

세라믹 담체에 적용된 해양박테리아 4종의 저농도 질소-인 제거

이건섭¹, 김소정², 정영재³, 김동균⁴, 이상섭⁵, 오정균⁶, 이택건^{1*}

¹한국해양과학기술원, ²경북해양바이오산업연구원, ³신경대학교 생명공학과

⁴신라대학교 생명과학과, ⁵경기대학교 생명과학과, ⁶목포대학교 생명과학과

Low Concentrated Nitrogen-Phosphate Removal of 4 Strains of Marine Bacteria Applied to Ceramic Media

Gunsup Lee¹, SoJungKim², YoungjaeChung³, DongguinKim⁴,
Sang-Seob Lee⁵, Chung-KyoonAuh⁶ and Taek-KyunLee^{1*}

¹Korea Institute Ocean Science & Technology

²Kyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry

³Department of Life Science and Biotechnology, Shin Gyeong University

⁴Department of Biological Science, Silla University

⁵Department of Life Science, Kyonggi University

⁶Department of Biological Science, Mokpo National University

요 약 세라믹담체에 적용한 4종의 해양박테리아 (*Aeromonas hydrophila*, *Chryseomonas indologenes*, *Pseudomonas diminuta*, *Vibrio parahaemolyticus*)의 저농도 질소-인 제거 효율의 변화를 분석하였다. 해양박테리아는 광양만에서 분리 동정하였다. 담체에 적용한 4종의 해양박테리아 모두 대조군에 보다 약 3배 정도의 성장률이 증가하였으며, 암모니아에서 질소 제거효율도 30% 이상 증가하였다. 질산성 질소의 제거 효율은 *A. hydrophila* 균주가 가장 높았으며, 인의 제거는 *P. diminuta* 균주가 가장 높은 것으로 나타났다. 본 연구의 결과는 세라믹담체는 질소-인 제거 효율 증진에 좋은 재료이며, 분리된 해양박테리아는 현장의 저농도 질소-인 조절에 유용할 수 있음을 보여준다.

Abstract Changes of low concentrated nitrogen-phosphate removal efficiency were investigated in 4 strains of marine bacteria applied to ceramic media. Marine bacteria were isolated and identified from Gwangyang bay. Growth rates and removal efficiencies of NH₃-N of 4 strains of marine bacteria applied to ceramic media were increased approximately 3 fold and over 30% than control group, respectively. *A. hydrophila* and *P. diminuta* had highest NO₃⁻-N and phosphate removal efficiencies, respectively. This results showed that ceramic media is very nice material for improvement of nitrogen-phosphate removal efficiency and isolated marine bacteria may be useful to control nitrogen-phosphate at low concentration in field.

Key Words : Marine Bacteria, Nitrogen, Phospahte, Removal efficiency, Ceramic media

1. 서론

최근 들어 급격하게 이루어지고 있는 산업화 및 도시화로 인하여 자연환경과 생활환경은 더 이상 방치할 수

없을 정도로 악화되고 있다, 특히 수질오염에 있어서는 그 정도가 나날이 심각해져 전국의 주요 수역과 해역에서 많은 문제가 발생하고 있으므로 이에 적절히 대처하지 않으면 생활환경의 오염은 물론 회복이 불가능할 정도의 생

본 논문은 논문은 해양과학기술원(PE98753)의 연구과제로 수행되었음.

