



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0146354

(43) 공개일자 2015년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C02F 3/10 (2006.01) *C02F 1/62* (2006.01)

C02F 101/20 (2006.01) *C02F 103/08* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0129344

(22) 출원일자 2014년09월26일

심사청구일자 2014년09월26일

(30) 우선권주장

1020140074257 2014년06월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

오병근

서울특별시 은평구 서오릉로 258 102동 501호 (갈현동, 우남아파트)

김영기

경기도 성남시 분당구 탄천로 35, 505동 904호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

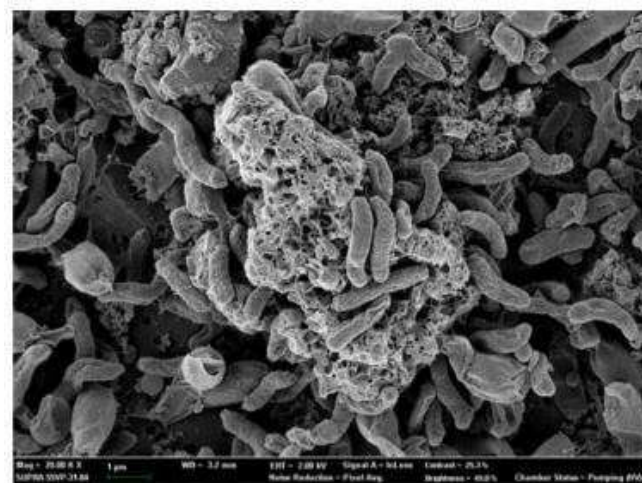
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 해양 중금속 제거용 미생물담체

(57) 요약

본 발명은 (a) 골재(aggregate), 제올라이트(zeolite) 및 슬래그(slag)로 구성된 군으로부터 하나 이상의 선택되는 담체; 및 (b) 상기 골재에 부착(adhesion)된 디설포비브리오 디설포리칸스(*Desulfovibrio desulfuricans*)를 포함하는 해수 중금속 제거용 미생물담체 및 이를 이용한 해수 중금속 제거방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 해수 중금속 제거용 미생물담체는 화학적 방법을 통한 공정을 거치지 않아 2차 오염의 우려가 없고 해양 생태계 교란의 문제가 없다. 또한, 상기 해수 중금속 제거용 미생물담체는 담체를 단독으로 사용하여 해수 중금속을 제거하는 경우와 비교하여, 10-80% 향상된 중금속 제거율을 나타낸다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

주정욱

경기 고양시 덕양구 고양대로1395번길 11-12, 308
호 (성사동, 서안아파트)

김인화

경기 포천시 소흘읍 태봉로 153, 302동 1904호 (태
봉마을주공3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E2110571H190000110

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양환경기술개발산업

연구과제명 오염퇴적물의 생물학적 피복정화기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 환경대학교

연구기간 2011.08.16 ~ 2016.08.15

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 골재(aggregate), 제올라이트(zeolite) 및 슬래그(slag)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 담체(carrier); 및 (b) 상기 골재에 부착(adhesion)된 디설포비브리오 디설파리칸스(*Desulfovibrio desulfuricans*)를 포함하는 해수 중금속 제거용 미생물담체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 골재는 순환골재, 모래, 자갈, 돌, 벽돌, 콘크리트, 암석 및 석분(crushed stone)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 골재인 것을 특징으로 하는 미생물담체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 골재는 100-1000 μm 의 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 미생물담체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 슬래그는 고로슬래그 또는 제강슬래그인 것을 특징으로 하는 미생물담체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 중금속은 카드뮴, 구리, 아연, 니켈, 크롬, 코발트, 비소, 셀렌, 은, 안티몬, 수은, 탈륨 및 납으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중금속인 것을 특징으로 하는 미생물담체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 미생물담체는 피복정화용 해수 중금속 제거용 미생물담체인 것을 특징으로 하는 미생물담체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 해수 중금속 제거용 미생물담체를 해수에 접촉시키는 단계를 포함하는 해수 중금속 제거방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 해양 중금속 제거용 미생물담체에 관한 것이다.

배경 기술

생물에 대한 중금속의 독성은 널리 알려져 있다. 이의 특이적인 특성 및 다양한 상호작용 때문에, 중금속은

저농도만으로도 환경에 심각한 위협을 미치고, 이의 유독 충격은 긴 시간에 걸쳐 지속된다. 중금속을 산화시키거나 환원시켰을 때 독성이 증가하는 것과 관련하여 유의한 보고가 있다. 예컨대, Ni(II)는 Ni(IV)보다 독성이 약하고 As(V)은 As(III)의 독성보다 약하다. 또한, 중금속은 화학적 또는 생물학적으로 분해되지 않고 축적되어 먹이사슬 내 그 함량이 위험하게 증가하게 되고 소비자의 건강 및 삶에 심각한 영향을 미친다. 이러한 점을 고려하면, 중금속 오염 이슈가 환경오염 방지의 중요한 의미를 갖으며, 이것이 즉각적인 해결이 요구되는 문제 중 최우선 순위에 해당하는 것은 놀랍지 않다.

[0003] 광산배수 및 공업폐수에서 생물의 독성 임계값을 현저히 초과하는 고농도의 중금속이 검출되었다. 이러한 농축을 감소시키기 위해, 다양한 방법이 개발 및 적용되고 있다. 예컨대, 이온 교환법, 침전법, 응고-응집법, 부유법, 막 여과법 및 전기탈이온법과 같은 물리화학적 방법이 있다.

