

탈질균 *Pseudomonas* CW4의 분리 및 특성

황 선 현 · 이 영 호 · †조 무 환
영남대학교 공과대학 응용화학부
(접수 : 1999. 10. 1., 게재승인 : 1999. 10. 18.)

Isolation and Characteristics of Denitrifying *Pseudomonas* CW4

S. H. Hwang, Y. H. Lee, and M. H. Cho†
School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
(Received : 1999. 10. 1., Accepted : 1999. 10. 18.)

Ten denitrifying bacteria, which were identified as *Pseudomonas* sp., were isolated from Winogradsky columns. The most effective denitrifying bacterium was named as *Pseudomonas* CW4, which was cultivated at anoxic condition. The optimal growth temperature and pH were 30°C and 6-8, respectively. The effects of carbon concentration and agitator speed on the rate of denitrification were very low. 100% of NO₃-N was removed after 15 hrs when initial concentration of NO₃-N was 142.5 mg/L.

Key Words : denitrification, *Pseudomonas*, Winogradsky column, NO₃-N

서 론

최근 하천과 호소의 극심한 부영양화 및 점점 심각해지는 침출수의 악성폐수로 인하여 질소제거에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 침출수 및 각종 폐수에 의한 지하수 오염은 음용수에 질산염 농도를 증가시키는 결과를 초래하였고, 질산염은 특히 유아 건강에 심각한 결과를 초래할 수 있으므로 질산염 제거기술에 대한 연구는 시급한 과제라고 할 수 있다.

탈질의 생물학적 공정이란 탈질 박테리아에 의하여 질산성 질소(NO₃⁻)를 가스상태의 질소로 변화시키는 것을 말한다. 가스상태의 질소는 주로 N₂이며, N₂O, NO의 형태로도 존재한다. 탈질 반응에 대한 연구는 동물 찌꺼기 같은 고농도 질소 폐기물에 대한 질소의 효율적인 제거 및 탈질의 중간생성물인 N₂O에 관여하는 인자에 대한 연구 그리고 화학 질소 비료 등의 분야에서 연구되어지고 있다(1).

다량으로 존재하는 질산염을 제거하는 탈질 공정으로는 탈질 박테리아를 이용한 생물학적 공정 외에도 이온교환(ion exchange), 환원(chemical reduction), 역삼투압(reverse osmosis), 전기영동(electrodialysis) 등(2) 여러 가지가 있으나 이러한 물리, 화학적 방법은 제한적이고 비경제적이므로 각종 하수종말처리 및 산업폐수 처리에는 생물학적 탈질화가 적절한 방법이라고 할 수 있다(3-7).

탈질 박테리아는 질산화 박테리아와는 다른 별개의 미생물로

서 질산화에 비해 상대적으로 폭 넓은 박테리아가 탈질에 관여하고 있다. 탈질에 관여한다고 알려진 박테리아의 종류로는 *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Archromobacter*, *Thiobacillus*, *Bacillus*가 있다. 대부분 질산염에서 가스상태의 질소로 환원하는데 필요한 환원효소(nitrate reductase)를 갖고 있다. 그러나 종류에 따라서 질산염 환원효소가 부족한 것도 있고, 아질산염에 의존하는 것이 있다. 그러나 대부분의 탈질 박테리아는 첫째 질산염(NO₃)에서 아질산염(NO₂)으로의 전환과 둘째 아질산염(NO₂)에서 질소가스(N₂)로 전환되는 2 단계 이화과정을 거치면서 질산염을 소모한다. 또한 탈질 박테리아는 무산소 조건에서 최종 전자 수용체로서 질산염을 이용한다고 알려져 있다(8-13).

Gamble 등은 토양에서 분리한 탈질화 세균의 대다수가 *Pseudomonas*종이고 다음으로 *Alcaligenes*종이었다고 보고하였다(14). 또한 일본 호수에서 분리된 탈질 박테리아의 77%가 *Pseudomonas*종이었고, 나머지는 *Alcaligenes*종이었다고 한다. 담수저니(Fresh-water sediment)와 해수(marine water)에서도 역시 비슷한 결과를 보였다(15).

