

ORIGINAL ARTICLE

하수슬러지 처리 실규모 중온 혐기성 소화조 미생물 군집 및 다양성 조사

김민재 · 박수인¹⁾ · 이주윤 · 이혜빈¹⁾ · 강선민 · 배효관²⁾ · 이준엽*

부경대학교 지구환경시스템과학부(환경공학전공), ¹⁾부산대학교 사회환경시스템공학과, ²⁾울산과학기술원 도시환경공학과

Microbial Communities and Diversities in a Full-Scale Mesophilic Anaerobic Digester Treating Sewage Sludge

Minjae Kim, Suin Park¹⁾, Juyun Lee, Hyebin Lee¹⁾, Seonmin Kang, Hyokwan Bae²⁾, Joonyeob Lee*

Division of Earth Environmental System Science (Major of Environmental Engineering), Pukyong National University, Busan 48513, Korea

¹⁾Department of Social Environmental Systems Engineering, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²⁾Department of Urban and Environmental Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology, Busan 44919, Korea

Abstract

This study investigated microbial communities and their diversity in a full-scale mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. Influent sewage sludge and anaerobic digester samples collected from a wastewater treatment plant in Busan were analyzed using high-throughput sequencing. It was found that the microbial community structure and diversity in the anaerobic digester could be affected by inoculation effect with influent sewage sludge. Nevertheless, distinct microbial communities were identified as the dominant microbial communities in the anaerobic digester. Twelve genera were identified as abundant bacterial communities, which included several groups of syntrophic bacteria communities, such as *Candidatus Cloacimonas*, Cloacimonadaceae W5, *Smithella*, which are (potential) syntrophic-propionate-oxidizing bacteria and *Mesotoga* and *Thermovigra*, which are (potential) syntrophic-acetate-oxidizing bacteria. *Lentimicrobium*, the most abundant genus in the anaerobic digester, may contribute to the decomposition of carbohydrates and the production of volatile fatty acids during the anaerobic digestion of sewage sludge. Of the methanogens identified, *Methanolinea*, *Candidatus Methanofastidiosum*, *Methanospirillum*, and *Methanoculleus* were the dominant hydrogenotrophic methanogens, and *Methanosaeta* was the dominant acetoclastic methanogens. The findings may be used as a reference for developing microbial indicators to evaluate the process stability and process efficiency of the anaerobic digestion of sewage sludge.

Key words : Full-scale anaerobic digester, Sewage sludge, Microbial diversity, Microbial communities, High-throughput sequencing

1. 서 론

혐기성 소화 기술은 생물학적 처리기술로 유기성 폐기물 및 폐수의 유기성 고형분의 감량과 에너지원으로

활용 가능한 바이오가스 생산을 동시에 달성할 수 있다는 이점이 있어 하수슬러지와 같은 고농도 유기성 폐기물 처리에 널리 활용되고 있는 기술이다(Cai et al., 2016). 하수슬러지는 하수처리공정에서 필연적으로 발

Received 26 October, 2022; Revised 29 November, 2022;

Accepted 29 November, 2022

*Corresponding author : Joonyeob Lee, Division of Earth Environmental System Science (Major of Environmental Engineering), Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Phone : +82-51-629-6525
E-mail : Leejy@pknu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© 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.

생하며 국내의 경우 2020년 기준 연간 약 421만톤 발생한 대표적인 고농도 유기성폐기물로 현재 국내의 경우 정부 및 지자체의 지속적인 투자의 결과로 전국의 총 62곳의 하수처리장에서 하수슬러지 처리를 위한 실규모 혐기성 소화조가 건설되어 운영 중이다(MoE, 2021).

혐기성 소화는 혐기성 세균(bacteria)에 의해 고분자성 유기성 물질이 분해되어 휘발성 유기산과 수소분자로 전환되고, 최종적으로 혐기성 고세균(archaea)에 의해 CH_4 , CO_2 를 포함한 바이오가스로 전환되는 미생물 기반 생화학적 반응으로 유입 폐기물의 특성, 공정운영 조건과 소화조 내 미생물들의 생장 및 활성 등의 다양한 인자들의 인과관계에 의해 공정 효율 및 안정성이 결정된다(Carballa et al., 2015). 특히 혐기성 소화조 내 유기산 축적은 공정 불안정화를 나타내는 대표적인 현상으로 소화조 내 산생성 미생물들의 활성과 메탄생성 미생물간의 불균형에 의해 유발되며 이는 소화 공정 불안정화와 공정 효율 감소로 귀결될 수 있다(Ahring et al., 1995). 이를 선제적으로 예방하고 혐기성 소화 공정의 최적운동을 위해서는 소화 반응의 주체인 미생물 군집구조와 다양성에 대한 이해에 기반한 진단 및 대응 전략 개발이 요구되나 미생물의 정성, 정량 분석의 기술적 어려움으로 혐기성 소화 공정은 블랙박스 형태의 공정 진단 및 운영으로 제한되어 왔다(Riviere et al., 2009). 현재의 단순화된 운전지표(소화조온도, pH 등)에 기반한 공정 진단보다 정확한 공정 진단과 효과적인 공정 안정성 및 효율 개선방안의 발굴을 위해서는 대상 소화조 내 주요 미생물 군집과 다양성에 대한 양질의 정보 확보가 선행되어야 한다(Carballa et al., 2015). 이를 확보한다면 대상 공정의 공정상태를 보다 정확히 진단할 수 있는 미생물지표의 발굴이 가능할 것이다(Lee et al., 2017).

