



퇴비로부터 분리한 종속영양 질화세균의 동정 및 특징에 관한 연구

김영준, 이건영, 김진용

가톨릭대학교 생명공학부

(2005년 5월 2일 접수, 2005년 6월 1일 채택)

Characterization and identification of heterotrophic nitrifying bacteria isolated from composting soil

Young-Jun Kim, Gun-Young Lee, Jin-Yong Kim

Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Puchon 420-743, Korea

ABSTRACT

A heterotrophic nitrifying bacterium was isolated from the compost and analyzed for its characteristics. This bacterium was found to be a Gram positive rod, catalase positive, and motile. Nitrite production was detected on the ammonium acetate medium through the violet color formation. BBL test showed that this strain has high homology with Bacillus strains. Phylogenetic analysis using 16S rDNA revealed that the bacterium has 94% of similarity with *Mycobacterium smegmatis* strain.

Keywords: Heterotrophic Nitrifying Bacteria, Compost, *Mycobacterium smegmatis*

초 록

퇴비로부터 종속영양 질산화과정에 관여하는 세균을 분리하여 그 특성을 조사하고 동정하였다. 본 세균은 그람 양성 간균으로 운동성을 가지고 있었으며, ammonium acetate 배지에서 아질산용액으로 실험한 결과, 세균의 균락이 자주색으로 변화됨으로써 암모니아로부터 아질산을 형성하는 것으로 나타났다. 세균의 동정을 위한 BBL Test의 결과 본 세균은 Bacillus strains과 78%의 유사성을 지닌 것으로 나타났다. 계통분류학적 분석을 위하여 세균의 염색체로부터 16S rDNA를 클로닝한 후 DNA 염기서열을 파악하고 이를 비교 및 분석한 결과 본 세균은 *Bacteria*; *Actinobacteria*; *Actinobacteridae*; *Actinomycetales*; *Corynebacterineae*; *Mycobacteriaceae*; *Mycobacterium*에 속하는 *Mycobacterium smegmatis* strain과 94%의 유사성을 보이는 것으로 나타났다.

핵심용어 : 종속영양 질산화세균, 퇴비, *Mycobacterium smegmatis*

1. 서론

질산화 과정(nitrification)은 nitrite를 중간매개체로 하여 연속적으로 ammonium을 nitrate로 산화시키는 미생물군에 의하여 이루어진다. 이러한 질산화과정을 수행하는 두 가지 중요한 미생물로 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*를 들 수 있으며, 이들은 유기물을 이용하지 못하는 절대 화학적 독립 영양 세균(chemoautotrophic bacteria)이다.

이들에 의한 질산화과정은 1단계로 질산화 미생물인 *Nitrosomonas*(*N. europaea*, *N. monocella*)의 대사에 의해서 암모니아성 질소가 아질산성 질소로 전환되는 과정이고, 2단계는 아질산성 질소가 질산성 질소로 바뀌는 과정으로 주로 질산화 미생물인 *Nitrobacter*(*N. agilis*, *N. winogradsky*)의 활동에 의해 이루어진다. 두 미생물이 모두 생존에 필요한 에너지를 환원된 무기질을 산화시키며 얻기 때문에 이를 화학적 독립 영양세균(chemoautotrophs)이라 한다. 이러한 chemoautotrophic bacteria뿐만 아니라 많은 종속영양미생물(heterotrophic micro-organisms)도 질산화과정에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 이들은 무기질소뿐 아니라 유기질소도 nitrification에 사용하고 있다.¹⁾ Heterotrophic nitrifiers는 다양한 종류들이 알려져 있는데 세균을 비롯하여, fungi, 방선균 및 algae 등이 있다.^{2, 3, 4)}

Heterotrophic microorganisms에 의한 nitrification은 autotrophic nitrification의 방법과 상이한 점들이 많은데, 우선 다양한 유기물질과 무기질소가 heterotrophic nitrification의 N-sources로 사용될 수 있고, 유기탄소원의 공급에 의해서만 성장과 무기질소의 산화가 가능하다는 것이다.²⁾

또한, 독립영양 질산화세균과 달리, 몇몇 종속영양 질산화 세균들은 질산화와 탈질화를 동시에 수행하는 이중 기능을 보이고 있다. 주로 산소분압이 낮을 경우 또는 유기물의 농도가 매우 높을 경우 이러한 이중 기능을 나타내고 있다.^{5, 6, 7)}

