

## 암모니아 산화세균의 분리와 그 특성

이명숙 · 박지현  
부경대학교 미생물학과

## Isolation of Ammonia Oxidizing Bacteria and their Characteristics

Myung Suk LEE and Jee Hyun PARK

Dept. of Microbiology, Pukyong National University, 608-737 Pusan, Korea

This study was carried out for isolation and characterization of ammonia oxidizing bacteria (AOB) from aquacultural place and sludges of waste water collected in Pusan.

One autotrophic AOB, *Nitrosomonas* sp. and 8 heterotrophic AOB (2 strains of *Bacillus* sp., 2 strains of *Acinetobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp., and *Sphingobacterium* sp.) were isolated and identified. Variation of total ammonia nitrogen (TAN) and  $\text{NO}_2\text{-N}$  in mineral salt media containing 10 mg/l of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 15 days in different 9 strains was measured in order to examine the ability of ammonia oxidation. TAN was started to reduce after 4 days incubation and ca. 2 mg/l of TAN was decreased after 15 days incubation by *Nitrosomonas* sp.. At that time,  $\text{NO}_2\text{-N}$  was produced to 0.023~0.036 mg/l. Heterotrophic AOB showed the low ability of ammonia oxidation, 0.02~0.04 mg/l of TAN was decreased and  $\text{NO}_2\text{-N}$  was produced to 0.01~0.51 mg/l after 15 days. When each strain of 8 heterotrophs was incubated in mineral salt media containing 10 mg/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 50 mg/l glucose, and 50 mg/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 5 g/l glucose, the diminution of TAN was 1.12~3.38 mg/l and 1~20 mg/l, respectively.

**Key words:** ammonia oxidizing bacteria, total ammonia nitrogen,  $\text{NO}_2\text{-N}$

### 서 론

순환여과 양식장에서 정상적인 수질 유지를 위해서는 어류에게 해를 주는 질소 배설물인 암모니아의 제거가 가장 중요하다. 지금까지의 연구는 주로 여과재, 여과조의 깊이, 유수량 등을 조절하는 물리적인 측면에서의 수질 개선에 관한 연구나 순환여과 시스템의 여과법으로 침지식과 회전 원판식 그리고 기타 다른 여과조와의 수질 개선효과를 비교한 연구 (Miller and Libey, 1985; Rogers and Klemetson, 1985)가 행하여져 왔으며 생물학적인 측면에서의 연구는 찾아보기가 힘들다.

암모니아는 질산화세균에 의해 아질산으로 산화되어 질산염으로 분해되고 이 과정에서 생성된 질산염은 탈질세균에 의해 환원되어 아질산가스 또는 질소가스가 되어 대기중으로 방출되므로 완전한 분해가 이루어진다 (Paul and Clark, 1989). 이러한 질산화-탈질작용을 이용한 생물학적 질소 제거의 첫 단계로서 암모니아 산화과정은 매우 중요하다. 즉 질산화반응은 *Nitrosomonas*로 대표되는 암모니아 산화세균에 의한 아질산성 질소로의 산화단계와, 연속되어 일어나는 *Nitrobacter*로 대표되는 아질산 산화세균에 의한 질산성 질소로의 산화단계로 나눌 수 있다. 이들 세균은 탄소원으로 이산화 탄소를 이용하고 수소 공여체로 암모니아성 질소 또는 아질산성 질소를 이용하는 호기성의 화학합성 무기산화 독립영양세균인

것이 그 특징이다. 그러나 이러한 독립 영양성 질화세균 (autotrophic nitrifier)의 증식속도는 일반세균에 비하여 매우 낮고, 특히 겨울철 수온이 낮아질 때는 여과조 속성에 상당한 시간이 소요되고 유기물의 농도가 높은 경우에는 증식이 저해를 받는 등 환경에 매우 예민하다고 보고 (Focht and Verstraete, 1997)되고 있다.

한편 Mishustin (1926)은 중속 영양성 질화세균 (heterotrophic nitrifier)을 분리하여 이에 대한 연구를 시작하였다. 이러한 중속 질화세균은 유기탄소원을 이용하여 성장하며 유기질소원이나 암모니아를 아질산이나 질산염으로 전환시키며 이들 중 일부는 탈질작용을 동시에 하는 세균도 알려져 있다. 이들 세균은 주로 유기물질의 농도가 높은 토양이나 폐수에서 분리되며 증식속도가 빠르고 외부환경에 덜 민감한 편이지만 암모니아 산화속도는 독립 영양균에 비하여 상당히 느린 편이다. 따라서 autotrophic과 heterotrophic nitrifier를 혼합 배양하면 암모니아 산화성을 높일 수 있을 것으로 사료되고 실제 Castignetti and Gunner (1980)은 *Nitrobacter*와 *Alcaligenes*를 혼합 배양하여 이러한 가능성을 제시하였다.

