

도시 하수내 질소와 인의 제거균주 분리 및 동정에 관한 연구

김 철 호 · 윤 성 녀 · 장 성 렬 · 최 영 길

한양대학교 자연대학 생물학과

The Isolation and Identification of Valuable Bacteria for Removal of Nitrogen and Phosphate in Municipal Waste Water

Kim, Chul Ho, Sung Nyo Yoon, Sung Yeoul Chang and Yong Keel Choi

Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang Univ.

ABSTRACT

Bacterial strains which have excellent removal capacity of phosphate or reduction capacity of NO_3^- were isolated from waste water. Among isolated strains, WR8 and WR1 strains were showed good efficiency in removal of phosphate and reduction of NO_3^- , respectively. When each strain was cultivated in waste water, WR8 strain removed about 85% of phosphate and WR1 strain reduced about 85% of $\text{NO}_3^- - \text{N}$. By the result of investigation of morphological and physiological characteristics, WR8 was identified as *Aeromonas hydrophila* and WR1 as *Klebsiella pneumoniae*.

서 론

1987년 현재 서울시의 하수종말처리장에서는 방류수의 경우 유기물은 90% 이상 처리된 상태로 유출되지만 질소와 인산화합물의 처리효율은 매우 낮은 상태이다(서울특별시, 1987).

서울시의 도시하수는 그것이 정화되었건 되지 않았건 간에 한강이라는 생태계에 연결된다. 질산염과 인산염은 유기질과의 정상 분포비율(C : N : P=100 : 10 : 1)을 벗어날 경우, 그리고 질산염이 0.2~0.3 ppm, 인산염이 0.01~0.02 ppm을 초과할 경우 부영양화를 초래하게 된다(Whittaker, 1975). 이러한 문제 해결을 위하여 현재 물리, 화학적인 방법이 주로 사용되고 있으나 2차적인 문제를 야기할 수 있으므로 생물학적 처리가 가장 바람직한 방법이라 할 수 있다.

본 실험에서는 도시하수 종말처리장의 방류수의 환경요인을 계절별로 측정하고 방류수 내에서 질소의 환원능력과 인의 제거효율이 우수한 균주를 분리하고 동정하는데 목적을 두었다.

인의 제거를 위한 균주는 방류수배지내의 인과 세포내에 축적되는 인의 양을 측정함으

본 연구는 1988년도 한국과학재단의 목적기초 연구비에 의하여 수행되었음

로써, 질소환원을 위한 균주는 탈질화경로중의 하나인 NO_3^- 의 환원정도를 측정함으로써 그 능력을 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

환경요인의 분석

방류수의 환경요인으로는 온도, pH, 생물학적 산소요구량, 부유고형물질의 양, 유기물 함량 그리고 질소(NO_3^- -N, NO_2^- -N, NH_4^+ -N)와 인의 함량을 계절별로 측정하였는데, 질소와 인의 함량은 방류수를 membrane filter(Gelman, GF/A)로 여과시킨 후 측정하였다. 환경요인 측정은 APHA, AWWA, WPCF(1985)에 의거하였다.

인산염 제거효율이 우수한 균주의 분리

방류수에 한천을 넣은 방류수 배지와 nutrient agar 배지에 방류수의 희석액을 접종하여 30°C 배양기에 24시간 배양한 후 형성된 colony중 잘 자란 colony를 임의로 택하였다.

선택한 균주를 방류수에 넣어 배양하면서 배지내 인산염의 양을 측정하여 제거능력이 있는 균주를 분리하여 세포내의 무기인산염의 양을 측정하고 세포내 무기인산중합체의 축적양상을 관찰하였다.

방류수에서 선택한 균주들을 nutrient broth 배지에 접종하여 30°C 진탕 배양기로 배양한 다음 원심분리하여 (10,000 rpm) 세포를 수획한 후 potassium phosphate가 첨가되지 않은 Knopp's 최소배지($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0.12 g, FeCl_3 trace glucose 15 g/l D. W)에서 3일간 진탕배양함으로써 인을 결핍시켰다(Lee, 1984). 이렇게 처리한 세포들을 다시 원심분리하여(10,000 rpm) 멸균된 방류수배지에 재접종하고 시간별로 배지내 무기인산염의 양을 측정함으로써 이들 균주들의 인산염 제거효율을 비교하였다.

