

Analysis of Archaeal Community in Autotrophic Perchlorate-degrading Enrichment Culture

Young-Hwa Kim¹, Sanghyun Do², Hyunseung So², Junwon Been², Haechan Sung², Sungchan Ji², Myunghwa Son² and Yeonghee Ahn^{1*}

¹Department of Environmental Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Busanil Science High School, Busan 604-828, Korea

Received November 2, 2016 / Revised January 26, 2017 / Accepted February 1, 2017

Perchlorate (ClO_4^-) is an emerging contaminant detected in soil, groundwater, and surface water. Previous study revealed bacterial community in the enrichment culture degraded perchlorate using elemental sulfur as an electron donor. Quantitative and qualitative molecular methods were employed in this study to investigate archaeal community in the enrichment culture. Real-time qPCR showed that archaeal 16S rRNA gene copy number in the culture was about 1.5% of bacterial 16S rRNA gene copy number. This suggested that less archaea were adapted to the environment of the enrichment culture and bacteria were dominant. DGGE banding pattern revealed that archaeal community profile of the enrichment culture was different from that of the activated sludge used as an inoculum for the enrichment culture. The most dominant DGGE band of the enrichment culture was affiliated with *Methanococci*. Further research is necessary to investigate metabolic role of the dominant archaeal population to better understand microbial community in the perchlorate-reducing enrichment culture.

Key words : Archaea, DGGE, enrichment culture, perchlorate, qPCR

서 론

현대 산업이 발달하게 되면서 새로운 오염물질의 배출은 불가피해졌다. 이러한 오염물질은 신규 오염물질(emerging contaminant)로 분리된다. 신규 오염물질 중 퍼클로레이트(ClO_4^-)는 미국에서 1940년대 중반에 처음 생산된 이후 군사용 폭발물, 로켓 추진제, 불꽃놀이용 폭발물, 기폭제, 성냥, 윤활유, 에어백과 특정 비료 등에 사용되는 미량 오염물질이다[16]. 미량 오염물질은 미량의 농도(ng 혹은 $\mu\text{g/l}$)로도 위해성을 나타내는 오염물질이다.

퍼클로레이트는 요오드가 갑상선에 흡수되는 것을 방해하여 갑상선 호르몬의 생산을 저해한다. 대사 조절에 관여하는 갑상선 호르몬은 태어나 성장발육기의 어린이들에게 특히 중요하므로 이들의 퍼클로레이트의 노출은 매우 치명적일 수 있다. 퍼클로레이트는 물에 대한 용해도가 높고, 화학적으로 안정하여 쉽게 분해되지 않으므로 광범위 수질오염을 초래할 수 있다. 그러나 이 오염물을 처리하기 위한 기술은 상당히 제한적인 실정이다. 대표적인 퍼클로레이트 처리법인 이온교환

환법은 실제로 퍼클로레이트를 분해하는 것은 아니다. 게다가 사용한 수지를 주기적으로 재생해야 하는 번거로움과 함께 발생된 폐재생액으로 인한 이차오염을 야기할 수 있는 단점이 있다[20].

한편 미생물을 이용한 생물학적 처리는 퍼클로레이트를 무해한 산물로 완전히 분해하므로 가장 친환경적인 방법이며 경제적이다 할 수 있다[5]. 퍼클로레이트 분해 미생물은 보통 세균 domain에 속하고 이들을 perchlorate-reducing bacteria (PRB)라고 한다[2]. PRB는 적절한 전자공여체가 주어지면 전자수용체인 ClO_4^- 를 순차적으로 환원시키므로, 최종적으로 무해한 염소 이온과 산소가 생성된다[4]. PRB 중에서 β -Proteobacteria가 가장 많이 보고되었으며[3], 다양한 환경으로부터 새로운 PRB들이 계속 보고되고 있다.

