

# 메탄산화세균의 EPS를 이용한 Cd의 생물흡착

## Biosorption of Cadmium by a Methanotrophs Exopolysaccharide

이희자\* · 김광수\*\* · 조양석\*\*\*

Hee Ja Lee\* · Kwang Soo Kim\*\* · Yang Seok Cho\*\*\*

### 요 지

메탄을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 메탄산화세균은 물질대사과정 중에 다량의 세포외 고분자물질인 Extracellular polymeric substances(EPS)를 생성하는데, EPS는 카르복실기와 같은 표면흡착 기능을 가지고 있어 생체흡착제로 사용이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 메탄산화세균을 이용하여 중금속인 Cd의 흡착능을 파악하여 활성슬러지의 흡착능과 비교하고, EPS 농도별, pH별 흡착량의 변화를 실험한 후 Freundlich 흡착모델식에 적용하여 흡착공정의 기본적인 설계인자를 도출하고자 하였다.

실험에 사용한 메탄산화세균은 매립지 복토층 상부 토양에서 분리하여 실험실에서 대량으로 배양하였으며, EPS 생성을 위해 메탄을 Head space의 20%를 주입하고 30℃, 150rpm에서 질소원이 부족한 조건으로 48hr 동안 배양하였다. Cd의 흡착실험은 용액의 pH를 3에서 8까지 변화를 주면서 활성슬러지와 메탄산화세균의 시간별 흡착능을 측정하였다. 또한 중금속의 농도별 흡착능을 측정하여 흡착평형 상수를 파악하였으며, 중금속 흡착 전, 후 미생물의 SEM 촬영, FT-IR 분석, 전자현미분석(EPMA)을 통하여 무기성분 분석 및 표면관찰을 수행하였다.

실험결과 메탄산화세균에 의해 생성된 EPS 물질은 중금속에 대한 강한 결합능력이 있으며, Cd에 대한 최고 흡착능은 26mg Cd(II)/g VSS의 값을 보였다. 이러한 미생물의 EPS의 흡착능은 pH와 칼슘이온의 영향을 많이 받았으며, 메탄산화세균의 FT-IR 분석결과 EPS에는 sulfate ester, pyruvate 등과 같은 작용기와 amino sugar, carboxyl 작용기들이 많이 존재하여 활성슬러지에 비해 중금속의 흡착능이 높은 것으로 사료되었다.

**핵심용어 : 메탄산화세균, 중금속, 생물흡착, EPS, FT-IR**

## 1. 서 론

중금속 함유폐수 처리법에 있어서 가성소다나 소다회에 의한 화학적 침전법은 운전이 쉽고 처리비용이 저렴하지만 pH 변화에 민감하며, 슬러지발생량이 많아지는 단점이 있기 때문에 화학적침전법의 단점을 보완하는 새로운 중금속 함유 폐수처리법으로 생체흡착법(biosorption)이 많은 연구자에 의해서 연구되어 왔다.(Volesky 등, 1995) 생체흡착은 중금속이 생물체 표면이나 내부로 물리화학 및 생물학적 상호작용에 의한 이온교환, 흡착, complexation 등 다양한 기작에 의해 생체흡착(biosorbents) site에 결합(binding)하여 수용액으로부터 중금속이 제거 분리되는 것이다.

메탄을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 메탄산화세균은 물질대사과정 중에 세포외 고분자물질(Extracellular polymeric substances; EPS)을 다량으로 분비하는 미생물로서 이들 Extracellular polymer

\* 정희원 · 한국건설기술연구원 국토환경연구부 선임연구원 · E-mail : ink42@kict.re.kr

\*\* 정희원 · 한국건설기술연구원 국토환경연구부 수석연구원 · E-mail : kskim@kict.re.kr

\*\*\* 정희원 · 국립환경과학원 물환경연구소 · E-mail : piusyocho@me.go.kr

substances(EPS)는 carboxyl, amino, phosphate, hydroxyl, sulfate 등과 같은 음이온 작용기를 많이 함유하고 있어 중금속에 대한 생체흡착제로 사용이 가능하다.(Wingender 등, 1999)

따라서 본 연구에서는 메탄산화세균을 이용하여 중금속인 Cd의 흡착성능을 파악하여 활성슬러지의 흡착능과 비교하고, EPS 농도별, pH별 흡착량의 변화를 실험한 후 Freundlich와 Langmuir 흡착모델식에 적용하여 흡착공정의 기본적인 설계인자를 도출하고자 하였다.

