

완전침지형 회전매체공정 내 질산화 및 탈질 관련 미생물의 군집 분포

전철학 · 임봉수* · 강 호**† · 윤경여*** · 윤여규***

중국 복단대학교 미생물공학과

*대전대학교 환경공학과

**충남대학교 환경공학과

***동성이앤지(주)

Diversity of Nitrifying and Denitrifying Bacteria in SMMIAR Process

Quan, Zhe-Xue · Lim, Bong-Su* · Kang, Ho**† · Yoon, Kyung-Yo*** · Yoon, Yeo-Gyu***

Department of Microbiology and Microbial Engineering, Fudan University, China

*Department of Environmental Engineering, Daejeon University

**Department of Environmental Engineering, Chungnam National University

***Dongsung E&G Co. Ltd.

(Received 11 May 2006, Accepted 21 September 2006)

Abstract

SMMIAR (Submerged Moving Media Intermittent Aeration Reactor) process is a very efficient system which remove ammonia to nitrogen gas in one reactor. In this study, we determined the diversity of ammonia oxidizing bacteria and denitrifying bacteria using specific PCR amplification and the clone library construction. An ammonia monooxygenase gene (*amoA*) was analyzed to investigate the diversity of nitrifiers. Most of *amoA* gene fragments (27/29, 93%) were same types and they are very similar (>99%) to the sequences of *Nitrosomonas europaea* and other clones isolated from anoxic ammonia oxidizing reactors. ANAMMOX related bacteria have not determined by specific PCR amplification. A nitrite reductase gene (*nirK*) was analyzed to investigate the diversity of denitrifying bacteria. About half (9/20, 45%) of denitrifiers were clustered with *Rhodobacter* and most of others were clustered with *Mesorhizobium* (6/20, 30%) and *Rhizobium* (3/20, 15%). All of these *nirK* gene clones were clustered in alpha-Proteobacteria and this result is coincide with other system which also operate nitrification and denitrification in one reactor. The molecular monitoring of the population of nitrifiers and denitrifiers would be helpful for the system stabilization and scale-up.

keywords : Denitrifying bacteria, Diversity, Nitrifying bacteria, SMMIAR

1. 서 론

전통적인 생물학적 질소 가스의 생성은 호기성 조건에서의 질산화와 혐기성 조건에서 유기물을 에너지원으로 하는 탈질과정을 통해서만 생성된다고 생각했다. 따라서 일반적인 질소 제거 반응시스템은 폭기를 위한 에너지가 많이 필요하고 탄소원의 첨가가 필요하며, 또 두 단계로 나누어서 처리해야 하는 단점을 갖고 있다.

1990년대에 네덜란드의 Jetten group에 의해서 혐기성 조건에서 미생물에 의해 암모니아가 산화되는 것을 발견하였으며 이에 관여하는 미생물이 Planctomytales에 속하는 자영양미생물로서 아질산염을 전자수용체로 하여 혐기성 조건에서 암모니아를 질소가스로 산화한다는 것을 발견하였다(Strous et al., 1999). 또한 최근에는 전통적인 호기성 암모니아 산화미생물로 알려졌던 *Nitrosomonas*에 속하는 일

부 미생물들이 산소가 없거나 산소 농도가 매우 낮은 조건에서도 효과적으로 암모니아를 산화한다는 것이 밝혀졌다. 따라서 암모니아 산화와 탈질을 미호기성의 단일반응시스템에서 동시에 진행하는 연구가 많이 진행되고 있다 (Mulder et al., 1995; Egli et al., 2003). 그러나 이러한 새로운 단일질소 제거 시스템에 대한 연구는 대부분 시스템의 개발과 운전조건의 최적화에 초점을 맞추고 있고 시스템 내부에 존재하는 미생물의 종류와 메커니즘을 하나의 블랙박스로만 보기 때문에 시스템의 안정화와 광범위한 이용에 한계를 나타낸다.

분자생물학적 기법은 지금까지 블랙박스로 여겨져 왔던 처리시스템 내의 미생물 분포와 특징 및 그 변화를 측정하는 가장 효과적이고 직접적인 방법이다. 미생물분포의 분석에서 가장 대표적으로 이용되고 있는 것이 clone library 구축과 DGGE(denatured gradient gel electrophoresis)/TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) 및 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 등 방법이다(Quan et al., 2006; Marsh, 1999). 이러한 방법들은 공통

* To whom correspondence should be addressed.

hokang@cnu.ac.kr

적으로 시료로부터 DNA를 추출한 후 PCR(Polymer chain reaction)을 통해 특정 유전자를 증폭하는 특징을 갖고 있다. 미생물분포의 모니터링에서 가장 많이 대상으로 이용하는 유전자는 16S rRNA 유전자이다(Woese et al., 1977). 그러나 질소처리시스템에 있어서 16S rRNA 유전자는 질소 제거와 관련이 없는 많은 미생물들도 함께 검출되므로, 실제 시스템에서 중요한 작용을 하는 질산화미생물과 탈질미생물의 분포를 정확하게 파악할 수 없는 단점이 있다. 따라서 암모니아산화와 탈질에 각각 직접 관여하는 효소인 ammonia-monooxygenase와 nitrite-reductase와 관련된 유전자 분포에 대한 분석을 통하여 질산화와 탈질에 관여하는 미생물의 조성을 연구하는 방법들이 많이 이용되고 있다(Gieseke et al., 2003; Yoshie et al., 2004). Clone library 구축을 통한 미생물 분포분석은 특정 유전자를 갖고 있는 미생물들의 염기서열상 공통적인 부분을 프라이머(primer)로 이용하여 대부분의 특정 유전자를 갖고 있는 미생물 유전자를 PCR을 통해 증폭하고, 이 증폭된 유전자들을 특정 E.coli plasmid에 cloning하여 유전자의 염기서열을 분석하는 방법이다.