본 연구는 생물학적 측면에서 양어장 수질을 개선하기 위한 전단계 실험으로 기존 양어장 여과막과 하수처리장의 오니에서 암모니아 산화성이 강한 균주를 분리 동정하고 이들의 암모니아 산화성을 실험한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1) 독립 영양성 암모니아 산화세균의 분리와 계측

암모니아 산화세균의 분리는 부산 근교의 하수종말처리장과 부경대 양어장의 물과 오니, 그리고 여과막을 시료로 행하였다.

먼저 일정량의 시료를 5 mM의 HEPES가 첨가된 암모니아 산화배지 (pH 8.0, Watson, 1965) 200 ml에 접종한 다음 28°C, 100 rpm으로 30일 배양시켰다. 배양액 10 ml를 다시 200 ml의 암모니아 산화 배지에 재접종하여 동일 조건에서 30일 배양하였다. 이 배양액 1 ml를 9 ml의 암모니아 산화배지 (0.05% phenol red 첨가)에 접종하여 이를 심진희석법으로 10<sup>-5</sup>까지 희석하여 시험관에 이식, 접종한 다음 28°C에서 30일간 배양하였다. 암모니아 산화성을 나타낸 시험관의 시료 0.2 ml를 암모니아 산화 평판 배지 (1.3% agar)에 도말 배양하여 28°C, 4~8주 배양하였다. 여기서 증식한 독립 집락을 순수분리하였다. 마지막으로 독립 영양균임을 확인하기 위하여 2종류의 유기 배지 (1/4 농도의 nutrient broth과 1/4 농도의 TSB)에 접종하여 30°C에서 배양하여 2~3일동안 증식하지 않으면 암모니아 산화성 독립 영양균으로 분리한다. 분리된 균은 50 mM HEPES를 함유한 10 ml 암모니아 배지에 보관하면서 한 달에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

독립 영양균의 계측은 암모니아 산화배지를 사용하여 MPN법 (Tate III, 1980)으로 하였다. 즉 단계별로 희석된 시료를 암모니아 산화배지에 3 portions 법으로 접종하고 이들을 28°C에서 4주간 배양하였다. 배양 후 Nessler 시약을 1~2방울 시험관에 분주하여 아질산 형성으로 적색~갈색반응을 나타내는 것을 양성으로 판정하였다.

2) 증속 영양성 암모니아 산화세균의 분리와 계측

1) 항에 사용한 동일 시료 일정량을 nutrient broth에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 다음, 이를 100 mg/l의 NH<sub>4</sub>Cl이 첨가된 mineral salt medium (Choi et al., 1994) 평판 (pH 7.5)에 일정량 접종하여 30°C에서 10일 정도 배양하면서 형성된 독립 colony를 형태별로 분리하였다. 분리된 균을 10 mg/l의 NH<sub>4</sub>Cl이 첨가된 mineral salt medium에 접종하여 암모니아 산화능이 우수한 균주만을 분리하였다. 이렇게 분리된 균은 nutrient slant에 계대 배양하면서 생화학적 특성을 실험하여 동정하였다. 일반적인 방법은 MacFaddin (1984)에 준하였고, commercial kit는 API 20E와 rapid ID32 GN (BioMerieux sa., France)를 사용하였다. 그리고 증속 영양균의 증식 정도

는 spectrophotometer (Spectronic Genesys TM5)로 660 nm의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

3) 암모니아 산화성 실험

독립영양성 암모니아 산화세균은 10 mg/l의 NH<sub>4</sub>Cl과 5 mM의 HEPES를 첨가한 mineral salt medium (pH 8.0)에 초기균수가 2.1×10<sup>4</sup>/ml되도록 접종하여 28°C에서 배양하면서 암모니아성 질소 (TAN, total ammonia nitrogen)량과 아질산성 질소 (NO<sub>2</sub>-N)을 측정하여 암모니아 산화정도를 측정하였다. 증속 영양균인 경우는 mineral salt medium에 10 mg/l의 NH<sub>4</sub>Cl 만 첨가한 배지 (I), NH<sub>4</sub>Cl 10 mg/l와 glucose 50 mg/l를 첨가한 배지 (II), 그리고 NH<sub>4</sub>Cl 50 mg/l와 glucose를 5 g/l 첨가하여 만든 배지 (III)등 3종류에 균을 접종하여 30°C에 배양하면서 TAN과 NO<sub>2</sub>-N량의 변화를 측정하였다. 이때 접종균 농도는 I과 II의 배지는 탄소원이 없거나 미량 함유되어 있어 균 증식 속도가 매우 낮을 것으로 추정되어 OD<sub>660</sub> 값이 0.20~0.22 (약 10<sup>6</sup> cells/ml)되도록 조절하였고 III의 배지에는 탄소원이 일정량 함유되어 있어 OD<sub>660</sub> 값이 0.02~0.04 (약 10<sup>2</sup> cells/ml)되도록 조절하였다.

