

Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals abundance and spatial organization of methanogens in thermophilic sludge granules

이유진, 김효섭, 안영희*, 박성훈

부산 대학교 화학공학과, 환경기술·산업개발연구소*

Tel. (051) 510-2395, Fax. (051) 512-8563

Abstract

In situ hybridization with fluorescent oligonucleotides(FISH) was used to detect and localize microorganisms in the granules of lab-scale upflow anaerobic sludge blanket(UASB) reactors. An UASB reactor was seeded with mesophilically-grown(35 °C) granular sludge, and thermophilically(55 °C) operated by feeding with a synthetic wastewater. Sections of the granules were hybridized with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for *Eubacteria*, *Archaeobacteria*, and specific phylogenetic groups of methanogens. FISH clearly showed the layered structure of thermophilic granules, which was consisted of outer bacterial cells and inner archaeal cells. *Methanoseata*-, *Methanosarcina*-like cells were also found to be localized inside the granules. These results demonstrated FISH was useful in studying the spatial organizations of methanogens and *in situ* morphologies and metabolic functions in thermophilic granular sludges.

Introduction

기존 미생물 군집 분포 조사방법은 현미경으로 관찰하거나 미생물을 배양하여 각 미생물들을 동정하는 것에 의존하고 있다. 환경요인에 따라 미생물의 형태가 바뀐다거나 비슷한 형태를 갖는 미생물의 경우 현미경으로 식별이 어렵고 대부분의 환경 미생물이 실험실 조건에서 배양이 잘되지 않는다는 것을 고려하면, 이 방법들은 환경시료의 미생물에 대한 정확한 조사가 어렵다는 단점이 있다. 특히 환경 미생물의 배양성 문제는 심각한데, 일례로 활성 슬러지나 혐기성 소화조 내의 미생물 군집에는 약 10 % 미만의 미생물만이 배양이 가능하다고 알려져 있다(3). 그러나 최근 rRNA 유전자를 이용하는 분자생물학적 분류기술이 개발됨에 따라, rRNA를 대상으로 hybridization기법을 적용하여 토양과 같은 환경시료에 존재하는 미생물군집들을 분석하고 정량화하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 국내에서 발표된 자료를 종합해 볼 때 자연계 내에 미생물 군집의 분류 및 동정의 한 방법으로서 rRNA hybridization을 적용한 경우는 많이 있지만 폐수처리공정에 DNA hybridization 방법을 적용한 사례는 미약하다. 본 연구에서 고부하 혐기성 유동층 반응기 운전 중 미생물 군집 분포의 변화를 confocal laser scanning microscopy (CLSM)를 이용한 *in situ* hybridization기법으로 조사하였다. 이 결과는 미생물 군집의 변화가 반응기 처리 능력에 미

치는 영향을 정량적으로 파악하고 반응조의 동적 특성변화에 따른 적절한 대응전략을 찾아 궁극적으로 반응기의 처리효율을 증진시키는데 유용하게 이용될 것이다.

Materials and Methods

In situ hybridization

시료의 고정과 탈수, 박편화는 Sekiguchi (2)가 제시한 과정을 따랐다. 본 연구에서 사용한 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe와 probe에 결합시킨 dye 종류를 Table 1에 나타내었다. *In situ* hybridization을 위해 probe들을 Cy5와 rhodamine으로 label하였다. 미생물 과립의 박편화가 끝난 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.2], 0.01 % sodium dodecyl sulfate)에 1시간 동안 prehybridization시켰다. Hybridization을 위해 probe(5 ng of each labeled probe/ hybridization buffer μ l)를 넣고 46 °C에서 16시간 방치하였다. 이 때 probe의 침투성을 향상시키기 위해 각 probe에 해당하는 최적농도의 formamide(ARC915, 35 %; EUB338, 5 %; MX825, 20 %; MS1414, 35 %)를 첨가하였다. 반응이 끝난 후 30분간 3회, 남아 있는 probe들을 동일한 buffer로 씻어 내었다. Double staining의 경우 formamide 농도가 높은 probe로 먼저 label한 후 연속적으로 다음 hybridization을 행하였다. Hybridization이 끝난 과립 박편은 CLSM으로 관찰하였다.

