

## 축산환경 개선을 위한 암모니아 제거 미생물의 탐색 및 분리

이소진 · 이은영\*  
수원대학교 환경공학과

**Screening and Isolation of Ammonia Removal Microorganism for the Improvement of Livestock Environment.** Lee, So Jin and Eun Young Lee\*. *Department of Environmental Engineering, University of Suwon, Suwon 445-743, Korea* – A study on the screening and isolation of microorganism was performed for the removal of main malodor, such as ammonia, produced from the livestock farm. The main malodor components in livestock farm are ammonia, volatile fatty acids, sulfur compounds and trimethylamine. Damages to man and livestock were originated from malodors mainly due to ammonia, and thus ammonia reduction experiments were performed. Sludge of sewage treatment plant was inoculated in the sesame dregs culture, from which ammonia gas was produced. An aerobically grown, pure cultured isolated from the 10th enrichment culture was analyzed by 16S rRNA sequencing and identified as *Alcaligenes* sp. NS-1. This strain NS-1 pre-cultured in the sesame dregs was found to remove ammonia gas with an efficiency of approximately 99-100% at an average concentration of 40 ppmv of ammonia gas. When the strain NS-1 sprayed to pig excrements, the removal efficiency at an average concentration of 100 ppmv of ammonia was approximately 60% after 16 hr.

**Key words:** *Alcaligenes* sp., livestock farm, ammonia, nitrification

축산업은 규모화와 전업화를 통해 농촌의 경제를 주도하는 산업이 되었으나 이와 동시에 가축분뇨, 동물의 사체, 사료 등으로 인한 악취가 늘면서 인근 주민의 민원을 증가시키고 있다. 축사에서 발생하는 주요 악취 성분으로는 암모니아, 휘발성지방산, 스틸렌, 트리메틸아민 등이 있으며, 이러한 악취는 인간과 가축의 건강에 영향을 미치며 적은 농도로도 불쾌감을 준다. 과거에는 축사시설의 축사 내 청결을 우선시 하였으나 이 후, 축산업을 하는 모든 시설을 생활악취민원 대상으로 적용하여 악취문제에 규제를 강화하였으며[12], 2005년에는 환경부에서 악취방지법을 시행하여 규제물질이 확대 되고 규제 농도도 강화 되었다. 지정된 악취물질의 배출허용기준이 초과할 경우 사용중지 처분이나 폐쇄, 과징금이 부과 될 수 있다. 이는 영세한 축산농가에서 큰 부담으로 작용하므로 악취저감과 축사의 친환경적인 관리를 위해 쉽게 사용이 가능하고 경제적인 악취처리기술의 개발이 시급하다[8].

가축배설물에서 발생하는 악취는 축종에 따라 성분의 양과 분진의 농도 차에 따라 변하게 된다. 특히 양돈장에서는 노량이 많기 때문에 악취의 발생이 우사나 계사에 비해 두드러진다[1]. 악취로 인한 피해는 주로 암모니아가스에서 기인하는데 이는 가축의 체내에서 미생물의 분해에 의한 질소화합물이 형성된 것으로 소화가 불충분하게 이루어진 사료

및 체내 질소 생성물, 노로 배설된 질소 등이 그 구성 물질이 된다[8].

암모니아를 쉽게 억제하는 방법으로 환기를 통한 방법이 있으나 공기보다 무거워 축사 주위에 가라앉기 때문에 제어하기가 어려우며 겨울철에는 환기율이 떨어지고 연료비 상승으로 어려움이 많다[2]. 이외에도 목초액을 이용한 암모니아가스 제거 연구[11], *Alcaligenes faecalis* No.4를 이용한 고농도 암모늄 제거[4], 해양미생물 *Vibrio alginolyticus*를 이용한 암모니아 가스 제거[6], 바이오필터에 *Arthrobacter* sp.를 접종하여 트리메틸아민과 암모니아 가스를 제거했다는 보고[3]와 *Candida rugosa* CY-10을 접종하여 돈분 배양액 내 악취저감 효과에 대한 연구[9] 및 사료의 단백질 수준에 따라 가축배설물이 암모니아 가스발생량에 영향을 미침에 따라 합성아미노산, *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* 등을 첨가하여 암모니아 가스발생에 미치는 영향 연구[10] 등 악취 저감을 위한 다양한 연구가 수행되었다.

