

## Aeromonas hydrophila KH-54가 분비하는 유기폐수처리용 생물응집제 생산조건에의 최적화

서호찬<sup>1</sup> · 이정석 · 윤주환<sup>2</sup> · 이윤석<sup>2</sup> · 조홍연\*

고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학연구소, <sup>2</sup>고려대학교 환경공학과

**초 록 :** 미생물이 생산하는 유기폐수처리용 생물응집제를 개발하기 위하여 보관균주 및 자연계로부터 100 units/ml 이상의 응집활성을 나타내는 응집제 생산균주를 1차로 분리하고 돈분폐수에서 가장 높은 제거율을 보인 KH-54를 최종 선별하였다. 선별된 균주는 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었으며 응집제 생산을 위한 최적 배양 조건은 2.0% mannitol, 0.05% ammonium chloride, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% yeast extract 조성의 배지와 초기 pH 7.0, 배양온도 25°C 및 교반속도 150 rpm 의 환경인자들이었다. 상기의 조건으로 4일 배양 하였을 때 770 units/ml의 응집활성과 81%의 높은 nephelometer turbidity unit(NTU) 제거율을 나타내었으며 이 응집물질은 돈분폐수 이외의 두부공업폐수 92%, 제당폐수 78%, 주정공업폐수 68% 및 항생물질 발효공업폐수 36%의 NTU 제거율을 각각 나타내었다.(1998년 8월 25일 접수, 1998년 9월 21일 수리)

### 서 론

수처리에서 응집이란 색깔과 탁도를 유발하는 입자가 크게 입자화되어 물과 분리되는 현상을 말하며 응집제는 폐수 처리 공정에 있어 전처리 단계의 부유물 침전과 최종단계의 슬러지 회수 및 탈수단계에서 주로 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup> 폐수처리 공정 이외 유기고분자물질인 응집제는 발효공업에서의 균체분리,<sup>3)</sup> 식품공업 분야의 혼탁물질 제거,<sup>4)</sup> 하천바닥의 준설<sup>5)</sup> 등 산업이 발전함에 따라 각종 분야에서 그 사용이 확장되고 있다. 현재 시판 중인 응집제는 무기응집제인 alum, ferric chloride, polyaluminium chloride(PAC) 등과 유기합성 고분자물질인 polyacrylamide 유도체, polyethyleneamine, Na-polyacrylates 등이 경제성과 높은 응집성을 가지고 있기 때문에 폐수처리공정의 응집제로서 사용되고 있으나 alum 처리 슬러지의 토양 잔류독성 및 acrylamide 단량체의 강한 발암성은 가축이나 인체에 유해하다는 보고<sup>6,7)</sup>에 따라 점차 사용이 규제되고 있다.

응집제로 사용가능한 생분해성 고분자로는 alginate, chitosan, guar gum, gelatin 등<sup>8,9)</sup>이 있으나 수율이 낮고 생산가격이 높아 미생물로부터 저렴하고 대량생산이 가능한 생물응집제에 대해 관심이 고조되고 있다. 생물응집제의 응집기작은 다당류인 polyhexosamine계의 탄수화물,<sup>10)</sup> 단백질<sup>11)</sup> 및 지질<sup>12)</sup> 등이 금속이온 등에 의해 응결(coagulation)된 폐수처리 미생물들과 결합을 일으켜 조대화가 일어나 응집(flocculation) 되는 것으로 밝혀져 있다. 현재 생물응집제를 생산하는 균주로는 *Norcardia* sp.,<sup>13)</sup> *Aspergillus sojae*,<sup>14,15)</sup> *Paecilomyces* sp.<sup>16)</sup> 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 생물응집제를 이용한 식품공업폐수, 주정

폐수, 발효공업폐수, 돈분폐수 등 고농도 유기폐수처리공정을 개발하기 위한 기초연구의 일환으로 기존의 응집제로 처리한 슬러지의 2차 오염을 방지하고 동시에 생물응집제로 처리한 슬러지를 미생물 비료 또는 사료로 자원화시키기 위해 생물응집제 생산균주를 자연계에서 분리, 선별하였으며 균주의 특성과 생물응집제의 생산조건을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 선별

