

축산폐수 미생물의 초기적 동정 연구

*김 태 진 · 서 종 원 · 김 진 경 · 김 종 철 · 정 태 훈
수원대학교 공과대학 화학공학과 바이오센서 실험실, ¹(주)바이오텔 중앙연구소
(접수 : 2001. 3. 2., 게재승인 : 2001. 7. 10.)

Initial Study on Behavior of Microorganisms in Livestock Wastewater

Tai-Jin Kim*, Jong-Won Seo, Jin-Kyeong Kim, Jong-Chul Kim¹, and Tae-Hoon Jung¹
Biosensor Laboratory, Department of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Suwon,
Suwon P. O. Box 77, Korea
Biotel Co., Ltd., Suwon 445-743, Korea
(Received : 2001. 3. 2., Accepted : 2001. 7. 10.)

Microorganisms of livestock wastewater were microscopically examined to identify bacillus types with optimal absorbance at 630 nm. Growth curves of microorganisms at various levels of livestock wastewater (5, 10, 20, 30, 40, 50%) and different temperatures (20°C, 37°C) were prepared to determine dilution at which microorganisms did not grow within 1 hour of inoculation, regardless of levels and temperatures. Heat treatment of livestock wastewater at 100°C for 2 minutes was good enough to inhibit the growth of microorganisms at 20°C and 37°C. A good linear relationship was obtained between levels of livestock wastewater and absorbance at 630 nm ($R=98.88\%$) and dry cell weight (98.98%). The dry cell weight of microorganisms in livestock wastewater was 0.375 g/L.

Key Words : livestock, wastewater, microorganism, dry cell weight, absorbance

서 론

급속한 경제성장으로 육류와 유제품의 소비가 늘면서 국내 축산업의 규모는 점차 대형화되고 축산농가의 수 또한 증가하고 있다. 이와 함께 축산폐수의 발생량도 급증하게 되었지만, 각 단위 농가로부터 발생하는 고농도의 유기폐수는 처리되지 않은 상태로 하천으로 유입되어 하천과 호소의 부영양화를 초래하고 상수원을 크게 오염시키고 있다. 또한, 축산폐수는 병원성 미생물에 의한 지하수 오염을 가져오는 주요인으로 지적 받고 있다(1).

이러한 축산폐수의 처리는 침전, 흡착, 중화, 응집, 부상, 역삼투 등의 물리화학적 방법과 세균, 균류, 원생동물, 조류 등을 이용한 생물화학적 처리 방법이 있다. 이 중에서 생물화학적 처리방법은 호기 혹은 혐기 조건에서 미생물의 대사작용을 이용하여 축산폐수 내에 존재하는 유기물을 분해, 합성, 변환시켜 처리하는 방법이다(2).

따라서, 생물학적 처리 방법에서는 미생물 성장 형태가 폐

수처리의 효율을 결정하는 매우 중요한 요소로 부각된다. 특히, 산소소모속도(oxygen uptake rate, OUR)를 이용한 활성도 평가에서는 미생물의 성장곡선을 파악하면 그의 평가가 매우 용이하게 되기 때문이다(3,4).

본 논문에서는 현재 국내 축산 농가의 폐수 내부에 존재하는 미생물의 일반적인 성장 형태를 시간에 따라 파악하여 성장곡선을 구하고자 하였다. 이를 위하여 폐수 내부에 존재하는 대표적인 미생물을 일차 동정 후 일정 조건에 따라 배양하여 세포농도 증가에 따른 흡광도의 변화를 측정하였고, 건조세포무게와의 선형성 관계를 구함으로써 축산폐수 내의 미생물의 성장 형태를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 미생물 배양

실험에 사용된 축산폐수의 시료는 경기도 화성시에 위치한 축산 기술연구소 내의 축산폐수 처리장에서 채취하였으며, 이는 돈사에서 유출된 분뇨를 일차적으로 스크린(400×400) 처리한 상태의 축산폐수이었다. 채취장소는 실험실로부터 10분 정도의 거리에 위치하고 있어 운반도중의 폐수의 변질은 없다고 할 수 있으며, Whatman No. 1 여과지로 여과후 4°C 냉장 보관하여 사용하였다.

