

Trichloroethylene 분해를 위한 혼합 메탄자화균 생물막 반응기의 초기 조건

이무열 · 양지원*

동경공업대학 대학원이공학연구과 국제개발공학전공
*한국과학기술원 화학공학과

(1999년 7월 29일 접수, 2000년 3월 10일 채택)

Initial Condition of Methanotrophic Consortium Biofilm Reactor(MCBR) for Trichloroethylene Degradation

Moo-Yeal Lee · Ji-Won Yang*

Department of International Development Engineering, Tokyo Institute of Technology (TITech)

**Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST)*

ABSTRACT

Mixed methanotrophs (MM) secreting soluble methane monooxygenase(sMMO) were immobilized on celite R-635 to degrade trichloroethylene(TCE) in methanotrophic consortium biofilm reactor(MCBR) system. Further neutralization of celite R-635 was not needed for immobilization because effluent pH was stabilized at neutral after 4 hour washing. It took 130 days to develop biofilm on celite R-635 and the color of the celite changed gradually from white to red. After biofilm developed, influent methane and oxygen were decreased from 2.5~4 and 8~10 ppm to 0.5~1 and 1~2 ppm, respectively. With influent 2 ppm of TCE and 10 hours of retention time, 79.9% of TCE was degraded in the MCBR system.

Key Words : Trichloroethylene, Mixed Methanotrophs, Biodegradation, Soluble Methane Monooxygenase, Continuous Operation

요약문

가용성 메탄산화효소를 분비하는 혼합 메탄자화균종을 celite R-635에 고정화시켜 TCE 분해를 위한 새로운 형식의 가압 산기식 혼합 메탄자화균종 고정층 생물막 반응기를 설계하였다. Celite R-635에서 용출되는 용액의 pH는 약 4시간 후부터 안정화되어서 중성 영역에 도달하므로 더 이상 중화할 필요가 없었다. 혼합 메탄자화균 생물막을 완전히 형성하기 위해서는 130일이 걸렸으며, 처음에 흰색을 띠고 있었던 celite는 점차 붉게 변해 갔었다. 생물막이 형성된 후에는 메탄과 산소를 각각 2.5~4, 8~10 ppm씩 공급할 때 하루 동안 체류한 후 0.5~1, 1~2 ppm 정도로 농도가 낮아졌다. 초기에 2 ppm의 TCE를 메탄자화균 고정층 생물막 반응기에서 10시간 동안 체류시켰을 때 79.9%의 분해 효율을 보였다.

주제어 : TCE, 혼합 메탄자화균, 생분해, sMMO, 연속공정

1. 서론

자연계에서 문제가 되는 난분해성 오염물질 중에는 산소를 필요로 하는 효소(hydroxylase, dioxygenase, monooxygenase 등)를 가진 호기성 미생물에 의해서 분해가 잘 되는 것이 있는 반면에 산소를 전자수용체로 사용하지 않고 NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} 등을 전자수용체로 사용하는 미생물에 의해서 혐기성이나 준혐기성 상태에서 분해가 잘 되는 물질이 있다.¹⁻³⁾ 특히 지하수 및 토양 오염물질 중의 하나로 관심의 대상이 되고 있는 염소계 유기 화합물의 경우는 치환된 염소가 많아서 산화상태가 높으므로 산화반응이 더 이상 진행되기 어렵기 때문에 호기성 미생물에 의해서는 분해가 잘 되지 않는다고 알려져 왔다.^{2,4)} 이 경우에는 혐기적 조건에서 환원 반응을 통해 염소이온을 하나씩 떼어 내는 탈염소화 반응으로 분해를 할 수 있으나 완전히 분해되는 것이 아니라 더욱 유독한 중간생성물로 전환되는 경우가 많았다.⁴⁾ 염소계 유기 화합물 중의 하나로 문제가 되고 있는 TCE의 경우는 휘발성이 강해서 처리하기가 매우 곤란하며, 미생물에 대해서도 독성을 가지고 있다. 또한 비중이 물보다 무겁고 물에 잘 녹지 않으므로 고농도의 TCE는 뭉쳐서 하부에 가라앉아서 지하수 오염의 원인이 되었다.⁵⁾ 이러한 TCE는 호기적 또는 혐기적 조건하에서 모두 분해가 가능하지만 메탄자화균(methanotroph)을 이용하면 호기적 조건에서 유독한 중간생성물의 전환없이 보다

빠르게 분해시킬 수 있다고 알려져 왔다.^{6,7)} 이렇게 메탄을 탄소원이나 에너지원으로 이용하는 메탄자화균은 "cometabolism"이라는 대사과정을 거치며, 호기적 조건하에서 TCE를 비교적 쉽게 분해할 수 있다고 알려져 있다.⁸⁾ 메탄자화균을 이용하여 TCE를 생물학적으로 분해시키고자 하는 연구는 80년대 중반부터 알려지기 시작하였다.⁷⁾ 그 후, 많은 연구자들에 의해서 순수한 메탄자화균이 분리되었고,^{8,9)} 속도론적,¹⁰⁾ 대사론적 연구,¹¹⁾ 변이 균주¹²⁾ 등에 관한 연구가 진행되어 왔다. 90년대 들어와서는 2단 생물 반응기,¹³⁾ 고정층 생물막 반응기¹⁴⁾ 등을 이용한 연속 분해 연구도 진행되어 왔다. 본 연구진은 앞서의 연구에서 새로운 메탄자화균들을 분리하였으며,¹⁵⁾ 이들 균주를 혼합배양하여 TCE에 관한 분해 특성을 살펴보았다.¹⁶⁾ 특히 pilot plant에서 연속적으로 TCE를 분해하기 위해서 멸균하지 않은 상태에서 대량 배양이 가능하며, TCE의 분해에 관여하는 sMMO의 활성이¹⁷⁾ 구리의 존재 하에서도 비교적 저하되지 않는 균주를 분리하는데 성공하였으며, 배양조건, 여러 가지 탄소원과 메탄의 이용능, TCE 분해능, sMMO 활성 등에 대해서도 실험을 진행하였다.

