

막/생물반응기에서 Fluorescence *in situ* Hybridization 기법을 이용한 질산화 미생물 분포특성 및 질소제거 연구

임경조 · 김선희¹ · 김동진¹ · 차기철² · 유익근*

울산대학교 생명화학공학과, ¹한림대학교 환경생명공학과, ²연세대학교 환경공학부

Characteristics of Microbial Distribution of Nitrifiers and Nitrogen Removal in Membrane Bioreactor by Fluorescence *in situ* Hybridization. Lim, Kyoung-Jo, Sun-Hee Kim¹, Dong-Jin Kim¹, Gi-Cheol Cha², Ik-Keun Yoo*. School of Chemical Engineering & Bioengineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea, ¹Department of Environmental Sciences & Biotechnology, Hallym University, Kangwon 200-702, Korea, ²Division of Environmental Engineering, Yonsei University, Kangwon 220-710, Korea – An aerobic submerged membrane bioreactor (MBR) treating ammonium wastewater was studied in respect of nitrification characteristics and distribution of nitrification bacteria over a period of 350 days. MBR was fed with ammonium concentration of 500-1000 mg NH₄-N/L at a nitrogen load of 1-2 kg N/m³·d. Overall ammonium oxidation rate increased with dissolved oxygen (DO) concentration, temperature, and sludge retention time (SRT). Under a higher concentration of free ammonia (NH₃-N) due to the decrease of ammonium oxidation rate, the nitrite ratio (NO₂-N/NO_x-N) in the effluent increased. The sudden collapse of nitrification efficiency accompanied by sludge foaming and the increase of sludge volume index (SVI) was observed unexpectedly during the operation. At the later stage of operation, additional carbon source was fed to the MBR and resulted in twice higher value of SVI and the decrease of ammonium oxidation rate. In fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis, genus *Nitrosomonas* which is specifically hybridized with probe NSM156 was initially the dominant ammonia oxidizing bacteria and the amount of *Nitrospira* gradually increased. *Nitrospira* was the dominant nitrite oxidizing bacteria during whole operational period. Significant amount of *Nitrobacter* was also detected which might due to the high concentration of nitrite maintained in the reactor.

Key words: Membrane bioreactor, nitrification, nitrite, FISH

생물학적 질소폐수 처리 과정은 질산화와 탈질 단계로 크게 구분되며 각각 전혀 다른 미생물 군집에 의해 이루어진다. 생물학적 질소 처리가 흔히 어려움을 겪는 이유는 주로 질산화 미생물 때문인데, 저해물질, 기질 농도, pH, 온도 변화 등에 매우 민감하며 성장속도 및 수율이 낮은 문제점을 가지고 있다[24]. 한편, 탈질 과정은 최근 질산성 질소(NO₃-N)가 아닌 아질산성 질소(NO₂-N)로부터의 탈질이 폭기에너지 및 외부 탄소원 절감의 장점 때문에 많은 관심을 모으고 있다. 이를 유도하기 위해서는 질산화 단계에서 아질산 산화균에 의해 아질산성 질소가 질산성 질소로 완전 산화되는 것을 막아야 하는데, 현재까지 제시된 방법으로는 pH, 온도, 용존산소 농도, free ammonia 농도 등을 조절하는 방법이 알려져 있다[4, 6, 9, 26].

대표적인 질산화 균으로는 암모니아 산화균으로 *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* 속, 아질산 산화균으

로는 *Nitrobacter*, *Nitrospira* 속 등이 알려져 있다. 호기성 조건에서 유기물 산화를 일으키는 종속영양세균(heterotrophs)에 비해 이와 같은 질산화 독립영양세균(autotrophs)에 대한 이해도는 상대적으로 낮은 편이다. 현재까지 생물학적 질소 처리 연구는 주로 효율 향상 측면에서 이루어져 왔는데, 보다 정확한 공정 이해를 위해서는 질소제거 공정에서 관찰되는 미생물에 대한 정확한 실태 파악이 필요하다. 예를 들어 질소제거 미생물이 반응기에 어느 정도 존재하는지, 또는 존재한다면 충분한 활성을 보유하고 있는지 알 필요가 있다. 그러나 폐수처리 공정에 존재하는 미생물의 종류와 양을 파악하는 것은 쉽지 않고, 특히 전통적인 미생물 배양법과 현미경 관찰만으로는 불충분하거나 잘못된 정보를 얻을 가능성이 있다. 몇 년 전까지만 해도 대표적인 질산화 미생물은 암모니아 산화균으로 *Nitrosomonas* spp.와 아질산 산화균으로 *Nitrobacter* spp. 정도가 알려져 왔으나, *Nitrospira* spp.의 존재가 새롭게 밝혀지는 등[3], 분자 생물학적 방법에 의해 25종의 암모니아 산화균과 8종의 아질산 산화균이 새롭게 밝혀졌다[10]. 미생물의 종별 rRNA 특이성에 근거한 fluorescent *in situ* hybridization(FISH) 방법은 비교적 쉽게

