

窒化細菌의 암모니아 酸化能과 이에 미치는 환경요인의 영향

宋 弘 珪·河 永 七·洪 淳 佑

(서울대 自然大 微生物學科)

Ammonia oxidation activity of nitrifying bacteria and effects of some environmental factors

SONG, Hong Gyu, Yung Chil HAH and Soon Woo HONG

(Dept. of Microbiology, Seoul National Univ.)

ABSTRACT

Ammonia oxidation activity of polluted water samples in Jinhae Bay and isolated strain from the seawater was investigated, and effects of environmental factors such as temperature, salinity, substrate concentration to the ammonia oxidation were also investigated.

The ammonia oxidation activities of sediments, 0.01~0.04mg eq. NO₂-N/l/h, were exceptionally higher than that of sea water, 0.5~1μg eq. NO₂-N/l/h. The activities of muddy sediments at station 4 and 2 were 0.03~0.04mg eq. NO₂-N/l/h and that of sandy sediment at station 3 was 0.002mg eq. NO₂-N/l/h.

In the case of sea water, the activity of polluted area, station 1, was 2 times higher than that of offshore, station 4.

The isolated strain reached log phase after 30 days culture and its oxidation activity was 2~3μg eq. NO₂-N/day. The maximum oxidation of ammonia by IA 13 strain occurred at 30mg/l substrate concentration. And temperature for maximum oxidation of ammonia was 35°C. The oxidation increased with the salinity rising up to 100% seawater concentration.

緒 論

産業과 文化의 발달로 인한 많은 工場廢水와 都市下水에 의해 각종 窒素化合物이 상당량 海洋으로 유입되고 있으며 그 대부분이 NH₄⁺態이다. 이 NH₄⁺態窒素는 微生物에 의하여 窒素化合物의 態轉換에 중요한 한 단계인 窒化作用(nitrification)으로 NO₃⁻態로 轉換한다. 이러한 窒化作用은 海洋의 基礎生産性 調節(Yoshida; 1967, Miyazaki *et al.* 1973, Jones *et al.* 1980)

과 窒素循環에 중요한 役割(Curtis *et al.* 1975, Zumft *et al.*; 1979, Vanderborght *et al.* 1975)을 한다.

窒化作用은 2 가지 chemoautotrophic bacteria에 의해 2 단계에 걸쳐 일어난다. 그 첫째는 nitroso group bacteria에 의하여 암모니아를 아질산으로 산화시키는 과정이며, 둘째는 nitro group bacteria에 의하여 아질산을 질산으로 산화시키는 과정이다. 그러나 이 세균들은 生長이 느리며(Finstein *et al.* 1975) 그 산화능도 비교적 낮은 편이다. (Belser *et al.* 1978) 따라서 多

량의 암모니아態 化合物의 海洋生態系로의 流入은 生態系의 균형을 亂게하는 요인이 된다.

자연계에 있어서 미생물에 의한 窒化作用의 역가에 대해서는 여러 사람이 조사한 바 있으나 그 방법과 조사대상은 다양하다. (Belser et al. 1982, Henriksen; 1980, Henriksen et al. 1981, Hansen et al. 1981, Hall; 1982, Curtis et al. 1975). 그러나 한 군주에 대한 질소화합물의 산화기작 및 성장곡선 등에 관해서는 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 더우기 현재까지 우리나라의 海洋의 窒化作用에 대하여서는 연구된 바가 없는 실정이다.

本 研究에서는 우리나라에서 근간 오염되고 있는 지역중의 하나인 鎭海灣을 대상으로 하여 海水 및 底質層에 의한 實驗室의 암모니아 산화능과 試料에서 분리한 군주의 암모니아 산화능을 조사하여 窒化作用의 정도를 파악코자 하였으며, 아울러 분리 군주의 암모니아 산화능에 미치는 몇가지 환경요인의 영향을 검토하여 그 결과의 일부가 정리되었으므로 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 試料採取

試料은 1980년 1월부터 1980년 11월까지 격월로 5회에 걸쳐 馬山內港을 포함한 鎭海灣 海域에서 採取하였다.

試料採取 定點은 Fig. 1 과 같이 馬山內港에서 定點 1 과 2, 釜島부근을 定點 3, 外海로 나가는 부분인 蠶島부근을 定點 4로 정하였다.

