creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

BY: **저작자표시**. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236474

2008年 8月

석사학위 논문

*Klebsiella pneumoniae*에 의한 NO_3-N의 호기성 탈질에 관한 연구

조선대학교 대학원

환경공학과

김 솔 진

*Klebsiella pneumoniae*에 의한 NO_3-N의 호기성 탈질에 관한 연구

A Study on the aerobic denitrification of NO_3-N by *Klebsiella pneumoniae*

2008년 8월 24 일

조선대학교 대학원

환경공학과

김 솔 진

*Klebsiella pneumoniae*에 의한 NO_3-N의 호기성 탈질에 관한 연구

지도교수 정 경 훈

이 논문을 공학석사 학위신청 논문으로 제출함.

2008년 4월 일

조선대학교 대학원

환경공학과

김 솔 진

김솔진의 석사학위논문을 인준함

위원장　조선대학교 교수　최 형 일　인

위　원　조선대학교 교수　신 대 윤　인

위　원　조선대학교 교수　정 경 훈　인

2008년 5월　일

조선대학교 대학원

목 차

List of tables ····· iii
List of figures ····· iv
ABSTRACT ····· vi

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 이론적 고찰 ····· 3

1. 생물학적 질소 제거 이론 ····· 3
1) 질산화 반응 ····· 3
2) 생물학적 탈질화 반응 ····· 11
2. 생물학적 질소제거의 새로운 연구 동향 ····· 15
1) 호기적 탈질 ····· 15
2) 독립 영양 미생물에 의한 혐기성 ammonium 산화 ····· 16
3) 혐기성 암모늄 산화 ····· 17
3. 동시 질산화 및 탈질 ····· 17

Ⅲ. 실험방법 ····· 18

1. 실험재료 ····· 18
1) 균주 ····· 18
2) 합성배지 ····· 19
2. 실험방법 ····· 19
1) Aerobic culture ····· 19
2) Stationary culturee ····· 20
3. 분석방법 ····· 21

Ⅳ. 결과 및 고찰 ····· 22

1. C/N비 변화 ····· 22
2. COD 및 Glucose의 소모 ····· 25
3. 초기 질소농도에 따른 NO_3-N, COD 및 glucose 변화 ····· 26
4. 탄소원 변화 ····· 31
5. 초기 Cell농도에 따른 변화 ····· 34
6. 정치상태에서의 NO_3-N변화 ····· 36
7. NH_4-N와 NO_3-N 동시분석 ····· 37
8. T-N 변화 ····· 39

Ⅴ. 결 론 ····· 41

REFERENCES ····· 42

List of tables

Table 1. Oxidation of nitrogen species during nitrification. ····· 5

Table 2. Relationships for oxidation and growth in nitrification reaction on in relationship to the carbonic acid system. ····· 8

Table 3. Neutron poison of affecting nitrifying bacteria ····· 10

Table 4. Relationships for nitrate dissimilation and growth in denitrification reactions. ····· 13

Table 5. Comparison of energy yields of nitrate dissimilation vs oxygen respiration for glucose. ····· 14

Table 6. Composition of synthetic wastewater. ····· 18

Table 7. Analytical methods and parameters. ····· 21

List of figures

Fig. 1. Effects of different C/N ratios concentrations on NO_3-N removal ····· 20
Fig. 2. Effects of different C/N ratios concentrations on cell growth ····· 22
Fig. 3. Effects of different C/N ratios concentrations on COD removal ····· 23
Fig. 4. Effects of different C/N ratios concentrations on Glucose removal ····· 24
Fig. 5. Effects of different nitrogen concentrations on NO_3-N removal ····· 25
Fig. 6. Effects of different nitrogen concentrations on NO_3-N removal ····· 26
Fig. 7. Effects of different nitrogen concentrations on cell growth ····· 27
Fig. 8. Effects of different nitrogen concentrations on COD removal ····· 28
Fig. 9. Effects of different nitrogen concentrations on Glucose removal ····· 30
Fig. 10. Effects of different carbon sources on NO_3-N removal ····· 31
Fig. 11. Effects of different carbon sources on cell growth ····· 32

Fig. 12. Effects of different cell concentrations on NO_3-N removal ····· 34
Fig. 13. Effects of different cell concentrations on cell growth ····· 35
Fig. 14. Effects of stationary culture on NO_3-N removal and cell growth ····· 36
Fig. 15. Effects of C/N 5 ratio concentrations on NH_4-N and NO_3-N removal and cell growth ····· 37
Fig. 16. Analysis of T-N in cultural supernatant and cells ····· 39

ABSTRACT

A Study on the aerobic denitrification of NO_3-N by *Klebsiella pneumoniae*

by Kim Sol Jin
Advisor : Prof. Kyeong-Hoon Cheong
Department of Environmental Engineering,
Graduate School, Chosun University

The aim of this research is to investigate the effects of several factors on the removal of NO_3-N under aerobic condition by *Klebsiella pneumoniae.*

In the synthetic wastewater initially containing 350 mg/ℓ of NO_3-N. NO_3-N were completely consumed at C/N ratios of 5, 10, 20 and 34.3, but at C/N 2.5, the consumption of NO_3-N stopped at 207 mg/ℓ. For the complete remo val of NO_3-N and complete consumption of glucose, the optimal C/N was 5. Therefore, the addition of external carbon is necessary in the wastewater tr eatment of NO_3-N at C/N less than 5.

The effect of shaking and standing cultures on NO_3-N removal also

investigated.

NO_3-N was removed complete after 24 hours on the shanking culture. NO_3-N was removed complete attained in after 24 hours on the shaking culture. Si milarly the NO_3-N was slowly removed on the standing culture.

By taking the nitrogen balance after cultivation of 24 hours, about 82.5% of removed T-N was denitrified and 7.6% of removed T-N was converted to the intracellular nitrogen.

Ⅰ. 서 론

수계 내 질소 물질은 호소 및 하천 부영양화의 주요 원인이 되며 용존산소를 소비하고 수생생물에 대한 직접적인 독성저해를 일으키는 등 환경 문제의 주요 원인 물질로 알려져 있다.

또한 수중에서 암모니아 형태로 존재하는 질소성분은 질산화 반응을 일으키는 동안에 상당량의 산소를 요구하므로 수중 용존산소를 고갈시키고 유리 암모니아는 수생생물에 유독성을 일으킨다.

수계 내 질소처리는 물리화학적 공정과 생물학적 공정으로 나뉘며, 이 중 생물학적 질소 처리는 미생물의 세포합성과 관련된 동화 및 이화작용을 이용한 것으로 호기 조건하의 질산화 과정과 혐기 조건하의 탈질화 과정으로 구분된다(U.S. EPA, 1993)

즉 암모니아성 질소를 질산화균에 의해 아질산성 질소, 질산성 질소로 질산화하며 탈질균에 의해 질산성 질소를 질소가스로 탈질 처리를 하게 된다는 것이다.

한편, 잘 알려진 A_2O 공정에서 질소제거는 대부분 혐기조와 무산소조에서 제거되는 것으로 알려져 있으나, 일부 연구자들에 의해서 호기탈질, 특히 생물막에서의 호기탈질이 제안되어지고 있다[1]. Watanabe 등[2,3]은 RBC 고정생물막을 이용하여 산소분압에 따른 호기탈질을, 윤 등[4]은 C/N비에 따른 호기탈질 변화. Gupta 등[5]은 호기성 생물막 내에서 질소와 유기물의 동시제거를 연구하였으나 정량적 고찰이 미흡한 실정이다.

이러한 처리 방법들은 잉여 슬러지가 다량 발생하며 슬러지 반송이 필요하고 또 질산화균의 질산화 속도가 유기물 분해속도에 비해 저온 시에 특히 저하되기 때문에 유기물의 처리와 비교해서 두배 이상의 처리시간을 필요로 하고 있어 보다 효율이 좋은 제거기술의 개발이 요구되고 있다. 전통적으로 암모늄 제거는 호기성 조건에서의 질산화 균에 의한 독립영양 질산화와 혐기성이나 무산소 조건에서의 탈질균에 의한 탈질화의 처리방법을 이용해 왔다. 그러나 이 시스템은 NH_4^+를 N_2로 전환하기 위해서 호기와 혐기의 두 가지 반응기가 필요 될 뿐 아니라 독립영양 미생물의 증식속도가 느리기 때문에 고농도 암모늄의 처리에는 불합리하다는 단점을 가지고 있다[6,7]. 전통적인 시스템을 대신하는 수단으로서, 독립영양질산화 균보다 증식속도가 빠르고 단일반응기로서 암모늄을 N_2로 변환하는 것이 가능한 박테리아[8,9]

를 이용한 종속영양 질산화-호기탈질이라는 새로운 방법이 주목받고 있는 반면[10], 최근에는 *Thiosphaera pantotropha*[11]가 혼합된 활성슬러지 프로세스에서 질산성 질소의 호기적 탈질을 보고한바 있고(Mona Kshirsagar et al., 1995), 또한 *Alcaligenes faecalis*[12]에 의한 암모니아성 질소의 호기적 탈질을 보고한바 있으며 (Joo et al., 2005), 여러종류의 *prokaryotic*와 *eukaryotic heterotrophs*가 암모니아성 질소를 NO_2^- 또는 NO_3-N로 질산화 할 수 있음도 알려져 있다[13].

이러한 미생물들은 단일 반응조에서 질소제거가 가능하기 때문에 폐수처리에 있어서 흥미가 있을 것으로 생각된다. 또한 고농도의 질소를 함유하고 있는 폐수에 대한 경제적인 처리에 관심이 증대되면서 질산화에 필요한 공기량과 알칼리 소모를 절감하고 탈질화에 필요한 유기물 양을 감소시키기 위한 연구가 진척되면서 ANAMMOX 반응에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 그러나 ANAMMOX 반응은 독립영양 미생물에 의한 반응으로 미생물 성장속도가 느리며, 유기물을 제거하지 못하는 단점도 있다. 이러한 관점에서 김 등[14]은 유기물과 암모니아성 질소와 질산성 질소를 동시에 제거하는 균주를 분리하여 배양조건을 확립한바 있다.

본 연구에서는 NO_3-N를 제거하는 새로운 방법을 개발하고자 김 등이 분리한 *Klebsiella pneumoniae*를 사용하여 합성배지 중의 NO_3-N를 호기적으로 제거하는데 있어서의 C/N비, 탄소원, 초기 질소농도, Cell농도 등의 영향을 검토하였다.

Ⅱ. 이론적 고찰

1. 생물학적 질소 제거 이론

질소는 폐수에서 여러 가지 형태로 존재하며 폐수처리 시 다양하게 변환된다. 이러한 변환은 암모니아성 질소(NH_4-N)로부터 폐수 내에서 쉽게 제거되는 생성물로 전환된다. 질소 제거를 위한 두 가지 중요한 기작은 동화(assimilation)와 질산화-탈질화이다. 질소는 영양소이 때문에 처리공정 내의 미생물은 암모니아성 질소(NH_4-N)을 흡수(동화)하고 이를 세포로 만든다. 이 암모니아성질소(NH_4-N)의 일부분은 미생물의 죽음과 용균작용에 의하여 폐수내로 되돌아간다. 질산화-탈질화에서 질소의 제거는 두 과정에 의하여 이루어진다. 첫 번째 질산화 단계에서 암모니아는 질산염(nitrate)으로 변환됨에 따라 감소된다. 그러나 질소는 단순히 형태만 변하고 제거되지는 않으며. 두 번째 탈질화 단계에서 질산염은 가스 형태로 전환되어 제거된다. 질산화 작용은 물에서 용존 산소를 소모하게 된다. 따라서 폐수가 유입되는 물, 특히 그 물이 식수원으로 이용될 경우에는 폐수를 방류하기 전에 질산염이 반드시 제거 되어야 한다. 생물학적 탈질(denitrification)이란 미생물이 산소가 없는 상태에서 호흡을 하기 위하여 최종 전자 수용체(terminal electron acceptor)로서 작용하는 질산성 질소를 환원시키는 것을 말하며, 무산소(anoxic)상태에서 일어나기 때문에 혐기성 호흡이라고 한다[25].

