



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

고농도 석유화학 폐수에서 성장가능한
미생물 분리 및 특성

Isolation and Characterization of Bacteria
Which Can Grow in High Strength
Petrochemical Wastewater

울산대학교 대학원
생명과학과
황준원

고농도 석유화학 폐수에서 성장가능한
미생물 분리 및 특성

지도교수 김종설

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2024년 2월

울산대학교 대학원
생명과학과
황준원

황준원의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 박정우 

심사위원 한인섭 

심사위원 김종설 

울산대학교 대학원

2024년 2월

국 문 요 약

석유화학 산업에서 발생하는 폐수의 경우 일반적으로 유기물의 농도가 높으며 폐놀과 같은 독성물질을 함유하고 있다. 고농도 석유화학 폐수는 주로 액상 소각, 습식 산화 등의 물리·화학적 방법으로 처리되고 있다. 하지만 이러한 처리법들은 유지 및 운전 비용이 높으며, 사용 약품의 폐기 등에서 2차 환경오염이 발생하는 문제점이 존재한다. 따라서 운전 비용이 비교적 낮으며 환경오염 문제가 거의 발생하지 않는 생물학적 처리 방법의 적용이 요구된다.

본 연구에서는 고농도 석유화학 폐수 내에서 성장 가능한 미생물을 분리하여 고농도 석유화학 폐수의 생물학적 처리 효율을 증진하고자 하였다.

첫 단계로 35℃에서 성장하는 26개의 미생물의 순수배양을 얻었으며, 분리 미생물을 석유화학 폐수에 접종하였을 때 14개의 미생물만이 내성을 가지는 것을 확인하였다. 14개의 분리 미생물은 모두 15℃에서 잘 자랐으나 55℃에서 3개의 분리 미생물은 자라지 않았다. 또한, 분리 미생물 모두 염분 농도가 3%인 배지에서 잘 성장하였고, 염분 농도가 6%인 배지에서는 5개의 분리 미생물만 성장하였다. 고농도 석유화학 폐수 내에서 14개의 분리 미생물은 모두 성장하였으며, 분해능 측정 결과 분리 미생물들이 폐수 내에 존재하는 물질을 탄소원/에너지원으로 이용하는 것을 확인할 수 있었다.

14개의 분리 미생물은 모두 그람 양성 세균으로 관찰되었고 내생포자를 형성할 수 있는 것을 확인하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초하여 분자적으로 동정했을 때, *Bacillus* 속은 9개로, closest match 확인 결과 *Bacillus cereus*가 4개, *Bacillus subtilis*가 2개, *Bacillus proteolyticus* 및 *Bacillus tequilensis*가 각각 1개로 확인되었고 나머지 2개는 *Bacillus* sp.로 종소명이 확인되지 않았다. *Brevibacillus* 속은 3개로 closest match 확인 결과 *Brevibacillus fluminis* 2개와 *Brevibacillus parabrevis* 1개로 확인되었다. *Lysinbacillus* 속은 1개로 closest match 확인 결과 *Lysinbacillus bronitolerans*로 확인되었다.

목 차

국문 요약	i
목차	ii
List of Figures	iii
List of Tables	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 미생물 분리	3
1.1 접종원의 미생물 농도	3
1.2 폐수 내성 미생물 분리	3
2. 분리한 미생물의 특성	4
2.1 성장 특성	4
2.2 형태학적 특성	4
3. 분리한 미생물의 동정	5
3.1 DNA 추출 및 증폭	5
3.2 염기서열 분석	6
III. 결과 및 고찰.....	8
1. 접종원의 미생물 농도	8
2. 분리한 미생물의 특성	19
3. 분자생물학적 동정	41
IV. 참고문헌	44
Abstract	46

List of Figures

Figure 1. Schematic view of experimental procedure for this study.....	7
Figure 2. Growth characteristics of microorganisms isolated from K sludge in wastewater.....	14
Figure 3. Growth characteristics of microorganisms isolated from H sludge in wastewater.....	16
Figure 4. Growth characteristics of microorganisms isolated from microbial agent in wastewater.....	18
Figure 5. Growth characteristics of isolated microorganisms from K sludge at 35°C.....	20
Figure 6. Growth characteristics of isolated microorganisms from H sludge at 35°C.....	21
Figure 7. Growth characteristics of isolated microorganisms from microbial agent at 35°C.....	23
Figure 8. Growth characteristics of isolated microorganisms from K sludge in liquid media at different salt concentrations.....	26
Figure 9. Growth characteristics of isolated microorganisms from H sludge in liquid media at different salt concentrations.....	27
Figure 10. Growth characteristics of isolated microorganisms from microbial agent in liquid media at different salt concentrations.....	29
Figure 11. Growth characteristics of isolated microorganisms from K sludge at different petrochemical wastewater concentrations.....	31
Figure 12. Growth characteristics of isolated microorganisms from H sludge at different petrochemical wastewater concentrations.....	32

Figure 13. Growth characteristics of isolated microorganisms from microbial agent at different petrochemical wastewater concentrations.....	34
Figure 14. Reduction of COD by isolated microorganisms from K sludge in petrochemical wastewater.....	35
Figure 15. Reduction of COD by isolated microorganisms from H sludge in petrochemical wastewater.....	36
Figure 16. Reduction of COD by isolated microorganisms from microbial agent in petrochemical wastewater.....	38

List of Tables

Table 1. Microbial concentration in K sludge.....	9
Table 2. Microbial concentration in S sludge.....	10
Table 3. Microbial concentration in H sludge.....	11
Table 4. Microbial concentration in microbial agent.....	12
Table 5. Growth of isolated microorganisms at different temperatures.....	24
Table 6. Gram staining and endospore staining of isolated microorganisms.....	40
Table 7. Molecular identification of isolated microorganisms.....	42

I. 서론

산업이 고도화되고 다양화됨에 따라 경제발전과 함께 물질적인 풍요를 증진하는 반면, 환경오염이라는 중요한 문제를 일으키고 있다. 환경오염 중 하천과 호수 등의 수질오염 문제는 가장 두드러지며, 오염의 주요 원인 중 하나가 산업폐수이다.

대한민국의 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률에 따르면 폐수를 물에 액체성 또는 고체성의 수질오염물질이 섞여 있어 그대로는 사용할 수 없는 물로 정의하며, 수질 오염방지 시설은 수질 오염물질을 감소시키거나 제거하기 위한 시설로 정의하고 있다(1). 이를 통해 폐수 처리란 폐수 내의 수질 오염물질을 제거하거나 독성을 감소시켜 배출 기준 이하로 만들거나 재활용을 할 수 있도록 하는 과정이라 할 수 있다.

폐수 처리 과정은 일반적으로 1차, 2차 및 3차 처리로 구분된다. 1차 처리는 물리적 처리 방법으로 혼탁 고형물을 제거하기 위해 침전 혹은 부상 등의 방법을 사용한다. 2차 처리는 생물학적 처리를 적용하는데, 미생물의 활성을 활용하여 폐수 내의 생분해성 유기물을 분해하는 과정이다. 3차 처리는 1차 및 2차 처리에서 제거되지 않은 질소, 인, 염분 및 잔류 유기물 등을 제거하는 과정이다(17). 생물학적 처리에서 미생물의 역할은 주로 산화를 통한 폐수에 용해된 질소나 인을 제거하는 것이다(19).

일반적으로 산업폐수는 생물학적 처리 방법을 활용하여 처리되지만, 석유화학 공장의 폐수는 난분해성 물질과 유해 물질을 다량 함유하고 있어서 생물학적 처리가 어려운 경우가 많다. 현재 Chemical Abstract Service(CAS)에 등록된 유·무기 화합물들의 수는 1억 6천만 종을 넘어섰으며, 이 중 수백만 종 이상이 상업적으로 생산되고 있다(12).

석유화학산업의 발전은 1918년의 프로필렌 합성에서 시작되었으며, 1930년대 항공기 및 자동차 산업의 급격한 성장으로 번창하였다. 그 이후로 다양한 화학물질을 통한 화학제품이 생산되었다. 이러한 석유화학산업의 성장과 함께 수질오염과 같은 환경오염 문제가 중요한 문제로 대두되었다.

우리나라에서 폐수를 배출하는 석유화학 공장은 2020년 기준 약 6,000곳이며, 전체 폐수 배출업소 통계에서 11%를 차지하고 있다. 울산에는 많고 다양한 석유화학 공장이 위치하여 우리나라의 석유화학산업의 선두역할을 이끌고 있다. 울산(경남)의 산업폐수 발생 및 방류량은 경기도와 대구(경북) 다음으로 많은 것으로 집계되었다(2).

석유화학 공장에서 배출되는 폐수는 원료와 생산되는 제품에 따라 다양하다. 공정에서 배출되는 폐수는 대부분 유기물의 농도가 높은 고농도 폐수이다. 고농도 폐수의 경우 통상적으로 약품을 이용한 전처리 공정 및 증발 농축, 액상 소각, 습식산화 등의 물리-화학적 처리 방법이 주로 사용되어 높은 운영 비용뿐만 아니라 2차 환경오염 문제가 대두되었다. 또한, 일반적으로 pH가 높아 이를 희석하거나

중화하는 과정에서 염분의 농도가 높아질 수 있다. 폐수의 성상에 따라 화학 약품을 이용하여 오염물질을 분해하는 화학적 방법과 염분을 제거하는 이온교환법 및 응집-침전 공법 등은 효과적일 수 있지만 부산물의 처리 문제와 높은 운전 및 유지비용으로 인해 환경문제와 경제적 문제에 대한 대안이 요구되고 있다(15).

미생물을 이용한 생물학적 처리 방법은 물리-화학적 처리 방법에 비해 유지비용이 저렴하며 2차 오염물질이 없어 친환경적이다. 그러나, 주로 유기물의 농도가 석유화학 폐수에 비해 낮은 생활하수 등의 처리 공정에 이용되고 있다. 석유화학 폐수는 유기물의 농도, 온도 및 염분 농도가 비교적 높아 적용이 어렵기 때문에, 이를 극복하기 위한 많은 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에서는 고농도 석유화학 폐수의 생물학적 처리 공법에 활용할 수 있는 미생물을 분리하는 실험으로 석유화학 공정의 폐수 처리 슬러지(sludge)를 접종원으로 사용하여 호기성 미생물(aerobic microorganism)을 분리하고자 하였다. 일반적으로 미생물의 생장에 불리한 석유화학 공장의 고농도 폐수 내에서 성장할 수 있는 미생물을 분리하고, 분리한 미생물의 온도 및 염분 농도에 따른 생리적 특성을 확인하여 고농도 석유화학 폐수의 생물학적 처리에 활용할 수 있는 미생물을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 미생물의 분리

1.1 접종원의 미생물 농도

접종원으로 3개의 석유화학 회사(국내 K, S, H)의 폐수 처리 생물반응기의 슬러지 및 하수처리 미생물 제제(B)를 사용하였다. 미생물의 농도를 확인하기 위해 각각의 접종원을 phosphate buffered saline(NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.42 g, KH₂PO₄ 0.26 g, distilled water 1 L)용액을 사용하여 연속으로 희석($10^{-1} - 10^{-5}$)하였다(10). 희석한 시료를 plate count agar (pancreatic digest of casein 5 g, glucose 1 g, yeast extract 2.5 g agar 15 g, distilled water, 1 L)에 각각 희석 도말하여 접종한 후 35°C의 배양기에서 48시간 배양한 후 배지에 생겨난 집락(colony)을 계수하였다(4). 슬러지 중 미생물의 농도는 집락형성단위(colony forming unit, CFU)로 측정되었다. 배지에서 생겨난 집락을 무작위로 선택하여 동일한 조성의 새로운 배지에 계대 배양하여 일차적으로 26개의 분리 미생물의 순수 배양을 확립하였다.

