

페놀폐수 처리를 위한 *Rhodococcus sp.* EL-GT와 활성슬러지를 이용한 호기성 생물막 반응기의 미생물 군집 동태

박 근 태·원 성 내·손 홍 주·남 귀 숙*·이 재 동·이 상 준
부산대학교 미생물학과·*밀양대학교 생물공학과·**농업기반공사
(2000년 8월 18일 접수)

Dynamics of Microbial Community of Aerobic Biofilm Reactor using *Rhodococcus sp.* EL-GT and Activated Sludge for Phenol Wastewater Treatment

Geun-Tae Park, Seong-nae Won, Hong-Joo Son*, Gui-Sook Nam**, Jea-Dong Lee and Sang-Joon Lee

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea

*Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

**Rural research Institute, Korea Agricultural & Rural Infrastructure Corporation, Ansan 425-170, Korea

(Manuscript received 18 August, 2000)

This research was performed to investigate the dynamics of microbial community by RBC (Rotating Biological Contactor) using *Rhodococcus sp.* EL-GT and activated sludge. Cell counts revealed by DAPI were compared with culturable bacterial counts from nutrient agar. Colony counts on nutrient agar gave values 20~25% and 1~15% of cell counts (DAPI). The cell counts for the dynamics of bacterial community were determined by combination of *in situ* hybridization with fluorescently-labelled oligonucleotide probes and epifluorescence microscopy. Around 90~80% of total cells visualized by DAPI were also detected by the bacteria probe EUB 338. For both reactors proteobacteria belonging to the gamma subclass were dominant in the first stage (1 and 2 stage) and proteobacteria belonging to the gamma subclass were dominant in the last stage (3 and 4 stage).

Key word : RBC, Microbial community, *in situ* hybridization, proteobacteria

1. 서 론

폐수를 처리하는 여러 공정에서 탄소, 질소, 인 등의 제거율 최적화에 관한 많은 연구가 이루어져 왔으며 이에 따른 처리 기술도 많은 발전을 거듭하여 왔다. 그러나 이들 많은 연구들은 대부분이 처리시설의 물리·화학적 면에 치중되어 왔으며 실제로 공정의 최적화를 담당하는 미생물 군집에 관한 연구는 미진한 단계로서 하나의 암상자 정도로만 취급되어 왔다.¹⁾

생물학적인 폐수처리 공정에서 보다 좋은 처리 효율을 얻기 위해서는 폐수처리 생태계내에서 전개되는 미생물 군집의 동태를 파악하여 이들 군집이 가장 효과적으로 활동할 수 있도록 물리·화학적 인자를 조절해주는 것이 가장 필수적이다. 그 동안 세균 군집 동태조사는 배양적 방법을 이용한 전통적인 방법이 주로 이용되었고 현재도 많이 사용하고 있으나, 많은 시간적 소모와 영양원, 높은 온도, 짧은 배양시간 등 최적조건인 미비로 배양 불가능한 세균이 많아 군집을 조사 분석하는 데 커다

란 어려움을 가지고 있었다. 특히 활성슬러지의 배양적 방법에 의해서 검출되는 미생물은 전체의 10~15%로서 실제적으로 효능을 발휘하는 미생물이 간과될 우려가 크다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위한 일환으로 *in situ* hybridization에 의한 세균 군집 조사에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 많은 보고가 이루어지고 있다. 그러나 대부분이 활성슬러지법의 군집 조사에 관한 연구만이 활발히 진행되고 있으며, 회전원판법에 관한 연구는 극히 미진한 실정이다.^{2~4)}

생태계내의 군집 구조를 밝히기 위해 최근 개발된 분자생물학적인 방법은 세균을 직접 관찰할 수 있어 세균 군집 파악에 정확성과 신속성을 높여 준다. 이 방법에 사용되는 형광물질로 표지된 rRNA-targeted oligonucleotide probe는 특정 유전자와 결합하는 특이성을 가지고 있어 생태계에서 세균의 시간, 공간적 변화를 파악하는 데 많이 이용되고 있으며 이러한 방법을 통하여 생태계에서 특정 세균을 추정하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

rRNA는 세포 내에 많은 양이 존재하고 있어 관찰이 쉽다는 장점과 16S rRNA와 23S rRNA는 계통발생학적으로 진화적인 변이가 적은 보존적인 부분으로 분류군 파악에 주로 이용되고 있다. 그러므로 16S rRNA와 23S rRNA 같은 small subunit rRNA를 이용한 gene probe에 의한 세균 군집 분류는 많은 장점을 가진다.⁵⁻¹³⁾ 따라서 본 연구에서는 폐놀폐수처리를 위한 호기성 생물막 반응기의 생물막체군 동태를 파악하여 현재 연구가 미흡한 독성화합물의 처리에 대한 생물막의 군집구조를 규명하여 우수한 생물막 반응기의 개발과 효과적인 운전을 목적으로 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용시약 및 기기

