The Korean Journal of Microbiology, Vol. 38, No. 2, June 2002, p. 113-118
Copyright©2002, The Microbiological Society of Korea

Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms (dPAOs)을 이용한 영양소제거 및 반응조내 미생물 분포 조사

이진우 · 이한웅[1] · 이수연[1] · 최의소[2] · 박용근[1]*

고려대학교 환경시스템 공학과, [1]고려대학교 생명공학원, [2]고려대학교 토목 · 환경공학과

혐기-무산소조건으로 구성된 회분식 반응조에서 질산염을 이용하여 인(P)도 동시에 제거될 수 있는 가능성을 알아보기 위해서 인의 제거 양상을 혐기-호기조건의 반응조와 비교하여 조사하였고, 질산염과 인을 동시에 제거하는 미생물 분포를 분석하였다. 그 결과 비교적 낮은 농도의 유기물이 적용 되었을 때(평균 CODcr=130 *mg/l*) 두 반응조 모두 인이 효과적으로 제거되었으며 반응조내의 최종 인의 농도를 1 *mg* P/L 이하로 유지하였다. 특히, 질산염을 전자수용체로 이용한 혐기-무산소조건의 반응조는 기존의 영양소제거 시스템과 비교하여 5~7 *mg* (P+N)/*l* 의 영양소를 추가적으로 제거하여 유기물의 효과적인 이용이 가능한 것으로 판명되었다. 혐기-무산조 조건의 반응조내 미생물 분포를 조사 한 결과 질소원을 제거하는 미생물군(denitrifying bacteria)과 인을 제거하는 미생물군(polyphosphate accumulating bacteria)이 함께 존재하고 있음이 밝혀졌고, 이들중 β-proteobacteria에 속하는 *Zoogloea ramigera*와 *Rhodocyclus*에 포함되는 *Alcaligenes defragrans* 등은 탈질능력이 있으면서 anoxic 상태에서 인을 동시에 축적할 수 있는 탈질-탈인균주(denitrifying phosphate accumulating organisms; dPAO)로 조사되었다.

Key words □ **anaerobic-anoxic SBR, biological nutrient removal, dPAO, microbial community analysis**

최근에는 질소와 인의 제거를 위한 다양한 기법들이 국내 · 외에 개발되고 있다. 우리나라에 있어서 현안 문제가 되고 있는 하수, 매립지 침출수와 돈사폐수 등의 특성은 carbon/nitrogen 비 즉 유기물농도에 비해 상대적으로 질소농도가 높아 생물학적 질소제거에 효율이 낮다. 질소 제거가 안되면 동시에 인제거에도 영향을 미쳐 궁극적으로 영양소 제거효율이 낮아진다. COD/N 비가 낮은 특성을 가진 오 · 폐수의 영양소 제거를 위해서는 유기물의 부족한 부분을 해결해야 한다. 외부 탄소원으로는 acetate와 methanol 등을 외부 탄소원으로 고려할 수 있지만 경제적인 부담이 문제가 되고 있다. 탄소원이 제한된 폐수의 영양소 제거를 위해서는 종속영양 탈질(heterothrophic denitrification)이 아닌 자가영양 탈질(autothrophic denitrification) 연구(1), 오 · 폐수처리장에서 발생하는 1차슬러지의 발효액을 주입하여 탈질 효율을 향상시키는 방법(2), 하수처리장내에 유입되는 COD/N비가 높은 분뇨의 주입(7) 등의 경제적인 외부탄소원에 관한 연구와 더불어 생물학적 영양소제거를 위해 탄소의 소요량이 상대적으로 적은 생물공정 등의 응용연구가 필요하다. 본 연구에서는 PAO (phosphorous accumulating organism)가 인의 과잉섭취를 위해 이용되는 전자수용체(electron acceptor)를 DO (dissolved oxygen) 대신 NO_3N을 이용하는 dPAO (denitrifying phosphate accumulating organism)에 의한 질소와 인의 제거 양상에 관하여 비교 검토하였으며, 혐기-무산소조건의 반응조 내 미생물 분석을 통해 질소원과 인제거에 관여하는 미생물의 특성을 조사하였다.

