

회전접촉장치와 점감포기 반응조를 이용한 식품폐수 처리시설의 세균군집 구조

정순재¹ · 남지현¹ · 배우근² · 이동훈^{1*}

¹충북대학교 미생물학과, ²한양대학교 건설환경공학과

Bacterial Community Structure of Food Wastewater Treatment System Combined with Rotating Biological Contactor and Tapered Aeration Reactor

Soonjae Jeong¹, Ji-Hyun Nam¹, Wookeun Bae², and Dong-Hun Lee^{1*}

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

²Department of Civil and Environmental Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Republic of Korea

(Received May 13, 2010/Accepted June 13, 2010)

A pilot-scale wastewater treatment plant combined with rotating biological contactor and tapered aeration reactors was operated with the wastewater discharged from a food factory for 5 months. The bacterial communities of this plant were investigated by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and phylogenetic analysis of 16S rRNA genes. In spite of high concentration of nitrogen and phosphorus as well as organic carbon, removal efficiency of chemical oxygen demand, total nitrogen, and total phosphorus was 98%, 93%, and 95%, respectively. Bacterial community at the initial operation stage was clearly distinguished from that of the stable operation stage. The most predominant phylum in the sample of stable stage was Bacteroidetes. Major population of operation period was *Haliscomenobacter*, *Sphaerotilus*, and candidate division TM7, which were classified as filamentous bacteria. However, sludge bulking caused by these bacteria was not observed. The population that has a close relationship with *Haliscomenobacter* increased during the stable operation stage, emerging as the most predominant group. These results suggest that the filamentous bacteria participated in nutrient removal when using rotating biological contactor and tapered aeration reactor.

Keywords: 16S rRNA, bacterial community, T-RFLP, wastewater treatment system

인구 증가와 산업 발달로 폐수의 발생량은 증가하고 있으며, 환경오염을 막기 위한 폐수처리 부담도 증가하고 있다. 환경부에서 발간한 2008년도 공장폐수의 발생과 처리(환경오염 배출업소 조사결과)에 의하면 식품산업 폐수는 폐수발생량이 5위이며, 높은 생물학적 산소요구량(biological oxygen demand, BOD), 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand, COD)과 함께 고농도의 질소, 인을 함유하므로 환경부하가 큰 것으로 알려져 있다(1, 23). 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙에 의거, 2010년 현재 폐수 종말처리 시설의 방류수 수질 기준을 보면 BOD는 20 mg/L, COD는 40 mg/L 이하이며, 총 질소(total nitrogen, TN)와 총인(total phosphorus, TP)은 각각 40 mg/L, 4 mg/L 이하이다. 환경부에서는 폐수처리 시설의 방

류수에 관한 규제를 계속 강화하고 있다. 2011년부터 방류수 수질 기준에 생태독성 항목을 추가하며, 2013년부터는 방류지역에 따라 BOD와 COD는 각각 10 mg/L, 20 mg/L 이하로, TN은 20 mg/L 이하, TP는 0.2 mg/L 이하까지로 강화된다. 따라서 환경 오염을 줄이고 강화되는 방류수 수질 기준을 만족시킬 수 있는 새로운 폐수처리공정의 개발과 기존 폐수처리 공정의 개선이 요구된다.

하·폐수의 효율적인 처리에 관한 연구를 위해 회전접촉장치(rotating biological contactor, RBC)와 점감포기 생물반응조(tapered aeration tank)를 이용한 폐수 처리공정을 식품산업 폐수에 적용하였다. 회전접촉장치를 이용한 공정은 각종 산업폐수와 하수처리 등에 사용되며, 회전접촉장치에 부착하여 성장하는 세균 군집에 의해 폐수처리 공정이 진행된다(5). 회전접촉장치를 이용한 폐수처리공정은 짧은 수리학적 체류시간

* For correspondence. E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr; Tel: +82-43-261-3261; Fax: +82-43-264-9600

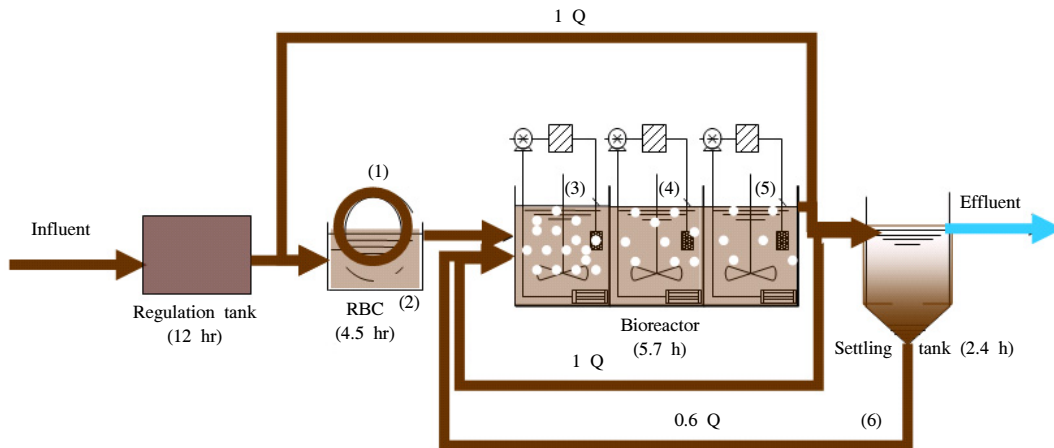


Fig. 1. Schematic diagram of a pilot-scale plant combined with rotating biological contactors and tapered aeration reactors. Numbers in parentheses indicate hydraulic retention time of each reactor. Sampling sites are (1) RBC biofilm, (2) RBC solution, (3) Bioreactor-1, (4) Bioreactor-2, (5) Bioreactor-3, and (6) Return sludge.

