

이온선택성 미소전극을 이용한 질산화 생물막내의 질소 이온의 농도 모니터링

선지윤¹ · 변임규² · 이태호¹ · 박태주^{1,3*}

¹부산대학교 사회환경시스템공학과, ²부산대학교 환경기술산업개발연구센터, ³한국환경정책영향평가연구원

Monitoring of Nitrogen Ion in Nitrifying Biofilm using an Ion Selective Microelectrode

Jiyun Seon¹, Imgyu Byun², Taeho Lee¹, and Taejoo Park^{1,3*}

¹Department of Civil and Environmental Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Institute for environmental technology and industry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

³Korea Environment Institute, Seoul 122-706, Korea

Abstract An ion selective microelectrode (ISME) was fabricated to measure concentrations of ammonium (NH_4^+ -N) and nitrate (NO_3^- -N) according to the depth of nitrifying biofilm. The limits of detectability and validity of results were investigated to evaluate the ISME. The electromotive force (EMF) was directly proportional to the ion concentration, and average detection limits of NH_4^+ and NO_3^- ISME were $10^{-5.14}$ and $10^{-5.16}$ M, respectively. The concentrations of NH_4^+ -N and NO_3^- -N in various depths on the nitrifying biofilm were measured by the ISME. When a modified Ludzack-Ettinger (MLE) process was operated at an HRT of 6 h, concentration gradients of NH_4^+ -N in the bulk solution and biofilm at depths of 100 μm decreased by 70 μM , while NO_3^- -N increased by 101 μM and remained constant thereafter. At an HRT of 4 h, concentration gradients of NH_4^+ -N at depths of 500 μm decreased by 160 μM and NO_3^- -N increased by 162 μM and remained constant thereafter. As HRT decreased, the concentration gradients of NH_4^+ -N and NO_3^- -N between bulk solution and biofilm was higher due to the increase of nitrogen load. Also, the concentration gradients of the NH_4^+ -N and NO_3^- -N of biofilm in the second aerobic tank were lower than those of the first aerobic tank, suggesting differences of nitrogen load and concentrations of DO between the first and second aerobic tank.

Keywords: ion selective microelectrode, biofilm, ion profile, NH_4^+ , NO_3^-

서론

현재 하·폐수 처리에 있어 가장 널리 이용되는 활성슬러지 공정은 유기물을 제거하기 위한 것으로, 적절히 처리되지 못하고 수계에 배출된 질소와 인 등의 영양염류는 부영양화 및 적조의 원인이 된다. 이러한 영양염류를 제거하기 위해, 생물학적 영양염 제거 (biological nutrient removal, BNR)공정이 개발되었다. 질소를 제거하기 위한 BNR 공정은 암모니아성 질소가 질산성 질소로 전환되는 질산화 과정과 질산성 질소가 질소 가스로 전환되는 탈질 과정으

로 이뤄진다. 하지만, 질산화 미생물은 온도, 부하, pH와 같은 환경 변화에 민감할 뿐만 아니라, 증식속도가 매우 느리기 때문에 성장에 저해를 받으면 회복하는데 많은 시간이 걸린다. 생물막 공정은 미디어에 미생물을 부착 성장 시킴으로서, 상대적으로 증식 속도가 매우 느린 질산화 미생물의 고농도 유지가 용이하고, pH, 온도 등과 같은 갑작스런 환경변화에도 대응할 수 있고, 슬러지 발생량이 적어 유지관리가 쉬운 장점을 가지고 있다 [1,2].

생물막의 두께는 수백 μm 에서 수천 μm 밖에 되지 않아 생물막내 미생물들의 활성도 및 분포상태 등의 모니터링에 있어 심각한 장애가 되어왔다. 기존의 연구들은 공정의 유입수와 유출수의 비교를 통해 생물막 공정의 효율을 평가하였지만, 생물막 내에서 일어나는 기질 전환 등의 기작은 명확하게 규명되지 않았다 [3]. 그러나 1990년 이후 팁 직

