

16S rRNA 유전자 기반의 Pyrosequencing을 이용한 하수처리시설 생물반응기의 세균군집구조 분석

김택승 · 김한신 · 권순동 · 박희등*

고려대학교 건축사회환경공학부

Analysis of Bacterial Community Composition in Wastewater Treatment Bioreactors Using 16S rRNA Gene-Based Pyrosequencing

Taek-Seung Kim, Han-Shin Kim, Soondong Kwon, and Hee-Deung Park*

School of Civil, Environmental and Architectural Engineering, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea

(Received December 6, 2010/Accepted December 21, 2010)

Bacterial community composition in activated sludge wastewater treatment bioreactors were analyzed using 16S rRNA gene-based pyrosequencing for the four different wastewater treatment processes. Sequences within the orders *Rhodocyclales*, *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, *Myxococcales*, *Xanthomonadales*, *Acidobacteria* group 4, *Anaerolineales*, *Methylococcales*, *Nitrospirales*, and *Planctomycetales* constituted 54-68% of total sequences retrieved in the activated sludge samples, which demonstrated that a few taxa constituted majority of the activated sludge bacterial community. The relative ratio of the order members was different for each treatment process, which was assumed to be affected by different operational and environmental conditions of each treatment process. In addition, activated sludge had very diverse bacterial species (Chao1 richness estimate: 1,374-2,902 operational taxonomic units), and the diversity was mainly originated from rare species. Particularly, the bacterial diversity was higher in membrane bioreactor than conventional treatment processes, and the long solids retention time of the operational strategy of the membrane bioreactor appeared to be appropriate for sustaining diverse slow growing bacteria. This study investigating bacterial communities in different activated sludge processes using a high-throughput pyrosequencing technology would be helpful for understanding microbial ecology in activated sludge and for improving wastewater treatment in the future.

Keywords: 16S rRNA, activated sludge, bacterial community composition, pyrosequencing, wastewater treatment plant

활성슬러지는 호기성 하수처리 생물반응기에서 생성되는 플록(floc) 상태로 존재하는 미생물의 복합체를 지칭한다. 활성슬러지를 포함한 하수처리 생물반응기는 하수에 존재하는 다양한 오염물을 분해하고, 독성물질을 무해화하며, 영양물질을 제거하는 역할을 수행함으로써 물환경을 보호하고 공중보건과 위생의 개선에 기여하고 있다(8, 17). 활성슬러지 미생물군집은 세균, 원생동물, 조류, 균류, 하등동물 등을 포함한 다양한 미생물로 구성되어 있다. 이 중에서 세균은 95% 이상의 비율을 차지하고 있어(2) 하수처리에서 중심적인 역할을 한다고 알려져 있다(6). 활성슬러지 세균군집구조는 하수 유입수의 성상변

화 및 처리장 운영변수에 영향을 받으며(17) 시간에 따라 변화하는 것으로 알려져 있다(3, 17). 여러 과학자와 환경공학자들은 이러한 변수들이 활성슬러지 세균군집구조와 군집의 역동성에 영향을 미치며 이는 하수처리장의 처리효율과 관련이 있다고 가정하고 있다(3, 9, 16).

지난 30년간 활성슬러지 세균군집구조를 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 연구초기에는 주로 배양법에 기초한 접근방법이 주류를 이루었다. 이는 평판배지에 직접 시료를 도말하여 단일군락(single colony)을 얻거나, 액체배지에 농화배양(enrichment culture)을 실시한 후 평판배지에서 단일군락을 얻는 방법이다. 하지만, 활성슬러지에 포함된 세균은 약 1-15% 정도만 배양이 가능하기 때문에(1) 배양법에 의존한 세균군집

* For correspondence. E-mail: heedeung@korea.ac.kr; Tel: +82-2-3290-4861; FAX: +82-2-928-7656

구조의 분석방법은 완전한 군집구조를 밝히는 데에 있어서 한계가 있다(15). 최근의 분자생물학적 기법의 발달은 배양에 의존하지 않고 활성슬러지 세균군집의 구성을 보다 객관적으로 밝힐 수 있게 하였다. 특히, 16S rRNA 유전자와 같이 세균의 계통분류에 용이한 유전자를 클로닝하여 Sanger 방법을 이용해 염기서열을 결정한 후, 이를 활성슬러지 세균군집을 분석하는 방법이 널리 이용되고 있다(15). 한편, 클로닝과 Sanger 염기서열 분석법은 고가의 분석비용(많은 클론을 분석할 경우), 많은 노동력, 그리고 긴 분석시간 등의 이유로 대개 적은 수의 클론만을 세균군집구조 분석에 이용하고 있어(일반적으로 500 개 이하), 활성슬러지 세균군집과 같이 매우 복잡한 군집구조를 가지고 있는 시료를 대상으로 한 연구에는 역시 한계가 있는 것으로 알려졌다(18).

