

암모니아 부분산화 공정의 제어와 미생물 군집의 변화

안조환[†]

동경농공대학 화학공학과

Influence of FA and FNA to Microbial Community in Sequencing Batch Ammonium Partial Nitrification System

Johwan Ahn[†]

Department of Chemical Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan

(Received 24 March 2015, Revised 26 June 2015, Accepted 21 July 2015)

Abstract

A sequencing batch reactor was operated under different pH conditions to see the influence of free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) to microbial community on ammonium partial nitrification. Long-term influences of FA and FNA were evaluated by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. Nitrite accumulation was successfully achieved at pH 8.2 and 6.3. The shifts in the microbial community were observed when influent ammonia concentration increased to 1 g NH₄-N/L at pH 8.2, and then when pH was dropped to 6.3. Both *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* were selected during the startup of the reactor, and eventually became dominant members as ammonia-oxidizing bacteria. The results of molecular microbiological analysis strongly suggested that the composition of microbial community was changed according to the method used to control nitrite-oxidizing bacteria.

Key words : Ammonia-oxidizing bacteria, Fluorescence in situ hybridization, Free ammonia, Free nitrous acid, Nitrite-oxidizing bacteria, Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis

1. Introduction

고농도 암모니아를 함유한 폐수가 적절히 처리되지 못하고 배출되면 악취, 지하수 오염, 방류수역의 생태계 독성 및 부영양화 등 다양한 환경문제를 야기한다. 이를 방지하기 위해 다양한 종류의 질소제거 공정이 개발되어 이용되고 있다. 생물학적 방법인 MLE (Modified Ludzack-Ettinger) 공정이 대표적이며, 다양한 종류의 폐수에 적용할 수 있고 처리효율도 높아 널리 사용되고 있다. 이 공정은 암모니아를 호기성 조건에서 질산염으로 산화시킨 후, 내부순환을 통해 무산소 조건에서 질소가스로 환원시켜 제거한다. 그러나 질소 대비 탄소의 비가 낮은 폐수의 경우, 생물학적 처리를 위한 적정 C/N비의 유지가 어렵기 때문에 탈질효율 향상을 위해 메탄올과 같은 외부 탄소원의 주입이 필요하다(Rittmann and McCarty, 2001).

최근에는 기존 생물학적 질소제거 공정의 단점을 보완할 수 있는 공정들이 개발되어 사용되고 있는데 암모니아를 아질산염까지만 부분적으로 산화시킨 후, 질소가스로 환원

시켜 제거하는 단축질소제거 공정이 대표적이다(Choi et al., 2000). 이 공정은 크게 암모니아의 부분산화와 아질산염의 탈질 공정으로 구성되어 있다. 기존 공정에 비해 이론적으로 암모니아 산화 과정에서 산소 요구량을 약 25% 절감할 수 있고, 탈질 시 필요한 유기물 요구량도 메탄올 기준으로 약 40%나 절감할 수 있어 경제적인 것으로 알려져 있다(Hellinga et al., 1998).

단축질소제거 공정의 성공적인 운영을 위해서는 암모니아가 질산염으로 완전히 산화되지 않도록 아질산염 산화균의 적절한 제어가 필요하다. 암모니아 부분산화 공정은 이를 위해 아질산염 산화균의 활성 및 성장이 고히형물 체류시간(Jetten et al., 1997), 온도(Fdz-Polanco et al., 1994), 용존산소(Hanaki et al., 1990) 그리고 FA (Free ammonia)와 FNA (Free nitrous acid) (Anthonisen et al., 1976) 등의 특정 운전조건에서 암모니아 산화균보다 크게 저해되는 생리학적 특징을 이용한다. 일례로 SHARON 공정은 아질산염 산화균의 제어를 위해 높은 온도(>25°C)와 짧은 고히형물 체류시간(<1일) 조건을 이용한다(Logemann et al., 1998).

이와 같이 암모니아 부분산화 공정의 제어방법은 잘 정립되어 있는 반면 이들 운전조건이 미생물 군집에 미치는 영향과 그에 따른 동력학적 특성의 변화는 일부만 알려져 있다. 암모니아 부분산화 공정에서 용존산소 농도에 따라 변화하는 암모니아 산화균의 군집은 용존산소에 대한 친화

[†] To whom correspondence should be addressed.
johwahn@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

력도 크게 달라져 동력학적으로 서로 다른 특징을 가지는 것으로 알려져 있다(Park and Noguera, 2004). 더욱이 pH 변화에 따라서도 암모니아 산화균의 군집과 암모니아 산화력에 큰 변화가 있는 것으로 알려져 있다(Nicol et al., 2008). 이와 같은 결과는 암모니아 부분산화 공정에서 관찰되는 대표적 암모니아 산화균인 *Nitrosomonas* (*Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomonas*)과 *Nitrospira* (*Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*)의 생리학적 특징이 서로 상이하어 운전조건에 따라 이들 미생물의 종류나 우점화 정도가 다양하기 때문이다. 또한 암모니아 산화 고미생물(Archaea)에서도 이와 유사한 결과가 관찰되는 것으로 알려져 있다(Stempfhuber et al., 2015). 따라서 미생물 군집의 구조는 결국 암모니아 부분산화 공정의 동력학적 특성에 큰 영향을 미치게 된다.

