

탈질능을 가진 *Pseudomonas* sp.의 분리 및 특성

김현국·김성구·이병현**·서근학*·공인수†

부경대학교 생물공학과
*부경대학교 화학공학과
**부경대학교 환경공학과

Isolation and characterization of denitrifying bacteria, *Pseudomonas* sp.

Hyun-Kuk Kim, Sung-Koo Kim, Byung-Hun Lee**, Keun-Hack Suk* and In-Soo Kong†

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Department of Environmental Engineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Pseudomonas sp. KH2-2 had the denitrifying ability and was isolated from the denitrifier consortium in order to remove nitrogen compounds from waste water in aquaculture system. When this strain was reached stationary phase, it has the maximum denitrification activity. Denitrification activity of the isolated strain was shown the growth associated pattern. Optimal temperature for cell growth and denitrification activity was 40°C and optimal pH was 7.

Key words : Denitrification, *Pseudomonas* sp.

서 론

미생물에 의한 탈질화는 일반적으로 혐기적 nitrate (NO_3^-) 호흡의 결과이다.^{1,2)} 탈질화 과정은 4단계의 환원 과정 즉, Nitrate (NO_3^-)가 연속적으로 nitrite (NO_2^-), nitric oxide (NO), nitrous oxide (N_2O)를 거쳐 최종 산물인 nitrogen (N_2)로 전환하는 과정을 거친다.³⁾ 질산화 과정 (nitrification)에 의해 생성된 nitrate는 절대 혐기성균 혹은 편성 혐기성 균주에 의한 탈질화 과정을 거쳐 자연계의 유독한 암모니아성 질소를 제거하게 된다.

산업 폐수, 축산 폐수, 생활하수에서 배출되는 오염물질에 대한 기존의 오폐수 처리 시설들은 대부분 유기물질과 부유

물질의 제거에 중점을 두고 있어 수계의 부 영양화가 가중되고 있다. 이런 부 영양화로 인해 질소와 인과 같은 영양분이 과다하게 되어 수계에서의 조류의 생산력이 증대하게 되는데 이러한 조류는 주간에는 광합성 작용이 왕성하지만, 야간에는 호흡작용을 통하여 용존산소를 소모하므로 어패류 등 수중 생물에 필요한 산소를 결핍시켜 어류의 폐사를 초래한다.⁴⁾

또한 양어장에서의 순환 여과식 사육 시스템은 순환수 재이용에 따른 적정 온도 보존 및 경비 절감의 장점에도 불구하고, 지속적인 배설물 및 사료에 의한 수질악화로 인해 적절한 수처리가 요구되고 있다. 고밀도 양어장에 적용되고 있는 순환수 처리 공법으로 회전 원판 공법^{5,6)}, 살수

† Corresponding author

여과공법⁷⁾, 침지 여과 공법⁸⁾, 수경법⁹⁾, 활성 슬러지법¹⁰⁾, 유동층 공법¹¹⁾ 등이 보고된 바 있다.

앞에서 언급한 이런 문제점을 해결하기 위한 방법의 하나가 질산화, 탈질산화 능력이 뛰어난 균을 이용한 고정화 방법으로, 이것은 충격부하에 대한 저항성과 안정성, 비교적 높은 농도의 미생물에 의해 유기물 및 영양물질의 처리가 가능한 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 양어장의 순환수에 존재하는 암모니아성 질소 제거를 목적으로 하는 고정화 생물막법에 적용하기 위해 탈질화 미생물을 자연계에서 분리하고 이 균의 생화학적 특성에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 탈질능을 지니는 미생물의 분리

탈질능을 가지는 미생물을 분리하기 위하여 denitrifier consortium으로부터 시료를 채취하여 0.85% 식염수에 최종 10^{-4} 으로 희석한 뒤 고체 평판 배지에 도말하여 단일 균주를 분리하였다. 미생물 분리를 위한 배지는 meat extract 0.3%, peptone 0.5%를 2차 증류수에 첨가한 것을 사용하였다.

분리된 균주들은 최종 150ppm 농도의 NaNO_3 가 첨가된 동일 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 진탕배양 (150rpm) 하였다. 배양액을 원심분리 (13,000rpm for 1 min) 하여 얻은 상청액을 0.2 μm filter에 여과하여 Ion chromatography (Dionex DX-100)로써 O_2^- , NO_3^- 농도를 측정하였다. 여기서 가장 강한 NO_2^- , NO_3^- 환원능을 지니는 균주를 선택하였다.

