

살수여상에서의 질소, 인 제거 미생물 분포 및 질산화 활성 조사

김동진 · 유익근* · 안대희**

한림대학교 환경생명공학과 및 에너지·환경연구소,
*울산대학교 화학생명공학부, **명지대학교 환경생명공학과
(2009년 4월 13일 접수; 2009년 4월 28일 수정; 2009년 5월 20일 채택)

Analysis on the distribution of nitrogen and phosphorus removing microorganisms and nitrifying activity in a trickling filter

Dong-Jin Kim, Ik-Keun Yoo* and Dae Hee Ahn**

Department of Environmental Sciences & Biotechnology and Institute of Energy & Environment, Hallym
University, Kangwon 200-702, Korea

*School of Chemical Engineering and Bioengineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

**Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Myongji University, Kyunggi 449-728, Korea

(Manuscript received 13 April, 2009; revised 28 April, 2009; accepted 20 May, 2009)

Abstract

Trickling filter has been extensively studied for the domestic wastewater treatment especially for the small scale plants in rural area. The performance of the trickling filter depends on the microbial community and their activity in the biofilms on the media. Nitrification, denitrification, and phosphorus removal of the trickling filter from the wastewater depend on the activity and the amount of the specific microorganisms responsible for the metabolism. For the estimation of the performance of a trickling filter, batch nitrification experiment and fluorescence in situ hybridization (FISH) were carried out to measure the microbial activity and its distribution on the media of the trickling filter. Batch nitrification activity measurement showed that the top part of the 1st stage trickling filter had the highest nitrification activity and the maximum activity was 0.002 g NH₄-N/g MLVSS · h. It is thought that higher substrate (ammonia) concentration yields more nitrifying bacteria in the biofilms. The dominant ammonia oxidizer and nitrite oxidizer in the biofilm were *Nitrosomonas* species and genus *Nitrospira*, respectively, by FISH analysis. Less denitrifiers were found than nitrifiers in the biofilm by the probe Rrp1088 which specifically binds to *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter*, and *Paracoccus*. Phosphorus accumulating bacteria were mostly found at the surface of the biofilm by probe Rc988 and PAO651 which specifically binds to *Rhodocyclus* group and their biomass was less than that of nitrifiers.

Key Words : FISH, Nitrifying activity, Nitrogen removal, Phosphorus removal, Trickling filter

1. 서 론

생물학적 고도처리시설에서 질소제거는 질산화
(nitrification)와 탈질(denitrification)로 구성되어 있으

며 질소제거 공정은 호기성 독립영양 미생물에 의한 질산화를 거쳐 중속영양 미생물에 의한 무산소 반응조에서의 탈질에 의해 기체 형태의 질소(N_2)로 환원시킨 후 공기 중으로 방출하여 제거한다. 질산화는 다시 암모니아 산화균(ammonia oxidizers)과 아질산산화균(nitrite oxidizers)의 두 종류의 산화균에 의해서 탄소가 진행된다. 두 산화균은 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 무기 화합물을 산화하여 얻어지는 자유 에너지를 에너지원으로 사용하며 세포증식을 위해서 무기탄소(CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-})를 이용한다.

하폐수에서 질소 제거 성능을 향상시키기 위해서는 율속 단계로 알려진 질산화 속도를 높여야 하고 그러기 위해서는 질산화 미생물의 분포를 높이고 질산화 미생물의 활성을 높게 유지하는 환경 조성이 필요하다. 질산화에 유리한 환경 조건은 물리화학적 측정으로 쉽게 알 수 있지만 암모니아 산화균과 아질산 산화균으로 이루어진 질산화 미생물의 종류와 분포를 조사하는 것은 쉽지 않다. 그 이유는 자연에서 분리 배양할 수 있는 미생물이 극히 제한적이기 때문이다. 이는 미생물의 특성상 그 군집구조가 매우 작을 뿐 아니라 배양 자체에 활성을 나타내지 않거나 전혀 배양되지 않는 경우가 다수 존재하기 때문이다. 활성 슬러지의 경우 총 계수된 미생물의 1 ~ 15% 정도만이 배양 가능하였으며, 해수의 경우 1% 이하가 배양 가능하다고 보고되고 있다¹⁾.

