

## Anthraquinone계 염료의 제거를 위한 호알칼리성 *Bacillus* sp.의 분리와 성장 특성

김 정 목\*  
대경대학 환경정보계열

**Isolation and Growth Characteristics of Alkalophilic *Bacillus* sp. for Removal of Anthraquinone Dye.** Kim, Jeong-Mog. School of Environmental Information, Taekyeung College, Kyungsan, 712-850, Korea - Alkalophilic strain degrading and decolorizing anthraquinone dye, Remazol brilliant blue R was isolated from natural system and named as *Bacillus* sp. ARB1. The optimal temperature and pH of *Bacillus* sp. ARB1 were 35°C and 9.0, respectively. The pH of culture media during the fermentation were changed from 10 and 10.5 of initial values to 9.3 and 9.4 after 40 hrs, respectively. Decolorization efficiency in aerobic shaking culture of *Bacillus* sp. ARB1 was markedly higher than that in standing culture. At the optimal culture condition, decolorization efficiency by the *Bacillus* sp. ARB1 was 93% after 32 hrs batch culture. In the case of batch culture using real dye processing wastewater, dye decolorization efficiency of *Bacillus* sp. ARB1 was 78% after 40 hrs.

**Key words:** Isolation, growth characteristics, alkalophilic, *Bacillus* sp., decolorization

염색가공공장은 섬유의 원단에 따라 다르나 염색 전단계에서 호발이나 감량 및 수세공정을 거치며, 이때 NaOH를 다량 사용하기 때문에 발생하는 폐수는 강알칼리성을 나타낸다. 다음 공정인 염색공정에서 미염착된 염료가 폐수에 함유되어 배출된다. 이와 같은 염색가공폐수는 pH 10~13의 알칼리성을 나타내며, 다량의 산을 투입하여 1차 물리·화학적 방법으로 응집·침전한 후 활성슬러지법으로 처리한다 [2,12,13].

흡착, 응집·침전 및 산화와 같은 물리·화학적 처리법의 단점인 다량으로 생성되는 슬러지와 이의 2차적인 처리의 문제점을 해결하기 위하여 생물학적인 처리에 관한 연구가 주목을 받고 있다[1]. 그러나 염색가공폐수에 함유된 염료는 일반적으로 난분해성 물질로 알려져 있다.

염색공업에 광범위하게 사용하는 염료는 azo계, anthraquinone계, indigo염료, phthalocyanine계 염료 등이 있으며, 이와 같은 염료는 생물학적인 방법에 의하여 쉽게 분해되지 않는다[15].

Azo계 염료의 생물학적 분해에 관한 연구는 많이 진행되어 왔다[3,4,5,6,10,11]. 국내의 경우 anthraquinone계 염료는 azo계 염료 다음으로 많이 사용되지만 이에 관한 연구는 많이 이루어지지 않는 실정이다. Yatome 등[8,9,14]은 염료의 분해능을 가진 미생물을 자연계에서 순수분리하고 azo 염료를 비롯한 여러 염료의 분해에 대한 연구를 실시하였다.

염색폐수의 처리에 이용되는 미생물은 대부분 pH 7 부근의 중성균이며, 적정 온도는 25°C 부근으로 알려져 있다. 따라서 고온의 알칼리성인 염색폐수를 중성균에 의하여 처리하기 위해서는 폐수의 냉각과 중화를 위한 산의 투입이 필요하다. 그러나 자연계에는 극한 환경에서 존재하는 미생물을 여러 산업에 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[3,4,7].

알칼리성 상태의 염료제거는 Horikoshi 등[3,4]에 의한 연구가 많이 이루어져 왔으며, 호알칼리성 미생물의 특성은 미생물 자체가 성장하는데 적합한 환경의 pH로 전환하는 능력을 가지고 있다. 현재 대부분의 염색가공공장에서 발생하는 폐수는 알칼리성 상태로 이를 중화하지 않고 염료의 색도를 제거하는 호알칼리성 미생물을 개발하고 그 특성을 조사하는 것은 여러 면에서 유용하다할 것이다.

