

# 입상 슬러지 반응조 내의 혐기성 암모늄 산화(ANAMMOX) 및 분자생태학적 특성 평가

한지선 · 박현아 · 성은혜 · 김창균<sup>†</sup> · 윤조희\* · 배영신\*\*

인하대학교 환경공학과 · \*경남대학교 환경공학과 · \*\*수도권매립지관리공사

(2006년 2월 20일 접수, 2006년 11월 27일 채택)

## Anaerobic Ammonium Oxidation(ANAMMOX) in a Granular Sludge Reactor and its Bio-molecular Characterization

Ji-Sun Han · Hyun-A Park · Eun-Hae Sung · Chang-Gyun Kim<sup>†</sup> · Cho-Hee Yoon\* · Young-shin Bae\*\*

Department of Environmental Engineering, Inha University · \*Department of Environmental Engineering, Kyungnam University

\*\*SUDOKWON Landfill Site Management Corp.

**ABSTRACT :** In this study, granular sludge used in an anaerobic process treating brewery waste was inoculated in a laboratory scale of reactor to induce anaerobic ammonium oxidation(ANAMMOX). The reactor was operated with synthetic wastewater, which prepared at 1:1 ratio of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  over  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ . Changes in nitrogen concentration, COD, alkalinity and gas production were analyzed. There are 3 phases of spanning in experimental period according to influent nitrogen concentration. In the Phase 1, each of the concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  were increased from  $1.91 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$  to  $14.29 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ . Ammonium nitrogen loading(same as nitrite nitrogen) was  $23.81 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$  in the Phase 2 and  $19.05 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$  in the Phase 3, respectively.  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  has been removed up to 99% during whole period while the removal efficiency of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  was significantly varied. In Phase 2,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  was removed up to 75%. Microorganisms varied temporally through three phases were characterized by 16s rDNA analysis methods. ANAMMOX bacteria were dominantly found in phase 2 when the removal rate of  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  was the highest up to 99% and 75%, respectively. Due to erroneously exposed to air, the removal efficiency of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  was unexpectedly lowered, but ANAMMOX bacteria still existed.

**Key Words :** ANAMMOX, Granular Sludge, 16S rDNA, Nitrogen Removal

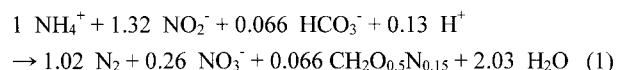
**요약 :** 본 연구에서는 혐기성 암모늄 산화(ANAMMOX)반응을 유도하기 위해 양조폐수를 처리하는 메탄 생성 반응조의 입상 슬러지를 혐기성 반응기에 식종하였다. 암모니아성 질소( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )와 아질산성 질소( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )를 1:1의 비율로 인공폐수를 조제하여 반응조를 운전하였다. 실험기간은 반응기의 유입 질소농도 조건에 따라 3개의 phase로 구분하였다. 각 phase별 유출수의 질소농도, COD, 알칼리도, 발생 가스 조성을 측정하여 처리효율을 평가하였다. Phase 1에서는 유입  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 를 각각  $1.91 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ 부터  $14.29 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ 까지 점차 높였으며 Phase 2에서 각 질소의 부하를  $23.81 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ , Phase 3에서는  $19.05 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ 로 하여 운전하였다. 아질산성 질소( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )는 전 기간에 걸쳐 99%까지 제거 되었으며, 암모니아성 질소( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )의 제거율은 각 phase별로 변동폭이 높았으며 이 중 Phase 2에서 최대 75%까지 제거되었다. 한편 각 phase별 반응조의 미생물 군집 변화는 16s rDNA방법을 이용하여 분석하였다. 입상 슬러지의 점종 초기인 Phase 1의 경우 메탄생성이 일정하게 유지되었으며 메탄균과 탈질균이 공존하였다. Phase 2의 경우 아질산성 질소( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )와 암모니아성 질소( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )의 제거율이 각각 99%와 75%까지 증가하였으며 이 때 ANAMMOX균의 존재가 확인되었다. Phase 3의 경우 외부 공기 유입으로 인하여 암모니아성 질소( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )의 제거율은 급격히 감소하였으나 미생물 군집 중 여전히 ANAMMOX균이 관측되었다.

**주제어 :** ANAMMOX, 입상 슬러지, 16S rDNA, 질소제거

### 1. 서론

혐기성 암모늄 산화(ANAMMOX)공정은 1970년대에 그 미생물의 존재가 예측되었고<sup>1)</sup> 1990년대 중반에 연구가 시작된 새로운 질소제거 공정으로 메탄생성 반응기의 유출수를 탈질 처리하는 과정에서 발견되었다.<sup>2)</sup> 이 반응은 준호기성 조건에서 아질산( $\text{NO}_2^-$ )을 전자수용체로 사용하여 암모늄( $\text{NH}_4^+$ )을 질소

가스( $\text{N}_2$ )로 산화한다. 그 양론식은 식 (1)과 같다.<sup>3)</sup>



일반적인 질소제거 공정이 암모늄( $\text{NH}_4^+$ )을 질산( $\text{NO}_3^-$ )까지 산화하는 호기성 공정과 질산( $\text{NO}_3^-$ )을 질소가스( $\text{N}_2$ )로 탈질하는 혐기성 공정을 포함하고 있으나 ANAMMOX공정은 단일 반응기에서 암모늄( $\text{NH}_4^+$ )과 아질산( $\text{NO}_2^-$ )을 동시에 제거할 수 있다. 또한 ANAMMOX반응은 독립영양 반응으로 탈

<sup>†</sup> Corresponding author  
E-mail: cgk@inha.ac.kr  
Tel: 032-860-7561

Fax: 032-865-1425

질 과정에서 유기물이 필요하지 않고 슬러지 발생량이 적다는 장점을 가지고 있다.<sup>4)</sup> 그러므로 양돈폐수나 침출수 등의 고농도 질소함유 폐수의 경우 탈질 시 소모되는 외부 탄소원의 양을 현저히 줄일 수 있다.

