

B3 공법을 사용하는 하수종말처리장에서 *Bacillus* 속 세균의 변화

안태석* · 홍선희¹ · 김옥선¹ · 유재준¹ · 전선옥¹ · 최승익²

*강원대학교 생물다양성 연구소 · ¹강원대학교 환경학과 · ²강원대학교 환경연구소

Bacillus spp. 이용하여 B3 공법을 사용하는 하수 종말 처리장의 포기조에서 *Bacillus* spp. 변화를 FSIH 방법과 포자염색 방법으로 관찰하였다. DAPI로 측정된 세균수는 $3.2 \times 10^8 \sim 4.4 \times 10^8$ cells/ml 범위로 큰 변화가 없었으나, *Bacillus* sp. 균수는 $0.3 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^8$ cells/ml 범위로 지점별, 조사시기별로 큰 차이가 있었다. 포자수는 $0.3 \times 10^7 \sim 8.4 \times 10^7$ cells/ml 범위로 3월에는 세 번째 포기조, 5월에는 두 번째 포기조에서 각각 $8.5, 5.5 \times 10^7$ cells/ml로 높은 값을 보였다. 총세균수는 DAPI를 측정된 값과 포자수를 합하여 사용하였고, *Bacillus* 속 세균수는 FISH로 계수된 수와 포자수를 합하여 사용하였다. 총세균수에 대한 *Bacillus* sp. 균의 비율은 약 8~60% 범위로 첫 번째 및 세 번째 포기조에서 각각 50%, 35% 이상의 높은 비율을 보였다. B3 공법에서는 *Bacillus*가 우점하고 있음이 FISH 방법으로 확인되었으며, 반송 슬러지와 하수가 유입되는 첫 번째 포기조에서 그 비율이 높았고, 다음 포기조로 가면서 그 비율이 줄어들고 있었다. *Bacillus*의 포자수는 뒤의 포기조로 가면서 그 수와 비율이 높아지고 있었다.

Key Words □ B3 process, *Bacillus* sp., DAPI, FISH, spore, wastewater treatment

하수처리 공정방법중 한가지 방법인 B3 공정은 하수, 분뇨, 축산 및 유기성폐수의 유기물은 물론 질소·인 제거를 목적으로 *Bacillus*를 선택 배양하고 우점화 시킴으로써 포기조 및 소화조내에서 비교적 변화의 폭이 큰 유기물의 부하변동과 외부 조건 변화에 적응하는 특징이 있으며, 동시에 악취제거에도 유용하고 슬러지의 침강성이 우수함에도 슬러지 발생량은 기존 처리방법에 비해 훨씬 적으며 탈수효율도 양호하여 유기물의 제거는 물론 질소·인까지 고효율로 제거되는 새로운 고도처리 공정이다(3, 16).

Bacillus 속은 포자(spore)를 형성하는 간균으로서 난분해성 단백질, 전분, 지방 등도 빠르게 분해시키며, 또한 악취성분을 분해함으로써 탈취효과가 높아 고도처리 및 악취제거의 주역으로 주요한 역할을 담당한다. *Bacillus* 속은 반응조 내에서 일반세균 및 대장균 등에 대한 용균, 사멸작용이 있으며, 부유물질에 대한 흡착성 및 접착성이 있어 floc이 형성되어 분해를 촉진시킨다. 또, 유기폐수 중 암모니아, 황화수소(H_2S), 아민류를 직접 섭취 또는 분해한다. 일반적으로 폐수처리에 이용되는 *Bacillus* 종들은 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. marcerans*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *B. fastidiosus* 등으로 알려져있다(15).

Bacillus 속 검출에는 그 동안 선택배지를 사용하는 전통적인 평판계수법(plate count)이 사용되었다. *Bacillus*를 배양하기 위한 선택배지에는 여러 가지가 있으며, 이 배지들은 모두 무기 염류의 함량이 다른 배지보다 높다는 특징이 있다(9). 평판 계수법

에서 사용하는 배지는 모든 미생물의 요구 조건을 충족시키기 어려우며, *Bacillus* 속의 경우도 그 종류가 매우 많기 때문에, 모든 *Bacillus*를 표현하는 배지는 없다. 실제 자연생태계에서는 배양 가능한 세균이 직접 관찰하여 측정된 세균의 0.1~15%에 불과하므로 배양에 의한 군집 파악은 생태학적으로 큰 의미가 없으며, 하수 처리장의 경우, 평판 계수법으로 나타나는 세균은 총세균수의 15% 미만인 것으로 나타났다(8). 따라서 이 방법은 하수처리장과 같은 다양한 미생물이 존재하는 곳에서는 적용하기가 어렵다.

