

메탄올 기반 탈질 공정의 고속화 및 탄소 섭취 특성

박수인^a · 전준범^{b,†} · 배효관^{c,†}

부산대학교 사회환경시스템공학과

High-rate Denitrifying Process Based on Methanol and Characteristics of Organic Carbon Uptake

Suin Park^a · Junbeom Jeon^{b,†} · Hyokwan Bae^{c,†}

Department of Civil and Environmental Engineering, Pusan National University

(Received 30 October 2020, Revised 30 November 2020, Accepted 30 November 2020)

Abstract

In this study, two types of reactors were operated to examine the properties of methanol uptake under the high-rate denitrification process. In a sequencing batch reactor, the denitrifying activity was enriched up to 0.80 g-N/g-VSS-day for 72 days. Then, the enriched denitrifying sludge was transferred to a completely stirred tank reactor (CSTR). At the final phase on Day 46-50, the nitrogen removal efficiency was around 100% and the total nitrogen removal rate reached 0.097 ± 0.003 kg-N/m³-day. During the continuous process, the sludge settling index (SVI₃₀) was stabilized as 118.3 mL/g with the biomass concentration of 1,607 mg/L. The continuous denitrifying process was accelerated by using a sequencing batch reactor (SBR) with a total nitrogen removal rate of 0.403 ± 0.029 kg-N/m³-day with a high biomass concentration of 8,433 mg-VSS/L. Because the reactor was open to ambient air with the dissolved oxygen range of 0.2-0.5 mg-O₂/L, an increased organic carbon requirement of 5.58 ± 0.70 COD/NO₃⁻-N was shown for the SBR in comparison to the value of 4.13 ± 0.94 for the test of the same biomass in a completely anaerobic batch reactor. The molecular analysis based on the 16S rRNA gene showed that *Methyloversatilis discipulorum* and *Hyphomicrobium zavarzini* were the responsible denitrifiers with the sole organic carbon source of methanol.

Key words : Bacterial community structure, Denitrification, Methanol, Specific denitrification rate

^a 석박사통합과정(Ph. D. student), starsinee@pusan.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-7363-8334>

^{b,†} Corresponding author, 석박사통합과정(Ph. D. student), swc7852@pusan.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-6454-7625>

^{c,†} Corresponding author, 교수(Professor), hyokwan.bae@pusan.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-2422-9411>

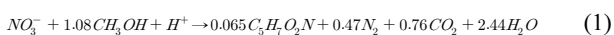
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

산업화와 급속한 경제 성장으로 인한 질소폐수와 같은 공정 오염물질은 적절한 처리 없이 수계로 유입되어왔다. 이는 자연계에 존재하는 질소 순환에 영향을 미쳤고 부영양화와 같은 심각한 환경문제를 유발하여 수생태계의 혼란을 야기하고 있다. 이에 대한 대책으로 Ardern and Lockett에 의해 개발된 활성슬러지 공법은 질소 고도처리와 함께 오늘날까지 성공적으로 수계로 방류되는 질소의 양을 조절하는 역할을 수행하고 있다. 폐수 내에 존재하는 질소는 대부분 암모니아성 질소로 존재하며, 이는 질산화/탈질 공정에 의해 질소가스로 전환된다. 질산화과정에서 암모니아성 질소는 암모니아 산화균에 의해 아질산성 질소로 전환되며, 이는 아질산염 산화균에 의해 질산성 질소로 산화된다. 탈질균은 무산소 조건 하에 질산성 질소를 질소가스로 환원시킨다 (McCarty, 2018; Thakur and Medhi, 2019).

중속영양 탈질균은 탈질을 위하여, 낮은 chemical oxygen demand (COD)와 질소의 비율인 COD/NO₃⁻-N을 요구하며, 고농도 질소폐수 혹은 하수의 3차 처리의 경우 방류수질 기준을 맞추기 위한 외부탄소원의 주입이 절대적으로 필요하다. (Lee et al., 2009; Lee et al., 1999). 현재의 탈질 공정은 유기산, 알코올, 당류 등을 외부탄소원으로 사용하고 있으며, 메탄올은 많은 탈질 특성 연구에서 탄소원 및 효율 평가를 위한 대조군으로써 성공적으로 사용되어 왔다 (Gavazza dos Santos et al., 2004; Volokita et al., 1996; Yoon et al., 2010). 탈질 과정을 수행하는 미생물은 *Pseudomonas*, *Bacillus* 외에 여러 종이 존재하고, 외부탄소원의 종류에 따라 이들의 군집 내 상대 우점도는 상이하게 나타난다 (Grießmeier and Gescher, 2018; Osaka et al., 2008; Xu et al., 2018). Li et al. (2018)은 탈질 과정에서 메탄올을 외부탄소원으로 사용할 경우, 다음과 같은 장점이 있다고 설명했다. 1) 탈질 미생물에 의한 동화작용 용이, 2) 아질산의 축적이 없는 완벽한 탈질 반응 3) 우수한 질산성 질소 제거 효율. 메탄올을 탄소원으로 사용할 경우, *Hyphomicrobium sp.*를 포함한 Methylo-trophic denitrifying bacteria가 군집 내에서 우점을 하는 것으로 보고되고 있으며, Sperl and Hoare (1971)은 메탄올을 단일 탄소원으로 사용하는 환경에서 *Hyphomicrobium sp.*를 성공적으로 분리했고 이는 Timmermans and Haute (1983), Claus and Kutnzer (1985)의 연구에서도 확인되었다. Baytshtok et al. (2009)은 stable isotope probing (SIP)를 이용해 *Hyphomicrobium sp.*와 Methylo-trophic denitrifying bacteria인 *Methyloversatilis sp.*의 군집 내 높은 우점도를 관찰했다.

한편, Focht and Chang (1975)은 메탄올을 외부탄소원으로 사용하는 탈질 반응에 대해, 다음과 같은 경험식을 제안했다.



폐수 내의 모든 질소가 질산염으로 존재할 경우, 최종 메탄올 요구량은 식 (1)에 의해 산출될 수 있다. 하지만 실제 폐수 내에는 아질산염과 용존산소가 존재할 수 있으며, 이

경우 메탄올 요구량은 아래 경험식을 통해 구할 수 있다 (Focht and Chang, 1975).

$$C_m = 2.47N_0 + 1.53N_1 + 0.87D_0 \quad (2)$$

여기서, C_m = 요구되는 메탄올 농도, mg/L

N_0 = 초기 질산성 질소 농도, mg/L

N_1 = 초기 아질산성 질소 농도, mg/L

D_0 = 초기 용존산소 농도, mg/L

식 (1)의 양론비를 이용해, 질산성 질소 1 g/L를 제거하기 위한 메탄올 요구량을 COD로 환산하면 식 (3)과 같다.

$$1.08 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_3^- - N} \times \frac{48g \text{ COD}}{\text{mol } CH_3OH} \times \frac{\text{mol } NO_3^- - N}{14g \text{ N}} = 3.70 \frac{g \text{ COD}}{g \text{ N}} \quad (3)$$

식 (2)에서 계산된 메탄올 요구량을 COD로 환산할 경우, 적절한 환산계수를 곱해준다. 이에 대해, Jung et al. (2004)는 식 (2)에서 계산된 메탄올 농도에 반응조 내 평균 용존산소 농도 및 폐수 내의 총 질소가 모두 질산성 질소로 전환된다는 가정을 고려하여 환산계수 1.5을 도출했다. 이를 통해 질소 1 g/L 제거를 위한 COD 요구량을 계산하면 2.47 mg-COD/L×1.5 = 3.26 mg-COD/L이며, 이는 식 (3)에 의한 3.70 mg-COD/L와 0.44 mg-COD/L의 차이를 나타낸다.