실험에 사용된 각종 시약은 Sigma Co., Aldrich Co., Fluka Co., Junsei Chemicals, Difco Laboratories의 특급 및 일급시약을 사용하였다. Probe는 (주) Bioneer에서 fluroscein으로 표지한 oligonucleotide를 사용하였고 slide glass는 silane coating slide glass(Muto pure chemical, Cat. No. 5116)를 사용하였다. 미생물 형태 등의 관찰을 위해서는 Olympus BH(Olympus, Japan), FISH의 관찰을 위한 형광현미경은 OLMPUS BX-60M(Olympus, Japan) 및 Confocal Laser Microscopy는 LSM510(Zeisser, Germany)을 사용하였다. 또한 생물막의 형태관찰을 위한 전자현미경은 주사전자현미경 S-4200(Hidachi, Japan)을 사용하였다.

2.2 실험장치와 기구

본 실험에 사용된 폐수처리 반응기의 구조는 Fig. 1과 같으며 구조 특성은 Table 1과 같다. 지름 15 cm, 두께가 0.3 cm인 원판과 2.5 cm × 2.5 cm 크기의 아크릴판을 120 w 사포로 일정하게 연마한후, 원판에 2.5 cm × 2.5 cm 크기의 아크릴판을 원판에 8개씩을 일정한 위치에 각각 부착하였다. 반응기는 총 4단으로 구성하였고, 각 단마다 원판을 4개씩 설치하여 연속적으로 기질을 처리할 수 있도록 구성하였다.

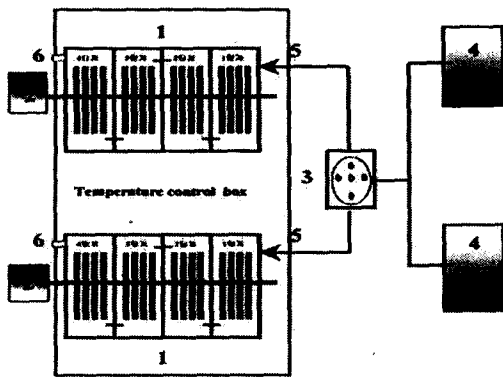


Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus RBC. 1, reactor; 2, motor ; 3, peristaltic pump; 4, feed reservoir; 5, input; 6, output.

Table 1. Specification of rotating biological contactor

Contents	Values
Number of stage per unit operation	4
Number or disc per stage	4
Disc diameter (cm)	15
Disc thickness (cm)	0.3
Disc spacing (cm)	1
Submergence (%)	40

2.3 접종미생물

단일개체군 생물막 반응기는 이전에 분리된 *Rhodococcus* sp. EL-GT 균주를 사용하였다. Glucose를 유일탄소원으로 한 무기염배지 및 LB배지 등에서 7 l jar fermenter (working volume, 5 l) 및 30 l의 pilot fermentor (working volume, 20 l)에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 동결건조한 분말을 500mg/l의 농도로 반응기에 투입하였다. 이때의 생균수는 1 × 10⁸ CFU/l로 유지되었다.

혼합개체군 생물막 반응기는 부산광역시 소재의 장림 하수처리장 반응 슬러지를 MLSS 3000mg/l로 조절하여 반응기에 투입하였다.

