

중온 및 고온 혐기성 소화에서 메탄생성균 군집 분석에 관한 연구

In situ Analysis of Methanogenic Bacteria in the Anaerobic Mesophilic and Thermophilic Sludge Digestion

황선진^{1,*} · 장현섭¹ · 엄형춘² · 장광언¹

Sun-Jin Hwang^{1,*} · Hyun-Sup Jang¹ · Hyoung-Choon Eom² · Kwang-Un Jang¹

1 경희대학교 환경응용화학대학 및 환경연구센터

2 한국지질자원연구원

(2004년 6월 28일 접수; 2004년 7월 27일 최종수정논문 채택)

Abstract

Anaerobic digestion has many advantages over the more conventional aerobic treatment processes such as low levels of excess sludge production, low space (area) requirements, and the production of valuable biogas.

The purpose of this study was to evaluate the effect of organic loading rate of anaerobic digestion on thermophilic(55°C) and mesophilic(35°C) conditions. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method was also used to study the microbial community in the reactors.

The stabilizing time in mesophilic anaerobic reactors was shorter as approximately 20 days than 40 days in the thermophilic anaerobic reactors. The amount of methane production rate in anaerobic reactors was independent of the concentrations of supplied substrates and the amount of methanogens. When the microbial diversity in the mesophilic and thermophilic reactors, which had been treated with acetate-based artificial wastewater, were compared, it was found that methanogenesis was carried out by microbial consortia consisting of bacteria and *archaea* such as methanogens. To investigate the activity of bacterial and archaeal populations in all anaerobic reactors, the amount of acetate was measured. *Archaea* were predominant in all reactors. Interestingly, *Methanotherix*-like methanogens appeared in mesophilic anaerobic reactors with high feed substrate concentrations, whereas it was not observed in thermophilic anaerobic reactors.

Key words: anaerobic digestion, methanogens, *archaea*, FISH

주제어: 혐기성 소화, 메탄생성균, 고세균, FISH

*Corresponding author Tel: +82-31-201-2497, FAX : +82-31-203-4589, E-mail: sjhwang@khu.ac.kr (Hwang, S.J.)

1. 서론

혐기성소화는 고분자의 유기물질이 산생성균에 의하여 저분자의 유기산으로 분해되고 이것이 다시 메탄생성균에 의하여 메탄가스와 탄산가스로 분해되는 과정에 의하여 이루어진다(장덕 외, 1988). 또한 고농도의 유기물 처리가 가능하고 슬러지 생성량이 호기성처리에 비해 적으며 특히 처리과정에서 발생하는 메탄가스는 소화조의 온도유지 등에 재활용 할 수 있어 동력비가 절감되는 장점이 있다(Van Lier 등, 1992). 하지만 실제 소화조 운전에서 소화작용의 정지현상과 같은 문제점이 종종 발생하여 원인 규명에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다(장덕 외, 1988). 특히 유기물 부하에 따른 유기산 축적으로 pH가 감소하여 메탄발효 효율이 급격히 떨어지는 현상을 제어하기 위한 다양한 노력에도 불구하고 아직까지 명확한 해석이 이루어지지 않고 있다.

메탄생성균은 산생성균에 비하여 그 성장속도가 매우 느리고 기질로서 이용되는 유기산이 과잉되면 악영향을 받는다. 또한 외부환경조건, 특히 온도에 대단히 민감하며 각종 생존조건이 만족되지 못하면 양호한 소화를 기대할 수 없다(Sekiguchi 등, 1998).

따라서 온도와 유기산 농도에 따른 메탄생성균의 특성을 파악하는 것이 무엇보다 중요하다. 그러나 종래의 미생물 배양법은 배양단계에서 실제 분포하는 미생물의 종류 및 양이 왜곡된다는 사실이 근래에 알려지고 있고 본래 존재하고 있던 미생물의 상태를 완벽하게 유지하면서 배양하는 것은 현실적으로 매우 힘든 문제점이 있다(Van Lier 등, 1992).

