

연속회분식 반응기를 이용한 혐기성 암모늄 산화균 농후배양에서의 정성 및 정량적 미생물 군집구조 분석

Qualitative and Quantitative Analysis of Microbial Community Structure in the Sequencing Batch Reactor for Enriching ANAMMOX Consortium

배효관 · 정진영 †

Hyokwan Bae · Jin-Young Jung †

한국과학기술연구원 환경기술연구단

Center for Environmental Technology Research, Korea Institute of Science and Technology

(2009년 7월 21일 접수, 2009년 9월 11일 채택)

ABSTRACT : Enrichment of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) bacteria is the essential step for operating full-scale ANAMMOX bioreactor because adding a significant amount of seeding sludge is required to stabilize the ANAMMOX reactor. In this study, the enrichment of ANAMMOX bacteria from an activated sludge using sequencing batch reactor was conducted and verified by analyzing changes in the microbial community structure. ANAMMOX bacteria were successfully enriched for 70 days and the substrate removal efficiencies showed 98.5% and 90.7% for NH_4^+ and NO_2^- in the activity test, respectively. The phylogenetic trees of Planctomycetes phylum showed that the diverse microbial community structure of an activated sludge was remarkably simplified after the enrichment. All 36 clones, obtained after the enrichment, were affiliated with ANAMMOX bacteria of *Candidatus Brocadia* (36%) and *Candidatus Anammoxoglobus* (64%) genera. The quantification using real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) revealed that the 16S rDNA concentration of ANAMMOX bacteria was 74.8% compared to the granular ANAMMOX sludge obtained from an upflow ANAMMOX sludge bed reactor which had been operated for more than one year. The results of molecular analysis supported that the enriched sludge could be used as a seeding sludge for a full-scale ANAMMOX bioreactor.

Key words : Anaerobic Ammonium Oxidation, Enrichment, Phylogenetic Tree, Real-time Quantitative PCR

요약 : 혐기성 암모늄 산화공정을 안정화시키기 전에 많은 양의 식종 미생물 투여가 필요하므로 혐기성 암모늄 산화균의 농후배양은 실규모의 혐기성 암모늄 산화 반응기를 운영할 때 필수적인 과정이다. 본 연구에서는 활성슬러지 미생물을 식종한 연속 회분식 반응기를 이용하여 혐기성 암모늄 산화균을 농후배양하고, 미생물 군집구조의 변화를 관찰하여 농후배양 결과를 검증하였다. 혐기성 암모늄 산화균의 농후배양은 70일간 시행되었고, 농후배양 후 활성시험에서 NH_4^+ 와 NO_2^- 의 기질 제거효율이 각각 98.5%와 90.7%로 관찰되어 혐기성 암모늄 산화균의 배양이 성공적으로 수행된 것으로 판단되었다. 계통분류학적 분지도 작성 결과, 다양하였던 Planctomycetes 문(phylum)의 미생물 군집구조가 농후배양 이후에 현저하게 단순해졌다는 것이 밝혀졌다. 농후배양 이후 발견된 36개의 clone들 모두가 혐기성 암모늄 산화균이었으며, *Candidatus Brocadia* (36%)와 *Candidatus Anammoxoglobus* (64%) 속(genus)에 속하였다. RTQ-PCR (real-time quantitative PCR)을 통해 혐기성 암모늄 산화균을 정량한 결과, 혐기성 암모늄 산화 상향류식 연속 배양기에서 1년 이상 선택 배양된 붉은색 혐기성암모늄 산화 입상 슬러지에 비해 혐기성 암모늄 산화균의 16S rDNA 농도가 74.8%인 것으로 나타났다. 상기의 분자생물학적 분석을 통해 70일간 농후배양된 활성슬러지가 혐기성 암모늄 산화 실용화 공정의 접종 미생물로 활용 가능할 것으로 판단되었다.