1.2 폐수 내성 미생물 분리

폐수에 내성을 갖는 미생물을 확인하기 위해 plate count agar에서 agar 성분을 제외한 액체 배양 배지(plate count broth)에 접종하여 대수증식기까지 배양한 후, 전처리 공정을 거치지 않은 석유화학 폐수 원액 100 mL에 각각의 분리 미생물의 배양액을 1 mL씩 접종하였고, 35°C에서 6일간 진탕 배양기(SIF 6000, Jeio tech)에서 진탕 배양하였다. 24시간 간격으로 분광광도계(DU 730, Beckman)를 이용하여 흡광도(595 nm)를 측정하였다. 동시에 phosphate buffered saline을 이용하여 연속 희석하여 plate count agar에 평판 도말하여 배양 후 생겨난 집락을 계수하여 집락형성단위로 환산하였고, 분리 미생물 중 폐수에 내성이 있는 14개의 미생물 균주를 확인하였다.

2. 분리한 미생물의 특성

2.1 분리한 미생물의 성장 특성

온도에 따른 성장

분리한 미생물에 대한 온도에 따른 성장 여부를 확인하기 위해 plate count broth 를 3 set로 준비하여 접종하였다. 접종한 액체 배양 배지는 각각 15°C, 35°C, 55°C의 진탕 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 plate count agar에 도말하여 집락을 계수하였다.

염분 농도에 따른 성장

분리한 미생물의 염분의 농도에 따른 성장 여부를 확인하기 위해 sea water agar(yeast extract 5.0 g, peptone 5.0 g, beef extract 3.0 g, agar 15.0 g, NaCl 24.0 g, KCl 0.7 g, MgCl₂·6H₂O 5.3 g, MgSO₄·7H₂O 7.0 g CaCl₂ 0.1 g, distilled water 1 L)에서 agar 성분을 제외한 액체 배양 배지(sea water broth)에 분리한 미생물들을 각각 접종하였다. 접종한 액체 배양 배지는 35°C의 진탕 배양기에서 6일간 배양하였으며, 24시간 간격으로 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였고, sea water agar에 도말하여 집락을 계수하였다.

폐수 내 성장 특성

분리한 미생물의 폐수 내 성장 특성을 확인하기 위해 고농도 석유화학 폐수 및 멸균한 증류수로 희석하여 폐수의 농도가 10% 및 50%의 희석 폐수에 접종하여 분리한 미생물의 성장 특성을 확인하였다. 접종된 희석 폐수는 35°C의 진탕 배양기에서 10일간 배양하였으며, 48시간 간격으로 plate count agar에 도말하여 집락을 계수하였다. 동시에 분리 균주의 폐수 내 유기물을 분해하는 능력을 확인할 수 있는 지표인 화학적 산소 요구량(chemical oxygen demand, COD)의 변화를 확인하기 위해 COD kit(HI 93754A, Hanna)에 배양액을 증류수로 희석하여 2 mL을 넣은 후, COD reactor(HI 839800, Hanna)에서 150°C로 2시간 동안 가열시켜 반응을 유도하였다. 가열 끝난 COD kit를 약 30분간 실온에서 식힌 후, COD 측정기(HI 83313, Hanna)를 이용하여 측정하였다.

2.2 분리한 미생물의 형태학적 특성

그람 염색

분리한 미생물의 형태학적 특성을 확인하기 위해 각각의 미생물을 그람 염색한 후 관찰하였다. plate count agar에서 배양한 미생물의 단일 colony를 백금이를 이용하여 채취하여 슬라이드 글라스 위에 증류수와 현탁 후 열을 가하여 고정 후 crystal violet으로 1차 염색, gram's iodine으로 착색 후, ethanol로 탈색하였다. 마지막으로 safranin O를 이용하여 대조염색을 하였다(5).

내생포자 염색

분리한 미생물의 내생포자(endospore)의 유무를 확인하기 위해 각각 미생물을 Schaeffer-Fulton method로 염색하였다(18). plate count agar에서 배양한 미생물의 단일 colony를 백금이를 이용하여 채취하여 슬라이드 글라스 위에 열을 가하여 고정 후 malachite green으로 1차 염색하였고, 불침투성인 포자에 염색이 될 수 있도록 증기를 가해주었다(9). 증류수로 1차 염색약을 씻어낸 후, 마지막으로 safranin O를 이용하여 대조염색을 하였다(14).

3. 분리한 미생물의 동정

3.1 DNA 추출 및 증폭

14개의 미생물 분리 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자생물학적 동정을 위해, *AccuPrep* Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 분리한 미생물로부터 genomic DNA를 추출한다. 추출한 DNA로부터 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 bacterial universal primer set인 27F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC -3')와 1492R (5'- GGT TAC CTT GTT ACGA CTT -3')을 사용하여 thermalcycler (Bio-rad, Singapore)로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 Sensi 2x PCR premix(Taq polymerase, dNTP mixture, reaction buffer)(Lugen Sci, Korea) 10 μ L, 10 pmole primer 2 μ L 및 template DNA 2 μ L를 넣은 후 3차 증류수로 최종 반응량을 20 μ L로 맞추었다.

PCR 증폭 과정은 94°C에서 3분간 pre-denaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension을 총 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 최종 반응시켰다.

증폭한 PCR product를 1.2%(w/v) agarose gel에서 전기 영동하여 대략 1.5 kb 정도 크기의 DNA 밴드를 확인하였다.

3.2 염기서열 분석

증폭한 PCR product는 *Accuprep* PCR purification kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였다. 27F / 1492R primer를 이용하여 양방향에서 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다.

분리한 미생물로부터 얻은 각각의 16s rRNA gene의 염기서열은 BioEdit(version 7.7.1)의 Contig Assembly Program(CAP)을 사용하여 배열하였고, Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)을 이용하여 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank에 등록된 염기서열과 비교하여 closest match를 확인하였다. 본 연구에서 분리한 미생물의 염기서열은 Korea Collection for Type Cultures(KCTC) 생물자원센터에 제출하였으며, accession number 및 균주 기탁증을 받은 상태이다(20).

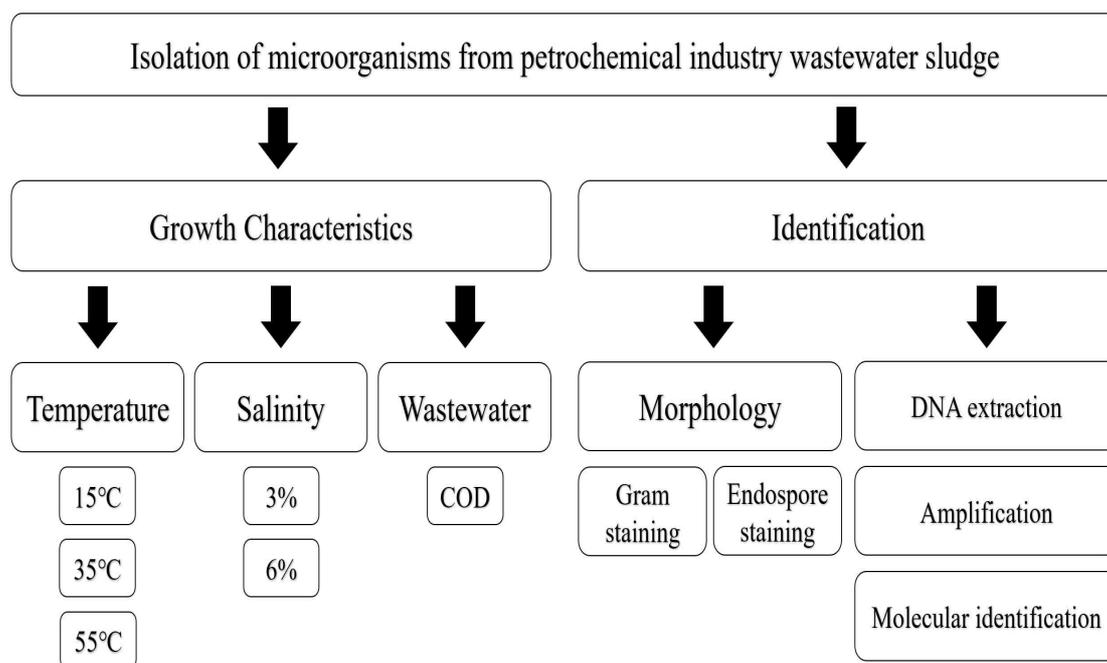


Figure 1. Schematic view of experimental procedure for this study.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 미생물 분리 결과

접종원의 미생물 농도

접종원으로 3개의 석유화학 회사(국내 K, S, H)의 폐수를 처리하는 생물반응기의 슬러지 및 하수처리 미생물제제(B)를 접종원으로 사용하였다. 시료에 존재하는 미생물의 농도를 확인하기 위해 각각의 접종원을 연속으로 희석하여 plate count agar 배지에 접종한 후 35℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 배지에 생겨난 집락의 수를 측정하였고 이를 집락형성단위로 환산하여 슬러지의 미생물 농도를 표에 정리하였다(Tables 1-4).

접종원으로 사용한 슬러지의 농도는 K 공장의 슬러지에서 $(1.79 \pm 0.55) \times 10^4$ - $(2.5 \pm 0.5) \times 10^4$ CFUs/mL로 측정되었고, S 공장의 슬러지에서 $(1.9 \pm 0.3) \times 10^4$ - $(3.465 \pm 0.135) \times 10^4$ CFUs/mL로 측정되었으며, H 공장의 슬러지에서 $(7.175 \pm 0.025) \times 10^4$ - $(9.5 \pm 0.5) \times 10^4$ CFUs/mL로 측정되었다. 마지막으로 미생물 제제의 농도는 $(9.5 \pm 1.5) \times 10^5$ - $(1.015 \pm 0.025) \times 10^6$ CFUs/mL로 측정되었다.

배지에서 생겨난 집락을 무작위로 선택하여 K 공장의 슬러지를 접종한 배지에서 9개(K-1 - K-9), S 공장의 슬러지를 접종한 배지에서 6개(S-1 - S-6), H 공장의 슬러지를 접종한 배지에서 8개(H-1 - H-8), 미생물 제제 B를 접종한 배지에서 3개(B-1 - B-3)의 모두 26개의 균주를 분리하여 순수배양을 확립하였다.

Table 1. Microbial concentrations in K sludge. (*Uncountable \geq 1,000)

Dilutions	K	
	# of colonies	CFUs/mL
10^0	Uncountable	–
10^{-1}	179.5(\pm 5.5)	$1.8(\pm 0.6) \times 10^4$
10^{-2}	19(\pm 2)	$1.9(\pm 0.2) \times 10^4$
10^{-3}	2.5(\pm 0.5)	$2.5(\pm 0.5) \times 10^4$
10^{-4}	–	–

Table 2. Microbial concentrations in S sludge. (*Uncountable $\geq 1,000$)

Dilutions	S	
	# of colonies	CFUs/mL
10^0	Uncountable	–
10^{-1}	346.5(± 13.5)	$3.5(\pm 0.2) \times 10^4$
10^{-2}	19(± 3)	$1.9(\pm 0.3) \times 10^4$
10^{-3}	2(± 1)	$2.0(\pm 1.0) \times 10^4$
10^{-4}	–	–

Table 3. Microbial concentrations in H sludge. (*Uncountable $\geq 1,000$)

Dilutions	H	
	# of colonies	CFUs/mL
10^0	Uncountable	–
10^{-1}	717.5(± 2.5)	$7.2(\pm 0.1) \times 10^4$
10^{-2}	82(± 7)	$8.2(\pm 0.7) \times 10^4$
10^{-3}	9.5(± 0.5)	$9.5(\pm 0.5) \times 10^4$
10^{-4}	1	–

Table 4. Microbial concentrations in microbial agent. (*Uncountable $\geq 1,000$)

Dilutions	B	
	# of colonies	CFUs/mL
10^0	Uncountable	–
10^{-1}	Uncountable	–
10^{-2}	Uncountable	–
10^{-3}	101.5(± 2.5)	$1.0(\pm 0.1) \times 10^6$
10^{-4}	9.5(± 0.5)	$9.5(\pm 0.5) \times 10^5$

폐수 내성 미생물 분리

폐수에 대하여 분리한 미생물의 내성 유무를 알아보기 위해 전처리 공정을 거치지 않은 석유화학 폐수 원액 100 mL에 각각의 분리 미생물의 배양액을 1 mL씩 접종하여 35°C에서 6일간 진탕 배양하였다. 24시간 간격으로 분광광도계를 통해 흡광도를 측정하였고 동시에 plate count agar에 접종하여 집락의 수를 측정하였다. K 공장의 슬러지로부터 분리한 미생물 균주 9개 중 5개(K-2, K-4, K-7, K-8, K-9)와 H 공장의 슬러지로부터 분리한 미생물 균주 8개 중 6개(H-1, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8)와 미생물 제제로부터 분리한 미생물 균주 3개(B-1, B-2, B-3)는 고농도 폐수 내에서 영양물질의 공급 없이 사멸하는 속도가 느리거나 사멸하지 않는 것을 확인하였지만, S 공장의 슬러지로부터 분리한 미생물 균주 6개는 모두 사멸하였다(Figures 2-4).

