

## 식품폐수처리 RABC system의 생물막과 포기조 대사지문 비교

이동근 · 유기환 · 성기문<sup>1,2</sup> · 박성주<sup>2</sup> · 이재화 · 하배진 · 하종명 · 이상현\*

신라대학교 제약공학과, <sup>1</sup>Global Water Institute Korea, <sup>2</sup>대전대학교대학원 미생물학과

Received August 7, 2008 / Accepted January 19, 2009

**Comparison of Metabolic Fingerprintings between Biofilm and Aeration Tanks of RABC System for Food Wastewater Treatment.** Dong-Geun Lee, Ki-Hwan Yoo, Gi Moon Sung<sup>1,2</sup>, Seong Joo Park<sup>2</sup>, Jae-Hwa Lee, Bae Jin Ha, Jong-Myung Ha and Sang-Hyeon Lee\*. *Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, <sup>1</sup>Global Water Institute Korea, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Graduate School, Daejeon University* - Metabolic fingerprinting of microbial communities was investigated with Biolog GN2 plates using samples of biofilm and aeration tanks from an RABC (rotating activated Bacillus contactor) system - an advanced wastewater treatment system for the food wastewater of pig slaughterhouses. Aerobic and anaerobic results revealed the following four aspects. First, simple matching and pairs *t*-test of daily variation showed more defined qualitative and quantitative relatedness of active microbial communities than that of mere optical densities. Second, metabolic potentials were higher in biofilm than in aeration tanks ( $p < 0.01$ ), meaning higher activity of biofilm. Third, two aeration tanks showed the highest similarity (78%) and similar metabolic power ( $p = 0.287$ ). However, actively used carbon sources were different among samples, signifying change of active communities at each wastewater treatment step. Finally, aerobic and anaerobic metabolic fingerprinting patterns were different for the same samples representing activities of microaerophilic and/or anaerobic communities. These results suggest that daily variation and anaerobic incubation would help in the comparison of metabolic fingerprintings.

**Key words :** Metabolic fingerprinting, biofilm, Biolog, RABC

### 서 론

폐수처리에 이용되는 활성슬러지법은 단위부피당 낮은 처리효율 및 이로 인한 넓은 부지 면적 외에 슬러지 처리 문제 등이 있어 이의 극복과 함께 부영양화를 일으키는 영양염류의 제거 등을 위한 고도처리공법으로 생물막(biofilm)을 이용한 공법 등이 이용되고 있다[2,5]. RBC (rotating biological contactor) 등 생물막을 이용하는 부착미생물법은 유량과 유기물 농도 변동에 대한 저항성과 공정설치에 작은 면적을 필요로 하는 등의 장점이 있다. 한편 *Bacillus* 등 포자형성균의 우점화를 이용한 생물막 공법인 RABC (rotating activated Bacillus contactor) 공법은 RBC 공법의 변형으로 부착미생물법의 장점 외에 *Bacillus* 종 등과 같은 포자형성균 혼합종에 의한 난분해성 유기물과 악취성분 제거능이 우수한 것으로 보고되고 있다[5,8].

미생물 군집의 조성 조사와 비교를 위한 방법으로 배양법과 비배양법이 있는데 배양법은 전체 군집구조를 파악할 수 없고 비배양법은 활성을 파악할 수 없는 한계가 있다[10]. 다양한 탄소원이 함유된 Biolog plate를 이용한 대사지문(metabolic fingerprinting)은 미생물군집 각 구성원들이 이용하는 탄소원

의 정성적, 정량적 비교를 하는 것으로 군집구성원들의 개별적 파악은 어렵지만, 빠른 분석속도와 간편하고 재현성이 있어 널리 이용되고 있으며 CLPP (community level physiology profile)라고도 하며 공간과 시간에 따른 군집비교에 이용되고 있다[3,6,10,12]

한편 Røling 등[10]은 침출수로 오염된 수역의 대사지문을 조사하면서 혐기 조건이 혐기성 군집의 활성화에 필수적이라고 하였으며 Anderson 등[1]은 플라크(plaque) 생물막의 혐기 조건 대사지문을 보고하였다. 하지만 RBC에서는 혐기성 및 미호기성 미생물의 존재가 확인되는데도[9] 대사지문은 주로 호기성 군집에 적용되어 왔고 혐기성 군집의 대사지문에 대한 보고는 없었다.