*Corresponding author

Tel: +82-51-510-2432, Fax: +82-51-514-9574

e-mail: taejoo@pusan.ac.kr

경이 1-10 μm 을 가지고, 짧은 응답시간을 가지고 있는 이온선택성 미소전극을 생물막내로 직접 침투시킴으로서 생물막의 깊이에 따른 NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , H^+ 등의 이온 농도 변화를 통해, 막 내에서 일어나는 기작에 대한 해석이 가능하게 되었다 [4]. Satoh 등 [5]은 활성 슬러지 플럭 내 이온선택성 미소전극을 탐침하여 산소 확산의 제한에 의한 질산화 및 탈질 영역에 대해 규명하였다. Scharmm 등 [6]는 질산화 생물막 내 이온선택성 미소전극을 이용하여 NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , O_2 의 농도 측정하고, fluorescence *in situ* hybridization (FISH)를 이용하여 생물막 내 질산화 미생물의 분포 조사를 조사하였다. 이와 같이 최근에는 이온선택성 미소전극은 분자생물학적 방법인 polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)와 접목하여 생물막을 구성하는 미생물의 종 규명 및 반응기 작에 대한 연구가 가능하고, FISH와 접목하여 *in-situ* 상태에서 생물막 내 미생물의 활성, 분포 및 기작에 대한 연구가 가능해졌다 [7,8].

본 연구에서는 질산화 생물막 내 NH_4^+ 및 NO_3^- 의 농도를 측정하기 위해 액체 교환막을 이용한 이온선택성 미소전극을 직접 제작하여 검출한계, 재사용기간 등 미소전극 특성을 평가하였다. 또한, 질산화 생물막에 적용하여 HRT 변화에 따른 생물막 두께에 따른 기질 농도 변화에 대해서도 평가하였다.

재료 및 방법

이온 선택성 미소전극의 제작방법

본 연구에서 이온선택성 미소전극은 De Beer 등 [9,10]를 참고하여 제작하였으며, NH_4^+ 및 NO_3^- 미소전극의 세부 제작과정은 다음과 같다. Glass capillary tube (ED : 1.2 mm, ID : 0.6 mm, H : 150 mm, Borosilicate-std. wall Cat. No. 64-0769, Warner Instruments Inc.)를 pipette puller (PIP5, HEKA)에 설치한 후, 950°C 및 1150°C로 온도를 2단계로 설정하여, 팁 직경이 1 μm 이하가 되도록 절단하였다. Beveller (BV-10, Sutter Instrument Co.)를 이용하여 약 30° 각도로 다듬어, 전극의 팁 직경이 5-10 μm 가 되도록 제작하여, 전극 감지부분의 접촉 면적을 넓혔다. 전극 내에 잔존하는 수분을 제거하기 위해, 150°C에서 3시간 동안 가열하고 1시간 동안 건조시켰다.

팁 부분을 N,N-dimethyltrimethylsilylamine 용액에 30초간 담그고 난 뒤, 오븐에서 200°C로 12시간 동안 가열하고, 1시간 동안 데시케이트에서 건조시켰다. 이는 팁 내부에 소수성막을 형성하여 이온선택성 교환막의 부착을 용이하게 하기 위한 것이다. NH_4^+ 미소전극의 전해질은 0.05 M KCl이고, NO_3^- 미소전극의 전해질은 0.05 M KCl과 0.05 M KNO_3 을 혼합한 용액을 사용하였다. 각각 미소전극의 전해질 용액은 주사기와 34 gauge (0.164 mm O.D) plastic

needle (MF34G-5, World precision instrument, INC.)을 이용하여 전극 내에 충전하였다. 특정이온만을 통과시키기 위해 액체 이온 교환막은 Fluka사로부터 구입한 ammonium ionophore I-cocktail A, nitrate ionophore-cocktail A을 사용하였다. 액체 이온 교환막은 팁의 앞부분에 100-200 μm 두께로 충전하고 난 뒤, 2시간 동안 데시케이트에서 2시간 건조하였다.

팁의 강도를 증가시키고, 측정시 액체 이온 교환막의 생물막 직접 접촉을 방지하기 위하여 단백질 막을 코팅하였다. 단백질 막의 코팅은 먼저 10%의 cellulose acetate 용액에 3초간 담그고 난 뒤, 1 mL의 10% (wt/vol) Bovine serum albumin용액과 10 μL 의 25% glutaraldehyde 용액을 혼합한 용액에 10초간 담그고, 1시간동안 데시케이트에서 건조시켰다. 이는 미소전극 팁 표면에 단백질 막을 형성시키기 위한 것이다.

NH_4^+ 및 NO_3^- 미소전극의 보정은 10^{-6} - 10^{-2} 의 10배씩 희석시킨 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하였다.

