

종속영양 질산화- 호기적탈질 세균 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y의 분리와 질소제거 특성

이은영^{1*}, 이창원²

Isolation and Nitrogen Removal Characteristics of Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrifying Bacteria, *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y

Eun Young Lee^{1*} and Chang Won Lee²

접수: 2013년 12월 30일 / 게재승인: 2014년 2월 15일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: CW-4Y was identified as *Stenotrophomonas* sp. by morphological and physiological characteristics, and phylogenetic analysis of its 16S rDNA gene sequence. Nitrogen removal by CW-4Y was analyzed in relation to the ammonium concentration, presence of organic carbon, carbon source, and carbon-to-nitrogen ratio (C/N). *Stenotrophomonas* CW-4Y has heterotrophic nitrification and aerobic denitrification abilities. *Stenotrophomonas* CW-4Y utilized only glucose as carbon sources, and heterotrophic nitrification and aerobic denitrification were observed regardless of the type of nitrogen source. The maximum ammonium removal rate of CW-4Y was 80 mg-N·L⁻¹·d⁻¹ and its denitrification rate of 192 mg-N·L⁻¹·d⁻¹ at NO₃⁻-N (about 280 ppm) in shake culture experiments at a C/N ratio of about 15 was about 30 times higher than those of other bacteria with the same ability.

Keywords: Heterotrophic nitrification, Aerobic denitrification, *Stenotrophomonas* sp. Ammonia

1. 서론

질소는 생물의 주요 영양소이며, 질소 순환은 육지 생태계와 수 생태계에서 그리고 연결고리에서 미생물이 중요한 역할을 한다. 이때 수 생태계에 막대한 양의 질소가 순환하지 않을 경우 부영양화 등의 환경문제가 발생된다. 질소 유입의 주 경로는 축사 및 양계사의 분뇨가 함유된 폐수이다 [1]. 각종 폐수에서 질소를 제거하는 과정은 주로 호기적 환경의 독립 영양성 질산화균과 혐기적인 환경에서의 종속영양성 탈질세균의 상호작용의 결과로 나타난다. 질산화세균은 호기적 환경에서 암모니아를 아질산을 거쳐 질산으로 산화시켜준다. 탈질세균은 혐기적 환경에서 질산염이 산소대신 최종 전자 수용체로 작용하여 환원되면서 에너지를 생산하는 과정으로 질산을 아질산으로 환원시켜주고 이는 다시 NO, N₂O의 중간 대사체를 거쳐 가스상의 질소로 전환된다 [2]. 하수처리장에서 질소제거에 이용되는 대표적인 질산화 미생물은 *Azotobacter*, *Azomonas*, *Clostridium*, *Nitobacter*, *Nitrosomonas*와 *Nitrospira*가 알려져 있으며 탈질화 미생물은 주로 혐기적 상태에 생존하는 미생물로 *Agrobacter*, *Camphylobacter*, *Eikenella*, *Flavobacter*, *Kingella*, *Moraxella*, *Morococcus*, *Ochrobacterium*, *Oligella*, *Sphingobacterium*, *Tsakamurella* 등이 알려져 있다[3].

그러나, 이와 같은 질소처리과정은 질산화과정을 안정화시키는데 시간이 오래 걸리고 질산화와 탈질과정을 두 개의 별도의 시스템으로 운전해야 한다는 어려운 점이 있다. 두 개의 대사과정은 생리학적 혹은 생화학적인 면에서 구별된다. 질산화 과정에 참여하는 세균의 경우, 유기물에 저해를 받는 반면에 [4], 탈질과정에는 유기물이 필요하다. 산소 요구도 역

¹수원대학교 환경에너지공학과

¹Department of Environmental and Energy Engineering, The University of Suwon

Tel: +82-31-220-2614, Fax: +82-31-220-2533

e-mail: ley@suwon.ac.kr

²도드람 환경연구소

²Dodram Environmental Research Institute

시 상반된 조건인데, 질산화 세균은 폐수의 높은 산소 용해도 (DO)를 요구하나, 탈질세균의 경우 산소는 유독하게 작용하여 무산소조로 운영된다 [5]. 이와 같은 차이는 폐수처리장의 규모를 대형화시키고 초기 건설비를 높게 투자해야 하는 문제점을 유발한다 [6]. 1972년 중속영양성 질산화과정을 하는 *Arthrobacter* sp.가 발견 [7]된 이후, 1983년 *Thiosphaera pantotropha* (*Paracoccus denitrificans*)이 중속영양성 질산화와 호기적 탈질을 수행한다는 것이 폐수처리장의 활성슬러지에서 발견되었다 [8]. 이후 많은 연구가 진행되었으며, 이후 *Alcaligenes faecalis* [2,9], *Bacillus* sp. [10], *Diaphorobacteria* sp. [11], *Acinetobacter calcoaceticus* [12], *Agrobacterium* sp. [13], *Pseudomonas putida* [14], *P. stutzeri* [15], *Microvirgula aerodenitrificans* [16] 등이 발견되었다.

중속영양성 질산화 및 호기적 탈질과정을 통한 질소제거 기작은 다양한 측면에서 유리한 점이 있다. 첫째로, 유기물과 산소를 이용할 수 있는 조건이 동일하여 동시에 질산화와 탈질이 한 반응기 내에서 일어날 수 있다. 둘째로 탈질과정이 진행되는 반응기 내의 pH의 변화를 균형있게 유지시켜서 질산화 과정 중에 일어나는 산성화 과정을 억제해 줄 수 있다. 마지막으로, 중속영양성 질산화의 최종 생성물 및 기질이 다양하기 때문에 다양한 미생물의 혼합배양을 할 수 있고 그 응용 범위도 넓게 확대될 수 있다 [17].

