[UCI]I804:24011-200000232797

2006年度 8月
教育學碩士(環境)學位論文

고정화 활성슬러지를 이용한 시안화합물 분해에 관한 연구

朝 鮮 大 學 校 敎 育 大 學 院

環 境 敎 育

金 明 熙

고정화 활성슬러지를 이용한 시안화합물 분해에 관한 연구

A Study on the Removal of Cyanide by Immobilized Activated Sludge

2006年 8月 日

朝 鮮 大 學 校 敎 育 大 學 院

環 境 敎 育

金 明 熙

고정화 활성슬러지를 이용한
시안화합물 분해에 관한 연구

指 導 敎 授　鄭 京 勳

이 論文을 敎育學碩士學位 申請論文으로 提出함.

2006年　4 月　　日

朝 鮮 大 學 校　敎 育 大 學 院

環 境 敎 育

金　明　熙

고정화 활성슬러지를 이용한
시안화합물 분해에 관한 연구

審査 委員長 朝鮮大學校 敎授 崔 炯 一 印

審 査 委 員 朝鮮大學校 敎授 申 大 允 印

審 査 委 員 朝鮮大學校 敎授 鄭 京 勳 印

2006年 6 月 日

朝 鮮 大 學 校 敎 育 大 學 院

목 차

List of Figures ····· iii
List of Tables ····· v
ABSTRACT ····· vi

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 이론적 고찰 ····· 3

A. 시안화합물 ····· 3
1. 시안화합물의 특성 ····· 3
2. 시안화합물의 발생원 ····· 4
3. 시안 분해 미생물 ····· 5
B. 시안화합물 처리 방법 ····· 9
1. 물리 · 화학적 처리 ····· 9
2. 생물학적 처리 ····· 11
C. 미생물 고정화법 ····· 12
1. 고정화법의 정의 및 역사 ····· 12
2. 고정화법의 특성 ····· 14
3. 포괄고정화법의 원리 ····· 20
4. 포괄고정화 재료 및 조건 ····· 20

Ⅲ. 실험방법 및 재료 ····· 22

A. 활성슬러지 순화 및 고정화 활성슬러지 제조 ····· 22
1. 공시활성슬러지 ····· 22
2. 합성폐수의 조성 ····· 23

3. 고정화 재료 및 방법 ····· 24
4. 주사전자현미경 (SEM) ····· 24
B. 실험장치 ····· 27
1. 회분식 실험장치 ····· 27
2. 연속식 실험장치 ····· 28
C. 분석방법 ····· 31

Ⅳ. 결과 및 고찰 ····· 32

A. 회분식 실험 ····· 32
1. 포기에 따른 시안화합물의 변화 ····· 32
2. 슬러지량에 따른 시안화합물 분해 효율 ····· 34
3. 비드의 슬러지 함량이 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 34
4. 기질농도가 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 37
5. pH가 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 41
6. 비드 충진율이 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 44
7. 시안화합물 분해에 따른 암모니아성질소 생성 ····· 46
8. Glucose가 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 48
9. SCN^- 이 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 51
10. Phenol이 시안화합물 분해에 미치는 영향 ····· 53
B. 연속식 실험 ····· 56
1. HRT에 따른 시안화합물의 분해 효율 ····· 56

Ⅴ. 결 론 ····· 58

List of Figures

Fig. 1. Dissociation of hydrogen cyanide as a function of pH ····· 4
Fig. 2. The pathway on the hydrolysis of cyanide ion ····· 8
Fig. 3. Continuous chlorination of cyanide wastes ····· 10
Fig. 4. Schematic of the immobilized method ····· 15
Fig. 5. Procedure for immobilization of activated sludge ····· 25
Fig. 6. Photograph of bead with immobilized activated sludge ····· 26
Fig. 7. Scanning electron micrograph before (A) and after (B) immobilized on PEG 60 days in activated sludge ····· 26
Fig. 8. Schematic diagram of the experimental apparatus for batch system ····· 28
Fig. 9. Schematic diagram of the experimental apparatus for continuous system ····· 29
Fig. 10. Changes of cyanide concentration according to the aeration in distilled water ····· 32
Fig. 11. Effect of MLSS on the cyanide degradation by activated sludge ···· 34
Fig. 12. Effect of the amount of activated sludge on the cyanides efficiency ····· 35
Fig. 13. Effect of initial CN^- concentration on the CN^- degradation(A) and Lineweaver - burk plots on the cyanide degradation by Activated sludge(B) ····· 38
Fig. 14. Effect of initial CN^- concentration on the CN^- degradation(A) and Lineweaver - burk plots on the cyanide degradation by Immobilized activated sludge(B) ····· 39
Fig. 15. Effect of pH on the cyanide removal with activated sludge(A)

and Relative activity(B) ····· 41
Fig. 16. Effect of pH on the CN^- degradation by immobilized activated sludge(A) and Relative activity(B) ····· 43
Fig. 17. Effect of amount of immobilized bead on the CN^- removal ····· 45
Fig. 18. Biotransformation of cyanides by immobilized activated sludge · 47
Fig. 19. Effect of glucose concentration on the cyanide degradation by immobilized activated sludge ····· 49
Fig. 20. Effect of glucose concentration on the COD degradation by immobilized activated sludge ····· 50
Fig. 21. Effect of glucose concentration on the TOC degradation by immobilized activated sludge ····· 50
Fig. 22. Effect of SCN concentration on the cyanide degradation by immobilized activated sludge ····· 52
Fig. 23. Effect of SCN concentration on the TOC degradation by immobilized activated sludge ····· 52
Fig. 24. Effect of phenol concentration on the cyanide degradation by immobilized activated sludge ····· 54
Fig. 25. Effect of phenol concentration on the COD degradation by immobi lized activated sludge ····· 54
Fig. 26. Effect of phenol concentration on the TOC degradation by immobilized activated sludge ····· 55
Fig. 27. Effect of phenol concentration on the phenol degradation by immobilized activated sludge ····· 55
Fig. 28. Variation of CN^- with continuous reactor by immobilized activated sludge ····· 57

List of Tables

Table 1. Sources of cyanides ····· 6

Table 2. Biochamical degradation process of cyanides in water ····· 7

Table 3. The applied range of the immobilized enzymes & microorganisms ····· 13

Table 4. The comparative of feature by the immobilized method ····· 16

Table 5. References for wastewater treatment by immobilized microorganisms ····· 18

Table 6. Composition of synthetic wastewater ····· 23

Table 7. Analytical methods and parameters ····· 30

ABSTRACT

A Study on the Removal of Cyanide by Immobilized Activated Sludge

By : Myoung-Hee, Kim
Advisor : Prof. Kyoung-Hoon, Cheong
Department of Environmental Education,
Graduate School, Chosun University

Cyanide is highly toxic to ecosystems, cyanide-containing effluents cannot be discharged without being subjected to treatment to reduce to very low levels (0.1 <mg dm^{-3} of CN^-). To prevent the access of cyanide to ecosystems, many biological detoxifications of cyanide have been tried, for the biological system has been considered to be the most effective and ultimate method.

Many microorganisms have an inherent capacity to degrade the toxic organic compounds that enter the environment as a result of pollution and natural activities. However, there are few examples of biological degradation for cyanide compounds in the field.

The immobilization of a microorganism has been rapidly progressed with the development of bio-technology and it has been used as a tool to isolate

products from biological media in various areas, it has not yet been practiced in the treatment of wastewater.

This study has been optimized operating conditions removal to cyanide in a synthetic wastewater by PEG method with microorganisms immobilized.

The immobilized activated sludge utilized of $Ni(CN)_4^{2-}$ as a nitrogen source. During cyanide degradation, ammonia and carbon dioxide were found as final products. The utilization of ammonia formed by $Ni(CN)_4^{2-}$ degradation was investigated by adding the glucose as carbon source.

In the batch experiments, the effects of a substrate concentration, pH, amount sludge, phenol, bead packing volume, glucose, thiocyanate on the removal of cyanide compounds were investigated a maximum condition by immobilized activated sludge.

The higher degradation activity was obtained at pH 7.0. In case that pH was beside 6~9, relative activity was dramatically decreased. The cyanide degradation decreased with increasing of initial cyanide concentration. Although cyanide degradation increased with increasing of glucose, phenol and SCN^- .

In continuous experiments operational conditions is HRT 48~24hrs, pH 8.0, bead 30%. The hydraulic retention time of 36hr, the higher degradation efficiency of cyanide was shown. As decreasing the hydraulic retention time further down to 24hr, the degradation efficiency of cyanide degreased to 90%. The removal efficiency of cyanide were 99%, while HRT was 36hrs.

Ⅰ. 서 론

도금 폐수에는 시안과 중금속 등 독성 물질이 다량 함유되어 있기 때문에 적절하게 처리하지 않고 방류할 경우 수생생태계를 교란 시키고 먹이 사슬을 통하여 동식물 및 인체에 치명적인 해를 끼칠 수 있다[1),2)].

시안이온은 반응성이 강하여 쉽게 금속 - 시안착물을 생성하는데, 이 물질은 안정적이고 독성이 강하다. 시안화합물의 물리 · 화학적처리 방법으로서는 염소나 차아염소산나트륨에 의한 산화처리법[3)], 과산화수소에 의한 산화처리법[4),5)], 황화물 침전법[6)], 전기 분해법[7)], 활성탄 흡착법[8)], 오존 처리법[9)] 등이 있으며, 물리화학적 처리방법은 처리비용이 많이 들며 부산물이 많고 이차오염원을 일으키는 단점이 있다.

생물학적 처리방법은 이와 같은 물리화학적 처리 방법의 대안으로서 연구되어 왔다. 1950년대 Pettet 등[10)] 은 동정되지 않은 박테리아를 이용하여 생물학적 처리를 시도하였다. Fry 등[11)] 은 *Stemphylium loti* 효소를 이용한 연구에서 시안이 Formamide로 전환된다고 보고 하였고, 이 효소를 Formamide hydro-lyase라고 명명하였다. Kunz 등[12)] 은 *Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764*를 이용한 연구에서 시안화합물이 CO_2 와 ammonia 로 전환되며, KCN 1M이 분해되어 ammonia 0.4M이 생성되었다고 보고 하였다. Barclay 등[13)] 은 *Fusarium solony* 를 이용한 시안 및 금속 시안착물의 생물학적 분해실험에서 KCN 및 $Ni(CN)_4^{2-}$이 formamide, ammonia, formic acid 로 전환된다고 보고하였다.

시안화합물을 활성슬러지법에 의해서 처리할 경우, 활성슬러지의 기능이 약화되면 폐수의 분해성이 저하되어 수질악화가 초래되고 회복하는데 장기간을 요하게 된다[14)]. 이러한 문제를 해결할 수 있는 하나의 방법으로서 활성슬러지의 고정화방법을 들 수 있다.

고정화법은 반응조내에 유효한 미생물을 정착시킴과 동시에 미생물의 농도를 증가시켜 반응조를 콤팩트화 하고 효율을 높이는 장점이 있다.

즉, 오염물질의 분해능력이 우수한 균을 자연계에서 분리하여 대량으로 배양한

후 반응조내에서 고농도로 유지하면서 처리하는 방법이다. 이러한 방법을 이용하면 증식속도가 낮은 균을 반응조내에 고농도로 유지할 수 있고 잉여슬러지의 발생량을 저감할 수 있다[15].

일반적으로 사용되고 있는 미생물 고정화방법에는 불용성 media에 부착시키는 담체결합법, 가교법, 포괄고정화법등이 사용되고 있다[15].

포괄고정화법은 폐수처리 분야에 많이 사용되고 있는데 이는 미생물을 고농도로 유지시킬 수 있어 처리의 효율을 높일 수 있고, 특정한 미생물을 고정화함으로서 특정물질의 처리가 가능하고, 시설의 compact화 및 슬러지의 감량화가 가능하게 되기 때문이다[15].

미생물을 고정화하는 재료로서는 천연 및 합성고분자 물질이 있으며, 천연고분자 물질인 알긴산염 및 카라기난 등은 gel 강도가 낮기 때문에 폐수처리에 적용시키는 데는 어려움이 있어서 최근에는 합성고분자인photo-crosslinked resin, polyvinylalcohol, polyacrylamide, 등이 널리 사용되고 있다[16].

본 연구에서는 고정화 미생물의 장점을 이용하여 시안 함유 하수를 효율적으로 처리하고자 고분자 물질인 PEG를 사용하여, 여기에 시안 분해 능력이 있는 활성슬러지를 포괄고정화하였으며, 고정화 활성슬러지가 시안을 분해하는데 따르는 비드 충진율, pH, 초기농도, SCN의 영향, glucose 영향, phenol의 영향 등을 조사하고 시안의 연속처리의 가능성에 대하여 검토하였다.

Ⅱ. 이론적 고찰

A. 시안화합물(Cyanide Compounds)

1. 시안화합물의 특성

시안화합물은 다음과 같이 크게 3가지 형태로 산업폐수에서 존재하게 된다. 이온형태인 Free Cyanide는 KCN, NaCN등이 있으며 금속과 결합된 형태는 Ni, Fe, Co, Pt, Au, Ag등과 같은 금속과 결합을 이루고 있다. 그리고 sulfide가 존재시 형성될수 있는 thiocyanate와 acetonitrile등와 같은 유기화합물의 형태로 존재한다.

이들 중 수용액에서 유리 시안화합물 이온을 생성하는 화합물이 유독하다. 특히, 시안화염이 염화시안(CNCl)이나 시안이온(CN^-)으로 해리되면 맹독성을 띠게 되며, 공유결합성 화합물은 물에는 난용성이지만 무기산으로 분해되면 유독하다.

유리시안은 알칼리성에서 산화제에 의해 잘 산화되지만, 시안 착화합물 중에는 수중에서 안정한 착화합물이 많다. 특히 중심원소가 $[Fe(CN)_6]^{4-}$, $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 및 $[Co(CN)_6]^-$ 등은 아주 안정하여 강산을 작용시켜도 유리시안을 생성하지 않는다.

따라서 시안폐액처리는 폐수의 조성이나 시안화합물의 형태에 따라 확실하게 처리할 수 있는 방법이 선택되어져야만 한다.

금속이온이 없을 경우 시안은 수용액내에서 해리하여 다음과 같은 평형관계를 갖는다[17].

$$HCN \leftrightarrow H^+ + CN^-, \quad K = [H^+][CN^-]/\{HCN] \tag{1}$$

$$K = 6.17 \times 10^{-10}$$

또, 총 시안에 대한 물질수지는

$$CN_T = [HCN] + [CN^-] \tag{2}$$

이다. 위 식(1), (2)의 관계로부터 각 화학종의 분포율은 다음과 같이 정리된다.

$$a_{HCN} = [HCN]/CN_T = [H^+]/([H^+] + K) \quad (3)$$

$$a_{CN^-} = [CN^-]/CN_T = K/([H^+] + K) \quad (4)$$

위 식(3)과 식(4)의 관계로부터 HCN과 CN^-의 분포율을 알 수 있다. Fig. 1는 pH변화에 따른 HCN과 CN^-의 분포율을 나타내었다.

