

454 Pyrosequencing을 이용한 실규모 혐기성 소화조의 아케아 군집구조 분석

강현진¹ · 김택승¹ · 이영행² · 이택준² · 한금석³ · 최영준³ · 박희등^{1*}

¹고려대학교 건축사회환경공학부, ²한국과학기술연구원 물연구센터, ³서울특별시 상수도연구원

Analysis of Archaeal Communities in Full-Scale Anaerobic Digesters Using 454 Pyrosequencing

Hyunjin Kang¹, Taek-Seung Kim¹, Young Haeng Lee², Taekjune Lee², Keumsuk Han³,
Youngjun Choi³, and Hee-Deung Park^{1*}

¹School of Civil, Environmental and Architectural Engineering, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea

²Water Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Republic of Korea

³Waterworks Research Institute, Seoul Metropolitan Government, Seoul, 149-820, Republic of Korea

(Received June 16, 2011 / Accepted September 1, 2011)

Archaeal communities were investigated using 454 pyrosequencing technology based on 16S rRNA gene in 11 samples collected from six different full-scale anaerobic digesters. Observed operational taxonomic units (OTUs) estimated from the archaeal 16S rRNA gene sequences were 13-55 OTUs (3% cutoff) which was corresponded to 29-89% of Chao1 richness estimates. In the anaerobic digesters there were archaeal sequences within the orders *Thermoproteales*, *Thermoplasmatales*, *Desulfurococcales* as well as within the orders *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, and *Methanocellales*, which are known to produce methane. Among these orders, *Methanococcales* known to produce methane using hydrogen was the predominant taxon and constituted 51.8-99.7% of total sequences. All samples showed a very similar community structure (Pearson correlation coefficient=0.99) except for one sample based on a heat map analysis. In addition, canonical correspondence analysis correlating archaeal communities to the environmental variables demonstrated that digester temperature and total solids removal rate were the two important explanatory variables. Overall results suggested that environmental and operational variables of anaerobic digester are important factors determining archaeal diversity and community structure.

Keywords: *Methanococcales*, anaerobic digestion, archaea, methanogenesis, pyrosequencing

혐기성 소화공정은 산소가 배제된 조건에서 하수슬러지, 축산폐수, 고농도 식품폐수 등의 유기성 오염물질을 생물학적으로 처리하는 효과적인 방법 중 하나이다. 이 방법은 호기성 처리방법과 비교하여 폐슬러지(wastage sludge)의 발생량이 적으며(처리된 화학적 산소요구량의 약 5-15%가 발생함), 적은 양의 영양소를 필요로 하고, 운영비가 작게 소요되는 장점이 있다(23, 28). 특히, 소화과정에서 발생하는 메탄가스는 표준 조건에서 1 L 당 35.8 kJ의 발열량을 가지고 있어, 스팀 및 온수생산, 발전, 자동차 연료 등 다양한 에너지원으로 사용되기도 한다(23, 28). 하지만, 혐기성 소화는 반응속도가 느리며,

운전이 까다롭고, 소화과정 중 불쾌한 냄새가 발생하며, 낮은 농도의 유기 오염물질 처리에 적합하지 않다는 단점들도 가지고 있다(23, 28).

혐기성 소화는 박테리아(Bacteria) 및 아케아(Archaea) 도메인에 속하는 미생물이 관여하는 생화학반응으로, 복잡한 유기물질이 여러 단계의 분해 및 산화환원을 거쳐 메탄으로 전환되는 과정이다. 복잡한 유기물질은 우선 저분자 물질인 탄수화물, 단백질 및 지질로 분해되며, 이들 물질은 더 간단한 물질(당당, 아미노산, 지방산)로 가수분해된다. 가수분해 생성물은 발효과정을 거쳐 아세트산과 수소로 전환되며, 일부는 프로피온산과 부틸산과 같은 중간생성물을 형성한다. 중간생성물은 다시 아세트산과 수소로 전환된다. 여기까지의 반응은

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

박테리아 도메인에 속하는 미생물이 담당을 하게 된다. 아세트산과 수소는 최종적으로 아케아 도메인에 속하는 미생물에 의해 메탄가스로 전환된다. 아세트산은 메탄과 이산화탄소로 분리반응(acetoclastic reaction)을 거쳐 메탄으로 전환되며(7, 22, 28), 수소는 이산화탄소를 최종전자수용체로 이용해 산화 과정을 거쳐 메탄이 된다(7, 22, 28). 일부의 메탄생성 아케아는 두 기질(아세트산과 수소)을 모두 이용하여 메탄을 생성할 수 있으나(22), 나머지 메탄생성 아케아는 기질 특이성을 가지고 있다(22). 한편, 포름산, 메탄올, 메틸아민, 디메틸아민, 메틸티올 등도 메탄을 생성할 수 있는 기질로 이용될 수 있지만(7), 혐기성 소화에서는 아세트산과 수소에 비해 중요도가 떨어지는 기질로 알려져 있다(7).

분해가 어려운 유기 오염물질의 경우(예를 들면 리그닌을 포함한 물질)에는 초기 분해반응이 전체 반응의 속도를 좌우하지만, 일반적인 유기 오염물질의 경우 성장속도가 느린 아케아에 의해 진행되는 마지막 메탄생성 반응이 혐기성 소화의 율속단계(rate-limiting step)로 알려져 있다(28). 이에 많은 연구자들이 혐기성 소화의 메탄생성에 관여하는 아케아의 군집 구조를 규명하려는 노력을 진행해 오고 있다(1, 3, 9, 11, 40). 형광 탐침자를 이용한 FISH (fluorescence *in situ* hybridization) (1, 11), 정량 PCR법(40), t-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) (3), clone library 분석(9) 등 PCR 기반의 방법들이 주로 메탄생성 아케아 군집구조를 규명하는데 이용되고 있다. 메탄생성 아케아는 주로 *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales* 목(Order)에 속하는 것으로 알려져 있으며(1), 이들 아케아 군집 구조와 다양한 환경변수 및 운영조건의 상관관계를 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(5, 34, 37). 그럼에도 불구하고 아직까지 혐기성 소화에 관여하는 아케아에 대한 정보는 충분하지 못한 편이며(9), 이는 주로 혐기성 소화에 관여하는 아케아 군집구조를 규명하기 위한 분석방법들의 한계 때문으로 사료된다. 상기에 열거한 PCR 기반의 분석방법들은 혐기성 소화에 관여하는 주요 미생물 군집을 연구하는데 효과적인 방법이지만, 반응기 내에 포함된 다양한 미생물을 정밀하게 조사하는 데에는 적합하지 못한 편이다. 한편, 16S rRNA 유전자 기반의 clone library 분석법이 아케아 군집구조를 비교적 자세하게 설명할 수 있지만(9), 비용이 많이 들고 분석시간이 길어 일반적으로 많은 수의 clone을 얻기 힘들기 때문에 이 방법 역시 군집구조의 정밀 분석에는 한계가 있다고 할 수 있다.