지금까지의 탈질화 연구는 해양과 토양 중심으로 연구되었고(16-18), 하천 및 폐수처리시설에서 탈질균을 분리하고 그 특성에 대해 연구한 것은 거의 없는 실정이다. 본 논문에서는 광범위한 자연계로부터 탈질균을 분리하여, 폐수 중에서 가장 탈질능이 우수한 균주를 선별하여 동정하고 여러 가지 생육 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

자연계에서 탈질 박테리아를 분리하기 위해 Winogradsky

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
Tel : 053-810-2517, Fax : 053-814-8790
E-mail : mwcho@yucc.yeungnam.ac.kr

column을 이용하였다(19). 본 실험을 위해 제작된 Winogradsky column은 직경이 50 mm이고 높이는 200 mm이다. 내부에는 진흙 200 g, 효모 추출물 30 g, 탄산칼슘 5 g, 황산칼슘 5 g씩을 균일하게 혼합하여 column의 중간까지 채워 넣고, 10개소의 각기 다른 장소에서 채취된 시료들을 80℃에서 저온 살균한 후, 칼럼에 100 mL를 채워 넣고 알루미늄 호일로 뚜껑을 덮어 100일 동안 농화배양하였다. 시료 채취 장소는 D시의 염색공단 폐수처리장과 분뇨처리장의 활성오니조 슬러지, Y대학 주변의 소하천수 등 탈질균이 분포되어 있을 만한 지점이었으며, 이 시료를 Winogradsky column에 접종하여 100일 동안 농화 배양한 후 각각의 column에서 목적 균주층을 채취하여 평판 배양하였다. 평판배양에서 생성된 양호한 colony를 액체 배지에 배양하여 성능이 우수한 균주를 다시 평판배양하는 반복된 과정을 거쳐 분리한 후 본 실험에 사용하였다. 분리된 균주는 20% glycerol을 첨가하여 -70℃에 냉동 보관하여 사용하였다.

사용배지 및 배양방법

균주 분리 배지로는 탈질균 기본 배지(20, 21)에 한천 1.5%(w/v)를 첨가한 평판 고체배지를 사용하였다(Table 1). 한천배지에서 생성된 colony 중 우수한 colony를 1 백금이씩 취하여 다시 액체 배지에 접종하여 진탕 배양하였다. 모든 실험은 무산소 조건에서 행하였으며 shaking incubator의 온도는 30℃, 교반속도는 200 rpm, 배지내 pH는 6.8을 유지하였다. 이 과정을 여러번 반복하여 우수한 균주를 분리하였다. 분리된 균주의 온도에 따른 영향은 진탕배양기의 온도를 20, 30, 40℃로 조정하여 실험하였고, 배양 배지의 pH는 6.8, 교반속도는 200 rpm으로 고정하여 균체의 성장과 질산성질소의 농도 변화를 실험하였다. 초기 pH에 따른 영향은 온도와 교반속도를 30℃, 200 rpm으로 각각 고정하고, 0.1 N NaOH와 0.1 N H₂SO₄를 사용하여 초기 pH를 5, 6, 7, 8, 9로 조절하여 실험하였다. 교반속도에 따른 영향은 교반속도를 0, 100, 200 rpm 조정하고, 온도와 pH는 각각 30℃, 6.8로 고정하였다. 질산성 질소 농도에 따른 영향은 배지내의 KNO₃ 농도를 71.59 mg/L, 142.5 mg/L, 349.4 mg/L로 각각 조정하고 온도 30℃, pH 6.8, 교반속도를 200 rpm으로 맞추어 실험하였다. 마지막으로 탄소원에 대한 영향으로 배지내 sodium citrate 농도를 0 g/L, 4 g/L, 8.5 g/L, 12 g/L로 각각 조절하고 온도, pH, 교반속도는 각각 30℃, 6.8, 200 rpm으로 고정하여 실험하였다.

분석방법

탈질을 측정은 배지 내 질산성 질소의 농도 변화로 측정하였다. 질산성 질소 분석은 환경오염공정 시험법의 부루신법으로

Table 1. Giltay media composition for isolation of *Pseudomonas* CW4.

Medium A		Medium B	
KNO ₃	1.0 g	Sodium citrate	8.5 g
asparagine	1.0 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
1%(w/v) *BTB solution	5 mL	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.05 g
distilled water	500 mL	KH ₂ PO ₄	1.0 g
		CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.2 g
		distilled water	500 mL

Using after mixing medium A with medium B(pH 7.0~7.2)

* BTB solution : dissolve Brom Thymol 1g in 95%(v/v) alcohol 100 mL

측정하였고(22), 미생물의 성장은 optical density(OD₆₆₀)로 측정하였다. 이 때 사용한 기기는 UV-spectrophotometer(Shimadzu UV-160, Japan)를 사용하였다.

