

Bacterial Community of Natural Dye Wastewater Treatment Facility

Yeoung Min Hwang¹, Dae Kuk Kim^{1,2}, Ji Hee Lee¹, Keun Sik Baik^{1,3}, Chul Park^{1,4} and Chi Nam Seong^{1*}

¹Department of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-950, Korea

²Naju Foundation of Natural Dyeing Culture, Naju 520-931, Korea

³Department of Biological Sciences, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea

⁴Department of Clinic Pathology, Gwangyang Health College, Gwangyang 545-703, Korea

Received July 26, 2013 / Revised March 12, 2014 / Accepted March 21, 2014

Culture-dependent and culture-independent denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analyses were employed to investigate the bacterial community associated with a natural dye wastewater treatment facility. A total of 104 (influent water, 48 strains; aeration tank, 25; settling tank, 31) bacterial strains were isolated. Based on the 16S rRNA gene sequences comparison analysis, the isolates belonged to four phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*. Seventeen DGGE bands representing dominant taxa in each sample were cloned and partially sequenced. The same four phyla were detected by DGGE fingerprinting. The most dominant taxon retrieved by both methods was the member of the phylum *Proteobacteria* with *Alphaproteobacteria* as the predominant class. The bacterial community associated with the natural dye wastewater treatment facility is composed of parasites of animals and plants, decomposers of polysaccharides and dyes, and producers of extracellular polysaccharides.

Key words : Bacterial community, denaturing gradient gel electrophoresis, natural dye wastewater

서 론

합성염색폐수의 특성은 pH가 높고 독성 유기물 및 무기물 등을 함유하고 있을 뿐 아니라 색을 띠고 있다[25]. 합성염색폐수처리 공정에서 중요한 염료의 탈색을 위해 많은 경우 흡착제를 이용한다[13]. 최근에는 염료의 탈색과 난분해성 화합물의 분해를 위해 생물학적 처리방법들이 적용되고 있으며 특정 미생물을 이용하여 분해 효율을 높이는 연구들이 진행되고 있다[6, 11, 14, 15, 21, 25, 26].

합성염색폐수처리에서 탈색에 관여하는 미생물의 분리와 미생물에 의한 분해 효율에 관한 연구 외에 각 공정별 미생물 군집 변화에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 몇 연구에서는 실험실 규모의 반응조에 합성염색폐수의 활성슬러지를 접종한 후 미생물 군집 구조와 분해 효율을 측정하거나[18, 23], 염색폐수의 활성슬러지의 미생물 군집 구조에 관한 연구에 국한되어 있다[17].

천연염색시설에서는 녹말과 양과 그리고 쪽 등 식물체를 염료의 원료로 사용하므로 천연염색폐수처리에서는 생물학적 처리방법을 사용하게 된다. 나주시 천연염색문화재단의 천

연염색시설은 천연염색제인 쪽, 치자, 양과 추출물을 염료로 이용하며 매염제로 명반, 철, 수산화나트륨 등을 사용한다. 염색시설의 폐수배출량은 하루 평균 40 m³이다. 폐수처리방법으로는 물리적·화학적·생물학적 처리 방법을 이용하며, 최대 폐수처리능력은 50 m³이다. 폐수처리시설의 공정은 폐수 유입부터 15단계에 걸쳐 배출되고 있다(<http://www.naturaldyeing.or.kr>). 주요 공정은 다음과 같다. 유입된 폐수는 침사지에서 여과된 후 pH 조정조(H₂SO₄ 혹은 NaOH사용)와 응집조(Al₂(SO₄)₃사용)를 거쳐 접촉포기조에서 생물학적 폐수처리를 한다. 처리된 폐수는 침전조로 옮겨진 후 상등액은 여과와 소독을 실시한 후 방류되며 슬러지는 포기조로 반송되거나 탈수를 거쳐 고형화된다.

본 연구에서는 천연염색폐수처리시설에 존재하는 세균 군집의 구조를 파악하기 위해 미생물을 분리 배양하는 방법과 배양을 이용하지 않고 시료에서 DNA를 직접 추출하여 이용하는 방법을 사용하였다. 배양된 세균은 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교 분석하는 방법을 사용하였으며, 비분리 방법으로는 DGGE를 수행하였다.

재료 및 방법

시료 채취 및 환경요인 분석

전라남도 나주시에 소재한 (재)나주시천연염색문화재단의 폐수처리장의 유입수, 접촉포기조 그리고 침전조에서 시료를 채취하였다. 채수된 시료는 4℃를 유지하면서 즉시 실험실로 운반 후 24시간 이내에 실험하였다. 채수한 시료의 온도, pH,

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3613, Fax : +82-61-750-5469

E-mail : scnu@sunchon.ac.kr

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.

용존산소 등은 수질 측정기(YSI 556MPS, USA)를 사용하여 현장에서 직접 측정하였으며, BOD는 윙클로-아자이드화나트륨변법, COD는 산성KMnO₄법, 부유물질은 유리섬유여지법, 총인함유량은 아스코로빈산환원법, 총질소함유량은 자외선 흡광도법을 사용하여 측정하였다[2]. 색도는 시료를 유리섬유로 여과한 후 340 nm와 657 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 색도의 제거율은 Phugare *et al.* [26]의 방법에 따라 측정하였으며 식은 다음과 같다.

$$\text{색도제거율(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 유입수의 흡광도

B: 접촉포기조 및 침전조의 흡광도

세균 분리

시료를 생리식염수에 연속 희석하고 Plate Count Agar (PCA; Becton Dickinson, USA)에 도말 하여, 25°C에 5일간 배양하여 colony수를 계수하였고 배양 후 육안으로 다른 colony 형태를 보인 미생물을 순수 분리하여, 동정 분석에 사용될 때까지 20% (v / v) glycerol에 균체를 넣어 -80°C에 냉동 보관하였다.