최근 개발된 다양한 차세대 염기서열 분석법은 비교적 적은 비용으로 단시간에 많은 염기서열을 얻을 수 있어(24), 다양한 환경의 미생물 군집구조를 매우 자세하게 분석할 수 있는 장점을 가진다. 특히, 454 Life Science사(Branford, USA)의 pyrosequencing 방법은 여러 효소를 이용해 DNA 염기서열을 신장시키면서 동시에 염기서열을 결정할 수 있는 방법으로(26), 염기서열 분석속도는 시간 당 약 1,000만 bp에 달한다(26). 특히, PCR을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭한 후 454 pyrosequencing 방법을 이용해 대량으로 염기서열을 결정한

뒤, 토양, 대장, 분변, 침적토, 해수, 지표, 활성슬러지 등 다양한 환경시료의 미생물 다양성과 군집구조를 연구한 논문이 최근 폭발적인 증가추세에 있다(20). 혐기성 소화조에 대해서도 이 분석법을 적용하여 미생물 군집을 조사한 논문이 출간되고 있지만(31), 아직까지는 많은 정보를 접하기는 어려운 실정이다. 특히, 이 분석법을 이용해 도시하수 슬러지를 기질로 한 혐기성 소화 아케아 군집구조에 관한 연구는 매우 제한적이라고 할 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 대량 염기서열 분석법인 454 pyrosequencing을 이용하여 i) 도시하수 슬러지를 처리하는 혐기성 소화조의 아케아 군집구조를 파악하고, ii) 혐기성 소화조의 운영특성과 아케아 군집구조의 연관성을 규명하는 것이다. 이를 위해 서울특별시에 위치한 4곳의 물재생센터로부터 11개 혐기성 소화 슬러지를 채취하였으며, 아케아 16S rRNA 유전자를 표적으로 하는 프라이머를 이용해 PCR을 수행하였고, PCR 산물에 대해 454 pyrosequencing을 실시하여 혐기성 소화에 관여하는 아케아 군집구조의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

혐기성 소화조의 특성 및 시료채취

혐기성 소화에 관여하는 아케아 군집구조를 규명하기 위하여, 본 연구에서는 서울특별시 소재 서남물재생센터, 난지물재생센터, 중랑물재생센터, 탄천물재생센터에서 운영중인 6개 실험규모 혐기성 소화시설을 대상으로 하였다. 서남물재생센터에서 운영중인 혐기성 소화조는 고온(50-55°C) 조건으로 운영되고 있었으며, 최초침전지에서 발생하는 생슬러지와 활성슬러지공법에서 발생하는 잉여슬러지를 1:9 비율로 혼합하여 소화조의 유입수로 사용하였다. 난지물재생센터의 혐기성 소화조는 중온(35°C)으로 운영되는 두 종류의 소화조를 가지고 있었다. 난지1처리장은 음식물폐수와 폐슬러지(생슬러지와 잉여슬러지를 1:2.5 비율로 혼합한 슬러지)를 혼합하여 소화조의 유입수로 이용하고 있었으며, 난지2처리장은 폐슬러지(생슬러지와 잉여슬러지를 1:2.5 비율로 혼합한 슬러지)만을 유입수로 이용하고 있었다. 중랑물재생센터의 2처리장은 고온(45-50°C) 조건으로 운영되었으며, 분뇨를 유입수로 이용하고 있었다. 중랑3처리장은 중온(35°C) 조건으로 운영되었으며, 폐슬러지(생슬러지와 잉여슬러지를 1:2.5 비율로 혼합한 슬러지)를 유입수로 이용하고 있었다. 탄천물재생센터의 혐기성소화조는 중온(35°C) 조건으로 운영되고 있었으며, 생슬러지와 잉여슬러지를 1:20 비율로 혼합하여 유입수로 사용하고 있었다. 소화조의 pH는 4개 물재생센터 모두 중성(7-8) 조건에서 운영되었다. 소화조의 교반방식은 모든 처리장에서 가스식 교반을 채택하고 있었다. 혐기성 소화시설에 대한 자세한 재원 및 특징은 Table 1에 나타내었다. 시료는 2011년 1월과 2월에 두 차례에 걸쳐 소화조 유출수 펌프에서 무균적으로 채취하였으며, 채취 즉시 아이스박스에 보관하여 실험실로 옮겨 DNA 추출 전까지 시료의 변성을 최소화 하기 위해 1,500 rpm (250 ×g)

Table 1. Characteristics of the six anaerobic digesters used in this study

Name	Configuration ^a	Digester Volume (m ³)	Influent composition	Digester temperature (°C)	Total solids removal (%)	Hydraulic retention time (day)	Influent concentration	
							Total solids (mg/L)	Volatile solids (mg/L)
Senam	Two-stage	6,600	Waste sludge	50-55	49.7	47.0	33,000	23,000
Nanji 1	Two-stage	6,600	Food waste+Waste sludge	35	44.0	27.6	43,700	36,885
Nanji 2	One-stage	7,100	Waste sludge	35	43.0	27.0	25,000	19,000
Jungnang 2	One-stage	3,700	Excrement	45-50	38.5	30.9	47,000	41,500
Jungnang 3	Two-stage	9,900	Waste sludge	35	57.5	46.0	35,000	26,600
Tancheon	One-stage	3,400	Waste sludge	35	41.8	26.2	30,000	24,500

^a One-stage digestion system uses one reactor, while two-stage digestion system uses two reactors for the anaerobic reaction.

