

비점오염물질 처리를 위한 생물막 공정의 운전 및 미생물 군집의 특성

최기충 · 박정진 · 강두기* · 유재철** · 변임규** · 신현석** · 이태호** · 박태주^{†, **}

(주)수엔지니어링 · *낙동수환경방재기술원 · **부산대학교 사회환경시스템공학부

(2008년 8월 21일 접수, 2008년 9월 29일 채택)

Study on the Performances and Microbial Community in the Biofilm Process for Treating Nonpoint Source Pollutants

Gi-Choong Choi · Jeung-Jin Park · Du-Kee Kang* · Jae-Cheul Yu**
Im-Gyu Byun** · Hyun-Suk Shin** · Tae-Ho Lee** · Tae-Joo Park^{†, **}

SU engineering Co. Ltd · *Nwater Co. Ltd

**School of Civil and Environmental Engineering, Pusan National University

ABSTRACT : In this study, biofilm process was introduced for treating nonpoint source pollutants. The ceramic media were provided for biofilm growth in the reactors. The packing ratio of ceramic media was 5% and 15(v/v)%, respectively. Thereafter, the reactors were operated intermittently with the different interevent periods such as 0, 5, 10 and 15 days, respectively. The removal efficiencies of COD and NH₄⁺-N were investigated at the different operating conditions such as media packing ratio, temperature, and interevent period. Additionally, Polymerase chain reaction(PCR)-denaturing gel gradient electrophoresis(DGGE) and INT-dehydrogenase activity(DHA) test were conducted to observe the microbial community and activity in the biofilm. Consequently, the interevent period seemed to have no significant influence on the COD removal efficiency. COD was removed within 6~8 hours at 25°C and about 15 hours at 10°C. DGGE profiles showed that the initial species of microorganisms were changed from seeded activated sludge into the microorganisms detected in sediments. INT-DHA test also showed that the activities of microorganisms were not decreased even in the 15 days of interevent period.

Key Words : Biofilm, Microbial Community, Nonpoint Source, PCR-DGGE, INT-Dehydrogenase Activity

요약 : 본 연구에서는 비점오염물질을 처리하기 위해 생물막 공정이 도입되었다. 반응기내의 생물막의 성장으로 위해 세라믹 담체가 사용되었으며, 담체의 충전률은 각각 5% 및 15(v/v)%였다. 이후, 반응기는 각각 0, 5, 10, 15일의 무강우기간에 따라 회전식으로 운전되었다. COD 및 NH₄⁺-N의 제거효율이 담체 충전률, 온도 및 무강우기간에 따라 조사되었으며, 추가적으로 polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gel gradient electrophoresis(DGGE)와 INT-dehydrogenase activity(DHA) test를 통하여 미생물 군집 및 활성도가 해석되었다. 운전 결과, 무강우기간이 늘어남에도 충전률에 관계없이 COD의 제거는 안정적으로 일어났다. COD는 25°C에서는 6~8 hr, 10°C에서는 약 15 hr의 반응시간이 필요하였다. DGGE 분석 결과, 무강우기간이 늘어남에 따라 식중 슬러지에서 발견되는 미생물에서 저니토에서 주로 발견되는 미생물로 변화됨을 확인할 수 있었다. 또한 INT-DHA법에 의한 미생물의 활성도 측정 결과, 15일의 무강우기간에도 활성도의 감소는 관찰되지 않았다.

주제어 : 생물막, 비점오염원, 미생물 군집, PCR-DGGE, INT-DHA

1. 서론

오염원은 오염물질의 배출 형태에 따라 점오염원(point source)과 비점오염원(nonpoint source)로 구분할 수 있다. 점오염원은 생활하수 · 산업폐수 · 축산폐수 등 일정한 배출경로를 가진 오염원을 말하며, 비점오염원은 강우시 노면배수, 농경지 배출수 등과 같이 불특정하게 배출되는 것을 말한다.¹⁾ 일반적으로 점오염원은 배출지점이 명확하기 때문에 비교적 제어하기 쉬운 반면, 비점오염원은 배출지점이 불특정하여 제어가 어렵고 오염원의 배출량이 강우에 크게

좌우되어 계량적인 관리대책 수립에 많은 어려움이 있다.

비점오염물질의 4대강 수계에 대한 오염부하는 BOD를 기준으로 전체의 22~37%에 이르는 것으로 추정되지만,¹⁾ 그동안 우리나라의 수질오염에 대한 규제는 주로 점오염원을 중심으로 관리되어 왔기 때문에 강우시 수계로 유입되는 비점오염물질로 인하여 하천 및 호소의 수질은 크게 개선되지 않고 있다. 이에 따라 환경부에서는 비점오염원 관리 단계별 추진계획을 마련하여 비점오염물질 유출 지역에 대한 관리를 강화하고 있다.²⁾

현행 수질환경보전법에 의하면, 비점오염 방지시설은 크게 자연형 시설, 장치형 시설 및 기타 시설로 구분한다. 우리나라의 경우, 저류조 및 인공습지를 이용하는 자연형 시설은 토지확보의 어려움으로 그 이용에 한계가 있다. 공

[†] Corresponding author

E-mail: taejoo@pusan.ac.kr

Tel: 051-510-2432

Fax: 051-514-9574

등은³⁾ 비점오염 방지시설 중 장치형 시설을 크게 여과형 시설, 수리동력학적 분리시설 및 유수분리 장치로 구분하였으며, 대상 오염물질의 제거 기작에 따른 장치형 시설의 선정을 제한하였다. 또한 장치형 시설의 경우, 오염물의 퇴적에 따른 정기적인 퇴적물 준설 등이 필요하다고 하였다.

