

T-N, T-P를 효율적으로 제거할 수 있는 균주의 분리 및 동정

차월석, 최형일*, 이동병, 강시형
 조선대학교 화학공학과, 조선대학교 환경공학과*

A Study on Separation and Identification of Strains
for Effective Removal of T-P and T-N

Wol-Suk Cha, Hyung-Il Choi*, Dong-Byung Lee, Si-Hyung Kang

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

Division of Environmental Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea*

서론

생물체를 구성하고 있는 무기물질 중 단백질의 구조와 결정에 관여하는 인(P)과 질소(N)는 자연계에 널리 존재하는 무기 영양소이다. 특히, 하천과 호소의 극심한 부영양화와 심각해지는 침출수의 악성폐수로 인하여 이들 물질의 제거에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 환경 오염 측면에서 인간 및 가축의 분뇨, 도시하수, 식품 등의 산업폐수, 비료에 의한 농업폐수, 호수·하천의 침전물, 쓰레기 침출수 등에 영양물질이 많이 포함되어 있으며, 되어 있다. 이들 영양물질 제거에는 주로 생물학적 처리 방법에 의존하고 있다 [1]. 질소성분의 경우에는 질산화균, 아질산화균(*Nitrosomonas*), 질산화균(*Nitrobacter*) 등이 있으며, 탈질에 관여하는 미생물은 많은 종이 있으나 fungi나 algae는 탈질능이 없다. 탈질은 종속영양이나 독립영양 미생물 둘 다에 의해 일어날 수 있다. 종속영양 미생물로는 *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Hypobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio* 등 [2]이 이 있다. 인의 제거에 이용되는 미생물들은 호기적인 조건하에서는 인을 polyphosphate의 형태로 전환하여 cell내에 저장하고 있다가 혐기적인 조건이 되면 다시 가수분해 반응을 일으켜 인을 cell밖으로 배출시키게 된다. 인성분의 경우에 많은 미생물이 세포 내에 과잉의 인산을 축적할 수 있다고 알려져 있는데 특히 호기성균이며 세포내에 volutin granule을 형성하는 *Acinetobacter* 속 균주가 혐기-호기 폐수처리 공정에서 인산제거에 중요한 역할을 하는 것으로 연구되어 있고, *Pseudomonas* 속, *Xanthomonas* 속 및 *Arthrobacter globiformis* 등의 세균에 있어서도 실용적인 측면에서 연구가 이루어져 있다. 이외에도 *Micrococcus* 속, *Micrococcus* 속, *Streptomyces* 속 등의 세균, *Aspergillus niger* 등의 곰팡이 그리고 남조류 등도 인을 축적한다고 보고 [3] 되어 있으며, 이들 균주를 이용한 생물학적 인 제거에 대한 연구가 수행되고 있다 [4].

따라서 본 연구는 질산화, 탈질화 등의 능력 및 과잉의 인을 흡수하고 배출할 수 있는 우수한 미생물을 하수 및 폐수에서 생물학적 방법에 이용하고자 토양 및 활성오니로부터 인 축적능이 우수한 균주를 최종 분리하여, 동정하였다.

본론

실험방법

광주시 하수처리장, 분뇨처리장의 활성오니조 슬러지, 전남 근교 골프장 주변, 소하천 수, 축산, 분뇨 및 토양 등에서 시료를 채취하였다. 이 시료를 기질이 포함된 액상배지에 접종하여 3-4주 동안 적응 배양한 후 각각의 분리원 시료에서 균주를 채취하여 평판 배양하였다. 평판배양에서 생성된 성장이 우수한 colony를 다시 액체 배지에 배양한 후 다시 성능이 우수한 균주를 다시 평판배양하는 반복 과정을 수차례 수행하여 분리한 후 본

실험에 사용하였다.

먼저 질산화 균주는 2주일간 진탕배양을 하였다. 1차 진탕배양된 균주를 고체 평판배지에 도말하여 30일간 28℃에서 배양하였다. 평판배양한 균주의 colony를 분리하여 다시 액체배지에 접종한 후 7일간 배양한 후 5회 걸쳐 계대배양하여 우수한 균주를 분리하게 되었다. 또한 탈질균은 1.5% 한천(w/v)을 첨가한 평판 고체배지를 사용하였다. 한천배지에서 생성된 colony 중 우수한 colony를 1 백금이씩 취하여 다시 액체 배지에 접종하여 진탕 배양하였다. 모든 실험은 무산소 조건에서 행하였으며 sharking incubator의 온도는 30℃, 교반속도는 150rpm, 배지내 pH는 6.8을 유지하였다. 이과정을 여러번 반복하여 우수한 균주를 분리하였다. 한편, 인 축적균의 분리를 위해 광주 및 전남 지역의 주요 토양과 하수처리장, 골프장 토양에서 수집한 활성오니를 분리원으로 하였다. 시료 1g을 0.85% NaCl 용액 99mL에 현탁 회석한 후 Shoda 등에 의한 인 이용 균주 분리배지는 한천배지(glucose 2g, NH₄Cl 1g, NaCl 2g, Na₂SO₄ 1g, KCl 0.1 g, MgCl₂ 0.01g, CaCl 0.01g, FeCl 0.001g, NaHPO 0.22g, tris(hydroxymethyl)aminomethane 10g, agar 15g, distilled water 1L, pH 7.6)에 도말하고, 25℃에서 2일간 배양하면서 형성된 집락을 3회 이상 계대하여 순수 분리하였다. 또한 분리 균주를 액체배지에서 배양시켜 여액 중 인산의 감소율이 높은 균주를 최종 선별하였다. 균주의 배양은 50mL 삼각플라스크에 액체배지를 10mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한 후 전배양액을 0.35%계 접종하여 25℃에서 진탕배양하였다. 전배양액은 보관중인 한천사면배지로부터 균주를 백금으로 일회 취하여 액체배지에 접종하고 24시간 진탕배양한 것을 사용하였다. 각 균의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 따랐으며, Methods in microbiology 및 Laboratory manual of general bacteriology에 준하여 실시하였으며, 환원당의 정량 및 인산정량을 실시하였다.

