

고농도 염분폐수의 정화능이 우수한 기능성 미생물 커뮤니티의 군집 분석

이재원^{1,2}, 김병혁¹, 박용석², 송영채^{1*}, 고성철^{1*}

¹한국해양대학교 환경공학과

²큐바이오틱(주)

Received: October 2, 2014 / Revised: December 3, 2014 / Accepted: December 4, 2014

Microbial Community Analysis in the Wastewater Treatment of Hypersaline-Wastewater

Jae-Won Lee^{1,2}, Byung-Hyuk Kim¹, Yong-Seok Park², Young-Chae Song¹, and Sung-Cheol Koh^{1*}

¹Department of Environmental Engineering, Korea Maritime and Ocean University, Busan 605-801, Republic of Korea

²Q-BioTech Corporation, Ulsan 680-110, Republic of Korea

In this study, a wastewater treatment system for hypersaline wastewater utilizing the Hypersaline Wastewater Treatment Community (HWTC) has been developed. The hypersaline wastewater treatment efficiency and microbial community of the HWTC were investigated. The average removal efficiencies of chemical oxygen demand were 84% in an HRT of 2.5 days. Microbial community analysis, by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments and 16S rRNA gene clone library, revealed community diversity. The 16S rRNA gene analysis of dominant microbial bacteria in 4% hypersaline wastewater confirmed the presence of *Halomonas* sp. and *Paenibacillus* sp. Phylogenetic analysis suggested that the taxonomic affiliation of the dominant species in the HWTC was γ -proteobacteria and firmicutes. These results indicate the possibility that an appropriate hypersaline wastewater treatment system can be designed using acclimated sludge with a halophilic community.

Keywords: Wastewater treatment, hypersalinity treatment, microbial community

서론

염분을 고농도로 함유하는 폐수는 석유화학, 직물, 가죽 산업 등의 다양한 산업으로부터 발생한다. 또한, 고농도의 염분을 함유한 폐수는 원료 물질의 종류에 따라서 폐수내 오염 물질의 성상이 변한다. 일반적으로 고농도의 염분을 함유하는 폐수는 높은 염분과 다량의 유기 물질을 함유하고 있으며, 이러한 염분이 높은 폐수가 처리되지 않고 환경으로 유입 될 경우 토양, 표층수, 지하수 등의 염류의 함량을 높

여(salinification) 환경 오염을 유발한다. 염분을 함유하는 폐수의 처리는, 일반적으로 물리적 처리와 화학적 처리를 병행하는 처리법이 사용되고 있다. 그러나 물리적 화학적 처리방법을 통한 고농도의 염분을 함유하는 폐수 처리방법은 에너지 소비가 매우 높고, 운전 비용이 매우 비싸다. 염분폐수의 생물학적 처리방법은 물리적 처리와 화학적 처리를 병행하는 방법보다 저렴하다는 장점을 가지고 있다. 고농도의 염분을 함유하는 폐수를 처리하기 위한 기존의 생물학적 처리기술은 발생하는 폐수를 희석하여 활성슬러지 공정을 적용하고 있는 실정이다. 그러나 이와 같은 처리방법은 생산시설의 증설과 기존의 희석방식으로 폐수처리시설 증설에 따른 부지 확보가 힘들며, 희석수의 사용량이 증가하는 문제가 수반된다. 또한, 기존 활성슬러지 방법은 염분에 의하여 염분 폐수의 정화가 강력하게 저해받는다. 염분의 농도가 증가할 경우 삼투압에 의하여 세포가 파괴되기 쉬운 활성슬러지 내의 생물학적 플럭이 감소되고 이에 따라 슬러지를 구성하는 플

*Corresponding authors

Y.-C. S.

Tel: +82-51-410-4417, Fax: +82-51-410-4415

E-mail: soyc@kmou.ac.kr

S.-C. K.

Tel: +82-51-410-4418, Fax: +82-51-410-4415

E-mail: skoh@kmou.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

력이 해제되어 불량한 슬러지의 침강 특성을 보이게 되어 결국 부유 고형물(suspended solid; SS)의 유출이 많아져 오염 물질의 제거율이 저하되는 결과를 초래한다.

