

미생물 실험을 이용한 생물학적 폐·하수처리



연재

이 문 호 | 이호환경컨설팅 대표이사

한국과학기술원 생물공학과 이학석사, 국립환경과학원 12년 근무
(95~현재) 이호환경컨설팅 대표
tel. 031-407-8001 | leehojamun@hanmail.net

하수, 폐수, 활성슬러지 시험법

6. 질산화세균수 시험

폐수나 하수내에 존재하는 N 성분은 주로 NH₃-N이나 유기태질소이다. 그러나 특정폐수의 경우에는 NH₃-N 대신 NO₃-N만 있는 폐수도 있고 또 어떤 폐수에는 NO₃-N과 함께 NO₂-N이 고농도로 함유되어 있는 폐수도 있다. 어느 경우에는 생물학적으로 N를 제거하기 위해서는 NH₃-N를 NO₂-N이나 NO₃-N으로 변화시켜야 한다.

NH₃-N을 NO₃-N까지 변화시키는 과정에 2가지 종류의 미생물이 관여한다. NH₃-N을 NO₂-N으로 변화시키는 과정에 관여하는 세균(암모니아산화세균)과 NO₂-N을 NO₃-N으로 산화시키는 세균(아질산산화세균)이다.

먼저 이 2과정에 관여하는 세균의 수를 측정하여 활성을 분석하는 방법이다. 국내에 발간된 논문에서 보면 평판배양법(NH₃-N이 함유된 무기배지)으로 질산화세균을 순수분리했다고 보고된 게 있는데 본인의 실험에서는 평판배양에서 작은 집락(colony)이 생성되긴 했어도 그 집락의 세균을 분리하여 질산화활성을 측정해본 결과 질산화활성이 없었다. 그러므로 평판배양에서 생성된 집락은 배지내 agar에 포함된 불순물(유기물)을 먹고 자라는 유기영양세균일 것으로 생각한다. 그러므로 평판배양으로는 질산화세균을 배양하여 그 수를 헤아리기 어렵다고

본다. 그렇다면 결국 MPN법으로 질산화세균을 실험할 수 밖에 없다. MPN법은 실험과정이 번거롭고 또 배양시간이 길어야 하므로 MPN법으로 질산화세균수를 측정하여 실제 폐수처리에 활용하기엔 어려운 점이 있다. 그러나 진단에 꼭 필요하다거나 대책수립에 꼭 필요하며 배양시간이 길더라도 감수해야 한다.

6-1. 암모니아산화세균수

6-1-1. 배지

(NH ₄) ₂ SO ₄	30mg(6mg-N)
KH ₂ PO ₄	100mg
EDTA-Fe	6mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	50mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	20mg
NaHCO ₃	200mg
純水	1L
pH	7.0

6-1-2. 시험방법

1) 활성슬러지 플럭의 파괴

플럭의 파괴방법으로는 ①blender ②homogenizer ③초음파파쇄기 ④플럭분산제 등이 이용되고 있다.

blender를 미리 멸균시켜 둔다. 아니면 blender를 물에 담귀 30여분간 끓인다.

일정량의 멸균희석수를 blender에 넣고 일정량의 시료를 혼합한 다음 슬러지플러를 파쇄시킨다. 한꺼번에 너무 긴 시간 파쇄시키지 말고 잠깐 잠깐 여러번 파쇄시킨다. homogenizer로는 얼음 냉각하에서 5분간 처리한다.

초음파파쇄기로는 슬러지농도를 1,000mg/l 이하로 희석한 시료를 지름 16.5mm 시험관에 넣고 출력 100W로 얼음 냉각하에서 60초정도 처리하면 좋은 결과를 얻는다. 때로는 간이적으로 활성슬러지 플러를 파괴시키기도 한다. 시험관에 약 5mL의 폭기조 혼합액을 취하고 5mL 피펫으로 시료를 빨아올린 다음 힘차게 뿜는다. 플러가 거의 파괴된 것처럼 보일 때까지 이 조작을 계속한다. 그러나 이 방법으로는 균수의 최대치를 얻기가 매우 어렵다는 사실을 알아야 한다.

2) 접종

MPN법으로 시험한다.

