

황을 이용한 탈질 공정에서 분리되어진 미생물의 탈질 특성

정경자, 안영희, 박우신, 김성연, 김인수*

광주과학기술원 환경공학과 BEEL실험실

1. 서론

지난 수십년 동안 지하수, 산업폐수, 축산폐수에서 발생한 질소화합물을 제거하기 위한 공정들이 많이 연구되어져 왔다. 지금까지 적용되어져 오던 탈질 기술로는 여러 가지 공법들이 있으나 주로 종속영양 탈질을 기본으로 하는 공법들이었다. 그러나 이 공법은 C/N비가 낮은 폐수의 경우 외부 탄소원을 공급해주어야 하며 이것의 경제적인 손실은 상당히 크다고 볼 수 있다. 이러한 폐수를 경제적인 면을 감안할 때 대체공법의 개발이 필요하였으며 이로 인해 최근 들어 추가기질인 외부탄소원을 필요로 하지 않는 황입자를 이용한 자가영양 탈질 공법에 관심이 모아지고 있다. 그러나 자가영양 탈질균은 종속영양탈질균에 비해 성장이 늦어 균체량이 적기 때문에 순수 분리균만으로 반응기를 통한 폐수처리가 어렵다는 단점이 있다. 따라서 실제로 운전되는 자가영양탈질 반응기 내부는 순수한 단일 미생물만 존재하는 것이 아니라 여러 상태의 탈질균의 혼합상태로 존재한다. 효율적인 자가영양 탈질 반응계 구축을 위하여 반응계 내부에 존재하는 균의 특성을 파악하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 6종의 균을 순수 분리하였고 그 균들의 탈질과 관련된 특성과 계통발생학적 다양성을 분석하였다.

2. 실험방법

2.1 탈질 미생물 분리

미생물 분석에 사용된 시료(반응기내의 황입자와 인공폐수)는 6개월 이상 35℃에서 반연속식으로 운전한 주반응조(Master culture reactor;MCR)와 실패수를 이용한 울산 pilot plant에서 시료를 채취하였다⁷⁾. MCR 내의 인공폐수의 부피는 1L이고 지름이 2-5mm인 황입자로 충전되었다. 이 반응기에 식종된 미생물은 폐수의 탈질 처리에 1년간 운전된 파일럿 규모의 황충전 반응기에서 채취한 혼합미생물이었다. 반면 울산에 설치한 pilot plant 는 운전조건이 유입유량 60 L/hr (HRT: 15 hr), 30 ℃에서 약 3개월간 실제 철강폐수로 운전하였고 폐수의 특징은 pH 7.0-7.5 정도로 중성부근이며 질산성 질소농도는 200-300mg/L 정도로 고농도의 질산성 질소를 함유하고

10,000-15,000 mg/L의 아주 고농도의 칼슘이온을 함유하여 침전물의 형성 가능성이 아주 커서 본 공법 자체에서 생성되는 황산염과 더불어 이미 원수 중에 1000-2500mg/L의 황산염을 함유하고 있고 그 변화폭이 크다는 것이다.

반응기내의 미생물을 순수분리하기 위해 액과 황입자를 각각 채취하였다. 황입자는 10ml의 phosphate-buffered saline(PBS; 0.13M NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2)에 넣어 vortex 한 후 생물막에 존재하는 미생물을 황입자로부터 분리시킨 후 상등액을 취하여 분주하였다. 시료는 PBS에 연속 희석한 것을 고체배지⁷⁾에 분주하여 탈질 미생물을 배양하였다.

2.2 분리된 탈질 균주의 동정

분리된 탈질 균주의 특징을 알아보기 위하여 standard method를 이용한 그람 염색과 형태적인 특징을 현미경을 통해 관찰하였다.

2.3 분리균주의 DNA 추출과 PCR

각각의 반응기로부터 분리되어진 탈질 미생물들은 순수분리에 사용되어진 배지의 조성파 동일한 배지에 배양하여 DNA 추출⁵⁾을 하였으며 PCR에 사용하였다. 16S rDNA 증폭을 위한 PCR은 primer 27f, 1492r를 사용하여 16S rDNA를 증폭하였다.