2. 분리균의 동정

분리된 탈질화 미생물의 생화학적 특성은 API 20NE kit를 사용하여 행하였으며 형태학적 특성은 전자 현미경을 사용하여 관찰하였다. 실험 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology를 참조하여 동정하였다.

3. 균성장에 따른 탈질능

최종 200ppm의 NaNO_3 가 첨가된 100ml의 배지 (meat extract 0.3%, peptone 0.5%)에 0.1%의 균을 접종하여 8시간마다 균성장과 잔존하는 NO_2^- , NO_3^- 농도를 ion

chromatography로써 측정하였다. 균 성장은 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu)를 사용하여 O.D.₅₅₀에서 측정하였다.

4. 온도와 pH에 따른 균성장과 탈질능

최종 150ppm의 NaNO_3 가 첨가된 배지에 동일 균을 접종하여 각각 30°C와 40°C에서 진탕 배양시키면서 8시간 별로 균성장을, 16시간 별로 잔존하는 NO_2^- , NO_3^- 농도를 측정하였다.

또한 배지의 pH를 각각 5, 7, 9로 제조하여 동일 방법으로 균성장과 변화된 NO_2^- , NO_3^- 농도를 측정하였다.

결 과

1. 균주 분리

Sample로부터 총 23개의 서로 다른 형태를 지니는 균주

Table 1. Denitrification activity of microorganisms isolated from denitrifier consortium

Microorganisms	Residual NO_2^- (ppm)	Residual NO_3^- (ppm)
K1-1	0.00	28.25
K1-2	28.81	80.65
K2-1	74.89	103.09
K2-2	60.53	90.23
K3	118.90	92.18
K4	31.22	87.82
K5-1	20.42	102.46
K5-2	1.26	94.59
KH1-1	37.12	86.08
KH1-2	7.21	106.51
KH2-1	0.00	33.10
KH2-2	0.00	0.00
KH3-1	78.87	49.72
KH3-2	123.09	6.64
KH4	55.82	47.27
KH5	15.99	102.80
KW1	11.67	105.16
KW2	6.10	107.15
KW3-1	8.00	108.07
KW3-2	8.72	108.93
KW4-1	8.16	107.71
KW4-2	17.48	96.48
KW5	9.03	25.54

를 분리하였다. 앞에서 제시한 탈질능 조사 방법으로 각 균주의 탈질능을 실험해 본 결과 KH2-2가 가장 강한 NO₂⁻, NO₃⁻ 환원능을 나타냈다 (Table 1). 또한 KH3-2 균주의 경우는 NO₃⁻ 환원능은 우수한데 반하여 NO₂⁻를 축적하는 경향을 보였다.

2. 균 성장에 따른 탈질능

KH2-2 균주는 배양 후 16시간까지의 대수증식기에서 강한 NO₃⁻ 환원능을 보여주고 있고(Fig. 1) 그 결과로 생성된 NO₂⁻는 정지기에 들어서면서 급격한 감소를 보이다가 배양후 32 시간 이후가 되면 거의 모든 NO₂⁻가 환원되는 경향을 보여주었다.

NO₂⁻를 축적하는 경향을 보였던 KH3-2 균주는 배양 시간을 늘려 8시간 별로 NO₃⁻ 환원능을 조사하였다. 그 결과 배양 24시간까지는 NO₂⁻를 축적하였으나 그 후에 서서히 NO₂⁻를 환원하기 시작하여 40시간 이후에는 거의 모든 NO₂⁻가 환원됨을 알 수 있었다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 이후 KH2-2 균주를 선택하여 실험을 행하였다.

3. 균주 동정

KH2-2로 생화학적 특성 (Table 2)과 전자 현미경을 이용한 형태학적 특성을 조사하였다. 분리된 균은 gram negative bacteria이며 간균이고 운동성을 지니고 있었다. 하지만 indole 생성능과 gelatin 분해능이 없었고 내성 포자를 형성하지 않았다. 분리된 탈질 균주를 Bergey's manual과

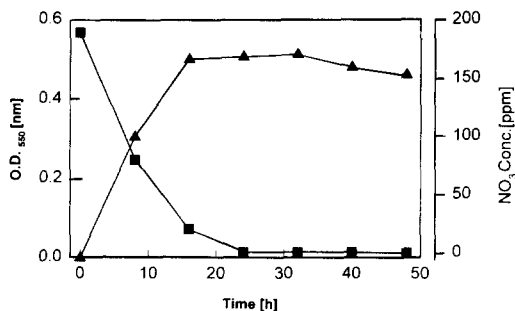


Fig. 1. Residual nitrate, according to cell growth of the isolated KH2-2.