탈질 반응은 pH, 온도, 용존산소 등의 공정인자에 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Cao, Qian et al., 2013; Dawson and Murphy, 1972; Saleh-Lakha et al., 2009). 특히, 용존산소는 탈질 과정 효율을 결정짓는 매우 중요한 인자이며, Skerman and Macrae (1957)은 *Pseudomonas denitrificans*에 대해, 용존산소가 0.2 mg-O₂/L 수준에서 탈질 과정이 중단되었다고 보고했고, Oh and Silverstein (1999)은 활성 슬러지를 이용한 연속회분식반응기 (Sequencing batch reactor, SBR) 내에서 용존산소가 0.09 mg-O₂/L일 때, 탈질속도가 약 35% 줄어드는 것을 확인했다. 용존산소는 탈질 과정에 관여하는 효소의 작용을 억제하는 것으로도 알려져 있다. 이에 대해, Chang and Morris (1962)는 *Micrococcus denitrificans* 종에서 질산성질소를 환원하는 효소인 nitratase가 무산소 및 혐기성 조건에서 활성이 나타남을 확인했다. 또한, 식 (2)는 폐수에 잔류하는 용존산소의 농도에 의해 요구되는 탄소원의 농도가 증가할 수 있음을 보여주며, 이는 용존산소가 존재할 경우 통성혐기성세균 (facultative anaerobes)의 호기성 호흡에 의해 외부탄소원이 소모되어 탈질균과의 외부탄소원 경쟁을 초래하기 때문인 것으로 추측된다. 이는 추가적인 외부탄소원의 주입을 의미하며, 공정 운영에서 경제적인 손실을 야기한다. 이처럼 탈질 과정에서 용존산소의 존재는 미생물 간의 외부탄소원 경쟁 및 공정 효율의 저해를 유발할 수 있는 인자이며, 효율적인 탈질 공정을 달성하기 위해 용존산소와 탈질 과정 COD/NO₃⁻-N비의 관계를 파악하는 것은 중요하다. 이를 위해, 본 논문에서는 산소 접촉 조건에 따른 메

탄을 기반 탈질 반응의 효율을 관찰하기 위한 연속 반응기와 완전 혐기성 회분 반응기를 고속화하여 각 운영전략에서의 비탈질속도 및 질소 제거 속도를 비교 및 정량화했다. 또한, 반응기 형태에 따른 탄소요구량의 변화를 비교하기 위해 통계적 기법인 Box plot 분석을 실시했으며, 메탄을 탄소원으로 사용했을 때 우점하는 미생물을 확인하기 위해 16S rRNA에 기반한 분자생물학적 분석을 실시했다.

2. Materials and Methods

2.1 초기 탈질 활성화

초기 접종원으로 양산시의 S하수처리장의 활성슬러지를 이용하여, 20 L 연속회분반응기 (Sequencing batch reactor, SBR)에 미생물 농도 2,435 mg-VSS/L을 접종 하였다. 유입 배지는 질산염 100 mg-NO₃⁻-N/L, 메탄을 단일 탄소원 500 mg-COD/L (COD/NO₃⁻-N = 5)를 유지하였고, 기타 성분의 조성은 Cao, Wang et al. (2013)의 연구를 참고하였으며 다음과 같다. KH₂PO₄ 11.1 mg/L, MgSO₄ · 7H₂O 6 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 3 mg/L, Trace element 1 mL. Trace element는 FeCl₃ · 6H₂O 1.5 g/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.030 g/L, MnCl₂ · 4H₂O 0.120 g/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.060 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 0.120 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.150 g/L, KI 0.180 g/L, H₃BO₃ 0.150 g/L, EDTA 10 g/L로 구성되었다. 72 일간 배양기간 동안 1 일 1 회 배지를 교체하는 회분식 반응을 수행하였고 배지 교체비율은 80%였다. 50 rpm의 교반을 시행하였고, 가온 없이 실내온도 조건을 유지하였다 (24.8±1.9 °C). 탈질 미생물의 활성 촉진 여부를 확인하기 위하여 완전 혐기성 회분식 반응기에서 간헐적으로 비탈질속도를 측정하였다. 또한 탈질효율에 영향을 미치는 pH는 pH meter (AB15+ basic, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 측정 하였다.

2.2 완전 혐기성 회분식 반응기

500 mL 플라스크에 배지 200 mL, 반응기에서 채취한 농축슬러지 25 mL, 탄소원 25 mL를 첨가한 후, 무산소 조건을 만들기 위해 배지 내부에 10 분 동안 질소 폭기를 수행했다. 이후, 플라스크의 입구를 실리콘 마개와 파라필름으로 밀봉한 후 150 rpm, 25 °C 조건에서 진탕배양기 (NB-250LF, N-Biotek, Korea)에 넣어 24 시간 동안 배양시키고 각 0, 3, 6, 12, 24 시간에 플라스크 내부의 상등액을 20 mL씩 채취해 1.2 um 공극의 GF/C 필터 (GF/C, Whatman, UK)로 여과 후 분광광도계 (HS 3300, Humas Inc., Korea)를 이용해 시간에 따른 질산성 질소, 총질소, COD의 농도 변화를 측정했고, pH meter (AB15+ basic, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 pH를 측정했다.

2.3 연속식 탈질 반응기 운영

질산성 질소 100 mg-NO₃⁻-N/L, 메탄을 단일 탄소원 500 mg-COD/L (COD/NO₃⁻-N = 5)의 초기조건에서 연속식 반응기를 운영했다. 본 연구에서 사용된 반응기의 구조는 Fig. 1과 같이 완전교반식 연속반응조 (Completely stirred tank

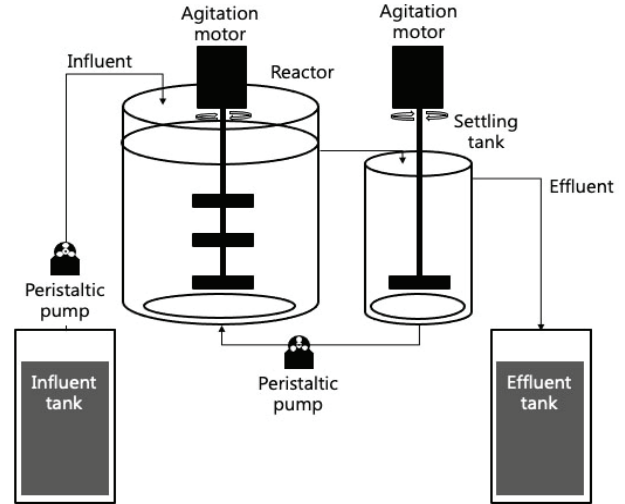


Fig. 1. A denitrifying reactor used in this study.

