

활성슬러지내 *Nocardia* 거품현상 진단을 위한 Fatty Acid Methyl Ester (FAME) 기술

Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Technology for Diagnosing *Nocardia* Foaming in Activated Sludge

이재우^{1,*} · 김일규² · 이석현³ · 안규홍³ · Daniel K. Cha¹

Jae Woo Lee^{1,*} · Il Kyu Kim² · Seok Hun Lee³ · Kyu-Hong Ahn³ · Daniel K. Cha¹

1 Department of Civil and Environmental Engineering, University of Delaware, USA

2 부경대학교 환경공학과

3 한국과학기술연구원 환경공정연구부

(2004년 5월 6일 접수; 2004년 7월 29일 최종수정논문 채택)

Abstract

Fatty acid methyl ester (FAME) technology was evaluated as a monitoring tool for quantification of *Nocardia amarae* causing a nuisance foaming problem in activated sludge process. The identified signature peak was 19:1 alcohol as a reliable unique peak to *N. amarae*. Chemostat study revealed that the distribution and quantity of fatty acid peaks were dependent on the growth stage of *Nocardia*. The FAME results were similar for two relatively high dilution rates; however, the amounts of signature peaks extracted from the 4 and 6 day cultures were significantly higher. This dependence of signature peaks on the physiological state of the organism may be a useful information to assess the health of microbial populations in activated sludge. A laboratory scale batch foaming potential experiment provided a critical foaming level depending on *Nocardia* population. This critical *Nocardia* level determined in this study was in terms of either the threshold filament intersections number or the threshold signature FAME amount. The threshold peak area of signature FAME (19:1 alcohol) and corresponding filament counts were 430PA/mg VSS and 1.45×10^6 intersections/g VSS, respectively. The threshold signature FAME level could be effectively applied as a criterion for diagnosing foam occurrence in activated sludge system.

Key words: FAME, activated sludge foaming, *Nocardia amarae*, foaming potential

주제어: FAME, 활성슬러지 거품현상, *Nocardia amarae*, 거품 포텐셜

*Corresponding author Tel: +1-302-831-1588, FAX : +1-302-831-3640, E-mail: jaewoos@udel.edu (Lee, J.W.)

1. 서론

활성슬러지 공정에서 종종 보고되고 있는 거품(foam) 현상 중 상당수는 *Nocardia* 종의 급증과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 일단 활성슬러지에서 *Nocardia* 개체가 임계수준(critical level)을 넘어 거품 현상이 나타나기 시작하면, 거품현상은 급속도로 진행되어 매우 안정적이며 두터운 거품 층이 포기조 뿐만 아니라 최종침전조의 표면으로 넓게 확산된다(Pitt and Jenkins, 1990; de los Reys III and Raskin, 2002). 이 경우, *Nocardia* 종과 함께 많은 다른 미생물도 거품 층으로 이동하게 되어 포기조 내 슬러지 농도가 급격히 감소하게 된다. 특히, 포기조 슬러지 감소는 유출수 수질 악화를 일으키며, 혐기성소화조 운전에도 심각한 문제를 발생시키기도 한다(Pitt and Jenkins, 1990). 거품현상이 과도하게 진행되어 대부분의 *Nocardia* 종이 거품 층에 존재할 경우, 슬러지체류시간(SRT)과 같은 운전조작으로 제어하는 것이 불가능해진다. 따라서 거품현상을 일으키는 *Nocardia* 개체의 임계수준을 결정하고, 이를 기준으로 주기적으로 감시하고 진단함으로써 사전에 *Nocardia* 거품 피해를 예방하는 것이 바람직하다.

지금까지 *Nocardia* 개체 및 거품현상 제어기술을 정량적으로 평가하기 위한 방법으로 사상체수 측정기술(filament counting methods)이 널리 성공적으로 사용되었다(Cha et al., 1992; Pagilla et al., 1996; Pitt and Jenkins, 1990). 비록 사상체수 측정기술이 비교적 정확하고 의미있는 결과를 제공함에도 불구하고, 많은 시간과 인력이 요구되는 단점을 가지고 있으며, 또한 그람 염색을 실시하는 데 있어서 *Nocardia* 이외의 사상균이 존재할 경우 실험자의 숙련도에 따라 결과가 상당한 영향을 받는 점도 간과할 수 없다. 특히, *Nocardia*가 저해받는 조건에서는 *Nocardia* 사상체의 그람 염색 후 착색이 미미하거나 전무한 경우가 종종 발생하는 문제점도 존재한다.