따라서 본 연구에서는 염색공정에서 일반적으로 사용되면서 많은 연구가 이루어지지 않았던 알칼리성 상태의 염색폐수에 함유된 anthraquinone계 염료를 제거하기 위하여 이를 분해·산화하는 호알칼리성 균주를 자연계에서 순수분리하고 이들의 성장 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

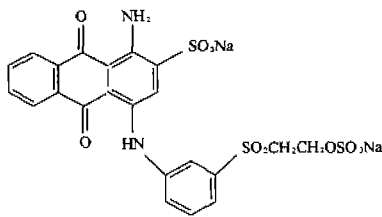
#### 균주의 분리

Anthraquinone계 염료 중 현재 여러 공장에서 가장 많이 사용되고 있는 Remazol brilliant blue R을 분해하는 균주를 자연계로부터 순수분리하기 위하여 염색공업공단 폐수 처리장의 방류수와 방류하천의 토양, (주)K방직 폐수처리장

\*Corresponding author  
Tel. 053-850-1382, Fax. 053-850-1325  
E-mail: jmkim@tk.ac.kr

**Table 1. Basal medium for alkalophilic microorganisms**

Components	Concentration (g/l)
Glucose	10.0
Polypeptone	5.0
Yeast extract	5.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
Agar	15
dye	0.1~0.2
pH	9.0

**Fig. 1. Chemical structure of Remazol Brilliant Blue R.**

의 반송슬러지를 시료로 사용하였다. Fig. 1은 Remazol brilliant blue R의 화학구조를 나타내며, 실험에 사용한 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. 균주를 분리하기 위하여 배양온도를 30°C로 유지하고, 초기 pH를 9.0으로 하여 염료 Remazol brilliant blue R을 분해하는 균주를 분리하고 그 중 염료의 성장 및 색도 제거능이 가장 우수한 균주를 선정하여 실험을 위한 공시균으로 사용하였다.

#### 분석방법

염료의 농도는 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 점광선을 작성하고 염료농도를 정량하였다. 염료의 분해율은 시료를 채취 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등수의 흡광도를 측정하여 정량하였으며, 초기 흡광도와 비교하여 염료의 제거율을 나타내었다. 분리한 균체의 성장은 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 증류수로 3회 씻은 후 vortex로 균체를 분산시켜 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

#### 온도와 pH의 영향

분리된 균주의 온도에 대한 성장 특성을 조사하기 위하여 pH 9.0에서 배양온도를 20°C에서 45°C까지 단계적으로 변화하여 염료 분해능을 조사하였다. 또한 최적 pH를 조사하기 위하여 최적 배양온도에서 배양액의 초기 pH에 따른 염료 분해능을 조사하였다. 이 때 pH의 변화는 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 0.1N NaOH를 사용하였으며, 배양액의 초기 pH를 6에서 11까지 변화하여 실험하였다.

폐수처리장의 최종 방류수는 중성을 유지하여야 하므로 초기 pH를 달리하였을 경우 균주의 성장에 따른 pH변화를 조사하기 위하여 배양액의 초기 pH를 6에서 10.5까지 단계적

으로 변화하여 균주 성장에 따른 배지의 pH변화를 조사하였다.

또한 분리한 균주의 성장과 염료 분해능의 상관관계를 조사하기 위하여 최적 성장조건의 온도와 pH에서 분리한 균주를 회분배양하여 배양시간의 변화에 따른 균주의 성장과 색도 제거능의 관계를 조사하였다. 모든 실험은 회전수 180 rpm의 진탕 배양기에서 실시하였으며, 전배양액 3%를 접종하여 실시하였다.

#### 질소원의 영향

분리한 균주의 질소원에 대한 영향을 조사하기 위하여 유기 및 무기 질소원을 각각 5 g/l를 사용하여 질소원의 변화에 따른 균주의 성장 및 색도 제거능을 조사하였다. 이때 온도와 pH는 최적의 조건을 유지하였으며, 회전수 180 rpm의 진탕 배양기에서 회분배양하였다.

#### 산소의 영향

일반적으로 폐수처리장은 혐기성 처리보다는 적극적인 방법인 호기성 미생물을 이용하여 처리한다. 따라서 분리한 균주의 산소에 대한 영향을 조사하기 위하여 최적 온도와 pH에서 진탕배양할 경우와 정지배양할 경우 균주의 성장 및 색도 제거능을 조사하였다. 이때 회전수 180 rpm의 진탕 배양기에서 최적의 온도와 pH를 유지하였다.

#### 실제 염색가공폐수를 이용한 탈색능

(주)K방직은 polyester와 면섬유를 염색가공하는 업체로 날염과 염색폐수 뿐만 아니라 호발정련폐수, 감량폐수, mercerizing 폐수 등이 혼합된 고온, 고농도 알칼리성 폐수이다. 이와 같은 폐수는 다양한 종류의 염료와 조제가 함유되어 있으므로 특정 파장에서만 흡광도가 높게 나타나지 않는다.