이러한 단점들을 극복하기 위해 최근 세계적으로 16S rRNA 유전자 기반의 pyrosequencing 방법을 이용한 미생물 군집구조 분석법이 주목을 받고 있다. Sanger DNA 염기서열 결정방법이 dideoxynucleotide를 이용해 DNA 사슬을 종결하면서 염기서열을 결정하는데 반해, pyrosequencing DNA 염기서열 결정방법은 효소를 이용해 DNA 사슬을 신장시키면서 염기서열을 결정하게 된다(12). 454 Life Sciences 사(현재는 Roche Diagnostics)는 pyrosequencing 반응을 대량으로 단시간에 가능케 하는 기술을 상용화하였다(12). 이 회사에서 개발한 Genome Sequencer (GS) FLX 플랫폼은 합리적인 분석비용으로 약 10시간에 약 1억 개의 염기서열을 결정하는 것을 가능케 하였다. Pyrosequencing 방법은 특히 미생물 생태학자들에게 많은 주목을 받게 되었는데, 이는 짧은 시간에 합리적인 비용으로 대량의 염기서열을 결정할 수 있는 pyrosequencing의 특성이 복잡한 미생물군집을 분석하는데 적합하기 때문이다.

16S rRNA 유전자 기반의 pyrosequencing 방법을 이용한 미생물군집구조의 연구는 토양, 대장, 분변, 침적토, 해수, 지표수 등의 시료를 대상으로 활발히 진행되고 있는 것에 반해, 활성슬러지 세균군집 분석에 관한 보고는 아직까지 초보수준에 머물러 있다. 몇몇 연구자들이 이 방법을 이용해 활성슬러지 세균군집구조의 특성을 보고하고 있지만 대부분의 연구는 단일 하수처리 생물반응기에 한정되었다(7, 13). 이는 활성슬러지

의 세균군집의 주요한 분류군, 역동성, 및 다양성 등의 다양한 생태학적 특성을 포괄적으로 이해하는데 많은 제한을 주고 있다. 따라서, 본 연구의 목적은 다양한 처리공정의 하수처리 생물반응기에서 활성슬러지 시료를 채취해 16S rRNA 유전자 기반의 high-throughput pyrosequencing 기술과 다양한 생태학적 분석기법을 이용해 세균군집의 구성과 다양성 등을 처리시설 별로 분석하여 포괄적으로 활성슬러지 세균군집의 특성을 이해하는 것이다.

재료 및 방법

하수처리장 및 시료채취

본 연구에서는 일반적인 생물학적 하수처리공법으로 운영되는 2개의 하수처리시설[구리하수처리장(Guri, Korea), 포항하수처리장(Pohang, Korea)]과 분리막을 이용한 하수처리공법(membrane bioreactor)으로 운영되는 2개의 하수처리시설[덕평하수처리장(Ichon, Korea), 석수하수처리모형장치(Anyang, Korea)]를 선택하여 세균군집구조의 특성을 조사하였다. 구리하수처리장은 고도처리를 위해 생물반응기가 혐기조, 무산소조, 및 호기조로 분리되어 있었으며, 호기조에는 미생물 농도를 높게 유지하기 위해 섬모상 미생물 부착여체가 충전되어 운영되고 있었다. 포항하수처리장은 고도처리가 도입되지 않았으며 생물반응기가 호기조로만 구성된 일반적인 활성슬러지 공정으로 운영되고 있었다. 덕평하수처리장은 영동고속도로 덕평휴게소에 설치된 하수처리장으로 생물반응기가 탈기조, 무산소조, 혐기조, 호기조, 및 분리막조로 구성되어 있었으며, 처리수를 얻기 위해 분리막조에는 0.01 µm 크기의 공정을 가진 침지형 정밀여과막(immersed microfiltration membrane)이 설치되어 있었다. 석수하수처리모형장치는 석수하수처리장의 1차 처리수를 대상으로 한 하수처리 평가시설로 생물반응기는 탈기조, 무산소조, 호기조, 및 분리막조로 구성되어있으며, 분리막조에는 덕평하수처리장과 마찬가지로 침지형 정밀여과막이 설치되어 있었다. 각 하수처리시설의 자세한 제원 및 특징을 Table 1에 설명하였다.

모든 시료는 여름철에 채취하였다. 2009년 7월에 구리하수처리장, 덕평하수처리장, 석수하수처리모형장치로부터, 2006년

Table 1. Characteristics of the wastewater treatment plants (WWTPs) used in this study

| | Guri WWTP | Pohang WWTP | Dukpyung WWTP | Seoksu pilot |
|--------------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------------------------|--------------------------------|
| Location | Guri, Korea | Pohang, Korea | Yicheon, Korea | Anyang, Korea |
| Capacity (m ³ /day) | 160,000 | 80,000 | 1,100 | 500 |
| Treatment process | BNR | CAS | MBR | MBR |
| Bioreactor configuration | Anaerobic/Anoxic/Aerobic | Aerobic | Deoxic/Anaerobic/Anoxic/Anaerobic/Membrane | Deoxic/Anoxic/Aerobic/Membrane |
| Bioreactor HRT (h) | 5.9 | 6.1 | 6 | 6.5 |
| Bioreactor SRT (h) | 8.5 | 6.8 | 90 | 64.8 |
| Influent/effluent BOD (mg/L) | 120.5/8.0 | 66.3/3.3 | 312/2.7 | 134.2/1.0 |
| Influent/effluent SS (mg/L) | 124.4/8.0 | 74.7/3.9 | 178/0.6 | 184/0.4 |
| Influent/effluent TN (mg/L) | 32.2/15.0 | 15.9/9.9 | 70.1/15.3 | 34.8/5.8 |
| Influent/effluent TP (mg/L) | 2.9/1.5 | 1.9/0.9 | 6.6/1.4 | 4.8/0.7 |