Table 1. *In situ* hybridization에 사용한 probe와 형광 dye

Probe name	Sequence (5'~3')	Target bacteria	5' modification
Eub338	GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	<i>Bacteria</i>	Rhodamine
Arch915	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	<i>Archaea bacteria</i>	Cy5
Msae825	TCG-CAC-CGT-GGC-CGA-CAC-CTA-GC	<i>Methanoseata</i>	Rhodamine
Msar1414	CTC-ACC-CAT-ACC-TCA-CTC-GGG	<i>Methanosarcina</i>	Rhodamine

Confocal laser scanning microscopy

CLSM은 LSM 510(Zeiss, Germany)을 이용하였고, 시료는 laser intensity 86 %, pinhole setting 190 (1.9 Airy units), detector gain 883의 조건에서 측정하였다. Rhodamine-과 Cy5-labeled probe는 각각 568 nm과 647 nm에서 여기시켜 625 nm과 680 nm에서 관찰하였다.

Results and Discussion

고온 UASB 반응기는 중온 반응기에서 자란 미생물 과립으로 접종하였다. 그 결과 운전 초기의 미생물 과립은 급격한 온도 변화로 인해 과립형태가 많이 손상되어 상당수의 세공과 균열이 관찰되었다(data not shown). 운전기간이 경과하면서 손상된 미생물 과립은 점차 회복하였고 정상상태에 도달(운전 180일 후)하였을 때는 완전히 회복되어 대다수 시료의 형광 광도가 높았으며 미생물의 밀도도 증가되었다(data not shown). Fig. 1(A)은 정상상태 고온

UASB 반응기 미생물 과립에 존재하는 *Archaea bacteria*와 *Eubacteria*를 CLSM으로 관찰한 것이다. *Archaea*와 *Bacteria*를 각 Cy5와 rhodamine-labeled probe를 사용하여 연속적으로 hybridization하였다. Granule section에서 layered structure(층 구조)를 확인할 수 있었는데 외각층에는 *Eubacteria* (green)가 10 μm 의 두께로 미생물 과립 반경의 약 20 %내외로 존재하였고 내부에는 혐기성 미생물인 *Archaeabacteria* (red)가 대다수 관찰되었다. Fig. 1(B)은 미생물 과립의 외각층만을 60배 확대한 것으로 과립내의 층 구조를 확실히 보여주었고, 간균이나 사상균과 같은 다양한 미생물 형태도 관찰되었다.

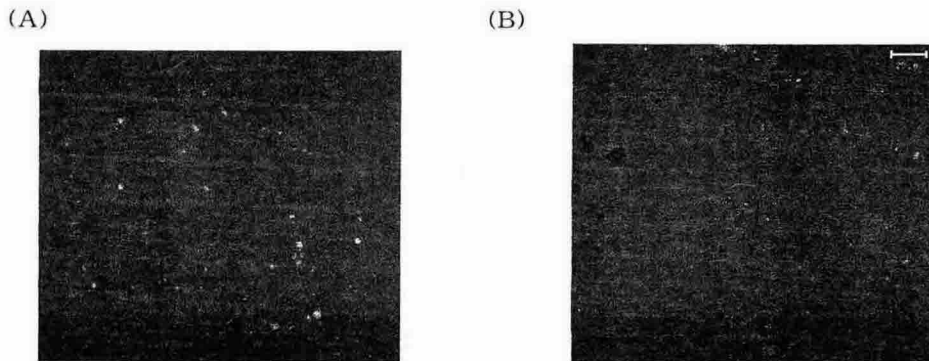


Fig. 1. *In situ* hybridization of thermophilic granule section viewed by CLSM. (A) Simultaneous hybridization with Cy5-labeled bacterial-domain probe (EUB338: green) and rhodamine-labeled archaeal-domain probe (ARC915: red). (B) Higher magnification to show the outer layer of the section.