1) 질산화 반응

하수중의 질소는 유기성 질소(Org-N), 암모니아성 질소(NH_4-N), 아질산성 질소(NO_2-N) 및 질산성 질소(NO_3-N)의 형태로 존재하는데, 미처리된 하수중의 주된 형태는 유기질소와 암모니아성 질소이다. 오염초기에는 주로 암모니아성 질소로 존재하다가 오염이 회복됨에 따라 호기성 상태에서 질산성 질소로 다시 산화되는데, 이 산화과정을 질산화(Nitrification)라고 한다. 폐수처리공정에서 생물학적 질산화는 암모니아성 질소를 아질산성 질소로 산화시키는 *Nitrosomonas*와 아질산성 질소를 질산성 질소로 산화시키는*Nitrobacter*의 두종에 의해 이루어진다. 암모니아성 질소

의 질산화는 두 단계로 이루어진다. 이 두 단계를 화학식으로 나타내면 다음과 같다.

$$NH_4^+ + 1.5O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+$$
$$NO_2^- + 0.5O_2 \rightarrow NO_3^-$$

위 반응식에서 산소는 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 생물화학적 산화의 전자 전달체이다. 산소는 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*가 이용할 수 있는 유일한 전자 전달체이다. 그러므로 질산화과정이 진행되기 위해서는 호기성 조건이 필수적이다. 생물학적 암모니아 산화반응은 hydroxylamine(NH_2OH)의 생성과 아직도 정확히 규명되지 않은 불안정한 중간물질을 포함하는 복잡한 반응으로서 초기 산화반응에서 hydroxylamine이 생성되기까지 에너지 방출은 없으며, 식(1)에 제시된 바와 같이 NH_2OH가 NO_2^-로 산화되는 과정은 cytochrome계를 포함하는 semiclical 공정이 요구되며, 이때 비로소 아질산성 질소(NO_2-N)가 생성된다[15-17].

$$NH_2OH + O_2 \rightarrow H_2 + NO_2^- + H_2O + \text{Energy} \qquad (1)$$

아질산성 질소(NO_2-N)의 산화과정에서는 어떠한 중간물질도 생성되지 않는다. 이 반응에서 질소원자는 수중에서 질산성 질소로 되면서 전자수용체역할을 하게 된다[18].

Table 1. Oxidation of nitrogen species during nitrification.

NITROGEN OXDATION STATE		
	−III	AMMONIUM NH_4^+
	−II	↘
	−I	HYDROXYLAMINE NH_2OH
	O	↘
	+I	NITROXYL NOH
	+II	↘
	+III	NITRITE NO_2^-
	+IV	↘
	+V	NITRATE NO_3^-
		← *Nitrosomonas* → ← *Nitrobacter* →

Table 1은 질산화 과정이 산화상태의 변화함수로서 연속된 천이과정을 나타내었는데, 암모늄이온에서 아질산이온까지의 산화과정 중에서는 중간생성물인 hydroxylamine과 Hypothetical nitroxyl 형태가 있다고 믿어지며, 질산화의 최종 생성물은 질산성 질소이다[19].

가) 용존산소

DO 농도는 생물학적 처리에서 질산화균 성장률과 질산화율에 큰 영향을 끼치는 주요 영향 인자이다. Monod에 의해 제안된 식(2)은 성장 제한기질을 고려한 DO 농도로 많은 모델에 적용되어 왔다. Monod 식에 의하면 *Nitrosomonas* 비성장 속도 μ_N은 DO 농도에 따라 다음과 같이 주어진다.

$$\mu_N = \mu_N \frac{DO}{K_{O2} + DO} \qquad (2)$$

여기서,

μ_N : *Nitrosomonas* 비성장 속도, day^{-1}

μ_N : *Nitrosomonas* 최대 비성장 속도, day^{-1}

DO : 용존 산소 농도, mg/L

K_{O2} : 산소 반포화 상수, mg/L

식 (2)에서 K_{O2}의 값이 비 특정화된 온도에서 1.3 mg/L, 15℃에서 0.15 mg/L, 25℃에서 0.42 mg/L로 보고되었다. DO 농도는 질산화균의 최대 비성장율에 영향을 주는 것으로 알려져 있고 특정 조건하에서 수중의 DO 농도가 0.5 mg/L 정도인 경우에도 완전한 질산화가 이루어질 수 있다고 보고 되고 있다. 실험실 규모실험에서 *Nitrosomonas*는 1.0 mg/L 이상에서는 저해를 받지 않으며, *Nitrobacter*는 2.0 mg/L 이상에서 저해를 받지 않는다는 보고도 있다[20]. U.S. EPA[21]에 따르면 질산화에 필요한 적정 용존산소범위는 고형물체류시간, 물질 전단율 및 미생물 floc내 확산저항에 따라 달라지긴 하지만, 0.5 ~ 2.5 mg/L로 보고되고 있다. 용존산소는 질산화 미생물의 성장에 대단히 중요한 요소로 순수배양 실험에서 질산화반응의 경계농도는 0.2 mg/L로 보고 되고 있다[20].

나) 온도

질산화는 온도에 의해 영향을 크게 받는다. Nitrifier의 성장에 있어서 최적온도는 *Nitrosomonas*에 대해 30 ~ 36℃, *Nitrobactor*에 대해서는 28℃로 알려져 있다[22]. Nitrifier들의 성장은 보통 4 ~ 50℃에서 일어나고, 4℃ 이하 로 45℃ 이상에서는 성장이 거의 일어나지 않는다고 했다. 또한 15℃ 이하에서는 질산화율이 급격히 감소한다.

다) pH

질산화 과정에서 암모니아의 산화에 의해서 알칼리도가 소모되고 이산화탄소의 생성으로 pH가 감소된다. 질산화 과정중에 HCO_3^-농도가 감소하면서 수중에 탄산(H_2CO_3)이 생성되어 pH는 감소하게 되지만 포기 공정으로 수중의 이산화탄소가 대기로 배출되어 다시 pH가 상승할 수 있다. 알칼리도 소모량을 $CaCO_3$로 환산하면 암모니아성 질소 1 mg 당 7.14 mg의 알칼리도가 소모되는 것으로 계산되나 일반 공학적인 계산에서는 7 mg을 사용한다[23].

라) 알칼리도

질산화 반응은 알칼리도를 필요로 하기 때문에 pH를 일정수준으로 유지하는 것은 매우 중요하다. 암모니아성 질소가 산화된 후에 진존 알칼리도가 50 mg/L 이하가 되면 알칼리도를 첨가시켜줘야 한다. 즉, 적정수준의 알칼리도가 공정내에 완충작용(Buffer)으로 작용하지 않는다면 pH는 떨어질 것이고 질산화 반응에 방해요인으로 작용할 것이다. 질산화가 일어날 때 알칼리도가 소비되는데(Table 2), 세포합성이 무시되었을 때 산화된 암모니아성 질소 1 mg 당 알칼리도 소비는 $CaCO_3$로서 7.14 mg이다.

Table 2. Relationships for oxidation and growth in nitrification reaction on in relationship to the carbonic acid system

Reaction	Equation
Oxidation – Nitrosomonas	$NH_4^+ + 1.5O_2 + 2HCO_3^- \rightarrow 2H_2CO_3 + H_2O + NO_2^-$
Oxidation – Ntrobacter	$NO_2^- + 0.5O_2 \rightarrow NO_3$
Oxidation – Overall	$NH_4^+ + 2O_2 + 2HCO_3^- \rightarrow NO_3^- + 2HCO_3 + H_2O$
Synthesis – Nitrosomonas	$13NH_4^+ + 23HCO_3^- \rightarrow 10NO_2^- + 3C_5H_7NO_2 + 19H_2O + 8H_2CO_3$
Synthesis – Nitrobacter	$NH_4^+ + 10NO_2^- + 4H_2CO_3 + HCO_3^- \rightarrow 10NO_3^- + C_5H_7NO_2 + 3H_2O$

마) 방해물질

질산화 억제인자로는 중금속이나 일부의 유기물질 등을 들 수 있으며, 이들은 질산화 균에 독성을 나타낸다. 이와 같은 독성효과는 질산화균의 성장을 미치는 동력학적 관점에서 양적으로 나타내지는 못하지만, 생물학적 관점에서 독성을 나타내는 작용이 알려지고 있다. 한편, 질산화균은 높은 pH인 7.5 ~ 9.0에서 10 ~ 20 mg/L의 중금속 농도에 견딜 수 있다고 알려져 있다. Fig. 2는 Painter(1970)에 의해 검토된 것으로 질산화균에 독성을 나타내는 물질을 요약한 것이다[24]. 일시적인 산업폐수의 유입이나 고농도 암모니아 등의 유입으로 인해 질산화 균에 악영향을 줄 수도 있다. 이러한 경우에는 안전 처리율을 고려하여 고농도 폐수를 희석 처리해 주어야 한다.

Table 3. Neutron poison of affecting nitrifying bacteria

Organics	Inorganics
Thiourea	Zn
Allyl-Thiourea	OCN^{-1}
8-Hydroxyquinoline	CLO_4^{-1}
Salicyladoxine	Cu
Histidine	Hg
Amino acids	Cr
Mercaptobenzthiazole	Ni
Perchloroethylene	Ag

2) 생물학적 탈질화 반응

생물학적 탈질은 질산이온(Nitrate ion)을 N_2, N_2O, NO로 환원시켜 제거하는 공정이다. 탈질화에 관여하는 미생물은 *Achromobacter, Bacillus, Brevib-acterium, Micrococcus, Pseudomonas* 등이다. 이들 미생물들은 종속영양 미생물이다. 이들은 호기성, 통성 혐기성, 혐기성 등으로 다양하지만 자연계에 존재하는 80%이상이 통성혐기성으로 알려져 있다. 이들 미생물들은 유기화합물을 산화시키는데 전자 전달체로서 산소를 이용하는데, 산소가 없거나 부족한 상태에서는 무산소 호흡을 하며, 이때에는 최종전자수용체로서 화학적으로 결합한 형태의 산소(NO_3^-,SO_4^{2-}등)를 이용한다. 무산소 상태에서 산소의 존재는 통성 혐기성 미생물의 호흡에서의 산소 작용을 통제하게 되는데, 이것은 최종전자수용체로서 화학적으로 결합된 산소보다는 용존산소를 이용할 때 훨씬 더 많은 에너지가 발생하게 된다. 따라서 탈질을 위해서는 용존산소가 존재하지 않아야 한다. 탈질화 과정은 2단계를 거치는데, 첫 단계는 질산성 질소에서 아질산성 질소로의 환원과정[26] 즉, 질산이 세포합성에 필요한 에너지를 얻는데 사용되는 기질로부터 아질산염으로 전환되는 과정이다. 모든 질산 제거 박테리아는 이 첫 번째 반응의 생성물로써 아질산염을 생성한다. 두 번째 단계는 질소가스까지 두 개의 중간 생성물을 거쳐 일어나게 된다. 다시 말해 아질산염이 N_2, N_2O로 제거되는 반응이다. 보통 이 두 단계를 Nitrate dissimilation 또는 respirationd이라 하는데, 미생물(*Micrococcus, Psuedomonas, Denitrobacillus, Spirillum, Achromobacter*)들은 무산소 조건하에서 최종 전자수용체로서 질산성 질소를 사용한다. 탈질 박테리아는 또한 동화(Assimilation)라고 알려진 공정에 의해 아질산을 세포합성에 필요한 암모니아성 질소로 전환시킬 수 있으나, 폐수 내에 암모니아의 농도가 성장에 필요한 만큼 충분하다면 보통 일어나지 않는다. 한편, 산화질소를 암모니아까지 환원시키는 전 과정을 Nitrate assimilation이라고 하는데 여기에 관여하는 미생물은 *Neurospora, Achromobacter Aspergillus*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Azotobacter*가 있다.

가) 온도

탈질 반응은 5 ~ 25℃에서 주로 진행되고 5℃이하에서는 급격히 감소한다. 5 ~ 25℃ 범위에서 탈질율은 온도가 10℃ 증가할 때 대략 2배정도 빨라지는 것으로 보고되고 있다. 3 ~ 30℃범위에서 탈질 반응은 식 (3)의 Arrhenius 온도 관계를 따른다[25].

$$K = Ae^{-E/RT} \qquad (3)$$

여기서, K : 속도상수 (mol/L)

A : 상수

E : 활성화 에너지(cal/mol)

R : 기체상수 (0.082L · atm / mol · K)

T : 절대온도

나) pH 및 알칼리도

탈질소화 반응은 알칼리도가 생성되는 반응이다. Table 4는 질산성 질소가 질소가스로 탈질소가 이루어질 때 탄산(Carbonic acid)은 중탄산(Bicarbonate)으로 전환된다. 이론적으로 알칼리도의 생성량은 3.57 mg(as $CaCO_3$)/mg $N_{reduced}$인데, 실제로는 2.3 ~ 3.0 mg(as $CaCO_3$)/mg $N_{reduced}$ 범위에 있다[27]. 알칼리도의 생성은 시스템의 pH를 높이거나, 질산화와 복합된 시스템인 경우는 알칼리도 손실을 어느 정도 상쇄시킬 수 있다. 탈질소화의 최적 pH는 존재하는 bacteria의 종류나 폐수 내 성분에 따라 달라지지만 보통 pH 7 ~ 8사이에서 결정된다. 질산화 처리 공정이 탈질소화의 최적 pH에 가깝게 운전되므로 특별한 조정은 필요치 않다.