Abbreviations; BNR, biological nutrient removal; CAS, conventional activated sludge; MBR, membrane bioreactor; HRT, hydraulic retention time; SRT, solids retention time; BOD, biochemical oxygen demand; SS, suspended solids; TN, total nitrogen

8월에 포항하수처리장으로부터 각각 활성슬러지 시료를 채취하였다. 시료 채취는 생물반응기 호기조 말단에서 손잡이가 달린 bucket-type 시료채취기를 이용해 grab sampling 방법으로 실시하였으며, 바로 아이스박스에 보관하였다. 시료를 실험실로 옮긴 후에는 DNA 추출 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

DNA 추출, DNA 증폭, 및 pyrosequencing

시료 준비는 우선 1.5 ml 활성슬러지를 Tris-EDTA (pH=7.6) 완충액으로 세정한 후 원심분리기로 활성슬러지를 회수하였으며, 이 때 회수된 활성슬러지를 250 μl Tris-EDTA (pH=7.6) 완충액으로 현탁하였다. 이 현탁액을 genomic DNA 추출시료로 이용하였으며, 추출은 Soil Extraction kit (MoBio Laboratories, USA)를 이용하였다. 약 20-50 ng의 genomic DNA를 PCR에 이용하였다. PCR로 세균의 16S rRNA 유전자를 증폭하였으며, primer 세트인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; M은 A 또는 C를 나타냄)와 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')을 이용하였다. 각각의 50 μl PCR 반응을 위해 $1\times$ EF-Taq buffer (Solgent, Korea), 2.5 unit의 EF-Taq polymerase (Solgent), 0.2 mM dNTP mix, 0.1 μM 의 primer, 그리고 100 ng의 template DNA를 사용하였다. PCR을 위한 온도조건은 95°C (10분); 35주기의 94°C (45초), 55°C (1분), 72°C (1분); 72°C (10분)으로 구성되었다. Duplicate PCR 산물을 혼합한 후 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 PCR 산물을 정제하였으며, 이 후 pyrosequencing 반응에 이용하였다.

Pyrosequencing 반응을 위해 PCR 산물의 양쪽 말단을 blunt end로 전처리한 후 14-bp 길이의 adaptor를 부착시켰다. 이렇게 변형된 PCR 산물은 하나의 단편이 DNA 부착 구슬 (bead) 하나에 부착되도록 하여, 부착된 단편을 증폭시킨 후 구슬들은 필요한 시약 및 효소와 함께 PicoTiterPlate의 well에 함침한 뒤 GS FLX Titanium system (Roche, Germany) 염기서열 분석기를 이용하여 pyrosequencing 반응을 진행시켰다. Pyrosequencing에 요구되는 모든 반응은 염기서열 분석기 제조사(Roche)의 방법에 따라 Macrogen 사(Korea)에서 실시하였다.

세균군집구조 분석

염기서열 데이터는 우선 GS FLX 소프트웨어(Roche)를 이용해 adaptor의 key를 인식해 4개의 하수처리시설에 해당하는 염기서열을 각각 분류하였다. 이 후 같은 소프트웨어를 이용하여 염기서열의 adaptor와 PCR primer 부위를 제거하였다. 부정확하게 결정된 염기서열과 PCR 과정에서 발생할 수 있는 염기서열 오류를 최소화하기 위해 300 bp 이하의 염기서열을 제거하였으며, Mothur (14) 프로그램을 이용해 chimera 염기서열 후보군도 제거하였다. 이렇게 전처리를 마친 염기서열에 대하여 RDP (4) Classifier를 이용해 계통분류를 실시하였다. 또한, RDP Aligner와 RDP Mothur: column distance matrix를 이용하여 distance matrix를 만들었으며, 이를 Mothur에 적용하여 observed OTU (operational taxonomic unit), Chao1 richness estimate, Shannon index 등의 다양성 인자들과 rarefac-

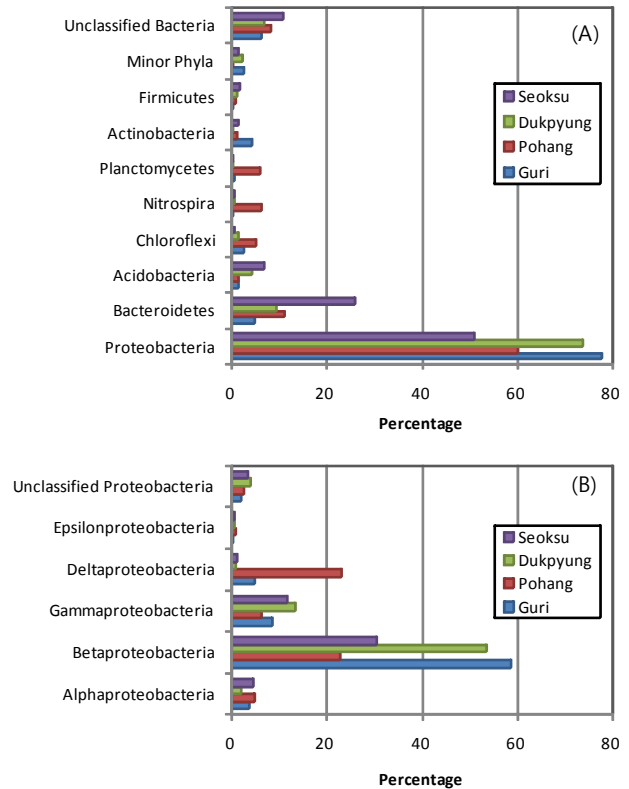


Fig. 1. Taxonomic composition by phylum (A) and by class within the phylum *Proteobacteria* (B) for the 16S rRNA gene sequences retrieved from the four different activated sludge samples.

tion curve 및 rank abundance curve 분석을 실시하였다.

