

다양한 환경 조건의 하수처리시설 반응조 내 세균 및 고세균 군집 Bacterial- and Archaeal Communities in Various Environmental Conditioned Basins of Several Wastewater Treatment Plants

조순자*, 하달수**, 이영옥**
부산대학교 미생물학과*, 대구대학교 생명과학과**

Sunja Cho(chosj@pusan.ac.kr)*, Tal Soo Ha(tal.ha@daegu.ac.kr)**,
Young Ok Lee(ecolomi@daegu.ac.kr)**

요약

하수의 종류(생활하수, 축산폐수) 및 다양한 처리 공정에 따른 미생물군집구조를 비교하기 위해 A2O공법으로 운영되는 생활하수처리시설(안심·서부·신천)의 10개 생물학적 반응조와 축산폐수처리시설의 활성슬러지를 채취해 DNA 유전체를 추출한 후 세균은 프라이머 27F/518R, 고세균의 경우, 프라이머 Arch519F/A958R를 이용해 유전체를 증폭시켰고 그 염기서열을 Roche 454 GS-FLX Titanium을 이용한 pyrosequencing 법으로 분석하였다. 그 결과, 생활하수와 축산폐수에 따른 미생물 군집구조의 차이는 컸지만 A2O공법에 따른 산소 유무 등의 환경 변화와 관련된 군집구조의 변화는 크지 않았다. 혐기조 및 무산소조 반응조들에서만 분석한 고세균 군집 결과에서는 동일 하수처리시설의 반응조들의 고세균군집들끼리만 모이는 하수처리시설별 집괴현상을 나타냈다. 세균다양성 및 종 풍부도가 높은 서부처리시설이 다른 시설보다 더 높은 질소 및 인 제거율을 나타냈다.

■ 중심어 : | 생활하수 축산폐수 | 세균·고세균 군집구조 | pyrosequencing | 종다양성 | PCA |

Abstract

To investigate the differences of bacterial- and archaeal communities depending on kind of wastewater (municipal/livestock) and on treating conditions of basins, sludges were sampled from 10 basins of 3 municipal wastewater treatment plants(WWTP) with A2O and a activated sludge sample from a livestock WWTP. The metagenomic DNAs of the sludge samples were extracted and amplified with primers, 27F/518R for bacteria and Arch519F/A958R for archaea, and pyrosequenced with Roche 454 GS-FLX Titanium. As results, the bacterial communities in basins of municipal WWTPs were quite different from those of livestock WWTP, but within the same municipal WWTP their community structures were similar to each other regardless of different environmental conditions such as O₂. And their archaeal communities resulted from anaerobic-anoxic basins were clustered only within communities originated from the same WWTP. Furthermore Seo-bu WWTP with high bacterial diversity and species richness performed better N/P-removal compared to the other WWTPs.

■ keyword : | Municipal/Livestock WWTP | Bacterial/Archaeal Community | Pyrosequencing | α-diversity | PCA |

* 본 연구는 대구대학교 학술연구비(과제 번호 20170365) 지원에 의해 수행되었습니다.

접수일자 : 2020년 04월 06일
수정일자 : 2020년 07월 28일

심사완료일 : 2020년 08월 07일
교신저자 : 이영옥, e-mail : ecolomi@daegu.ac.kr

I. 서론

미생물을 이용한 하수에 포함된 오염물질을 제거하는 하수의 생물학적 처리는 생태계의 구성원인 분해자 생물의 고유 기능을 활용한 자연 생태계의 복원 행위이다[1][2]. 다양한 성상의 하수 오염원, 특히 유기성 오염물질을 세균 등의 미생물이 섭식 제거해주는 일명, 생물학적 처리공정은 실제로 자연계에서 끊임없이 일어나는 물질순환 현상을 벤치마킹한 것이다[3]. 만약 세균 등의 분해자가 유기물을 무기물로 전환시켜 주지 않는다면 생산자의 성장에 필수적인 N, P 등의 영양염류가 부족해 종국에는 생산자의 생존 또한 위협받게 될 것이다[4]. 이처럼 자연계에서 분해자의 역할을 담당하는 세균, 진균(fungi) 등의 기능이 하수처리시설이라는 인공적인 생태계에 도입되어 오염원을 효율적으로 제거해 줌으로써 자연 수계의 수질이 보존된다[5]. 지난 세기 초부터 하수처리 공정은 인간 활동에 의해 발생하는 다양한 성상의 수질 오염원을 효율적이면서도 경제적으로 처리하기 위해 팔목할 만한 발전을 이루어왔다. 일례로 하수에 포함된 질소 제거를 위해 예전에는 고비용을 요구하면서 대기 중의 이산화탄소 농도를 증가시키는 종속영양성 탈질세균을 이용했는데 최근에는 독립영양적으로 질소를 제거하는 아나모क्स(anammox)균들의 기능을 알게 됨으로써 이들을 이용한 보다 친환경적인 질소제거가 하수처리시설에서 시도되고 있다[6-8].

그러나 미생물 특히 세균들이 하수처리 공정에서 주역을 담당하고 있음에도 불구하고 세균에 대한 이해는 아직 부족한 편이다. 초기에는 하수처리에 관여하는 세균군집을 배양기법으로 분석하였으나 실제 하수처리에 관여하는 세균들 중 극히 일부만이 배양가능하다는 것[9]을 세균이 가진 유전자를 분석하는 분자생물학적인 연구방법이 슬러지세균 분석에 도입되면서 알게 되었다[10]. 즉 하수처리에 관여하는 세균 군집의 유전체(DNA)를 추출해 그들의 염기서열을 분석하는 방법으로 이제는 배양기법에서 제외되었던 세균군들을 포함한 세균군집 전체의 구조 분석이 가능해졌다. Sanger에 의해 1977년 염기서열분석법이 개발된 후[11], 그 분석기법이 점차 발달하여 2000년대 초반에는 짧은 시

간에 대량의 염기서열을 저비용으로 분석할 수 있는 pyrosequencing법을 포함한 다양한 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS) 방법들이 토양, 물, 공기 등의 자연생태계 및 하수슬러지 등의 인공적인 생태계에 존재하는 세균군집 분석에 활용되고 있다[2-4][12-14]. 이와 같이 비배양적 방법으로 환경 시료 내 미생물 분석이 가능해짐에 따라, 최근에는 일부의 연구진들에 의해 그동안 잘 알려지지 않았던 슬러지 내 미생물에 대한 정보가 지속적으로 축적되고 체계화되어 MiDAS (The Microbial Database for Activated Sludge)라는 명칭의 웹사이트 (<http://www.midasfieldguide.org>)를 개설하여 타연구자들도 손쉽게 관련 정보에 접근할 수 있도록 하였다[17].