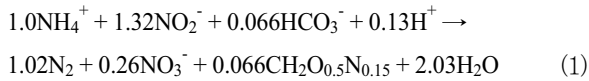
주제어 : 혐기성 암모늄 산화, 농후배양, 계통분류학적 분지도, real-time quantitative PCR

1. 서론

혐기성 암모늄 산화(ANAerobic AMMonium OXidation, ANAMMOX)균은 혐기성 및 독립영양 조건에서 식 (1)과 같이 NH_4^+ 와 NO_2^- 를 동시에 소모하여 N_2 가스와 NO_3^- 를 생산한

다.¹⁾ 혐기성 암모늄 산화균은 분류학적으로 Planctomycetes 문(phylum)에 속해 있고, 현재까지 확인된 미생물은 *Candidatus Brocadia*^{2,3)}, *Candidatus Kuenenia*⁴⁾, *Candidatus Scalindua*⁵⁾, 그리고 *Candidatus Anammoxoglobus*⁶⁾ 속(genus)이 있다.

† Corresponding author : E-mail : jjjung@kist.re.kr Tel : 02-958-5837 Fax : 02-958-5839



혐기성 암모늄 산화 반응을 이용하면 완전 혐기성 상태에서 질소처리가 가능하므로 폭기비용이 줄어들고 독립영양조건에서 탈질이 가능하여 외부탄소원을 공급해주지 않아도 되므로 전통적인 질소처리공정에 비해 운영비용이 50%까지 절감될 수 있다. 이러한 장점 때문에 최근 혐기성 암모늄 산화균을 이용한 질소처리 공정의 개발이 가속화되고 있다. 예를 들어, 암모니아성 질소를 부분 질산화시켜 암모니아성 질소 대비 아질산성 질소를 1:1로 조성하는 SHARON (Single reactor system for High activity Ammonia Removal Over Nitrite) 공정이 혐기성 암모늄 산화반응과 연계되었고⁷⁾, SHARON공정과 혐기성 암모늄 산화 공정을 한 반응기에서 동시에 진행시키는 CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) 공정⁸⁾이 개발되었다.

최근 발표된 SHARON 공정과 연계된 70 m³ 급 혐기성 암모늄 산화 반응기의 운영사례는 혐기성 암모늄 산화 반응의 상용화 가능성을 입증하였다.⁹⁾ 이 사례에서는 5 m³ 급의 혐기성 암모늄 산화균 배양기를 운영하였는데, 이것은 혐기성 반응이 안정화될 때까지 공급해 줄 상당량의 미생물이 필요하기 때문이다. 이와 같이 혐기성 암모늄 산화균을 다량 확보하는 것은 혐기성 암모늄 산화 반응기를 운영하는데 필수적인 요소이다.

혐기성 암모늄 산화균을 확보하기 위해 슬러지로부터 혐기성 암모늄 산화균을 농후배양한 연구결과가 보고되어 왔다.^{10~15)} 이러한 연구사례들은 혐기성 암모늄 산화 반응의 효율로 농후배양의 성공도를 가늠할 뿐만 아니라, 분자생물학적인 분석법을 이용하여 배양된 혐기성 암모늄 산화균의 종류를 판별하거나 혐기성 암모늄 산화균이 얼마나 증가하였는지 정량분석을 수행하였다. 특히, FISH (fluorescence in situ hybridization)와 RTQ-PCR (real-time quantitative PCR)을 이용하여 혐기성 암모늄 산화균을 정량한 정보는 농후배양의 성공도를 나타내는 집적적인 지표가 되었다. 이와 같이 농후배양 후에는 정성적으로 혐기성 암모늄 산화균의 종류를 식별하는 것과 더불어 반드시 분자생물학적인 정량분석을 수행하여 농후배양 정도를 검증해야 한다. 본 연구에서는 혐기성 암모늄 산화균을 짧은 시간내에 농후배양하고, 농후배양 결과를 분자생물학적 정성 및 정량 분석을 통하여 검증하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 농후배양 반응기

농후배양 반응기는 18 cm 높이의 0.5 L 유리병을 고무마개로 막아 혐기성 연속 회분식 반응이 가능하도록 제작되었고, 20 cm 길이의 주사기 바늘을 이용하여 주기적으로 배지를 교체하였으며, 10 cm 길이의 주사기 바늘을 이용하여 혐기성 암모늄 산화 반응에 의해 발생하는 질소를 하루에 한 번씩 제거해 주었다. 배양기의 온도를 35℃로 유지하고 100 rpm^{15,16)}의 속도로 교반하였다. 1주일에 한 번씩 배지를 교체하였고, 슬러지의 유출을 막기 위해 30분간 정지된 상태로 슬러지를 침전시킨 이후에 0.4 L의 용액을 제거하고 새로운 배지 0.4 L를 60 mL 주사기를 이용하여 투여하였다. 용존산소의 유입을 막기 위해 배지 투여 전에 아르곤 가스로 30분간 폭기하였고, 배지 교체시에 산소가 반응기로 유입되지 않도록 반응기를 아르곤 가스로 충전하며 작업하였다.