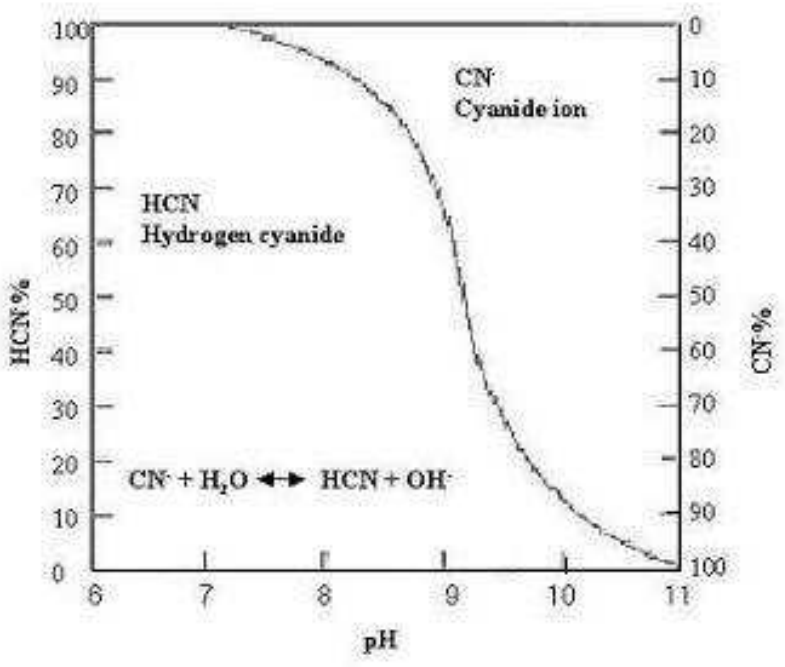


Fig. 1. Dissociation of hydrogen cyanide as a function of pH.

2. 시안화합물의 발생원

환경 내에서 자연적, 인위적으로 시안이 배출되는 곳을 Table 1 에 나타내었다. 시안의 발생은 자연 내에서 식물이나 미생물에 의해 낮은 수준으로 발생하지만 인간의 활동에 의해 많은 양의 시안이 집중적으로 발생이 된다.

3. 시안 분해 미생물

Table 2에 시안 분해 미생물의 종류를 나타내었다. 대부분의 시안 분해 미생물의 경우 시안화합물을 유일한 질소원으로 이용하는 것으로 알려져 있으며, 이는 미생물이 시안을 탄소원으로 섭취하기에는 시안 자체의 독성이 너무 강하기 때문인 것으로 밝혀졌다. 시안화합물은 미생물에 의해 분해되면서 부산물로서 암모니아와 CO_2로 생성된다고 알려져 있다. 이러한 사실은 1983년 Knowles 등[18] 이 시안분해의 메카니즘을 제시하면서 확인되었다.

그러나 현재까지 분해 중간체는 명확하게 밝혀지지 않았지만 *P. flurescens* NCIMB11764의 경우 시안화합물이 분해되면서 cyanate로 생성되었다가 암모니아와 CO_2로 전환된다고 보고된 바 있다[19~21].

Fig. 2와 같이 최근 발표에 의하면 이런 경로 외에 시안화합물이 formate와 formade로 바뀌었다가 암모니아나 CO_2로 생성된다는 사실이 증명되면서 이 균주의 시안화합물에 대한 분해 경로가 multipathway를 거쳐 이루어진다는 것으로도 보고되고 있다[22]. 따라서 일반적으로 최종 부산물의 경우는 잘 알려진 물질이나 아직 그 중간체에 대한 명확한 증거는 뚜렷하지 않다.

Table 1. Sources of cyanides

1. Natural sources

Cyanogenic bacteria

Chromobacterium *Pseudomonos aeruginosa*

Pseudomonos chloraphis *Pseudomonos fluorescens*

Cyanogenic algae

Chlorella vulgaris *Nostoc muscorum*

Plectonema boryanum *Anacystis nidulans*

Pathogenic fungi generating cyanide

Marasmius oreades *Stemphyllium loti*

Gloeocercosporo sorghii *Snow muolds*

Cyanogenic crops

Almonds, Cassava, Apple, Loquat, Lima Beans

2. Artificial sources of cyanide

Electroplating Industries *Coal-gastification plants*

Coal-coking plants *Manufactured gas plants*

Synthetic-fibre-producing plants *Recovery of precious metals*

Processing of cyanogenic crops *Pharmaceutical Industries*

Paint-Manufacturing Industries

Metallurgy and metal-cleaning operations

Table 2. Biochamical degradation process of cyanides in water

1. Cyanide monooxygenase

(*Pseudomonos sp.*, Harris & Knowles 1983b, Dorr & Knowles 1989[18])

$HCN + O_2 + H^+ + NADPH \rightarrow HOCN + NADP^+ + H_2O$

2. Cyanide dioxygenase

(*P.fluorescens, Bacillus pumillus*, P.c 8. *Cyanoalanine synthaseereus*, Harris & Knowles 1983[19])

$HCN + O_2 + 2H^+ NADPH \rightarrow CO_2 + NH_3 + NADP^+$

3. Cynase

(E. coli Taussig 1960[23], 1965[24], Dorr & Knowles 1989, Kunz & Nagappan 1989[25])

$HOCN + H_2O \rightarrow CO_2 + NH_3$

4. Cyanide hydratase

(snow moulds and common pathogenic fungi, Fry & Myers 1981[26])

$HCN + H_2O \rightarrow HCONH_2$

5. Cyanidase

(Alcaligenes xylosooxidans denitrificans, Ingvorsen et al. 1991[22])

$HCN + 2H_2O \rightarrow HCOOH + NH_3$

6. Nitrilase

(Klebslella ozaenae, Nocardia sp., Arthrobacter sp., P.aeruginosa, Harper 1985[27], Bandyopadhyay et al. 1986[28], McBride et al. 1986[29], Nawaz etal 1991[30])

Bromoxynil (nitrile) → 3,5-Dibromo,4-Hydroxy benzoic acid

7. Rhodanese

(B.subtillis, Thiobacillus denitrificans, B.stearothermophilus, Bowen et al. 1965[31], Atkinson 1975[32])

Cyanide → Thiocyanate + sulfphite

8. Cyanoalanine synthase

(B.megaterium, Dunnll & Fowden 1965[33], castric & Strobel 1969[34])

Cyanide → β-Cyanoalanine

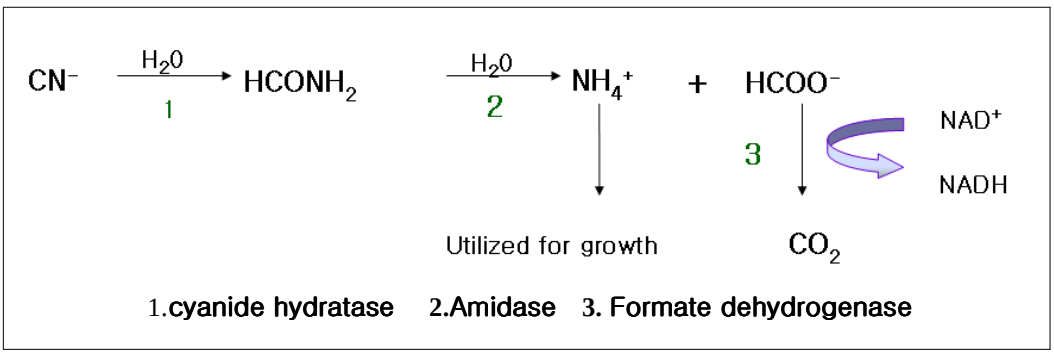


Fig. 2. The pathway on the hydrolysis of cyanide ion.

B. 시안화합물 처리 방법

1. 물리 · 화학적 처리

시안화합물은 보통 알칼리성 염소주입법에 의하여 제거되지만 그 외에도 표백제, ClO_2, 오존 등을 사용하는 방법과 덜 유독한 시안복합물로 바꾸는 방법, 전기적 산화, 산성화, 석회유황법, 건조법 등에 의해서도 처리할 수 있다[35].

1) 알칼리성 염소주입(alkaline chlorination)

Fig. 3은 시안폐수에서 가장 일반적으로 알려진 알칼리염소법이다. 이것은 산화에 의해서 분해되어 비독성의 화합물로 되는 것이며 반응속도도 빨리 진행되며 조정하기도 쉽다. 공장규모의 대소에 불구하고 시안폐수의 처리에는 가장 안전하고 확실하다. 시안을 완전히 산화시키기 위해서 석회나 가성소다로 폐수의 pH를 11정도로 높인 다음 염소가스를 주입시키는 방법으로서 이때 시안이 산화되기 전에 나트륨이나 칼슘염으로 침전하는 것을 방지하기 위해서 폐수를 세차게 휘저어 주어야 한다. 만약 다른 금속이 존재한다면 시안의 복합물을 형성시켜 시안의 산화를 방해하므로 염소가스를 더 많이 주입해야 한다.

$$2NaCN + 5Cl_2 + 12NaOH \rightarrow N_2 + 2Na_2CO_3 + 10NaCl + 6H_2O$$

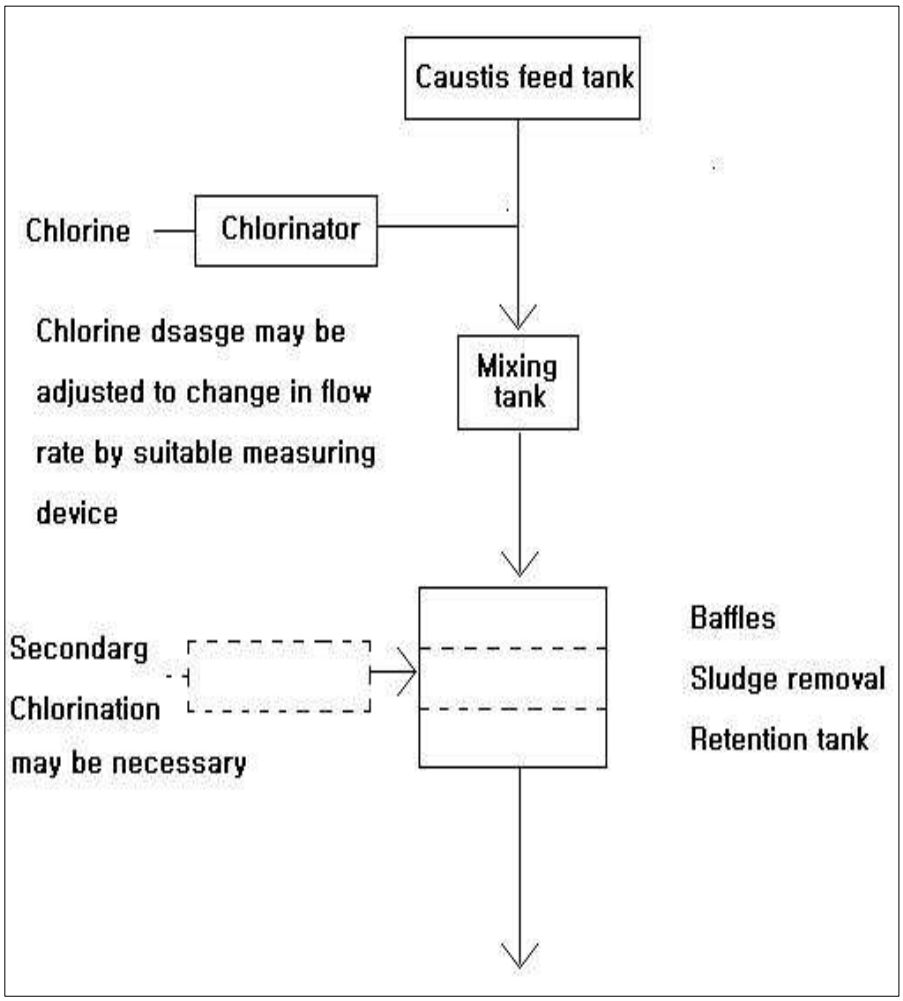


Fig. 3. Continuous chlorination of cyanide wastes.

2) 시안착화합물로 변화시키는 방법

황산제1철의 과량을 시안폐수에 넣고 페로시안화물로 하고 다시 공존하는 제2철이온과 반응시켜 페로시안 블루를 침전시키는 방법으로서 특히 크롬폐수와 혼합되어 있을 때의 처리에 적합하다. 이 방법에서는 황산제1철의 상당한 과잉량을 가해도 시안은 5-10ppm 이하로 한다는 것은 매우 곤란하다, 이 경우 황산아연과 황산동을 첨가하면 페로시안화물의 제거는 양호해진다. 이 방법의 결점은 생성되는 슬러지의 양이 많고 시안의 제거가 완전하지 못하다는 데 있다.

3) 오존에 의한 산화법

$CN^- + O_3 \leftrightarrow CNO^- + O_2$

$CNO^- + H_2O + O_3 \leftrightarrow 2HCO_3 + H_2 + O_2$

4) 산성으로 폭기하는 방법

pH<3의 산성으로 하여 공기를 격렬하게 주입시켜 HCN 가스를 대기 중에 발산시키는 방법이다.

$$2NaCN + H_2SO_4 \leftrightarrow Na_2SO_4 + 2HCN\uparrow$$

$$K_2Zn(CN)_4 + 2H_2SO_4 \leftrightarrow ZnSO_4 + K_2SO_4 + 4HCN\uparrow$$

이 방법에 의한 처리수는 1ppm 정도까지 저하된다. 폭기시간은 통상 6~16시간이 안전하며 유독한 시안가스가 배출되므로 폭기조는 완전밀폐하고 높은 배기통을 설치하지 않으면 안 된다.

2. 생물학적 처리

생물학적 폐수처리에는 크게 현탁배양방법과 미생물막을 이용하는 방법의 2가지로 나누고 있다 [36~37]. 현탁배양방법에는 잘 알려진 활성오니공정이 대표적이라 할 수 있으며 미생물막을 이용하는 방법에는 회전원판법, 살수여상법 등을 들 수 있다.

C. 미생물 고정화법

1. 고정화법의 정의 및 역사

고정화 미생물(immobilized cells)이란 어떤 일정한 공간내에 갇힌 상태로 있는 미생물을 말하며, 연속적인 반응을 행할 수 있고 반응후에 재이용할 수 있는 상태에 있는 것을 말한다. 고정화 미생물은 원래 효소를 고정화 한 것으로부터 시작되었으며, 1916년 Nilson과 Griffin이 골탄의 미분에 흡착한 효소 이소베르타제가 활성을 유지하고 있다는 것을 발견한데서부터 발단이 되었다[38]. 이처럼 처음에는 효소를 고정화에 이용하다가 효소는 고정화할 때에는 정제해야만 하는 번거로움을 없애기 위해서 점차 미생물을 고정화하게 되었다. 효소나 미생물을 고정화하는 궁극적인 목적은 유용한 물질의 생산, 미량 물질의 분석, 의료 등에 이용하려는 것으로 Table 3과 같이 여러분야에서 연구가 진행되고 있다[15]. 최근에는 이러한 고정화 미생물을 이용하여 하수처리에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Shirakami 등 [39]은 다공질 폴리우레탄의 유동입자에 담지한 미생물 군에 의한 유기물 및 질소의 동시제거를 보고하였고, Kawamura 등[40]은 담체로서 앰버라이트를 이용한 유동상에 의한 생물학적 질산화를 보고하였다.

Nilson 등[41]은 탈질균(Pseudomonas denitrificans)을 고정화하여 질소 제거의 가능성을 시사하였으며, Kokututa 등[42,43]은 질산균과 탈질균을 고정화하여 고정화하지 않은 탈질 미생물과 비교 검토하여 고정화 탈질균의 반복처리시 처리 성적이 우수함을 보고하였고, Hashimoto 등[44], Sumino 등[45] 및 Huzisawa 등[14]은 활성슬러지를 고정화하여 질소 제거에 관한 연구를 보고한 바 있다.

단일 효소를 고정화하여 단순 반응을 촉매시키는 것으로부터 시작한 고정화에 대한 연구는 고정화 미생물, 동식물 세포의 고정화와 응용에 관한 고정화 생체촉매의 연구로까지 발전하였고 고정화 담체나 고정화법의 개발도 활발하게 진행되고 있다[15].