대조균주로는 *Bacillus cereus*를 사용하였다(Rosenberg *et al.*, 1969).

세포내의 인산화합물 측정

세포내의 무기인산 중합체의 추출은 Miyachi and Tamiya(1961)의 방법을 변형하여 사용하였다. 상기와 같이 배양하여 수획한 세포에 5% cold perchloric acid를 2회 처리(30분, 15분)하여 10,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 취하여 산 가용성분획을 얻었다.

산 가용성 무기인산 중합체의 함량은 산 가용성분획 3 ml을 pH 4.0으로 조절한 후 1 M acetate buffer(pH 4.0) 5 ml와 진한 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 용액 3 ml을 가하여 잘 섞어서 5°C 에서 하루밤 방치한 다음 원심분리하여(5,000 rpm, 10분) 얻은 침전물을 1 N HCl에 용해하여 가수분해된 무기인산의 양을 측정하여 구하였다. Ortho-phosphate의 분리는 Berenblum and Chain(1938)의 방법에 따라 산 가용성분획에 H_2SO_4 (최종농도 1 N)와 ammonium molybdate(최종농도 0.00016 M) 및 isobutanol 3 ml을 가하여 잘 섞은 다음 상등액을 취하였다.

산 불용성 무기인산 중합체의 분리는 Wiame(1949)과 Harold(1962)의 방법을 변형하여 산 불용성 침전물에 8% TCA를 가하여 15분간 가열한 다음 원심분리하여 상등액을 취하였다.

무기인산의 정량은 Lee(1984)의 방법에 따라 위에서 얻은 시료에 1.25% ammonium molybdate(in 2.5 N H₂SO₄)와 Eiconogen 용액을 처리하여 37°C에서 20분 반응시킨 후 ice-water(4°C)에서 반응을 정지시키고 660 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포내에 축적된 무기인산 중합체의 관찰

무기인산 중합체는 전자밀도가 높으므로 전자현미경상에서 검게 나타난다. 따라서 세포내에 축적된 무기인산 중합체를 인이 결핍된 배지에서 배양시킨 세포와 방류수에서 배양중인 세포 배양액을 수확하여 OsO₄로 처리한 후 전자현미경으로 관찰하였다.

질산염(NO₃⁻)의 환원력이 뛰어난 균주의 분리

방류수에서 분리된 균주들은 탈질화세균 분리배지(KNO₃ 0.5 g, beef extract 0.3 g,

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of WR 1 and WR 8

Parameters	Strains	
	WR1	WR8
Colony form	round, convex	round, convex
Cell arrangement	single, pair	single, pair
Shape	rod	rod
Gram stain	-	-
Motility	-	+
VP test	+	-
Gelatin liquefaction	-	+
Nitrate reduction	+	+
Oxidase test	-	+
ONPG test	+	+
Arginine dihydrolase	-	+
Lysine decarboxylase	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate utilization	+	-
H ₂ S production	-	-
Urease test	+	-
Tryptophane deaminase	-	-
Indole production	-	+
Gas from glucose	+	+
Carbohydrate utilization		
Glucose	+	+
Mannitol	+	+
Inositol	+	-
Sorbitol	+	-
Rhamnose	+	+
Sucrose	+	-
Melibiose	+	-
Amygdalin	+	+
Arabinose	+	+

peptone 0.5 g/100 ml D.W., pH 7.0)에 접종하여 candle jar에 넣고 30°C 배양기에서 24~48시간 배양 후 배지내의 질산염을 아질산염으로 환원시킨 균주를 선별하였다.