본 연구에서는 수질환경보전법에서 기타 시설로 구분한 생물학적 처리형 시설에 대한 연구를 수행하였다. 재래적인 활성슬러지 공법은 처리효율이 비교적 안정적이지만, 높은 유지관리 기술과 잉여슬러지가 많은 단점을 지닌다. 특히 침전조의 존재로 인하여 슬러지의 bulking이나 rising 현상이 일어날 수 있기 때문에 강우 특성에 기인한 비점오염물질의 처리에는 적합하지 않다.^{4,5)} 반면, 미생물 담체를 이용하는 생물막 공정의 경우, 침전조의 존재로 인한 문제점이 발생하지 않기 때문에 비점오염물질을 처리하기에는 적합한 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 용존성 물질의 처리가 가능한 생물학적 비점오염물질의 처리형 시설을 구현하기 위해 생물막 공법이 도입되었다.

이러한 생물막 공정내의 미생물의 군집특성으로 해석하기 위해 PCR(polymerase chain reaction)에 기반한 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)가 수행되었다. DGGE는 전기 영동시 gel 내에 존재하는 변성체의 농도구배에 따른 DNA의 구조차이에 의해 이동속도가 달라지는 원리를 이용한 분자생물학적 기법이다. 이 때 서로 다른 염기서열을 가진 DNA가 각기 다른 위치에서 band를 형성하며 동일한 염기서열이 많을수록 band의 명도는 증가하게 된다. 따라서 시간과 공간 변화에 따른 전체적인 미생물 군집에 대한 수적, 양적 변화를 하나의 gel상에서 관찰할 수 있으며, 단 시간에 여러 시료를 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다.^{6,7)} 또한 간헐적으로 유입되는 비점오염물질의 발생특성으로 인하여 생물학적 처리공정의 미생물 활성도의 조사 필요성이 대두되었다. 미생물의 활성도는 생물학적 하수 및 폐수 처리 공정에서 성공적인 운전과 제어를 위한 중요한 요소로 작용하고 있다. INT(2-(4-idophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazolium chloride)-DHA(dehydrogenase activity)의 경우, 미생물의 활성도 측정에 있어 간단하고 신속하게 실험이 가능하며, 폭넓은 범위에서 적용이 가능하다.⁸⁾

본 연구에서는 무강우기간에 따른 충전률 및 온도변화에 따른 생물막 공정의 비점오염물질 제거 가능성을 오염물질의 제거효율 및 INT-DHA에 의한 활성도 분석을 통하여 평가하였다. 그리고 이때의 미생물 군집의 특성을 DGGE를 통하여 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험장치 및 운전

본 연구에 사용한 실험실 규모의 반응기는 유효용적 5.3 L로 제작되었으며, 일정한 온도를 유지하기 위해 항온조 내에 설치되었다. 생물막 공정의 운전을 위해 세라믹 담체

를 각각 5%, 15(v/v)%로 충전한 2기의 반응기를 운전하였으며, 미생물 부착을 위해 하수처리장 활성슬러지를 식종하여 20일간 순화하였다. 제조된 비점오염물질의 특성은 Table 1에서 제시한 바와 같이, 상대적으로 일반하수의 성상과 유사한 합류식 하수관거 월류수의 수준으로 제조되었다. COD, NH₄⁺-N 및 alkalinity 평균농도는 각각 61.2 mg/L, 9.4 mg/L 및 102.3 mg/L(as CaCO₃)로 제조되었으며, 본 연구에서는 입자상 물질의 처리여부는 제외하였다. 생물막 반응기의 운전은 Fig. 1에서 도시한 바와 같이, 비점오염물질의 주입, 반응(폭기), 배출 및 휴지기간으로 운전되었다.

질산화 미생물은 호기성 종속영양미생물에 비해 산소에 대한 친화력이 낮아 종속영양 미생물보다 높은 용존산소가 필요하다.⁹⁾ Lazarova et al.¹⁰⁾은 생물막 반응기에서 안정적인 질산화에 필요한 DO농도를 5.2 mg/L로 보고 하였으며, 유 등¹¹⁾은 5.0 mg/L에서 DO에 의한 질산화 방해가 없음을 보고하였다. 따라서 폭기기간 동안, DO의 영향을 배제하기 위해 5.0 mg DO/L로 유지하였다.

