

## 메탄자화균에 의한 납의 제거 특성

<sup>1</sup>이 무 열 · †양 지원

<sup>1</sup>동경공업대학 국제개발공학전공, †한국과학기술원 화학공학과  
(접수 : 2000. 7. 11., 게재승인 : 2000. 9. 25.)

## Characteristics of Lead Removal by Methanotrophic Biomass

Moo-Yeal Lee<sup>1</sup> and Ji-Won Yang<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Department of International Development Engineering, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, Japan

<sup>†</sup>Department of Chemical Engineering, KAIST, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Korea

(Received : 2000. 7. 11., Accepted : 2000. 9. 25.)

Nonliving methanotrophic biomass was used as biosorbent to remove lead which is one of representative pollutants in metal-bearing wastewater. Solution pH, maximum uptake, biosorbent dose and ionic strength were considered as major factors for adsorption experiments. The optimum pH range for lead removal was increased 3.8~11.0 for methanotrophic biomass compared to biosorbent-free control, pH of 8.4~11.2. Removal efficiency of lead by methanotrophic biomass was pH dependent, but less sensitive than that of control. In isotherm experiments with 0.2 g biosorbent/L at initial solution pH 5.0, methanotrophic biomass took up lead from aqueous solutions to the extent of 1085 mg/g biomass. Removal amount of lead increased with an increase of biomass dose. According to biomass dose for initial 1000 mg Pb/L at initial pH 5.0, the optimum amount of biomass for maximum lead removal per unit methanotrophic biomass was 0.2 g biomass/L. As a result of scanning electron microscope (SEM) micrographs equipped with energy dispersive spectroscopy (EDS), lead removal by methanotrophic biomass seemed to be through adsorptions on the surface of methanotrophic biomass and exopolymers around the biomass. EDS spectra confirmed that lead adsorption appeared on the biomass and exopolymers that may be effective to lead removal comparing before and after contact with lead. Removal efficiency of lead was slightly affected by ionic strength up to 2.0 M of NaCl and NaNO<sub>3</sub>, respectively.

**Key Words** : Methanotrophic biomass, Biosorption, Lead, Surface adsorption

### 서 론

중금속 함유 폐수 처리에 있어서 가정소나 소다회에 의한 화학적 침전법이 많이 이용되어 온 것은 무엇보다도 운전이 쉽고 처리 비용이 저렴하기 때문이었다. 그러나 이 방법은 저농도에서의 제거율이 낮고 pH의 변화에 매우 민감하며, 음이온 및 여러가지 중금속이 동시에 존재할 때 처리효율이 떨어지고 화학물질 및 응집제의 과다 투입으로 슬러지 발생량이 많다는 단점이 있다(1,2). 앞으로 오염물질에 대한 규제가 점점 더 강화되면 저농도의 중금속에 대해서 처리능이 낮은 화학적 침전법은 새로운 방법으로 대체되거나 추가적인 공정의 설치가 필수적으로 될 것이다. 따라서 지금까지 알려

진 화학적 침전법의 단점을 보완하는 새로운 중금속 함유 폐수 처리법으로서 생물흡착법 (biosorption)이 많은 연구자에 의해서 연구되어 왔다(3-5). 넓은 의미의 생물흡착법은 바이오매스 (biomass)를 이용하여 중금속이나 방사성 핵종을 흡착, 제거하는 방법으로 방대한 표면적을 가지는 미생물의 표면에 폐수 중의 금속 이온들을 다량으로 흡착시켜서 농축시키는 방법이다. 지금까지 알려진 생물흡착제에는 박테리아 (*Citrobacter* sp., *Bacillus subtilis*), 조류 (*Chlorella regularis*, *Ascophyllum nodosum*), 곰팡이 (*Absidia orchidis*, *Aspergillus niger*), 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*), 그 외의 바이오매스 (chitosan, crab shell) 등이 있다(3-6). 생물흡착법에 의한 중금속 제거의 주요 메커니즘은 크게 세포벽 성분과의 흡착, 세포의 고분자와의 반응 또는 흡착에 의한 표면 흡착 (surface binding), 세포내 효소 분비물에 의한 불활성화, 즉 표면 침전 (surface precipitation), 세포내 단백질과의 화학물 형성, 세포내에서 중금속의 변화, siderophores에 의한 중금속의 축적과 같은 내부 축적 (intracellular accumulation)으로 나

<sup>†</sup>Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, KAIST, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Korea  
Tel : +82-42-869-3964, Fax : +82-42-869-3910  
E-mail : jwyang@kaist.ac.kr

눌 수 있으나 현실적으로는 표면 흡착이 주로 연구되어 오고 있다(3-5). 중금속 처리시 흡착능에 영향을 미치는 인자로는 미생물 표면의 기능기(functional groups)의 수 및 형태, 그리고 기능기로서의 중금속의 접근 용이성, 미생물의 크기 및 공극 등이 알려져 있다(3-5). 생물흡착제는 기존의 이온교환 수지나 중금속 흡착제와 비교하여 흡착능이 높기 때문에 비교적 고농도 뿐만 아니라 저농도의 중금속 함유 폐수를 처리하는데 적당하다. 또한 기존의 이온교환수지나 흡착제와 비교하여 제조 비용이 비교적 저렴하며, 칼럼 안에 충전시켜서 운전하거나 직접 살포할 수 있기 때문에 설치가 용이하고 에너지 비용이 낮다. 그리고 넓은 pH의 영역에서 중금속에 대한 높은 흡착능을 보이기 때문에 pH의 변화에 대한 영향이 적고 폐수에 대한 특별한 pH의 조정없이 처리할 수 있다. 또한 각각 다른 최적의 제거 pH 영역을 가진 여러가지 중금속들이 존재할 때 동시에 처리할 수 있다. 칼럼 내에 충전시키거나 작은 비드(bead)로 만들 경우 이온교환수지와 마찬가지로 여러 번 사용이 가능하고 특별한 화학물질 및 응집제의 투입이 필요 없으며,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  등과 같은 알칼리 금속 이온에 대한 영향도 적은 편이다. 그 외에도 pH의 조정이나 화학첨가제를 넣지 않기 때문에  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{HF}$  등과 같은 유독성 가스의 발생 위험이 적으며, 높은 흡착능으로 인해 소량의 농축 폐액이 발생하므로 처리처분의 비용을 줄일 수 있다. 그러나 생물흡착제를 만들기 위해서는 미생물을 배양해야 하므로 경우에 따라서는 높은 배양 비용이 발생할 수 있으며 이온교환법이나 흡착법과 마찬가지로 생물흡착제의 재생이 필요하다. 또한 강산이나 강염기성의 폐수를 처리할 때 유기물질인 생물흡착제가 분해될 위험이 있으며, 음이온이 다량 존재할 때 처리능이 낮아지는 단점은 여전히 존재한다.