[0004] SRB(Sulfate Reducing Bacteria)는 최종 전자수용체인 황산염을 이용하여 단순 유기물을 산화시키는 혐기성 균이다. 황산염 환원은 중금속이온과 반응하여 황화물로 침전되는 수용성 음이온(중성 pH에서는 HS^- 및 혐기성 pH에서는 S^{2-})의 형성을 발생시키는 황화물의 형성을 선호한다. 대부분의 황화물은 무산소 조건에서 안정하다. SRB는 황산염을 환원 및 유기 오염물질을 산화시켜 알칼리성을 발생시키고 pH를 낮추게 되어 SBR 활성의 상승시킬 수 있는 조건을 조성한다. SRB는 황화물 침전물로부터 유용금속(valuable metals)을 용이하게 재활용할 수 있는 장점을 갖는다.

[0005] 한양대학교 팀은 SRB 등과 같은 황화물 이온 생성 유도 박테리아들과 *Phanerochaete chrysosporium*, *Pseudomonas aeruginosa* 등과 같은 미생물을 이용하여 중금속을 처리하였고(Drying temperature can change the specific surface area of *Phanerochaete chrysosporium* pellets for copper adsorption, Jong Yeon Lee. Biotechnology Letters. 1998. p.531533), 순천대학교 팀은 순천만을 모델로 하여 환경정화 역할을 기대할 수 있는 미생물에 대한 기초자료를 수집하고 토양으로부터 다환 방향족 화합물인 PAH를 획득하여 PAH의 분해능을 갖는 4개의 균주(SCB1, SCB2, SCB6 및 SCB7)를 선별, 이를 이용하여 PAH 분해균주가 PAH로 오염된 토양환경의 정화작용에 중요한 역할을 할 수 있음을 제시하였으나(순천만 갈대근원 토양으로부터 얻은 PAH 분해세균의 특성 분석, 김성현. The Korean Journal of Microbiology. 2005. p.208-215), 이는 담수용 미생물 균주로 상대적으로 해수 및 퇴적물의 중금속 및 PAH 분해용 미생물에 관한 연구는 없었다. 또한, 일본 Kochi 대학의 Nankoku 교수 연구팀은 해양 세균인 *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Brevibacterium iodinium*의 중금속 정화력을 이용하여 72-96시간에 70% 카드뮴 처리 및 98% 납 처리능을 보여주었다(Reduction of Cr, Mo, Se and U by *Desulfovibrio desulfuricans* immobilized in polyacrylamide gels, MD Tucker. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 1998. p1319).

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 해양 퇴적물의 중금속 오염을 정화하기 위한 친환경적인 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 골재(aggregate), 제올라이트(zeolite) 및 슬래그(slag)로 구성된 균으로부터 선택되는 담체, 및 디설푸리브리오 디설푸리칸스(*Desulfovibrio desulfuricans*)를 혼합 및 배양하여 상기 디설푸리브리오 디설푸리칸스가 상기 담체 상에 부착(adhesion)되어 성장하는 미생물담체를 제조함으로써, 친환경적이고 해양 생태계 교란 문제가 없는 중금속 제거용 미생물 담체를 개발하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 해수 중금속 제거용 미생물담체를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 해수 중금속 제거방법을 제공하는 데 있다.

- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.
- 과제의 해결 수단**
- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 골재(aggregate), 제올라이트(zeolite) 및 슬래그(slag)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 담체; 및 (b) 상기 골재에 부착(adhesion)된 디설포비브리오 디설피리칸스(*Desulfovibrio desulfuricans*)를 포함하는 해수 중금속 제거용 미생물담체를 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 해양 퇴적물의 중금속 오염을 정화하기 위한 친환경적인 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 골재, 제올라이트 및 슬래그로 구성된 군으로부터 선택되는 담체, 및 디설포비브리오 디설피리칸스를 혼합 및 배양하여 상기 디설포비브리오 디설피리칸스가 상기 담체 상에 부착(adhesion)되어 생장하는 미생물담체를 제조하였다.
- [0013] 본 발명의 미생물담체는 해수 중금속을 정화하기 위해 중금속 흡착 효과가 있는 골재, 제올라이트 및 슬래그로 구성된 군으로부터 선택되는 담체를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 미생물담체는 담체로서 골재를 포함한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 골재는 순환골재, 모래, 자갈, 돌, 벽돌, 콘크리트, 암석 및 석분(crushed stone)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 골재이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 골재는 순환골재, 모래 및 슬래그로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 골재이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 골재는 순환골재이다.
- [0016] 본 명세서에서 용어 “순환골재(recycled aggregates)”는 하나 이상의 재활용 물질로 구성된 골재이다. 예컨대, 상기 재활용 물질은 재생 폐기물, 파편 또는 건축자재의 잔해로부터 취득될 수 있다. 이러한 재활용 물질은 결정형, 분말형 또는 깨진 형태의 넓은 범위를 포함한다. 예컨대, 콘크리트, 암석, 돌, 석골재, 모래, 벽돌 또는 석조 부분의 물질을 포함한다. 이러한 재활용 물질의 혼합물이 순환골재이다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 순환골재는 콘크리트로부터 제조된 순환골재이다.
- [0018] 본 발명의 상기 순환골재는 균일한 크기를 갖는다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 골재는 100-1000 μm 의 크기를 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 골재는 150-750 μm 의 크기를 갖는다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 골재는 180-500 μm 의 크기를 갖는다.
- [0020] 본 발명의 담체는 상기 언급된 재활용 물질과 함께 통상적으로 사용되는 추가적인 골재 물질을 포함할 수 있다. 상기 골재 물질은 모래, 천연암석, 돌, 콘크리트 및 자갈을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미생물담체는 추가적인 골재 물질로 모래를 포함한다(도 1).
- [0022] 본 명세서에서 용어 “제올라이트”는 결정형 알루미늄 규산염으로, 점토광물과 합성적으로 유사하나 명확한 3-차원 나노 및 마이크로-다공성 구조의 차이가 있다. 0.1-2 nm 직경의 미세 구멍(터널, 채널과 동의어)의 프레임워크를 형성하는 $[\text{SiO}_4]$ - 및 $[\text{AlO}_4]$ -4면체 유닛의 규칙적인 구조 내 알루미늄, 실리콘 및 산소가 배열된다. 제올라이트의 이온교환 및 구멍 크기의 특징은 부분적으로 연관되어 있음에 주의해야 한다. 제올라이트가 나트륨 형태인 경우에(예컨대, 양전하로 하전된 나트륨 이온은 음전하로 하전된 알루미늄 규산염 프레임워크를 균형이룸), 나트륨 이온은 한정된 사이즈이므로, 구멍 입구의 4면체 알루미늄 또는 실리콘 원소와 관련이 있어, 개시 구멍의 직경을 효과적으로 감소시킨다. 만일 나트륨 이온이 칼륨이온으로 대체되면, 나트륨 이온보다 크기 때문에, 개시 구멍을 그 이상 감소시킨다. 즉, 이러한 특징으로, 제올라이트를 이루는 물질의 사이즈에 따라 제올라이트 구멍의 크기를 조절 할 수 있다. 제올라이트는 대개 알루미늄 규산염이나, 인, 갈륨, 게르마늄, 붕소 및 베릴륨과 같은 다른 4면체 원소를 프레임 내 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 제올라이트를 이루는 구조는 Natrolite, Edingtonite 및 Thomsonite의 섬유형 제올라이트, Analcime, Laumontite, Yugawaralite, Goosecreekite 및 Montesommaite의 단일 결합 4-원자 링형 제올라이트,

