

아연 내성균의 균체내 아연 축적특성 및 균체내 축적된 아연의 회수

조주식 · 한문규* · 이홍재* · 허종수*
경상대학교 공동실험실습관, *경상대학교 농화학과
(1996년 3월 28일 접수)

Zinc Accumulation in the Cell of Zinc-Tolerant Bacteria, *Pseudomonas chlororaphis*, and Recovery of Zinc from the Cells Accumulating Zinc

Ju-Sik CHO, Mun-Gyu HAN*, Hong-Jae LEE* and Jong-Soo HEO*
Central Laboratory, Gyeongsang National University, Chin Ju 660-701, Korea
Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chin Ju 660-701, Korea
(Manuscript received 28 March 1996)

This study was performed to develop the biological treatment technology of wastewater polluted with heavy metals. Zinc-tolerant microorganism, such as *Pseudomonas chlororaphis* which possessed the ability to accumulate zinc, was isolated from industrial wastewaters polluted with various heavy metals. The characteristics of zinc accumulation in the cells, recovery of the zinc from the cells accumulating zinc, were investigated.

Removal rate of zinc from the solution containing 100 mg/l of zinc by zinc-tolerant microorganism was more than 90% at 48 hours after inoculation of the microorganisms.

A large number of the electron-dense granules were found mainly on the cell wall and membrane fractions, when determined by transmission electron microscope. Energy dispersive X-ray spectroscopy revealed that the electron-dense granules were zinc complex with the substances binding heavy metals.

The zinc accumulated into cells was not desorbed by distilled water, but more than 80% of the zinc accumulated was desorbed by 0.1M-EDTA. The residues of the cells after combustion at 550°C amounted to about 21% of the dry weight of the cells. EDS analysis showed that the residues were comparatively pure zinc compounds containing more than 79% of zinc.

Key words : zinc accumulation, zinc-tolerant microorganism, recovery of the zinc, desorb, electron-dense granule, zinc complex, Energy dispersive X-ray spectroscopy.

1. 서 론

산업발달과 인구증가 및 도시화로 인한 환경오염은 날로 심화되고 있으며, 환경오염은 우리나라 뿐만 아니라 세계적인 중요한 문제로 대두되고 있

음은 주지의 사실이다. 특히 각종 산업폐수중 함유되어 있는 중금속등 독성물질들은 하천에 유입됨으로써 상수원 오염과 식수오염을 일으키고 있으며, 이들 독성오염물질들은 하천수 뿐만 아니라 인근 지하수 및 토양을 오염시키는 등 큰 문제가

되고 있다. 외국의 도금공장의 경우 Cr^{6+} 및 Cd^{2+} 이 각각 27,000 mg/l 및 23,000 mg/l 함유된 폐수가 발생되고 있으며, 우리나라의 경우 15% 정도만 최종산물로 되고 나머지는 거의 폐기 방출되고 있는 실정이다 (Tsezos and Volesky, 1981; Sag and Kutsal, 1989). 그리고 일반 하수슬러지중에도 건조량으로 0.5%~2.0%의 중금속이 함유되어 있으며 (Jain and Tyagi, 1992), 해수중에도 여러 종류의 중금속이 상당량 용해되어 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 중금속들은 직접 혹은 간접적으로 인체에 해를 끼칠 뿐만 아니라 수중생물의 오염물질 분해를 저해시킴으로써 수질의 자정작용을 감소시키는 등 생태계에 큰 영향을 미치므로 이들 중금속등 독성오염물질의 효과적인 처리를 위한 기술개발이 절실히 요구되고 있다.

중금속등이 함유되어 있는 특정폐수의 현행 처리방법은 응집침전법, 이온교환법, 흡착법, 산화환원법, 전기분해법, 중화법 및 추출법 등 주로 물리화학적 처리방법으로 하고 있으나, 이러한 방법들은 에너지소모가 많고 유지관리 경비가 과다할 뿐만 아니라 처리효율이 낮으며 처리부산물로 다량의 슬러지가 발생되므로 슬러지의 폐기처리가 큰 문제가 되고 있다 (조 순행, 1988). 이들 처리방법의 단점을 보완하기 위하여 최근에는 미생물을 이용하여 중금속을 처리하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 결과 이온교환수지 혹은 활성탄을 이용한 흡착법에 비하여 중금속 처리효율이 더 높은 것으로 보고 되고 있다 (Friis and Myers, 1986; Heo and Cho, 1994).

미생물을 이용한 생물학적 처리방법은 저렴한 비용으로 다량의 biomass를 얻을 수 있고 (Norberg and persson, 1984; Kuyucak and Volesky, 1989), 미생물에 의한 중금속의 흡수와 탈착반응이 단시간 내에 이루어지며 (Tsezos, 1984; Flemming et al, 1990), 고정화된 미생물은 재사용할 수 있을 뿐만 아니라 (Treen-Sears et al, 1984; Michel et al, 1986), 미생물 군체의 폐기처리가 크게 문제되지 않으므로 현행 물리화학적 처리방법에 비하여 훨씬 더 효과적인 방법이라 할 수 있으며 (Naka-