선별된 균주들을 nutrient broth 배지에 접종하여 대량 배양한 후 무균적으로 원심분리한 다음 멸균된 방류수에 적당량 접종하였다. 이것을 candle jar에 넣고 30°C 배양기에서 정제배양하면서 시간별로 배지를 수확하여 10,000 rpm으로 원심분리한 다음 배지내에 남아있는 질산염(NO_3)과 아질산염(NO_2)의 양을 측정함으로써 질산염 환원력을 비교하였다.

대조균주로는 *Pseudomonas aeruginosa* (Higgins and Burns, 1975)를 사용하였다.

균주의 동정

균주의 동정은 Kreig and Halt(1984)에 의거하여 시행하였는데, Table 1에 나타난 29가지의 형태적, 생화학적 특징들을 비교, 조사하였다.

결 과

본 실험에서 조사한 환경요인들을 살펴보면 pH는 7.3~8.0 정도로 나타났고 BOD는 평균 45 mg/l로써 일반적인 방류수(40 mg/l)에 비하여 약간 높은 값을 보였으나 질소화합물과 무기인산의 양은 매우 높은 값을 나타내었다. 방류수의 C:N:P 비율은 1:6.2:0.8 정도이다(Table 2).

방류수내 인산염 제거효율 실험에서는 거울에 분리한 WN3(NA 배지에서 선택)와 WR8(방류수 배지에서 선택) 두 균주가 상대적으로 높은 능력을 보였는데, 이 두 균주와 대조균주인 *Bacillus cereus*의 인산염 제거효율을 비교해보면 WR8이 제거 효율에 있어서 가장 우수한 것으로 판명되었다(Fig. 1). 배양시간에 따른 세포내 무기인산 화합물의 축적과 양적동태를 살펴보면 WR8이 *Bacillus cereus*에 비해 더 많은 무기인산을 축적하였으며, 배양초기에 orthophosphate, 산 가용성 무기인산중합체, 산 불용성 무기인산중합체와 같은 무기인산화합물을 다량축적하였다가 6시간 이후에서 12시간까지는 감소하는 현상을 나타내었다(Fig. 2). 무기인산 중합체의 세포내 축적양상은 인산결핍시기에는

Table 2. Environmental factors of waste water experimented in this study

Characters	Season			
	Spring	Summer	Fall	Winter
Temperature (°C)	12.0	19.0	13.5	9.0
pH	7.50	7.99	7.68	7.29
BOD (mg/L)	48.52	44.59	38.06	48.84
SS (mg/L)	56.8	70.0	12.8	13.6
Organic C (mg/L)	1.4312	2.7602	3.0259	1.8299
$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ (mg/L)	9.5563	6.4934	15.7819	9.9501
$\text{NO}_3^- - \text{N}$ (mg/L)	2.3291	2.5475	3.1618	1.4485
$\text{NO}_2^- - \text{N}$ ($\mu\text{g/L}$)	82.4472	486.7753	1354.7956	44.4830
PO_4^{3-} (mg/L)	1.2907	1.9101	1.9509	1.9338
C:N:P	1:8.36:0.90	1:3.45:0.69	1:6.71:0.64	1:6.25:1.06

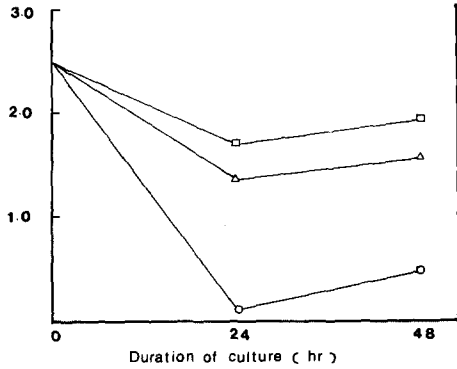


Fig. 1. Relative capacity in removal of phosphate compounds in waste water.
[□—□; of *Bacillus cereus*, △—△; of WN3, ○—○; of WR8]