이에 본 논문에서는 Biolog GN2 plate를 이용하여 RABC 공정 각 단계별로 미생물 군집의 활성화와 대사지문을 호기성군집과 혐기성군집으로 나누어 비교한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 처리 시스템

분석대상 식품폐수처리장은 경상북도 소재로 돈·도축 및 육가공 폐수를 처리하며 하루 처리 용량은 1300 m<sup>3</sup> 규모이고 간략한 시스템은 Fig. 1에 나타내었다. 폐수는 생물막인 RABC, 포기조(aeration tank) 1-2-3 순서로 지나가며 용존

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

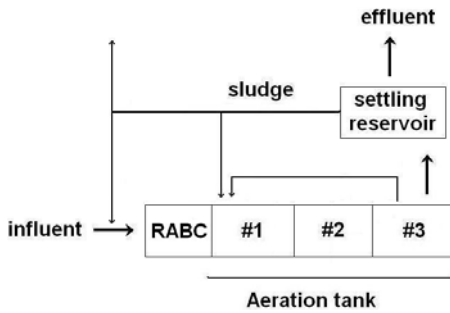


Fig. 1. Schematic diagram of RABC system for food-wastewater treatment.

산소(DO) 농도는 생물막에서 0.5~1.0 ppm 사이이며 포기조에서는 점감식으로 하여 #1 포기조에서 1.0~0.5 ppm, #2 포기조에서 0.4~0.5 ppm, #3 포기조에서 0.1~0.2 ppm 정도이다. #3 포기조에서 #1 포기조로 일부가 재순환하며 슬러지의 일부가 생물막과 #1 포기조로 유입되는 것을 Fig. 1로 알 수 있다.

시료 채취와 세균 탈착

2008년 4월에 생물막, #1 및 #3 포기조 시료를 채취하였다. #2 포기조와 침전지(settling reservoir) 시료는 채취할 수 없었다. 시료를 손으로 3분 이상 아주 세게 흔들면서 교반하여 잘 섞은 후에 시료 5.0 ml씩을 멸균된 45.0 ml의 희석수가 담긴 falcon tube에 넣었다. 호기성 희석수로서 0.85% NaCl이 함유된 증류수를 사용하였고 혐기성 희석수로는 증류수 1 L에 NaCl 2.25 g, KCl 0.105 g, CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.12 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.05 g이 들어 있었으며, 최종농도 0.0001%가 되게 resazurin을 첨가하여 분홍색으로 혐기성을 확인할 수 있도록 하였다. 대사지문 조사를 위한 혐기성 희석수는 resazurin을 첨가하지 않아 흡광도(OD)의 측정을 방해하지 않게 하였다. 세균탈착과정은 교반(vortexing) 1분, 얼음에 꽂아두기 1분, 초음파세척(Branson sonicator 7150, USA) 1분, 얼음에 꽂아두기 1분의 총 4단계로 거쳤다[6]. 세균탈착과정을 연속적으로 3회 실시한 후에 불순물을 제거하기 위하여 3,000× g에서 2분간 원심분리함으로써 시료 침전물과 세포가 함유된 상층액을 분리하였다.

세균 농도 측정과 대사지문(metabolic fingerprinting)

세균탈착액을 희석수로 연속희석한 후에 호기성 및 혐기성 종속영양세균의 농도를 측정하였다. 연속희석된 시료를 TSA 한천배지(Tryptic Soy agar media, Difco)와 증류수 대신 혐기성 희석수를 이용한 혐기성 TSA 한천배지에 도말하였다. 멸균된 증류수에 적신 Anaerocult A (Merck)나 GasPak EZ anaerobe container system (Becton, Dickinson and company, USA)을 Anaerobic jar (Merck)에 놓아 두어 혐기성 조건이 유지되도록 하였고 dry anaerobic 100 indicator strip (BBL)을 anaerobic jar에 넣어 흰색이 유지되는지 점검하여 혐기성 배

양을 확인하였다.

10<sup>3</sup>으로 희석된 호기성 희석수와 resazurin이 첨가되지 않은 혐기성 희석수 시료를 채취한 후 Biolog GN2 plate (Biolog, Hayward, CA, USA)의 각 탄소원에 시료 180 µl씩 접종하였고, 혐기성 희석수를 접종한 것은 mineral oil 20 µl씩 접종하여 공기의 접촉을 차단하였다. 공기를 차단할 때까지 세균 농도 측정용으로 사용된 resazurin 첨가 혐기성 희석수들의 색깔이 분홍색임을 확인하였다. 항습배양기(25°C)에서 7일간 배양하면서 매일 microtiter plate reader (model Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 대사지문은 duplicate로 세균 농도 측정은 triplicate로 하였다.

통계 처리 및 측정값 분석

생물막과 포기조의 활성도를 조사하기 위하여 매일 측정된 흡광도값을 이용하여 대조구보다 높은 값들만 취한 다음에 각 탄소원의 일별변화량(OD<sub>n</sub>-OD<sub>n-1</sub>, n=day of incubation)을 구하였고 통계분석을 위해 표준화[14]를 한 후에 'SPSS 14.0K'로 분석하였다.

