

호기성 탈질균 *Pseudomonas* sp. DN-9의 분리 및 질산염 환원 특성

조 순 자 · 정 용 주 · 이 상 준
부산대학교 미생물학과
(2005년 9월 9일 접수; 2005년 10월 17일 채택)

Isolation and Nitrate Reduction Characteristics of Aerobic Denitrifier *Pseudomonas* sp. DN-9

Sun-Ja Cho, Yong-Ju Jung and Sang-Joon Lee
Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
(Manuscript received 9 September, 2005; accepted 17 October, 2005)

From sludge of S municipal wastewater treatment plant in Busan, Korea, we isolated the denitrifier DN-9 which showed the ability of denitrification under aerobic condition by the color change and gas formation in liquid culture with Giltay medium. The isolated strain was identified as *Pseudomonas* sp. DN-9 on the basis of the morphological, physiological, biochemical and nucleotide sequence analysis of 16S rRNA. The isolated strain, *Pseudomonas* sp. DN-9, has cytochrome *cd₁* *nirS* of nitrite reductase. By the co-existence of additional ammonium and nitrate ion, the strain was not affected largely on growth in SL series broth. It seemed the result of denitrification. Although *Pseudomonas* sp. DN-9 has a good nitrate reduction activity under aerobic condition, the activity is less than *Pseudomonas stutzeri* in same cultivation condition. However, *Escherichia coli* had little the activity of aerobic denitrification and *Pseudomonas putida* showed lower activity of aerobic denitrification than *Pseudomonas* sp. DN-9 and *Pseudomonas stutzeri* in this study.

Key Words : Aerobic denitrifier, Nitrate reduction, *Pseudomonas* sp.

1. 서 론

최근 산업의 발달과 함께 도시화와 같은 인구집중은 국소지역 뿐만 아니라 넓은 지역에 있어 자연정화의 범위를 벗어나게 만들어 시간이 지날수록 환경오염을 가중시키는 경향을 가지며 그 중 하나는 과도한 영양염류로 인한 부영양화와 적조현상이다¹⁾. 그 결과 수원의 탁도는 높아지고, 유기물이 부패하여 썩는 냄새가 나며, 수중의 용존산소가 낮아져 수중생물에 악영향 및 독성을 유발시킴으로써 수자원의 재사용에 있어 어려움을 초래시키고 있다²⁾.

이렇게 다량으로 존재하는 질산염을 제거하는 인위적인 방법으로 이온교환 (ion exchange), 화학적 환원 (chemical reduction), 역삼투 (reverse osmo-

sis), 전기투석 (electrodialysis) 등 물리·화학적 방법을 응용한 공정이 개발되어 왔다. 그러나 현재까지는 처리의 용이성 및 안정성, 게다가 경제적이라는 장점으로 인해 생물학적 탈질화 공정방법이 주로 채택되어지고 있는 실정이다³⁻⁶⁾.

현재까지 개발된 생물학적 질소 제거 공정을 살펴보면 절대적 호기성 조건을 요구하는 질산화 단계와 무산소적 조건에서 행해지는 탈질화의 두 반응이 다양한 순서로 이어져 진행되는 시스템으로서 두 반응을 별도로 수행하기 위한 큰 면적의 부지 확보가 요구되며, 급격한 환경변화로 인해 처리의 주역이 되는 미생물을 제어하기가 쉽지 않은 단점을 가지고 있다⁷⁻⁹⁾. 이러한 단점 외에도 질산화 후속공정으로서의 탈질에는 추가적인 유기물이 요구되어 유기물제거 후 다시 유기물을 일부 보충하기 위한 추가경비가 소요된다는 점의 경제적인 손실이 있으며, 질산화와 탈질의 최적화를 위해서 임의로 각 반

Corresponding Author : Sang-Joon Lee, Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone: +82-51-510-2268
E-mail: sangjoon@pusan.ac.kr

응조에 맞는 pH조정이 필요하다¹⁰⁾.

한편, 일반적으로 예측하는 것에 비해 훨씬 광범위한 영역에서 다양한 종류의 탈질균이 호기성 환경에서도 분리되고 있어, 이들의 특성을 이용한 새로운 생물학적 탈질공정 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적으로 *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas nautica*, *Thiosphaera pantotropha*, *Microvirgula aerodenitrificans* 등^{10~12)}의 많은 탈질균들이 자신들의 생장률을 높이기 위하여 산소와 nitrate를 동시에 전자수용체로 이용할 수 있다고 보고되고 있다. 특히, 국내에서도 하폐수내 고농도의 질소화합물을 제거하기 위한 탈질공정 개발과 함께 황을 이용한 독립영양 탈질균에 대한 연구가 진행 중에 있으며, 호기성 탈질균주를 포함한 관련 연구가 꾸준히 진행되고 있다^{13~15)}.

