

CANON 공정에서 운전조건에 따른 질소 제거효율 및 미생물군집 변화 Variation of Nitrogen Removal Efficiency and Microbial Communities Depending on Operating Conditions of a CANON Process

조경민 · 박영현 · 조순자* · 이태호[†]

Kyungmin Jo · Younghyun Park · Sunja Cho* · Taeho Lee[†]

부산대학교 사회환경시스템공학부 · *부산대학교 미생물학과
Department of civil and environmental engineering, Pusan National University

*Department of microbiology, Pusan National University

(Received April 3, 2015; Revised June 15, 2015; Accepted June 20, 2015)

Abstract : Nitrogen removal is one of the most important issues about wastewater treatment because nitrogen is a primary pollutant caused various problems such as eutrophication. We developed a CANON microbial community by using AOB and ANAMMOX bacteria as seeding sources. When 100 mg-N/L of influent ammonium was supplied, the DO above 0.4 mg/L showed a very low TN removal efficiency while the DO of 0.3 mg/L showed TN removal efficiency as high as 71.3%. When the influent ammonium concentration was reduced to 50 mg/L, TN removal efficiency drastically decreased. However, TN removal efficiency was recovered to above 70% after 14 day operation when the influent nitrogen concentration was changed again from 50 mg-N/L to 100 mg-N/L. According to the operating temperature from 37±1 °C to 20±1 °C, TN removal efficiency also rapidly decreased but gradually increased again up to 70.0±2.6%. The analysis of PCR-DGGE showed no substantial difference in microbial community structures under different operational conditions. This suggests that if CANON sludge is once successfully developed from a mixture of AOB and ANAMMOX bacteria, the microbial community can be stably maintained regardless of the changes in operational conditions.

Key Words : CANON, ANAMMOX, Partial Nitrification, Microbial Community

요약 : 질소화합물은 부영양화 등 수질을 악화시키는 결과를 초래하므로 질소 제거는 수처리에 있어 가장 중요한 문제들 중 하나이다. 본 연구에서는 독립영양탈질 공정인 CANON (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite)을 이용하여 암모니아성 질소 제거 효율을 평가하고, 미생물 군집 분석을 수행하였다. AOB (Ammonium Oxidizing Bacteria)와 ANAMMOX (ANAerobic AMMONium OXidation)균을 동시에 식종하고, 37°C에서 유입 암모니아성 질소농도 100 mg-N/L와 아질산성 질소농도 100 mg-N/L 조건으로 운전한 결과, 성공적인 CANON 반응이 유도되었다. 유입수에서 아질산성 질소를 제외시키고 암모니아성 질소(100 mg-N/L)만을 공급하였을 때, DO농도 0.4 mg/L 이상에서는 CANON의 성능이 악화되었지만, DO농도를 0.3 mg/L로 낮추자 71.3%의 총 질소제거효율을 나타내었다. 유입 암모니아성 질소 농도를 50 mg-N/L로 낮추었을 때, 질소 제거효율이 급격히 악화되었다. 그러나 유입농도를 다시 100 mg-N/L로 증가시키자 14일 만에 이전의 질소제거성능을 회복하였고, 이후 76.1±4.9%의 총 질소제거효율을 나타냈다. 온도를 상온(20±1 °C) 조건으로 전환하자 초기에는 불안정한 CANON 반응이 일어났지만, 23일 이후에는 안정적인 총 질소제거효율(70.0±2.6%)을 유지하였다. PCR-DGGE를 이용한 미생물군집 분석 결과, 식종원과 CANON의 미생물군집은 확연한 차이를 나타냈지만, CANON의 각 조건에 따른 미생물군집은 크게 다르지 않았다. 따라서 질소제거 성능의 악화는 미생물군집을 구성하는 미생물종의 변화에 기인하기 보다는 구성 미생물종들의 질소제거 활성의 저하에 기인하는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 AOB와 ANAMMOX균을 식종하여 CANON 반응을 성공적으로 유도한다면, 이후 농도나 온도의 변화에도 안정적인 미생물군집을 유지할 수 있다는 것을 의미한다.

주제어 : 캐논, 아나폭스, 부분 질산화, 미생물군집

1. 서론

산업화와 비료 사용으로 인하여 유기물과 영양염류가 포함되어 있는 하·폐수 발생량이 증가하였다. 영양염류가 처리되지 않고 수계로 방류될 경우 부영양화 현상으로 인한 유기물 증가, 부식물질 생성 및 수중 용존산소 농도의 감소로 인해 수계에 심각한 문제를 유발한다. 영양염류 중 질소를 제거하기 위한 일반적인 질산화-탈질화 공정에서는 질산화를 위한 폭기 과정에 다량의 에너지가 요구되며, 탈질화를 유도하기 위한 유기 탄소원 비용이 추가적으로 요구된다.¹⁾ 최근에는 질소제거 공정의 에너지 효율을 높이고 비

용을 절감할 수 있는 독립영양탈질공정이 주목을 받고 있다.

