

## Slot Hybridization을 이용한 연속 회분식 반응기내 미생물 분포 조사

전체옥 · 신금주 · 이대성 · 서판길 · 박종문

포항공과대학교 환경공학부

(1999년 12월 10일 접수, 2000년 3월 8일 채택)

## Microbial Communities of Activated Sludge in an Anaerobic/ Aerobic Sequencing Batch Reactor using Slot Hybridization

Che Ok Jeon · Kum-Joo Shin · Dae Sung Lee · Pann-Ghill Suh · Jong Moon Park

*School of Environmental Engineering, Pohang University of Science & Technology*

### ABSTRACT

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) was performed in an anaerobic/aerobic sequencing batch reactor (SBR). Influent was a synthetic wastewater based on acetate as a carbon source. The sludge age and hydraulic retention time were kept at 10 days and 16 hrs, respectively. Phosphate release during the anaerobic period and phosphate uptake in aerobic period were increased gradually with time, and after about 200 days, steady-state operation could be achieved with complete removal of influent phosphate. Number distribution of microbial community in the sludge performing EBPR was investigated during the steady state operation. 17 rRNA targeted oligonucleotide probes were designed and slot hybridization technique was used to determine the number distribution of each microorganism. In the acetate fed SBR, rRNA belonging to the beta subclass of proteobacteria was the most dominant in total rRNA and rRNA matching to CTE probe was the second. rRNAs of *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Pseudomonas*, which are usually thought as phosphorus accumulating organisms in EBPR processes, constituted less than 10% of total rRNA. From this community analysis, it was inferred that microorganisms belong to the beta subclass of proteobacteria (BET) and CTE such as *Rhodocyclus* group were important in biological phosphorus removal. Therefore, the role of *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Pseudomonas* in the EBPR might have been overestimated.

---

Key Words : EBPR, Microbial Community, rRNA, Slot Hybridization, SBR

## 요약문

연속 회분식 반응기를 이용하여 생물학적인 제거에 관한 미생물 분포 연구를 수행하였다. 탄소원으로 초산을 넣은 합성 폐수를 사용하였고 미생물 체류 시간과 수리학적 체류 시간은 각각 10일과 16시간으로 유지하였다. 인 방출과 흡수가 운전 시간이 경과됨에 따라 점점 빠르게 일어났으며 약 200일 경과 후 안정적인 인 제거가 유지되었다. 안정적인 생물학적인 제거가 유지될 때의 미생물 분포를 조사하기 위하여 17개의 ribosomal RNA (rRNA) signature probe를 합성하여 슬러지로부터 분리한 전체 rRNA에 대하여 slot hybridization을 실시하였다. 분리한 전체 RNA에는 proteobacteria의 베타군 (beta subclass)에 속하는 rRNA가 가장 많이 함유되어 있음을 확인하였고 CTE probe와 관계된 rRNA가 다음으로 많이 분포하였다. 전통적으로 생물학적인 제거를 담당하는 미생물로 여겨져 왔던 *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*의 rRNA는 10% 미만으로 존재하고 있음이 확인되었다. 이러한 결과로부터 *Rhodocyclus* 그룹같은 proteobacteria의 베타군과 CTE에 속하는 미생물이 인 제거에 중요한 역할을 수행할 것으로 생각되었고 *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* 등은 생물학적인 제거에 있어서 과평가된 것으로 판단되었다.

주제어 : 생물학적인 제거, 미생물 분포 조사, rRNA, Slot Hybridization, 연속 회분식 반응기

## 1. 서론

폐수로부터 질소 및 인의 제거를 위한 생물학적 고도처리하는 이들 물질이 수중 생태계의 파괴현상인 부영양화 (eutrophication)의 주원인이 밝혀진 이후 이에 대한 다각적인 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 아직까지 생물학적인 제거 (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR)의 경우 생화학적 반응 기작 및 미생물의 특성이 완전히 규명되지 않은 상황이며, 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 생물학적인 제거 미생물에 대한 연구가 선행되어야 한다. Fuhs & Chen<sup>1)</sup>에 의해 생물학적인 제거 능력이 있는 미생물로 *Acinetobacter* spp.가 보고된 이후 대부분의 생물학적인 제거 미생물 연구가 *Acinetobacter* spp.에 집중되어 왔다. 그 이후 배양 의존적인 방법에 의한 연구들은 생물학적인 제거 공정내에 *Acinetobacter* spp.가 우점종임을 계속해서 보고하여 왔으며<sup>2,3)</sup> 몇몇 분리된 *Acinetobacter* spp.가 약간의 인 제거 능력이 있음도 밝혀지기도 하였다<sup>1,4)</sup>.

