

인 축적균 *Acinetobacter* CW3의 분리 및 특성

심성훈·류원률·이영호·¹김정목·†조무환
영남대학교 화학공학 및 공업화학부, ¹대경대학 환경공업과
(접수 : 1998. 10. 12., 게재승인 : 1999. 1. 26.)

Isolation and Characterization of Phosphorus Accumulating *Acinetobacter* CW3

S. H. Shim, W. R. Ryu, Y. H. Lee, J. M. Kim¹, and M. H. Cho[†]

School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

¹Dept of Environmental Industry, Taekyeung College, Kyongsan 712-850, Korea

(Received : 1998. 10. 12., Accepted : 1999. 1. 26.)

A highly effective phosphorus accumulating bacterium named *Acinetobacter* CW3 was isolated from the nature by using Winogradsky columns. The optimal cultivation conditions of *Acinetobacter* CW3 in shaking flask were determined as 20°C, pH 7, 200rpm, 18.5mg PO₄-P/L. *Acinetobacter* CW3 could remove phosphorus completely in 12hours for a batch culture at optimal cultivation condition. This bacterium could uptake phosphorus on aerobic condition and release it on anaerobic condition.

Key Word : phosphorus removal, *Acinetobacter*, Winogradsky column, isolation

서론

호소 하천 등의 부영양화로 인해 질소, 인과 같은 영양분이 과다하게 축적되면 수계에서 조류의 생산력이 증대하여 빛의 강도와 온도가 조류의 성장에 적합한 수표면 근처에서 과다한 조류 성장이 발생한다(1). 이러한 조류는 주간에는 광합성 작용이 왕성하지만, 야간에는 호흡작용을 통하여 용존산소를 소모하므로 어패류 등 수중생물의 생존에 필요한 산소를 결핍시켜 어류의 폐사를 초래한다(2). 근래 인간의 생활이 윤택해짐으로 인해 사람들이 환경문제에 관심을 가질 여유가 생기게 되고, 폐쇄성 수역의 부영양화가 커다란 사회문제화 되고 있어 호소뿐만 아니라 폐쇄성 해역의 질소, 인에 관한 환경기준과 배수기준이 설정되기에 이르렀다. 그러므로 적은 비용으로 효율이 높고 유지 및 관리가 간편한 새로운 인 제거기술 개발이 요망되고 있다.

현재는 혐기·호기성 조건을 이용한 생물학적 인 제거 공정이 하수처리를 중심으로 실용화되고 있다. 이러한 생물학적 인 제거공정은 응집침전법 등의 물리·화학적 처리공정과 비교하여 운전가동비가 낮으면서도 슬러지 발생량이 적어 비용을 절감할 수 있다는 우수한 특성을 가지고 있다(3). 하지만 최적 관리 기술이 명확하지 않고 bulking, 과부하 충격에 대한 인 제거 안정성에 커다란 문제를 남기고 있는 게 사실이다(4). 따라서 생물학적 인 제거공정의 최적 관리기술을 확립하고 생물학적 인 제거

에 중요한 역할을 하고 있는 인 축적세균을 적극적으로 이용한 새로운 인 제거공정을 개발하기 위해서 인 축적세균에 관한 기초적인 연구가 매우 중요하다.

혐기·호기성 조건을 이용한 생물학적 질화·탈질소 과정에 관한 연구가 진행되는 가운데 일반적인 호기성 조건만의 생물학적 처리공정과 비교해서 이들 처리과정에서 인 제거능력이 높다는 사실이 명확해졌다. 혐기성 조건에서는 슬러지 구성 미생물에 축적된 폴리인산이 가수분해되어 인산형태로 액 중에 방출됨과 동시에 폐수 중의 유기물질의 대부분이 혐기성 조건하에도 불구하고 슬러지에 혼합되어 감소한다. 한편 호기성 조건에서는 잔존하는 유기물질이 제거됨과 동시에 혐기성 조건에서 미생물로부터 방출된 인과 폐수침가에 따라 첨가된 인도 제거된다(5).

