

식품폐수 처리 공정용 생물막의 겨울철 세균군집 구조와 특성

이동근[†] · 유기환* · 박성주**

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, *국립수산과학원 생명공학연구단,
**대전대학교 임상병리학과

Structure and Characteristics of Bacterial Community on Biofilm of Food Wastewater Treatment System in Winter

Dong-Geun Lee[†], Ki-Hwan Yoo*, and Seong Joo Park**

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science,
Silla University, Busan, Korea

*Biotechnology Research Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan, Korea

**Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Biofilm and aeration tank of pilot and full RABC (rotating activated *Bacillus* contactor) plant were analyzed to characterize and determine bacterial community structure in food wastewater treatment system at winter. Concentration of heterotrophic bacteria and *Bacillus* group was 10^7 and 10^5 CFU/ml, respectively, at biofilm of pilot-plant while others represented 10^6 and 10^4 CFU/ml, respectively. Five and eight phyla were detected at biofilm of pilot- and full-plant, respectively, by 16S rDNA sequencing. Biofilm of pilot-plant was dominated by β -*Proteobacteria* (38.8%), γ -*Proteobacteria* (22.4%), and *Bacteroidetes* (12.2%), and the most dominant genus was *Zoogloea* genus (22.4%). Candidate division TM7 (12.5%) was only detected at biofilm of full-plant and it was dominated by *Bacteroidetes* (33.3%), γ -*Proteobacteria* (29.2%), and β -*Proteobacteria* (20.8%). *Clostridium* genus specific primer set enabled to detect the sequences of *Clostridium* genus. These suggested that anaerobic and aerobic bacteria were coexisted even from the initial period of biofilm formation and β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were major phyla in biofilm of food wastewater treatment system at winter.

Key words: Bacterial community, Biofilm, Food wastewater, RABC, 16S rDNA

I. 서 론

미생물의 활성을 이용한 생물학적 하폐수처리는 폭기조와 침전지로 구성된 활성슬러지 공정이 널리 사용되어 왔다. 활성슬러지법은 처리수의 수질이 비교적 양호하며 부산물에 의한 오염이 적다는 장점이 있지만 유지관리, 운전비용, 슬러지 발생량 등에서 문제가 있다.¹⁾ 또한 총질소 제거율이 10~20%에 지나지 않는 단점이 있는데,²⁾ 2008년부터 시행된 호소 등의 부영양화 방지를 위한 공공하수처리시설의 방

류수 수질기준이 강화됨에 따라³⁾ 활성슬러지 공정이 아닌 고도처리공법의 도입이 불가피하게 되었다. 고도처리공정으로서 BNR(Biological Nutrient Removal)⁴⁾, B3(Bio Best Bacillus),⁵⁾ A2O(Anaerobic-Anoxic-Oxic)⁶⁾ 등에 관한 연구보고가 있었다. 단위용적당 미생물 수를 높일 수 있는 생물막을 활용하는 담체공법은 담체 표면에 부착된 미생물 응집체(agggregation)에 의한 생물학적 분해 작용으로 인하여 하폐수에 포함된 오염물질의 제거가 잘 되어 체류시간을 줄일 수 있고 수처리의 안정성 확보가 가능하다.^{7,8)}

[†]Corresponding author: Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea, Tel: +82-51-999-6282, Fax: +82-51-999-5636, E-mail: ldg@silla.ac.kr
Received: 25 January 2011, Revised: 21 February 2011, Accepted: 22 March 2011

담체공법인 회전접촉장치(Rotating Biological Contactor, RBC)와 점감폭기법의 결합인 Rotating Activated Bacillus Contactors(RABC) 공정은 *Bacillus* 속 세균을 비롯한 내생포자형성세균집단을 이용하며 난분해성 유기물과 약취성분 제거능이 우수한 것으로 보고되고 있다.^{9,10} 점감폭기법은 에너지 소모가 적고, 생물반응조에 호기성 조건, 혐기적 조건, 무산소적 조건을 구현할 수 있어 질소, 인 제거의 효율을 높일 수 있다.^{9,10}