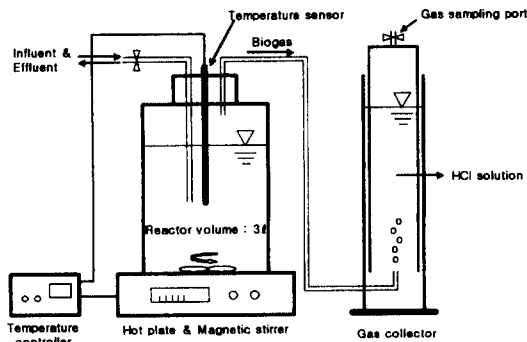


Fig. 1. The schematic diagram of experimental apparatus.

이러한 문제점을 보완하기 위해 최근 들어 미생물의 세포내에 다량의 rRNA가 존재하는 사실에 주목해, 이들을 표적핵산으로 하는 DNA 염기배열(primer)을 갖는 물질(이하 probe)을 *in situ*에서 결합반응(hybridization)시킴으로서 표적미생물 또는 그 군집을 검출하는 FISH(Fluorescent *in situ* Hybridization)법이 최근 각광을 받고 있다. 이는 특정염기배열에만 선택적으로 결합하여 형광하는 probe를 이용해 세포벽을 파괴하지 않고 표적종을 검출하는 수법으로, probe는 rRNA signature 배열에 상응하는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide: 10-30base 정도의 DNA)로 이루어져 있다(Amann 등, 1995)

본 연구에서는 중온(35°C)과 고온(55°C)소화의 소화특성을 비교하고 FISH 분석법을 적용하여 메탄생성과 관련한 미생물에 관한 기초자료를 획득하고자 한다.

2. 실험 방법

2.1. 실험장치 및 운전

본 연구에서는 Fig. 1에 나타난 바와 같은 유효용량(working volume)이 3/1 반응조를 4개 제작하여 실험을 진행하였다. 가열 겸용 교반기를 이용하여 반응조의 교반과 가열을 동시에 진행하였으며 HRT는 15일로 운전하였다. 각 반응조에는 S-하수처리장의 소화조에서 채취한 하수슬러지를 주입 후 20일간 순용시켰으며, 고온(55°C) 및 중온(35°C) 소화조에 각각 10,000mg/l, 30,000mg/l 씩의 acetate를 주입하여 반연속식으로 운전하였다(TA-1: 55°C, 30,000mg/l of acetate, TA-2: 55°C, 10,000mg/l of acetate, MA-1: 35°C, 30,000mg/l of acetate, MA-2: 35°C, 10,000mg/l of acetate).

2.2. 분석방법

각 반응조에서 발생하는 소화가스는 눈금이 표시된 gas collector에서 측정하였으며, 가스의 조성은 TCD가 장착된 Gas Chromatography(Varian Co.)를 이용하여 분석하였다. 또한, 반응조내 소화상태를 확인하기 위해 pH, Alkalinity, SCOD_C을 2일 간격으로 측정하였으며 VFA(Volatile Fatty Acid)는 Ion Chromatography(792 BASIC IC, Metrohm Co.)를 사

용하여 분석하였다.

미생물의 FISH 분석은 Fig. 2에 나타낸 방법으로 실시하였으며, CLSM(Confocal Laser Scanning Microscopy)를 이용하여 공간적 분포를 형광패턴으로 관찰하였다. 본 연구에 사용된 DNA probe는 Table 1에 나타내었다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 반응조의 소화특성

혐기성 소화시 나타나는 반응조 내의 pH, alkalinity, VFA, 가스 발생량, SCOD_{Cr} 등의 변화는 소화상태를 평가하는 중요한 지표가 되며, 이를 바탕으로 최적의 운전조건을 도출할 수 있다.

pH의 경우 모든 반응조에서 혐기성 소화에 유리한 조건인 pH 7.0~7.8에서 운전되었다. Fig. 3은 각 반응조의 alkalinity 변화를 나타내었으며 고농도의 유기물 부하로 운전된 반응조에서 alkalinity가 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나 그 수준은 5000mg/L as

CaCO₃ 이하로서 혐기성 소화에 저해를 일으키지 않는 적정농도로 유지되고 있음을 알 수 있다.