배지가 들어있는 5개의 시험관에 희석배율별로(무희석시료, 10배, 100배, 1,000배, 10,000배, 100,000배 희석시료) 희석된 시료 각 1mL씩을 5개의 시험관에 접종한다. 사정이 여의치 않다면 5개의 시험관 대신 3개의 시험관으로 시험하여 3-tube MPN표로부터 결과를 구할 수도 있다.

3) 배양

28 ~ 30°C에서 20일간 배양한다.

그러나 배양온도를 현장의 폭기조 수온과 동일하게 20 ~ 35°C범위로 할 수도 있다. 배양시간이 길어지면 음성이던 시험관이 양성으로 변할 수 있다. 그러면 우리가 계수하는 균수가 증가하게 된다.

하수처리장 활성슬러지시험에서 배양시간에 따라 양성시험관수의 변화를 계수해 보

았다. 배양온도는 30°C였다. 그림-1에서 보면 6일 배양에서는 양성시험관이 1개도 나타나지 않았다. 11일 배양에서는 양성시험관이 나타났고 20일 배양이후에는 양성시험관수의 증가가 없었다. 그러므로 최소한 20일은 배양해야 신뢰할 만한 결과를 얻는다는 것이다.

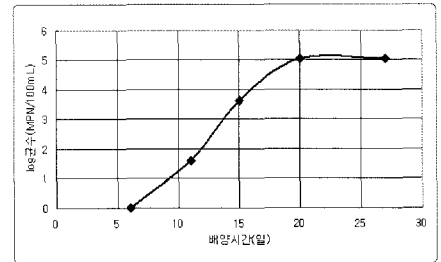


그림-1. 배양시간에 따른 암모니아산화세균수 증가

4) 계수

일반 종속영양세균은 균체의 증식에 수반되는 배지의 혼탁을 가지고 판정할 수도 있지만 질화세균은 증식된 균체량이 너무 적으므로 기질(NH_4^+ 또는 NO_2^-)의 消失 또는 代謝産物(NO_2^- 또는 NO_3^-)의 생성으로 양성시험관, 음성시험관을 판정한다. 일반적으로는 기질의 소실보다 대사산물의 생성을 확인하는 방법이 더 예민하다.

그러나 기질의 소실이나 대사산물의 생성을 시험하기가 쉽지 않으므로 간단하게 pH의 변화를 지시해주는 지시약을 사용하여 양성, 음성을 판정하기도 한다. 암모니아산화세균시험에서는 발색시액을 시험관에 첨가하여 짙은 홍색을 띠면 양성시험관으로 한다. MPN법으로 계수하지만 배지가 무기염류만의 조성이므로 선택성이 높고, 공존하는 잡균의 영향도 많이 받지 않으므로 대체로 정확한 계수가 MPN법으로도 가능하다.

5) 발색시액의 조제

A액 : sulfunilic acid용액

따뜻한 증류수 70mL에 sulfunilic acid 0.5g을 용해시키고, 냉각후 acetic acid 30mL를 혼합한다. 증류수를 첨가해 전량을 100mL로 만든다. 냉암소에 보관하면 1개월간 안정하다.

B액 : α -naphthyl amine액

acetic acid 30mL에 α -naphthyl amine 0.5g을 용해시키고 증류수를 첨가해 전량을 100mL로 만든다. 냉암소에 보관하면 1개월간 안정하다.

사용직전에 A액과 B액을 같은 양으로 혼합한다. 발색시액의 첨가량은 배양시험관에 발색시액 3방울을 첨가한다. 이 발색시액은 NO_2 -N과 반응하므로 암모니아산화세균의 계수에서는 붉은색이 나타나면 양성(+)이다. 아질산산화세균의 계수에서는 무색이어야 양성(+)이고 붉은색이 나타나면 음성(-)이다.

6) 평가

질산화세균의 비증식속도는 종속영양세균의 1/10정도 밖에 되지 않는다. 따라서 BOD부하가 낮고 SRT가 긴 활성슬러지에서는 우점화되어 활성슬러지 1g당 암모니아산화세균수는 $10^6 \sim 10^8$ 정도, 아질산산화세균수는 $10^5 \sim 10^8$ 정도 된다. 질산화세균은 증식속도가 느려 배양시간이 20일 등으로 배양기간이 긴 것이 질산화세균을 계수하는데 최대의 문제점으로 되고 있다. 그러나 아주 정확한 계수보다는 현장에 필요한 자료를 얻기 위함이라면 배양시간을 좀더 단축시켜도 가능하다. 배양온도를 높게 하거나 배지의 NH_3 -N 농도를 높게 하면 배양시간을 조금 더 단축시킬 수 있다.

