

생물막 반응기에서의 폐수 처리 및 Fluorescence *In Situ* Hybridization에 의한 복합 미생물계 구조 해석

†김 동 진·한 동 우·¹이 수 철·¹박 병 곤·¹권 일·²성 창 근·³박 완 철
한림대학교 환경시스템공학과, ¹(주)대덕바이오 부설 생물공학연구소, ²충남대학교 식품공학과, ³한국과학기술연구원
수질환경연구센터
(접수 : 2002. 1. 18., 게재승인 : 2002. 2. 18.)

Wastewater Treatment and Microbial Structure Analysis by Fluorescence *In Situ* Hybridization in a Biofilm Reactor

Dong-Jin Kim†, Dong-Woo Han, Soo-Choul Lee¹, Byeong-Gon Park¹, Il Kwon¹, Chang-Keun Sung², and Wan-Cheol Park³

Department of Environmental Systems Engineering, Hallym University, Chunchon, Kangwon 200-702, Korea

¹Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Dbio, Inc., Daejeon 305-764, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Water Environment Research Center, KIST, Seoul 136-197, Korea

(Received : 2002. 1. 18., Accepted : 2002. 2. 18.)

Laboratory scale aerobic/anaerobic biofilm reactor was used for simultaneous and stable removal of organics, N and P components to investigate optimum design and operation parameters and to analyze the microbial distribution and consortium structure of nitrification and denitrification bacteria in aerobic and anaerobic biofilm systems. The biofilm reactor was successfully operated for 143 days to show COD_{Cr}, BOD₅, SS removal efficiencies of 88, 88, and 97%, respectively. During the experiment period, almost complete nitrification efficiency of 96% was achieved. Denitrification efficiency was about 45% without addition of any external carbon sources. In case of total phosphorus removal, 44% of the inlet phosphorus was removed. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) results showed that most of the ammonia oxidizing bacteria in the aerobic nitrification zone was found to be *Nitrosomonas* species while *Nitrospira* was the representative nitrite oxidizing bacteria. For the denitrification, *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* and *Paracoccus* were the dominant denitrification bacteria which was 10 to 20% of the total bacteria in numbers.

Key Words : wastewater treatment, fluorescence *in situ* hybridization, nitrification, denitrification, microbial consortium structure, biofilm reactor

서 론

현재 국내에서 주로 이용되는 생물학적 폐·하수 처리 기술은 활성오니법을 위주로 한 현탁배양 방식이다. 이 공정은 기술적 평이함과 많은 실적 및 축적된 경험으로 인해 폐·하수 처리장 설계에 가장 많이 적용되고 있으며 대규모 처리시설에 적합하고 비교적 우수한 처리수질을 얻을 수 있다. 반

면에 고도처리가 힘들고 부지가 많이 필요하며 운전인력이 많이 필요하고 악취 등의 2차오염 문제가 있다. 구체적으로 활성오니법에서 배출되는 BOD/SS 수질은 보통 30 ppm 정도이고 이러한 수질도 운전자의 경험이나 능력에 따라 달라진다. 또한 우수한 처리 수질을 얻기 위해서는 운전자가 폭기조와 2차 침전조의 상태를 면밀히 관찰하고 이에 따라 운전을 조절하여야 한다.

생활하수 및 산업폐수로 방출되는 질소나 인 성분은 하천의 자정작용에 악영향을 미치며 수계에 배출될 때 조류의 이상증식을 조장하여 부영양화 현상을 유발하거나 용존산소의 소비, 수생 생물에 직접적인 독성을 나타내므로 특별한 처리공정이 요구된다.

그중 질소의 주요발생원은 분뇨, 비료 및 산업폐수 등이며

†Corresponding Author : Department of Environmental Systems Engineering, Hallym University, Chunchon, Kangwon 200-702, Korea

Tel : +82-33-240-1537, Fax : +82-33-256-3420

E-mail : dongjin@hallym.ac.kr

도시하수의 질소농도는 15~50 mg/L 정도가 된다. 수중에서 질소는 요소와 아미노산과 같은 유기질소(organic nitrogen), 암모니아성 질소(ammonia/ammonium), 아질산성 질소(nitrite) 및 질산성 질소(nitrate)의 상태로 존재하며, 인은 단백질, ATP 등과 같은 유기인(organic phosphorus), 인산염(phosphate)의 형태로 존재한다. 도시하수 중의 질소는 약 60%가 암모니아성 질소이며 나머지는 유기질소인데, 질소에 의한 문제점은 부영양화의 촉진 외에도 질산화가 진행되면서 BOD보다도 2.7배나 되는 많은 양의 산소를 소모한다는 것이다. 게다가 수중생물에 독성을 유발하고, 염소소독의 효율에 영향을 끼치며, 공공보건상의 위해를 야기하고, 하수 재사용시 적합성에 영향을 끼치게 된다.

생물학적으로 질소를 제거하는 방법은 질산화 및 탈질화과정을 거치는 특별한 처리공정을 통해 이루어지며 질산화는 주로 autotrophic이나 mixotrophic 미생물에 의하여 일어나고 암모늄은 아질산성 질소를 거쳐 질산성 질소로 두 단계에 걸쳐 진행된다. 암모늄의 산화에는 *Nitrosomonas europaea*, 아질산성 질소의 산화에는 *Nitrobacter agilis*가 주로 관여하는 것으로 알려져 왔고 이들의 반응을 요약하면 다음과 같다.

암모늄 산화의 첫 번째 단계는 암모늄(NH_4^+)이 아닌 암모니아(NH_3)의 산화인데 이는 막에 결합된 ammonia mono-oxygenase(AMO)에 의한 것으로 흡열반응이다. 이 반응에 필요한 전자는 전자전달계의 ubiquinone-cytochrome b로부터 공급 받는 것으로 알려져 있다. Hydroxylamine (NH_2OH)은 hydroxylamine oxidoreductase에 의해 아질산성 질소로 산화되며 발열반응이다. 아질산성 질소는 nitrite oxidoreductase에 의하여 질산성 질소로 산화되며 가역적이다(1).