생물학적 폐수처리공정 가운데 서식하는 미생물은 다종다양하고 그 가운데 각종 미생물이 증식의 기질이 되는 유기물의 획득을 둘러싸고 경쟁하고 있다. 따라서 특정한 미생물이 처리과정 중에서 우점종이 될 수 있을지 여덟지는 다른 미생물과의 유기물 획득경쟁에 달려있다고 할 수 있다. 인의 생물학적 제거공정은 인 축적 능력이 높은 세균만을 어떻게 우점적으로 증식시킬 수 있는냐에 따라서 인 제거특성이 결정된다. 생물학적 인 제거기술의 확립과 안정성 확보를 위해서도 인 제거에 관여하는 세균 분리와 특성 해명이 커다란 연구과제로 되고 있다.

활성슬러지에 존재하는 인 축적세균으로는 1975년에 Fuhs 등(6)에 의해 *Acinetobacter* 속 세균이 분리된 후 *Acinetobacter* 속 세균을 활발히 연구하게 되었다. 인 제거능력이 우수한 활성슬러지의 인 함량은 건조중량당 5%를 초과하고 때로는 10% 가까이 되는데 *Acinetobacter* 속 세균의 인 함량도 이 정도까지 증가하여 인 함량 증가는 폴리인산 획득 량의 증가에 따른 것이라는 사실이 명확해지고 있다. 현재 인 축적능력이 뛰어난 인 축

† Corresponding Author ; School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Tel . 053-810-2517, Fax : 053-814-8790

e-mail : mwcho@ynucc.yeungnam.ac.kr

적세균으로는 *Acinetobacter globiformis*과 *Pseudomonas vesicularis* 등이 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 자연계로부터 인 축적능이 우수한 균주를 순수 분리 및 동정하고, 하수와 폐수 속에 함유된 인을 보다 효율적으로 처리하기 위한 새로운 생물학적 인 제거공정을 개발하기 위하여 기초특성을 조사하였다

재료 및 방법

인 축적 균주의 분리

자연계에서 우리가 목적으로 하는 인 축적세균의 분리를 위해 위노그라드스키 칼럼을 이용하였다(7) 본 실험을 위해 제작된 위노그라드스키 칼럼은 직경이 50 mm이고 높이는 200 mm이다 Figure 1에 나타내었듯이 인 축적균의 순수분리 과정은 유기물이 풍부한 진흙 200 g, 효모 추출물 30 g, 탄산칼슘 5 g, 황산칼슘 5 g씩을 균일하게 혼합하여 칼럼의 중간까지 채우고 80℃에서 저온 살균한 다음 각기 다른 장소에서 채취된 시료들을 칼럼에 100 ml를 넣은 다음 일루미늄 호일로 뚜껑을 덮어 100일 동안 어두운 곳에서 농화배양하였다 본 연구에 사용된 접종원은 D시의 염색공단 폐수처리장과 분뇨처리장의 활성오니조와 슬러지, Y대학 자연자원대, 공과대와 생활과학대 주변의 소하천수와 연못 등 다양하다 충분히 농화된 위노그라드스키 칼럼에서 균주를 취하여 Table 1의 배지를 이용하여 7일간 1차로 삼각 플라스크에 진탕배양을 실시하였다 1차 진탕배양을 통하여 농화된 균주를 고체 한천배지에 도말하여 30일간 20℃에서 평판배양하였다. 평판배양한 균주의 colony를 분리하여 다시 액체배지에 접종하고 7일간 배양한 후 5회에 걸쳐 계대배양하여 우수

