

폐수 질산화 시스템에서 아질산 산화 미생물의 분포 특성 연구

김선희 · 김동진[†] · 유익근* · 차기철**

한림대학교 환경생명공학과 · *울산대학교 생명화학공학과 · **연세대학교 환경공학과

(2006년 6월 21일 접수, 2006년 10월 2일 채택)

A Study on the Distribution Characteristics of Nitrite Oxidizing Bacteria in Wastewater Nitrification Systems

Sun-Hee Kim · Dong-Jin Kim[†] · Ik-Keun Yoo* · Gi-Cheol Cha**

Department of Environmental Sciences and Biotechnology, Hallym University

*School of Chemical Engineering and Bioengineering, University of Ulsan

**Department of Environmental Engineering, Yonsei University

ABSTRACT : Genus *Nitrospira* and *Nitrobacter* species are the key nitrite-oxidizing bacteria(NOB) in nitrifying wastewater treatment plants. It has been hypothesized that genus *Nitrospira* are K-strategists(low K_s value) that can exploit low amounts of nitrite more efficiently than *Nitrobacter*. In contrast, *Nitrobacter* species are r-strategists(high V_{max}) that can grow faster than *Nitrospira*. It has also been known that the availability of organic compounds and dissolved oxygen as well as nitrite affects the distribution of NOB. In this study, we determined the distribution and competition of NOB in wastewater nitrification systems where nitrite, organic compounds, and dissolved oxygen concentrations were compositively varied. For the purpose, several compounds of the laboratory-scale nitrification bioreactor and full-scale A_2O wastewater treatment plant and their distribution of NOB were analyzed and compared. The analysis showed that *Nitrobacter* was the dominant NOB in nitrification bioreactor where average nitrite was maintained at 5 mg-N/L with very low organic concentration in aerobic condition, whereas *Nitrospira* was the dominant NOB in full-scale A_2O plant where nitrite was maintained very low and organic compounds were maintained relatively high in alternating aerobic-anoxic condition. The result indicates that nitrite concentration is more critical factor than organics and dissolved oxygen which determines the dominant NOB in nitrification system and it is confirmed that *Nitrobacter* and *Nitrospira* showed the characteristics of r-strategist and K-strategist, respectively.

Key Words : K/r Hypothesis, Nitrification, Nitrite Oxidation, Nitrite-Oxidizing Bacteria(NOB), *Nitrobacter*, *Nitrospira*

요약 : Genus *Nitrospira*와 *Nitrobacter*는 폐수 질산화 시스템의 대표적인 아질산 산화균으로 알려져 있다. Genus *Nitrospira*는 아질산 농도가 매우 낮은 조건에서도 이를 효율적으로 활용하는 K-strategists로 알려져 있는 반면에 *Nitrobacter* 종은 기질소비와 성장이 빠른 r-strategists로 알려져 왔다. 또한 유기물이나 용존산소도 아질산 산화균의 분포에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 아질산과 유기물, 용존산소가 복합적으로 작용하는 질산화 시스템에서 아질산 산화균의 분포와 경쟁에 어떻게 영향을 받는지를 검토하였다. 이를 위하여 실험실 규모의 질산화 생물반응기와 질산화-탈질을 수행하는 A_2O 계열의 실제 폐수처리장에서 여러 항목과 두 종류의 아질산 산화균 분포를 측정, 비교하였다. 그 결과 아질산 농도는 평균 5 mg-N/L로 유지되며, 호기조건에서 유기물이 매우 낮게 유지되는 실험실 질산화 생물반응기는 *Nitrobacter*가, 호기-무산소 조건에서 질산화-탈질이 일어나고 아질산이 거의 없는 상태이며 유기물이 비교적 높게 유지되는 A_2O 폐수처리장은 *Nitrospira*가 우점종으로 분포하였다. 이것은 여러 인자가 복합적으로 작용하는 상태에서는 아질산 산화균의 분포가 유기물과 용존산소 보다는 아질산 농도가 가장 중요한 인자임을 보여주며 기질 친화도가 낮지만 반응속도가 빠른 *Nitrobacter*가 r-strategist, genus *Nitrospira*는 기질친화도가 높은 K-strategist인 특성을 보임을 확인하였다.

주제어 : K/r Hypothesis, 질산화, 아질산 산화, 아질산 산화균, *Nitrobacter*, *Nitrospira*

1. 서론

최근 국내외적으로 효율적이며 환경 친화적인 질소제거 방법으로 Sharon 공정이나 Anammox 공정이 많은 관심 아래 연구되어 왔다.¹⁻⁴⁾ 두 공정은 공통적으로 암모니아를 아질산과

지만 산화시키는 기술이 필요한데 이를 위해서 아질산 산화균의 생리적, 생화학적 반응 특성에 대한 이해가 필요하다.