ANAMMOX (ANAerobic AMMONium OXidation)는 혐기성 조건에서 암모니아성 질소를 전자공여체로, 아질산성 질소를 전자수용체로 이용하여 하·폐수내의 질소를 제거하는 공정이다.²⁾ 외부탄소원을 필요로 하지 않고,³⁾ N₂O 가스를 생성하지 않는다는 장점이 있다.⁴⁾ 일반적으로 알려진 ANAMMOX균의 최적 활성조건은 30-40 °C의 온도와,^{5,6)} 6.7-8.3의 pH이다.^{2,6)} ANAMMOX는 일반적인 수계에 존재하지 않는 아질산성 질소를 사용하기 때문에 암모니아성 질소를 아질산성 질소로 부분적으로 산화시키는 공정(부분 질산화)이 반드시 필요하다. 부분 질산화에 관여하는 AOB

[†] Corresponding author E-mail: leeth55@pusan.ac.kr Tel: 051-510-2465 Fax: 051-514-9574

(Ammonia Oxidizing Bacteria)는 30°C 이상의 온도 조건에서 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 부분 질산화를 성공적으로 유지시키기 위해서는 특히 NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria)의 활성을 억제시켜야 하는데, 35°C의 온도와⁸⁾ 7.5-8.5의 pH,⁹⁾ 1.0-1.5 mg/L의 DO 농도가 최적조건이라고 보고되었다.¹⁰⁾

CANON (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite)은 부분 질산화와 ANAMMOX를 동시에 이용하여 하·폐수내의 암모니아성 질소를 제거하는 독립영양탈질 공정으로써 외부탄소원이 공급이 불필요하고, 산소 요구량 및 슬러지 생산량이 전통적인 질산화-탈질 공정보다 적다는 장점이 있다.^{11,12)} 하지만 CANON은 지금까지 고농도 질소(>300 mg-N/L)나 30°C 이상의 온도 조건에서 수행된 연구가 대부분이었기 때문에,¹³⁾ 공정의 범용성을 생각하였을 때 상대적으로 낮은 농도와 상온에서의 연구가 필요하다.

본 연구에서는 사전에 배양된 AOB와 ANAMMOX균을 식종원으로 사용하여 CANON을 구축하였고, 유입수의 암모니아성 질소 농도를 100 mg-N/L로 유지하여 연속식으로 운전하였다. 유입수 질소 농도 저하(50 mg-N/L)와 반응기 DO 농도 조절, 상온(20±1°C)에서의 운전 등을 통하여 CANON 공정의 질소제거효율을 분석하였다. 또한 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 이용하여 각 조건에 따른 미생물 군집 분석을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. CANON 공정 운전조건

본 연구에서의 CANON은 유효 부피가 1,300 mL인 반응기를 사용하여 HRT 16시간 조건에서 연속흐름식으로 운전되었다(Fig. 1). 식종원은 질소 농도 200 mg-N/L (100 mg-NH₄⁺-N/L와 100 mg-NO₂⁻-N/L)로 배양된 ANAMMOX균과 500 mg-NH₄⁺-N/L로 배양된 AOB가 사용되었다. 초기 40일 동안은 ANAMMOX 반응을 안정화시키기 위하여 암모니

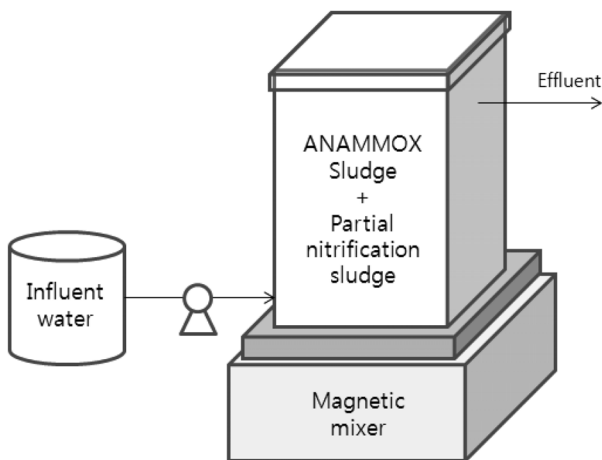


Fig. 1. Schematic diagram of the CANON reactor.

Table 1. Summary of variations in operational condition

Phase	I	II-1	II-2	II-3	II-4	III	IV	V
Time (d)	0-39	40-45	46-50	51-55	56-62	63-83	84-111	112-142
NH ₄ ⁺ -N _{in} (mg/L)	100	100	100	100	100	50	100	100
NO ₂ ⁻ -N _{in} (mg/L)	100	0	0	0	0	0	0	0
Alk./N ratio	1.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
DO (mg/L)	<0.5	1.0	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
Temp. (°C)	37±1	37±1	37±1	37±1	37±1	37±1	37±1	20±1

아성 질소와 아질산성 질소를 함께 주입하였다. 이때의 배지 조성은 다음과 같다; (NH₄)₂SO₄ 0.472 mg/L, NaNO₂ 0.63 mg/L, KHCO₃ 0.25 mg/L, KH₂PO₄ 0.0544 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.009 mg/L, C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2H₂O 0.005 mg/L. 반응기 내의 DO 농도는 0.5 mg/L 이하로 유지하였으며, 반응기 온도는 항온 배양기 내에서 37±1°C로 유지하였다.

식종 40일 후, 배지의 아질산성 질소 공급원인 NaNO₂를 제거하여 CANON 반응을 유도하였다. Alk./N비는 ANAMMOX 기준인 1.5에서 부분 질산화 기준인 5.0로 증가시켰고, 반응기의 DO 농도에 따른 CANON 성능 평가를 수행하기 위하여 DO 농도를 0.3-1.0 mg/L 범위에서 조절하였다(Table 1).