완전침지형 회전매체공정(SMMIAR : Submerged Moving Media Intermittent Aerator Reactor)은 일종의 RBC 공정과 활성슬러지 반응조의 혼합공정으로 단일공정에서 암모니아산화와 탈질을 효과적으로 완성한다. SMMIAR 공정은 다른 일반적인 질소제거 반응조에 비해 산소요구량이 적고, 탈질에 필요한 탄소요구량이 적은 장점을 갖고 있다(Kim, 1997; Kim et al., 1999).

본 연구에서는 clone library 구축을 통한 분자생물학적기법을 활용하여, 현장에서 실제 운영중인 마을하수처리시설(SMMIAR 공정)을 대상으로 SMMIAR 반응조내에 서식하는 암모니아 산화 미생물과 탈질미생물의 조성을 파악하여 그 분포특성을 밝히고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. SMMIAR 공정의 운전 및 분석방법

SMMIAR 공정은 Fig. 1과 같이 혐기조, SMMIAR 반응조 및 침전조로 조성되었으며 침전조의 슬러지가 혐기조에 재순환 되는 시스템이다. SMMIAR 반응조에는 완전침지형 회전매체를 도입하여 호기/미세호기/무산소 조건을 동시에 형성함으로써 유기물질뿐만 아니라 질소, 인 제거를 동일반응조 내에서 수행하는 고도처리공정이다. 본 공정은 공정을 운영하는데 있어서 회전매체에 확보된 biofilm과 부유미생물이 함께 이용되므로 수량 및 수질 부하변동, 온도변화 등 외부 환경변화에 대한 유연성이 크고 처리 안정성이 우수한 기술이다. 연기군 노장 마을하수처리장에 설치된 SMMIAR 공정은 2003년 12월부터 운전을 시작하여 현재 지속적으로 가동되고 있으며 시설용량은 60 m³/d이며 일평균 처리량은 약 40 m³/d 정도이다. 주요 반응조의 체류시간은 혐기조 3~3.5 hr, SMMIAR 반응조 9 hr, 침전조 3.5~4 hr 정도이었으며, SMMIAR 반응조 DO농도는 1~2

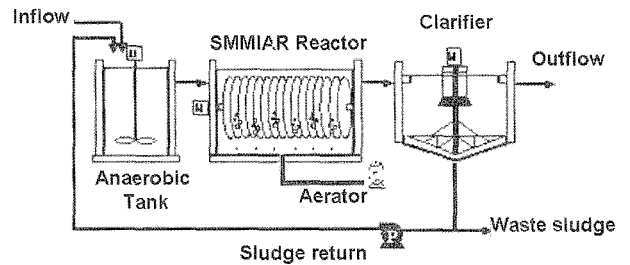


Fig. 1. Schematic diagram of SMMIAR Process.

mg/L, MLSS 2500~3000 mg/L로 운전되고 있다. 2004년 1년 동안 본 공정의 유입수의 평균 수질은 BOD 147 mg/L, CODmn 108 mg/L, SS 115 mg/L, T-N 35.2 mg/L, T-P 3.72 mg/L이었으며, 처리수는 BOD 7.1 mg/L, CODmn 9.0 mg/L, SS 6.8 mg/L, T-N 8.7 mg/L, T-P 0.52 mg/L로 나타났다. 전체 공정은 BOD 제거효율 94.6%, T-N 제거효율 73.7% T-P 제거효율 86%로 유기물질이나 영양소제거효율이 매우 양호한 처리효율을 나타냈다. 유입수의 평균 NH₄-N은 27.91 mg/L이고, 처리수 중 평균 NH₄-N은 4.48 mg/L, NO₃-N은 1.64 mg/L로 질산화와 탈질에 의해 생물학적으로 질소가 충분히 처리되고 있다.

SMMIAR 반응조내 여러 가지 미생물의 활성을 측정하기 위하여 2005년 5월 3일에 노장지구 마을하수처리장을 방문하여 직접 시료채취를 하였다. 부유미생물 슬러지 시료는 SMMIAR 반응조의 상부와 하부 및 중간부분에서 각각 채취하였다. SMMIAR 공정에서 수질분석은 Standard Method (APHA, 1998)에 의하여 분석하였다.

2.2. DNA 추출

본 연구에서는 여러 종류 세포에서의 DNA 추출이 상대적으로 균일한 폐놀 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 1mL 정도의 슬러지를 증류수로 2번 정도 씻은 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA)에 담가두었다. 그리고 70 µL의 10%(w/v) SDS와 5 µL의 20 mg/mL proteinase K를 첨가하여 37°C에서 1~2시간 정도 배양하였다. 또 세포벽을 완화하여 세포내 미생물 DNA가 쉽게 추출될 수 있도록 해빙을 3번 정도 반복하였으며, RNA의 영향을 없애기 위하여 10 µL RNase(100 mg/mL)로 상온에서 20분간 처리하였다. 그리고 120 µL의 5 M NaCl를 첨가하고 완전히 혼합하였다. 90 µL의 CTAB/NaCl 용액을 혼합한 후 65°C에서 10~20분간 배양하였으며 같은 체적의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)를 혼합한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 다시 chloroform/isoamylalcohol(24:1)를 혼합한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 상등액을 취하여 0.6 체적의 isopropanol을 넣어 두 시간 이상 놓아두었다. 그리고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 70% 에탄올로 washing하고 건조한 후 100~400 µL 증류수로 녹였다. 그리고 얻은 DNA 농도는 UV spectrum을 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며 또 1% 아가로스 겔을 이용하여 그 농도를 다시 한번 확인했다.