대조구로 보정한 흡광도(OD) 평균값인 AWCD (average well color development)는  $AWCD = \frac{\sum(OD_i - OD_c)}{95}$ 로 (OD<sub>i</sub>: i번째 탄소원의 OD, OD<sub>c</sub>: 대조구의 OD, 95±탄소원의 갯수) 하였다[3]. 각 탄소원의 일별변화량을 AWCD로 나누고 기질다양성(substrate diversity, H')과 탄소원 편중성(Evenness, J')을 구하였다[12]. OD<sub>i</sub>-OD<sub>c</sub>를 OD<sub>k</sub>로 하고  $H' = -\sum P_i \ln P_i$  (P<sub>i</sub>=i번째 탄소원의 OD<sub>k</sub>/모든 탄소원의 OD<sub>k</sub> 합)이고  $J' = H' / \ln S$  (S: 이용한 탄소원의 총 개수)이다[12].

결과 및 고찰

Average well color development (AWCD)

Biolog microplate는 탄소원이 없는 1개의 well (대조구)과 95개의 서로 다른 탄소원이 들어있는 well로 구성되어 있다. 미생물에 의한 탄소원의 산화로 각 well에 있는 tetrazolium이 환원되는데 그 정도를 흡광도로 측정한다. 호기성 혹은 혐기성 microplate 모두 같은 원리를 이용하므로 본 연구에서는 호기성 및 혐기성 미생물군집 활성의 직접 비교를 위하여 공통적으로 GN2 microplate를 이용하였다.

Fig. 2는 매일 측정된 각 시료의 흡광도로부터 대조구 well로 보정하지 않은 AWCD (Fig. 2A)와 보정한 AWCD (Fig. 2B)를 나타내고 있다. 가장 차이가 나는 것은 anBi (생물막 혐기조건)로 대조구 값을 보정하기 전에는 1일째 제일 높고 7일째까지 높은 값을 유지하지만 보정을 하면 3일 이후 최소 AWCD를 보였다. 이는 아무런 탄소원이 없는 대조구의 높은 흡광도에 의한 결과인데 생물막 시료 속에 포함된 유기물질이나 세포 내 저장물질 등에 의한 영향일 가능성이 있다[1]. 하지

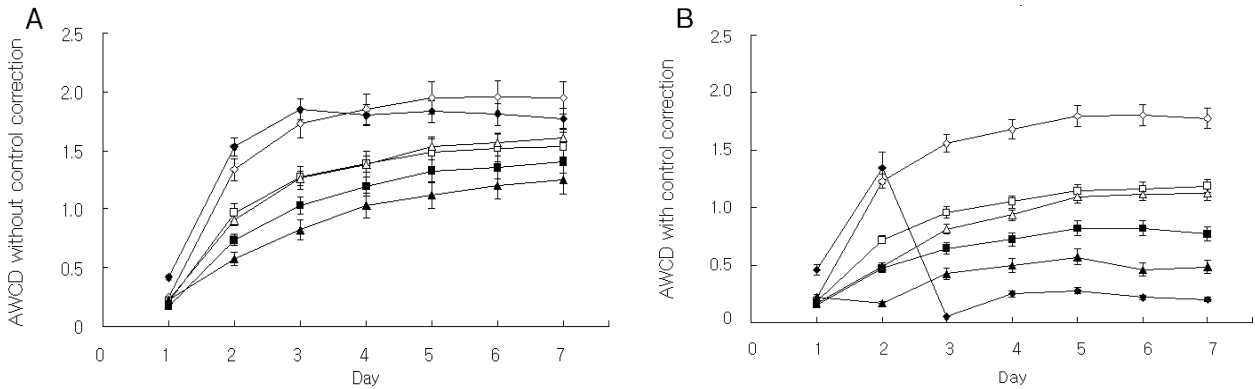


Fig. 2. Change of AWCD (average well color development) without (A) and with (B) control correction at daily variations. Bi(◇), A1(□) and A3(△) means biofilm, #1 and #3 aeration tanks, respectively, at aerobic incubation and anBi(◆), anA1(■) and anA3(▲) means biofilm, #1 and #3 aeration tanks, respectively, at anaerobic incubation.

만 대조구의 높은 흡광도는 생물막 시료의 혐기대사지문에서만 보였고 호기 대사지문에서는 보이지 않았다. 이에 대한 원인으로서는 첫째 혐기 조건에서 분해할 수 있는 유기물의 존재, 둘째 혐기세포 내부에만 있는 저장물질, 셋째 혐기회색수 속에 포함된 성분들의 영향 등이 있을 수 있었다. Table 3의 혐기 배양을 통한 세균 농도를 보면 #1 포기조가 생물막보다 세균수가 높은데도 대조구의 값은 실험기간 동안 큰 변화가 없었다. 따라서 anBi 대조구의 높은 흡광도는 세균수나 혐기회색수에 의한 결과는 아닌 것으로 판단하였다. 그리고 각 탄소원 당 종속영양세균의 수가  $10^2$  이상이면[13] 혹은 배양시간이 긴 경우 종속영양세균의 수가 1개 이상이면[4] 발색양상이 상관없다는 보고들에 의하면 세균수에 의한 문제는 없었을 것이다. Anderson 등[1]은 세척으로 시료의 유기물을 없애도 대조구의 높은 흡광도가 여전히 세포의 저장물질의 분해가 계속 일어나 대조구의 높은 흡광도가 관찰된다고 보고하였다. 생물막은 유기물인 EPS (extracellular polymer substance)가 충분한데[7] 이들이 혐기 조건에서 분해된 결과로 예상된다. 그리고 EPS 등의 유기물에 의해 microplate의 각 탄소원 분해가 촉진되었을 가능성이 있지만 여전히 미생물군집의 대사활성능력을 나타내는 결과일 것이다.