2.4 Nitrite reductase gene test

일반적으로 혐기성상태에서 탈질 미생물은 탈질 반응이 일어날 때 최종전자수용체로 nitrate reductase, nitrite reductase, nitric oxide reductase 과 nitrous oxide reductase 등의 효소의 영향을 받는다. 이 중에 nitrite reductase 는 탈질반응시 가장 핵심이 되는 것으로 NO₂에서 NO로 넘어가는 단계에서 작용하는 효소이다⁴⁾. nitrite reductase로는 *nirS* (*cd₁-NiR*)와 *nirK* (*Cu-NiR*) 형태 두 가지로 나누어지며 본 연구에서는 분리된 미생물이 가진 nitrite reductase 유전자의 종류를 알아보기 위해 primer *nirK1f*, *nirK5r* 두 가지를 사용하여 PCR로 분석하였다²⁾.

2.5 분리한 균주의 계통분류학적 분석

각각의 분리되어진 균주는 total DNA를 추출한 후 PCR로 16S rDNA를 증폭하여 sequencing 분석을 실시하였다. sequencing은 다카라 코리아에 분석을 의뢰하였으며 그 서열을 바탕으로 BLAST (version 2.0)와 Sequence_Match (version 2.7)을 이용하여 6개 균주의 염기서열을 분석하였다.

3. 결과

3.1 탈질 미생물 분리

반응기에서 분리되어진 sample은 고체배지에 도말한 뒤 anaerobic chamber를 이용, 30°C에서 5일간 배양하였다. 배양 후 많은 미생물들이 배지 위에 single colony로 형성되었으며 이들 중 우점종으로 보이는 총 6개의 colony를 선별하여 고체배지로의 계대 배양을 통해 순수 분리하였다. 분리된 6가지의 균주는 현미경 관찰을 통한 형태학적 특징 등을 관찰한 결과 서로 다른 미생물로 확인되었다. 이 6가지의 균주들은 각각 strain 4ML, 8ML, 9MS, 10MSB, 9US, 10US라고 이름을 명명하였으며, 각 미생물들의 특징은 Table 1에 나타난 바와 같이 순수 분리된 6종 모두 그람 음성으로 rod type으로 밝혀졌다. 또한 IC, GC 분석을 통해 NO₃의 감소와 N₂ gas 생성을 통해 탈질에 관여하는 미생물이라는 것을 재확인하였다.

3.2 Nitrite reductase gene test

실험에 사용되어진 nitrite reductase로는 nirS(*cd1-NiR*)와 nirK (Cu-NiR) 형태 두 가지로 나누어지며 본 연구에서는 분리되어진 각각의 미생물에 모두 적용하여 분리되어진 미생물이 탈질반응에 기여를 할 수 있는지를 알아보았다. Table 2에 나타내어진 것을 보면 10US를 제외한 나머지 5가지 균주 모두 nirK type을 가지고 있는 것으로 확인되어졌다.

Table 1. Description of denitrifiers isolated in this study.

Source sample type	Isolate	Gram Straining	Cell morphology	Colony morphology	
MCR	Sulfur particle	4ML	-	rod	round, small
		8ML	-	rod	brown, small
	Bulk liquid	9MS	-	rod	round, white, pulvinate
		10MSB	-	rod	round, flat
Ulsan pilot plant	Sulfur particle	9US	-	rod	round, big
		10US	-	rod	transparent, round

Table 2. Biochemical and genetic characteristics of denitrifiers isolated from sulfur-based denitrification process.

Isolate	Electron donor		nir gene nirK
	thiosulfate	S ^{0*}	
4ML	+	+	+
8ML	+	+	+
9MS	+	+	+
10MSB	+	+	+
9US	+	+	+
10US	+	+	-

* S⁰; elemental sulfur

3.3 분리한 탈질미생물의 동정

탈질 미생물의 보다 더 정확한 동정을 위해 추출되어진 total DNA 를 16S rDNA를 증폭하여 Applied Biosystems model 373A DNA sequencer (Foster City, CA)를 통해 각 균주의 염기서열을 분석하였다. 이 염기서열을 Ribosomal Database Project (RDP) and GenBank databases 를 이용하여 비교, 동정하였다. Table 3에서 16S rDNA를 비교하여 동정하였다.