따라서 본 연구는 C/N비가 비교적 낮은 부산의 S하수처리장의 슬러지로부터 탈질 효율이 높은 균주를 선별한 후, 그 중 호기성인 영역에서도 탈질을 수행할 수 있는 균을 분리하여 균을 동정하고 호기적인 조건에서의 탈질 특성을 살펴보고자 하였다. 아울러 기존의 잘 알려져서 연구되고 있는 호기성 탈질균 및 전통적인 무산소 탈질을 수행하는 대조균과의 탈질능을 비교함으로써 본 연구에서 분리된 탈질균의 호기성 상태에서의 질산염 환원능을 평가해보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 탈질 세균의 분리 및 배지 조성

탈질능이 우수한 탈질세균을 분리하기 위해서 S하수처리장으로부터 반송 슬러지를 채취하여 분리용 시료로 이용하였다. 채취한 슬러지 1 g을 50 ml의 인산염 완충액 (pH 7.2)이 들어있는 삼각플라스크에 첨가 후, 200 rpm으로 30 분간 진탕배양시킴으로써 미생물을 탈리시켰다. 이 액을 시험관으로 옮겨 약 30 분 동안 방치한 후, 상등액을 단계적으로 회석하여 탈질세균용 배지인 Durham관이 담긴 Giltay배지 (Table. 1)의 시험관에 각각 접종하였고, 30℃의 혐기배양기에서 72시간 배양하였다. 이 때 가스를 형성하면서 배지내 질산염을 이용함에 따라 pH의 상승이 초래되어 파란색으로 변한 시험관에서 탈질세균을 1차적으로 분리하였다.

2.2. 실험균의 선정 및 동정

분리된 균주를 30℃ 수욕조내에서 산소발생기를 통해 공기를 주입하면서 호기적 배양하여, 가스 발생도와 질산성 질소 및 총질소 제거능의 비교를 통하여 탈질능이 우수한 균주를 선정하고, 이를 본 실험에 사용하였다.

Table 1. Giltay media composition for isolation of denitrifying bacteria

Medium A and B of Giltay media	
Medium A (500 ml)	
KNO ₃	1.0 g
Asparagine	1.0 g
1% BTB solution	5 ml
Medium B (500 ml)	
Sodium citrate	8.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
FeCl ₂ · 6H ₂ O	0.005 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.2 g

Using after mixing medium A with medium B (1:1), pH 7.0-7.2

분리균주의 형태적, 생리적 및 생화학적인 특성을 조사하였으며, 생화학적 특성의 조사를 위해서는 API 32NE kit를 사용하여 동정하였다. 분자생물학적 동정을 위해서는 실험균주의 DNA를 추출하여 16S rRNA의 유전자 중에 변이가 많다고 알려진 V3 부위를 암호화 하고 있는 유전자범위를 PCR로 증폭한 후 염기서열분석을 하였으며 그 결과를 NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Blast search를 통해서 결과를 도출하였다. 이 때 사용된 primer들은 Bioneer사에 주문제작하여 사용하였다. 16S rRNA의 일부분을 증폭시키기 위해 사용된 forward primer (341F)는 염기서열이 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'이며 reverse primer (907R)는 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'이다. 한편 대부분의 탈질균은 cytochrome *cd1*과 연관된 *nirS* 혹은 Cu-mediated nitrite reductase인 *nirK*라는 두 종류의 nitrite reductase 중의 한 종류를 가진다고 알려져 있는데¹⁶⁾ 분리균주의 nitrite reductase종류를 알아보기 위해 사용한 *nirS* 유전자 증폭용 forward primer (*nirS* 1F)는 5'-CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T-3'이며 reverse primer (*nirS* 6R)의 경우는 5'-CGTTGAACTT(A/G)CCGGT-3'이었다. 그리고 *nirK*유전자의 증폭을 위해 사용된 forward primer는 5'-GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA-3'이며 reverse primer의 경우는 5'-GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG-3'이었다¹⁷⁾. PCR산물은 전기영동 후 gel extraction kit로 DNA를 용출하였고, 제노텍사에 염기서열분석을 의뢰하였다.

2.3. 실험균주의 탈질특성

2.3.1. 배지내 영양염의 종류에 따른 탈질특성

기본적으로 탈질의 특성 실험에 사용한 배지는

Sistrom's Minimal Medium A(Table 2)¹⁸⁾에 5% Luria broth를 첨가한 SL broth를 사용하되, 암모니아와 질산성 질소의 조합에 따른 서로 다른 4종류의 배지를 설정하여 실험을 하였다(Table 3). 실험은 1 L 삼각플라스크에 150 ml의 SL 배지에 0.5 g/L의 sodium nitrate를 첨가한 배지에 전배양하여 키운 실험균주를 흡광도 (600nm)로 0.05가 되도록 주입하여 실험을 실시하였으며, 각 조의 반응조는 2개가 한 조를 이루어 실험하였다. 배지의 반응조기 pH는 모두 7.0으로 조정하였다.

