

혐기성 암모늄 산화 반응기 내 붉은색 입상슬러지의 미생물 군집구조 분석

배효관 · 박경순 · 정윤철 · 정진영[†]

한국과학기술연구원 환경공정연구부

(2006년 8월 18일 접수, 2006년 10월 16일 채택)

Analysis on the Microbial Community Structure of Red Granule in the Anaerobic Ammonium Oxidation Reactor

HyoKwan Bae · Kyung-Soon Park · Yun-Chul Chung · Jin-Young Jung[†]

Environment & Process Technology Division, Korea Institute of Science and Technology

ABSTRACT : Extremely slow growing anammox(anaerobic ammonium oxidation) bacteria were cultivated using a combination of UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reactor seeded with anaerobic granular sludge and carbon-fiber cultivating reactor. After 180 days of continuous cultivation, average nitrogen removal rate showed 0.54 kg N/m³-day when 0.6 kg N/m³-day of nitrogen loading was applied. The black granule was changed to brown and red granule as continuous operation, and the red granule was highly dependant on the high anammox activity. Microbial community structure of red granule in the UASB reactor was analyzed by molecular methods such as gene cloning, phylogenetic tree analysis, and FISH(Fluorescence In Situ Hybridization) method. As a result of gene cloning and phylogenetic tree analysis, 5 kinds of phylum were found to be Planctomycetes, Proteobacteria, Acidobacteria, Chlorobi, and Chloroflexi. 13 clones were matched to anammox bacteria among 51 clones in the red anammox granule. In-silico test which used cloning information and FISH probe of the AMX368 was conducted to detect the presence of anammox bacteria in the red anammox granule. As a result of in-silico test, only one clone was exactly matched to AMX368 but 11 clones was mutated one base among 18 bases representing all 12 clones are anammox bacteria. A filamentous Chloroflexi might be related to the granulation of anammox bacteria. As a result of FISH analysis, anammox bacteria was abundant in the red anammox granule.

Key Words : Anammox, Anammox UASB Reactor, Red Granule Sludge, Clone Library, Phylogenetic Tree, FISH

요약 : 본 연구에서는 혐기성 입상슬러지를 증진한 UASB 반응기와 탄소섬유를 증진한 배양기를 조합하여 아주 느린 성장특성을 가진 혐기성 암모늄 산화균의 배양을 시도하였다. 연속배양 180일 이후, 유입질소부하가 0.6 kg N/m³-d였을 때, 평균 질소전환율은 0.54 kg N/m³-d로 나타났다. 검은 혐기성 입상슬러지는 연속배양시간이 지남에 따라 갈색과 붉은 색으로 변화되었으며, anammox 반응기는 붉은색 입상슬러지가 많을수록 높은 활성도를 나타내었다. 따라서, 붉은색 입상슬러지를 채취하여 분자생물학적 방법을 이용하여 미생물 군집구조를 분석하였다. 클로닝 및 계통분류학적 분석도 작성 결과, anammox UASB 반응조의 붉은색 입상슬러지에서 발견된 미생물 종류는 anammox 미생물과 더불어 문단위의 4가지 다른 미생물, Proteobacteria, Acidobacteria, Chlorobi와 Chloroflexi로 나타났다. Anammox UASB 반응조내의 붉은색 입상슬러지에서는 clone의 개수를 기준으로 anammox 미생물이 약 25%가 존재하였고, β -proteobacteria가 우점하고 있는 양상을 보여주었으며, 본 연구의 클로닝 정보와 AMX368 FISH 탐침자를 이용해 in-silico 실험을 수행한 결과 AMX368과 정확히 들어맞는 anammox 미생물 clone 하나와 하나의 염기서열이 변이를 일으킨 11개의 anammox 미생물 clone을 확인할 수 있었다. 사상균 형태의 Chloroflexi는 혐기조건 입상 슬러지의 형성과 관련이 있는 것으로 판단되었다. FISH 수행결과, anammox 미생물은 붉은색 입상 슬러지에 우점하고 있는 것으로 나타났다.

주제어 : 혐기성 질소산화, Anammox UASB 반응조, 붉은색 입상 슬러지, 클로닝, 계통분류학적 분석도, FISH

1. 서론

질소는 부영양화를 유발하는 물질로써, 환경부에서는 엄격한 배출허용기준을 설정하여 수계의 배출을 제한하고 있다. 질소제거를 위한 생물학적 질산화/탈질소화 공정은 기존의 물리화학적 공정에 비해 경제적이기 때문에 고도하수처리공

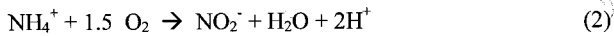
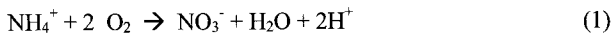
정에 일반적으로 적용되고 있다. 생물학적 질산화는 독립영양 질산화 미생물에 의해 수행되는데 산소를 전자공여체로 활용하여 ammonium을 nitrite와 nitrate로 순차적으로 산화시킨다. 이후, 무산소 탈질 단계에서 nitrite와 nitrate는 탈질 미생물에 의해 질소가스로 환원된다. 고농도의 질소를 함유한 폐수의 경우에는 재래식 생물학적 질산화/탈질 공정보다 더욱 경제적이고 처리시간을 단축할 수 있는 기술적 진보가 요구되고 있는데, 그 이유는 질산화 공정의 운영상 효율적인 산소의 전달과 alkalinity의 조절이 필요하기 때문이다. 또한 탈질 미생물은 탄소 영양원을 전자 수용체로 이용하기 때

[†] Corresponding author
E-mail: jjjung@kist.re.kr
Tel: 02-958-5837

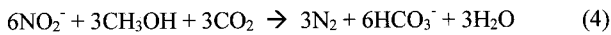
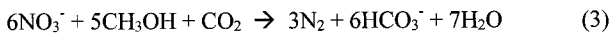
Fax: 02-958-5839

문에 탈질 공정은 운영이 복잡하거나, 외부탄소원 공급을 위한 비용을 필요로 한다. 따라서, 고농도 질소를 함유한 폐수를 경제적으로 처리하기 위해서는 산소와 탄소 영양원의 비용을 획기적으로 줄일 수 있는 공정의 개발이 필요한 실정이다.

