

생물학적 인 제거 공정에서 탄소원에 따른 미생물군집구조의 변화

여상민 · 이영옥[†]

대구대학교 생명과학과

(2006년 1월 5일 접수, 2006년 2월 2일 채택)

Changes of the Bacterial Community Structure Depending on Carbon Source in Biological Phosphate Removing Process

Sang-Min Yeo · Young-Ok Lee[†]

Department of Life Science, Dae-Gu University

ABSTRACT : In order to analyze the bacterial community structure including P-removal related organisms, PAOs(polyphosphate accumulating organisms) and GAOs(glycogen-accumulating non-poly-P organisms) occurred in biological phosphate removing process, 2 reactors (SBR; sequencing batch reactor) were operated on different carbon sources(sodium acetate, glucose). For the analysis of bacterial community structure, molecular methods(FISH; fluorescent in situ hybridization and DGGE; denaturing gel gradient electrophoresis) were employed. After 100 days reaction, PO₄-P in effluent dropped to 3.92 mg/L in SBR #1(60.8% removal) fed by sodium acetate, and at the same time FISH results showed that β-subclass proteobacteria(39.67%) and PAOs(45.10%) were dominantly present whereas those value in SBR #2 fed by glucose was 8.30 mg/L(17% removal), and γ-subclass proteobacteria were considerably observed(23.89%) and PAOs was 21.42%. Also the result of DGGE indicated that β-subclass proteobacteria was dominantly observed in SBR #1. However as the temperature increased, the proportion of β-subclass proteobacteria and PAOs decreased, but phosphorus removing inhibitors(GAOs) increased. It suggests that the environmental factor like as temperature and types of carbon source had influence on the prevalence of phosphorus removing organism(PAOs) and phosphorus removing inhibitors(GAOs) in biological phosphate removing process.

Key Words : P-removal, PAOs, GAOs/TFOs, FISH, DGGE

요약 : 생물학적 인 제거공정에서 인 제거 효율에 따른 인제거관련 미생물을 포함하는 슬러지 미생물상의 변화를 분석하기 위하여 2개의 반응조(SBR)에 각기 다른 탄소원(초산나트륨, 포도당)을 주입하여 작동시켰다. 초산나트륨을 주입한 SBR1에서는 반응 100일 후, 유출수에서 PO₄-P가 3.92 mg/L 검출되었고(제거효율 60.8%) 이때의 미생물상은 β-subclass proteobacteria(39.67%)와 인제거미생물인 PAO(45.10%)가 우점하는 양상을 보인 반면, 포도당을 주입한 SBR 2에서는 PO₄-P가 8.3 mg/L 검출되었으며(제거효율 17%), γ-subclass proteobacteria(23.89%)가 우점하였고 PAO는 21.42%를 차지할 뿐이었다. DGGE결과에서도 β-subclass proteobacteria가 SBR1에서 우점하였다. 그러나 수온이 증가할수록 β-subclass proteobacteria and PAOs의 비율이 감소하였고 GAOs는 증가하였다. 그러므로 생물학적 인 인제거공정에서 수온과 영양원의 상태 등 환경인자들이 인제거 미생물과 인제거를 저해하는 미생물의 우점도에 영향을 미친다고 할 수 있다.

주제어 : 인제거효율, PAOs, GAOs/TFOs, FISH, DGGE

1. 서론

생물학적 인산염제거(EBPR; enhanced biological phosphorus removal) 공정은 혐기성처리와 호기성처리를 번갈아 함으로써 폐수의 무기성 인을 체내에 다중인산염(polyphosphate) 형태로 저장하는 세균들, 즉 인산염축적세균군(PAOs; polyphosphate accumulating organisms)을 선별적으로 증대시켜 폐수의 용존성 인을 제거하는 기법이다. 그러나 이미 이 기법이 폐수처리에 실용화되었음에도 불구하고 어떤 기작에 의

해 인이 제거되는지는 명확하게 규명되지 않은 까닭에¹⁾ 아직도 생물학적인 인제거를 위한 적당한 작동 조건이 개발되지 못하고 있는 실정이다. 즉, 슬러지는 수온, 영양염류 등 다양한 환경요인과 처리시스템의 작동조건에 따라 선호도가 다른 미생물 군집 즉, 인산염 제거능이 있는 PAOs뿐 아니라 비인산염 축적 세균군집단(glycogen-accumulating non-poly-Porganisms; GAOs)도 포함하고 있으므로 효율적으로 인을 제거하려면 인 제거능이 있는 PAOs뿐 아니라 PAOs와 경쟁 관계에 있는 세균군으로 알려진 GAOs에 관한 분류, 생리학, 생태학 등의 기초 연구들이 선행되어야한다.^{2,3)} 그 일환으로 EBPR에 관여하는 세균을 알아보기 위해 종전에 주로 사용한 세균연구기법인 배양기법으로 EBPR공법 처리시스템의 슬러지 세균을 동정한 결과, *Acinetobacter* spp.가 주된