아질산을 질산으로 산화시키는 아질산 산화균에는 genus *Nitrobacter*와 *Nitrospira*에 속한 세균들이 주로 알려져 있다. 최근까지 *Nitrobacter*가 대표적인 아질산 산화균으로 알려져 있었는데 그것은 슬러지를 test tube에서 배양했을 때 *Nitrobacter*가 주로 검출되었기 때문이다.⁵⁾ 그러나 최근 몇 년 사이에 분자생물학 기술의 발전으로 폐수처리장 슬러지의 DNA 추출에 의한 16S rDNA 서열분석이나 oligonucleotide probe

[†] Corresponding author

E-mail: dongjin@hallym.ac.kr

Tel: 033-248-2154

Fax: 033-256-3420

를 이용한 16S rRNA의 in situ 분석에 따르면 *Nitrospira*가 대표적인 아질산 산화균으로 나타나고 있으며 *Nitrobacter*는 검출되지 않았다고 발표되었다.⁶⁻⁸⁾ Daims 등⁹⁾의 실험에서는 폐수처리장에서는 *Nitrospira*만이 검출되었지만 생물막 연속 회분 반응기에서는 *Nitrospira*와 *Nitrobacter*가 같이 검출되었고, 연속으로 운전되는 생물막 반응기에서는 *Nitrospira*만이 검출되었다고 보고되었다. 그러나 최근의 질산화 시스템 연구 결과에서는 *Nitrobacter*와 *Nitrospira*가 비슷하게 나타났다고 보고되었다.¹⁰⁻¹²⁾ Schramm 등¹³⁾도 용존산소가 높은 영역에 형성된 membrane biofilm에서는 *Nitrobacter*가, 용존산소가 낮은 영역에서는 *Nitrospira*가 우점화되어 있다고 하였다. 따라서 이상의 결과로부터 *Nitrobacter*나 *Nitrospira*는 폐수처리장의 환경적 요인과 두 미생물의 생리적 특성에 따라 어느 한 종이 우점화되거나 공존하는 현상이 나타나는 것으로 판단된다.

Schramm 등¹⁴⁾은 *Nitrosomonas*나 *Nitrobacter*는 반응속도 (V_{max})가 빠르나 기질에 대한 친화도(K_s)가 낮아 r-strategist로 *Nitrosospira*나 *Nitrospira*는 반응속도가 느리나 기질 친화도는 높다고 추정되어 K-strategist로 분류하였다. 최근 Kim 등¹⁵⁾은 유기물 없이 아질산을 유일한 에너지원으로 주입하는 연속흐름 생물막 반응기와 연속회분 반응기 실험을 수행한 뒤 fluorescence in situ hybridization(FISH)과 confocal laser scanning microscope(CLSM) 방법으로 반응기 내에 존재하는 *Nitrobacter*와 *Nitrospira*의 분포 비율과 이들의 활성을 조사한 결과 아질산 농도가 낮게 유지되는 조건에서는 *Nitrospira*가, 아질산이 비교적 높은 경우에는 *Nitrobacter*가 주로 분포하는 것을 알아냈다. 또한 각각의 specific activity는 *Nitrospira*에 비해 *Nitrobacter*가 높게 나타나 앞의 K, r-strategist 가설을 실험적으로 증명하였다.

아질산 외에 유기물과 용존 산소도 아질산 산화균 간의 경쟁과 분포에 영향을 줄 수 있다. 순수 배양 실험결과에 의하면 *Nitrobacter*는 nitrite/nitrate oxidoreductase에 의해 호기 조건에서 아질산을 산화해서 에너지를 얻기도 하고, 유기물(pyruvate, acetate, glycerine 등)이 존재하는 무산소 조건에서 아질산성 질소의 농도가 낮게 유지되면 높은 yield를 나타내며 nitrate를 환원한다고 알려져 있다.^{16,17)} 그러므로 *Nitrobacter*는 호기적 조건에서는 산소를 공동기질로, 무산소 조건에서는 아질산성 질소와 유기물을 놓고 종속영양미생물(heterotrophs)과 경쟁해야 하는 특징이 있다. 그러나 *Nitrospira*는 호기 조건에서 무기탄소원과 pyruvate만을 탄소원으로 이용하고 무산소 조건이나 혐기성 조건에서는 어떤 형태의 carbon도 이용하지 않는다고 밝혀졌다.^{18,19)} 따라서 유기물이 존재하는 무산소 환경에서는 *Nitrobacter*는 *Nitrospira*에 비해서 경쟁에 유리한 특성을 가지게 된다.

