

울산광역시 삼산동 매립장 침출수 처리를 위한 AquaMats[®] 상에서 미생물의 분리 및 동정

이 준 우 · 김 좌 관
부산가톨릭대학교 환경공학과
(2006년 5월 25일 접수; 2006년 12월 20일 채택)

Isolation and Identification of Microbes from AquaMats[®] for the Treatment of Leachate Originated with the Samsan Dong Landfill in Ulsan Metropolitan City

June-Woo Lee and Jwa-Kwan Kim

Department of Environmental Engineering, Catholic University of Pusan, Pusan 607-757, Korea
(Manuscript received 25 May, 2006; accepted 20 December, 2006)

The high surface area polymer, AquaMats[®] was used for the leachate purification process originated from the Samsan Dong Landfill in Ulsan Metropolitan City. And then, three species of dominant microbes were isolated and identified from AquaMats[®].

Gram staining revealed these microbes to be Gram-negative rod strains: They were identified as *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas cepacia*, *Flavobacterium indologenes*. All they showed no growth on media in which the leachate was added alone, but a rapid proliferation rate on media with yeast extract as nutrient requirements.

Key Words : AquaMats[®], *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas cepacia*, *Flavobacterium indologenes*

1. 서 론

현재 국내에서 운용되고 있는 위생매립시설의 설계 및 시공에 있어서 가장 중요한 요소 중의 하나가 침출수 처리 시설이다. 적절하게 처리되지 않은 침출수는 인근의 지하수, 지표수 등 수자원과 토양을 오염시키고 주변 생태계 파괴를 초래할 수도 있어 침출수 처리는 매립지 운영단계에서 뿐만 아니라 사후관리에 있어서도 매우 중요한 문제이다. 또한 매립지 내부로 침투한 빗물은 불균질한 폐기물 층을 통과하면서 각종 오염물질들을 용출시키며 복잡한 성분의 침출수로 발전된다^{1~3)}.

AquaMats[®]는 종래 미생물에 의한 생물학적 처리 공법과는 달리 여재 제조 방법(Ultra Weave Technology)의 특허기술로 여재의 유효표면적을 증대시켜 자연생태계의 하부구조인 식물성 플랑크톤이

나 박테리아의 빠른 착생이 가능하게 하여 먹이사슬을 형성시켜 줌으로써 수질 생태계의 자정능력을 부여하는 신개념의 생물학적 처리 공법이다. AquaMats[®]를 이용한 고농도 미생물 처리 공정(AMTP : Advanced Microbial Treatment Process)은 다공성의 여재에 여러 종류의 미생물이 공생 및 고밀도의 증식으로 인해 호기 및 혐기화 반응을 동시에 진행시킬 수 있어 용존 유기물 및 질소, 인의 제거에 탁월한 효과를 나타내고 수질 생태계의 자정능력을 극대화시킬 수 있어 파괴된 수질 생태계의 균형을 복원시킬 수 있는 생물학적 처리공법이다.

본 실험에서는 현재 새로운 생물학적 처리공정으로 알려진 AquaMats[®]를 이용한 침출수 처리 공정에는 어떤 호기적 미생물이 관여하는지에 중점을 두었다. 이에 울산광역시 삼산동 매립지 침출수의 처리 공정에서 이용된 AquaMats[®] 상에서 시료를 채취하여 미생물을 분리한 다음 그 미생물이 어떤 균인지를 동정하고 또, 분리된 미생물들을 직접 침출수에 적용하여 침출수의 분해 양상을 알아보고자 하였다.

Corresponding Author : June-Woo Lee, Department of Environmental Engineering, Catholic University of Pusan, Pusan 607-757, Korea
Phone: +82-51-510-0621
E-mail: leejw@cup.ac.kr

2. 재료 및 방법

2.1. 미생물 균주의 분리 및 배양조건

AquaMats[®] 상에 서식하고 있는 미생물을 분리하기 위해서는 Fig. 1과 같은 과정을 통해 분리하였다. 이때 미생물 시료는 AquaMats[®]의 끝부분을 소량 70%(w/w) 에탄올로 살균한 가위로 절단하여 채취하였으며, 다음 멸균증류수를 사용하여 추출한 다음 원심분리하였다. 이 때 원심분리(Hanil Refrigerate Centrifuge, Hanil Co. Ltd.)의 조건은 4°C, 500rpm, 5분간이었으며 주로 미생물과 함께 혼입된 토양 같은 부유물질을 제거하기 위해서였다.