그러나 최근의 16S rDNA 유전자 전극(gene probe)을 이용하여 활성오니움의 질산화 미생물 종류를 조사한 결과 일반적으로 *Nitrosomonas* spp.는 암모늄 산화 미생물군의 우점종으로 밝혀졌으나 *Nitrobacter*는 활성오니에 나타나지 않는 것으로 나타났다(2).

Hiorns *et al.*(1995)은 *Nitrosospira*가 자연계나 활성오니에서 가장 많이 출현하는 암모늄 산화 미생물종이고 *Nitrosomonas*는 실험실에서 배양하는 경우에만 측정 가능하다고 밝혔다(3).

Burrel *et al.*(1998)은 활성오니에서 아질산염 산화균은 *Nitrobacter* 대신 *Nitrosospira*가 주로 존재한다고 최근 발표하였으며, Schramm *et al.*(1998)은 질산화 반응기에서 gene probe나 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 방법으로 *Nitrosomonas*나 *Nitrobacter* 대신 *Nitrosospira*와 *Nitrospira*가 암모니아와 아질산성 질소의 산화 미생물로 발견되었다고 보고하였다(4-5).

이러한 gene probe를 사용한 최근의 연구 결과는 전통적으로 이용된 순수 배양방법을 이용한 자연 상태에서의 미생물 종 분석 방법의 편견을 보여준다. 대개 미생물은 제한이 없는 조건(높은 기질 및 용존산소 농도)에서 고농도로 배양된 다음 희석하여 plate에서 single colony를 형성하도록 하여 분리한다. 이것은 고농도로 배양하는 단계에서 성장속도와 수율이 높은 미생물종이, 그리고 floc을 형성하는 것에 비해 단세포로 자라는 미생물이 경쟁에서 매우 유리하게 된다. 그러나 실제 시스템에서 기질에 대한 경쟁은 다른 미생물종이 우점종일 수 있다. 활성오니 시스템에서 암모늄은 실험실에서

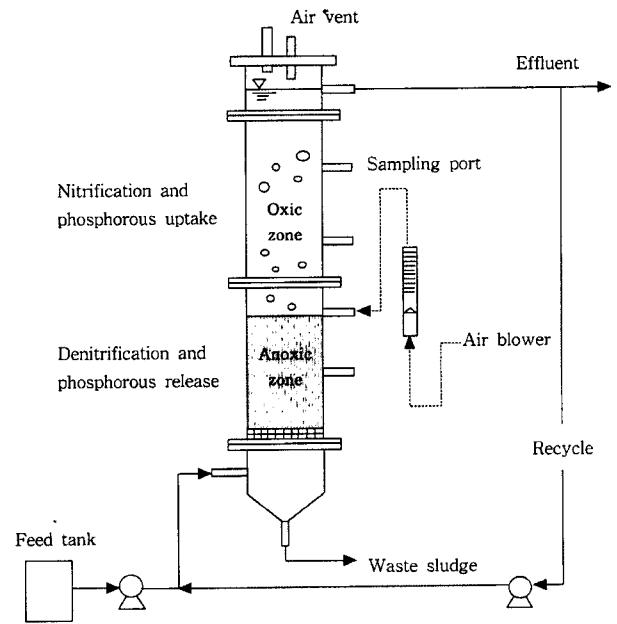


Figure 1. Schematic diagram of the anoxic-oxic upflow biofilm reactor experimental set-up for domestic wastewater treatment.

의 고농도 배양에서처럼 비교적 높은 농도로 있고 아질산성 질소는 매우 낮은 농도로 존재하고 있어 아질산염 산화균은 기질에 대하여 심한 경쟁을 하게 될 것이다. 따라서 활성오니에서는 기질에 대한 친화력이 높은 미생물이 실험실에서 빨리 성장하는 미생물에 비하여 우점종이 될 수 있다. 순수 배양을 이용한 미생물 생태 연구는 실제 생태계와 같은 조건에서 경쟁을 통하여 배양된 미생물일 경우에 의미를 갖게 된다.

본 연구에서는 유기물 제거뿐만 아니라 안정적으로 질소와 인의 동시 제거를 위한 순환식 생물막 반응기를 제작 운전하여 생활하수 처리에 적용, 최적의 운전인자를 도출하고, 최근 발전하고 있는 분자 생물학적 기술의 하나인 rRNA oligonucleotide probe와 결합된 FISH 기법의 다양한 적용을 통해 보다 많은 미생물들의 동정 및 군집 구조 분석을 수행토록 하였다. 이를 토대로 하여 최적의 운전 상태를 유지하는데 관여하는 미생물들의 종과 분포를 관찰하고 보다 향상된 공정 수행과 조절의 기초 자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

순환식 생물막 반응기

본 연구에 사용된 순환식 생물막 반응기의 개략도를 Figure 1에 나타냈다. 생물막 반응기는 내경 3 cm, 높이 110 cm의 아크릴 소재의 원형관으로써 담체 충전 높이는 75 cm이며 나머지는 침전조와 유출가스를 포함한 head space로 이루어졌다. 또한 반응기의 중앙부분에 air flow meter를 설치하여 0.2 L/min의 공기를 일정하게 공급함으로써 생물막 반응기의 하부에는 유효부피의 약 40% 정도로 무산소 구역을 형성하게 하였고 상부에는 호기 구역을 형성하게 하였다.

