

## FISH법을 이용한 정수처리장 내 생물활성탄 공정의 세균군집 구조 분석

손형식 · 김미아\* · 정성윤\* · 김영훈\* · 손희종\*\* · 박근태\*\*\* · 김민주 · 유은연 · 이상준

부산대학교 미생물학과, \*부산대학교 Bio-IT 파운드리센터,  
\*\*부산광역시 상수도사업본부 수질연구소, \*\*\*부산대학교 산학협력단  
(2008년 2월 1일 접수; 2008년 3월 4일 채택)

### Analysis of Bacterial Community Structure of Biological Activated Carbon Process in Drinking Water Treatment Plant Using FISH

Hyeng-Sik Son, Mia Kim\*, Seong-Yun Jeong\*, Young-Hun Kim\*, Hee-Jong Son\*\*,  
Geun-Tae Park\*\*\*, Min-Ju Kim, Eun-Yeon Ryu and Sang-Joon Lee

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

\*Korea Bio-IT Foundry Center, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

\*\*Water Quality Research Institute, Waterworks Headquarter, Busan 621-813, Korea

\*\*\*Research & University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Manuscript received 1 February, 2008; accepted 4 March, 2008)

#### Abstract

The bacterial community structure in biological activated carbon (BAC) process in drinking water treatment plant was investigated by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probe. Samples were collected at different three points in BAC process every month for one year. They were hybridized with a probe specific for the alpha, beta, gamma subclass of the class *Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* group and Gram-positive high G+C content (HGC) group. Total numbers of bacteria in BAC process counted by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining were  $5.4 \times 10^{10}$  (top),  $4.0 \times 10^{10}$  (middle) and  $2.8 \times 10^{10}$  cells/ml (bottom). The number of the culturable bacteria was from  $1.0 \times 10^7$  to  $3.6 \times 10^7$  cells/ml and the culturability was about 0.05%. The faction of bacteria detectable by FISH with the probe EUB338 was about 83% of DAPI counts. Gamma and alpha subclass of the class *Proteobacteria* were predominant in BAC process and their ratios were over 20% respectively. In top and middle, alpha, beta and gamma subclass of the class *Proteobacteria* competed with each other and their percentages was changed according to the season. In bottom, gamma subclass of the class *Proteobacteria* was predominant all through the year. It could be successfully observed the seasonal distribution of bacterial community in biological activated carbon process using FISH.

**Key Words** : Biological activated carbon, Bacterial community, FISH, Drinking water treatment plant

#### 1. 서론

현재 국내 상수원으로 이용되고 있는 주요 하천

들은 급격한 인구증가와 산업의 고도화에 의한 각종 오염물질의 유입으로 하천 본래의 자정능력이 현격히 저하되었거나 거의 상실된 상태이다. 특히 낙동강은 중상류 지역에 많은 공업단지와 인구밀집 도시가 위치하고 있어 국내에 있는 다른 하천보다도 각종 오염사고로 인한 크고 작은 수질 이상 현상이 자주 발생하고 있다. 가정하수, 축산폐수 및 난분해성 공장폐수에 함유되어 있는 영양염류로 인하여 하천의 부영양화(eutrophication)가 발생하고 있으며, 연중 활발한 조류의 수화현상(water bloom)으로 수중 pH와 알칼리도가 증가하고 있는 실정이다<sup>1,2)</sup>. 또한 부유물질에 의해 탁도가 증가하고 있으며, 천연 유기물질 및 자생적으로 발생하는 유기물질 증가로 인하여 그 오염이 가속화되어 가고 있다<sup>3)</sup>. 상수원수 3급수를 육박하고 있는 낙동강 원수를 이용하여 양질의 수돗물을 생산하고 수돗물에 대한 시민들의 불신감을 해소하기 위해 고도정수처리(advanced water treatment) 도입의 필요성이 대두되었으며, 1994년 4월 부산광역시 화명정수장에 우리나라 최초로 오존과 생물활성탄(Biological Activated Carbon : BAC)의 고도정수처리 시설 도입을 시작으로 고도정수처리 시설이 정수장에 도입되었다<sup>4)</sup>.

생물활성탄 공정은 활성탄소(activated carbon)를 이용하여 물리적 흡착과 부착된 세균에 의한 유기물의 생분해 과정으로 구성된 공정으로서, 용존 유기물질, 질소, 인, 암모니아 등의 제거에 효과적인 것으로 알려져 있다<sup>5,6)</sup>. 생물활성탄 공정의 활성탄소의 표면 및 공극에는 그 수계에 존재하는 미생물들(indigenous microorganisms)이 부착·서식하며, 수중의 천연유기물질(Natural Organic Matter: NOM)을 기질로 이용하기 때문에 그 수계에 서식하는 미생물 종들에 매우 의존적이다. 또한 수온, 유기물 종류 및 pH 등과 같은 유입수의 성상과 활성탄의 재질에 따라라도 부착미생물의 구성종 및 생체량에 많은 차이가 나며, 생물활성탄 공정의 효율에 많은 영향을 미친다고 알려져 있다<sup>7~10)</sup>. 따라서 생물활성탄 공정에서 활성탄소 부착미생물의 구성종과 생체량 분석은 공정의 운전에 매우 중요한 요소 중의 하나이다. Moll 등<sup>10)</sup>과 박 등<sup>11)</sup>은 배양학적인 방법인 Heterotrophic Plate Count(HPC)법을 이용하여 활성탄소내의 세균 군집을 분석하였다. 그러나 수계 내

에는 배양 불가능한(Viable But Not Culturable : VBNC) 세균이 수계의 환경에 따라 약 99% 이상으로 존재하므로, 실제로 활성을 가지는 미생물 개체수보다 낮게 측정되는 등 정확한 군집 분석에 한계를 지니고 있다<sup>12)</sup>.

최근에는 분자생물학적 기법의 발전과 더불어 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE), Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), Ribosomal RNA Intergenic Spacer Analysis (RISA), Fluorescent *in situ* Hybridization(FISH), DNA re-association analysis 등의 다양한 기법을 이용하여 수계의 미생물 군집내 미생물 다양성을 분석하는 연구가 진행되고 있다<sup>13,14)</sup>. Fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probe는 간단하고 쉽게 여러 생태계에서 세균군집의 시간·공간적 변화를 파악할 수 있다<sup>15)</sup>. rRNA는 세포 내에 많은 양이 존재하고 있어 관찰이 쉽다는 장점이 있고 특히 16S rRNA와 23S rRNA유전자는 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있는 영역이며 염기서열의 변화는 미생물간의 유연관계를 파악하는데 유용하다<sup>16)</sup>. 또한 16S rRNA의 특정부분은 진화 속도가 매우 느려 많은 생물체가 공통적으로 갖는 보존된 염기서열과 이차 구조를 나타내어 다양한 분류군의 상호 비교를 가능하게 한다<sup>17)</sup>. 따라서 FISH법은 정량적인 분석이 가능하며, 성장이 느리고 배양이 불가능한 세균을 포함한 미생물 세포를 직접 육안으로 관찰할 수 있다는 장점을 가지고 있어 환경 시료 내의 미생물 군집구조의 분석과 모니터링에 적용되고 있다<sup>18~21)</sup>. 수처리 분야에서 주로 하·폐수처리 공정 중 생물학적 처리공정의 미생물 군집 분석, 상수처리 분야에서 배·급수관망에서 미생물 재성장(regrowth)에 의해 형성된 생물막 특성분석<sup>22,23)</sup> 등에 FISH 등의 분자생물학적 기법을 적용한 연구가 보고되고 있으나, 생물활성탄 공정 내에서 비배양학적인 방법을 이용한 세균 분석에 관한 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 FISH법을 이용하여 정수처리장 고도처리공정 중의 하나인 생물활성탄 공정의 활성탄소에 부착하여 서식하고 있는 세균의 군집구조를 분석하고, 월별·수리학적 수질특성에 따른 군집구조의 변화를 밝히고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 생물활성탄 시료의 채취