reactor, CSTR)의 형태이며, 반응조의 부피는 3.8 L이며, 밀폐되지 않은 채 상부가 공기 중에 노출되었다. 1 L의 미생물 침전조를 설치하여 침전된 미생물을 재순환시켰다. 배지의 유입과 미생물 반응을 위해 연동펌프 (NEXT 100M, NEXT, Korea)를 사용했으며, 반응기의 수리학적 체류시간은 1 일로 고정했다. 이후, 유입수에 포함된 500~800 mg-NO₃⁻-N/L의 고농도 질산염을 처리하기 위해 CSTR 방식에서 SBR 방식으로 전환하였다. SBR은 침전 단계가 있기 때문에 미생물을 고농도로 유지할 수 있는 장점이 있다. Abdel Kader (2009)는 SBR을 운영할 경우 metabolic activity의 제어를 통한 에너지 최적화 및 유기물의 급격한 부하를 견딜 수 있다고 보고했다. 고속화를 위한 3.8 L의 SBR을 구축하기 위해 Fig. 1에서 연동펌프와 침전조 운영을 중지하였으며, 교환율 (exchange ratio) 50% 조건으로 매일 혼합물의 50%가 배출되고 50%의 배지가 채워졌다. 반응조의 반응 주기는 유입: 20 min, 반응: 1380 min, 침전: 30 min, 유출: 10 min으로 설정하였고, HRT는 2 일로 유지되었다. 연속식 탈질 반응기 운영 기간 동안 pH meter (AB15+ basic, Fisher Scientific, USA)를 사용하여 pH를 측정하였고, 용존산소를 용존산소 측정기 (AZ 8602, AZ Instruments Corp, Taiwan)를 이용하여 측정하였다. 또한, 고속화 단계에서 탄소 요구량을 산정하기 위하여 완전 혐기성 회분식 반응을 수행하였다.

2.4 질소 및 COD 분석

질산성 질소는 HS-NO₃(N)-CA Kit (Humas Inc., Korea)에 증류수 0.5 mL를 주입하여 blank 키트를 준비한 후, 각 조건별로 반응기 내부의 상등액을 0.5 mL씩 채취해 키트에 주입하고 HS-NO₃(N)-CA-P 파우더 (Humas Inc., Korea)를 blank를 제외한 Kit에 주입했다. 이후, 마개를 닫고 10 회 정도 흔들어 혼합한 후 10 분간 방치하고 Kit가 노란색으로 발색되면 기기에 넣어 410 nm 파장 조건에서 흡광도를 분석했다. 총질소는 HS-TN-CA-H Kit A (Humas Inc., Korea)에 증류수와 시료를 각각 0.5 mL씩 주입한 후, HS-TN-CA-H-P1 (Humas Inc., Korea) 파우더를 넣어 10 회 정도 흔들어 혼합

했다. 이후, 120 °C, 30 분 조건에서 가열한 후, 상온까지 냉각하여 HS-TN-CA-H-P2 (Humas Inc., Korea) 파우더 주입 후 10 회 혼합 및 3 분간 방치하고 HS-TN-CA-H-P3 (Humas Inc., Korea) 파우더를 주입하여 10 회 혼합 및 2 분간 방치 후, 각 용액을 HS-TN-CA Kit B (Humas Inc., Korea)에 1 mL씩 주입 후 10 회 혼합 및 10 분간 방치시켜 발색된 Kit 를 기기에 넣고 410 nm 파장 조건에서 분석했다. COD는 HS-COD-M Kit (Humas Inc., Korea)에 증류수와 시료를 각각 2 mL씩 주입 후, 마개를 닫고 10 회 정도 흔들여 혼합한 후, 150 °C, 2 시간 조건에서 가열했다. 이후 실온까지 방랭하고 600 nm 파장 조건에서 흡광도를 분석했다.

2.5 미생물 침강성 측정

반응조에서 미생물을 채취하여 총량이 1 L가 되도록 상등액을 제거한다. 이후 균질상태의 시료를 채취하여 1.2 um 공극의 GF/C 필터 (GF/C, Whatman, UK)를 사용하여 필터링하고, 120 °C에서 건조한 중량과 550 °C 강열조건에서 나타난 회분의 중량 차이를 이용하여 VSS (volatile suspended solids)를 측정하였다. 동일 용액을 1 L 메스실린더에서 30 분간 정치한 후 침강된 슬러지의 부피를 육안으로 측정한다. 이 때 측정된 슬러지 부피 (mL)를 슬러지 중량 (g)으로 나누어 sludge volume index (SVI₃₀)를 계산하였다.

2.6 분자생물학적 분석

박테리아 군집 구조를 확인하기 위해 FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)과 샘플파쇄기 (FastPrep-24™ MP Biomedicals, USA)을 사용하여 DNA를 추출했다. 추출된 genomic DNA를 Macrogen Inc. (Republic of Korea)로 보내 Illumina MiSeq 플랫폼 (Illumina, USA)에서 16S rRNA 유전자의 paired-end read를 생성했다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 341F 및 805R의 프라이머로 수행했고, 시퀀싱 후 잠재적인 키메라 서열과 저품질 시퀀스는 분석에서 제외

되었다. 이에 따라, 유효한 read 수는 297,870 개로 결정되었다. 정제된 서열은 CD-HIT-OTU를 사용하여 97% 이상의 유사도를 가지는 시퀀스를 operational taxonomic unit (OTU)으로 클러스터링하여 257 개가 발굴되었다. 박테리아 16S rRNA 유전자 서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 데이터베이스와 비교하여 계통분류학적 정보를 추출했다.

3. Results and Discussion

3.1 Activation of denitrifying bacteria using methanol

양산시의 하수처리장 슬러지를 이용하여 1 일 1 회 배지를 교체한 SBR의 유출수에서 질산성 질소 농도는 0에 가까운 값을 나타내어 올바르게 탈질 활성화를 판별할 수 없었지만, pH 8.07±0.5를 보이며, 종속 영양 탈질을 위한 최적의 pH인 7~8 사이로 측정이 되었고 (Knowles, 1982), 질산염 감소는 pH 11 (Prakasam and Loehr, 1972) 이하까지 되는 것으로 보고되어, 질산염 감소를 간접적으로 확인 하였다. 탈질미생물의 활성을 정확히 평가하기 위하여, 배양 중 미생물을 채취하여 별도의 플라스크에서 완전 혐기성 회분식 조건에서 비탈질 속도를 측정하였다. 실험 초기의 비탈질속도는 0.02 ~ 0.26 g-N/g-VSS-day 사이를 보이며 낮은 수치를 보였다 (Fig. 2). 이것은 메탄올을 탄소원으로 사용하는 탈질 미생물의 군집이 적은 비율로 존재하여 초기 비탈질속도가 낮은 것으로 예상된다. 그러나, 실험 5~13 일 기간에 급격한 비탈질속도의 증가가 나타났으며, 이는 해당 기간 동안 탈질 미생물 군집의 급격한 성장에 의한 것으로 예상된다. 이에 대해, Yao et al. (2019)는 A2O 공정의 반송 슬러지를 접종원으로 하는 탈질 SBR 운영 결과, 12 일 동안 비탈질속도가 0.09 g-N/g-VSS-day에서 1.24 g-N/g-VSS-day로 급격히 증가된 것을 확인했으며, 이는 농후배양 기간 동안의 급격한 탈질 미생물 군집 성장에 기인한 것으로 제안했다. 이후 실

