

PB1) 피혁폐수 처리공정 슬러지로부터 농화배양된 미생물 연료전지 군집의 FISH법을 이용한 분석

유은연*, 김미아, 손형식¹, 하은총¹, 정성윤, 김영훈, 이상준¹
부산대학교 Bio-IT 파운드리 센터, ¹부산대학교 미생물학과

1. 서 론

최근 환경시료에 존재하는 미생물 군집의 분석에 분자생물학적 방법이 선호되고 있다. 분자생물학적 방법을 이용하면, 배양적 방법으로 확인하기 어려운 미생물 종의 분석도 가능하며 보다 다양하고 폭넓은 미생물 군집구조의 파악이 가능하다. 그 중에서도 FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization)법은 미생물 내의 목적 DNA 혹은 RNA에 형광물질이 부착된 작은 조각의 DNA나 RNA(probe)를 결합시켜 분석하는 기술이다. 이 기술은 미생물을 자연 상태 그대로 직접 관찰할 수 있으며, 측정이 쉽고 간단하여 비교적 빠른 시간 내에 미생물 군집의 시간·공간적 변화를 파악할 수 있다.

미생물 연료전지(Microbial fuel cell)는 전지 내에 농화배양된 미생물의 대사활동을 통해서 생물화학적 에너지를 전기화학적 에너지로 변환하는 장치이다. 유기물이 산화될 때 발생하는 전자를 외부 전극으로 전달 가능한 미생물만이 미생물 연료전지 내에서 생존 가능하며, 이러한 미생물을 전기화학적 활성미생물이라고 한다. 전기화학적 활성미생물은 다양한 성질의 접종원에서 농화배양이 가능하며, 전기화학적 활성미생물이 농화배양된 미생물 연료전지는 폐수처리장치, 생물경보센서 등으로 활용된다.

피혁산업에서 발생하는 폐수는 염분, 석회, 질소화합물, 크롬 등이 다량으로 포함되어 있으며, BOD 700-3,000 mg l⁻¹, COD 182-31,500 mg l⁻¹ 등의 특성을 가지는 것으로 조사되고 있다. 국내에서는 하루 약 52,000 톤의 피혁폐수가 배출되고 있으며, 물리·화학·생물학적 폐수처리공정을 적용하여 처리 및 배출하고 있다.

본 연구에서는 미생물 연료전지를 이용하여 피혁폐수 슬러지로부터 전기화학적 활성미생물을 농화배양하고 FISH법을 이용하여 미생물 연료전지의 전극에 형성된 미생물 군집의 구조를 분석하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에서 접종원으로 사용된 피혁폐수 처리공정 슬러지는 부산시 사하구 신평동 무지개 산업공단에서 채취하였다. 전기화학적 활성미생물의 농화배양을 위한 미생물 연료전지 시스템은 전체크기를 40×80×30 mm로 제작한 센서형 미생물 연료전지와 발생된 전기신호를 측정하기 위한 멀티미터를 외부 회로로 연결하여 구성하였다. 농화배양은 35℃의 일정한 온도에서 진행되었다. 접종 24시간 후 200 Ω의 외부 저항을 걸고, 음극에는 glucose와 glutamic acid가 각 150 mg l⁻¹씩 첨가된 synthetic wastewater를, 양극에는 산소가 포화된 증류수를 주입하였다. 배지 공급은 1 ml min⁻¹의 속도로 하루 24번, 1회당 15분씩 주

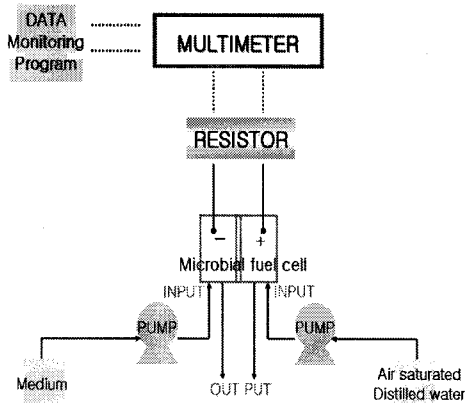


Fig. 1. The schematic diagram of microbial fuel cell system.

각 1 ml을 polycarbonate membrane(diameter, 47 mm; pore size, 0.20 mm; type GTTP 4700; Millipore, Germany)을 통과시켜 막에 균체를 부착시켰다. 사용된 FISH probe 조건은 Table 1과 같으며 형광은 CLSM(LSM 510; ZEISS, Germany)을 통해 확인하였다. 각 그룹 미생물의 수는 직접 계수하여 나타내었다.