경상남도 김해시 덕산정수장 고도정수처리시설 내의 생물활성탄 공정에서 3개의 지점을 선정하여 시료를 채취하였다(Fig. 1). 시료는 2002년 3월부터 2003년 2월까지 월별로 각각 3개의 지점에서 100 ml 씩 채취하여, 이화학적인 수질분석과 세균 군집구조를 분석하였다. 생물활성탄 공정 내 기본적인 생물활성탄의 특성은 Table 1에 나타내었다. 생물 활성탄 내부 구조는 전자현미경(scanning electron microscope, DSM940A, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

### 2.2. 수질분석

생물활성탄 공정으로 유입·유출되는 시료를 매일 채취하여 수질분석을 하였으며, 수질 조사 항목의 모든 분석은 standard method<sup>24)</sup>와 일본 상수도 시험법<sup>25)</sup>에 근거하여 분석하였다. pH meter(Model 260, Orion, U.S.A)를 이용하여 pH를 측정하였으며, 수질

내 용존 유기탄소(Dissolved Organic Carbon: DOC)의 농도는 채수한 시료를 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과시킨 후 TOC analyzer(Sievers 800, Sievers, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. 질산성질소의 농도는 ED<sub>40</sub> electrochemical detector가 장착된 이온크로마토그래피(D-500, Dionex, U.S.A)로 분석하였다. 암모니아성 질소의 농도는 indophenol method<sup>24)</sup>, 과망간산칼륨의 농도는 acid titration method<sup>24)</sup>에 따라 분석하였다. 탁도, 온도는 각각 turbidimeter(2100AN, HACH, U.S.A)와 thermometer(TES-1311, TES, Taiwan)로 측정하였다.

### 2.3. 세균 군집 구조 분석

#### 2.3.1. 시료의 전처리 및 고정

생물활성탄 공정에서 채취된 시료 활성탄 건조중량 1 g을 증류수 9 ml에 혼합시켜 준 후, 37 KHz, 190 W에서 3 분 동안 초음파로 처리하여 생물활성탄에 부착된 세균을 탈리시켰다<sup>26)</sup>. 초음파로 처리한 시료를 4% paraformaldehyde solution(시료: 고정액 = 1:3)으로 4°C에서 16 시간 동안 고정시켰다. 고정된 시료를 4°C, 12,000  $\times g$  으로 20분 동안 원심 분리하여 상등 액을 제거하고, phosphate buffered saline(PBS: 130 mM NaCl; 10 mM sodium phosphate buffer; pH 7.2)으로 고정액을 세척하였다. 고정된 시료는 99% 에탄올(1:1, v/v)에 넣어 -20°C에 저장하여 실험에 사용하였다<sup>27)</sup>.

#### 2.3.2. Gene probes

본 연구에 사용된 probe는 주문, 제작(Takara, Japan)하여 사용하였으며, probe의 종류와 염기서열 등은 Table 2에 나타내었다. 형광 dye는 fluorescein isothiocyanate(FITC), infrared fluorescence dye IRD700, IRD800, rhodamine-green, rhodamine-red를 사용하였다.

#### 2.3.3. *In situ* hybridization

고정된 시료를 gelatin으로 코팅된 slide glass에 놓고, probe 1  $\mu\text{l}$ (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )과 hybridization buffer(0.9 mM NaCl; 0.01% SDS; 20 mM Tris/HCl; formamide(농도: EUB, 20%; ALF1b, 20%; BET42a, 35%; GAM42a, 35%; CF319a, 15%; HGC, 25%) 8  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 46°C에서 90분 동안 반응시켰다<sup>21,27)</sup>. 미리 가열된 washing buffer로 48°C에서 15분 동안 세정하고 공기 중에서 건조시켰다. 형광현미경(Axioskop 2 plus,

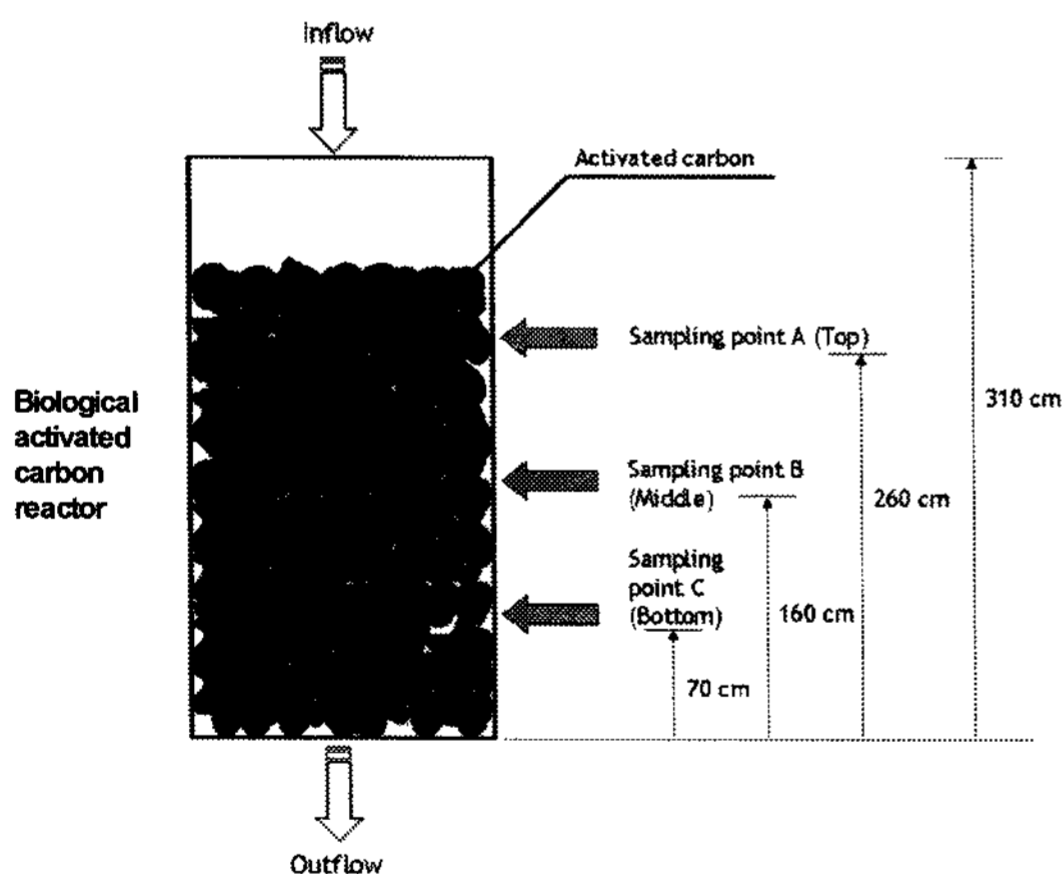


Fig. 1. Schematics of biological activated carbon reactor and sampling points for FISH analysis.

