

암모니아산화세균 *Brevundimonas diminuta*의 분리 및 암모니아 산화 특성

권혁구[†] · 정준오

호서대학교 환경공학과
(2007. 2. 7. 접수/2007. 8. 10. 채택)

Isolation and Characteristics of Novel Ammonia Oxidizing Bacteria *Brevundimonas diminuta*

Hyuk Ku Kwon[†] · Joon Oh Jung

Department of Environmental Engineering, Hoseo University Asan 165, Korea
(Received February 7, 2007/Accepted August 10, 2007)

ABSTRACT

The microorganism for ammonia gas removal was isolated from composting product. This was identified as *Brevundimonas diminuta* by morphological, biochemical characteristics study and 16S rDNA sequence analysis. Optimal incubation temperature for cell growth and oxidizing ability of $\text{NH}_4\text{-N}$ was 30°C and optimal initial pH was 7. Glucose affected the growth of cell and the removal of NH_4^+ . The growth rate of the isolates were increased when grown in the presence of 0.05-1%(w/v) glucose in the selective medium and further increases in glucose concentration to 2% caused significant decreases in the cell growth and oxidizing ability of NH_4^+ .

Keywords: ammonia, *B. diminuta*, cell growth, carbon source

I. 서 론

악취는 여러 가지성분이 혼합된 상태로 존재하면서 인간의 후각을 자극하여 심리적 정신적 피해를 야기하는 감각공해이다.¹⁾

하수, 분뇨처리장, 공장 및 축산폐수, 퇴비화시설, 매립지 등 각종 환경기초시설과 농어촌지역의 악취발생원에 대한 지역주민들의 악취 민원이 급격히 증가하는 추세이다.

2005년도에 악취문제에 보다 효과적으로 대처하기 위해 악취방지법이 제정된 이후로 악취관리체계가 보완, 강화되고 있다. 따라서 효율적인 악취관리, 민원해소, 삶의 질 향상을 위해 악취발생원 특성에 맞는 적절한 악취 저감기술의 도입이 필수적이다.²⁾

악취를 제어하는 방법으로는 크게 물리·화학적 방법³⁻⁵⁾과 생물학적 방법⁶⁻⁹⁾으로 구분된다.

물리·화학적 방법은 안정된 처리효율에도 불구하고 높은 운전비용과 2차 오염물질의 발생 등의 단점이 있는데 반하여, 미생물을 이용하여 악취를 제어하는 생물 탈취기술은 2차 공해물질의 발생이 적고 상온상압에서 운영이 가능한 기술적인 장점이 있다. 특히 담체층진행 바이오필터법(Packed-bed biofilter)은 담체의 보완, 미생물 개발, 운전조건의 개선 등을 통해 적용 가능한 농도 범위가 크게 넓혀지고 있는 추세이며, 악취세기가 비교적 높게 발생하는 축산농가와 퇴비화단지에서 발생하는 악취를 효과적으로 제거하기 위한 가장 적절한 악취제어 수단이다.¹⁰⁾

그러나 바이오필터 기술은 악취가스가 우선 담체층에 쌓여있는 미생물층 및 수막층과 접촉 후 담체 표면에서 성장하는 미생물에 의한 생흡착 및 생분해능에 따라 악취물질 분해제거의 많은 효율을 의존하기 때문에 담체의 종류뿐만 아니라 적절한 미생물의 공급, 활성화, 유지관리 등의 요소들이 전체 처리 효율에 큰 영향을 미치게 된다.¹¹⁻¹⁵⁾

따라서 미생물 상호간의 작용과 변동, 오염물 농도변화에 능동적으로 대처 가능한 바이오 필터를 적용하기

[†]Corresponding author : Department of Environmental Engineering, Hoseo University
Tel: 82-41-540-5347, Fax: 82-41-540-5748
E-mail : hkkwon@office.hoseo.ac.kr

위해서는 사용되는 미생물에 대한 보다 구체적인 이해와 연구개발이 필요하다.