Table 3. The applied range of the immobilized enzymes and microorganisms

이용분야	응 용 및 연 구
발효공업	아미노산, 당, 핵산, 유기산, 항생물질, 스테로이드, 테르페노이드의 합성이나 변환, 호르몬, 효소 등의 생산
식품공업	유당의 분해, 치즈, 유지, 프룩토오스, 전화당 등의 제조, 우유나 식품의 살균, 알콜 음료의 제조, 과즙 쓴맛의 제거 등
화학공업	알콜 연료, 수소, 메탄가스의 제조, 기초 화학 공업 제품의 합성이나 변환 등
분 석	효소전극법, 미생물전극법, 효소면역측정법 등의 임상검사 및 여러 가지 화학분석에 이용, 측정의 자동화, 간편화 등
의 료	임상검사, 효소치료제, 인공장기 등
환경정화	페놀, 벤젠, 시안 등의 분해, 질산 또는 아질산의 환원, BOD 측정 등
생 화 학	효소반응기구, 효소의 기능이나 구조의 해석, 생체성분의 분리, affinity chromatography에 의한 정제, 생화학 시약의 합성 등

2. 고정화법의 특성

효소가 촉매작용을 하려면 효소단백질의 일부에 기질과 상호작용을 하는 영역, 즉 활성중심 (active center)이 필요하며, 여기에는 기능이 다른 2개의 부위가 있다. 하나는 효소의 촉매로서의 반응성에 관여하는 반응부위 (reactive site) 또는 촉매부위 (catalytic site)이며, 다른 하나는 효소반응의 기질특이성을 지배하는 특이성부위 (specific site) 또는 결합부위 (binding site)라 불리 운다. 이들 부위는 몇 개의 아미노산 잔기로 형성되어 효소 고유의 고차구조를 지니고 있는데, 효소가 고정화된 상태에서 촉매작용을 나타내려면 활성중심의 아미노산 잔기가 변화를 받지 않고 고유의 고차구조를 유지해야만 한다. 이것들이 변화된 경우는 촉매작용의 저하, 또는 기질특이성 등의 효소적 성질에 변화가 생긴다. 고정화시 효소단백질중의 반응기를 변화시키지 않아야 한다. 또한 효소단백질의 고차구조는 수소결합, 소수결합, 이온결합 등 비교적 약한 결합으로 유지되고 있으므로 효소를 고정화할 때는 고온, 강산, 강알칼리 등의 처리는 피해야 하며, 유기용매, 고농도의 염류에 의해서도 변성되거나 활성을 잃게 되기 때문에 특히 온화한 조건이 필요하다.

효소의 고정화 방법은 다음 3가지로 분류할 수 있다.

* 담체결합법 - 물에 불용성인 담체에 효소를 결합시키는 방법
* 가교법 - 2개 또는 그 이상의 반응기를 갖는 시약을 사용하여 효소와 효소간에 가교를 형성시켜 고정화하는 방법
* 포괄고정화법 - 효소를 겔 (gel)의 미세한 격자속에 가두든지, 반투막성 폴리머의 피막으로 피복하는 방법[15)]

이들 고정화법을 Fig. 4에 나타내었다.

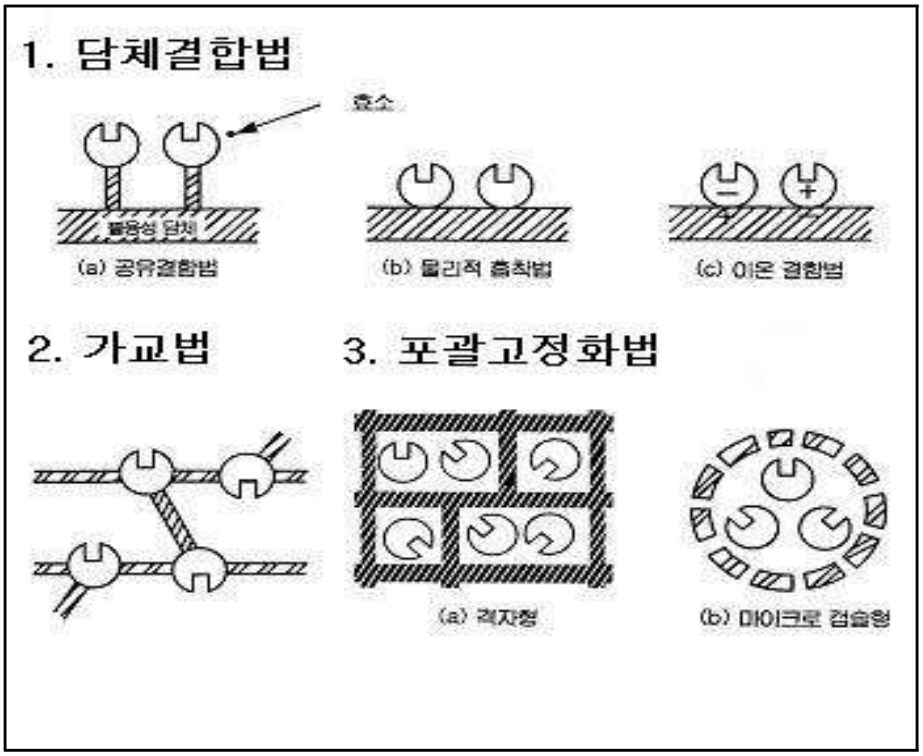


Fig. 4. Schematic of the immobilized method.

많은 효소는 고정화함으로써 본래의 효소보다 활성이 저하되는데 본래의 효소보다 높은 활성을 갖는 고정화 효소를 만드는 것은 금후의 과제로 생각된다.

담체결합시, 활성저하의 원인으로 다음과 같이 생각되고 있다.

첫째, 효소단백질을 구성하는 아미노산의 반응기가 담체와 결합할 때, 활성중심에 관여하는 아미노산과 관여하지 않는 아미노산의 구별 없이 반응한다.

둘째, 효소의 고정화로 고차구조가 변한다.

셋째, 효소분자가 활성을 잃지 않고 담체와 결합하고 있어도 담체의 입체적 장해에 의해 기질분자의 접근이 방해받는다.

첫째와 둘째의 경우는 고정화 조건을 잘 설정함으로써 활성저하를 어느 정도 막을 수 있지만, 셋째의 경우는 고정화법을 바꾸지 않는 한 피할 수 없는 것으로 생각된다.

한편, 포괄고정화법에 의한 활성저하는 포괄할 때 효소가 변성되든지, 겔 또는 막에 의해 기질 또는 반응생성물의 투과속도가 영향을 받는 것으로 생각된다.

활성저하를 막기 위해 고정화 할 때 미리 그 효소와 특이적 친화력이 있는 저해제, 기질 또는 반응생성물을 이용하여 효소의 활성중심을 보호한 상태로 고정화하는 방법이 행해졌다. 즉, SH효소의 저해제인 p-히드록시 메르크릴 벤조이트를 가하여 ATP아제의 활성중심의 설파히드릴기를 보호한 상태로 고정화한 후, 환원제로 처리하여 저해제를 제거함으로써 활성이 비교적 높은 고정화 효소를 얻게 되었다[15].

이외에 효소의 전구물질을 고정화 및 활성화시켜 고정화 효소로 하는 방법이 시도 되었는데, 즉, 호박산을 결합한 다공성유리에 키모트립시노겐을 카르보이미드 시약으로 펩티드 결합시켜, 이것을 트립신으로 활성화하는 것으로 활성이 높은 고정화 키모트립신을 얻을 수 있었다[16].

현재까지 모든 효소에 적용 가능한 이상적인 고정화법은 없고, 각각의 방법에 따라 특징이 있고 이점과 결점이 따른다. 따라서 실제로 그 효소의 이용목적에 맞는 고정화방법을 검색하여 채용하고 있는 실정으로 Table 4 에 고정화 효소의 제법과 특성을 나타내었다.

Table 4. The comparative of feature by the immobilized method

특 성	담 체 결 합 법			가 교 법	포 괄 법
	공유결합법	이온결합법	물리적흡착법		
제 법	어렵다	쉽 다	쉽 다	어렵다	어렵다
결 합 력	강하다	중 간	약하다	강하다	강하다
효 소 활 성	높 다	높 다	낮 다	중 간	높 다
기질 특이성	변 함	불 변	불 변	변 함	불 변
재 생	불 가	가 능	가 능	불 가	불 가
제법의 보편성	중 간	높 다	낮 다	낮 다	높 다
고정화 가격	높 다	낮 다	낮 다	중 간	낮 다

활성슬러지, 혐기성세균, 질산화세균, 탈질균, 난분해성물질 분해균 또는 중금속 축적세균 등의 특수한 세균이 고정화 미생물로서 이용되며, BOD로 대표되는 유기물은 물론이고 질소, 인 또는 PVA, 페놀 등의 난분해성 및 독성물질, 카드뮴 등 중금속 등을 광범위한 처리대상으로 삼고 있다. 고정화재료로는 알긴산칼슘, 카라기난, 아크릴아미드, 광경화성수지, PVA(Polyvinyl alcohol)등이 널리 사용되고 있으며, 고정화 미생물에 의한 폐수처리의 문헌을 정리하여 Table 5 에 나타내었다.

Table 5. References for wastewater treatment by immobilized microorganisms

Meterials and method	Microorganisms	Experimental abstract
Agar, Polyacrylamide, Carrageenan, Agar and Polyacrylamide	*Alcaligenes sp.*	각종 담체에 의한 탈질균의 고정화를 비교검토.
Carrageenan	*Alcaligenes sp.* *Bacillus firmus sp.*	고정화탈질균의 활성에 대해서 검토.
Carrageenan	*Scenedesmus quadricauda*	고정화조류에 의한 질소 · 인제거(반연속배양).
Agar, Polyacrylamide, Carrageenan, Na-alginate	Activated sludge	각종 고정화담체의 비교와 연소거리 성능에 대하여 검토.
Carrageenan	*Nitrobacter agilis*	아질산 함유폐수의 연속공급에 의한 질산화반응을 검토.
Carrageenan, Na-alginate, Photo-crosslinked resin (ENTG-3800)	*Alcaligenes sp.*	각종 고정화담체에 의한 폐수중의 질소제거.
Carrageenan, Na-alginate, Photo-crosslinked resin	*denitrificans*	실제의 2차 처리수를 대상으로 질소제거.
Carrageenan	*Chlorella sp.*	2차 처리수중의 인산제거.
Na-alginate	*Pseudomonas denitrificans*	탈질 운전조건 검토.
Ca-alginate	*Methanosarcina barkeri*	고정화비드에 의한 메탄 발효.
Ca-alginate	*Nitrobacter agilis* *Nitrosomonas europea*	NO_2 - NO_3 에 미치는 pH, 온도, 비드크기, 균체량의 영향을 검토(균체량은 TOC로 평가)

To be continued

Meterials and method	Microorganisms	Experimental abstract
Agar, Acrylamide	Activated sludge	고정화비드의 특성과 합성폐수의 연속처리에 의한 정화기능에 대해서 검토.
Acrylamide	*nitrificans, denitrificans*	질산화균, 탈질균의 고정화에 의한 질소제거 검토.
Polyacrylic sodium	Anaerobic bacteria	고정화 미생물의 기질투과성, 기질반응성과 혐기성처리에의 적용성에 대해서 검토.
Polyacrylamide	*Citrobacter sp.*	카드뮴 섭취에 대해서 검토.
Polyacrylamide-hydrazid	*Pseudomonas sp.*	페놀분해성에 대해서 검토.
PVA	Activated sludge	고정화조건과 합성하수의 연속처리에 의한 정화기능 검토.
PVA	*Phenol degrading bacteria*	페놀합성폐수의 연속처리에 의한 고정화 페놀분해균의 정화기능 검토.
Photo-crosslinked resin	*denitrificans*	고정화재료의 물성, 최대 탈질 활성에 대해서 검토.
Photo-crosslinked resin	*nitrificans*	합성 암모니아 폐수의 질산화.
Polyelectrolyte complex	*Nitrosomonas europea*	미생물 고정화 담체의 성능평가와 아질산생성속도에 대해서 검토.
Polyelectrolyte complex	*Paracoccus denitrificans*	고정화미생물의 탈질속도와 활성에 대해서 검토.

3. 포괄고정화법의 원리

하수에 있어 반응조중에서 정화력을 인공적으로 효율 좋게 진행시키는 폐수처리법으로 생물막법이 있다. 생물막의 형성은 자연적으로 부착하기 쉬운 균이 우점종이 되고 정기적인 역세시기를 놓치게 되면 내부가 혐기적으로 되고 생물막이 떨어져서 나중에는 처리조내의 생물보존량이 적게 되고 처리성능이 저하하는 단점이 있는데 이러한 결점을 개선하기 위해 포괄고정화법을 도입하게 되었다.

포괄고정화법에서는 비드 내부에 미생물이 갇혀 있어서 임의의 균을 임의의 균체량으로 고정화 할 수 있다. 이 때문에 균체의 박리에 의한 균체의 감소는 없으며 균체보존량은 대체로 안정하다.

포괄고정화법은 폐수중의 유기물 및 질소, 인 등은 비드를 투과하여 미생물에 의해 섭취된다. 비드의 소공 크기는 재질에 따라 달라지며, 활성슬러지의 간극은 재질의 투과성과 통기성이 좋은 비드로 형성되어 있기 때문에 생물막에 비해 혐기성이 되기 어렵다[15].

미생물 보존량은 비드 내부에 100,000 mg/ℓ까지 가능하다. 또한 특정한 균으로서 *Nitrosomonas, Nitrobacter* 등의 질산화균, 메탄균, 혐기성균, 그리고 시안균 등을 고정화에 이용할 수 있다. 슬러지발생량은 종래의 활성슬러지법 보다 적다고 보고되고 있다[15]. 슬러지발생량 저감의 매카니즘으로서는 아직 확인된 이론은 아니지만, ① 비드로부터 균이 누출되지 않기 때문에 슬러지단이 길게 증식하여 균의 자기 소화가 쉽다. ② 비드내부에 증식환경이 다르기 때문에 균체 생성을 위한 ATP수율이 저하하므로 균체 생성량이 저하된다고 보고된다.

4. 포괄고정화 재료 및 조건

포괄고정화법은 의약, 식품공업에서 이미 실용화된 기술로서 여기에 사용하는 재료는 천연 유기 고분자인 카라기난과 알긴산, 그리고 합성 고분자인 아크릴아미드, 폴리에틸렌글리콜 등이 있다. 천연 고분자 재료는 미생물에 대한 독성이 작고 저렴하나 미생물에 의해 분해되기 쉬워 내구성이 약하다는 결점을 가지고 있다[15].

이에 반해 합성 고분자는 미생물에 대한 독성이 있고 약간 고가이지만 미생물에 의한 분해성이 약하여 내구성이 뛰어나다. 운전비용을 줄이기 위해서는 장기간 사

용에 견딜 수 있는 합성고분자가 좋을 것으로 사료된다. 이 밖에 비드 재료에 요구되는 조건으로는 다음과 같은 것이 있다.

기질 및 산소투과성이 좋아야 하고, 미생물 누출, 침입이 적고 안정성이 양호해야 하며, 상온, 상압에서 고정화가 가능해야하고, 조립조작이 용이하고, 처리처분이 용이해야하는 조건 등이 있다.

Ⅲ. 실험방법 및 재료

회분식 실험에서는 합성폐수 내 시안화합물을 제거하기 위하여 활성슬러지를 고분자 물질에 고정화시켜 제작된 비드를 사용하여 시안화합물이 분해되는 정도를 비교실험 하였다.

연속식 실험에서는 회분식 실험결과를 토대로 시안화합물을 제거하기 위해 호기성 반응조를 이용하여 연속적으로 제거되도록 하였다.