기존의 연구에 의하면 ANAMMOX반응을 일으키는 혐기성 미생물로 *Candidatus Brocadia anammoxidans*,<sup>5)</sup> *Candidatus Kueneenia stuttgartiensis*,<sup>2,6)</sup> *Candidatus Scalindua sorokinii* 등이 밝혀졌다. 또한 *Nitrosomonas europaea*와 *Nitrosomonas europaea* 등의 일부 호기성 질산화 미생물도 혐기성에서 암모늄을 산화한다고 알려져 있다.<sup>7,8)</sup>

본 연구에서는 맥주공장의 폐수를 처리하는 메탄생성 반응기의 입상 슬러지를 이용하여 혐기성 암모늄 산화반응을 유도하였다. 그 과정에서 실험 기간을 3개 구간(3 phases)으로 나누어 유입 질소농도에 따른 유출수 내의 질소농도 변화 및 생성 가스 조성을 관찰하였으며, 각 시점의 시료를 채취하여 세균의 16S rDNA의 염기서열을 분석하여 그 다양성을 확인하고 미생물 종의 변화를 조사하였다.

## 2. 실험방법 및 장치

### 2.1. 실험장치

ANAMMOX 반응기는 원통형으로 총 부피 11 L, 그 중 입상 슬러지의 부피는 4.3 L, 인공폐수의 부피는 6 L, Head space는 약 0.7 L로 Fig. 1과 같다. 이 반응기는 30°C 항온실에서 혐기성 조건에서 운전되었으며 알려진 바와 같이 ANAMMOX균의 배양을 최적화할 수 있는 연속회분식배양기(SBR : sequencing batch reactor)를 사용 하였다.<sup>3)</sup> 유입 인공 폐수는 반응기 하단으로 주입하였으며 연속적으로 3Q의 유량으로 내부 재순환했다. 작동일수는 공탐체류시간(EBCT : Empty Bed Contact Time)을 기준으로 산정하였으며, 실제 운전 일수는 450일(EBCT 930일)이었다.

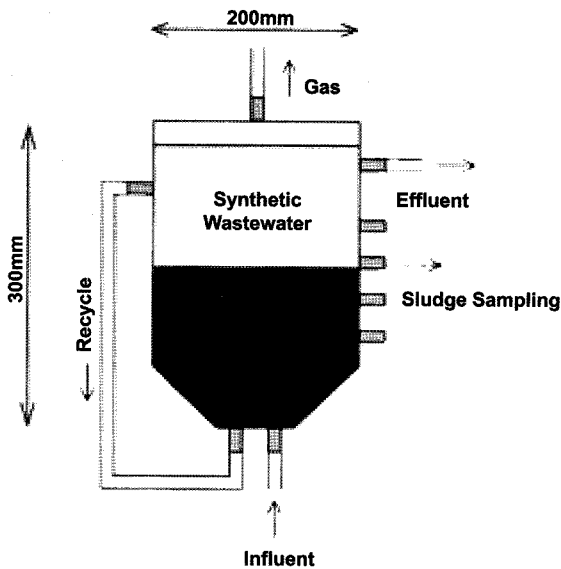


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental SBR for ANAMMOX.

Table 1. Composition of the synthetic wastewater(Values in mg/L)

Component	Phase 1	Phase 2	Phase 3
KHCO <sub>3</sub>	1000	1000~2000	10~1000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	50	50
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	300	300	300
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200	200	200
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10	10	10
EDTA	6.25	6.25	6.25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.5~64.5 mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L	125 mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L	100 mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L
NaNO <sub>2</sub>	8.5~64.5 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/L	125 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/L	100 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/L

### 2.2. 유입수 성상 및 슬러지 집중

유입수는 Table 1과 같은 조성으로 제조하였으며, 3.5일 간격으로 2 L씩 주입하였다. 유입되는 질소농도에 따라 실험 기간을 세 단계로 나누었다. Phase 1에서는 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)와 아질산성 질소(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)의 부하를 각각 1.91 gN/m<sup>3</sup>·d부터 14.29 gN/m<sup>3</sup>·d까지 서서히 높여 운전하였다. Phase 2에서는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 및 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N의 부하를 각각 23.81 gN/m<sup>3</sup>·d, Phase 3에서는 19.05 gN/m<sup>3</sup>·d의 부하로 운전하였다. 유입수의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N과 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N의 비는 항상 1:1을 유지하였으며 10~2000 mg/L의 KHCO<sub>3</sub>를 이용하여 반응기내 pH가 7.5에서 8.5를 유지되도록 하였다.

### 2.3. 수질분석방법

유입수와 유출수 중 COD<sub>Cr</sub>, TKN(total kjeldahl nitrogen), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 및 알칼리도를 Standard Methods<sup>26)</sup>에 준하여 분석하였으며 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N과 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 농도는 IC(Yong Lin Instrument, Water 432 Conductivity Detector, Korea)로 분석하였다. Head space에 생성된 gas 조성(CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)은 GC-TCD(HP6890, Alltech Packed column CTR I, oven 50°C, injector 120°C, detector 210°C, He 25 mL/min)로 분석하였다.