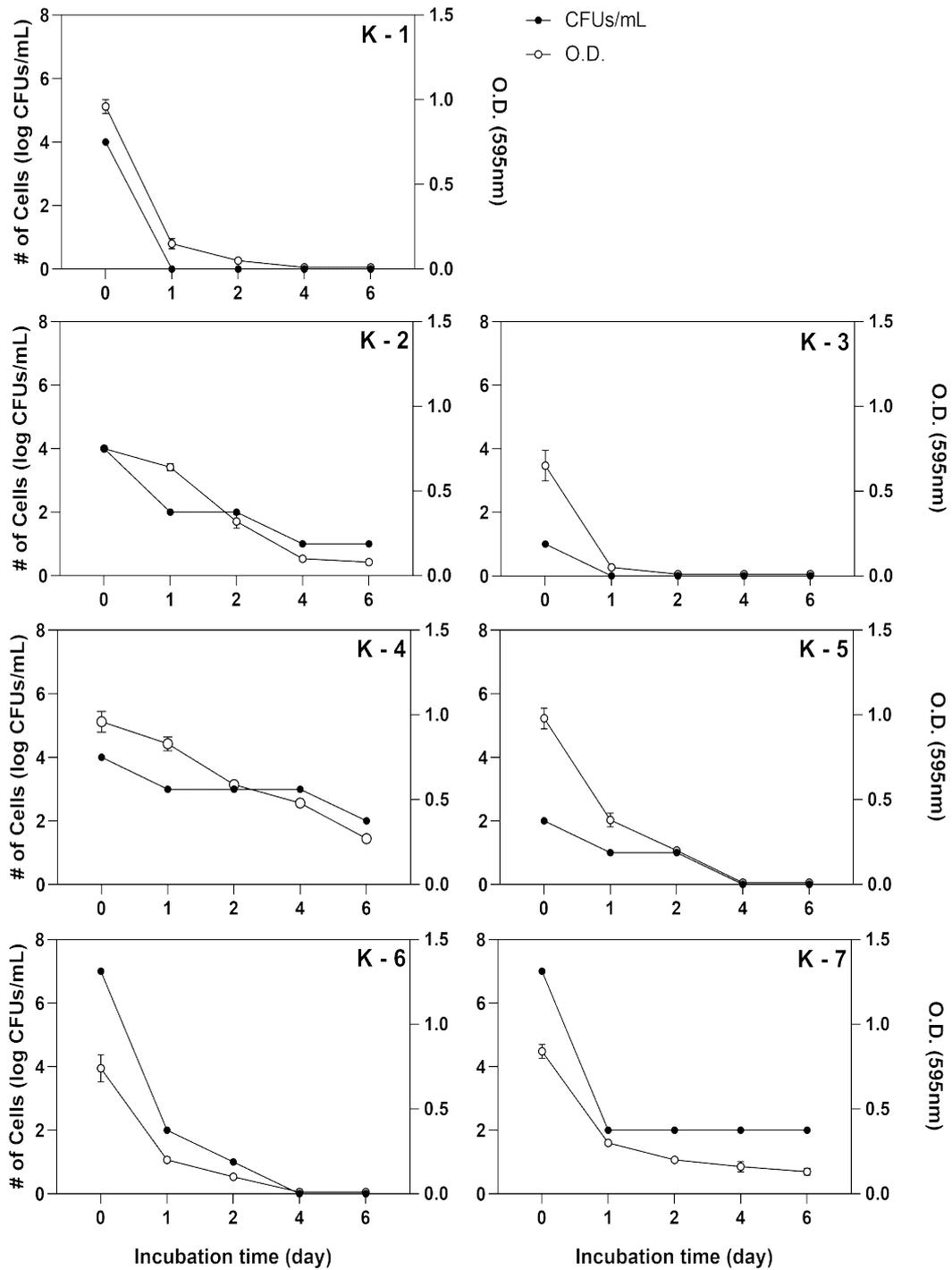


Figure 2. Growth characteristics of microorganisms isolated from K sludge in wastewater.

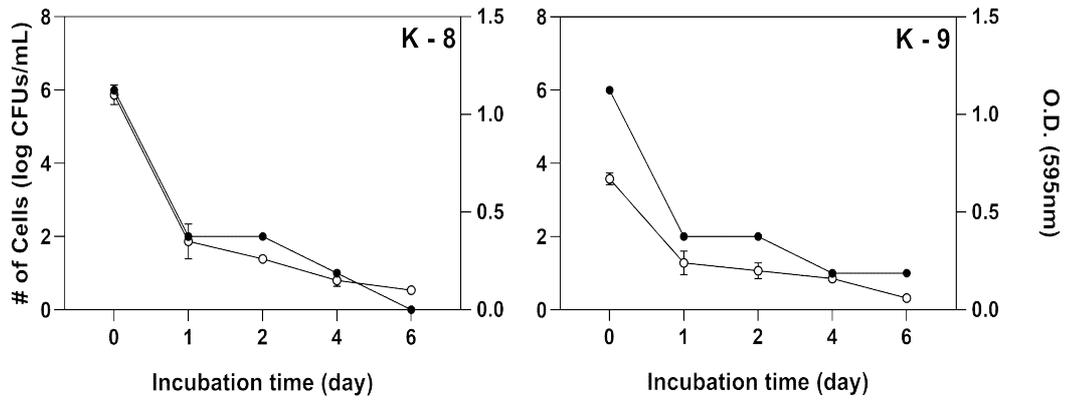


Figure 2. Continued.

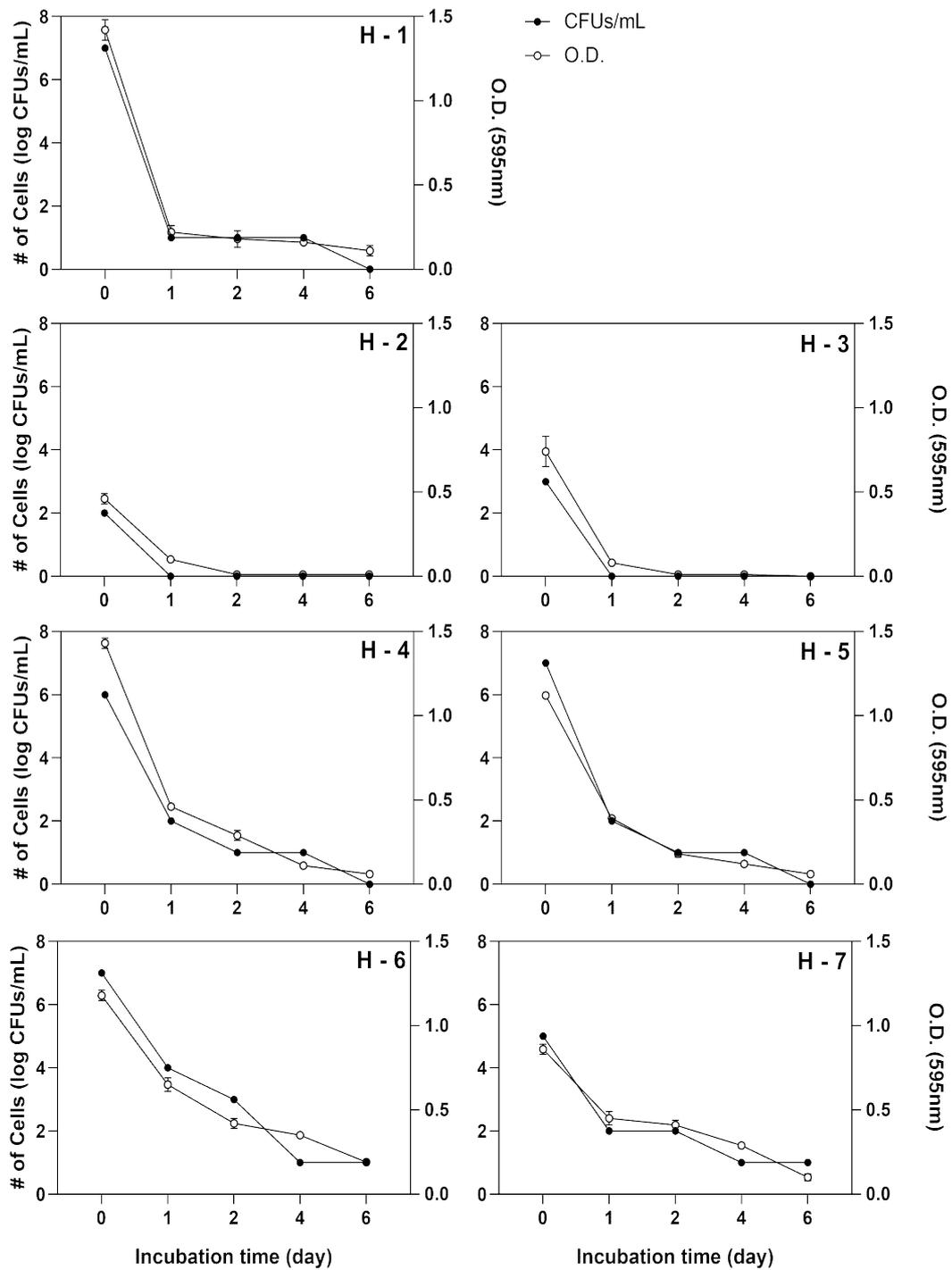


Figure 3. Growth characteristics of microorganisms isolated from H sludge in wastewater.

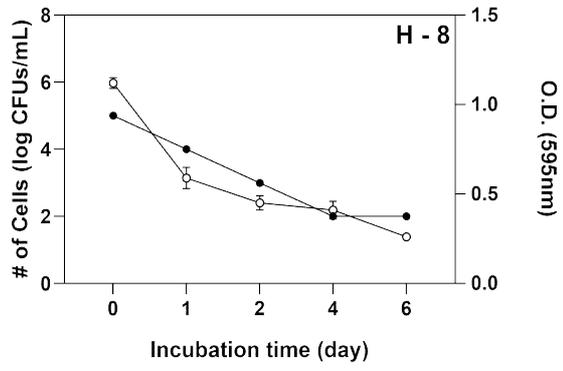


Figure 3. Continued.