으로 5분간 원심분리 후 pellet 형태로 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

DNA 추출, PCR, 및 pyrosequencing

냉동고에 보관한 시료는 상온에서 해동한 뒤 2 ml tube에 옮겨 10,000×g 로 1분간 원심분리하였다. 이후, 제조사의 프로토콜에 따라 Soil Extraction kit (MoBio Laboratories, USA) 를 이용하여 침전된 시료로부터 genomic DNA를 추출하였다. 아케아의 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭을 위해 아케아 universal primer인 21F (5'-TCCGGTTGATCCYGCCGG-3') (6)와 516R (5'-GGTDTTACCGCGGCKGCTG-3') (25)을 이용하였다. PCR 반응은 10 μM 프라이머, 10 mM dNTP mix, 1.25 unit DNA 중합효소, PCR 버퍼를 혼합한 용액을 94°C (3분); 30주기의 94°C (15초), 60°C (45초), 72°C (1분); 72°C (8분)의 온도조건에서 수행하였다. QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Korea)를 이용해 PCR 산물을 정제하였으며, 정제된 PCR 산물을 이용하여 단일 가닥 DNA library 제작과 emulsion PCR을 진행한 후 pyrosequencing 반응을 진행하였다. 상기에 열거한 pyrosequencing에 요구되는 모든 반응은 염기서열 분석기 제조사인 454 Life Science (Branford, USA)의 방법에 따라 Macrogen 사(Korea)에서 실시하였으며, GS FLX Titanium system (454 Life Science)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

아케아 군집구조 분석

Pyrosequencing을 통해 얻어진 염기서열 데이터는 Macrogen에서 독자적으로 개발한 Perl script를 이용해 Adaptor의 key를 인식해 각 시료 별로 염기서열을 분류하였다. 이 후 동일한 Perl script를 이용하여 낮은 질의 염기서열(<Q20), 작은 크기의 염기서열(<250 bp), 프라이머, 및 adaptor를 제거하였다. 또한, Mothur utility (30)를 이용하여 chimera로 의심되는 염기서열도 제거하였다. 이렇게 전처리를 마친 염기서열에 대해 RDP Classifier (2)를 이용해 계통분류를 실시하였다(bootstrap cutoff=50%). 분류된 염기서열에 대해 생태 통계분석 프로그램인 PC-ORD (10)를 이용해 two-way dendrogram 분석을 실시하여, 각 시료간의 상관도와 분류군(taxa)의 유연관계를 결정하였다. 한편, 군집의 다양성을 분석하기 위해 RDP Aligner

와 RDP Mothur: column distance matrix를 이용하여 distance matrix를 만들었으며, 이를 Mothur utility에 적용하여 Observed operational taxonomic unit (OTU), Chao1 richness estimate, Shannon index 등의 다양성 지수들과 rarefaction curve 분석을 실시하였다. 환경변수와 아케아 군집구조의 상관관계는 생태 통계분석 프로그램인 CANOCO (8, 35)를 이용해 canonical correspondence analysis (CCA)를 실시하였다.

결과

혐기성 소화조 아케아 군집의 다양성

본 연구에 이용된 6개 소화조의 11개 시료로부터 얻은 염기서열의 수는 1,470-5,333개 이었으며(평균 ± 표준편차=2,532 ± 1,097), 염기서열의 길이는 254-540 bp (430 ± 45 bp)이었다. 이들 염기서열을 대상으로 측정(3% 염기서열 차이를 기준)된 아케아 군집의 observed OTUs는 13-55 OTUs였다(30 ± 15 OTUs). 이는 Chao1 richness estimate로 계산된 값의 29-89%에 해당하였다(Table 2). 2011년 1월에 채취한 서남물재생센터 소화조가 가장 높은 55 OTUs를 나타내었으며, 2011년 1월에 채취한 탄천물재생센터 소화조가 가장 낮은 13 OTUs를 보였다. 다양성은 서남(1월), 난지1(1월), 중량2(1월), 난지2(1월), 난지1(2월), 중량2(2월), 서남(2월), 난지2(2월), 탄천(2월), 중량3(2월), 탄천(1월) 순으로 높은 값을 보였다. 또한, Chao1 richness estimate와 Shannon index를 이용하여 각 시료의 다양성 비교분석을 실시하였는데(Table 2), 시료 간 다양성의 순서는 observed OTUs와 매우 비슷한 경향성을 나타내었다.

한편 pyrosequencing으로부터 얻은 염기서열의 수가 아케아 군집의 다양성을 충분히 설명하고 있는지, 그리고 어떠한 시료가 더 다양한 아케아 군집을 가지고 있는지 서로 비교하기 위하여 rarefaction curve 분석을 실시하였다(Fig. 1). 분석 결과 각 시료에 대한 곡선이 모두 plateau에 도달하지 못한 것으로 보아, 혐기성 소화조 아케아 군집의 다양성을 충분히 예측하기 위해서는 더 많은 염기서열의 확보가 필요한 것으로 나타났다. 또한, 곡선의 형상으로부터 예측한 다양성의 정도는 서남(1월), 난지1(1월), 난지2(1월), 중량2(2월), 탄천 (1월), 중량2(1월), 난지2(2월), 난지1(2월), 서남(2월), 탄천(2월), 중량