Table 2는 본 연구의 운전조건을 나타내며, 먼저 충전률에 따른 오염물질 제거 효율을 평가하기 위해 충전율이 각각 5% 및 15%인 A, B조건으로 운전하였다. 이후, 저온에서의 운전 효율을 평가하기 위해 충전률이 15%인 반응기를 10℃인 C조건으로 운전하였다. 낙동강물환경연구소는 2000~2006년 동안 부산지역의 우수기 및 비우수기의 평균 무강우기간은 각각 12, 6일로 보고하였다.¹²⁾ 이에 따라 본 연구에서는 전 조건에 걸쳐 무강우기간(즉, 휴지기간)은 0, 5, 10, 15일로 설정하여 회분식 실험을 실시하였다.

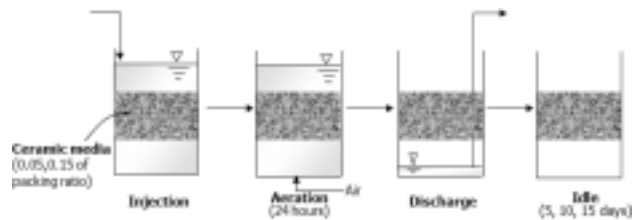


Fig. 1. Operating procedure of the biofilm reactor for treating non-point source pollutant.

Table 1. Composition of the synthetic wastewater used in this study

Component	Concentration(mg/L)	Remarks
Glucose	60.0	Carbon source
NH ₄ Cl	38.0	Nitrogen source
KH ₂ PO ₄	2.8	Phosphors source
NaHCO ₃	168.0	Alkalinity
KCl	18.0	Minerals
CaCl ₂ · 2H ₂ O	18.0	Minerals
NaCl	38.0	Minerals
MgSO ₄	14.0	Minerals
Yeast extract	5.0	Trace elements

Table 2. Operating conditions in this study

Condition	Packing ratio (%)	Temperature (°C)	Interevent period (days)	DO (mg/L)
A	5	25		
B	15	25	0, 5, 10, 15	5.0 ± 0.2
C	15	10		

2.2. 분석방법

2.2.1. 수질분석방법

비점오염원의 생물학적 처리가능성을 평가하기 위하여 COD, NH₄⁺-N, PO₄³⁻-P는 AA3(Bran+Luebbe-Auto Analyzer 3, SPX Co., Germany)를 이용하여 분석하였으며, BOD₅, TN, TP, TSS는 수질공정오염시험방법¹²⁾에 근거하여 측정하였다. 반응기내 온도 및 DO 농도는 4회/일 주기로 측정하여 유지하였다.

2.2.2. 미생물 군집특성 및 활성도 분석방법

(1) DNA 추출 및 PCR 증폭

DNA 추출을 위해서 세라믹 담체에서 생물막을 탈리시킨 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고 biomass 0.1 g을 멸균수 1 mL에 재용해시켜 PowerSoil™ DNA isolation kit (MoBio Ltd. Co., USA)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 1%의 agarose gel에서 전기 영동하여 추출여부를 확인하였다. 추출한 DNA는 0.5 mL 튜브에 10×Taq buffer 2.5 μL, 10 mM dNTP 10 μL, 각각의 primer 0.25 μL(10 pmol), DNA template 2 μL, Taq DNA polymerase(Solgent Co., Korea) 0.125 μL를 첨가하고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 25 μL가 되도록 PCR stock solution을 제조하였다.

본 실험을 위해 사용한 primer는 Table 3에서 제시하였으며, 진정세균의 16S ribosomal ribonucleic acid(rRNA)를 대상으로 하였다. EUB 10F와 EUB 1400R primer를 사용하여 16S rRNA를 증폭하고, 다시 EUB 340F와 EUB 518R을 사용하여 V3 부분을 증폭하였다. DGGE를 위해 EUB 340F-GC Clamp와 EUB 518R을 사용하여 다시 증폭을 실시하였다.

DGGE 분석을 위한 PCR 증폭의 각 단계별 조건들은 Table 4에 나타내었다. 증폭된 PCR product는 1%의 agarose gel에서 전기영동하여 UV-transilluminator를 이용하여 DNA의 증폭여부를 확인한 후, PCR purification kit(Bioneer Ltd. Co., Korea)를 사용하여 정제하였다.

Table 3. PCR primers used in this study

Primer	sequence(5' to 3')
EUB 10F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
EUB 1400R	ACG GGC GGT GTG TAC AAG
EUB 340F	CCT ACG GGA GGC AGC AG
EUB 518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG
EUB 340F- ^a GC	GC - CCT ACG GGA GGC AGC AG

^a GC : 5'- CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GC - 3'

Table 4. PCR conditions used in this study

Primers	PCR conditions
EUB 10F/EUB 1400R	9 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 95 °C 1 min at 53 °C, 2 min at 72 °C followed by 10 min final extension at 72 °C
EUB 340F or GC-EUB 340F/EUB 518R	9 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C 1 min at 53 °C, 2 min at 72 °C followed by 10 min final extension at 72 °C

(2) DGGE 및 염기서열 분석

DGGE gel stock solution은 20%와 50%의 변성제 농도 구배로 조제하여(변성제 농도 100%는 7 M urea와 40% formamide) 각각 glass plate사이에 16 mL씩 주입하여 농도 구배가 있는 gel을 제조하였다. DGGE 실험을 위해 PCR product 30 μL에 dye solution 10 μL를 혼합하여 gel에 loading한 뒤 D-code system(Model 475 gradient delivery system, Bio-Rad Ltd. Co., USA)을 이용하여 60 °C, 200 V에서 8시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기 영동한 gel은 ethidium bromide으로 30분간 염색시킨 후 UV transilluminator(Uvitec gel documentation system, UK)를 사용하여 band를 확인하였다.

