



혐기소화액에서 분리한 아질산 산화세균의 성장특성

장현민, 장재은, 김영준[†]

가톨릭대학교 생명환경공학부 환경공학전공

(2010년 3월 9일 접수, 2010년 3월 19일 수정, 2010년 3월 23일 채택)

Growth Characteristics of Nitrite Oxidizing Bacteria Isolated from Anaerobic Digestion Liquor

Hyun-Min Jang, Jae-Eun Jang, Young-Jun Kim[†]

School of Biotechnology and Environmental Engineering, The Catholic University, Bucheon, Korea

ABSTRACT

Two nitrite oxidizing bacteria, NOB1 and NOB2, were isolated from anaerobic digester liquor of food wastewater and analyzed for their growth characteristics and the ability to oxidize nitrite under different temperature, pH, and DO (dissolved oxygen) concentrations. Both of the isolated strains have shown the best growth at pH 7.0 and at 35°C, and also shown higher growth rate with the increasing dissolved oxygen concentrations. As the factors to restrict the growth of these strains, parameters such as pH and DO were found to be effective ones, by increasing (up to 9.0) or decreasing pH (up to 5.0), or lowering DO below 1.0 ppm. Especially, the ability to oxidize nitrite in both strains was about 50% lower in below 1.0 ppm of DO than above of 1.0 ppm. NOB2 was found to be two times greater in both the growth rate and the nitrite-oxidizing ability than NOB1.

Keywords : Partial nitrification, Nitrite oxidizer, Anaerobic digestion liquor, Isolation of Bacteria

초록

음식물류폐기물 혐기소화액으로부터 아질산성 질소를 산화하는 세균 2종, NOB1 과 NOB2를 분리하여 이들의 아질산성 질소산화능 및 온도, pH, 용존산소의 농도에 따른 성장특성을 조사하였다. 분리된 두 균주 모두 최적의 성장조건은 pH 7.0과 배양온도 35°C로 나타났으며 용존산소의 농도가 높을수록 성장율이 상

[†]Corresponding author : yjunkim@catholic.ac.kr

승하는 것으로 나타났다. 두 균주의 성장을 억제하는 요인으로는 pH와 용존산소가 효과적인 것으로 나타났는데, pH 5.0 및 9.0에서, 용존산소 1.0 ppm 이하에서 성장율이 현저히 감소하는 결과를 보여주었다. 특히, 아질산성 질소의 산화능력은 1.0 ppm 이하의 농도에서 1.0 ppm 이상에서 보다 약 50% 감소하는 것으로 나타났다. 두 균주의 생성율 및 질소산화능은 NOB2가 NOB1에 비해 약 2배 이상 높은 것으로 조사되었다.

핵심용어 : 부분적 질산화, 아질산 산화세균, 혐기소화액, 미생물분리

1. 서론

아질산 산화세균은 아질산을 질산으로 산화시키는 세균으로 생물학적 폐수처리시 주요한 질소처리 과정을 담당하는 세균이다. 일반적으로 생물학적 폐수처리를 수행하는 과정에서 질소처리는 폐수내 유기물로부터 유리된 암모니아가 아질산과 질산으로 전환되며 질산이 다시 탈질화과정을 거치면서 질소가스로 공기중으로 방출되는 과정을 통하여 이루어진다. 유기물로부터 유리된 암모니아는 일차적으로 암모니아 산화세균에 의하여 아질산으로 전환되며 이는 곧바로 아질산 산화세균에 의해서 질산으로 전환된다. 이러한 과정을 질산화과정이라 한다. 질산화 과정을 거치며 전환된 질산은 탈질화세균에 의하여 다시 아질산으로 전환되고 이는 동일한 세균에 의해 몇 단계의 생화학적 변환과정을 거치며 질소가스로 생성되는 데 이와 같은 과정을 탈질화과정이라 한다. 이와 같이 통상의 생물학적 질소처리과정은 질산화 및 탈질화 등, 몇 단계의 생물학적 과정을 통해서 완성되는 과정이다. 탈질화과정에 관여하는 세균들은 질산을 환원하기 위하여 적절한 에너지를 필요로 하고 있으며, 일반적으로 하·폐수처리장에서는 외부에너지원으로 메탄올 등을 사용하고 있다.