4) 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 정량

암모니아성 질소 (TAN)는 NH<sub>3</sub> 선택전극 (Orion Research Inc., 9512BN)이 부착된 Ion meter (Orion Research Inc., 420A)를 이용하여 이온 선택성 전극법 (A.P.H.A. 1992b)에 의하여 분석하였다. 그리고 아질산성 질소 (NO<sub>2</sub>-N)는 시수에 sulfanilamide와 N-(1-naphthyl)-ethylene diamin dihydrochloride를 주입하고 10분 이상 발색시킨 후 543 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다 (Hooper, 1968).

5) 전자 현미경 관찰

회수된 cell을 먼저 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide로 이중고정한 후 탈수하여 Epon 812로 고정해서 LKB ultramicrotome (Nova, Sweden)을 이용하여 세절한 후, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 것을 TEM 1200EX-II (JEOL, Japan) 전자 현미경으로 가속전압 80 kv에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

1) 독립 영양성 암모니아 산화세균

독립영양성을 가진 암모니아 산화세균의 분리를 위해

25개의 tube에  $10^0$ - $10^{-5}$ 까지 희석된 시료를 접종하여 배양한 결과 7개의 tube에서 암모니아 산화성을 나타내었다. 7개 시험관의 배양액을 평판배지에 접종하여 분리한 4개의 균주를 유기배지 (nutrient와 TSB)에 접종하여 배양한 결과, 그중 한 개의 tube에서 종속영양균이 오염되지 않음을 나타내었다. 따라서 이 균을 독립 영양성의 암모니아 산화세균으로 분리하였으며 전자현미경 사진은 Fig. 1과 같다.

분리균은 Gram 음성으로 형태는 끝이 약간 둥근 간균이었고 intracytoplasmic membrane가 multilayer를 형성하고있으며 세포내부에 carboxysome이 관찰되었다. 암모니아 산화세균은 세포의 형태와 intracytoplasmic membrane의 배열 상태에 따라 *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosobrio*, 그리고 *Nitrosolobus* sp. 5가지로 분류하고 있다 (Koops and Moller, 1991). 본 균주는 intracytoplasmic membrane이 몇 겹 평형으로

싸여 있으며 세포내의 carboxysomes이 관찰되었으며 간균의 형태를 나타내고 있는 것으로 미루어 *Nitrosomonas* sp.에 속하는 것으로 추정되어진다. 그리고 *Nitrosomonas* sp.는 *N. europaea*와 *N. cryotolerance*만 알려져 있었으나 Koops et al. (1991)은 DNA homologies와 G+C함량, 미세구조 그리고 암모니아와 염의 내성에 따라 8종의 *Nitrosomonas*를 추가로 분류 보고하였다. 이들의 보고에 의하면 세포내 carboxysome을 형성하는 것은 *N. nitrosa*, *N. eutropha*, 그리고 *N. halophila*이고 이 중에서 *N. halophila*는 식염내성이 있다고 보고하였다. 그리고 나머지 두 종의 외부형태를 비교해 보면 *N. nitrosa*는 다형성 (pleomorphic)으로 간균 혹은 구형 또는 서양배 모양을 나타내는데 비하여 *N. eutropha*는 구형 혹은 끝이 둥근 막대형을 나타낸다고 보고된 바 있다. 이상의 결과로 미루어 보면 본 실험에서 분리한 균은 carboxysome을 가지고 있고 식염 내성은 없으며 (결과 미제시) 외부형태는 끝이 둥근 간균으로 보아 *N. eutropha*에 가까우나 DNA와 세포내 단백질 조성등의 실험이 보완되어야 할 것으로 사료되어 본 분리균을 *Nitrosomonas* sp. GM 7330로 명명하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

본 균주에 의한 암모니아 산화성을 검토하기 위하여 10 mg/l의  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 첨가한 mineral salt medium (pH 8.0)에 균주를 접종하여 15일 동안 배양하면서 균 증식에 따른 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 변화를 측정하였고 그 결과는 Table 1과 같다.