Band 확인 후, 대상 band가 포함된 부위를 잘라낸 후 1.5 mL tube에 옮기고 TE buffer 30 μL를 첨가한 후 -70 °C에서 15분, 60 °C에서 15분 씩 총 3회 반복하여 gel에서 DNA를 추출하였다. 그리고 동일한 primer를 사용하여 PCR 증폭을 다시 실시하고, 전기영동으로 확인 후, 정제를 하고 염기서열 분석을 하였다. 분석 결과는 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST를 이용하여 16S rRNA의 염기서열과 비교하였다.

(3) INT-DHA에 의한 미생물의 활성도

생물막내 미생물의 활성을 분석하기 위하여 세라믹 담체를 50 mL tube에 35 mL의 탈리용액과 함께 넣어 생물막을 탈리시킨 후 5 mL를 취하여 15 mL tube에 옮긴다. 전자 수용체로 0.1 mL의 nalidizic acid(20 mg/10 mL), 0.1 mL yeast extract(30 g/L)를 첨가하고 0.1 mL의 NH₄Cl(2,000 mg/L), 0.1 mL의 NaNO₂(2,000 mg/L)첨가한 것을 준비하여, 0.2%의 INT 1 mL를 첨가하고 20 °C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 37% formaldehyde 용액을 1 mL 첨가하여 시료를 고정시킨 다음 2,500 rpm에서 10분간 원심분리를 하고 상등수를 제거하였다. 남아 있는 INTF는 물에 불용성이므로 2+3 Aceton/Demethyl Sulfuroxid(DMSO) 유기용매 5 mL를 가하여 혼합한 다음, 암소(20 °C)에서 20분간 반응시켜 INTF를 추출하였다. 이를 다시 원심분리기에서 10분간 2,500 rpm으로 원심 분리하여 상등수만 취하여 흡광광도계를 사용하여 465 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이는 Koopman et al.¹⁴⁾의 방법을 수정한 것으로 다음의 식 (1)을 이용하여 DHA(Dehydrogenase Activity, 탈수소 효소 활성도)를 구하였다.

$$\text{DHA}(\text{mgO}_2/\text{gVSS}/\text{day}) = \frac{905 \times D_{465} \times V_1}{C \times V_2 \times t \times F} \quad (1)$$

여기서, D_{465} = 465 nm에서 시료의 흡광도, V_1 = 용매의 부피(mL), T = INT와 반응한 시간(min), C = VSS의 농도(g VSS/L), V_2 = 추출에 사용된 시료의 부피(mL) 및 F = INT와 formaldehyde 용액에 의한 희석 보정 계수(0.714)를 말한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 담체 충전률에 따른 오염물질의 제거

Fig. 2(a) 및 (b)는 각각 A, B조건의 반응시간에 따른 COD 농도의 변화를 나타내며, 이때의 담체 충전률은 각각 5%, 15%이다. 반응시간 6 hr에서의 COD 농도는 A, B조건에서 각각 14.3, 16.2 mg/L로 나타나 충전률이 높은 B조건의 COD 감소가 A조건에 비해 낮았다. 이는 미생물의 순화 과정에서 반응기내 매디아의 균일성을 확보하지 못했기 때문으로 판단된다. 그러나 반응시간 8 hr이 지났을 때의 A 및 B조건의 평균 농도는 각각 11.7 mg/L, 11.9 mg/L로 나타나 충전률이 5% 이상에서는 충전률이 COD 제거에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

반응시간 8 hr 후의 0, 5, 10, 15일의 선행 무강우기간에 따른 COD 농도는 A조건에서 각각 9.3, 13.5, 12.0, 11.8 mg/L로 나타났고, B조건에서는 각각 13.5, 12.6, 9.6, 11.9

mg/L로 나타났다. Fig. 2에서 알 수 있듯이, 8 hr 이전까지의 반응시간에서는 무강우기간이 길어질수록 COD의 감소가 적음을 알 수 있으나, 8 hr 이후에서는 유사하게 나타났다. 이는 무강우기간이 15일까지는 COD 제거에 미치는 영향이 미미함을 의미한다.