海水는 各定點의 水面下 1m의 上層水와 海底 1 m上部의 下層水를 van Dorn sampler 로 採水하였다. 水深은 정점 1이 10m 정점 2가 13m 정점 3이 20m 정점 4가 40m이다.

底質層은 各정점의 0~5cm 깊이의 표면 底質層을 sediment sampler 로 採取하였다.

2. 窒化細菌의 分離

採取한 海水 試料과 底質層 試料은 aged seawater 로 연속희석하여 Watson(1965)의 변형한천배지에 접종하여 27°C에서 30일 배양한 후 colony 를 순수분리 하였다.

3. 試料의 암모니아 酸化能 測定

底質層 試料과 海水 試料를 각각 5g, 5ml 씩

1l 의 Watson 변형 액체 배지에 넣고 충분히 섞은 후, 일정 시간 경과에 따라 질화세균에 의한 아질산의 변화량을 sulphanilamide 와 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 로 정색반응시켜 파장 543 nm 의 분광분석기(Gilford, Model 250)로 측정 정량하였다.

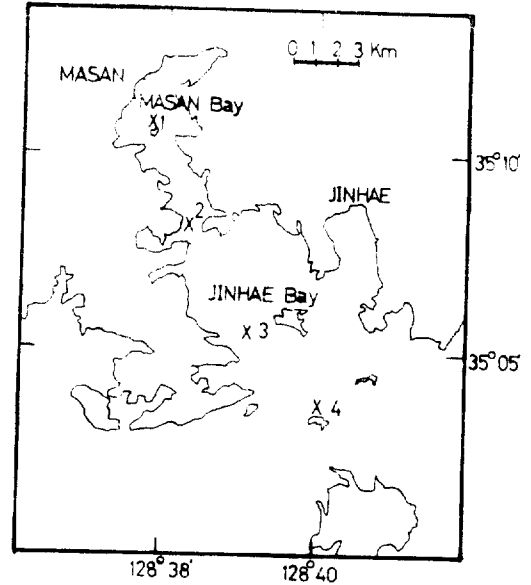


Fig. 1. Sampling stations in Jinhae Bay.

4. 分離菌株의 암모니아酸化能 測定

底質層 試料를 접종한 암모니아 산화용 배지에서 nitroso-group bacteria 의 단일 colony 를 얻어 이를 계대배양하여 순수분리를 한다. 이 분리 군주를 액체배지에 넣고 배양하면서 3일 간격으로 배양액을 採取하여 아질산이온을 정량하여 암모니아 산화능을 측정한다.

5. 分離菌株의 암모니아 酸化能에 미치는 여러가지 환경요인의 영향

여러 환경요인의 정도를 달리하여 배양하면서 암모니아의 아질산 이온으로의 酸化能을 測定하였다.

기질농도의 영향은 배지에 각각 3, 30, 300, 3000 mg/l 의 (NH₄)₂ SO₄를 넣고, 온도에 의한 영향은 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C에서 배양하였으며, 염분도의 영향은 海水의 함량을 각각 0%, 25%, 50%, 75%, 100%로하고 나머지 부분은 0.02% NaHCO₃를 넣은 배지를 사용하였다. 이렇게 조정된 조건에서 군주를 배양하면서

일정 간격으로 배양액을 채취하여 생성된 아질산 이온을 測定하였다.

結果 및 考察

1. 試料의 암모니아 酸化能

調査海域의 窒化作用 程度를 알기 위하여 1980년 11월에 採取한 現場試料에 의한 암모니아의 아질산으로의 산화능을 조사하였다. 窒化作用은 底質層에서 활발히 일어나며 窒化細菌의 개체수도 많기 때문에 (Matulewich *et al*; 1978) 본 조사에서는 오염정도가 다른 定點 1, 2, 3, 4의 4군데 定點에서 底質層 試料를 採取하였으며, 海水는 汚染이 심한 定點 1과 비교적 깨끗한 定點 4의 上下層水를 採水하였다.

암모니아 酸化能은 試料에 存在하는 窒化細菌의 개체수와 細菌의 酸化能 차이에 따라 달라질 수 있는데 우선 存在하는 nitroso-group 세균의 개체수는 底質層의 경우 定點 1, 4, 2, 3의 순서로 작아지며 海水는 定點 1의 上下層水에서 定點 4보다 더 많은 것으로 나타났다 (Table.1).