A. 활성슬러지 순화 및 고정화 활성슬러지 제조

1. 공시 활성슬러지

본 실험에 사용한 활성슬러지는 K 제철소의 코크스 폐수를 처리하고 있는 활성슬러지 폭기조 중에서 특히 시안을 주성분으로 처리하고 있는 폭기조로부터 분양 받았다. 시료를 채취한 폭기조에 유입되는 시안 농도는 35 mg/ℓ의 범위이었고, pH는 7 -8를 유지하였다. 이 활성슬러지를 반응조에 정치시켜 상등수를 분리제거하고 수돗물 세정을 3차례 실시한 후, Table 3의 합성 폐수를 사용하였으며, 반응조의 유입수 pH를 7로 조절하고, 체류시간 1일, 항온실의 온도를 30±2℃로 유지하면서 30일간 순화시킨 활성슬러지를 사용해 고정화 펠렛을 만들었다. 시안분해 능력이 우수한 활성슬러지를 고정화 비드제작과 회분식 및 연속식 실험에 이용하였다.

2. 합성폐수의 조성

본 실험에 사용한 합성폐수의 조성은 Table 6과 같고 시안화합물을 주 기질로 하여 실험에 따라 여러 단계의 농도로 조정하였다.

Table 6. Composition of synthetic wastewater

Component	Concentration (mg/ℓ)	Remarks
$C_6H_{12}O_6$	187.5	Carbon source
$K_2Ni(CN)_4 \cdot H_2O$	120.4	Nitrogen source
KH_2PO_4	103.2	Phosphorus source
$NaHCO_3$	50	Minerals
$FeCl_3 \cdot H_2O$	0.09	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.4	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7	

3. 고정화 재료 및 방법

본 실험에 사용된 고정화 재료로서 PEG-1000(Shin-Nakamura Chemical, wakayama)이며, 가교제는 N,N'-methylene-bis-acrylamide(Wako Pure Chemicals, osaka)이고, 촉진제는 N,N,N',N'-tetramethylethlene-diamine(Tokyo Kansai Co.)이고, 개시제는 potassium persulfate(Kanto Chemical Co.)이다. 이 고정화 재료는 천연고분자인 알긴산 또는 카라기난보다 강도가 높아서 폭기나 교반에 대해서 안정하다[16].

고정화 활성슬러지 제조과정은 Shumino 등[43]의 방법을 적용하여 Fig. 5와 같이 제작하였다. 제작된 비드의 모습은 Fig. 6에 나타내었다.

즉, 고분자 물질 PEG 9%에 대해서 가교제는 0.5%, 촉진제는 0.25%의 비율로 혼합하여, 이 혼합물에 원심분리(3000 rpm, 5 min, 25 ℃)한 활성슬러지 현탁액 10%을 혼합한 후 개시제 0.25%을 넣어 플레이트에 시트형으로 넣고 10분 동안 방치 한 후 직경 3 mm로 자른 후 흐르는 물에서 세척한 후 합성폐수를 사용하여 2주간 순화시켜서 회분식 실험 및 연속식 실험에 사용하였다.

4. 주사전자현미경 (SEM)

고분자 물질에 고정화된 미생물의 구조를 살펴보기 위하여 주사전자현미경을 사용하였다. 고정화 활성슬러지를 50℃에서 2시간 건조한 후 Gold coating하여 4500배 배율로 관찰하였다 (Fig. 7).

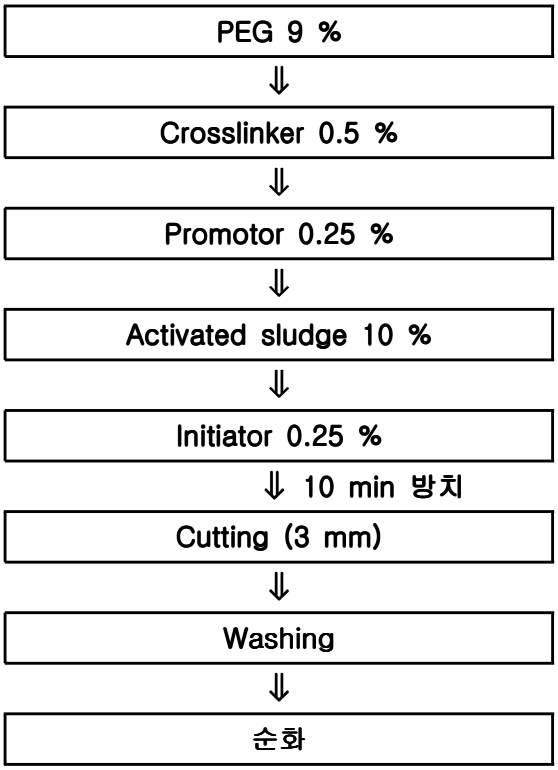


Fig. 5. Procedure for immobilization of activated sludge.

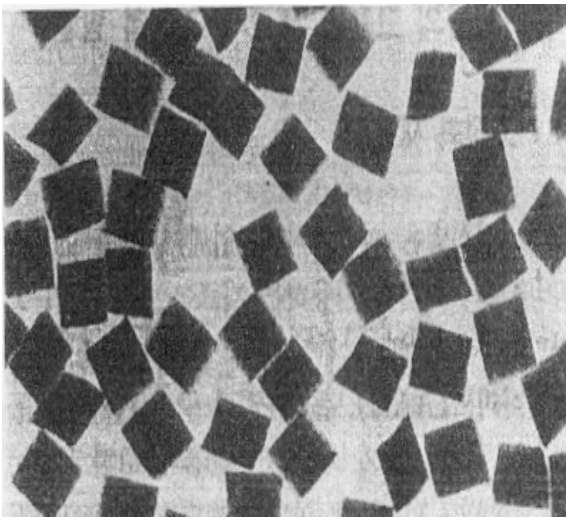


Fig. 6. Photograph of bead by immobilized activated sludge.

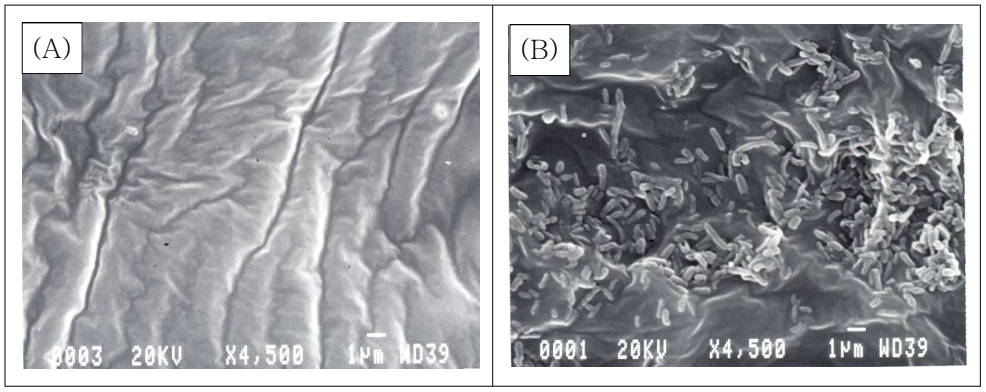


Fig. 7. Scanning electron micrograph before (A) and after (B) immobilized on PEG 60 days in activated sludge.

B. 실험장치

1. 회분식 실험장치

PEG고정화 활성슬러지 실험장치는 Fig. 8과 같다. 원통형의 반응기 용량은 1 ℓ이며 반응조내의 완전혼합을 위해서 하향류식 공기주입 장치를 설치하였다.

반응기의 공기주입은 확산기를 이용하였다. 또한 pH는 0.1N NaOH와 0.1N HCl을 사용하여 pH 7.0으로 조절하였고, 실험은 25±2 ℃가 유지되는 항온실에서 수행하였다.

1) 포기에 따른 시안화합물의 변화

실험은 회분식 반응조에 시안 50 mg/ℓ에 해당하는 KCN, $Ni(CN)_4^{2-}$, $Fe(CN)_6^{4-}$를 증류수에 녹여 포기를 시켰다.

2) 슬러지량에 따른 시안화합물 분해 효율

본 실험에서는 MLSS 량에 따른 처리 효율을 조사하기 위하여 MLSS를 각각 800, 2400, 4000, 6000 mg/ℓ 가 되도록 하였으며 시안농도는 50 mg/ℓ이다.

3) 비드의 슬러지 함량이 시안화합물 분해에 미치는 영향

고정화 활성슬러지의 경우 bead 제작시 슬러지 함량에 따라 제작된 bead의 활성도를 조사하고자 활성슬러지 함량 2%, 6%, 10%, 15%를 각각 넣어서 만든 bead로 실험을 수행하였다.

4) 기질농도가 시안화합물 분해에 미치는 영향

본 실험에서는 시안 초기 농도를 각각 25, 50, 100, 200, 400 mg/ℓ로 실험을 수행하였다.

5) pH가 시안화합물 분해에 미치는 영향

반응조내의 시안농도는 50 mg/ℓ로 주입하였고, 실험대상의 초기 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 10 으로 조절하였다.

6) 비드 충진율이 시안화합물 분해에 미치는 영향

고정화 활성슬러지 비드를 충진율은 10%, 30%, 50%이 되도록 충진하였다.

7) 시안화합물의 분해에 따른 암모니아성 질소 생성

초기 시안 농도를 50 mg/ℓ로 수행하였다.

8) Glucose가 시안화합물 분해에 미치는 영향

Glucose 농도를 각각 200, 400, 600, 1200, 2400 mg/ℓ로 수행하였다.

9) SCN^- 이 시안화합물 분해에 미치는 영향

티오시안 농도를 각각 200, 400, 600, 800, 1600 mg/ℓ로 수행하였다.

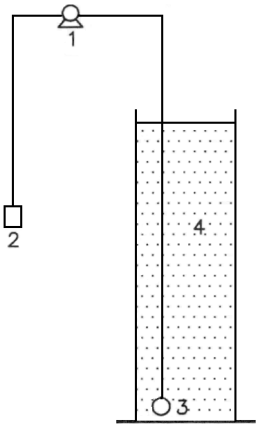
10) Phenol이 시안화합물 분해에 미치는 영향

실험은 phenol 농도 100, 200, 300, 400 mg/ℓ와 phenol를 넣지 않는 Control 조건에서 수행하였다.

2. 연속식 실험장치

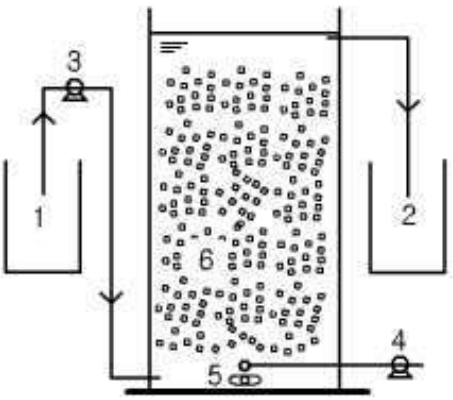
연속식 실험장치는 Fig. 9와 같다. 반응기의 주요 구성 장치는 반응기와 공기주입펌프(MEDO, LA 100) 및 Feed Tank이며 그 외 부속장치로는 인공폐수 주입펌프와 반송펌프, 교반기, 산기관을 설치하였다.

원통형의 투명 아크릴를 이용하여 제작하였고, 반응조 부피는 3ℓ이며, MLSS는 4000 mg/ℓ이다. 비드 충진율은 30%이다. pH는 7.0으로 조절해 주었고, HRT는 48시간에서 24시간으로 변화시켜서 실험을 수행하였다.



1. Air pump	2. Power supply
3. Diffuser	4. Reactor

Fig. 8. Schematic diagram of the experimental apparatus for batch system.



1. Influent	2. Effluent
3. Feed pump	4. Air pump
5. Diffuser	6. Immobilized bead

Fig. 9. Schematic diagram of the experimental apparatus for continuous system.

C. 분석방법

회분식 및 연속식 실험에 사용된 분석항목 및 분석방법을 Table 7 에 나타내었다. 실험 및 분석방법은 수질오염공정시험법[24]에 의거하여 분석하였다.

Table 7. Analytical methods and parameters

Items	Analytical methods
pH	pH meter, TOA HM-14P
COD_{Mn}	$KMnO_4$ closed reflux method
MLSS	Filtration-Evaporation method
CN^-	Pyridine-Pyrazolon method
NH_4^+-N	Indophenol method
Phenol	HPLC
TOC	Combustion/non-dispersive infrared gas analyzer-TOC-5000A (Shimadzu)
SEM	Japan, JEOL, JSM 840-A

Ⅳ. 결과 및 고찰

A. 회분식 실험

1. 포기에 따른 시안화합물의 변화

본 실험에서는 시안이온 및 시안착물의 포기에 의한 휘발 영향을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 10에 나타내었다.

시안화칼륨의 경우 포기에 의해서 휘발되어 버림을 알 수 있다. 강 등[48] 은 새로운 타입의 시안 분해 미생물에 의한 시안 분해에서 시안화칼륨이 수용액에서 시안화수소로 휘발되어 버림을 확인하였다.

이 후 실험에서는 앞에서 나타낸 바와 같이 $Ni(CN)_4^{2-}$를 주 기질인 시안화합물로써 사용하였다.

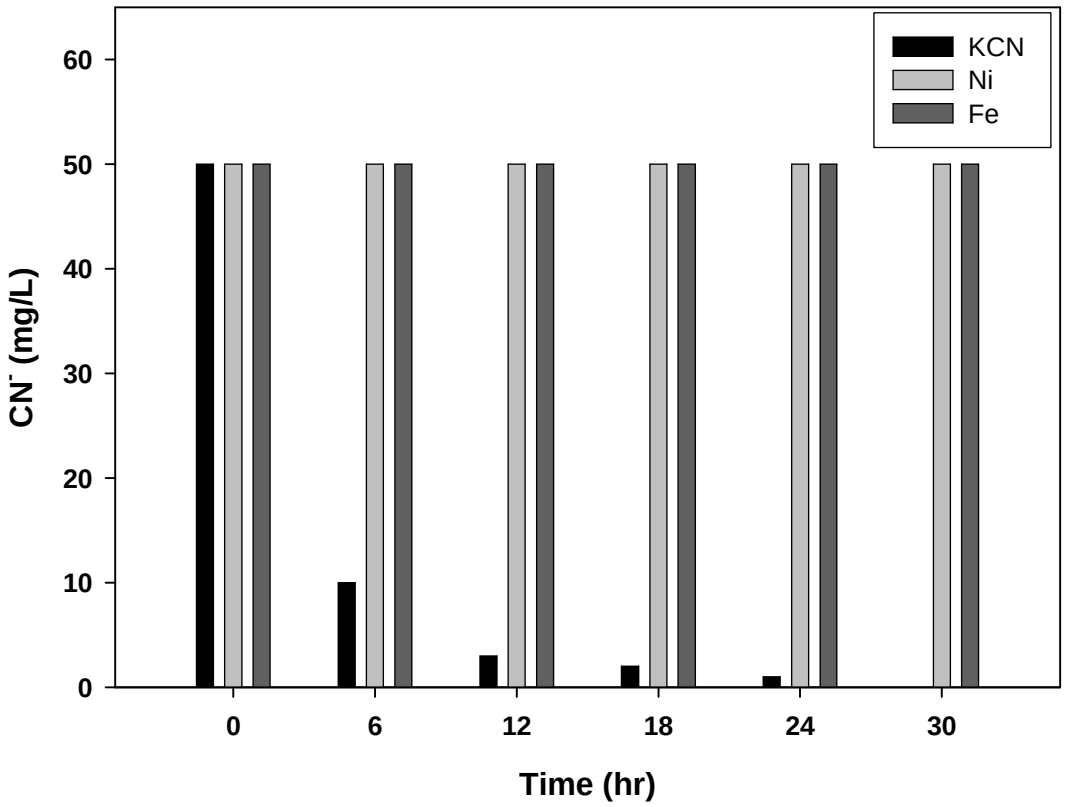


Fig. 10. Changes of cyanide concentration according to the aeration in distilled water.