이에 본 연구에서는 생물학적 회분식 암모니아 부분산화 공정에서 FA와 FNA를 이용한 아질산염 산화균의 제어방법이 암모니아 산화균의 산화능력과 군집에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)와 FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) 분석법을 이용하여 미생물 군집을 분석하고, 그 결과를 수질분석 결과와 함께 논의 하였다.

2. Materials and Methods

2.1. 생물학적 회분식 반응기 운전

암모니아 부분산화 공정에서 FA와 FNA가 미생물 군집에 미치는 영향을 알아보기 위해 20°C로 유지되는 실험실에서 합성폐수를 이용하여 3.6 L의 회분식 반응기를 약 100일간 운전하였다.

암모니아 산화균의 빠른 우점화를 도모하기 위해 운전초기에 매립지 침출수를 처리하는 활성 슬러지 공정에서 채취한 슬러지를 접종한 후, pH 운전조건에 따라 두 단계로 나누어 회분식 반응기를 운전하였다. 첫 번째 단계에서는 FA의 영향을 관찰하기 위해 아질산염의 원활한 축적이 관찰된 28일째부터 pH 8.2의 조건에서 암모니아의 농도를 1 g-N/L까지 단계적으로 증가시켜 38일간 운전하였다. 두 번째 단계에서는 FNA의 영향을 알아보기 위해 66일째부터 pH를 점진적으로 6.3까지 낮추어 39일간 운전하였다. 이를 실현하기 위해 회분식 반응기를 운전하는 동안 pH 콘트롤러(YPMS-48, DDK, Japan)를 사용하여 pH 운전조건을 유지하였다.

회분식 반응기의 운전은 일일 3 사이클로 하였으며, 1 사이클은 합성폐수 주입 8분, 호기성 조건 412분, 침전 45분 그리고 처리수 배출 15분 등 총 480분으로 구성하였다. 1 사이클 당 1.2 L의 합성폐수를 처리하여 24시간의 수리학적 체류시간을 유지하였고, 특정 고형물 체류시간을 유지하기 위해 반응기에서 잉여 슬러지를 제거하지는 않았다. 한편, 운전기간 동안 미생물의 반응을 원활히 유지하기 위해 임펠러를 이용하여 분당 약 250 rev.의 속도로 교반하였으며, 호기성 조건을 유지하기 위해 분당 50~200 mL의 공기

를 공급하였다.

2.2. 합성폐수

합성폐수는 1.0 L 당 (NH₄)₂SO₄ 4.718 g (1 g-N), K₂HPO₄ 0.027 mg, NaCl 600 mg, MgSO₄·7H₂O 280 mg, CaCl₂·2H₂O 120 mg, NaHCO₃ 300 g, 그리고 미량원소 FeSO₄·7H₂O 3.3 mg, MnSO₄·H₂O 3.3 mg, CuCl₂·2H₂O 0.8 mg, ZnSO₄·7H₂O 1.7 mg, NiSO₄·6H₂O 0.3 mg을 포함되도록 준비하였다(Terada et al., 2013).

2.3. 화학적 분석

회분식 반응기에서 얻은 시료의 암모니아성 질소, 아질산성 질소 및 질산성 질소 농도는 이온크로마토그램(ICS1000 and ICS90, Dionex, USA)을 이용하여 측정하였고, 휘발성 고형물질(Volatile suspended solids) 농도는 Standard method (APHA, AWWA, and AWEF, 1999)의 분석법을 이용하여 측정하였다.

2.4. 생물학적 분석

분자 생물학적 분석은 각각의 운전조건에서 주기적으로 채취한 슬러지 시료를 이용하여 수행하였다. PCR-DGGE 분석에서는 FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals, USA)를 이용하여 슬러지 시료에서 추출한 DNA를 유니버설 프라이머로 증폭하고, 아크릴아마이드 겔로 분리한 후, 이미지 분석을 실시하였다. PCR 증폭은 GC 크래프트를 가진 341f (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') (Muyzer et al., 1993)와 907r (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') (Lane et al., 1985) 프라이머를 이용하여 94°C에서 60초간 denaturation, 52°C에서 60초간 annealing, 72°C에서 60초간 extension을 30 사이클 반복하고 마지막 사이클에서 15분간 extension 하는 조건에서 Thermal cycler (TP600, Takara, Japan)로 수행하였다. DGGE 분리는 PCR로 증폭한 16S rRNA 농도를 분광광도계(NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific, USA)로 측정해 일정한 마운팅 농도가 되도록 염색약과 혼합한 후, 20~80%의 변성제 농도구배를 가진 아크릴아마이드 겔에서 DCode universal mutation detection system (Bio-Rad, USA)으로 수행하였다. 이후 아크릴아마이드 겔을 SYBR-gold (Molecular Probes, Japan)로 염색하여 이미지 파일을 얻었다. 이 이미지를 ImageJ (IJ 1.46r, National Institutes of Health, USA)로 밴드의 형광강도를 분석한 후, PHYLIP (V3.6, University of Washington, USA)을 이용하여 UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Algorithm) 클러스터 분석법으로 미생물 군집의 변화를 분석하였다.

한편, FISH 분석에서는 암모니아 산화균의 검출을 위해 Fig. 1에 나타난 것과 같이 FITC로 레이블링한 EUB_{mix} (EUB338-I, II, III) (Amann et al., 1995; Daims et al., 1999)와 Cy3로 레이블링한 NEU (Wagner et al., 1995) 혹은 Nsv443 (Mobarry et al., 1996) 프로브를 함께 이용하여 하이브리다이제이션을 실시한 후, 현광 현미경(BZ-9000, Keyence, Japan) 분석을 실시하였다.

