

암모니아 산화 세균 *Nitrosomonas* sp. PK1의 분리 및 특성

김대경 · 김현국 · 이종석 · 서근학* · 김성구 · 공인수†

부경대학교 생물공학과
*부경대학교 화학공학과

Isolation and Characterization of Ammonia Oxidizing Bacteria, *Nitrosomonas* sp. PK1

Dae-Kyung Kim, Hyun-Kuk Kim, Jong-Soek Kim, Kuen-Hack Suh*, Sung-Koo Kim and In-Soo Kong†

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

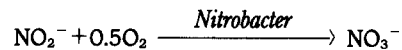
To remove dissolved NH_4^+ in the aquaculture system, one ammonia oxidizing bacterium, *Nitrosomonas* sp. PK1, was isolated from samples collected in many aquacultural place and sludges of waste water. The stationary phase of this strain was reached after 9 days, and the maximum NO_2 production was shown from 3 days to 9 days. In the selective medium, 0.1% of glucose was the good carbon source for growth. However, the NO_2 productivity was repressed by the addition of glucose to the medium. When Zn^{++} ion was supplemented to the medium, growth and the NO_2 productivity was increased, 10mM of ZnCl_2 was the optimal concentration for growth and 1 mM of ZnCl_2 was the optimal concentration for the production of NO_2 , respectively.

Key words : Ammonia oxidizing bacteria, *Nitrosomonas*

서 론

질산화 과정(nitrification)은 계속적으로 진행되는 탈질화 반응(denitrification)등을 통하여 폐수 등에 존재하는 nitrogen을 제거하는데 이용되고 있는 전형적인 생물학적 반응이다. 질산화 과정은 두 단계를 거치는 산화적 반응으로써 첫번째로 암모니아성 질소가 nitrite(NO_2^-)로 산화되면 두번째로 nitrite가 nitrate(NO_3^-)로 산화되는 과정이다. 이때 이 반응에 관여하고 있는 미생물은 자연환경에서 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*이며 각각의 균은 다음과 같은 반

응에 관여하고 있다.



이와 같은 반응에 의해 생성된 nitrate는 절대 혐기성균 혹은 편성 혐기성 균들의 생화학적 반응을 통하여 N_2 gas 로써 전환되는 과정을 거쳐 자연계의 유독한 암모니아성 질소를 제거하게 된다.

생활하수, 산업폐수 및 축산 폐수 등으로부터 배출되는

† Corresponding author

오염 물질은 자연의 정화능력을 초과하고 있기 때문에 우리의 수질 환경을 악화시키고 있는 실정이다. 기존의 오폐수 처리 시설들은 대부분 유기물질과 부유물질의 제거에 중점을 두고 있으나 호수와 하천의 부영양화의 원인물질이 되는 질소와 인 등의 영양 염류에 대한 제거능력을 갖춘 처리시설이 요구되고 있다.

현재 양어장에서의 순환여과식 사육시스템에서 순환수 재이용은 적정 온도 보존 및 경비 절감 등의 장점을 가지고 있지만 지속적인 배설물 및 사료에 의하여 수질이 악화되므로 적절한 수처리가 요구되고 있다. 고밀도 양어장의 수질관리를 위한 양어장 순환수 처리 공법으로 사용되고 있는 것은 회전원판공법(Antonie et. al., 1974 ; Lim, 1993), 살수여과공법(Rogers et. al., 1985), 침지 여과공법(Carmignani et. al ; 1977), 수경법(Lewis et. al., 1978) 및 활상 슬러지법(Meske, 1976) 등이 보고되고 있으며 최근에는 처리공법의 효율증대를 위하여 유동층 공법(Jewell et. al., 1990)에 의한 양어장 순환수 처리에 대한 연구도 보고되고 있다. 어류의 배설물이나 사료에 의해 생성되는 암모니아는 어류의 성장을 저해하거나 치사시킬 뿐만 아니라 사육조내의 용존성 유기물을 여러 미생물들에 의해 분해되면서 물 속의 용존 산소를 제거시키고 있으므로 생육 속도가 늦은 질산화 탈질화 미생물은 생육이 억제되어 효율적인 질산화 작용을 하지 못하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법의 하나로서 질산화, 탈질산화 능력이 뛰어난 균을 이용한 고정화방법이다.