특히, 하수처리공정의 슬러지 탈수 공정에서 배출되는 반류수(reject water)의 경우는 발생량은 총 하수유입량의 5% 이내에 불과하지만, 질소농도가 높기 때문에 하수처리 공정의 질소 부하의 25%까지 달하기도 한다. 따라서 질소부하를 적절히 줄일 수 없을 경우, 생물학 처리공정의 용적을 증가시키는 결과를 초래한다. 최근, 이러한 문제를 해결하기 위해 SHARON(Single reactor system for High activity Ammonia Removal Over Nitrite)과 ANAMMOX(ANAerobic AMMONium OXidation) 복합공정이 네덜란드에서 개발되어 반류수를 경제적으로 처리할 수 있는 가능성을 제시하였다.¹⁻⁴⁾ SHARON 공정은 수리학적 체류 시간, pH, 반응온도 등을 적절히 조절하여 반응기내 아질산산화균의 증식을 최소화하였고, 그에 따라 질소산화에 요구되는 산소와 탈질에 필요한 외부탄소원의 요구량을 절감하도록 개발되었다. SHARON공정은 암모늄 산화 미생물에게 호의적인 환경을 제공함으로써 유입수 내의 암모늄을 아질산성 질소로 부분산화시켜 질소산화시에 필요한 산소를 25% 절감할 수 있으며, 탈질시에 필요한 외부탄소원을 기존공정 대비 40% 절감할 수 있고 그 반응식은 아래와 같다.

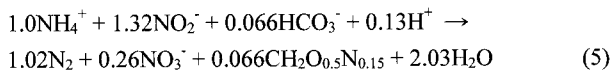


식 (2)의 반응은 기존의 질산화 반응식 (1)에 비해 25% 산소를 절감할 수 있다.



식 (4)의 반응은 기존 탈질반응식 (3)에 비해 40%의 외부탄소원을 절감할 수 있다.

Anammox 반응은 메탄형성반응기의 처리수를 처리하는 탈질 유동층 반응기(nitrifying fluidized bed reactor)의 암모니아가 사라지는 현상에서 발견되었다.⁵⁾ 암모늄의 산화 및 제거 기작은 nitrite의 소비와 질소가스 생산과 연관되어있고, nitrite가 전자 수용체로 활용되면서 암모늄이 산화되고, 동시에 질소가스가 생성되는 혐기성 암모늄 산화반응으로 결론지어졌다. Strous 등에 의해 정립된 anammox 반응의 반응식은 아래와 같다.⁶⁾



지난 10년여 동안 공학적 시스템, 퇴적토, 대량배양 등에

서 anammox 미생물의 존재와 활성이 보고되었다.⁷⁻¹¹⁾ 이들 anammox 미생물들의 발견은 SHARON/ANAMMOX, CANON, OLAND 공정과의 같은 타공정과 결합과 함께 새로운 질소 제거 공정의 지평을 열고 있다.^{4,12,13)} anammox 미생물이 과량 배양되면 ammonium이 풍부한 폐수에 효과적으로 적용될 수 있는데, 반출수, 침출수, 축산폐수 등에 활용되고 있다. 그러나 이러한 공정의 초기 운영(start-up)은 anammox 미생물의 느린 성장속도(세대시간: 11일)와 긴 배양시간에 의해 저해를 받고 있다.⁶⁾

anammox 공정에서 활성이 뛰어난 미생물은 Planctomyceales 목(order)에 속하는 독립영양미생물로서 *Candidatus "Brocadia anammoxidans"*¹⁴⁾와 *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*¹⁵⁾ 등을 예로 들 수 있다. anammox 미생물은 독립배양이 불가능한 특징을 가지고 있으므로, 배양에 기초한 전통적인 방법으로는 그 존재를 확인할 수 없다. 따라서, anammox 미생물의 존재를 확인하기 위해서는 배양과정을 거치지 않는 분자생물학적인 분석 기법을 사용해야 한다.

기초실험으로 수행된 16S rRNA gene 분석 결과에 따르면, anammox UASB에 존재하는 미생물은 α , β , γ , δ -proteobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria와 Chloroflexi로서 혹은 혐기성 독립영양조건에서도 다양한 군집구조를 나타냈었지만, anammox 미생물의 존재는 확인할 수 없었다. 본 연구의 목적은 높은 질소제거 효율을 보이고 있는 anammox UASB 반응기에 나타나는 붉은색 혐기성 입상 슬러지를 채취하여 미생물 군집구조를 분석하는 것이다. 좀 더 세부적으로는, 분자생물학적 기법인 16S rRNA gene 분석과 FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)를 활용하여 anammox 미생물의 존재를 확인하고 우점도를 파악하는 것이다. 아울러, anammox 미생물과 공존하는 미생물의 군집구조를 조사하였다.

2. 실험방법

2.1. 반응기 운전조건

연속 반응기는 유효부피 3.35 L의 UASB(Uplflow Anaerobic Sludge Blanket) 형태이며, 반응기의 온도를 조절하기 위하여 127 cm(가로) × 70 cm(세로) × 151 cm(높이) 크기의 상자에 히터를 장착한 항온시스템을 제작하였고, 발생되는 가스는 반응기 상부의 GSS(Gas Solid Separator)에 의해 분리된 후, 습식 가스 미터(TG05 type, Ritter)를 이용하여 생성가스량을 측정하였다. 배양초기에는 주정폐수를 처리하고 있는 UASB 반응기에서 채취한 혐기성 입상혐기성 슬러지와 anammox 활성이 나타난 국내의 축산폐수 처리장의 부유성 슬러지, 오수처리용 회전원판접촉식 반응기(Rotating Biological Contractor)에서 탈리된 부유성 슬러지를 식중하여 운전하였으며, 침전조 상부로 anammox 미생물이 유실되는 것을 최소화하고, 지속적으로 UASB반응기로 anammox미생물을 공급하기 위해서 탄소섭유판을 UASB 앞단에 설치하여 연속배양을 실시하였다(Fig. 1). 입상혐기성 슬러지는 반응기 유효부피의 약

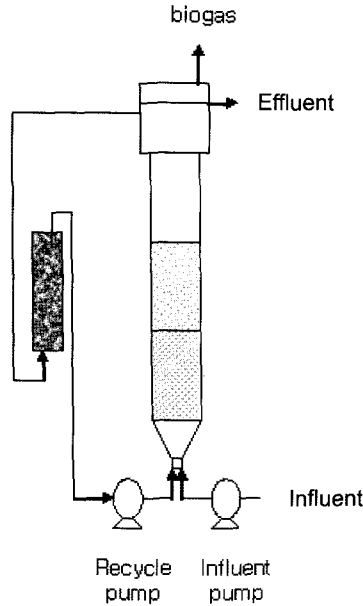


Fig. 1. Schematic diagram of the continuous culture reactor.

