

ORIGINAL ARTICLE

## FISH 기법을 이용한 생물활성탄 공정에서의 운전기간별 부착 박테리아 군집변화 분석

손형식 · 손희종<sup>1)</sup> · 박근태<sup>2)</sup> · 이상준\*

부산대학교 미생물학과, <sup>1)</sup>부산광역시 상수도사업본부 수질연구소, <sup>2)</sup>부산대학교 산학협력단

### Analysis of Attached Bacterial Community of Biological Activated Carbon Process Using FISH

Hyeng-Sik Son, Hee-Jong Son<sup>1)</sup>, Geun-Tae Park<sup>2)</sup>, Sang-Joon Lee\*

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

<sup>1)</sup>Water Quality Institute, Waterworks Headquarter, Busan 621-813, Korea

<sup>2)</sup>Research & University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

#### Abstract

The concentration of organic compounds was analyzed at each step of BAC process though BDOC<sub>total/rapid/slow</sub>. Further, bacteria communities and biomass concentrations measured FISH and ATP methods were analyzed. The bed volume (BV) of steady state is different from that of based on assessment of organic compounds removal. Bed volumes in DOC, BDOC<sub>rapid</sub> and BDOC<sub>total/slow</sub> removal at steady state were around 27,500 (185.8 day), 15,000 (101.4 day) and 32,000 (216.2 day), respectively. A biomass didn't change after the bed volume reached 22,500 (152.0 day) according to analyzing ATP concentration of bacteria. The concentration of ATP was 2.14 µg/g in BV 22,500 (152.0 day). The total bacterial number was  $4.01 \pm 0.4 \times 10^7$  cells/g at the bed volume 1,150 (7.8 day) (the initial operation) and the number of bacteria was  $9.27 \pm 0.2 \times 10^9$  at the bed volume 58,560 (395.7 day) that increased more than 200 times. Bacterial uptrend was reduced and bacterial communities were stabilized since BV 18,720 (126.5 day). When BV were 1,150 (7.8 day), 8,916 (60.2 day), 18,720 (126.5 day), 31,005 (209.5 day), 49,632 (335.3 day), 58,560 (395.7 day), a proportion of total bacteria for the Eubacteria were 60.1%, 66.0%, 78.4%, 82.0%, 81.3% respectively. *γ-Proteobacteria* group was the most population throughout the entire range. The correlation coefficient ( $r^2$ ) between Eubacteria biomass and ATP concentration was 0.9448.

**Key words** : Biological activated carbon (BAC), Attached bacterial community, Fluorescent *in situ* hybridization (FISH), Biomass, Biodegradable dissolve organic carbon (BDOC), Bed volume (BV).

#### 1. 서론

정수처리 공정에서 생물활성탄(biological activated carbon, BAC) 공정은 미생물에 의한 유·무기성 오염 물질 제거능을 극대화시킨 일종의 생물여과 공정으로

이전부터 국·내외에서 널리 사용되고 있다(Son 등, 2009). BAC 공정은 입상활성탄(granular activated carbon, GAC)을 장기간 사용할 경우에 활성탄에 다양한 미생물들이 자연적으로 군집을 형성·서식하면서 유입되는 유·무기성 오염물질들을 생물분해하여

Received 16 August, 2012; Revised 20 November, 2012;

Accepted 7 January, 2013

\*Corresponding author: Sang-Joon Lee, Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea  
Phone: +82-51-510-2268  
E-mail: sangjoon@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.  
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

제거하는 원리로 GAC 공정을 장기간 운전할 경우 부착박테리아 생체량(biomass)이 증가되어 생물막(biofilm)으로 성장한다(Son 등, 2009). 이렇게 자연적으로 생성된 활성 생물막은 수중에 존재하는 용존성 유기물질의 제거에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Carlson과 Amy, 1989; Chien 등, 2008).

GAC 공정에서 BAC 공정으로의 전환은 유입되는 운전기간에 의존한다고 볼 수 있다. GAC 공정의 운전 단계 초기에는 흡착에 의해 공급되는 풍부한 영양물질들로 인해 유입수중의 부유성 박테리아들은 GAC 표면에서 부착, 성장 및 탈착을 반복하면서 군집을 형성하며 생물막으로 증식한다. Fig. 1에는 운전기간의 증가에 따라 GAC 공정에서 BAC 공정으로 전환되는 단계를 이론적으로 3단계로 나누어 도식화한 것으로 각 단계에서의 용존 유기탄소(dissolved organic carbon, DOC)의 제거 메커니즘과 함께 활성탄에서의 부착 박테리아에 의한 생물막 형성을 연계하여 각 단계별 특성을 나타내고 있다. A~C 구간은 각각 물리적 흡착단계(A 구간), 흡착과 생물학적 분해가 동시에 이루어지는 단계(B 구간) 및 생물분해가 주를 이루는 단계(C 구간)로 구분되며, 보통 A 구간은 GAC 공정으로, B와 C 구간은 BAC 공정으로 평가한다(Servais 등, 1994).

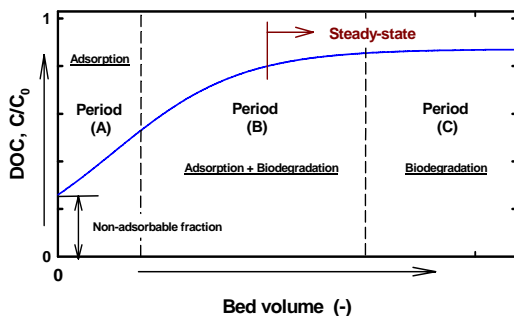


Fig. 1. DOC removal by adsorption and biodegradation from GAC period to BAC period.

BAC 공정의 운전기간 동안 생분해 가능한 DOC (biodegradable DOC, BDOC)의 제거를 생물학적 메커니즘이 담당하기 때문에 생물학적 시스템의 이해 및 BAC 공정의 운전효율을 극대화를 위해서는 활성 생물막의 정량화 및 특성 파악은 매우 중요하다(Wakelin 등,

2010). 즉, GAC에서 BAC 단계로의 전환 과정에서의 부착 박테리아들의 생체량 형성 과정과 최대 생체량 및 최대 생체량 형성에 필요한 운전기간을 파악하는 것도 매우 중요하다.