위의 결과와 아질산에 대한 K-r 가설을 기준으로 볼 때 아질산 산화균의 분포에는 아질산 외에 유기물과 용존산소도 영향을 끼칠 수 있으므로, 유기물과 함께 호기 조건만 있는 경우와 호기-무산소 조건이 같이 있는 경우에 이들이 어떻게 경쟁하고 분포하는지는 매우 흥미롭고 이는 폐수처리 시스템에서 질산화와 아질산 축적이 어떻게 일어나는지를 이해하

는데 도움이 될 것이다. 본 연구의 목적은 아질산과 유기물, 용존산소가 복합적으로 작용하는 질소 제거 시스템에서 아질산 산화균의 분포와 경쟁에 어떤 인자가 가장 큰 영향을 주는지를 조사하는 것이다. 이를 위해 본 연구에서는 유기물이 있고 호기-무산소 조건이 같이 있어 질산화와 탈질이 일어나는 실제 폐수처리장과 실험실 규모의 순환 유동상 생물막 반응기에서 호기 조건에서 유기물 및 질산화가 같이 일어날 때 아질산 산화 미생물간의 경쟁에 의한 분포 특성과 이들의 경쟁에 영향을 미치는 제어 인자를 고찰하려고 한다. 일반적으로 아질산이 유입 폐수에 포함되는 경우는 드물며 대부분 질산화 단계에서 암모니아가 질산성 질소로 전환되는 중간 생성물로 나타나고 이를 아질산 산화균이 이용하므로 본 연구에서는 암모니아를 기질로 이용하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 순환 유동상 생물반응기 및 폐수

본 연구에 사용된 실험실 규모의 순환 유동상 생물반응기(이하 생물반응기)는 다음의 Fig. 1과 같다. 생물반응기는 유효부피 5 L(높이 100, 본체 외경 7, 내경 4, 고액분리기 외경 10, 내경 4 cm)로 질산화가 진행되는 동안 1 M NaHCO_3 를 사용하여 반응기의 pH를 7.4±0.1 범위에서 유지하였다. 생물반응기로 유입되는 폐수의 평균 COD는 127 mg/L, 암모니아 산화균 및 아질산 산화균의 분포를 늘리기 위해 폐수처리장 유입 폐수에 암모니아성 질소($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)를 100 mg-N/L 추가하여 암모니아성 질소는 평균 120 mg/L이었으며, 유기물 부하는 $0.183 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{day}$, 암모니아성 질소 부하 $0.175 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{day}$, 반응기 내 수온은 26~28°C, 수리학적 체류시간은 16.5 h, 평균 MLVSS 0.39 g/L로 운전되었다. 대조군으로 사용된 폐수처리장은 도시 하수를 처리하는 A₂O 계열의 고도폐수처리 시설로서 유입수는 평균 COD 120 mg/L, 암모니아성 질소는 25 mg/L, 질산성 질소는 계절에 따라 0~5 mg/L로 유지되었으며 혐기, 무산소, 호기조를 포함하여 약 7시간의 수리학적 체류시간과 약 15일의 고형물 체류시간으로 운전되고 있으며 생물학적인 방법으로 질산화/탈질 및 탈인 기능을 수행한다. 유출수의 COD는 약 15 mg/L, 질산화율은 동절기에는 20~30% 정도로 낮았으나 하절기에는 100%에 가깝게 유지되었다. 질산화의 중간생성물인 아질산은 전혀 검출되지 않았다. 생물반응기 집종은 본 연구에서 대조군으로 사용된 A₂O(anaerobic-anoxic-oxic) 계열의 도시 하수를 처리하는 폐수처리장 포기조 슬러지를 이용하였다. 약 3주에 걸친 시운전 후부터 정상상태로 운전하였으며 이때 고형물 체류시간은 12~15일 범위로 운전되었다.

2.2. 폐수 분석

유입과 유출되는 시료는 GF/C filter로 여과하여 부유 물질을 제거한 후 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소를 Standard Method²⁰⁾에 의거하여 분석하였다. 암모니아성 질소는 Nesslerization method에 의해 425 nm에서 흡광도를 측

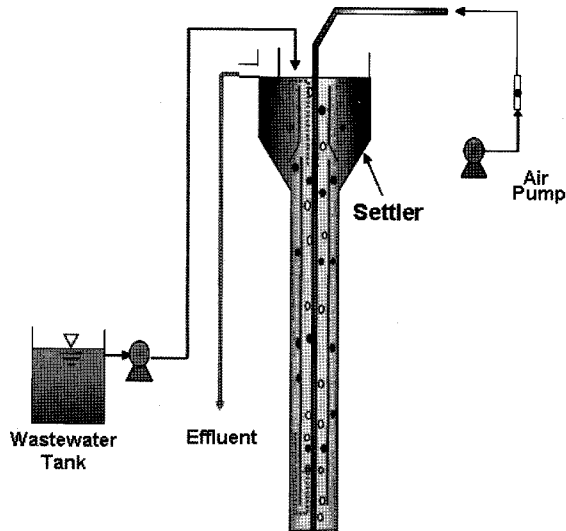


Fig. 1. Schematic diagram of the laboratory scale airlift bio-reactor for the nitrification of wastewater.

정하였다(UV 1601, Shimadzu). 아질산성 및 질산성 질소는 0.2 μm syringe membrane filter를 사용하여 한 번 더 미세 부유 물질을 거른 후 ion chromatograph(DX 500, Dionex)로 측정하였다. COD는 KMnO₄를 산화제로 이용하여 분석하였다. 반응기 내의 용존산소(Istek 215D), 온도, pH(Istek 720P) 등은 연속적으로 측정하였다.