16S rDNA는 1.5kb 모두를 분석한 것이 아니라 부분적으로 109 에서 536 까지만 염기서열 을 분석하였고 각 균주의 염기서열을 비교한 결과 10US를 제외한 나머지 5종은 Beta Proteobacteria 에 속해 있음을 알 수 있었다. 또한 10US, 10MSB를 제외한 4ML, 8ML, 9MS, 9US 4종은 *Alcaligenes sp.* 으로 나타났다³⁾.

Table 3. Phylogenetic position of the denitrifiers.

Isolate	Closest phylogenetic relative	16S rDNA similarity (%)	Phylogenetic group
4ML	<i>Alcaligenes sp.</i> strain F4 (AF380161)*	99	Beta Proteobacteria
8ML	<i>Alcaligenes defragrans</i> isolate TJ4(AF508102)	100	Beta Proteobacteria
9MS	<i>Alcaligenes defragrans</i> isolate TJ4	100	Beta Proteobacteria
10MSB	Unidentified bacterium rA9 (AB021360)	100	Beta Proteobacteria
9US	<i>Alcaligenes defragrans</i> isolate TJ4	100	Beta Proteobacteria
10US	Uncultured bacterial clone TFBMH (AF390951)	99	Gamma Proteobacteria

*GenBank accession number.

4. 결론

1. 황을 이용하는 탈질 공정을 도입한 반응기 내에서 탈질 미생물을 농화배양시켜 우점종으로 차지하는 strain 6가지를 동정하였다. 10US, 10MSB를 제외한 4ML, 8ML, 9MS, 9US 4종은 *Alcaligenes sp.* 와 밀접한 관계가 있었다.

2. 분리균 중 6가지의 균들은 탈질 반응에 관여하는 enzyme (nitrate reductase, nitrite reductase, nitric oxide reductase, nitrous oxide reductase) 중에 질소가 가스상으로 바뀌는 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ 단계에서 가장 핵심이 되는 nitrite reductase 유전자 *nirK* type을 가지고 있었다. 이것은 분리되어진 균주가 황을 이용한 탈질 반응을 수행할 수 있다는 것을 의미한다.

감사의 말씀

연구는 환경부의 차세대 핵심환경기술개발 사업과 과학재단 우수 연구센터인 환경 모니터링 신기술 연구센터의 일부지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Alm, E. W., D. B., Oerther., N. Larsen., D. A. Stahl., and L. Raskin., "The oligonucleotide probe database"(1996), *Appl Environ. Microbiol.* **62**, 3557-3559.
2. Braker, G., J. Zhou, L. Wu., A. H. Devol., and J. M. Tiedje., "Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities"(2000), *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2096-2104.
3. Brosius, J., H. L. Palmer., J. P. Kennedy., and H. F. Noller., "Complete nucleotide sequence of a ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*"(1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4801-4805.
4. Casciotti, K. L., and B. B. Ward., "Dissimilatory Nitrite Reductase Genes from Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria"(2001), *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2213-2221.
5. Jung, G. Y., H. O. Jung, J. R. Kim, Y. Ahn, and S. Park., "Isolation and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* P4 which utilizes CO with the production of H₂"(1999), *Biotechnol. Lett.* **21**, 525-529.
6. Kim, I. S. and J.-H. Son., "Impact of COD/N/S ratio on denitrification by the mixed cultures of sulfate reducing bacteria and sulfur denitrifying bacteria"(2000), *Wat. Sci. Tech.* **42**, 69-76.
7. Oh, S.-E., K. S. Kim., H.-C. Choi., J. Cho., and I. S. Kim., "Kinetics and physicochemical characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria"(2000), *Wat. Sci. Tech.* **42**, 59-68.