최근 최신 분자생물학적 분석기법인 차세대 염기서열 분석기법의 보급으로 이를 활용한 고농도 유기성폐기물의 혐기성 소화에 관여하는 미생물 군집 및 다양성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Han et al., 2017; Han et al., 2019; Shin et al., 2019a). 다만 국내 하수슬러지 처리 실규모 혐기성 소화조의 유입 하수슬러지와 혐기성 소화조의 주요 미생물 군집 및 미생물 종 다양성의 거동에 대한 연구는 제한적으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 실규모 중온 슬러지 처리 혐기성 소화 공정의 부산시 하수처리장의 혐기성 소화

조의 유입 하수슬러지와 소화조액을 시료로 채취하여 차세대 염기서열 분석을 수행하였고, 하수슬러지 및 소화조의 주요 우점 미생물 군집과 미생물 종 다양성을 조사하여 비교분석을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에서는 실규모 중온 혐기성 소화 공정의 주요 우점 미생물 군집과 미생물 종 다양성을 조사하기 위해 부산시 A 하수처리장의 하수슬러지 바이오가스화 실규모 중온 혐기성 소화조의 유입 하수슬러지와 소화조액을 시료로 채취하여 차세대 염기서열 분석을 수행하였다. 대상 혐기성 소화조는 하수슬러지를 단독소화 시스템으로 난형 CSTR 형태의 7,000 m^3 체적 반응조로 구성되어 있으며, 소화공정은 약 25일의 수리학적체류시간과 중온 조건인 $\sim 37^\circ\text{C}$ 에서 운영되었다. 대상 혐기성 소화조가 정상상태로 운영되는 시기의 시료를 채취하여 분석을 수행하였다.

시료의 총 genomic DNA는 상용 DNA 추출 키트인 Accuprep genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 추출하였으며, bacteria, archaea 특이적 범용 프라이머 세트인 BAC341F (CCTAC GGGNG GCWGC AG), BAC805R (GACTA CHVGG GTATC TAATC C)와 ARC787F (ATTAG ATACC CSBGT AGTCC), ARC1059R (GCCAT GCACC WCCTC T)의 서열 기반의 프라이머와 Herculase II fusion DNA polymerase (Agilent Technologies)를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 각 DNA 시료 내 bacteria, archaea의 16S rRNA gene의 증폭 산물을 확보하였다(Yu et al., 2005; Herlemann et al., 2011). 해당 PCR 증폭산물은 AMPure beads (Agencourt Bioscience)를 사용하여 정제해준 후, NexteraXT Indexed Primer(Illumina)를 사용한 두 번째 PCR을 통해 high-throughput sequencing용 최종 library를 확보하였다. 이를 high-throughput sequencing 기기인 MiSeq platform (Illumina)을 사용하여 염기서열 분석을 수행하였다. High-throughput sequencing에는 Miseq reagent kit (Illumina)를 사용하였다.

확보한 염기서열들은 operational taxonomic units (OTUs) 보다 높은 정확도 및 해상도의 결과 제공이 가능한 것으로 보고되고 있는 amplicon sequence

Table 1. 16S high-throughput sequencing results

Type	Sample	Valid sequence reads	Total ASVs	Total abundant ASVs*
Bacterial 16S rRNA gene	Sewage sludge	39,935	1578	305
	Anaerobic digester	39,789		
Archaeal 16S rRNA gene	Sewage sludge	12,988	57	43
	Anaerobic digester	54,550		

* ASVs whose relative abundances were above 0.1% in at least one sample.

variants (ASVs)로 그룹핑하였다(Callahan et al., 2017). 시료의 미생물 종 다양성은 R 프로그램의 Vegan library를 활용하여 대표적인 미생물 다양성 지수인 richness, Pielou's evenness와 Shannon diversity 지수들을 계산하였고 이를 활용하여 평가하였다. 시료의 bacteria와 archaea의 군집 정보는 Silva database version 138.1을 활용하여 각 ASVs의 taxonomic classification을 수행하여 확보하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. High-throughput sequencing 결과

본 연구에서는 실규모 중온 혐기성 소화 공정의 주요 우점 미생물 군집과 미생물 종 다양성을 조사 연구를 수행하고자 부산시 A 하수처리장의 하수슬러지 바이오가스화 실규모 중온 혐기성 소화조의 유입 하수슬러지와 소화조액을 시료로 채취하여 bacteria와 archaea 각각에 대한 16S high-throughput sequencing을 수행하였다. Bacteria의 분석 결과, 79,724개의 유효한 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하였고, 총 1,578개의 ASVs로 그룹화되었다(Table 1). Archaea의 분석 결과, 각각 67,538개의 유효한 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하였고, 총 57개의 ASVs로 그룹화되었다. Rarefaction curve를 통해 본 high-throughput sequencing 결과가 대상 시료의 미생물 다양성을 충분히 표현하는 수준인 것으로 확인되었다.