Table 4. Relationships for nitrate dissimilation and growth in denitrification reactions.

Reaction	Equation
Nitrogen dissimilation Nitrate to nitrite	$NO_3^- + 0.33CH_3OH$ $= NO_2^- + 0.33H_2O + 0.33H_2CO_3$
Nitrite to nitrogen gas	$NO_2^- + 0.5H_2CO_3$ $= 0.5N_2 + HCO_3^- + H_2O$
Nitrate to nitrogen gas	$NO_3^- + 0.833CH_3OH + 0.167H_2CO_3$ $= 0.5N_2 + 1.33H_2O + HCO_3^-$
Synthesis - denitrifiers	$14CH_3OH + 13NO_3^- + 4H_2CO_3^-$ $= 3C_5H_7O_2N + 20H_2O + 3HCO_3^-$

다) 용존산소

탈질 미생물들은 용존산소가 충분치 않은 상태에서 NO_3^-나 NO_2^-를 최종전자수용체로 이용하지만 용존산소가 존재하는 경우 다른 무기성수용체보다 낮은 환원전위를 갖는 산소를 선호하게 된다[28].

즉, 호기성 호흡으로 더 많은 ATP가 만들어질 수 있고 무산소상태보다 호기상태에서 탈질 미생물 생성이 훨씬 많아진다. 이것이 탈질화 반응이 산소의 부재 시에만 일어나는 이유이다[29].

Table 5. Comparison of energy yields of nitrate dissimilation vs oxygen respiration for glucose

Reaction	Energy Yield per mole glucose kilocalories
Nitrate Dissimilation $5C_6H_{12}O_6 + 24KNO_3 \rightarrow$ $30CO_2 + 18H_2O + 24KOH + 12N_2$	570 Kcal
Oxygen Respiration $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	686 Kcal

DO 농도가 낮은 경우에 탈질에 관여하는 효소가 합성된다[30]. 탈질균의 순수 배양 실험을 통하여 탈질을 저해하는 용존산소의 농도를 0.2 mg/L 이상으로 보고 있으며 탈질을 제한하는 산소 농도가 0.3 ~ 1.5 mg/L라고 제시하였다[29]. 산소는 NO_2^- 환원 미생물의 성장에 저해작용을 일으키는데, 산소가 NO_3^-의 환원 미생물보다는 NO_2^- 환원 미생물에 더 큰 저해작용을 일으킨다는 것이 밝혀졌다[31]. 5% 포화농도의 DO가 N_2O의 발생율을 감소시킨다고 하였다[32]. 또한 NO_2^- 환원 미생물은 13% 포화농도에 민감하나 NO_3^- 환원 미생물은 산소에 덜 민감하여 13% 포화농도보다 큰 농도에서 저해작용을 받는다고 하였다.

2. 생물학적 질소제거의 새로운 연구 동향

환경 내 질소 화합물의 배출량 증가에 따라 이들의 처리에 관심이 고조되고 있는 가운데 기존의 활성 슬러지 처리 공법뿐만 아니라 질소 제거를 위한 많은 연구와 기술 개발이 시도되어 왔다. 특히 미생물에 의한 새로운 질소 전환 및 새로운 반응기의 배치와 조합에 연구의 초점이 맞춰지고 있다. 최근 토양 및 수계 내 질소 제거를 위한 새로운 미생물학적 가능성들이 보고 되고 있다. 이러한 반응의 예로는 종속영양 질산화(heterotrophic nitrification) 및 호기적 탈질(aerobic de-nitrification), 혐기적 ammonium 산화(anaerobic ammonium oxidization), 그리고 부분 질산화를 통한 탈질 등이 있다[33]. 또한 기존의 활성 슬러지 공법을 이용한 질소제거 공정 외에 미생물 고정화 및 생물여과 반응기 시스템에서 nitrite 경로에 의한 에너지와 탄소원의 절약에 대한 연구도 활발히 진행 중에 있다. 결국 질소제거의 새로운 전환에 기초한 연구들의 세계적 추세는 단순하고, 경제적인 개념의 효율적인 질소제거 공법 개발에 초점을 맞추고 있다. 이에 미생물학적 측면과 반응기 시스템에 대한 현재의 기술들을 알아보고자 한다.

1) 호기적 탈질

동시질산화 탈질 현상과 관련하여 크게 물리적인 원인과 생물학적인 원인으로 나누어 설명할 수 있는데(Pochana, 1999) 먼저 물리적인 원인으로서 호기조 내 DO농도 구배에 따른 무산소 영역의 발생과(Puznava, 2000) 미생물 플록 내 무산소 영역의 형성이 있다(Kubleman, 1988). 그에 따른 DO농도와 플록크기 등 물리적인 원인이 미치는 영향에 관한 연구가 활발히 이루어져 있다(Pochana, 1999). 반면 생물학적인 관점에서는 탈질 미생물이 호기 조건하에서도 탈질을 할 수 있는데 이는 탈질 효소가 비활성화 되기까지는 시간이 걸리므로 높은 DO가운데서도 어느 정도 탈질이 일어난다(Kubleman, 1988). 또한 탈질 미생물의 생리학적 다양성에 의한 독립영양탈질 미생물의 존재를 제안하였고(Helmer, 1998), 특히 전기분해에 의한 수소와 산소를 발생시키고 이를 각각 전자 공여체로 이용하는 탈질 미생물과 전자수용체로 사용하는 질산화 미생물로 인해 질소 제거 효율을 높이는 연

구가 많이 이루어지고 있다(Sakadibara and Kuroda, 1993; Felekke, 1998)[1]. 일반적으로 호기적 탈질 반응은 호기성 상태에서 floc, 생물막, 토양 또는 완전한 혼합이 이루어지지 않은 활성 슬러지에 용존산소가 미생물 cluster 안쪽으로 확산되는데 제한을 받아 무산소 상태로 되기 때문에 일어난다. 이러한 무산소 상태에서 전통적인 탈질화 반응이 일어날 수 있다. floc 크기가 150 ㎛ 범위면 호기성 활성 슬러지 공정에서 탈질이 일어나기에 충분한 무산소 상태를 제공하는 것으로 알려졌다. 또한 생물막 aggregates의 경우 직경이 100 ㎛보다 클 경우 같은 현상이 일어나는 것으로 보고되었다[34]. 호기적 탈질 미생물들은 토양 내 많은 수가 분포하는 것으로 알려졌다. 비록 이들의 비활성(specific activity)이 항상 높은 것은 아니지만, 질소 순환에 있어 화합물의 전환에 상당한 기여를 하는데 충분한 작용을 하는 것으로 알려졌다[33].

2) 독립 영양 미생물에 의한 혐기성 ammonium 산화

최근 질산화 미생물이 혐기적 대사를 수행할 수 있음이 밝혀졌다. Bock[35]등에 의해 *Nitrosomonas eutropha*의 혐기적 대사 작용에 관한 연구가 자세히 밝혀졌으며, 최대 혐기적 ammonium 산화율은 1.3 × 10^{-6} mol NH_4^+/kg protein · s로 나타났다. Ammonium으로부터 산화된 nitite(또는 NO)의 40 ~ 60%가 질소가스로 탈질 되었으며, 중간 산물로 N_2O 및 hydroxylamine이 관찰되었다. *Nitrosomonas eutropha*는 또한 NO_2의 존재 시 용존산소 농도가 3 ~ 4 mg/L일때 탈질 능력을 가지는 것으로 보고 되었다. 이들의 실험에서 생성된 nitrite의 약 50%가 호기적 상태에서 질소 가스로 탈질 되었다. 많은 *Nitrosomonas*의 혼합배양과 순수배양에 있어 산소가 제한된 상태에서 ammonia가 nitrite와 함께 nitrous oxide와 질소 가스로 전환되는 것이 관찰되었다.

3) 혐기성 암모늄 산화

일반적으로 암모늄의 산화는 ammonium mono-oxygenase의 효소 반응에 의해서 산소의 존재 하에 진행된다. 그러나 이론적으로 암모늄은 탈질반응에 전자공여체로 이용될 수 있으며, 이 반응의 free energy는 질산화 반응과 비슷하다[36]. 최근 메탄 생성 반응기의 유출수를 처리하는 혐기성 유동층 탈질 반응기에서 암모늄의 제거가 관찰되었다[37]. 이러한 혐기성 암모늄 산화는 미래의 폐수처리 시스템에서 매우 광범위하게 쓰일 수 있다[38]. 이러한 이유는 하나의 반응기에서 질산화와 탈질화를 동시에 수행할 수 있어 반응기를 축소할 수 있고 암모늄을 전자공여체로 이용하여 아질산성 질소나 질산성 질소와 직접적으로 반응하여 질소가스를 생성하는 반응이므로 탈질에 필요한 유기탄소원을 별도로 공급해줄 필요가 없기 때문이다. 또한 산호의 소비가 거의 없는 반응이므로 동력비의 절감으로 운전비를 줄일 수 있다.

3. 동시 질산화 및 탈질화

동시 질산화-탈질은 질산화와 탈질을 단일 반응조에서 동일한 시간에 수행하는 것으로, DO 농도가 충분히 낮으면(전형적으로 1 mg/L 이하) 탈질은 질산화 및 BOD 산화와 같은 호기성 반응과 동시에 일어날 수 있다. 동시 질산화와 탈질이 가능한 이유는 첫째, DO 농도가 1 mg/L 이상인 경우에만 여러 종류의 질소 환원효소가 억제되고 둘째, 질소 환원효소는 DO 농도가 1 mg/L 이하이면 크게 저해를 받지 않기 때문이다. 그리고 DO 농도는 처리 시스템에서 일반적으로 생성되는 미생물 군집체 내부에서는 높지 않다. 그러므로 전자 공여체가 침투할 수 있으면 생물막 내부에서는 탈질이 상당히 빠르게 일어날 수 있다[39]. Langeland[40]의 연구에 의하면 동시 질산화-탈질 공정에 의하여 100% 질소제거가 가능하다고 하였으며, 운영중인 활성슬러지 공정을 질소제거를 위한 공정으로 전환하기 위하여 실제 처리장에 적용되기도 하였다[41]. 그러나 현재까지 동시 질산화-탈질의 정확한 기작이 구명되지 못하여 동시 질산화-탈질을 적용할 때 주요 문제점인 미생물 체류시간, 수리학적 체류시간, DO 농도 등에 대한 연구가 진행되고 있다.

Ⅲ. 실험방법

1. 실험재료

1) 균주

본 실험에 사용한 균주는 김 등[14]이 토양에서 분리한 *Klebsiella pneumoniae* 이다.

Table 6. Composition of synthetic wastewater

Components	Concentration	Remarks
Glucose	30 g	Carbon Source
NH_4NO_3 $NaNO_3$	1 g 2.13 g	Nitrogen Source
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ KH_2PO_4	15 g 3 g	Phosphorus Source
NaCl $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.5 g 0.2 g 27.03 mg 2 mg	Minerals

2) 합성배지

균주 배양에 사용한 분해배지의 조성은 Table 6과 같으며, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 NH_4NO_3는 별도로 조제하여 autoclave로 살균한 후 사용하였다[48].

2. 실험방법

1) Aerobic culture

Table 6의 배지성상에 Agar 1.5%를 첨가하여 만든 고체배지에 *K. pneumoniae* 균을 접종하여 하루이상 배양한 후 배양된 *K. pneumoniae*균을 조성된 10 ml 액상배지에 접종하여 12시간동안 배양한 후 다시 새로운 10 ml 액상배지에 전 배양액 1%를 접종하여 12시간동안 다시 배양한 뒤 본 실험에 들어간다. 본 실험은 500 mL 삼각플라스크에 150 mL의 배지를 넣고 *K. pneumoniae* 전 배양액 1%를 접종하여 30℃에서 140 rpm 으로 진탕 배양하였다. C/N비에 따른 NO_3-N의 제거효율을 확인하기 위한 실험은 glucose의 농도를 조절하면서 C/N비 2.5 ~ 34.3이 되도록 하였으며, 질소원의 초기 농도에 따른 제거효율을 알아보기 위한 실험에서는 배지 중 $NaNO_3$의 농도를 50 ㎎/L～700 ㎎/L이 되도록 조절하여(C/N비:5), NO_3-N를 측정하였다. 이어서 25 ㎎/L~700 ㎎/L에서 NO_3-N을 제거하는 동안 COD 및 Glucose를 얼마나 이용하는지를 검토하였다. 탄소원에 따른 제거효율을 확인하기 위한 실험에서는 배지중의 glucose대신에 methanol과 acetate를 사용하였다. *K. pneumoniae*의 초기 cell농도에 따른 실험에서는 배양액을 0.5%, 1%, 2% 및 4%가 되도록 접종하였다.