양성시험관과 음성시험관을 발색유무(NO_2 -N 생성 유무)로 판정한다. 그러므로 배양도중에 배양액의 일부를 무균적으로 취하여 NO_2 -N 측정하면 훨씬 빠른 시간내에 결과를 얻을 수도 있다.

6-2. 아질산산화세균수

6-2-1. 배지

KNO_2 (또는 NaNO_2)	30mg
KH_2PO_4	100mg
EDTA-Fe	6mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20mg
NaHCO_3	200mg
純水	1L
pH	7.0

6-2-2. 시험방법

암모니아산화세균수와 동일

6-3. 측정예

6-3-1. 하수처리장 A

폭기조내에 침축재가 들어있고 부유활성슬러지량은 매우 적었다. 부유슬러지의 질산화세균수와 질산화활성을 2회 조사하였다.

표-1. 하수처리장 활성슬러지의 질산화세균수 (8월 12일 조사)

	폭기조-1	폭기조-3
암모니아산화세균수(MPN/100mL)	4,300	7,500
아질산산화세균수(MPN/100mL)	430	2,300
질산화활성(mgNH ₃ -N/gMLSS/hr)	0.09	0.98

표-2. 하수처리장 활성슬러지의 질산화세균수 (8월 18일 조사)

	폭기조-1	폭기조-3
암모니아산화세균수(MPN/100mL)	7,500	1,100,000
아질산산화세균수(MPN/100mL)	430	110,000
질산화활성(mgNH ₃ -N/gMLSS/hr)	0.12	0.98

8월 18일 조사에서 암모니아산화세균수와 아질산세균수가 8월 12일보다 훨씬 많이 나타났지만 질산화활성은 비슷하게 나타났다. 실제 하수처리장에서 질산화가 일어나지 않고 있을 때

질산화세균도 없고 질산화활성도 없는 경우와 질산화세균은 있는데 질산화활성이 없는 경우는 차이가 컸다. 물론 대책에 있어서도 달라야 할 것이다.

어쨌거나 폭기조-1보다는 폭기조-3에서 더 높은 세균수와 활성을 보이고는 있다. 그러니까 현재 폭기조에서 질산화세균의 증식과 질산화가 이루어지고 있음을 볼 수 있다.

일반적으로 하수처리장의 경우 겨울철엔 질산화세균수와 질산화활성이 여름보다 훨씬 낮다.

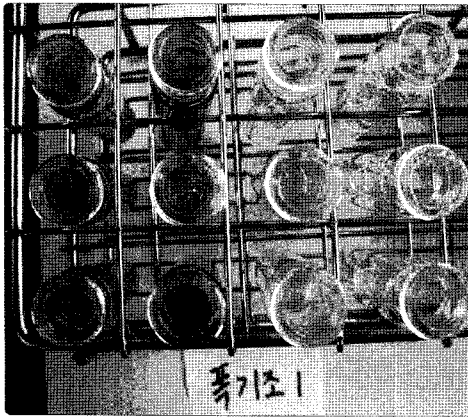


사진-1. 암모니아산화세균수 시험

사진-1에서 보면 희석율이 낮으면 발색되는 붉은색이 짙다. 그리고 희석율이 높아 암모니아 세균이 증식되지 않은 시험관은 NO₂-N 발색에서 무색으로 나타난다. 그런데 배양시간이 길어지면 어떤 경우엔 희석율이 낮은 시험관이 무색으로 나타난다. 이것은 NH₃-N이 NO₂-N으로 변했다가 NO₂-N이 다시 NO₃-N로 전부 변했기 때문에 NO₂-N 발색에서 무색으로 나타난 결과다.

하수처리장 활성슬러지에는 아질산산화세균도 공존하므로 이런 현상이 나타날 수 있다. 그리고 초기에 배지내 NH₃-N 농도가 높으면 발색되는 색이 짙다. 그러므로 빨리 실험결과를 보고 싶으면 초기 배지의 NH₃-N 농도를 높게 하고 배양온도를 높게 하면 빠른 결과를 볼 수 있다.