*Corresponding author

Tel: 82-52-259-2251, Fax: 82-52-259-1689

E-mail: ikyoo@ulsan.ac.kr

미생물 군집의 구조 분석 및 정량화, 동정이 가능하여 최근 활발히 적용되고 있다[8, 25]. 질산화는 생물학적 폐수처리 공정에서도 가장 해석이 까다로운 과정으로 여겨져 왔으므로, 이와 같은 FISH 분석이 “black box”로 간주되던 질산화 반응기의 해석에 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구에서 이용한 MBR(membrane bioreactor, 막/생물 반응기)은 이미 처리효율 면에서 그 우수성이 입증된 부유 성장 시스템으로 유기물 또는 유기물/질소 처리에 대하여 많은 연구가 수행되어 왔다[17, 20]. MBR은 막에 의해 고농도의 미생물 군집을 유지할 수 있어 질산화 균은 물론, 성장속도 및 수율이 낮은 여러 가지 미생물 군집을 공정 내에 유지하는 것이 가능한데, MBR에서는 통상적으로 슬러지 체류 시간을 길게, F/M 비를 낮게 유지한다. 따라서 활성오니 등의 전통적인 시스템과는 미생물 군집 면에서 상당히 다른 특성을 보인다고 알려져 있다[5, 12]. 현재까지의 MBR 연구는 주로 유기물 산화 중심의 연구에 치우쳐 있어, 질산화 혹은 아질산 축적 반응기로서 연구된 사례는 드물다. 본 연구에서는 MBR을 질산화 시스템으로 운영하면서 여러 가지 변수에 따른 질산화 특성을 모니터링 하였는데, 특히 아질산성 질소의 축적을 유발하는 인자에 대해 살펴보았다. 또한 질소 처리 공정을 포함하여 여러 생물학적 폐수처리 시스템에 FISH를 활용한 기존 사례를 참조하여, 유기물이 배제된 고농도의 암모니아성 질소가 공급되는 질산화 MBR에서의 미생물 분포 변화를 FISH에 의해 모니터링 하여, 질산화 반응기 해석에 대한 기초 자료를 얻고자 했다.

재료 및 방법

Membrane Bioreactor 제작

반응기의 규격은 가로 7 cm, 세로 25 cm, 높이 80 cm의 직사각형 형태의 아크릴로 제작된 유효 부피(working volume) 8 liter의 반응조에 중공사 침지형 막(Mitsubishi

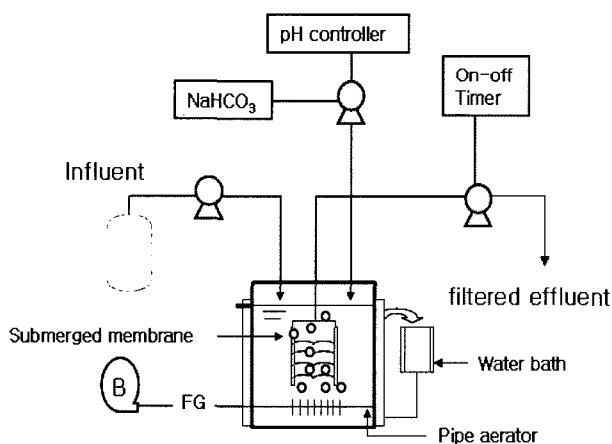


Fig. 1. Schematic diagram of submerged membrane bioreactor system.

Rayon Co., 0.2 m²)을 설치하였다. Fig. 1에서와 같이 반응기 하단에는 아크릴 파이프에 직경 1 mm의 구멍을 뚫은 porous pipe 형태의 산기관을 설치하여 blower를 이용하여 공기를 공급하였다. 유입 원수는 peristaltic pump를 이용하여 일정하게 공급하고, 흡입펌프는 diaphragm type의 펌프를 이용하였으며 흡입펌프와 침지된 막 모듈 사이에 압력계를 설치하였다. 흡입펌프는 on-off timer에 의해 작동시간과 정지시간을 조절할 수 있도록 구성하였는데 흡입 8분, 정지 2분으로 평균적으로 유지하였다.

Membrane Bioreactor 운전 조건

반응기 접종 전부터 이미 배양되고 있던 질산화 박테리아를 반응기에 접종한 후 실험을 시작하였다. 공기유량은 vent 및 유량계를 적절히 조절하여 5-10 L/min의 범위에서 실험 조건에 따라 변경하였다. pH controller에 의해 1M NaHCO₃를 이용하여 pH를 제어하였으며, water jacket에 의해 실험 조건에 따라 온도를 일정하게 유지하였다. 흡입펌프의 작동-정지 시간을 조절하여 유입수의 반응기 체류시간은 12시간으로 계속 유지되었으며, 따라서 유입수의 질소 농도가 1000 mg/L로 유지된 18일 이후에는 2 kg/m³·d, 질소 농도를 500 mg/L로 변화시킨 250일 이후에는 1 kg/m³·d의 질소 부하가 MBR에서 유지되었다. SRT를 구간에 따라 60, 20일로 각각 조절하였고, 온도는 일부 구간에서만 15°C, 나머지 구간에서는 모두 25°C로 유지하였다. 306일 이후에는 다른 운전 조건은 동일하게 유지하면서 질소 합성폐수에 유기물을 BOD 기준으로 50 mg/L 추가로 공급하여 질산화균 이외에 유기물 산화균의 성장을 증가시킬 수 있는 조건을 유지하였다.

합성폐수의 조성

질소 폐수의 경우 황산암모늄을 질소원으로 하는 합성폐수를 유입수로 사용하였으며 yeast extract에 포함된 일부를 제외하고는 유기 탄소원을 배제하였다: (NH₄)₂SO₄, 100-1000 mg N/L; NaHCO₃(as CaCO₃) 3-7.1 mg/mg N; MgSO₄·7H₂O 50 mg/L; CaCl₂·2H₂O 50 mg/L; KH₂PO₄·H₂O 50 mg/L; FeSO₄·7H₂O 2 mg/L; MnSO₄·H₂O 1 mg/L; yeast extract 50 mg/L. 운전 후반부에 유기물을 추가로 공급한 기간에는 앞의 조성에 CH₃COOH를 ThOD(theoretical oxygen demand) 기준으로 50 mg/L 첨가하였다.