결과

활성슬러지 세균군집구조 분석

활성슬러지 세균군집구조를 분석하기 위해 하수처리 생물반응기로부터 얻은 4개의 sequence library로부터 각각 2,988개의 16S rRNA 유전자 염기서열을 무작위로 선별하였다. 분석에 이용된 염기서열의 수가 세균군집구조 및 다양성에 미치는 영향을 최소화하기 위해 동일한 수의 염기서열을 선별하였다 (11). 선별된 염기서열의 평균 길이는 구리 434.8 ± 49.5 , 포항 445.2 ± 49.3 , 덕평 427.3 ± 52.3 , 석수 433.6 ± 55.0 bp로 시료별 염기서열 길이 차이는 적은 것으로 나타났다. 선별된 염기서열에 대하여 RDP Classifier를 이용하여(80% cutoff) 세균 계통분류를 실시하였으며, 이를 토대로 하수처리 생물반응기의 세균군집구조 특성을 분석하였다.

우선 각각의 하수처리 생물반응기에서 선별된 염기서열을 분류단계별로 Table 1에 정리하였다. 구리, 포항, 석수 시료는 각 분류단계별로 비슷한 수의 분류군을 가지고 있었다. 문(phylum) 12-13개, 강(class) 26-27개, 목(order) 39-47개, 과(family) 63-69개, 속(genus) 101-108개가 확인되었다. 한편, 덕평 시료는 문(14개), 강(27개), 및 목(37개) 분류단계에서는 다른 3개의 시료와 비슷한 수의 분류군을 가지고 있었으나, 과

(52개)와 속(75개) 분류단계에서는 상대적으로 적은 분류군이 발견되었다.

선별된 염기서열을 더욱 정량적으로 비교분석하기 위해 분류단계별로 발견된 분류군의 비율을 분석하였다. 하위분류 단계로 이동할수록 분류되지 않는 미생물군의 비율이 증가하는 경향을 보였다. 문 수준(전체 염기서열의 6.2-10.8%), 강 수준(10.4-23.0%), 목 수준(18.3-34.4%), 과 수준(23.9-42.6%), 속 수준(37.6-70.7%). 각 시료에서 선별한 염기서열에 대해 문 수준(Fig. 1A)과 *Proteobacteria* 문에 속하는 염기서열을 강 수준에서 분석하였다(Fig. 1B). *Proteobacteria* 문에 속하는 미생물군은 그 비율이 51.1-77.7%로 모든 하수처리 생물반응기 시료에서 가장 많이 발견되었으며, 다음으로 *Bacteroidetes* (4.9-25.8%), *Acidobacteria* (1.3-6.7%), *Chloroflexi* (0.6-5.2%), *Nitrospira* (0.0-6.2%), *Planctomycetes* (0.2-5.9%), *Actinobacteria* (0.3-4.1%), 및 *Firmicutes* (0.2-1.5%)에 속하는 미생물군이 발견되었다. 문 수준과 강 수준(*Proteobacteria* 문에 속하는)에서 염기서열을 분석한 결과 하수처리 생물반응기의 세균군집구조는 처리장에 따라 독특한 군집구조를 보였다. 문 수준에서 살펴보면 구리, 포항, 덕평 하수처리장에서는 *Proteobacteria* 문이 60% 이상을 차지하고 있으나, 석수 시료는 *Proteobacteria* 문(51.1%) 뿐만 아니라 *Bacteroidetes* 문(25.8%)도 우점군으로 발견되었다. 강 수준에서 구리와 덕평 시료는 *Betaproteobacteria* 강에 속하는 염기서열이 많았으나(각각 58.5와 53.4%), 포항 시료는 *Betaproteobacteria* 강(22.9%)과 *Deltaproteobacteria* 강(22.9%)에 속하는 염기서열이 많았으며, 석수 시료에서는 *Betaproteobacteria* 강(30.3%)과 *Gamma-proteobacteria* 강(11.5%)에 속하는 염기서열이 많았다.