6-3-2. 하수처리장B

역시 접촉재가 충전되어 있는 하수처리장이지만 부유슬러지가 약 2,300mg/L인 처리장이다. 암모니아산화세균수는 어느 정도 나타나지만 질산화활성은 낮다. 이 조사는 1월 17일 실시된 것으로 겨울철 자료이다. 그런데 활성슬러지는 이리하지만 실제 하수처리장에서는 질산화가 거의 일어나지 않고 있었다. 처리장의 수온은 13℃였다.

그러므로 질산화세균이 활성슬러지에 존재하더라도 현장에선 낮은 수온(13℃), 짧은 체류시간(4시간), 낮은 DO(3~5mg/L), BOD부하 등으로 인하여 질산화가 거의 일어나지 않을 수 있다. 물론 질산화가 일어나지 않고는 질소제거효율이 나타날 수 없다. 질산화활성 측정온도는 16℃였다

표-3. 하수처리장 질산화세균수와 질산화활성

	무산소조	폭기조-2
암모니아산화세균수(MPN/mgMLSS)	480,000	190,000
아질산산화세균수(MPN/mgMLSS)		
질산화활성(mgNH ₃ -N/gMLSS/hr)	0.300	0.068

6-3-3. 공장오수처리장

어느 조선회사의 공장오수처리장의 예를 보면 유입되는 31mg/L의 NH₃-N이 거의 질산화되고 있다(표-4). 조사시기는 2월 6일이고 폭기조 수온이 15℃, 체류시간 24시간이었다.

이 처리장의 질산화활성은 5.09mgNH₃-N/gMLSS/hr였다. 비록 수온이 15℃라도 질산화활성이 매우 높음을 볼 수 있었다.

표-4. 공장오수처리장의 질산화

	유입수	탈질조	폭기조1	폭기조2	침전조
NH ₃ -N(mg/L)	30.8	17.3	6.59	1.05	4.11
NO ₃ -N(mg/L)	0	0	9.8	9.7	11.3
pH	6.43	7.05	6.90	6.85	6.93

6-3-4. 부착슬러지

하수처리장에 침지되어 있는 고정상접촉재에서 부착슬러지를 긁어내어 질산화활성을 측정해 보았다. 긁어낸 슬러지는 완전히 검은색이었고 부패취가 심하였다.

표-5. 하수처리장 접촉재 부착슬러지의 질산화세균수

암모니아산화세균수(MPN/mgMLSS)	32,000
아질산산화세균수(MPN/mgMLSS)	
질산화활성(mgNH ₄ -N/gMLSS/hr)	0.310

부착슬러지에 존재하는 질산화세균수는 예상보다 적었다. 증식속도가 느린 질산화세균이 접촉재에 부착증식하므로 질산화균밀도가 높을 것으로 생각되지만 질산화세균의 증식에 한 가지 제한요인으로 작용하는 것이 DO가 아닌가 생각된다. 접촉재에 부착된 생물막을 통과하여 내부까지 전달이 되어야 하므로 산소, 기질의 물질전달이 제한요소로 보인다. 그러므로 생물막에 부착증식하여 체류시간(SRT)이 길다 하더라도 다른 환경요인이나 기질조건이 충족되지 않으면 질산화균의 증식은 일어나지 않는다고 본다. 이것은 폭기조에 접촉재를 충전시켰을 때 운전이 유의할 점이다.

6-3-5. 암모니아산화세균의 순수분리

평판배양으로 질산화세균을 순수분리하기는 어렵다. 그렇다면 MPN법으로 순수분리를 해야 된다는 것인데 도대체 얼마나 많은 계대배양을 해야 순수분리가 될까?

MPN법으로 암모니아산화세균수 시험을 해서 가장 높은 희석율에서 양성인 시험관을 고른다. 그 시험관에서 시료를 채취해 다시 새 배지에 접종한다. 이 조작을 계속하면서 배양액의 균수를 그려보았다. 배양은 30℃에서 14일간 배양하였다.

그림-2에서 보면 계대배양을 통해 6세대를 거쳐 배양액 1mL당 암모니아산화세균의 농도는

10⁶에 이른다. 물론 이 배양액내에 암모니아산화세균만 있는지는 배양액내 NO₃-N의 존재유무를 확인해 봐야 된다. 어쨌거나 무기배지에서 배양액에 최대한으로 배양할 수 있는 암모니아산화세균수는 10⁶/mL로 볼 수 있을 것이다.