[†] Corresponding author
E-mail: ecolomi@daegu.ac.kr
Tel: 053-850-6456

Fax: 053-850-6459

역할을 하는 것으로 간주되어왔으나 최근에 환경분야의 연구에도 도입된 분자기법 즉 유전자, 16S rRNA를 이용한 연구결과에 의하면 *Acinetobacter* spp.는 인제거에 관여하는 세균군집의 극히 일부분을 차지할 뿐이며⁴⁾ 효율적인 인제거에는 대부분의 그람음성세균을 포괄하는 proteobacteria 중, *Rhodocyclus* sp.²⁾를 포함하는 β -subclass proteobacteria와 그람 양성세균 그룹인 high G+C 세균들이 우점하는 것으로 알려졌다.⁵⁾ 반면에 인제거를 저해하는 GAOs세균군은 1990년대에 혐기성-호기성처리를 병행하는 반응조에서 특이한 형태의 세균군, 즉, 그람음성구균이면서 4개조(tetrads) 혹은 덩어리(clump)를 구성하는 세균군이 대량으로 발견되었는데 이들은 acetate만을 먹이로 주었을 때보다 acetate와 glucose를 혼합해 주었을 때 더 잘 성장한다하여 'G-bacteria'로 명명되었고⁶⁾ 추후에 이들이 가진 글리코겐 축적능과 연계해 GAOs (glycogen-accumulating non-poly-P organisms), 최근에는 tetrad forming organisms(TFOs)로 불리기도 한다. 실제로 세계 각처에서 Cech 등⁶⁾이 명명한 G-bacteria와 유사한 형태를 나타내는 세균들이 발견되었고^{3,7)} 그들의 현미경적 형태 특성에 준해 동일한 이름으로 불리고 있으나 그 세균들이 모두 동일한 균은 아닐 것으로 추정되고 있다. 최근에는 염기서열분석, FISH(fluorescent *in situ* hybridization)법, DGGE(denaturing gel gradient electro-phoresis)등의 분자기법이 슬러지 등 다양한 환경의 세균상 분석에 도입되면서^{8,9)} 그들의 분류계통적 지위가 매우 다양함이 점차 밝혀지고 있다.

본 연구에서는 기존의 A_2/O 방법을 변형시킨 2개의 lab-scale 연속 회분식 반응조(sequencing batch reactor; SBR)를 작동시켜 탄소원으로 sodium acetate와 glucose를 각각 투여할 경우, 인의 제거효율 및 그에 따른 전반적인 미생물상의 변화와 인제거관련 미생물들인 PAOs 및 GAOs의 발생빈도가 어떻게 달라지는지를 조사하였다. 아울러 제반적인 반응조의 운영인자인 COD, $PO_4\text{-P}$, T-P, MLSS 등도 측정하였다. 이때 미생물상의 분석은 FISH법과 DGGE법으로 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. SBR의 운전조건

SBR반응조는 반투명 polycarbonate 재질로 된 총량 8 L, 직경이 25 cm인 2개의 원형(SBR 1, SBR 2)조이며, 폭기는 산기식으로 하였고 교반장치로 혼합하였으며 time controller에 의해 작동을 조절하였다(Fig. 1). 실험에 사용한 슬러지는 경북 영천시 하수처리장의 반송슬러지이고, 본 실험에 앞서 예비 운전단계로써 하수처리장의 반송슬러지를 반응조에 접

종시킨 후 약 10일 동안 일정한 조건으로 반응시켜 슬러지를 실험환경에 적응시킨 다음 본 실험을 수행하였다. SBR반응조의 운전방식은 Fig. 2와 같고 이때 feed로서 각기 다른 탄소원(sodium acetate, glucose)을 포함한 합성폐수를 제조하여(Table 1) 1일 3회로 주입하였으며 기타 운전 조건은 다음과 같다. 수리학적 체류시간(hydraulic retention time; HRT)은 18시간, 합성폐수의 유입은 혐기성반응의 초기, 전체반응시간에서 무시할 정도로 짧은 시간 동안(10분) 이루어졌다(Fig. 2). 운전 중 반응조내 미생물의 농도(mixed liquor suspended solid; MLSS)는 약 5000 mg/L, 반응조내 미생물 체류시간(sludge retention time; SRT)은 약 30일, 그리고 pH는 대략 7.0로 조절하였다. 아울러 dissolved oxygen(DO)는 혐기와 무산소시에는 각각 0로, 호기 시에는 2 mg/L이상 유지되도록 공기 주입량을 조절하였다.

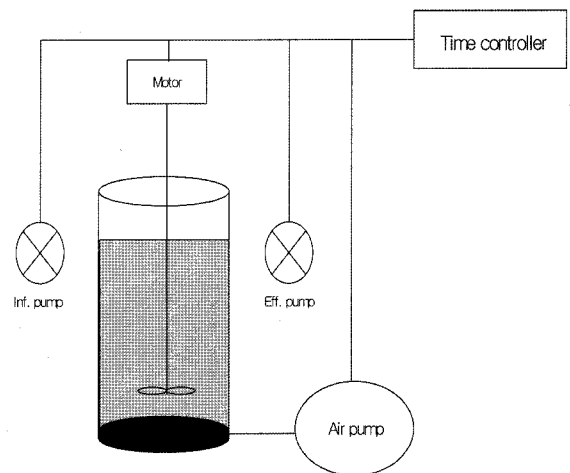


Fig. 1. Schematic diagram of SBR process.