유입 폐수는 D하수종말처리장 폭기조 폐수를 300~310 mL/hr의 유량으로 반응기에 유입시켜 주었다. 반응유량은 790 mL/hr

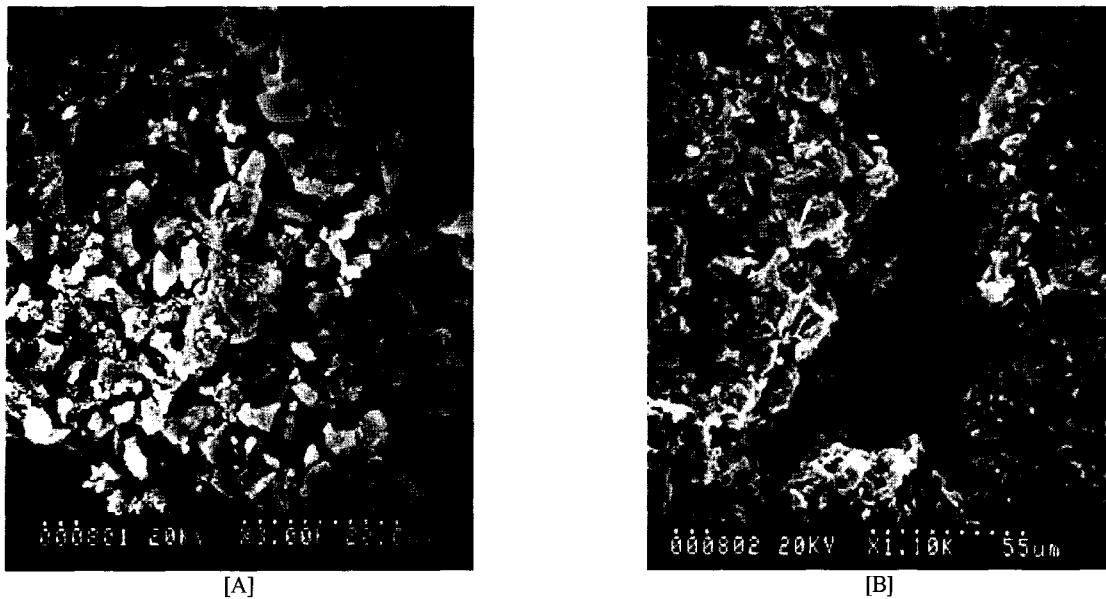


Figure 2. Scanning electron microscopy of the surface of the ceramic media.

으로 일정하게 유지하였다.

반응기 내부에는 직경이 4~6 mm인 다공성의 세라믹 담체를 충전하였다(porosity: 35%). SEM (scanning electron microscopy: Hitachi S-2500)을 통해 촬영한 담체 표면 모습은 Figure 2-(A), (B)에서와 같이 2~200 μm 정도의 pore를 갖는 다공성의 물질이다. 따라서 담체의 생물막 표면은 호기성 조건을 형성하고 담체의 공극을 비롯한 생물막 안쪽에는 산소의 확산 저항에 의해 산소가 결핍되어 무산소 상태가 된다. 그러므로 담체의 표면에서는 호기성 미생물인 ammonia oxidizer와 nitrite oxidizer에 의해 질산화가 수행되고 생물막의 안쪽으로 들어올수록 ammonia oxidizer와 nitrite oxidizer 사이에 산소를 놓고 기질경쟁을 벌이게 되며 질산화 과정에서 생성된 nitrite나 nitrate를 electron acceptor로, 외부로부터 확산되어 공급되는 유기탄소를 electron donor로 사용하여 탈질반응이 수행될 수 있다.

폐수의 분석은 standard method의 방법에 의해 수행하였으며 시료는 0.45 μm 의 GF/C filter로 여과한 후 실험하였다. 암모니아성 질소는 Nesslerization method에 의해 425 nm에서 흡광도를 측정하였다(UV 1601, Shimadzu). 아질산성 질소는 543 nm에서 흡광도를 측정하는 colorimetric method를 이용하였으며 질산성 질소는 220 nm에서 흡광도를 측정하는 ultraviolet

spectrophotometric screening method를 이용하였다. 또한 아질산성 질소와 질산성 질소는 0.2 μm 의 syringe filter로 부유물을 거른 후 ion chromatography(DX 500, Dionex)로 병행하여 분석하였다. 총 인의 분석은 ascorbic acid method 방법을 이용하여 880 nm에서 흡광도를 측정하였다. BOD₅, COD_{Cr}, SS 등은 공정시험법에 의거하여 분석을 수행하였다.

복합 미생물계 구조 해석

유기물 및 질소, 인의 동시 제거를 위해 운전 중인 순환식 생물막 반응기의 하단(혐기성)과 상단(호기성)에서 세라믹 담체 약 30개를 채취하여 가볍게 증류수로 씻어 주었다. 이를 50 mL comical tube에 넣고 강하게 vortexing 하여 생물막을 분리한 뒤 4% paraformaldehyde 용액에 4 $^{\circ}\text{C}$, 1시간동안 고정하였다. Phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 2~3차례 세척한 뒤 gelatin으로 코팅된 슬라이드에 고정된 생물막을 부착시켜 최종적으로 에탄올 희석액(50, 80, 100%)으로 탈수화 과정을 수행하였다.

실험에 사용된 oligonucleotide probe들과 이들의 서열, specificity 그리고 hybridization condition을 Table 1에 나타내었다. 기존에 보고된 질산화·탈질 미생물에 specific한 probe들을 선택하였으며, fluorescein isothiocyanate (FITC), hydrophilic

Table 1. 16S and 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes

Probe	Specificity	Probe sequence (5'-3')	% FA ^a	NaCl (mM) ^b
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	225
ALF1b	<i>a</i> subclass of <i>Proteobacteria</i> , genus <i>Nitrospira</i>	CGTTCGYTCTGAGCCAG	20	225
BET42a	<i>β</i> subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCCTTCGTTT	35	80
RRP1088	Genera <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodovulum</i> , <i>Paracoccus</i> and other bacteria	CGTTGCCGGACTTAACC	0	900
NSM156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTCGAT	5	636
NSV443	<i>Nitrosospira</i> spp.	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	30	112
NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56
NSR1156	Freshwater <i>Nitrospira</i> spp.	CCCGTTCTCCTGGGCAGT	30	112

^a Percentage formamide in the hybridization buffer.