따라서 앞서의 연구에서 확립된 배양조건을 기초로 하여 충전물, 반응기의 형태를 고려하여 pilot plant 규모의 메탄자화균 생물막 반응기를 설계 제작하여 TCE의 분해능 특성을 살펴보고자 하였다. 채택된 반응기 형태는 가압 산기식의 혼합 메탄자화

균 고정층 생물막 반응 시스템으로서 메탄과 산소를 nitrate mineral salt(NMS) 배지 내에 포화시킨 다음, TCE 폐수와 함께 생물막 반응기로 공급하였다.

2. 실험장치 및 방법

2.1. 메탄자화균의 배양

고정화에 사용된 메탄자화균은 이전 연구에서¹⁵⁾ 분리된 혼합 메탄자화균총 MM으로서 NMS 배지에서 배양하였다.^{9,15)} 먼저 밀폐된 가지달린 1000 mL 플라스크에 CuSO₄를 제외한 NMS 배지 300 mL를 넣고 혼합 메탄자화균 배양액을 10% (v/v) 접종하였다. 기체는 메탄 10, 공기 40, 이산화탄소 4 mL/min의 유속으로 12시간 간격으로 30분간 공급한 후 밀봉하였으며, 30°C, 300 rpm의 진탕배양기에서 대수성장기(stationary phase)까지 배양하였다. 이 혼합 메탄자화균 균총은 pH와 온도, 교반 속도가 조절 가능하며 기체가 공급되는 2 L 발효조(MultiGen사, 미국)에서 다시 대수성장기까지 대량 배양되었다. NMS 배지 부피의 10%에 해당하는 배양액을 접종하였으며, 배양온도는 29~32°C, 350~400 rpm, pH는 6.8~7.2, 기체는 메탄 5~6, 공기 45~50, 이산화탄소 4~6 mL/min을 혼합하여 연속적으로 공급하였다.

2.2. 메탄자화균의 고정화

혼합 메탄자화균총의 고정화를 위해서는 celite R-635가 선정되었다(Table 1). 사용된 celite R-635는 SiO₂(82.3%), Al₂O₃(7.2), CaO(2.6), MgO(1.2), Fe₂O₃(1.9), Na₂O(3.3), K₂O(0.9), P₂O₅(0.4), TiO₂(0.2)로 구성되어 있었다. 일반적으로 많은 기공을 가진 담체는 표면적이 넓으므로 용출시키면 초기에 산성이나 알칼리 영역의 용액이 나오는 경우가 많기 때문에 반응기에 충전하기 전에 celite R-635를 NMS 배지에 넣고 진공을 걸어 기포들을 제거한 다음, 300 mL 칼럼에 넣은 후 증류수를 흘려서 유출되는 pH를 1시간 단위로 측정하였다. 유출 pH를 측정한 후 모든 celite R-635는 진

Table 1. Typical properties of celite

Physical properties	R-635
Type and size	pellet 0.25"D×0.50"L
Average pore diameter (μm)	20
Surface area (B.E.T., m ² /g)	0.27
Total pore volume (cc/g)	0.61
Pore volume ratio (1.0~50 μm, cc/g)	0.513 (83.6%)
Water adsorption (wt%, pellet method)	60
Hardness (Monsanto hardness test, kg)	8
Bed density (lbs/ft ³)	32

공을 걸어 기포들을 제거하고 증류수로 세척한 다음 다시 NMS 배지로 세척하여 중성으로 맞추었다. 세척된 celite R-635를 반응기 내에 채운 다음, 발효조에서 대수성장기까지 배양한 혼합 메탄자화균총 접종액을 반응기 부피의 10~20% 정도 공급하였다. 그리고 초기 생물막의 형성시간을 단축시키기 위해서 메탄과 산소를 폭기시킨 NMS 배지를 반응기 안으로 공급시키면서 배지를 계속 재순환시켰다(Fig. 1). 발효조에서 배양한 메탄자화균 접종액은 TCE 공급 라인의 옆 라인을 이용하여 주기적으로 반응기 내에 직접 공급하였다. 메탄 및 산소 폭기조는 하루에 두번, 1시간씩 메탄과 산소의 게이지압 0.2기압 하에서 폭기시킨 다음 각각의 반응기로 유입시켰다. 이때 유체의 흐름은 병렬이며 각각의 반응기를 통과한 유체는 다시 메탄 및 산소 폭기조로 들어간 다음 메탄 및 산소로 폭기된 후 반응기로 재순환시켰다. 모든 배양 실험은 실온, 멸균하지 않은 상태에서 혼합배양하였으며, 메탄자화균의 성장 정도는 주사 전자현미경(SEM)으로 확인하였다.