일반적으로 종속영양 질산화세균은 독립영양세균과 달리 그들의 질산화 기능이 떨어지거나 효율

적이지 못한 것으로 알려져 있다. 종종 이들에 의한 질산화과정은 에너지 형성과는 별개의 것으로 보고되고 있는데, 최근의 보고에 의하면 종속영양 질산화세균에서도 암모니아를 아질산으로 활발하게 전환시키는 효소계가 존재하고 있는 것으로 나타나고 있다.⁸⁾

Robertson과 그의 동료들의 실험에 의하면, 종속영양세균의 낮은 질산화 활성도는 이들 세균에 의한 질산화과정과 탈질화과정이 동시에 이루어지기 때문인 것으로 나타났다. 또한 배양조건에 따라 서로 아질산을 생성하는 비율이 달라지고 있는 것으로 보고되고 있다.^{7, 9, 10)}

본 연구에서는 퇴비로부터 종속영양 질산화과정에 관여하는 세균을 분리하여 이들의 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징을 규명하고, 분리된 세균을 동정하고자 실험을 진행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 시료의 채취, 세균의 분리 및 배양

본 세균을 분리하기 위한 토양시료는 남양주시 한 농가의 퇴비를 이용하였다. 세균의 분리를 위한 배지는 Ammonium acetate 배지를 사용하였으며, 그 조성은 다음과 같다. (per liter): M9, 11.2g; trace element 10 ml; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5mM; $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 50mM; Bacto-Agar, 1.5%. 채취한 퇴비시료를 250ml 삼각 플라스크에 증류수 95ml와 시료 5g을 넣고 진탕 배양기(Shaking Incubator)에서 30°C, 1시간동안 충분히 섞어준 후, 0.1ml를 취하여 Ammonium acetate 배지위에 도말하였으며, 30°C에서 3일간 배양하여 생성된 콜로니 위에 nitrite color reagent (4% sulfanilamide in 25% concentrated HCl, 0.08% N-1-naphthylendiamine dihydrochloride)를 살포하였다. 이후 본 배지에서 자주색으로 변한 콜로니들을 선택하여 30°C, 48시간동안 NA고체배지에 배양하여 균주를 순수 분리하였다. motility test를 위한 배지로는 반고체 LB 배지¹¹⁾를 사용하였으며, *E. coli* JM109를 위하여 LB agar 배지를 사용하였다.

2.2 세균의 형태학적, 생리학적 특성실험

분리된 세균의 형태 및 생리, 생화학적 특성을 알아보기 위하여 그람염색실험과, 운동성 실험, catalase 양성반응실험 및 BBL 실험 등을 진행하였다.¹²⁾

2.3 염색체분리, 16s-rDNA의 cloning 및 염기서열 결정

세균의 계통진화학적 분류를 위하여 분리한 세균으로부터 염색체를 분리한 후 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통하여 16S rDNA부위를 증폭하였다. 증폭을 위한 primer는 세균의 공통 primer인 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1542R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하였고 반응조건은 다음과 같다. Micro tube에 멸균된 증류수 62.5 μ l, Chromosomal DNA Template 3 μ l, 10X Buffer 10 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l와 공통 primer를 각각 5 μ l씩 10 μ l로 총 부피 100 μ l PCR 완충액을 넣고 Gene Cycler™ (BIO RAD)를 이용하여 증폭하였다. Pre-denaturation 과정으로 99°C에서 8분간 반응시킨 후, 5U/ μ l *Taq Polymerase* 0.5 μ l와 2.5mM dNTP 8 μ l를 첨가하고 2분간 반응을 더 진행시킨 다음, 94°C에서 1분간 변성작용 (Denaturation Step), 55°C에서 30초간 혼성과정 (Annealing Step), 72°C에서 2분간 중합반응과정 (Polymerization Step)의 세 가지 과정을 35회 반복시켰다. 이후 PCR 과정의 마지막 복제과정 (Post-polymerization Step)으로 72°C, 10분간 방치한 후 반응을 완료하였다. 증폭한 PCR의 산물은 2% Agarose Gel에 전기영동하여 약 1.5Kb의 크기에 해당하는 16S rDNA Band를 확인하였다. 증폭된 16S rDNA를 Chromosomal DNA로부터 순수분리하기 위해 DNA PrepMate™ II Kit (Bioneer. Co. Ltd)를 이용하여 Gel Purification 하였으며, 분리된 DNA 절편을 pGEMT-Easy Vector System II (Promega)를 사용하여 vector에 ligation한 후, E. coli JM109 세균에 형질전환 하였다. 형질전환 후 mini-prep에 의해 확인된 positive colony로부터 Qiagen tip (Mini)

Kit을 사용하여 Plasmid DNA를 순수 분리하였으며 분리된 plasmid는 솔젠트(주)에 DNA Sequencing을 의뢰하여 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다.