원소 황(elemental sulfur, S^0) 입자와 황성슬러지를 이용하여 독립영양 방식으로 퍼클로레이트를 제거한 연구는 이미 보고되었다[9]. 원소 황을 이용한 퍼클로레이트 제거 공정에서 식종균으로 황성슬러지를 사용했을 때 보다 농화배양 미생물의 퍼클로레이트 제거능이 우수하였다[10]. 또한 원소 황을 전자공여체로 이용하여 퍼클로레이트를 분해하는 농화배양 내세균 군집조성에 대한 연구도 수행되었다[12]. 그 결과 β -Proteobacteria, Bacteroidetes, 그리고 Spirochaetes에 속하는 개체군이 우점하는 것으로 나타났고, 이들과 이미 알려져 있는 PRB와의 계통관계가 밝혀졌다. 퍼클로레이트를 분해하는 세균에 대한 연구는 비교적 많으나 고세균에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다[3]. 본 연구에서는 독립영양 방식으로 황을

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7677, Fax : +82-51-200-7683

E-mail : yahn@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

산화시켜 퍼클로레이트를 분해하는 농화배양 미생물의 고세균 군집을 정성 및 정량적으로 분석하였다. PCR-DGGE 기술을 이용하여 고세균 군집구조를 분석하였고, real-time PCR (qPCR)을 이용하여 16S rRNA 유전자를 정량하였다.

재료 및 방법

퍼클로레이트 분해 미생물 농화배양

PRB 농화배양은 문헌[12]에 보고된 것과 같이 수행하였다. 배양 초기에 mineral medium (2 mg/l MgSO₄·7H₂O, 47 mg/l K₂HPO₄, 27 mg/l NaH₂PO₄·H₂O, 16 mg/l NH₄H₂PO₄, 1 g/l NaHCO₃, pH 7.43), 원소 황 입자(70 g/l), 그리고 120 mg/l ClO₄⁻를 포함하는 1 l Wheaton bottle 반응기에 활성슬러지를 접종하였다. 새 mineral medium은 주기적으로 교체하였고 pH는 7.5로 조정하였다. 반응기 내의 ClO₄⁻ 농도가 검출한계 이하로 낮아질 때마다 ClO₄⁻를 주입하면서 5년 이상 배양하였다.

Genomic DNA 추출

농화배양 반응기에서 황 입자를 채취하고 그 입자에 형성된 생물막 미생물로부터 DNA를 추출하였다. 채취한 황 입자 시료에 phosphate buffered saline (pH 7.2)을 넣어 5분 간 강하게 vortex하여 생물막 미생물을 황 입자로부터 유리시켰다. 유리된 미생물을 회수하여 UltraClean Microbial DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, CA, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 한편 농화배양된 미생물 군집과 비교하기 위해 접종균으로 사용된 활성슬러지로부터 DNA를 추출하였다.

Real-time PCR (qPCR)

세균과 고세균의 16S rRNA 유전자의 정량적 분석을 위해 qPCR을 수행하였다. *E. coli* DH5α의 genomic DNA를 이용하여 341F와 518R 프라이머를 이용하여 PCR 한 후, PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제한 다음 세균 16S rRNA 유전자의 표준곡선을 작성하는데 이용하였다.

유전자 copy 수는 아래 식 1에 의해 계산하였다. 정제된 PCR 산물의 주형을 6×10⁸ 부터 6×10³ copies/μl까지 10 배 씩 희석하여 표준곡선을 작성하였다.

한편, 고세균의 경우에는 *Methanococcus jannashii* DSM2661의 genomic DNA로부터 109F와 915R 프라이머를 이용하여 고세균 16S rRNA 유전자를 증폭한 후 pGEM-T vector에 ligation한 후 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli*로부터 plasmid DNA를 정제하여, 고세균의 16S rRNA 유전자 copy수를 정량하기 위한 표준 클론으로 이용하였다. 표준 클론의 주형을 3×10⁸부터 3×10³ copies/μl까지 10 배씩 희석하여 표준곡선을 작성하였다. qPCR을 위한 모든 표준곡선의 R² 값은 0.99 이상, 증폭 효율은 80-120% 범위에 포함되었다. qPCR은 SYBR green법으로 수행하였고, Table 1에 있는 프라이머를 이용하였다. SYBR (2×) PCR master mix (Applied Biosystem, MA, USA), forward와 reverse primers (각각 10 μM), 주형 등을 포함하여 총 20 μl로 반응시켰다. qPCR은 StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystem)을 이용하여 수행하였다. qPCR의 반응 조건은, 세균의 경우 95°C 10분 간 변성, 95°C 30초, 56°C 30초, 72°C 40초 간 40 cycle 증폭하였고, 고세균의 경우, 95°C 10분 간 변성, 95°C 30초, 50°C 30초, 72°C 40초 간 40 cycle 증폭하였다.

$$\text{Copy number} = \frac{\text{concentration}}{(\text{molar mass}) \times (6.022 \times 10^{23})} \quad (\text{식 1})$$