2.3. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 방법

(1) 생물막 시료의 고정

FISH 실험은 생물 반응기의 시료를 고정시약인 4% para-formaldehyde 용액에 넣어 4℃에서 2-3시간 동안 고정한 후 phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 3회 세척하면서 고정시약을 제거한 뒤 시료를 gelatin(0.1% gelatin + 0.01% chromium potassium sulfate)으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 시료가 슬라이드에 잘 부착되도록 하기 위해서 overnight 보관한 후 ethanol 희석액(50, 80, 98%)으로 약 3분씩 탈수 과정을 수행하였다.

(2) 실험에 사용한 16S rRNA oligonucleotide probes

FISH 실험에 사용한 oligonucleotide probe와 이들의 서열, specificity 그리고 hybridization condition을 Table 1에 나타내었다. 이들 probe는 fluorescein isothiocyanate(FITC), hydrophilic sulfoindocyanine dye(Cy3)로 형광 표시하여 합성하였다(MWG Biotech, Germany).

(3) *In situ* hybridization and microscopy

고정과 탈수 과정의 전처리를 거친 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide)와 probe로 hybridization chamber에서 46℃, 120분 동안 반응시켰다.²²⁻²⁴⁾ 첨가한 probe 농도는 25-50 ng/μL로 일정하게 첨가하여 주었다. Hybridization이 끝난 후 미리 예열된 washing buffer(20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, NaCl)로 가볍게 헹구어 48℃에서 15분씩 2회의 세척 과정을 수행하였다. 세척이 끝난 시료를 증류수로 가볍게 헹구어 washing buffer를 제거해 준 뒤 공기 중에서 건조시킨 후 10 μL의 mounting medium을 첨가하고 cover slide로 덮어 시료를 완성하였다. *In situ* hybridization이 끝난 slide는 Kr/Ar ion laser (Excitation wave length 494, 550, 650 nm)가 장착된 confocal laser scanning microscope(Model: MRS-1024, Bio-Rad, U.K.)를 사용하여 관찰하였다. FISH 이미지의 특정 미생물 정량 분포 해석을 위해서는 시료 당 평균 10개의 이미지를 대상으로 이미지 프로세싱 소프트웨어(IMT i-Solution, version 3.0)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 순환 유동상 생물반응기에서 유기물과 암모니아의 동시 산화

Fig. 2는 순환 유동상 생물반응기의 운전 결과를 나타낸 것이다. 생물반응기가 정상상태에 도달한 후 암모니아와 COD는 모두 95% 이상 제거되었으며 이때 반응기의 평균 유기물 및 암모니아성 질소 부하는 각각 0.183과 0.175 kg/m³·day로 운전되었으며 평균 용존산소는 3.6 mg/L 정도였다(아래

Table 1. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study

Probe	Sepecificity	Sequence (5'-3')	FA ¹ (%)	NaCl ² (mM)	reference
EUB338I	bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	225	(22)
EUB338II	bacteria group not covered by EUB338I and EUB 338III	GCAGCCACCCGTAGGTGT			(21)
EUB338III	bacteria group not covered by EUB338I and EUB 338II	GCTGCCACCCGTAGGTGT			
Nsm156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTCGAT	5	636	(23)
Nsv443	<i>Nitrosospria</i> spp.	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	30	112	
Ntspa662	genus <i>Nitrospria</i>	GGAATTCGCGCTCTCT	40	56	(19)
Nit3	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56	(24)

¹ Percentage formamide in the hybridization buffer.

² Millimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

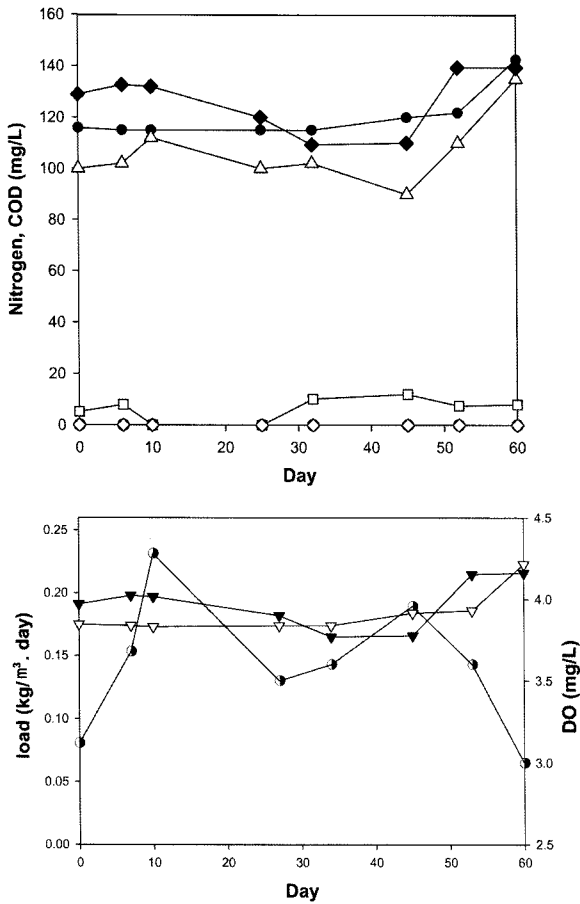


Fig. 2. Profiles of operation data in the biofilm airlift reactor for simultaneous carbon and nitrogen removal(● : input ammonium; ○ : output ammonium; □ : output nitrite; △ : output nitrate; ◆ : input COD; ◇ : output COD; ▼ : COD load; ▽ : NH4-N load; ○ : DO).

그림). 유입 폐수의 COD/N 비는 1.06으로 낮았으며 수리학적 체류시간을 길게 하여 COD 및 암모니아 부하를 낮게 운전하였고, 충분한 고형물 체류시간을 확보하여 질산화 저해가 일어나지 않아 높은 질산화율을 보였다. 암모니아 산화에 비해 아질산은 때때로 질산으로 완전 산화되지 못하고 약 10 mg/L 정도까지 축적되기도 하였다. 보통 폐수처리장에서는 아질산이 축적되는 현상은 거의 관측되지 않는다. 따라서 본 반응기에서는 호기 조건에서 유기물과 암모니아는 매우 낮은 농도 조건이고 아질산은 10 mg/L까지 축적되는 조건이라고 볼 수 있다.

아질산 축적은 아질산 산화균의 활성이 암모니아 산화균에 비해 낮거나 저해되는 경우에 일어난다. 아질산 산화균의 활성을 저해시킬 수 있는 인자는 free ammonia, nitrous acid가 일정 농도 이상 존재하거나²⁵⁾ 용존산소가 낮은 경우¹⁷⁾ 등이다. 같은 종류의 반응기에서 암모니아 농도와 부하를 높게 실험한 경우 전체 산화 암모니아의 약 80~95%가 아질산으로 축적되는 경우²⁵⁾와 비교해 볼 때 NH₄⁺-N이나 NO₂⁻-N 농도에 의해 주로 결정되는 free ammonia나 nitrous acid가 중요한 저해 인자로 작용함을 알 수 있다. 질산화가 일어나

는 도시 하수를 처리하는 폐수처리장에서의 조사 결과를 보면 암모니아성 질소가 45 mg/L 이하에서 아질산은 모든 경우 0.5 mg/L 이하로 나타나고 있어 암모니아가 낮은 경우에는 아질산이 거의 축적되지 않음을 알 수 있다.²⁷⁾

최근 연구결과에 따르면 nitrous acid가 아질산 산화균의 성장에 직접적인 저해를 준다는 결과 보고가 있었다.²⁸⁾ 그러나 실제적으로 자연계에서 아질산(또는 nitrous acid)이 직접 폐수로 유입되는 경우는 거의 없으며 질산화의 중간 산물로 아질산이 생기는 경우가 대부분이므로 초기에 아질산이 축적되게 하는 free ammonia의 역할이 아질산 축적에 중요하다고 볼 수 있다.²⁹⁾ 따라서 본 실험에서는 free ammonia가 아질산 산화균에 약간의 저해를 주며 유기물이 포함되어 있는 조건으로서 side stream의 슬러지 탈리액과 비슷한 수질 조건에서의 실험이라고 볼 수 있다.

3.2. 아질산 산화균 분포 특성 비교

아질산 영향을 무시한다면 실험실의 생물반응기는 호기 조건이며 유기물 농도가 낮게 유지되었으며 대조군으로 이용된 실제 폐수처리장은 호기와 혐기 및 무산소조가 있으며 유기물이 비교적 높게 있는 환경이다. 이러한 조건에서 아질산 산화균의 분포를 조사하였다.