질산화는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 어류독성 및 수계의 DO 고갈 문제, 부영양화 방지 및 물 재이용을 위한 질소 제거 때문에 필요하다.¹⁴⁾ Fig. 3은 A, B 조건에서의 반응시간에 따른 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 농도를 나타낸다. 총 24 hr의 반응시간이 지난 후의 0, 5, 10, 15일의 무강우기간에 따른 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 농도는 A조건에서 각각 1.0, 1.7, 3.8, 7.3 mg/L로 나타났고, B조건에서는 각각 0.2, 0.2, 0.3, 0.9 mg/L로 나타났다. 이는 질산화에 있어서는 무강우기간이 길어짐에 따라 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 제거가 감소함을 의미한다. 또한, 충전률이 15%인 B조건에 비해 충전률이 5%인 A조건의 질산화 효율이 현저히 떨어짐을 확인할 수 있었다. 즉, 비점오염물질의 처리를 위한 생물막 공정의 질산화에 있어서는 충전률과 선행 무강우기간이 중요한 변수로 작용함을 알 수 있다.

3.2. 저온에 따른 오염물질의 제거

생물막 공정의 운전 및 설계에 있어서 온도는 중요한 요소이다. van't Hoff-Arrhenius 식은 부유성장 공정의 온도의 영향을 평가하기 위해 적용되었으나,^{16,17)} 부착성장의 경우 온도에 기인한 다른 현상이나 인자에 영향을 많이 받기 때문에 적용에 한계가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ Zhu와

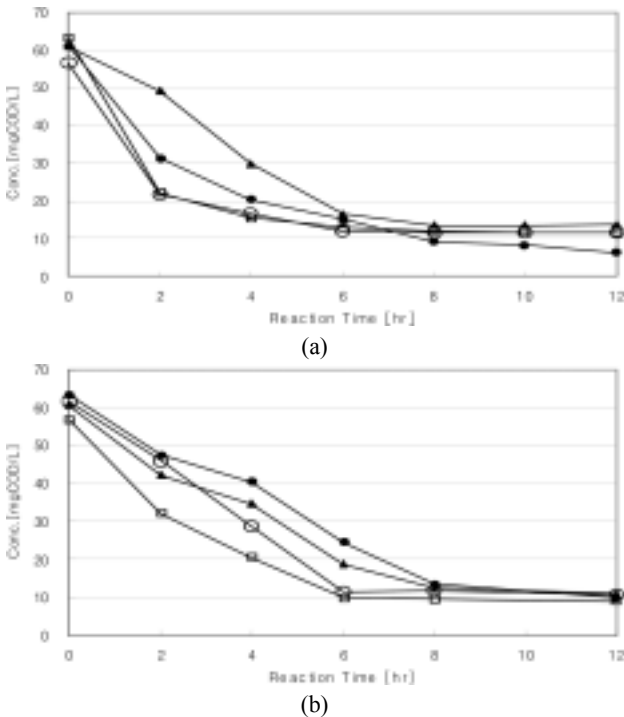


Fig. 2. Variation of COD_{Cr} concentration according to the reaction time with different interevent periods in (a) condition A and (b) condition B; 0 days(●), 5 days(▲), 10 days(□), 15 days(○).

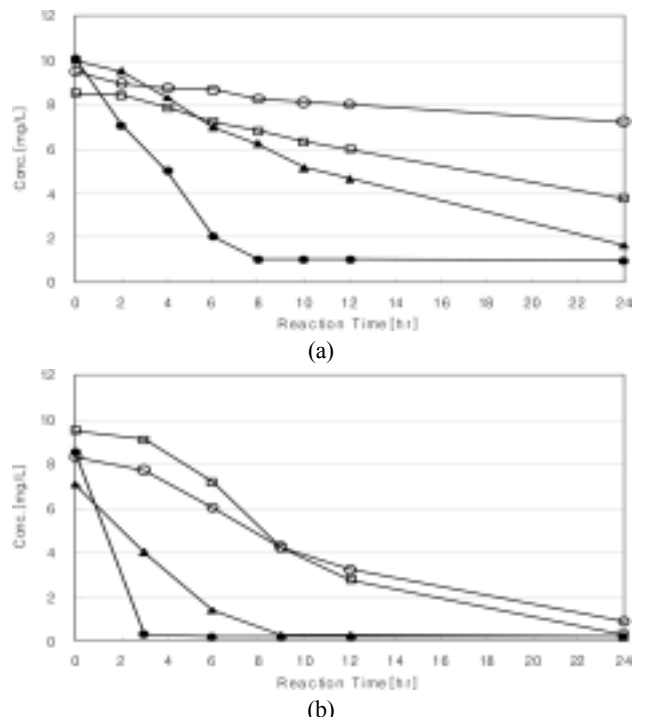


Fig. 3. Variation of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration according to the reaction time with different interevent periods in (a) condition A and (b) condition B; 0 days(●), 5 days(▲), 10 days(□), 15 days(○).