PCR-DGGE

추출한 DNA를 이용하여 109F와 915R 프라이머를 이용하여 95°C 5분 간 변성한 후, 95°C 1분, 52°C 1분, 72°C 1분 30초 간 30 cycles로 증폭하였다. PCR 산물을 주형으로 하여 GC clamp가 결합되어 있는 GCarch340F와 519R 프라이머를 이용하여 nested PCR을 수행하였다. 95°C 5분 간 변성한 후, 95°C 30초, 54°C 30초, 72°C 40초 간 30 cycle 증폭한 다음 얻어진 고세균 16S rRNA 유전자 단편은 DGGE에 사용하였다. Denaturing gel은 8%(w/v) polyacrylamide gel (acrylamide: N, N'-methylenebisacrylamide, 37.5:1)에 변성제로서 formamide와 urea를 첨가하여 40%에서 60%까지 농도구배가 형성되도록

Table 1. Primers used in this study

Target	Primer	Sequence (5'→3')	Use
Bacteria	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	qPCR
	518R	ATTACCGCGTCTGCTGG	
Archaea	109F	ACKGCTCAGTAACACGT	PCR
	915R	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	
Archaea	349F	GYGCASCAGKCGMGAAW	qPCR
	806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	
Archaea	GCarch340F 519R	GC clamp* -CCCTACGGGGYGCASCAG GGACTACVSGGGTATCTAAT	PCR-DGGE

*GC clamp: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGGG-3'

록 제작하였다. 이 농도구배 gel에 PCR 산물을 loading한 후 1× TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 DCode systems (Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 60°C, 200 V에서 4.5시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel을 SYBR gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, MA, USA)으로 염색하고 UV transilluminator에서 band의 패턴을 확인하였다.

염기서열 및 계통분석

DGGE에서 보여지는 주요 DNA band는 멸균된 칼로 잘라낸 후, tube에 담아 tip 끝으로 잘게 부순 다음, 멸균된 증류수에 담가 DNA가 유리되도록 하였다. 원심분리하여 상등액을 PCR의 주형으로 이용하였고, GC clamp가 없는 동일한 primer로 PCR하였다. PCR 산물은 정제 후 염기서열을 결정하는데 사용하였다. 결정된 염기서열 정보는 GenBank database에 등록하였다(KY432872-KY432883). 염기서열들은 Clustal W 프로그램을 이용하여 alignment를 수행하였다[14]. Multiple alignment 결과를 MEGA 6.0 프로그램[21]을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성하였으며 bootstrap은 1,000번 수행하였다. 대응분석(correspondence analysis)는 PAST (version 2.17c) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

고세균 16S rRNA gene copy 수 정량

미생물 정량을 위해 흔히 사용하는 평판배양법은 오직 해당 배양조건에서 배양이 되는 미생물에 대한 정보만 제공한다. 그래서 대다수 배양되지 않는 세균과 고세균에 대한 정보 제공에는 미흡하다. 본 연구에서는 qPCR을 이용해서 농화배양 내에 존재하는 세균과 고세균의 16S rRNA 유전자를 정량적으로 분석하였다. 표준곡선의 R²값이 0.99 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 1A, Fig. 1B). 표준 시료에서 세균과 고세균은 83.02°C와 87.96°C에서 각각 단일 peak를 가지는 melting curve를 나타내었다. 또한, 비특이적으로 증폭된 PCR 산물이 나타나지 않았음을 전기영동을 통해 확인하였다(결과 미제시).

식중균으로 이용한 활성슬러지 내 세균과 고세균의 16S rRNA 유전자 copy수(/ng DNA)는 각각 1.4×10⁶와 1.3×10⁵이었다. 한편 농화배양 내 세균과 고세균의 16S rRNA 유전자 copy수(/ng DNA)는 각각 9.3×10⁴과 1.4×10³으로 정량 되었다(Fig. 1C). 고세균의 16S rRNA 유전자 copy수가 활성슬러지에서는 세균의 9.3%였고, 농화배양 내에서는 1.5%를 차지하였다. 그래서 황을 이용하여 퍼클로레이트를 대사하는 환경에서