## 2. 실험내용 및 방법

메탄산화세균에서 EPS를 생성하기 위하여 연속식으로 운전되고 있는 유동상 메탄산화균 반응조로부터 미생물 혼합액을 일부 채취하여 3,000rpm으로 원심분리시켜 메탄산화균을 분리하였다. 메탄산화균에서 EPS를 최대한 생성하기 위하여 350mL 반응조에 원심분리된 메탄산화균을 질소와 인 및 미량영양물질이 함유된 합성폐수 200mL에 넣고 실리콘 마개로 반응조 입구를 봉한 후 주사기를 사용하여 메탄가스를 상부 150mL의 공간에 20%(부피 비)를 넣었다. 이후 파라필름으로 밀봉한 후 28℃ 진탕 배양기에서 교반하면서 일주일간 배양하였다. 메탄가스는 소모정도를 살펴가며 2~3시간 마다 부피 비 20%로 새로 주입하였으며, 2~3일에 한번씩 합성폐수를 전량 교체하였다. 최종적으로 배양된 메탄산화세균을 원심분리기에서 3,000rpm으로 분리하였으며, 이렇게 분리된 메탄산화세균을 중금속 제거 실험에 사용하였다.

메탄산화균의 EPS 양에 따른 Cd의 제거능을 파악하기 위하여 350mL 플라스크 4개에 분리된 미생물의 양을 달리하여 주입하고 용액을 부어 전체 양을 200mL로 했다. 메탄산화세균의 중금속 제거 능력과 비교하기 위해 일반 활성슬러지를 동일한 조건으로 실험하였고 Blank로는 증류수(pH 4)를 사용하였다. 중금속은 Cd 표준액(1,000ppm standard solution, SHOWA)을 사용하여 모든 플라스크에 20ppm의 동일한 농도로 주입하고 메탄가스를 20%(메탄:산소=1:1) 주입하여 28℃ 진탕 배양기에서 교반해주었다. 중금속 측정을 위해 초기에는 15분, 후반에는 30분 간격으로 측정하였으며, 2시간의 실험이 종료된 후 원심분리기를 이용하여 메탄산화세균과 활성슬러지를 분리하여 -50℃에서 동결건조(TFD5505, ilshin lab. Korea) 시켰다.

용액 내 존재하는 중금속 농도를 측정하기 위해서 샘플링한 상등액 10mL를 GF/C filter(Whatman)로 거른 후 질산으로 전처리하고 ICP(Inductively Coupled Plasma, 모델명)를 사용하여 분석하였다. 실험 시작과 종료 시의 메탄산화세균과 용액 내의 polysaccharide 함량은 Dubois Method를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 동결건조한 미생물은 EDX가 장착된 SEM을 이용하여 사진촬영을 하였다.

## 3. 실험결과

Fig. 1에는 카드뮴제거 실험결과를 나타내었는데, 메탄산화세균 반응조에서는 초기 20mg/L의 Cd이 15분 후에 5.6mg/L로 감소하여 73%의 제거효율을 보였으며, 이후에도 감소속도는 느렸지만 꾸준히 제거되는 것을 알 수 있다. 그러나 활성슬러지의 경우 20mg/L의 카드뮴이 15분 후 15.2mg/L로 감소(24%)하였으나 이후에는 변화가 없는 것을 관찰할 수 있다. 따라서 메탄산화세균은 활성슬러지에 비해 카드뮴의 제거율이 3배 이상 높았으며, 45분 내에 평형에 도달하는 것을 알 수 있다. Cd 제거 실험에서 EPS를 측정된 결과 메탄산화세균에서는 46.7mg/g으로 활성슬러지의 EPS 함량인 23.1mg/g의 2배로 측정되었으며, 따라서 메탄산화세균이 활성슬러지에 비해 카드뮴의 제거효율이 높은 것은 EPS의 흡착능 때문으로 판단된다.

