

## PCR-RFLP 방법을 이용한 활성 슬러지의 세균군집 분석

이현경 · 김준호 · 김치경 · 이동훈\*  
충북대학교 미생물학과 및 기초과학연구소

폐수처리에 중요한 역할을 담당하고 있는 세균 군집의 다양성과 폐수종류에 따른 군집차이를 알아보기 위해 분자생물학적 분석방법을 사용하였다. 국내 폐수처리장 슬러지 시료로부터 16S rDNA 클론 라이브러리를 구축하였고, *Hae*III RFLP pattern과 염기서열을 분석하였다. 하수처리장 시료에서는 총 1,151개의 클론에서 699개의 서로 다른 RFLP pattern이, 화학산업 폐수처리장 시료에서는 총 1,228개의 클론에서 300개의 서로 다른 RFLP pattern이 관찰되었다. Shannon-Weiner diversity index의 계산결과 하수처리장 슬러지 시료는 8.7, 화학산업 폐수처리장 슬러지 시료는 6.1로 하수처리장 시료가 더 다양한 군집을 구성하고 있었다. 두 시료에서 우점하는 RFLP pattern에 해당되는 40개의 클론을 선정하여 염기서열 분석과 상동성 검색을 수행하였다. 분석된 서열의 70%인 28개의 클론은 배양이 보고되지 않은 균주의 16S rRNA와 유사도가 높았고, 두 시료 모두  $\beta$ -Proteobacteria가 우점하였다. 그러나, 하수처리장의 경우 활성슬러지에서 분리된 균주들과 유사한 군집이 많았던 반면, 화학산업 폐수처리장의 경우 고온이며, 혐기성이고, 탄화수소나 황이 많이 존재하는 환경에서 분리된 균주들과 유사한 군집이 많았다. 이러한 결과는 유입수의 조성에 따른 차이로 생각된다.

**Key words** □ 16S rRNA, activated sludge, bacterial community, PCR-RFLP

환경오염이 증가함에 따라 폐수처리의 중요성이 더욱 부각되고 있는 추세이다. 그러나 그간의 기술개발 노력에도 불구하고 폐수처리시설이 생긴 이후부터 현재까지 폐수에 함유된 오염물질의 제거는 거의 전적으로 미생물, 특히 세균의 기능에 의존하고 있다(3).

폐수처리 시설에서 세균군집의 중요성에도 불구하고, 하·폐수의 정화를 담당하는 세균군집들은 오랫동안 "black-box"처럼 인식되어, 기능이 알려진 개별적인 종들로 정리되지 않았으며 단지 오염물질이 부여하는 선택압의 결과물이라고만 여기고 있는 실정이었다. 그러나 최근 들어 현장실무자, 공정개발자 등을 중심으로 이 복잡한 군집들의 구조와 기능에 대한 정확한 이해가 더 나은 설비의 최적화를 위한 좋은 출발점이 될 것이라는 데 동의하기 시작했다(1). 그러나 고전적인 배양방법을 이용하여 세균군집의 구조를 파악하는 데는 한계가 있다. 활성 슬러지에 서식하는 세균들 중에서 단지 5~15% 사이의 세균들만 배양할 수 있으며, 사상균과 같이 현미경으로 뚜렷이 관찰되는 미생물도 배양방법으로는 확인할 수 없었다고 한다(24).

자연 생태계의 미생물 군집 구조를 배양기법을 이용하지 않고 이해하기 위해 활발하게 사용되고 있는 것이 분자생물학적 분석 방법이다. 다양한 유전자를 대상으로 분자생물학적 분석방법을 응용할 수 있지만, 16S rRNA를 분석 대상으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 이러한 분석들을 통해서 폐수처리장에는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria와 Bacteroidetes, Actinobacteria에 속하는 균주들

이 우점한다고 보고되었다(28). 국내에서도 활성 슬러지의 세균 군집 구조를 분석하기 위한 연구들이 있었고,  $\beta$ -Proteobacteria가 우점함을 밝힌 바 있다(12, 17). 하지만, 아직까지 국내의 폐수처리장내 세균군집의 연구는 미흡한 실정이고, 서로 다른 폐수처리장의 세균군집 구조를 비교한 연구는 거의 없었다.

PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 방법인 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)는 일부 세균 group들의 종 특이적 동정 방법으로 사용될 뿐만 아니라(27), 다양한 미생물이 서식하고 있는 생태계의 군집 분석에도 사용되고 있는 방법이다(26). 본 연구에서는 서로 다른 성분 유입수가 처리되는 2 곳의 국내 폐수처리 시설의 세균군집 구조를 비교하고 군집의 구성원을 파악하기 위하여, 16S rDNA 클론 라이브러리를 제작하여 *Hae*III RFLP 분석을 수행하였고, 우점하는 클론의 16S rDNA 염기서열 분석을 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 채취 및 핵산 추출

2001년 10월에 강원도 강릉시에 있는 하수처리장과 경기도 안산시에 위치한 화학산업 폐수처리장으로부터 활성 슬러지를 채취하였다.

활성 슬러지 시료로부터 핵산을 추출하기 위하여 Miller 등(1999)의 bead beating 방법을 변형하여 이용하였다(19). 시료를 원심분리(14,000 × g, 15분, 4°C) 하여 세균을 농축하였으며, 멸균된 0.1 mm zirconium glass bead (Biospec, USA) 0.5 g과 phosphate buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) 300  $\mu$ l, SDS solution (10%

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 043-261-3291, Fax: 043-264-9600  
E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr

SDS, 100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8.0) 300  $\mu$ l, chloroform:isoamylalcohol (24:1) 300  $\mu$ l를 넣고, MINI-BEADBEATER™ (Biospec)를 이용하여 2,500 rpm에서 2분 동안 파쇄하였다. 파쇄된 시료를 원심분리(14,000  $\times$  g, 15분, 4°C) 한 후 상층액을 취하여 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)과 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 순서대로 각 1회 처리하였다. 상층액을 취하여 동량의 cold isopropanol과 sodium acetate (최종 농도 0.3 M)를 첨가하고 -20°C에서 2시간 이상 방치하여 핵산을 침전시켰다. 원심분리(14,000  $\times$  g, 30분, 4°C) 한 후, 건조시켜 DNA pellet을 얻었다. 추출된 핵산은 UltraClean™ kit (MO Bio Laboratories Inc., USA)로 정제하였고, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

### 16S rDNA의 PCR 증폭 및 cloning

16S rRNA 유전자 증폭에 이용된 eubacterial primer는 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 1X 반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ g/ml BSA, pH 8.3), 160  $\mu$ M dNTPs, 0.3  $\mu$ M primer, DNA 시료 (10-15 ng/ $\mu$ l)와 1.5 unit의 *Taq* polymerase를 첨가하여 총 50  $\mu$ l의 혼합물을 만들었다.

PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 49°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, Ultra Clean™ kit (MO Bio Laboratories Inc.)로 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 pGEM-T vector (Promega, USA)와 *E. coli* XL1-blue 균주를 이용하여 클로닝하였으며, 각 시료 당 약 1,000개 정도의 재조합 클론을 선별하였다.

### 16S rDNA 클론의 PCR-RFLP 분석

구축된 라이브러리의 클론들은 T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3')과 prGTr (5'-CTC AAG CTA TGC ATC CAA CGC-3') primer 쌍을 사용하여 direct amplified PCR을 수행하였다. PCR 반응물의 조성은 1X 반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ g/ml BSA, pH 8.3), 160  $\mu$ M dNTPs, 0.25  $\mu$ M primer와 0.3 unit의 *Taq* polymerase를 첨가하여 총 15  $\mu$ l의 혼합물을 만들었다.

PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 열 처리한 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 20회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR product는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, -20°C에서 보관하였다.

증폭된 16S rDNA의 RFLP 분석은 *Hae*III를 이용하였다. 각 PCR product에 *Hae*III (TaKaRa, Japan) 3 unit을 첨가 후 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. Restriction fragment (RF) pattern은 3.5% NuSieve 3:1 agarose gel (BMA, USA)로 2시간 동안 전기영동하여 확인하였다.