한편, 분자생물학을 이용한 미생물 분석기술의 발전과 더불어 16S rRNA 정보를 이용한 분석기술이 *Nocardia* spp. 동정 평가에 성공적으로 적용되고 있다(Davenport et al., 2000; de los Reys III and Raskin, 2002). 그러나 유전정보를 이용한 기술은 혼합균주에

대해 직접 적용한 사례가 부족하고, 상대적으로 고비용 분석기술이며 복잡한 조작이 요구되어 모니터링 기법으로 사용되기에는 아직 미흡한 단계이다.

이에 반하여, 미생물 세포막에 포함된 지질에서 추출된 fatty acid methyl esters(FAMEs)는 비교적 단기간에 분석이 가능하며, 활성슬러지와 같은 혼합균주에 대해 특정균주의 분리 배양없이 통합적으로 적용할 수 있는 기술이다. 많은 미생물들은 대부분이 인지질(phospholipids)로 구성된 세포막을 가지고 있으며, 인지질의 존재와 함량은 미생물마다 특이적이기 때문에 독립된 순수배양 미생물마다 분명한 구분이 가능하다(Lechevalier, 1977; Sasser, 1990). 미생물마다 특이성을 갖는 인지질로부터 지방산을 추출하여 분석하는 FAME 기술은 토양이나 하상 퇴적물과 같은 복잡한 환경에 존재하는 혼합균주의 동정에 매우 효과적으로 사용되어 왔다(Ibekwe and Kennedy, 1999; Ellis et al. 2001).

본 연구에서는 혼합시료에서 *N. amarae*를 선택적으로 정량분석하고 생물학적 처리공정에서 발생하는 거품현상을 진단하기 위한 FAME 기술의 적용가능성을 평가하고자 한다. 구체적으로 순수배양균주의 chemostat 연구를 통해 희석율(dilution rate)이 *Nocardia*의 특정 지방산 구성 및 양에 미치는 영향을 조사하였으며, foaming potential 평가실험을 수행함으로써 거품 발생과 관련된 *Nocardia* 특정 FAME의 임계수준을 결정하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 미생물

실험에 사용된 *N. amarae* 순수균주는 순수소가 공급되는 4L의 회분식 반응조에서 1L의 배양액을 사용하여 호기적으로 배양하였다. 탄소원으로 아세트산을 사용하였으며, 농도는 2,300mg/l이었다. 사용된 영양염류 및 미네랄 용액의 조성은 1,000mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,840mg/l Na_2HPO_4 , 2,720mg/l KH_2PO_4 , 290mg/l MgSO_4 , and 67mg/l CaCl_2 이었다. 미량금속용액은 영양염류 용액 1리터에 대해서 2ml를 첨가하였으며, 조성은 1,250mg EDTA, 5,000mg/l ZnSO_4 , 1,000mg/l FeSO_4 , 3,500mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 750mg/l MnSO_4 , 200mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 20mg/l CuSO_4 , and 10mg/l

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 이었다.

성장 정제기인 6일째에 채취된 순수균주 시료는 7000 x G의 조건에서 10분 동안 원심분리를 통해 고액분리하여 상정액을 제거한 후 준비하였으며, 잔존 미네랄 및 영양염류를 제거하기 위하여 2차례에 걸쳐 0.01M NaNO_3 용액으로 세척하였다.

2.2. Chemostat 연구

성장동력학 실험을 위하여 chemostat (Brunswick bioflow C30 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ)이 사용되었으며, 장치는 각각 2리터의 배양조 및 유입, 유출조로 구성되었다. 장치 내의 부피를 1L로 일정하게 유지하기 위하여 일정 수위에 배출장치를 설치한 후 유출펌프를 유입펌프보다 빠른 속도로 운전하였다. 순수산소에 의한 산소공급과 함께 200rpm의 회전속도를 가지는 임펠러를 사용하여 혼합하였다. 반응조 내의 온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지되었다. 유입속도, 용존산소, pH, TSS, COD를 측정함으로써 정상상태에 도달여부를 확인하였다. 4가지 조건의 다른 희석율 (dilution rate: 0.17, 0.25, 0.5, 1 day^{-1})을 적용하였으며, 정상상태에서의 시료를 채취하여 FAME 분석을 하였다.