악취문제는 악취 성분 자체를 분해·제거되도록 해야 사라지기 때문에 악취성분을 분해하는 미생물을 분리하여 분뇨의 냄새를 제거하기 위한 조건과 악취제거능이 좋은 미생물을 선별하는 것이 중요하다.

따라서 본 연구에서는 축산악취의 주요물질인 암모니아를 저감하는 균주를 분리하고 그 특성을 파악하여 실제 축산농가에서 적용할 수 있는 균주를 개발하고자 기초적인 연구를 수행하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-031-220-2614, Fax: 82-031-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

## 암모니아 제거 균주의 탐색 및 분리방법

본 연구에서는 축산악취 중 암모니아를 저감하는 미생물을 분리하기 위하여 경기도 지역의 A 하수처리장, B 하수처리장의 슬러지와 경기도 지역의 축사 및 중돈장의 돈분, 우분, 우사 주변의 토양을 시료로 하여 암모니아저감 미생물의 분리를 시도하였다. 미생물을 분리를 위해 TSA(Tryptic soy agar, Difco), NA(Nutrient Agar, Difco), PDA(Potato Dextrose Agar, Difco), MRSA(Lactobacilli MRS Agar, Difco) 및 Ammonia Oxidizing Medium(AOM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  13.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.18 g/L,  $\text{NaHCO}_3$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.014 g/L)과 Nitrite Oxidizing Medium(NOM,  $\text{NaNO}_2$  0.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  13.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.18 g/L,  $\text{NaHCO}_3$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.014 g/L)을 사용하였다[11]. 이 각각의 배지에 시료를 도말하여 30°C에서 2~3일간 배양하여 형성된 단일 콜로니를 분리하였다.

암모니아를 제거하는 미생물을 분리하기 위하여 물과 혼합하였을 때 악취를 발생시키는 혼합유박(질소전량 4%, 인산전량 2%, 가리전량 1% 및 피마자박 57%, 채종박 25%, 미강박 18%, (주)KG케미칼)을 이용하였다. 이 때 악취발생이 고르게 하기 위해 믹서로 갈아서 사용하였다. 이 혼합유박으로 부터 암모니아 가스를 발생시키기 위해 100 mL의 유리 바이알에 0.2 g의 혼합유박과 10 mL의 수돗물을 넣고 실리콘스토퍼를 사용하여 공기의 공급이 원활하도록 하였다. 이 유박물은 암모니아 발생하기까지 2~3일 정도 소요되며 시간이 경과할수록 암모니아 발생이 증가한다.

이렇게 준비된 유박물에 채취한 슬러지 1 mL를 넣고 30°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 대조군의 경우 총 부피를 맞추기 위해 슬러지 대신 1 mL의 증류수를 첨가하였다. 일주일 후에 암모니아 가스의 농도를 측정하였으며 4일 간격으로 계대 배양하였다. 계대 배양시 대조군은 새로 준비하여 실험관과 암모니아 농도 값을 비교할 수 있도록 하였다.

암모니아 가스의 농도측정은 신속한 측정이 가능한 가스 검지관법(Kitagawa, Japan)을 이용하였다. 바이알과 스토퍼 사이의 공간에 검지관을 끼워 넣은 후 50 mL을 채취하여 암모니아 가스 농도를 측정하였으며, 암모니아 가스 측정농도 범위는 0.2~20 ppmv와 5~200 ppmv의 105SD, 105SE 검지관을 이용하였다. 암모니아 가스농도를 측정한 결과 대조군에서 일주일동안 발생된 암모니아가스의 농도는 약 48 ppmv, A하수처리장 슬러지를 접종했던 실험군은 약 57 ppmv, B 하수처리장 슬러지를 접종했던 실험군은 검지관으로 검출되지 않았다.

