

탈질 세균의 분리 및 특성

† 차 월 석 · ¹최 형 일 · 이 동 병 · ²차 진 명
조선대학교 화학공학과, ²비엔이테크(주)
(접수 : 2003. 8. 19. 게재승인 : 2003. 12. 26.)

Isolation and Characterization of Denitrification Bacteria

Wol-Suk Cha[†], Hyung-Il Choi¹, Dong-Byung Lee, Jin-Myeong Cha²

Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

¹Division of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

²B & E Tech Co., Ltd., Business Incubation Center, Gwangju University, Gwangju 503-703, Korea

(Received : 2003. 8. 19. Accepted : 2003. 12. 26.)

Five denitrifying bacteria, which were identified as *Pseudomonas* sp., were isolated by the enrichment culture technique. The most effective denitrifying bacterium was named as *Pseudomonas* DWS, which was cultivated at anoxic condition. The optimal growth temperature and pH were 30°C and 7-8, respectively. Cell growth almost revealed a stationary phase at 18 hours after cultivation and nitrate was degraded 99.9% during this period. Therefore, it is suggested that *Pseudomonas* DWS could be effectively used for the biological treatment of wastewater containing nitrogen compounds.

Key Words : *Pseudomonas* DWS, Denitrifying, biological treatment

서 론

생물체를 구성하고 있는 무기물 중 단백질의 구조와 결정에 관여하는 질소는 자연계에 널리 존재하는 무기 영양소이다. 특히, 하천과 호소의 극심한 부영양화와 심각해지는 침출수 유출에 따른 악성폐수로 인하여 질소원 제거에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1, 2).

미생물이 유기물을 분해할 때 산소대신 질산성 질소를 최종 전자수용체로 사용하여 질산성 질소를 질소가스로 환원시키는 과정을 탈질이라고 한다(3). 탈질 반응에 관계하는 미생물은 *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Bacillus* 등과 같은 많은 종류의 세균이 포함되어 있다(4). 토양에서 분리한 탈질 세균의 대다수가 *Pseudomonas* 종이고 다음으로는 *Alcaligenes* 종이라고 보고 되고 있다(5).

탈질화의 기본적인 생화학적 경로는 혐기성 상태가 아니며, 단순히 호기성 생화학적 경로를 약간 변화시킨 것에 지나지 않으므로 혐기성 탈질 작용 (Anaerobic Denitrification)이라 하지 않으며 무산소 탈질 작용 (Anoxic Denitrification)

이라고 한다. 그 이유는 수중에 용존된 유리산소가 없는 환경조건에서 호기성 생화학적 경로의 특성은 그대로 존재하기 때문이다(6-9).

현재 분뇨, 축산폐수, 하수, 산업폐수 등의 처리에 광범위하게 적용되고 있는 생물학적 처리공법들은 모두 유기탄소성 오염물질들을 제어하는 기술로 질소 오염원을 제거하기에는 여러 가지 어려운 점이 있다(10). 그러므로 질소로 인한 수생태계의 부영양화를 방지하기 위하여 각종 처리장에서 질소를 충분히 제거할 수 있는 공정의 도입이 요구되며, 새로운 공정의 연구 개발과 더불어 탈질 작용을 하는 균주를 순수 분리하고 탈질 작용이 우수한 균주를 선별하는 일이 필요하다(11).

따라서 본 연구에서는 질소를 제거해 줄 수 있는 미생물을 자연계에서 광범위하게 분리하여 균주의 특성을 밝히며, 질소 자화능을 조사하여 실처리 공정에 적용할 수 있는 균주를 개발하고 우수한 균주를 선별하여 여러 가지 생화학적 특성과 균주 성장 특성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배지조성

광주광역시 하수처리장 주변 토양, 분뇨처리장의 슬러지, 전남 근교 골프장 주변 토양에서 시료를 채취하였다. 채취한

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-7218, Fax : +82-62-230-7226
E-mail : wscha@mail.chosun.ac.kr