(hydraulic retention time, HRT), 높은 농도의 유기물과 질소 화합물의 제거효율, 유량 변화에 대한 안정성, 공정 유지비용 절감 등의 장점이 알려져 있다(21, 29). 점감포기법은 생물반응조의 용존산소(dissolved oxygen, DO) 농도 조절을 달리한 것을 제외하면 활성슬러지 공법과 동일한 공정이다. 점감포기법은 반응조의 전단에서는 공기의 공급량을 크게 하고, 후단 쪽으로 갈수록 공급하는 공기의 양을 점점 감소시키는 운전 방법이다. 점감포기법은 에너지 소모가 적으며, 생물반응조에 호기성 조건, 혐기적 조건, 무산소적 조건이 함께 존재하므로 질소, 인 제거의 효율을 높일 수 있는 장점이 있다(18, 32).

폐수처리 공정에는 생물학적 처리방법이 많이 이용되고 있으며, 유기물의 분해 및 제거는 동일한 생태학적 역할을 수행하는 다양한 종류의 세균들에 의해 일어나기 때문에 폐수처리 공정내 미생물 군집 형성이 중요한 것으로 알려져 있다(8). 따라서 생물학적 폐수처리시스템의 공정 운영에 관한 전통적인 연구 외에도 폐수처리 시설의 미생물 군집에 관한 연구도 많이 진행되고 있다. 그러나 회전접촉장치와 점감포기 생물반응조를 이용한 식품 폐수처리 공정은 높은 효율로 유기물의 제거가 이루어짐에도 불구하고 세균 군집에 관한 연구는 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 폐수처리 공정의 최적화 및 처리 효율 향상에 중요한 주요 세균 군집의 구조와 기능에 대한 정보를 제공하기 위해 회전접촉장치와 점감포기를 이용한 새로운 폐수처리공정의 세균군집을 분석하였다. 말단단편길이다형성(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 분석법을 이용하여 공정 초기의 세균 군집 변화와 안정화 단계의 세균 군집을 비교하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 방법으로 우점하는 세균 군집을 구명하였다.

재료 및 방법

Pilot plant의 운영

회전접촉장치(rotating biological contactor)와 점감포기 생

물반응조(tapered aeration tank)를 이용한 pilot-scale plant의 폐수처리용량은 $0.5 \text{ m}^3/\text{day}$ 규모였으며, 분뇨처리장의 슬러지 케이크를 식중원으로, 폐지도축 폐수를 유입수로 사용하여 약 5개월간 운영하였다. 유입 폐수가 유량조정조를 거쳐 회전접촉장치에서 1차 처리되고 3개의 연속된 생물반응조(생물반응조-1, 생물반응조-2, 생물반응조-3)에서 2차 처리되도록 설계되었다(Fig. 1). 각각의 반응조에 대한 수리학적 체류시간은 유량조정조 12시간, 회전접촉장치 4.5시간, 생물반응조 5.7시간, 침전조 2.4시간이었다. 내부 반응은 회전접촉장치와 첫 번째 생물반응조로 1 Q씩 반응하였으며, 슬러지 반응은 생물반응조로 0.6 Q를 반응하였다. 회전접촉장치는 염화비닐리덴섬유(vinylidene chloride)로 제작된 4개의 디스크로 구성되었으며, 디스크 직경은 55 cm, 두께는 5 cm이었다. 디스크 유효면적 8.1 m^2 의 35%가 수중에 잠기며, 회전속도는 2.5 rpm이었다. 첫 번째 생물반응조(생물반응조-1)의 용존산소 농도는 1.5 mg/L , 세 번째 생물반응조(생물반응조-3)는 0.1 mg/L 로 농도구배가 유지되도록 점감포기법을 적용하였으며, 60일 이후에는 안정된 수준을 유지하였다.

시료 채취 및 분석

Pilot plant의 운전 시작일부터 1주일 간격으로 유량조정조, 회전접촉장치, 생물반응조, 침전조의 용존산소(DO) 농도, mixed liquor suspended solid (MLSS), 슬러지용적지수(Sludge Volume Index, SVI), total chemical oxygen demand (TCOD_{Cr}), soluble chemical oxygen demand (SCOD_{Cr}), 총질소(TN), 총인(TP), 암모니아성 질소(NH₃-N), 질산성 질소(NO₃-N)를 Standard method (2)와 수질오염공정시험기준에 따라 분석하였다. 세균 군집 분석을 위한 시료는 가동일, 6일, 13일, 27일, 90일, 100일, 125일에 회전접촉장치와 생물반응조에서 멸균된 원뿔형 시험관(50 ml)으로 채취하였으며, 핵산 추출 및 정제를 위해 Miller 등(22)의 bead-beating 방법과 Ultraclean™ DNA Purification kit (MOBIO, USA)를 이용하였다.

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 분석

세균군집의 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하기 위해 eubacterial primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 785R (5'-ACT ACC RGG GTA TCT AAT CC-3') 쌍을 사용하였다(16). 말단단편(Terminal Restriction Fragment, T-RF)을 선택적으로 분석하기 위하여 27F는 형광 물질인 6-carboxyfluorescein으로 수식된 primer (Bioneer, Korea)를 사용하였다. PCR 반응은 SolGent (Korea)의 *Taq* DNA polymerase와 시약을 사용하였으며, 95°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR 산물은 GENE ALL™ PCR SV Purification kit (General Biosystem, Korea)로 정제한 후에 제한효소 *HhaI* (TaKaRa, Japan) 5 unit을 첨가하여 37°C에서 5시간 이상 반응하였다. 제한효소에 의해 절단된 DNA를 ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 전기영동 한 후 T-RF profile을 얻었다. T-RF profile에서 각 단편이 나타내는 형광값의 백분율로 해당 단편의 점유비율을 계산하였으며, GelCompar II (Applied Maths, Belgium) 프로그램으로 각 시료의 Pearson 상관계수와 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) 방법으로 집괴분석을 수행하였다(30).