본 연구에서는 암모니아를 제거하기 위한 미생물을 농화배양하는 과정에서 영양배지에서 암모니아를 제거하는 중속영양성 암모니아 산화세균을 분리하게 되었다. 분리세균의 생리학적 특성을 알아보는 과정에서 중속영양적 질산화 및 호기적 탈질이 진행되는 것을 알았으며, 분자생물학적 분석결과 분리된 미생물이 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y로 동정되었다. 지금까지 많은 중속영양적 질산화 및 호기성 탈질균이 발견되었지만, 아직도 별도의 포기조와 무산소조가 운영되고 있음은 현장에서 그 효과를 검증 받지 못했기 때문이며 게다가 효율적인 균주의 개발이 아직 미흡하기 때문이다. 따라서, 본 연구를 통해 기존 알려진 유사 균주와의 비교를 통해 질소제거 능력을 비교하여 보았다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시료채취 및 균주의 분리

본 실험에 사용된 시료는 I시의 공단의 오염된 하천 슬러지를 이용하였으며, 채취한 시료는 직사광선의 차단을 위해 멸균한 1L 갈색 채수병에 넣은 후 4°C 냉장보관을 하여 실험실로 운반하였다.

암모니아를 제거하는 균주를 분리하기 위하여 위의 시료 10 mL을 LB Broth배지 100 mL를 함유한 300 mL 삼각 플라스크에 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 24시간 진탕배양하였다. 물과 혼합하였을 때 암모니아 가스가 발생하는 혼합유박 (질소전량 4%, 인산전량 2%, 가리전량 1%, 피마자박 57%, 채종박 25%, 미강박 18%, (주)케미칼) 0.2 g과 Glucose 0.1%

가 첨가된 증류수 10 mL에 LB Broth배지에서 전배양된 균주 1 mL을 70 mL용량의 바이얼에서 접종한 후 실리콘 스토퍼로 막고 농화배양 하였다 (Table 1). 이 배양액에서 발생하는 암모니아가스를 가스 검지관 (KITAGAWA, Japan)을 이용하여 측정하였다. 측정 후 암모니아 가스의 배출이 균주를 접종하지 않은 대조군에 비해 분해되는 배양액을 다시 5회에 걸친 계대과정 과정을 마친 후 LB Agar 배지에 도말하였다. 형성된 colony를 화염 멸균된 백금으로 streaking 하였다. 이러한 방법을 2~3회 반복한 후 독립된 단일 colony를 배양하여 위와 같은 방법으로 혼합유박과 glucose를 넣은 vial에 접종하여 암모니아가스가 대조군에 비해 분해되는 균주를 최종적으로 선택하였다.

혼합유박의 성분과 C, H, N, S조성은 Table 1에 나타냈으며, C, H, N, S 원소분석은 CHN/S Analyzer (LECO Corp., USA)을 이용하여 분석하였고, 미량원소에 대한 분석은 ICP-OES (Optima 5300DV, Perkinelmer, USA)로 분석하였다.

2.2. 중속영양 질산화-호기적 탈질화 균주의 동정

암모니아 가스 분해 효과가 있는 것으로 관찰된 순수 균주의 colony는 MACROGEN사에 의뢰하여 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다. 이때 primer는 F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')과 R1492 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다.

분석된 염기서열은 The National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm을 통해 Gen Bank database와 비교하여 분리된 미생물을 동정 하였다.

2.3. 분리균 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y의 암모니아 가스 분해 평가

암모니아 가스 분해 능력을 가진 균주의 암모니아 가스 분해 능력을 알아보기 위해 70 mL vial에 혼합유박 0.2 g을 넣고 glucose를 0.1% 함유한 증류수 10 mL에 균주 1 mL을 접종하였다. 배양 2일 째와 7일째 암모니아 가스 검지관 (KITAGAWA, Japan)을 이용하여 암모니아 가스의 농도를 측정하였다. 본 실험의 경우 배양온도는 30°C였고, 180 rpm으로 진탕배양

Table 1. Compositions of sesame dregs

CHNS	C	40.24 wt.%(dry basis)	
	H	5.78 wt.%(dry basis)	
	N	5.28 wt.%(dry basis)	
	S	N.D.	
ICP-OES	Qualitative analysis of	Sr, Mg, Ca, K, Na, Al, Si, Fe, Mn, Ti, Er, P, Li, Cu,	
		Zn, Ba, V, Cl, Y, Cr	
ICP	Quantitative analysis of	Cr	17 ppm
		Cu	25.8 ppm
	ICP-OES (PE)	Fe	1145 ppm
		Al	1301 ppm
		Zn	0.1 ppm
Mn	103.8 ppm		

을 실시하였다.

2.4. 배지

순수 분리된 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y의 암모니아 가스 분해 활성테스트를 위하여 인공적으로 배지에 질소원을 첨가한 후 확인하였다. 기본배지로써 황산암모늄 배지를 이용하였고 [2], 중류수에 K_2HPO_4 14 g, KH_2PO_4 6 g, trisodium citrate dihydrate 17 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g 그리고 trace mineral solution을 2 mL 넣어 1 L로 만들었다. Trace mineral solution은 다음과 같은 성분을 포함한다: ethylenediamine - N, N, N', N'- tetra acetic acid, di sodium salt dehydrate ($EDTA_2Na$), 57.1 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 9 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 7 g/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 5.1 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0 g/L; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1.1 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.6 g/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (pH=6.0), 1.6 g/L.

2.5. 호기적 배양 조건

탄소원은 기본배지에서의 glucose 대신 구연산 (citrate)염이 사용하였으며, 질소원으로는 기본배지에서의 황산암모늄 ($(NH_4)_2SO_4$) 대신에 질산암모늄 (NH_4NO_3)이 사용되었다. 기본배지 (100 mL)는 250 mL 삼각플라스크에 담았으며, 입구 부분은 실리스토퍼를 이용하여 막았다. 분리 균주 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y를 멸균된 LB Broth에 접종되어 30°C, 180 rpm으로 24시간 전배양을 한 후, 5 mL를 분취하여 새로운 활성테스트 배지에 접종하였다. NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- 이온, pH, 및 OD 측정을 위해 접종 직후 그리고 24시간 간격으로 3 mL씩 분취하였으며 시간(일)의 경과에 따라 관찰하였다. 일정양의 황산암모늄에 다양한 농도의 탄소원을 첨가하여 C/N 비율을 5, 10, 20, 30에 맞추어 그에 따른 암모니아 및 질산염의 제거율을 알아보았다.