일반적인 활성슬러지 공법에서 염농도가 1% (w/v)를 초과하는 폐수를 처리시 활성슬러지내의 박테리아의 원형질 분리현상으로 인해 COD 제거효율이 낮게 나타난다고 보고되었다[3, 21, 28]. 또한, 전통적인 생물학적 처리방법은 염농도 3% 이하의 폐수만을 처리 가능하며, 3% 이상의 염분을 함유한 폐수는 처리가 매우 어렵다고 알려져있다[20, 33]. 한편 고농도의 염분은 미생물의 활성을 저해하며[1, 3, 14, 15], 특히 폐수처리에 있어서 염의 갑작스러운 유입은 점진적인 유입보다 훨씬 더 부정적인 효과가 크다고 보고되고 있다[3, 24]. 이외에도 RBC 공법을 이용한 염폐수 처리시 염분의 고농도 조건에서 미생물 활성의 저해가 발생하였으며[16], 고염 조건에서는 염폐수의 질산화 및 탈질화 효율도 감소하는 것으로 조사되었다[11]. 이와 같이 고농도의 염을 함유한 폐수는 미생물처리시 여러 악영향을 끼친다. 또한, 미생물 활성의 증대를 위해 염폐수에서 역삼투압 방식이나 이온교환을 통해 염을 제거하는 방식이 제시되고 있으나 염분제거 과정에 들어가는 비용이 매우 비싸다는 단점을 가지고 있다. 이에 고농도의 염분을 함유하는 폐수의 생물학적 처리를 효과적으로 수행하기 위해서는 생물반응조의 미생물 유실을 방지하여 미생물을 고농도로 유지하고 슬러지 반송시간(sludge retention time; SRT)을 증가시켜 일반적인 활성슬러지보다 빠른 분해속도를 유지함으로써 높은 제거 효율과 양호한 처리 수질을 얻을 수 있는 기술과 함께, 고농도의 염분 농도 폐수에서도 우수한 정화능을 보유하는 미생물 커뮤니티의 개발이 필수적이다. 순수한 호염 미생물에 의한 고염폐수의 생물학적 처리는 생물막 공법과 연속 회분식 반응조에서 연구된 바가 있으며[32, 33], 호염 미생물을 포함한 활성슬러지의 배양으로 회전원판법에서 고염의 폐수처리시 COD 제거효율이 증가함을 확인한 연구도 발표되었다[10]. 그러나, 단일 미생물을 이용하여 오염 물질을 정화하는 유기물 분해 능력이 우수하고 내염성을 갖으며, 고염의 조건에서 높은 활성을 유지하는 *Halomonas* sp. [9], 내염성이 우수한 *Oceanobacillus* sp. [13]와 7.2%의 고염환경에서 분리한 *Staphylococcus xylosus* [1] 등의 고염에서 성장하는 미생물이 보고된 바 있다. 그러나, 단일 미생물로 분해할 수 있는 물질의 종류나 농도가 한정되고, 단일 미생물로 고염의 폐수를 처리하기에는 어려운 실정이다. 자연계에 존재하는 미생물들은 단일 미생물로서 역할을 하기보다는, 다른 미생물과 주변 환경과 상호작용을 이루며 미생물 군집을 형성하여 존재한다. 또한, 미생물 군집을 이룰 때 발현 특성은 개별적으로 존재하는 경우와는 상이하게 다르기 때문에 미생물 군집의 이해가 필수적이다[12]. 이렇듯 환경내의 미생물들은 커

뮤니티로 존재함에도 불구하고 고염폐수의 정화에 관련된 연구들이 단일 미생물에 집중되어 왔기 때문에 고염폐수를 정화하는 미생물 커뮤니티에 관한 실험이 매우 부족한 실정이다[9, 13].

이에 본 연구에서는 고농도의 염분을 함유한 폐수의 정화 능력이 우수한 기능성 커뮤니티를 확보하고, 확보된 커뮤니티를 구성하는 미생물의 다양성을 확인하여 고농도 염분폐수 기능성 미생물 커뮤니티의 유용성을 밝히기 위해 연구하였다. 또한, 고농도의 염분으로 오염된 시료에서 확보한 미생물 커뮤니티의 우점 미생물들을 동정하여 계통학적으로 분석하고, 고농도 염분을 함유한 폐수의 정화율을 분석하여 기능성 미생물 커뮤니티의 유용성을 확인하였다.

실험재료 및 방법

본 실험에 사용된 폐수는 고농도의 염분을 함유하고 있는 K사의 epoxy 폐수로서 CODcr이 약 8,500 ppm, total chloride (Cl⁻) 9%, pH 12, total nitrogen (TN) 100 ppm, NH₃-N 90 ppm, total phosphorus (TP) 3 ppm의 성상을 가지고 있다. 이외에도 아닐린이 약 300 ppm 정도 함유되어 있어서 실험시 Feed는 톨루엔을 이용하여 아닐린을 제거하였다. 아닐린의 제거가 우수한 비율은 원수:톨루엔 1:0.25로 확인되어 이 비율로 실험에 사용하였다. 따라서, 최종적으로 아닐린이 제거된 Feed는 CODcr이 약 5,000-6,000 ppm 사이였다. 연속반응조 운전시 초기 폐수를 희석하여 total chloride가 4% 되게 운전하였다.

반응기 및 운전조건

실험에 사용된 반응조(Q-biotech, Lab-Scale Fermenter)는 온도, pH, DO를 실시간으로 모니터링 가능하며 실험시 working volume을 3 L로 하였다. 반응조는 온도 35°C, DO 2.0-2.5 ppm, pH 7.0-7.5 조건으로 운전되었으며 모든 조건은 PLC를 이용하여 자동으로 제어하였다(Fig. 1). 또한 Feed의 주입은 정량 pump를 사용하여 주입하였으며 운전시 체류시간이 약 2.5일 CODcr 용적부하로 2 kg CODcr/m³/day 되게 주입하였다. MLSS의 유지를 위하여 침전조에서 슬러지 반송량을 주입 Feed 량의 약 2배가 되게 하였고 운전기간 중 조내의 MLSS는 2,500-3,000 ppm되게 유지하였다. 본 실험에 사용된 식중슬러지는 Q-biotech사의 고농도 생물학적 전처리장치(QBR)가 적용된 S사의 QBR 포기조 슬러지를 채취하여 순응시킨 후 약 1개월 이상 운전하였다.