생물응집제를 생산하는 세균을 선별하기 위해 상법에 따라 자연계로부터 분리한 균주 및 실험실 보관균주 약 260종을 nutrient agar 배지에 도말한 후 25°C에서 배양하여 형성된 colony의 점성여부에 따라 1차로 분리하였다. 1차 분리균주를 대상으로 동일배지, 25°C, 100 rpm에서 4일간 액체배양한 후 균체를 제거한 배양상등액의 응집활성이 100 units/ml 이상의 균주를 2차 분리하였다. 최종균주는 아래의 배양조건에서 배양하여 얻은 상등액에 대하여 고농도 유기폐수로 선정한 돈분폐수와 kaolin 용액에서의 응집력을 지표로 선별하였다.

#### 균주의 동정

선별된 균주의 형태학적 관찰은 대수기 말기의 세포를 주사 전자현미경(JEM 100CX-II)을 사용하여 상법에 따라 관찰하였고 생물학적 및 생화학적 성질은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"<sup>17)</sup>와 "Manual of Methods for General Bacteriology"<sup>18)</sup> 등에 기술된 방법에 따라 조사 비교하여 동정하였다.

찾는말 : *Aeromonas hydrophila*, 생물응집제, 폐수처리

\*연락처

### 배양조건

응집제 생산을 위한 배지조성을 최적화하기 위하여 2% glucose, 0.2% peptone, 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05% yeast extract, pH 7.0으로 구성된 기본배지를 사용하였으며 500 ml baffle flask에 100 ml의 배지를 넣고 25°C, 150 rpm에서 4일간 회전진탕 배양하였다.

### 응집활성 측정

0.5% kaolin 10 ml에 1.0%  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 균체를 제거한 배양상등액 100  $\mu\text{l}$ 를 가하여 10분간 정치한 후 상등액 1 ml를 취해 550 nm에서 흡광도를 측정 Nakamura 방법<sup>16)</sup>에 따라 응집활성을 환산하였다. Kaolin 용액에 대한 응집활성 측정시 배양상등액의 적정 첨가량을 결정하기 위해 표준물질인 0.5% kaolin 용액에 배양상등액을 각 농도별로 첨가하여 응집능의 표준곡선을 작성한 후 직선적으로 증가하는 농도영역에서 응집활성을 측정하였다.

$$\text{Flocculating activity (units/ml)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \times \text{dilution rate}$$

A: Absorbance of reference sample

B: Absorbance of reaction mixture

### 대상폐수

대상폐수인 고농도 유기폐수들은 사육두수 150두의 중규모 돈분폐수, P사의 두부공업폐수, S사의 제당폐수, J사의 주정공업폐수 및 C사의 항생물질 발효공업폐수를 4°C 이하에서 냉장보관하면서 각각 실험에 사용하였다.

### 대상폐수의 응집활성 측정

고농도 유기폐수로 선정한 돈분폐수 10 ml에 1.0%  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{l}$ 를 가하고 균체를 제거한 배양액을 동량 첨가하여 상온에서 1시간 정치한 후 Nephelometer(Turner TD-40)로 N.T.U(nephelometer turbidity unit)값을 측정하여 다음의 식에 따라 제거율(%)을 환산하였다. 대조군 균을 접종하지 않고 상기의 배양조건에 따라 회전진탕한 배지를 사용하였다.

$$\text{NTU removal efficiency (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A: NTU of reference sample

B: NTU of reaction mixture

## 결과 및 고찰

### 균주의 선별 및 동정

고농도 유기폐수 처리용 생물응집제를 생산하는 균주를 선별하기 위해 자연계에서 분리한 균주 및 실험실 보관균주 약 260 종을 대상으로 앞서 기술한 균주의 분리 및 선별 방법에 따라 응집활성 100 unit/ml를 나타낸 20 균주를 선별하였다. 최종균주를 선정하기 위해 이들을 상기의 배양조건과 같이 배양하여 응집능을 측정한 결과 KH-54가 kaolin 용액과 돈분폐수에 대해 각각 220 units/ml의 응집활성과