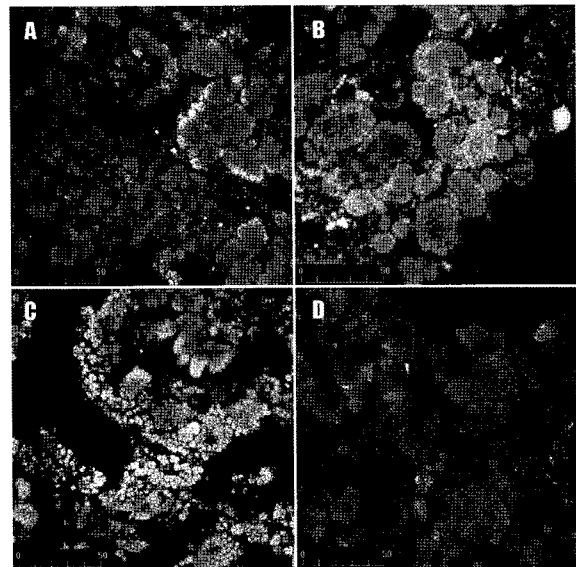


Fig. 3. FISH/CLSM images of ammonia oxidizing and nitrite oxidizing bacteria in the BAR. [A]: Simultaneous *in situ* hybridization with Cy3-labeled probe EUBMIX (EUBI + EUBII + EUBIII) and FITC-labeled probe NSM156(*Nitrosomonas* spp.), [B]: simultaneous *in situ* hybridization with FITC-labeled probe EUBMIX and Cy3-labeled probe NSV443(*Nitrosospira* spp.), [C]: simultaneous *in situ* hybridization with FITC-labeled probe EUBMIX and Cy3-labeled probe NIT3(*Nitrobacter* spp.), [D]: simultaneous *in situ* hybridization with Cy3-labeled probe EUBMIX and FITC-labeled probe NTSPA662(genus *Nitrospira*). FITC-green, Cy3-red. Bar = 50 μm.

Fig. 3은 호기 조건으로 유지된 실험실 규모 생물반응기 운전 약 60일 경과 후 반응기의 슬러지 시료를 고정하여 FISH/CLSM으로 관찰한 이미지이며 슬러지에는 암모니아 산화균으로서 *Nitrosomonas* spp.와 *Nitrosospira* spp.가 존재하였고 아질산 산화균으로는 *Nitrobacter*와 *Nitrospira*가 모두 존재하였다. 위의 생물반응기의 FISH/CLSM 그림을 image analyzer로 정량 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 전체 박테리아에 대한 *Nitrosomonas* spp.의 비율은 평균 $14.1 \pm 2.0\%$ 로 나타났고, *Nitrosospira* spp.는 평균 $3.0 \pm 1.0\%$ 로 나타났다. 즉 암모니아 산화균은 전체 미생물 대비 $17.1 \pm 3.0\%$ 분포하였다. 또한 *Nitrobacter*는 평균 $7.1 \pm 0.7\%$, genus *Nitrospira*는 평균 $2.0 \pm 0.6\%$ 로 분포하였다. 총 아질산 산화균은 $9.1 \pm 1.3\%$ 로 존재한 것으로 나타났다. 본 실험에서 생물반응기의 질산화균 분포는 뒤에 설명하는 폐수처리장의 그것에 비해 상당히 높은 값을 보이는데 이는 폐수에 인위적으로 암모니아를 추가하여 질산화 미생물이 상당히 존재할 수 있도록 한 때문이다.

대조군으로 이용된 도시하수 처리장 슬러지의 FISH/CLSM 자료(data not shown)에 따르면 계절에 따라 분포도에 약간의 차이가 있긴 하지만 암모니아 산화균으로 *Nitrosomonas*와 *Nitrosospira*, 그리고 아질산 산화균으로 *Nitrospira*와 *Nitrobacter*도 같이 존재하는 것으로 나타났으며 연 평균 분포를 조사한 결과는 Table 2와 같다.

즉, 대표적인 암모니아 산화균은 *Nitrosomonas*이고 아질산 산화균은 *Nitrospira*로 나타났으며 이는 다른 폐수처리장과 유사한 결과이다. 전체 암모니아 산화균과 아질산 산화균은 비슷한 수준으로 분포하였으며 이는 하수를 대상으로 한 다른 논문에서도 비슷한 결과를 보였다.^{14,30)}

실험실 규모의 생물반응기와 실제 규모 A₂O 폐수처리장 공히 암모니아 산화균은 *Nitrosomonas*가 *Nitrosospira* 보다 더 많이 분포하였으나 아질산 산화균 분포는 각기 달라서 생물반응기는 *Nitrobacter*가, A₂O 폐수처리장은 *Nitrospira*가 우점종으로 분포하는 결과를 보였다.

아질산에 대한 아질산 산화균의 K-r strategist 가설을 뒷받침하는 결과로 Schramm 등¹⁴⁾에 따르면 *in situ*에서 측정된 *Nitrospira*의 K_s 값은 10 μM로 *Nitrobacter*에 비해 10~60배(115~606 μM) 가량 낮은 것을 보여주고 있으며, V_{max}의 경우는 *Nitrobacter*가 200~2000배 더 높은 것으로 알려져

있다.³¹⁾ Kim 등¹⁵⁾의 경우에는 아질산 산화균의 조성 비율에 따른 회분활성 실험결과 *Nitrobacter*의 V_{max}가 *Nitrospira*에 비해 약 10배 정도 높아 아질산 농도가 아주 낮거나 제한되는 조건에서는 *Nitrospira*가, 그리고 비교적 높게 아질산 농도가 유지되는 곳에서는 *Nitrobacter*가 우점종이 된다는 것과 같은 결과를 보인 것이다.

