

생물학적 폐수처리 공정에서의 계절 및 유입수 성상 변화에 따른 미생물 군집 특성 변화 Changes of Microbial Community Structure According to a Changes of Season and Influent Characteristics in Biological Wastewater Treatment

손형식 · 손희종*[†] · 김미아 · 유은연** · 이 건*** · 이상준
Hyeng-Sik Son · Hee-Jong Son*[†] · Mia Kim · Eun-Yeon Ryu** · Geon Lee*** · Sang-Joon Lee

부산대학교 미생물학과 · *부산시 상수도사업본부 · **부산대학교 Bio-IT 파운드리센터 · ***세정 바이오텍
Department of Microbiology, Pusan National University · *Busan Water Authority
Korea Bio-IT Foundry Center, Pusan National University · *Sejung Biotech Co. Ltd

(2010년 7월 7일 접수, 2010년 8월 30일 채택)

Abstract : The bacterial community structure in biological reactor in wastewater treatment system was investigated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Samples were collected at different three points in wastewater treatment system. Through treatment processes, BOD (biochemical oxygen demand) and COD (chemical oxygen demand) of was removal efficiency was 83.1~98.6%, 67.2~85.2% respectively. Microbial community of aerobic tank and oxic tank were similar but anoxic tank was different (RRP group was increased about tripple) by DGGE and FISH in sludge (2007 October and 2008 January). Samples in 2007 October and 2008 January were dominant α -Proteobacteria and CF group respectively. Sludge in 2008 April were different comparing former results dominant others as 65~80%. Others group was dominant. Eubacteria by FISH with the probe EUB338 was about $1.7\sim 7.6\times 10^9$ cells/mL. It could be successfully observed bacterial community in biological wastewater system.

Key Words : Microbial Community, DGGE, FISH, Biological Wastewater Treatment

요약 : 실험기간 동안 생물학적 처리공정에서의 BOD와 COD의 제거율은 각각 83.1~98.6%, 67.2~85.2%였으며, 단위 공정별로 미생물 군집 변화에서는 가을과 겨울의 경우 호기조, 산소조 및 무산소조에서 전체적으로 비슷한 군집양상을 나타내었다. RRP 그룹의 경우는 무산소조에서 3배 정도 증가하여 DGGE 밴드결과에서 새로운 밴드들이 나타난 것과 일치하는 경향을 보였다. 또한 비슷한 분포를 나타내었지만, 가을엔 α -Proteobacteria가 우점하였고, 겨울엔 CF 그룹이 우점을 보였다. 봄에 분석한 DGGE와 FISH의 결과에서는 유입수의 성상변화에 따른 미생물의 군집 패턴이 가을과 겨울의 경우에 비해 완전히 다른 패턴을 보였으며, FISH 결과에서 others 그룹의 증가와 DGGE 밴드결과에서 새로운 밴드들이 나타난 것과 일치하는 경향을 보였다. Eubacteria는 $1.7\sim 7.6\times 10^9$ cells/mL 정도를 보였으며, 전체적인 미생물 군집을 평가하는데 FISH와 DGGE는 매우 효과적이었고, 계절별 및 공정별 군집의 변화에 대해 유용한 평가가 가능하였다.

주제어 : 미생물 군집, DGGE, FISH, 생물학적 폐수처리

1. 서론

하·폐수처리 공정에서의 유기성 오염물질이나 질소 및 인의 제거는 다양한 공법의 생물학적 처리공정들에서 이루어진다. 생물학적 처리공정에 존재하는 다양한 미생물 군집은 하·폐수의 특성에 따라 다양한 생태계를 형성하기 존재하기 때문에 생물학적 처리공정의 운전효율은 미생물의 활성이나 생체량과 같은 인자들이 많은 영향을 미친다.¹⁻⁴⁾ 일반적으로 도시 하수나 산업 폐수를 처리하는 생물학적 처리공정에서는 30종 이상의 다양한 미생물들이 관찰되었고 보고하고 있으며,^{1,5)} 이들은 외부 환경적 요인의 변화에 따라 미생물 군집들 사이에 많은 변화를 유발하기 때문에 다양한 미생물 군집들의 변화를 파악하고자 하는 연구들이 많이 시도되었다.⁶⁻⁹⁾

최근에는 생물학적 처리공정에 대한 미생물 군집을 해석하는 방법으로 분자유전학적 방법의 일종인 FISH (fluore-

scent *in situ* hybridization)와 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 기법을 많이 이용하고 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 이러한 기법들은 미생물들을 배양하지 않는 비배양적인 방법이기 때문에 미생물들의 군집을 자연상태 그대로 나타낼 수 있으며, 쉽고 간단하게 측정되는 장점과 미생물 군집의 시간·공간적 변화를 파악하는 데에 효과적이어서 최근 이를 활용한 다양한 연구들이 진행중이다.^{15,16)}