Table 1. General characteristics of activated carbon used for biological activated carbon process

Characteristics	Value
Iodine value	(mg/g) 1,016
Specific surface area	(m <sup>2</sup> /g) 1,100
Total pore volume	(ml/g) 0.548
Mean pore radius	(Å) 23

Table 2. Oligonucleotide probes used in this study

Probe	Probe sequence(5'-3')	Specificity	Formamide(%)	Ref.
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	20(0-50)	15)
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	$\alpha$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	20	16)
BET42a	GCCTTCCCACATTCGTTT	$\beta$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	35	16)
GAM42a	GCCTTCCCACATTCGTTT	$\gamma$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	35	16)
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	15	16)
HGC	TATAGTACCACCGCCGT	Gram (+) with high G+C content	25	21)

Carl Zeiss, Germany)과 scanning confocal laser microscopy(LSM 510, Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 800배 및 400배의 배율에서 field내에 나타난 세균 등을 10회 이상 계수하여 그 평균값을 계산하였다.

#### 2.3.4. DAPI에 의한 총 세균수 추정

고정된 시료 2  $\mu$ l를 gelatin으로 코팅된 slide glass에 놓고, DAPI(4',6-diamidino 2-phenylindole; 1  $\mu$ g/ml; Sigma, U.S.A)로 5분 동안 염색하였다. 염색된 시료는 멸균 증류수로 세척한 후 형광현미경(Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany)로 계수하였다<sup>28)</sup>.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 생물활성탄 공정의 연중 수질 변화 분석

생물활성탄 공정의 유입 유출수의 수질 변화를 월별로 분석하였으며 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 수온은 계절에 따라 뚜렷한 변화 양상을 보였다. 겨울철 최저 3.8°C에서 여름철 최고 29.1°C로 나타났다(Fig. 2(a)). pH는 6.71 - 7.73로서 연중 비슷하였으며, 유입·유출수 사이에도 커다란 변화를 보이지 않았다(data not shown). 탁도, KMnO<sub>4</sub>와 DOC의 농도는 생물활성탄 공정을 거치면서 농도가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. KMnO<sub>4</sub> 소비량은 유기물의 소비량을 나타내는 지표로서, 생물활성탄 공정을 통해 최대 58%까지 감소되었다(Fig. 2(c)). DOC(Dissolved Organic Carbon)는 수중에 용존 하는 0.1  $\mu$ m 이하의 유기물의 농도를 말하는데, 연중 분석결과 3월에 가장 높은 농도인 3.32 mg/l가 유입되었으며 생물활성탄 공정을 통해 DOC의 농도가 최대 41%까지 감소되었다(Fig. 2(d)). 실험기간 중 유입수의 질산성 질소의 농도는 약간 상승하였으며(Fig. 2(e)), 암모니아성 질소는 최대 71%까지 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2(f)). 생물활성탄 공정은 용존 유기물질의 제거 등에 효율적인 공정으로서 이를 제거할 때 흡착

용량 및 수명이 증대되며, 암모니아 등의 생물학적 처리에도 효율적인 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 본 연구의 실험기간 중 수질분석을 통해 생물활성탄 공정이 유기물질 및 암모니아성 질소의 제거에 효과적임을 확인할 수 있었다.

#### 3.2. 세균군집변화

활성탄내에는 많은 미생물이 존재하고 그 미생물들이 생물활성탄 공정의 효율에 영향을 미친다고 알려져 있다<sup>7-9)</sup>. 활성탄 내의 미생물의 존재를 확인하기 위하여 SEM(Scanning Electron Microscope)을 이용하여 관찰한 결과, 활성탄 표면과 내부에 미생물이 부착되어 서식하면서 군집을 형성하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 생물활성탄 내에 형성된 미생물 군집의 구조와 월별·수리학적 수질특성에 따른 군집구조의 변화를 FISH법과 DAPI법을 이용하여 분석하였다.

##### 3.2.1. 생물활성탄 공정 내의 세균수 분석

생물활성탄 공정 내의 세균수 분석 결과를 Table 3에 정리하였다. DAPI법에 의해 계수한 총세균수는 평균  $4.1 \times 10^{10}$  cells/ml로 나타났다. 유기물의 함량이 높은 유입수와 접촉하는 상층에서 채취한 시료에서는 가장 높은  $5.4 \times 10^{10}$  cells/ml로 나타났으나, 중층과 하층으로 갈수록 총세균수가 점차 줄어드는 경향을 보였다. EUB338 probe를 이용하여 FISH법으로 계수한 *Eubacteria*의 수는  $2.3 \sim 4.5 \times 10^{10}$  cells/ml로서 총세균수와 마찬가지로 상층에서 최대  $4.5 \times 10^{10}$  cells/ml를 나타내고 하층으로 갈수록 점차 줄어드는 경향을 보였다. *Eubacteria*와 DAPI법에 의해 계수된 총세균수의 비율은 평균 83%를 나타내었다. FISH법을 이용하여 세균을 검출할 때 세균내부의 gene probe 침투력과 세균에 존재하는 리보솜의 양에 따라 검출 가능성이 좌우되므로, 성장이 빠르거나 생리적 기능이 좋은 미생물은 FISH법에 의한 미

생물 검출이 높다<sup>12,22,29</sup>). 그러나 저영양상태나 음용수에서는 DAPI법에 의해 계수된 세균 수에 대한 *Eubacteria*의 비율이 40% 미만인 것으로 보고되고 있다<sup>22</sup>). 본 연구에서는 활성탄 공극에 세균이 부착하여 성장함으로써 높은 EUB/DAPI 값을 나타낸 것으로 생각되어지며, 이러한 결과는 rRNA-targeted oligonucleotide probe를 이용한 whole-cell hybridization이 생물활성탄 공정에서 세균군집 구조를 분

석하기 위한 방법으로 적합함을 보여준다. FISH법으로 계수되지 않은 세균은 archaeal cell이거나 FISH에 적용되는 조건에 의해 permeability가 되지 않는 cell일 가능성이 있다<sup>30,31</sup>). 배양학적 방법에 의해 계수한 생물활성탄 공정 내 세균 수는 평균  $2.1 \times 10^7$  cells/ml로서, 비배양학적인 방법인 DAPI법에 의해 계수된 세균수와 비교하였을 때 배양율은 평균 0.05%의 비율을 보였다. Amann 등<sup>12</sup>)은 환경 내에서

