

# 간헐포기공정에서 포기/비포기 구간에 따른 질소제거 및 미생물 군집분석 Nitrogen Removals according to Aeration/Non-aeration Periods in the Intermittent Aeration Reactor and Analysis of Microbial Community

최문수 · 이태진<sup>†</sup>  
Moon-su Choi · Tae-jin Lee<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 환경공학과·폐자원바이오매스 에너지화 센터  
Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Science & Technology

(2013년 12월 9일 접수, 2013년 12월 31일 채택)

**Abstract :** In this study, variations of the organic and nitrogenous compounds in wastewater were investigated in a single reactor with intermittent aeration. Over 90% of organic and nitrogen removals are accomplished with C/N ratio of 3 : 1 and 20/20 min of aeration/non-aeration period. Longer non-aeration period on the aeration/non-aeration cycle showed more stable nitrogen removal, showing various microbial community in the reactor. From PCR-DGGE analysis, it is conclusive that *Dysgonomonas mossii* strain Melo40, *Eubacterium* sp. oral clone JN088, Uncultured *bacterium* clone SPESB2\_718, and *Bacterium* enrichment culture clone LE are related with the organics and nitrogen oxidation. Uncultured *Acidobacteria bacterium* clone AKYG487, *Lactobacillus harbinensis* strain FQ003, *Erythrobacter litoralis* strain Gi-3, *Phytobacter diazotrophicus* strain Ls8, and *Mycobacterium* sp. enrichment culture clone GE10037biofNNA are distinctly appeared under denitrification condition.

**Key Words :** Nitrification, Denitrification, Intermittent Aeration, C/N Ratio, PCR-DGGE

**요약 :** 본 연구에서는 단일반응조에서 포기/비포기 시간에 따른 하수 내 유기물질 및 질소화합물을 변화양상을 살펴보고자 하였다. 실험 결과 C/N비 3 : 1, 포기/비포기 20/40 min 구간에서부터 90% 이상의 안정적인 유기물 및 질소 제거가 이루어짐을 알 수 있었다. 포기/비포기 구간의 비율을 길게 유지하는 것이 탈질에 더욱 효과적이었으며 이는 비포기 구간을 유지하는 동안 반응조 내 미생물의 군집변화에 기인하는 것으로 판단하였다. PCR-DGGE를 한 결과, 유기물 및 질소화합물의 산화에 관여하는 미생물로 *Dysgonomonas mossii* strain Melo40, *Eubacterium* sp. oral clone JN088, Uncultured *bacterium* clone SPESB2\_718 과 *Bacterium* enrichment culture clone LE이 관찰되었고 탈질에 관여하는 미생물은 Uncultured *Acidobacteria bacterium* clone AKYG487, *Lactobacillus harbinensis* strain FQ003, *Erythrobacter litoralis* strain Gi-3, *Phytobacter diazotrophicus* strain Ls8, *Mycobacterium* sp. enrichment culture clone GE10037biofNNA로 나타났다.

**주제어 :** 질산·탈질, 간헐포기, C/N비, PCR-DGGE

## 1. 서론

산업의 발달과 경제 성장은 생활수준의 향상을 가져왔으나 환경오염이라는 원치 않는 결과를 초래하였으며, 인구가 증가함에 따라 오염물질의 발생량도 증가하는 실정이다. 최근 시민의식의 향상 및 환경보전의 필요성으로 인해 오염물질의 관리에 많은 관심이 집중되고 있다. 특히 수중 생태계의 유지와 양질의 수자원을 확보하기 위해 하수의 안정적인 처리는 필수적이라 할 수 있다.

국내 하수 처리장의 대부분은 표준 활성 슬러지 공법으로 설계·운전되고 있고, 공법개선을 통해 유기물 뿐 아니라 질소와 인과 같은 영양염류의 제거 효율도 많이 개선되었다. 그러나 일부 개선되지 않은 기존의 하수처리장 및 관리미흡으로 인한 질소나 인의 수계유입은 부영양화를 야기하며 수중의 용존산소를 소모하여 어패류를 폐사시키는 등 주변환경에 악영향을 미치며 여전히 많은 문제점이 노출되고 있다. 이에 따라 법적 관리 주체인 정부에서는 배출 제한, 농도 제한 및 처리장 개선 등 다양한 방안을 시행하고 있으며 많은

연구자들에 의해 보다 안정적이고 효율적인 고도처리 공법에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.<sup>1)</sup>

생물학적 질소 제거는 유기성 질소 및 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N이 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N로 산화되는 질산화 과정과 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N이 N<sub>2</sub> gas로 환원되는 탈질 과정을 통해 이루어진다. 이러한 질산화 및 탈질 과정은 각각 호기성 상태와 무산소 상태에서 이루어지기 때문에 완전한 질소 제거를 위해서는 호기성 반응조와 무산소 반응조를 분리하여 설치하는 공간 분할 공법(A<sub>2</sub>O, BARDENPHO 공법 등)이나 시간에 따라 반응조 내의 조건을 호기성 조건과 무산소 조건으로 변환시켜 운영하는 시간 분할 공법(SBR, 간헐 폭기 공법 등)이 적용되었다.