최근 이러한 문제를 해결하는 방법으로 개발된 것이 분자생물학적 방법인 유전자 탐침(probe)을 사용하는 방법이다. 이 방법인 fluorescent in situ hybridization(FISH) 방법은 세균을 직접 관찰할 수 있을 뿐 아니라 간단하고 쉽게 세균군집을 측정할 수 있다는 장점이 있다. 이 방법에 사용되는 fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probe는 특정 유전자와 결합하는 특이성을 가지고 있어 생태계에서 세균의 시간, 공간적 변화를 파악하는 데에 많이 이용되고 있다(1,4,7,13).

이 FISH 방법은 probe가 세포내로 침투되어야 하는데, *Bacillus*의 영양세포와 포자는 세포벽이 두꺼워 전처리가 필요하다. 이미 홍 등(6)이 연구한 결과에 따르면, 영양세포는 lysozyme으로 전처리하는 방법이 좋으며, 포자에는 SDS/DTT(dithiothreitol)등으로 처리하여도 probe가 침투되지 않음을 확인하였다. 또, *Bacillus*의 비율을 확인하기 위하여는 FISH 방법 외에 포자 염색으로 포자수를 계수 하는 것이 옳다고 보고하였다.

이 연구에서는 *Bacillus*가 주요한 역할을 하는 B3 공법을 이용한 하수처리장에서 FISH방법과 포자염색방법으로 *Bacillus* 속 세

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 033-250-8574, Fax: 033-251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

균의 동태를 파악하였다.

재료 및 방법

조사장소 및 기간

조사장소는 경기도 오산시에 위치한 오산시 하수 종말 처리장의 포기조였고, 시료채취는 2001년 3월 21일, 5월 18일, 7월 16일, 3회 실시하였다. 시험의 편의를 위하여 하수와 반송오니가 유입되는 곳부터 최종 포기조까지 1번, 2번, 3번, 4번으로 하였고, 한 포기조에서 2개씩 시료를 채취하여 조사하였다.

시료의 전처리

시료는 현장에서 4% paraformaldehyde 용액으로 고정한 후 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 시료는 곧바로 20분간 sonication(28 KHz, 400 w)하여 유기물 등으로부터 세균을 분리하고 30분 정치한 후 상등액을 취하여 DAPI, FISH 및 포자계수를 위한 실험재료로 사용하였다.

FISH 방법에 의한 Bacillus의 검출 및 계수

이 연구를 위해 *Bacillus* 속 검출 효율이 95% 이상인 tetramethylrhodamine으로 표지한 S-G-Bacill-0597-a-A-22(10,6)를 probe로 사용하였다. 세포의 고정과 전처리 과정은 홍 등(6)의 방법에 따랐으며, FISH 관찰을 위한 전처리 과정은 lysozyme으로 처리하였다.

DAPI 염색과 계수

DAPI counting에 의한 세균수 측정은 FISH 방법을 적용한 후 DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole-2HCl, SIGMA)로 2차 염색하여 관찰하여 계수하였다(11). 세균의 계수는 형광 현미경(Olympus BX60, Exciting filter: U, Lamp: Mercury lamp HBO 100W/2, OSRAM)을 이용하여 DAPI로 염색된 세균과 probe가 결합한 세균을 계수 하였다. 각 세균 수는 20개 이상의 화상에서 평균값을 구하였다.

포자 계수

시료 25 μ 를 슬라이드에 유침하고 건조시킨 후 열고정하여 도말부위를 여과지로 덮고 malachite green(5%)용액으로 충분히 가하고, 5분간 가열한 후 증류수로 잘 세척한 다음 safranin O(2.5%)로 30초간 대응염색을 한 다음 다시 증류수로 세척하고 현미경으로 포자를 계수 하였다. 통계적 유의성을 갖기 위하여 3회 반복 실험하였다.