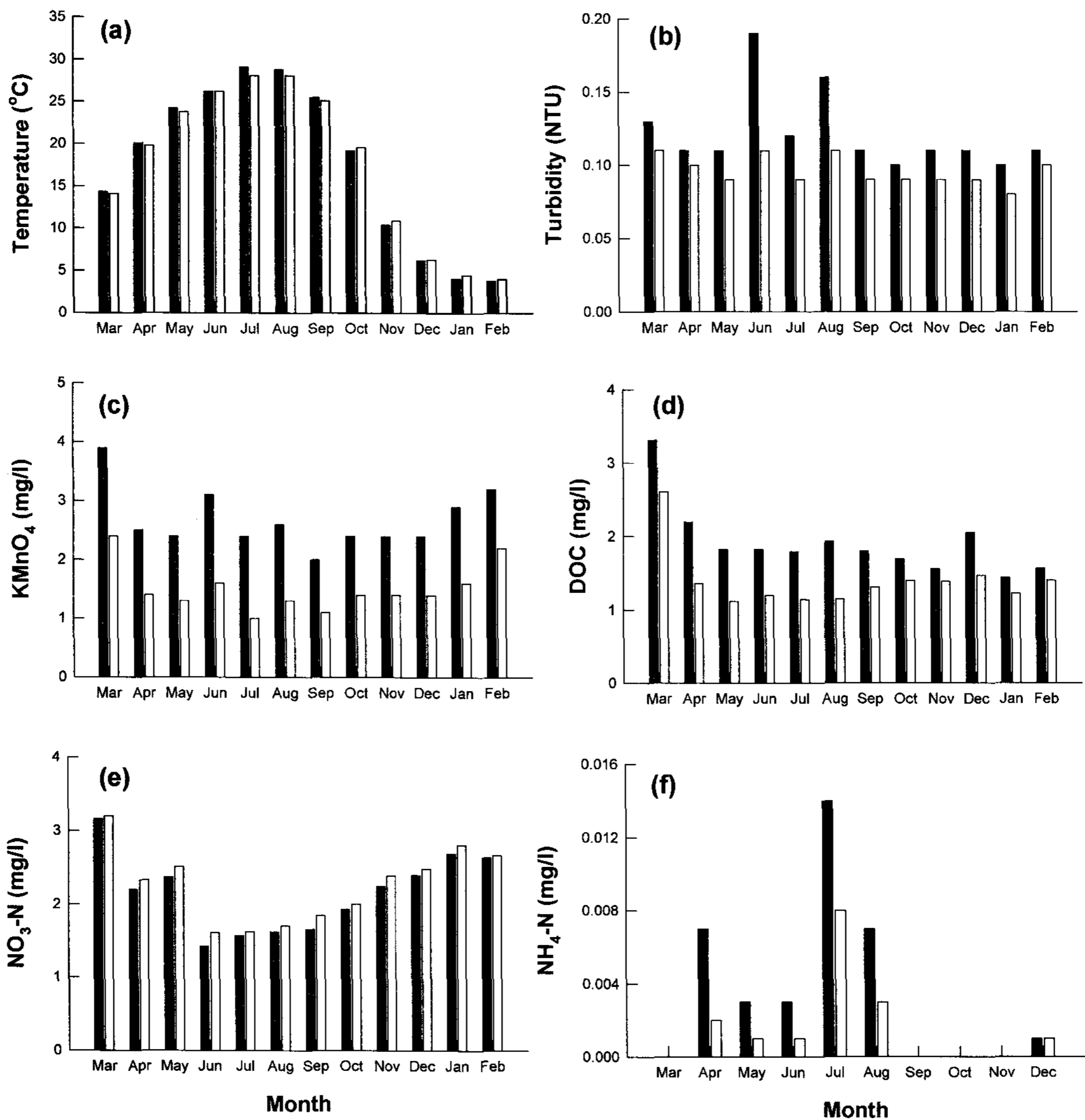


Fig. 2. Variations of influent and effluent of the biological activated process during an experimental period (Mar. 2002 - Feb. 2003): (a) temperature; (b) turbidity; (c) KMnO<sub>4</sub> concentration; (d) dissolved organic carbon concentration; (e) NO<sub>3</sub>-N concentration; (f) NH<sub>4</sub>-N concentration. —, influent; □, effluent.

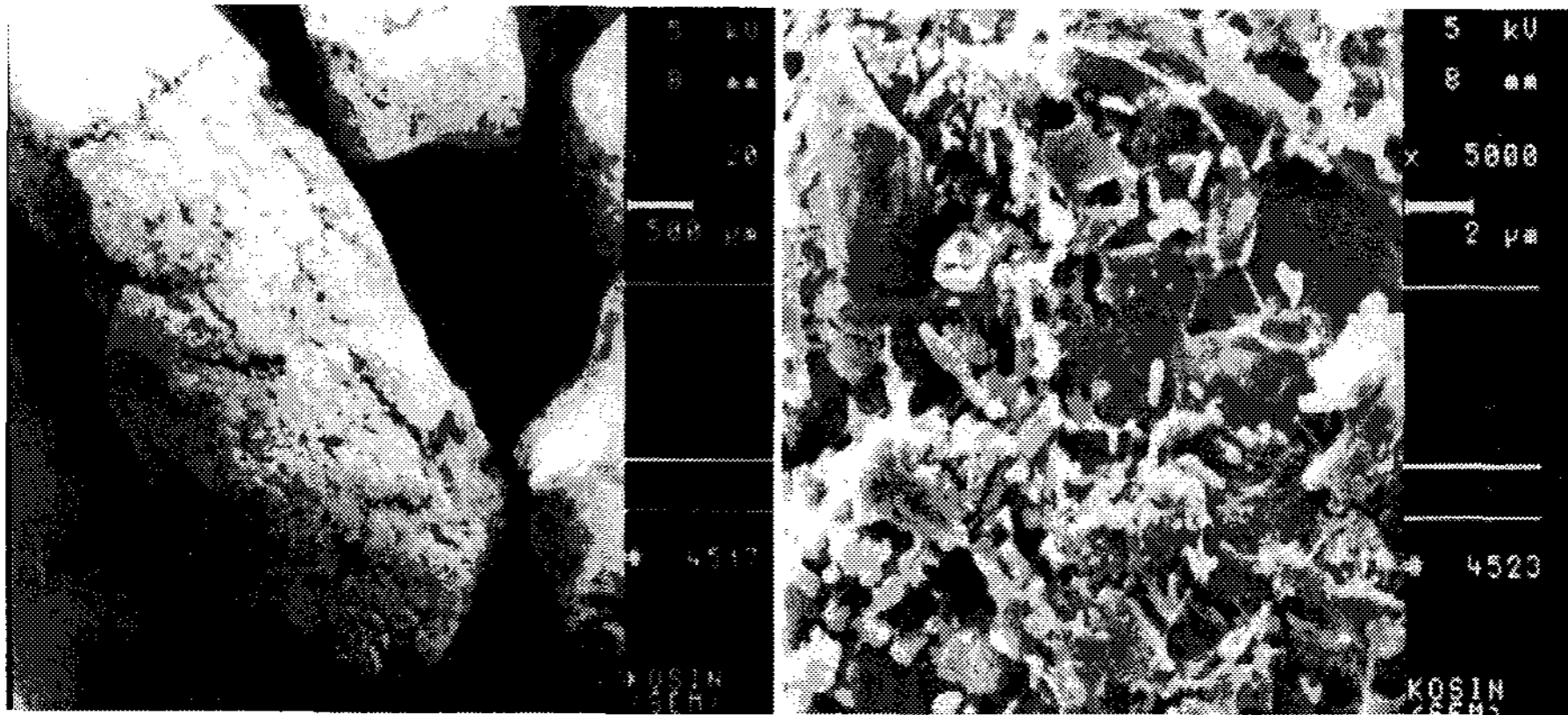


Fig. 3. Scanning electron micrographs of microorganisms grown on biological activated carbon. The scale bars in left and right figure equal 500 µm and 2 µm, respectively.

