

## 혐기성 암모늄 산화균의 활성화에 대한 식종미생물, 히드라진 및 아질산성 질소 농도의 영향

정진영 · 강신현 · 김영오<sup>†</sup> · 정윤철

한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터

## Effects of Seeding Microorganisms, Hydrazine, and Nitrite Concentration on the Anammox Activity

Jin-Young Jung · Shin-Hyun Kang · Young-O Kim<sup>†</sup> · Yun-Chul Chung

Water Environment & Remediation Research Center, KIST

(Received 15 March 2005, Accepted 17 May 2005)

### Abstract

Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation) bacteria is recently discovered microorganism which can oxidize ammonium to nitrogen gas in the presence of nitrite under anaerobic conditions. The anammox process can save an energy for nitrification and need not require a carbon source for denitrification, however, the start-up periods takes a long time more than several months due to the long doubling time (approximately 11 days). In order to find the effects of seeding microorganisms, hydrazine, and nitrite concentration on the enhancement of the anammox activity, five kinds of microorganisms were selected. Among the several kinds of seeding microorganisms, the granule from acclimated microorganisms treating high concentration of ammonia nitrogen (A-1) and sludge from piggery wastewater treatment plant (A-2) were found to have a high anammox activity. In the case of A-1, the maximum nitrogen conversion rate represented 0.4 mg N/L-hr, and the amount of nitrite utilization was high compared to those of other seeding microorganisms. The A-4 represented a higher nitrogen conversion rate to 0.7 mg N/L-hr although the ammonium concentration in the serum bottle was high as 200 mg/L. Meanwhile, the anaerobic granule from UASB reactor treating distillery wastewater showed a low anammox activity due to the denitrification by the remained carbon sources in the granule. Hydrazine, intermediate product in anammox reaction, enhanced the anammox activity by representing 1.4 times of nitrogen gas was produced in the test bottle than that of control, when 0.4 mM of N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> was added to serum bottle which contains 5 mM of nitrite. The high concentration of nitrite (10 mM) resulted in the decrease of the anammox activity by showing lower production of nitrogen gas compared to that of 5 mM addition of nitrite concentration. As a result of FISH (Florescence In-Situ Hybridization) experiment, the Amx820 probe showed a more than 13% of anammox bacteria in a granule (A-1).

**keywords** : Anammox, Granule, Hydrazine, Nitrite, Florescence in-situ hybridization (FISH)

## 1. 서론

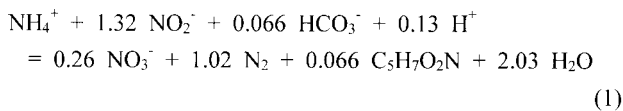
지금까지 하·폐수처리장에서 질소제거를 위해 주로 사용되고 있는 공정은 먼저 호기조에서 독립영양미생물에 의해 암모늄(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)을 아질산염(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)으로 질산화시키고, 무산소조에서 종속영양미생물에 의해 질소가스(N<sub>2</sub>) 탈질시키는 방법이다. 첫 번째의 질산화단계에서는 질산화 미생물과 충분한 양의 산소공급 및 알칼리도의 공급이 필요하며, 두 번째의 탈질산화단계에서는 적절한 양의 전자공여체(외부 탄소원)를 첨가하여야 한다.

이론적으로 암모늄은 탈질을 위한 무기물 전자 공여체로 사용될 수 있고, 이러한 혐기성 상태에서의 암모니아의 산

화는 1977년 Broda 등에 의해 그 가능성이 처음 제시되었고, 1995년 네덜란드의 Delft 대학의 Mulder 등이 최초로 실험실 규모의 배양에 성공하였다. 이러한 anammox (ANAerobic AMMonium OXidation)공정은 외부탄소원의 공급 없이 고농도의 암모니아성 질소를 질소가스로 전환시킬 수 있는 생물학적 공정이다. 이후 연속회분식반응기 (Sequencing Batch Reactor, SBR)가 anammox 미생물의 환경생리학적 연구를 위한 최적의 반응기 형태로 사용되었다 (Strous et al., 1998). Jetten 등(1999)은 anammox 미생물이 전자 공여체로서 암모니아, 전자 수용체로서 아질산을 이용하는 것을 증명하였고 미량의 산소농도에서도 큰 저해를 받았다고 보고하였다. 또한 성장률이 매우 느려 이 미생물의 배가시간(doubling time)이 약 11일이라고 하였다. Anammox 미생물 성장을 위한 pH 범위는 6.4~8.3, 온도 범위는 20~40°C 사이에서 배양되어야 한다. 그리고