암모니아 산화세균은 배양 4일 후부터 증식도가 빨라지기 시작하였고 동시에 암모니아 산화속도도 빨라졌다. 암모니아 산화속도는  $2.92 \sim 7.61 \times 10^{-7}$   $\mu\text{moles/cell/hr}$ 로 나타났다. 일반적으로 독립 영양성균은 종속 영양성균에 비하여 암모니아 산화속도가 빠른 것으로 보고 (Focht and Verstraete, 1997)되고 있으며 실제 *N. europaea*는 0.5  $\mu\text{moles of N/min/mg of protein}$ 으로 보고 (Hollocher et al., 1982)되고 있다. 그리고 *Nitrosococcus oceanus*는  $2.16 \times 10^{-8}$   $\mu\text{moles/cell/hr}$ , 해양성 암모니아세균인 *Nitrosococcus* sp.는  $1.43 \times 10^{-8}$   $\mu\text{moles/cell/hr}$ 로 보고 (Castig-

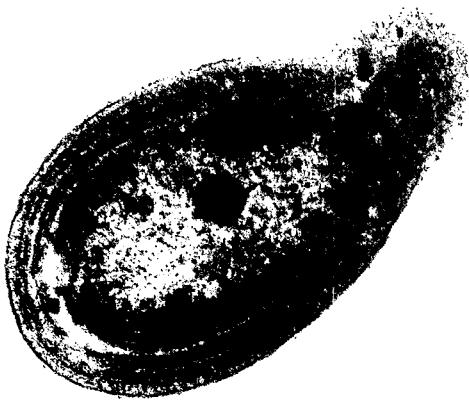


Fig. 1. Transmission electron micrographs of *Nitrosomonas* sp. GM7330.

Table 1. Ammonia oxidation by the growth of *Nitrosomonas* sp. GM7330 in mineral salt medium containing 10 mg/l- $\text{NH}_4\text{Cl}$

	Incubation time (days)					
	0	2	4	6	10	15
Cell number (cells/ml)	$2.1 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$9.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$
Ammonia oxidation rate ( $\mu\text{moles/cell/hr}$ )	—	—	$7.61 \times 10^{-7}$	$6.27 \times 10^{-7}$	$4.43 \times 10^{-7}$	$2.92 \times 10^{-7}$
Total ammonia nitrogen (mg/l)	10.00	9.99	9.62	9.27	8.62	8.22
$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/l)	—	—	0.023	0.035	0.036	0.028

netti and Hollocher, 1982)된 바도 있다. 본 공시균주를 단독 배양한 경우 10 mg/ℓ의 NH<sub>4</sub>Cl은 배양 15일 동안 약 2 mg/ℓ 정도 감소되었고 아질산성 질소는 0.023~0.036 mg/ℓ 정도 측정되었다.

2) 종속 영양성 암모니아 산화세균

암모니아 산화능이 우수한 8균주를 분리하여 ATB system reader (BioMerieux Sa.)로 판독, 동정한 결과는 Table 2와 같다. 1번 균주는 *Xanthomonas maltophilia*, 2번은 *Alcaligenes xyloxydans*, 3번은 *Bacillus* sp., 4번은 *Bacillus mycoides*, 5번은 *Pseudomonas putida*, 6번은 *Acinetobacter baumannii*, 7번은 *Acinetobacter iwoffii*, 그리고 8번은 *Sphingobacterium multivorum* 이었으나 더 이상의 구체적인 동정법이 추가 실험 되지 않았기에 이들의 속 (genus)명만으로 명명하여 실험에 제공하였다.

종속 영양성 질화세균은 1926년 Mishustin이 *Bacillus* sp.가 유기질소로부터 nitrite를 생성하는 것을 발견 하므로서 연구되기 시작한 이래 계속 연구되어 heterotrophic nitrification 작용을 가진 세균은 *Arthrobacter*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Thiospora*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Aerobacter*, 등의 세균류와 일부 곰팡이 (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.)와 효모 (*Saccharomyces* sp., *Candida* sp.)에서도 그 작용이 보고 (Focht and Verstraete, 1997)되고 있다.

분리된 8균주의 암모니아 산화성을 실험하기 위하여 mineral salt medium에 NH<sub>4</sub>Cl과 glucose의 첨가량을 달리하여 균을 접종하고 15일 동안 30℃에서 배양한 결과는 Table 3과 같다.