2.4 폐놀폐수의 조성 및 반응기의 운전조건

본 실험에 사용된 유입폐수는 이전의 폐놀분해 최적 조건 배지와 같은 조성으로 제조하여 폐놀을 유일탄소원으로 한 합성폐수를 사용하였다. 실험 목적에 맞게 탄소원의 양을 조절하였다. 반응기 총 용적은 4.8 l이며 수리학적 체류시간(HRT)은 7시간으로 유지하였고, 반응기의 회전수는 10rpm으로 조절하였다. 초기에 식종된 미생물이 매체에 부착되어 생물막을 형성하도록 하기 위해 이틀간 기질을 투입하지 않았다. 반응기내의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 자동온도조절 장치를 사용하여 온도를 일정하게 유지하였고(20 ± 2°C), 일정량의 폐수를 주입하기 위해 정량펌프를 사용하여 유입유량을 조절하였다. 각 반응기의 아크릴 표면에 일정량의 생물막이 가시적으로 보이기 시작하면 일정량의 폐수를 주입하여 운전을 시작하였고, 운전시 처리 수질의 농도가 큰 변동 없이 일정적으로 유지되었을 때를 정상상태(steady state)로 간주하였다.

단일개체군 생물막반응기와 혼합개체군 생물막반응기는 폐놀 농도 300mg/l (SCOD 700 ± 50mg/l)의 일정한 농도에서 생물막을 형성시켰고, 부하량은 19.96g SCOD/m².day였다.

2.5 배양적 방법에 의한 생물막내 세균군집의 동태

배양적 방법에 의한 생물막내 세균군집의 동역학은 육즙한천영양배지에 의한 일반세균수 측정법을 이용하였다. 먼저 반응기 원판에 부착되어 있는 2.5cm × 2.5cm의 아크릴판을 떼어낸 후 20ml의 PBS가 있는 원심분리관에 넣었다. Vortex와 sonicator를 사용하여 아크릴판에 붙어 있는 생물막을 떼어낸 후 미생물이 10⁸에서 10⁹의 범위가 되도록 적당히 희석하였다. 희석된 시료

100 μ l를 육즙한천평판배지에 도말하고 30 $^{\circ}$ C incubator에서 24시간, 48시간, 72시간 배양하면서 나타나는 집락을 계수하였다.

2.6. 비배양적 방법에 의한 생물막내 세균군집의 동태 비배양 계수법은 nucleotide에 삽입되어 결합하는 DAPI(4, 6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하여 총개체수를 측정하였다. 그룹별 군집동태조사를 위하여 16S rRNA와 23S small subunit rRNA gene probe를 이용하였으며 총개체수를 위한 DAPI와 그룹별 군집에 대한 fluorescent oligonucleotide의 dual stain은 Hicks 등의 방법에 준하여 실시하였다.¹⁴⁾

2.6.1 시료의 고정

생물막내 세균의 동역학 조사를 위해 반응기내 아크릴판 2.5cm \times 2.5cm을 떼어내어 20ml의 PBS가 들어있는 원심분리관에 넣은 후 이전에 사용한 방법과 같이 vortex와 sonicator를 사용하여 아크릴 판에 붙어 있는 생물막을 떼어내었다. 아크릴 판을 제거하고 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm으로 20분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 침전 시료에 cold paraformaldehyde solution(4% in PBS)를 시료량의 3배가 되도록 넣고 잘 섞은 후 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 시료를 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm으로 20분동안 원심 분리하여 상등액을 제거하고 PBS로 세척한 후 적당히 희석하였다. 고정된 시료 1 volume에 대해 ethanol 1 volume를 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에 저장하면서 다음 실험을 행하였다.

2.6.2. DAPI에 의한 총 세균수 와 FISH(Fluorescence in situ hybridization)

고정된 시료 2 μ l를 silane coating slide glass위에 떨어뜨린 후, DAPI(1 μ g/ml)를 50 μ l 첨가하여 5분간 염색한 후, 멸균 증류수로 세척하였다.

Table 2. Oligonucleotide probes, their sequences, target positions, and specificities

Probe	Sequence (5'-3')	Target position	Specificities
EUB	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	All bacteria
ALF	CGTTTCGCTCTGAGCCAG	16S, 19-35	α -subclass proteobacteria
BET	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S, 1027-1043	β -subclass proteobacteria
GAM	GCCTTCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	γ -subclass proteobacteria
CF	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	Cytophaga-flavobacterium
HGC	TATAGTTACCACCGCGT	23S, 1901-1918	Gram (+) with high DNA G+C content
S-G-Gor-0696-a-A-22	TGCGGGATTTACACAGC GTACGC		<i>Rhodococcus sp.</i> EL-GT

단일개체군 생물막과 혼합개체군 생물막의 세균 동역학을 조사하기 위하여 probe로 사용된 rRNA-targeted oligonucleotide는 Table 2와 같다. *Rhodococcus sp.* EL-GT와 결합하는 S-G-Gor-0696-a-A-22(16S rRNA), Eubacteria와 결합하는 EUB338(16S rRNA), proteobacteria의 α -group과 결합하는 ALF1b(16S rRNA), β -group과 결합하는 BET42a(23S rRNA), γ -group과 결합하는 GAM42a(23S rRNA)와 *Cytophaga-Flavobacterium* group과 결합하는 CF(23s rRNA), 그리고 gram(+) high G+C content bacteria group과 결합하는 HGC(23s rRNA)를 probe로 사용하였다.