3.2. 하수슬러지 및 혐기성 소화조 미생물 다양성 분석

혐기성 소화조의 공정 안정성과 공정 효율은 소화 반응의 주체인 미생물의 군집구조와 다양성에 직접적인 관련이 있는 것으로 문헌에서 보고되고 있다(Carballe et al., 2015). 따라서 본 연구에서는 차세대 염기서열 분석기법을 활용하여 부산시 A 하수처리장의 실규모

혐기성 소화 공정의 유입 하수슬러지와 혐기성 소화조 시료의 미생물 다양성 및 군집 구조를 조사하였고, 이를 통해 하수슬러지 혐기성 소화에 관여하는 bacteria와 archaea에 대한 이해를 높이고자 하였다.

본 연구에서는 하수슬러지 및 혐기성 소화조 내 미생물 종 다양성 분포를 비교 분석하기 위해 미생물 생태분야에서 종 다양성 지수로 활용되는 richness, Pielou's evenness, Shannon diversity 지수를 계산하여 비교 평가를 수행하였다(Spellerberg and Fedor, 2003)(Fig. 1). 혐기성 소화조의 미생물 종 다양성의 경우 bacteria가 archaea보다 richness 및 Shannon diversity 기준으로 각각 7.8배, 2.5배 가량 더 큰 것으로 확인되었다(Fig. 1a, c). 이는 기존의 문헌에서 보고된 것처럼 부산시 하수슬러지 처리 혐기성 소화조의 미생물 종 다양성 또한 메탄생성균이 속해있는 archaea의 종 다양성이 가수분해균, 산생성균 등이 속해있는 bacteria보다 현저히 낮다는 것을 실험적으로 확인 결과로 볼 수 있다(Lee et al., 2018; Shin et al., 2019b).

유입 하수슬러지와 혐기성 소화조의 미생물 종 다양성을 비교해 본 결과는 다음과 같다. 시료 내 미생물 종의 종류 수를 의미하는 richness의 경우, bacteria는 혐기성 소화조에서 하수슬러지 보다 유의미하게 높았으며(13% 높음), archaea는 두 시료 모두 유사한 수준인 것으로 확인되었다(Fig. 1a). 한편 시료 내 미생물 종의 우점 분포를 의미하는 Pielou's evenness는 bacteria와 archaea 모두 하수슬러지에서 혐기성 소화조보다 유의미하게 높은 것으로 확인되었다(각 5%, 7% 높음)(Fig. 1b). 이는 혐기성 소화조의 미생물 군집 구조는 유입 하수슬러지와 비교 시 상대적으로 더 다양한 종류의 미생물로 구성되어 있으며, 이 중 몇몇 미생물의 우점도가 상대적으로 높은 것을 의미한다.

소화조 유입 하수슬러지와 혐기성 소화조 각각에서 발견되는 미생물 종과 두 시료에서 포번적으로 발견

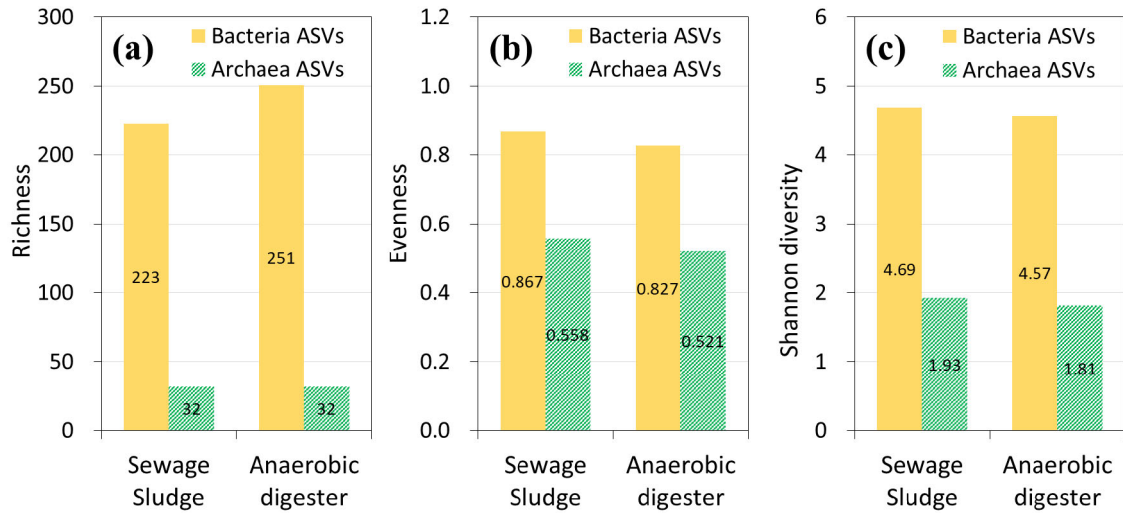


Fig. 1. Microbial diversity of the influent sewage sludge and full-scale anaerobic digester: (a) richness, (b) Pielou's evenness, (c) Shannon diversity.

