

연속회분반응기의 아질산 축적 특성과 질산화 및 탈질 미생물의 정량적 분포 연구

김동진[†] · 권현진 · 윤정이 · 차기철^{*}

한림대학교 환경생명공학과

^{*}연세대학교 환경공학과

Nitrite Accumulation Characteristics and Quantitative Analyses of Nitrifying and Denitrifying Bacteria in a Sequencing Batch Reactor

Dong-Jin Kim[†] · Hyun-Jin Kwon · Jung-Yee Yoon · Gi-Cheol Cha^{*}

Department of Environmental Sciences and Biotechnology, Hallym University

^{*}Department of Environmental Engineering, Yonsei University

(Received 12 February 2008, Accepted 25 March 2008)

Abstract

Recently, the interests on economical nitrogen removal from wastewater are growing. As a method of the novel nitrogen removal technology, nitrogen removal via nitrite pathway by selective inhibition of free ammonia and free nitrous acid on nitrite oxidizing bacteria have been intensively studied. The inhibition effects of free ammonia and free nitrous acid are low when domestic wastewater is used, however, because of its relatively lower nitrogen concentration than the wastewater from industry and landfill, etc. In this study, a sequencing batch reactor (SBR) is proposed for nitrogen removal to investigate the effect of the low nitrogen concentration on nitrite accumulation. Nitrification efficiency reached almost 100% during the aerobic cycle and the maximum specific nitrification rate ($V_{max,nit}$) reached 17.8 mg NH_4^+-N/g MLVSS · h. During the anoxic cycle, average denitrification efficiency reached 87% and the maximum specific denitrification rate ($V_{max,den}$) reached 9.8 mg NO_3^--N/g MLVSS · h. From the analysis the main reason of nitrite accumulation in the SBR was free nitrous acid rather than free ammonia. Nitrite accumulation increased with the decrease of organic content in the wastewater and the mechanism is not well understood yet. From the result of fluorescent in situ hybridization, the distribution of nitrite oxidizing bacteria was in equilibrium with ammonium oxidizing bacteria when nitrite accumulation did not occur.

keywords : Denitrification, Fluorescence in situ hybridization (FISH), Nitrification, Nitrite accumulation, Sequencing batch reactor (SBR)

1. 서론

질산화/탈질에 의한 폐수의 질소 제거 시 암모니아를 아질산까지 산화(부분 질산화)하여 탈질하면 질산화 단계에서 포기에너지와 탈질에 필요한 전자공여체가 절감되는 장점이 있다(Anthonisen et al., 1976; Yoo et al., 1999). 따라서 암모니아를 아질산까지만 산화할 수 있는 방법에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있으며 이 때 암모니아 농도가 높을수록 부분 질산화가 잘 되고 그 경제적 효과도 높다(Abeling and Seyfried, 1992; Garrido et al., 1997; Kuai and Verstraete, 1998). 그러나 암모니아 농도가 낮은 폐수나 하수에서는 암모니아(NH_4^+-N)는 아질산(NO_2^--N)을 거처 빠르게 질산(NO_3^--N)으로 산화되어 아질산 축적이 거의 일어나지 않으며, 그 이유는 아질산 산화 활성이 암모니아 산화에 비해 매우 크기 때문이다.

폐수의 질산화에서 아질산 축적이 일어나는 주요한 원인은 free ammonia (NH_3 , FA)와 free nitrous acid (HNO_2 , FNA)가 알려져 있고 이들이 아질산 산화균(nitrite oxidizing bacteria, NOB)을 선택적으로 저해하기 때문이다. Table 1에는 문헌에 나타난 FA와 FNA에 의한 AOB (ammonia oxidizing bacteria)나 NOB에 대한 저해 결과를 보여주고 있다. FA와 FNA의 농도를 결정짓는 인자로는 각각의 NH_4^+-N , NO_2^--N 농도가 가장 중요하고 그 외에 용액의 온도와 pH가 중요한 역할을 한다(Abeling and Seyfried, 1992; Villaverde et al., 1997). 대부분의 하수에서는 암모니아 농도가 낮아 FA와 FNA 저해 효과를 얻기 어렵다. 따라서 아질산이 축적되는 결과는 대부분 암모니아 농도가 높은 폐수나 침출수, 슬러지 반류수 등을 대상으로 하고 있다(Kim et al., 2003; Villaverde et al., 1997, 2000).

연속회분반응기(SBR)는 기질과 product의 농도가 일정하게 유지되는 완전혼합 연속흐름 반응기와는 달리 회분반응기의 특성을 가지고 있어 초기에는 기질 농도가 높고 후반에는 기질 농도가 낮아지는 대신 product의 농도가 높은

[†] To whom correspondence should be addressed.

dongjin@hallym.ac.kr

Table 1. Free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) inhibition of nitrifying bacteria

| | Ammonium oxidizing bacteria | Nitrite oxidizing bacteria |
|-----|--|--|
| FA | <ul style="list-style-type: none"> • 25 mg NH₃-N/L (Balmelle et al., 1992) • 116±24 mg NH₃-N/L (Baquerizo et al., 2005) | <ul style="list-style-type: none"> • 0.52 mg NH₃-N/L (Baquerizo et al., 2005) • 0.04~0.08 mg NH₃-N/L (Vadivelu et al., 2006a) • 0.2 mg NH₃-N/L (Chang et al., 2002) • 22.1 mg NH₃-N/L (Turk and Marvinic, 1989b) |
| FNA | <ul style="list-style-type: none"> • 0.59±0.04 mg HNO₂-N/L (Baquerizo et al., 2005) • 0.1~0.4 mg HNO₂-N/L (Vadivelu et al., 2006b) | <ul style="list-style-type: none"> • 0.065±0.009 mg HNO₂-N/L (Baquerizo et al., 2005) • 0.011~0.0023 mg HNO₂-N/L - <i>Nitrobacter</i> (Vadivelu et al., 2006a) • 0.03 mg HNO₂-N/L - <i>Nitrosipra</i> (Blackburne et al., 2007) |

특성이 있다. 또한 질산화/탈질 시스템에서는 기질 유입 시 탈질이 일어나며 이때 pH가 상승하여 FA 농도의 상승효과가 있고 후반의 질산화에서는 pH가 낮아져 FNA의 상승효과가 있어 NOB 저해에 효과적이다(Kim and Seo, 2006).