2.3. 생물막 반응기의 초기 운전 조건

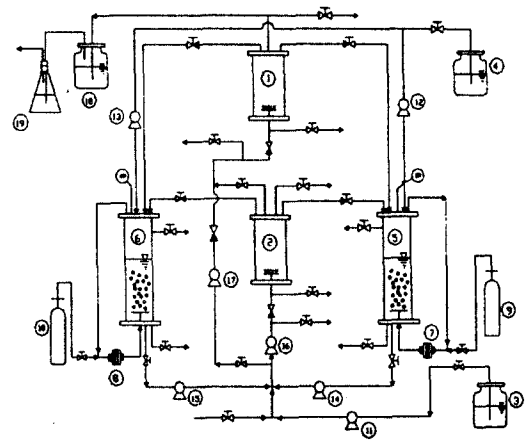
메탄자화균을 접종시킨 후 약 1달이 지났을 때, 미생물의 성장 정도를 간접적으로 유추해보기 위해서 각각의 메탄자화균 고정층 반응기에서 용존산소의 양을 측정하였다. 이때 산소와 메탄으로 폭기된 NMS 배지는 각각 합쳐져서 충분히 섞인 다음 다시 들로 갈라져서 병렬로 각각 메탄자화균 고정층 반응

기 I 과 II 로 들어갔다. 그리고 산소폭기조에서 나오는 NMS 중의 산소의 양과 메탄산화균 고정층 반응기 I 과 II 에서 반응되어 메탄으로 포화된 다음 다시 나오는 유출수 중의 산소의 양을 측정하였다. 측정시에는 관 안의 유체에 의해서 생기는 에러를 줄이기 위해서 시료 용액을 200 mL 정도 뽑아 버린 후 새로 동일한 양 만큼을 취하여 용존 산소의 양을 측정하였다.

혼합 메탄산화균생물막 반응기의 전체 부피는 I 과 II 모두 약 40.7 L 씩이었으며, celite를 충전한 부피는 대략 32.4 L, 상부와 충전물 사이의 총 공극의 부피는 약 25 L 이었다(Table 2). Celite R-635 위에 메탄산화균 생물막이 완전히 형성된 후 TCE의 분해를 위해서, 먼저 TCE 공급 펌프, NMS 배지의 메탄 및 산소 폭기조 공급 펌프, 메탄 및 산소 포화 NMS 배지 공급 펌프는 작동시켰으며, 고정층 반응기 I 과 II 의 유입 펌프는 작동시키지 않았다(Table 3). TCE 폐수는 희석되는 비율을 고려하여 전체 유량의 약 8/10, 나머지 산소 및 메탄 폭기조의 유량을 각각 1/10으로 하여 운전하였으며, 세가지의 흐름이 합쳐져서 직렬로 고정층 반응기 I 과 II 로 들어가도록 하였다(Fig. 1).

2.4. 분석 방법

TCE의 연속 분해능을 측정하기 위해서 사용된 폐수는 수돗물에 TCE를 희석한 것으로 멸균하지 않았으며, 관리 중에 TCE가 휘발되어 양이 너무 적을 때에는 TCE를 다시 spiking하여 사용하였다. 보다 정확한 측정을 위해서 반응기로부터 시료를 200 mL 정도 뽑아서 버린 후 새로 동일한 양 만큼을 샘플로 취하였다. 그리고 PIFE/silicone septa를 가진 8 mL vial 속에 head space가 없이 TCE가 들



- ① methanotropic consortium
- ② biofilm reactor II
- ③ wastewater contaminated by TCE
- ④ NMS medium
- ⑤ methane sparger
- ⑥ oxygen sparger
- ⑦ methane blower
- ⑧ oxygen blower
- ⑨ methane cylinder
- ⑩ oxygen cylinder
- ⑪ TCE feed pump
- ⑫ NMS feed pump to methane sparger
- ⑬ NMS feed pump to oxygen sparger
- ⑭ feed pump of NMS medium with methane
- ⑮ feed pump of NMS medium with oxygen
- ⑯ input feed pump to reactor I
- ⑰ input feed pump to reactor II
- ⑱ waste tank
- ⑲ activated carbon bed

Fig. 1. Diagram of MCBR system.

어 있는 시료 용액을 넣고 주사기로 3 mL 정도 뽑아낸 다음, 내부 표준물질로 1 ppm의 1,3-dibromopropane(DBP)가 포함된 2 mL hexane을 주입하여 TCE를 역추출하여 electron captured detector(ECD)가 장착된 GC(HP 5890II)로 분해된 TCE의 양을 분석하였다. 내경 0.53 mm인 VOCOL capillary column이 사용되었으며, 오븐, injector, detector의 온도는 각각 80 → 160°C (10°C/min), 180°C, 200°C로 설정하였다. 시료 중의 용존 산소의 농도는 DO meter(YSI model 55)로 측정하였

Table 2. Scale of MCBR system

Reactors	Numbers in Fig. 1	Total volume (L)	Liquid volume (L)	Diameter (cm)	Height (cm)
Biofilm reactor I	①	40.7	25.0	25	83
Biofilm reactor II	②	40.7	25.0	25	83
Methane sparger	⑤	54.7	20.0	21	158
Oxygen sparger	⑥	54.7	20.0	21	158