Lab-scale MLE 공정의 운전

본 연구에서는 질산화 생물막의 깊이에 따른 질소 이온의 농도 변화를 측정하기 위해, 생물막 반응기를 운전하였으며, 사용된 반응기의 개략도는 Fig. 1에 나타내었다. 사용된 공정은 lab-scale modified Ludzack-Ettinger (MLE) 공정으로, 무산소조, 호기(1)조, 호기(2)조로 구성되어 있으며, 2개의 호기조에는 생물막 부착 및 성장을 위한 섬모상 매디아를 각각 2 V/V%로 충전하였다. 각 반응조의 유효용적은 6 L이고, 아크릴 재질로 제작하였다. 호기(2)조 및 침전조에서 무산소조의 질산성 질소 및 슬러지의 반송을 유입수와 동일한 유량으로 각각 1Q로 하였다. 부산시 S 하수처리장 1차 침전조 반송슬러지를 이용하여 식종하였고, 반응기 내 MLSS는 $2,700 \pm 200$ mg/L로 유지하였다.

Table 1. Characteristics of synthetic wastewater in this study

Item	pH	SCOD _{Cr} (mg/L)	NH_4^+ -N (mg/L)	Alkalinity (mg/L as CaCO_3)
Value	7.09-7.36 (7.18)	185.1-221.2 (195.7)	37.8-42.2 (39.8)	278-312 (302)

* Mean values.

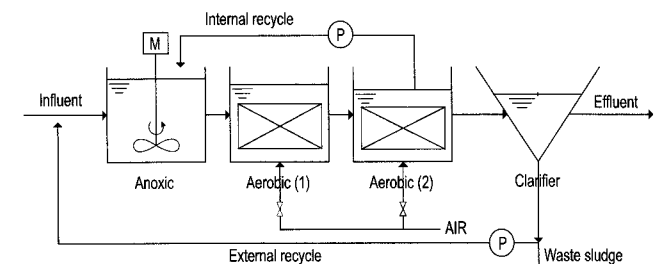


Fig. 1. Schematics of the reactor for lab-scale MLE process equipped with cilia media.

유입수는 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 NH₄Cl을 이용하고, 미량영양염류를 첨가한 합성하수를 제조하여 사용하였으며, 유입하수의 주요 성상은 table 1에 나타내었다. HRT는 6시간과 4시간인 조건에서 각 50일 이상 운전되었다.

수질분석방법

각 반응조의 DO, 온도 및 pH는 5회/일 주기로 측정하였다. Alkalinity, TSS, VSS, MLSS, MLVSS는 수질오염공정시험방법 [11]과 standard method [12]에 준하여 측정하였다. SCOD_{Cr}, NH₄⁺-N의 농도는 자동분석기 (AA3, Bran-Lubbe, Germany)를 이용하여, NO₂⁻-N와 NO₃⁻-N의 농도는 ion chromatography (IC, Dionex ICS-1000, USA)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

전극의 검출한계

10⁻⁶-10⁻² M의 농도 범위인 표준용액에서 목적이온과 응답신호간의 상관관계를 통해 미소전극의 보정곡선을 측정하였다. 목적이온에 대한 측정 가능한 최소한의 농도를 검출한계라고 하며, 보정곡선식을 토대로 검출한계를 계산하였다. 일반적으로, 목적이온의 농도는 응답신호간의 상관관계에서 선형적인 관계를 나타내는 부분과 농도 변화를 제대로 감지하지 못하여 기울기가 거의 0에 가까운 비선형적인 부분으로 나뉘게 되며, 두 부분의 교차점이 검출한계가 된다 [13]. Table 2는 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 미소전극을 표준용액에 보정한 결과를 나타내고 있으며, 각각 전극의 평균 응답시간은 각각 25초, 23초로 나타났다. 본 연구에서 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 미소전극의 보정곡선의 기울기는 각각 -53.2, 54.3 mV/M decade로 나타났으며, 이는 이론적인 기울기 값인 59 mV/M decade와는 다소 차이가 있었으나 상관계수 (R²)는 0.99 이상으로 높게 나타나, 목적이온 농도와 미소전극의 응답신호 (전위, mV)는 비례관계를 나타내는 것으로 판단된다. 또한 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 미소전극의 검출한계는