따라서 본 연구에서는 저농도의 암모니아 폐수를 대상으로 SBR에서 질산화/탈질에 의해 폐수중의 질소 성분을 제거하고, SBR 운전에서 저농도의 질소 함유 폐수에서 아질산 축적이 일어나게 하는 특성을 연구하고, 또한 이러한 SBR의 운전에 따라 질산화 및 탈질 미생물의 분포를 살펴보고자 한다. AOB와 NOB, 그리고 탈질 미생물의 분포 비율을 정량적으로 조사하는 방법으로는 미생물중에 따른 특이 핵산서열을 이용한 분자생물학적인 기법인 fluorescence *in situ* hybridization (FISH)을 이용하였다(Amann et al., 2001).

2. 연구방법

2.1. 실험 장치 및 운전

본 연구에서 사용된 SBR은 높이 40 cm, 직경 20 cm로 유효부피가 10 L인 원통형의 형태로 아크릴 소재로 제작되었으며 SBR 실험장치의 개략도는 Fig. 1에 나타내었다.

합성 폐수는 유입부에서 반응기 수면 쪽으로 공급되었고, 반응기 중간 지점의 유출부를 통해 반응기 밖으로 유출되었다. 반응기 부피 중 합성 폐수 및 미생물이 차지하는 부피는 10 L로 유입/유출되는 부피는 4 L이고, 나머지 6 L는 반응기 내에 잔류된다. 반응기의 1 주기가 8시간인 경우 폐수의 수리학적 체류시간(HRT)은 20시간이 된다. 공기는 소형 블로우어에 의해 반응기 바닥 부분에서 공급되고, 교반기 회전과 더불어 반응기의 슬러지액을 혼합할 수 있도록 하였다. 질산화에 의한 pH 저하를 막기 위해 pH가 7.0 이하로 떨어지면 pH 펌프가 작동되어 NaHCO₃를 첨가

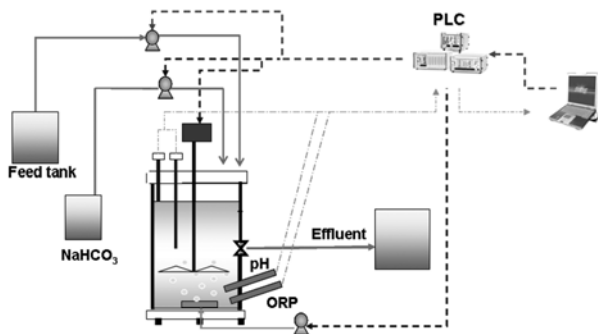


Fig. 1. Schematics of the SBR experimental set-up.

Table 2. Operation cycle and conditions of the SBR

| Operation cycle (min) | | Operation condition |
|-----------------------|------------|---|
| Cycle | R1 | |
| Anoxic (Feed) | 240(5) | DO 0~0.06 mg O ₂ /L (anoxic) 2.6~4.7 mg O ₂ /L (aerobic) |
| Aerobic | 180 | MLSS 750 mg/L |
| Settling | 5 | HRT 20 hr |
| Draw | 5 | SRT 16 days (R1) |
| Idle | 50 | Air 1.5 L/min (aeration) |
| Total | 480 | Temp. 25~28°C |

하여 제어하였다. 반응기는 PLC (programmable logic circuit)에 의해 폐수 유입, 무산소, 호기, 침전, 유출, 휴지(idle) 단계로 연속해서 반복적으로 운전 제어되었고, 공기 펌프, 유입 펌프, 유출 펌프, pH 조절 펌프, 혼합을 위한 교반기를 제어하였다.

SBR은 하수처리 시설의 슬러지를 이용하여 접종하였으며 하수의 특성과 유사한 50 mg NH₄⁺-N/L의 암모니아 인 공폐수를 1~2일 마다 새로이 만들어 실험하였다.

본 연구에서는 탈질에 필요한 탄소원으로 acetate를 질소원과 함께 공급해 주었으며 폐수 유입은 무산소 구간 초기 5분 동안 한 번에 주입하는 방법으로 실험하였다. 자세한 SBR 운전조건은 Table 2와 같다.

2.2. 합성 폐수의 조성 및 시료 분석 방법

본 연구에서 사용된 폐수의 질소원으로는 (NH₄)₂SO₄를, 탄소원으로는 acetate를 사용하였다. 미량원소로 MgSO₄ · 7H₂O, KCl, NaHPO₄ · 12H₂O, CaCl₂ · 2H₂O, KH₂PO₄, FeCl₃ · 6H₂O를 사용하였고 각각의 농도는 Table 3에서 나타난 것과 같다.