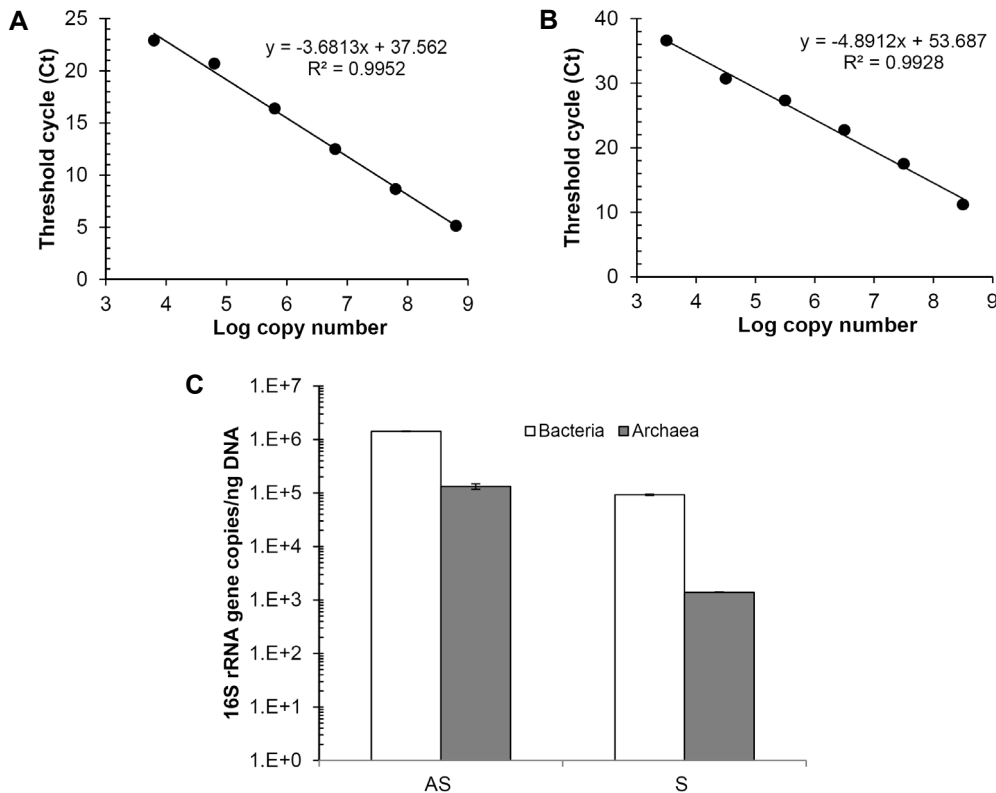


Fig. 1. Quantification of bacterial and archaeal 16S rRNA genes. (A) Standard curve of bacterial 16S rRNA gene copy numbers and threshold cycles (Ct) using purified PCR product of *E. coli* 16S rRNA gene. (B) Standard curve of archaeal 16S rRNA gene copy numbers and Ct using a plasmid containing *M. jannashii* DSM2661 16S rRNA gene. (C) Bacterial and archaeal 16S rRNA gene copy numbers in activated sludge (AS) and enrichment culture (S) (mean ± SD, n=3).

는 고세균의 비율이 낮아 세균이 우점하는 것으로 나타났다. 세균의 경우 평균적으로 세포 당 16S rRNA 유전자가 3.6-4.1 copies가 존재하고, 고세균의 경우 세포 당 1-1.5 copies가 존재하는 것으로 알려져 있다[10]. 따라서 본 연구에 사용된 활성슬러지의 세균과 고세균의 수는 반응 당 3.5×10^5 - 3.9×10^5 과 8.8×10^4 - 1.3×10^5 으로 각각 추정되었다. 한편 농화배양 내 세균과 고세균의 수는 2.3×10^4 - 2.6×10^4 과 9.2×10^2 - 1.4×10^3 으로 각각 정량할 수 있다. 활성슬러지는 유입되는 하수나 폐수의 성상에 따라 미생물 조성과 농도가 다른 것으로 보고되었다[11].