균주의 동정

균주의 형태적, 생리적 및 생화학적 특성 검사를 행하였으며, 분리균의 형태를 주사현미경(TEM, HITACHI H-600)을 이용하여 관찰하였다. 각 균의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 따랐으며, Methods in microbiology 및 Laboratory manual of general bacteriology에 준하여 실험하였다(23, 24).

결과 및 고찰

탈질균주 분리 동정 및 탈질능 비교

10개소의 샘플을 고체배지에 평판도말하여 얻은 우수한 3종의 균주는 Winogradsky column No. 2, 4, 9이었다. No. 2는 대구염색공단 폐수처리장 슬러지에서 분리된 균주로 *Pseudomonas* CF4로, No. 4는 대구광역시 분뇨처리장 폭기조에서 분리된 균주로 *Pseudomonas* BN4로, No. 9는 Y대학 측사 주변 소하천수에서 분리된 균주로 *Pseudomonas* CW4로 명명하였다. 각 균주를 동정한 결과 모두 *Pseudomonas*속이었으며 분류학적 특성은 Table 2에 나타내었다.

각 균주의 탈질능을 비교하기 위하여 shaking incubator 온도

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of *Pseudomonas*.

characteristics	<i>Pseudomonas</i> CF4	<i>Pseudomonas</i> CW4	<i>Pseudomonas</i> BN4
Gram strain	-	-	-
Cell form	Rod	Rod	Rod
Hydrolysis of			
Gelatin	-	+	-
Starch	+	-	-
Utilization of			
Glucose	+	+	+
Arginine	+	+	-
Ethanol	+	+	+
Citrate	+	+	+
L-Valine	+	+	+
Growth at			
4℃	-	+	+
20℃	+	+	+
30℃	+	+	+
40℃	+	+	-
Denitrification	+	+	+
Oxidase Reaction	+	+	+
Catalase Reaction	+	+	+
No. of flagella	1	1	1
Need at least 12-15% NaCl for growth	-	-	-
Requirement for growth factors	-	-	-

+ : positive - : negative

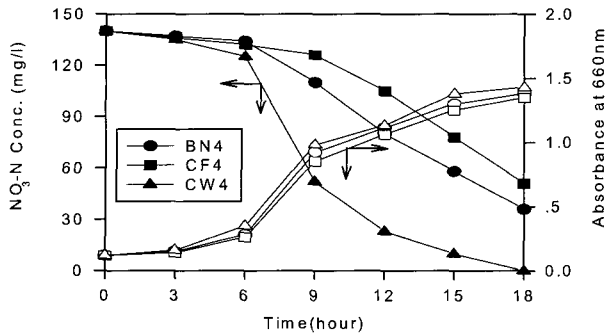


Figure 1. Denitrification and growth of *Pseudomonas* BN4, CF4, CW4. (Initial pH 6.8, Temp. 30°C, 200 rpm) Closed symbol : $\text{NO}_3\text{-N}$ Conc., Open symbol : Abs. at 660 nm

30°C, 교반속도 200 rpm, 배지내 pH를 6.8로 맞추고 세 균주를 삼각 플라스크에 각각 접종하였다. 그 중 *Pseudomonas* CW4 균주를 접종한 플라스크의 질산성 질소 농도는 9시간만에 50% 이상이 제거되었으며, 18시간만에는 모두 탈질되었다(Figure 1). 이것은 일반적인 활성슬러지 공법에 의한 탈질 소화 능력이 20~30% 정도인 것과 비교해 매우 우수한 탈질능을 나타낸 것이다. 그러나, 기존의 활성슬러지 공법에 적용할 경우에 탈질 박테리아의 최적 생육 환경을 어떻게 유지하는가가 해결해야 할 과제로 남게 되는데, 본 연구에서는 탈질균의 최적 생육 특성을 조사하기 위해 가장 성능이 우수한 균주로 선별된 *Pseudomonas* CW4 균주를 액체 배지에 접종하고, 온도, pH, 교반속도, 초기 질산성질소 농도, 탄소원 농도에 변화를 주어 최적 생육 조건을 실험하였다.