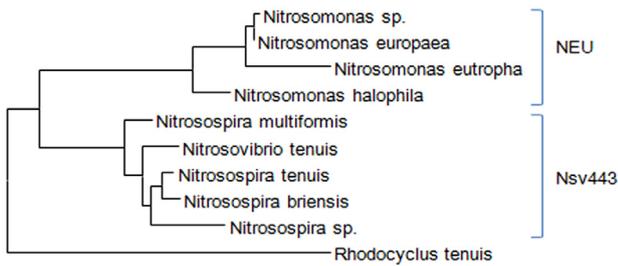


Fig. 1. Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing bacteria detected by NEU and Nsv443 probes.

3. Results and Discussion

3.1. 암모니아 산화능력

pH 운전조건에 따라 두 단계로 나누어 운전한 회분식 반응기의 암모니아 산화능력을 Fig. 2에 나타내었다. 암모니아 산화균의 우점화를 위해 pH 8.2의 운전조건에서 유입수의 암모니아 농도와 폭기량을 300 mg-N/L와 50 mL/min으로 제한한 운전초기에는 소량의 암모니아만 질산염으로 산화되었고, 나머지 암모니아는 산화되지 못한 채 배출되어 아질산염의 축적이 관찰되지 않았다. 그러나 17일째부터 서서히 아질산염의 축적이 관찰되기 시작하여 27일째에는 아질산염 농도가 약 0.2 g-N/L에 이르렀다. 이에 28일째부터 FA의 영향을 관찰하기 위하여 암모니아 농도와 폭기량을 1 g-N/L와 200 mL/min이 되도록 단계적으로 증가시켜 39일간 운전하였다. 그 결과, 원활한 암모니아의 부분산화가 진행되어 아질산염 축적이 관찰된 반면 질산염은 거의 검출되지 않았다. 이는 회분식 반응기의 특성상 사이클 초기에 형성되는 높은 농도의 FA가 아질산염 산화균의 활성 및 성장을 크게 억제할 수 있었기 때문으로 판단된다. FA는 아질산염 산화균이 아질산염을 산화시킬 때 활성화되는 nitrite oxidoreductase의 경쟁적 저해인자(Yang and Alleman et al., 1992)

로 약 6 mg-N/L의 농도에서 대표적 아질산염 산화균인 *Nitrobacter*의 성장을 완전히 저해하는 것으로 알려져 있다(Vadivelu et al., 2007). 따라서 사이클 초기에 형성되는 약 26.3 mg-N/L의 고농도 FA가 아질산염 산화균의 제어를 통해 아질산염의 산화를 억제할 수 있었던 것으로 판단된다.

66일째부터는 FNA의 영향을 관찰하기 위하여 pH 운전 조건을 8.2에서 6.3까지 단계적으로 낮추어 38일간 운전하였다. 이 기간 동안에도 모든 암모니아가 아질산염으로 전환되어 축적된 반면 질산염의 축적은 거의 관찰되지 않았다. 이는 Fig. 3에서 알 수 있듯이 암모니아 산화가 진행되는 동안 FNA 농도가 최대 1.29 mg-N/L까지 증가해 아질산염 산화균의 활성 및 성장을 억제할 수 있었기 때문으로 판단된다. FNA는 이들 미생물의 ATP 생산을 저해하는 언커플러(Glass et al., 1997)로 약 0.02 mg-N/L의 매우 낮은 농도에서도 *Nitrobacter*의 성장을 완전히 저해하는 것으로 알려져 있다(Vadivelu et al., 2007). 그러나 이 범위의 FNA 농도 또한 암모니아 산화균의 활성 및 성장에도 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 FNA의 영향인지 단정할 수 없지만 89일째 암모니아의 비질산화속도(Specific nitrification rate)는 0.314 mg-N/g-VSS·min으로 FA의 영향을 관찰하던 58일째의 0.329와 비교해 약간의 저해가 관찰되었으나 그 폭은 크지 않았다.

더욱이 암모니아 산화가 진행되는 동안 용존산소 농도가 0.5 mg-O₂/L 부근에서 유지 되었는데 이와 같이 낮게 유지된 용존산소 농도(Blackburne et al., 2008)와 유입수의 높은 염분 농도(0.6 g-NaCl/L) (Dinçer and Kargi, 1999) 또한 이들 미생물의 활성 및 성장 억제에 기여했을 것으로 판단된다.

이외에 사이클 초기에 암모니아가 포함된 합성폐수가 유입된 직후, FA 농도가 약 0.31 mg-N/L까지 증가하지만 농도가 낮아 아질산염 산화균 제어에는 큰 기여를 하지 못했을 것으로 판단된다.