되는 미생물 종을 판별하기 위해 bacteria와 archaea의 abundant ASVs(상대우점도 0.1% 이상 ASVs)를 대상으로 벤 다이어그램 분석을 수행하여 비교하였다(Fig. 2). 전체 251 종류의 혐기성 소화조의 bacterial ASVs 중 169 종류(전체의 67%)는 하수슬러지에서 유래된 ASVs로, 나머지 82 종류(전체의 33%)는 혐기성 소화조에서만 특이적으로 우점한 ASVs로 확인되었다(Fig. 2a). Archaeal ASVs의 경우, 전체 32 종류 중 21 종류의 ASVs(66%)는 하수슬러지에서 유래된 ASVs이며, 나머지 11 종류의 ASVs(전체의 34%)는 혐기성 소화조에서만 우점한 ASVs로 확인되어 bacteria와 비슷한 경향을 나타냈다(Fig. 2b). 이 결과를 통해 하수슬러지 혐기성 소화조의 미생물 군집 및 다양성은 유입 하수슬러지의 inoculation의 영향을 받을 수 있다는 것을 확인하였다(Lee et al., 2018). 또한 그럼에도 불구하고 유입 하수슬러지에서는 우점하지 않았지만 하수슬러지의 혐기성 소화 조건에서 선택적으로 우점화된 미생물들이 혐기성 소화조 전체 군집의 1/3 가량을 차지한다는 결과를 통해 슬러지 혐기성 소화를 위한 특이적 미생물 군집의 우점화 가능성을 확인하였다.

3.3. 하수슬러지 및 혐기성 소화조 미생물 군집 구조 분석

16S high-throughput sequencing을 통해 확보한 1578개의 bacterial ASVs (B.ASVs)는 총 14종류의

bacterial phylum에 속하는 것으로 판별되었다(Fig. 3a). 소화조 유입 하수슬러지 시료에서는 Proteobacteria(상대우점도, 37.7%), Actinobacteriota (19.5%), Bacteroidota (12.7%), Firmicutes (12.1%), Patescibacteria (10.3%), Planctomycetota (2.0%), Chloroflexi (2.0%), Verrucomicrobiota (1.4%)가 상대우점도 1% 이상의 우점 phylum으로 확인되었으며, 이는 총 bacteria 군집의 98%를 차지하는 것으로 확인되었다. 이 중 총합 53.9%의 우점도를 차지하는 phylum들인 Proteobacteria, Bacteroidota, Planctomycetota 및 Verrucomicrobiota는 Gram-negative 세포 외피 구조를 가진 bacteria 그룹으로 보고되고 있다(Sutcliffe et al., 2010). 하수슬러지의 가수분해 단계는 혐기성 소화 반응의 율속단계로 고려되며, 이를 개선하기 위해서 하수슬러지의 주요 구성물질인 bacteria의 세포를 파쇄시키기 위한 다양한 물리화학적, 생물학적 전처리법의 개발 연구가 수행되고 있다(Zhen et al., 2017; Tongco et al., 2020). 그 중 lysozyme, phospholipase와 같은 세포 외피 분해효소를 활용한 하수슬러지 전처리 기술개발을 위해서는 하수슬러지 구성 bacteria의 세포외피 구조에 대한 정보가 필수적으로, 본 연구의 결과는 해당 전처리 기술개발을 위한 기초자료로 활용 가능할 것이다.

한편 슬러지 처리 혐기성 소화조 시료에서는 Bacteroidota (27.3%), Cloacimonadota (13.1%),

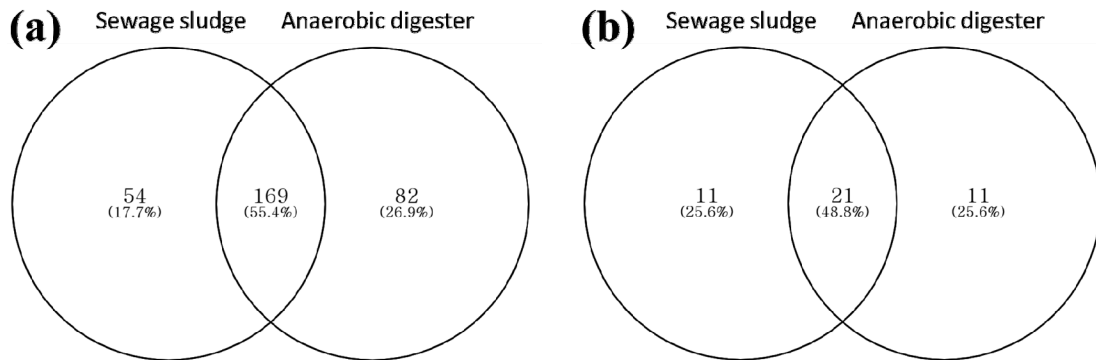


Fig. 2. Venn diagrams for microbial communities of the influent sewage sludge and full-scale anaerobic digester: (a) bacterial communities, (b) archaeal communities.