Table 1. Flocculating activity and NTU removal efficiency of culture supernatant by isolated strains

Strains	Kaolin solution		Swine wastewater	
	Flocculating activity		NTU	NTU removal
Control	0		321	0
KH-11	178		205	36.1
KH-13	102		250	22.1
KH-22	189		243	24.3
KH-31	143		254	20.9
KH-32	110		205	36.1
KH-34	134		290	9.74
KH-42	186		270	15.9
KH-43	205		235	26.8
KH-53	194		298	7.25
KH-54	220		190	40.8
KH-64	200		260	19.0
KH-68	176		225	30.0
KH-2011	162		206	35.8
KH-2012	152		209	34.9
KH-3011	167		198	38.3
KH-3012	132		278	13.3
KH-3015	203		268	16.5
KH-4011	201		288	10.3
KH-5013	122		294	8.42
KH-7013	125		299	6.97

41%의 NTU 제거효율로 다른 균주에 비해 높은 값을 나타내었다(Table 1). 각 대상균주별 kaolin과 대상폐수에 대한 응집활성은 유사한 경향이었으나 KH-32는 대상폐수에서, KH-54, KH-4011은 kaolin에서 상대적으로 높은 값을 보임으로써 두 응집활성 측정계 간의 큰 차를 나타내었다. 선별 균주 KH-54를 전자현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과 폭 0.4~0.6  $\mu\text{m}$ , 길이 2.0~3.0  $\mu\text{m}$ 의 간균이었다(Fig. 1). 또한 이 균주는 운동성이 있는 Gram 음성균으로 gelatin과 catalase 반응에서 양성, indole과  $\text{H}_2\text{S}$ 를 생성하였으며 일부 생리학적 성질을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"<sup>17)</sup>에 보고된 *Aeromonas hydrophila*의 특성과 유사함을 나타내었다.

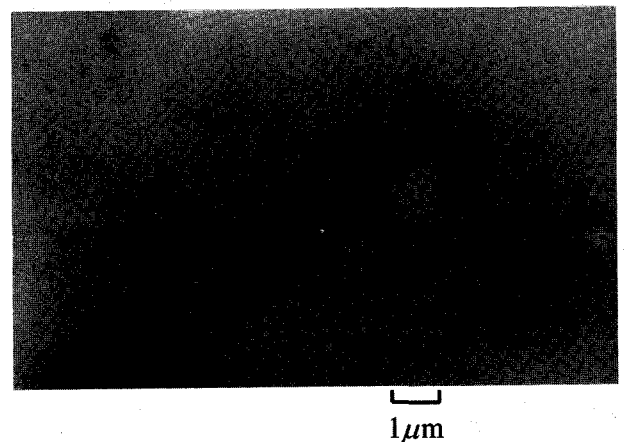


Fig. 1. Scanning electron microscopy of selected strain KH-54 ( $\times 12,000$ ).

**Table 2. Characteristics of selected strain KH-54**

Characteristics	KH-54	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Gram stain	-	-
Shape	Rod	Rod
Cell size	0.4~0.6×2.0~3.0 μm	0.3~0.8×1.0~5.0 μm
Flagella	+	+
Motility	+	+
Pigment	Brown	Brown
Catalase test	+	+
Starch liquefaction	+	+
Nitrate reduction	+	+
H <sub>2</sub> S production	+	+
Indole formation	+	+
Starch hydrolysis	-	+
Acid production		
Galactose	-	-
Sucrose	+	-
Mannitol	+	+
Arabinose	-	-
Inositol	-	-