결 과

DAPI로 계수된 세균수

DAPI로 검출된 세균수 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 3월 조사 결과, 3.2~4.3 $\times 10^8$ cells/ml, 5월 조사에서는 3.5~4.3 $\times 10^8$ cells/ml, 7월 조사에서는 3.2~4.4 $\times 10^8$ cells/ml로 계절적으로 큰 차이

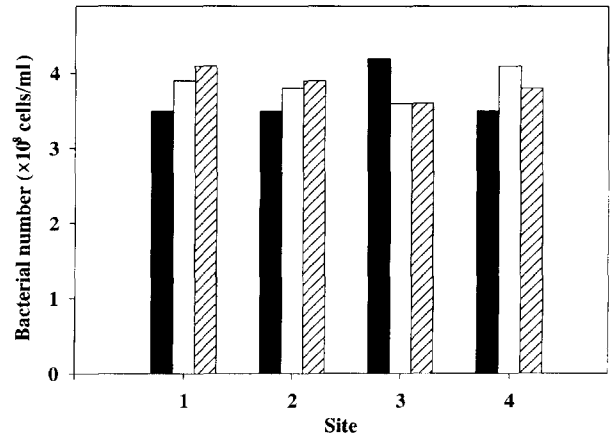


Fig. 1. The DAPI count in Osan municipal wastewater treatment plant (■, March; □, May; ▨, July, 2001).

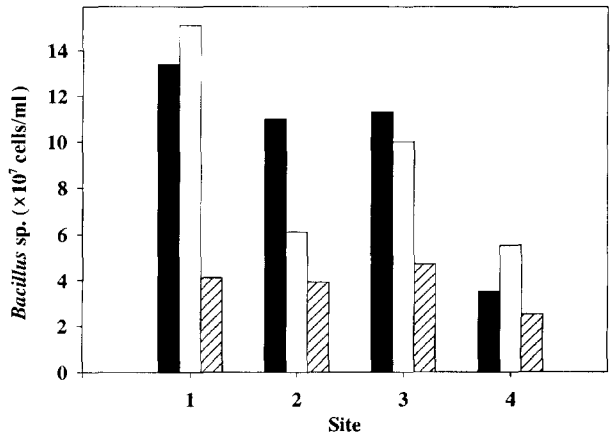


Fig. 2. The variations of probe (S-G-Bacill-0597-a-A-22) binding bacteria in Osan municipal wastewater treatment plant (■, March; □, May; ▨, July, 2001).

가 없이 비슷한 값이었고, 조사시기에 따른 변화는 나타나지 않았다.

FISH로 검출된 Bacillus 속에 속하는 세균수

Bacillus 속에 속하는 세균수는, 3월 조사의 경우 1 지점에서 13.4 $\times 10^7$ cells/ml의 개체수를 나타내었고, 2 지점에서는 11.0 $\times 10^7$ cells/ml, 3지점은 11.3 $\times 10^7$ cells/ml로 비슷한 값을 보였으나 4지점에서 3.5 $\times 10^7$ cells/ml로 낮은 결과 값을 나타내었다. 5월 조사에서는 1지점에서 15.1 $\times 10^7$ cells/ml, 2지점은 6.1 $\times 10^7$ cells/ml였으나, 3지점은 10.0 $\times 10^7$ cells/ml의 결과값을 나타내었고 4지점은 5.5 $\times 10^7$ cells/ml로 *Bacillus* 속에 속하는 세균수가 낮았다. 7월은 이전 조사와는 달리 모든 조사 지점에서 2.5~4.7 $\times 10^7$ cells/ml로 전체적으로 매우 낮은 값을 나타내었다(Fig. 2).