^b Millimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

Table 2. Results of the anoxic-oxic upflow biofilm reactor operations

(Average value)

	Influent concentration (mg/L)	Effluent concentration (mg/L)	Removal efficiency (%)
NH ₄ ⁺	34.4	1.3	96.2
NO ₂ ⁻	0.05	0.8	-
NO ₃ ⁻	2.9	17.8	-
T-N	37.0	20.2	45.4
T-P	5.2	2.9	44.2
COD _{cr}	274.1	33.0	88.0
BOD ₅	117.8	14.3	87.9
SS	194.7	6.1	96.9

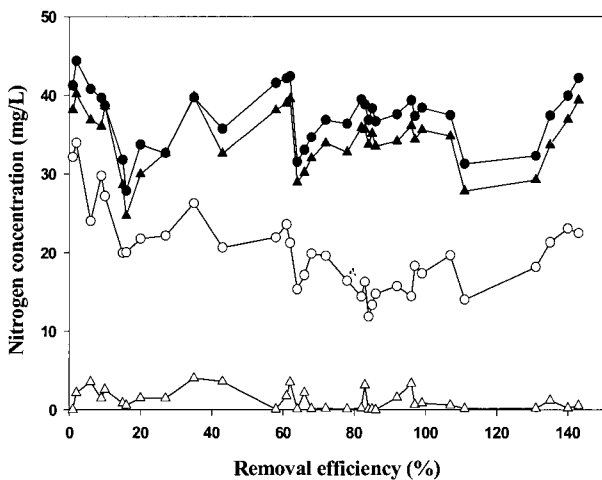


Figure 3. Time courses of the nitrogen concentration (●: Influent T-N concentration; ○: Effluent T-N concentration; ▲: Influent NH₄⁺-N concentration; △: Effluent NH₄⁺-N concentration).

sulfoindocyanine dye (CY3, CY5)로 형광 label하여 합성하였다(MWG Biotech, German).

고정과 탈수과정의 전처리를 거친 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide; Table 2)와 probe로 hybridization chamber에서 46°C, 90분 동안 반응시켜주었다. Probe 농도는 25~50 ng/L이다. Hybridization이 끝난 후 미리 예열된 washing buffer(20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, NaCl; Table 1)로 48°C에서 10분 동안 세정하였다. 반응이 끝난 시료를 증류수로 washing buffer를 제거한 뒤 공기 건조하여 25 µL의 mounting medium으로 처리하였다. 생물막 내 질산화 미생물의 관찰은 Zeiss Axiovert 형광현미경과 Kr/Ar ion laser(488 nm, 560 nm, 633 nm)가 장착된 MRS 1024(Bio-Rad, U. K.) confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 사용하였다.

결과 및 고찰

생물학적 질소·인 제거

순환식 생물막 반응기를 통한 유입 폐수내 질소·인 및 유기물 제거 실험을 현재 143일간 수행 중에 있다. 유입 폐수내 총 질소의 농도 범위는 27.9~44.4 mg/L로 나타났으며 평균 총 질소(T-N) 및 암모니아성 질소의 농도는 각각 37.0, 34.4 mg/L을 보였다. 유출수의 평균 총 질소 및 암모니아성 질소의 농도는 각각 20.2 와 1.3 mg/L을 보였다(Figure 3).

이로부터 구한 질산화율과 탈질율은 평균 96% 및 45% 수준을 유지하였다. C/N 비는 평균 7.8을 나타냈다. 이렇듯 실험기간 내내 높은 질산화율과 C/N 비에도 불구하고 상대적으로 낮은 탈질율을 보이는 것은 유입 폐수의 성상이 매번 불규칙하게 변하여 이로 인한 반응기 내 미생물들의 적응이 용이하지 않았기 때문인 것으로 판단된다.

또한 충분한 질산화를 이루기 위해 호기성 반응조의 용존 산소 농도를 7 이상으로 유지하여 주었다. 이러한 높은 용존 산소 농도를 가지는 반응수에 의해 탈질을 위한 준혐기성 반응조의 용존산소 농도가 증가하여 결과적으로 탈질율을 낮추는 계기가 된 것으로 사료된다. 이에 반해 유입수가 준혐기성 반응조에서 일차적으로 처리된 뒤 질산화를 위한 호기성 반응조로 유입되기 때문에 질산화를 촉매하는 미생물들이 환경변동 요소에 대해 더 안정적이며 이로 인해 높은 질산화율을 얻을 수 있었다.

생물학적 질소 제거에 있어 성장 속도가 느린 독립영양 질산화 미생물의 안정화가 종속영양 탈질 미생물을 안정화시키는 것에 비해 많은 문제점을 가진다. 그러므로 현재까지의 실험은 질산화 미생물의 안정화에 초점을 맞추어 실험을 수행하였다. 그러나 호기성 반응조에 충분한 공기를 공급하여 질산화율의 향상은 이루었지만 결과적으로 반응수에 포함된 용존산소에 의해 탈질을 위한 최적의 준혐기성 상태를 유지하는데는 많은 어려움이 있었다. 따라서 앞으로의 실험은 성공적인 질산화를 이루면서 준혐기성 상태를 유지하는데 최소의 영향을 미치는 용존산소 농도에서 반응기를 운전하여 질산화 및 탈질화의 극대화를 이루도록 하는데 초점을 맞추어야 한다.

Table 2에 유입, 유출수 내 질소 성분 및 총인의 농도 변화를 나타내었다. 유입 암모니움은 아질산성 질소를 거쳐 질산성 질소로 빠르게 산화되었으며 이 결과 유출수 내 아질산성 질소의 농도는 1 mg/L 이하를 보였다. 질산성 질소의 경우 17.8 mg/L가 제거되지 않고 유출수로 배출되었다. 이는 탈질에 의한 완전한 질소제거가 이루어지지 않았기 때문이다.