Table 1. Characteristics of synthetic wastewater of influent

Item	SBR 1	SBR 2
Carbon source	200 mg/L as Sodium Acetate COD	200 mg/L as Glucose COD
Ammonium sulfate	13.34 mg/L as N	13.34 mg/L as N
Potassium phosphate	10 mg/L as P	10 mg/L as P
Sodium bicarbonate	200 mg/L as HCO_3^-	200 mg/L as HCO_3^-
Mineral solution ¹⁰⁾		
pH 7.0		

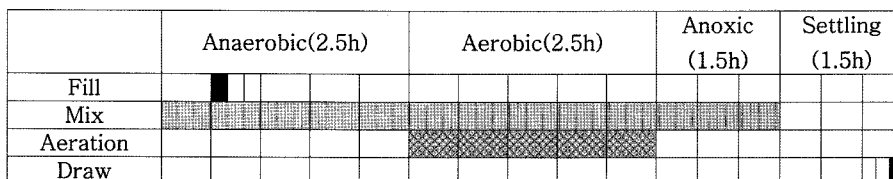


Fig. 2. Operating mode of SBR. (□ : 30min, █ : 10min)

2.2. 수질분석방법

유출수의 시료는 반응조 중앙에 설치된 시료 채취관을 통하여 매 2일마다 140일 동안 채수하여 반응조의 제한적인 운전인자인 COD, 총인(T-P), MLSS 등 수질항목을 수질오염공정시험방법¹¹⁾과 standard method¹²⁾에 준하여 측정하였다. 또한 용존성 인(orthophosphate; PO₄-P)은 완전히 혼합된 슬러지를 3000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후, 그 상등액을 시료로 하여 측정하였다.

2.3. 슬러지 미생물의 분석

반응조 내 인제거효율에 따른 전반적인 미생물상의 변화를 알기위해 인제거 저해 미생물로 알려진 GAOs를 제외한 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ -subclass proteobacteria *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) 세균군,⁹⁾ 다중인산염 축적세균인 PAOs의 정량분석은 FISH법으로 수행하였다.

GAOs의 결과치는 위상차현미경(Zeiss, Axioplan 2, Germany)으로 관찰했을 때 10개의 구간(field)에 존재하는 4개조(tetrads) 혹은 덩어리(clump)를 구성하는 세균수 평균값이 총세균수에서 차지하는 비(%)로 산출하였다. 또한 PAOs는 FISH법을 수행한 후, GAOs와 마찬가지로 동일한 field내의 형광을 띠는 세균수를 계수하여 그 평균값이 총 세균수에서 차지하는 비율을 결과치로 하여 인의 제거효율에 따른, PAOs 및 GAOs의 발생빈도를 정량분석 하였다.

2.3.1. FISH 분석

다른 탄소원을 투여한 각각의 SBR로부터 반응 전·후의 슬러지 시료를 채취하여 4% paraformaldehyde 용액(시료 : 고정액 = 1 : 3, v/v)으로 24시간 이상 고정된 후, 고정액을 씻어내기 위하여 1X phosphate buffered saline(PBS)으로 2번 이상 세척한 다음 teflon coated slide(cel-line, USA)위에 5 μ L씩 올려놓고, 50%, 80%, 90% 에탄올로 각각 3분 동안 탈수하였다. 예열된 hybridization solution[0.9M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.01% sodium dodecyl sulfate, formamide(Table 2)] 10 μ L와 gene probe 3 μ L를 첨가하여 46°C hybridization chamber에서 12시간 동안 교잡시켰다. 교잡한 후 48°C에서 예열된 hybridization washing solution[20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.01% SDS, NaCl(농도 ALF 0.225 M, BET·GAM·CF·PAO 80 mM)]로 30

분간 세척하였다. 각 세균그룹들이 총세균수에서 차지하는 비율을 알기 위해 DAPI(4-6-diamino-2-phenylindole; Sigma, 0.33 μ g/mL)로 20분간 염색하여 총세균수를 측정하였다.^{10,13)} FISH와 DAPI염색은 모두 암실에서 진행되었고, 그 결과는 형광현미경(Zeiss, Axioplan 2, Germany)을 사용하여 10회 무작위로 선택한 구간(field)에서 계수한 평균값을 총세균수에 대한 비(%)로 나타내었다. 인제거미생물인 PAOs를 포함한 슬러지 미생물분석에 사용한 gene probe는 Table 2에 요약되었다.^{14,15)}

2.3.2. DGGE 분석

반응 전 및 반응 후 100일, 120일, 140일이 지난 슬러지 시료로부터 Ultra Clean™ Soil DNA kit(Mo-Bio, USA)를 사용하여 total DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 0.7% agarose gel에 전기영동하여 존재유무를 확인하였다. 이렇게 추출된 DNA(template 1 μ L)에 taq polymerase[20 mM Tris-HCl(pH 8.3), 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, dNTP 0.4 mM](TaKaRa) 25 μ L를 포함하는 PCR premix와 forward/reverse primer(10 pmole) 각각 1 μ L를 넣고 3차 증류수를 추가하여 최종 50 μ L로 만들어 증폭하였다(My cycler™ Thermal cycler, BIO-RAD). 이때 사용한 forward primer는 341F(5'-CCTACGG GAGGCAGCAG-3', Tm; 61), with GC clamp(5'-CGCCCG CCGCGCGCGGGGGGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') 이고, reverse primer는 518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', Tm; 59)이다. Polymerase chain reaction(PCR)의 증폭조건은 pre-heating(94°C, 4분), denaturing(94°C, 30초), annealing (55°C, 60초), extension(72°C, 90초), final extension(72°C, 8분) 이고 30회 증폭하였다. 이후 PCR product를 1.5% agarose gel에 전기영동하여 band의 존재 유무를 확인하였다. DGGE는 1X TAE buffer를 포함하는 6% polyacrylamide gel [(20 mM Tris acetate(pH 7.4), 10 mM sodium acetate 0.5 mM Na₂-EDTA, 6% acrylamide stock solution(acrylamide:N, N'-methylenebisacrylamide, 37.5:1, w/v)]에 urea와 formamide 40~60%의 변성제를 포함하는 gel에 running buffer로써 1X TAE buffer를 사용하여 70V로 480분 동안 60°C에서 DCode system™(Bio-Rad, USA)으로 수행하였다.¹⁶⁾ 또한 gel의 DNA band를 elusion하여 sequencing한 결과를 NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 준해 동정하였다.