한편 유기물과 용존산소가 *Nitrobacter*나 *Nitrospira* 분포에 어떤 영향을 주었는지를 보면 실험실 생물반응기는 호기 조건에서 유기물 농도가 상당히 낮게 유지되었고 반면에 실제 A₂O 폐수처리장은 혐기, 무산소 및 호기 조건이 같이 있고 유기물 농도가 상대적으로 높게(혐기 및 무산소 반응기의 평균 COD: 30~50 mg/L) 유지되었다. 유기물과 용존산소만 고려한다면 실험실 생물반응기는 *Nitrospira*에, 실제 A₂O 폐수처리장은 *Nitrobacter*에 유리한 조건이다.

그러나 분포조사 결과는 앞의 예상과는 달리 실험실 생물반응기에서는 *Nitrobacter*가 우점종으로 분포하였고, 혐기 및 무산소조가 포함되어 있어 유기물을 이용한 탈질이 가능한 A₂O 폐수처리장에서는 *Nitrospira*가 *Nitrobacter* 보다 많이 분포하였다. 따라서 유기물과 용존산소가 아질산 산화균의 분포에 주는 영향은 크지 않고 아질산 농도가 더 직접적인 영향을 주는 것으로 보인다. 유기물의 영향이 낮은 또 다른 이유는 Bock 등¹⁶⁾에 따르면 *Nitrobacter*의 유기물 소비속도는 아질산 소비속도에 비해 매우 낮으며 세포합성에는 유기물을 이용하지 않는 것으로 알려져서 *Nitrobacter*의 증식에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

그러나 아직까지 2종류의 *Nitrobacter*(*N. winogradsky*, *N. hamburgensis*) 외에 *Nitrospira*는 실험실에서 순수 배양이 되지 않아서 이들의 생리적인 특성이 정확히 파악이 되지 않고 있다. 이들 아질산 산화 미생물간의 경쟁은 기질인 아질산성 질소뿐만 아니라 또 다른 기질인 산소(O₂) 농도, 유기물의 존재 여부 및 농도, 미생물의 존재 형태(floc, granule, biofilm 등), 처리장의 질소제거 특성(질산화, 질산화 및 탈질)에 따라 매우 다를 것으로 예상되고 있다. 그러나 미생물 생태학적인 관점에서 볼 때 여러 기질에 대해 r-strategist와 K-strategist 특성을 갖는 아질산 산화균이 생물학적 질소제거 시스템에 고루 분포한다면 높은 효율의 처리수를 얻을 수 있을 뿐 아니라 충격부하와 같은 갑작스러운 부하 증가에도 능동적으로 대처할 수 있는 장점이 있다.⁹⁾

4. 결론

폐수처리장에서 질산화 미생물, 특히 아질산 산화균의 분포에 대한 유기물과 용존산소의 영향을 조사하기 위해 유기물 농도가 낮고 호기조건으로 유지되는 실험실 규모의 순환 유동상 생물반응기를 운전하고 그 결과를 유기물 농도가 상대적으로 높고 호기 외에 혐기, 무산소 조건이 유지되는 A₂O 계열의 실제 폐수처리장의 그것과 비교하여 분석하였다. 질산화 과정에서 중간 생성물로 생성되는 아질산의 경우 A₂O 계열의 폐수처리장에서는 전혀 검출되지 않았고, 실험실 생

Table 2. Quantification of *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrospira* and *Nitrobacter* of full-scale(A₂O) biological nutrient removal plant and lab-scale biofilm airlift reactor

Genus	Lab-scale Bioreactor ¹	Full-scale A ₂ O plant ¹
<i>Nitrosomonas</i>	14.1±2.0 ²	1.4±0.3 ²
<i>Nitrosospira</i>	3.0±1.0	0.7±0.1
<i>Nitrospira</i>	2.0±0.6	1.6±0.2
<i>Nitrobacter</i>	7.1±0.7	0.4±0.1

¹ Percent to the number of eubacteria bound with EUBMIX(EUB338I + EUB338II + EUB338III)

² Standard deviation(n = 10)

물반응기는 때때로 10 mg/L로 높게 유지되었다.

실험실 규모의 생물반응기와 실제 규모 A₂O 폐수처리장 공히 암모니아 산화균은 *Nitrosomonas*가 *Nitrospira* 보다 더 많이 분포하였으나 아질산 산화균 분포는 유기물과 용존 산소에 대한 기존 연구결과와는 달리 생물반응기는 *Nitrobacter*가, A₂O 폐수처리장은 *Nitrospira*가 우점종으로 분포하는 결과를 보였다. 이는 아질산 산화균의 기질인 아질산 농도가 서로 다른 조건 즉, 실험실 생물반응기가 A₂O 폐수처리장 보다 아질산 농도가 높게 유지된 때문으로 사료된다.

즉, 아질산 산화균은 유기물과 용존산소 보다는 아질산 농도에 따라 우점종이 결정되며 실험실 생물반응기는 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. 반면에 실제 폐수처리장에서는 아질산이 거의 없는 상태로 기질 친화도가 높은 K-strategist인 *Nitrospira*가 우점종을 차지하였다.