분리균의 16S rRNA 유전자 증폭

순수 분리된 세균 균체 1~2 loop를 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS] 100 µl와 2 small spoon의 glass bead (size: 0.4 mm)를 넣고 10분간 TOMY mixer (TOMY, USA)를 이용하여 균체를 파쇄한 후 혼합하였으며, 1× TE buffer 300 µl와 phenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) 400 µl를 넣고, 3분간 TOMY mixer에 다시 혼합 한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min) 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 RNase A (20 mg/ml) 3 µl을 넣고 37°C에 1시간 배양하였고, 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2 volume의 차가운 100% ethanol을 넣고 DNA를 침전 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C) 하였다. 냉각된 70% ethanol로 세척 한 후 건조하여 증류수에 녹여 실험에 사용할 때까지 -20°C 냉동 보관하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 세균에 특이적으로 부착하는 27F primer (*E. coli* numbering 8 ~ 27; 5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R primer (*E. coli* numbering 1492 ~ 1510; 5' -GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다[20]. PCR 증폭을 위한 반응용액의 구성은 주형 DNA 1 µl, dNTP mixture (각 2.5 mM) 5 µl, 10×반응완충용액[0.15 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 3 mM MgSO₄] 5 µl, BSA (4 µg/µl) 5 µl, 5 U/µl Ex *Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Japan) 0.25 µl, 27F primer (20 µM) 1 µl, 1492R primer (20 µM) 1 µl에 멸균된 2차 증류수를 첨가하여 총 부피를 50 µl 로 하였다. PCR 반응은 TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였으며 PCR 반응조건은 전변성과정을 94°C에서 3분간 수행

한 후 변성(94°C, 30초), 결합(50°C, 30초), 신장(72°C, 40초) 반응을 총 30회 반복하고 후신장(72°C, 10분)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동 한 후 16S rRNA 유전자의 크기를 확인하였다.

염기서열 분석 및 계통분석

유전자 서열분석은 27F primer를 사용하였으며 염기서열 분석은 마크로젠(<http://dna.macrogen.com>)에 의뢰하였다. 염기서열은 PHYDIT version 3.1(<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>)를 이용하여 편집과 정렬하였으며 CHIMERA CHECK 프로그램([http://decipher.cee.wisc.edu/\[32\]](http://decipher.cee.wisc.edu/[32]))을 이용하여 혼성 여부를 측정하였다. 부분 16S rRNA 유전자 염기서열은 EzTaxon-e database ([http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/\[19\]](http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/[19]))을 이용하여 최근연종을 검색하였다.

시료로부터 DNA 추출

채수된 시료는 부유성 물질들을 제거하기 위해 여과지(No. 2, Whatman, USA)로 여과 한 후 Sterivex™-GP filter unit (0.22 µm, Millipore, USA)으로 농축하였다. 농축된 시료는 Massana *et al.* [24] 및 Somerville *et al.* [30]의 방법을 사용하여 chromosomal DNA을 분리하였다. DNA의 shearing을 확인하기 위해 1% agarose gel 을 이용하여 전기영동을 통해 확인하였고, DNA 농도는 spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)로 정량 하였다. DGGE 분석용 DNA의 준비는 추출한 DNA를 0.75% agarose gel 에 전기영동하여 5 kb 이상에 위치하는 chromosomal DNA 를 절단하여 1× TAE 용액이 담긴 dialysis bag에 넣고 전기영동 장치에 100 V에서 30 분 동안 전개 시키고 다시 방향을 바꾸어 10초간 역 전개 하였다. 그 뒤 dialysis bag 안의 1× TAE 를 새로운 tube 로 옮기고 1/10 의 8 M LiCl₂ 및 두 배의 냉각된 100% ethanol에 침전시켜 DNA를 회수하였다.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 27F primer와 803R Primer (5' -CTA CCR GGG TAT CTA ATC C-3')를 사용하였다. PCR 증폭을 위한 반응용액 구성은 dNTP mixture (2.5 mM) 5 µl, Ex *Taq* DNA polymerase (5 U) 2.5 µl, 주형 DNA 1 µl, BSA (4 µg/µl) 5 µl 및 PCR 반응완충용액(10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂) 5 µl에 총 부피가 50 µl가 되도록 증류수를 첨가하였다. PCR 반응은 TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였으며 16S rRNA 유전자 증폭과 동일한 조건을 사용하였다. 반응 결과는 1% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

DGGE를 위한 nested-PCR은 GC clamp가 붙어 있는 GC-341F primer (5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG

CAG CAG-3')와 518R primer (5'-WTT ACC GCG GCT GCT G-3')를 사용하여 16S rRNA 유전자 중 V3 부위를 증폭하였다. PCR 증폭을 위한 reaction mixture 구성은 주형 DNA를 16S rDNA PCR 산물 1 µl 로 교체한 것을 제외한 16S rRNA 유전자 증폭과 동일하게 구성하였다. PCR 반응은 TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였으며 PCR 반응조건은 초기변성을 94°C 에서 5 분간 수행하였고, 변성(94°C, 30초), 결합(65°C 부터 56°C까지 cycle 마다 0.5°C 씩 온도를 내림, 30초), 신장(72°C, 30초)을 20 회 진행하고, 변성(94°C, 30초), 결합(55°C, 30초), 신장(72°C, 30초)을 10 회 진행하였다. 마지막으로 후신장(72°C, 7분)을 수행하였다. PCR산물은 1% agarose gel 에 전기영동 하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

DGGE 는 D-code System (Bio-Rad, USA)을 이용하였고 polyacrylamide gel의 농도는 8%, 크기는 20×16(W×H), 두께는 1 mm로 사용하였다. 변성제는 urea와 formamide (Sigma, USA)를 이용하여 40~60% 사이의 농도구배가 수직으로 일정하게 형성되도록 gel을 제작하였다. D-code system에 약 7 liter의 1× TAE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8.0)를 채우고 gel에 6× loading buffer (0.25% bromphenol blue, 40% sucrose)와 nested-PCR product를 혼합하여 gel에 전개하고, 200 V로 5 분간 초기 전기영동한 후 60 V에서 930 분 동안 전기영동 하였으며 SYBR green 으로 gel을 15분간 염색한 후 band들을 확인하였다.