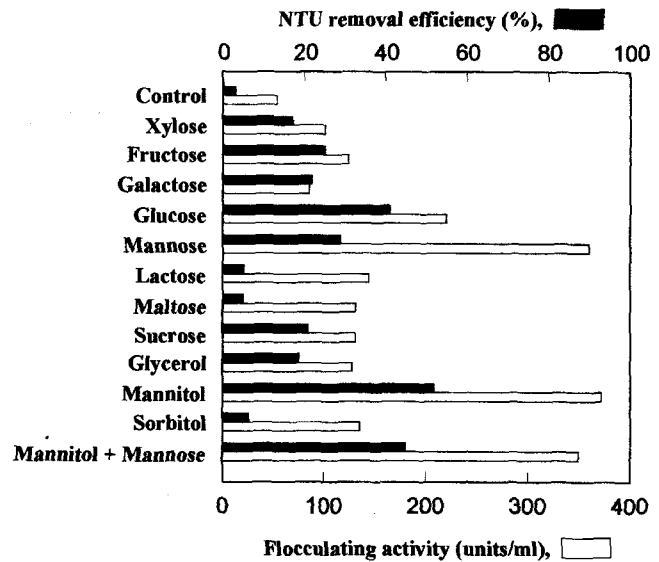
+: Typically positive, -: Typically negative

**탄소원의 영향**

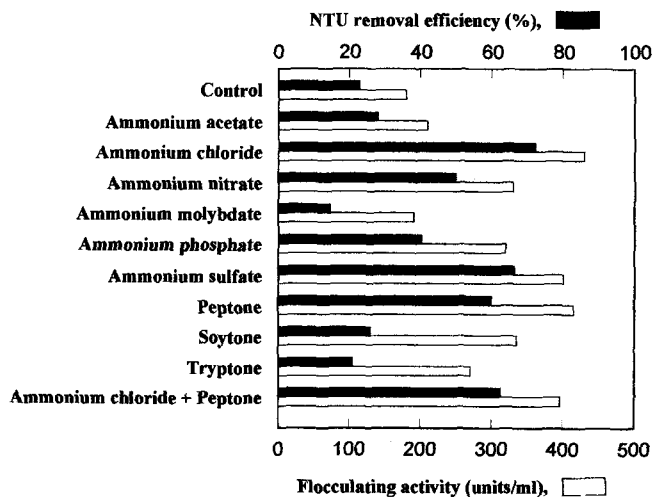
선정균주 KH-54의 응집제 생산을 위한 최적 탄소원 조건을 조사하기 위해 기본배지에 탄소원을 2.0%씩 첨가하여 kaolin에 대한 응집활성과 돈분폐수의 NTU 제거율에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 2). Kaolin 용액에 대한 응집활성은 mannitol, mannose, glucose 등의 순으로 나타났으며 돈분폐수에 대한 NTU 제거율은 mannitol, glucose, mannose 등의 순으로 높게 나타났다. 이 중 mannitol이 가장 우수한 응집활성(370 units/ml)과 NTU 제거효율(52%)을 보였으며 mannitol과 mannose를 각각 1.0%의 농도로 첨가한 경우 상승효과는 나타나지 않았다. Takagi 등<sup>19)</sup>은 응집제 최대생산을 위한 탄소원과 농도는 *Paecilomyces* sp.에서 glucose 0.0%, Kurane 등<sup>20,21)</sup>은 *R. erythropolis*에서 fructose 1.0%가 효과적이라고 보고한 바 있다.

**질소원의 영향**

탄소원으로 2.0%의 mannitol을 첨가한 기본배지에 각각 유기질소원 및 암모늄염을 첨가하여 응집제 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. Kaolin 현탁액에 대한 응집활성은 ammonium chloride, peptone, ammonium sulfate의 순으로 돈분폐수의 NTU 제거율은 ammonium chloride, ammonium sulfate, peptone의 순으로 활성이 높았다. Ammonium chloride 단독 첨가구와 유기질소원 중 응집활성이 가장 높았던 peptone과 ammonium chloride를 각각 0.2%, 0.1%씩 복합첨가한 균을 비교할 때 단독 첨가균이 kaolin 용액에 대한 응집활성이 430 units/ml, 돈분폐수의 NTU 제거율이 72%로 높았다. 대부분 응집제 생산균주들이 이용하는 무기질소원은 ammonium sulfate로 보고되고 있는 것<sup>19)</sup>과는 달리 본 균주는 ammonium chloride 첨가시 다소 높은 응집활성을 나타내어 지금까지 보고와는 상이한 결과를 나타내었다. 한편 질소원 및 생육인자인 yeast extract에 대한 영향을 0.5%~0.01%의 농도범위에서 검토한 결과



**Fig. 2. Effect of carbon source on flocculating activity and NTU removal efficiency of swine wastewater.** Cultivation was carried out in 100 ml basal medium containing each carbon source source of 2.0% on rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm for 4 days.