식종 63일 후, 유입 질소 농도의 감소에 따른 CANON의 반응성을 평가하기 위하여, 암모니아성 질소 농도를 50 mg-N/L로 낮추었다가 20일 후에 다시 100 mg-N/L로 회복시켰다. 운전 온도는 37±1°C로 일정하게 유지시키다가, 식종 112일 후부터 20±1°C로 감소시켜 상온에서의 CANON 성능 평가를 수행하였다. 각 단계에서의 운전조건 변화를 Table 1에 정리하였다.

2.2. 시험방법 및 장비

매일 유입수와 유출수를 채취하였고, 실린지 필터(0.22 μm)를 이용하여 필터링을 거친 후에 각 성분을 분석하였다. 암모니아성 질소는 수질공정시험법에 의거하여 분석하였고, 아질산성 질소와 질산성 질소는 Ion Chromatography (DX-300, DIONEX, Sunnyvale, USA)를 이용하여 분석하였다. pH는 pH meter (Orion star, Thermo Scientific, Singapore)를 사용하였으며, DO는 DO meter (550 A, YSI incorporated, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.3. 질소제거효율 산출

CANON의 성능을 평가하기 위한 인자로 총질소제거효율 (Total Nitrogen Removal, TNR)과 질소부하율(Nitrogen Loading Rate, NLR), 질소제거율(Nitrogen Removal Rate, NRR)을 사용하였으며 다음 식으로 산출되었다. 또한 CANON의

영향인자 평가를 위하여 FA (Free Ammonia) 농도를 산출하였다.

$$\text{TNR} (\%) = \frac{(\text{NH}_4^+ - \text{N} + \text{NO}_2^- - \text{N} + \text{NO}_3^- - \text{N})_{\text{input}} - (\text{NH}_4^+ - \text{N} + \text{NO}_2^- - \text{N} + \text{NO}_3^- - \text{N})_{\text{output}}}{(\text{NH}_4^+ - \text{N} + \text{NO}_2^- - \text{N} + \text{NO}_3^- - \text{N})_{\text{input}}}$$

$$\text{NLR} = \frac{(\text{NH}_4^+ - \text{N} + \text{NO}_2^- - \text{N} + \text{NO}_3^- - \text{N})_{\text{input}}}{\text{HRT}}$$

$$\text{NRR} = \frac{\text{NLR} \times \text{TNR} (\%)}{100}$$

$$\text{FA} (\text{NH}_3, \text{mg/L}) = \frac{17}{14} \times \frac{[\text{NH}_4^+ - \text{N}] \times 10^{\text{pH}}}{e^{[6344/(273+t)]} + 10^{\text{pH}}}$$

2.4. 분자생물학적 분석

분자생물학적 분석을 위하여 CANON의 부유 미생물을 다음과 같은 특정 시기에 채취하였다; AOB 식종균, ANAMMOX 식종균, phase I 초기(5일), phase I 후기(40일), phase II 후기(62일), phase III 후기(83일), phase IV 후기(111일), phase V 후기(142일).

모든 시료들은 PowerSoil™ DNA isolation kit (MoBio Ltd CO., USA)를 사용하여 DNA 추출을 수행하였다. 추출된 DNA로부터 16S rRNA를 증폭시키기 위하여 1차로 Eub 8F primer와 1392R primer를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였으며, 2차로 GC clamp가 부착된 Eub 27F primer와 Eub 518R primer를 사용하여 PCR을 수행하였다 (Table 2). PCR이 완료된 시료는 PCR purification kit (Sol-Gent Co., Korea)를 사용하여 정제하였으며, 각 단계별로 1% agarose gel에 전기영동한후 EtBr (Ethidium Bromide)로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

정제된 PCR 산물을 이용하여 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 수행하였다. Formamide와 40% acryl/

Table 2. PCR primers and conditions

Primer	Condition	Sequence(5'-3')	References
Eub 8F	9 min 95°C, followed 30 cycle of 1 min at 95°C, 1 min 53°C, 2 min 72°C, and followed by a 10 min final extension at 72°C	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Weisburg ¹⁴⁾
Eub 1392R	9 min 95°C, followed 35 cycle of 1 min at 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C, and followed by a 10 min final extension at 72°C	ACG GGC GGT GTG TAC AAG	Nishimura ¹⁵⁾
Eub 27F (GC)*	9 min 95°C, followed 35 cycle of 1 min at 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C, and followed by a 10 min final extension at 72°C	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Kaksonen ¹⁶⁾
Eub 518R	9 min 95°C, followed 35 cycle of 1 min at 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C, and followed by a 10 min final extension at 72°C	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Kaksonen ¹⁶⁾

* The GC Clamp was attached to Eub 27F primer, GC clamp sequence : 5'- CGC CGC GCG GCG GGC GGC GGC GCG GGC GC - 3'

bis를 이용하여 30-60%의 농도구배를 갖도록 DGGE Gel을 제조하고, 정제된 PCR 산물을 주입해 주었다. D-code system (Bio-Rad laboratories, Inc., USA)을 이용하여 20 V에서 15분, 100 V에서 990분 동안 60°C에서 전기영동을 수행하였다.

DGGE band에서 DNA를 추출하여 PCR로 증폭시키고 ABI 3730 XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST program을 이용하여 GenBank에 등록되어 있는 미생물과 비교하였고, 가장 높은 유사도를 가진 미생물을 선택하였다.

