

## A Study on the Distribution of Nitrite Oxidation Microorganisms in a Biofilm Reactor

Joung Yee Yoon, Sun-Hee Kim, Dong-Jin Kim

Dept. of Environmental System Engineering, Hallym University

Tel:+82-33-248-2154, 2163

### Abstract

Biofilm airlift reactor was continuously operated to investigate the competitions between the autotrophs and heterotrophs, ammonia oxidizers and nitrite oxidizers, and *Nitrobacter* and *Nitrospira* with real wastewater at a C/N ratio of 0.86. As the reactor achieved complete nitrification, microbial distribution was analyzed by FISH/CLSM technique. The results showed that heterotroph was more abundant than nitrifying bacteria. Ammonia oxidizers (17%) and *Nitrobacter* (7%) prevailed nitrite oxidizers (9%) and *Nitrospira* (2%), respectively.

### 서 론

유기탄소와 질소의 비, 즉 C/N비는 무산소조에서 일어나는 탈질 반응에 못지않게 질산화 반응이 일어나는 호기성 반응조에서도 중요한 요소이다. 질산화 반응에서 C/N비의 영향을 살펴보면 종속영양 미생물과 질산화 미생물 사이에서 biofilm의 공간과 기질에 대한 경쟁을 벌이게 된다. 탄소원을 주입함에 따라서 종속 영양 미생물이 보통 빠른 성장 속도를 가지기에 우점종이 되고, 상대적으로 성장 속도가 낮은 독립 영양 미생물인 질산화 미생물이 기질 및 산소 섭취 경쟁에서 종속 영양미생물에 의해 제한을 받게 된다. Tjihuis(1994)<sup>1</sup> 등의 실험에 따르면 biofilm의 공간적인 구조 안에서 종속영양 미생물의 성장 속도가 질산화 미생물 보다 빨라 biofilm 바깥층에 종속영양 미생물이 존재하였고, 질산화 미생물은 biofilm 안쪽 층에서 주로 발견되었다. 즉 질산화 미생물 층 위에 종속영양 미생물이 층을 형성하고 있었다. 또한 산소 농도가 충분히 높지 않으면 종속영양 미생물 층 내에 물질 이동의 저항과 소비로부터 산소가 제한되어 질산화가 어렵다. 종속영양 미생물의 긍정적인 면은 질산화 미생물을 담체로부터 분리되는 것을 보호한다는 것이다. 비교적으로 긴 수리학적 체류시간은 빠르게 자라는 종속영양미생물을 질산화 미생물 층으로부터 분리하여 반응조에 부유시킬 수 있다<sup>2</sup>.

본 연구에서는 순환 유동상 생물막 반응기를 이용하여 실제 하수처리장의 폐수와 유기물과 암모니아성 질소를 기질로 한 인공폐수를 기질로 넣어주었을 때의 아질산 산화 미생물의 분포 특성을 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### Reactor & Metrial

본 실험에서는 유동상 생물막 반응기에 하수 처리장의 실제 유입 폐수와 암모니아성 질소를 넣어 만든 인공폐수를 유입수로 넣어 주어 운전하였다. 사용된 인공 폐수 및 Nutrient, Buffer의 조건은 Table.1에 나타내었다.

Table 1. Chemical composition of the artificial wastewater used in this study

Chemical Composition	
COD	127 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120 mg N/L
NaHCO <sub>3</sub>	1 M
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5 mg/L
KCl	7 mg/L
NaHPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29 mg/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11 mg/L
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 mg/L

### Analysis

유입과 유출되는 시료의 질소분석은 각각의 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소를 Standard Method에 의거하여 분석하였다. 모든 시료는 0.45  $\mu$ m GF/C filter로 여과하여 부유 물질을 제거한 후 실험하였다. 암모니아성 질소는 Nesslerization method에 의해 425 nm에서 흡광도를 측정하였다(UV 1601, Shimadzu). 아질산성 및 질산성 질소는 0.2  $\mu$ m syringe membrane filter를 사용하여 한 번 더 미세 부유 물질을 거른 후 ion chromatography(DX 500, Dionex)로 측정하였다. COD는 standard method의 방법에서 closed reflux method를 이용하여 실험하였다. 반응기 내의 MLVSS는 Standard Method의 Fixed and Volatile Solids 측정에 의거해서 550℃에서 15 분간 회화하였다. 또한 반응기내의 용존산소(Istek 215D), 온도, pH(Istek 720P) 등