(NH₄)₂SO₄와 NaNO₂로 질소 기질농도를 조절하였고, 기본 배지는 van de Graaf 등¹⁷⁾의 조성을 변용하여 Table 1과 같이 조성하였다. 미량원소 I 용액은 EDTA 5 g/L와 FeSO₄·7H₂O 5 g/L로 제조되었고, 미량원소 II 용액은 ZnSO₄·7H₂O 0.43 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.24 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.99 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.25 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.22 g/L, NiCl₂·6H₂O 0.19 g/L, Na₂SeO₄·10H₂O 0.21 g/L, H₃BO₃ 0.014 g/L로 제조하여 4℃의 냉장고에서 보관하였다. 아질산성 질소 100 mg/L 농도에서 혐기성 암모늄 산화균이 저해를 받는 것으로 알려져 있으므로 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도를 100 mg/L 이하로 유지하였다.¹⁸⁾

2.2 질소 분석방법

암모니아성 질소 농도는 kjeldahl nitrogen analysis (Kjeltec 1035, Sweden)로 측정하였고, 아질산성 질소와 질산성 질소 분석을 위해 ion chromatography (Dionex 120, USA)를 사용하였다. 휘발성 부유 고형물은 Standard Methods¹⁹⁾에 기술된 방법으로 분석하였다.

Table 1. Composition of the basal medium used in this study

Component	Concentration (mg/L)
NaHCO ₃	350
KH ₂ PO ₄	6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12
CaCl ₂ ·2H ₂ O	48
Trace element solution I	1 ml/L
Trace element solution II	1 ml/L

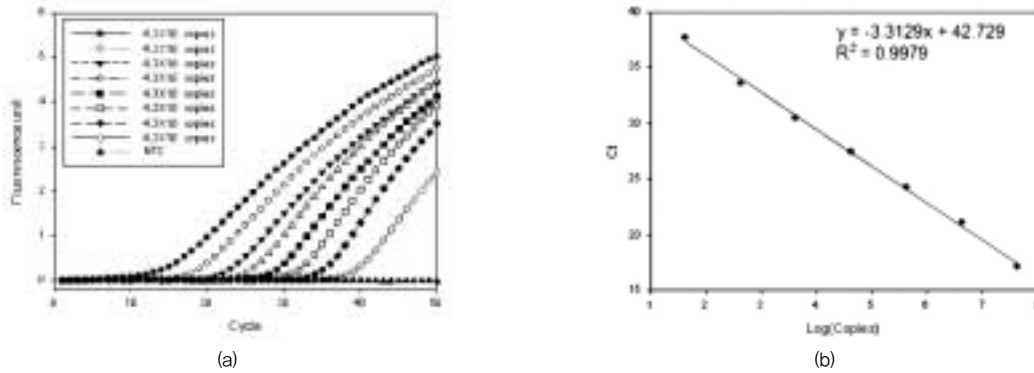


Fig. 1. Amplification of the 16S rDNA of anammox bacteria (a) and standard curve (b) of real-time quantitative PCR.

2.3. DNA의 추출 및 16S rDNA의 증폭

국내 A 하수처리장의 활성슬러지를 식중슬러지로 사용하였다. 활성슬러지가 채취된 반응기내 pH는 6.9였고, 휘발성 부유 고형물의 농도는 1,380 mg/L이었다. 침전시킨 활성슬러지 100 mL를 500 mL 반응기에 식중하였을 때, 반응기내 휘발성 부유 고형물의 농도는 1,038 mg/L이었다. 미생물 군집구조의 변화를 분석하기 위해 두 개의 1.5 mL tube에 1 mL씩 미생물을 채취하였다. 채취한 샘플은 3차 증류수로 세척하여 16S rDNA 증폭을 저해할 수 있는 불순물을 제거하였고, 최종 부피를 0.25 mL로 조정하였다. Power Soil™ DNA kit (Mo Bio Laboratories Inc., USA)에 미생물 전량을 투입하여 제조사의 설명서에 따라 DNA를 추출하고, 두 개의 DNA 샘플을 하나의 1.5 mL tube에 혼합하였다.