최근에는 인제거 반응조에대한 미생물 분포 조사가 활발히 진행되고는 있으나 인을 축적하는 미생물에 대한 보고는 미비한 실정이다. *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aero-monas*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*와 *Microlunatus* 같은 미생물 속이 순수 분리되었거나(16,22), 분자적인 기술을 이용하여 인제거 반응조에서 인 축적 미생물의 분포 분석 결과 β-proteobacteria에 속하는 *Rhodocyclus* 군 또는 G+C 함량이 많은 그람양성 미생물이 이에 속한다는 보고가 있다(5,9,25). 그러나 우리 나라와 같이 탄소원은 적고 상대적으로 질소원이 많은 환경 조건에서 인 축적 미생물(PAO) 또는 탈질하는 인 축적 미생물(dPAO) 분포에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. dPAO 공정을 이용하면 유기물의 효율적인 이용과 더불어 공기 주입에 의한 전력비를 절감할 수 있으며, 호기조에 비해 무산소조의 상대적인 슬러지 생산량의 감소효과를 얻어 궁극적으로 슬러지 처리 비용절감 등의 부수 효과를 얻을 수 있다. 따라서 이에 대한 가능성을 확인하는 것과 본 공정에 관여하는 미생물 군을 조사하는 것은 탈질 시스템 또는 탈질과 탈인을 동시에 수행 할 수 있는 시스템을 실질적으로 운전하는데 있어서 중요한 자료로 많은 도움이 되리라 판단된다.

재료 및 방법

반응조의 설치, 운전 및 수질분석

Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 인의 과잉섭취를 위한 전자수용

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-3290-3922, Fax: 02-927-9028
E-mail: ykpark@korea.ac.kr

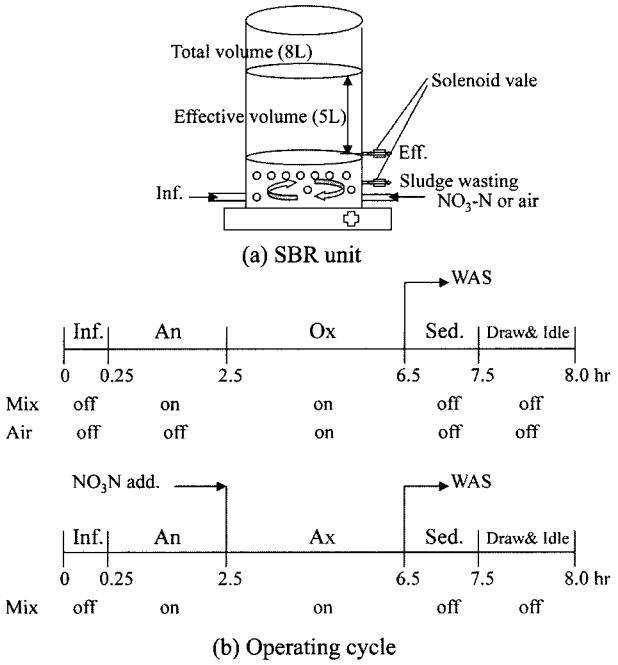

Fig. 1. Laboratory scale SBR unit and operating cycle Inf., influent; Eff., effluent; An, anaerobic; Ox, oxic; Ax, anoxic; Sed., sedimentation; WAS, wasting activated sludge.

체를 DO와 NO_3-N으로 이용하는 반응조의 양상을 비교하고자 각각 혐기-호기(anaerobic-oxic)와 혐기-무산소(anaerobic anoxic) 조건으로 구성된 2개의 SBR (sequencing batch reactor) 반응조를 운전하였다. 전체 반응조의 용적은 8 *l* (실제 운전이 되는 유효용적은 62.5%), 항온수조에 조절을 통해 온도는 20±1°C를 유지하였으며, 미생물의 전체농도를 나타내는 MLSS (mixed liquor suspended solid)는 평균 2,000 *mg/l*이고, 1 일 3 cycle 즉 평균체류시간 8 hr로 운전하였으며, 미생물의 농도를 유지하기 위한 SRT (solid retention time)는 10 일로 조정하기 위해서 침전이 일어나기 바로 전에 각각 약 266 *ml*씩 하루에 총 800 *ml*을 제거하였다. Anaerobic-anoxic SBR 반응조에는 혐기조건 이후에 NO_3-N을 평균 20 *mg/l* 주입하여 무산소 조건을 유지하였다. 각 반응조의 유출수 농도가 일정하게 유지되었을 때 Track Study를 실시하여 반응조에서의 질소와 인의 거동을 파악하였다. Chemical oxygen demand (COD), total suspended solid (TSS), ammonium ion (NH_4-N), total kiejdahl nitrogen (TKN), total phosphate (T-P)는 Shimazu™ UV-spectrophotometer에 의한 비색법으로 측정하였으며, NO_3-N, PO_4-P는 Dionex™ Ion-Chromatography (DX-500, USA)에 의하여 전기전도도에 따른 이온물질을 측정하였는데 Standard Methods (4)에서 제시한 표준방법에 따라 실시되었다.

