

돼지 도축폐수 처리를 위한 RABC 공정의 생물막 세균군집 구조

성기문¹ · 이동근² · 박성주^{1,3*}

¹대전대학교 대학원 미생물학과, ²신라대학교 제약공학과, ³대전대학교 임상병리학과

The Bacterial Community Structure in Biofilms of the RABC Process for Swine Butchery Wastewater Treatment

Gi Moon Sung¹, Dong-Geun Lee², and Seong Joo Park^{1,3*}

¹Department of Microbiology, Graduate School, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Republic of Korea

³Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

(Received February 11, 2011 / Accepted March 24, 2011)

Culture-independent microscopic observations and 16S rDNA analyses were applied to describe the bacterial community inherent to the biofilm structure of the RABC (Rotating Activated Bacillus Contactors) process for swine butchery wastewater treatment. The ratios of Gram-positive bacterial counts to total bacterial counts of the RABC process were significantly increased in the last aeration tank as well as returned sludge, while those of the existing A2O (Anaerobic-Anoxic-Oxic) process maintained constant from aeration tanks to returned sludge. Totally nine phyla were recovered by 16S rDNA analysis, two of which were major groups: the *Proteobacteria* (64.1%) and the *Actinobacteria* (18.4%). The third major group was the endospore-forming *Firmicutes* (5.4%). The remaining six minor groups are the *Bacteroidetes* (3.3%), the *Chlorobi* (2.2%), the *Nitrospirae* (1.1%), the *Chloroflexi* (1.1%), the *Acidobacteria* (1.1%), and the *Fusobacteria* (1.1%). The ratio of endospore-forming bacteria was 19.4%, which was composed of the members of the *Firmicutes* phylum (5.4%) and the *Intrasporangiaceae* family (14.0%) of the *Actinobacteria* phylum. Nitrifying and denitrifying related- and phosphorus accumulating related-sequences were composed of 6.5% and 5.4% of total community, respectively, these could mean the high capacity of the RABC process to remove odor compounds and reduce eutrophication by efficient removing inorganic nutrients.

Keywords: 16S rDNA, bacterial community structure, biofilm, endospore-forming bacteria, Rotating Activated Bacillus Contactors (RABC), swine butchery wastewater

생태계의 구조와 기능을 파악하기 위한 필수 측정요소로는 첫째, 군집의 구성 즉 미생물의 종류 및 개체수를 알아야하며, 둘째, 각 군집 및 전체의 생물량(biomass)의 파악, 그리고 셋째, 활성도(activity) 파악이 있다(1). 미생물 군집 구조에 대한 조사와 비교를 위해서는 배양기법과 비배양기법이 사용되며, 배양기법은 미생물을 순수분리하여 생리적 특성 파악 등 여러 실험이 가능하다는 장점이 있는 반면, 자연생태계에는 배양 가능한 미생물 비율이 극히 일부분에 지나지 않아 배양기법에 의하여 분석된 군집구조는 전체를 대표하지 못한다는 한계에 부딪치게 된다(13, 14). 배양기법과는 달리 비배양기법은 세균

의 순수분리 과정 등이 없어 군집 각 구성원의 활성이나 생리적 특성을 파악할 수 없는 한계가 있지만, 배양의 한계를 극복할 수 있어 군집 구조를 보다 정확하게 파악할 수 있다는 장점이 있다(13, 21).

2006년을 기준으로 우리나라의 하수도 보급률은 85.5%이며 344개 공공 하수종말처리시설의 시설용량은 23,273천 m³/일로서, 2015년까지 전국 하수도 보급률 90%로 목표로 하고 있다(16). 미생물을 이용한 생물학적 하 폐수처리는 포기조와 최종침전지로 구성된 활성슬러지 공정이 널리 사용되고 있다. 하지만 활성슬러지법은 단위부피당 처리효율이 낮아 넓은 부지를 필요로 하며, 대량으로 생성되는 슬러지 처리 등 2차 오염 문제를 내포하고 있다. 국내에서도 단위부피당 처리효율을

* For correspondence. E-mail: psjj@dju.kr; Tel: +82-42-280-2441; Fax: +82-42-280-2904

향상시키기 위하여 생물막을 이용하거나 슬러지의 재순환 정도를 높이는 시도가 이루어졌다(5, 12).

2008년부터 시행된 호소 등의 부영양화 방지를 위한 공공하수처리시설의 방류수 수질기준이 강화됨에 따라 신설되는 공공하수처리시설은 물론 기존의 2차 처리시설도 부영양화 원인물질로 알려진 질소와 인과 같은 영양염류를 제거할 수 있는 시설로 개선하도록 되어 있다(16). 이러한 고도처리공정으로서는 B3 (Bio Best Bacillus) (2), A2O (Anaerobic-Anoxic-Oxic) (18), RBC (Rotating Biological Contactor) (20) 등에 관한 연구보고가 있었다. 이 가운데 RBC (Rotating Biological Contactor)와 같은 생물막공정의 장점은 유입수 유량과 유기물 농도의 변동에 대해서도 처리효율이 떨어지지 않으며, 상대적으로 적은 부지면적이 소요된다는 것이다.

한편 *Bacillus* 속 세균 등 내생포자형성세균의 우점화를 이용하는 생물막 공법인 Rotating Activated Bacillus Contactors (RABC) 공정은 RBC 공법의 변형으로 생물막공정의 장점 외에 *Bacillus* 속 세균을 비롯한 내생포자형성세균집단에 의한 난분해성 유기물과 악취성분 제거능이 우수한 것으로 보고되고 있다(11, 19). 따라서 RABC 공정에서 내생포자형성세균의 존재 비율을 조사하는 것은 중요하며 이를 위하여 첫째 포자염색(2)을 들 수 있다. 하지만 포자염색은 포자가 발아되면 관찰이 불가능하며 폐수시료 속에 포함된 불순물 등에 의해 관찰이 어려운 한계가 있다. 둘째 FISH (fluorescent *in situ* hybridization)의 적용인데(2), 다양한 종류의 내생포자형성세균에 맞게 probe 숫자를 늘려야 하는 단점이 있다. 셋째 세균군집에 대한 16S rDNA 분석으로 내생포자형성세균의 비율 파악이 가능하다. Park 등(19)은 도시하수 처리를 위한 RABC

공정의 생물막에 대한 16S rDNA를 분석하는 비배양기법의 군집구조 분석을 통하여, *Clostridium* 속과 *Bacillus* 속 등 내생포자를 형성하는 *Firmicutes* 문의 비율이 43.9%로 우점하고 있음을 밝혔다. 16S rDNA 분석은 비교적 시간과 비용이 많이 소모되지만 염기서열의 동정을 통한 정확한 분석이 가능하다. 한편 포자형성세균은 대부분 그람양성세균이므로 그람염색을 적용하면 포자를 형성하지 않는 그람양성세균까지 계수되는 단점이 있지만 내생포자형성세균의 과소평가는 방지할 수 있다.