광학현미경으로 검출한 포자의 개체수

포자의 개체수 변화는 Fig. 3과 같다. 3월 조사에서 포자수는 지점 1에서 8.3 $\times 10^7$ cells/ml로 조사되었고 지점 2에서는 0.3 \times

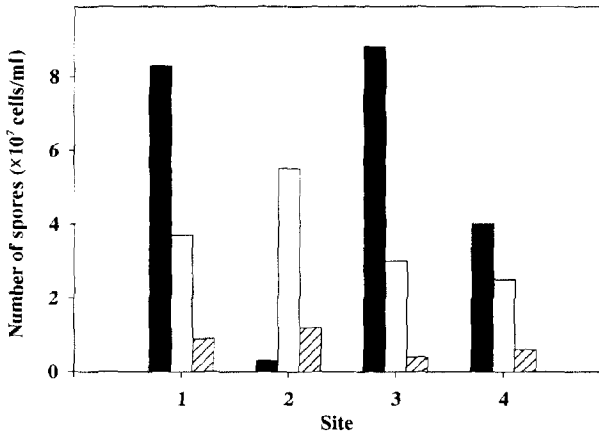


Fig. 3. The variations of spore in Osan municipal wastewater treatment plant (■, March; □, May; ▨, July, 2001).

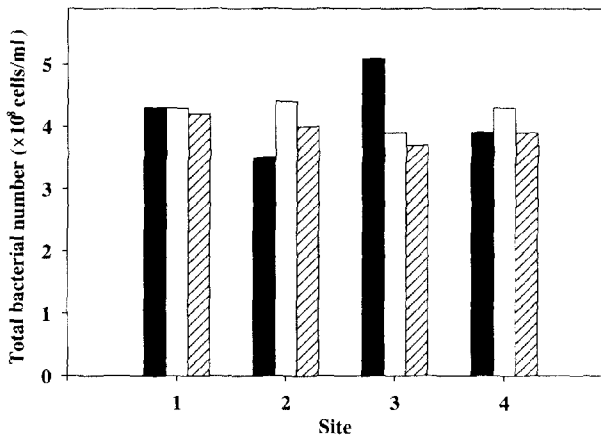


Fig. 4. The variations of total bacterial number in Osan municipal wastewater treatment plant (■, March; □, May; ▨, July, 2001).

10⁷ cells/ml로 낮은 분포를 보였다. 지점 3과 4에서는 다시 포자의 수가 증가하여 각각 8.8×10⁷ cells/ml, 4.0×10⁷ cells/ml로 나타났다. 5월 조사의 경우는 모든 조사지점에서 전체적으로 2.5~5.5×10⁷ cells/ml로 비슷한 분포를 보였고 7월 조사에서는 지점 2에서만 1.2×10⁷ cells/ml로 다른지점에 비해 비교적 높은 개체수를 보였고, 지점 1, 3, 4에서는 0.4~0.9×10⁷ cells/ml로 낮은 결과 값을 나타내었다.

총세균수

DAPI로 계수된 세균과 포자의 수를 합한 값인 총세균수 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 3월 조사의 경우 2, 4지점에서 각각 3.5×10⁸ cells/ml, 3.9×10⁸ cells/ml로 비슷한 값을 나타내었고, 1, 3 지점에서는 4.3×10⁸ cells/ml, 5.1×10⁸ cells/ml로 다소 높은 값을 보였다. 5월 조사에서는 3지점이 3월과는 달리 3.9×10⁸ cells/ml로 가장 낮은 값을 나타내었고, 그 외 다른 지점들은 4.3~4.4×10⁸ cells/ml의 범위로 비슷한 결과 값을 보였다. 7월은 1 지점에서 4.2×10⁸ cells/ml 개체수를, 2지점에서는 4.0×10⁸

cells/ml, 3, 4지점은 각각 3.7×10⁸ cells/ml, 3.9×10⁸ cells/ml로 비슷한 분포를 보였다. 3월의 지점 3을 제외하고는 지점별 조사 시기별 총세균수의 뚜렷한 변화는 없었다.

***Bacillus* 속에 속하는 세균수**

Bacillus 속에 속하는 세균수 변화는 FISH로 계수된 수와 포자수를 합하였으며, Fig. 5에 나타내었다. 3월 조사의 경우 지점 1과 지점 3은 21.7~20.1×10⁷ cells/ml로 비슷하게 분포하였고, 지점 2는 11.3×10⁷ cells/ml, 지점 4는 7.5×10⁷ cells/ml로 낮은 결과 값을 나타냈다. 5월 조사에서는 지점 1에서 18.9×10⁷ cells/ml 값이었고, 지점 2, 3에서는 각각 11.6×10⁷ cells/ml, 12.9×10⁷ cells/ml 값으로 다소 차이를 나타내었다. 지점 4에서는 7.9×10⁷ cells/ml의 범위로 다른 지점보다 낮은 값을 나타내었다. 7월 조사에서는 전체적으로 3.1~5.1×10⁷ cells/ml 값으로 고른 분포를 나타내었고, 3월과 5월에 비하여 낮은 결과 값이었다.