미생물의 분리는 우선 미생물 추출 시료를 최소 영양배지(nutrient agar) 상에서 미생물의 성장 여부를 확인하였으며 우점종의 확인과 단일 개체균을 얻기 위해서는 희석평판배양법(dilution agar plate method)을 통해 확인하였다.

다음 접종된 미생물 현탁액은 37°C에서 24시간 배양기(Vision Scientific Co. Ltd)에서 배양한 다음 나타난 미생물을 관찰하였다. 이때 나타난 미생물의 집락은 균집 계수기(colony counter)를 사용하여 관찰하였다. 나머지 모든 미생물의 배양은 37°C에서 이루어졌고, 그리고 API 20 NE kit의 배양은 29°C의 온도에서 이루어졌다.

2.2. 시약 및 재료

최소영양배지(nutrient agar)와 효모 추출물(yeast extract)은 미국 Difco사의 것을 사용하였으며, 현미경은 일본 Olympus사 제품을 사용하였으며 고배율의 현미경 사진 촬영을 위해서는 Motic[®] MC Camera (Motic China Group Co., Ltd)를 사용하였다.

미생물을 동정하기 위해서는 API kit를 사용하였는데 이는 프랑스 Biomerieux 회사의 장내세균 이외의 그램 음성 간균을 동정하는 API 20 NE를 사

용하였다. 한편 AquaMats[®]는 SDF(surface development front) Type으로 미국 AquaMats[®]사의 것을 사용하였다.

미생물의 성장을 확인하기 위해서는 turbidity로 파장 610nm에서 측정하였는데 이때 사용한 흡광광도계는 Opron-3000[®] UV/VIS spectrophotometer (Hanson Tech. Co. Korea)의 것을 사용하였다. 한편 미생물의 배양은 진탕 배양기(Vision Scientific Co., Ltd. Korea)를 이용하여 온도 37°C, 회전수 180rpm의 조건으로 이루어졌다.

2.3. 미생물의 동정

먼저 현미경(Olympus Model CX 40, 일본 Olympus Co. Ltd.)을 이용하여 4(대물렌즈) × 10(대안렌즈)의 배율로 세균의 집락 형태를 관찰하였다. 다음 미생물을 분류하는 가장 선결방법은 미생물을 그램 염색하는 방법이기 때문에 그램 염색을 위해서는 Hucker의 방법⁵⁾을 사용하여 100(대물렌즈) × 10(대안렌즈)의 배율에서 관찰하였다.

분리된 미생물을 동정하기 위해서는 고전적인 미생물 동정법으로서 널리 사용되는 API Kit를 사용하였다. 이 미생물들은 그램 염색 결과 모두 그램 음성 간균으로 나타났기 때문에 주로 장내 세균 이외의 그램 음성 간균을 동정하는 API 20 NE를 이용하여 API Manual⁵⁾대로 실험하였다.²⁾

API Kit는 첫째, 미생물의 특징적인 8가지 생화학적 반응(biochemical test), 즉 NO₃ test(nitrate reductase에 의한 KNO₃의 환원 여부 측정), TRP test(L-tryptophane으로부터 indole 생성 측정), GLU test(D-glucose의 발효 여부 측정), ADH test(arginine dihydrolase에 의한 L-arginine의 분 test(β -glucosidase에 의한 esculin ferric citrate의

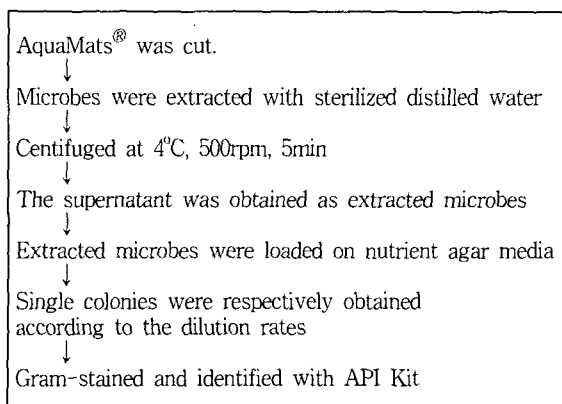


Fig. 1. Isolation and identification methods of microbes inhabited in AquaMats[®].