PCR-DGGE에 의한 미생물 군집비교

황을 전자공여체로 이용하는 농화배양 내 고세균군집을 파악하기 위해 PCR-DGGE 기법을 사용하였다. 그 결과는 식종균으로 이용한 활성슬러지 내의 고세균 군집과 비교 분석하였다. 활성슬러지와 농화배양 고세균의 DGGE 밴드 패턴은 확연히 다르게 나타났다(Fig. 2). 두 시료의 고세균 군집을 대응분석을 통해 시각적으로 도식화함으로써, DGGE의 결과를 뒷받침해주었다(Fig. 3). 농화배양 시료에서는 활성슬러지에서 나타난 밴드들과 같은 위치에 있는 것도 있지만, 다른 위치에서 새로 진하게 나타난 밴드가 관찰되었다. 한편 활성슬러지에 존재하던 밴드가 농화배양 시료에서 나타나지 않는 것도 있었다. 이들 밴드에 해당하는 개체균들의 농도는 농화배양되는 동안 사멸했거나 검출한계 이하로 나타남을 의미한다. 따라서, 접종된 활성슬러지의 고세균 군집이 농화배양되는 동안 그 환경에서 적응하여 사는 고세균 군집으로 천이하였다는

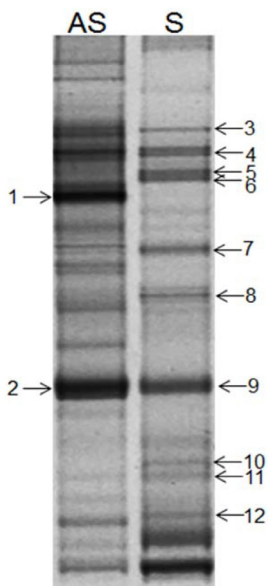


Fig. 2. PCR-DGGE profile of archaeal 16S rRNA gene fragments. Activated sludge was used as an inoculum of sulfur-based enrichment culture. Arrows indicate DNA bands that were excised and analyzed for nucleotide sequence. AS, activated sludge; S, enrichment culture.

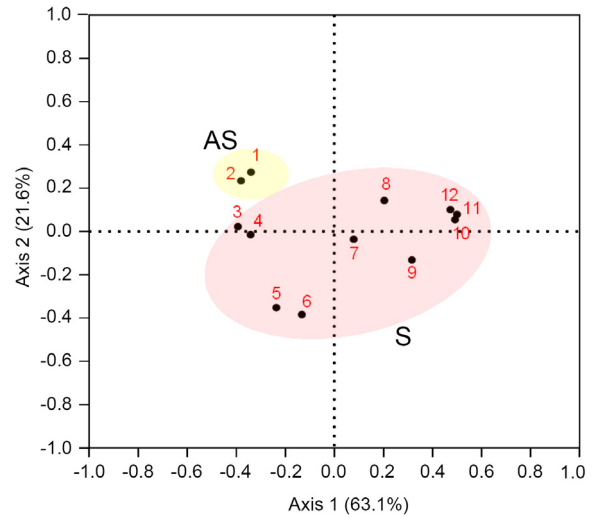


Fig. 3. Correspondence analysis of archaeal 16S rRNA gene band patterns shown in DGGE. AS, activated sludge; S, enrichment culture.

것을 알 수 있었다.

DGGE 결과 활성슬러지의 주요 밴드 1과 2, 그리고 농화배양 고세균 군집에서 구별되는 밴드 3-12를 잘라낸 후 PCR로 재증폭하여 염기서열을 분석하였다. 확보된 염기서열은 BLASTN 분석을 통해 가장 근연관계에 있는 것을 검색하였다(Table 2). 활성슬러지의 세균 군집에 비해 고세균의 군집에 관해서는 많이 보고되지 않았다[8]. 본 연구에서 활성슬러지로부터 검출된 밴드 1과 2는 *Methanobacteria* 강과 *Woesarchaeota* 문에 각각 해당하였다. *Woesarchaeota* 문에 해당하는 고세균들은 이전에 DHVEG-6 (Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota* Group 6) cluster로 알려졌고, 아직까지 순수배양된 적은 없으며 주로 NGS를 기반으로 한 분자생태학적 기법을 통하여 이들의 존재가 확인되었다. 접종된 활성슬러지에서 가장 진한 밴드 1에 해당하는 개체균은 농화배양되는 동안 사멸하였거나 검출이 안될 정도로 농도가 낮아졌다.

