

보 문

Alcaligenes faecalis NS13에 의한 호기성 종속영양 질산화 및 탈질화

정택경¹ · 라창식² · 조기성³ · 송홍규^{1*}

¹강원대학교 생명과학과, ²강원대학교 동물자원과학부, ³한국외국어대학교 생명공학과

Characterization of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* NS13

Taeck-Kyung Jung¹, Chang-Six Ra², Ki-Seong Joh³, and Hong-Gyu Song^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Division of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

³Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 17035, Republic of Korea

(Received March 31, 2016; Revised May 2, 2016; Accepted May 3, 2016)

ABSTRACT: In order to find an efficient bacterial strain that can carry out nitrification and denitrification simultaneously, we isolated many heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment plant. One of isolates NS13 showed high removal rate of ammonium and was identified as *Alcaligenes faecalis* by analysis of its 16S rDNA sequence, carbon source utilization and fatty acids composition. This bacterium could remove over 99% of ammonium in a heterotrophic medium containing 140 mg/L of ammonium at pH 6–9, 25–37°C and 0–4% of salt concentrations within 2 days. It showed even higher ammonium removal at higher initial ammonium concentration in the medium. *A. faecalis* NS13 could also reduce nitrate and nitrous oxide by nitrate reductase and nitrous oxide reductase, respectively, which was confirmed by detection of nitrate reductase gene, *napA*, and nitrous oxide reductase gene, *nosZ*, by PCR. One of metabolic intermediate of denitrification, N₂O was detected from headspace of bacterial culture. Based on analysis of all nitrogen compounds in the bacterial culture, 42.8% of initial nitrogen seemed to be lost as nitrogen gas, and 46.4% of nitrogen was assimilated into bacterial biomass which can be removed as sludge in treatment processes. This bacterium was speculated to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification simultaneously, and may be utilized for N removal in wastewater treatment processes.

Key words: *Alcaligenes faecalis*, aerobic denitrification, heterotrophic nitrification, nitrogen removal

자연환경에서 질소의 순환은 생물 서식지의 안정적 유지 및 생물체의 생장에 매우 중요한데 다양한 질소 전환 중 질산화 반응은 호기적 조건에서 화학무기영양성 질산화세균에 의해 주로 일어나며 암모니움(ammonium, NH₄⁺) 산화세균과 아질산염(nitrite, NO₂⁻) 산화세균이 순차적으로 관여한다(Van Loosdrecht and Jetten, 1998). 질산화에 의해 생성된 질산염(nitrate, NO₃⁻)은 대부분 혐기성 종속영양세균에 의한 탈질화 과정을 통해 질소기체(N₂)로까지 환원된다. 질산화에 이은 탈질화는 폐수처리 시 질소화합물을 제거하는데 매우 중요하지만, 질산화와 탈질화에 관여하는 미생물들의 산소와 유기물 요구가 상반되어, 대부분의 처리공정에서 각 반응을 순차적으

로 진행하기 때문에 질소제거 공정이 복잡하고 또한 효율도 떨어지게 된다(Van Loosdrecht and Jetten, 1998). 그러나 일부 종속영양 세균과 진균이 질소화합물의 산화능을 갖는 것이 보고되었으며(Yoshida and Alexander, 1970; Sarioglu *et al.*, 2012), 호기적 조건에서도 탈질화가 일어날 뿐만 아니라(Shi *et al.*, 2013), 종속영양성 질산화세균인 *Alcaligenes* sp.가 활발한 탈질화를 일으키는 것이 발견되었다(Castignetti and Hollocher, 1981). 이런 두 가지 상반된 질소 전환은 폐수처리 시 질소제거에 매우 유리한 특성이 될 수 있다. 이에 따라 최근 들어 질산화 및 탈질화 과정을 동시에 진행하는 호기성 질산화 및 탈질화(simultaneous nitrification-denitrification; SND)에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있으며 관련 세균으로 *Bacillus methylotrophicus* L7 (Zhang *et al.*, 2012), *Paracoccus versutus*

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

(Shi *et al.*, 2013), *Acinetobacter calcoaceticus* STB1 (Sarioglu *et al.*, 2012), *Alcaligenes faecalis* NR (Zhao *et al.*, 2012), *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 (Zhang *et al.*, 2011), *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 (Padhi *et al.*, 2013), *Rhodococcus* sp. CPZ24 (Chen *et al.*, 2012) 등이 보고되었다.

본 연구는 암모니움 및 질산염 제거효율이 우수하고 환경의 여러 성장제한 요소에도 덜 민감해서 활용가치가 높은 중속영양 호기성 질산화 및 탈질화 세균의 선발을 목적으로 하였다. 실제 폐수처리를 위한 여러 환경 조건에서 균주의 암모니움 제거효율을 측정하고 탈질화 작용의 산물인 아산화질소(nitrous oxide, N₂O)를 측정하였으며 탈질화에 관여하는 여러 유전자의 존재를 조사하고 암모니움이 최종적으로 변환되는 형태를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 동정

암모니움 제거능이 우수한 균주를 분리하기 위해서 강원도 춘천시 하수처리장의 토양과 슬러지 시료를 채취하였다. 채취한 시료 각 1 g을 생리식염수(0.85% NaCl) 35 ml에 넣어 교반 후 생리식염수로 희석하였다. 희석액 0.1 ml를 ammonia oxidizing agar medium [AOAM: (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, Na₂HPO₄ 13.5 g, KH₂PO₄ 0.7 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.18 g, NaHCO₃ 0.5 g, FeCl₃·6H₂O 0.014 g, agar 15 g, DW 1 L]에 도말하여 30°C에서 4일간 배양하였다. AOAM에서 순수분리될 때까지 희석배양하여 얻은 균주 중 가장 빠르게 자라는 균주 NS13을 선택하였다. 순수 분리된 균주의 동정을 위해 heterotrophic nitrification medium (HNM) (Zhang *et al.*, 2012)에서 배양한(160 rpm, 30°C, 2 day) 균주 배양액에서 Xprep Tissue DNA Mini Kit (Philekorea Technology)의 매뉴얼에 따라 균주의 genomic DNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위해서 forward primer 27f와 reverse primer 1492r를 사용하였다. 추출한 g-DNA를 PCR의 template로 사용하였으며 10x taq polymerase buffer 2.5 µl, 2.5 mM dNTP 2 µl, 10 pmol primer 각각 1 µl, Ex-taq polymerase (TaKaRa) 0.125 µl, template 2 µl를 섞고 증류수를 추가하여 최종적으로 25 ml로 보정하였다. PCR을 수행한 조건은 94°C에서 5분, 94°C에서 30초, 49°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분으로 이루어진 과정을 35 cycle 반복하였고 마지막으로 72°C에서 10분을 수행하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 염기서열은

(주)마크로젠에 분석을 의뢰하였으며 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 등 록균주들과 상동성을 비교하여 동정하였다.