분석방법

폐수의 분석은 Standard Method[1]에 따라 실시하였으며 시료는 0.45 µm GF/C 필터로 여과후 분석하였다. 암모니아성 질소(NH₄-N)의 농도는 Nesslerization 방법에 의해 425 nm에서 측정하였으며, NO₂-N, NO₃-N의 농도는 이온 크로마토그래프(Basic IC, Metrohm)로 분석하였다. NO₂-N은 Diazotization 방법에 근거한 분석 kit(Hach Laboratory

Table 1. Oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Specificity	Probe sequence (5'-3')	% FA ^a	NaCl (mM) ^b
EUBMIX				
EUB338I	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	225
EUB338II	bacteria group not covered by EUB338I and EUB338III	GCAGCACCCGTAGGTGT		
EUB338III	bacteria group not covered by EUB338I and EUB338II	GCTGCCACCCGTAGGTGT		
NSO1225	Ammonia-oxidizing β -Proteobacteria	CGCCATTGTATTACGTGTGA	35	80
NSM156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTCGAT	5	636
NTSPA662	Genus <i>Nitrospira</i>	GGAATTCCGCGCTCCTCT	40	56
NIT3	Genus <i>Nitrobacter</i>	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56
NSV443	<i>Nitrospira</i> spp.	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	30	112

^a Percentage formamide in the hybridization buffer.
^b Millimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

method 8507 kit)로도 병행 분석하였다. 용존산소 농도 측정 은 DO meter(YSI 55)를 이용하였다.

FISH

슬러지 형태의 미생물을 채취한 즉시 고정 시약인 4% paraformaldehyde 용액에 넣어 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 고정 후 phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 3회 세척하여 고정시약을 제거한 뒤 gelatin(0.1% gelatin + 0.01% chromium potassium sulfate)으로 코팅 된 슬라이드에 부착시켰다. 그 뒤에 ethanol 희석액(50, 80, 98%)으로 각각 3분씩 탈수 과정을 수행하였다[14]. 위와 같은 전처리를 거친 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide)와 probe로 hybridization chamber에서 48°C, 120분 동안 반응시켰다. 첨가한 probe 농도는 25 ng/L로 일정하게 첨가하여 주었다. 본 FISH 실험에 사용한 oligonucleotide probe와 이들의 서열, specificity 그리고 hybridization condition을 Table 1에 나타내었다. 이들 probe는 fluorescein isothiocyanate(FITC), hydrophilic sulfoindocyanine dye(Cy3, Cy5)로 형광 표식되어 합성되었다(MWG BIotech., Germany). Hybridization이 끝난 후에는 미리 예열된 washing buffer(20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, NaCl)로 46°C에서 15분씩 2회의 세척 과정을 수행하였다. 세척이 끝난 시료를 증류수로 가볍게 헹구어 washing buffer를 제거해 준 뒤 공기 중에서 건조시킨 후 10 μ L의 mounting medium을 첨가하고 cover slide로 덮어 slide 시료를 완성하였다. *In situ* hybridization이 끝난 aggregate slides는 Zeiss Axiovert 형광 현미경과 Kr/Ar ion laser(excitation wave length 494, 550, 650 nm)가 장착된 confocal laser scanning microscope (MRS-1024, Bio-Rad)를 사용하여 관찰하였다. 결과에 사용된 FISH image는 LaserSharp (Bio-Rad) program을 이용하여 얻어진 것이다. FISH 정량화를 위해서는 10여개 이상의 이미지를 대상으로 측정 한 값의 평균을 이용하였다(IMT *i*-Solution, Version 3.0).

결과 및 고찰

Free Ammonia, 용존산소 농도에 따른 질산화 특성

합성 질소폐수를 이용하여 예비 운전기간을 포함, 1년 이상 membrane bioreactor(MBR)을 운전하면서 질산화 특성을 살펴보았다. Fig. 2에 전 기간 동안의 반응기 내의 용존 산소(DO) 농도, 처리수에서의 암모니아성 질소, 아질산성 질소 (NO₂-N), 질산성 질소(NO₃-N)의 농도 변화를 나타냈다. 55일까지의 구간에서 처리수의 암모니아 농도는 100-400

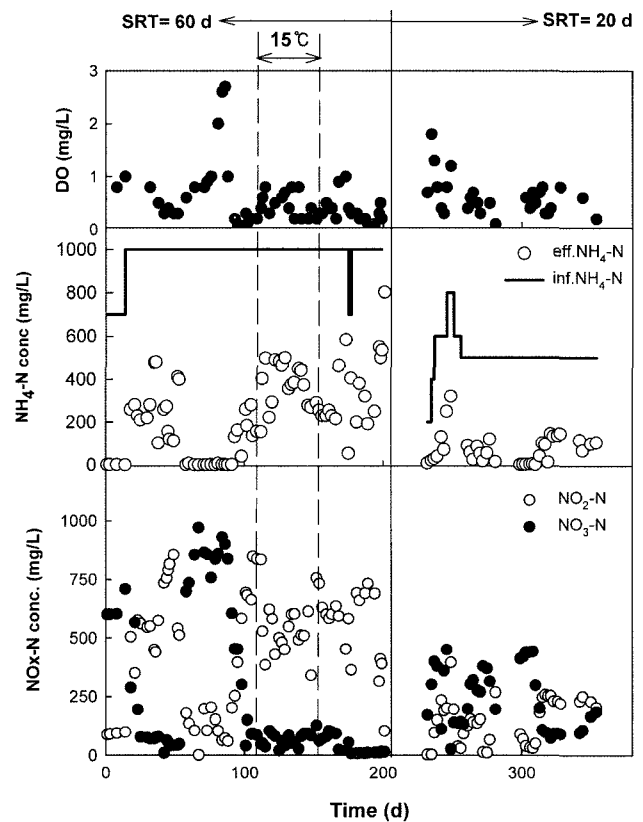


Fig. 2. Nitrification characteristics and dissolved oxygen (DO) concentration in membrane bioreactor.