Table 3. Typical operation conditsystememions in MCBR system

Pumps and blowers	Numbers in Fig. 1	Type	Operation condition	Flow rate (mL/min)
TCE feed pump	①	N-Feeder ZA-61	ON (*OFF)	10~60
NMS feed pump to methane sparger	②	LMI P143-151	ON (*OFF)	2~10
NMS feed pump to oxygen sparger	③	LMI P143-151	ON (*OFF)	2~10
Feed pump of NMS medium with methane	④	LMI P143-151	ON	2~10(*50~100)
Feed pump of NMS medium with oxygen	⑤	LMI P143-151	ON	2~10(*50~100)
Input feed pump to reactor I	⑥	LMI P143-151	OFF (*ON)	(*50~100)
Input feed pump to reactor II	⑦	LMI P143-151	OFF (*ON)	(*50~100)
Methane blower	⑧	LMS AC 0602	Periodically ON	41 (L/min)
Oxygen blower	⑨	LMS AC 0602	Periodically ON	41 (L/min)

* Initial operation condition for biofilm development

으며, 메탄 농도는 시료 용액의 head space를 TCD가 장착된 GC(HP 5890II)를 이용하여 분석하였다. 먼저 10 mL의 부피를 가진 bottle을 rubber stopper로 밀봉시킨 후, 10 mL glass syringe로 공기를 두번에 걸쳐 빼내었다. 다음, 5 mL의 시료 용액을 bottle에 넣은 후 손으로 격렬하게 30초간 흔들어서 물속에 있던 메탄을 기상으로 기화시켰다. 다음으로 공기를 bottle 안에 주입하여 대기압 상태로 맞추었다. 그후에 기상을 1 mL gas-tight syringe로 0.5 mL 분취하여 GC-TCD로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. MCBR의 설계시 고려한 사항

혼합 메탄자화균 생물막 반응기(MCBR)는 pilot plant 크기로서 체류시간을 하루로 보아 평균 50 L의 TCE 오염 폐수를 연속적으로 처리할 수 있도록 설계하였다(Table 2). 설계를 할 때는 메탄자화균이 호기성 균주이므로⁶⁾ 반응기 내에서 산소가 고갈되지 않아야 한다는 점과 메탄이 물에 잘 포화되지 않는다는 것을 고려하였다. 그리고 TCE는 30 ppm 정도의 비교적 고농도에서 분리된 혼합 메탄자화균에 대해 독성이 있으며,¹⁶⁾ 생물학적 분해에 의해 생성되는 염소 이온을¹³⁾ 씻어내고 반응기 내에 신선한 NMS 배지를 주기적으로 공급할 수 있도록 생물막 반응기를 둘로 나누어서 하나의 반응기를 세척중일

때에는 다른 하나의 반응기는 운전중인 형식이 되도록 하였다(Fig. 1). 또한 메탄자화균의 성장 및 sMMO 발현을 위해서는 최소한의 질소, 인 및 무기물이 필요하므로¹⁸⁾ 처리 공정에서 TCE 함유 폐수와 함께 NMS 배지를 약간씩 공급하였다. 왜냐하면 TCE로 오염된 지하수나 폐수가 많이 발생하는 것으로 생각되는 전자산업의 경우에는⁵⁾ 무기물을 포함하는 경우가 드물기 때문에 부가적으로 최소한의 첨가는 불가피하다고 보았다. 그 외에도 실제의 처리공정에서는 NMS 배지 보다 처리해야 할 폐수가 훨씬 더 많기 때문에 순메탄과 순산소를 NMS 배지에 폭기하지 않는다면 탄소원 및 전자수용체의 부족으로 메탄자화균들이 잘 자라지 못한다는 점을 고려하였다. 따라서 생물막 반응기는 순수한 산소와 메탄을 NMS 배지 속에 각각 폭기시켜 과량으로 포화시킨 다음 TCE 함유 폐수와 접촉시켜서, 반응기 안에 항상 산소와 메탄이 충분하도록 설계를 하였다. 그러므로 혼합 메탄자화균 생물막 반응기로 유입되는 부분은 산소 및 메탄 폭기조로부터 폭기된 NMS 배지와 TCE를 함유한 합성폐수가 합쳐져서 반응기로 들어가도록 하였다. 설계시 TCE 함유 폐수의 유량은 반응기로 들어가는 전체 양의 8/10이라고 가정하였고, 나머지 산소 및 메탄 폭기조로부터의 NMS 배지의 유량이 각각 1/10이라고 가정하였다. 그런데 운전 초기에는 발효조에서 배양한 고농도의 메탄자화균을 접종하여 담체 위에 흡착시켜 성장시켜야 하므로 TCE 함유 폐수는 공급할 필요가 없었으며, 산소 및 메탄 폭기조에서 산소 및 메탄을 포화시킨 다음 고정층 생물막 반응기 내로 접종액을 공급하면

서 계속 순환시킬 필요가 있었다.