jima et al, 1981; 정 윤철 외, 1989), 실제 하수슬러지중의 중금속처리시 화학적처리방법에 비하여 생물학적 처리방법은 비용을 80% 절감한다는 보고도 있다 (Jain and Tyagi, 1992). 따라서 현행 중금속등 독성오염물질의 처리방법인 물리화학적 처리방법을 대체할 수 있는 생물학적 처리방법에 의한 고효율의 중금속등 독성오염물질의 처리 및 회수에 관한 기술개발은 중요한 일이라 아니할 수 없다. 따라서 본 연구는 중금속오염폐수처리에서의 미생물 이용 가능성을 검토하기 위하여 아연에 강한 내성을 지니고 동시에 균체내 아연 축적능력이 우수한 아연 내성균을 분리하여 균체내 아연 축적특성, 축적형태 및 균체내에 축적된 아연의 회수방법등을 조사하였으며, 그 결과를 보고코자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 아연 내성균주는 본인들이 분리 동정한 아연 내성균주 *Pseudomonas chlororaphis*를 사용하였으며, 공시 균주의 배양은 basal medium (glucose 10 g, Polypeptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, D.W 1000 ml, pH 6.0)에 아연을 일정한 농도로 처리한 액체배지를 사용하였다.

2.2. 균체의 수확 및 아연처리

아연을 처리하지 않은 기본배지 400 ml에 공시균주를 접종하여 Shaking incubator (KSI-200L, Korea)에서 30°C, 140 rpm으로 48시간 진탕배양하였고, 대량배양은 아연을 처리하지 않은 기본배지 15 l에 공시균주를 접종하여 Jar fermentor (Bioengineering 11523, Switzerland)에서 30°C, 200 rpm, D.O 5 mg/l이 되도록 조정하여 48시간 배양한 다음 8,000 rpm (Centrikon T-324, Germany)으로 10분간 원심분리하여 회수한 균체를 멸균증류수로 3회 세척하여 배지성분이 제거된 순수한 균체를 수확하

아연 내성균의 균체내 아연 축적특성 및 균체내 축적된 아연의 회수

였다. 수확된 균체는 동결건조후 또는 그대로 사용하였다.

균체의 아연 처리는 $ZnCl_2$ 을 Zn^{2+} 농도로서 10,000 mg/l이 되게 조제한 표준용액을 이용하여 일정한 농도가 되도록 멸균증류수로 희석 조제하여 처리하였다.

2.3. 균체량 및 아연 정량

균체내에 축적된 아연 축적량과 용액중에 남아 있는 아연 잔존량은 직접법(일본분석학회, 1973)에 의하여 전처리하여 원자흡광법으로 정량하였다. 즉, 아연이 처리된 균체를 원심분리기로 회수하여 멸균증류수로 3회 세척한 다음, crucible에 넣어 105°C에서 24시간 건조시켜 건조균체량을 우선 측정하였으며, 이 건조균체에 HNO_3 와 $HClO_4$ 를 각각 5 ml씩 가하여 Hot plate상에서 완전히 분해시킨 후 0.1N-HCl용액 100 ml에 용출시켜 Atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu AA-680, Japan)를 이용하여 아연 함량을 정량하였다.

2.4. 아연 내성균주의 아연에 대한 내성

아연을 처리하지 않은 배지와 아연을 100, 500, 1,000, 2,000 mg/l되게 농도별로 처리한 액체배지 각각에 공시균주를 접종한 다음, 30°C에서 진탕배양하면서 배양시간별로 Spectrophotometer (Spectronic 21D, Milton Roy, U.S.A)의 흡광도로서 성장도를 비교함으로써 공시균주의 아연에 대한 내성 정도를 조사하였다. 그리고 공시균주와 *E. coli*, *Xanthomonas citri* 및 activated sludge로부터 분리한 mixed microorganism을 아연이 200 mg/l 처리된 기본배지에 각각 접종하여 배양하면서 성장도를 비교함으로써 공시 아연 내성균주의 아연에 대한 내성 정도를 다른 미생물들과 비교하였다.

2.5. 아연 내성균주의 아연 축적능력

아연이 100 mg/l농도로 처리된 기본배지에 공시균

주를 접종하여 30°C에서 4일간 진탕배양하면서 배양시간에 따른 아연 축적량을 조사하였으며, 또한 아연이 처리되지 않은 기본배지에 공시균주를 접종하여 48시간 배양한 다음, 원심분리기로 회수한 균체를 아연이 100 및 200 mg/l의 농도로 처리된 용액 (pH 6.0) 100 ml에 처리하여 30°C에서 진탕시키면서 처리 시간에 따른 균체내 아연 축적량과 용액내 아연 잔존량을 조사하였다. 그리고 공시균주와 *E. coli*, *Xanthomonas* 및 activated sludge로부터 분리한 mixed microorganism을 아연이 100 mg/l처리된 용액 (pH 6.0) 100 ml에 건조균체량으로서 100 mg되게 각각 처리하여 처리시간에 따른 아연 처리율을 조사함으로써 공시균주의 아연 축적능력을 다른 미생물들과 비교하였다.

2.6. 아연 축적균체의 전자현미경 관찰 및 EDS분석

균체내 축적된 아연의 외형적인 축적형태는 Tsezos와 Volesky (1982a, b) 및 Mullen et al (1989)의 방법에 따라 전자현미경으로 관찰하였다.