2.3. PCR 증폭

슬러지에 존재하는 암모니아 산화미생물의 분포를 확인하기 위하여 ammonium monooxygenase A(*amoA*) 유전자에 대응하는 프라이머인 *amoA*-1F와 *amoA*-2R(Rotthauwe et al., 1997)를 이용하였다. 이 프라이머는 지금까지 발견된 beta-Proteobacteria에 속하는 모든 암모니아 산화미생물을 다 수용할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또 혐기성 암모니아 산화미생물의 존재 여부 및 그 종류를 알기 위하여 Planctomycetales에 특이적인 PLA-46F(Neef et al., 1998)와 공통적인 반대편 프라이머(universal reverse primer) 1390R(Sacks, 2003)를 사용하였다. 지금까지 밝혀진 모든 혐기성 암모니아 산화미생물은 Planctomycetales에 속한 것으로 알려졌다(Strous et al., 2004). 탈질 미생물의 분포는 nitrite reductase K(*nirK*) 유전자에 대응하는 *nirK*-1F와 *nirK*-5R를 이용하여 증폭하였다(Braker et al., 1998). 이 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

이 프라이머를 이용한 PCR 온도변환 조건은 아래와 같다. 초기에 94°C에서 5분간 denaturation시키고 그 다음 94°C에서 1분간 denaturation, 서로 다른 온도에서 1분간 annealing, 72°C에서 1.5분간 extension하면서 이 순환을 25-35 cycle 반복하였다. 마지막에 72°C에서 10분간 extension시켰다. Annealing 온도는 각 프라이머와 PCR 결과에 따라 조절하였다. PCR 과정에서 발생하는 bias를 최대한 줄이기 위하여 PCR cycle 수를 점차 줄이면서 증폭 정도를 고찰하였다.

2.4. Clone library 구축

TA cloning kit(pGEM-T Easy vector; Promega)를 이용하여 PCR 산물로부터 16S rRNA, *amoA* 및 *nirK* 유전자를 클로닝하였다. Clone library 구축을 위하여, 먼저 PCR 반응물을 PCR purification kit(Bioneer)로 정제한 후, pGEM-T easy Vector(Promega)에 회사에서 제공한 매뉴얼에 따라 연결(ligation)시켰고, 이 플라스미드(plasmid)를 hot shocking 방법(42°C에서 60초)으로 *E. coli* DH-5a에 넣은 후 선택배지에서 확인하였다. 이 clone들은 70 µg/mL ampicillin을 포함한 LB 배지에서 키웠으며 생성된 콜로니들은 멸균한 이쑤시개로 임의로 선택하여 분석에 이용하였다. 선택한 콜로니 세포는 2분정도 끓인 후 1 µL를 취하여 직접 PCR에 이용하였고, PCR 산물은 정제하여 염기서열을 분석하거나 혹은 70 µg/mL ampicillin(항생제 일종)을 포함한 LB배지에서 재배양하여 plasmid를 뽑은 후 염기서열을 분석하였다.

2.5. 계통수(Phylogenetic tree) 그리기

염기서열분석과정에서는 삽입(insert)된 PCR 산물의 유전자 염기서열 뿐만 아니라 함께 연결된 vector의 염기서열도 연결되어 함께 측정된다. 따라서 때 염기서열 결과에서 Vector의 한쪽 끝의 염기서열과 같은 염기서열을 찾아내어 그 뒤부분의 염기서열들을 제거해 줌으로써, 정확한 insert 염기서열을 얻었다.

염기서열분석을 통하여 유효한 염기서열을 얻은 후 NCBI 데이터베이스(<http://www.ncbi.nih.gov>; 2006년 4월)에서 blast 검색을 통하여 분석한 염기서열과 비교적 가까운 염기서열에 대응하는 중요한 미생물들이 어떤 종류인지를 확인하고 이를 바탕으로 reference 균주 염기서열들을 확보하였다. 그리고 분석한 염기서열들과 reference 균주의 염기서열들을 ClustalX 프로그램(Thompson et al., 1997)을 통해 alignment 하고, BioEdit 프로그램으로 열어 각 염기서열의 앞뒤를 잘라주어 모든 염기서열들의 길이를 갖게 했으며 또 가운데 존재하는 gap들을 제거해주었다. 다시 Mega 2 프로그램(Kumar et al., 2001)에서 Mega file 형태로 전환하고 Mega 2 프로그램에 포함되어 있는 Neighbour-joining(Saitou et al., 1987) 방법을 이용하여 계통수를 그렸다. 또한 각 tree를 1,000번씩 그려 통계학적으로 처리함으로써 그 신뢰도를 높였다.

2.6. 염기서열 등록번호

본 연구과정에서 측정된 clone들의 염기서열은 이미 NCBI에 등록되었으며 등록 번호는 아래와 같다. DQ996539 (clone H14), DQ996540 (clone H15), DQ996541 (clone N4), DQ996542 (clone N6), DQ996543 (clone N12), DQ996544 (clone N13), DQ996545 (clone N16), DQ996546 (clone N21).

3. 결과 및 고찰

3.1. SMMIAR 반응조 운전 및 슬러지 특성

Fig. 2는 2004년 1년동안 현장 SMMIAR 공정내 SMMIAR 반응조의 암모니아와 질산성질소에 대하여 모니터링 결과이다. 그림에서 볼 수 있듯이 비록 여름에 유입수 중의 암모니아 농도의 급격한 변화가 있었지만, 암모니아가 안정적으로 제거됨을 알 수 있다. 또한 질산염의 축적이 이루어지지 않음을 알 수 있다. 1년동안 SMMIAR 반응조에서 암모니아성질소는 평균 16.4 mg/L로 유입되어

Table 1. Sequences of specific primers for the amplification of nitrogen removal related bacteria

Target gene	Name	Primer sequences	Reference
planctomycetales-specific 16S rRNA	Pla-46F	5'-GACTTGATGCCTAATCC-3'	Neef et al., 1998
	1390R	5'-CA(G/T)AAAGGAGGTGATCC-3'	Sacks, 2003
ammonia monooxygenase A	<i>amoA</i> -1F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	Rotthauwe et al., 1997
	<i>amoA</i> -2R	5'-CCCCTC(G/T)G(G/C)AAAGCCTTCTTC-3'	
nitrite reductase K	<i>nirK</i> -1F	5'-GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA-3'	Braker et al., 1998
	<i>nirK</i> -5R	5'-GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG-3'	