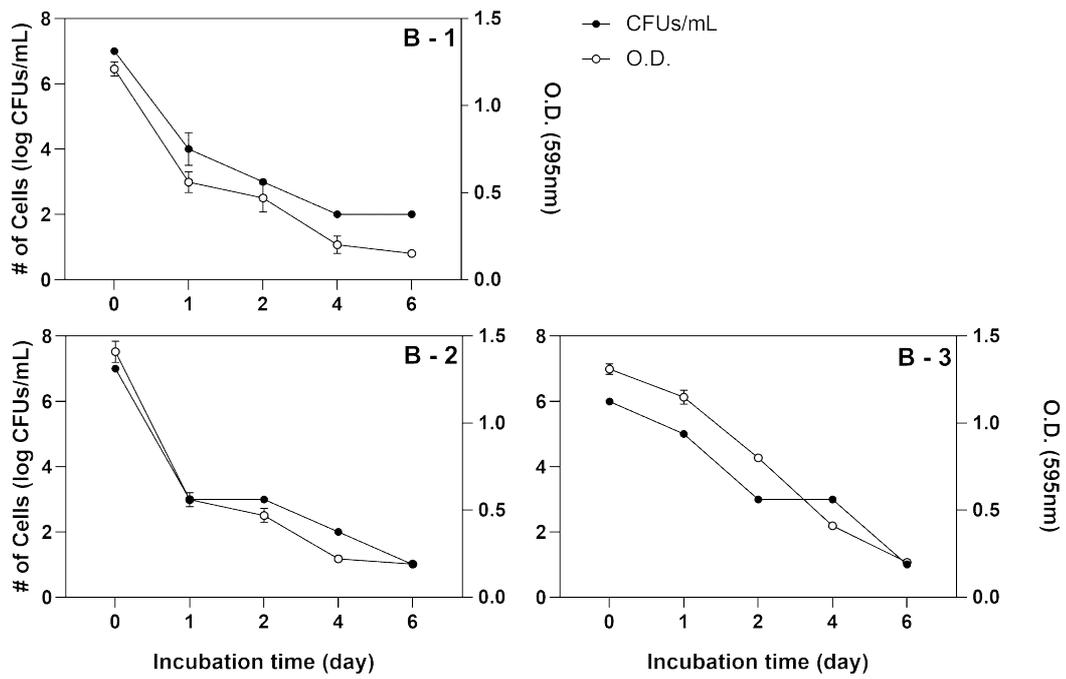


Figure 4. Growth characteristics of microorganisms isolated from microbial agent in wastewater.

2. 분리한 미생물의 특성

온도에 따른 성장 특성

분리한 균주의 배양 온도의 변화에 따른 성장 차이를 확인하기 위해서 각각 15°C, 35°C 및 55°C에서 배양하였다. 15°C 및 55°C의 경우 성장 여부를 확인하기 위해 plate count agar에 각 분리 균주를 희석 도말 후 각 온도의 배양기에서 48시간 동안 배양하였다(Table 5). 35°C의 경우 성장 여부는 접종원의 농도 확인 실험에서 확인이 되었기 때문에, 배양 시간에 따른 균주의 성장 정도를 확인하고자 하였다. 액체 배양 배지에 각 균주를 접종하여 6일간 진탕배양을 하였고, 24시간 간격으로 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 동시에 phosphate buffered saline으로 연속 희석하여 최대 희석배수에서 자라난 집락의 수를 측정하여 집락형성단위로 환산하였다(Figures 5-7).

14개의 분리 균주는 55°C 이상에서 전혀 자라지 않았고, 15°C 이하에서 K-9, H-4, H-8은 자라지 않았다. 35°C에서 모든 균주는 배양 후 24시간에서 48시간 사이에 대수증식기(exponential phase)로 확인되었고, 48시간에서 72시간 이후부터 정체기(stationary phase), 그 이후에는 사멸기(death phase)의 시작으로 확인되었다.

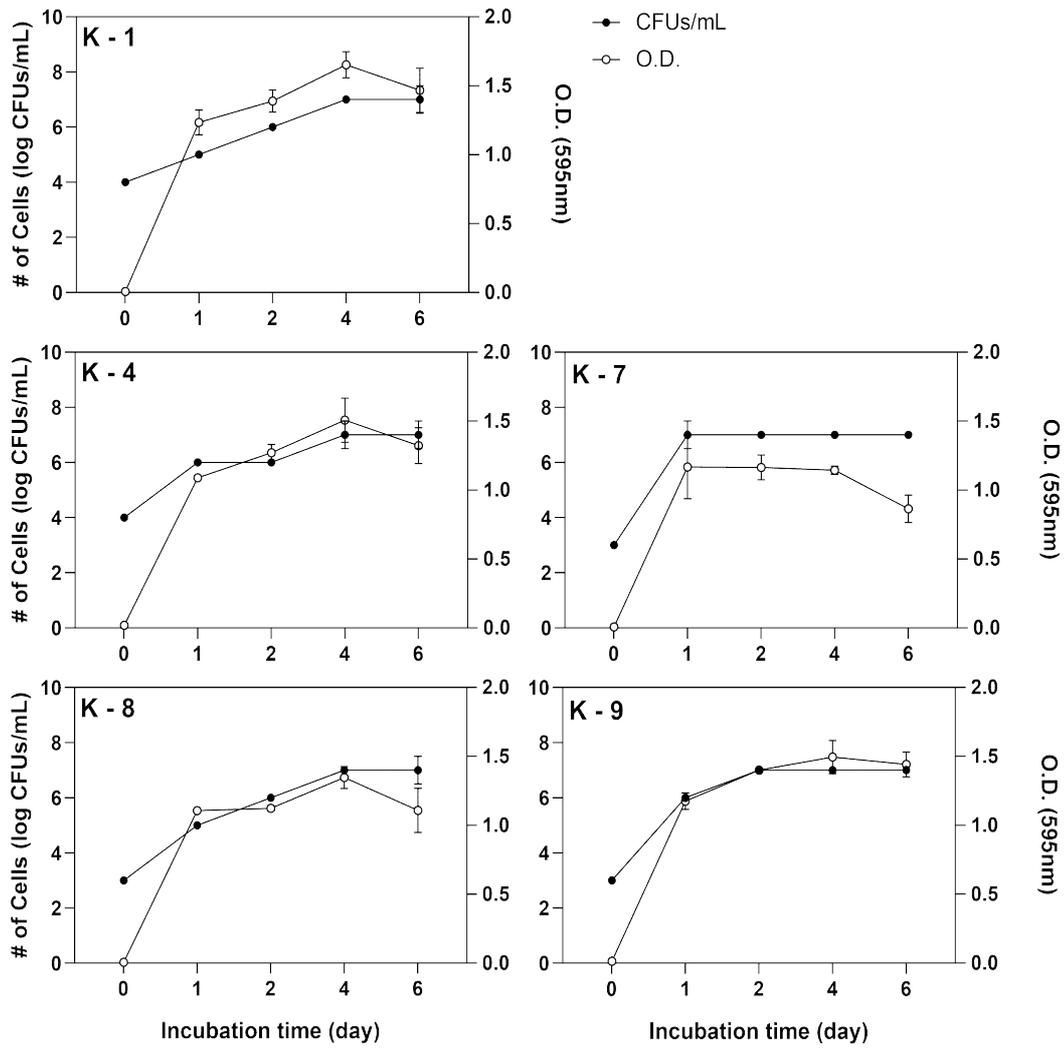


Figure 5. Growth characteristics of isolated microorganisms from K sludge at 35°C.

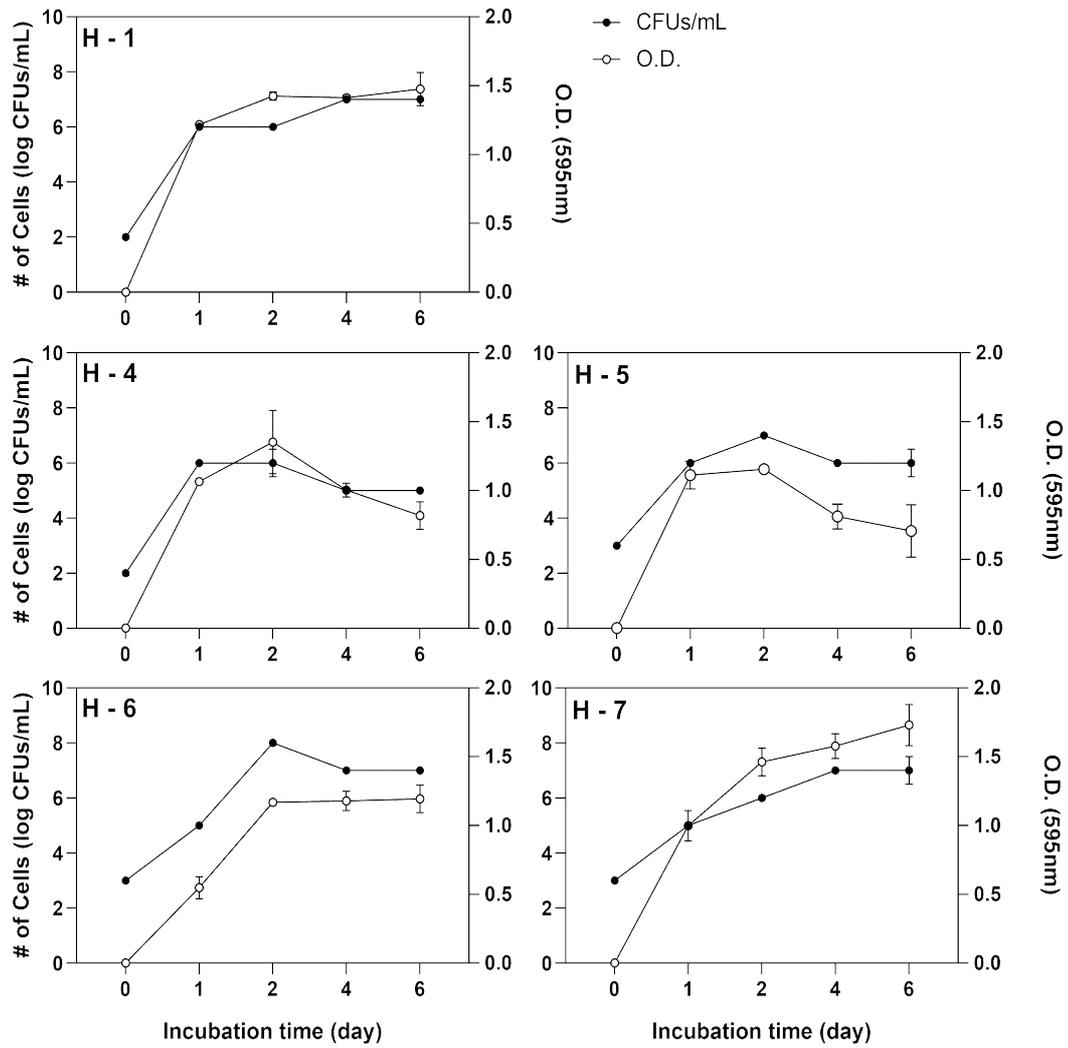


Figure 6. Growth characteristics of isolated microorganisms from H sludge at 35°C.

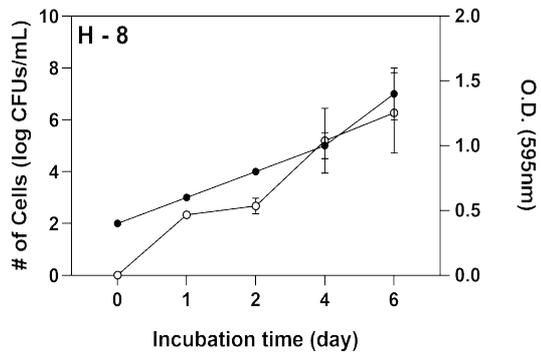


Figure 6. Continued.