한편 fingerprinting II Informatics (Bio-Rad Inc., California, USA)를 이용하여 DGGE band들의 선명도와 위치를 분석하였으며, SPSS 14.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 시료 간의 상관관계를 분석하는 PCA (Principal Components Analysis)를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DO 농도에 따른 CANON 성능 평가

식종 후 39일 동안은 ANAMMOX로 운전되었고 총 질소 제거효율은 약 80.7%로 나타났다(phase I). CANON으로 전환 후 반응기 내의 DO 농도를 0.5 mg/L 이하에서 1.0 mg/L로 증가시키자(phase II) 총 질소제거효율이 4.3%까지 감소하였다(Fig. 2). 유출수 암모니아성 질소 농도는 20 mg/L 이하에서(DO 0.5 mg/L) 70 mg/L까지(DO 1.0 mg/L) 증가하였는데, 이는 부분 질산화 반응이 억제되었기 때문인 것으로 판단된다.

DO 농도가 0.5 mg/L, 0.4 mg/L일 때는 총 질소제거효율이 각각 42.9%, 39.3%까지 증가하였지만 3일 만에 다시 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 2). 이때의 유출수 암모니아성 질소 농도는 30 mg/L 이하를 유지하였지만, 질산성 질소의 축적으로 인하여 낮은 질소제거효율을 나타냈다. NOB에 의한 질산화 반응으로 인하여 ANAMMOX의 활성이 낮았던 것으로 추측된다.

DO 농도를 0.3 mg/L로 유지하자 총 질소제거효율이 급격하게 회복되어 71.3%까지 증가하였다(Fig. 2). 조건 변경 3일 후부터 유출수 암모니아성 질소 및 질산성 질소 농도가 감소하기 시작하였고, 운전 60일 이후에는 각각 20 mg/L 이하의 농도를 나타냈다. 따라서 DO 농도 0.3 mg/L에서는 부분 질산화 및 ANAMMOX 반응이 모두 활성화된 것으로 판단된다.

DO 농도는 부분 질산화와 ANAMMOX의 중요한 인자들 중 하나로 알려져 있다.¹⁷⁾ 따라서 부분 질산화와 ANAMMOX가 동시에 일어나는 CANON 또한 DO 농도의 영향을 크게 받는다. 부분 질산화는 일반적으로 1.0-1.5 mg/L의 DO 농도를 유지해야 아질산성 질소가 성공적으로 축적된다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 하지만 CANON은 높은 DO를 유지할 경우 ANAMMOX균이 억제될 수 있기 때문에 1.0 mg/L 이하의

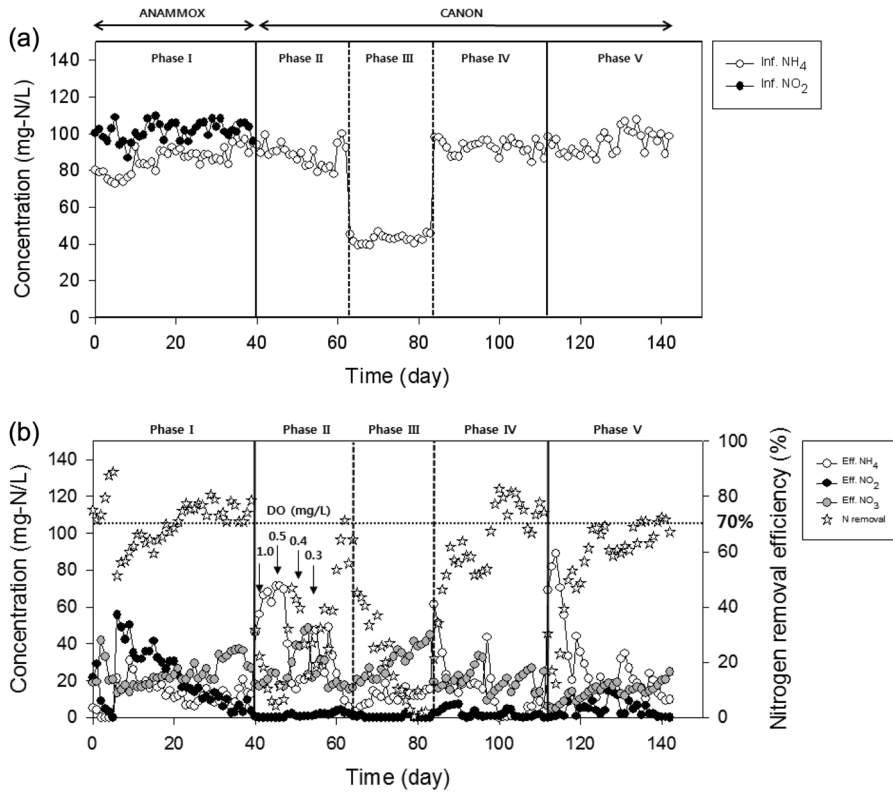


Fig. 2. Concentrations of nitrogen compounds; (a) in the influent, (b) in the effluent and total nitrogen removal efficiency.

DO 농도를 유지해야 한다. Vazquez-Padin¹⁸⁾은 유입 암모니아성 질소 300 mg/L를 연속회분식 CANON으로 제거하기 위해서는 DO 농도를 0.3-0.5 mg/L로 유지해야 되며, 이때의 총 질소제거효율은 77%였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에 따르면 유입 암모니아성 질소 농도가 100 mg/L일 때 0.4 mg/L 이상의 DO 농도는 CANON의 성능을 악화시켰고, 0.3 mg/L의 DO 농도를 유지한 경우에만 70% 이상의 질소를 제거할 수 있었다.