Firmicutes (12.8%), Proteobacteria (9.4%), Actinobacteriota (6.5%), Thermotogota (5.7%), Chloroflexi (5.6%), Desulfobacterota (3.8%), Patescibacteria (3.6%), Synergistota (2.6%), Spirochaetota (2.3%), Acidobacteriota (1.7%), Verrucomicrobiota (1.4%)가 상대우점도 1% 이상의 우점 phylum으로 판별되었으며, 이는 총 bacteria 군집의 96%를 차지하는 것으로 확인되었다. 이 중 Bacteroidota, Cloacimonadota, Firmicutes, Thermotogota, Chloroflexi, Desulfobacterota, Synergistota, Spirochaetota, Acidobacteriota는 유입 하수슬러지 보다 상대우점도가 높은 것을 확인하였으며, 하수슬러지 혐기성 소화 반응에 관여한 것으로 추정된다.

Bacteria의 대사 및 성장특성에 대한 정보를 활용하여 해석하기 위해서는 phylum 보다 낮은 taxonomic level의 정보가 필요하다(Le et al., 2021). 따라서 본 연구에서는 genus 수준의 heatmap 분석을 통해 하수슬러지와 혐기성 소화조의 우점 bacteria 군집 분석을 수행하였다(Fig. 3b). 하수슬러지 내 상대우점도 상위 14종의 bacterial genus(상대우점도 1% 이상)의 경우 혐기성 소화조에서는 각각의 하수슬러지 우점도 대비 6~41% 수준의 상대우점도로 확인되었다. 한편 혐기성 소화조 bacterial genus 군집 중 상대우점도 상위 10종의 bacterial genus(상대우점도 1% 이상 genus 중 *Tetrasphaera*, *Saprosiraceae OLB8* 제외)가 소화조 유입 하수슬러지에서는 우점하지 않고, 혐기성 소화조에서만 특이적 우점화 한 것으로 확인되었다. 이 분석 결과들을 통해 하수슬러지 혐기성 소화조의 bacteria

군집구조는 유입 하수슬러지의 inoculation의 영향을 받으나 소화조 내 우점 bacteria 군집에는 그 영향이 상대적으로 미비한 것을 확인하였다.

혐기성 소화조에서 특이적으로 우점한 bacteria 군집인 *Candidatus Cloacimonas*와 Cloacimonadaceae W5는 phylum Cloacimonadota 에 속하는 genus들로 문헌에 따르면 하수슬러지, 음식물류폐기물과 같은 고농도 유기성폐기물의 혐기성 소화공정의 우점균들로 보고된 바 있다(Lee et al., 2018). 이 genus에 속한 bacteria들은 아직까지 배양 기반 동정이 된 사례가 없어 대사 및 성장 특성에 대한 정보가 제한적이나, 총 염기서열 분석 결과를 기반으로 한 함유 기능성 유전자 정보를 통해 수소이용성메탄생성균과 공생관계가 가능한 잠재성을 띤 미생물로 확인된 바 있다(Pelletier et al., 2008). Phylum Cloacimonadota에 속하는 균주 중 최근 처음으로 농축배양에 성공한 *Candidatus Syntrophosphaera thermopropionivorans*의 경우 혐기성 소화 공정의 공정 안정성과 직결되는 유기산인 프로피온산을 분해하는 공생 bacteria (Syntrophic Propionate Oxidizing Bacteria, SPOB)인 것으로 보고되고 있다(Dyksma et al., 2019). 따라서 본 연구 결과와 문헌 내용을 종합 해 볼 때, *Candidatus Cloacimonas*와 Cloacimonadaceae W5는 하수슬러지 혐기성 소화에서 메탄생성균과 공생관계에 기반한 프로피온산 분해에 기여한 것으로 추정된다. *Smithella*는 *Syntrophobacter*와 함께 대표적인 SPOB로 본 연구에서는 위 두 미생물 군집과 함께 프로피온산 분해에 기여한 것으로 추정된다(de Bok et al., 2001). *Mesotoga*와 *Thermovigra*는 잠재적인 공생 아세트산 산화 미생물