Table 3. Composition of the synthetic wastewater used in the SBR experiment

| Composition | Conc. (mg/L) | Note |
|---|---------------------------------------|---------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 236 | 50 mg N/L |
| Acetate | 150 | Carbon source |
| NaHCO ₃ | 100% norm of NH ₄ -N Conc. | pH control |
| MgSO ₄ · H ₂ O | 15 | Mineral |
| KCl | 17 | |
| NaHPO ₄ · 12H ₂ O | 14 | |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 8 | |
| KH ₂ PO ₄ | 10 | |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 5 | |

SBR의 수질 분석을 위해 1시간마다 15 mL씩의 시료를 채취하여 20 mL 유리병에 1~2분간 정치한 후 상등액을 0.45 μm 와 0.2 μm 공극의 syringe filter를 이용하여 여과한 후 실험하였다. 분석은 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 를 측정하였고(APHA et al., 1992), $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 은 425 nm의 파장을 이용한 Nesslerization 방법을 사용하여 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, SHIMADZU)에서 측정하였다. $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, acetate는 ion chromatography(DX 500, DIONEX)로 측정하였다. 총 질소(T-N)는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ + $\text{NO}_2^-\text{-N}$ + $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 합으로부터 산정하였다. 반응기 내의 MLVSS (mixed liquor volatile suspended solids)는 잔류 및 휘발성 고형물 측정에 의거해서 100~110°C에서 2시간 동안 건조한 후 550°C에서 15분 동안 회화하였다. 또한 반응기내 용존산소(DO meter : Istek model 235D, 215D), 온도, pH (Istek model 720P, 700P) 등은 연속적으로 측정하였다.

2.3. Fluorescence *in situ* hybridization 방법

FISH 실험에서는 반응기에서 슬러지 시료를 채취한 후 고정액인 4% paraformaldehyde를 시료 1 volume 당 고정액 3 volume의 비율로 첨가해 준 후 4°C에서 1~3시간 동안 고정하였다. 고정된 시료를 슬라이드에 부착시키기 전에 잘 부착되도록 깨끗한 슬라이드를 0.1% gelatin + 0.01% chromium potassium sulfate를 녹인 70°C의 용액에 담근 후 공기 중에 말려서 코팅을 한다.

시료의 고정과 탈수 등의 전처리를 거친 후 hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide)와 probe로 hybridization시키는데 첨가하는 probe 농도는 25 ng/ μL 로 일정하게 희석하여 사용하였다. Hybridization 과정은 46°C에서 120분 동안 hybridization chamber에서 수행하였다(Amann et al., 2001). *In situ* hybridization이 끝난 시료가 부착된 슬라이드는 Kr/Ar ion laser (Excitation wave length 494, 550, 650 nm)가 장착된 MRS-1024 (Bio-Rad, U.K.) confocal laser scanning microscope를 사용하여 관찰하였다. 본 실험에 사용한 oligonucleotide probe와 hybridization 조건은 Table 4에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 순간 기질 주입 SBR에서의 질산화 및 탈질

8시간을 1 cycle로 하는 SBR에서 무산소 조건(4시간)과 호기 조건(3시간)으로 나누어 질산화 및 탈질을 수행하였다. 폐수는 무산소 조건 초기 5분간 펄스 방식으로 순간적으로 주입하였다. 펄스방식의 폐수 주입은 반응기 내 초기 기질 농도를 높여주므로 질산화의 경우 free ammonia 농도가 높게 되는 특징이 있다. 집중 후 30일간의 시운전 후 SBR의 질산화 및 탈질 효율을 Fig. 2에 나타내었다. 질산화율은 원수와 처리수의 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 농도를 기준으로 산정하였고 탈질율은 호기 단계에서의 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 과 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 농도의 합을 기준으로 무산소 단계에서 제거된 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 과 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 값으로부터 산정하였다. SBR에서 운전 부피가 10 L이고 그중에서 4 L가 무산소 구간에서 유입되고 SBR에 남아있던 6 L의 질산화된 폐수만이 탈질될 수 있는 것이다. Fig. 2를 보면 초기에 질산화율이 70~80% 범위에서 15일 경과하면서 90% 이상으로 유지되며 20일이 경과하면서는 거의 100% 질산화 되었다. 무산소 조건에서 탈질원으로 acetate를 주입하였으며 탈질율은 질산화율보다는 약간 낮았으며 대체로 60% 이상에서 최대 90% 가까이 유지되었다.

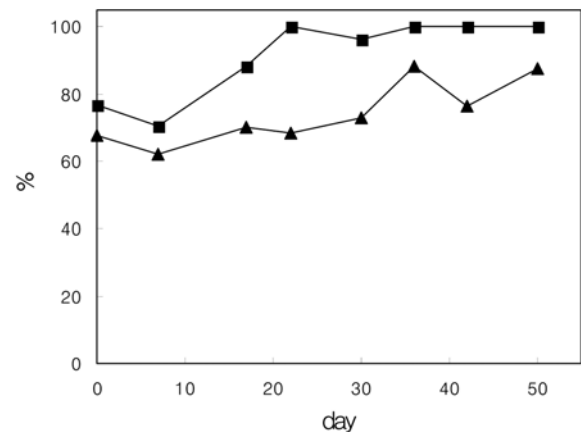


Fig. 2. Nitrification (■) and denitrification (▲) efficiencies of the SBR after start-up operation.

Table 4. 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used in this SBR study

| Probe | Specificity | Sequence (5'-3') | FA ^a (%) | NaCl ^b (mM) |
|------------|--|----------------------|---------------------|------------------------|
| EUB338 I | bacteria | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | | |
| EUB338 II | bacteria group not covered by EUB338 I and EUB338 III | GCAGCCACCCGTAGGTGT | 20 | 225 |
| EUB338 III | bacteria group not covered by EUB338 I and EUB338 II | GCTGCCACCCGTAGGTGT | | |
| Bet42a | β -proteobacteria | GCCTTCCCACTTCGTTT | 35 | 80 |
| Nso1225 | ammonium oxidizing bacteria of β -proteobacteria | CGCCATTGTATTACGTGTGA | 35 | 80 |
| Nit3 | <i>Nitrobacter</i> spp. | CCTGTGCTCCATGCTCCG | 40 | 56 |
| Ntspa662 | genus <i>Nitrospira</i> | GGAATTCGCGCTCCTCT | 40 | 56 |
| DEN124 | acetate denitrifying cluster (k-strategist) | CGACATGGGCGGTTCCGAT | 40 | 56 |
| DEN581 | acetate denitrifying cluster (r-strategist) | TGTCTTACTAAACCGCCTGC | 45 | 40 |

^a Percentage formamide in the hybridization buffer.