혐기성 암모늄 산화 미생물이 속해있는 Planctomycetes 문의 16S rDNA를 PCR로 증폭하기 위하여 Pla46F (5'-GGATTAGGCATGCAAGTC-3')와 1392R (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')을 프라이머로 사용하였다.^{20,21)} PCR을 위한 혼합액은 총 20 μ L이고, Smart 2 \times PCR Pre-Mix (Solgent Inc., Korea) 10 μ L, 10 μ M 농도의 프라이머 각 1 μ L, 주형 DNA 1 μ L, 3차 증류수 7 μ L로 조성되었다. PCR 기기는 MyCycler™ (BIO-RAD Inc., USA)를 사용하였으며, 증폭 조건은 pre-heating (95 $^{\circ}$ C, 2분), denaturing (95 $^{\circ}$ C, 20초), annealing (57 $^{\circ}$ C, 40초), extension (72 $^{\circ}$ C, 40초), final extension (72 $^{\circ}$ C, 5분)이었고, denatureing, annealing, extension 과정을 30회 반복하였다. 증폭산물은 100 V에서 25 분간 전기영동하고, QIAquick gel extraction kit (QIAGEN Inc., USA)를 이용하여 정제하였다.

정제된 16S rDNA는 T&A cloning vector (Real Biotech Corp., Taiwan)를 사용하여 ligation하고, HIT™ competent cells (Real Biotech Corp, Taiwan)를 사용하여 형질전환을 시행하였다. 이후, X-gal과 ampicillin이 첨가된

한천배지에 형질전환된 미생물을 도말하여 선택배양하였다. 16S rDNA의 삽입이 확인된 미생물을 ampicillin이 첨가된 LB Broth에서 과량배양 후, QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN Inc., USA)를 이용하여 plasmid를 순수정제하였다. 순수정제된 plasmid 시료를 Solgent Inc.(Korea)에 송부하여 염기서열을 분석하였다.

2.4. 계통분류학적 분지도 작성

본 실험에서 획득한 16S rDNA 염기서열의 상대적인 유사성을 MEGA 3.1 프로그램을 이용하여 분석하고, 5% 유사성을 보이는 염기서열을 한 그룹으로 분류하였다. 한 그룹 안에서 무작위로 하나의 염기서열을 택하여 OTU (Operational Taxonomic Unit)로 사용하였다. OTU의 근유종을 BLAST Network Service에 입력하여 탐색하였고, 근유종의 16S rDNA를 계통분류학적 분지도의 작성에 활용하였다. 실험에서 획득한 미생물과 근유종의 염기서열을 ClustalX 1.81을 이용하여 정렬하고, MEGA 3.1로 계통분류학적 분지도를 작성하였다. 계통분류학적 분지도 작성 시 neighbor-joining method를 알고리즘으로 이용하였으며, 신뢰성을 확보하기 위해 1,000회의 bootstrap을 시행하였다.

2.5. real-time quantitative PCR

RTQ-PCR을 이용하여 혐기성 암모늄 산화균을 정량하기 위하여 프라이머로 Pla46F (5'-GGATTAGGCATGCAAGTC-3')와 667R (5'-ACCAGAAGTTCCTCTC-3')를 사용하였고, TaqMan 탐침자로 381F (5'-AAGGGTGACGAAGCGACGCC-3')를 사용하였다.⁹⁾ RTQ-PCR 혼합액의 총 부피는 20 μ L이고, TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems Inc., USA) 10 μ L와 주형 DNA 0.5 μ L를 포함하였다. 프라이머와 탐침자는 최종 농도가 250 nM이 되도록 조정하여 투여하고 총 부피가 20 μ L이 되도록 3차 증류수를 투여하였다. ABI

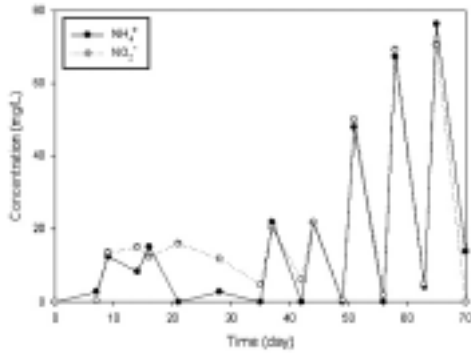


Fig. 2. Variation of ammonium and nitrite concentrations in the enrichment test.

