

## Biological Nitrogen Removal System의 세균 군집 분석

김경미 · 이상일<sup>1</sup> · 이동훈\*

충북대학교 미생물학과 및 바이오연구소, <sup>1</sup>충북대학교 환경공학과

생물학적 질소 제거(Biological nitrogen removal; BNR) 시스템의 효율적인 처리 공정을 이해하기 위하여 질산화 반응조 내 세균 군집 구조를 16S rRNA 유전자의 PCR 및 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 방법을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 사용한 BNR 시스템은 국내에서 비교적 많이 적용되고 있는 부상여재를 이용한 고도처리 시스템, Nutrient Removal Laboratory 시스템, 반추기법을 이용한 영양염류 처리 Sequencing Batch Reactor (SBR) 시스템이었고, 실험 결과 모든 시료에서 암모니아 산화 세균과  $\beta$ -proteobacteria에 해당되는 말단 단편을 확인할 수 있었다. 암모니아 산화 세균 군집에서 유래된 말단 단편의 염기서열을 분석한 결과 SBR 공정에서는 *Nitrosomonas*와 *Nitrosolobus*에 속하는 군집이 우점종임을 확인할 수 있었다. 그러나 다른 두 공정들에서는  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 미배양 균주와 *Cardococcus australiensis*와 염기서열 유사도가 높은 군집이 우점하였다. 또한, 암모니아 산화 세균 군집을 분석한 결과, SBR 공정이 암모니아 산화 세균의 농화 배양에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 각 BNR 시스템에 동일한 폐수가 유입되었음에도 불구하고 서로 다른 세균 군집 구조를 형성하고 있음을 의미한다.

**Key words** □ 16S rRNA, ammonia-oxidizing bacteria, biological nitrogen removal, T-RFLP

폐수 오염물질 중 질소는 용존산소의 고갈, 수생생물의 독성피해, 공중보건의 피해 등을 야기시키며(3), 인과 함께 호소 및 하천으로 유입시 조류(algae)의 성장을 촉진시켜 수체에서 부영양화를 가속화시키는 주원인 물질이다. 질산화반응(nitrification)과 탈질반응(denitrification)에 의한 생물학적 질소 제거(Biological Nitrogen Removal; BNR)는 폐수처리 공정에서 중요한 기술로(22) 효율적인 비용의 처리 방식으로 알려져 있으며(14), 암모니아 아질산을 거쳐 질산으로 전환되는 질산화반응은 질소 순환과 폐수처리 공정의 결정적인 단계이다(9). 질산화반응은 *Nitrosomonas* 같은 암모니아 산화 세균과 *Nitrobacter* 같은 아질산 산화 세균인 독립영양생물에 의해서 이루어진다. 질산화반응은 무기성 질소( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )를 가스형태로 환원시켜 제거시키는 생물학적 탈질반응 전의 준비 단계이기 때문에 폐수처리에서 중요한 역할을 한다(8). 질산화세균은 긴 세대 시간과 낮은 성장률로 인해서(19) 개체군의 분포가 과소평가될 수 있기 때문에 전통적인 배양 방법을 이용하여 연구하기에는 어려움이 있다(11). 따라서, 근래에는 분자생물학적 분석방법이 활발하게 사용되고 있다. 다양한 유전자를 대상으로 분자생물학적 분석방법을 응용할 수 있지만, 16S rRNA를 분석 대상으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 16S rRNA 유전자는 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있는 영역이며, 염기서열의 변화는 미생물간의 유연관계를 파악하는 데에 유용하다(2). 또한 Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>)에서 제공하는

16S rRNA의 database 등 축적된 자료가 비교적 많기 때문에 염기서열의 정보를 특정 세균의 분류 및 동정에 이용할 수 있으며, 다양한 분류군 수준에서의 PCR primer 및 핵산 탐침의 설계가 가능하다(5).

16S rRNA의 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 분석법은 제한 효소에 의해 절단된 여러 개의 단편 중 말단의 단편만을 분리하여 분석하는 방법으로, 하나의 terminal(5' 또는 3') restriction fragment (T-RF)가 특정 분류군을 대표하는 것이다. 이로 인해 황성슬러지(1), 토양(6), 수계(18) 등의 복잡한 자연 생태계의 군집을 구성하는 미생물 종의 정성적 분석과 정량적 분석이 가능해진다(13, 15).