DGGE band 의 염기서열 분석

모든 시료에 공통으로 나타난 band와 각 시료에서 농도가 진한 band를 선별한 후, band를 잘라내어 멸균된 증류수 30 µl에 용출하였다. GC clamp를 제거하기 위해 GC clamp가 없는 341F 와 518R primer를 이용하여 PCR을 실시하고 pGEM-T Easy Vector를 이용하여 cloning을 수행한 후 *E. coli* DH5a competent cell에 형질전환 시켜 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (Promega, USA), IPTG (isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside) (Promega, USA), ampicillin (50 µg/ml)이 포함된 LB ager배지에서 blue-white colony 선별 방법에 의해 형질전환 된 clone을 선별 하였다. 선별된 white colony를 direct reamplified PCR방법으로 증폭하였다. 이 때 사용한 primer는 vector 내에 존재

하는 pGTf (5'-TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3') primer와 pGTr (5'-ACT CAA GCT ATG CAT CCA ACG-3') primer를 사용하였고[7], PCR조건은 16S rRNA 유전자의 증폭과 같다. 염기서열 분석은 분리군의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석과 동일한 방법을 사용하였다.

세균에 의한 쪽 추출물 분해

쪽 분해에 관여하는 세균을 탐색하기 위해 분리 세균 25군 주 각각과 포기조 원액을 쪽 추출물(<http://www.naturaldyeing.or.kr>) 0.1% (w / v)가 함유된 R2A 액체배지 (Becton Dickinson, USA)에 접종한 후 25°C와 30°C에서 진탕 배양과 정지방법으로 30일 동안 배양한 후 340 nm와 657 nm에서 흡광도를 측정하여 색도제거율을 구하였다.

결 과

시료의 환경 요인

시료의 환경요인은 Table 1과 같다. COD, 총 인 함유량, 총 질소 함유량은 폐수유입수에서 가장 높았고, BOD와 SS는 접촉포기조에서 가장 높았으며, pH는 7.7~8.1의 범위로 나타났다. 시료의 최대 흡광도는 340 nm에서 나타났으며, 657 nm에서 두번째 peak를 확인하였다. 유입수가 포기조를 거쳐 침전조에 이르는 동안 95% 이상의 색도가 제거되었다.

배양된 세균 군집 조성

분리된 104개 균주의 16S rRNA 유전자의 부분 염기서열을 토대로 동정한 결과 *Proteobacteria*문은 가장 많은 69균주 (66.3%)로 나타났고, *Firmicutes* 문은 9균주(8.7%), *Actinobacteria* 문은 7균주(6.7%), *Bacteroidetes* 문은 19균주(18.3%)로 나타났다 (Table 2). 3개의 시료 모두에서 4개의 문의 세균만 확인되었다.

폐수유입수에서 분리된 48개의 균주는 *Proteobacteria* 문이 29개(60.4%)로 가장 많이 차지 하였으며, *Bacteroidetes* 문은 12개, *Firmicutes* 문은 5개, *Actinobacteria* 문은 2개로 각각 25.0%, 10.4%, 4.2%를 차지하였다(Table 2). *Proteobacteria* 중 *Betaproteobacteria* 강과 *Gammaproteobacteria* 강이 각각 10균주 (20.8%)로 가장 많은 비율을 차지 하였다. 과(family) 수준에서

Table 1. Physicochemical properties of water samples obtained from wastewater treatment facility in Naju Natural Dyeing Cultural Center

Site	Tem. (°C)	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	SS (mg/l)	T-P (mg/l)	T-N (mg/l)	pH	Chromaticity	
								A _{340nm}	A _{657nm}
IW	22	5.7	8.0	6.3	0.155	2.790	7.95	0.80	0.31
AT	23	6.0	4.0	12.9	0.046	2.325	8.10	0.04	0.01
ST	21	5.8	6.0	4.3	0.141	1.777	7.70	0.03	0.00

*Tem., temperature; BOD, biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; SS, suspended solids; T-P, total phosphorus; T-N, total nitrogen; IW, influent water; AT, aeration tank; ST, settling tank.

Table 2. Relative abundance of isolates from wastewater treatment facility in Naju Natural Dyeing Cultural Center

Phylum (Class)	Influent water	Aeration tank	Settling tank	Total
<i>Proteobacteria</i>	29 (60.4)	16 (64.0)	24 (77.4)	69 (66.4)
<i>Alphaproteobacteria</i>	9 (18.8)	12 (48.0)	20 (64.5)	41 (39.4)
<i>Betaproteobacteria</i>	10 (20.8)	2 (8.0)	2 (6.5)	14 (13.5)
<i>Gammaproteobacteria</i>	10 (20.8)	2 (8.0)	2 (6.5)	14 (13.5)
<i>Firmicutes</i>	5 (10.4)	1 (4.0)	3 (9.7)	9 (8.7)
<i>Actinobacteria</i>	2 (4.2)	3 (12.0)	2 (6.5)	7 (6.7)
<i>Bacteroidetes</i>	12 (25.0)	5 (20.0)	2 (6.5)	19 (18.3)
Total	48	25	31	104

*Numerals in parentheses are percentage.