한편, 유기성폐기물의 혐기소화 후 발생한 소화액과 같이 고농도의 암모니아를 함유하고 있는 폐수의 경우에는 이를 처리하기 위하여 다량의 외부탄소원을 공급해야 하는데 이때 공급되는 외부탄소원의 고비용문제로 혐기소화에 의한 바이오에너지의 회수라는 장점에도 불구하고 경제성이 담보되지 않고 있는 실정이다. 이를 해결하기 위하여 다양한 고농도 질소처리방법들이 연구되고 있으며 부분적 질산화

공정 (Sharon process)이 그 대안으로 떠오르고 있다^{1)~3)}.

부분적 질산화공정이란 암모니아-아질산-질산으로 이어지는 질소산화 과정 중 아질산-질산의 회로를 차단하여 질산화와 탈질화시에 소요되는 산소 투입비용과 외부탄소원의 공급을 줄여 경제적 효율성을 제고시키려는 새로운 공법으로 네덜란드의 Delft 공대에서 개발된 Anammox 공정과 연계하여 많은 연구가 이루어지고 있다^{4)~6)}. 아질산-질산의 회로를 차단하기 위해서는 이를 담당하는 아질산 산화세균의 활성을 억제하는 것이 중요하므로 이를 수행하기 위해서는 아질산 산화세균의 생리특성을 파악하는 것이 우선이다.

이에 본 연구는 아질산 산화세균을 혐기소화액으로부터 분리하고 그 성장특성을 파악함으로써 소화액의 부분적 질산화공정에 의한 질소처리시 본 세균의 활성을 억제하기 위한 기초적인 운전인자를 파악하기 위하여 수행되었다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 시료채취, 세균분리 및 배양

본 실험에 사용된 시료는 B시의 하수처리장내 음식물류폐수를 혐기소화 시킨 후 발생한 혐기소화액을 사용하였으며 채취한 시료는 멸균한 유리용기에 담아 실험실로 운반한 후 4℃에 냉장보관하면서 실험에 이용하였다. 채취한 시료로부터 아질산 산화세균을 분리하기 위하여 사용된 배지는 ammonium sulfate가 첨가된 NOB (Nitrite Oxidation Bacteria) 평판배지를 사용하였으며[Table 1], 이후 순수 NOB 배지를 사용하여 아질산성 질소산화 능력을 지닌 균주를 분리하였다.

[Table 1] Chemical Composition of NOB Media

Component	Concentration (g/L)
NaNO ₂	6.6
NaCl	3.0
KH ₂ PO ₄	1.4
CaCO ₃	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
Agar	15.0
pH 6.8~7.0	

2.2 온도, pH, 용존산소(DO)의 변화에 따른 성장특성 실험

분리된 세균을 대상으로 NOB 액체배지에 전 배양한 후 일정량을 100mL의 NOB 액체배지가 첨가된 250mL 삼각플라스크에 접종하고 pH 및 온도를 달리 하여 배양하면서 각 배양액으로부터 6시간 간격으로 시료를 채취한 후 spectrophotometer (Hitachi, Ltd.)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장곡선을 도출하였다. 용존산소의 농도에 따른 균주의 성장특성 및 아질산성 질소의 산화실험은 4L의 유효용적(총 용적 5L)을 가진 회분식반응조(Biotron)를 이용하여 실험하였다. 회분식반응조를 이용한 실험에서는 배지로 합성폐수를 사용하였으며[Table 2], 최적배양조건인 pH 7.0 및 35°C에서 용존산소의 농도를 변

화시켜 72시간동안 배양하면서 배양상등액을 취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장곡선을 도출하는 한편 아질산성 질소의 산화정도를 측정하였다.