실제 염색가공폐수에서 순수분리한 균주의 성장과 색도 제거능을 조사하기 위하여 anthraquinone계 염료인 Remazol brilliant blue R를 사용하는 (주)K방직의 염색가공폐수를 시료로 사용하였다. 이때 순수분리하여 대수성장단계까지 배양한 전배양액 5%를 실제폐수에 접종하여 분리한 균주의 탈색능과 균주의 성장을 조사하였다.

(주)K방직의 시료 폐수는 염료액을 만들 때 염착을 돕기 위하여 조제로 요소를 많이 사용하므로 질소원을 첨가하지 않았다. 또한 실제 염색가공폐수는 강알칼리성이므로 최적 pH인 9로 조절하기 위하여 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 조절하였다. 이때 회전수 180 rpm의 진탕배양기에서 최적의 온도와 pH를 유지하였다.

## 결과 및 고찰

#### 균주의 분리

순수분리 결과 anthraquinone계 염료 중 현재 (주)K방직에서 많이 사용되고 있는 Remazol brilliant blue R을 분

해하는 호알칼리성 균주 3종류를 얻었다. 그 중 분해능이 가장 우수한 균주를 선정하여 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되어 이를 *Bacillus* sp. ARB1으로 명명하였으며, 실험을 위한 공시균으로 사용하였다.

**온도 및 pH의 영향**

초기 배지의 pH를 9로 조정하고 온도의 변화에 따른 분리한 균주의 성장 및 염료 탈색율을 조사하였으며, Fig. 2에 나타내었다. 분리한 호알칼리성 균주는 30°C와 35°C에서 대체로 성장과 탈색율이 높았으며, 35°C에서 배양 26hr 후 88%의 탈색율을 나타내었다. 일반세균의 최적 배양조건은 pH 7, 온도 25°C 전후로 알려져 있는 것에 비하여 호

알칼리성 균주인 *Bacillus* sp. ARB1은 매우 높은 온도에서 성장과 탈색율이 우수한 것으로 나타났다.

초기 pH의 변화에 따른 분리된 균주의 염료 탈색율을 Fig. 3에 나타내었으며, 알칼리 영역인 pH 9와 10범위에서 성장과 탈색율이 우수하였다. 최적 pH 9에서 배양 26hr 후 흡광도는 0.92, 탈색율은 88%로 나타났다.

알칼리성 염색폐수에 분리균을 적용할 경우 최종 처리수의 pH 조절이 가능한지를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *Bacillus* sp. ARB1의 경우 pH 10과 10.5는 배양시간의 경과에 따라 pH가 감소하여 9.3, 9.4로 각각 감소하였고, pH 7과 8은 상승하여 8.3, 8.6으로 각각 변화하였다. 그러나 초기 배양액의 pH가 6인 경우 pH의 변화가 거의

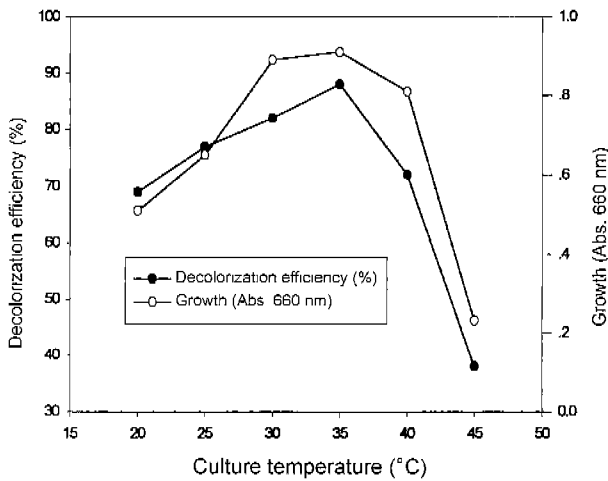


Fig. 2. Effect of culture temperature on the growth and decolorization of dye after 26 hrs in batch culture of *Bacillus* sp. ARB1 (culture conditions: dye concentration, 100 mg/l; initial pH, 9.0; shaking, 180 rpm).