Table 2. Oligonucleotide probe used in microbial analysis by FISH

Probe	Labelling dye	Probe sequence(5' → 3')	Target site ^{a)}	Formamide conc.(%) ^{b)}
ALF1b	Cy3	CGTTCGYTCTGAGCCAG	19-35	20
BET42a	Cy3	GCCTTCCCACCTTCGTTT	1027-1043	35
GAM42a	Cy3	GCCTTCCCACATCGTTT	1027-1043	35
non-BET42a		used as competitor together with GAM 42a		
non-GAM42		used as competitor together with BET 42a		
CF319a	FITC	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	319-336	35
PAO462	Cy3	CCGTACATCACCAGGGTATTACC	462-486	35

^{a)} 16S rRNA position according to Escherichia coli numbering, ^{b)} Formamaide concentration in the hybridization buffer

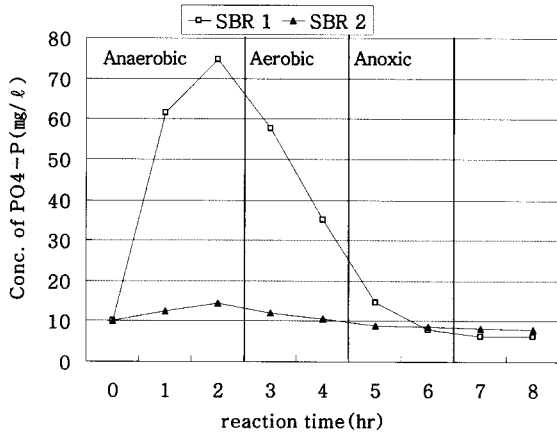


Fig. 3. Variation of PO₄-P in both SBRs on 100th day.

3. 결과 및 고찰

3.1. 탄소원과 인제거효율

3.1.1. PO₄-P의 시간별 농도변화

SBR을 이용하여 반응 100일째의 용존성 인의 농도변화를 Fig. 3에 나타내었다. 초기 유입수의 용존성 인의 농도는 10 mg/L이었지만, 혐기상태에서는 인의 방출이 일어나 SBR 1, SBR 2의 용존성 인의 농도가 각각 64.82, 13.84 mg/L으로 초기 유입농도 보다 높아졌으며 호기 반응에서는 인의 과잉섭취가 일어나 유입수의 농도보다 더 낮은 3.72, 6.60 mg/L으로 측정되었다. 이는 PAOs가 혐기상태에서 분자량이 작은 휘발성 유기산(Short Chain Fatty acid; SCFA)을 효과적으로 흡수하여 연속적으로 poly-β-hydroxybutyrate(PHB)로 전환하는데 glucose보다 sodium acetate가 더 효과적이기 때문으로 판단되었다.

3.1.2. COD 변화

유입수의 COD의 농도는 200 mg/L였으나 유출수는 SBR 1에서 0.51~22.7 mg/L(평균 8.21 mg/L)의 범위에서 변화하였으며 95.90%의 처리효율을 나타내었다. SBR 2의 유출수에서도 SBR 1과 유사한 0.52~21.99 mg/L(평균 8.55 mg/L)의 농도와 처리효율(95.73%)을 나타내었다(Fig. 4). 이처럼 두 반응조 모두 높은 COD 제거 효율을 나타내는 것은 탄소원인 sodium acetate와 glucose 모두 분해가 용이한 기질 즉, biodegradable COD(BDCOD)이기 때문으로 사료된다.

3.1.3. 총인과 용존성 인의 변화

유출수의 T-P의 농도는 SBR 1에서는 2.48~54.94 mg/L의 범위(평균 20.69 mg/L)에서, 그리고 SBR 2에서는 9.69~52.33 mg/L의 범위(평균 38.30 mg/L)에서 변화하였고 PO₄-P의 농도는 SBR 1에서는 0.92~9.22 mg/L(평균 3.92 mg/L), SBR 2에서는 24.86~9.44 mg/L(평균 8.3 mg/L)로 나타났다(Fig. 4). 아울러 평균처리효율은 SBR 1, SBR 2에서 각각 60.8%, 17%였다.