균종과 배지의 조성에 따라 암모니아 감소 정도는 차이가 있었다. 먼저, 10 mg/ℓ의 NH<sub>4</sub>Cl이 첨가된 배지에서는 배양 5일동안은 암모니아성 질소량이 약간 증가하였다가 그후 10일 동안은 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 아질산성 질소량은 배양 5~10일 사이에 생성되기 시작하였고 그 양은 균주에 따라 약간의 차이가 있었다. 이상의 결과로 미루어 위의 8균주는 배양 15일 동안 암모니아를 산화시켜 아질산성 질소를 생산하는 것으로 보아 heterotrophic nitrifier로 사료된다. Choi et al. (1994)도 토양에서 분리된 heterotrophic nitrifier인 *Xanthomonas* sp.와 *Alcaligenes* sp.를 mineral salt medium에 배양한 경우 아질산성 질소는 배양 5~8일 사이에 생성되기 시작하여 14일째 최대에 달하였다가 그 후 약간 감소하는 경향을 나타내었다고 보고하였다.

그리고 mineral salt medium에 NH<sub>4</sub>Cl 10 mg/ℓ의

탄소원으로 glucose를 50 mg/ℓ 첨가한 경우에는 glucose 무 첨가구에 비하여 암모니아성 질소의 감소 정도가 높았고 동시에 균 증식량도 증가하였으나 아질산성 질소의 생성량은 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 8균주중 *Xanthomonas* sp.와 *Acinetobacter* sp. II가 암모니아 산화성이 가장 높아 배양 15일 만에 약 3~5 mg/ℓ의 암모니아성 질소의 감소를 나타내었다.

한편 NH<sub>4</sub>Cl과 glucose의 첨가량을 각각 50 mg/ℓ와 5 g/ℓ으로 하여 배양한 결과 균체는 배양 15일 동안 꾸준히 증식하였으나 그에따른 암모니아성 질소의 감소량은 상당한 차이가 나타났다. 즉 *Sphingobacterium* sp.와 *Alcaligenes* sp.의 경우는 배양 15일 후에 잔존 암모니아성 질소량은 1~3 mg/ℓ로 낮았는데 비하여 앞의 두 경우에 비교적 암모니아 산화성이 좋았던 *Xanthomonas* sp.는 오히려 암모니아 산화성이 낮았다. 그리고 아질산성 질소는 전반적으로 앞의 두 경우에 비하여 생성 속도와 생성량이 상당히 낮게 나타났다. 이는 배지중 glucose의 첨가량이 높아지면, 균 증식과 NH<sub>4</sub>Cl 감소량이 증가한 것으로 미루어 상당량의 NH<sub>4</sub>Cl이 균체의 증식에 소모되었을 것으로 생각되어진다. 그리고 heterotrophic nitrification은 autotrophs와는 다르게 다양한 nitrogenous substrate로부터 nitrite외에도 nitrate, hydroxylamine, nitroxyl 등을 생성할 수 있으며 유기 질소원의 경우 hydroxylamine에 대응하는 amine이나 amide를 생성할 수 있다고 보고 (Focht and Verstrate, 1997)되고 있어 nitrite의 생성량 만으로 암모니아 산화성을 직접 비교하기는 어려운 것으로 생각된다. 뿐만아니라 Bock et al. (1991)에 의하면, heterotrophic nitrification은 autotrophic nitrification보다 nitrification rates가 상당히 낮을 뿐만 아니라, 실제보다도 낮게 측정되는데, 이는 heterotrophic nitrifier가 ammonia를 nitrite와 nitrate로 산화시키는 동시에 nitrate를 환원시키는 denitrification이 일어날 수 있기 때문에 실제보다 nitrification rates가 낮아질 수 있다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 이를 고려하여 nitrate를 측정하여 보았으나 검출되지는 않았다.

이러한 nitrification의 두 가지 mechanism중 하나인 autotrophic nitrification에 대한 연구는 비교적 상세하게 이루어져 이를 담당하는 autonitrifier의 순수 분리와 생리생태학적 특징 그리고 배양법이 확립된 상태이지만, heterotrophic nitrification에 관한 연구는 이에 훨씬 뒤쳐져 있으며, *in vitro* 단계의 연구는 더욱더 미진한 실정이다 (Bock et al., 1991). 이처럼 heterotrophic nitrification에 관한 연구가 어려운 원인으로서는 균체의 증식과 증식량에 관계없이 질화작용이 일어나고 있다는 점이다