Table 1. Composition of synthetic wastewater used in this study

Component	Target compound	Concentration(mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ -N	32-500
NaNO ₂	NO ₂ -N	32-500
NaHCO ₃	Alkalinity	350
KH ₂ PO ₄	PO ₄ -P	6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Mg	12
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Ca	48
Trace element solution I	Trace elements	1 mL/L
Trace element solution II	Trace elements	1 mL/L

60%(v/v)로 채워졌으며, 주입되기 전 수 차례 세척하였다. 반응기 하부에는 직경 7-10 mm의 ceramic ball을 약 90 mL 부피로 채워 식중미생물의 유실을 방지하였고, 미량펌프(Model QSY with RH, Fluidmetering Inc.)를 이용하여 합성폐수를 유입하였다. 합성폐수의 조성은 아래 Table 1과 같다. 미량원소 I용액은 EDTA 5 g/L와 FeSO₄ · 7H₂O 5 g/L로 제조되었고, 미량원소 II용액은 ZnSO₄ · 7H₂O 0.43 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.24 g/L, MnCl₂ · 4H₂O 0.99 g/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.25 g/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.22 g/L, NiCl₂ · 6H₂O 0.19 g/L, Na₂SeO₄ · 10H₂O 0.21 g/L, H₃BO₃ 0.014 g/L로 제조하여 냉장실에서 보관하였다.

초기 유입 질소 부하는 수리학적 체류시간 1일의 조건에서 암모니아성 질소와 아질산성 질소를 각각 32 mg/L 주입하여, 유입질소부하를 0.06 kg N/m³-day로 유지하였고, 연속 배양에 따른 anammox 반응 효율의 변화를 관찰하기 위해 주기적으로 유출수를 분석하였다. anammox 활성에 의해서 유입 암모니아성 질소의 농도가 안정적으로 제거되었을 때, 유입 질소농도를 단계적으로 증가시켜 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도를 각각 300 mg/L의 조건에서 운전하였다. pH는 조절하지 않았으며, 반응기내 온도는 항온조에서 히터를

이용하여 증온조건인 35±1℃의 조건을 유지하였다. 발생가스량은 매일 측정하였고, 유출 가스내 질소가스 함량은 매주 1회 측정하였다. 유입, 유출수의 암모니아성 질소, 아질산성 질소와 질산성 질소의 농도는 매주 3회 분석하였다.

2.2. 16S rRNA gene 클로닝

분자생물학적 기법을 이용하여 반응기내 미생물을 분석하기 위하여, 연속반응기 하부의 시료 채취구를 통하여 반응기내 입상 슬러지를 채취하였다. 운전초기 식종한 혐기성 입상 슬러지는 검은색을 나타내었지만, anammox 활성이 증가됨에 따라 점점 갈색 또는 붉은색으로 변화되었다. 질소제거속도가 0.54 kg N/m³-day로 우수한 anammox 활성을 나타낸 운전 200일 이후의 입상 슬러지를 채취하여 육안으로 살펴본 결과, 일부는 갈색을 나타내었고, 일부의 입상슬러지에서는 표면에 anammox 균으로 추정되는 붉은 색의 미생물균이 부착되었고, 일부는 붉은 색의 입상슬러지로 구성되어 있었다. 본 연구에서는 주로 입상 anammox균으로 추정되는 붉은색 입상 슬러지만을 채취하여 실험하였다. 채취한 샘플은 3차 증류수로 세척하여 부유물을 제거하였다. 채취한 붉은색 입상 슬러지는 250 mg 정도를 Power Soil™ DNA kit(Mo Bio Laboratories Inc., USA)에 투입하여 혼합 genomic DNA를 추출하였다. 혼합 genomic DNA를 주형으로 이용하여 다양한 원핵 미생물의 16S rRNA gene을 증폭하였는데, 이를 위해 전체 원핵 미생물의 16S rRNA gene의 증폭이 가능한 27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492r(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')을 primer로 사용하였다. PCR을 위한 혼합액은 총 20 µL이고, 2 µL의 10X PCR buffer(15 mM MgCl₂), 0.2 µL의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP와 dTTP 각각 2.5 mM으로 구성), 0.2 µL의 27f primer(20 pmol), 0.2 µL의 1492r primer(20 pmol), 1 µL의 DNA template, 0.2 µL의 Taq DNA polymerase(Takara Ltd. Co., Japan), 그리고 16.4 µL의 3차 증류수로 조성되었다.

16S rRNA gene의 증폭은 MyCycler™(BIO-RAD, USA)를 이용하여 시행하였다. PCR 증폭조건은 pre-heating(94℃, 4분), denaturing(94℃, 1분), annealing(55℃, 1분), extension(72℃, 1분), final extension(72℃, 10분)이었고, 30회 증폭을 실시하였다. 증폭산물은 100 mV에서 25분 동안의 전기영동(Mupid-a, Japan)하였고, 단일 band의 DNA Power Gel Extraction Kit(Dyne BioInc., Korea)를 사용하여 정제하였다.

정제된 16S rRNA gene은 T&A cloning vector(Real Biotech Corp., Taiwan)를 사용하여 ligation 하고, HIT™ competent cells(Real Biotech Corp, Taiwan)을 사용하여 형질전환을 시행하였다. 이후, X-gal과 ampicillin이 첨가된 한천배지에 형질전환된 미생물을 도말하여 선택배양하였다. 16S rRNA gene의 삽입이 확인된 미생물을 ampicillin이 첨가된 LB Broth에서 과량배양 후, Plasmid Miniprep Kit(DyneBioInc., Korea)를 이용하여 plasmid를 순수정제하였다. Plasmid에 삽입된 16S rRNA gene의 염기서열은 DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit(GE Health Care, USA)와 MegaBACE 1000 DNA sequencer(GE Health Care, USA)에 의해 분석되었다.

2.3. DNA 정보의 계통분류학적 분석

RDP(Ribosomal Database Project) 사이트의 CHIMERA_CHECK 프로그램을 이용하여 부분적 염기서열(500 bp)중의 chimera를 스크리닝하였다. Chimera가 아닌 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST Network Service에 입력하여 최상의 유사성을 보이는 근유종을 탐색하였다. 근유종 정보를 계통분류학적 분지도 상에서 확인하기 위해서 염기서열을 ClustalX 1.81을 이용하여 정렬하고, 정렬된 염기서열 정보를 MEGA 3.1으로 분석하여 계통분류학적 분지도를 작성하였다. 계통분류학적 분지도 작성 시 neighbor-joining method를 알고리즘으로 이용하였으며, 신뢰성을 확보하기 위해 1000회의 bootstrap을 시행하였다.