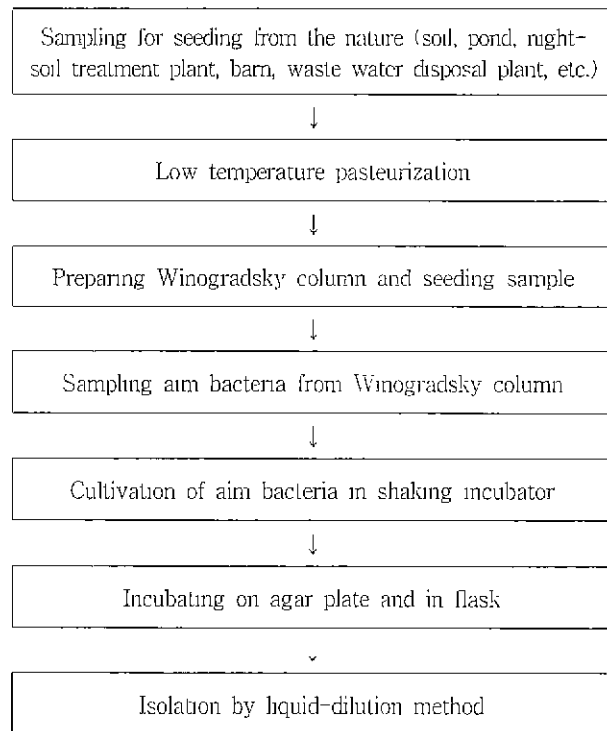


Figure 1 Procedure for isolation of phosphate accumulating bacteria using Winogradsky column

Table 1. Media composition for the isolation of phosphorus accumulating bacterium.

Component	Concentration (g/L)
Na · acetate · 3H ₂ O	5
NH ₄ Cl	0.5
KH ₂ PO ₄	0.15
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.01
CaCl ₂	0.01

한 인 축적균주를 얻게 되었다 순수 균주는 20% glycerol을 첨가하여 -70℃에서 냉동 보관하여 사용하였다 획득된 인 축적균주는 동정 및 특성 조사에 이용하였다.

배지 조성

위노그라드스키 칼럼으로부터 농화된 균을 순수분리 및 특성 조사를 위한 배지 조성은 Table 1과 같다

고체 한천배지에는 Table 1의 배지에 agar를 15%(W/V)첨가한 배지를 사용하였다(8)

배양방법 및 균주 보관

액체배지 배양에는 250 mL 삼각플라스크에 배지의 10%부피의 종균을 무균적으로 접종하여 shaking incubator (Vision scientific Co, LTD Korea)에서 진탕배양하였으며, 선별된 인 축적균주의 보관은 1~2일 각격으로 계대배양을 실시하여 활성을 유지하고 clean bench안에서 고체 한천배지에 백금으로 도말하여 incubator에서 일주일간 배양한 후 성장한 평판배지를 4℃에 냉장보관하는 방법과 배양액을 -70℃로 deep freezer에 보관하는 방법을 병행하였다

분석방법

위노그라드스키 칼럼으로부터 분리된 인 축적균주의 동정은 각종형태, 생리, 생화학적 특성 검사를 행하여 얻어진 결과들을 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology(9)에 따라 동정하였다

배양액중의 PO₄-P의 양은 시료를 채취하여 3000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상등액을 취하여 수질오염 폐기를 공정 시험 방법에 의해 아스코르빈산 환원법(10, 11)을 이용하였으며 UV-spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu)를 사용하여 880 nm에서 흡광도를 측정하였다 분리균의 성장에 따른 세포증식은 진탕배양 과정에서 얻어진 배양액을 660 nm에서 OD₆₆₀를 측정하여 분리균주의 배양시간에 따른 성장곡선을 조사하였다.

온도 및 배양시간의 영향

인 축적능이 우수한 균주를 선별한 후, 인 축적에 미치는 배양온도 및 배양시간의 영향을 조사하기 위하여 각기 다른 온도 15, 20, 25℃에서 pH 7, 200 rpm에서 진탕배양하면서 2시간 단위로 시료를 채취하여 각 온도에서 균체의 성장 및 인 축적능을 조사하였다

초기 pH의 영향

인 축적에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의

초기 pH를 1N-H₂SO₄ 및 1N-NaOH로 pH를 각각 5, 7, 9로 조절하였고, 20°C, 200 rpm에서 진탕배양하면서 균체의 성장 및 인 축적능을 조사하였다

PO₄-P 농도의 영향

PO₄-P 농도에 따른 균체성장과 인 축적능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지의 PO₄-P 농도를 185 mg/L, 269 mg/L, 562 mg/L로 조절하고 20°C, pH 7, 200 rpm에서 진탕배양하면서 균체의 성장 및 인 축적능을 조사하였다

Agitation speed의 영향

교반속도에 따른 균체성장과 인 축적능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 교반속도를 50, 100, 200 rpm으로 조절하고 20°C, pH 7에서 진탕배양하면서 균체의 성장 및 인 축적능을 조사하였다