축산폐수 미생물의 배양은 250 mL 삼각플라스크에 50 mL의 LB broth media (Luria-Bertani broth: yeast extract 0.5%,

*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
College of Engineering, University of Suwon, Suwon P. O.
Box 77, Suwon 440-600, Korea
Tel : +82-31-220-2602, Fax : +82-31-220-2601
E-mail : tjkim@mail.suwon.ac.kr

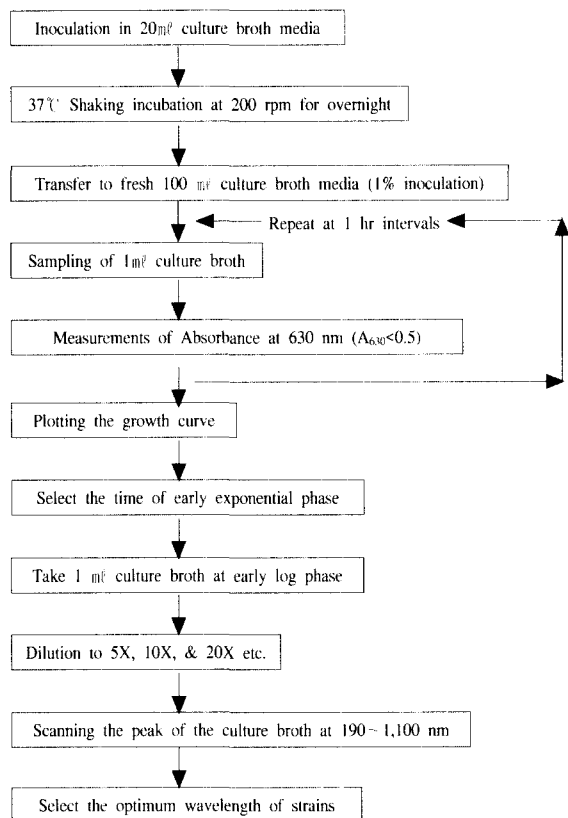


Figure 1. Schematic diagram for determination of optimum wavelength of microorganisms in livestock wastewater.

Bacto-tryptone 1.0%, NaCl 1.0%; pH 7.0)를 준비하여 121°C에서 15분간 멸균(Autoclave, SS-325, Tomy Seiko, Japan)한 후, 축산폐수 원액을 1% 접종하여 37°C에서 200 rpm 조건으로 overnight 진탕 배양(Shaking incubator, C-SIL, JISICO, Korea)하였다.

현미경 관찰

축산폐수 내의 미생물의 존재여부와 형태를 관찰하기 위하여 여과지로 여과된 축산폐수를 20 mL LB 액체배지에 1% 접종한 후 37°C에서 200 rpm으로 overnight 진탕 배양한 후 적당한 배율로 희석하여 광학현미경(Selopt SL8-M2, Seoul Optical, Korea)과 Camera(CCD color, Toshiba, Japan)를 이용하여 축산폐수 배양액을 관찰 및 촬영하였다.

최적흡수파장 선정

축산폐수 원액을 20 mL LB 액체배지에 1% 접종한 후 37°C에서 200 rpm으로 overnight 진탕 배양하여 축산폐수 내의 미생물을 활성화시킨 후 다시 100 mL의 LB 액체배지에 이 배양액을 1% 접종한 후, 매 시간마다 배양액 1 mL를 sampling하여 UV-VIS spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu, Japan)를 이용하여 630 nm에서 흡광도가 0.5이하가 되도록 적당한 배율로 희석하여 성장곡선을 구하였다. 이 곡선에서 초기 대수성장기에 있는 배양액 1mL를 채취하여 5배, 10배, 20배, 50배 등으로 희석하여 UV-VIS spectrophotometer(UV-2401PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 190 nm부터 1100 nm