2.3 이화학적 분석

DO(용존산소)측정은 YSI사의 Model 58 DO meter를 이용하였고, Hach사의DR/4000U spectrophotometer를 이용하여 암모니아성 질소(NH₃-N, vial 26045-00), 아질산성 질소(NO₂-N, vial 26083-25), 질산성 질소(NO₃-N, vial 26053-00)의 농도를 제작사의 안내문에 따라 측정하였다

3. 결과 및 고찰

3.1 아질산성 질소산화균의 분리

B시의 하수처리장내 음식물류폐수를 혐기소화시킨 후 발생된 혐기소화액을 대상으로 아질산성 질소산화세균을 분리하였다. 아질산 산화세균의 생장은 주로 암모니아 산화세균의 대사물질에 의존하고 있으며 이는 종종 암모니아 산화세균과 군집을 형성하는 경향이 있으므로 초기 균주분리의 수월성을 위하여 암모니아가 첨가된 NOB 고체배지를 이용하여 형성된 콜로니(colony)를 대상으로 암모니아가 배제된 순수 NOB 배지에 재차 도말하여 최종적으로 아질산성 질소를 산화하는 균주를 분리하였다. 암모니아가 첨가된 1차 배지에서 10일후 생성된 콜로니 중 각각 다

[Table 2] Chemical Composition of Synthetic Wastewater

Component	Concentration (mg/L)	Component	Concentration (mg/L)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	7	MgSO ₄ · H ₂ O	5
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1	NaHPO ₄ · 12H ₂ O	29
KCl	7	NaHCO ₃ (as CaCO ₃)	7.13g/g NH ₄ ⁺ -N
KH ₂ PO ₄	11	NaNO ₂	500

른 형태의 콜로니를 NOB 배지에 재접종한 후 35°C에서 약 10일간 배양한 결과 콜로니의 형태와 크기에 차이를 보이는 2종류의 균주 NOB1과 NOB2를 분리하여 이들의 성장특성실험 및 아질산성 질소산화능을 분석하였다.

3.2 환경변화에 따른 분리균주의 성장특성 및 아질산성 질소 산화

분리된 NOB1, NOB2 균주를 대상으로 산도 및 배양온도에 따른 성장특징을 파악하고자 NOB 액체배지에 균을 접종한 후 pH 5.0, 7.0, 9.0하에서 온도를 각각 25°C, 35°C, 45°C로 조정하여 배양하면서 72시간 동안 흡광도를 조사하였다. NOB1의 경우, 최적 성장조건은 pH 7.0과 배양온도 35°C로 나타났다 [Fig. 1]. pH 5.0과 9.0의 산도와 알칼리도가 비교적 높은 조건하에서는 온도의 영향에 관계없이 생장이 크게 저하되는 것으로 나타났다. 이는 아질산 산화세균이 암모니아 산화세균에 비해서 pH의 변화에 매우 민감하게 반응한다는 기존의 보고를 상기시키는 결과로써 Anthonisen 등은 배양액내 산도를 증가하거나 감소시킬 경우 아질산 산화세균의 생장이 급격히 억제된다고 보고하고 있다⁷⁾.

한편, 온도의 영향을 살펴보면, 비교적 중온인 25°C에서 낮은 성장율을 보이고 있는 반면 35°C에서 최적의 성장율을 나타냈고 비교적 고온인 45°C에서도 성장율이 유지되고 있는 것이 관찰되었다. Randall 등은⁸⁾ 아질산 산화세균이 암모니아 산화세균에 비하여 중온이상의 높은 온도에서 비교성장율이 낮은 것으로 보고하고 있는데 본 세균의 경우에는 추후 암모니아 산화세균과의 성장실험을 비교함으로써 온도에 따른 세균의 성장제어가 가능할 것으로 사료된다.

