

생물학적 인 제거용 연속회분식 반응기에서의 미생물 분포 조사

전 체욱, 박 중문

포항공과대학교 환경공학부 환경생물공학연구실

전화 (0562) 279-5952, FAX (0562) 279-8299

Abstract

Various analytical methods such as electron microscopy, quinone analysis, and 16S rDNA sequencing studies were used to investigate the microbial communities and to identify the microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) in an anaerobic/aerobic sequencing batch reactor (SBR) fed with acetate. Electron photomicrographs showed that oval-shaped microorganisms of about $0.7 \sim 1 \mu\text{m}$ in diameter dominated the microbial sludge. These microorganisms contained polyphosphate granules and glycogen inclusions, which suggests that they are a kind of phosphorus accumulating organism. Quinone and 16S rRNA sequence analyses showed that the members of *Proteobacteria* beta subclass were the most abundant species, which were affiliated with the *Rhodocyclus*-likes group. Phylogenetic analysis revealed that the two dominating clones of the beta subclass were most distantly related to *Propionivibrio dicarboxylicus* DSM 5885 and *Rhodocyclus tenuis* DSM 109 with about 95% and 96% sequence similarity, respectively. Therefore, it was concluded that the oval-shaped organisms related to the *Rhodocyclus*-likes group are likely to be responsible for biological phosphorus removal in SBR operation supplied with acetate.

서 론

생물학적 인 제거는 활성오니 공정의 혐기성 단계와 호기성 단계의 교차적 반응이 요구되며 이를 설명하기 위한 여러 가지 생화학적 모델이 제시되어 왔다^{1,2)}. 혐기적 조건에서는 초산같은 단쇄 지방산을 세포내 저장물질인 polyhydroxy alkanolic acids (PHA)로 저장하고 이때 필요한 에너지로서 polyphosphate의 분해로부터 나오는 ATP와 glycogen의 분해로부터 나오는 환원력 (NAD(P)H₂)을 이용하는 것으로 알려져 있다. 이들 모델은 주로 혼합 배양 공정에서의 관찰에 의해서 이루어졌기 때문에 생물학적 인 제거 미생물의 생리학적 특성을 알기 어려워 정확한 인 제거 특성의 이해와 공정의 최적화가 어려웠다. 따라서 생물학적 인 제거 공정의 완전한 이해와 공정의 최적화를 이루기 위해서는 인 제거 미생물에 대한 이해가 절실히 요

구된다. Fus와 Chen³⁾이 인 제거 미생물로 *Acinetobacter* spp.을 제시한 이래 많은 연구자들이 이 미생물의 연구에 초점을 맞추어 왔다. 그러나 최근의 연구결과는 *Acinetobacter* spp.가 생물학적인 제거 특성을 설명하지 못하고 우점종도 아님을 보여주고 있다. 이러한 결과는 생물학적인 제거 공정을 이루는 미생물 중 대부분을 배양할 수 없었기 때문이다. 따라서 최근에는 비배양학적 방법을 이용하여 미생물의 분포를 연구하고자 하는 많은 시도가 이루어지고 있다^{4,5)}. 이러한 비배양학적 방법들에 의한 미생물 분포 조사 결과 *Acinetobacter* spp.가 생물학적인 제거 공정에서 낮은 분포를 이루고 있음을 보여주고 있다. 대신에 quinone과 rRNA-targeted oligonucleotide probing 분석에 의하면 *Proteobacteria* beta subclass와 *Actinobacteria* 그룹이 많은 분포를 이루고 있음을 보여주고 있다^{3,5)}. 그러나 PCR (polymerase chain reaction)에 의한 16S rRNA 분석 결과는 *Actinobacteria* 그룹이 주요 미생물이 아님을 보여 주고 있다⁵⁾. 이처럼 비배양학적 방법을 이용한 연구가 배양의 제한 없이 미생물 분포를 조사할 수 있을 지라도 이들 방법에 의해 얻어진 결과는 아직까지 확실성이 떨어지며 방법에 따라 서로 상이한 결과를 보여주고 있다. 이러한 배경 하에 본 연구에서는 전자현미경, quinone 분석, 분자생물학적 방법 등을 복합적으로 이용하여 생물학적인 제거를 수행하는 SBR (sequencing batch reactor) 공정에서의 미생물 분포를 조사하였다.