Park 등(19)은 도시하수를 처리하는 RABC 공정의 생물막을 구성하는 세균군집구조 파악에 16S rDNA 분석을 적용하였다. 하지만 동일한 RABC 공정이라도 유입되는 유입수의 유기물 성분과 농도 등에 따라서 세균군집의 구조가 다를 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 도시하수보다 오염물질 농도가 훨씬 높은 고농도의 돼지 도축폐수를 처리하는 RABC 공정에서 생물막을 구성하고 있는 세균집단의 군집구조를, 16S rDNA의 염기서열을 분석하는 분자생물학적 기법을 사용하여 파악하고, 계통수를 작성함과 동시에 내생포자형성세균의 비율을 조사하고자 하였다. 또한 A2O 공정의 시료와 비교하여 각 처리단계별 총세균수와 포자형성균이 포함되는 그람양성세균수를 계수하였다.

재료 및 방법

시료채취

Figure 1은 연구에 사용된 RABC와 A2O 공정의 모식도이다. 경상북도 김천 소재의 돼지 도축폐수를 처리하는 실증

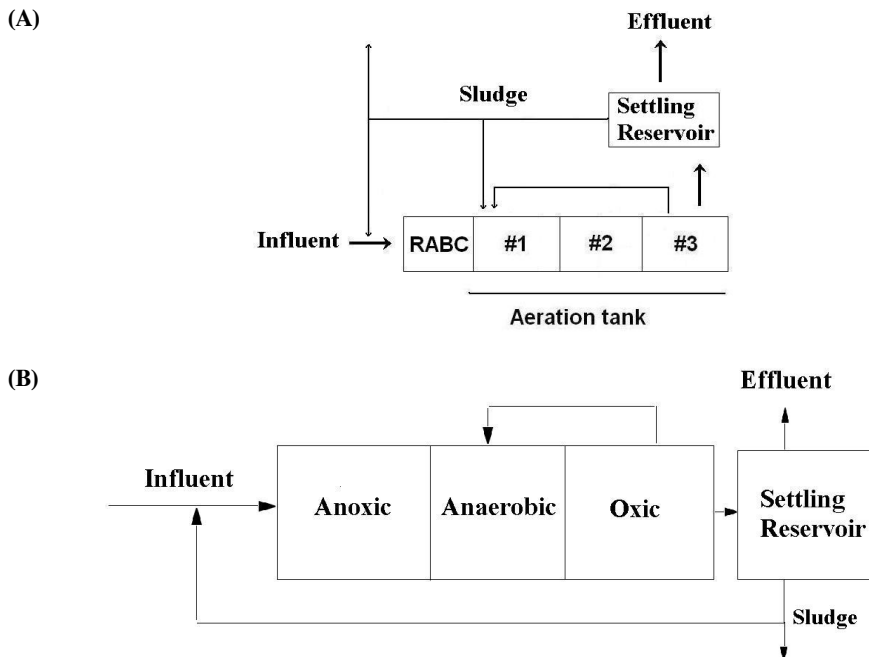


Fig. 1. Schematic diagram of RABC (A) and A2O (B) wastewater treatment systems.

RABC 처리장(1,300 m³/일)의 생물막, #1 포기조, #3 포기조, 반송슬러지 시료와 대전광역시 소재로 A2O 공정으로 운영되는 처리장의 호기조와 반송슬러지 시료를 채취하여 냉장상태로 6시간 이내에 실험실로 운송한 후 일부를 초저온냉동(-65°C)하여 미생물 군집의 변화를 최소화하였고, 이후 냉동보관한 시료 1.0 ml을 취하여 eppendorf tube에 넣고 14,000×g에서 5분간 원심분리한 후에 상층액을 버리고 pellet을 취하였다.

그람양성세균수와 총세균수 계수

냉장상태로 운반된 시료를 손으로 3분 이상 아주 세게 흔들면서 잘 섞은 다음, 시료 5.0 ml씩을 멸균된 45.0 ml의 0.85% NaCl 용액에 담긴 falcon tube에 넣어 시료를 1/10로 희석하였다. 세균탈착 과정은 교반(vortexing) 1분, 얼음에 꽂아두기 1분, 초음파세척(Branson sonicator 7150, USA) 1분, 얼음에 꽂아두기 1분의 총 4단계를 거치며(14), 이 과정을 연속적으로 3번 반복하였다. 세균탈착과정을 연속적으로 3회 실시한 후에, 불순물을 제거하기 위하여 1,000×g에서 1분간 원심분리함으로써 시료 침전물과 세포가 함유된 상층액을 분리하였다. 세포 염색을 위해서 먼저 세포가 탈착된 상층액 시료 300 µl을 polycarbonate 여과지(지름 25 mm, 구멍크기 0.22 µm)에 여과한 다음, 여과멸균된 증류수 1 ml로 세척·여과하였다. 여과지에 걸러진 세포의 그람염색은 Hucker 염색법을 따랐다(8). 총세균수 계수를 위한 형광염료로서 5.0 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, USA) 용액 1 ml를 첨가하여 5분 동안 염색한 후 여과멸균수로 세척하였다(2).

세포 계수를 위해서는 1/10로 희석된 시료의 세포가 탈착된 상층액 300 µl을 여과한 여과지를 3-5장 만들고, 각각의 여과지를 현미경으로 관찰하면서 세균수를 세었다. 세균 계수는 접안렌즈 grid의 큰 정사각형 25개 가운데 중앙의 6개 큰 정사각형에 포함된 세포만을 세었으며, 재물대를 무작위로 움직이면서 최소 30 field 이상의 세포수를 센 후 이를 산술평균하였다. 광학/형광/위상차 현미경(Axioskop 50, Carl Zeiss, Germany)을 ×1600의 배율로 관찰하였다. 세균수 계수를 위해 여과면적과 현미경 시야의 면적 비율에서 구한 환산계수(135,989)와 희석배율(1/10), 그리고 시료량(0.3 ml)을 적용하여 세포수를 cells/ml의 단위로 나타내었다. 통계분석 프로그램인 SPSS (V12.0) (SPSS Inc.)를 이용하여 t-test를 수행하여 세포수와 세포크기 변화를 통계적으로 분석하였다.

세포벽 파괴

세포벽 파괴와 DNA 추출은 각 시료에 대해 duplicate로 실시하였다. 세포벽 파괴를 위하여 효소처리와 freeze-thaw 방법을 병행하였다. 원심분리에서 얻어진 pellet 0.25 g를 lysozyme (Sigma-Aldrich)과 lysostaphin (Sigma-Aldrich)용 완충용액으로 풀어헤친 후에, lysozyme과 lysostaphin을 각각 10 mg/L 농도로 37°C에서 2시간 처리하였다. 이후 eppendorf tube를 parafilm (Sigma-Aldrich)으로 밀봉하고, -75°C에 보관된 99%

에탄올 용액에 담가 10분간 냉동하고, 80°C에서 3분간 처리하는 과정을 총3회 반복하여 세포벽이 파괴되도록 하였다.

DNA 추출 및 PCR

전체 미생물군집에서 genomic DNA 추출을 위하여 Mo-Bio 회사(USA)의 PowerMax™ Soil DNA Isolation kit를 이용하였다. 전체 세균군집의 16S rDNA 증폭을 위하여 bacterial universal primer set인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)와 1492R (5'-GGYTACCTTGTACGACTT)를 사용하였다. 총 PCR volume은 25 µl로 하였으며 DNA template는 2 µl 사용하였다. 그리고 PCR 반응은 각 시료별로 duplicate로 하였다. PCR 반응액의 조성은 10× Pyrobest buffer 2.5 µl, 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) 2 µl, 10 pM oligonucleotide primer 1 µl, genomic DNA 2 µl, Pyrobest (TaKaRa, Japan) 2 U이었으며, 멸균된 무이온증류수(deionized distilled water)를 첨가하여 최종 25 µl로 하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 3분간 전처리한 후 denaturation (94°C, 1.5 분), annealing (50°C, 1분), extension (72°C, 2분) 과정을 35회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 30분간 final extension을 하였다. PCR 반응에는 MJ Research Inc. (USA)의 PTC-100™을 이용하였으며, PCR 반응물은 4°C에서 보관하였다.