Hybridization을 위하여 미리 고정된 시료 2 μ l를 silane coating slide에 spot하여 공기 중에서 건조시키고 이 slide를 50, 80, 96% ethanol에 각각 3분간 담근 후, 건조하였다. Hybridization 용액(0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl[pH 7.4] 0.1% SDS, formamide농도: EUB, 20%; ALF, 20%; BET와 GAM, 35%; CF, 15%; HGC, 20%) 8 μ l와 probe로 사용되는 oligonucleotide(5 μ g/ul) 1 μ l을 잘 섞은 혼합액을 상기의 slide glass에 떨어뜨려 46 $^{\circ}$ C, 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 slide는 미리 48 $^{\circ}$ C로 예열된 세척용액(20mM Tris-HCl[pH 7.4], 5 mM EDTA, 0.1% SDS, NaCl 용액농도: EUB, 0.9 M ; ALF, 0.225 M ; BET와 GAM, 80 mM ; CF, 80 mM)에 15분간 담근 후 증류수로 세척하여 공기 중에서 건조시켰다.

준비된 시료의 관찰은 형광현미경과 Scanning confocal laser microscopy를 사용하여 1,000배의 배율에서 field에 나타난 세균을 계수하였으며 20번 이상을 계수하여 그 평균값으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 단일개체군을 이용한 생물막의 세균 군집 동태

3.1.1. 생물막의 현미경적 고찰

단일개체군을 이용한 생물막을 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 15일 동안 운전한 반응기 1단에서 채취한 시료로서 부정형의 간균형태인 *Rhodococcus* 속의 단일개체군 생물막으로 거의 비슷한 모양을 한 개체들이 배열되어 있었고 고분자물질에 싸여 있는 형태를 취하고 있었다.

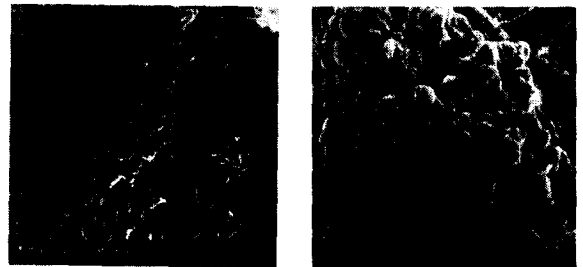


Fig. 2. Scanning electron micrograph on biofilm of *Rhodococcus sp.* EL-GT. A, \times 5,000; B, \times 10,000.

3.1.2. 배양적 방법에 의한 세균수

배양적 방법에 의한 세균수는 Table 4와 같았다. 배양적 방법에 의한 세균수는 반응기 운전 초기는 *Rhodococcus* sp. EL-GT로 생각되는 균주가 많이 나타나다가 안정화된 후 일정시간이 지나면 다른 세균이 많이 검출되었다. 가장 많이 나타난 세균 2종류는 gram(-) 균으로 Vitek kit에 의한 동정 결과 *Chromobacter*속과 unidentify로 나타났다. 특히 육즙한천배지에서 *Chromobacter* 균주가 *Rhodococcus* sp. EL-GT보다 많은 숫자를 나타내고 있는데 이들이 생물막 생태계에서 많이 존재하는 이유도 있겠지만 *Rhodococcus* sp. EL-GT의 생육속도가 이 균주보다 느려서 적게 출현할 수도 있다. 실제 현미경 관찰을 해보면 *Rhodococcus*로 보이는 균들이 우점종을 나타내고 있으며, 따라서 배양적 방법은 실제 미생물계체균과 전혀 다른 결과를 나타낼 수도 있다는 것을 시사하고 있다.