생물학적 처리공정은 일반적으로 물리·화학적 처리공정들에 비해 많은 장점들을 가지지만 오염물질 농도 부하, 수온, pH, 용존 산소 등과 같은 유입수의 성상 변화에 매우 민감하기 때문에 처리효율에 많은 영향을 받는다.¹⁷⁾ 따라서 생물학적 처리공정에서는 실제 현장에서의 효율적인 처리공정의 설계와 운영을 위하여 폐수 성상에 따라 형성되는 미생물 군집의 구조와 밀도를 파악하는 연구가 매우 중요하다.

[†] Corresponding author E-mail: menuturk@hanmail.net Tel: 051-669-4625 Fax: 055-323-4719

Table 1. Influent characteristics (unit: mg/L)

	pH	BOD	COD	T-N	T-P	SS	Cr	Temp.
Influent	7.2~8.9	302~489	332~588	226~338	20~32	21600~29800	12~37	7~21

본 연구에서는 피혁 폐수와 수산 폐수를 혼합하여 처리하는 생물학적 폐수처리 공정의 단위공정들 내에 형성된 미생물 군집의 구조와 밀도를 DGGE와 FISH 기법을 이용하여 계절변화 및 유입수의 성상 변화에 따른 생물학적 처리 공정에서의 미생물 군집들의 분포 특성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 유입수

생물학적 폐수처리 공정으로 유입되는 폐수는 부산시 사하구 신평동 무지개 공단(피혁 폐수)과 수산시장에서 발생하는 혼합 폐수로 실험기간 중의 폐수의 혼합비율은 2007년 10월의 경우는 피혁 폐수가 60%, 수산 폐수 40%의 비율이었으며, 2008년 1월은 피혁 폐수 55%, 수산 폐수 45%, 2008년 4월의 경우는 피혁 폐수가 80%, 수산 폐수가 20%의 비율을 나타내어 계절별로 혼합 폐수의 혼합 비율에 많은 차이가 있었다. 생물학적 폐수처리 공정으로 유입되는 유량은 평균 5,000 톤/일이었으며, Table 1에 유입 혼합 폐수의 성상을 나타내었다. 실험 기간 동안 유입되는 혼합 폐수의 pH는 7.2~8.9의 범위로 나타났고, BOD와 COD의 농도는 각각 302~489 mg/L와 332~588 mg/L로서 COD 구성물질 중에서 BOD가 차지하는 비율은 68~91%의 범위로 나타났다. 또한, T-N과 T-P의 경우는 각각 226~338 mg/L와 20~32 mg/L의 범위로 나타났다.

2.2. 처리공정 및 시료 채취

본 실험에 사용된 처리공정을 Fig. 1에 개략적으로 나타내었다. 처리공정은 유량 조정조, 호기조(tank 1), 1차 침전조, 산소조(tank 2), 2차 침전조, 무산소조(tank 3), 3차 침전조, 섬유여과 공정으로 구성되어져 있으며, 평균 유입 유량은 평균 5,000 톤/일이다. 평균 체류시간은 호기조(tank 1)는 2일, 산소조(tank 2)는 0.36일이며 무산소조(tank 3)는 3.6일이다. 또한, 호기조(tank 1)에는 폭기 시설이 설치되어져 있어 충분한 용존산소의 공급이 이루어진다.

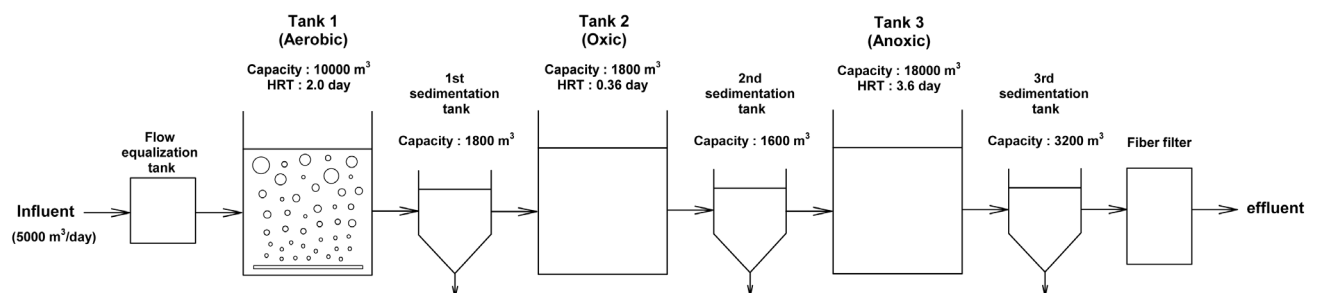


Fig. 1. Schematic diagram of wastewater treatment process.