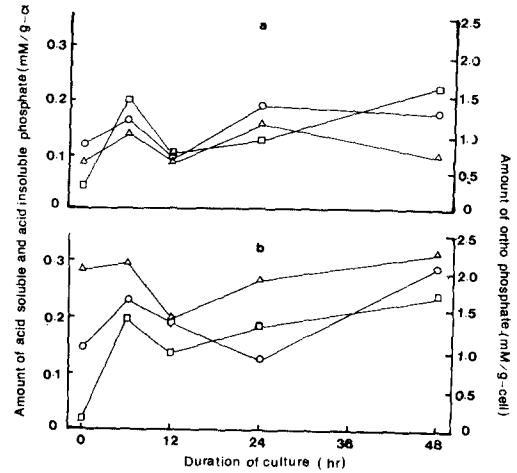


Fig. 2. Changes in amount of phosphate compounds during the growth of *Bacillus cereus* (a) and WR8(b) in waste water.
[□—□; ortho-phosphate, ○—○; acid-soluble polyphosphate △—△; acid-insoluble polyphosphate]

과립이 나타나지 않았으나 6시간 배양시기의 세포에서는 과립이 진하게 나타나고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 방류수내에서 질산염의 환원력이 가장 뛰어난 균주로는 WR1이 대표적으로 선별되었는데, 이 균주는 질산염 농도를 배양시기 12시간에 약85% 정도의 매우 높은 수준으로까지 환원시킬 수 있었다(Fig. 4).

분리균주(WR1, WR8)를 동정하기 위한 실험의 결과는 Table 1에 나타내었으며, 29가지 특징들은 Kreig and Halt(1984)와 비교해 보았을 때 WR1은 *Klebsiella pneumoniae*, WR8은 *Aeromonas hydrophila*로 판명되었다. *Aeromonas* sp.는 폐수내에 존재하고 있는 과잉의 인산염을 제거할 수 있는 Bio-P bacteria로 보고된 바 있다(Comeau *et al.*, 1986).

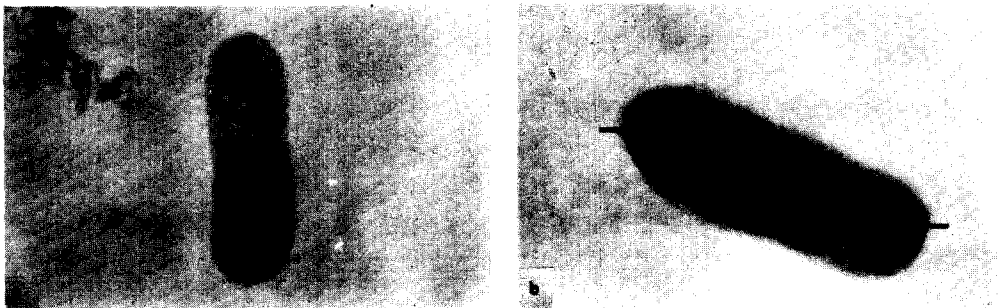


Fig. 3. Electron microscope photographs of WR8 showing the formation of polyphosphate granules.
a; phosphate-starved cell, b; WR8 cell cultivated for 6 hours in waste water.