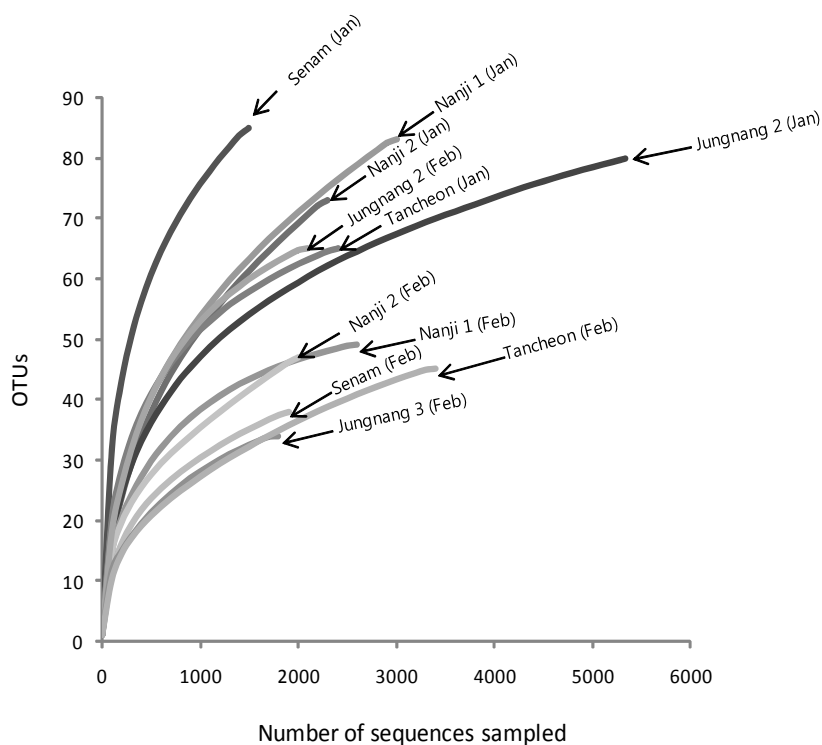


Fig. 1. Rarefaction curves of the OTUs defined by 3% sequence variations for the 11 different anaerobic sludge samples.

3(2월) 순으로 높았으며, 이는 다양성 지수로부터 얻은 순서와 비슷한 경향성을 보였다.

혐기성 소화조 아케아 군집구조 분석

11개 시료로부터 얻은 염기서열을 RDP Classifier를 이용해 여러 분류단계로 계통분류를 실시하였다. 각 시료의 분류군(taxa)의 개수는 문(phylum) 2개, 강(class) 3-5개, 목(order) 1-6개, 과(family) 1-6개, 속(genus) 1-5개로 전체적으로 모든 시료에서 많은 수의 분류군이 발견되지는 않았다. 또한, 분류되지 않는 염기서열의 비율은 문 0.3%, 강 20.0%, 목 25.4%, 과 57.8%, 속 76.8%로 분류 단계가 낮아질수록 증가하는 경

향을 보였다. 각 시료의 아케아 군집구조 비교분석은 two-way heat map analysis를 통해서 수행되었다(Fig. 2). 또한 과 수준 이하에서는 분류되지 않는 염기서열의 비율이 너무 높게 나타나(>57.8%), heat map 분석에는 목 수준의 분류군을 이용하였다(목 수준에서 분류되지 않는 염기서열=6.2%). 분석 결과 모든 소화조에서 *Methanococcales* 목이 가장 많이 발견되었고(51.76-99.71%), 그 다음으로 *Methanosarcinales* (0.12-10.2%), *Thermoplasmatales* (0.03-4%), *Thermoproteales* (0.05-0.46%) 순으로 많이 발견되었다. 매우 적은 비율이지만(<0.03%) *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Desulfurococcales*, *Methanocellales* 목에 속하는 아케아도 확인할 수 있었다.

Table 2. Diversity indexes for the archaeal communities determined from the 11 anaerobic sludge samples used in this study

Sample	Number of sequences analyzed	Observed OTU		Chao1 richness estimate		Shannon index	
		3% cutoff	5% cutoff	3% cutoff	5% cutoff	3% cutoff	5% cutoff
Senam (Jan)	1,470	55	42	79	63	2.34	1.93
Nanji 1 (Jan)	2,950	47	29	81	47	1.93	0.84
Nanji 2 (Jan)	2,256	38	22	133	67	1.35	0.74
Jungnang 2 (Jan)	5,333	45	26	56	37	1.52	0.43
Tancheon (Jan)	1,875	13	6	18	9	0.27	0.08
Senam (Feb)	2,546	24	14	38	24	0.76	0.34
Nanji 1 (Feb)	2,363	31	19	49	34	1.71	1.23
Nanji 2 (Feb)	1,975	17	11	25	17	1.09	0.48
Jungnang 2 (Feb)	2,040	31	21	38	30	1.43	0.40
Jungnang 3 (Feb)	1,716	14	8	17	9	1.03	0.70
Tancheon (Feb)	3,333	17	9	19	11	0.95	0.08

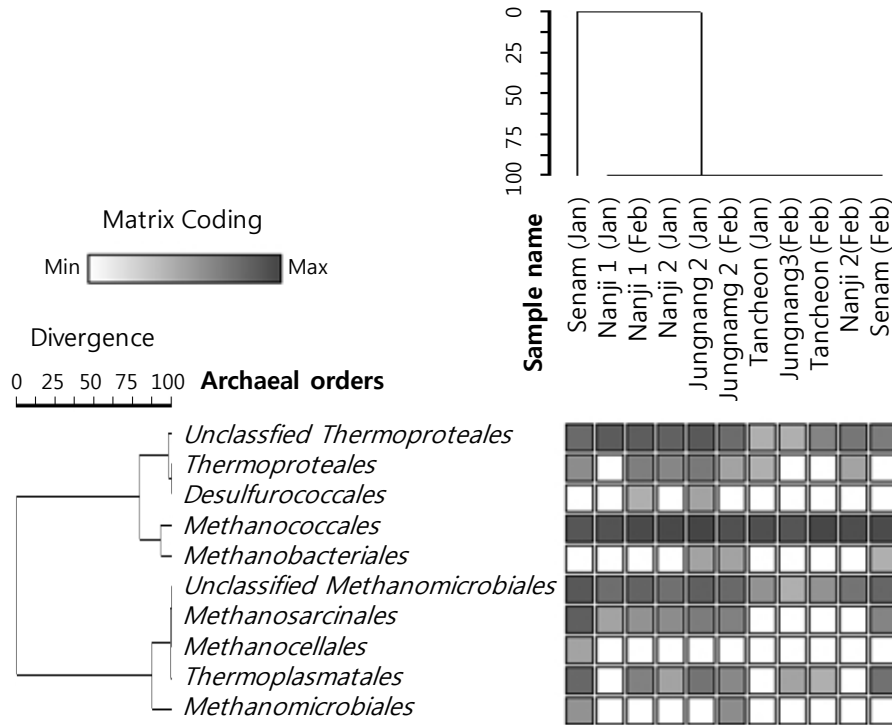


Fig. 2. Two-way heat map analysis based on the archaeal orders obtained from the 11 different anaerobic sludge samples. Each column corresponds to the sample, while each row indicates the archaeal order. The color turns dark by increasing the numbers of sequences corresponding to the order.