미생물 순수 분리

Anaerobic-anoxic SBR에서 채취한 슬러지(1 *g*) 시료를 0.9% NaCl이 첨가된 phosphate buffer (pH 7.0)에 첨가한 후 적당히 희석하여 준비된 고체 배지에 도말하여 30°C의 anaerobic jar 에서 10일간 배양시킨 후 배지에 형성된 콜로니를 일차적으로 선별하였다. 선별된 콜로니들은 해부현미경(Kyowa. No. 631542)과 형광현미경(Leica. No. 513558. Germany)를 사용하여 형태학적인 분리(11,14)를 먼저 실시하였다. 사용한 고체배지는 슬러지가 첨가된 폐수 1 L에 Difco bacto agar (Difco, USA) 15 *g*을 첨가하여 멸균한 후 제조한 슬러지 합성배지를 사용하였다.

탈질 미생물의 분리는 순수 분리된 각각의 균주를 Griess Ilosvary 시약과 zinc powder가 첨가된 액체합성배지에 접종하여 30°C에서 5 일 동안 배양시킨 다음 액체 배지 상에 존재하는 nitrate 또는 nitrite 존재 여부를 측정하여 분리하였다(24). 순수분리된 탈질세균은 그람염색과 16S rDNA 서열분석을 실시하여 동정하였다. 인 축적 미생물은 인 방출과 인 축적 실험 후 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 염색 방법으로 순수 분리하였다 (15,21). 미생물 세포내에 축적된 인은 DAPI에 염색되면 밝은 노란 형광색을 발하는데 이것은 1 번 필터를 장착한 형광현미경 (Axioplan; Zeiss, Axiophot 2)으로 관찰하여 세포내 인축적 여부를 확인하였다.

DNA 추출, PCR 증폭, 클로닝 및 16S rDNA 서열분석

순수 분리된 미생물의 DNA 추출은 NB (Nutrient broth, Diffco Co.)에서 하루 동안 배양한 후 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 이용하여 미생물의 genomic DNA를 추출하였다(12). 슬러지로부터 직접 total DNA를 추출하는 방법은 Lee 등(17)의 방법을 이용하여 수행하였고 추출된 total DNA로부터 부식산과 오염원을 제거하기위해 2% SeaKem GTG (FMS, USA) agarose gel에서 전기영동을 실시 하였다. 추출한 DNA를 주형으로해서 중합연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하였다. PCR 반응물 20 *μl* 안에는 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 0.02% gelatin, 각각 5 mM deoxynucleoside triphosphate (Promega, Madison, USA), 0.2 pmol Primer, 10 ng DNA 주형, 1 U Taq Polymerase (Promega, Madison, USA)를 첨가하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위해 사용된 primer (6)는 forward primer (TaKaRa, Shiga, Japan)로 5'-GA-TTTGGATCCT-GGCTCAG-3' (27F), reverse primer는 5'-AA-GGAGGGGATC-CAGCC-3' (1492R)를 사용하였다. PCR 반응 조건은, 첫 번째 반응은 94°C에서 4 분, 다음 각 단계에서는 94°C 1 분, 57°C에서 1 분, 72°C에서 1.5 분 동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 30번 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10 분 동안 16S rDNA를 증폭한 후 4°C에서 냉각하였다. PCR 증폭 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Cat. No. 28106, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. PCR 증폭 산물의 ligation은 pGEM-T Easy vector system I (Promega, Madison, USA)를 사용하여 Sambrook 등의 방법(23)에 따라 수행하였으며 형질전환은 Mandel과 Higa의 방법(18)으로 수행하였다. RFLP (restriction fragment length polymorphism)은 시료로부터 증폭된 PCR 산물을 제한효소(*RsaI*)로 처리하여 1% agarose gel (FMC, USA)에서 80 V, 40 분 전기영동한 후 Quantity One-