다른 한편으로는 수처리의 효율을 개선하고자 하수처리에 관여하는 세균들의 생태적 기능에 관한 연구들을 수행하고 있다[1][16]: 하수처리공정과 세균군집간의 상관성을 규명하거나[18][19] 하수처리시설에 존재하는 세균의 다양성[2][3][14], 혐기소화조 등 특정 처리 공정에서 우점하는 세균 및 고세균의 군집 구조를 규명하였다[19]. 이와 같이 외국에서는 하수처리와 관련된 하수 미생물에 관한 연구들이 활발한 편인데 반해 국내 하수처리시설에 존재하는 미생물의 생태에 관한 정보가 부족한 편이다. 따라서 본 연구에서는 ‘하수의 종류(생활하수와 축산폐수)나 다양한 환경 조건에 있는 생물 반응조들(혐기조, 무산소조, 호기조)에 어떠한 세균들이 존재하는가?’ 즉 세균 다양성을 상기 거론한 pyrosequencing법으로 규명하고자 하였다.

본 연구 등을 통해 하수처리에서 주역을 담당하는 세균들의 생태적 기능에 대한 이해가 점차 깊어진다면 이러한 정보들은 추후에 보다 친환경적이고 경제적인 하수 처리 공정을 개발하는데 유익한 기초 자료로서 활용될 수 있을 것이다[5]. 더 나아가 하수 처리기법을 개선하고자 하는 이러한 시도는 현재 우리 인류가 직면한 지구온난화 및 기후변화를 지연시키는 효과를 유발할 수도 있을 것이다.

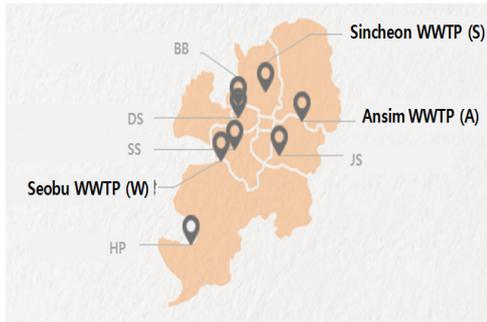


그림 1. 생활하수 시료를 채취한 처리시설의 위치

II. 재료 및 방법

1. 시료 채취 및 시료의 이화학적 특성

시료를 채취한 하수처리시설: 하수의 성상 및 처리 공정에 따른 미생물의 군집구조를 비교 분석하기 위해 대구광역시에 있는 총 3곳의 생활하수처리시설(안심·서부·신천 하수처리시설)의 각 생물학적 반응조, 총 10개 반응조에서 슬러지 시료를 채취하였다(그림 1). 즉 혐기조, 무산소조, 호기조로 구성된 A2O공정으로 하수를 처리하는 안심·서부·신천 생활하수처리시설의 각 반응조에서 시료를 채취하였는데 신천하수처리시설의 경우, 상기 3개의 반응조인 혐기조(S1), 무산소조(S2), 호기조(S3) 외에 추가적으로 존재하는 전탈질 반응조(S4)에서도 슬러지를 채취하였다. 또한 하수의 종류(생활하수와 축산폐수)에 따른 미생물 군집구조의 차이를 알아보기 위해 활성슬러지법으로 축산폐수를 처리하는 상주축산폐수시설의 생물반응조 슬러지도 분석하였다[20]. 슬러지 시료를 채집한 생활 하수처리장 3곳의 처리공법, 유입수 및 유출수의 연평균 수질(BOD(생물화학적 산소 요구량), COD(화학적 산소요구량), T-N(총질소), T-P(총인))에 관한 정보는 [표 1]에 제시되어 있다[20][21].

시료의 전처리: 각 반응조에서 3 L 용량의 bucket-type 시료 채취기로 시료를 채취한 후, 1 L 용량의 멸균된 채수용 플라스틱 용기에 담아 아이스박스에 넣어 실험실로 옮긴 직후, 1.5 mL microtube에 균질하게 혼합한 시료 1 mL를 분주하고 원심분리(7,000 rpm)한 후, 상등액을 버리고 남은 것을 시료로 간주하는데 이 시료를 3배수(replicates)로 분할하여 DNA 추출

전까지 -80°C에서 보관하였다.

표 1. 생활하수 및 축산폐수 처리시설의 특성

Facility	An-sim municipal WWTP	Seo-bu municipal WWTP	Sin-cheon municipal WWTP	Sang-ju livestock WWTP	
Treating process	Anaerobic -Anoxic -Aerobic plus Chemical P treatment	Anaerobic -Anoxic -Aerobic	Preanoxic -Anaerobic -Anoxic -Aerobic	MLE (Modified Ludzack -Ettinger)	
Average inflow (m ³ /day)	38,054	428,659	507,034	80	
Cover area(km ²)	3.37	44.73	49.4	-	
Influent (mg/L)	BOD (108.4-185.5)	133.5 (108.4-185.5)	207.1 (162.5-258.7)	228.1 (109.9-328.3)	28600
	COD (63.6-95.9)	72.8 (63.6-95.9)	134.2 (108.4-161.2)	145.2 (77.8-211.1)	60000
	T-N (28.8-42.0)	34.2 (28.8-42.0)	44.4 (39.8-60.3)	38.1 (26.6-54.8)	4500
	T-P (3.09-4.21)	3.50 (3.09-4.21)	7.55 (5.69-9.83)	7.19 (4.38-11.36)	800
Effluent (mg/L)	BOD (0.3-0.7)	0.5 (0.3-0.7)	0.7 (0.4-1.7)	0.9 (0.4-1.9)	1.2
	COD (3.9-6.4)	4.8 (3.9-6.4)	6.5 (4.9-8.4)	6.5 (5.4-7.7)	113
	T-N (5.7-8.9)	6.6 (5.7-8.9)	8.8 (7.6-10.1)	8.2 (7.5-11.8)	38
	T-P (0.02-0.07)	0.05 (0.02-0.07)	0.08 (0.05-0.09)	0.09 (0.08-0.10)	0.8

2. 세균 및 고세균 군집 구조 분석

2.1 DNA 추출 및 증폭과 pyrosequencing에 의한 염기서열 분석

시료의 metagenomic DNA는 각각 Fast DNA SPIN Kit for soil (MP biomedical, France)을 이용하여 냉동보관된 시료로부터 제작사의 지시대로 추출하였다. 추출된 metagenomic DNA(100 ng)는 시료 내 미생물 군집의 16S rRNA 유전자 PCR 증폭을 위해 주형으로 사용하였다. 이때 사용된 primers는 세균의 경우, 16S rRNA 유전자의 V1-V3 영역을 증폭시키는 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')이고 고세균의 경우, Arch519F(5'-CAGCCGCCGCGGTA -3')와 A958R(5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT- 3')이다[22].