인 축적균주의 역가 측정

인 축적균주가 호기조건에서는 배지내의 인을 과량 축적하고 혐기조건에서는 균체내에 폴리인산형태로 축적하였던 인을 인산형태로 방출하는지를 확인하기 위해 인의 역가실험을 실시하였다(6). 역가실험은 3 L의 용량의 fermenter(HDF-300, marubishi)를 사용하여 반응기에 2 L의 배지를 넣고 멸균 후 미리 250 mL 삼각플라스크에서 수 차례 계대배양을 통해 활성화되어 다량의 인을 축적하였으리라 예상되는 균주 200 mL를 무균상태로 접종하였다

초기 혐기상태를 조성해 인을 방출시키기 위해 반응기내의 DO를 0.0~0.1 mg/L 사이에 유지되도록 일정량의 질소를 공급하였고 인이 방출되어 반응기 내 인의 농도가 더 이상 변하지 않는 시점에서 호기상태를 조성해 인을 다시 축적하는지 확인하기 위해 공기를 2 L/min의 속도로 간헐적으로 공급하여 반응기 내 DO를 8 mg/L로 유지하였다. 인을 대부분 축적하였을 시점에서 다시 한번 더 혐기상태를 조성해 인의 방출을 확인하여 보았다.

결과 및 고찰

균주의 분리

인 축적균주가 다량 분포할 가능성이 있는 다양한 저점에서부터 채취한 시료를 위노그라드스키 칼럼을 이용하여 농화배양하였다. 목적균을 위노그라드스키 칼럼의 aerobic zone과 anaerobic zone의 중간층에서 획득하였다.

농화배양된 위노그라드스키 칼럼의 목적균층에서 샘플을 취하여 액체 계대배양과 평판배양을 수십 차례 거듭하여 순수 배양한 10개 인 축적균주에 대한 PO₄-P의 축적능을 조사한 결과 3종의 우수한 인 축적균주를 분리하였다 이 중 가장 우수한 인 축적능을 가진 Y대학 자연자원대 축사 주변 소하천수를 검증원으로 한 위노그라드스키 칼럼으로부터 분리된 CW3 균주를 대상으로 동정과 특성조사를 시행하였다

분리균주의 동정

Y대학 자연자원대 축사 주변 소하천수를 검증원으로 한 위노그라드스키 칼럼으로부터 분리된 CW3 인 축적균주의 각종형태,

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of *Acinetobacter* CW3.

Characteristic tested	Result
Morphology	
Gram	-
Motility	-
Rod type	Straight Rod
Spore Formation	-
Hydrolysis of	
Casein	-
Gelatine	+
Starch	+
Utilization of	
Citrate	+
Ammonium salt	+
Nitrate salt	-
Growth factor requirements	
Growth at	
10°C	-
20°C	+
30°C	+
40°C	-
Anaerobic growth	+
Oxidase	-
Catalase	+

생리, 생화학적 특성 검사를 행한 결과를 Table 2에 나타내었다 Table 2에 나타낸 것처럼 분리된 인 축적균주는 그람음성에 운동성은 없으며 끈은 간균형태로 spore를 형성하지 못했다. 이 균주는 gelatin과 전분을 가수분해했지만 casein은 분해하지 못했다. Ammonium salt를 질소원으로 하고 생장인자 요구성은 없으며 20 ~ 30°C에서 잘 자랐다

그 외의 여러 가지 특징들을 토대로 보아 분리된 인 축적균주는 *Acinetobacter* 속으로 판단되었으며, 이 균주를 *Acinetobacter* CW3 이라 명명하였다.

온도 및 배양시간의 영향

인 축적을 위한 최적온도 검사는 15, 20, 25°C 범위에서 실험을 행하였다. 분리된 인 축적균주는 일반적인 그람음성세균의 배양온도보다 다소 낮은 온도인 20°C에서 우수한 성장을 보였으며 12시간만에 배지 속의 인을 90%정도 제거하는 것으로 나타났다(Figure 2). 이 실험 결과는 20°C에서 가장 우수한 제거능을 보인 Fhus 등(6)의 연구결과와 일치함을 알 수 있다 15, 25°C에서는 인의 제거와 생장이 다소 떨어짐을 보였으며 특히 25°C에서는 8시간 이후에 축적된 인이 다시 배양액 속으로 용출됨을 볼 수 있다.