수질측정

반응조 내 시료를 매일 30 ml 채취하였으며, 채취한 시료는 0.45 μm 마이크로 여과지로 여과하여 COD를 측정하였

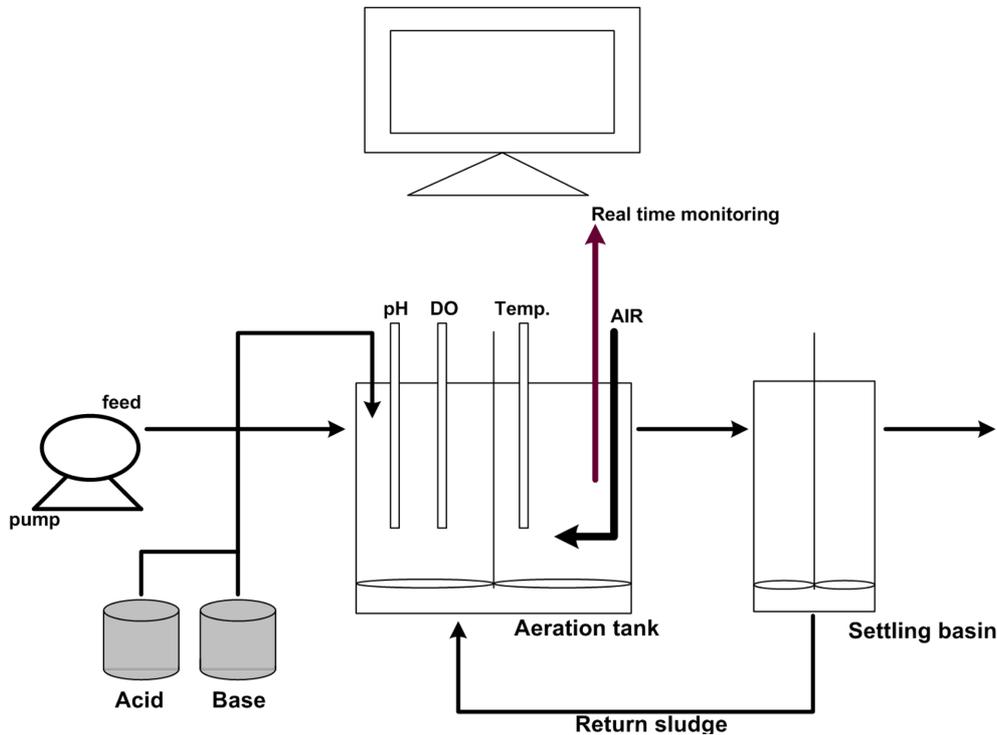


Fig. 1. Scheme of reactor for high salt wastewater.

다. COD 분석은 Standard method의 크롬법을 이용하여 분석하였다[2].

DNA extraction

포기조내 시료 1.5 ml로부터 FastDNA Spin kit for Soil (MP bio, USA)을 이용하여 total DNA를 추출하였으며, 시료로부터 얻은 DNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.

16S rRNA gene clone library를 통한 미생물 군집분석

16S rRNA gene clone library 분석을 위한 PCR은 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 사용하였고, 이 primer를 이용하여 50 μ l 안에 1 \times PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μ M), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다[22, 23]. 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 pre-denaturation 시켜, 94°C에서 1 min denaturation, 60°C에서 1 min annealing, 72°C에서 1 min 30 sec extension하고 72°C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. 16S rRNA gene clone library 구축을 위해 PCR 증폭산물을 1% agarose gel에 loading한 후 약 1,500 bp 크기의 band를 잘라, LaboPass Gel Extraction kit (CosmoGen, Korea)를 이용하여 정제한 후, T-Blunt vector (Solgent, Korea)에

ligation하고, 이 plasmid를 *E. coli* DH5 α (RBC Korea, Korea)에 넣은 후 LB + kanamycin 배지에서 키워 생성된 colony들을 16S rRNA gene 분석에 이용하였다.

DGGE 분석을 위한 PCR 조건

포기조의 미생물 군집을 분석하기 위하여, 분자 생물학적 기법인 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 이용하였다. 미생물 다양성을 확인하기 위하여 시료로부터 얻은 DNA를 주형으로 1차 PCR과 nested-PCR 반응을 수행하였다. DGGE 분석을 위하여, 1차 PCR의 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행하였으며, 16S rDNA를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 40개의 GC-clamp가 붙은 341F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 786R (5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC-3')을 이용하였다 [6, 7]. 2차 PCR을 위한 PCR mixture는 1차 PCR에 사용된 것과 동일하며, 사용된 PCR 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 45 sec denaturation, 60°C에서 45 sec annealing, 72°C에서 45 sec extension하고 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. Annealing 온도는 초기에는 60°C에서 시작해서 1 cycle 당 0.5°C 감소하게 20 cycles 수행하였고, 그 후 50°C에서 15 cycles을 수행하여 touch-down PCR을 완료하였고, 2차 PCR의 산물을

이용하여 DGGE를 수행하였다[23].

DGGE 운전 조건

PCR 산물은 Dcode™ System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 DGGE를 수행하였다[23]. Denaturing gradient gel은 10% polyacrylamide (37.5:1 = acrylamide:bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 40-70%까지 농도구배가 형성되도록 첨가하여 제작하였으며, 제작된 DGGE gel에 PCR 증폭산물을 30 µl씩 loading하여 1× TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 115 V로 19시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 DGGE gel은 ethidium bromide (1:10,000)에서 염색한 후, UV로 확인하였다[23].

염기서열분석

DGGE gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 band를 선택한 후, 잘라내어 3차 멸균수 50 µl를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 상등액을 취하였다. Band에서 회수한 DNA를 주형으로 PCR에 사용한 primer를 이용하여 재증폭을 수행했으며, PCR 산물은 아가로스젤에서 전기영동하여 DNA recovery kit (QIAGEN, Germany)로 정제한 후 cloning 하였다. Cloning은 T-Blunt vector (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하였고, manufacturer’s protocol을 따라 수행하여 16S rRNA gene의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여

BLAST search를 통해 분석하였다[12].