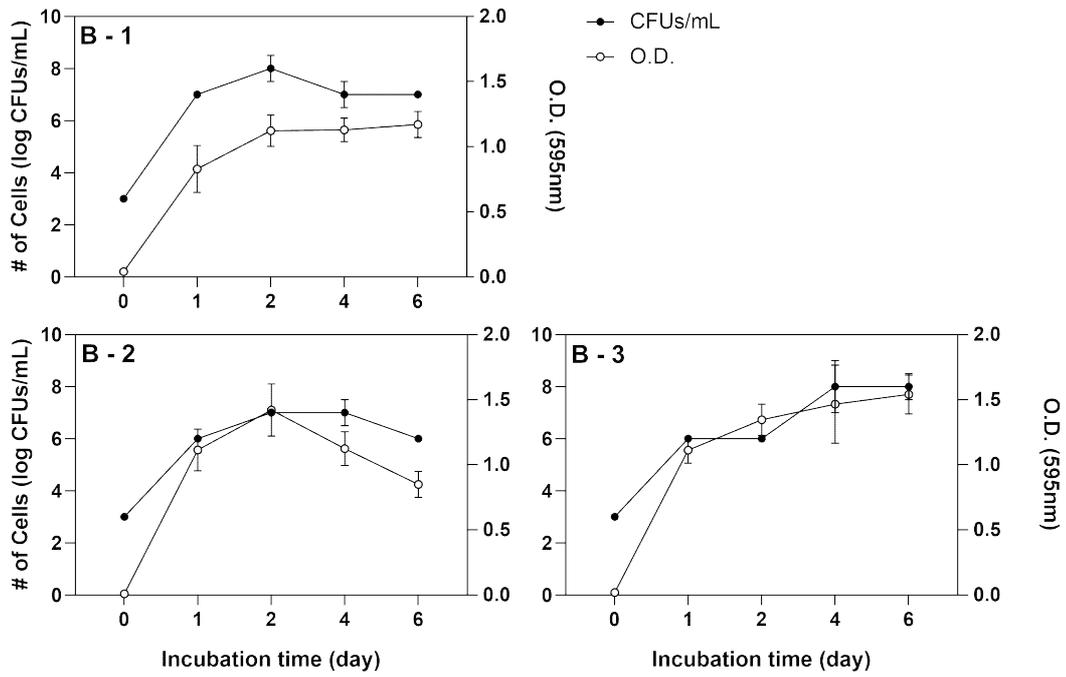


Figure 7. Growth characteristics of isolated microorganisms from microbial agent at 35°C.

Table 5. Growth of isolated microorganisms at different temperatures.

* (++) : Good growth. (+) : Growth , (-) : No growth

Isolates	Incubated at 15°C	Incubated at 55°C
K-2	(++)	(-)
K-4	(++)	(-)
K-7	(+)	(-)
K-8	(++)	(-)
K-9	(-)	(-)
H-1	(++)	(-)
H-4	(-)	(-)
H-5	(++)	(-)
H-6	(+)	(-)
H-7	(+)	(-)
H-8	(-)	(-)
B-1	(+)	(-)
B-2	(+)	(-)
B-3	(+)	(-)

염분농도에 따른 성장 특성

분리 균주의 염분 농도에 따른 성장 여부를 확인하기 위해 sea water agar에서 agar 성분을 제외한 액체 배양 배지를 염분 농도가 3% 및 6%인 배지를 2 set를 준비하여 각 균주를 1%로 접종 후 35°C에서 6일간 배양하였다. K 공장의 슬러지로부터 분리한 균주의 경우 염분 농도가 3%의 sea water broth에서 plate count broth와 비슷한 성장 정도를 보였으나, 염분 농도가 6%의 액체 배양 배지에서는 K-7를 제외한 나머지 균주들은 성장하지 못하였다(Figure 7). H 공장의 슬러지로부터 분리한 균주는 염분 농도가 3%의 액체 배양 배지에서 일반 액체 배양 배지와 비슷한 성장 정도를 보였으나, 염분 농도가 6%의 액체 배양 배지에서는 H-6을 제외한 나머지 균주들은 성장하지 못하였다(Figure 8). 미생물 제제로부터 분리한 균주들은 염분 농도가 3% 및 6%인 액체 배양 배지에서 자랄 수 있는 것이 확인되었다(Figure 9).

석유화학 공장에서 발생 되는 고농도 석유화학 폐수는 공정이나 폐수의 회석 혹은 중화와 같은 전처리 공정에서 염분 농도가 높아질 수 있어서 분리한 세균의 염분 농도에 따른 성장 특성을 확인하였고, 회석용수 혹은 냉각수로 사용되는 해수의 농도를 기준으로 염분농도가 3% 및 6%인 조건을 적용했을 때 3%의 염분 농도에서는 14개의 분리 세균이 모두 성장하였지만, 6%의 염분 농도에서는 K-7, H-6, H-8, B-1, B-2, 및 B-3만 성장하는 것을 확인하였다.

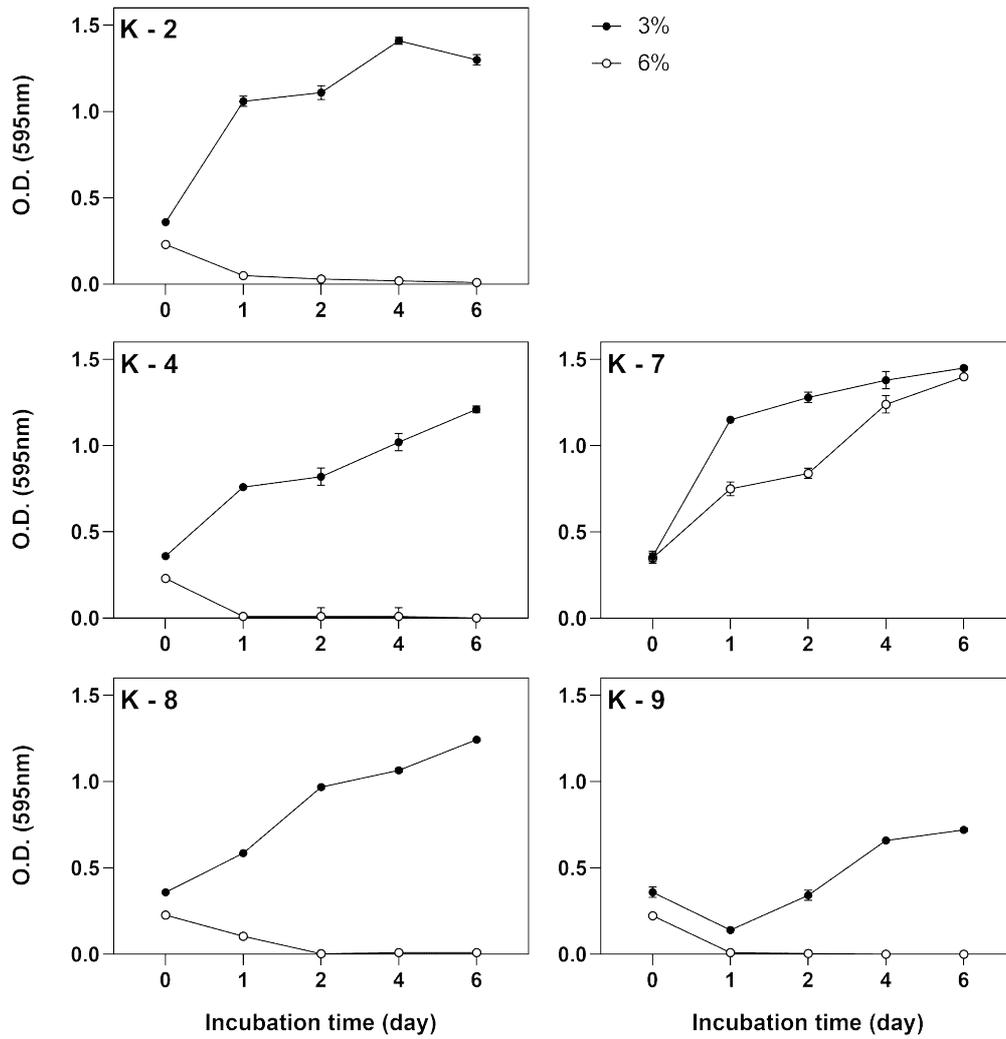


Figure 8. Growth characteristics of isolated microorganisms from K sludge in liquid media at different salt concentrations.

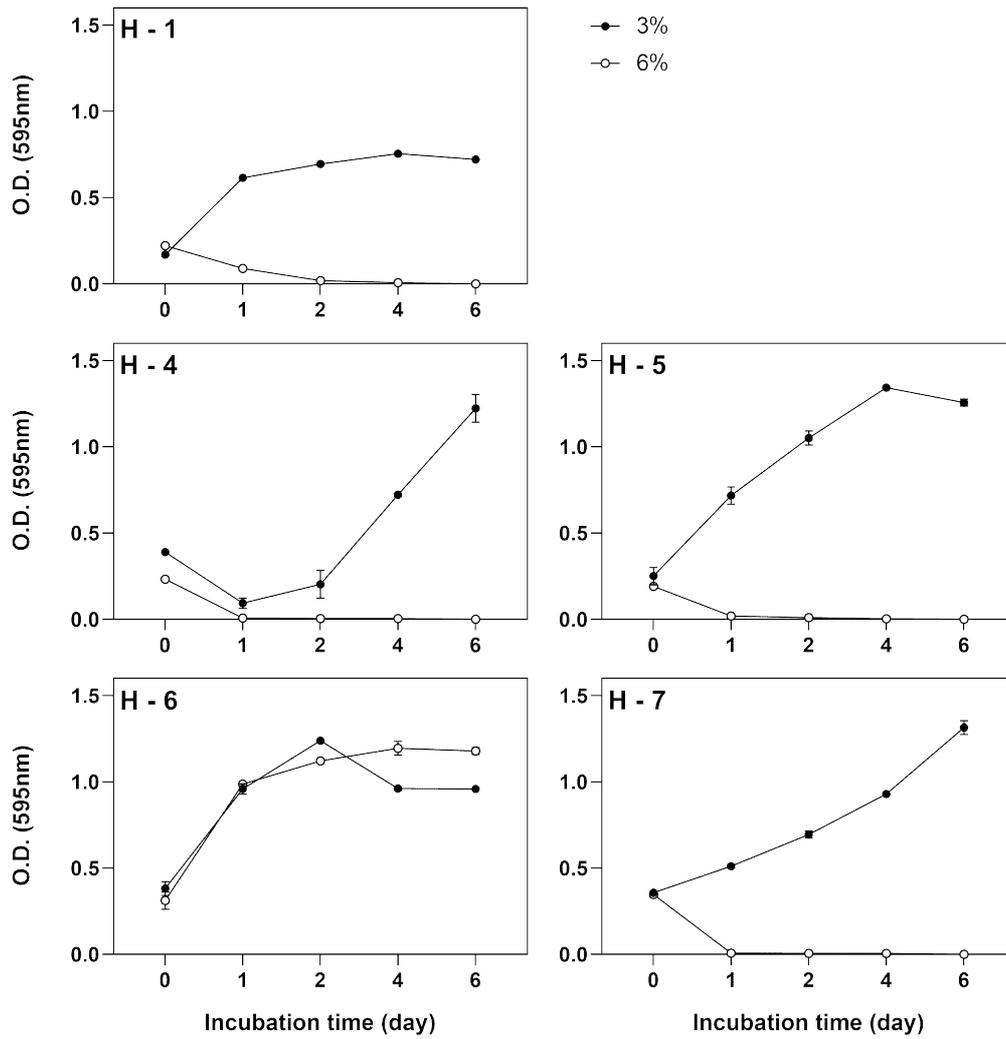


Figure 9. Growth characteristics of isolated microorganisms from H sludge in liquid media at different salt concentrations.