각 시료에서 선별한 염기서열을 더욱 정밀하게 비교·분석하기 위해 선별된 목 수준에서 계통분류를 시도하였다. 과 수준 이하에서는 분류되지 않는 염기서열이 하수처리시설별로 전체 sequence의 23.9-42.6% 이상 존재하여, 목 미만의 하위 분류단계에서는 더 이상 비교분석이 시도되지 않았다. 4개의 시료에서 발견된 총 57개의 목에 대해 존재유무와 양적비교를 heat map 분석을 통해 Fig. 2에 나타내었다. 포항 시료에서 가장 많은 47개의 목이 발견되었으며 다음으로 구리(44개), 석수(39개), 덕평(37개) 순이었다(Fig. 2A). 각각의 목에 속하는 염기서열의 양적비교를 나타낸 heat map (Fig. 2B)에서는 일부의 목이 대부분을 차지하며 다수의 목이 매우 적은 부분을 차지하는 것을 알 수 있었다. 전체 염기서열 수의 1% 이상을 차지하는 목은 총 57개의 목 중에서 17개에 불과하였다. 특히, *Rhodocyclales*, *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, *Myxococcales*,

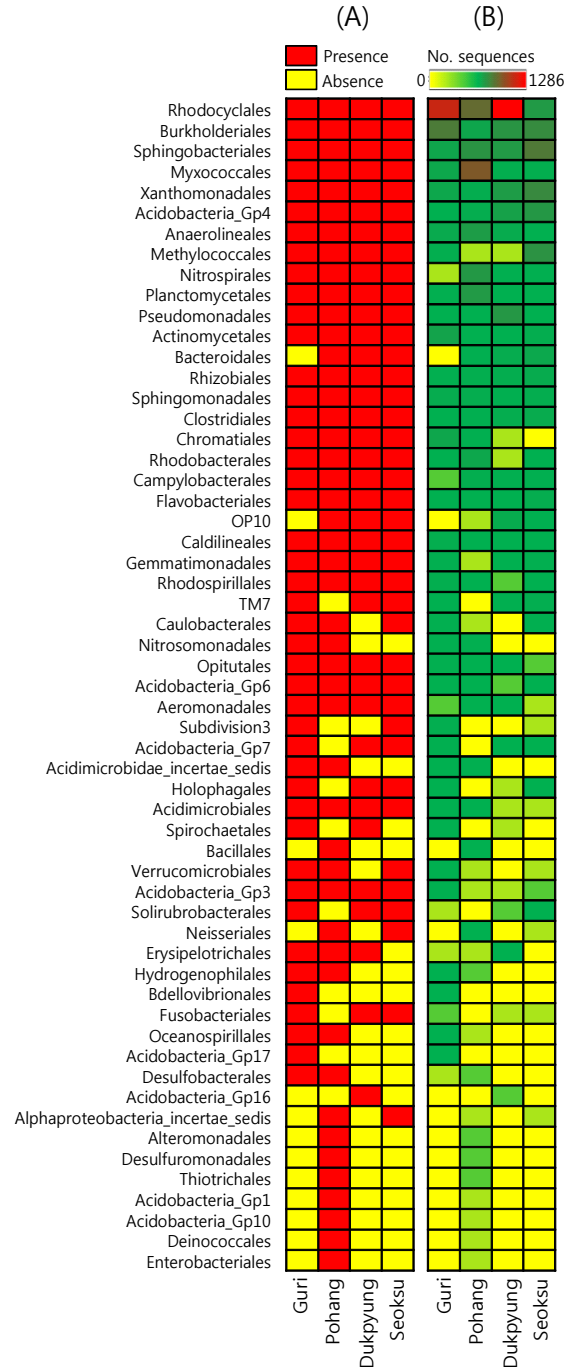


Fig. 2. Heat map analysis of the 57 orders based on presence and absence (A) and the number of detected sequences (B) for the four different activated sludge samples.

Table 2. Classification of 16S rRNA gene sequences by different taxonomic levels

| Taxonomic level | Total numbers | | | | Mean | Standard deviation |
|-----------------|---------------|-------------|---------------|--------------|------|--------------------|
| | Guri WWTP | Pohang WWTP | Dukpyung WWTP | Seoksu pilot | | |
| Phylum | 13 | 12 | 14 | 13 | 13.0 | 0.8 |
| Class | 27 | 26 | 27 | 26 | 26.5 | 0.5 |
| Order | 44 | 47 | 37 | 39 | 41.8 | 4.6 |
| Family | 65 | 69 | 52 | 63 | 62.3 | 7.3 |
| Genus | 105 | 108 | 75 | 101 | 97.3 | 15.1 |

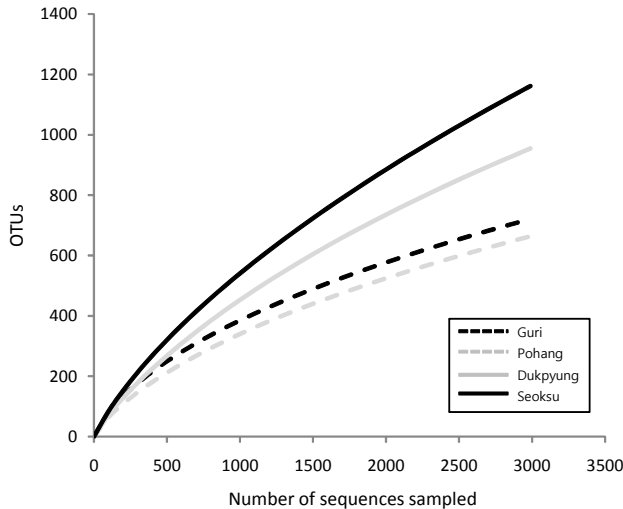


Fig. 3. Rarefaction curves of OTUs defined by 3% sequence variations for the four different activated sludge samples.