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

회전접촉장치와 생물반응조 시료에서 27F와 785R primer 쌍을 이용하여 증폭된 PCR 산물을 1.0% agarose gel에서 전기영동 한 후 Power Gel Extraction kit (TaKaRa)로 정제하였으며, pGEM-T vector (Promega, USA)를 이용하여 16S rRNA clone library를 구축하고 각각 50개 이상의 클론을 선별하여 염기서열을 분석하였다. 27F와 prGTr (5'-CTC AAG CTA TGC ATC CAA CGC-3') primer 쌍을 사용하여 16S rRNA 유전자가 5'에서 3' 방향으로 삽입된 재조합 클론을 선별하였으며(6, 7), Plasmid DNA Mini-prep Column kit (GeneAll, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 추출한 후에 ABI 3730XL Capillary DNA Sequencer (Applied Biosystems)로 염기서열을 분석하였다.

시료에서 확인된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 Bellero-phon 프로그램(12)으로 chimera 서열을 조사한 후에, Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>)와 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 데이터베이스 자료와 비교하였으며,

BLASTN 프로그램으로 상동성 검색을 수행하였다. 시료 및 데이터베이스의 염기서열은 CLUSTAL X (version 1.83) 프로그램을 이용하여 정렬하였다. 정렬된 서열들은 PHYLIP package v3.6a3을 이용하여 Jukes & Cantor distance model (14)과 neighbor-joining method (27)에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 계통분류학적 트리를 추론하였다. 트리의 신뢰도를 검증하기 위한 Bootstrap 값은 1,000회의 resampled data로부터 계산하였다. 본 연구에서 확인된 염기서열은 GenBank와 DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에 AB567762부터 AB568083까지의 기탁번호(accession no.)로 등록되어 있다.

결과 및 고찰

Pilot plant의 운영 및 처리효율

Pilot plant의 유입수인 도축폐수는 TCOD가 4,258±1,856 mg/L, SCOD가 457±299 mg/L로 고형유기물의 오염부하가 큰 폐수였으며, 총질소(TN)와 총인(TP)은 각각 286±142 mg/L, 40±26 mg/L 수준이었다(Table 1). 운전기간 동안의 유기물 제거 효율, 생물반응조의 용존산소(DO) 변동량, 세균군집의 변화 등을 고려하면 가동일부터 60일까지의 공정 초기 단계와 그 후의 안정화 단계로 구분할 수 있었다. 초기단계에 생물반응조-1의 DO 농도는 1.3±0.6 mg/L였으며, 생물반응조-3은 0.2±0.1 mg/L로 첫 번째 생물반응조의 변동이 컸다. 60일 이후의 안정화 단계에서는 생물반응조-1과 생물반응조-3이 각각 1.4±0.3 mg/L와 0.1±0.0 mg/L로 변동없이 안정된 수준을 유지하였다. 운전기간 동안 회전접촉 장치, 생물반응조-1, 생물반응조-3의 pH는 각각 7.3±0.2, 7.3±0.2, 7.2±0.2였다.

생물반응조-1과 생물반응조-3의 슬러지 농도를 반영하는 MLSS (Mixed Liquor Suspended Solid) 값은 초기 단계에 5,894±506 mg/L, 5,806±574 mg/L였으며, 안정화 단계에서는 4,980±502 mg/L, 4,725±475 mg/L로 매우 높은 수준이 유지되었다. 생물반응조의 슬러지 체류시간(sludge retention time)은 3.1일 이상이었으며, 특히 운전기간 동안 슬러지용적지수(Sludge Volume Index, SVI)도 평균 160 ml/g로 높게 유지되었으나 슬러지 팽화(sludge bulking)에 의한 슬러지 침강 저하, 방류수의 부유물질(Suspended Solids, SS)과 COD의 증가 현상은 발생하지 않았다.

회전접촉장치에 형성된 생물막의 두께는 5-10 mm로 다른 연구 결과에서 관찰된 3-5 mm의 생물막보다 두껍게 형성되었다(29). 회전접촉장치에 형성된 생물막의 성장은 독성물질에 의해 저해작용을 받으며, 탈착과정은 디스크의 회전속도에 영

Table 1. Average nutrient concentrations and removal efficiency of a pilot-scale wastewater treatment plant

Parameter	Initial stage			Stable stage		
	Influent (mg/L)	Effluent (mg/L)	Removal efficiency (%)	Influent	Effluent	Removal efficiency
TCOD	5,272.2±1,721.8	68.1±35.3	98.6±0.6	3,234.0±1,557.3	55.1±9.1	97.9±1.1
SCOD	377.9±315.9	62.8±32.0	70.8±25.1	533.4±290.4	41.6±6.0	89.6±6.4
TN	380.8±114.0	59.2±32.7	84.0±7.3	198.3±115.9	7.9±8.2	93.0±8.5
TP	55.2±29.5	2.7±5.0	93.3±13.4	25.7±10.5	1.2±0.5	95.0±2.0