* AquaMats[®]의 사진 : SDF(Surface Deployment Format) Type

* AquaMats[®] : 사진첨부

가수분해), GEL test(gelatine의 가수분해), PNPG (4-nitrophenyl- β -galactopyroside) test(4-nitrophenyl- β -galactopyroside 분해효소의 여부 측정)을 살펴보면, 두 번째, D-glucose(GLU), L-arabinose (ARA), D-mannose(MNE), D-mannitol(MAN), N-acetyl-glucosamine(NAG), D-maltose(MAL), potassium gluconate (GNT), capric acid(CAP), adipic acid(ADI), malic acid(MLT), trisodium citrate (CIT), phenylacetic acid(PAC) 등의 12가지 탄수화물을 이용하는 정도(assimilation test)를 살펴봄으로써 균을 동정하는 방법이다.

우선 API 20 NE kit를 3개씩 2개조로 준비한 다음 한, 두 개의 미생물 집락을 취해 시험균을 0.85%(W/V) NaCl 용액 3ml에 현탁시킨 후 이를 NaCl 시험액으로 하고, 그 중 현탁액 200 μ l을 API AUX Medium에 넣어 잘 섞어준 다음 이를 AUX Medium 시험액으로 하였다. 그 후 NaCl 시험액은 biochemical tests를 위해 NO₃ test부터 PNPG (4-nitrophenyl- β -galactopyroside) test에 접종하였고, AUX Medium 시험액은 D-glucose test부터 phenylacetic acid test에 이르는 assimilation test에

접종하였다. 그리고 각각 GLU test, ADH test, URE test는 혐기적인 조건을 만들어 주기 위해 광유로 가득 채워 주었다. 접종한 다음에는 API 20 NE kit를 API incubation box에 넣고 29°C의 온도를 갖는 배양기를 이용하여 하루 동안 배양하여 관찰하였고 결과가 분명치 않은 것은 NO₃와 TRP test에 광유를 채워 혐기적인 조건으로 만든 다음 다시 24시간을 배양하여 나타난 결과를 관찰하였다.

2.4. 미생물의 침출수 분해 양상

침출수에서 미생물의 성장여부를 알아보기 위해 배양 배지를 하나는 부유물질을 pore size 0.45 μ m 여과막으로 여과한 것과 다른 하나는 그냥 여과하지 않고 부유물질이 그대로 든 배지를 만들어 관찰하였다. 성장과 침출수 분해 여부는 하루 단위로 5일 동안 미생물 시료를 채취하여 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물의 그림 염색

우점종으로 나타난 미생물의 수는 3종이었다. 각각의 미생물 집락 형태는 Fig. 2와 같은데 한 종의

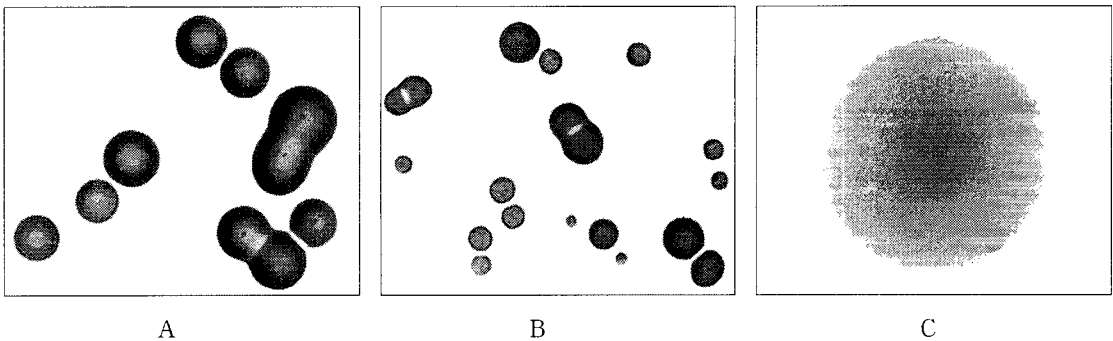


Fig. 2. The type of microbial colonies at the 40 magnifications. A: Slime colony(smooth sphere forms), B: Light yellow colony(rough sphere forms), C: Yellow colony.