국내 하수고도처리공법의 질소제거공정 적용현황을 보면, 대규모 하수처리장의 경우에는 주로 연속흐름식 고도처리공법이 적용되고 있으며, 중소규모의 경우에는 유입유량의 탄력적인 대응을 목적으로 Sequencing Batch Reactor (SBR) 방법이 많이 적용되고 있고, 접촉재를 활용하는 공법도 많이 적용되고 있는 추세이다. A/O나 A<sup>2</sup>/O 와 같은 연속흐름식 하수처리공법은 처리 대상물질에 따라 공법이 차별화 되어 있으며, 우리나라에서는 주로 질소 및 인을 동시에 제거하는 공법들이 많이 개발되고 있다(국가환경기술정보센터; <http://www.konetic.or.kr>).

본 연구에서는 국내에서 비교적 많이 적용되고 있는 BNR 시스템 중에서 부상여재를 이용한 고도처리 시스템, Nutrient Removal Laboratory (NRL) 시스템, 반추기법을 이용한 영양염류 처리 SBR 시스템에서 질산화반응조의 세균 군집 구조를 T-RFLP 방법을 이용하여 분석하고, BNR 시스템의 효율적인 처리 공정을 위한 주요 세균에 대한 정보를 제공하고자 한다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 043-261-3261, Fax: 043-264-9600  
E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr

## 재료 및 방법

### 시료 채취 및 핵산 추출

실험실 규모로 제작한 3 종류의 Biological Nitrogen Removal (BNR) 시스템, 즉 부상여재를 이용한 고도처리 시스템, NRL 시스템, SBR 시스템으로부터 질산화반응이 일어나는 반응조의 세균을 채취하였다(Fig. 1). 각 BNR 시스템에 유입되는 폐수는 청주시 하수종말처리장의 유입폐수였으며, 모두 일정기간 이상 시

운전하여 안정화된 후에 시료를 채취하였다.

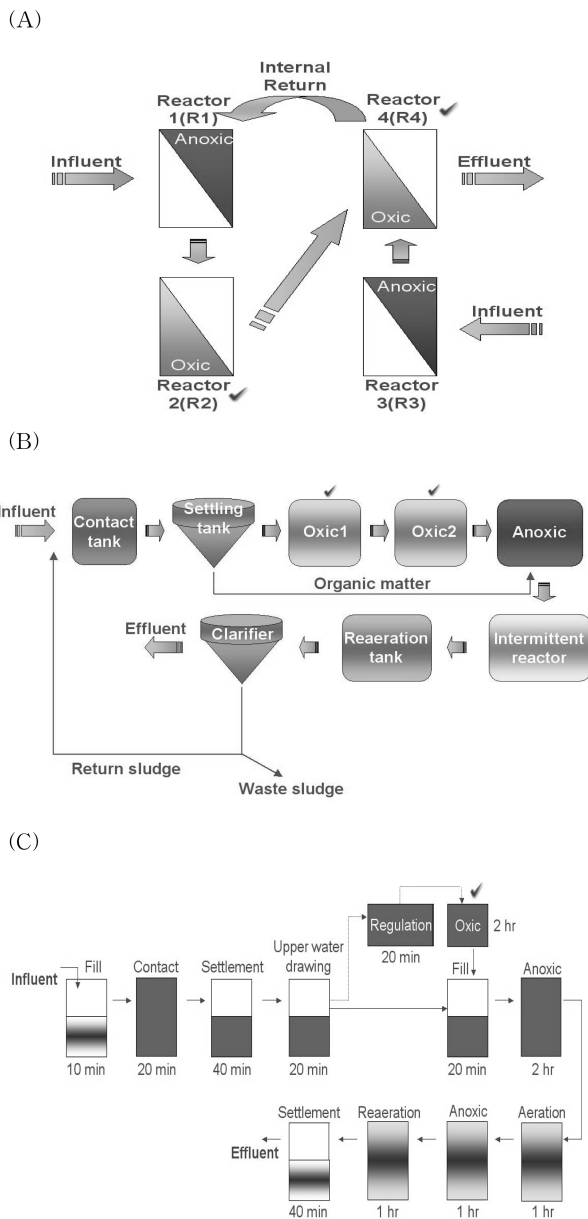
채취한 시료의 핵산을 추출하기 위하여 Miller 등(17)의 bead beating 방법을 다음과 같이 변형하여 이용하였다. 먼저 원심분리 (14,000×g, 10분, 4°C)로 농축된 용액시료와 담체시료에 0.1 mm zirconia glass bead (Biospec, USA) 0.5 g, phosphate buffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0) 300  $\mu\text{l}$ , SDS solution (10%[wt/vol] SDS, 100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8.0) 300  $\mu\text{l}$ , chloroform: isoamylalcohol (24:1) 300  $\mu\text{l}$ 를 넣고, microtube mixer (TOMY SEIKO, Japan)를 이용하여 5분 동안 bead beating 하였다. 원심분리(14,000×g, 15분, 4°C) 한 후, 상층액을 취하여 phenol: chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)과 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 순서대로 각 1회 처리하였다. 상층액에 동량의 cold isopropanol과 sodium acetate (최종 농도 0.3 M)를 첨가하고 -20°C에서 2시간 이상 방치하여 핵산을 침전시켰다. 원심분리 (14,000×g, 30분, 4°C) 한 후, 에탄올로 세척하고 건조시켜 핵산 침전물을 얻었다. 추출된 핵산은 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 녹인 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며 Ultraclean™ DNA Purification kit (MO BIO, USA)로 정제하여 -20°C에서 보관하였다.