결과 및 고찰

수질정화능력

본 연구는 고농도의 염분을 함유하고 있는 폐수의 정화능이 우수한 기능성 미생물 커뮤니티(Hypersaline Wastewater Treatment Community; HWTC)를 집적배양을 통해 확보하였다. 또한, HWTC의 고농도의 염분을 함유하고 있는 폐수의 정화능 및 활성을 조사하고, HWTC 내의 미생물을 동정하여, 미생물 다양성과 미생물 커뮤니티의 유용성을 확인하였다.

HWTC가 4% 염분을 함유하고 있는 폐수의 정화능은 CODcr 측정법을 통해 확인하였고, HWTC의 수질 정화능과 처리효율은 Fig. 2와 같다. 본 연구에 사용된 4% 염분을 함유하고 있는 폐수의 평균 CODcr은 4,924.17 ± 149.33 ppm이며, HWTC를 이용하여 처리된 방류수의 평균 CODcr은 807.67 ± 146.67 ppm으로 나타났다(Fig. 2). HWTC는 4%의 염분을 함유하고 있는 폐수를 체류시간 2.5일 만에 유입 CODcr 약 5,000 ppm의 폐수를 800 ppm 정도로 84% 이상의 처리효율을 나타냈다. 이는 고농도로 염분을 함유하고 있는 폐수에서는 매우 높은 처리효율로서, 현재까지 3% 이상의 염분을 함유하고 있는 폐수정화는 처리가 매우 어렵다고 보고되어졌으나[33], 본 연구에서 확보한 HWTC는 기존의 보고와 달리 매우 높은 처리효율을 보이는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해서 고농도의 염분을 함유하고 있는 폐수의 처

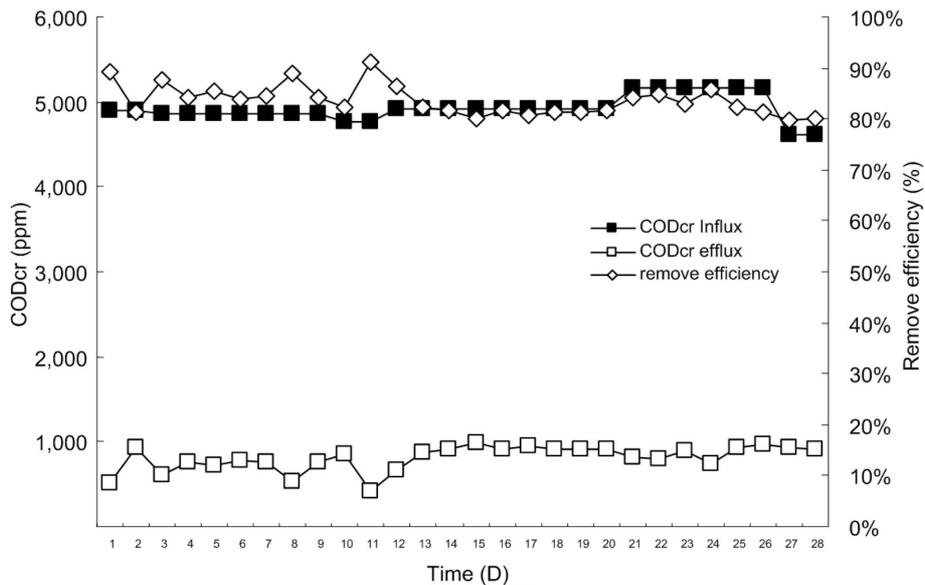


Fig. 2. Time course of COD concentrations and COD removal efficiency. ■, influent; □, effluent, ◇; COD removal efficiency.

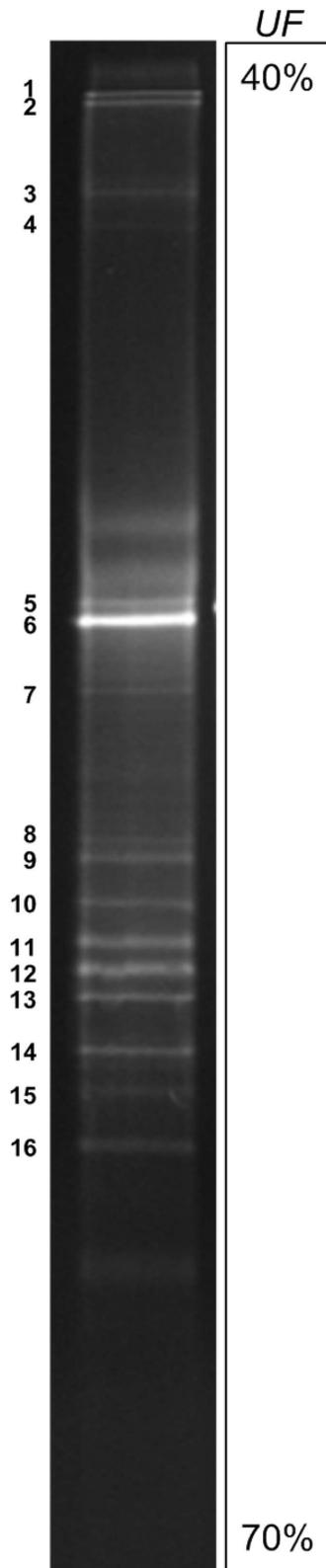


Fig. 3. DGGE profiles based on 16S rRNA gene generated from the HWTC. UF; urea-formamide concentration.