최근 분자 생물학의 발달로 인해 미생물의 다양성은 유전자 수준으로 접근이 가능하여졌다. 미생물들은 유전자의 상동성에 따라 그룹화 되었고, 이는 진화적 상관관계를 대변한다²⁾. 미생물 다양성 연구의 효과적인 방법으로 16S rRNA를 cloning하여 서열을 분석하는 것이 있다³⁾. 일반적으로 rRNA를 통한 분석은 자연환경 내 미생물로부터 유전자를 추출(extraction), 증폭(amplification), 복제(cloning), 서열화(sequencing), 비교서열 분석(comparative analysis)의 과정을 거쳐 이루어진다. Polymerase chain reaction (PCR)과 결합된 16S rRNA oligonucleotide의 서열 분석은 새로운 미생물 및 자연계 내 미생물의 동정에 있어 빠르고 믿을만한 정보를 제공하지만, 미생물의 계수 및 구조 분석과 공간적 분포의 조사에는 한계가 있었다⁴⁾. 이에 rRNA oligonucleotide의 특정 부위에 형광 표지를 붙인 뒤 confocal laser scanning micro-

scopy (CLSM) 관찰을 통해 이러한 제한을 극복할 수 있다. 초기에는 방사성 물질로 표지된 (radio-labeled) DNA 혹은 23S rRNA를 사용하여 연구가 수행되었다^{5,6)}. 이러한 기술은 미생물의 변형 없이 세포 내부를 조사할 수 있는 핵산 서열화(sequence)를 가능하게 하였다. 그러나 형광 염료의 발전과 함께 방사성 표지는 점차로 비방사성 형광물질도 대체되어 형광염료로 표지된 oligonucleotide를 단일 미생물의 관찰을 위해 사용하였다⁷⁾. 형광 probe들은 서로 다른 파장대의 염료들로 표지할 수 있어 단일 hybridization 단계로 여러 서열들을 동시에 관찰할 수 있게 되었다. 이러한 형광 표시 rRNA-targeted oligonucleotide probes와 결합된 fluorescence in situ hybridization (FISH) 기법은 생물막⁸⁾, 활성 슬러지⁴⁾와 같은 복잡한 미생물 군집 내 미생물의 동정 및 계수에 있어서도 배양 없이 빠르고 믿을만한 정보를 제공하여 주었다. 특히 앞에서 기술한 CLSM은 미생물들의 공간적 분포 및 군집구조 분석을 가능하게 하였다.

따라서 CLSM은 자연계 및 폐수처리 시설에서 floc 및 aggregate를 형성하는 미생물뿐만 아니라 여재에 부착된 생물막 내 미생물들의 입체적이고 구조적인 관찰이 가능하다. 또한 16S rRNA oligonucleotide probe와 함께 정확한 미생물의 동정이 가능하며, 한 이미지에 최대 3종류의 미생물 군집구조 및 공간적 분포를 나타낼 수 있다⁹⁾.

본 연구에서는 생활하수를 처리하기 위해 1차, 2차 처리조로 구성된 살수여상에서 질산화 성능을 확인하는 방법으로 회분실험을 이용한 질산화 활성과 FISH를 이용한 질산화, 탈질 및 타인 미생물의 종류와 분포를 살수여상의 높이별로 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 살수여상에 의한 하수처리

본 연구에 이용된 살수여상 시설은 강원도 원주시에 위치하는 25 톤/일 규모의 소규모 마을하수 처리 시설이며 1차 침전조 다음에 2단계에 걸쳐서 각 26.5 m^3 (1차 처리조)와 16 m^3 (2차 처리조)의 살수여상 반응조가 순서대로 구성되어 있으며 담체층 높이는 2 m이다. 유입수는 평균 BOD 125 mg/L, 총 부유물질 70 mg/L, 총 질소 30 mg/L, 총인 2.8 mg/L로 되어 있으며 가동한지 3년 이상 경과하였다. 담체로는 가

로, 세로 각각 20~50 mm, 두께 2~5 mm의 침엽수 목편을 이용하였다. 처리수의 BOD 농도는 0.3~6.2 (평균 1.7) mg/L로서 제거효율은 98.5%, SS 농도는 2.0~18.0 (평균 8.4) mg/L로서 제거효율은 86.9%, COD_{Mn} 농도는 11.2~21.6 (평균 16.2) mg/L로서 제거효율은 64.7%, T-N 농도는 6~20.8 (평균 12) mg/L로서 제거효율은 60.3%, T-P 농도는 1.1~2.1 (평균 1.6) mg/L로서 제거효율은 42.7%를 나타냈다.