이 후의 실험에서는 최적 성장온도인 20°C에서 실험을 시행하였다

초기 pH의 영향

인 축적에 미치는 초기 pH의 영향에 관해 실험해본 결과 증

성인 pH 7에서 가장 높은 인 축적과 성장이 이루어 졌다. 옅기 인 pH 9에서는 pH 7과 거의 대등한 성장을 보였지만 산성인 pH 5에서는 현저한 인 축적능의 저하를 보였다. 이는 인 축적 능이 성장함에 따라 산화된 인 때문에 배지의 pH가 낮아져 중 성 가까이 변하기 때문이라고 사료된다.

시간에 따른 각 pH별 PO₄-P의 농도의 변화는 Figure 3에 나타내었다.

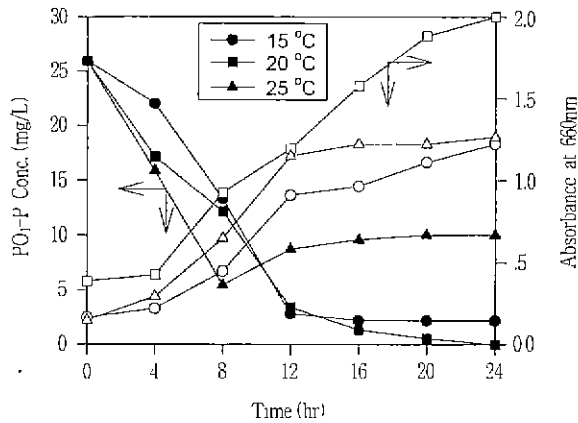


Figure 2. Effect of temperature on cell growth and PO₄-P removal (Initial pH 7.0, 200rpm).

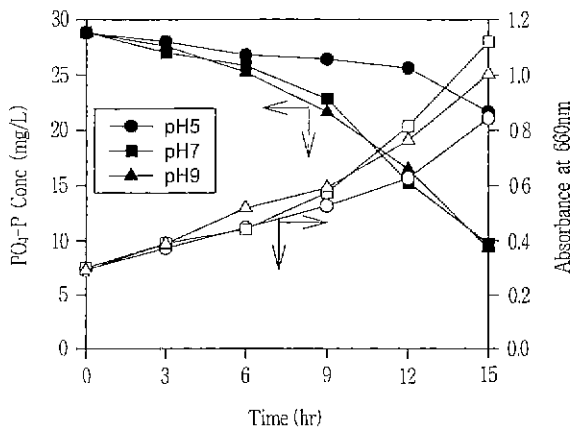


Figure 3. Effect of initial pH on cell growth and PO₄-P removal (Temp. 20°C, 200rpm).

PO₄-P 농도의 영향

PO₄-P 농도에 따른 균체성장과 인 축적능에 미치는 영향에 대한 실험에서는 배지의 초기 PO₄-P 농도가 가장 낮은 185 mg/L에서 가장 좋은 인 제거속도를 보였다. Figure 4에서 보는 바와 같이 배양 후 12시간만에 각각 185 mg/L에서는 100%의 제거효율을, 26.9 mg/L에서는 약 43%의 제거효율을, 56.2 mg/L에서는 약 17%의 제거효율을 보여주었다. 이를 제거속도로 나타내면 각각 12시간을 기준으로 1.5 mg/L·hr, 0.97 mg/L·hr, 0.8 mg/L·hr이므로 초기 인의 농도가 낮을수록 인의 제거 속도가 빠름을 보였다. 따라서 *Acinetobacter* CW3은 저농도의 인 제거공정에 적합함을 알 수 있다.

Agitation speed의 영향

교반속도에 따른 균체성장과 인 축적능에 미치는 영향은 비교

적 높은 교반속도인 200 rpm에서 아주 우수한 인 축적능을 보이고 교반속도가 떨어질수록 *Acinetobacter* CW3균주의 인 축적능도 현저하게 저하됨을 볼 수 있는데, 이는 호기적 조건에서는 인을 폴리인산 형태로 균주 내부에 저장하고, 혐기성상태에서 이러한 폴리인산형태의 인을 분해 혹은 방출하는 *Acinetobacter*속의 일반적인 특징(6)에서 기인하는 것으로 보인다. 즉 교반에 의한 산소의 전달이 잘 될 수록 인 축적이 잘 이루어짐을 보여준다. 그 결과는 Figure 5과 같다.