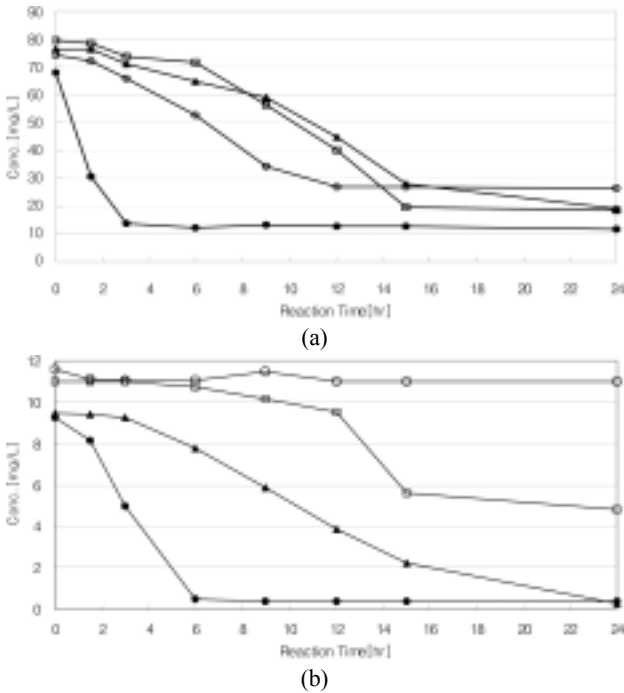


Fig. 4. Variation of (a) COD_{Cr} and (b) NH₄⁺-N concentration according to the reaction time with different interevent periods in condition C; 0 days(●), 5 days(▲), 10 days(□), 15 days(○).

Chen¹⁹⁾은 부착성장 공정에서 질산화는 van't Hoff-Arrhenius 식의 적용보다는 확산 물질전달이 더 중요하게 작용한다고 보고하였다.

Fig. 4는 저온에서의 영향을 평가하기 운전된 C조건에서의 반응시간에 따른 COD 및 NH₄⁺-N의 농도를 나타낸다. 총 24 hr의 반응시간이 지난 후의 0, 5, 10, 15일의 무강우 기간에 따른 COD의 농도는 각각 12.7, 23.6, 18.8, 35.9 mg/L로 나타났고, NH₄⁺-N의 농도는 각각 0.4, 0.3, 4.8, 11.0 mg/L로 나타났다. Fig. 4(a)에서 알 수 있듯이, 저온인 10℃에서 안정적인 COD 제거가 달성하기 위해서는 약 15 hr의 반응시간이 경과해야 함을 알 수 있다. 또한, 무강우기간이 길어질수록 24 hr 후의 질산화 효율은 각각 96.1%, 96.9%, 56.3% 및 4.8%로 감소하였다. 따라서 저온에서 비

Table 5. COD removal and nitrification efficiencies at 6 and 12 hours of reaction time in each condition

Interevent period (days)	Condition A		Condition B		Condition C							
	6 hr	12 hr	6 hr	12 hr	6 hr	12 hr						
	CE ^a	NE ^b	CE	NE	CE	NE						
5	72	30	77	53	36	81	79	97	11	1	71	59
10	80	15	82	29	43	24	83	71	9	3	74	14
15	79	9	79	15	64	27	81	62	9	4	56	5

^aCOD removal efficiency(%)

^bNitrification efficiency(%)

점오염물질을 제거하기 위한 생물막 공정의 운전시, COD 제거는 상대적으로 원활한 반면, 질산화는 무강우기간에 따라 현저히 감소함을 고려하여야 할 것으로 판단된다.

3.3. 생물막 공정의 성능평가

Table 5는 반응시간이 6 hr 및 12 hr일 때의 각 조건별 COD 제거효율과 질산화 효율을 나타낸다. 5%의 충전률 및 25℃에서 운전된 A조건에서 6 hr의 반응시간에도 안정적인 COD 제거가 달성됨을 알 수 있다. 그러나 질산화를 달성하기 위해서는 B조건 즉, 15%의 담체 충전률을 가지고 12 hr 이상의 반응시간이 유지되어야 함을 알 수 있다. 또한 10℃ 이하의 저온에서 운전된 C조건에서는 무강우기간이 늘어남에 따라 안정적인 질산화는 어려우며 12 hr 이상의 반응시간을 가져야 COD 제거가 가능함을 알 수 있다. 이러한 결과는 비점오염물질을 처리하기 위한 생물막 공정의 공학적 설계 및 운전에 도움을 줄 수 있을 것이다.

3.4. DGGE에 의한 미생물 군집 특성

Fig. 5(a) 및 (b)는 각각 본 연구에 사용된 세라믹 담체 및 B조건에서 15일간의 무강우기간이 지난 후의 담체의 사진이다. Fig. 5(b)에서 알 수 있듯이, 15일의 무강우기간이 경과하였을 때, 담체표면의 부착 미생물은 건조되어 있음을 확인 할 수 있다. B조건에서의 무강우기간에 따라 생물막 시료를 채취하여 Table 3에서 제시한 primer를 이용하여 PCR이 실시되었다.



(a)



(b)

Fig. 5. Photographs of (a) ceramic media and (b) ceramic media with attached biomass after 15 days of interevent period.