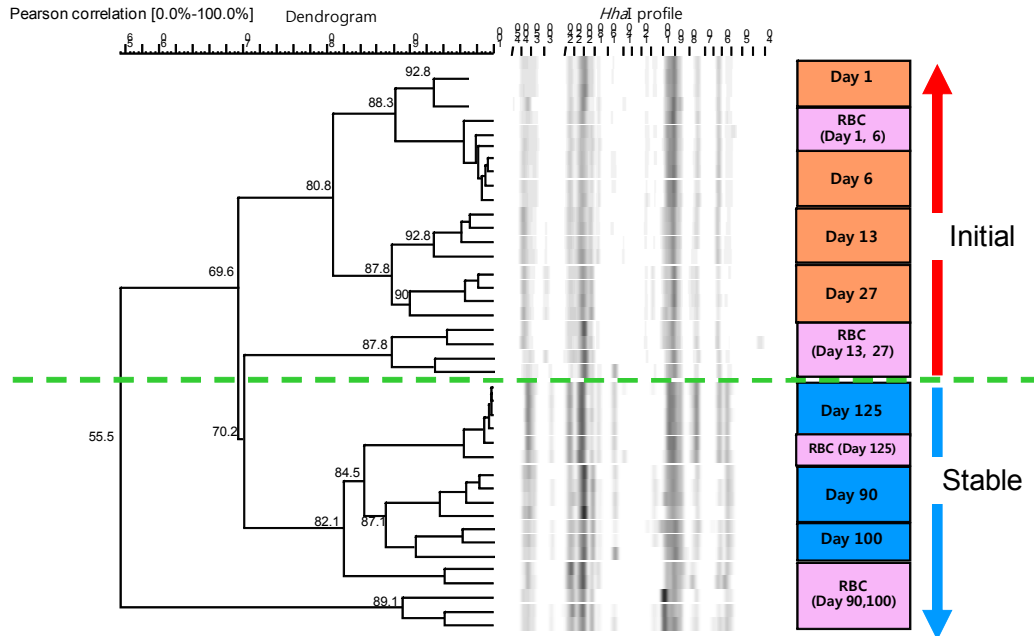


Fig. 2. Cluster analysis of *HhaI* T-RF profiles of wastewater treatment plant. The dendrogram was constructed by Pearson's correlation coefficient of T-RF profiles and UPGMA method. Numbers on the branch represent the similarity value of the samples belonging to the same cluster.

향을 받는 것으로 알려져 있다(3, 5). 그러므로 본 공정에서 회전접촉장치의 생물막이 두껍게 형성된 것은 일반적인 회전속도인 5 rpm 보다 느린 2.5 rpm의 회전속도와 독성이 적은 식품폐수의 성상에 영향을 받는 것으로 생각된다.

초기 단계에서의 TCOD, SCOD, TN, TP의 평균 제거율은 각각 98.6±0.6%, 70.8±25.1%, 84.0±7.3%, 93.3±13.4%로 방류수의 평균 농도가 68±35 mg/L, 63±32 mg/L, 59±33 mg/L, 2.7±5.0 mg/L였으며, 안정화 단계에서는 각각 97.9±1.1%, 89.6±6.4%, 93.0±8.5%, 95.0±2.0%로 유기물 제거 효율이 증가하였고, 방류수의 수질도 각각 55±9 mg/L, 42±6 mg/L, 7.9±8.2 mg/L, 1.2±0.5 mg/L로 개선되었다(Table 1). 최근 많은 고도처리기술이 연구되고 있으나 COD 제거율이 79-94%, TP의 제거율이 50% 수준인 다른 공정의 처리효율과 비교할 때 회전접촉장치와 점감포기법을 도입한 본 공정의 폐수처리 효율이 매우 우수함을 알 수 있다(1, 19). 또한 유기물 제거와 함께 질소와 인의 동시제거라는 특징을 나타내고 있다.

회전접촉장치를 이용한 공정은 생물막의 깊이에 따른 DO 농도 차이로 질산화세균과 탈질화세균이 동시에 존재하여 질소제거율이 높은 것으로 알려져 있다(5, 21). 또한 낮은 DO 농도(0.1 mg/L)의 반응조에서 질소와 인의 제거가 이루어짐이 보고되었다(18). 본 연구에서 총질소 제거효율이 95.7%로 최대이었던 90일-130일 사이의 암모니아 농도와 질산염의 농도가 각각 유량조정조에서는 63.5±7.1 mg/L, 4.7±3.5 mg/L였으나, 생물반응조-1에서는 2.5±2.6 mg/L, 13.3±3.6 mg/L로 바뀌었고, 생물반응조-3에서는 0.9±0.4 mg/L, 2.2±2.6 mg/L로 낮아졌다. 따라서 회전접촉장치와 점감포기 생물반응조에서 질산화 과정에 의한 암모니아의 질산염으로의 변환과 탈질 과정에 의

해 질소가 효율적으로 제거됨을 알 수 있다.

T-RFLP 방법에 의한 세균군집 분석

Pilot plant 가동일, 6일, 13일, 27일에 각각 채취한 초기 단계의 시료와 90일, 100일, 125일에 채취한 안정화 단계의 시료의 T-RFLP 분석을 통해 회전접촉장치와 생물반응조의 세균군집 변화를 조사하였다. 공정 초기 단계에서는 88-96 bp의 말단 단편(Terminal restriction fragment, T-RF)이 32-42%로 가장 많았으나, 안정화 단계에서는 185-225 bp의 T-RF가 20-34%로 가장 우점하였다(Fig. 2).

