폐기물자원화
제4권 제2호, 71~75 1996

분변토 Biofilter를 이용한 Trimethylamine의 제거

김 성 건, 이 성 택

한국과학기술원 생물과학과 환경미생물 실험실

Biodeodorization of Trimethylamine by Earthworm Cast Bioflter

Song-Gun Kim, Sung-Taik Lee

Environmental Microbiology Lab, Dept. of Biological Sciences
Korea Advanced Institute of Science and Technology

ABSTRACT

A bacterium, capable of the degradation of trimethylamine (TMA), dimethylamine, and methylamine, was isolated from an enrichment culture on TMA basal mineral medium. The isolate was identified as *Methylobacterium* some carbon-carbon bonds compounds like malate, succinate, betaine. When the strain was immobilized to earthworm cast, the biofilter could remove the gaseous TMA of SV 30 h^{-1}, concentration of 120 ppm, continuously.

Key words : Trimethylamine, Facultative methylotroph, Earthworm cast biofilter

요 약 문

Trimethylamine, dimethylamine, methylamine 등의 아민류를 분해할 수 있는 미생물을 TMA를 성장기질로 사용한 농화배양으로부터 분리하였다. 분리된 균은 *Methylobacterium* sp. T32에 속하는 균으로 동정되었다. 이 균은 메탄올, 메틸아민류를 분해할 수 있으나, 다탄소화합물중에서는 malate, succinate, betaine과 같이 극히 제한된 종류의 유기화합물만을 분해할 수 있는 restricted facultative methylotroph였다. 이 균을 분변토에 고정하여 biofilter를 제작하였을 때 TMA gas를 SV 30 h^{-1}, 농도 120 ppm를 연속적으로 분해했다.

핵심낱말 : 트리메칠아민, 임의성 메칠자화균, 지렁이분변토 바이오필터

1. 서 론

우리나라에서 1992년부터 공포된 대기환경보전법에서 규제하는 악취물질 가운데 트리메칠아민(trimethylamine:TMA)은 생선이 부패하면서 발생한다(환경처, 1992). 다량의 생선을 소비하는 우리 나라에서 발생하는 음식쓰레기와 어류가공공장 등에서 발생하는 폐수에 TMA는 다량 포함되어 있다(Gamati *et al.*). 악취물질을 제거하는 방법으로 사용되는 산화법, 소각법, 활성탄에 의한 흡착법과 같은 물리, 화학적방법은 제거효율은 좋지만 저농도로 다량 발생하는 악취를 제거하는데에는 비경제적이다. 악취물질을 분해할 수 있는 미생물을 이용한 생물학적인 악취제거방법으로는 bioscrubber, trickling filter, biofilter 등이 있고 이 중에서 구조가 간단하고 미생물 농도가 높은 biofilter에 의한 환원성 황화합물의 제거에 관한 많은 연구가 이루어졌다(Cho *et al.*, 1991). biofilter는 그 미생물 고정체에 따라서 peat biofilter, soil filter, compost biofilter가 있으며 본 실험에는 유기성폐기물을 재활용한 분변토(지렁이 똥)에 TMA를 분해하는 미생물을 고정하여 TMA를 제거했다(송준상 등, 1993). TMA를 제거하는 미생물로는 *Pseudomonas*, *Arthrobacter* (Colby and Zatman, 1973), *Hyphomicrobium* X (Meiberg *et al.*, 1980), *Methylophilus* W3A1 (Colby and Blakey) 등이 알려져 있다. TMA의 분해경로와 TMA를 산화하는 효소에 관한 연구는 많이 발표되었으나 분해능력에 관한 연구는 많이 이루어지지 않았다(Boulton and Large, 1977).

본 연구에서는 TMA를 분해하는 새로운 미생물을 분리하여 특성을 조사하고 분변토 biofilter로 TMA를 제거했다.