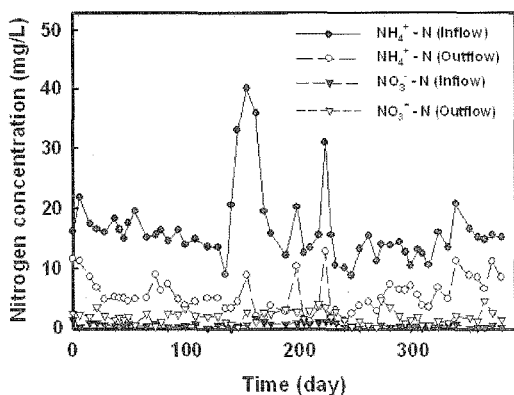


Fig. 2. Nitrogen removal in the SMMIAR reactor treating village sewage in Nojang.

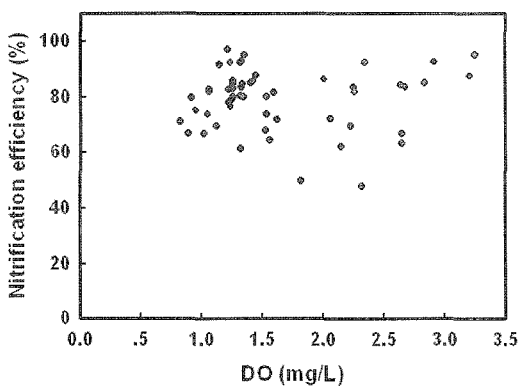


Fig. 3. The relationship of DO and nitrification efficiency in the SMMIAR reactor treating village sewage in Nojang.

5.7 mg/L를 유출되었으므로 암모니아 제거효율은 65.2%이었으며, 질산염의 축적은 거의 일어나지 않았다. 이는 SMMIAR 반응조의 질소 제거에 있어서 암모니아의 효과적인 산화가 가장 중요함을 말하고 있다.

Fig. 3은 암모니아 제거효율과 DO사이의 상관관계를 보여주고 있다. 그림에서 볼 수 있듯이 용존산소 농도가 암모니아산화에 직접적인 영향은 주지 않음을 알 수 있다.

SMMIAR 반응조 상부와 하부의 부유미생물 슬러지를 이용하여 암모니아 산화, 탈질 및 혐기/미호기 조건에서의 암모니아 제거 특성을 고찰하였다. 이 실험을 통하여 상부슬러지와 하부슬러지가 비슷한 특성을 나타내는 것은 확인할 수 있었다. 본 반응시스템에서 상부슬러지와 하부 슬러지는 함께 유출되어 혼합된 후 다시 재순환을 거쳐 반응시스템에 들어오게 되므로 이런 혼합과정을 거치면서 결국 상하부 슬러지의 특성은 비슷하게 된다. 따라서 반응기내 중간 높이에서 채취한 슬러지만을 대상으로 분자생물학적기법을 이용하여 암모니아 산화 및 탈질에 관련된 미생물 분포를 고찰하였다.

3.2. 호기성 암모니아 산화미생물의 분포

암모니아 산화미생물은 질소제거 시스템에서 가장 중요한 미생물이다. 일반적으로 암모니아 산화미생물은 완전 호기성 미생물로 알려져 있지만, 산소농도가 매우 낮은 조건

에서도 발견된다(Park et al., 2004). Ammonium mono-oxygenase는 암모니아 산화과정에 가장 중요한 역할을 하는 효소이다. 암모니아 산화미생물에서는 ammonium mono-oxygenase 효소관련 유전자의 일종인 *amoA* 유전자가 16S rRNA유전자와 진화적으로 비슷한 패턴을 나타낸다 (Purkhold et al., 2000). 또한 *amoA* 유전자는 암모니아 산화미생물에만 존재하는 유전자로서, 암모니아 산화와 관련 없는 다른 미생물들의 영향을 제거함으로써, 정확히 암모니아 산화에 직접적으로 관여하는 미생물의 분포를 알 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 대부분의 암모니아 산화미생물을 수용할 수 있는 프라이머인 *amoA*-1F와 *amoA*-2R을 사용하였다 (Rotthauwe et al., 1997). 여러 미생물이 혼합된 DNA에 대한 PCR 과정에서 각 미생물 DNA의 PCR 산물은 초기에는 기하급수적으로 증가하지만 생성된 PCR 산물의 양이 일정수준이 되면 PCR 산물의 증가속도가 급격히 감소하게 되므로, 초기 혼합 DNA에 존재하는 여러 미생물의 분포와 최종 PCR 산물 중의 미생물 분포가 차이를 나타내게 된다. 따라서 여러 가지 미생물이 포함된 환경 시료에서 PCR bias를 줄이기 위하여서는 PCR cycle수를 최대한 줄이는 것이 필요하다. PCR과정의 cycle수에 따른 bias를 감소하기 위하여 cycle수를 35, 30, 25 cycle 세가지로 나누어 PCR 반응을 진행하였다. 그 결과 30 cycle에서도 비교적 선명한 약 500 bp의 band를 얻을 수 있었다(Fig. 4). 따라서 30 cycle을 진행한 PCR 산물을 clone library 구축에 이용하였다.