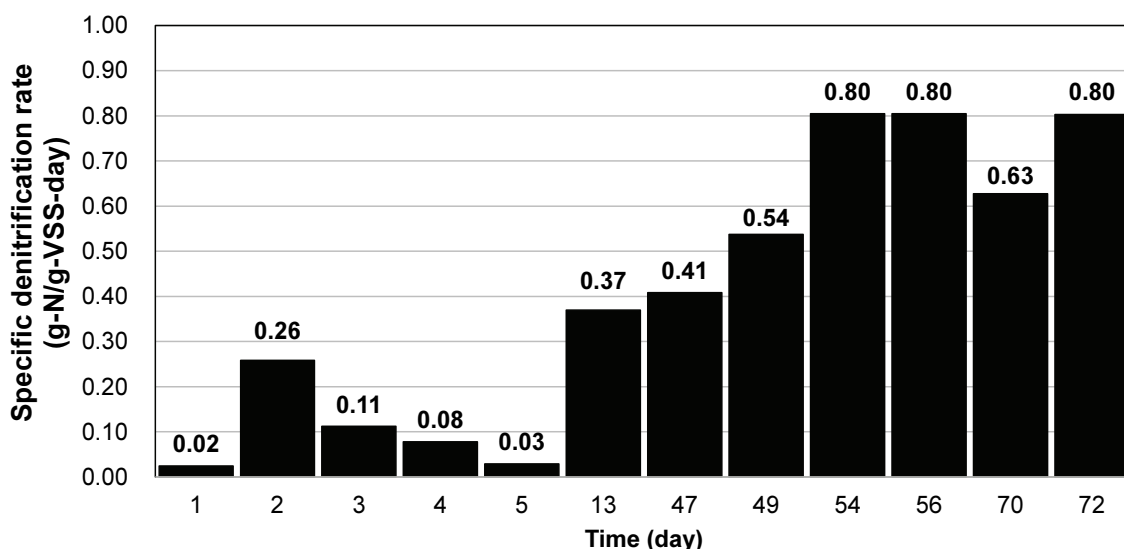


Fig. 2. Specific denitrification rate during activation culture based on methanol.

험 13~72 일 동안 비탈질속도가 가속화되어 최대 0.63~0.80 g-N/g-VSS-day로 상승하였다. Dold et al. (2005)의 메탄올 이용한 완전 혐기성 회분식 실험에서 나타난 최대 비탈질속도 0.144 g-N/g-VSS-day에 비해 본 실험은 높은 비탈질속도를 보였다.

3.2 Continuous denitrifying reaction using methanol

초기 탈질 활성화를 위한 SBR에서 확보된 미생물을 CSTR에 적용하여 수리학적 체류시간 1.02±0.18 일의 연속 공정을 구현하였다. 초기 미생물 농도는 693 mg-VSS/L로 시작하였다. 본 반응기는 침전조가 결합되어 미생물이 실시간으로 반응되는 방식을 사용하였다. 안정적인 탈질 반응을 위해, 유입되는 질산염의 농도는 다소 낮은 94.1±5 mg-NO₃⁻-N/L으로 유지하였다 (Fig. 3). 본 농도는 하수방류수가 20 mg-NO₃⁻-N/L의 질산을 함유하고 있을 때, 역삼투막을 이용하여 하수재이용수를 80% 가량 생산하고 잔류하는 5 배 농축된 농축수에 존재하는 질산성 질소의 농도 100 mg-NO₃⁻-N/L를 모사한 것이다. Playchoom et al. (2011)는 COD/NO₃⁻-N이 5가 되도록 하였을 때에 100 mg-NO₃⁻-N/L 유입질소염에 대하여 90% 가량의 안정적인 질산성 질소 제거효율을 보고하였다. 이를 참고하여, 본 연구에서는 COD/NO₃⁻-N이 5가 되도록 설정하였다. 측정된 유입수의 메탄올은 523±65.8 mg-COD/L이었고, COD/NO₃⁻-N의 비율은 3.45~6.24로 COD/NO₃⁻-N 평균 5.56±0.75로 조정되었다. 실험 결과, 운영기간 15 일 이전에는 유출되는 질산성 질소의 농도가 30 mg-NO₃⁻-N/L로 나타나 약 69%의 질산성 질소 제거 효율을 보여 주었다. 점차 유출수 질산성 질소의 농도가 감소하여, 운영기간 46~50 일 간에는 유출수 질산성 질소 농도가 0.10±0.10 mg-NO₃⁻-N/L로 유지되어 질산성 질소 제거 효율 99.8~100%를 달성하였다. 유출수의 총질소 농도가 질산성 질소의 농도와 유사한 수준을 보이고, 유출수의 pH 8.3±0.2를 보이며 알칼리성 pH에서 측정되는 경향을 보이는 아질산염 (Glass and Silverstein, 1998)은 없는 것으로 판단된다. 동일 기간 동안 연속 공정상에서 소모된 COD/NO₃⁻-N은 5.49±0.23으로 나타났다. 미생물의 성장 수준을 알아보기 위하여 VSS를 측정된 결과 (Table 1), 실험 초기에서 35 일까지 반응기 내의 VSS가 693.3 mg-VSS/L에서 626.7 mg-VSS/L로 다소 줄었는데 비해, 실험 최종단계인 운영기간 49 일에 1,607 mg-VSS/L으로 약 2.6 배 늘어나는 활발한 미생물의 성장이 나타났다. 본 반응기의 최대 탈질속도 0.097 g-N/L-day를 미생물량 1.607 g-VSS/L로 나누어 연속반응 상태의 비탈질속도를 산정하면 0.060 g-N/g-VSS-day로 산정된다. 이는 플라스크에서 완전 혐기성 회분식 조건으로 실험한 Fig. 2의 54~72 일보다 낮은 값으로 연속반응 상태의 비탈질속도는 산소의 유입, 기질의 제한 등으로 인해 완전 혐기성 회분식 반응보다 느린 것으로 판단된다. SVI₃₀ 지수는 101.0~118.3 mL/g으로 나타나 기존의 활성슬러지 침강지수 50~150 mL/g과 유사한 수준을 보였다. (Ahn et al., 2011) 탈질 공정에서의 SVI₃₀ 지수는 여러 값들이 보고되고 있다. Cuervo-López et al. (1999)은 세 가지 탄소원 (소듐 아세트산 나트

륨, 젖산 나트륨, 글루코오스)을 이용한 탈질공정에서 질산성 질소 농도가 500 mg-NO₃⁻-N 일 때, SVI₃₀ 지수가 각각 101.36 mL/g, 130.67 mL/g, 96.87 mL/g을 보였다고 보고했고, Dangcong et al. (2004)는 SBR를 이용한 혐기성 그레놀 탈질공정에서 30-40 mL/g의 SVI₃₀ 지수를 보고했다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 연속반응기 운영 46~50 일에서 총질소 제거속도와 아질산제거속도는 동일한 수준인 0.097±0.003 kg-N/m³-day를 나타냈었다. 이는 통상적으로 사용되는 메탄올 기반 고속 탈질 SBR의 수준 0.6±0.3 kg-N/m³-day에 비하여 미약한 수준으로 추가적인 고속화가 필요한 것으로 판단되었다 (Bill et al., 2009). 이에 따라, 본 연구에서는 유입 질산염 농도 향상을 통해 탈질속도를 고속화하였다.