2. 실험 방법

2.1 배지, 균 분리

실험에서 사용한 최소배지의 조성은 다음과 같다(g/liter). Trimethylamine hydrogclori-de; 1, KH_2PO_4; 2, K_2HPO_4; 2, $MgCl_2$ $6H_2O$; 0.25, NH_4Cl; 0.4, $FeSO_4$ $7H_2O$; 0.01, trace element stock 용액; 1 ml. Trace element solution의 조성은 다음과 같다(mg/liter). $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 250, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 24, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 5, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 100, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$; 144, $H_3 \cdot 3BO_3$; 30, Na_2MoO_4 $\cdot 2H_2O$; 36, Na-EDTA; 15.5 mM. yeast extract 0.2 (g/L)를 첨가한 TMA 액체 배지 500 ml에 하수처리장에서 떠온 미생물원을 50 ml 첨가하고 실온에서 배양하였다. TMA의 농도가 초기의 1/10 이하로 감소했을 때 새로운 배지에 10%의 배양액을 옮겨 3회 반복하여 배양했다. 배양원액을 희석하여 1.5%의 agar를 첨가한 고체배지에 도말하여 순수분리하였다

2.2 Characterization of Isolated Bacterium

순수분리된 균을 동정하기 위해 primary test, 생리적, 형태적 특징을 조사하였다(Smibert and Krieg, 1981). 또한 분리된 균의 유기물 분해능

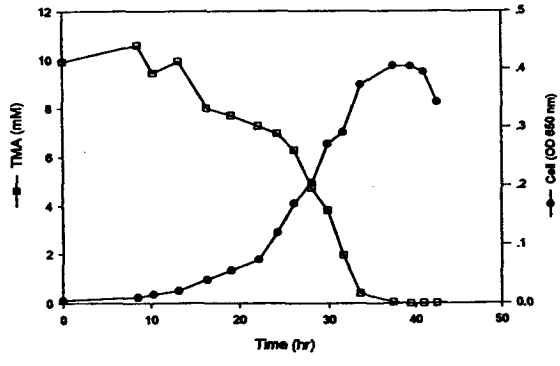

Fig. 1. Specific growth rate of T32 on various concentration of TMA.

력을 알아보기 위하여 다양한 단탄소분자와 다탄소분자를 최소배지에 첨가하여 배양한후 균의 증가를 측정하였다.

2. 3 Growth pattern on TMA

분리된 균을 0.1% (wt/vol) TMA · HCl를 유일한 탄소원, 에너지원으로 사용하여 30°C, 150 rmp에서 배양하고 균의 농도와 TMA 농도를 측정했다. TMA의 농도에 따른 균의 비성장속도를 측정하기 위해 다양한 농도의 TMA를 최소배지에 성장 기질로 첨가하여 배양한 후, 비성장속도(specific growth rate)를 계산하였다.

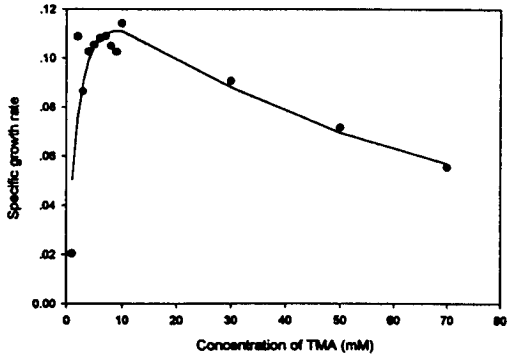

Fig. 2. Removal of TMA by T32 on the TMA basal mineral medium.