본 연구에서는 중금속에 대해 뛰어난 흡착능을 가진 생물흡착제를 개발하고 이의 특성에 대한 기초 연구를 수행하여 기존의 흡착제 보다도 성능이 뛰어나며, 보다 안전하고 경제적으로 중금속을 제거하는데 있다. 생물흡착제와 중금속으로는 메탄자화균과 납이 각각 선정되었으며 용액 pH, 최대 흡착능, 메탄자화균 투입량, 이온강도 등의 영향에 관한 실험을 진행하였다.

## 재료 및 실험방법

### 1. 시약 및 재료

실험에 사용된 납 용액은 lead nitrate ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , Aldrich chemical)를 3차 증류수에 녹인 후 약간의 산을 가하여 pH를 3.0으로 맞추어 stock solution으로 사용하였다. 납 용액의 농도는 원자흡광분석기(Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)로 검증하였으며 필요시마다 일정량을 희석하여 사용하였다. 그 외에 pH 및 이온 강도의 조정을 위해서 Sigma Chemical의 sodium hydroxide (NaOH), nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ), sodium chloride (NaCl), sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ )를 각각 사용하였다.

### 2. 메탄자화균의 분리 및 배양

대전 인근의 토양, 고인 물, 혐기성 발효조 상등 유출수 부근의 토양에서 메탄자화균의 분리를 시도하여 새로운 균주를 분리하였다(7,8). 분리된 메탄자화균은 2 L 발효조 (MultiGen

사, 미국) 2대에서 Higgins nitrate mineral salt (NMS, Table 1) 배지를 이용하여 대량으로 배양하였다. 배양온도는 25~30°C, 교반 속도는 350~400 rpm, pH는 6.8~7.2을 유지하였으며, 기체의 공급 속도는  $\text{CH}_4$ , air,  $\text{CO}_2$ 가 각각 5~6, 45~50, 4~5 mL/min으로 혼합하여 공급하였다. 메탄자화균은 단일 균주로는 성장이 느리기 때문에 여러 가지 메탄자화균을 복합적으로 배양하여 흡착 실험에 사용하였으며, 균주는 배양 후 5~6일 정도 지나면 대수 성장기에 이르렀다. 생물흡착제는 1주일 동안 배양한 혼합메탄자화균 배양액을 15000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균주를 침전시켜 얻었다. 배지 성분들을 없애기 위하여 상등액은 버리고 침전된 균주들을 증류수에 다시 분산시킨 다음 원심분리하여 재침전시켰다. 상등액은 다시 버리고 침전된 균주들을 모았으며, 균주의 표면의 기능기들의 변성을 막기 위해서 동결 건조시켰다. 대부분의 박테리아는 크기가 매우 작기 때문에 분쇄할 필요가 없으나 혼합 메탄자화균의 경우에는 점액성 고분자 물질들이 외부로 분비되어서 미세한 입자로 응집되기 때문에 막자사발로 분쇄하여 사용하였다.

### 3. 흡착실험 방법

용액 pH에 따른 납의 침전능 및 메탄자화균에 의한 흡착능을 알아 보기 위하여 3차 증류수로 stock solution을 희석하여 50 mg/L의 용액을 만들었다. 이때 이온강도는 맞추지 않았으며, pH를 3.0으로 맞추고 질소 가스를 불어넣어 용존되어 있는 이산화탄소를 날려보냈다. 먼저 50 mg/L의 납 용액을 100 mL씩 플라스크 10개에 넣은 후 메탄자화균을 1 g/L씩 넣고  $\text{HNO}_3$ 와 NaOH로 pH를 2~12로 맞추었다. 이 플라스크를 30°C 항온 교반조에서 200 rpm으로 교반하면서 24시간 방치하였다. 그 후 플라스크 속의 용액을 40 mL 취하여 원심분리기에서 15000 rpm, 30분 가량 원심분리하여 상등액을 취한 후 최종 pH를 측정하고 AAS로 분석하였다. Blank 실험으로 메탄자화균을 넣지 않고 유사한 실험을 진행하였다. pH는  $\text{HNO}_3$ 와 NaOH로 각각 2~12까지 맞추었으며, 30°C 항온 교반조에서 200 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 방치하였다. 그 후 침전물을 원심분리기에서 분리한 다음, 상등액을 취해서 AAS로 잔존 납의 양을 분석하였다.

평형 상태에서 단위 메탄자화균 당 납의 최대 제거능을 확

Table 1. Composition of NMS medium (g/L)

Salt solution (10 $\times$ )	$\text{NaNO}_3$	8.5
	$\text{K}_2\text{SO}_4$	1.7
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.07
Phosphate buffer solution (10 $\times$ )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.3
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8.6
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.574
	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.446
Trace metal solution (1000 $\times$ )	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.124
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.096
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.096
	KI	0.166
Iron solution (1000 $\times$ )	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.2

Add 1 and 5 mL of 1 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 1 L trace metal and 100 mL iron solution, respectively. Dilute and mix all the solutions before use

인하기 위해서 200, 400, 600, 800, 1000 mg/L의 stock solution을 제조한 다음 pH를 각각 3.0과 5.0으로 조정하였다. 납은 pH 5.0 이하에서 침전되지 않기 때문에 흡착 실험에서는 5.0와 보다 낮은 pH 3.0을 기준으로 stock solution을 제조하였다. 플라스크에 pH를 조정한 각각의 stock solution을 100 mL씩 넣은 후 생물흡착제를 각각 1 g/L씩 넣었다. 이것을 항온 교반조에서 반응시킨 다음, 마찬가지로 원심분리기에서 메탄자화균을 침전시켰다. 그 후 상등액의 pH를 측정하고 다음 AAS로 분석하였으며 침전된 메탄자화균은 거름종이로 거른 다음, 잘 건조시켜서 전자현미경 (Scanning Electron Microscope, SEM)으로 분석하였다.