인간의 삶과 밀접한 수계의 보전 및 환경유지에 중요한 하폐수처리 공정에서 미생물군집이 중요한 역할을 수행하며¹¹) RABC 공정에서 오염물 제거는 주로 생물막 처리단계에서 이루어지므로⁹ 생물막을 구성하는 미생물군집의 구조파악은 필요하다. 동일한 RABC 공정이라도 처리대상 오수의 종류에 따라 미생물군집의 차이가 생길 수 있으며 실제로 동일한 공정이지만 도시하수와 식품폐수 처리 공정에서 서로 다른 군집구조가 보고되었다.^{10,12} 일반적으로 기온이 떨어지는 겨울은 미생물의 활성도 감소하므로 폐수처리공정에서 중요한 미생물 군집에 대한 겨울철 조사도 필요할 것이다. 한편 Jeong 등¹³)은 pilot-plant에서의 군집구조만 보고하여 실제 운전에서 사용된 full-plant와 군집구조에서 차이를 보일 가능성이 있다. 이에 본 연구의 목적은 수질보전을 위한 식품폐수처리 RABC 공정에서 중요한 역할을 수행하는 생물막에 형성된 세균군집구조와 특성을 겨울철에 파악하는 것이었고 더불어 동일한 식품폐수를 처리하는 pilot-plant와 full-plant의 생물막에 형성된 세균군집을 도시하수 처리용 RABC 생물막의 세균군집과¹⁰) 비교하였다.

II. 연구방법

1. 처리시스템 및 시료채취

연구에 사용된 plant의 구조를 Fig. 1에 나타내었다. Pilot-plant 공정과 공장폐수 실처리용 full-plant 공정의 기본 구조는 유사하였다. 폐수는 생물막, 폭기조 1-2-3 순서로 처리되며 용존산소 농도는 생물막에서 0.5~1.0 ppm 사이이며 폭기조(aeration tank)에서는 점감폭기 방식으로 운영하여 폭기조 1에서 1.0~1.5 ppm, 폭기조 2에서 0.4~0.5 ppm, 폭기조 3에서 0.1~0.2 ppm 범위였다. Pilot-plant 공정의 폐수

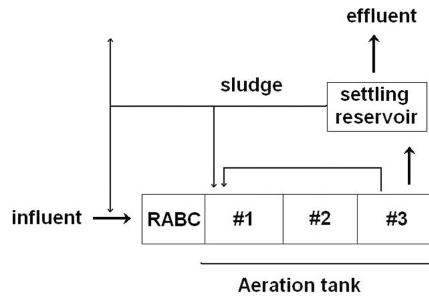


Fig. 1. Schematic diagram of wastewater treatment system.

처리용량은 0.5 m³/day 규모였고, full-plant 공정의 폐수처리용량은 1300 m³/day 규모였다. Pilot-plant와 full-plant 공정의 생물막 모두 동일 분뇨처리장의 슬러지 케이크를 식종원으로 사용하였고 동일한 돼지 도축 폐수를 유입수로 사용하였다. 2007년 2월초에 시료를 채취하였는데 pilot-plant 공정은 접종 후 3일째였고 full-plant 공정은 접종 후 45일 정도 소요된 상태였다. 냉장상태로 6시간 이내에 실험실로 운송한 생물막 시료의 일부를 초저온냉동(-65°C)하여 미생물 군집의 변화를 최소화하였고 생물막 시료 일부와 폭기조 1의 시료는 세균계수용으로 사용하였다.

2. 세균탈착과 배양계수

시료를 손으로 3분 이상 아주 세게 흔들면서 교반하여 잘 섞은 후 시료 5.0 ml씩을 멸균된 45.0 ml의 0.85% NaCl 희석수가 담긴 falcon tube에 넣었다. 세균탈착과정은 교반(vortexing) 1분, 얼음에 꽂아두기 1분, 초음파세척(Branson sonicator 7150, USA) 1분, 얼음에 꽂아두기 1분의 총 4단계로 거쳤다.¹⁴) 세균탈착과정을 연속적으로 3회 실시한 후에 시료 침전물과 세포가 함유된 상층액을 분리하기 위해 원심분리하였다(1000×g, 2분). 세균탈착액을 희석수로 연속희석한 후에 *Bacillus* 그룹 세균과 호기성 종속 영양세균의 농도를 측정하였다. 연속희석된 시료를 *Bacillus* 선택배지(Fluka #11703)와 TSA 한천배지(Tryptic Soy agar media, Difco)에 도말하였고 37°C에서 48시간 배양한 후에 생성된 세균집락(colony)을 계수하였다.

3. 세균군집구조 분석

생물막 시료의 세포벽 파괴와 DNA 추출 그리고

Table 1. Sequence, position to *E. coli* 16S rRNA, size of PCR product (base pairs, b.p.) and annealing temperature (°C) of used primer set for polymerase chain reaction

Primer set	Primer Sequence	Primer Positionvs <i>E. coli</i> 16S rRNA [†]	PCR Product (b.p.)	Annealing Temperature (°C)
Bacterial universal	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 5'-GGYTACCTTGTACACTT	27F 1492R	~1480	50.0
<i>Bacillus</i> specific	5'-TCACCAAGGCRACGATGCG 5'-CGTATTACCCGCGGCATG	255F 1350R	~1095	63.0
<i>Clostridium</i> specific	5'-CTCAACTTGGGTGCTGCATTT 5'-ATTGTAGTACGTGTAGTACCC	586F 1205R	~619	60.0