총 용량 50 μL의 PCR반응은 5분간 94°C에서 변성 시킨 metagenomic DNAs를 이용하여 94°C (45초),

55°C (45초), 72°C (60초)의 주기를 35회 반복한 후, 72°C에서 5분간 정치함으로써 종결하였다. PCR산물의 존재 유무는 1.2% agarose gel에서 확인하였고 약 500bp의 PCR산물을 gel로부터 Xprep Gel & PCR Purification Kit로 분리 정제하였다. 정제된 염기서열은 Chunlab 사(Korea)에 의뢰해 차세대 염기서열분석기법(NGS)의 일종으로 다량의 염기서열의 신속한 분석이 가능한 454 pyrosequencing법으로 분석하였다.

2.2 세균 및 고세균 군집 구조 분석

454 GS Junior(Roche)에 의해 얻어진 슬러지 시료에 존재하는 총 16S rRNA 유전자의 염기서열 정보는 우선 primer 앞의 구별된 barcode를 이용하여 시료별로 구분하고 분류하였으며 primer부위의 염기서열은 제거하였다. QIME v.1.8.0[23], QIME 기반의 wrapper[24], Mothur에 의해 299 bp이하의 reads와 chimera를 포함하는 염기서열을 제거시키고 남은 reads 중, Ez Taxon(www.eztaxon.org)의 database와 비교하여 97% 이상의 유사도를 나타내는 operational taxonomic units(OTUs)를 해당 세균분류군으로 동정하였다[표 2].

이렇게 동정된 세균종들의 빈도(abundance)와 다양성을 지시하는 α -다양성은 종 출현도(Rarefaction curve), 종 다양성 지수(Shannon Index), 종 풍부도 지수(Chao1 Index) 등으로 세분화되어 정량 분석되는데[5][11] 본 연구에서는 그 중 Shannon 및 Chao1 지수를 산출하였고 이 지수들은 수치가 클수록 좋은 지수이다[표 2].

3. 주성분 분석 (Principle Component Analysis, PCA)

하수의 종류 및 처리 공정에 따른 각 생물 반응조 미생물군집의 유사성(similarity) 및 상이성(dissimilarity)을 평가하기 위해 덴드로그램이나 PCA, PCoA 등을 도구로 사용하는데[12], 본 연구에서는 각 시료에 포함된 미생물군집간의 유사성(similarity) 평가에 이용되는 주성분 분석(principal component analysis, PCA)을 One-way ANOVA 분석법으로 하였다. 이를 위하여 SPSS Statistics 23을 적용하였다.

표 2. 시료를 채취한 각 반응조 및 슬러지 세균의 특성

WWTP	Sampling Site	No. of valid reads	Average read length	No. of OTUs	Index		
					Shannon	Chao 1	
An-sim municipal WWTP	anaerobic	A1	1840	504	1014	5.93	2049.9
	anoxic	A2	1692	500	1074	6.00	1955.5
	oxic	A3	1689	500	1005	5.97	1822.1
Seo-bu municipal WWTP	anaerobic	W1	4508	506	1711	6.11	3334.6
	anoxic	W2	3357	504	1612	6.10	2933.8
	oxic	W3	3266	505	1509	6.15	2879.8
Sin-cheon municipal WWTP	anaerobic	S1	1657	500	967	5.83	1866.5
	anoxic	S2	2132	495	1281	5.95	2811.0
	oxic	S3	3056	503	1463	5.95	2719.9
	pre-anoxic	S4	3170	506	774	5.20	1427.6
Sang-ju livestock WWTP	oxic	SJ	5819	509	1458	5.46	2995.0

III. 결과 및 토론

1. 각 생물반응조 시료의 유효 염기서열·OTU갯수 및 다양성 지수

각 시료에서 얻어진 reads들을 97% 이상의 유사도 기준으로 정리한 후 OTUs별로 clustering하여 비교 분석하였다[표 2]. 그러나 이 방법 또한 개선여지의 필요성이 여러 연구자들[5][12]에 의해 언급된 바와 같이 본 연구 결과에서도 유사한 문제점이 발생하였다. 즉 본 연구에 사용된 primers로 읽혀진 reads의 51.9(±9.5)%에서 chimera가 발견되어 제거되었다. 또한 환경 시료의 경우, 각 시료당 reads수가 약 4,000개 이상이어야 유의적인 결과가 도출된다는 타연구자의 보고[12][14]를 감안한다면 본 연구 결과에서 검출된 reads 수가 서부하수처리시설의 혐기성 반응조와 상주 축산폐수처리시설의 호기성 반응조를 제외하고는 4,000개 이하이므로 그로부터 도출되는 결과의 유의성(significance)에 의문을 가질 수도 있을 것이다. 그러나 pyrosequencing법으로 하수미생물을 분석한 타연구자들의 연구 결과를 보면, reads수가 많다고 해서 반드시 그에 상응해 OTU 수치가 큰 것은 아니었다[5]. 실제로 본 연구 대상이었던 상주 축산폐수처리시설의 호기성 반응조에서 검출된 reads수는 5819개(11개 반응조 평균 2926개)로 가장 많았는데도 그로부터 도출된 OTUs는 평균치 1260개를 조금 상회하는 1458개

였다[표 2]. 각 생물반응조에서 우점하는 세균종명이 reads 갯수에 의존해 변동될 수는 없을 것이므로 reads 개수에 개의치 않고 우점하는 문(phylum), 강(class), 목(order), 속(genus) 분류체계 수준에서 동정된 세균군 중심으로 본 연구의 결과를 고찰하였다[그림 2][그림 3][그림 4].