2. 슬러지량에 따른 시안화합물 분해 효율

Fig. 11.과 같이 MLSS가 높을수록 시안 분해 시간이 짧게 나타났으며, CN^- 50 mg/ℓ는 MLSS 4000mg/ℓ, 6000 mg/ℓ에서 24시간과 36시간내에 분해되었으며, MLSS 800mg/ℓ, 2400 mg/ℓ 는 24시간에 89.7%, 92.7%가 제거 되었다. MLSS 량이 많을수록 분해시간이 짧아짐을 알 수 있었으며, 이 후 모든 실험에서는 MLSS 4000 mg/ℓ 로 고정하여 실험을 수행하였다.

3. 비드의 슬러지 함량이 시안화합물 분해에 미치는 영향

본 실험에서는 고정화 활성슬러지를 이용하여, 시안 분해 효율을 조사하였다.

시안 분해 효율은 활성슬러지 함량 10%를 넣어서 만든 비드가 분해 능력이 우수하였다. 이것은 기질과 반응 할 수 있는 미생물량이 많을수록 시안 분해 효율이 빨리 일어남을 확인할 수 있었다. 결과는 Fig. 12에 나타내었다.

고정화에 사용한 활성슬러지의 양은 고정화에 사용하지 않은 활성슬러지량을 동량으로 사용하였다. 활성슬러지 함량이 많을수록 시안분해 시간이 짧게 나타났다.

이와 같이 PEG를 이용한 고정화 활성슬러지 bead를 제작하여 이용하면 합성폐수중 시안화합물이 제거됨을 확인하였으며, 이후의 회분식 실험을 수행하였다. 또한 활성슬러지 15%을 고정화 하였을 때 보다는 활성슬러지 10%를 고정화 하였을 때의 분해 능력이 더 높음을 알 수 있었다. 이후에 실험에선 활성슬러지 함량 10%로 제작된 bead를 제작하여 실험에 사용하였다.

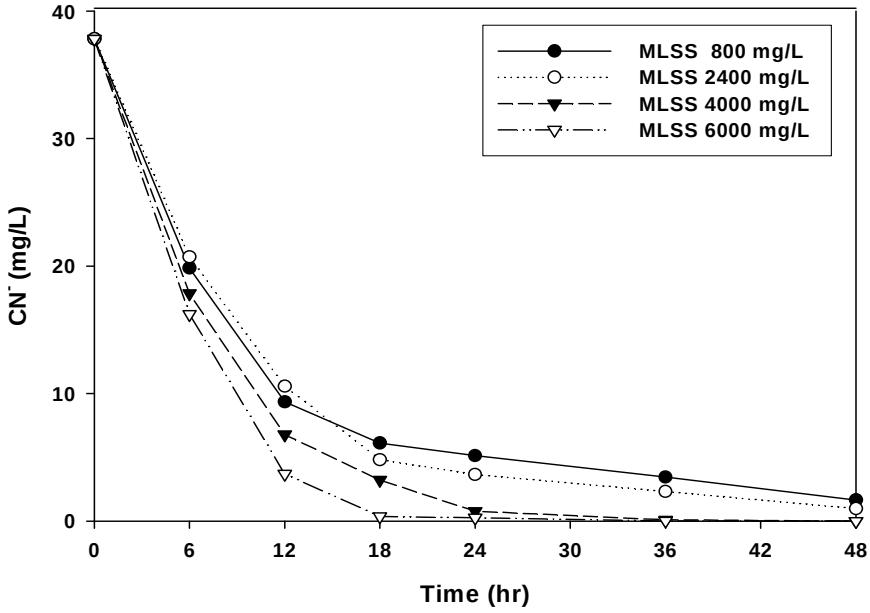


Fig. 11. Effect of MLSS on the cyanide degradation by activated sludge.

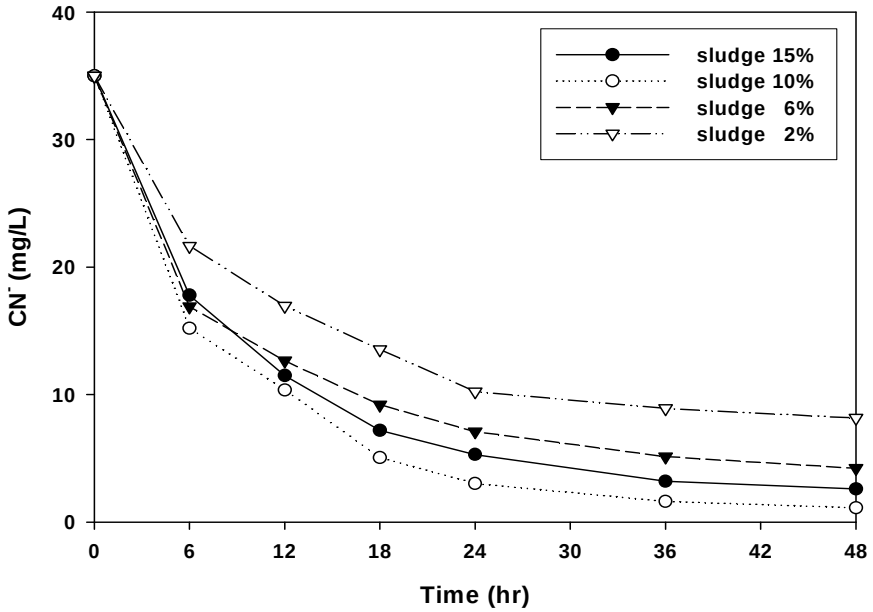


Fig. 12. Effect of the amount of activated sludge on the cyanides efficiency.

4. 기질농도가 시안화합물 분해에 미치는 영향

본 실험에서는 고정화하지 않은 활성슬러지와 고정화 활성슬러지를 이용하여, 시안 분해에 미치는 시안 농도의 영향을 조사하여 Fig. 13에 나타내었다.

고정화하지 않은 활성슬러지와 고정화 활성슬러지 모두 CN^- 400 mg/ℓ에서 Lag time이 있었고 고정화 활성슬러지의 시안 분해 시간이 짧았다.

고정화 하지 않은 활성슬러지의 경우 25 mg/ℓ 와 50 mg/ℓ는 각각 반응 30시간과 48시간만에 완전히 시안이 제거 되었으며, 100 , 200 , 400 mg/ℓ에서는 반응 48시간을 기준하여, 87.53%, 62.50%, 49.65%의 제거율을 보여 CN 농도의 증가에 따라 제거 시간이 증가함을 알 수 있다.

고정화 활성슬러지의 경우 25 mg/ℓ 와 50 mg/ℓ는 각각 반응 30시간, 36시간, 완전히 시안이 제거 되었으며, 100 , 200 , 400 mg/ℓ에서는 반응 48시간을 기준하여 96.48%, 93.21% 60.50%의 제거율을 보여 CN 농도의 증가에 따라 제거 시간이 증가함을 알 수 있다.

이 결과 고정화 하지 않은 활성슬러지의 경우보다 고정화 활성슬러지가 다소 낮은 농도에서는 분해 활성이 더 좋게 나타났다.

Yanase 등[38] 은 Fusarium oxysporum N-10에 의한 니켈(II) 시안 착물의 분해에서 기질농도의 증가에 따라 시안 분해시간이 늘어남을 보여주었다. 기질 확산의 제한인자 추정방법으로는 Lineweaver - Burk plots을 작성하여 기질과의 친화성을 나타내는 Michaelis 정수 Km값을 구하여 추정하는 경우가 있다.

비생장률 μ와 기질농도 S 사이의 상호관계는 모노 방정식에 의해 주어진다.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

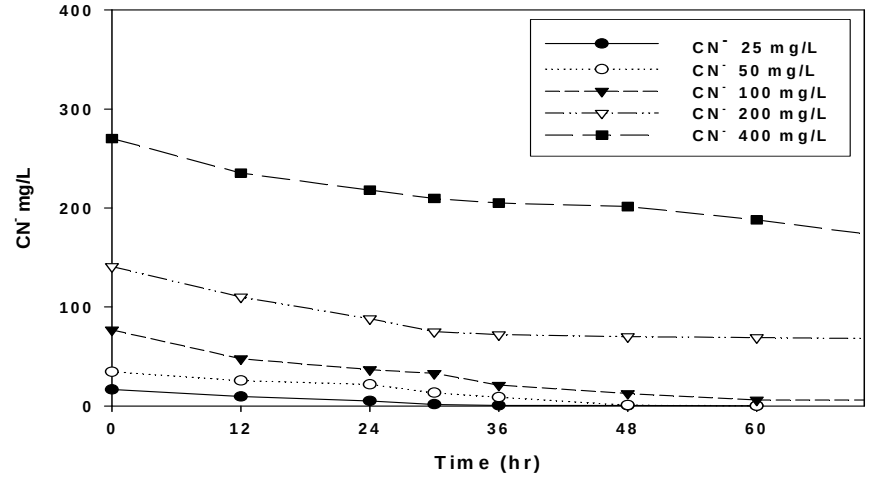
여기서, μ_{max} = 최대 비생장률(hr^{-1}); S = 기질농도(mg/ℓ); K_m = 반포화상수이다. K_m는 비생장률이 $\mu_{max}/2$일 때 기질농도이다. K_m는 기질에 대한 미생물의 친화력을 나타낸다.

μ_{max}와 K_m는 온도, 탄소원의 형태, 그리고 다른 요소들에 의해 영향을 받으며, 모노식은 Lineweaver - Burk plots의 사용으로 직선으로 될 수 있다.

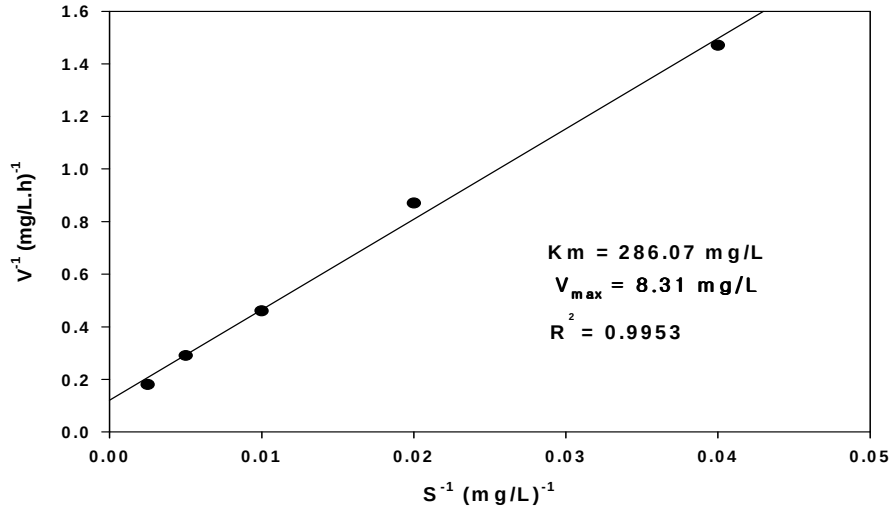
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

V_{max} = 최대반응속도 $(mg/L.h)^{-1}$; y절편 = $1/V_{max}$

실험 결과를 근거로 회귀선법에 의해 Lineweaver - Burk plots을 작성하여 그 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 고정화 하지 않은 활성슬러지의 경우 시안화물에 대한 K_m값은 286.07 mg/L 이고, V_{max}값은 8.31 $(mg/L.h)^{-1}$ 이며, 고정화 활성슬러지의 경우 시안화물에 대한 K_m값은 815.93 mg/L 이고, V_{max}값은 23.53 $(mg/L.h)^{-1}$ 이다.

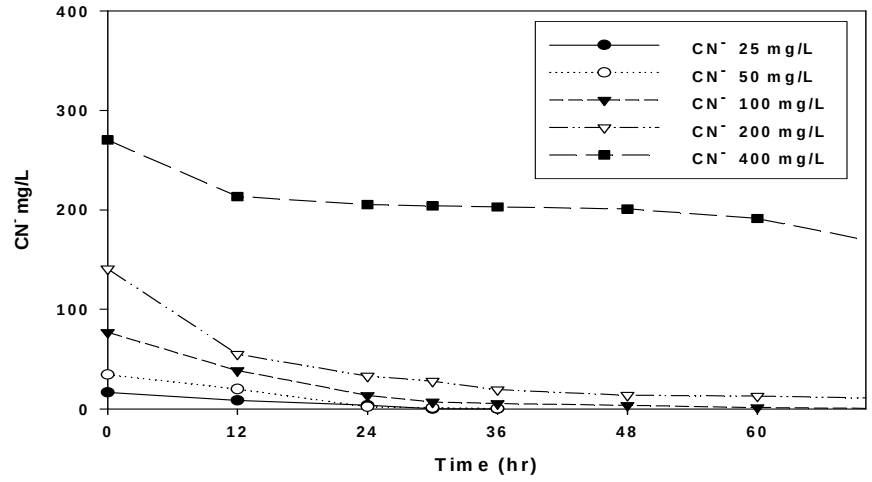


(A)

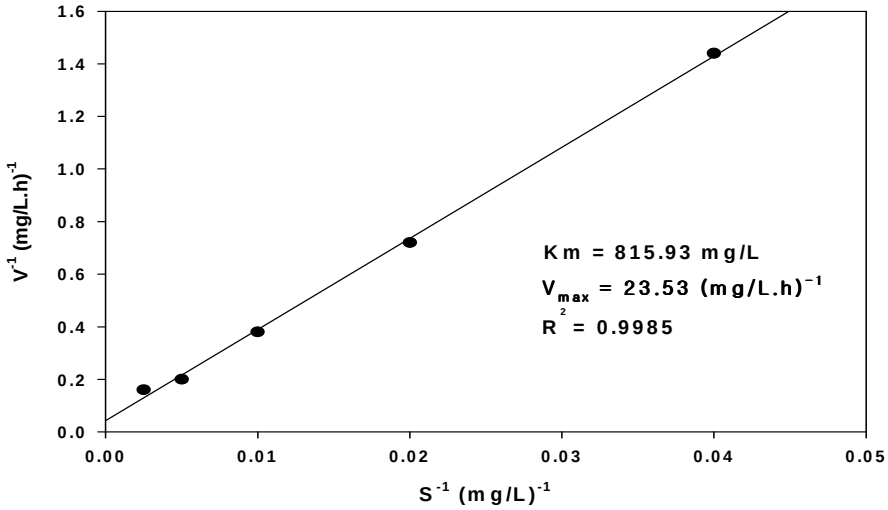


(B)

Fig. 13. Effect of initial CN^- concentration on the CN^- degradation(A) and Lineweaver - burk plots on the cyanide degradation by Activated sludge(B).



(A)



(B)

Fig. 14. Effect of initial CN^- concentration on the CN^- degradation(A) and Lineweaver - burk plots on the cyanide degradation by Immobilized activated sludge(B).

5. pH가 시안화합물 분해에 미치는 영향

본 실험에서는 고정화 하지 않은 활성슬러지(free immobilized bead)와 고정화 활성슬러지(immobilized bead)가 시안화합물을 분해하는데 있어서의 최적 pH 및 분해 pH영역을 조사하였다.