활성탄 부착 박테리아들의 생체량을 측정하기 위해 HPC(heterotrophic plate count)법(Stewart 등, 1990), epifluorescence microscopic total cell count법(Dewaters와 Digiano, 1990), phospholipid analysis법(Fonseca 등, 2001; Seredyńska-Sobecka 등, 2006), ATP(adenosine tri-phosphate) analysis법(Velten 등, 2007; Magic-Knezev와 van der Kooij, 2004), 16S-rRNA (ribonucleic acid) gene-targeting DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analysis법(Dewaters 등, 1990; Boon 등, 2011) FISH(fluorescent *in situ* hybridization)법(Son 등, 2005; Son 등, 2008) 등과 같은 방법들이 이용되어 오고 있으며, 각각의 방법들은 장·단점이 있어 보통 몇 가지 방법을 함께 이용하여 부착 박테리아들의 군집을 평가를 한다. 특히, FISH법은 다양한 probe들을 사용하여 빠른 시간내에 목적으로 하는 부착 박테리아 군집들에 대한 시·공간적인 해석이 가능하기 때문에 이전부터 널리 사용한 방법이다(Lew 등, 2010). FISH법을 이용한 BAC 공정의 부착 박테리아들의 군집 해석에 대한 이전의 몇몇 연구결과들이 있으나 이들 연구 결과들(Son 등, 2005; Son 등, 2008)은 단순한 probe 조합으로 부착 박테리아 군집을 조사한 결과, 측정 probe들에 의해 검출되지 않은 Eubacteria (others)의 분포 비율이 약 8%~30%로 매우 높게 보고되고 있기 때문에 정확한 군집 해석에는 한계가 있었다(Son 등, 2005; Son 등, 2008).

본 연구에서는 GAC 공정 운전초기부터 BAC 공정으로 전환된 이후까지 부착 박테리아들의 주요 유기탄소원인 수중의 BDOC<sub>total/rapid/slow</sub>의 제거율 평가와 부착 박테리아들의 군집 평가를 위해 15종의 probe를 이용한 FISH법과 ATP 농도 분석법으로 부착 박테리아들의 생체량 (biomass)을 정량적으로 분석하였으며, 또한, BDOC<sub>total/rapid/slow</sub>의 제거율 변화에 따른 FISH법을 이용하여 분석된 군집들의 분포비율 변화를 함께 평가하여 BAC 공정의 운전시 기초자료로 사용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

2.1.1. 유입수

유입수는 300 톤/일 처리용량의 pilot-plant의 후오존 처리수를 실험에 사용하였다. 후오존 처리수의 성상을 Table 1에 나타내었다. 운전기간 동안 수온은 10~15°C였으며, 유입수 집수조 및 활성탄 여과지를 실내에 설치하여 실내 냉·난방기 및 수온조절기를 이용하여 수온의 변화폭을 최소화 하였다.

2.2.1. 활성탄 및 활성탄 접촉조

본 실험에 사용된 활성탄은 석탄계 재질의 활성탄 (F400, Calgon, USA)을 사용하였으며, 실험에 들어가기 전에 순수에 깨끗이 세척한 후 7일 이상 실온에서 건조한 후 사용하였다.

활성탄 접촉조는 아크릴 재질의 내경 7 cm, 높이 200 cm의 규모이며, 충전된 활성탄의 층고는 100 cm로 하였다. 후오존 처리수가 유입수의 집수조에 유입된 후 수온조절을 거친 다음 정량 펌프를 이용하여 활성탄 접촉조의 상부로 유입되도록 설계하였으며, 접촉조의 상부에는 유입수의 수온을 측정하는 온도계를 설치하였다. 접촉조의 운전은 하향류식으로 공탐체류시간(empty bed contact time, EBCT)은 15분으로 고정하여 운전하였고, 역세척은 염소처리 공정이 배제된 pilot-plant의 최종 처리수로 주 1회로 공세와 수세를 병행하여 실시하였다. 활성탄 접촉조의 상세한 설계인자를 Fig. 2에 나타내었다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 용존 유기물질 분석

DOC의 분석은 시료수 채수 후 깨끗이 세척된 0.2 μm 멤브레인 여지(Millipore, USA)를 사용하여 여과한 여액을 TOC 분석기(Sievers 5310C, Sievers, USA)를 사용하여 분석하였다. BDOC의 경우는 손 등이 제시한

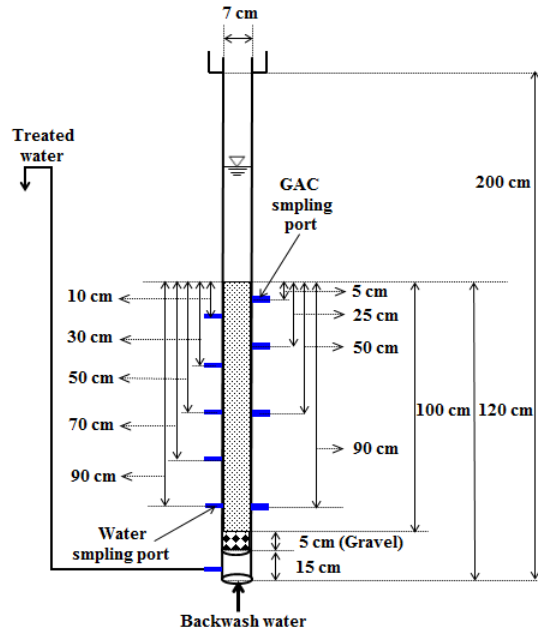


Fig. 2. Schematic diagram of biological activated carbon (BAC) filter.

방법(Son 등, 2004)을 이용하여 BDOC<sub>total</sub>, BDOC<sub>rapid</sub> 및 BDOC<sub>slow</sub>를 분석하였다. 일반적으로 BDOC<sub>rapid</sub>는 빠른 생분해능을 나타내어 BAC 공정에서 제거 가능한 BDOC이며, BDOC<sub>slow</sub>는 느린 생분해능을 나타내어 BAC 공정에서 제거되지 않고, 배·급수관망으로 유출될 가능성이 높은 BDOC 성분을 의미한다(Son 등, 2004).

2.2.2. ATP 농도 분석

부착 박테리아의 ATP 농도는 BAC 습중량 200 mg을 채집하여(Velten 등, 2007)등이 제시한 방법을 이용하여 전처리한 후 분석하였다. ATP standard(Promega, USA)를 이용하여 ATP 농도 검량선을 작성하였고, luminometer(Victor3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 활성탄 부착 박테리아들의 ATP 농도를 측정하였다.

