

## 根面흡착 미생물을 이용한 오염수의 질소처리 기술

# Treatment of Organic Nitrogen by Root Surface Adsorption Bacteria in Water

박진희<sup>1</sup> · 김덕원<sup>1</sup> · 김상진<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(주)두합크린텍

### I. 서론

최근 들어 한국 정부는 국내 4대 강 유역의 재정비를 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 이들 강의 재정비에 가장 중요한 것은 강을 오염시키는 오염물의 저감이라 할 수도 있다. 따라서 강의 원천이라 할 수 있는 하천의 오염정화는 무엇보다 중요한 요소라 할 수도 있다. 이에 따라 강으로 유출되는 하천의 오염물처리하는 하천의 재정비에 필수불가결한 항목이라 생각되며 4대강의 수질오염 방지는 먼저 중소규모 하천의 화학적 오염물질의 제거가 무엇보다도 우선되는 요소라 할 수 있다.

도시지역은 주로 주민들의 다양한 생활용수의 다량 사용에 의해 폐수가 발생하며 농촌지역에서는 식물의 성장을 위한 유기태 질소, 무기태 질소 및 인산 등과 병해충을 제거하기 위해 사용하는 다양한 농약 등에 의해 하수가 오염될 수 있다. 특히 질소, 인산 오염은 하천에 조류를 발생시킴으로써 먼저 시각적 오염문제를 야기할 수 있으며 하천주위 악취의 원인으로도 파악될 수 있다. 특히 중요한 사항은 이들 오염물질의 증가는 병원균의 성장에도 영향을 미쳐 인축의 건강에 피해를 끼칠 수도 있다.

하천정화를 위한 기술에는 여러 방법이 있다. 그 중 생물적 방법으로는 미생물과 담체를 이용하여 하천의 유기태 질소를 제거 할 수 있도록 하는 방법과 식물을 이용하여 다양한 무기태 질소 및 인산을 흡취함으로써 하천의 질소 및 인산 오염을 감소시키게 할 수 있다고 본다. 그 중 하수질의 질소오염의 경우 유무기성 질소의 농도와 조건에 따라 미생물별 밀도 및 생태적 조건이 현저히 변화되어 지속적으로 하천오염정화가 어려우며 특정 식물 또는 미생물이 오염하

천에서 우점(dominant)관계가 지속적이지 못하여 수질의 질소오염저감에는 상당한 어려움이 내포된다고 판단된다. 또한 물리적 방법으로는 다양한 질소흡착담체를 사용하여 수질을 개선하는 등 많은 방법을 적용시키고 있지만 설치의 문제점과 설치 후의 재처리방법의 문제점으로 인해 적용하기가 아직 이런 실정이라 말할 수 있다.

또한 화학적 방법으로는 많은 수처리 연구자들의 결과로 수질을 정화할 수 있지만 하천에 화학성분을 적용시키는 것은 매우 우려스럽고 다량의 유해물이 첨가됨으로써 적용하기가 매우 까다롭다고 할 수 있겠다.

그러나 하천의 오염물을 처리하기 위해서는 미생물과 식물을 각각 또는 혼합 처리하여 질소를 제거하기도 하지만 효율적으로 유기태질소와 무기태질소의 감소를 위한 방법으로는 아직 많은 기술이 적용되어야 한다고 본다.

본 연구는 국내 4계절의 환경조건에서도 성장하고 적용 식물 근면과 밀접한 공생관계를 가지며 원활한 유기태질소를 이용하고 최종 식물에게 무기태질소를 제공하는 기술개발이다. 이에 따라 우선적으로 근면 미생물을 선발하고 선발된 미생물을 적용식물의 근면에 접촉시켜 효율적으로 유기태 질소 이용도를 높이고자 한다.

이에 따라 근면 정착미생물을 이용하여 근면에서 원활한 유기태의 무기태 질소화를 위해 본 연구를 수행하였다.

### II. 연구범위 및 방법

#### 1. 연구범위

본 연구는 하천에 생육하는 식물과 그 식물에 우점적으로 성장하는 미생물을 이용하여 유기태 질소와 무기태 질소를

효율적으로 제거하기 위한 기술을 개발하고자 하는 것이다.