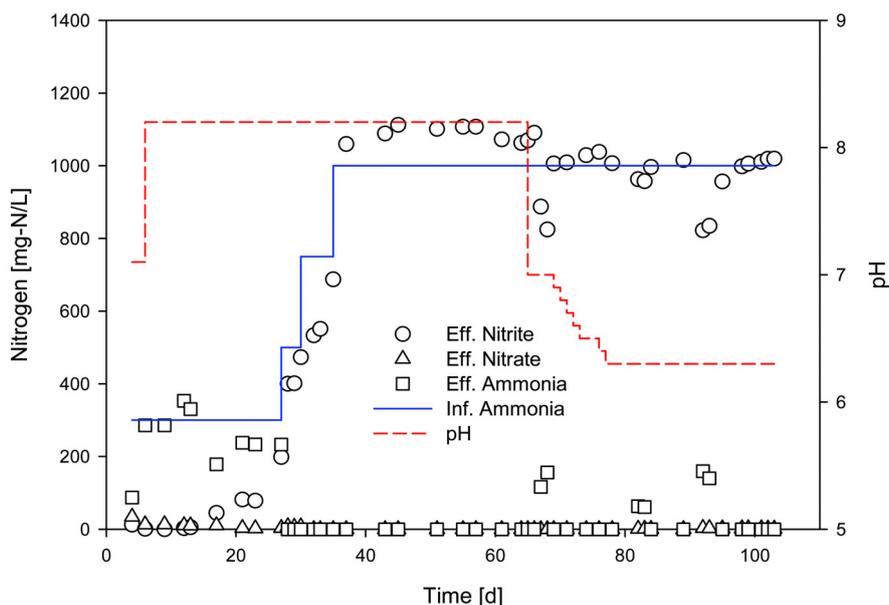


Fig. 2. Daily effluent N concentrations under different operational pH conditions.

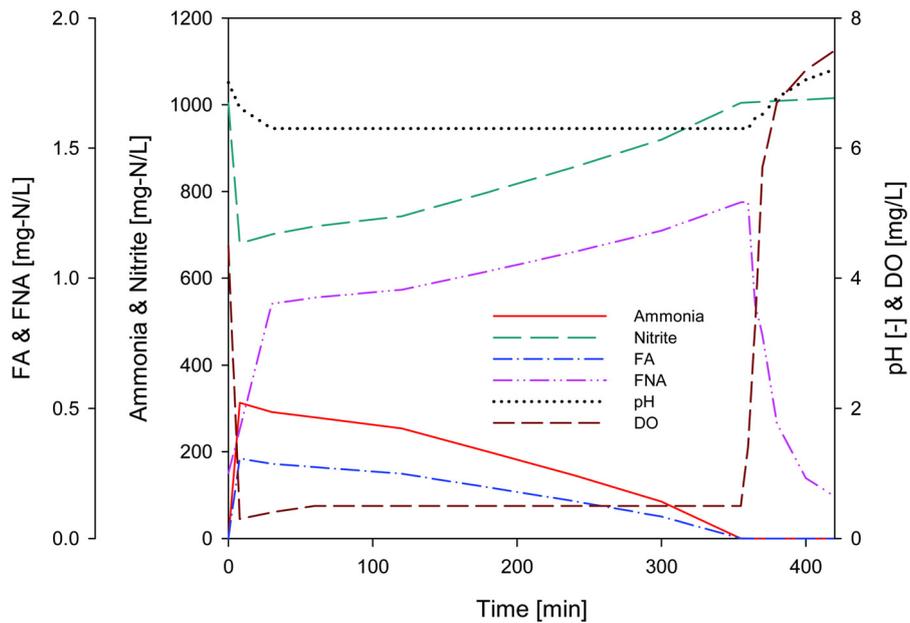


Fig. 3. Typical profiles of the N transformations occurring in the SBR on day 78.

한편, 본 연구에서는 회분식 반응기의 고형물 체류시간이 길기 때문에 생물막 반응기와 같은 유사한 서식환경이 형성되어 아질산염 산화균에 의한 질산염 축적이 예상되었다. 그러나 운전초기를 제외하고는 질산염이 거의 검출되지 않았는데 이는 종속영양세균에 의해 형성된 응결체(Aggregates)가 아질산염 산화균보다 암모니아 산화균이 성장하기에 좋은 서식처를 제공했기 때문으로 사료된다. 응결체는 미생물체외대사물질(Extracellular polymeric substances)의 집합체로 외부에서 내부로 물질이동이 제한적인 물리적 특성을 가지고 있다(Dytcak et al., 2006; Wilen et al., 2004). 따라서 응결체 외부에는 FA나 FNA의 농도가 높아 아질산염 산화균보다 암모니아 산화균이 우점화하기 쉬운 조건이 형성되고, 내부로 갈수록 FA나 FNA의 영향은 해소되지만 용존산소 농도가 낮아져 암모니아 산화균이 우점화하기 쉬운 조건이 형성된다. 결국, 이들 암모니아 산화균 및 아질산염 산화균의 생리학적 특징과 응결체의 물리적 특성이 아질산염 산화균의 활성을 크게 억제했을 것으로 판단된다. 더욱이 암모니아 산화가 진행되는 동안 용존산소 농도가 0.5 mg-O₂/L 이하로 유지된 점 또한 아질산염 산화균 제어에 크게 기여했을 것으로 판단된다.