6세대가 지난 배양액에서 시료를 채취하여 저농도배지(PCA의 1/10농도 배지)에 희선배양했을 때 잘 증식하는 균이 있었다.(흰색과 노란색의 2가지 균). 이 균을 다시 분리하여 질산화활성을 측정해 봤을 때 전혀 질산화활성이 나타나지 않았다. 결국 6차례나 무기배지에 계대배양하여도 거기엔 질산화세균(주로 암모니아산화세균, 계대배양을 하면 할수록 아질산산화세균의 함유비는 줄어들었다)과 유기영양세균이 함께 공존하는 것으로 생각된다. 여기서 유기영양세균이 공존하는 이유를 알 수 없다.

그리고 질산화세균을 배양하여도 맨눈으로 봤을 때 침전되는 균체가 있거나 배양액이 혼탁되어 보이는 것도 없다. 그만큼 균체량이 적다. 즉 수율이 적다는 것이다. 질산화세균의 또 다른 특성으로 보이는 것은 배양액내에 고형물이 있으면 대부분의 질산화세균이 그 고형물에 부착하여 증식한다는 것이다. 따라서 질산화세균을 순수배양 할 때 고형물을 배양액내에 넣어 주면 균체를 회수 할 때 회수율이 높을 것이다.

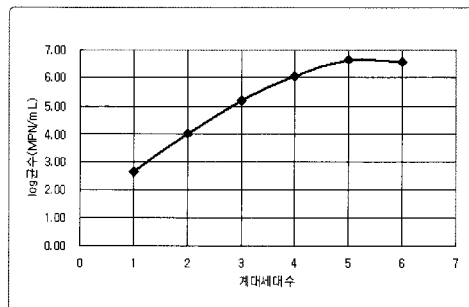


그림-2. 계대배양을 통한 암모니아산화세균의 순수분리

7. 탈질세균수 시험

탈질세균이라는 것은 NO₃⁻ 또는 NO₂⁻를 환원시켜 N₂ 또는 N₂O와 같은 기체를 생성하는 세균이다.

탈질세균은 호기성조건하에서 용존산소를 이용하여 생활하지만 혐기성조건하에서는 NO₃ 또는 NO₂와 같은 결합형산소를 이용하여 생활하는 통성혐기성균이다.

또 탈질세균의 대부분은 중속영양세균에 속하지만 그 중에는 Thiobacillus denitrificans와 같은 독립영양세균도 알려져 있다.

7-1. 배지

Giltay배지 15mL를 마개시험관(cap tube)에 넣고 여기에 Duhram tube를 거꾸로 집어넣은 다음 마개를 하여 고압멸균한다.

15분 고압멸균 후 압력을 빼지 않고 냉각시키면 Duhram tube내의 공기가 완전히 빠지게 된다. 그래도 멸균 후 Duhram tube내의 공기가 완전히 빠지지 않았으면 배지가 담긴 시험관을 찬물에 담궈두면 공기가 빠진다.

Giltay배지

< A액 >

KNO ₃	1.0g
asparagine	1.0g
BTB용액(1 w/v%)	5mL
純水	500mL

BTB용액: bromothymol blue 1g을 ethanol(95 v/v%) 100mL에 용해시킨다.

< B액 >

sodium citrate	8.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.05g
KH ₂ PO ₄	1.0g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.2g
純水	500mL

A액에 B액을 혼합한다. 혼합하면 배지의 색이 녹색으로 된다.(pH = 7.0~7.2)

7-2. 시험방법

1) 활성슬러지 플러의 파괴

질산화세균시험과 동일하다

2) 접종

MPN법으로 시험한다.

시험조작은 질산화세균의 계수와 동일하다.

활성슬러지의 경우 시료희석율은 1,000배, 10,000배, 100,000배 정도가 알맞다.

3) 배양

28℃에서 7~14일간 배양한다. 3~4일 배양이면 어느 정도 결과를 얻는다.

4) 계수

Giltay배지에서는 가스가 생성되어 Duhram tube내에 가스가 차고 아울러 NO₃⁻의 소비에 의해 BTB의 녹색이 청색으로 변한 것을 양성으로 한다.