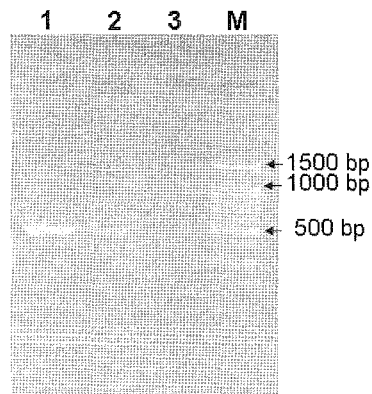


Fig. 4. The gel image of PCR product of *amoA* gene with different amplification cycles (Line 1: 35 cycles; Line 2: 30 cycles; Line3: 25 cycles; M: mark).

Clone library 및 염기서열분석을 통해 총 29개의 유효한 염기서열을 확보하였다. 통계학적으로 고려할 때, 시료 중 암모니아 산화미생물 총 DNA 양의 10%를 차지하는 균주는 29개의 염기서열에 포함되지 않을 확률은 5%보다 적다 (식 1). 즉 암모니아 산화미생물의 10%이상을 차지하는 미생물들은 95%확률로서 29개의 염기서열에 포함되었다고 볼 수 있다.

$$(1-0.1)^{29} = 0.047 < 5\% \tag{1}$$

확보한 이 29개 염기서열 및 NCBI Blast 검색을 통해 확보한 중요한 reference 균주 염기서열들을 함께 통합하여 계통수를 작성하였다.

계통수는 각 미생물들의 진화적 친화도를 나타내는 그림으로서, 특정 염기서열로부터 이런 염기서열을 갖고 있는 미생물이 어떤 종류에 속하는 미생물이며, 어느 미생물과 유전적으로 가장 비슷한지를 나타내므로, 분리되지 않은 특정 미생물의 특성을 간접적으로 알 수 있는 방법이다.

Fig. 5에서 볼 수 있듯이 clone H14와 같은 염기서열을 나타내는 27개의 clone은 *Nitrosomonas europaea* ATCC 19179 및 *Nitrosomonas europaea* M103 균주와 99.5% 이상 (393/393, 444/445) 일치하였으며 clone LDOM-287-13과 같은 그룹을 이루고 있다. 대표적인 호기성 암모니아 미생물종의 하나인 *Nitrosomonas eutropha*가 산소가 없는 조건에서 nitrogen dioxide를 전자수용체로 하여 암모니아를 산

화한다는 것이 보고되었고(Schmidt et al., 1997, 1998) 혐기성 암모니아 산화반응기에서도 *Nitrosomonas* sp. 속하는 여러 미생물들이 보고되고 있다(Kuenen et al., 2001; Tal et al., 2005). Pynaert 등(2003)은 고부하(8.3g N/m²/day)의 RBC 반응기의 Biofilm에서 존재하는 95%이상의 호기성 암모니아 산화미생물의 16S rDNA 염기서열이 *Nitrosomonas europaea* M103과 97% 이상의 유사성을 나타냈다고 보고했다. 이 시스템은 상대적으로 DO 농도가 매우 낮은 상태에서 운전되었으며 ANAMMOX 미생물인 *Kuenenia stuttgartiensis*도 함께 존재하였다(Pynaert et al., 2003). 또 SMMIAR 반응조 내 호기성 암모니아 산화미생물과 관련된 대부분의 clone과 99.5% 이상의 유사성을 나타낸 clone LDOM-287-13은 낮은 DO 농도(0.6% 포화DO농도에서 150일, 0.3% 포화DO 농도에서 138일 운전한 암모니아 산화 활성슬러지조)에서 발견된 clone이다(Park et al., 2004). 또

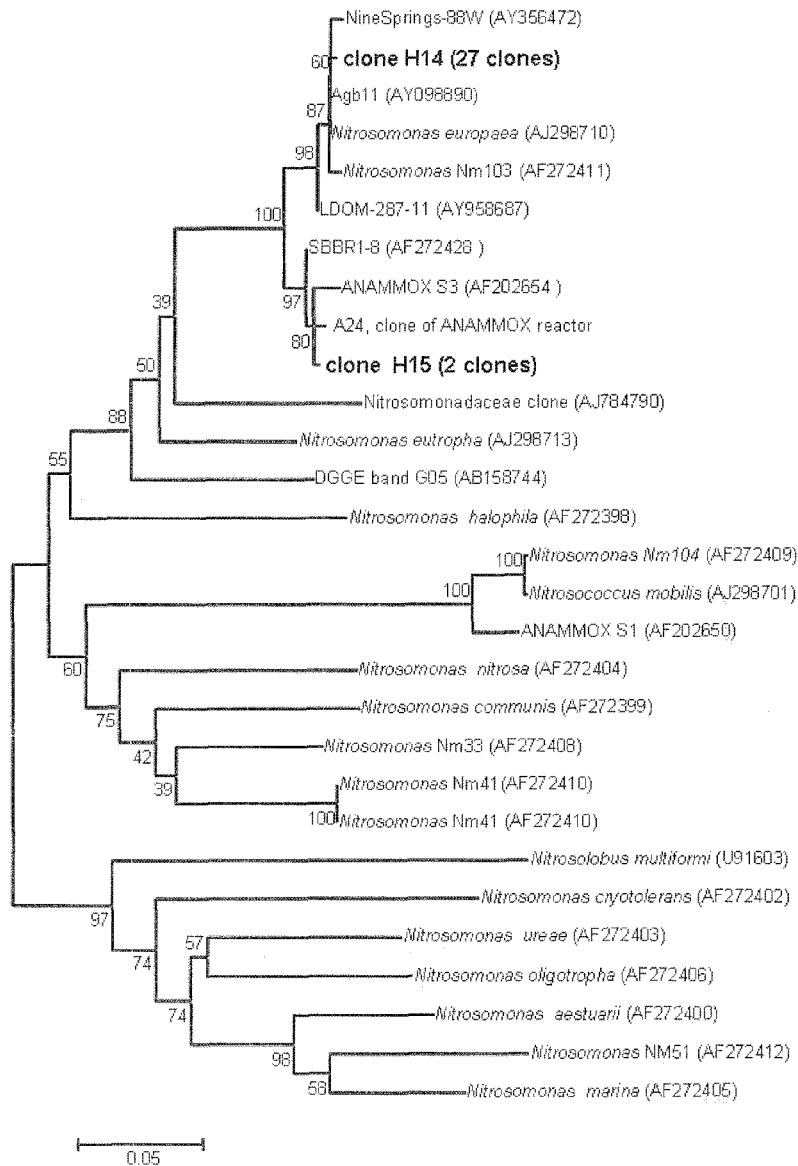


Fig. 5. Neighbor-joining analysis of partial *amoA* gene products cloned from DNA isolated from the sludge of SMMIAR reactor. The tree shows the topology of branching. Accession numbers in brackets. Values indicate the percentage of 100 replicate trees.