2.4 16S rDNA의 염기서열분석 및 계통도 작성

16S rDNA의 염기서열은 미국 국립 의료 도서관 (UNITED STATES National Library of Medicine) Site에 있는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST와 Biology Workbench 3.2를 이용하였으며, 계통분석을 위한 계통도의 작성은 Tree View Program을 사용하였다.

3. 결과

3.1 종속영양 질산화세균의 분리 및 생리, 형태학적 특성

남양주시의 농가에 야적된 퇴비의 내부로부터 시료를 채취하여 이를 희석시킨후 Ammonium acetate 배지에 접종하였다. 이후 30°C에서 3일간 배양하여 생성된 콜로니 위에 아질산 발색 반응액을 살포하여 발색반응을 살펴보았다. 발색반응의 결과 이중 가장 진한 자주색으로 변색한 콜로니를 선택하여 NA배지에 옮겨 배양한 후, 균주를 순수 분리 하였다. 이는 배지상의 암모니아가 아질산으로 전환되었다는 증거임으로 본 실험에서 분리한 세균이 종속영양 질산화세균임을 추정할 수 있다. 분리한 콜로니의 색깔은 백색으로 나타났으며, 그람염색결과 그람양성 이었고, 간균의 외형을 갖는 세균임을 현미경을 통하여 관찰할 수 있었다. 분리된 균주의 운동성을 관찰하기 위해 LB 반고체배지 (Agar 0.4%)에 균을 접종한 후 운동성 (Motility) 여부를 파악하였다. 대조균으로 정상적인 flagellar를 갖고 있는 *Pseudomonas putida* MK1과 비정상적인 flagellar를 갖고 있는 *P. putida* MK107을 같이 배양하여 비교해본 결과 분리한 세균이 MK1과 유사한 운동성이 있는 것으로 나타났다. 산소에 의해 발생하는 과산화수소의 유해성 제거

를 위한 Catalase 실험결과 본 균주는 양성반응을 보였다. 또한 본 균주의 다양한 물질대사능과 발효능 및 각종 생리학적, 생화학적 특징을 알아보기 위해서 BBL Crystal E/NF ID System Kit를 사용하여 실험하였다[Table 1]. BBL 실험의 결과, 본 균주는 *Bacillus subtilis*와 유사성이 높은 것으로 나타났다.

3.2 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통진화학적 동정

분리된 질산화 세균으로부터 Chromosomal DNA를 추출하여 16S rDNA를 PCR 증폭을 통해 얻을 수 있었다. PCR결과 얻어진 1.5kb 정도의 16S rDNA fragment를 pGEMT-T easy vector에 Ligation한후 솔젠트(주)에 의뢰하여 염기서열을 파악하였다[Fig. 1]. 16S rDNA의 염기서열은 Universal Primer 중 순방향(5'→3')과 역방향(3'→5')의 두 가지 방향으로 읽어 분석하였다. 9F Primer로부터 얻은 순방향 염기서열은 751bp였으며, 1542R Primer로부터 얻은 역방향 염기서열은 900bp였다. 본 결과로부터 얻어진 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 이용하여 기존의 세균

과 유사성을 비교·분석하였다[Fig. 2]. 본 염기서열의 분석결과, *Mycobacterium smegmatis* MC2가 94%의 유사성을 나타내었으며, *Mycobacterium tuberculosis*와는 92%, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032와 91%, *Thermobifida fusca* Tfus_24와는 88%, *Tropheryma whipplei* str. Twist와는 84%의 유사성을 나타내었다.