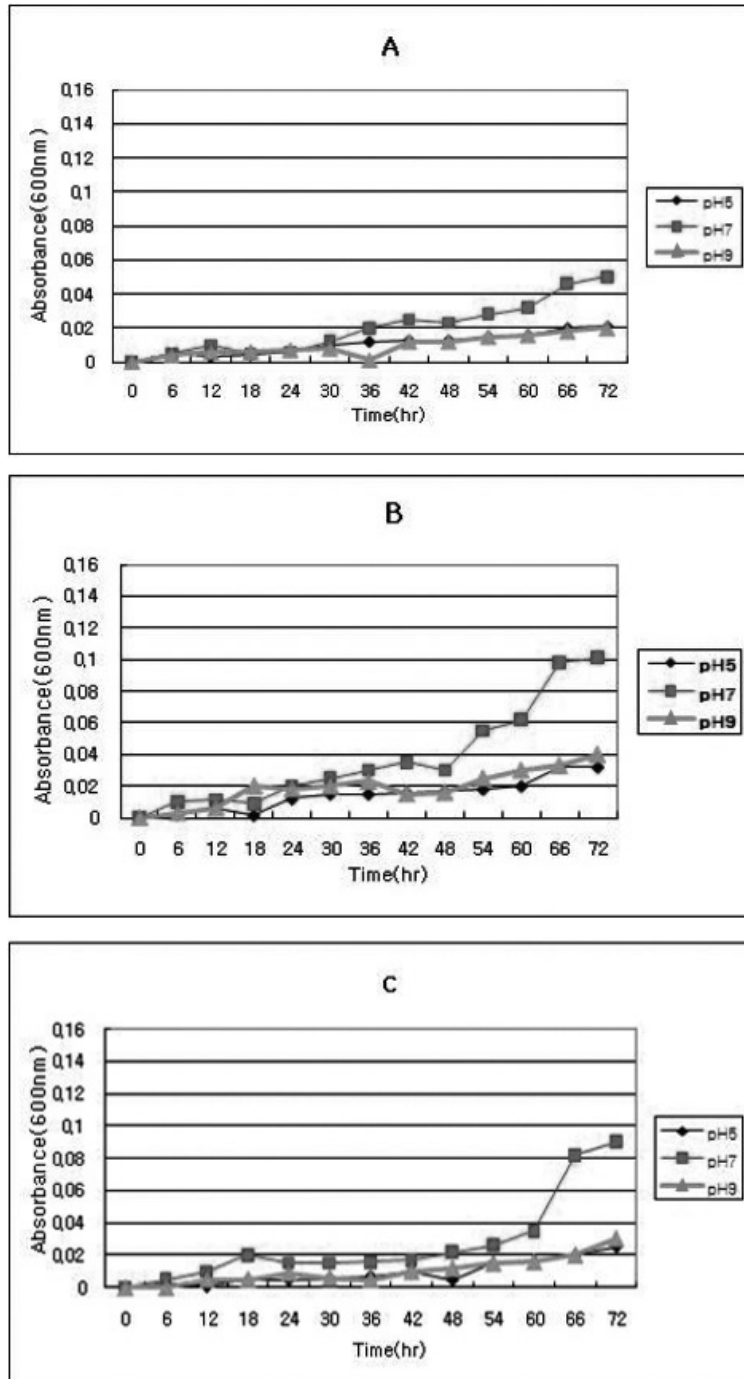
NOB2의 경우에도 pH 7.0과 35°C의 배양온도에서 최적의 성장곡선을 나타내며 pH의 변화에 민감하게 반응하는 등, NOB1과 거의 유사한 특징을 보여주고

있으며 성장율은 NOB1과 비교하여 다소 앞서는 것으로 나타났다 [Fig. 2].