3.2. Celite R-635에 의한 메탄자화균의 고정화

미생물의 고정화는 유체의 전단력에 의해 많은 영향을 받기 때문에 적절한 크기와 많은 기공을 가진 담체를 선정하는 것이 중요하였다.¹⁹⁾ 기초 실험에서 표면 처리되지 않은 유리구(glass bead), 활성탄, 폴리스티렌(스티로폼), 폴리 우레탄 폼(foam) 등이 메탄자화균의 고정화에 문제점을 보였기 때문에 가장 좋은 성능을 보인 celite R-635를 이용하여 고정화를 수행하였다(data not shown). 특히 celite R-635는 비교적 저가이며 미생물에 대한 독성이 없고 다른 유기물질에 대한 흡착능도 낮기 때문에 메탄자화균을 고정화시켜 폐수를 처리하는데 응용될 수 있는 가능성이 큰 것으로 판단되었다. 일반적으로 초기에 빠르게 미생물을 고정화하는데 있어서 간과하기 쉬운 것 중의 하나가 담체의 용출 pH이었다. 특히, 많은 기공을 가진 담체는 표면적이 넓으므로 용출시키면 초기에 산성이나 알칼리 영역의 용액이 나오는 경우가 많았다. 활성탄의 경우에는 원료물질과 제조과정에 따라 표면특성이 틀리기 때문에 pH 2~4 정도의 산성과 pH 9~11 정도의 알칼리 용액이 용출되기도 한다.²⁰⁾ 그러므로 증류수로 중성 영역에 이를 때까지 용출시키거나 산 또는 알칼리로 중화시켜서 미생물의 고정화에 적절한 중성 영역을 유지해야 한다. 따라서 celite R-635의 경우에도 메탄자화균의 고정화를 위해서 용출 pH를 측정하였다(Fig. 2). 실험은 celite R-635를 칼럼에 충전시킨 후 증류수를 흘려서 유출되는 pH를 1시간 단위로 측정하였다. 실험 결과, 용출되는 용액의 pH는 처음에는 8.5 이상으로 다소 높았으나 약 4시간 후부터 안정화되어 쉽게 중성 영역에 도달함을 알 수 있다. 이것은 사용된 celite R-635의 주요 성분이 무기물로 구성되어 있어서 H^+ 나 OH^- 를 흡착할 수 있는 특별한 관능기를 가지지 않기 때문인 것으로 사료되었다. 그러므로 별다른 중화 과정없이 celite를 두번 정도 세척한 다음, 고정화를 위해 반응기 내에 충전시켜서 메탄자화균을 성장시켰다. 사용된 celite R-635는 실리카와 실리케이트 계통의 물질로서 열

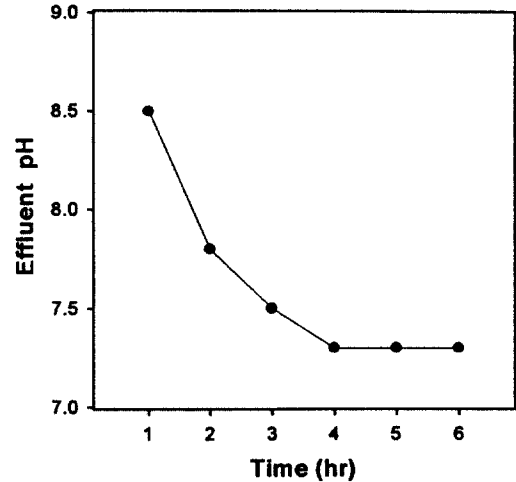


Fig. 2. Effluent pH of celite R-635.

이나 화학물질에 안정하며 기계적 강도가 우수하기 때문에 단단하고 메탄자화균에 의해서 분해되지 않았다. 그리고 기공의 지름이 약 $20 \mu m$ 이기 때문에 메탄자화균 크기의 대략 열배 크기로서 메탄자화균의 성장에 필요한 적절한 크기의 공간을 확보할 수 있었다(Fig. 3(a)). 또한 비교적 기공의 부피가 크며 경도도 크므로 많은 양의 메탄자화균을 고정화시킬 수 있었고 충전 후에도 잘 부서지지 않았다.

3.3. MCBR의 초기 운전 조건

초기의 생물막은 부유된 메탄자화균이 정착되어 형성되므로 반응기 내의 부유 미생물의 농도가 생물막의 형성에 중요한 역할을 한다.¹⁹⁾ 그러므로 반응기 내에 높은 농도의 메탄자화균이 존재한다면 더 많은 수의 균주를 담체에 흡착시킬 수 있다. 따라서 연속적으로 접종 미생물을 공급하거나 접종액의 공급속도 및 재순환 양을 늘림으로서 좀더 빨리 생물막을 형성할 수 있다. 채택된 반응기가 매우 크기 때문에 고농도의 메탄자화균을 연속적으로 반응기에 공급하면서 생물막을 형성시키기 어려웠으므로 주기적으로 메탄자화균을 공급하면서 재순환을 시켜서 메탄자화균 생물막을 형성시켰다. 또한 적절한 pH를 유지한 상태에서 메탄과 산소의 공급을 늘리면서 접종액의 공급속도를 늘려서 생물막의 형성시간을 단축시키도록 하였다. 생물막을 형성하는 초기

Table 4. Dissolved oxygen (DO) after inoculation in a month at MCBR system

Reactor	Measurement position	DO (ppm)
Biofilm reactor I	Influent	8.89
	Effluent	4.35
Biofilm reactor II	Influent	8.54
	Effluent	4.79
Oxygen sparger	Effluent	16.03
Methane sparger	Effluent	4.11