이 결과를 통하여 앞서 언급한 TSA, NA, PDA, MRSA 배지에 균을 도말 하였으나, 활성이 있는 균주를 찾지 못했다. 따라서 암모니아가스 저감 메커니즘을 확인하기 위

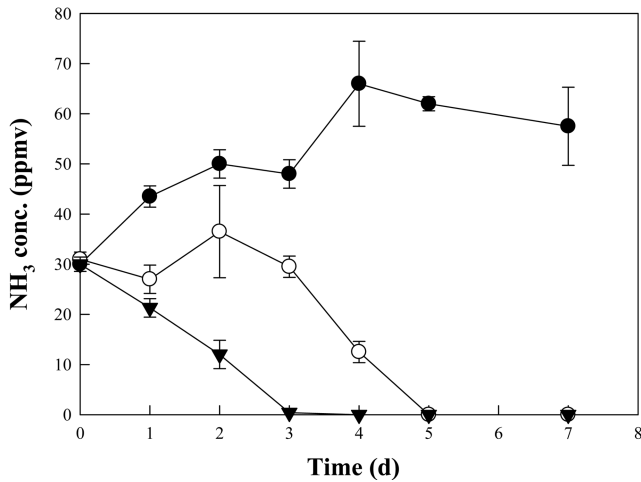
해 아질산성 질소 및 질산성 질소의 농도를 측정하였다. 혼합유박 배양액을 분석 Kit(Test 'N Tube™ NitraVer® X Reagent Set, Test 'N Tube™ NitriVer® 3 Nitrite Reagent Set, HACH, USA)를 이용해 아질산성질소와 질산성질소의 농도를 측정하였다. 측정결과 대조군에서 아질산성질소와 질산성질소가 각각 0.9 mg/L, 0.6 mg/L로 나타났으며, B하수처리장 배양액에서는 각각 176.1 mg/L, 21 mg/L로 현저하게 차이를 보였다. 두 시료의 아질산 및 질산염의 분명한 차이는 암모니아의 제거에 질산화 기작이 큰 원인이 될 수 있음을 예측할 수 있었다.

B 하수처리장에서 채취한 슬러지에 암모니아 산화세균이 있을 것으로 예상하여 혼합유박에 전배양 한 뒤, 배양액을 AOM과 NOM에 심진회석법으로 회석하여 도말하고 30°C에서 7일간 배양하여 형성된 단일 콜로니를 분리하였다. 또한 축산악취를 제거하기 위한 미생물이 실제 사용될 때는 악취의 근원이 되는 분뇨에 직접 사용되므로 그와 유사한 환경에서 배양이 되어야 악취를 저감하는데 유리하다고 생각되었다. 이 점에 착안하여 본 연구진은 Pig feces Agar를 제작하여 분리된 균이 Pig feces agar 배지에서 성장하는지 알아보았다. 돈분 100 g을 1L의 증류수에 넣고 고형물이 풀리도록 잘 섞은 다음 여러 장의 거즈를 이용하여 거르고 Agar를 첨가하여 121°C에서 15분간 멸균하여 고체배지로 사용하였다. 이 배지에 분리된 균을 도말하여 상온에서 2일~5일간 배양한 후 집락의 출현 여부를 확인할 수 있었다.

분리된 질산화 세균은 NS-1로 명명하였으며 현미경상에서 약 0.015  $\mu\text{m}$ 의 간균이며, 그람 음성의 호기성 세균으로, 16S rDNA 분석을 (주)솔젠트에 의뢰하여 Primer 337F-518R을 이용해 동정한 결과 유사도는 98%로서 *Alcaligenes* sp.로 잠정적으로 동정되었다. 이후 보다 정밀한 분석을 통해 정확한 동정을 수행할 예정이다.

## 초기 암모니아농도가 암모니아 제거속도에 미치는 영향

분리균 NS-1에 의해 암모니아를 제거하는데 있어서 초기 암모니아의 농도가 미치는 영향을 알아보았다. 따라서, 1) 균주 접종시 이미 암모니아가 30 ppmv 발생되어있는 경우, 2) 균주 접종 시 암모니아 발생되어있지 않은 경우를 설계하였다. 또한, a) 혼합유박에서 전배양 된 균주를 이용하는 경우와 b) 3일간 암모니아산화 배지(AOM)에서 전배양한 균주를 이용하는 경우를 비교하여 각각의 경우에서 분리균주의 암모니아 제거 능력에 미치는 영향을 알아보았다. 70 mL 부피의 유리 바이알에 0.2 g의 혼합유박과 10 mL의 수돗물을 넣고 각 배양액을 1 mL씩 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 7일간 진탕 배양하였다. Fig. 1에서는 약 30 ppmv의 암모니아를 미리 발생시킨 유박물에 유박물에서 전배양 된 균주 NS-1을 접종했을 때의 악취 저감 경향을 나타내었다. 접