Pseudomonas CW4의 온도별 특성 조사

Pseudomonas CW4 균주의 온도에 따른 질산성 질소 제거량과 균성장은 Figure 2와 같다. 30°C, 40°C에서 우수한 탈질능을 나타내었는데, 접종 3시간 후부터 급격한 탈질을 나타내어 18시간 후에는 모든 질산성 질소가 제거되었다. 반면 20°C에서는 급격한 탈질은 일어나지 않았다. 이 실험 결과로 *Pseudomonas* CW4 균주의 탈질은 30~40°C에서 잘 일어나는 것으로 나타났다. 통상적으로 탈질균의 성장온도범위는 5~35°C 사이인 것으로 알려져 있으며, 특히 30°C 부근에서 최대 성장률이 발현되는 것으로 보고되고 있다(1). 본 실험에서 분리한 *Pseudomonas* CW4의 경우 30°C에서 성장률이 가장 좋은 것으로 나타났다. *Pseudomonas* CW4 균주 이외에 탈질능을 가진 균주 *Paracoccus denitrificans*도 30°C에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있다(25).

Pseudomonas CW4의 pH별 특성 조사

초기 pH에 따른 질산성 질소의 변화는 Figure 3과 같다. 탈질균 성장에 적합한 초기 pH는 6~8 사이라고 할 수 있다. 배지내의 질산성 질소는 pH 6~8에서 12시간만에 거의 모두 제거되었다. 그리고 pH 9에서는 15시간 경과 후 모두 탈질되었으며, pH 5에서는 15시간 경과후에 약 50%의 탈질율을 나타내었다. 이 실험 결과로 *Pseudomonas* CW4 균주는 넓은 pH 영역에서 잘 성장하며 약알카리에서도 비교적 우수한 탈질능을 보였다.

Pseudomonas CW4의 교반속도별 특성 조사

교반속도에 따른 질산성 질소의 변화는 Figure 4와 같다. *Pseudomonas* CW4 균주의 교반속도에 대한 영향을 알아보기 위

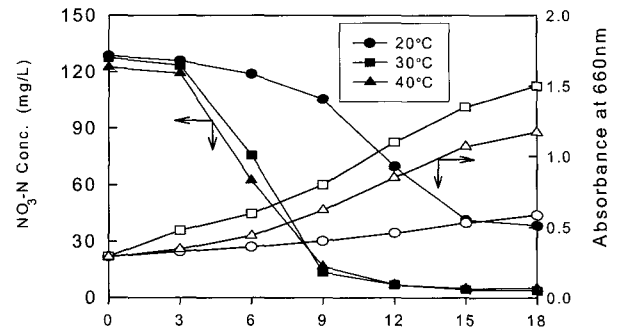


Figure 2. Effect of temperature on denitrification and growth of *Pseudomonas* CW4. (Initial pH 6.8, 200 rpm) Closed symbol : $\text{NO}_3\text{-N}$ Conc., Open symbol : Abs. at 660 nm

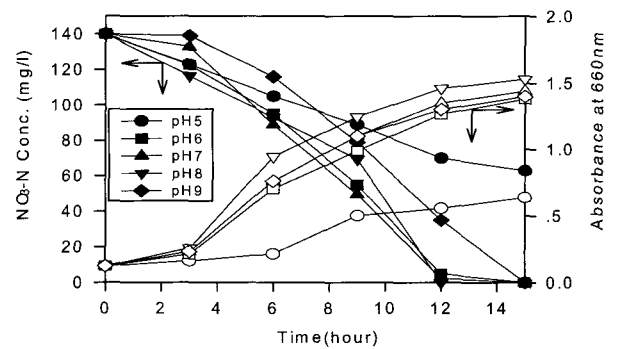


Figure 3. Effect of initial pH on denitrification and growth of *Pseudomonas* CW4. (Temp. 30°C, 200 rpm) Closed symbol : $\text{NO}_3\text{-N}$ Conc., Open symbol : Abs. at 660 nm

해 rpm에 변화를 주어 실험하였다. 교반속도 100 rpm 및 200 rpm에서는 16시간 경과 후, rpm 0에서는 20시간이 경과한 후에 모든 질산성 질소가 제거되었다. 결국 교반을 전혀 하지 않는 것보다는 교반을 하는 것이 미생물 성장 및 탈질에 조금 더 유리하다는 결론을 얻었을 뿐, 교반속도는 탈질 박테리아의 탈질능에 크게 영향을 미치지 않았다. 따라서 교반속도의 증가는 배지내 기질과 미생물과의 혼합을 증대시켜 탈질능을 향상시키는 것으로 보여진다.