Table 3. Comparison of direct microscopic cell count by DAPI and FISH and cultural method in RBC with *Rhodococcus* sp. EL-GT (cells/cm²)

	1st stage	2nd stage	3rd stage	4th stage
Direct count by DAPI	3.17×10 ⁸	3.04×10 ⁸	2.48×10 ⁸	8.23×10 ⁷
Total count by cultural method	2.72×10 ⁸	2.3×10 ⁸	1.24×10 ⁸	1.22×10 ⁷
Count of <i>Rhodococcus</i> sp. EL-GT by FISH	2.81×10 ⁸	8.57×10 ⁷	5.12×10 ⁷	1.79×10 ⁷
Count of <i>Rhodococcus</i> sp. EL-GT by cultural method	9.2×10 ⁸	6.4×10 ⁸	5.3×10 ⁸	3.1×10 ⁸

Table 4. Comparison of direct microscopic cell count by DAPI and culture cell count (cm⁻²)

	1st	2nd	3rd	4th
Direct count by DAPI (Cell)	2.9×10 ⁸	8.3×10 ⁷	7.2×10 ⁷	4.8×10 ⁷
Cultural method (CFU)*	2.8×10 ⁷	1.2×10 ⁷	6.6×10 ⁶	5.4×10 ⁵

* CFU, Colony forming units.

3.1.3. 비배양적 방법에 의한 세균수

배양적 방법에 의한 개체수는 DAPI 개체수의 20 ~ 25%를 차지하였다(Table 3). 정상상태에서 DAPI에 의한 개체수는 1단 3.17×10⁸cells/cm², 2단 3.04×10⁸cells/cm², 3단 2.48×10⁸cells/cm², 4단 8.23×10⁷cells/cm²로 육즙한천평판배지에서 계수한 CFUs와 상당한 차이를 나타내었다.

배양적 방법은 많은 시간적 소모에 비해, 영양원, 또는 높은 온도, 짧은 배양시간 때문에 배양 불가능한 세균이 많으므로 균집을 분석하는데 어려움이 많다. 따라

서 최근에는 세균 균집 파악에 배양적 방법보다 정확성과 신속성이 높은 비배양적 방법이 많이 이용되고 있으며, 상기의 결과를 통해서도 현재 사용되는 일반세균수 시험법을 대체 보완할 수 있는 방법일 것으로 사료된다.

Fig. 3은 총 세균중 eubacteria에 속하는 세균의 점유 비율로서 1~4단에서 각각 DAPI의 94.0%, 95.0%, 89.5%, 85.5%의 cell이 EUB probe에 의해 검출되었다.

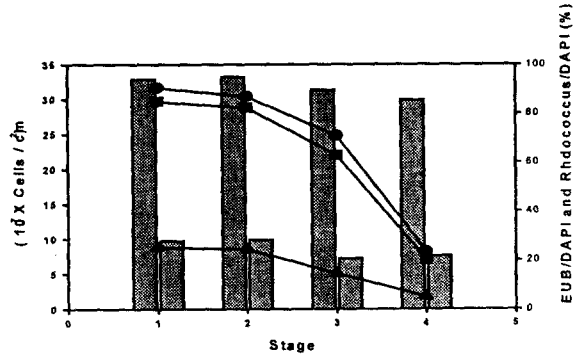


Fig. 3. The ratio of eubacteria and *Rhodococcus* sp. EL-GT to total bacteria in RBC with *Rhodococcus* sp. EL-GT. Symbols : ratio ; total bacteria; eubacteria, *Rhodococcus* sp. EL-GT.