*Methanomicrobiales*는 서남(1월)과 중랑2(2월) 시료에서, *Methanobacteriales*는 중랑2(1월, 2월) 시료에서, *Desulfurococcales*는 중랑2(1월)와 난지1(2월) 시료에서, *Methanocellales*는 서남(1월) 시료에서 특징적으로 발견되었다. Heat map을 볼 때 서남(1월) 시료를 제외한 나머지 10개의 시료는 상당한 유사성을 보였다(Pearson 상관지수=0.99). 서남(1월) 시료는 다른 시료와 비교하여 상대적으로 낮은 *Methanococcales* (51.8%), 높은 *Methanosarcinales* (10.2%), 그리고 분류되지 않은 많은 *Methanomicrobiales* (29.7%)를 가지고 있어 다른 시료와는 상당한 차이를 보였다(Pearson 상관지수<0.86). 한편,

속 수준에서는 분류되지 않는 혐기서열의 비율이 61.2-99.5%로 시료간 군집구조의 비교가 용이하지 않았지만, 특징적인 몇 가지 결과를 얻을 수 있었다. Table 3에 나타내었듯이 속 수준에서는 총 9개의 분류군(*Thermogymnomonas*, *Thermocladium*, *Methanotorris*, *Methanosphaera*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanomicrobium*, *Methanococcus*, *Methanocell*)이 발견되었으며, 이 중 *Methanococcus* 속에 속하는 혐기서열이 전체 혐기서열의 0.00-38.8%로 가장 많이 분석되었다. 난지 2(2월)와 탄천(2월) 시료는 혐기서열이 *Methanococcus* 속에 서만 발견되었으며, 서남(1월)와 난지2(1월) 시료는 5개 속에

Table 3. Archaeal community composition of the 11 anaerobic sludge samples analyzed by genus level

Genus	Senam (Jan)	Nanji 1 (Jan)	Nanji 2 (Jan)	Jungnang 2 (Jan)	Tancheon (Jan)	Senam (Feb)	Nanji 1 (Feb)	Nanji 2 (Feb)	Jungnang 2 (Feb)	Jungnang 3 (Feb)	Tancheon (Feb)
<i>Thermogymnomonas</i>	3.41	0.07	0.04	0.43	0.00	1.10	0.34	0.00	0.15	0.12	0.00
<i>Thermocladium</i>	0.00	0.03	0.04	0.06	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Methanotorris</i>	0.35	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Methanosphaera</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.06	0.00
<i>Methanosaeta</i>	0.07	0.07	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Methanosarcina</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Methanomicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00
<i>Methanococcus</i>	11.67	30.18	32.49	0.00	36.50	14.18	16.77	36.59	16.49	13.94	38.79
<i>Methanocella</i>	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Unclassified	84.36	69.65	67.24	99.51	63.45	84.52	82.81	63.41	83.12	85.89	61.21

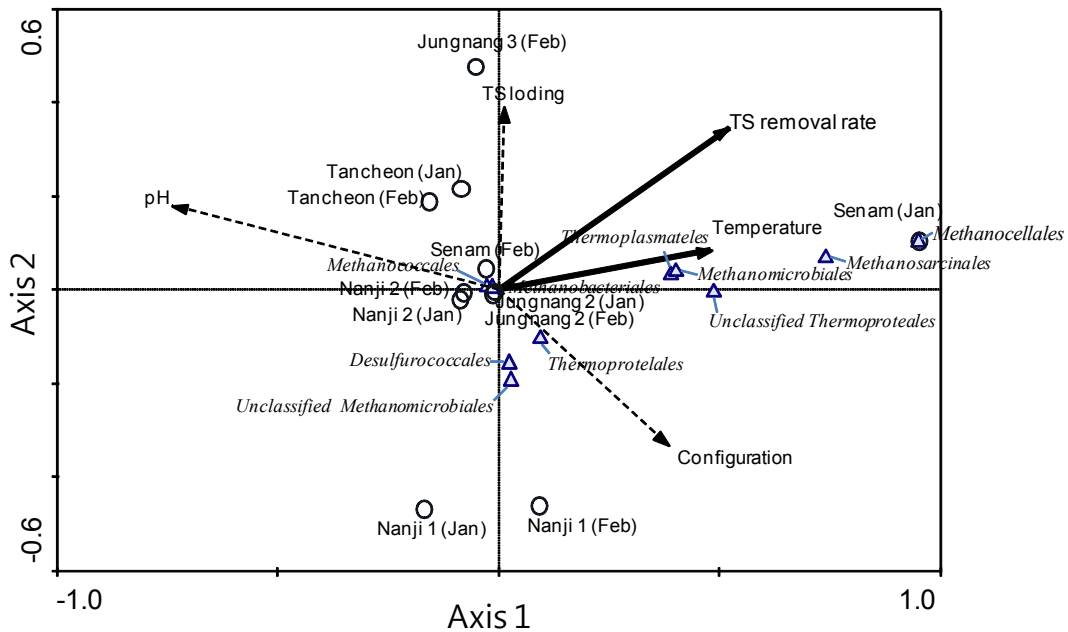


Fig. 3. Ordination of CCA triplot calculated from the numbers of sequences based on archaeal order level. Statistically significant ($P < 0.05$) explanatory variables are shown by thick arrows in the plot. Sample names and archaeal orders are indicated in circles and triangles, respectively.

서 발견되어 다른 시료에 비해 다양한 군집분포를 가지고 있었다. 한편, 서남(1월)시료는 *Thermogymnomonas* 속에 속하는 염기서열이 3.41%로 다른 시료와 비교하여 가장 높은 비율을 가지고 있었다.