자연환경에서, 미생물에 의해 생성되는 세포외 고분자물질(EPS)은 표면에 미생물을 부착하는 중요한 역할을 담당하며(Marshall 등, 1971), EPS물질은 수많은 carboxyl, hydroxyl 및 다른 작용기들을 함유하고 있어 금속이온을 강하게 결합하며(Brown과 Lester, 1979), EPS의 강한 금속결합능력 때문에 많은 학자들이 중금속을 제거하는 대안으로 EPS를 활용하는 연구를 수행하고 있다고 한다.(Martine 등, 1997)

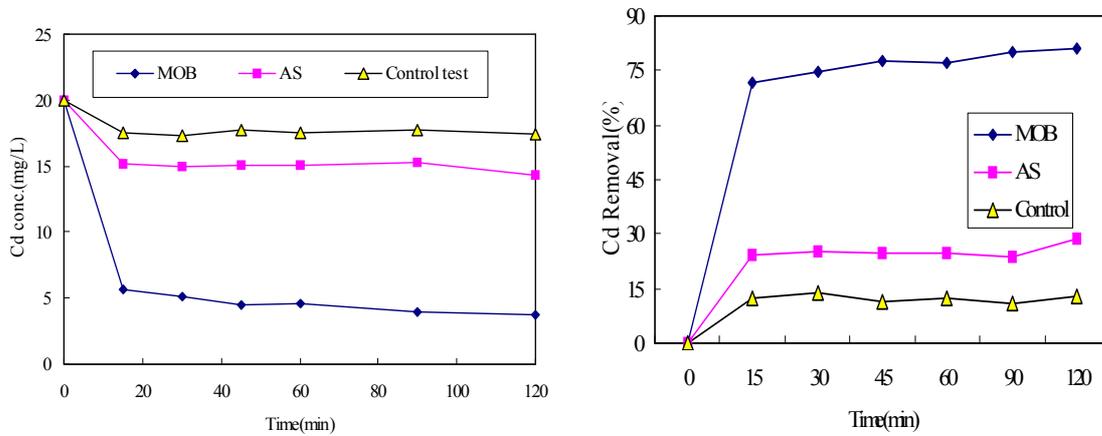


Fig. 1 Time course of cadmium removal by methanotrophs and activated sludge

Fig. 2에는 메탄산화세균과 활성슬러지의 Cd의 흡착량 및 제거속도를 비교하여 나타내었다. 활성슬러지에 비해 메탄산화세균의 Cd 흡착량이 상당히 높은 것을 알 수 있으며, 활성슬러지의 Cd 흡착량은 15분 후 2.7mg/g이었으나 이후에도 흡착량은 평균 2.8mg/g으로 일정한 값을 보였다. 메탄산화세균의 Cd 흡착량은 15분 후 12.4mg/g으로 활성슬러지에 비해 약 5배 정도 높았으며, 시간의 경과에 따라 흡착량은 꾸준히 증가하여 1hr 후 20.9mg/g, 2hr 후 25.0mg/g의 흡착량을 보였다.

Ozdemir 등(2005)에 의하면, 이러한 생물흡착은 EPS 성분인 단백질과 다당류의 함량, 표면전하 강도, 표면적 등 생물흡착체의 구조적 특성에 영향을 많이 받는다고 하였으며, 생물흡착체에 의한 중금속의 흡착은 대부분 실험초기에 급속히 일어난다는 것을 다른 생물흡착체에 대한 실험에서도 확인되었다고 하였다.(Kapoor 등, 1999) 본 실험에서도 실험 초기에 중금속의 흡착이 급속히 진행되었으며, 메탄산화세균 자체보다 메탄산화세균의 대사산물인 EPS에 의한 중금속의 흡착속도가 더 높은 것으로 파악되었다. 따라서 메탄산화세균에 의해 생성된 EPS는 중금속에 대한 좋은 흡착특성을 가지고 있어 폐수내에 존재하는 Cd의 처리에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

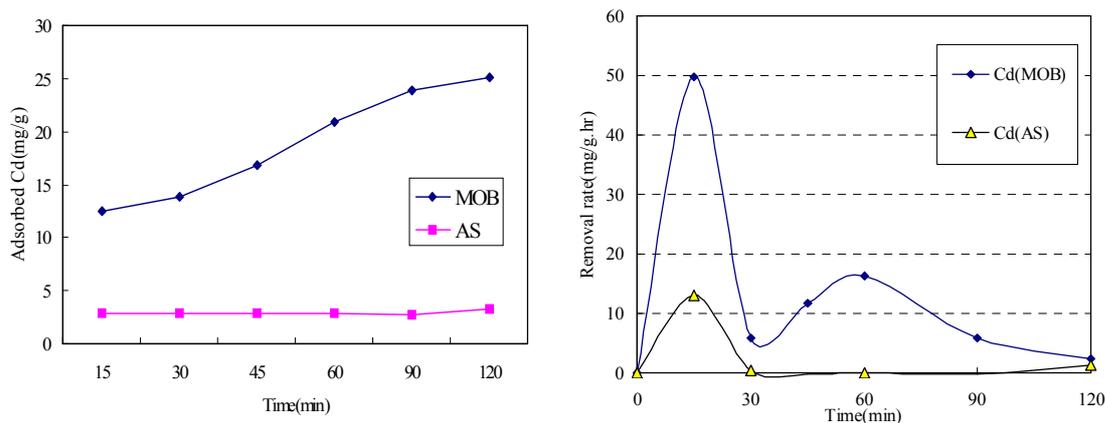


Fig. 2 Biosorption of Cd(II) ions by methanotrophs and activated sludge at 100rpm, pH 4 and 28°C; initial concentration of metal ions 20mg/L