시료를 멸균된 증류수를 이용하여 희석단계별로 1 mL씩 배지가 첨가된 시험관에 접종하였다. 접종한 시험관을 30°C에서 2주일간 배양한 후 배지의 색이 변하면서 질소가스가 발생하는 집락 중 집락이 크고 분명한 것을 선별하여 분리과정을 반복하여 1차 탈질 균주로 선정하였다. 일차로 순수 분리된 균주 중 최종적인 탈질 균주를 분리하기 위하여 액상배지에 균주를 접종한 다음 30°C에서 2일간 배양하면서 균주의 생육속도가 빠르고 탈질능이 우수한 균주를 최종 선별하였다. 분리된 균주는 20% glycerol을 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하여 사용하였다.

탈질균 기본 배지는 Table 1에 있는 배지에 1.5% 한천(w/v)을 첨가한 평판 고체배지를 사용하였다(12).

Table 1. Media composition for the isolation of denitrifying bacteria

Medium A	Conc. (g/L)	Medium B	Conc. (g/L)
		Sodium Citrate	8.5
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
KNO ₃	1.0	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.05
Asparagine	1.0	KH ₂ PO ₄	1.0
BTB solution	5 mL	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.2
D.W	500 mL	D.W	500 mL

Using after mixing medium A with medium B, pH 7. * BTB solution : Dissolve Brom Thymol 1g in 95% (v/v) alcohol 100 mL.

분리균주의 동정

분리 균주의 형태적, 생리적 및 생화학적 특성을 조사하기 위하여, 분리 균의 형태를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 각 균의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(13)에 따랐으며, Laboratory manual of general bacteriology(14)에 준하여 실시하였다. 선별된 균주의 형태학적 특성은 Gram 염색과 전자현미경으로 관찰하였고, 반 유동배지에서 운동성을 조사하였다. 또한 균주의 생리학적 특성으로는 gelatin 액화력, nitrate 환원력 및 catalase, oxidase 이용능과 아울러 혐기적 조건에서의 증식여부를 관찰하였다. 또한 분리된 탈질 균주의 온도에 따른 영향은 온도를 20, 30, 40°C로 조정하여 실험하였고, 탈질화에 따른 초기 pH 영향은 온도와 교반속도를 30°C, 배양 배지의 pH는 7로 하여 교반속도는 150 rpm을 고정하여 균체의 성장과 질산성 질소의 농도 변화를 조사하였다.

분석방법

탈질을 측정은 배지 내 질산성 질소의 농도 변화로 측정하였다. 배양액내의 질산성 질소를 정량을 위해 10,000 ppm으로 원심분리한 후 membrane filter (Advantec: pore size 0.45 um)로 여과하여 질산성 질소 분석은 환경오염공정 시험법의 불루신법을 이용하여 측정하였다(6, 15).

결과 및 고찰

분리균주의 동정 및 성장특성

분리된 5개 균주 가운데 성장속도가 빠르고 질산성질소 제거율이 우수한 균주를 선별하기 위하여 각각의 균주를 2일간 배양한 후 결과를 Table 2에 나타내었다. 특히 분리 균주 가

운데 DWS3이 세포성장과 질산성질소 제거율이 가장 우수하여 최종 분리 균주로 선정하였다.

Table 2. Comparison of cell growth and removal ratio of nitrate by the isolated denitrification bacteria

Strain	Cell growth (OD _{660nm})	Removal ratio of Nitrate (%)
DWS1	1.14	91.7
DWS2	0.68	54.2
DWS3	1.42	99.5
DWS4	1.01	86.3
DWS5	0.95	75.6

분리된 DWS3 탈질 균주의 여러 가지 배양학적 특성을 조사한 결과 Table 2에 나타내었다. 분리 균주 DWS3를 동정한 결과 Pseudomonas 속으로 나타났으며 생리, 생화학적 특성은 Table 3에 나타내었고, 본 연구에서 최종 선별한 DWS3를 Pseudomonas DWS로 명명하였다.