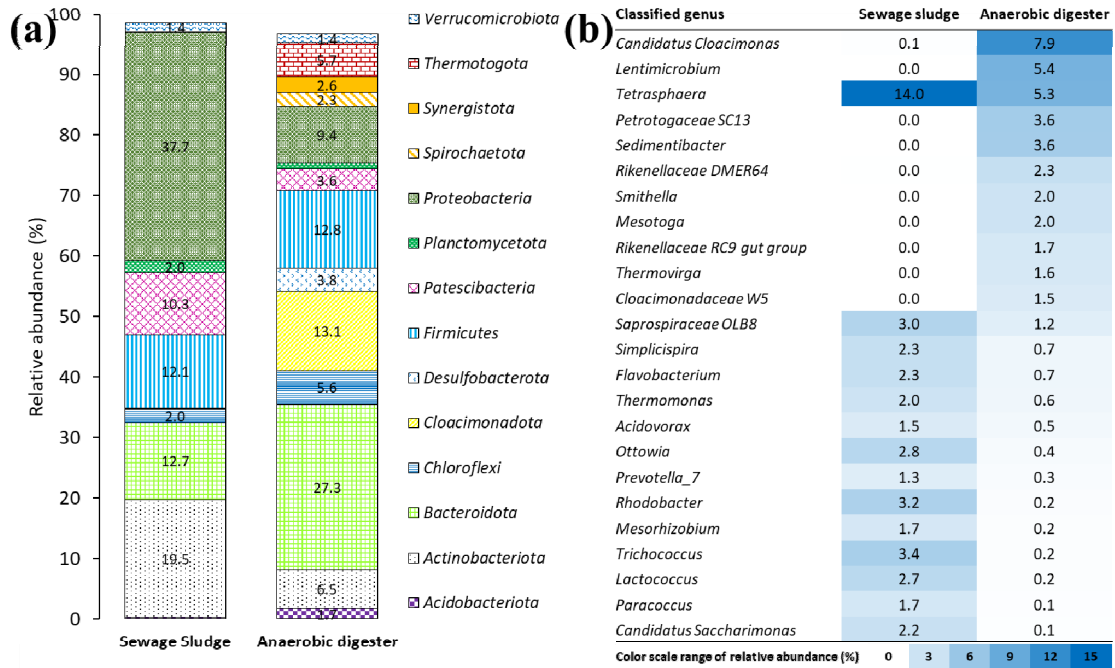


Fig. 3. Bacterial communities of the influent sewage sludge and full-scale anaerobic digester in (a) phylum level, (b) genus level.

(Syntrophic Acetate Oxidizing Bacteria, SAOB)로 보고되고 있어, 본 연구의 하수슬러지 혐기성 소화조에서는 수소이용성 메탄균들과 함께 공생 아세트산 분해 반응에 기여한 것으로 추정된다(Nobu et al., 2015; Singh et al., 2021).

*Lentimicrobium*은 본 연구의 혐기성 소화조 시료에서 두번째로 상대우점도가 높고 소화조에서 특이적으로 우점한 bacterial genus로 고농도 전분 폐수를 처리하는 혐기성 소화조에서 발견된 *Lentimicrobium saccharophilum* 단일종으로 구성된 bacteria 그룹이다(Sun et al., 2016). 해당 문헌에 따르면 *Lentimicrobium saccharophilum*은 중온성 절대 혐기성 미생물로 탄수화물계열의 물질들을 혐기성 조건에서 아세트산, 프로피온산, 말레익산, 포름산, 수소 등으로 분해 가능한 미생물로 보고되고 있다. 따라서 본 연구 결과와 종합 해 볼 때, *Lentimicrobium*은 하수슬러지 혐기성 소화 공정에서 하수슬러지 구성 탄수화물의 분해 및 산생성 반응에 기여한 것으로 추정된다.

Archaea의 경우, 16S high-throughput

sequencing을 통해 확보한 57개의 archaea ASVs (A.ASVs)는 총 4종류의 archaeal phylum에 속하는 것으로 판별되었다(Fig. 4a). 이 결과를 통해 대상 혐기성 소화조의 전체 archaea 중 95%는 메탄생성균임을 확인할 수 있었다. 슬러지 처리 혐기성 소화조 시료에서는 *Methanolinea* (44.1%), *Methanosaeta* (27.0%), *Candidatus Methanofastidiosum* (11.9%), *Methanospirillum* (8.6%), *Methanomassiliicoccus* (1.9%), *Methanoculleus* (1.5%)가 상대우점도 1% 이상의 우점 genus로 확인되었으며, 이는 전체 archaea 군집의 95%를 차지하는 것으로 확인되었다(Fig. 4b). 이 중 *Methanoculleus*를 제외한 나머지 우점 archaeal genus는 모두 소화조 유입 하수슬러지에서 우점하는 것으로 확인되었다. 이를 통해 혐기성 소화조의 메탄생성균 군집구조는 유입 하수슬러지의 inoculation의 영향을 받으며 우점균 또한 그 영향을 유의미하게 받는 것을 확인할 수 있었다.

한편 메탄균 genus 수준의 군집구조 분석결과를 통해 혐기성 소화조 메탄균 군집구조는 수소분자와 이산

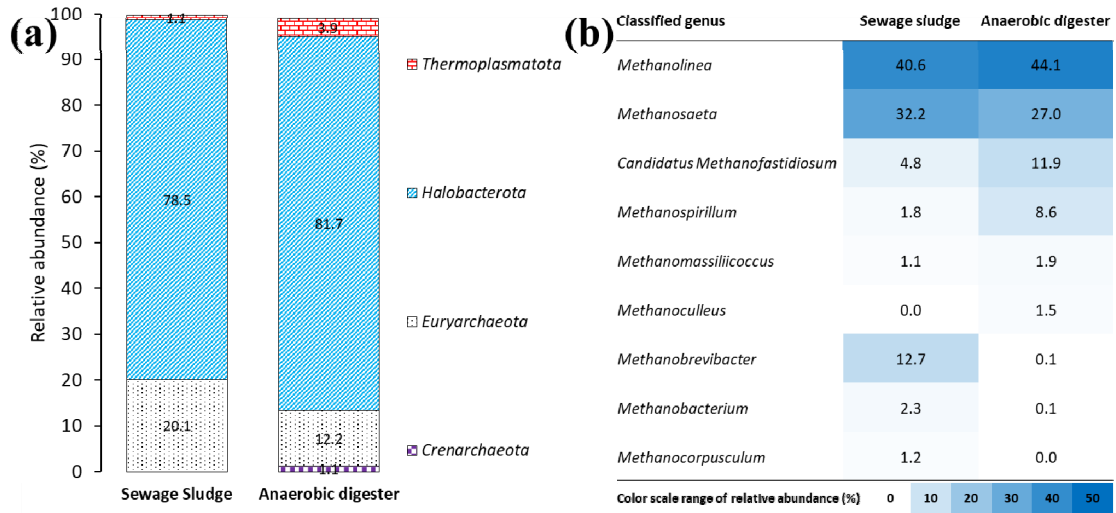


Fig. 4. Archaeal communities of the influent sewage sludge and full-scale anaerobic digester in (a) phylum level, (b) genus level.