각 RF의 크기를 계산하여 RFLP pattern의 유사성이 높은 클론들의 cluster를 확인하였고, 클론 라이브러리의 다양성 지수로 coverage value (C), richness (S), Shannon-Weiner diversity index (H), Pielou's evenness index (e), Simpson dominance index (D)를 계산하였다(6). 또한 on-line Rarefaction Calculator (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>)를 이용하여 Rarefaction 값을 계산하였다(15).

전체 클론의 1% 이상의 빈도를 차지하는 RFLP group을 선정한 후, BaseStation™ DNA Fragment Analyzers (MJ Research, USA)를 사용하여 대표 클론의 염기서열을 분석하였다.

### 16S rDNA 염기서열을 이용한 유연관계 분석

RFLP 분석을 통해 슬러지에 우점한다고 예상되는 클론의 염기서열과 Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>)와 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database로부터 확인된 염기서열을 ClustalX 프로그램을 이용하여 정렬하였다. PHYLIP package v3.6 (10)을 이용하여 Jukes & Cantor distance model (13)과 neighbor-joining method (22)에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 추론하였다. 계통수 조상 위치를 추정하기 위해 *Methanothermobacter wolfeii*를 outgroup으로 사용하였으며, branch의 신뢰도(bootstrap 값)는 1,000 회의 재구성된 (resampling) 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다(9).

## 결과 및 고찰

### 클론 라이브러리의 구축과 세균군집 다양성 분석

폐수처리장의 슬러지 시료에서 추출된 핵산을 이용하여 16S rDNA에 대한 PCR을 수행하였으며, 약 1.5 kb에 해당하는 증폭 산물을 확인하였고, pGEM-T vector에 삽입하여 하수처리장 시료와 화학산업 폐수처리장 시료에서 각각 1,151개와 1,228개의 클론을 얻었다.

각 클론들의 *Hae*III RFLP pattern을 분석한 결과, 하수 시료에서는 699개의 서로 다른 RFLP phylotype이, 화학산업 폐수 시료에서는 300개의 서로 다른 RFLP phylotype이 관찰되었다(Table 1). Clone number ratio [(total number of RFLP phylotypes/total clone number)  $\times$  100]는 하수 시료에서 60.7%, 화학산업 폐수 시료에서 24.4%로, 하수 시료는 하나의 클론만을 포함하는 RFLP phylotype이 많았던 반면, 화학산업 폐수 시료는 특정 RFLP phylotype에 속하는 클론이 우세하였다.

Coverage value(현장의 세균군집을 라이브러리가 반영하는 비율)는 하수 시료에서 53.4%, 화학산업 폐수 시료에서 85.7%로 두 시료 모두 전체 다양성의 50% 이상은 반영하였다. 화학산업 폐수 시료에서 더 큰 값이 관찰된 것은 군집구조가 상대적으로 단순하고 클론 라이브러리의 크기가 더 컸기 때문인 것으로 생각된다.

또한 클론 라이브러리의 다양성 지수를 조사하기 위해 richness (S), Shannon-Weiner diversity index (H), evenness (e), Simpson dominance index (D)를 분석하였다. 그 결과 하수 시료는 세균 군집의 다양성이 매우 높은 반면, 화학산업 폐수 시료는

**Table 1.** Diversity indices based on RFLP phlotypes in the 16S rDNA clone libraries generated from the sludge samples

Parameter	Site*	
	A	B
Total number of clones (N)	1,151	1,228
No. of unique clones (n)	536	176
No. of RFLP phlotypes (R)	699	300
% Coverage (C) <sup>1</sup> of clone library	53.4	85.7
Richness (S) <sup>2</sup> of RFLP phlotypes	228.0	96.8
Shannon-Weiner diversity (H) <sup>3</sup>	8.696	6.135
Evenness (e) <sup>4</sup>	3.057	2.477
Simpson dominance (D) <sup>5</sup>	0.006	0.062

\*Sampling site : (A) sewage treatment plant, (B) wastewater disposal plant of chemical industry

<sup>1</sup>Calculated as  $C = [1 - (n/N)] \times 100$ , where  $n$  is the number of unique clones and  $N$  is the total number of clones.

<sup>2</sup>Calculated as  $S = (R - 1) / (\log N)$ ,  $R$  is the total number of RFLP phlotypes and  $N$  is the total number of clones.