본 연구에서는 양어장의 순환수에 존재하는 암모니아성 질소를 제거하기 위한 고정화 생물막법에 사용할 목적으로 질산화 미생물을 자연계에서 분리하여 균의 대량 배양을 위하여 이 균의 생화학적 특성에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 미생물 분리

암모니아 산화 세균의 분리를 위하여 부산 근교의 하수 종말처리장, 축산 폐기물, 부경대 양어장 및 부산 근교의 양어장으로부터 시료를 채취하였다. 암모니아산화 미생물의 분리를 위한 배지 조성은 다음과 같은 배지를 사용하였다(Choi et. al, 1994). 배지조성으로서는 중류수 1ℓ당 NH₄Cl 0.535g, KH₂PO₄ 0.054g, KCl 0.074g, MgSO₄ · 7H₂O

0.049g, NaCl 0.584g, HEPES 4g과 미량원소 solution 1 ml를 첨가하였다. 미량원소의 조성은 MnSO₄ · 2H₂O 44.6 mg, H₃BO₃ 49.4mg, ZnSO₄ · 7H₂O 173mg, CuSO₄ · 5H₂O 25mg, 0.1M HCl 100ml이었다. pH의 변화를 보기 위하여 배지에 0.05% phenol red solution 1ml을 첨가하였다.

시료를 희석하여 한천이 첨가된 고체 평판배지에 도말하여 4주간 배양한 후 생성된 colony들을 분리하였다.

2. 분리균의 동정

분리된 암모니아 산화세균의 생화학적 특성은 API 20NE kit를 사용하여 행하였으며 형태학적인 특징은 전자현미경으로 관찰하여 Bergey's manual of systematic bacteriology를 참조하여 동정하였다.

3. Nitrite 생성 측정

분리균에 의해서 생성된 NO₂⁻량은 diazotization coupling method(Hooper, 1968)에 의해서 측정하였다. 배양액을 원심 분리하여 상등액(1ml)만을 취한 뒤 1% sulfanilamide 용액 0.5ml과 0.02% N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride 0.5ml를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하여 NO₂⁻의 생성량을 산출하였다. NO₂⁻ 생성에 사용되는 검량곡선은 서로 다른 농도(0~60mM)의 NaNO₂를 사용하여 작성하였다.

4. 암모니아 농도 측정

분리균을 최소배지에 접종하여 30°C, 2주간 배양한 후 배양액에 존재하는 암모니아성 질소농도를 전위차계(Ion Meter, Orion Model 720A)를 사용하여 검량 곡선으로부터 산출하였다. 검량곡선은 110°C에서 1시간 건조한 NH₄Cl 3.819g을 중류수 1ℓ에 녹인 후 10배~10,000배 희석한 후 시료 50ml에 1M NaOH 1ml를 혼합하여 암모니아로 변환 시킨 후 안정된 mV를 측정하여 작성하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선별 및 동정

하수처리장, 축산 폐수, 양어장 등으로부터 분리한 균 가운데 생육이 가장 좋으며 암모니아 산화 능력이 뛰어난 균

을 선별하여 이 균을 대상으로 생화학적 특징과(Table 1) 전자현미경을 통하여 형태학적인 특징을(Fig.1) 검토하였다. 분리된 균은 gram negative bacteria이며 straight rod type이었으며 운동성이 있었다. Bergey's manual에 의한 암모니아 산화세균과 비교한 결과 *Nitrosomonas* sp.에 속하는 균으로 여겨져 *Nitrosomonas* sp. PK1으로 명명하였다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of isolated *Nitrosomonas* sp. PK1