**Fig. 3. Effect of nitrogen source on flocculating activity and NTU removal efficiency of swine wastewater.** Cultivation was carried out in 100 ml basal medium containing 2.0% mannitol, each organic nitrogen source of 0.2% and each ammonium salt of 0.1% with rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm for 4 days.

0.05% 이상 첨가시 균체생육은 증가하였으나 응집활성은 0.05% 첨가와 유사한 값을 보였다.

**C/N ratio의 영향**

선정균주 *A. hydrophila* KH-54가 생산하는 응집물질의 본체를 알아보기 위해 배양상등액을 동결건조하여 분자량 10,000을 초과하는 막을 사용, 투석한 후 periodate 산화 및 pronase 처리를 행하였다. 그 결과 periodate 산화에 의해 활성이 크게 감소한 반면 pronase 처리는 활성에 영향을 주지 않음으로써 단백질보다는 다당류 또는 그 유도체일 가

**Table 3. Effect of C/N ratio on flocculating activity and NTU removal efficiency**

Conc. of mannitol C/N ratio	1%		2%		3%		4%	
	FA	NTU	FA	NTU	FA	NTU	FA	NTU
40	266	20.0	450	73.3	425	50.7	429	63.6
30	216	26.3	426	55.5	418	46.2	428	58.3
20	169	12.3	425	53.6	396	44.1	426	46.7
10	148	10.1	420	58.5	372	46.2	424	40.7
5	136	8.93	392	33.7	396	40.7	425	34.8

Cultivation was carried out at 25°C for 4 days with medium containing 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 0.05% yeast extract. Ammonium chloride was used as nitrogen source.

FA: Flocculating activity (units/ml), NTU: NTU removal efficiency (%)

능성을 보였다. 이에 따라 균체내 · 외 비질소 유기화합물의 축적, 분비조건에 영향을 주는 C/N ratio를 검토하기 위해 탄소원인 mannitol의 농도 1~4% 범위에서 질소원인 ammonium chloride의 비를 5에서 40까지 조정하면서 응집제 생산능을 조사하였다(Table 3). 그 결과 mannitol 2%의 농도에서 C/N ratio가 40일 때 kaolin에 대한 응집활성이 450 units/ml, 돈분폐수의 NTU 제거율은 73%로 최대치를 나타내었다. Mannitol 농도 3%와 4%에서도 응집활성과 돈분폐수 NTU 제거율이 향상됨을 보였으며 C/N ratio 크기에 따른 영향은 40의 경우가 양호하였고 30~10의 범위에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 서 등<sup>20</sup>도 *Lactobacillus jensenii* YW-33이 생산하는 다당류성 응집제 생산조건 검토시 탄소원으로 sucrose 2.0%와 질소원으로 tryptone을 첨가하였을 때 C/N ratio 40에서 응집활성이 가장 높게 나타났음을 보고하였다.