메탄자화균 투입량에 따른 납의 제거능을 알아보기 위해서 1000 mg/L의 stock solution을 제조한 다음 pH를 각각 3.0과 5.0으로 조정하였다. 그 후 플라스크에 stock solution을 100 mL씩 넣은 후 메탄자화균을 각각 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g/L씩 넣었다. 이것을 항온 교반조에서 반응시킨 다음, 마찬가지로 원심분리하고 상등액의 pH와 납 농도를 측정하였다.

이온 강도에 따른 납의 흡착능을 측정하기 위해서 초기 pH 5.0, 50 mg/L의 stock solution을 제조한 다음, 100 mL씩을 플라스크에 각각 넣고 NaCl과 NaNO<sub>3</sub>를 넣어서 농도를 0.2~2 M으로 맞추었다. 다음으로 메탄자화균을 1 g/L씩 넣고 항온 교반조에서 반응시킨 다음, 마찬가지로 원심분리한 후 상등액의 pH와 납 농도를 측정하였다.

#### 4. 분석방법

침전 및 흡착 반응을 시키고 난 후 상등액 속에 남아있는 납의 최종 농도를 분석하기 위해서 PERKIN-ELMER 3100 AAS를 사용하였다. 사용된 가스는 air와 acetylene이었으며, 납에 대해서 wave length 283.3 nm, slit 0.7 nm에서 분석을 진행하였다. 표준 용액은 linear range 농도와 3배, 6배 진한 농도를 각각 사용하였다.

납을 흡착하기 전, 후의 메탄자화균의 모양의 변화라든지, 표면에서의 납의 침전이 일어나는지 확인하기 위해서 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS, EDAX international Co. PV 9900)를 장착하고 있는 주사전자현미경 (Philips 535M Scanning Electron Microscope, SEM)을 사용하였다. 먼저, 액체 상태 또는 한천 배지 상의 콜로니를 eppendorf 튜브에 넣고 배지를 넣은 다음 원심분리한 후, 동일한 조작을 3~4회 정도 반복하여 완전히 불순물을 제거하여 현탁시켰다. 납을 흡착한 균주의 경우에는 침전된 균주를 원심분리하여 모아두었다. 단백질을 고정하기 위해서 4°C의 3% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde의 혼합액에 시료를 4시간 동안 담궈 둔 다음, 0.1 M phosphate 완충 용액으로 3회 정도 overnight하면서 세척하였다. 다음으로 지질을 고정하기 위해서 상온의 1% OsO<sub>4</sub>에 1시간 동안 담궈 둔 다음, 0.1 M phosphate 완충 용액으로 10분씩 3회 정도 세척하였다. 시료 속의 물을 제거하기 위해서 각각 10분씩 50%, 70%, 80%, 95%의 에탄올 용액에 담궈 둔 다음, 10분씩 3회에 걸쳐 100% 에탄올에 담궈 두었다. 에탄올을 휘발시키기 위해서 100% 에탄올과 isoamylacetate의 비율을 각각 2:1, 1:1, 1:2로 높여 가면서 10분씩 시료를 담궈 둔 다음, 10분씩 3회에 걸쳐 100% isoamylacetate 용액에 담궈 두었다. 그 후, 80 bar 정도의 고압에서 액체 CO<sub>2</sub>를

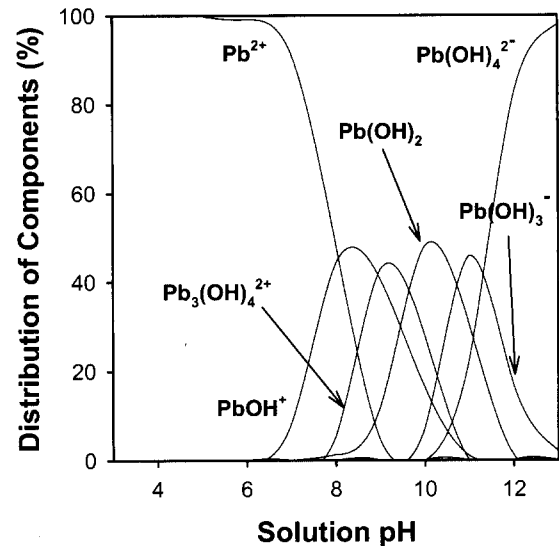


Figure 1. Chemical equilibrium speciations of lead computed by MINTEQA2/PRODEFA2.

공급한 후 31.1°C 정도로 온도를 올리면서 CO<sub>2</sub>를 기화시켜서 시료를 건조하였다. 시료 표면의 charge를 없애기 위해서 gold로 sputtering한 다음, 주사전자현미경으로 관찰하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 1. pH에 따른 메탄자화균의 납 제거능

생물흡착법에 의해 중금속을 제거하기 위해서 메탄자화균 (methanotrophic biomass)을 생물흡착제로 선정하였다. 메탄자화균은 다른 복합 탄소원은 이용하지 못하며 오직 메탄만을 산화시켜 탄소원이나 에너지원으로 사용하는 박테리아로서, 특히하게도 메탄을 이용하여 성장하면서 TCE와 같은 유기오염물질을 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다(7,8). 메탄자화균은 메탄을 메탄올로 변환시키는 methane monooxygenase (MMO)라는 효소를 가지고 있으며, 낮은 기질특이성을 보이는 이 효소의 cometabolism에 의해 TCE를 분해할 수 있다(7,8). 또한 이 균주는 NMS 배지라고 불리는 미량의 금속염 용액 속에서 자라고 성장에 필요한 MMO와 같은 효소들이 모두 금속 이온을 포함하고 있으므로 세포벽을 통해서 내부로 금속 이온을 받아들이는 경로가 잘 발달되어 있을 것으로 사료되었다. 즉, 세포벽에서 금속을 흡착할 수 있는 능력이 많이 분포할 것으로 추측되었기 때문에 생물흡착제로 선정되었다. 앞의 연구에서 분리된 메탄자화균은 다량의 고분자를 세포외로 분비하면서 soluble MMO에 대한 저해제로 작용하는 구리에 대해서 강한 흡착능을 가지고 있었다(8). 메탄자화균에 의한 납의 흡착능을 알아보기 위해서 먼저 평형 상태에서 pH에 따른 납의 제거능을 살펴보았다. 중금속 이온을 제거하는데 있어서 pH는 가장 중요한 역할을 수행하는 인자로 알려져 있다(1,2). 금속 이온의 수중 거동을 알아보는 프로그램인 MINTEQA2/ PRODEFA2의 계산에 의하면, 탄산 이온이 존재하지 않는 낮은 pH에서 Pb<sup>2+</sup>의 형태를 띠고 있는 납 이온은 pH의 증가에 따라서 OH<sup>-</sup> 이온과 결합하므로 PbOH<sup>+</sup>, Pb<sub>3</sub>(OH)<sub>4</sub><sup>2+</sup>의 형태를 띠게 된다 (Figure 1). 약 pH 8