Table 2. Biochemical tests of the isolated ammonia oxidizing bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8
Gram staining	-	-	+	+	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	+	+	+	+	-	-	+
TSI test	K/K	K/K	K/K	A/A	K/K	K/K	K/K	A/A
API 20E								
Arginine	+	-	+	+	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium Citrate	+	+	-	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	-	-	-	-	-
Tryptophane Desaminase	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium pyruvate	-	-	-	+	-	-	-	-
Gelatinase	+	-	+	+	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	+	+	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	+	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	+	-	+	-
Amygdaline	-	-	-	+	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	+	-	+	-
OX	-	-	+	-	+	-	-	+
NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	-	-	-	-
N <sub>2</sub>	nd*	nd	nd	nd	-	-	-	-
ID 32 GN								
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	-	+	+	-	-	-	+
D-Ribose	-	-	+	-	+	+	+	+
Inositol	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Sucrose	+	-	+	+	-	-	-	+
Maltose	+	-	+	-	-	-	-	+
Itaconate	-	+	-	-	-	-	-	-
Suberate	-	+	-	-	-	+	+	-
Malonate	+	-	-	+	-	+	+	-
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Lactate	-	+	+	+	+	+	+	-
L-Alanine	+	+	+	-	+	+	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	-	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	-	+	-	-	-	-	+
D-Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	+
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	-	+	+
Propionate	+	+	-	-	+	+	+	-
Caprate	-	+	-	-	+	+	+	-
Valrate	-	+	-	-	+	+	+	-
Citrate	+	+	-	+	+	-	+	-
Histidine	-	+	+	+	+	+	+	-
5-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogene	-	-	+	+	-	-	-	+
3-Hydroxy-Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Ketogluconate	-	-	-	-	+	+	+	-
3-Hydroxy-Butyrate	-	+	-	-	+	+	+	-
4-Hydroxy-Benzoate	-	-	-	-	+	-	+	-
L-Serine	-	+	+	+	-	+	+	-
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	-
Supposed bacterial name	<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. I	<i>Bacillus</i> sp. II	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. I	<i>Acinetobacter</i> sp. II	<i>Sphingobacterium</i> sp.

\*not detected

(Verstraete and Alexander, 1972). 그리고 배양조건이나 배지성분에 따라 질화정도가 다르게 나타난다는 점을 들 수 있다. 즉 Schimel et al.(1984)은 토양 내에서의

heterotrophic nitrification을 조사하는 실험에서, 멸균한 토양에서는 nitrate가 생성되지 않았으나 멸균하지 않은 토양에서는 nitrate가 생성되어 토양 내에 nitrate 생성을

Table 3. Ammonia oxidation by the growth of bacteria in different composition of mineral salt medium

Strain	Incubation time (day)	Mineral salt medium NH <sub>4</sub> Cl 10 mg/ℓ				Mineral salt medium NH <sub>4</sub> Cl 10mg/ℓ+Glucose 50 mg/ℓ				Mineral salt medium NH <sub>4</sub> Cl 50 mg/ℓ+Glucose 5 g/ℓ			
		OD	pH	TAN <sup>1</sup>	NO <sub>2</sub> -N <sup>2</sup>	OD	pH	TAN	NO <sub>2</sub> -N	OD	pH	TAN	NO <sub>2</sub> -N
<i>Xanthomonas</i> sp.	0	0.20	7.80	10.00	—	0.21	7.80	10.00	—	0.02	7.80	50.00	—
	5	0.16	8.18	10.35	—	0.19	8.07	9.65	—	0.07	8.05	44.91	—
	10	0.18	8.40	9.84	0.01	0.23	8.01	8.51	—	0.14	7.90	42.50	—
	15	0.18	8.51	9.60	0.02	0.27	7.95	8.12	0.01	0.10	7.94	40.45	0.01
<i>Alcaligenes</i> sp.	0	0.23	7.80	10.00	—	0.20	7.80	10.00	—	0.02	7.80	50.00	—
	5	0.19	8.20	10.41	0.09	0.21	7.98	9.44	0.09	0.13	7.92	43.40	—
	10	0.23	8.36	10.20	0.12	0.21	7.84	8.98	0.09	0.28	6.02	25.20	0.02
	15	0.29	8.56	9.96	0.13	0.27	7.68	7.20	0.11	0.28	4.07	3.28	0.04
<i>Bacillus</i> sp. I	0	0.20	7.80	10.00	—	0.22	7.80	10.00	—	0.03	7.80	50.00	—
	5	0.19	8.16	10.75	0.04	0.24	8.05	9.85	0.06	0.18	7.95	40.60	—
	10	0.22	8.50	10.58	0.04	0.29	8.01	9.45	0.06	0.21	7.83	31.20	—
	15	0.21	8.56	9.98	0.04	0.27	7.96	8.86	0.10	0.27	7.55	9.94	0.05
<i>Bacillus</i> sp. II	0	0.12	7.80	10.00	—	0.20	7.80	10.00	—	0.04	7.80	50.00	—
	5	0.20	7.72	10.50	0.14	0.21	7.96	9.60	0.16	0.16	4.18	16.13	0.01
	10	0.19	8.18	10.18	0.15	0.21	7.96	9.00	0.15	0.19	3.58	12.89	0.01
	15	0.21	8.50	9.75	0.13	0.24	7.91	8.68	0.14	0.20	3.30	11.54	0.07
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0.20	7.80	10.00	—	0.22	7.80	10.00	—	0.03	7.80	50.00	—
	5	0.21	8.20	10.11	0.30	0.27	8.00	9.82	0.14	0.08	4.55	37.59	—
	10	0.22	8.29	9.78	0.51	0.28	7.91	9.51	0.10	0.12	4.39	30.32	—
	15	0.26	8.47	9.60	0.22	0.33	7.89	8.25	0.13	0.22	4.35	28.15	0.02
<i>Acinetobacter</i> sp. I	0	0.22	7.80	10.00	—	0.23	7.80	10.00	—	0.04	7.80	50.00	—
	5	0.25	8.24	10.37	0.09	0.24	8.03	9.20	0.12	0.09	4.70	18.66	—
	10	0.26	7.78	9.88	0.12	0.31	7.96	8.92	0.12	0.11	4.65	16.02	0.01
	15	0.29	8.46	9.36	0.13	0.36	7.88	8.76	0.14	0.16	4.52	14.98	0.05
<i>Acinetobacter</i> sp. II	0	0.24	7.80	10.00	—	0.21	7.80	10.11	—	0.04	7.80	50.00	—
	5	0.27	8.17	10.50	0.62	0.30	7.98	9.35	0.14	0.12	5.03	28.69	—
	10	0.32	8.36	9.91	0.80	0.35	7.91	8.29	0.15	0.13	4.58	25.26	0.01
	15	0.32	8.44	9.76	0.30	0.37	7.81	7.84	0.15	0.14	4.03	24.80	0.05
<i>Sphingobacterium</i> sp.	0	0.24	7.80	10.00	—	0.20	7.80	10.00	—	0.02	7.80	50.00	—
	5	0.28	8.12	10.65	0.02	0.21	7.80	9.17	0.03	0.16	4.18	6.21	0.01
	10	0.24	8.32	10.16	0.03	0.24	7.82	7.69	0.04	0.14	3.65	2.08	0.01
	15	0.23	8.55	9.85	0.03	0.28	7.75	6.15	0.04	0.14	3.56	1.43	0.01