Table 2. The calibration curve, detection limits and determination coefficients

ISME	Times	Calibration curve	Detection limits (M)	Determination coefficients (R ²)
NH ₄ ⁺	1	y = -54.2x + 202.6	10 ^{-5.27}	0.9994
	2	y = -53.2x + 201.9	10 ^{-5.18}	0.9995
	3	y = -52.8x + 201.3	10 ^{-5.07}	0.9999
	4	y = -52.6x + 200.6	10 ^{-5.01}	0.9999
NO ₃ ⁻	1	y = 54.0x + 20.5	10 ^{-5.36}	0.9982
	2	y = 53.2x + 19.5	10 ^{-5.29}	0.9954
	3	y = 55.5x + 19.1	10 ^{-4.89}	0.9979
	4	y = 54.5x + 19.6	10 ^{-5.17}	0.9965

각각 10^{-5.14} M, 10^{-5.18} M로 기존문헌과 유사하거나 약간 높게 나타났다 [14,15]. 본 연구에서 제작된 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 미소전극의 검출한계는 0.1 mg/L 이하로, 생물막 내부에서의 NH₄⁺-N 및 NO₃⁻-N의 안정적인 농도 변화 측정이 가능할 것으로 판단된다.

미소전극의 재사용성

액체 이온 교환막을 사용한 이온 선택성 미소전극은 시간 경과에 따라 막의 고형화 및 막의 수축이나 확장 등에 의해 응답신호의 재현성이 낮아질 수가 있다 [4]. 전극 보관용액으로는 NH₄⁺의 경우 0.1 M NH₄Cl을 사용하였으며, NO₃⁻의 경우 0.1 M KNO₃에서 보관하였으며, 각각 5개 이상의 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 전극을 사용하여 시간경과에 따른 미소전극의 재사용성에 대한 실험을 실시하였다. Fig. 2에서는 각각 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 미소전극의 시간경과에 따른 보정곡선, 검출한계, 상관계수의 변화를 나타내고 있다. 미소전극 제작 직후에서 16일 경과까지 검출한계는 NH₄⁺ 및 NO₃⁻ 미소전극 종류에 상관없이 크게 변화하지 않았다.

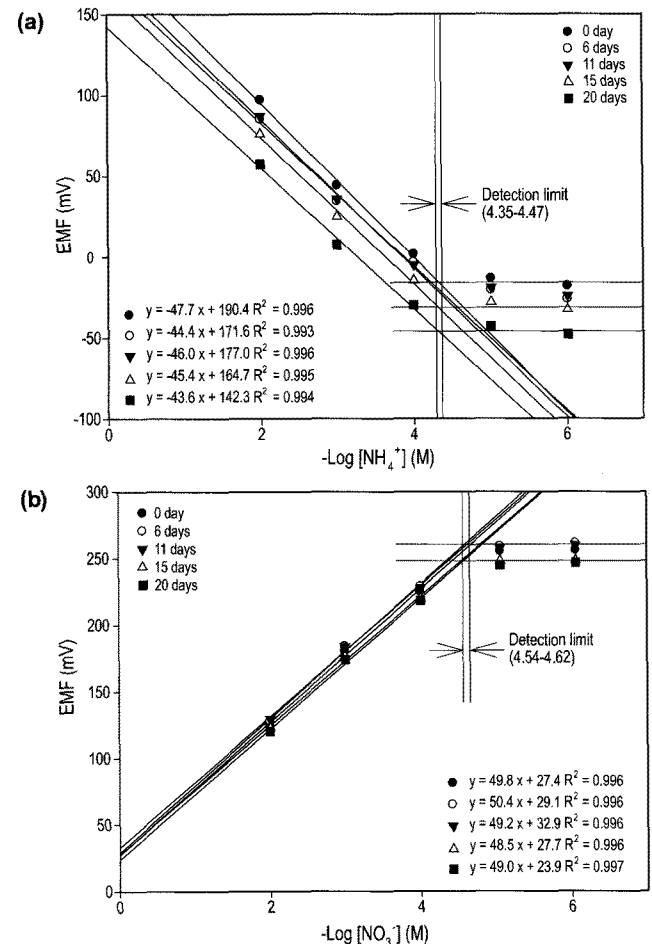


Fig. 2. Calibration curve and detection limit of ISME response according to the time (a) NH₄⁺ and (b) NO₃⁻.