혐기성 소화조 아케아 군집구조와 환경인자의 상관관계 분석

혐기성 소화조 아케아 군집구조와 환경변수의 상관관계를 규명하기 위해 CCA ordination 분석을 실시하였다(Fig. 3). 소화조의 pH, 소화조 온도, 총고형물 부하(total solids loading), 총고형물 제거율(total solids removal rate), 소화조 형상(configuration: single-stage versus two-stage digestions)을 환경변수로 이용하였으며, 아케아 군집의 구조는 Fig. 2의 heat map 분석과 마찬가지로 목 수준에서 분류한 염기서열의 수를 이용하였다. 아케아 군집구조에 영향을 미치는 통계적으로 유의한($P < 0.05$) 환경변수는 소화조의 온도와 총고형물 제거율이었으며, 나머지 변수들은 덜 중요한 인자로 분석되었다. CCA ordination에서 나타난 특징적인 현상은 서남 시료를 제외하면 각 시료가 채취 시점(1월과 2월)에 상관없이 매우 가까이 위치하였다는 것이다. 즉, 각 시료는 채취 시점과 관계없이 비슷한 군집구조를 가지고 있었으며, 서남 시료를 제외하면 시료 채취 간격인 1달의 기간은 소화조의 아케아 군집구조에 많은 변화를 일으키지 못했다는 것을 의미한다. 또한, CCA ordination 상에서 군집의 위치를 결정하는 중요한 요인은 모든 시료에 공통적으로 비슷하게 존재하는 분류군(예: *Methanococcales*, *Methanobacteriales*) 보다는 적은 비율로 존재하지만 각 시료에 특징적으로 존재하는 분류군(예: *Methanocellales*, *Methanosarcinales*, *Unclassified Thermoproteales* 등)으로 나타났다.

고찰

혐기성 소화조의 아케아 군집구조를 조사한 본 연구에서는 메탄생성에 직접적으로 관련이 있는 것으로 알려진 아케아(*Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*) 뿐만 아니라, 메탄형성의 대사를 가지고 있지 않는 것으로 추정되는 *Thermoproteales*, *Thermoplasmatales*, *Desulfurococcales* 목에 속하는 아케아도 함께 발견되었다. *Thermoproteales*와 *Desulfurococcales*는 *Crenarcheota* 문에 속하는 아케아로 호열성으로 알려져 있다(12). 한편 *Thermoplasmatales*는 *Euryarchaeota* 문에 속하는 아케아로 산성조건에서 잘 자라는 호열성 미생물로 알려져 있다(29). *Thermoproteales*는 종종 혐기성 소화조에서 발견되지만(32), *Thermoplasmatales*와 *Desulfurococcales*는 아직까지 소화조에서 발견된 보고는 없으며 온천이나 심해 열수구에서 주로 확인되었다(12). 향후 이들 아케아가 혐기성 소화에서 어떠한 역할을 하는지 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

여러 아케아 분류군 중 본 연구에서 가장 많이 발견된 아케아는 *Methanococcales*이었다(51.8-99.7%). 지금까지 *Methanococcales* 목은 2개의 과와 4개의 속, 그리고 15개의 종이 알려져 있다(39). 이들은 세포의 직경이 1-3 μm 로 불규칙한 균의 형태를 띄고 있으며, 메탄생성을 위한 기질로 주로 수소를 사용하지만 일부는 포름산도 함께 사용한다고 한다(38). 최적의 생장온도는 상온보다 조금 높은 30-40°C이지만, *Methanococcus thermolithotrophicus*나 *Methanococcus jannaschii*와 같은 종은 65-85°C의 고온에서 잘 자란다고 보고되고 있다(13, 16). 생장에 필요한 염분의 농도는 0.3-6%(최적 0.6-2)이

Table 4. Comparison of 21F primer sequence with representative target 16S rRNA gene sequences within the order *Methanosarcinales*

Species name	21F Primer	GenBank accession number
	5' -TCCGGTTGATCCYGCCGG-3'	
<i>Methanohalophilus mahii</i>	..T.....A.	M59133
<i>Methanobolus tindarius</i>	..T.....A.	M59135
<i>Methanococcoides methylutens</i>	.C.....A.	M59127
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	..T.....A.	U20149
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	AY817738
<i>Methanosaeta concilii</i>	..T.....A.	M59146
<i>Methanosaeta thermophila</i>	A.T.....A.	M59141
<i>Methanobolus bombayensis</i>	..T.....A.	U20148
<i>Methanobolus vulcani</i>	..T.....A.	U20155
<i>Methanobolus taylorii</i>	..T.....A.	U20154
<i>Methanobolus oregonensis</i>	..T.....A.	U20152
<i>Methanosarcina lacustris</i>	***.....N.	AF432127
<i>Methanosarcina baltica</i>	..T.....A.	AJ238648
<i>Methanosarcina thermophila</i>	..T.....A.	NR044725
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	..T.....A.	NR044724
<i>Methanobolus zinderi</i>	..T.....A.	NR044558
<i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM 4017	**.....A.	NR044593
<i>Methanosarcina</i> sp. GRAU-10	JN020915
<i>Methanohalophilus</i> sp. T2/21.5	**.....	HQ658667
<i>Methanosarcina mazei</i>	..T.....A.	M59138

* not available nucleotide base for the comparison; . same nucleotide base as that of 21F primer.

고, 최적 pH는 6-8의 중성인 특징을 갖는다고 알려져 있다 (39).

흥미로운 점은 기존의 많은 연구에서 *Methanococcales* 보다는 *Methanosarcinales* 목에 속하는 아케아가 혐기성 소화조에서 주로 발견되었다는 점이다(14, 19, 33). 대사작용면에서 *Methanosarcinales*는 주로 아세트산을 기질로 이용하는데 반해, *Methanococcales*는 수소를 기질로 하여 메탄을 생성한다고 알려져 있다(39). Raskin 등(27)은 하수슬러지를 처리하는 중온 소화조의 주요 아케아는 *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales*이며 *Methanococcales*는 상대적으로 작은 역할을 한다고 보고하였다. Kim 등(17)은 축산분뇨를 유입수로 이용한 혐기성 소화 연구를 진행하였는데, 가장 많이 발견된 아케아는 *Methanosarcinales*이었으며 *Methanococcales*는 검출되지 않았다. 하지만, Liu 등(21)은 반응기를 혐기성 상태에서 pH를 5.5로 낮추어 운영하면서 70일간 아케아 군집구조를 분석한 결과, 접종원인 혐기성 슬러지에 우점하였던 *Methanosarcinales*의 비율이 급격히 떨어지면서 *Methanobacteriales*와 *Methanococcales*의 비율이 상대적으로 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, 염분이 높게 포함된 흑해 퇴적물에서 메탄생성 아케아의 군집을 분석한 Ince 등(15)의 연구에 의하면 *Methanococcales*가 8-12%로 가장 많이 발견된 아케아였다. 이러한 선행 연구결과로 볼 때 *Methanococcales*는 정상상태의 혐기성 소화조보다는 박테리아의 활동이 활발한 혐기성 소화조의 초기운전 혹은 갑자기 고농도의 유기물(혹은 염분)이 다량으로

유입될 경우 등으로 사료된다. 하지만, 본 연구에서 조사된 혐기성 소화조는 모두 안정적으로 운영되었기 때문에, 아직까지 알려지지 않은 다른 환경인자가 *Methanococcales*의 우점 조건을 만들었을 가능성이 있는 것으로 사료된다.