2. 4 Analytical Methods

TMA의 농도는 flame ionization detector가 장착된 GC 14-A (Shimatsu Co., Japan)로 측정하였고 이때 사용된 column의 재질은 Unicarbon B-2000 (GL Science, Japan)이었다. 세포의 성장은 spectrophotometer (DU-68 Beckman, USA) 로 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 5 바이오필터 실험

2. 5. 1 TMA gas 제거 측정

3 L짜리 삼각 플라스크 2개에 각각 1 L씩의 TMA 최소배지를 준비한 다음 전배양한 분리균 배양액을 100 ml씩 넣고, 14시간 동안 배양한 후, 분변토를 200 g씩 넣고 다시 4시간 배양시켰다. 균이 부착된 분변토를 꺼내어 멸균한 원형 칼럼(46 mm × H 1600 mm)에 채운 후, 칼럼의 다른 한 쪽도 필터가 연결된 고무 마개로 막은 다음, TMA gas를 포함한 공기를 통과시키면서 TMA의 농도를 측정하였다. 통기실험에 사용한 장치는 Fig. 3에 나타냈다.

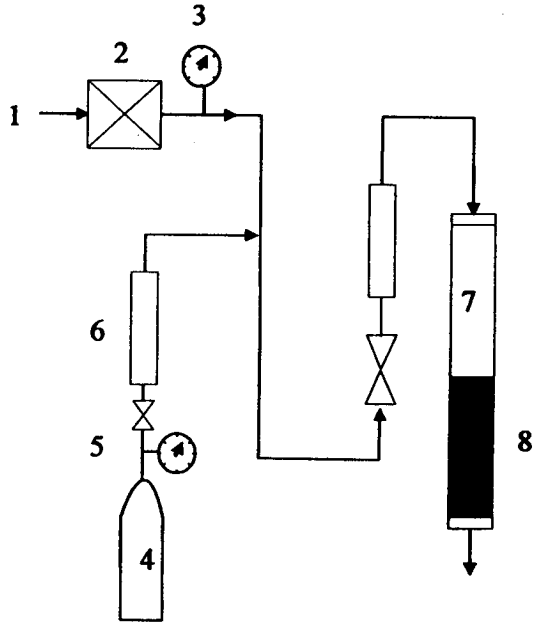

Fig. 3. Schematic diagram of laboratory-scale earthworm cast biofilter system. 1. Air; 2. Regulator; 3. Pressure gauge; 4. TMA gas cylinder; 5. Control valve; 6. Flow meter; 7. Glass column; 8. Earthworm cast.

2. 5. 2 분변토에 부착된 균수 측정

Homogenizer (Nissei AM-8, Japan) cup에 균이 부착된 분변토를 넣고 10,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 희석하여 TMA agar plate

에 도말했다. 배양후 나타난 colony의 수를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 균 분리와 특성

분리된 균은 그람 음성균으로 methanol, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, formate 등의 C_1 유기화합물을 성장기질로 사용할 수 있으며 glucose나 acetate 등을 제외한 malate, succinate, betaine과 같은 제한된 다탄소유기화합물을 성장기질로 사용할 수 있는 restricted facultatively methylotrophic bacteria였다. Table 1에서 보여지는 특성으로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의거하여 *Methylobacterium* sp. T32라고 잠정적으로 동정되었다(Patt *et al.*, 1976).

Table 1. Characteristics of strain T32.

Test of	
Gram stain	−
Oxidase	−
Catalase	+
Colony color on basal minimal agar	pink
Indole production	−
O/F test	inert
Urease	+
β-glucosidase	−
Protease	−
β-galactosidase	−
Assimilation of	
Methanol	+
Methylamine	+
Dimethylamine	+
Trimethylamine	+
Trimethylamine N-oxide	+
Formate	+
Formaldehyde	−
Glucose	−
Arabinose	−
Mannose	−
Mannitol	−
N-acetyl-glucosamine	−
Maltose	−
Gluconate	−
Caprate	−
Adipate	−
Malate	+
Citrate	−
Phenyl-acetate	−
Succinate	+
Acctate	−
Propionate	+
Butyrate	−
Valerate	−
Choline	−
Betaine	+

3.2 T32의 TMA 분해

수용액에 녹아있는 0.1%의 TMA HCl은 35시간안에 완전히 분해 제거되었다. 이때 TMA 분해 중간 대사 물질로써 다른 아민류는 생성되지 않았다. 비성장속도는 7 mM에서 최대값을 나타냈으며 더 높은 기질에서 비성장속도는 감소하는 것으로 보아 TMA는 미생물에 독성을 나타내는 물질임을 알 수 있었다.