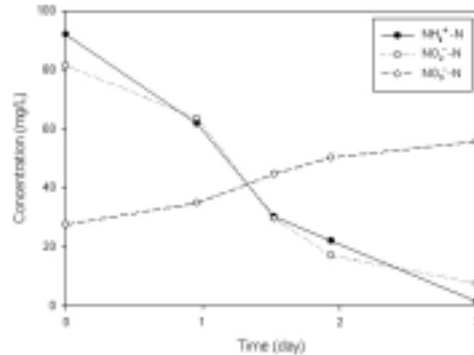


Fig. 3. Variation of nitrogen concentrations in the anammox activity test after 70 days of enrichment.

Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems Inc., USA)기기를 사용하였으며, 증폭조건은 증폭 효소 활성화(50°C, 2분) pre-heating (95°C, 10분), denaturing (95°C, 15초), annealing과 extension (60°C, 1분)이었고, denaturing, annealing과 extension 과정을 50회 반복하였다.

주형 DNA 농도에 따른 Ct값의 표준선을 만들기 위해 각 tube 당 4.3×10^1 to 4.3×10^8 copy의 혐기성 암모늄 산화균 16S rDNA를 투여하여 실험한 결과, 성공적으로 DNA가 증폭되었으며(Fig. 1a) 표준선은 R^2 값 0.9979의 훌륭한 직선성(Fig. 1b)을 보였다. 표준 시료의 증폭에서 DNA시료를 넣지 않은 Non-Template Control (NTC)은 증폭을 보이지 않았고, 모든 RTQ-PCR 실험에서 NTC를 사용하여 시료의 오염 여부를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 연속회분식 농후배양

혐기성 암모늄 산화균 농후배양을 위한 일주일 단위의 연속 회분식 반응기에서의 질소농도 추이를 Fig. 2에 나타내었다. 아질산은 혐기성 암모늄 산화 미생물에 저해를 주는 것으로 알려져 있기 때문에 반응 초기에 유입 아질산성 질소의 농도를 15 mg/L 이하로 유지해 주었고, 암모니아성 질소는 아질산성 질소와 동일한 양을 투여하였다. 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도를 각각 20 mg/L로 상승시킨 농후배양 37일 이후 현저한 혐기성 암모늄 산화균의 활성을 보였고, 농후배양 70일 까지 활성이 유지되었다. 마지막 회분식 반응에 암모니아성 질소 74.1 mg/L, 아질산성 질소 78.3 mg/L를 초기 기질로 투여하였는데, 유출농도는 암모니아성 질소 5.5 mg/L, 아질산성 질소 0.2 mg/L로 낮아지는 높은 기질 제거효율을 보였다. 아질산성 질소의 저해농도가 100 mg/L이므로 더 이상 기질농도를 증가시키지 않고, 농후배양된 혐기성 암모늄 산화균의 활성을 테스트

트하고 반응기내 군집구조를 분석하였다.

3.2. 혐기성 암모늄 산화 활성

농후배양을 종료한 70일 직후 별도의 회분식 실험을 수행하여 농후배양된 혐기성 암모늄 산화균의 기질소모 활성을 연속적인 시료분석을 통하여 확인하고, 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 소모 비율과 부산물인 질산성 질소의 생성 비율을 계산하였다.(Fig. 3)

혐기성 암모늄 산화균이 농후배양된 슬러지의 휘발성 부유고형물의 농도는 680 mg/L이었고, 3일간 반응을 진행하였다. 반응 초기의 암모니아성 질소 농도는 92.0 mg/L, 아질산성 질소는 81.5 mg/L이었고, 질산성 질소의 농도는 27.5 mg/L이었다. 3일 내에 대부분의 기질이 소모되었고, 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 제거율은 각각 98.5%와 90.7%로 나타났다. 혐기성 암모늄 산화 반응의 부산물인 질산성 질소는 55.7 mg/L로 증가하는 경향을 보였다.