2.4. FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)

입상슬러지 시료는 세포고정을 위하여 PBS(phosphate buffered saline) 세척과 4% cold paraformaldehyde 용액 반응을 거쳤다. 세포에 Tissue-Tek OCT compound(Sakura Finetek, USA)를 칩투시켜 하루 밤 동안 급냉 후(-38℃), 샘플을 -20℃에서 미세절단기(Reichert-Jung Cryocut 1500, Leica)를 사용하여 10-20 μm의 두께로 절단하였다. 이후, 절단된 샘플을 젤라틴(0.1% gelatin과 0.01% chromium potassium sulfate)으로 코팅시킨 에폭시 수지 코팅 슬라이드에 올려 약 20분 동안 자연 건조시켰다. 그 후 각각 2분간 50, 80, 96% 에탄올에 2번씩 담구어 탈수시킨 후 hybridization을 수행하였다. hybridization은 46℃, 3시간 동안 hybridization buffer(0.9M NaCl, 20 mM Tris(pH 7.2), 0.01% sodium dodecyl sulfate(SDS))에 슬라이드를 담아 배양하였다. 본 실험에 사용된 탐침자는 전체 박테리아 식별을 위한 fluorescein labeled EUB338 I, II, III mix와 anammox 미생물 식별을 위한 HEX labeled AMX368이었다.

탐침자의 최종농도는 5 ng/μL이었으며, formamide의 농도는 탐침자에 따라 조정하였다. 슬라이드는 세척액(4.5 M NaCl, 20 mM Tris HCl(pH 7.2), 0.01% sodium dodecyl sulfate(SDS))에 담구어 48℃, 20분 동안 정지한 후 탈이온수로 세정하여 자연건조 시켰다. 현미경 관찰은 위상차 Neofluar 렌즈와 axiocam이 장착된 형광현미경(Axioskop 2plus, Zeiss, Germany)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 질소제거효율

운전초기와 유입 암모니아성 및 아질산성 질소 농도를 각각 30에서 50 mg/L, 100에서 200 mg/L로 증가시켰을 때를 제외하고 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 제거율은 100%에 가까웠으며, 반응이 안정화된 이후부터는 83.3-93.5%의 총 질소 제거율을 나타내었다. 유입질소부하가 0.6 kg N/m³-d이었을 때, 평균 질소전환율은 0.54 kg N/m³-d로 나타났다.

Fig. 2(a)는 R3 반응기의 연속배양에 따른 유입, 유출수의 암모니아성 질소농도의 변화를 나타낸 것으로서, 유입수의 암

모니아성 질소의 농도는 32 mg/L에서 단계적으로 50, 100, 200, 300 mg/L까지 증가시켰다. 운전 17일까지는 유입 아질산성 질소의 농도를 32 mg/L로 주입하였으나, 유출수내 아질산성 질소의 제거율이 낮게 나타난 운전 18일부터 49일까지는 아질산성 질소의 농도를 20 mg/L로 낮추어서 주입하여 배양기의 안정화를 시도하였다.

암모니아성 질소의 경우 운전 38일부터 비교적 안정적으로 제거되기 시작하였고, 운전 100일째 암모니아성 질소의 농도를 50 mg/L로 증가시켰을 때, 제거율이 급격히 저하되었다가 서서히 회복되었다. 또한 운전 86일에 암모니아성 질소의 농도를 100 mg/L에서 200 mg/L로 증가시켰을 때에도 일시적으로 60 mg/L까지 암모니아성 질소가 증가하기도 하였지만

Table 2. Oligonucleotide probe used in microbial analysis by FISH

Probe	Specificity	Sequence(5'-3')	Target site	Formamide conc.(%)
EUB338 I		GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	10-50
EUB338 II	Eubacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	338-355	10-50
EUB338 III		GCTGCCACCCGTAGGTGT	338-355	10-50
AMX368	Anammox Bacteria	CCTTTCGGGCATTGCGAA	368-385	15

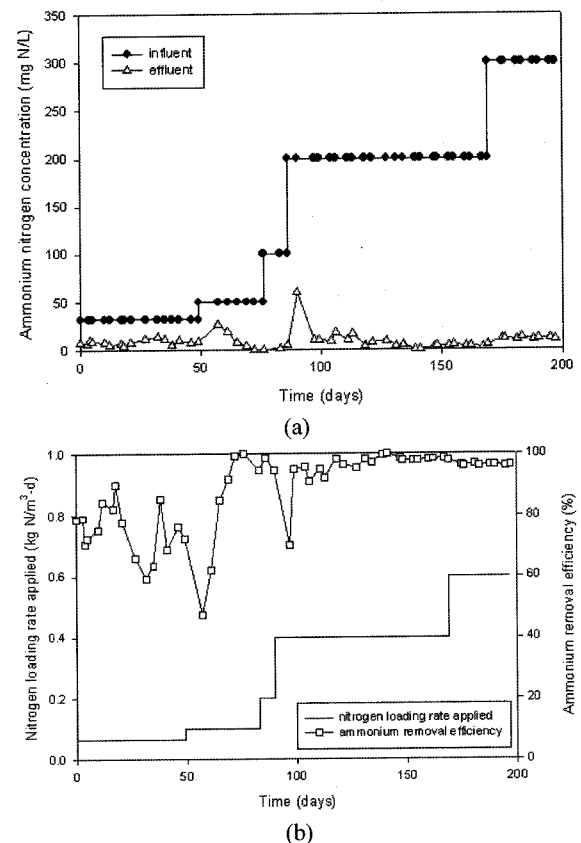


Fig. 2. Operational efficiency in the continuous culture reactor: (a) variation of ammonia nitrogen concentration in the R3 reactor (b) variation of ammonium removal efficiency with nitrogen loading rate applied.

급속하게 회복되었고, 운전 100일 이후에는 안정적인 질소 제거율을 지속적으로 나타내었다. 운전 169일에 유입농도를 200에서 300 mg/L까지 상승시켰을 때에도 안정적인 암모니아성 질소농도를 지속적으로 나타내어 우수한 연속배양특성을 나타내었다.