분리균주 중 암모니아와 총질소 제거능이 가장 높은 NS13 균주의 배양 특성을 비교하기 위해 Luria-Bertani 배지(LB)에서 24시간 선배양 후 생리식염수로 2-3회 세척하고 heterotrophic nitrification medium (HNM) (Zhang *et al.*, 2012) 및 5% NaCl이 포함된 HNM에 각각 접종하였다. HNM은 42°C, 160 rpm에서 배양하였으며 5% NaCl이 포함된 HNM은 30°C, 160 rpm에서 배양하여 균주의 성장 유무를 관찰하였다.

균주의 탄소기질 이용 및 지방산 분석

균주의 탄소원 이용을 조사하기 위해서 Biolog EcoPlate™ (Biolog, Inc.)를 이용하였다(Garland and Mills, 1991). 균주 배양액의 OD₆₀₀ 측정치를 1.0으로 보정한 뒤 각 well에 150 µl를 접종하였다. 접종된 plate는 20°C에서 7일간 배양하며 24시간 간격으로 분광광도계로 OD₅₉₀를 측정하였다. 측정 결과가 0.5 이상일 경우 탄소기질의 이용을 양성으로 간주하여 +로 표시하고 1.0 이상부터 0.5 간격으로 +의 수를 더해서 탄소기질 이용 상태를 달리 표시하였다.

균주의 지방산을 분석하기 위해서 trypticase soy agar (TSA; trypticase soy broth 30 g, agar 15 g, 1 L 증류수)에서 배양하였으며 비누화, 메틸화 및 추출은 Sasser (1990)의 방법을 이용하였다. 분석에는 gas chromatography (GC; Agilent Technologies model 7890A)를 이용하였으며 column은 HP-5 column (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm) (Agilent Technologies)을 사용하였다. 지방산의 분석은 Microbial Identification System (MIDI Inc.)의 RTSBA6 database를 이용하였다.

질산화 및 탈질화 과정 조사

배양액 내의 질소 화합물을 조사하기 위해 먼저 균주를 LB 배지에서 24시간 선배양(160 rpm, 30°C) 후 배양액의 OD₆₀₀를 측정하고 현미경을 이용하여 직접 계수하였다. 한편 배양액을 원심분리(3,400 × g, 4°C, 15 min) 하여 상등액을 제거하고 침전물을 생리식염수(0.85% NaCl)를 이용하여 2-3회 세척한 뒤 99 ml의 HNM이 들어있는 플라스크에 최종부피가 100 ml가 되도록 균주를 1% 접종하였다. 배지의 초기 암모니움 농도는 139.9 mg/L이며, 배양(160 rpm, 30°C) 중 24시간 주기로 질소 대사산물을 측정하였다. 암모니움 측정은 네슬러 방법을 이용하였으며(APHA *et al.*, 1995), 암모니움 산화산물인 하이드록실아민(hydroxylamine, NH₂OH) 측정은 Frear와 Burrell

(1955)의 방법에 따라 측정하였다. 아질산염 측정은 디아조화 방법을 이용하였으며(APHA *et al.*, 1995), 질산염과 총질소(total nitrogen) 측정은 second derivative spectroscopy 방법을 사용하였다(Ferree and Shannon, 2001). 균주의 생장은 분광광도계를 이용하여 OD₆₀₀로 측정하였다.

3일간의 배양이 끝난 뒤 암모니아 검지관(No. 3 L, Gastec)과 펌프(GV-100S, Gastec)를 이용하여 플라스크 headspace에 존재하는 암모니아 가스를 측정하여 정량하였다. 한편 탈질화의 중간 산물인 아산화질소는 플라스크의 headspace 기체를 3-way plastic syringe로 60 ml을 뽑아내어 electron capture detector가 장착된 GC (Varian 450, Varian Inc.)를 이용해 측정하였다(Won *et al.*, 2014). 배지에서 자라난 세균은 0.45 µm 공극의 여과막으로 여과한 후 Kjeldahl method를 이용하여 총질소를 측정하였으며 배지의 총질소도 동일한 방법으로 측정하였다(APHA *et al.*, 1995). 모든 실험은 triplicate sample에 대해 실시하여 평균치±표준편차로 나타내었다.

질산염 환원효소 유전자 조사

주변세포질 질산염 환원효소 유전자, *napA*를 조사하기 위해서 Klatt 등(2011)이 forward primer LF716 (5'-GCNGAR ATGCACCC-3')와 reverse primer SR2294 (5'-GWR TGCCA RTGNTC-3')를 사용한 touchdown PCR protocol를 변형하여 이용하였으며 앞에서 추출된 균주의 genomic DNA를 template로 사용하였다. PCR은 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 42.5°C에서 30초 그리고 72°C에서 2분 30초로 이루어진 과정을 35 cycle 반복하였고 마지막으로 72°C에서 10분 동안 수행하였다. PCR을 통해 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위해 PCR 산물과 6x DNA loading dye를 5:1로 섞어 1% agarose gel에 100 V로 약 30-40분간 전기영동하여 band의 위치를 관찰하였다.

