

생물학적 질소제거 공정에서 용존산소변화에 따른 미생물의 군집변화

박종일 · 이태진*

서울산업대학교 환경공학과

(2008년 6월 4일 접수, 2008년 8월 28일 채택)

Changes of Microbial Community Depending on Different Dissolved Oxygen in Biological Nitrogen Removal Process

Jong-Il Park · Tae-Jin Lee*

Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology

ABSTRACT : PCR-DGGE method was applied to analyze changes of microbial community in simultaneous nitrification and denitrification (SND) bioreactor with various DO concentrations. In the analysis of eubacterial community, band profiles of DGGE were similar with 2 or 1 mg/L DO concentrations in the reactor. Experimental results led to 16 different bacteria being identified, including 5 dominant strains(3 strains of Uncultured Bacterium, 1 strains of *Bacillus*, 1 strains of Uncultured Bacteroidetes). DGGE results at 0.5 mg/L DO concentration led to 12 strains being identified, including 7 dominant strains(5 strains of Uncultured Bacterium, 2 strains of *Zoogloea* sp.). DGGE results at 0.1 mg/L DO concentration led to 11 strains being identified, including 3 dominant strains(1 strains of Uncultured Bacterium, 2 strains of *Zoogloea* sp.). In DGGE band profiles of β -AOB(β -Ammonia Oxidizing Bacteria), only one band was observed. This band had 97% similarity with *Nitrosomonas* sp. *done DNB Y20*. This band was clearly observed at the 2, 1 and 0.5 mg/L DO concentrations, while the brightness of the band at 0.1 mg/L DO concentration was mostly dimmed. In DGGE band profiles of denitrification process, 5 bands(3 strains of Uncultured organism containing *nirS*, 2 strains of Uncultured organism containing *nirK*) were observed. Among those bands, the brightness of one band was gradually increased at the lower DO concentrations. This band has 86% identity with Uncultured organism clone *eS1 cd1 nirS gene, partial cds*. Based on this result, it could be concluded that Uncultured organism clone *eS1 cd1 nirS gene, partial cds* is a predominant microorganism in the denitrification process.

Key Words : Simultaneous Nitrification and Denitrification(SND), Nitrogen Removal, CFSTR, PCR, DGGE

요약 : 본 연구에서는 PCR-DGGE 기법을 이용하여 DO 농도에 따른 동시 질산화·탈질 반응조 내 미생물 군집 변화 양상을 규명하고자 하였다. DO 농도의 변화에 따른 eubacteria의 군집 변화 해석 실험에서, DO 농도를 2와 1 mg/L로 운전한 반응조 내의 band profile은 거의 유사하게 관찰되었으며 5종의 우점화 미생물(Uncultured Bacterium 3종, *Bacillus* sp. 1종, Uncultured Bacteroidetes sp. 1종)을 포함한 16종의 미생물을 동정할 수 있었다. 그리고 DO 농도 0.5 mg/L로 운전한 반응조 내의 DGGE 결과 7종의 우점화 미생물(Uncultured Bacterium 5종, *Zoogloea* sp. 2종)을 포함한 12종의 미생물을 동정할 수 있었으며, DO 농도 0.1 mg/L로 운전한 반응조의 경우 3종의 우점화 미생물(Uncultured Bacterium 1종, *Zoogloea* sp. 2종)을 포함한 11종의 미생물을 동정할 수 있었다. 반응조 내 DO 농도의 변화에 따른 β -AOB(β -Ammonia Oxidizing Bacteria)의 군집 변화 해석 실험 결과, 하나의 band를 관찰할 수 있었다. 이 band는 Uncultured *Nitrosomonas* sp. *done DNB Y20*와 97%의 유사도를 갖는 것으로 나타났으며 2, 1, 그리고 0.5 mg/L의 DO 농도에서 추출한 sample에서는 선명하게 관측되었으나, 0.1 mg/L DO 농도에서 추출한 sample에서는 선명도가 현저히 감소하였다. 이는 NH_4^+ -N의 질산화 양상과 상관관계가 있음을 보였다. 반응조 내 DO 농도에 따른 탈질 bacteria의 군집 변화 해석 실험 결과, 다섯 개의 band(*nirS*를 함유하는 Uncultured organism 미생물 3종, *nirK*를 함유하는 Uncultured bacterium 미생물 2종)가 관측되었으며 관측된 band 중 한 band는 DO 농도가 낮아질수록 선명도가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 band에 해당하는 미생물은 86%의 유사도를 가진 Uncultured organism clone *eS1 cd1 nirS gene, partial cds*로, 본 연구의 탈질 반응에 직접적으로 관여 하는 미생물로 사료된다.

주제어 : 동시 질산화·탈질, 질소 제거, CFSTR, PCR, DGGE

1. 서론

대부분의 국내 하수 처리장은 표준 활성슬러지 공법으로 설계·운전 되고 있어 유기물 및 부유물질은 90% 이상의

제거가 가능한 반면, 부영양화의 원인이 되는 질소의 제거 효율은 미흡한 실정이다. 이에 따라 많은 연구자들에 의해 다양한 고도처리 공법에 관한 연구가 진행·완료되었다. 일반적으로 질산화 과정과 탈질 과정은 각각 호기성 상태와 무산소 상태에서 이루어지며,¹⁾ 이에 따라 호기성 반응조와 무산소 반응조를 분리하여 설치(공간 분할 공법; A_2O , UCT 공법 등)하거나, 시간에 따라 반응조 내의 조건을 호

* Corresponding author
E-mail: leetj@snut.ac.kr
Tel: 02-970-6614

Fax: 02-970-5776

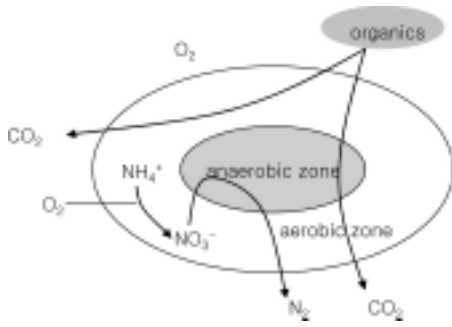


Fig. 1. Schematic diagram of the floc in a simultaneous nitrification and denitrification(SND) bioreactor.

기성 조건과 무산소 조건으로 변화시켜 운영(시간 분할 공법; SBR, 간헐 폭기 공법 등)하는 공법이 적용되었다. 그러나 공간 분할 공법의 경우 다수의 반응조의 설치로 인해 넓은 부지 면적이 필요하며, 시간 분할 공법의 경우 연속적인 처리의 어려움이 한계로 나타나게 되었다.

Fig. 1에 나타낸 것과 같이 동시 질산화·탈질 반응은 반응조 내 미생물 슬러지 플럭이 혐기와 호기 영역이 공존하는 이중 구조를 형성하여 질산화와 탈질이 동시에 일어나는 반응으로서, 하나의 반응조에서 효과적인 질소 제거가 가능하다는 장점이 있으며, 산화구,^{2,3)} SBR,⁴⁾ 생물학 접촉 반응기,⁵⁾ 상향류식 고정 반응기⁶⁾ 등 다양한 공법에^{7~16)} 적용할 수 있음이 밝혀졌다.