2.2. 회분 질산화에 의한 살수여상 부착 미생물의 질산화 활성 실험

1차 처리조와 2차 처리조가 직렬로 연결된 연속 살수여상 반응조의 질산화 활성을 알아보기 위하여 살수여상 담체에 부착된 생물막 시료를 채취하여 회분 실험을 수행하였다. 각각의 처리조에서 높이에 따른 구간별로 시료를 채취하여 반응조의 구간별 질산화 성능을 조사하였다. 두 처리조에서 시료를 채취한 것을 각각 1차 처리조, 2차 처리조로 하였고 각 처리조에서 시료를 채취한 살수여상 높이에 따라서 상층부(깊이: 0~30 cm), 중층부(깊이: 80~120 cm), 하층부(깊이: 170~200 cm)로 구분하였다. 질산화 성능을 알아보기 위한 회분 실험에는 암모니아성 질소 25 mg/l, 질산화에 따른 pH 저하를 막기 위해서 완충

제 bicarbonate, 미생물의 생장에 필요한 영양염류를 삼각플라스크에 첨가하여 교반 incubator에서 100 rpm, 25℃로 약 65 시간동안 실험을 수행하였다. 회분 실험에 필요한 미생물량은 1, 2차 처리조의 각 장소에서 채취한 미생물이 다수 부착되어 있는 담체를 영양염류를 첨가한 증류수에 넣은 후 빠른 속도로 교반하여 담체에서 탈리시킨 후 원심분리 하여 미생물을 침전시켰다. 침전된 미생물을 수차례 세척한 후 다시 원심 분리하여 사용하였다. 미생물량의 정확한 양은 모든 회분 실험이 끝난 후 Standard method¹⁰⁾에 따라서 105℃에서 2 시간 건조시킨 중량과 550℃에서 15 분간 회화시켜 측정하였다.

2.3. Fluorescence in situ hybridization (FISH)에 의한 미생물 분포 조사

2.3.1. 슬러지 시료의 고정

FISH 실험은 담체에 부착된 시료를 채취하여 바로 고정 시약인 4% paraformaldehyde 용액에 넣어 4℃에서 2~3 시간 동안 고정하였다. 고정 후 phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 3회 세척하면서 고정시약을 제거한 뒤 ethanol 희석액(50, 80, 98%)으로 약 3 분씩 탈수 과정을 수행하였다.

2.3.2. 실험에 사용한 16S rRNA oligonucleotide

Table 1. 16S and 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this experiment

Probe	Sepecificity	Sequence(5'-3')	FA ^a (%)	NaCl ^b (mM)	Ref.
Eub338I	bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	225	12)
Eub338II	bacteria group not covered by EUB338I and EUB 338III	GCAGCACCCCGTAGGTGT			13)
Eub338III	bacteria group not covered by EUB338I and EUB 338II	GCTGCCACCCCGTAGGTGT			13)
Alf1b	α subclass of <i>Proteobacteria</i>	CGTTCGYTCTGAGCCAG	20	225	12)
Bet42a	β subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCCTTCGTTT	35	80	12)
Nso1125	Ammonia-oxidizing β- <i>Proteobacteria</i>	CGCCATTGTATTACGTGTGA	35	80	14)
Nsm156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTCGAT	5	636	14)
Ntspa662	genus <i>Nitrospria</i>	GGAATTCGCGCTCCTCT	40	56	15)
Nit3	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56	4)
PAO651	PAO cluster	CCCTCTGCCAAACTCCAG	35	80	16)
Rc988	<i>Rhodocyclus</i> group	AGGATTCCTGACATGTCAAGGG	0	900	16)
RRP1088	Genera <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodovulum</i> , <i>Roseebacter</i> and <i>Paracoccus</i> and other bacteria	CGTTGCCGACTTAACC	0	900	17)

^aPercentage formamide in the hybridization buffer.

^bMillimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

probes

FISH 실험에 사용한 oligonucleotide probe와 이들의 서열, specificity 그리고 hybridization 조건을 Table 1에 나타내었다. 이들 probe는 fluorescein isothiocyanate (FITC), hydrophilic sulfoindocyanine dye (Cy3)를 부가하여 합성하였다(MWG biotech, Germany).