Table 1. Characteristics of BAC filter influent water

Parameter	pH (-)	Turbidity (NTU)	Temp. (°C)	DOC (mg/L)	BDOC (mg/L)		
					total	rapid	slow
Value	6.8~7.5	0.04~0.08	10~15	1.32~1.57	0.32~0.58	0.13~0.33	0.15~0.31

### 2.2.3. 부착 박테리아 군집 분석

부착 박테리아의 탈리는 활성탄을 운전기간별로 채취하여 활성탄 습증량 1 g을 건조시킨 후 37 kHz, 190 W로 3분 동안 초음파 처리(DHA 1000, Branson, USA)하여 세균을 탈리시켰다(Son 등, 2005).

FISH 관찰을 위한 목적 probe들은 일반적으로 생물여과 공정에서 많이 검출(Son 등, 2005; Son 등, 2008)되는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -*Proteobacteria* group, *Bacteroidetes*(CF) group, HGC(Gram + high G+C content) group, *Acinetobacter* spp., *Firmicutes* (Gram + low G+C content) group 및 토양, 담수와 해수 환경에 많이 존재하는 *Cyanobacteria* group(Lymeropoulou 등, 2012), *Planctomycetes* group(Neef 등, 1998; Wang과 Webb, 2002), *Acidobacter* group(Faoro 등, 2010), *Desulfovibrio* group( $\delta$ *Proteobacteria* group)(Suzuki 등, 2007)을 추가로 선정하였고, 이 모두를 포함하는 진정세균류 Eubacteria probe까지 15개의 probe들을 목적 probe로 주문·제작하였다. Table 2에는 FISH법에 사용된 15개의 probe들에 대한 서열을 나타내었으며, 총 12개의 group들을 측정하였다.

박테리아 고정방법은 탈리시킨 활성탄 시료를 4% paraformaldehyde solution (시료: 고정액=1:3)으로 4°C에서 16시간 동안 고정시켰다. 고정된 시료를 4°C, 12,000 × g으로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고, phosphate buffered saline(PBS:130 mM NaCl; 10

mM sodium phosphate buffer; pH 7.2)으로 고정액을 세척하였다. 고정된 시료는 99% 에탄올(1:1, v/v)에 넣어 -20°C에 저장하여 실험에 사용하였다(Manz 등, 1992).

박테리아 분석방법은 전처리를 거친 고정된 시료 각 1 mL 씩을 polycarbonate membrane(diameter, 25 mm; pore size, 0.20  $\mu$ m; type GTTP 4700; Millipore, Eschborn, Germany)으로 여과하여 50%, 80%, 100%의 에탄올에 순차적으로 각 3분씩 처리한 후 공기 중에서 건조시켰다. 각각의 probe들을 균체가 부착된 polycarbonate membrane에 떨어뜨린 후 46°C에서 90분 동안 혼성화시켰다. 그 후 polycarbonate membrane을 48°C에서 미리 예열된 washing buffer에서 15분 동안 세척 건조 후 confocal laser scanning microscopy (LSM 510, ZEISS, Germany)를 이용하여 형광을 띤 박테리아를 계수하였다.

DAPI법에 의한 총 세균수 측정은 고정된 시료 2  $\mu$ L를 gelatin으로 코팅된 slide glass에 놓고, DAPI (4',6-diamidino 2-phenylindole 1  $\mu$ g/mL; Sigma, U.S.A)로 5분 동안 염색하였다. 염색된 시료는 멸균 증류수로 세척한 후 confocal laser scanning microscopy (LSM 510, ZEISS, Germany)를 이용하여 직접 형광을 띤 박테리아를 계수하였다(Manz 등, 1992).

**Table 2.** Characteristics of oligonucleotide probes used in this study

Probe	Probe sequence (5'-3')	Specificity	Ref.
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	$\alpha$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	Wagner 등, 1993
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	$\beta$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	Wagner 등, 1993
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	$\gamma$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	Wagner 등, 1993
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	Wagner 등, 1993
CF319b	TGGTCCGTATCTCAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	Wagner 등, 1993
HGC69	TATAGTTACCACCGCCGT	Gram(+) high G+C content	Wagner 등, 1994
Aca23a	ATCCTCTCCATACTACTA	<i>Acinetobacter</i> spp.	Wagner 등, 1994
PLA46	GACTTGCATGCCTAATCC	<i>Planctomycetes</i>	Neef 등, 1998
HoAc1402	CTTTCGTGATGTGACGGG	<i>Acidobacter</i>	Juretschko 등, 2002
Cyan785	CTACTGGGGTATCTAATCC	<i>Cyanobacteria</i>	Nu'bel 등, 1997
DSV698	GTTCTCCAGATATCTACGG	<i>Desulfovibrio</i> spp.	Manz 등, 1998
LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	Meier 등, 1999
LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	Meier 등, 1999
LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	Meier 등, 1999
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	Wagner 등, 1993

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 운전기간 증가에 따른 BDOC 제거 특성

GAC 신탄을 충전한 활성탄 접촉조의 운전기간(*bed volume*, BV) 증가에 따른  $BDOC_{total}$ ,  $BDOC_{rapid}$  및  $BDOC_{slow}$  잔존비 변화를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이  $BDOC_{rapid}$ 의 경우는 BV 5,000 (34 day) 부근까지는 잔존비가 일시적으로 증가하는 현상을 보였으나, BV 5,000 (34 day) 이후로는 잔존비가 감소하였고, BV 15,000 (101.4 day) 정도에서 정상상태에 도달하여 안정적인  $BDOC_{rapid}$  제거능을 나타내었다.  $BDOC_{slow}$ 와  $BDOC_{total}$ 의 경우는 운전기간 증가에 따른 잔존비 변화곡선이 거의 유사한 경향을 나타내었으며, BV 15,000 (101.4 day) 부근까지는 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으나 BV 15,000 (101.4 day) 이후로는 점점 감소하였고, 특히, BV 32,000 (216.2 day) 이후로는 정상상태에 도달하여  $BDOC_{slow}$ 와  $BDOC_{total}$ 의 잔존비가 0.17과 0.10 부근에서 거의 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. 일반적으로  $BDOC_{rapid}$ 는 BAC 공정과 같은 생물여과(biofiltration) 공정에서 쉽게 제거가 가능한 BDOC 성분으로 정상상태에 도달한 BAC 공정에서는 BAC 접촉조의 상층부에서 거의 다 생물분해되는 것으로 알려져 있다(Son 등, 2009).  $BDOC_{slow}$ 의 경우는  $BDOC_{rapid}$  보다는 비교적 느린 생물분해능을 나타내어 생물여과 공정에서 완전히 제거되지 않고 배·급수관망으로 유출될 가능성이 있는 BDOC 성분이다. 따라서, BAC 접촉조의  $BDOC_{slow}$ 에 대한 생물분해능이 정상상태에 도달(BV 32,000 부근)한 이후에도 유입되는  $BDOC_{slow}$ 의 17% 정도는 제거되지 않았다.