Strous 등¹⁾은 혐기성 암모늄 산화 반응의 화학양론을 식 (1)과 같이 보고했고, 혐기성 암모늄 산화 반응의 질소성분 물질수지 기준으로 널리 사용되고 있다. 이에 의해 보고된 기질 질소 소모 및 부산물 질소 생성 비율은 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : \text{NO}_3^- = 1 : 1.32 : 0.26$ 이다. 본 실험에서 나타난 비율은 1:0.82:0.31로 Strous 등¹⁾의 선행연구와 차이를 보였다. 기질 및 부산물의 소모 및 생성 비율은 다른 농후배양 결과들에서도 차이를 나타내고 있다. 예를 들어, van der Graaf 등¹⁷⁾의 부유층반응기(fluidized bed reactor)에서는 기질비율이 1:1.31:0.22로 나타났고, Tsushima 등¹³⁾의 생물막 반응기는 1:1.2:0.33의 기질비율을 나타내었다. 양론비가 다른 것은 혐기성 암모늄 산화균의 특성이 다르기 보다는 혐기성 암모늄 산화 미생물 이외의 다른 미생물의 활동 때문인 것으로 설명할 수 있다. 미량의 산소가 유입되어 질산화 미생물이 활동하게 되면 암모니아성 질소가 이론보다 더 많이 소비되고^{13,15)}, 사멸되는 미생물에 의해 생성되는 유기물질은 탈질 미생

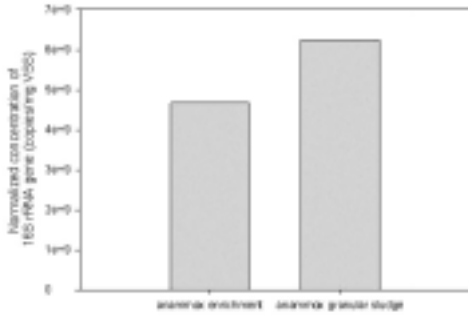


Fig. 5. Qualitative evaluation of the anammox enrichment by real-time quantitative PCR compared to the anammox granular sludge.

군집과도 관련 없는 것으로 판단되었다.

농후배양 후에 획득한 36개의 유전자는 모두가 혐기성 암모늄 산화균에 속하는 것으로 밝혀졌다.(Fig. 4b) 36개의 유전자 중 Ana-001 (GQ344835)에 속하는 23개(64%)의 유전자는 *Candidatus Anammoxoglobus* 속에 속하였고, Ana-002 (GQ344834)에 속하는 13개(36%)의 유전자는 *Candidatus Brocadia* 속에 속하였다. 계통분류학적 분지도 작성을 통해 혐기성 암모늄 산화 미생물의 개체수가 농후배양을 거쳐 급격히 증가되고 다른 Planctomycetes는 사멸한 것을 알 수 있었다.

선행 연구에서 축산폐수 처리장의 부유 활성슬러지와 오수처리용 회전원판 접촉식 반응기에서 탈리된 슬러지로부터 배양된 혐기성 암모늄 산화균은 *Candidatus Anammoxoglobus* 속 한 가지로 나타났었다.²²⁾ 이에 비해, 본 연구의 농후배양을 통해 증식한 혐기성 암모늄 산화균은 두 가지로 비교적 다양하였고, 식종하는 슬러지에 따라 농후배양되는 혐기성 암모늄 산화균이 다를 수 있다는 것을 보여주었다.

3.4. RTQ-PCR을 이용한 정량 평가

휘발성 부유 고형물의 농도가 농후배양 초기에는 1,038 mg/L 이었으나, 농후배양 후 680 mg/L로 감소하였는데, 이는 혐기성 및 독립영양 조건에서 증식하지 못하는 미생물들이 사멸하였기 때문인 것으로 판단된다. 이와 같이 활성슬러지를 이용한 혐기성 암모늄 산화균의 농후배양에서 혐기성 암모늄 산화균 및 관련 군집이 선택적으로 증식될 때, 휘발성 부유 고형물은 오히려 감소하므로 고형물의 무게를 측정하는 방식으로는 혐기성 암모늄 산화균이 얼마나 증식되는지 판단하기 어렵다. 따라서, 혐기성 암모늄 산화균만이 가지고 있는 특이적인 성분을 측정하여 농후배양의 결과를 평가해야 한다. 이런 관점에서 혐기성 암모늄 산화균의 특이적 정량 분석을 위한 RTQ-PCR의 이용은 정확한 농후배양의 평가 방법을 제공할 수 있다.