에는 TCE 공급 펌프, NMS 배지의 메탄 및 산소 폭기조 공급 펌프는 작동시키지 않았으며, 메탄 및 산소 포화 NMS 배지 공급 펌프와 고정층 반응기 I 과 II의 유입 펌프를 작동시켰다(Table 3). 그리고 발효조에서 배양한 혼합 메탄자화균이 완전히 자라는 1주일¹⁵⁾ 기준으로 주기적으로 접종시킨 후 약 1달이 지났을 때 메탄자화균의 성장 정도를 유추하기 위해서 각각의 고정층 반응기에서 용존산소의 양을 측정하였다. 일반적인 메탄자화균은 호기성 균주이기 때문에 성장을 하면서 반드시 전자수용체로 산소를 필요로 한다.⁶⁾ 앞의 연구 결과에 의하면,¹⁵⁾ 최적의 성장과 sMMO 발현능을 보이는 조건, 즉 CH₄ 5~6, air 45~50, CO₂ 4~5 mL/min에서 발효조 안의 용존 산소 농도는 평균 3 ppm이었다. 이 농도는 동일한 조건에서 메탄자화균이 없을 때 공기를 폭기했을 때 보다 낮은 농도로서 메탄자화균에 의해서 용존 산소가 많이 없어졌음을 알 수 있었다. 따라서 메탄자화균이 celite R-635 위에 흡착되어 성장을 시작하면 마찬가지로 초기에 공급하였던 용존 산소의 감소 현상이 나타날 것으로 예측되었다. 또한 본 실험에 앞서 기초 실험으로 수행한 300 mL 메탄자화균 생물막 반응기에서 생물막이 완전히 형성되었을 때 용존 산소는 약 1.5 ppm이었다(data not shown). 하지만 pilot plant 규모의 생물막 반응기에서는 접종 후 한달이 지난 다음에도 여전히 용존 산소의 농도가 비교적 높은 것으로 보아서 생물막이 완전히 형성되지 않았음을 간접적으로 알 수 있었다(Table 4). 그러나 130일 정도 후에 메탄자화균 고정층 생물막 반응기에 생물막이 완전히 형성되고 나

Fig. 3. Scanning electron microscope (SEM) micrographs of methanotrophic consortium on celite R-635 after inoculation in 30 day (A) and 130 day (B). (Bars are 10 μ m)

면 마찬가지로 유출수 중의 용존산소의 농도가 1.5 ppm 이하였다.

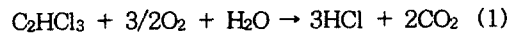
직접적으로 생물막의 형성 여부를 확인하기 위해서 한달마다 반응기 상부의 celite R-635 일부를 채취하여 주사 전자현미경(SEM)으로 관찰하였다(Fig. 3). 혼합 메탄자화균을 접종시킨 후 초기에 흰색을 띠고 있던 celite는 생물막이 형성됨에 따라 붉은색 균주에¹⁵⁾ 의해서 점차 붉게 변해갔다. SEM에 의한 관찰에 의하면 붉은색 균주의 영향으로 celite 표면에 많은 고분자 물질들이 엉켜 붙어 있음을 알 수 있었고(Fig. 3(b)). 이 사이로 원형의 흰색 균주와 막대형의 붉은색 균주가 함께 자라고 있었다. 앞의 연구에서^{15,16)} 흰색 균주가 비록 붉은색 균주보다 TCE 분해능이 뛰어나기는 하지만 정착능

이 붉은색 균주에 비해 떨어지므로 이들을 혼합 배양하여 생물막을 형성시키는 것을 고려하였다. 붉은색 균주는 외부로 점액질의 다당을 방출하기 때문에 고정화의 측면에서 유리한 점으로 작용할 수 있었다. 최초로 메탄자화균을 접종한 후 130일이 지난 후에야 완전히 메탄자화균 고정층 생물막이 형성되었다. 생물막이 완전히 형성된 경우, 메탄과 산소를 각각 2.5~4 ppm과 8~10 ppm씩 공급하면 하루 동안 체류한 후 0.5~1 ppm과 1~2 ppm 정도로 낮아졌다.

3.4. MCBR에 의한 TCE의 분해

메탄자화균 고정층 생물막 반응기의 생물막이 완전히 형성된 후에는 재순환시키지 않고 TCE 함유 폐수를 공급하면서 생물막 반응을 운전하였다. 연속적으로 TCE를 반응기 내에 공급하기 전에 2주일 이상 2 ppm 정도의 TCE를 하루에 8시간 정도씩 공급한 후 펌프를 끄고 반응기 내에서 분해시켜 메탄자화균이 TCE에 적응할 수 있게 하였다. 공급하는 TCE의 농도는 앞의 연구 결과에서 완전 분해 가능한 농도인 5 ppm을 기준으로 이것보다 낮은 값을 설정하였다.¹⁶⁾ 체류시간은 batch실험의 결과를 바탕으로 대략 10시간을 기준으로 하였다. 앞의 연구에 의하면 메탄자화균층이 자라는데 메탄에 의한 기질 저해의 작용이 상당히 크게 나타났으며,¹⁵⁾ TCE의 분해반응에도 경쟁반응을 보이므로¹³⁾ 메탄이 포화된 배지를 과잉으로 공급하는 것은 피했다. 또한 TCE의 독성과 분해에 의해 생성된 Cl⁻ 이온이 축적되므로 메탄자화균이 사멸하기 쉬워서 1주일에 1회 이상 TCE가 포함되지 않은 깨끗한 NMS 배지로 반응기 안을 세척하여 메탄자화균의 활성을 유지시켰다. 실험 결과에 의하면 메탄자화균 고정층 생물막 반응기를 10시간 동안 체류하고 나온 경우에 10일 동안 운전한 평균 TCE 제거능이 79.9%이었다 (Fig. 4). 그리고 잔존하는 TCE의 농도는 대부분 0.3 ppm 정도이었으며, 산소는 2 ppm이었다. 실험에 사용된 GC-ECD 분석조건에서 TCE와 내부 표준물질인 1,3-DBP는 각각 1.83 및 5.61 min에 검출되었기 때문에 서로 간의 간섭은 전혀 없었으며, TCE의 반응 부산물에 의한 피크가 검출되지 않