탄소원 분석

Table 1은 실험기간동안 식품폐수의 처리단계별로 그리고 동일한 처리단계의 시료를 호기성 유무로 배양하였을 때 가장 이용도가 높은 10가지 탄소원을 순차적으로 나열한 것이다. 동일한 95개의 탄소원을 처리하였지만 각 시료별로 호기와 혐기 대사지문 사이에 이용도가 높은 공통 탄소원은 1개 혹은 2개로 생물막(Bi, anBi)이 galactose와 raffinose, #1 포기조(A1, anA1)가 mannose, #3 포기조(A3, anA3)가 raffinose 뿐이었다. 이는 호기성 및 혐기성 군집구성원이 나타내는 활성이 다르다는 것을 의미할 수도 있고 동일한 통성혐기성 군집구성원이 호기 및 혐기 조건에서 서로 다른 탄소원을 이용했을 가능

성도 배제할 수 없었다.

생물막과 2개의 포기조 시료 사이의 공통탄소원을 보면 호기 대사지문에서는 galactose, gentibiose, raffinose가 공통이었고 혐기 대사지문은 공통 탄소원이 없었다. 이로써 시료사이의 활성을 보이는 군집구성원을 유추하면 호기성 군집은 공통성이 일부 있지만 혐기성 군집 사이에는 공통성이 별로 없다는 것으로 각 단계에서 활성을 보이는 혐기성 군집의 구조 변화가 크다고 판단할 수 있었다. 이는 폐수처리 각 공정별로 활성을 보이는 미생물 군집구조의 변화를 나타내는 것으로 해석할 수 있었다.

Anderson 등[1]은 이(tooth)에 형성된 플라크 시료를 혐기 조건과 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하여 10% CO<sub>2</sub> 조건이 더 높은 탄소원 이용도를 보인다고 보고하였고 Röling 등[10]은 95/5% N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 현장시료와 동일한 조건이면 탄소원 이용도가 달라질 가능성이 있지만 본 연구에서는 매일 탄소이용도를 측정하기 위해 mineral oil로 산소를 차단하여 혐기 대사지문을 구하였고 호기 대사지문과 차이가 있음을 밝혔다.

대사지문 상관관계

Ros 등[11]은 동일 탄소원에 접종된 시료를 1일, 2일, 7일째 분석하여 각 분석일별로 우점하는 세균군집 구성원이 다르고 보고하였다. 이는 시료 속에 포함된 세균군집 중에서 측정일별로 활성을 보이는 구성원의 차이를 나타내는 것으로 일별 변화량을 시료 사이로 확장하면 세균군집의 비교도 가능할 것이다.

Table 2는 시료 사이에서 각 탄소원들의 이용도에 대한 대응표본 상관계수를 구한 것으로 시료 사이의 군집구조 비교에 유용할 것이다. 즉 탄소원 이용에 대한 정성분석을 바탕으로 하므로 시료사이의 군집구조가 유사하면 탄소원들의 이용유무가 유사할 것이므로 상관관계가 높을 것이다. 대조구로 보정한 매일의 측정값(Table 2A)과 일별변화량(Table 2B) 사이

Table 1. List of actively used top 10 carbon sources in metabolic fingerprinting of biofilm and #1 and #3 aeration tanks of RABC at aerobic and anaerobic incubation.

Biofilm	Aerobic incubation		Rank	Anaerobic incubation		
	#1 Aeration	#3 Aeration		Biofilm	#1 Aeration	#3 Aeration
galactose <sup>1,2</sup>	galactose <sup>2</sup>	galactose <sup>2</sup>	1	galactose <sup>1</sup>	L-arabinose	L-proline
gentiobiose <sup>2</sup>	D-mannose <sup>1</sup>	D-mannose	2	D-raffinose <sup>1</sup>	D-arabitol	$\alpha$ -D-lactose
maltose	D-raffinose <sup>2</sup>	D-fructose	3	L-ornithine	dextrin <sup>1</sup>	L-pyroglutamic acid
xylitol	i-erythritol	$\alpha$ -D-glucose	4	D-alanine	D-mannose <sup>1</sup>	$\gamma$ -amino butyric acid
D-raffinose <sup>1,2</sup>	maltose	p-hydroxy phenylacetic acid	5	inosine	adonitol	sucrose
itaconic acid	dextrin <sup>1</sup>	D-raffinose <sup>1,2</sup>	6	putrescine	D-fructose	L-glutamic acid
D, L-lactic acid	N-acetyl-D-galactosamine	adonitol	7	L-asparagine	$\alpha$ -keto glutaric acid	D-glucose-6-phosphate
D-melibiose	gentiobiose <sup>2</sup>	gentiobiose <sup>2</sup>	8	$\beta$ -methyl-D-glucoside	N-acetyl-D-glucosamine	N-acetyl-D-galactosamine
succinamic acid	cis-aconitic acid	D-mannitol	9	D-sorbitol	turanose	D-glucosaminic acid
L-alanine	D-galacturonic acid	tween 40	10	citric acid	$\beta$ -methyl-D-glucoside	D-raffinose <sup>1</sup>