2.3. Foaming potential 실험

Foaming potential 실험은 예비실험을 통해 선정된 활성슬러지에 *N. amarar* 순수균주를 첨가(spike)하여 수행하였다. 선정된 활성슬러지는 매릴랜드 주 볼티모어에 위치한 Anne Arundel county 하수처리장의 시료로서, 도시하수를 처리하는 활성슬러지이며 사상체수 측정방법을 통해서 *N. amarar*가 거의 존재하지 않음이 확인되었다. 활성슬러지는 4시간 동안 포기를 실시하여 잔여 유기물질을 제거하였으며, 중력침전을 통한 고액분리 후 농축된 슬러지를 준비하였다. 농축 활성슬러지와 *N. amarar*의 양이 VSS 기준으로 각각 0, 2.5, 4.2, 5.9, 9.4, 13%이 되도록 다른 양의 *N. amarar* 순수균주를 첨가하여 시료를 준비하였다. 혼합시료의 최종부피는 200ml, VSS 농도는 1,900mg/l가 되도록 증류수로 희석한 후 각 시료를 500ml 메스실린더에 옮겨 foaming potential 평가실험을 수행하였다. Foaming potential 실험은 메스실린더내의 시료에 대해서 거품발생을 유발시켜 발생된 거품의 최대 부

피가 얼마인지를 측정하는 것으로, 본 연구에서는 일반적으로 사용하는 공기주입방식대신 Alka-Seltzer™를 거품발생보조제로 사용하여 실험하였다. Foaming potential은 최초 혼합 시료의 부피(200ml)에 거품발생 후 증가된 최대 부피의 비율로 정의되었으며, foam stability는 최대 거품 부피의 반감시간으로 정의되었다. 거품발생제 첨가에 앞서 혼합 시료 중 5ml을 채취하여 *Nocardia*의 FAME 분석과 *Nocardia* 사상체수 측정을 하였으며, *Nocardia*의 foaming potential 및 stability의 실험결과로부터 얻어진 임계수준과 비교 평가하였다.

2.4. FAME 추출 및 분석

FAME 분석에서 사용되는 모든 시료는 채취 후 24시간 이내에 추출하여 분석하였다. 완전 혼합 시료 10ml을 4°C 로 유지되는 원심분리기에서 500 x G로 30분 동안 원심분리하였으며, 상등수는 제거하였다. 남아있는 고형시료에 0.2M methanolic potassium hydroxide 25ml을 첨가하여 vortex를 이용하여 교반하였다. 시료를 37°C 수조에 옮겨 10분마다 주기적으로 혼합하면서 1시간 동안 반응을 시킨 후, 1M 아세트산 용액으로 중화하였다. 지방산 추출을 위하여 hexan 10ml을 첨가하여 vortex를 이용하여 혼합 한 후 유기용매와 물을 분리하기 위하여 500 x G로 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층부에 있는 hexan 추출액 5ml을 10ml 시험관에 옮겨 질소가스로 휘발 건조시킨 후, 시험관에 0.5ml hexane:methyl tert-butyl ether(1:1, v/v) 용액을 다시 첨가하여 에스테르화시키면 지방산은 FAME으로 전환되며 이를 가스크로마토그래피(GC)로 분석하였다.

추출된 FAME은 불꽃이온화 검출기 (flame ionization detector)가 장착된 HP5890 GC(Hewlett Packard, Rolling Meadows, IL)에서 HP Ultra 2 capillary 컬럼(25m x 0.2mm x 0.33 μm)을 사용하여 분석하였다. GC 분석 결과와 특정 지방산은 Microbial ID (MIDI) Inc.에서 제공하는 표준 크로마토그램 소프트웨어를 사용하여 해석되고 확인되었다.