(▲, cell growth ; ■, residual nitrate)

대조하여 본 결과 *Pseudomonas* sp.로 동정되어졌고 전자현미경 상에서도 전형적인 *Pseudomonas* sp.의 형태를 보여주고 있다 (Fig. 2).

4. 온도와 pH에 따른 탈질능

30℃와 40℃에서 각각 배양된 *Pseudomonas* sp. KH2-2는 균 성장과 NO₃⁻의 환원 정도에는 큰 차이를 보이지는 않았지만 NO₃⁻를 환원하는데 있어서는 40℃에서 매우 강한 활성을 보여 주었다. 30℃의 경우에는 반응 48시간이

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the isolated *Pseudomonas* sp. KH2-2

Test Items	Characteristics
Shape	Rod
Size	0.74 × 1.78 ~ 2.28 μm
Motility	+
Gram stain	-
Nitrite formation	+
Indole production	-
Glucose acidification	+
Arginine dehydrolase	-
Urea test	+
Esculin hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
β-galactosidase	-
Carbohydrate utilization	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannose	+
Mannitol	-
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	+
Gluconate	+
Caprate	-
Adipate	-
Malate	+
Citrate	+
Phenyl-acetate	-
Cytochrome oxidase	+



Fig. 2. Transmission electron micrograph (TEM) of the isolated *Pseudomonas* sp. KH2-2.

지나도 여전히 20ppm 정도의 NO_3^- 가 잔존하고 있었지만 (Fig. 3 A) 40°C의 경우에는 반응 32시간 후에는 거의 모든 NO_3^- 가 환원되었음을 보여주고 있다 (Fig. 3 B).

Pseudomonas sp. KH2-2은 pH 5에서는 거의 성장하지 않았으며 탈질능도 나타내지 않았다 (Fig. 4 A). 본 균주는 pH 7에서 최적의 성장을 보였으며 탈질능 역시 가장 강하게 나타냈다 (Fig. 4 B). pH 9에서도 높은 NO_3^- 의 환원능을 보여주었다 (Fig. 4 C).

고 찰

Gram positive 균에서의 총체적인 탈질 기구는 아직 많은 연구가 진행되지 않은 상태이지만 gram negative 균 세포막에서의 탈질화 경로는 4가지 효소 작용에 의해서 이루어진다고 보고 되고 있다.¹²⁾

Sieh 등은 gram negative 호염성 미생물에 의한 탈질화를 보고한 바 있고¹³⁾ Nozawa 등도 역시 gram negative 탈질 *Pseudomonas* sp. strain P136을 보고한 바 있다.¹⁴⁾ 분리

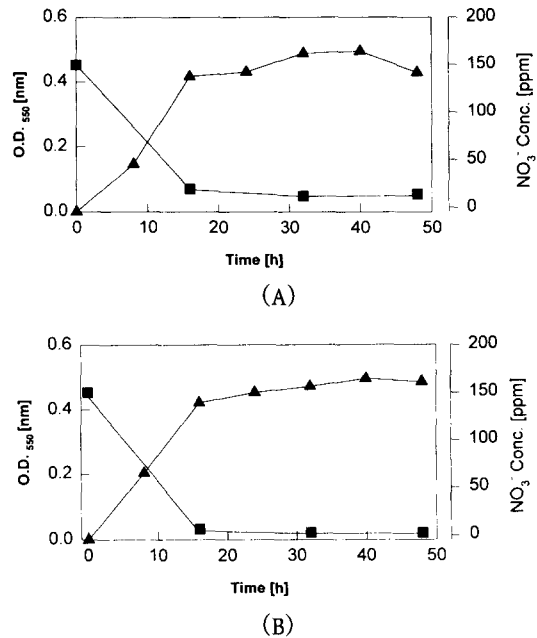


Fig. 3. Effect of temperature on the cell growth of *Pseudomonas* sp. KH2-2 and residual nitrate. (A, for 30°C ; B, for 40°C ; ▲, cell growth ; ■, residual nitrate)

한 *Pseudomonas* sp. KH2-2도 역시 gram negative이므로, 앞에서 언급한 균들과 마찬가지로, 양어장 순환수의 암모니아성 질소 제거를 위한 고정화 생물막법 적용에 보다 많은 잇점을 가질 수 있을 것으로 사료된다.