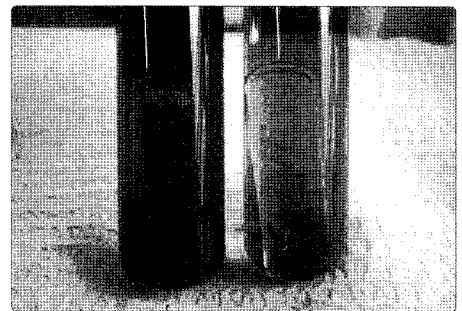


사진-2. 탈질균시험, 왼쪽:양성, 오른쪽:음성

5) 평가

탈질세균의 탈질활성은 일반적으로 pH 6~7사이에서 高温(단 40℃까지)일수록 높게 된다. 그러나 15℃이하에서는 반응속도가 현저히 저하된다.

탈질현상은 용존산소농도가 낮고, 또 유기물 농도가 높은 경우에 일어나기 쉽지만 반드시 혐기성상태가 아니라도 일어난다고 한다.

7-3. 측정예

7-3-1. 하수처리장A

혐기조-탈질조-폭기조1-폭기조2-침전조로 구성된 하수처리장인데 유입 $\text{NH}_3\text{-N}$ 이 30mg/L, 유입 $\text{NO}_3\text{-N}$ 이 0이다. 질산화는 거의 일어나지 않고 있으며 부유슬리지 농도는 2,500mg/L 정도다.

이 하수처리장의 탈질균수를 조사해 보았다. 현장의 탈질조에서 탈질이 일어날 소지가 없음에도 탈질균은 어느 정도 나타나고 있다.

표-6. 하수처리장 탈질세균수

	탈질조	폭기조-2
탈질균수(MPN/mgMLSS)	48,000	450,000

7-3-2. 하수처리장B

이 하수처리장에서도 탈질균수가 $10^4 \sim 10^5$ MPN/100mL 정도 나타나고 있다.

표-7. 하수처리장 탈질세균수

	폭기조-1	폭기조-3
1차 조사	21,000	2,100
2차 조사	93,000	75,000

7-3-3. 시료채취와 분석

일반적으로 폐수처리장에서 시료를 채취하여 실험실로 운반하여 분석한다. 얼음과 함께 스티로폼박스에 시료를 넣어 운반하겠지만 그렇지 않은 경우도 많다. 특히 기온이 높은 여름철에는 채취시료의 수질이 운반중에 변하기 쉽다. 특히 탈질에 의한 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 농도변화는 심하다.

폐수처리장 폭기조의 시료를 채취하여 하나는 슬러지가 있는 그대로, 다른 하나는 현장에서 GF/C로 여과하여 여과액을 운반하였다. 여과한 것은 $\text{NO}_3\text{-N}$ 이 21.8mg/L였고 여과하지 않은 시료는 실험실에 도착했을 때 이미 슬러지가 전부 부상되어 있었다. 이 시료의 $\text{NO}_3\text{-N}$ 은

10.8mg/L였다. 이처럼 차이가 컸다. 슬러지가 부상한 시료를 흔들어준 다음 열린 냉장고에 넣었다. 저녁이라 분석할 시간이 없어서 시료를 냉장고에 넣어두고 이튿날 꺼내어 분석하였다. 냉장으로 하룻밤 지난 다음 보니 다시 슬러지가 부상하였다(사진-3). 이 시료를 분석하니 $\text{NO}_3\text{-N}$ 이 3.4mg/L였다(표-8).

그러므로 탈질과 관련하여 현장의 시료를 분석할 때 $\text{NO}_3\text{-N}$ 을 분석할 시료는 시료채취 후 곧바로 여과하여 여과액을 운반하는 것이 바람직하다. 그렇지 않으면 현장의 $\text{NO}_3\text{-N}$ 과 현저하게 낮은 $\text{NO}_3\text{-N}$ 을 얻게 되어 진단을 잘못하는 경우가 생긴다. 침전조에서의 슬러지부상과 같은 탈질반응은 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도와 밀접한 관계가 있다.

표-8. 탈질에 의한 슬러지부상과 $\text{NO}_3\text{-N}$ 변화

	초기	1차 슬러지부상	2차 슬러지부상
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	21.8	10	3.4



사진-3. 냉장중 슬러지부상

다음호에 계속 ...