*Corresponding Author : Taek-Kyun Lee

Tel: +82-55-639-8630 email: tklee@kiost.ac

접수일 12년 07월 31일

수정일 12년 09월 03일

게재확정일 12년 10월 11일

태계 파괴를 초래할 것이 분명하다 [1]. 특히 연안역은 육지-해양-대기가 만나는 중요한 경계역으로서, 높은 인구 밀집과 농업 및 공업단지가 집중되고 있고, 이로 인하여 연안역에는 비료사용, 대기로의 산업 방출 및 폐기물 배출 등 인간활동의 결과로서 상당량의 영양염을 포함한 오염물질들이 유입되고 있다 [2,3]. 양식업이 발달하고, 다양한 수산생물의 가공이 활발해짐에 따라 연근해역의 오염은 갈수록 심화되고 있다. 현행법규 상 암모니아성 질소의 농도가 1 ppm 이하인 연안해수를 수산용수로 사용하도록 권장되지만, 다양한 오염원으로부터 노출되어 있는 연안 양식장의 경우 어류의 질소배설물인 암모니아 농도가 높아 생산성 저하가 우려되고 있다 [4-5].

담체에 고정된 미생물을 이용하여 하·폐수를 처리하는 생물막공정(biofilm process)은 부유상태의 미생물을 이용하는 활성슬러지법과는 달리 담체에 미생물을 부착시켜 운전하는 방법이다 [6]. 미생물이 부착된 담체는 생물막이 형성되어 외부로 유출되는 슬러지의 양을 크게 줄일 수 있고, 증식속도가 느린 미생물의 증식에도 용이한 것으로 알려져 있다. 특히 다양한 미생물종의 성장에 적합하여 온도, pH 및 충격부하에 강하고, 난분해성 물질의 제거에도 적합한 것으로 보고되고 있다 [7-9]. 또한 슬러지 팽화 현상으로 인해 슬러지 부상 등이 일어나는 활성슬러지법과는 달리 담체를 사용하면 슬러지 부상 등이 일어나지 않아 운전 관리가 용이하며, 단위 체적당 미생물 농도를 높게 유지할 수 있다는 장점을 가지고 있다 [10].

본 연구팀은 해양환경에 적응되어 있는 해양 박테리아 중 질소 및 인 제거능이 우수한 해양박테리아를 선별하고, 해양에서의 질소, 인 제거 공정에 적용하기 위하여 광양만에 분포하고 있는 해양박테리아를 분리하고 동정한 바 있다 [11]. 예비 실험을 통하여 유기물 및 질소 제거 효율이 높은 4종(*Aeromonas hydrophila*, *Chryseomonas indologenes*, *Pseudomonas diminuta*, *Vibrio parahaemolyticus*)의 해양박테리아를 분리하였다. 본 연구에서는 세라믹 담체에 적용된 4종의 해양박테리아의 질소·인 제거효율을 분석하여, 분리된 해양박테리아와 세라믹담체를 이용한 해수정화 적용 가능성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용균주 및 배양방법

광양만에서 분리한 해양박테리아 중 고효율 질소·인 제거 균주로 밝혀진 4종의 균주 (*Aeromonas hydrophila*, *Chryseomonas indologenes*, *Pseudomonas diminuta*, *Vibrio*

parahaemolyticus)를 실험에 적용하였다. 배양을 위하여 Marine broth (DIFCO 2216)와 sea water complete (SWC)를 배지로 사용하였다 (표 1과 2). 해양박테리아를 8 mL 시험관에 4 mL의 Marine broth 배지를 넣고 진탕배양으로 28-30°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 다시 1000 mL 배양병에 500 mL의 배지를 채운 후, 배양액을 접종하여 3일간 배양하였다. 배양한 균주는 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 모았으며, 정확한 접종량을 위해 세포의 습중량을 측정하였다.

균주 접종 시 각 균주 당 1 g/L (wet weight; 개체수 1.5x10⁸ CFU/mL)로 300 mL의 배양병에 들어있는 150 mL의 변형 Marine broth 배지 (표 3)에 접종하였다. 변형 배지는 유기물 농도 (CODCr) 250 µg/L, NH₃-N 100 µg/L, NO₃-N 100 µg/L, PO₄³⁻-P 10 µg/L로 조정하여 사용하였다. 측정 및 분석을 위한 시료는 각각 0, 1.5, 3, 5, 10, 20, 30 시간에 채취하였다.