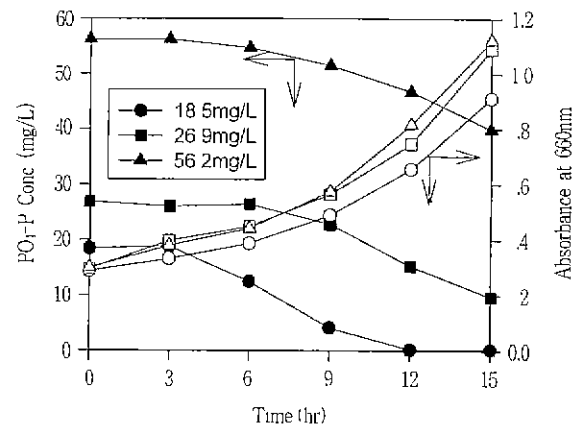


Figure 4. Effect of initial PO₄-P conc. on cell growth and PO₄-P removal (Initial pH 7.0, Temp. 20°C, 200rpm)

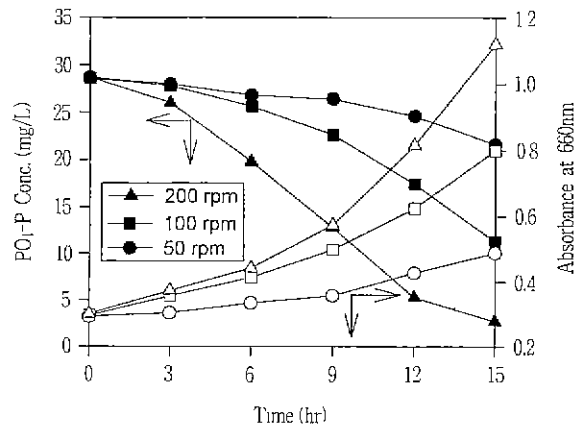


Figure 5. Effect of agitation speed on cell growth and PO₄-P removal (Initial pH 7.0, Temp. 20°C).

인 축적균주의 역가 측정

인 축적균주는 호기조건에서 인을 폴리인산 형태로 균주 내부에 과량 축적하고 혐기조건하에서는 폴리인산 형태의 인을 다시 방출한다. Figure 6은 *Acinetobacter* CW3의 방출과정을 보여주고 있다. 혐기과정을 거쳐 호기조건으로 전환하였을 때 536 mg/L였던 PO₄-P의 농도가 20시간만에 9 mg/L로 떨어져 약 83%의 인이 제거됨을 볼 수 있다.

또 다시 혐기조건을 조성해 주었을 때 축적되었던 인을 다시 방출하는데, 초기의 혐기상태보다 방출속도가 떨어지는 것을 볼 수 있다. 이는 배지내의 탄소원이 고갈되어 더 이상 방출하지 않는 것으로 사료된다. 위의 실험으로 보아 새로이 분리된 인 축적세균은 *Acinetobacter*속의 전형적인 특징을 보였다.

호기적 조건에서의 12시간 기준으로 인의 제거 속도를 다른

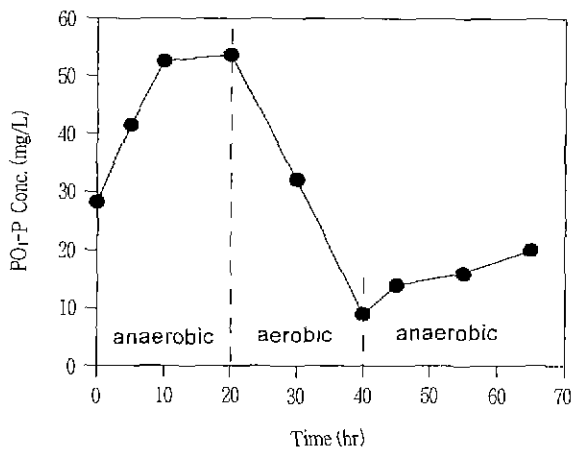


Figure 6. Phosphorus removal ability of *Acinetobacter* CW3.