Table 3. Biological features in biological activated carbon process

Sampling point	No. ( $\pm$ SD) of cells <sup>a</sup>			EUB/DAPI (%)	Culturability <sup>d</sup> (%)
	DAPI ( $\times 10^{10}$ cells/ml)	EUB <sup>b</sup> ( $\times 10^{10}$ cells/ml)	HPC <sup>c</sup> ( $\times 10^7$ cells/ml)		
A (Top)	5.4 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.3	83.4 $\pm$ 6.7	0.07 $\pm$ 0.04
B (Middle)	4.0 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.1	85.0 $\pm$ 9.6	0.04 $\pm$ 0.03
C (Bottom)	2.8 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	81.7 $\pm$ 6.0	0.03 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup>Average value from Mar., 2002 to Feb., 2003

<sup>b</sup>Eubacteria counted by FISH

<sup>c</sup>Heterotrophic bacteria counts

<sup>d</sup>Culturability (%) = 100 $\times$ HPC / DAPI

활성을 나타내는 미생물의 99% 이상은 전통적인 배양방법에 의해서는 배양할 수 없다고 보고하였으며, 이번 연구를 통해서 생물활성탄 공정에서도 약 99.95% 이상의 세균이 배양학적인 방법으로는 배양이 불가능한 것으로 나타났다.

Fig. 4는 생물활성탄 공정 내 총세균수의 변화를 월별·층별로 나타낸 그래프이다. 총세균수는 여름철에 최대값을 나타내며 겨울에는 세균수가 감소하는 경향을 보였으며, 연중 상층에서 가장 높은 세균수를 보이고 중층, 하층으로 갈수록 감소하였다. 총세균수의 월별변화에 영향을 미칠 수 있는 중요한 요인 중의 하나는 수온이다. 미생물은 보통 단세포이므로 외부 온도에 따라 세포 온도가 그대로 변하므로 온도에 특히 민감하다<sup>32</sup>. 본 연구에 사용된 생물활성탄 공정의 연중 수온변화와 총세균수 그리고 제거된 용존유기탄소의 농도 변화를 Fig. 5에 도시하였다. 온도가 높아질수록 유기물의 제거량이 증

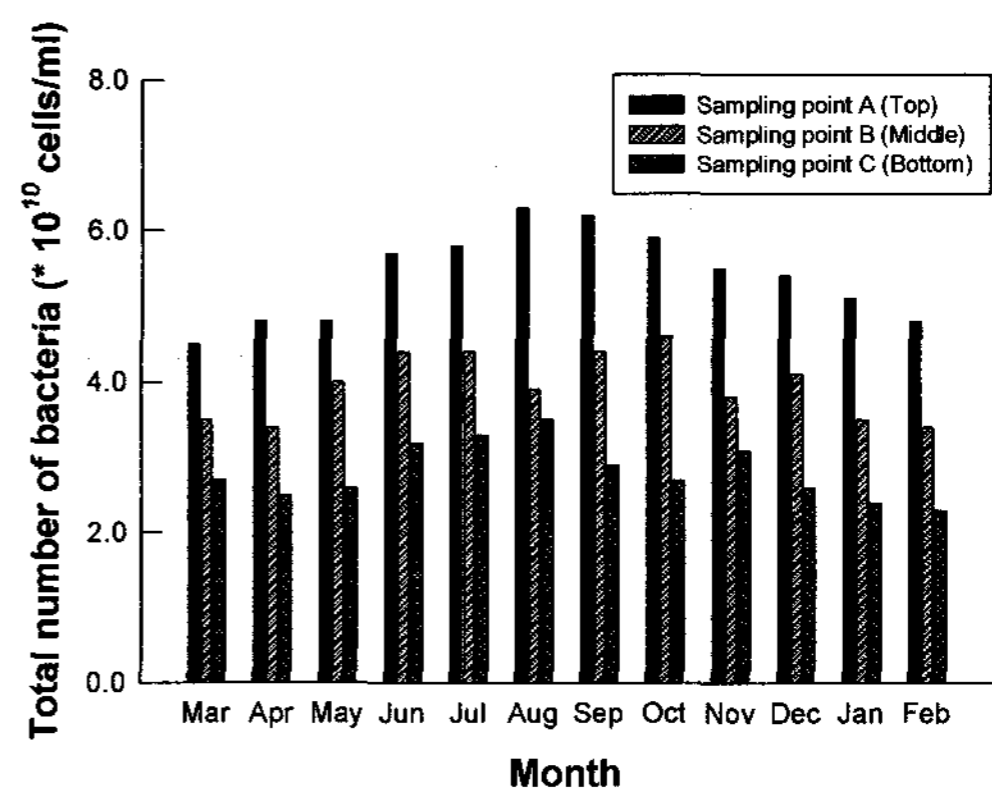
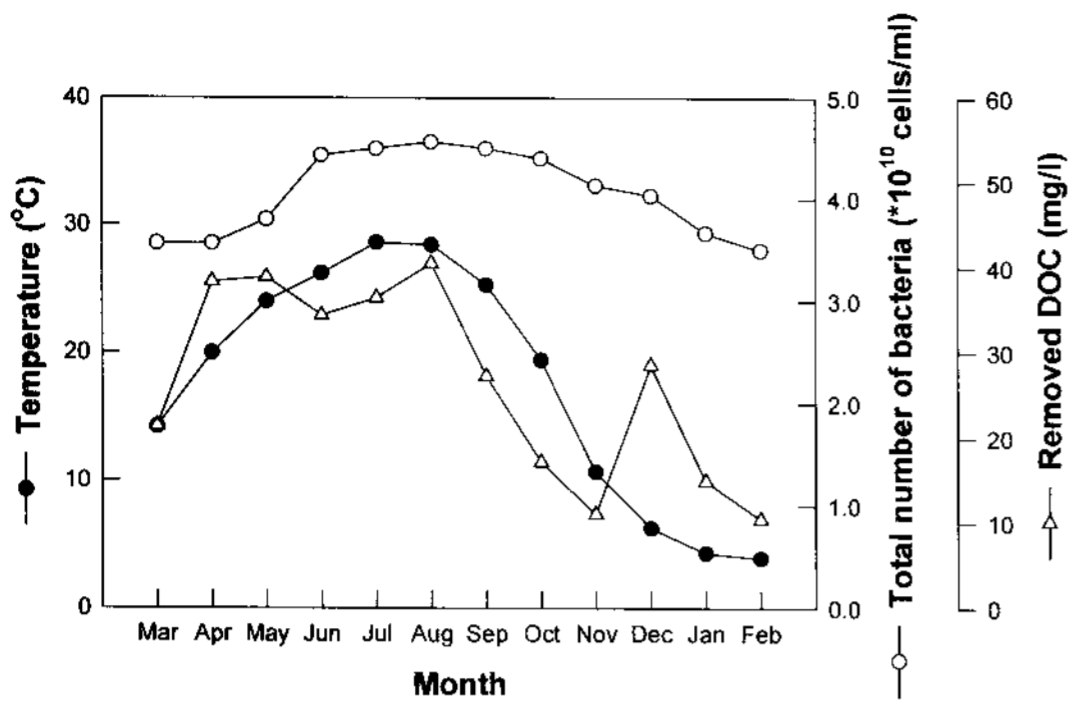


Fig. 4. Variation of total bacterial counts in biological activated carbon process during an experimental period (Mar. 2002 - Feb. 2003). Total bacterial cells were counted using DAPI staining.