먼저 적용하고자 하는 근면 미생물은 다양한 장소의 서식처를 선발하여 채집한 적용예정 식물에서 분리하고 그 중 유기태 질소를 잘 분해하는 근면 미생물을 순수 분리하였다. 또한 분리 및 선택한 근면미생물을 적용식물의 근면에 효율적으로 흡착 증진시키기 위하여 적용식물의 근면에서 타 미생물을 제거하였고 그 후 순수 분리된 근면 미생물을 생장시켜 식물 뿌리에 흡착되도록 하여 우점화시켰다.

최종적으로 근면 미생물이 뿌리에 우점화된 식물을 하천에 식재하여 식물의 생장을 통해 수질이 정화되도록 하기 위한 실험을 수행하였다.

## 2. 연구방법

### (1) 식물 채집

우리나라 전국의 하천에 자생하는 대표적인 정수식물들은 애기부들(*Typha angustifolia*), 부들(*Typha orientalis*), 노랑꽃 창포(*Iris pseudoacorus*), 연(*Nelumbo nucifera*), 달뿌리풀 (*Phragmites japonica*), 갈대(*Phragmites communis*) 등이 있다. 본 실험에서는 다양한 환경에 적응이 용이하고 안정적인 정수식물 *T. angustifolia*을 이용하였다.

### (2) 유기물분해 미생물의 순수분리

*T. angustifolia*의 뿌리에서 근면 미생물을 분리하기 위하여 채집해온 뿌리에서 약 100g의 양을 1cm간격으로 잘라 2차 증류수 150ml에 넣은 다음 *Typha* sp. 뿌리 100g이 들어간 증류수 150ml를 강하게 25분간 shaking시켜 근면에 붙어있는 미생물들을 뿌리에서 탈락 시켰다. 전기에 탈락시킨 현탁액을  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  로 희석하여 그 중  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  희석액을 미세한 옥수수가루배지(corn meal agar)에 200 $\mu$ l씩 도말하였다. 이 고체배지를 20 $^{\circ}$ C BOD 배양기에서 3일 이상 배양한 후 배양된 콜로니(colony)들을 각각 단일 콜로니(single colony)별로 PDA에 생장시킨 후 순수 분리하여 LA에 생장시켰다.

### (3) 우점미생물분리

각각의 미생물을 순수 배양하여 7주간 조직배양용 영양제를 첨가한 배양기에서 생장시킨 *T. angustifolia*을 이용하여 각각의 선발 미생물 우점율을 평가하였다. 배양기에서 7주간 배양한 *T. angustifolia*뿌리에 선발미생물을 각각의

농도로 접종하여 우점율이 높은 미생물을 재 선발하고 우점율을 평가한 후 초저온 냉동고에 저장하였다.

그 후 우점율이 높은 세균을 선택하여 실험에 이용하였으며 그 세균이 매디아에서 유기 질소원을 분해하도록 하여 고밀도의 세균을 선발하였다. 또한 *T. angustifolia*뿌리에서 선발된 세균을 적용 대상 식물에 inoculation하여 다양하게 오염된 하천수에 적용한 후 7일 후 선발하여 미생물의 생태적 우점율을 재 평가하였다.

그 후 우점율이 높은 미생물을 선발하여 저장하며 이용하였다.

### (4) 정수식물의 뿌리 살균

정수식물의 뿌리에 유기물을 잘 분해하는 미생물만을 흡착 및 우점화시키기 위해서는 적용하려는 *T. angustifolia*의 뿌리에 미생물이 제거된 상태가 필요하다. 따라서 본 발명에서는 식물에 영향을 주지 않고 식물의 뿌리의 세균을 제거하기 위하여 먼저 *T. angustifolia*의 뿌리를 증류수로 깨끗이 씻어 준비하고 75% 알코올 용액에 60초간 처리하여 근면에 흡착된 근면 미생물 들을 제거하고 2차 증류수로 3회 세척하고 그 후 자연건조 시킨 뿌리를 준비하였다.

### (5) 미생물 현탁액 제조

순수분리된 미생물을 액체배지(LB) 5ml에 25 $^{\circ}$ C, 200rpm으로 2일간 배양하였다. 배양된 미생물을 원심분리하여 상층액을 버리고 pellet을 DDW로 3번 세척하여 배지내 포함된 영양성분을 제거하였다. 그 성분을 제거한 세균의 pellet을 DDW에 넣어 O.D.660 0.3으로 맞추어 현탁액을 제조하였다.