리에 있어서 기능성 미생물 커뮤니티인 HWTC의 폐수정화 능력이 매우 우수함을 확인하였으며, 1개월간의 지속적인 운전을 통해서 매우 높은 처리효율의 폐수정화능력이 안정되게 유지되는 것을 확인되었다. 또한, 반응조 운전 시작시 염분농도는 약 1.5% 정도 였으며, 반응조의 체류시간이 2.5일로 운전됨에 따라 운전시작 5일 후 반응조내의 염분농도는 약 4%로 유지되었다. 이후 반응조내의 염분농도는 4%로 유지되는 것을 확인하였다(자료 미제시).

기능성 미생물 커뮤니티 HWTC의 미생물 군집분석

4% 염분을 함유하는 폐수의 정화능이 우수한 HWTC의 미생물 다양성을 확인하기 위해 분자생물학적 기법을 이용하였다. 포기조내의 HWTC sludge로부터 DNA를 추출하여 박테리아용 universal primer로 알려진 341F-GC와 786R primer를 이용하여 PCR 증폭산물을 얻었고, agarose gel에서 예상했던 486 bp의 band를 확인하였다(자료 미제시). 미생물 군집의 다양성을 확인하는데 유용한 기법인 PCR-DGGE를 이용하여 미생물 다양성을 조사해본 결과, Fig. 3과 같이 DGGE gel 상에서 다양한 band가 나타나는 것을 확인하였다. 또한, DGGE profile 상의 각 bands로부터 회수한 DNA 염기서열을 결정하여, NCBI GenBank를 이용하여 상동성을 비교 검색하였고, Table 1과 같이 분석되었다. 박테리아 16S rRNA gene에 대해서 7개 bands에 대한 염기서열을 결정하였다(Fig. 3). 박테리아 16S rRNA gene을 분석한

Table 1. Identity of the bands obtained from 16S rRNA gene DGGE profile of the HWTC.

| Band no. | Accession no. | Description |
|----------|---------------|--|
| 1 | DQ223670 | <i>Cellulomonas</i> sp. zf-IIRht4 |
| 2 | AJ244761 | <i>Methylophaga</i> sp. V4 |
| 3 | FJ871055 | <i>Azospirillum lipoferum</i> ATCC 29707 |
| 4 | AJ302088 | <i>Halomonas</i> sp. IB-16 |
| 5 | AY635468 | <i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19 |
| 6 | AY635468 | <i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19 |
| 7 | AY962237 | <i>Halomonas kenyensis</i> AIR-2 |
| 8 | EU656113 | <i>Oceanibaculum indicum</i> P24 |
| 9 | FJ671504 | Uncultured bacterium LL143-8D11 |
| 10 | AB021183 | <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> IFO15660 |
| 11 | DQ289069 | <i>Halomonas nitritophilus</i> WST6 |
| 12 | AB021183 | <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> IFO15660 |
| 13 | CQ076331 | Uncultured bacterium clone nbw363g05c1 |
| 14 | DQ343837 | <i>Rhodocyclaceae bacterium</i> 5BCVA |
| 15 | AB301614 | <i>Lewinella cohaerens</i> |
| 16 | DQ330452 | Uncultured Bacteroidetes bacterium 05D2Z64 |