2.3.3. In situ hybridization과 CLSM 관찰

고정과 탈수 과정의 전처리를 거친 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide; Table 1)와 probe로 hybridization chamber에서 48°C, 120분 동안 반응시킨다.^{1,11)} 첨가한 probe 농도는 25-50 ng/ml로 일정하게 첨가하여 주었다. Hybridization이 끝난 후 미리 예열된 washing buffer(20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, NaCl)로 가볍게 행구어 46°C에서 15분씩 2회의 세척 과정을 수행하였다. 세척이 끝난 시료를 증류수로 가볍게 행구어 washing buffer를 제거해 준 뒤 공기 중에서 건조시킨 후 10 uL의 mounting medium을 첨가하고 cover slide로 덮어 slide 시료를 완성하였다. In situ hybridization이 끝난 slide는 Zeiss Axiovert 형광 현미경과 Kr/Ar

ion laser(Excitation wave length 494, 550, 650 nm)가 장착된 MRS-1024(Bio-Rad, U.K.) CLSM를 사용하여 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 회분실험에 의한 살수여상 부착 미생물의 질산화 활성 조사

Fig. 1, 2는 순서대로 연결된 살수여상 1, 2차 처리조의 높이에 따라 채취한 미생물 시료를 이용하여 회분 실험 결과이다. 두 처리조 모두 상층부에 위치한 시료가 하층부에 비해 보다 빠른 질산화 속도를 보이고 있다. 특히 1차 처리조의 상층부와 중층부에서 질산화 활성이 매우 높은 것을 볼 수 있으며 이는 뒤에 specific activity를 계산한 것에서도 알 수 있다. 두 처리조 모두 하층부에서는 비록 낮은 속도로 일어나지만 질산화 성능은 존재함을 알 수 있다. 특히 Fig. 2의 2차 처리조 하층부의 경우 45 시간 이후 활발한 암모니아성 질소 산화가 일어나는 것을 볼 수 있다. 제1 처리조와 제2 처리조의 상층부와 중층부에서는 암모니아 질산화 속도가 빨리 일어나며 그

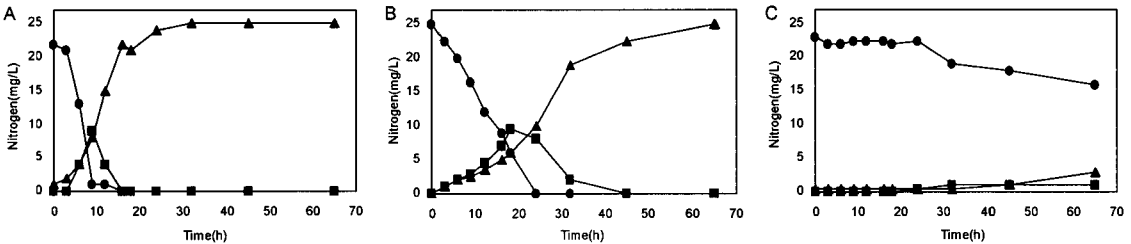


Fig. 1. Nitrifying activity of the biofilms of the trickling filter (1st stage) at different filter depth. (A: Nitrifying activity from the top part of the trickling filter, B: Nitrifying activity from the middle part of the trickling filter, C: Nitrifying activity from the bottom part of the trickling filter) (●: NH₄⁺-N, ■: NO₂⁻-N, ▲: NO₃⁻-N)

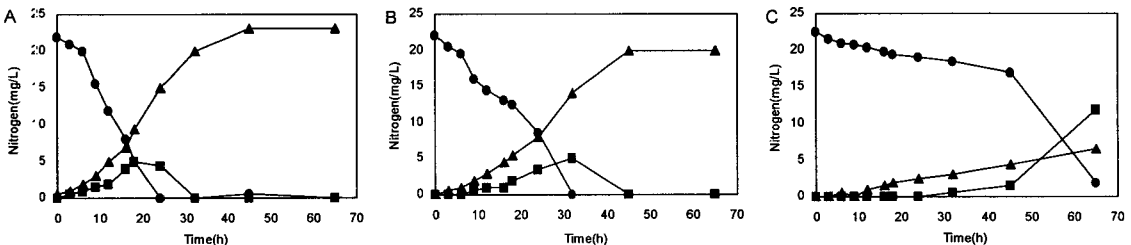


Fig. 2. Nitrifying activity of the biofilms of the trickling filter (2nd stage) at different filter depth. (A: Nitrifying activity from the top part of the trickling filter, B: Nitrifying activity from the middle part of the trickling filter, C: Nitrifying activity from the bottom part of the trickling filter) (●: NH₄⁺-N, ■: NO₂⁻-N, ▲: NO₃⁻-N)

결과 아질산이 미처 질산성 질소로 산화되지 못하고 아질산성 질소가 축적되는 현상을 보여주고 있다.