4. 결론

본 논문에서는 자연계로부터 유용한 heterotrophic nitrifying bacteria 탐색과 개발이라는 목적으로 nitrification이 가능한 세균을 퇴비로부터 분리하여 형태를 파악하고 동정하였다. 분리된 세균의 16S rDNA 염기서열 분석결과 *Mycobacterium smegmatis* strain인 것으로 추정되고 있지만, 추후 16S rDNA의 전체 염기서열을 밝힌 후에야 동정이 확실해 질것으로 기대된다.

Heterotrophic nitrifying bacteria는 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*와 같은 autotrophic bacteria와 비교해서 질산화 효율이 매우 떨어지는 것으로 보고되고 있으나, 생육이 빠르고 질산화와 탈질화를 동

[Table 1] Physiological and Biochemical Characteristics of the Isolated Strain.

arginine	phosphate	valine	arabinose	mannitol
-	+	-	-	-
trehalose	o-n-p-galactoside, p-n-p-glucoside	p-n-p-β-D-glucoside	urea	β-D-glucoside
-	+	+	-	+
methionine	pyro glutamic acid	phenylalanine	maltose	galactose
-	-	+	-	-
mannose	p-n-p-α-D-glucoside	p-n-p-phosphate	esculin	proline
-	+	+	-	-
cellobioside	tryptophan	α-D-glucoside	dextrin	N-acetyl glucosimine
+	-	+	-	-
maltotriose	p-n-p-cellobioside	o-n-p-β-D-galactoside, p-n-p-α-D-galactoside	ornithine	
-	+	-	+	

A

1	CATGCAAGTT	CCCCCATGAA	AAAAAAAAA	GATGGGTTTT	CCCCCGGCGA	ACGGGAAAAA
61	TAACACGTGG	GTGATCTGCC	CTGCACTCTG	GGATATTCCT	CCCCAACTG	GGTCTAATAC
121	CGGATATGAC	CTCTTGCTGC	ATGGCGAGGG	GTGGAAAGTT	TTTCGGTGCA	GGATGAGCCC
181	GCGGCCTATC	AGCTTGTTGG	TGGGGTAATG	GCCTACCAAG	GCGACGACGG	GTAGCCGGCC
241	TGAGAGGGCG	ACCGGCCACA	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCGAC
301	ATTGGGGAAT	ATTGCACAAT	GGGCGAAAGC	CTGATGCAGC	GACGCCCGCT	GAGGGATGAC
361	GGCCTTCGGG	TTGTAACCT	CTTTCAGCAG	GGACGAAGCG	AAAGTGACGG	TACCTGCAGA
421	AGAAGCACCG	GCCAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CGTAGGGTGC	GAGCGTTGTC
481	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	AGCTCGTAGG	CGGTTTGTCT	CGTCGTCTGT	GAATCCCGC
541	AGCTCACTGC	GGGCTTGCCG	GCGATACGGG	CAACTCGAGT	ATGCAGGGAA	CTGGAATTCT
601	GGGTACGTGA	ATGGCAAATT	AAGAGAAACG	GGGCGAGCGG	TTTTGGCATA	CTGACTGAGA
661	CAAGGGGTAG	AAAGATAAAC	TGGATCAGCT	ACGGGGCTAG	GGGTTCTCCG	ACGGCGACAA
721	TTAGCCCTGG	AAGCAGTATA	GATAGGCCCA	C		