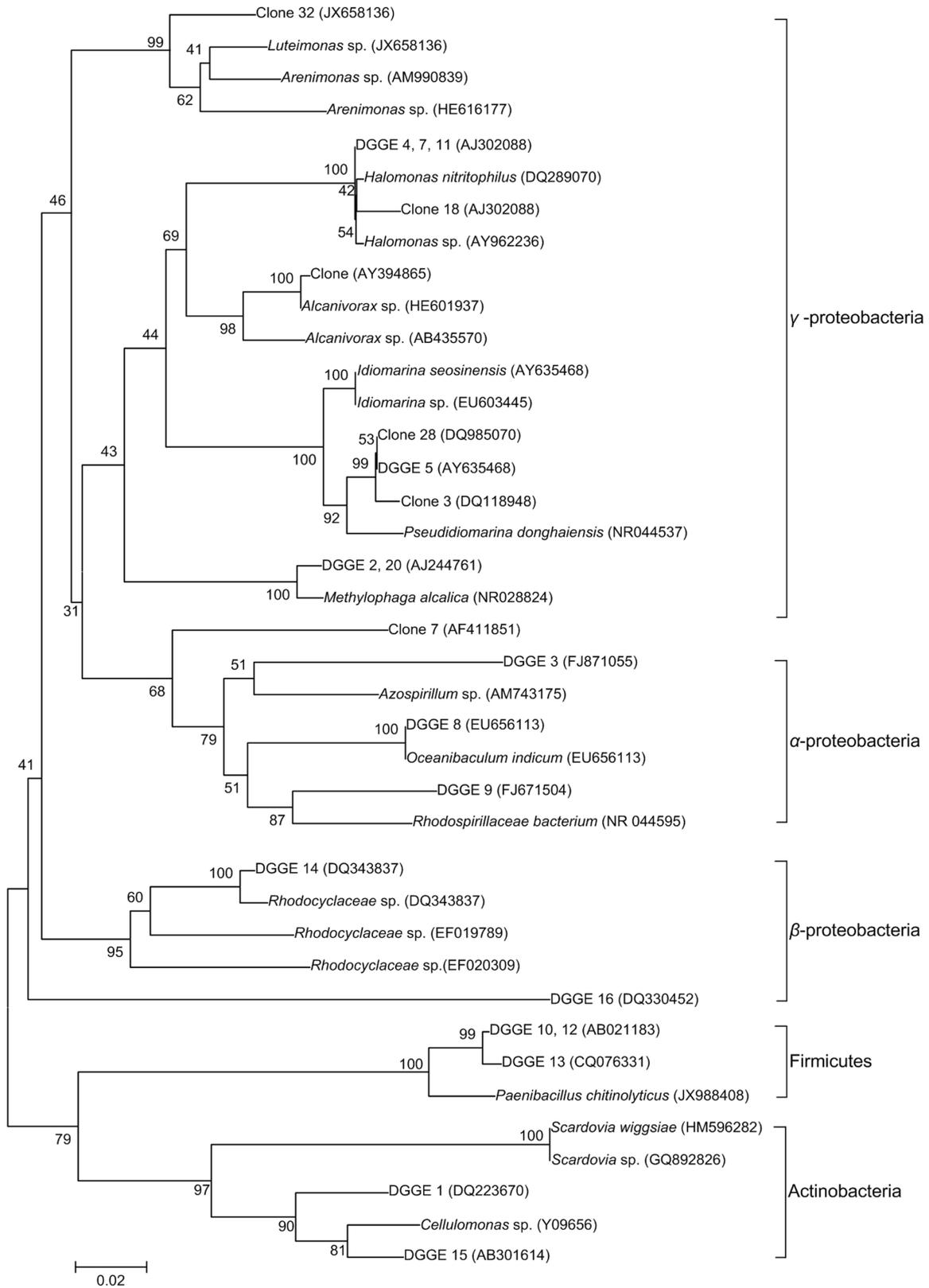


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence using the neighbor-joining methods showing the HWTC.

결과, 9종의 박테리아와 uncultured bacteria로 분석되었다. 6번 band (*Idiomarina seosinensis* 16S rRNA gene, AY635468)의 경우 band의 강도가 강하게 나타났다. 반면, 3번 band (*Azospirillum lipoferum* 16S rRNA gene, FJ871055), 4번, 7번 band (*Halomonas* sp. 16S rRNA gene, AJ302088, AY962237), 8번 band (*Oceanibaculum indicum* 16S rRNA gene, EU656113), 15번 band (*Lewinella cohaerens* 16S rRNA gene, AB301614)의 band intensity가 약하게 나타났다(Fig. 3, Table 1). DGGE를 통해 가장 우점하는 미생물은 5번, 6번 band인 *Idiomarina* sp.와 4번, 7번, 11번 band인 *Halomonas* sp.로 분석되었다. *Halomonas* sp.는 고농도의 염분을 함유하고 있는 폐수를 정화하는 미생물 커뮤니티에 존재하는 것으로 보고되고 있다[18].

또한, 16S rRNA gene clone library를 통해 미생물 군집의 다양성과 군집의 크기를 확인하였다. 박테리아 universal primer인 27F와 1542R을 이용하여 PCR 증폭산물을 얻었으며, cloning을 통하여 염기서열을 분석하였고 NCBI blast를 검색하여 동정하였다. HWTC의 동정 결과 *Paenibacillus* (AY571847, 25%), *Pseudidiomarina* (DQ118948, 19.4%)와 *Idiomarina* (DQ985070, 11.1%)가 우점을 나타내고 있다(Table 2). 또한 *Azospirillum* (AF411851, 8.3%), *Scardovia* (HM596282, 5.6%), *Halomonas* (AJ302088, 2.8%) 등이 기타 군집을 이루고 있다. 미생물 군집분석을 통해 확인된 미생물중에 γ -proteobacteria (*Alcanivorax*, *Arenimonas*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Methylophaga*, *Pseudidiomarina*)가 47.2%로 매우 높게 우점하는 것을 확인하였으며(Fig. 4), HWTC 내에 존재하는 γ -proteobacteria들은 3% 이하의 염분을 함유한 폐수를 처리하는 슬러지의

미생물 커뮤니티에서도 발견되는 미생물들이다[18, 34]. *Halomonas* sp.는 halophilic proteobacteria이며, 염분 농도 5-25%의 염분 농도에서 성장이 가능한 것으로 알려져 있고, 일반적으로, 3-5%의 염분을 함유하는 폐수는 전통적인 생물학적 폐수의 처리에서 폐수처리 효율이 현저히 저하된다고 알려져 있다[19, 33]. 4% 염분을 함유한 폐수를 정화하는 HWTC에서 다양한 *Halomonas* sp.를 확인하였으며(Table 1, 2), *Halomonas* sp.의 폐수정화에 기여할 것이라고 추론할 수 있다. *Alcanivorax*는 halophilic bacteria로서 염분으로 오염된 토양을 정화하는 능력을 가지고 있으며, crude oil과 diesel oil의 다양한 aliphatic hydrocarbon (C₁₂-C₃₄)을 분해한다고 보고되었다[4]. *Arenimonas*도 halophilic bacteria이며, 22%의 염분을 함유하고 있는 환경에서 성장이 가능하며, 37°C의 온도에서 최적의 성장을 가지고 있는 것으로 보고되었다[30]. *Idiomarina*는 고염 폐수를 정화하는 halophilic bacteria consortium에서 발견되고 있으며, phenathrene, diesel 등과 같은 hydrocarbon을 정화하는 능력이 있다[17, 27]. 또한, 고염의 환경에서 *Methylophaga*가 성장한다고 보고되어지며, 질소의 제거, 유기물질의 정화한다고 보고되고 있다 [29, 35]. HWTC내 약 25%의 우점을 보이는 *Paenibacillus*는 Firmicutes에 속하는 미생물로 고염 환경에서 발견되어진다[5, 31]. 현재 보고되어지는 *Paenibacillus*에 관한 보고는 폐수에서 유기물질의 정화와 BOD biosensor로서 이용될 수 있으며, 수질의 색도를 증가시키는 azo dye를 분해하여 수질의 색도를 제거하며, 폐수에서 질소의 제거능이 우수하다고 보고되어지고 있다[8, 25, 26].