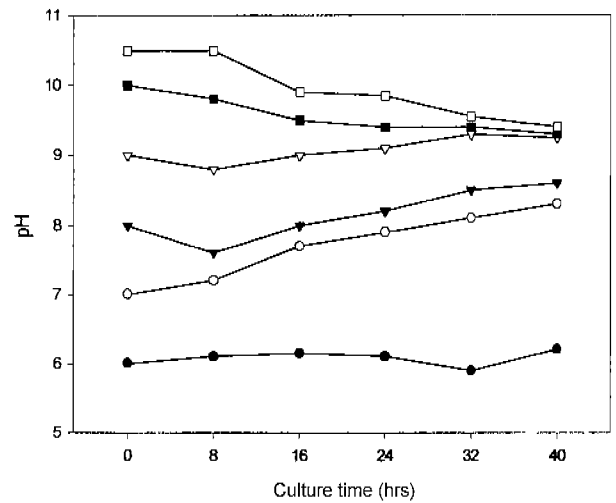


Fig. 4. Variation of pH value during batch culture of *Bacillus* sp. ARB1 (culture conditions: dye concentration, 100 mg/l; temperature, 35 °C; shaking, 180 rpm).

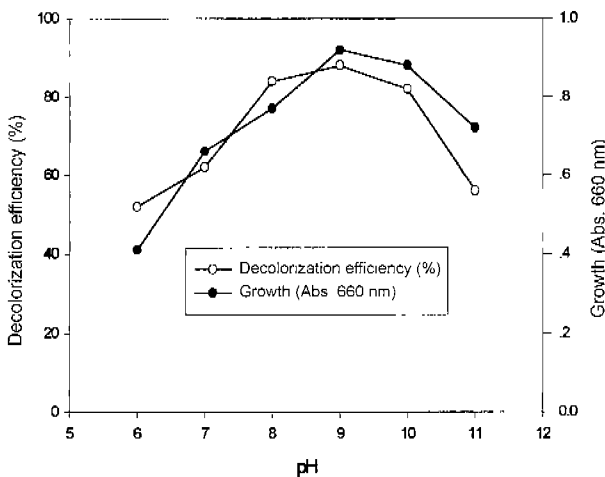


Fig. 3. Effect of initial pH on the growth and decolorization of dye after 26hrs in batch culture of *Bacillus* sp. ARB1 (culture conditions: dye concentration, 100 mg/ml; temperature, 35°C; shaking, 180 rpm).

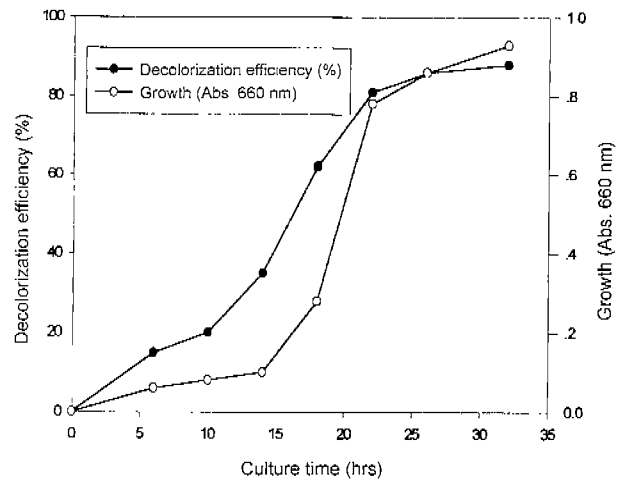


Fig. 5. Relationship between growth of *Bacillus* sp. ARB1 and decolorization of dye on optimum culture conditions (culture conditions: dye concentration, 100 mg/l; initial pH 9.0; temperature, 35°C; shaking, 180 rpm).

없었다. 이와 같은 결과에서 강알칼리성 폐수에 호알칼리성 균주인 *Bacillus* sp. ARB1을 적용할 경우 폐수의 pH는 알칼리성이 약해지나 바로 방류할 경우 산을 사용하여 중화하는 것이 바람직하다.

Fig. 5는 최적 배양조건에서 *Bacillus* sp. ARB1을 회분 배양할 경우 미생물의 성장과 탈색율을 나타낸다. 초기 대수성장단계에서는 미생물의 급격한 증식에도 불구하고 탈색율은 비례하여 증가하지 않았다. 이와 같은 결과는 배양 초기에는 분리한 미생물이 탄소원으로 glucose를 이용하고 시간이 경과함에 따라 염료의 발색단을 제거하고 염료를 분해하여 이용하는 것으로 사료된다. 배양 18hr 후 미생물의 증식과 탈색이 급격히 진행되어 22hr에 78%의 탈색율을 나타내었으며, 26hr 후 86%의 탈색율을 나타내었다.