는 *Moraxellaceae*과 (*Gammaproteobacteria* 강)가 5군주 (*Acinetobacter* 속)로 가장 많은 비율을 차지하였다(Table 3). 포기조에서 분리된 25군주는 4개의 문에 속했으며 *Proteobacteria* 문은 16개(64.0%) 군주로 가장 많이 차지 하였으며, *Bacteroidetes* 문은 5개, *Actinobacteria* 문은 3개, *Firmicutes* 문은 1개로 각각 20.0%, 12.0%, 4.0%로 비율을 차지하였다(Table 2). 특히 *Alphaproteobacteria* 강이 12개 군주(48.0%)로 가장 많은 비율을 차지하였다. 침전조에서 분리된 31개 군주도4개의 문에 속했다. 포기조에서도 *Proteobacteria* 문은 24개(77.4%)로 가장 많이 차지 하였으며, *Firmicutes* 문은 3개, *Bacteroidetes* 문과 *Actinobacteria* 문은 각각2개로 각각 9.7%, 6.5%, 6.5%의 비율을 차지하였다(Table 2). 유입수, 포기조 그리고 침전조로 갈수록 세균의 조성은 점차 *Proteobacteria* 문의 세균의 비율이 높아지며 *Bacteroidetes* 문의 세균의 비율이 감소하고 있었다. 특히 *Proteobacteria* 문 중 *Alphaproteobacteria* 강에 속한 세균의 비율이 크게 증가하고 있었다(Table 2).

유입조에서만 분리되거나 우점하는 세균은 아래와 같다: *Corynebacterium* (*Actinobacteria* 문), *Streptococcus* (*Firmicutes* 문), *Brevundimonas*, *Rhizobium* (*Alphaproteobacteria* 강), *Acidovorax*, *Albidiferax*, *Janthinobacterium* (*Betaproteobacteria* 강), *Rheinheimera*, *Acinetobacte*, *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria* 강), *Cloacibacterium*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter* (*Bacteroidetes* 문) (Table 3).

포기조에서만 배타적으로 분리된 세균은 *Microbacterium*, *Micrococcus* (*Actinobacteria* 문), *Elstera* (*Alphaproteobacteria* 강) 그리고 *Ralstonia* (*Betaproteobacteria* 강)이다.

침전조에서만 분리되었거나 우점하는 세균은 *Frigoribacterium*, *Kocuria* (*Actinobacteria* 문), *Rhodobacter*, *Sphingomonas*, *Sphingosinicella*, *Novosphingobium* (*Alphaproteobacteria* 강) 등이었으며, *Xanthobacter* (*Gammaproteobacteria* 강)는 포기조와 침전조에서만 각각 3주와 5주 분리되었다.

분리된 세균들 중 8개는 신종 후보일 가능성이 매우 높았다 (Table 3). 이 세균들의16S rRNA 유전자의 전체 염기서열을 분석한 결과 이미 등록된 최 근연종과 유사도가 97% 이하였다. 이 세균들의 최 근연종은 다음과 같다(군주 수): *Rhodobacter*

capsulatus (1), *Microbacterium schleiferi* (1), *Ralstonia solanacearum* (1), *Flavobacterium pectinovorum* (1), *Flavobacterium resistens* (3), *Mucilaginibacter polysacchareus* (1).

DGGE를 이용한 세균 다양성 분석

세 개의 시료로부터 직접 추출한 DNA로부터 얻은 DGGE band 패턴은 Fig. 1과 같다. 농도가 진한 band와 각각의 시료에 독특한 band 17개를 선별하여 cloning을 거쳐 염기서열을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 17개의 band 중 3개 시료에서 공통으로 나타나는 band는 총 10개로 나타났다. 17개 band의 clone들에 대해 염기서열을 결정한 결과 10개의 band는 단일 염기서열로 확인되었으나, 7개의 band에서는 두 가지 이상의

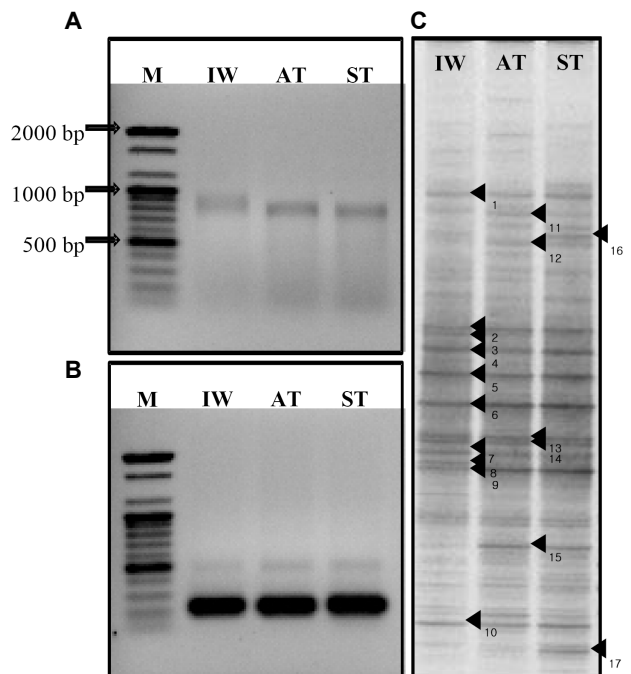


Fig. 1. PCR product of partial 16S rRNA gene amplified using primer pairs, 27F and 803R (A) and GC-341F and 518R (B) and DGGE profiles (C). Samples: IW, influent water; AT, aeration tank; ST, settling tank; M, 100 bp DNA ladder.