PCR은 각 시료에 대해 duplicate로 실시하였다. 냉동 보관한 시료 1.0 ml을 취하여 eppendorf tube에 넣고 14000×g에서 5분간 원심분리한 후에 상층액을 버리고 pellet을 취하였다. 세포벽 파괴를 위하여 eppendorf tube를 parafilm으로 밀봉하고, -75°C에 보관된 99% 에탄올 용액에 담귀 10분간 냉동하고, 80°C에서 3분간 처리하는 과정을 총 3회 반복하였다. Genomic DNA 추출을 위하여 Mo-Bio 회사(USA)의 PowerMax Soil DNA Isolation Kit를 이용하였다. PCR primer는 bacterial universal primer, 호기성 포자생성세균인 *Bacillus* 속 특이 primer, 혐기성 포자생성세균인 *Clostridium* 속 특이 primer set 등 총 3종을 이용하였다(Table 1). PCR 반응액의 조성은 10X Pyrobest buffer 2.5 µl, 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate(dNTPs) 2 µl, 10 pM each oligonucleotide primer 1 µl, genomic DNA 2 µl, 2U of Pyrobest(Takara)였으며 멸균된 무이온 증류수(deionized distilled water)를 첨가하여 최종 25 µl로 하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 전처리한 후 denaturation(94°C), annealing(Table 1), extension(72°C) 과정을 35회 반복하였고 각 과정을 1분간 처리하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 final extension을 하였다. PCR 반응에는 Perkin Elmer Geneamp 2400 PCR System을 이용하였고 PCR 반응물은 4°C에서 보관하였다.

형질전환 및 형질전환체의 확인은 전반적으로 Sambrook 등¹⁵⁾을 따랐다. 배양한 재조합 균체를 14000×g, 3분의 원심분리로 회수한 후, Quiagen plasmid purification kit를 이용하여 재조합 플라스미드를 추출, 정제하였다. 정제가 완료된 재조합 플라스미드를 서열결정 전문회사인 솔젠트(주)에 의뢰하여 재조합된 16S rDNA 염기서열을 결정하였다.

4. 염기서열 분석

솔젠트(주)으로부터 얻은 16S rDNA의 염기서열을 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 이용하여 GenBank에 있는 염기서열정보와 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 배양 계수 및 처리효율

Table 2는 배양법으로 파악한 종속영양세균과 *Bacillus* 속의 농도 그리고 *Bacillus* 속 세균의 비율을 나타내는 표이다. 종속영양세균은 pilot-plant만 10⁷ CFU/ml 수준이었고 나머지는 10⁶ CFU/ml 수준이었다. *Bacillus* 속은 10⁴ 내지 10⁵ CFU/ml 수준으로 파악되었다. 종속영양세균과 비교한 *Bacillus* 속의 비율은 모든 시료가 1.0% 이하로 낮게 나타났다. Pilot-plant 생물막이 *Bacillus* 속 세균과 종속영양세균의 농도가 다른 시료들에 비해 ml 당 1 order 정도 높은 값을 보였고 다른 시료들은 유사하였다. 종속영양세균에 대한 *Bacillus* 속 세균의 농도는 처리대상 폐수의 수질과 계절에 따라 0.1% 이하에서 34.0%까지 다양하였고 본 연구결과와 같이 겨울에 가장 낮았다.¹²⁾ *Bacillus* 속과 같은 포자생성균은 영양분의 결핍이나 DO 농도가 낮으면 내생포자(endospore)를 형성하고 성장에 필요한 조건이 다시 형성되면 포자가 발아하여 영양세포로 성장하며 RABC 공정에서 중요한 역할을 수행한다.⁹⁾ Table 2의 *Bacillus* 속 세균의 농도는 *Bacillus* 배지 위에서 도말(loading)법을 적용한 후 성장한 세균점락(colony)을 종류별로 분류하고 계수한 후에, 각 콜로니 종류별로 순수분리한 세균을 대상으로 27F-1492R의 bacterial universal primer set을 적용하여 16S rDNA를 증폭시킨 후에 염기서열을 분석한 결과를 바탕으로

Table 2. Numbers of *Bacillus* and heterotrophic bacteria (CFU/ml) and ratio of *Bacillus* (%) in biofilm and wastewater of aeration tank 1 of pilot- and full-plant

Sample		No. of <i>Bacillus</i> (A)	No. of heterotrophic bacteria (B)	% of <i>Bacillus</i> (A/B×100)
Pilot-plant	Biofilm	1.0×10 ⁵	1.3×10 ⁷	0.76
	Aeration tank 1	3.0×10 ⁴	9.3×10 ⁶	0.32
Full-plant	Biofilm	6.0×10 ⁴	9.8×10 ⁶	0.61
	Aeration tank 1	5.0×10 ⁴	6.4×10 ⁶	0.78