mg/L 내외, NO₂-N 농도는 높게 유지되었다. DO를 낮게 유지하여 0.5 mg/L 미만에서 미세하게 조절하면 단기간 동안 처리수의 암모니아 농도를 100 mg/L 미만으로 유지하면서도 아질산성 질소의 비율을 높일 수 있었으나, 실험 장치상의 문제로 공기 공급량을 조절하여 DO를 제어하는 실험은 수행하지 못했다. 아질산성 질소의 비율이 높게 유지된 원인은 크게 두 가지로서, 용존산소에 대한 친화력 및 free ammonia(NH₃-N) 저해 정도에 대한 암모니아 산화균과 아질산 산화균의 차이 때문이다[6, 9, 24, 26]. 질산화균은 대체로 free ammonia 농도에 따라 활성을 저해받는다고 알려져 있는데, 아질산 산화균이 암모니아 산화균에 비해 더 심하게 저해를 받는다. 기존 연구에 따르면 암모니아 산화균은 8-124 mgNH₃-N/L 범위에서, 아질산 산화균은 0.1-0.8 mgNH₃-N/L에서 활성 저해가 일어났다[2]. 따라서 free ammonia 농도를 적절한 범위에서 조절하면 아질산 산화균을 선택적으로 저해할 수 있어 처리수에서 아질산성 질소 농도를 증가시킬 수 있었다. Free ammonia의 농도는 pH, 온도, NH₄⁺-N의 농도에 의존하므로[24], 본 연구에서 처리수의 NH₄⁺-N 농도가 증가할수록 아질산 산화균에 대한 저해 효과가 커지게 된다. 그러나 일정 기간이 지나면 아질산 산화균이 free ammonia에 적응할 가능성이 있어 어느 정도 수준의 free ammonia가 반응기에서 유지되어야 안정적으로 아질산 산화균을 저해할 수 있는지에 대해서는 이견이 있다[21].

한편, 암모니아 산화균은 아질산 산화균에 비해 산소에 대한 친화력이 높아서 산소 농도를 낮게 조절하면 아질산 산화균의 활성을 억제할 수 있었다[9, 15]. Free ammonia에 비해 낮은 산소 농도에 대해 아질산 산화균이 적응하는 현상은 아직 보고된 바 없다. 따라서 산소 농도를 적절히 조절하면 free ammonia 농도만을 조절하는 것에 비해서 혹은 free ammonia 저해와 병행하여 아질산 산화균을 저해하기 위한 수단이 될 수 있다. 본 연구에서도 이와 같은 두 가지 인자에 의해 아질산성 질소가 축적되는 것으로 보인다. 55일 이후에 DO 농도를 1 mg/L 내외로 증가시키면 대부분의 암모니아가 산화되면서(반응기 내의 free ammonia 농도가 감소하면서) 아질산성 질소의 비율이 감소하였고, 92일 이후에

DO 농도를 0.3 mg/L 미만으로 감소시키면 암모니아 농도가 100-300 mg/L 범위로 증가하면서 아질산성 질소의 비율이 증가하는 것을 확인하였다. 110여일 이후에는 반응기의 온도를 25°C에서 15°C로 낮춰서 운전했을 때에는 암모니아 농도는 더욱 증가하였고, 아질산성 질소의 비율은 90% 내외까지 증가하였다. 150일 이후에는 다시 온도를 25°C로 계속 유지하였다.

Table 2에서 각 운전 기간별 주요 실험값의 평균값을 계산하였다. 18-55일 기간과 58-92일 기간을 비교해보면 DO 농도에 따른 질산화 특성의 변화를 파악할 수 있다. 슬러지 당의 비 암모니아 산화율(specific ammonium oxidation rate)은 DO 농도가 높을수록 증가하였으며, free ammonia 농도는 58-92일 구간의 경우 0.04 mgNH₃-N/L 내외로 매우 낮게 유지되었고 따라서 아질산성 질소의 비율은 0.12로 낮게 나타났다. DO 농도가 0.6 mg/L 이하로 낮을 경우는 free ammonia가 8.4 mgNH₃-N/L로 높게 유지되었고 처리수에서의 아질산성 질소의 비율이 0.85 내외로 높게 나타났다. 온도가 낮아진 113-148일 구간의 경우도 비슷하게 암모니아 산화 활성의 감소와 함께 free ammonia 증가, 아질산성 질소 비율 증가가 관찰되었다.

SRT 변화에 따른 질산화 특성

190일 이후에 별다른 운전 조건의 변화가 없었음에도 암모니아 산화율이 급격히 감소하였다. 슬러지 상태 역시 약간의 색깔 변화, 과도한 거품 발생 등 비정상적인 상태가 관찰되어 이후부터는 SRT를 20일로 유지한채 반응기를 안정화시키는데 주력하였다. Fig. 2에서 200-230일 사이 구간의 data는 표시되지 않았다. 반응기가 안정화된 이후 유입수의 농도를 800 mgNH₄-N/L까지 증가시켜 보았으나 암모니아 산화율이 어느 이상 증가하지 않아 250일 이후에는 암모니아 농도를 500 mg/L으로 유지하였다. 290-305일 사이에는 처리수의 암모니아 농도가 10 mg/L 이하로 낮게 유지되면서 거의 질산성 질소로의 완전 질산화가 이루어졌다. 즉 SRT 20일 조건하에서도 free ammonia 농도가 반응기에서 낮게 유지될 경우 아질산 산화균에 대한 저해 효과가 약한

Table 2. Effect of operating conditions on nitrification characteristics.