<sup>1</sup>means common actively used carbon source in aerobic and anaerobic condition for the same sample

<sup>2</sup>represent common actively used carbon source in biofilm, # 1 and #3 aeration tanks at same aerobic condition.

Table 2. Correlation coefficient ( $p < 0.01$ ) among samples of value of days (A) and daily variation (B) by simple matching based on all 95 substrates

A. Values of each day

	Bi <sup>1</sup>	A1 <sup>2</sup>	A3 <sup>3</sup>	anBi <sup>4</sup>	anA1	anA3
Bi	1.000					
A1	0.816	1.000				
A3	0.864	0.875	1.000			
anBi	0.099	0.129	(-) <sup>5</sup>	1.000		
anA1	0.720	0.738	0.767	(-)	1.000	
anA3	0.477	0.520	0.501	(-)	0.471	1.000

B. Daily variation

	Bi	A1	A3	anBi	anA1	anA3
Bi	1.000					
A1	0.737	1.000				
A3	0.603	0.780	1.000			
anBi	0.518	0.507	0.310	1.000		
anA1	0.504	0.619	0.605	0.352	1.000	
anA3	0.125	0.251	0.277	(-)	0.248	1.000

<sup>1</sup>Bi means biofilm.

<sup>2</sup>A1 means #1 aeration tank.

<sup>3</sup>A3 means #3 aeration tank.

<sup>4</sup>Prefix an- means anaerobic condition.

<sup>5</sup>(-) means no significance ( $p > 0.01$ ).

의 상관관계를 전체적으로 보면 호기대사지문 3개 모두 동일 시료의 혐기대사지문보다 다른 시료의 호기대사지문과 상관관계가 높았다. 혐기대사지문 사이는 상관관계가 호기대사지문보다 낮거나 통계학적으로 유의하지 않았다. 일별변화량의 혐기대사지문을 보면 동일 시료의 호기대사지문과 가장 상관관계가 높았는데 이는 미호기성 혹은 통성혐기성 미생물군집에 의한 영향과 함께 활성을 보이는 혐기성군집구조가 시료별로 차이가 있다는 것을 알려주는 것이라고 판단되었다. 가장 높은 상관관계는 #1 포기조와 #3 포기조의 호기대사지문으로 측정값과(87.5%) 일별변화량(78%) 모두에서 공통적이었다. 이는 #3 포기조에서 #1 포기조의 내부순환에 의한 결과로 판단되며(Fig. 1) 폐수처리시스템에서 군집구조는 생물막과 포기조들 사이에 차이가 나는 것을 알 수 있었다. anA3 (#3 포기조 혐기조건) 대사지문은 각 시료의 혐기 및 호기 대사지문들과 가장 낮은 상관관계를 보여 활성을 띄는 혐기성군집의 구조가 다른 시료들과 차이가 심한 것으로 판단되었다.

각 시료별로 보면 Bi (생물막 호기조건) 대사지문은 측정값에서는 A3 (#3 포기조 호기조건) 대사지문과, 일별변화량에서는 A1 (#1 포기조 호기조건) 대사지문과 상관관계가 가장 높았다. 측정값에서 A3와 높은 상관관계를 보인 것은 일부 공통되는 군집구조가 분석초기에 높은 활성을 나타냈고 활성의 결과인 흡광도가 분석기간 동안 높게 유지된 결과일 것이다. 하지만 일별변화량이 A1과 상관관계가 높은 것은 전반적인

군집구조의 유사성을 나타내는 결과로 판단된다. anBi (생물막 혐기조건)와 Bi 대사지문의 상관관계는 측정값에서는 가장 낮았지만 일별변화량에서는 높았다. 이는 대조구에 의한 영향과 함께 군집조성에 미호기성 혹은 통성혐기성 세균집단의 존재를 알려주는 것으로 판단된다. anBi의 A3, anA1와의 대사지문을 비교하면 측정값에서는 상관관계가 없으며 일별변화량에서는 상관관계를 보였다. anA1 (#1 포기조 혐기조건) 대사지문은 A1 대사지문보다 A3 대사지문과 상관관계가 높았는데 이는 #3 포기조의 DO 농도가 0.1-0.2 ppm 정도로 낮게 가동되어 혐기조건과 유사하게 한 것과 연관이 있을 것이다. anBi와 anA3는 측정값과 일별변화량 모두에서 상관관계의 유의성이 없었다. 이는 활성을 띄는 군집구조의 차이를 의미하며 침전조(settling reservoir)를 거친 슬러지의 생물막 반응조 유입에 의한 혐기성 군집구조의 차이와 관계있는 것으로 판단되었다.