았기 때문에 TCE는 이산화탄소와 염산으로 완전 분해되는 것으로 간주하였다. 생물막을 완전히 형성하고 난 뒤 용존 산소가 1.5 ppm 이하였는데 비해 TCE를 공급하면 2 ppm 정도로 약간 높아진 것으로 보아 TCE에 의한 저해가 일어난 것으로 추측되었다.¹⁶⁾ TCE가 메탄자화균에 의해서 분해되는 과정은 호기적인 산화이며, 성장 과정에서도 산소가 요구되므로 TCE의 분해와 메탄자화균의 성장을 위해서 충분한 양의 산소를 공급해야 할 필요가 있었다.^{6,13)} 먼저 TCE가 완전 분해되기 위해 필요한 이론적인 산소 요구량을 구해보면 다음과 같다.



따라서 C₂HCl₃ 1 mol(131.5 ppm)을 완전 산화시키기 위해서는 최소한 O₂ 3/2 mol(48 ppm)이 필요하며, O₂/TCE의 질량 비율은 0.365이었다. 또한 메탄자화균의 메탄 대사과정에도 추가로 산소가 필요하므로 더 많은 산소가 공급하여야 했다. 즉 대사과정의 첫 단계인 메탄이 메탄올로 산화되는 과정

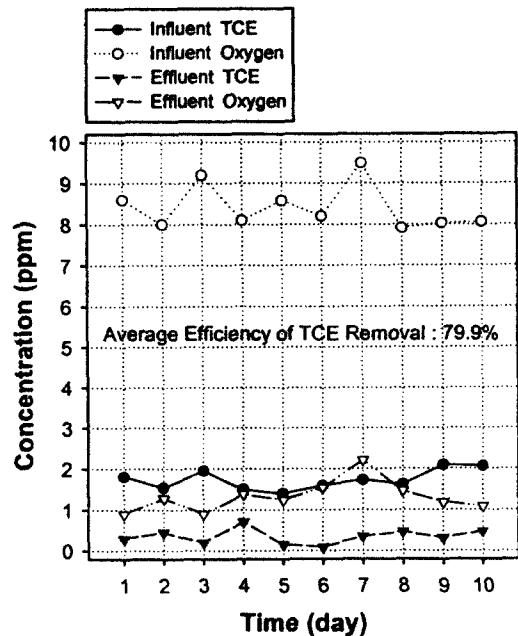
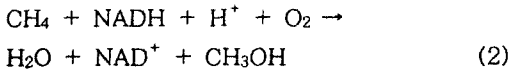


Fig. 4. Continuous TCE degradation in MCBR fed with influent 2 ppm of TCE at 10 hour of hydraulic retention time.

에서 한 분자의 산소가 필요하며, 이 후의 산화반응에서는 산소가 필요없었다.^{6,13)}



따라서 반응기 내에서 메탄자화균을 성장시키기 위해서 1 mol의 메탄을 연속적으로 공급한다면 필요한 O_2/CH_4 의 질량분율은 2.0이며, 메탄과 동시에 C_2HCl_3 1 mol을 완전히 산화시키기 위해서는 적어도 O_2 5/2 mol이 필요함을 알 수 있었다. 만약 메탄자화균이 3 ppm의 메탄을 소비하면서 성장하고, TCE 2 ppm을 연속적으로 분해한다면 이론적으로 필요한 산소의 공급량은 6.73 ppm이 된다는 것을 알 수 있었다. 전체적인 TCE 분해능을 살펴볼 때 채택된 가압 산기식의 혼합 메탄자화균 고정층 생물막 반응 시스템은 멸균시키지 않아도 잠균에 의한 오염이 적으며, 비교적 높은 농도의 TCE 폐수를 빠른 시간 내에 처리할 수 있었다.