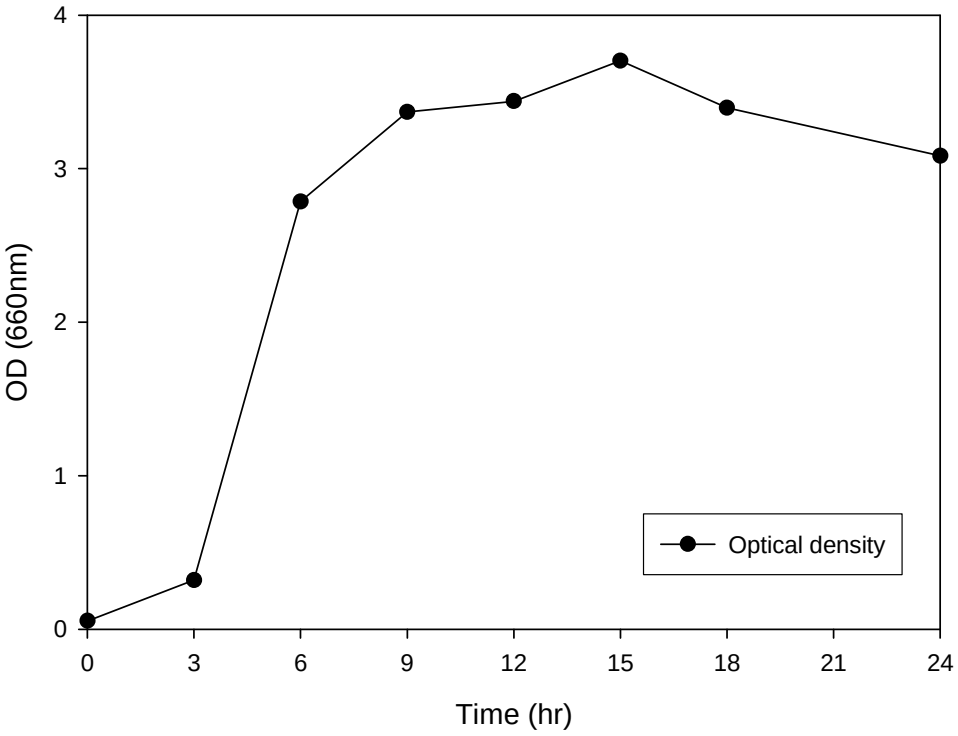

Fig. 1. Effects of Aerobic culture on cell growth.

2) Stationary culture

실험은 500 mL 삼각플라스크에 150 mL의 배지를 넣고 *K. pneumoniae* 전 배양액 1%를 접종하여 30℃에서 정치 배양하였다. 질소원으로는 $NaNO_3$를 사용하였고, 농도는 350 ㎎/L로 하였다(C/N : 5).

3. 분석방법

실험에 사용된 분석 항목 및 분석 방법을 Table 7에 나타내었다. pH, NH_4-N 및 NO_3-N은 수질오염공정시험법[42]에 의하여 측정하였고, Glucose의 농도는 환원당을 측정하는 DNS method[49,50]에 따라 측정하였다.

Table 7. Analytical methods and parameters

Items	Analytical methods
pH	pH meter, TOA HM-20S
NH_4-N	Indophenol method
NO_3-N	UV Spectrophotometric method
Optical density	UV Spectrophotometer (660nm)
Glucose	DNS method
COD_{Mn}	$KMnO_4$ closed reflux method

Ⅳ. 결과 및 고찰

1. C/N비에 따른 NO_3-N 제거

Fig. 2에는 C/N비 변화에 따른 NO_3-N 제거 변화를 나타내었다. 본 실험에서는 glucose양을 달리하여 C/N비를 조절하였으며, 실험 중 *Klebsiella pneumoniae* 균의 증식변화를 Fig. 3에 나타내었다. C/N비 2.5~10에서는 9시간 정도의 lag time이 필요하며 이 후에 NO_3-N이 제거되기 시작하여 실험 18시간에는 잔류 NO_3-N 농도가 각각 207.4 mg/L, 7.024 mg/L, 7 mg/L 으로 각각 41.3%, 98.3%, 98% 제거되었다. C/N비 20과 34.3에서는 lag time이 각각 12시간과 18시간으로 C/N비가 높을수록 초기 NO_3-N이 제거되는 시간이 지체되었으나 C/N비 34.3에서도 실험 24시간에는 91.5%가 제거되었다. 한편, C/N비 2.5인 경우에는 탄소원 부족으로 인해 초기 NO_3-N의 41.3%만 제거되었다.

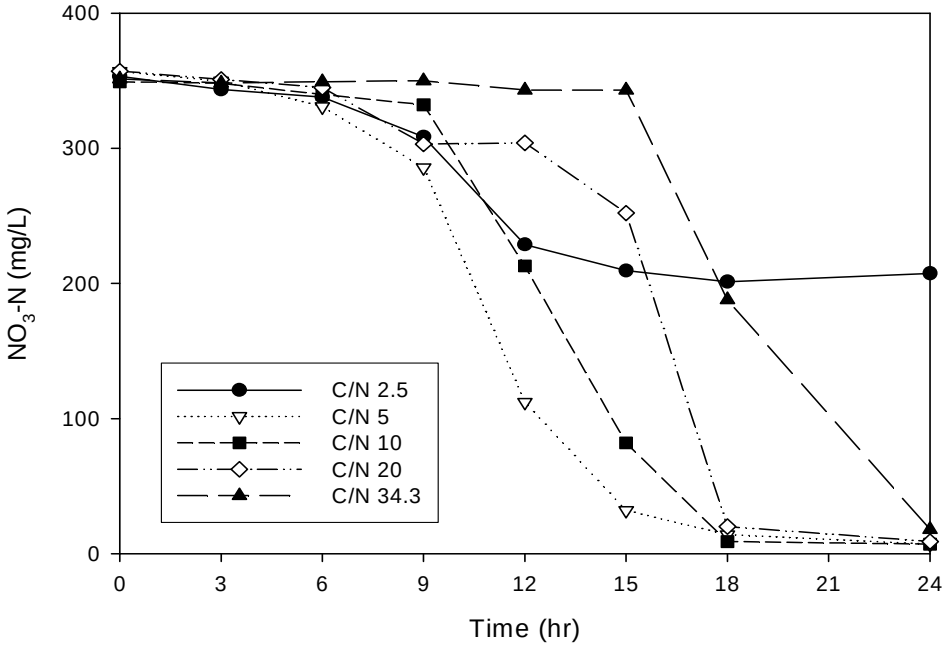

Fig. 2. Effects of different C/N ratios on NO_3-N removal.

Fig. 3에서 보면 C/N비 2.5는 낮은 NO_3-N 제거율과 낮은 Optical density를 보이며 시간이 지날수록 더 이상 증가하지 않는 추세를 보였다. C/N비 10과 20은 비교적 높은 Optical density를 보이지만 C/N비 5에 비해 늦은 cell growth을 보인다. C/N비 34.3 또한 다른 C/N비율에 비해 늦은 cell growth 을 보이지만 24시간 내에 C/N비 20과 근사한 값을 나타낸 것으로 확인된다. 이러한 결과를 보았을 때 *Klebsiella pneumoniae* 균이 NO_3-N의 높은 제거효율과 높은 cell growth를 나타내는 적정 C/N비는 5로 사료된다.

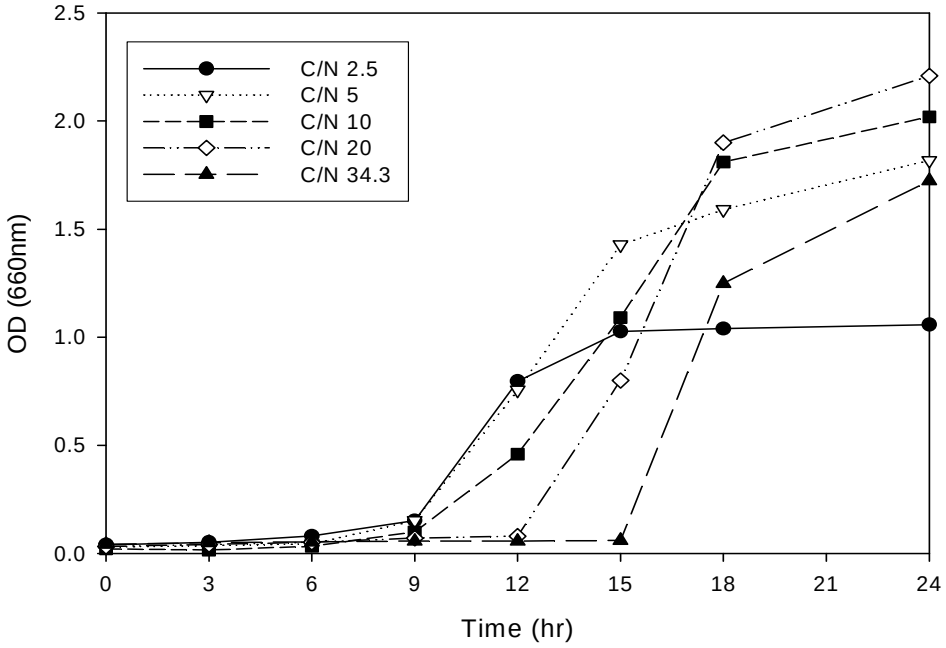

Fig. 3. Effects of different C/N ratios on cell growth.

2. COD 및 Glucose의 변화

Fig 4에는 C/N비에 따른 COD의 변화를 나타내었다. glucose를 분해하면서 소요되는 C/N비 2.5일 경우 70.7%의 COD제거를 나타냈으며, C/N비 5에서 68.1%, C/N비 10에서는 약 71.5%의 제거율을 나타냈으며 C/N비 20과 C/N비 34.3에서는 각각 36.4%와 17.24%가 제거되는 것으로 나타났다. C/N비2.5와 5에서 NO_3-N 1 g당 COD 제거량은 각각 6.79 및 5.37 gCOD/gNO_3-N이며, C/N비 10과 20는 12.05 및 11.49 gCOD/gNO_3-N이고, C/N비 34.3은 9.3 gCOD/gNO_3-N이다.

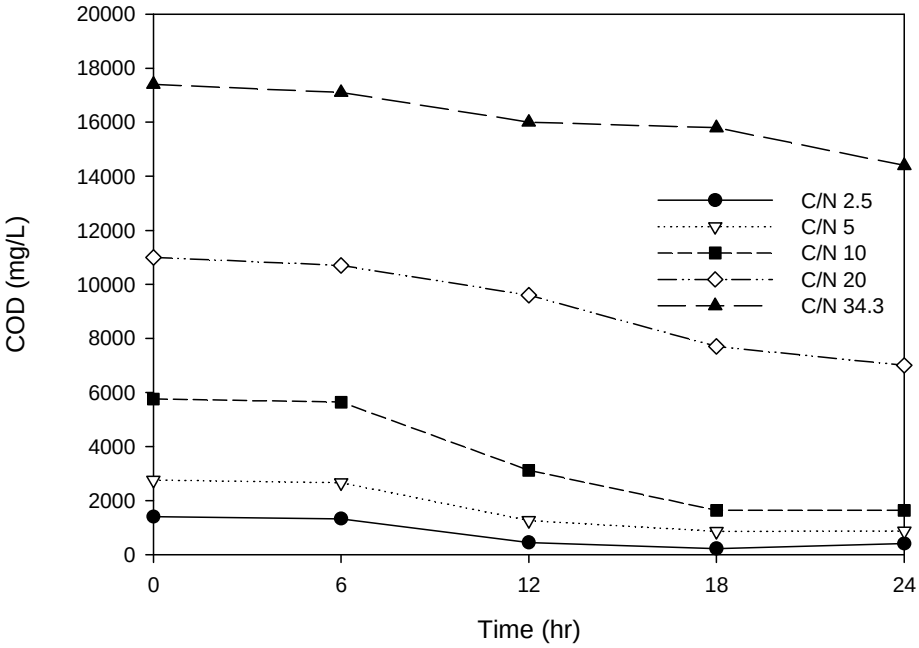

Fig. 4. Effects of different C/N ratios on COD removal.