Xanthomonadales, *Anaerolineales*, *Nitrospirales*, *Planctomycetales*, *Pseudomonadales*은 5% 이상 차지하는 주요한 목이었다. 하수처리장별로 가장 많이 발견되는 목은 차이를 보였는데, 구리와 덕평 시료에서는 *Rhodocyclales* (각각 33.9와 43.0%), 포항 시료에서는 *Myxococcales* (21.6%), 석수 시료에서는 *Sphingobacteriales* (13.7%)가 가장 많이 발견되는 목이었다.

활성슬러지 세균군집의 다양성

각 시료의 세균군집의 종 다양성(species richness)을 비교하기 위해 Mothur를 이용해 rarefaction curve를 Fig. 3에 도시하였다(3% cutoff). 석수 시료의 곡선이 가장 가파른 것으로 관찰되어 종 다양성이 가장 큰 것으로 분석되었으며, 다음으로 덕평, 구리, 포항 시료 순으로 종 다양성이 작아지는 것으로 나타났다. 또한, 모든 곡선이 plateau에 도달하지 못해 4개 시료 모두 분석에 이용된 2,988개의 염기서열 수가 시료에 포함된 모든 종을 확인하기에는 부족한 것으로 나타났다. 한편, 세균군집의 다양성을 여러 측면에서 평가하기 위해 Mothur를 이용해 observed OTU, Chao1 richness estimate, 및 Shannon diversity index를 구했다(Table 3). Rarefaction curve 분석결과(Fig. 3)와 마찬가지로 세 가지 다양성 지표(index)에서 석수 시료가 가장 높은 값을 나타내었으며, 다음으로 덕평, 구리, 포항 시료 순으로 낮은 값을 나타내었다.

고찰

Pyrosequencing을 이용하여 여러 하수처리 활성슬러지 생물반응기의 세균군집의 구조와 다양성을 비교 분석한 본 연구는 이전에 발표된 논문에 비하여 매우 자세하고 포괄적인 정보를 제공하고 있다. Sanapareddy 등(13)은 pyrosequencing을 이용하여 미국 North Carolina에 위치한 한 활성슬러지 하수처리 생물반응기를 대상으로 세균군집을 조사하였지만, 연구의 접근 방법이 시료의 전체 염기서열을 얻기 위한 메타게놈 연구이었기 때문에 단지 148개의 적은 수의 16S rRNA 유전자만을 얻을 수 있었다. 이는 군집구조가 복잡한 활성슬러지 세균군집을 평가하는데 한계를 보였다. 한편, Kwon 등(7)은 본 연구와 동일한 구리하수처리장 생물반응기를 대상으로 pyrosequencing을 이용하여 16S rRNA 유전자의 sequence library를 통해 연구를 하였지만, Sanapareddy 등(13)과 마찬가지로 단일의 하수처리 생물반응기만을 대상으로 세균군집을 분석하였기 때문에 활성슬러지 미생물 군집구조를 포괄적으로 이해하는 데에는 어려움이 있었다.

Wagner와 Loy는 8개의 하수처리 혹은 산업폐수처리 생물반응기로부터 전통적인 16S rRNA 유전자 클론 library를 이용하여 세균군집을 조사했는데, 활성슬러지에는 *Beta-*, *Alpha-*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, 그리고 *Actinobacteria*에 속하는 세균이 주로 존재하며, 세균의 다양성 측면에서 약 17-268개의 OTU가 존재한다고 보고하였다(15). 한편, 정량 fluorescent *in situ* hybridization 방법을 이용해 산업폐수처리 활성슬러지 세균군집을 조사한 Juretschko 등(5)의 연구에 의하면 *Betaproteobacteria* (47%)가 주류를 차지하며, 나머지는 *Alphaproteobacteria* (16%), *Nitrospira* (12%), *Planctomycetes* (6%)가 나머지를 차지하는 것으로 보고하고 있다. 또한, 같은 시료를 16S rRNA 유전자 클론 library를 이용해 분석한 결과 세균의 군집은 최소 83개의 종이 존재하는 것으로 보고하고 있다(5). Pyrosequencing을 이용하여 4개의 하수처리 활성슬러지 세균군집구조를 분석한 본 연구도 문 혹은 강 수준에서는 이들의 연구결과와 유사하였다(Fig. 1). 하지만, 군집구조의 다양성 면에서는 pyrosequencing을 이용한 본 연구와 Kwon 등(7)의 연구결과는 이전의 클론 library를 이용한 연구와는 많은 차이를 보이고 있다. 활성슬러지 세균군집은 1,374-2,902의 OTU (Chao1 richness estimate)를 보유하고 있는 것으로 예측되고 있으며, 이는 이전의 클론 library를 이용해서 얻은 예측 값에 비해 5-170배 가량 높은 것이다. 이렇게 높은 세균의 다양성이 예측되는 이유는 매우 많은 염기서열을 대상으로 한 본 연구가 활성슬러지에 포함된 매우 희귀한 세균 종을 탐지할 수 있기

