

## 혐기성 SBR을 이용한 anammox 미생물 배양 및 fluorescence *in situ* hybridization(FISH)을 통한 미생물 군집 분석

한동우, 윤호준, 김동진

한림대학교 환경학과

전화 (031) 240-1537, FAX (031) 256-3420

### Abstract

Anaerobic ammonium oxidation with nitrite to  $N_2$ (anammox) is a recently discovered microbial reaction with interesting potential for nitrogen removal from wastewater. Here we investigated the microbial community structure in the sequencing batch reactor(SBR) with an anammox activity. The SBR was optimized for the enrichment of a very slowly growing microbial community and showed that possibility of anaerobic ammonium oxidation. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) analysis revealed that anaerobic ammonium oxidizers were Candidatus *Brocadia anammoxidans* and Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*. Furthermore, *Nitrosomonas* spp. of the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria* was also present within the anaerobic SBR microorganisms.

### 서론

이론적으로 ammonium이 탈질을 위한 무기 전자 주계로써 사용될 수 있으며 이 반응의 free 에너지는 호기성 질산화 공정과 거의 비슷하다. 이러한 열역학적 제산에 기초하여 혐기적 상태에서 ammonium을 산화시킬 수 있는 미생물들의 존재가 Broda(1977)에 의해 이미 24년 전에 예견되었다.<sup>1)</sup> 이들 미생물들은 최근 *Planctomycetales* 목(order)에 속하는 것으로 밝혀졌으며 Candidatus *Brocadia anammoxidans*으로 불리고 있다.<sup>2)</sup> 또한 높은 혐기성 ammonium 산화 능력을 가지는 trickling filter 반응기에서 새로운 속(genus)의 anammox 미생물이 우점종을 이루고 있음이 밝혀졌다. 이들 미생물은 Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*라 감정적으로 이름이 붙여졌다.<sup>3)</sup> 호기성 ammonia oxidizers 중 *Nitrosomonas* spp.에 속하는 몇몇 미생물들 또한 혐기성 상태에서 ammonium을 산화 할 수 있음이 밝혀지고 있다. 그러나 혐기성 ammonium 산화 능력은 anammox 미생물에 비해 약 20 배정도 낮게 보고되고 있다. 느린 성장 속도를 보이는 Anammox 미생물들의 선택적 배양에 있어 연속 회분식 반응기(SBR)가 최적화되었다. SBR의 경우 anammox 미생물들을 90% 이상 보유하는데 있어 매우 효과적이며 반응기 전체에 걸친 기질, 생산물 및 biomass aggregate의 균일한 분포가 가능하다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 장기간 혐기성 상태로 유지된 SBR 반응기에서 anammox 반응을 촉매하는 미생물의 존재 여부 및 혐기적 ammonium 산화 능력을 가진 질산화 미생물에 대하여 전통적 배양방법에 대한 오차 없이 최근에 발전하고 있는 fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 기법을 사용하여 확인하였다. 이를 통하여 점차로 증가하고 있는 새로운 질소 제거 공정인 anammox의 적용 가능성을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1) SBR 실험 장치 및 미생물 접종

혐기성 ammonium 산화 능력을 가지는 미생물의 농후 배양을 위하여 연속 회분식 반응기(SBR)를 사용하였다(Fig. 1). 미생물 접종은 춘천시 하수종말처리장 폭기조의 MLSS를 사용하였다. 반응기의 온도는 37°C로 유지하였으며 질소 가스를 이용하여 분자 상태의 산소를 배제하여 주었다. 실험은 약 300여 일에 걸쳐 수행되었다. 유입 폐수 중 ammonium과 nitrite이 제거되는 시점에서 반응기내 미생물을 이용하여 회분 실험을 수행하였다. 폐수는  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  및  $\text{NO}_2^--\text{N}$ 을 각각 50 mg/L 씩 넣어 주었으며 분석은 *Standard Method*에 의거하였다.