底質層 試料의 암모니아 酸化能은 定點 2와 4에서 처음부터 아질산의 양이 상당히 증가하여 9~10일 이후에는 log phase로 들어간다. 定點 1은 초기에 증가량이 적지만 약 10일 이후에 급격한 증가를 보이기 시작하고 定點 3에서는 11일이 경과되어도 약간의 증가현상이 나타날 경

Table 1. Population of nitrifying bacteria in Nov. 1980. (cells/ml)

Station	Population of nitroso-group bacteria
1 Sd	2.07×10^5
2 Sd	7.56×10^4
3 Sd	1.43×10^4
4 Sd	1.26×10^5
1 S	3.60×10^3
1 B	4.97×10^3
4 S	4.30×10^2
4 B	3.00×10^2

1 Sd, 2 Sd, 3 Sd, 4 Sd: Sediment
1 S, 1 B, 4 S, 4 B: Sea Water (S: surface, B: bottom)

도이다. 배양 11일 째의 암모니아 산화능은 定點 4에서 0.042mg eq. $\text{NO}_2\text{-N/l/h}$, 定點 2에서 0.03 mg eq. $\text{NO}_2\text{-N/l/h}$, 定點 1이 0.013mg eq. $\text{NO}_2\text{-N/l/h}$, 그리고 定點 3이 0.002 mg eq. $\text{NO}_2\text{-N/l/h}$ 이었다. 이를 percent activity로 나타내면 定點 4를 100%로 할 때 定點 1, 2, 3이 각각 21%, 64%, 4%가 된다 (Fig. 2). Curtis *et al* (1975)에 의한 實驗的인 酸化에 관한 연구에서는 그 배양기간이 나타나 있지 않으나 암모니아 산화율의 결과가 0.017mg eq. $\text{NO}_2\text{-N/l/h}$ 로 되어 있는 데 이 값과 비교해보면 本實驗의 定點 1이 Curtis 등이 실험한 영국의 Trent Basin의 底質層과 유사한 정도로 窒化作用이 일어난

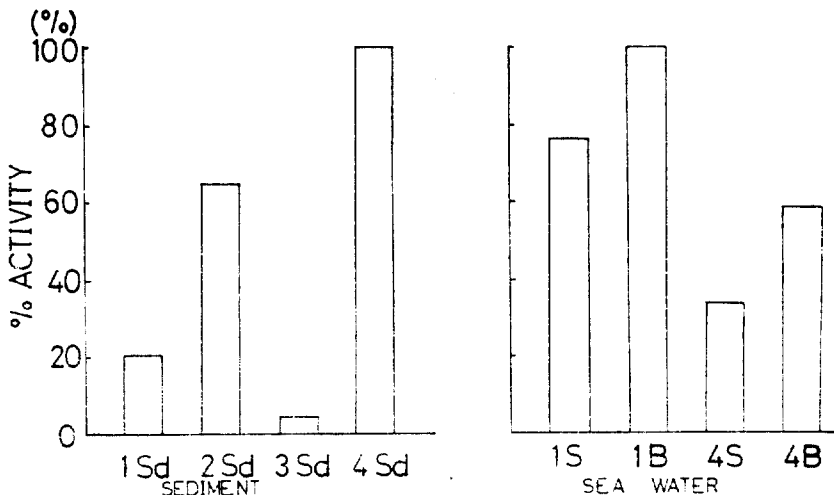


Fig. 2. Comparative oxidation rates of ammonia by natural samples.

다고 볼 수 있으며, 定點 4와 2같은 곳은 窒化作用이 활발히 일어나고 있으나, 定點 3은 비교적 서서히 진행한다고 할 수 있다. 따라서 存在하는 窒化細菌의 개체수를 고려하면 定點 4의 底質層에는 암모니아 산화능이 높은 균체들이 서식하며 定點 3은 균체수도 적고 酸化能도 낮은 균체들이 生長하는 것으로 생각된다. 鎭海灣 海洋 基礎調查 報告書(1980)와 鎭海灣의 赤潮 및 汚染모니터링시스템 開發을 위한 研究(1980)에 의하면 定點 3 부근이 鎭海灣의 중앙부로 수온도 낮고 潮流의 이동이 심하여 퇴적물질이 적어서 底質層이 砂質性으로 되어있다고 하는데 아마 이런 부적합한 환경 때문에 균체들의 암모니아 산화능이 낮은 것으로 생각된다.