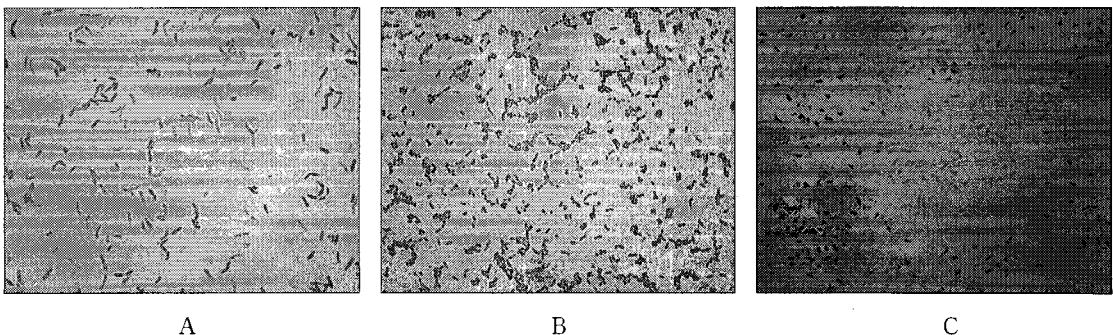


Fig. 3. The results of Gram staining observed at the 1,000 magnifications. A: Slime colony, B: Light yellow colony, C: yellow colony.

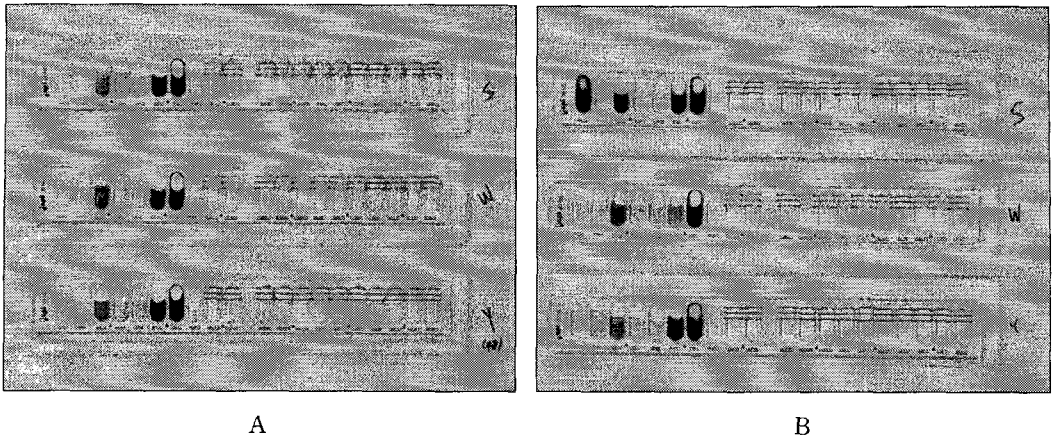


Fig. 4. The identification results by API 20NE. A: Incubated for 24hours, B: Incubated for 48hours. (Each strip is sequenced downward as slime colony, light yellow colony and yellow colony.)

미생물은 아주 점액질이 많은 집락의 모습을 보여주었고 다른 한 종은 역시 점액질이 많으며 아주 얇은 노란색 집락의 모습을, 나머지 한 종은 노란색의 집락 형태를 보여주었다. 또한 미생물들은 그램 염색 결과 모두 그램 음성으로 판명(Fig. 3)되었는데 세 종의 미생물 모두 간균의 형태로 관찰되었다.