본 연구에서 사용한 농화배양 시료를 DGGE 분석한 결과 관찰된 밴드에 해당하는 고세균 개체균들은 황 대사에 직·간접적으로 관여할 것으로 여겨진다. 농화배양 시료에서 분리한 밴드 3-12는 각각 *Thaumarchaeota* 문, Marine Benthic Group E, *Woesarchaeota* 문, 그리고 *Euryarchaeota* 문에 속하는 *Methanobacteria*, *Methanococci* 등에 해당하였다(Fig. 4, Table 2). Park 등[17]은 *Thaumarchaeota* 문에 속하는 암모니아 산화 고세균(ammonium-oxidizing archaea, AOA)이 thiosulfate를 전자공여체로 이용하는 황 산화 세균과 같이 배양하였을 때 농화배양이 가능하였다고 보고하였다. AOA의 농화배양이 가능한 명확한 기전은 밝혀지지 않았으나 황 산화 세균군집이 AOA에 필수적인 성장요인들을 제공했을 거라고 추정하였다. 밴드 8은 *Euryarchaeota* 문에 속하는 Marine Benthic group E에 해당하는 것으로 나타났는데 이 group E는 심해 열수 환경에서

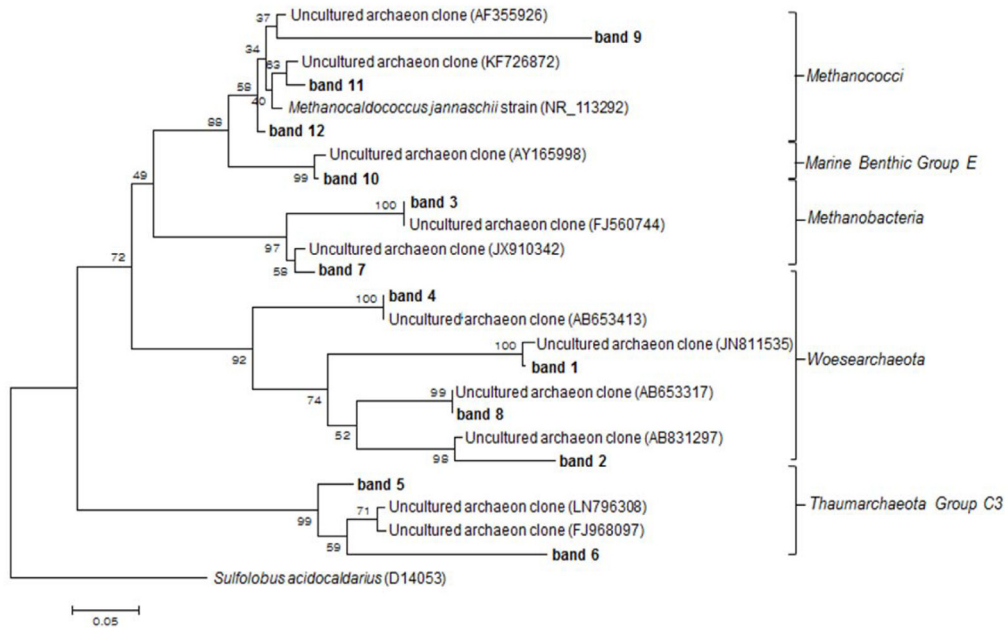


Fig. 4. Phylogenetic relationship of the 16S rRNA gene detected by DGGE and closely related nucleotide sequences from GenBank. Scale bar indicates 50 inferred nucleotide substitutions per 1,000 nucleotides. Nucleotide sequence accession numbers are shown in parentheses. *Sulfolobus acidocaldarius* was used as outgroup.

Table 2. Characteristics of 16S rRNA gene fragments obtained from DGGE gel

Sample	DGGE band (Accession No.)	Closest relatives (Accession No.)	Isolated environment	Taxonomic description (Phylum/Class)	Identity (%)
AS	1 (KY432872)	Uncultured <i>Methanobacterium</i> sp. clone sk0812-6 (FJ560744)	Enriched methanogen community from an anaerobic wastewater digestion reactor	<i>Methanobacteria</i>	99
	2 (KY432873)	Uncultured archaeon clone A0618R003 (AB653414)	Rice paddy soil	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)	99
S	3 (KY432874)	Uncultured archaeon clone denovo502 (LN796308)	Freshwater anaerobic oxidation of methane associated with sulfate reduction	<i>Thaumarchaeota</i> Group C3	97
	4 (KY432875)	Uncultured crenarchaeote clone Arch_AE_E04 (FJ968097)	Sulfur-rich spring on the lake	<i>Thaumarchaeota</i> Group C3	99
	5 (KY432876)	Uncultured archaeon clone SZBHcARC-26 (JX910342)	Anaerobic methane oxidation and methanogenesis	<i>Methanobacteria</i>	99
	6 (KY432877)	Uncultured archaeon clone A0618R003_I19 (AB653317)	Rice paddy soil	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)	99
	7 (KY432878)	Uncultured archaeon clone 33-P57A99 (AF355926)	Mid-ocean ridge seafloor habitat	<i>Methanococci</i>	99
	8 (KY432879)	Uncultured archaeon clone FZ2aA40 (AY165998)	Walls of an active deep-sea sulfide chimney	Marine Benthic Group E	99
	9 (KY432880)	Uncultured archaeon clone ANS_C08_TL_7 (KF726872)	Biofilm communities associated with corroded oil pipeline surfaces	<i>Methanococci</i>	97
	10 (KY432881)	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> strain JCM 10045 (NR_113292)	Submarine hydrothermal vent	<i>Methanococci</i>	97
	11 (KY432882)	Uncultured archaeon clone AG_UASB4-21 (JN811535)	UASB reactors treating brackish aquaculture sludge	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)	99
	12 (KY432883)	Uncultured archaeon gene clone MK903D_A26 (AB831297)	Deep sea methane seep sediment	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)	99