혐기성 암모늄 산화균 증식량의 적절한 비교를 위하여 혐기성

암모늄 산화 상향류식 연속 배양기²²⁾에서 1년 이상 선택 배양된 붉은색 혐기성 암모늄 산화 입상 슬러지를 채취하여 분쇄기로 균질화시키고 농후배양된 슬러지와 함께 정량분석을 시행하였다.(Fig. 5) 농후배양된 슬러지와 표준 슬러지의 휘발성 부유 고형물 농도가 서로 다르므로 측정된 혐기성 암모늄 산화균의 16S rDNA 농도를 휘발성 부유 고형물 농도 나눈 표준화된 값을 상호 비교하였다. 농후배양된 슬러지는 mg 휘발성 부유 고형물 당 4.66×10^9 copies, 표준 혐기성 암모늄 산화 입상 슬러지는 mg 휘발성 부유 고형물 당 6.23×10^9 copies의 16S rDNA를 함유하고 있어, 표준슬러지 대비 74.8%의 혐기성 암모늄 산화균이 70일만에 농후배양되었다는 것을 알 수 있었다.

70일의 농후배양을 통해 증식된 혐기성 암모늄 산화균의 군집에서 *Candidatus Anammoxoglobus*와 *Candidatus Brocadia* 속의 혐기성 암모늄 산화균이 식별되었고, 표준 시료 대비 74.8%로 농후배양된 것을 근거로 하수처리장 활성슬러지로부터 농후배양된 혐기성 암모늄 산화 균집은 실용화 공정의 집중 미생물로 활용 가능할 것으로 판단되었다.

4. 결론

국내의 하수처리장의 활성슬러지를 식종하여 혐기성 암모늄 산화 미생물을 농후배양하고 분자생물학적 기법을 통하여 농후배양 결과를 평가한 결과 아래와 같은 결론을 도출하였다.

- 1) 연속회분식 공정을 이용한 농후배양 초기 35일에 첫 혐기성 암모늄 산화 활성을 관찰할 수 있었고, 이후 배양 70일까지 암모니아성 및 아질산성 질소를 서서히 높여 각각 74.1 mg/L 및 78.3 mg/L 기질 농도에서 현저한 혐기성 암모늄 산화 활성을 나타내었다.
- 2) 농후배양을 종료한 70일 직후, 농후배양된 혐기성 암모늄 산화균의 기질소모 속도를 별도의 혐기성 회분식 실험으로 측정된 결과 3일 안에 암모니아성 질소 92.0 mg/L와 아질산성 질소 81.5 mg/L를 대부분 소모하여 각각 98.5%와 90.7%의 제거효율을 보였다. 질소성분 물질수지는 선행 연구를 통해 보고된 비율인 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^- = 1:1.32:0.26$ 과 차이를 보이는 $1:0.82:0.31$ 로 나타났다.
- 3) 농후배양 전후의 Planctomycetes 문에 속한 미생물의 16S rDNA를 cloning과 계통분류학적 분지도 작성을 통해 분석한 결과, 농후배양전의 미생물 시료에서는 획득한 75개의 유전자 중에서 기존 혐기성 암모늄 산화균과 일치하는 미생물을 발견하지 못하였고, 단지 39개의 유전자가 계통 분류

학적으로 혐기성 암모늄 산화균과 가까운 그룹을 이루고 있는 것으로 나타났다. 그러나, 농후배양 후에 획득한 36개의 유전자에서는 모두가 혐기성 암모늄 산화균에 속하는 것으로 밝혀졌고, 64%는 *Candidatus Anammoxoglobus* 속, 36%는 *Candidatus Brocadia* 속으로 규명되었다.

4) RTQ-PCR을 이용한 정량 평가

혐기성 암모늄 산화균의 개체수를 비교하기 위하여 혐기성 암모늄 산화 상향류식 연속 배양기에서 1년 이상 선택 배양된 붉은색 혐기성 암모늄 산화 입상 슬러지를 표준시료로 사용한 결과, 농후배양된 혐기성 암모늄 산화균은 표준 시료 대비 74.8%의 혐기성 암모늄 산화균을 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다.