3.2. 미생물 군집의 변화

회분식 반응기에서 주기적으로 채취한 시료를 PCR-DGGE로 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 회분식 반응기의 운전기간 동안 다수의 밴드에서 형광강도의 변화가 관찰되었는데 4개의 밴드(1, 2, 3, 7)가 완전히 사라지고, 2개의 밴드(4, 5)에서 형광강도가 증가한 것으로 나타났다. 또한 암모니아 산화균의 우점화 기간(a, b)과 비교해 FA 농도가 높게 운전된 기간(c, d) 동안 4개의 밴드(6, 8, 9, 10, 11)에서 형광강도가 감소하지만 FNA 농도가 높게 운전된 기간(e) 동안에는 다시 증가한 것으로 나타났다. 한편, FA 농도가

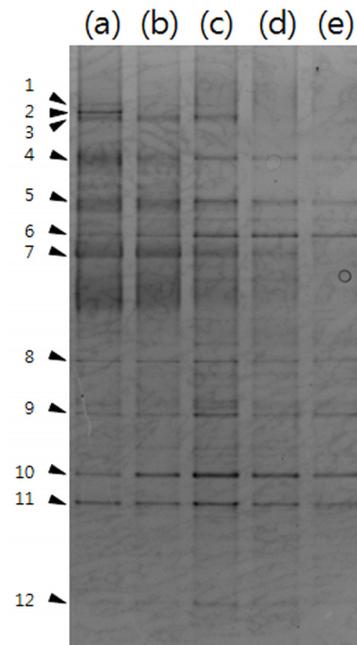


Fig. 4. DGGE profiles of 16S rRNA gene, PCR-amplified fragments using universal primers with DNA extracted from biomass samples collected from the SBR on (a) day 22, (b) 36, (c) 54, (d) 65 and (e) 86.

높게 운전된 기간에만 출현한 밴드(12) 1개도 관찰되어 아질산염 산화균의 제어방법에 따른 미생물 군집의 변화가 강하게 시사되었다.

이에 암모니아 부분산화 공정의 미생물 군집이 어떻게 그리고 얼마만큼 변화했는지를 알아보기 위해 PCR-DGGE의 이미지에 나타난 각 밴드의 형광강도를 분석하여 얻은 비유사성 인덱스(Index of dissimilarity, D)를 이용하여 클러스터 분석을 실시하였다.

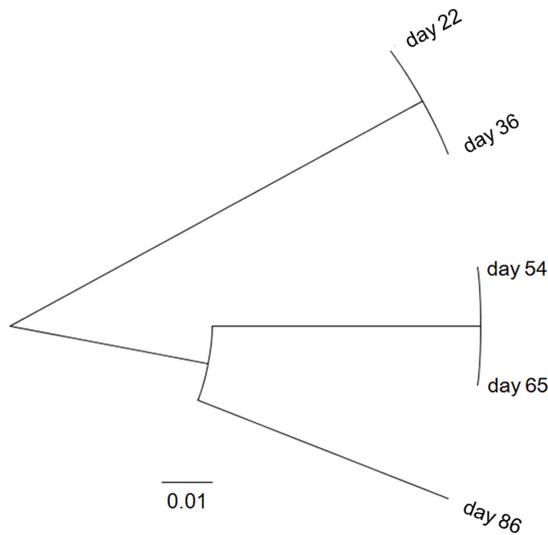


Fig. 5. UPGMA cluster analysis from fingerprint obtained by PCR-DGGE.

$$D(i, j) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n |f_{ki} - f_{kj}|$$

f_{ki} and f_{kj} : the fraction of the DGGE band intensity for the i and j samples

그 결과를 Fig. 5에 나타내었는데 회분식 반응기의 미생물 군집이 아질산염 산화균의 제어방법에 따라 큰 영향을 받은 것으로 나타났다. 암모니아 산화균의 우점화를 위해 FA와 FNA의 농도가 낮게 유지된 22일과 36일째의 미생물 군집에서는 변화가 거의 관찰되지 않았다. 또한 FA 농도가 동일한 54일과 65일째의 미생물 군집에서도 변화가 거의 관찰되지 않다. 그러나 암모니아 산화균의 우점화를 위해 FA와 FNA를 낮게 유지했을 때와 아질산염 산화균의 제어를 위해 FA 농도를 높게 유지했을 때의 미생물 군집을 비교하면 큰 변화가 관찰되었다. 더욱이 아질산염 산화균 제어방법을 FA에서 FNA로 변경했을 때에도 커다란 변화가 관찰되었다. 이와 같이 아질산염 산화균의 제어방법에 따라 미생물 군집에 변화가 관찰되었는데 이는 암모니아 산화균의 미생물 군집의 변화에서 기인한 것으로 사료된다. 일반적으로 FA와 FNA는 미생물에 강한 독성을 가지고 있어 암모니아 산화균의 대사와 성장에 부정적인 영향을 주지만 그 저해가 서로 다른 메커니즘을 통해서 이루어지고 저해 범위도 이들 미생물의 종류나 배양조건에 따라 다른 것으로 알려져 있다(Cua and Stein, 2011; Tan et al., 1998). 이는 FA가 암모니아 산화균의 성장에 관여하는 반면 FNA는 암모니아를 아질산성 질소로 산화하는데 관여하는 암모니아 산화효소(Ammonium monooxygenase)의 불활성에 특이적으로 관여하기 때문이다(Stein and Arp, 1998). 따라서 암모니아 부분산화 공정에서 아질산염 산화균의 제어를 위해 어떠한 방법이 사용되느냐에 따라 암모니아 부분산화 공정의 미생물 군집의 구조가 결정될 것으로 판단된다.

그러나 아질산염 산화균의 제어방법을 FA에서 FNA로

변화시켜 운전하는 동안 암모니아의 부분산화 능력에는 큰 변화가 관찰되지 않은 반면 미생물 군집에 큰 변화가 관찰되었는데 이는 암모니아 산화균 이외에도 이들과 함께 공존하고 있던 종속영양세균의 미생물 군집에도 변화가 있었기 때문으로 판단된다. 이 기간 동안 휘발성 고형물질 농도가 약 3.23 g-VSS/L에서 2.87로 감소한 것으로 나타났다.