기존의 연구 보고서에 따르면, 동시 질산화·탈질에 영향을 미치는 주요 인자는 DO(dissolved oxygen),^{2,3,17,18)} ORP (oxidation reduction potential),¹⁷⁾ floc size^{19,20)} 등으로 제안된 바 있다. 이 중 DO 농도는 반응조 내 미생물 군집 및 우점화 미생물의 변화를 야기하여 동시 질산화·탈질 반응에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이에 따라 동시 질산화·탈질 반응 효율의 안정성을 확보하기 위해, 반응조 내 환경 변화에 따른 미생물 군집을 해석하고 관찰하는 것이 필요하다.

최근에는 sample들을 분석하고 정보를 해독하기 위해 조작 및 기술적 분석이 용이하며 sequencing 이전에 sample의 전체적인 profile을 파악할 수 있는 유전자 fingerprinting

기법인 SSCP(single strand conformation polymorphism)나 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis), T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 등이 적용되고 있다.²¹⁾ DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis; 변성 농도구배 겔 전기영동)는 전기영동 시 gel 내 변성제(denaturant)의 농도구배에 의한 DNA의 이중 나선 구조의 변성, 즉 염기 서열이 갖는 Tm(melting temperature) 값의 차이에 의해 DNA의 이동 속도가 달라지는 점을 이용한 것으로, 전체적인 DNA의 수적 그리고 양적 변화를 하나의 gel 상에서 관찰할 수 있는 장점이 있다.^{22,23)} 또한 중요도가 높은 DGGE band의 경우는 band로부터 직접 DNA를 회수한 후 sequencing을 통해 종을 확인할 수 있기 때문에 cloning 분석법에 비해 시간, 노동력 및 경제적 손실을 최소화할 수 있다.^{23,24)} 더구나 활성슬러지와 같은 복잡한 매질을 가진 경우 시각적으로 미생물을 분류하는 것 보다 분자생물학적 분석을 이용할 경우 양질의 분석결과를 보장할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 PCR-DGGE 기법을 이용하여 동시 질산화·탈질 반응조에서 용존산소의 농도에 따라 변화하는 미생물의 군집 양상을 살펴보고 각 농도에서의 우점화 미생물을 규명하고자 하였다. 본 실험결과를 통하여 동시 질산화·탈질조의 운영에 있어서 미생물 분포에 대한 기초자료를 확보할 수 있으며 이는 적정 제거효율을 유지할 수 있는 동시 질산화·탈질 반응의 공정설계에 기본 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 실험 장치 및 방법

2.1. 실험 장치

본 연구에서 사용된 완전혼합식 반응기는 23 cm×23 cm×33 cm(W×L×H)의 아크릴로 제작되었으며 유효용적은 12 L이다. 반응조 내의 DO, ORP, pH, 온도는 반응조 내부에 설치된 각각의 sensor[(주) 대양 E.I engineering]에 의해 6초마다 실시간으로 측정되었고 측정된 data는 panel box로 전달되어 computer에 기록될 수 있도록 구성하였다(Fig. 2).

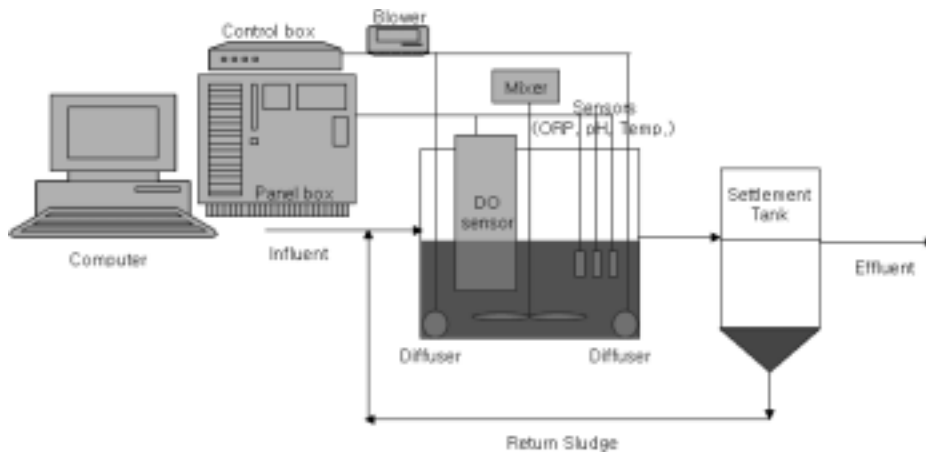


Fig. 2. Schematic diagram of the completely mixed single bioreactor.

Computer에 설치된 DAQ 2005 program을 이용하여 반응조 내부의 DO 농도를 설정하면 DO sensor를 통해 측정된 DO data 값이 설정한 DO 농도보다 낮아질 경우 control box와 연결된 blower가 작동하여 반응조 내부를 포기시키고, 설정 DO 농도 이상이 되면 blower의 작동은 멈춘다(ON/OFF 제어 방식). 일반적인 CFSTR(contineous flow stirred tank reactor)의 경우 포기가 연속적으로 일어나기 때문에 포기를 통해 반응조 내부가 교반될 수 있지만, 본 반응조의 경우 간헐 포기가 일어나기 때문에 반응기 내부의 농도를 균일하게 유지시키고 유입수와 미생물의 원활한 접촉을 위해서 교반기를 별도로 설치하였다. 반응조 내부의 MLSS(mixed liquor suspended solids)는 1,800~2,200 mg/L, HRT 24시간, 교반속도 150 rpm, 반송비 80%, pH 7.1~7.5, 온도 약 20℃ 그리고 포기 유량은 3.5 L/min로 설정하여 운전하였다. 반응기에서 각각 DO농도에 따른 시료 채취는 정해진 DO농도에서 반응기에 합성된 하수를 유입하여 7일 간 적응기간을 거친 후 14일간 매일 실시하여 분석하였다.

2.2. 실험 방법

반응조 내 미생물의 군집은 반응조의 운전 조건 및 환경 조건에 달라질 수 있으며, 특히 DO 농도의 변화에 따라 미생물 군집의 변화가 이루어질 것으로 판단된다. 이에 본 실험에서는 반응조의 DO 농도를 2, 1, 0.5 그리고 0.1 mg/L로 각각 변화시켰을 때 각각의 DO 농도에서의 미생물 군집 변화를 PCR-DGGE법으로 분석하였다.

2.2.1. DO 농도에 따른 유기물 및 질소 화합물 제거 효율 비교

반응조 내 DO 농도를 2, 1, 0.5, 0.1 mg/L로 변화시켜, DO 농도에 따른 유기물 및 질소화합물의 제거 효율을 비교하였다. 본 실험 시 Table 1에 제시된 수질을 가진 하수를 인공적으로 합성하여 사용하였다.