총세균수에 대한 *Bacillus* 속에 속하는 세균수의 비율

총세균수에 대한 *Bacillus* 속에 속하는 세균수의 비율은, 3월

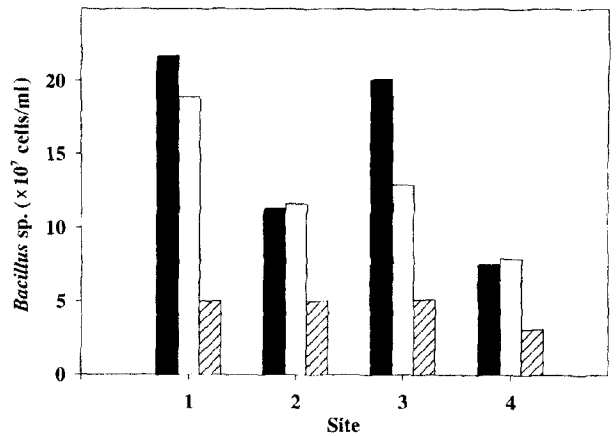


Fig. 5. The variations of *Bacillus* spp. in Osan municipal wastewater treatment plant (■, March; □, May; ▨, July, 2001).

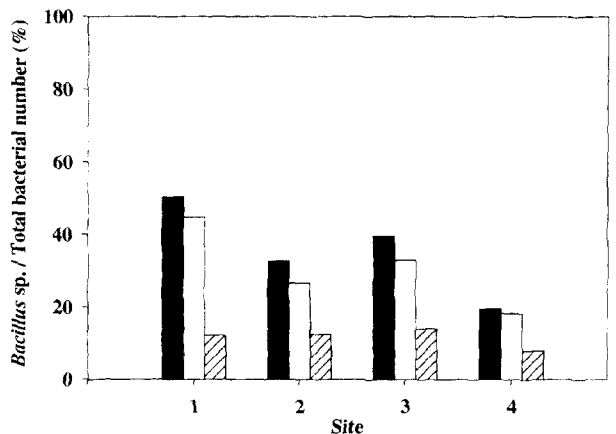


Fig. 6. The ratios of *Bacillus* spp. to total bacterial numbers in Osan municipal wastewater treatment plant (■, March; □, May; ▨, July, 2001).

조사에 지점 1~3에서는 32.6~50.4%의 분포를 보였으나 지점 4에서는 19.5%로 비교적 낮은 점유율을 나타내었다. 5월 조사에서도 3월 조사와 비슷한 경향을 보였으며, 이에 반해 7월 조사에서는 모든 지점이 7.9~14.0% 범위로 3월, 5월에 비해 매우 낮은 분포를 나타내었다 (Fig. 6).

고 찰

B3공법의 중요한 원리중의 하나는 *Bacillus* 균을 우점화 배양하는 것이다. 즉 *Bacillus* 속 세균이 발아, 증식, 분열, 포자형성을 반복하면서 우점화 시키는 방법으로 포기조의 1실에서 4실로 진행함에 따라 포기량을 줄여서 *Bacillus* 속 세균을 우점화 시킨다(3,5). 지금까지 발표된 대부분의 자료들은 B3공법의 원리, 운영 및 공정에 관한 것들과, 반응조내의 *Bacillus* 균들을 분리 배양한 후 생화학적인 특징들에 관한 것이었다(5,15,16). 이들에 따르면 이 과정에서 *Bacillus* 균의 변화 과정은 다음과 같다. 영양분이 충분한 반응조에서는 포자로부터 발아하여 사상체(Filament 상)의 형태가 된다. 다음 반응조로 이동 하면서 영양분이 부족한 상태에 이르게 되면 사상체의 해체 및 분열이 일어나며 다음 반응조로 이동되면서 포자를 형성한다. 그러나 실질적으로 반응조(포기조) 내에서 우점하여 서식하는 *Bacillus* 균들의 각각 반응조별 개체수나 생체량을 정량적으로 보고한 자료는 찾을 수 없었다.