Table 3. Bacterial diversity indexes of the activated sludge samples

| Sample | Number of sequences analyzed | Observed OTU | | Chao1 index | | Shannon index | |
|---------------|------------------------------|--------------|-----------|-------------|-----------|---------------|-----------|
| | | 3% cutoff | 5% cutoff | 3% cutoff | 5% cutoff | 3% cutoff | 5% cutoff |
| Guri WWTP | 2988 | 721 | 530 | 1,374 | 923 | 5.68 | 5.11 |
| Pohang WWTP | 2988 | 664 | 506 | 1,367 | 910 | 5.16 | 4.76 |
| Dukpyung WWTP | 2988 | 955 | 722 | 2,089 | 1,367 | 5.64 | 5.18 |
| Seoksu pilot | 2988 | 1,162 | 899 | 2,902 | 1,865 | 6.29 | 5.83 |

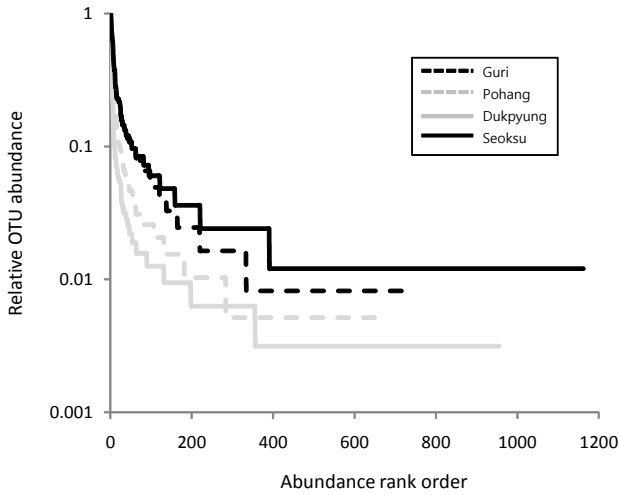


Fig. 4. Rank abundance curves of OTUs defined by a 3% sequence variation for the four different activated sludge samples.

때문이다. 이러한 추측은 발견된 OTU에 대한 rank abundance curve 분석에서 확인할 수 있었다(Fig. 4). 4개 시료 모두 상위 OTU에서 종밀도가 줄어드는 폭이 매우 큰 것으로 나타나, 상위에 위치한 몇몇 종들이 대부분의 군집을 구성하는 것으로 예측되었다. 이는 목 수준에서 세균군집을 분석한 heat map에서도 비슷한 경향을 보였다(Fig. 2B). 한편, 활성슬러지에서 발견된 희귀 세균 종이 생물반응기 안에서 어떠한 역할을 하는지는 아직까지 명확하지 않다. 하수처리장에서는 유입수와 대기로부터 외부 세균 종이 끊임없이 생물반응기로 유입되기 때문에 이러한 이유로 단지 희귀 종이 존재하는지, 혹은 아직까지 알려지지 않은 희귀 세균 종이 하수처리에서 중요한 생태학적 역할을 하는지는 밝혀지지 않았으며, 이에 대한 향후 연구가 필요하다고 할 수 있다.

하수처리 생물반응기의 세균군집 구조는 유입수 성상, 유입수에 포함된 독성물질, 생물반응기의 온도, 용존산소, pH, 체류시간 등 다양한 환경조건 및 운전조건에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 조사된 4개의 하수처리 생물반응기에 대해 세균군집구조를 비교 분석한 결과 각각의 생물반응기는 독특한 세균군집구조를 가지는 것으로 나타났는데(Figs. 1 and 2), 이는 각 하수처리 생물반응기에 주어진 독특한 환경조건 및 운전조건의 차이 때문인 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고, 각각의 생물반응기에서는 공통적으로 많이 발견되는 분류군이 존재하는 것으로 나타났다. 세균군집구조 분류를 목 수준에서 분석한 Fig. 2에서 볼 때 *Rhodocyclales*, *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, *Myxococcales*, *Xanthomonadales*, *Acidobacteria* group 4, *Anaerolineales*, *Methylococcales*, *Nitrospirales*, *Planctomycetales* 목이 전체 염기서열의 54-68%를 차지해, 여기에 속하는 세균 종이 하수처리장에서 오염물 분해에 주요 역할을 담당하는 것으로 사료된다. 한편, 높은 비율을 차지하지 않는 세균군집이라도 하수처리에서 중요한 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 질소산화를 담당하는 질산화균은 *Nitrosomonadales* 목에

속하지만 차지하는 이 세균군집이 전체 염기서열에서 차지하는 비율은 0-0.5%에 불과하였다.

OTU로 평가된 세균군집의 다양성 측면에서 석수와 덕평하수처리장이 구리 및 포항 하수처리장에 비해 높은 다양성을 가지는 것으로 나타났다(Table 3 and Fig. 3). 석수와 덕평하수처리장은 분리막을 이용한 처리공정(membrane bioreactor)을 도입하였으며 생물반응조의 고형물 체류시간(Solids retention time: SRT)이 일반적인 처리공정에 비해 2-20배 가량 길어(10) 느리게 성장하는 세균이라도 생물반응기에 체류할 수 있는 환경을 제공할 수 있다. 이러한 환경이 세균군집의 다양성을 높이는 요인이 되었을 것으로 생각된다. 흥미로운 사실은 석수와 덕평 시료에서는 구리와 포항 시료에 비해 RDP Classifier로 분류되지 않는 염기서열이 많은 것으로 나타나, 긴 고형물 체류시간으로 인하여 RDP database에 포함되어 있지 않은 희귀 세균 종을(즉 분류되지 않는 염기서열) 다수 포함하고 있는 것으로 판단된다.