은 연속적으로 측정하였다. Solids 측정에 의거해서 550°C에서 15 분간 회화하였다. 또한 반응기내의 용존산소(Istek 215D), 온도, pH(Istek 720P) 등은 연속적으로 측정하였다.

**Quantitative Analysis of Microbe : Fluorescence *in situ* hybridization**

Bacteria의 16s-RNA에 특이적으로 결합하는 DNA probe를 이용하여 FISH 실험 후 Confocal laser scanning microscope (CLSM)에 의해 이미지를 얻었다. 또한 Image Analyzer를 이용하여 각각의 이미지에 대한 정량 데이터를 계산하였다.

**결과 및 고찰**

순환 유동상 생물막 반응기의 유입 실제 폐수의 평균 유기물(COD) 농도는 127 mg/L, 암모니아성 질소 농도 120 mg/L, 유기물의 평균 부하는 0.092 kg/m<sup>3</sup>·day, 암모니아성 질소의 평균 부하 0.087 kg/m<sup>3</sup>·day, 평균 DO 농도 3.6 mg/L, 수리학적 체류시간은 16.5 h로 운전하였고, 평균 MLVSS 0.39 g/L였다. 즉 C/N비는 0.86으로 운전하였고 암모니아 제거율은 평균 100%, COD 제거율은 평균 100%로 나타났다. Figure 1은 순환 유동상 생물막 반응기의 운전 데이터를 나타낸 것이다. 반응기내의 C/N 비를 낮게 운전하였고, 수리학적 체류시간은 길게 운전하여 중속영양 미생물의 빠른 성장속도로 인한 질산화 미생물의 저해를 최소화 시켜주어 암모니아 제거율(질산화율)은 100%로 나타났다.

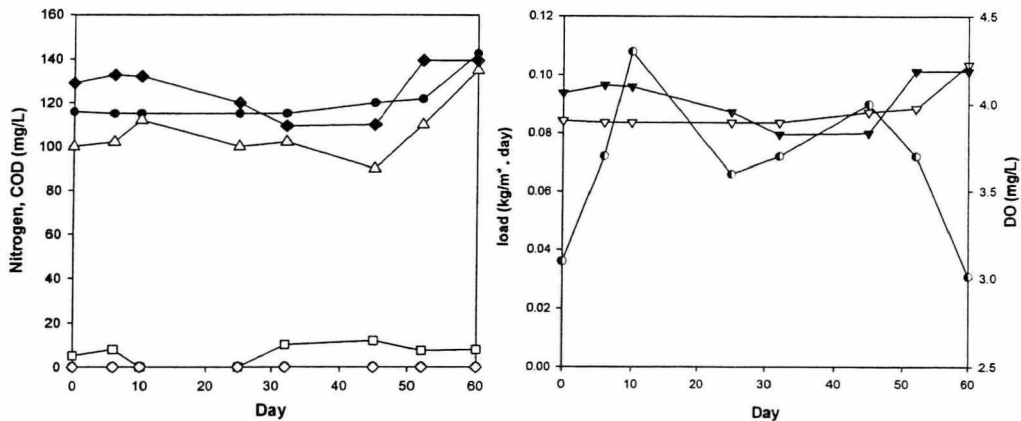


Fig. 1. Profiles of operation data in the biofilm airlift reactor for simultaneous carbon and nitrogen removal (● input ammonium(mg/L), ○output ammonium, □output nitrite, △output nitrate, ◆input COD, ◇output COD, ▼COD load(kg/m<sup>3</sup>·day),▽N load, ● DO(mg/L)).