Table 2. Composition of Sistrom's Minimal Medium A Preparation of 1 liter of 10× medium

Compound	
KH ₂ PO ₄	27.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
Succinic acid	40.0 g
NaCl	5.0 g
Nitritotriacetic acid	2.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.334 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.020 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (1% solution)	0.2 ml
Trace Element Solution ^a	1 ml
Vitamins Solution ^b	1 ml

^a per D.W. 100 ml (Store at 4°C)

EDTA	1.765 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10.95 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5.0 g
MnSO ₄ · H ₂ O	1.54 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.392 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.248 g
H ₃ BO ₃	0.114 g

^b per D.W. 100 ml (Store at 4°C)

Nicotinic acid	1.0 g
Thiamine HCl	0.5 g
Biotin	0.010 g

Table 3. SL series broth for experiments of nitrate reduction

Type	Composition
SL	Sistrom's medium : Luria broth (100:5)
SL+NO ₃	Sistrom's medium : Luria broth (100:5) + nitrate (0.5 g/L)
SL ⁻	Sistrom's medium [without (NH ₄) ₂ SO ₄] : Luria broth (100:5)
SL ⁻ +NO ₃	Sistrom's medium [without (NH ₄) ₂ SO ₄] : Luria broth (100:5)+ nitrate (0.5 g/L)

2.3.2. 기존 탈질균과의 비교실험

대조균주로는 기존에 잘 알려져서 연구가 진행되고 있는 호기성 탈질균 *Pseudomonas stutzeri*¹⁹⁾와 *Pseudomonas putida*를 KCTC (Korea Culture Type Collection)로부터 분양을 받아 사용하였으며, *Escherichia coli* 또한 탈질능 실험의 대조균주로 이용하였다. 균주간의 성장정도에 따른 nitrate의 경쟁적 전자수용체인 산소에의 영향을 고려하여 호기상태를 충족시키기 위한 실험으로 200 ml 용량의 serum용병에 시료 100 ml를 넣은 후, 공기 발생기를 통해 무균적으로 공기를 주입하면서 30°C 수욕조를 이용하여 실험을 실시하였으며, 6시간 단위의 시간 간격으로 시료분석을 하였다. 이 때 사용한 배지는 SL broth에 질산염을 첨가 (0.5 g/L)한 배지를 사용하였다.

2.4. 시료분석

배양액내의 질산성 질소, 아질산성 질소, 암모니아성 질소, 총 질소 정량은 분리된 각각의 균주를 Table 3의 배지로 배양 후 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 구경 0.22 μm의 유리섬유지로 여과한 액을 시료로 하여 분석하였다. 아질산성 질소, 질산성 질소 및 암모니아성 질소는 BANS+LUBBE사의 수질이온분석기를 사용하였으며, 총질소는 수질오염 공정시험 방법의 흡광광도법을 이용하였다. Nitric oxide의 측정은 GC (Gas Chromatography, Varian 3800)를 사용하였으며, ECD 검출기에 Polarpack Q (80/100)으로 충전된 Column을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 실험균주의 선정 및 동정

혐기적인 조건에서 탈질효능을 보이는 49개의 분리균주 중 호기성인 상태에서도 탈질활성을 보이는 16개의 균주를 분리하였으며 그 가운데 가스형성능, 배지색깔의 변화를 육안으로 관찰하고 시료의 총질소 제거율이 우수한 DN-9을 본 연구의 호기성 탈질용 실험균주로 선정하였다(Table 4).

분리된 탈질 균주 DN-9의 형태학적 특성은 Gram 음성의 간균이었으며, 생화학적 특성을 실험한 결과는 Table 5, 6에 나타내었다. 균의 동정은 기본적으로 Bergey's mannul of systematic bacteriology 에 의하여 동정하였다²⁰⁾. 이상의 형태학적, 생화학적 결과에서 1차적으로 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. 또한, 16S rDNA의 염기서열 자료를 가지고 NCBI의 BLAST search한 결과, 16S rRNA 염기서열상에 상동성이 95%이상인 2 종류의 균주가 검색되어 나왔는데 AY965247의 *Pseudomonas* sp. WT OTU2와 AY472116의 *Pseudomonas fluorescens*

Table 4. Removal efficiency of total N of the isolated strains under aerobic condition

Isolated strains	Removal efficiency of Total N	Isolated strains	Removal efficiency of Total N
DN-1	34.3%	DN-9	56.2%
DN-2	23.7%	DN-10	40.5%
DN-3	29.0%	DN-11	32.6%
DN-4	34.1%	DN-12	31.0%
DN-5	31.9%	DN-13	39.1%
DN-6	33.0%	DN-14	48.9%
DN-7	33.0%	DN-15	42.0%
DN-8	33.0%	DN-16	0.4%

Table 5. Biochemical and physiological characteristics of DN-9

Characteristics	DN-9
<i>Morphology</i>	
Gram stain	-
Cell form	rod
<i>Motility</i>	
	+
<i>Utilization of</i>	
Glucose	+
Arginine	+
Ethanol	+
Citrate	+
L-Valine	+
<i>Denitrification</i>	+
<i>Oxidase Reaction</i>	+
<i>Catalase Reaction</i>	+
<i>Aerobic growth</i>	+
<i>Anaerobic growth</i>	+