본 연구에서는 음식물 퇴비화과정 중 발생하는 대표적인 악취물질인 암모니아성 질소를 제거해 줄 수 있는 미생물을 담체충진형 바이오필터에 이용하기 위하여, 암모니아성 질소 산화능이 우수하며 자연계에서 생육이 양호한 균주를 분리하였으며 생육특성 및 암모니아성 질소 산화능을 조사하여 현장처리 공정에 적용할 수 있는 균주개발을 위한 기초적 연구를 수행하였기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 배지 조성

암모니아 산화세균을 분리하기 위하여 자연 숙성된 돈분, 우분 및 계분 퇴비와 음식물 퇴비화 공정을 거쳐서 나온 퇴비 등 총 34점의 시료를 채취하였다. 채취한 시료를 25 ml의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 포함된 암모니아산화세균 선택배지 [glucose 100 μM , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, Fe-EDTA 0.1 mg, Distilled water 1 l]에 접종하여 30°C에서 3주간 배양을 한 후, 배양액 0.5 ml를 생리식염수에 희석(10^{-1} ~ 10^{-2})하여 5 ml의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 포함된 암모니아산화세균 선택배지에 희석액을 재접종한 다음 30°C에서 4주간 배양을 하였다.

배양액 1 ml를 취하여 Griess-Ilosvay 시약으로 NO_2 의 생성능을 테스트한 후 발색반응이 좋은 배양액을 일차적으로 선별을 하였으며 암모니아가 포함된 고체배지에서 도말하여 호기성 조건으로 3주간 정치배양을 한 다음 집락을 선별해서 암모니아산화세균 선택배지에 재접종하여 발색반응을 통해 암모니아 산화능이 우수한 균을 선별하였다.¹⁰⁾

2. 분리균주의 동정

분리된 암모니아 산화세균의 형태학적인 특징은 광학현미경(Olympus, DP11)으로 관찰하였으며, 생화학적인 특성은 API 20NE kit (BioMerieux korea)를 사용하여 조사하였다.

16S rDNA에 의한 분리균주의 계통분석은 Applied Biosystems 사의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits을 이용하여 시퀀싱 반응을 하고, MJ Research 사의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler를 사용하여 얻은 PCR 산물을 ABI PRISM 3730XL Analyzer로 분석을 하였다.

3. 분석방법

분리 균주의 성장은 UV-Spectrophotometer(UVmini 1240)를 사용하여 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. 암모니아 산화율은 배지 내의 암모니아성 질소 및 아질산성질소의 농도 변화를 측정하였다. 측정기기는 Spectrophotometer(Hach, DR-4000)를 사용하여 NH_3 및 NO_2 를 정량적으로 측정하였다.

4. 온도의 영향

분리된 균이 암모니아성 질소를 산화하는데 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 20°C, 30°C, 40°C로 조절하여 액체배지에서 1주일간 배양시키면서 각 온도에서의 균 성장과 산화율을 비교 조사하였다.

5. pH의 영향

분리된 균이 암모니아성 질소를 산화하는데 미치는 최적 pH를 조사하기 위하여 최적배양온도에서 pH 5, pH 7, pH 9로 조절된 액체배지에서의 균 성장과 산화율을 비교 조사하였다.

6. 탄소원의 영향

분리된 균을 탄소원으로 포도당을 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%로 각각 다른 농도로 첨가된 암모니아 산화세균 분리용 액체배지에 접종하여 30°C, pH 7에서 1주일 간 배양하면서 균의 성장 및 암모니아 산화 특성을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 동정

퇴비화 공정에서 배출된 음식물 퇴비와 자연 숙성된 돈분, 우분 및 계분퇴비 시료를 채취하여 암모니아 산화균 선택배지에서 배양되어 농화된 균주를 3단계 희석평판법에 의해 암모니아가 함유된 고체배지에서 3주간 배양 후 생성된 콜로니를 순수 분리하였다. 생육이 가장 우수하고 암모니아 산화능력이 뛰어난 균을 선별하여 생화학적인 특성을 API 20NE kit로 조사하고 광학현미경(Olympus, DP11)으로 형태학적 특징을 관찰한 결과를 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. 또한 분리된 균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 Fig. 2와 같았으며, 생리 생화학적인 특성 등과 연계하여 검토한 결과 그람음성의 단간균인 *Brevundimonas diminuta*와 유의성이 가장 높은 것으로 확인되었다.