### (6) 유기질소흡수 미생물의 근면흡착 및 우점화

뿌리표면 살균 후 준비된 *T. angustifolia*의 뿌리를 제조된 현탁액에 넣어 27 $^{\circ}$ C 배양기에서 6시간 정지 처리하여 근면 미생물이 뿌리에 흡착 및 우점화되도록 하였다.

### (7) 정수식물의 배양

각각의 실험 용기에 잎과 뿌리의 생장이 활성화되어 있는 것으로 판단되는 *T. angustifolia*를 적용하고 그 후 뿌리가 구슬의 표면에 효율적으로 접촉되게 하기위해 구슬을 개별적으로 투입하여 식물지지체를 만들고 그 후 질소로 오염되어 있는 자연 하천수를 200ml씩 넣어 실험장치를 준비하

였다. 준비된 식물이 파종된 성장장치에 광합성과 생장의 효율성을 위해 140,000Lux의 빛과 90%의 상대 습도 (relative humidity), 27°C의 온도로 처리하였고 명암은 명암이 18/6시간이 되도록 3일간 배양하였다.

### (8) 정수식물의 질소 제거율 측정

정수식물 배양 후 발생하는 처리수와 대조구를 이용하여 처리수의 질소감소량을 평가하였다. *T. angustifolia* 배양 후 처리수에 남아 있는 총 질소(total nitrogen)의 함량을 확인하여 미생물 무처리 조건, 우수 흡착미생물 2가지로 처리조건에서 총 질소 감소율을 측정하였다. 각 실험구의 처리수를 수거하여 total nitrogen을 전처리기와 수질분석기 [DR2800(HARC)]로 과황산염 흡수(Persulfate Digestion) 방법으로 분석하였다.

## III. 결과 및 고찰

### (1) 질소이용도 평가

*T. angustifolia* 뿌리에 근면 미생물을 흡착시킨 조건에서 총 질소 제거율이 대조구에 비해 높았는데 특히 세균 DH-1에서 대조구에 비해 46% 더 효율이 좋은 것으로 나타나 급격한 세균의 밀도증가가 있었음이 확인되었다.

그리고 생체 중 별 질소처리율을 평가하기 위하여 실험에 사용한 *T. angustifolia*의 생체 중을 각각 지하부와 지상부로 나누어 측정하여 전체 생체 중을 측정하였다. 측정된 생체중은 각 실험구의 1g당 질소제거율을 측정하기 위하여 질소 제거량을 생체 중으로 나누어 구하였다.

생체 중 1g당 질소제거율은 대조구에 비해 세균 DH-1 미생물이 49% 효율이 더 좋았으며 세균 DH-19 미생물은 15% 더 효율이 좋은 것으로 확인되었다.

따라서 기존의 방법인 식물만 식재하여 처리하는 것보다 오염물질을 잘 분해하는 미생물을 식물의 뿌리에 처리하여 식재할 경우 더욱 수질정화 효과가 좋은 것으로 나타났다.

### (2) 세균동정

미생물 HD-1을 순수 분리하여 생리적 생리적 실험으로 identification한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

이 미생물은 형태적으로 구형과 막대형, 분열조건으로는 2분열, gram test에서는 negative로 나타났으며 기타 화학 유기영양생물, 임의 혐기성, 과산화수소분해 등으로 identification

했을 때는 *Pseudomonas*목으로 분류되며 colony의 노랑색과 움직임으로 판단했을 때 *Pseudomonadaceae*과와 *Azotobacteraceae*과로 identification되어 진다. 먼저 *Pseudomonadaceae*과에서 성장조절물질이 필요 없으므로 *Pseudomonas* spp.과 *Frateriaria* spp.속으로 identification되며 *Azotobacteraceae*과에서 막대형태이므로 *Azotobacter* spp. 속과 *Azomonas* spp. 속으로 분류되었다.

따라서, 이는 *Pseudomonas*, *Frateriaria* 속, *Azotobacter* 속, *Azomonas* spp.속으로 identification되었다.