재료 및 방법

유효 용적이 4 리터인 연속회분식 반응기에 포항공과대학교 하수처리장에서 얻은 슬러지를 접종하여 운전을 시작하였다. 반응기 운전은 유입 (15 min.), 혐기적 반응 (2 hr), 호기적 반응 (4 hr 10 min.), 침전 (1 hr), 배출 (15 min.) 및 휴지 (20 min.)의 순서로 하여 8 시간의 운전 주기를 갖도록 하였으며, 수리학적 체류시간은 16 시간, 미생물 평균 체류시간은 10 일이 유지되도록 하여 약 650일 간 운전하였다. 탄소원으로 초산 나트륨을 리터 당 720 mg을 사용하였고 영양 염류는 Smolders 등⁷⁾의 방법에 따라 제조하였다. 유입수의 COD, 인, 암모니아의 농도는 각각 600 mg/l, 15 mg/l PO₄⁻-P, 40 mg/l NH₄⁺-N으로 하였다. 슬러지의 전자 현미경 분석, quinone 분석, PCR에 의한 16S rRNA 서열 분석은 기존에 제시된 방법에 따라 수행하였다^{4,5)}.

결과 및 고찰

유일한 탄소원으로 acetate를 이용하여 오랜 기간 (약 650일) SBR 운전 후 반응기 내 질산염과 인산염을 분석한 결과 시간에 따른 변화형태가 일정하여 반응기가 정상 상태에 도달하였음을 확인하였다. 정상 상태 후 SEM에 의한 미생물 형태를 분

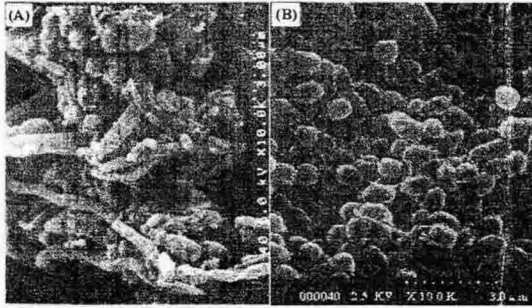


Fig. 1. Scanning electron photomicrograph of (A) inoculum and (B) SBR sludge.

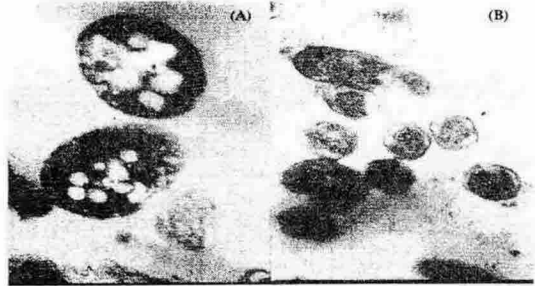


Fig. 2. Electron microscopic observations of activated sludge from the sequencing batch reactor fed with acetate.

석한 결과 집중한 슬러지는 여러 가지 형태의 미생물이 복합적으로 존재하였지만 오랜 배양후에는 0.7 ~ 1 um 크기의 난형 미생물로 단순화됨을 확인하였다 (그림 1). 또한 이 SBR 슬러지의 TEM 분석 결과 난형 미생물들의 세포 내에 polyphosphate granule과 glycogen inclusion이 함유되어 있었기 때문에 이들 미생물이 acetate를 탄소원으로 사용했을 때 생물학적 인 제거 작용을 수행하는 미생물로 추정할 수 있었다 (그림 2). SBR 슬러지의 미생물 분포를 알기 위하여 세포 내 quinone 분석을 실시한 결과 ubiquinone-8을 생산하는 *Proteobacteria*의 beta group이 우점종임을 보여 주었고, 또한 PCR에 이용한 16S rDNA 서열 분석 결과 역시 *Proteobacteria*의 beta group에 속하는 *Propionivibrio* 와 *Rhodocyclus* 속에 속하는