4.2.1 (BIO-RED, USA)프로그램을 사용하여 분석하였다. 염기 서열을 위한 플라스미드는 Qiagen사(Qiagen, Germany)의 plasmid kit를 사용하여 분리하였으며, 16S rDNA가 봉합된 플라스미드를 주형으로 다시 DNA Sequencing Kit (ABI prism, Part No. 4303152) 중합효소를 사용하여 16S rDNA를 증폭하였다. 27F를 염기서열 primer로 사용하여 얻은 PCR 산물을 ABI model 310 (version 3.0) 염기서열 분석 기계를 사용하여 분석하였다. 미생물 동정은 16S rDNA염기서열 분석 결과를 Basic Local Aligment Search Tool을 이용하여 Genbank와 RDP의 database를 사용하여 수행하였다.

Fluorescent *In situ* hybridization (FISH)

FISH에 사용된 rRNA probe의 염기 서열은 이미 보고된 방법(3)에 따라 주문, 제작하였고(TaKaRa, Shiga, Japan), 형광 물질인 tetramethlyrhodamine-5-isothiocyanate (TRITC)로 수식화하였다. 사용한 probe들은 eubacteria와 결합하는 EUB338, proteobacteria의 α-group과 결합하는 ALF1b, proteobacteria의 β-group과 결합하는 BET42a, proteobacteria의 γ-group과 결합하는 GAM42a 및 *Cytophaga-Flavobacterum* group과 결합하는 CF319a probe였다. 미생물 총수와 미생물 분포를 동시에 분석하기위해, DAPI 염색과 형광 물질이 수식화된 rRNA probe를 동시에 염색하는 방법을(13) 이용하여 관찰하였으며 모든 hybridization 조건과 proteobacteria 중 β, γ-group의 간섭을 배제하는 방법은 Manz 등(19)의 방법을 이용하여 수행하였다.

Nucleotide Sequence Accession Number

혐기-무산소조건의 반응조내 클론의 16S rDNA 부분 염기서열의 accession number는 AF387323에서 AF387329이다.

결과 및 고찰

반응조의 특성

Table 1에는 유입수와 함께 SBR 반응조 유출수의 평균농도를 나타내었다. 본 연구가 탄소원이 제한 폐수의 질소와 인의 제거 양상을 파악하기 위하여 운전되었으므로 비교적 낮은 유기물 농도(CODCr의 경우 평균 130 *mg/l*)의 하수를 이용하였는데 유출수상의 인제거 효율은 혐기-호기조건으로 구성된 반응조와 혐기-무산소 조건으로 구성된 반응조의 결과가 유사하게 1 *mg/l*이하의 수질을 보였다. 그러나 질소제거의 경우 혐기-무산소조건과 혐기-호기조건에서 총 질소의 제거량은 각각 19.1 *mg/l* (= $TKN_{Inf.}$-$TKN_{eff.}$-NO_3-N_{eff}+add. NO_3-N 20 *mg/l*의 NO_3-N이 무산소 조건 주입)과 8.0 *mg/l* (=$TKN_{Inf.}$-$TKN_{eff.}$-NO_3-N_{eff})로서 같은 유기물농도로 주입되었을 경우 혐기-무산소조건으로 운전된 반응조의 경우 혐기-호기조건에 비해 2 배 이상의 높은 제거량를 보였다.