Period	DO (mg/L)	Temp (°C)	SRT (d)	Sp. ammonium oxidation rate (gN/gMLSS · d) ^a	Free ammonia (mgNH ₃ -N/L) ^b	NO ₂ ⁻ -N/NO _x ⁻ -N ^c
Days 18 to 55	< 0.6	25	60	0.29±0.05	8.4±4.6	0.85±0.15
Days 58 to 92	0.8-2.7	25	60	0.33±0.04	0.04±0.06	0.12±0.06
Days 113 to 148	< 0.8	15	60	0.24±0.04	7.5±4.7	0.89±0.04
Days 261 to 305	< 0.7	25	20	0.43±0.04	0.8±0.7	0.23±0.17

^a (Influent NH₄⁺-N - Effluent NH₄⁺-N)/(sludge concentration in reactor)(hydraulic retention time)

$${}^b \text{NH}_3 - \text{N} = \frac{\text{NH}_4 - \text{N} \times 10^{\text{pH}}}{\exp \frac{6344}{273 + T} + 10^{\text{pH}}}$$

^c NO₂⁻-N/(NO₂⁻-N+NO₃⁻-N) in effluent

Table 3. Effect of organics addition in a nitrifying membrane bioreactor.

(temp=25°C, SRT=20d)

Period	Influent	MLSS (mg/L)	SVI	Sp. ammonium oxidation rate (gN/gMLSS · d) ^a	Free ammonia (mgNH ₃ -N/L) ^b	NO ₂ ⁻ -N/NO _x ⁻ -N ^c
Days 261 to 305	500 mgN/L	2100	67	0.43±0.04	0.8±0.7	0.23±0.17
Days 306 to 354	500 mgN/L + 50 mgBOD/L	2350	117	0.34±0.04	3.5±2.2	0.67±0.09

^a (Influent NH₄⁺-N - Effluent NH₄⁺-N)/(sludge concentration in reactor)(hydraulic retention time)

$$^b NH_3 - N = \frac{NH_4 - N \times 10^{pH}}{\exp \frac{6344}{273 + T} + 10^{pH}}$$

^c NO₂⁻-N/(NO₂⁻-N+NO₃⁻-N) in effluent

것으로 보인다. Table 2에서 SRT 20일로 유지된 261-305 일 기간에 대한 평균값을 보면 SRT 60일 조건인 18-55일 구간에 비해 비 암모니아 산화율 값이 0.43으로 증가하였다. 그러나 SRT 20일에서는 반응기 내의 슬러지 농도가 2000 mg/L 내외로 낮아 반응기 부피 당의 총괄 암모니아 산화율(gN/L · d)이 감소하므로, 비 암모니아 산화율과 총괄 암모니아 산화율을 고려한 적절한 SRT를 찾아야 할 것으로 보인다.

유기물 공급에 의한 질산화 특성 변화

Fig. 2에서 유기물이 공급된 306일부터는 DO 농도가 감소하면서 처리수의 암모니아 농도 및 free ammonia 농도가 점차 증가하였고, 이로 인해 아질산성 질소의 비율이 증가하였다. Table 3에 유기물이 투입된 이후의 질산화 특성 변화를 비교하였다. 유기물이 추가로 투입된 결과 MLSS는 2100에서 2350 mg/L 내외로 10% 정도 증가하였고 특히 SVI 값이 67에서 117로 증가하였다. 즉, 유기물 산화균의 비율이 증가함에 따라 질산화 우점 슬러지에 비해 침전성이 나빠지는 모습으로 통상적인 폐수 처리장의 SVI 값에 근접해 가는 결과이다. 비 암모니아 산화율 역시 감소하여 free ammonia가 3.5 mgN/L로 증가하였고 이로 인해 아질산 비율도 0.67로 증가하였다. 유기물 투입 이외에 다른 운전 조건은 동일하게 유지하였기 때문에, 이러한 결과는 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 DO 농도 감소로 인한 암모니아 산화율의 감소 때문으로 판단된다.

질산화 슬러지의 벌킹 현상

Fig. 3에 슬러지 농도(MLSS)와 sludge volume index (SVI)의 변화를 나타냈다. SRT 60일 구간에서는 MLSS 농도가 5,500-7,000 mg/L 사이에서 유지되었고 SRT 20일에서는 2,000-2,500 mg/L 내외로 유지되었다. 110일 부근의 급격한 MLSS 감소는 반응기 운전 사고로 슬러지가 외부로 유출된 결과로 이후 점차 회복하는 모습을 보인다. DO 농도가 높았던 60여일 이후 구간에서는 SVI 값이 점차 100 이하까지 감소하였으나 질산화 효율이 감소된 110일 이후의 구간에서는 슬러지 농도가 낮았음에도 SVI 값이 200 내외

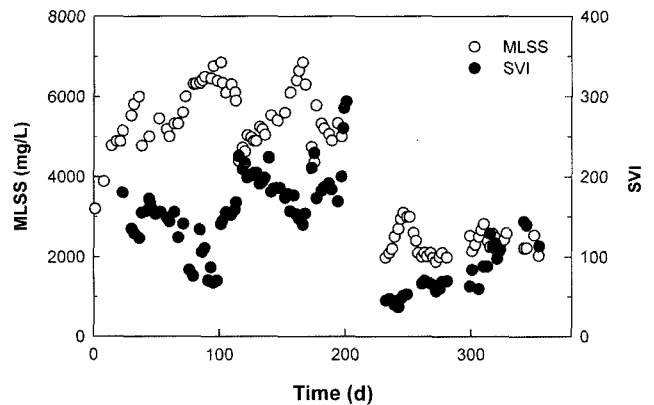


Fig. 3. Variation of sludge concentration (MLSS) and sludge volume index (SVI).