고도처리공법 중 간헐포기 공정은 포기조에서 포기기를 on/off시켜, 유기물과 질소처리에 적합한 호기/무산소 조건을 단일반응조에서 반복적으로 실행할 수 있는 공정으로 적절한 포기/비포기 시간과 유입수 내 유기물 성분의 농도는 질산화 및 탈질 과정에서 질소의 처리를 극대화 시켜 높은 제거효율을 얻을 수 있다.<sup>2)</sup> 따라서 간헐포기공정의 핵심은 유기물 성분의 유입에 따른 포기/비포기 시간의 운영을 적절히

<sup>†</sup> Corresponding author E-mail: leetj@seoultech.ac.kr Tel: 02-970-6614 Fax: 02-971-5776

배분하여 처리효율의 극대화를 유도하고 포기시간의 단축으로 인한 경제적 효과를 얻는데 있다.<sup>3)</sup> 하지만 기존의 간헐포기공정에 대한 연구가 유입수 성상에 따른 간헐포기의 운영조건에 치중하여 연구됨으로써 실질적으로 유기물과 질소의 제거에 관여하는 미생물의 종류와 다양한 군집에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 간헐포기의 하수처리효율을 제고하기 위해 공정운영조건 뿐만 아니라 우점하는 미생물 군집에 관한 정보를 파악하여 공정에 대한 이해를 높일 필요가 있다.

미생물의 군집을 확인하기 위해 배지배양이나 현미경 관찰 등을 통한 전통적 방법을 많이 이용하였지만 최근에는 미생물 군체의 구성성분(세포막, 세포벽의 지질, 퀴논, 다당, 아미노산 등)을 지표로 하는 화학분류법과<sup>4-9)</sup> 분자생물학적인 분석 기법의<sup>10)</sup> 사용이 증가하는 추세이다. 분자생물학적인 분석 기법의 미생물 군집변화 해석은 DNA (Deoxyribonucleic acid), RNA (Ribonucleic acid)를 분석하는 것으로 특히 bacteria의 16S rDNA (ribosomal DNA)의 특정 부위는 진화속도가 매우 느려 다양한 분류군의 상호 비교를 가능하게 한다. 따라서 분자생물학적으로 염기서열을 분석해 원핵생물의 계통분류학적 연구에 유용하게 이용할 수 있다.<sup>11-13)</sup> 따라서 본 연구에서는 간헐포기공정의 기본 운영인자인 C/N 비, 포기/비포기 시간에 따른 유기물과 질소제거의 양상을 살펴보고, PCR-DGGE 기법을 이용하여 포기/비포기 구간에 따른 미생물 군집분포 변화 및 우점화 미생물을 규명하여 타 연구의 활용할 수 있는 미생물 군집변화의 기초자료를 제공하고자 한다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험장치 및 방법

실험에서 사용한 간헐포기 반응조는 유효용적 20 L의 직사각형 아크릴로 제작하였으며, 후단에 슬러지의 침전 및 반송을 위한 2 L 용적의 침전조를 배치하였다. 간헐포기를 위해 반응조 내부에 산기관을 설치하고 일정시간마다 on/off 하여 호기와 무산소조건을 주기적으로 반복되도록 하였고, 비포기 시 반응조 내부의 충분한 혼합을 위해 100 rpm의 교반모터를 사용하였다. 실험 반응조에 사용한 슬러지는 경기도 U하수처리장 포기조에서 채취된 활성슬러지를 이용하였다. 유입·유출방법은 연속흐름 완전혼합 상태로 체류시간은 18 hr로 하였고, 체류시간에 상관없이 지정된 포기/비포기 구간은 반복적으로 운영되도록 하였다. 포기/비포기 시간은 1시간을 주기로 40/20, 30/30, 20/40, 10/50 min으로 변화시켜 운전하였다. 반응조 내 슬러지체류시간 30일, 포기량 2 L/min, MLSS (mixed liquid suspended solid)는 약 3,100 mg/L로 하였다. 실험에 대한 세부적인 운영방법을 Table 1에 요약하였다.

유입수는 Table 2와 같이 합성폐수를 조제하여 사용하였으며, C/N비는 유입수 유기물(Glucose) 농도를 변화시켜 각각 1 : 1, 2 : 1, 그리고 3 : 1로 조정하여 실험을 실시하였다.