본 연구에서 이용된 합성하수 내 질소원은 NH₄⁺-N과 NO₃⁻-N의 두 종류가 사용되었으며, 실험에서 채취된 모든 시료에서 NO₂⁻-N은 검출되지 않아, 산화된 NH₄⁺-N이 모두 NO₃⁻-N

Table 1. Composition of the Synthetic Wastewater¹³⁾

Compound	Synthetic Wastewater(mg/L)
Glucose(as COD)	200
NH ₄ Cl(as N)	14
KNO ₃ (as N)	14
KH ₂ PO ₄ (as P)	6.8
K ₂ HPO ₄ (as P)	2.7
KHCO ₃ (as HCO ₃ ⁻)	366
Nutrient solution*	1 mL

*: The nutrient solution contains per liter: 90 g MgSO₄ · 7H₂O, 6 g CaCl₂ · 2H₂O, 1.5 g FeCl₃ · 6H₂O, 6.5 g MnCl₂ · 4H₂O, 1.7 g ZnSO₄ · 7H₂O, 0.1 g CuCl₂ · 2H₂O, 1.9 g CoCl₂ · 6H₂O, 6.5 g NiSO₄ · 6H₂O, 0.1 g H₃BO₃, 0.6 g(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 1 g yeast extract

로 전환되었음을 확인할 수 있었다. 이에 따라 반응기에서 탈질률을 다음 식 (1)과 같이 산출하였다.

$$\text{Denitrification Rate(\%)} = \frac{(dNH_4^+ - N) + (dNO_3^- - N)}{(\text{Influent } NO_3^- - N) + (dNH_4^+ - N)} \times 100 \quad (1)$$

where, dNH₄⁺-N = influent NH₄⁺-N - effluent NH₄⁺-N
 dNO₃⁻-N = influent NO₃⁻-N - effluent NO₃⁻-N

2.2.2. DNA 추출 및 PCR

반응조 내 슬러지를 30분간 정지시킨 후 침강 슬러지 250 μL를 샘플로 하여 미생물의 DNA를 추출하였다. DNA 추출 시 PowerSoil™ DNA kit(MO BIO)를 사용하였으며, 추출한 DNA는 2% agarose A gel에서 전기영동하여 추출 여부를 확인하였다. 반응조 내 미생물 중 eubacteria와 β-아미노리아산화균, 그리고 탈질 bacteria의 DO 농도에 따른 군집 변화를 분석하기 위하여 각각의 bacteria에 적합한 방법으로 PCR을 실시하였다. eubacteria의 경우, 추출한 미생물 DNA의 16S rDNA 중 가변 부위인 V3 region을 증폭하여 DGGE를 위한 PCR product를 얻기 위해 EUB 341F GC와 EUB 518R을 primer로 하여 PCR을 실시하였다. β-아미노리아산화균 분석실험에서는 추출한 미생물 DNA의 16S rDNA를 10F와 1400R을 이용하여 1차 PCR을 실시한 후 β-아미노리아산화균에 특이성이 있는 CTO 189F GC와 CTO 654R을 primer로 하여 2차 PCR을 실시하는 nested PCR을 적용하였다. 탈질 미생물 분석실험에서는 10F와 1400R를 이용한 DNA의 16S rDNA의 1차 PCR 실시 후 NO₂⁻를 NO로 환원하는데 필수적인 효소 생산에 관여하는 nirS (nitrite reductase S) gene에 특이성이 있는 nirS 2F GC와 nirS 3R을 이용하여 2차 PCR을 실시하는 nested PCR을 적용하였다(Table 2).²⁵⁻²⁷⁾

Table 2. The sequences of primers used for the PCR experiment

Primer	Sequence(5' to 3')	Target
EUB 341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	eubacteria V3 region
EUB 341F GC	GC Clamp-CCT ACG GGA GGC AGC AG	
EUB 518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	
10F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	16S rDNA
1400R	ACG GGC GGT GTG TAC AAG	
CTO 189F	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	β-AOB
CTO 189F GC	GC Clamp-GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	
CTO 654R	CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C	
nirS 2F	TAC CAC CCC GAA CCG CGC GT	nirS gene
nirS 2F GC	GC Clamp-TAC CAC CCC GAA CCG CGC GT	
nirS 3R	GCC GCC GTC ATG AAG GAA	

GC Clamp: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GGC GCG GGC GCA CGG GGG G

Table 3. The PCR condition

		Eubacteria ²⁶⁾	β -AOB ²⁶⁾ and nirS gene ²⁷⁾
preincubation		9 min at 95 °C	4 min at 94 °C
35 cycle	denaturing	60 sec at 95 °C	60 sec at 94 °C
	annealing	60 sec at 53 °C	60 sec at 57 °C
	extention	60 sec at 72 °C	60 sec at 72 °C
final extention		10 min at 72 °C	10 min at 72 °C

PCR 증폭의 각 단계별 조건을 Table 3에 요약하여 정리하였다. 증폭된 PCR product는 2% agarose A gel에서 전기영동하여 DNA의 증폭 여부를 확인하였다.

2.2.3. DGGE-Profile

DGGE는 eubacteria의 경우 40~60%, β -아모니아산화균과 nirS gene의 경우 30~60%의 변성제 농도 구배(변성제 농도 100%는 7M urea와 40% formamide)가 존재하는 8% polyacrylamide gel에서 실시하였다. DGGE(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 Gradient delivery system) 분석을 위해 PCR product 30 μ L에 gel loading dye 6 μ L를 혼합하여 denaturing gradient gel에 loading한 뒤 61 °C 200V에서 300분 동안 전기영동을 실시하였다.²⁸⁾ 전기영동 후 denaturing gradient gel은 EtBr(ethidium bromide)에 30분간 staining, 1×TAE buffer에 15분간 destaining을 실시하여 UV transilluminator를 사용하여 band profile을 확인하였다.

2.2.4. 미생물 동정

Polyacrylamide gel 상에서 원하는 DNA band가 포함된 부위를 멸균된 면도칼로 잘라낸 후 1.5 mL tube에 옮기고 멸균된 pipette tip으로 잘게 조각낸다. 그 후 30 μ L의 TE buffer를 첨가한 후 -20 °C에서 15분, 60 °C에서 15분씩 3회 반복하여 gel에서 DNA가 diffusion되도록 하였다. 1분의 원심 분리 후 상등수 5 μ L을 template로, EUB 341F와 EUB 518R, CTO 189F와 CTO 654R, nirS 2F와 nirS 3R을 각각의 primer로 하여 PCR을 실시하였다. 온도 조건 및 mixture 제조 시 첨가 시약의 비율은 Table 3, 4에서 선행된 PCR 조건과 동일하다. PCR product는 sequencing 실시 후 NCBI의 BLAST search database를 이용하여 미생물을 동정하였다.