형질전환 및 형질전환체 확인

전반적으로 Sambrook 등(22)을 따랐다. PCR 증폭 산물을 전기영동시켜 1,500 bp 정도의 DNA 길이를 나타내는 gel을 멸균된 면도칼로 절단한 다음, PCR Purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였다. PCR 증폭 산물의 ligation은, pGEM-T Easy vector system II (Pomega, USA)을 이용하여 16°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응물은 pGEM-T Easy vector 1 µl, 10× T4 DNA ligase buffer 1 µl, T4 DNA ligase (3 U/µl) 1 µl, PCR product DNA (18 ng)을 넣고 무이온수를 채워 10 µl로 하였다. Ligation이 완료된 벡터 5 µl를 competent *E. coli* DH5α 균주 50 µl와 섞고, 얼음 위에서 1시간 방치한 후 42°C에서 90초간 열처리 하였으며, 이후 다시 얼음 위에 10분간 방치하는 Sambrook 등(22)의 방법에 따라 형질전환을 수행하였다. 형질전환 단계가 끝난 대장균에 LB 액체배지 1 ml을 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하였으며, 미리 준비한 선택배지(ampicilin 60 mg/ml, X-gal 20 mg/ml, IPTG 0.1 M)에 형질전환된 *E. coli* DH5α를 도말하였다. 37°C에서 24시간 배양된 선택배지 상에서 흰색의 세균 집락(colony)을 확인한 다음, 이쭉시개와 ampicilin이 함유된 LB 한천 선택배지에 반복 복제(replication)하여 형질전환 여부를 확인하였다.

재확인된 집락을 대상으로 colony PCR을 수행하여, 증폭된 16S rDNA가 pGEM T-easy vector에 제대로 연결되었는지 (ligation) 확인하였다. Colony PCR은 집락 일부를 10 µl의 멸균된 무이온수에 이쭉시개를 이용하여 희석하였으며, 100°C에서 10분간 끓여 세포를 파괴하였다. PCR 용액의 조성 및 반응조건은 27F-1492R primer의 조건과 같았으며, T7 primer

Table 1. Comparison of numbers of Gram-positive cells and total bacterial cells in bioreactors between the RABC process and the A2O process.

Method	Category	Range	RABC process				A2O process	
			Biofilm	#1 Aeration tank	#3 Aeration tank	Returned sludge	Oxic tank	Returned sludge
Direct count (cells/ml)	Gram-positive cells (A)	Minimum	5.44×10^7	9.07×10^6	9.52×10^7	2.27×10^7	2.72×10^7	4.53×10^6
		Maximum	1.31×10^9	2.63×10^8	1.33×10^9	1.40×10^9	2.86×10^8	4.35×10^8
		Average	4.79×10^8	8.51×10^7	7.21×10^8	5.50×10^8	1.13×10^8	1.35×10^8
	Total bacterial cells (B)	Minimum	7.08×10^8	4.08×10^7	1.81×10^7	1.81×10^7	9.97×10^7	4.53×10^7
		Maximum	3.05×10^9	3.85×10^8	1.90×10^8	1.90×10^8	5.85×10^8	9.52×10^8
		Average	1.50×10^9	7.76×10^7	5.55×10^7	5.75×10^7	2.80×10^8	2.77×10^8
	A/B (%)	Minimum	14	4	457	461	8	9
		Maximum	82	129	5600	4700	140	357
		Average	32	110	1282	958	40	49

(5'-TAATACGACTCACTATAGGG)와 SP6 primer (5'-CGA TTAGGTGACACTATAG)를 사용하였고, annealing temperature는 50°C로 하였다. PCR 반응산물을 전기영동한 결과 16S rDNA PCR 산물보다 약 200 bp가 더 긴 1,700 bp 정도의 산물이 확인된 집락은, 다른 세균에서 기원된 외래 16S rDNA PCR 산물을 갖는 것으로 간주하고 다음 실험의 재료로 이용하였다.

재조합 플라스미드 추출

외래 16S rDNA를 포함하는 재조합체를 대상으로 재조합 플라스미드(plasmid)를 추출하였다. 즉 colony PCR로 확인된 집락을 ampicilin이 함유된 LB 액체배지 4 ml에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양한 집락을 14,000×g, 3분의 원심분리로 회수한 후, QIAGEN 회사의 plasmid purification kit (USA)를 이용하여 재조합 플라스미드를 추출, 정제하였다.

16S rDNA 염기서열 결정

정제가 완료된 재조합 플라스미드를 서열결정 전문회사인 마크로젠(주)에 의뢰하였으며, M13과 reverse M13 프라이머로서 16S rDNA를 증폭하여 염기서열을 결정하게 하였다. 통계학적 유의성을 위하여 100개의 염기서열을 분석하였다. 마크로젠(주)으로부터 얻은 16S rDNA의 염기서열을 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 이용하여 GenBank에 있는 염기서열정보와 비교하였다. 시료 및 GenBank데이터베이스의 염기서열은 Clustal X (version 1.81) 프로그램으로 정렬하였고 프로그램의 option인 neighbor-joining method에 의해 계통수를 추론하였다. 계통수의 신뢰도를 검정하기 위한 Bootstrap 값은 1,000회로 하였다. 한편 본 연구에서 확인된 염기서열은 GenBank에 HM773442부터 HM773533까지의 기탁번호(accession no.)로 등록되어 있다(Table 2).

결과

그람양성세균수와 총세균수

Table 1은 RABC 공정의 생물반응조인 생물막(RABC-Bf), #1 포기조 폐수(RABC-#1), #3 포기조 폐수(RABC-#3), 반송슬러지(RABC-RS)의 그람양성세균수와 총세균수를, 기존고도처리공정인 A2O 공정의 호기조 폐수(A2O-OT)와 반송슬러지(A2O-RS)에서의 세균수와 비교한 것이다. RABC 공정의 그람양성세균수는 생물막에서 8 log 수준이던 것이, #1 포기조에서 7 log로 감소하였다가 #3 포기조에서 다시 8 log로 회복되었다. 반면 총세균수는 생물막에서의 9 log 수준이 후속되는 #1 포기조에서 감소한 7 log 수준에 불과하였다. #1 포기조에서 그람양성세균의 비율이 100% 이상이 된 것은, #1 포기조 시료는 세포 밀도가 생물막 시료에 비해 낮아 형광이 아주 희미하여 관찰이 불가능하였던 반면, 현미경 시야에서 붉은색이 아닌 검게 나타나는 세포 모양은 모두 보라색으로 간주하여 그람양성세균으로 계수하였기 때문이다. 기존고도처리공정인 A2O 공정의 호기조 폐수의 그람양성세균수는 RABC #3 포기조와 같은 8 log 수준을 유지하고 있기는 하지만, 총세균수에 대한 비율은 40%로서 RABC #3 포기조의 1282% 보다는 훨씬 낮게 나타났다(Table 1). 그람양성세균수와 총세균수 모두 인접 시료간에 농도변화의 유의성이 확인되었다(t -test: $p < 0.001$). 이러한 결과는 처리대상 폐수의 종류가 달라도 도출될 수 있지만 동일한 하수를 처리하는 다른 공정들을 비교하였을 때 RABC 공정에서 그람양성에 속하는 바실러스속 세균의 비율이 높았다는 보고(19, 24)에서와 같이 RABC 공정이 그람양성세균의 비율을 높인다는 기존 결과와 상응하는 것이었다.