Allison 등이 보고한 *Propionibacterium acnes*에 의한 탈질화는 본 균주와 마찬가지로 growth associated pattern의 경향을 보이는데 pH 6과 7.5에서 균주를 배양하며 탈질능을 조사하였다.¹⁵⁾ 그 결과 pH 6에서는 정상적인 성장을 하고 있으나 pH 7.5에서는 최대 성장이 저해 받고 사멸기로의 진행이 빠르게 진행됨이 보였다. 이런 균성장예의 저해는 NO_3^- 환원에는 별 영향을 미치지 않았지만 NO_2^- 환원능을 현저히 떨어뜨리고 있어 이점에서는 본 균주와 유사한 특성을 보였다.

균 성장에 있어 Sieh 등과 Nozawa 등도 각각 호염성 미생물과 *Pseudomonas* sp. strain P136에 대한 온도와 pH 영향을 보고하고 있는데 전자의 경우는 온도 20~35°C,

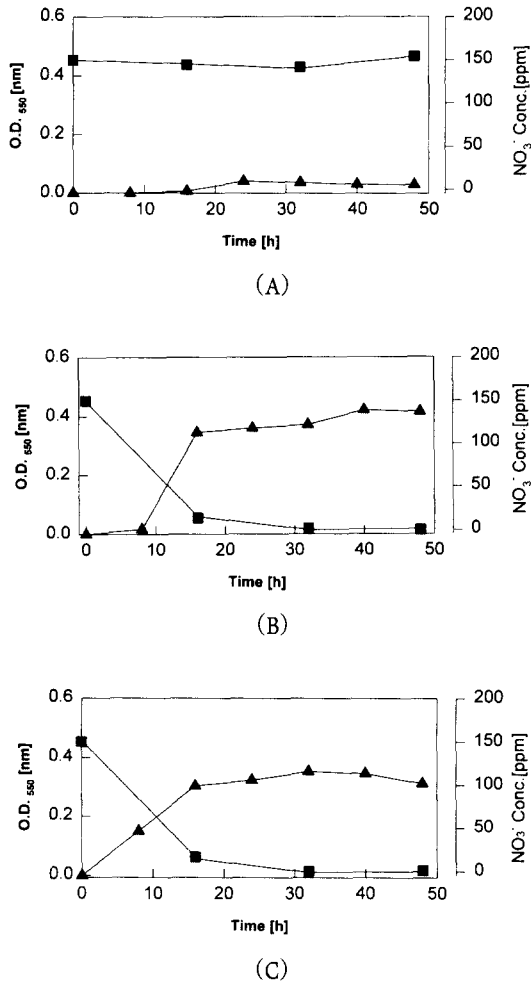


Fig. 4. Effect of pH on the cell growth of *Pseudomonas* sp. KH2-2 and residual nitrate.
(A, for pH 5 ; B, for pH 7, C, for pH 9 ; ▲, cell growth ; ■, residual nitrate)

pH 7~8 범위에서 안정하게 성장하였으며 특히 30°C에서 최적의 성장을 보였다. 하지만 10°C 이하나 40°C 이상에서는 균의 성장이 이루어지지 않았다.

후자에 있어서는 25~35°C에서 최적 성장이 이루어졌으며 42°C에서는 약하게 그리고 15°C이하, 42°C 이상에서는 성장이 이루어지지 않았다. 그리고 pH 7~8 범위에서 최적의 성장을 보였으며 pH 5.5 이하에서는 성장하지 못했다.

이에 반해 분리된 *Pseudomonas* sp. KH2-2은 앞에서 제시한 균들과 비교해 볼 때 보다 넓은 온도 범위 (30~40°C)와 pH 범위 (pH 7~9)에서 안정적으로 성장할 수 있었다.

암모니아성 질소 제거를 위한 균체 고정에 있어서는 polyelectrolyte complex (PEC)를 사용하여 *Nitrosomonas europaea*와 *Paracoccus denitrifican*을 고정화 한 보고가 있는데 이는 같은 system 안에서 질화와 탈질화가 동시에 일어날 수 있는 장점을 지닌다.¹⁶⁾ 국내에서도 질화, 탈질균을 이용한 고정화에 관한 연구가 보고된 바 있지만 기존의 폐수 처리 방법에 비하여 경제적인 면에서 크게 뒤지므로 많은 개선이 요구되고 있다.⁴⁾ 따라서 앞으로 본 균주를 이용한 효과적인 고정화에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

또한 Nitrate reductase나 nitrite reductase에 대한 유전자적 연구도 진행되고 있어^{17,18)} 본 균주의 cloning을 통한 유전자적 분석도 이루어져야 할 것으로 본다.