Fig. 3은 1차, 2차 처리조의 시료 채취 장소에 따른 암모니아 산화균의 specific activity를 나타내었다. 1차 처리조의 상층부에서 암모니아 산화균의 specific activity가 가장 크며 최대 0.002 g NH₄-N/g MLVSS · h 값을 가진다. 처리조 별로 볼 때 1차 처리조가 2차 처리조 보다 질산화 활성이 높고, 살수여상 높이 구간별로 보면 상층부가 하층부보다 질산화 활성이 높다. 반면에 1, 2차 처리조 하층부의 암모니아 산화균의 65 시간 동안의 specific activity는 각각 7.54×10⁻⁵ 과 1.39×10⁻⁴ g NH₄-N/g MLVSS · h로 모두 매우 낮은 것을 알 수 있다.

본 장치에서의 질산화 회분 실험결과 대부분의 질산화 활성은 1차 처리조 상층부에서 가장 높게 나타남을 알 수 있다. 이는 암모니아성 질소의 기질이 가장 높게 나타나는 지역이기도 하며 따라서 높은 기질 농도에 노출된 지역에서 질산화 활성이 높다고 판단된다. 그 아래인 중층부나 하층부, 또는 2차 처리조에서도 질산화 활성이 나타나는 하나 1차 처리조의 상층부의 활성에 비해서는 낮게 나타난다. 기질인 암모니아가 존재하지 않을 경우 이를 에너지원으로 이용하여 성장하는 질산화균이 적게 분포할 수밖에 없다. 따라서 전체 미생물을 기준으로 한 질산화 활성이 낮은 것으로 사료된다. 최대 질산화 활성은 0.002 g NH₄-N/g MLVSS · h 값을 가진다. 그러나 여기에서의 MLVSS에는 질산화 미생물 외의 중속영양미생물이 모두 포함되어 있기 때문에 질산화 미생물만의 비활성을 확인하기는 어렵다. 일반적으

로 유기물이 포함된 폐수에서의 질산화 미생물의 비율은 BOD₅/TKN의 비율에 따라 달라지며 그 비율이 낮을수록 질산화 미생물 비율은 증가하고 높을수록 질산화 미생물 비율은 감소한다¹⁸⁾.

Metcalf와 Eddy¹⁸⁾의 문헌에 따르면 본 실험에서 적용된 폐수의 BOD₅/TKN 비는 6 내지 7 정도이므로 질산화 미생물의 비율은 약 0.04로 볼 수 있다. 즉 전체 미생물의 약 4%만이 질산화 미생물로 볼 수 있고 이 가정이 타당하다면 실제 질산화 미생물만의 활성은 측정값의 약 25 배 정도로 볼 수 있다.

3.2. 살수여상 담체 부착 미생물의 FISH에 의한 미생물 분포조사

살수여상 처리조 1차와 2차에서 각각 시료를 채취하여 실험을 수행하였으나 1차 처리조에서 2차 처리조 보다는 비교적 많은 양의 미생물이 검출되었다. 하지만 본 실험에서 두 처리조에서의 미생물 동정에서 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 결과는 검출된 미생물을 중심으로 서술하였다.

Fig. 4는 형광 표식한 Eub338Mix(I, II, III 혼합) probe를 사용하여 domain bacteria를 검출한 결과를 나타낸 것이다. DIC (differential interference contrast) 이미지와 비교하였을 때 hybridization이 잘 되어있음을 알 수 있다. 따라서 본 시료는 FISH 실험을 수행하기 위한 16S rRNA의 함량이 충분함을 보여준다.

Fig. 5는 살수여상 내 질산화 미생물의 검출 결과를 나타낸 것이다. [A]는 전체 bacteria에 특이적으로 결합하는 probe Eub338과 *Proteobacteria*의 α 아강에

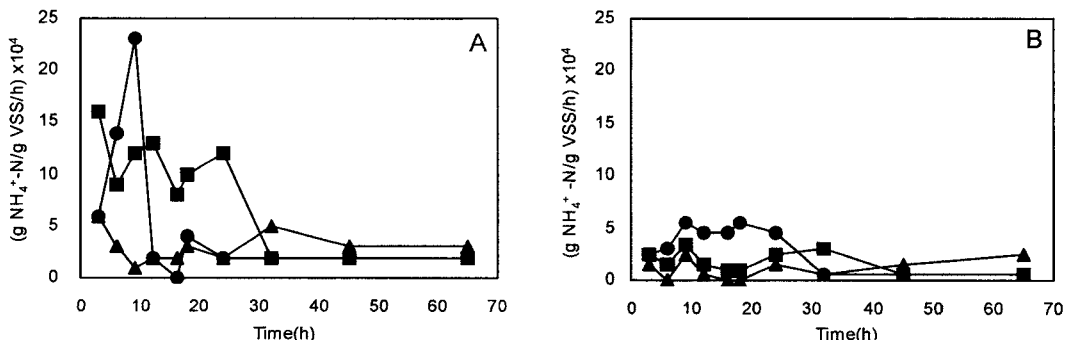


Fig. 3. Specific ammonia oxidation activity of the biofilms at different bed depth. (A: 1st stage trickling filter, B: 2nd stage trickling filter, ●: top part, ■: middle part, ▲: bottom part)