NH_4^+ 미소전극의 경우 16일 경과까지 보정곡선의 기울기 값은 크게 변화하지 않았으나, y 절편값의 변화가 크게 나타났다. NH_4^+ 미소전극은 시간경과에 따라 일정한 농도에서의 전위값이 크게 낮아지는 것으로 나타났다. 표준용액에서의 전위값의 변화가 큰 것으로 나타나, NH_4^+ 미소전극의 사용기간이 NO_3^- 미소전극에 비해 짧은 것으로 판단되며, 생물막의 깊이에 따른 NH_4^+ -N 및 NO_3^- -N 농도 변화를 측정할 경우에는 측정하기 전과 후에 검량선을 작성해야 할 것으로 판단된다.

질산화 생물막의 농도 profile

생물막의 두께가 증가함에 따라, 생물막내 부착 미생물의 양도 증가하지만, 생물막의 과도한 성장은 막 내의 산소확산이 제한되고, 기질 전환에 제한을 주므로 공정 효율을 저하시키게 된다. 그러므로 생물막 공정의 효율적인 운영을 위해서는 생물막 두께가 적절하게 유지되어야 한다. 실험실 규모의 MLE 공정을 HRT 6시간으로 운전하였을 때, 호기(1)조와 호기(2)조의 생물막 깊이에 따른 NH_4^+ -N 및 NO_3^- -N의 농도 측정 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

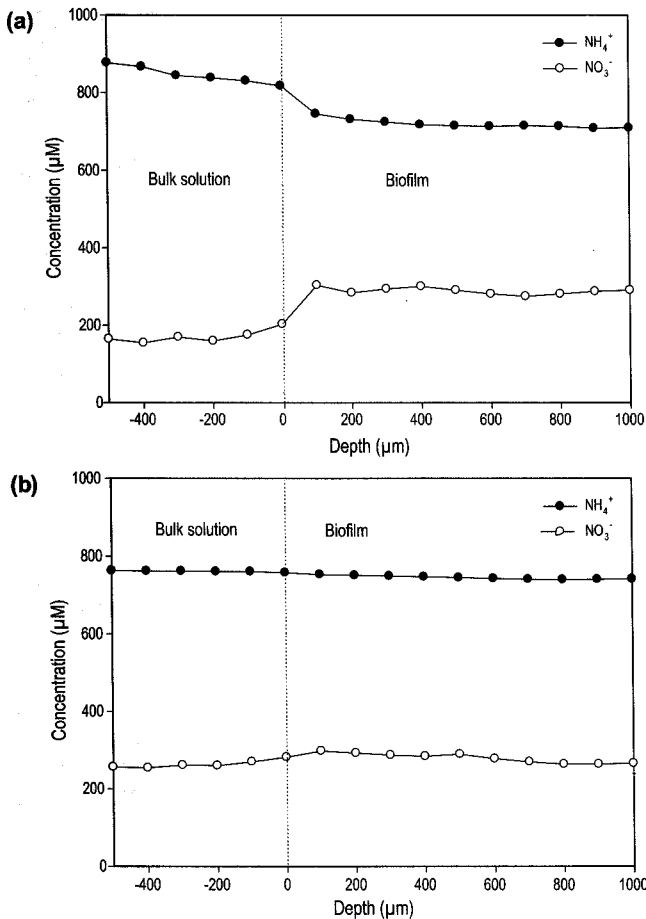


Fig. 3. Variation of NH_4^+ -N and NO_3^- -N concentration at HRT of 6 h (a) first aerobic tank (b) second aerobic tank.

호기(1)조에서 생물막 표면의 NH_4^+ -N 농도는 817 μM 이었고, 100 μm 깊이에서는 745 μM 로 약 70 μM 가 감소하였다. 반면에 NO_3^- -N의 농도는 표면에서 약 203 μM 이었으나 100 μm 깊이에서는 304 μM 로 약 101 μM 가 증가하였다. NH_4^+ -N와 NO_3^- -N의 농도 변화를 통해, 호기(1)조의 생물막에서는 약 100 μm 까지 활발한 질산화 반응이 일어나는 것으로 나타났다. 호기(2)조에서는 표면에서 100 μm 까지 NH_4^+ -N와 NO_3^- -N의 농도는 각각 10, 17 μM 가 변화한 것으로 나타나, 호기(1)조보다는 농도 변화가 작게 나타났다. 호기(1)조와 호기(2)조의 DO농도는 4.5 mg/L, 2.5 mg/L로 유지되었으며, 이로 인해 생물막내 NH_4^+ -N 및 NO_3^- -N의 농도 프로파일이 다르게 나타난 것으로 판단된다. 이전의 연구에서도 생물막 내의 용존산소의 확산에 의해 생물막내의 질산화효율에 영향을 미친다고 보고하였다 [15,16]. 또한, 호기(1)조는 호기(2)조에 비해 상대적으로 NH_4^+ -N의 농도가 높기 때문에, 이 또한 생물막 내 NH_4^+ -N 및 NO_3^- -N의 농도 프로파일에 영향을 준 것으로 판단된다.