B

1	CTTCGGTCCG	CTCCTTGTTT	GATTCTTCCC	AATCGCCGAT	CCCACCTTCG	ACGGTTCCT
61	CCCACAAGGG	GTTAGGCCAC	CGGCTTCGGG	TGTTACCGAC	TTTCATGACG	TGACGGGCGG
121	TGTGTACAAG	GCCCCGGAAC	GTATTCACCG	CAGCGTTGCT	GATCTGCGAT	TACTAGCCGAC
181	TCCGACTTCA	CGGGGTCGAG	TTGCAGACCC	CGATCCGAAC	TGAGACCGGC	TTAAGGGAT
241	TCGCTCCACC	TCACGGTATC	GCAGCCCTCT	GTACCGACCA	TTGTAGCATG	TGTAAGGCC
301	TGGACATAAG	GGGCATGATG	ACTTGACGTC	GTCCCCACT	TCCTCCGAGT	TGACCCCGGC
361	AGTCTCCTGC	GAGTCCCCAC	CATTACGTGC	TGGCAACACA	GGACAAGGGT	TGCGCTCGTT
421	GCGGGACTTA	ACCCAACATC	TCACGACACG	AGCTGACGAC	AGCCATGCAC	CACCTGTCTA
481	CCGGCCACAA	GGGAAACCAC	ATCTCTGCAG	TCGTCCGGTA	CATGTCAAAC	CCAGGTAAGG
541	TTCTTCGCGT	TGCATCGAAT	TAATCCACAT	GCTCCGCCGC	TTGTGCGGGC	CCCGTCAAT
601	TCCTTTGAGT	TTAACCTTGG	GGCCGTACTC	CCAGGGGGGG	GCTTAAGGGT	CGCTACGCAG
661	GATCCGGGAA	AGAAACCAAC	TACGCCACGT	TACGGGGGAA	TACAGGTATT	ATCTGTCTGTA
721	CCAGTTTCTT	CTCAGGTAGT	ATGCAAACCC	TCCCGGGTCT	CGATTGGCTT	CGTACGAT
781	CATCTGAAAT	AGTGCCTCGG	ACCGATATGG	ATCAAAGAAC	CAATTTCCAA	TGAATCCCAT
841	ACGGGGATGG	TTGGAATTTT	GAAAAAGCCG	GTTTTTACCC	CAGGCGGCC	CCCCAAAAA

[Fig. 1] Partial 16S rDNA sequences of the strain isolated in this study.

A : 9F universal primer로부터 약 751bp의 염기서열.

B : 1542R universal primer로부터 900bp의 염기서열.

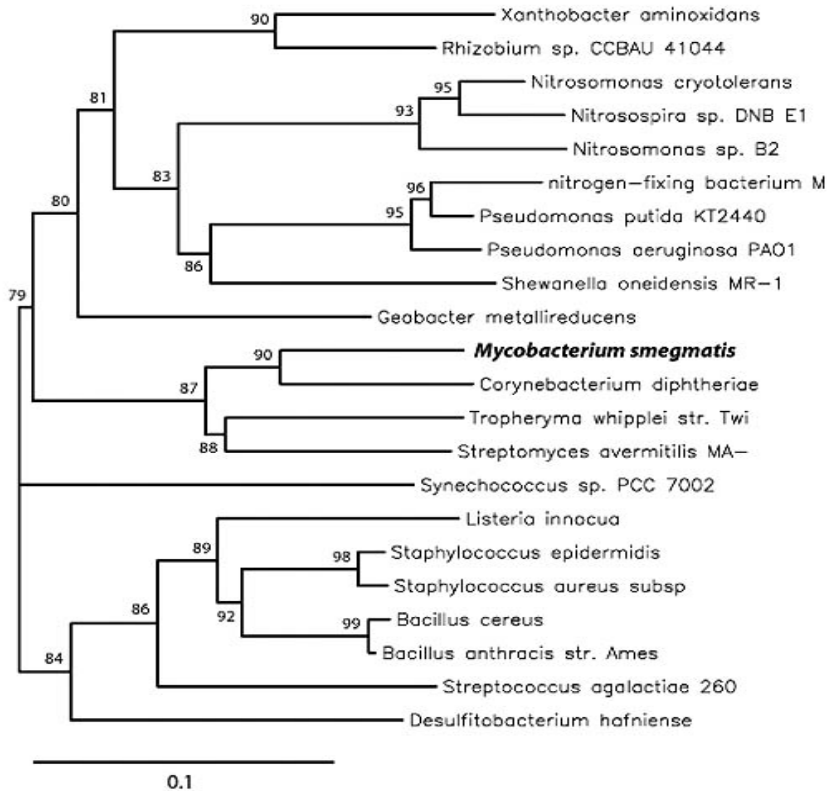
시에 수행한다는 특징으로 폐수처리시 질소원제거를 위한 간편한 생물학적 공정의 설계가 가능하다는 점에서 많은 주목을 받고 있다.¹³⁾

본 연구에서 분리한 균주는 동정결과 Mycobacteria 군에 속하는 것으로 나타났다. Mycobacteria는 성장속도와 관련하여 두 종류의 세균이 존재하는 것으로 알려져 있다. 우선 성장이 매우 느리며, 결핵의 원인균으로 알려진 것이 있으며, 다른 것은 성장이 빠른 세균이 있는데 본 연구에서 분리한 세균과 유사한 *Mycobacterium smegmatis*의 경우에는 토양에서 쉽게 분리가 되고 있으며 매우 빠르게 자

라고 병원성이 없는 것으로 보고되어 있다.¹⁴⁾

한편, 본 동정은 부분적인 16S rDNA Sequencing Data를 바탕으로 조사된 것으로 BBL 실험과 비교하여 매우 상이한 결과를 보여주고 있어 추후 전체 염기서열 파악 및 세부적인 동정이 필요하다 하겠다.