Table 6. Characterization of DN-9 by API 32 NE

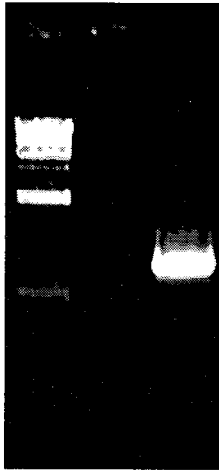
Ornithine decarboxylase	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Urease	+
L-Arabitol (Acidification)	-
GHI	-
5-Ketogluconate	-
Lipase	+
Phenol Red (Acidification)	-
β-Glucosidase	-
Mannitol (Acidification)	-
Maltose (Acidification)	-
Indol (Production)	-
Adonitol N-Acetyl-β-Glucosamin	-
β-Galactosidase	-
Glucose (Acidification)	-
Saccharose/sucrose (Acidification)	-
L-Arabinose	-
D-Arabitol	-
α-Glucosidase	+
α-Galactosidase	-
TRE	-
n Rhamnose (Acidification)	-
Inositol	-
Adonitol	-
Palatinose E (Acidification)	-
β-Glucuronidase	-
CEL	-
Sorbitol(Acidification)	-
α-Maltosidase	-
MaloNaTe	+
L-Aspartic acid	-

으로 96.36%의 상동성을 나타내었다(request ID : 1162226723-5092-175213678513 BLASTQ1).

한편 nitrite reductase의 PCR증폭실험결과, *nirK* primers와는 반응하지 않았고 *nirS* 유전자증폭용 primers와는 정확히 반응하여 약 900 bp대의 PCR 산물 (Fig. 1)을 보여주었다. 이를 염기서열 분석한 자료를 BLAST search한 결과 미동정의 *Pseudomonas* sp. (AJ440494, AJ440494)의 *nirS*와 각각 96.78과 96.58%의 상동성을 보여주었다 (request ID : 1126230905-15154-24708986651. BLASTQ1). 그러나 16S rDNA 염기서열에서 상동성이 높게 나온 *Pseudomonas fluorescens*의 *nirS*의 염기서열과 alignment한 결과에 의하면 88%정도의 상동성 (Fig. 2)만을 나타내어 본 실험에서의 분리균주는 *Pseudomonas* 속의 미동정 균주로 파악하고 이에 *Pseudomonas* sp. DN-9으로 명명하였다.

3.2. *Pseudomonas* sp. DN-9의 호기성 탈질 특성
 3.2.1. 배지내 영양염의 종류에 따른 탈질특성
 3시간의 유도기를 거친 후 배양시간에 따라 시료

를 채취하여 배양액내 무기질소성분의 변화를 통해 그 탈질능을 살펴보았으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 암모늄염과 질산염이 각각 단독으로 배지내에 있을 때와 암모늄과 질산염이 혼합되었을 때 균의 생육변화를 살펴본 결과, 본 실험균주의 경우 SL⁻배지(Sistrom 최소배지에서 암모늄염을 제거한 것에



lane1: size marker (Hind III처리한 λ DNA)
lane2: PCR product with *nirK* primers
lane3: PCR product with *nirS* primers

Fig. 1. PCR product with *nirK* and *nirS* primers.

5% LB를 첨가한 배지)에 질산염을 첨가한 배지에서 균의 생장이 다소 늦게 시작되었고 암모늄염과 질산염 모두 있는 반응조에서는 초기에는 빠른 성장속도였으나 시간이 지날수록 탈질과 함께 생장이 둔화되었다. 그러나 질소원이 타반응조에 비해 절대

적으로 부족할 것 같은 SL⁻배지에서의 반응을 제외한 나머지 3종류의 배지 (SL, SL+NO₃, SL⁻+NO₃)에서는 모두 균의 생장이 접종 18시간 정도에서 최대 흡광도를 보여주었다. SL 배지에서의 균의 생육은 흡광도 1.3정도에서 약간의 지체기를 가진 후 재성장하여 최대 흡광도에 이르렀는데 그 이유는 명확하게 밝히지 못하였으나 본 실험에 사용된 배지가 Sistrom최소배지와 Luria broth가 섞인 형태이어서 기질이용속도의 차이가 아닐까 유추해본다. 이것은 암모늄염을 제거한 배지에 질산염도 첨가하지 않은 반응조의 생육이 흡광도 1.35정도에서 최대를 이룬 것으로도 간접적으로 해석할 수 있을 것으로 보인다.