일반적으로 탈질세균은 NO₃⁻ 또는 NO₂⁻를 환원시켜 N₂ 또는 N₂O와 같은 기체를 생성하는 세균으로 탈질능을 갖는 세균은 Pseudomonas 속, Alcaligenes 속, Moraxella 속, Bacillus 속 등 여러 가지 균주에 대한 특성을 보이나 본 연구에서 분리한 균주는 Pseudomonas 속과 유사함을 보여주고 있다(4, 5). 탈질균은 호기성 조건하에서 용존산소를 이용하여 생활하지만 혐기성조건하에서는 NO₃⁻ 또는 NO₂⁻와 같은 결합형 산소를 최종전자수용체로 이용하여 생활하는 통성혐기성균이다. 그러나 호기적 조건 하에서도 탈질능을 나타내는 세균(Thiosphaera pantotropha, Paracoccus denitrificans) 등에 관한 연구보고도 많이 있다(13, 14). 탈질반응은 질산성질소 또는 아질산질소가 환원되어 최종적으로 질소가스를 생성하지만 탈질반응의 혐기성 반응 결과 가스가 발생하는 경우가 있다. 따라서 이들 결과를 최종적인 확인을 위하여 질산성질소가 환원되면 pH를 상승하므로 배지 색의 변화가 발생하므로 탈질반응을 증명하기 위하여 질소가스 발생과 배지 색의 변화를 관찰하였다.

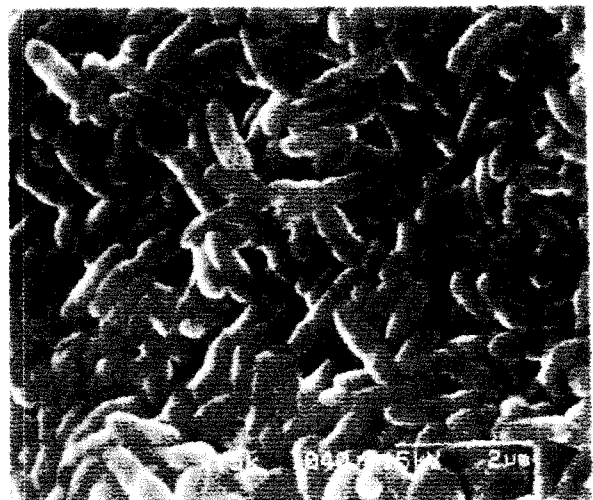


Figure 1. Scanning electron microscopy of Pseudomonas DWS.

분리된 *Pseudomonas* DWS을 배양한 결과 Fig. 1에 보였고, 분리균을 반유동성 사면배지에 배양한 결과 색은 녹색을 띠었으나, 탈질능을 갖는 균주의 활성에 따라 배지의 색이 녹색에서 암녹색으로 변환이 되어진다. 본 연구 결과는 배양 후 약 3일째 되는 시점에 배지의 집락 주변에 청색을 서서히 보이다가 탈질능에 따라 배지의 전면에 청자색을 나타내는 균주의 특성을 보였다. 또한 질소가스 검출은 탈질 균주 배지내에 Durham 관에 가스 포집여부를 확인한 결과 가스가 생성이 확인되어 분리균주인 *Pseudomonas* 속을 탈질반응에 이용할 수 있는 균주로 최종 확인되었다.

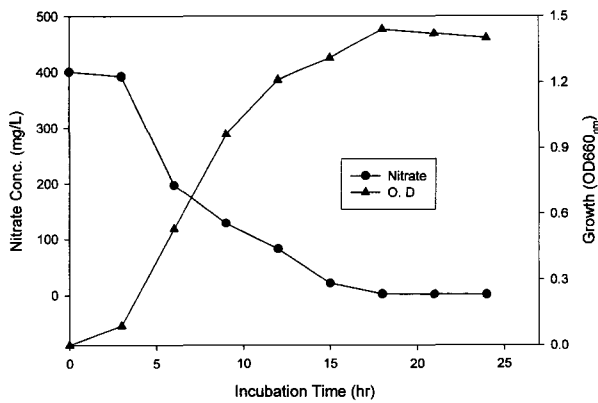


Figure 2. Denitrification and growth curve of *Pseudomonas* DWS (initial pH 7.0, 30°C, 150 rpm).