Table 1. Operating conditions of the intermittently aerated bio-reactor

Item	Condition			
Aeration/Non-Aeration (min/min)	40/20	30/30	20/40	10/50
HRT (hr)	18			
SRT (d)	30			
pH	7±0.5			
Temp. (°C)	30±3			
DO (mg/L)	Aeration on	4~5		
	Aeration off	<0.03		
MLSS (mg/L)	3,100±200			

Table 2. Composition of the synthetic wastewater

Components	Concentration (mg/L)
Glucose (as COD)	100
NH <sub>4</sub> Cl (as N)	25
KNO <sub>3</sub> (as N)	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (as P)	2.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (as P)	2.5
KHCO <sub>3</sub> (as HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	366
Nutrient solution*	1 mL

\* The nutrient solution contains per liter: 90 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 6 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.5 g FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 6.5 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1.7 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 g CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.9 g CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 6.5 g NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.1 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1 g yeast extract

### 2.2. 분석방법

운전기간 동안 유입수와 유출수를 1일 2회 채취하여 시료로 사용하였다. 수질분석항목으로는 COD<sub>Mn</sub>, SS, T-N, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N와 그 외 온도, pH 등을 1주일에 2회 이상 측정하였다. COD<sub>Mn</sub>은 수질오염공정시험법<sup>14)</sup>에 준하여 실험하였고 SS 및 T-N은 standard methods<sup>15)</sup>를 이용하여 측정하였다. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, 그리고 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N의 분석에는 Ion Chromatography (Metrohm, Germany)를 사용하였으며 미생물 분석은 분자생물학적인 기법(PCR-DGGE)을 이용하였다.<sup>16)</sup> 미생물의 DNA는 간헐포기 각 구간에서 채취된 각 시료를 11,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제외한 침전물을 Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)를 사용하여 추출하였다.<sup>17)</sup> 실험에 사용된 primer (Bionics, Korea)의 sequence은 Table 3과 같다. 16S rDNA

Table 3. PCR primers used in this study

Primer pair (Target)	Nucleotide sequence (5'- 3')	Size of PCR product (bp)	Reference
10f 1400r	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG ACG GGC GGT GTG TAC AAG	1408	19)
341f 518r	CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GG	193	20)
GC clamp	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	233	20)

\* f : forward primer, r : reverse primer, The GC clamp added DGGE

증폭을 위하여 10 f와 1,400 r primer를 사용하여 1차 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행하였으며, 341 f와 518 r primer로 2차 PCR을 수행하였다. 또한 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 수행을 위해 341 f에 GC clamp를 부착하여 2차 PCR을 수행하였다.<sup>18)</sup> DGGE는 40%~60%의 농도 구배를 가지는 8% Polyacrylamide Gel에 PCR product를 Loading 한 후 전기영동을 실시하였다. 16S rDNA의 염기서열 결과는 NCBI BLAST Search Database에서 검색된 염기서열 정보를 이용하였다.<sup>21-25)</sup>

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 운영인자에 따른 오염물질 제거효율

##### 3.1.1. 간헐포기에 따른 유기물질의 제거

포기/비포기 시간과 C/N비에 따른 유출수의 유기물질 제거효율을 Table 4에 나타내었다. 유입수의 평균 COD<sub>Mn</sub>은 98~215 mg/L이었으며, 반응조의 MLSS는 약 3,100 mg/L, HRT 18 hr, SRT 30 d일 때 C/N비와 포기/비포기 시간의 변화에 상관없이 모든 구간에서 약 91~96%의 안정적인 제거효율을 나타냈다. 예를 들어 C/N비 3일 경우, 유입수의 평균 COD<sub>Mn</sub>은 215 mg/L이었고, 유출수의 평균 COD<sub>Mn</sub>은 7.5 mg/L이었으며 포기/비포기 시간별로 94.2~94.5%의 높은 제거효율을 나타냈다. 이는 짧은 포기시간으로도 유기물의 충분한 산화가 일어났음을 보여주는 것으로 간헐포기 공정에서 포기과 비포기 구간의 설정이 유기물 제거에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 판단되었다.

##### 3.1.2. 간헐포기에 따른 질소화합물의 제거

Table 5에 C/N비와 포기/비포기 시간에 따른 유출수 T-N 제거효율을 나타내었다. 유입수의 C/N비는 1:1, 2:1, 3:1

Table 4. Removal efficiencies of COD<sub>Mn</sub> according to the C/N ratio and aeration/non-aeration period

Aeration/Non-Aeration (min/min)	Removal efficiency (%)		
	C/N 1:1	C/N 2:1	C/N 3:1
40/20	94.1±1.7	96.0±0.5	94.4±1.0
30/30	94.8±2.4	95.2±0.2	94.4±0.6
20/40	95.8±0.8	95.9±0.2	94.5±0.4
10/50	93.4±2.3	95.9±0.2	94.2±0.7