<sup>1</sup>Total ammonia nitrogen mg/ℓ; <sup>2</sup>NO<sub>2</sub>-N mg/ℓ; <sup>3</sup>ODat 660 nm.

촉진시키는 제한된 양의 어떤 unidentified substrates가 있을 것으로 추정 보고하고 있다. 또한 배지 중 C/N ratio나 기타 성분 즉, ferric iron의 농도나 organic substrates 즉, carbonaceous nutrient나 ammonium 양에 따라 질산화 속도가 달라진다는 보고 (Verstraete and Alexander, 1972)도 있다. 그리고 heterotrophic nitrifier의 생육을 위한 C source로서 glucose 이외에 pyruvic oxime이나 sodium acetate, sodium citrate 등을 배지에 첨가한 연구 (Anderson and Levine, 1986; Castignetti and Hollocher, 1982)도 행하여 졌다. Castignetti and Gunner (1980)은 autotrophs와 heterotrophs의 특성을 고려하여 이 두 종을 혼합 배양하면 질화정도를 효율적으로 조절할 수

있을 것으로 생각되어 실험한 결과 heterotrophs인 *Alcaligenes*가 빠른 증식 속도로 증식하면서 암모니아를 산화시키고 이에 생성된 아질산을 증식속도가 느린 autotrophs인 *Nitrobacter*가 뒤이어 작용하여 아질산을 질산염으로 분해시키므로 autotrophs를 단독 배양할 때보다 질화 속도가 빠르다고 보고 하였다.

본 실험에서 분리된 종속질화균도 배지의 조성에 따라 질화 정도가 차이가 있었으나 그에 따른 일정한 상관 관계를 찾기가 어려웠으며 다양한 탄소원이나 기타 성분은 따른 질화 정도를 실험 하여야 할 것으로 사료되어진다. 뿐만 아니라 분리된 autotrophs와 heterotrophs를 혼합배양하면서 질산화정도를 향상 시킬 수 있는 방법을 찾기

위한 실험을 수행할 예정이다.