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.  
yokim@kist.re.kr

anammox 미생물의 활성을 높이기 위해서 대사의 중간산물인 히드라진(hydrazine) 또는 하이드록실아민(hydroxylamine)을 소량 첨가했을 때, 활성도가 증진되었다고 보고하였다(Strous et al., 1999). 2000년에 이르러서야 분리동정 기술의 발달로 혐기 조건에서 암모니아 산화 능력을 가지는 planctomycetes와 유사한 이들 미생물을 동정하여 '*Candidatus Brocadia anammoxidans*'라고 명명하였다(Kuenen et al., 2001). 호기성 암모니아 산화균과 혐기성 암모니아 산화균을 단일 반응기에서 배양을 시도한 CANON(completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) 공정은 anammox 관련 미생물을 FISH 분석기법으로 조사한 결과 약 40%의 균집형태를 이루고 있었다고 하였다(Jetten et al., 2003). 이후 미생물에 관한 관심이 세계적으로 높아지면서 최초로 발견된 폐수처리공정에서 뿐만 아니라 혐기적 조건이 형성되는 바다의 퇴적층과 토양 등에서도 대사과정이 유사한 균들이 발견되었다(Jetten, 2001; Thamdrup et al., 2002). Anammox 미생물의 존재 및 생화학적 경로의 존재는 기존의 암모니아 및 질소의 대사 및 처리에 혁신적인 개선 가능성을 의미하는 것으로 평가된다. Anammox 미생물에 의한 질소평형은  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : \text{N}_2 = 1:1.32:0.26$  (식 (1))이며, 화학양론식은 다음과 같이 반응되는 화학합성 무기 독립영양세균 (chemolithoautotrophic bacteria)이다(Strous et al., 1998).



국내에서도 고농도 질소함유폐수처리에 anammox 미생물을 이용하기 위해 학계에서 일부 연구되고 있지만(이 등, 2004), 네덜란드와 일본 등의 선진국에 비해서는 연구성과가 높지 않은 실정이다. 본 연구에서는 국내 고농도 암모니아성 질소 폐수가 유입되는 생물학적 폐수처리장 5개 지역에서 미생물을 채취하였고, 현장에서 분취된 혐기성 슬러지와 입상 슬러지는 먼저 anammox 활성도 비교·평가를 통해 anammox 대사경로를 가지는 미생물을 확보하고자 하였다. 확보된 미생물은 아질산성 질소와 히드라진 첨가 농도에 따른 암모니아 변화를 관찰하여, 실험실규모 반응기 운전을 위한 초기 운전인자 및 식종 미생물을 확보하고자 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 식종 미생물과 배지 조성

국내 고농도 암모니아성 질소 폐수가 유입되는 생물학적 폐수처리장의 슬러지에서 anammox 활성도 평가를 위해 혐기성 슬러지와 입상 슬러지를 채취하였다. 실험은 A-1(고농도 암모니아폐수 순용 입상 슬러지), A-2(주정폐수처리용 UASB 혐기성 입상 슬러지), A-3(B지역 RBC 공정 슬러지), A-4(Y지역 축산폐수처리장 슬러지), A-5(U지역 RBC

공정 슬러지)로 구분하고, serum bottle에 전자공여체로 암모니아, 전자수용체로 아질산염, 탄소원으로 중탄산염을 사용한 배지에 미생물을 식종하였다. 온도 35°C, 150 rpm의 배양기에서 전자수용체와 전자공여체의 분해기간에 따라 운전을 달리하여 회분식으로 수행하였다. 이때 사용된 배지 조성은, 2.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM  $\text{NaNO}_2$ , 6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 미량원소 I, II 1 mL/L로 구성되어있다. 미량원소는 anammox균의 성장에 적합한 환경을 제공하기 위해 문헌에 제시된 농도와 동일하게 주입하였다(van de Graaf et al., 1996).

### 2.2. 실험장치 및 운전조건

여러 지역에서 채취된 슬러지와 입상 슬러지를 포함한 다섯종류의 식종 미생물에 대하여 anammox 활성을 평가하였다. 400 mL의 serum bottle을 이용하여 전자수용체와 전자공여체의 분해기간을 기준으로 5-step으로 운전을 달리하여 회분식 반응조에서 약 35일 동안 수행되었다. 실험은 채취된 슬러지 종류별로 구분하고 35°C, 압조건으로 운전하였다. 초기 슬러지는 2~3번의 세척을 거친 후, 각 serum bottle에 미생물 100 mL, 배지 300 mL을 채웠다. 그리고 모든 실험은 미네랄만 주입한 대조구와 기질(암모니아, 질산염)을 주입한 실험구로 수행하였다. 시료의 총 가스 및 질소 가스의 생산량은 시료의 발생가스에서 대조구 시험의 가스발생량을 빼줌으로서 가스발생량을 산정하였다.