3.3. 암모니아 산화균의 우점화

암모니아 산화균의 다양성 검토를 위해 NEU와 Nsv443 프로브를 이용하여 FISH 분석을 실시하였다. 그 결과를 Fig. 6에 나타내었는데 회분식 반응기의 운전과 함께 암모니아 산화균의 우점화가 관찰되었다. 운전초기 5일째 회분식 반응기의 슬러지에서는 적은 개체수의 암모니아 산화균만이 관찰되었는데 이는 대부분의 암모니아가 아질산염으로 산화되지 못하고 배출된 원인이었던 것으로 판단된다. 그러나 17일째부터 암모니아 산화능력이 향상되면서 안정적인 아질산염 축적과 함께 암모니아 산화균의 개체수가 급격히 증가하였는데 *Nitrosomonas*와 *Nitrosospira*의 우점화가 관찰되었다. 이들 암모니아 산화균 중에서 *Nitrosospira*의 우점화는 특이적인 것으로 *Nitrosomonas*와 비교해 하수처리장에서는 잘 관찰되지 않는 것으로 알려져 있다(Limpiyakorn et al., 2005; Wang et al., 2010). 이는 암모니아 산화균의 생리학적 특징이 서로 달라 서식환경에 따라 우점화종이 결정되기 때문인데 암모니아 농도가 높은 곳에서는 *N. europaea*, *N. eutropha*와 *N. mobilis*, 암모니아 농도가 낮은 곳에서는 *Nitrosospira*와 *Nitrosomonas oligotropha*의 우점화가 보고된 바 있다(Tan et al., 2008; Wang et al., 2010). 따라서 암모니아 농도가 사이클 초기에는 높게 유지되지만 질산화가 진행되면서 사이클 후기에는 낮아지는 회분식 반응기의 특성 때문에 *r-strategist*로 *Nitrosomonas*와 *K-strategist*로 *Nitrosospira*의 우점화가 가능했을 것으로 판단된다(Andrews and Harris, 1986).

더욱이 높은 농도의 FNA 또한 *Nitrosospira*의 우점화에 기여했을 것으로 판단되는데 높은 FNA 농도에서 *Nitrosospira*의 성장률이 *Nitrosomonas*보다 큰 것으로 알려져 있다. 또한 고농도의 염분도 *Nitrosospira*의 우점화에 기여했을 것으로 판단된다. 염분은 암모니아 산화균의 미생물 군집의 다양성을 감소시키고, *Nitrosospira*의 우점화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Bernhard et al., 2005; Freitag et al., 2006).

이들 암모니아 산화균 이외에도 고농도 염분에서 활성 및 성장을 유지할 수 있는 *N. mobilis*의 출현도 예상되었지만(Chen et al., 2003) *N. europaea* 및 *N. eutropha*와 계통학적으로 가까워 본 연구에서 사용한 프로브만으로는 검출할 수 없었기 때문에 이들 미생물의 우점화 여부는 확인할 수 없었다.

한편, 회분식 반응기 운전기간 동안 양호한 슬러지 침전성이 유지되었는데 유기물을 포함하지 않는 암모니아 폐수를 처리하는 암모니아 부분산화 공정에서는 잘 관찰되지 않는 현상이다. 이는 암모니아 산화균이 암모니아를 에너지와 환원력으로 이용하여 무기 탄소원인 이산화탄소를 고정

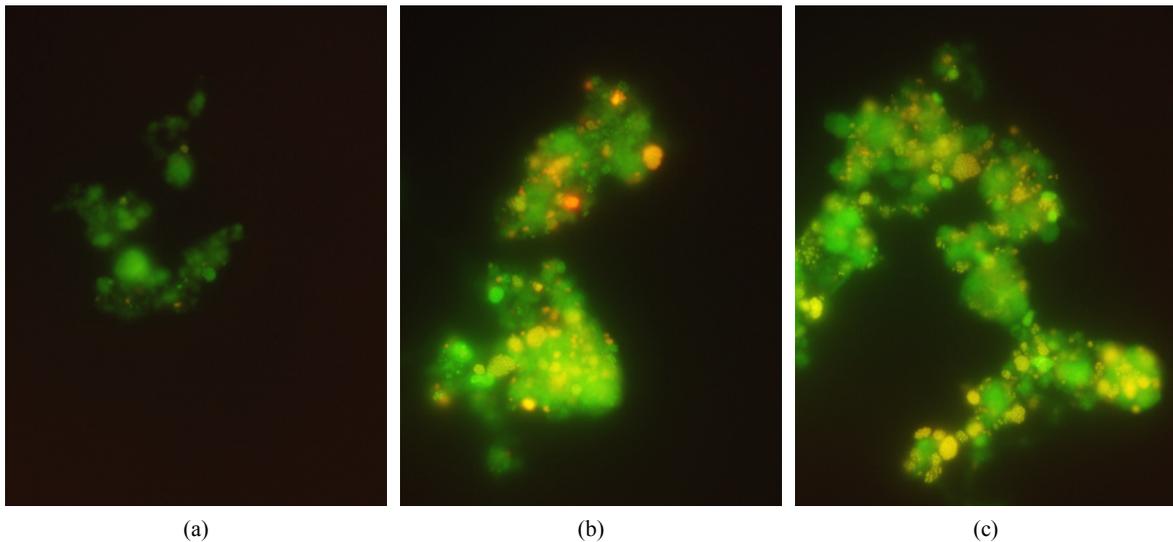


Fig. 6. Fluorescent images for the activated sludge samples obtained on (a) day 5 and (b and c) 80. FISH images show bacteria hybridized with (a and b) Nsv443 and (c) NEU probes.