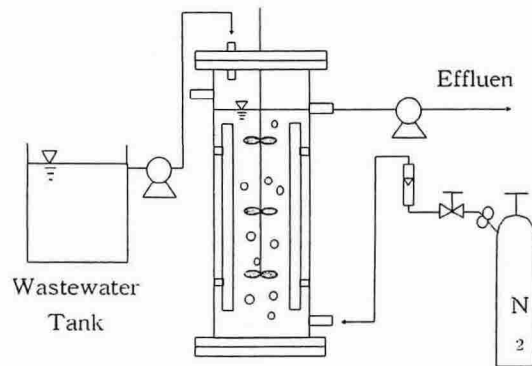


Fig. 1. Experimental set-up of the sequencing batch reactor(SBR)

### 2) *In situ* hybridization

Anammox 반응이 일어나는 시점에서 연속 회분식 반응기의 휴지 기간동안 침전되어 있는 미생물의 일부분을 sampling 한 뒤 고경과 탈수화 과정을 거쳐 *in situ* hybridization 실험을 48°C에서 10분 동안 수행하였다. 미생물의 관찰은 Zeiss Axiovert 형광현미경과 Kr/Ar ion laser(488 nm, 560 nm, 633 nm)가 장착된 MRS-1024(Bio-Rad, U.K.) confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 사용하였다. 사용된 probe들과 이들의 sequence, specificity 그리고 hybridization condition을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 16S and 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes

Probe	Specificity	Probe sequence (5'-3')	% FA <sup>a</sup>	NaCl (mM) <sup>b</sup>
EUB338	Bacteria	GCTGCTCCCGTAGGAGT	20	225
ALF1b	$\alpha$ subclass of <i>Proteobacteria</i> , genus <i>Nitrospira</i>	CGTTCGYTCTGAGCCAG	20	225
BET42a	$\beta$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACTTCGTTT	35	80
NSO1225	Ammonia oxidizing $\beta$ proteobacteria	CGCGATTGTATTACGTGTGA	35	80
Pla46	Candidatus <i>Brocadia anammoxidans</i>	GACTTGCATGCCTAATCC	25	159
Kst1273	Candidatus <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	25	159
NSM156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTCGAT	5	636
NSV443	<i>Nitrospira</i> spp.	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	30	112
NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56
NSR1156	Freshwater <i>Nitrospira</i> spp.	CCCGTTCCTCCTGGGCAGT	30	112

<sup>a</sup> Percentage formamide in the hybridization buffer.

<sup>b</sup> Millimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

## 결과 및 고찰

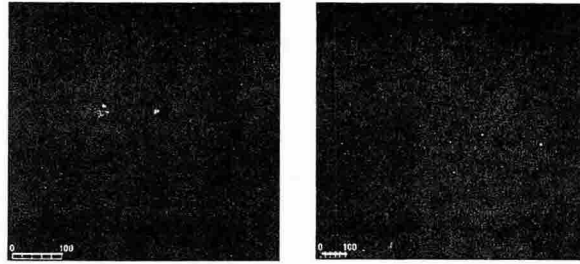
실험 시작 후 약 250일 뒤에 연속 회분식 반응기에서 혐기성 ammonium 산화 반응이 관찰되었다. 이 때부터 반응기의 형태를 회분식으로 전환하여주었다. 그 결과 유입 ammonium은 20일이 지난 뒤 완전히 제거됨을 보였고 nitrite의 경우 제거된 ammonium 양에 비해 약 1/6정도만이 제거되었다. 또한 ammonium과 nitrite이 제거되면서 유입 ammonium의 약 20%정도의 nitrate가 생성되었다. 이는 기존의 anammox 반응에 의해 ammonium과 nitrite가 소비되면서 생성되는 nitrate 비가 1 : 1.32 : 0.2 임을 고려 할 때, 비록 유입 ammonium이 모두 제거되었고 생성된 nitrate이 위의 anammox 반응비에 일치한다하여도 소비된 nitrite의 양으로 인해 실질적 anammox 반응에 의한 제거는 약 13%임을 알 수 있었다.