Phillipsite, Gismondine, Boggsite, Merlinoite, Mazzite-series, Paulingite 및 Perlialite의 이중 결합 4-원자 링형 제올라이트, Chabazite, Faujasite, Mordenite, Offretite-wenkite, Bellberite, Bikitaite, Erionite-series, Ferrierite, Gmelinite, Levyne-series, Dachiardite-series 및 Epistilbite의 6-원자 링형 제올라이트, Heulandite, Stilbite 및 Brewsterite의 4면체형 제올라이트, Cowlesite, Pentasil, Tschernichite 및 Linde type A로 구성된 군으로부터 선택되는 구조를 갖으며 이에 한정되지 않는다 (International Zeolite Association, Database of Zeolite Structures 및 Tschernich, Rudy W. (1992). Zeolites of the World. Geoscience Press. p. 563).

[0024] 본 명세서에서 용어 “슬래그”는 원광(raw ore)으로부터 분리된 목적 금속 외의 유리-유사(glass-like) 부산물이다. 슬래그는 대개 금속 산화물 및 이산화 규소의 혼합물이나 금속 황화물 및 기본 금속을 포함할 수 있다. 슬래그는 일반적으로 금속 용융의 폐기물을 제거하는데 사용되나, 용융 금속최종 액상 금속 산물의 재-산화를 최소화하는 용광로로부터 제거하여 고상 금속을 제조하거나 제련의 온도를 조절하는데 보조적으로 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 슬래그는 고로슬래그 또는 제강슬래그이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 슬래그는 제강슬래그이다.

[0026] 본 발명의 미생물담체를 구성하는 상기 제강슬래그는 철에서 강을 만들기 위해 쇠물에 녹아있는 탄소, 규소성분 등을 제거하는 공정에서 발생하며 전로슬래그와 전기로슬래그로 구분된다. 상기 전로슬래그(convert slag)는 주원료인 용융 선철(용선)의 배합율이 높은 경우에 이용하는 전로제강법이다. 부원료로는 생석회(CaO), 석회석(CaCO₃) 및 dolomite(MgCO₃CaCO₃) 등이 있다. 전로에서는 용융선철에 포함된 순탄소를 99.5%이상 제거하기 위하여 용선에 포함된 탄소 등 불필요 성분을 산화 연소시킨다. 생성된 산화물은 슬래그를 형성하고 철과의 비중차로 분리시킨다. 전로슬래그의 발생량은 원료 배합비에 따라 용강 1톤당 150-180 kg으로 고로슬래그에 비하여 발생량이 적다. 상기 전기로슬래그(electric arc furnace slag)는 전기로는 전로와는 달리 주원료로는 스크랩(고철)을 주로 사용하는 것으로 외부에서 열을 가하여 원료를 용해하여 정련한다. 전기로의 특징은 로 내의 분위기를 산화성, 환원성으로 자유로운 변화가 가능하고 이때 각각의 경우에 발생하는 슬래그가 산화슬래그, 환원슬래그이다. 국내에서는 포항종합제철의 경우만 전로를 이용하고 그 외 제철소는 전기로 공정을 이용한다.

[0027] 본 발명의 미생물담체는 해수 중금속을 정화하기 위해 중금속 흡착 효과가 있는 디설포비브리오 디설피리칸스를 포함한다.

[0028] 상기 디설포비브리오 디설피리칸스는 황산염환원균(Sulfate Reducing Bacteria; SRB)의 한 종류로 해수환경에 대한 내성을 갖는다.

[0029] 상기 황산염환원균은 중금속 안정화 기작(도 3)을 갖는 미생물로, 산소가 없는 혐기성 환경에 존재한다. 황산염의 경우 어느 정도의 농도로 자연에 널리 존재하며 폐수에는 다량 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 황산염은 황산염환원균에 의하여 전자 수용체(electron acceptor)로 작용하고 황화물(sulfide)로 환원되며 이 황화물은 다시 주변 환경의 조건에 따라수소이온과 결합하여 황화수소의 형태로 되거나 금속이온들이 존재할 경우에 이들과 결합하여 용해도가 낮은 금속 황화물을 형성하며 침전되는 특징을 보인다.