[표 1] Marine broth 2216의 조성

[Table 1] Composition of Marine broth 2216

Components	
Peptone	5.00 g
Yeast Extract	1.00 g
Ferric Citrate	0.10 g
Sodium Chloride	19.45 g
Magnesium Chloride, dried	5.90 g
Sodium Sulfate	3.24 g
Calcium Chloride	1.80 g
Potassium Chloride	0.55 g
Sodium Bicarbonate	0.16 g
Potassium Bromide	0.08 g
Strontium Chloride	0.034 g
Boric Acid	0.022 g
Sodium Silicate	0.004 g
Sodium Fluoride	0.0024 g
Ammonium Nitrate	0.0016 g
Disodium Phosphate	0.008 g
D.W.	1000 ml
Adjust to pH	7.0

[표 2] Sea water complete의 조성

[Table 2] Composition of sea water complete

Components	
Peptone	5.00 g
Yeast	3.00 g
Glycerol	3.00 ml
Sea water(adjust to D.W.)	75.0 %
Total Volume	1000 ml
Adjust to pH	7.0

2.2 담체 및 반응기

세라믹 담체는 청자토를 이용하여 제조하였으며, 분쇄와 혼합과정을 거쳐 균일한 물성을 갖도록 하였고, 발포제를 첨가하여 기공률을 높였다. 담체는 약 20-30 mm 크기의 정육면체 형태이며, 부피비중은 약 1.1, 겉보기 기공률은 약 53.6%, 흡수율은 53.1%를 나타내었다. 질소·인 처리장치는 20 L 유리용기를 사용하였으며, 세라믹 담체를 적용한 실험구와 세라믹 담체를 적용하지 않은 대조구의 질소·인 제거 효율을 비교하였다.

[표 3] 변형 marine broth 2216의 조성
[Table 3] Composition of modified marine broth 2216

Components	
Glucose	0.068 g
Disodium succinate	0.100 g
Absolute Ethanol	0.05 mL
Ferric Citrate (0.5% sol.)	1 mL
Sodium Chloride	19.45 g
Magnesium Chloride, died	5.90 g
Ammonium Chloride(NH3-N)	20 mg/L
Sodium Nitrate(NO3--N)	20 mg/L
Potassium Phosphate(PO43--P)	5 mg/L
Sodium Sulfate	3.24 g
Calcium Chloride	1.80 g
Potassium Chloride	0.55 g
Sodium Bicarbonate	0.16 g
Potassium Bromide	0.08 g
Strotium Chloride	0.034 g
Boric Acid	0.022 g
Sodium Silicate	0.004 g
Sodium Fluoride	0.0024 g
Ammonium Nitrate	0.0016 g
Disodium Phosphate	0.008 g
D.W.	1000 mL
Adjust to pH	7.0

2.3 측정 및 분석

균주의 생장은 OD₆₀₀를 spectrophotometer로 측정 분석하였다. 그리고 균주의 생장에 따른 질소 및 인의 측정을 위해서 각 시료는 MFS (0.2 μm) 실린지 필터와 5 mL 실린지를 사용하여 여과하여 사용하였다. 암모니아성 질소는 nessler reagent에 의한 발색법으로 사용하여 spectrophotometer (DR2010)으로 분석하였다. 질산성 질소와 인은 QuickChem 800으로 측정 분석하였다. 측정결과는 3번의 독립적인 반복실험 결과값의 평균값으로 표시하였다.