사 사

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2004-041-D00401).

참 고 문 헌

- Hellinga, C., Schellen, A., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J., "The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water," *Water Sci. Technol.*, **37**, 135~142(1998).
- Kuai, L. P. and Verstraete, W., "Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4500~4506(1998).
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., and Strous, M., "New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater," *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 481~492(2003).
- Third, K. A., Paxman, J., Schmid, M., Strous, M., Jetten, M. S. M., and Cord-Ruwisch, R., "Enrichment of Anammox from activated sludge and its application in the CANNON process," *Microbial Ecol.*, **49**, 236~244(2005).
- Grady, C. P. L. and Lim, H. C., "Biological wastewater treatment: Theory and applications," Marcel Dekker(1980).
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommering-Röser, A., Koops, H. P., and Wagner, M., "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira-like* bacteria as dominant populations," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3042~3051(1998).
- Schramm, A., Beer, D., Wagner, M., and Amann, R., "Identification and activities *in situ* of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3480~3485(1998).
- Burrell, P. C., Keller, J., and Blackall, L. L., "Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1878~1883(1998).
- Daims, H., Purkhold, U., Bjerrum, L., Arnold, E., Wilderer, P. A., and Wagner, M., "Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches," *Water Sci. Technol.*, **43**, 9~18(2001a).
- Coskuner, G. and Curtis, T. P., "In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* spp.," *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 431~437(2002).
- Kelly, J. J., Siripong, S., McCormack, J., Janus, L. R., Urakawa, H., Fantroussi, S. E., Noble, P. A., Sappelsa, L., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A., "DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples," *Water Res.*, **39**, 3229~3238(2005).
- Kim, D. J., Lee, D. I., and Keller, J., "Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH," *Biores. Technol.*, **97**, 459~468(2006).
- Schramm, A., Beer, D., Gieske, A., and Amann, R., "Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm," *Environ. Microbiol.*, **2**, 680~686(2000).
- Schramm, A., Beer, D., Heuvel, J. C., Ottengraf, S., and Amann, R., "Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microelectrode," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3690~3696(1999).
- Kim, D. J. and Kim, S. H., "Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics," *Water Res.*, **40**, 887~894(2006).
- Bock, E., Wilderer, P. A., and Freitag, A., "Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen," *Water Res.*, **22**, 245~250(1988).
- Prosser, J. I., "Autotrophic nitrification in bacteria," *Adv. Microbial. Physiol.*, **30**, 125~181(1989).
- Ehrlich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E., "A new obligately chemolithotrophic, nitrite-

- oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship," *Arch. Microbiol.*, **164**, 16~23(1995).
19. 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(2001b).
 20. American Public Health Association, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," 18th ed.,(1992).
 21. Daims, H., Bruhl, A., Amann, R. I., Schleifer, K. H., and Wagner, M., "The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set," *Sys. Appl. Microbiol.*, **22**, 434~444(1999).
 22. Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A., "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations," *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919~1925(1990).
 23. Amann, R. I., "In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic probes," In: Akkermans, ADL, van Elsas, JD, de Bruijn, FJ(Eds.) "*Molecular Microbial Ecology Manual*," Kluwer Academic Publications, London, pp. MEM-3.3.6/1-MEM-3.3.6/15(1995).
 24. Wagner, M., Rath, G., Koops, H. P., Flood, J., and Amann, R., "In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants," *Water Sci. Technol.*, **34**, 237~244(1996).
 25. Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., and Srinath, E. G., "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid," *J. Water Poll. Control. Fed.*, **48**, 835~852(1976).
 26. Kim, D. J., Chang, J. S., Lee, D. I., Han, D. W., Yoo, I. K., and Cha, G. C., "Nitrification of high strength ammonia wastewater and nitrite accumulation characteristics," *Water Sci. Technol.*, **47**, 45~51(2003).
 27. Kim, D. J., Kim, T. K., Choi, E. J., Park, W. C., Kim, T. H., Ahn, D. H., Yuan, Z., Blackall, L., and Keller, J., "Fluorescence in situ hybridization analysis of nitrifiers in piggery wastewater treatment reactors," *Water Sci. Technol.*, **48**, 333~340(2004).
 28. Vadivelu, V. M., Yuan, Z., Fux, C., and Keller, J., "The inhibitory effects of nitrite on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture," *Proceeding of 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference.*, pp. 287~294(2005).
 29. Kim, D. J., Ahn, D. H., and Lee, D. I., "Effect of free ammonia and dissolved oxygen on nitrification and nitrite accumulation in a biofilm airlift reactor," *Kor. J. Chem. Eng.*, **22**, 85~90(2005).
 30. Kindaichi, T., Ito, T., and Okabe, S., "Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography fluorescence in situ hybridization," *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1641~1650(2004).
 31. Laanbroek, H. J., Bodelier, P. L. E., and Gerards, S., "Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations," *Arch. Microbiol.*, **161**, 156~162(1994).