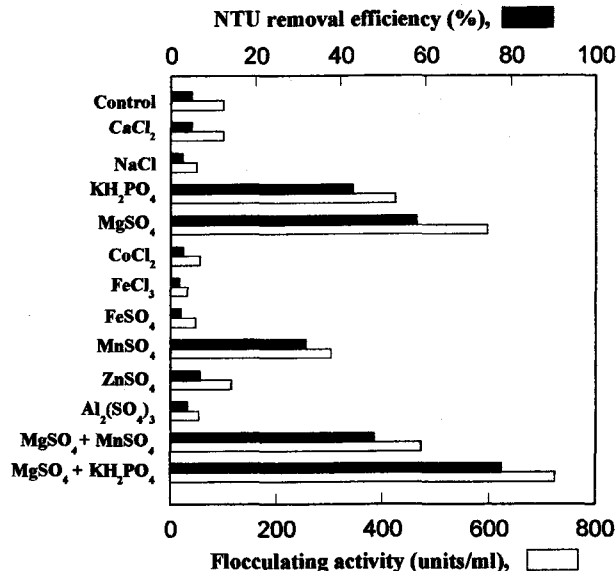
**무기염의 영향**

무기염들이 본 균주가 생산하는 응집물질의 응집능에 미치는 영향을 조사하기 위해 무기염과 금속염을 각각 0.01%와 0.005% 농도로 상기에서 검토한 배지에 첨가하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이 Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 등의 이온과 인산염 첨가시 응집활성이 증가한 반면 Na<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> 등은 감소하는 경향을 나타냈고 기타 염들은 무첨가와 차이를 보이지 않았다. 특히 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O는 무첨가에 비해 약 6배의 활성증가를 보였으며 MnSO<sub>4</sub>와의 복합첨가에 의해 활성은 증가하지 않았으나 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와의 복합첨가시에는 응집활성과 제거율이 각각 7배와 15배 증가함을 나타내었다. 이 결과는 Kurane 등<sup>20</sup>이 *Rhodococcus erythropolis*에 의한 응집제 생산시 검토한 무기염의 영향과 MgSO<sub>4</sub>를 0.02% 농도로 첨가하였을 때 응집활성이 증가한다는 보고와 일치하였다.

이상의 검토결과들로부터 *Aeromonas hydrophila* KH-54의 응집제 생산용지조건을 2.0% mannitol, 0.05% ammonium chloride, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 및 0.05% yeast extract, pH 7.0으로 최적화시킬 수 있었다.

**환경인자들의 영향**

본 균주의 응집제 생산을 최대화시키기 위해 최적배지를



**Fig. 4. Effect of salts on flocculating activity and NTU removal efficiency of swine wastewater.** Inorganic salts of 0.01% an metal salts of 0.005% were added to the medium containing 2.0% mannitol, 0.05% ammonium chloride and 0.05% yeast extract. Cultivation was carried out under cultural conditions as describe in the above experiments.

사용하여, 배양조건 중 환경인자들인 배양온도, 교반조각 및 배양시간의 영향을 검토하였다. 배양온도 10~35°C에서 5°C 차로 조사한 응집활성과 균생육은 선별균주가 수중미생물임에도 불구하고 각각 25°C와 30°C에서 최대값을 나타내었으며 10°C와 35°C에서는 응집활성과 생육이 급격히 저하되었고 15°C와 20°C에서의 응집활성은 배양 6일에서 각각 25°C의 약 60%와 80%를 보였다. 한편 500 ml baffl flask에 배지 100 ml의 working volume으로 50~200 rpr의 범위에서 검토한 교반조건은 150 rpm에서 최대 응집활성을 보였으나 전 실험구가 30% 내외의 차이를 보일 뿐 큰 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과들은 본 균주의 생육 및 응집활성이 양호한 폐수일 경우에는 실제 폐수처리공정 내에 응집제 생산공정을 추가시킴으로써 응집제 생산과 동시에 폐수의 BOD를 저하시키는 공정설계가 가능함을 보여주었다. Fig. 5는 500 ml baffl flask에 100 ml의 최적배지를 넣고 초기 pH 7.0, 배양온도 25°C, 150 rpm으로 회전전 당시 배양시간에 따른 응집활성 및 균의 생육을 조사한 결과로 응집활성과 NTU 제거율이 균의 생육과 함께 증가하여 배양 96시간 부근에서 각각 770 units/ml와 81%로 최대치를 보였다. 이는 균체량 증가에 따라 응집제 생산이 증가한다는 Kurane 등의 보고<sup>20,21</sup>와 일치하는 결과로 미생물이 생산하는 대부분의 응집물질은 1차 대사산물에 속함을 알 수 있다.