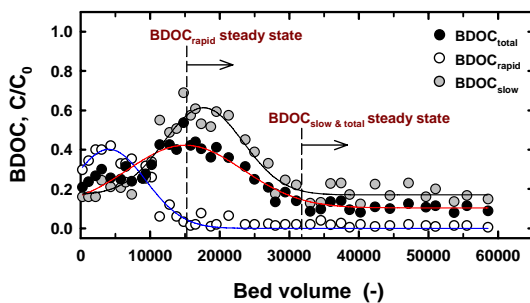


Fig. 3.  $BDOC_{total}/rapid/slow$  residual ratio curves according to the operated bed volumes.

#### 3.2. 운전기간 증가에 따른 활성탄 부착 박테리아 biomass 평가

GAC 신탄을 충전한 활성탄 접촉조의 운전기간 증가에 따른 표층(*bed depth* : - 5 cm)에서 채집한 활성탄의 부착 박테리아 생체량 변화를 ATP 농도, 총세균수(DAPI)와 Eubacteria 개체수로 분석한 것을 Fig. 4에 나타내었다. BV에 따른 운전일수는 BV 1,150의 경우 운전기간이 8일 정도 경과한 운전초기 시점이며, BV 8,916은 운전기간이 60일, BV 18,720은 127일, BV 31,005는 208일이며, BV 49,632는 335일, BV 58,560은 396일 정도가 경과한 시점이다.

운전기간 증가에 따른 ATP 농도의 변화는 BV 24,000 (162.2 day) 부근까지 점진적인 증가 추세를 나타낸 이후로는 부착 박테리아들의 ATP 농도가 일정하게 유지되는 경향을 나타내어 ATP 농도의 경우는 BV 24,000 (162.2 day) 부근에서 정상상태에 도달한 것으로 나타났고, 정상상태 도달 후의 활성탄 단위 g 당 부착 박테리아들의 ATP 농도는 2.14  $\mu\text{g}$  정도로 나타났다. Full-scale과 pilot-scale의 BAC 공정에서 활성탄 부착 박테리아들의 생체량을 ATP 농도로 모니터링한 연구결과(Velten 등, 2007)에서는 정상상태 도달 후의 full-scale의 BAC 부착 박테리아들의 ATP 농도는 0.61  $\mu\text{g/g}$ 로 본 연구결과에 비해 매우 낮았으나, pilot-scale의 BAC 부착 박테리아들의 ATP 농도는 1.82  $\mu\text{g/g}$ 로 본 연구결과와 비교하여 많은 차이를 보이지는 않았다. BAC 공정의 경우는 유입수의 성상이 운전효율과 부착 박테리아들의 생체량에 많은 영향을 미치기 때문에 장기간 운전한 BAC 공정의 부착 박테리아들의 생체량이 많은 차이가 있을 수도 있다. 특히, BAC 공정의 전단에 오존처리 공정이 없는 경우는 BAC 공정 유입수의 BDOC 함유량이 낮아 부착 박테리아들의 생체량이 매우 낮게 나타난다.

DAPI법을 이용한 총세균수의 경우는 BV 1,150 (7.8 day)에서  $4.01 \pm 0.4 \times 10^7$  cells/g으로 가장 낮은 개체량을 나타내었으며, BV 58,560 (395.7 day)에서는  $9.27 \pm 0.2 \times 10^9$ 로 BV 1,150 (7.8 day)일 때에 비해 약 200배 증가하여 가장 높은 개체수를 나타내었다. 운전기간(BV) 증가에 따라 총세균수와 Eubacteria 개체수는 증가하였으나, BV 18,720 (126.5 day) 이후로는 상승세가 점차 둔화 보였으며, BV 49,632 (335.4 day)와 BV 58,560



(395.7 day)일 때는 비슷한 개체수를 보였다. Eubacteria의 경우도 총세균수와 비슷한 경향을 보였다. 총세균수에 대한 Eubacteria의 비율(EUB/DAPI)은 BV 1,150 (7.8 day)와 BV 8,916 (60.2 day)일 때 60.1%로 나타났으며, BV 18,720 (126.5 day)일 때 66.0%, BV 31,005 (209.5 day)일 때 78.4%, BV 49,632 (335.4 day)일 때 82.0% 및 BV 58,560 (395.7 day)일 때 81.3%로 운전기간의 증가에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다.