그러나 순수한 *Acinetobacter* spp.는 실제 공정의 생물학적인 제거에 대한 생화학적 특성을 설명하지 못하고 있으며 현재 생물학적인 제거는 *Acine-*

*tobacter* spp.가 아닌 타 미생물에 의해 이루어질 것으로 제안되고 있다. 실제로 비 배양학적 방법에 의한 미생물 분포를 조사한 결과는 *Acinetobacter* spp.가 생물학적인 제거 공정 내에서 소수에 불과함을 보여주고 있다. 대신에 Gram (+) 미생물과 proteobacteria의 베타군 (beta subclass)에 속하는 미생물이 우점종임을 보여주었다.<sup>5)</sup> 그러한 결과는 *Acinetobacter* spp.가 혼합배양공정 내의 기타 미생물들에 비해 배양 가능성 (culturability)이 높아 실제 생물학적인 제거 공정에서는 낮은 분포를 가질지라도 배양학적 방법으로는 우점종으로 나타났기 때문이라고 설명하고 있다.<sup>6)</sup> 이러한 문제점을 해결하기 위하여 오늘날 혼합배양공정의 미생물 분포를 조사하는 방법으로 rRNA를 이용한 분자생물학적 연구 방법이 그 대안으로 떠오르고 있다. 미생물은 rRNA에 종이나 속에 따라 독특한 염기 서열 (signature sequence)을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 signature probe를 이용한 미생물 분포 조사 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>5-7)</sup>. 따라서 본 연구자는 생물학적인 제거 공정을 수행하는 연속 회분식 반응기 (sequencing batch reactor)에서 rRNA signature probe의 slot hybridization을 이용하여 반응기내 미생물 분포를 조사하였다.

## 2. 실험 장치 및 방법

### 2.1. 실험 장치

생물학적인 제거를 위해 Fig. 1과 같이 유효 용적이 4리터인 회분식 반응기에 포함공과대학교 하수처리장에서 얻은 슬러지 (sludge)를 접종하여 운전 을 시작하였다. 타이머 (Timer)에 의하여 peristaltic 펌프, 공기 펌프, solenoid 밸브 등의 개폐를 조절하였다. 연속 회분식 반응기의 운전은 유입 (15 min.), 혐기적 반응 (2 hr), 호기적 반응 (4 hr 10 min.), 침전 (1 hr), 배출 (15 min.) 및 휴지 (20 min.)의 순서로 하여 8시간의 운전 주기를 갖도록 하였으며, 수리학적 체류시간은 16시간, 미생물 평균 체류시간은 10일이 유지되도록 하였다. 탄소원으로 초산 나트륨 (sodium acetate)을 사용하였고 (리터당 1.44 g 초산 나트륨), 합성 배수의 변질을 막기 위하여 영양 염류 용액과 별도로 만들어 공급 시 동 부피로 혼합되어 공급되도록 하였다. 처리된 용액은 2리터가 배출되도록 하였고 탄소원과 영양 염류 용액을 각각 1리터씩 공급하였다. 또 호기적 기간 이외에는 반응기내에 질소 가스를 공급하여 표면 포기를 방지하였다. 영양 염류 용액은 리터당 305 mg NH<sub>4</sub>Cl, 151 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 180 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 28 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2 mg yeast extract와 0.6 mL의 미량 염류 (salt) 용액으로 구성되었고, 미량 염류 용액의 조성은 리터당 1.5 g FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.15 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.03 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.18 g KI, 0.12 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.12 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.15 g CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10 g EDTA였다. 유입수의 COD, 인, 암모니아의 농도는 각각 600 mg/l, 15 mg/l PO<sub>4</sub><sup>-</sup>P, 40 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N으로 하였다.

### 2.2. Total RNA의 분리

슬러지로부터 ribosomal RNA (rRNA)의 분리는 Ultraspec (Biotecx Laboratories, Inc., USA)을 이용한 분리법을 변형하여 사용하였다. 혐기적 단계와 호기적 단계의 말기에 각각 용액 30 mL씩 채취한 후 원심 분리하여 상등액을 버리고 Ultraspec 용

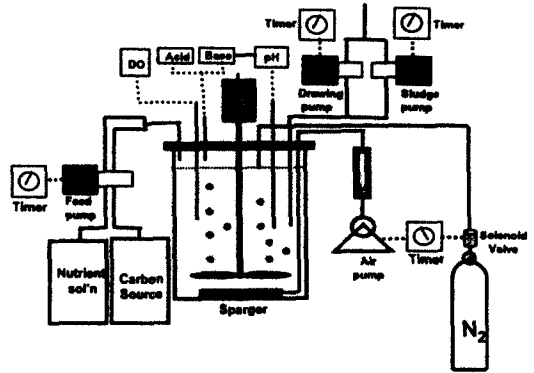


Fig. 1. Schematic diagram of sequencing batch reactor.