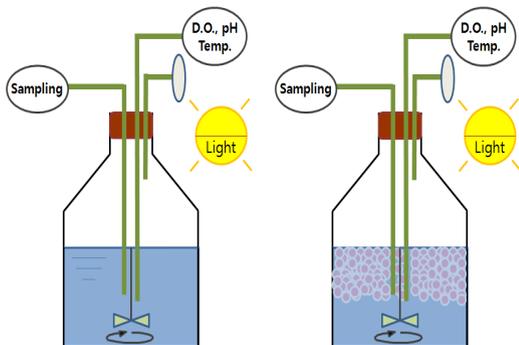
3. 결과 및 고찰

3.1 균주 성장 측정

분리된 해양박테리아를 담체에 적용하고, 성장률을 측정하였다. 대조군으로는 담체에 적용하지 않고 회분식 배양을 통한 성장을 측정하였다(그림 1). 담체를 적용하지 않은 대조군의 경우 30시간 배양 후 4종의 해양박테리아의 평균 OD 값의 증가는 0.095이였으며, *P. diminuta*가 0.131로 가장 높은 성장률을 나타내었다. 담체에 적용하여 배양한 해양박테리아는 평균 OD 값의 변화가 0.295를 나타내어 대조군에 비해 약 3배 이상의 성장률이 증가하였다. 또한 대조군에서 종에 따라 성장률의 변화가 큰 반면 담체를 적용한 실험에서는 4종의 해양박테리아의 성장률이 0.254-0.323으로 대조군에 비해 고른 성장률의 증가를 보였다. 따라서 본 연구 결과는 본 연구에 적용한 담체가 미생물의 적용에 효과적임을 보여주고 있으며, 미생물의 성장에 크게 도움이 되고 있음을 보여주고 있다.

3.2 암모니아성 질소 제거

대조군의 경우 20 시간에 60%가 넘는 암모니아성 질소를 제거하였으며, 특히 *P. diminuta*는 88.8%를 제거하여 4종의 해양박테리아 중 가장 높은 암모니아성 질소 제거 효율을 보였다. 반면 담체에 적용된 해양박테리아는 대조군과 비교하여 10시간에 최고의 제거 효율을 보였다. 4종 모두 90% 이상의 암모니아성 질소를 제거하여 담체 적용이 암모니아성 질소의 제거를 위한 시간 및 효율을 크게 증가시킨 것으로 나타났다.



[그림 1] 생물반응기 모형.
[Fig. 1] Schematic diagram of bioreactor.

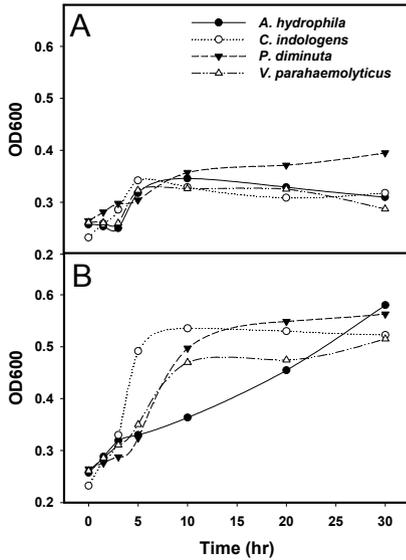
3.3 질산성 질소 제거

대조군의 경우 30 시간까지 처리해도 약 20% 정도의 질산성 질소를 제거하였고, *P. diminuta*가 21%의 제거율을 보였다. 그러나 담체에 적용한 경우 30 시간에 40% 이상의 제거 효율을 보였으며, *A. hydrophila*의 경우 55.4%의 가장 높은 효율을 보였다. 담체를 적용한 경우 대조군에 비해 질산성 질소의 제거 효율이 2배 이상 증가한 것은 담체에 적용된 미생물의 성장이 증가하고, 이에 따라 질산성 질소의 제거효율이 증가한 것으로 판단된다.