Table 2는 활성군집의 정성적 분석이므로 정량적 분석을 위해 각 시료의 호기와 혐기 대사지문의 대응표본 *t*-검정을 수행하였다. A1과 A3가  $p=0.287$ 이고 나머지는 모두  $p \leq 0.01$ 로 나타났다. 이를 AWCD 그리고 대응표본 상관계수와 연관지으면 세균군집의 조성과 활성이 A1과 A3 사이에는 차이가 크게 없으며 나머지는 조성은 상관관계가 있더라도 활성은 서로 다르며 생물막의 활성이 유의적으로 높다는 것을 의미한다.

**일별 탄소원 이용도**

Fig. 3은 각 분석일별로 파악한 일별 변화량의 개수로 흡광도 변화 1.0 초과(Fig. 3A), 0.5 이상 1.0 미만(Fig. 3B), 0.1 이상 0.5 미만(Fig. 3C) 등 탄소원 이용도를 상중하로 분류한 것이다. 일별 결과를 누적하여 '시료(상, 중, 하)'로 표시하면 Bi (67, 65, 144), anBi (63, 27, 104), A1 (15, 67, 201), anA1 (7, 47, 210), A3 (7, 57, 253), anA3 (1, 37, 201)였다. 전반적으로 보면 Bi와 anBi 대사지문 모두에서 이용도가 높은 탄소원의 종류가 많고 포기조 시료들은 호기와 혐기 모두 이용도가 낮은 탄소원의 종류가 많았다. 이는 폐수처리 단계별 군집의 활성이 생물막에서 가장 높다는 것으로 김 등[5]이 보고한 RABC 전체 공정에서 생물막이 처리대상 유기물의 대부분을 제거한다고 것과 상통하였다. 이용도 중간 정도의 탄소원 개수는 A1, Bi, A3 순으로 호기성 군집의 활성을 알 수 있었다. 탄소원 이용도가 높은 것은 2일째이며 중간정도는 2일째와 3일째 그리고 이용도가 낮은 것은 5일째까지 꾸준히 유지되었다. Ros 등[11]은 동일 탄소원에 접종된 시료를 1일, 2일, 7일째 분석하여 탄소원에 따라 다르지만 1일 혹은 2일째는 유기물 농도가 높은 곳에서 서식하는  $\gamma$ - 혹은  $\beta$ - Proteobacteria가 우점하고 2일째 혹은 7일째는 유기물 농도가 낮은 곳에서 서식하는  $\alpha$ -Proteobacteria가 우점한다고 보고하였다. Ros 등[11]의 보고와 김 등[5]의 보고 및 본 연구 결과를 연관시키면 생물막에는

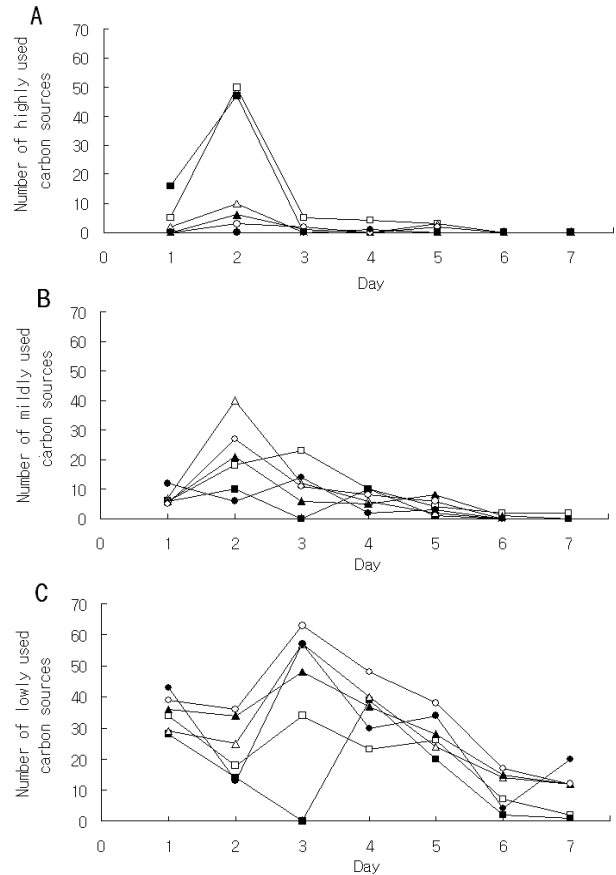


Fig. 3. Numbers of highly (OD>1.0), mildly (0.5≤OD<1.0) and lowly (0.1≤OD<0.5) used carbon sources at daily variations. Bi(◇), A1(□) and A3(△) means biofilm, #1 and #3 aeration tanks, respectively, at aerobic incubation and anBi(◆), anA1(■) and anA3(▲) means biofilm, #1 and #3 aeration tanks, respectively, at anaerobic incubation.