가장 높은 anammox 활성을 가진 미생물은 160 mL의 serum bottle을 이용하여 아질산염과 히드라진 농도만을 달리하여 다시 회분식 반응조에서 실험되었다. 각 serum bottle은 미생물 50 mL과 배지 50 mL을 채운 후 아르곤 가스(99.9%)로 10분간 탈기하였다. 아르곤 탈기가 끝난 이후, bottle은 외부공기가 유입되지 않도록 butyl rubber stopper와 aluminium crimp seal로 밀봉하였다. 30분 후 초기 온도상승에 따른 발생가스를 뽑아주었다. 실험은 가스 발생이 종료되는 시점을 기준으로 아질산염 또는 히드라진만을 다시 주입하여 3 회 반복되었으며, 위와 동일한 운전 조건으로 배양기에서 수행되었다. 배지는 전자공여체( $\text{NH}_4^+$ ) 2.5 mM, 전자수용체( $\text{NO}_2^-$ ) 5~10 mM을 기준으로 각각 첨가하되, 식종미생물에 미네랄만을 첨가한 대조구 시험을 통해 비교·평가하고자 하였다. 또한 anammox 반응의 중간 대사물질로 알려진  $\text{N}_2\text{H}_4$  0.4 mM을 첨가하여 활성증진 여부를 확인하고자 하였다.

### 2.3. 실험방법

발생된 가스는 유리주사기를 이용하여 발생 가스양을 측정하였으며, Porapak Q(80/100)를 충전한 1/8인치 구경, 6 ft 길이를 가진 스테인레스 칼럼과 TCD(Thermal Conductivity Detector)를 장착한 GC(HP 6890N)로 가스성분을 분석하였다. 캐리어 가스로는 아르곤 가스를 사용하였다. pH, 알칼리도, VSS,  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 시료 분석은 Standard Methods와 수질오염공정시험법에 따라 분석하였고,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  분석은

이온크로마토그래프(DX-500, DIONEX)와 수질오염공정시험법을 병행하였다.

2.4. FISH 시험

Anammox 미생물의 군집특성을 조사하기 위하여 사용된 FISH(fluorescence in situ hybridization) 방법은 다음과 같다. 채취된 각 샘플들을 1×PBS에 2~3회 세척을 하고 4% paraformaldehyde 용액 반응을 거친 후 Tissue-Tek OCT compound(Sakura Finetek, USA)를 칩투시켜 하루 밤 동안 -38°C에서 급냉시켰다. 급냉 후 샘플을 -20°C에서 미세절단기(Reichert-Jung Cryocut 1500, Leica)를 사용하여 10~20 μm의 두께로 절단하여 젤라틴(0.1% gelatin과 0.01% chromium potassium sulfate)을 코팅시킨 슬라이드에 올려 놓았다. 슬라이드는 각각 2분씩 에탄올(50, 80과 90% ethanol)에 담구어 시료를 탈수시킨 후 hybridization 시켰다. 본 실험에 사용된 올리고뉴클레오타이드 probes의 염기 배열과 조성은 Table 1에 나타내었다. Hybridization은 46°C, 3시간동안 hybridization buffer[0.9 M NaCl, 20 mM Tris HCl(pH 7.2), 0.01% sodium dodecyl sulfate(SDS)]을 배양그릇(50 mL Polypropylene conical tube, Falcon, USA)에 담아 배양하였다. 각 슬라이드는 세척액[4.5 M NaCl, 20 mM Tris HCl(pH 7.2), 0.01% SDS]에 담아 48°C, 20분 동안 배양을 거친 후 탈이온수로 세정하여 자연건조를 시켰다(김 등, 2004). 현미경 관찰은 위상차 Neofluar 렌즈와 axiocam이 장착된 형광현미경(Axioskop 2plus, Zeiss, Germany)을 사용하였으며, 미생물 분포면적 분석은 Visual Digital Image analyzer(Zeiss, Germany)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. anaerobic ammonium oxidation 반응 평가

Fig. 1은 5개 지역에서 채취한 슬러지와 입상 슬러지를

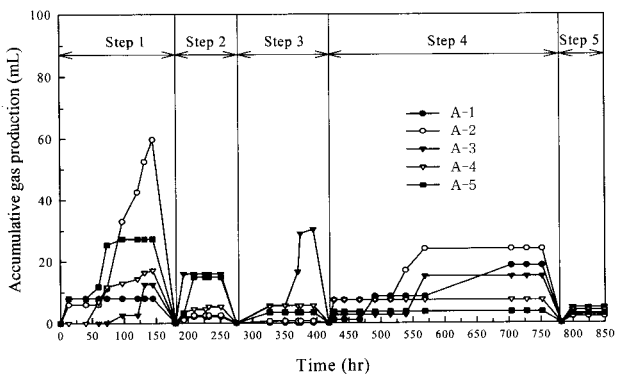


Fig. 1. Comparison of accumulative gas production at each batch reactor.

이용하여 anammox 활성 평가시 발생하는 가스의 변화를 나타낸 것이다. Anammox 회분식 반응기(A-1, A-2, A-3, A-4, A-5)를 전자공여체인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 보충시간에 따라 구별하였다. 그러나 step 4에서는 pH를 8로 조절하고 전자공여체와 전자 수용체를 같이 주입하여 가스의 발생량을 측정하였다.