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

Fig. 3(a)는 SBR 운전 30일 경의 1 cycle 동안의 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, acetate의 농도 변화를 보여주고 있다. SBR의 무산소 구간 초기에서 폐수 유입이 끝났을 때 암모니아성 질소의 농도는 약 28 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$ 로 나타났다. 이는 총 10 L의 반응기 유효 부피 중 1 cycle이 끝나고 4 L의 처리된 폐수를 배출하고 새로 유입되는 4 L의 폐수가 기존 6 L의 폐수와 혼합되어 원 폐수의 농도보다는 낮게 나타난 것이다. 무산소 구간 동안 질산화가 일어나지 않은 채 탈질이 일어나므로 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 은 거의 일정하게 유지되었고 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 과 acetate는 같이 감소하는 것을 볼 수 있다. 이 동안 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 은 약간 증가하다가 다시 감소하는 양상을 보였는데 이는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 산화에 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 로 전환되는 중간물질로 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 이 생성되는 호기 조건과는 달리 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 가 N_2 로 탈질되는 중간 과정에 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 이 일시적으로 축적된 것으로 판단된다. T-N은 탈질의 영향으로 47에서 30 mg/L 이하로 감소함을 확인할 수 있다. 총질소(T-N) 제거율을 유입수와 유출수의 질소농도를 기준으로 할 때 총질소 제거율은 약 45% 정도가 되었다.

호기 구간 동안 질산화에 의해 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 은 3 mg/L 이하로 감소하고 대신 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 이 증가하였다. 질산화 과정에서 중간물질인 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 은 크게 변화하지 않아 이의 축적이 크게 일어나지 않음을 알 수 있다. Acetate는 이미 무산소 구간에서 거의 소비되었으므로 호기 구간에서도 거의 0으로 유지되었다.

다음의 Fig. 3(b)는 SBR의 같은 기간에서의 pH와 ORP의 변화를 나타낸 것이다. 서론에서 설명한 것과 같이 무산소 구간 동안 탈질 반응이 일어나면서 HCO_3^- 가 생성되어 pH가 상승하는 것을 볼 수 있다. 반대로 호기 구간 동안 질산화 반응에 의해 HCO_3^- 가 소비되면서 pH가 감소되는 것을 볼 수 있다.

ORP 변화 역시 무산소 구간 동안 탈질 반응이 일어나면서 NO_3^- 나 NO_2^- 가 환원되어 값이 지속적으로 감소하다가 호기 구간에서는 포기에 의해 용존산소가 높아지면서 값이 다시 증가한다. 이러한 탈질과 질산화 구간에서 나타나는 pH와 ORP의 변화는 Kim 등(2004)과 Kishida 등(2003)의 연구에서와 같이 탈질과 질산화 공정을 관찰하거나 제어하는 중요한 매개변수가 됨을 확인할 수 있었다.

위와 같은 질소성분의 농도와 pH 조건에서 NOB의 활성화에 저해영향을 줄 수 있는 FA와 FNA의 농도 변화를 계산한 것이 다음의 Fig. 3(c)에 나타나있다. FA와 FNA는 반응기 내의 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 과 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 농도, 온도, pH의 영향을 받고 FA와 FNA는 각각 일정 농도 이상에서 AOB와 NOB에 저해 영향을 미치게 된다. SBR에서 무산소 구간에서는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 이 유입되고 폐수의 pH가 높아지면서 FA는 1.2 mg/L에서 2.5 mg/L로 높아졌다. 반면에 호기 구간에서는 질산화에 의해 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 이 감소하고 pH도 낮아지면서 FA값은 거의 0까지 낮아졌다. 따라서 무산소 구간에서는 FA의 NOB에 대한 저해 효과를 기대할 수 있다. 반면에 FNA는 무산소 구간에서는 0.00005 mg/L 정도로 매우 낮고 호기 구간에서는 질산화가 되면서 0.0003 mg/L까지 높아졌다. FA와는 반대로 호기 구간에서 FNA 농도는 높아져서 NOB 저해효과를 기대하지만 측정된 FNA 값(0.00005 mg/L나 0.0003 mg/L)이 Table 1에 나타난 값에 비해 현저히 낮아 FNA의 NOB 저해는 무시할 수 있다고 사료된다. 만약에 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 이 축적된다면 무산소와 호기 구간에서 각각 FA와 FNA에 의해 NOB를 선택적으로 저해하는 환경이 만들어지는 것이다. 그러나 본 SBR에서 보는 바와 같이 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 이 축적이 심각하게 일어나고 있지 않아서 Table 1에 나타나 있는 기존의 연구와는 차이를 보인다. 기존의 연구 결과에서 흥미로운 것은 유기물이 없거나 낮은 농도에서 실험을 한 결과에서는 낮은 FA에서도 NOB가 저해를 받았으나(Balmelle et al., 1992; Baquerizio et al., 2005; Blackburne et al., 2007; Chang et al., 2002; Vadivelue et al., 2006a) Turk and Mavinic(1989b)의 연구에서와 같이 유기물이 포함된 폐수의 실험에서는 NOB를 저해하는 FA 농도(22.1 mg/L)가 앞의 유기물이 없는 것에 비해 매우 높아졌다는 것이다. 본 실험에서도 유기물(acetate)이 상당히 존재하고 있었으며 1~2 mg/L의 FA에 NOB가 영향을 받지 않