3.2. 인제거 효율과 미생물상의 변화

3.2.1. FISH법으로 분석한 반응전후의 미생물상 변화

반응전·후의 전반적인 세균상의 변화를 추적하기 위해 각각의 반응조에서 반응전(0일)과 반응 후 100일, 120일, 140일째에 슬러지를 채취하여 α·β·γ-subclass proteobacteria와 CF 세균군이 총세균수에서 차지하는 비율을 조사하였다(Fig. 5). 반응 전에는 α·β·γ-subclass proteobacteria, CF 세균군의 총세균수에 대한 비율이 각각 13.54, 8.74, 8.24, 4.62%로 나타났다. 그러나 시간이 지남에 따라 SBR 1에서는 β-subclass proteobacteria가 그리고 SBR 2에서는 γ-subclass proteobacteria 세균군이 우점하는 양상을 보였다. 즉, 인의 처리 효율이 높은 SBR 1에서 총 세균수에 대한 β-subclass proteobacteria의 비가 반응전에는 8.74%였으나 인제거효율(63%)이 높았던 반응 100일째(7월 2일)에는 39.67%로 증가하였으나 그 후, 수온이 25℃ 이상으로 상승하자 다시 감소하

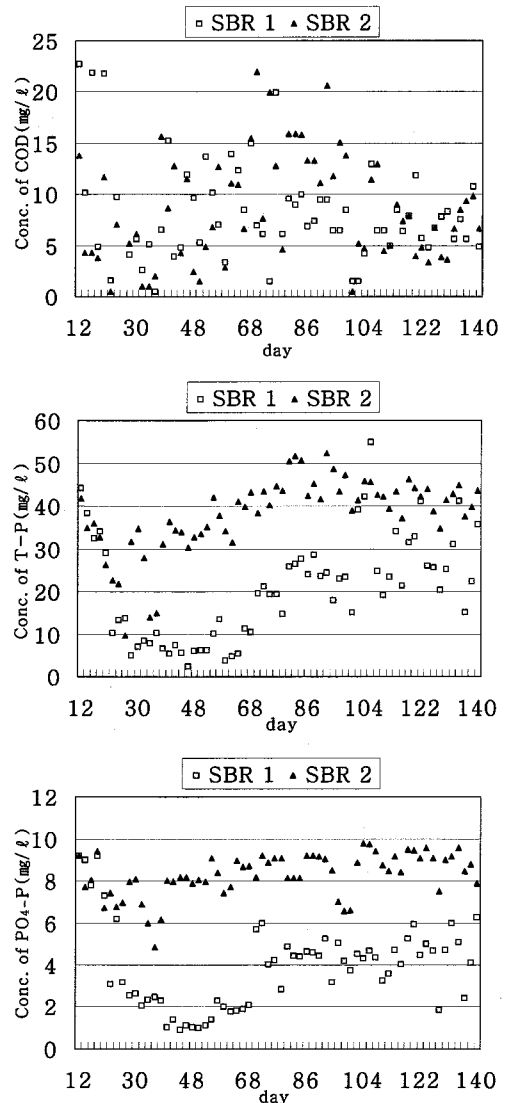


Fig. 4. Variation of COD, T-P, PO₄-P in effluent during the reaction time.

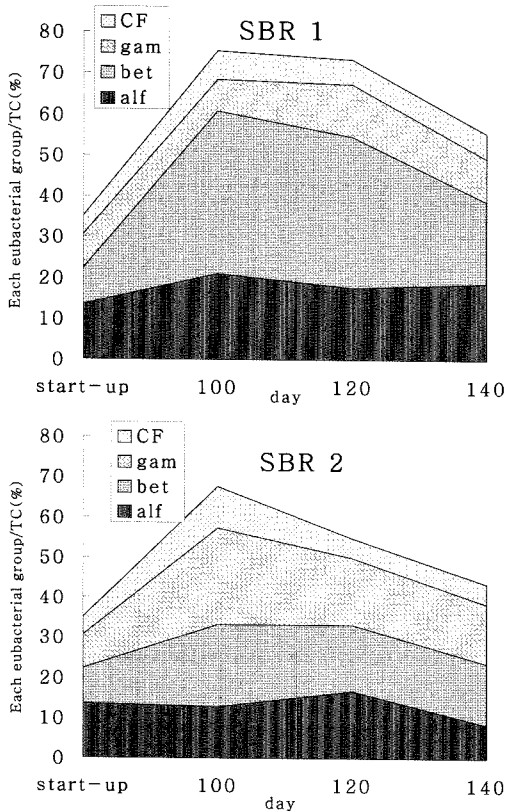


Fig. 5. Changes of proportions of eubacterial groups detected by group specific fluorescent probes to total bacteria during 140 days in both SBRs.