3.4 인산 제거

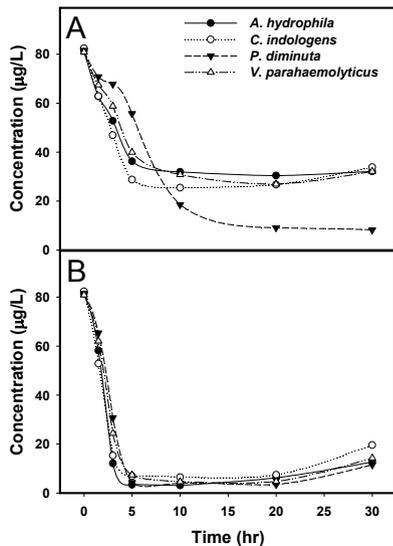
담체를 적용하지 않은 경우 중에 따라 다른 제거율을 보였는데, *A. hydrophila*와 *V. parahaemolyticus*가 처리 후 5시간에 각각 60.0 및 58.4 %의 최고 제거율을 보였으나 *C. indologenes*와 *P. diminuta*는 20 시간에 73.1 및 69.1%의 최고 효율을 보였다. *C. indologenes*의 경우 5시간에도 72.5%의 높은 제거율을 보여 인 제거 효율이 가장 높은 종으로 나타났다. 담체에 적용하였을 때, 4종의 해양박테리아 모두 처리 후 3시간에 최고의 제거율을 나타냈으며, 80% 이상의 인산을 제거하였다. 특히 *P. diminuta*는 대조군에서는 20시간에 69.1%의 제거율을 보였으나, 담체에 적용한 경우 5시간에 87.6%를 제거하여 담체에 적용하였을 때 가장 효율이 증가한 종으로 판명되었다.

본 연구에서는 해양박테리아를 담체에 적용하였을 때, 중에 따라 성장, 질소 및 인의 제거 특성이 다르게 나타났다. 암모니아성 질소의 제거는 적용한 4종의 해양박테리아 모두 90% 이상의 제거 효율을 보였다. 질산성 질소는 대조군에서는 *P. diminuta*가 가장 높은 제거효율을 보인 반면 담체가 적용된 실험군에서는 *A. hydrophila*가 가장 높은 효율을 보여, 중에 따라 다양한 질소형태가 사용된다는 것이 확인되었다 [12-15]. 또한 인의 경우 대조군과 담체 적용군에서 모두 높은 제거효율을 보여주고 있는데, 세포내에 인을 pyrophosphate 또는 polyphosphate 형태로 축적하는 기작 [16] 등이 해양박테리아에서도 이루어지고 있는지에 대하여 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.



[그림 2] 세라믹담체에 적용된 해양박테리아의 성장곡선. A, 대조군; B, 실험군

[Fig. 2] Growth curve of marine bacteria applied to ceramic media. A, control group; B, experimental group



[그림 3] 세라믹담체에 적용된 해양박테리아의 암모니아성 질소 제거. A, 대조군; B, 실험군

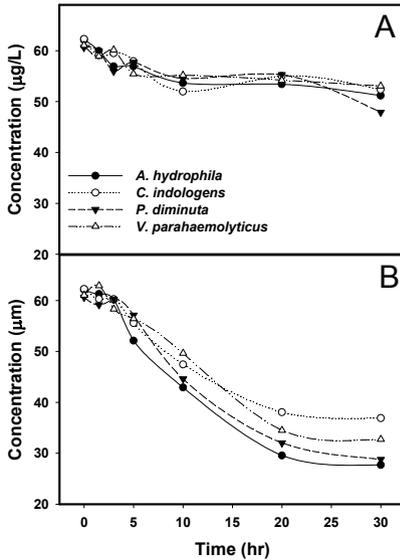
[Fig. 3] NH₃-N removal of marine bacteria applied to ceramic media. A, control group; B, experimental group

4. 결론

청자토를 이용하여 제조된 세라믹 담체에 4종의 해양 박테리아를 적용하여 질소 및 인의 제거 효율을 분석하였다. 담체를 사용하지 않은 대조군에 비해 담체를 사용한 4 종의 실험군 모두 약 3배 이상의 성장률의 증가를 보였으며, 암모니아성 질소 제거 효율도 30% 이상 증가하였다. 담체를 적용한 실험군에서 질산성 질소의 제거는 *A. hydrophila* 군주가 가장 높은 것으로 나타났으며, *P. diminuta* 군주가 5시간에 거의 90%의 인을 제거하는 것으로 나타나, 담체 적용 효율이 가장 크게 증가한 종으로 판명되었다.