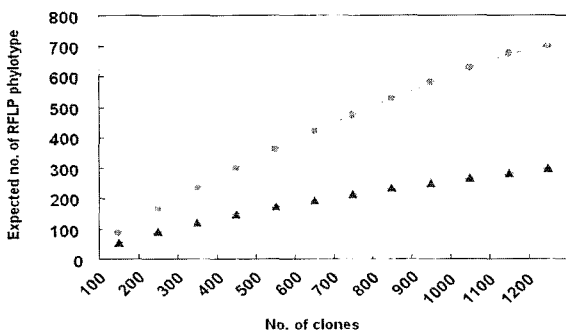
<sup>3</sup>Calculated as  $H = -\sum(P_i)(\log_2 P_i)$ , where  $P_i$  is the proportion of clones belonging to  $i$ th RFLP phlotyp.

<sup>4</sup>Calculated as  $e = H / (\log R)$ , where  $H$  is Shannon-Weiner diversity index and  $R$  is the total number of RFLP phlotypes.

<sup>5</sup>Calculated as  $D = \sum(P_i)^2$ , where  $P_i$  is the proportion of clones belonging to  $i$ th RFLP phlotyp.

특정 세균군집들이 우점함을 알 수 있었다.

2개의 시료로부터 얻어진 클론들이 세균군집의 다양성을 추정하기에 충분한지 rarefaction 분석으로 평가하였다. 두 시료 모두 rarefaction curve가 포화상태에 도달하지 못하고 계속 증가하는 현상을 볼 수 있었다(Fig. 1). 특히 직선의 기울기가 큰 하수 시료의 경우는 화학산업 폐수 시료보다 세균 군집의 다양성이 더 높음을 알 수 있었다. 따라서 하·폐수처리장 슬러지의 세균 군집 구조가 매우 다양하며, 두 시료 모두 1,000개 이상의 클론으로 구성된 라이브러리의 분석이 필요함을 알 수 있었다. 기존의 연구에서는 경제적, 시간적 이유로 인하여 제한된 수의 클론들을 분석하는 경향이 있는데, 이러한 방법은 슬러지에 서식하는 세균



**Fig. 1.** Phylotype richness curve of two clone libraries. Expected number of phlotypes was calculated by the rarefaction method (-●-, sewage treatment plant; -▲-, wastewater disposal plant of chemical industry).

군집의 다양성을 과소평가할 가능성이 있다고 생각된다.

하수 시료에서 가장 우점을 보였던 RFLP phlotyp은 분석한 총 클론의 6%를 차지하였던 반면, 화학산업 폐수 시료에서는 21.5%의 높은 빈도를 보였다(Fig. 2). 또한, 하수 시료에서는 하나의 클론만을 포함하는 RFLP phlotyp의 클론이 전체 클론의 46.6%를 보였던 반면, 화학산업 폐수 시료에서는 14.3%의 낮은 빈도를 보였다. 도시 하수의 경우는 다양한 오염원이 섞여있어 세균 군집 구조가 매우 다양한 반면, 산업폐수의 경우는 특정 물질을 집중적으로 방출하기 때문에 그 물질의 분해에 관련된 일부 균주가 우점할 수 있는 환경이 제공되기 때문에 이러한 결과가 관찰된 것으로 생각된다.

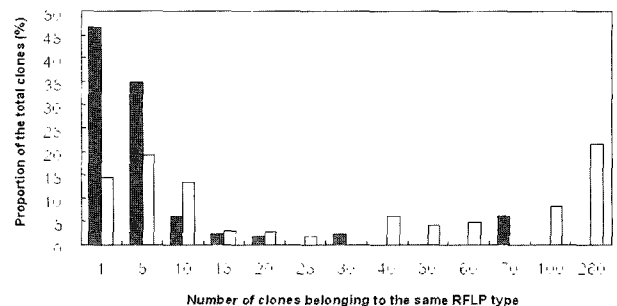
**16S rDNA 서열을 이용한 계통분류학적 분석**

HaeIII를 이용한 PCR-RFLP 분석결과에서 1% 이상의 우점을 보였던 phlotyp에 포함되는 클론들 중에서 각각 2개씩의 클론을 무작위로 선정하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 하수 시료에서는 22개의 클론을, 화학산업 폐수 시료에서는 18개의 클론을 선정하여 5'-말단 부위에서 385~717 bp 크기의 염기서열을 분석하였다.