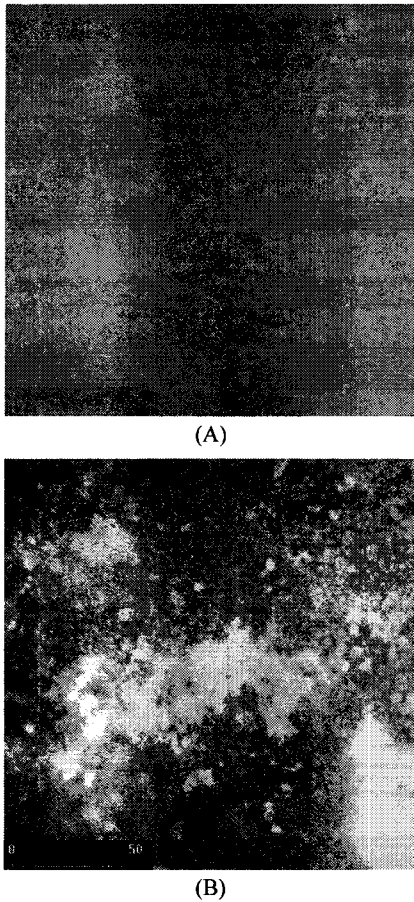


Fig. 4. FISH image analysis of the biofilm in the trickling filter for the distribution of all bacteria ([A]: Eub338Mix - Cy5; [B]: DIC image). Bar = 50 μ m.

특이적으로 결합하는 probe Alf1b의 동시 FISH한 결과를 나타내었다. 전체 미생물 그룹중에서 *Proteobacteria*의 γ 아강의 미생물이 다수 분포하고 있음을 확인할 수 있다. [B]는 *Proteobacteria*의 β 아강에 속하는 암모니아 산화균에 특이적으로 결합하는 probe Nso1225와 *Nitrosomonas*에 특이적으로 결합하는 Nsm156의 FISH 결과이다. Nso1225가 Nsm156 보다 더 큰 분포를 가짐을 확인할 수 있다. [C]는 전체 bacteria에 결합하는 Eub338과 아질산 산화균인 genus *Nitrospira*에 특이적으로 결합하는 probe Ntspa662의 FISH 결과이다. 아질산 산화균으로 *Nitrospira*로 검출되었으며 일반적인 아질산 산화균인 *Nitrobacter* (Nit3)는 거의 발견되지 않았다. 흥미로운 것은 *Nitrospira*가 대부분 생물막 내부에 분포함을 알