호기성 탈질균의 경우 대부분이 종속영양의 질화도 병행한다고 알려진 바²¹⁾와 같이 nitrate가 첨가된 상태에서 Fig. 3의 (c), (d) 모두 반응 9시간쯤에 NO₃가 반응초보다 더 높은 농도를 보였다. 암모늄염만 있는 배지 (SL배지)와 암모늄염에 질산염이 부가된 배지 (SL+NO₃배지)에서의 흡광도로 본 균의 생장에 있어 동일한 배양조건하에서 비슷한 최고치의 흡광수치를 보임으로써, 그리고 배양액에도 가스상의 다량의 거품을 보이는 점 등을 통해 배지내 존재하던 질산염은 nitrate ammonification에 의해 생체구성성분으로 소비된 것이 아니라, 명백하게 탈질을 수행하였음을 알 수 있었다. 한편 SL broth에서 암

```

agcagatcgtctcgcaccgg-ggcatgaccgtcgacacccagcaatacca tcccagccg
agcagatcgtctctaccgggtggcatgaccgtggacaagcaggagtaccacccggaaccg

cgcgctcgcggcgatcatcgcctcccacgagtgcccgagttcatcgtcaacgctcaaggaa
cgtgtagcggcgatcatcgcctcccacgaatggccggagttcatcgtcaacgctcaaggaa

accggcaaggtgatgctggtcaactaccaggacatcaagaacctcaccatcaccagcatc
accggcaaggtgatgctggtcaattaccaggacatcaagaacctcaccatcaccaccatc

gacgccgcaccgttctcctcagcggcggtgggacagcagccatcgctacttcatgagc
gacgccgcaccgttctcctcagcggcggtgggacagtcaccatcgttatttcatgagc

gccgccaacaactccaacaaggtagcgggtgatcgactccaaggaacgcaagctcaccgcc
gcggcgaacaactccaacaaggtagcgggtgatcgactccaaggaacgcaagctcaccgct

ctgggtggagctgggcaagaccccgacccaggccggcgcccaacttcaacca tccactc
ctgggtggatgtgggcaagaccccgaccccggtcgtggcgccaacttgtgacccgcaa

tatggaccggtgtgggcccaccagccacttgggtgacgccgggtttcgctgatcggcacc
tatggtcgggtgtgggcccaccagccacttgggtgacggcggtgttcagtgattggttacc

gaccgggtcaagcatccgcaatcgcctggaaca P. fluorescens
gaccgggtcaagcaccgcantacnctggaanca Isolated strain
    
```

Fig. 2. Comparison of *nirS* sequence between the isolated strain and *P. fluorescens*.

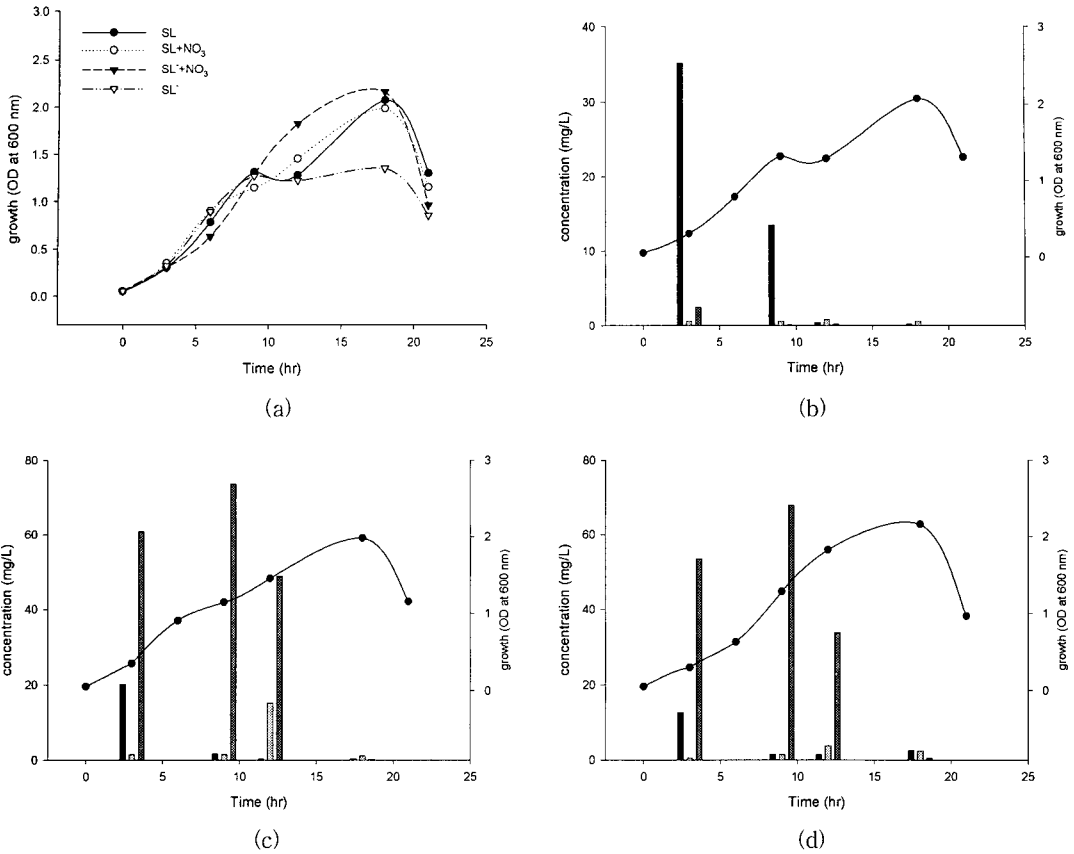


Fig. 3. Nitrate reductase activity and growth curve of *Pseudomonas* sp. DN-9 under with or without ammonia and nitrate.