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *B. diminuta*

Test items	
Shape	short rod
Motility	+
Gram stain	-
Nitrite formation	+
Indole production	-
Glucose acidification	-
Arginine dehydrolase	-
Urea test	-
Esculin hydrolysis	+
Gelatine hydrolysis	+
β-galactosidase	+
Carbohydrate utilization	
Glucose	+
Arabinose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	+
Gluconate	+
Caprate	-
Adipate	-
Malate	-
Citrate	-
Phenyl-acetate	-
Cytochrome oxidase	+

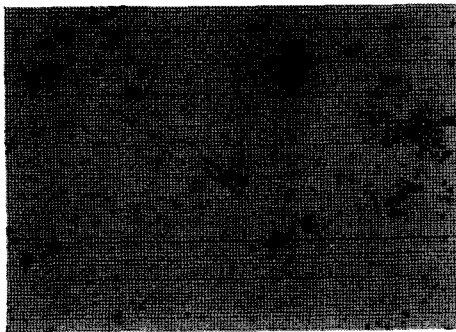


Fig. 1. Optical microscope picture of isolated *B. diminuta* on nutrient broth after incubation for 30°C, pH 7 (×1000).

AGTTTGGATCNTNGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCAGGCCATAACACATGCAAGTGAACGAACCTCTCCGGAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA
 CGTGGGAACGTGCCCTTTGGTTCGGAATAACTCAGGAACTTGCTAATACCGAATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTATTCGCATTAGAGCGG
 CCCCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAACTCTGCGCAATGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCCGTGAATGATGAAGTCTTAGG
 ATTGTAATAATCTTTACCGGGGACGATAATGACGGTACCCGGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGTAAACGAAAGGGGGC
 TAGCGTTGCTCGAATTAAGGGCTAAAGGGCGCTAGGCGGATCGTTAAGTCAGAGGTTGAAATCCAGGGCTCAACCTGGAACCTGCCTTTGAT
 ACTGGCGATCTTGAGTCTGAGAGAGGATGTGGAACCTCCGAGTGTAGAGGTTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGACAT
 ACTGGCTCATTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATTGCTAGTTGT
 CGGGTGCATGCAGTTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCCGCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAAAACCAAGGAATTGACGGGGG
 CCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAGCGCAGAACCTTACCACCTTTTGACATGCCTGGACGCCACCGAGAGCTGGCTTTC
 CCTTCGGGACTAGGACACAGGTGCTGATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGAGTGTGAGTGTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTTCGCCATT
 AGTTGCCATCATTTAGTTGGAACTCTAATGGGACTGCCGGTGCFAAGCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACAGGGT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGAGGGTTAATCTTAAAGTCTGCTCAGTTCGGATTGCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTG
 GAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTCTCTAC

Fig. 2. The partial nucleotide sequences of 16S rDNA gene from isolated *B. diminuta*.

2. 분리된 균주의 생육 특성

분리 균의 배양학적인 조건에 따른 암모니아의 산화력을 조사하고자 배양온도 및 배양배지의 초기 pH에 따른 균주의 생육특성을 조사하여 Fig. 3에 나타내었다. 분리균주 *B. diminuta*은 교반속도 180 rpm으로 30°C에서 배양 조건에서는 초기 pH 5에서 pH 9까지의 범위에서 생육이 왕성하였다. 배양온도 20°C, 30°C, 40°C에서 1주간 배양한 결과 대체적으로 비슷한 생육을 보임으로서 미생물을 이용한 생물학적 처리의 문제를

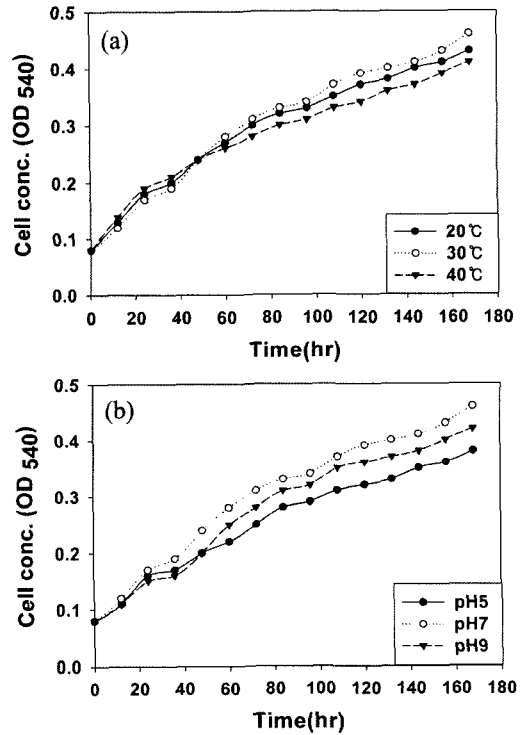


Fig. 3. Effect of temperature (a) and initial pH (b) on the growth of *B. diminuta*. (a) Effect of temperature at pH 7.0, (b) effect of initial pH at 30°C.