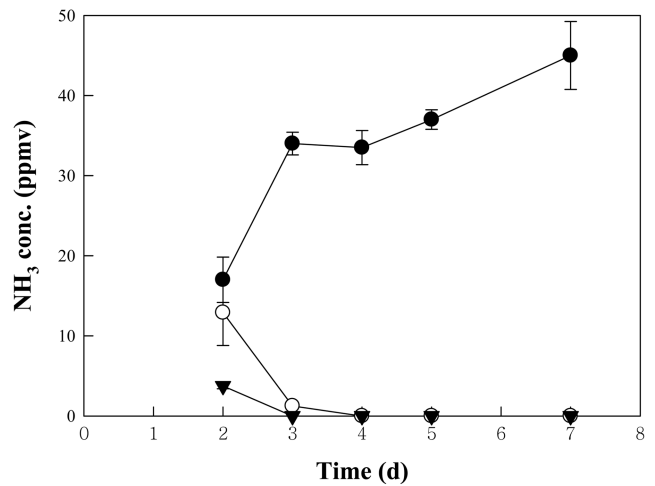
**Fig. 1. Profiles of ammonia gas preproduced in the sesame dregs where strain NS-1 was inoculated.** ●, Without inoculation; ▼, Inoculation of the strain NS-1 precultured in the sesame dregs culture; ○, Inoculation of the strain NS-1 precultured in AOM.

중 하루 만에 저감효과를 보이며, 접종 3일 후 암모니아가 대부분 저감되는 것으로 나타났으며 4일간 저감효과를 유지하였다.

또한 암모니아가 발생된 유박물에 암모니아 산화배지에서 전배양 된 균주 NS-1를 접종한 결과를 살펴보면 접종 2일 후 농도가 다소 증가하는 경향을 보였으나 꾸준히 암모니아 농도가 감소하여 5일째 암모니아 농도가 0 ppmv로 나타났다. 이 두 실험을 살펴보면 암모니아를 미리 발생시킨 유박물에서 전배양 했을 때 균주의 암모니아 저감 속도가 더욱 효과적인 것을 알 수 있었다. 이렇게 암모니아 저감효과가 빠르게 나타나는 이유는 전배양 기간에 성장하면서 암모니아에 적응이 되어 동일한 기질이 포함된 새로운 배지에서도 효소의 유도기가 없이 바로 산화작용을 통해 암모니아의 제거가 가능한 것으로 사료된다.

Fig. 2에는 악취를 발생시키지 않은 상태에서 각각의 균을 접종했을 때의 암모니아 제거 양상을 보여주고 있다. 이 실험은 악취가 발생이 되지 않은 상태에서 실험했기 때문에 배양시작 2일 동안은 암모니아가스를 발생시키고 시료채취를 하지 않았다. 배양 2일째 대조군의 농도는 17 ppmv로 나타났으며, 유박물에서 전배양 된 균을 접종했을 때 2일째 농도는 3.75 ppmv이며 대조군에 비해 약 77% 저감된 농도로 나타났으며 접종 3일째에는 암모니아가 검출되지 않았다(Fig. 2). 암모니아 산화배지에서 전배양 된 균을 접종했을 때는 2일째 암모니아 농도가 약 12.5 ppmv로 나타났으나 3일째 암모니아 제거율이 95.5%로 나타났으며 4일째 암모니아를 제거하였다.

앞선 Fig. 1의 결과와 비교해보면, 암모니아가 기발생된 상태보다는 발생이전에 균주가 접종된 경우 적응기 없이 빠른 속도로 암모니아가스를 저감함을 알 수 있었다. 따라서,



**Fig. 2. Profiles of ammonia gas produced in the sesame dregs after strain NS-1 was inoculated.** ●, Without inoculation; ▼, Inoculation of the strain NS-1 precultured in the sesame dregs culture; ○, Inoculation of the strain NS-1 precultured in AOM.