Fig. 4에는 각 반응조의 acetate 농도 변화를 측정된 결과를 나타내었다. 반응초기에는 모든 반응조에서 acetate 농도변화가 크게 나타나 불안정한 상태임을 알 수 있었으며 50일 전후에서 점차 안정화되는 것을 볼 수 있었다. 고농도의 기질을 주입한 TA-1과 MA-1의 경우, acetate 농도는 약 500mg/L로 유지되었으며, 저농도 기질을 주입한 TA-2와 MA-2의 acetate 농도는 약 200mg/L로 운전되었다. 또한 중온 반응조의 경우, acetate와 isobutyrate를 제외한 유기산이 반응초기에 모두 분해된 반면, 고온 반응조에서는 propionate와 isovalerate가 중온 반응조에 비해 매우 천천히 분해되었다.

Fig. 5는 SCOD_{Cr}의 변화를 나타내었으며, SCOD_{Cr}의 경우에도 acetate의 변화패턴과 마찬가지로 반응 초기에는 다소 많은 변화를 보였으나, 50일 정도 소화가 진행됨에 따라 반응이 안정되고 TA-1에서 그 농도가 가장 높은 것을 알 수 있었다.

Table 1. 16S rRNA targeted oligonucleotide probe sequences and specificities

Probe name	Sequence (5'-3')	5' modification	Specificity
EUB338	GCTGCCTCCGTTAGGAGT	FITC	<i>Eubacteria</i>
Arch915	GTGCTCCCCGCAATTCT	CY3	<i>Archaea</i>
MSMX860	GGCTCGCTTCACGGCTCCCT	FITC XRITC	<i>Methanosarcinaceae</i>
MS821	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	FITC	<i>Methanosarcina</i>
MX825	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	TRITC	<i>Methanothrix</i>

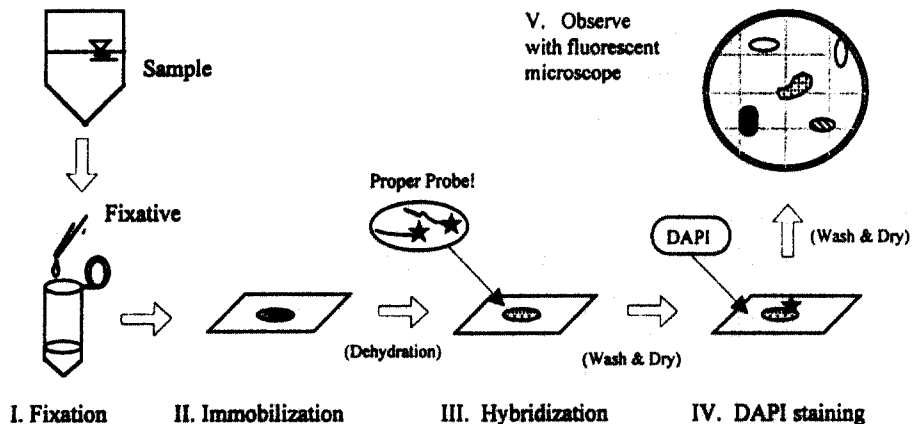


Fig. 2. Five-steps of FISH method (황선진 등, 1999).