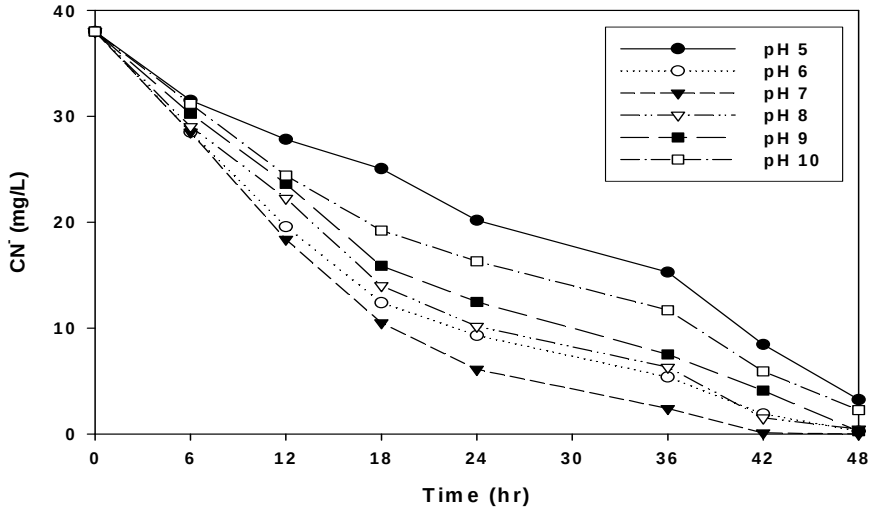
실험대상의 초기 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 10 으로 조절하였다. 분해 최적 pH에 대한 상대 활성, 즉 Relative activity를 Fig. 15와 Fig. 16에 나타내었다.

Relative activity는 시안화합물을 분해하는데 있어서 최적 pH 7일때의 분해속도를 기준으로 각각의 pH에서의 분해속도의 비, 즉, (각각의 pH에서의 분해속도 / pH 7에서의 분해속도) × 100 = x (%)이다. 여기서 분해속도는 시간당(h) 반응조 전체 실험용적(V)에 대한 시안화합물의 분해를 나타낸 것으로 mg/h·V이다.

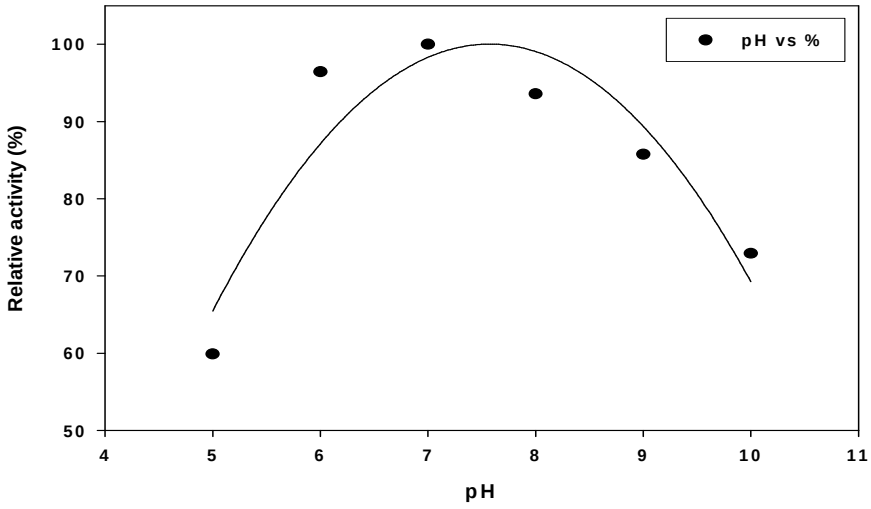
시안화합물 분해에 있어서 고정화 하지 않은 활성슬러지의 최적 pH는 7이며, pH 5에서 60%, pH 6에서 96%, pH 8에서 94%, pH 9에서 86%, pH 10에서 73%로 나타났다. 각각의 pH 영역에 있어서 다소 차이를 보였다.

고정화 활성슬러지의 경우 최적 pH는 9이며, pH 5에서 77%, pH 6에서 84%, pH 7에서 88%, pH 8에서 98%, pH 10에서 70%로 나타났다. pH 6에서 pH 9사이에서는 비슷한 상대활성을 보여 넓은 pH 범위에서 분해활성이 있음을 보여 주었다. .

박[50] 은 코크스 폐수로부터 분리한 미생물에 의한 시안화합물의 생물학적 처리 및 분해기작에서 분해 최적 pH는 7.5이고, pH 5.5 ~8.5에서 분해활성이 있음을 보여주고 있다. Shivaramen 등[51] 은 pH 및 phenol 영향에서 *Pseudomonas acidovorans* 에 의한 시안의 분해에서 pH 7에서 분해 시간이 가장 짧음을 보인 바 있고, Patil 등[52] 은 금속 시안 착물이 함유된 폐수의 생물학적 무독성화 공정 개발에서 구리 시안, 아연 시안, 니켈 시안 착물의 최적 pH가 7.5 임을 확인한 바 있다.

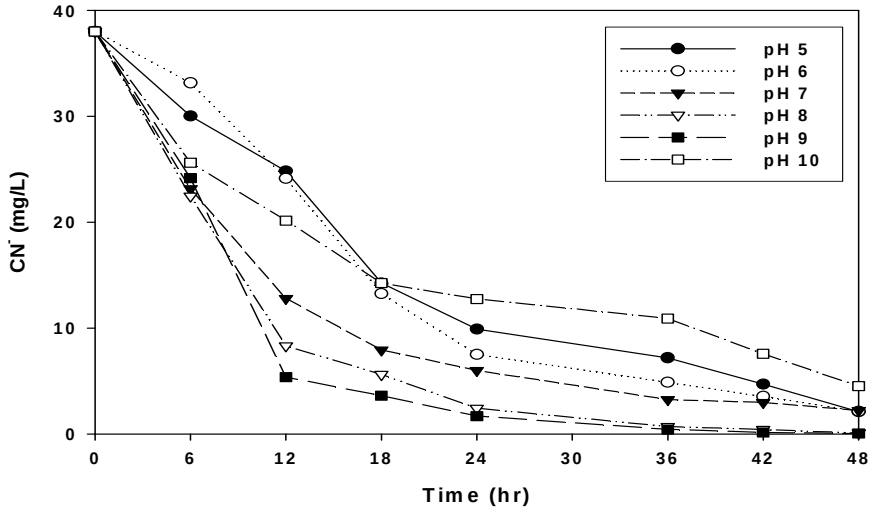


(A)

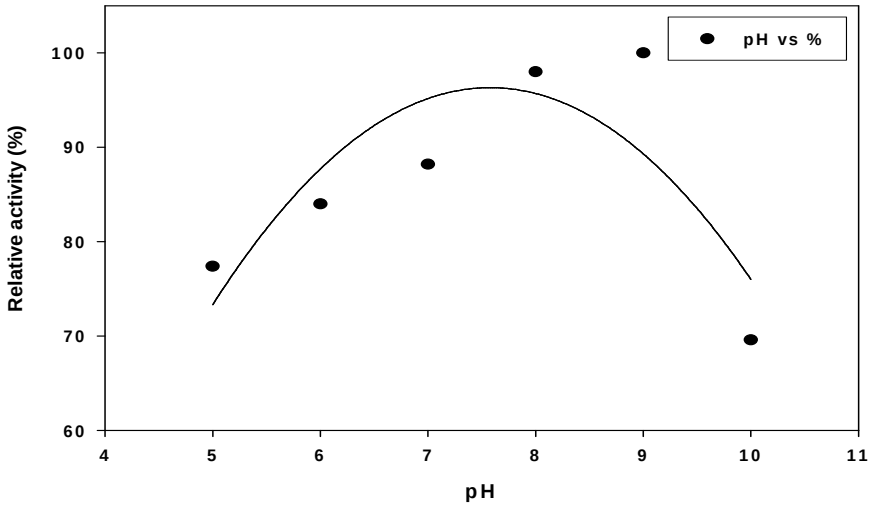


(B)

Fig. 15. Effect of pH on the cyanide removal by activated sludge(A) and Relative activity(B).



(A)



(B)

Fig. 16. Effect of pH on the CN^- degradation by immobilized activated sludge(A) and Relative activity(B).

6. 비드 충진율이 시안화합물 분해에 미치는 영향

고정화 활설슬러지 비드 충진율에 따른 질산화율을 나타낸 것으로, 충진율은 10%, 30%, 50%이며, 그 결과는 Fig. 17에 나타내었다.

시안분해율은 각각 72시간, 48시간, 30시간이 걸렸다. 시안분해율은 반응기 내에 충진된 고정화 비드양에 정비례하지는 않았으나 충진율이 높을수록 시안화합물 분해율이 높았다. 고정화 비드양이 증가하면 시안분해 시간이 빠른데, 이것은 고정화비드 충진율이 높을수록 고정화 균체량이 많기 때문에 분해속도가 빨라졌을 것으로 사료된다.

하지만 반응조내에 비드 충진율을 50%로 유지하기 위해서는 약품 값이 과다하게 소요되므로 본 실험에서는 비드 충진율 30%로 회분식 실험을 수행하였다.

박 등[46]도 한천 아크릴아미드로 포괄고정화된 미생물을 이용한 PVA의 처리특성에서 처리율은 반응기에 주입된 bead양에 비례하지는 않았으나 주입량이 많을수록 처리효율이 높아짐을 보고하였다.

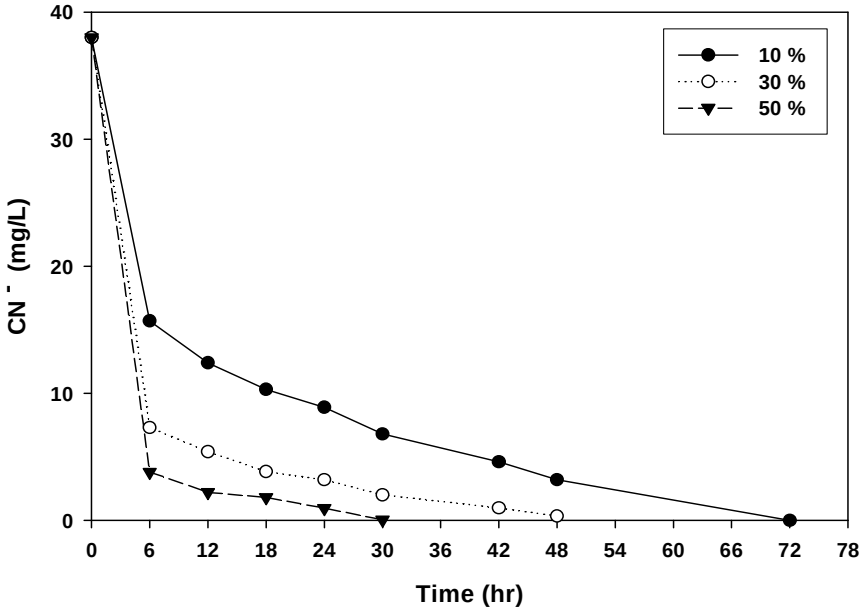


Fig. 17. Effect of amount of immobilized bead on the CN^- removal.

7. 시안분해에 따른 암모니아성 질소 생성

본 실험에서는 활성슬러지에 의해 시안화합물이 NH_3^+-N로 분해됨을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 18에 나타내었다.

초기 시안 농도 50 mg/ℓ는 반응 42시간만에 완전히 제거 되었고, NH_3^+-N는 42시간만에 7.65 mg/ℓ가 생성되었다. Yanase 등[49] 은 *Fusarium oxysporum N-10* 을이용한 니켈(II) 시안 착물의 분해에서 260 mg/ℓ의 니켈(II) 시안 착물 및 시안화 칼륨이 분해되어 각각 109 mg/ℓ, 77 mg/ℓ의 암모니아가 생성됨을 보고한 바 있다.

Kunz 등[12] 은 *Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764*를 이용한 연구에서 시안화합물이 CO_2 와 ammonia 로 전환되며, KCN 1M이 분해되어 ammonia 0.4M 이 생성되었다고 보고 하였다.

이와 같이 본 연구에 사용한 시안화합물은 미생물에 의해서 NH_3^+-N로 분해됨을 알 수 있었다.

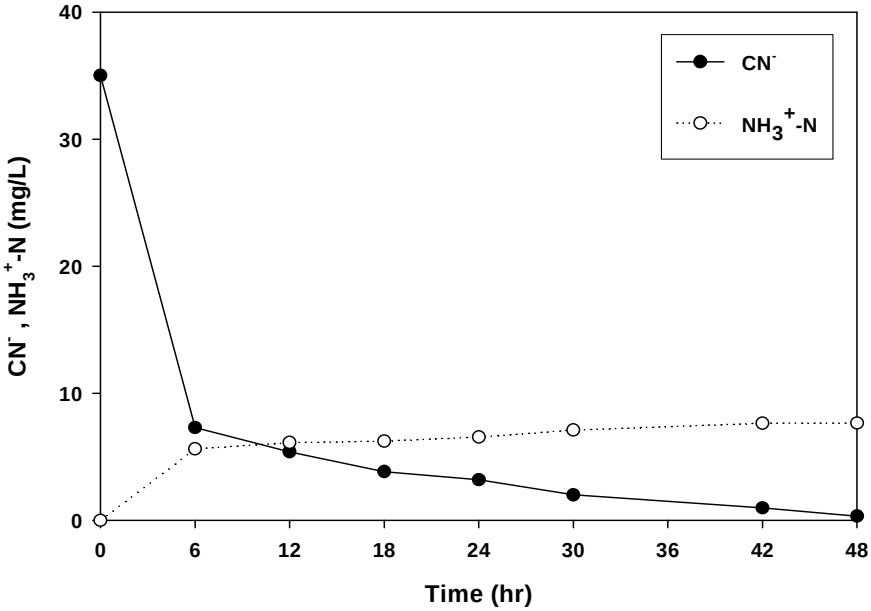


Fig. 18. Biotransformation of cyanides by immobilized activated sludge.

8. Glucose가 시안화합물 분해에 미치는 영향

본 실험에서는 glucose 농도에 따른 시안 분해 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 19~21에 나타내었다.

COD 농도 200, 400, 600, 1200, 2400 mg/ℓ에 따른 시안의 제거율은 반응 12시간에 71.9, 80.6, 82.0, 92.2, 95.3% 이었으며 glucose가 첨가되지 않은 비교(control)실험에서는 61.9%의 제거율을 보였다. 탄소원으로 glucose가 첨가되면 시안의 분해율이 더 좋아짐을 확인 할 수 있었다.

반응 12시간에서 glucose 농도에 따른 시안의 제거율과 TOC와 COD 농도를 비교한 결과 glucose 양이 많을수록 시안의 제거율은 높아졌으며 이에 따른 각각의 TOC 와 COD 농도 제거율은 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 박[50]이 코크스 폐수로부터 분리한 미생물에 의한 시안화합물의 생물학적 처리 및 분해기작에서 탄소원으로 phenol 과 glucose를 동시에 첨가하였을 때 시안이 분해됨을 확인 한 것과 같이 시안화합물을 분해하는데 glucose를 탄소원으로 사용함을 알 수 있었다.