Table 1. rRNA-targeted oligonucleotide probes conditions

Probe	Label	Target group	Sequence (5'→3')	Target
EUB 338a	Fluorescein	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S rRNA
ALF 1b	Cy3	α -Proteobacteria	CGTTCG(CT)TCTGAGCCAG	16S rRNA
BET 42a	Cy3	β -Proteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S rRNA
GAM 42a	Cy3	γ -Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	23S rRNA
CF 319a	Cy3	<i>Bacteroidetes</i>	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S rRNA
HGC 69a	Cy3	<i>Actinobacteria</i>	TATAGTTACCACCGCCGT	23S rRNA

3. 결과 및 고찰

피혁폐수 처리과정 슬러지에서 미생물 연료전지의 전극에 형성된 미생물 군집의 분석을 위해 먼저 농화배양을 진행하였다. 농화배양 시작 후 약 5일이 지나면서 일정한 전류 패턴을 보였고, 이때의 coulombic yield는 $0.51 C \pm 1.16\%$ 였다(data not shown). 발생한 전류가 전극 내 존재하는 미생물의 영양임을 확인하기 위하여 전자현미경 관찰을 진행하였다(Fig. 2). SEM촬영 결과, 접촉 전의 전극은 얇은 탄소가닥들이 모여 굵은 탄소가닥들이 열기설기 구성되어있는 형태로 공극이 존재하는 매끈하고 깨끗한 전극의 모습이 관찰되었다. 농화배양 완료 후에는 전극 가닥에 얇은 막이 형성되어 있는 것을 확인 할 수 있었는데 배율을 5,000배로 높여 관찰해 본 결과 미생물들이 전극에 붙어 biofilm을 형성하

입하였고, 전기적 신호는 60초에 1회 수집하였다(Fig. 1). 농화배양의 완료는 발생된 전기신호의 양상 및 전자현미경(SEM; HITACHI S3510N, Japan, CLSM; LSM 510 ZEISS, Germany)관찰을 통해 판단하였다.

농화배양 된 미생물 군집의 분석을 위해 미생물 연료전지의 음극을 20 mm × 20 mm 크기로 잘라 5 ml의 1× Phosphate buffered saline(pH=7.0)에 첨가하여 vortexing을 통해 전극으로부터 미생물 군집을 추출하였다. 추출된 미생물 군집은 4% paraformaldehyde solution으로 고정하였고, 막 여과법을 통해 시료

거나, 일부 균 덩어리를 이루고 있는 것이 관찰되었다. 또한, CLSM을 이용하여 관찰한 결과, 미생물에 존재하는 DNA의 염색에 의해 전기화학적 활성미생물이 농화배양 된 전극은 선명한 녹색을 나타냈다. 이로부터 피혁폐수 처리공정 슬러지로부터 전기화학적 활성미생물이 성공적으로 농화배양 되었다고 판단하였다.

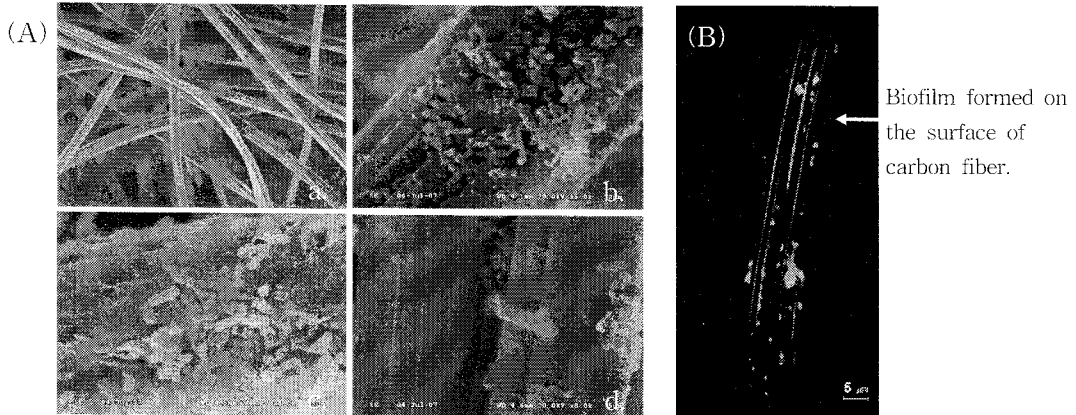


Fig. 2. (A) Scanning electron micrographs of the electrode: a; the control electrode, b, c, d; enriched electrode. (B) Confocal laser scanning micrograph of the biofilm developed on the electrode.