시료 채취는 2007년 10월, 2008년 1월 및 2008년 4월에 유입되는 혼합 폐수와 각 반응조에서 처리된 처리수를 채수하여 수질분석을 하였으며, 각 반응조(Tank 1~3) 내의 슬러지를 채집하여 미생물 군집을 조사하였다.

2.3. 미생물 군집 분석

2.3.1. DGGE를 이용한 군집 분석

2.3.1.1. DNA 추출 및 PCR 분석조건

채취한 슬러지 600 μ L를 fast DNA[®]SPIN for soil kit (MP Biomedicals, France)를 이용하여 chromosomal DNA를 추출하였다. 추출된 chromosomal DNA를 주형으로 27F와 1492R primer를 이용하여 16S rDNA 부분을 direct PCR 한 후에, GC-clamp가 달린 341F-GC와 518R primer를 이용하여 nested PCR을 진행하였다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제 kit로 DNA를 정제하였다.¹⁸⁾ 본 연구에 사용된 primer의 종류를 Table 2에 나타내었다.

2.3.1.2. DGGE 분석

PCR을 통해 증폭하여 정제된 DNA 2 μ g/ μ L를 8% acrylamide gel에 loading하였다. Gel의 농도구배는 urea와 formamide를 변성제로 사용하여 35~55%로 하였다. 전기영동은 Bio-Rad사의 D-Code system (USA)를 이용하여 60°C에서 20 V로 30분간 pre-running 후, 200 V로 3시간 30분 running하였다. 0.01% SYBR Gold (invitrogen)를 이용하여 20분간 staining하였으며, UV transilluminator (MyImager 1000TM, SLB, USA)로 관찰하였다.¹⁸⁾

Table 2. Synthetic oligonucleotide primers for PCR amplication

	Primer	Primer sequence (5'-3')
Direct PCR	27F	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
Nested PCR	341F-GC	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGAG
	518R	ATTACCGCGCTGCTGG

2.3.2. FISH를 이용한 군집 분석

2.3.2.1. 시료의 전처리 및 고정

시료(습중량 1 g)를 4% paraformaldehyde solution(시료:고정액 = 1:3)으로 4°C에서 16시간 동안 고정시켰다.¹⁹⁾ 고정된 시료를 4°C, 12,000 rpm의 조건으로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 고정액을 세척하였다.^{19,20)}

2.3.2.2. Gene probes

본 연구에 사용된 probe (Coa-biosystem, Germany)는 주문, 제작하여 사용하였으며, probe의 종류와 염기서열 등은 Table 2에 나타내었다. 형광 dye는 fluorescein isothiocyanate (FITC), infrared fluorescence dye IRD 700, IRD 800, rhodamine-green, rhodamine-red를 사용하였다.

2.3.2.3. In situ hybridization

고정된 시료를 gelatin으로 코팅된 slide glass에 놓고, probe 2 µL (5 µg/µL)과 hybridization buffer (0.9 mM NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris/HCl, formamide (EUB 20%, ALF1b 20%, BET42a 35%, GAM42a 35%; CF319a 15%; HGC 25%)) 16 µL를 첨가하여 46°C에서 90분 동안 반응시켰다.¹⁹⁾ 미리 가열된 washing buffer로 48°C에서 15분 동안 세정하고 공기 중에서 건조시켰다. 형광현미경(Axioskop 2 plus, 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.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생물학적 처리공정의 처리효율 평가

혼합 폐수의 유입수와 각각의 생물학적 처리공정에서의 BOD, COD, 총질소(T-N) 및 총인(T-P)에 대한 제거율을 Table 4에 나타내었다. 처리공정으로 유입되는 폐수의 BOD 농도는 302~489 mg/L, COD 농도는 332~588 mg/L로서 COD 구성물질 중에서 BOD가 차지하는 비율(BOD/COD)은 68~91%의 범위로 나타났다. 또한, T-N과 T-P의 경우는 각각 226~338 mg/L와 20~32 mg/L로 나타났다.