3.2. 유입 질소 농도에 따른 CANON 성능 평가

유입수의 암모니아성 질소 농도를 100 mg/L에서 50 mg/L로 낮추고 20일 동안 운전하였다(phase III). 시간이 지날수록 질산성 질소의 축적량이 15.3 mg-N/L에서 44.9 mg-N/L까

지 점차 증가하였고, 이에 따라 총 질소 제거효율은 64.3%에서 1.9%까지 감소하였다(Fig. 2). 그러나 유입수 암모니아성 질소의 농도를 100 mg-N/L로 다시 증가시키자 14일 만에 이전의 성능을 회복하였고, 이후 76.1±4.9%의 총 질소제거효율을 안정적으로 나타냈다. 이때의 NLR과 NRR은 각각 0.15±0.01 kg-N/m³/d, 0.11±0.01 kg-N/m³/d이었다(Fig. 3).

유입 암모니아성 질소 농도와 아질산성 질소는 ANAMMOX의 저해 인자가 될 수도 있다.¹⁹⁾ 특히 암모니아성 질소 농도와 온도, pH로 산출되는 FA 농도는 부분 질산화와 ANAMMOX 모두에게 영향을 준다고 알려져 있다.^{19,20)} 그러나 본 연구에서의 FA 농도는 유입 암모니아성 질소 농도가 50 mg/L, 100 mg/L일 때 각각 3.3±1.8 mg/L와 4.3±1.4 mg/L로 큰 차이가 없었다. 따라서 FA 농도 보다는 낮은 암모니아

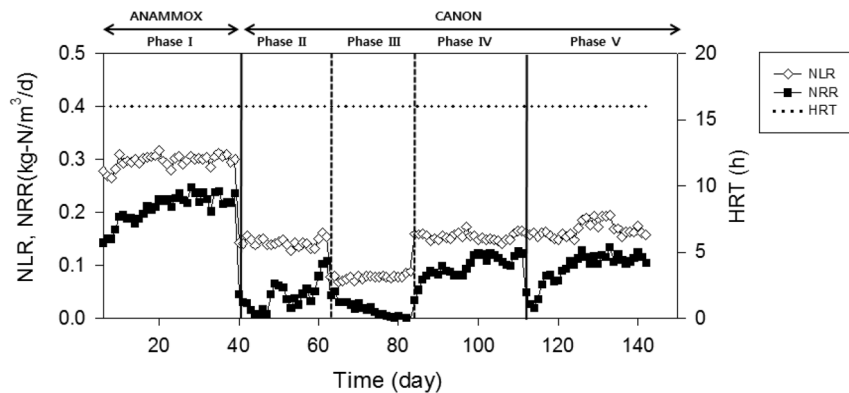


Fig. 3. Variations of Nitrogen Loading Rate (NLR), Nitrogen Removal Rate (NRR) and HRT.

성 질소 농도로 인해 CANON의 성능이 저하된 것으로 사료된다. 유입 질소 농도 50 mg-N/L일 때 질산성 질소의 축적량이 초기 15.3 mg-N/L에서 44.9 mg-N/L로 약 3배 증가하였고, 같은 기간 동안 유출수 암모니아성 질소 및 아질산성 질소 농도변화가 거의 없었기 때문에, 완전 질산화에 의한 질산성 질소 축적만 일어난 것으로 판단된다.

유입 질소 농도를 100 mg-N/L로 다시 증가시키자(phase IV), 초기에 아질산성 질소가 일부 축적이 되었는데(5.3±2.0 mg-N/L), 이는 phase III에서 유입 질소 농도의 감소로 인해 ANMMOX균이 저해를 받았을 것으로 생각된다. 농도 전환 7일 후부터는 아질산성 질소가 축적되지 않았고, 14일 후에는 총 질소제거효율이 이전 수준(76.1±4.9%)으로 회복되었다.

3.3. 상온에서의 CANON 성능 평가

상온에서의 CANON 성능 평가를 수행하기 위하여 반응기의 온도를 37±1℃에서 20±1℃로 낮추어 운전하였다(phase V). 초기 3일 동안 총 질소제거효율이 12.2%까지 급격하게 감소하였으나, 이후 서서히 증가하여 온도를 낮춘 지 23일 이후에는 70.0±2.6%의 총 질소제거효율을 나타냈다(Fig. 2). 이때의 NLR은 0.16±0.01 kg-N/m³/d, NRR은 0.11±0.01 kg-N/m³/d로 나타났다(Fig. 3).