[0030] 상기 디설포비브리오 디설피리칸스는 양이온 중금속인 카드뮴, 구리, 아연, 납, 니켈 뿐 아니라, 비양이온 중금속인 크롬 및 비소에 있어서도 효과적인 안정성을 나타낸다(Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury, De Jaysankar. Marine Biotechnology. 2008. p.471-477).

[0031] 본 발명의 미생물담체는 화학적 방법을 통한 공정을 거치지 않아 2차 오염의 우려가 없다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미생물담체는 골재 및 디설포비브리오 디설피리칸스를 혼합하고 배양하여 제조할 수 있다.

[0033] 본 발명의 미생물 담체는 해수 중금속을 제거한다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중금속은 카드뮴, 크롬, 코발트, 니켈, 구리, 아연, 비소, 셀렌, 은, 카드뮴, 안티몬, 수은, 탈륨 및 납으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중금속이고, 본 발명의 다른 구현

예에 따르면, 상기 중금속은 카드뮴, 구리, 아연, 니켈, 크롬 및 코발트이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 중금속은 카드뮴, 구리, 아연 및 니켈이다.

[0035] 본 발명의 해수 중금속 제거용 미생물담체는 해수 중금속 제거를 위해 피복형태로 적용한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 해양 중금속 제거용 미생물담체를 추가적인 골재와 혼합시켜 피복을 형성하여 해수 중금속을 제거한다(도 1). 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 해수 중금속 제거용 미생물담체를 모래와 혼합하고 모래층 및 자갈층 사이에 피복하여 해수 정화에 적용한다.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 해수 중금속 제거용 미생물담체를 해수에 접촉시키는 단계를 포함하는 해수 중금속 제거방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 방법은 상기 해수 중금속 제거방법은 상기 해수 중금속 제거용 미생물담체를 이용하는 방법으로, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0040] (a) 본 발명은 해수 중금속 제거용 미생물담체 및 이를 이용한 해수 중금속 제거방법을 제공한다.

[0041] (b) 본 발명의 해수 중금속 제거용 미생물담체는 화학적 방법을 통한 공정을 거치지 않아 2차 오염의 우려가 없고 해양 생태계 교란의 문제가 없다.

[0042] (c) 본 발명의 해수 중금속 제거용 미생물담체는 담체를 단독으로 사용하여 해수 중금속을 제거하는 경우와 비교하여, 10~80% 향상된 중금속 제거율을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 해수 중금속 제거용 미생물담체를 이용한 피복정화 구조를 나타낸다.

도 2a 내지 2c는 각각 순환골재, 제올라이트 및 제강슬래그 상에 부착(adhesion)된 디설포비브리오 디설피리칸스(*Desulfovibrio desulfuricans*)의 주사전자현미경 사진을 나타낸다.

도 3은 황산염환원균의 중금속 안정화 기작을 나타낸다.

도 4는 디설포비브리오 디설피리칸스의 디설포비브리오 배지 및 인공해수에서의 생장곡선을 나타낸다.

도 5는 디설포비브리오 디설피리칸스의 중금속 내성을 조사한 결과를 나타낸다.

도 6은 디설포비브리오 디설피리칸스의 황산염 유무에 따른 중금속 제거율을 나타낸다.

도 7은 골재 단독 및 미생물담체(골재+디설포비브리오 디설피리칸스)의 중금속 제거율을 비교한 결과를 나타낸다.

도 8은 담체(제올라이트)와 미생물 담체(제올라이트)의 중금속 제거율을 비교한 결과를 나타낸다.