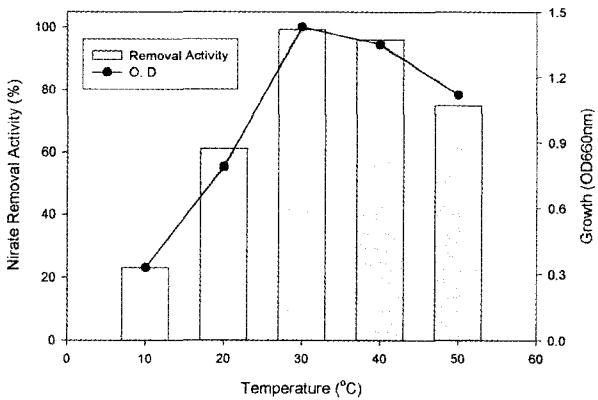


Figure 3. Effect of temperature on denitrification and growth of *Pseudomonas* DWS (initial pH 7.0, 150 rpm).

분리된 *Pseudomonas* DWS의 탈질균 성장속도를 측정하기 위하여 질산성질소가 400 mg/L가 함유된 배지에 접종한 후 균의 증식속도와 질산성질소의 제거율을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. *Pseudomonas* DWS는 4시간 정도의 유도기를 거쳐 18시간에 최대 증식을 나타내었으며, 균의 생육속도와 비례하여 질산성질소의 제거율이 증가하는 것으로 나타났으며, 배양 7시간만에 50% 정도 질산성질소가 제거되었고, 배양 20시간에 질산성질소는 99% 이상 제거되는 것으로 나타났다. 따라서 본 균주를 이용하여 탈질에 이용할 경우 24시간 정도 배양한 후 실험에 사용하는 것이 적절한 것으로 사료된다.

Table 3. Biochemical and physiological characteristics of Denitrification strain

Characteristics	<i>Pseudomonas</i> DWS
Morphology	
Gram stain	-
Cell form	rod
Hydrolysis of	
Gelatin	+
Starch	-
Reproduction	
Binary fission	-
Budding or binary fission	+
Motility	
	+
Utilization of	
Glucose	+
Arginine	+
Ethanol	+
Citrate	+
L-Valine	+
Growth at	
4 °C	+
20 °C	+
30 °C	+
40 °C	+
Denitrification	
Oxidase Reaction	+
Catalase Reaction	+
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	-

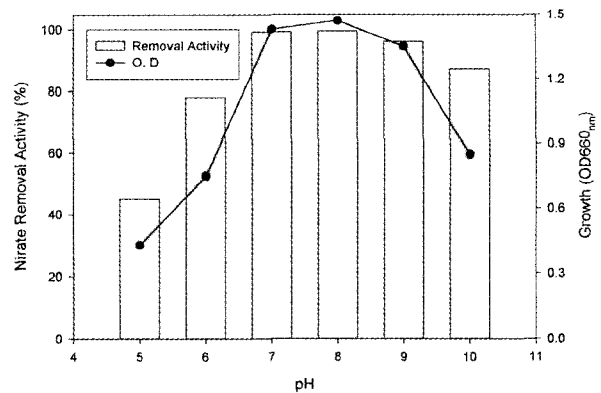


Figure 4. Effect of pH on denitrification and growth of *Pseudomonas* DWS (initial 30°C, 150 rpm).