*Pseudomonas* spp.속과 DH-1의 특징비교에서 DH-1은 41°C생장되지 않고 형광콜로니가 없으며 sucrose levan이 negative이고 gelatine은 positive이며 arginine은 negative였다. 따라서 *Pseudomonas mallei*와는 큰 차이를 보였으며 *P. stutzeri*와 gelatine 반응의 차이는 보였으나 *P. stutzeri*와 거의 유사하였다.

그리고 *Frateriaria* 속과 DH-1의 비교에서 동일한 결과는 없었다.

*Azotobacter*속과 HD-1의 특징을 비교한 결과 생리 생태 조사에서 거의 유사 했으나 *Azotobacter* 속의 경우 근면에서 성장하지 않는 특징이 있으므로 동일한 균이라 볼수 없었다.

*Azomonas* 속과 HD-1의 특징비교 결과 동일한 결과가 부족함으로 *Azomonas*속으로 파악될 수 없었다.

따라서 전체 동정결과 본 DH-1의 세균을 동정한 결과가 가장 유사성이 높은 세균의 종속은 *P. stutzeri*로 나타났다. 따라서 당사에서 선발된 근면정착에 따른 질소처리세균의 명명은 *P. stutzeri* DH-1으로 명명하였다.

## IV. 결론

본 연구에서 사용된 세균을 identification하기 위해 먼저 형태학적 및 생리학적 계통으로 실험한 결과 그 균은 *P. stutzeri* DH-1으로 판정되었다. 그러나 더욱 확실한 ID를 위해서는 *P. stutzeri* DH-1의 유전자 검정을 통하여 효율적으로 identification하는 방법을 적용하여야 할 것이다.

또한 세균 DH-19 미생물이 *T. angustifolia* 근면에 적용되어 있을 경우는 15%의 유기질소 분해도를 나타내었고 *P. stutzeri* DH-1를 근면에 적용할 경우에는 49%이상의 유기질소 제거 효과가 나타내었다. 뿌리에 흡착하지 않은 경우 두세균은 세균 성장율이 유사했으나 식물에 적용시킬

경우 *P. stutzeri* DH-1과 균 DH-19 미생물의 질소분해도가 차이가 현저하게 나타나는 것은 *P. stutzeri* DH-1의 경우 근면에 흡착함으로써 motility가 현저히 떨어지며 이와 동시에 근면에 흡착할수 있는 물질을 나타내어 효과적인 근면 정착 및 유기질소 효율이 높은 것이 아닌가 생각 된다.

따라서, 본 결과와 같이 *P. stutzeri* DH-1의 유기질소 제거는 대조구 대비 약 50%정도의 유기질소 제거 효과가 나타남에 따라 기존의 근권 미생물에 의해 유기질소를 제거하는 것 보다는 본 기술에서 개발된 근면정착 할 수 있는 미생물로서 효율적으로 유기질소를 이용하여 수질을 자연적으로 정화시킬 수 있었다.

이상의 결과에 따라 하천의 오염도를 감소시키는 기존의 방법으로 하천에 자연적 흡착미생물을 기진 식물만 하천에 식재하여 처리하는 것보다 오염물질을 잘 분해하는 미생물을 적용식물의 뿌리에 처리하여 식재하면 더욱 수질정화 효과가 좋은 것으로 판단된다.

결과에 의한 애기부들(*T. angustifolia*)을 비롯하여 부들(*T. orientalis*), 노랑꽃 창포(*I. pseudoacorus*), 연(*N. nucifera*), 달뿌리풀 (*P. japonica*), 갈대(*P. communis*) 등의 정수식물에도 오염물질을 잘 분해하는 미생물을 식물뿌리에 처리하여 식재하면 비슷한 효과가 있을 것으로 사료된다.

(특허출원번호 10-2009-0083491)

## V. 인용문헌

1. 김귀남(2002) 미나리, 애기부들의 수질정화에 관련된연구, 성균관대 M.S thesis
2. 丹保憲仁 등 (1995) 정수기술, 문지사.
3. 윤순강 등 (2002) 만경강 유역 하천의 특성별 영향평가 한국환경농학회지 21:237-242
4. Peter H.A. Sneath et al(1986)Bergy's manual of Systematic Bacteriology Volumn 1, 2 William & Wilkins
5. Cambell.R (1985) Plant microbiology, Edward Arnold