모든 조건에서 질소가스가 대부분을 차지하였다. 특히, step 1에서는 축산폐수 혐기성 입상 슬러지를 주입한 A-2에서 가장 많은 60 mL의 가스가 발생되었는데, 이는 혐기 조건에 순응된 입상 슬러지를 이용함으로써 대부분이 종속 탈질(heterotrophic denitrification)에 의한 질소가스가 발생된 것으로 사료된다. Anammox 반응 과정 중 세포순응단계에서 반응초기에는 미생물의 내생 호흡에 의한 종속탈질을 나타내었다. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 제거가 진행되는 step 2에서는 RBC 공칭 슬러지를 이용한 A-3와 A-5에서 가장 많은 질소가스가 발생하는 것으로 나타났다. pH를 조절한 step 4에서는 초기에는 5조건이 거의 동일한 가스 발생을 보이다가 100 시간 후부터 step 1과 유사한 과정으로 진행되었다. 이는 미처리된 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N에 의해 탈질이 진행된 것으로 판단된다. Step 5에서는 미처리된 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N과 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 존재시 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N을 추가 주입하였을 때 모든 조건이 거의 가스를 발생하지 않는 것으로 나타났다. 과도한 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N의 존재는 탈질로 인한 pH의 증가와 더불어 세포의 활성을 떨어지게 한 결과를 보여주고 있다.

Fig. 2는 각 조건의 anammox 회분식 반응기에서 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N가 산화되는 과정에서 질소 성분들의 변화를 나타낸 것이다. 고농도 암모니아에 순응된 혐기성 입상 슬러지를 식종한 A-1의 경우, 질소전환율이 최대 0.4 mg N/L · hr로 나타났고, anammox 미생물의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 이용률이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. A-2의 경우는 혐기영역에서 탈질이 더 높게 나타나 anammox 순응이 가장 늦게 나타났다. 또한, A-3와 A-5의 경우도 과도한 질산염이 억제제로 작용하여 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 산화율이 상대적으로 낮은 것으로 조사되었다. 축산폐수처리장 슬러지를 식종한 A-4의 경우 초기 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도가 200 mg/L에도 불구하고 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 산화가 짧은 시간에 진행되어 상대적으로 0.7 mg N/L · hr의 높은 전환율을 나타내고 있다. 본 경우는 초기에는 높은 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 산화가 진행되다가 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N이 완전히 환원되기 전 과도한 주입으로 인하여 anammox 활성이 떨어지는 것으로 판단된다.

그렇지만, 다섯 종류의 식종미생물중 A-1과 A-4의 경우는 anammox 활성 평가에서 가장 좋은 질소 전환율을 보여 많은 양의 anammox 미생물이 존재할 것으로 판단되었다.

3.2. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 및 N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 첨가에 따른 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 변화

Fig. 3은 A-1 미생물(주정폐수 혐기성 입상 슬러지)에 전자수용체(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) 및 히드라진(N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)의 첨가량에 따른 누

Table 1. rRNA targeted oligonucleotide probes used this study

| Probe   | Specificity                        | Sequence(5'-3')        | Formamide conc.(%) |
|---------|------------------------------------|------------------------|--------------------|
| EUB 338 | Eubacteria                         | GCTGCCTCCCGTAGGAGT     | 20                 |
| Nso 190 | Ammonia-oxidizing β-Proteobacteria | CGATCCCCTGCTTTTCTCC    | 20                 |
| Amx 820 | Anaerobic ammonium oxidizer        | AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC | 40                 |