AOB와 ANAMMOX균이 안정적으로 성장하기 위해서는 30℃ 이상의 온도를 유지해야 된다고 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾ 하지

만 최근에는 실용화를 위하여 CANON을 상온(15-24℃)에서 운전하는 연구들이 진행되었다.^{18,21)} 본 연구에서는 앞선 사례들(200-400 mg-N/L)보다 상대적으로 낮은 유입 질소 농도(100 mg-N/L)에서 상온 CANON 운전이 가능함을 확인할 수 있었다. 온도 전환 초기에는 부분 질산화 반응이 억제되어 암모니아성 질소가 거의 제거 되지 않았다. 그 이후 암모니아성 질소 제거 효율이 증가하였지만, 아질산성 질소 축적 현상이 발견되는 등 불안정한 ANAMMOX 반응이 나타났다. 온도 전환 20일 이후에는 유출수 아질산성 질소 및 암모니아성 질소 농도가 동시에 감소하였고, 비록 37±1℃ 온도 조건보다 낮지만 성공적인 CANON 반응이 일어났다(Fig. 2). 이때의 FA 농도는 2.8±1.4 mg/L이었는데, 이는 37±1℃ 온도 조건의 4.3±1.4 mg/L(유입 질소 농도 100 mg-N/L)과 3.3±1.8 mg/L(유입 질소 농도 50 mg-N/L)보다 낮은 수치였지만, 50 mg-N/L 농도 조건의 사례를 볼 때 FA 농도 저하가 CANON 반응에 큰 영향을 주지는 않은 것으로 사료된다. FA 농도보다는 온도 저하에 따른 AOB와 ANAMMOX균의 활성저하가 CANON 효율 저하에 더 큰 영향을 준 것으로 추측된다.

3.4. 미생물군집 분석

각 조건에 따른 CANON의 DGGE 결과를 분석하였고(Table 3, Fig. 4), DGGE profile을 이용한 주성분 분석을 수행하였다(Fig. 5).

Table 3. Microbial community of 16S rRNA gene sequences obtained from DGGE bands in the CANON reactor

Band no.	Closet 16S rRNA gene sequence	Accession no.	Similarity (%)	Phylum	Source	References
1	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: B-3	AB775667	99	Environmental samples	Biofilm in swine wastewater activated sludge facility with anammox activity	Yamagishi ²²⁾
2	Uncultured bacterium clone KIST-JJY-GR86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ237359	96	Environmental samples	Anammox bioreactor	Bae ²³⁾
3	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: B45	AB780932	100	<i>Chloroflexi</i>	Biogas slurry treating corn straw	Qiao ²⁴⁾
4	Uncultured bacterium clone KIST-JJY036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EF654705	84	Environmental samples	Mixed granule from anammox reactor	Bae ²³⁾
5	<i>Nitrosomonas</i> sp. IWT514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AF363293	99	<i>Proteobacteria</i>	Ammonium oxidizing bacteria	Wang ²⁵⁾
6	Uncultured bacterium clone ASNR-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ809249	98	Environmental samples	Autotrophic nitrogen removal in granular sludge bed reactor	Fukushima ²⁶⁾
7	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU17	AB576911	99	Environmental samples	Denitrifying PGE pellet samples	Isaka ²⁷⁾
8	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: HIC442-11 (OTU HF)	AB740402	99	Environmental samples	Activated sludge	Fukushima ²⁶⁾
9	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone c5LKS95	AM086156	90	Environmental samples	Lake profundal sediment	Schwarz ²⁸⁾
10	Uncultured bacterium clone PAE-EN23_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC238408	99	Environmental samples	Anammox enrichment bioreactor	Bae ²³⁾
11	Uncultured <i>planctomycete</i> clone JZ44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ861342	100	<i>Planctomycetes</i>	Peanut rhizosphere soil	Wang ²⁵⁾

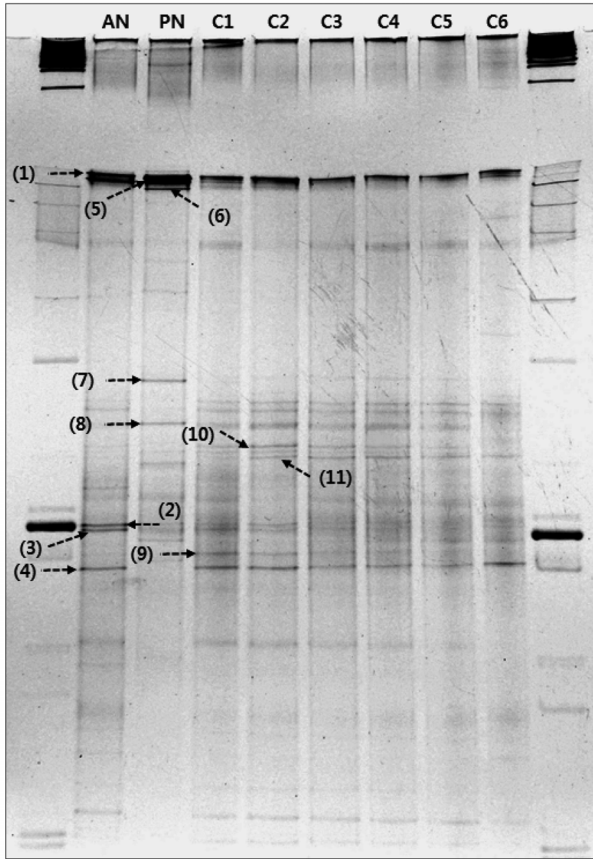


Fig. 4. DGGE profile of partial 16S rRNA gene obtained from CANON reactor. PN: inoculum from partial nitrification, AN: inoculum from ANAMMOX, C1: initial of phase I (5th day), C2: end of phase I (40th day), C3: end of phase II (62th day), C4: end of phase III (83th day), C5: end of phase IV (111th day), C6: end of phase V (142th day).