도 9는 담체(제강슬래그)와 미생물 담체(제강슬래그)의 중금속 제거율을 비교한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0045] 실시예
- [0046] 실험방법
- [0047] 황산염환원균 배양방법
- [0048] 본 연구에서는 황산염환원균으로 *D. desulfuricans*(KCTC 5768)를 사용하였으며 동결 건조된 상태의 균을 액체배지에 접종 및 활성화 시켜 사용하였다. 균배양 배지(*Desulfovibrio* 배지)는 K_2HPO_4 0.5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, 레자주린(Resazurin) 1 mg/L, 효모 추출물(Yeast extract) 1 g/L, 'DL' -젖산나트륨 2 g/L, Na_2SO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g/L, 티오글리콜산나트륨(Sodium thioglycolate) 0.1 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L 조성으로 제조하였다. 제조된 배지는 N_2 가스로 치환하여 용존 산소를 최대한 제거하였고, 121℃에서 15분 동안 멸균하여 사용하였으며 37℃에서 배양하였다. 균의 성장곡선을 참고하여 실험 시작 전 이를 동안 배양하여 최대의 성장치에 도달하도록 활성화 시킨 후 사용하였다.
- [0049] 또한, 해수환경에서 *D. desulfuricans*의 적응가능성을 알아보기 위해서 인공적으로 해수를 $NaCl$ 24 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/L, KCl 0.75 g/L, $NaNO_3$ 0.04 g/L, K_2HPO_4 0.001 g/L, 트리스-[히드록시메틸]-아미노메탄(tris-[hydroxymethyl]-aminomethane) 1 g/L, Na_2EDTA 12 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mg/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.5 mg/L, $MnCl \cdot 4H_2O$ 0.2 mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 μg /L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 μg /L, 티아민 염산염(Thiamine Hydrochloride) 300 μg /L, p-아미노 벤조산염(p-amino benzoate) 20 μg /L, 판토텐산칼슘(Calcium pantothenate) 10 μg /L, 시아노코바라민(Cyanocobalamin) 4 μg /L, 효모 추출물(Yeast extract) 10 g/L 의 조성으로 제조하였다. 1 M HCl과 1 M NaOH를 이용하여 최종 pH를 7로 맞추었고 N_2 가스로 치환하여 용존 산소를 최대한 제거하였으며 121℃에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다.
- [0050] 미생물 담체 제작 방법
- [0051] 담체[순환골재(경기 안성, 동부이엔티), 제올라이트 및 제강슬래그]는 증류수로 5회 이상 세척하고 드라이오븐에서 건조한 후 사용했으며, 막자사발에 담체를 넣어 분쇄하여 시험용 망체로 걸러서 180-500 μm 로 사이즈를 균일화하였다. 이것을 병에 0.5 g 씩 담아서 121℃에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다. 48시간 동안 배양한 미생물을 담체와 혼합하여 일주일동안 배양하였다.
- [0052] 미생물 균주 배지에 48시간 동안 배양한 균을 따로 멸균한 담체와 혼합하여 37℃, 180 rpm의 진탕기에서 일주일 동안 배양하였다. 상기 미생물은 배지상 또는 담체 상에 부착되어 성장하였다.
- [0053] *D. desulfuricans*의 중금속 내성 및 중금속 제거
- [0054] *D. desulfuricans*의 중금속에 대한 내성을 알아보기 위하여 인공바닷물 배지에 균을 접종한 후 48시간이 지나서 최종농도가 50 ppm이 되도록 중금속 용액을 주입 하고 시간에 따른 OD값을 측정하였고. 중금속 용액을 주입하기 전 최대 성장치의 OD값을 기준으로 균의 바이오매스의 변화를 시간별로 살펴보았다.
- [0055] 해수환경에서 *D. desulfuricans*의 적응가능성을 알아보기 위해서 인공적으로 해수를 $NaCl$ 24 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/L, KCl 0.75 g/L, $NaNO_3$ 0.04 g/L, K_2HPO_4 0.001 g/L, 트리스-[히드록시메틸]-아미노메탄 1 g/L, Na_2EDTA 12 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mg/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.5 mg/L, $MnCl \cdot 4H_2O$ 0.2 mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 μg /L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 μg /L, 티아민 염산염 300 μg /L, p-아미노 벤조산염 20 μg /L, 판토텐산칼슘 10 μg /L, Cyanocobalamin 4 μg /L 및 효모 추출물 10 g/L 의 조성으로 제조하였다. 1 M HCl과 1 M NaOH를 이용하여 최종 pH를 7로 맞추었고 N_2 가스로 치환하여 용존 산소를 최대한 제거하였으며 121℃에서 15분동안 멸균하여 사용하였다. Cu, Zn, Cd, Ni 용액은 초순수(Deionized water) 에 각각 $CuN_2O_6 \cdot 3H_2O$, $N_2O_6Zn \cdot 6H_2O$, $CdN_2O_6 \cdot 4H_2O$, $NiO_4S \cdot 6H_2O$ 를 용해한 후 N_2 가스로 치환한 뒤 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 배지 내의 균의 농도는 600 nm에서 광학밀도(optical density, OD)를 이용하여 측정하였으며, OD값 측정은 UV-visible spectrophotometer (Libra S11, Biochrom, UK)를 사용하였다.)

[0056] 미생물 담체의 중금속 제거

[0057] 일주일 동안 배양한 미생물담체를 3회 세척해준 후 위의 조성으로 구성된 인공바닷물 배지와 중금속 용액을 혼합한 후 미생물 담체를 배양하였다. 배양조건은 37℃, 180 rpm이며 7일에 ICP-MS를 이용하여 분석하였다.

[0058] 분석방법

[0059] 균의 이미지는 주사형 전자 현미경(AURIGA, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 촬영하였다. 중금속 농도 측정에는 ICP-MS(Varian 820-MS, Varian, Australia)를 이용하여 분석하였다.

[0060] 실험결과

[0061] 미생물 담체

[0062] 중금속 오염 해양퇴적물의 생물학적 정화를 위해 사용될 미생물담체를 제조하고 피복정화구조를 고안하였다(도 1). 상기 미생물담체는 담체(순환골재, 제올라이트 및 제강슬래그) 상에 미생물이 부착(adhesion)된 형태이다(도 2a 내지 2c). 황산염환원균, *D. desulfuricans*는 전자 수용체(electron acceptor)로 작용하고 황화물(sulfide)로 환원되며 이 황화물은 다시 주변 환경의 조건에 따라 수소이온과 결합하여 황화수소의 형태로 되거나 금속이온들이 존재할 경우에 이들과 결합하여 용해도가 낮은 금속 황화물을 형성하며 침전되는 특징을 나타낸다(도 3).

[0063] *D. desulfuricans*의 성장곡선

[0064] 본 연구의 목적에 맞게 담수가 아닌 해수에서의 성장을 보기 위해 고농도의 염(salt)을 포함하는 인공바닷물을 제조하였고, 해수환경에서 *D. desulfuricans*를 배양한 결과 도 4에서 보여지는 바와 같이 초기 성장 속도가 감소하는 경향이 보이긴 하지만 *D. desulfuricans*에 최적화된 배지만큼의 최대의 성장치에 도달 하고 약 100시간이 지난 후에는 이보다 더 증가한 것을 확인하였다.

[0065] *D. desulfuricans*의 중금속 내성

[0066] 중금속 용액을 접종한 후 시간에 따른 바이오매스를 비교해 보았을 때 Cu의 경우에는 2일째에 약간 감소하였으나 그 후 점점 증가하여 14일 후에는 약 10%가량 증가한 것으로 나타났으며 Zn의 경우에는 초기 바이오매스보다는 감소하여 약 70-80%가량으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. Cd의 경우 초기 바이오매스보다 점점 증가하여 95%가량으로 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, Ni의 경우 초기 바이오매스는 98% 정도였으나 시간이 지날수록 큰 폭으로 증가하여 최종적으로 210% 이상이 되었다. 이는 중금속이 균의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있으며 균이 이러한 중금속들에 대한 내성이 있다고 판단된다(도 5).