연구결과와 비교해보면 송 등(12)은 0.24 mg/L·hr의 속도로, Fuhs 등은 4 mg/L·hr의 속도로 인을 제거한 반면 본 연구에서는 2.3 mg/L·hr의 속도로 인을 제거 가능함을 보여줘 송 등의 연구결과보다 우수함을 보였다.

요 약

인 축적능이 우수한 균주를 자연계로부터 워노그라프스키 칼럼을 이용해 분리하여 *Acinetobacter* 속으로 동정하였고, *Acinetobacter* CW3로 명명하였다. 인 축적균주의 배양조건은 20°C, pH 7, 200 rpm, 18.5 mg PO₄-P/L가 최적임을 보였다. *Acinetobacter* CW3은 회분배양에서는 최적조건에서 12시간만에 인의 제거가 완료되었다. 이 균주는 호기조건에서는 인을 균주 내부에 과량 축적하고 혐기조건에서 인을 다시 방출함을 보였다.

감 사

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

참 고 문 헌

- 류재근 (1995), 질소·인 (N, P) 제거 기술(I), *침단환경기술*, 2, 5-11.
- Wisemann, V (1994), Biological Nitrogen Removal from Waste Water, *Advance in Biochemical Engineering*, 51, 113-121.
- 김창원 (1995), 질소·인 (N, P) 제거 기술(II), *침단환경기술*, 3, 4-11
- Bundgaard E., G. Petersen (1991), Methods for Improving Biological Phosphorus Removal, Presented at the 1991 *WEF Annual Conference*, U.S.A.
- M. H. Denima, L. H. A. Habets, J. Scholten, E. Turkstra and H. A. A. M. Webers (1980), The Accumulation of Polyphosphate in *Acinetobacter* spp., *FEMS Microbiology letters*, 9, 275-279.
- G. W. Fuhs and Min Chen (1975), Microbiological Basis of Phosphate Removal in the Activated Sludge Process for the Treatment of Wastewater, *Microbial Ecology*, Vol. 2, 119-138
- Thomas D. Brock, David W. Smith and Michael T. Madigan (1984), *Biology of microorganisms*, 5th ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New jersey.
- 동아 환경 신문사 編 (1995), 환경 실무 총람, p. 106, 동아 환경신문사, 서울.
- Baumann, P., A. I. Fumiss, and J. V. Lee (1984), In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1-4, William & Wilkins, Baltimore.
- Health Ass. (1997), *Standard Method for the Examination of Water and Waste - Water*, 14th ed, Am. Publ. Washington D.C.
- 수질오염 폐기물 공정 시험방법 (1992), pp. 194-198, 도서출판 동화기술, 서울.
- Ju Yeong Song and Sang Ho Lee (1997), Biological Removal of Nitrogen and Phosphorus from Waste Water by Microencapsulated Strains, *Korean J of Biotechnol. Bioeng.*, 12-3, 269-275.
- 부산대학교 환경기술·산업개발 연구센터 編(1996), 하폐수의 질소인 제거기술, pp. 127-128
- 한국건설기술 연구원, P/L(생물학적인, 질소제거)프로세스 개발에 관한 연구.
- Balous, A. and H. G. Tramper (1992), *Handbook on the Biology of Bacteria Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*, Vol. 3, pp. 2322-2334, Springer-Verag.
- Mino, T., T. Kawakami, and T. Matsuo (1985), Behaviour of Intracellular Polyphosphate in Biological Phosphate Removal Process. *Wat Sci. Tech.*, 17, 11-21.
- Smolders, G. J F., J. Vandermeij, and Vanloosdrecht M. C. M. (1994), Model of Anaerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 461-470.
- Surampalli RY., Banerji SK, Pycha CJ. and Lopez ER. (1995), Phosphorus Removal in Ponds, *Wat Sci. Tech.*, 31, 331-339.
- Liao C. M, Maekawa T and Feng X. D (1995), Nitrogen and Phosphorus Removal for Swine Waste-Water by Ammonium Crystallization and Intermittent Aeration Process. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 30, 733-758.
- Smolders, G. J F., J. Vandermeij and Vanloosdrecht M. C. M (1995), A Structured Metabolic Model for Anaerobic and Aerobic Stoichiometry and Kinetics of Biological Phosphorus Removal Process, *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 277-287.