16S rRNA 유전자 기반의 pyrosequencing을 이용하여 활성슬러지 하수처리 생물반응기의 세균군집구조를 분석한 본 연구는 이전의 연구에 비해 세균군집구조를 대단위로 분석하였다. 여러 하수처리장 시료를 비교 분석한 결과 소수의 세균 분류군이 대부분의 세균군집을 구성하였으며, 이들의 세균 분류군의 조성은 처리장마다 상이한 것으로 나타나 이들의 조성이 어떻게 환경변수와 운영변수와 연관성이 있는지에 대한 연구가 향후 더 필요할 것으로 보인다. 또한, 본 연구로부터 얻은 결과는 향후 세균군집구조의 역동성과 세균군집구조와 생물반응기의 성능과 연계하여 연구를 수행하는데 기초적인 정보를 제공할 것으로 생각된다.

적요

서로 다른 처리공정으로 운영되는 4개의 하수시설을 대상으로 16S rRNA 유전자 기반의 pyrosequencing을 이용해 활성슬러지 하수처리 생물반응기의 세균군집구조를 분석하였다. 활성슬러지에는 *Rhodocyclales*, *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, *Myxococcales*, *Xanthomonadales*, *Acidobacteria* group 4, *Anaerolineales*, *Methylococcales*, *Nitrospirales*, *Planctomycetales* 목에 속하는 염기서열이 전체의 54-68%를 차지해, 소수의 세균 분류군이 활성슬러지 세균군집의 대부분을 차지하고 있었다. 이들 소수 세균 분류군의 조성은 처리장별로 차이가 있었으며, 하수처리장의 운전조건 및 환경조건에 영향을 받는 것으로 추측되었다. 또한, 활성슬러지는 매우 다양한 세균 종을 가지는 것으로 관찰되었는데(Chao1 richness estimate: 1,374-2,902 operational taxonomic units), 대부분의 다양성은 희귀 종에 기인한 것으로 나타났다. 특히, 분리막으로 운영되는 하수처리시설에서 높은 다양성을 나타내었는데, 처리공정이 매우 긴 고형물체류시간으로 운영되어 느리게 성장하는 다양한 세균이 서식하는데 용이하기 때문인 것으로 판단되었다. High-throughput pyrosequencing 기술을 이용하여 활성슬러지 세균군집을 처리장별로 비교·분석한 본 연구는 향후 활성슬러

지 미생물의 생태학적 특성을 보다 잘 이해하고 하수처리공정을 개선하는데 도움이 될 것이다.

감사의 말

본 연구에 사용된 하수처리 생물반응기 운영자료를 제공한 구리하수처리장, 포항하수처리장, 덕평하수처리장 및 석수하수처리장 운영 관계자 여러분께 감사를 드립니다. 본 연구는 한국연구재단의 한중일 과학기술협력확충사업의 연구비(K20901001306-09B1200-10310)를 수혜 받아 진행되었습니다.

참고문헌

- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Bitton, G. 1994. Wastewater microbiology. Wiley-Liss. New York, USA.
- Briones, A. and L. Raskin. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 270-276.
- Cole, J.R., B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, D.M. McGarrell, G.M. Garrity, and J.M. Tiedje. 2005. The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, D294-D296.
- Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, and M. Wagner. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 84-99.
- Kaewpipat, K. and C.P.L. Grady. 2002. Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Sci. Technol.* 46, 19-27.
- Kwon, S., T.S. Kim, G.H. Yu, J.H. Jung, and H.D. Park. 2010. Bacterial community composition and diversity of a full-scale integrated fixed-film activated sludge system as investigated by pyrosequencing. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 1717-1723.
- Metcalf and Eddy. 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse. 4th ed. McGraw-Hill, New York, N.Y., USA.
- Park, H.D. and D.R. Noguera. 2004. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Wat. Res.* 38, 3275-3286.
- Radjenovic, J., M. Matosic, I. Mijatovic, M. Petrovic, and D. Barcelo. 2008. Membrane bioreactor (MBR) as an advanced wastewater treatment technology. *Handbook Environ. Chem.* 37-101.
- Roesch, L.F., R.R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A.K.M. Hadwin, A.D. Kent, S.H. Daroub, F.A.O. Camargo, W.G. Farmerie, and E.W. Triplett. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283-290.
- Rothberg, J.M. and J.H. Leamon. 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnol.* 26, 1117-1124.
- Sanapareddy, N., T.J. Hamp, L.C. Gonzalez, H.A. Hilger, A.A. Fodor, and S.M. Clinton. 2009. Molecular diversity of a North Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1688-1696.
- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, and C.F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
- Wagner, M. and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218-227.
- Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, and H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 81, 665-680.
- Wells, G.F., H.D. Park, C.H. Yeung, B. Eggleston, C.A. Francis, and C.S. Criddle. 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environ. Microbiol.* 11, 2310-2328.
- Xia, S.Q., L.A. Duan, Y.H. Song, J.X. Li, Y.M. Piceno, G.L. Andersen, L. Alvarez-Cohen, I. Moreno-Andrade, C.L. Huang, and S.W. Hermanowicz. 2010. Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7391-7396.