2.6. 혐기적 배양 조건

분리 균주 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y의 혐기적 (정치) 배양은 500 mL 혈청병을 이용하여 혐기적 조건하에서 수행되었다. 혈청병에 각각 황산암모늄과 질산암모늄을 넣은 합성배지 100 mL을 분주한 후 butyl rubber stopper와 aluminum cap을 이용하여 밀봉하였다. 그 후 혐기적 조건을 조성하기 위하여 질소 (99.9%)가스로 치환한 후 24시간 LB Broth배지에서 전배양한 CW-4Y균주를 syringe를 이용하여 5 mL씩 접종하였다. 30°C의 인큐베이터에서 정치배양을 한 후 접종 직후 그리고 24시간 간격으로 3 mL 분취하여 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 이온농도를 분석하였으며, pH, OD 측정을 하였다. 시료 채취하는 혐기적 상태를 유지하기 위하여 syringe를 사용하여 분취하였다.

2.7. 호기적 반응기 운전조건

호기적 탈질화 반응을 확인하기 위하여 유리재질의 6L (17.5 \times 25.5H)의 반응기 (Fig. 1)에 3 L의 배지를 넣고 멸균한 후 전배양된 균주를 접종한 후 실험하였다. 반응기에는 DO

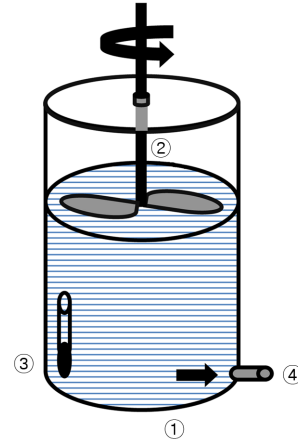


Fig. 1. Schematic diagram of aerobic bioreactor. ① Bioreactor (6 L; 17.5 \times 25.5H); ② Impeller; ③ DO Meter; ④ Sampling port.

meter 등이 연결되어 내부 반응기의 환경조건을 모니터링할 수 있도록 제작되었다. $NaNO_3$ 와 glucose를 C/N비 15로 조절하였으며, 초기 배지의 pH는 7.14였으며, NO_3^- -N의 농도는 184 ppm, NO_2^- -N의 농도는 0 ppm이었다. 배양 온도는 30°C로 조절해주었다. 그리고 공급되는 에어의 양과 배지의 수면에 위치한 impeller의 교반 속도는 50 rpm에서 200 rpm 사이로 조절하여 공기중의 산소가 녹아 들게 하여 배지 내의 DO농도를 조절해주었다. Sampling port로부터 syringe를 이용하여 하루에 한번씩 5 mL의 가스를 취하여 분석하였다.

2.8. 분석방법

NH_4^- -N의 농도, NO_2^- -N 및 NO_3^- -N의 농도는 (주)씨맥 (C-MAC)사의 시약을 이용하여 분광광도계 (DR5000 UV; HACH, USA)를 이용하여 측정하였다. DO는 DO meter (KPK Co., DO-5Z)을 이용하여 측정하였다. 액체 배양된 균의 광학밀도는 분광광도계 (DR5000 UV; HACH, USA)를 이용하여 660 nm에서 OD를 측정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 암모니아 가스 분해효과

Table 2에는 I 공단 내의 다양한 지역에서 채취한 슬러지를 LB배지에서 전배양한 후 두 개의 실험군으로 접종한 후의 암모니아 가스 제거율을 나타내었다. 두 실험군은 각각 0.1% Glucose를 넣은 것과 Glucose를 넣지 않은 것으로 구분하였다.

제거율은 다음과 같이 계산하였다.

암모니아 제거율 (%) =

$$\frac{\text{Control의 암모니아 (ppm)} - \text{Sample의 암모니아 (ppm)}}{\text{Control의 암모니아 (ppm)}} \times 100$$

Table 2. Effect of glucose concentration on the ammonia removal

Sample	Ammonia	Measurement day	Glucose 0% in sesame dregs	Glucose 0.1% in sesame dregs
Control	Ammonia concentration (ppm)	3rd	3	24.6
		7th	53.4	70.6
A	Removal of ammonia (%)	3rd	0	93.5
		7th	0	66.9
B	Removal of ammonia (%)	3rd	0	-5
		7th	0	-23
C	Removal of ammonia (%)	3rd	0	4.9
		7th	0	-28
D	Removal of ammonia (%)	3rd	-9.9	-8.5
		7th	27.4	13.5
E	Removal of ammonia (%)	3rd	26.3	21
		7th	32.1	0
F	Removal of ammonia (%)	3rd	-35.4	12
		7th	42.9	0
G	Removal of ammonia (%)	3rd	13.5	21
		7th	34	0

축산농가 내의 분뇨 슬러리, 주변 토양 및 하수처리장의 활성슬러지 등의 다양한 환경으로부터 채취한 총 7개의 실험군 중 A 실험군에서 0.1%의 Glucose를 첨가한 경우, 3일째 암모니아가스의 제거율이 93.5%, 7일째 66.9%로 나타났으며, 이는 모든 실험군에서 가장 우수한 제거율을 보여주는 것이었다. 이후 A 실험군에서 배지 종류를 다양하게 하여 순수분리를 하였다. 이로부터 분리된 CW-4Y균주의 암모니아가스 제거율은 3째 100%의 제거율을 보여주었다.