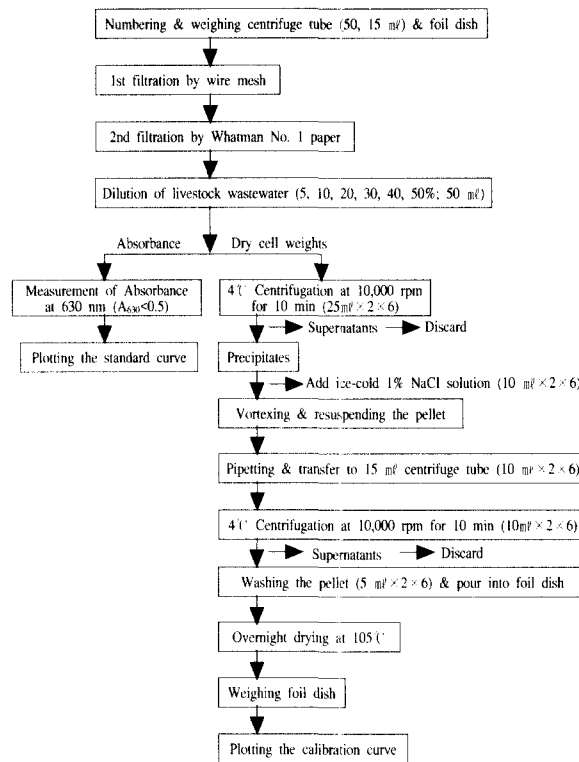


Figure 2. Schematic diagram for determination of dry cell weights of microorganisms in livestock wastewater.

까지의 흡수과정을 scanning하여 축산폐수 농도에 대하여 선형성을 나타내는 최적흡수과정을 선정하였다(Figure 1).

성장곡선 측정

축산폐수를 원액의 농도별(5, 10, 20, 30, 40, 50% v/v)로 희석한 후 6 일(144 hr) 동안 배양하면서 630 nm에서의 배양액의 성장곡선을 구하여 축산폐수 내 미생물의 성장 형태를 확인하였다. 이를 토대로 축산폐수 원액 농도(5, 10, 20, 30, 40, 50% v/v)에 따른 온도별(20, 37°C) 성장곡선(0~10 hr)을 작성하여 온도증가에 의한 성장 형태의 안정성을 검토하였다. 한편 다양한 시간별(0, 2, 5, 10, 20 min) 100°C 증탕에 의한 부분 사멸된 축산폐수 원액의 성장곡선을 측정하여 변화를 비교하였다. 이를 통하여 20°C 및 37°C의 온도 변화에 따른 축산폐수 미생물의 농도(X)가 임의의 측정시간인 1시간 동안에 일정한지 여부를 검정하였다.

표준곡선 및 건조세포무게 측정

축산폐수 원액의 농도별 50 mL sample을 준비하여 4°C, 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(Centrifuge, RPR20-2, Hitachi, Japan)하여 상등액을 제거하고 침전물을 획득하였다. 여기에 냉장 보관된 1% NaCl 용액 10 mL를 첨가하여 녹인 후 4°C, 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(Centrifuge, V1512AS, Vision, Korea)하여 상등액을 제거하고 침전물을 획득하여 냉장 보관된 5 mL의 증류수를 첨가하여 세척한 후 105°C dry oven(Mechanical convection oven, C-DM2, JISICO, Korea)에서 overnight 건조시킨 후 건조세포무게를 측정하여 축산폐수 원액 내의 미생물의 세포농도 증가에 따른 표준곡선 및 건조세포무게와의 상관관계를 구하였다(Figure 2). 구한 상관관계

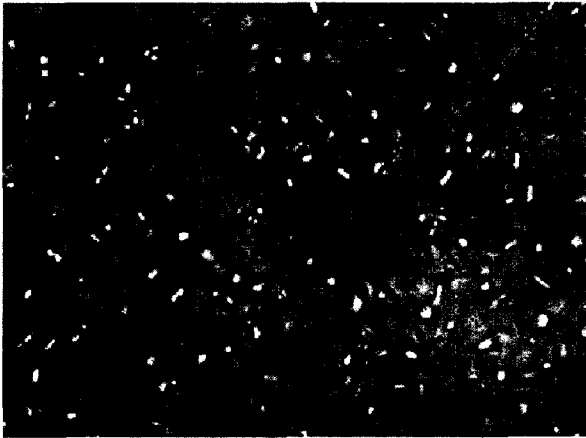


Figure 3. Photomicrography of microorganisms in livestock wastewater ($\times 400$).