海水試料에 의한 암모니아의 酸化도 9~10일까지는 완만하게 증가하다 그 후에 빠른 산화를 나타낸다. 정점간 산화율을 보면 定點 1의 下層水가 1 μ g eq. NO₂-N/l/h로 이를 100%로 보면 定點 1 上層水가 77% 定點 4의 上下層水가 각각 34%, 49%가 된다(Fig. 2) 이같이 定點 1의 酸化能이 定點 4 보다 큰 데 이것은 定點 1의 海水가 汚染이 되어서 각종 영양 염류가 定點 4보다 많고 암모니아 이온도 定點 1이 2.7 μ g eq. N H₄⁺-N/l로 定點 4의 0.8 μ g eq. NH₄⁺-N/l보다 많으며 또한 Table 1에서 보듯이 균체수도 많기 때문인 것으로 보여진다. 그러므로 海水에서의 窒化作用은 汚染과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 上下層水간의 차이는 下層水가 약간 높는데 이것은 下層水가 부유물질 등이 上層水보다 많기때문에 암모니아 산화에 보다 좋은 장소인 것으로 생각된다.

海水에 의한 암모니아의 아질산으로 산화되는 양은 Fig. 2에서 定點 1의 下層水가 9 μ g eq. NO₂-N/l/h으로 2.4mg eq. NO₂-N/l/h인 底質層試料에 의한 것과는 비교가 되지 않을 정도로 낮다. 이것은 집중하는 試料에 存在하는 균체수도 틀리지만 Cirello *et al*(1979), Matulewich *et al*(1978)등 여러 사람이 주장하듯이 底質層이 질화세균의 서식에 보다 좋은 장소, 즉 부착하여 자랄수 있는 환경이기 때문인 것으로 생각된다.

2. 分離菌株의 암모니아酸化能과 이에 미치는 환경요인의 영향

海洋에서의 窒化作用은 存在하는 窒化細菌의

암모니아酸化能에 따라 그 程度가 변화할 수 있으므로 分離菌株에 의한 암모니아酸化能과 이에 미치는 몇가지 환경요인의 영향에 대하여 살펴보았다.

海水에서 分離한 암모니아 산화세균 nitroso group bacteria의 암모니아 산화능을 조사한 결과 生長곡선과 유사하여(Fig. 3) 약 15일 정도의 lag phase를 갖고 그 후 약 15일의 acceleration phase를 거쳐서 log phase로 들어간다는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 Belser(1979) 등 여러 사람들이 질화세균은 상당히 긴 generation time 및 culture time을 갖는다고 하는 사실과 일치되는 경향임을 알 수 있다.

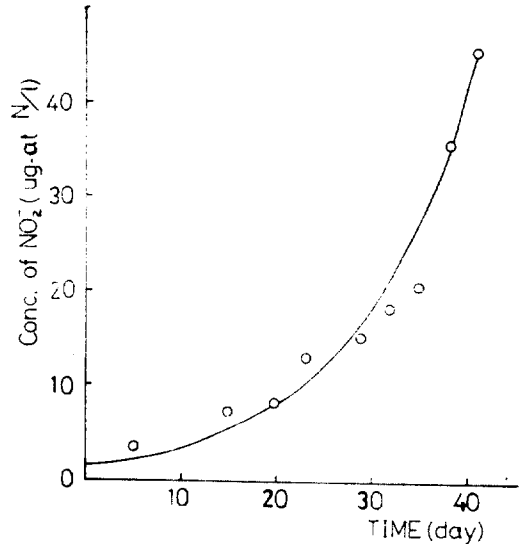


Fig. 3. Ammonia oxidation rate by IA 13 strain.

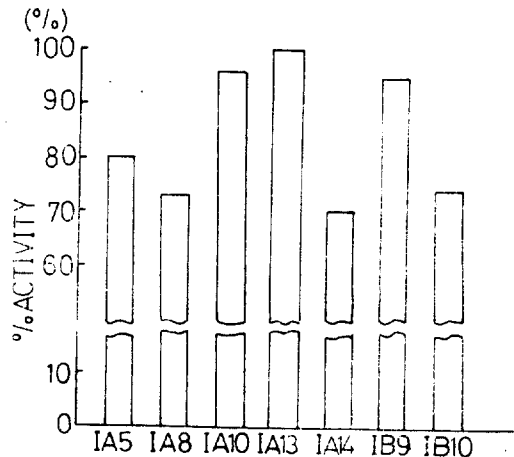


Fig. 4. Comparative ammonia oxidation rates by isolated strains.