이러한 결과를 바탕으로 유입되는 유기물에 따른 질소와 인의 제거량을 문헌자료와 함께 표시하였는데 혐기-무산소 조건으로 구성된 반응조의 질소와 인의 제거량은 기존의 영양소제거 공정과 비교하여 약 5~7 *mg* (P+NO_3-N)이 추가적으로 제거 가능한 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 미생물의 생체 합성량, 질산성 질소를 탈질시키는 heterothrophic denitrifier와 질소와 인을 동시에 제거하는 dPAO 등에 의해서 제거되는 질소와 인제거량을 모두 나타낸 것인데 질소와 인을 제거하기 위해 요구되는 CODCr을 5 *mg/l* (8)라고 할 때 25~35 *mg/l*의 CODCr을 절감 할 수 있는 값으로 즉 탄소원이 제한된 폐수에서 보다 효과적인 공정으로 판단된다.

반응조 내의 질소와 인의 제거양상을 파악하고자 실시한 Fig. 3의 Track study 결과에서 인의 섭취율은 각각 1.1~1.5 mgP/gVSS/hr로 나타났으며, 혐기-무산소조로 구성된 반응조의 인 제거당 NO_3-N 이용율은 약 4~5 *g* (NO_3-N/P)로 문헌(20) 상에 나타난 것보다는 높은 값을 보였다. 이는 혐기-무산소 조건의 반응조에서 질소와 인의 동시 제거되는 dPAO 뿐만 아니라 일반 탈질 미생물이 함께 존재한다는 것을 나타내는

Table 1. Summary of operating results of reactors in laboratory experiment

Parameters	Influent	effluent	
		anaerobic-aeobic SBR	anaerobic-anoxic SBR
pH	7.3	7.2	7.7
TSS	80	10	15
VSS	50	8	11
TCOD	130	36	36
SCOD	73	22	24
NO_3-N	–	9.0	1.4
NH_4-N	9.2	0.1	9.3
TKN	21	4	16
T-P	5.3	1.0	0.9
PO_4-P	4.5	0.7	0.7

TSS (VSS) is total (volatile) suspended solid. TCOD (SCOD) is total (soluble) chemical oxygen demand. T-P is total phosphate. TKN is total kiejdahl nitrogen. *All units are expressed as *mg/l* except pH.

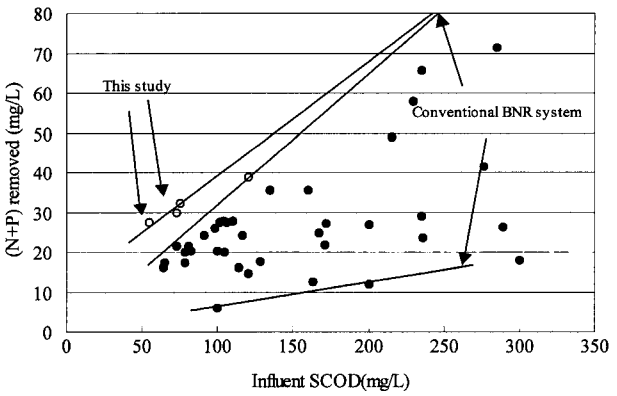

Fig. 2. Relationship of influent SCOD and (N+P) removed at this study(anaerobic-anoxic SBR).

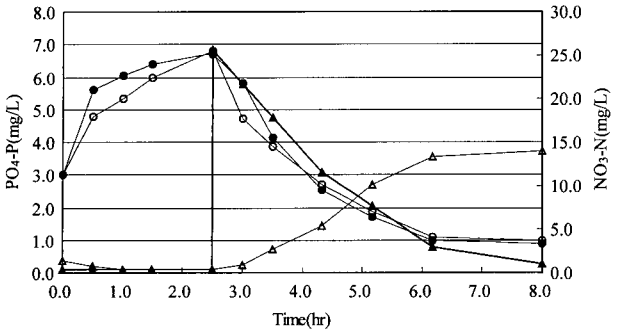

Fig. 3. PO_4-P and NO_3-N profile in SBRs. Symbol ○ - ○ , PO_4-P(w/air); ● - ● , PO_4-P(w/NO_3-N); △ - △ , NO_3-N(w/air); ▲-▲, NO_3-N(w/NO_3-N)