결과 및 고찰

균주의 형태학적, 배양학적 특성과 생리학적 특성을 분석하여 Bergey's manual에 의해 고려해 볼 때 암모니아성 질소 산화균주는 각각 *Nitrosomonas* sp.로 추정되며 *Nitrosomonas* WS으로 명명하였다(Fig. 1). 또한 분리된 아질산성 질소 산화균주 모두 *Nitrobacter*로 추정되며, *Nitrobacter* WS로 명명하였다(Fig. 1).

28℃에서 암모니아 산화 균주인 *Nitrosomonas* WS의 산화율이 배양 4일만에 90%의 암모니아 산화능을 보였고, 암모니아의 산화가 정량적으로 발생되어 아질산으로 변화함을 보여주고 있다. *Nitrobacter* WS은 배양 4일만에 93%의 아질산성 질소를 산화시켰음을 알 수 있다. 또한 여러 종류의 탈질 분리원 샘플의 탈질 균주들은 동정한 결과 모두 *Pseudomonas* 속이었다. *Pseudomonas* WS 균주를 접종한 플라스크의 질산성 질소 농도는 9시간만에 50% 이상이 제거되었으며, 18시간 만에는 모두 탈질이 되었다(Fig. 2). 이것은 일반적인 활성슬러지 공법에 의한 탈질소화 능력이 20~30% 정도인 것과 비교해 매우 우수한 탈질능을 나타내었다.



Nitrosomonas WS(I)



Nitrosomonas WS(II)

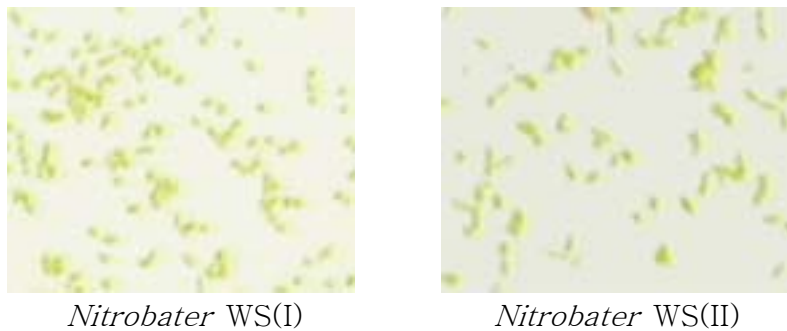


Fig. 1. Photomicrograph of *Nitrosomonas* WS and *Nitrobacter* WS.

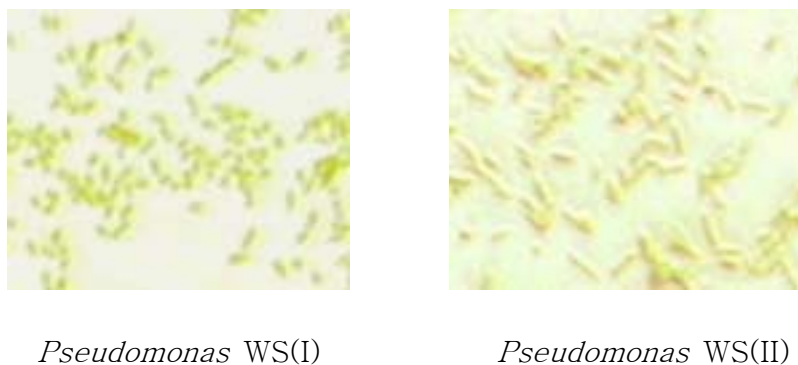


Fig. 2. Photomicrograph of *Pseudomonas* WS.