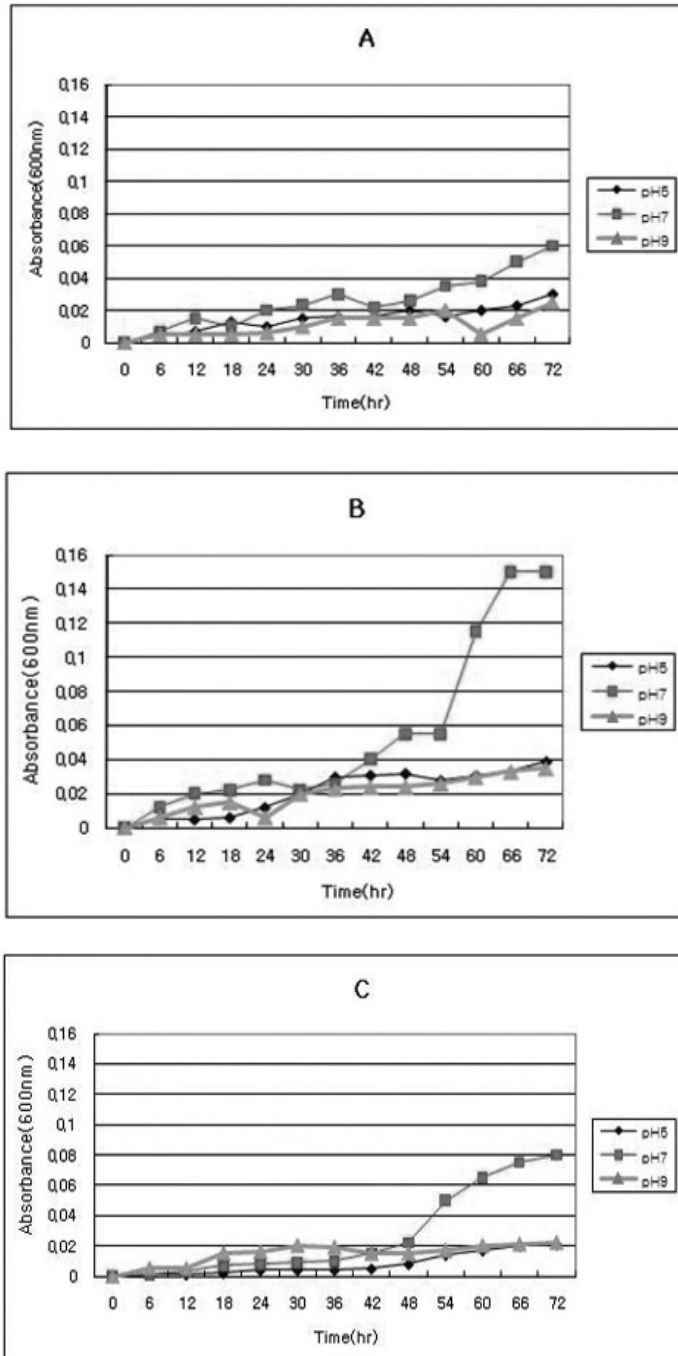
균주의 최적 성장조건인 pH 7.0과 35°C의 배양온도에 DO (용존산소) 1 ppm 이하, 1~2 ppm, 2 ppm 이상의 세 조건에서 두 균주의 성장곡선을 조사하였다 [Fig. 3]. 두 균주 모두 1 ppm 이하의 DO에서 현저하게 생장이 억제되고 있는 것으로 나타났고 2 ppm이상에서 높은 성장율을 보이고 있음을 관찰하였다. 이는 아질산 산화세균이 암모니아 산화세균에 비해 용존산소에 더 민감하게 반응하고 있다는 기존의 연구결과와 일치하고 있음을 보여주고 있다⁹⁾. 이상의 결과들은 Bernet 등이 보고한 바와 같이 부분적 질산화공정을 유도하기 위하여 용존산소 및 산도 등이 매우 중요한 조절인자가 되고 있음을 보여주는 결과라 할 것이다¹⁰⁾.