로 계수한 것으로, 크기 2 mm 이상의 흰색 혹은 노란색 세균집락이 *Bacillus* 속으로 파악되었다.¹²⁾

처리대상 식품폐수는 시료채취월인 2007년 2월에는 BOD 2000 mg/l, TN 250 mg/l, TP 50 mg/l 수준이었고 2005년 1월부터 2007년 2월까지의 평균 BOD는 1899 mg/l, TN은 309 mg/l, TP는 83 mg/l이었다.¹²⁾

Full-plant는 평균적으로 유입수의 BOD 99.6%, TN 96.9%, TP 98.2 %를 제거하였고 시료채취월에도 유사하였다. Pilot-plant에서도 오염물 제거능이 우수하여 전체 공정을 거친 후 SCOD 91.4%, NH₃-N 97.9%, PO₄-P 96.8%가 제거되었고 TN의 97.6%와 TP의 96.4%가 제거되었는데¹²⁾ 이러한 처리효율은 DNR(Daewoo Nutrient Removal) 공정의 TN 67.8%, TP 80.6%에 비해 15.8% 이상 높은 것이었다.²⁾ Shin 등도 미생물의 생물막 형성에 도움을 주는 매디아의 첨가가 하수의 질소제거 효율은 많이 증진시킨다고 보고하였다.¹⁾ 일반 RBC 반응조의 생물막 두께가 1-2 mm인데 비하여 RABC full-plant 공정의 생물막 두께가 30-40 mm로 미생물이 고농도이며 다양한 생물상에 의해 COD 및 인산염의 제거와 질산화가 활발하게 일어나는 것이라고 판단되었으며 pilot-plant와 full-plant 모두 우수한 약취 제거능을 보고하였다.¹²⁾

2. 세균군집구조

RABC 공정의 오염물 처리에서 중요한 역할을 수행하는 생물막에 형성된 세균군집구조를 Table 1의 bacterial universal primer set를 적용한 후 16S rDNA 염기서열 결정으로 파악한 결과를 Table 3에 나타내었다. Chimera 등을 제외하고 분석에 사용된 염기서열의 수는 pilot-plant와 full-plant 생물막 각각 49개와 48개였다. 본 연구 수행 당시와 달리 최근에는 NGS(next generation sequencing) 기술의 발달로 예

전보다 저렴하게 훨씬 많은 수의 16S rDNA 유전자 분석이 가능하므로 즉 많은 수의 염기서열을 이용할 수 있으므로 향후 미생물 군집 연구에 유용할 것으로 사료된다. 검출된 문(phylum)의 수를 보면 pilot-plant가 8개, full-plant가 5개로 full-plant의 군집구조가 단순화된 것으로 파악되었다. Full-plant에서는 특별히 많이 관찰된 속(genus)이 없었지만 pilot-plant에서 가장 많이 관찰된 속은 β -Proteobacteria에 속하는 *Zoogloea* 속으로 전체 군집의 22.4%를 차지하였다. *Zoogloea* 속은 생물막 형성에서 중요한 역할을 수행하고¹⁶⁾ 도시하수 처리¹⁷⁾에서 풍부하게 존재하며 윤활유를 분해하는 능력 등을 가지는 것¹⁸⁾으로 보고되고 있어 오염물질 분해에도 관여하는 것을 알 수 있었다.

Table 3을 보면 pilot-plant 생물막에서 가장 우점한 그룹은 β -Proteobacteria(38.8%)였고 γ -Proteobacteria(22.4%), *Bacteroidetes*(12.2%) 순서였고 Full-plant 생물막은 *Bacteroidetes*(33.3%)가 가장 우점하였고 γ -Proteobacteria(29.2%), β -Proteobacteria(20.8%), candidate division TM7(12.5%) 순서였다. 생물학적 폐수처리 공정에서 세균 군집은 대부분 유기물 농도가 높은 환경에서 유리한 β -Proteobacteria와 γ -Proteobacteria가 최대 군집이란 보고와 함께^{19,20)} 식품 폐수처리에서는 *Firmicutes*도 주요 군집으로 보고되었다.²¹⁾ Park 등은 도시하수를 처리하는 RABC 공정에서 *Firmicutes*가 43.9%로 가장 우점하였고 *Bacteroidetes*(17.6%)와 β -Proteobacteria(14.3%)가 우점하고 있다고 보고하였다.¹⁰⁾ 동일한 식품폐수를 처리했던 pilot-plant와 full-plant의 생물막을 구성하는 세균군집 구조가 차이를 보인 원인은 첫째 가동 시간의 차이로 판단되었다. 동일한 생물막도 시간에 따라 파악되는 세균의 종류가 달라지는데¹³⁾ pilot-plant는 가동 3일째였고 full-plant는 가동 45일 정도