본 연구에서 확보한 4%의 염분을 함유한 폐수의 정화능이 우수한 HWTC의 미생물 커뮤니티에는 γ -proteobacteria

Table 2. Analysis of microbial community structure of the HWTC based on 16S rRNA gene clone library analysis.

| NCBI accession no. | Description | Number of clone seq. | Distributions (%) |
|--------------------|---|----------------------|-------------------|
| AY571847 | <i>Paenibacillus</i> sp. | 9 | 25.0 |
| DQ118948 | <i>Pseudidiomarina taiwanensis</i> PIT1 | 7 | 19.4 |
| DQ985070 | <i>Idiomarina</i> sp. JL1018 | 4 | 11.1 |
| AF411851 | <i>Azospirillum</i> sp. 5C | 3 | 8.3 |
| AB125942 | <i>Marinobacter alkaliphilus</i> ODP1200D-1.5 | 2 | 5.6 |
| AM084043 | <i>Rhizobium</i> sp. R-24658 | 2 | 5.6 |
| HM596282 | <i>Scardovia wiggisiae</i> F0424 | 2 | 5.6 |
| AB071665 | <i>Tistrella mobilis</i> | 2 | 5.6 |
| AY394865 | <i>Alcanivorax</i> sp. EPR 6 | 1 | 2.8 |
| JX658136 | <i>Luteimonas</i> sp. | 1 | 2.8 |
| FJ357426 | <i>Fodinicurvata sediminis</i> YIM D82 | 1 | 2.8 |
| AJ302088 | <i>Halomonas</i> sp. IB-16 | 1 | 2.8 |
| AJ505850 | <i>Thauera</i> sp. PIV-1 | 1 | 2.8 |
| Total | | 36 | 100.0 |

에 속하는 미생물이 다양성이 높다는 것을 알 수 있다. 그러나, HWTC의 미생물 커뮤니티에서 단일종으로는 firmicute에 속하는 *Paenibacillus* sp.가 우점하고 하고 있으며, *Halomonas* sp.이 존재하지만, HWTC 내에 우점하지 않은 구성을 보이고 있다. 이는 고농도의 염분을 함유하고 있는 폐수의 정화에 있어서 *Halomonas* sp.가 많은 기여를 한다고 보고된 바와 달리 본 연구에서 사용된 HWTC에서는 *Paenibacillus* sp.의 더 큰 역할을 하는 것을 추론할 수 있다.

현재까지 국내에서는 고염 폐수의 정화에 관한 연구는 폐수에서 염분의 제거가 주관심이었으며, 염분폐수의 정화화에 관여하는 미생물 커뮤니티 분석에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. 기존의 폐수내 3% 이상의 염분을 함유할 경우 폐수의 정화가 불가능하다고 알려져 있다[1, 33]. 그러나, 본 연구에서는 기존의 한계점 3% 염분)보다 높은 4%의 염분을 함유하는 폐수를 기능성 미생물 커뮤니티 HWTC의 확보 및 적용을 통하여, 한달간 수질 정화능을 확인한 결과 평균 84% (CODcr) 이상의 높은 처리효율을 확인하였다. 또한, 4% 염분을 함유한 폐수를 생분해하는 기능성 미생물 커뮤니티 HWTC를 확보 및 미생물 군집을 분석하여 우점하는 미생물을 확인한 결과, *Paenibacillus* sp.가 25%로 우점하는 것을 확인하였다. 본 연구결과를 통해서 신규성을 보유한 신규 미생물 커뮤니티의 자원화와 더불어, HWTC는 국내뿐만 아니라 국외의 고염폐수 및 고염환경의 생물정화(Bioremediation)에 기여할 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 고염폐수의 정화능이 우수한 미생물 기능성 커뮤니티 HWTC (Highsalt Wastewater Treatment Community)를 이용한 고염폐수 처리시스템을 개발하였으며, HWTC의 미생물 군집의 다양성을 확인해 보았다. HWTC의 고염폐수 처리능력은 HRT 2.5일만에 CODcr 84%의 처리효율로 확인하였다. 미생물 군집분석은 PCR-DGGE 기법과 16S rRNA gene clone library를 통하여 미생물 다양성을 확인하였다. 4%의 염농도의 폐수에서 우점하는 미생물은 *Halomonas* sp.와 *Paenibacillus* sp.로 나타났고, phylogenetic tree 분석을 통해 γ -proteobacteria 속하는 미생물의 다양성이 높게 나타났으며, firmicutes속 하는 미생물이 우점하고 있었다. 고염폐수를 처리할 수 있는 미생물 기능성 커뮤니티 HWTC를 이용하여, 고염의 폐수 정화를 가능하게 할 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This work is the outcome of a Manpower Development Program for Marine Energy by the Ministry of Oceans and Fisheries.