### T-RFLP 분석을 위한 핵산의 증폭

16S rRNA 유전자 증폭에 이용된 eubacterial primer는 27F (*E. coli* numbering 8-27 : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 785R (*E. coli* numbering 785-804 : 5'-ACT ACCRGGGATCT AATCC-3')을 사용하였다(7, 12). 또한 Ammonia-oxidizing bacteria (AOB)의 16S rRNA 유전자 증폭에 이용된 specific primer는 27F와 Nso1225R (*E. coli* numbering 1225-1244 : 5'-CGCCATTGTATTACGTGTGA-3')을 사용하였다(4). T-RF 분리를 위하여 27F는 biotinylated primer (27FB)를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 1X 반응용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  BSA, pH 8.3), 160  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0.3  $\mu\text{M}$  primer, 주형 핵산(10-100 ng/ $\mu\text{l}$ )과 1.5 unit의 *Taq* polymerase를 첨가하여 총 50  $\mu\text{l}$ 의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조 건은 95°C에서 3분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 785R primer는 58°C, Nso1225R primer는 52°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR product는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, Ultraclean™ DNA purification kit (MO BIO)로 정제 후 -20°C에서 보관하였다.

### 16S rDNA T-RFLP 분석

PCR 산물에 제한효소 *Hae*III, *Hha*I (TaKaRa, Japan) 5 unit을 각각 첨가하여 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 제한효소에 의해 절단된 DNA에 0.5× SSC 완충용액(75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate, pH 7.3)으로 3회 세척한 streptavidin paramagnetic particle (Promega, USA)과 1× SSC를 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. Magnetic stand로 분리된 streptavidin paramagnetic particle은 0.1× SSC 완충용액으로 4회 세척 후,



**Fig. 1.** Scheme of Biological Nitrogen Removal (BNR) systems. (A) An advanced treatment system with plotting media; (B) Nutrient Removal Laboratory (NRL) system; (C) Operating strategy in the rumination type Sequencing Batch Reactor (SBR) system. Check marks indicate the sampling sites of nitrification reactors.

0.2 N NaOH를 첨가하여 5분간 반응시키고, 다시 0.2 N NaOH를 첨가하여 2분간 반응시킴으로써 biotin이 붙은 single-stranded DNA T-RF (ssT-RF)만을 회수하였다. 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ 를 넣고 65°C에서 10분간 반응시켜 streptavidin으로부터 DNA를 분리시켰다. 원심분리(14,000×g, 4분, 4°C)하여 상층액만 취한 후, 20분 동안 진공 건조하여 암모니아를 제거하였다. T-RF profile은 6% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 확인하였다. 시료 3  $\mu\text{l}$ 와 loading dye buffer (95% formamide, 10 mM NaOH, 20 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue, 0.02% xylene cyanol FF) 1.5  $\mu\text{l}$ 를 섞어 3분 동안 95°C에서 변성 시킨 후, 얼음에 식혔다. 1× TBE 완충용액(90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)으로 완충된 6% polyacrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide = 19:1, 0.7 M urea)에서 1,900 V로 *Hae*III 처리시 3시간, *Hha*I 처리시 2시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 10% acetic acid로 30분 동안 고정한 후, 3차 증류수로 3회 세척하고, silver staining solution (0.1%  $\text{AgNO}_3$ , 0.055% form-aldehyde)으로 30분 동안 염색하였다. Developing reagent (3.0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.055% formaldehyde,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  2.0 mg/l)로 발색 반응 후 10% acetic acid를 처리함으로써 반응을 정지시키고 3차 증류수로 2회 세척하였다. GelCompar II program (Applied Maths, Belgium)을 이용하여 각 T-RF pattern을 Pearson 방법으로 상관관계를 분석하고, UPGMA (21) 형태의 dendrogram을 작성하였다. 또한 T-RF 자료로 Richness (S), Shannon-Weiner diversity index (H)를 계산하였다(6).