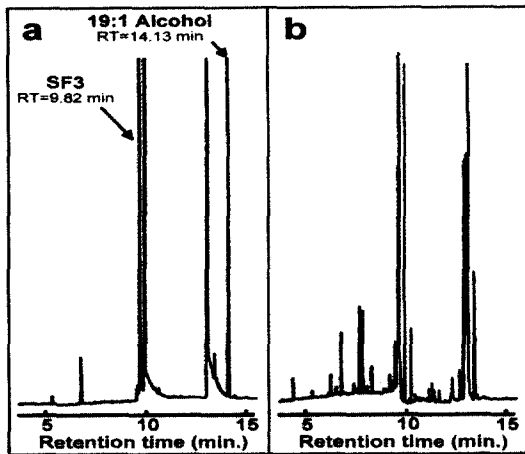


Fig. 1. Gas chromatograms of fatty acids released from (a) pure *Nocardia* cells and (b) an activated sludge sample.

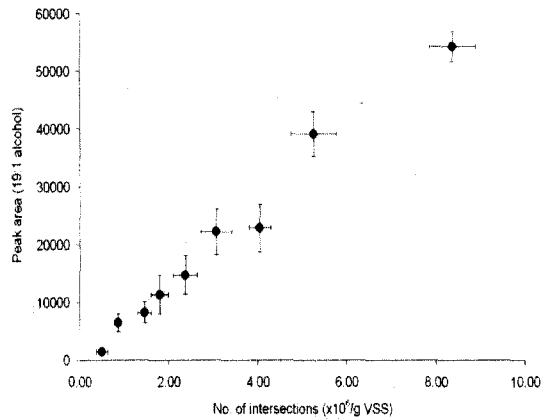


Fig. 2. Comparison of FAME method and the conventional filamentous counting technique for quantification of *Nocardia* levels in activated sludge.

3. 실험결과 및 토의

3.1. *N. amarae*의 특정 (signature) FAME

순수 *N. amarae* 및 활성슬러지에서 각각 추출된 FAME의 GC 분석결과를 Fig. 1과 같다. 많은 수의 지방산들이 활성슬러지 시료로부터 추출되었으며, 이는 시료 내에 존재하는 모든 종류의 미생물들과 관련된 지방산으로 보여진다. 반면, 순수 배양된 *N. amarae* 시료에서는 단지 일곱 종류의 지방산과 관련된 FAME peak들이 추출되었다. 일반적인 활성슬러지 시료와 비교해 보면, 일곱 종류 peak들 중에서 두 개의 peak(19:1 alcohol과 SF3)만이 *N. amarae*에 존재하는 특정 지방산(signature fatty acid)과 관련된 FAME peak인 것으로 보인다. 그러나 SF3는 두 종류의 지방산(15:0 iso 2OH와 16:1 w6c)이 합쳐져 이루어진 peak이며 주변에 다른 peak이 많이 존재하기 때문에, 19:1 alcohol이 *Nocardia* 모니터링에 사용하기에 보다 적절한 특정 지방산 peak이라고 볼 수 있다.

활성슬러지에서 *Nocardia* 수준을 모니터링하는 데 있어서, 19:1 alcohol의 적용성을 평가하기 위해 다양한 양의 *N. amarae*를 포함하는 혼합시료에 대해 FAME 분석을 시도하였다. 높은 수준의 *N. amarae*를 포함하는 시료에서는 큰 면적의 특정 지방산(19:1 alcohol)과 관련된 FAME peak이 추출되었으며, 이 결과는 사상체수 측정시험과 매우 일치하는 결과를 나

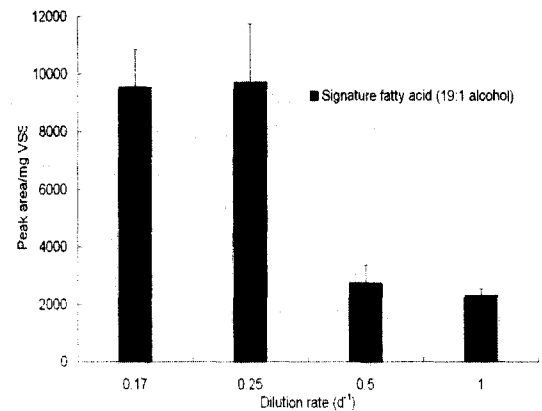


Fig. 3. Effect of steady-state growth rate on the amounts of signature fatty acid extracted from *Nocardia*.

타내었다(Fig. 2).