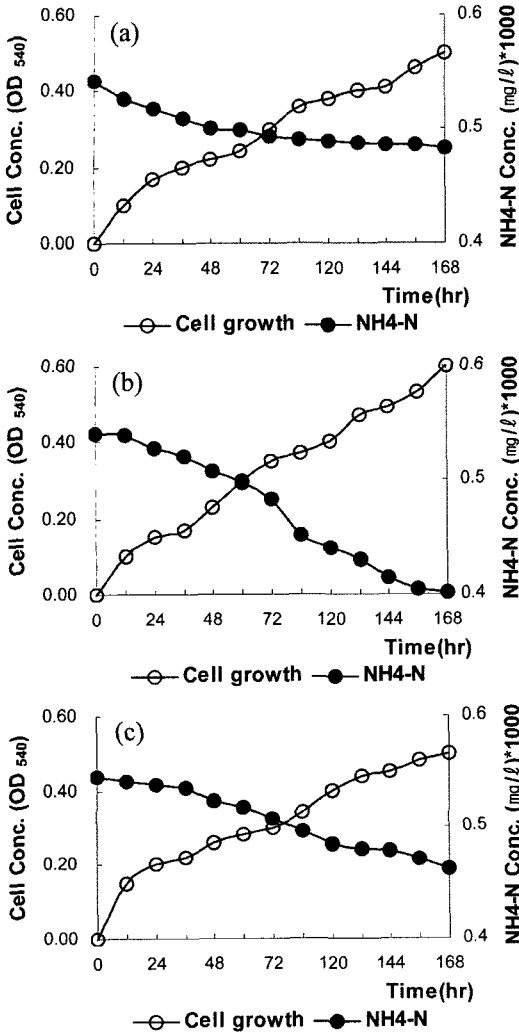


Fig. 4. Effect of temperature on the growth and ammonia oxidizing ability of *B. diminuta* after 7 days at pH 7. (a) 20°C, (b) 30°C, (c) 40°C.

점인 겨울철 처리 효율에 있어서도 안정적인 처리 효율을 유지할 수 있는 균주로서 이용이 가능한 것으로 조사되었다.

3. 배양조건에 따른 암모니아 산화능력

분리 균의 배양학적 조건에 따른 질소의 산화능을 조사하고자 초기 pH 7로 고정을 하고 배양온도에 따른 균주의 생육특성과 암모니아성 질소 산화능을 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 대부분의 온도에서 균 성장에 따른 암모니아성 질소의 농도가 매시간 일정한 감소를 보였으나 20°C, 40°C와 비교해 볼 때 30°C에서는 균