Table 3. Comparison of bacterial communities in biofilms of the RABC process for the treatment of food wastewater and municipal wastewater

Phylum	Class	Order (Family)	Municipal wastewater	This study	
			(Park <i>et al.</i> 2007) ⁽²⁾	Pilot-plant	Full-plant
			%	%	%
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	40.6	2.0	
		Bacillales	2.2		
		Bacilli	1.1	2.0	
		sum	3.3	2.0	
	Sum		43.9	4.0	
Bacteroidetes			17.6	12.2	33.3
Proteobacteria	Gammaproteobacteria		8.8	22.4	29.2
		Betaproteobacteria	14.3	38.8	20.8
	Alphaproteobacteria		4.4	2.0	
		Deltaproteobacteria	1.1		
	Sum		28.6		
Actinobacteria	Actinobacteria		1.1		
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	1.1		
Planctomycetes			4.4		
Verrucomicrobia			1.1		
Chloroflexi	Dehalococcoidetes			2.0	2.1
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales		4.0	
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	2.2	4.0	
Fusobacteria	Fusobacteriales				
Cyanobacteria				2.0	
Candidate division TM7				4.0	12.5
Environmental samples				4.0	2.1
Total			100.0	100	100

가 지난 후에 시료를 채취하였다. 그리고 생물막 처리단계에서의 체류시간은 pilot-plant가 4.5시간 full-plant가 0.23시간이었는데 이러한 운전조건의 차이 등도 영향을 줄 수 있었을 것으로 판단되었다.

원활한 운전이 되는 full-plant 생물막에서만 관찰된 candidate division TM7은 현재까지 배양된 균주가 없는 세균 군집으로, 다양한 환경에서 발견되는 그람양성세균으로 분류가 불완전하며 간균, 구균, 사상균 등 다양한 형태가 있고, 일부는 하수처리에서는 슬러지 팽화 현상을 일으킨다고 보고되었다.^{22,23)} 또한 Jeong 등도 pilot-plant의 운전 안정화 단계에서 candidate division TM7이 우점한다고 보고하여¹³⁾ 실제 원활한 운전이 되는 full-plant에서 검출된 본

연구와 일치하였다.

Jeong 등¹³⁾은 돼지도축 폐수를 유입수로 사용한 RABC 공정에서 27F와 785R primer set를 이용하여 생물막의 세균군집을 공정 가동 1, 13, 27, 125 일째 등 총 4번 분석하였는데 *Bacteroidetes*가 공정 가동 1일째 30% 이상에서 27일째까지 감소하다가 125일째 최대 군집으로 50%를 차지한다고 보고하였는데, 본 연구에서는 pilot-plant 생물막에서 12.2% 검출되었고 full-plant 생물막에서 33.3% 검출되었다 (Table 3). Jeong 등은 호기와 혐기 환경의 반복이 *Bacteroidetes*의 우점과 연관이 있는 것으로 보고하였다.¹³⁾

RABC 공정의 생물막을 대상으로 본 연구와 동일

한 PCR 조건과 primer set을 사용한 연구는 Park 등과 Sung의 보고가 있었다.^{10,26)} Park 등은 도시하수 처리공정의 생물막을 봄에 분석하여 내생포자를 형성하는 *Firmicutes* 문의 비율이 43.9%였는데¹⁰⁾ 본 연구에서는 낮았다(Table 3). Sung은 본 연구와 동일한 full-plant 생물막을 여름에 분석하여 β -*Proteobacteria*(32%)가 가장 우점하였고 내생포자형성세균의 비율이 17.3%였으며 *Actinobacteria* 문의 비율이 18.3%라고 밝혔는데²⁶⁾ 본 연구에서는 전혀 검출되지 않았다. 따라서 겨울에도 full-plant RABC의 식품폐수처리 효율이 높았지만¹²⁾ 내생포자형성세균의 비율이 낮은 원인에 계절적 요인도 있음을 암시하는 것으로 판단되었다. 본 연구에서 사용된 시료의 수가 적어 일반화시키기는 어렵지만, 이러한 결과는 향후 연구를 위한 토대로는 충분할 것으로 판단되었다.