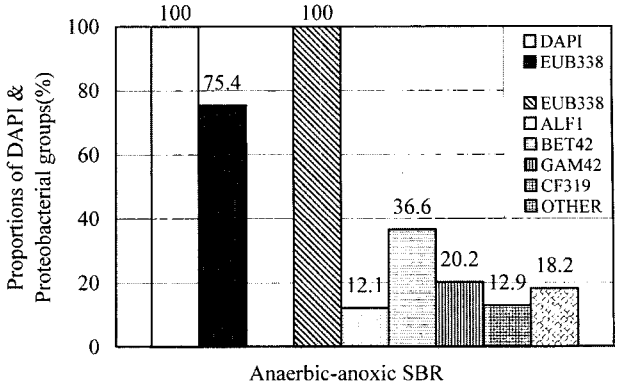

Fig. 4. Proportion of major bacterial divisions in the anaerobic-anoxic SBR by FISH. EUB338, probe of eubacteria; ALF1b, probe of alpha subclass of the class proteobacteria; BET42a, probe of beta subclass of the class proteobacteria, GAM42a: probe of gamma subclass of the class proteobacteria, CF319a, probe of *Cytophaga-Flexibacter cluster*, OTHER, probe of other bacteria. Assessment of relative abundances (%) of probe-positive cells relative to those visualized by probing with EUB338 or with ALF1a, BET42a, The specific probe EUB338 were set to control 100%, and then the relative subclass probe number of proteobacteria was measured by FISH.

것으로 판단된다.

미생물 분석

혐기-무산소 조건의 반응조로부터 순수 분리된 탈질 및 질산염 환원 미생물은 Table 2와 같다. 순수 분리된 미생물 중 I-2와 I-3은 질산염을 질소 가스까지 완전히 탈질하는 미생물이었으며, 이 미생물들은 *Pseudomonas* 속에 속하는 미생물임을 알 수 있었다. 순수 분리된 나머지 미생물은 I-1, I-4, I-5, I-6로 이들 미생물은 질산염을 아질산염까지만 환원하는 특성을 가지고 있다. 순수 분리된 탈질 및 질산염 환원 미생물 중 인을 축적하는 미생물은 I-1과 I-5로 혐기적인 조건에서 배양 후 호기적인 조건에서 순수 배양하였을 때 세포 내에 인을 축적하는 미생물의 특징을 갖는 것으로 판단된다.

위와 같은 Cultured dependent method를 통해서는 자연생태계에서 배양가능한 미생물은 자연생태계의 1~10% 미만에 불과하다는 단점을 보안하기 위해 미생물 군집 구조를 DAPI, FISH (fluorescent *in situ* hybridization) 방법과 eubacterial 16S rDNA cloning방법을 이용하여 조사하였다. DAPI와 FISH 방법에 의한 미생물 분포를 조사한 결과 총 미생물 수는 단위 시료당 3.71×10^{12} (cells/*g*) 이었고(Fig. 4), 이들중 75.4%가 eubacteria specific probe, EUB 338과 결합하였다. 그리고 eubacteria 중에서 β-proteobacteria group이 38.1%로 우점종으로 나타났는데 일반적으로 유기물이 부족한 빈영양 상태에서 우점종의 분포를 보이는 결과와 유사한 결과를 보였다. 반응조에서는 Cytophaga-Flexibacter (CF) group이 아군(subclass)에 대한 비율에 10% 이상이 검출되었는데 이러한 현상은 반응조에서 보여주는 특이한 현상이었다. 일반적으로 CF group은 gliding mobility (운동성)가 크고 다양한 고분자 유기물을 분해할 수 있는 능력이 있는 미생물로 알려졌다. CF group의 미생물은 폐수에 존재하는 고분자 유기물을 이용하여 살아가며 이로부터 생산된 acetate와 같은 유기물은 다른 미생물의 탄소원으로 사용되어 미생물들이 상호협력관계를 유지하면서 질소원과 인을 제거하는데 도움을 주는 미생물이라 사료된다(12,14). 16S rDNA clone libraries 방법에 의해 미생물 분포를 조사한 결과 C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 group이 탈질에 관여하는 미생물 속 (genus)에 포함되는 미생물임을 알 수 있었다

Table 2. Results of identification of isolates from the anaerobic-anoxic SBR by sample dilution and spread plating method.