3.2. 계통학적 특성

암모니아 가스분해 능력이 가장 높았던 CW-4Y에 대한 계통학적 특성을 알아보았으며, 분석된 CW-4Y의 DNA 염기서열은 총 1451 bp였고, NCBI Blast search한 결과 CW-4Y는 *Stenotrophomonas* sp. M2T2B9 (NCBI accession number: GQ246699)와는 1447/1450 (99%)의 상동성을 보였다. 또한, 가열할 경우 열 분해되어 독성을 가진 염화물, 질소산화물, 황산화물, 인산화물 등을 방출하는 유독물질인 클로르피리포스를 분해하는 *Stenotrophomonas* sp. YC-1 (NCBI accession number: DQ537219)와는 1449/1453 (99%)의 상동성을 보였다. 그리고, 클로르피리포스를 분해하는 것으로 보고된 *Stenotrophomonas* sp. Dsp-4 (NCBI accession number: DQ482654)와 1449/1453 (99%)의 상동성을 가진 채 가장 유사하였다. 지금까지 알려져 있는 질산화 미생물로는 *Azotobacter*, *Azomonas*, *Clostridium*, *Nitobacter*, *Nitrosomonas*와 *Nitrospira*가 알려져 있으며, 혐기적 탈질화 미생물은 *Agrobacter*, *Camphylobacter*, *Eikenella*, *Flavobacter*, *Kingella*, *Moraxella*, *Morococcus*, *Ochrobacterium*, *Oligella*, *Sphingobacterium*, *Tsukamurella* 등이 알려져 있다. 본 연구에서 분리된 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y는 지금까지 보고된 암모니아 분해 미생물과는 다른 *Stenotrophomonas* sp.이며 기존 data base에 있는 *Stenotrophomonas* sp. M2T2B9 (GQ246699), *Stenotrophomonas* sp. YC-1 (DQ537219), 및 *Stenotrophomonas* sp. Dsp-4 (DQ482654)의

염기서열과의 상동성은 모두 99%이었다.

3.3. 질소원에 따른 암모니아 분해능력 평가

탄소원으로 glucose를 이용하고, 두 종류의 질소원에 대한 분리균주 CW-4Y의 활성을 호기적 진탕배양 조건에서 확인하였다 (Fig. 2). 일반적으로 미생물은 C/N비 10에서의 성장과 기질이용도가 높다고 잘 알려져 있다. 따라서, 초기 질소원에 따른 실험을 수행할 때의 C/N비는 모두 10으로 설정하였다.

질산암모늄 (NH₄⁺NO₃⁻)을 질소원으로 넣어준 배지는 CW-4Y를 접종 후 5일째 초기 농도인 NH₄⁺-N 192 mg/L 중 평균 143.3 mg/L를 분해하였으며, NO₃⁻-N는 초기 농도인 282 mg/L를 2일째까지 256 mg/L을 분해하여 128 mg-N·L⁻¹·d⁻¹의 빠른 제거 속도를 보여주었다 (Fig. 2(A)). 반면, 황산암모늄(NH₄)₂SO₄을 질소원으로 넣어준 배지에서는 초기 NH₄⁺-N 농도 448 mg/L를 5일째까지 160 mg/L을 분해하였으며, 제거 속도는 32 mg-N·L⁻¹·d⁻¹로 질산암모늄을 질소원으로 넣어준 배지와 거의 유사한 NH₄⁺-N의 제거 속도를 보여주었다 (Fig. 2(B)). 그러나 NO₃⁻-N는 배지에서는 초기 NO₃⁻-N 농도 22 mg/L를 5일째까지의 제거속도는 0.5 mg-N·L⁻¹·d⁻¹으로 질산암모늄을 넣어준 배지의 제거속도의 약 100배 이상의 차이가 있는데 이것은 실험 초기의 질산암모늄 농도에 기인한 결과라 사료된다.

황산암모늄배지와 질산암모늄 배지 모두 접종 후 2일째 최대 제거 속도로 NH₄⁺-N와 NO₃⁻-N를 제거하였으며, 이는 2일째 CW-4Y의 성장이 대수증식기로 인한 것으로 사료된다. 각각의 최대제거 속도는 황산암모늄배지에서 NH₄⁺-N이 74.3 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, NO₃⁻-N이 3.3 mg-N·L⁻¹·d⁻¹이었고, 질산암모늄 배지에서 NH₄⁺-N는 80 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, NO₃⁻-N이 192 mg-N·L⁻¹·d⁻¹로 높은 제거 속도를 보여주었다.

Joo 등 (2006)의 *Alcaligenes fecaelis* No.4를 이용한 축산분뇨 정화처리를 연속공정으로처리하는 연구에서 초기값이 2000 NH₄⁺-N mg/L일때 30 mg-N·L⁻¹·d⁻¹의 제거율을 보였다.

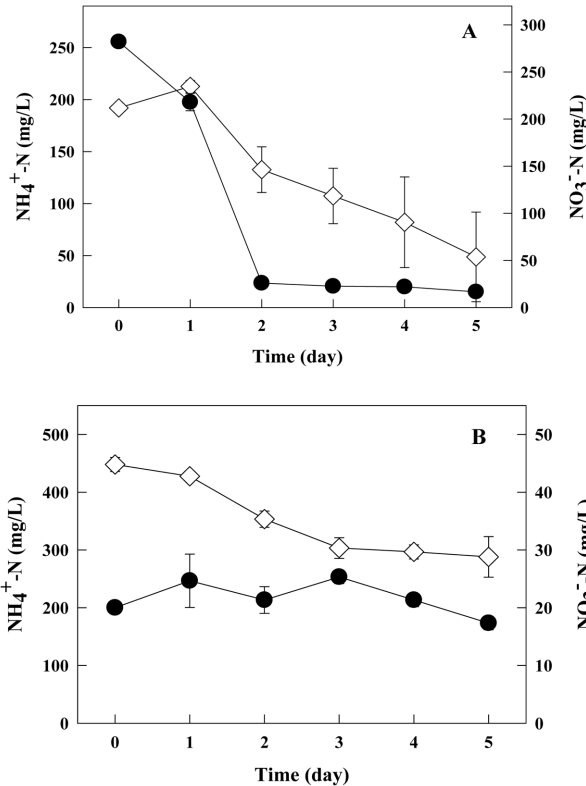


Fig. 2. Effect of Nitrogen source on the ammonium and nitrate removal of *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y in an aerobic culture. (A) Medium containing NH₄NO₃, (B) medium containing (NH₄)₂SO₄. (◇ NH₄⁺-N; ● NO₃⁻-N)