도시하수처리용 RABC 공정의 생물막을 구성하는 세균군집의 40% 이상이 혐기성이며 내생포자를 형성하는 *Clostridia* 강(class)이고 호기성이며 내생포자를 형성하는 *Bacillus* 속을 포함하는 *Bacilli* 강은 3.3%였다.¹⁰⁾ 본 연구도 full-plant 생물막 시료에 27F-1492R primer set을 적용하였지만 *Clostridia* 강과 *Bacilli* 강에 속하는 염기서열이 전혀 발견되지 않았으며 pilot-plant 생물막에서 *Clostridia* 강과 *Lactobacilli* 강에 속하는 염기서열이 각각 2% 발견되었다(Table 3). 하지만 배양법에서 1% 미만의 *Bacillus* 속 세균이 검출되었고(Table 2) *Clostridia* 강에 속하는 염기서열도 일부만 검출되었다(Table 3). 이러한 결과가 이들 세균이 존재하지 않아서 나타나는 것인지 확인하기 위하여 *Firmicutes* 문에 속하는 *Bacillus* 속²⁴⁾과 *Clostridium* 속²⁵⁾만 특이적으로 증폭시킨다고 보고된 primer set(Table 1)을 사용한

결과를 Table 4와 5에 나타내었다. PCR 산물은 pilot-plant와 full-plant 생물막에서 모두 검출되었으며 형질변환 후 각각 동일한 수 만큼 염기서열을 결정하였다. Wu 등²⁴⁾이 호기성 포자생성균인 *Bacillus* 속에 특이적이라고 보고했던 primer set은 본 연구에서는 특이성이 높지 않아 분석대상 6개의 염기서열 중 1개의 염기서열만 *Bacillus* 속의 16S rDNA 염기서열과 가장 유사하였다(Table 4). 한편 Rekha 등²⁵⁾이 혐기성 포자생성균인 *Clostridium* 속에 특이적이라고 보고했던 primer set은 본 연구에서 분석대상 14개의 염기서열 모두가 *Clostridium* 속이나 *Clostridiales* 과의 염기서열과 유사도가 가장 높았다(Table 5). Full-plant 생물막 시료의 27F-1492R primer set에서 전혀 검출되지 않았던 *Clostridium* 속이 pilot-plant와 full-plant에서 공통적으로 검출되었다(Table 3, 5). 이는 *Clostridium* 속 등 포자생성균이 연구대상 시료에 존재할 가능성이 높음을 나타내는 것이며 생물막 형성초기에 호기성인 *Zoogloea* 속 세균 등과 혐기성인 *Bacteroidetes*, *Clostridium* 속 등이 공존함을 나타내는 것으로 판단된다. 실제로 개선된 full-plant RABC 공정의 생물막을 대상으로 2008년 1월, 4월, 5월 3회의 배양을 통한 생물막 분석에서 ml 당 *Clostridium* 속이 $10^7 \sim 10^9$ CFU/ml이고 *Bacillus* 속이 $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml이었다.¹²⁾

Lim 등²⁷⁾은 절삭유로 오염된 지하수를 처리하는 생물활성탄상에 생성된 미생물군집 분석에 quinone 법을 시도하여 오염물질의 분해가 원활한 위치는 파악하였지만 정확한 세균을 동정할 수는 없었다. Seo 등²⁸⁾은 시흥천의 미생물 군집을 PCR-DGGE로 조사하여 공단지역 상류와 하류가 미생물 군집구조가 완전히 다르며 비교적 적은 수인 10개의 DNA band에 대해 염기서열 분석만을 수행하여 정확한 군

Table 4. Identified *Bacillus* genus sequences derived from the PCR product of *Bacillus*-specific primer set (Table 1). F1~F7 and P1-P7 sequences were originated from biofilm of full- and pilot-plant, respectively

Sample #	Most match	Similarity (%)	NCBI #
Baci-F1	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium	99	AM268354
Baci-F2	Uncultured bacterium clone	99	DQ810017
Baci-F3	Uncultured bacterium clone	99	DQ325561
Baci-P1	Uncultured rumen bacterium	99	EF436301
Baci-P2	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium	99	AM268353
Baci-P3	<i>Bacillus</i> sp.	99	EF522122

Table 5. Identified *Clostridium* genus sequences derived from the PCR product of *Clostridium*-specific primer set (Table 1). F1~F7 and P1-P7 sequences were originated from biofilm of full- and pilot-plant, respectively

Sequence	Most match	Similarity (%)	NCBI #
Clo-F1	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium	93	DQ144105
Clo-F2	<i>Clostridium</i> sp.	99	AM117584
Clo-F3, F7	<i>Clostridium</i> sp.	99	DQ144101
Clo-F4	<i>Clostridium</i> sp.	98	DQ144101
Clo-F5	<i>Clostridium</i> sp.	99	AM042697
Clo-F6	<i>Clostridium</i> sp.	98	AM117583
Clo-P1	<i>Clostridium</i> sp.	99	AM042697
Clo-P2	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium	98	DQ144105
Clo-P3	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium	100	DQ144105
Clo-P4	<i>Clostridium butyricum</i>	99	DQ831126
Clo-P5	<i>Clostridium butyricum</i>	100	DQ831127
Clo-P6	<i>Clostridium</i> sp.	99	DQ144101
Clo-P7	<i>Clostridium</i> sp.	99	AM117584