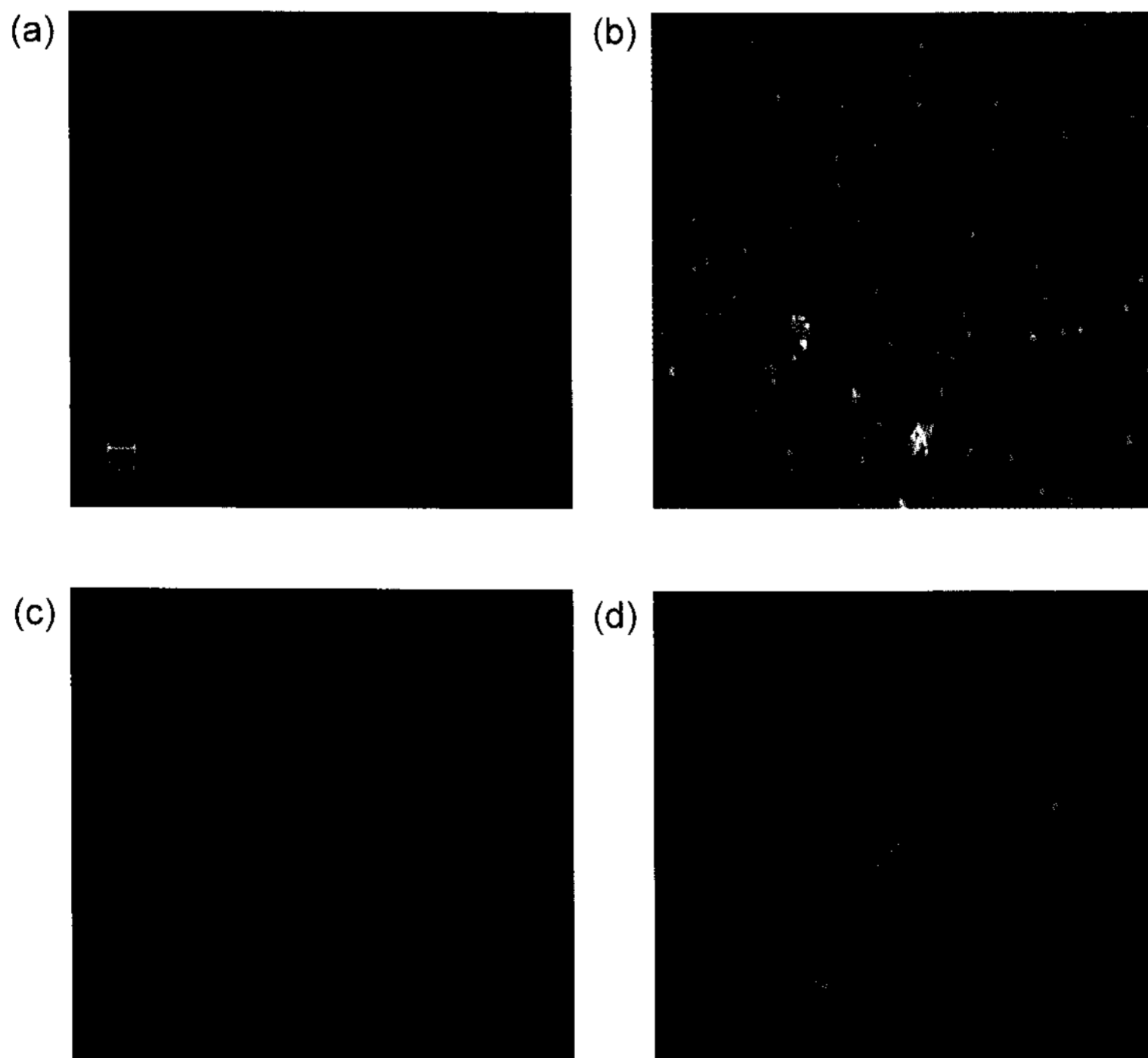
가하는 경향을 보였으며, 12월의 데이터를 제외하고 세균수가 많을수록 용존 유기물의 제거량이 증



**Fig. 5.** Variations of temperature, total bacterial counts in biological activated carbon (BAC) reactor and removed dissolved organic carbon through BAC process. Total bacterial counts cells were counted using DAPI staining.

가하였다. 따라서 생물활성탄 공정을 통해 제거되는 용존유기탄소의 농도는 공정 내 세균 수, 수온과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

3.2.2. 생물활성탄 공정 내의 월별 세균 군집 변화  
 생물활성탄 공정 내의 세균 군집의 분포를 FISH법을 이용하여 분석하였다. Fig. 6은 Table 2에 정리된 probe를 이용하여 *in situ* hybridization 시킨 후에 형광현미경으로 관찰한 사진이며, 생물활성탄 공정 내의 층별·월별 Eubacteria의 군집구조의 분포는 Fig. 7에 나타내었다.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Proteobacteria, CF group, HGC group의 개체 수는 총세균수의 경우와 마찬가지로 상층에 많이 분포하며 하층으로 갈수록 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 각 세균군이 차지하는 비율은 모든 층에서 비슷한 분포를 보였다.  $\gamma$ -Proteobacteria와  $\alpha$ -Proteobacteria가 전층에 걸쳐 가장 높은 군집 분포인 평균 20% 이상의 값을 보였다. 월별로는 상층과 중층에서는 3월-6월에는  $\alpha$ -Proteobacteria, 7월-11월에는  $\alpha$ -Proteobacteria와  $\gamma$ -Proteobacteria, 그리고 12월-2월에는  $\beta$ -Proteobacteria와  $\gamma$ -Proteobacteria가 우점을 나타냈다. 하층은 연중



**Fig. 6.** Micrographs of bacteria in biological activated carbon reactor after *in situ* hybridization with fluorescently labelled probes: (a) DAPI (total bacterial count, blue); (b)  $\alpha$ -subclass Proteobacteria (ALF1b, FITC, yellow); (c)  $\beta$ -subclass Proteobacteria (BET42a, rhodamine-red, red); (d)  $\gamma$ -subclass Proteobacteria (GAM42a, rhodamine-green, green). The scale bar in panel (a) is 5  $\mu$ m and applies all four photographs.