### 2.4. 16S rDNA 염기서열을 통한 미생물 군집 분석

ANAMMOX반응기의 입상 슬러지의 미생물 군집은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 분석하였다. 먼저 반응기의 입상 슬러지를 각 phase 별로 EBCT 300, 850 및 1000일 짝에 10 mL씩 채취한 후 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit(Bio101 system, Q-Bio gene)을 사용하여 슬러지의 유전체(genomic DNA)를 FastPrep<sup>®</sup> Instrument(Q-Bio gene)로 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 16S universal primer(27F-5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3', 1492R-5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3')를 사용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 증폭하였다. PCR 증폭생성물은 Winzard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega, USA)으로 정제한 후 정제된 16S rDNA PCR 산물을 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 접합(ligation)시키고 숙주세포(host cell : *E. coli* XL1-Blue)로 형질전환(Transformation)시켰다. X-Gal과 IPTG로 처리된 LB(Luria-Bertani) 배지에 형질전환된 세포를 배양하여 균주의 접합이 확인된 콜로니는

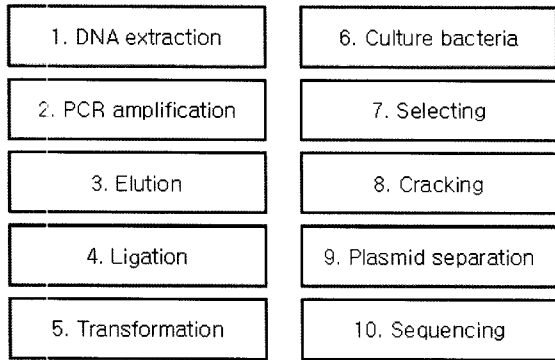


Fig. 2. Procedure on 16S rDNA gene cloning.

Winzard® Plus Minipreps DNA Purification System(Promega, USA)을 이용해 플라스미드를 회수하고 세균의 16S rDNA 염기서열을 분석 하였다.<sup>9)</sup>

미생물 염기서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Bank에 등록된 데이터베이스와 비교, 결정하였다. 이와 같이 도출된 미생물 종 별 염기서열 정보를 근거로 CLUSTAL W(<http://clustalw.genome.jp/>) 및 MEGA 3.1(Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>)를 이용하여 관련 미생물에 대한 계통도를 작성하여 미생물 중간 유근관계를 파악하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 질소제거

Table 2에서 보는 바와 같이 메탄생성 입상형 슬러지에 대하여 ANAMMOX 미생물 발현을 위해 Phase 1의 실험기간 동안 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)와 아질산성 질소(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)를 각각 1.91 gN/m<sup>3</sup> · d부터 14.29 gN/m<sup>3</sup> · d까지 서서히 증가시켰다. 이 때 초기 접종 시 이용되었던 메탄생성 미생물의 사멸이 발생하여 유출 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N농도가 유입수 중의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 에 비하여 높은 농도를 나타내었다(Fig. 3.). 그러나 반응시간이 경과함에 따라, 유입되는 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)의 농도가

Table 2. Influent nitrogen loading and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N concentrations

	Phase 1	Phase 2	Phase 3
N loading(gN/m <sup>3</sup> · day)	1.91 ~ 14.29	23.81	19.05
Inf. NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N(mgNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/L)	10 ~ 75	125	100
Inf. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N(mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L)	10 ~ 75	125	100

증가함에도 불구하고 유출수의 암모니아성 질소의 농도는 Phase 1 전체에 걸쳐 점차 감소하였다. 이는 저농도의 암모니아성 질소를 함유한 유입수의 주입에 따른 회석과 ANAMMOX 균의 성장에 따른 것으로 여겨진다. 유출수의 COD가 Fig. 7 에서와 같이 EBCT 200일경 최대였으므로 미생물의 사멸은 운전 초반 지속적으로 일어났으며 이 때 암모니아성 질소는 감소하였으므로 ANAMMOX균의 활동이 발생한 것으로 여겨진다.

유입수의 암모니아성 질소의 농도를 125 mg/L(질소부하 23.81 gN/m<sup>3</sup> · d)까지 증가시킨 Phase 2의 경우 초기에는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 이온이 효율적으로 처리되지 못하고 반응기내 축적되었다. 또한 EBCT 60일 경 질소부하에 적응하지 못한 미생물이 사멸하여 암모니아성 질소의 농도를 증가시켰을 것으로 여겨지며 이에 따라 유출 CDD도 증가했다(Fig. 7). 그러나 반응 시간이 경과하면서 질소 제거율은 다시 75%까지 증가하였다. 이에 따라 Phase 2 후반 질소가스의 발생이 증가하여 반응기의 압력이 높아졌고 그로 인해 반응기에 설치된 시료 채취 밸브가 일시적으로 개방되어 반응기 내부로 공기가 유입되었다. 이로 인하여 반응기내 순환되었던 일부 ANAMMOX반응 및 탈질에 관여하는 혐기성 미생물이 사멸하였으며 그 결과 처리수의 암모니아성 질소 농도는 다시 증가하였다.

혐기성 암모늄 산화 반응을 다시 회복시키기 위해 Phase 3에서는 인공폐수의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도를 100 mg/L(질소부하 19.05 gN/m<sup>3</sup> · d)로 감소시켜 운전하였다. 또한 반응기의 pH가 8.5 이상으로 증가하여 적정 운전 pH를 벗어나 인공폐수의 알칼리도를 60 mgCaCO<sub>3</sub>/L까지 감소시켜 pH를 적정범위로 낮추었다. 그러나 ANAMMOX반응은 그 이전에 비하여 더디

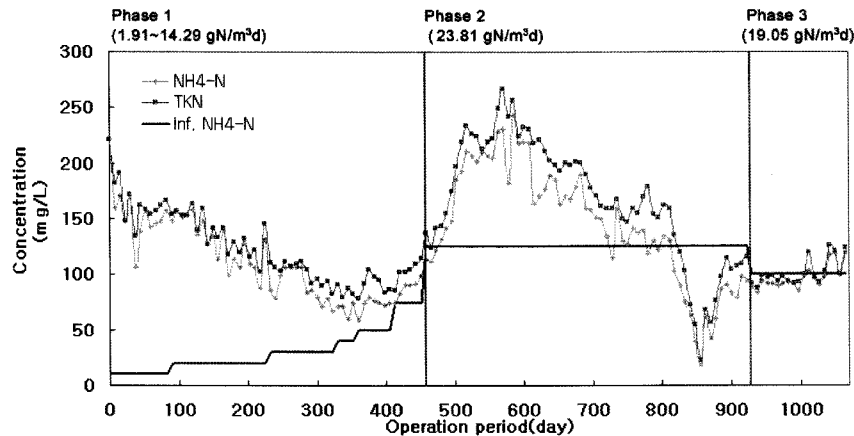


Fig. 3. Temporal variation of TKN and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N concentrations in the experiment.