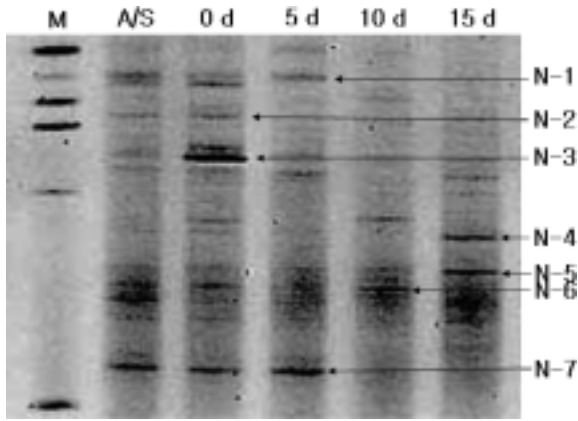


Fig. 6. DGGE profiles of 16S rDNA gene fragments; M: marker, A/S: seeded activated sludge, 0 d: interevent 0 day, 5 d: interevent 5 days, 10 d: interevent 10 days, 15 d: interevent 15 days.

Table 6. Sequences of extracted DGGE bands

DGGE band ^a	Access No.	Closest species in GenBank	Sources	Similarity (%)
N-1	AF094732	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	91
N-2	DQ419742	uncultured bacterium	-	97
N-3	DQ792752	uncultured soil bacterium	soil	97
N-4	AB127860	bacterium DR2A-7G21	freshwater sediment	100
N-5	AY711255	uncultured bacterium	sediment	100
N-6	DQ838095	uncultured bacterium	-	97
N-7	DQ105621	uncultured proteobacterium	activated sludge	91

^a Name of DGGE band in Fig. 6

Fig. 6은 PCR-DGGE의 결과를 나타낸다. DGGE 결과, 무강우기간에 따라 다양한 band가 형성됨을 알 수 있으며, 무강우기간이 늘어남에 따라 band의 수는 감소하면서 초기와는 다른 band들이 나타났다. 0일 및 5일에서는 식중 슬러지와 유사한 DGGE band를 나타내었으나, 10일 및 15일에서는 우점화되는 미생물종이 바뀌는 것을 알 수 있다. 특히 식중 슬러지 및 무강우기간 0, 5일에서 발견되는 band N-1, N-2, N-3, N-7이 무강우기간이 길어짐에 따라 사라지는 것을 확인할 수 있으며, 그 이후에는 band N-4, N-5가 우점화 되었다.

염기서열의 분석결과(Table 6), band N-7은 식중 슬러지인 활성슬러지에서 주로 발견되는 uncultured proteobacterium으로 나타났다. 반면, 무강우기간이 늘어남에 따라 우점화 경향을 나타내는 band N-4와 N-5는 각각 bacterium DR2A-7G21, uncultured bacterium으로 주로 저니토에서 발견되는 미생물이다. 따라서 무강우기간으로 인해 활성슬러지에서 발견되는 미생물은 감소하고, 저니토에서 발견되는 미생물이 담체에 부착되어 존재하는 것을 알 수 있다.

3.5. INT-DHA에 의한 미생물 활성화도

Fig. 7은 A 및 B조건에서의 INT-DHA에 의한 미생물의

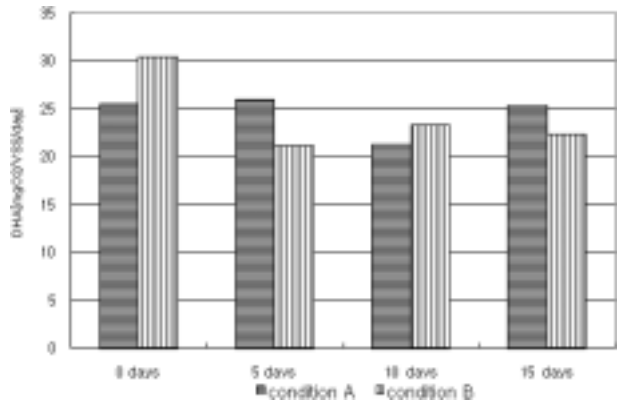


Fig. 7. DHA of condition A and B according to the different interevent periods.

활성도를 나타낸다. 생물막 시료는 매 24 hr의 폭기가 끝난 후 채취되었다. A 및 B조건 미생물 활성화도는 초기 각각 25.5 및 30.3 mgO₂/gVSS/day에서 15일의 무강우기간이 지난 후 각각 25.4 및 22.4 mgO₂/gVSS/day로 나타났다. 즉, 충전을 및 무강우기간에 관계없이 비교적 일정한 미생물 활성화도가 유지됨을 알 수 있다. 이를 DGGE 결과와 비교하여 해석하면, 초기에는 활성슬러지에 존재하는 미생물에 의해 활성화도가 유지되나, 무강우기간이 길어지면서 저니토에서 발견되는 미생물이 우점화 되어 초기와 유사한 활성화도 값을 유지하는 것으로 판단된다.

4. 결론

강우특성에 영향을 받는 비점오염물질을 생물학적으로 처리하기 위해 도입된 생물막 공정을 대상으로 본 연구가 수행되었다. 세라믹 담체 충전률이 각각 5% 및 15%인 생물막 공정은 0, 5, 10, 15일의 무강우기간에 따라 회분식으로 운전되었으며, 오염물질의 제거효율 및 INT-DHA에 의한 활성화도가 모니터링 되었다. 또한 이때의 미생물 군집의 특성을 PCR-DGGE를 통하여 해석되었다.