3.3 분리균주의 아질산성 질소 산화능 비교

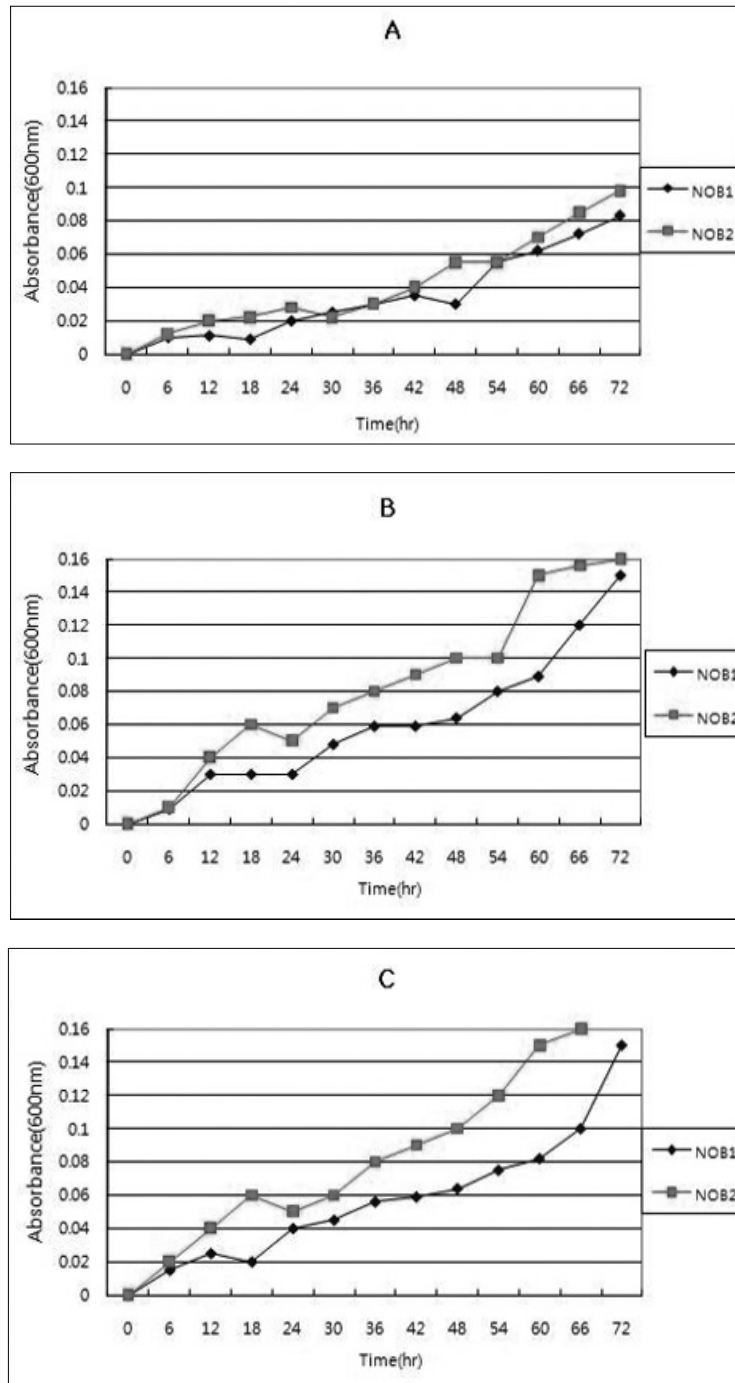
분리한 두 균주 NOB1과 NOB2의 아질산성 질소 산화능력을 비교하기 위하여 두 균주의 최적배양조건인 pH 7.0과 35°C의 배양조건에서 합성폐수를 이용하여 14일 동안 배양한 후 아질산성 질소의 농도를 측정하여 감소율 (배양 14일후 아질산성 질소 농도/최초배양일의 아질산성 질소 농도 x 100%)을 조사하였다. DO농도가 1 ppm 이하에서 NOB1의 아질산성 질소 산화율은 8.33%, NOB2의 경우, 19.35%를 나타냈으며, DO농도 1~2 ppm에서는 NOB1이 16.13%, NOB2가 37.01%로 NOB2가 2배 정도 산화능력이 뛰어난 것으로 나타났다. 이는 아질산 산화세균의 종류에 따라 질산화능력 및 성장율에 차이가 있음을 보여주는 결과로써 향후 부분적 질산화공정을 설계하는 과정에서 아질산 산화세균의 생리, 생태학적 특성을 면밀히 연구하여 효율적인 제어 운전인자를 도출하는데 활용되어야 할 것으로 사료되는 바이다.