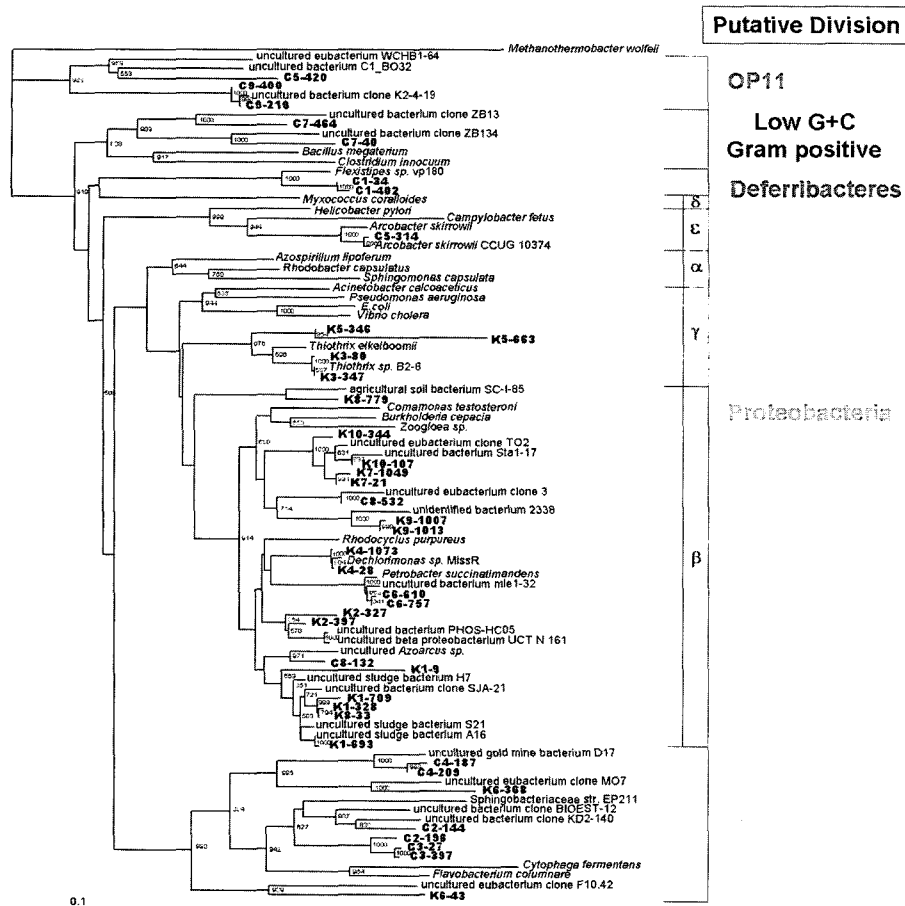
일부 클론들에서는 같은 HaeIII RFLP pattern을 보이나, 염기서열의 유사도는 낮았다. 이러한 클론들은 HhaI RFLP pattern으로 구분이 가능하였고(결과 미 제시), PCR-RFLP 방법으로 정확한 세균 군집 분석을 하기 위해서는 2개 이상의 제한효소 사용이나, MERFLP (multiple enzyme RFLP)의 적용이 필요하다고 생각된다.

분석된 염기서열들은 RDP와 GenBank에 등록되어 있는 세균들의 16S rDNA서열과 비교하였다. 하수 시료의 경우 분석된 클론 염기서열의 73%가, 화학산업 폐수 시료의 경우 67%가 배양이 보고되지 않은 균주의 서열과 유사도가 높았다.

클론들의 염기서열과 RDP와 GenBank에 등록되어 있는 세균들의 염기서열을 바탕으로 phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 3). 하수 시료는 β-Proteobacteria가 73%로 가장 많은 비중을 차지하였고, γ-Proteobacteria와 CFB group이 각각 18%와 9%의 빈도로 나타났다. 화학산업 폐수 시료도 역시 β-Proteobacteria가 22%로 높은 비율을 보이기는 했으나, CFB group이 33%로 가장



**Fig. 2.** Comparison of the bacterial community structures of two activated sludge samples determined by PCR-RFLP (■, sewage treatment plant; □, wastewater disposal plant of chemical industry).