(a) Growth curve with various broth
 (b) SL broth (c) SL+NO₃ (d) SL⁻+NO₃ (Table 6참고)
 ■ NH₄-N, ■ NO₂-N, ■ NO₃-N, (b)(c)(d)의 ●— Growth with each broth

모습 성분은 제거한 SL⁻ broth에 질산염을 첨가한 배지 (SL⁻+NO₃) 에서는 5%로 첨가한 LB배지 외에는 암모늄이 없는데, SL⁻ broth에서의 생육보다도 훨씬 높은 생육흡광도를 보이는 것은 질산염의 환원이 아마 nitrate ammonification 방향으로 진행된 것이 아닐까 유추된다. 하지만 전환속도의 차이인지 중간 산물로서 암모니아태의 질소가 상승하는 값은 시료분석상에 크게 나타나지 않았다.

3.2.2. 호기성 탈질과정 중 발생한 가스분석

분리균의 배양중 나온 가스 분석은 운반기체로서 N₂를 사용한 GC를 이용하였다. 다양한 질소태의 가스가 탈질과정중 발생할 것으로 예상되나 GC 운반기체가 N₂ gas이며 아직 국내에서는 질소 방사선 동위원소를 사용한 실험분석상의 애로가 있어 정량 분석을 하지 못했다. 하지만 *Pseudomonas* sp. DN-9를 인위적으로 공기를 주입하여 배양하면서

흡광도 0.8미만의 균주배양액에서 가스를 채취하여 분석한 결과, 탈질의 중간 대사 산물로서 체류시간 4-5분사이에 N₂O가 검출되어 본 연구에서 분리된 균주 *Pseudomonas* sp. DN-9은 호기성 탈질균임을 다시 한 번 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 하지만 본 연구에서는 탈질의 극히 일부분의 영역에 대해서

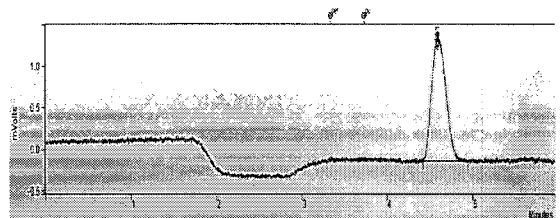


Fig. 4. Detection of N₂O gas as one of the intermediates emitted in aerobic culture.

호기성 탈질균 *Pseudomonas* sp. DN-9의 분리 및 질산염 환원 특성

실험한 것으로서 중간대사물을 포함한 탈질의 최종 산물인 질소가스로의 전환에 대한 실험은 앞으로 더 진행되어야 할 것이다.

3.2.3. 대조균주와의 생육곡선 및 탈질능 비교

대조균주마다 성장속도 및 산소이용도 차를 고려하여 본 실험에서 사용된 분리균주에서의 탈질능 실험 때와는 달리 산소의 고갈을 대비하여 반응초부터 공기발생기를 통해 인위적으로 공기를 불어넣어주면서 실험을 실시하였다. 반응기는 200 ml의 serum병을 이용하였으며, 100 ml의 배지를 채우고 여기에 흡광도 0.05 수준으로 전배양한 균을 접종한 후 30°C, 수욕조에서 공기를 주입하면서 탈질능 실험을 실시하였다.

이에 의하면 본 실험에 사용된 균주 모두 흡광도 0.05로 출발하여 약 20시간을 전후로 최대증식에 도달하였다(Fig. 5). 또한, 동일한 농도의 암모니아태 질소와 질산태 농도를 가지는 배지에서 본 실험에 사용된 균주인 *Pseudomonas putida*와 *Escherichia coli*는 아질산태 질소에서 아질산 가스 및 질산화

가스, 질소로의 일련의 탈질반응에 의한 nitrate의 소실보다는, 화학적 산화 혹은 흡광도 상승과 함께 cell량이 증가됨에 따라 이어지는 산소와의 경쟁에서 일부 사용되어지는 것이 아닌가 여겨진다. 즉, *Pseudomonas stutzeri*와 분리균주인 *Pseudomonas* sp. DN-9의 경우 일정한 양의 균체량이 확보된 후 급속한 질산태 질소의 소실이 일어나는 것을 알 수 있는데 중간대사물로 nitrite가 보여지는 것으로 미루어보다 nitrate의 환원이 호기적인 탈질의 결과로 판단된다. 탈질속도면에서는 *P. stutzeri*가 흡광도 1에서 2사이의 급속한 균체생장과 함께 질산염 상태의 질소 역시 왕성하게 탈질시킴을 알 수 있었으며, 본 실험의 분리균주도 실험에 사용된 배지에서의 성장속도가 늦은 탓인지는 명확하지 않으나 동일한 흡광도에 도달했을 때 *P. stutzeri*와 견줄만한 좋은 호기성 탈질균임을 알 수 있었다. *Escherichia coli*와 비교해본다면 *Pseudomonas putida*도 호기적인 조건에서 nitrate reductase의 활성이 약하게나마 존재할 가능성도 있었다. 하지만 *Escherichia coli*의 경우 균체의 증가에 따라 예상되는 충분한 호기가