아연이 처리되지 않은 기본배지에서 배양한 균체와 아연이 200 mg/l농도로 처리된 기본배지에서 배양한 균체를 원심분리기로 각각 회수하여 멸균증류수로서 3회 세척하여 배지성분이 제거된 순수한 균체를 2.5% glutaraldehyde로 실온에서 2시간 전고정시킨 후 1% osmium tetroxide로 24시간 후 고정 시켰다. 이때 사용한 모든 시약의 희석은 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0)으로 하였으며, 동일한 완충용액으로 세척하였다. 검체를 60, 70, 80, 90 및 100%의 ethanol로서 연속적으로 탈수하고 propylene oxide로 조직을 치환시킨 다음 Epon 812에 포매하여 60°C Dry oven에서 24시간 중합시킨 후, Ultramicrotome (ULTRACUT, Reicher-Jung)을 이용하여 0.35 μ m 크기로 semi-thin section하여 carbon coated 200 mesh nickel 또는 copper grid에 고정시켜 전자현미경 (TEM, Hitachi H-600) 75KV에서 관찰하였으며, 무기원소의 분석은 TEM에 부착된 energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS,

Serial II, Noran, U. S. A.)로 분석하였다.

2.7. 균체내 축적된 아연의 회수

아연이 축적된 균체를 증류수, 0.1M-HCl 및 0.1 M-EDTA용액으로 각각 처리 세척하여 세척 횟수에 따른 균체내 축적된 아연의 탈착율을 조사하였다.

그리고 아연이 축적된 균체를 550°C 회화로에서 12시간 회화시킨 후 남은 작열잔유화합물을 EDS 분석하여 작열잔유화합물중의 아연 함량을 조사하였고 균체내 축적된 아연을 분석 정량함으로써 회수방법의 효율성을 비교 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 아연 내성균주의 아연에 대한 내성

아연 내성균의 아연 농도에 따른 내성정도를 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 아연을 처리하지 않았을 경우와 아연을 처리했을 경우의 성장도를 비교해 볼때 아연을 100 mg/l 농도로 처리했을 경우에는 아연을 처리하지 않았을 경우와 생장이 서로 별 차이가 없었다. 그러나 아연 농도가 500, 1,000 및 2,000 mg/l로 높아질수록 성장에 저해를 받았으나 500 및 1,000 mg/l에서도 비교적 양호한 성장율을 나타냈으며, 배양액중 아연 농도가 높을수록 유도기가 연장될 뿐만 아니라 성장도 저해되는 것으로 나타나 Kim과 Lee (1976)의 *Enterobacter cloacae* 생육에 미치는 중금속의 영향을 조사한 연구에서 배양액중 중금속농도가 높아질수록 성장에 큰 저해를 받는 것으로 나타난 결과와 비슷한 경향이였다.

그리고 아연 내성균주의 아연 내성을 다른 미생물들의 아연 내성과 비교해 본 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 activated sludge로 부터 분리한 mixed microorganism은 어느 정도 성장하였으나 아연 내성균에 비하여 성장율이 낮았으며, *E.coli*와 *Xanthomonas*는 거의 성장하지 못하였다. 따라서 중금

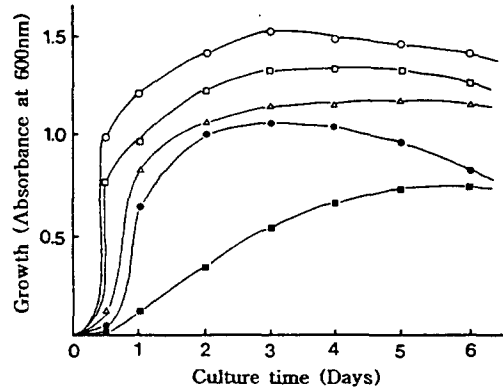


Fig. 1. Growth curves of *P. chlororaphis* at the various Zn concentrations according to culture time.

○: Without Zn □: 100mg/l of Zn
△: 500mg/l of Zn ●: 1000mg/l of Zn
■: 2000mg/l of Zn

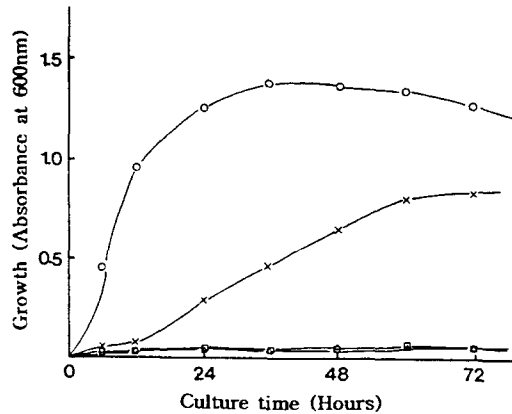


Fig. 2. Growth curves of *P. chlororaphis*, *E. coli*, *Xanthomonas* and mixed microorganisms isolated from activated sludge. Cultivation was carried out in 100 ml of the basal medium with 200 mg/l of Zn with shaking at 30°C or 37°C for 72 hours.

○: *P. chlororaphis* △: *E. coli*
□: *Xanthomonas*
×: mixed microorganisms

속에 의한 미생물의 생육저해 정도는 미생물 종류와 중금속 종류에 따라 각각 다르게 나타나는 것으로 생각되었으며, 이러한 결과는 Abbas and Edwards (1989)과 Lester et al (1979)이 토양 미생물의 일종인 *Streptomyces* species들과 중금속에 내성을 지니고 있는 *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp. 및

Brevibacterium sp.의 여러가지 중금속들에 대한 생육저해 정도를 조사한 결과, 중금속 종류와 미생물 종류에 따라 생육저해 정도가 다르게 나타났다는 결과와 비슷한 경향이었으며, 본 실험에 사용한 아연 내성균주는 아연에 대하여 상당히 강한 내성을 지니고 있는 것으로 생각되었다.