Table 3. Affiliation of the isolates from the natural dye wastewater treatment facility

Phylum (class)/family	Isolates			Nearest neighbor	Accession No.
	IW	AT	ST		
<i>Actinobacteria</i>					
<i>Corynebacteriaceae</i>	1			<i>Corynebacterium afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>	X82054
<i>Microbacteriaceae</i>		1		<i>Microbacterium schleiferi</i> †	Y17237
			1	<i>Frigoribacterium faeni</i>	Y18807
	1			<i>Rothia dentocariosa</i>	M59055
<i>Micrococcaceae</i> *			1	<i>Kocuria gwangalliensis</i>	EU286964
		1		<i>Micrococcus luteus</i>	AJ536198
<i>Nocardiaceae</i> *		1		<i>Nocardia takedensis</i>	AB158277
<i>Firmicutes</i>					
	2			<i>Bacillus licheniformis</i>	CP000002
<i>Bacillaceae</i> *			1	<i>Bacillus simplex</i>	AJ439078
			1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	D16281
	1			<i>Bacillus stratosphericus</i>	AJ831841
<i>Paenibacillaceae</i>			1	<i>Paenibacillus urinalis</i>	EF212892
<i>Staphylococcaceae</i> *	1	1		<i>Staphylococcus caprae</i>	AB009935
	1			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X66100
<i>Streptococcaceae</i> *	1			<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	AY188352
<i>Proteobacteria</i>					
<i>(Alphaproteobacteria)</i>					
<i>Bradyrhizobiaceae</i> *		1	1	<i>Atipia birgiae</i>	AF288304
	1			<i>Brevundimonas mediterranea</i>	AJ227801
	1			<i>Brevundimonas nasdae</i>	AB071954
<i>Caulobacteraceae</i>	3			<i>Brevundimonas vesicularis</i>	AJ227780
		1		<i>Brevundimonas bullata</i>	D12785
			1	<i>Phenylobacterium haematophilum</i>	AJ244650
		1		<i>Phenylobacterium conjunctum</i>	AJ227767
<i>Erythrobacteraceae</i>			1	<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	AY562220
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	1	2	3	<i>Aquabacter spiritensis</i>	FR733686
<i>Rhizobiaceae</i>	1			<i>Rhizobium radiobacter</i>	AB247615
<i>Rhodobacteraceae</i>			1	<i>Rhodobacter capsulatus</i> †	D16428
<i>Rhodospirillaceae</i> *		1		<i>Elstera litoralis</i>	EU678309
		1		<i>Sphingomonas mali</i>	Y09638
			2	<i>Sphingomonas wittichii</i>	AB021492
			1	<i>Sphingomonas histidinilytica</i>	EF530202
<i>Sphingomonadaceae</i> *			1	<i>Sphingobium xenophagum</i>	X94098
			1	<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i>	AB084247
			1	<i>Novosphingobium resinovororum</i>	EF029110
	1			<i>Sphingopyxis panaciterrae</i>	AB245353
	1	1		<i>Sphingopyxis soli</i>	FJ599671
<i>Unclassified Rhodospirillales</i>		1	2	<i>Reyranella massiliensis</i>	EF394922
<i>(Betaproteobacteria)</i>					
<i>Burkholderiaceae</i>		1		<i>Ralstonia solanacearum</i> †	EF016361
	1			<i>Acidovorax delafieldii</i>	AF078764
	1			<i>Acidovorax radialis</i>	HM027578
	1		1	<i>Acidovorax soli</i>	FJ599672
<i>Comamonadaceae</i> *	2			<i>Acidovorax temperans</i>	AF078766
	3			<i>Albidiferax ferrireducens</i>	CP000267
		1		<i>Hydrogenophaga defluvii</i>	AJ585993
			1	<i>Hydrogenophaga atypica</i>	AJ585992
<i>Oxalobacteraceae</i>	2			<i>Janthinobacterium lividum</i>	Y08846

Table 3. Continued

Phylum (class)/family	Isolates			Nearest neighbor	Accession No.
	IW	AT	ST		
<i>(Gammaproteobacteria)</i>					
<i>Aeromonadaceae</i>		1		<i>Aeromonas veronii</i>	X60414
			1	<i>Aeromonas jandaei</i>	X60413
<i>Chromatiaceae</i>	1			<i>Rheinheimera tangshanensis</i>	DQ874340
	3			<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Z93440
<i>Moraxellaceae*</i>	1			<i>Acinetobacter radioresistens</i>	X81666
	1			<i>Acinetobacter schindleri</i>	AJ278311
		1		<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	X81665
<i>Pseudomonadaceae*</i>	1		1	<i>Pseudomonas guineae</i>	AM491810
	1			<i>Pseudomonas peli</i>	AM114534
	1			<i>Pseudomonas psychrophila</i>	AB041885
<i>Xanthomonadaceae</i>	1			<i>Thermomonas koreensis</i>	DQ154906
		3	5	<i>Xanthobacter flavus</i>	X94199
<i>Bacteroidetes</i>					
	1			<i>Cloacibacterium normanense</i>	AJ575430
			1	<i>Flavobacterium aquidurense</i>	AM177392
	1	1	1	<i>Cloacibacterium rupense</i>	EU581834
	1			<i>Flavobacterium banpakuense</i>	GQ281770
<i>Flavobacteriaceae*</i>		2		<i>Flavobacterium limicola</i>	AB075230
		1		<i>Flavobacterium reichenbachii</i>	AM177616
	1			<i>Flavobacterium macrobrachii</i>	FJ593904
	1			<i>Flavobacterium pectinovorum†</i>	AB681003
	3			<i>Flavobacterium resistens†</i>	EF575563
	1			<i>Mucilaginitacter polysacchareus†</i>	HM748604
<i>Sphingobacteriaceae</i>	1	1		<i>Pedobacter aquatilis</i>	AM114396
	2			<i>Pedobacter terrae</i>	DQ889723
	48	25	31		

*The taxa detected also by the DGGE profiles.
 †Candidate species (<97% 16S rRNA gene sequence similarity).
 IW, influent water; AT, aeration tank; ST, settling tank.

염기서열이 혼합되어 존재하는 것을 알 수 있었다. 3개의 조사 지점에서 모두 *Proteobacteria* 문이 가장 우점하였으며, *Firmicutes* 문, *Actinobacteria* 문과 *Bacteroidetes* 문에 속한 세균이 확인되었다(Table 4).