Fig. 4에서는 HRT 4시간에서 호기(1)조와 호기(2)조의 생물막 깊이에 따른 NH_4^+ -N 및 NO_3^- -N의 농도 변화를 나타내고 있다.

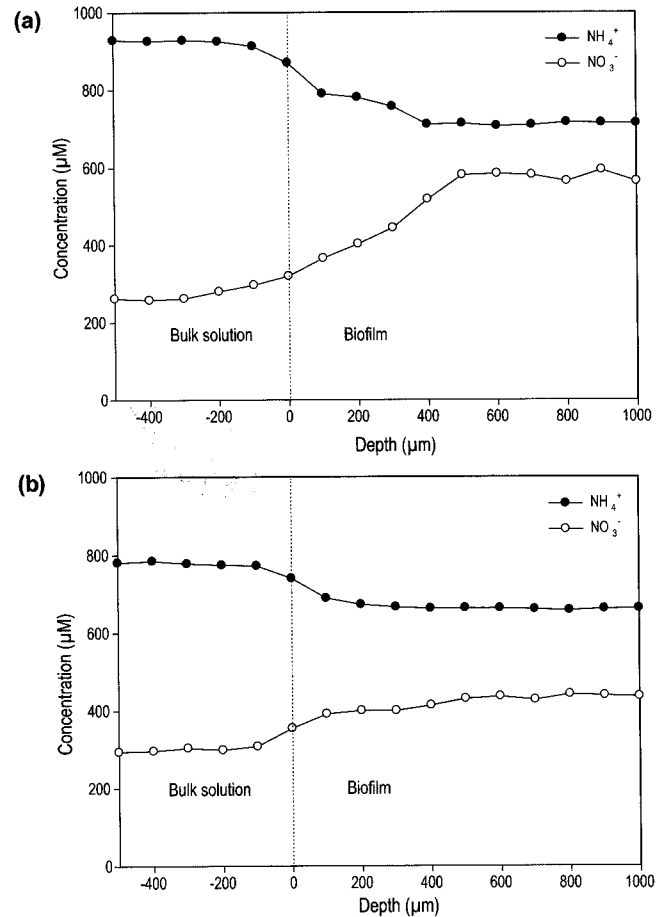


Fig. 4. Variation of NH_4^+ -N and NO_3^- -N concentration at HRT of 4 h (a) first aerobic tank (b) second aerobic tank.

호기(1)조에서는 500 μm 까지 160 μM 농도의 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 가 감소한 반면에, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 농도가 162 μM 증가하였다. 호기(2)조에서 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 농도는 300 μm 까지 약 80 μM 가 감소하였으며, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 농도는 약 500 μm 까지 75 μM 가 증가한 것으로 나타났다. HRT 6시간일 때보다 생물막 내에서 더 많은 양의 농도 변화가 관찰되었는데, 이는 질소 유입 부하의 증가에 의한 것으로 판단된다. Matsumoto 등 [17]의 연구에서는 생물막의 두께가 500 μm 까지는 질산화율, COD 및 TN 제거효율이 증가하였지만, 1000 μm 이상으로 존재할 경우, 효율이 감소하는 것으로 나타났다. 본 연구에서도 500 μm 이상의 깊이에서 질산화효율이 저하되는 것으로 나타났으므로, 생물막 내 질산화가 원활하게 일어나기 위해서는 500 μm 정도의 생물막 두께를 유지하는 것이 적합하다고 판단된다.