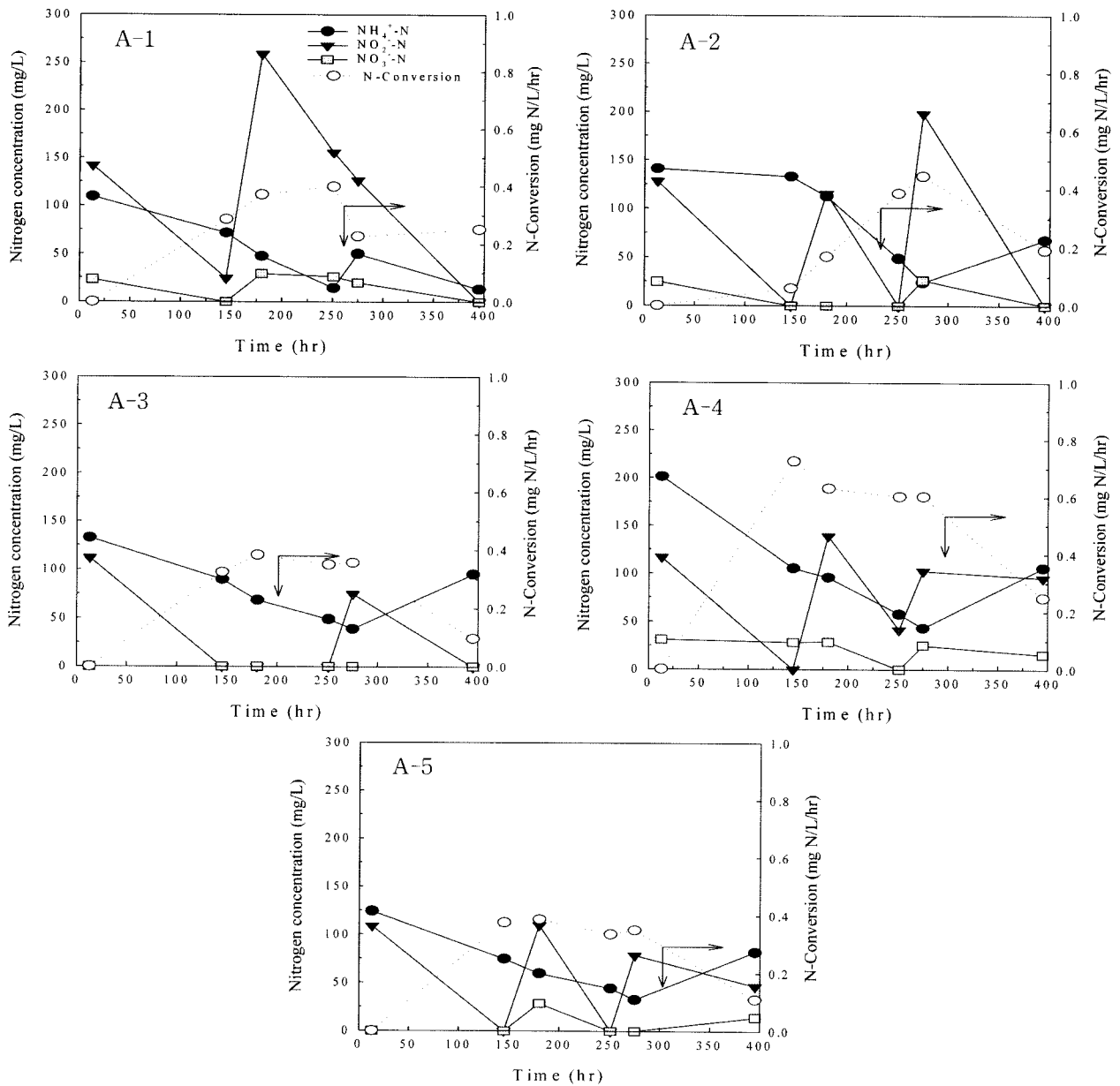


Fig. 2. Profiles of nitrogen concentration and N-conversion rate depending on reaction time at each batch reactor.

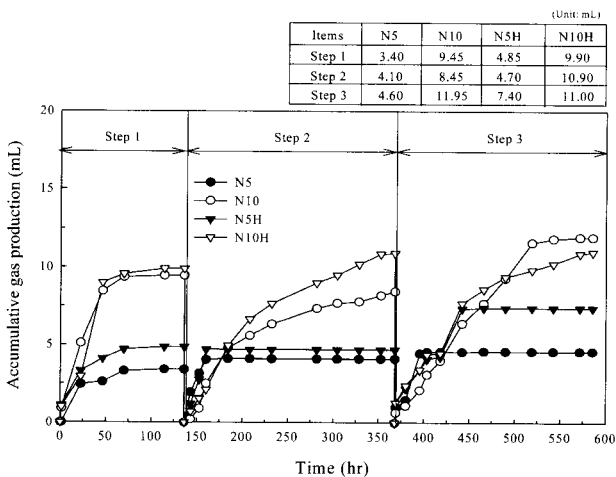


Fig. 3. Comparison of accumulative gas production for anammox activity depending on amount of electron acceptor.

적 가스발생량을 나타낸 것이다. 가스발생이 종료되었을 때  $\text{NO}_2^--\text{N}$ 을 다시 첨가한 기준으로 운전조건을 3개의 step으로 구별하여 전자수용체에 의한 순수한 anammox 반응을 평가하였다. 또한 동일조건에서 중간생성물로 알려진  $\text{N}_2\text{H}_4$ 를 첨가하여 전 단계에서  $\text{NO}_2^--\text{N}$ 을 5 mM(N5)에서 10 mM(N10)로 증가시켰을 때 평균 약 2.5배의 가스가 발생되었고,  $\text{NO}_2^--\text{N}$  5 mM에  $\text{N}_2\text{H}_4$  0.4 mM(N5H)을 첨가했을 때는 평균 약 1.4배의 더 많은 가스가 발생되었다. 이는  $\text{NO}_2^--\text{N}$ 이 anammox 반응의 전자 수용체로 이용되고 있음을 확인할 수 있으며, 반응의 중간생성물로 알려진  $\text{N}_2\text{H}_4$ 가 anammox 미생물의 활성을 증진시키는 것으로 판단된다. 동일조건에서,  $\text{NO}_2^--\text{N}$ 을 5 mM첨가한 경우(N5, N5H) 반응이 종료되는 시점이 step 1에서는 약 5일이 소요되었으나 Step 2, 3으로 갈수록 약 1일로 그 시기가 앞당겨지고 총 가스 발생량 또한 증가하여 anammox 미생물의 적응기간