3.2. 아연 내성균주의 아연 축적능력

공시 아연 내성균주를 아연이 100 mg/l 처리된 기본배지에 접종하여 배양시간에 따른 아연 축적량을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양 1.5일 이후에 축적되기 시작하여 배양 3일 후 최대의 축적율을 보여 이때 아연 제거량은 약 56 mg/l이었다. 이러한 결과를 미루어 볼때 아연 내성균주의 아연 축적은 어느 정도의 유도기 이후에 이루어지는 것을 알 수 있었으며, Cho (1995)도 Cd, Pb, Zn 및 Cu에 각각 내성이 있는 *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* 및 *P. stutzeri*를 분리하여 배양시간에 따른 각 중금속 축적양상을 조사한 결과 Pb의 경우에는 배양액내 균체량이 증가됨에 따라 축적량도 증가되었으나 Cd, Zn 및 Cu의 경우에는 어느 정도의 유도기를 거친후에 축적되기 시작하였다고 보고하였다. 이러한 균체들의 세포형태를 전자현미경 (SEM)으로 관찰한 결과 Photo. 1에서 보는바와 같이, 세포표면에 많은 electron-dense granule들이 형성되어 있는 것이 관찰되었으며, 이것은 세포내 중금속 결합능력이 있는 물질들에 아연이 결합된 zinc complex인 것으로 생각되었다.

그리고 아연이 처리되지 않은 배지에서 완전히 성장한 균체를 원심분리기로 회수하여 멸균증류수에 아연을 100 및 200 mg/l 농도로 처리한 용액 (pH 6.0) 100 ml에 처리하여 처리시간에 따른 용액내 아연 제거율을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 처리 초기에는 제거율이 매우 낮았으나 처리 24시간 이후에는 매우 높은 Zn 제거율을 나타내었으며, 처리 72시간 후 100 및 200 mg/l 농도에서 각각 약 90 및 77% 이상의 높은 Zn 제거율을 나타내어 아연이 처리된 배지에서 배양하였을 경

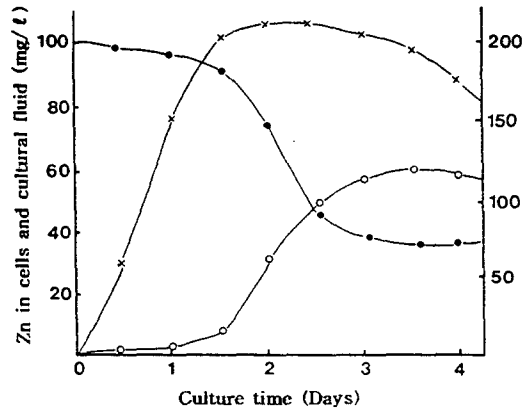


Fig. 3. Changes of Zn accumulation in the cell according to culture time. Cultivation was carried out in 100 ml of the basal medium with 100 mg/l of Zn with shaking at 30°C for 4 days.
 ×: Dry weight of cells
 ○: Zn in cells
 ●: Zn in cultural fluid

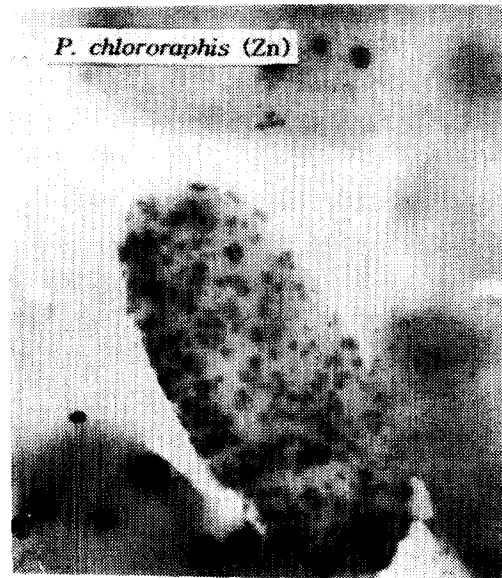


Photo. 1. Scanning electron microscopic observation of cell surface of *P. chlororaphis*.

우 (Fig. 3)와 비슷한 축적양상을 나타내었다.

Cheng등 (1975)의 activated sludge에 의한 중금속 흡착실험과 Tsezos등 (1982a, b, 1983)의 *Rhizopus arrhizus*를 이용한 중금속 흡착실험에서 미생

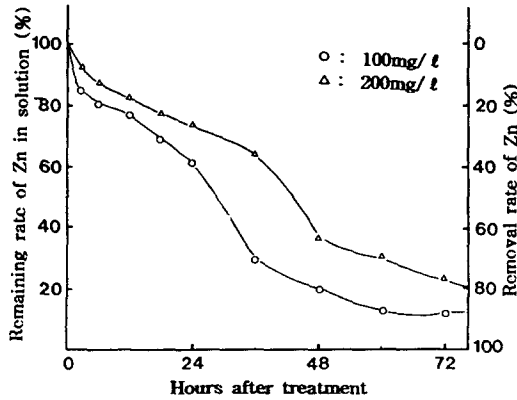


Fig. 4. Removal rates of Zn in solution treated with Zn by *P. chlororaphis*. The precultured *P. chlororaphis* cells (dry weight; 185 mg) were suspended in 100 ml of solution (pH 6.0) treated with 100 or 200 mg/l of Zn.