Table 1. Sludge volume index (SVI₃₀) during experiment

Day	Sludge volume (mL)	VSS (g)	SVI ₃₀ (mL/g)
0	70	0.6933	101.0
35	120	0.6267	191.5
49	190	1.6066	118.3

3.3 High-rate denitrification using methanol

메탄올 기반 고속 탈질을 수행하기 위하여 SBR 방식으로 전환하여 41 일간 운영하였다. SBR은 CSTR 반응보다 미생물 유출 방지에 효과적이다. 초기 미생물 농도는 1,607 mg-VSS/L로 시작하였고 41 일간 최대 8,433 mg-VSS/L로 향상되었다. 별도의 SVI₃₀ 지수 측정은 수행되지 않았으며, 슬러지 부상으로 인한 미생물 유출은 발생하지 않았다. 유입수의 COD/NO₃⁻-N은 5로 고정하고자 하였으나, 실측값은 평균 6.2±1.5로 조정되었다. Fig. 5와 같이 질산성 질소의 농도는 100, 200, 350, 550, 600, 800 mg-NO₃⁻-N/L 수준으로 상승시켰다. 유출수의 총질소 농도가 질산성 질소의 농도와 유사한 수준을 보이고, 유출수의 pH 8.9±0.5를 보이며 아질산염 (NO₂⁻) 생성은 없는 것으로 판단된다. 총질소 및 질산성 질소 제거 효율은 유입 질산성 질소 농도 600 mg-NO₃⁻-N/L에서 저해되어 각각 75.1±11.4%와 75.6±14.5%를 나타내었다(반응기 운영 14~19 일). 그러나 반응기 운영 20 일 이후에는 총질소 및 질산성 질소 제거 효율이 각각 99.2±2.8%와 98.6±4.4%를 나타내어 우수한 질소처리 성능을 확인할 수 있었다. 최대 총질소제거속도와 질산제거속도는 같았으며, 반응기 운영 35, 37, 41 일에 평균 0.403±0.029 kg-N/m³-day로 나타났다 (Fig. 6). 이는 Fig. 4의 저속 탈질반응에 비하여 탈질속도가 약 4 배 증가한 수치이다. 본 반응기의 최대 탈질속도 0.436 g-N/L-day를 미생물량 8.433 g-VSS/L로 나누어 연속반응 상태의 비탈질속도를 산정하면 0.052 g-N/g-VSS-day로 이는 CSTR보다 13.5% 가량 낮은 값이다. 따라서 SBR을 이용한 탈질속도 고속화의 주된 요인은 비탈질속도 증가가 아니라 미생물 농도의 증가로 판단된다. 고속탈질 SBR 운영기간 동안 나타난 COD/NO₃⁻-N은 5.58±0.70로 산정되었다. 이는 CSTR의 COD/NO₃⁻-N은 5.49±0.23와 유사한 수치이다.

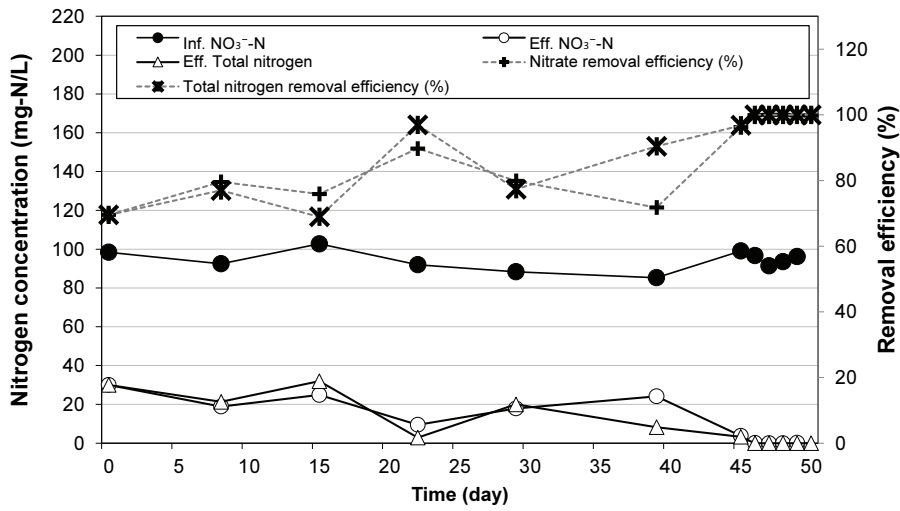


Fig. 3. Nitrogen profiles and removal efficiencies in the denitrifying CSTR reactor.

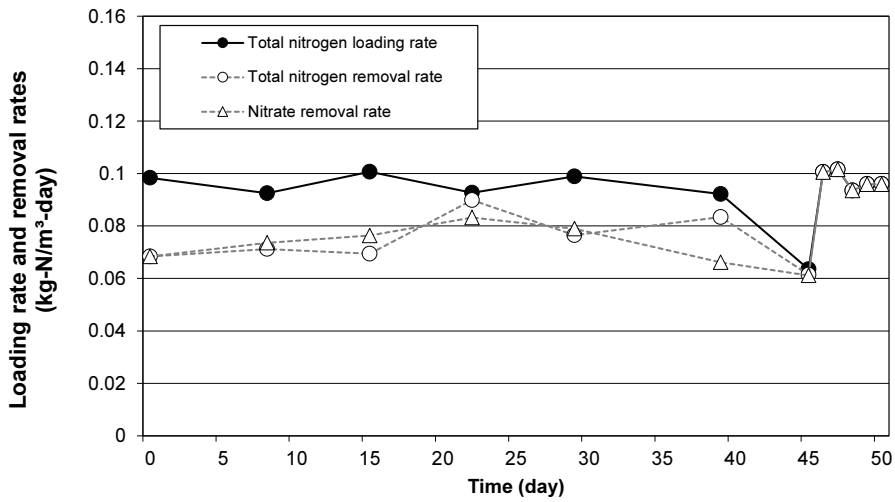


Fig. 4. Nitrogen loading and removal rates of the denitrifying CSTR reactor.

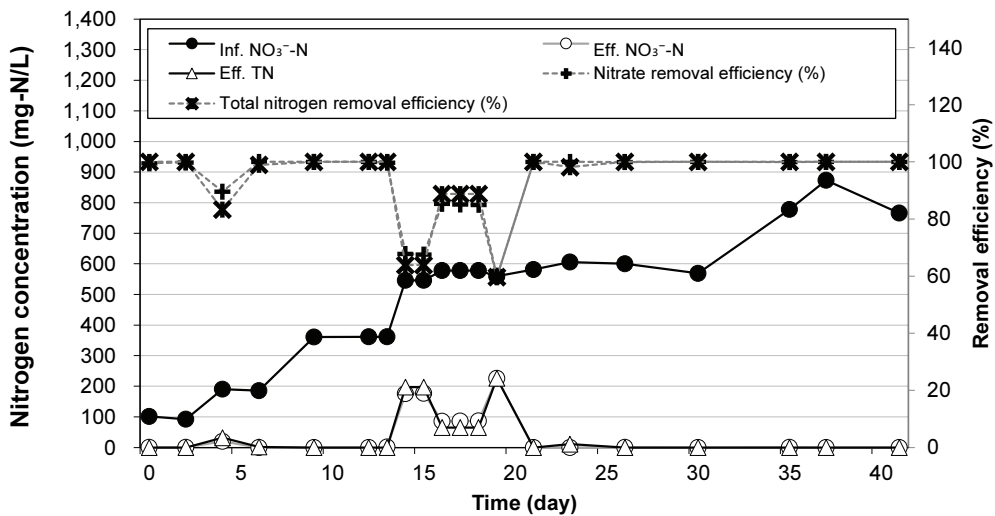


Fig. 5. Nitrogen profiles and removal efficiencies in the denitrifying SBR reactor.