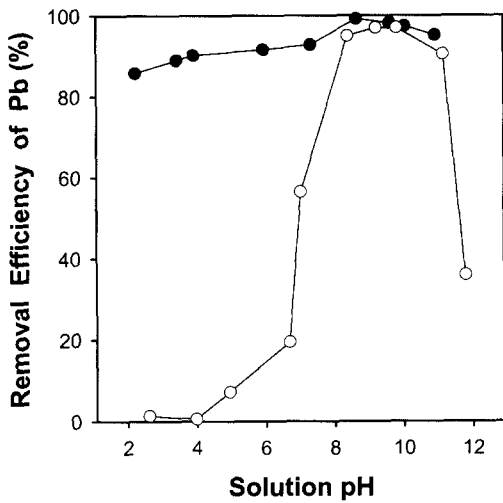


Figure 2. Removal efficiency of lead for initial 50 mg/L with 1 g dry biosorbent/L at various pH value: (●) methanotrophic biomass and (○) without biosorbent.

부근에서는 이온성을 잃게 되어 Pb(OH)<sub>2</sub> 형태의 침전물을 형성하게 되며, 더욱 높은 pH에서는 다시 Pb(OH)<sub>3</sub><sup>-</sup>나 Pb(OH)<sub>4</sub><sup>2-</sup> 형태로 재 용해되게 된다. 따라서 좋은 생물흡착제는 넓은 pH의 영역에서 침전 및 재 용해의 영향이 적으면서 중금속을 흡착하여 제거할 수 있어야 한다. pH에 관한 실험은 기존의 많은 실험에서 일반적으로 알려진 흡착반응이 평형에 이르는 24시간을 기준으로 실시하였다. 흡착 실험은 초기 50 mg/L의 납에 대해 1 g/L의 메탄자화균을 투입한 경우와 투입하지 않은 blank 실험을 동시에 병행하였다 (Figure 2). Blank 실험의 경우 침전된 납의 용해도는 pH 변화에 매우 민감하여 좁은 최적 pH 범위를 벗어날 경우에는 침전되었던 납이 다시 용해되었다. 90% 이상의 납을 제거할 수 있는 최적의 pH 영역은 8.4~11.2로 좁은 편이다. 납은 탄산 이온이나 산소가 없는 경우에 pH 5 이상에서 침전이 일어나기 시작하여 pH가 11 이상이 되면 흰색으로 침전되었던 대부분 재 용해된다 (9). 그러나 메탄자화균을 1 g/L씩 넣었을 경우에는 침전에 의해 제거된 것 보다 납 제거의 최적 pH가 3.8~11.0으로 더욱 넓어졌다. 또한 pH 2 부근의 낮은 pH에서도 80% 이상의 높은 납 제거능을 보였다. 그러므로 낮은 pH에서 납은 메탄자화균의 표면에 흡착되어 제거된 것으로 볼 수 있고 높은 pH에서는 침전에 의해서 제거된 것으로 보였다. Blank에서는 납이 높은 pH 영역에서만 침전되어 제거되므로 불합리한 점이 많을 것으로 보였다. 특히, 침전에 의한 제거는 첨가되는 화학 물질의 양이 많고 최적 pH의 영역이 비교적 좁다. 더욱이 납 함유 침전물을 제거하기 위해서는 응집제를 사용해야 하며 발생한 슬러지 처리를 위한 2차적인 공정도 필요하다. 그런 점에서 메탄자화균에 의한 납의 흡착 제거는 최적 pH가 3.8~11.0로 넓다는 측면에서 유용하다. 특히, 낮은 pH에서도 제거능이 높으므로 산성 영역에서 방출되는 중금속 폐수를 처리하는데 효과적일 것으로 사료되었다.

2. 평형상태에서 단위 메탄자화균 당 납의 최대 제거능

단위 메탄자화균 당 납의 최대 제거능을 확인하기 위하여

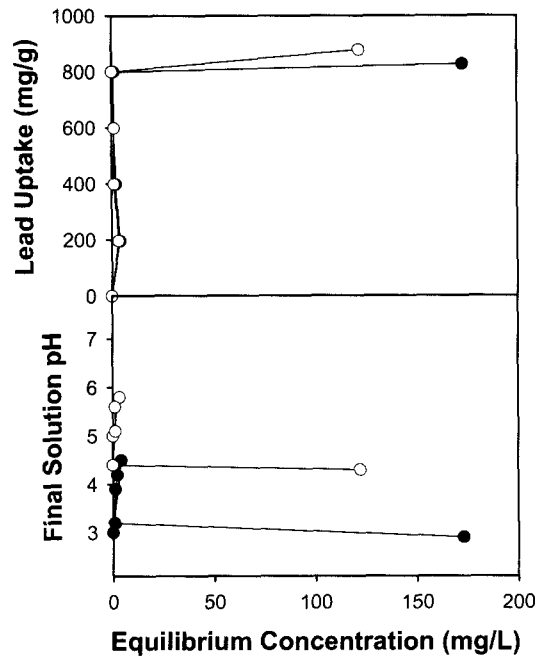


Figure 3. Maximum uptake of lead with 1 g dry methanotrophic biomass at initial pH 3.0 (●) and 5.0 (○).