고농도 유기물에서 살아가는 군집조성원의 활성이 높고 폐수의 유기물을 대부분 제거시키며, 포기조에서는 저농도 유기물에서 살아가는 군집조성원의 활성이 높아 생물막에서 제거하지 못한 혹은 저농도 유기물을 분해한다고 할 수 있다.

일별로 세분하면 Bi, anBi가 1일과 2일째 높은 활성을 보이는 탄소원이 많았고 이후 다른 시료와 비슷하였다(Fig. 1A). 포기조들의 호기(A1, A3) 시료는 이용도 중간 정도의 탄소원 개수가 많았으며 탄소원 이용도가 0.1-0.5 사이는 7일까지 개수가 어느정도 유지되는 것을 알 수 있다(Fig. 3C).

**탄소원 종류별 이용도(Metabolic fingerprinting guild)**

Table 3에 각 시료의 호기 및 혐기 조건에서 나타난 탄소원 이용의 다양성(diversity)과 탄소원 편중성(evenness) 그리고 탄소원 종류별 이용도(guild)를 일별 변화도에서 구하여 표시하였다. 다양성과 편중성은 각 시료의 분해가능한 탄소원의 종류와 편중성을 나타내므로 대사활성의 척도를 나타내는 것이

Table 3. Bacterial concentration and diversity, evenness and guild of metabolic fingerprinting (MeFp) of biofilm and #1 and #3 aeration tanks at aerobic and anaerobic condition

	Aerobic condition			Anaerobic condition		
	Biofilm	#1 Aeration	#3 Aeration	Biofilm	#1 Aeration	#3 Aeration
Bacterial concentration (log CFU <sup>1</sup> /ml, average±standard deviation)	8.04±2.55	8.72±2.55	6.59±0.07	9.18±3.21	9.49±1.60	8.40±0.71
MeFp diversity (average±standard deviation)	3.12±0.50	3.35±0.36	3.33±0.24	3.23±0.41	3.39±0.23	3.41±0.30
MeFp evenness (average±standard deviation)	0.84±0.08	0.89±0.04	0.90±0.03	0.91±0.05	0.90±0.02	0.90±0.04
MeFp guild of daily variation (OD <sup>2</sup> /AWCD <sup>3</sup> , average±standard deviation)						
carbohydrates	0.85±0.42	1.07±0.29	0.97±0.42	0.70±0.48	0.98±0.40	0.86±0.38
carboxylic acids	1.24±0.56	0.80±0.21	1.06±0.42	0.52±0.46	0.92±0.25	0.83±0.36
amino acids	0.83±0.35	0.97±0.28	0.80±0.22	0.79±0.51	0.87±0.27	0.92±0.35
polymers	1.26±1.61	1.63±0.55	1.50±0.77	1.21±1.93	1.42±0.65	1.25±1.35
amines/amides	0.93±0.90	1.09±0.73	1.05±0.76	3.78±8.00	1.80±1.60	1.44±1.16
aromatic compounds	0.98±0.68	0.87±0.52	0.83±0.55	0.72±0.42	0.82±0.31	1.76±2.11
phenolic compounds	0.54±0.33	1.21±1.29	1.00±0.96	2.67±4.47	1.48±1.47	1.83±2.03

<sup>1</sup>CFU means colony forming units.

<sup>2</sup>OD means optical density.

<sup>3</sup>AWCD means average well color development.

다. 다양성은 시료와 혐기/호기 조건에서 큰 차이가 없었다. 하지만 편중성은 Bi에서 가장 낮아 이용하는 탄소원 종류의 편중성이 높았다. 이는 특정탄소원에 대한 분해도가 높은 군집구성원의 존재를 알려주는 것으로 판단된다. 표준편차가 평균값 보다 높은 경우 및 비교적 큰 경우는 탄소원의 일별사용량에 차이가 심하다는 것이다. 탄소원 종류별[3] 이용 정도가 가장 높은 것을 시료별로 파악하면 호기조건의 생물막과 포기조 시료 모두 polymer가 가장 잘 이용되었으며, 혐기조건의 생물막과 #1 포기조는 amine 그리고 #3 포기조는 phenolic compound였다. 탄소원 종류별로 이용된 정도를 호기와 혐기조건의 시료들과 비교하면 carboxylic acids (Bi), carbohydrates (A1), carboxylic acids (A1), polymers (A1), amines/amides (anBi), phenolic compounds (anBi), aromatic compounds (anA3)로 A1이 3개, anBi가 2개였고 anA1과 A3는 하나도 없었다. 가장 이용도가 높은 것은 anBi의 amines/amides였다. 이러한 결과는 각 시료와 혐기/호기 조건별로 활성이 높은 군집구성원의 차이를 나타낸 것으로 판단된다.