[Fig. 1] The effect of temperature and pH on the growth curve of NOB1.
 A: growth curve at 25°C, B: at 35°C, C: at 45°C, ●: at pH 5.0, ■: at pH 7.0, ▲: at pH 9.0



[Fig. 2] The effect of temperature and pH on the growth curve of NOB2.
 A: growth curve at 25°C, B: at 35°C, C: at 45°C, ●: at pH 5.0, ■: at pH 7.0, ▲: at pH 9.0



[Fig. 3] The effect of DO on the growth of NOB1 and NOB2.

A: growth curve at DO < 1 ppm, B: at 1 ppm < DO < 2 ppm, C: at DO > 2 ppm, ◆: NOB1, ■: NOB2

4. 결론

본 연구에서는 유기성폐기물의 혐기성소화액과 같이 고농도 암모니아 폐수를 저비용 고효율로 처리하기 위한 폐수처리방법의 일환으로 최근 각광을 받고 있는 Sharon-Anammox 공정중 전 단계로써 아질산의 축적과정을 유도하기 위하여 아질산성 질소의 산화를 담당하는 세균을 혐기소화액으로부터 분리하여 그 성장 특성을 조사하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 음식물류폐기물의 혐기소화액으로부터 아질산성 질소를 산화하는 세균 2종, NOB1과 NOB2를 분리하였다.
2. 분리된 두 균주의 최적 성장 pH 및 온도는 각각 pH 7.0과 35℃로 조사되었다.
3. 분리된 두 균주 모두 pH가 낮거나 (pH 5.0) 높은 수치 (pH 9.0)에서 생장율이 크게 저하되고 있음이 관찰되었으며, 배양액내 용존산소의 농도역시 균주의 생장율에 큰 영향을 끼치고 있는 것으로 나타났다.
4. 두 균주 모두 아질산성 질소의 산화능력은 용존산소 1.0 ppm 이하의 농도에서 1.0 ppm 이상에서 보다 약 50% 감소하는 것으로 나타났다.
5. 분리된 두 균주는 아질산성 질소의 산화능력 및 생장율에 차이를 보였으며 NOB2가 NOB1에 비해 2배 이상 높은 것으로 나타났다.

사사

본 연구는 2009년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김현아, 이경하, 이대성, “SHARON-ANAMMOX 공정 공정개요, 디자인, 경제성검토”, DICER TechInfo Part I, 11, pp. 337~351 (2007).
2. Hellinga C, Schellen A AJC, Mulder, JW, van Loosdrechet, MCM, Heijnen JJ., “The SHARON process, an innovative method for nitrogen removal from ammonia rich wastewater”, Water Sci Technol., 37, pp.

- 135~142 (1998).
3. Shiha B, Annachhatre AP., “Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved”, Rev Environ Sci Biotechnol., 6, pp. 285~313 (2009).
4. Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G., “Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor.”, FEMS Microbiol Ecol, 16, pp. 177~184 (1995).
5. Strous, M., van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M., “Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations”, Water Res., 31, pp.1955~1962 (1997).
6. Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, MSM. and Strous, M., “New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater”, FEMS Microbiol. Rev., 27, pp. 481~491 (2003).
7. Anthonisen AC, Loehr RC, prakasam TBS, Srinath EG., “Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid.”, J water Pollut Control Federation, 48, p. 835 (1976).
8. Randall CW, Buth D., “Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects”, J Water Pollut Control Federation, 56, p. 1039 (1984).
9. Garrido JM, Van Benthum WAJ, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ., “Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor.”, Biotechnol Bioeng., 53, p. 168 (1997).
10. Bernet N, Peng D, Delgenes JP., Moletta R, “Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor.”, J. Environ. Eng., 127, p. 266 (2001). 