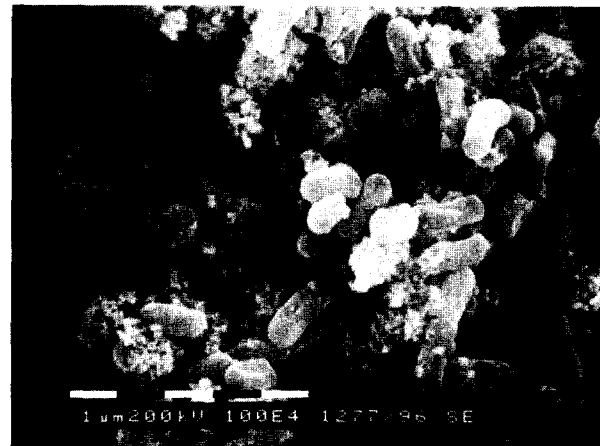
초기 pH 3.0과 5.0의 납 용액에 메탄자화균 1 g/L를 투입하였다. 이때, 납의 제거능은 평형상태에서 메탄자화균에 흡착되어 제거된 납의 양과 액상 중에 남아있는 납의 양의 비로서 표시하였다. 실험은 액상에서 납이 침전되는 것을 막기 위해서 초기 pH 5.0 이하에서 수행하였고, 평형에 이르는 시간은 24시간으로 보아 납의 제거량과 물 속에 남아 있는 양을 비교하여 그림으로 나타내었다 (Figure 3). 결과에 의하면 초기 pH가 낮을수록 납의 흡착능이 떨어짐을 알 수 있었다. 이것은 메탄자화균의 기능기에 H<sup>+</sup> 이온과 Pb<sup>2+</sup> 이온이 서로 경쟁적으로 흡착되기 때문에 생기는 현상으로 보였다. 즉, pH가 낮아질수록 H<sup>+</sup> 이온의 수가 급격히 증가하므로 세포벽의 기능기에서 Pb<sup>2+</sup> 이온을 밀어내고 대신 흡착되므로 흡착능이 떨어지는 것으로 보였다. 메탄자화균은 이전에 사용한 곰팡이 (*Absidia coerulea*)나 조류 (*Thraustochytrium* sp.) 보다도 7~8배 이상의 높은 흡착능을 보였다(10). 초기 pH 5.0에서 들어간 메탄자화균 g 당 최대 제거량은 870 mg, pH 3.0에서는 825 mg의 납이 흡착되어 제거되었다. 최근 여러 연구자에 의한 연구 결과에 의해 *Ascophyllum nodosum*, *Brevibacterium* sp., *Durvillaea potatorum*, *Ecklonia radiata*, *Fucus vesiculosus*, *Penicillium chrysogenum*, *Phellinus badius*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus versicolor*, *Pseudomonas aeruginosa* PU21, *Rhizopus oligosporus*, *Saccharomyces uvarum*, *Sargassum fluitans*, *Sargassum horneri*, *Sargassum sagamianum*, *Streptovorticillium cinnamoneum* 등의 생물흡착제가 새롭게 알려지게 되었으며, 대개 50~370 mg/g biosorbent의 높은 납 흡착능을 보였다 (Table 2). 그 중에서도 우수한 흡착능을 보인 생물흡착제는 대부분 조류와 곰팡이였다. 특히, Matheickal and Yu에 의해 알려진 *Durvillaea potatorum*는 332 mg/g, Holan과 Volesky에 의해 알려진 *Fucus vesiculosus*와 *Ascophyllum*

**Table 2.** Recent studies for the biosorption of lead

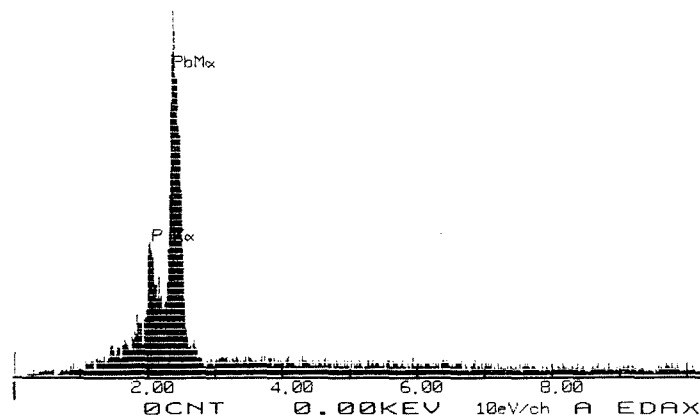
Microorganism	Lead uptake (mg/g)	References
<i>Brevibacterium</i> sp.	74.6	16
brewery yeast	127	17
distillery-derived biomass	189	18
<i>Durvillaea potatorum</i> & <i>Ecklonia radiata</i>	332 & 269	19
<i>Fucus vesiculosus</i> & <i>Ascophyllum nodosum</i> , crosslinked	370	20
<i>Penicillium chrysogenum</i>	116	21
<i>Phellinus badius</i>	170	22
<i>Polyporus versicolor</i> & <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	57.5 & 110	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21	110	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21, calcium alginate-immobilized	332	25
<i>Rhizopus oligosporus</i>	126	26
<i>Saccharomyces uvarum</i>	48.9	27
<i>Sargassum fluitans</i> & <i>Ascophyllum nodosum</i>	369 & 287	28
<i>Sargassum horneri</i>	185.5	29
<i>Sargassum sagamianum</i>	224.5	30
<i>Streptoverticillium cinnamomeum</i>	57.7	31



(a)



(b)



(c)

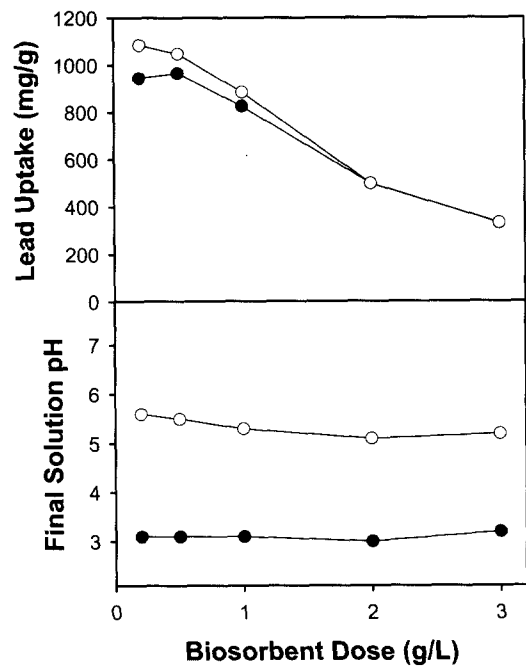
**Figure 4.** SEM of methanotrophic biomass and EDS on the surface of methanotrophic biomass: (A) raw methanotrophs ( $\times 10000$ ), (B) methanotrophs exposed to initial 1000 mg Pb/L at pH 5.0 ( $\times 10000$ ) and (C) EDS peak on the surface of methanotrophs exposed to initial 1000 mg Pb/L at pH 5.0.