였으며(120일; 36.90%, 140일; 20.22%), 이에 비례하여 인 제거효율도 떨어졌다(Fig. 4. 120일; 40.4%, 140일; 32.8%). 반면에 glucose를 탄소원으로 주입한 SBR 2에서의 β -subclass proteo-bacteria 세균군의 변화 양상을 보면 반응 전에 그들이 총세균수에서 차지하는 비율(8.74%)이 증가하였지만 그 증가율이 acetate를 주입한 SBR 1 반응조에 비해 훨씬 낮았다(100일; 20.54%, 120일; 16.50%, 140일; 15.03%). 반면 γ -subclass proteobacteria 세균군은 반응 전에는 8.24%이었지만 시간에 따라 증가하여(100일; 23.89%, 120일; 16.62%, 140일; 16.03%) 가장 높은 우점도를 나타냈다. 이 결과는 인 제거효율이 상대적으로 좋았을 때 슬러지 세균상을 분석해보면 β -subclass proteobacteria 세균군이 우점했다는 타 연구자들의 결과^{4,5,10})와 일치하였다. 또한 반응 100일(7월 2일) 이후, 즉 하절기에 접어들면서 수온이 상승하면 인 제거효율이 좋았던 SBR 1에서도 β -subclass proteobacteria 세균군의 감소와 더불어 인 제거 효율이 떨어지는 것으로 보아 이는 높은 수온이 오히려 인 제거효율이 감소시킨다는 보고내용^{7,17})과도 일치하였다. 아울러 반응 전의 SBR 1 슬러지 미생물군집 중, 인제거 미생물로 알려진 PAO가 총세균수에서 차지하는 비율이 29.16%였지만 인제거효율(63%)이 가장 높았던 100일째에 45.10%로 최고의 우점도를 나타냈으며 수온 증가와 함께 점차 감소(120일; 35.6 %, 140일; 34.7%)하였다(Fig. 6). 반면 SBR 2 반응조에서는 반응 전 슬러지보다 PAO가 총세균수에서 차지하는 비율이 점차 감소하였다(100일;

21.4%, 120일; 16.3%, 140일; 13.5%). 즉 반응이 진행 되면서 SBR 2보다 SBR 1에서 인 제거 미생물이 총세균수에서 차지하는 비율이 훨씬 높았다. 이 결과는 SBR 1의 유출수 중 용존성 인 농도가 SBR 2 보다 낮은 결과와 부합하였다. 반면에 인제거를 저해하는 세균군으로 알려진 GAO 혹은 TFO(Fig. 7)의 세균수가 인제거가 높았던 100일 후에 각 반응조 모두에서 증가하였다(Fig. 6). 이 결과는 실험 초기대비 반응 100일이 지난 후에 총인과 용존성 인이 다시 증가하는 추세인 것과도 부합하는데(Fig. 4), 이는 수온이 상승하였기 때문으로 판단된다. Erdal 등도 수온이 상승할수록 인 제거를 저해하는 GAOs가 PAOs보다 우위를 점하기 때문에 인 제거 효율이 떨어지고¹⁷⁾ 동시에 GAOs의 수가 증가한다고 하였다. 그러나 실제로 수온과 인 제거효율과의 연계성에 관해서는 추후에 좀 더 명확하게 규명되어야 할 것이다. 또한 이들을 호기적으로 배양하면 덩어리로 뭉쳐있던 GAOs들이 각기 떨어져서 짧은 간균의 형태를 나타냈고 GAOs균을 싸고 있던 EPS도 없어지는 반면 혐기 배양 시에는 GAOs들이 성장하지 않는 것¹⁸⁾으로 미루어 GAOs가 두꺼운 EPS층을 형성하면서 나타내는 형태적 특징은 호기성인 GAOs가 호기/혐기적 환경을 병행하는 처리과정에서 자신의 생존에 부적합한 혐기적 환경에서 살아남기 위한 일종의 방어 기작으로 사료된다. 그러나 아직 GAOs에 대한 생성기작 및 기능에 관해서는 명확하게 규명되지 않았다.¹⁾

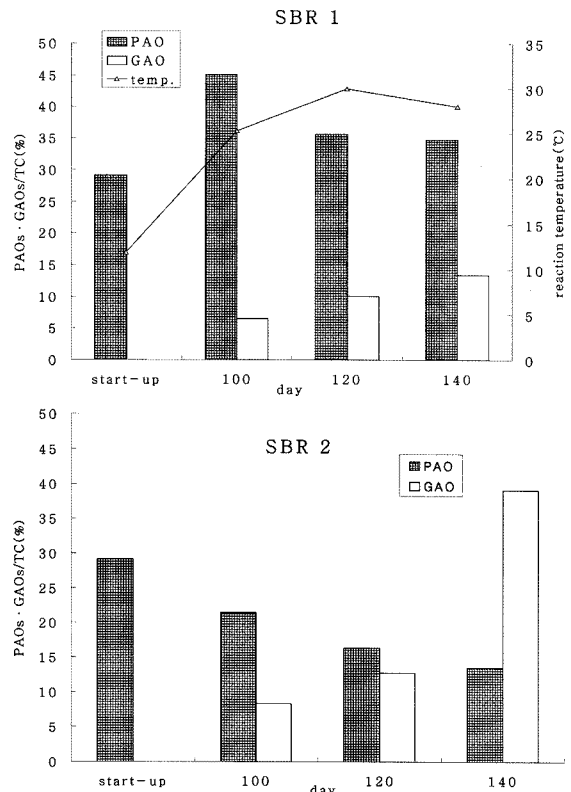


Fig. 6. Changes of proportions of PAOs detected by its specific fluorescent probes to total bacteria(%) and GAOs(TFOs) by phase-contrast microscopy to total bacteria(%) during 140 days in both SBRs.