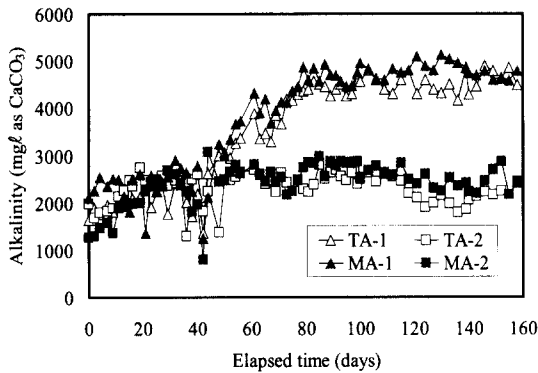


Fig. 3. Alkalinity variation in the anaerobic bioreactors with elapsed time.

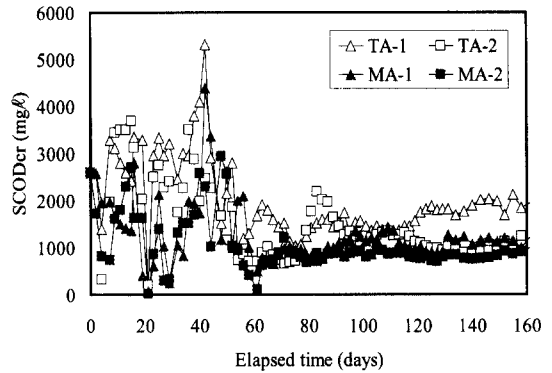


Fig. 5. SCOD_{cr} variation in the anaerobic bioreactors with elapsed time.

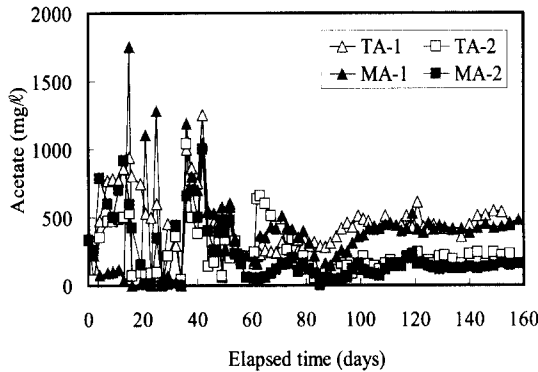


Fig. 4. Acetate variation in the anaerobic bioreactors with elapsed time.

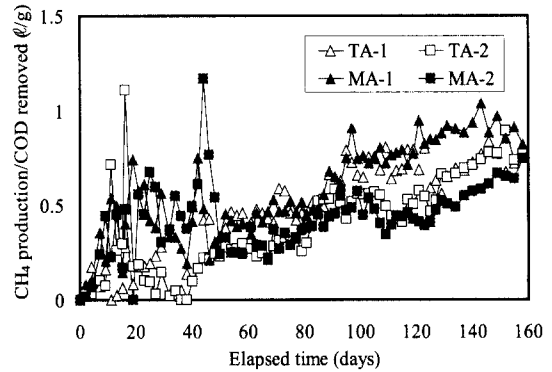


Fig. 6. Methane production rate variation in the anaerobic bioreactors with elapsed time.

Fig. 6에는 미생물에 의해 제거된 기질이 메탄가스로 전환되는 비율을 나타내었다. 각 반응조의 메탄가스 전환률 변화를 보면 반응초기에는 중온으로 유지되는 MA-1과 MA-2에서 전반적으로 고온보다 많이 전환되는 경향을 나타내었으나, 50일 전후에서 소화반응이 안정화되면서 고온소화와 중온소화의 메탄가스 전환률은 크게 차이가 없는 것을 알 수 있다. 이러한 사실로부터 혐기성 소화반응의 반응초기에는 중온성 메탄 생성균이 고온성 메탄 생성균 보다 더 안정한 활성을 가진 것으로 예상할 수 있다. 소화반응이 안정화되었다고 판단되는 50일 전후부터 고농도의 acetate가 주입된 TA-1 및 MA-1에서 저농도로 운전된 TA-2와 MA-2보다 투입된 기질의 메탄가스 전환율이 상대적으로 큰 것을 알 수 있는데 이는 메탄 생성균의 개체수와 활성의 차이라고 볼 수 있다.