**각종 고농도 유기폐수에 대한 응집활성**

Fig. 6은 선별균주 *A. hydrophila* KH-54를 최적배양조건에서 배양하여 얻은 상등액과 각종의 고농도 유기폐수들을 동량씩 첨가하고 1시간 후에 측정된 제거율을 나타낸 값으

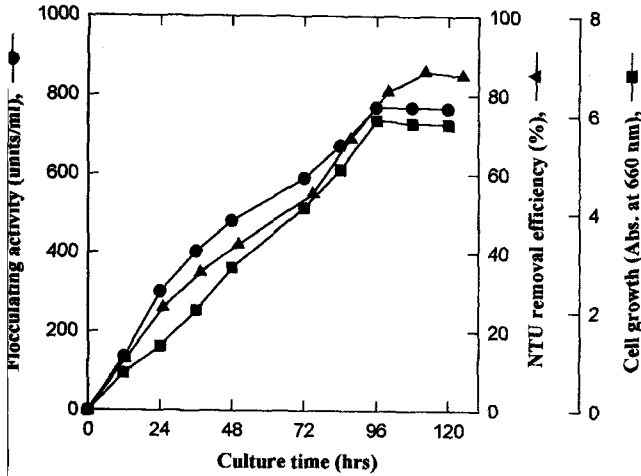


Fig. 5. Time course of flocculant production in flask culture. Cultivation was carried out under optimal culture conditions on rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm.

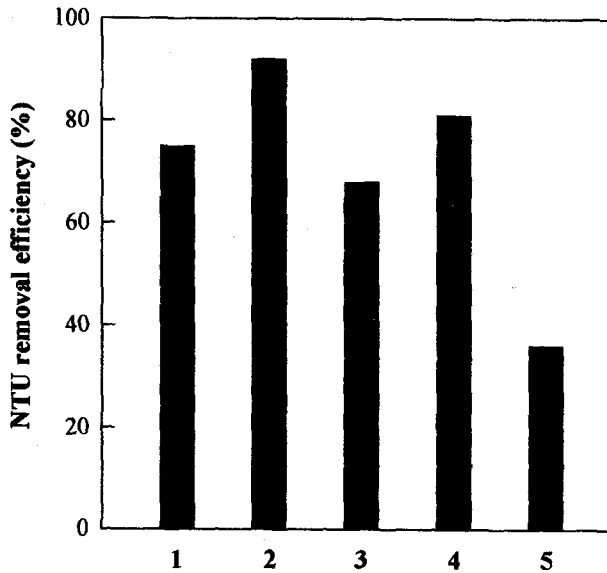


Fig. 6. NTU removal efficiency of flocculant on various organic wastewater with high BOD level. 1: Sugar industry wastewater, 2: Soybean curd wastewater, 3: Alcohol fermentation wastewater, 4: Swine wastewater, 5: Antibiotic fermentation wastewater

본 대상폐수들 중 두부공업폐수가 약 92%의 최대 제거율을 보였다. 반면 항생물질 발효공업폐수는 36%, 주정공업폐수는 68%로 폐수에 따라 큰 차이를 나타내었다. 이는 본 균주가 생산하는 응집물질의 스펙트럼이 넓지 않음을 보여주는 결과로 폐수의 조성이 균일하고 폐수발생공정이 단순할수록 높은 응집성을 나타내는 경향임을 알 수 있었다. 향후 폐수별로 BOD제거율이 높고 생육 및 응집활성이 높은 균주의 개발이 요구되고 있으며 균주의 활성여하에 따라서는 슬러지의 자원화가 가능한 단순 폐수처리공정의 설계가 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단 부설 연구소 과제