3.2 Chemostat 연구

활성슬러지의 운전인자 중에서 평균미생물체류시간(MCRT)은 *Nocardia*의 성장 및 생리적 상태에 큰 영향을 미친다. 일반적으로 *Nocardia*는 MCRT가 증가함에 따라 성장이 빠르게 진행되기 때문에, *Nocardia*를 제어하기 위한 방법으로 MCRT를 5일 이하로 줄이는 방법이 제안되기도 하였다(Cha et al., 1992).

성장 동력학이 *Nocardia*의 특정 FAME의 양에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 4가지 다른 희석율(0.17, 0.25, 0.5 그리고 1d⁻¹) 조건을 부여하면서, chemostat

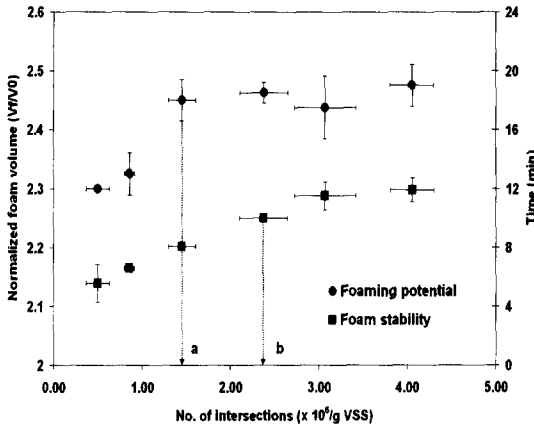


Fig. 4. Threshold level of foaming potential and foam stability of *Nocardia*-spiked to activated sludge sample in terms of filament counts.

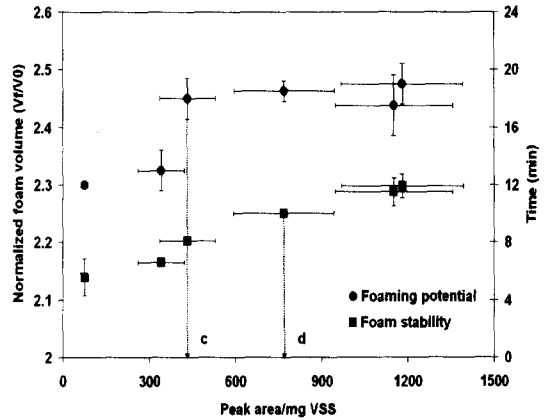


Fig. 5. Threshold level of foaming potential and foam stability of *Nocardia*-spiked to activated sludge sample in terms of signature FAME (19:1 alcohol).

연구를 수행하였으며 그 결과를 Fig. 3에 제시하였다. 높은 희석율을 적용한 두 시료(0.5와 1d⁻¹)에서는 FAME의 분포와 양이 비교적 비슷한 것으로 나타났다. 그러나 MCRT 4일과 6일 (0.25와 0.17d⁻¹) 조건의 시료에서 추출한 특정 FAME(19:1 alcohol)의 양은 분명히 증가한 것으로 나타났다. 즉, 이 결과는 추출한 특정 FAME이 운전조건의 변화에 대한 *Nocardia*의 성장 특성을 잘 반영하고 있으며, 처리장의 거품 발생의 진단 및 제어에 많은 유용한 정보를 제공할 수 있음을 의미한다.

3.3 Foaming potential 실험

Nocardia 수준이 어느 정도일 때 거품발생이 임계점에 도달하는 지를 조사하고, 또 이 때에 특정 FAME (19:1 alcohol)이 어느 정도 수준인 지를 조사하기 위하여 foaming potential 실험을 하였다. 일단, *Nocardia* 거품발생과 관련된 특정 FAME의 임계수준이 결정되면, 처리장에서의 거품 발생 진단을 위한 모니터링 기법으로 FAME 기술의 적용성은 더욱 향상될 수 있을 것으로 기대된다.