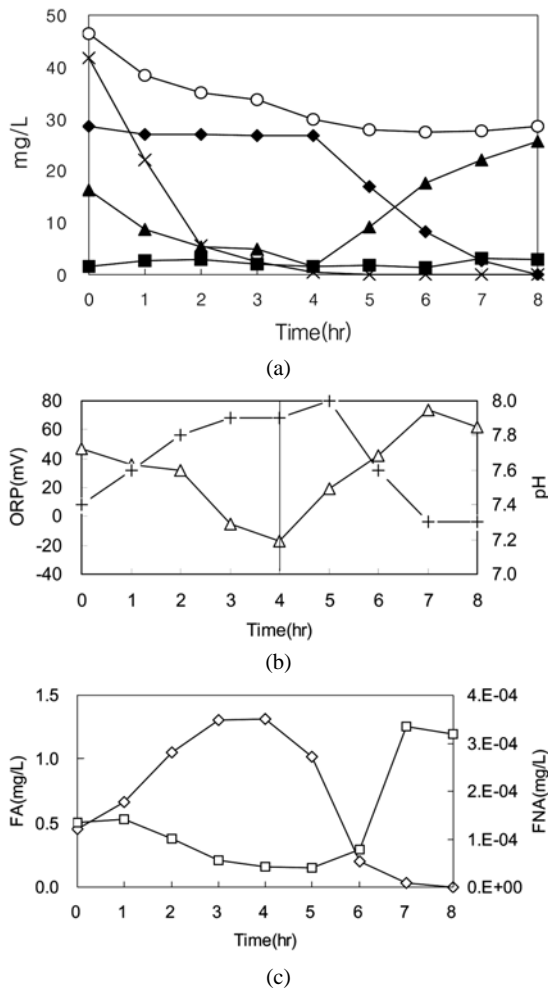


Fig. 3. Concentration profiles of the SBR during nitrification and denitrification. (a): (◆: $\text{NH}_4^+\text{-N}$, ■: $\text{NO}_2^-\text{-N}$, ▲: $\text{NO}_3^-\text{-N}$, ×: acetate, ○: Total N); (b): Profiles of the pH and ORP (+: pH, △: ORP); (c): Profiles of free ammonia (◇) and free nitrous acid (□).

았다. 본 연구에서 어느 정도의 FA 농도가 유지됨에도 불구하고 NOB 활성 저해에 의해 NO₂⁻-N 축적이 되지 않는 것은 앞의 SBR에서의 질소 성분 농도와 뒤의 FISH에 의한 질산화 미생물 분포에서도 확인할 수 있다. 그러나 본 실험에서 FA에 의한 저해 효과가 낮아진 원인은 명확하지는 않지만 앞의 Turk and Mavinic(1989b)의 결과에서처럼 유기물이 존재하는 경우에 FA의 NOB에 대한 영향이 낮아진 것이 그 원인의 하나라고 사료된다. NOB의 FA에 대한 적응 효과에 의해 NO₂⁻-N 축적이 감소하기도 하지만(Turk and Mavinic, 1989a) 다른 실험(Chang et al., 2002; Vadivelu et al., 2006a)에서는 장기간 운전 후에도 NO₂⁻-N의 축적이 높게 나타나 FA에 의한 적응효과만이라고 단정할 수는 없다.

다음의 Fig. 4는 유입수의 acetate 농도를 150에서 100 mg/L로 감소시켰을 때의 SBR의 질소성분 농도 변화를 보여주고 있다. 여기서 무산소 구간은 3시간, 호기 구간을 5시간으로 전체 9시간이 한 cycle이 되도록 하였다(HRT = 22.5 hr). Fig. 4(a)에서 볼 때 대부분은 앞의 경우와 비슷하나 호기 구간에서 NO₂⁻-N이 14 mg/L 정도 상당히 축적되는 것을 확인할 수 있다. 총 질소 제거율은 약 67%로 나타났다. FA는 최고 약 3 mg N/L 정도의 값을 보여 앞의 경우와 거의 비슷하였으나 FNA는 최고 0.0017 mg/L 정도에

달하여 앞의 경우보다는 약 5배 높은 값을 보였다(Fig. 4(b)). 이 결과로 보아 NOB의 활성에 직접적으로 영향을 미친 것은 FNA로 보여지며 유기물 농도가 낮아질 때 NOB에 대한 저해 효과가 커지는 이유는 아직 명확하지 않으며 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

결론적으로 본 실험에서는 acetate 100 mg/L가 포함된 인공폐수에 하수 수준의 낮은 농도의 암모니아를 질소원으로 이용하였을 때 FA와 FNA의 농도는 매우 낮게 나타나 NOB 저해 현상은 거의 나타나지 않은 것으로 보인다.

SBR에서 질산화 반응에 의한 암모니아성 질소의 제거 효율은 100% 가까이 나타났으며 이때 슬러지의 최대 질산화 속도(V_{max,nit})는 17.8 mg NH₄⁺-N/g MLVSS · h로 나타났다. 탈질 반응에 의한 질산성 질소의 제거 효율은 평균 87% 정도의 효율을 보였고 슬러지의 최대 탈질 속도(V_{max,den})는 9.8 mg NO₃⁻-N/g MLVSS · h로 나타났다.

3.2. SBR에서의 질산화/탈질 미생물의 정량적 분포

본 연구에 사용된 SBR은 질산화와 탈질이 일어나는 단일 슬러지(single sludge) 형태이므로 AOB와 NOB를 포함하는 질산화 미생물과 또한 탈질 미생물을 포함하는 종속 영양 미생물이 같이 분포할 것으로 예상된다. 본 SBR에서는 호기와 무산소 조건이 교대로 변하고 탈질 탄소원으로 acetate를 사용하는 특징이 있다. 이러한 조건에서 대표적인 AOB와 NOB, 그리고 탈질 미생물의 분포를 조사하는 것은 질소 제거 SBR의 최적 설계와 운전의 기초자료가 될 것이다. Fig. 5는 SBR이 정상 운전 후 30일 경의 슬러지를 채취하여 FISH/CLSM으로 관찰한 결과이다. 이와 같이 미생물의 분포의 정량분석을 위해 image analyzer로 각각의 미생물에 해당하는 FISH/CLSM 이미지 10장 이상을 대상으로 분석하였다.