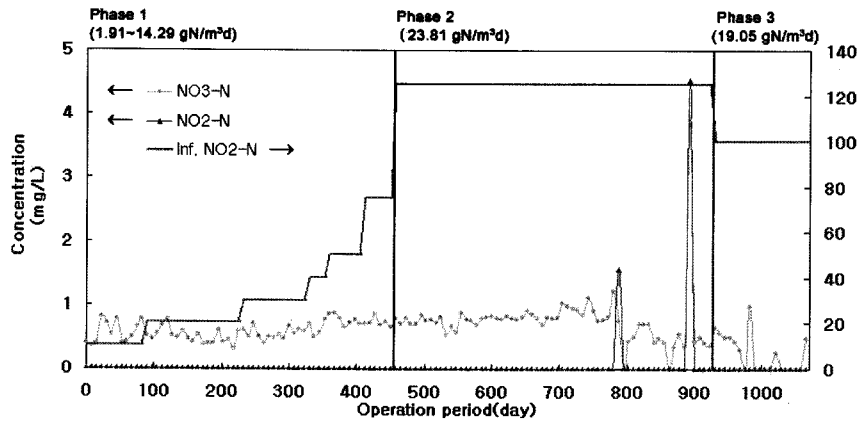


Fig. 4. Temporal variation of  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{NO}_3^-$ -N concentrations in the experiment.

계 회복되었으며, 그 결과  $\text{NH}_4^+$ -N의 제거율은 약 5% 범위로 매우 낮게 유지되었다. 이를 통하여 반응기 내로 산소가 단순 유입되더라도 ANAMMOX 미생물에 큰 영향을 미쳐 처리효율을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

유출수 중  $\text{NO}_2^-$ -N과  $\text{NO}_3^-$ -N 농도를 분석한 결과 전기간 (Phase 1~3) 걸쳐  $\text{NO}_2^-$ -N는 검출되지 않았고  $\text{NO}_3^-$ -N는 1 mg/L 이하의 낮은 농도로 관찰되었다(Fig. 4). 즉  $\text{NO}_2^-$ -N는 모두 질소가스로 환원되어 제거되었으며,  $\text{NO}_3^-$ -N는 총괄양론식 (1)에 따라 ANAMMOX반응에 의해 발생되었으나 양론식을 이용하여 계산된 양에 비해서는 80% 가량 적었다. 이는  $\text{NO}_3^-$ -N가 ANAMMOX반응에 따라 생성되었으나 탈질균에 의해 일부 제거된 것으로 판단된다. Phase 2 후반 반응기 내로 외부 공기가 유입되어 ANAMMOX 반응이 순간적으로 억제되고 유입된 산소에 의해 질산화되어  $\text{NO}_2^-$ -N 및  $\text{NO}_3^-$ -N의 유출 농도가 갑자기 증가하기도 하였다. 그러나 그 농도는 0.3 mg/L 이하로 매우 낮았으며 다시 곧 모두 제거되었으므로 산소의 유입에도 불구하고 아질산 이온의 탈질은 큰 영향을 받지 않았다. 원수 중에 함유된 아질산( $\text{NO}_2^-$ )은 ANAMMOX활동이 일어나지 않는( $\text{NH}_4^+$ -N의 제거가 일어나지 않는) 때에도 미생물 사체 등으로 인한 유기물을 이용하여 탈질된 것으로 판단되며 이것은 Phase 3에서 탈질

균인 *Thiobacillus denitrificans*가 발견된 결과와 일치한다. 이로 인해 전기간에 걸쳐 아질산의 제거율은 100%에 가까웠다.

### 3.2. pH 및 알칼리도 변화

ANAMMOX공정은 pH 6.7~8.3범위에서 효율적으로 발생한다고 알려져 있다. 본 실험의 경우 Phase 1의 운전 초반에는 pH가 7.3~7.5로 유지되었으나 부분적 탈질 반응에 의한 알칼리도의 상승으로 인하여 pH가 점차 증가하여 Phase 1 후반에는 pH가 8.3까지 증가하였다(Fig. 5). 그 이후 Phase 2에서도 pH는 8.3~8.5범위로 유지되었으나 아질산의 제거에 저해작용은 발생되지 않았다. 그러나 반응의 최적화를 위해 Phase 3에서 유입되는 인공폐수의  $\text{KHCO}_3$ 의 농도를 10 mg/L까지 감소시켜 pH가 8.3이하를 유지하도록 조절하였다.

ANAMMOX반응에서 탄소원으로서는  $\text{HCO}_3^-$  소모가 기대되지만 유출수의 평균 알칼리도는 Phase 2와 3에서 각각 3,000 mg $\text{CaCO}_3$ /L 및 1,000 mg $\text{CaCO}_3$ /L로 측정되어 유입수보다 각각 1.5배 및 1.2배 높은 농도를 나타내었다(Fig. 6). 이러한 결과는 혐기성의 순응과정에서 미생물의 우열관계에 따라 사멸된 미생물로부터 공급된 유기물질이 종속영양탈질에 의하여 전자공여체로 이용되어 생성된 알칼리도에 기인한 것으로 판단된다. 아질산탈질 반응의 화학양론식은 다음 식 (2)로 표

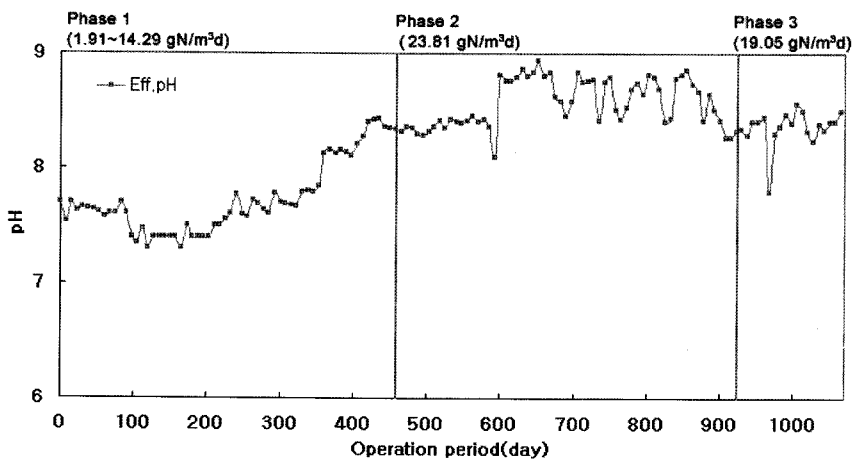


Fig. 5. Temporal variation of pH in the experiment.