Fig. 5에는 C/N비에 따른 glucose 변화를 나타내었다. C/N비 2.5에서 91.68%, C/N 5에서 96.8%, C/N비 10에서 70%, C/N비 20과 C/N비 34.3에서는 각각 37%와 24%의 Glucose를 이용하여 NO_3-N를 제거하는 것으로 나타났다. Fig. 2에서 보듯이 C/N비 34.3는 94.8%의 NO_3-N를 제거함에도 불구하고 24%의 glucose만을 이용하였다.

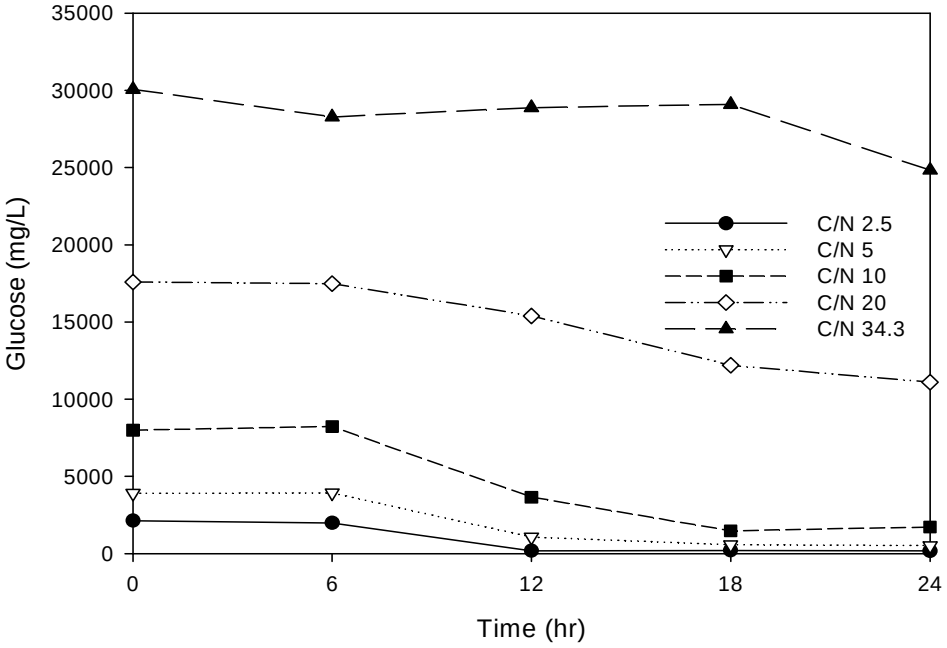

Fig. 5. Effects of different C/N ratios on Glucose removal.

3. 초기 질소농도에 따른 NO_3-N, COD 및 glucose 변화

저농도 암모늄 이온농도가 유입되는 조건에서도 질산화 미생물 농도가 낮은 조건에서는 질산화가 진행되지 않을 수 있으며 고농도 암모늄 이온 농도가 유입되는 조건에서도 질산화 슬러지의 농도를 높임으로서 질산화가 잘 진행되는 연구결과가 보고된 바 있다[47]. 이와 달리 본 연구에서는 *Klebsiella pneumoniae*균을 전 배양액 1%를 일정하게 유지한 뒤 $NaNO_3$을 질소원으로 하였을 때 *Klebsiella pneumoniae*균에 의한 초기 질소농도에 따른 제거 능력을 조사하고자 실험을 수행 하였다. 초기 농도를 달리 하여 측정한 결과f를 Fig. 6과 Fig. 7에 나타내었다.

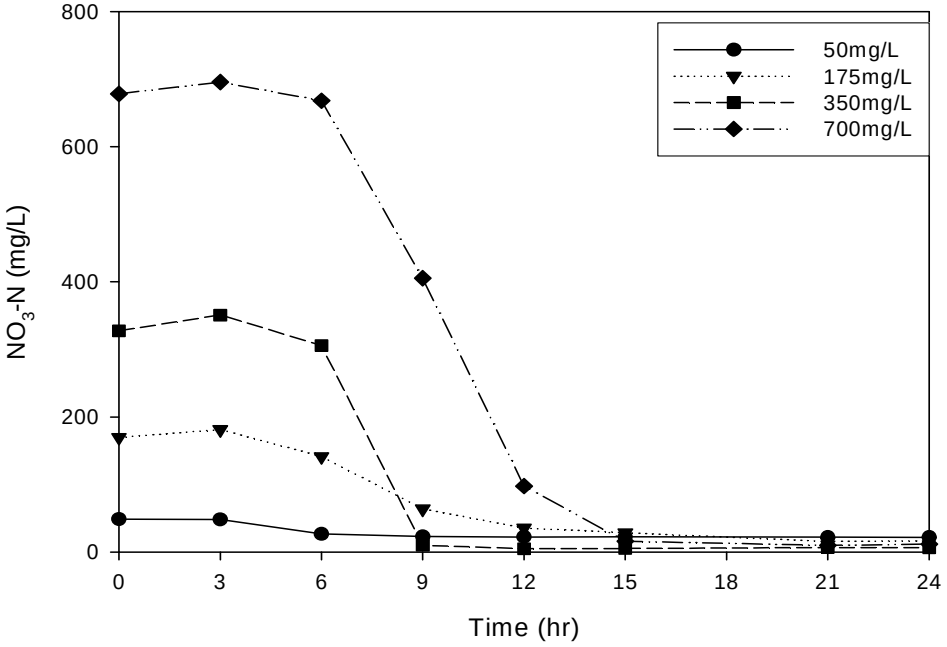

Fig. 6. Effects of different nitrogen concentrations on NO_3-N removal.

배지 중 NO_3-N의 농도를 50 ㎎/L ~ 700 ㎎/L이 되도록 조절하였고, C/N비는 5로 맞추어 실험하였다. NO_3-N 농도 700 ㎎/L에서는 15시간동안 97.6%가 제거되었고 350 ㎎/L에서는 9시간 만에 97%를 제거하였다. 이와 달리 175 ㎎/L 와 50 ㎎/L은 24시간이 경과됨에도 불구하고 각각 55%, 90%의 제거율밖에 나타내지 못했다. Fig. 7에서 cell growth는 NO_3-N의 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있었으나 시간이 지남에 따라 cell growth는 더 이상 증식되지 않는 것으로 확인되었다.

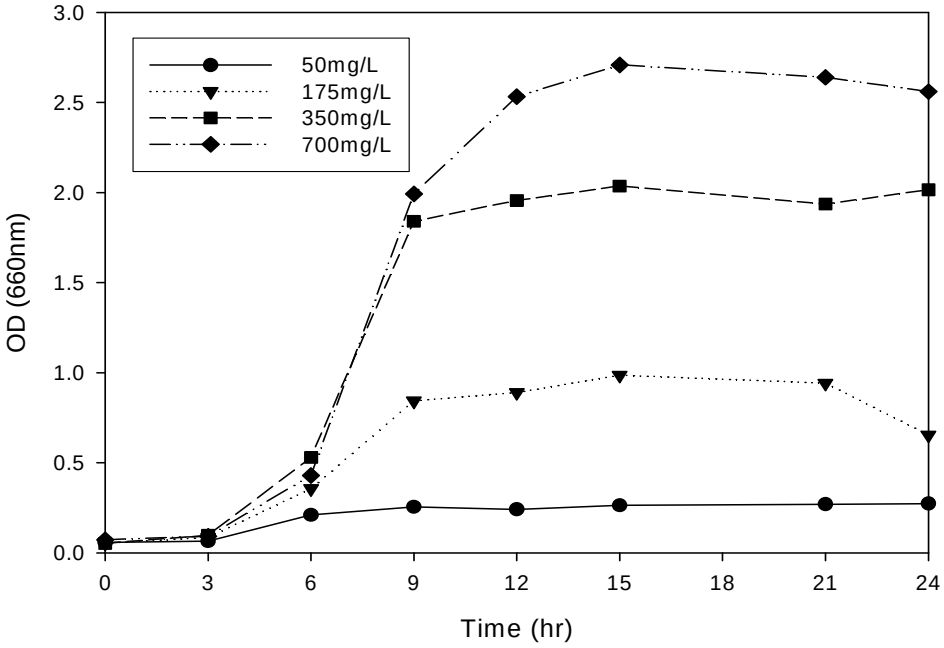

Fig. 7. Effects of different nitrogen concentrations on cell growth.

본 실험에서는 $NaNO_3$을 질소원으로 하였을 때 *Klebsiella pneumoniae*균에 의한 초기 질소농도에 따른 제거 능력을 조사하여 COD 및 Glucose를 측정하여 비교하였다.

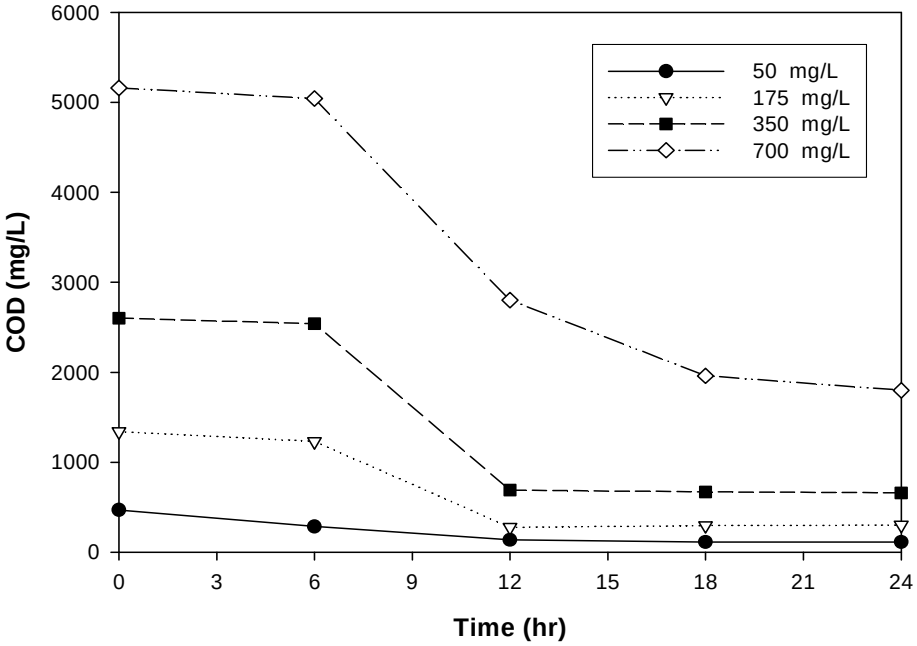

Fig. 8. Effects of different nitrogen concentrations on COD removal.

Fig. 8에서 C/N비를 5로 일정하게 맞추기 위해 질소농도에 따라 glucose양을 조절하였다. glucose를 제거하는데 사용되는 최종 COD는 700 ㎎/L 에서 64.3%, 350 ㎎/L 와 175 ㎎/L 는 74%, 77%를 50 ㎎/L 와 25 ㎎/L 는 76%와 71%로 초기 질소농도의 높고 낮음과 상관없이 비슷한 양상으로 COD를 분해하는 것으로 보인다.

초기 질소농도에 의한 NO_3-N 제거의 실험에 나타난 Fig. 6과 비교하여 Fig. 9의 glucose의 제거 양상을 볼 때 고농도에서는 glucose를 이용하여 NO_3-N을 제거하지만 저농도의 NO_3-N 상태에서는 일정한 glucose양이 있음에도 불구하고 NO_3-N가 완벽하게 제거되지 않는 것으로 나타났다.