인 축적 균주를 인을 함유한 한천배지에서 분리한 후 인 축적능이 우수한 균주를 선발하여 분리 균주의 형태적 및 배양학적 특성을 조사하였다. 인 이용 분리균주는 gram 음성의 간균이고, 크기는 $0.3 \sim 0.35 \times 1.2 \sim 1.3 \mu\text{m}$ 이며 편모를 가지고 있어 운동성을 가지며, 자외선하에서 형광을 나타냈다. Nutrient agar에서 인 이용 균주의 경우는 원형의 콜로니를 가지며 점성이 약하고 묽은 반투명의 흰색을 나타내었다. 분리 균주는 gelatine 액화력, 탄소원으로 citrate 이용성에서 양성반응을 보였으며 탄수화물의 산화/발효력은 두 성질을 모두 가지고 있었다, 각종 당으로부터의 산생성능 시험에서는 분리균주는 음성반응을 보였으며 glucose를 산화시키는 것으로 나타났다. 이상과 같은 형태, 세리 및 생화학적 특성이 전반적인 결과를 종합하여 Bergey's Manual 에 따라 동정한 결과 *Chromobacterium*. WS로 명명하였다(Fig. 3). *Chromobacterium* WS 균주를 인산 150 ppm을 함유한 배지에 30°C , 48시간 진탕배양하면서 시간경과에 따른 균체의 생육, pH 변화, 당의 소비율 및 인산의 흡수율 변화를 조사한 결과 *Chromobacterium* WS 생육속도가 다소 늦고 균체량도 낮았으며, 이와 비례적으로 인산의 흡수도 지연되어 40간 이후에 80% 수준의 흡수율을 나타내었으며 glucose 이용은 24시간 후에 빠른 소비율을 보였다. 인산의 배양 초기농도를 여러 균주에서 비교 실험한 결과, *A globiformis*이 24시간 이후 약 87%로 최대흡수율을 보였으며, 인산 소비에 있어 중요 문제점으로 많은 세균에서 성장 중 또는 성장 중지 후 인산의 분비가 있는데 48시간까지 흡수농도를 유지하여 조사한 균주 중 효과적으로 인산을 소비하였다고 하며, *Acinetobacter calcoaceticus* 이 배지 중 인의 초기농도를 2mmol/L로 하여, 20시간 경과했을 때 1.25mmol로 최대흡수율을 보였으나, 탄소원의 소비로 성장이 중단된 몇 시간 후 흡수된 인산의 분비가 관찰되었다.



Chromobacterium WS(I) *Chromobacterium* WS(II) *Chromobacterium* WS(III)

Fig. 3. Photomicrograph of *Chromobacterium* WS.

결론

광주시 하수처리장, 분뇨처리장의 활성오니조 슬러지, 전남 근교 골프장 주변, 소하천 수, 축산, 분뇨 및 토양 등에서 시료를 채취하여 분리동정한 결과는 다음과 같다. Bergey's manual에 의해 고려해 볼 때 암모니아성 질소 산화균주는 각각 *Nitrosomonas* sp.로, 또한 분리된 아질산성 질소 산화균주 모두 *Nitrobacter*로 추정되었다. 28°C에서 암모니아 산화 균주인 *Nitrosomonas* WS의 산화율이 배양 4일만에 90%의 *Nitrobacter* WS은 배양 4일만에 93%의 아질산성 질소를 산화시켰다. 또한 탈질 균주들은 동정한 결과 모두 *Pseudomonas* 속이었고, 9시간만에 50% 이상이 제거되었다. 이것은 일반적인 활성슬러지 공법에 의한 탈질소화 능력이 20~30% 정도인 것과 비교해 매우 우수한 탈질능을 나타낸다. 인 이용 분리균주는 gram 음성의 간균이고, 크기는 $0.3 \sim 0.35 \times 1.2 \sim 1.3 \mu\text{m}$ 이며 편모를 가지고 있어 운동성을 가지며, 자외선하에서 형광을 나타내는 등 결과를 종합하여 Bergey's Manual 에 따라 동정한 결과 *Chromobacterium* 속이었다. *Chromobacterium* WS 균주를 인산 150 ppm을 함유한 배지에서 인산의 흡수는 40시간 이후에 80% 수준의 흡수율을 나타내었다. 인산의 배양 초기농도를 여러 균주에서 비교 실험한 결과, *A globiformis*이 24시간 이후 약 87%로 최대흡수율을 보였다.

결과적으로 질산화, 탈질화 및 인제거의 효율을 높일수 있는 미생물을 분리하였으며, 이들 미생물의 좀더 진척된 특성 및 최적 조건을 파악하기 위해서 온도 pH, 교반속도, 초기 인산, 질소 농도, 탄소원 농도의 변화에 의한 실험을 진행할 예정이다.

감사

본 연구는 농림기술개발센터 첨단기술개발사업 연구비(과제명: 생물막 여과공법에 응용 황토(인공토양)를 이용한 총질소, 총인 처리공정기술, 개발연구기간: 2001. 8. 16 - 2002. 8. 15)를 지원 받아 수행한 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. K. H. Baker and D. S. Herson, Bioremediation, McGraw-Hill, Inc., (1994).
2. 이인선 등, 폐하수중 질소의 생물학적 제거기술에 관한 연구, 과학기술처, (1990).
3. H. F. Kaspar, *Arch. Microbiol.*, **133**, 126-130(1982).
4. C. W. Randall, G. T. Morales L., G. D. Waltrip, & E. D. Romm, High rate economical biological removal of nitrogen and phosphorous, IAWPRC SPECIAL Conference, Rome, Sept.(1987).