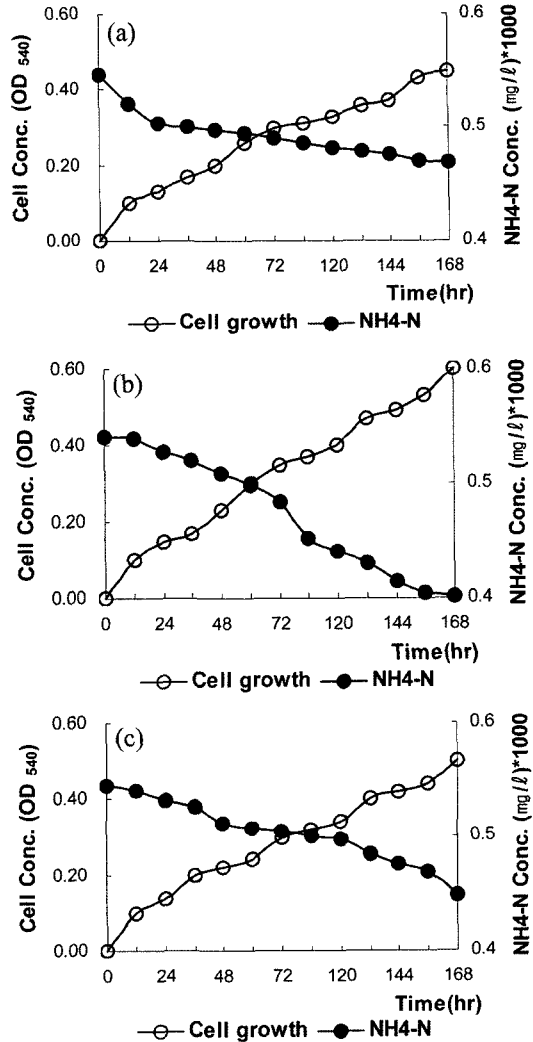


Fig. 5. Effect of pH on the growth and ammonia oxidizing ability of *B. diminuta* after 7 days culture at 30°C. (a) pH 5, (b) pH 7, (c) pH 9.

의 생육이 높았으며 이에 따른 암모니아성 질소 농도의 급격한 감소로 인하여 30°C 범위에서 최적생육 조건을 확인하였다.

분리된 균의 최적 pH를 찾기자 배양온도 30°C에서 초기 pH를 5, 7, 9로 조정하여 pH 변화에 따른 균의 생육 특성과 암모니아성 질소의 산화능을 조사하여 Fig. 5에 나타내었다. 산성조건인 pH 5에서는 균성장은 크게 나타나지 않았고 이에 따른 암모니아성 질소 농도의 감소는 가장 낮았으며, pH 7에서 균성장에 따른 암모니아성 질소가 가장 빨리 산화되는 것으로 나타났다. 알칼리성 조건인 pH 9에서는 산성조건일 때보다는

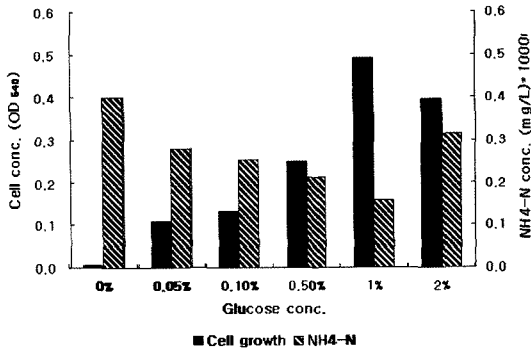


Fig. 6. Effect of glucose on the growth and ammonia oxidizing ability of *B. diminuta* after 7 days culture at pH 7 and 30°C.

산화능이 더 좋은 것으로 조사되었다.

이와 같은 결과에 따라 배양학적 조건에 따른 분리 균주의 최적 생육 온도는 30°C이며, pH 7인 중성 조건에서 균의 증식과 암모니아성 질소 산화율이 가장 우수한 것으로 조사되었다.

탄소원으로 포도당을 첨가하여 암모니아성 질소의 산화에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 6에서와 같이 액체배지속의 포도당 농도가 증가할수록 균체의 성장과 암모니아성 질소의 산화율이 함께 좋았으나, 2%의 포도당 농도에서는 오히려 암모니아성 질소의 산화율이 감소하였다. 이는 탄소원으로 사용된 포도당이 저농도에서는 균체의 빠른 생육에 도움이 되나, 고농도의 포도당 농도가 암모니아 질소의 산화능에는 catabolite repression 작용을 하는 것으로 추측된다. 따라서, 본 연구에서 분리한 미생물의 성장배지에 독립영양균에 자화하기 좋은 탄소원인 포도당을 적절한 농도로(0.5-1.0%, w/v) 첨가해줌으로서 균의 빠른 증식을 유도하여 암모니아 질소 산화능 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 결 론

분분, 우분, 계분이 자연 숙성된 퇴비와 음식물 퇴비 등의 시료로부터 선택배지를 사용하여 암모니아 산화능이 우수한 그람음성 단간균인 *B. diminuta*를 분리하였다. 이 균은 30°C 배양 조건에서 초기 pH 5에서 pH 9까지의 범위에서 생육이 왕성하였으며, 배양온도 20°C, 30°C, 40°C에서 비슷한 성장특성을 보임으로서 안정적인 처리 효율을 유지할 수 있는 균주인 것으로 조사되었다.