분리균주들의 암모니아酸化能은 상당히 낮은편으로 대체로 2~3 $\mu\text{g eq. NO}_2\text{-N/day}$ 이었다. 이것은 Fig. 2의 底質層 試料에 의한 산화능에 비하면 매우 낮은 값이다. 각 균주의 상대적 산화능은 Fig. 4에서 보듯이 차이가 그렇게 크지 않다. 이 분리균주들 중에서 nitrite former IA 13 균주가 3.2 $\mu\text{g eq. NO}_2\text{-N/day}$ 로 가장 높은 암모니아산화능을 나타내었다. 이 균주를 이용하여 암모니아酸化能에 미치는 여러 환경요인들의 영향을 조사하였다.

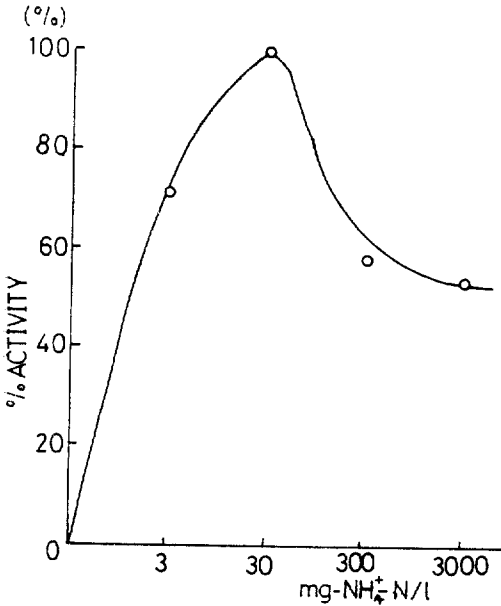


Fig. 5. Effect of substrate concentration on the activity of nitrifying bacteria, IA 13 strain.

먼저 기질농도에 의한 영향은 Fig. 5에서 보듯이 30mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ 의 기질농도에서 암모니아산화능이 가장 높았고 그 다음이 3mg/l이고, 300mg/l와 3,000mg/l는 유사하였다. 이 결과는 Yoshida(1967)에 의한 30분 배양후의 상대역가측정의 결과와 비슷하다. 즉 30mg/l의 기질농도가 암모니아 산화에 가장 적합하다는 것인데, 최적 기질농도는 균주 및 분리한 장소에 따라 약간씩 틀려질 수 있다. Jones(1980)등은 하구에서 분리한 균주가 0.2g $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ 의 최적조건을 갖는다고 보고한 바 있으며, Carlucci *et al.* (1979)은 5 $\mu\text{g/l}$ 의 기질농도에서도 아질산 생성을 잘하는 균주를 찾아냈으며 Anthonisen *et al.* (1976)은 높은 농도의 암모니아와 아질산이 질화

작용을 도리어 억제하는 것을 알아냈다. 대체로 이 질화세균은 낮은 기질농도에서 성장과 대사를 잘하는 것으로 알려져 있다.

온도에 의한 영향은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 35°C에서 최대 암모니아산화능을 갖는데 대체로 높은 온도에서 산화능이 높은 것 같다. 최적 성장온도와 최적 산화온도는 다를 수가 있는데 Yoshida(1967)의 실험결과로는 최적 성장온도는 27~28°C이고 아질산 생성 최적 온도는 35°C로 되어 있고 또한 cell free extracts에 의한 아질산 생성 최적온도는 50~55°C로 나타나

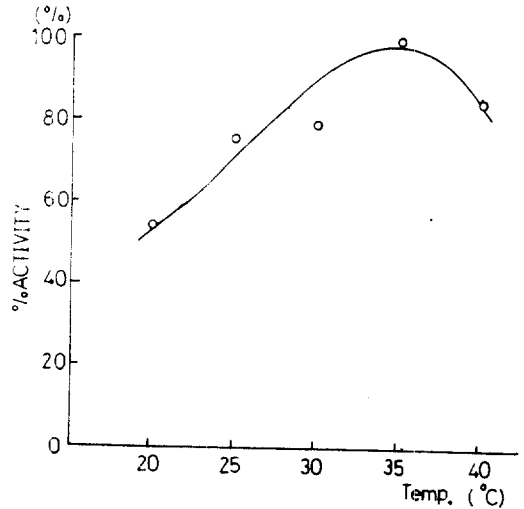


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of nitrifying bacteria, IA 13 strain.