[0067] 황산염 유무에 따른 *D. desulfuricans*의 중금속 제거

[0068] 황산염환원균에 의한 중금속 제거에 있어서 황산염의 유무가 미치는 영향을 인공바닷물 배지에서 0.6% (w/v) 황산염의 존재유무에 따른 중금속 제거율을 토대로 조사하였다. 사용된 중금속의 농도는 50 ppm이다. 결과적으로 Cu의 경우 황산염이 없는 배지에서는 약 30%가 제거되었고 0.6%(w/v)황산염 농도에서는 약 57% 정도 제거된 것으로 나타났으며 황산염이 없는 경우에 비해 제거율이 약 2배정도 좋은 것으로 나타났다. Zn의 경우에는 황산염이 없는 경우 약 48%가 제거되었으며 0.6% (w/v)의 황산염이 존재할 경우 58%의 제거율을 보여 10% 가량의 제거율의 차이를 보였다. Cd의 경우에는 황산염이 없는 경우 약 33%가 제거되었으며, 황산염이 존재할 경우 51%의 제거율을 보여 약 20% 가량의 제거율 차이를 보였다. Ni의 경우 황산염의 존재유무에 상관없이 약 60%의 비슷한 제거율을 보였다(도 6).

[0069] 미생물담체의 중금속 제거(1)

[0070] Cd의 경우 담체(순환골재)만 이용한 경우와 미생물 담체(순환골재)를 이용한 경우에서의 중금속 제거율은 미생물담체를 이용한 경우 99% 정도 Cd가 제거되는 반면 담체만 들어간 배지에서는 약 59% 가량의 제거율을 보인다. Cu의 경우 담체만 이용한 경우 80% 정도의 중금속 제거율을 보이는 반면 미생물 담체를 이용한 경우 100%의 중금속 제거율을 보인다. Zn의 경우 미생물 담체를 이용한 경우 100%의 제거율을 보이는 반면 담체만 이용한 경우 절반도 안되는 48%의 제거율을 보인다. Ni의 경우 담체만 이용한 경우 16% 제거율로 거의 제거가 되지 않지만 미생물 담체를 이용한 경우 92%에 가까운 제거율을 보이고 있다. 연구를 통해 담체만 이용하는 경우 보다 미생물 담체를 이용할 때 중금속 제거율이 더 높은 것을 확인 할 수 있다(도 7).

[0071] 미생물담체의 중금속 제거(2)

[0072] Cd의 경우, 담체(제올라이트)와 미생물 담체(제올라이트) 모두 100%에 가까운 제거율을 보인다(도 8). Cu의 경우 담체만 이용한 경우, 17% 정도의 중금속 제거율을 보이는 반면 미생물 담체를 이용한 경우 98%의 중금속 제거율을 보인다. Zn의 경우, 미생물 담체를 이용한 경우 52%의 제거율을 보이는 반면 담체만 이용한 경우 절반도 안되는 17%의 제거율을 보인다. Ni의 경우, 담체만 이용한 경우 11% 제거율을 보이는 반면 미생물 담체를 이용한 경우 86%에 제거율을 보이고 있다. 연구를 통해 담체만 이용하는 경우보다 미생물 담체를 이용할 때 중금속 제거율이 더 높은 것을 확인할 수 있다.

[0073] 미생물담체의 중금속 제거(3)

[0074] Cd의 경우 담체(재강슬래그)와 미생물 담체(재강슬래그) 모두 100%의 제거율을 보인다(도 9). Cu의 경우 담체만 이용한 경우 19% 정도의 중금속 제거율을 보이는 반면 미생물 담체를 이용한 경우 100%의 중금속 제거율을 보인다. Zn은 담체만 이용한 경우 31%의 제거율을 보이며 미생물담체를 이용한 경우 56%의 제거율을 보인다. Ni의 경우 담체만 이용한 경우 9% 제거율을 보이는 반면 미생물 담체를 이용한 경우 83%의 제거율을 보이고 있다. 연구를 통해 미생물 담체를 이용할 경우 담체만을 사용할 때보다 중금속 제거율이 더 높은 것을 확인할 수 있다.