해 성장하므로 성장속도가 늦고 미생물체외대사물질의 분비가 적어 응결체 형성도 어려워 침강성이 좋지 못하기 때문이다(Rittmann and McCarty, 2001). 이를 해결하기 위해 생물막 공정을 도입하기도 한다. 이외에도 낮은 용존산소농도, 높은 암모니아, 질산염, 염분 농도 혹은 낮은 pH와 같은 스트레스 요인에 의한 암모니아 산화균의 침전성 향상이나(De Boer et al., 1991) 응결체를 형성하는 거대구균(Large coccoid cells)의 형태학적 특징을 가지는 *N. europaea*의 출현(Vejmelkova et al., 2012)에 의해 양호한 슬러지 침전성이 유지되기도 한다.

그러나 본 연구에서는 이러한 형태학적 특징을 가진 암모니아 산화균의 출현이 관찰되지 않았고, FISH 분석에서 검출된 암모니아 산화균 대부분이 응결체에서 클러스터를 형성하고 있었다. 따라서 회분식 반응기를 운전하는 동안 관찰된 양호한 침전성은 응결체를 형성하는 종속영양세균의 공존에서 기인했을 것으로 판단된다. 본 연구에서와 같이 고형물 체류시간이 긴 운전조건에서는 호기성 미생물의 내생호흡에 의해 생성되는 용해성 미생물 산물(Soluble microbial products)이 증가하고, 이들 물질들은 종속영양세균에 이용되어 응결체의 형성을 용이하게 해주는 미생물체외대사물질로 전환되었기 때문에 이와 같은 침전성 향상 및 유지가 가능했을 것으로 판단된다.

4. Conclusion

본 연구에서는 FA와 FNA가 암모니아 부분산화 공정의 산화능력과 미생물 군집에 어떠한 영향을 미치는지 PCR-DGGE와 FISH 분석법을 이용하여 알아보았고, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1) 생물학적 회분식 암모니아 부분산화 공정을 운전하는 동안 FA와 FNA로 아질산염 산화균의 활성 및 성장을 성공적으로 제어할 수 있었다.

- 2) 회분식 반응기 운전기간 동안 암모니아 산화균의 개체수 증가와 함께 암모니아 산화능력이 향상되었는데 이 기간 동안 *Nitrosomonas*와 *Nitrospira*의 암모니아 산화균이 우점화하였다.
- 3) 암모니아 산화균의 우점화 단계 및 FA와 FNA에 의한 아질산염 산화균 제어 단계에서 특정 미생물의 우점화가 진행되거나 사라지는 등 미생물 군집의 구조에 커다란 변화가 나타났다.
- 4) 이와 같은 결과는 아질산염 산화균의 활성과 성장을 제어하기 위해 사용된 FA와 FNA를 이용한 제어방법이 암모니아 부분산화 공정의 미생물 군집을 이루고 있는 각각의 구성원에 미치는 영향이 다르기 때문으로 결국 동력학적 특징에도 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다.

References

- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp. 1919-1925.
- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation (APHA, AWWA, and AWEF). (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington D.C.
- Andrews, J. H. and Harris, R. F. (1986). r- and K-selection and Microbial Ecology, *Advances in Microbial Ecology*, 9, pp. 99-147.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B., and Srinath, E. G. (1976). Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid, *Water Pollution Control Federation*, 48, pp. 835-852.
- Bernhard, A. E., Donn, T., Giblin, A. E., and Stahl, D., A. (2005). Loss of Diversity of Ammonia-oxidizing Bacteria Correlates with Increasing Salinity in an Estuary System, *Environmental*