생물학적 유기물 제거

유입 COD_{cr}, BOD₅ 및 SS의 평균 농도는 각각 274.1, 117.8, 194.7 mg/L로 순환식 생물막 반응기에 의해 제거된 유출수의 평균 농도는 각각 33, 14.3, 6.1 mg/L이었다. 이들의 평균 제거율은 각각 88, 88, 97%로 나타났다. 비록 질소·인의 동시 제거를 위한 순환식 생물막 반응기에 의한 유기물 제거 효율이 약 90% 정도이었지만, 유기물 제거를 위한 기존의 활성 슬러지법과 비교하면 약간 낮은 효율을 보이

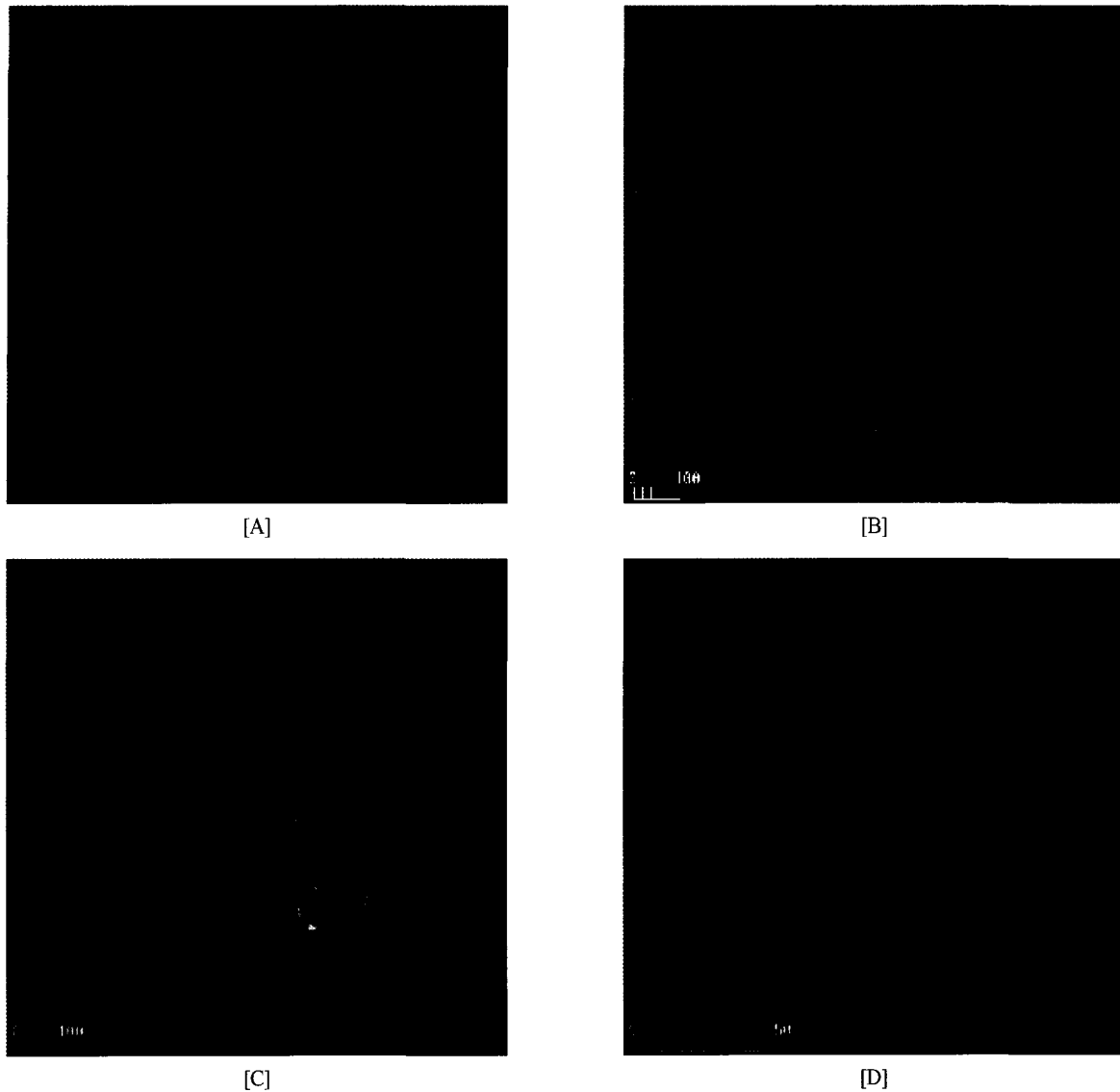


Figure 4. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) image of the ammonia oxidizing bacteria in the aerobic zone. [A] : EUB338(blue), [B] : DIC image, [C] : AIF1b(red) and BET42a(green), [D] : NSR1156(red) and NSM156(green).

고 있다. 그러나 운전 초기에 비해 유기물제거가 향상되는 결과를 보이고 있고 아직 최적의 반응기 운전 상태가 아닌 점을 고려하면 매우 고무적인 결과임을 알 수 있다.