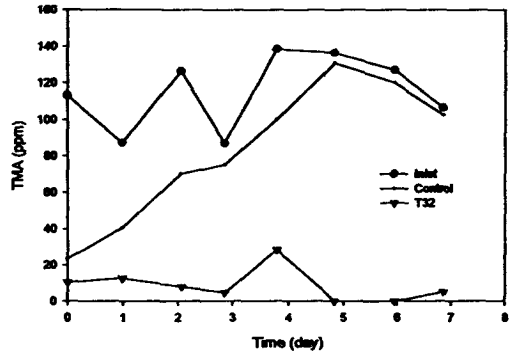

Fig. 4. Removal of TMA by earthworm cast biofilter inoculated with T32.

3.3 분변토 Biofilter에서의 연속제거

분변토의 화학적 조성은 다음과 같았다.

Component	Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Sulphur	Others
Concentration(%)	1.5	31.5	4.7	0.8	61.5

분변토 5g을 증류수 45ml에 섞어 가라앉힌 후 측정한 pH는 6.8이었다. 따라서 이 분변토는 미생물이 부착하여 성장하기에 좋은 고정체라고 할 수 있다.

분변토의 함수율은 54%였으며, 분변토에 부착된 균수는 1g당 8.3×10^9cfu였다. T32를 부착하지 않은 분변토 바이오필터에서는 TMA가 제거되지 않았으나 T32를 부착한 분변토 바이오필터에서 TMA는 완전히 제거되었다.

4. 결 론

새로 분리된 T32는 TMA를 분해하는 능력을 가지고 있으며 이를 분변토에 고정하며 제작한 biofilter는 TMA gas를 제거할 수 있었다.

REFERENCES

1. 환경처, 대기환경보전법 제9조, 규칙별표, 3. 악취(1992)
2. Meiberg, J.B.M., Bruinenberg, P.M. and Harder W., "Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium* X in the absence and presence of nitrate; Evidence for aerobic denitrification," J. Gen. Microbiol., 120, 453-463(1980)
3. Colby, J. and Zatman, L.J. "Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs," *Biochem. J.*, 132, 101-112(1973)
4. Cho, K.S., Zhang, L., Hirai, M., and Shoda, M. "Removal characteristics of hydrogen sulfide and methanethiol by *Thiobacillus* sp. isolated from peat in biological deodorization," *J. Ferment. Bioeng.* 71, 44-49(1991)
5. Smibert, R.M. and Krieg, N.R., "General characterization," *Manual of methods for general bacteriology*, Gerhardt, P. *et al.*(Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 409-443(1981)
6. Patt, T.E., Cole, G.C., and Hanson R.S. "*Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 226-229 (1976)
7. Meiberg, J.B.M., and Harder, W. "Aerobic and anaerobic metabolism of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in *Hyphomicrobium* X," *J. Gen. Microbiol.* 106, 265-276(1978)
8. Boulton, C.A., and Large P.J. "Synthesis of certain assimilatory and dissimilatory enzymes during bacterial adaptation to growth on trimethylamine," *J. Gen. Microbiol.* 101, 151-156(1977)
9. Gamati, S., Luong, H.T., and Mulchandani, A. "A microbial biosensor for trimethylamine using *Pseudomonas aminovorans* cells," *Biosensors and Bioelectronics* 6, 125-131(1991)
10. 송준상, 이길철, 전성환, 최훈근, 조경희, 김선일. "지렁이를 이용한 퇴비화 조건과 분변토의 비료성·안전성에 관한 연구," 유기성폐기물자원화 1, 85-102(1993)
11. Colby, J. and Blakey A.J., "Effect of growth conditions on the activities of methylotrophic enzymes in Methylophilus W3A1," FEMS Microbiol. Lett. 128, 333-337(1995)