[0075] 결론

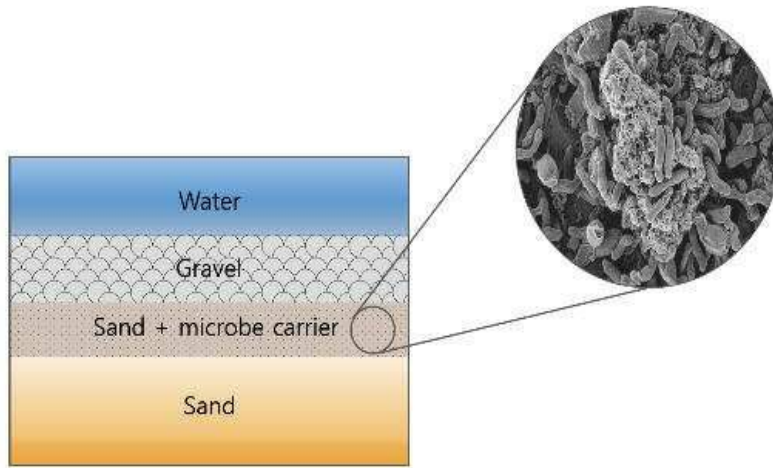
[0076] 결론적으로, 황산염환원균의 한 종류인 *D. desulfuricans*를 이용하여 해수에서의 중금속의 제거에 관한 연구를 진행하였다. *D. desulfuricans*에 최적화된 *Desulfovibrio* 배지와 인공바닷물의 배지에서의 성장을 비교함으로써 인공바닷물의 배지에서도 *Desulfovibrio* 배지에서의 최대 성장치의 수준에 도달하는 것을 확인하여 해수에서의 적용 가능성을 알아보았다. *D. desulfuricans*이 인공바닷물에서도 잘 성장할 수 있는 것은 염화나트륨(NaCl)이 있는 환경의 영향을 받아 염에 영향을 많이 받지 않도록 하는 유전자의 발현이 일어나 높은 농도의 염에서도 잘 성장할 수 있는 것으로 생각된다. 또한 균이 최대로 자란 환경에서 중금속 용액을 첨가하여 균의 바이오매스의 변화가 감소하지 않는 것을 보아 중금속에 대한 내성이 있는 것을 알 수 있었다. 황산염환원균의 전자 수용체로 작용하는 황산염의 존재유무가 중금속 제거에 어떠한 영향을 미치는지 보았을 때 황산염이 없는 경우는 Cu, Zn, Cd 및 Ni에서 각각 약 30%, 48%, 33% 및 60%가 제거되었으나 황산염의 농도가 0.6%(w/v)로 존재할 경우에는 약 57%, 58%, 51% 및 60%가 제거되는 것으로 나타났다. 이는 Cu의 경우 황산염이 존재하지 않을 때보다 약 2배가량 제거율이 증가 되고 Zn의 경우 10% 가량 증가했으며, Cd의 경우 약 20% 가량 증가한 결과인데 이러한 황산염 존재에 따른 중금속 제거율의 증가는 균의 바이오매스가 증가함으로써 동반되는 물리적 흡착이 아니라 대사 과정에서 일어나는 황화물과 중금속의 결합으로 일어나는 침전에 의한 것으로 생각된다. 이러한 연구를 통해 *D. desulfuricans*가 균 표면 전하에 의한 물리적 흡착에 의한 중금속 제거만이 아니라 대사를 통한 침전에 의한 제거도 같이 이루어지고 있는 것으로 판단되며 이를 통해 해양환경의 조건에서 Cu, Zn, Cd 및 Ni 뿐만 아니라 다른 중금속의 처리에도 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 미생물담체를 이용한 중금속의 처리결과를 살펴보면 담체에 물리적 흡착과 더불어 미생물 고유의 중금속 제거능이 결합되어 시너지효과를 보임으로 더욱 효과적으로 중금속을 제거할 수 있음을 알 수 있었다.

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

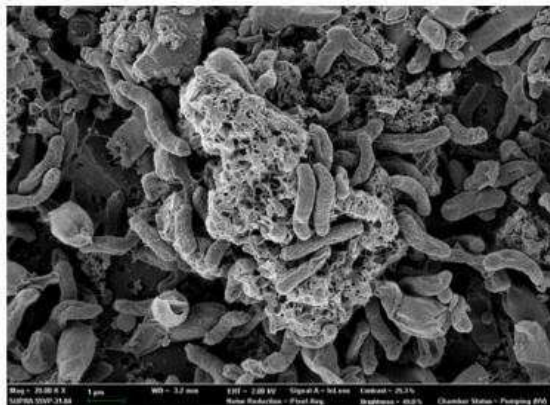
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