Pseudomonas CW4의 질산성 질소 농도별 특성 조사

초기 질산성질소 농도에 따른 질산성 질소의 변화를 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 배지내 초기 질산성 질소 농도를 72, 143, 350 mg/L로 조정 후 *Pseudomonas* CW4 균주를 배양하였다. 그 결과 Figure 5에서와 같이 질산성 질소 농도에 관계없이 모두 초기 6시간 동안에 배지속의 질산성 질소의 약 절반이 제거되었으며, 15시간 경과 후 모든 질산성 질소가 제거되었다. 고정화된 *Paracoccus denitrificans*는 질산성 질소 농도 20, 40 mg/L을 12시간만에 거의 제거한다고 하는데(23), 본 연구에서는 *Pseudomonas* CW4를 고정하지 않은 상태에서도 350 mg/L의 고농도 질산성 질소를 빠르게 탈질시키는 것으로 보아 고정화법과 병행할 경우, 처리 효과의 상승이 기대되는 우수한 균주로 판명된다.

Pseudomonas CW4의 sodium citrate 농도별 특성 조사

초기 탄소원의 농도에 따른 질산성 질소의 변화를 실험하기

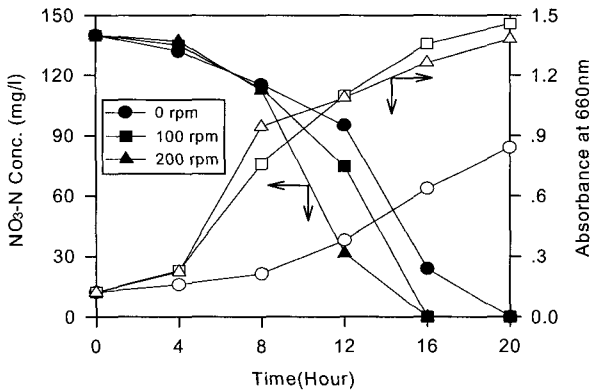


Figure 4. Effect of shaking speed on denitrification and growth of *Pseudomonas* CW4. (Initial pH 6.8, Temp. 30°C) Closed symbol : NO₃-N Conc., Open symbol : Abs. at 660 nm

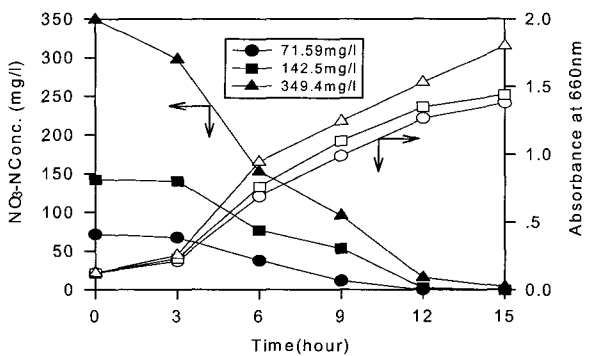


Figure 5. Effect of initial nitrate concentration on denitrification and growth of *Pseudomonas* CW4. (Initial pH 6.8, Temp. 30°C, 200 rpm) Closed symbol : NO₃-N Conc., Open symbol : Abs. at 660 nm

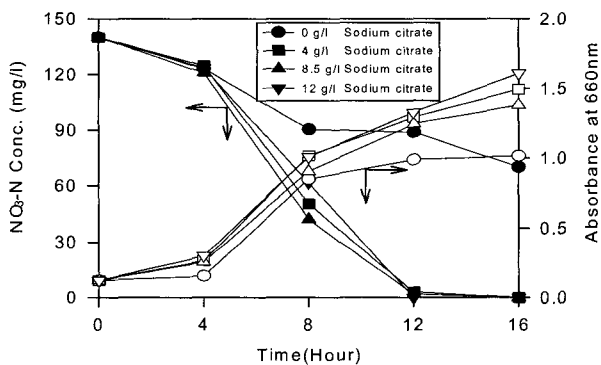


Figure 6. Effect of initial carbon concentration on denitrification and growth of *Pseudomonas* CW4. (Initial pH 6.8, Temp. 30°C, 200 rpm) Closed symbol : NO₃-N Conc., Open symbol : Abs. at 660 nm

위해 배지에 sodium citrate를 각각 0, 4, 8.5, 12 g/L씩 넣고 *Pseudomonas* CW4를 배양하였다. 그 결과 sodium citrate 0g/L을 제외한 모든 경우에서 16시간만에 질산성 질소 대부분이 제거되었다(Figure 6). sodium citrate 0g/L에서는 16시간 경과후 약 50% 정도의 탈질율을 나타내었다. 질산성 질소의 제거에는 탄소원이 필수적이라는 것을 알았으며 탄소원을 투입하지 않았을 때에는 결국 *Pseudomonas* CW4가 sodium citrate 이외에도 asparagine 및 BTB solution에 포함된 미량의 알코올로서 부족한 탄소원을 보충한 것으로 생각된다.