RABC 생물반응조의 세포수는 기존공정인 A2O 호기조보다 ml당 평균적으로 그람양성균이 423%, 총세균이 536% 각각 많게 나타났다. 특징적인 것은 모두 1,600×의 동일한 배율로 관찰하였는데, DAPI로 염색한 세포의 크기를 비교하면 생물막 세포가 다른 시료에 비해 크다는 것이었다($p < 0.001$).

Table 2. Origin of most similar sequences and accession number at GenBank from biofilms of the RABC process by this study. Number in parenthesis represents the number of each clone and accession number of most similar sequence.

Origin of most similar sequences	GenBank accession number (Clone #, accession # of most similar sequences) of this study			Total #
Activated sludge	HM773442 (A01, EU104279)	HM773442 (A04, Y18616)	HM773447 (A05, Y14596)	29
	HM773452(A11, EU104270)	HM773454 (B01, EU283348)	HM773462 (B09, EU518930)	
	HM773465 (B12, EU104279)	HM773477 (C12, EU104318)	HM773479 (D02, EU104279)	
	HM773489 (D12, EU104279)	HM773495 (E06, EU104279)	HM773498 (E10, X85212)	
	HM773499 (E11, EU104227)	HM773501 (F01, EU518930)	HM773502 (F02, EU104321)	
	HM773503 (F03, Y18616)	HM773505 (F05, DQ147285)	HM773506 (F06, EU518930)	
	HM773509 (F09, EU104345)	HM773511 (F11, EU518930)	HM773509 (G09, AB000700)	
	HM773510 (G10, Y18617)	HM773524 (H02, EU104279)	HM773525 (H03, Y14597)	
	HM773526 (H04, GU325836)	HM773528 (H06, EU104227)	HM773531 (H09, EU104282)	
Anaerobic sludge	HM773457 (B04, AB195904)	HM773474 (C09, CU918140)	HM773481 (D04, GU455281)	9
	HM773487 (D10, GU455339)	HM773500 (E12, CU919912)	HM773507 (F07, CU925875)	
	HM773510 (F10, CU926331)	HM773522 (G12, EF688214)	HM773529 (H07, CU917776)	
Wastewater sludge	HM773448 (A07, AF513091)	HM773449 (A08, FJ66058)	HM773451 (A10, CU927719)	6
	HM773444 (B05, CU927719)	HM773459 (B06, FJ660512)	HM773523 (H01, FJ660575)	
EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) sludge	HM773450 (A09, DQ413110)	HM773476 (C11, DQ413120)	HM773483 (D06, EU834774)	4
	HM773521 (G11, DQ413120)			
Membrane bioreactor	HM773456 (B03, FM201001)	HM773475 (C10, GQ249355)	HM773478 (D01, FM201089)	5
	HM773494 (E05, FM200987)	HM773512 (F12, AY168745)		
Sludge undergoing ATAD	HM773460 (B07, GU325831)	HM773468 (C03, GU320664)		2
Pharmaceutical wastewater	HM773492 (E03, EU234197)			1
Sediments	HM773463 (B10, FJ437965)	HM773464 (B11, GQ472438)	HM773470 (C05, AB308364)	8
	HM773485 (D08, AY756595)	HM773513 (G01, AF150802)	HM773515 (G03, FJ719039)	
	HM773516 (G06, GQ500814)	HM773530 (H08, EU244101)		
Anaerobe	HM773443 (A02, DQ018788)	HM773471 (C06, AJ249099)		2
Heavy metal contaminated site	HM773455 (B02, GQ487892)			1
Landfill soil	HM773504 (F04, AF177299)			1
Radioactive waste	HM773508 (F08, GQ264150)			1
Muds	HM773461 (B08, EU431831)	HM773493 (E04, EU431831)		2
Mine water	HM773466 (C01, DQ469201)			1
Feedlot	HM773472 (C07, FJ674543)			1
Seawater	HM773473 (C08, FJ796074)	HM773488 (D11, FJ796074)	HM773491 (E02, FJ796074)	4
	HM773517 (G07, FJ796074)			
Coastal lagoon	HM773484 (D07, DQ450166)			1
Cave	HM773480 (D03, FJ796074)			1
Wall biomat	HM773482 (D05, FJ484838)			1
Manure water	HM773496 (E08, AY212681)			1
Lake water	HM773514 (G02, FJ612220)			1
Microbial fuel cell	HM773518 (G08, EU639277)			1
Sum				83

돼지 도축폐수 처리 RABC 생물막의 세균군집 구조

비배양기법으로 시료에서 DNA를 추출한 후에, 16S rDNA의 PCR과 cloning을 통하여 총 100개의 16S rDNA clone을 분석하였으며, 이 가운데 8개는 chimera 등으로 염기서열 결정이 불가능하였다. 기존에 보고된 염기서열과의 유사도는 최소 91%, 최대 99%, 평균 97%이었다. 총 77개의 염기서열이 uncultured bacteria 유래의 염기서열과 가장 유사하였으며, 이 중 13개는 uncultured *Betaproteobacteria* 등 개략적인 분류가 가능한 염기서열이었다. 배양된 세균의 16S rDNA와 가장 높

은 유사도의 염기서열을 보이는 것은 총 16개 염기서열이었다. Table 2는 Blast 탐색에서 가장 유사도가 높은 염기서열이 유래된 장소를 나타내는 표이다. 활성슬러지 유래 클론 29개, 혐기성슬러지 유래 클론 9개, 하수 처리관련 슬러지 유래 클론 6개, EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) 공정 유래 클론 4개 등 폐수처리 관련 염기서열 클론이 총 55개가 검출되었으며, 퇴적층 유래 클론 9개, 혐기성환경 유래 클론은 2개가 검출되었다. Table 2에 표시된 83개의 염기서열을 제외한 9개 클론의 염기서열과 가장 유사한 염기서열은 시

Table 3. Comparison of bacterial communities in biofilms of the RABC process between swine butchery wastewater and municipal wastewater.