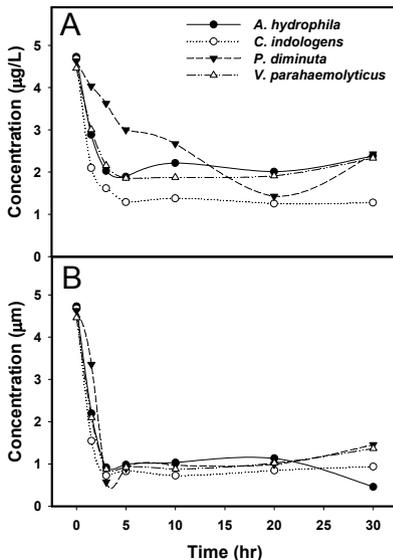
References

- [1] J. W. Fleeger, K. R. Carman, and R. M. Nisbet, "Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems", *Sci. Total. Environ.* 317, 207-233, 2003.
- [2] L. J. Guillette and E. A. Guillette, "Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health?" *Toxicol. Ind. Health* 12, 537-550, 1996.
- [3] K. Schiff, S. Bay, "Impacts of stormwater discharges on the nearshore benthic environment of Santa Monica Bay." *Mar. Environ. Res.* 56, 225-243, 2003
- [4] M.-S. Lee, J.-H. Park, "Isolation of ammonia oxidizing bacteria and their characteristics". *J. Korean Fish. Soci.*, 31, 760-766, 1998.
- [5] J.-Y. Jung, S.-W. Lee, K.-H. Kim, J.-H. Lim, J.-K. Lee, "Removal of N,P in seawater by zeolite" *Theo. App. Chem. Eng.* 8(2), 3773-3776, 2002
- [6] Y.-S. Park and K.-H. Ahn. "Preparation of ceramic support carrier and investigation of performance." *J. Kor. Society of Environ. Engineers.* 23(3), 507-516, 2001.
- [7] B. H. Jun, "Nitrogen removal in fluidized bed and hybrid reactor using porous media" *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* 27(5), 542-548, 2005.
- [8] G. M. Kim, W. Hur, H. J. Baek, "Treatment of acid mine drainage using immobilized beads carrying sulfate reducing bacteria" *Econ. Environ. Geol.* 41(1), 57-62, 2008.
- [9] S.-J. Kim and S.-S. Lee, "The development of treatment system for removing the low concentrated nitrogen and phosphorus using phototrophic bacteria and media" *Kor. J. Microbiol.* 46(1), 27-32, 2010.
- [10] Young Seek park, Ki Woo Koo, Young Soo Na,



[그림 4] 세라믹담체에 적용된 해양박테리아의 질산성 질소 제거. A, 대조군; B, 실험군

[Fig. 4] NO₃-N removal of marine bacteria applied to ceramic media. A, control group; B, experimental group



[그림 5] 세라믹담체에 적용된 해양박테리아의 인 제거. A, 대조군; B, 실험군

[Fig. 5] Phosphate removal of marine bacteria applied to ceramic media. A, control group; B, experimental group

Seung Koo Song, "Physical Characteristics of Support Media for Microbial Immobilization." J. Environ. Sci. 7(3), 269-274, 1998.