세균 및 고세균 군집을 구성하는 세균종 다양성을 나타내는 Shannon 지수[표 2]를 보면 하수의 종류에 따른 분명한 차이(축산폐수: 5.46, 생활하수: 5.83- 6.15)를 나타냈다. 물론 폐음식물 발효액이 추가된 신천하수 처리시설의 전탈질을 유도하는 무산소적 생물반응조(S4)에서는 축산폐수보다 더 낮은 세균 다양도 (5.2)를 나타냈지만 이 반응조에는 하수만이 있는 것이 아니므로 S4 자료를 제외한다면 생활하수를 처리하는 각 생물반응조의 세균종 다양성은 하수처리시설별 혹은 동일 처리시설내의 산소 농도가 다른 각 생물반응조별 차이가 크지 않았지만 서부하수처리시설의 모든 반응조에서 가장 높은 수치를 보였다. 반면에 세균종 풍부도(richness)를 나타내는 Chao1 지수(평균 2346)의 경우, 세균종 다양성 지수에 비해 생물반응조간의 차이가 큰 편이었으며 신천하수처리시설의 전탈질조를 제외하면 1866.5(신천하수처리시설의 혐기조)-3334.6(서부하수처리시설, 혐기조) 범위에서 변화하였다.

결론적으로 생활하수 및 축산폐수 처리시설의 11개 반응조에서 분석한 세균종 다양성에는 차이가 있었다. 우선 3곳의 생활하수를 처리하는 시설의 세균종 다양성이 축산폐수처리시설의 그것보다 높았으며 3곳의 생활하수처리시설 중 서부처리시설의 모든 반응조에서 가장 높은 세균 다양성(Shannon 지수)과 세균종 풍부도(Chao1 지수)가 도출되었고 해당처리시설이 다른 시설보다 높은 N 및 P 제거효율을 나타냈다[표 1]. 생활하수슬러지를 기반(seed sludge)으로 이용해 돈분을 처리한 결과, Shannon 및 Chao1 지수 등이 감소되었다는 타연구자의 보고[25]와 같이. 우선 본 연구결과에서도 생활하수슬러지의 세균다양성이 축산폐수슬러지의 세균다양성보다 높았다. 이러한 결과는 처리 대상인 하·폐수의 성상이 세균다양성이나 세균개체군 풍부도 등의 세균군집구조 요인들에 미치는 영향이 작지 않음을 시사한다. 축산폐수를 활성슬러지법으로 처리하는

상주의 축산폐수처리시설에서는 Shannon 지수(5.46)는 낮으나 Chao1 지수(2995.0)는 높은 편인 것으로 보아 해당 처리시설의 세균종 다양성은 낮으나 동일조에 속한 개체군풍부도는 높다고 판정할 수 있다. 앞으로 처리시설의 질소 및 인 등의 영양염류 제거 효율과 세균 다양성 간의 상관성에 관한 추가적인 연구들이 지속적으로 수행되어 상관성 여부가 규명된다면 이는 보다 경제적이면서 친환경적으로 하수처리시설을 운영하는 유익한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

2. 세균도메인에 속한 세균의 군집 구조

각 생물반응조의 세균 군집 구조를 비교하기 위해 각 시료에서 얻어진 reads들을 97% 유사도 기준으로 정리한 다음, 문(phylum) 및 강(class) 수준으로 모식화하였다[그림 2]. 이때 총 reads에서 해당 read가 차지하는 비율이 0.1% 이하인 세균분류군들은 합산하여 기타 분류군(the others)으로 그룹화하였다.

2.1 문(phylum) 수준의 세균군집구조

3곳의 생활하수처리시설(A2O 처리공정)을 구성하는 혐기·무산소·호기 생물반응조들에서 검출된 세균 도메인에 속한 세균군집구조를 문(phylum) 수준에서 비교하면 산소 농도가 매우 상이할 것임에도 불구하고 시료간의 차이가 크지 않았다. 산발효된 액상의 음식물쓰레기가 추가되는 신천하수처리시설의 전탈질조(S4)를 제외한 모든 반응조의 슬러지 시료에서 프로테오박테리아(Proteobacteria)문에 속한 세균들이 41.5-54.2% (평균 46%)로 가장 우점하였고 Bacteroidetes문(13.8-24.7%), Actinobacteria문(6.8-17.2%), Chloroflexi문(5.3-11.2%) 순서로 그 검출 비율이 낮아졌다. 본 연구에서 우점도가 가장 높은 Proteobacteria문에 속한 세균은 타연구자의 연구에서도 산소 농도 등의 처리조건과 무관하게 활성슬러지(51.1-77.7%)[16]와 무산소조 슬러지(60.4%)[18]에서 가장 우점하고 심지어는 혐기소화조[19]에서도 우점하는 문으로 보고되었는데 이는 우선 Proteobacteria문이 세균 도메인에 속한 문 중 가장 큰 문이며 지금까지 그 특성이 밝혀진 세균 도메인에 속하는 세균의 대부분(90%)이 Proteobacteria문, Bacteroidetes문,

Actinobacteria문, Firmicutes문 등 4개 문에 편중되어 있기 때문일 것이다[6]. Bacteroides문(22.5 %)은 혐기소화조 슬러지에서 가장 우점하는 세균문이며[18] 무산소조에서는 Proteobacteria문 다음으로 우점한다고 보고되었다[17]. 그밖에 Actinobacteria문, Chloroflexi문, Firmicutes문 순으로 우점하였는데 본 연구결과에서는 위에 기술한 5개 문에 속한 세균들이 총세균에서 차지하는 비율이 생활하수의 경우, 90 % 이상이었고 축산폐수의 경우 79.4 %를 차지하였다. Chloroflexi문에 속한 세균들은 활성슬러지에 흔하며 그들 중에는 별킹을 야기하는 사상성(filamentous) 세균의 일종인 Eikelboom 0092균도 포함되어 있어 이들의 분포 비율이 크면 하수처리 시, 문제를 야기하는 것으로 알려져 있는데[26] 이 Chloroflexi문에 속한 세균들이 생활하수슬러지에서는 5- 10 %를 차지하였으나 유기물 오염도가 높은 축산폐수[표 1]의 슬러지에서는 Proteobacteria문 다음으로 높은 비율(23%)을 나타냈다.