아산화질소 환원효소 유전자, *nosZ*를 조사하기 위해서 forward primer nosZF (5'-CGYTGTCMTCGACAGCCAG-3')와 reverse primer nosZ1622R (5'-CGSACCTTSTTGCCSTY GCG-3')을 이용해서 Enwall 등(2005)이 보고한 touchdown PCR protocol를 변형하여 증폭하였으며 앞에서 추출된 균주의 genomic DNA를 template로 사용하였다. PCR은 94°C에서 2분, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 그리고 72°C에서 2분 30초로 이루어진 과정을 10 cycle 반복하였고 94°C에서 30초, 58°C에서 30초 그리고 72°C에서 2분 30초로 이루어진 과정을 15 cycle 반복한 뒤 마지막으로 72°C에서 10분 동안 수행하고 band의 크기를 조사하였다.

결 과

세균의 분리와 동정

강원도 춘천시 하수처리장 토양으로부터 AOAM 배지 내 암모니움을 산화시켜 빨리 성장하는 집락을 순수분리하여 그것의 높은 암모니움 산화능을 측정 후 HNM 배지에서의 성장 여부 및 질소 제거를 확인하고 최종적으로 세균 균주 NS13을 선발하였다. 균주 동정을 위한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *A. faecalis* IAM12369 (GenBank accession number

Table 1. Metabolic profile of *A. faecalis* NS13 as tested in Biolog EcoPlate™ assay during 7 days^a

Substrate	<i>A. faecalis</i> NS13
Tween 40	++
Tween 80	++
α-Cyclodextrin	-
Glycogen	-
D-Cellobiose	-
α-D-lactose	-
β-Methyl-D-glucoside	-
D-Xylose	-
i-Erythritol	-
D-Mannitol	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-
Glucose-1-phosphate	-
D,L-α-glycerol phosphate	-
D-Galactonic acid γ-lactone	-
2-Hydroxy benzoic acid	-
4-Hydroxy benzoic acid	-
Pyruvic acid methyl ester	+++
D-Galacturonic acid	-
D-Glucosaminic acid	-
γ-Hydroxybutyric acid	-
Itaconic acid	-
α-Ketobutyric acid	+++
D-Malic acid	-
L-Arginine	-
L-Asparagine	+++
L-Phenylalanine	++++
L-Serine	+
L-Threonine	++
Glycyl-L-glutamic acid	-
Phenylethyl-amine	-
Putrescine	-

^a -, OD < 0.5; +, 0.5 < OD < 1.0; ++, 1.0 < OD < 1.5; +++, 1.5 < OD < 2.0; +++++, 2.0 < OD

NR043445.1)와 98.0%로 가장 높은 상동성을 보였다. 그람염색 결과 그람 음성세균으로 운동성이 있는 작고 짧은 간균의 형태로 관찰되었다. 또한 5%의 NaCl이 포함된 HNM에서도 생장이 일어났으며 42°C에서도 3일 이후부터 생장이 활발히 일어났다.

균주의 탄소기질 이용 및 지방산 분석

NS13 균주의 동정을 위한 생리학적 특성을 조사하기 위해 총 31개의 탄소기질에 대한 활성도를 측정하였다. 대조군 대비 OD₅₉₀ 0.5 이상을 탄소기질을 이용하는 것으로 판단한 결과 총 8종류의 탄소기질인 Tween 40, Tween 80, pyruvic acid methyl ester, α-ketobutyric acid, L-asparagine, L-phenylalanine, L-serine 및 L-threonine을 이용하는 것으로 나타났다. 이 중 L-phenylalanine을 이용할 때 가장 높은 활성을 보였다(Table 1).

TSA에서 24시간 배양한 NS13 균주의 지방산을 GC를 이용해서 측정한 결과 주요 성분으로는 C_{16:0} (36.36%), C_{17:0} cyclo (35.21%), Summed feature 2^a (C_{12:0} aldehyde?; 8.51%) 및 Summed feature 3^b (C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c; 4.88%)으로 구성되었다. C_{10:0}, C_{12:0}, C_{12:0} 2-OH, C_{14:0}, C_{18:0}, C_{19:0} cyclo ω8c, Summed feature 5^c (C_{18:0} ante and/or C_{18:2} ω6,9c) 및 Summed feature 8^d (C_{18:1} ω7c)는 1-2%였으며 C_{12:0} 3-OH, C_{16:0} 3-OH, C_{16:0} ω5c, C_{17:0}, C_{17:1} ω7c, C_{17:1} ante iso ω9c와 C_{19:0}는 1% 이하로

측정되었다(Table 2).

암모니움 제거에 미치는 환경요인의 영향

배양 온도에 따른 NS13 균주의 암모니움 제거율을 조사한 결과 온도가 높아짐에 따라 암모니움 제거율이 증가하였다. 특히, 25, 30 및 37°C에서는 배양 2일째에 약 99% 이상 제거되었으며, 20°C에서는 3일째에 99% 이상 제거되었고 15°C에서는 제거율이 다소 떨어지지만 7일째 약 88% 이상의 암모니움이 제거되었다(Fig. 1).

염분 농도에 따른 NS13 균주의 암모니움 제거율을 조사한 결과 염분 농도가 높아짐에 따라 암모니움 제거율이 감소하였다. NS13 균주의 성장에는 염분 농도가 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보였지만 암모니움의 제거율에서는 차이가 뚜렷하게 나타났다. 배양 1일째에 염분 농도가 0%인 HNM에서 암모니움 제거율이 약 94%인 것에 반해 염분 농도가 4%일 때는 약 73%를 나타내었다. 그러나 2일째에는 염분 농도와 관계없이 약 99% 이상의 암모니움 제거율을 보였다(Fig. 2).

pH에 따른 NS13 균주의 암모니움 제거율을 조사한 결과 배양 1일째에 pH 9에서 암모니움 제거율이 약 88% 이상으로 가장 높았으며 배양 2일째 pH 6-9 조건에서 암모니움의 제거율이 99% 이상 측정되었다. 반면 동시간대 pH 5와 10에서는 각각 약 50 및 74% 제거율을 보였지만 4일째 약 98% 이상 암모