References

1. Abou-Elela SI, Kamel MM, Fawzy ME. 2010. Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism. *Desalination*. **250**: 1-5.
2. APHA, AWWA, WEF. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. APHA, Washington, DC, USA.
3. Burnett WE. 1974. The effect of salinity variations on the activated sludge process. *Water Sew. Works*. **121**: 37-38.
4. Dastgheib SMM, Amoozegar MA, Khajeh K, Ventosa A. 2011. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**: 305-312.
5. de Albuquerque JP, Keim CN, Lins U. 2010. Comparative analysis of *Beggiatoa* from hypersaline and marine environments. *Micron*. **41**: 507-517.
6. Ishii K, Fukui M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3753-3755.
7. Jaspers E, Nauhaus K, Cypionka H, Overmann J. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 153-164.
8. Jin HJ, Tu R, Xu F, Chen SF. 2011. Identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* from different plant rhizospheres and a novel *nifH* gene detected in the *P. stellifer*. *Microbiology* **80**: 117-124.
9. Jung RK, Yang HC, Lee JJ, Kim YH. 2008. A novel halophilic *Halomonas* sp. having an excellent digestive effect of organic material, a soil conditioner for the reclaimed land using said strain and a method for plant growth-promoting thereof. Republic of Korea patent application.
10. Kargi F, Dincer AR. 1998. Saline wastewater treatment by halophile-supplemented activated sludge culture in an aerated rotating biodisc contactor. *Enzyme Microb. Tech.* **22**: 427-433.
11. Kargi F, Dincer AR. 1999. Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater. *Environ. Technol.* **20**: 1147-1153.
12. Kim B-H, Baek K-H, Cho D-H, Sung Y, Ahn C-Y, Oh H-M, et al. 2009. Analysis of microbial community during the anaerobic dechlorination of tetrachloroethylene (PCE) in stream of Gimpo and Incheon areas. *Korean J. Microbiol.* **45**: 140-147.
13. Kim JS, Pi YT. 2010. *Oceanobacillus* sp. strain having excellent salt-resistance and use thereof. Republic of Korea patent application.
14. Kincannon DF, Gaudy AF. 1966. Some effect of high salt concentration on activated sludge. *J. Water Poll. Cont. Fed.* **38**: 1148-1158.
15. Kincannon DF, Gaudy AF. 1968. Response of biological waste treatment system to changes in salt concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **10**: 483-496.

16. Kinner NE, Bishop PL, Asce M. 1962. Treatment of saline domestic wastewater using RBC's. *J. Environ. Eng. ASCE*. **108**: 650-663.
17. Kleinstaub S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Müller S. 2006. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3531-3542.
18. Lefebvre O, Vasudevan N, Thanasekaran K, Moletta R, Godon JJ. 2006. Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries. *Extremophiles* **10**: 505-513.
19. Liebgott P-P, Labat M, Casalot L, Amouric A, Lorquin J. 2007. Bioconversion of tyrosol into hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid under hypersaline conditions by the new *Halomonas* sp. strain HTB24. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**: 23-33.
20. Linarić M, Markić M, Sipos L. 2013. High salinity wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* **68**: 1400-1405.
21. Ludzack FJ, Noran DK. 1965. Tolerance of high salinities by conventional wastewater treatment processes. *J. Water Poll. Cont. Fed.* **37**: 1404-1413.
22. Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 317-322.
23. Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
24. Oren A, Gurevich P, Malkit A, Heins Y. 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation*. **3**: 387-398.
25. Raud M, Tutt M, Jögi E, Kikas T. 2012. BOD biosensors for pulp and paper industry wastewater analysis. *Environ. Sci. Pollun. Res.* **19**: 3039-3045.
26. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. 2010. Decolorization and biodegradation of reactive dyes and dye wastewater by a developed bacterial consortium. *Biodegradation*. **21**: 999-1015.
27. Sharghi EA, Bonakdarpour B, Roustazade P, Amoozegar MA, Rabbani AR. 2013. The biological treatment of high salinity synthetic oilfield produced water in a submerged membrane bioreactor using a halophilic bacterial consortium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* In press.
28. Stewart MJ, Ludwig HF, Kearns WH. 1962. Effect of varying salinity on the extended aeration process. *J. Water Poll. Cont. Fed.* **34**: 1161-1177.
29. Surakasi VP, Antony CP, Sharma S, Patole MS, Shouche YS. 2010. Temporal bacterial diversity and detection of putative methanotrophs in surface mats of Lonar crater lake. *J. Basic Microbiol.* **50**: 465-474.
30. Tang J, Zheng A-P, Bromfield ESP, Zhu J, Li S-C, Wang S-Q, et al. 2011. 16S rRNA gene sequence analysis of halophilic and halotolerant bacteria isolated from a hypersaline pond in Sichuan, China. *Ann. Microbiol.* **61**: 375-381.
31. Tiquia SM, Davis D, Hadid H, Kasparian S, Ismail M, Ahly S, et al. 2007. Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of Southeastern Michigan. *Environ. Technol.* **28**: 297-307.
32. Woolard CR, Irvine RL. 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environ. Res.* **66**: 230-235.
33. Woolard CR, Irvine RL. 1995. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res.* **29**: 1159-1168.
34. Yoshie S, Noda N, Miyano T, Tsuneda S, Hirata A, Inamori Y. 2001. Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 346-353.
35. Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, Hirata A, Inamori Y. 2004. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3152-3517.