아질산성 농도의 경우에는, 운전 20일 이후부터 안정적으로 제거되기 시작하다가 운전 69일부터 유출수내 아질산성 질소가 거의 검출되지 않은 것으로 나타났다. 이는 운전 70일부터 anammox 미생물의 활성도가 충분하게 확보되어 anammox 반응을 안정적으로 일으킬 수 있었던 것으로 판단된다. 운전 70일 이후에는 유입질소의 부하변동과 농도변경에 관계없이 거의 100% 아질산성 질소제거율을 나타내었다. anammox공정의 반응부산물인 질산성 질소의 경우에는 반응기에서 제거된 암모니아성 질소에 따라 유출수내 질산성 질소의 농도는 유입 암모니아성 질소의 농도가 200 mg/L이었을 때 유출되는 질산성 질소의 농도는 20-50 mg/L의 변동폭을 나타내었고, 유입 암모니아성 질소의 농도가 300 mg/L이었을 때에는 유출 질산성 질소의 농도가 70-80 mg/L로 나타났다. 이는 유입 암모니아성 질소의 농도가 200과 300 mg/L일 때 이론적으로 생성되는 질산성 질소의 값인 52와 78 mg/L에 근접한 농도로서 본 반응기의 질소전환반응도 anammox 반응임을 알 수 있었다.

3.2. BLAST 및 계통분류학적 분지도를 통한 유사종 파악

사전 연구를 통하여 본 연구팀이 운영중인 anammox UASB 반응기의 입상 슬러지에서 확인된 미생물은 α-proteobacteria, β-proteobacteria, δ-proteobacteria, γ-proteobacteria의 proteobacteria를 비롯하여 Planctomycetes, Acidobacteria와 Chloroflexi로 군집구조가 다양하였다.

본 연구에서는 27f forward primer를 포함하고 있는 500 bp의 부분적 염기서열 총 89개 sequence중 CHIMERA_CHECK을 통해 non-chimera 염기서열 51개를 선별하고 염기서열이 중복되는 clone을 제외한 결과, 최종적인 분석대상 염기서열은 모두 27개로 파악되었다. BLAST를 통해 최상의 유사도를 가지는 미생물을 검색한 결과 27개의 clone은 anammox bacteria, β-proteobacteria 3가지, Chlorobi 2가지, Acidobacteria, Chloroflexi의 총 8가지 미생물로 분류되었다(Table 3). 각 균유종에 대하여 최고의 유사도를 보이는 8개의 clone들(GR 3, GR 15, GR 24, GR 35, GR 45, GR 55, GR 77, GR 88)과 균유종으로 예상되는 염기서열들을 NCBI에서 발췌 및 참조하여 계통분류학적 분지도를 작성하였다(Fig. 3). 각 분지에 표시된 숫자는 1000회 bootstrap resampling에 의해 묶여진 백분율을 나타내는 것으로 5개의 phylum 집단은 85% 이상의 견고성을 나타냈다. Table 3을 기반으로 각 phylum 집단의 다양성과 우점도 정보를 추출할 수 있는데, phylum에 해당하는 균유종의 개수로 다양성을 판단하고, 총 51개 clone 중 해당 phylum에 속한 clone의 비율로 우점도를 계산하였다(Fig. 4). BLAST 및 계통분류학적 분지도 분석결과 anammox 반응기 환경이 혐기성 독립영양 조건임에도 불구하고 다양한 미생물이 존재하는 것을 나타내고 있다.

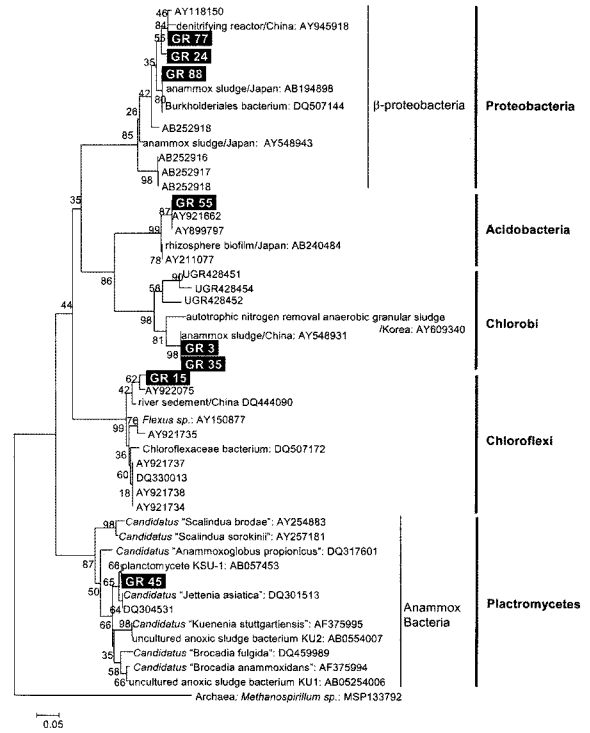


Fig. 3. Phylogenetic tree of red granule in the continuous culture reactor.

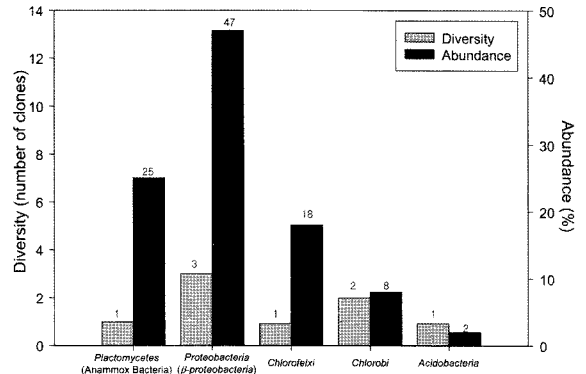


Fig. 4. Comparison of the diversity and the abundance of clones in this study.

Table 3의 No 1-12에 해당하는 clone들은 오직 일본의 anammox 반응기에서 유래된 AB057453(Planctomycete KSU-1)과 유사한 것으로 밝혀졌고, 유사도가 98-100%로 상당히 높았다. Anammox 미생물 그룹은 25%(13/51)의 높은 우점도를 나타내었으나, 다양한 anammox 미생물이 발견되지는 않았다. 현재까지 밝혀진 anammox 미생물은 *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”, *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”, *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”, *Candidatus* “*Scalindua brodae*”, *Candidatus* “*Scalindua sorokinii*”, *Candidatus* “*Brocadia fulgida*”, *Candidatus* “*Jettenia asiatica*”와 *Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*” 등으로 다양하지만 본 연구실의 UASB 반응기의 anammox 미생물 군집구조는 단일한 특성을 나타내었다. 그리고 한국 고유의 슬러지로부터 유래한 특유의 anammox 미생물 clone을 발견하지 못하였다.