Table 2. Fatty acid composition of *A. faecalis* NS13^a

Fatty acids	<i>A. faecalis</i> NS13	Fatty acids	<i>A. faecalis</i> NS13
C _{10:0}	1.22	C _{17:0} cyclo	35.21
C _{10:0} 3-OH	-	C _{17:1} ω7c	tr
C _{12:0}	1.57	C _{17:1} ω8c	-
C _{12:0} aldehyde	-	C _{17:1} ante iso ω9c	tr
C _{12:0} 2-OH	1.58	C _{18:0}	1.05
C _{12:0} 3-OH	tr	C _{18:1} 2-OH	-
C _{13:0} at 12-13	-	C _{18:1} ω7c	-
C _{14:0}	2.03	C _{18:1} ω8c 11 methyl	-
C _{14:0} 2-OH	-	C _{19:0}	tr
C _{15:0}	-	C _{19:0} cyclo ω8c	1.58
C _{16:0}	36.36	iso-C _{19:0}	-
C _{16:0} 2-OH	-	C _{20:2} ω6,9c	-
C _{16:0} 3-OH	tr	Summed feature 2 ^a	8.51
C _{16:1} 3-OH	-	Summed feature 3 ^b	4.88
C _{16:0} ω5c	tr	Summed feature 5 ^c	1.02
C _{17:0}	tr	Summed feature 8 ^d	2.3

^a*A. faecalis* NS13 was cultivated on TSA at 30°C for 1 day before harvesting cell mass. -, not detected; tr, < 1% of the total fatty acids. Summed feature could not be separated using the MIDI system. ^bSummed feature 2 comprises C_{12:0} aldehyde. ^cSummed feature 3 comprises C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c. ^dSummed feature 5 C_{18:0} ante and/or C_{18:2} ω6,9c. ^eSummed feature 8 comprises C_{18:1} ω7c.

니움을 제거하였다. 암모니움의 제거율과 비슷하게 NS13 균주의 성장도 pH 6-9에서는 활발한 것에 반해 pH 5와 10에서는 초기에 더딘 성장을 보였다(Fig. 3).

초기 암모니움 농도에 따른 NS13 균주의 암모니움 제거율

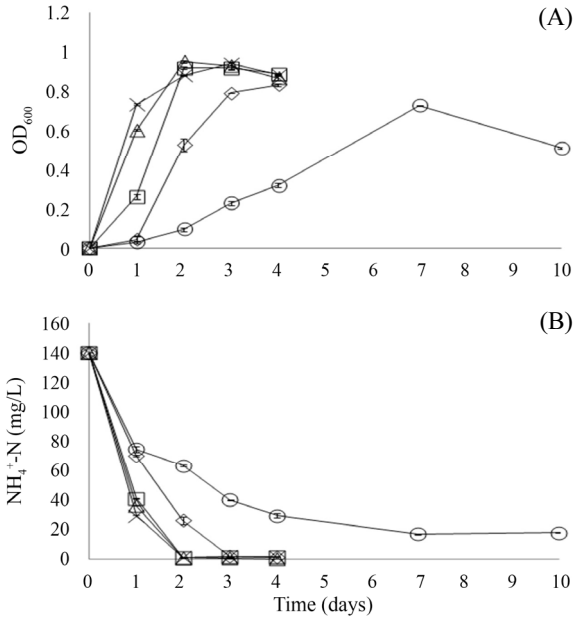


Fig. 1. Growth curve (A) and ammonium removal (B) by *A. faecalis* NS13 in HNM at different temperature of 15 (○), 20 (◇), 25 (□), 30 (△), and 37°C (×). Values are means ± SD (error bars) for triplicate.

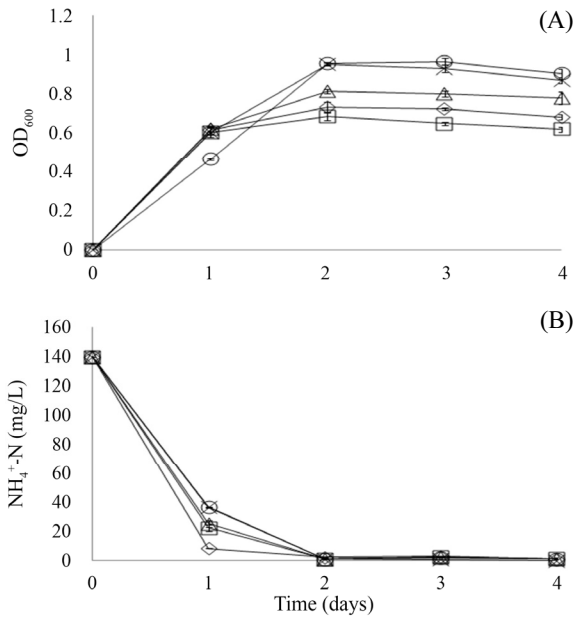


Fig. 2. Growth curve (A) and ammonium removal (B) by *A. faecalis* NS13 in HNM at 30°C and salt concentration of 0 (◇), 1 (□), 2 (△), 3 (×), and 4% (○). Values are means ± SD (error bars) for triplicate.

을 조사한 결과 암모니움의 초기 농도 증가에 따라 하루 동안 암모니움을 제거하는 양도 증가되었다. 139.9 mg 이하의 암모니움이 포함되어도 2일째에 99% 이상 제거되었다. 농도가 높아짐에 따라 암모니움 제거효율이 증가되었는데, 4일째에 암모니움의 농도가 300 mg/L 일 때 하루에 55.2 mg/L를 제거시켰으며, 가장 높은 1,500 mg/L일 때는 210.5 mg/L의 암모니움이 제거되었다(Table 3).