3.2. 미생물 분석

각 반응조 내의 미생물에 관한 FISH 분석결과를 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다.

Fig. 7은 혐기성 소화반응이 14일 정도 진행된 초기 미생물상의 FISH 결과와 비교적 메탄생성이 안정적으로 이루어지던 98일째의 미생물상의 FISH 결과를 보여주고 있다.

EUB338 probe와 hybridization된 미생물(전세균)은 phase상에 녹색으로 형광하며, Arch915 probe와 hybridization된 미생물(고세균)은 붉은색으로 형광한다. 노란색(빛의 경우 녹색과 붉은색이 겹쳐지면 노란색으로 보임) 및 화살표로 표시된 부분은 기타 유기물 등의 자가형광(autofluorescent)으로 판단된다.

고온에서 고농도로 운전된 TA-1의 경우, 반응초기

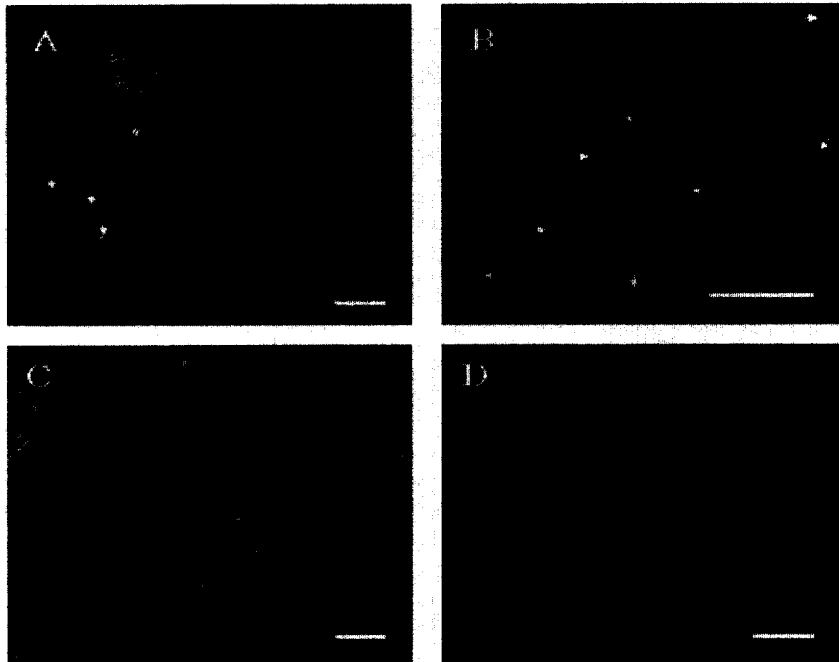


Fig. 7. Simultaneous *in situ* hybridization results of anaerobic digestion sludges with FITC-labeled EUB338 probe (green) and Cy3-labeled Arch195 (red) probe. *In situ* analysis of cells in the thermophilic and mesophilic anaerobic digester was carried out after 14 days (A[TA-1] & C[MA-1]) and 98 days (B[TA-1] & D[MA-1]) of running (bar = 10 μm , arrow = Autofluorescence).