있다. 本實驗의 결과는 Jones *et al.*(1980)의 결과와 유사하게 35~40°C에서 높은 암모니아 산화능을 나타냈는데 이 nitrite former IA 13은 성장온도 보다 높은 온도에서 최대산화능을 갖는 것 같다.

염분도가 암모니아 산화능에 미치는 영향은 Fig. 7에서 보는 것 같이 대체로 염분도가 높을수록 암모니아 산화능이 증가하는 경향을 볼 수 있으나, 그다지 큰 차이는 나타나지 않고 있다. 염분도가 海洋性 窒化細菌에 미치는 영향은 Finstein *et al.*(1972)에 의한 결과와 Yoshida의 결과가 큰 차이를 나타내고 있다. 즉 Finstein은 미국 동부해안에서 분리한 nitrite former를 해수염의 농도를 달리하고 배양했을 때 그다지 큰 차이는 나지 않지만 50% marine salts배지에서 가장 높은 암모니아 산화능을 나타내고 75%,

25%, 100% marine salts 배지순으로 낮아지고 담수배지는 거의 아질산을 생성하지 못하는 결과를 나타내고 있다. Yoshida는 여러 균주로 해수농도가 미치는 영향을 보았는데 그 중에서 nitrite former SI 균주만 Finstein의 균주와 같은

형태를 나타내고, M2와 A6 균주는 100% 해수농도에서 최대 암모니아 산화능을 나타내었으나 SW 1 균주는 0% 해수에서도 최대 산화능의 45% 정도의 역가를 나타낸다고 하였다. 이에 비해 海水의 농도가 nitrite former A6의 cell free extracts의 아질산 생성에 미치는 영향을 보면, 0%에서 100%까지의 해수농도가 거의 비슷하고 40%가 약간 높은 역가를 나타내고 있다. 이와같이 아질산 생성에 미치는 염분도의 영향도 분리균주에 따라 상당한 차이가 나고 있다.

본 실험의 결과를 보면 nitrite former IA 13은 염분도가 증가할 수록 암모니아 산화능이 높아져서 100%의 해수농도에서 가장 산화능이 높고 0%의 해수농도에서도 상당한 정도로 산화가 일어나는 것으로 미루어보아 Ycshida의 cell free extracts에 의한 결과와 같이 euryhaline 하다고 볼 수 있으며 어느 정도 淡水種의 性質을 갖고 있다고 할 수 있겠다. 이 균주에 대한 해수 농도의 영향은 다른 여러 사람의 균주와는 또 다른 양상을 보이고 있다.

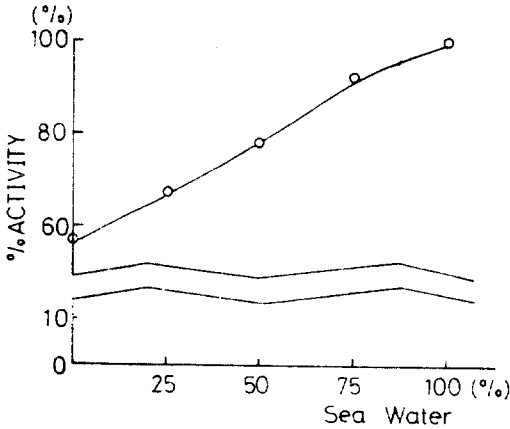


Fig. 7. Effect of salinity on the activity of nitrifying bacteria, IA 13 strain.

摘 要

鎮海灣 一帶海域에서의 窒化作用과 窒化細菌의 性질을 알아보기 위해서 균주와 현장시료의 산화능 등에 대하여 실험하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

底質層의 암모니아 산화능은 0.01~0.04mg eq. NO₂-N/l/h 정도로 海水의 0.5~1μg eq. NO₂-N/l/h 보다 훨씬 높으며 底質層의 경우 粘土質인 定點 4와 2에서 酸化能이 0.03~0.04mg eq. NO₂-N/l/h로 높고 砂質인 定點 3은 0.002mg eq. NO₂-N/l/h로 비교적 낮다.