2.3. 반응조의 이화학적 운영인자 분석

유입수와 유출수를 1일 1회 채취하여 시료로 사용하였다. 시료의 COD_{Cr}은 standard methods의 closed reflux method로 측정하였고,²⁹⁾ NH₄⁺-N과 T-N은 standard methods의 흡광도법에 준하여 실험 하였으며, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N의 분석에는 Ion Chromatography(Metrohm, Germany)를 사용하였다. 반응조 내 DO, ORP, pH, 온도는 센서에 의해 측정되어 computer에 실시간으로 저장되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DO 농도에 따른 유기물 및 질소화합물 제거 효율

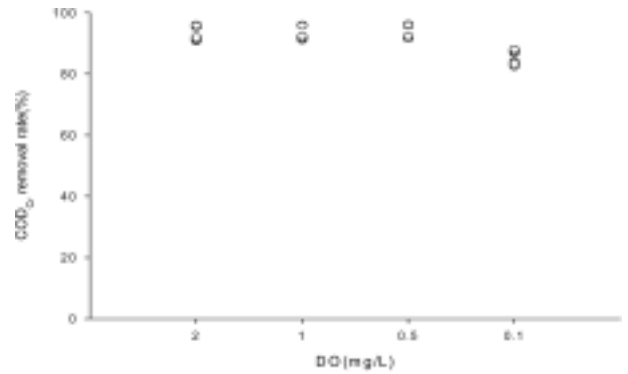


Fig. 3. COD_{Cr} removal rate with various DO concentration in the SND bioreactor. Samples were taken each day at influent and effluent and analyzed for COD. Constant DO concentration was achieved with DO auto-control system for each experiment.

Fig. 3에 각 DO 농도에 따른 COD_{Cr}의 제거율을 도시하였다. 유입 합성하수의 COD_{Cr}은 평균 200 mg/L였고 DO 농도를 변화시켜 실험한 결과, 2, 1, 0.5 mg/L의 DO 농도에서는 92~96%, 0.1 mg/L에서는 83~88%의 제거율을 보였다. 시험 결과 평균 200 mg/L COD_{Cr} 값을 가지는 유입수 내 유기물의 제거는 0.1 mg/L의 DO 농도를 유지하는 것으로도 가능하였으나 90% 이상의 유기물 제거를 위해서는 0.5 mg/L 이상의 DO 농도가 필요함을 확인할 수 있었다.

Fig. 4는 각 DO 농도에 따른 NH₄⁺-N의 질산화율을 도시한 그래프이다. 유입수 중의 NH₄⁺-N는 평균 13.8 mg/L였다. 반응기 내 DO 농도를 2, 1, 0.5 mg/L로 각각 변화시켰을 때 모든 경우에서 99% 이상의 질산화가 진행된 반면, 0.1 mg/L의 DO 농도에서는 16~20% 정도의 질산화만이 일어나 질산화율이 급감했음을 알 수 있었다. 이를 통하여 0.1 mg/L의 DO 농도에서는 유기물의 산화를 위한 DO의 공급은 되고 있지만 NH₄⁺-N의 안정적인 질산화가 일어나기 어려우며 질산화에 관여하는 미생물의 우점화를 위해서는 0.5 mg/L 이상의 DO 농도가 필요하다고 판단되었다. 본 실험에서 채취된 모든 시료에서 NO₂⁻-N는 검출되지 않았으며, 이는 산화된 NH₄⁺-N이 모두 NO₃⁻-N로 전환되었음을 의미한다.

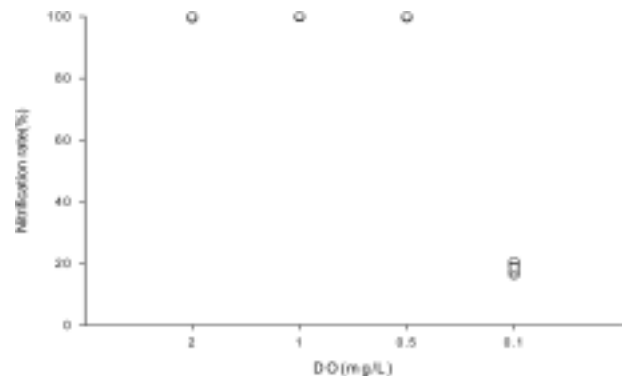


Fig. 4. Nitrification rate with various DO concentration in the SND bioreactor.

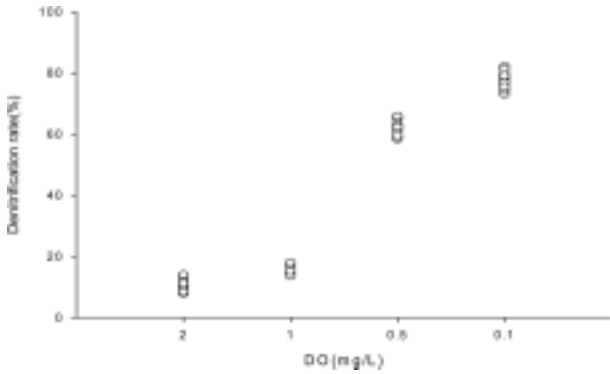


Fig. 5. Denitrification rate with various DO concentration in the SND bioreactor.

반응조 내 DO 농도에 따른 NO₃⁻-N의 탈질률을 Fig. 5에 도시하였다. 본 실험에 사용된 유입 인공하수 내 질소원은 NH₄⁺-N과 NO₃⁻-N의 두 종류가 사용되었으며, 실험에서 채취된 모든 시료에서 NO₂⁻-N은 검출되지 않아, 산화된 NH₄⁺-N이 모두 NO₃⁻-N로 전환되었음을 확인할 수 있었다. 유입수 중의 NO₃⁻-N는 평균 14.46 mg/L였으며, 2, 1, 0.5, 0.1 mg/L의 DO 농도에서의 탈질률은 각각 8~14, 14~18, 59~66, 73~82%로 나타났다. DO 농도가 낮을수록 높은 탈질률을 보이며, 이는 무산소 환경에서 탈질 반응이 원활히 이루어진다는 기존의 연구결과³⁰⁾와 일치하는 현상이라 할 수 있다. 본 실험 결과 탈질반응은 0.5 mg/L 이하의 DO 농도에서 원활하게 이루어짐을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 탈질에 관여하는 미생물은 반응조 내 DO 농도가 0.5 mg/L 이하일 때 우점화될 수 있을 것으로 사료된다.

Fig. 6은 반응조 내 DO 농도에 따른 T-N 제거율을 도시한 그래프이다. T-N은 용존산소 2 mg/L에서 8~13%, 1 mg/L에서 약 13~18%의 제거율을 보였다. 0.5 mg/L의 DO 농도에서는 57~66%의 비교적 높은 T-N 제거율을 보였으며 DO 0.1 mg/L에서는 42~49%의 제거율을 나타내었다. 이를 통해 0.5 mg/L의 DO 농도에서 가장 효과적인 T-N 제거가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 0.1 mg/L에서 T-N 제거율이 상대적으로 높게 나타난 것은 실험에 사용된 인공하수가 NH₄⁺-N과 NO₃⁻-N를 각각 14 mg/L로 제조하였기 때문에 준혐기성 조건에서 NO₃⁻-N가 탈질반응을 일으

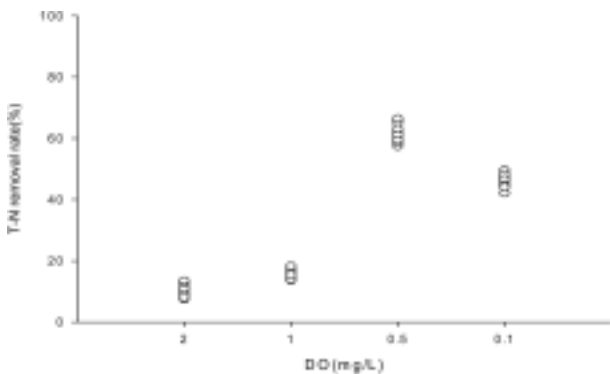


Fig. 6. T-N removal rate with various DO concentration in the SND bioreactor.