다른 두 clone은 ANAMMOX S3 및 A24와 같은 그룹을 이루고 있다. ANAMMOX S3은 혐기성 암모니아 산화 RBC 반응기내에 존재하는 “호기성” 암모니아 미생물의 하나의 중요한 조성부분이며, A24는 청화대학에서 운전하는 ANAMMOX 반응기내에서 10%정도를 차지하는 “호기성” 암모니아 산화미생물이다(personal communication with Dr. Zuo, J.-E.). 이런 결과로 볼 때 SMMIAR 반응조 내에 존재하는 대부분의 암모니아 산화미생물은 낮은 DO 농도에 적응한 미생물들임을 추정할 수 있다. Park 등(2004)의 보고에 따르면 이런 low-DO enrichment는 DO 농도가 2.0 mg/L로 될 때까지는 DO 증가에 따라 비성장속도(specific growth rate)가 증가하지만 그 후로는 오히려 DO 증가에 따라 감소한다고 한다. 이 결과는 Fig. 3에서 언급된 것 같이 DO 농도에 직접적인 관련 없이 SMMIAR 반응조가 암모니아를 효과적으로 제거한다는 운전결과와도 일치한다.

3.3. ANAMMOX 미생물 존재 여부

혐기성 암모니아산화(anaerobic ammonia oxidizing : ANAMMOX)미생물은 완전한 혐기성 조건에서 산소를 필요로 하지 않으며 암모니아와 아질산염을 이용하여 질소가스를 생성한다. 아직까지 ANAMMOX 미생물은 전혀 분리가 되지 않았다. 따라서 ANAMMOX 미생물에 대한 측정은 분자생물학적 방법에 의존할 수밖에 없다. 본 시스템 내에 ANAMMOX 미생물이 중요한 조성요소로서 존재하는지 여부를 PCR 반응과 cloning 및 염기서열분석을 통해 확인하였다.

현재까지 밝혀진 ANAMMOX 미생물들은 모두 Planctomycete 그룹에 속하는 것으로 알려져 있으므로(Strous et

al., 2004) Planctomycete 그룹에 특이적인 프라이머 PLA-46F와 공통적인 프라이머인 1390R을 이용하여 미생물의 16S rRNA 유전자에 대한 PCR 반응을 진행하였다. 그러나 PCR 증폭이 진행되지 않았으며 annealing 온도를 58°C에서 55°C로 낮추었을 때 PCR 증폭이 이루어 졌다. 이 PCR 산물로 clone library를 구축하고 그 중 일부 clone에 대해 염기서열분석을 진행하였으나 ANAMMOX 관련 미생물은 검출되지 않았다. 이는 SMMIAR 반응조내에 현재까지 밝혀진 ANAMMOX 미생물과 비슷한 종류의 혐기성 암모니아 산화미생물들의 양이 매우 적음을 의미한다.

3.4. 탈질미생물의 분포

질소제거 반응기에서 탈질미생물은 질산화미생물에 의해 생성된 질산염을 유기물이 있는 조건에서 질소 가스로 환원하는 작용을 한다. 본 연구에서는 탈질과정에서 공통적으로 중요한 작용을 하는 nitrite reductase 효소의 subunit인 *nirK* 유전자에 대응하는 프라이머들인 *nirK*-1F와 *nirK*-5R를 이용하여 PCR를 진행하였다. PCR 순환수는 30 cycle이다. 이 PCR 산물을 이용하여 clone library를 구축하였으며, 그 중 임의로 콜로니들을 선택하여 20개의 유효한 *nirK* 염기서열을 확보하였다.

Fig. 6은 이들 탈질미생물의 분포를 나타내고 있다. 그림에서 볼 수 있듯이 clone N4와 같은 염기서열을 나타내는 9개(45%)의 clone은 clone K1-26과 99%이상 일치하였다. Clone K1-26은 혐기성 fluidized bed 폐수처리시스템에서 발견된 clone으로서 이런 종류의 미생물이 이 처리시스템 내 *nirK* 분포의 40%이상을 차지하는 것으로 보고되었다(Yoshie et al., 2004). Clone N4는 또 *Rhodobacter*와 동일