액 10 mL씩 넣었다. 혼합액을 vortex mixer로 잘 섞은 후 여러 종류의 미생물로부터 균일하게 rRNA가 추출되도록 얼음상에서 2분간 초음파 분쇄 (UL Transonic processor, Germany)를 실시하였다. 분쇄물은 10 mL 주사기로 점도가 감소할 때까지 여러 회 펌핑(pumping)하였고, 여기에 2.4 mL 클로로포름을 넣어 격렬하게 섞은 후 5분간 얼음물에 방치한 후 15분간 원심분리 (15,000 rpm, 4°C)하였다. 상등액을 취하여 50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA 완충액으로 각각 평형화시킨 동 부피의 산성화 페놀(acid-phenol, pH 5.1, Sigma Co., USA)과 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (100/24/1)로 불순물을 연속 추출 제거하였다. 수용액 부분에 동량의 isopropyl alcohol을 넣어 4°C에 10분간 방치 후 15000 rpm에서 15분간 원심분리하여 1차 핵산 (primary rRNA) 추출물을 얻었다. 얻어진 핵산을 80% 에탄올로 세척 후 증류수에 녹여 RNase 섞여 있지 않은 DNase (RNase free DNase)를 넣어 1시간동안 37°C에서 반응시켜 DNA를 제거하였다. 반응액에 3 M 초산 나트륨 (sodium acetate, pH 5.2) 완충액을 최종 농도가 2 M이 되도록 넣은 후 동 부피의 산성화 페놀을 넣어 격렬하게 혼합하였다. 혼합액을 원심분리하여 얻은 상등액에 2 부피의 무수 에탄올을 넣어 원심분리하여 rRNA를 침전시켜 건조시킨 후 증류수에 녹였다. 녹인 rRNA 추출물은 260 nm에서 흡광도 (흡광도 1 = 40 µg/mL)를 측정하여 농도가 300 µg/mL가 되도록 조정하여 냉동 보관하였다.

### 2.3. Oligonucleotide Probes

Slot hybridization에 사용한 oligonucleotide probe는 이미 보고된 문헌<sup>6,8,9</sup>과 Ribosomal Database Project<sup>10</sup>를 근거로 하여 17개의 probe를 선정하였고 Genotech Co. (Korea)에서 합성하였다. 선정된 signature probe의 종류와 염기 서열, rRNA

상의 hybridization 위치, 미생물에 대한 hybridization 특이성 등을 Table 1에 나타내었다.

### 2.4. Slot Hybridization

연속 회분식 반응기에서 얻은 슬러지내 특정 미생물의 rRNA양을 정량화하기 위하여 Lin & Stahl<sup>11</sup>

Table 1. Oligonucleotide probes, their sequences, target positions and specificities

Probe	Sequence(5'-3')	Target Position	Specificity
EUB	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Eubacteria
ALF	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S, 19-35	$\alpha$ subclass proteobacteria, Several $\delta$ -subclass proteobacteria, Most spirochetes
BET	GCCTTCCCACCTTCGTTT	23S, 1027-1043	$\beta$ -subclass proteobacteria
GAM	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	$\gamma$ -subclass proteobacteria
DEL	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S, 385-402	Most members of $\delta$ subclass of proteobacteria, few gram(+) bacteria
CF	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	Cytophaga-flavobacterium cluster of CFB-phylum(most)
BAC	CCAATGTGGGGGACCTT	16S, 303-319	Bacteroides cluster of CFB-phylum
HGC	TATAGTTACCACCGCCGT	23S, 1901-1918	Gram(+) with high DNA G+C Content
ACA	ATCCTCTCCATACTCTA	16S, 652-669	<i>Acinetobacter</i> species
SNA	CATCCCCCTCTACCGTAC	16S, 656-673	<i>Sphaerotilus natans</i> and relatives
AER	CTACTTTCCCGCTGCCGC	16S, 66-83	All hitherto sequenced <i>Aeromonas</i> spp. except <i>A. schubertii</i> (1 mismatch), all other available sequences (16S and 23S) had at least 2 mismatches
AMH	ACCTGGGCATATCCAATC	16S, 222-239	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. enteropelgenes</i> , <i>A. media</i> , <i>A. trota</i> , all other available sequences (16S and 23S) had at least 2 mismatches
PSE	GCTGGCCTAGCCTTC	23S,1432-1446	Most true <i>Pseudomonas</i> spp.
GOR	TGCAGAATTTACAGACGACGC	16S, 0596-0617	<i>Godona</i> spp.
CTE	TTCCATCCCCCTCTGCCG	16S, 659-676	<i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Brachymonas denitrificans</i> , <i>Rhodocyclus purpureus</i> , <i>Leptothrix discophora</i>
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	16S, 1035-1048	<i>Nitrobacter</i> ssp.
Nso190	CGATCCCCCTGCTTTTCTCC	16S, 190-208	Ammonia-oxidizing $\beta$ -proteobacteria