*nodosum*의 고정화 담체는 370 mg/g, Chang과 Huang에 알려진 알긴산 고정화 *Pseudomonas aeruginosa* PU21는 332 mg/g, Leusch 등에 의해 알려진 *Sargassum fluitans*도 369 mg/g의 높은 납 흡착능을 보였다. 그외에서 *Macaskie* 등은 박테리아의 일종인 *Citrobacter* sp.를 이용하여 표면 침전의 원리로서 높은 중금속 제거 결과를 얻었다(11). 그러나 이 경우는 흡착이 아니라 효소에 의해서 세포 외부로 방출되는 phosphate를 중금속과 반응, 침전시켜 제거하는 메카니즘이었다. 그러므로 메탄산화균에 의한 납 흡착 제거의 결과는 지금까지 알려진 것들 보다 약 2배 이상의 우수한 결과로 볼 수 있다.

다음으로는 메탄산화균에 의한 납 제거 메카니즘을 규명하기 위하여 납을 투입하기 전 후의 균주를 전자현미경 (SEM)으로 관찰하였다. 또한 균주의 표면을 EDS 스펙트럼으로 관찰하여 어떤 원소들이 주로 존재하고 있는지 분석하였다 (Figure 4). 메탄산화균을 1000 mg/L의 납과 접촉시킨 후 관찰한 결과에 의하면, 메탄산화균은 납을 흡착하기 전과 후에 큰 변화가 없었다. 그림에서 납의 결정 형태의 침전물이 보이지 않는 것으로 보아 납은 침전에 의해서 제거되는 것이 아니라 흡착에 의해서 제거되는 것으로 보였다. 특이한 점은 납과 접촉한 후 메탄산화균 주변의 고분자 물질들이 마치 솜털처럼 보인다는 것이다. 이것에 대해서 보다 확실히 알아 보기 위해서 납을 흡착시킨 메탄산화균에 대해서 EDS 분석한 결과, 고분자 물질들에서 더 많은 양의 납 peak가 관찰되었다 (Figure 4, C). 여기서 인 (P)에 대한 peak가 나타나는 것은 SEM 시료를 준비하는 과정에서 phosphate 완충용액으로 3회 정도 overnight하면서 세척했기 때문으로 사료되었다. 따라서 메탄산화균은 많은 양의 고분자 물질들을 세포 외로 방출하며, 이들은 중금속에 대해 매우 높은 흡착능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 문헌에 의하면 물 속에서 금속 이온은 양 전하를 띠므로 전자가 많은 리간드나 세포벽의 기능기 쪽으로 가서 결합하는 경향이 있다. 예를들어, 곰팡이 세포벽의 주요 성분 중의 하나인 키틴이나 키토산의 oxygen 및 acetamido 그룹 중 nitrogen은 리간드로 작용하여 금속을 흡착할 수 있는 능력이 있어서 여러 가지 금속에 대해서 폭넓은 흡착능이 있다(12,13). 박테리아의 세포벽의 주요 구성 성분은 peptidoglycan이며, 이 중 N-acetyl glucosamine은 금속에 대한 흡착능이 뛰어난 것으로 알려진 키틴의 주요 성분이다. 중금속의 흡착에 중요한 박테리아 세포벽의 음이온 특성은 teichoic acid, teichuronic acid, phospholipid, lipopolysaccharide, N-acetyl glucosamine 등에 의해서 나타나는 것으로 알려져 있다(5).

**3. 메탄산화균 투입량 및 이온강도에 따른 납의 제거능**

우수한 생물흡착제를 선정하기 위해서는 pH에 따른 중금속의 제거능과 평형상태에서 단위 생물흡착제 당 중금속의 최대 제거능을 살펴보면 알 수 있다. 즉, 좋은 생물흡착제는 넓은 pH 영역에서 높은 중금속 제거능을 가지고 있어야 하며, 낮은 pH에서 단위 생물흡착제 당 높은 최대 중금속 제거능을 보여야 한다. 본 실험에서는 초기 일정 농도의 납 용액에 대한 최적량의 생물흡착제 투입량을 결정하기 위하여 평형상태에서 메탄산화균의 투입량에 따른 납 제거능을 살펴보았다. 실험은 초기 pH 3.0과 5.0인 1000 mg/L의 납 용액에



**Figure 5.** Effects of methanotrophic biomass dose for 1000 mg/L of lead at initial solution pH 3.0 (●) and 5.0 (○).

서로 다른 양의 메탄산화균을 투입하여 단위 메탄산화균 당 최대 납 제거능을 알아 보았다 (Figure 5). 결과에 의하면 초기 pH 3.0과 5.0에서 1000 mg Pb/L에 대해서 최적 메탄산화균 투입량은 각각 0.2 g/L이었으며, 그때 단위 메탄산화균 당 최대 납 제거량은 각각 950과 1085 mg/g이었다. 예상했던 바와 같이 메탄산화균의 투입량이 증가함에 따라 제거되는 총 납의 양도 증가하였다. 그러나 이것을 메탄산화균의 질량으로 나누어서 계산해보면 반드시 생물흡착제의 양이 증가한다고 해서 단위 메탄산화균 당 흡착량이 증가하는 것이 아님을 알 수 있었다. 특히 *Absidia coerulea*나 *Thraustochytrium* sp.와 같이 비교적 낮은 흡착능을 보이는 생물흡착제는 생물흡착제의 양이 증가함에 따라 단위 흡착량의 감소가 완만하였으나 (10), 메탄산화균과 같이 높은 흡착능을 보이는 생물흡착제는 매우 급격한 단위 흡착량의 감소를 보였다. 이러한 메탄산화균의 투입량에 따른 단위 흡착량은 초기 납의 농도와 매우 관련이 많았다. 메탄산화균은 흡착능이 높아서 초기 pH 5.0, 1000 mg Pb/L에서 1 g/L의 생물흡착제를 투입하면 약 880 mg/g의 납을 제거할 수 있었으나, 동일한 조건에서 2 g/L를 투입하면 제거능이 499 mg Pb/g으로 떨어졌다. 이것을 역으로 환산해보면 2 g/L의 메탄산화균 투입으로 998 mg의 납이 제거되어 남아있는 납이 2 mg/L 뿐이었다. 즉, 초기 납의 농도에 따라서 최적의 생물흡착제의 투입량이 존재함을 알 수 있었다. 만약 엄격한 환경기준을 지켜야 하는 상황이라면 1000 mg/L의 납을 처리하기 위해서는 최소한 2 g/L 이상의 메탄산화균을 투입해야함을 알 수 있었다. 이것은 중금속 제거를 위해서 화학첨가제를 투입할 때도 마찬가지로 환경기준에 따라서 투입량을 결정한다.