Test Items	Characteristics
Shape	straight-rod
Size	0.49×1.02μm
Cell pigment	clear
Motility	+
Gram stain	-
Nitrite formation	+
Indole production	-
Glucose acidification	-
Arginine dehydrolase	+
Urea test	+
Esculin hydrolysis	+
Gelatine hydrolysis	-
β-galactosidase	-
Carbohydrate utilization	
Glucose	+
Arabinose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	+
Gluconate	+
Caprate	+
Adipate	-
Malate	+
Citrate	+
Phenyl-acetate	+
Cytochrome oxidase	-

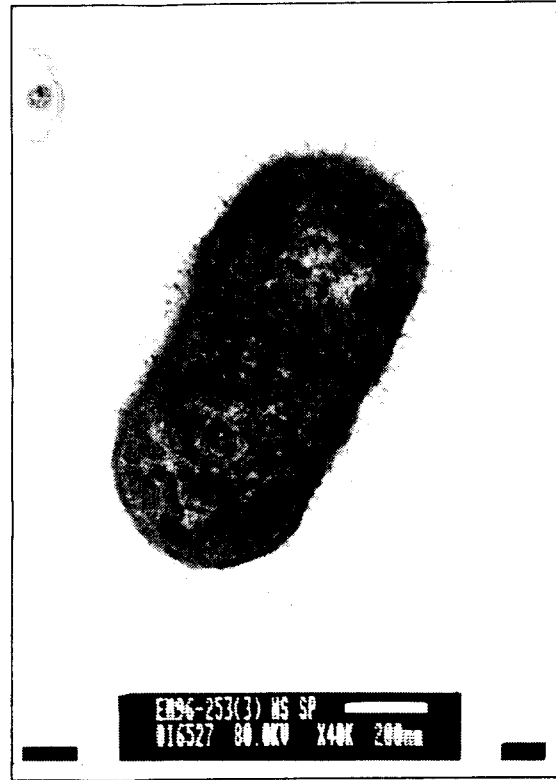


Fig. 1. Electron microscope picture of isolated strain, *Nitrosomonas* sp. PK1.

2. 분리균의 생육 및 NO₂ 생성

액체 배양된 균을 일정량 취하여 고체 평판 배지에 도말하여 생육하는 세포수를 측정하여 균의 생육을 검토한 결과 도말 후 6일까지 lag phase 보여주다가 9일후 stationary phase에 도달하였다. 그러나 NO₂ 생성량은 접종 후 3일 후에서 안정적인 NO₂ 생성을 보이다가 9일 후부터 감소하기 시작하였다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 균의 생육과는 무관하게 접종 된 균에 의해서 급속히 NO₂의 생성이 시작되는 것으로 추측되었다. 또한 Choi 등(1994)이 보고한 *Xanthomonas maltophilia*와 *Achromobacter* sp.를 배양하여 NO₂ 생성을 검토한 결과는 12일 후부터 감소하기 시작하였으나 감소하는 경향은 본 연구 결과와 거의 일치하였다.

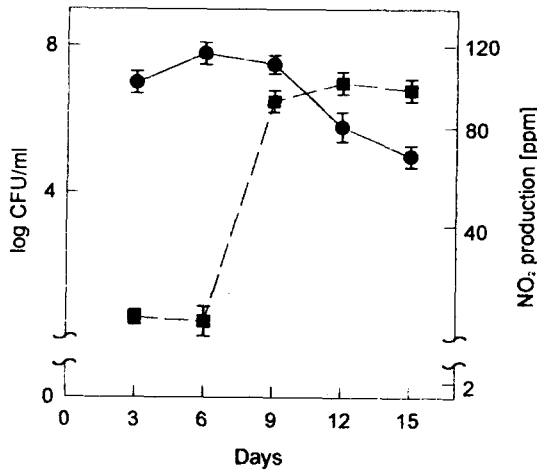


Fig. 2. Growth curve and nitrite production of *Nitrosomonas* sp. PK1.