**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on the partial 16S rDNA sequences. K and C in bold names represent the sequences identified from the sewage treatment plant and wastewater disposal plant of chemical industry, respectively.

큰 비중을 차지하였고, 하수 시료에서는 나타나지 않았던 OP11, Deferribacteres, low G+C Gram positive bacteria, ε-Proteobacteria가 각각 17%, 11%, 11%, 6%의 빈도로 나타났다.

하수 시료의 RFLP phylotype K1 (우점빈도 6%)의 클론들(K1-9, K1-328, K1-693, K1-709)과 95.2±3.35% 서열의 유사도를 보인 uncultured sludge bacterium H7 (AF234684), A16 (AF234726)은 활성 슬러지에서 질소의 제거와 관련이 있고, uncultured bacterium SJA-21 (AJ009455)은 혐기적 상태에서 trichlorobenzene (TCB) 분해에 관련된 것으로 보고되었다(29). RFLP phylotype K2 (우점빈도 2%)의 클론들(K2-327, K2-397)과 94.5±1.73% 서열의 유사도를 보인 uncultured β-Proteobacterium clone UCT N161 (AY064178)과 uncultured bacterium PHOS-HC05 (AF314417)는 *Rhodocyclus*와 유사 균주들로 폐수처리장에서 enhanced biological phosphorus removal (EBPR) 과정에 관련되어 있다 (4, 30). RFLP phylotype K3 (우점빈도 2%)과 K5 (우점빈도 1%)의 클론들(K3-80, K3-347, K5-346, K5-663)과 91.4±11.59% 서열의 유사도를 보인 *Thiothrix* sp. (AB042537, AB042542)는 폐수처리에 문제가 되는 슬러지의 bulking 형성과 관련이 깊은 filamentous bacteria의 일종이다(14). RFLP phylotype

K4 (우점빈도 1%)의 클론들(K4-28, K4-1073)과 99% 서열의 유사도를 보인 *Dechloromonas* sp. Miss R (AF170357)은 미시시피강에서 분리된 균주로 chlorate의 dissimilatory reduction에 관련이 있다(2). 이처럼 하수 시료로부터 분리된 클론들의 대부분은 활성 슬러지에 존재한다고 이미 알려진 균주들과 많은 유사성을 보였고, 다른 폐수처리장의 균집과 크게 다르지 않았다.

반면, 화학산업 폐수 시료의 염기서열 분석 결과는 하수 시료의 결과와 뚜렷한 차이가 있었고, 이는 산업 폐수의 세균 군집 구조가 하수처리장의 세균 군집 구조와 다르다는 Manz 등 (1994)의 연구결과와 일치한다(18). 화학산업 폐수 시료의 RFLP phylotype C1 (우점빈도 21%)의 클론들(C1-34, C1-402)과 91.5±0.71% 서열의 유사도를 보인 *Flexistipes* sp. vp180 (AF220344)은 황이 풍부한 석유 저장소에서 분리되었으며, 배양온도가 80°C이다(20). C2-196번 클론(우점빈도 8%)과 87% 서열의 유사도를 보인 uncultured bacterium clone BIOEST-12 (AJ548901)는 혐기적이고 황이 풍부한 곳에서 분리되었으며, RFLP phylotype C4 (우점빈도 4%)의 클론들(C4-187, C4-209)과 93% 서열의 유사도를 보인 uncultured gold mine bacterium D17 (AF337873)은 중금속으로 오염된 광산에서 분리되었다. C5-314번 클론(우점빈도