까지 증가하였다. 즉, 질산화 슬러지의 활성과 침전성 지표는 밀접한 관계가 있는 것으로 보이며, 질산화 효율이 악화되었던 160-200일 구간에서도 SVI는 약 150에서 300까지 증가하였다. 이때 MLSS 농도는 크게 변하지 않았기 때문에 슬러지의 활성 감소는 단위 미생물당 비산화 효율(specific ammonium oxidation rate, g/gMLSS · d)의 감소라고 할 수 있다. 외부 순환형 막을 이용한 MBR의 질소 제거 연구에서도 본 연구와 비슷하게 원인을 알 수 없는 효율 감소가 일어났다[7]. 이때 질산화 효율의 감소 및 foam 형성이 관찰되었으며, 이와 같은 효율 저하가 일어나는 원인으로 슬러지의 고액 혼합액을 외부의 막 여과를 위해 재순환시킬때 슬러지에 부과되는 shear stress를 지목하였다. 그러나 본 연구에서는 침지형 막을 사용했기 때문에 그러한 설명이 적절치 않다. 전형적인 폐수처리장에서 SVI가 증가하는 원인으로서는 흔히 과도한 기질 부하, 낮은 DO 농도 등을 지목하는데, 본 연구에서는 질소 부하가 2 kg/m³ · d로 매우 높았고 DO 농도는 질산화 폐수처리장에서의 추천 조건인 2 mg/L 이상이 아닌 0.5 mg/L 근처의 매우 낮은 값으로 장기간 유지된 점이 원인 중의 하나로 짐작된다. SRT가 20일로 유지된 230-310일 사이의 구간에서는 SRT가 90 이하로 매우 낮았고, 시각적으로도 상등수가 다른 구간에 비해 투명하였다.

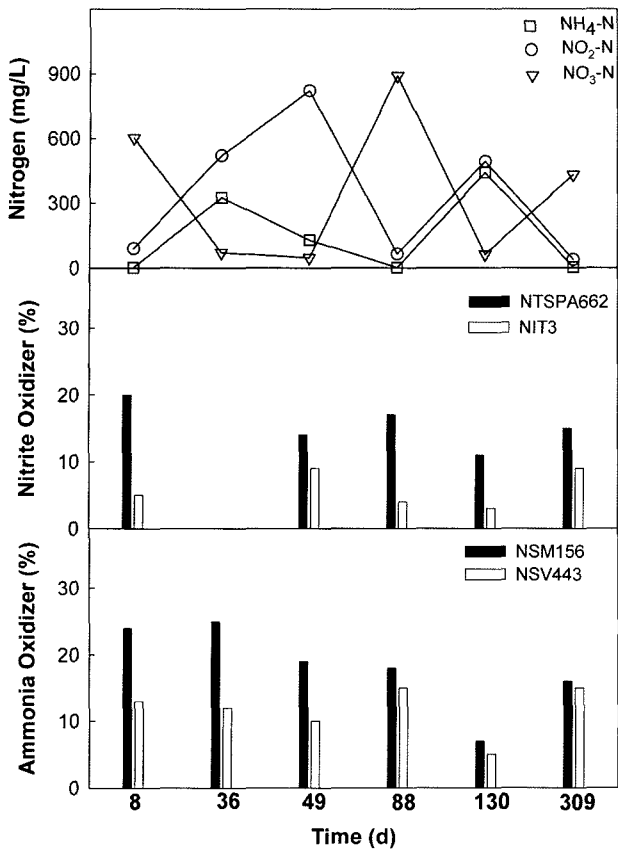


Fig. 4. Ratios of nitrifying bacteria relative to eubacteria and nitrogen concentrations during whole operational period. NSM156 (*Nitrosomonas* spp.), NSV443 (*Nitrosospira* spp.), NTSPA662 (Genus *Nitrosospira*), NIT3 (*Nitrobacter* spp.).

FISH에 의한 질산화 미생물 분포 분석

질산화가 일어나고 있는 MBR에서 FISH에 의해 질산화 미생물 분포를 확인하였다. Fig. 4는 특정한 날짜에 채취된 MBR 슬러지에서서의 암모니아 산화균과 아질산 산화균의 분포 비율 변화를 나타낸 것이다. 전체 박테리아를 대표하는 FISH probe로는 EUBMIX(EUB338I + EUB338II + EUB338III)를 선택하였으며, 암모니아 산화균 probe로는 *Nitrosomonas* spp.에 특이적인 NSM156, *Nitrosospira* spp.에 특이적인 NSV443을 이용하였다. 아질산 산화균 probe는 genus *Nitrosospira*에 특이한 NTSPA662, genus *Nitrobacter*에 특이적으로 결합하는 NIT3을 선택하였다. 그럼에서 나타낸 비율은 EUBMIX probe에 결합되는 전체 박테리아 대비, 질산화균 probe에 결합하는 슬러지 면적의 상대적인 비율로서 나타낸 것이다. 질소 농도는 FISH 분석을 위해 슬러지를 채취한 날 전후로 3회 이상의 처리수 농도(Fig. 2)에 대한 평균값을 취한 것이다. 운전 시작후 8일째, 암모니아 산화균은 *Nitrosospira*에 비해 *Nitrosomonas* 비율이 거의 2배 정도 높았고, 아질산 산화균에서는 *Nitrobacter*에 비해 *Nitrosospira*의 비율이 매우 높았다. 암모니아 산화균의 경우 *Nitrosospira*