음용수와 같은 저영양 상태에서의 EUB/DAPI는 평균적으로 40% 미만 정도로 보고되고 있고(Manz 등, 1993), 또한 수생태계를 대상으로 조사한 연구결과에서는 52~78% 정도로 보고되고 있다(Glöckner 등, 1999). Fig. 3에서 볼 수 있듯이 BDOC<sub>rapid</sub>의 제거율이 일정하게 유지되는 즉, BDOC<sub>rapid</sub> 제거율이 정상상태에 도달한 BV 15,000 (101.4 day) 이후에 EUB/DAPI의 증가가 나타난 것으로 보아서 비교적 쉽게 생물분해되는 BDOC<sub>rapid</sub>를 유기탄소원으로 이용하는 박테리아들의 개체수가 증가하여 나타난 결과로 판단된다. 또한, BV 31,005 (209.5 day) 부근에서 EUB/DAPI가 78.4%의 높은 비율로 증가한 것으로 나타나고 있다. 이 시점은 Fig. 3의 BDOC<sub>slow</sub>의 제거율이 정상상태에 도달한 시점으로 비교적 느린 생물분해능을 나타내는 BDOC<sub>slow</sub>의 제거율이 83% 정도로 매우 높게 나타나고 있다. BDOC<sub>slow</sub>의 경우는 용존 유기물질이 수류의 흐름을 따라서 입상활성탄 입자들 사이를 통과하면서 입상활성탄 표면에 형성되어 있는 생물막(biofilm)에 서식하는 부착 박테리아들의 세포막을 통해 흡수·생물분해되는 직접적인 생물분해 메커니즘을 거치기 보다는 입상활성탄의 세공(pore)에 흡착 또는 입상활성탄 표면의 생물막에 생흡착(biosorption)되어 세공에 서식 또는 생물막에 서식하는 부착 박테리아들이 분비하는 효소에 의해 물질의 구조적인 변화가 야기된 후에 부착 박테리아들의 유기탄소원으로 이용되는 간접적인 생물분해 메커니즘을 따르는 것으로 보고되고 있다(Son 등, 2009). 따라서 BDOC<sub>slow</sub>의 제거율이 정상상태에 도달하였다는 것은 입상활성탄의 표면 및 세공에 형성된 생물막 부착 박테리아들의 생체량이 최대화되었다는 것을 의미하며, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 부착 미생물의 총세균수, Eubacteria의 개체수 및 ATP 농도가 정상상태에 도달한 것을 알 수 있다.

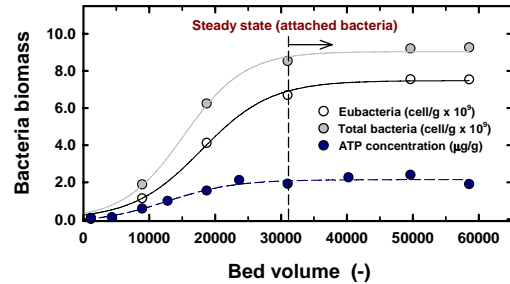


Fig. 4. Variations of attached bacteria biomass according to the operated bed volumes.

### 3.3. FISH법을 이용한 운전기간 증가에 따른 부착 박테리아 군집 분석

GAC 신탄을 충전한 활성탄 접촉조의 운전기간 증가에 따른 표층(bed depth : - 5 cm)에서 채집한 활성탄의 부착박테리아의 군집을 FISH법을 이용하여 분석한 결과를 Fig. 5와 Table 3에 나타내었다.

활성탄 접촉조의 운전 초기 단계인 BV 1,150 (7.8 day)일 때는 Fig. 5에는 부착 박테리아들의 생체량이 너무 적어서 거의 나타나지 않았으나,  $\alpha$ -Proteobacteria group이  $7.6 \times 10^6$  cell/g으로 가장 우점하였고, 다음으로  $\beta$ -Proteobacteria group, Bacteroidetes group,  $\gamma$ -Proteobacteria group이 각각  $6.6 \times 10^6$  cell/g,  $2.1 \times 10^6$  cell/g,  $1.4 \times 10^6$  cell/g으로 많은 개체수를 나타내었다. BV 8,916 (60.2 day)에서는 BV 1,150 (7.8 day)일 때에 비해 Eubacteria의 개체수가 약 50배 정도 증가하였으며, 우점한 종은  $\gamma$ -Proteobacteria group으로 개체수는  $4.5 \times 10^8$  cell/g으로 나타났다. 다음으로는 HGC group으로  $2.3 \times 10^8$  cell/g의 개체수를 나타내어 BV 1,150 (7.8 day)에 비해 높은 증가세를 보였다.  $\alpha$ -Proteobacteria group,  $\beta$ -Proteobacteria group 또한  $2.0 \times 10^8$  cell/g,  $1.5 \times 10^8$  cell/g의 개체수로 높은 분포를 나타내었다.

BV 18,720 (126.5 day)에서는  $\alpha$ -Proteobacteria group이  $9.5 \times 10^8$  cell/g으로 가장 우점하였고, 다음으로  $\gamma$ -Proteobacteria group, Bacteroidetes group과  $\beta$ -Proteobacteria group이 각각  $7.8 \times 10^8$  cell/g,  $6.2 \times 10^8$  cell/g과  $5.5 \times 10^8$  cell/g으로 나타났다. 또한 Firmicutes group이  $4.6 \times 10^8$  cell/g으로 개체수가 많이 증가하였다. 그 외의 group들은 약 3~11배 정도 개체수가 증가하였

으나 Eubacteria 개체수 전체로 볼 때 약 10% 정도 분포하는 것으로 나타났다.

BV 31,005 (209.5 day) 일 때는 BV 18,720 (126.5 day)에 비해 Eubacteria 개체수가 약 30% 정도 증가를 나타내어 부착 박테리아들의 개체수 증가경향이 많이 둔해졌으며, 박테리아 분포는  $\alpha$ -Proteobacteria 및  $\gamma$ -Proteobacteria group이 각각  $1.5 \times 10^9$  cell/g으로 나타나 우점하였다.

BV 49,632 (335.4 day) 일 때도  $\alpha$ -Proteobacteria group과  $\gamma$ -Proteobacteria이 각각  $1.6 \times 10^9$  cell/g의 같은 개체수를 나타내어 가장 우점하였고, 다음으로  $\beta$ -Proteobacteria group이  $1.2 \times 10^9$  cell/g으로 나타났다. HGC group과 Bacteroidetes group은 각각  $7.3 \times 10^8$  cell/g 및  $6.8 \times 10^8$  cell/g으로 나타났고, HGC group은 BV 31,005 (209.5 day) 일 때에 비해 개체수의 감소를 보였다. Planctomycetes group은  $3.3 \times 10^8$  cell/g으로 나타나 개체수가 4배 정도 증가하였다.