- [11] Sung Youl Park, Do Han Kim, Young Seek Park, Seung Koo Song, "Characteristics of Ceramic and Polymer Support Carrier affecting the Microbial Attachment under Anaerobic Condition." Kor. Environ. Eng. 23(6), 951-959, 2001.
- [12] G. Lee, S. H. Moh, Y. Chung, S. J. Kim, Y. J. Kim, S-S Lee, T.-K. Lee, "Isolation and identification of marine bacteria with high removal efficiencies for nitrogen-phosphate in Gwangyang bay" J. Korea Acad-Indus. Soci. 13(7),
- [13] M. Madigan, S. S. Cox, and R. A. Stegeman, "Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae." J. Bacteriol. 157, 73-78, 1984.
- [14] K. L. Casciotti, and B. B. Ward, Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 67, 2213-2221, 2001.
- [15] S.-S. Lee, H.-J. Joo, S. Lee, M. Chang, T.-K. Lee, H. Shim, E. Shin, "Development of advanced wastewater treatment system using phototrophic purple non-sulfur bacteria." Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 30, 189-197, 2002.
- [16] S. S. Lee, "The Advanced Biological Treatment System Using Photosynthetic Bacteria." News & Information for Chemical Engineers, 22, 20-22, 2004
- [17] I. S. Kulaev, A. Sha, and S. E. Mansurova, "Poluphosphates of phototrophic bacteria Rhodospirillum rubrum under different cultivation conditions. Biochemia, 36, 656, 1974.

이 건 섭(Gunsup Lee)

[정회원]



- 2003년 2월 : 성균관대학교 생명공학과 (이학석사)
- 2010년 2월 : 성균관대학교 생명공학과 (이학박사)
- 2011년 1월 ~ 현재 : 해양과학기술원 연수연구원

<관심분야>
분자생물학, 해양 독성학

김 소 정(so-jung kim)

[정회원]



- 1998년 2월 : 인제대학교(환경독성학석사)
- 2006년 9월 : 해양연구원 남해연구소 연구원
- 2006년 10월 ~ 2007년 4월 : 대한적십자 연구원
- 2007년 5월 ~ 현재 : 경북해양바이오산업연구원 연구원

<관심분야>
생물소재 생화학

정 영 재(Youngjae Chung)

[정회원]



- 1988년 2월 : 성균관대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1993년 2월 : 성균관대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 1997년 3월 ~ 2007년 2월 : 서남대학교 생명과학과 교수
- 2007년 3월 ~ 현재 : 신경대학교 생명공학과 교수

<관심분야>
식물형태 및 계통분류학, 식물유전자원학

김 동 균(Dong Giun Kim)

[정회원]



- 1989년 2월 : 성균관대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1999년 3월 : 미국오하이오대학교 대학원 생물학과 (식물학박사)
- 2010년 3월 ~ 현재 : 신라대학교 생물학과 교수

<관심분야>
식물학, 생화학, 분자생물학, 생리학

이 상 섭(Sang-Seob Lee)

[정회원]



- 1988년 8월 : 성균관대학교 미생물학 (이학박사)
- 1999년 3월 ~ 현재 : 경기대학교 이과대학 생명과학과 교수
- 2006년 3월 ~ 현재 : 국가 연구 소재은행(환경미생물은행) 은행장
- 2009년 ~ 현재 : 국가연구소재 미생물거점센터 센터장

<관심분야>

분자생물학, 해양 독성학

오 정 균(Chung-Kyoon Auh)

[정회원]



- 1983년 8월 : KAIST 생물공학 (이학석사)
- 1995년 3월 : UC Davis 식물학 (이학박사)
- 2000년 9월 ~ 2004년 8월 : 성균관대학교 생명과학과 연구교수
- 2005년 3월 ~ 현재 : 목포대학교 생명과학과 부교수

<관심분야>

식물분자생물학, 식물환경생리학

이 택 건(Taek-Kyun Lee)

[정회원]



- 1991년 2월 : 성균관대학교 생물학 (이학석사)
- 1998년 2월 : 성균관대학교 식물분자생리학 (이학박사)
- 1998년 9월 ~ 2000년 8월 : 한국해양연구원 연수연구원
- 2000년 9월 ~ 현재 : 해양과학기술원 남해특성연구부 책임연구원

<관심분야>

환경분자생리학, 해양환경독성학