Fig. 2는 특정 미생물 *Methanoseata*, *Methanosarcina*와 *Eubacteria*를 각 rhodamine과 Cy5로 label하여 관찰하였다. 미생물 과립의 안쪽에서 methanogen은 대부분 관찰되었다. 이는 methanogen이 혐기성 미생물이므로 외부와 차단시켜주는 외각층의 *Bacteria* 안쪽에 위치하고 있는 것이라 판단된다. Fig. 2의 (A)와 (B)는 *Methanoseata*, *Methanosarcina*와 *Eubacteria*의 FISH 사진으로 methanogen은 red로 *Eubacteria*는 green으로 나타났다. 고온 과립 슬러지내 *Methanoseata*는 MS825 probe를, *Methanosarcina*는 MX1414 probe를 이용하여 hybridization한 후 관찰한 결과 *Methanoseata*의 형광 광도가 *Methanosarcina*에 비해 훨씬 우세하였다. 그리고 과립 슬러지 내부에 많은 수의 *Methanoseata* microcolony를 형성하고 있었다. Fig. 2의 (C)와 (D)는 (A)와 (B)의 내부를 2배 확대한 것으로 수많은 microcolony들을 관찰되었다. *Methanosarcina*는 *Methanoseata*에 비해 훨씬 적은 수가 존재하였으나 드물게 microcolony를 이루고 있었고 몇몇 형광 microcolony들을 확대하여 관찰할 경우 형태상으로 *Methanosarcina*와 비슷한 모양을 이루고 있었다 (data not shown).

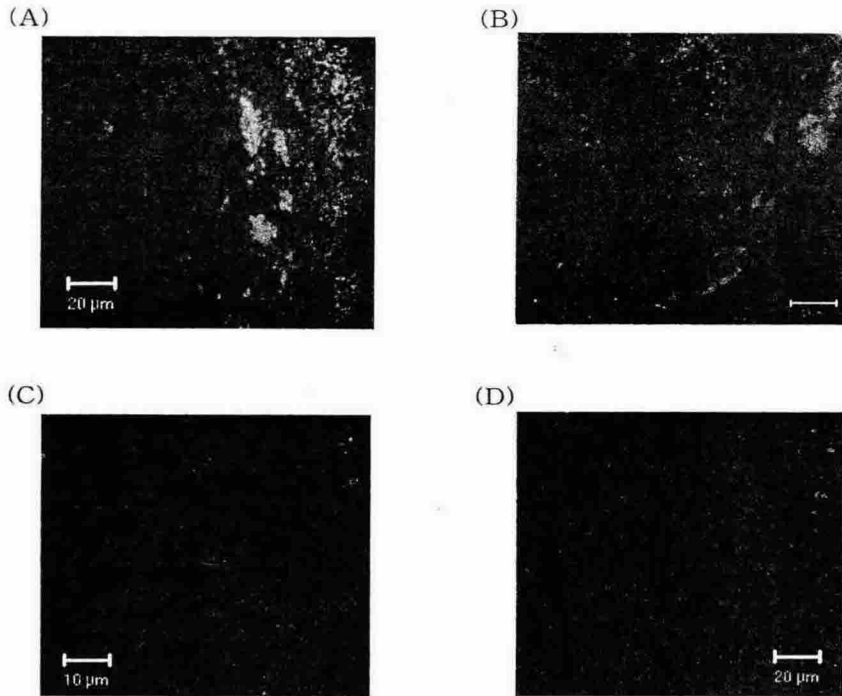


Fig. 2. *In situ* hybridization of thermophilic granule section viewed by CLSM. (A) Simultaneous hybridization with Cy-5-labeled bacterial probe(ARC915: green) and rhodamine-labeled *Methanoseata* probe(MX825: red). (B) Simultaneous hybridization with MS1414 probe for the genus *Methanosarcina* (red) and bacterial probe (green). (C to D) Higher magnification of panel A and B to show the inner layer of the section.

이번 연구에서 증온 UASB 반응기 정상상태의 미생물 과립을 접종한 고온 UASB 반응기를 운전하면서 granule내의 특정 미생물의 분포도를 CLSM을 이용한 *in situ* hybridization의 분자생물학적 기법을 통해 조사하였다. 또한 *in situ* hybridization시 probe의 침투성을 증가시키기 위하여 여러 문헌 조사를 토대로 적합한 실험 방법을 확립하였다. 이런 연구를 통해 granular sludge 내 특정 미생물들의 구조와 기능에 대한 다양한 정보를 제공해 줄 것으로 기대된다.

Reference

1. Yuksenlen, M. A. (1997), Environ. Sci. Health, 32(7), 2069-2087.
2. Sekiguchi, Y. (1999), App. Environ. Micro., 65(3), 1280-1288.
3. Dolfing, J., J. W. Mulder (1985). App. Environ. Micro., 49, 1141-5.