Note) Y = C or T

의 방법을 변형하여 사용하였다. 분리된 rRNA 용액을 60°C에서 10분간 방치하여 변성(denaturation)시킨 후 주입 용액 (loading solution: 0.1 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 50% Formamide, 6% formaldehyde, pH 7.0)을 넣어 농도가 3 µg/mL가 되도록 희석시켰다. 용액 100 µL (300 ng)를 약간의 감압이 걸리게 한 slot hybridization 장치의 나일론 막 (membrane membrane, Schleicher & Schuell Co., Deutschland)에 2회에 걸쳐 주입 (loading)하였다. rRNA 용액을 순차적으로 희석시킨 후 주입하여 (0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 ng) hybridization 후 결과값을 산출할 때 일종의 검량선 (standard curve)으로 사용하였다. rRNA가 부착된 나일론 막은 공기 중에서 건조한 후 Ultraviolet crosslinker (Techne Co., USA)를 사용하여 고정화시켰다.

DNA oligonucleotide probe는 DNA 5'-end 표지 시스템 (Promega Co., USA)과 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP를 사용하여 표지하였다. 나일론 막에 부착시킨 전체 rRNA와 hybridization될 수 있는 양의 10배 이상에 해당하는 probe를 반응에 사용하였고 hybridization 조건은 Lin & Stahl<sup>11)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 약 20 mL의 hybridization 완충액 [0.9 M NaCl, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 5 mM EDTA, 10 × Denhardt's solution,<sup>11)</sup> 0.5% SDS, 100 µg salmon sperm DNA (Sigma, USA)]을 넣은 hybridization 튜브에 rRNA가 부착된 나일론 막을 넣어 밀봉하였다. 밀봉된 튜브는 45°C 진탕 반응기 (shaking water bath)에서 2시간 prehybridization시킨 후 표지된 probe를 넣어 45°C에서 추가로 12시간에서 16시간 동안 hybridization을 실시하였다. 반응시킨 나일론 막은 세척액 [1 X SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0), 1% (w/v) SDS] 100 mL로 45°C에서 30분간 세척한 후 동일한 세척액 250 mL로 30분씩 2회에 걸쳐 비특이적 부착 probe (unspecific binding probe)를 제거하기 위하여 probe에 따라 문헌에서 제시된 세척 온도<sup>6,8-10,12)</sup>에서 세척하였다. Hybridization 값은 Phosphor-Imager와 ImageQuant software package (Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 정량화하였고, 분리된 전체 rRNA의 양은 모든 bacteria가 함유하

는 rRNA에 hybridization이 가능한 EUB probe에 의한 hybridization 결과값을 가지고 결정하였다.<sup>7)</sup>

## 2.5. 분석 방법

연속 회분식 반응기의 용액 내 인산염 (orthophosphate)과 질산염 (nitrate)의 농도는 DX-120 이온 크로마토그래피 (Dionex Co., USA)를 사용하여 분석하였다. 그리고 용액 내 초산과 세포 내 PHA의 함량 분석은 가스 크로마토그래피 (Hewlett Packard Co., USA)를 이용하였고,<sup>13)</sup> 세포 내 glyco-gen 함량은 amperometer 검출기가 부착된 HPLC (Dionex Co., USA)를 이용하여 분석하였다.<sup>13)</sup>

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 연속 회분식 반응기 운전 및 시료 채취

Fig. 2는 탄소원으로 초산나트륨 (sodium acetate)을 사용한 입출수의 인산염 농도와 연속 회분식 반응기의 혐기적 단계 말기와 호기적 단계 말기에 있어서 용액 내 인산염 농도의 장기간 변화를 보여주고 있다. 운전 초기에는 혐기적 반응 단계의 pH를 조절하지 않았으나 약 50 일부터 혐기적 반응 단계의 pH를 7.0으로 조절하였다.<sup>15)</sup> pH 조절 결과 시간이 경과할수록 오히려 혐기적 단계의 인 방출과 호기적 단계의 인 흡수 현상이 점점 사라짐을 보여