메탄산화균의 이온강도에 따른 납 제거능의 영향을 알아보기 위해서 초기 pH 5.0, 0~2.0 M NaCl 또는 NaNO<sub>3</sub>를 가진

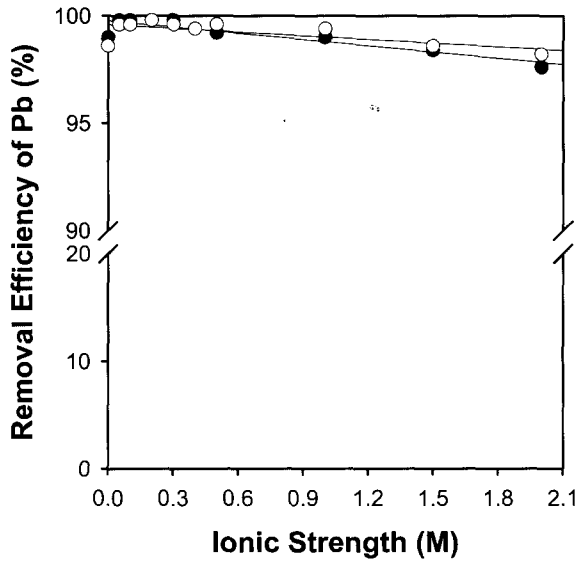


Figure 6. Effects of ionic strength for 50 mg Pb/L, initial solution pH 5.0 and 1 g dry methanotrophs/L: (●) NaCl and (○) NaNO<sub>3</sub>.

50 mg Pb/L에 1 g/L의 메탄자화균을 투입하여 각각 흡착량의 변화를 살펴 보았다 (Figure 6). 실험은 높은 이온강도, 즉 많은 경쟁 이온 속에서 생물흡착제가 납을 얼마만큼 흡착할 수 있는지에 대해서 수행하였으며, 이온강도는 NaCl과 NaNO<sub>3</sub>를 이용하여 조정하였다. 결과에 의하면 메탄자화균은 해수 정도의 높은 이온강도 하에서도 납을 효과적으로 제거할 수 있었다. 그러므로 일반적인 중금속 폐수에서와 같이 여러 가지 이온들이 동시에 존재할 때에도 효과적으로 납을 제거할 수 있을 것으로 기대되었다. 이온교환수지는 중금속 제거의 메커니즘이 이온들의 교환에 의해서 이루어지므로 물 속에 경쟁하는 다른 이온이 존재하면 제거능이 많이 떨어질 수 있으나 생물흡착제는 비교적 다른 이온들의 영향이 적은 것으로 사료되었다. 실제로 도금폐수 처리 공정의 경우는 유출되는 폐수 중에 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> 등과 같은 이온 이외에도 EDTA나 CN<sup>-</sup>와 같은 킬레이트 화합물들이 많이 포함되어 있어서 보통의 침전법이나 이온교환수지에 의해서는 중금속을 효과적으로 제거하기 힘든 것으로 알려져 있다(1,2). 열역학적인 관점에서 볼 때 이런 경쟁 이온의 존재는 생물흡착제나 이온교환수지의 기능기에서의 납과 이온간의 경쟁 뿐만 아니라 물 속의 활동도 계수 (activity coefficient)를 바꿀 수 있다. 이 활동도는 어떤 이온이 물 속에 어떠한 농도로 존재할 때 실제로 나타나는 농도를 의미하므로 경우에 따라서는 1 N의 이온을 투입해도 1 N 만큼 작용하지 않을 수 있다. 그러므로 용액 중의 이온 강도를 바꾸면 활동도 계수가 바뀌게 되므로 용액 중의 성분의 조성이 바뀌게 된다. 따라서 일반적으로 중금속 흡착 실험에서는 다른 이온들의 영향을 줄여주기 위해서 많은 양의 또 다른 이온을 투입하여 이온강도를 고정시켜서 미량으로 들어가는 이온의 영향을 줄이기도 한다(14,15).

결론

중금속 폐수 속에 포함된 납을 제거하기 위한 메탄자화균

을 생물흡착제로 사용하여 평형상태에서 pH에 따른 납의 제거능, 단위 메탄자화균 당 최대 제거능, 메탄자화균의 투입량에 따른 제거능, 이온 강도에 대한 영향 등에 대해서 살펴 보았다. 메탄자화균으로 납을 제거할 때 90% 이상을 제거할 수 있는 최적 pH 영역은 3.8~11.0이었으나 blank로 사용한 침전에 의한 제거는 8.4~11.2이었다. 메탄자화균에 의한 납 제거능은 용액의 pH에 의존하였으나 blank 보다는 심하지 않았다. 초기 pH 5.0에서 0.2 g/L의 메탄자화균을 투입했을 때 단위 메탄자화균 당 최대 납 제거능은 1085 mg Pb/g이었다. 메탄자화균의 투입량이 많아질수록 납의 제거량도 많아졌으며, 초기 1000 mg/L의 납 용액에 대해 단위 메탄자화균 당 최대 흡착량을 보이는 최적 메탄자화균 투입량은 0.2 g/L이었다. EDS를 장착한 SEM의 분석에 의하면 메탄자화균에 의한 납 제거는 세포벽과 세포 외로 방출된 고분자 물질에 의한 흡착으로 사료되었다. 그리고 NaCl과 NaNO<sub>3</sub>에 의한 이온 강도의 영향은 2 M 이상의 높은 농도에서도 비교적 적었다.

감사

본 논문은 한국과학기술원 생물공정연구센터 “생물학적 중금속 제거 및 회수” 사업 및 한국과학기술원 신행원자료연구센터 “신행원자료의 핵주기 및 방사선 관리 연구”의 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다. 이에 감사드립니다. 또한 실험에 많은 도움을 주신 전 진숙 연구원께 진심으로 감사드립니다.