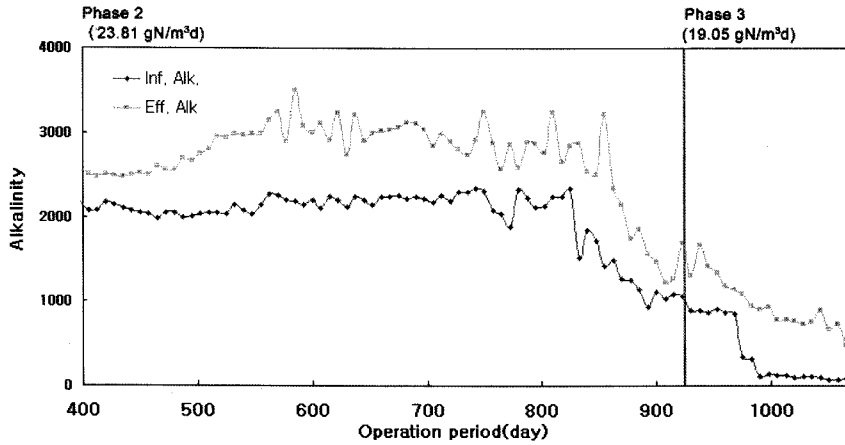
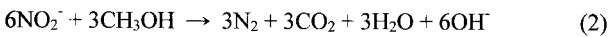


Fig. 6. Temporal variation of alkalinity in the experiment.

현할 수 있다.



식 (2)에 나타난 바와 같이 반응조에서 아질산 탈질이 일어나면 100 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N가 제거될 때, 약 200 mgCaCO<sub>3</sub>/L의 알칼리도가 생성됨을 알 수 있다. 따라서 이와 같은 이유로 인하여 유입수의 알칼리도보다 유출수의 알칼리도가 증가한 것으로 여겨진다.

### 3.3. COD변화

ANAMMOX균은 독립영양균(Autotrophs)으로 유기물 제거는 기대하기 어렵다. Phase 1의 실험 시간 경과에 따른 COD 증가는 기존에 메탄생성 입상슬러지가 ANAMMOX반응 순응과정에서 우열관계에 따라 사멸 및 분해되어 유기성 탄소가 생성되었기 때문으로 여겨진다(Fig. 7). Phase 2의 경우에도 반응시간 초기 COD의 증가가 관찰되었는데 이는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 메탄가스의 발생량이 증가하다가 급격히 감소한 시점과 일치한다. 즉 Phase 2 초반 COD 증가는 초기 입상 슬러지 내에 우점화 되었던 메탄균이 사멸하여 발생된 유기물에 의한 것으로 사료된다. 한편 Phase 2의 후반

에 발생한 외부 공기 유입 등의 갑작스러운 환경변화로 인해 발생한 일부 혐기성 미생물의 사멸로 COD 농도가 500 mg/L 까지 증가하였다. 그러나 Phase 3에서는 아질산(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 제거율은 유지되는 반면 암모늄(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)의 제거는 일어나지 않았으므로 종속영양균인 아질산탈질균의 활동으로 COD농도가 20 mg/L 이하까지 감소한 것으로 판단된다.

### 3.4. 가스 성상 변화

Phase 1에서는 반응기에 식종된 입상 슬러지 내 메탄균의 활성이 높아 메탄 발생이 증가하였으나 Phase 2 이후 메탄 가스의 양은 점점 감소하여 Phase 2 중반 이후부터는 전혀 생성되지 않았다(Fig. 8). 한편 메탄균의 활성이 감소하고 ANAMMOX균 또는 탈질균이 우점화되어 질소가스의 발생 비율은 점점 증가하여 전체 가스량의 95% 이상을 차지하였다. 이산화탄소는 전혀 생성되지 않았으며 산소는 1~4% 정도로 존재하는 것으로 나타났다. 그러나 Phase 2에서 돌발적인 외부 공기의 유입으로 인하여 Head space의 가스 조성이 대기 중의 조성(N<sub>2</sub> 79%, O<sub>2</sub> 21%)과 동일하게 관찰되었으나 이후 다시 그 조성은 N<sub>2</sub>가 97%, O<sub>2</sub>가 3%로 빠르게 회복되었다. 250 mgN/L의 유입수 2 L를 주입하여 모두 제거되었을 때(1회분, 3.5일)의 이론적 질소가스의 발생량은 0.44

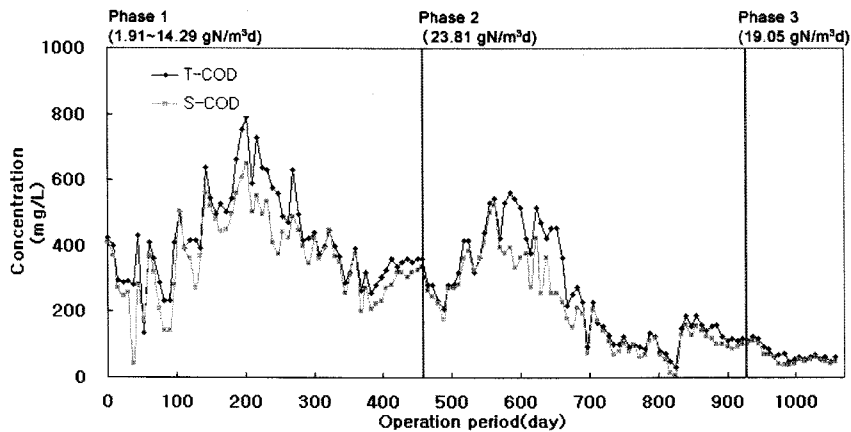


Fig. 7. Temporal variation of T-COD and S-COD concentrations in the experiment.