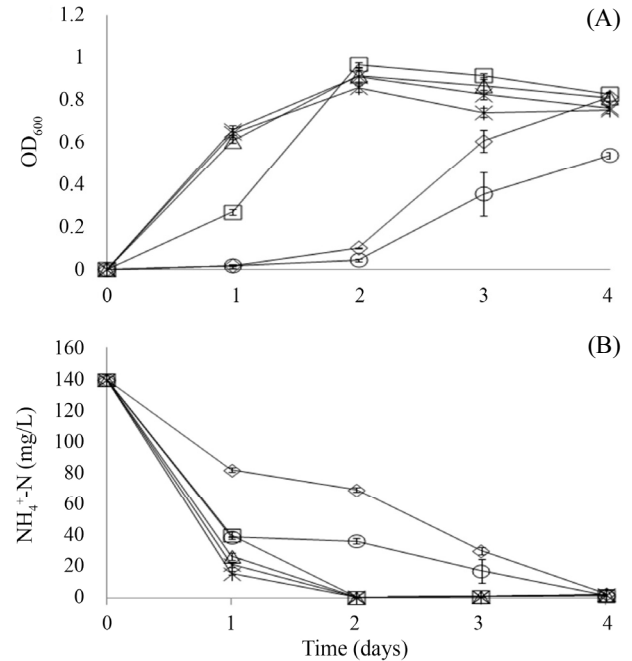


Fig. 3. Growth curve (A) and ammonium removal (B) by *A. faecalis* NS13 in HNM at 30°C and initial pH of 5 (◇), 6 (□), 7 (△), 8 (×), 9 (+), and 10 (○). Values are means ± SD (error bars) for triplicate.

Table 3. Ammonium removal by *A. faecalis* NS13^a

Initial NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	Final NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	Removal efficiency (mg/d)
50	0.69 ± 0.01	12.3
100	0.86 ± 0.1	24.8
139.9	0.04 ± 0.03	35.0
300	79.2 ± 1.7	55.2
450	223.4 ± 1.8	56.6
600	200.1 ± 4.4	100.0
750	306.9 ± 14.6	110.8
900	381.7 ± 19.5	129.6
1500	658.1 ± 25.4	210.5

^a *A. faecalis* NS13 was cultivated for 4 days (30°C, 160 rpm) in heterotrophic nitrification medium (HNM) with different initial ammonium concentration.

암모니움 제거에 따른 질소 평형

HNM에서 배양한 NS13 균주에 의해 제거되는 암모니움뿐만 아니라 질산화 과정 시 발생하는 하이드록실아민, 아질산염, 질산염 및 암모니움 가스와 탈질화 시 발생하는 아산화질소를 측정하고 또한 HNM의 총 질소량을 측정하였다. 최종적으로 암모니움은 0.21 mg/L이 남아 99% 이상 제거되었으며 하이드록실아민, 아질산염 및 질산염은 각각 0.68, 0.67 및 13.47 mg/L로 측정되었다. 암모니아 가스는 검출되지 않았고, 아산화질소는 2.5×10^{-7} mg/L로 측정되었다. HNM의 총 질소량은 80.01 mg/L로 최종적으로 약 42.8%의 질소가 제거되었다(Table 4).

탈질화 유전자 조사

탈질화 과정 중 질산염을 아질산염으로 환원시키는데 관여하는 유전자를 조사한 결과 1,800 bp 크기의 질산염 환원효소 유전자, *napA*의 존재를 PCR 증폭된 band로 확인하였다(Fig.

4A). 또한 탈질화 과정 중 아산화질소를 질소로 환원시키는데 관여하는 유전자를 조사한 결과 453 bp 크기의 아산화질소 환원효소 유전자, *nosZ*의 band를 확인하였다(Fig. 4B).

고찰

본 연구에서는 호기적인 조건에서 질산화와 탈질화를 모두 수행하여 암모니움 제거 효율이 우수한 세균 균주 NS13을 분리하고 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 동정한 결과 *A. faecalis* IAM12369와 98%의 상동성을 보였다. 동정의 신뢰도를 높이기 위해서 *A. faecalis* NS13 균주를 42°C에서 배양한 결과 다소 느리지만 생장이 3일째부터 활발하였으며 5%의 NaCl이 포함된 HNM에서도 성장하였다. 이는 *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* (Schroll *et al.*, 2001), *A. defragrans* (Foss *et al.*, 1998)와 *A. aquatilis*는 42°C에서 배양되지 않지만(Van Trappen *et al.*, 2005), *A. faecalis*는 소량의 NaCl 및 42°C에서 성장한다고 보고와 일치하는 결과이다(Rehfuß and Urban, 2005; Yokoyama *et al.*, 2012). NS13 균주의 지방산을 분석한 결과 C_{16:0}와 C_{17:0} cyclo가 가장 높은 수치를 나타냈으며 각각 36.36%와 35.21%로 측정되었다(Table 2). 이는 *A. faecalis* LMG1229^T 균주의 주요 지방산 구성성분이 C_{16:0}와 C_{17:0} cyclo로 각각 36.8%와 28.8%를 차지하고 있다는 결과와 유사하다. *A. aquatilis* (Van Trappen *et al.*, 2005)는 지방산 구성 비율이 NS13 균주와 유사하였지만 C_{17:0} cyclo가 13.3%로 NS13 균주의 35.21%와는 큰 차이를 보였다. 또한 *A. defragrans* 54Pin (Foss *et al.*, 1998) 균주는 C_{12:0}과 C_{15:0}가 차지하는 비율이 각각 5.9%와 2.2%인 것에 반해 NS13 균주는 각각 1.57%와 0%로 측정되어 지방산 구성 비율의 차이를 보였다. 이와 같은 분석을 통해 NS13 균주는 최종적으로 *A. faecalis*로 동정되었다.