Phylum	Class	Order (Family)	Food Wastewater (this study)		Municipal wastewater (Park <i>et al.</i> , 2007)	
			#	%	#	%
<i>Firmicutes</i>	Clostridia	Clostridiales	2	2.2	37	40.6
		sum	2	2.2	37	40.6
	Bacilli	Bacillales	1	1.1	2	2.2
		Lactobacillales	2	2.1	1	1.1
		sum	3	3.2	3	3.3
Sum		5	5.4	40	43.9	
<i>Bacteroidetes</i>			3	3.3	16	17.6
<i>Proteobacteria</i>	Gammaproteobacteria		3	3.2	8	8.8
	Betaproteobacteria		32	34.8	13	14.3
	Alphaproteobacteria		24	26.1	4	4.4
	Deltaproteobacteria				1	1.1
	Sum		59	64.1	26	28.6
<i>Actinobacteria</i>	Actinobacteria	Actinomycetales				
		(Mycobacteriaceae)			1	1.1
		(Microbacteriaceae)	2	2.2		
		(Propionibacteriaceae)	2	2.2		
	(Intrasporangiaceae)	13	14.0			
Sum		17	18.4	1	1.1	
<i>Nitrospirae</i>	Nitrospira	Nitrospirales	1	1.1	1	1.1
<i>Planctomycetes</i>					4	4.4
<i>Verrucmicobia</i>					1	1.1
<i>Chloroflexi</i>	Dehalococcoidetes		1	1.1		
<i>Acidobacteria</i>	Acidobacteria	Acidobacteriales	1	1.1		
<i>Chlorobi</i>	Chlorobia	Chlorobiales	2	2.2	2	2.2
<i>Fusobacteria</i>	Fusobacteriales		1	1.1		
environmental samples			2	2.2		
Total			92	100.0	91	100.0

료채취장소 및 그 유래를 알 수 없는 것들이었다.

Table 3에는 본 연구에서 구한 각 염기서열에 대한 Blast 검색 결과 중 분류 가능한 유사한 염기서열을 이용하여 나타낸 연구대상 RABC 생물막의 군집구조이다. 분류할 수 없는 염기서열들도 BLAST 검색을 통하여 E value가 10^{-13} 이하로 나타나 분석에는 크게 문제가 없었다. Bosshard 등(4)은 800 bp 정도의 염기서열에서 유사도가 95% 이상이면 같은 속(genus), 95% 미만이면 같은 과(family)로 분류하였는데 본 연구에서 유사도가 91-94% 범위의 것은 총 10개 염기서열이었다. 분석된 92개의 염기서열 중 *Betaproteobacteria*가 34.8% (32/92)로 우점도가 제일 높았다. 다음으로는 *Alphaproteobacteria* (26.1%)와 *Actinobacteria* (18.4%)가 우점하고 있었다. *Gammaproteobacteria*는 3.2%로 아주 낮은 비율을 차지하는 것으로 파악되었으며, *Deltaproteobacteria*와 *Epsilonproteobacteria*는 전혀 검출되지 않았다. 내생포자를 형성하는 세균의 비율은 *Actinobacteria*의 *Intrasporangiaceae*가 14.0%, 그리고 *Clostridia*와 *Lactobacillales*, *Bacillus* 가 5.4%로 총 19.4%를 차지하였었다. 기타 *Bacteroidetes* (3.3%), *Chlorobi*

(2.2%) 그룹에 속하는 염기서열 등이 일부 검출되었다.

고찰

RABC 공정의 폐수는 생물막인 RABC, 포기조(aeration tank) 1-2-3 순서로 지나가며 용존 산소(DO) 농도는 생물막에서 0.5-1.0 ppm 사이이며 포기조에서는 점감식으로 하여 #1 포기조에서 0.5-1.5 ppm, #2 포기조에서 0.4-0.5 ppm, #3 포기조에서 0.1-0.2 ppm 정도이다(24). 배양을 통하여 RABC (24)에서 그리고 포자염색을 통하여 B3 (2) 공정에서 처리단계의 후반부로 갈수록 내생포자형성세균의 비율이 높아지는 것을 보고하였다. 본 연구에서 포자염색(2) 대신 그람염색을 수행한 것은 시료에 포함된 불순물로 인해 관찰이 어렵고 포자생성균이라도 포자가 발아된 영양세포가 되면 포자염색에서 관찰되지 않아 포자생성균이 과소평가될 것이기 때문이었다. Forster 등(7)은 하수, 산업폐수, 육가공폐수-처리장 시료에 전통적 그람염색과 그람양성세균벽에 특이적으로 결합하는 형광물질을 이용한 연구에서 그람양성세균수의 비율은 두 방법

Table 4. Operation factors, water qualities of influent, and removal efficiencies (%) of the RABC and A2O wastewater treatment processes (17, 24).

Category		RABC	A2O
Capacity (m ³ /d)		1,300	300,000
Flow rate (m ³ /d)		1,300	20,000
Mixed Liquor Suspended Solids (MLSS, mg/L)		3,500~4,500 (in aeration tanks)	4,000~8,000 0
F/M ratio (kgBOD/kgMLSS·d)		0.05~0.8 (in biofilms)	0.3~3.0
Dissolved oxygen (DO)		0.1~1.5 (in aeration tanks)	2.0 over
Chemical Oxygen Demand (COD)	Influent (mg/L)	~1,720	95
	Removal (%)	97	86
Suspended solid (SS)	Influent (mg/L)	840	138
	Removal (%)	99	98
Total nitrogen (TN)	Influent (mg/L)	168.5	44.2
	Removal (%)	97	55
Total phosphorus (TP)	Influent (mg/L)	62	3.7
	Removal (%)	97	87

에 큰 차이가 없었고, 전체세균의 5% 미만인 그람양성세균이지만 활성을 보이는 세균의 19-50%가 그람양성세균이라고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 수행한 그람염색은 포자형성세균 파악 이외에도 의미를 가진다고 할 것이다. Table 1에서와 같이 RABC 공정의 총세균수는 생물막에서 높고 포기조에서 낮지만 그람양성세균수는 변화가 없는 현상의 원인은 산소농도와 유기물농도 감소에 따라 호기성인 중속영양세균은 사멸하지만 내생포자형성세균은 내생포자를 생성하여 생존하기 때문일 것이다(24). RABC와 A2O 시료 모두 그람염색 후에 현미경 관찰에서 붉은색이 아닌 보라색 혹은 검게 나타나는 세포 모양은 그람양성세균으로 계수하였다. RABC 시료는 총세균수 계수법인 DAPI 형광이 아주 희미하여 관찰이 어려웠던 반면, 그람염색에서의 계수는 상대적으로 쉬웠다. A2O 공정은 포기조나 반송슬러지에서 총세균수와 그람양성세균수 모두 8 log cells/ml 수준으로 큰 변화가 없었다. 하지만 RABC 공정은 폐수처리가 진행되면서 총세균수는 감소하고 그람양성세균수는 감소하지 않으므로 그람양성세균에 속하는 내생포자형성세균수의 비율은 높아지게 되고 이 상태로 생물막 단계이전에 반송된다. 내생포자형성세균집단은 난분해성 유기물과 약취성분 제거능이 우수하며(2, 11, 19) 내생포자가 발아할 때 유기물을 많이 소모하므로 폐수처리능력이 우수하다(19, 24). DAPI로 염색한 세포의 크기를 보면 생물막 세포가 다른 시료의 세포에 비해 평균 30% 이상 컸다($p < 0.001$). 이것은 생물막 환경이 포기조 폐수에 비하여 기질의 양을 포함한 여러 측면에서 세균생장에 훨씬 양호하기 때문인 것으로 생각된다. 크기가 큰 세포는 폐수의 유기물이 생물량으로 전환되는 비율이 높으므로 결국 RABC 생물막은 A2O에 비해 처리효율을 높여지게 된다. Sung (24)은 RABC 공정에서 생물막의 중속영양세균수와 내생포자형성세균수가 기존 하수공정의 100배