집구조를 분석할 수 없었다. FISH(fluorescent *in situ* hybridization)법을 이용하여 retrofitting BNR (Biological Nutrient Removal) 공정의 하수처리장에 β -*Proteobacteria*가 우점이며 *Bacillus* 속의 비율은 1% 미만이라는 보고도 있었지만²⁹⁾ FISH법은 잡종화(hybridization)에서 생기는 가짜양성(false-positive) 등의 한계가 있다. Jeong 등은 T-RFLP 분석으로 폐수처리장치의 가동초기와 안정화 단계의 세균군집 구조가 다르다고 보고하면서 염기서열분석을 추가하여 동정하였다.¹³⁾ 본 연구와 같이 16S rDNA 염기서열을 분석하는 것은 시간과 비용이 많이 든다는 한계를 상쇄하여 정확한 분석과 동정이 가능하다는 장점이 있지만 사용된 primer의 종류, PCR 반응 온도와 cycle 수, 주형속에 포함된 부식질 등에 의한 효과 등 여러 변수가 PCR-cloning 결과에 영향을 미쳐 군집구조의 오차가 발생한다고 알려져 있다.³⁰⁾ RABC 공정을 대상으로 한 본 연구와 Park 등¹⁰⁾ 및 Jeong 등¹³⁾의 보고를 비교하면 본 연구와 Park 등¹⁰⁾의 연구에서 사용한 primer set은 Jeong 등¹³⁾의 연구와 차이가 있었고 DNA 추출, 정제 과정은 모두 달랐다.

IV. 결 론

돈도축 식품폐수 실처리용 full-plant 공정과 pilot-

plant 공정의 시료에 대한 배양과 군집구조분석으로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생물막과 폭기조 시료속에 포함된 *Bacillus* 속은 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml 수준이고 종속영양세균은 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 수준으로 *Bacillus* 속의 비율은 1% 미만이었다. 이는 겨울철 낮은 온도에 의한 기존 결과와 상응하는 것이었다.

2. 배양없이 추출한 DNA에 대해 27F-1492R primer set를 이용한 16S rDNA 분석법을 적용한 결과 가동시간이 짧은 pilot-plant 생물막에서 8개 문(phylum)이, 가동시간이 비교적 긴 full-plant 생물막에서 5개 문이 검출되어 full-plant의 생물막 세균군집이 단순한 것으로 판단되었다.

3. Pilot-plant에서 가장 우점한 속(genus)은 *Zoogloae* 속으로 전체군집의 22.4%를 차지하였고, 가장 우점한 종류는 β -*Proteobacteria*(38.8%)였고 γ -*Proteobacteria*(22.4%), *Bacteroidetes*(12.2%)의 순서였으며 full-plant에서는 *Bacteroidetes*(33.3%)가 가장 우점하였고 γ -*Proteobacteria*(29.2%), β -*Proteobacteria*(20.8%), candidate division TM7(12.5%)로 순서로 차이를 보였으며 candidate division TM7은 full-plant에서만 우점하였다.

4. 호기성 포자생성균인 *Bacillus* 속 세균 검출용 primer set는 특이성이 낮았으며 혐기성 포자생성균인 *Clostridium* 속 세균 검출용 primer set는 특이성

이 매우 높았다.