배양온도에 따른 *A. faecalis* NS13의 성장율과 암모니움(초기 농도 139.9 mg/L) 제거율을 측정한 결과 25-37°C에서 48시간 이내에 99% 이상의 제거율을 보였으며 기존에 알려진 *A. faecalis* 종의 최적 성장온도인 37°C에서 가장 활발하게 성장을 하였으며 온도가 낮아짐에 따라 성장율도 같이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). 이는 질산화 및 탈질화가 우수하다고 보고된 *Bacillus methylotrophicus* L7 (Zhang *et al.*, 2012)이 37°C에서 암모니움 제거율이 약 78%이며, 또한 같은 농도의 암모니움을 78%까지 제거하는데 걸리는 시간이 108시간이며 초기 접종량도 2배에 이른다는 점에서 *A. faecalis* NS13의 암모니움 제거율이 월등히 우수하다는 것을 알 수 있다. 또한 적용 온도 범위도 훨씬 광범위한데, *B. methylotrophicus* L7은

Table 4. Change of nitrogen compounds in heterotrophic nitrification medium (HNM) by *A. faecalis* NS13 after 3 days of incubation

Nitrogen compounds	Time 0	Day 3
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	139.9	0.21 ± 0.23
NH ₂ OH-N (mg/L)	0	0.68 ± 0.14
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	0	0.67 ± 0.18
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	0	13.47 ± 0.78
NH ₃ (mg/L)	0	0 ± 0
N ₂ O (mg/L)	0	0.00000025 ± 9.33E-09
Bacterial total nitrogen (mg/L)	0	64.98 ± 0.86
Total nitrogen (mg/L)	139.9	80.01 ± 1.17
% N lost	0	59.89

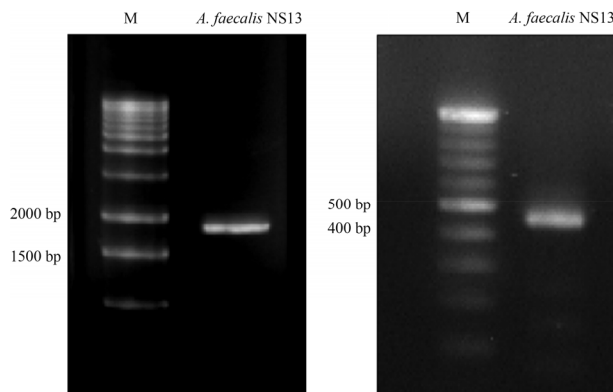


Fig. 4. Detection of denitrification genes, periplasmic nitrate reductase gene, *napA* (A, M; 1 kb ladder) and nitrous oxide reductase gene, *nosZ* (B, M; 100 kb ladder) in *A. faecalis* NS13.

20°C에서 약 10%의 암모니움을 제거시킨 반면 *A. faecalis* NS13은 20°C에서 72시간 이내에 동량의 암모니움을 99% 이상 제거시켰다. *Paracoccus versutus* LYM은 30°C에서 120 mg/L의 암모니움을 최종적으로 약 75%를 제거했다고 보고되었으며(Shi et al., 2013), *Klebsiella pneumoniae* CF-S9는 30°C에서 24시간 동안 4.3 mg/L/h의 암모니움을 제거하였다고 보고되었다(Padhi et al., 2013). 배지 조성 및 배양조건이 약간 다르지만 초기 암모니움 농도가 120 mg/L이었으며 18시간 후에 균주의 생장이 정체기인 것을 감안한다면 비록 *A. faecalis* NS13과 24시간 이전의 암모니움 제거율은 비슷할지라도 *K. pneumoniae* CF-S9 균주를 계속 배양하여도 85%의 제거율이 상으로 증가되지 않았을 것으로 생각된다. 반면에 *A. faecalis* NS13은 24시간이 지나도 생장이 단계였으며 암모니움 제거가 계속 진행되어 48시간 이전에 약 140 mg/L의 암모니움을 제거하였다.

염분농도가 높을수록 질산화 과정이 억제되며 실제로 염분농도가 2% 보다 높을 경우 질산화 반응이 억제된다고 보고되었다(Ludzack and Noran, 1965). *A. faecalis* NS13은 0-4%의 염분이 포함된 배지에서 염분농도가 높아짐에 따라 24시간 이내에 암모니움 제거율은 다소 떨어졌지만 48시간 이내에 염분농도와 관계없이 99% 이상 암모니움을 제거하였다(Fig. 2). 특히 24시간 이내에 0% 염분농도의 HNM에서 암모니움 제거율은 약 5.5 mg/L/h로 가장 높았다. 같은 조건에서 108시간 동안 *B. methylotrophicus* L7의 암모니움 제거 약 84%, 제거율 1.08 mg/L/h (Zhang et al., 2012)에 비하면 훨씬 우수하다. 염분농도가 4%인 배지에서는 *B. methylotrophicus* L7에 의해 최종적으로 제거된 암모니움 양은 39.5%로 급격히 떨어진 반면에 *A. faecalis* NS13은 24시간 이내에 4.3 mg/L/h로 염분농도가 0%일 때보다는 제거율이 약간 떨어졌지만 훨씬 이른 시간에 동량의 암모니움을 99% 이상 제거하였다. 또한 배지 조성 및 배양조건이 약간 다르지만 염분농도가 약 3.5%에서 생장할 수 있는 *Acinetobacter calcoaceticus* STB1이 염분농도가 0.2%인 배지에서 72시간 동안 100 mg/L의 암모니움을 약 93% 밖에 제거하지 못한 것(Sarioglu et al., 2012)에 비해서도 상당히 우수한 결과이다.

산성 보다는 중성 또는 약염기성에서 질산화 반응이 더 빠르게 일어난다고 알려져 있듯이(Chang and Hao, 1996; Yokoyama et al., 2012), *A. faecalis* NS13 균주는 배지의 초기 pH가 7-9 범위일 때 생장 및 암모니움 제거율이 높았다(Fig. 3). 질산화 효율이 높다고 알려진 *Alcaligenes* sp. W1 균주는 배지가 산성화 및 염기성화 되면서 효율이 떨어졌으며 pH 5와 10에서 배양이 되지 않았던 반면 *A. faecalis* NS13 균주는 pH 5와 10에서도 생

장과 동시에 암모니움을 상당량 제거하였다. 배양 후 24시간 후에 pH 7-9에서 각각 80, 84 및 88%의 암모니움을 제거하였으며 pH 6과 10에서도 71%와 72%를 제거시켰다. 48시간 이전에 pH 6-9에서 99% 이상의 암모니움 제거율을 보였으며 pH 5와 10에서는 99% 이상 제거하는데 걸리는 시간이 96시간이었다. *B. methylotrophicus* L7 균주를 같은 조건에서 실험했을 경우 pH 7과 8에서 각각 58.4와 55.0% 밖에 암모니움을 제거하지 못했으며 pH 9에서는 30% 이하, pH 5, 6 및 10에서는 20% 이하로 질산화에 pH의 영향을 상당히 많이 받았다(Zhang et al., 2012).