Table 5. Removal efficiencies of T-N according to the C/N ratio and aeration/non-aeration period

Aeration/Non-Aeration (min/min)	Removal efficiency (%)		
	C/N 1:1	C/N 2:1	C/N 3:1
40/20	-	2.2±0.9	34.5±4.4
30/30	-	13.4±3.3	42.0±5.6
20/40	5.9±2.3	16.7±2.8	92.6±4.4
10/50	9.0±3.4	33.1±10.5	93.5±0.4

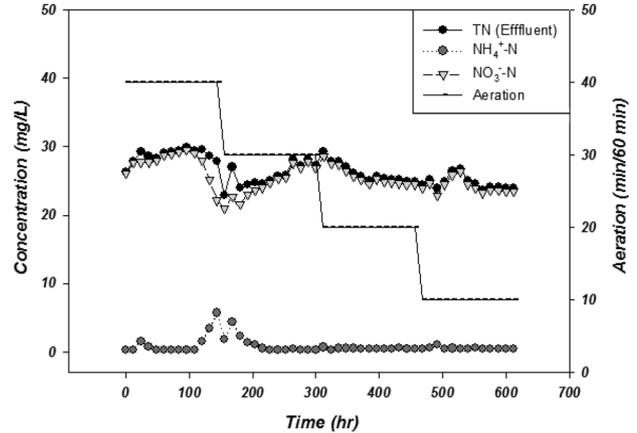


Fig. 1. Concentration profiles of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  with intermittent aeration at C/N ratio as 1:1. Total time of the aeration/non-aeration period was 1 hour.

이었으며, 포기/비포기 시간이 각각 40/20, 30/30, 20/40, 10/50 min이었다. C/N비 1:1과 C/N비 2:1에서는 모든 포기/비포기 시간에서 낮은 처리효율을 보였으나 C/N비 3:1에서 각 구간 평균 34.5, 42.0, 92.6, 93.5%의 제거효율을 나타냈다. 낮은 C/N 비에서는 질소제거를 위한 유입수의 유기물 농도가 충분하지 않을 뿐만 아니라 짧은 비포기 시간으로 인하여 충분한 탈질이 이루어지지 않았다. C/N비 3:1에서도 비포기 구간이 비교적 길게 설정되었을 때 기대하는 탈질을 이룰 수 있었다. 이는 간헐포기에 있어서 C/N비의 설정이 탄소원의 공급이라는 측면에서 탈질의 주요한 인자이지만 포기/비포기 구간의 설정 역시 탈질을 위한 반응시간을 충분히 공급한다는 측면에서 매우 중요한 요소라는 것을 보여준다.

C/N비의 변화에 따른 질소제거 특성을 자세하게 알아보기 위해 각 C/N비에서 질소의 거동 변화를 관찰하였다. Fig. 1은 C/N비 1:1에서 포기/비포기 시간에 따른 질소화합물의 변화양상을 알아보기 위해 T-N,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , 그리고  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 농도를 분석하였다. 반응조에서 총 포기/비포기 시간은 1시간으로 반복 운영되고 있으며 Fig. 1에서 포기(aeration)시간은 1시간의 총 포기/비포기 운영구간 중 포기시간만을 나타낸다. 포기/비포기 시간을 40/20, 30/30, 20/40, 그리고 10/50 min으로 조정하였을 때 포기/비포기 시간에 상관없이 모든 구간에서 유입과 동시에 완전한 질산화가 이루어진 것으로 나타났으나, 탈질은 최대 7% 이하로 거의 일어나지 않았고, 이는 유입수내 유기물의 농도가 충분하지 못해 탈질에 필요한 탄소원의 공급이 부족한 것으로 판단하였다.

Fig. 2는 C/N비 2:1에서 포기/비포기 구간에 따른 질소화합물의 변화양상을 나타낸다. C/N비가 1:1인 경우와 동일하게 40/20, 30/30, 20/40, 10/50 min으로 조정하였을 때 포기/비포기 시간에 상관없이 완전한 질산화가 이루어졌으나 탈질은 포기/비포기 구간에 따라 약 2~37%로 C/N비가 1인 경우보다 약간 증가하였으나 크게 개선되지 않는 것으로 측정되었다.