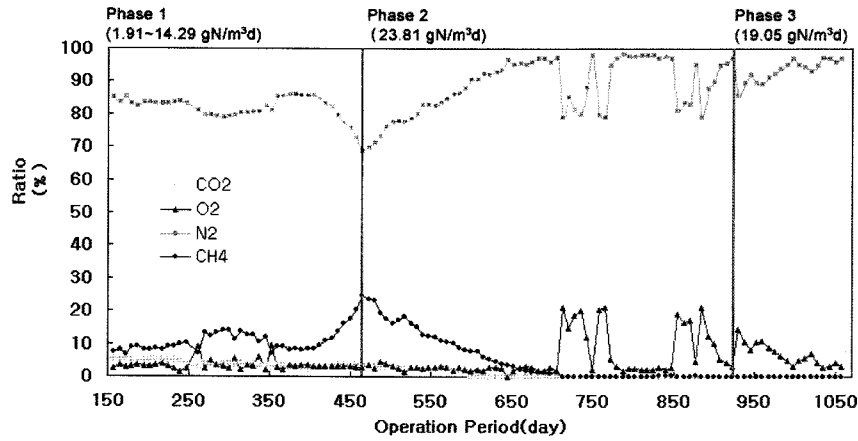


Fig. 8. Temporal variation of gas composition in the experiment.

L이며 아질산성 질소의 제거율이 100%이고 암모니아성 질소의 제거율이 75%로 가장 높았던 Phase 2에서의 질소가스 발생량은 약 0.39 L로 제거된 질소가 모두 질소가스로 변환되었다. Phase 3에서 유입수의 총 질소 농도가 200 mgN/L였으며 제거율이 100%인 경우 이론적 질소가스 발생량은 0.352 L이며 아질산성 질소는 모두 제거되고 암모니아성 질소도 일부 제거되어 1회분에 평균 0.25 L의 질소가스가 발생하였다.

### 3.5. 미생물 분석 결과

Phase별 반응기 내 미생물 분석을 위하여 EBCT 300일(Phase 1), EBCT 850일(Phase 2), EBCT 1000일(Phase 3)에서 각각 입상 슬러지를 채취하여 미생물 균집을 분석하였다. 분석결과 동정된 미생물의 대부분이 난배양성 미생물(Unculturable bacterium)과 유사도가 높은(97% 이상)것으로 나타났다. 이 미생물들의 계통분류학상의 위치를 확인함으로써 그 역할을 예측하기 위해 각 염기서열을 ANAMMOX균, 탈질균, 메탄균과 기타 근연종의 NCBI의 데이터 베이스와 비교하여 계통도(Phylogenetic tree)를 도식화하였다.

#### 3.5.1. Phase 1의 슬러지 중 분석

Petri dish에 배양된 200여 개의 콜로니 중 무작위로 선택한 14개의 콜로니에 대하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 약 97% 이상 일치하는 종을 그룹화 하였다.<sup>19)</sup> 각 그룹을 NCBI 데이터 베이스와 비교한 결과 그 특성을 확인 할 수 있는 미생물 그룹은 3개로 나타났다(Fig. 9). 나머지 9개 그룹의 균종은 기존에 알려진 균과의 유사성이 97% 이하인 난배양성 미생물이었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 AG3 그룹에는 두 개의 콜로니가 포함되었으며, 이 그룹과 98% 유사성을 보였던 *Dechloromonas* 속에는 탈질을 수행하는 미생물이 다수 포함되었다.<sup>20)</sup> 1개의 콜로니가 속한 AG6 그룹도 *Thauera*속에 포함되어 탈질 미생물로 분류되었다.<sup>21)</sup> 한편 AG9 그룹에는 3개의 콜로니가 포함되었으며 이들과 근연종인 toluene-degrading methanogenic consortium은 메탄생성균으로 알려져 있다.<sup>22)</sup> Phase 1에서 수행된 중 분석 결과 ANAMMOX균은 발견되지 않았으며, 종속영양탈질균과 메탄생성균이 우점종으로 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 메탄균에 속하는 콜로니는 분석 콜로니 14개 중 3개가 존재함을 확인하였고 이 때 메탄가스의 발생도 확인할 수 있었다.

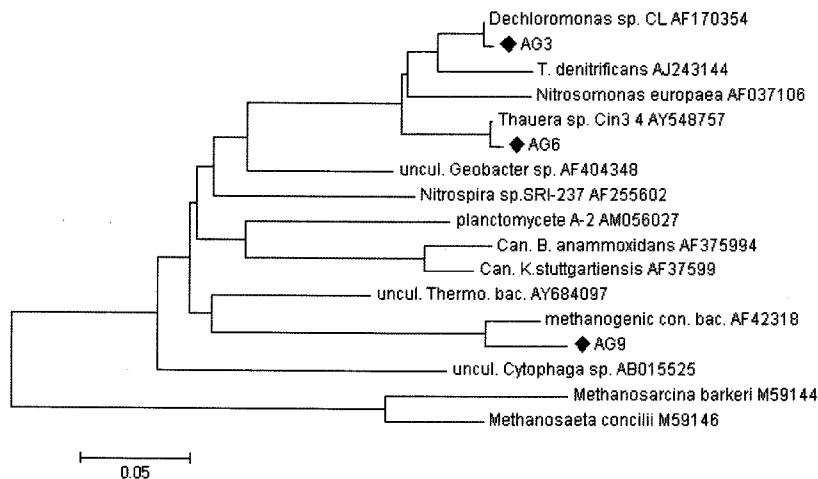


Fig. 9. 16S rDNA-gene-based neighbor-joining phylogenetic tree on the sludge sample for phase 1.