3개의 시료에서 진하게 나타난 band 4, 5, 6, 9 그리고 10을 우점하는 균집으로 판단하여 염기서열을 확인 한 결과 band 4는 *Sphingopyxis wittflariensis*, *Acinetobacter guilouiae* 와 *Sphingopyxis flavinaris*로 2개 종 이상이 혼합되었고, band 5는 *Delftia acidovorans*, 그리고 band 6은 *Sphingopyxis wittflariensis* 로 단일 균주임을 확인하였다. Band 9는 *Sphingopyxis wittflariensis* 와 *Achromobacter marplatensis* 이며, band 10은 *Nocardia soli*, *Dongia mobilis* 와 *Limnochabans parvus* 가 혼합되어 있었다. 한편 band 15는 포기조와 침전조의 우점균으로 최근연종은 *Rothia mucilaginos*a 이었다.

쪽 추출물 분해

분리된 세균 25 균주를 독립적으로 배양할 경우 흡광도의 변화를 관찰할 수 없었다. 접촉포기조 원액을 사용한 경우 색도 제거율은 340 nm 에서는 10.5% 그리고 657 nm 에서는 18.8% 이었다.

고 찰

본 실험에 이용된 천연염색폐수처리시설에서 채취한 세 개 시료의 이화학적 특성은 색도를 제외한 모든 요인들은 큰 차이가 나타나지 않았다. 이것은 각각의 시료에 분포하는 세균의 균집 구조도 큰 차이가 나타나지 않았던 것과 관련된다. 그러나 배양이 가능한 세균을 이용한 실험에서는 폐수처리과정에서 진행되는 과정에 따라 미생물들의 종 조성 변화를 확인할 수 있었다. 천연염색폐수 유입수에는 인간과 동식물에 기생하는 세균(*Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Acinetobacter*) [5]이

Table 4. Sequence identification of clones obtained from DGGE bands

Band No.	Source	Phylum	Family	Nearest neighbor	Accession No.	Sequence similarity (%)
1	IW, AT, ST	Fir	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>	AB009935	100.0
2	IW, AT, ST	Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis wittlariensis</i>	AJ416410	99.4
		Bac	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Tamlana crocina</i>	AM286230	93.2
		Fir	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	AF003931	99.0
3	IW	Fir	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	DQ298074	100.0
4	IW, AT, ST	Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis wittlariensis</i>	AJ416410	99.4
		Pro	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	X81659	99.5
		Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis flavimaris</i>	AY554010	98.2
5	IW, AT, ST	Pro	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	AB021417	97.9
6	IW, AT, ST	Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis wittlariensis</i>	AJ416410	99.4
7	IW, AT, ST	Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis wittlariensis</i>	AJ416410	99.4
8	IW	Pro	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	FR870445	99.5
		Bac	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas lutea</i>	AB192292	96.3
		Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis wittlariensis</i>	AJ416410	99.4
9	IW, AT, ST	Pro	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter marplatensis</i>	EU150134	99.5
		Pro	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	AB021405	99.0
		Pro	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Dongia mobilis</i>	FJ455532	98.8
10	IW, AT, ST	Pro	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Limnohabitans parvus</i>	FM165536	95.4
		Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas xinjiangensis</i>	FJ754464	100.0
11	AT	Pro	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Salinarimonas rosea</i>	EU878006	96.5
13	IW, AT, ST	Act	<i>Nocardioideaceae</i>	<i>Nocardioides dubius</i>	AY928902	93.0
		Pro	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	AY061962	96.9
		Fir	<i>Planococcaceae</i>	<i>Bhargavaea cecembensis</i>	AM286423	99.5
14	IW, AT, ST	Pro	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis flavimaris</i>	AY554010	99.4
		Pro	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	AY970951	100.0
		Act	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia mucilaginoso</i>	X87758	99.4
15	AT, ST	Act	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia mucilaginoso</i>	X87758	99.4
16	ST	Fir	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	CP000002	100.0
17	ST	Bac	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium glycines</i>	EU672803	98.4

*Act, *Actinobacteria*; Bac, *Bacteroidetes*; Fir, *Firmicutes*; Pro, *Proteobacteria*; IW, influent water; AT, aeration tank; ST, settling tank.

다수 분포하였고, 일부 세균은 폐수에서 자주 분리된 세균으로 세포의 다당을 생산하며 색소를 띤 세균(*Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Cloacibacterium*)이었다[1]. 유입된 폐수가 포기조를 거쳐 침전조에 이르는 동안 오염균의 수가 감소하면서 유기물과 방향족 화합물을 분해하는 세균(*Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomona*, *Acidovorax*, *Albidiferax*) [27, 29, 34]이 증가하는 경향을 확인하였다.

DGGE band의 염기서열 분석을 통해 나타난 우점균 들은 폐수처리시설에 정상군총으로 존재하며 염료를 포함한 난분해성 화합물의 분해에 관련한 세균들과 유사하였다. DGGE를 통해 검출된 세균들의 분리원과 분해 기질 특이성은 아래와 같다. *Sphingopyxis wittlariensis*는 활성슬러지에서 분리된 종이며, 난분해성 화합물을 분해하며 세포의 다당을 합성하는 세균이다[16]. *Delftia acidovorans*는 acetamide로 오염된 토양에서[31], *Dongia mobilis*는 염료인 malachite green 처리소에서

[22], 그리고 *Achromobacter marplatensis*는 난분해성 방향족화합물인 pentachlorophenol로 오염된 토양에서[12] 분리되었다. 이 외에도 세포의 다당을 형성하는 세균인 *Rothia mucilaginoso* [10]가 확인되었다.

합성염료 폐수처리에서 탈색에 관여한다고 알려진 세균으로 *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*와 *Streptomyces* 등이 알려져 있다[6, 7, 8, 11, 15, 26, 28, 33]. 본 연구 결과에서도 *Pseudomonas*, *Streptococcus*와 *Bacillus* 속의 세균들이 배양되었거나 DGGE를 통해 확인되었다.