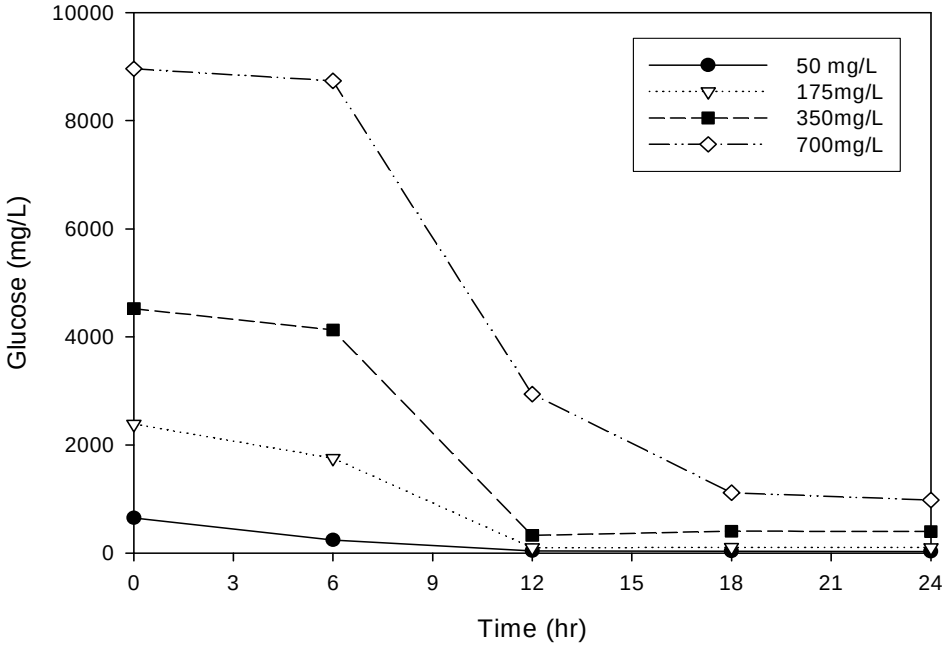

Fig. 9. Effects of different nitrogen concentrations on Glucose removal.

4. 탄소원 변화

Fig. 10과 11은 탄소원 변화에 따른 *Klebsiella pneumoniae*균의 최적 탄소원을 나타낸 것이다. Fig. 10에서 Glucose를 탄소원으로 한 배지의 NO_3-N은 24시간만에 완전히 제거 되었고, Acetate는 24.4%만 제거 되었으며, Methanol은 전혀 제거가 되지 않았다. Fig. 11에서 Glucose에 의하여 미생물이 증식하며 Acetate는 일정 시간동안 증식률을 쉽게 보이지 않으며 Methanol은 거의 미생물의 증식이 없는 것으로 나타났다.

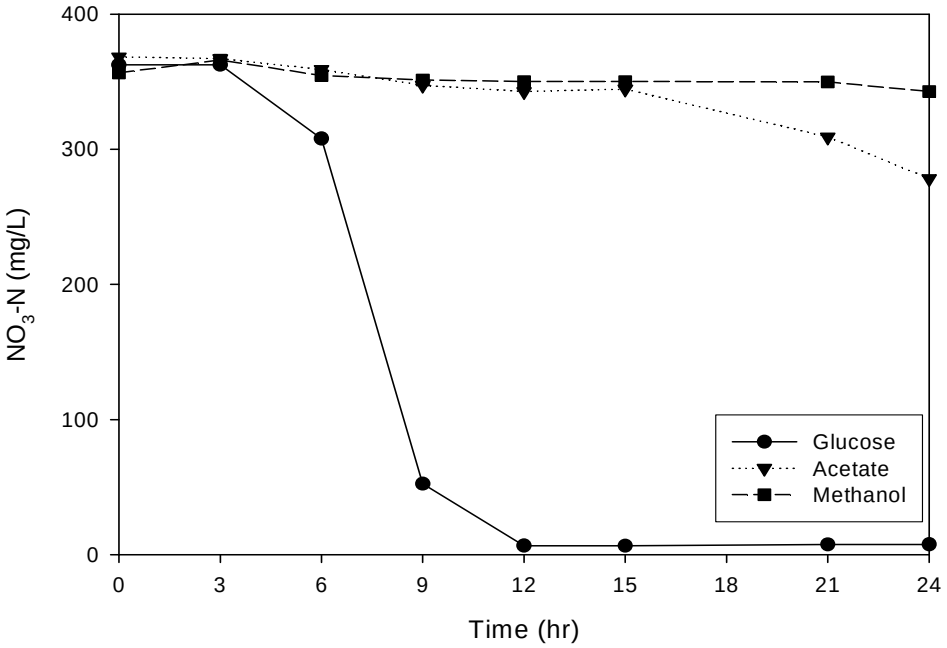

Fig. 10. Effects of different carbon sources on NO_3-N removal.

Fig. 10과 11은 탄소원 변화에 따른 *Klebsiella pneumoniae*균의 최적 탄소원을 나타낸 것이다. Fig. 11에서 Glucose를 탄소원으로 사용한 경우 OD 값이 증가하여 12시간째에는 OD값이 2.00까지 도달하였으나 미생물이 증식하며 Acetate는 일정 시간동안 증식률을 쉽게 보이지 않으며 Methanol은 거의 미생물의 증식이 없는 것으로 나타난다. 윤 등[46]에 의하면 유동여재 A_2O공정에서 와부 탄소원으로 메탄올을 이용하여 무산소조에서 총 무기성 질소(TIN)을 제거하는 연구결과가 보고된 바 있다[46]. 이와 달리 본 연구에서는 탄소원으로 Glucose(C/N비:5), Acetate(C/N비:5), 그리고 Methanol(C/N비:5)을 사용 하였으며, 배지 중 NO_3-N의 농도는 350 ㎎/L 로 한 결과, C/N 비 5에서 전혀 성장하지 않은 것으로 보아 Acetate와 Methanol은 탄소원으로 적합하지 않으며, *Klebsiella pneumoniae*균의 최적 탄소원으로는 Glucose가 적합한 것으로 나타났다.

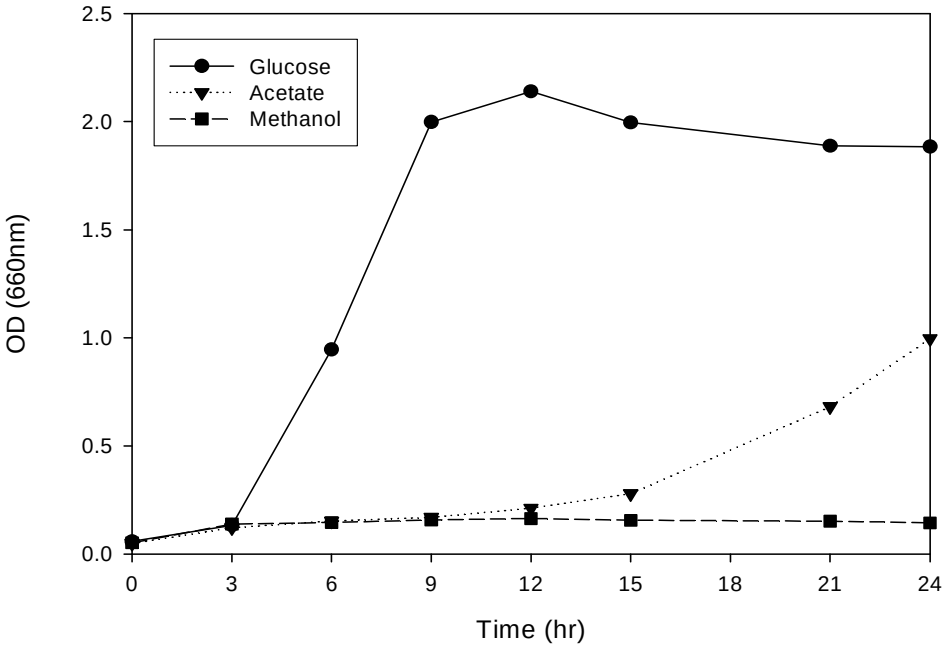

Fig. 11. Effects of different carbon sources on cell growth.

Acetate를 탄소원으로 사용하였을 때에는 실험 12시간까지는 거의 증식하지 않다가 점차 증식하는 경향을 보였고, 실험 24시간째에는 OD값이 0.997에 도달하였으나 반면 Methanol을 탄소원으로 사용한 경우에는 실험기간동안 증식하지 않아 본 실험에서 사용한 Methanol은 본 균의 탄소원으로는 부적합한 것으로 사료된다.

5. 초기 cell농도에 따른 변화

본 실험에서는 초기 Cell 농도에 따른 NO_3-N 제거 변화를 실험하였으며, 그 결과는 Fig. 12과 Fig. 13에 나타내었다. Fig. 12에서 초기 cell농도 2%와 4%를 접종하였을 때 약 12시간만에 제거되었으나, 0.5%를 접종하였을 때에는 24시간정도 소요되었다. 이와 유사한 연구로 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 초기 cell 농도에 따라 실험한 결과 접종하는 cell농도가 많으면 NO_3-N 제거시간이 단축되나 2%이상이면 NO_3-N제거시간이 비슷하게 나온 연구결과가 보고된바 있다[48].

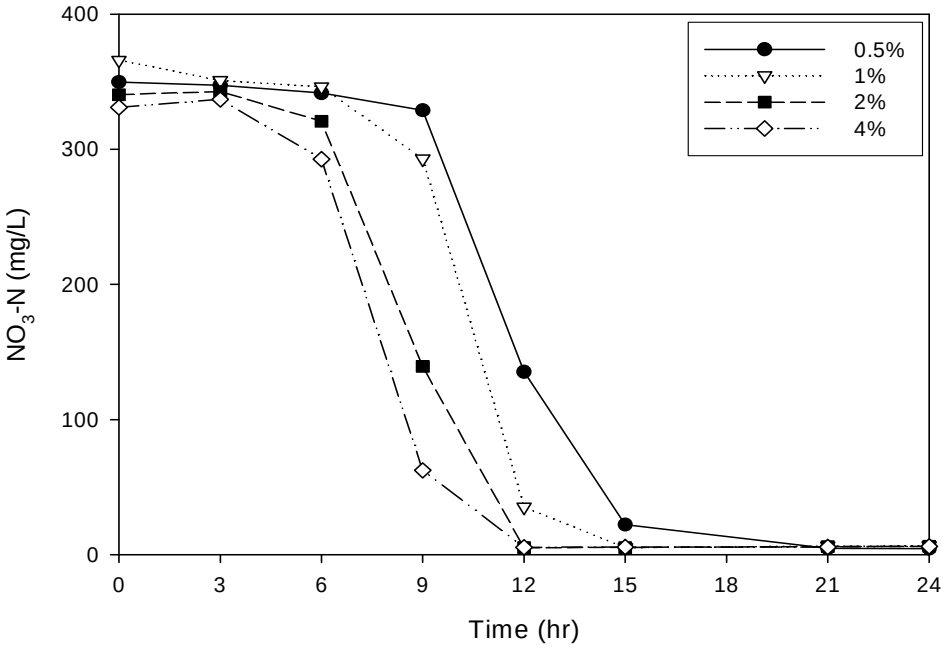

Fig. 12. Effects of different cell concentrations on NO_3-N removal.

Fig. 13에서 cell growth는 cell의 농도에 따라 증식하는 속도가 빠르지만 초기 cell농도의 변화에도 불구하고 최종 cell농도는 비슷한 값을 나타내었다. 따라서 NO_3-N 제거 속도는 초기 cell농도에 의해 영향을 받지만 최종 cell growth는 변화가 없는 것으로 확인되었다.

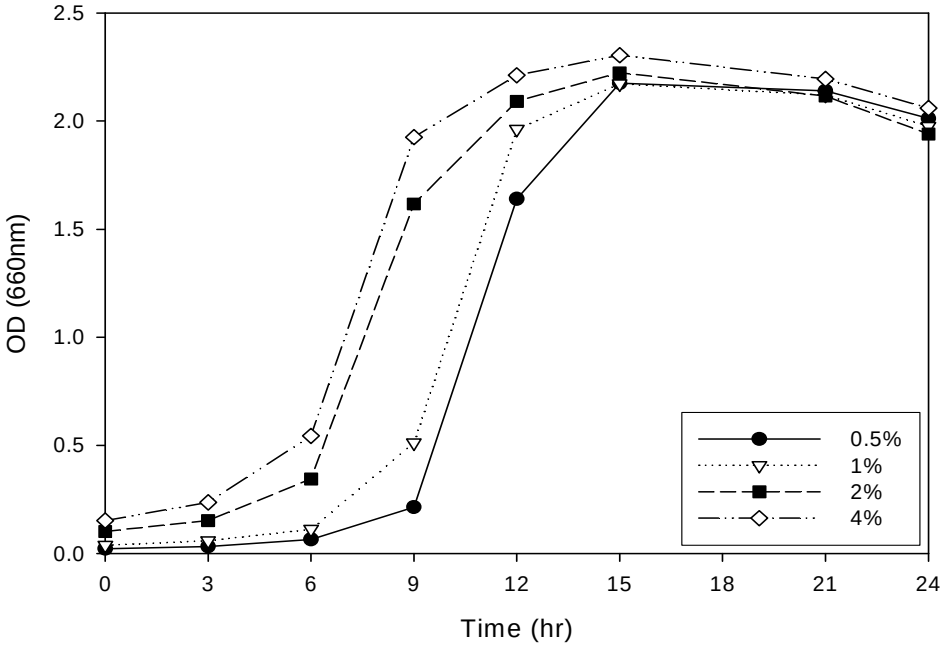

Fig. 13. Effects of different cell concentrations on cell growth.