5. Pilot-plant에서 호기성이며 생물막 형성에 관여하는 *Zoogloea* 속 세균과 혐기성인 *Bacteroidetes* 문과 *Clostridium* 속 세균의 염기서열이 함께 검출된 것은 생물막의 형성 초기에 혐기성 조건의 형성이 병행되는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Shin MC, Lee YS. The effects of changing of hydraulic retention time and charging media on the removal of nitrogen and phosphorus in the up-flow anaerobic/anoxic reactor and water-mill for sewage treatment. *J Environ Health Sci.* 2009; 35(1): 64-70.
2. Choi JT, Nam SY. Sewage treatment using a modified DNR process. *J Environ Health Sci.* 2008; 34(6): 446-451.
3. Ministry of Environment Republic of Korea. 2008 White paper on environment. 2009.
4. Kim DS, Park YS. Nutrient removal characterization by the addition ratio of BNR sludge in SBR. *J Environ Health Sci.* 2008; 34(1): 76-85.
5. Ahn TS, Hong SH, Kim OS, Yoo JJ, Jeon SO, Choi SI. The changes of *Bacillus* spp. in municipal wastewater treatment plant with B3 process. *Korean J Microbiol.* 2001; 37(3): 209-213.
6. Park TJ, Lee CM, Song KS, Cho IH, Kim YK, Chung MH. A study on the removal of nitrogen and phosphorus depending on existence of cilia media in sewage in anaerobic-anoxic-oxic process. *J Environ Health Sci.* 2000; 26(3): 69-75.
7. Imai A, Onuma K, Inamori Y, Sudo R. Biodegradation and adsorption in refractory leachate treatment by the biological activated carbon fluidized bed process. *Wat Res.* 1995; 29(2): 687-694.
8. Kutics K, Suzuki M. Attachment and growth of biomass on surface-modified activated carbon fibers. *Wat Sci Tech.* 1992; 26(10): 665-671.
9. Kim EH, Jo YJ, Park SJ, Sin GS, Im SB, Jeong JG. Advanced wastewater treatment process using rotating activated Bacillus contactor (RABC). *J KSWQ.* 2004; 20(2): 190-195.
10. Park SJ, Yoon JC, Shin KS, Kim EH, Yim S, Cho YJ, Sung GM, Lee DG, Kim SB, Lee DU, Woo SH, Koopman B. Dominance of endospore-forming bacteria on a rotating activated bacillus contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *The J Microbiol.* 2007; 45(2): 113-121.
11. Forster S, Lappin-Scott HM, Snape JR, Porter J. Rains, drains and active strains: towards online assessment of wastewater bacterial communities. *J Microbiol Meth.* 2003; 55(3): 859-864.
12. Ministry of Environment, Mechanistic Modeling for Bacillus System, 2008.
13. Jeong S, Nam JH, Bae W, Lee DH. Bacterial community structure of food wastewater treatment system combined with rotating biological contactor and tapered aeration reactor. *Korean J Microbiol.* 2010; 46(2): 169-176.
14. Lee DG, Lee JH, Kim SJ. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World J Microbiol Biotech.* 2005; 21(2): 155-162.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York; 1989.
16. Lu F, Lukasik J, Farrah SR. Immunological methods for the study of *Zoogloea* strains in natural environments. *Wat Res.* 2001; 35(17): 4011-4018.
17. Rossell-Mora RA, Wagner M, Amann R, Schleifer KH. The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(2): 702-707.
18. Jin L, Wang XJ, Gu ZL, Zhou DZ, Xie SQ. Biodegradation of lubricating oil in wastewater with *Zoogloea* sp. *Pedosphere.* 2006; 16(4): 540-544.
19. Lee H, Choi E, Yun Z, Park YK. Microbial structure and community of RBC biofilm removing nitrate and phosphorus from domestic wastewater. *J Microbiol Biotech.* 2008; 18(8): 1459-1469.
20. Silva CC, Jesus EC, Torres AP, Sousa MP, Santiago VM, Oliveira, VM. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *J Microbiol Biotech.* 2010; 20(3): 447-459.
21. Ren N, Xing D, Rittmann BE, Zhao L, Xie T, Zhao X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ Microbiol.* 2007; 9(5): 1112-1125.
22. Hugenholtz P, Tryson GW, Webb RI, Wagner AM, Blackall L.L. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(1): 411-419.
23. Thomsen TR, Kjellerup BV, Nielsen JL. *In situ* studies of the phylogeny and physiology of filamentous bacteria with attached growth. *Environ Micro-*

- biol.* 2002; 4(7): 383-391.
24. Wu XY, Walker MJ, Hornitzky M, Chin J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J Microbiol Meth.* 2006; 64(1): 107-119.
 25. Rekha R, Rizvi MA, Jaishree P. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Elect J Biotechnol.* 2006; 9(5): 505-511.
 26. Sung GM. Structure and characteristics of bacterial communities of the RABC process for food wastewater treatment. Ph.D. thesis. Daejeon University, Daejeon, Republic of Korea; 2010.
 27. Lim BR, Bae CA, Lim HJ, Cho CH. Treatment performance and microbial community structure in BAC-process treating contaminated groundwater by water-soluble cutting oil. *J Environ Health Sci.* 2006; 32(1): 71-76.
 28. Seo KJ, Kim JM, Kim MJ, Kim SK, Lee JE, Kim IY, Zoh KD, Ko GP. Assessing water quality of Siheung stream in Shihwa industrial complex using both principal component analysis and multi-dimensional scaling analysis of korean water quality index and microbial community data. *J Environ Health Sci.* 2009; 35(6): 454-462.
 29. Kim MK, Hong JH, Kim YK, Ahn TS, Shin EB. Evaluation of field application for the developed retrofitting process and analysis of bacterial community structure in pilot-plant. *J Kor Soc Environ Engin.* 2006; 28(3): 240-248.
 30. Ranjard L, Poly F, Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol.* 2000; 151(3): 167-177.