각 시료의 T-RF profile을 비교하여 피어슨(Pearson) 상관계수를 계산하였으며, 집괴분석(cluster analysis)한 후에 dendrogram을 구성한 결과, 공정초기 단계와 60일 이후의 안정화 단계에 채취된 시료들은 각각 80.8%와 82.1%의 유사도를 갖는 두 클러스터로 나뉘어, 두 단계의 세균군집 구조에 차이가 있음을 알 수 있다. 공정 초기 단계의 클러스터는 다시 2개의 하위 클러스터로 구분되며, pilot plant 가동일부터 6일까지 시료의 유사도는 88.3%였으며, 13일과 27일 시료의 유사도는 87.8%였다. 공정 가동일부터 6일까지 1차 초기 세균 군집이 형성된 후에, 27일까지 2차 초기 군집으로 발달하는 과정으로 생각된다. 안정화 단계는 날짜에 따른 하위 클러스터가 관찰되었으나 공정 초기 단계보다 클러스터의 유사도가 높아서 군집의 변화가 작았다고 생각된다.

특히 13일 이후에 채취한 회전접촉장치(rotating biological contactor, RBC)의 시료가 점감포기 생물반응조(tapered aeration tank)의 시료와 구분되는 클러스터를 형성하였다. 공정 초기에 부착세균이 부착하여 회전접촉장치의 생물막 형성이 시작되며,

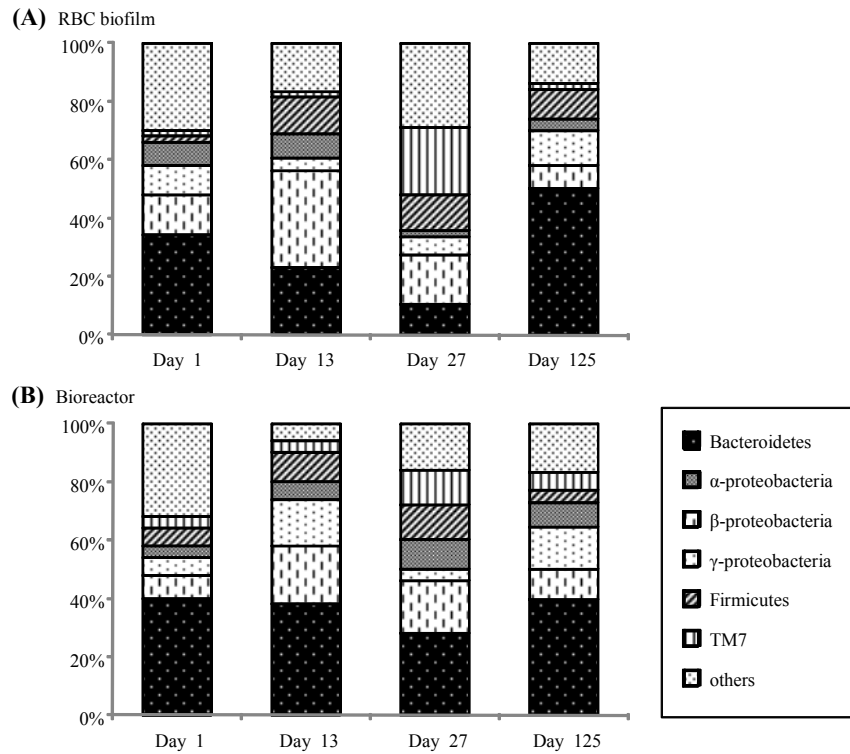


Fig. 3. Structure of the bacterial communities in RBC biofilm and Bioreactor-3 measured by 16S rRNA gene clone libraries.

생물막이 부착되는 디스크판이 회전하며 상단부가 대기에 노출되어 호기성 환경이 형성된다(11). 그러나 점감포기 생물반응조는 매우 낮은 DO가 유지되므로, 환경의 차이에 의해 세균군집 구조가 구분되는 결과가 관찰되었다고 생각된다. 그 후 공정이 진행됨에 따라 회전접촉장치의 디스크에서 성숙된 생물막의 두께가 증가하고 탈락작용이 발생하여 생물반응조에 생물막 군집이 유입되어 125일 시료에서는 회전접촉장치와 생물반응조 군집 구조가 유사하게 되었을 것이다(3, 29).

16S rRNA 유전자의 클로닝에 의한 염기서열 분석 결과와 T-RFLP 분석결과를 비교하기 위하여 16S rRNA 유전자 라이브러리의 염기서열에서 제한효소(*HhaI*) 인식부위를 확인한 결과 61-62 bp의 T-RF는 Bacteroidetes와 α-Proteobacteria, β-Proteobacteria에서 유래되었으며, *Halsicomenobacter*와 유연관계가 가까운 Bacteroidetes와 candidate division TM7에 속하는 세균군집이 88-96 bp의 T-RF에 해당하였다. *Halsicomenobacter*, *Chitinophaga*, *Flavobacterium*이 포함된 Bacteroidetes와 *Sphaerotilus*, *Acidovorax*가 속한 β-Proteobacteria, candidate division TM7과 유사한 세균들이 185-225 bp의 T-RF를, *Tetrasphaera*가 속한 Actinobacteria와 Bacteroidetes 같은 세균들이 381-401 bp의 T-RF를 형성하였다. T-RFLP 분석은 말단 단편의 크기라는 제한된 정보만을 제공하지만, 많은 양의 시료를 간편하게 비교, 분석할 수 있는 장점이 있으며, 본 연구에서는 염기서열에 의한 군집분석과 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

세균군집의 종다양성을 반영하는 T-RF 수의 변화를 살펴보면, 공정 초기 시료는 대부분 T-RF의 수가 많아서 가동일 생물반응조에서 최대 68개가 관찰되었으나, 공정 후기에는 T-RF의 수가 감소하여 125일에는 25개의 최소값을 나타내었다. 따라서 공정이 진행됨에 따라 특정 세균군집의 우점화와 함께 다양성이 감소하여 세균 군집이 안정화됨을 알 수 있다.