*Methanococcales*가 주로 발견된 또 다른 가능성은 본 연구에 사용된 아케아 universal primer 세트가(21F forward and 516R reverse primers) *Methanosarcinales* 보다 *Methanococcales*를 더 효과적으로 증폭할 수도 있다는 것이다. 특히, forward primer인 21F는 1992년 DeLong (6)이 개발하여 많은 연구자들이 다양한 시료에서 아케아 군집구조를 규명하는데 사용하였지만(4, 18, 36), *Methanosarcinales* 목에 속하는 아케아가 적은 숫자로 발견되었다는 사실은 이 근거를 뒷받침하고 있다. 본 연구에 사용된 21F 프라이머 염기서열과 *Methanosarcinales* 목에 속하는 대표적인 20개 아케아의 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교하였다(Table 4). 분석 결과 0-3개의 염기서열이 프라이머 염기서열과 일치하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 불일치가 혐기성 소화조에 존재하는 *Methanosarcinales* 16S rRNA 유전자를 증폭하는데 어려움을 주었을 것으로 사료된다. 또한, RDP Probe Match 분석 결과 reverse primer인 516R이 아케아 데이터베이스의 80.49%를 인식하지만, forward primer인 21F는 단지 22.14%의 아케아만을 인식하는 것으로 보아 21F 프라이머에 대해 향후 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 CCA ordination 분석(Fig. 3)을 통해 소화조

의 온도와 총고형물 제거율이 아케아 군집구조를 결정하는 중요한 환경변수라는 결과를 얻었다. 온도는 미생물의 대사작용과 생장속도에 영향을 미치는 중요한 환경변수로 여러 연구자들이 소화조를 대상으로 온도 영향을 평가하였으며 아케아 군집구조가 온도에 따라 변화하는 것을 확인하였다(21, 34). 총고형물의 제거율의 영향에 대해서는 아직까지 아케아 군집구조에 직접적으로 영향을 미친다는 보고는 찾을 수 없었다. 그렇지만 총고형물의 제거율은 소화조의 체류시간, 미생물 농도, 교반방식, 소화조 온도 등 여러 운영변수들과 연관이 되어 있으므로, 향후 이들 변수들과의 상관관계를 체계적으로 조사할 경우 총고형물 제거율의 영향에 대한 추론이 가능할 것이다. 한편, 아케아 군집에 영향을 미치는 환경변수는 상기의 두 가지 환경변수(소화조 온도와 총고형물 제거율)로 한정 되지는 않을 것으로 판단된다. 본 연구에서 두 가지 변수를 제외한 다른 변수들이 군집구조에 영향을 미치지 못한 이유는 이들 변수의 변화의 차이가 작아 군집구조에 영향을 주지 못한 것으로 사료된다. 실제로 암모니아 농도, 반응기 형태, 유입기질의 종류, 소화조의 지방산의 종류, 소화조의 pH 등의 여러 환경변수는 소화조의 아케아 군집구조에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(5, 37).

적요

결론적으로 본 연구에서는 16S rRNA 유전자 기반의 454 pyrosequencing을 통해 혐기성 소화조에 존재하는 다양한 아케아를 규명할 수 있었으며, 지금까지 그 중요성이 잘 알려지지 않은 *Methanococcales* 목에 속하는 아케아가 소화조에 공통적으로 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, 소화조의 운전조건은 아케아의 다양성과 군집구조를 결정하는데 영향을 미치는 중요한 인자라는 것을 알 수 있었다.

실규모 6개 혐기성 소화조를 대상으로 11개 소화 슬러지 시료를 채취해, 16S rRNA 유전자 기반의 454 pyrosequencing을 이용하여 아케아 군집구조를 조사하였다. 아케아 16S rRNA 유전자 염기서열로부터 측정된 observed operational taxonomic units (OTUs)는 13-55 OTUs이었으며(3% cutoff), 이는 Chao1 richness estimate로 계산된 값의 29-89%에 해당하였다. 소화조에는 메탄생성에 직접적으로 관련이 있다고 알려진 *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* 목에 속하는 아케아 뿐만 아니라, *Thermoproteales*, *Thermoplasmatales*, *Desulfurococcales* 목에 속하는 아케아도 함께 발견되었다. 이 중 수소를 기질로 해서 메탄을 생성한다고 알려진 *Methanoacoccales*가 전체 염기서열의 51.8-99.7%를 차지해 가장 많이 발견된 분류군으로 나타났다. Heat map 분석결과 각 시료들의 아케아 군집구조는 1개 시료를 제외한 나머지 10개 시료가 매우 비슷한 군집구조를 가지고 있었다(Pearson 상관지수=0.99). 또한, 아케아 군집구조와 환경변수들의 상관성을 분석한 canonical correspondence analysis를 통해 혐기성 소화조의 아케아 군집구조에 영향을 미치는 중요 환경변수는 소화조의 온도와 총고

형물 제거율임을 확인하였다. 모든 결과들을 종합해 볼 때 소화조의 운전조건은 아케아의 다양성과 군집구조를 결정하는데 영향을 미치는 중요한 인자라고 사료된다.

감사의 말

본 연구에 사용된 혐기성 소화조의 운영자료 및 시료를 제공한 서남물재생센터, 난지물재생센터, 중랑물재생센터, 탄천물재생센터 관계자 및 서울특별시 상수도연구원 관계자 여러분께 감사를 드립니다. 본 연구는 2010년 서울형 GT R&D 사업의 일환으로 진행되었습니다.