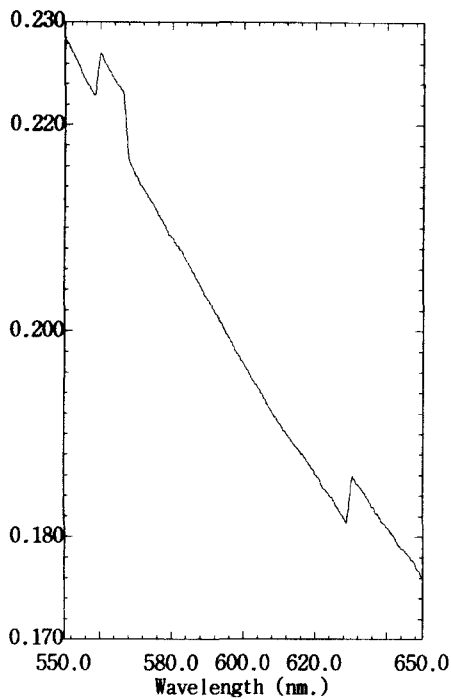


Figure 4. Scanning diagram for optimum wavelength of microorganisms in livestock wastewater.

식을 이용하여 축산폐수 내 미생물의 건조세포무게(dry cell weights)를 구하였다.

결과 및 고찰

현미경 관찰

채취한 축산폐수 배양액 내의 미생물의 존재여부를 광학현미경(배율 400배)으로 관찰한 결과, 축산폐수 내의 미생물은 주로 bacillus 계통의 복합 균주들로 구성되었다(Figure 3).

최적흡수파장 선정

축산폐수 배양액 내에 존재하는 미생물은 560 nm 및 630 nm에서 나타났으며(Figure 4), 민감도가 높은 630 nm를

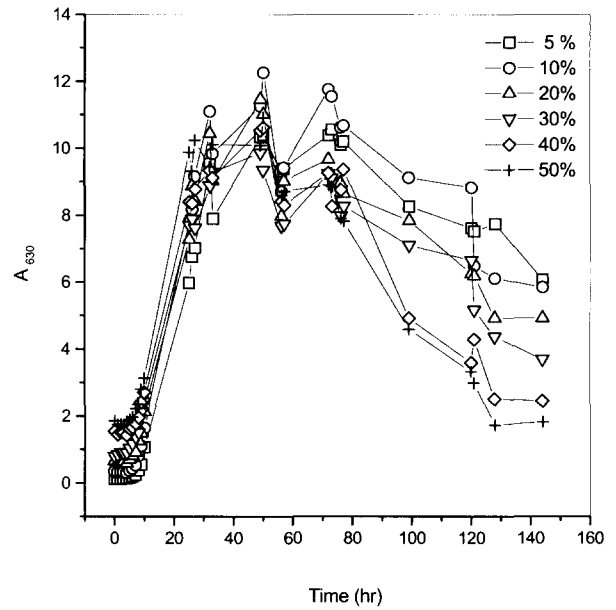


Figure 5. Growth curve of microorganisms in livestock wastewater for 144 hours at 20°C.

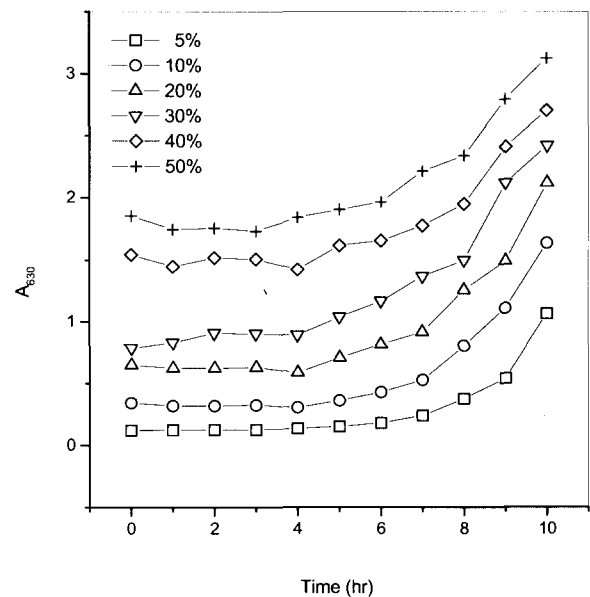


Figure 6. Growth curve of microorganisms in livestock wastewater for 10 hours at 20°C.