온도 외에 초기 암모니움 농도가 질산화세균에 영향을 미쳐서 10-150 mg/L인 경우 질산화 활성이 억제된다고 보고되었다(Fdz-Polanco et al., 1994). HNM에 들어가는 암모니움 양을 50과 100 mg/L로 낮춰서 측정한 결과 48시간 이전에 99% 이상 제거하였으며, 농도가 높아짐에 따라 시간 당 암모니움 제거율이 증가하였다(Table 3). *B. methylotrophicus* L7 균주가 암모니움 농도 427.4와 1,121.2 mg/L일 때 각각 41.2와 90.1 mg/L/d의 제거율을 나타내어 암모니움 농도 증가에 따른 제거율 증가를 나타내었지만(Zhang et al., 2012) *A. faecalis* NS13 균주의 제거율이 이보다 훨씬 높았다. 또한 Yang 등(2011)은 *Bacillus subtilis* A1 균주가 암모니움 농도가 약 536 mg/L일 때 제거율이 4.1%이었으며 그 이상 농도이면 생장 및 질산화 활성이 거의 나타나지 않았다고 보고하였다. 초기 암모니움 농도 약 300 mg/L이며 염분농도 0%인 배지에서 *A. faecalis* OKK17 균주의 암모니움 제거율이 6.5 mg/L/h였다(Nishio et al., 1998). *A. faecalis* NS13 균주는 동시간 대에 암모니움 제거율이 7.5 mg/L/h였으며, 염분농도가 3%임에도 불구하고 제거속도가 *A. faecalis* OKK17 균주보다 빨랐다. 뿐만 아니라 *A. faecalis* OKK17 균주를 20시간 이후 계속 배양한 결과 배양액 내에 암모니움 양이 오히려 늘어난 반면에 *A. faecalis* NS13 균주는 지속적으로 암모니움을 제거하였다. 만약 초기 염분농도가 0%였다면 제거하는 속도가 월등히 우수했을 것으로 생각된다. *A. faecalis* NS13 균주는 초기 암모니움 농도가 1,500 mg/L일 때 제거 효율이 56% 이상인 것을 감안하면 더 높은 암모니움 농도에서도 질산화 활성이 나타날 것으로 기대된다.

A. faecalis NS13 균주의 질산화 후 여러 질소화합물의 농도를 측정한 결과 HNM에 접종 후 3일 후에 초기 139.9 mg/L의 암모니움은 0.21 mg/L로 감소하였으며 가스 상태의 암모니아는 검출되지 않았다. 질산화 과정 시 생성되는 중간 산물들인 하이드록실아민, 아질산염 및 질산염은 각각 0.68, 0.67 및 13.47 mg/L로 상당히 낮은 수준을 유지하였다. *A. faecalis*

NS13 균주의 탈질화에 의해서 생성된 중간산물 중 하나인 아산화질소는 2.5×10^{-7} mg/L로 상당히 소량 존재하였다. 배지에 남아 있는 모든 질소 성분 및 *A. faecalis* NS13 균주에 동화되어 들어간 질소를 포함한 총 질소량을 측정된 결과 처음 139.9 mg/L에서 80.01 mg/L로 감소하였다(Table 4). *A. faecalis* NS13 균주와 같은 종으로 기존에 보고된 *A. faecalis* NR 균주(Zhao *et al.*, 2012) 결과와 비교하면 하이드록실아민과 아질산염은 극히 소량이며 질산염은 25-30 mg/L 사이를 유지하고, 아산화질소도 미량 측정되었다. 비록 *A. faecalis* NS13 균주를 대상으로 최종 물질인 N_2 를 측정하지는 않았지만 기존의 보고된 결과와 탈질화에 관여하는 유전자인 *napA*와 *nosZ*의 존재를 PCR 증폭을 통해서 확인했기 때문에(Fig. 4) 질소화합물이 N_2 로 상당량 전환되었을 것으로 생각된다. 호기적인 조건에서 탈질화가 일어난다고 보고된 *K. pneumoniae* CF-S9 균주에서도 동일한 primer를 이용해서 *napA*의 존재가 확인되었다(Padhi *et al.*, 2013). 아산화질소의 질소기체로의 반응은 *nosZ* 유전자에 의해서 일어나며 Enwall 등(2005)은 탈질화 세균의 균집을 조사할 때 *nosZ* 유전자를 마커로 사용하였다. 따라서 *A. faecalis* NS13 균주의 DNA에서 *napA*와 *nosZ* 유전자의 존재는 호기적인 조건에서 질산화뿐만 아니라 탈질화 과정이 동시에 진행될 수 있다는 또 다른 증거가 될 수 있다.

배양 후 배지 안에 남아있는 총 질소화합물은 약 15 mg/L 정도이며 NS13 균주에 동화된 양은 약 65 mg/L이었다. 따라서 실제 폐수처리 시 *A. faecalis* NS13 균주의 질산화 및 탈질화가 끝난 뒤에 세포물질을 슬러지로 처분한다면 약 90%의 암모니움 제거효과를 거둘 수 있을 것이다. 이는 Zhao 등(2012)이 질산화 및 탈질화가 우수하다고 보고한 *A. faecalis* NR 균주를 이용해서 초기 암모니움 농도가 비슷한 폐수 처리 시 약 79%의 암모니움 제거율보다 11% 더 높다.

다양한 온도, pH, 염분농도 및 초기 암모늄이온 농도 조건에서 암모니움 제거율이 우수한 호기성 종속영양 질산화 및 탈질화 세균 *A. faecalis* NS13 균주는 폐수 처리 시 질소제거 미생물제로서 가치가 있다고 판단된다.