Table 3. Affiliations of the 16S rRNA gene clones analyzed in this study

No	Clone	% Similarity	Accession No	Organism	Source	Phylum ²⁾
1	GR 72	98				
2	GR 2	98				
3	GR 10	98				
4	GR 30	98				
5	GR 5	98				
6	GR 33	99	AB057453	Uncultured	Anammox Biofilm(Japan)	Planctomycetes
7	GR 1	99	(Planctomycete KSU-1)	Planctomycetes		(Anammox Bacteria)
8	GR 67	99				
9	GR 9	99				
10	GR 28	99				
11	GR 12 (2) ¹⁾	100				
12	GR 45	100				
13	GR 69	95				
14	GR 23	98				
15	GR 4 (16)	98	AB194898	Uncultured Bacteria	Anammox Sludge(Japan)	
16	GR 70	99				Proteobacteria
17	GR 88	100				(β -proteobacteria)
18	GR 36	98				
19	GR 77 (2)	99	AY945875	Uncultured Bacteria	Denitrifying Bioreactor(China)	
20	GR 24	97	DQ507144	Burkholderiales	Anammox Reactor(Russia)	
21	GR 76	94				
22	GR 18 (6)	95				
23	GR 73	96	DQ444090	Uncultured Bacteria	River Sediment(China)	Chloroflexi
24	GR 15	97				
25	GR 3 (2)	99	AY548931	Uncultured Bacteria	Anammox Sludge(China)	
26	GR 35 (2)	98	AY609340	Uncultured Bacteria	Autotrophic Nitrogen Removal Granular Sludge(Korea)	Chlorobi
27	GR 55	95	AB240484	Uncultured Bacteria	Rhizosphere Biofilm (Japan)	Acidobacteria

¹⁾ () means the number of identical clones

²⁾ Phylogenetic information was determined by the phylogenetic tree(Fig. 3)

No. 13-17의 Clone들은 β -proteobacteria phylum에 속하는 것으로 판단된다. β -proteobacteria 집단은 3가지 근유종이 파악되어 가장 다양한 균집을 보이고, 총 24개의 clone(47%) 이 발견되어 가장 큰 우점도를 보였다. 이러한 다양성과 우점도를 기반으로 판단해 볼 때, β -proteobacteria가 anammox 반응과 일부 관여하고 있는 것으로 사료된다. 또한, β -proteobacteria가 본 연구의 anammox UASB 반응기에서만 발견되는 것이 아니라, 근유종으로 파악된 AB194898(uncultured bacteria), DQ507144(Burkholderiales)이 해외에서 운영된 anammox 반응기에서도 발견되고 있는 것은 β -proteobacteria가 anammox 반응에 크게 관여할 가능성을 높혀주고 있다.

기타 근유종으로 파악된 미생물은 Chloroflexi, Chlorobi와 Acidobacteria phylum에 속해 있는데, Chloroflexi(green non-sulfur bacteria)는 anammox균의 입상화와 관련이 있는 것으

로 판단된다. 입상화는 화학적, 열역학적, 미생물 특성에 의해 이루어지는 것으로 보고되고 있는데, 사상(filamentous)균인 Chloroflexi는 미생물의 플록화 및 입상화를 위한 미생물적 특성을 제공하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 사상 Chloroflexi는 thermophilic 폐수처리를 위한 입상화 슬러지에 풍부하게 존재하고, 플럭구조의 지탱과 팽화(bulking)에 주요한 역할을 한다. Chlorobi(green sulfur bacteria) 근유종 AY548931과 AY609340이 혐기성 질소제거 공정에서 발견되고 있으므로, 그들이 혐기성조건하에서의 질소제거에 기여하는 역할에 대한 규명도 필요할 것으로 판단된다.

3.4. AMX368 FISH 탐침자를 활용한 in-silico와 in-situ hybridization 실험

이미 AMX156, AMX820, AMX223, BAN71, BAN108, BAN222, KST31, KST77, KST193 등의 여러 FISH probe가 개발

된 바 있지만, 전체 anammox 미생물을 탐침하는 탐침자로는 AMX368이 유일하다.¹⁹⁾ AMX368 탐침자가 anammox 미생물을 전체적으로 탐침할 수 있는지 확인하기 위해서 in silico FISH test를 수행하였다. 이를 위해 문헌조사를 통해 파악한 모든 anammox 미생물의 16S rRNA gene 염기서열 정

보와 Probe Match(Ribosomal Database Project)에서 AMX368로 탐침되는 미생물 정보를 대조하였다. 총 90,211개의 염기서열을 참조하여 Probe Match를 시행한 결과 AMX368은 anammox 외의 미생물을 탐침하지는 않았으나, 모든 anammox 미생물을 탐침하지는 못하였다. AMX368에 의해 탐침되는 미생물은 Type I으로 표시하였고, AMX368에 의해 탐침되지 않는 anammox 미생물은 Type II, III으로 분류하였다(Table 4). Planctomycete KSU-1, *Candidatus* "Jettenia asiatica", Uncultured Planctomycetales bacterium clone P14, *Candidatus* "Anammoxoglobus propionicus"를 AMX368가 탐침하지 못하는 이유는 탐침 대상인 *E. coli* rRNA gene base number 368-385 범위 중 하나의 염기서열에 염기서열교체(substitution)가 존재하기 때문이다. 염기서열 교체는 두 가지 양상을 보였는데 그 결과를 Table 5에 표시하였다.

E. coli rRNA gene base numbering 368-385 사이의 염기서열 유형으로 파악된 Type I, II, III를 기반으로 51개의 clone에 대하여 in-silico hybridization을 시행한 결과 11개의 clone은 Type II에 해당하는 anammox 미생물이었고, 1개의 clone만이 AMX368과 정확히 일치하는 것을 보였다(Table 6). Table 6의 결과에 따르면, 혐기성 질소산화 UASB 반응기에 우점하는 anammox 미생물은 Planctomycete KSU-1과 같은 Type II이고, Type I의 anammox 미생물의 우점도는 낮은 것으로 파악된다. 따라서, anammox 미생물들을 효과적으로 탐침하기 위해서는 Type I과 II anammox 미생물을 동시에 탐침할 수 있도록 개선된 AMX368 FISH probe를 사용하여야 한다. 또한 잠재적으로 존재할 수 있는 Type III의 anammox 탐침을 위하여 3가지 degeneracy가 고려될 수 있도록 AMX368을 개선하는 것 또한 필요하다.