16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 세균군집 분석

대부분의 유기물이 제거되는 공정 전단의 회전접촉장치에서 채취한 생물막 시료와 낮은 DO를 유지하여 탈질과 동시에 유기물 제거가 진행되는 생물반응조의 시료로부터 16S rRNA clone library를 구축하고 염기서열을 분석하였다. 공정 가동일, 13일, 27일의 시료를 이용하여 공정초기 단계의 세균 군집 변화를 조사하였으며, 안정화 단계인 125일의 시료로 공정 초기와 안정화 단계의 세균 군집 구조를 비교·분석하였다.

Pilot plant 운전 기간 동안 Bacteroidetes에 속하는 세균의 염기서열이 25% 이상 확인되어 가장 우점하였고, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria, 그리고 candidate division TM7의 세균 군집도 높은 비율을 차지하였다(Fig. 3). 공정 가동일의 시료에서 대표적인 세균 군집은 Bacteroidetes, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria였으며, 회전접촉장치 생물막에서 각각 34%, 14%, 10%, 생물반응조에서 각각 40%, 8%, 6%를 점유하였다. 13일 시료에서도 Bacteroidetes와 β-Proteobacteria가 계속 우점하여 회전접촉장치에서 각각 23%, 33%를, 생물반응

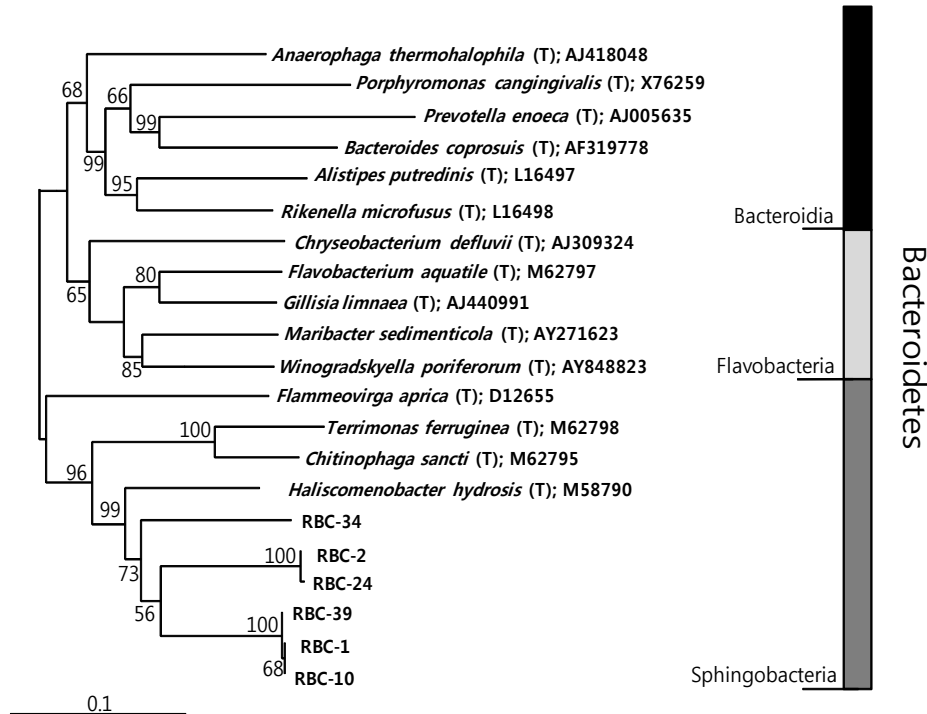


Fig. 4. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences identified from RBC sample and representative strains belonging to Bacteroidetes. Tree was constructed by using Jukes & Cantor distance model and neighbor-joining method. *Methanoterris igneus* DSM 5666 was used as an outgroup. The bootstrap values less than 50% are not shown.

조에서는 38%, 20%를 차지하였다. γ -Proteobacteria는 생물반응조에서 16%로 증가한 반면에 회전접촉장치에서는 4%로 감소하였다. 가동 후 27일 시료에서는 candidate division TM7이 갑자기 증가하여 회전접촉장치에서 23%, 생물반응조에서 12%가 관찰되었고, β -Proteobacteria는 각각 17%, 18%, Bacteroidetes는 10%, 28%를 나타내었다.

속(genus) 수준에서 가장 우점한 집단은 Bacteroidetes 문(phylum)의 *Haliscomenobacter*와 β -Proteobacteria에 포함되는 *Sphaerotilus*과 유연관계가 가까운 세균 군집으로 *Haliscomenobacter*가 가동일의 생물반응조에서 22%, *Sphaerotilus*가 13일 후의 회전접촉장치에서 19%를 차지하였고, candidate division TM7은 회전접촉장치 27일 시료에서 23%를 나타내었다.

안정화 단계인 125일의 세균 군집은 Bacteroidetes가 최대 군집으로 회전접촉장치와 생물반응조에서 각각 50%와 40%를 차지하였으며, γ -Proteobacteria가 12%와 15%를 나타내었다. β -Proteobacteria와 Firmicute가 각각 8-10%, 4-10%로 존재하였으며, candidate division TM7은 2-6%로 감소하였다. 속 수준에서는 *Haliscomenobacter*와 유사한 군집이 회전접촉장치에서 20%를, γ -Proteobacteria에 속하는 *Xanthomonas*가 생물반응조에서 8%를 나타내었다.