최적흡수파장으로 선정하였다.

배양온도별 성장곡선 분석

축산폐수 접종량별(5, 10, 20, 30, 40, 50%) 배양액의 성장곡선(0~144 hr)을 Figure 5에 도시한 바와 같이 축산폐수 내에 존재하는 미생물의 성장형태를 확인하였다. 배양온도 20°C(Figure 6) 조건하에서는 6~7시간 이후부터 그리고 37°C(Figure 7) 조건하에서는 5~6시간 이후부터 성장하기 시작하여 세포농도가 증가하는 것으로 나타남으로써, 축산폐수 내에 존재하는 미생물은 1시간 이내에는 일반적으로 가시적 성장을 나타내지 않음을 확인하였다.

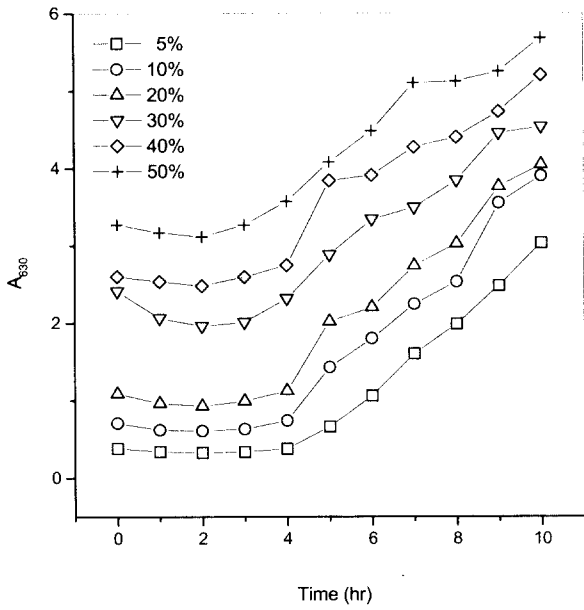


Figure 7. Growth curve of microorganisms in livestock wastewater for 10 hours at 37°C.

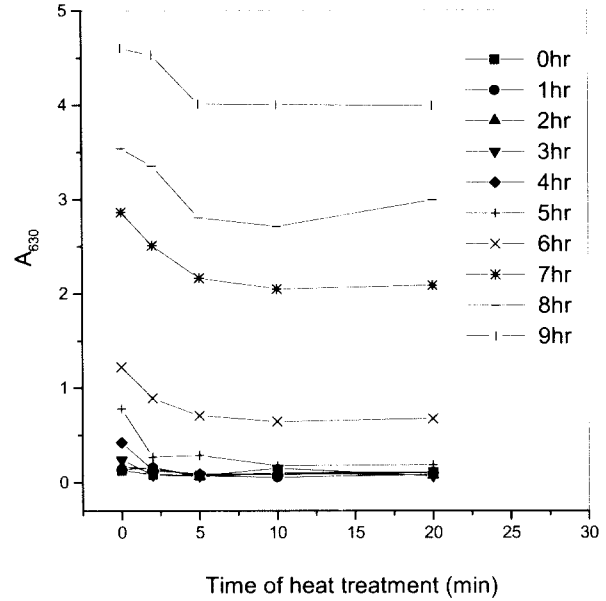


Figure 9. Absorbance change of microorganisms in livestock wastewater cultured for every hour up to 9 hours at 37°C with respect to various duration of 100°C heat treatment.