2.2 강(class) 수준의 세균군집구조

세균군집구조를 강(class) 수준에서 비교하면 [그림 2]의 아래 그래프에서 보듯이, 처리하는 하·폐수의 종류, 처리시설별, 더 나아가 동일처리시설 내 각기 다른 반응조간에도 분명한 세균 군집간의 차이가 보인다: Proteobacteria문에 속한 α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria강 중, β -Proteobacteria강(20.1-26.9%)이 모든 생활하수 시료에서 가장 우점하였고 그 다음에 우점하는 세균그룹에는 하수처리시설별 차이를 나타냈다: 안심하수처리시설에서는 δ -Proteobacteria강(8.8-11.6%)이, 신천하수처리시설과 서부하수처리시설에서는 γ -Proteobacteria강(신천:9.7-12.0%, 서부: 9.6-11.7%)이 높은 우점도를 보였다. β -Proteobacteria강에 속한 세균들은 안정화된 활성슬러지에서 우점하고[9], γ -Proteobacteria강에는 그 특성이 알려진 세균도메인 세균의 1/2이 포함되며[6], 그 대부분이 일반적인 배지로 배양이 가능한 세균들로 알려져 있다[27]. 김 등[16]이 A2O공법으로 처리하는 구리하수처리시설, 활성슬러지법으로 처리하는 포항하수처리시설, 분리막을 이용해 처리하는 이천의 덕평하수처리시

설 등에서 세균군집구조를 비교분석한 결과, 포항의 경우, β -Proteobacteria강과 δ -Proteobacteria강이 동일한 비율(22.9%)를 차지하였고 구리처리시설과 덕평처리시설의 경우, β -Proteobacteria강이 압도적인 우위를 차지해 각각 58.5%, 53.4%로 검출되었다고 보고하였다. 소규모인 안심하수처리시설은 서부·신천처리시설이 처리하는 하수 용량의 1/10보다 작은 양의 생활하수를 A2O 공법으로 처리하면서 추가적으로 인을 화학적으로 침전 제거하는데 이러한 독특한 처리방법이 δ -Proteobacteria강의 우점도와 관련이 있을 것이다[표 1]. 각 반응조에서 검출된 수백 개의 세균속 중에서 상위 10여개의 우점속을 정량적으로 도식화한 Heat map[그림 3]을 보면 δ -Proteobacteria강에 속한 *Haliangium*속([그림 3]에 Haliangiaceae로 표기됨) 세균들이 안심처리시설과 같이, A2O 공법으로 처리하는 중국의 소규모 하수처리시설에서도 우점한 것으로 보고되었다[28].

그 다음으로 생활하수슬러지에서는 Sphingobacteria강(11.4-18.6%)이 우점한 반면, 축산폐수슬러지에서는 Chloroflexi문에 속하는 Anaerolineae강(20.6 %)이 β -Proteobacteria강(20.3%)과 동등한 수준으로 검출되었고 생활하수 슬러지에 많았던 Sphingobacteria강은 적은 비율(4.2%)을 차지하였다.

이 외에도 축산폐수에서는 Planctomycetes강에 속한 익명의 세균(OM190)이 높은 비율(7.6%)로 검출되었으며 이 세균군은 생활하수에는 전혀 없거나 매우 낮은 비율(0-0.1%)을 차지하였다. 다양한 가축분뇨의 세균 군집을 분석한 결과에 의하면 가축의 종류에 따라 차이가 크며 돈분에서는 Bacteroidia강(Bacteroides문)이, 계분에서는 Actinobacteria강이 우점하는 등 생활하수에서의 세균군집과 확연히 다른 패턴을 나타냈다[29]. 결론적으로 축산폐수의 슬러지는 생활하수 슬러지와 매우 상이한 세균군집구조를 나타냈다. 또한 축산폐수처리시설(SJ1)의 세균 군집을 음식물폐액이 함유된 신천하수처리시설의 전탈질조(S4)의 세균군집구조와 heat map을 이용해 비교해 보았다[그림 3]. 두 슬러지의 세균군집구조가 유사해 보임에도 불구하고 그들을 속(genus) 수준에서 비교해 보면 그들간에 공통적으로 존재하는 우점속은 없었다. 그 이유는 유입폐

수의 성장 차이 때문일 것으로 사료된다: 즉 신천하수 처리시설의 전탈질조(S4)에는 산발효된 음식물 폐액을 포함하는 생활하수가 유입된 반면, 상주축산폐수처리시설의 유입수는 축산분뇨에서 유래하는 고농도의 폐수를 함유하기 때문이다. 또한 두 유입수간의 유기물 농도 차이도 매우 크다[표 1].

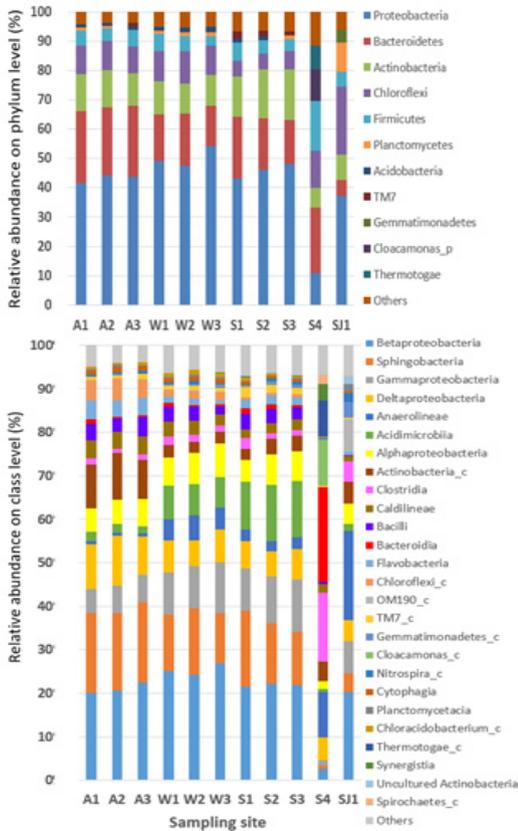


그림 2. 처리시설의 각 반응조(안심 ; A1, A2, A3, 서부 ; W1, W2, W3, 신천 ; S1, S2, S3)에서 검출된 세균군집구조 상; 문(phylum)수준, 하; 강(class) 수준

3. 고세균도메인에 속한 고세균의 군집구조

고세균 도메인에 속한 균들의 군집구조를 목(order) 수준으로 모식화한 [그림 4]를 보면, Euryarchaeota 문, Methano- bacteria강에 속하는 Methanobacteriales목 세균분류군이 시료를 채집한 모든 혐기적 반응조와 무산소적 반응조에서 가장 우점하였고 그 다음으로 Euryarchaeota문, Methano- microbia강

에 속하는 Methanosarcinales목이 우점하는 양상을 보였다.