물에 의한 중금속의 흡착은 2단계 반응메카니즘에 의해 일어나며, 1단계 흡착은 중금속 유입 직후부터 30~60분 사이의 빠른 시간내에 흡착반응이 일어나며, 이 시간은 평형단계에 거의 도달하는 속도 결정단계로서 주로 미생물 세포간의 생성물질에 의한 중금속의 물리적인 흡착과 세포표면에서의 이온교환에 의해서 일어나며, 2단계 흡착은 미생물 대사활성 또는 증식에 따른 흡착으로서 세포의 성장율에 의해서 결정된다고 한 보고를 미루어 볼때 본 공시균주에 의한 아연 축적은 세포표면에 존재하는 중금속 결합능력이 있는 물질들에 의해 매우 빠른 속도로 강하게 결합되는 물리적인 흡착과정과 미생물 대사작용에 의하여 느린 속도로 세포내로 천천히 흡수되는 과정이 복합적으로 일어나는 것으로 생각되었다. 그러나 처리 초기의 아연 축적량에 비하여 처리 6시간 이후의 아연 축적량이 매우 높게 나타나 물리적인 흡착보다는 미생물 대사작용에 의하여 세포내로 흡수되는 양이 더 많은 것으로 생각되었다.

공시 아연 내성균주의 아연 축적능력을 다른 미생물들의 아연 축적능력과 비교해 본 결과 Fig. 5와 같이 아연 내성균주의 아연 축적능력은 다른 미생물들의 아연 축적능력에 비하여 대단히 높은 것을 알수 있었다. 특히 아연에 대하여 가장 약한 내성

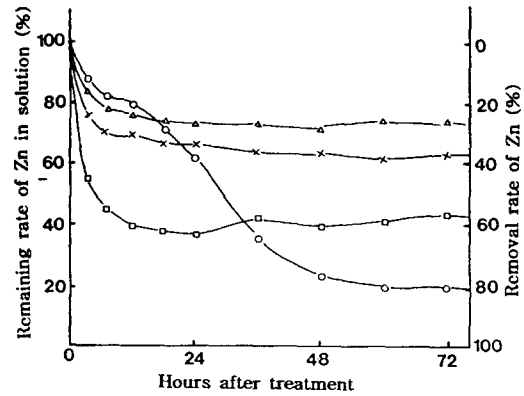


Fig. 5. Removal rates of Zn in solution treated with 100 mg/l of Pb by *P. chlororaphis*, *E. coli*, *Xanthomonas* and mixed microorganisms isolated from activated sludge. The precultured cells (dry weight 100 mg) were suspended in 100 ml of a solution (pH 6.0) treated with 100 mg/l of Zn.

○: *P. chlororaphis* △: *E. coli*
 □: *Xanthomonas*
 ×: mixed microorganisms

을 지닌 것으로 나타난 *Xanthomonas* (Fig. 2)의 아연 제거율이 *E. coli*나 mixed microorganism에 비하여 높게 나타났으며, 아연 내성균주에 의한 아연 축적양상은 처리시간이 경과함에 따라 점차적으로 증가하였으나 *Xanthomonas*, *E. coli* 및 mixed microorganism에 의한 아연 축적양상은 처리초기에 대부분이 흡착되고 그 후에는 큰차이가 없는 것으로 나타나 미생물에 의한 중금속의 흡착은 중금속에 대한 내성과는 상관없이 세포외부에 존재하는 polysaccharide와 같은 미생물 대사산물 등에 결합되는 물리적인 흡착과정에 의해서도 흡착될 수 있는 것으로 생각되었다 (Tsezos and Volesky, 1982a, b; Brown and Lester, 1979, 1980, 1982).

3.3. 아연 축적균체의 전자현미경 관찰 및 EDS분석

아연이 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체와 아연이 200 mg/l 처리된 배지에서 성장한 균체의 세포형태 변화 및 아연 축적형태를 전자현미경

(TEM)으로 관찰한 결과는 photo. 2에서 보는 바와 같이, 아연이 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체는 정상적인 세포형태를 이루고 있었으나 아연이 처리된 배지에서 성장한 균체는 세포표면과 내부에 많은 electron-dense granule들이 형성되어 있는 것이 관찰되었으며, 아연이 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체에 비하여 cell wall과 cell membrane 부근이 상당히 팽창되어 있었다. 이러한 electron-dense granule들을 EDS 분석한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 상당량의 아연이 함유되어 있는 것으로 나타났으며, 미생물의 중금속 축적에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 phosphorus와 sulfur의 함량이 다른 원소들에 비하여 높게 함유되어

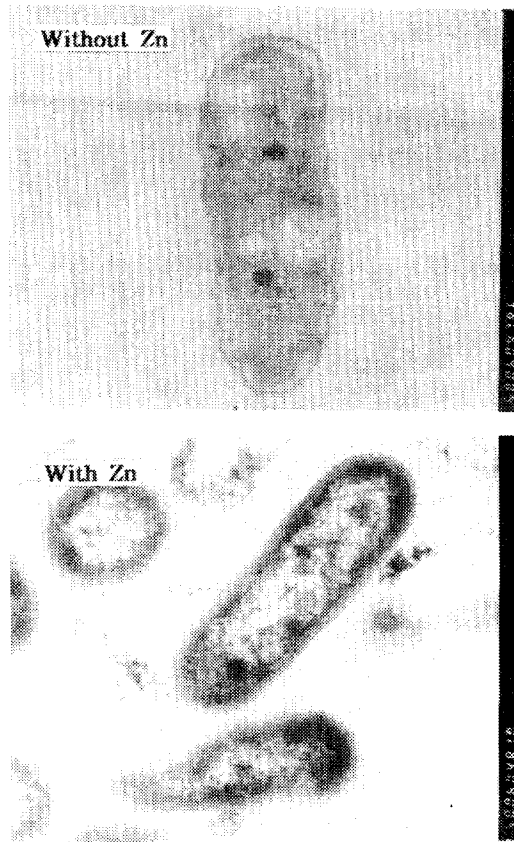


Photo. 2. Electron microphotograph of *P. chlororaphis* treated with or without Zn (40,000 \times).