황 순환에 관여하는 것으로 보고되었다[22]. 농화배양시료에서 가장 우점종으로 나타난 밴드 9는 *Methanococci* 강에 해당되었으며, 밴드 7과 10도 이 강에 해당되는 것으로 나타났다. 최근 연구에 의하면 *Methanobacterium articum*이 퍼클로레이트를 분해하였다고 보고되었다[19]. 또한 황을 산화하여 퍼클로레이트를 분해하는 내염성(5% NaCl) 농화배양 내에서 *Methanobacteria*와 연관된 고세균이 우점종으로 보고되었다[1]. *Methanobacteria*와 *Methanococci* 강에 해당하는 고세균들은 절대 혐기성이고, H₂와 CO₂를 이용하여 메탄을 생성(hydrogenotrophic methanogen)을 하는 것으로 알려져 있다[7]. 본 연구에서 사용한 농화배양 시료의 DGGE 결과 검출된 hydrogenotrophic methanogens이 퍼클로레이트를 분해하는지는 향후 연구가 필요하다. 그러나 황을 산화하여 퍼클로레이트를 분해하는 환경 하에서 우점종으로 나타난 것으로 미루어보아 이런 환경 하에서 이들의 대사적 기능이 있는 것은 명확하다.

최근 연구[15]에 의하면 해양 환경에서 분리한 고온성 고세균인 *Euryarchaeota* 문에 속하는 *Archaeoglobus fulgidus*가 종속 영양 방식으로 퍼클로레이트를 분해하는 것으로 알려졌다. 그리고, acetate를 전자공여체로 이용한 퍼클로레이트 제거 반응기로부터 acetoclastic methanogen인 *Methanoseta harundinacea*이 우세함이 보고되었다[2]. 이들 모두 종속영양 방식이며 독립영양 방식으로 퍼클로레이트를 분해하는 고세균에 관한 정보는 거의 없었다. 본 연구에서는 황을 전자공여체로 이용하여 퍼클로레이트를 분해하는 농화배양의 고세균 군집을 분석하여 우점 고세균 개체군들을 밝혀냈다. 우점 개체군들은 대부분 배양 되지 않은 고세균의 16S rRNA 유전자 클론들과 계통발생학적 연관이 있었다. 향후 이 우점 개체군들의 중요성과 대사적 역할에 대해서는 더 연구가 필요하다. 이 우점 고세균 개체군들의 기능이 규명되면 퍼클로레이트를 제거하는 농화배양 내 존재하는 미생물 군집을 이해하는데 도움이 될 것이다. 미생물 군집에 대한 정보와 이해를 통해 본 농화배양 미생물을 이용한 퍼클로레이트 연속제거 공정의 모니터링과 효율 증진에 활용될 기술을 개발 할 수 있다.