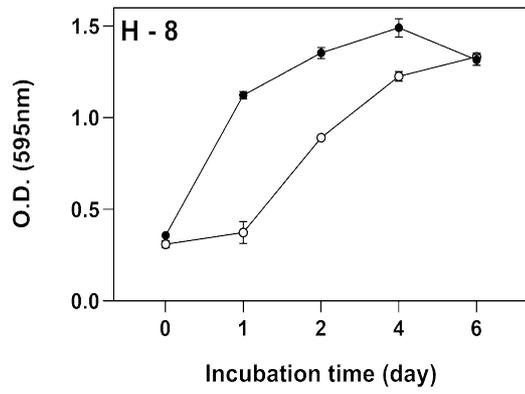


Figure 9. Continued.

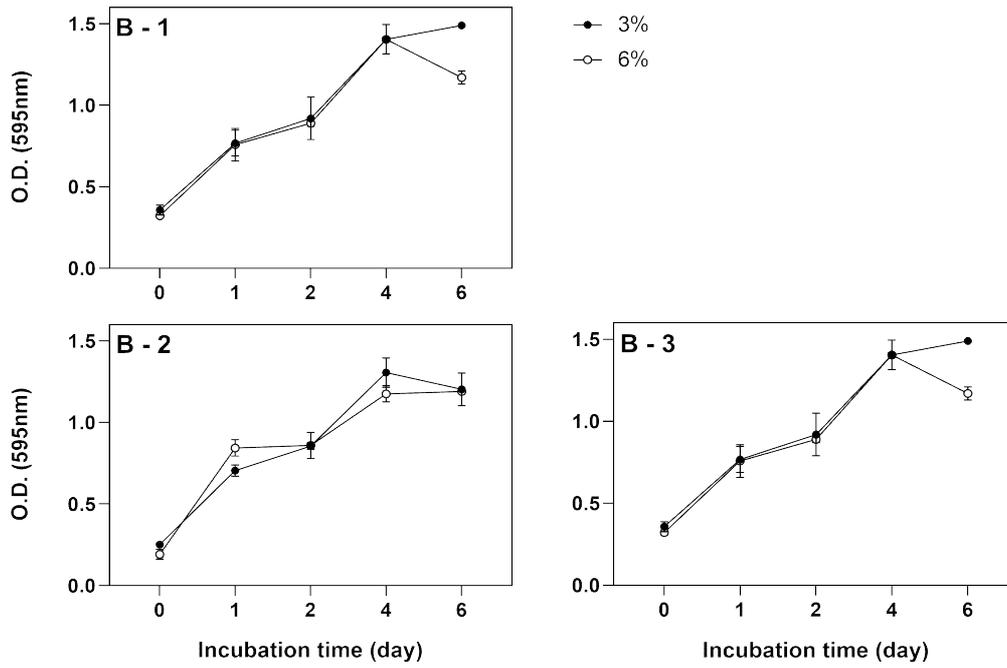


Figure 10. Growth characteristics of isolated microorganisms from microbial agent in liquid media at different salt concentrations.

폐수 내 성장 특성

분리한 미생물 균주의 고농도 폐수 내 성장 특성을 확인하기 위해 고농도 석유화학 폐수와 멸균한 증류수로 폐수를 희석하여 농도가 10% 및 50%인 희석 폐수에 접종하였을 때, 희석하지 않은 폐수 및 농도가 50%인 폐수에서 모두 사멸하였으나 농도가 10%인 폐수에서 모두 성장하는 것을 확인하였다. 희석 폐수에서 COD를 측정하였을 때 각각의 분리 미생물 모두 폐수 내 유기물을 분해하여 탄소원/에너지원으로 활용하여 성장할 수 있는 것을 관찰하였고, 유기물 분해 효율은 최소 약 76%에서 최대 81%로, 평균 약 80%로 측정되었다(Figures 10-11).

분리 균주들을 기반으로 고농도 석유화학 폐수에서 대사 및 분해능을 분석하여 유기물을 분해하기 위한 최적 조건을 확인하여 생물반응기의 운전조건과 전처리 공정을 개선한다면 2차 오염물질의 발생과 운전 비용이 낮은 생물학적 처리법이 현재 많이 사용되고 있는 물리화학적 처리 방법을 대체할 수 있을 것으로 예상된다.

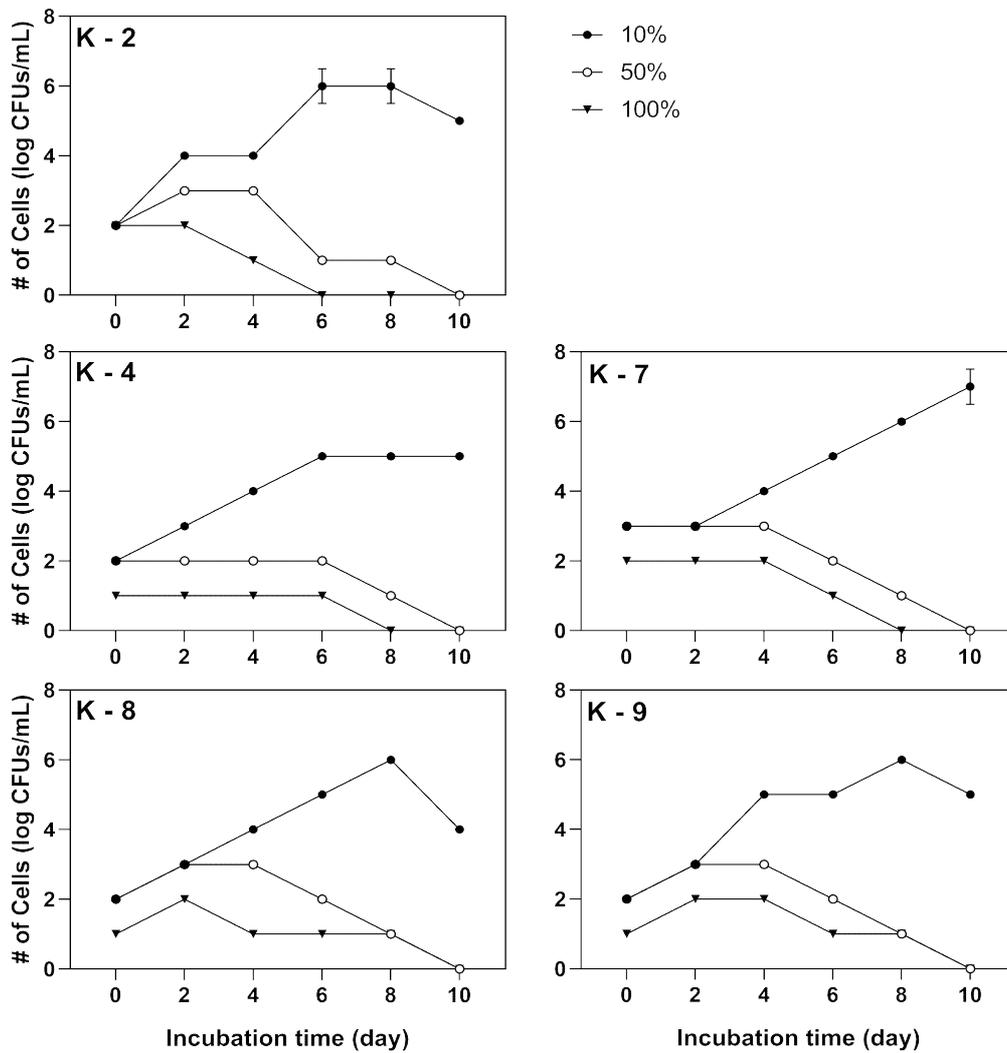


Figure 11. Growth characteristics of isolated microorganisms from K sludge at different petrochemical wastewater concentrations.

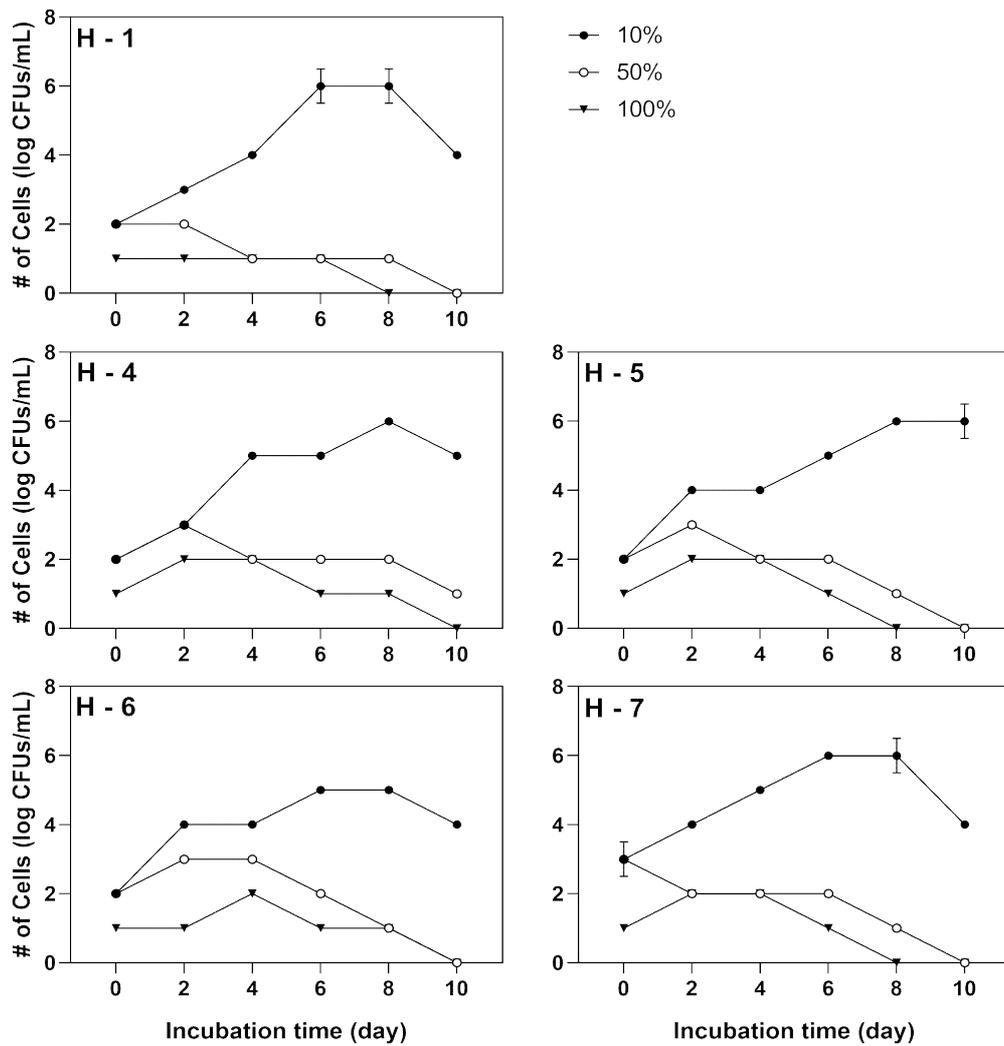


Figure 12. Growth characteristics of isolated microorganisms from H sludge at different petrochemical wastewater concentrations.

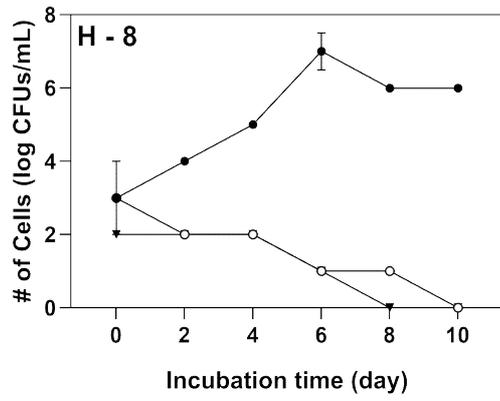


Figure 12. Continued.