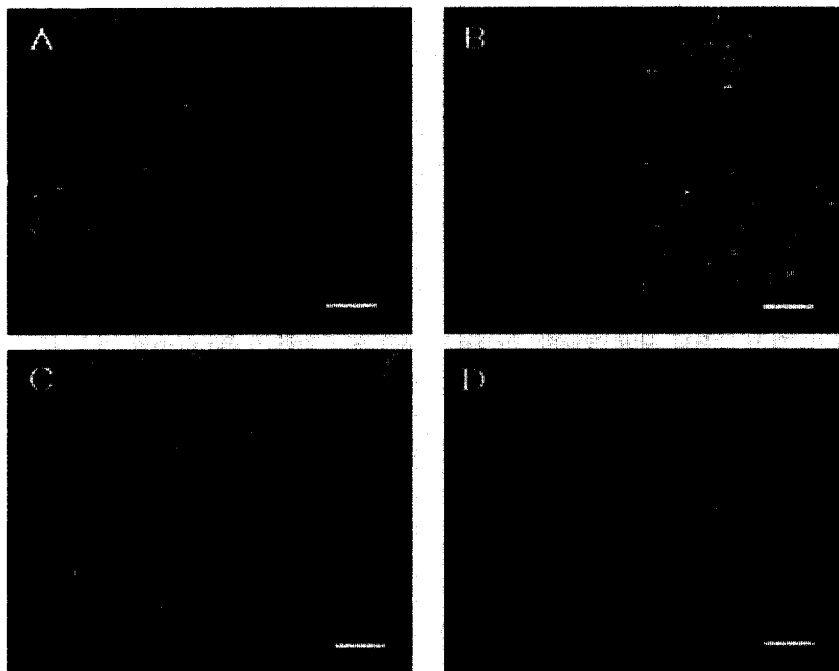


Fig. 8. Simultaneous *in situ* hybridization results of anaerobic digestion sludges with FITC-labeled MSMX860 probe (green) and Cy3-labeled Arch195 (red) probe after 148 days of anaerobic running. (bar = 10 μm) (A: TA-1, B: TA-2, C: MA-1, D: MA-2).

에는 산생성세균 등을 포함하는 *Eubacteria*와 메탄 생성균을 포함하는 *Archaea* 등 다양한 형태의 미생물상을 보였으나(Fig. 7A), 메탄생성이 안정화된 단계에서는 약 1~2 μ m 크기의 간균(rods)인 *Archaea*만이 존재하고 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 7B).

고온에서 저농도로 운전된 TA-2 반응조의 경우 EUB338과 Arch915 probe 모두 검색되지 않았는데, 그 이유로는 우선 TA-1에 비해 상대적으로 미생물량이 매우 적고, 부차적인 이유로서 아주 소량일 것으로 추정되는 미생물도 활성이 높지 않아 형광의 세기가 약했음을 들 수 있다(TA-2 사진 생략).

중온에서 고농도의 기질을 주입하여 운전한 MA-1 반응조 내 미생물의 FISH 분석결과, 다양한 형태의 *Eubacteria*가 출현하고 있음을 알 수 있으며 긴 사슬형태의 *Archaea*가 공존하는 것을 볼 수 있다(Fig. 7C). 특히 고온 소화조의 결과와는 달리, 반응 초기부터 발생된 긴 사슬형태의 *Archaea*가 반응 중기인 98일후까지도 유지되어 우점화하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 7D). 또한, MA-1와 MA-2에서 관찰된 미생물상은 크게 차이가 없으며, 이에 따라 기질농도는 미생물의 종 변화에 대한 영향 보다는 미생물의 활성에 우선적으로 더 유효하게 작용하는 것으로 추정되었다(MA-2 사진 생략).

Fig. 8은 각 반응조에서 채취한 소화슬러지에 고세균을 동정하는 Arch915 probe와 *Methanosarcinaceae* sp.를 동정할 수 있는 MSMX860 probe를 적용하여 분석한 FISH 결과이다.

148일 동안 고온으로 운전중인 TA-1과 TA-2 반응조의 소화슬러지에 Arch915와 MSMX860 probes를 적용한 결과, 두 반응조 모두 CLSM 관찰에 적합한 미생물량은 존재하고 있지 않으나 구균 형태의 *Archaea*가 출현한 것을 알 수 있다(Fig. 8A, Fig. 8B). 이것은 acetate를 기질로 하는 고온성 *Methanosarcina* sp.로 추정된다. 또한, 중온 소화조에서 채취한 소화슬러지에 Arch915와 MSMX860 probes를 적용한 결과를 보면 MA-1 반응조의 경우 *Archaea*의 대부분이 acetate를 기질로 하는 메탄 생성균임이 판명되었으며 운전조건과 미생물의 형태를 비교하여 볼 때, *Methanobrix*인 것으로 추정된다(Fig. 8C).