Anammox 반응기내의 입상슬러지는 운전초기 검은 색을 나타내었으나, anammox활성이 증가할수록 붉은 색을 나타내어 연속운전 200일 이후에는 붉은 색 입상슬러지가 많이 관찰되었고, 혐기성 입상슬러지 표면에 붙어있기도 하였다(Fig. 5).

Fig. 6은 EUB338 I, II, III와 AMX368을 이용하여 붉은 색 입상 슬러지에서 anammox 미생물을 탐침을 수행한 결과이다. Fig. 6(a)에 나타난 바와 같이 anammox 미생물은 입상슬러지 내부와 주변부 붉은색 생물막에 우점하는 것을 알 수 있었다. Fig. 6(b)는 anammox 미생물이 우점하는 입상슬러지 내부를 두 배 확대한 그림이다. 붉은색 막은 anammox 미생

Table 4. Type of AMX368 region searched from NCBI database

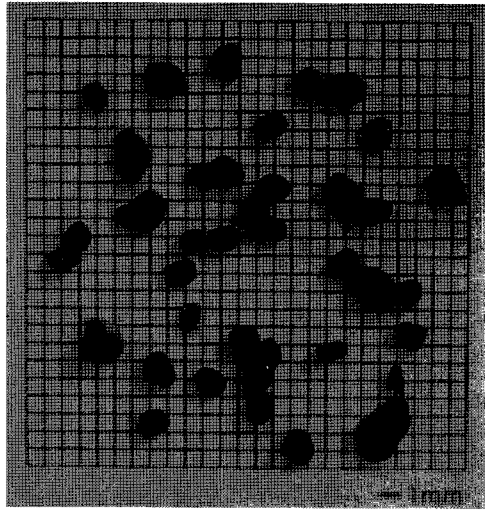
No	Accession NO	Definition	Type
1	AJ131819	anaerobic ammonium-oxidizing Planctomycete	I
2	AJ519649	uncultured bacterium; Sh765B-TzT/AG-34	
3	AJ250882	anaerobic ammonium-oxidizing Planctomycete	
4	AF202655	anoxic biofilm clone Pla1-47	
5	AF202656	anoxic biofilm clone Pla1-48	
6	AF202657	anoxic biofilm clone Pla1-44	
7	AF202658	anoxic biofilm clone Pla2-10	
8	AF202659	anoxic biofilm clone Pla1-14	
9	AF202660	anoxic biofilm clone Pla1-1	
10	AF202661	anoxic biofilm clone Pla2-19	
11	AF202662	anoxic biofilm clone Pla2-22	
12	AF202663	anoxic biofilm clone Pla2-48	
13	AF375994	<i>Candidatus</i> "Brocadia anammoxidans"	
14	AF375995	<i>Candidatus</i> "Kuenenia stuttgartiensis"	
15	AY254882	<i>Candidatus</i> "Scalindua wagneri"	
16	AY254883	<i>Candidatus</i> "Scalindua brodae"	
17	AY257181	<i>Candidatus</i> "Scalindua sorokinii"	
18	AY769988	Uncultured Planctomycete; 3-8b6	
19	AB015552	unidentified bacterium; BD3-11	
20	AB05254006	uncultured anoxic sludge bacterium KU1	
21	AB0554007	uncultured anoxic sludge bacterium KU2	
22	AB176696	uncultured Planctomycetales bacterium	
23	AB177171	uncultured bacterium; ODP1230B20.10	
24	DQ459989	<i>Candidatus</i> "Brocadia fulgida"	
25	AB057453	Planctomycete KSU-1	
26	DQ301513	<i>Candidatus</i> "Jettenia asiatica"	
27	DQ304531	Uncultured Planctomycetales bacterium clone P14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	
28	DQ317601	<i>Candidatus</i> "Anammoxoglobus propionicus"	

Table 5. Nucleotide information in AMX368 region

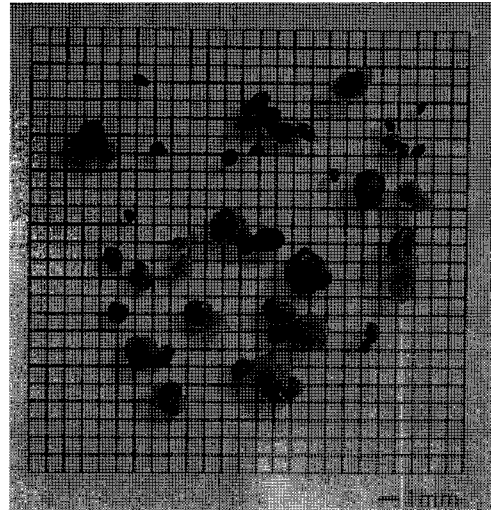
Type	Sequence Information																Probe	
Type I	T	T	C	G	C	A	A	T	G	C	C	G	A	A	A	G	G	AMX368
Type II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-
Type III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-

Table 6. In silico FISH test result of clones obtained in this study

Type I	GR 10
Type II	GR 1, GR 2, GR 5, GR 9, GR 12, GR 28, GR 30, GR 33, GR 45, GR 67, GR 72
Type III	not detected

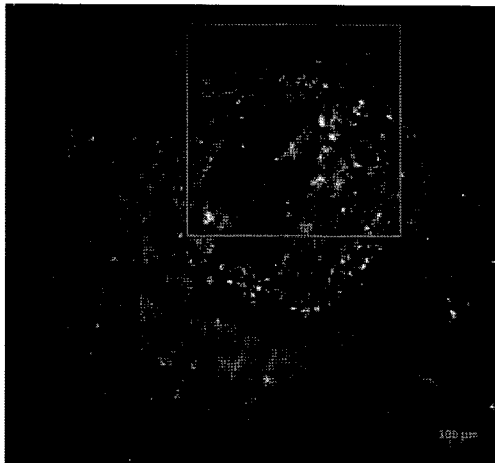


(a) Seed granule

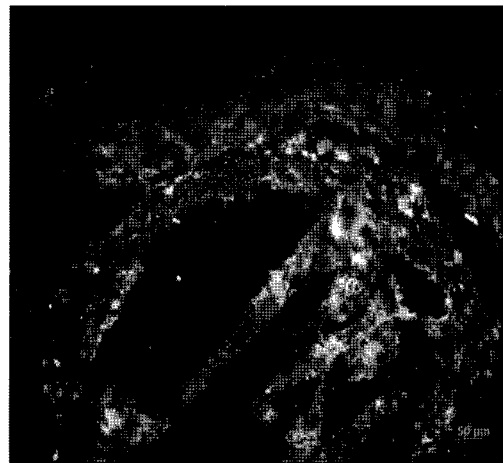


(b) Granules after 200 days of continuous operation

Fig. 5. Photographs of seed granule and changed granules after 200 days of continuous operation.