켰기 때문이라는 것을 주목할 필요가 있다. 실제 유입 하수 내 대부분의 질소는 유기성 질소와 NH₄⁺-N로 존재하기 때문에 실제 하수 적용 시, 0.1 mg/L의 DO 농도에서의 T-N 제거율은 더 낮아질 것으로 예상된다.

3.2. 반응조 내 미생물 군집 해석

3.2.1. DO 농도에 따른 반응조 내 eubacteria의 군집 해석

Fig. 7에 나타난 DGGE band profile을 통해 DO 농도에 따른 반응조 내 미생물 군집의 변화를 관찰할 수 있었으며, DNA band의 gel elution 및 sequencing 분석 결과는 Table 4에 제시하였다.

DO 농도를 2와 1 mg/L로 운전한 반응조 내의 band profile은 거의 유사하게 관찰되었다. 총 16개의 band를 확인할 수 있었으며, 선명하게 나타난 C, G, K, P, R band가 우점화 미생물로 추측된다. DO 농도 2와 1 mg/L로 운전된 반응조 내 미생물은 Uncultured Bacterium 10종(A, B, C, E, F, G, M, N, P, Q band), *Flavobacterium* sp. 1종(D band), *Zoogloea* sp. 1종(I band), *Bacillus* sp. 2종(J, K band), Uncultured Bacteroidetes(O, R band) sp. 2종이었으며, 우점화 미생물은 Uncultured Bacterium 3종(C, G, P band), *Bacillus* sp. 1종(K band), Uncultured Bacteroidetes 1종(R band)으로 나타났다.

DO 농도를 0.5 mg/L로 운전한 반응조 내의 DGGE 결과 12개의 band를 확인할 수 있었으며, 우점화 미생물은 B, E, F, G, H, I, L band로 나타난 미생물로 추측된다. DO 농도 0.5 mg/L로 운전된 반응조 내 미생물은 Uncultured Bacterium 9종(A, B, C, E, F, G, H, N, Q band), *Flavobacterium* sp. 1종(D band), *Zoogloea* sp. 2종(I, L band)이었으며, 우점화 미생물은 Uncultured Bacterium 5종(B, E, F, G, H band), *Zoogloea* sp. 2종(I, L band)으로 나타났다.

DO 농도를 0.1 mg/L로 운전한 반응조 내의 DGGE 결과 11개의 band를 확인할 수 있었으며, band가 선명하게 나타난 I, L, P가 우점화 미생물로 추측된다. DO 농도 0.1

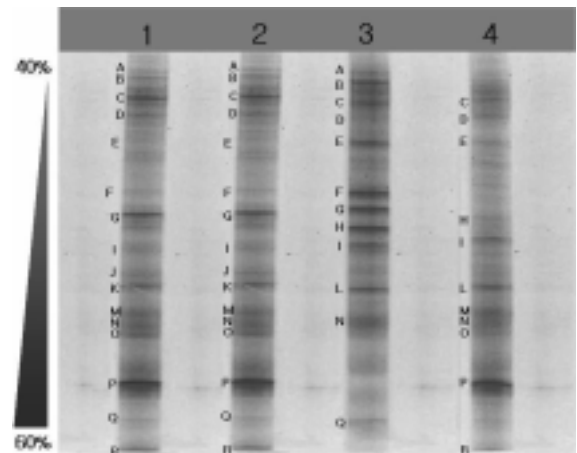


Fig. 7. DGGE profile of eubacteria.

1: DO 2 mg/L sample, 2: DO 1 mg/L sample, 3: DO 0.5 mg/L sample, 4: DO 0.1 mg/L sample

Table 4. Summary of phylogenetic diversity of DGGE bands based on 16S rDNA V3 region sequences

Band	Class/phylum	Accession No.	Similarity
A	U. Bacterium clone 36ds5 16S rRNA gene, partial sequence	AY212730	96%
B	U. Bacterium clone ES3-37 16S rRNA gene, partial sequence	DQ463256	100%
C	U. Bacterium clone 23d12 16S rRNA gene, partial sequence	EF515366	84%
D	<i>Flavobacteria yabuuchiae</i> 16S rRNA	D14021	80%
E	U. Bacterium clone ML-9-56.2 16S rRNA gene, partial sequence	DQ520191	86%
F	U. Bacterium clone LaP15L30 16S rRNA, partial sequence	EF667660	94%
G	U. Bacterium PHOS-HE21 16S rRNA gene, partial sequence	AF314419	97%
H	U. Bacterium clone LaC15L144 16S rRNA, partial sequence	EF667808	90%
I	<i>Zoogloea</i> sp. Rud14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY788985	79%
J	<i>Bacillus</i> sp. SKAL-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EF406129	85%
K	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716, 16S rRNA gene	X76440	94%
L	<i>Zoogloea</i> sp. EMB 62 16S rRNA gene, partial sequence	DQ413151	85%
M	U. Bacterium partial 16S rRNA gene, clone W3063.	AM259157	100%
N	U. Bacterium isolate DGGE band 9 16S rRNA gene, partial sequence	EF117986	100%
O	U. Bacteroidetes bacterium clone Skagenf21 16S rRNA gene, partial sequence	DQ640684	88%
P	U. Bacterium clone S25_1448 16S rRNA gene, partial sequence	EF575104	88%
Q	U. Bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:13C-A52	AB205697	73%
R	U. Bacteroidetes bacterium clone Skagen127 16S rRNA gene, partial sequence	DQ640713	95%

mg/L로 운전된 반응조 내 미생물은 Uncultured Bacterium 6종(C, E, H, M, N, P band), *Flavobacteria* sp. 1종(D band), *Zoogloea* sp. 2종(I, L band), Uncultured Bacteroidetes 2종(O, R band)이었으며, 우점화 미생물은 Uncultured

Bacterium 1종(P band), *Zoogloea* sp. 2종(I, L band)으로 나타났다.