3.2. 미생물의 동정

API 20NE kit를 이용한 미생물 동정 결과는 Fig. 4와 같다. API 20NE kit는 3개씩 2조로 나뉘어 1개 조는 24시간 배양 후 곧 바로 NO₃ test와 TRP test를 함으로써 동정 결과를 확인하였고 나머지 1개 조는 다시 24시간을 배양하여 결과를 관찰하였다.

점액질 집락은 생화학적 test 결과 NO₃ 반응, ESC 반응, GEL 반응 및 PNG 반응에서 양성의 결과를 나타내었고, 나머지 반응에서는 모두 음성의 결과가 나타났으며, 탄수화물을 이용하는 test 결과 CAP 반응, ADI 반응, CIT 반응, PAC 반응에서는 음성의 결과를, 나머지 반응에서는 모두 양성의 결과를 나타내었다(Fig. 4의 S열).

얇은 노란색 집락은 생화학적 test 결과 ESC 반응, GEL 반응, PNG 반응에서 양성의 결과를 나타내었고 나머지 반응에서는 모두 음성의 결과를 나타내었으며, 탄수화물을 이용하는 test 결과 ADI 반응에서 음성의 결과를, 나머지 반응에서는 모두 양성의 결과를 나타내었다(Fig. 4의 W열).

노란색 집락은 생화학적 test 결과 TRP 반응, ESC 반응, GEL 반응에서 양성의 결과를 나머지 반응에서는 모두 음성의 결과가 나타났다. 탄수화물을 이용하는 반응에서는 GLU 반응, ARA 반응, MNE 반응, MAL 반응, GNT 반응에서 양성의 결과를 나머지는 모두 음성의 결과를 나타내었다(Fig. 4의 Y열).

그리고 이들 미생물은 oxidase 반응 결과 모두 양성의 결과를 나타냈다. 이들 결과는 Ttable 1에 나타나있다. 위 결과들을 가지고서 API의 website (<http://apiweb.biomerieux.com>)에서 각각의 균을 검정한 결과 점액질 집락의 미생물은 *Agrobacterium radiobacter*(%동정확률 = 98.9%)임이 판명되었고 얇은 노란색 집락의 미생물은 *Pseudomonas cepacia*(%동정 확률 = 87.0%)임이 판명되었으며, 노란색 집락의 미생물은 *Flavobacterium indologenes* (%동정확률 = 99.8%)임이 판명되었다. 그밖에 비우점종 미생물로서 *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas vesicularis* 등도 AquaMats[®]에 서식하고 있는 것으로 나타났다.

3.4. 미생물의 침출수 분해 양상

삼산동 매립장은 산업폐기물을 매립하던 곳으로 본 실험에 사용된 삼산동 매립장의 침출수는 상당히 고농도의 부유물질을 포함하고 있었다. 따라서 흡광도를 측정하는데 어려움이 따라 부유물질을 여과한 배양 배지를 따로 만들었다. 하지만 여과한 침출수와 여과하지 않은 침출수 이진 간에 침출수 단독만으로 배양했을 때 3종의 미생물은 모두 자라지 않았으나 침출수에다 효모추출물을 첨가한 배지를 만들어 미생물을 배양했을 때는 여과 여부에 관계 없이 미생물은 모두 잘 자랐다(Fig. 5).

Fig. 5는 미생물 접종량을 1(v/v)%, 효모추출물의 양을 0.5(w/v)%로 첨가하여 3종의 미생물을 5일 동안 배양한 결과이다. 거의 하루정도의 시간에 3종의 미생물은 다 자람을 보여주었는데 그 중 *P. cepacia*가 제일 높은 성장도를 보여주었고, 그 다음 성장도의 순서는 *A. radiobacter*와 *F. indologenes*의 순이었다.