REFERENCES

- Grosse, D.W. (1986), A Review of Alternative Treatment Processes for Metal Bearing Hazardous Waste Streams, *J. Air Pollut. Control Assoc.* **36**(5), 603-614.
- Janson, C.E., R.E. Kenson, and L.H. Tucker (1982), Treatment of Heavy Metals in Wastewaters, *Environ. Prog.* **1**(3), 212-216.
- Volesky, B. and Z.R. Holan (1995), Biosorption of Heavy Metals, Review, *Biotechnol. Prog.* **11**, 235-250.
- Volesky, B. (1987), Biosorbents for Metal Recovery, *Trends in Biotech.* **5**(4), 96-101.
- Voleský, B. (1990), Biosorption of Heavy Metals, CRC Press.
- Muzzarelli, R.A.A. (1978), Chitin, Pergamon Press.
- Lee, M.Y., H.J. Shin, S.P. Yeom and J.W. Yang (1998), Isolation and Cultivation of Methanotrophic Consortium for Trichloroethylene Degradation, *Korean J. Biotech. Bioeng.* **13**(5), 483-490.
- Lee, M.Y., H.J. Shin, S.P. Yeom and J.W. Yang (1998), Biodegradation of Trichloroethylene by a Methanotrophic Consortium, *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **20**(9), 1207-1217.
- Kragten, J. (1978), Atlas of Metal-Ligand Equilibria in Aqueous Solution, Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Lee, M.Y. and J.W. Yang (2000), Biosorption of Lead and Cobalt by *Absidia coerulea* and *Thraustochytrium* sp., *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, accepted.
- Macaskie, L.E., B.C. Jeong, and M.R. Tolley (1994), Enzymically Accelerated Biomineralization of Heavy Metals: Application to the Removal of Americium and Plutonium from Aqueous Flows, *FEMS Microbiol. Reviews* **14**, 351-368.

12. Onsoyen, E. and O. Skaugrud (1990), Metal Recovery Using Chitosan, *J. Chem. Tech. & Biotech.* **49**, 395-404.
13. Tsezos, M. (1983), The Role of Chitin in Uranium Adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Biotech. Bioeng.* **25**, 2025-2040.
14. Reed, B.E. and S.K. Nonavinakere (1992), Metal Adsorption by Activated Carbon: Effect of Complexing Ligands, Competing Adsorbates, Ionic Strength and Background Electrolyte, *Sep. Sci. Tech.* **27**, 1985-2000.
15. Ma, Q.Y., T.J. Logan, and S.J. Traina (1994), Effects of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> on Pb<sup>2+</sup> Immobilization by Hydroxyapatite, *Environ. Sci. Technol.* **28**, 408-418.
16. Vecchio, A., C. Finoli, S.D. Di, and V. Andreoni (1998), Heavy Metal Biosorption by Bacterial Cells, *J. Anal. Chem.* **361(4)**, 338-342.
17. Riordan, C. and A.P. McHale (1998), Removal of Lead from Solution Using Non-living Residual Brewery Yeast, *Bioprocess Eng.* **19(4)**, 277-280.
18. Bustard, M. and A.P. McHale (1998), Biosorption of Heavy Metals by Distillery-derived Biomass, *Bioprocess Eng.* **19(5)**, 351-353.
19. Matheickal, J.T. and Q.M. Yu (1999), Biosorption of Lead(II) and Copper(II) from Aqueous Solutions by Pre-treated Biomass of Australian Marine Algae, *Bioresour. Tech.* **69(3)**, 223-229.
20. Holan, Z.R. and B. Volesky (1994), Biosorption of Lead and Nickel by Biomass of Marine Algae, *Biotech. Bioeng.* **43(11)**, 1001-1009.
21. Niu, H., X.S. Xu, J.H. Wang, and B. Volesky (1993), Removal of Lead from Aqueous Solutions by *Penicillium* Biomass, *Biotech. Bioeng.* **42(6)**, 785-787.
22. Matheickal, J.T. and Q. Yu (1997), Biosorption of Lead(II) from Aqueous Solutions by *Phellinus Badius*, *Minerals Eng.* **10(9)**, 947-957.
23. Yetis, U., G. Ozcengiz, F.B. Dilek, N. Ergen, A. Erbay, and A. Dolek (1998), Heavy Metal Biosorption by White-rot Fungi, *Water Sci. & Tech.* **38(4-5)**, 323-330.
24. Chang, J.S., R. Law, and C.C. Chang (1997), Biosorption of Lead, Copper and Cadmium by Biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21, *Water Res.* **31(7)**, 1651-1658.
25. Chang, J.S. and J.C. Huang (1998), Selective Adsorption/Recovery of Pb, Cu, and Cd with Multiple Fixed Beds Containing Immobilized Bacterial Biomass, *Biotech. Prog.* **14(5)**, 735-741.
26. Ariff, A.B., M. Mel, M.A. Hasan, and M.I.A. Karim (1999), The Kinetics and Mechanism of Lead(II) Biosorption by Powderized *Rhizopus oligosporus*, *World J. Microbiol. & Biotech.* **15(2)**, 255-260.
27. Ashkenazy, R., L. Gottlieb, and S. Yannai (1997), Characterization of Acetone-washed Yeast Biomass Functional Groups Involved in Lead Biosorption, *Biotech. Bioeng.* **55(1)**, 1-10.
28. Leusch, A., Z.R. Holan, and B. Volesky (1997), Solution and Particle Effects on the Biosorption of Heavy Metals by Seaweed Biomass, *Appl. Biochem. & Biotech.* **61(3)**, 231-249.
29. Suh, K.H., K.H. Ahn, B.J. Kim, J.K. Cho, H.J. Jin, and Y.K. Hong (1999), Biosorption and Desorption of Pb by Using *Sargassum horneri*, *Bull. Korean Fisheries Soc.* **32(3)**, 333-337.
30. Suh, K.H., K.H. Ahn, H.S. Lee, H.G. Lee, J.K. Cho, and Y.K. Hong (1999), Biosorption of Pb and Cr by Using *Sargassum sagamianum*, *Bull. Korean Fisheries Soc.* **32(4)**, 399-403.
31. Puranik, P.R. and K.M. Paknikar (1997), Biosorption of Lead and Zinc from Solutions Using *Streptovercillium cinnamoneum* Waste Biomass, *J. Biotech.* **55(2)**, 113-124.