의 비율이 88일부터는 *Nitrosomonas*와 비슷할 정도로 증가하고 있다. 130일째 샘플은 질산화 활성이 크게 감소한 구간으로 암모니아 산화균, 아질산 산화균 모두 다른 구간에 비해 감소하였다. 아질산 산화균은 *Nitrosospira*가 우점하였으나 *Nitrobacter* spp. 역시 운전 기간 내내 검출되었다. 그러나 아질산성 질소의 비율과 *Nitrosospira* spp.와 *Nitrobacter* spp.의 분포비율 사이에는 큰 상관관계가 없어 보인다.

Liebig 등[11]의 MBR 연구에서는 *Nitrobacter*는 검출되지 않았고 *Nitrosospira*만이 검출되었으며, 처리수의 아질산성 질소 농도가 0.5 mg/L 이하로 완전 질산화가 이루어졌다. 반면에, 본 연구에서는 아질산성 질소의 농도가 대체로 높게 유지된 것이 큰 차이점이다. *Nitrosospira*는 *Nitrobacter*에 비해 높은 기질 친화성과 낮은 성장속도를 지닌다고 알려졌는데[18], 본 연구에서 높게 유지된 아질산성 질소가 *Nitrobacter*의 성장에 우호적인 환경을 제공한 것으로 보인다. Liebig 등[11] 외에도 최근의 아질산 산화균 연구에서는 *Nitrosospira*의 중요성을 강조하여, *Nitrobacter*는 통상적인 활성오니 시스템에서의 아질산 산화와 관련이 없다거나 역할이 미미하다고 주장하고 있다[17, 23]. 이러한 이유로는 일반적인 활성오니 시스템 혹은 질산화 연구에서는 질산성 질소로의 완전 질산화가 일어나는 조건 하의 슬러지가 분석되기 때문으로 추측된다. 또한, 질산성 질소로의 완전 질산화가 유지된 반응기에서는[11, 24] 아질산 산화균의 양이 암모니아 산화균에 비해 많았다고 보고되었으나, 본 연구에서는 2가지 종류의 암모니아 산화균의 합계(130일 째의 샘플을 제외하고) 30-37%, 아질산 산화균의 합은 21-25%로서 암모니아 산화균의 비율이 더 높게 나타났다. 결국 본 연구에서 유지된 MBR 내에서의 아질산 산화균의 성장 저해와 아질산성 질소 축적과의 상관 관계가 FISH 분석에서도 잘 보여지고 있다.

Liebig 등[11]의 MBR에서는 완전 질산화가 일어났기 때문에 높은 농도의 DO가 유지되었을 것인데, 암모니아 산화균의 경우 *Nitrosomonas*만이 검출되었고 *Nitrosospira*는 발견되지 않았다고 보고하였다. 슬러지 체류가 없는 CSTR 형태의 질산화 시스템인 SHARON 반응기에서는 암모니아 산화균의 약 50-70%가 *Nitrosomonas* 계열로 보고되었다[13]. 본 연구에서도 *Nitrosomonas*가 우점하였으나 *Nitrosospira*의 비율이 점차 증가하였는데, 앞의 연구에 비해 본 연구에서는 산소 농도가 매우 낮게 유지되었고 SRT가 60일로 유지된 점이 차이점이라고 할 수 있다. 한편으로는 무산소-호기 공정으로 구성된 질산화-탈질 MBR 시스템에서의 FISH 결과에서는 NSM156, NIT3 probe에 각각 특이적으로 결합하는 *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*가 전혀 검출되지 않았다고 보고되었다[20]. 오직 *Nitrosospira* spp., *Nitrosospira* spp.만이 10.5-15.8% 정도의 비율로 검출되었으며, 운전 조건을 고려해 볼때 *Nitrosospira*, *Nitrosospira*가 상대적으로 산소에 대한 친화력이 강하거나 혹은 다른 종류의 전자 수용체를 이용하

기 때문일 것이라고 추측되었다.

기존의 FISH 분석에 의한 몇 가지 사례와 비교해 볼 때, 본 연구에서의 질산화균 분포 결과는 아질산 산화균의 경우 기존 연구 결과를 뒷받침하거나 유사한 결과를 보이기도 했지만, 암모니아 산화균의 경우 서로 상반된 결과를 보이는 하는 등 아직까지 정확하게 질산화균의 분포 특성에 대해서 결론을 내리기는 어려워 보인다. 그럼에도 향후 질산화 시스템의 정확한 해석을 위해서는 슬러지에 존재하는 특정 미생물의 분포 특성과 이와 관련된 활성을 예측하는 것이 무엇보다 중요하므로, 보다 다양한 probe와 운전 조건 하에서의 후속 연구가 뒤따라야 할 것으로 보인다.