Table 1. %Identification probability of three microbes through eight biochemical tests, twelve assimilation tests and oxidase test

Tests	Slime colony	Light yellow colony	Yellow colony
NO ₃	+	-	-
TRP	-	-	+
GLU	-	-	-
ADH	-	-	-
URE	-	-	-
ESC	+	+	+
GEL	+	+	+
PNG	+	+	-
GLU	+	+	+
ARA	+	+	+
MNE	+	+	+
MAN	+	+	-
NAG	+	+	-
MAL	+	+	+
GNT	+	+	+
CAP	-	+	-
ADI	-	-	-
MLT	+	+	-
CIT	-	+	-
PAC	-	+	-
Oxidase	+	+	+
IDENTIFIED	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Flavobacterium indologenes</i>

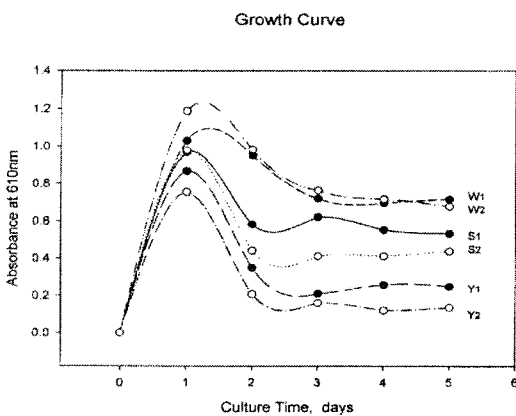


Fig. 5. Growth curve of 3 microbes. Cultures were executed with leachate added yeast extracts: In the tail numbered 1 media, suspended solids were filtered with membrane of pore size 0.45µm, but in the tail numbered 2 media, suspended solids were not.(S: *A. radiobacter*, W: *P. cepacia*, Y: *F. indologenes*)

그리고 분리 동정된 미생물을 침출수에 적용하는 동안 한 가지 뚜렷한 현상을 보여주었다. 즉, 침출수 중의 부유물질을 여과하지 않은 배지에다 이들 동안 미생물을 키웠을 때 *P. cepacia*의 배양 배지 속의 부유물질은 아무런 변화가 없었으며(Fig 6의 D중 오른쪽 삼각플라스크), 그 반면 *A. radiobacter*(Fig. 6의 B)와 *F. indologenes* (Fig. 6의 C)의 두 미생물은 검게 배지에 떠있는 부유물질을 배양에 사용된 삼각플라스크의 바닥에다 침적시키고 배지의 투명도를 부유물질을 여과하여 배양한 배지와 비슷하게 증가시켰다. 이는 김⁶⁾의 보고서 중 AquaMats®를 이용하여 수계 투명도의 변화를 관찰하였을 때 약 8일 정도 지나서 수계 투명도가 향상되었다고 보고하였는데 이들 미생물을 직접 이용하면 그 보다 훨씬 빠른 속도로서 침출수 내에 떠있는 부유물질을 제거하고 그로써 수계의 투명도를 증가시켜 혼탁도 같은 수질오염문제를 해결할 수 있는 좋은 실마리가 되리라고 생각한다.