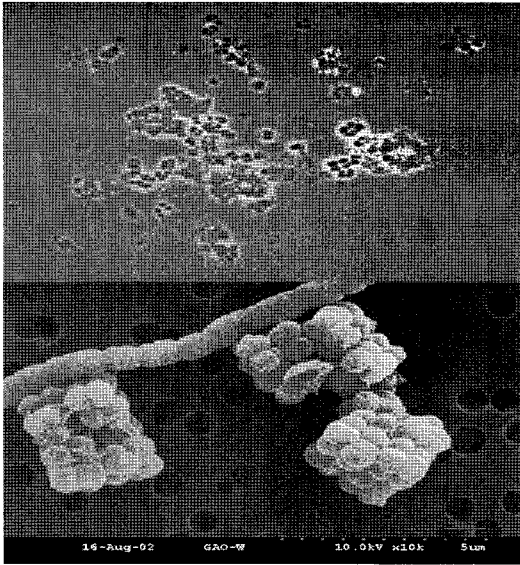


Fig. 7. Micrographs of phase contrast(top) and SEM(bottom) of GAOs in SBR 2.

3.2.2. DGGE법에 의한 분석

반응 전·후의 각각의 반응조 슬러지에서 추출한 DNA로 수행한 DGGE 결과이다(Fig. 8). 동일한 위치에 있는 band는 동일한 세균에 의한 것일 가능성이 큰 것으로 간주되는데¹⁶⁾ DGGE-profile을 분석해 보면 SBR 1에서는 특정세균이 우점하는 반면 SBR 2에서는 특정세균의 우점 현상을 볼 수 없다. 또한 반응 140일째에 인제거를 저해하는 GAOs 세균군이 많이 형성된 SBR 2의 슬러지를 EPS를 제거하기 위해 전처리한 후에¹⁹⁾ 수행한 DGGE profile에는 SBR 1, 2에서는 볼 수 없었던 band들이 나타났다(lane 8). 이는 EPS를 둘러싸인 GAOs에서의 DNA가 SBR 1, 2 반응조 슬러지에서의 DNA 추출에 적용한 실험방법, 즉 상용화된 실험방법으로는 추출되지 않아 SBR2에 FISH법 결과에 언급되었듯이 γ -subclass proteobacteria이 우점함에도 불구하고 우점현상을 관찰할 수 없었던 것으로 생각된다. 이 band들의 일부를 elution하여 염기서열을 분석하고 NCBI databsc(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 동정한 결과, 8 lane의 GAOs는 호기성세균인 *Acinetobacter* sp.와 유사하였고(유사도 92%) SBR 1의 우점세균들은 β -subclass proteobacteria에 속하였으며 SBR 2 반응조 슬러지에서 추출한 DNA band pattern을 보면 band는 존재하지만 그 yield가 SBR 1에 비해 적어 이들을 이용한 세균 동정은 불가능하였다. 즉, 인 제거 효율이 좋았던 SBR 1에서 β -subclass proteobacteria 세균군이 우점함을 FISH법과 DGGE법으로 확인할 수 있었다.

과거의 배양법으로는 *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Aeromonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Sphingomonas* sp.와 *Microtholunatus* sp. 등이 인 제거에 관여하는 것으로 알려졌으나,^{19,20)} 근래의 분자기법으로는 β -subclass proteobacteria에 속하고 광합성능이 있는 purple non-sulfur 세균인 *Rhodocyclus* sp.이 인제거 효율이 좋은 하·폐수처리시스템에서 우점한다고²⁾ 밝혀졌다. 정량분석이 가

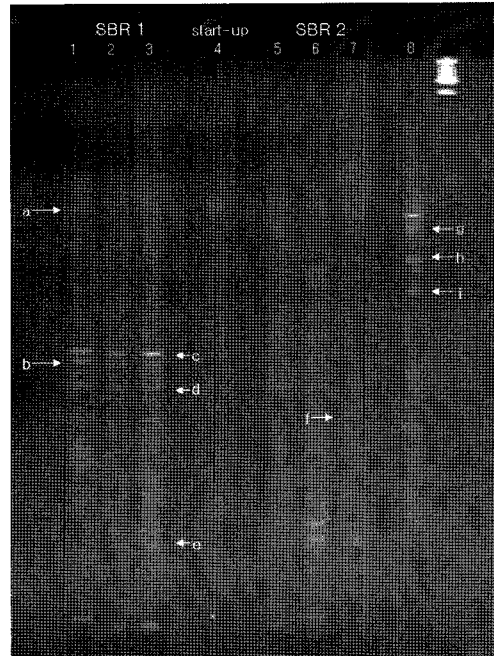


Fig. 8. DGGE profile in both SBRs: lane 1~3; after 100 · 120 · 140 days in SBR 1, lane 4; before the reaction in both SBRs, lane 5~7; after 100 · 120 · 140 days in SBR 2, lane 8; GAOs from SBR 2 and the results of sequencing were as follows; b~d: uncultured β -subclass proteobacteria, a, e, f, h, i; uncultured, unidentified bacteria, g; similar to *Acinetobacter* sp.(92%).

능한 FISH법이나 손쉽게 슬러지에 존재하는 세균상 파악이 용이하고 정성분석이 가능한 DGGE법 등, 분자기법들은 기존의 배양법보다 빠르게 미생물군집을 분석할 수 있는 장점을 갖지만, 우선 슬러지에 존재하는 다양한 두께의 체외물질(EPS)과 세포벽을 가진 세균군으로부터 DNA를 추출하는데 동일한 방법을 적용하는데서 기인하는 실험방법상의 오차도 잠재하고 있다. 그러나 점차적으로 실험방법이 개선되어 보다 손쉽게 생물학적인 하·폐수처리에 관여하는 미생물을 분석할 수 있게 되면 처리공정의 문제점 규명 및 그 효율 향상에 도움이 될 것이다.