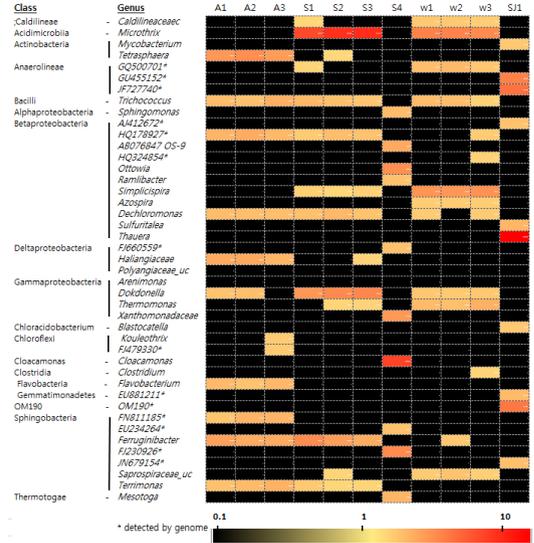


그림 3. 각 반응조에서 우점하는 세균 속(genus)의 분포도 (heat map), 하단의 바(bar)는 각 반응조에서 추출한 해당 속의 유전체가 총유전체에서 차지하는 비율

본 연구 결과에서 우점하는 Methanobacteriales, Methanobacteriales 모두 Euryarchaeota문에 속하므로 본 연구결과는 슬러지에서 두 개의 고세균 문(Euryarchaeota, Crenarchaeota) 중, Euryarchaeota문이 우점적으로 검출된다는 타연구자의 보고와 일치하였다[17]. 목(order)수준에서 보면 Methanobacteriales목(49.7-96.7%)의 우점도가 가장 높았고, 그 다음으로 Methanosarcinales목이 서부처리시설(19.1 -21.4%)과 신천처리시설(33.3-36.6%)에서 상당한 비율을 차지하였으나 안심처리시설의 혐기조 및 무산소조에서는 소량(1.2-2.3%)으로 존재했다[그림 4]. 이는 Methanobacteriales목에 속한 균들이 무산소조에서 가장 빈번하게 검출된다는 타연구자의 결과와 일치하였다[18]. 그러나 동일 연구자들이 혐기소화조에서 수행한 연구에서는 Methanomicrobiales목과 Methanosarcinales목이 고세균도메인의 대부분을 차지하였고 Methanobacteriales목은 전혀 검출되지 않았다고 보고하였다[19]. 이처럼 우점하는 고세균의 종류가 달라지는 것은 해당 고세균

의 출처인 슬러지의 처리과정과 연관이 있다고 한다 [19]. 즉 중온 및 고온으로 병행처리되는 생활하수슬러지(Municipal Solid Waste, MSW)에서는 Methanobacteriales가 우점하는 반면, 중온성 MSW와 Sewage Solid Digester(SSD)에서는 Methanosarcinales가 우점한다고 보고되었다[19]. 혐기소화조(anaerobic digester)에서 가장 우점한다고 보고된 Methanomicrobiales목이 본 연구 대상의 시설에서는 극히 낮은 비율(안심·신천처리시설의 무산소조와 혐기조: 0.1-0.3%, 서부처리시설: 2.9-3.2%)로 검출되었다(그림 4). Methanobacteriales목에 속하는 *Methanobrevibacter*속이 산발효된 음식물 폐액이 주입되는 전탈질조(S4)를 제외한 모든 혐기적·무산소적 반응조에서 우점하였고 전탈질조에서는 Methanosarcinales목에 속하는 *Methanosaeta*속이 우점하였다(데이터 미포함).

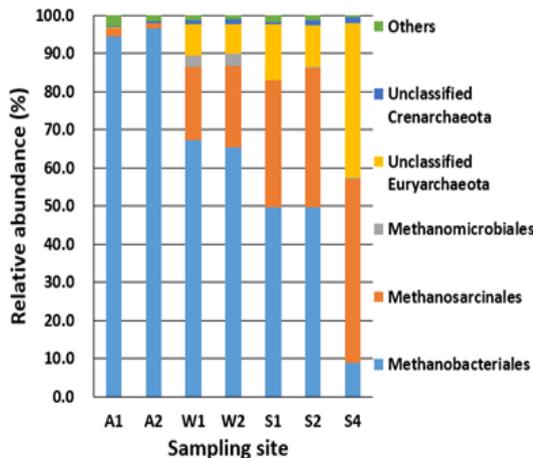


그림 4. 혐기조와 무산소조에 있는 목(order) 수준의 고세균 군집구조

4. 주성분 분석

각 생물반응조에 분포하는 세균 및 고세균 군집간의 유사도(similarity)를 주성분 분석(principal component analysis, PCA)법으로 규명한 결과(그림 5)를 보면, 소규모인 안심처리시설 반응조(A1, A2, A3)의 세균군집들이 대규모인 신천하수처리시설 반응조(S1, S2, S3)나 역시 대규모인 서부하수처리시설 반응

조(W1, W2, W3)의 세균 군집과는 경미한 차이를 보였다(그림 5A). 그 외에도 신천하수처리시설의 전탈질조(S4)와 상주축산폐수처리시설의 활성슬러지조를 제외하고는 생활하수의 세부적인 성상(하수 출처에 따른 차이)이나 각 처리시설의 고유한 특징, 더 나아가 A2O 처리공정을 구성하는 혐기·무산소·호기 생물반응조의 각기 다른 산소 농도 등 이화학적인 환경 조건이 상이함에도 불구하고 거의 한 곳에 편중되어 있다(그림 5A). 반면, 고세균군집에서는 동일 하수 처리시설에 속한 반응조들의 고세균군집들만이 모이는 집괴현상(clustering)을 나타냈다(그림 5B). 즉 고세균들에게 먹이인 하수의 성상이 동일한 경우에만 그들의 군집 구조가 유사하였고 처리시설이 달라 하수의 성상에도 변화가 있는 경우에는 군집구조에 차이가 있었다. 각 그래프에서 세균군집들 간의 연관성이 높으면 상이성(dissimilarity)가 낮아 군집의 높이(Y축)도 낮고 연관성이 낮으면 상이도가 높아 군집의 Y축 높이도 높아진다는 타연구자의 결과[10]를 토대로 본연구결과를 분석해보면 소규모인 안심처리시설에 있는 각 반응조들의 세균군집들간의 유사도가 대형인 신천하수처리시설 반응조(S1, S2, S3) 및 서부하수처리시설 반응조(W1, W2, W3)의 그것보다 높았는데 이는 생활하수를 동일한 A2O공정으로 처리하는 경우에도 처리용량 차이에 따라 세균 및 고세균의 군집구조가 변화하고 그곳의 미생물군집의 유사도는 처리용량에 역비례한다는 결과이다. 따라서 미생물군집을 구성하는 세균들의 유사도(혹은 상이도)와, 처리용량이나 처리효율과의 상관성에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 그들의 상관성 여부가 규명되면 이 또한 경제성과 환경성이 좋은 처리공정 개발에 도움이 될 것이다. 상주축산폐수처리시설의 활성슬러지조(SJ1)의 세균군집은 발효된 음식물폐액이 추가된 신천하수처리시설의 전탈질조(S4)를 제외한 모든 생활하수 처리조들의 세균군집과는 큰 차이를 보였다(그림 5A). 이는 처리하는 하수의 성상(생활하수와 축산폐수)뿐 아니라 하수에 부족한 탄소원을 보충해 줄 목적으로 추가되는 음식물쓰레기 발효액 등 하수 외의 오염원들이 하수처리공정으로 조성되는 환경(혐기조, 무산소조, 호기조)보다도 하수처리에서 주역을 담당하는 미생물군집에 큰 변화를 유발할 수도 있음을 시사한