BV 58,560 (395.7 day) 일 때는 부착 박테리아들의 개체수 및 group 별 분포는 BV 49,632 (335.4 day)와 매우 유사하게 나타났으며,  $\gamma$ -Proteobacteria group이 전 범위에

걸쳐 높은 개체수를 나타내었다. 전체적으로 보면 부착 박테리아들 군집의 안정화가 진행되는 BV 18,720 (126.5 day) 이후로는  $\alpha$ -Proteobacteria 및  $\gamma$ -Proteobacteria group이 거의 우점을 하는 것으로 나타났으며, 다음으로  $\beta$ -Proteobacteria group, Bacteroidetes group, HGC group, Firmicutes group 순으로 조사되었고, 그 외의 group 들은 10% 정도의 분포율을 나타내었다. Acinetobacter spp. group은  $\gamma$ -Proteobacteria group에 포함되는 group이기 때문에 Fig. 5에서는 Acinetobacter spp. group을 따로 표시해서 나타내지 않고  $\gamma$ -Proteobacteria group에 포함시켜 도식화하였으며, Table 3에는 Acinetobacter spp. group을  $\gamma$ -Proteobacteria group에서 분리하여 표현하였다. 초기 운전을 제외하곤 전 범위에 걸쳐 Proteobacteria group( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  group)이 약 55% 정도의 분포를 보였으며, Bacteroidetes group, HGC group 및 Firmicutes group 등이 각각 10% 정도의 분포비율로 존재하였다.

또한, Fig. 3에 나타낸 BDOC 결과와 연계해서 살펴보면  $\gamma$ -Proteobacteria group과 HGC group의 분포비율이 각각 40% 및 17%로 급격히 증가한 BV 8,916 (60.2

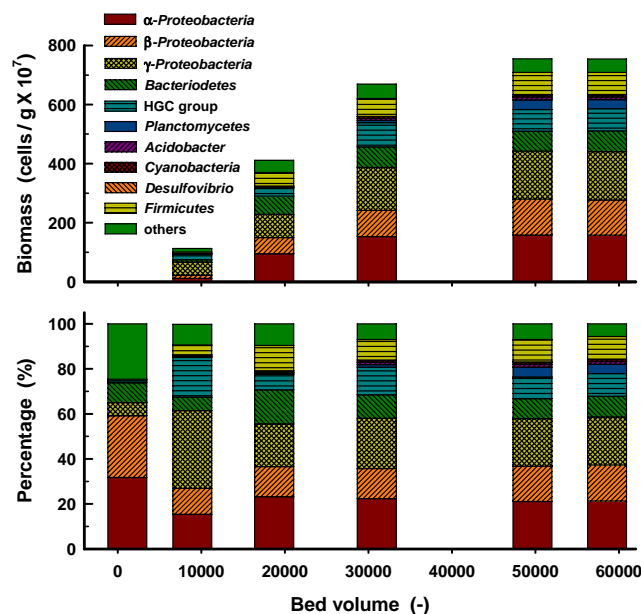


Fig. 5. Variations of attached bacterial biomass (up) and percentage (down) using FISH method according to operated bed volume.

day)의 경우는 BDOC<sub>rapid</sub>의 잔존비 곡선이 서서히 안정화되는 단계로 나타나  $\gamma$ -Proteobacteria group 및 HGC group이 BDOC<sub>rapid</sub>의 제거와 많은 연관이 있을 것으로 판단된다.  $\gamma$ -Proteobacteria group 수 생태계에 많이 존재하는 *Pseudomonas*와 *Azotobacter*, *Klebsiella* 등이 여기에 속하며(Delong 등, 1993), 분해가 용이한 유기물질을 이용하여 빠른 성장능을 가진 group으로 알려져 있다(Glückner 등, 1999). 또한, 이 시기에 Eubacteria에는 속하지만 본 연구에서 사용한 FISH probe에는 검출되지 않은 others group의 이전의 24%에서 11% 정도로 감소한 것으로 나타났다. BV 18,720 (126.5 day) 이후로는 BDOC<sub>slow</sub> 잔존비 곡선이 안정화 단계에 접어드는 시점으로  $\alpha$ -Proteobacteria group, *Bacteriodes* group 및 *Firmicutes* group의 우점비율이 23%, 15% 및 11% 정

도로 급증하였다. 따라서 이러한 group들이 BDOC<sub>slow</sub>를 구성하는 물질들을 유기 탄소원으로 사용할 가능성이 높은 것으로 판단된다.

BAC 공정의 운전기간(BV) 증가에 따른 활성탄에 부착된 Eubacteria 생체량과 ATP 농도와의 상관성을 BV 1,150 (7.8 day)에서 BV 58,560 (395.7 day)까지 총 6회의 실험결과를 이용하여 평가한 것을 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 7에서 볼 수 있듯이 Eubacteria 생체량과 ATP 농도와의 상관성( $r^2$ )은 0.9448로 아주 밀접한 것으로 나타났으며, 그래프에는 나타내지 않았으나 총 세균(DAPI)의 생체량과 ATP 농도와의 상관성( $r^2$ )은 0.9631로 Eubacteria 생체량과 ATP 농도와의 상관성( $r^2$ ) 보다 높게 나타났다.