질산화과정에 관여하는 독립영양세균들은 배양 조건이 까다롭고 성장시간이 긴 단점이 있기 때문에 좀더 배양이 편리하고 생장이 빠른 종속영양세균에 의한 질산화가 필요하다고 볼 수 있으나, 질산화 효율성이 떨어지는 것이 단점으로 지적되고 있다. 그러나 종속영양 질산화세균의 경우, 독립영



[Fig. 2] Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the isolated strain and members of mycobacterium.

양세균과 비교하여 질산화 과정에 대한 연구가 매우 부족하고, 또한 배양조건에 따라 효율성에 많은 차이가 발생한다는 점을 고려해보면, 차후 본 세균에 대한 보다 집중된 유전학적, 생리생화학적 연구가 수행되어야 할 것이다. 따라서 효율성 높은 새로운 균주의 탐색과 연구를 통하여 질산화와 탈질화가 동시에 수행가능한 편리하고 효율적인 질소 제거방법을 모색해야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어진 것으로써 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Alexander, M., K. C. Marshall, P.

Hirsch, "Autotrophy and heterotrophy in nitrification", In Proceedings of the Seventh International Congress of Soil Science, Madison. Vol. 2. pp 586~59 (1960).

2. Focht, D.D., and W. Verstraete, "Biochemical ecology of nitrification and denitrification", In Advances in microbial ecology, Vol. 1. Edited by M. Alexander. Plenum Press, New York, pp 135~214 (1977).

3. Killham, K., "Heterotrophic nitrification", In Nitrification, Edited by J.J. Prosser. IRL Press. Oxford, pp 117~126 (1986).

4. Bock, E., H. P. Koops, B. Ahlers, H.

- Harms, "Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source", In *The Prokaryotes*. New York, pp 414~430 (1992).
5. Castignetti, D., T. C. Hollocher, "Heterotrophic nitrification among denitrifiers", *Appl. Environ. Microbiol.* 47, pp 620~623 (1984).
 6. Kuenen, J.G., and L. A. Robertson, "Ecology of nitrification and denitrification", In *The nitrogen and sulfur cycles*. 42nd Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge, U.K. pp 162~218 (1987).
 7. Robertson, L.A., R. Cornelisse, P. de Vos, R. Hadioetomo, J. G. Kuenen, "Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers", *Antonie van Leeuwenhoek*. 56, pp 289~299 (1989).
 8. Richardson, D.J., and N. J. Watmough, "Inorganic nitrogen metabolism in bacteria", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, pp 207~219 (1999).
 9. Robertson, L.A., and J. G. Kuenen, "Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: oxygen uptake and enzyme studies", *J. Gen. Microbiol.* 134, pp 857~863 (1988).
 10. Castignetti, D., D. Palutsis, J. Turley, "An examination of proton translocation and energy conservation during heterotrophic nitrification", *FEMS Microbiol. Lett.* 66, pp 175~182 (1990).
 11. S. Panza, M. Baetens, C. H. Park, T. Au, M. Keyhan, A. Martin. "The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*", *Molecular Microbiol.* 36(2), pp 414~423 (2000).
 12. 김영준 외 2인, "하수슬러지로부터 페놀분해 세균의 분리 및 동정에 관한 연구", *유기물자원화* 12(1), pp 67~74 (2004).
 13. Littleton H. X., G. T. Daigger, P. F. Strom, R. A. Cowan, "Simultaneous biological nutrient removal: evaluation of autotrophic denitrification, heterotrophic nitrification, and biological phosphorus removal in full-scale systems", *Water Environ Res*, Mar-Apr. 75(2), pp 138~50 (2003).
 14. Snapper S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, W. R. Jr. Jacobs, "Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*", *Mol. Microbiol.* Nov. 4(11), pp 1911~9 (1990). 