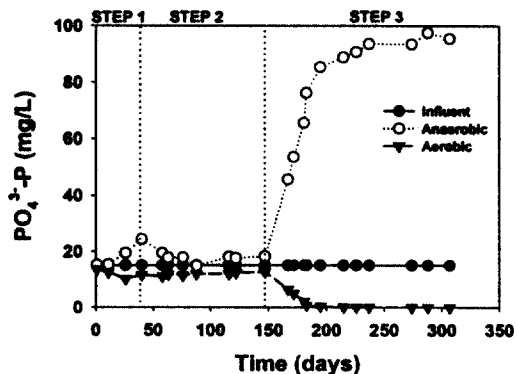


Fig. 2. Long-term profiles of phosphate concentration in a SBR operation.

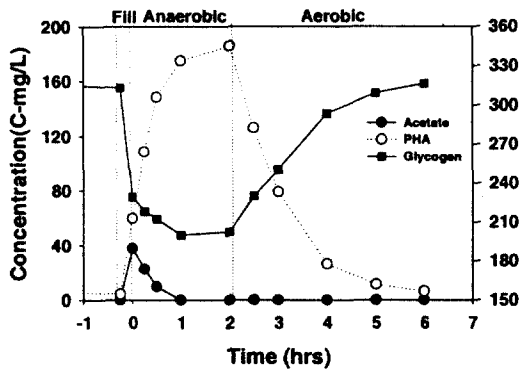


Fig. 3. Profiles of acetate, PHA and glycogen during the STEP 2 in a SBR operation.

주었는데 (Fig. 2, STEP 2), 이 경우에도 혐기적 조건에서 초산의 polyhydroxy alcanoic acids (PHA)로의 저장은 빠르게 일어났다. 즉, 연속 회분식 반응기의 혐기적 단계에서 인 방출없이 용액내 초산은 점차로 소멸되었으며 그에 따라 세포내의 PHA 양은 증가되었다 (Fig. 3). 이처럼 혐기적 조건에서 인의 방출없이 초산이 PHA로 합성될 수 있는 것은 초산을 흡수하여 PHA 합성시 필요한 ATP와 환원력 (reducing power)을 세포 내에 저장되었던 glycogen의 분해로부터 모두 얻을 수 있는 미생물인 glycogen accumulating organisms (GAO)이 반응기내에서 과다 성장하였기 때문으로 판단되었다.<sup>14,15)</sup> 그리고 호기적 반응 단계에서 세포 내 PHA의 분해와 glycogen의 합성은 일어났지만 인의 흡수는 거의 일어나지 않음을 보여주었다 (Fig. 2, STEP 2; Fig. 3).

약 150일 경과 후부터는 혐기적 조건의 pH를 조절하지 않았는데 혐기적 조건 기간 용액의 pH가 8.4까지 올라감을 보여주었다. 그 결과 연속 회분식 반응기내의 생물학적 인 제거 현상이 점차로 증가하였고 200일 경과 후에는 안정적이고 완전한 생물학적 인 제거 현상 (~100%)이 유지되었다 (Fig. 2, STEP 3). 이러한 생물학적 인 제거 현상의 증가는 혐기적 조건의 pH 증가로 GAO가 phosphorus accumulating organisms (PAO)로 대체되었기 때문으로 사료된다.<sup>15)</sup> Fig. 4는 약 300일 경과 후 안정적인 인 제거를 보였을 때의 용액내 인산염과 질산염의 전형적인 농도 변화를 보여주고 있다. 혐기

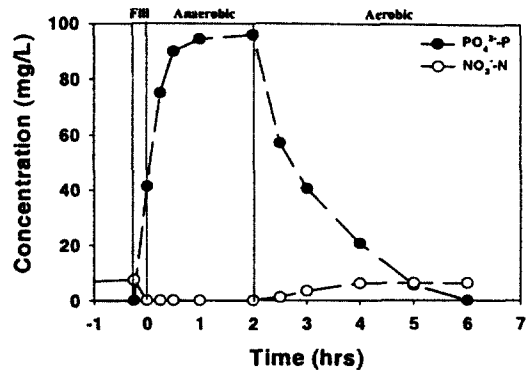


Fig. 4. Typical one cycle profiles of orthophosphate and nitrate during the STEP 3 in a SBR operation.