● NO₂⁻ production
■ cell growth

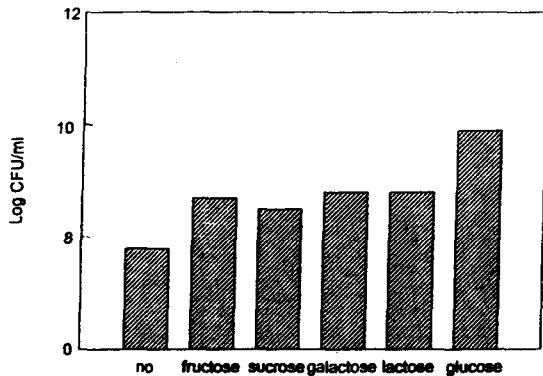


Fig. 3. Effect of various carbon source [0.1% w/v] for cell growth of *Nitrosomonas* sp. PK1.

3. 탄소원에 의한 세포 생육

배지에 0.1%씩 서로 다른 탄소원을 첨가하여 9일간 배양한 결과 일반적인 미생물에서의와 같이 glucose를 첨가하였을 때 가장 좋은 생육을 보여 주고 있었다 (Fig. 3). 그러나 Fig. 4에서의와 같이 glucose를 첨가 하였을 때 glucose 농도에 따른 생육과 NO₂ 생성량은 0.1% 이상에서는 급격하게 감소하고 있어 glucose에 의한 NO₂ 생성량이 catabolite

repression을 받고 있다. 이와 같은 결과는 독립 영양균에 자화하기 좋은 탄소원인 glucose가 첨가됨으로써 암모니아를 산화 할 대사능력의 감소에 기인하는 것으로 사료되었다. 탈질화 고정화 공법에 이용하기 위해서는 무엇보다도 균의 대량 생산이 필요하다. 이를 위해서는 좋은 탄소원을 사용하여 배양하는 것이 좋으나 이럴 경우 본 연구결과에서 같이 NO₂ 생성능력이 떨어진다는 점을 극복해야만 할 것으로 생각되었다.

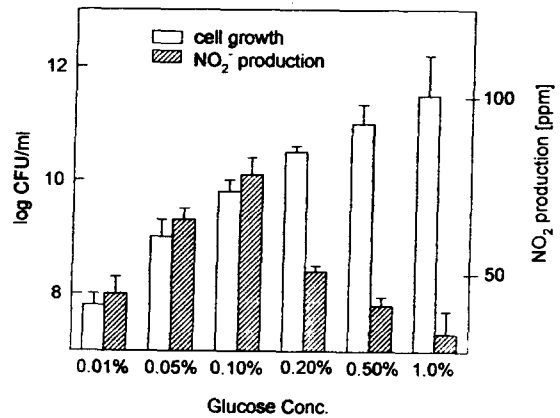


Fig. 4. Effect of glucose for cell growth and NO₂ production of *Nitrosomonas* sp. PK1.

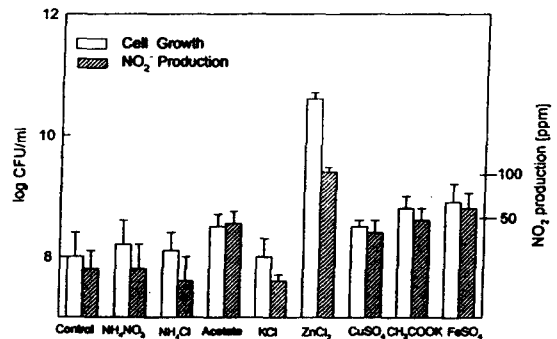


Fig. 5. Effect of various ions for cell growth and NO₂ production of *Nitrosomonas* sp. PK1.

4. Ion 첨가에 의한 영향

여러 가지 무기염을 첨가하여 생육 및 NO₂ 생성을 검토한 결과 ZnCl₂를 첨가하였을 때 대조군에 비하여 생육 및 NO₂ 생성이 현저히 증가하였다 (Fig. 5). ZnCl₂의 농도별

영향을 검토한 결과 균의 생육은 10mM 농도일 때 가장 좋았지만 NO₂ 생성량은 오히려 1mM일 때 더 많이 생성하는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 일반적으로 독립 영양 세균들은 무기물을 영양원으로 하여 생육을 유지하고 있으며 이와 같은 무기물을 세포내로 이동시키는 작용기작은 그다지 많이 밝혀지고 있지는 않으나 종속 영양 세균들과는 많은 차이점을 보여주고 있다.