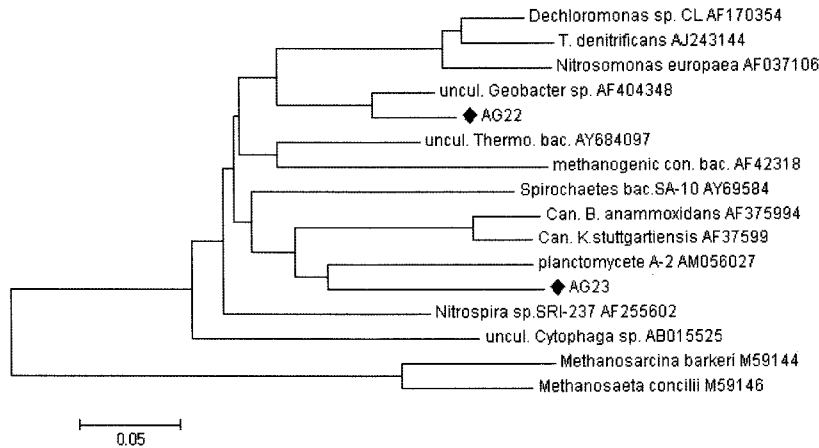


Fig. 10. 16S rDNA-gene-based neighbor-joining phylogenetic tree on the sludge sample for phase 2.

3.5.2. Phase 2의 슬러지 중 분석

총 21개의 콜로니를 선택하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석결과에 따라 각 종은 14개의 그룹으로 구분되었으며 이 가운데 AG22 및 AG23 그룹의 근연종이 확인되었다 (Fig. 10). AG22 그룹은 *Geobacter* 속에 속하며 이들은 3가철 (Fe<sup>3+</sup>)을 환원하는 것으로 알려졌다.<sup>23)</sup> 또한 ANAMMOX 미생물로 분류되는 *Planctomycetes* 문을 확인하였다. 즉 이 때 이와 같은 ANAMMOX 균의 존재로 인하여 암모늄(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)의 제거율이 75%로 높았으며 아질산의 제거율이 100%로 나타나 질소가스의 생성이 가장 활발하였다.

3.5.3. Phase 3의 슬러지 중 분석

Phase 3의 경우 총 44개의 콜로니를 선택하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 결과 총 4개의 그룹이 97% 이상 일치하는 근연종이 확인되었다 (Fig. 11). AG26 그룹의 경우 1개의 콜로니가 이에 속하였으며 탈질균으로 널리 알려진<sup>24)</sup> *Thiobacillus denitrificans*와 99% 일치하였다. 이는 종속영양반응인 아질산 탈질이 진행되고 있음을 입증하는 것이다. AG21 그룹은 toluene-degrading methanogenic consortium과 97%까지 일치하였고 3개의 콜로니가 이에 속하였다. 이는 메탄균이 여전히 일부 존재하고 있으나 메탄 가스의 발생이

관찰되지 않아 그 활성은 무시할 정도로 미미한 것으로 판단되었다. 8개의 콜로니가 속한 AG16 그룹의 경우 질산화에 관여하는 *Nitrospira* spp.로 분류되었다.<sup>25)</sup> 이는 Phase 후반에 일시적으로 유입된 외부 공기로 인하여 Phase 3의 ANAMMOX 반응이 부분적으로 지체되는 동안 반응기에 유입된 질소가 산화될 수 있음을 의미하는 것이다. 한편 1개의 콜로니는 ANAMMOX 미생물로 분류되는 *Planctomycetes* 문에 속하는 것으로 분석되었으며, 반응기내 공기 유입으로 미생물이 사멸한 이후에 EBCT 200일 가량이 지난 후에 분석한 결과로서 Phase 2 후기에 발생된 반응기 내부 공기 유입에 의한 미생물 중 변화의 영향이 감소되어 ANAMMOX 반응이 다시 회복되고 있음을 입증하였다.

4. 결론

본 연구에서는 메탄생성반응기의 슬러지를 혐기성 반응기에 식중하여 lab-scale의 ANAMMOX 반응을 유도하고자 하였으며 시간별로 미생물 변화를 분자생태학적 방법으로 분석하였다. 전 실험 기간에 걸쳐 NO<sub>2</sub>-N는 거의 100% 제거되었고 NO<sub>3</sub>-N은 1 mg/L 이하로 측정되었다. Phase 2에 이르러 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N은 최대 75%까지 제거 되었으나 급작스런 외부

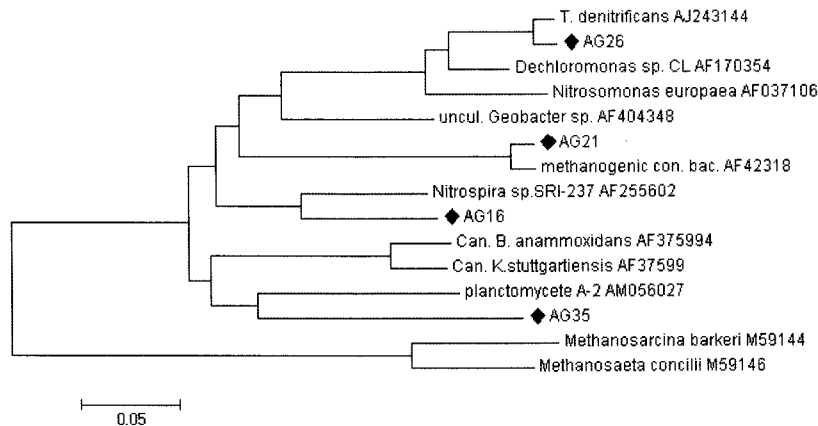


Fig. 11. 16S rDNA-gene-based Neighbor-joining phylogenetic tree on the sludge sample for phase 3.