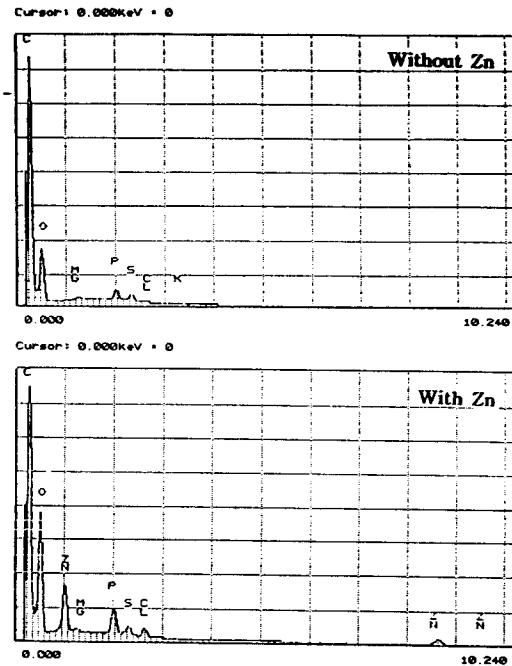


Fig. 6. X-ray energy dispersion spectra of *P. chlororaphis* treated with or without Zn.

있는 것으로 나타나 metallothionein이 존재할 가능성이 있는 것으로 생각되었으며, 아연이 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체에 비하여 아연이 처리된 배지에서 성장한 균체의 sulfur 및 phosphorus의 함량이 더 높게 나타났다. 그러나 다른 원소들은 아연이 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체와 별다른 차이가 없었다.

따라서 아연 처리균체에서 관찰된 electron-dense granule들은 아연 결합능력이 있는 세포물질들과 아연이 complex를 이루고 있는 것으로 생각되었으며, 아연 처리시간에 따른 아연 축적양상 (Fig. 4)과 중금속 축적능력이 있는 미생물의 가상적인 polyphosphate: heavy metal complex는 불용성의 colloidal suspension 상태로 세포내에 혹은 세포 표면에 존재하며, 불용성 heavy metal: S complex는 세포 표면에 존재한다고 이미 보고된 연구 결과들 (Standberg et al, 1981; Aiking et al, 1982; Macaskie, 1984; Cho, 1995)과 비교해 볼때, 본 공시균주에 의한 아연 축적은 주로 cell wall과 cell membrane

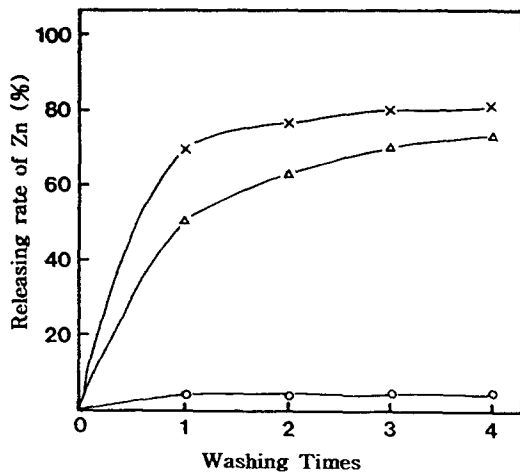


Fig. 7. Release of Zn from Zn accumulated cells treated with distilled water, HCl or EDTA according to washing times.
○: Distilled water △: HCl
×: EDTA

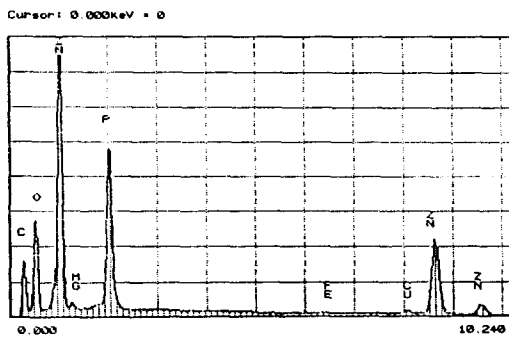


Fig. 8. X-ray energy dispersion spectra of residues after combusting the *P. chlororaphis* cells accumulating Zn at 550°C.

에서 이루어지며, 미생물 세포간의 생성물질 및 세포표면에서의 이온교환에 의하여 매우 빠른 시간 내에 세포표면에 주로 흡착되는 물리적인 흡착과정과 미생물 대사과정에 의하여 세포내부로 흡수

되는 과정이 복합적으로 일어나는 것으로 생각되었다.

3.4. 균체내 축적된 아연의 회수

아연이 축적된 균체를 증류수, 0.1M-HCl 및 0.1 M-EDTA 용액으로 처리하여 세척 횟수에 따른 축적된 균체로부터의 아연 탈착율, 그리고 아연이 축적된 균체를 550°C 회화로에서 12시간 회화시킨 후 남은 작열잔유화합물을 EDS분석하여 작열잔유화합물중 아연 함량을 조사함으로써 균체내에 축적된 아연의 회수방안을 검토한 결과는 Fig. 7, 8 및 Table 1, 2, 그리고 Photo. 3에서 보는바와 같다. 아연이 축적된 균체를 증류수, 0.1M-HCl 및 양이온킬레이트제인 0.1M-EDTA 용액으로 각각 처리하여 세척 횟수에 따른 균체내에 축적된 아연의 탈착율을 조사한 결과, Fig. 7에서 보는바와 같이 증류수에 의해서는 아연이 거의 탈착되지 않았으며, 0.1M-HCl 용액에 의해서는 아연이 약 64% 정도

Table 2. Elemental compositions of residues after combusting the cells accumulating Zn at 550°C.