요 약

양어장에서 어류의 배설물이나 사료에 의해 생성된 암모니아성 질소 제거를 위한 수처리 공법의 하나로써 질산화 세균 및 탈질화 세균을 이용한 고정화 방법의 개발이 필요한 실정이다. 이를 위해서는 우수한 질산능과 탈질능을 가지는 미생물의 분리가 선행되어야 하므로 denitrifier consortium으로부터 여러 균주를 분리하고 이중 가장 빠른 성장과 탈질능을 보이는 균주를 선별, 동정하여 이를 *Pseudomonas* sp. KH2-2으로 명명하였다.

분리된 균의 탈질능은 최적의 생육을 보일 때 가장 강하게 나타났다. 30°C보다는 40°C에서 배양하였을 때 최적의 성장을 보여주었고, 탈질능도 현저히 높았다. pH에 있어서는 pH 7에서 가장 강한 탈질능을 나타내었다. pH 5에서는 균의 성장이 이루어지지 않았고 pH 9에서는 NO₃⁻ 환원능은 높았으나 NO₂⁻ 환원능은 낮았다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 농림수산 특정 연구비 지원에 의해서 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Knowles, R. : Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**, 43-70(1982).
2. Payne, W. J. : Reduction of nitrogenous oxidase by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **101**, 409-452(1973).
3. Baumann, B., M. Snozzi, A. J. B. Zehnder, and J. R. Meer. : Dynamics of denitrification activity of *paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.* **178**(15), 4367-4374(1996).
4. Song, J. Y., and S. H. Lee. : Biological removal of nitrogen and phosphorus from waste water by microencapsulated strains. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**(3), 269-275(1997).
5. Antonie, R. L., D. L. Kluge, and J. H. Mielke. : Evaluation of a rotating disk waste water treatment plant. *J. WPCF* **46**, 298-311(1974)
6. Lim, Y. S. : A Study on nitrification of low ammonia content waste water by RBC process. *M. S. Thesis, Pukyong Univ.* (1993).
7. Rogers, G. L., and S. L. Klementson. : Ammonia removal in selected aquaculture water reuse biofilters. *Aquaculture Engineering* **4**, 135-154(1985).
8. Carmignani, G. M., and J. P. Bennelt. : Rapid start-up of a biological filter in a recirculating aquaculture system containing channel catfish. *Aquaculture Engineering* **3**, 39-57(1977).
9. Lewis, W. H., J. H. Yopp, and A. M. Brandenburg. : Use of hydroponics to maintain quality of recirculator water in fish culture system. *Trans Am. Fish. Soc.* **107**, 92-99(1978).
10. Meske, C. H. : Fish culture in a recirculating system with water treatment by activator sludge, *Advances in aquaculture. Eds T. V. R. Pillay & W. A. Dill* : 527-531(1985).
11. Jewell, W. J., and R. J. Cummings. : Expanded bed treatment of complete recycle aquaculture system. *WAT. Sci. Tech.* **22**, 443-450(1990).
12. Ye, R. W., B. A. Averill, J. M. Tiedje. : Denitrification : Production and consumption of nitric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4), 1053-1058(1994).
13. Shieh, W. Y., and C. M. Liu. : Denitrification by novel halophilic fermentative bacterium. *Can. J. Microbiol.* **42**, 507-514(1996)
14. Nozawa, T., and Y. Maruyama. : Denitrification by a soil bacterium with phthalate and other aromatic compounds as substrate. *J. Bacteriol.* **170**(6), 2501-2505(1988).
15. Allison, C., and G. T. Macfarlane. : Dissimilatory nitrate reduction by *Propionibacterium acnes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(11), 2899-2903(1989).
16. Kokufuta, E., M. Shimohashi, and I. Nakamura. : Simultaneously occurring nitrification and denitrification under oxygen gradient by polyelectrolyte complex-coimmobilized nitrosomonas europaea and *Paracoccus denitrificans* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 382-384(1988).
17. Stewart, V., and J. Parales. : Identification and expression of genes *narL* and *narX* of *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**(4), 1589-1597(1988).
18. Tosques, I. E., Kwlatkowski, J. Shi, and J. P. Shapleigh. : Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* **179**(4), 1090-1095(1997).