및 활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있다. 따라서 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 1 mM당 평균 약 0.97 mL의 가스가 발생되었고, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N에 N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>를 첨가했을 때는 평균 약 1.03 mL의 가스가 발생되었다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 10 mM의 경우(N10, N10H) 초기 실험의 경우 약 5일의 적응기간이 필요하였으나 실험이 반복될수록 총 가스 발생량은 조금씩 증가하나 적응기간이 약 9일로 오히려 길어지고 있어, 이 농도에서 저해 영향이 관찰되었다.

Fig. 4는 각 step에서 전자수용체의 첨가량을 달리하였을 때, anammox 활성에 의해 발생되는 N<sub>2</sub> 가스의 함량의 변화를 나타낸 것이다. anammox 순응 단계의 step 1에서는 질산염의 농도를 10 mM 주입한 N10의 경우를 제외하고는 거의 비슷한 N<sub>2</sub> 가스 함량을 나타내고 있다. 이는 미생물 순응에 따른 질산염의 주입으로 주로 탈질에 의한 N<sub>2</sub> 가스의 발생이 일어난 것으로 판단된다. Step 2에서는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N이 산화됨과 동시에 anammox 활성 영역이 증가함에 따라 N<sub>2</sub> 가스의 함량이 약 60%에 도달하였다. 질산염의 농도를 5 mM을 주입한 N5와 N5H의 경우가 높은 함량을 나타내었다. Step 3의 경우 전단계와 유사한 경향을 나타내면서 전 두 조건인 경우 완전한 N<sub>2</sub> 가스로의 전환을 보여주고 있다. Anammox 미생물에 의해 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 산화의 중간생성물인 N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>의 첨가여부에 따른 N<sub>2</sub> 가스의 함량은 N5와 N5H의 경우에서는 유사하게 나타났다. 그러나 N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>를 첨가하고 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 양을 달리하였을 때, 즉 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 10 mM 보다 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 5 mM의 경우가 N<sub>2</sub> 함량이 더 높은 것으로 나타나 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 양의 조절이 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 산화에 중요한 변수로 작용하였다.

Fig. 5는 각 step에서 전자수용체의 첨가량에 따른 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도, 알칼리도 및 가스 생산량의 변화를 나타낸 것이다. Step 1에서 전자수용체를 첨가하지 않은 대조구와 비교하였을 때, N10H의 경우가 가장 상대적으로 높은 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 제거를 나타내었다. 이는 초기 10 mM의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N을 첨가함으로써 인하여 anammox 미생물의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 산화에 저해제로 작용하지 않았으나, step 2, 3에서는 오히려 고농도의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N이 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 산화에 저해 농도로 존재하는 것을 알 수 있다. 각 단계별로 살펴보면 step 1에서는 control의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도 650 mg/L와 비교할 때, N5와 N10은 각각 44 mg/L과 43 mg/L의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N이 제거되었으며, N5H와 N10H

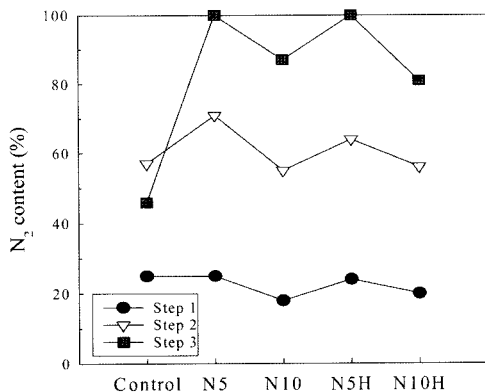


Fig. 4. Comparison of N<sub>2</sub> content depending on amount of electron acceptor at each step.