- 1) 무강우기간이 늘어남에도 충전률에 관계없이 COD의 제거는 안정적으로 일어난 반면, NH₄⁺-N는 충전률이 높을수록 안정적인 제거 효율을 달성 할 수 있었다. 본 실험 결과, COD 및 NH₄⁺-N의 안정적인 처리를 위해서는 15% 이상의 충전율을 유지해야 하는 것으로 나타났다.
- 2) COD의 안정적인 제거는 25℃에서는 6~8 hr의 반응 시간 동안 가능한 반면, 10℃에서는 약 15 hr의 반응시간이 경과해야 함을 알 수 있었다. 또한 NH₄⁺-N는 저온에서 무강우기간이 늘어남에 따라 제거효율이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.
- 3) DGGE 분석 결과, 무강우기간이 늘어남에 따라 band의 경향이 변화함을 알 수 있었다. 염기서열의 분석결과, 초기 활성슬러지에서 발견되는 미생물종들이 사라지고, 저니토에서 주로 발견되는 미생물로 우점화 되는 것을 확인할 수 있었다.

4) INT-DHA법에 의한 미생물의 활성도 측정결과, 무강우기간이 늘어남에도 활성도는 일정하게 나타났다. 이는 초기에는 식중 슬러지인 활성슬러지에 존재하는 미생물의 활성이 나타났지만, 무강우기간이 늘어남에 따라 저니토에서 발견되는 미생물이 상대적으로 우점화되어 미생물 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역 혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 환경부, 환경백서(2006).
2. 환경부, 물환경관리 기본계획(2006).
3. 공민근, 배기현, 강우영, “비점오염 저감을 위한 장치형 시설의 현황,” 상하수도학회지, **18**(6), 707~711(2004).
4. Park, T. J., Lee, K. H., Kim, D. S. and Kim, C. W. “Petrochemical Wastewaterwith Aerated Submerged Fixed-Film Reactor(ASFFR) under High Organic Loading Rate,” *Water Sci. Technol.*, **34**(10), 9~16(1996).
5. Park, T. J., Lee, K. H., and Lee, J. H., “Simultaneous Organic and Nutrient Removal from Municipal Wastewater by BSACNR Process,” *Korean J. Chem. Eng.*, **15**(1), 9~14(1998).
6. Muyzer, G. and Smalla, K., “Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology,” *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127~141(1998).
7. Zhaojun Li, Jianming Xu, Caixian Tang, Jianjun Wu, Akmal Muhammand, and Haizhen Wang, “Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerpringting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils,” *Chemosphere*, **62**(8), 1374~1380(2006).
8. Awong, J., Bitton, G., and Koopman, B., “ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomy-

- cete foams,” *Water Res.*, **19**(7), 917~921(1985).
9. Wiesmann, U., “Biological Nitrogen Removal from Wastewater,” *Adv. Biocem. Eng. Biotechnol.*, **51**, 113~154(1994).
10. Lazarova, N. R., Manem, J., and Melo, L., “Influence of dissolved oxygen on nitrification kinetics in a circulating bed reactor,” *Water Sci. Technol.*, **37**(4), 189~193(1998).
11. 유재철, 박정진, 허성호, 김유진, 변임규, 이태호, 박태주, “호기성 생물막 반응기에서 Ammonia Oxidizing Bacteria에 대한 DO 농도의 영향,” 대한환경공학회지, **29**(1), 106~112(2007).
12. 낙동강물환경연구소, “주요비점오염원 유출 장기모니터링 및 저감기법연구”, 낙동강수계 2007년도 환경기초 조사사업(2007).
13. 환경부, 수질오염공정시험방법(2004).
14. Koopman, B., Bitton, G., Logue, C., John, M. Bossart, and Juan, M. Lopez, “Validity of tetrazolium reduction assays for assessing toxic inhibition of filamentous bacteria in activated sludge,” Toxicity screening procedures using bacterial systems(Edited by Dickson Liu and Bernard J. Dutka), 147~162(1984).
15. Tchbanoglus, G., Burton, F. L., and Stensel, H. D., “Wastewater engineering : treatment and reuse,” 4thed., McGraw-Hill, NY, 661~665(2003).
16. Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., Svoronos, S. A., “Effect of temperature and pHon the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria,” *Water Res.*, **24**(1), 97~101(1990).
17. Willke, Th. and Vorlop, K. D., “Nitrification in PVAL beads: Influence of pH and temperature on nitrite oxidation,” *Progress in Biotech.*, **11**, 718~724(1996).
18. Fdz-Polanco, F., Méndez, E., Villaverde, S., “Study of nitrifying biofilms in submerged biofilters by experimental design methods,” *Water Sci. Technol.*, **32**(8), 227~233(1995).
19. Zhu, S., Chen, S., “The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters,” *Aquacult. Eng.*, **26**, 221~237(2002).