화탄소를 메탄으로 전환시키는 수소이용성메탄생성균이 전체 군집의 70%, 아세트산을 메탄으로 전환시키는 아세트산이용성메탄생성균 전체 군집의 28%를 차지하는 것으로 확인되었다. 앞선 bacteria 군집 분석 결과와 함께 종합 해 볼 때, 하수슬러지 혐기성 소화 공정의 안정적 운영(다시 말해, 소화조 불안정 상황을 유발하는 유기산인 아세트산, 프로피온산 등의 소화조 내 축적을 최소화)을 위해서는 *Methanolinea*, *Candidatus Methanofastidiosum*, *Methanospirillum*, *Methanoculleus*와 같은 수소이용성메탄생성균과 *Methanosaeta*와 같은 아세트산이용성메탄생성균, *Mesotoga*, *Thermovigra*와 같은 (잠재적)아세트산산화균, *Candidatus Cloacimonas*, Cloacimonadaceae W5, *Smithella*와 같은 (잠재적)프로피온산산화균의 공생관계가 필수적이며, 소화조 내 적정 수준 공존이 필요할 것으로 판단된다. 본 연구결과에서 확인된 우점 bacteria 및 메탄생성균은 하수슬러지 혐기성 소화조의 공정 안정성 및 공정 효율 평가를 위한 미생물 지표로서 활용이 가능할 것으로 판단되며, 이는 추후 후속연구를 통해 검증이 필요할 것이다.

4. 결론

본 연구에서는 실규모 중온 슬러지 처리 혐기성 소화 공정인 부산시 A 하수처리장의 혐기성 소화조의 유입

하수슬러지와 소화조 시료를 채취하여 16S high-throughput sequencing을 수행하였고, 하수슬러지 및 소화조의 주요 우점 미생물 군집과 미생물 종 다양성을 조사하였다.

- 1) 미생물 종 다양성 지수인 richness와 evenness는 하수슬러지와 비교 시 혐기성 소화조에서 유사하거나 상대적으로 높게 나타났으며, 이를 통해 혐기성 소화조의 미생물 생태계가 상대적으로 더 다양한 종류의 미생물로 구성되어 있고, 미생물 우점경향의 불균형이 상대적으로 더 큰 것을 확인하였다.
- 2) 혐기성 소화조의 전체 미생물 종의 2/3은 소화조 유입 하수슬러지에서 유래된 미생물로 구성되어 있으며, 나머지 1/3은 혐기성 소화조에서만 특이적으로 관측되었다.
- 3) Bacteria의 경우, 총 12종류의 genus가 슬러지 처리 혐기성 소화조의 우점 군집(상대우점도 1% 이상)으로 확인되었다. 소화 공정 안정성과 직결되는 유기산 분해 균주로는 (잠재적)공생 프로피온산 산화균인 *Candidatus Cloacimonas* (상대우점도, 7.9%), Cloacimonadaceae W5 (1.5%), *Smithella* (2.0%), (잠재적)공생 아세트산 산화균인 *Mesotoga* (2.0%), *Thermovigra* (1.6%)가 소화조 우점 균주로 확인되었다.

4) Archaea의 경우, 소화조 내 총 archaea의 95%가 메탄생성균으로 수소이용성메탄균은 *Methanollinea* (44.1%), *Candidatus Methanofastidiosum* (11.9%), *Methanospirillum* (8.6%), *Methanoculleus* (1.5%)가, 아세트산이용성메탄균은 *Methanosaeta* (27.0%)가 소화조 우점 균주로 확인되었다.

본 연구결과는 최신 분자생물학적 분석기법인 차세대 염기서열 분석을 활용하여 부산시 하수슬러지 처리 혐기성 소화조의 미생물 군집 및 종 다양성에 대해 조사한 연구 결과로 하수슬러지 혐기성 소화조의 공정 안정성 및 공정 효율 평가를 위한 미생물 지표 발굴 및 미생물 정보 기반 공정 최적 운영 전략 수립을 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 부산녹색환경지원센터의 연구사업비 지원을 받아 연구되었습니다(22-4-50-54). 또한 이 성과는 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 2021R1C1C1009122). 또한 본 연구는 환경부의 폐자원에너지화 전문인력양성사업으로 지원되었습니다 (YL-WE-21-002).