이상이며, RABC 생물막의 총세균수(DAPI법)는 1.50×10^9 cells/ml이라고 밝혔다. Table 4는 연구에 사용된 A2O와 RABC 공정의 운전조건과 오염물 제거효율 등을 비교한 표이다. 전반적으로 RABC 공정이 A2O에 비해 오염물 제거효율이 우수하다는 것을 알 수 있다. 이것은 RABC 공정의 생물막에 포함된 높은 생물량에 기인되는 것이므로(11) 생물막을 구성하는 주요 세균군집에 대한 파악은 매우 중요하다. RABC 공법을 이용하는 도시하수(19)와 본 연구대상인 돼지 도축폐수(24)에서 RABC 생물막의 중속영양세균수와 *Bacillus* 수는 각각 10^8 , 10^7 CFU/ml 수준으로 차이가 없었다. RABC 공정의 생물막의 그람양성세균수의 비율은 현미경 관찰에서 32% (Table 1)이고, PCR-sequencing에서 high G+C인 *Actinobacteria*와 low G+C인 *Firmicutes*로 전체 염기서열의 23.8% (Table 3)로 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

Jeong 등(9)은 돼지 도축폐수를 처리하는 pilot plant 수준의 RABC 공정을 구성하는 생물막에 대한 27F-785R primer 세트를 이용한 16S rDNA 염기서열 분석에서, 전반적으로 *Bacteroidetes*에 속하는 세균이 가장 우점하고, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, candidate division TM7 등이 우점하고 있다고 보고하였다. Park 등(19)은 도시하수를 처리하는 RABC 공정의 생물막을 구성하는 군집구조 조사에 배양기법과 비배양기법을 동시에 수행하여, 파악된 군집구조에 많은 차이가 있음을 보고하였다. 특히 비배양기법을 사용하여, 혐기성세균이자 내생포자형성세균인 *Clostridia* 속의 우점을 밝힘으로써, 배양이 어려운 세균들이 RABC 생물막의 세균군집 구조에서 중요한 구성원임을 보고하였다. Table 3은 chimera 등 분석 불가능한 염기서열을 제외하고 본 연구 대상인 도축폐수에 대한 RABC 공정 생물막의 세균군집 구조를 Park 등(19)이 연구한 도시하수를 처리하는 RABC 공정 생물막과 비교한 것이다. Jeong 등(9)은 *Bacteroidetes*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 등을 제외하고는 정확한 수치를 제공하지 않아 비교에서 제외하였다. 본 연구와 Park 등(19)의 연구에서 공통점은 *Nitrospirae*와 *Chlorobi*의 낮은 비율이다. 차이점으로는 도시하수에서 43.9%를 차지하던 *Firmicutes*의 비율이 도축폐수에서는 5.4%로 약 1/9로 감소한 반면, 도시하수에서 1.1%에 불과하였던 *Actinobacteria*의 비율이 도축폐수에서 18.4%로 약 17배 증가하였고, *Proteobacteria*의 비율도 도시하수에서 28.6%이던 것이 도축폐수에서는 64.1%로 2배 이상 증가하였다. 그리고 도축폐수 처리 생물막에서는 *Betaproteobacteria*의 비율이 34.8%로 가장 우점하고 있었다.

내생포자형성세균의 비율과 종류에서도 도시하수와 도축폐수가 큰 차이를 나타내었다. 즉 도시하수에서는 *Firmicutes*의 비율이 43.9%인데 비해, 도축폐수에서는 *Actinobacteria*에 속하는 *Intrasporangiaceae*의 비율이 14.0%로 나타났다. 한편 Jeong 등(9)은 자세한 수치를 명시하지 않았지만 *Firmicutes*의 비율이 10% 미만으로 나타났다. Egli 등(6)은 RBC의 생물막이 약 750 μm 의 두께를 가지지만, 산소는 표면에서 100-200 μm 정도만 투과하여 혐기성 조건이 형성된다고 하였

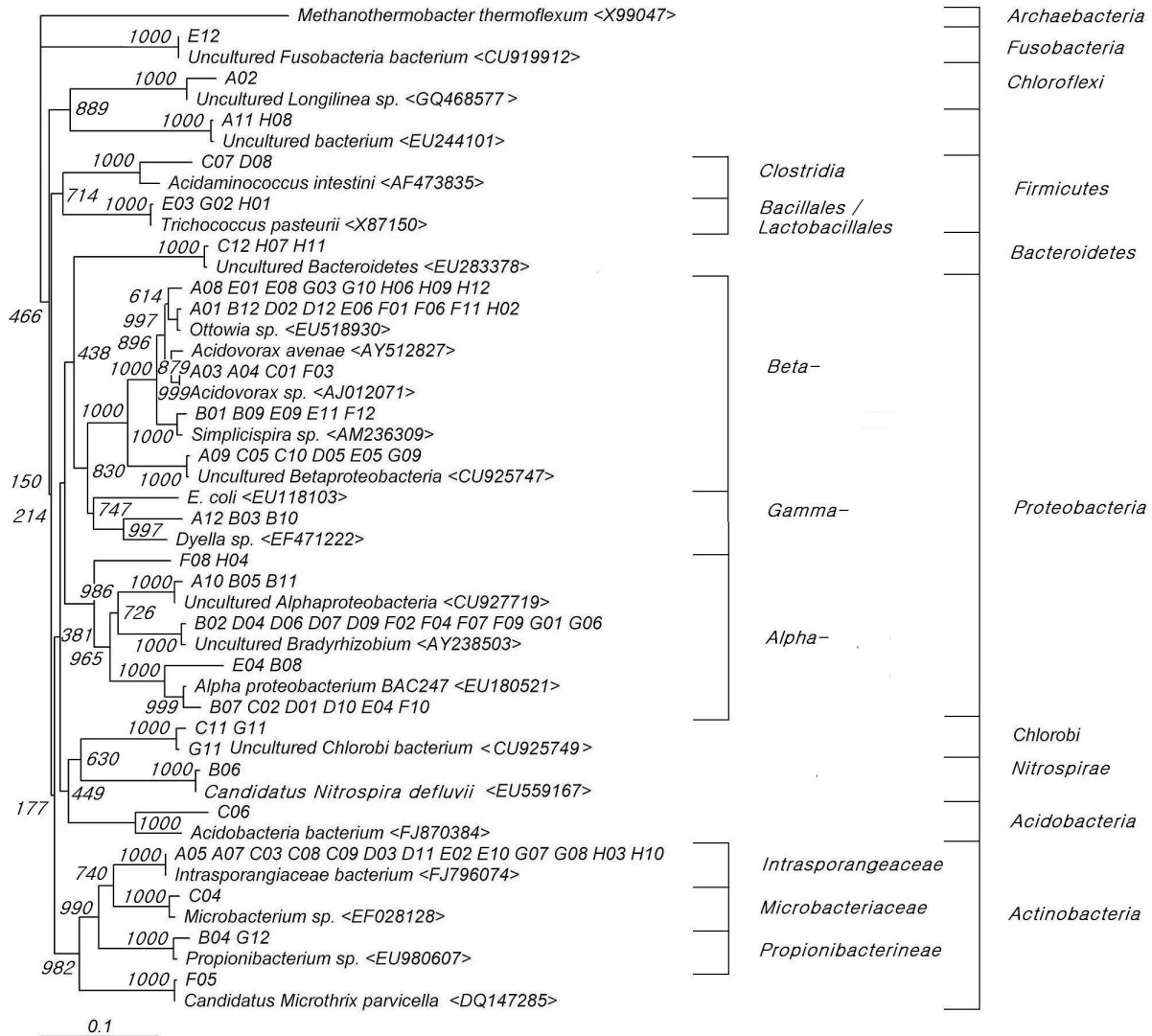


Fig. 2. Phylogenetic tree generated via the neighbor-joining method showing the phylogenetic relationships of the RABC biofilm clones within the Domain *Bacteria* based on the analysis of ca. 705 bases of aligned 16S rDNA sequences. Bootstrap values generated from 1,000 replicates are shown at each node. *Methanobacterium thermoflexum* in the Domain *Archaea* was utilized as the outgroup. The scale bar represents 0.1 change per nucleotide.