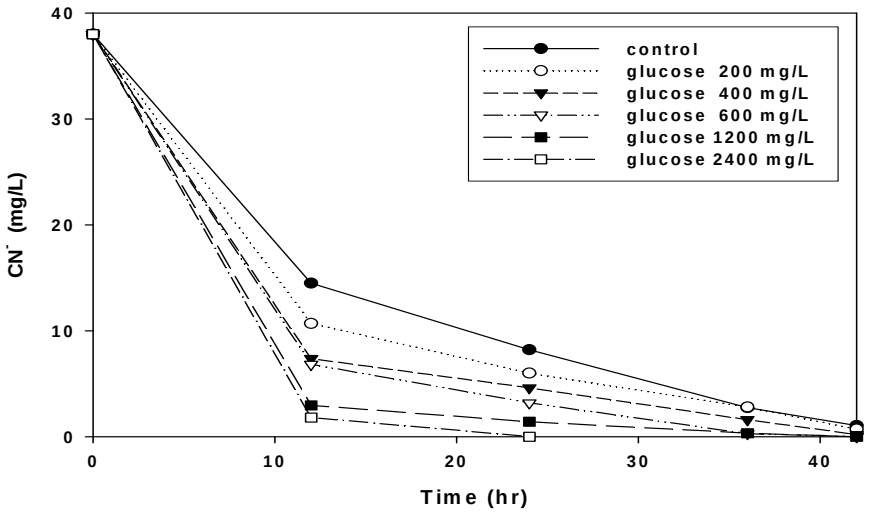


Fig. 19. Effect of glucose concentration on the cyanide degradation by immobilized activated sludge.

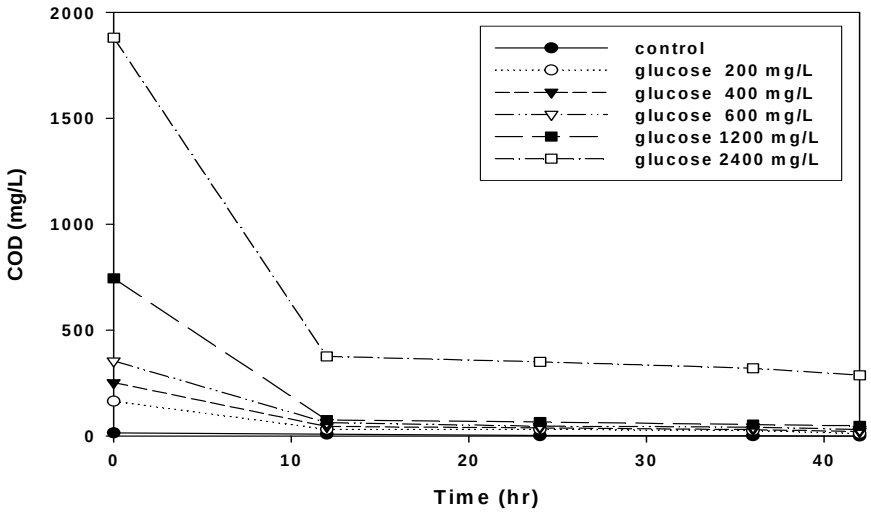


Fig. 20. Effect of glucose concentration on the COD degradation by immobilized activated sludge.

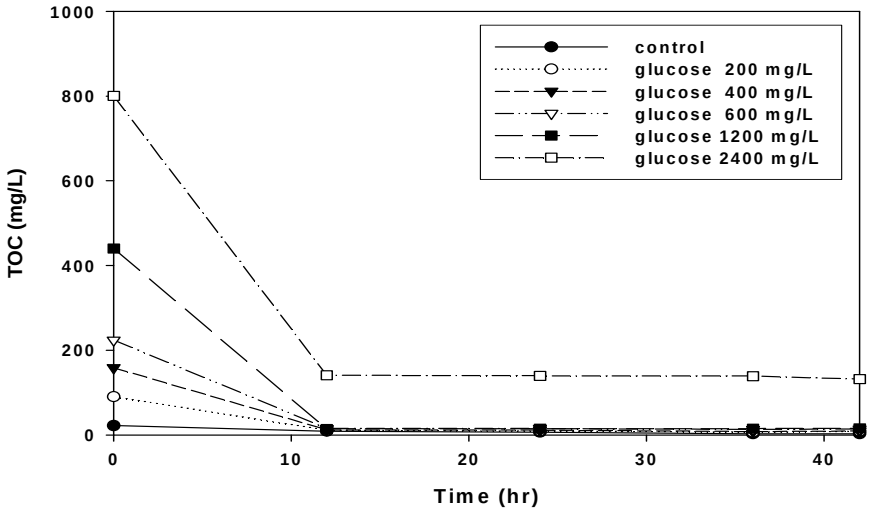


Fig. 21. Effect of glucose concentration on the TOC degradation by immobilized activated sludge.

9. SCN^-이 시안화합물 분해에 미치는 영향

시안 배출공정에 황이 존재할 경우 티오시안이 생성 되는데 이 티오시안이 시안 분해에 주는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 22, 23과 같다.

티오시안 농도가 각각 200, 400, 600, 800, 1600 mg/ℓ일 때 반응 24시간에서 시안의 제거율은 91.7, 94.5, 94.7, 96.5, 87.6, 73.0% 이었다. 티오시안의 농도가 200~600 mg/ℓ 까지는 시안의 제거율이 일정하다가 티오시안의 농도가 800 mg/ℓL 이상으로 첨가되었을 때 시안의 제거율이 감소되어지는 것을 알 수 있었다.

Goncalves 등[53] 은 시안이온, 티오시안, 금속 시안 착물 함유 폐수의 생물학적 분해를 검토한 결과 시안 및 티오시안의 각각 99%, 69%의 제거율을 보였다.

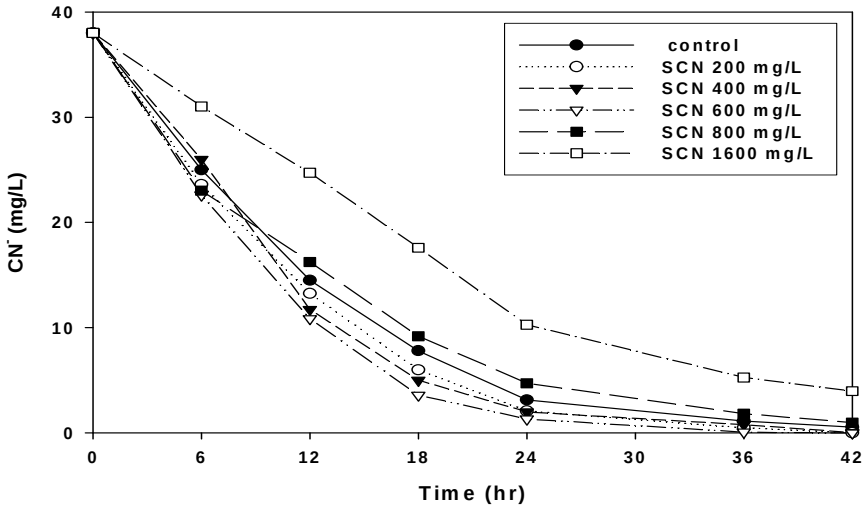


Fig. 22. Effect of SCN concentration on the cyanide degradation by immobilized activated sludge.

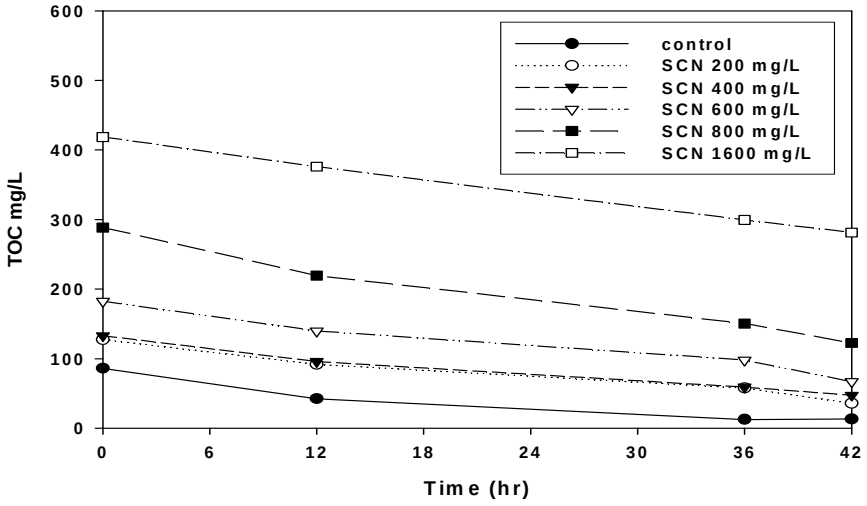


Fig. 23. Effect of SCN concentration on the TOC degradation by immobilized activated sludge.

10. Phenol이 시안화합물 분해에 미치는 영향

본 실험에서는 코크스폐수와 같이 phenol과 시안이 동시에 존재할 때 phenol의 농도가 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 24~27에 나타내었다.

초기 시안 농도는 50 mg/ℓ이며 phenol 농도 100, 200, 300, 400 mg/ℓ와 Control에서 시안 제거율은 42시간동안 각각 97.76%, 98.52%, 99.00%, 99.42% 그리고 96.36%이었다. phenol을 첨가하였을 때 시안 제거율이 더 좋음을 알 수 있었다.

미생물에 의한 시안화합물의 생물학적 처리에서 탄소원으로 phenol을 첨가하였을 때 탄소원의 감소량을 알아보기 위하여 COD, TOC와 phenol 의 제거량을 측정한 결과는 다음과 같다.

12시간만에 전체적으로 COD, TOC와 phenol이 제거됨을 알 수가 있었으며 24시간에서는 phenol 또한 거의 제거됨을 알 수 있었다.

박[50]은 코크스 폐수로부터 분리한 미생물에 의한 시안화합물의 생물학적 처리 및 분해기작에서 탄소원으로 phenol 과 glucose를 동시에 첨가하였을 때 시안이 분해됨을 확인 하였고, 페놀은 유일 탄소원으로 545 mg/L까지 이용할 수 있었으나 탄소원의 부족으로 완전히 분해되지는 않았다.

Shivaraman[51]은 유입 pH 및 phenol에서 Pseudomonas acidovorans를 이용한 시안화물의 생물학적 분해에서 phenol 5 mg/ℓ 이상에서 시안 분해를 저해함을 확인하였다.

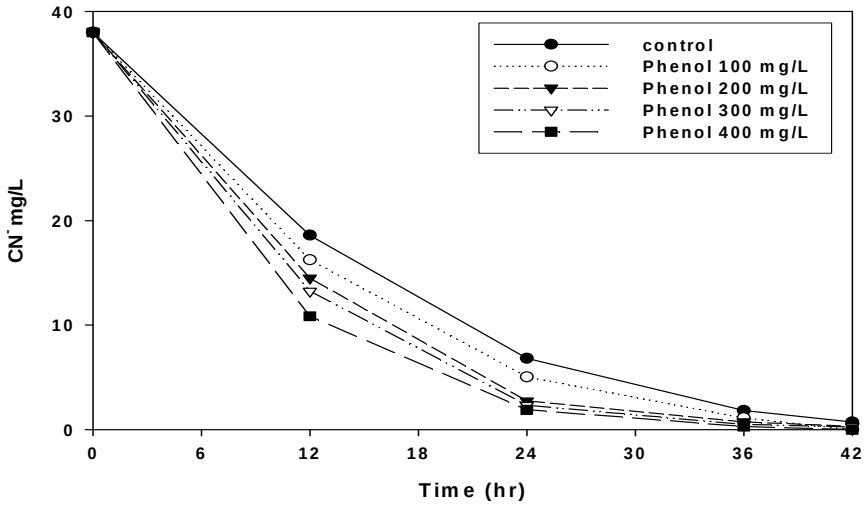


Fig. 24. Effect of phenol concentration on the cyanide degradation by immobilized activated sludge.

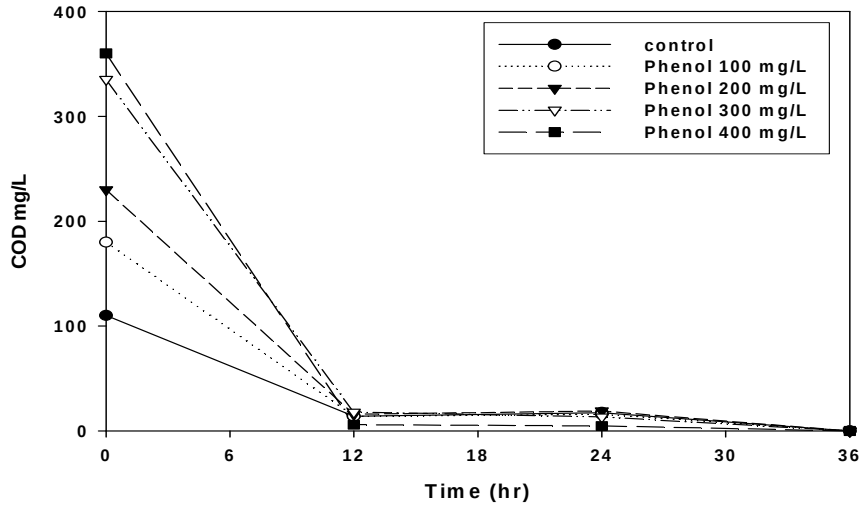


Fig. 25. Effect of phenol concentration on the COD degradation by immobilized activated sludge.

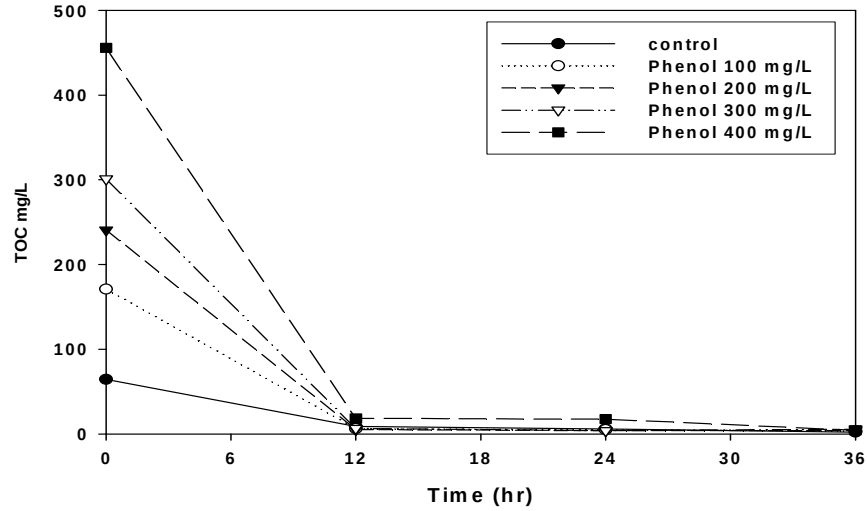


Fig. 26. Effect of phenol concentration on the TOC degradation by immobilized activated sludge.

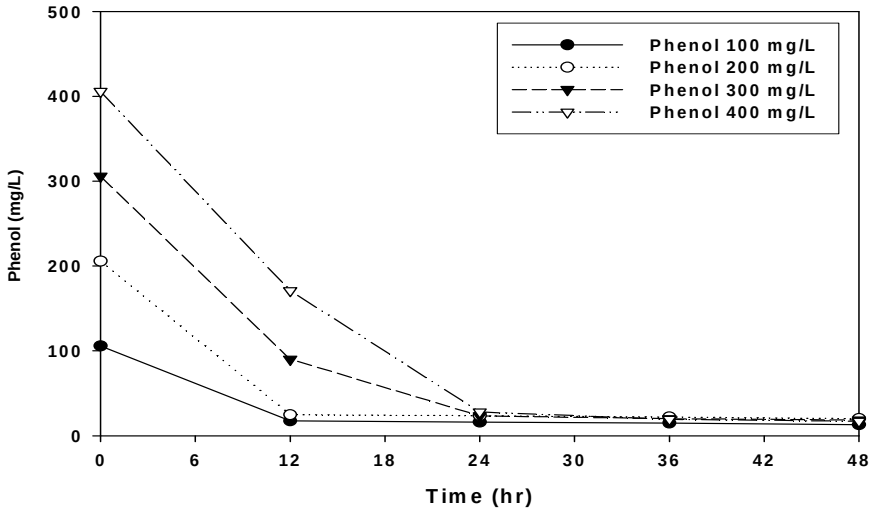


Fig. 27. Effect of phenol concentration on the phenol degradation by immobilized activated sludge.