Fig. 5(a)는 전체 박테리아에 특이적으로 결합하는 Cy3로 labeling된 probe EUBmix (EUB338 I +EUB338 II +EUB338 III)와 β-proteobacteria에 특이적으로 결합하는 FITC로 labeling된 probe Bet42a를 이용한 hybridization 결과를 보여주고 있다. 이미지의 정량분석 결과 전체 박테리아 중 평균 60.4%가 β-proteobacteria subclass에 속함을 알 수 있다. Fig. 5(b)는 FITC로 labeling된 Bet42a(β-proteobacteria)와 Cy3로 labeling된 probe Nso1225(β-proteobacteria 속의 *Nitrosomonas* spp.)의 hybridization 결과를 보여주고 있다. 전체 β-proteobacteria의 15.6%가 AOB인 *Nso1225*임을 확인할 수 있다. 전체 박테리아 기준으로는 약 9.4%가 *Nitrosomonas*임을 알 수 있다. Fig. 5(c)는 EUBmix(FITC)와 Cy3로 labeling된 probe Nit3(*Nitrobacter* spp.)로 hybridization한 결과를 나타낸 것이다. 전체 박테리아 중 오직 1.1% 정도만이 *Nitrobacter* NOB로 판명되었다. Fig. 5(d)는 EUBmix(Cy3)와 또 다른 NOB인 genus *Nitrospira*에 특이적으로 결합하는 probe Ntspa662(FITC)의 hybridization 이미지를 나타낸 것이다. 전체 박테리아의 약 7.8%가 genus *Nitrospira*인 것으로 나타나 이것이 본 SBR에서 대표적인 NOB인 것으로 나타났다. 다른 연구결과에서도 *Nitrospira*

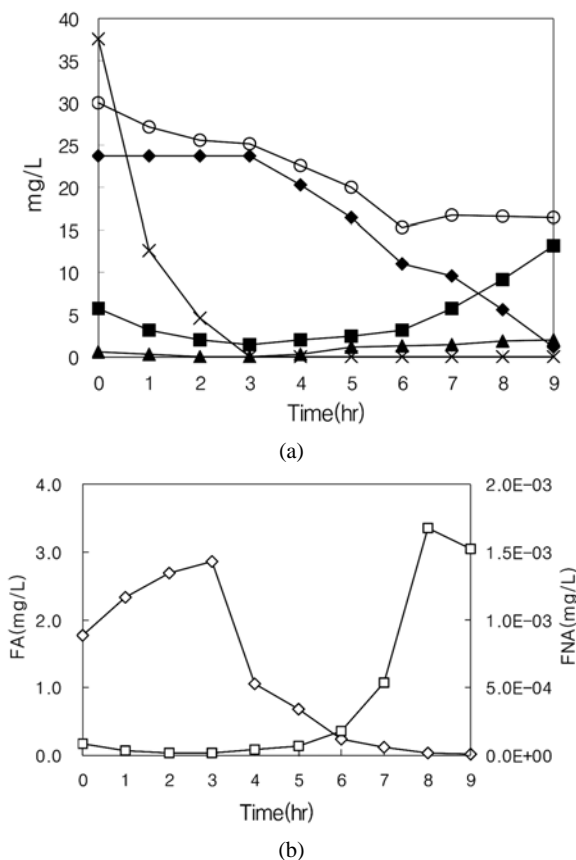


Fig. 4. (a): Concentration profiles of the SBR with low acetate concentration(100 mg/L). (◆: NH₄⁺-N, ■: NO₂⁻-N, ▲: NO₃⁻-N, ×: acetate, ○: Total N); (b): free ammonia(◇) and free nitrous acid(□).