## 요 약

암모니아 산화 미생물을 부산근교 하수처리장의 오니와 양어장 여과막에서 분리 동정하여 이들의 암모니아 산화성을 실험하였다. 독립영양성 암모니아 산화세균으로는 *Nitrosomonas* sp.를 분리 동정하였고 종속 영양성 균으로는 2종의 *Bacillus* sp., 2종의 *Acinetobacter* sp., 그리고 *Xanthomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp., 그리고 *Sphingobacterium* sp. 등의 8종을 분리하였다. 분리균주들의 암모니아 산화성을 실험하기 위하여서는 mineral salt medium에  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mg/l를 첨가한 배지에서 28°C, 15일 배양한 결과 *Nitrosomonas* sp.는 배양 4일째부터 균수가 증가하면서 암모니아 산화와 아질산생성이 시작되어 15일 배양후에는 약 2 mg/l의 암모니아성 질소의 감소가 일어났고 동시에 0.023~0.036 mg/l의 아질산성 질소가 생성되었다. Heterotrophs 8균주는 균주에 따라 다소 차이는 있었으나 배양 15일동안 균의 증식은 거의 일어나지 않았고 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 암모니아 산화성도 낮아 0.02~0.64 mg/l 정도 감소하였고 아질산성 질소의 생성량은 0.01~0.51 mg/l 정도 이었다. 그러나 heterotrophs 8균주를 mineral salt medium에  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mg/l과 glucose 50 mg/l를 첨가시키면 균증식도 좋아지고 암모니아 산화성도 증가하여 15일 배양 후에는 암모니아성 질소는 1.12~3.85 mg/l 정도 감소하였다.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mg/l과 glucose 5 g/l로 조절된 배지에서는 암모니아 산화성이 더욱 좋아져 15일 배양 후에 약 1~20 mg/l의 암모니아성 질소가 감소하였다.

## 사 사

본 연구는 부경대학교 해양산업개발 연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사 드립니다 (과제번호: 97K3-1506-02-03-3).

## 참 고 문 헌

Anderson, I.C. and J.S. Levine, 1986, Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers and nitrate respirers. *AEM*, 51 (5), 938~945.  
A.P.H.A. 1992. Standard methods for the examination of water and waste water. 18th ed., EPS Group. pp.4

122~4-124.  
Bock, E., H. Koops, B. Ahlers and H. Harms, 1991, Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. *The prokaryotes* vol. 1, chap. 17.  
Castignetti, D. and T.C. Hollocher. 1982, Nitrogen redox metabolism of a heterotrophic, nitrifying-denitrifying *Alcaligenes* sp. from soil. *AEM.*, 44 (4), 923~928.  
Castignetti, D. and H.B. Gunner. 1980. Sequential nitrification by an *Alcaligenes* sp. and *Nitrobacter agilis*. *Can. J. Microbiol.* 26, 1114~1119.  
Choi, M.K., H.Y. Han, Y.H. Jung and K.H. Min, 1994. A composition of nitrite production by ammonium oxidizing bacteria *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A. *Kor. J. Microbiol.*, 32 (6), 517~524.  
Focht, D.D. and W. Verstraete, 1997, Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microbiol. Ecol.* 1, 135~214.  
Koops, H.P., B. Bottcher, U.C. Moller, A. Pommerening-Roser and G. Stehr. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 137, 1689~1899.  
Koops, H.P. and U.C. Moller. 1991. *The Prokaryotes*, 2nd Ed., Springer-Verlag, 2625~2630.  
MacFaddin, J.F. 1984. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams & Wilkins, 2nd ed., Baltimore, America.  
Miller, G.E. and G.S. Libey. 1985. Evaluation of three biological filters suitable for aquacultural applications. *Journal of World Mariculture Society*, 16, 158~168.  
Mishustin E. 1926. Zur frage von der nitrit bildung durch metatrophe bacterien. *Ber. Bakteriolog. Agron. Sat.*, 42, p. 28.  
Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. Transformation of nitrogen between the organic and inorganic phase and to nitrate in *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, California, 131~146.  
Rogers, G.L. and S.L. Klemetson. 1985. Ammonia removal in selected aquaculture water reuse biofilters. *Aquacultural Engineering*, 4, 135~154.  
Schimel, J.P., M.K. Firestone and K.S. Killam. 1984. Identification of heterotrophic nitrification in a Sierram Forest soil. *AEM.*, 48 (4), 802~806.  
Tate III R.L. 1980, Variation in heterotrophic and autotrophic nitrifier populations in relation to nitrification in organic soils. *AEM.*, 40 (1), 75~79.  
Verstraete, W. and M. Alexander. 1972, Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp., *J. of Bacteriology*, 110 (3), 955~961.  
Watson, S.W. 1965. Characteristics of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis oceanus* sp. N. *Limnol. Oceanogr.*, 10, 274~289.

1998년 8월 10일 접수  
1998년 9월 12일 수리