References

- Ahn, Y. and Kim, Y. H. 2016. Analysis of microbial community in perchlorate-degrading salt-tolerant enrichment culture. *J. Kor. Soc. Environ. Tech.* **17**, 527-535.
- Anupama, V. N., Prajeesh, P. V. G., Priya, S. A. P. and Krishnakumar, B. 2015. Diversity of bacteria, archaea and protozoa in a perchlorate treating bioreactor. *Microbiol. Res.* **177**, 8-14.
- Bardiya, N. and Bae, J. H. 2011. Dissimilatory perchlorate reduction: A review. *Microbiol. Res.* **166**, 237-254.
- Coates, J. D., Michaelidou, U., Bruce, R. A., O'connor, S. M., Crespi, J. N. and Achenbach, L. 1999. Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 5234-5241.
- Coates, J. D. and Achenbach, L. A. 2004. Microbial perchlorate reduction: Rocket-fuelled metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 569-580.
- DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685-5689.
- Demirel, B. and Scherer, P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **7**, 173-190.
- Gray, N. D., Miskin, E. P., Kornilova, O., Curtis, T. P. and Head, I. M. 2002. Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol.* **4**, 158-168.
- Han, K. R., Kang, T. H., Kang, H. C., Kim, K., Seo, D. H. and Ahn, Y. 2011. Autotrophic perchlorate-removal using elemental sulfur granules and activated sludge: batch test. *J. Life Sci.* **21**, 1473-1480.
- Han, K. R. and Ahn, Y. 2013. Characterization of perchlorate-removal using elemental sulfur granules and activated sludge. *J. Life Sci.* **23**, 676-681.
- Jang, H. M., Kim, J. H., Ha, J. H. and Park, J. M. 2014. Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Bioresour. Technol.* **165**, 174-182.
- Kim, Y. H., Han, K. R., Hwang, H., Kwon, H., Kim, Y., Kim, K., Kim, H., Son, M., Choi, Y. I. and Ahn, Y. 2016. Analysis of a sulfur-oxidizing perchlorate-degrading microbial community. *J. Life Sci.* **26**, 68-74.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R. and Schmidt, T. M. 2001. rrib: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* **29**, 181-184.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Liebernstiner, M. G., Pinkse, M. W., Schaap, P. J., Stams, A. J. M. and Lomans, B. P. 2013. Archaeal (per)chlorate reduction at high temperature: an interplay of biotic and abiotic reactions. *Science* **340**, 85-87.
- Motzer, W. E. 2001. Perchlorate: problems, detection, and solutions. *Environ. Forensics* **2**, 301-311.
- Park, B. J., Park, S. J., Yoon, D. N., Schouten, S., Damste, J. S. S. and Rhee, S. K. 2010. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **76**, 7575-7587.
- Schleper, C., Jurgens, G. and Jonscheit, M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 479-488.
- Shcherbakova, V., Oshurkova, V. and Yoshimura, Y. 2015. The effects of perchlorates on the permafrost methanogen: implication for autotrophic life on Mars. *Microorganisms* **3**, 518-534.
- Shin, K. H., Son, A., Cha, D. K. and Kim, K. W. 2007.

- Review on risks of perchlorate and treatment technologies. *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* **29**, 1060-1068.
21. Timura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
22. Wei, M., Zhang, R., Wang, Y., Ji, H., Zheng, J., Chen, X. and Zhou, H. 2013. Microbial community structure and diversity in deep-sea hydrothermal vent sediments along the Eastern Lau Spreading Centre. *Acta. Oceanologica. Sinica.* **32**, 42-51.

초록 : 독립영양 방식으로 퍼클로레이트를 분해하는 농화배양 내 고세균 군집 분석

김영화¹ · 도상현² · 소현승² · 빈준원² · 성해찬² · 지성찬² · 손명화² · 안영희^{1*}

(¹동아대학교 공과대학 환경공학과, ²부산일과학교)

퍼클로레이트(ClO_4^-)는 토양, 지하수, 그리고 지표수의 신규 오염물질이다. 원소 황을 전자공여체로 이용하여 퍼클로레이트를 분해하는 농화배양에 존재하는 세균 군집에 대한 정보는 이전 연구를 통해 밝혀졌다. 본 연구에서는 정량 및 정성적인 분자기법으로 이 농화배양 내 고세균 군집을 조사하였다. 농화배양 내의 16S rRNA 유전자 copy수를 실시간 정량 PCR로 조사한 결과 고세균의 이 유전자 copy수는 세균의 1.5%를 나타냈다. 그래서 이 농화배양 환경에서 적응하는 고세균의 수가 적어 세균이 우점하는 것으로 나타났다. DGGE 밴드패턴을 통해 농화배양과 식중균으로 이용한 활성슬러지의 고세균 군집조성이 다르다는 것을 알 수 있었다. 농화배양의 가장 우세한 DGGE 밴드는 *Methanococci*와 연관되는 것으로 나타났다. 향후 이 우점 고세균 개체군의 대사적 역할이 규명되면 퍼클로레이트를 제거하는 농화배양 내 존재하는 미생물 군집을 이해하는데 도움이 될 것이다.