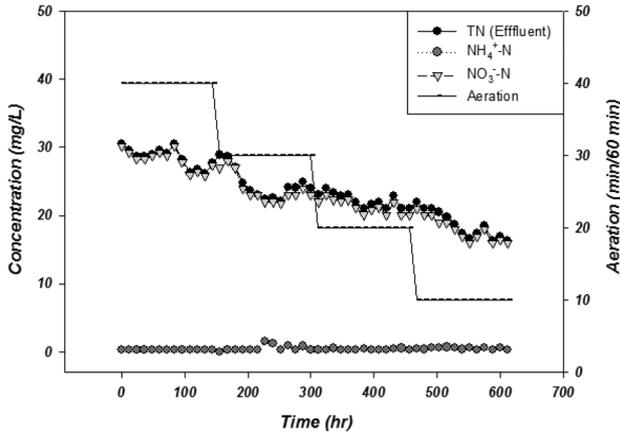


Fig. 2. Concentration profiles of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  with intermittent aeration at C/N ratio as 2:1. Total time of the aeration/non-aeration period was 1 hour.

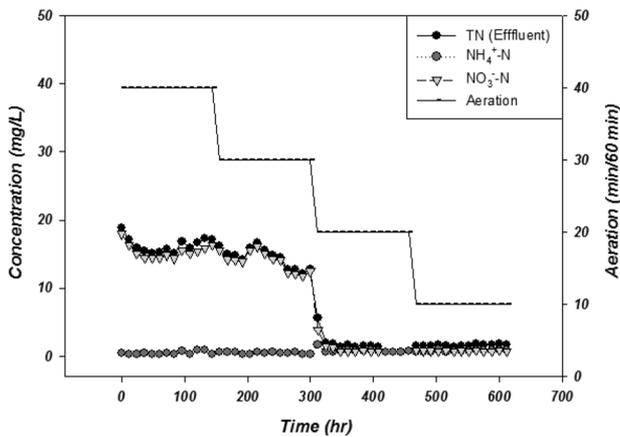


Fig. 3. Concentration profiles of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  with intermittent aeration at C/N ratio as 3:1. Total time of the aeration/non-aeration period was 1 hour.

Fig. 3은 C/N비 3 : 1에서 포기/비포기 시간별 T-N 및  $\text{NH}_4^+$ -N과  $\text{NO}_3^-$ -N의 농도를 나타내었다. 포기/비포기시간을 40/20 min 그리고 30/30 min으로 운전하였을 때 포기시간에 상관 없이 모든 구간에서 유입과 동시에 완전한 질산화가 이루어져서 유입 질소의 대부분이  $\text{NO}_3^-$ -N로 검출되었으나 포기/비포기시간이 20/40 min부터  $\text{NO}_3^-$ -N의 농도가 점차 감소하여 10/50 min에서 0.7 mg/L로 나타나 충분한 탈질이 일어나면서 T-N의 제거효율 역시 높아지는 것으로 나타났다. 이는  $\text{NO}_3^-$ -N를 질소가스로 환원하기 위해 충분한 비포기 시간을 주어줘야 하며 포기시간보다 비포기시간을 2배 이상 유지하는 것이 바람직하다는 결론을 도출하게 되었다. 따라서 본 간헐포기 공정에서 90% 이상의 T-N 제거효율을 얻기 위해서는 C/N비 3 : 1 이상, 20/40 min 이상의 포기/비포기 시간이 필요하다고 판단하였다.

Choi와 Lim<sup>32,33)</sup>에 따르면 포기/비포기 구간의 비율 50 : 50에서 약 90%의 하수 내 질소화합물의 제거율을 보였으나, C/N비가 4 이상 요구되고, Choi<sup>34,35)</sup>의 경우 포기/비포기 구간 비율이 42 : 58, C/N비 약 3을 유지한 상태에서 각각 83.5,

Table 6. T-N removal efficiency according to intermittently aeration and C/N ratio

No	Aeration on/off (min)	C/N ratio	T-N Removal efficiency (%)	Reference
1	60/60	3:1	56	Choi <sup>32)</sup>
		4:1	88	
		5:1	90	
2	60/60 50/70 40/80	3:1	64.4	Choi <sup>34)</sup>
			83.5	
			86.9	
3	60/60	2:1	62.4	Choi <sup>35)</sup>
		3:1	89.1	
		4:1	92.9	
4	60/60 50/70 40/80	3:1	60	Lim <sup>33)</sup>
			82.2	
			82.9	
5	40/20 30/30 20/40 10/50	3:1	34.5	This paper
			42	
			92.6	
			93.5	

82.2%의 제거효율을 보였다(Table 6). 본 실험에서도 C/N비 약 3에서 약 93%의 질소제거율을 보였는데 낮은 C/N비에서도 제거율이 상대적으로 높은 것은 포기/비포기 구간의 비율을 33 : 67로 타 연구보다 길게 유지함으로써 가능하였다. 이는 포기/비포기 구간의 비율을 길게 유지하는 것이 질소 제거에 주요한 요소이며 비포기구간을 길게 유지하는 것은 반응조 내 미생물의 군집 조성을 다르게 할 것으로 판단하였다. 반응기 내 미생물 군집의 조성을 살펴보기 위해 PCR/DGGE 기법을 이용하여 포기/비포기 구간에 따라 시료를 채취하여 미생물 군집변화를 살펴보았다.