#### 암모니아 산화 세균 T-RF 염기서열 분석 방법

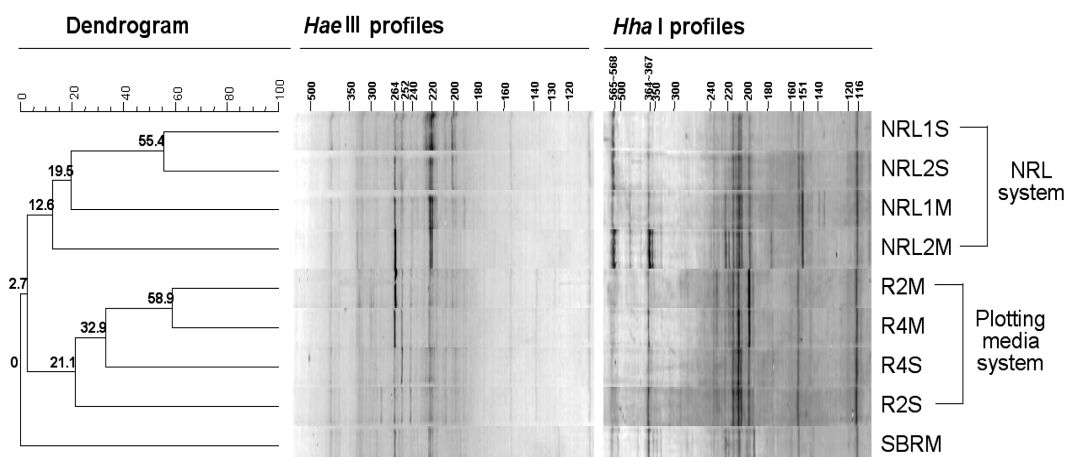
암모니아 산화 세균의 T-RF의 염기서열을 분석하기 위해 amplified fragment length polymorphism (AFLP) 방법(24)을 적용하였다. 제한 효소 *Hha*I (TaKaRa, Japan)에 의해 절단된 PCR

산물은 0.2 N NaOH 반응 과정만을 제외하여 ssT-RF 분리와 동일하게 double-stranded DNA T-RF (dsT-RF)만을 회수하였다. 분리된 dsT-RF에 *Hha*I-adapter를 ligation 한 후, 27FB와 adapter (A2) primer 쌍으로 PCR 증폭하였다. *Hha*I-adapter는 A1 primer (5'-CGATCGACAGTGTACTCTAGTC-3')와 A2 primer (5'-GAC TAGAGTACA CTGTCGATCGCG-3')를 각각 25  $\mu\text{M}$ 씩 첨가 후, 95°C에서 10분 반응 후, 상온에서 20분 반응하여 제작하였다. 2차 PCR 산물로부터 다시 streptavidin paramagnetic particle (Promega, USA)을 이용하여 ssT-RF를 분리한 후, 6% polyacrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide = 19:1, 0.7 M urea, 1× TBE)에서 전기영동하여 확인하였다. 주요 T-RF band는 멸균된 주사기 바늘로 잘라내어, 멸균된 3차 증류수를 넣고 30°C에서 12시간 교반시켰다. 상층액을 주형으로 하여 27F와 A2 primer 쌍으로 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T vector (Promega, USA)를 이용하여 cloning 하였다. 재조합 클론을 선별한 후, plasmid DNA를 추출하여 BaseStation™ DNA Fragment Analyzers (MJ Research, USA)로 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

#### 진정세균의 군집 분석

세 가지 BNR 시스템에서 16S rRNA 유전자를 이용하여 T-RFLP 분석을 하였다(Fig. 2). *Hae*III를 처리한 T-RF profile에서는 세 BNR 시스템의 용액시료와 담체시료에서 모두 공통으로 우점하는 221 bp, 담체시료에서만 우점하는 264 bp의 T-RF를 관찰하였다. 부상여제를 이용한 공법의 reactor 4의 용액시료와 담체시료에서는 252 bp의 T-RF가 관찰되었다. NRL 시스템과 SBR 시스템의 시료에서는 219 bp의 T-RF를 관찰하였고, NRL 시스템의 용액시료에서는 201 bp의 T-RF가 관찰되었다. 16S