요 약

Winogradsky column을 이용하여 10개의 탈질 박테리아를 분리하였다. 그 중 가장 성능이 우수한 탈질 박테리아를 *Pseudomonas* CW4로 명하였다. *Pseudomonas* CW4는 무산소 조건에서 배양하였고, *Pseudomonas* CW4의 최적 생육조건을 온도, pH, 교반속도, 탄소원 농도 및 질산성질소 농도에 변화를 주어 측정하였다. 최적 생육 온도는 30°C, 최적 pH 범위는 6~8이었다. 교반속도와 탄소원 농도에 대한 영향은 아주 작았다. 그리고 질산성 질소의 초기농도 142.5 mg/L 에서 15 시간만에 100%의 탈질을 나타내었다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구 조성비(생물화학공학 F-13)에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. B. Halling Sorensen and S. E. Jorgensen (1993), The Removal of Nitrogen Compounds from Wastewater, DFH, Institute A, Environmental Chemistry Section.
2. J. Peter, V.D. Hoek and A. Klapwijk (1987), Nitrate removal from ground water., *Water Res.*, 21, 989-997.
3. Barnard, J. L. (1974), Cut P and N without chemicals, *Water and Wastes Engineering*, 7.
4. Barnard, J. L. (1973), Biological Denitrification, *Journal Inst. of Water Pollution Control*, 72, 705-720.
5. Wuhrmann, K. (1964), Nitrogen removal in Sewage Treatment Process, *Vehr. Int. Ver. Limnol.*, 15, 580.
6. Eckenfelder W.W. and Argaman (1989), Principles of Biological and Physical Chemical Nitrogen Removal, The Soap and Detergent Association, pp. 9-72, N.Y.
7. M. C. Mulbarger (1971), Nitrification and denitrification in activated sludge systems. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 43, 2059-2070.
8. 이영대, 최용수, 신용배, 이정욱 (1995), 생물학적 질소제거 신공정, *대한환경공학회지*, 17(4) 387.
9. 류재근 (1995), 질소·인 (N, P) 제거 기술(I), *첨단환경기술*, 1, 5-9.
10. 한국건설기술연구원 (1993), P/L(생물학적 인·질소제거) 프로세스개발에 관한 연구.
11. George Tchobanoglous and Franklin L. Burton (1993), Wastewater engineering, 3rd ed., pp.694-696, McGraw-Hill, New York
12. U. S. EPA (1993), Manual of Nitrogen Control, U. S. EPA/625/R-93/010.
13. Delwiche, C. C. (1981), Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide., John Wiley and Sons, Inc. New York.
14. Gamble, R.N., M.R. Belach and J. M. Tiedje (1997), Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils., *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 926-939.
15. Tiedje, J.M. (1988), Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In *Biology of Anaerobic Microorganisms.*, Zehnder, A.J.B. ed. pp.179-244, John Wiley and Sons Inc. New York .
16. Carlson, C. A. and J. L. Ingraham (1983), Comparison of

- denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*., *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1247-1253.
17. Slater, J.M. and D.G. Capone (1987), Denitrification in aquifer soil and nearshore marine sediments influenced by groundwater nitrate, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1292-1297.
 18. Smith, R. L. and J. H. Duff (1988), Denitrification in a sand and gravel aquifer., *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1071-1078.
 19. Thomas D. Block and Michael T. Madigan (1984), *Biology of Microorganisms*, 6th/d, pp. 642-646, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
 20. 이장훈 (1992), 실험환경미생물, pp. 140-141, 도서출판 동화기술, 서울.
 21. 김주영, 정동욱, 서승교 (1997), 환경미생물 실험법, pp.135-141, 도서출판 동화기술, 서울.
 22. 김남천 (1989), 환경공학실험, pp. 265-267, 도서출판 동화기술, 서울.
 23. Krieg, N. R. and J. G. Holt (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
 24. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1986), *Microbiology a Laboratory Manual*, 2nd ed., The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., Menlo Park.
 25. 송주영, 이상호 (1997), Microcapsule에 고정화된 균주를 이용한 오·폐수 중의 생물학적 탈인 및 탈질 소화에 관한 연구, *한국생물공학회지* **12**(3), 269-275.