Eubacteria의 균집 구조를 보면 각 단별 세균 균집의 비율은 Fig. 4와 같이 eubacteria를 100%로 하였을때 α-group은 7.2~12.3%, β-group은 8.2~20.4%, γ-group은 14.1~16.4%, *Cytophaga-Flavobacterium* group은 1.4~2.38%, 그리고 gram(+) high G+C content bacteria group은 44 ~ 65.2%의 범위로 분포하였다. 1단에서는 Gram(+) high G+C content bacteria group이 65.2%, α-group과 β-group이 각각 7.2, 7.3%로 비슷한 분포를 보였고 *Cytophaga-Flavobacterium* group이 1.4%의 분포를 나타내었다. 2단에서도 비슷한 양상을 보였는데, gram(+) high G+C content bacteria group이 62.7%, α-group, β-group, *Cytophaga-Flavobacterium* group이 각각 7.3%, 8.2%, 2.3%의 분포를 나타내었고, γ-group은 상대적으로 많은 양인 16.4%를 나타내었다. 3단과 4단은 1, 2단과는 다른 양상을 보였는데, 3단은 gram(+) high G+C content bacteria group이 54.2%, α-group 12.3%의 분포를 나타낸 반면 *Cytophaga-Flavobacterium* group은 2.3%, β-group과 γ-group은 각각 12.1%, 16.4%의 분포를 보였다. 4단에서는 gram(+) high G+C content bacteria group이 각 단중 가장 적게 차지하여 44%를 차지하였고, α-group, γ-group, *Cytophaga-Flavobacterium* group이 각각 12.3%, 14.7%, 1.8%의 분포를 나타내었다. 대체로 유기물 부하를 가장 많이 받는 1단과 2단에서 gram(+) high G+C content bacteria group을 제외하고 γ-group이 우점종이며, 유기물 부하가 낮은 3단과 4단에서는 β-group이 우점종이었으며 4

단에서는 γ -group이 높은 분포를 나타내었다. 여러 group중 *Cytophaga-Flavobacterium* group의 분포가 가장 낮았다. 따라서 유기물이 풍부한 곳에서는 β -group보다 γ -group이 우점한다는 홍 등의 보고와 일치 하였다.¹⁵⁾

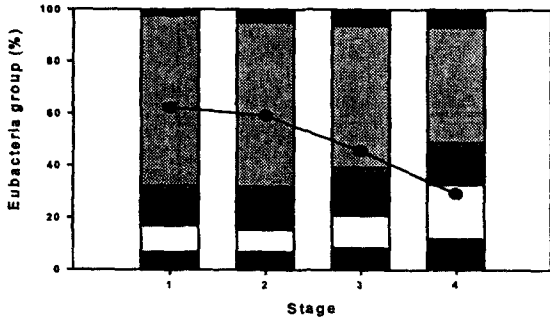


Fig. 4. Comparison of community structure analysis in RBC with *Rhodococcus sp.* EL-GT by *in situ* hybridization. The values were standardized over the values obtained with the bacterial probe EUB (100%). Symbols : ■, ALF; □, BET; ■, GAM; ■, CF; ■, HGC; ■, other bacteria; ●—, *Rhodococcus sp.* EL-GT.

3.2. 혼합개체군을 이용한 생물막의 세균 군집 동태

3.2.1. 생물막의 현미경적 관찰

1단과 2단은 과부하운전으로 세균류가 우점종으로 나타났다. 폐놀부하에 잘 견디는 세균으로 알려진 *Zoogloea* 속으로 보이는 점질물질 생성균들이 초기에는 우점종으로 존재하다가 정상상태에서는 *Zoogloea*와 사상성 세균이 거의 같은 비율로 존재하였다. 20일 경에는 우점종이 *Zoogloea*에서 사상성 세균으로 대체되었다. Fig. 5는 생물막 내부를 주사전자현미경으로 촬영한 사진이다.



Fig. 5. Scanning electron micrograph on biofilm of mixed population ($\times 3,500$).

3.2.2. 배양적 방법에 의한 세균수

정상상태에서 1단 2.8×10^7 cells/cm², 2단 1.2×10^7 cells/cm², 3단 6.6×10^6 cells/cm², 4단 5.4×10^5 cells/cm²의 세균 수를 나타내었다(Table 4).

3.2.3. 비배양적 방법에 의한 세균수

배양적 방법과 DAPI 염색 방법으로 측정된 개체수는 Table 3과 같으며 배양적 방법에 의한 개체수는 DAPI의 1~15%를 차지하였다. 정상상태에서 DAPI 염색법에 의한 cell계수는 1단 2.9×10^8 cells/cm², 8.3×10^7 cells/cm², 7.2×10^7 cells/cm², 4.8×10^7 cells/cm²로 단일개체군 생물막 반응기와 같이 육즙한천 평판배지에서 계수한 CFUs와 상당한 차이가 나타났다. 따라서 배양적 방법은 군집을 분석하는데 어려움이 많을 것으로 사료되었으며 세균 군집 파악에는 비배양적 방법이 훨씬 신뢰성이 높은 것으로 나타났다.