이는 기존의 연구에 비해 5~10배 높은 속도를 보였다고 하였다 [18]. 본 연구는 인공 합성폐수의 초기농도가 192~448 NH₄-N mg/L로 Joo 등 (2006)에 비해 다소 낮은 값을 보이거나 그 제거 속도는 2.5~2.6배 가량 높았다. *Rhodococcus* sp. CPZ 24를 이용한 삼각플라스크 실험에서는 초기 암모니아의 농도값이 50 NH₄-N mg/L이었을 때, 3.1 mg-N·L⁻¹·h⁻¹의 제거율을 보였다 [19]. Su 등 (2006)의 연구에서는 *Pseudomonas alcaligenes* AS-1가 1.15 mg-N·L⁻¹·h⁻¹의 암모니아 제거율을 보였으며 [20], Zhao 등 (2010)의 연구 [21]에선, *Bacillus* sp. LY가 초기 암모니아의 농도값이 41 NH₄-N mg/L이고, C/N비가 15이었을 때, 0.43 mg-N·L⁻¹·h⁻¹의 제거율을 보였다. 본 연구에서 얻은 암모니아 제거율을 시간단위로 환산할 경우, 3.1~3.33 mg-N·L⁻¹·h⁻¹의 제거율을 보이므로 초기 값이 기존 발표보다 약 3.8~9배 가량 높은 것을 감안하면 매우 효과적인 제거효율을 보이는 것을 알 수 있었다.

3.4. 탄소원에 따른 암모니아 분해능력 평가

질소원으로 (NH₄)₂SO₄를 넣고 두 종류의 탄소원이 첨가된 조건에 따라 CW-4Y의 NH₄⁺-N과 NO₃⁻-N의 제거능을 알아보았다. 실험은 진탕배양 조건으로 하였으며 실험초기의 C/N비는 참고문헌 등에 의거하여 10으로 설정하였으나, 이후 적절

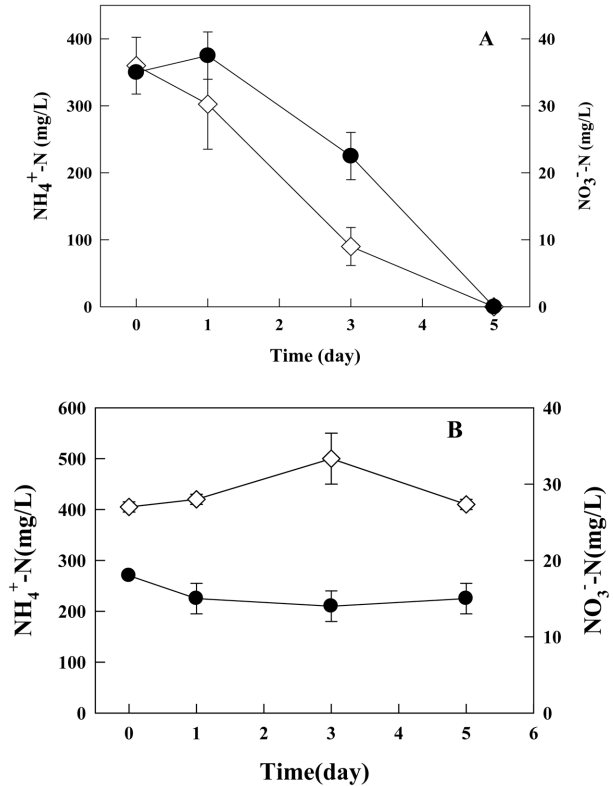


Fig. 3. Effect of Carbon source on the ammonium and nitrate removal of *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y in an aerobic culture A, Glucose; B, Citric acid. (◇ NH₄⁺-N; ● NO₃⁻-N)

한 C/N비 조건을 찾은 후 16으로 다시 조절하였다.

Fig. 3(A)를 보면 glucose를 탄소원으로 넣어준 배지는 CW-4Y를 접종 후 5일째 NH₄⁺-N 360 mg/L과 NO₃⁻-N 35 mg/L는 완벽히 분해되었다. 즉, NH₄⁺-N과 NO₃⁻-N를 동시에 분해를 할 수 있는, 질산화와 탈질화가 동시에 이루어진다고 할 수 있다. 반면 Fig. 3(B)인 구연산염 (citric acid)을 넣어준 배지에서는 NH₄⁺-N과 NO₃⁻-N 모두 분해되지 않는 모습을 보여주었는데 이는 CW-4Y 균주는 탄소원으로 glucose를 쉽게 이용할 수 있으며, 반면에 구연산염은 탄소원으로 이용할 수 없는 것으로 사료된다. Glucose를 탄소원으로 이용하였을 때 NH₄⁺-N의 분해 속도는 72 mg-N·L⁻¹·d⁻¹였으며, NO₃⁻-N의 분해 속도는 7 mg-N·L⁻¹·d⁻¹이었다.

분리 균주와 동일한 활성을 보이는 것으로 알려진 *Agrobacterium* sp. LAD9의 경우 glucose, sucrose 및 기타 4종류의 유기산을 이용하는 실험에서 탄소원에 대한 이용도를 알아본 결과, growth rate는 유사한 (0.14~0.16 h⁻¹) 결과를 보이는 반면, 질소분해 속도는 acetate (0.32 d⁻¹), succinate (0.44 d⁻¹), 및 glucose (0.21 d⁻¹)는 높았고, citrate를 탄소원으로 이용 시 분해 속도 (0.14 d⁻¹)가 낮았다 [13]. Chen과 Ni의 설명에 의하면, citrate를 기질로 이용할 경우 대부분이 biomass의 증가에 이용됨에 따라 미생물의 질산화 속도가 낮아진다고 하였다.

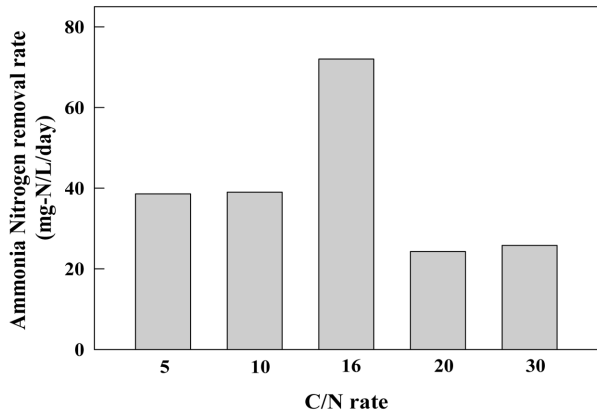


Fig. 4. Effect of C/N ratio of substrate on the ammonium-N removal rate.