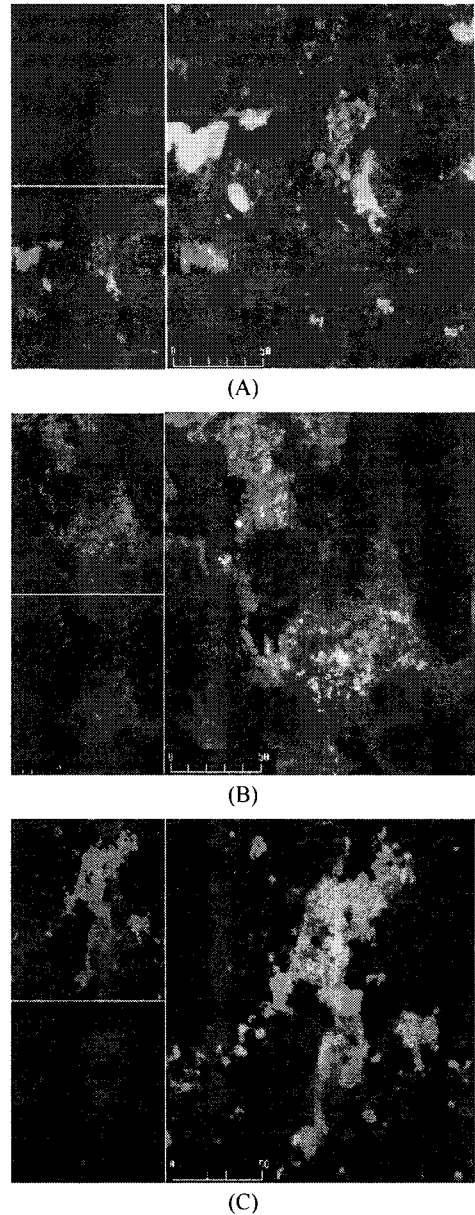


Fig. 5. FISH image analysis of the biofilm in the trickling filter for the distribution of ammonia oxidizing bacteria (Nsm156, Nso1225). [A]: Eub338Mix - Cy5, Alf1b - Cy3; [B]: Nso1225 - Cy3, Nsm156 - FITC; [C]: Eub338Mix -Cy3, Ntspa662 -Cy5. Bar = 50 μ m.

수 있다. 이는 *Nitrospira*가 아질산 산화균이고 기질을 얻기 위해서는 암모니아 산화균의 도움이 필요하므로 암모니아 산화균 뒤쪽에 주로 분포하는 것이 이롭기 때문이다.

Fig. 6은 전체 bacteria인 Eub338과 *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* 그리고 *Paracoccus* 속의 탈질 미생물에 특이적으로 결합하는 probe Rrp1088과 결합하여 형광을 나타내는 미생물들을 나타내었다. 탈질 미생물은 전체 시료에서 질산화 미생물보다 적은 수가 발견되었다. 이는 살수여상 장치가 호기성 상태로 작동되고 있기 때문에 준혐기성 상태에서 활동하는 탈질 미생물의 성장에는 적합하지 않았기 때문으로 판단된다. 일부 탈질 미생물이 나타난 것은 살수여상 여재 표면에 형성된 생물막으로 인하여 생물막 내부에 형성된 준혐기성 조건으로 인해 탈질 미생물이 소량 존재하고 있는 것이다. 이는 의 운전 결과자료에서 보이는 바와 같이 질산염이나 아질산염이 상당량 존재하여 높은 질산화 성능에 비해 탈질 성능이 낮게 나타난 결과와 일치하는 것이다.

Fig. 7은 살수여상 미생물 시료를 *Rhodocyclus* group에 특이적으로 결합하는 probe인 Rc988과 인 축적 미생물로 알려진 probe PAO651의 FISH 결과를 나타낸 것이다. 시료에서 많은 양의 인 축적 미생물이 다수로 존재하지 않았으며 일부에서 Fig. 7과 같이 대부분의 탈인 미생물은 생물막의 표면에 분포함을 알 수 있다. 이는 인 흡수 방출에 생물막 표면이 유리한 여건을 가지고 있음이고 생물막 내부는 휘발성 유기산과 인의 흡수에 불리한 여건 때문인 것으로 사료된다. 탈인 미생물이 다량으로 나타나지 않는 것은 탈인 미생물이 다른 종속영양미생물과의 경쟁에서 우위를 차지하기 위해서는 인의 흡수와 방출, 세포 내의 PHA 축적 대사와 연관되어야 하고

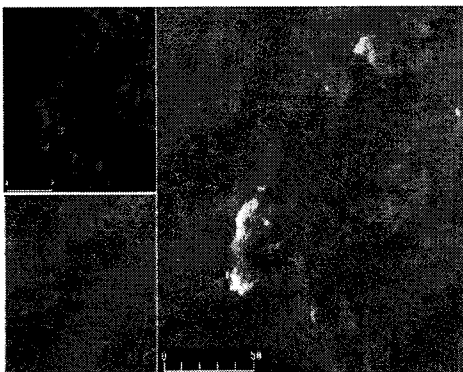


Fig. 6. FISH image analysis of the biofilm in the trickling filter for the distribution of denitrifying bacteria. (Eub338Mix - Cy5, Rrp1088 - FITC). Bar=50 μ m.

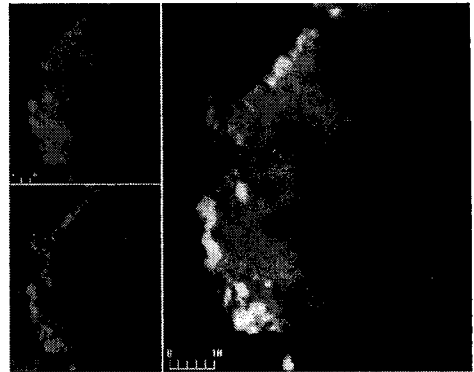


Fig. 7. FISH image analysis of the biofilm in the trickling filter for the distribution of phosphorus accumulating organisms. (Rc988 - FITC, PAO651 - Cy3). Bar=10 μ m.