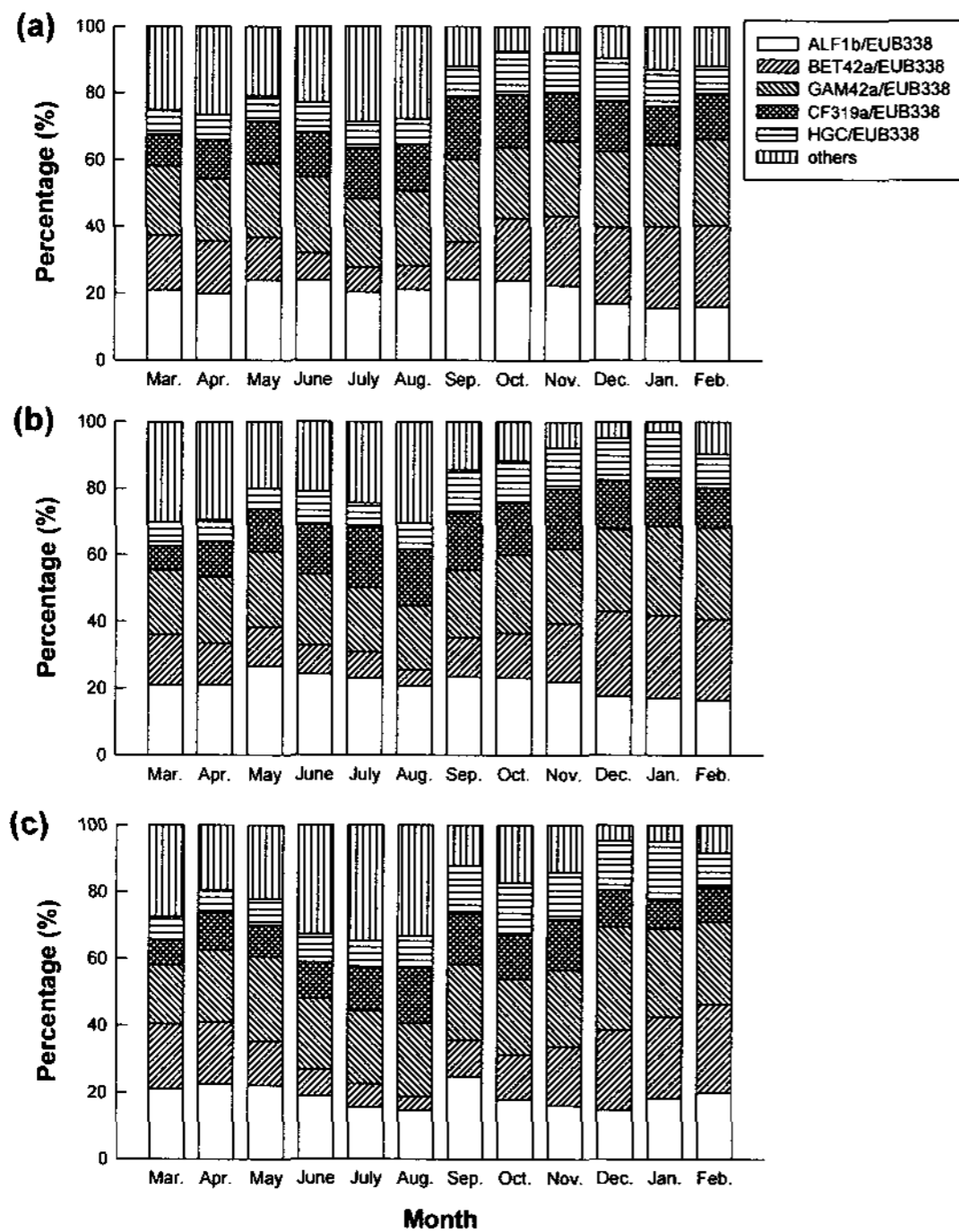


Fig. 7. Comparison of bacterial community structure of three sampling points in biological activated carbon process determined by FISH analysis with all probes listed in Table 2. All the values are presented as percentage of the relative cell area of respective probe against probe EUB338.

$\gamma$ -Proteobacteria가 20%이상의 우점을 나타냈으며, 3월-5월, 9월에는  $\alpha$ -Proteobacteria가 1월-2월에는  $\beta$ -Proteobacteria가 비슷한 분포를 보였다.

$\alpha$ -Proteobacteria는 생물활성탄의 모든 층에 평균 20%의 분포를 보였으며, 월별로는 수온이 낮아지는 겨울철인 12-2월에 최저 15%에서 5월-7월에는 최고 27%로 생물활성탄 공정에서 우점을 보였다.  $\alpha$ -Proteobacteria는 대부분이 빈영양생물로서 *Rhodospillum*, *Ricketteia*, *Caulobacter*, *Rhizobium*, *Brucella*, *Nitrobacter*, *Methylobacterium* 등과 같은 미생물군을 포함하는 것으로 알려져 있는데<sup>32)</sup>, 생물활성탄 공정에서도 우점을 나타내는 것으로 보인다. 특히 생물활성탄 공정을 통해 질산성 질소의 농도가 약간 증가하였으며, 암모니아성 질소의 농도가 급격히 감소하는 결과가 나왔는데 (Fig. 2(e) 및 (f)), 이는  $\alpha$ -Proteobacteria인 *Nitrobacter*와  $\beta$ -Proteobacteria에 속하는 *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, 그리고  $\gamma$ -Proteo-

bacteria인 *Nitrococcus* 등의 질화세균이 관여하고 있을 것으로 판단되어지며, 향후 암모니아 산화세균, 질산화세균을 검출하기 위한 probe를 적용한 FISH 분석을 통한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

$\beta$ -Proteobacteria는 생물활성탄의 모든 층에 평균 16%의 분포를 보였다. 월별로는 수온이 낮아지는 12-2월에 증가하여 최고 26%를 보였으며, 수온이 높아지는 6-8월경에는 분포가 감소하여 최저 4%로 나타났다.  $\beta$ -Proteobacteria는  $\alpha$ -Proteobacteria의 대사와 유사하며, *Nitrosomonas*, *Thiobacillus* 등 화학독립영양세균과 메탄을산화세균 등을 포함한다<sup>32)</sup>. 빈영양상태의 호수나 활성슬러지에서 상당수 검출되는데, 특히 낮은 수온의 수계에서 우점하는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 생물활성탄에서도 수온이 낮은 겨울철에 우점을 나타내는 것으로 나타났다.

$\gamma$ -Proteobacteria는 Proteobacteria에서 가장 큰 집단으로서 다양한 생리학적 유형을 보이며, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Klebsiella* 등을 포함하는 것으로 알려져 있다<sup>32)</sup>. 생물활성탄 공정에서  $\gamma$ -Proteobacteria는 상·중·하층에 각각 평균 22%, 22%, 23%의 분포로 층에 관계없이 비슷한 분포를 보였으며, 생물활성탄 공정에서 가장 우점하고 있는 군집으로 나타났다.

*Cytophaga*와 *Flavobacteria*는 평균 13%의 분포를 보였으며, 월별로는 여름철에 약간 상승하기는 하지만 거의 비슷한 분포를 나타냈다. *Cytophaga*와 *Flavobacteria*는 Bacteroidetes문에 속한다. *Cytophaga*는 단백질과 복합 다당류를 분해하여 유기물의 무기질화에 중요한 역할을 하며, 하수처리에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>32,33)</sup>. 생물활성탄 공정에서도 고분자 유기물질의 분해에 *Cytophaga*가 관여하고 있을 것으로 사료되어 진다. G+C 함량이 높은 그람양성균인 HGC group의 생물활성탄내 분포를 살펴보면, 상·중·하층에 각각 평균 9%, 10%, 11%의 분포를 보여 다른 세균 군집에 비해 낮은 분포를 나타내었다.