6. 정치상태에서의 NO_3-N변화

본 실험에서 Fig. 14는 *K. pneumoniae* 전 배양액 1%를 접종하여 30℃ 에서 정치 배양하였다. 질소원으로는 $NaNO_3$를 사용하였고, 농도는 350 ㎎/L 로 하였다 (C/N : 5). 단일 반응조 내 동시 질산 탈질 반응에 관한 연구 보고에 의하면 DO농도에 따라 NO_3-N의 제거효율이 달라지는데 DO농도가 낮을수록 NO_3-N를 제거하는 효율이 더 커지는 것으로 보고된 바 있다[51]. 이와 유사하게 30℃ 에서 140 rpm으로 배양한 Fig. 6의 350 ㎎/L 와 Fig. 11의 Glucose를 이용한 질산성 질소 제거 실험을 비교했을 때 정치 상태에서의 NO_3-N의 제거율은 98%로 다만 최종 Optical density가 조금 낮을 뿐 호기상태와 별다른 차이가 없는 것으로 확인되었다.

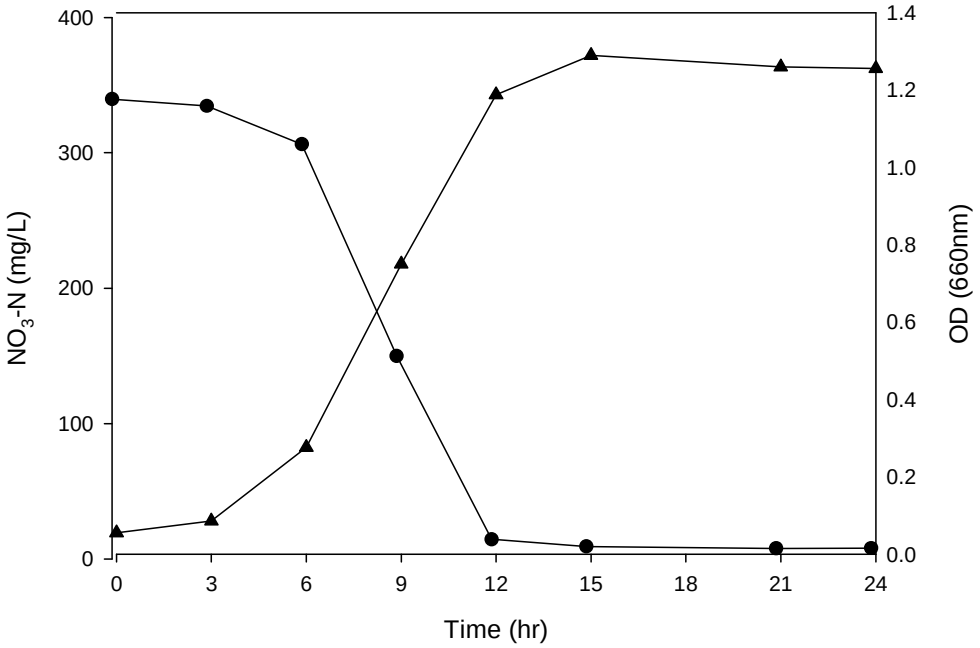

Fig. 14. Effects of stationary culture on NO_3-N removal and cell growth.
●:NO_3-N (350 mg/L) ▲:Optical Density (660 nm)

7. NH_4-N와 NO_3-N 동시제거

본 실험에서는 NH_4Cl과 $NaNO_3$를 이용하여 초기 암모니아성 질소농도를 150 ㎎/L, 질산성질소 농도 350 ㎎/L, C/N비 5상태에서 NH_4-N과 NO_3-N의 변화를 Fig. 16에 나타내었다.

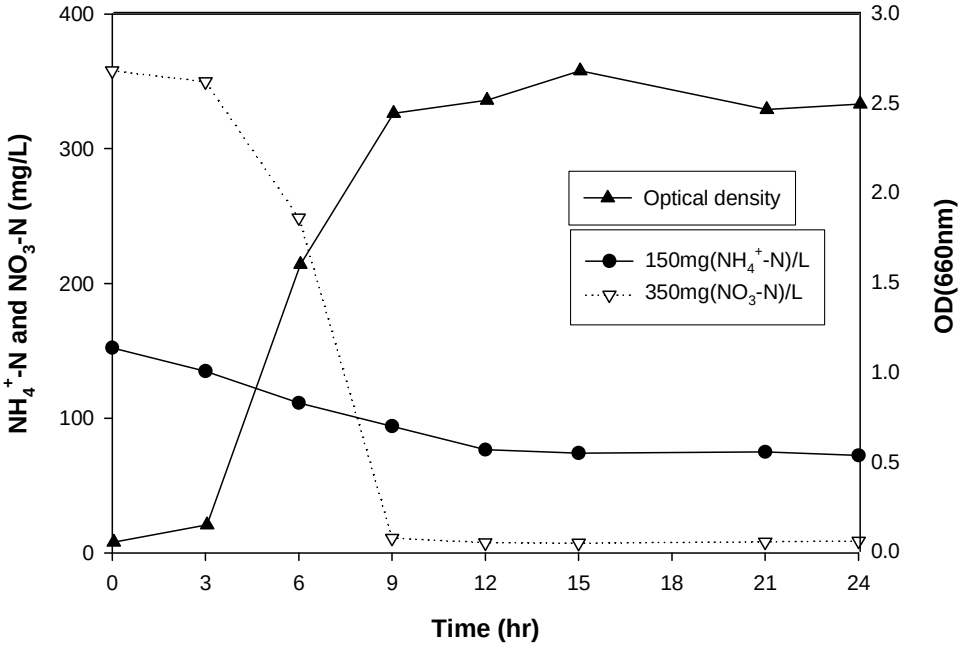

Fig. 15. Effects of C/N 5 ratio on NH_4-N and NO_3-N removal and cell growth.

정 등[48]의 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 NH_4-N 및 NO_3-N의 동시제거에 관한 연구결과에 의하면 NH_4-N 175 ㎎/L까지는 30시간만에 완전히 제거된 연구결과가 보고된 바 있다. 반면, *Klebsiella pneumoniae* 균에 의하여 350 ㎎/L의 NO_3-N는 12시간만에 제거 가능하지만, 150 ㎎/L의 NH_4-N는 24시간동안에 50% 정도만 제거된 것으로 나타났다. Fig. 15를 보면 12시간 지난 후 NH_4-N가 약 75 ㎎/L로 더 이상 제거되지 않는 것으로 보아 *Klebsiella pneumoniae* 균에 의한 동시질산화 탈질을 기대하기에는 좀 더 많은 실험을 통하여 연구되어져야 한다고 판단된다.

8. T-N 변화

본 실험에서는 *Klebsiella pneumoniae* 균의 세포합성을 실험하였다. Fig. 16은 초기 상등액과 세포, 그리고 24시간 후의 상등액과 세포의 질소를 측정한 결과이다. 먼저 $NaNO_3$를 이용하여 C/N비 5 기준으로 측정한 초기 질소양은 60.7 mg이며, NO_3-N 농도는 404.64 mg/L 이다. 30℃, 140 rpm에서 24시간동안 배양한 후의 상등액과 세포의 질소양을 측정한 결과 각각 5.99 mg과 4.61 mg이며, 상등액의 NO_3-N는 약 6 mg/L이었다. 실험 결과 *Klebsiella pneumoniae* 균에 의해 나머지 82.5%은 탈질 되고 7.6%는 세포합성에 이용되는 것으로 사료된다.

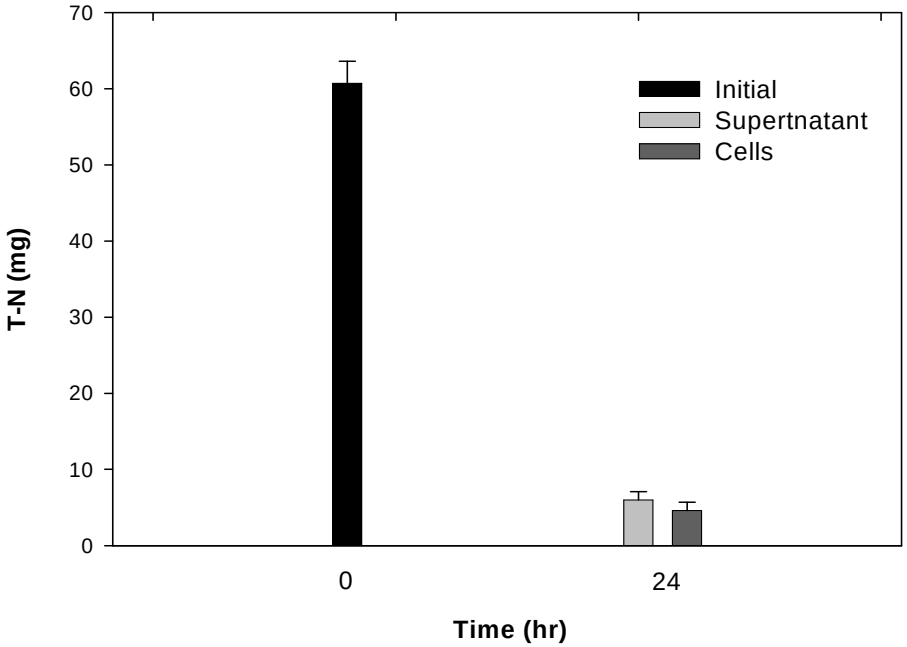

Fig. 16. Analysis of T-N in cultural supernatant and cells.

이와 비슷하게 *Pseudomonas aeruginosa* 균에 의하여 64%의 질소를 탈질 시킨 연구결과가 보고되어진 바 있으며[52], *Alcaligenes faecalis* No. 4에 의하여 종속영양 질산화 반응에 의해서 수중에 아질산 및 질산이온이 종속영양 질산화 호기탈질을 통해 제거되었고, 90%이상이 안전한 질소 가스로 제거되는 연구결과가 보고된 바 있다[10]. 또한 김 등[53]은 NH_4NO_3를 이용하여 초기 T-N 양을 70 mg로 사용한 다른 배지에 *Klebsiella pneumoniae* F-5-2균을 이용하여 T-N을 측정한 결과 10%가 세포에 합성되어진 연구 결과가 보고된 바 있다.

Ⅴ. 결　론

*Klebsiella pneumoniae*을 사용하여 NO_3-N의 제거를 위한 C/N비, C/N비에 따른 COD(Chemical Oxygen Demand) 및 DNS(환원당), 초기 질소농도, 탄소원, cell농도 와 정치상태 및 NH_4-N, NO_3-N 동시제거와 T-N 제거에 대한 영향을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. C/N비 5이상일 경우 NO_3-N가 24시간만에 제거 가능하였으며 높은 C/N비일 경우 제거 속도가 상대적으로 느렸다. 또한 C/N비 2.5일 경우에 제거능력이 떨어졌다. 적정 C/N비는 5이다.

2. 초기 질소 농도에 따른 실험에서 24시간 내에 NO_3-N는 700 ㎎/L에서 98%이상 제거되었지만, 50 ㎎/L에서는 55%만 제거되었다.

3. 700 ㎎/L에서 glucose를 이용하여 NO_3-N를 제거하지만 NO_3-N 50 ㎎/L은 일정한 glucose가 있음에도 불구하고 NO_3-N가 완전히 제거되지 않았다.

4. 탄소원으로 glucose를 사용하였을 때 NO_3-N의 제거가 가능하였으나 methanol과 acetate를 탄소원으로 사용할 수 없었다.

5. 초기 cell농도가 많으면 NO_3-N 제거시간이 단축되나 2%이상이면 NO_3-N가 제거되는 시간은 비슷하였다. 또한 초기 cell농도와 상관없이 최종 cell농도의 Optical density는 비슷하였다.

6. 정치상태에서의 Optical density는 호기상태보다 낮았지만 제거율은 98%로 호기성 상태와 유사하였다.

7. C/N비 5인 상태에서 초기 질소 양 60.7 mg으로 30℃, 140 rpm에서 24시간 동안 배양한 결과 T-N은 *Klebsiella pneumoniae* 균에 의해 82.5%는 탈질 되어지고 7.6%는 세포합성에 이용되었다.

REFERENCES

1) Barnes. D. and Bliss. P. J., "Biological control of nitrogen in wastewater treatment.", *(1st ed) E.& F.N.Spon Co.,* pp. 89~112, 1983.