### 3.2. 포기/비포기 구간에 따른 미생물 군집 분석

Fig. 4는 본 반응조에서 포기/비포기 시간에서 채취한 시료

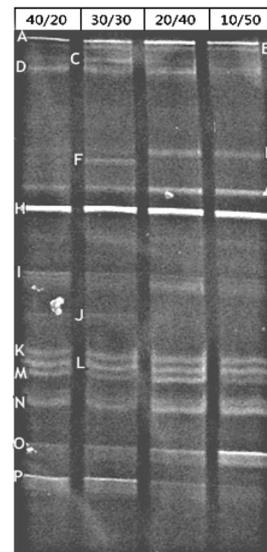


Fig. 4. DGGE profiles of the sludge from Intermittently aeration.

Table 7. Affiliation of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fragments determined by their 16S rDNA sequence

Band name	Gen band search result		Assession No.	Similarity	Taxonomic description (class)
	Phylogenetically closet relative				
A	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i> clone AKYG487		AY921925.1	100%	Acidobacteria
B	<i>Erwinia billingiae</i> partial		FR695871.1	98%	$\gamma$ -proteobacteria
C	<i>Dysgonomonas mossii</i> strain Melo40		KC866165.1	100%	Bacteria
D	<i>Eubacterium</i> sp. oral clone JN088		AY349377.1	100%	Firmicute
E	<i>Lactobacillus harbinensis</i> strain FQ003		KF418816.1	100%	Firmicute
F	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i> clone Upland_75_7169		JF987871.1	81%	Acidobacteria
G	<i>Erythrobacter litoralis</i> strain Gi-3		KF444160.1	100%	$\alpha$ -proteobacteria
H	Uncultured <i>bacterium</i> clone SPESB2_718		KC327255.1	100%	Bacteria
I	<i>Bacteroides xylanolyticus</i> partial		HF558386.1	100%	Bacteria
J	<i>Pantoea</i> sp. A1059		KC236721.1	100%	$\gamma$ -proteobacteria
K	<i>Endosymbiont of Sphenophorus levis</i> clone Field_clone_A06		FJ626273.1	100%	Actinobacteria
L	<i>Gordonia</i> sp. AmG		KF444801.1	64%	Firmicute
M	<i>Eubacterium tarantellae</i> partial		FR733677.1	100%	Firmicute
N	<i>Phytobacter diazotrophicus</i> strain Ls8		DQ821583.1	97%	$\gamma$ -proteobacteria
O	<i>Mycobacterium</i> sp. enrichment culture clone GE10037biofNNA		JX083129.1	100%	Actinobacteria
P	<i>Bacterium</i> enrichment culture clone LE		JN982535.1	97%	Bacteria

에서 DNA를 추출하여 PCR을 통해 증폭시킨 후, 16S rDNA의 V3 region의 DGGE 수행을 통해 얻은 겔 상의 DNA BAND들이다. 시료는 유입수의 C/N비가 3 : 1일 때 40/20, 30/30, 20/40, 10/50분의 포기/비포기 시간별로 직접 반응기 내에서 채취하였다. 선명도가 각기 다른 몇 개의 Band가 나타났으며 Band A, E, G, N, O는 비포기 시간에 증가함에 따라 Band의 선명도가 점차 뚜렷하게 나타났고, Band C, D, H, P에서는 포기 시간이 증가함에 따라 Band의 선명도가 높게 나타났다.

미생물 군집을 동정하기 위해서 16개의 Band를 sequence하여 NCBI BLAST를 이용하여 분석하여 Table 7에 정리하였다. 제시된 DGGE 밴드로부터 판명된 미생물의 계통발생학적 유연관계 결과로 Firmicute 25%, Acidobacteria 12.5%,  $\alpha$ -proteobacteria 6.25%, Actinobacteria 12.5%,  $\gamma$ -proteobacteria 18.75%, Bacteria 25%를 차지하였다. 포기 시간이 증가할수록 선명해지는 Band C, D, H, P는 각각 *Dysgonomonas mossii* strain Melo40, *Eubacterium* sp. oral clone JN088, Uncultured *bacterium* clone SPESB2\_718과 *Bacterium* enrichment culture clone LE이었으며, 이러한 미생물은 유기물의 산화 및 질소화합물의 산화와 관련있는 미생물로 구분하였다. 비포기 시간이 증가할수록 선명해지는 Band A, E, G, N, O는 각각 Uncultured *Acidobacteria bacterium* clone AKYG487, *Lactobacillus harbinensis* strain FQ003, *Erythrobacter litoralis* strain Gi-3, *Phytobacter diazotrophicus* strain Ls8, *Mycobacterium* sp. enrichment culture clone GE10037biofNNA 미생물로 판명되었으며, 이 중 *Lactobacillus*, *Erythrobacter*, *Mycobacterium*은 탈질에 관여하는 미생물<sup>26-31)</sup> 기존의 연구논문에서 보고된 바 있으며 *Phytobacter*와 *Acidobacteria*는 본 연구에서 나타난 새로운 종으로 탈질반응에 직접적인 영향을 미치는 미생물로 판단하였다. 그 외 나타난 Band B,