다.

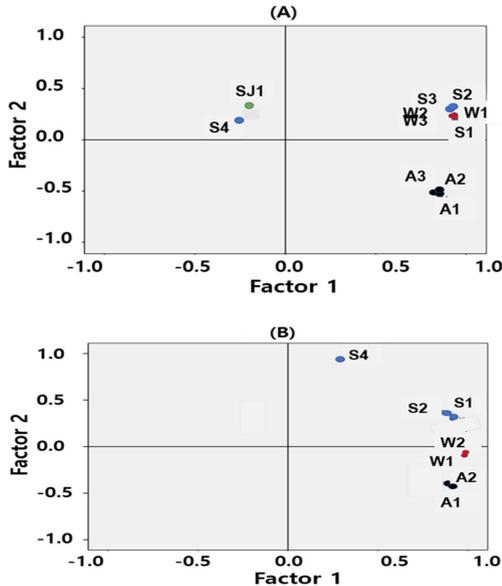


그림 5. 주성분 분석 결과;
(A) 세균군집, (B) 고세균군집

IV. 결론

하수의 종류(생활하수, 축산폐수) 및 처리 공정에 따른 미생물의 군집구조를 비교 분석하기 위해 대구시에 있는 총 3곳의 생활하수처리시설(안심·서부·신천 하수처리시설)[20]의 각 생물학적 반응조와, 경북 상주에 있는 축산폐수시설[21]의 활성슬러지조에서 슬러지를 채취해 pyrosequencing법으로 세균 및 고세균 군집구조를 분석하였고 그 결과는 다음과 같다.

1. 세균군집구조는 처리하는 하수의 종류(생활하수와 축산폐수)에 따라 큰 차이를 보였지만 A2O 공정으로 생활하수를 처리하는 각 반응조(혐기조, 무산소조, 호기조)간의 차이는 크지 않았다.

2. 혐기적·무산소적 반응조들에서만 분석한 고세균군집의 경우, 동일한 하수를 처리하는 반응조들의 고세균군집들끼리만 집괴현상(clustering)을 나타냈다.

3. 세균 및 고세균 군집간의 유사성을 나타내는 주성분 분석(PCA) 결과는 1. 2. 결과를 지지해 주었다.

4. 하수에 부족한 탄소원을 보충할 목적으로 추가되

는 음식물쓰레기 발효액이 A2O 공정에 따른 각 반응조의 환경 차이보다 더 큰 미생물 군집의 변화를 유발하였다.

5. 생활하수를 처리하는 시설의 세균 다양성이 축산폐수처리시설의 세균 다양성보다 컸다. 3곳의 생활하수처리시설 중 서부처리시설이 모든 반응조에서 가장 높은 세균 다양성(Shannon 지수)과 종 풍부도(Chao1 지수)를 보였으며 다른 시설보다 더 높은 질소 및 인 제거효율을 나타냈다.

6. 생활하수를 동일한 A2O공정으로 처리하는 경우에도 처리용량의 규모에 따라 세균 및 고세균의 군집구조가 다르고 주성분 분석(PCA)으로 측정된 미생물군집의 유사도는 처리용량에 역비례해서 감소하였다.

현재는 미생물을 연구하는 기법이 배양기법에서 염기서열을 이용하는 분자기법으로 이행 중이어서 분자기법으로 분석된 각 미생물개체군들의 특성에 대한 자료가 기존의 배양기법 자료에 비해 적은 편이다. 그러나 하수의 물성 및 처리 효율 등과 특정 미생물개체군들과의 상관성에 관한 연구 결과들이 지속적으로 축적된다면 이를 토대로 보다 친환경적이면서 경제적인 하수처리공정을 개발할 수 있을 것이다. 즉 온실가스를 덜 배출하는 하수처리공정의 상용화는 우리 인류를 위협하기 시작한 기후변화를 완화시키는 일이기도 하다.

참고 문헌

- [1] S. D. Weber, W. Ludwig, K. H. Schleifer, and J. Fried, "Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.73, pp.6233-6240, 2007.
- [2] M. Hu, X. Wang, X. Wen, and Y. Xia, "Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis," *Bioresour. Technol.*, Vol.117, pp.72-79, 2012.
- [3] X. Wang, M. Hu, Y. Xia, X. Wen, and K. Ding, "Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.78,