4. 결론

생물학적 인 제거 공정에 관여하는 미생물을 규명하기 위하여 탄소원으로 sodium acetate, glucose를 각각 주입한 2개의 SBR 반응기를 가동하여 인 제거 실험을 수행하였는데 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 반응조의 정상적인 작동유무를 점검하기 위해 측정된 용존성 인의 시간별 농도변화로 볼 때, glucose를 주입한 SBR 2보다 sodium acetate을 주입한 SBR 1에서 인의 방출/과잉 섭취 현상이 더 뚜렷하게 나타났다.
- 2) 탄소원으로 sodium acetate을 주입한 SBR 1의 인제거 효율(60.8%)이 glucose를 주입한 SBR 2(17%)보다 높았다. 그

러나 수온이 증가하면서 그 처리효율이 감소하였다.

3) FISH 결과, SBR 1에서는 총세균수에 대한 β -subclass proteobacteria와 PAOs의 비가 높은 반면, SBR 2에서는 γ -subclass proteobacteria와 GAOs의 비가 높았다. 그러나 수온이 증가하면서 두 반응조 모두에서 GAOs가 증가하였다.

4) DGGE의 band pattern 분석 결과, SBR 1에서 β -subclass proteo-bacteria가 우점한다는 FISH결과를 재확인할 수 있었다.

즉, 탄소원으로 sodium acetate를 주입한 SBR 1이 glucose를 주입한 SBR 2보다 인의 제거효율, 인의 방출 및 과잉섭취 정도가 더 좋은 것으로 조사되었다. 아울러 수온 및 탄소원 등의 환경요인이 인 제거공정효율을 좌우하는 영향 인자로 작용하므로 처리시스템 가동 전에 적용하는 슬러지에 존재하는 세균의 생태적인 연구가 요구된다.

사 사

본 연구는 과학재단 지역대학 우수과학자 지원연구사업(KOSEF; R05-2002-00001260-0)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J., "Microbiology and Biochemistry of the Enhanced Biological Phosphate Removal Process," *Water Res.*, **32**, 3193~3207(1998).
2. McMahon, K. D., Dojka, M. A., Pace, N. R., Jenkins, D., and Keasling, J. D., "Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4971~4978 (2002).
3. Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., and Wanner, J. A., "fluorescently-labelled rRNA targeted oligonucleotide probe for the in situ detection of G-bacteria of the genus *Amaricoccus* in activated sludge," *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 826~835(2000).
4. Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K. H., "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(1994).
5. Bond, P. L., Hugenholtz, P., Keller J. and Blakall, L., "Bacterial Community structures of phosphate-removing and non-phosphate removing activated sludge from SBR," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1910~1916(1995).
6. Cech J. S. and Hartman, P., "Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in

- enhanced biological phosphate removal systems," *Water Res.*, **27**, 1219~1225(1993).
7. Whang, L. M. and Park, J. K., "Competition Between Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen-Accumulating Organisms at Different Temperatures," *Water Sci. Technol.*, **46**, 191~194(2002).
8. Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K. H., "Identification of Uncultured Bacteria A Challenging Task for Molecular Taxonomists," *AMS News.*, **60**, 360~365 (1994).
9. Lee, S. H. and Fuhrman, J. A., "DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages," *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 739~746 (1990).
10. Christensson, M., Blackall, L. L., Welander, T., "Metabolic transformations and characterisation of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 226~234(1997).
11. 환경부, 수질오염공시시험방법(2004).
12. APHA, "Standard methods for the examination of water and wastewater," *American Public Health Association*, Washington, D.C.(1995).
13. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H., "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions," *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**, 593~600(1992).
14. Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M., "Characterization of Bacterial Communities from Activated Sludge ; Culture-Dependent Numerical Identification Versus *in situ* Unidentification Using Group- and Genus- Specific rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes," *Microbial Ecology.*, **32**, 101~121(1996).
15. Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K. H., "Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation," *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143~169(1995).
16. Muyzer, G., DE Waal Uitter-linden. E. C., "Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction Amplified Genes Coding for 16s rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **3**, 695~700(1993).
17. Erdal, U. G., Erdal, Z. K., and Randall, C. W., "The Competition between PAOs and GAOs in EBPR Systems at different temperatures and the effects on system performance," 3rd World Water Congress, IWA, Melbourne, Australia(2002).
18. Lee, Y. O., Choi, J. W., "Speculation on existence of bacteria named TFOs occurred in biological phosphorus removal," 3rd IWA Specialised Conference on Sequen-

- cing Batch Reactor Technology(SBR3), Noosa, Australia (2004).
19. Klijn, N., Nieuwenhof, F. F., van der Waals, J. D., and Weerkamp, A. H., "Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late lowing in cheese by species-specific PCR amplification," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2919~2924(1995).
 20. Kortstee, G. J. J., Appeldoorn, K. J., Bonting, C. F. C., van Niel, E. W. J., van Veen, H. W., "Biology of polyphosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal," *FEMS Microbiol Rev.*, **15**, 137~153(1994).
 21. Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., Kamagata, Y., "Microbunus phosphorus genov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 17~22(1995).