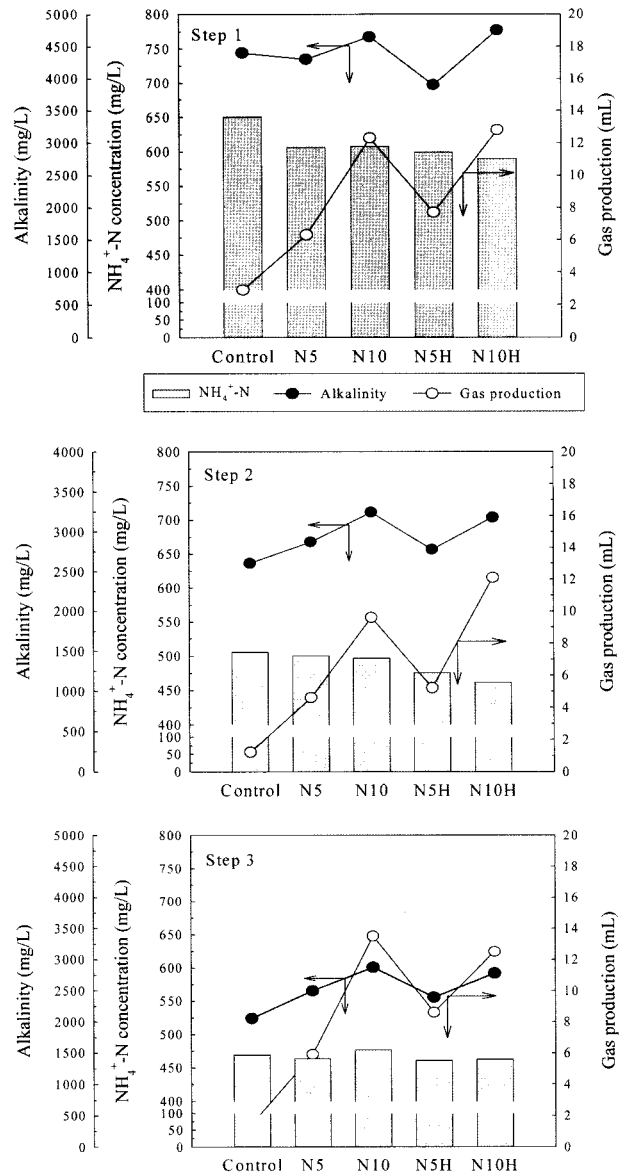
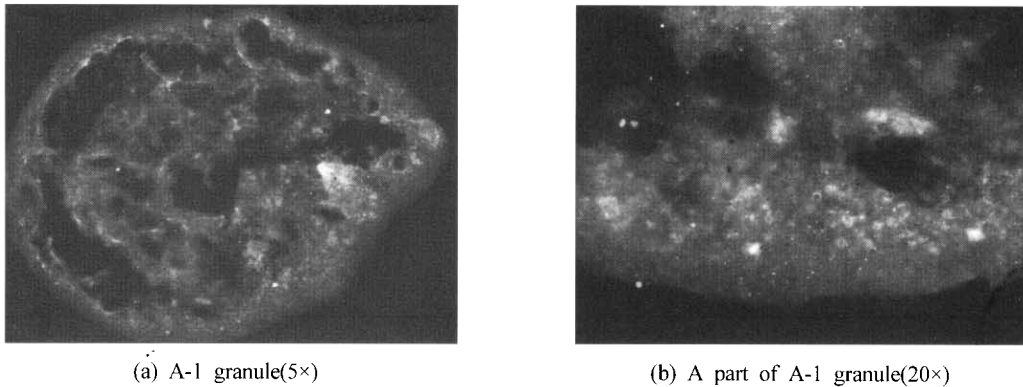


Fig. 5. Variation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal rate, gas production, and alkalinity at each step.

에서는 각각 51 mg/L, 60 mg/L의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N이 제거되었다. 총 가스 발생량의 경향과 같이, 히드라진을 첨가한 실험이 다소 높은 암모니아 제거율을 나타내었다. 이때 가스 발생량 중의 N<sub>2</sub>로 전환된 함량은 모두 20% 내외였다. 그러나 step 2, 3으로 갈수록 전체 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 제거율은 다소 둔화되었으나 가스 발생량은 조금 증가하였으며, 특히 가스 발생량 중의 N<sub>2</sub> 함량은 60% 내외에서 90% 내외의 기하학적인 증가를 나타내었다. 따라서 각 단계별로 비교해 본 결과 본 실험에 사용된 슬러지는 anammox 반응에 의해 진행되는 것으로 사료되었으며, 전자수용체의 양에 따라 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 제거율과 가스발생량이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 또한, anammox 반응의 중간생성물인 히드라진을 첨가하였을 때, anammox 반응을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.

### 3.3. 형태학적인 특성에 따른 anammox균의 군집 특성

Fig. 6은 회분식 실험 종료 후, 고농도 암모니아폐수 순



**Fig. 6.** *In situ* hybridization of A-1 granule in batch reactor. After FISH with FITC-labeled probe EUB338 (green) and Cy 5-labeled probe Nso190 and Amx820 (red) by fluorescence image analysis. Anaerobic ammonia oxidizer is visualized in yellow because of the overlapping labels.