다. 본 연구에서는 Table 2에 있는 sediments, muds, landfill 등을 제외하고도 혐기성슬러지 9개, 혐기성세균 2개 등 최소한 12%가 혐기성으로 나타났다. Park 등(19)은 혐기성인 *Clostridium* 속의 비율이 40.6%라고 보고하였다.

RABC의 생물막 군집구조 분석에 비배양기법의 16S rDNA를 적용한 본 연구와 Jeong 등(9) 그리고 Park 등(19)의 연구와 차이를 보이는 원인에는 PCR primer의 차이, 내생포자 파괴의 어려움, 처리대상 폐수의 차이 등이 있을 수 있다 (4, 23). 본 연구의 PCR 조건과 사용된 primer는 27F-1492R 등 Park 등(19)의 연구와 동일하였고, Jeong 등(9)의 27F-758R과는 primer 등에서 차이가 있었다. 또한 내생포자 파괴를 위하여 Park 등(19)은 lysozyme 처리와 bead beating을 시도하였고, Jeong 등(9)은 bead-beating 만을 이용하였다. 본 연

구에서는 lysozyme 외에 lysostaphin을 이용한 효소학적 처리와 더불어 freeze-thaw 방법까지 실시하였으며, genomic DNA isolation kit에 포함된 bead-beating법도 적용하였다. 그러므로 Jeong 등(9)과 Park 등(19)의 연구보다 본 연구에서 내생포자가 더 잘 파괴되었을 것으로 생각된다. 동일한 primer를 이용한 본 연구와 Park 등(19)이 보고한 *Firmicutes* 등 내생포자 형성세균의 비율에서 차이를 보이는 것은, RABC 공정이 본 연구는 도축폐수를, Park 등(19)은 도시하수를 각각 처리하였으므로 유입폐수 수질에 따른 영향도 있을 것으로 판단된다. 실제로 Kim과 Park (12)은 슬러지의 식종 비율에 따라 인의 제거효율에 차이가 있음을 보였고, Lee 등(13)은 활성슬러지에 대한 PCR-RFLP 분석을 통하여 일반하수처리장이 화학하수처리장에 비해 세균의 다양성이 높으며, 군집구조가 서로

다름을 보였다.

생물막 세균의 16S rDNA 서열결정으로 동정한 세균 가운데 그람양성세균에 속하는 무리에는 *Firmicutes* 5개, *Actinobacteria* 17개, *Betaproteobacteria*에 속하는 *Dechloromonas* 1개로 모두 23개의 클론으로, 전체 클론 수 92개의 25%가 그람양성세균 집단이었다(Table 2). 현미경 직접계수에서는 그람양성세균 비율이 32%였다(Table 1).

Figure 2는 보고된 염기서열들과 본 연구에서 검출된 염기서열을 정렬(alignment)한 후에 작성한 계통수(phylogenetic tree)이다. A11과 H08 등 uncultured bacterium 외에 유사도를 찾기 어려웠던 염기서열들은 *Bacteroidetes* 그룹과 가장 유사도가 높은 것으로 나타났다. 분류학적으로 보면 DNA 조성 중에 G+C 비율이 높은 그람양성세균인 *Actinobacteria* 강(class)의 비율이 18.3%인데(Table 3), 이 강에 포함된 과(family)를 보면 *Intrasporangiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, 그리고 과를 알 수 없는 *Candidatus Microthrix parvicella* 등이었다. G+C 비율이 높은(high G+C ratio) 세균집단들은 PCR이 잘 되지 않는 것으로 알려져 있는데도(26), 본 연구에서는 18.4%로 높게 검출되었다. 또 다른 그람양성세균인 *Firmicutes* 문(phylum)은 G+C 비율이 낮은(low G+C ratio) 세균집단으로서, C+C 비율이 높은 그람양성세균 집단인 *Actinobacteria*와의 유사도가 높게 나타나고 있다(Fig. 2 and Table 3).

Choi 등(5)은 비점오염원 처리에서 세라믹 담체에 형성된 생물막에 대하여 PCR-DGGE를 수행하였지만, 7종류의 염기서열만 검출하여 군집구조의 분석에는 충분하지 않았다. Lee 등(13)은 16S rDNA 클론 라이브러리를 대상으로 PCR-RFLP를 수행하여 다양한 세균의 염기서열을 파악하였다. Lim과 Ahn (15)은 활성슬러지 공정을 대상으로 전자전달계에 존재하는 quinone의 profiling을 통하여 세균군집을 분석하여, 산소유무에 따른 군집구조의 차이를 보고하였지만 16S rDNA 만큼 풍부하고 정확한 분석을 하지는 못했다. Kim 등(10)은 retrofitting BNR (Biological Nutrient Removal) 공정의 하수처리장에 FISH (Fluorescent in situ Hybridization) 기법을 적용하여 분석한 결과, *Betaproteobacteria*가 우점이며 *Bacillus* 속의 비율은 1% 미만이라고 하였다. 한편 Ahn 등(2)은 B3 공정에 FISH를 사용하여 전체 세균군집의 8-60%가 *Bacillus* 속 세균이라고 보고하였다. 본 연구에서 수행한 PCR-sequencing 방법은 FISH법에 비해 시간과 비용이 많이 들기는 하지만, 염기서열에 대한 직접 분석으로서 hybridization에서 생기는 거짓 양성 혹은 거짓 음성 등의 문제가 없다는 장점이 있다.

RABC 공정의 탁월한 질소와 인의 제거 능력은(5) 질화 및 탈질 관련 세균 클론들이 많이 검출된 것과 관련이 있을 것으로 판단된다. 질화 및 탈질 세균의 16S rDNA와 유사도가 95% 이상이며 가장 유사도가 높은 클론은 A01, A03, A08, C01, E09, H05 등 총 6개로(Table 2) 전체 군집의 6.5%를 차지하고 있었다. B06과 C02는 각각 94%와 92%이면서 질화 및 탈질 세균의 16S rDNA와 유사도가 가장 높았다. Quan 등(20)은 완전침지형 회전매체공정에서 호기성 및 혐기성 암모

니아 산화미생물의 분포를 PCR을 이용한 분자생물학적 분석으로 보고하였다. 지금까지 밝혀진 혐기성 암모니아 산화세균은 대개 *Planctomycetales*에 속한다(25). RABC 공정의 세균군집 분석결과를 보면, 도시하수처리에서는 *Planctomycetales*가 4.4% 검출되었지만 도축폐수 처리인 본 연구에서는 전혀 검출되지 않았다(Table 3). 그리고 인 제거 관련 세균의 염기서열과 97% 이상의 가장 높은 유사도를 보인 염기서열은 A05, A09, E10, H03, H10 등 총 5개로(Table 2) 전체 군집의 5.4%를 차지하였다. 특히 A05, E10, H03, H10의 염기서열은 체내에 polyphosphate를 축적하며 질산을 질소로 바꾸는 특징이 있는 세균의 16S rDNA와 유사도가 가장 높았으며 A05와 E10은 96%의 유사도를 보였다. EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) sludge 유래의 세균염기서열(3)과 유사한 염기서열이 A09, C11, D06, G11 등(Table 2) 총 4개로 이들도 인 제거에 관여할 가능성이 있다. 이는 세균군집의 최대 8.7%가 인 제거에 참여할 수 있다는 것으로 나타났다.