초기 단계에 일시적인 우점을 나타내었던 *Sphaerotilus* 속은 운동성이 없는 그람음성 간균($1 \times 2-6 \mu\text{m}$)으로 filament를 형성하고, 우점하면 SVI가 200 ml/g 이상으로 되는 슬러지 팽화 현상의 대표적인 미생물로 알려져 있다(10, 31). 회전접촉장치

에서 우점하여 증식하며, 광범위한 산소 농도에서 성장할 수 있으나 특히 낮은 DO 조건과 BOD 부하가 높을 때 다량으로 출현함이 보고되었다(26).

Candidate division TM7은 분류가 불완전하며 배양된 균주가 없는 세균 군집으로, 환경에 널리 분포하는 그람양성, sheathed bacteria로 간균, 구균, 사상균(filamentous bacteria) 등 다양한 형태로 관찰되며, 슬러지 팽화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(13, 33).

안정화 단계에서 우점한 종은 *Haliscomenobacter* 속과 유연관계가 가까운 집단이다(Fig. 4). *Haliscomenobacter* 속은 생물학적 폐수처리시설에서 종종 관찰되는 세균군집으로 그람양성 간균($0.4-0.5 \times 3-5 \mu\text{m}$)이며 filament를 형성한다(10). 운동성은 없으며, 배양이 어렵고 낮은 DO 조건에서 잘 성장하는 화학유기영양세균이다. 플락(flock) 형성 및 높은 SVI 값에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 슬러지 팽화와 관련되어 있다는 보고도 있다(9, 24).

일반적인 생물학적 폐수처리 공정의 세균 군집은 대부분 Proteobacteria이며, 특히 β -Proteobacteria와 γ -Proteobacteria가 최대 군집이란 보고가 많다(13, 17, 28). 또한 식품 폐수처리에서는 Firmicutes도 주요군집으로 보고된 바 있다(15, 25). 그러나 본 연구에서는 Bacteroidetes의 우점도 관찰되었는데, 호기-혐기 환경이 반복되는 enhanced biological phosphorus removal (EBPR) 공법에서 Bacteroidetes가 우점하였다는 보고(34)를 참고하면, 낮은 DO 농도를 유지하는 점감포기 생물반

응조의 환경이 이 군집의 분포와 연관이 있다고 생각된다.

회전접촉장치와 생물반응조는 유사한 세균군집 구조를 나타내었으며, 회전 원판의 생물막에서 사상균이 우점하는 특징을 보였다. 이는 회전접촉장치에서 사상균의 우점을 보고한 선행연구(4, 20)와 질소와 인 제거를 위한 회전접촉장치의 생물막이 두꺼워질수록 사상균의 분포가 많았다는 보고(17)와도 일치하는 결과이다. 공정 13일과 27일, 125일에 우점한 세균 군집은 각각 *Sphaerotilus*, candidate division TM7, *Haliscomenobacter*였으며, 이들은 폐수처리공정에서 나타나는 대표적인 사상균으로 낮은 산소농도에서 생장이 가능하다는 공통점을 갖고 있다(9, 33). 따라서 회전접촉장치에 의한 부착환경과 점감포기법에 의한 낮은 DO가 제공되는 환경에서 이들 군집에 의해 유기물질 및 영양염류의 제거가 진행되었고, 운전기간 동안 높은 SVI값이 유지된 것도 이들 사상균에 의한 영향으로 생각된다.

식품산업폐수는 생물학적 분해가 쉬운 특징이 있지만, 고농도의 유기물과 질소, 인을 함유하고 있다. 본 연구에서는 고농도 식품 폐수의 효율적인 처리를 위해 회전접촉장치와 점감포기법을 이용한 새로운 폐수처리 시스템을 적용하였으며, 유기물 제거와 동시에 TN, TP의 효율적인 제거를 확인하였다. 16S rRNA 유전자의 T-RFLP 분석과 염기서열 분석 방법으로 공정의 초기 단계부터 안정화 단계까지의 세균 군집 변화를 조사하였으며, 우점하는 세균에 관한 정보를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 회전접촉장치와 낮은 DO의 생물반응조로 인한 사상균의 우점이 관찰되었으나 슬러지 팽화 현상이란 문제점 없이 우수한 처리효율을 유지한 것은 이례적인 결과로 생각된다. 특히 안정화 단계에서 우점한 *Haliscomenobacter*와 유사한 세균이 새로운 폐수처리 공정에서 중요한 역할을 담당할 것으로 예상된다. 슬러지 팽화 및 사상균의 역할에 관한 연구와 함께 이들 균주의 분리 및 배양 연구가 진행된다면 새로운 폐수처리공정의 효율적인 운영에 많은 도움을 줄 것이다.

적요

회전접촉장치와 점감포기 생물반응조를 이용한 실험용 규모의 폐수처리 공정을 식품산업폐수를 유입수로 사용하여 5개월 동안 운전하였으며, 16S rRNA 유전자의 말단단편길이다형성(T-RFLP) 분석과 계통분류학적 분석방법으로 폐수처리 공정의 세균군집을 조사하였다. 유기물 외에 고농도의 질소와 인이 함유된 식품산업폐수를 적용하였음에도 불구하고, 안정화 기간 동안 화학적산소요구량, 총질소, 총인인 제거효율은 각각 98%, 93%, 95% 이상이었다. 가동 초기의 세균 군집과 안정화 이후의 세균군집은 뚜렷하게 구분되었으며, 안정화 기간 동안 가장 우점한 세균군집은 Bacteroidetes였다. 운전 기간중의 주요 세균 군집은 사상균으로 분류되는 *Haliscomenobacter*, *Sphaerotilus*, Candidate division TM7이었으나, 이들 사상균에 의한 슬러지 팽화 현상은 관찰할 수 없었다. *Haliscomenobacter*와 유연관계가 가까운 세균군집이 안정화 시기에 증가하여 최대 우점 군집이 되었다. 본 연구결과는 회전접촉장치와 점감포기 생물반응