상기의 실험결과를 통해 70일간 농후배양된 활성슬러지는 혐기성 암모늄 산화 실용화 공정의 식중 미생물로 활용가능할 것으로 판단되었다.

KSEE

사 사

이 논문은 환경부에서 지원한 2009년도 차세대 핵심환경기술 개발사업의 일환으로 수행한 논문으로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M., "The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**(5), 589~596 (1998).
2. Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M., "Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria," *ASM News*, **67**(9), 456~463 (2001).
3. Kartal, B., van Niftrik, L., Rattray, J., van de Vossenberg, J. L., Schmid, M. C., Sinninghe Damsté, J., Jetten, M. S., and Strous, M., "*Candidatus 'Brocadia fulgida'* : an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**(1), 46~55(2008).
4. Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J. W., Schleifer, K. H., and Wagner, M., "Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation," *Syst. Appl. Microbiol.*, **23**(1), 93~106(2000).
5. Kuypers, M. M., Sliemers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B. B., Kuenen, J. G., Sinninghe Damsté, J. S., Strous, M., and Jetten, M. S., "Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea," *Nature*, **422**(6932), 608~611(2003).
6. Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L. A., van de Vossenberg, J., Schmid, M. C., Webb, R. I., Schouten, S., Fuerst, J. A., Damsté J. S., Jetten, M. S., and Strous, M., "*Candidatus 'Anammoxoglobus propionicus'*" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria," *Syst. Appl. Microbiol.*, **30**(1), 39~49(2007).
7. van Dongen, U., Jetten, M. S., and van Loosdrecht, M. C., "The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater," *Water Sci. Technol.*, **44**(1), 153~160(2001).
8. Sliemers, A. O., Derwort, N., Gomez, J. L., Strous, M., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S., "Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor," *Water Res.*, **36**(10), 2475~2482(2002).
9. van der Star, W. R., Abma, W. R., Blommers, D., Mulder, J. W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C., and van Loosdrecht, M. C., "Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam," *Water Res.*, **41**(18), 4149~4163(2007).
10. Toh, S. K., Webb, R. I., and Ashbolt, N. J., "Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters," *Microb. Ecol.*, **43**(1), 154~167(2002).
11. Chamchoi, N., and Nitisoravut, S., "Anammox enrichment from different conventional sludges," *Chemosphere*, **66**(11), 2225~2232(2007).
12. Tsushima, I., Kindaichi, T., and Okabe, S., "Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR," *Water Res.*, **41**(4), 785~794(2007).
13. Tsushima, I., Ogasawara, Y., Kindaichi, T., Satoh, H., and Okabe, S., "Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors," *Water Res.*, **41**(8), 1623~1634(2007).
14. Sánchez-Melsiό, A., Cáliz, J., Balaguer, M. D., Colprim, J., and Vila, X., "Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems," *Chemosphere*, **75**(2), 169~179(2009).
15. Wang, T., Zhang, H., Yang, F., Liu, S., Fu, Z., and Chen, H.,

- "Start-up of the Anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor," *Bioresour. Technol.*, **100**(9), 2501~2506(2009).
16. López, H., Puig, S., Ganigué, R., Ruscalleda, M., Balaguer, M. D., and Colprim J., "Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**(3), 233~241(2008).
17. 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 micro-organisms in a fluidized bed reactor," *Microbiology*, **142**(8), 2187~2196(1996).
18. Strous, M., Kuenen, J. G., and Jetten M. S., "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), 3248~3250(1999).
19. APHA, AWWA, WEF, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21th ed., Washington D. C., pp. 2-59.
20. Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., and Schleifer, K. H., "Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes," *Microbiology.*, **144**(12), 3257~3266(1998).
21. Ferris, M. J., Muyzer, G., and Ward, D. M., "Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(2), 340~346(1996).
22. 배효관, 박경순, 정윤철, 정진영, "혐기성 암모늄 산화 반응기 내 붉은색 입상슬러지의 미생물 군집구조 분석," *대한환경공학회지*, **28**(10), 1055~1064(2006).