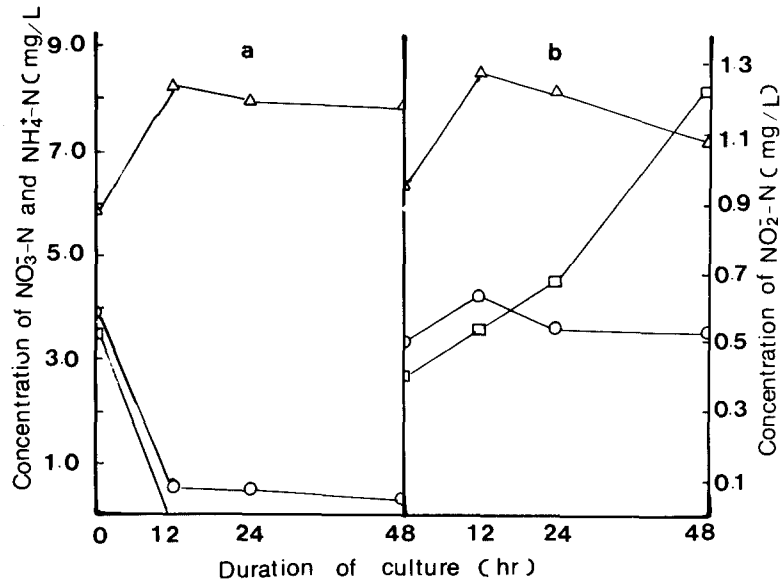


Fig. 4. Changes in amount of NO₃-N (○—○), NO₂-N (□—□), NH₄-N (△—△) during the growth of WR1(a) and *Pseudomonas aeruginosa* (b) in waste water.

고 찰

방류수의 환경요인을 보면 pH 7.3~8.0으로 질산염이나 인산염제거에 적당한 범위를 나타내며 (Friedberg, 1977; Knowles, 1982), C : N : P 비율은 1 : 6.2 : 0.8으로 유기탄산에 비해 질소와 인의 비가 매우 높다는 사실을 알 수 있다. 일반적으로 암모니아성 질소는 질산성 질소의 양보다는 낮다 (Welch, 1980)는 사실과는 달리 암모니아성 질소가 훨씬 많다는 것을 알 수 있다. 인의 양은 대부분의 방류량(1.0 mg/l)에 비해 높은 수준이었다 (Hammer, 1971).

인의 제거실험에서는 실험균주를 인산이 제거된 배지에서 배양시킨 후 방류수에 재접종하였을 경우 초기에 활발히 방류수에서 인산염을 제거함과 동시에 세포내 무기인산화합물의 축적이 높아지는 현상은 "phosphate overplus" 현상 (Weimberg, 1975)과 직접 연관이 있다. 이는 인산결핍후에 인산이 충분히 공급될 경우(방류수에 재접종할 경우) 인산결핍에 대한 hypercompensation effect가 나타나서 세포내 무기인산 중합체의 축적이 일어났다고 볼 수 있다. 이처럼 방류수 또는 배지에서 과잉의 인산이 제거되기 위해서는 먼저 인산이 결핍된 상태에서 생육된 세포를 이용하는 것이 효율적이라는 것을 알 수 있다. 배양시간이 지남에 따라 방류수내에 orthophosphate의 양이 증가하고 있는 것은 배양조건이 혐기적으로 변함에 따라 polyphosphate를 절단하여 orthophosphate를 방류수내로 방출하고 생성된 에너지를 사용하여 세포내 저장물질을 만든다는 보고 (Comeau *et al.*, 1987)와 일치하고 있음을 알 수 있다. 방류수에서 배양된지 6시간된 세포에서 가장 많은 인산화합물이 축적하게 되었고 그 이후 12시간까지는 감소하는 현상을 나타내는데 이는 세포가 성장하고 세포내 저장물질을 만드는 데 필요한 에너지원으로 사

용하기 때문이다(Comeau *et al.*, 1987). 세포내에 축적되는 무기인산 중합체의 양상을 보기위해 전자현미경으로 관찰한 결과 인이 결핍된 배지에 비해 방류수에서 배양한 세포에서 두개의 과립이 형성되었음을 알 수 있고 이는 Fig. 2와 일치함을 나타내고 있다.

이상의 결과 방류수에서 분리된 WR8 균주가 인산염 제거균주로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 질산염을 환원할 수 있는 균주는 수개 보였지만 그 중 WR1이 가장 우수하였다. 대조균주로서 *Pseudomonas aeruginosa*를 사용하여 candle jar에 넣어 산소 분압이 낮은 상태에서 배양하였을 때 방류수내의 질산염을 WR1의 경우 85% 정도의 높은 수준까지 환원시켰고 아질산염의 경우까지 완전히 환원시킬 수가 있었다. 그러나 Fig. 4에 나타난 결과를 보면 질산염과 아질산염이 없어진 대신 암모니아의 양이 증가하였는데 WR1의 경우 약 45% 정도 *Pseudomonas aeruginosa*의 경우 약 30% 가량 증가하였다. 방류수내에 암모니아성 질소의 증가현상은 방류수내 C:N:P 비율의 불균형때문이며 특히 *Klebsiella pneumoniae*의 경우는 질산염을 암모니아로 환원시키는 균주로 보고된 바 있다. 이상의 결과 방류수에서 분리된 WR1 균주를 아질산염을 질소가스로까지 탈질화시키는 균주와 혼합배양을 한다면 질산염을 제거할 수 있는 우수한 균주가 될 수 있음을 알 수 있었다.