3.2. DGGE를 이용한 단위공정 내의 미생물 군집 분석

각각의 단위 생물학적 처리공정에서 채취한 슬러지로부터 추출된 DNA를 주형으로 16S rDNA 부위를 direct PCR 한 결과, 실험결과는 나타내지 않았으나 약 1,460 bp의 size로 1% agarose gel에서 밴드가 확인되었으며, direct PCR을 통해 증폭된 16S rDNA를 주형으로 DGGE를 위한 nested PCR을 진행한 결과 약 160 bp의 size로 1% agarose gel에서 밴드가 확인되었다. 증폭된 DNA를 DGGE Gel에 loading하여 시료 채취 시기별, 생물학적 처리 반응조별로 분석한 결과는 Fig. 2에 나타내었고, Fig. 2에서 보는 바와 같이 2007년 10월에서 2008년 1월까지의 DGGE 분석결과를 보면 Tank 1과 Tank 2에서의 미생물 군집은 양적인 차이는 보이고 있으나 패턴은 아주 유사하게 나타났다. 그러나 Tank 3의 분석결과는 Tank 1, 2에서와는 매우 다른 패턴을 나타내었고, Tank 1, 2의 DGGE 결과에서는 볼 수 없었던 새로운 band들이 검출되었다. 이는 각각의 생물 반응조들의 역

Table 3. Characteristics of oligonucleotide probes used in this study

Probe	Probe sequence(5'-3')	Specificity	% FA*	Ref.
EUB338	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	20	19)
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	α subclass of <i>Proteobacteria</i>	20	19)
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	β subclass of <i>Proteobacteria</i>	35	19)
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	γ subclass of <i>Proteobacteria</i>	35	19)
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	15	19)
CF319b	TGGTCCGTATCTCAGTAC			
HGC	TATAGTTACCACCGCCGT	Gram (+) with high G+C content	25	21)
NSV443	CCGTGACCGTTTTCGTTCCG	<i>Nitrospira</i> spp.	30	22)
RRP1088	CGTTGCCGGACTTAACC	Genera <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodovulum</i> , <i>Paracoccus</i> and other bacteria	0	10)

* Percentage formamide in the hybridization buffer.

Table 4. Removal efficiencies of unit biological reactors in wastewater treatment (unit: mg/L)

	BOD			COD			T-N		
	07.10	08.01	08.04	07.10	08.01	08.04	07.10	08.01	08.04
Influent conc.	489	302	311	588	332	458	304	226	338
Tank 1 removal (%)	91.4	85.0	78.8	78.3	73.0	62.3	4.6	6.2	5.6
Tank 2 removal (%)	3.9	3.0	2.3	4.0	3.8	2.9	22.7	18.1	16.3
Tank 3 removal (%)	3.3	2.4	2.0	2.9	2.7	2.0	51.3	42.9	39.3
Total removal (%)	98.6	90.4	83.1	85.2	79.5	67.2	78.6	67.2	61.2
Effluent conc.	2	29	53	87	68	150	65	74	131

할에 따라 용존산소 농도 등 여러 가지 운전조건들이 다르기 때문에 각각의 반응조에서의 미생물 군집 패턴에도 차이를 나타내었다. Tank 1은 호기조로 유기물질의 제거 및 질산화가 일어나며, Tank 3은 무산소조로 탈질반응이 일어나는 반응조이다. 따라서 Tank 1과 2의 DGGE 결과에는 없는 탈질에 관여하는 다양한 미생물군들이 Tank 3의 DGGE 결과에서 새로운 band로 나타난 것으로 판단된다. 또한, 계절별 변화에 따른 DGGE의 band 패턴의 경우 가을(2007년 10월)과 겨울(2008년 1월)의 Tank 1~3의 DGGE 결과를 비교해보면 겨울의 경우가 유입수의 수온 저하로 인해 미생물의 생체량이 줄어드는 경향을 보이고 있으나 군집 패턴에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 그러나 봄(2008년 4월)에 채취한 슬러지의 경우 가을과 겨울에 분석한 결과와 매우 상이한 미생물 군집분포를 나타내고 있다. 이러한 이유는 봄(2008년 4월)의 경우 유입 혼합 폐수의 성상이 피혁 폐수가 80%, 수산 폐수가 20%를 차지하여 이전의 가을(2007년 10월)과 겨울(2008년 1월)의 피혁 폐수가 55~60%, 수산

폐수가 40~45%와 비교하여 혼합 비율에서 많은 차이를 나타내었기 때문에 피혁 폐수의 혼합 비율이 높아지면 유해 중금속 함량 증가, 유기성 오염물질 성상 변화 및 pH 저하 등의 유입수 성상변화가 유발되어 생물학적 처리 공정의 운영에 악영향을 미친다. 따라서 Fig. 2에서와 같이 피혁 폐수의 함량 증가에 따른 생물학적 처리공정에서의 미생물 군집 구조의 변화를 DGGE 밴드 패턴의 결과로 확인할 수 있었다.