그러기 위해서는 미생물이 호기, 혐기 조건에 교대로 노출되어야 이러한 조건을 충족시킬 수 있다. 그러나 본 살수여상 장치는 호기 조건으로 운전되기 때문에 혐기조건에 노출될 기회가 거의 없어 비록 인 축적 미생물이 다수 존재한다하더라도 과량의 인 섭취 기능을 기대하기는 어렵다고 보인다.

4. 결 론

살수여상의 담체 부착 미생물에 대해 질산화 활성 실험, FISH에 의한 질산화, 탈질, 탈인 미생물 조사한 결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1) 시료를 질산화 회분 실험을 통해 분석한 결과 질산화 활성은 1차 처리조 상층부에서 가장 높게 나타남을 알 수 있다. 이는 암모니아성 질소의 기질이 가장 높게 나타나는 지역이기도 하며 따라서 높은 기질 농도에 노출된 지역에서 질산화 활성이 높다고 판단된다. 살수여상의 중층부나 하층부, 또는 2차 처리조에서도 질산화 활성이 나타나기는 하나 1차 처리조의 상층부의 활성에 비해서는 낮게 나타난다. 최대 질산화 활성은 0.002 g $\text{NH}_4\text{-N/g MLVSS} \cdot \text{h}$ 값을 보였다.

2) FISH 기법으로 살수여상 장치에 부착된 미생물을 관찰한 결과 암모니아 산화균은 아질산 산화균보다 많이 분포하였으며 대부분의 암모니아 산화균은 *Nitrosomonas*, 아질산 산화균은 *Nitrospira*로 나타났다.

3) *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* 그리고 *Paracoccus* 속의 탈질 미생물 probe Rrp1088과 결합하여 형광을 나타내는 미생물들이 관찰되었으나 질산화 미생물보다 적은 분포를 나타내었다.

4) 살수여상 내에서 인 축적 미생물을 조사한 결과 *Rhodocyclus* group (Rc988)과 PAO651의 분포를 확인하였으며 분포량은 질산화 미생물에 비해 많지는 않았으며 주로 생물막 표면에 분포함을 확인할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 산학협력실 사업에 의해서 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Amann R. I., Ludwig W., Schleiffer K. H., 1995, Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbial Rev.*, 59, 143-109.
- 2) Woese C. R., 1987, Bacterial evolution, *Microbial Rev.*, 51, 221-271.
- 3) Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R., 1998, Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *J. Bacteriol.*, 180, 4705-4774.
- 4) Wagner M. G., Koops H. P., Flood J., Amann R., 1996, *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Water Sci. Tech.*, 34, 237-244.
- 5) John H., Birnstiel M., Jones K., 1969, RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level, *Nature*, 223, 582-587.
- 6) Pardue M. L., Gall J. G., 1969, Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64, 600-604.
- 7) De Long E. F., Wickha G. S., Pace N. R., 1989, Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells, *Science*, 243, 1360-1363.
- 8) Amann R. I., Fuchs B. M., Behrens S., 2001, The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization, *Curr. Opin. Microbiol.*, 12, 231-236.
- 9) Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U., 2000, Heterogeneity in biofilms, *FEMS. Microbiol. Rev.*, 24, 661-671.
- 10) APHA, AWWA, WEF, 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed., 2-55~2-60, 5-14~5-18.
- 11) Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer, K. H., 1992, Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclass of proteobacteria: problems and solutions, *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 593-600.
- 12) Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux, R., Stahl, D. A., 1990, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1919-1925.
- 13) Daims H., Brhl A., Amann R., Schleifer K. H., Wagner M., 1999, The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set, *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434-444.
- 14) Mobarry B. K., Wangner M., Urbain V., Rittmann B. E., Stahl D. A., 1996, Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, *Appl Environ Microbiol.*, 62, 2156-2162.
- 15) Daims H., Nielsen J. L., Nielsen P. H., Schleifer K. H., Wagner, M., 2001, *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5273-5284.
- 16) Crocetti G. R., Hugenholtz P., Bond P. L., Schuler A., Keller J., Jenkins D. Blackall L. L., 2000, Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1175-1182.
- 17) Neef A., 1997, Anwendung der *in situ*-Einzelzell-identifizierung von Bakterienzur Populationsanalyse mikrobiellen Biozonen, Ph.D. Dissertation, Technical University of Munich, Munich.
- 18) Metcalf & Eddy, 1991, Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse, 3rd Ed., McGrawHill, Inc., 697pp.