결론

NH_4^+ 및 NO_3^- 이온선택성 미소전극을 제작 및 특성을 평가하고, 이를 생물막 공정에 적용하여 생물막 내 깊이에 따른 농도 프로파일을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- (1) 목적이온의 농도와 응답신호는 비례관계를 보였으며, NH_4^+ 및 NO_3^- 미소전극의 검출한계는 평균 10^5 M 이하로, 생물막 내부에서의 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 및 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 농도 변화 측정이 가능할 것으로 판단된다.
- (2) 시간경과에 따라 미소전극의 보정곡선 결과에서 NH_4^+ 미소전극은 y 절편값의 변화가 큰 것으로 나타나나, NO_3^- 미소전극에 비해 수명이 짧은 것으로 나타났다. NH_4^+ 미소전극의 사용기간이 NO_3^- 미소전극에 비해 짧기 때문에, 생물막의 NH_4^+ 농도변화를 측정할 경우에는 측정하기 전과 후, 전극의 보정이 필요할 것으로 판단된다.
- (3) HRT가 6시간에서 4시간으로 감소함에 따라, 호기(1)조와 호기(2)조에서 벌크 용액과 생물막 깊이에 따른 농도 변화는 크게 나타났으며, 이는 질소 유입 부하의 증가에 의한 것이다. 또한, 호기(1)조에서 호기(2)조보다 농도 변화가 크게 나타난 것은 호기조 내 용존산소의 농도의 차이에 의한 것으로 판단된다.

감사

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었음.

접수 : 2009년 11월 27일, 게재승인 : 2009년 12월 23일

REFERENCES

1. Liu, Y. and B. Capdeville (1996) Specific activity of nitrifying biofilm in water nitrification process. *Wat. Res.* 30: 1645-1650.
2. Park, T. J., H. U. Nam, Y. O. Kim, J. H. Lee, and Y. G. Kim (1998) Comparison of COD, nitrogen and phosphorous removal between anaerobic/anoxic/aerobic and anoxic/aerobic fixed biofilm reactor using SAC (synthetic activated ceramic) media. *Korean J. Chem. Eng.* 15: 429-433.
3. Lee, S. G., A. Jang, Y. H. Yoon, and I. S. Kim (2002) Evaluation of characteristics of ion selective microelectrodes. *J. of KSEE.* 25: 234-239.
4. Miller, A. J. (1995) Ion-selective microelectrodes for measurement of intracellular ion concentrations. *Methods in cell biology* 49: 275-291.
5. Satoh, H., Y. Nakamura, H. Ono, and S. Okabe (2003) Effect of oxygen concentration on nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. *Biotech. and Bioeng.* 83: 605-668.
6. Scharrm, A., D. De Beer, J. C. Van den Heuvel, and S. Ottengraf (1999) Microscale distribution of populations and activities of nitrosospira and nitrosospira 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.
7. Okabe, S., H. Satoh, and Y. Watanabe (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and use of microelectrode. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3182-3191.
8. Kim, Y. O., T. J. Park, and T. H. Lee (2003) Analysis of morphology, microbial activity and distribution in aerophilic biofilms by in situ hybridization methods. *J. of KSEE.* 25: 803-809.
9. De Beer, D., J. C. Van der Heuvel, and S. P. P. Ottengraf (1992) Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying Bacterial aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 573-579.
10. De Beer, D., A. Schramm, C. M. Santegoted, and M. Kuhl (1997) A nitrite microsenser for profiling environmental biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 973-977.
11. Ministry of Environment (2004) Official test methods of water quality.
12. APHA, WEF, and AWWA, (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 20th ed., APHA, Washington, DC, USA.
13. Richard, P. B. and Erno Linder (1994) Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (IUPAC Recommendations). *Pure & Appl. Chem.* 68: 2527-2536.
14. Jang, A., S. G. Lee, S. M. Kim, and I. S. Kim (2000)

- Measurement of ion concentrations in denitrifying Biofilm by microelectro-sensor. *J. of KSEE*. 22: 1833-1841.
15. Jun, H. Y., K. S. Seon, J. J. Park, I. G. Byun, and T. J. Park (2006) Characterization of signal measuring system using ion selective microelectrode and electrometer. *J. of KSEE* 28: 1148-1153.
 16. Jang, A., Y. H. Yoon, I. S. Kim, K. S. Kim, and P. L. Bishop (2003) Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *J. of Biotechnology* 105: 71-82.
 17. Matsumoto, S., A. Terada, and S. Tsuneda (2007) Modeling of membrane-aerated biofilm: effects of C/N ratio, biofilm thickness and surface loading of oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification. *J. Biochem. Eng.* 37: 98-107.