FISH 방법으로 *Bacillus* 속 균수를 측정된 결과 7월 조사자료를 제외하고는 제 1실에서 제 4실로 갈수록 그 수가 감소하는 것으로 나타난 반면(Fig. 2), 총 세균수는 뚜렷한 변화양상을 보이지 않았다(Fig. 4). 이렇게 *Bacillus* 균들의 점유율이 줄어드는 이유는 다음과 같이 설명이 가능하다. 첫째, 포기조내의 원생동물에 의해서 *Bacillus* 속 세균의 선택적으로 포식되는 경우이다. 생물학적처리방법(활성오니법)으로 운전되고 있는 포기조에서 흔히 관찰되는 rotifer는 0.28~1.1 μm 크기의 세균 보다는 2.0~3.1 μm 크기의 세균을 선택적으로 포식하며, 최고 24배 이상 더 포식하는 것으로 보고되었다(14). 실제 이 연구에서 포기조내 *Bacillus* 균의 경우 다른 세균에 비해 커, 선택적으로 제거된 것으로 사료된다. 둘째로, 영양세포의 포자화이다. 이론적으로 하나의 *Bacillus* 속 영양세포는 하나의 포자를 형성하기 때문에 각각의 반응조내 *Bacillus* 균의 수는 큰 변화가 없어야 한다. 그러나 영양세포는 증식이 가능하지만 포자세포는 증식을 할 수 없기 때문에 *Bacillus* 균의 점유율이 점차로 낮아진 것으로 사료된다. 그러나 일부 *Bacillus* 속 세균은 포자화가 진행되는 과정에서 항생물질을 생산하기 때문에 다른 미생물을 억제하는 능력이(12) 있어 일부 *Bacillus* 균이 분비하는 항생물질이 다른 일반세균에 미치는 영향은 더 연구해 보아야 할 것으로 사료된다.

포자의 수를 보면, 3월에는 제 3실에서 포자수가 급격히 증가한 것으로 보아 포자화(sporulation)가 제 3실에서 일어난 것으로 사료되며, 5월에는 하야야 포자화가 일어난 것으로 사료된다 (Fig. 3). B3 공법의 반응조에서, 용존산소는 0.1 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 이하로 유지하고, 유기물은 빈영양상태를 유지하며, 마그네슘 포함물질

이 미량 존재해야지 만 포자화가 일어나는 것으로 보고 되었으며, 실제 B3공법은 제 2실, 제 3실부터 용존산소를 각각 0.3~0.4 mg/l , 0.1~0.2 mg/l 로 유지시켜 포자화 시키는 것으로 보고 되었으나(2), 본 조사 결과 포자화가 일어나는 포기조가 일정하지 않은 것은 운전상의 문제로 사료된다. 또한 7월에 전체적으로 *Bacillus* sp. 세균수도 낮은 값을 보였고, 포자의 수도 낮게 나타났으나, 총 세균수를 보면 지점과 조사 시기별로 큰 차이가 없어 (Fig. 4), *Bacillus* 속을 우점화 시키는데 있어 처리장 운영과정이 매우 중요함을 시사한다.

이 연구에서 포기조내의 총세균수에 대한 *Bacillus* 속에 속하는 세균은 7.9~50.4%로 나타났다. 특히 3월과 5월은 전체적으로 그 비율이 약 30% 이상으로 높았으며, 지점 1 포기조에서 그 비율이 각각 50.4, 44.8%에 달하였다. 이 비율은 뒤의 포기조로 가면서 감소하는 경향을 보였는데, 포자화 후기에 항생능력이 떨어져 다른 세균의 증식이 일어나, 그 비율이 줄어들거나 포자세포가 여과 섭식을 하는 원생동물에 의해 선택적으로 섭식되어 그 비율이 점차로 낮아진 것으로 사료된다. 7월 조사의 경우 *Bacillus* 속에 속하는 세균수의 비율이 7.9~14.0%로 3, 5월에 비해 1/4~1/2 수준으로 나타났다. 이는 앞서 언급된 하수처리장의 운전상의 문제로 사료된다. 이 문제는 앞으로 용존산소, pH, 온도 등 운전 조건과 관련하여 더 연구하여야 할 부분이다.