3.5. C/N비에 따른 암모니아 분해능력 평가

배지 내의 C/N비의 변화에 따라 분리균주 CW-4Y의 암모니아 제거에 미치는 영향을 알아보았다 (Fig. 4). 일정량의 황산 암모늄이 첨가된 배지에 탄소원으로 이용되는 glucose의 양을 달리하여 C/N비를 각각 5, 10, 16, 20, 30으로 설정한 후 실험을 진행하였다. 일반적으로 미생물은 C/N비 10에서의 성장과 기질이용도가 높다고 잘 알려져 있다. 실험 결과, 분리균 CW-4Y의 경우 C/N비가 5, 10, 16, 20, 30에서 암모니아의 분해속도가 각각 38.6 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, 39 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, 72 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, 24.3 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, 25.8 mg-N·L⁻¹·d⁻¹으로 나타나 C/N비 16에서 가장 높은 것으로 나왔다. 본 연구결과와 비교할 수 있는 호기성 중속영양 질산화 탈질 세균으로 알려진 *Bacillus subtilis* A1은 acetate를 기질로 이용할 경우 초기 암모늄의 농도값이 104.27~110.31 NH₄⁺-N mg/L일 때, C/N비가 6 혹은 12에서 큰 차이 없이 66.5%와 60.3%의 NH₄⁺-N의 분해 효율을 보였으며 [22], *Bacillus* sp. LY의 경우, C/N비가 15이었을 때, 0.43 mg-N/L·h⁻¹의 NH₄-N 제거속도를 보여주었다 [21]. 즉, 중속영양성 질소분해 세균의 경우 기질의 종류와 균주에 따라, C/N비가 6-15사이에서 최고의 암모니아분해 효율을 보임을 알 수 있었다.

3.6. 호기적 (진탕배양) 상태와 혐기적 (정지배양) 상태에 따른 암모니아 및 질산염의 분해

분리 균주 CW-4Y의 NH₄⁺-N 와 NO₃⁻-N의 분해를 산소의 유무에 따라 확인하였다. 호기적 배양과 혐기적 배양 모두 질소원으로는 질산암모늄을 이용하였으며, 탄소원으로는 glucose를 이용하였으며, C/N비는 16으로 맞춰주었다. NH₄⁺-N의 경우 호기적 배양에서 6일간 총 148 mgNH₄⁺-N/L를 분해하였다. 평균제거 속도는 24.7 mg-N·L⁻¹·d⁻¹이었으며, 최대 제거 속도는 2일째 80 mg-N·L⁻¹·d⁻¹의 제거 속도를 보여주었다. 반면에 혐기적 배양의 경우 NH₄⁺-N는 분해되지 않았다 (Fig. 5(A)).

호기적 및 혐기적 배양에서 초기 NO₃⁻-N의 값은 각각 282 mg/L와 277.3 mg/L였다. 각 조건에서 총 237.8 mg/L와 234.7 mg/L의 유사한 양을 분해하였지만 최대제거속도는 호기적

배양에서 2일 동안 192 mg-N·L⁻¹·d⁻¹, 혐기적 배양에서 하루 만에 253.3 mg-N·L⁻¹·d⁻¹의 제거 속도를 보여주었다. Fig. 5(B)에서 보는 바와 같이 혐기적 환경에서 배양된 *Stenotrophomonas* sp. CW-4P균주는 기질로 이용되는 NO₃⁻-N를 하루 만에 91.3%를 제거할 수 있는 것을 알 수 있었다. 이는 기존의 탈질화가 혐기적 조건 하에서 이루어진다는 결과와 같지만 CW-4Y는 호기적 조건 하에서도 NO₃⁻-N를 분해하는 것을 확인할 수 있었다. 이는, 기존에 보고된 *A. faecalis* OKK17의 최대 탈질화 속도는 8.3 mg-N·L⁻¹·d⁻¹인 것에 비해 호기적 배양에서는 약 23배, 혐기적 배양에서는 약 30배나 높은 수치였다 [23].

균주 접종 후 1일 후에 호기적 배양에서 17.3 mg/L의 NO₂⁻-N가 생성되었고, 그 이후는 평균 0.11 mg/L이 측정되었다. 이는 암모늄의 아질산화가 1~2일째 가장 빨리 이루어졌다고 볼 수 있으며, NH₄⁺-N의 최대분해 속도 역시 2일째 80 mg-N·L⁻¹·d⁻¹로 가장 빨랐다. 반면 혐기적 배양에서는 평균 0.06 mg/L의 NO₂⁻-N가 검출되었다.

Fig. 5(E)의 결과에서 보듯이, CW-4Y의 성장은 혐기적 조건에서는 저해를 받으며, 호기적으로 질산화와 탈질이 진행되는 것을 알 수가 있다. 배양 1일 이후부터는 균의 성장이 이루어지지 않으나 호기적 배양에서는 약 3일째까지 급속도로 성장하는 것을 알 수가 있다. 두 실험에서 초기 pH는 6.9이었으며, 6일 동안 pH의 변화는 거의 발견되지 않고 소폭 상승하였다.