海水의 암모니아 산화능은 汚染이 심한 定點 1이 1μg eq. NO₂-N/l/h로 바깥쪽 定點 4보다 2배정도 높은데 이것은 定點 1이 암모니아態 질소의 양과 窒化細菌의 수가 많기 때문이다. 그리고 下層水가 上層水보다 산화능이 약간 높았다.

여러 분리 균주의 암모니아 산화능은 그다지 큰 차이 없이 약 30일 배양후에 log phase에 들어가서 2~3μg eq. NO₂-N/day의 낮은 값을 나타낸다. 분리 균주 IA 13의 암모니아 산화능은 기질 농도가 30mg/l 일 때 가장 높고 35°C에서 최대 산화능을 나타냈으며 100%의 해수농도까지 염분도가 증가할수록 산화능이 커짐을 알 수 있었다.

引用 文 獻

1. Aaronson, S. 1970. Experimental microbial ecology. Academic Press. New York. 125~126.
2. Anthonisen, A.C., R.C. Loehr, T.B.S. Prakasam and E.G. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF.* 48 : 835~851.
3. Belser, L.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33 : 309~333.
4. Belser, L.W. and E.L. Schmidt. 1978. Diversity in the ammonia-oxidizing nitrifier population in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 584~588.
5. Belser, L.W. and E.L. Mays. 1982. Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and

- sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** : 945~948.
6. Cirello, J., R.A. Rapaport., P.F. Strom, V.A. Matulewich, M. L. Morris, S. Getz, and M.S. Finsten. 1979. The question of nitrification in the Passaic river, New Jersey; Analysis of historical data and experimental investigation. *Water Res.* **9** : 255~268.
 7. Curtis, E.J.C., Durrant, K. and M.M.I. Harmon. 1975. Nitrification in rivers in the Trent Basin. *Water Res.* **9** : 255~268.
 8. Finstein, M.S. and M.R. Bitzky. 1972. Relationships of autotrophic ammonium-oxidizing bacteria to marine salts. *Water Res.* **6** : 31~40.
 9. Hall, G.H. 1982. Apparent and measured rates of nitrification in the hypolimnion of a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** : 542~547.
 10. Hansen, J.I., K. Henriksen, and T.H. Blackburn. 1981. Seasonal distribution of nitrifying bacteria and rates of nitrification in coastal marine sediments. *Microb. Ecol.* **7** : 297~304.
 11. Henriksen, K. 1980. Measurement of in situ rates of nitrification in sediment. *Microb. Ecol.* **6** : 329~337.
 12. Henriksen, K., Hansen, J.I. and T.H. Blackburn. 1981. Rates of nitrification, distribution of nitrifying bacteria and nitrate fluxes in different types of sediment from Danish waters. *Marine Biology.* **61** : 299~304.
 13. Holt, J.G. 1977. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
 14. Jones, R.D. and M.A. Hood. 1980. Effects of temperature, pH, salinity, and inorganic nitrogen on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from wetland environments. *Microb. Ecol.* **6** : 339~347.
 15. Matulewich, V.A. and M.S. Finstein. 1978. Distribution of autotrophic nitrifying bacteria in a polluted river (the Passaic). *Appl. Environ. Microbiol.* **35** : 65~71.
 16. Rand, M.C., Greenberg, A.E., and M.J. Taras. 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
 17. Schmidt, E.L. 1982. Nitrification in soil. in Nitrogen in Agricultural soils-*Agronomy Monograph* No. **22** : 253~288.
 18. Suzuki, I., U. Dular, and S.C. Kwok. 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120** : 556~558.
 19. Watson, S.W. and M. Mandel. 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **107** : 563~569
 20. Yoshida, Y. 1967. Studies on the marine nitrifying bacteria: with special reference to characteristics and nitrite formation of marine nitrite formers. *Bull. Misaki Marine Biological Institute, Kyoto Univ.* No. **11** : 1~58.
 21. Zumft, W.G. and J. Cardenas. 1979. The inorganic biochemistry of nitrogen bioenergetic processes. *Naturwissenschaften* **66** : 81~88.
 22. 鎭海灣의 赤潮 및 汚染 모니터링 시스템 開發을 위한 研究, 1980. 韓國 科學技術院 海洋研究所.
 23. 鎭海灣 海洋基礎調查 報告書. 1980 서울大學校 微生物學科