**Fig. 2.** PAGE and cluster analysis of *Hae*III and *Hha*I T-RF profiles of the eubacterial communities in 3 BNR systems. NRL1S; Solution of NRL oxalic tank 1, NRL2S; Solution of NRL oxalic tank 2, NRL1M; Media of NRL oxalic tank 1, NRL2M; Media of NRL oxalic tank 2, R2M; Reactor 2 media of an advanced treatment system with plotting media, R4M; Reactor 4 media of an advanced treatment system with plotting media, R4S; Reactor 4 solution of an advanced treatment system with plotting media, R2S; Reactor 2 solution of an advanced treatment system with plotting media, SBRM; Media of Sequencing Batch Reactor oxalic tank.

rRNA 염기서열 database의 자료를 분석한 결과에 의하면 264 bp의 T-RF는 *Nitrospira*, *Desulfotomaculum*, *Hydrogenobacter* 등이 포함된 분류군에서 관찰이 가능하고, 252 bp의 T-RF는 *Acinetobacter*, *Chlorobium* 등에서 생성이 가능하며, 221 bp의 T-RF는 주로 *Nitrosomonas*, *Azoarcus*, *Burkholderia* 등이 포함된  $\beta$ -Proteobacteria에서 관찰이 가능하다. 219 bp의 T-RF는 *Nitrospira*, *Aquaspirillum*, *Comamonas* 등이 포함된  $\beta$ -Proteobacteria와 Firmicutes 계열에서 생성이 가능하며, 201 bp의 T-RF는  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes 계열의 광범위한 분류군에서 관찰이 가능하다.

*HhaI*을 처리한 T-RFs profile에서는 세 BNR 시스템의 용액시료와 담체시료에서 모두 364~367 bp, 205 bp, 116 bp의 T-RF를 관찰하였다. 부상여재를 이용한 시스템의 담체시료에서는 197 bp의 T-RF, NRL 시스템의 시료에서는 565~568 bp의 T-RF가 다른 시스템에서 보다 높은 비율로 존재하였다. NRL 시스템의 시료에서만 151 bp의 T-RF가 관찰되었다. 565~568 bp의 T-RF는 주로  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria, Firmicutes 등에서 관찰이 가능하며, 364~367 bp의 T-RF는  $\beta$ -Proteobacteria, Actinobacteria 등에서 생성이 가능하다. 205 bp의 T-RF는  $\beta$ -Proteobacteria, *Pseudomonas*, Firmicutes, Bacteroidetes가 포함된 분류군에서 관찰할 수 있고, 197 bp의 T-RF는 *Brevibacillus*, *Flavobacterium*, *Pirellula* 등에서 생성이 가능하다. 151 bp의 T-RF는 *Cardococcus*, *Frankia*, *Paenibacillus* 등에서 관찰이 가능하고, 116 bp의 T-RF는 *Lactobacillus*에서 생성이 가능하다. *HaeIII*와 *HhaI*을 처리하였을 때 공통으로 관찰 가능한 군집은 *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* 등의 암모니아 산화 세균과 *Algaligenes*, *Aquaspirillum*, *Comamonas*, *Clostridium*, *Dechlorimonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Thiobacillus* 등의 군집이었다. 따라서 이들은 질산화반응조에서 높은 수준으로 존재하며 주요 군집을 형성하고 있는 분류군이라 추정된다. *HaeIII*와 *HhaI*을 처리한 시료의 T-RF pattern을 합쳐서 집괴 분석(cluster analysis)을 한 결과, 각 시스템 별로 구분되는 집괴를

이루었다(Fig. 2). 특히 용액시료와 담체시료는 각각 나뉘었다. 부상여재를 이용한 시스템의 경우는 담체시료가 58.9%의 유사도, 용액시료는 28.7%의 유사도를 보였으며 담체시료와 용액시료는 21.1% 수준에서 하나의 집괴를 형성하였다. 이와는 달리 NRL 시스템의 경우는 용액시료가 55.4%의 유사도를 보이며 먼저 묶였으며 12.6%의 수준에서 담체시료가 묶였다. 각 시스템은 다른 시스템과는 매우 낮은 유사도를 보였으며, 이를 통해 각 BNR 시스템에 따라서 동일한 폐수가 유입되었음에도 불구하고 서로 다른 세균 군집 구조를 형성하고 있으며, 같은 시스템 내에서도 용액시료와 담체시료 간에도 서로 다른 군집 구조를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