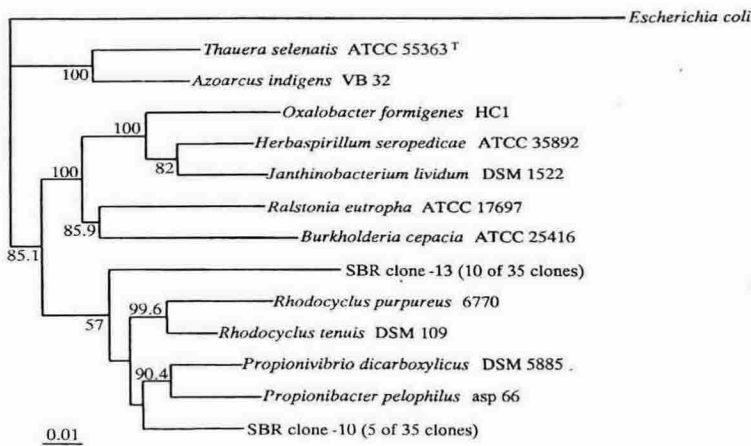


Fig. 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of the dominated clones of beta subclass and some other taxa.

미생물이 가장 많은 분포함을 알 수 있었다. 그러나 기존의 연구자가 인 제거 공정에서 중요하다고 보고한 *Actinobacteria* 그룹은 거의 존재하지 않음을 보여 주었다. 따라서 *Proteobacteria*의 beta 그룹에 속하는 *Rhodocyclus* 유사 그룹이 연속 회분식 공정에서 생물학적 인 제거에 중요하리라 판

단되었다. 이들 우점종의 phylogeny 분석 결과 *Propionivibrio dicarboxylicus* DSM 5885 과 *Rhodocyclus tenuis* DSM 109에 가장 가까운 유연관계가 있음을 확인하였

다 (그림 3). 그리고 이들 비배양학적 방법에 의한 미생물 분포 조사 연구는 전통적으로 생물학적인 제거와 관련이 있다는 *Acinetobacter* ssp., *Aeromonas* ssp., *Pseudomonas* ssp. 등의 미생물들은 소수에 불과함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 여러 가지 분석 방법을 사용하여 *Rhodocyclus*에 속하는 난형 미생물이 생물학적인 제거에 중요함을 간접적으로 알 수 있었다. 그러나, 생물학적인 제거 연구에 대한 완전한 생화학적, 미생물학적 이해를 위해서는 인 제거에 관여하는 미생물의 순수 분리 등 보다 근본적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Mino, T., V. Arun, Y. Tsuzuki, and T. Matsuo, "Effect of Phosphorus Accumulation on Acetate Metabolism in the Biological Phosphorus Removal" (1987), *Advances in Water Pollution Control 4: Biological Phosphate Removal from Wastewaters*, Edited by Ramadori R., 27-38 Pergamon Press, Oxford, England.
2. Wentzel, M. C., L. H. Lötter, G. A. Ekama, R. E. Loewenthal, and G. v. R. Marias, "Evaluation of biochemical models for biological excess phosphate removal" (1991), *Water Sci. Technol.*, **23**, 567-576.
3. Fuhs, G. W., and M. Chen, "Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater" (1975), *Microbiol. Ecol.*, **2**, 119-138.
4. Hiraishi, A., "Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial populations in activated sludge" (1988), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **55**, 39-56.
5. Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge" (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2884-2896.
6. Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K. -H. Schleifer, "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge" (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 792-800.
7. Smolders G. J. F., J. van der Meij, M. C. M. van Loosdrecht, and Heijnen J. J. "Model of the Anaerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process: Stoichiometry and pH Influence" (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 461-470.