(a)



(b)

Fig. 6. Fluorescence in situ hybridization of granules in continuous culture reactor red granule. Anaerobic ammonia oxidizer is visualized in yellow-red because of the overlap of labels. (a) $\times 50$, (b) $\times 100$

물의 우점에 의한 것으로 추정되는데, van de Graaf 등에 의하면 anammox 미생물 내의 cytochrome의 함량증가에 의한 것이라고 보고된 바 있다.²⁰⁾ 따라서 붉은색 생물막 내의 anammox 미생물이 우점현상을 Fig. 7과 같이 확대관찰을 통하여 확인하였다. FISH 결과는 degeneracy를 고려하여 개선된 AMX368 FISH probe를 사용하였을 경우 더욱 정교해질 수 있을 것으로 판단된다.

5. 결론

본 연구에서는 83.3-93.5%의 총질소 제거율을 보이는 anammox UASB 반응기에 나타나는 붉은색 혐기성 입상 슬러지의 미생물 군집구조를 분자생물학적 기법인 16S rRNA gene 분석과 FISH를 활용하여 분석하였다. 16S rRNA gene 클로닝을 통해 획득한 염기서열 정보를 활용하여 BLAST를 시행하고 계통분류학적 분지도를 작성한 결과 반응기 내의 미생

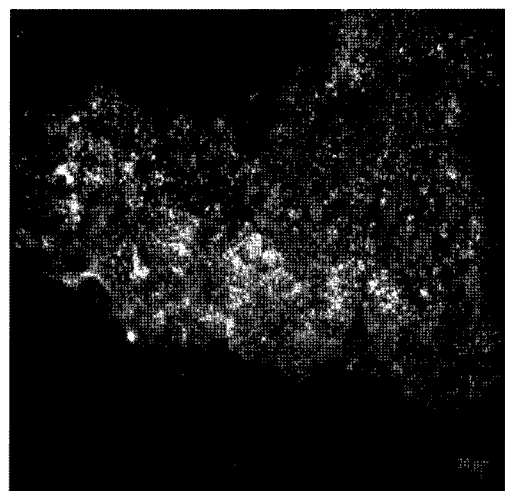


Fig. 7. Fluorescence in situ hybridization of peripheral region of red biofilm. Anaerobic ammonia oxidizer is visualized in yellow-red because of the overlap of labels. (200 \times)

물 군집구조가 다양함을 확인하였다. 붉은색 혐기성 입상슬러지에 서식하는 박테리아는 anammox bacteria, β -proteobacteria 3가지, Chlorobi 2가지, Acidobacteria, Chloroflexi로 분석 되었으며, β -proteobacteria의 우점도와 다양성이 가장 큰 것으로 나타났다. AMX368은 전체 anammox 미생물을 탐침하기 위해 개발되었는데, *E. coli* rRNA gene base number 368-385 범위에서의 교체현상에 의해 개선이 필요한 것으로 확인되었다. In-situ EUB338 I, II, III와 AMX368 FISH probe를 사용하여 anammox 미생물의 분포형태를 확인한 결과 anammox 미생물이 붉은색 혐기성 입상 슬러지에 우점하고 있었으며, 붉은 생물막에 특히 집중적으로 존재하였다.

사 사

이 논문은 환경부에서 지원한 2006년도 차세대 핵심환경 기술개발사업의 일환으로 수행한 논문으로서 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J., "The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water," *Water Sci. Technol.*, **37**, 135~142(1998).
- Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., Hellinga, C., and van Kempen, R., "Full scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering," *Water Sci. Technol.*, **43**, 127~134(2001).
- Jetten, M. S. M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. G., and Strous, M., "Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation('anammox') process," *Curr. Opin. Biotech.*, **12**, 283~288(2001).
- van Dongen, U., Jetten, M. S., and van Loosdrecht, M. C., "The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater," *Water Sci. Technol.*, **44**, 153~160(2001).
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G., "Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**, 177~183(1995).
- Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M., "The sequencing batch reactor as a powerful tool to study very slowly growing micro-organisms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 589~596(1998).
- van de Graaf, A. A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M. S., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G., "Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1246~1251(1995).
- Egli, K., Fanger, U., Pedro, J. J. A., Siegrist, H., van der Meer, J. R., and Zehnder, A. J. B., "Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate," *Arch. Microbiol.*, **175**, 198~207(2001).
- Strous, M., van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M., "Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation(anammox) process in different reactor configurations," *Water Res.*, **31**, 1955~1962(1997).
- Thamdrup, B. and Dalsgaard, T., "Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1312~1318(2002).
- Toh, S. K., Webb, R. I., and Ashbolt, N. J., "Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters," *Microb. Ecol.*, **43**, 154~167(2002).
- Jetten, M. S. M., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op den Camp, H. J. M., Hulth, S., Nielsen, L. P., Abma, W., Third, K., Engström, P., Kuenen, J. G., Jørgensen, B. B., Canfield, D. E., Sinninghe Damsté, J. S., Revsbech, N. P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M., and Strous, M., "Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 107~114(2003).
- Kual, L. and Verstracte, W., "Ammonium removal by the oxygen limited autotrophic nitrification-denitrification system," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4500~4506(1998).
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R. I., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M., "Missing lithotroph identified as new planctomycete," *Nature*, **400**, 446~449(1999).
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J. W., Schleifer, K. H., and Wagner, M., "Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation," *Syst. Appl. Microbiol.*, **23**, 93~106(2000).
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., and Harada, H., "Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in methophilic and thermophilic sludge granules," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1280~1288(1999).

17. Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., and Harada, H., "Syntrophothermus lipocalidus gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 771~779(2000).
18. Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., and Harada, H., "In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5740~5749(2001).
19. Schmid, M. C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Kartal, B., van Niftrik, L., Schmidt, I., Cirpus, I., Kuenen, J. G., Wagner, M., Sinninghe Damste, J. S., Kuypers, M., Revsbech, N. P., Mendez, R., Jetten, M. S., and Strous, M., "Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing(anammox) bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1677~1684(2005).
20. Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., and Kuenen, J. G. "Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor," *Microbiol.*, **142**, 2187~2196(1996).