**Table 3.** Bacterial biomass in biological activated carbon (BAC) according to operated bed volume (unit: cells/g)

Bacteria group	Bed volume(BV)					
	1150 (7.8 day)	8916 (60.2 day)	18720 (126.5 day)	31005 (209.5 day)	49632 (335.4 day)	58560 (395.7 day)
$\alpha$ -Proteobacteria	7.6×10 <sup>6</sup> (31.7%)	2.0×10 <sup>8</sup> (15.4%)	9.5×10 <sup>8</sup> (23.2%)	1.5×10 <sup>9</sup> (22.4%)	1.6×10 <sup>9</sup> (21.1%)	1.6×10 <sup>9</sup> (21.3%)
$\beta$ -Proteobacteria	6.6×10 <sup>6</sup> (27.5%)	1.5×10 <sup>8</sup> (11.5%)	5.5×10 <sup>8</sup> (13.4%)	8.9×10 <sup>8</sup> (13.3%)	1.2×10 <sup>9</sup> (15.7%)	1.2×10 <sup>9</sup> (16.0%)
$\gamma$ -Proteobacteria	1.4×10 <sup>6</sup> (5.8%)	4.5×10 <sup>8</sup> (34.6%)	7.8×10 <sup>8</sup> (19.0%)	1.5×10 <sup>9</sup> (22.4%)	1.6×10 <sup>9</sup> (21.1%)	1.6×10 <sup>9</sup> (21.3%)
<i>Bacteroidetes</i>	2.1×10 <sup>6</sup> (8.8%)	7.7×10 <sup>7</sup> (5.9%)	6.2×10 <sup>8</sup> (15.1%)	7.0×10 <sup>8</sup> (10.4%)	6.8×10 <sup>8</sup> (8.9%)	7.0×10 <sup>8</sup> (9.3%)
HGC	2.9×10 <sup>5</sup> (1.2%)	2.3×10 <sup>8</sup> (17.7%)	2.8×10 <sup>8</sup> (6.8%)	8.2×10 <sup>8</sup> (12.2%)	7.3×10 <sup>8</sup> (9.6%)	7.5×10 <sup>8</sup> (10.0%)
<i>Acinetobacter</i> spp.	1.1×10 <sup>5</sup> (0.4%)	2.2×10 <sup>6</sup> (0.2%)	1.1×10 <sup>7</sup> (0.3%)	8.1×10 <sup>7</sup> (1.2%)	1.0×10 <sup>8</sup> (1.3%)	9.9×10 <sup>7</sup> (1.3%)
<i>Planctomycetes</i>	6.5×10 <sup>4</sup> (0%)	5.6×10 <sup>6</sup> (0.4%)	1.5×10 <sup>7</sup> (0.4%)	7.9×10 <sup>7</sup> (1.2%)	3.3×10 <sup>8</sup> (4.3%)	3.1×10 <sup>8</sup> (4.1%)
<i>Acidobacter</i>	7.9×10 <sup>4</sup> (0%)	2.0×10 <sup>6</sup> (0.2%)	2.1×10 <sup>7</sup> (0.5%)	6.6×10 <sup>7</sup> (1%)	9.5×10 <sup>7</sup> (1.3%)	9.4×10 <sup>7</sup> (1.3%)
<i>Cyanobacteria</i>	1.0×10 <sup>4</sup> (0%)	7.8×10 <sup>6</sup> (0.6%)	2.9×10 <sup>7</sup> (0.7%)	6.5×10 <sup>7</sup> (1%)	7.5×10 <sup>7</sup> (1.0%)	7.1×10 <sup>7</sup> (1.0%)
<i>Desulfovibrio</i> spp.	2.1×10 <sup>4</sup> (0%)	5.5×10 <sup>5</sup> (0%)	3.0×10 <sup>6</sup> (0.1%)	4.1×10 <sup>5</sup> (0%)	8.0×10 <sup>6</sup> (0.1%)	9.0×10 <sup>6</sup> (0.1%)
<i>Firmicutes</i>	1.0×10 <sup>5</sup> (0.4%)	5.6×10 <sup>7</sup> (4.3%)	4.6×10 <sup>8</sup> (11.2%)	6.1×10 <sup>8</sup> (9.1%)	7.5×10 <sup>8</sup> (9.9%)	7.5×10 <sup>8</sup> (10%)
Others	5.9×10 <sup>6</sup> (24.6%)	1.2×10 <sup>8</sup> (9.2%)	3.9×10 <sup>8</sup> (9.6%)	4.7×10 <sup>8</sup> (7.0%)	5.3×10 <sup>8</sup> (7.0%)	4.2×10 <sup>8</sup> (5.6%)
Eubacteria	2.4×10 <sup>7</sup> (100%)	1.3×10 <sup>9</sup> (100%)	4.1×10 <sup>9</sup> (100%)	6.7×10 <sup>9</sup> (100%)	7.6×10 <sup>9</sup> (100%)	7.5×10 <sup>9</sup> (100%)



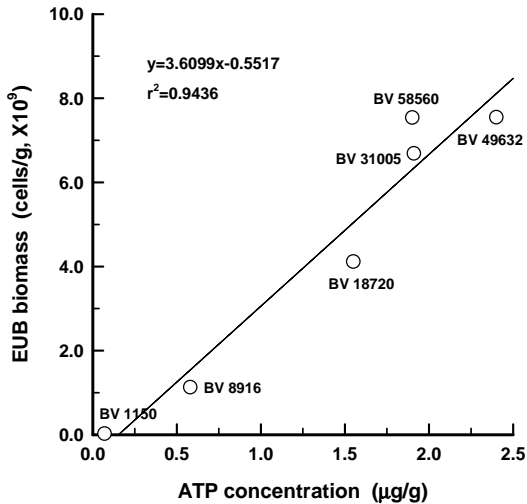


Fig. 6. Relationship of *Eubacteria* biomass and ATP concentrations according to operated bed volume.

#### 4. 결론

BAC 공정 운전초기부터 부착 박테리아들의 생체량이 정상상태(steady-state)에 도달한 이후까지 BDOC<sub>total/rapid/slow</sub> 제거율의 변화와 FISH 분석과 ATP 분석을 통하여 부착 박테리아들의 군집과 생체량을 평가해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 용존 유기물질 제거율 평가에 따른 BAC 공정의 정상상태 도달 여부 평가결과를 보면 DOC의 경우 운전 BV 27,500 (185.8 day) 부근에서 BAC 공정이 정상상태에 도달하였고, BDOC<sub>rapid</sub>와 BDOC<sub>total/slow</sub>의 경우는 각각 운전 BV 15,000 (101.4 day) 부근과 32,000 (216.2 day) 부근에서 정상상태에 도달하였다.

2. BAC 공정의 운전기간 증가에 따른 ATP 농도 분석을 통한 부착 박테리아들의 생체량 평가결과 BV 22,500 (152.0 day) 이후로 거의 일정한 ATP 농도를 나타내었으며, 이 때 ATP 농도는 2.14 µg/g 정도로 나타났다.

3. 운전기간 증가에 따른 BAC 부착 총세균수(DAPI)를 보면 운전초기(BV 1,150 - 7.8 day)의 경우  $4.01 \pm 0.4 \times 10^7$  cells/g이었으며, BV 58,560 (395.7 day)에서는  $9.27 \pm 0.2 \times 10^9$  cells/g로 BV 1,150 (7.8 day)일 때에 비해

약 200배 증가하였다. 또한, 총세균수(DAPI)의 증가는 BV 18,720 (126.5 day) 이후로는 상승세가 점차 둔화되면서 박테리아 군집의 안정화를 보였다.

4. BAC 공정의 운전기간 증가에 따른 BAC 부착 총세균수(DAPI)에 대한 *Eubacteria*의 비율(EUB/DAPI)은 BV 1,150 (7.8 day)와 BV 8,916 (60.2 day)일 때 60.1%로 나타났으며, BV 18,720 (126.5 day)일 때 66.0%, BV 31,005 (209.5 day)일 때 78.4%, BV 49,632 (335.4 day)일 때 82.0% 및 BV 58,560 (395.7 day)일 때 81.3%로 나타났다.