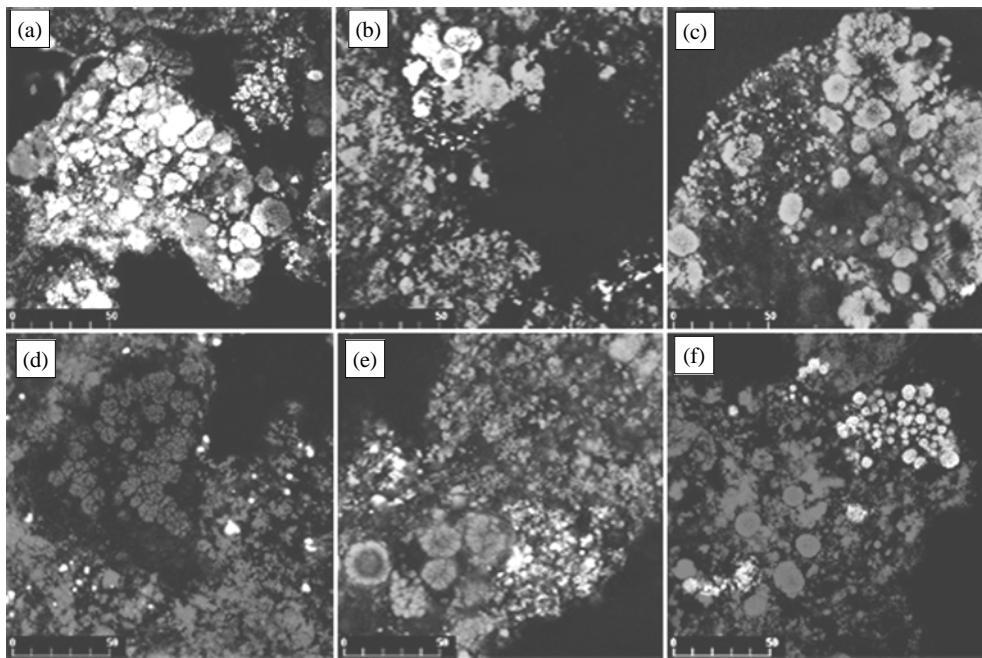


Fig. 5. *In situ* identification of nitrifying/denitrifying bacterial community of the SBR. (a): Simultaneous *in situ* hybridization with Cy3-labeled probe EUBmix and FITC-labeled probe Bet42a, (b): probe Bet42a(FITC) + probe Nso1225(Cy3), (c): probe EUBmix (FITC) + probe Nit3(Cy3), (d): probe EUBmix(Cy3) + probe Ntspa662(FITC), (e): probe Bet42a(FITC) + probe DEN124(Cy3), (f): probe Bet42a(Cy3) + probe DEN581(FITC). Bar = 50 μ m.

는 nitrite의 농도가 낮은 경우에 우점적인 NOB가 된다고 알려져 있어 본 연구 결과와 일치한다(Kim and Kim, 2006).

Kim and Seo(2006)는 처음 SBR 접종에 이용된 활성슬러지는 전체 미생물에 대비하여 0.9%의 AOB와 0.6%의 NOB로 구성되어 있어 현 SBR에서는 AOB와 NOB로 구성된 질산화 미생물의 분포 비율이 증가하였음을 알 수 있다. 암모니아의 부분 질산화에 의해 NH_4^+ -N이 NO_2^- -N으로만 산화되는 경우 전체 박테리아의 70.5%가 AOB로 구성되고 NOB는 거의 검출되지 않는 결과도 발표되었다(Kim and Seo, 2006).

Fig. 5(e)와 (f)는 탈질 미생물 종류를 조사한 것이다. 탈질 미생물은 그 종류가 매우 다양하여 특정 미생물만으로 표시하기 어려운 특징이 있다. 분자생물학적으로 최근 알려진 바로는 탈질에 이용되는 탄소원의 종류에 따라서 종류가 달라지는데 대표적으로 acetate와 methanol에 따라서 그 종류가 다르다고 한다. 최근의 연구 결과에 따르면 acetate를 전자공여체로 이용하는 탈질 미생물의 종류도 acetate의 농도에 따라 다르게 분포한다고 하였다(Ginige et al., 2005).

Fig. 5(e)는 probe Bet42a(FITC)와 탈질 미생물 중 acetate를 탄소원으로 이용하는 미생물에 특이적으로 결합하는 Cy3로 labeling된 probe DEN124를 hybridization, Fig. 5(f)는 probe Bet42a(Cy3)와 탈질 미생물 중 acetate를 탄소원으로 이용하는 미생물 probe DEN581(FITC)을 이용한 hybridization 이미지를 나타낸 것이다. Ginige 등(2005)의 연구에서 탈질 반응 시작 후 acetate를 사용하는 미생물 중 DEN124와 DEN581에 특이적으로 결합하는 미생물들이 점

차 우점종을 이루는 것으로 관찰되었고 DEN124와 DEN581에 특이적인 미생물들은 각각 k-strategists와 r-strategists로 분류된다고 하였다. 이에 본 실험에서는 탈질 미생물을 관찰하는데 DEN124와 DEN581 이 두 가지 probe를 사용하였으며 각각 Bet42a의 $10.2 \pm 1.7\%$ 와 $27.3 \pm 4.1\%$ 로 분포하여 r-strategists인 DEN581이 우점종으로 분포하였다. 이것은 초기에 폐수가 순간적으로 유입되어 acetate 농도가 높게 유지되는 본 SBR 실험에서의 조건과 일치하는 결과이다.

Fig. 6은 전체 박테리아(EUBmix)를 기준으로 AOB인 *Nitrosomonas*와 NOB인 *Nitrobacter* spp.와 genus *Nitrospira*, acetate를 이용하는 탈질 미생물인 DEN124와 DEN581에 특

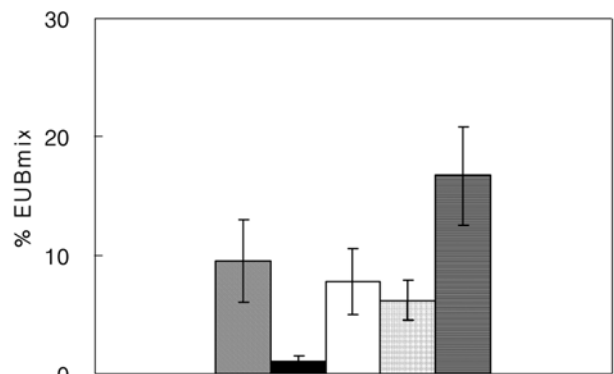


Fig. 6. Bacterial community analysis of the SBR reactor. (■): Ntspa662, (■): Nit3, (□): Nso1225, (▨): DEN124, (■): DEN581).

이적으로 결합하는 미생물의 분포를 나타낸 것이다. 정량 분석 결과 전체 박테리아에 대한 NOB의 분포 중 genus *Nitrospira*는 평균 $7.8 \pm 2.8\%$ 로 나타났고, *Nitrobacter* spp.는 전체 박테리아 중 $1.1 \pm 0.4\%$ 로 나타났다. 전체 박테리아 중 $60.4 \pm 8.4\%$ 에 해당하는 β -proteobacteria에 속하는 미생물 중 AOB의 분포는 $15.6 \pm 3.5\%$ 로 나타나 전체 박테리아 기준 *Nitrosomonas*는 9.4%를 차지하였다. 전체 박테리아 기준 acetate를 탄소원으로 사용하는 탈질 미생물 중 DEN124에 특이적으로 결합하는 미생물은 6.2%의 분포를 보였고 DEN581에 특이적으로 결합하는 미생물은 16.5%의 분포를 보여 대표적인 탈질 미생물로 나타났다.