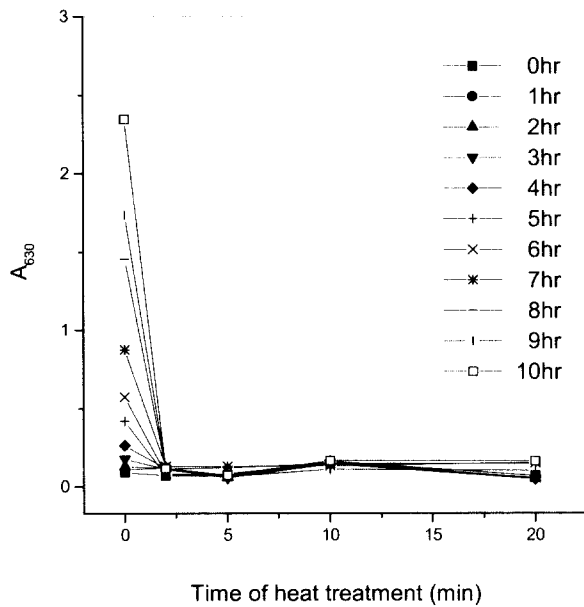


Figure 8. Absorbance change of microorganisms in livestock wastewater cultured for every hour up to 10 hours at 20°C with respect to various duration of 100°C heat treatment.

100°C 열처리 후 성장변화 분석

축산폐수 원액 내 미생물의 100°C 중탕에 의한 사멸정도를 알아보기 위해 시간별(0, 2, 5, 10, 20 min)로 중탕한 후 20°C 와 37°C에서 배양한 결과 20°C 조건하에서는 열처리하지 않은 시료를 제외하고는 100°C 중탕의 시간에 관계없이 10시간 이내에서는 모두 성장하지 못하였다(Figure 8). 37°C 조건하에서는 배양한 후 5시간 이상 지난 시료들은 100°C 열처리 영향을 크게 받지 않고 성장하였다. 따라서 축산폐수를 100°C로 2분 이상 중탕 처리하여 20°C 및 37°C에서 배양하면 배양시간 1시간 이내에는 온도에 관계없이 미생물의 성장 변

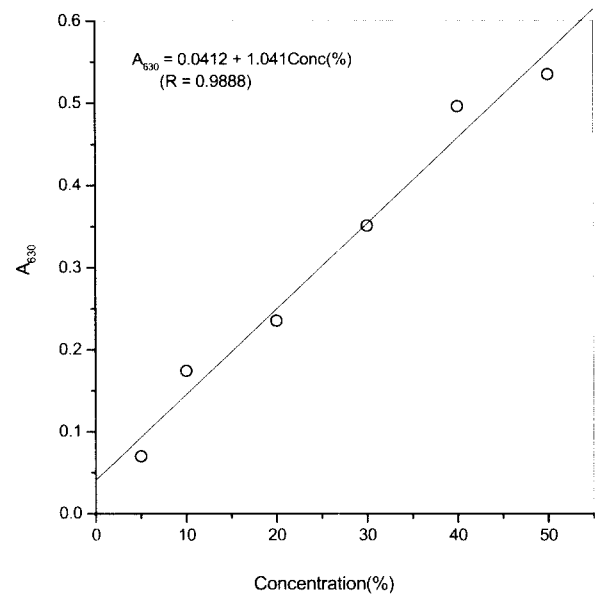


Figure 10. Standard curve of microorganisms in livestock wastewater.

화를 무시할 수 있음을 확인하였다.

표준곡선 및 건조세포무게 측정

축산폐수 내에 존재하는 미생물을 순수하게 분리·여과한 후 축산폐수의 세포농도 증가에 따른 흡광도 표준곡선(Figure 10) 및 건조세포무게(Figure 11)와의 상관관계식을 각각 구하였다. 따라서 Figure 11의 경우 축산폐수 농도가 100%일 경우, 즉 순수한 축산폐수만 존재할 때 건조세포무게 농도는 0.375 g/L임을 알 수가 있었다.