Isolates	16S rRNA gene sequencing			Subclass of proteobacteria	Gram stain and cell morphology
	Closest match	No. of nucleotides compared	% Similarity with closest match		
I-1	*Stenotrophomonas maltophilia*	470	97	γ^a	G(−)[d],rod
I-2	*Pseudomonas* sp.	345	93	γ	G(−),rod
I-3	*Pseudomonas geniculata*	343	96	γ	G(−),rod
I-4	*Chromohalobacter marismortui*	400	97	γ	G(−),rod
I-5	*Staphylococcus eqidermidis*	574	93	B/C[b]	G(+)[e],
I-6	*Enterococcus durans*	562	96	β^c	G(−), cocci

[a]Gamma subclass of proteobacteria. [b]*Bacillus/Clostridium* group, [c]beta subclass of proteobacteria, [d]G(−); Gram-negative staining; [e]G(+); Gram-positive staining.

Table 3. Results of identification of clone libraries as determined by RFLP analysis and 16S rDNA sequencing

Clones of anaerobic-anoxic SBR	16S rRNA gene sequencing			Subclass of proteobacteria
	Closest match	No. of nucleotides compared	% Similarity with closest match	
C-1	*Bacteroides* sp. (13)[a]	454	86	CF[b]
C-2	*Zoogloea ramigera* (12)	315	92	β[c]
C-3	*Alcaligenes defragrans* (8)	319	93	β
C-4	*Azoarcus* sp. (8)	463	93	β
C-5	Denitrifying-Fe-oxidizing bacteria (6)	421	96	β
C-6	*Rhodobacter capsulatus* (5)	397	92	α[d]
C-7	*Flavobacterium ferrugineum* (4)	418	89	CF

[a]No. of plasmid inserted 16S rDNA. [b]*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteria*. [c]Beta suclass of proteobacteria, [d]Alpha subclass of proteobacteria.

(Table 3). 이 반응조에서는 탈질 미생물이 다수 분포(전체 clone 130 개 중 30.0%)하고 있는 것을 나타내며 특히 C-2 group은 16S rDNA의 부분적인 염기서열 결과 *Zoogloea ramigera*로 동정되었는데(전체 130 clone의 9.23%) 이 미생물은 활성 슬러지에서 floc을 형성하고 용존산소가 제한된 환경에서 세포내에 PHB을 축적하며, 최종 전자 수용체로 NO_3-N이 존재할 경우 탈질을 하고, 세포내에 PHB를 이용하여 인을 축적하는 미생물로 알려져 있다(5,14). 또한 C-3 group은 β subclass 중 *Rhodocyclus*에 포함되는 미생물 군으로 이들 미생물들이 질소제거 반응조에서 인을 축적하는 미생물이라 보고된 바 있는데(5,10) 전체 clone 중 약 6.15%로 분포하고있어 C-3 group이 폐수 내에 질소원과 인 제거에 관여하는 dPAO라 사료된다.

이상의 결과들로 혐기-무산조조건의 반응조에는 질소원을 제거하는 미생물 군과 인을 제거하는 미생물 군은 함께 존재하고 있음을 알 수 있었고 특히 β-proteobacteria에 속하는 *Zoogloea ramigera*나 *Rhodocyclus*에 포함되는 *Alcaligenes defragrans*과 같은 미생물들이 산소대신 질산염이 존재하는 환경에서 질소원과 인을 동시에 제거하는 dPAO로도 존재하여 탄소원이 제한된 반응조에서 질소와 인을 제거하는데 주된 역할을 수행하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학재단의 특정기초연구(과제번호 97-06-01-01-3)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사의 뜻을 표합니다.