3.7. 호기조건에서의 탈질산화

CW-4Y균주를 호기적 조건의 5 L 용량의 반응기에서 NaNO₃과 glucose를 첨가한 배지에서 성장을 측정하였다. Fig. 6에서 보듯이, NO₃⁻-N의 농도가 2일째에서 3일째 170 ppm에서 약 37.3 ppm으로 급격히 분해하였으며, 이 기간 NO₃⁻-N의 분해 속도는 132.5 mg-N·L⁻¹·d⁻¹이었다. 같은 기간 NO₂⁻-N 농도는 반대로 약 0.09 ppm에서 약 40.53 ppm으로 급격히 늘어나는 모습을 보여준다. 이는 NO₂⁻-N의 농도가 변화가 없다고 기존에 보고된 중속영양 질산화와 호기적 탈질 균주 *Pseudomonas stutzeri* YZN-001와는 상반된 모습을 보여주고 있다 [24]. 반응기에서 0~1일차의 DO 농도를 0.4 ppm으로 조절하였을 경우 NO₃⁻-N와 NO₂⁻-N의 변화가 거의 없었다. 즉, 충분한 산소가 공급되지 않는 환경에서 질산화가 진행되지 않음을 알 수 있었다. 이후, DO농도를 4.3 ppm으로 높여준 2일째부터(2~7일까지의 평균 DO 농도는 약 3.9 ppm으로 해주었다.) NO₃⁻-N가 소모되며 NH₄⁺-N의 질산화 과정의 중간 산물인 NO₂⁻-N가 늘어나는 모습을 보여주고 있다 (Fig. 6). 이는 균주 CW-4Y가 호기성 상태에서 탈질화와 질산화를 동시에 진행하고 있다는 것을 알 수 있다.

4. 결론

본 연구에서 분리된 *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y균주는 축

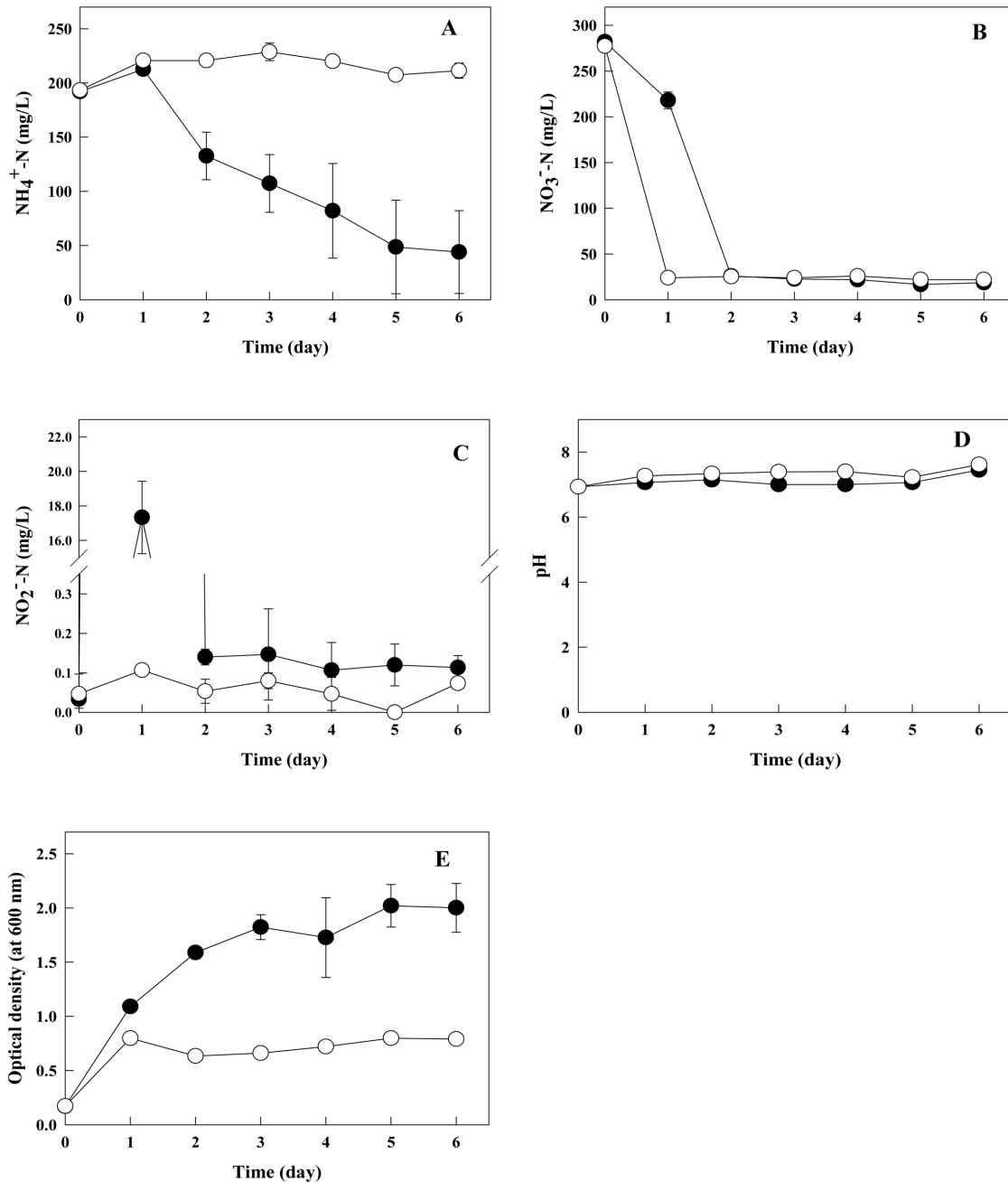


Fig. 5. Effect of culture condition on Nitrogen removal, pH change, and bacteria growth condition of CW-4Y. (● Aerobic culture; ○ Anaerobic culture)

산 및 축산폐수의 악취의 주요 원인물질인 암모니아가스를 분해하는 능력을 가졌으며, 중속영양세균으로서 호기적 질산화-탈질화를 하여 동시에 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 및 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 를 제거하는 특이적 성질을 가졌다.

CW-4Y 균주는 기존에 보고된 중속영양 호기적 탈질화를 하는 균주와 비교하여 최대로 약 23배 (호기적배양)~약 30배 (혐기적배양)의 높은 분해속도를 보이며, 탄소원으로 glucose가 공급되었을 때 성장이 잘 이루어지고 C/N비 16 부근에서 최대 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 제거율을 보인다.

종래에 알려진 미생물을 이용하여 생물학적 기법으로 폐수 처리를 할 경우, 하수처리공정에서 질소를 제거하기 위해서는 기존 Bardenpho process [25]나 A²O process [26]의 경우 질산화를 위한 호기조와 탈질화를 위한 무산소조가 각각 존재해야 하기 때문에 하수처리공정이 복잡해질 수밖에 없고, 시설비가 많이 들어가는 비경제적인 문제점, 그리고 독립영양 미생물을 이용하여 질산화를 시키기 때문에 발생하는 장시간의 처리시간이 길다는 단점을 가지고 있다.