적 요

본 연구에서는 질소와 인산화합물의 처리효율이 매우 낮은 상태로 유출되는 방류수에서 잘 성장할 수 있는 균을 일차 선별하고 이들 균중 질산염의 환원력이 뛰어난 균과 인산염을 잘 제거할 수 있는 균을 이차 선별하여 동정하고자 하였다. 인산염의 제거효율이 가장 우수한 균은 *Aeromonas hydrophila*로 방류수에서 85%의 인산염을 제거할 수 있었고 질산염의 환원력이 가장 뛰어난 균은 *Klebsiella pneumoniae*로 동정되었으며 방류수내 질산염을 85%까지 환원시켰다.

引用文獻

- APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard method for the examination of water and wastewater. 16ed. American Public Health Association. pp. 3-619.
- Berenblum, I. and E.Chain. 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. J. Biochem. 32:295-298.
- Comeau, Y., R. Barry, J.H. Kenneth and K.O. William. 1987. Phosphate release and uptake in enhanced biological phosphorus removal from wastewater. Jour. Water Poll. Control Fed. 59:707-715.
- Deakynne, C.W., A.P. Manu and J.K. David. 1984. Pilot plant demonstration of biological phosphorus removal. Jour. Water Poll. Control Fed. 56:867-873.
- Friedberg, J. 1977. Phosphate transport in *Micrococcus lysoderleticus*. Biochim. Biophys. Acta. 466:451-460.
- Harold, F.M. 1962. Depletion and replenishment of the inorganic polyphosphate pool in *Beyrisoria crassa*. J. Bacteriol. 83:1047-1057.
- Higgins, I.J. and R.G. Burns. 1975. Sewage and fertilizers. In, The Chemistry and Microbiology of Pollution. Academic Press, New York, Sanfransisco. pp. 87-100
- Hammer, M.J. 1977. Water amd waste-water technology. John Wiley and Sons, Inc. pp. 451-454.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. Microbiol. Reviews 46:43-70.

- Kreig, N.R. and J.G. Halt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.I. Williams and Wilking Co., Baltimore, London, pp. 409-598.
- Lee, K.S. 1984. Studies on the regulation of phosphate metabolism in yeast (*Saccharomyces uvarum*). Ph.D. Thesis, Hanyang Univ. pp. 13-14.
- Miyachi, S. and H. Tamiya. 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella cells*. Plant and Cell Physiol. 2:415-424.
- Rhee, G.Y. and F. Wolfgang. 1978. Wastewater denitrification with one carbon compounds as energy source. Jour. Water Poll. Control Fed. 50:2111-2119.
- Rosenberg, H., N. Medveczky and J.M. Lanauze. 1969. Phosphate transport in *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta. 193:159-167.
- 서울특별시. 1987. 하수종말처리장 일일 종합가동일지.
- Weimberg, P. 1975. Phosphate levels in nongrowing cells of *Saccharomyces mellis* as determined by magnesium ion and the phenomenon of "Überkompensation". J. Bacteriol. 121:1122-1130.
- Welch, E.M. 198. Ecological effects of waste water. Cambridge Univ. Press. 77 pp.
- Whittaker, R.H. 1975. Communities and ecosystems. 2nd ed. Macmillan Publishing Co. p.p. 1-385.
- Wiame, J.M. 1949. The occurrence and physiological behavior of two netaphosphate fraction in yeast. J. Biol. Chem. 178:919-929.

(1989年 5月 19日 接受)