참고문헌

1. 이진우, 최의소. 1998. Autothrophic denitrification using sulfide, 1998년 한국 수질보전 학회 학술연구 발표회 논문초록집(고려대학교), 33.
2. Abu-ghararah, Z.H. and C.W. Randall. 1991. The effect of organic compound on biological phosphorous removal, *Wat. Sci. Tech.* 23, 585-594.
3. Amann, R., I.W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995 Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
4. APHA. 1995. Standard Methods for Examination of Water & Wastewater, 19th Ed.
5. Bond, P.L., P. Hugenholtz, J. Keller, and L. Blackall. 1995. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1910-1916.
6. Brosius, J., J.L. Palmer, H.P. Kennedy, and H.F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4801-4805.
7. Choi, E., H.S. Lee, J.W. Lee, and S.W. Oa. 1996. Another Carbon Source for BNR System, *Wat. Sci. Tech.* 34, 363-370.
8. Choi, E., H. Park, and D. Rhu. 2001. Phosphorus removal from SBR with controlled denitrification for weak sewage, *Wat. Sci. Tech.* 43, 159-166.
9. Christensson, M, L. Blackall, and T. Welander. 1998. Metabolic transformations and characterisation of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. *Appl Microbiol Biotechnol* 49, 226-234.
10. Crocetii, R. G, P. Hugenholtz, P.L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L. Blackall. 2000 Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Envir. Microbiol.* 66, 1175-1182.
11. Gerhardt, P., R.G.E. Murrary, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.R. Pillips. 1982. Manual of methods for general bacteriolgy. Am. Soc. Microbiol. Press. Microbiology, Washington, D. C.
12. Hallin, S. and P-E. Lindgren. 1999 PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 1652-1657.
13. Hicks, R.E., R.I. Amann, and D.A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligon-ucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158-2161.
14. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stalely, and S. T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Wiliams & Wilkins. Baltimore, Md.
15. Kawaharasaki, M., H. Tanaka., T. Kanagawa., and K. Nakamura.

1999. *In situ* identification of polyphosphate accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at polyphosphate-probing concentration. *Wat. Res.* 33, 257-265.
16. Kortstee G.J.J, K.J. Appeldoorn, C.F.C. Bonting, E.W.J. Niel van, and H.W. Veen van. 1994. Biology of polyphosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. *FEMS Microbiol Rev.* 15, 137-153.
17. Lee, S.Y., J.B. Bollinger, D. Bezdicek, and A. Ogram. 1996. Estimation of the abundance of an unculturable soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3787-3793.
18. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 109-118.
19. Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
20. Meinhold, J., C. Filipe, G. Daigger, and S. Isaacs. 1999. Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal, *Wat. Sci. Tech.*, 39, 31-42.
21. Merzouki, M., J.P. Delgenes, N. Bernet, R. Moletta, and M. Benlemlih. 1999. Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Curr. Microbiol.* 38, 9-17.
22. Nakamura K., A. Hiraishi, Y. Yoshimi, M. Kawaharasaki, K. Masuda, and Y. Kamagata. 1995. Microlunatus phosphorus gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 17-22.
23. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
24. Simith, G.B. and J.M. Tiedje. 1992. Isolation and chracterization of a nitrite-reduction gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 376-384.
25. Wagner M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.H. Schleifer. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 60, 792-800.

(Received March 11, 2002/Accepted April 26, 2002)

ABSTRACT: Nutrient Removal using the Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms (dPAOs) and Microbial Community Analysis in Anaerobic-Anoxic Sequencing Batch Reactor

Jinwoo Lee, Han-Woong Lee[1], Soo-Youn Lee[1], Euiso Choi[1] and Yong-Keun Park[1]* (Department of Environmental System Engineering, [1]Department of Biotechnology, Graudate School of Biotechnology and [2]Department of Civil and Environmental Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Laboratory experiments were aimed to evaluate the effect of nitrate as a electron acceptor during the biological phosphorus uptake and to investigate the microbial community. Anaerobic-anoxic sequencing batch reactor (SBR) compared the removal behaviour to anaerobic-oxic SBR, both SBRs maintained lower effluent quality with I.0 *mg*P/*l*. Anaerobic-anoxic SBR was able to remove additional 5.0 to 7.0 *mg* (P+N)/*l* than other biological nutrient removal (BNR) system. Therefore, it was proposed that the anaerobic-anoxic SBR was more effective at weak sewage. From the results of the maicrobial community analysis, it can be inferred that denitrifying bacteria and polyphosphate accumulating bacteria coexist in anaerobic-anoxic SBR during stable condition for removing the nitrogen and phosphorus. Particularly, it was suggested that the *Zoogloea ramigera* in the β-subclass of proteobacteria and the *Alcaligenes defragrans* of the *Rhodocyclus* group in the β-subclass of proteobacteria played a major role for removing the nitrogen and phosphorus as dPAOs (denitrifying phosphate accumulating organisms).