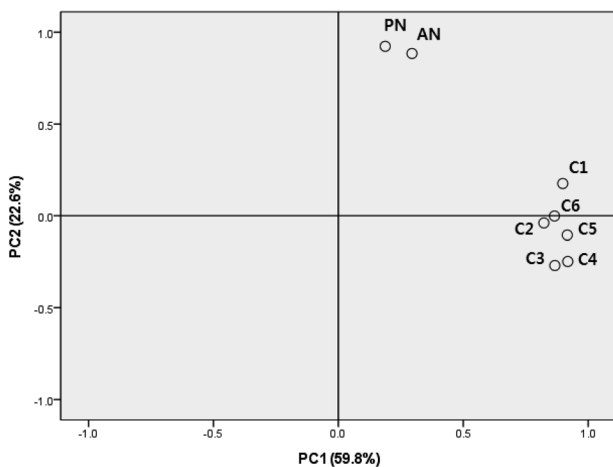


Fig. 5. Principal Component Analysis (PCA) based on the DGGE profile. PN: inoculum from partial nitrification, AN: inoculum from ANAMMOX, C1: initial of phase I (5th day), C2: end of phase I (40th day), C3: end of phase II (62th day), C4: end of phase III (83th day), C5: end of phase IV (111th day), C6: end of phase V (142th day).

식중원인 ANAMMOX 슬러지(AN) 및 부분질산화 슬러지 (PN)와 ANAMMOX 운전조건 및 CANON 운전조건의 슬러지 샘플 C1-6 그룹이 확연한 차이를 나타냈다(Fig. 5). 반면 ANAMMOX로 운전한 조건(C1-2)과 농도 및 온도에 따른 CANON 조건(C3-6)의 band 경향은 거의 유사하였는데, 이는 조건 변화에 따른 성능의 차이는 있을지언정 CANON 반응기 내에 존재하는 미생물군집은 거의 변화가 없었다는 것을 의미한다. 따라서 AOB와 ANAMMOX균을 식중하여 CANON을 성공적으로 유도한다면 농도나 온도에 변화에도 안정적인 미생물군집을 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

Band 1은 ANAMMOX 활성화에 관여하는 생물막에서 발견된 종과 99% 유사한 것으로 나타났으며, 모든 조건에서 발견되어 본 연구의 CANON 반응에 큰 영향을 미친 것으로 추측된다.²²⁾ Band 2와 4는 ANAMMOX 반응기에서 발견된 균과 각각 96%, 84%의 유사도를 나타냈는데, band 2는 CANON으로 전환한 이후 거의 사라졌지만, band 4는 모든 CANON 조건에서 발견되었다. Band 3은 *chloreoflexi*와 100% 유사하였지만, band 2와 비슷하게 CANON 조건에서는 발견되지 않았다. Band 10은 ANAMMOX 반응기에서 발견된 균과 99%의 유사도를 나타냈는데, ANAMMOX 식중원에서는 발견되지 않다가 CANON의 ANAMMOX 조건에서 발현되기 시작하여 이후 CANON 조건에서도 계속 존재하였고, 상온 조건에서는 다시 발견되지 않았다. Band 11은 *Planctonmycetes* 문에 속하는 partial sequence와 100%의 유사도를 나타냈는데, band 10과 유사한 경향을 나타냈지만, 이 band는 상온 조건에서도 발견되었다. Band 9는 ANAMMOX 조건인 C1과 C2에서만 발견되었다.

AOB 식중원에서 발견된 band 5는 *Nitrosomonas* sp.와 99%의 유사도를 보였지만, CANON 반응기에 식중한 후에는 거의 발견되지 않았다. 따라서 이 균은 500 mg-N/L의 유입 질소농도 조건에서 활성화되는 것으로 추측되며, 100 mg-N/L 및 50 mg-N/L인 본 연구에서는 성장하기 어려웠던 것으로 판단된다. 탈질화에 관여하는 균과 99%의 유사도를 보였던 band 7은 CANON 조건에서는 나타나지 않았다.

4. 결론

본 연구에서는 저농도 질소 제거를 위한 CANON을 구축하였고, 유입수의 암모니아성 질소농도 저하 및 반응기 DO 농도 조절, 상온에서의 운전 등을 통한 CANON의 성능을 평가하였으며, 각 조건에 따른 미생물 군집 분석을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 유입 암모니아성 질소 농도가 100 mg-N/L일 때 DO 농도가 0.4 mg/L 이상인 경우에는 CANON 성능이 악화되었고, DO 농도를 0.3 mg/L로 유지할 경우 70% 이상의 질소제거효율을 나타내었다.
- 2) 유입수 암모니아성 질소의 농도를 50 mg-N/L으로 낮추

었다가 다시 100 mg-N/L로 증가시키자 14일 만에 CANON 성능이 이전으로 회복되었고, 이후 76.1±4.9%의 총 질소 제거효율을 나타냈다.

3) CANON을 상온으로 전환하자 초기 3일 동안은 불안정한 부분 질산화 및 ANAMMOX 반응이 일어났지만, 23일 이후에 70.0±2.6%의 총 질소제거효율을 나타냈다.