흡착평형 데이터의 분석은 다른 운전조건 아래에서의 설계 또는 최적의 조작조건들을 도출해 내는데 있어서 매우 중요한 일이다. 생체흡착의 흡착평형을 해석하는데 사용되는 흡착등온식이 여러 가지 있으나 본

연구에서는 흡착평형을 해석하는데 일반적으로 사용되는 Freundlich 흡착등온식을 적용하였다. Freundlich 흡착등온식은 다음 식 (1)과 같이 평형상태에서의 중금속이온의 농도( $C_e$ )와 흡착제에 흡착된 금속이온의 흡착량( $q_e$ ) 사이의 상관관계를 나타내고 있다.

$$q_e = \frac{x}{m} = K \cdot C_e^{\frac{1}{n}} \quad (1)$$

여기서,  $1/n$ ,  $K$ 는 시스템에 따른 Freundlich 상수이다. 또, 이 Freundlich 식을 선형화하면 식(2)로 나타낼 수 있다.

$$\log q_e = \log \frac{x}{m} = \log K + \frac{1}{n} \log C_e \quad (2)$$

선형화된 Freundlich 등온흡착식을 카드뮴 제거 실험에 적용한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, Cd에 대한 상관계수는 0.9737로서 Freundlich 모델에 잘 부합되는 것을 알 수 있다.

활성슬러지와 메탄산화세균의 FT-IR 스펙트럼을 분석하여 Fig. 4에 나타내었으며, 두 미생물은 비슷한 흡수 경향을 보였지만 모든 구간에서 메탄산화세균의 흡수 스펙트럼이 높게 나타났다. 각각의 미생물은 수산기에 해당하는  $3436 \text{ cm}^{-1}$  부근의 흡수띠를 비롯하여  $1660 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1546 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1076 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2929 \text{ cm}^{-1}$  부근에서 강한 흡수띠를 나타내고 있다.  $3436 \text{ cm}^{-1}$ 는 OH기에 의한 것으로 AS보다 메탄산화세균에 alcohol이 높게 나타났으며, 기타  $1041$ ,  $1076 \text{ cm}^{-1}$ 의 흡수띠는 알코올 화합물(alcoholic compounds)의 C-O기에 의한 것으로 나타났다.  $2929 \text{ cm}^{-1}$ 는 alkane의 C-H stretching이며,  $1388 \text{ cm}^{-1}$ 는  $-\text{CH}_3$ 기(메틸기) 이고,  $510 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$ 는  $-\text{COOH}$ (카르복실기)의 변형인 것으로 나타났다.

카르복실기그룹(carboxyl groups)은  $1650 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$  부근에서 강한 흡수띠를 나타낸다고 하며, 메탄산화세균의 FT-IR 분석에서도  $1660 \text{ cm}^{-1}$  부근에서 가장 높은 peak를 나타내었다. Fine 등(2005)에 의하면, 카르복실기 그룹은 양이온 중금속의 흡수에 중요한 역할을 담당한다고 하였으며, Stevenson(1994)은 중금속 흡수에 카르복실기 그룹의 중요한 역할은 천연유기물질(Natural organic matter)에 이들 그룹이 풍부하게 존재하기 때문으로 보고하였다. Wang 등(1998)은 폐수나 슬러지의 용존유기물질에 존재하는 카르복실기 그룹들이 양이온 중금속을 활발하게 흡수한다고 발표하였다. 활성슬러지와 메탄산화세균의 FT-IR 스펙트럼을 비교해 본 결과 모든 작용기에서 메탄산화세균의 흡수세기가 높았으며, 특히 메탄산화세균에서는 카르복실기가 높은 흡수 스펙트럼을 나타내었다.