H, I, J, K, L, M은 *Erwinia billingiae* partial, Uncultured *bacterium* clone SPESB2\_718, *Bacteroides xylanolyticus* partial, *Pantoea* sp. A1059, *Endosymbiont of Sphenophorus levis* clone Field\_clone\_A06, *Gordonia* sp. AmG, *Eubacterium tarantellae* partial로 분석되었으며, 포기/비포기 시간에 상관없이 활성슬러지 공정에서 출현하는 미생물로 주로 유기물의 산화와 관련이 있는 미생물로 추정하였다. 간헐포기 공정에서 미생물의 군집 양상은 동정 보고된 바 없어 기존의 연구와 미생물의 종의 다양성을 비교분석할 수는 없으나 활성슬러지 공정에서 위에 나타난 미생물의 역할을 보다 명확히 규명하기 위해 각 미생물을 순수분리하고 개별적 배양을 하여 각각 미생물의 생태학적 특성을 규명을 할 수 있는 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 간헐포기공정에서 C/N비와 포기/비포기 시간의 변화에 따른 하수 내 유기물질 및 질소제거 양상을 살펴보고, 그에 따른 미생물의 군집 변화를 분석해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 간헐포기식 반응공정에서 유입 유기물(최대 200 mg/L)의 포기/비포기 구간에 상관없이 약 92% 이상의 높은 제거 효율을 나타냈으며, 질소화합물의 경우 C/N비 3, 포기/비포기 시간 10/50 min에서 약 93%로 가장 높은 제거효율을 보였다. 낮은 C/N비에서도 제거율이 상대적으로 높은 것은 포기/비포기 구간의 비율을 길게 유지함으로써 가능하였으며, 이는 비포기 구간을 유지하는 동안 탈질에 관여하는 반응조 내 미생물의 군집조성을 변화시키는 것에 기인하는 것으로

로 판단하였다.

2) 간헐포기공정 내 미생물 군집분석 결과, 유기물 및 질소화합물의 산화에 관여하는 미생물로 *Dysgonomonas mossii* strain Melo40, *Eubacterium sp.* oral clone JN088, Uncultured bacterium clone SPESB2\_718과 *Bacterium* enrichment culture clone LE이 관찰되었고 탈질에 관여하는 미생물은 Uncultured *Acidobacteria bacterium* clone AKYG487, *Lactobacillus harbinensis* strain FQ003, *Erythrobacter litoralis* strain Gi-3, *Phytobacter diazotrophicus* strain Ls8, *Mycobacterium sp.* enrichment culture clone GE10037biofNNA로 나타났다. 본 연구를 통해 간헐포기 공정에서 미생물의 군집분석은 추후 타 연구의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