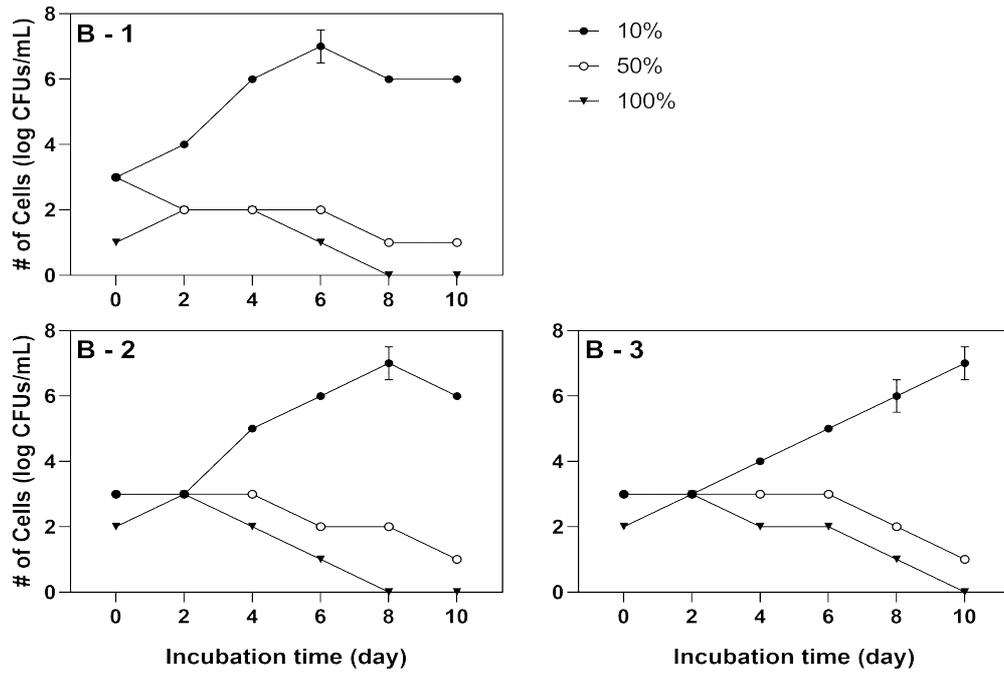


Figure 13. Growth characteristics of isolated microorganisms from microbial agent at different petrochemical wastewater concentrations.

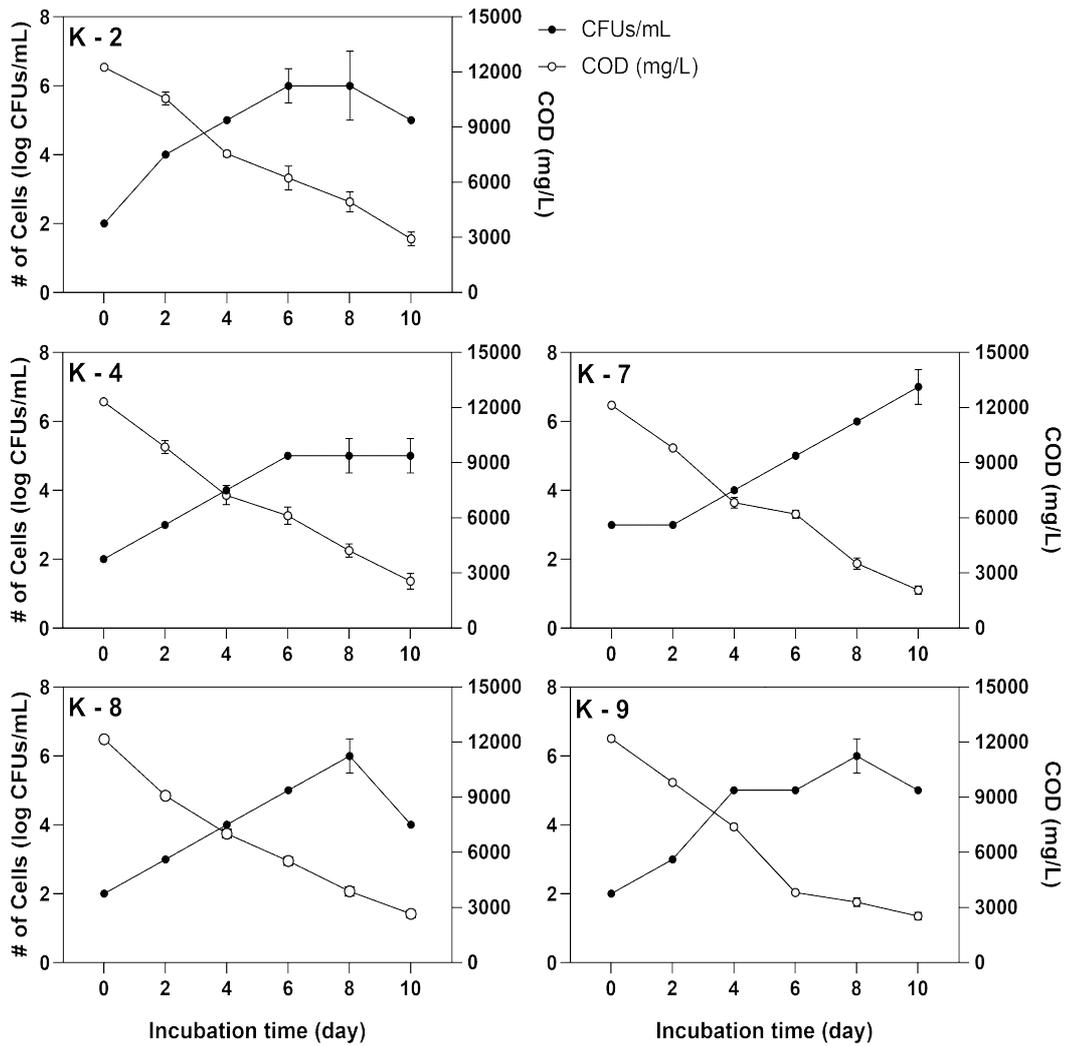


Figure 14. Reduction of COD by isolated microorganisms from K sludge in petrochemical wastewater.

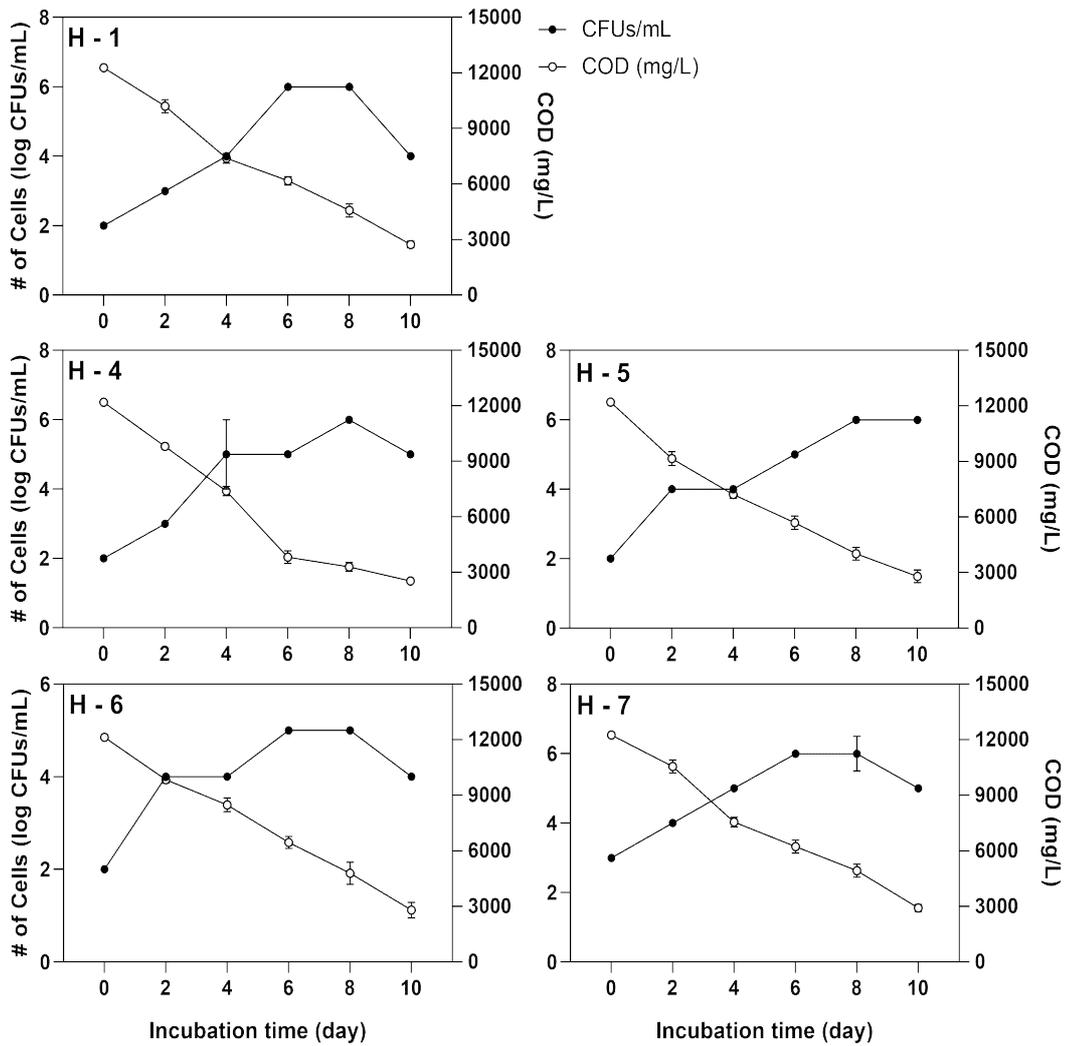


Figure 15. Reduction of COD by isolated microorganisms from H sludge in petrochemical wastewater.

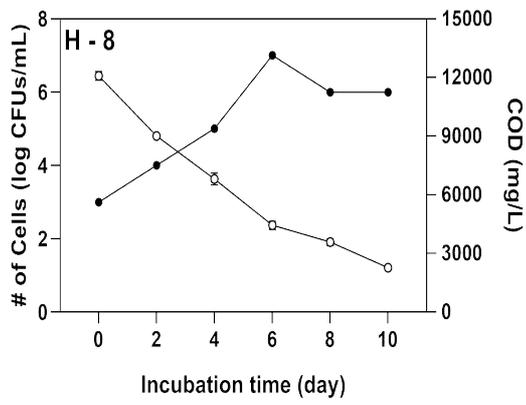


Figure 15. Continued.

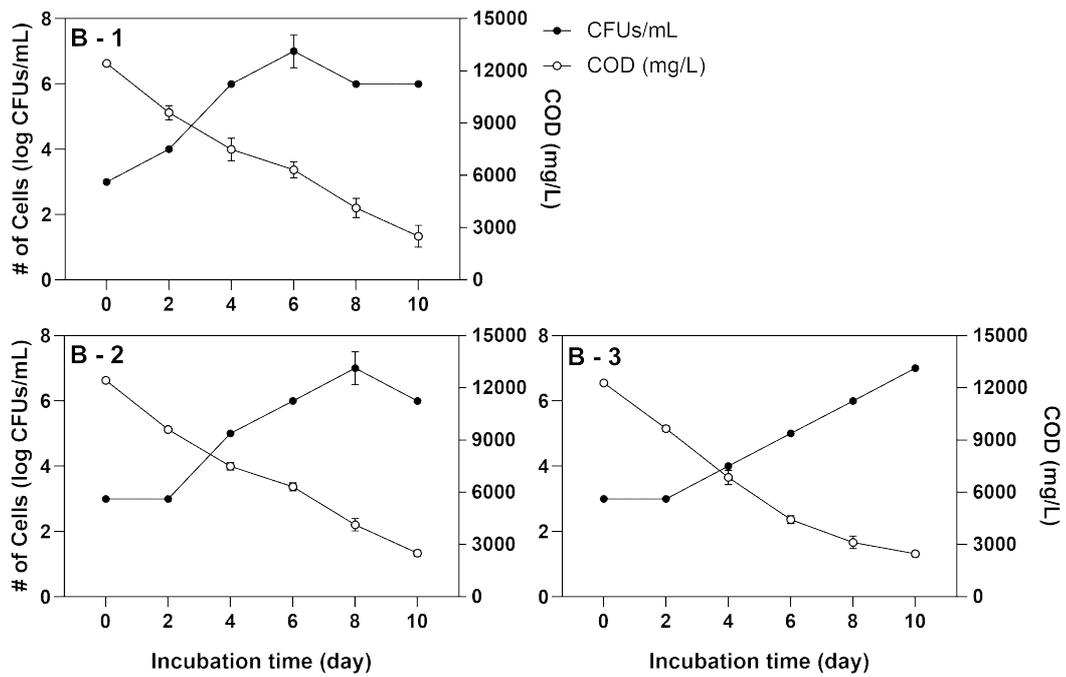


Figure 16. Reduction of COD by isolated microorganisms from microbial agent in petrochemical wastewater.