또한, 지금까지의 미생물을 이용한 폐수처리 연구들은 단

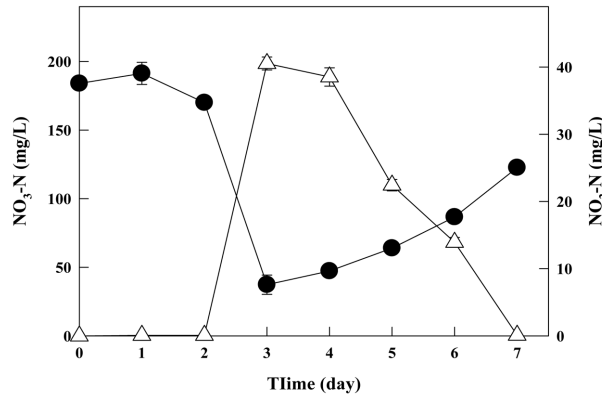


Fig. 6. Nitrogen removals of *Stenotrophomonas* sp. CW-4Y in the bioreactor. (● NO₃⁻-N; ○ NO₂⁻-N)

순히 질산화 미생물과 탈질화 미생물을 각각의 반응조에 첨가하여 유기질소원을 제거하는 방식으로 이루어 졌다. 하지만 이 과정에서 다량의 악취가 발생하게 되고, 이로 인한 악취는 자극성의 정도에 따라 주민 생활에 직, 간접적으로 영향을 끼치는 대표적인 생활 공해 물질로서 이로 인한 민원이 끊이지 않고 있어 폐수처리장 악취제거는 시급한 문제인데 이를 CW-4Y균주를 이용하여 해결할 수 있을 것으로 기대된다.

사사

본 연구는 환경부의 “차세대에코이노베이션기술개발사업” (Project No. 413-112-010)으로 지원 받은 과제입니다.

REFERENCES

- Zhang, X. (2009) The status of production and pollution by animal and poultry in China. *Env. Sci. Manag.* 134: 35-40.
- Joo, H. S., M. Hirai, and M. Shoda (2005) Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 184-191.
- Shuo, Y., N. Jinren, C. Qian, and Alistair G. L. Borthwick (2013) Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature, *Bioresour. Technol.*, 127: 151-157.
- Kulikowska, D., T. Jozwiak, P. Kowai, and S. Ciesieski (2010) Municipal landfill leachate nitrification in RBC biofilm-process efficiency and molecular analysis of microbial structure. *Bioresour. Technol.* 101: 3400-3405.
- Lloyd, D., L. Boddy, and K. J. P. Davies (1987) Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions-the rule rather than the exception. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 185-190.
- Khin, T. and A. P. Annachatre (2004) Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22: 519-532.

- Verstrae, W. and M. Alexande (1972) Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *J. Bacteriol.* 110: 955-959.
- Robertson, L. A. and J. G. Kuenen (1983) *Thiosphaera pantotropha* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2847-2855.
- Anderson, I. C., M. Poth, J. Homstead, and D. Burdige (1993) A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas-europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3525-3533.
- Kim, J. K., K. J. Park, K. S. Cho, S. W. Nam, T. J. Park, and R. Bajpai (2005) Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresour. Technol.* 96: 1897-1906.
- Khardenavis, A. A., A. Kapley, and H. J. Purohit (2007) Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 403-409.
- Zhao, B., Y. L. He, J. Hughes, and X. F. Zhang (2010a) Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR. *Bioresour. Technol.* 101: 5194-5200.
- Chen, Q. and J. Ni (2012) Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, *J. Biosci. Bioeng.* 113: 619-623.
- Kim, M., S. Jeong, S. J. Yoon, S. J. Cho, Y. H. Kim, M. J. Kim, E. Y. Ryu, and S. Lee (2008) Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios, *J. Biosci. Bioeng.* 106: 498-502.
- Su, J. J., B. Y. Liu, and C. Y. Liu (2001) Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *J. Appl. Microbiol.* 90: 457-462.
- Patureau, D., E. Helloin, E. Rustrain, T. Bouchez, J. P. Delgenes, and R. Moletta (2001) Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microbircula aerodenitrificans*. *Water Res.* 35: 189-197.
- Marazioti, C., M. Kornarons, and G. Lyberatos (2003) Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. *Water Res.* 37: 1239-1251.
- Joo, H. S., M. Hirai, and M. Shoda (2006) Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* No.4. with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Res.* 40: 3029-3036.
- Chen, P, J. Li, Q. X. Li, Y. Wang, S. Li, T. Ren, and L. Wang (2012) Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresour. Technol.* 116: 266-270.
- Su, J. J., K. S. Yeh, and P. W. Tseng (2006) A Strain of *Pseudomonas* sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan. *Curr. Microbiol.* 53: 77-81.
- Zhao, B., Y. L. He, and X. F. Zhang (2010b) Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY. *Environ. Technol.* 31: 409-416.
- Yang, X. P., S. M. Wang, D. W. Zhang, and L. X. Zhou (2011) Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic het-

- erotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresour Technol.* 102: 854-862.
23. Nishio, T., T. Yoshikura, H. Mishima, Z. Inouye, and H. Itoh (1998) Conditions for nitrification and denitrification by an immobilized heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK17. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 351-356.
24. Zhang, J., P. Wu, B. Hao, and Z. Yu (2011) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour Technol.* 102: 9866-9869.
25. Sattayatewa, C., K. Pagilla, P. Pitt, K. Selock, and T. Bruton (2009) Organic nitrogen transformations in a 4-stage Bardenpho nitrogen removal plant and bioavailability/biodegradability of effluent DON. *Water Res.* 43: 4507-4516.
26. Zeng, W., L. Li, Y. Y. Yang, X. D. Wang, and Y. Z. Peng (2011) Denitrifying phosphorus removal and impact of nitrite accumulation on phosphorus removal in a continuous anaerobic-anoxic-aerobic (A²O) process treating domestic wastewater, *Enz. Microb. Technol.* 48: 134-142.