### 요 약

돈·도축 식품폐수를 처리하는 생물막 시스템인 RABC (rotating activated Bacillus contactor) 공정의 생물막과 점검 식으로 운영되는 포기조의 동일한 시료를 대상으로 Biolog GN2 plate를 이용한 호기/혐기 대사지문 분석으로 다음과 같은 결과를 얻었다. 첫째 대응표본 상관관계 분석과 pairs t-test를 통하여 매일 측정값보다 일별변화량이 전반적인 군집구조의 유사성을 나타내는 것으로 판단되었다. 둘째 생물막이 포

기조 시료들에 비해 높은 탄소원 이용도를 보여( $p < 0.01$ ) 생물막의 높은 유기물 제거 능력을 알 수 있었고 포기조 시료사이 는 이용된 탄소원의 상관관계가 높았고(78%) 활성정도도 비슷하였다( $p = 0.287$ ). 셋째 활발하게 이용된 탄소원의 종류는 시료별로 차이를 보여 활성을 보이는 군집이 각 처리단계 별로 변화하는 것으로 판단되었다. 마지막으로 같은 시료라도 호기/혐기 조건에 따라 대사지문에 차이를 보여 미호기성 및 혐기성 군집구성원에 의한 활성 차이를 확인하였다. 향후 대사지문(metabolic fingerprinting)을 통한 활성군집 비교에 일별변화량과 혐기조건 분석을 병행하면 더욱 풍부한 분석이 가능할 것이다.

### References

- Anderson, S. A., C. H. Sissons, M. J. Coleman, and L. Wong. 2002. Application of carbon source utilization patterns to measure the metabolic similarity of complex dental plaque biofilm microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5779-5783.
- Choi, D. B., C.-B. Lee, and W.-S. Cha. 2005. Optimization for phosphorus removal by loess ball using *Chromobacterium*. *J. Life Sci.* **15**, 584-589.
- Garland, J. L. and A. L. Millis. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2311-2359.
- Gamo, M. and T. Shoji. 1999. A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses BIOLOG plates and multiple sole carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4419-4424.
- Kim, E. H., Y. J. Jo, S. J. Park, G. S. Sin, S. B. Im, and J.

- G. Jeong. 2004. Advanced wastewater treatment process using rotating activated Bacillus contactor (RABC). *J. Korean Soc. Wat. Qual.* **20**, 190-195.
6. Lee, D.-G., J.-H. Lee, S.-H. Lee, B. J. Ha, and J.-M. Ha. 2006. Efficiency of different disinfectants against biofilm on carbon steel pipe and carbon utilizing ability of biofilm. *J. Life Sci.* **16**, 579-583.
7. Mojica, K., D. Elseya, and M. J. Cooney. 2007. Quantitative analysis of biofilm EPS uronic acid content. *J. Microbiol. Methods* **71**, 61-65.
8. Park, S. J., J. C. Yoon, K.-S. Shin, E. H. Kim, S. Yim, Y.-C. Cho, G. M. Sung, D.-G. Lee, S. B. Kim, D.-U. Lee, S.-H. Woo, and B. Koopman. 2007. Dominance of endospore-forming bacteria on a rotating activated Bacillus contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *J. Microbiol.* **45**, 113-121.
9. Puigaguta, J., H. Salvadó, D. García, F. Granesc, and J. García. 2007. Comparison of microfauna communities in full scale subsurface flow constructed wetlands used as secondary and tertiary treatment. *Wat. Res.* **41**, 1645-1652.
10. Röling, W. F. M., B. M. van Breukelen, M. Braster, M. T. Goeltom, J. Groen, and H. W. van Verseveld. 2000. Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. *Microb. Ecol.* **40**, 177-188.
11. Ros, M., M. Goberna, J. A. Pascual, S. Klammer, and H. Insam. 2008. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *J. Microbiol. Methods* **72**, 221-226.
12. Shishidoa, M., S. Kazunori, H. Yokoyama, N. Mommaa, and S. Miyashita. 2008. Changes in microbial communities in an apple orchard and its adjacent bush soil in response to season, land-use, and violet root rot infestation. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1460-1473.
13. Viti, C. and L. Giovannetti. 2005. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Appl. Soil Ecol.* **28**, 101-112.
14. Weber, K. P., J. A. Grove, M. Gehder, W. A. Anderson, and R. L. Legge. 2007. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. *J. Microbiol. Methods* **69**, 461-469.