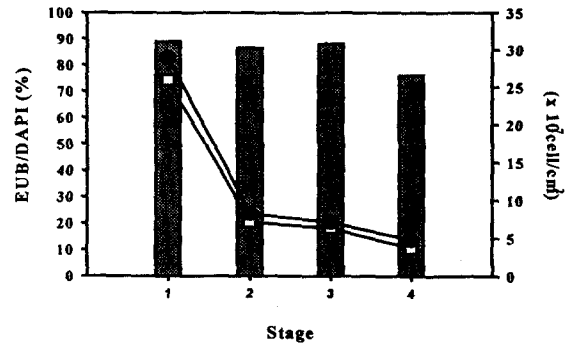


Fig. 6. The ratio of eubacteria to total bacteria in RBC with sludge. Symbols : ■, ratio; ●—, total bacteria; □—, eubacteria.

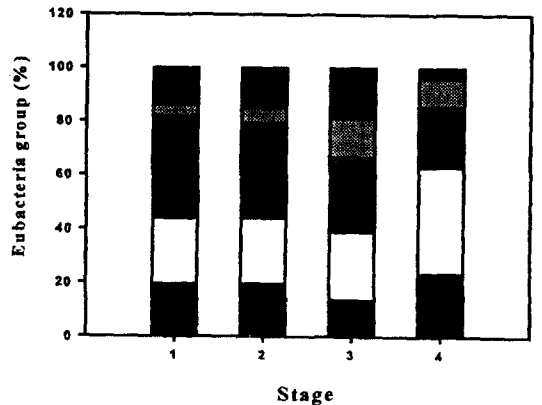


Fig. 7. Comparison of community structure analysis in RBC with sludge by *in situ* hybridization. The values were standardized over the values obtained with the bacterial probe EUB (100%). Symbols : ■, ALF; □, BET; ■, GAM; ■, CF; ■, HGC; ■, other bacteria.

Fig. 6은 총 세균 중 eubacteria에 속하는 세균 점유의 비율을 나타낸 것이다. 1~4단에서 각각 DAPI의 88.9%, 86.5%, 88%, 76% cell이 EUB probe에 의해 검출되었다. 활성슬러지의 경우 eubacteria의 비율이 총세균 수의 89.3~69.8%를 차지한다는 Trebesius 등의 보고와 일치하는 것을 볼 수 있다¹¹⁾. Eubacteria의 군집 구조에 대한 각 세균 군집의 비율은 Fig. 7과 같다. Eubacteria를 100%로 하였을 때 α -group은 14~24%, β -group은 24~39%, γ -group은 19~35%, *Cytophaga-Flavobacterium* group은 3~5.8%, 그리고 gram(+) high G+C content bacteria group은 3.6~14%의 분포를 보였다. 1단에서는 α -group과 β -group이 각각 20, 24%로 비슷한 분포를 보였고 *Cytophaga-Flavobacterium* group과 gram(+) high G+C content bacteria group이 3.5, 3.6%, γ -group은 35%로 가장 많은 분포를 나타내었다. 2단에서도 비슷한 양상을 보였는데, α -group, β -group, *Cytophaga-Flavobacterium* group, 그리고 gram(+) high G+C content bacteria group이 각각 20, 24, 3, 5%의 분포를 나타내었고, γ -group은 33%로 가장 많이 분포하였다. 3단과 4단은 1, 2단과는 다른 양상을 보였으며, 3단은 α -group과 gram(+) high G+C content bacteria group이 14%의 같은 분포를 나타내었고, *Cytophaga-Flavobacterium* group은 5.8%, β -group과 γ -group은 각각 25, 22.5%의 비슷한 분포를 보였다. 4단에서는 α -group, γ -group, *Cytophaga-Flavobacterium* group, 그리고 gram(+) high G+C bacteria group이 각각 24, 29, 4, 10%의 분포를 나타내었고 β -group은 이전 단일 개체군 생물막 반응기와 같이 39%의 가장 큰 값을 나타내었다. 단일개체군 생물막 반응기에서 gram(+) high G+C bacteria group를 제외하고는 유기물 부하를 가장 많이 받는 1단과 2단에서는 γ -group이 우점종이었으며, 유기물 부하가 낮은 3단과 4단에서는 β -group이 우점종으로 나타났다. 이 반응기 역시 유기물이 풍부한 곳에서는 β -group보다 γ -group이 우점한다는 홍 등(1997)의 보고와 일치하였다.¹⁵⁾

4. 결 론

배양적 방법에 의한 세균 계수와 비배양적 방법인 DAPI에 의한 세균수의 계수를 비교해본 결과 배양적 방법에 의한 세균계수가 1~15%에 불과하여 배양적 방법에 의한 동태조사로는 군집에 대한 신뢰성이 희박한 것으로 보여졌다.