연구비에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kawamura, S. (1991) Effectiveness of natural polyelectrolytes in water treatment. *J. Am. Water Works Association* **83**, 88-91.
2. Tsuji, Y. (1994) 凝集分離, 高分子 凝集劑 と 凝集反應. *PPM* **25**(2), 72-73.
3. Robert H. and R. Mitchell (1973) The role of polymers in microbial aggregation. *Annal Review of Microbiology* **27**, 27-30.
4. Pörschmann, S., R. P tz and W. Zirkler (1991) Production of microbial exopolymers for application as flocculants in wastewater treatment. *Acta Biotechnol.* **11**, 583-591.
5. 전병준 (1993) 실무자를 위한 용·폐수 처리기술, 환경관리 인연협 회보. **85**, 40-43.
6. Pullen R.G.L. (1990) Gallium-67 as a potential marker for aluminium transport in rat brain : implications for Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* **55**, 251-260.
7. Kerry L. and O. Charles (1988) Acrylamide : Its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research* **195**, 45-52.
8. Bough, W. A., A. L. Shewfelt and W. A. Salter (1975) Use of chitosan for the reduction and recovery of solids in poultry processing waste effluents. *Poultry Sci.* **54**, 1992-1999.
9. Bough, W.A. (1975) Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.* **40**, 297-232.
10. Kage, H., Y. Matsuno and K. Higashitani (1988) Flocculation of kaolin suspension with cationic polymer. *Can. J. Chem. Eng.* **66**, 728-740.
11. Toeda, K. and R. Kurane (1991) A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **55**(10), 2663-2665.
12. Kurane, R. and Y. Nohata (1991) Microbial flocculation of waste liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agr. Biol. Chem.* **55**(4), 1127-1131.
13. Koizumi, J. and M. Takeda (1991) Synergistic flocculation of the bioflocculant fix extracellularly produced by *Norcardia Amarae*. *J. Gen. Appl. microbiol.* **37**, 447-450.
14. Nam, J. S., G. S. Kwon, S. O. Lee, J. S. Hwang, J. D. Lee, B. D. Yoon and T. H. Lee (1996) Bioflocculant produced by *Aspergillus* sp. JS-42. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**(2), 325-328.
15. Yi, D. H. and D. S. Ham (1995) Characterization of a cell aggregation factor from *Aspergillus* sp. LAM 94-142. *Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol.* **23**(5), 506-508.
16. Takagi, H. and K. Kadowaki (1985) Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces*. *Agr. Biol. Chem.* **49**, 3153-3156.
17. Locci, R. (1989) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Williams, S. T. ed.) Williams Wilkins, London, vol. 4.
18. Murray, R. G. E. (1981) *Manual of Methods for General Microbiology* ASM (American society of microbiology, ed.), Washington, 26.
19. Nakamura, J., S. Miashiro and Y. Hirose (1976) Screening,

- isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 377-383.
20. Kurane, R. (1994) Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohol. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(2), 428-430.
21. Kurane, R. (1994) Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(11), 1977-1980.
22. Seo, H. C., Y. M. Choi, H. Y. Cho and H. C. Yang (1997) Polysaccharide bioflocculant produced by *Lactobacillus jensenii* YW-33 and its production condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(3), 328-334.
23. Kurane, R., K. Takeda and T. Suzuki (1986) Screening for and characteristics of microbial flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **50**(9), 2301-2304.

---

#### Optimization of Bioflocculant Production Conditions for Organic Wastewater Treatment with *Aeromonas hydrophila* KH-54

Ho Chan Seo<sup>1</sup>, Jung Suk Lee, Zuwhan Yun<sup>2</sup>, Yunseok Yi<sup>2</sup> and Hong Yon Cho\* (*Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, <sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, <sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Korea University, Chungnam 339-800*)

**Abstract :** For the need of bio-degradable flocculant in stage of wastewater treatment, some cultural conditions of bioflocculant production were optimized with *Aeromonas hydrophila* KH-54. About 260 strains of type culture and bacteria isolated from marsh, pond, activated sludge, etc were examined for their ability to flocculate kaolin particles and swine wastewater. Among them, KH-54 showed the highest flocculating activity and was identified as *Aeromonas hydrophila* according to the cultural, morphological and physiological properties. The maximum production of the flocculant secreted by *Aeromonas hydrophila* KH-54 was observed in culture medium containing 2.0% mannitol, 0.05% ammonium chloride, 0.02% potassium phosphate dibasic, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 0.05% yeast extract at initial pH 7.0 when cultured on rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm. Under the optimized condition, the flocculating ability reached to 770 units/ml of kaolin flocculating activity and 81% of NTU removal efficiency against swine wastewater after 4 days cultivation. The bioflocculant was also effective on various organic wastewaters other than swine wastewater, showing NTU removal rate ranging from 92% to 34%.

Key words : *Aeromonas hydrophila*, Bioflocculant, Wastewater treatment

\*Corresponding author