- Microbiology*, 7, pp. 1289-1297.
- Blackburne, R., Yuan, Z., and Keller, J. (2008). Partial Nitrification to Nitrite using :Low Dissolved Oxygen Concentration as the Main Selection Factor, *Biodegradation*, 19, pp. 303-132.
- Chen, G. H., Wong, M. T., Okabe, S., and Watanabe, Y. (2003). Dynamic Response of Nitrifying Activated Sludge Batch Culture to Increased Chloride Concentration, *Water Research*, 37, pp. 3125-3135.
- Choi, E., Lee, Y., Gil, K., and Yun, Z. (2000). Nitrogen Removal from Anaerobic Digester Supernatant Via Nitritation-denitritation, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 16, pp. 265-273. [Korean Literature]
- Cua, L. S. and Stein, L. Y. (2011). Effects of Nitrite on Ammonia-oxidizing Activity and Gene regulation in Three Ammonia-oxidizing Bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 319, pp. 169-175.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (1999). The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of All Bacteria: Development and Evaluation of a More Comprehensive Probe Set, *Systematic and Applied Microbiology*, 22, pp. 434-444.
- De Boer, W., Gunnewiek, P. J. A., Veenhuis, M., Bock, E., and Laanbroek, H. J. (1991). Nitrification at Low pH by Aggregated Chemolithotrophic Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, pp. 3600-3604.
- Diñçer, A. R., and Kargi, F. (1999). Salt Inhibition of Nitrification and Denitrification in Saline Wastewater, *Environmental Technology*, 20, pp. 1147-1153.
- Dytczak, M. A., Londry, K., Siegrist, H., and Oleszkiewicz, J. A. (2006). Extracellular Polymers in Partly Ozonated Return Activated Sludge: Impact on Flocculation and Dewaterability, *Water Science and Technology*, 54(9), pp. 155-164.
- Fdz-Polanco, F., Villaverde, S., and Garcia, P. A. (1994). Temperature Effect on Nitrifying Bacteria Activity in Biofilters: Activation and Free Ammonia Inhibition, *Water Science and Technology*, 30(11), pp. 121-130.
- Freitag, T. E., Chang, L., and Prosser, J. I. (2006). Changes in the Community Structure and Activity of Betaproteobacterial Ammonia-oxidizing Sediment Bacteria Along a Freshwater-marine Gradient, *Environmental Microbiology*, 8, pp. 684-696.
- Glass, C., Silverstein, J., and Oh, J. (1997). Inhibition of Denitrification in Activated Sludge by Nitrite, *Water Environment Research*, 69, pp. 1086-1093.
- Hanaki, K., Wantawin, C., and Ohgaki, S. (1990). Nitrification at Low Levels of Dissolved Oxygen with and Without Organic Loading in a Suspended-growth Reactor, *Water Research*, 24, pp. 297-302.
- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J. (1998). The SHARON Process: an Innovative Method for Nitrogen Removal from Ammonium-rich Waste Water, *Water Science and Technology*, 37(9), pp. 135-142.
- Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., and Robertson, L. A. (1997). Novel Principles in the Microbial Conversion of Nitrogen Compounds, *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, pp. 75-93.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., and Pace, N. R. (1985). Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, pp. 6955-6959.
- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., and Yagi, O. (2005). Communities of Ammonia-oxidizing Bacteria in Activated Sludge of Various Sewage Treatment plants in Tokyo, *FEMS Microbiology Ecology*, 54, pp. 205-217.
- Logemann, S., Schantl, J., Bijvank, S., van Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. G., and Jetten, M. (1998). Molecular Microbial Diversity in a Nitrifying Reactor System Without Sludge Retention, *FEMS Microbiology Ecology*, 27, pp. 239-249.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. (1996). Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, pp. 2156-2162.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified Genes Coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, pp. 695-700.
- Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J. I. (2008). The Influence of Soil pH on the Diversity, Abundance and Transcriptional Activity of Ammonia Oxidizing Archaea and Bacteria, *Environmental Microbiology*, 10, pp. 2966-78.
- Park, H. D. and Noguera, D. R. (2004). Evaluating the Effect of Dissolved Oxygen on Ammonia-oxidizing Bacterial Communities in Activated Sludge, *Water Research*, 38, pp. 3275-3286.
- Rittmann, B. and McCarty, P. L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principle and Applications*, McGraw-Hill, New York.
- Stein, L. Y. and Arp, D. J. (1998). Loss of Ammonia Monooxygenase Activity in Nitrosomonas Europaea Upon Exposure to Nitrite, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp. 4098-4102.
- Stempfhuber, B., Engel, M., Fischer, D., Neskovic-Prit, G., Wubet, T., Schöning, I., Gubry-Rangin, C., Kublik, S., Schloter-Hai, B., Rattei, T., Welzl, G., Nicol, G. W., Schrupf, M., Buscot, F., Prosser, J. I., and Schloter, M. (2015). pH as a Driver for Ammonia-Oxidizing Archaea in Forest Soils, *Microbial Ecology*, 69, pp. 879-883.
- Tan, N. C. G., Kampschreur, M. J., Wanders, W., van der Pol, W. L. J., van de Vossenberg, J., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. C. M., and Jetten, M. S. M. (2008). Physiological and Phylogenetic Study of an Ammonium-oxidizing Culture at High Nitrite Concentrations, *Systematic and Applied Microbiology*, 31, pp. 114-125.
- Terada, A., Sugawara, S., Yamamoto, T., Zhou, S., Koba, K., Hosomi, M. (2013). Physiological Characteristics of Predominant Ammonia-oxidizing Bacteria Enriched from Bioreactors with Different Influent Supply Regimes, *Biochemical Engineering Journal*, 79, pp. 153-161.
- Vadivelu, V. M., Keller, J., and Yuan, Z. (2007). Effect of Free Ammonia on the Respiration and Growth Processes of an Enriched Nitrobacter Culture, *Water Research*, 41, pp. 826-834.
- Vejmelkova, D., Sorokin, D. Y., Abbas, B., Kovaleva, O. L., Kleerebezem, R., Kampschreur, M. J., Muyzer, G., and van Loosdrecht, M. C. (2012). Analysis of Ammonia-oxidizing Bacteria Dominating in Lab-scale Bioreactors with High Ammonium Bicarbonate Loading, *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 93, pp. 401-410.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. P., and Schleifer, K. H. (1995). In Situ Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 18, pp. 251-264.
- Wang, X., Wen, X., Criddle, C., Wells, G., Zhang, J., and Zhao, Y. (2010). Community Analysis Ammonia-oxidizing Bacteria in Activated Sludge of Eight Wastewater Treatment Systems, *Journal of Environmental Sciences*, 22, pp. 627-634.
- Wilén, B. M., Gapes, D., Blackall, L. L., and Keller, J. (2004). Structure and microbial composition of nitrifying microbial aggregates and their relation to internal mass transfer effects, *Water Science and Technology*, 50(10), pp. 213-220.
- Yang, L. and Alleman, J. E. (1992). Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture, *Water Science and Technology*, 26, pp. 997-1005.