적 요

호기적 조건에서 질산화와 탈질화를 동시에 진행하는 *Alcaligenes faecalis* NS13 균주를 분리하여 다양한 특성을 파악하였다. 이 균주는 15-37°C 온도에서 성장할 수 있으며 암모니움 산화율이 높고 고농도의 암모니움 환경에서도 생장이 저해되지 않고 초기 암모니움 농도 증가에 따라 제거량이 증

가하였다. pH와 염분농도에 대해서도 내성 범위가 넓어 암모니움 산화가 영향을 받지 않았다. 질산화에 이어진 탈질화로 인해 질산염의 축적이 일어나지 않았으며 탈질화의 중간산물인 아산화질소는 미량 검출되었지만 배양 후 모든 질소 화합물을 측정된 결과 약 42.8%가 N_2 로 전환된 것으로 추정되었다. 탈질화는 PCR 증폭을 통해서 탈질화에 관여하는 유전자 nitrate reductase gene, *napA*과 nitrous oxide reductase gene, *nosZ*의 존재로 뒷받침되었다. 또한 배지 내 질소의 46.4%가 NS13 균주로 동화되었기 때문에 폐수처리 시 질산화 및 탈질화 후에 슬러지로 처분한다면 실질적으로 89% 이상의 우수한 암모니움의 제거효과를 거둘 수 있을 것이다.

감사의 말

이 논문은 2012년 중소기업청 연구비 지원(C1008961-01-01)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- APHA, AWWA, and WPCF. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. pp. 483-484. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Castignetti, D. and Hollocher, T. 1981. Vigorous denitrification by a heterotrophic nitrifier of the genus *Alcaligenes*. *Curr. Microbiol.* **6**, 229-231.
- Chang, C.H. and Hao, O.J. 1996. Sequencing batch reactor system for nutrient removal: ORP and pH profiles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **67**, 27-38.
- Chen, P., Li, J., Li, Q.X., Wang, Y., Li, S., Ren, T., and Wang, L. 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresour. Technol.* **116**, 266-270.
- Enwall, K., Philippot, L., and Hallin, S. 2005. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8335-8343.
- Fdz-Polanco, F., Villaverde, S., and Garcia, P. 1994. Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters: activation and free ammonia inhibition. *Water Sci. Technol.* **30**, 121-130.
- Ferree, M. and Shannon, R. 2001. Evaluation of a second derivative UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis of wastewater samples. *Water Res.* **35**, 327-332.
- Foss, S., Heyen, U., and Harder, J. 1998. *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpene (+)-menthene, α -pinene, 2-carene, and α -phellandrene and nitrate. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 237-244.
- Frear, D. and Burrell, R. 1955. Spectrophotometric method for

- determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Anal. Chem.* **27**, 1664–1665.
- Garland, J. and Mills, A.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351–2359.
- Klatte, T., Evans, L., Whitehead, R.N., and Cole, J.** 2011. Four PCR primers necessary for the detection of periplasmic nitrate reductase genes in all groups of proteobacteria and in environmental DNA. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 321–326.
- Ludzack, F. and Noran, D.** 1965. Tolerance of high salinities by conventional wastewater treatment processes. *J. Water Poll. Control Fed.* **37**, 1404–1416.
- Nishio, T., Yoshikura, T., Mishima, H., Inouye, Z., and Itoh, H.** 1998. Conditions for nitrification and denitrification by an immobilized heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK17. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 351–356.
- Padhi, S., Tripathy, S., Sen, R., Mahapatra, A., Mohanty, S., and Maiti, N.** 2013. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *Int. Biodet. Biodeg.* **78**, 67–73.
- Reh fuss, M. and Urban, J.** 2005. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 421–429.
- Sarioglu, O., Suluyayla, R., and Tekinay, T.** 2012. Heterotrophic ammonium removal by a novel hatchery isolate *Acinetobacter calcoaceticus* STB1. *Int. Biodet. Biodeg.* **71**, 67–71.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note 101. MIDI., Newark, Del, USA.
- Schroll, G., Busse, H., Busse, H., Parrer, G., Rölleke, S., Lubitz, W., and Denner, E.** 2001. *Alcaligenes faecalis* subsp. *parafaecalis* subsp. nov., a bacterium accumulating poly- β -hydroxybutyrate from acetone-butanol bioprocess residues. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 37–43.
- Shi, Z., Zhang, Y., Zhou, J., Chen, M., and Wang, X.** 2013. Biological removal of nitrate and ammonium under aerobic atmosphere by *Paracoccus versutus* LYM. *Bioresour. Technol.* **148**, 144–148.
- Van Loosdrecht, M. and Jetten, M.** 1998. Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* **38**, 1–7.
- Van Trappen, S., Tan, T., Samyn, E., and Vandamme, P.** 2005. *Alcaligenes aquatilis* sp. nov., a novel bacterium from sediments of the Weser Estuary, Germany, and a salt marsh on Shem Creek in Charleston Harbor, USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2571–2575.
- Won, S., Cho, W., Lee, J., Park, K., and Ra, C.** 2014. Data build-up for the construction of Korean specific greenhouse gas emission inventory in livestock categories. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **27**, 439–446.
- Yang, X., Wang, S., Zhang, D., and Zhou, L.** 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresour. Technol.* **102**, 854–862.
- Yokoyama, S., Adachi, Y., Asakura, S., and Kohyama, E.** 2012. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**, 89–95.
- Yoshida, T. and Alexander, M.** 1970. Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europea* and heterotrophic micro-organisms. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* **34**, 880–882.
- Zhang, Q., Liu, Y., Ai, G., Miao, L., Zheng, H., and Liu, Z.** 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresour. Technol.* **108**, 35–44.
- Zhang, J., Wu, P., Hao, B., and Yu, Z.** 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.* **102**, 9866–9869.
- Zhao, B., An, Q., He, Y., and Guo, J.** 2012. N₂O and N₂ production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR. *Bioresour. Technol.* **116**, 379–385.