균의 성장에 미치는 온도의 영향

온도는 미생물 성장속도와 질산성질소의 제거 속도에 영향을 미치므로 분리 균의 성장을 위한 최적성장 온도를 알아보기 위하여 pH를 7로 유지하여 질산성질소를 400 mg/L 첨가한 후, 분리된 *Pseudomonas* DWS 접종하여 배양 시간 21시간 후 온도에 따른 질산성 질소 제거량과 균주 성장은 Fig. 4에 나타내었다. *Pseudomonas* DWS의 온도별 특성은 30°C에서 99% 이상 우수한 탈질능이 나타났으나, 20°C에서는 68% 탈질율, 40°C에서는 92% 탈질율이 보여, 30~40°C에서 탈질이 잘 일어나는 것으로 나타났다. 일반적으로 탈질 균주의 성장온도 범위는 5~35°C 사이인 것을 알려져 있으며, 대부분 30°C 부근에서 최대 성장이 나타나는 것으로 보고 되고

있다(3, 16). 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* DWS의 경우도 30°C에서 탈질과 성장률이 가장 좋은 것으로 나타났다.

균의 성장에 미치는 pH의 영향

탈질반응의 최적 pH는 분리균주나 반응 물질의 성분에 따라 달라지나 일반적으로 pH 7.0-8.5의 범위가 가장 효율적인 것으로 알려져 있다(11). 또한 탈질반응은 알칼리 생성반응이므로 탈질화에 따라 알칼리도와 pH는 증가한다(17). 따라서 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* DWS 탈질 균주의 최적 성장 pH를 알아보기 위하여 배지의 pH를 5.0-10.0으로 조절한 후 초기 pH에 따른 균의 성장과 질산성질소 제거량을 Fig. 4에 나타내었다.

Pseudomonas DWS의 탈질균 성장에 적합한 초기 pH는 7~8에서 18시간에 질산성 질소가 99% 이상 거의 모두 제거되었다. 그리고 pH 10에서는 89%가 탈질되었으며, pH 5에서는 45%의 탈질율을 나타내어, pH 5 이하 및 pH 10 이상의 pH에서는 균의 성장 저해에 따른 탈질율이 감소하는 것으로 나타났다. 이 연구 결과 *Pseudomonas* DWS 균주는 넓은 pH 영역에서 잘 성장하며 약알칼리에서도 비교적 우수한 탈질능을 보였다.

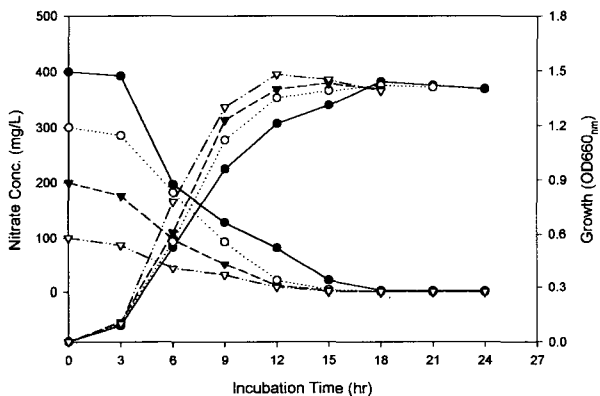


Figure 5. Effect of initial nitrate concentration on denitrification and growth of *Pseudomonas* DWS (initial pH 7.0, temp. 30°C, 150 rpm).

탈질균의 생육에 미치는 질산염 농도의 영향

Pseudomonas DWS 탈질균의 생육에 미치는 질산성 질소의 농도에 대한 영향은 알아보기 위하여, 30°C와 pH를 7로 유지하고 질산성질소의 농도를 100~400 mg/l로 조정하여 균주의 성장 및 질산성 질소 제거율을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다.

Pseudomonas DWS는 질산성 질소 농도에 관계없이 모두 9시간 이내에 배지의 질산성 질소가 약 50%가 제거되었으며, 18시간 경과 후 99% 이상 질산성 질소가 제거되었다. 따라서 본 연구에서는 *Pseudomonas* DWS를 고정하지 않은 상태에서 400 mg/L의 질산성 질소를 빠르게 탈질시키는 것으로 보아 미생물 고정화 방법을 병행할 경우, 탈질능 처리 효율 증가가 기대되는 우수한 균주로 사료된다.