돈사의 슬러리에 적용하여 개발 균주를 살포할 경우 초기 살포 후 돈분의 발생이 있을 경우에도 효과적인 저감을 할 수 있을 것이라 사료된다.

각각의 조건에서 시간이 경과함에 따라 약간의 차이를 두고 암모니아를 저감하였으나 제거율이 77~99%로 나타났는데 이는 *Alcaligenes faecalis* No.4를 이용해 암모늄염을 40~50% 제거하였다는 보고[5]와 비교해 볼 때 약 2배 정도 효과가 우수한 것으로 나타났고, *Bacillus subtilis* IB101을 이용한 암모니아가스 제거연구[8]에서 보고된 결과 보다 약 20~30%정도 암모니아 저감효과가 뛰어났다. 또한 기축분뇨 발효제의 개발을 위한 미생물 분리 연구에서 분리된 미생물이 암모니아가스를 95%제거 했다는 보고와 유사한 결과가 나타났다[7].

위의 실험결과 악취발생의 유무와는 상관없이 유박물에서 전배양 된 균이 암모니아 저감속도가 빠르다는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 축산농가에서 암모니아제거를 위해 이용을 하게 된다면 혼합 유박과 같은 악취발생 배지에서 미리 전배양하여 그 배양액을 사용한다면 보다 좋은 효과를 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

### 분리 균주 NS-1을 돈분뇨에 직접 살포시 암모니아 저감 효과 검증

혼합유박을 이용해 암모니아를 저감효과를 확인한 후, 분리 균주 NS-1를 배양하여 실제 축산농가에 적용할 때 저감효과를 검증하기 위해 돈분뇨에 직접 살포하는 실험을 수행하였다.

1 L 부피의 플라스틱 재질의 병에 100 g의 돈분뇨를 넣고 1시간 동안 악취를 발생시킨 후, 배양된 NS-1 균주 30 mL

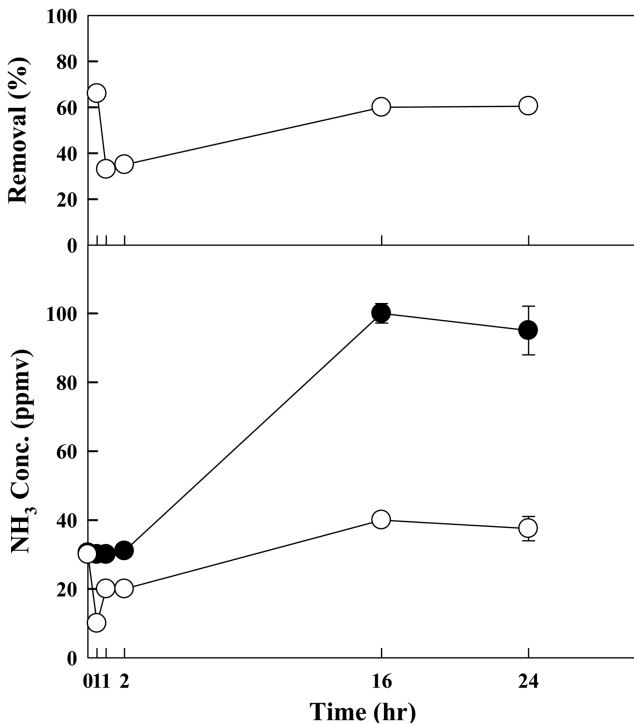


Fig. 3. Profiles of ammonia gas produced in the pig excretions. ●, Control experiment without the inoculation; ○, the experiment with the inoculation of the strain NS-1.

를 접종하여 시간경과에 따른 암모니아 저감효과를 확인 하였다.