본 DGGE 실험 결과 반응조 내 eubacteria 중 대부분 Uncultured Bacterium 미생물이며, *Flavobacteria*, *Zoogloea*, *Bacillus*, Uncultured Bacteroidetes sp. 미생물도 존재함을 확인할 수 있었다. *Flavobacteria*, *Zoogloea*, *Bacillus* 등은 기존 하수처리 시스템의 활성슬러지 flocc 및 생물막 등에서 관찰되는 미생물로 알려져,³¹⁾ DGGE 실험을 통해 규명된 동시 질산화-탈질 반응조 내 eubacteria가 하수 중의 오염물질을 제거하는 데 기여하는 것을 확인할 수 있었으며, 반응조 운전 DO 농도에 따라 eubacteria 군집의 변화 양상을 확인할 수 있었다. 그러나 본 실험을 통해서 질산화 미생물 및 탈질 미생물을 동정할 수는 없었으므로, 질산화와 탈질에 각각 직접 관여하는 효소와 관련된 유전자 분석을 통한 실험이 실시되어야 할 것으로 판단하였다.

3.2.2. DO 농도변화에 따른 반응조 내 β-아모니아산화균의 군집 해석

Fig. 8은 질산화 미생물을 규명하기 위한 β-아모니아산화균에 대한 DGGE 실험 결과로, 각 DO 농도에서 하나의 band가 관측되었다. 이 band는 2, 1, 0.5 mg/L의 DO 농도에서 추출한 sample에서는 선명하게 관측되었으나, 0.1 mg/L

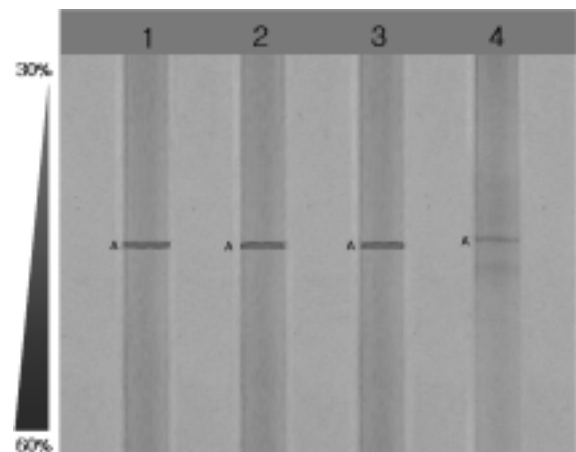


Fig. 8. DGGE profile of β-AOB.

1: DO 2 mg/L sample, 2: DO 1 mg/L sample, 3: DO 0.5 mg/L sample, 4: DO 0.1 mg/L sample

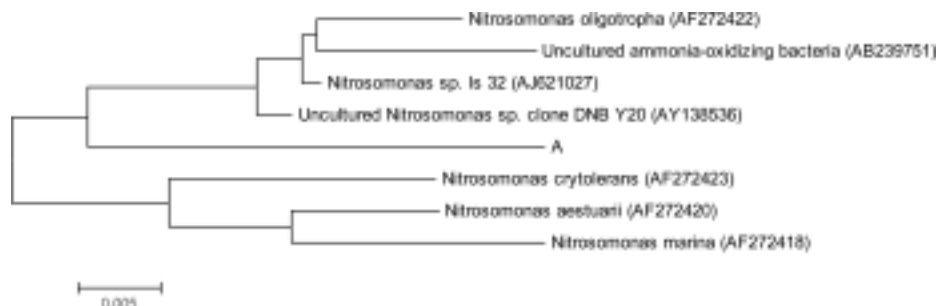


Fig. 9. Phylogenetic tree illustrating the relationships among the relatives in the GenBank database and the DGGE bands (β-AOB) in Fig. 8. The tree was produced using a neighbor-joining method. The bar indicates 0.5% sequence divergence.

Table 5. Summary of phylogenetic diversity of DGGE bands based on β -AOB sequence

Band	Class/phylum	Accession No.	Similarity
A	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. done DNB Y20	AY138536	97%

DO 농도에서 추출한 sample에서는 선명도가 현저히 감소하였다. DNA band의 gel elution 및 sequencing 분석을 실시한 결과 DGGE에서 관측된 band의 염기서열은 Uncultured *Nitrosomonas* sp. done DNB Y20와 97%의 유사도를 갖는 것으로 나타났으며, 이 미생물은 대표적인 암모니아 산화 미생물로 알려져 있다(Table 5). 이를 통해 β -암모니아산화균의 일종인 Uncultured *Nitrosomonas* sp. done DNB Y20은 0.5 mg/L 이상의 DO 농도에서 우점화 됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 9는 Fig. 8의 DGGE 밴드로부터 판명된 미생물의 계통 발생학적 유연관계를 도식한 결과이다. NH_4^+ -N는 0.5 mg/L 이상의 DO 농도에서는 99% 이상의 질산화가 이루어진 반면 0.1 mg/L에서는 20%의 질산화가 이루어졌으며, 이는 반응조 내 β -암모니아산화균의 우점화가 NH_4^+ -N의 질산화에 영향을 미치는 것을 나타낸다. 또한, PCR-DGGE를 통한 반응조 내 β -암모니아산화균의 monitoring은 안정적인 반응조 운전의 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

3.2.3. DO 농도에 따른 반응조 내 탈질 bacteria의 군집 해석

Fig. 10은 탈질 미생물을 규명하기 위한 DGGE 실험 결과로, 다섯 개 band(A, B, C, D, E)의 미생물 종을 규명할 수 있었으며, 두 개의 band(B, C)가 선명하게 나타났다. 이 중 B band는 모든 DO 농도에서 유사한 선명도를 보였으나, C band는 DO 농도가 감소할수록 선명도가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. DGGE에서 관측된 DNA band의 gel elution 및 sequencing 분석 결과는 다음과 같다.

A, B, C band의 염기 서열은 *nirS*를 함유하는 Uncultured organism 미생물과 각각 86, 90, 86%의 유사도를, D, E band의 염기 서열은 *nirK*를 함유하는 Uncultured bacterium

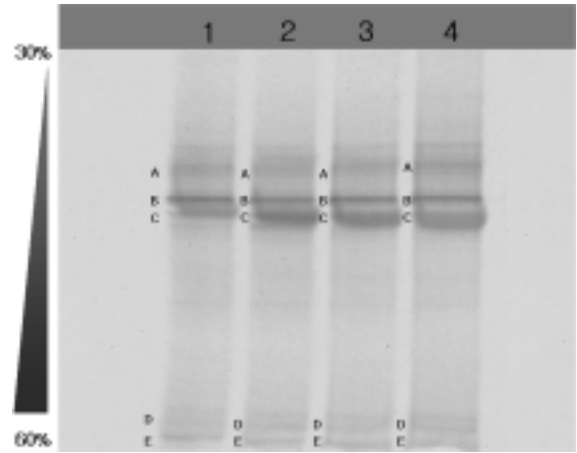


Fig. 10. DGGE profile of *nirS* gene. 1: DO 2 mg/L sample, 2: DO 1 mg/L sample, 3: DO 0.5 mg/L sample, 4: DO 0.1 mg/L sample

Table 6. Summary of phylogenetic diversity of DGGE bands based on *nirS* gene sequences