공기 유입으로 인하여 유출수 중  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 농도는 다시 증가하였다.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 제거 효율이 감소하는 동안에도  $\text{NO}_2\text{-N}$ 의 제거는 지속적으로 일어났으며, 반응기 내 유기물이 존재하였으므로 그 기간 동안 아질산 탈질이 발생했음을 확인할 수 있었다. Head space의 가스 조성 분석 결과 생성된 가스는 95% 이상의 질소와 약 5% 이하의 산소로 구성되어 있음을 확인하였다. 미생물 분석 결과 Phase 1에서는 메탄 생성균과 탈질균이 확인되었으며, 순응이 진행됨에 따라 Phase 2에서는 ANAMMOX균의 존재를 확인하였다. 그리고 Phase 2 후반에 발생한 외부 공기 유입에도 불구하고 Phase 3에서는 여전히 ANAMMOX균의 존재를 확인하였고 부분적으로 아질산의 산화에 관여하는 질산화 세균도 발견하였다. 또한 종속영양성 탈질균도 발견되어 반응기 내에서 부분적으로 아질산의 탈질이 일어나고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 ANAMMOX반응은 그 발현에 오랜 기간이 걸리며 무산소 조건에 의한 안정적인 운전이 선행되어야 함을 알 수 있었다. 따라서 이와 같은 안정적인 조건이 확보된다면 외부 유기 탄소원의 주입 없이도 아질산성 질소와 암모니아성 질소를 효율적으로 제거 할 수 있음을 확인하였다. 또한 분자생물학적 방법이 반응조의 미생물학적 변동성을 효율적으로 모니터링 하는 것에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

## 사 사

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

## 참 고 문 헌

1. Broda, E., "Two kinds of lithotrophs missing in nature," *Z. Allg. Mikrobiol.*, **17**, 491~493(1977).
2. Van de Graaf, A. A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G., "Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1246~1251(1995).
3. 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**, 589~596(1998).
4. van Dongen, L. G. J. M., Jetten, M. S. M., and van Loosdecht, M. C. M., "The Combined Sharon/Anammox Process," STOWA Report, IWA Publishing(2001).
5. Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., "Missing lithotroph identified as new planctomycete," *Nature*, **400**, 446~449(1999).
6. Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G., "Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidizing microorganism in a fluidized bed reactor," *Microbiology*, **142**, 2178~2196(1996).
7. de Bruijn, P., Van de Graaf, A. A., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G., "Growth of Nitrosomonas europaea on hydroxylamine," *FEMS. Microbiol. Lett.*, **125**, 179~184(1995).
8. Schmidt, I. and Bock, E., "Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by Nitrosomonas eutropha," *Arch. Microbiol.*, **167**, 106~111(1997).
9. 박현아, 한지선, 김창균, "분자생물학적 방법을 이용한 매립지 미생물 군집 분석 및 안정화 지표 개발," 대한환경공학회, 춘계학술연구발표회 논문집, 611~616(2005).
10. Strous, M., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M., "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3248~3250(1999).
11. Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F., and Kunst, S., "Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems," *Water Sci. Technol.*, **43**, 311~320(2001).
12. Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G., "Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor," *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **16**, 177~184(1995).
13. Nielsen, M., Bollmann, A., Sliemers, O., Jetten, M., Schmidt, I., Larsen, L. H., Nielsen, L. P., Revsbech, N. P., "Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organism in a CANON reactor," *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **51**, 247~256(2005).
14. Ahn, Y. H., Kim, H. C., Hwang, I. S., "Nutrient removal and microbial granulation in anaerobic process treating inorganic and organic nitrogenous wastewater," *ICWNR*, **04**, 26~29(2004).
15. 김동진, 한동우, 윤호준, 이수철, 이현용, 차기철, 유익근, 박완철, "SBR을 이용한 ANAMMOX 미생물 배양 및 Fluorescence *in situ* Hybridization에 의한 미생물 군집 분석," 대한환경공학회지, **24**, 655~663(2002).
16. Jianlong, W., Jing, K., "The characteristics of anaerobic ammonium oxidation(ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor," *Process Biochemistry*, **40**, 1973~1978(2005).
17. 황인수, 안영호, 민경석, "혐기성 슬러지상 반응조를 이용한 돈사폐수의 암모늄 제거," 대한토목학회, **22**, 615~621(2002).
18. 이명숙, 박지현, "암모니아 산화세균의 분리와 그 특성," 한수지, **31**(5), 760~766(1998).
19. Stackebrandt, E., Goebel, B. M., "A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in



- the present species definition in bacteriology," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 846~849(1994).
20. XU, J., TRIMBLE, J. J., and LOGAN, B. E., "Perchlorate reduction and denitrification pathways are separate in perchlorate reducing bacteria," In The 102nd general meeting of American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah.(2002).
  21. Sabine, B., Emile, S., Georg, F., "Genes Involved in Anaerobic Metabolism of Phenol in the Bacterium *Thauera aromatica*," *J. Bacteriology*, **10**, 5849~5863(2000).
  22. Ficker, M., Krastel, K., Orlicky, S., and Edwards, E. "Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(12), 5576~5585(1999).
  23. Robert, T. A., Helen, A. V., Irene, O-B., Charles, T. R., Philip, E. L., Richard, D., Ken, K., Sam, M., Donald, R. M., Aaron, P., David, C. W., Mary, L., Derek, R. L., "Stimulating the In Situ Activity of Geobacter Species To Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer," *Appl. Environ. Microbiol.*, **10**, 5884~5891(2003).
  24. Lovley, D. R., Phillips, E. J. P., "Bioremediation of uranium contamination with enzymatic uranium reduction," *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 2228~2234(1992).
  25. Hovanec, T. A., Taylor, L. T., Blakis, A., Delong, E. F., "Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 258~264(1998).
  26. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> ed., Washington D.C., USA(1988).