결론적으로 이번 조사에서는 *Bacillus*를 단순히 숫자로 총 세균수와 비교하였는데, *Bacillus*균 자체가 일반 세균에 비하여 세포가 크기 때문에 앞으로는 생체량을 비교하여 우점도를 파악하는 방법이 더 좋을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 환경관리공단의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 김동주, 홍선희, 안태석. 1999. 소양호에서 세균군집구조의 계절적, 수질적 변화. 한국미생물학회지 35, 242-247.
2. 대경기계기술, 1999. 하 · 폐수처리에서 바실러스균을 이용한 질소 · 인 제거기술(Bio-Best *Bacillus* System:B3 System). 대경기계기술.
3. 대경기계기술, 2001. B3(Bio-Best *Bacillus* System) 공법을 이용한 하 · 폐수의 고도처리. 대경기계기술.
4. 서미애, 홍선희, 김동주, 박경미, 안태석. 2001. 하수처리과정에서 염분이 세균군집에 미치는 영향. 한국미생물학회지 37, 124-129.
5. 최용수. 2000. B3 공법을 이용한 오수 · 분뇨 및 축산폐수의 고도처리기술. 한국화학기술연구원. (인터넷자료. <http://www.mc.go.kr>)
6. 홍선희, 김옥선, 송홍규, 이동훈, 안태석. 2001. *Bacillus* 속 세균을 검출하기 위한 FISH 방법의 개발. 한국 미생물학회지 37, 204-208.
7. 홍선희, 오덕화, 전선옥, 안태석. 2000. 팔당호에서 Aggregates에 부착한 세균군집구조의 변화. 한국미생물학회지 36, 292-298.
8. Amann, R., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic

- and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
9. Atlas, R.M. 1995. Handbook of media for environmental microbiology. CRC press. New York.
 10. DUteau, N. M., Rogers, J. D. Bartholomay C. T., and K. F. Reardon. 1998. Species-specific oligonucleotide for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. Strain JS150 and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4994-4999.
 11. Hicks, R., R. I. Amann, and D. A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4, 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158-2163.
 12. Maruo, B and H. Yosikawa. 1989. *Bacillus subtilis*: Molecular biology and industrial application. Elsevier, Tokyo.
 13. Trebesius, K., R. Amann, W. Ludwig, K. M. Hlegger, and K. H. Schleifer. 1994. Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive rRNA targeted transcript probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3228-3235.
 14. Vadstein, O., G. Øie, and Y. Olsen. 1993. Particle size dependent feeding by the rotifer *Branchionus plicatilis*. *Hydrobiologia.* 255/256, 261-267.
 15. 村上弘毅, 土井幸夫, 青木満, 入江三, 1995 “好氣性し尿處理槽における*Bacillus* spp. の優點化とそれらの生化学的性質.”日本水環境學會誌. 18, 33-44.
 16. 伊那中央衛生センター, 1998. 糞尿處理施設 精密機能検査報告書.

(Received August 22, 2001/Accepted September 10, 2001)

ABSTRACT : The Changes of *Bacillus* spp. in Municipal Wastewater Treatment Plant with B3 process.
Tae-Seok Ahn, Sun-Hee Hong¹, Ok-Sun Kim¹, Jae-Jun Yoo¹, Sun-Ok Jeon,¹ and Seung-Ik Choi² (Institute of Biodiversity Research, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea, ¹Department of Environmental Science, Kangwon Natonal University, Chunchon 200-701, Korea, ²Institute of Environment Research, Kangwon Natonal University, Chunchon 200-701, Korea)

By FISH and spore staining methods, the changes of *Bacillus* spp. numbers were investigated at municipal waste water treatment system, which operated with B3 process. Total bacterial numbers, which is the sum of DAPI bound cells and numbers of spore, were ranged 3.2×10^8 to 4.4×10^8 cells/ml. The Bacilli numbers which is the sum of probe S-G-Bacill-0597-a-A-22 bound cells and numbers of spore were from 0.3×10^7 to 8.4×10^7 cells/ml. The ratios of *Bacillus* sp. to total bacteria were ranged from 8 to 60%. Among 4 aeration tanks, the first tank had shown the highest proportions of *Bacillus* sp. And third and fourth tanks, the numbers of spore were increasing.