Band	Class/phylum	Accession No.	Similarity
A	Uncultured organism clone H02-03-116 <i>nirS</i> gene, partial <i>cds</i>	AF549089	86%
B	Uncultured organism clone aT3 <i>cd1 nirS</i> gene, partial <i>cds</i>	DQ303101	90%
C	Uncultured organism clone eS1 <i>cd1 nirS</i> gene, partial <i>cds</i>	DQ303107	86%
D	Uncultured bacterium clone DGGE band AS8A <i>nirK</i> gene	AY583422	83%
E	Uncultured bacterium clone DGGE band AS4E <i>nirK</i> gene, partial <i>cds</i>	AY583414	87%

미생물과 각각 83, 87%의 유사도를 갖는 것으로 나타났다. *nirS*와 *nirK*는 nitrite reductase(아질산 환원효소)의 subunit으로, 특정 종류의 세균에 존재하며, 이들 효소를 함유한 생물에 의한 질산 및 아질산의 동화, 그리고 탈질 과정에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이를 통해,

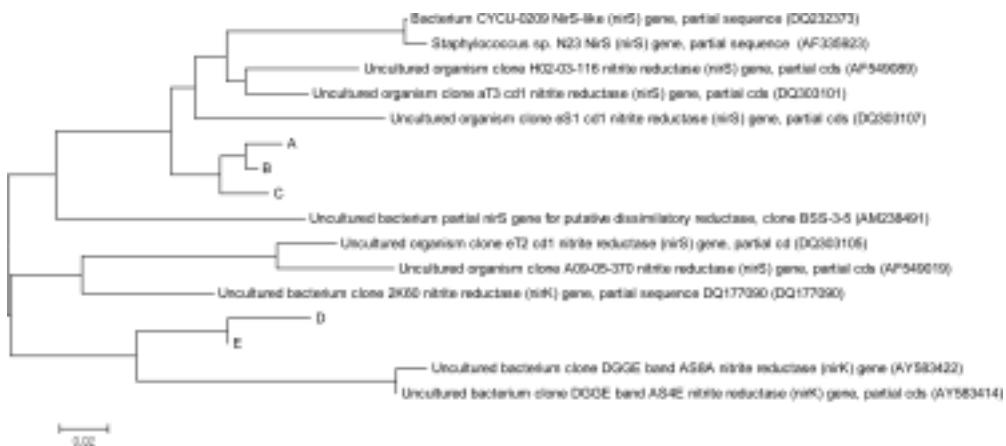


Fig. 11. Phylogenetic tree illustrating the relationships among the relatives in the GenBank database and the DGGE bands(*nirS* gene). The tree was produced using a neighbor-joining method. The bar indicates 2% sequence difference. A, B, C, D, and E on the tree represent microbial class listed in Table 6.

본 질산화-탈질 반응 시스템 내의 탈질 유도 bacteria의 존재 여부를 확인할 수 있었다. 특히 C band에 해당하는 Uncultured organism clone *eSl cdl nirS gene, partial cds*(유사도 86%)는 0.5 mg/L 이하의 DO 농도에서 우점화되는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구의 탈질 반응에 직접적인 관여를 하는 미생물로 사료된다.

Fig. 11은 Fig 10의 DGGE 밴드로부터 판명된 미생물의 계통 발생학적 유연관계를 도식한 것이다.

4. 결론

본 연구에서는 DO 농도에 따른 SND 반응조 미생물 중 eubacteria와 β -아모니아산화균, 그리고 탈질균의 변화 양상을 분석하기 위하여 각각의 미생물에 적합한 방법으로 PCR-DGGE를 실시하였다. 실험을 통해 DO 농도에 따라 질산화율 및 탈질률이 변화됨을 알 수 있었고, 이는 반응조 내 질산화 및 탈질 미생물의 분포에 영향을 미치는 것을 관찰할 수 있었다.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다

1) 동시 질산화·탈질 반응이 구현된 동시 질산화·탈질 반응기의 DO 농도에 따른 유기물 및 질소 화합물 제거율을 비교하기 위하여, 반응조 내 DO 농도를 2, 1, 0.5, 0.1 mg/L로 각각 변화시켜 실험을 실시하였다. 평균 200 mg/L의 COD_{Cr} 농도를 갖는 유입수 내 유기물의 제거는 0.1 mg/L의 DO 농도에서도 가능하며, 0.5 mg/L 이상의 DO 농도에서 비교적 높은 유기물 제거가 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, SND 반응조에서 질산화의 경우 0.5 mg/L 이상의 DO 농도에서, 탈질의 경우 0.5 mg/L 이하의 DO 농도에서 안정적으로 이루어짐을 확인할 수 있었으며 탈질의 관점에서 용존산소의 농도를 0.5 mg/L로 유지하였을 때 최적의 탈질률을 관찰할 수 있었다.

2) 반응조 내 DO 농도의 변화에 따른 eubacteria의 군집 변화를 해석하기 위해, EUB primer set를 이용한 PCR product의 DGGE를 실시하였다. DO 농도를 2와 1 mg/L로 유지한 채 운전한 반응조 내의 DGGE band profile은 거의 유사하게 관찰되었으며 16종의 미생물을 동정할 수 있었다. 이 중 상대적으로 우점화된 미생물은 Uncultured Bacterium 3종과 *Bacillus* sp. 1 종, Uncultured Bacteroidetes sp. 1종으로 나타났다. DO 농도를 0.5 mg/L로 운전한 반응조 내의 DGGE 결과 12개의 DGGE band를 확인할 수 있었으며, Uncultured Bacterium 5종과 *Zoogloea* sp. 2종이 상대적으로 우점화 되었음을 관찰할 수 있었다. DO 농도를 0.1 mg/L로 운전한 반응조 내의 DGGE 결과 11개의 band를 확인할 수 있었으며, 상대적인 우점화 미생물은 Uncultured Bacterium 1종과 *Zoogloea* sp. 2종으로 나타났다.

3) 반응조 내 DO 농도의 변화에 따른 β -아모니아산화균의 군집 변화를 해석하기 위해, CTO primer set를 이용한 PCR product의 DGGE를 실시한 결과 하나의 band를 관

찰할 수 있었다. 이 band는 2, 1, 그리고 0.5 mg/L의 DO 농도에서 추출한 sample에서는 선명하게 관측되었으나, 0.1 mg/L DO 농도에서 추출한 sample에서는 선명도가 현저히 감소하였다. DGGE에서 관측된 band의 염기서열은 대표적인 아모니아 산화 미생물인 Uncultured *Nitrosomonas* sp. *done DNB Y20*와 97%의 유사도를 갖는 것으로 나타났다. 이를 통해 β -아모니아산화균의 일종인 Uncultured *Nitrosomonas* sp. *done DNB Y20*는 0.5 mg/L 이상의 DO 농도에서 우점화 됨을 확인할 수 있었다. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 은 0.5 mg/L 이상의 DO 농도에서는 99% 이상의 질산화가 이루어진 반면 0.1 mg/L에서는 20%의 질산화가 이루어졌으며, 이는 반응조 내 β -아모니아산화균의 우점화가 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 질산화에 영향을 미치는 것을 나타낸다.