적요

돼지 도축폐수를 처리하는 Rotating Activated Bacillus Contactors (RABC) 공정의 세균군집 특성을 파악하기 위하여 그람양성세균수와 총세균수를 계수하여 기존 고도폐수처리공정인 A2O (Anaerobic-Anoxic-Oxic) 공정과 비교하였다. RABC 공정의 생물막 세균군집구조는 비배양기법인 16S rDNA 염기서열결정법을 이용하여 분석하였다. RABC 공정의 총세균수에 대한 그람양성세균수 비율은 생물막(32%)에 비해 최종포기조(1282%) 및 반응슬러지(958%)에서 현저히 증가한 반면, A2O 공정의 그람양성세균수 비율은 호기조(40%)와 반응슬러지(49%) 모두에서 상대적으로 훨씬 낮았다. 총 9개 문에 해당하는 92개의 클론이 검출되었으며, 이 가운데 최우점 집단은 *Proteobacteria* (64.1%)와 *Actinobacteria* (18.4%)로서 이들 2개 문이 전체의 82.5%를 차지하였다. 3번째로 많이 검출된 것은 내생포자형성세균집단이 속하는 *Firmicutes* (5.4%) 문이었다. 소량 검출된 나머지 6개 문은 *Bacteroidetes* (3.3%), *Chlorobi* (2.2%), *Nitrospirae* (1.1%), *Chloroflexi* (1.1%), *Acidobacteria* (1.1%), *Fusobacteria* (1.1%)의 순이었다. *Proteobacteria* 문 중에서는 *Betaproteobacteria* 강 34.8%, *Alphaproteobacteria* 강 26.1%로서 대부분을 차지하였고, *Gamma-proteobacteria* 강은 3.2%이었다. 내생포자형성세균집단의 비율은 모두 19.4%로서, *Firmicutes* 문 5.4%와 *Actinobacteria* 문의 *Intrasporangiaceae*과 14.0%이었다. 질화세균 및 탈질세균과 관련된 클론 비율 6.5%, 인축적세균과 관련된 클론 비율 5.4%를 기록함으로써 무기영양소 및 악취 제거능력을 가진 세균집단이 RABC 생물막에 많이 서식하고 있음이 확인되었다.

참고문헌

- Ahn, T.S., S.G. Ahn, O.S. Kwon, S.J. Park, Y.G. Shin, T.Y.

- Ahn, and K.H. Lee. 2007. Environmental Microbiology, Shin-Kwang Press, Seoul.
2. Ahn, T.S., S.H. Hong, O.S. Kim, J.J. Yoo, S.O. Jeon, and S.I. Choi. 2001. The changes of *Bacillus* spp. in municipal wastewater treatment plant with B3 process. *Kor. J. Microbiol.* 37, 209-213.
 3. Blackall, L.L., E.M. Seviour, D. Bradford, S. Rossetti, V. Tandoi, and R.J. Seviour. 2000. '*Candidatus Nostocoida limicola*', a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 703-709.
 4. Bosshard, P.P., S. Abels, R. Zbinden, E.C. Böttger, and M. Altwegg. 2003. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-Month Evaluation). *J. Clin. Microbiol.* 41, 4134-4140.
 5. Choi, G.C., J.J. Park, D.K. Kang, J.C. Yu, I.G. Byun, H.S. Shin, T.H. Lee, and T.J. Park. 2008. Study on the performances and microbial community in the biofilm process for treating nonpoint source pollutants. *J. KSEE* 30, 1021-1027.
 6. Egli, K., F. Bosshard, C. Werlen, P. Lais, H. Siegrist, A.J.B. Zehnder, and J.R. van der Meer. 2003. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbiol. Ecol.* 45, 419-432.
 7. Forster, S., J.R. Snape, H.M. Lappin-Scott, and J. Porter. 2002. Simultaneous fluorescent gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4772-4779.
 8. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg. 1994. Methods for general and molecular bacteriology, pp. 31-32. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA.
 9. Jeong, S., J.H. Nam, W. Bae, and D.H. Lee. 2010. Bacterial community structure of food wastewater treatment system combined with rotating biological contactor and tapered aeration reactor. *Kor. J. Microbiol.* 46, 169-176.
 10. Kim, M.K., J.H. Hong, Y.K. Kim, T.S. Ahn, and E.B. Shin. 2006. Evaluation of field application for the developed retrofitting process and analysis of bacterial community structure in pilot plant. *J. KSEE* 28, 240-248.
 11. 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.
 12. Kim, D.S. and Y.S. Park. 2008. Nutrient removal characterization by the addition ratio of BNR sludge in SBR. *J. Envi. Hlth. Sci.* 34, 76-85.
 13. Lee, H.K., J.H. Kim, C.K. Kim, and D.H. Lee. 2004. Molecular characterization of the bacterial community in activated sludges by PCR-RFLP. *Kor. J. Microbiol.* 40, 307-312.
 14. Lee, D.G., J.H. Lee, and S.J. Kim. 2005. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 155-162.
 15. Lim, B.R. and K.H. Ahn. 2002. Microbial community structure and treatment characteristics of domestic wastewater in the intermittently aerated membrane bioreactor. *J. Korean Soc. Water Waste* 16, 679-685.
 16. Ministry of Environment Republic of Korea. 2009. 2008 White paper on Environment. Seoul, 362-364.
 17. Ministry of Environment Republic of Korea. 2008. Mechanistic Modeling for Bacillus System, 2008.
 18. Park, T.J., C.M. Lee, K.S. Song, I.H. Cho, Y.K. Kim, and M.H. Chung. 2000. A study on the removal of nitrogen and phosphorus depending on existence of cilia media in sewage in anaerobic-anoxic-oxic process. *J. Envi. Hlth. Sci.* 26, 69-75.
 19. Park, S.J., J.C. Yoon, K.S. Shin, E.H. Kim, S. Yim, Y.J. Cho, G.M. Sung, D.G. Lee, S.B. Kim, D.U. Lee, and *et al.* 2007. Dominance of endospore-forming bacteria on a rotating activated bacillus contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *J. Microbiol.* 45, 113-121.
 20. Quan, Z.X., B.S. Lim, H. Kang, K.Y. Yoon, and Y.G. Yoon. 2006. Diversity of nitrifying and denitrifying bacteria in SMMIAR Process. *J. Korea Soc. Water Qual.* 22, 1014-1021.
 21. Røling, 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.
 22. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 23. Sandaa, R.A., V. Torsvik, and O. Enger. 2001. Influence of longterm heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.* 33, 287-295.
 24. Sung, G.M. 2010. Structure and characteristics of bacterial communities of the RABC process for food wastewater treatment. Ph.D. thesis. Daejeon University, Daejeon.
 25. Strous, M. and M.S. Jetten. 2004. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 99-117.
 26. Varadaraj, K. and D.M. Skinner. 1994. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 140, 1-5.