적 단계에서의 인 방출과 호기적 단계에서 인 흡수가 빠르게 일어났으며, 또한 탈질 미생물에 의한 혐기적 상태의 탈질화와 질산화 미생물에 의한 호기적 상태의 질산화도 완전하게 일어남을 알 수 있었다 (Fig. 4).

### 3.2. Nucleic Acid Hybridization

생물학적 질소, 인 제거를 수행하는 연속 회분식 반응기내 슬러지 (sludge)의 미생물 분포를 조사하기 위해서 안정적인 생물학적 질소, 인 제거가 일어나는 운전 개시 300일 이상 경과 후 혐기적 단계와 호기적 단계의 말기에서 슬러지를 각각 채취하였다. 채취한 슬러지는 Ultraspec 용액과 2분간의 초음파 분쇄 처리를 실시하였고, 분쇄처리 용액을 현미경으로 관찰한 결과 미생물 형태는 전혀 보이지 않았고 단지 현탁액 상태로만 보였기 때문에 슬러지 내 모든 미생물이 완벽하게 분쇄되었다고 결론을 내릴 수 있었다.

Fig. 5는 slot hybridization후 나일론 막 (nylon membrane)을 X-ray 필름에 8시간 노출시켜 현상한 결과이다. Fig. 5에서 1~4행은 반응기의 혐기적 단계에서, 5~8행은 호기적 단계에서 각각 얻은 슬러지로부터 분리한 rRNA에 대해 EUB, BET, ACA probe를 각각 사용했을 경우의 hybridization 결과를 보여주고 있다. 그리고 Fig. 5의 (c)열은 호기적 반응단계의 마지막 시기에 얻은 슬러지로부터 분리한 rRNA 용액을 순차적으로 회석하여 (0, 30,

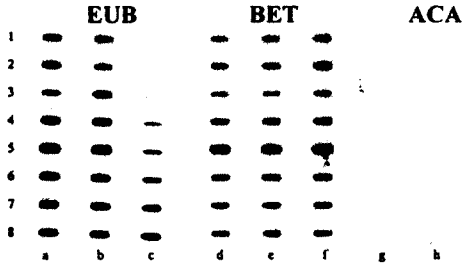


Fig. 5. Quantification of hybridization responses of radioactively labeled specific probes (BET and ACA) to total rRNA (EUB). The third line of EUB probe represents the responses of radioactively labeled EUB probes depending on the loading amount of total rRNA for standard curve.

60, 90, 120, 180, 240, 300 ng 슬롯(slot)에 주입(loading)한 후 EUB probe로 hybridization을 실시한 결과로, 기타 특정 probe를 이용한 hybridization 결과 정량을 위한 일종의 표준 검량선(standard curve)으로 사용하였다. Hybridization 후 나일론 막을 X-ray 필름에 노출시켜 현상한 필름을 densitometer에 의해 측정된 결과 주입한 rRNA양에 대해 densitometer 측정값이 정량적으로 비례하지 않았으며 낮은 농도의 결과치는 잘 분석되지 않았지만, hybridization후 나일론 막을 PhosphoImager에 의해 분석한 결과는 주입한 rRNA 양에 대해 거의 비례적인 결과를 보여 주었을 뿐만 아니라 낮은 농도까지도 정량화가 가능했기 때문에 그 이후의 모든 분석은 PhosphoImager를 사용하였다. 전체 슬러지에서 분리한 전체 rRNA에서 특정 미생물이 가지는 특정 rRNA가 차지하는 양은 EUB probe에 의한 hybridization 결과와 특정 probe에 의한 hybridization 결과와의 비율로 계산하였다. 여기서 EUB probe는 모든 미생물로부터 분리한 rRNA와 hybridization 될 수 있으며 특정 probe는 특정 미생물 군들의 rRNA에 대해서만 hybridization 특이성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Table 1). 따라서 이러한 방법을 이용하면 전체 미생물 중 특정 미생물 군이 차지하고 있는 양을 간접적으로 측정할 수 있음을 제시해 준다.<sup>11)</sup>

PhosphoImager에 의한 분석 결과 혐기적 단계와

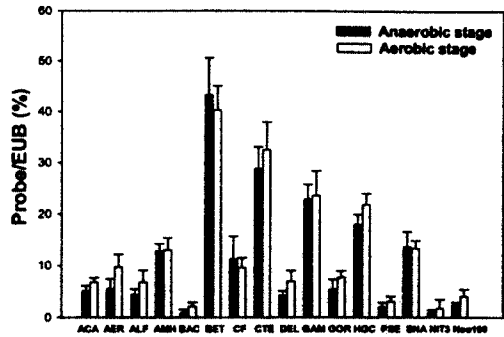


Fig. 6. Relative abundance of specific microbial rRNA inferred by nucleotide probe hybridization to total RNA extracted from sludge sampled from SBR. The bar graph represents the average of multiple hybridization experiments.