- pp.7042-7047, 2012.
- [4] S. J. Cho, M. H. Kim, and Y. O. Lee, "Effect of pH on soil bacterial diversity," *J. Eco. and Env.*, Vol.40, pp.1-9, 2016.
- [5] G. K. Matar, S. Bagchi, K. Zhang, D. B. Oerther, and P. E. Saikaly, "Membrane biofilm communities in full-scale membrane bioreactors are not randomly assembled and consist of a core microbiome," *Wat. Res.*, Vol.123, pp.124-133, 2017.
- [6] M. Madigan, J. Martinko, K. Bender, D. Buckley, and D. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 14th ed., Pearson Education International Pub., 2015.
- [7] S. Xu, W. Lu, M. F. Mustafa, L. M. Caicedo, H. Guo, X. Fu, and H. Wang, "Co-existence of Anaerobic Ammonium Oxidation Bacteria and Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation Bacteria in Sewage Sludge: Community Diversity and Seasonal Dynamics," *Microb. Ecol.*, Vol.74, pp.832-840, 2017.
- [8] 황인수, 민경석, 이영옥, "부분질산화와 혐기성 암모니아산화를 이용한 동사폐수처리," *한국물환경학회지*, 제22권, pp.509-604, 2006.
- [9] M. Wagner, R. Amann, H. Lemmer, and K. H. Schleifer, "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.59, pp.1520-1525, 1993.
- [10] R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "Phylogenetic and in situ detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, Vol.59, pp.143-169, 1995.
- [11] 한국미생물학회, *미생물학* 범문에듀케이션, 2017.
- [12] 고관수, 임영옥, 신동천, 박준홍, *황사 중 미생물 위험도 평가(II)*, 주관연구기관: 대한환경공학회, 2013.
- [13] O. H. Hwang, S. Raveendar, Y. J. Kim, J. H. Kim, T. H. Kim, D. Y. Choi, C. O. Jeon, S. B. Cho, and K. T. Lee, "Deodorization of Pig Slurry and Characterization of Bacterial Diversity Using 16S rDNA Sequence Analysis," *J. Microbiol.*, Vol.2, pp.918-929, 2014.
- [14] T. Zhang, M. F. Shao, and L. Ye, "454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants," *ISME J.*, Vol.6, pp.1137-1147, 2012.
- [15] S. J. Jo, H. K. Kwon, S. Y. Jeong, C. H. Lee, and T. G. Kim, "Comparison of microbial communities of activated sludge and membrane biofilm in 10 full-scale membrane bioreactors," *Wat. Res.*, Vol.101 pp.214-225, 2016.
- [16] 김택승, 김한신, 권순동, 박희등, "16S rRNA 유전자 기반의 Pyrosequencing을 이용한 하수처리시설 생물반응기의 세균군집구조 분석," *한국미생물학회지*, 제46권, 제4호, pp.352-358, 2010.
- [17] S. J. McIlroy, A. M. Saunders, M. Albertsen, M. Nierychlo, B. McIlroy, A. A. Hansen, S. M. Karst, J. L. Nielsen, and P. H. Nielsen, "MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge," *Database*, Vol.2015, pp.1-8, 2015.
- [18] R. Chouari, D. Le Paslier, P. Daegelen, C. Dauga, J. Weissenbach, and A. Sghir, "Molecular Analyses of the Bacterial Community Composition of an Anoxic Basin of a Municipal Wastewater Treatment Plant Reveal a Novel Lineage of Proteobacteria," *Microb. Ecol.*, Vol.60, pp.272-281, 2010.
- [19] R. Chouari, D. Le Paslier, P. Daegelen, P. Ginestet, J. Weissenbach, and A. Sghir, "Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester," *Environ. Microbiol.*, Vol.7, pp.1104-1115, 2005.
- [20] <https://www.data.go.kr/dataset/15001183/file> Data.do, 2019.1.20.
- [21] 황인수, 민경석, "수정된 MLE 공정을 이용한 full-scale에서의 동사분뇨처리," *한국물환경학회지*, 제22권, pp.895-904, 2006.
- [22] E. W. Vissers, P. L. Bodelier, G. Muyzer, and H. J. Laanbroek, "A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples," *FEMS Microbiology Letters*, Vol.298, pp.193-198, 2009.

- [23] J. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Pena, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, and R. Knight, "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data," *Nature Methods*, Vol.7, pp.335-336, 2010.
- [24] R. C. Edgar, B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, and R. Knight, "UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection," *Bioinformatics*, Vol.27, pp.2194-2200, 2011.
- [25] J. Liu, J. Li, X. Wang, Q. Zhang, and H. Littleton, "Rapid aerobic granulation in an SBR treating piggery wastewater by seeding sludge from a municipal WWTP," *J. Environ. Sci(China)*, Vol.51, pp.332-341, 2017.
- [26] S. J. McIlroy, S. M. Karst, M. Nierychlo, M. S. Dueholm, M. Albertsen, R. H. Kirkegaard, R. J. Seviour, and P. H. Nielsen, "Genomic and in situ investigations of the novel uncultured Chloroflexi associated with 0092 morphotype filamentous bulking in activated sludge," *ISME J*, Vol.10, pp.2223-2234, 2016.
- [27] W. Manz, U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K.H.Schleifer, and T. Stenström, "In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.59, pp.2293-2298, 1993.
- [28] D. Xu, S. Liu, Q. Chen, and J. Ni, "Microbial community compositions in different functional zones of Carrousel oxidation ditch system for domestic wastewater treatment," *AMB Express*. Vol.7, pp.40-52, 2017.
- [29] J. J. Minich, Q. Zhu, Z. Z. Xu, A. Amir, M. Ngochera, M. Simwaka, E. E.Allen, H. Zidana, and R. Knight, "Microbial effects of livestock manure fertilization on freshwater aquaculture

ponds rearing tilapia (*Oreochromis shiranus*) and North African catfish (*Clarias gariepinus*)," *Microbiologyopen*, Vol.7, pp.1-15, 2018. <https://doi.org/10.1002/mbo3.716>

저 자 소 개

조 순 자(Sunja Cho)

정회원



- 1986년 2월 : 부산대학교 미생물학과(이학사)
 - 1999년 8월 : 부산대학교 환경과학과(이학석사)
 - 2006년 2월 : 부산대학교 미생물학과(이학박사)
 - 2006년 9월 ~ 2008년 8월 : 일본 북해도대학(박사후연구원)
 - 2009년 2월 ~ 2012년 8월 : 부산대학교(BK연구교수)
 - 2012년 9월 ~ 2020년 2월 : 부산대학교(강의교수)
- 〈관심분야〉 : 미생물과 질소 사이클, 생물학적 수처리

하 달 수(Tal Soo Ha)

정회원



- 2003년 2월 : 광주과학기술원 생명과학부(이학박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 대구대학교 생명과학과 교수

〈관심분야〉 : 초파리, 환경과 노화, 후각 감지

이 영 옥(Young Ok Lee)

정회원



- 1987년 2월 : 오스트리아 Wien대학교 졸업(학사-박사)
- 1991년 9월 ~ 현재 : 대구대학교 생명과학과 교수

〈관심분야〉 : 다양한 환경의 바이오 모니터링, 생태복원