4) 반응조 내 DO 농도에 따른 탈질화 bacteria의 군집 변화를 해석하기 위해, *nirS* primer set를 이용한 PCR product의 DGGE를 실시하였다. DGGE 실험 결과 다섯 개의 band가 관측되었으며, 염기서열 분석 결과 *nirS*를 함유하는 Uncultured organism 미생물 3종과 *nirK*를 함유하는 Uncultured bacterium 미생물 2 종으로 동정되었다. 관측된 band 중 한 band는 DO 농도가 낮아질수록 선명도가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 band에 해당하는 미생물은 86%의 유사도를 갖는 Uncultured organism clone *eSl cdl nirS gene, partial cds*로, 0.5 mg/L 이하의 DO 농도에서 우점화된다고 판단할 수 있었으며, 본 연구의 탈질 반응에 직접적인 관여를 하는 미생물로 사료되었다.

참고 문헌

1. Metcalf & Eddy, 고티광백 외 13인 공역, “폐수처리공학 2,” 동화기술, pp. 1048~1248(2004).
2. Rittman, B. E. and Langeland, W. E., “Simultaneous Denitrification with Nitrification in Single-Channel Oxidation Ditches,” *J. Water pollut. Control Fed.*, **57**, 300(1985).
3. Trivedi, H. and Heinen, N., “Simultaneous Nitrification/Denitrification by Monitoring NAOH Fluorescence in Activated Sludge,” Proceedings of the Facility Operations II: Innovative Technology Forum; 73d Annual Conference, Water Environment Federation, Anaheim, CA(2000).
4. Irvine, R. L., Murthy, D. V. S., Arora, M. L., Copeman, J. L., Heidman, J. A., “Analysis of full-scale SBR operation at Grundy Centre, IOWA,” *J. Water pollut. Control Fed.*, **59**(3), 132~138(1987).
5. Masuda, S., Watanabe, Y., Ishiguro, M., “Biofilm properties and simultaneous nitrification and denitrification in aerobic rotating biological contactors,” *Water Sci. Technol.*, **23**, 1355~1363(1991).
6. Halling, S. B., Hjuler, H., “Simultaneous nitrification and denitrification with an upflow fixed bed reactor applying

- clinoptililite as media,” *Water Treat.*, **7**, 77~88(1992).
7. Kugleman, I. J., Spector, M., “Nutrient removal in staged biological reactors,” Proceedings of the third WPCF Joint Technical Seminar on Sewage Treatment Technology, Tokyo, Japan, May 12-14, pp. 4~27(1988).
 8. Moriyama, K., Sato, K., Harada, Y., Washiyama, K., Okamoto, K., “Simultaneous biological removal of nitrogen and phosphorus using oxic-anaerobic-oxic process,” *Water Sci. Technol.*, **22**(7/8), 61~66(1990).
 9. Watanebe, Y., Masuda, S., Ishiguro, M., “Simultaneous nitrification and denitrification in micro-aerobic biofilms,” *Water Sci. Technol.*, **26**(3/4), 511~522(1992).
 10. Gupta, S. K., Raja, S. M., Gupta, A. B., “Simultaneous nitrification and denitrification in a rotating biological contactor,” *Environ. Technol.*, **15**, 145~153(1994).
 11. Munch, E. V., Lant, L., Keller, J., “Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors,” *Water Res.*, **30**(2), 277~285(1996).
 12. Sen, P., Dentel, S. K., “Simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized bed reactors,” *Water Sci. Technol.*, **38**(1), 247~254(1998).
 13. Menoud, P., Wong, C. H., Robinson, H. A., Farquhar, A., Barford, J. P., Barton, G. W., “Simultaneous Nitrification and Denitrification Using SIPORAXTMPACKING,” *Water Sci. Technol.*, **40**(4/5), 153~160(1999).
 14. Fuerhacker, M., Bauer, H., Ellinger, R., Sree, U., Schmid, H., Zibuschka, F., Puxbaum, H., “Approach for a novel control strategy for simultaneous nitrification-denitrification in activated sludge reactors,” *Water Res.*, 2499~2506(2000).
 15. Watanebe, T., Hashimoto, S., Kuroda, M., “Simultaneous nitrification and denitrification in a single reactor using a bioelectro-chemical process,” *Water Sci. Technol.*, **46**(4/5), 163~169(2002).
 16. Hibiya, K., Tereda, A., Tsuneda, S., Hirata, A., “Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor,” *J. Biotechnol.*, **100**, 23~32(2003).
 17. 권문선, 김환홍, “탈질균의 호기성상태에서 탈질 특성에 관한 기초적 연구,” 대한환경공학회지, 143~148(1992).
 18. Holman, J. B. and Wareham, D. G., “COD, ammonia and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process,” *Biochem. Eng. J.*, **22**, 125~133(2005).
 19. Pochana, K., Keller, J., “Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification(SND),” *Water Sci. Technol.*, **39**(6), 61~68(1999).
 20. Pochana, K., Keller, J., Lant, J., “Model development for simultaneous nitrification and denitrification,” *Water Sci. Technol.*, **39**(1), 235~243(1999).
 21. Muyzer, G., 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).
 22. Claudia Schabereiter-Gurtner, Warner Lubitz, Sabine Roleke, “Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria,” *J. Microbiol. Methods*, **52**, 251~260(2003).
 23. Emilie Lyautey, Benedicte Lacoste, Loic Ten-Hage, Jean-Luc Rols, Frederic Garabetian, “Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rRNA PCR-DGGE: methodological setting and fingerprints interpretation,” *Water Res.*, **39**, 380~388(2005).
 24. Muyzer, G., Ellen C., De Waal, Andre G. Uiterlinden, “Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695~700(1993).
 25. Mannix Salvador Pedro, Shin Haruta, Masaru Hazaka, Rumiko Shimada, Chie Yoshida, Koichiro Hiura, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of microbial community from field-scale composter,” *J. Bioscience and Bioengineering*, **91**(2), 159~165(2001).
 26. 정수희, “PCR-DGGE를 이용한 호기성 고정생물막내 질산화 미생물의 군집해석,” 부산대학교 대학원 환경공학과 (2005).
 27. 이진욱, “Real-time PCR을 이용한 BioCube 내부 탈질 미생물 분포 측정,” 대한환경공학회 2005년 추계학술연구 발표회지, pp. 164~168(2005).
 28. Gesche Braker, Andreas Fesefeldt, Karl-Paul Witzel, “Development of PCR primer system for amplification of nitrite reductase genes(*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environment samples,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **Oct.**, 3769~3775(1998).
 29. APWA, AWWA, WPCF, “Standard methods for the examination of water and wastewater,” 20th ed.(1999).
 30. Christensen, M. H., Harremoës, P., “Nitrification and denitrification in wastewater treatment,” pp. 391~414, In: *Water Pollution Microbiology*. 2, R. Mitchell, Ed. John Wiley & Sons, New York(1978).
 31. Garbriel Bitton저, 오계현, 송홍규, 최철호, 공인철, 정금희, 이병의 공역, “폐수 미생물,” pp. 247~312(2004).