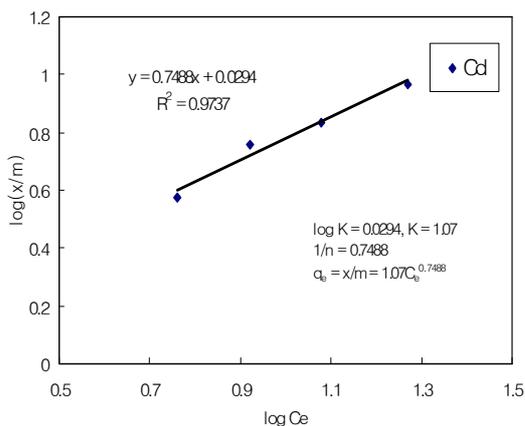


Fig. 3 Linearized Freundlich isotherms for adsorption of Cd

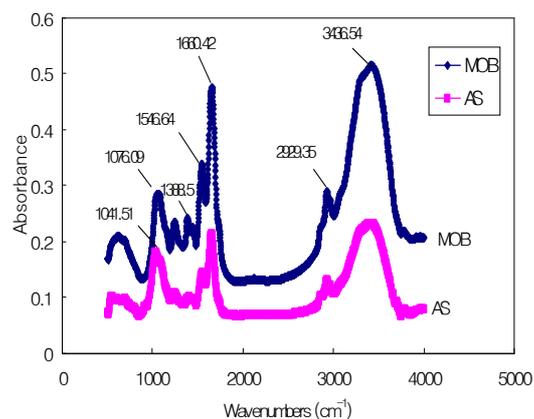


Fig. 4 IR spectra of methanotrophs and AS

Fig. 5의 (a)는 중금속인 Cd 이온에 접촉하기 전의 메탄산화세균 사진이며, 사진 (b)는 카드뮴이온

10mg/L에 접촉한 후의 메탄산화세균의 Fe-SEM 사진으로서 카드뮴이 미생물 표면에 침적되어 있는 것을 육안으로 알 수 있다. 또한, Cd이온에 접촉한 후의 메탄산화세균의 성분함량을 살펴보면 기존 탄소, 산소, 황 성분 이외에 Cd 성분이 4.22% 함유되는 것으로 측정되었다.

따라서 메탄산화세균이 분비하는 세포의 유기물질(EPS)에 의해 카드뮴이 흡수되어 세포 표면에 침적된 것으로 판단된다.

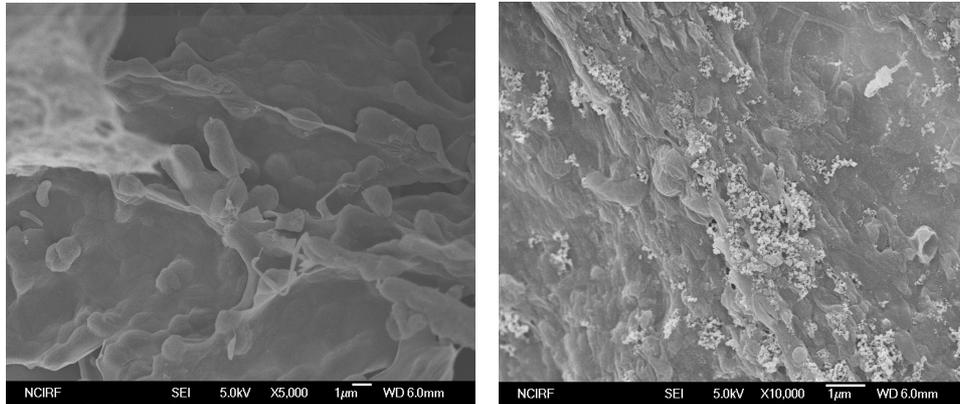


Fig. 5 Typical SEM micrograph of methanotrophs: (a) before Cd loaded, (b) Cd loaded.

### 참 고 문 헌

- 1) J.H. Wilshusen, J.P.A. Hettiaratchi, A. De Visscher, R. Saint-Fort, "Methane oxidation and formation of EPS in compost: effect of oxygen concentration", *Environmental Pollution*, 129, pp.305-314 (2004)
- 2) 이무열, 양지원, 메탄산화균에 의한 납의 제거 특성, *한국생물공학회지*, Vol. 15, pp. 444-451(2000)
- 3) Guibaud, G., Comte. S. and Bordas, F., "Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel", *Chemosphere*. Vol. 59, pp. 629-638 (2005)
- 4) Brown, M.J. and Lester, J.N., "Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge", *Wat. Res.* 16, pp. 1549-1560 (1982)