분리한 미생물의 형태학적 특성

그람 염색과 내생포자 염색(Schaeffer-Fulton method)을 통해 14개의 미생물 분리 균주의 형태학적 특성을 관찰하였다(Table 6.).

모든 미생물 분리 균주가 그람 양성 세균으로 관찰되었고 내생포자를 생성할 수 있는 것을 확인하였다.

Table 6. Gram staining and endospore staining of isolated microorganisms.

* (+): gram positive, (○): spore formation

Isolates	Gram staining	Endospore staining
K-2	(+)	(○)
K-4	(+)	(○)
K-7	(+)	(○)
K-8	(+)	(○)
K-9	(+)	(○)
H-1	(+)	(○)
H-4	(+)	(○)
H-5	(+)	(○)
H-6	(+)	(○)
H-7	(+)	(○)
H-8	(+)	(○)
B-1	(+)	(○)
B-2	(+)	(○)
B-3	(+)	(○)

3. 분자생물학적 동정

염기서열 분석 결과

분리한 14개의 미생물들의 순수배양으로부터 얻은 16S rRNA gene의 부분 염기서열은 각각 BioEdit(version 7.7.1.)의 contig assembly program(CAP)을 사용하여 하나의 서열로 배열하였다. 결정된 염기서열을 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank에서 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST, version 2.12.0+)을 이용하여 등록된 염기서열과 비교하여 14개 분리 미생물 균주의 closest match를 조사하였다(Table 7).

순수분리한 미생물 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과를 살펴보면, K 공장의 슬러지로부터 분리된 미생물은 *Bacillus cereus*, *Bacillus proteolyticus*, *Brevibacillus fluminis*, *Bacillus sp.* 등 *Bacillus* 속의 5개의 미생물 균주로 확인되었고, H 공장의 슬러지의 경우 *Bacillus cereus*, *Brevibacillus fluminis*, *Lysinbacillus bronitolerans*, *Brevibacillus parabrevis*, *Bacillus sp.* 등 *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinbacillus* 속의 6개의 미생물 균주로 확인되었다. 미생물파우더의 경우 *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* 등 *Bacillus* 속의 3개의 균주가 확인되었다.

*Bacillus cereus*는 그람 양성의 간균으로 하위 계통에 따라 혐기성 혹은 통성혐기성이다. 최적온도는 25°C - 37°C의 중온성 세균이며 최적 pH는 6 - 8의 중성에서 잘 자라지만 일부 계통은 극단적인 조건에서도 자랄 수 있다(7). *Bacillus proteolyticus*는 그람 양성의 통성혐기성 간균형태의 세균이고, 최적온도는 20°C - 45°C의 중온성 세균이며 최적 pH는 5 - 9의 중성에서 잘 자란다. 3% 정도의 염분이 존재하는 환경에서도 잘 자랄 수 있다(16). *Brevibacillus fluminis*는 그람 양성의 호기성 간균이다. 최적온도는 20°C - 45°C의 중온성 세균이며 pH 5 - 7에서 자랄 수 있다. 바다로 이어진 강의 하구 혹은 습지의 퇴적물에서 발견될 수 있다(6). *Bacillus tequilensis*는 그람 양성의 간균형태의 호기성 세균이다(8). *Bacillus parabrevis*는 그람 양성의 통성혐기성 간균이다. 1900년에 분리된 *Bacillus brevis*와 유전자 염기서열이 유사하며 내생포자를 생성할 수 있다(11). *Bacillus subtilis*는 그람 양성의 호기성 간균으로 주로 토양에서 발견되며 최적온도는 30°C의 중온성 세균이다(13). *Lysinbacillus bronitolerans*는 그람 양성의 간균이며 최적온도는 16°C - 45°C이고, pH는 5.5 - 9.5이다. 일반적으로 5% 이하의 염분이 존재하는 환경에서도 자랄 수 있다(3).

Table 7. Molecular identification of isolated microorganisms.

Isolates	Sequence length(bp)	Closest match (accestion no.)	Similarity (%)
K-2	1423	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 (NR 115714.1)	1421/1421 (100%)
K-4	1424	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 (NR 115714.1)	1424/1425 (99%)
K-7	1424	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365 (NR 17735.1)	1424/1424 (100%)
K-8	1442	<i>Bacillus sp.</i> strain ILR 58 (MK 696376.1)	1441/1442 (99%)
K-9	1411	<i>Brevibacillus fluminis</i> strain CJ 71 (NR 116293.1)	1403/1408 (99%)
H-1	1420	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 (NR 115714.1)	1418/1418 (100%)
H-4	1410	<i>Brevibacillus fluminis</i> strain CJ 71 (NR 116293.1)	1400/1405 (99%)
H-5	1443	<i>Bacillus sp.</i> strain ILR 58 (MK 696376.1)	1442/1443(99%)
H-6	1421	<i>Lysinbacillus bronitolerans</i> strain NRBC 103108 (NR 144027.1)	1413/1423 (99%)
H-7	1422	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 (NR 115714.1)	1422/1423 (99%)
H-8	1424	<i>Brevibacillus parabrevis</i> strain PS 12 (MN 326592.1)	1425/1427 (99%)

Table 7. Continued.

Isolate	Sequence length(bp)	Closest match (accession no.)	Similarity (%)
B-1	1420	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b (NR 104919.1)	1419/1420 (99%)
B-2	1420	<i>Bacillus subtilis</i> strain DSM 10 (NR 027552.1)	1420/1421 (99%)
B-3	1420	<i>Bacillus subtilis</i> strain DSM 10 (NR 027522.1)	1418/1418 (100%)

V. 참고문헌

1. 환경부. 2014. 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률. 환경부, 세종.
2. 환경부 물환경정책국 수질관리과. 2022. 산업폐수의 발생과 처리 - 환경오염 배출업소 조사 결과. 환경부, 세종.
3. Ahmed, I., A. Yokota., A. Yamazoe, and T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinbacillus bronotolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinbacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinbacillus sphaericus* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**:1117-1125.
4. Atlas, R. M. 2010. Handbook of Microbiological Media, 4th (ed.). p.797-798. CRC press, Boca Raton, USA.
5. Beveridge, T. J., and J. A. Davies. 1983. Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the gram stain. J. Bacteriol. **156**:846-858.
6. Choi, M. J., J. Y. Bae, K. Y. Kim, H. Kang, and C. J. Cha. 2010. *Brevibacillus fluminis* sp. nov., isolated from sediment of estuarine wetland. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**:1595-1599.
7. Drobniewski, F. A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. Clin. Microbiol. Rev. **6**:324-348.
8. Gatson, J. W., B. F. Benze, C. Chandrasekaran, M. Satomi, K. Venkateswaran, and M. E. Hart. 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**:1475-1484.
9. Murray R. G. E., R. N. Doetsch, and C. F. Robinow. Determinative and cytological Light microscopy. p.33-24. In Gerhardt, P. R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Kreig (ed.), Methods for General and Molecular Bacteriology ASM press, Washington, DC.
10. Goldman, E., and L. H. Green. 2009. Practical Handbook of Microbiology, 4th (ed.). CRC press, Boca Raton, USA.
11. Inan, K., A. Ozer, H. Ibrahim Gular, A. Osman Belduz, and S. Canakci. 2016. *Brevibacillus gelatini* sp. nov., isolated from a hot spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **66**:712-718.
12. Kim, M. S., K. M. Lee, and C. Chang. 2020. Advanced oxidation technologies for the treatment of non-biodegradable industrial wastewater. J. Korean Soc. Water Wastewater. **34**:445-462.
13. Koch, A. L. 2001. Bacterial Growth and Form, 2nd (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

14. **Lechtman, M. D., J. W. Bartholomew, A. Phillips, and M. Russo.** 1965. Rapid methods of staining bacterial spores at room temperature. *J. Bacteriol.* **89**:848–854.
15. **Lefebvre, O., and R. Moletta.** 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Res.* **40**:3671–3682.
16. **Liu, Y., J. Du, Q. Lai, R. Zeng, D. Ye, J. Xu, and Z. Shao.** 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**:2499–2508.
17. **Gerba, C. P., and I. L. Pepper.** 2009. Wastewater treatment and disinfection. p.503–538. *In* Maier, R. M., I. L. Pepper, and C. P. Gerba (ed.), *Environmental Microbiology* 2nd (ed.). Academic press, Amsterdam, Netherlands.
18. **Schaeffer, A. B., and M. D. Fulton.** 1933. A simplified method of staining endospores. *Science* **77**:194.
19. **Metcalf & Eddy, Inc.** 2003. Wastewater treatment and disinfection, 4th (ed.) p.583–594. *In* Tchobanoglous, G, F. L. Burton, and H. D. Stensl (ed.) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th (ed.). Mcgraw–Hill, Boston.
20. **Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **7**:203–214.

Abstract

Wastewater generated from the petrochemical industry typically exhibits a high concentration of organic matter and contains toxic substances. The treatment of high-strength petrochemical wastewater traditionally relies on physical and chemical methods such as liquid incineration and wet oxidation. However, these approaches incur significant maintenance and operational costs and contribute to secondary environmental pollution through the disposal of used chemicals. Thus, a shift towards a biological treatment method is imperative, aiming to mitigate operational expenses and minimize environmental impact.

The purpose of this study was to contribute to the biological treatment of high-strength petrochemical wastewater by isolating microorganisms capable of thriving in this challenging environment.

As the first step, we successfully established 26 pure cultures of bacteria which showed growth on solid medium at 35°C. Subsequent inoculation of these microorganisms into petrochemical wastewater revealed the resistance of only 14 strains. These 14 microorganisms exhibited robust growth at 15°C, while only three strains capable of growth at 55°C. Moreover, their adaptability was demonstrated by thriving in a medium with a 3% salt concentration, with only five strains capable of growth at 6% salt concentration. Resolution measurements in a medium containing high concentrations of petrochemical wastewater confirmed the utilization of wastewater substances as carbon and energy sources by the isolated microorganisms.

All 14 isolated microorganisms were identified as Gram-positive bacteria capable of forming endospore. Molecular identification based on the 16S rRNA gene sequences revealed that nine belonged to the *Bacillus* genus, with *Bacillus cereus* (4), *Bacillus subtilis* (2), *Bacillus proteolyticus* (1), and *Bacillus tequilensis* (1) as closest matches. The remaining isolates were identified as *Bacillus* sp. (2) without a specified species designation. Three isolates belonged to the *Brevibacillus* genus, with *Brevibacillus fluminis* (2) and *Brevibacillus parabrevis* (1). Additionally, one isolate from the *Lysinbacillus* genus was identified as *Lysinbacillus bronitolerans*.

This comprehensive microbial characterization underscores the potential of these strains, particularly within the *Bacillus*, *Brevibacillus*, and *Lysinbacillus* genera, for the biological treatment of high-concentration petrochemical wastewater. These findings contribute valuable insights toward developing cost-effective and environmentally sustainable solutions for the petrochemical industry.