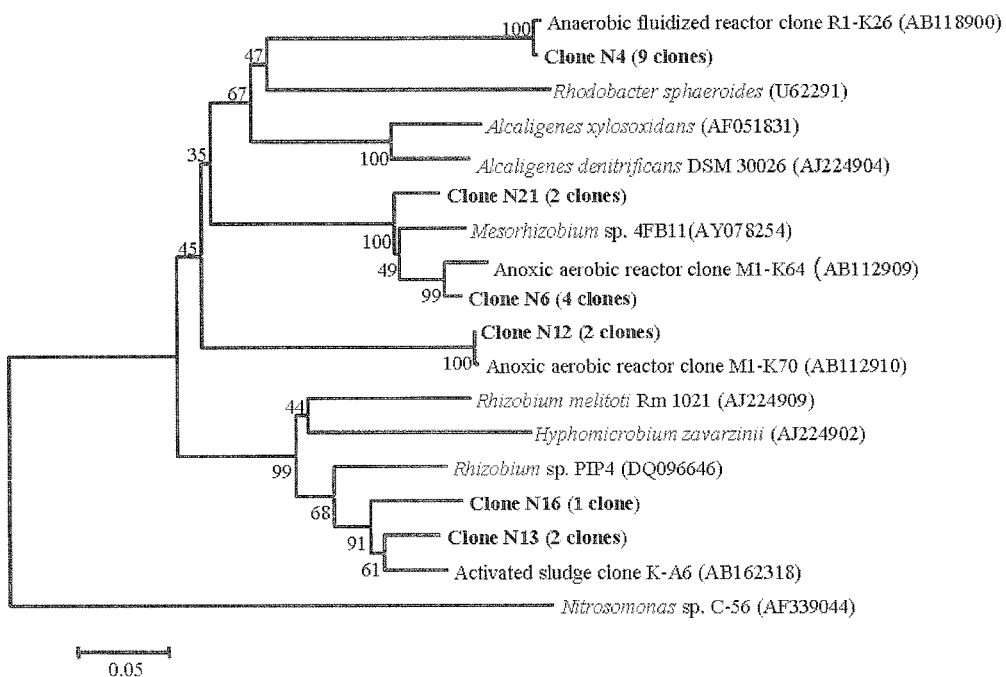


Fig. 6. Neighbor-joining analysis of partial *nirK* gene products cloned from DNA isolated from the sludge of SMMIAR reactor. The tree shows the topology of branching. Accession numbers in brackets. Values indicate the percentage of 100 replicate trees.

한 cluster를 형성하였는데 이는 *Rhodobacter*와 관련된 미생물이 SMMIAR 반응조 내 탈질미생물 분포의 전반정도를 차지함을 의미한다. *Rhodobacter*는 대표적인 탈질미생물로서 공업폐수처리용 생물막반응조에서도 중요한 미생물로 존재한다는 보고도 있다(Satoh et al., 2006).

그 다음 가장 많은 부분을 차지하는 탈질미생물은 *Mesorhizobium*과 관련된 미생물로서 두 가지 종류의 clone이 각각 4개(20%)와 2개(10%)가 분석되었다. 그 중 4개 clone은 SBR반응기 내 탈질미생물 clone M1-K64과 97%의 상관성을 나타냈다(Hoshino et al., 2005). 또 다른 두 개의 clone(10%)도 이 SBR 시스템내의 다른 한 clone인 M1-K70과 99%이상의 유사성을 나타냈다. 그 외 3개의 clone(15%)은 *Rhizobium* 관련 미생물과 동일한 cluster를 형성하였다. *Rhizobium* 미생물은 일반적으로 공생성(symbiotic) 질소고정미생물로 알려져 있지만, 최근에는 폐수처리시스템에서도 새로운 종류의 *Rhizobium* 미생물이 발견되고 있다(Quan et al., 2005).

SMMIAR 반응조에서 발견된 탈질미생물관련 20개의 clone은 모두 alpha-Proteobacteria에 속하는 미생물이다. 이는 공업폐수처리용 질소제거 관련 생물막반응조에서도 alpha-Proteobacteria에 속하는 미생물이 가장 많이 발견되었다는 보고와도 일치한다(Satoh et al., 2006). 이러한 결과는 이 두 시스템 모두 단일반응조에서 질산화와 탈질이 동시에 일어나는 공통점과 관련이 있다고 생각된다.

4. 결론

노장지구 SMMIAR 반응조 내 상부와 하부 부유미생물 슬러지는 암모니아 산화 및 탈질에 있어서 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 미생물 clone library 구축은 반응조 중부의 단일 슬러지를 대상으로 진행하였다.

1. 슬러지내 암모니아 산화미생물과 관련된 29개 clone 중 27개 clone은 같았으며 이들은 이미 밝혀진 *Nitrosomonas europaea*의 *amoA* 유전자와 비슷하였으며, 다른 혐기성 질소제거시스템에서 분석한 암모니아 산화미생물 *amoA* 유전자들과도 높은 유사성(>99%) 나타냈다. 이러한 결과는 SMMIAR 반응조에 존재하는 암모니아 산화미생물들이 주로 낮은 산소농도에서도 상대적으로 안정적으로 암모니아를 산화할 수 있는 미생물들임을 의미한다.
2. ANAMMOX 미생물에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였으나 밝혀진 ANAMMOX 미생물과 관련된 염기서열은 얻지 못했다. 이는 본 SMMIAR 반응조에서는 현재까지 밝혀진 ANAMMOX 미생물과 관련된 혐기성 암모니아 산화미생물들이 중요한 작용을 하고 있지 않음을 의미한다.
3. 슬러지내 탈질미생물과 관련된 20개 clone 중 9개의 clone이 *Rhodobacter*와 동일한 cluster를 형성하면서 fluidized bed 형태 질소제거시스템내의 중요 미생물 clone과도 99%이상의 유사성을 나타냈다. 나머지 clone들은 주로 *Mesorhizobium* (30%) 및 *Rhizobium* (15%)과

같은 cluster를 형성하였다. 이 20개 clone 모두 alpha-Proteobacteria에 속하여 단일반응조에서 질산화와 탈질이 동시에 일어나는 다른 시스템과 동일한 특성을 나타냈다.

따라서 본 SMMIAR 반응조는 이미 단일반응조내 질산화와 탈질진행에 순화된 미생물 분포를 갖고 있음을 알 수 있다. 시스템 안정화 및 규모확장과정에서 지속적으로 질산화 및 탈질 관련 미생물에 대한 분석을 진행한다면 안정적인 상태에서의 미생물분포와의 비교분석을 통해 현재 시스템내 미생물들의 군집구조의 상황과 변화방향을 조기에 확정할 수 있다. 시스템내 미생물 조성이 완전히 파괴되기 이전에 예측하고, 운전조건을 변화시켜 시스템이 안정화되는 방향으로 변화하도록 유도할 수 있다. 그러므로 질산화 및 탈질 관련 미생물에 특이적인 유전자 분석을 통한 질소제거시스템 내 미생물 조성에 대한 분석은 앞으로의 시스템안정화와 처리규모확장에 있어서 중요한 지표로 이용될 수 있으리라 생각된다.