MA-2 반응조의 경우에도 *Methanobrix*로 추정되는 미생물이 검출되었으나 MA-1 반응조에 비해 미생물

의 양은 현저히 적음을 알 수 있었다(Fig. 8D).

위의 결과에 대한 확실한 검증은 위해서는 향후 *Methanosarcina*를 동정할 수 있는 MS821 probe 및 *Methanobrix*의 동정이 가능한 MX825 probe 등을 활용한 좀 더 구체적인 접근을 시도할 필요가 있다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 혐기성소화에 있어 소화온도와 기질부하가 소화효율 및 출현하는 관련 미생물상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반연속식 혐기성 반응조를 제작하여 온도와 기질농도에 따른 소화특성을 조사하고, 소화여건에 따른 미생물상의 변화를 FISH법을 적용하여 해석하였으며, 그 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다.

1) 고온소화조의 경우, 전체적인 소화반응이 안정화되기까지 중온소화조에 비해 더 많은 시간이 소비되었으나, 안정화 단계에서는 pH와 알칼리도 등의 변동이 크지 않았고 온도에 따른 변화보다는 기질농도의 차이에 따른 pH와 알칼리도의 변화가 더 큰 것으로 나타났다.

2) 제거된 기질이 메탄가스로 전환된 비율은 반응 초기에 중온 혐기성 반응조에서 고온 혐기성 반응조보다 다소 높았으나 안정화 단계에서는 온도보다는 기질부하가 메탄가스 전환률에 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

3) FISH법을 이용한 미생물 분석결과, 중온소화와 고온소화 반응의 초기 미생물상은 산생성균과 가수분해균을 포함하는 *Eubacteria*와 메탄 생성균을 포함하는 *Archaea*가 공존하였으나, 메탄발생이 안정적으로 이루어지는 단계에서는 *Archaea*가 우점화하는 것으로 확인되었다.

4) 혐기성 소화가 148일 동안 진행된 고온 혐기성 반응조에서는 고온성 *Methanosarcina* sp.로 추정되는 구균 형태의 acetate 이용 메탄 생성균이 출현하였으나, 중온 혐기성소화의 경우는 *Methanobrix*로 추정되는 acetate 이용 메탄생성균이 우점화하는 것으로 나타났다며 주입 기질 농도의 차이는 미생물의 종변화보다는 개체수 변화에 더 큰 영향을 미치는 것으로

나타났다.

참고문헌

장덕, 정태학 (1988) 혐기성소화의 동력학: 중온 및 고온 혐기성소화의 비교연구, 대한토목학회논문집, 8(4), pp. 59-67.

황선진, Keisuke Hanaki (1999) 질소화합물을 함유한 고형폐기물로부터의 아산화질소(N₂O) 발생특성 및 FISH법에 의한 미생물군집의 해석에 관한 연구, 한국폐기물학회지, 16(3), pp. 271-279.

Amann, R. I. (1995) In situ identification of micro-organisms by wholecell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, section 3.3.6, p. 3.3.6/1-3.3.6/15. In A. D. L. Akkermans, and J. D. van Elsas (ed.), *Molecular microbial*

ecology manual. Kluwer. Academic Publishers, London, England.

Alm, E. W., D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl, and L. Raskin (1996) The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3557-3559.

Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada, and K. Nakamura (1998) Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144, 2655-2665.

Van Lier, J. B., K. C. F. Grolle, A. J. M. Stams, E. Conway de Macario, and G. Lettinga (1992) Start-up of a thermophilic upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with mesophilic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 130-135.