3.3. FISH를 이용한 단위공정 내의 미생물 군집 분석

각각의 단위 생물학적 처리공정들에서 계절별로 채취한 슬러지에 대한 FISH 분석결과를 Table 5와 Fig. 3에 나타내었다. Table 5에는 계절변화에 따른 단위 공정별 미생물 군집의 생체량을 나타낸 것으로 가을(2007년 10월), 겨울(2008년 1월) 및 봄(2008년 4월)의 결과를 비교해 보면 EUB (*Eubacteria*)의 경우는 가을(2007년 10월)이 Tank 1, 2 및 3에서 각각 7.6×10^9 cells/mL, 7.4×10^9 cells/mL 및 5.0×10^9 cells/mL로 나타나 겨울(2008년 1월) 및 봄(2008년 4월)의 결과에 비해 각각 20~54% 및 32~77% 정도 높게 나타났다. EUB는 생물학적 폐수처리에 관여하는 *eubacteria*들의 전체적인 생체량을 나타낸 것으로 겨울(2008년 1월)과 봄(2008년 4월)의 경우에는 EUB의 생체량이 가을에 비해 비교적 낮게 나타났는데 그 이유는 동절기시 수온 저하에 따른 영향으로 인해 생체량의 감소가 유발된 것으로 평가가 되며, 2008년 4월의 경우는 앞서서도 언급하였듯이 유입되는 혼합폐수에서 피혁폐수의 구성비율이 높아져서 전체적인 유입수의 성상변화가 미생물 개체수 감소의 주요인으로 작용한 것으로 판단되며, Table 4에서 볼 수 있듯이 유입수의 BOD/T-N의 비율이 2007년 10월과 2008년 1월의 1.61과 1.34에 비해 2008년 4월의 경우 0.92로 낮게 나타났다. 또한, Table 4에 나타난 계절별 처리효율 비교에서 EUB의 생체량이 가장 높게 나타난 2007년 10월에 BOD, COD 및 T-N에 대한 제거율이 높은 것으로 나타나 생물학적 처리공정의 처리효율과 EUB의 생체량은 높은 상관성을 가지는 것으로 나타났다. Tank 1 (aerobic 공정)에서의 BOD 및 COD 제거율과 EUB 생체량과의 상관계수(r^2)는 0.96과 0.85

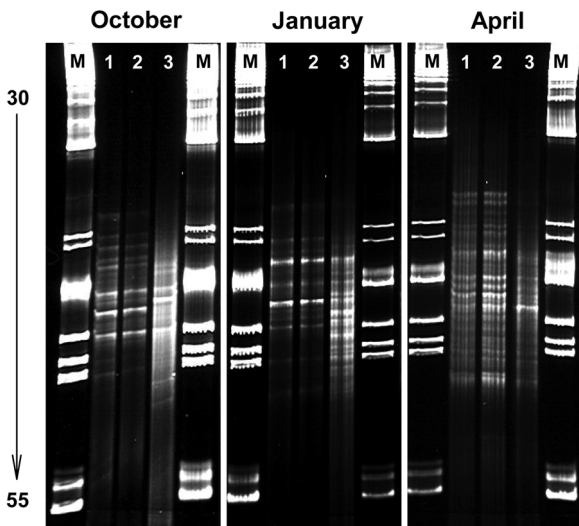


Fig. 2. DGGE analysis of PCR-amplified 16S-rDNA fragments of total bacterial population from sludge samples (Lane M : maker for denaturing gradient balance, Lane 1 : Tank 1, Lane 2 : Tank 2, Lane 3 : Tank 3).

Table 5. Bacterial biomass in biological reactor for wastewater treatment (unit: cells/mL)

Oct, 2007	α - <i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	CF	HGC	NSV	RRP	EUB
Tank 1	9.4×10^8	1.2×10^9	1.0×10^9	9.7×10^8	6.2×10^8	1.5×10^8	7.6×10^7	7.6×10^9
Tank 2	8.7×10^8	8.6×10^8	7.0×10^8	7.3×10^8	6.7×10^8	1.5×10^8	1.9×10^8	7.4×10^9
Tank 3	7.4×10^8	6.0×10^8	3.5×10^8	4.4×10^8	2.1×10^8	1.0×10^8	4.5×10^8	5.0×10^9
Jan, 2008	α - <i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	CF	HGC	NSV	RRP	EUB
Tank 1	3.9×10^8	5.7×10^8	4.6×10^8	4.8×10^8	4.5×10^8	1.0×10^8	7.5×10^7	5.0×10^9
Tank 2	2.3×10^8	3.2×10^8	2.9×10^8	3.8×10^8	3.4×10^8	6.8×10^7	6.8×10^7	3.4×10^9
Tank 3	2.5×10^8	3.0×10^8	1.7×10^8	2.1×10^8	4.8×10^8	8.0×10^7	2.8×10^8	4.0×10^9
Apr, 2008	α - <i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	CF	HGC	NSV	RRP	EUB
Tank 1	2.5×10^8	7.7×10^7	8.4×10^7	1.7×10^8	1.7×10^8	3.8×10^7	3.8×10^7	3.8×10^9
Tank 2	3.5×10^8	8.5×10^6	3.9×10^7	7.1×10^7	8.7×10^7	3.4×10^6	3.4×10^7	1.7×10^9
Tank 3	3.5×10^8	1.0×10^7	1.0×10^7	1.0×10^7	1.3×10^7	6.8×10^6	2.0×10^8	3.4×10^9

정도로 나타났고, Tank 3 (anoxic 공정)에서의 T-N 제거율과 EUB 생체량과의 상관관계수(r^2)는 0.99 정도로 나타났다.