사 사

본 연구는 대전환경기술개발센터의 2005년도 연구개발사업 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- APHA, AWWA and WEF, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th Ed. (1998).
- Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K. P., Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) to Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, pp. 3769-3775 (1998).
- Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A. J. and Van der Meer, J. R., Microbial Composition and Structure of a Rotating Biological Contactor Biofilm Treating Ammonium-rich Wastewater without Organic Carbon, *Microb. Ecol.*, **45**, pp. 419-432 (2003).
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M. and Amann, R., Structure and Activity of Multiple Nitrifying Bacterial Populations Co-existing in a Biofilm, *Environ. Microbiol.*, **5**, pp. 355-369 (2003).
- Hoshino, T., Terahara, T., Tsuneda, S., Hirata, A. and Inamori, Y., Molecular Analysis of Microbial Population Transition associated with the Start of Denitrification in a Wastewater Treatment Process, *J. Appl. Microbiol.*, **99**, pp. 1165-1175 (2005).
- Kim, H. T., The Simultaneous Removal of Organic Matters and Nutrients using High-rate Anaerobic Reactor and Moving Media Intermittent Aeration Reactor, *J. Environ. Sci. Health*, **A43**, pp. 2657-2667 (1997).
- Kim, H. T., Randall, C. W. and Oh, S. H., Biological Nutrient Removal using a Submerged Moving Media Intermittent Aeration Reactor (SMMIAR), *Adv. Environ.*

- Res.*, **3**, pp. 215-225 (1999).
- Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., Extraordinary Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria, *American Society Microbiology News*, **67**, pp. 456-463 (2001).
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. and Nei, M., MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software, *Bioinformatics*, **17**, pp. 1244-1245 (2001).
- Marsh, T. L., Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): An Emerging Method for Characterizing Diversity among Homologous Populations of Amplification Products, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, pp. 323-327 (1999).
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A. and Kuenen, J. G. (1995) Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**, pp. 177-183 (1995).
- NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov> (accessed Apr 2006).
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. and Schleifer, K. H., Monitoring a Widespread Bacterial Group: in situ Detection of Planctomycetes with 16S rRNA-targeted Probes, *Microbiology*, **144**, pp. 3257-3266 (1998).
- Park, H. D. and Noguera, D. R., Evaluating the Effect of Dissolved Oxygen on Ammonia-oxidizing Bacterial Communities in Activated Sludge, *Water Res.*, **38**, pp. 3275-3286 (2004).
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. and Wagner, M., Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, pp. 5368-5382 (2000).
- Pynaert, K., Smets, B. F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S. D., and Verstraete, W., Characterization of an Autotrophic Nitrogen-removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-scale Rotating Biological Contactor, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, pp. 3626-3635 (2003).
- Quan, Z. X., Bae, H. S., Baek, J. H., Chen, W. F., Im, W. T. and Lee, S. T., *Rhizobium daejeonense* sp. nov., Nickel-complexed Cyanide-degrading Bacterium, *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, pp. 2543-2549 (2005).
- Quan, Z. X., Rhee, S. K., Bae, J. W., Baek, J. H., Park, Y. H. and Lee, S. T., Bacterial Community Structure in Activated Sludge Reactors Treating Free or Metal-complexed Cyanides, *J. Microbiol. Biotech.*, **16**, pp. 232-249 (2006).
- Rothauwe, J. H., Witzel, K. P. and Liesack, W., The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-scale Analysis of Natural Ammonia-oxidizing Populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, pp. 4704-4712 (1997).
- Sacks, M. S., Incorporation of Experimentally-derived Fiber Orientation into a Structural Constitutive Model for Planar Collagenous Tissues, *J Biomech. Eng.*, **125**, pp. 280-287 (2003).
- Saitou, N. and Nei, M., The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, *Mol. Biol. Evol.*, **4**, pp. 406-425 (1987).
- Satoh, H., Yamakawab, T., Kandaichi, T., Ito, T. and Okabe, S., Community Structures and Activities of Nitrifying and Denitrifying Bacteria in Industrial Wastewater-treating Biofilms, *Biotechnol. Bioeng.*, DOI: 10.1002/bit.20894 (2006).
- Schmidt, I. and Bock, E., Anaerobic Ammonia Oxidation with Nitrogen Dioxide by *Nitrosomonas Eutropha*, *Arch. Microbiol.*, **167**, pp. 106-111 (1997).
- Schmidt, I. and Bock, E., Anaerobic Ammonia Oxidation by Cell-free Extracts of *Nitrosomonas eutropha*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, pp. 271-278 (1998).
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S., Missing Lithotroph Identified as New Planctomycete, *Nature*, **400**, pp. 446-449 (1999).
- Strous, M. and Jetten, M. S., Anaerobic Oxidation of Methane and Ammonium, *Annu. Rev. Microbiol.*, **58**, pp. 99-117 (2004).
- Tal, Y., Watts, J. E. and Schreier, H. J., Anaerobic Ammonia-oxidizing Bacteria and Related Activity in Batimore Inner Harbor Sediment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, pp. 1816-1822 (2005).
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G., The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools, *Nucleic Acids Res.*, **25**, pp. 4876-4882 (1997).
- Woese, C. R. and Fox, G. E., Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, pp. 5088-5090 (1977).
- Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A. and Inamori, Y., Salinity Decreases Nitrite Reductase Gene Diversity in Denitrifying Bacteria of Wastewater Treatment Systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, pp. 3152-3157 (2004).