Fig. 4와 Fig. 5에서는 *Nocardia* 첨가에 따른 foaming potential과 foam stability의 변화를 사상체수와 표준화된 특정 FAME peak 면적의 변화로 나타내고 있다. 활성슬러지에 *Nocardia* 첨가량이 증가하면 할수록 foaming potential과 foam stability는 증가하는 것을 알 수 있다. Foaming potential은 초기 혼합액의 부피에

대해 거품발생제 첨가 후의 부피 비로 나타내었으며, foam stability는 최대거품부피의 반감시간으로 평가하였다. Fig. 4와 Fig. 5의 a와 c는 foaming potential로 평가된 임계점을 표시하고 있으며, 이 때 활성슬러지에 첨가된 *Nocardia* 비율은 4.2%이었다. 또, b와 d는 foam stability로 평가된 임계점으로 *Nocardia* 비율이 5.9%이었다. 임계점의 결정은 통계학적 방법인 One way ANOVA와 Turkey's post hoc 결과를 이용하여 99%의 유의수준에서 검증되었으며, 각 임계점에서의 차이가 분명한 것으로 판별되었다(ANOVA, P < 0.01). Foaming potential과 관련한 임계 사상체수와 특정 FAME의 면적은 각각 1.45 x 10⁶ intersections/g VSS와 430PA/mg VSS이었다. Foam stability와 관련된 임계수준은 사상체수로 2.37 x 10⁶ intersections/g VSS, 특정 FAME으로 770PA/mg VSS에 해당되었다. 이 결과들은 모두 처리장에서 *Nocardia* 거품발생을 FAME 기법을 이용하여 진단하는 경우 매우 효과적인 기준으로 적용될 수 있으나, 안전성을 고려하여 foaming potential로 평가된 임계수준이 보다 적합한 기준이라고 판단된다.

4. 요약 및 결론

본 연구는 활성슬러지 공정에서 *Nocardia*에 의한 거품발생을 진단하기 위한 모니터링기법으로 FAME 기술을 평가하는 연구로서, chemostat 실험을 통해서

Nocardia 성장특성이 특정 FAME에 미치는 영향을 조사하였으며, foaming potential 실험을 통해서 *Nocardia* 거품발생과 관련된 FAME의 임계수준을 결정할 수 있었다.

1. *N. amarae*의 특정 지방산으로 19:1 alcohol과 SF3이 얻어졌으나, 19:1 alcohol이 보다 적합한 것으로 판단되었다.

2. *N. amarae*로부터 추출된 FAME의 분포와 양은 MCRT 조건에 따라 많은 영향을 받았다. 특정 FAME은 MCRT가 4일 이상인 경우 급격히 증가하는 결과를 보여주었으며, 이는 4일 이상의 MCRT가 *N. amarae*의 성장과 관련하여 매우 양호한 조건임을 간접적으로 의미하는 결과였다.

3. Foaming potential 실험을 통해 FAME 및 사상체수의 임계수준이 각각 430PA/mg VSS 및 1.45×10^6 intersections/g VSS으로 결정되었으며, 이 결과는 거품발생 진단을 위한 모니터링 기법으로 FAME을 사용하는 경우, 매우 유용한 기준으로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원 및 한국과학기술연구원의 지원으로 연구되었음

참고문헌

Cha, D. K., Jenkins, D., Lewis, W. P. and Kido, W. H. (1992)

Process control factors influencing *Nocardia* populations in activated sludge. *Water Environ. Res.*, **64**, 37-43.

Davenport R. J., Curtis T. P., Goodfellow M., Stainsby F. M. and Bingley M. (2000) Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(3), 1158-1166.

de los Reyes III, F. L. and Raskin, L. (2002) Role of filamentous microorganisms in activated sludge foaming: relationship of micolota levels to foaming initiation and stability. *Water Res.*, **36**, 445-459.

Ellis, R. J., Neish B., Trett, M. W., Best, J. G., Weightman, A. J., Morgan, P., and Fry, J. C. (2001) Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination, *J of Microbiological Methods*, **45**, 171-185

Ibekwe, A. M. and Kennedy, A. C. (1999) Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant and Soil*, **206**, 151-161.

Lechevalier M. P. 1977. Lipids in bacterial taxonomy-a taxonomist's view. *Crit. Rev. Microbiol.*, **5**, 109-210.

Pagilla, K. R., Jenkins, D. and Kido, W. H. (1996) *Nocardia* control in activated sludge by classifying selectors. *Water Environ. Res.*, **68**, 235-239.

Pitt, P. and Jenkins, D. (1990) Causes and control of *Nocardia* in activated sludge. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.*, **62**, 143-150.

Sasser M. (1990). Identification of Bacteria through Fatty Acid Analysis. in *Methods in Phytobacteriology*. Klement Z. et al. (eds.) Akademiai, Budapest. 199-204, McGraw-Hill, Inc., New York.