**질소원의 영향**

유기 및 무기 질소원을 사용하여 질소원의 변화에 따른 균주의 성장 및 색도 제거능을 각각 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 무기질소원 보다는 유기 질소원인 polypeptone, yeast extract, beef extract가 대체로 양호한 성장과 탈색율을 보였으며, polypeptone의 경우 배양 28hr 후 90%의 탈색율을 나타내었다.

**산소의 영향**

순수분리한 균주의 산소에 대한 영향을 조사한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 진탕배양의 경우가 정지배양의 경우보다 탈색율이 현저히 높았으며, 배양 32hr 후 진탕배양은 93%, 정지배양은 38%의 탈색율을 각각 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 *Bacillus* sp. ARB1은 호기성 균이며, 폐수처리장의 혼합된 염료와 다른 유기물을 함께 제거하기 위해서는 공기를 공급하는 것이 필수적이다. 그러나, *Bacillus* sp.

ARB1은 호알칼리성이므로 염색폐수를 효과적으로 처리하기 위해서는 염색폐수와 다른 폐수를 분리하여 처리하는 것이 바람직하다.

**실제 염색기공폐수를 이용한 탈색능**

실제 염색기공폐수를 시료로 하여 전배양한 배양액 5%를 접종하여 회분배양 했을 경우 *Bacillus* sp. ARB1의 성장과 탈색율을 Fig. 8에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 배양 24hr 후 탈색율 28%, O.D. 0.38로 매우 낮게 나타났다. 배양 40hr 후에 탈색율은 78%로 나타났다. 이와 같은 결과는 실제폐수에는 다양한 종류의 염료가 혼합되어 있어 *Bacillus* sp. ARB1의 성장과

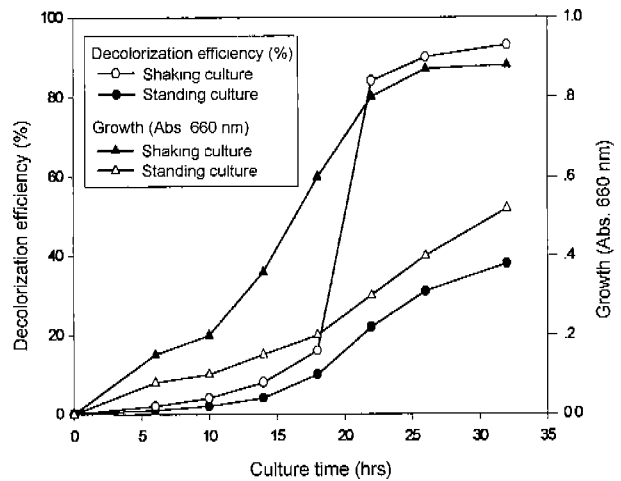


Fig. 7. The effect of shaking on decolorization of dye and growth of *Bacillus* sp. ARB1 with culture time in batch culture (culture conditions; dye concentration, 100 mg/l; initial pH, 9.0; temperature, 30°C).

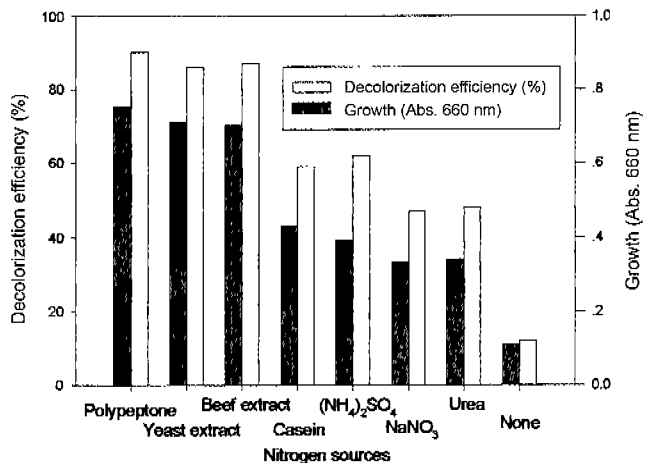


Fig. 6. Effect of nitrogen sources on the growth and decolorization of dye after 28 hrs in batch culture of *Bacillus* sp. ARB1 (culture conditions; dye concentration, 100 mg/l; temperature 35°C; pH, 7; shaking, 180 rpm).