요 약

침지형 막/생물반응기에 암모니움 합성폐수를 공급하여 약 350일 동안 운전하면서 질산화 특성 및 미생물의 분포 변화를 살펴보았다. 원수의 암모니움 농도는 500-1000 mgNH₄-N/L, 질소 부하는 1-2 kgN/m³·d로 공급하였고, 용존산소(DO) 농도, 슬러지 체류시간(SRT), 온도 변화에 따른 질산화 효율, 아질산성 질소의 비율, 슬러지 농도, sludge volume index(SVI) 변화를 모니터링 하였다. DO 농도, 온도, SRT 증가에 따라 암모니움 산화율은 증가하였으며, 이와 같은 암모니움 산화율의 감소로 MBR 내에서 free ammonia(NH₃-N) 농도가 증가할 경우 처리수에서 아질산성 질소의 비율이 높아졌다. 운전 기간 중 원인이 뚜렷하지 않은 질산화 효율의 급격한 감소가 관찰되었는데, 이때 슬러지 벌킹 및 SVI 값의 증가가 동시에 수반되었다. 운전 후반부에 질산화균이 우점된 MBR에 추가로 유기물을 공급하면, SVI 값이 2배로 증가하였고 암모니움 산화율은 감소하였다. FISH 분석에서 나타난 MBR 내의 미생물 분포는 암모니아 산화균의 경우 *Nitrosomonas*가 우점하였으나 운전 후반부로 갈수록 *Nitrospira*의 비율이 *Nitrosomonas*와 비슷할 정도로 증가하였다. 아질산 산화균은 *Nitrospira*가 우점하였지만 *Nitrobacter* 역시 운전기간 내내 관찰되었는데, 이는 MBR 내에서 높게 유지된 아질산성 질소가 *Nitrobacter*의 성장에 도움을 준 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2003년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2003-002-D00086).

REFERENCES

1. APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed., Washington DC.
2. Anthonisen, A. C., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam, and E. G. Stinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitric Acid. *J. Water Pollut. Con. F.* **48**: 835-852.
3. Daims, H., J. L. Nielsen, P. H. Nielsen, K. H. Schleifer, and M. Wagner. 2001. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5273-5284.
4. Fdz-Polanco, F., S. Villaverde, and P. A. Garcia. 1994. Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters : activation and free ammonia inhibition. *Water Sci. Technol.* **30**: 121-130.
5. Gao, M., M. Yang, H. Li, Q. Yang, and Y. Zhang. 2004. Comparison between a submerged membrane bioreactor and a conventional activated sludge system on treating ammonia-bearing inorganic wastewater. *J. Biotech.* **108**: 265-269.
6. Garrido, J. M., M. C. M. van Loosdrecht, and J. J. Heijnen. 1997. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **53**: 168-178.
7. Ghyoot, W., S. Vandaele, and W. Verstraete. 1999. Nitrogen removal from sludge reject water with a membrane-assisted bioreactor. *Water Res.* **33**: 23-32.
8. Han, D. W., J. S. Chang, and D. J. Kim. 2002. Nitrifying microbial community analysis of nitrite accumulating biofilm reactor by fluorescence *in situ* hybridization. *Water Sci. Technol.* **47**: 97-104.
9. Kim, D. J., J. S. Chang, D. I. Lee, D. W. Han, I. K. Yoo, and G. C. Cha. 2003. Nitrification of high strength ammonia wastewater and nitrite accumulation characteristics. *Water Sci. Technol.* **47**: 45-51.
10. Koops, H. P. and A. P. Roser. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**: 1-9.
11. Liebig, T., M. Wagner, L. Bjerrum, and M. Denecke. 2001. Nitrification performance and nitrifier community composition of a chemostat and a membrane-assisted bioreactor for the nitrification of sludge reject water. *Biopro. Biosys. Eng.* **24**: 203-210.
12. Lim, B. R., K. H. Ahn, P. Songprasert, S. H. Lee, and M. J. Kim. 2004. Microbial community structure in an intermittently aerated submerged membrane bioreactor treating domestic wastewater. *Desalination* **161**: 145-153.
13. Logemann, S., J. Schantl, S. Bijvank, M. Loosdrecht, J. G. Kuenen, and M. Jetten. 1998. Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. *FEMS Microb. Ecol.* **27**: 239-294.
14. Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria : problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
15. Pollice, A., V. Tandoi, and C. Lestingi. 2002. Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Res.* **36**: 2541-2546.
16. Rosenberger, S., U. Kruger, U. Witzig, R. Manz, U. Szwedzyk, and M. Kraume. 2002. Performance of a bioreactor

- with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Res.* **36**: 413-420.
17. Schramm, A., D. de 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**: 3480-3485.
 18. Schramm, A., D. de Beer, J. C. van den Heuvel, S. Ottengraf, and R. Amann. 1999. 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 microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3690-3696.
 19. Shim, J. K., I. K. Yoo, and Y. M. Lee. 2002. Design and operation considerations for wastewater treatment using a flat submerged membrane bioreactor. *Process Biochem.* **38**: 279-285.
 20. Sofia, A., W. T. Liu, S. L. Ong, and W. J. Ng. 2004. In-situ characterization of microbial community in an A/O submerged membrane bioreactor with nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* **50**: 41-48.
 21. Turk O. and D. S. Mavinic. 1989. Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Res.* **23**: 1383-1388.
 22. Urbain, V., B. Mobarry, V. de Silva, D. A. Stahl, B. E. Rittmann, and J. Manem. 1998. Integration of performance, molecular biology and modeling to describe the activated sludge process. *Water Sci. Technol.* **37**: 223-229.
 23. Wagner, M., G. Rath, H. P. Koops, and R. Amann. 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* **34**: 237-244.
 24. Wiesmann, U. 1994. Biological nitrogen removal from wastewater. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* **51**: 692-699.
 25. Witzig, R., W. Manz, S. Rosenberger, U. Kruger, M. Kraume, and U. Szewzyk. 2002. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Res.* **36**: 394-402.
 26. Yoon, H. J. and D. J. Kim. 2003. Nitrification and nitrite accumulation characteristics of high strength ammonia wastewater in a biological aerated filter. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **78**: 377-383.

(Received June 16, 2006/Accepted June 23, 2006)