B. 연속식 실험

1. HRT 변화에 따른 시안화합물의 분해 효율

본 실험에서는 HRT에 따른 연속처리에서의 유출수 시안농도를 나타내었고 결과는 Fig. 28에 나타내었다. 고정화 활성슬러지를 이용한 실험 초기에는 HRT 48시간으로 운전하였으며 유출수 시안농도는 점차 감소하여 운전 23일 경에는 유입시 안농도 50 mg/ℓ가 거의 완전히 제거되었다. 운전 70일에는 HRT를 24시간으로 낮춰서 운전한 결과 유출수 시안 농도는 증가하는 경향을 보였으며, 유출수 평균 시안농도는 5 mg/ℓ 정도까지 나타났다. 운전 95일경에는 HRT를 원래의 상태인 48시간으로 증가시켰으며 이때 유출수 시안농도는 다시 감소하였다.

Siler 등[54]은 식품사업에서 나오는 시안 함유 폐수 처리에서 시안은 평균 80%이상이 제거율로써 연속처리 결과를 보였다.

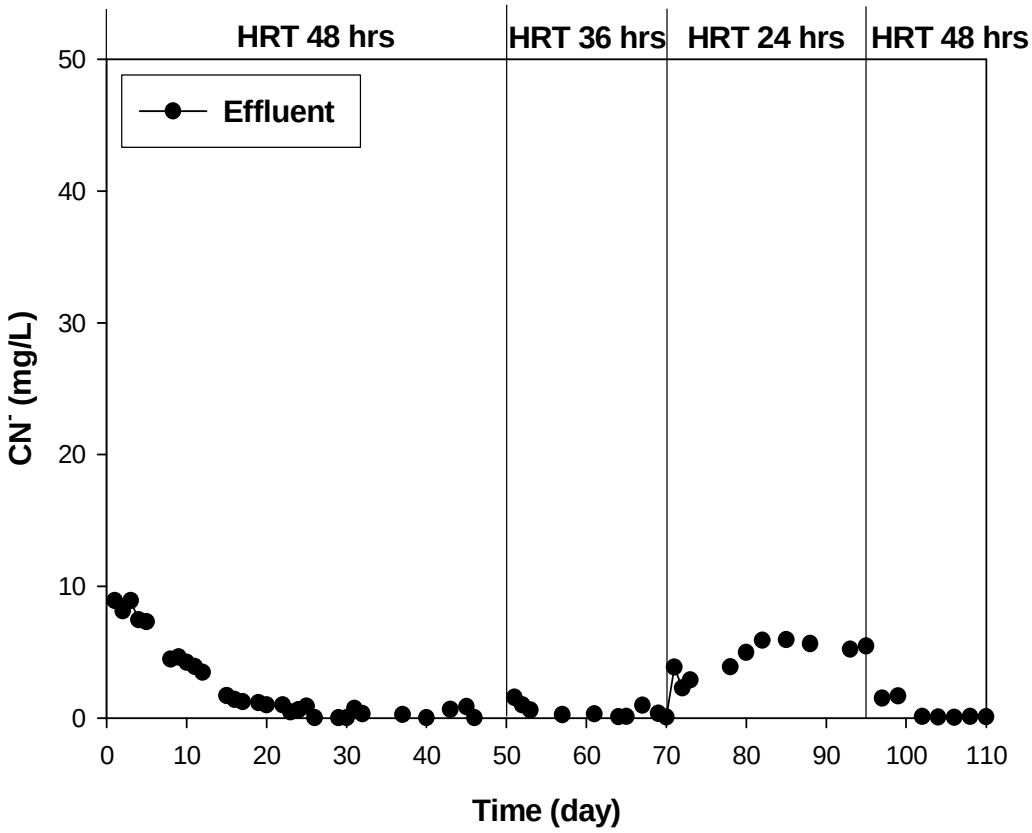


Fig. 28. Variation of CN^- with continuous reactor by immobilized activated sludge.

Ⅴ. 결 론

고정화 활성슬러지를 이용하여 합성폐수 중의 시안화합물을 제거하기 위하여 회분식 실험 및 연속식 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

A. 회분식 실험

1) 고정화 활성슬러지 경우 슬러지 함량이 2% ~ 10%까지는 슬러지 함량에 따라 분해율이 증가하였으나, 15%이상에서는 오히려 분해율이 낮아지는 경향을 보였다.
2) 초기 시안화합물의 농도가 높을수록 시안의 분해 시간은 증가하였다.
3) 시안화합물 분해 상대활성도는 고정화 활성슬러지가 free 활성슬러지 보다 넓은 pH 범위에서 높게 나타났다.
4) 비드충진율이 높을수록 시안화합물 분해율이 높았다.
5) 시안화합물이 분해되면 분해 농도의 약 40%가 암모니아로 생성됨을 알 수 있었다.
6) Glucose의 양이 증가함에 따라 시안의 제거율은 증가하였으며, 시안화합물을 분해하는데 glucose를 탄소원으로 사용함을 알 수 있었다.
7) SCN^- 농도 200 ~ 800 mg/ℓ까지는 시안 분해에 영향을 주지 않았으나, 1600 mg/ℓ에서는 시안 분해율이 저하되었다.
8) phenol 농도가 높아질수록 시안 분해 시간이 짧아지는 경향을 볼 수 있었다.

B. 연속식 실험

고정화 활성슬러지를 이용하여 연속적으로 합성폐수를 처리한 결과 HRT 48시간에서는 유입원 시안농도 50 mg/ℓ이 거의 제거되었으나 HRT를 24시간으로 한 경우에는 90%(잔류유출수농도 5 mg/ℓ)까지 밖에 제거되지 않았다.

참 고 문 헌

1. 조순행·김영권·유희찬. “고농도 시안 폐액의 처리”, 대한환경공학회지, 15(6),735~742 (1993)
2. Torphy, M. F. "Electroplating and cyanide wastes", Jour. of WPCF, Liter-ature Review, 1182-1188 (1977)
3. 최원석·박기학, “과산화수소를 이용한 시안화나트륨 및 시안화합물을 함유한 도금폐수의 처리”, 환경관리학회지, 3(1) (1997)
4. Bernard, C. L. and Owen, B. M., "Process for detoxifying cyanide waste-water", U.S Patent 3,617,582 (1971)
5. Joseph, G. M., "Zinc sludge recycling after KASTONE® treatment of cyanide-bearing rinse water", EPA-600/2-77-038 (1977)
6. Torphy, M. F. and Runke, H. M. "Electroplating and cyanide wastes", Jour. of WPCF, Literature Review, 1270-1277 (1978)
7. Cenkin. V. E. and Belevtsev, A. N., "Electrochemical treatment of industrial wastewater", Effluent and water treatment Jour. 243-247 (1985)
8. Frederick, E. B., "Cyanide detoxification using adsorption and catalytic oxidation on granular activated carbon", Jour. of WPCF, Vol. 45, No. 2, 221-231 (1978)
9. Zeevalkink, J. A., et. al., "Mechanism and kinetics of cyanide ozonation in water", Water Res., Vol. 14, 1375-1385 (1979)
10. Pettet, A.E.J. and M ills, E.V. “Biological treatment of cyanides, with and without sewage.“, J . Appl. Chem., 4, 434-444 (1954)
11. Fry, W. E., Millar, R. L., " Cyanide degradation by an Enzyme from Stemp hylium loti", A. of Bioche. and Biophy., 151, 468-474 (1972)
12. Kunz, D.A., Nagappan, O., Silva-avalos, J., and Delong, G., “ Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: Evidence for multiple pathways of metabolic conversion”, App. Environ. Microbiol., 58. 2022-2029 (1992)

13. Barclay, M ., Tett, V., and Knowles, C.J., “Metabolism and enzymology of cyanide/metallocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions”, Enzyme and Microbial Technology, 23, 321-330 (1998).
14. 정경훈·최형일. “고정화 Thiobacillus sp. THI 011에 의한 티오시안 분해에 미치는 성질”, 대한환경공학회, ***16***, (3), 381 (1994)
15. 정재춘. “미생물고정화법에 의한 배수처리”, 동화기술 (1991)
16. 김선일·윤영재·정경훈. “광경화성 수지에 고정화된 활성슬러지에 의한 페놀 분해”, 한국생물공학회지, 11 (1996)
17. Shivaraman, N. and Parhad, N.M . “Microbial detoxification of cyanide from wastewater”, Proc. Int. Conf., Sep. 15-18, 155-162 (1985)
18. Harris R. and Knowles, CJ “Isolation and growth of a Pseudomonas species that utilizes cyanide as a source of nitrogen” J . Gen. Microbiol. 129, 1005-1011 (1983)
19. Harris, R. and Knowles, C. J., “The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of Pseudomonas fluorescens that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth.", FEMS Microbiol, 20, 227-341 (1983)
20. Dhillon, J.K. and Shivaram an, N. "Biodegradation of cyanide compounds by a Pseudomonas species (S1)", Can. J . Microbiol. 45, 201-208 (1999)
21. Chen, J., Kunz, D.A. "Cyanide utilization in Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764 involves a putative siderophore." FEMS Microbiol. Lett. 156, 61-67 (1997)
22. Ingvorsen, K., Hojer-Pederson, B.H., and Godtferedsen, S.E. "Novel hydrolyzing enzyme from Alcaligenes xylosoxidans subsp", Denitrificans. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1783-1789 (1991)
23. Taussig, A. "The synthesis of the induced enzyme, cyanase in E.coli.", Biochimica et Biophysica Acta 44, 510-519 (1960)

24. Taussig, A. "Some properties of the induced enzyme, cyanase", Canadian Journal of Biochemistry 43, 1063-1069 (1965)
25. Kunz, D.A, Nagappan, O. "Cyanase-mediated utilization of cyanate in Pseudomonas fluorescens NCIB 11764", Appl. Environ. Microbiol. 55, 256-258 (1989)
26. Fry, W.E. and Myers, D.F. Hydrogen cyanide m etabolism by fungal pathogens of cyanogenic plants", p. 321-334 (1981)
27. Harper, D.B. "Characterization of a nitrilase from Nocardia sp. (Rhodochrous group) NCIB 11215 using p-hydroxylbenzonitrile as sole carbon source", International Journal of Biochemistry 17, 677-683 (1985)
28. Bandyopadhyay, A.K., Nagasawa, T., Asano, J. Fujishiro, K.T. and Yamada, H. "Purification and characterization of benzonitrilases from Arthrobacter sp", Strain J1. Applied and Environmental Microbiology 51, 302-306 (1986)
29. McBride, K.E., Kenny, J.W. & Stalker, D.M . "Metabolism of the herbicide, Bromoxynil by Klebsiella pneumoniae sub sp ozaenae", Applied and Environmental Microbiology 52, 325-330 (1986)
30. Nawaz, M .S., Davis, J.W., Wolfram , J.H., & Chapatwala, K.D. "Degradation of organic cyanides by Pseudomonas aeruginosa", Applied Biochemistry and Biotechnology, 28-29, 865-875 (1991)
31. Bowen, T.J ., Butler, P.J. and Happold, F.C. "Some properties of the rhodanese system of Thiobacillus denitrificans", Biochemistry Journal 97, 651-657 (1965)
32. Atkinson, A "Bacterial cyanide detoxification", Biotechnology and Bioengineering 17, 457-460 (1975)
33. Dunnill, P.M . & Fowden, L. Enzymeatic formation of -cyanoalanine from cyanide by Escherichia coli extracts", Nature 208, 1206-1207 (1965)
34. Castric, P.A. & Strobel, G.A. "Cyanide metabolism by Bacillus

megatherium", Journal of Biological Chemistry 244, 4083-4094 (1969)

35. Hoecker, W. and M uir, D. "Degradation of cyanide. The AusIMM AdelaideBranch, Research and Development in Extractive Metallurgy", May 1987 29-36(1987)

36. M udder, T.I. & Whitlock, J .L. Biological treatment of cyanidation waste waters", In: roceedings of the 38th Annual Purdue Industrial Waste 279-287(1984)

37. Babu, G.R.V., Wolfram, J.H., Chapatwala, D. "Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of Pseudomonas putida", Journal of Industrial Microbiology 9, 235 (1992)

38. Nilson, I. Hilson, S. Molin, N. and K. Mosbach, "Denitrification of Water using Immobilized Psedomonas Denitrifications Cells", Eur. J. Appl. Microbiol. biotechnol, ***10***,261~274 (1991)

39. Xing, X. H. Shiragami. N, and H. Unno, "Simultaneous of organic substanaced and nitrogen by retained microbial community accumulated in porous polyurethane particles", 수질오탁연구, ***14***. 2,127~130 (1991)

40. Kawamura, J. Umita, T. Omura, Y. Aizawa, J. and M. Onuma, "Biological nitrification in the fluidized bed reactor with amberlite IRA-938 as a support medium", 수질오탁연구, ***14***. 3,190~198 (1991)

41. Kikufuta, E. Matsumoto, W. and I. Nakamura, "Immobilization of Nitroscomonas europaea cells with polyelctrolyte complex", Biotechnol. Biong., ***24***,1591~1603 (1982)

42. Kokufuta, E. Shimohashi, M. and I. Nakamura, "Immobilization of Paracoccus denitrificans cells with polyelctrolyte complex and denitrifying activity of the immobilized cells", J. Fermednt. Techmol., ***64***,533~538 (1986)

43. 橋本, 高憲治. "活性汚泥の 固定化との 淨化機能に關すみ 研究", 下水導 協會誌. ***22***,42~50 (1985)

44. 角野立夫, 大竹康友, 中村紀.. アワソルアミト 包括固定化法 による排水處理, 用水と 廢水, *29*,735~741 (1987)
45. 김종택. 수질오염공정시험법해설, 신광출판사, 서울 (1999)
46. 박영규·이철희·박수정. "포괄고정화법에 의한 PVA함유폐수의 처리특성", 대한환경공학회지, 16 (1995)
47. Brown, J.C., Swaisgood, H.E., and Horton, H.R. : Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.48, 1068 (1972)
48. kang, S. M., Kim, D. J., "Degradation of cyanide by a bacterial mixture composed of new types of cyanide-degrading bacteria", Biotechnologt Letters, 15, 201-206 (1993)
49. Yanase, H., Sakamoto, A., Okamoto, K., Kita, K., Sato, Y., "Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate(II) by Fusarium oxyysporum N-10", Appl Microbiol Biotechnol, 53, 328-334 (2000)
50. 박종문, "Biological Treatment and Degradation Metabolism of Cyanide Compounds by Microorgani는 Isolated from Wastewater of Coke Oven plant", 포항공과대학교, 박사학위논문 (2002)
51. Shivaraman, N. and Parhd, N.M., " Biodegradation of cyanide by Pseudomonas acidovorans and influence of pH and phenol", Indian Journal of Microbiology , 25, 79-82 (1985)
52. Patil, Y.B., Paknikar, K.M., "Development of a process for biodetoxification of metal cyanides from waste waters" Process Biochemistry , 35, 1139-1151(2000)
53. Goncalves, M. M. M., Pinto, A. F., Granto, M., "Biodegradation of free cyanide, thiocyanate, and metal complexed cyanides in solutions with different compositions", Environmental Technology, 19, 133-142 (1998)
54. Siller, H. and Winter, J., "Treatment of cyanide-containing wastewater from the food industry in a laboratory-scale fixed-bed methanogenic reactor", Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 215-220 (1998)