앞으로의 연구 방향은 여러 이화학적인 항목 분

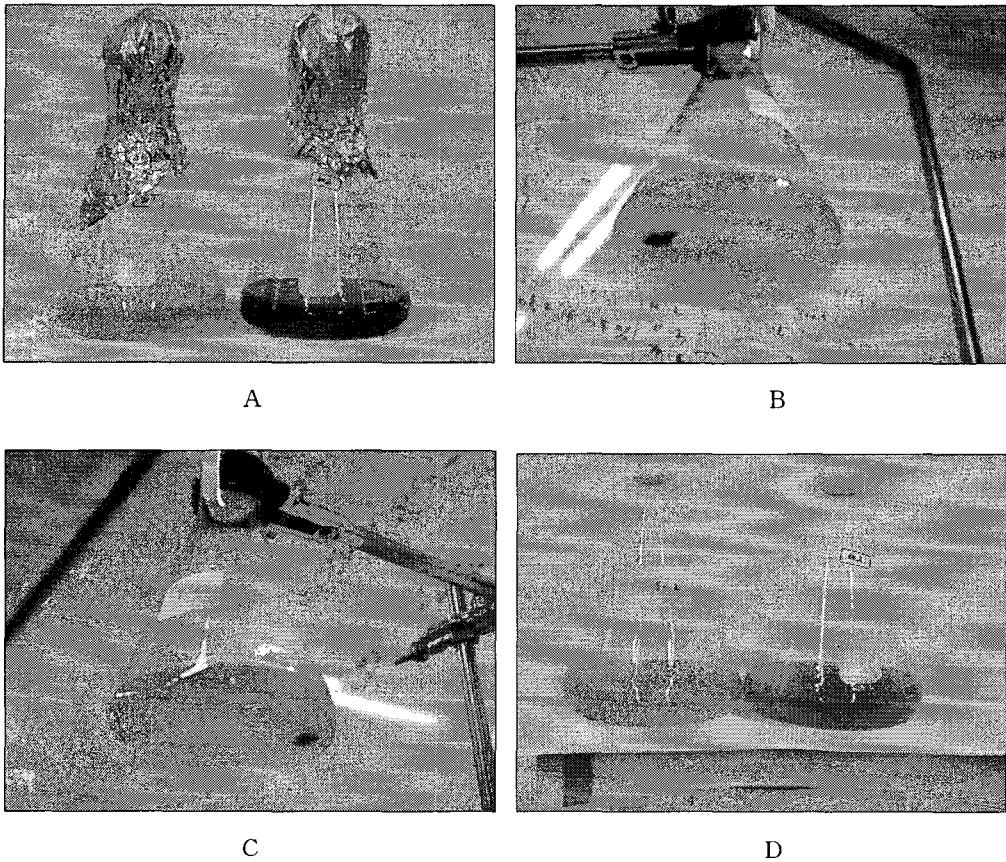


Fig. 6. The transparency change of microbial culture media. A; Before cultivation, suspended solids were filtered in the left flask, but not in the right flask. B, C; Respectively, culture media of *A. radiobacter* and *F. indologenes* for 2 days in which suspended solids were not filtered. D; Culture media of *A. radiobacter* (left) and *S. cepacia*(right) for 5 days in which suspended solids were not filtered. The turbidity of *A. radiobacter*'s medium was almost diminished and *S. cepacia*'s medium was left intact.

석을 통해 분리된 미생물에 의한 삼산동 매립장 침출수 분해 양상을 더 연구하고 그 결과를 현장에다 적용시키면 기존 생물학적 처리 공정보다 더 빠른 속도로 침출수를 분해시킴으로써 매립장 주변의 수질환경개선에 큰 도움이 될 수 있으리라 본다.

4. 결 론

울산광역시 삼산동 매립장 침출수의 수질정화 공정을 위해 새로운 여재인 AquaMats[®]가 사용되었다. 본 실험에서는 AquaMats[®]에 서식하고 있는 여러 미생물 중 우점종으로 여겨지는 3 종의 미생물을 각각 분리하여 동정하였다. 이들 미생물은 그램 염색 결과 모두 간균 형태의 그램 음성으로 나타났으며, 각각 *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas cepacia*, *Flavobacterium indologenes*로 판명되었

다, 이들 3 종의 미생물은 모두 침출수 만의 배지에서는 잘 자라지 못하였으나 효모 추출물 같은 성장 촉진물질의 존재 하에서는 침출수에서 빠른 성장속도를 보여주었다. 그리고 *Agrobacterium radiobacter*와 *Flavobacterium indologenes*는 부유물질을 침적시켜 배지의 투명도를 향상시켰다.

참 고 문 헌

- 1) Saint-Fort, R., 1992, Fate of municipal refuse deposited in sanitary landfills and leachate treatability, J. Environ. Sci. Health(A27), 2, pp.369-401.
- 2) Lema, J. M., 1998, Characteristics of landfill leachate and alternatives for their treatment A review, Water, Soil Pollution (40), pp.223-250.

- 3) 김성호, 1995, 침출수 처리 현황과 문제점 및 대책, 고려대 부설 환경기술·정책 연구소 창립 기념 심포지움, pp.138-168.
- 4) Doetsch, R. N., 1981, Determinative methods of light microscopy, In the Manual of methods for general bacteriology, Ame. Soc. for Microbiol., 26pp.
- 5) API manual, The Identification of All Microorganisms, Ver. 3, pp.15-24.
- 6) 김좌관, 2005, 울산광역시 삼산동 매립장 침출수 수질 정화를 위한 AMTS Pilot Plant 실험 결과 보고서.