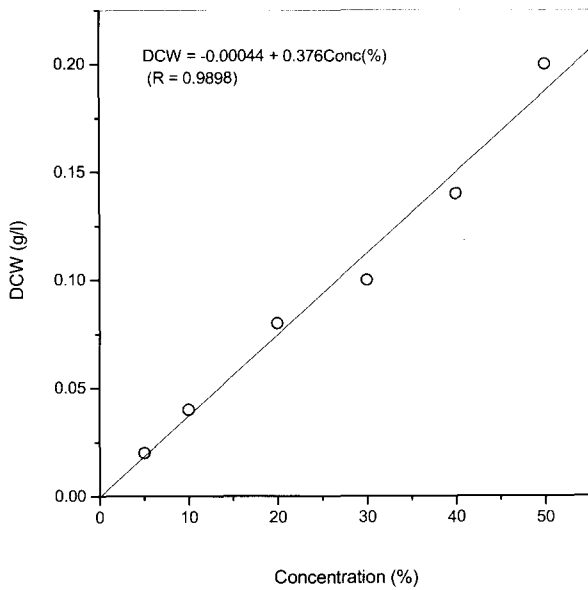


Figure 11. Dry cell weights of microorganisms in livestock wastewater.

요 약

축산폐수 배양액을 현미경으로 관찰한 결과 축산폐수 내에는 주로 bacillus 계통의 균주들이 존재함을 확인하였고, 미생물 농도 측정을 위하여 630 nm를 최적흡수파장으로 선정하였다. 축산폐수 원액의 접종량(5, 10, 20, 30, 40, 50%) 및 온도 변화(20℃, 37℃)에 따른 성장곡선을 구한 결과 20℃에서는 6~7시간 이후부터, 37℃에서는 5~6시간 이후부터 세포 농도가 증가하였다. 따라서 축산폐수 내에 존재하는 미생물은 1시간 동안 미생물의 농도(X)가 일정함을 확인하였다. 축산폐수를 100℃로 2분 이상 중탕 처리하여 20℃ 및 37℃에서 배양하면 1시간 이내에는 온도에 관계없이 미생물의 동정이 변화 없음을 확인하였다. 축산폐수 내에 존재하는 미생물을 순수하게 분리·여과한 축산폐수의 세포농도는 흡광도 및 건조세포무게와 각각 높은 선형성(98.88% 및 98.98%)을 나타내었다. 이때 축산폐수 원액의 경우에는 0.375 g/L의 건조세포무게 농도가 존재함을 확인하였다.

감 사

본 연구 결과는 1999년도 농림부에서 시행한 농림기술개발사업(과제번호 : 2960325)의 재정적 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Park, S. H. and M. S., Zong (1992), A study on treatment of livestock wastewater by sequencing batch reactor, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, **18**, 62-66.
2. Suh, S. K., J. H. Kim, and Y. H. Kim (1997), Treatment of wastewater from acetaldehyde plant by activated sludge process, *J. of the Korean Environmental Sciences Society*, **6**, 259-265.
3. Aiba, S., A. E. Humphrey, and N. F. Millis (1973), *Biochemical Engineering*, 2nd ed., p. 332, Academic press, New York.
4. Taguchi, H. and A. E. Humphrey (1966), Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems, *Journal of Fermentation Technology*, **44**, 881.
5. Fair, G. M. and J. C. Geyer (1954), Water supply and waste water disposal, In *Disinfection*, John Wiley & Sons, New York.
6. Fair, G. M., J. C. Geyer, and D. A. Okun (1968), Water purification and waste water treatment and disposal, In *Disinfection*, John Wiley & Sons, New York.
7. Lamanna C. and M. F. Mallette (1965), Physical factors affecting bacteria and on disinfection, In *Basic bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore.
8. Weber W. J. and H. S. Posselt (1972), *Physical processes for water quality control*, In *Disinfection*, John Wiley & Sons, New York.
9. Koch, A. L. (1995), *Bacterial growth and form*, Chapman and Hall, New York.
10. Monod, J. (1949), The growth of bacterial cultures, *Annu. Rev. Microbiol.*, **3**, 371-394.
11. Neidhardt, F. C., R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (1996), *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington DC.
12. White, D. (1995), *The physiology and biochemistry of prokaryotes*, Oxford University Press, New York.
13. Bitton, G. (1994), *Wastewater Microbiology*, Wiley-Liss, New York.
14. Michael, T. Madigan, John M. Martinko, and Jack Parter (1997), *Microbial growth*, In *Brock biology of microorganisms*, 8th ed., p150, Prentice-Hall International.