호기성(Oxic) 반응조 내 질산화 미생물들의 동정 및 군집구조 분석

순환식 생물막 반응기는 동시 질산화·탈질화 그리고 인 제거를 위해 혐기성 반응조와 호기성 반응조로 구성되었으며, 질소 제거의 첫 번째 단계인 질산화는 반응기 상단 호기성 반응조에서 일어난다. Figure 4에 호기성 반응조에 분포하는 미생물들의 FISH 관찰 결과를 나타내었다. 대부분의 미생물들이 probe EUB338과 결합하여 형광을 나타내었다(Figure 4-A). 이는 cell들이 FISH 관찰을 위한 충분한 ribosomal RNA를 함유하고 있음을 보여준다. 또한 조밀한 미생물 clusters, 거칠고 불규칙한 표면, 그리고 미생물이 없는 빈 공간 등이 이들 미생물의 DIC(Differential interference contrast)

이미지에 나타나고 있다(Figure 4-B). 암모니아 산화균과 아질산 산화균을 포함하는 *Proteobacteria*의 α 아강 및 β 아강에 선택적인 probe ALF1b와 BET42a의 FISH 분석 결과 반응기 내 미생물들의 약 60~70%가 반응하여 형광을 나타내었다(Figure 4-C). 질산화 미생물의 경우 생물막 전역에서 관찰되었으나 한곳에 집중적으로 분포하는 경향을 보였다. 이는 아직까지도 호기성 반응조 전역에 걸쳐 이들 미생물들이 우점종을 차지하지 못하고 있으며 시간이 지날수록 이들 미생물의 수는 증가할 것으로 예상된다. Figure 4-D에 질산화 미생물이 집중적으로 분포하는 생물막의 FISH 관찰 결과를 나타내었다. Probe NSM156에 선택적으로 결합하여 녹색 형광을 나타내는 미생물들은 *Nitrosomonas* 계열의 암모니아 산화균들로 5~20 μm 크기의 aggregate를 형성하고 있다. 그 주위에 probe NSR1156에 선택적으로 결합하여 빨간색을 나타내는 *Nitrospira* 계열의 아질산 산화균들이 관찰되었다. 이는 유입 암모니아를 암모니아 산화균들이 우선적으로 기질로

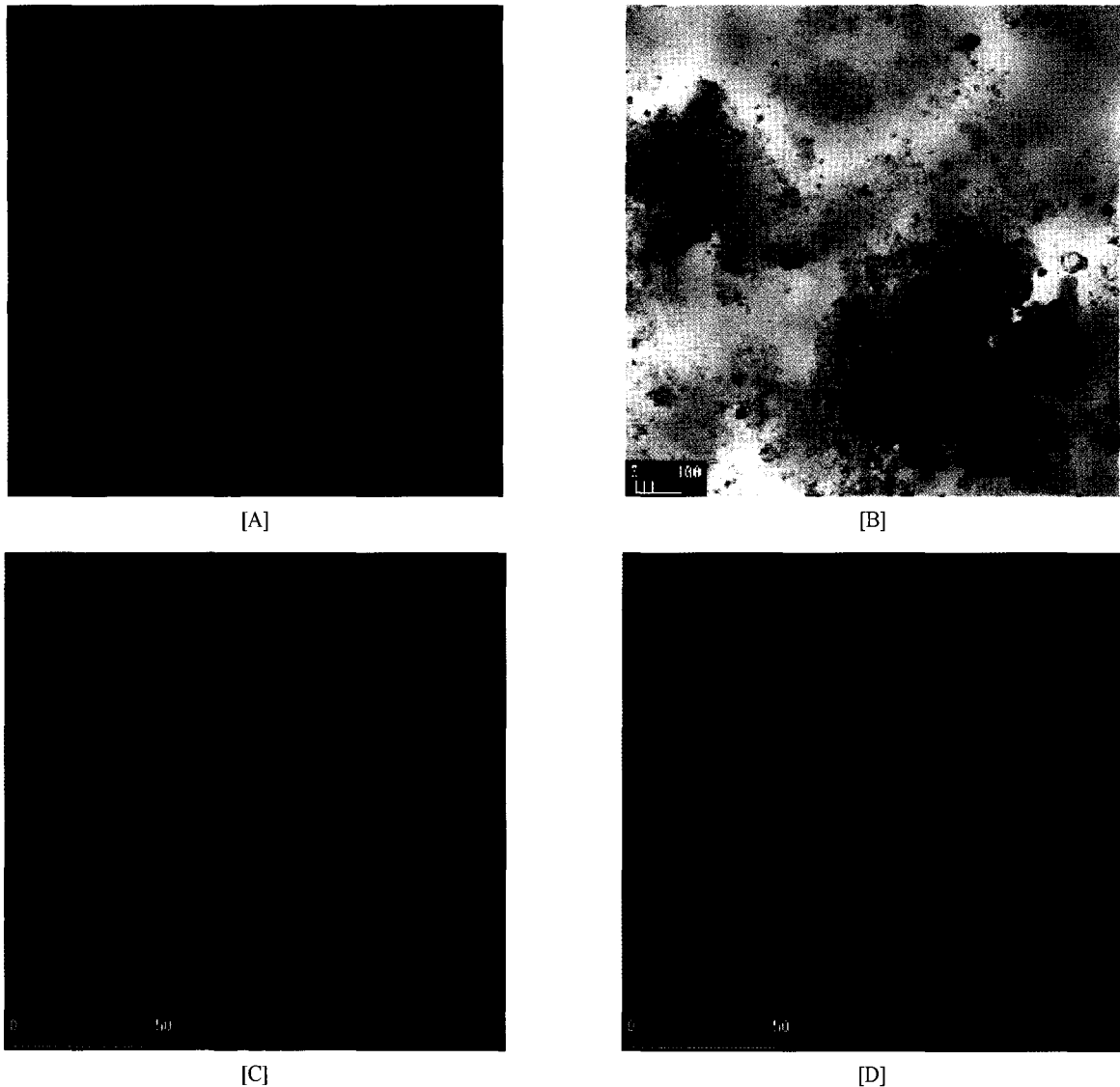


Figure 5. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) image of the ammonia oxidizing bacteria in the anoxic zone. [A] : EUB338(blue), [B] : DIC image, [C] : AIF1b(red) and BET42a(green), [D] : NSR1156(red) and NSM156(green).