REFERENCES

- Ahring, B. K., Sandberg, M., Angelidaki, I., 1995, Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 559-565.
- Cai, M., Wilkins, D., Chen, J., Ng, S. K., Lu, H., Jia, Y., Lee, P. K., 2016, Metagenomic reconstruction of key anaerobic digestion pathways in municipal sludge and industrial wastewater biogas-producing systems. *Front. Microbiol.*, 7, 778.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Holmes, S. P., 2017, Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.*, 11, 2639-2643.
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J. M., 2015, Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 33, 103-111.
- de Bok, F. A. M., Stams, A. J. M., Dijkema, C., Boone, D. R., 2001, Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1800-1804.
- Dyksma, S., Gallert, C., 2019, *Candidatus Syntrophosphaera thermopropionivorans*: a novel player in syntrophic propionate oxidation during anaerobic digestion. *Environ. Microbiol. Rep.* 11, 558-570.
- Han, G., Shin, S. G., Cho, K., Lee, J., Kim, W., Hwang, S., 2019, Temporal variation in bacterial and methanogenic communities of three full-scale anaerobic digesters treating swine wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 26, 1217-1226.
- Han, G., Shin, S. G., Lee, J., Shin, J., Hwang, S., 2017, A Comparative study on the process efficiencies and microbial community structures of six full-scale wet and semi-dry anaerobic digesters treating food wastes. *Bioresour. Technol.*, 245, 869-875.
- Herlemann, D. P. R., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., Andersson, A. F., 2011, Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.*, 5, 1571-1579.
- Le, T. N. T., Lee, J., 2021, Effect of ammonia load on microbial communities in mesophilic anaerobic digestion of propionic acid. *J. Environ. Sci. Int.*, 30, 1093-1100.
- Lee, J., Kim, E., Han, G., Tongco, J. V., Shin, S. G., Hwang, S., 2018, Microbial communities underpinning mesophilic anaerobic digesters treating food wastewater or sewage sludge: A full-scale study. *Bioresour. Technol.*, 259, 388-397.
- Lee, J., Shin, S. G., Han, G., Koo, T., Hwang, S., 2017, Bacteria and archaea communities in full-scale thermophilic and mesophilic anaerobic digesters treating food wastewater: Key process parameters and microbial indicators of process instability. *Bioresour. Technol.*, 245, 689-697.
- MoE., 2021, Statistics of sewerage, Ministry of Environment, Korea.
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S. G., Woyke, T., Liu, W. T., 2015, Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME J.*, 9, 1710-1722.
- Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Riviere, D., Ganesan, A., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G. N., Medigue, C., Weissenbach, J., Le Paslier, D., 2008, *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*: genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *J. Bacteriol.*, 190, 2572-2579.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie,

- S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A., 2009, Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.*, 3, 700-714.
- Shin, S. G., Han, G., Lee, J., Shin, J., Hwang, S., 2019a, A Snapshot of microbial community structures in 20 different field-scale anaerobic bioreactors treating food waste. *J. Environ. Manage.*, 248, 109297.
- Shin, J., Cho, S. K., Lee, J., Hwang, K., Chung, J. W., Jang, H. N., Shin, S. G., 2019b, Performance and microbial community dynamics in anaerobic digestion of waste activated sludge: impact of immigration. *Energies*, 12, 573.
- Singh, A., Schnürer, A., Westerholm, M., 2021, Enrichment and description of novel bacteria performing syntrophic propionate oxidation at high ammonia level. *Environ. Microbiol.*, 23, 1620-1637.
- Spellerberg, I. F., Fedor, P. J., 2003, A Tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon-Wiener' Index. *Glob. Ecol. Biogeogr.*, 12, 177-179.
- Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Turlousse, D. M., Matsuura, N., Meng, X. Y., Tamaki, H., Hanada, S., Cruz, R., Yamaguchi, T., Sekiguchi, Y., 2016, *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum Bacteroidetes, and proposal of Lentimicrobiaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 2635-2642.
- Sutcliffe, I. C., 2010, A Phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.*, 18, 464-470.
- Tongco, J. V., Kim, S., Oh, B. R., Heo, S. Y., Lee, J., Hwang, S., 2020, Enhancement of hydrolysis and biogas production of primary sludge by use of mixtures of protease and lipase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 25, 132-140.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005, Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, 89, 670-679.
- Zhen, G., Lu, X., Kato, H., Zhao, Y., Li, Y. Y., 2017, Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 69, 559-577.

-
- Graduate student. Min-Jae Kim
Division of Earth Environmental System Science
(Major of Environmental Engineering), Pukyong
National University
mj6232004@naver.com
 - Graduate student. Su-In Park
Department of Social Environmental Systems
Engineering, Pusan National University
starsinee@pusan.ac.kr
 - Graduate student. Ju-Yun Lee
Division of Earth Environmental System Science
(Major of Environmental Engineering), Pukyong
National University
bestrongirl@naver.com
 - Graduate student. Hye-Bin Lee
Department of Social Environmental Systems
Engineering, Pusan National University
pnubyn21@naver.com

-
- Undergraduate student. Seon-Min Kang
Division of Earth Environmental System Science
(Major of Environmental Engineering), Pukyong
National University
kangseonmin@naver.com
 - Professor. Hyo-Kwan Bae
Department of Urban and Environmental Engineering,
Ulsan National Institute of Science and Technology
hyokwan.bae@unist.ac.kr
 - Professor. Joon-Yeob Lee
Division of Earth Environmental System Science
(Major of Environmental Engineering), Pukyong
National University
Leejy@pknu.ac.kr