다른 천연염색폐수처리장의 미생물 군집에 관한 연구는 거의 없으므로 본 연구의 미생물군집과 비교하기는 어렵다. 다만 생활하수 처리시설에서의 미생물 군집은 많은 경우 *Proteobacteria*가 우점하거나 몇몇 처리시설에서는 *Bacteroidetes*가 우점하는 보고가 있다. 이 두 문의 세균 외에 *Acidobacteria*,

Chloroflexi, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*와 *Actinobacteria* 순으로 점차 비율이 낮아진다고 하였다[14]. 본 연구에서 확인된 세균 군집은 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*와 *Actinobacteria*의 4가지 문이었다. 생활하수에 비해 유기물의 함량이 낮고 색소 화합물이 많은 염색폐수이므로 세균의 군집이 단순할 것으로 판단된다. 그러나 nitroaromatic 화합물을 함유한 화학염색폐수의 활성슬러지에 분포하는 세균 군집이 *Proteobacteria*와 *Firmicutes*의 2개의 문으로 단순했던 것보다는 다양한 세균 군집이 확인되었다[17]. 즉, 천연염색폐수의 세균 조성은 화학염색폐수 보다는 다양하지만 생활하수 보다는 단순하였다.

3개 지점의 세균 군집 간의 차이는 분리균의 군집 조성에 비해 DGGE 분석결과에서는 확실하게 나타나지 않았다. 그 이유 중 첫 번째는 세균을 분리할 때 각 시료별 분리균의 수가 동일하지 않았으며, 가급적 형태적으로 다른 균을 선별하여 3개 시료에 공통으로 존재하는 세균들이 특정 시료에서는 분리되지 않았을 수 있는 오류에 기인한다고 볼 수 있다. 즉, 형태적으로 유사한 세균을 유입조에서 선택할 경우 나머지 두 시료에서는 배제 되었을 가능성이 매우 높다고 볼 수 있다. 두 번째는 DGGE band들 중 농도가 낮아 염기서열 분석에 이용되지 않았던 세균 군집의 차이가 분리에 의한 종 조성과는 다른 결과를 나타냈다고 볼 수 있다. 따라서 이와 같은 약점을 보완하기 위해서는 세균의 분리시 여러가지 배지와 다양한 배양 조건을 적용하고, 가급적 많은 수의 세균을 분리해야 할 필요가 있다. 또한 본 연구에 사용된 두 가지 방법 외에 시료에 존재하는 대부분의 세균의 16S rRNA 유전자들의 염기서열을 단시간에 대량으로 파악할 수 있는 pyrosequencing [14]과 같은 기법을 적용해야 할 필요가 있다고 본다.

한편, 본 연구에 사용된 처리시설의 염색공정에서 가장 많은 비율로 사용되는 염료는 쪽 추출물로서 indigo라고 한다. Indigo ($C_{12}H_8O_2N_2$)는 물에 불용성이기 때문에 그대로는 염색이 어려우므로 일반적으로 환원제와 알칼리를 병용하여 leuco화하여 염색을 하게 된다[3]. Indigo 분해에 관여하는 세균종을 탐색한 결과 분리된 단일 세균 종은 indigo의 분해에 큰 영향을 미치지 못하고 여러 종의 세균 집합체가 관여함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 타 연구와 유사하였다[4]. 폐수 처리시 색도의 제거가 세균들에 의한 분해 외에도 응집과 같은 물리화학적 방법이 미치는 영향에 후속 연구가 필요하다.

이와 같은 제한요인에도 불구하고 염색폐수 처리시설의 세균 군집은 염료를 포함한 난분해성 화합물을 분해하는 세균, 세포외 다당을 생산하는 세균 그리고 인간을 비롯한 동식물의 기생균과 유사한 종의 세균들이 우점하고 있음을 알 수 있었으며, 8개의 신종 후보 세균 또한 확보할 수 있었다. 이와 같이 천연염색 폐수처리시설에 서식하는 세균들 중에는 화학염색 폐수에서 염료를 비롯한 난분해성 화합물의 분해에 관여하는

세균들이 분포하고 있었다. 또한 세포외 다당을 형성하는 세균들이 분리되는 것을 확인하였으며 이 세균들은 유기물의 분해와 응집작용에 관여한다고 볼 수 있다.

References

- Allen, T. D., Lawson, P. A., Collins, M. D., Falsen, E. and Tanner, R. S. 2006. *Claacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1311-1316.
- American Public Health Association (APHA). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., Washington D. C., USA.
- Balan, D. S. L. and Monteiro, R. T. R. 2001. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *J Biotechnol* **89**, 131-139.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresour Technol* **58**, 217-227.
- Bouvet, P. J. M. and Grimont, P. A. D. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *Int J Syst Evol Microbiol* **36**, 228-240.
- Chang, J. S. and Lin, Y. C. 2000. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol Prog* **16**, 979-685.
- Chang, J. S., Chou, C., Lin, Y. C., Lin, P. J., Ho, J. Y. and Hu, T. L. 2001. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Res* **35**, 2841-2850.
- Chen, K. C., Huang, W. T., Wu, J. Y. and Houng, J. Y. 1999. Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 686-690.
- Chun, J., Huq, A. and Colwell, R. R. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2202-2208.
- Collins, M. D., Hutson, R. A., Båverud, V. and Falsen, E. 2000. Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1247-1251.
- Conneely, A., Smyth, W. F. and McMullan, G. 1999. Metabolism of the phthalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 333-337.
- Gomila, M., Tvrzová, L., Teshim, A., Sedláček, I., González-escalona, N., Zdráhal, Z., Šedo, O., González, J. F., Bannasar, A., Moore, E. R. B., Lalucat, J. and Murialdo, S. E. 2011. *Achromobacter marplatensis* sp. nov., isolated from a pentachlorophenol-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2231-2237.
- Gupta, V. K., Mittal, A. and Gajbe, V. 2005. Adsorption and