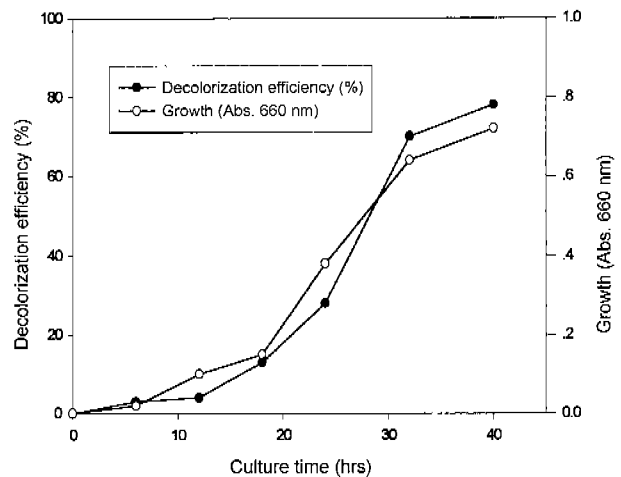


Fig. 8. Relationship between growth of *Bacillus* sp. ARB1 and decolorization in the alkaline real wastewater (culture conditions; dye concentration 100 mg/l; initial pH, 9.0; temperature, 35°C, shaking, 180rpm).

탈색에 저해작용을 할 뿐만 아니라 영양분의 불균형 등에 기인된 것으로 사료된다.

## 요 약

자연계로부터 anthraquinone계 염료인 Remazol brilliant blue R를 분해·탈색하는 호알칼리성 균주를 분리하여 *Bacillus* sp. ARB1으로 명명하고 성장특성을 조사하였다. 최적 배양온도와 pH는 35°C, pH 9.0로 나타났다. 배양액의 초기 pH가 10과 10.5일 경우 배양시간의 경과에 따라 pH 값이 점점 감소하여 40시간 후 9.3, 9.4로 각각 감소하였다. 진탕배양의 경우가 정지배양의 경우보다 *Bacillus* sp. ARB1의 탈색율이 현저히 높았다. 최적 배양조건에서 *Bacillus* sp. ARB1을 회분배양한 결과 배양 32시간 후 93%의 탈색율을 나타내었다. 실제 염색가공폐수를 사용한 회분배양에서 40시간 후에 탈색율은 78%로 나타났다.

## REFERENCES

- Eaton, D., H. M. Chang, and D. K. Kirk. 1980. Decolorization of kraft bleach plant effluents. *TAPPI*. **63**: 103.
- Groff, K. A. and B. R. Kim. 1989. Textile Wastes. *J. Water Pollution Control Federation*. **61**: 872.
- Horikoshi, K. 1991. *Microorganisms in alkaline environments*, pp. 5-25. Kodansa, Tokyo.
- Horikoshi, K. and D. W. Grant. 1991. *Superbugs*, pp. 227-286. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Kulla, H. G. 1981. *Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds*, pp. 387-399. Academic Press, London.
- Lee, J. H., G. -D. Whang, D. -W. Cho, and U. -H. Chun. 1993. Biodegradation of azo and reactive dyes with *Pseudomonas* strains. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**: 150-155.
- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., and Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 711-729.
- Ogawa, T., C. Yatome, E. Idaka, and H. Kamiya. 1986. Biodegradation of azo acid dyes by continuous cultivation of *Pseudomonas cepacia* 13NA. *JSDC*. **102**: 12-14.
- Ogawa, T., C. Yatome, and E. Idaka. 1981. Biodegradation of p-aminoazobenzene by continuous cultivation of *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *JSDC*. **97**: 435-438.
- Pasti, M. B., A. paszczynski, S. Goszczynski, D. L. Crawford, and R. L. Crawford. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3605-3613.
- Paszczynski A., M. B. Pasti, S. Goszczynski, D. L. Crawford, and R. L. Crawford. 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 378-384.
- Rafii, F., W. Franklin, and C. E. Cerniglia. 1990. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2146-2151.
- Wuhrmann, K., K. Mechsner, and T. Kappeler. 1980. Investigation on rate-determining factors in microbial reduction of azo dyes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 325-338.
- Yatome C., T. Ogawa, D. Koga, and E. Idaka. 1981. Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *JSDC*. **97**: 166-169.
- Zhou, P. and W. Zimmermann. 1993. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 157-162.

(Received Jan. 2, 2001/Accepted Mar. 5, 2001)