#### 4. 결 론

FISH법을 이용하여 정수처리장 내 생물활성탄 공정의 세균군집 구조를 관찰하고 월별·수리학적 수질특성에 따른 군집구조의 변화를 살펴본 결과



다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 생물활성탄 공정 내의 총세균수는 상층, 중층, 하층에서 각각  $5.4 \times 10^{10}$ ,  $4.0 \times 10^{10}$ ,  $2.8 \times 10^{10}$  cells/ml로서, 유기물의 농도가 상대적으로 높은 유입수와 접하는 상층에서 가장 높고 하층으로 갈수록 감소하는 경향을 나타내었다. 월별로는 수온이 높은 여름철에 총세균수가 가장 높았으며, 용존유기탄소의 제거율도 높았다. FISH법에 의해 계수된 *Eubacteria*의 수도 총세균수와 같은 경향을 보였다. EUB/DAPI의 비율은 약 83%, HPC/DAPI의 비율은 약 0.05%로서 생물활성탄 공정 내의 세균군집의 분포를 분석하는데 FISH법이 효과적임을 알 수 있었다. 생물활성탄 공정 내 세균군집의 구조를 분석한 결과,  $\gamma$ -*Proteobacteria*와  $\alpha$ -*Proteobacteria*가 상·중·하 전층에 걸쳐 약 20% 이상의 높은 분포를 보였으며, 비슷한 세균분포를 나타냈다. 월별로는 상층과 중층은  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -*Proteobacteria*가 계절에 따라 우점되는 분포율이 변화하였으며, 하층은 연중  $\gamma$ -*Proteobacteria*가 우점을 나타내면서 계절에 따라  $\alpha$ ,  $\beta$ -*Proteobacteria*와 경쟁하였다. 향후 본 연구에서 사용된 probe로는 검출되지 않는 군집의 규명과, 16S rDNA level에서의 분석을 통한 생물활성탄 공정과 미생물 군집 구조의 관계를 정밀하게 규명하는 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구결과를 통하여 FISH법에 의해 생물활성탄 공정내의 층별·월별 세균군집의 변화를 확인할 수 있었으며, 생물활성탄 공정의 효율적인 운영을 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 기대되어진다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- 1) 유명호, 김영웅, 손희중, 1998, 낙동강 수계의 수질 변화 특성, 부산광역시 수질연구소 상수도연구소보, 4, 1-15.
- 2) 박흥기, 정종문, 박재림, 홍용기, 1999, 낙동강 하류에서 식물플랑크톤 생산력과 수질 변화와의 관계, 한국환경과학회지, 8, 101-106.
- 3) 신성교, 이수용, 박청길, 1996, 낙동강에서 chlorophyll-a와 BOD의 상관관계, 한국수질보전학회지, 12, 369-375.
- 4) 박중현, 1994, 낙동강 수질오염대책 및 음용수 공급방안, 대한상하수도학회지, 8, 51-63.
- 5) Kim W. H., Mitsumasa O., 2007, Characterization of organic matters removed by biological activated carbon, J. Environ. Sci., 16, 671-675.
- 6) 이상훈, 문순식, 신종철, 최광근, 심상준, 박대원, 이진원, 2003, 오존처리와 생물활성탄 공정에 의한 상수원수 중의 용존유기물 제거, 한국생물공학회지, 18, 211-216.
- 7) Fonseca A. C., Summers R. S., Hernandez M. T., 2001, Comparative measurements of microbial activity in drinking water biofilters, Wat. Res., 35, 3817-3824.
- 8) Kihn A., Andersson A., Laurent P., Servais P., Prévost M., 2002, Impact of filtration material on nitrification in biological filters used in drinking water production, J. Wat. Supply: Res. & Technol.-Aqua, 51, 35-45.
- 9) Melin E., Eikebrokk B., Brugger M., Ødegaard H., 2002, Treatment of humic surface water at cold temperatures by ozonation and biofiltration, Wat. Sci. Tech.: Wat. Suppl., 2, 451-457.
- 10) Moll D. M., Summers R. S., Fonseca A. C., Matheis W., 1999, Impact of temperature on drinking water biofilter performance and microbial community structure, Environ. Sci. Technol., 33, 2377-2382.
- 11) 박흥기, 나영신, 정종문, 류동춘, 이상준, 홍용기, 2001, 낙동강 하류 상수원수의 생물활성탄에 의한 수질개선 및 세균분포 특성, 한국환경과학회지, 10, 105-111.
- 12) Amann R., Ludwig W., Schleifer K. H., 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiol. Rev., 59, 143-169.
- 13) Gibride K. A., Lee D. Y., Beaudette L. A., 2006, Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control, J. Microbiol. Meth., 66, 1-20.
- 14) Dorigo U., Volatier L., Humbert J. F., 2005, Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities, Wat. Res., 39, 2207-2218.
- 15) Trebesius K., Amann R., Ludwig W., Mühlegger K., Schleifer K. H., 1994, Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive rRNA targeted transcript probes, Appl. Environ. Microbiol., 60, 3228-3235.
- 16) Amann R., Ludwig W., Schleifer K. H., 1994, Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists, ASM News, 60,

- 360-365.
- 17) Woese C. R., 1987, Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271.
  - 18) Alfreider A., Pernthaler J., Amman R., Sattler B., Glöckner F. O., Wille A., Psenner R., 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.
  - 19) Falkentoft C. M., Müller E., Arnz P., Harremoës P., Mosbaek H., Wilderer P. A., Wuertz S., 2002, Population changes in a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use of FISH, *Wat. Res.*, 36, 491-500.
  - 20) Bouvier T., Giorgio P. A. D., 2003, Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44, 3-15.
  - 21) Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., Schleifer K. H., 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.
  - 22) Manz W., Szewzyk U., Ericsson P., Amann R., Schleifer K. H., Stenström T. A., 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.
  - 23) 김영오, 박태주, 이태호, 2004, *In situ* 측정기법을 이용한 호기성 고정생물막의 형상 변화와 미생물 활성 및 분포 해석, *대한환경공학회지*, 26, 566-572.
  - 24) APHA, 1992, Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA-AWWA-WPCD, New York.
  - 25) 日本水道協會, 1985, 日本上水道試験方法, 630-637pp.
  - 26) 長澤, 1990, 粒狀活性炭表層における微生物の動向, 第41回 日本水道研究発表會 発表論文集, 1-3pp.
  - 27) Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., 1992, Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria : Problems and solutions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 15, 593-600.
  - 28) Porter K. G., Feig Y. S., 1980, The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943-948.
  - 29) Hicks R. E., Amann R. I., Stahl D. A., 1992, Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdomlevel 16S rRNA sequences, *Environ. Microbiol.*, 58, 2158-2163.
  - 30) Huber I., Spanggaard B., Appel K. F., Rossen L., Nielsen T., Gram L., 2004, Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Appl. Environ. Microbiol.*, 96, 117-132.
  - 31) O'Sullivan C., Burrell P. C., Clarke W. P., Blackall L. L., 2007, A survey of the relative abundance of specific groups of cellulose degrading bacteria in anaerobic environments using fluorescence *in situ* hybridization, *Appl. Microbiol.*, 103, 1332-1343.
  - 32) Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002, *Microbiology*, McGraw-Hill Higher Education, New-York.
  - 33) Delong E. F., Wickham G. S., Davis A. A., 1993, Phylogenetic diversity of substrate marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans, *Science*, 243, 1360-1363.