응 입상 슬러지(A-1)에 대한 hybridization 후 검출되는 anammox 미생물의 공간분포를 나타낸 것이다. Oligonucleotide probe는 FITC-labeled 16S rRNA EUB338과 Cy 5-labeled 16S rRNA Amx820과 Nso190 probes를 사용하였으며, 면적 및 공간 분포비는 이미지 분석기를 사용하였다. Anammox 조건으로 약 30일간 배양 후 Amx820을 이용하여 hybridization 시켰을 때, 입상 슬러지의 내부 약 13%의 혐기성 암모니아 산화균(붉은색)을 확인할 수 있었다.

#### 4. 결론

- 1) 국내 5개 지역에서 채취한 슬러지와 입상 슬러지를 대상으로 anaerobic ammonium oxidation 활성도를 평가하였을 때, 고농도 암모니아에 순응된 혐기성 입상 슬러지를 식종한 A-1과 축산폐수처리장의 슬러지를 식종한 A-4의 경우가 가장 높은 활성을 나타내었다. A-1의 경우, 질소전환율이 최대 0.4 mg N/L · hr로 나타났으며, A-2(주정폐수 처리용 UASB 혐기성 입상 슬러지)의 경우는 혐기영역에서 탈질이 더 높게 나타나 anammox 순응이 가장 늦게 나타났다. 또한, A-3과 A-5(RBC 슬러지)의 경우도 과도한 아질산염이 저해제로 작용하여  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 산화율이 상대적으로 낮은 것으로 관찰되었다. A-4(축산폐수처리장 슬러지)의 경우는  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  농도가 200 mg/L이었음에도 불구하고  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 산화가 짧은 시간에 진행되어 상대적으로 0.7 mg N/L · hr의 높은 전환율을 나타내었다.
- 2) A-1 샘플에 전자수용체인  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 와 중간대사물질로 알려진 히드라진의 농도만을 달리하여 anammox 균의 활성 증진을 유도하였다.  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  5 mM과 여기에 히드라진 0.4 mM를 첨가한 실험이 각각 높은 활성을 나타내었다. 그러나 0.4 mM의 히드라진을 첨가하고  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  농도를 5 mM, 10 mM로 달리하였을 때,  $\text{N}_2$  발생량은  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  5 mM의 경우가 더 높게 나타나  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  농도가  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  산화에 중요한 변수로 작용하였음을 확인할 수 있었다.

- 3) 고농도 암모니아에 순응된 입상슬러지의 anammox균의 존재를 관찰하기 위하여 30간 배양시험한 후 Amx820으로 확인한 결과, anammox균이 군집형태를 이루면서 약 13% 정도를 차지하고 있었다.

#### 사 사

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업으로 이루어진 것으로 본 연구의 지원에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- 김영오, 박태주, 이태호, *In situ* 측정기법을 이용한 호기성 고정생물막의 형상 변화와 미생물 활성 및 분포 해석, *대한환경공학회지*, **26**, pp. 566-572 (2004).
- 이진우, 김희철, 권수열, 안영호, 독립영양 질소제거 미생물의 입상화 및 군집특성, *대한환경공학회지*, **26**, pp. 1109-1115 (2004).
- Broda, E., Two Kinds of Lithotrophs Missing in Nature, *Z. Allg. Mikrobiol.*, **17**, pp. 491-493 (1977).
- Jetten, M. S. M., Strous, M., Van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., Van Dongen, U. G. J. M., Van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M. C. M. and Kuenen, J. G., The Anaerobic Oxidation of Ammonium, *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, pp. 421-437 (1999).
- Jetten, M. S. M., New Pathways for Ammonia Conversion in Soil and Aquatic System, *Plant and Soil*, **230**, pp. 9-19 (2001).
- Jetten, M. S. M., Slikkers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., Van Niftrik, L., Cirpus, I., Van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op den Camp, H. J., Hulth, S., Nielsen, L. P., Abma, W., Third, K., Engstrom, P., Kuenen, J. G., Jorgensen, B. B., Canfield, D. E., Sinninghe Damste, J. S., Revsbech, N. P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M. and Strous, M., Anaerobic Ammonium Oxidation by Marine and Freshwater Planctomycete-like Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, pp. 107-114 (2003).

- Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., Extraordinary Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria, *Am. Soc. Microbiol. News*, **67**, pp. 456-463 (2001).
- Mulder, A., Van de Graaf, A. A., Robertson, L. A. and Kuenen, J. G., Anaerobic Ammonim Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**, pp. 177-184 (1995).
- Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool to Study Very Slowly Growing Micro-organisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, pp. 589-596 (1998).
- Strous, M., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, pp. 3248-3250 (1999).
- Thamdrup, B. and Dalsgaard, T., Production of N<sub>2</sub> through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, pp. 1312-1318 (2002).
- Van de Graaf, A. A., De Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. and Kuenen, J. G., Autotrophic Growth of Anaerobic, Ammonium-oxidizing Microorganisms in a Fluidized Bed Reactor, *Microbiology*, **142**, pp. 2187-2196 (1996).