Anammox 반응이 진행되는 동안 반응기내 이를 촉매하는 미생물의 존재여부를 FISH 기법을 통하여 알아보았다(Fig.3). Fig 3-[A]는 이들 미생물의 DIC 이미지로 형태학적으로 불규칙한 여러 종류의 미생물들이 존재하고 있음을 보여주고 있다. Anammox 반응이 관찰되는 시점에서 기존에 이를 촉매하는 미생물로 알려진 *Candidatus Brocadia anammoxidans*에 specific한 probe Pla 42로 염색된 미생물이 관찰되었다(Fig.3-[B]). 그러나 DIC 이미지에서 보인 전체 미생물 대비 이들의 분포 비율은 매우 낮음을 알 수 있었다. 60일 뒤의 관찰에서는 *Candidatus Brocadia anammoxidans* 이외의 새로운 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*에 specific한 probe Kst 1273으로 염색된 미생물들이 관찰되었다(Fig. 3-[C]). 호기성 질산화 미생물에 의한 anammox 가능성 또한 FISH를 통해 알아보았다. 초기 접종 폐수 내 미생물들은 *Proteobacteria*의  $\alpha$ ,  $\beta$ 아강에 속하는 미생물들이 전체 미생물의 약 60~ 70%을 차지하였으며(Fig. 4-[A]) 이 중 질산화 미생물로 ammonia oxidizers인 *Nitrosomonas* spp.에 속하는 미생물과 nitrite oxidizers에 속하는 *Nitrospira* spp.가 관찰되었다(Fig 4-[B]). 장기간 혐기적 상태로 운전된 실험 종료 시에는 기존에 혐기성 ammonium 산화 능력이 있는 것으로 보고된 *Nitrosomonas* spp.만이 관찰되었다(Fig. 4-[C]). Nitrite oxidizers인 *Nitrospira* spp. 및 *Nitrobacter*의 경우 관찰되지 않았다.

느린 anammox 미생물들의 성장 속도로 인하여 300 여일 간의 실험 기간동안 낮은 혐기적 ammonium 산화율 및 이를 촉매하는 적은 수의 미생물들이 관찰되었지만, 이를 토대로 반응기 운전과 미생물들의 생리학적 특징에 대하여 더 많은 실험이 수행된다면 최적의 anammox 활성을 이룰 수 있을 것으로 판단된다.

## 요약

혐기적 ammonium 산화는 폐수 내 질소의 생물학적 제거에 있어 가장 혁신적인 기술중의 하나이다. 본 연구에서는 느린 성장속도를 보이는 anammox 미생물의 농후 배양을 위하여 연속 회분식 반응기를 사용하였다. 혐기적 상태에서 ammonium의 산화는 약 13% 정도이었다. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 분석에 의하면 anammox 반응 초기에는 *Candidatus Brocadia anammoxidans*만이 관찰되었으나 시간이 지남에 따라 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*가 동시에 관찰되었다. *Proteobacteria*의  $\beta$ 아강에 속하는 *Nitrosomonas* spp. 또한 관찰되었다.

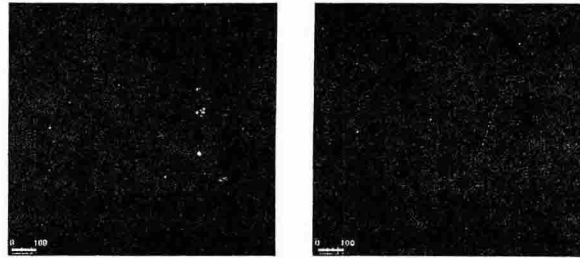


[A]

[B]

[C]

Fig. 3. Fluorescent *In situ* hybridization for anammox cells in SBR. [A] DIC image. [B] Simultaneous *in situ* hybridization with CY5-labeled probe EUB 338 and CY3-labeled probe Pla 42. Cells of bacteria are shown in blue; cells of Candidatus *Brocadia anammoxidans* are red. [C] Simultaneous *in situ* hybridization with FITC-labeled probe Kst 1273 and CY3-labeled probe Pla 42. Cells of Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis* are shown in green; cells of Candidatus *Brocadia anammoxidans* are red. Bar = 100  $\mu$ m



[A]

[B]

[C]

Fig. 4. Simultaneous *in situ* hybridization of municipal wastewater treatment biofilms. [A] CLSM projection image after hybridization with CY-5 labeled BET 42a (blue) and CY-3 labeled ALF 1b (red). [b] and [c] FITC labeled probe NSM156 and CY-3 labeled NSR1156. Cells of *Nitrosomonas* spp. are shown in green; cells of *Nitrospira* spp. are red. Bar = 100  $\mu$ m

## 참고 문헌

1. Broda, E., "Two kinds of lithotrophs missing in nature"(1977), *Z. Allg. Mikrobiol.*, **17**, 497-493.
2. Strous, M., fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de pas-Schoonen, K.T., Webb, Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M., "Missing lithotroph identified as new planctomycete"(1999), *Nature*, **400**, 446-449
3. Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Scleifer, K-H. and Wagner, M., "Molecular evidence for genus-level diversity of bacteria capable catalyzing anaerobic ammonium oxidation"(2000), *Syst. Appl. Microbiol.*, **23**, 93-106.
4. Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M., "The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms"(1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 589-596