Elements	Content of elements in residues(%)
C	1.85
O	2.49
Cl	-
Mg	0.27
Fe	0.11
P	16.83
Zn	78.57
Cu	0.07
Total	100.00

Table 1. Dry weight of cells after accumulation of Zn residues after combusting the cells.

Dry weight of cells		Residues after combusting the cells	
Native (mg)	After accumulation of Zn (mg)	mg	mg/g
1837 (100)	2315 (126.0) (100)	496 (21.3)	214.3

(): Index

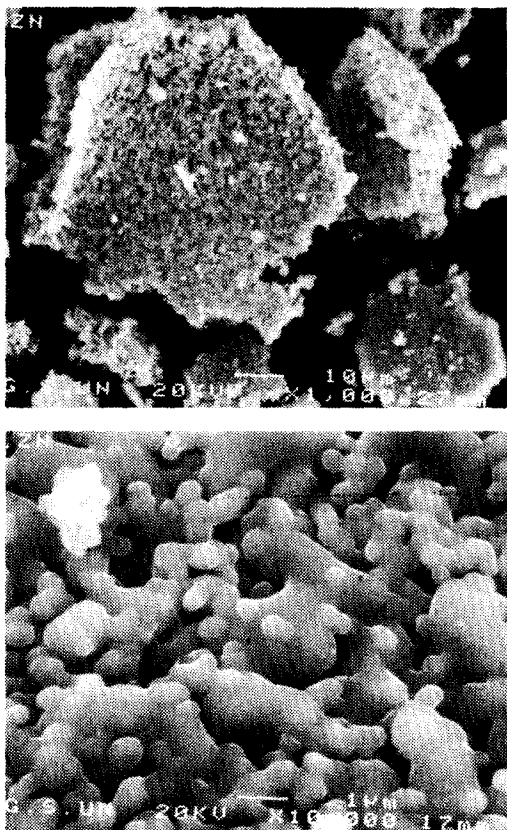


Photo. 3. Electron microphotographs of residues after combusting the *P. chlororaphis* cells accumulating Zn at 550°C.

탈착되었고, 양이온 킬레이트제인 EDTA에 의해서 는 약 80% 탈착되어 EDTA 용액에서 높은 아연 탈착율을 나타내었다. 그리고 세척 횟수에 따른 탈착율은 1회(1h)이후 큰 차이가 나지 않았으며, 이러한 결과는 Nakajima와 Sakaguchi (1986)의 *Streptomyces albus*를 이용한 탈착실험에서 흡착된 UO_2^{2+} 의 탈착이 1시간 이내에 완료되었다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

아연 내성균주의 아연 축적전과 축적후의 균체량 변화 및 아연이 축적된 균체를 550°C 회화로에서 12시간 회화시킨 후 남은 작열잔유화합물을 조사한 결과, Table 1에서 보는바와 같이 아연 축적전에 비하여 축적후에 공시균주의 균체량은 약 26% 증가되었으며, 이때 증가된 균체량은 초기 용액

내에서 제거된 아연의 양과 거의 비슷함을 알 수 있었다. 그리고 아연이 축적된 균체를 550°C 회화로에서 12시간 회화시켰을 경우 균체량의 21%에 해당하는 작열잔유화합물이 생성되었다.

이때 생성된 작열잔유화합물들의 외형적인 구조를 전자현미경으로 관찰한 결과는 Photo. 3과 같고, 작열잔유화합물들 중의 원소성분을 EDS로 분석한 결과, Fig. 8에서 보는바와 같이 상당히 많은 양의 아연이 함유되어 있었으며, 특히 중금속 축적에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 phosphorus의 함량이 약 16.8%로서 아연 이외의 다른 원소들에 비하여 매우 높게 함유되어 있었으며, sulfur는 균체를 그대로 EDS 분석하였을 경우 (Fig. 6)에는 검출되었으나, 회화시킨 작열잔유화합물에서는 검출되지 않았다.

작열잔유화합물을 EDS분석하였을 경우 검출된 원소들과 아연의 상대적인 함량을 비교해 본 결과, Table 2에서 보는바와 같이 아연 함량이 약 79%로서 아연 함량이 매우 높은 화합물인 것으로 나타났으며, 따라서 균체내에 축적된 중금속의 회수 및 재사용 가능성은 충분히 있을 것으로 생각되었으며, 효율적인 회수방법에 관한 연구가 금후 필요할 것으로 생각되었다.

4. 결 론

아연 내성균인 *P. chlororaphis*의 균체내 아연 축적특성, 축적형태 및 균체내에 축적된 아연의 회수방법을 조사한 결과는 다음과 같다.

아연 농도가 100 mg/l인 용액중에서 처리 48시간 후 아연 내성균주의 아연 처리율은 약 90% 이상이었다.

아연이 축적된 균체를 전자현미경으로 관찰한 결과, 균체의 cell wall과 cell membrane에 많은 electron-dense granule들이 형성되어 있었으며, electron-dense granule들을 EDS로 분석한 결과, 이 granule들은 zinc complex인 것으로 확인되었다.