4. 결론

연속회분식 반응기(SBR)에서 하수와 유사한 50 mg NH_4^+ -N/L의 암모니아 폐수를 대상으로 질산화 탈질 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) SBR에서의 질산화 반응에 의한 암모니아성 질소의 제거 효율은 100% 가까이 나타났으며 이때 슬러지의 최대 질산화 속도($V_{\max, \text{ni}}$)는 17.8 mg NH_4^+ -N/g MLVSS · h로 나타났다. 탈질 반응에 의한 질산성 질소의 제거 효율은 평균 87% 정도의 효율을 보였고 슬러지의 최대 탈질 속도($V_{\max, \text{den}}$)는 9.8 mg NO_3^- -N/g MLVSS · h로 나타났다.
- 2) SBR에서 아질산의 축적은 free ammonia 보다 free nitrous acid에 의해 아질산 산화균 저해가 주요 원인으로 보인다.
- 3) 유기물 농도가 높아지면 아질산 산화균에 대한 저해 효과가 약해지면서 아질산 축적이 낮아진다.
- 4) FISH/CLSM으로 관찰 결과 아질산 축적이 일어나지 않을 경우 아질산 산화균의 분포도 증가하게 되어 암모니아 산화균과 균형을 이루었으며 *Nitrosomonas* 대표적인 암모니아 산화균(9.4%), *Nitrospira*가 대표적인 아질산 산화균(7.8%) 그리고 DEN581에 결합하는 미생물이 대표적인 탈질균(16.5%)로 나타났다.

사 사

“이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임”(KRF-2005-1-D00438). 또한 중소기업청의 산학협력연구실 사업에 의해서도 일부 지원되었음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Abeling, U. and Seyfried, C. F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater - nitrogen removal using nitrite. *Water Sci. Technol.*, **26**, pp. 1007-1015.

Amann, R. L., Fuchs, B. M. and Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ*

hybridization. *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**(1), pp. 231-236.

Anthonisen, A., Loehr, R., Prakasam, T. and Srinath, E. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, **48**, pp. 835-852.

APHA, AWWA, WEF (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th Edition., Washington D.C.

Balmelle, B., Nguyen, K. M., Capdeville, B., Cornier, J. C. and Deguin, A. (1992). Study of factors controlling nitrite buildup in biological process for water nitrification. *Water Sci. Technol.*, **26**(5-6), pp. 1017-1025.

Baquerizo, G., Maestre, J. P., Sakuma, T., Deshusses, M. A., Gamisans, X., Gabriel, D. and Lafuente, J. (2005). A detailed model of a biofilter for ammonia removal : Model parameters analysis and model validation. *Chem. Eng. J.*, **113**, pp. 205-214.

Blackburne, R. Yuan, Z. and Keller, J. (2007). Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Wat. Res.*, **41**(14), pp. 3033-3042.

Chang, J. S., Cha, G. C. and Kim, D. J. (2002). Nitrite accumulation characteristics in the nitrification of high strength ammonia wastewater with biofilm airlift suspension reactor. *HWAHAK KONGHAK*, **40**(1), pp. 114-120.

Garrido, J. M., Van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. (1997). Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **53**(2), pp. 168-178.

Ginige, M. P., Keller, J. and Blackall, L. L. (2005). Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent *in situ* hybridization-microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(12), pp. 8683-8691.

Kim, D. J., Chang, J. S., Lee, D. I., Han, D. W., Yoo, I. K. and Cha, G. C. (2003). Nitrification of high strength ammonia wastewater and nitrite accumulation characteristics. *Wat. Sci. Tech.*, **47**(11), pp. 45-50.

Kim, D. J. and Seo, D. W. (2006). Selective enrichment and granulation of ammonia oxidizers in a sequencing batch airlift reactor. *Proc. Biochem.*, **41**(5), pp. 1055-1062.

Kim, D. J. and Kim, S. H. (2006). Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. *Wat. Res.*, **40**(5), pp. 887-894.

Kim, J. H., Chen, M., Kishida, N. and Sudo, R. (2004). Integrated real-time control strategy for nitrogen removal in swine wastewater treatment using sequencing batch reactors. *Wat. Res.*, **38**(14-15), pp. 3340-3348.

Kishida, N., Kim, J. H., Chen, M., Sasaki, H. and Sudo, R. (2003). Effectiveness of oxidation-reduction potential and pH as monitoring and control parameters for nitrogen removal in swine wastewater treatment by sequencing batch reactors. *J. Biosci. & Bioeng.*, **96**(3), pp. 285-290.

Kuai, L. and Verstraete, W. (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(11), pp. 4500-4506.

Turk, O. and Mavinic, D. S. (1989a). Stability of nitrite buildup in an activated sludge system. *J. WPCF*, **61**, pp. 1440-1448.

- Turk, O. and Mavinic, D. S. (1989b). Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Wat. Res.*, **23**(11), pp. 1383-1388.
- Vadivelu, V. M., Yuan, Z., Fux, C. and Keller, J. (2006a). The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environ. Sci. Technol.*, **40**(14), pp. 4442-4448.
- Vadivelu, V. M., Yuan, Z., Fux, C. and Keller, J. (2006b). Comparison of free ammonia and free nitrous acid inhibition on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **95**(5), pp. 830-839.
- Villaverde, S., Garcia-Encina, P. A. and Fdz-Polanco, F. (1997). Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Wat. Res.*, **31**(5), pp. 1180-1186.
- Villaverde, S., Fdz-Polanco, F. and Garcia, P. A. (2000). Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence, *Wat. Res.*, **40**(2), pp. 602-610.
- Yoo, H., Ahn, K., Lee, H., Lee, K., Kwak, Y. and Song, K. (1999). Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Wat. Res.*, **33**(1), pp. 145-154.