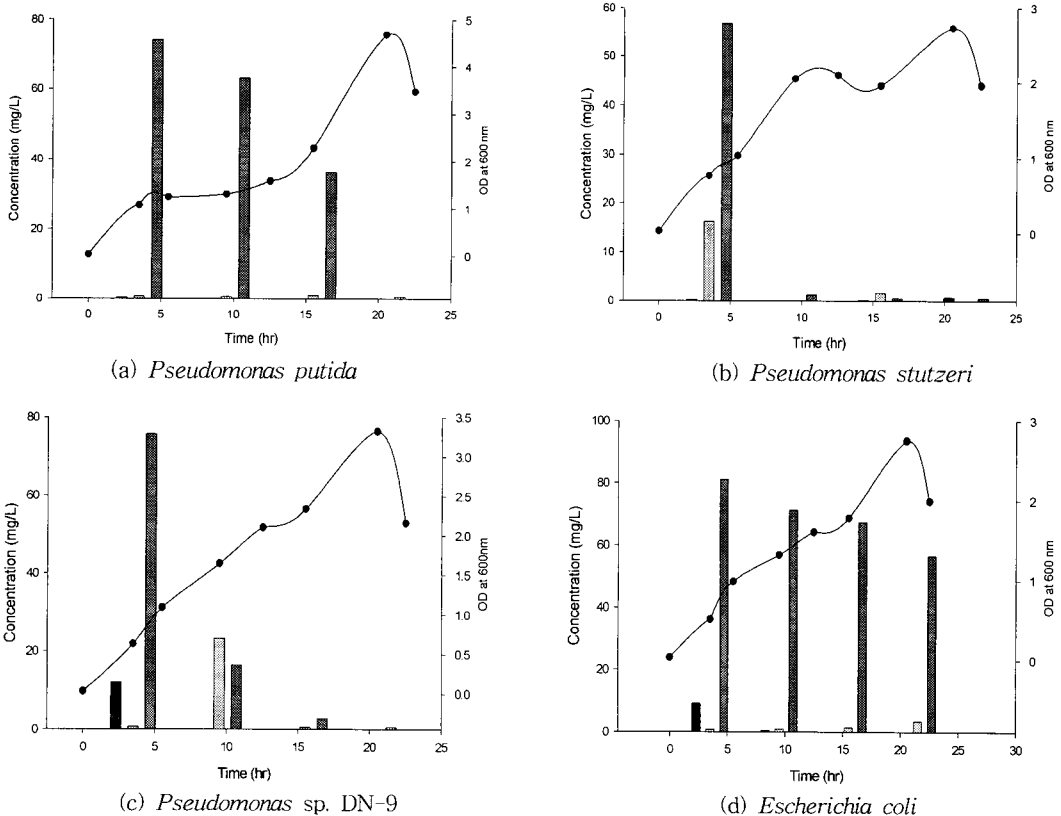


Fig. 5. Characteristics of nitrate reduction in various denitrifiers including *Pseudomonas* sp. DN-9 and *E.coli*.

■ NH₄-N, ▨ NO₂-N, ▩ NO₃-N, ●— Growth with each broth

이루어지지 못하는 상황에서의 무산소적 탈질외에는 호기적인 조건에서는 nitrate reductase의 활성이 거의 없었다. 그리고 *P. putida*의 경우 실험에 사용된 SL 배지에서 이중적인 성장형태를 보여주어 완전한 비교는 힘들지만, 호기성에서 배지내 단위 탄소원당 질소원제거능이 크지 않음을 알 수 있었다. 이것을 통해 볼 때 비록 탈질균이라 하더라도 동일한 형태의 탈질보다는 공존하는 탄소원과 다른 영양분의 종류와 농도에 따라 탈질특성이 달라질 수 있음을 알 수 있었다.

아무튼, 본 연구와 같은 호기성 탈질균에 대한 연구는 기존의 유기물 제거를 목적으로 하는 활성슬러지공법의 호기반응조를 약간 개조함으로써 탈질의 효과까지 유도할 수 있는 가능성을 보여준다는 점에서 주목할만하다 할 것이다. 이것은 질소와 인 같은 영양염제거에 요구되는 추가적인 반응조 부가에 따른 부지확보면의 해결 및 탈질에 요구되는 탄소원의 투입 등에 따른 추가부대비용의 불필요에 따라 경제적인 생물학적 탈질공정의 개발에 좋은 착안점이기도 하다. 그러나 현재까지의 연구에 의하면 탈질의 최종산물인 질소가스로의 전환을 충분히 해내는 호기성 탈질은 적어, 탈질과정에서 유발되는 아질산염, 질산화 가스 등의 유독성을 고려할 때 보다 세심한 연구 및 이를 보완가능한 새로운 공정 또한 개발되어야 할 것이며 최종산물이 용존성 물질이 아니라 주로 가스상의 물질이므로 슬러지의 침강성과 관련한 연구 또한 진행되어야 할 것으로 보인다.

4. 결 론

탈질의 수행에 있어 반드시 무산소 조건을 요구하는 전통적인 탈질균이 아닌 호기성상태에서도 탈질을 수행할 수 있는 호기성 탈질균의 분리를 S하수처리장의 반송슬러지를 시료로 하여 분리하였다. 분리된 호기성 탈질균의 형태학적·생화학적 특성 및 16S rDNA의 염기서열일부 및 nitrite reductase의 구성 염기서열 등의 결과를 근거로 동정한 결과 *Pseudomonas*속의 미동정 균주로 밝혀져 *Pseudomonas* sp. DN-9으로 명명하였다. 또한 분리균주는 대부분의 *Pseudomonas*속 계열과 마찬가지로 *nirS* 타입의 nitrite reductase를 가지고 있었다.