- desorption studies of a water soluble dye, Quinoline Yellow, using waste materials. *J Colloid Interface Sci* **284**, 89-98.
14. Hu, M., Wang, X., Wen, X. and Xia, Y. 2012. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour Technol* **117**, 72-79.
 15. Jian, H., Tso, W., Tso, M., Zhang, X., Xu, M., Deng, S. and Sun, G. 2000. Broad spectrum decolorizing bacterial strains and their functional plasmids, pp. 97-104. In: Healy, M., Wise, D. L. and Moo-Young, M. (eds.), *Environmental Monitoring and Biodiagnostics of Hazardous Contaminants*. Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands.
 16. Kämpfer, P., Witzemberger, R., Denner, E. B. M., Busse, H. J. and Neef, A. 2002. *Sphingopyxis wittflariensis* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2029-2034.
 17. Kapley, A., Prasad, S. and Purohit, H. J. 2007. Changes in microbial diversity in fed-batch reactor operation with wastewater containing nitroaromatic residues. *Bioresour Technol* **98**, 2479-2484.
 18. Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Godon, J. J. and Hamdi, M. 2009. Bacterial monitoring by molecular tools of a continuous stirred tank reactor treating textile wastewater. *Bioresour Technol* **100**, 629-633.
 19. Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S. and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716-721.
 20. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester, U.K.
 21. Lee, B. J., Wentzel, M. C. and Ekama, G. A. 2006. Measurement and modelling of ordinary heterotrophic organism active biomass concentrations in anoxic/aerobic activated sludge mixed liquor. *Water Sci Technol* **54**, 1-10.
 22. Liu, Y., Jin, J. H., Liu, Y. H., Zhou, Y. G. and Liu, Z. P. 2010. *Dongia mobilis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from a sequencing batch reactor for treatment of malachite green effluent. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2780-2785.
 23. Liu, Y., Zhang, Y., Quan, X., Zhang, J., Zhao, H. and Chen, S. 2011. Effects of an electric field and zero valent iron on anaerobic treatment of azo dye wastewater and microbial community structures. *Bioresour Technol* **102**, 2578-2584.
 24. Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. and Delong, E. F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**, 50-56.
 25. Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. 1996. An investigation of the biodegradation of textile dyes by aerobic and anaerobic microorganisms, pp. 278-287. In: Moo-Young, M., Anderson, W. A. and Chakrabarty, A. M. (eds.), *Environmental Biotechnology, Principles and Applications*. Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands.
 26. Phugare, S. S., Kagalkar, A. N., Govindwar, S. P. and Jadhav, J. P. 2011. A study on significant microbial interaction leading to decolorization and degradation of textile dye Rubine 3GP. *J Basic Microbiol* **51**, 499-514.
 27. Ramana, C. V. and Sasikala, C. 2009. *Albidoferax*, a new genus of *Comamonadaceae* and reclassification of *Rhodoferax ferrireducens* (Finneran *et al.*, 2003) as *Albidoferax ferrireducens* comb. nov. *J Gen Appl Microbiol* **55**, 301-304.
 28. Scheline, R. R., Nygaard, R. T. and Longberg, B. 1970. Enzymatic reduction of azo dye, acid yellow, by extracts of *Streptococcus faecalis* isolated from rat intestine. *Food Cosmet Toxicol* **8**, 55-58.
 29. Schulze, R., Spring, S., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. and Kämpfer, P. 1999. Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **22**, 204-214.
 30. Somerville, C. C., Knight, I. T., Straube, W. L. and Colwell, R. R. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* **55**, 548-554.
 31. Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S. and Sly, L. I. 1999. Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae* and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 567-576.
 32. Wright, E. S., Yilmaz, L. S. and Noguera, D. R. 2012. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **78**, 717-725.
 33. Xu, M., Guo, J., Cen, Y., Zhong, X., Cao, W. and Sun, G. 2005. *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 363-368.
 34. Yabuuchi, E., Yamamoto, H., Terakubo, S., Okamura, N., Naka, T., Fujiwara, N., Kobayashi, K., Kosako, Y. and Hiraishi, A. 2001. Proposal of *Sphingomonas wittichii* sp. nov. for strain RW1^T, known as a dibenzo-*p*-dioxin-metabolizer. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 281-292.

초록 : 천연염색 폐수처리시설의 세균 군집

황영민¹ · 김대국^{1,2} · 이지희¹ · 백근식^{1,3} · 박 철^{1,4} · 성치남^{1*}

(¹순천대학교 생물학과, ²(재) 나주시천연염색문화재단, ³한국기초과학지원연구원, ⁴광양보건대학교 임상병리과)

천연염색폐수시설 폐수의 세균 군집분석을 위해 배양 가능한 세균을 분리하는 방법과 비배양 방법인 denaturing gradient gel electrophoresis 방법을 이용하였다. 3개의 폐수 공정단계로부터 분리된 104개(폐수유입수, 48군주; 접촉포기조, 25군주; 침전조, 31군주) 군주들의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 104개의 분리균들은 *Proteobacteria* 문이 가장 많은 비율을 차지 하였으며, *Actinobacteria*, *Firmicutes* 와 *Bacteroidetes* 등 4개 문에 속했다. DGGE profile중 각 시료의 우점 군집을 대표하는17개의 band를 선택하여 부분 염기서열 분석 결과 분리균과 동일한 4개의 문에 속했다. 배양기법을 이용한 결과와 배양하지 않고 분석하는 방법인 DGGE결과 모두 *Proteobacteria* 문이 우점하였으며 *Alphaproteobacteria*강이 높은 비율을 차지하였다. 천연염색 폐수처리시설의 세균 군집들은 인간을 비롯한 동식물의 기생균, 다당류와 난분해성 화합물을 분해하는 세균 그리고 세포외 다당을 형성하는 세균들이 우점하고 있음을 알 수 있었다.