5. BDOC<sub>rapid</sub>의 잔존비 곡선이 서서히 안정화 직전단계인 BV 8,916 (60.2 day)에서는  $\gamma$ -*Proteobacteria* group 및 HGC group이 우점하였으며, 또한 BV 18,720 (126.5 day) 이후로는 BDOC<sub>slow</sub> 잔존비 곡선이 안정화 단계에 접어드는 시점으로  $\alpha$ -*Proteobacteria* group, *Bacteroides* group 및 *Firmicutes* group의 우점비율이 23%, 15% 및 11% 정도로 급증하였다.

6. BAC 공정의 운전초기를 제외하곤 전 범위에 걸쳐 *Proteobacteria* group ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  group)이 약 55% 정도의 분포를 보였으며, 그 중  $\gamma$ -*Proteobacteria* group이 BAC 공정의 운전기간 전 범위에 걸쳐 가장 우점을 보였고, *Bacteroidetes* group, HGC group 및 *Firmicutes* group 등이 각각 10% 정도의 분포로 존재하였다.

7. *Eubacteria* 생체량과 ATP 농도와의 상관성( $r^2$ )은 0.9448이었으며, 총세균과의 상관성( $r^2$ )은 0.9631로 나타났다.

#### 감사의 글

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

#### 참고 문헌

- Boon, N., Pycke, B. F. G., Marzorati, M., Hammes, F., 2011, Nutrient gradients in a granular activated carbon biofilter drives bacterial community organization and dynamics, *Water Res.*, 45, 6355-6361.
- Carlson, K. H., Amy, G. L., 1998, BOM removal during biofiltration, *J. AWWA.*, 90(12), 42-52.

- Chien, C. C., Kao, C. M., Chen, C. W., Dong, C. D., Wu, C. Y., 2008, Application of biofiltration system on AOC removal: column and field studies, *Chemosphere*, 71, 1786-1793.
- Delong, E. F., Wickham, G. S., Davis, A. A., 1993, Phylogenetic diversity of substrate marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans, *Science*, 243, 1360-1363.
- Dewaters, J. E., Digiano, F. A., 1990, The influence of ozonated natural organic matter on the biodegradation of a micropollutant in a GAC bed, *J. AWWA*, 82(8), 69-75.
- Faoro, H., Alves, A. C., Souza, E. M., Rigo, L. U., Cruz, L. M., Al-Janabi, S. M., Monteiro, R. A., Baura, V. A., Pedrosa, F. O., 2010, Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(14), 4744-4749.
- Fonseca, A. C., Summers, R. S., Hernandez, M. T., 2001, Comparative measurements of microbial activity in drinking water biofilters, *Water Res.*, 35(16), 3817-3824.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M., Amann, R., 1999, Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8), 3721-3726.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., Wagner, M., 2002, The Microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA Approach, *Syst. Appl. Microbiol.*, 25, 84-99.
- Lew, S., Lew, M., Miesszczyński, T., Szarek, J., 2010, Selected fluorescent techniques for identification of the physiological state of individual water and soil bacterial cells-review, *Folia Microbiol.*, 55(2), 107-118.
- Lymperopoulou, D. S., Kormas, K. A., Karagoun, A. D., 2012, Variability of prokaryotic community structure in a drinking water reservoir (marathonas, Greece), *Microbe Environ.*, 27(1), 1-8.
- Magic-Knezev, A., van der Kooij, D., 2004, Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment, *Water Res.*, 38, 3971-3979.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H., 1992, Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions, *Sys. Appl. Microbiol.* 15(4), 593-600.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R., Szewzyk, U., 1998, Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25, 43-61.
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K. H., Stenström, T. A., 1993, In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2293-2298.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1999, Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content, *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 186-196.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K., 1998, Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes, *Microbiol.*, 144(12), 3257-3266.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G., 1997, PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3327-3332.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., 2002, *Microbiology*, McGraw-Hill Higher Education, New-York.
- Seredyńska-Sobecka, B., Tomaszewska, M., Janus, M., Morawski, A. W., 2006, Biological activation of carbon filters, *Water Res.*, 40, 355-363.
- Servais, P., Billen, G., Bouillot, P., 1994, Biological colonization of granular activated carbon filters in drinking-water treatment, *J. Environ. Eng.*, 120(4), 888-899.
- Son, H. J., Park, H. K., Lee, S. A., Jung, E. Y., Jung, C. W., 2005, The characteristics of microbial community for biological activated carbon in water treatment plant, *Environ. Eng. Res.*, 27(12), 1311-1320.
- Son, H. J., Roh, J. S., Kang, L. S., 2004, Determination of BDOC<sub>rapid</sub> and BDOC<sub>slow</sub> using batch bio-reactor, *K. Society on Water Environ.*, 20(4), 357-364.
- Son, H. J., Yoo, S. J., Roh, J. S., Yoo, P. J., 2009, Biological activated carbon (BAC) process in water treatment,

- Environ. Eng. Res., 31(4), 308-323.
- Son, H. S., Kim, M., Jeing, S. Y., Kim, H. Y., Park, G. T., Kim, M. J., Ryu, E. Y., Lee, S. J., 2008, Anaysis of bacterial community structure of biological activated carbon process in drinking water treatment plant using FISH, *J. Environ. Sci.*, 17(5), 555-564.
- Stewart, M. H., Wolfe, R. L., Means, E. G., 1990, Assessment of the bacteriological activity associated with granular activated carbon treatment of drinking-water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(12), 3822-3829.
- Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A., Ueki, K., 2007, Diversity of substrate utilization and growth characteristics of sulfate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in Japan, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 53(2), 119-132.
- Velten, S., Hammes, F., Boller, M., Egli, T., 2007, Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination, *Water Res.*, 41, 1973-1983.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Scheleifer, K., 1993, 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.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K. H., 1994, Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 792-800.
- Wakelin, S. A., Page, D. W., Pavelic, P., Gregg, A. L., Dillon, P. J., 2010, Rich microbial communities inhabit water treatment biofilters and are differentially affected by filter type and sampling depth, *Water Sci. & Technol.: Water Suppl.*, 10(2), 145-156.
- Wang, J., Jenkins, C., Webb, R. I., Fuerst, J. A., 2002, Isolation of Gemmata-like and Isosphaera-like planctomycete bacteria from soil and freshwater, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(1), 417-422.