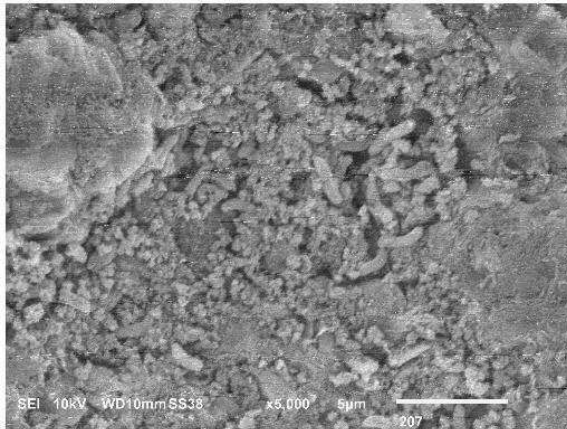
도면1



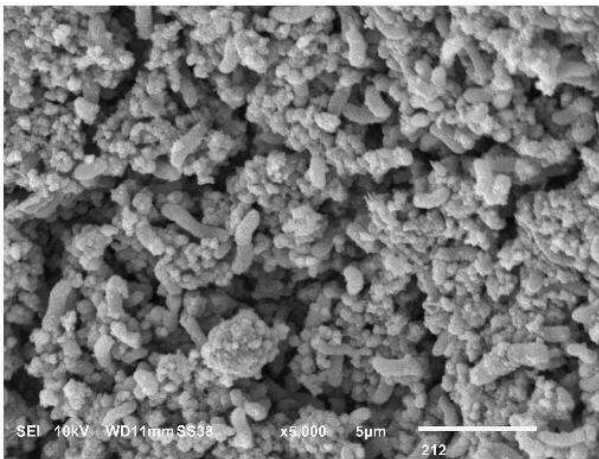
도면2a



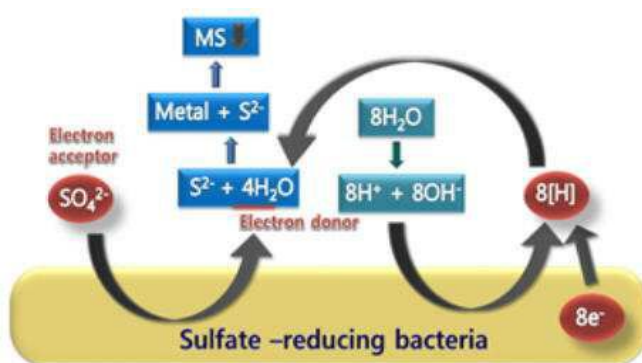
도면2b



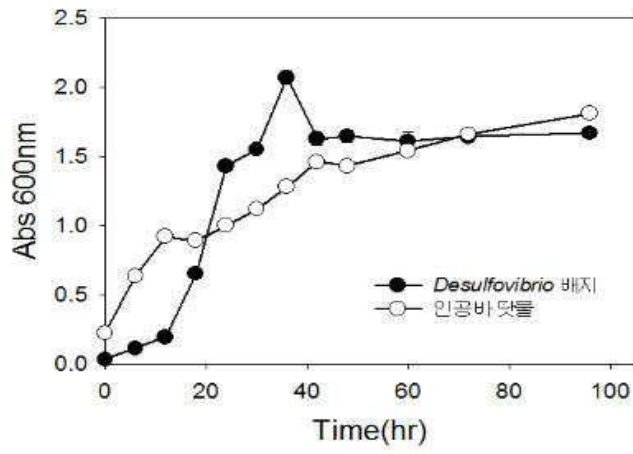
도면2c



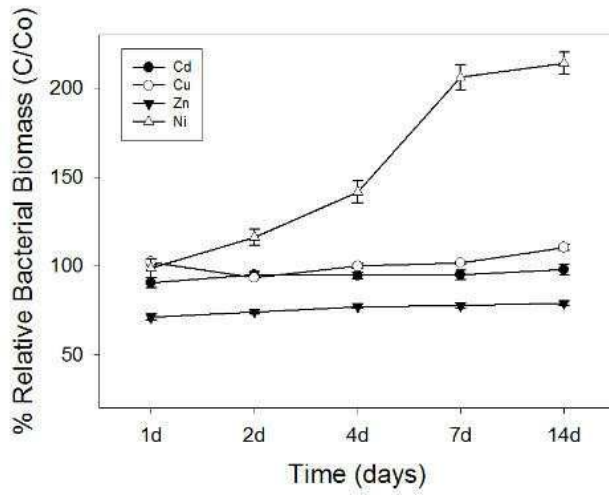
도면3



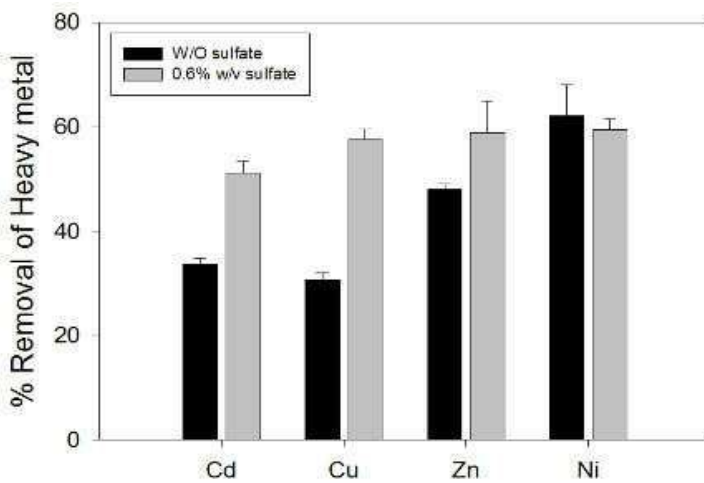
도면4



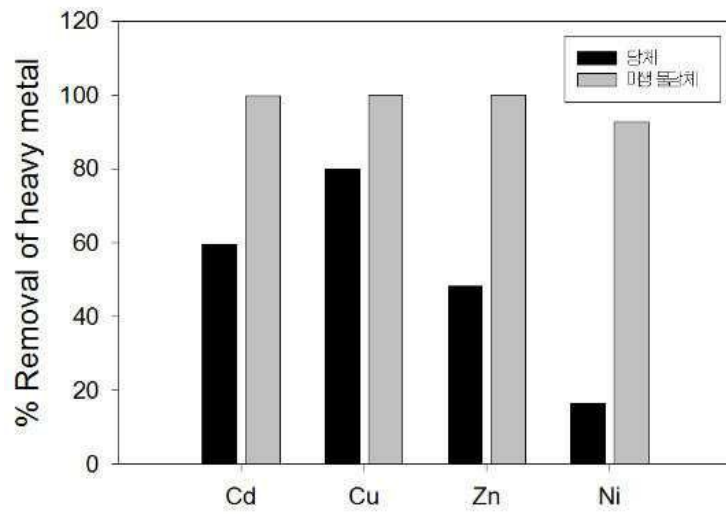
도면5



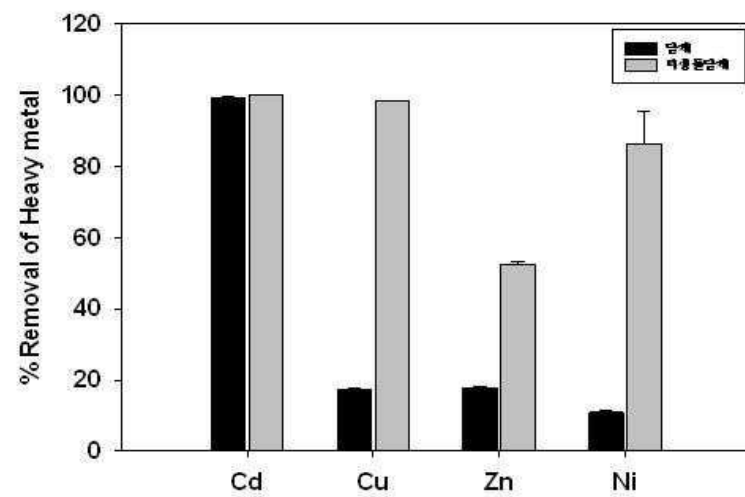
도면6



도면7



도면8



도면9