계절별 EUB를 구성하는 각각의 그룹들의 군집 비율의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 2007년 10월의 각각의 그룹들에 대한 군집비율을 나타낸 Fig. 3(a)를 보면 Tank 1 (T 1)~Tank 3 (T 3)에서 메탄을 산화(*Methylobacterium*), 화학무기영양(*Nitrobacter*), 질소고정(*Rhizobium*)과 같은 특수한 대사과정을 수행하는 α -*Proteobacteria* (*Rhodospillum*, *Ricketteia*, *Caulobacter*, *Rhizobium*, *Brucella*, *Nitrobacter*, *Methylobacterium* 등), α -*Proteobacteria*의 대사와 유사하지만 대체로 혐기 조건에서 유기물질의 부패 후 부패성 물질을 기질로 사용하는 것으로 알려져 있는 β -*Proteobacteria* (*Nitrosomonas*, *Thiobacillus* 등), *Proteobacteria*에서 가장 큰 집단으로서 다양한 생리학적 유형을 보이는 γ -*Proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Klebsiella* 등)가 차지하는 군집비율이 전체의 32.8~41.3%로 나타났으며, Tank 1에서 비율이 41.3%로 가장 높게 나타났다. Tank 1은 호기성 반응조로 주로 BOD와 COD 같은 유기성 오염물질의 제거 및 질산화가 진행되는 반응조로 활성 슬러지 공정에서의 미생물 군집을 조사한 Liu 등²³⁾과 Snaidr 등²⁴⁾의 연구들에서는 α , β 및 γ -*Proteobacteria*가 차지하는 군집비율이 58~61%로 보고하고 있어 본 연구의 결과보다는 높게 나타났으나 Wong 등¹¹⁾의 연구결과에서는 38~48%로 나타났다고 보고하고 있어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 이들의 군집비율은 유입수의 성상이나 반응기의 운전조건에 따라 많은 차이를 보이기 때문에 전체적으로 우점하는 종으로 알려져 있으나 군집비율에는 다소 차이가 있다.

Tank 2의 경우는 *proteobacteria* 그룹이 차지하는 비율이 32.8%로 Tank 1에 비해 20% 정도 감소하였고, RRP 그룹의 비율이 조금 증가하였다. 그 외의 그룹들은 Tank 1과 거의 유사한 결과를 보였다. Tank 3에서는 *proteobacteria* 그룹의 비율은 33.8%로 Tank 2와 거의 비슷한 결과를 나타내었고, RRP 그룹을 제외한 모든 그룹의 비율이 감소하였으나, RRP 그룹의 비율은 2.4배 정도 상승하였다. RRP 그룹¹⁰⁾은 *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* 및 *Paracoccus* 속의 탈질 미생물들이 주종을 이루기 때문에 Tank 3에서의 주반응이 탈질반응인 것을 고려하면 일치하는 결과이며, 이는 앞의 DGGE 밴드결과에서 새로운 밴드들의 분포와도 밀접한 관련이 있다. 또한, NSV 그룹의 경우는 Tank 1 보다 Tank 2와 3에서 조금 더 높은 비율을 차지하였으며, NSV 그룹은 *Nitrosospira* cluster에 포함되며, 질산화 관련 미생물 그룹²⁵⁾으로 β -*Proteobacteria*에 속하며, T 1~T 3에서 β -*Proteobacteria*의 12.5~17.4% 정도를 차지하는 것으로 나타났다.