이 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

KSEE

## Reference

- Park, K. H. and Kwon, Y. D., "A Study on the Characteristics of Process for the Sewage Treatment in Korea," *J. Kor. Soc. Environ. Anal.*, **15**(1), 9~14(2012).
- Lim, J.-W., Lim, P.-E. and Seng, C.-E., "Enhancement of nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor with intermittent aeration during REACT period," *Chem. Eng. J.*, **197**, 199~203(2012).
- Moura, R. B., Damianovic, M. H. and Foresti, E., "Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration," *J. Environ. Manage.*, **98**, 163~167(2012).
- Fang, J. and Barcelona, M. J., "Biogeochemical evidence for microbial community change in a get fuel hydrocarbons contaminated aquifer," *Org. Geochem.*, **29**(4), 899~907(1997).
- Hedrick, D. B. and White, D. C., "Microbial respiratory quinones in the environment 1. A sensitive liquid chromatographic method," *J. Microbiol. Methods*, **5**, 243~254(1986).
- Hiraishi, A., "Respiratory quinone profiles as tool for identifying different bacterial populations in activated sludge," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 39~56(1988).
- Fujie, K., Hu, H.-Y., Tanaka, H. and Urano, K., "Ecological studies of aerobic submerged biofilter on the basis of respiratory quinone profiles," *Water Sci. Technol.*, **29**, 373~376(1994).
- Hu, H.-Y., Fujie, K., Tanaka, H., Makabe, T. and Urano, K., "Respiratory quinone profile as a tool for refractory chemical biodegradation study," *Water Sci. Technol.*, **35**, 103~110(1997).
- Hess, A., Hollander, R. and Mannheim, W., "Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic-acid bacteria and actinomycetes," *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 247~252(1979).
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H., "Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143~169(1995).
- Vreas, L., Forney, L., Daae, F. L. and Torsvik, V., "Distribution of Bacterioplankton in meromictic lake selenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3367~3373(1997).
- Hollibaugh, J. T., Bano, N. and Ducklow, H., "Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to Nitrosospira-like ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478~1484(2002).
- Pedro, M. S., Haruta, S., Hazaka, M., Shimada, R., Yoshida, C., Hiura, K., Ishii, M. and Igarashi, Y., "Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of microbial community from field-scale composter," *J. Biosci. Bioeng.*, **91**(2), 159~165(2001).
- Ministry of Environment, Standard Methods for examination of water and wastewater(2004).
- APWA, AWWA, WPCF, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21th ed., (2005).
- Arayz, R., Tani, K., Yamaguchi, N. and Nasu, M., "Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent insitu hybridization and DGGE analysis," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 111~119(2003).
- Vreas, L., Forney, L., Daae, F. L. and Torsvik, V., "Distribution of bacterioplankton in meromictic lake selenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3367~3373(1997).
- Pedro, M. S., Haruta, S., Hazaka, M., Shimada, R., Yoshida, C., Hiura, K., Ishii, M. and Igarashi, Y., "Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter," *J. Biosci. Bioeng.*, **91**(2), 159~165(2001).
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Anal. Chem.*, **28**(3), 350~356(1956).
- Minnan, L., Jinli, H., Xuijuan, W., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z. and Liangshu, X., "Isolation and characterization of a high H<sub>2</sub>-Producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring," *Res. Microbiol.*, **156**, 76~81(2005).
- Hung, C. H., Cheng, C. H., Cheng, L. H., Liang, C. M. and Lin, C. Y., "Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community," *Inter. J. Hydrogen Energy*(2007).
- Auch, A. F., Henz, S. R., Holland, B. R. and Goker, M., "Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences," Bio-Med Central Ltd, (2006).
- Felgenstein, J., "Confidence limits on phylogenetics: an ap-

- proach using the bootstrap," *Evolution*, **39**, 783~791(1985).
24. Kimura, M. "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences," *J. Mol. Evol.*, **16**, 111~120(1980).
  25. Saitou, N. and Nei, M., "The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees," *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406~425(1987).
  26. Costilow, R. N. and Humphreys, W., "Nitrate reduction by certain strains of *Lactobacillus plantaru*," *Science*, **121**, 168 (1955).
  27. Clarker, T. J., "A dextran-fermenting organism from the lumen closely resembling *Lactobacillus biBdus*," *J. Gen. Microbiol.*, **20**, 549(1959).
  28. Rogosa, M., "Experimental conditions for Nitrate reduction by certain strains of the genus *Lactobacillus*," *J. Gen. Microbiol.*, **24**, 401~408(1961).
  29. Shioi, Y., Doi, M., Arata, H. and Takamiya., K., "A Denitrifying Activity in an Aerobic Photosynthetic Bacterium, *Erythrobacter* sp. Strain OCh 114," *Plant Cell Physiol.*, **29**(5), 861~865(1988).
  30. Fritz, C., Maass, S., Kreft, A. and Bange., F.-C. "Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific," *Infect. Immun.*, **70**, 286~291(2002).
  31. Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Harrell, M. I., Visconti, K. C., Dolganov, G. M., Sherman, D. R. and Schoolnik, G. K., "Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* persistence program," *J. Exp. Med.*, **198**, 705~713(2002).
  32. Choi, C. K., Han, J. H. and Lee, K. H., "Evaluation of aeration on/off time, C/N ratio and ORP applicability for nutrient removal in intermittent-aeration membrane bioreactor (IAMBR)," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, 156~162(2003).
  33. Lim, B. S. Choi, B. C. Yu, S.W. and Lee, C. G. "Effects of operational parameters on aeration on/off time in an intermittent aeration membrane bioreactor," *Desalination*, **202**, 77~82(2007).
  34. Choi, B. C., Kim, K. S., Yang, Y. H. and Lim, B. S., "Evaluation of aeration on/off time optimum in intermittent aeration membrane bioreactor for advanced wastewater treatment," In Proceedings of The Korean Society of Water and Wastewater and the Korean society of Water Environment 2004 Joint conference, pp. 736~743(2004).
  35. Choi, C. K., Lee, J. K., Lee, K. H. and Kim, M. I., "The effects on operation conditions of sludge retention time and carbon/nitrogen ratio in an intermittently aerated membrane bioreactor (IAMBR)," *Bioresour. Technol.*, **99**, 5397~5401 (2008).