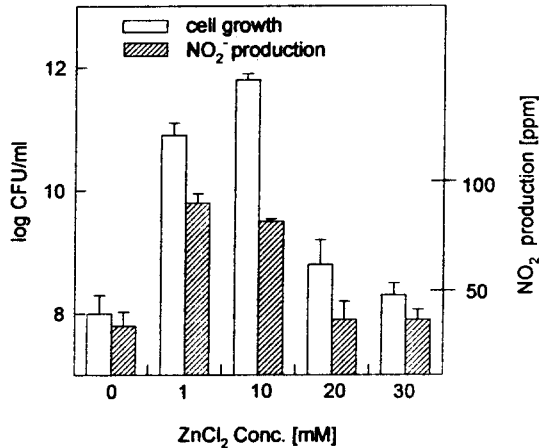


Fig. 6. ZnCl₂ effect for cell growth and NO₂ production of *Nitrosomonas* sp. PK1.

요 약

양어장에서 어류의 배설물 및 어류에 의해 소비되지 않고 있는 사료에 의한 암모니아성 질소의 제거를 위한 수처리 공법의 하나로써 질산화세균 및 탈질화 세균을 이용한 고정화 방법의 개발을 위해서는 우수한 암모니아 산화능력이 있는 미생물의 분리가 절대적이다. 이를 위하여 여러 곳으로부터 분리한 암모니아 산화 세균 가운데 생육이 빠르고 NO₂ 생성이 뛰어난 *Nitrosomonas* sp. PK1을 선별하였다. 분리된 균의 생육에 따른 NO₂ 생성은 non-growth associated pattern을 보여주고 있었다. 또한 생육에 영향을 미치는 탄소원 가운데 glucose가 생육에 가장 좋았으나 농도가 0.1% 이상에서는 오히려 NO₂생성이 감소되었다. 따라서 고정화 방법에 이용하기 위해서는 생육과 NO₂생성 능력의 유지를 위한 적절한 생육 배지의 필요성을 보여주었다. Ion 첨가에 의한 영향을 검토한 결과 ZnCl₂의 첨가가

생육 및 NO₂ 생성량의 증가를 보여 주었으며 그 농도는 1~10mM로서 제한적임을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 농림수산 특정 연구비 지원에 의해서 수행 되었습니다.

Reference

1. Antonie, R. L., Kluge, D. L. and Mielke, J. H. : Evaluation of a rotating disk waste water treatment plant, *J. WPCF*, **46**, 298-311(1974).
2. Carmignani, G. M. and Bennelt, J. P. : Rapid start-up of a biological filter in a recirculating aquaculture system containing channel catfish, *Aquaculture Engineering*, **3**, 39-57(1977).
3. Choi, M. K., Han, H. Y., Jung, Y. H. and Min, K. H. : A comparison of nitrite production by ammonium oxidizing bacteria *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A, *Kor. J. Microbiol.*, **32**(6), 517-524(1994).
4. Hooper, A. B. : A nitrite reducing enzyme from *Nitrosomonas europea*, *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 49-65 (1968).
5. Jewell, W. J. and Cummings, R. J. : Expanded bed treatment of complete recycle aquaculture system, *Wat. Sci. Tech.*, **22**, 443-450(1990).
6. Lewis, W. H., Yopp, J. H. and Brandenberg, A. M. : Use of hydroponics to maintain quality of recirculator water in fish culture system, *Trans Am. Fish. Soc.*, **107**, 92-99(1978).
7. Lim, Y. S. : A study on nitrification of low ammonia content waste water by RBC process, *M. S. Thesis, Pukyong Univ.* (1993).
8. Meske, C. H. : Fish culture in a recirculating system with water treatment by activator sludge, *Advances in Aquaculture*, Eds T. V. R. Pillay & W. A. Dill, p. 527-531(1976).
9. Rogers, G. L. and Klementson, S. L. : Ammonia removal in selected aquaculture water reuse biofilters, *Aquaculture Engineering*, **4**, 135-154(1985).