미생물 연료전지의 전극에 형성된 미생물 군집의 분석을 위하여 농화배양이 완료된 전극으로부터 미생물을 추출하여 FISH를 진행하였고 그 결과는 아래의 Fig. 3과 같다. 전체 미생물 군집에 존재하는 각 미생물 종의 비율을 알아보기 위하여 진행한 DAPI staining의 결과, 농화배양된 미생물 군집 내의 총 미생물수는 $1.68 \pm 0.80 \times 10^{11}$ cells/ml 이었다. 각 미생물 종별 특이적인 probe에 의해 나타난 형광을 통한 미생물 군집분포를 살펴보면, 전체 미생물 중 *Eubacteria*가 차지하는 비율은 69.9%를 보였고, 혐기적 환경에서 유기물이 부패되면서 나오는 물질을 사용하는 것으로 알려져 있는 β -*Proteobacteria* group (*Nitrosomonas*, *Thiobacillus* 등)이 20.14%, *Proteobacteria*에서 가장 큰 집단으로 다양한 생리학적 유형을 보이는 γ -*Proteobacteria* group(*Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Klebsiella*, *Escherichia* 등)이 17.34%로 우점하고 있음을 보였다. 또한, 메탄을 산화, 화학무기영양, 질소고정 등과 같은 특수 대사과정을 수행하는 α -*Proteobacteria* group(*Rhodospillum*, *Richettaia*, *Caulobacter*, *Phizobium*, *Brucella*, *Methylobacterium* 등)은 10.81%, 토양환경에서 주로 서식하는 방선균으로 높은 G+C 농도를 가지는 *Actinobacteria* group(*Actinomyces*, *Arthrobacter* 등)은 6.10%, 토양과 해양 등에 서식하는 *Bacteroidetes* group(*Sphingobacterium*, *Flavobacteriaceae* 등)은 12.19%의 분포를 보였다.

이와 같은 결과로부터 피혁폐수 처리공정의 슬러지를 미생물 연료전지에 접종하여 전극에 농화배양된 미생물 군집은 주로 β -*Proteobacteria* group과 γ -*Proteobacteria* group으로 구성된다는 사실을 알 수 있었다.

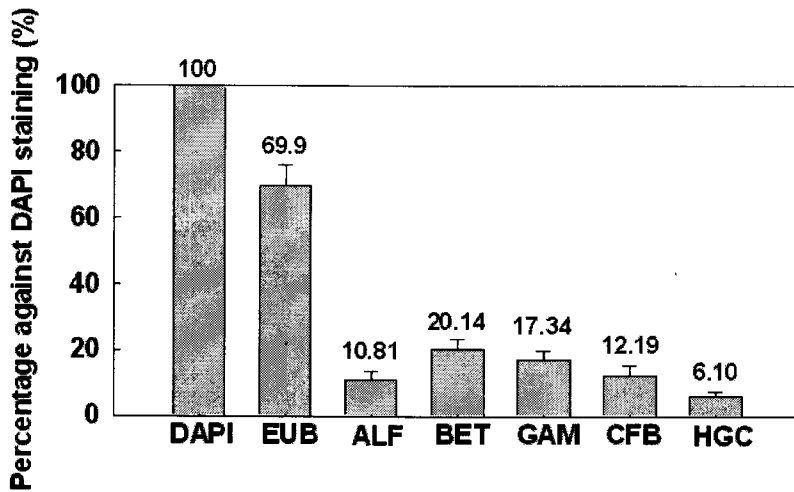


Fig. 3. The structure microbial community enriched on electrode sample by fluorescent *in situ* hybridization. DAPI: DAPI staining, EUB: *Eubacteria*, ALF: *α-Proteobacteria*, BET: *β-Proteobacteria*, GAM: *γ-Proteobacteria*, CFB: *Bacteroidetes*, HGC: *Actinobacteria* (Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content). The bars show the standard deviation.

4. 결 론

본 연구에서는 미생물 연료전지에 피혁폐수 처리공정 슬러지를 접종하여 전기화학적 활성미생물을 농화배양 하고 FISH법을 통해 그 군집을 분석하였다. 먼저, 농화배양이 완료된 시점에서 나타난 최대 전류값은 0.17 mA이었고, coulombic yield는 $0.51 C \pm 1.61\%$ 이었다. SEM 및 CLSM을 이용한 결과를 통해 발생된 전기적 신호는 전극에 배양된 미생물에 의한 것임을 확인하였다. 이 후, 농화배양 된 전극으로부터 미생물을 추출하여 FISH법을 통해 그 군집구조를 분석한 결과로부터 미생물 연료전지 내에서 농화배양된 피혁폐수 처리공정 슬러지에는 혐기적 조건에서 유기물의 발효 및 부패산물을 이용하는 *β-Proteobacteria group*이 우점한다는 사실을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Allen R.M., Benetto H.P. (1993) Microbial fuel-cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39**:27-40.
- Amann R., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925.
- Bagchi D., Stohs S.J., Downs B.W., Bagchi M., Preuss H.G. (2002) Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* **180**:5-22.
- Kim B.H., Park H.S., Kim H.J., Kim G.T., Chang I.S., Lee J., Phung N.T. (2004) Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:672-681.