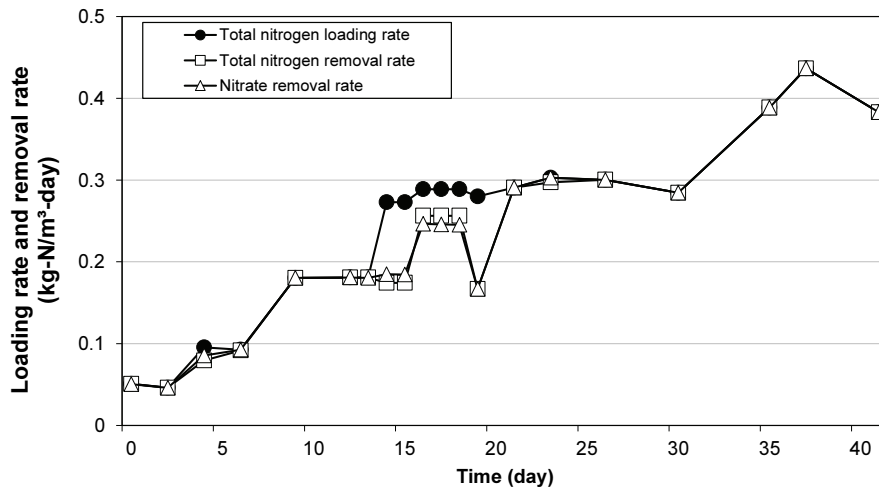


Fig. 6. Nitrogen loading and removal rates of the denitrifying SBR reactor.

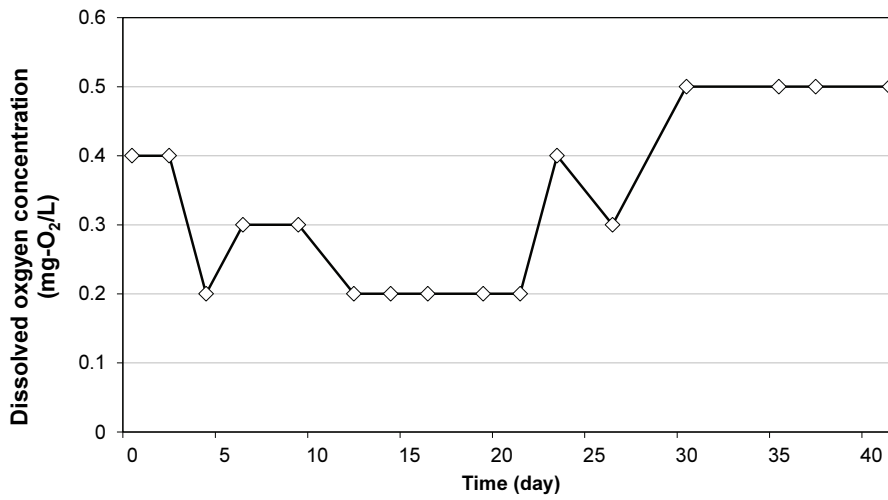


Fig. 7. Dissolved oxygen concentration of the denitrifying SBR reactor.

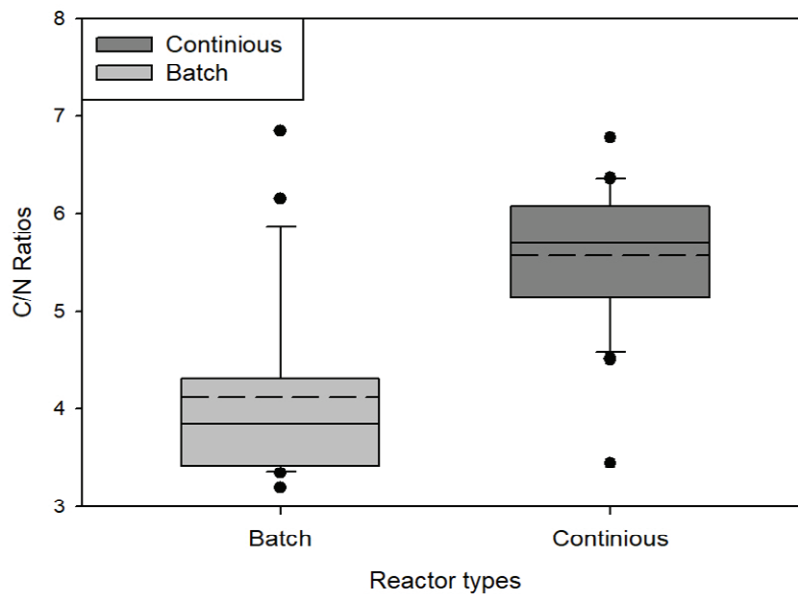


Fig. 8. COD:NO₃⁻-N ratio in batch and continuous mode of denitrification.

3.4 Evaluation of COD demand in batch and continuous denitrifying processes

SBR을 이용한 탈질 고속화 단계에서 측정된 용존산소의 농도는 0.2~0.5 mg-O₂/L의 범위를 나타내었다 (Fig. 7). 식 2에서 표현된 바와 같이, 용존산소는 통성혐기성 미생물의 호흡을 촉진시켜서 탄소 요구량을 상승시키므로, 연속반응조에서 측정된 용존산소에 의해 탄소 요구량이 상승할 것을 가정하였다. 이러한 가설을 검증하기 위하여 SBR 운영기간 동안 미생물을 채취하여 완전 혐기성 회분 반응을 수행하여 COD/NO₃⁻-N을 산정하고, SBR에서 산정된 값과 비교하였다 (Table 2). 22 회의 완전 혐기성 회분반응에서 나타난 COD/NO₃⁻-N은 4.13±0.94이다. 이는 고속 탈질 SBR에서 나타난 5.58±0.70 수치보다 낮은 값으로서 용존산소의 영향을 반증한다. Fig. 8의 Box plot을 이용한 평균치의 비교에서도 COD/NO₃⁻-N은 통계적으로 유의한 차이를 보여주고 있다.

Table 2. Statistical characteristics of COD:NO₃⁻-N ratio in batch and continuous mode of denitrification

Values	Batch	Continuous
Sample numbers	22	31
Maximum	5.89	6.39
Q3	4.32	6.09
Median	3.88	5.7
Mean	4.13	5.58
Q1	3.42	5.15
Interquartile range (IQR)	0.9	0.94
Minimum	3.34	4.59

3.5 Denitrifying bacterial community structure

메탄을 투여 환경에서 우점적으로 탈질기능을 수행하는 미생물을 판별하기 위하여, 고속 탈질 SBR 운영 최종단계에서 미생물 시료를 샘플링하여 MiSeq 플랫폼에서 대용량 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과 1% 이상의 우점도를 가지는 미생물은 16 개의 종으로 분류되었고 계통분류학적 정보를 Table 3에 나열하였다. 전체 미생물 중 Phylum 단계에서 Proteobacteria가 60.8%의 우점율을 보였다. 이 중 *Methyloversatilis discipulorum*와 *Hyphomicrobium zavarzinii*는 각각 22.2%와 14.9%의 최고 우점도를 보였다. Beta-proteobacteria에 속하는 *M. discipulorum*은 탄소가 하나로 구성된 유기탄소를 탄소원으로 사용하는 미생물 (Methylotroph)로서 메틸아민과 메탄올을 섭취할 수 있으며, 메탄올을 사용한 혐기성 실험에서 탈질과 질소고정 능력이 보고되었다. 또한 혐기성 및 미세 호기성 인큐베이션 테스트를 통해 호기성 조건에서도 미생물의 성장을 보이며 통성혐기성 활성도 보였다 (Smalley et al., 2015). Alpha-proteobacteria에 속하는 *H. zavarzinii* 또한 메탄올을 사용하는 대표적인 미생물 중 하나로서 탈질기능을 수행하는 *narG*, *nirK*, *nirS*, *nosZ* 유전자의 존재가 보고되었다. 또한 호기성 조건에서 혐기성조건보다는 느리지만