요 약

질소함유 폐수를 생물학적으로 효과적으로 처리하기 위한 전단계로서 탈질균을 분리하여 최종 선정된 균주의 분해특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 분리된 5개 균주 가운데 DWS3가 세포성장과 질산성질소 제거율이 가장 우수하여 최종 분리 균주로 선정하였다. DWS3를 동정한 결과 *Pseudomonas* DWS로 명명하였다. 반응동성 사면배지에 배양한 결과 녹색을 띠었으나, 탈질능을 갖는 균주의 활성화에 따라 배지의 색이 녹색에서 암녹색으로 변환되었다. *Pseudomonas* DWS는 4시간 정도의 유도기를 거쳐 18시간에 최대 증식을 나타내었으며, 균의 생육속도와 비례하여 질산성질소의 제거율이 증가하는 것으로 나타났다. *Pseudomonas* DWS의 온도별 특성은 30°C에서 성장과 탈질율이 99% 우수하게 나타났으나, 탈질균 성장에 적합한 초기 pH는 7~8에서 질산성 질소가 99% 이상 거의 모두 제거되었다. *Pseudomonas* DWS는 질산성 질소 농도에 관계없이 9시간 이내에 배지의 질산성 질소가 약 50%가 제거되었으며, 18시간 경과 후 99% 이상 질산성 질소가 제거되었다. 따라서 *Pseudomonas* DWS는 질소화합물을 다량 포함된 하, 폐수의 생물학적 처리에 효과적으로 이용될 수 있는 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 농림기술개발센터 첨단기술개발사업 연구비 (과제명: 생물막 여과공법에 응용 황토 (인공토양)를 이용한 총질소, 총인 처리공정기술, 개발연구기간: 2001. 8. 15~2003. 8. 16)를 지원받아 수행한 일부이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yoon, C. H. and H. J. Jim (2001), Decolorization characteristics of secondary effluent of livestock wastewater by electrochemical process, *Livestock Wastewater Symposium*, Korea.
2. Silverstein, J. and E. Schroeder (1983), Performance of SBR activated sludge process with nitrification/denitrification, *J. WPCF*, **55**, 377.
3. Sorensen, B. H. and S. E. Jorgensen (1993), The removal of nitrogen compounds from wastewater, DFH, *Institute A, Environmental Chemistry Section*.
4. Tiedje, J. M. (1988), Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Zehnder, A. J. B. Ed., p179, John Wiley and Sons Inc., New York.
5. Gamble, R. N., M. R. Betlach, and J. M. Tiedje (1997), Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils, *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 926-939.
6. Barth, E. F. and H. D. Stensel (1981), International nutrient control technology for municipal effluents, *J. WPCF*, **53**, 1691-1698.
7. Randall, C. W., G. T. Daigger, L. Morales, G. D. Waltrip, and E. D. Romm (1987), Highrate economical biological removal of nitrogen and phosphorus, *IAWPRC Special Conference*, Rome.
8. Bourdon, F., M. Florentz and J. Sibony (1987), Stepped supply process for simultaneous biological removal of nitrogen and phosphorus from wastewater, *IAWPRC Special Conference*, Rome.

9. Knowles, G. (1965), Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture with the aid of an electronic computer, *J. Gen. Microbiology* **38**, 263-169.
10. Marks R. F., J. Mckendrick, and S. Sango (1987), N and P removal by modified activated sludge (MAS) sewage works in Zimbabwe, *IAWPRC Special Conference*, Rome..
11. US EPA (1993) : Process Design for Manual Nitrogen Control. EPA / 625 / R-23 / 010.
12. Smith, R. L. and J. H. Duff (1988), Denitrification in a sand and gravel aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1071-1078.
13. Krieg, N. R. and J. G. Holt (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
14. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1986), *Microbiology a laboratory manual*, 2nd Ed., The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., Menlo Park.
15. Wuhrmann, K. (1964), Nitrogen removal in sewage treatment process, *Vehr. Int. Ver. Limnol.* **15**, 580-587.
16. Barnard, J. L. (1973), Biological denitrification, *J. Inst. Water Pollution Control* **72**, 705-720.
17. Painter, H. A (1970), A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganism, *Water Research* **4**, 393-399.