*B. diminuta*의 배양학적 조건에 따른 질소의 산화력

을 조사한 결과 초기 pH가 7이고 배양온도가 30°C인 조건에서 균의 생육이 높았으며 암모니아성 질소의 산화율도 가장 좋은 것으로 조사되었다. 유기 탄소원이 암모니아성 질소의 산화에 미치는 영향을 조사하고자 포도당을 첨가하여 균의 성장 및 암모니아성 질소의 산화율을 조사한 결과 포도당이 1% 첨가되었을 때 균의 증식 및 산화율이 가장 좋았으며 포도당의 농도가 1%보다 낮을 때는 균의 성장이 저조하였고, 1%보다 높은 포도당농도에서는 오히려 암모니아성 질소의 산화율이 감소하는 것으로 조사되었다. 따라서 분리된 *B. diminuta* 균주는 암모니아성 질소를 광범위한 온도와 pH 조건에서 효과적으로 제거할 수 있는 공정에 이용될 수 있는 균주로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2006년 농촌진흥청의 지원(농업특정연구과제, 2006-0063)에 의해 수행 되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Faruk Dincer and Aysen Muezzinoglu : Chemical characterization of odors due of some industrial and urban facilities in Izmir, Yurkey. *Atmospheric Environment*, **40**, 4210-4219, 2006.
2. 국립환경과학원 : 악취배출원관리 업무편람, 14-73, 2003.
3. 신대윤, 오유경 : 폐수의 감압 암모니아 탈기에 관한 연구. *한국환경위생학회지*, **27**(1), 93-99, 2001.
4. 박상일, 정경훈, 김해연, 백계진 : 토양걸름을 이용한 합성폐수중의 암모니아성질소 제거. *한국환경보건학회지*, **31**(4), 280-286, 2005
5. 박종안, 허준무, 손부순 : 회전원판공정과 화학침전공정 조합을 이용한 유기물과 질소, 인의 동시 제거. *한국환경위생학회지*, **24**(1), 132-140, 1998
6. 김태규 : 바이오필터와 황-석회석을 이용한 단일흐름 공정에서의 질산화와 탈질 연구. *한국환경보건학회지*, **32**(5), 469-477, 2006.
7. 여운호 : 가축분뇨 유기물부하별 연속회분식반응조 효율에 관한 연구. *한국환경위생학회지*, **21**(4), 32-36, 1995
8. 박태진, 이정민, 송경석, 조일형, 김영규, 정문호 : A₂O 공정에서의 섬모상 담체 사용에 따른 하수의 질소, 인 제거에 관한 연구. *한국환경위생학회지*, **26**(3), 69-75, 2000.
9. 김연규, 양익배, 김인배 : CNR 공법의 체류시간에 따른 도시하수의 질소제거. *한국환경위생학회지*, **26**(3), 98-102, 2000.
10. Tang, H. and Hwang, S. J. : Waste gas treatment in biofilters. *Journal of the Air & Waste Management Association*, **46**, 349-354, 1996.
11. 박상진, 이재호 : 발포법을 이용한 바이오필터용 다공성 세라믹 담체의 제조, *한국냄새 환경학회지*, **3**(1),

- 41-47, 2004.
12. Kwon, H. H., Lee, E. Y., Cho, K. S. and Ryu, H. W. : Benzene biodegradation using the polyurethane biofilter immobilized with *Stratotrophomonas maltophilia* T3-c. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**(1), 70-76, 2003.
 13. Kim, Y.-J. : Metabolism of ammonium and nitrate ions by *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 under anaerobic conditions, Kobe University, 43-52, 2002.
 14. Cohen, Y. : Biofiltration - the treatment of fluids by microorganism immobilized into filter bedding material, a review. *Bioresource Technology*, **77**, 257-274, 2001.
 15. Lu, C., Lin, M. R. and Chu, C. : Temperature effects of trickle bed biofilter for treating BTEX vapors. *Journal of Environmental Engineering*, **125**, 775-779, 1999.
 16. 양창술, 김종식 역 : 토양미생물실험법, 월드사이언스, 226-233, 2002.