4) 미생물군집 분석 결과, AOB와 ANAMMOX균을 식중하여 CANON을 성공적으로 유도한다면 농도나 온도에 변화에도 안정적인 미생물군집을 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

KSEE

References

1. Kartal, B., Kuenen, J. G. and Van Loosdrecht, M. C. M., "Sewage treatment with anammox," *Sci.*, **328**(5979), 702~703(2010).
2. Strous, M., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3248~3250(1999).
3. Chamchoi, N., Nitorisavut, S. and Schmidt, J. E., "Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification," *Bioresour. Technol.*, **99**(9), 3331~3336(2008).
4. Kampschreur, M. J., van der Star, W. R. L., Wielders, H. A., Mulder, J. W., Jetten, M. S. M., van Loosdrecht, M. C. M., "Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment," *Water Res.*, **42**(3), 812~826(2008).
5. Dosta, J., Fernandez, I., Vazquez-Padin, J. R., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., Mata-Alvarez, J. and Mendez, R., "Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process," *J. Hazard. Mater.*, **154**(1-3), 688~693(2008).
6. Van Hulle, S. W. H., Vandeweyer, H. J. P., Meesschaert, B. D., Vanrolleghem, P. A., Dejjans, P. and Dumoulin, A., "Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams," *Chem. Eng. J.*, **162**(1), 1~20(2010).
7. Denac, M., Uzman, S., Tanaka, H. and Dunn, I. J., "Modeling of experiments on biofilm penetration effects in a fluidized bed nitrification reactor," *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1841~1861 (1983).
8. Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., Van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen J. J., "The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonia-rich wastewater," *Water Sci. Technol.*, **37**, 135~142(1998).
9. Surmacz-Gorska, J., Cichon, A. and Miksch, K., "Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification," *Water Sci. Technol.*, **36**(10), 73~78(1997).
10. Wang, S. Y., Gao, D. W., Peng, Y. Z., Wang, P. and Yang, Q., "Nitrification denitrification via nitrite for nitrogen removal from high nitrogen soybean wastewater with on-line fuzzy control," *Water Sci. Technol.*, **49**(5-6), 121~127(2004).
11. Kuai, L. and Verstraete, W., "Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(11), 4500~4506(1998).
12. Jetten, M. S. M., Schmid, M., Schmidt, I., Wubben, M., Van Dongen, U. and Abma, W., "Improved nitrogen removal by application of new nitrogen cycle bacteria," *Rev. Environ. Sci. BioTechnol.*, **1**, 51~63(2002).
13. Wouter, R. L. Van der Star, Abma, W. R., Blommers, D., Mulder, J.-W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C. and Mark, C. M. Van Loosdrecht., "Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam," *Water Res.*, **44**(18), 4149~4163(2007).
14. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J., "16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study," *J. Bacteriol.*, **137**(2), 697~703(1991).
15. Nishimura, M., Kita-T., Kogure K., Ohwasa K. and Simidu U. A., "New method to detect viable bacteric in natural seawater using 16S rRNA Oligonucleotide probe," *J. Oceanog.*, **49**, 51~56(2003).
16. Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Franzmann, P. D. and Puhakka, J. A., "Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal and sulfate-containing wastewater," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **47**, 279~289(2004).
17. Jung, J., Kang, S., Chung, Y. and Ahn, D., "Factors affecting the activity of anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor," *Water Sci. Technol.*, **55**(1), 459~468 (2007).
18. Vazquez-Padin, J. R., Pozo, M. J. Jarpa, M., Figueroa, M., Franco, A., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L. and Mendez R., "Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process," *J. Hazard. Mater.*, **166**, 336~341(2009).
19. Jin, R., Yang, G., Yu, J. and Zheng, P., "The inhibition of the Anammox process: A review," *Chem. Eng. J.*, **197**(15), 67~79(2012).
20. Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. S. and Srinath, E. G., "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid," *J. Water Pollut. Contro.*, **48**, 835~852(1976).
21. Chang, X., Li, D., Liang, Y., Yang, Z., Cui, S., Liu, T., Zeng, H. and Zhang, J., "Performance of a completely autotrophic nitrogen removal over nitrite process for treating wastewater with different substrates at ambient temperature," *J. Environ. Sci.*, **25**(4), 688~697(2013).
22. Yamagishi, T., Takeuchi, M., Wakiya, Y. and Waki, M., "Distribution and characterization of anammox in a swine wastewater activated sludge facility," *Water Sci. Technol.*, **67**(10),

- 2330~2336(2013).
23. Bae, H., Chung, Y. C. and Jung, J. Y., "Microbial community structure and occurrence of diverse autotrophic ammonium oxidizing microorganisms in the anammox process," *Water Sci. Technol.*, **61**(11), 2723~2732(2010).
 24. Qiao, J. T., Qiu, Y. L., Yuan, X. Z., Shi, X. S., Xu, X. H. and Guo, R. B., "Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw," *Bioresour. Technol.*, **143**, 512~518(2013).
 25. Wang, L., Zheng, P., Chen, T., Chen, J., Xing, Y., Ji, Q., Zhang, M. and Zhang, J., "Performance of autotrophic nitrogen removal in the granular sludge bed reactor," *Bioresour. Technol.*, **123**, 78~85(2012).
 26. Fukushima, T., Whang, L. M., Chiang, T. Y., Lin, Y. H., Chevalier, L. R., Chen, M. C. and Wu, Y. J., "Nitrifying bacterial community structures and their nitrification performance under sufficient and limited inorganic carbon conditions," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**(14), 6513~6523(2013).
 27. Isaka, K., Kimura, Y., Osaka, T. and Tsuneda, S., "High-rate denitrification using polyethylene glycol gel carriers entrapping heterotrophic denitrifying bacteria," *Water Res.*, **46**(16), 4941~4948(2012).
 28. Schwarz, J. I., Eckert, W. and Conrad, R., "Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel)," *Syst. Appl. Microbiol.*, **30**(3), 239~254(2007).