사용하여 아질산으로 전환시키면 이를 곧바로 아질산 산화균들이 사용하기 위해 밀접하게 붙어서 공생하는 것으로 판단되며 이는 기존의 연구결과와도 일치하였다(6). 이 밖의 질산화 미생물 중 암모니아 산화균으로 *Nitrosospira* spp.가 관찰되었으나 *Nitrosomonas* spp.에 비해 상대적으로 매우 적은 분포를 나타내었다(data not shown). 기존에 아질산 산화균으로 일반적으로 알려진 *Nitrobacter*에 선택적인 probe NIT3와 결합하여 형광을 나타내는 미생물들은 관찰되지 않았다. Schramm 등에 의하면 FISH 기법을 포함한 분자 생물학적 방법에 의해 단지 두 곳의 생물막 반응기를 제외하곤 *Nitrobacter*가 관찰되지 않았다고 보고하고 있다(7). 또한 많은 연구 결과 *Nitrobacter*의 경우 배지의 선택성 및 다른 아질산 산화균과의 경쟁에 대한 우위성 때문에 전통적 배양, 의존적 방법에 의해 자연 환경 및 폐수처리 시설에서 우점종을 보이는 것으로 나타났다(6-11).

준혐기성(Anoxic) 반응조 내 질산화 미생물들의 동정 및 군집구조 분석

준혐기성 반응조의 경우는 하수종말처리장의 폭기조 폐수가 최초로 유입되는 곳으로 다양한 미생물뿐만 아니라 처리되지 않은 다양한 유기물질 및 부유물질이 호기성 반응조에 비해 많이 관찰되었다. 호기성 반응조에서와 같이 대부분의 미생물들은 probe EUB338과 결합하여 형광을 나타내었으며 형태학적으로 다양한 미생물 및 cluster들이 관찰되었다(Figure 5-A and B). 미생물의 종류에 따라서 probe ALF1b와 BET42a에 선택적인 *Proteobacteria*의 α 아강 및 β 아강에 속한 미생물들이 혼재되어 분포하거나 혹은 뚜렷이 구분되어 분포하였다(Figure 5-C). 질산화 미생물의 경우 호기성 반응조에 비해 현저히 적은 수가 관찰되었으며 주요 미생물은 *Nitrosomonas* 계열의 암모니아 산화균과 *Nitrosospira* 계열의 아질산 산화균과 같은 종류였다(Figure 5-D). 용존 산소가 제한된 준혐기성 반응조에서 이들 호기성 질산화 미생물들이

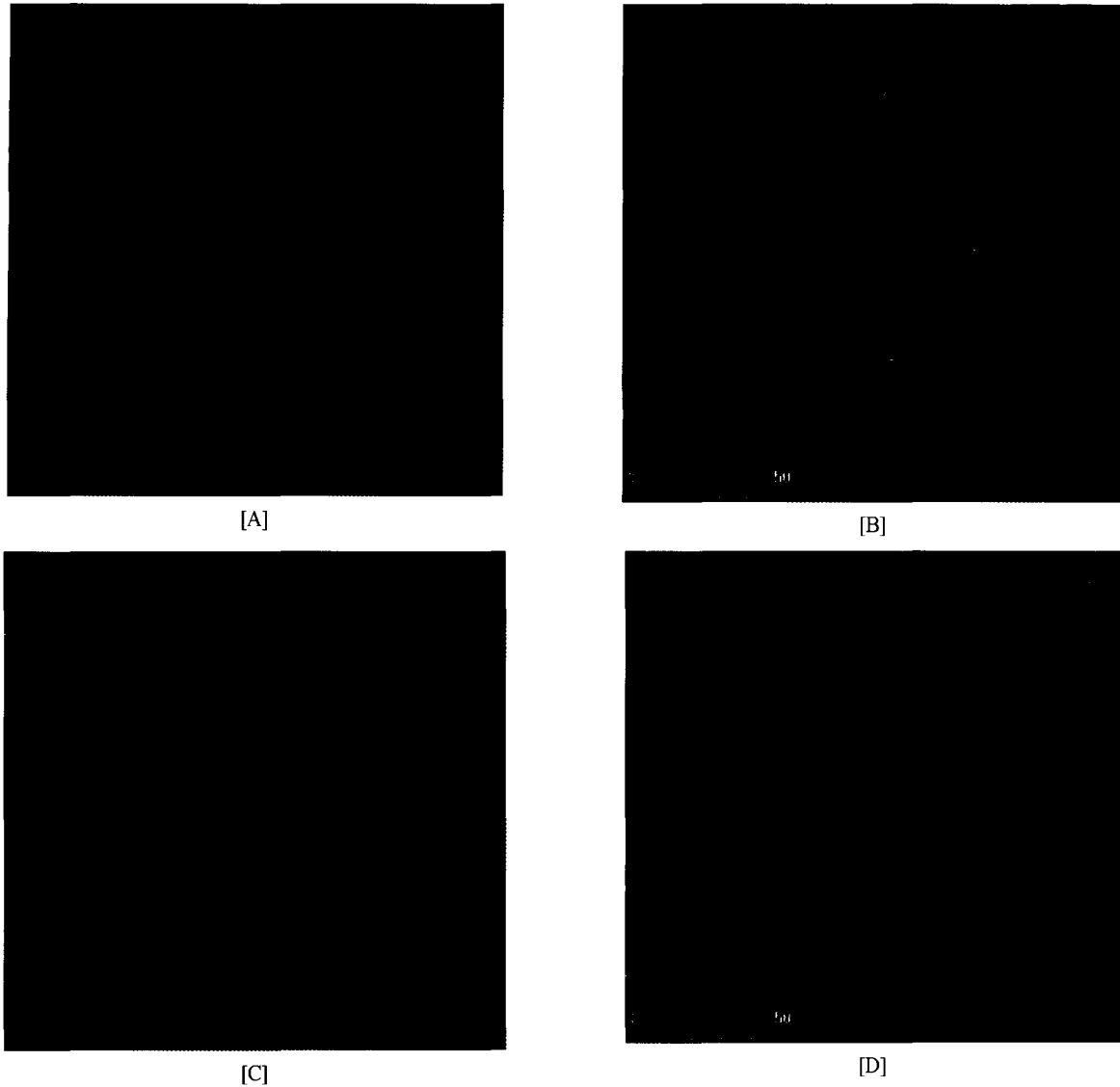


Figure 6. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) image of the denitrifying bacteria. [A] : EUB338(blue) and RRP1088(green), [B] : RRP1088(green). ([C] and [D]); anoxic zone [C] : EUB338(blue) and RRP1088(green), [D] : RRP1088(green).