균주를 살포한 직후에는 약 66%의 저감효과를 보였으나 이는 순간적인 저감효과로 생각된다. 이 효과는 지속되지 못하고 1시간 정도 경과 했을 때 약 33%의 제거율을 보였다(Fig. 3). 살포 2시간 후부터 16시간이 되기까지 대조군에서 암모니아가 급격히 증가하였으나 NS-1 균주를 살포한 실험군의 경우 암모니아 농도는 대조군에 비하여 느린 속도로 증가하였는데 이는 NS-1 균주의 암모니아 질산화효과가 기여했을 것이라 사료된다. 균주를 살포한지 16시간이 되었을 때 발생량의 60%가 저감되었으며 24시간까지 그 효과를 유지하였다. 이는 유박물에서 암모니아를 발생시킨 후 암모니아 저감효과를 본 결과와 유사하게 나타난 것으로 이후 분리균 NS-1의 접종이 돈분에서 지속적으로 발생하는 암모니아 가스 제거에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사한다. 이후 보다 장시간에 걸친 효과를 알아볼 예정이다.

### 결 론

암모니아는 대표적인 축산악취 물질로서 축산농가에서의 민원이 발생하는 주요 원인 이다. 이러한 암모니아를 저감하기 위하여 하수슬러지, 돈분, 우분, 우사주변의 흙 등에서 균주를 분리하였다. 그 중 하수 슬러지에서 분리한 균주

*Alcaligenes* sp. NS-1를 암모니아 가스가 발생하는 유박물에 접종하였을 때 3~4일 정도가 경과 후 95~100%의 저감효과를 보였다. 이를 근거로 하여 직접 돈분에 살포하였을 때 24시간 경과 후 약 60%의 암모니아 저감효과를 나타냈다. 이로써 축산환경개선제로의 이용 가능성을 확인할 수 있었다. 추후 NS-1 균주의 최적 성장조건을 탐색하여 대량배양 할 수 있는 방법이 마련된다면 실제 축산 악취저감을 위해 살포 할 때 매우 좋은 처리효과를 기대 할 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 2008년 경기도기술개발사업(전략산업: A08081810) 및 농촌진흥청 국책과제(Agenda 11-32-73)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. 양돈장의 악취 문제점과 그 대책. 2000. 서울대학교.
2. <http://www.koreapork.or.kr/JOURNAL/9911-month/new/new3.html>.
3. Ho, K. L., Y. C. Chung, and C. P. Tseng. 2008. Continuous deodorization and bacterial community analysis of a biofilter treating nitrogen-containing gases from swine waste storage pits. *Biores. Technol.* **99**: 2757-2765.
4. Joo, H. S. and M. Shoda. 2006. A study on the pathway of high-strength ammonium removal by heterophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Alcaligenes faecalis* No.4. *Environ. Eng. Res.* 230-235.
5. Joo, H. S., M. Hirai, and M. Shoda. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification -aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4. *J. Biosci. Bioeng.* **100**: 184-191.
6. Kim, N. J., Y. Sugano, M. Hirai, and M. Shoda. 2000. Removal of a high load of ammonia gas by a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 410-415.
7. Kim, S. Y., H. Kim, and H. J. Chae. 2003. Isolation and characterization of microorganisms for the development of fermentation accelerator of animal manure. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 466-472.
8. Kim, S. Y., Y. H. Noh, S. G. Kang, Y. B. Kim, W. J. Jang, D. J. Kim, and H. S. Yun. 2007. Ammonia gas removal by *Bacillus subtilis* IB101 and optimization of culture media. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**: 162-167.
9. Kim, T. I., K. H. Jeong, B. S. Jeon, J. H. Kwag, H. C. Choi, J. H. Park, et al. 2002. Effects of the Inoculation of *Candida rugosa* CY-10 on the reducing odours in pig slurry medium. *J. L. H. E.* **8**: 17-24.
10. Lee, S. J., S. W. Chio, H. Namkung, and I. K. Paik. 2000. Effect of dietary protein and feed additive on ammonia gas emission in broiler house. *J. Anim. Sci. Technol.* **42**: 299-

314.

11. Lee, Y. S., J. S. Yoo, S. Y. Chung, C. S. Park, and Y. L. Chio. 2003. Microbial immobilization, characterization and isolation of nitrogen oxidizing bacteria. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 1-6.
12. Park, J. H., G. I. Jun, and C. H. Jeong. 2003. Ammonia removal characteristics by pyroligneous liquid at livestock farmhouse. *J. Environment. Sci.* **12**: 1309-1313.

**(Received Sep. 8, 2009/Accepted Oct. 7, 2009)**