조를 이용한 폐수처리공정의 영양물질 제거에 사상균이 중요함을 제시한다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Al-Mutairi, N.Z., F.A. Al-Sharifi, and S.B. Al-Shammari. 2008. Evaluation study of a slaughterhouse wastewater treatment plant including contact-assisted activated sludge and DAF. *Desalination* 225, 167-175.
2. APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington, D.C., USA.
3. Burmolle, M., J.S. Webb, D. Rao, L.H. Hansen, S.J. Sorensen, and S. Kjelleberg. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3916-3923.
4. Chavan, A. and S. Mukherji. 2008. Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: Effect of N:P ratio. *J. Hazard. Mater.* 154, 63-72.
5. Chen, Z., Q. Wen, J. Wang, and F. Li. 2006. Simultaneous removal of carbon and nitrogen from municipal-type synthetic wastewater using net-like rotating biological contactor NRBC. *Process Biochem.* 41, 2468-2472.
6. Chun, J., A. Huq, and R.R. Colwell. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio minicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2202-2208.
7. Fode-Vaughan, K.A., C.F. Wimpee, C.C. Remsen, and M.L. Collins. 2001. Detection of bacteria in environmental samples by direct-PCR without DNA extraction. *Biotechniques* 31, 598-600.
8. Forster, S., H.M. Lappin-Scott, J.R. Snape, and J. Porter. 2003. Rains, drains and active strains: towards online assessment of wastewater bacterial communities. *J. Microbiol. Methods* 55, 859-864.
9. Gaval, G. and J. Pernelle. 2003. Impact of the repetition of oxygen deficiencies on the filamentous bacteria proliferation in activated sludge. *Water Res.* 37, 1991-2000.
10. Holt, J.G., N. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stalet, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
11. Hoyle, B.D. and W.J. Costerton. 1991. Bacterial resistance to anti-biotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37, 91-105.
12. Huber, T., G. Faulkner, and P. Hugenholz. 2004. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20, 2317-2319.
13. Hugenholz, P., G.W. Tryson, R.I. Webb, A.M. Wagner, and L.L. Blackall. 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 411-419.
14. Juke, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In H.N. Munro (ed.) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, N.Y., USA.

15. Kim, M.D., M. Song, M. Jo, S.G. Shin, J.H. Kim, and S. Hwang. 2010. Growth condition and bacterial community for maximum hydrolysis of suspended organic materials in anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1611-1618.
16. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester, UK.
17. Lee, H., E. Choi, Z. Yun, and Y.K. Park. 2008. Microbial structure and community of RBC biofilm removing nitrate and phosphorus from domestic wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1459-1469.
18. Li, H., Y. Chen, and G. Gu. 2008. The effect of propionic to acetic acid ratio on anaerobic-aerobic low dissolved oxygen biological phosphorus and nitrogen removal. *Biores. Technol.* 9910, 4400-4407.
19. Lobos, J., C. Wisniewski, M. Heran, and A. Grasmick. 2008. Sequencing versus continuous membrane bioreactors: Effect of substrate to biomass ratio F/M on process performance. *J. Membrane Science* 317, 71-77.
20. Malandra, L., G. Wolfaardt, A. Zietsman, and M. Viljoen-Bloom. 2003. Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Res.* 3717, 4125-4134.
21. Mba, D. and R. Bannister. 2007. Ensuring effluent standards by improving the design of rotating biological contactors. *Desalination* 208, 204-215.
22. Miller, D.N., J.E. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Hern. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724.
23. N-Chen, G.D., A.A.L. Zinatizadeh, and L.K. Lee. 2006. Performance of a three-stage aerobic RBC reactor in food canning wastewater treatment. *Biochem. Eng. J.* 30, 297-302.
24. Pernelle, J., G. Gaval, È. Cotteux, and P. Duchène. 2001. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial population in an activated sludge pilot plant. *Water Res.* 35, 129-134.
25. Ren, N., D. Xing, B.E. Rittmann, L. Zhao, T. Xie, and X. Zhao. 2007. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ. Microbiol.* 9, 1112-1125.
26. Richard, M., O. Hao, and D. Jenkins. 1985. Growth kinetics of *Sphaerotilus* species and their significance in activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57, 68-81.
27. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
28. Silva, C.C., E.C. Jesus, A.P. Torres, M.P. Sousa, V.M. Santiago, and V.M. Oliveira. 2010. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 447-459.
29. Sirianuntapiboon, S. and C. Chuamkaew. 2007. Packed cage rotating biological contactor system for treatment of cyanide wastewater. *Bioresour. Technol.* 98, 266-272.
30. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco, USA.
31. Strom, P.F. and D. Jenkins. 1984. Identification and significance of filamentous microorganisms in activated sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 56, 449-459.
32. Tallex, G., J. Garinier, G. Billen, and M. Gousailles. 2007. Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation. *Bioresour. Technol.* 99, 2200-2209.
33. Thomsen, T.R., B.V. Kjellerup, and J.L. Nielsen. 2002. *In situ* studies of the phylogeny and physiology of filamentous bacteria with attached growth. *Environ. Microbiol.* 4, 383-391.
34. Wagner, M. and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment system. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218-227.