2008년 1월(겨울)의 군집분포를 나타낸 Fig. 3(b)를 보면 T 1~T 3에서 α , β 및 γ -*Proteobacteria*가 차지하는 군집비율이 전체의 18~28.4%로 나타났다. 또한, CF 그룹은 10월의 경우 8.8~12.8%의 우점비율을 나타내었으나 1월의 경우는 5.3~11.2% 정도로 나타나 조금 감소한 경향을 보였다. 일반적으로 CF 그룹은 *acteriodetes*문에 속하며 단백질

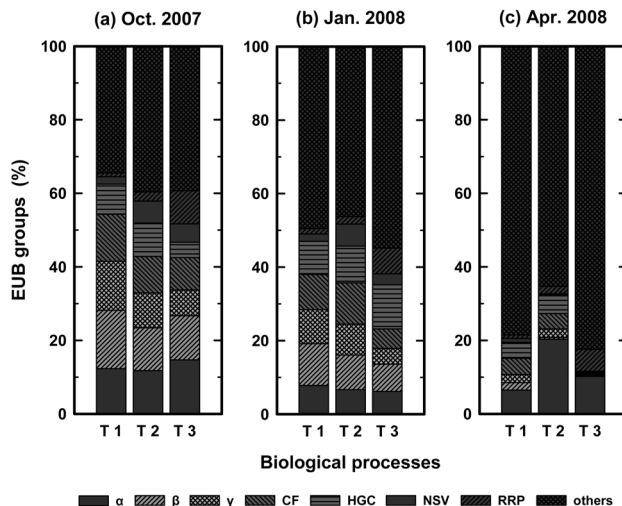


Fig. 3. Comparison of bacterial community structure of biological reactor for wastewater treatment determined by FISH analysis. All the values are presented as percentage of the relative cell area of respective probe against probe EUB338 (T1: aerobic, T2: oxic, T3: anoxic).

과 복합 다당류와 같은 고분자 유기물의 분해에 관여하기 때문에 하·폐수처리에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 또한, 방선균류(*actinomycetes*)로 *Actinomyces*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Pripionibacterium*, *Bifidobacterium* 등을 포함하는 HGC 그룹은 10월과 1월에 각각 4.2~12.7%와 9.0~12.0%로 나타났다. Wagner 등의 연구²¹⁾에서 CF 그룹의 우점비율은 혐·호기 조건에 관계없이 8~9% 정도를 차지하였으며, HGC 그룹은 19~24% 정도를 차지하는 것으로 보고하고 있어 CF 그룹은 유사한 경향을 보이는 반면 HGC 그룹의 경우는 Wagner 등의 연구²¹⁾와 비교하여 50% 정도 낮은 비율을 나타내었다. NSV 그룹은 10월의 결과와 비교해서 다소 증가한 17.6~26.6%의 비율을 나타내었으며, RRP 그룹의 경우는 Tank 3에서 7.0%의 비율로 가장 높게 나타나 10월의 결과와 유사한 경향을 보였다.

2008년 4월(봄)의 결과를 나타낸 Fig. 3(c)의 경우는 Fig. 3(a)~(b)와는 매우 상이한 경향을 나타내고 있다. 앞서의 DGGE 밴드결과에서도 나타났듯이 전체적인 군집의 분포가 다르게 나타났으며, 본 실험에서 사용한 probe들에 검출되지 않은 *others* 그룹이 가장 많은 분포로 나타나 *Proteobacteria* 그룹을 비롯한 다른 그룹들의 우점비율이 현저히 감소하는 경향을 보였다. 이는 앞서 언급한 유입수의 성상 변화에 기인한 결과로 유입수중의 피혁폐수 함유비율이 80% 정도까지 증가하여 이러한 영향들이 각각 생물 반응기내의 미생물 군집에 악영향을 끼친 것으로 판단된다. 일반적으로 피혁폐수의 경우는 생물학적 처리에 있어서 저해 작용을 미치는 chromium과 sulfide가 고농도로 함유되어 있어 생물학적 처리에 많은 어려움이 있는 것으로 알려져 있다.^{26,27)}

4. 결론

본 연구에서 DGGE와 FISH를 이용하여 혼합폐수의 생물학적 처리 단위공정의 미생물의 군집을 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 전체적인 미생물 군집을 평가하는데 FISH와 DGGE는 매우 효과적이었으며, 계절별 및 공정별 군집의 변화에 대해 유용한 평가가 가능하였다. BOD와 COD의 제거율은 각각 83.1~98.6%, 67.2~85.2%였다. 생물학적 처리 단위 공정별로 미생물 군집 변화에서는 가을과 겨울의 경우 호기조, 산소조 및 무산소조에서 전체적으로 비슷한 군집양상을 나타내었고, RRP 그룹의 경우는 무산소조에서 3배 정도 증가하여 DGGE 밴드결과에서 새로운 밴드들이 나타난 것과 일치하는 경향을 보였다. 또한 비슷한 분포를 나타내었지만, 가을엔 *α-Proteobacteria*가 우점하였고, 겨울엔 CF group이 우점을 보였다. 봄에 분석한 DGGE와 FISH의 결과에서는 유입수의 성상변화에 따른 미생물의 군집 패턴이 가을과 겨울의 경우에 비해 완전히 다른 패턴을 보였으며, FISH 결과에서 others 그룹의 증가와 DGGE 밴드결과에서 새로운 밴드들이 나타난 것과 일치하는 경향을 보였다. Eubacteria는 $1.7\sim 7.6\times 10^9$ cells/mL 정도를 보였다.