호기적 단계에서 전체 rRNA에 대한 특정 미생물의 rRNA 함유량은 크게 변하지 않았음을 보여 주었고, BET probe (proteobacteria의 beta군의 23S rRNA에 hybridization 특이성을 갖는 probe)와 hybridization 될 수 있는 미생물의 rRNA가 약 45% 정도로 가장 많이 차지하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6). 그리고, Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 CTE probe (*Rhodocyclus purpureus*, *Comamonas testosteroni*, *Brachymonas denitrificans*, *Leptothrix discophora*의 16S rRNA와 hybridization 특이성을 갖는 probe)에 hybridization 될 수 있는 미생물의 rRNA가 약 32% 정도 존재하였고 GAM probe (proteobacteria의 gamma군의 23S rRNA에 hybridization 특이성을 갖는 probe)와 HGC probe (DNA G+C 함량이 높은 Gram(+))군의 23S rRNA와 hybridization 특이성을 갖는 probe)와 hybridization 될 수 있는 rRNA도 상당량 함유하고 있음을 알 수 있었다. CTE probe에 hybridization할 수 있는 rRNA를 가지고 있는 미생물에는 proteobacteria의 베타군에 속하지 않는 미생물 (*Rhodocyclus* spp.)과 베타군에 속하지 않는 미생물 (*Comamonas* spp., *Brachymonas* spp., *Leptothrix* spp.)이 함께 포함되어 있다 (Table 1). 본 연구에서 BET probe와 CTE probe에 hybridization할 수 있는 rRNA를 가지고 있는

미생물이 가장 많이 분포하였으며, 이들 두 개의 probe에 의한 hybridization 결과값 (합이 약 77%) 이 과도하게 많은 것으로 나타났기 때문에 CTE probe와 BET probe에 공통적으로 hybridization 될 수 있는 미생물 (예를 들면 *Rhodocyclus* 그룹) 들이 생물학적 인 제거에 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있었으며 일부 연구자에 의해서도 *Rhodocyclus* 그룹의 생물학적 인 제거 가능성을 제시된 바 있다.<sup>6)</sup> 과거로부터 생물학적 인 제거에 중요한 역할을 할 것으로 제시되어 왔던 미생물들(ACA probe: *Acinetobacter* ssp., AER probe: *Aeromonas* ssp., PSE probe: *Pseudomonas* ssp.) 등의 rRNA은 전체 rRNA 중 각각 약 6%, 8%, 3% 정도의 적은 부분만을 차지하고 있어 (Fig. 6) 본 실험의 연속 회분식 반응기에서는 이들 미생물이 생물학적 인 제거에 그다지 중요한 역할을 하지 못할 것으로 판단되었다. 따라서, 다른 연구에도 이미 제시된 것처럼 이들 미생물들은 생물학적 인 제거에 대해 그 역할이 과평가되었을 가능성이 있는 것으로 판단되어 왔다고 사료되었다.<sup>6)</sup> 그리고, 질산화 미생물에 해당하는 Nso 190 (*Ammonia-oxidizing  $\beta$ -proteobacteria*)과 NIT 3 (*Nitrobacter* ssp.)과 hybridization 될 수 있는 rRNA의 양은 전체 rRNA 중 각각 약 4%와 1.5% 정도가 함유되어 있는 것으로 나타났다.

이상과 같이 slot hybridization을 이용하여 생물학적 질소, 인 제거를 수행하는 연속 회분식 반응기에서 특정 미생물들의 분포를 조사하였다. 그러나, 각 미생물 종마다 함유되어 있는 rRNA의 양은 일정하지 않은 것으로 알려져 있으며 ( $10^3 \sim 10^5$  ribosomes/cell), 또한 hybridization시에도 비 선택적 반응 등이 일어날 수 있기 때문에 slot hybridization 방법은 여러 가지 실험적 오차를 발생시킬 수 있는 것으로 되어 있다. 따라서, slot hybridization을 이용하여 혼합배양공정에서 정확한 미생물 분포 조사를 위해서는 추가적인 연구 이외에 다른 미생물 분포 연구와의 비교가 필요할 것으로 사료되었다.