단일개체군을 식종하여 형성된 생물막을 이용한 폐놀 폐수 반응기는 전단에 걸쳐 식종균인 *Rhodococcus* sp. EL-GT가 가장 우점종을 차지하였으며 후단으로 넘어갈수록 폐놀부하량 차이로 *Rhodococcus* sp. EL-GT의 점유율이 줄어들었으며, 다른 그룹은 1단과 2단은 γ -group이 우점하는 반면 3단과 4단은 β -group이 우점종을 차지하였다.

슬러지를 이용한 혼합개체군 생물막 반응기의 폐놀폐수처리에서는 1단과 2단은 각각 γ -group이 각각 35%, 33%로 우점하는 반면 3, 4단에서는 β -group이 각각

25%, 39%로 우점하고 있었다.

따라서 두반응기 모두 1단과 2단에서는 높은 유기물 부하량에서 우점하는 γ -group이 유기물의 부하량이 감소된 3단과 4단에서는 β -group이 우점하며 반응기가 운전되고 있었다. 효율적인 폐놀 처리를 위하여 폐놀분해를 효과적으로 수행하는 단일개체군을 식종하여 형성시킨 생물막 반응기나 활성슬러지를 이용한 일반적인 혼합개체군 생물막 반응기 모두 기본적인 미생물 군집의 동태변화 양상은 유사한 것으로 나타나, 이들 군집조합의 분포를 적절히 유지하는 것이 안정된 폐수처리에 가장 중요한 요소라고 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 수행된 연구의 일부이며 이에 감사를 드립니다(1998-005-000022).

참고 문헌

- 1) 박영식, 서정호, 송승구, 1998, 미생물 초기 생물막 부착과 성장에 미치는 *Zoogloea ramigera*의 영향, 한국환경과학회지, 7(4), 481-486.
- 2) Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2884-2896.
- 3) Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi and K. H. Schleifer. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 792-800.
- 4) Kazuya Watanabe, Satoshi Yamamoto, Sanae Hina, and Shigeaki Hayayama. 1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by gyrB-targeted quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1203-1209
- 5) Amann, R. L., B. J. Binder, R. L. Olson, S. W. Chishom, R. Deverux and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometer for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- 6) Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K. H. Schleifer, and T. A. Stenstrom. 1993. In Situ Identification of Bacteria in Drinking Water and Adjoining Biofilms by Hybridization With 16S and 23S rRNA-Directed Fluorescent Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2293-2298
- 7) Alfreider., A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. O. Glockner, A. Wille and R. Psenner. 1996. Community Analysis of the Bacterial Assemblages in the Winter Cover and Pelagic Layers of a High

- Mountain Lake by In Situ Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2138-2144.
- 8) Rudolf, I. A., L. Krumholz, and D. A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide Probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 763-779.
 - 9) Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1994. In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. 140 : 2849-2858.
 - 10) Raskin, L., L. K. Poulsen, D. R. Noguera, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1241-1248.
 - 11) Trebesius, K, R. Amann, W. Ludwig, K. Muhlegger, and K. Schleifer. 1994 Identification of Whole Fixed Bacterial Cells with Nonradioactive 23S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3228-3235
 - 12) Pernthaler, J, F. Glockner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, and R. Amann. 1998. Seasonal Community and Population Dynamics of Pelagic Bacteria and Archaea in a High Mountain Lake. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4299-4306
 - 13) Susanne Pressl, Gunther Stephan. 1998. Chromosome translocations detected by fluorescence in situ hybridisation(FISH)-a useful tool in population monitoring. Toxicol. Letters. 96:189-194
 - 14) Hicks, R, R. Amann, and D. Stahl. 1992. Daul staining of Natural Bacterioplankton with 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole and Fluorescent Oligonucleotide Probes Targeting Kingdom-Level 16S rRNA Sequences. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2158-2163
 - 15) 홍선희, 변명섭, 안태석. 1997. 16S와 23S rRNA에 결합하는 probe를 이용한 겨울철 소양호 세균 군집 구조의 분석. The Korean Journal of Microbiology. 33: 257-261.