공시균주의 균체내 축적된 아연은 중류수에 의

해서는 거의 탈착이 되지 않았으나 EDTA 처리에 의해서는 약 80% 이상 탈착되었다. 아연이 축적된 균체를 550°C에서 회화시켰을 때 건조균체량의 약 21%에 해당하는 작열잔유화합물들이 생성되었으며, 이 작열잔유화합물들을 EDS로 분석한 결과, 아연이 약 79% 이상 함유되어 있는 비교적 순수한 아연 화합물인 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- 日本分析學會. 關東支部, 1973, 公害分析指針 7, 公
立出版社 67, 503.
- 정윤철 외, 1989, 응집제 생산을 위한 생물공정기
술개발 (I), 1989 과기처보고서.
- 조순행, 1988, "물리화학적처리", 유해폐기물 관리
기술 심포지움, 한국과학기술원.
- Abbas, A. and C. Edwards, 1989, Effects of me-
tals on a range of *Streptomyces* species.
Appl. Environ. Microbiol., 55 (8), 2030~20
35.
- Aiking, H., K. Kok, H. van Heerikhuizen and J.
van't Riet, 1982, Adaptation to cadmium by
Klebsiella aerogenes growing in continuous
culture proceeds mainly via formation of ca-
dmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44,
938~944.
- Brown, M. J. and J. N. Lester, 1979, Metal remo-
val in activated sludge: The role of bacterial
extracellular polymer. *Water Res.*, 13, 817~
837.
- Brown, M. J. and J. N. Lester, 1980, Comparison
of bacterial extracellular polymer extraction
methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40 (2),
170~185.
- Brown, M. J. and J. N. Lester, 1982, Role of bac-
terial extracellular polymers in metal uptake
in pure bacterial culture and activated sludge.
II. Effects of mean cell retention time, *Water*
Res., 16, 1549~1560.
- Cheng, M. H., J. W. Patterson, and R. A. Minear,
1975, Heavy metals uptake by activated slu-
dge. *J. Water Pollut Control Fed.*, 47, 362~
376.
- Cho, J. S., 1995, Characterization of heavy metal
accumulation in the cell of heavy metal-tole-
rant microorganisms and utilization of the
microorganisms as heavy metal biosorbent,
박사학위 논문, 경상대학교.
- Flemming, C. A., FG. Ferris, T. J. Beveridge and G.
W. Bailey, 1990. Remobilization of toxic
heavy metals adsorbed to bacterial wall-clay
composites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56
(10), 3191~3203.
- Friis, N. and P. Myers-Keith, 1986, Biosorption of
uranium and lead by *Streptomyces longwoo-
densis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 21~28.
- Heo, J. S. and J.s. Cho, 1994, Utilization of mic-
roorganisms for treating wastewater polluted
with heavy metals. *Kor. J. Environ. Agric.*, 13,
386~395.
- Jain, D. K. and R. D. Tyagi, 1992, Leaching of
heavy metals from anaerobic sewage sludge
by sulfur-oxidizing bacteria. *Enzyme. Microb.
Technol.*, 14, 376~383.
- Kim, Y. B. and S. R. Lee., 1976, Isolation of cad-
mium-tolerant bacteria and accumulation of
cadmium into the bacteria cell. *Kor. J. Appl.
Microbiol. Bioeng.*, 4 (3), 111~115.
- Kuyucak, N. and B. Volesky, 1989, Accumulation
of cobalt by marine alga. *Biotechnol. Bioeng.*,
33, 809~814.
- Lester, J. N., R. Perry and A. H. Dado, 1979, The
influence of heavy metals on a mixed bacte-
rial population of sewage origin in the che-
mostat. *Water Res.*, 13, 1055~1063.
- Macaskie, L. E., and A. C. R. Dean, 1984, Cad-
mium accumulation by a *Citrobacter* sp., J.

- Gen. Microbiol., 130, 53~62.
- Michel, L. J., L. E. Makaskie and A. C. R. Dean, 1986, Cadmium accumulation by immobilized cells of a *Citrobacter* sp. using various phosphate donors. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1358~1365.
- Mullen, M. D., D. C. Wolf, T. J. Beveridge, C. A. Flemming and G. W. Baily, 1989, Baterial sorption of heeavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (12), 3143~3149.
- Nakajima, A., T. Horikoshi, and T. Sakaguchi, 1981, Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 76~83.
- Nakajima, A. and T.Sakaguchi, 1986, Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 59~64.
- Norberg, A. B. and H.Persson, 1984, Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 239~246.
- Sag, Y. and T.kutsal, 1989, The use of *Zoogloea ramigera* in waste water treatment containing Cr (VI) and Cd (II) ions. *Biotechnol. Lett.*, 11 (2), 145~148.
- Standberg, G. W., S. E. Shumate II and J. R. Parrott, JR., 1981, Microbial cell as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 (1), 237~245.
- Treen-Sears, M. E., B. Volesky, and R. J. Neufeld, 1984, Ion exchange/complexation of the uranyl ion by *Rhizopus* bio-sorbent *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1323~1329.
- Tsezos, and B. Volesky, 1981, Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 583~604.
- Tsezos, M., 1984, Recovery of uranium from biological adsorbents-desorption equilibrium. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 973~981.
- Tsezos, M, 1983, The role of chitin in uranium adsorption by *R. Arrhizus*. *Biotech. Bioeng.*, 25, 2025~2040.
- Tsezos, M. and B.Volesky, 1982, The mechanism of thorium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotech. Bioeng.*, 24, 955~969.
- Tsezos, M. and B. Volesky, 1982, The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotech. Bioeng.*, 24, 385~401.