Image analyzer로 FISH 이미지를 분석한 결과 전체 박테리아에 대한 *Nitrosomonas* spp.의 백분율은 평균 14%로 나타났고, *Nitrospira* spp.는 평균 3%로 나타났다. 즉 총 암모니아 산화균은  $17\pm 3\%$  분포하였다. 또한 전체 박테리아에 대한 *Nitrobacter* spp.는 평균  $7\pm 0.7\%$ , genus *Nitrospira*는 평균  $2\pm 0.6\%$ 로 분포하였다. 총 아질산 산화균은  $9\pm 1.3\%$ 로 존재하였고, 인 축적 미생물을 포함하는  $\gamma$ -proteobacteria는 평균  $34\pm 4\%$ 로 분포하였다.

## 결 론

순환 유동상 생물막 반응기에서 C/N비는 평균 0.86, HRT 16.5 h으로 유기물이 있는 실제 폐수를 이용하여 운전한 결과, 암모니아와 COD 제거율은 평균 100%로 나타났다. FISH 분석 결과를 보면 질산화 미생물은 총  $26\pm 4.3\%$ 로 분포하였고,  $\gamma$ -proteobacteria는  $34\pm 4\%$ 로 분포하였다. 질산화에 대한 저해가 없었음에도 불구하고 질산화 미생물보다 종속영양 미생물이 우점종을 이루었다. 이는 독립영양 미생물보다 종속영양 미생물이 성장 속도가 빨라 기질 및 산소섭취에서 우세하기 때문에 나온 결과이다.

아질산 산화균은 *Nitrobacter*가  $7\pm 0.7\%$ , *Nitrospira*가  $2\pm 0.6\%$ 로 존재하여 *Nitrobacter*가 우점종을 이루었다. 아질산 산화균은 아질산 농도에 따라 우점종이 결정된다. 반응기의 암모니아 제거율은 100% 였지만, 아질산 농도는 평균 5 mg/L로 유지되었고, 이로 인해 기질 친화도가 낮지만 반응속도가 빠른 *Nitrobacter*가 r-strategist로서 genus *Nitrospira*보다 우점종으로 분포하는 것으로 생각된다. 또한 *Nitrobacter*의 한종인 *Nitrobacter agilis*는 아질산 농도가 제한된 상태에서 유기물을 이용하여 세포합성 (mixotrophic)을 한다고 알려져 있고<sup>3,4</sup>, *Nitrospira*는 pyruvate외에는 유기물을 이용할 수 없다고 알려져 있어<sup>5</sup> *Nitrospira*보다 *Nitrobacter*가 우점종을 이루었다고 결론내었다. 또한 암모니아 산화균은  $17\pm 3\%$ , 아질산 산화균은  $9\pm 1.3\%$ 로 분포하여 암모니아 산화균이 아질산 산화균보다 더 많이 분포하였다. 이는 각 미생물군의 세포생성계수가 0.05-0.29 g VSS/g N와 0.02-0.08 g VSS/g N로써 암모니아 산화균의 세포생성계수가 크다는 이론을 뒷받침한다.

## References

1. Tijhuis, L., Rekswinkel, H.G., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Dynamics of population and biofilm structure in the biofilm airlift suspension reactor for carbon and nitrogen removal,

- Wat. Sci. Tech.*, **29**:377-384, 1994.
2. Garrido, J.M., van Benthum, W.A.J., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J., Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **53**:168-178, 1997.
  3. Pope, L.M., Hoare, D.S., and Smith, A.J., Ultrastructure of *Nitrobacter agilis* grown under autotrophic and heterotrophic conditions, *bacteriology.*, **97**(2):936-939,1969.(Pope.,1969,
  4. Degrange, V., Lensi, R., Bardin, R., Activity, size and structure of a *Nitrobacter* community as affected by organic carbon and nitrite in sterile soil, *FEMS. Microbiology. Ecology*, **24**:173-180, 1997.
  5. Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., and Wangner, M., *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:5273-5284, 2001.