4. 결 론

앞의 연구에서 분리된 혼합 메탄자화균총을 이용하여 TCE를 분해하기 위한 새로운 형식의 가압 산기식 혼합 메탄자화균총 고정층 생물막 반응기를 설계하였다. 고정화를 위한 담체는 기초 실험결과를 바탕으로 실리카와 실리카이트 계통의 celite R-635를 선정하였다. 선정된 celite R-635는 대용량으로 제조하기 쉽고 가격이 저렴하며 적절한 크기의 많은 기공과 표면 거칠기가 우수하여 메탄자화균의 고정화능이 우수하였다. Celite R-635에서 용출되는 용액의 pH는 약 4시간 후부터 안정화되어 중성 영역에 도달하였기 때문에 별다른 중화 과정없이 세척한 다음 충전시켰다. 발효조에서 배양한 혼합 메탄자화균총을 접종시킨 후, 처음에는 흰색을 띠고 있었던 celite는 생물막이 형성됨에 따라 점차 붉게 변해갔다. 고정화가 진행될수록 붉은색 계통의 균주의 영향으로 celite 표면에 많은 고분자 물질들이 엉켜 붙어 있었고, 그 사이로 흰색 균주와 붉은색 계통 균주가 함께 자라고 있었다. 접종 130일 후 생물막이 완전히 형성되었고, 메탄과 산소를 각각 2.5~4.8~

10 ppm씩 공급할 때 하루 동안 체류한 후 0.5~1, 1~2 ppm 정도로 농도가 낮아졌다. 그리고 2 ppm의 TCE를 메탄자화균 생물막 반응기에 유입하여 10시간 동안 체류시켰을 때 79.9%의 분해 효율을 보였다. 설계된 혼합 메탄자화균 생물막 반응 시스템은 멸균되지 않은 상태에서도 생물막을 잘 형성하며, 비교적 짧은 시간 내에도 TCE의 분해능이 우수하기 때문에 현장 적용도 가능할 것으로 사료되었다.

사 사

본 논문은 93~95년도 환경부 "G-7 환경공학기술 개발사업"의 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다. 이에 감사드립니다. 또한 실험에 많은 도움을 주신 송선옥 연구원께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Uchiyama, H., Nakajima, T., Yagi, O. and Tabuchi, T., "Aerobic degradation of trichloroethylene at high concentration by a methane utilizing mixed culture," *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1019~1024(1989).
2. Bouwer, E. J., Rittman, B. E. and McCarty, P. L., "Anaerobic degradation of halogenated 1- and 2-carbon organic compounds," *Environ. Sci. Technol.*, **15**, 596~599(1981).
3. Bouwer, E. J. and McCarty, P. L., "Transformations of halogenated aliphatic organic compounds under denitrifying conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1295~1299(1983).
4. Vogel, T. M. and McCarty, P. L., "Bioretransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1080~1083(1985).

5. Storck, W., "Chlorinated solvent use hurt by federal rules." *Chem. Eng. News*, **65**, 11(1987).
6. Dijkhuizen, L., "Methylotrophs." *Biotechnology*. Vol. 1, 2nd, VCH, pp. 266~280 (1993).
7. Wilson, J. T. and Wilson, B. H., "Bio-transformation of trichloroethylene in soil." *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 242~243(1985).
8. Little, C. D., Palumbo, A. V., Herbes, S. E., Lidstrom, M. E., Tyndall, R. L. and Gilmer P. J., "Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium." *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(4), 951~956(1988).
9. Whittenbury, R., Philips, K. C. and Wilkinson, J. F., "Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria." *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 205~218(1970).
10. Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., van der Waarde, J. J. and Janssen, D. B., "Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene." *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(1), 7~14(1991).
11. Alvarez-cohen, L. and McCarty, P. L., "Effects of toxicity, aeration and reductant supply on trichloroethylene transformation by a mixed methanotrophic culture." *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(1), 228~235(1991).
12. Phelps, P. A., Agarwal, S. K., Speitel, G. E. and Georgiou, G., "*Methylosinus trichosporium* OB3b mutants having constitutive expression of soluble methane monooxygenase in the presence of high levels of copper." *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(11), 3701~3708(1992).
13. Mafarland, M., Vogel, C. M. and Spain, J. C., "Methanotrophic cometabolism of trichloroethylene in a two stage bioreactor system." *Wat. Res.*, **26**(2), 259~265(1992).
14. Strandberg, G. W., Donaldson, T. L. and Farr, L. L., "Degradation of trichloroethylene and trans-1,2-dichloroethylene by a methanotrophic consortium in a fixed-film, packed-bed bioreactor." *Environ. Sci. Technol.*, **23**(11), 1422~1425(1989).
15. 이무열, 신현재, 염상필, 양지원, "Trichloroethylene의 분해를 위한 매탄자화균총의 분리 및 배양." *한국생물공학회지*, **13**(5), 483~490(1998).
16. 이무열, 신현재, 염상필, 양지원, "혼합 매탄자화균에 의한 Trichloroethylene의 분해." *대한 환경공학회지*, **20**(9), 1207~1217(1998).
17. Oldenhuis, R., Vink, L. J. M. R., Janssen, D. B. and Witholt, B., "Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase." *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(11), 2819~2826(1989).
18. Park, S. H., Hanna, M. L., Taylor, R. T. and Droege, M. W., "Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. 1: Production of soluble methane monooxygenase." *Biotech. Bioeng.*, **37**, 1037~1042(1991).
19. Annachatre, A. P. and Bhamidimarri, S. M. R., "Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: process startup considerations." *Biotech. Adv.*, **10**, 69~91(1992).
20. Lee, M. Y., Shin, H. J., Lee, S. H., Park, J. M. and Yang, J. W., "Removal of lead in a fixed-bed column packed with activated carbon and crab shell." *Sep. Sci. Tech.*, **33**(7), 1043~1056(1998).