관찰되는 것은 유입 폐수에 포함된 질산화 미생물들과 일부 호기성 반응조로부터 wash out된 미생물들이 반응수에 포함되어 준혐기성 반응조로 유입되기 때문일 것으로 판단된다. Probe NSV443에 선택적인 *Nitrosopira* 계열의 암모니아 산화균은 극히 일부만이 관찰 가능하였으며, *Nitrobacter*에 선택적인 probe NIT3에 결합하여 형광을 나타내는 미생물들은 호기성 반응조에서와 같이 관찰되지 않았다.

순환식 생물막 반응기 내 탈질 미생물의 동정 및 군집구조 분석

Figure 6-A와 B에 호기성 반응조 내 미생물 중 탈질 미생물들의 분포에 관한 FISH 결과를 나타내었다. *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* 그리고 *Paracoccus* 속의 탈질 미생물에 specific한 probe RRP1088과 결합하여 형광을 나타내는 미생물들은 전체 미생물의 대략 5~10% 정도를 차지하고 있었다. 반응기가 상향류 식으로 운전되어 하단의 준혐기성 반

응조로부터 이들 미생물들이 wash out되어 유입되었다하더라도 이러한 비율은 기존에 보고된 것에 비해 큰 값을 나타내었다. Figure 6-C와 D에는 준혐기성 반응조 내 탈질 미생물의 분포를 나타내었다. 호기성 반응조에 비해 약 2배 이상의 탈질 미생물들이 관찰되었으나 이 또한 전체 미생물에 비하면 적은 수임을 알 수 있었다. 이는 유입 폐수가 하수종말처리장의 1차 침전조를 거쳐 폭기조로 유입된 폐수로써 주요 호기성 미생들이 우점종을 차지하고 있으며 이들과 경쟁하면 적응하는데 오랜 시간이 필요하기 때문이다. 또한 호기성 반응조의 반응수에 높은 용존산소가 포함되어 준혐기성 반응조에 유입되므로 혐기성 탈질 미생물에 저해를 주어 이들 미생물들이 우점종을 이루기가 쉽지 않았을 것으로 사료된다.

요 약

유기물 제거뿐만 아니라 안정적으로 질소와 인의 동시 제

거를 위한 순환식 생물막 반응기를 제작, 운전하여 최적의 운전 인자를 도출하고, 질소 제거의 첫 번째 단계인 질산화 및 뒤이은 탈질에 관여하는 미생물들의 군집 구조 분석을 수행하였다.

유기물 제거와 질소와 인의 동시 제거를 위한 순환식 생물막 반응기는 143일 동안 운전되었다. 이 결과 COD_{Cr}, BOD₅, SS의 경우 각각 88, 88, 97%의 평균 제거효율을 보였다. 이 기간 중 질산화율은 약 96% 정도로 유입 NH₄⁺-N의 대부분이 제거됨을 보였다. 하지만 탈질율은 평균 45% 정도로 나타났다. 반응기로 유입되는 총 인의 경우 약 44%가 제거되었다.

질소제거의 첫 번째 단계인 질산화가 일어나는 호기성 반응조 내 질산화 미생물의 경우 FISH 관찰 결과, 주요 암모니아 산화균 및 아질산 산화균으로는 *Nitrosomonas* spp.와 *Nitrospira* spp.가 관찰되었다. 또한 탈질 반응이 일어나는 준 혐기성 반응조에서는 *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* 그리고 *Paracoccus* 속에 속하는 탈질 미생물들이 전체 미생물의 약 10~20% 정도를 차지하며 분포하였다.

감 사

본 연구는 환경부의 차세대 핵심 환경기술개발사업 및 (주) 대덕바이오의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 이수철, 박병곤, 권일 연구원은 대전·충남지역 대전환경기술개발센터 연구개발사업 연구비에 의해 일부 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Prosser, J. I. (1989), Autotrophic nitrification in bacteria, *Adv. Microb. Physiol.* **30**, 125-181.
2. Wagner, M., G. Rath, H. P. Koops, J. Flood, and R. Amann (1996), *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Wat. Sci. Tech.* **34**, 237-244.
3. Hiorns, W. D., Hastings, R. C., Head, I. M., McCarthy, A. J., Saunders, J.R., Pickup, R. W. and Hall, G. H. (1995), Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrospiras* in the environment, *Microbiology* **141**, 2793-2800.
4. Burrell, P. C., J. Keller and L. L. Blackall (1998), Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1878-1883.
5. Schramm, A., D. Beer, M. Wagner and R. Amann (1998), Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3480-3486.
6. Okabe, S., Satoh, H. and Watanabe, Y. (1999), *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3182-3191.
7. Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. (1998), Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. As dominant populations in a nitrifying Fluidized Bed reactor, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3480-3485.
8. Hovanec, T. A., Taylor, L.T., Blakis, A. and Delong, E.F. (1998), *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 258-264.
9. D.W. Han, H.J. Yun and D.J. Kim, (2001), Autotrophic nitrification and denitrification characteristics of an upflow biological aerated filter, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 1112-1116.
10. Joo, S.H., D.J. Kim, I.K. Yoo, K. Park and G.C. Cha, (2000), Partial nitrification in an upflow biological aerated filter by oxygen limitation, *Biotechnol. Lett.* **22**, 937-940.
11. S.C. Lee, H.Y. Lee and D.J. Kim, (2000), Simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized biofilm reactor with a hollow fiber double layer biofilm media, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 514-520.