도 3%)과 98% 서열의 유사도를 보인 *Arcobacter skirrowi* (L14625)는 예전에 aerotolerant *Campylobacter* 종으로 알려졌던 것으로 그람 음성, 곡간균이며, nitrate를 환원하고, 염농도가 높고(3.5% NaCl), 석유로 오염된 환경에서도 성장할 수 있는 특징을 갖는다. 이들은 30°C에서는 호기적 환경에서 서식할 수 있고, 15°C에서는 미호기적 상태에서 서식할 수 있다고 알려져 있으며 사람을 포함한 동물에게 질병을 유발한다(21). Snaidr 등(1997)에 의해서도 활성 슬러지로부터 *in situ* identification에 의해 *Arcobacter* 종이 활성 슬러지에 존재함이 밝혀진바 있다(23). 이러한 결과를 바탕으로 볼 때 비병원성 환경균주로서 *Arcobacter*가 활성 슬러지에 존재한다고 예상된다. C6-610번 클론(우점빈도 3%)과 97% 서열의 유사도를 보인 *Petrobacter succinimandens* (AY219713)는 고온의 석유저장소에서 분리된 균주로 nitrate의 환원에 관여하고 있고, C6-757번 클론(우점빈도 3%)과 98% 서열의 유사도를 보인 uncultured bacterium mle1-32 (AF280860)는 제약관련 산업의 폐수를 처리하는 반응조에서 분리된 균주이다(16). RFLP phylo-type C7 (우점빈도 2%)의 클론들(C7-40, C7-464)과 82.5±5.32% 서열의 유사도를 보인 uncultured bacterium clone ZB13 (AY327215)과 ZB134 (AY327216)는 황이 풍부한 곳에서 분리된 클론들로 low G+C Gram positive bacteria인 Firmicutes와 관련된 group으로 추측되고있다(7). C8-532번 클론(우점빈도 1%)과 97% 서열의 유사도를 보인 uncultured eubacterium clone 3 (AJ412672)은 혐기적으로 탈질화가 일어나는 반응조에서 16S rDNA 분석에 의해 확인된 것으로 β-Proteobacteria와 관련성을 보인다(8). C5-420번 클론(우점빈도 3%)과 81% 서열의 유사도를 보인 uncultured bacterium C1\_B032 (AF419694)는 심해의 hydrothermal vent에서 분리되었고(25), C9-210번 클론(우점빈도 1%)과 76% 서열의 유사도를 보인 uncultured eubacterium WCHB1-64 (AF050606)는 탄화수소와 염소화된 용매로 오염된 곳의 methanogenic zone에서 분리되었다(5). 이 균주들은 모두 OP11 division과 관련성을 보였다. OP11은 Yellowstone hot spring (75~95°C)에서 분리된 클론으로 이산화탄소, 철, 황의 환원에 관여한다고 여겨지며(11), hot spring 뿐 아니라 심해나 석유로 오염된 토양, 담수의 퇴적물 등 자연계에 널리 존재하고 있다. 이처럼 화학산업 폐수 시료로부터 분리된 클론들의 대부분은 고온이며 혐기성이고, 탄화수소와 황, 염소이온이 많이 존재하는 환경에서 분리된 균주들과 관련이 있었다.

PCR-RFLP 방법을 통해 슬러지에 우점하는 것으로 확인된 클론들의 염기서열 분석 결과, 대부분이 분리·동정되지 못하였기 때문에 그 특성이 정확히 알려지지 않은 균주들임을 알 수 있었다. 따라서 하·폐수처리장내 슬러지의 세균 군집 구조를 파악하기 위해서 앞으로도 더 많은 연구가 필요하며, 슬러지 미생물들의 역할을 파악하기 위해 오염물질 분해 등 기능과 관련된 유전자를 이용한 군집분석 연구도 필요할 것으로 생각된다.

### 감사의 말

본 연구는 충북대학교 기초과학연구소 지원에 의하여 수행되

었습니다.