## 4. 결 론

탄소원으로 초산 나트륨을 사용한 연속 회분식 반응기에서 rRNA signature probe를 이용한 slot hybridization으로 미생물 분포를 조사하였다.

- 1) Slot hybridization 방법을 이용하여 BET probe와 CTE probe에 공통으로 hybridization될 수 있는 미생물(예를 들면 *Rhodocyclus* 그룹)이 인 제거에 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 추정할 수 있었다.
- 2) Slot hybridization에 의해 과거로부터 인 제거에 중요한 역할을 할 것으로 제시되었던 *Acinetobacter* ssp., *Aeromonas* ssp., *Pseudomonas* ssp. 등의 rRNA는 적게 포함되어 이들 미생물의 생물학적 인 제거에 대한 역할은 미비한 것으로 판단되었다.
- 3) Slot hybridization을 이용하면 혼합배양 시스템 내의 미생물 분포를 조사할 수 있을 것으로 생각되나 정확한 결론을 얻기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

## 사 사

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

## 참 고 문 헌

1. Fuhs G. W., and Chen M., "Microbiological Basis of Phosphate Removal in the Activated Sludge Process for the Treatment of Wastewater," *Microbiol. Ecol.*, 2, 119~138(1975).
2. Lötter, L. H. "The Role of Bacterial Phosphate Metabolism in Enhanced Phosphorus Removal from the Activated Sludge Process," *Water Sci. Technol.*, 17(12), 127~138(1985).



3. Wentzel, M. C., R. E. Loewenthal, G. A. Ekama, and G. R. Marias, "Enhanced Polyphosphate Organism Cultures in Activated Sludge System. Part 1. Enhanced Culture Development," *Water SA* (Pretoria), **14**, 81~92(1988).
4. Ohtake H., K. Takahashi, Y. Tsuzuki, and K. Toda, "Uptake and Release of Phosphate by a Pure Culture of *Acinetobacter calcoaceticus*," *Water Res.*, **19**(12), 1587~1594 (1985).
5. Wagner M., Erhart, R. Manz W., R. Amann, Lemmer H., Wedi D., and Schleifer K.-H., "Development of an rRNA-targeted Oligonucleotide Probe Specific for the Genus *Acinetobacter* and its Application for *in situ* Monitoring in Activated Sludge," *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(3), 792~800(1994).
6. Amann R. I., Ludwig W., and Schleifer K.-H., "Phylogentic Identification and *In Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation," *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143~169(1995).
7. Stahl D. A., Flesher B., Mansfield H. R., and Montgomery L., "Use of Phylogenetically Based Hybridization Probes for Studies of Ruminant Microbial Ecology," *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(5), 1079~1084(1988).
8. Kämpfer P., Erhart R. Beimfohr C. Bohringer J. Wagner M., and Amann R., "Characterization of Bacterial Communities from Activated-Sludge Culture Dependent Numerical Identification Versus *in-Situ* Identification Using Group Specific and Genus Specific Ribosomal RNA Targeted Oligonucleotide Probes," *Microbial Ecol.*, **32**(2), 101~121(1996).
9. Reyes F. L. DE LOS, W. Ritter, and L. Raskin, "Group-Specific Small-Subunit rRNA Hybridization Probes to Characterize Filamentous Foaming in Activated Sludge Systems," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(3), 1107~1117(1997).
10. Maidak B., N. Larsen, M. J. McCaughey, O. Overbeek, G. J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy, and C. R. Woese, "The Ribosomal Database Project," *Nucleic Acids Res.*, **22**(17), 3485~3487(1994).
11. Lin C. and D. A. Stahl, "Taxon-Specific Probes for the Cellulolytic Genus *Fibrobacter* Reveal Abundant and Novel Equine-Associated Populations," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(4), 1348~1351(1995).
12. Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning-A laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
13. Jeon C. O., and J. M. Park, "Enhanced Biological Phosphorus Removal in a Sequencing Batch Reactor Supplied with Glucose as a Sole Carbon Source," *Water Res.*, **34**(7), 2160~2170(2000).
14. Liu W.-T., T. Mino, K. Nakamura, and T. Matsuo, "Glycogen Accumulating Population and its Anaerobic Substrate Uptake in Anaerobic-Aerobic Activated Sludge without Biological Phosphorus Removal," *Water Res.*, **30**(1), 75~82(1996).
15. Liu W.-T., T. Mino, T. Matsuo, and K. Nakamura, "Biological Phosphorus Removal Processes - Effect of pH on Anaerobic Substrate Metabolism," *Water Sci. Technol.*, **34**(1), 25~32(1996).