감사의 글

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

KSEE

참고문헌

- Eikelboom, D. H., "Filamentous organisms observed in activated sludge," *Water Res.*, **9**, 365~388(1975).
- Richard, M., Hao, O. and Jenkins, D., "Growth kinetics of Sphaerotilus species and their significance in activated sludge bulking," *J. Water Pollut. Con. F.*, **57**, 68~81(1985).
- Andreasen, K. and Nielsen, P. H., "Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3662~3668(1997).
- Nielsen, P. H., Andreasen, K., Wagner, M., Blackall, L. L., Lemmer, H. and Seviour, R. J., "Variability of type 021N in activated sludge as determined by in situ substrate uptake pattern and in situ hybridization with fluorescent rRNA targeted probes," *Water Sci. Technol.*, **37**, 423~440(1998).
- Eikelboom, D. H., *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*, IWA Publishing, London(2000).
- Ohashi, A., Viraj de Silva, D. G., Mobarry, B., Manem, J. A., Stahl, D. A. and Rittmann, B. E., "Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs," *Water Sci. Technol.*, **32**(8), 75~84(1995).
- Zhang, T. C. and Bishop, P. L., "Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm," *Water Environ. Res.*, **68**(7), 1107~1115(1996).
- Lazarova, V., Bellahcen, D., Manem, J., Stahl, D. A. and Rittmann, B. E., "Influence of operating conditions on population dynamics in nitrifying biofilms," *Water Sci. Technol.*, **39**(7), 5~11(1999).
- Kloep, F., Roske, I. and Neu, T. R., "Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor," *Water Res.*, **34**(1), 311~319(2000).
- 김동진, 한동우, 이수철, 박병곤, 권일, 성장근, 박완철, "생물막 반응기에서의 폐수 처리 및 fluorescence in situ hybridization," *한국생물공학회지*, **17**(1), 80~87(2002).
- Wong, M. T., Mino, T., Seviour, R. J., Onuki, M. and Liu, W. T., "In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan," *Water Res.*, **39**, 2901~2914(2005).
- Araya, R., Tani, K., Tagaki, T., Yamaguchi, N. and Nasu, M., "Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 111~119(2003).
- Patil, S. S., Kumar, M. S. and Ball, A. S., "Microbial community dynamics in anaerobic bioreactors and algal tanks treating piggery wastewater," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 353~363(2010).
- Dong, X. and Reddy, G. B., "Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique," *Bioresour. Technol.*, **101**, 1175~1182(2010).
- Mino, T., Satoh, H., Onuki, M., Akiyama, T., Nomura, T. and Matsuo, T., "Strategic approach for characterization of bacterial community in enhanced biological phosphate removal (EBPR) process," In *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology: Molecular Technology, Nutrient Removal, Sludge Reduction and Environmental Health*, Matsuo, T., Hanaki, K., Takizawa, S., and Satoh, H., (Eds.), Elsevier, London(2001).
- Nielsen, P. H., Kragelund, C., Seviour, R. J. and Nielsen, J. L., "Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge," *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 969~998(2009).
- Jang, A., Bishop, P. L., Okabe, S., Lee, S. G. and Kim, I. S., "Effect of dissolved oxygen concentration on the biofilm and in situ analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and microelectrodes," *Water Sci. Technol.*, **47**(1), 49~57(2002).
- Kim, G. T., Webster, G., Wimpenny, J. W., Kim, B. H., Kim, H. J. and Weightman, A. J., "Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell," *J. Appl. Microbiol.*, **101**(3), 698~710(2006).
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Scheleifer, K., "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(5), 1520~1525(1993).

20. Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. and Amann, R., "Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(8), 3721~3726(1999).
21. Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and 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**(3), 792~800(1994).
22. Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A., "Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(6), 2156~2162(1996).
23. Liu, W. T., Nielsen, A. T., Wu, J. H., Tsai, C. S., Matsuo, Y. and Molin, S., "In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process," *Environ. Microbiol.*, **3**(2), 110~122(2001).
24. Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., "Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(7), 2884~2896(1997).
25. Schramm, A., Beer, D., Wagner, M. and Amann, R., "Identification and activities in situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(9), 3480~3485 (1998).
26. Szpyrkowicz, L., Rigoni-Stern, S. and Zilio, F., "Pilot plant studies on tannery wastewater treatment with the objective to reduce sludge production," *Water Sci. Technol.*, **23**, 1863~1871(1991).
27. Kabdasli, I., Tunay, O. and Orhon, D., "The treatability of chromium tannery wastes," *Water Sci. Technol.*, **28**, 97~105 (1993).