아질산염 축적없이 질산염을 완전히 제거하고 성장하는 것을 보였다 (Martineau et al., 2015). 또한 Beta-proteobacteria에 속하는 *Methylophilus methylotrophus*는 우점율이 2.00%로 다소 낮지만 메탄올을 섭취하는 탈질 미생물로 알려져 있다 (Osaka et al., 2006). 위의 메탄올 섭취 탈질 미생물은 탈질 군집체(denitrifying consortium)에서 빈번히 발견되고 있다 (Kim et al., 2020; Waki et al., 2009). 7.75%의 낮은 우점율을 보이는 *Comamonas terrigena*는 NO₃⁻는 환원시키지만 NO₂⁻는 환원시키지 못하는 것으로 알려져있고 메탄올 섭취에 대해서는 알려져있지 않다. 또한 30, 35 °C에서 호기성 성장활성이 보고되었다 (Wauters et al., 2003). 6.69%의 우점율을 보이는 *Ignavibacterium album*는 nitrite reductase, nitric oxide reductase, nitrous oxide reductase를 가지고 있어서 부분적인 탈질 기능을 가지는 것으로 알려져 있고, 말단 산화효소를 가지고 있어 산소조건에서 호흡하는 능력 또한 가지고 있을 것으로 보고되어있다. 하지만 메탄올을 섭취하는 기능은 알려져있지 않다 (Liu et al., 2012). 이로써 본 연구에서 *C. terrigena*와 *I. album*는 호기성 호흡에는 기여하지만 탈질에 크게 기여하지 않는 것으로 판단된다.

4. Conclusion

본 연구는 메탄올을 외부탄소원으로 투여하는 탈질 공정을 고속화하고, 메탄올 섭취 탈질 미생물을 대량 시퀀싱 기법으로 판별하였으며, 산소가 영향을 주지 않는 완전 혐기성 회분식 반응과 개방형 연속 반응기 (CSTR, SBR)에서의 메탄올 섭취특성을 연구하여 아래와 같은 결과를 도출하였다.

1) 메탄올 기반 탈질 미생물의 초기 활성화를 위해 활성슬러지를 접종원으로 하여 72 일간 SBR을 운영한 결과, 유입수 평균 COD/NO₃⁻-N은 6.2±1.5를 보였다. 완전 혐기성 회분식 반응기에서 측정된 비탈질속도는 최대 0.63~0.80 g-N/g-VSS-day를 보였으며, 활성화된 탈질미생물을 완전교반 연속 반응기에 접종하여 51 일간 운영한 결과, 총질소제거속도 0.097±0.003 kg-N/m³-day, 비탈질속도 0.060 g-N/g-VSS-day를 획득했다.

2) 미생물 침전효과 강화를 위한 SBR 사용으로 탈질반응을 고속화한 결과, 총질소제거속도 0.403±0.029 kg-N/m³-day를 달성할 수 있었다. 고속화의 주요 요인으로는 고농도의 미생물량으로 판단되었으며, 이때 산정된 비탈질속도는 0.052 g-N/g-VSS-day로 나타났다. 고속화 기간 동안 SBR에서 나타난 NO₃⁻-N 대비 COD 소모량은 5.58±0.70로 나타났으며, 동일 미생물을 통해 획득된 완전 혐기성 회분식 반응에서의 COD 소모량 4.13±0.94보다 높았다. 추가적인 COD 소모량은 개방된 반응기 상부에서 유입된 용존산소에 의한 통성혐기성 미생물의 호기성 호흡으로 사료된다.

3) SBR 운영 최종단계에서 우점하는 미생물의 60.8%가 Proteobacteria에 속했다. 이 중 *M. discipulorum*와 *H. zavarzinii*

Table 3. Relative abundance of dominant denitrifying bacteria

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Relative abundance	
Bacteroidetes	Chitinophagia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Sediminibacterium</i>	<i>salmonium</i>	4.98%	
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	<i>Runella</i>	<i>zeae</i>	1.09%	
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	<i>Thermomarinilinea</i>	<i>lacumifontana</i>	1.35%	
	Caldilineae	Caldilineales	Caldilineaceae	<i>Litorilinea</i>	<i>aerophila</i>	3.02%	
Ignavibacteriae	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	Ignavibacteriaceae	<i>Ignavibacterium</i>	<i>album</i>	6.69%	
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhizobiales	Hypnomicrobiaceae	<i>Devosia</i>	<i>insulae</i>	1.07%	
				<i>Hyphomicrobium</i>	<i>zavarzinii</i>	14.9%	
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	<i>aminovorans</i>	4.32%	
	Beta-proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadales	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	<i>terrigena</i>	7.75%
					<i>Hydrogenophaga</i>	<i>pseudoflava</i>	1.08%
					<i>Simplicispira</i>	<i>piscis</i>	1.60%
	Nitrosomonadales	Methylophilaceae		<i>Methylophilus</i>	<i>methylophilus</i>	2.00%	
			Sterolibacteriaceae	<i>Methyloversatilis</i>	<i>discipulorum</i>	22.2%	
Gamma-proteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	<i>Aquimonas</i>	<i>voraii</i>	1.61%		
		Xanthomonadaceae	<i>Coralloluteibacterium</i>	<i>stylophorae</i>	3.16%		
			<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>mexicana</i>	1.07%		

는 각각 22.2%와 14.9%의 최고 우점도를 보였고, 이 미생물들은 메틸아민과 메탄올과 같이 탄소가 하나인 탄소원을 사용하는 탈질 미생물로 판별되었다. *M. methylophilus* (2.00%)와 *C. terrigena* (7.75%) 또한 산화된 질소의 환원기능이 있는 것으로 알려져 있지만, 본 연구에서 탈질에 크게 기여하지 않은 것으로 판단된다.

Acknowledgement

이 논문은 날코코리아와 2020년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2018R1C1B5086307).

References

Abdel Kader, A. M. (2009). Comparison study between sequencing batch reactor and conventional activated sludge by using simulation mathematical model, *Thirteenth International Water Technology Conference*, 693-702.

Ahn, J. S., Park, W. K., and Cho, J. H. (2011). Characteristics of wastewater treatment of sewage mixed with industrial wastewater, *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, 12(7), 3341-3352. [Korea Literature]

Baytshtok, V., Lu, H., Park, H., Kim, S., Yu, R., and Chandran, K. (2009). Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylophilic denitrifying bacteria, *Biotechnology and bioengineering*, 102(6), 1527-1536.

Bill, K. A., Bott, C. B., and Murthy, N. (2009). Evaluation of alternative electron donors for denitrifying moving bed

biofilm reactors (MBBRs), *Water Science & Technology*, 60(10), 2647-2657.

Cao, S., Wang, S., Peng, Y., Wu, C., Du, R., Gong, L., and Ma, B. (2013). Achieving partial denitrification with sludge fermentation liquid as carbon source: The effect of seeding sludge, *Bioresource Technology*, 149, 570-574.