참고문헌

1. Angenent, L.T., S.W. Sung, and L. Raskin. 2002. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* 36, 4648-4654.
2. 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.
3. Collins, G., A. Woods, S. McHugh, M.W. Carton, and V. O'Flaherty. 2003. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 159-170.
4. Cytryn, E., D. Minz, R.S. Oremland, and Y. Cohen. 2000. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3269-3276.
5. Delbes, C., R. Moletta, and J.J. Godon. 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2, 506-515.
6. DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5685-5689.
7. Demirel, B. and P. Scherer. 2008. The roles of acetotrophic and hydroentotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173-190.
8. Gilliam, F.S. and N.E. Saunders. 2003. Making more sense of the order: A review of Canoco for Windows 4.5, PC-ORD version 4 and SYN-TAX 2000. *J. Veg. Sci.* 14, 297-304.
9. Godon, J.J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2802-2813.
10. Grandin, U. 2006. PC-ORD version 5: a user-friendly toolbox for ecologists. *J. Veg. Sci.* 17, 843-844.
11. Harmsen, H.J.M., H.M.P. Kengen, A.D.L. Akkermans, A.J.M. Stams, and W.M. deVos. 1996. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1656-1663.
12. Huber, H. and K.O. Stetter. 2006. *Desulfurococcales*, pp. 52-68. In M. Dworkins (ed.), *Prokaryotes: an evolving electron resource for the microbiological community*, Springer, New York, NY, USA.

13. Huber, H., M. Thomm, H. König, G. Thies, and K.O. Stetter. 1982. *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch. Microbiol.* 132, 47-50.
14. Hwang, K., M. Song, W. Kim, N. Kim, and S. Hwang. 2010. Effects of prolonged starvation on methanogenic population dynamics in anaerobic digestion of swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, S2-S6.
15. Ince, B.K., I. Usenti, A. Eyigor, N.A. Oz, M. Kolukirik, and O. Ince. 2006. Analysis of methanogenic archaeal and sulphate reducing bacterial populations in deep sediments of the Black Sea. *Geomicrobiol. J.* 23, 285-292.
16. Jones, W.J., J.A. Leigh, F. Mayer, C.R. Woese, and R.S. Wolfe. 1983. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 136, 254-261.
17. Kim, W., S. Lee, S.G. Shin, C. Lee, K. Hwang, and S. Hwang. 2010. Methanogenic community shift in anaerobic batch digesters treating swine wastewater. *Water Res.* 44, 4900-4907.
18. Kim, B.S., H.M. Oh, H. Kang, and J. Chun. 2005. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol.* 43, 144-151.
19. Klocke, M., E. Nettmann, I. Bergmann, K. Mundt, K. Souidi, J. Mumme, and B. Linke. 2008. Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 190-205.
20. Krober, M., T. Bekel, N.N. Diaz, A. Goesmann, S. Jaenicke, L. Krause, D. Müller, K.J. Runte, P. Viehöver, A. Pühler, and *et al.* 2009. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J. Biotechnol.* 142, 38-49.
21. Liu, W.T., O.C. Chan, and H.H.P. Fang. 2002. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Res.* 36, 3203-3210.
22. Madigan, M.T. and J.M. Martinko. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle, Prentice Hall, USA.
23. Metcalf and Eddy. 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse. 4th ed. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
24. Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nat. Rev. Genetics* 11, 31-46.
25. Qian, P.Y., Y. Wang, O.O. Lee, S.C.K. Lau, J.K. Yang, F.F. Lafi, A. Al-Suwailem, and T.Y.H. Wong. 2011. Vertical stratification of microbial communities in the Red sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. *ISME J.* 5, 507-518.
26. Quince, C., A. Lanzen, T.P. Curtis, R.J. Davenport, N. Hall, I.M. Head, L.F. Read, and W.T. Sloan. 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat. Meth.* 6, 639-641.
27. Raskin, L., D.D. Zheng, M.E. Griffin, P.G. Stroot, and P. Misra. 1995. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 297-308.
28. Rittmann, B.E. and P.E. McCarty. 2001. Environmental biotechnology: principles and applications. McGraw-Hill Higher Education, New York, USA.
29. Schleper, C., G. Puehler, I. Holz, A. Gambacorta, D. Janekovic, U. Santarius, H.P. Klenk, and W. Zillig. 1995. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* 177, 7050-7059.
30. 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, and *et al.* 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
31. Schluter, A., T. Bekel, N.N. Diaz, M. Dondrup, R. Eichenlaub, K.H. Gartemann, I. Krahn, L. Krause, H. Kromeke, O. Kruse, and *et al.* 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136, 77-90.
32. Shin, S., G. Han, J. Lim, C. Lee, and S. Hwang. 2010. A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Water Res.* 44, 4838-4849.
33. Shin, S.G., B.W. Zhou, S. Lee, W. Kim, and S. Hwang. 2011. Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. *Process Biochem.* 46, 1035-1038.
34. Tang, Y.Q., T. Matsui, S. Morimura, X.L. Wu, and K. Kida. 2008. Effect of temperature on microbial community of a glucose-degrading methanogenic consortium under hyperthermophilic chemostat cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 180-187.
35. Ter Braak, C.J.F. 1988. CANOCO - an extension of decorana to analyze species-environment relationships. *Vegetatio* 75, 159-160.
36. Vissers, E.W., P.L.E. Bodelier, G. Muyzer, and H.J. Laanbroek. 2009. A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 193-198.
37. Wagner, A.O., C. Malin, P. Lins, and P. Illmer. 2011. Effects of various fatty acid amendments on a microbial digester community in batch culture. *Waste Management* 31, 431-437.
38. Whitman, W.B., E. Ankwanda, and R.S. Wolfe. 1982. Nutrition and carbon metabolism of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.* 149, 852-863.
39. Whitman, W.B. and C. Jeannot. 2006. *Methanococcales*, pp. 257-273. In M. Dworkins (ed.), Prokaryotes: an evolving electron resource for the microbiological community, Springer, New York, NY, USA.
40. Yu, Y., C. Lee, J. Kim, and S. Hwang. 2004. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 670-679.