분리균주의 탈질능을 암모니아 및 질산염을 제한하면서 실험한 결과에 의하면 암모니아염이나 질산염만이 있는 배지에서는 원활한 질산화와 탈질이 이어지는 것이 아니라 개체성장에 주로 질소원이 사용되었다. 그러나 암모니아와 질산염을 함께 준 배지에서도 단독염만을 준 배지와 비슷한 수준의 흡광도까지만 성장하는 것으로보아 암모늄염은 개체

의 성장에 이용이 되고 추가로 첨가한 질산염은 원인이 탈질의 방향으로 진행되었음을 알 수 있었고, 이것은 일련의 탈질반응의 중간산물 중 하나인 N_2O 의 검출로써 재확인 되었다.

Pseudomonas sp. DN-9를 기존에 이미 탈질균으로 알려진 *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*의 균주와 그 생육 및 탈질특성을 비교하였다. 가스형성정도 및 무기 질소화합물들의 동태를 살펴볼 때 본 연구중에 사용된 균주 중 호기적인 탈질능을 속도면까지 통합하여 볼 때 가장 우수한 탈질균은 *P. stutzeri*이었고, 본 실험에서 분리된 균주인 *Pseudomonas* sp. DN-9도 *P. stutzeri*에 견줄만큼 비교적 우수한 호기성 탈질을 수행함을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Cha, W. S., H. I. Choi, D. B. Lee and J. M. Cha, 2003, Isolation and characterization of denitrification bacteria, *J. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, 18(6), 461-465.
- 2) Yoon, C. H. and H. J. Jim, 2001, Decolorization characteristics of secondary treatment effluent of livestock wastewater by electrochemical process, *Livestock Wastewater Symposium, Korea.*
- 3) Peter, J., V. D. Hoek and A. Klapwijk, 1987, Nitrate removal from ground water, *Water Res.*, 21, 989-997.
- 4) Randall, C. W., J. L. Barnard and H. D. Stensel (editted), 1992, Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal, Technomic Publishing Company, Inc., USA, 2-7pp.
- 5) Cervantes, F. J., D. A. Rosa and J. Gomez, 2001, Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors, *Bioresource Technol.*, 79, 165-170.
- 6) 이원선, 1999, The Evolution of advanced treatment for elimination nutrient from the municipal wastewater by biosorption, 서울산업대학교 산업대학원 환경공학과 공학석사 학위논문.
- 7) U.S. EPA, 1993, Process design for manual nitrogen control, EPA, 625/R-23/010.

- 8) Jetten, M. S. M., S. J. Horn and M. C. M. Loosdrecht, 1997, Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system, *Water Sci. Technol.*, 35, 171-180.
- 9) Patreau, D., N. Bernet, J. P. Delgenes and R. Moletta, 2000, Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 535-542.
- 10) Huang, H. K. and S. K. Tseng, 2001, Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment, *Appl. Microbiol. biotechnol.*, 55, 90-94.
- 11) Gupta, A. B., 1997, *Thiosphaera pantotropha*: a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification, *Enzyme Microb. Tech.*, 21, 589-595.
- 12) Patreau, D., N. Bernet, T. Bouchez, P. Dabert, J. P. Delgenes and R. Moletta, 1998, Biological nitrogen removal in a single aerobic reactor by association of a nitrifying ecosystem to an aerobic denitrifier, *Microvigula aerodenitrificans*, *J. Mol. Catal B-Enzym.*, 435-439.
- 13) Hwang, S. H., Y. H. Lee and M. H. Cho, 1999, Isolation and Characteristics of Denitrifying *Pseudomonas* CW4, *J. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, 14(5), 616-620.
- 14) Bang, D. Y., Y. K. Park, C. H. Lee, T. Noike and Y. Watanabe, 1998, Denitrification mechanism and characterization of denitrifiers in aerobic-denitrification biofilm, *J. Korean Soc. Environmental Engineers*, 361-370.
- 15) Kwon, D. W., 2002, Isolation and characterization of denitrification bacteria, *J. Korean Soc. Hygienic Sciences*, 8(1), 25-30.
- 16) Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A. H. Devol and J. M. Tiedje, 2000, Nitrate reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2096-2104.
- 17) Takaya, N., M. A. B. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou and H. Shoun, 2003, Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3152-3157.
- 18) Sstrom, W. R., 1962, The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Gen. Microbiol.*, 28, 607-616.
- 19) Hartig, E. and W. G. Zumft, Kinetics of *nirS* expression (cytochrome *cd₁* nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: evidence for a denitrification specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system, *J. Bacteriol.*, 181(1), 161-166.
- 20) Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1984, *Bergey's manual of systematoc bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- 21) Robertson, L. A., E. W. J. Niel, R. A. M. Torremans and J. G. Keunen, 1988, Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2812-2818.