Cao, X. S., Qian, D., and Meng, X. (2013). Effects of pH on nitrite accumulation during wastewater denitrification, *Environmental Technology*, 34(1), 45-51.

Chang, J. P. and Morris, J. G. (1962). Studies on the utilization of nitrate by micrococcus denitrificans, *The Journal of General Microbiology*, 29, 301-310.

Claus, G. and Kutzner, H. J. (1985). Denitrification of nitrate and nitric acid with methanol as carbon source, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22, 378-381.

Cuervo-López, F. M., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Noyola, R. A., and Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, *Water Science and Technology*, 40(8), 123-130.

Dangcong, P., Yi, W., Hao, W., and Xiaochang, W. (2004). Biological denitrification in a sequencing batch reactor, *Water Science and Technology*, 50(10), 67-72.

Dawson, R. N. and Murphy, K. L. (1972). The temperature dependency of biological denitrification, *Water Research*, 6, 71-83.

Dold, P., Murthy, S., Takacs, I., and Bye, C. (2005). Batch test method for measuring methanol utilizer maximum specific growth rate, *Proceedings of the 78th Annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference*, Washington, DC.

Focht, D. D. and Chang A. C. (1975). Nitrification and

- denitrification processes related to waste water treatment, *Advanced in Applied Microbiology*, 19, 153-186.
- Gavazza dos Santos, S., Amâncio Varesche, M. B., Zaiat, M., and Foresti, E. (2004). Comparison of methanol, ethanol, and methane as electron donors for denitrification, *Environmental engineering science*, 21(3), 313-320.
- Glass, C. and Silverstein, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation, *Water Research*, 32(3), 831-839.
- Grießmeier, V. and Gescher, J. (2018). Influence of the potential carbon sources for field denitrification beds on their microbial diversity and the fate of carbon and nitrate, *Frontiers in microbiology*, 9, 1313.
- Jung, I. C., Kim, H. Y., Kang, D. H., Jung, J. S., Lee, S. W., Lim, K. T., and Kim, C. W. (2004). Development of alternative external carbon source from wasting carbonaceous organic resource and full scale application, *Journal of Environmental Science International*, 13(10), 911-919.
- Kim, I. T., Lee, Y. E., Jeong, Y., and Yoo, Y. S. (2020). A novel method to remove nitrogen from reject water in wastewater treatment plants using a methane- and methanol-dependent bacterial consortium, *Water Research*, 172, 115512.
- Knowles, R. (1982). Denitrification, *Microbiological reviews*, 46(1), 43.
- Lee, H. J., Koh, E. O., Kim, M. H., and Park, T. J. (1999). Effects of nitrogen removal with C/N ratio and internal recycle rate in high-strength wastewater using ICBR (Innovative Compact Biofilm Process), *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 21(8), 1529-1536. [Korea Literature]
- Lee, H. O., Kim, J. Y., Hyun, K. S., and Choi, J. W. (2009). A study on high-rate BNR process for fluctuating influent loadings and sludge reduction, *Journal of Korean Society of Water Science and Technology*, 17(3), 67-75. [Korea Literature]
- Li, E., Jin, X., and Lu, S. (2018). Microbial communities in biological denitrification system using methanol as carbon source for treatment of reverse osmosis concentrate from coking wastewater, *Journal of Water Reuse and Desalination*, 8(3), 360-371.
- Liu, Z., Frigaard, N. U., Vogl, K., Lino, T., Ohkuma, M., Overmann, J., and Bryant, D. A. (2012). Complete genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum Chlorobi, *frontiers in Microbiology*, 3(185), 1-15.
- Martineau, C., Mauffrey, F., and Villemur, R. (2015). Comparative alysis of denitrifying activities of *hyphomicrobium nitratorans*, *hyphomicrobium denitrificans*, and *hyphomicrobium zavarzinii*, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5003-5014.
- McCarty, P. L. (2018). What is the best biological process for nitrogen removal: When and why?, *Environment Science and Technology*, 52, 3835-3841.
- Oh, J. and Silverstein, J. (1999). Oxygen inhibition of activated sludge denitrification, *Water Research*, 33(8), 1925-1937.
- Osaka, T., Shirotani, K., Yoshie, S., and Tsuneda, S. (2008). Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process, *Water Research*, 42, 3709-3718.
- Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N., and Inamori, Y. (2006). Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing, *Microbial Ecology*, 52, 253-266.
- Playchoom, C., Pungrasmi, W., and Powtongsook, S. (2011). Effect of carbon sources and carbon/nitrogen ratio on nitrate removal in aquaculture denitrification tank, *Environmental Chemistry*, 1, 307-311.
- Prakasam, T. B. S. and Loehr, R. C. (1972). Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes, *Water Research*, 6(7), 859-869.
- Saleh-Lakha, S., Shannon, K. E., Henderson, S. L., Goyer, C., Trevors, J. T., Zebarth, B. J., and Burton, D. L. (2009). Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*, *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 3903-3911.
- Skerman, V. B. D. and Macrae, I. C. (1957). The influence of oxygen on the reduction on nitrate by adapted cells of *Pseudomonas denitrificans*, *Canadian Journal of Microbiology*, 3, 215-230.
- Smalley, N. E., Taipale, S., Marco, P. D., Doronina, N. V., Kypripides, N., Shapiro, N., Woyke, T., and Kalyuzhnaya, M. G. (2015). Functional and genomic diversity of methylotrophic Rhodocyclaceae: description of *Methyloversatilis discipulorum* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2227-2233.
- Sperl, G. T. and Hoare, D. S. (1971). Denitrification with methanol: a selective enrichment for *hyphomicrobium* species, *Journal of Bacteriology*, 108(2), 733-736.
- Thakur, I. S. and Medhi, K. (2019). Nitrification and denitrification processes for mitigation of nitrous oxide from waste water treatment plants for biovalorization: Challenges and opportunities, *Bioresource Technology*, 282, 502-513.
- Timmermans, P. and Haute, A. V. (1983). Denitrification with methanol: Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp, *Water Research*, 17(10), 1249-1255.
- Volokita, M., Belkin, S., Abeliovich, A., and Soares, M. I. M. (1996). Biological denitrification of drinking water using newspaper, *Water Research*, 30(4), 965-971.
- Waki, M., Yasuda, T., Yokoyama, H., Hanajima, D., Ogino, A., Suzuki, K., Yamagishi, T., Suwa, Y., and Tanaka, Y. (2009). Nitrogen removal by co-occurring methane oxidation, denitrification, aerobic ammonium oxidation, and anammox, *Environmental Biotechnology*, 84, 977-985.
- Wauters, G., Baere, T. D., Willems, A., Falsen, E., and Vaneechoutte, M. (2003). Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for

- two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 859-862.
- Xu, Z., Dai, X., and Chai, X. (2018). Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes, *Science of the Total Environment*, 634, 195-204.
- Yao, R., Yuan, Q., and Wang, K. (2019) Enrichment of denitrifying bacterial community using nitrite as an electron acceptor for nitrogen removal from wastewater, *Water*, 12(1), 48.
- Yoon, S. J., Kang, W. C., Bae, W. K., and Oh, S. E. (2010). Autotrophic nitrite denitrification using sulfur particles for treatment of wastewater with low C/N ratio (Batch Tests), *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 32(9), 851-856. [Korea Literature]