### 참고문헌

1. Amann, R., H. Lemmer, and M. Wagner. 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 205-215.
2. Coates, J.D., U. Michaelidou, R.A. Bruce, S. M. O'connor, J. N. Crespi, and L. A. Achenbach. 1999. Ubiquity and diversity of dissimilatory (per) chlorate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5234-5241.
3. Curds, C.R. and H. A. Hawkes. 1975. Ecological aspects of used-water treatment. Vol. 1. The organisms and their ecology. Academic Press, London.
4. Dabert, P., B. Sialve, J.P. Delgenès, R. Moletta, and J.J. Godon. 2001. Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorous-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 500-509.
5. Dojka, M.A., P. Hugenholtz, S.K. Hack, and N.R. Pace. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3869-3877.
6. Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern united states soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-2950.
7. Elshahed, M., J.M. Senko, F.Z. Najjar, S.M. Kenton, B.A. Roe, T. A. Dewers, J.R. Spear, and L.R. Krumholz. 2003. Bacterial diversity and sulfur cycling in mesophilic sulfide-rich spring. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5609-5621.
8. Etchebehere, C., M.I. Errazquin, P. Dabert, and L. Muxi. 2002. Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40, 97-106.
9. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
10. Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
11. Hugenholtz, P., C. Pitulle, K.L. Hershberger, and N. R. Pace. 1998. Novel division level bacteria diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180, 366-376.
12. Jeon, C.O., D.S. Lee, and J.M. Park. 2003. Microbial communities in activated sludge performing enhanced biological phosphorous removal in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 37, 2195-2205.
13. Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In: H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.
14. Kanagawa, T., Y. Kamagata, S. Aruga, T. Kohno, M. Horn, and M. Wagner. 2000. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5043-5052.
15. Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. Harper & Row, New York.
16. LaPara, T.M., C.H. Nakatsu, L. Pantea, and J.E. Alleman. 2000. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* 66, 3951-3959.
17. Lee, H.W., S.Y. Lee, J.W. Lee, J.B. Park, E.S. Choi, and Y.K. Park. 2002. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 85-94.
  18. Manz, W., M. Wagner, R. Amann, and K.H. Schleifer. 1994. *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Res.* 28, 1715-1723.
  19. Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724.
  20. Orphan, V.J., L.T. Taylor, D. Hafenbradl, and E.F. Delong. 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 700-711.
  21. Phillips, C.A. 2001. *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. *Trends in Food Sci & Technol.* 12, 263-275.
  22. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
  23. Snaird, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884-2896.
  24. Soddell, J.A. and R.J. Seviour. 1990. Microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 145-176.
  25. Teske, A., K.U. Hinrichs, V. Edgcomb, A. de V. Gomez, D. Kysela, S. P. Sylva, M. L. Sogin, and H. W. Jannasch. 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1994-2007.
  26. Urakawa, H., K. Kita-Tsukamoto, and K. Ohwada. 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 145, 3305-3315.
  27. Ventura, M., M. Elli, R. Reniero, and R. Zink. 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolate from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 113-121.
  28. Wagner, M. and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218-227.
  29. Wintzingerode, F., B. Selent, W. Hegemann, and U.B. Göbel. 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transformation microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 283-286.
  30. Zilles, J.L., J. Peccia, M.W. Kim, C.H. Hung, and D.R. Noguera. 2002. Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in full-scale wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2763-2769.

(Received October 7, 2004/Accepted December 3, 2004)

---

**ABSTRACT : Molecular Characterization of the Bacterial Community in Activated Sludges by PCR-RFLP**

**Hyun-Kyung Lee, Jun-Ho Kim, Chi-Kyung Kim, and Dong-Hun Lee\***(Department of Microbiology and Basic Science Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Diversity of the bacterial communities and the relation between community structure and components of wastewater were analyzed by 16S rRNA-based molecular techniques. Clone libraries of the 16S rDNAs from the sludges were constructed by PCR and cloning. The 1,151 clones from a sludge sample of sewage treatment plant were clustered into 699 RFLP phylotypes and the 1,228 clones from the wastewater disposal plant of chemical industry were clustered into 300 RFLP phylotypes. Shannon-Weiner diversity indices of two sampling sites were 8.7 and 6.1, indicating that the bacterial community structure of sewage treatment plant was more diverse than that of wastewater disposal plant of chemical industry. Forty clones belonging to predominant RFLP types were selected and sequenced. Seventy percent (28 clones) of the sequenced clones were related to the uncultured bacteria in public databases. The  $\beta$ -Proteobacteria dominated in the bacterial communities of investigated two sludge samples. 16S rDNA sequences of the sewage treatment plant were similar to those of other activated sludges, while the bacterial community in wastewater disposal plant of chemical industry represented the strains identified from high-temperature, anaerobic, hydrocarbon-rich, and sulfur-rich environments. This result suggested that bacterial communities depended upon the components of wastewater.