2) Watanabe. Y., Masuda. S. and Ishiguro. M., "Simultaneous nitrification and denitrification in microaerobic biofilms.", Wat. Sci. Tech. 26(3-4). 511~522, 1992.

3) Masuda. S. Watanabe. Y. and Ishiguro. M. "Biofilm properties and simultaneous nitrification and denitrification in Aerobic RBCs.", *Wat. Sci. Tech.* 23 (3). 1355~1363, 1991.

4) 윤조희, 이상훈, "A2O공정을 이용한 고정생물막법에서 C/N비 변화에 따른 유기물과 질소제거특성." 대한환경공학회지, 21(6).1037~1045, 1999.

5) Gupta. A. B. Gupta. S. K. "Simultanceous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic RBC biofilm.", *Wat.Res.* 33(2).555~561, 1999.

6) Carrera J, Baeza JA, Vicent T, Lafuente J., "Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system.", *WaterRes.* 37 4211-4221, 2003.

7) Itokawa H, Hanaki K, Matsuo T., "Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition.", *Water Res*. 35 657-664, 2001.

8) Schmidt I, Sliekers O, Schmid M, Bock E, Fuerst J, Kuenen JG, Jetten MSM, Strous M, "New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater.", *FEMS Microbiol. Rev.* 772 481-492, 2003.

9) Khin T, Annachhatre AP., "Novel microbial nitrogen removal processes.", *Biotechnol. Adv.* 22 519-532, 2004.

10) 주흥수, Makoto Shoda, "A Study on the Pathway of High-Strength Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacterium, Alcaligenes faecalis No.4.", 대한환경공학회 2006. pp.230-235

11) Mona Kshirsagar, A. B. Gupta, S. K Gupta, “Aerobic denitrification stu dieson activated sludge mixrd with Thiosphaera pantotropha.”, *Environment al technology,* 16:35-43, 1995.
12) Hung-Soo Joo, Mitsuyo Hirai,Makoto shoda, “Characteristics of amonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by Alcaligenes f aecalis no.”, *The Society for Biotechnology*, 100:184-191, 2005.
13) Kuenen, J. G. and Robertson, L. A, “Combined nitrification denitrification processes.”, *FEMS Microbiol. Rev*. 15:109-117, 1994.
14) 김영주, 송영채, 김종오, 박흥석, “혐기성 상태에서 암모니움 이온과 질산성 질소를 제거하는 미생물의 분리 및 배양조건.” *Microbiol. Biotechnol,* 33(1):65-6 9, 2005.
15) Focht, D. D., and Chang, A. C., “Nitrification and denitrification Process es Related to Wastewater Treatment.” *Adu Appl. Microbiol,* 20: 631, 1997.
16) 김용환, 조재현, 이용우, 정용대, “고정상 담체를 이용한 저부하 유기물 폐수처리 및 부착 미생물 특성 고찰.” 한국수질보전학회, 13(3):255-263 1997.
17) EPA, “Process Design Mannual Nitrogen Control.” Washington, DC, 1975.
18) Sharma, B., and Ahlert, R, C., “Nitrification and Removal.” *Wat Res.*, 11: 393-400, 1964.
19) Poduska, R. A. and Adrews, J. F.. “Dynaamics of nitrificationin the Activa ted Sludge Process”, *Jour. water poll. control Fed.*,47:2599-2619, 1975.
20) Sorm, R., Wanner, J., Bortone, G. and Tilche, A. “Behaviour of Activated Sludge from a System with Anoxic Phosphate Uptake”, *Wat, Sci. Tech.,* 3 7:563-566, 1998.
21) U.S EPA. “Manual Nitrogen Control, Office of Wasetwater Enforcement an d Compliance.”, *Washington, D.c*. 1993.
22) Nilson, I. Hilson, S, Morin, N. and K. Mosbach, “Denitrificationin of Water using Immobilized Psedomonas Denitrificationin Cells”, *Eur. J. Appl. Microb iol biotechnol,* 10:261-274, 1991.
23) EPA, “Mannual Nitrogen Control.” EPA/625/R-93/010,Washington, DC, Se mpter, 1993.
24) Painter, H. A.,,"A Review of Literature on Inorganic Metabolism in Microor

ganism." *Wat. res.*, 4(6):393-450,1970.

25) Tchobanoglous, G., Burton, F.L. and Stensel, H.D. Wastwater engi neerin g, McGraw Hill Inc., New Yok, N.Y. 2003.

26) Sumino, T. Nakamura, H. and K. Yukio, "TImmobilization of Nitri-fying Ba cteria by Polyethylene Glycol Prepolymer",*J. Ferment. Bioeng*, 73:37-42, 1 992.

27) Wanger, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.p. and Schleiferm, K.H. "In situ Identification of ammonia - Oxidizing Bacteria", *sys. Appl. Microbio.*, 18:251-264, 1995.

28) WEF, "Design of Wastewater Treatment Plants, 4th ed., Manual of Practic e No.8.", *Water Environmental Federation, Alexandria,* 1998.

29) Simpkin, T.J. "The Lack of Repression by Oxygen of the Denitrifying Enzy mes in Activated Siuge." *Water res.*, 22:201-206, 1981.

30) Payne, W. J, Denitrification, Wiley-interscience, New York, N.Y.1981.

31) Hockenbury,M.R. and Grady, C.P.L."Inhibitition of Nitrification Effects of S elected Organic Compounds."*J. Water Pollu. Cont. Fed.,* 49:768,1977 13-3 3, 1985.

32) Hochstein, P., Ramasarma, T. and Muakkassah-Kelly,s. "Inhibitition of Nitr ification of Dissolved Oxygen." *Water Res.,*20(3):243-250, 1984.

33) Jetten, M.S.M, "Newpathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems." *Plant and Soil.,* 230:9-19, 2001.

34) Van Loosdrecht, M.C.M., and Jetten, M.S.M., "Microbiological conversions in nitrogen removal."*Wat. Sci. Tech.*, 38:1-7, 1998.

35) Winogradsky, M.S."Recherches Sur Les Organismes de la Nitrification", *A nnals Institute Pasteur,* 5:92, 1981.

36) Brodda, E., "Two kind of lithortophs missing in nature", *Z. Allg. Microb* 1 7:491-493, 1977.

37) Wild, H.E., Sawyer, C.N. and McMahon, T.D. "Factors affectiing nitrificati on kinetics." *J. Water Pollu. Cont. Fed,* 43:1845, 1971.

38) Jetten, M. S. M., Horn, S. J., Van Loosdrecht, M.C.M., "Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system", *Wat. SciTech.* 35:171

-180, 1997.
39) Rittman, B. E., and McCarty, P. L., "Environmental Biotechnology : Principal and Applications.", *McGraw-Hill,* pp, 508-511, 2002.
40) Rittmann, B. E., and Langeland, W. E.,“Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches.”, *Appl environ. Microb* 55:300-308, 1985.
41) Bertanza, G., “Simultaneous nitrification-denitrification process in extended aeration plants: pilot and real scale experience.” *Wat. Sci.Tech.,* 35(6):53:61, 1997.
42) 김종택, 수질오염공정시험법 해설, 서울: 신광출판사, 1999.
43) 김영철, 정팔진, 안익성, “자연현상을 이용한 질산화-탈질공정에 의한 하수처리장 유출수의 질소제거” 대한환경공학회지. pp.323~329, 2005.
44) 류홍덕, 김학인, 이상일, “낮은 C/N비에서 운영되는 SBR 유형의 Two -sludge 공정의 질소 제거 특성” 대한환경공학회지. pp.7~14, 2006.
45) 이무재, 박상민, 박노백, 전항배, 김공수, “Biofilter 공정에서 유입 C/N비와 DO가 지하수의 질산성 질소제거에 미치는 영향” 대한환경공학회지.pp 355~361, 2006.
46) 윤조희, 김민수, 김승현, “유동여재 A_2O 공정에서 외부탄소원으로 메탄올을 이용한 낮은 C/N비 하수의 생물학적 질소제거 특성” 대한환경공학회지. pp 687~692, 2006.
47) 김정훈, 김영주, 박홍석, “Effect of Initial Concentration of Ammonium Ion and Active Nitrifiers on Nitrification" 대한토목학회논문집 26(4):421~426
48) 정경훈, 김세영, 임병갑, 최형일, 박상일, 김영주, "Simultaneous Removal of NH4+ and NO3- by *Pseudomonas aeruginosa* " 대한상하수도학회 pp 68~73, 2006.
49) Sun, Y. and J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review" *Bioresource Technol*. 83, 1-11., 2002.
50) Kadar, Z., Z. Szengyel, and K. Reczey, "Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol." *Ind. Crop prod*. 20. 103-110, 2004.
51) 박종일, 이태진, “The Study of Simultaneous Nitrification and Denitrification

in a Single Reactor" 대한환경공학회, 2006. pp.1708-1714
52) 김세영, “*Pseudomonas aeruginosa*에 의한 NH_4^+ 및 NO_3^-의 동시 제거에 관한 연구” 조선대학교, 2007. 2
53) Young-Ju Kim, Makoto YOSHIZAWA, Shinji TAKENKA, Shuichiro MURAKAMI, and Kenji $A_{OKI,,}$ "Isolation and Culture Conditions of a *Klebsiella pneumoniae* Strain That Can Utilize Ammonium and Nitrate Ions Simultaneously with Controlled Iron and Molybdate Ion Concentrations." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(5), 996-1001, 2002.

감사의 글

배울 틈이 없다는 사람은 틈이 있어도 배우지 못한다.
3년을 늦게 시작한 대학생활 4년과 대학원 2년은 나에게 있어 시간의 소중함과 깨달음을 느끼게 하는 시간들이었습니다.
어느덧 대학에서의 시간이 지나 새로운 삶을 향해 가고 있는 지금 그동안 사랑하는 사람들과의 소중한 인연을 맺게 해준 모든 분들께 깊은 감사드립니다.

먼저 따뜻한 관심과 충고로 논문을 지도해주신 정경훈 교수님께 머리숙여 깊은 감사드립니다.
또한 본 논문의 심사를 위해 자상한 지도와 관심을 가져주신 최형일 교수님과 신대윤 교수님께도 깊은 감사드립니다.
그리고 학위과정동안 학문적 성취를 위해 많은 가르침을 주신 정오진 교수님, 이성기 교수님, 김시욱 교수님, 이인화 교수님, 전영남 교수님께 진심으로 감사드립니다.

실험실 생활동안 많은 지식과 도움, 그리고 항상 즐거움을 주신 박상일 박사님, 매번 부탁한 일에도 싫은 내색하지 않고 도와준 착한 경훈이, 힘들었던 나에게 말벗이 되어주고 때론 버팀목이 되어준 나의 후배이자 동기 선미에게도 깊은 고마움을 전하며 실험실 선후배님께도 고마움을 전합니다. 또한 뒤에서 알게 모르게 도와준 창범오빠에게도 고맙단 말을 하고 싶습니다.

무엇보다 학위과정동안 저의 새 식구가 되어준 신랑 오철웅과 늦게나마 공부하는 저에게 항상 많은 이해와 관심을 가져주신 사랑하는 시아버지 시어머니께 깊은 감사드립니다. 또한 착한며느리로 그리고 이쁜 동서로 자리매김하게 도와준 우리 형님과 아주버님 그리고 학위 과정동안 태어나 집안의 기쁨이 되어준 우리 쌍둥이 조카 승현이 동현이에게도 고마움을 전합니다.

끝으로 이 논문을 쓰기까지 항상 저를 믿고 자랑스럽게 생각해주시며 헌신적으로 제 뒷바라지를 해주신 사랑하는 아버지 어머니께 깊은 감사드리며 이 논문을 드립니다. 또한 중국에서 열심히 공부하는 내 동생 혜린이와 대학을 앞둔 고3 수험생 막내 유린이에게도 사랑한다는 말과 함께 고맙다는 말을 전하며 이 시간들을 헛되이 하지 않는 자랑스런 딸로서 며느리로서 아내로서 열심히 살 것을 약속합니다.

저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20077111	과 정	석사
성 명	한글: 김 솔 진 한문 : 金 솔 진 영문 : Kim Sol Jin				
주 소	전남 보성군 벌교읍 회정리 장미 아파트 806호				
연락처	E-MAIL : rlathfwls@hanmail.net				
논문제목	한글 : *Klebsiella pneumoniae*에 의한 NO_3-N의 호기성 탈질에 관한 연구 영어 : A Study on the aerobic denitrification of NO_3-N by *Klebsiella pneumoniae*				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2008 년 8 월 일

저작자: 김 솔 진 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하