T-RF pattern을 이용하여 군집의 다양성을 계산하였다(Table 1). 총 T-RF의 수(richness, S)는 *HaeIII* profile은 21~32개, *HhaI* profile은 20~32개였고, 다양성 지수(Shannon-Weiner diversity index, H)는 *HaeIII* profile은 3.72~4.84, *HhaI* profile은 4.03~4.72로 나타났다. *HaeIII* profile의 경우 각 반응기의 용액시료가 담체시료보다 더 높은 다양성 지수를 보였으며, 부상여재를 이용한 시스템의 reactor 2와 NRL 시스템의 oxic tank 1 시료는 각각 공정 후단에 위치한 reactor 4와 oxic tank 2 시료보다 더 높은 다양성 지수를 보였다. *HhaI* profile의 경우 *HaeIII*와는 달리 담체시료가 용액시료보다 더 높은 다양성 지수를 보였고, 부상여재를 이용한 시스템 reactor 2의 용액시료를 제외하고는 다음단계의 반응조가 더 높은 다양성 지수를 보였다. 다양성 지수가 가장 높은 시료는 NRL 시스템 oxic tank 2의 담체시료였고, 가장 낮은 시료는 부상여재를 이용한 시스템 reactor 4의 용액시료였다. *HaeIII*와 *HhaI*의 다양성 지수의 평균값을 살펴보면 부상여재를 이용한 시스템은 용액시료와 담체시료 사이의 다양성 지수의 차이가 컸으며, reactor 2가 reactor 4 보다 높은 다양성 지수를 보였다. NRL 시스템 oxic tank 1은 용액시료가 담체시료보다 낮은 다양성 지수를 보였으며, oxic tank 2는 용액시료와 담체시료 사이에 별다른 차이를 보이지 않았다. 전체적인 다양성 지수를 비

**Table 1.** Diversity statistics calculated from *HaeIII* and *HhaI* T-RF profiles of the BNR system samples

Sample <sup>a</sup>	Parameter				
	<i>HaeIII</i> -S <sup>b</sup>	<i>HaeIII</i> -H <sup>c</sup>	<i>HhaI</i> -S <sup>b</sup>	<i>HhaI</i> -H <sup>c</sup>	Average-H
R2S	32	4.84	23	4.31	4.58
R2M	27	4.39	22	4.11	4.25
R4S	29	4.67	20	4.03	4.35
R4M	21	3.99	24	4.29	4.14
NRL1S	23	4.16	21	4.09	4.13
NRL1M	24	3.98	30	4.65	4.32
NRL2S	21	4.08	26	4.38	4.23
NRL2M	22	3.72	32	4.72	4.22
SBRM	23	4.29	27	4.51	4.40

<sup>a</sup>Sampling site : R2S; Reactor 2 solution of an advanced treatment system with plotting media, R2M; Reactor 2 media of an advanced treatment system with plotting media, R4S; Reactor 4 solution of an advanced treatment system with plotting media, R4M; Reactor 4 media of an advanced treatment system with plotting media, NRL1S; Solution of NRL oxic tank 1, NRL1M; Media of NRL oxic tank 1, NRL2S; Solution of NRL oxic tank 2, NRL2M; Media of NRL oxic tank 2, SBRM; Media of Sequencing Batch Reactor oxic tank

<sup>b</sup>Richness (S) = number of distinct T-RF in a profile

<sup>c</sup>Shannon-Weiner diversity index(H) =  $-\sum(P_i)(\log_2 P_i)$

$P_i$  is the proportion of an individual peak height.

교해 보면, SBR 시스템이 다른 시스템에 비해서 다양성 지수가 가장 높았으며, NRL 시스템은 가장 낮은 다양성 지수를 보였다.

### 암모니아 산화 세균의 군집 분석

암모니아 산화 세균의 세균군집을 분석하기 위하여 27FB primer와 Nso1225R specific primer를 이용하였다(Fig. 3). T-RF pattern을 분석한 결과 565~568 bp, 364~367 bp, 205 bp의 T-RF는 진정세균 군집 분석과 암모니아 산화 세균 군집 분석을 통해서 모두 관찰 할 수 있었던 주요 군집으로 질산화작용을 일으키는 주요 세균 군집이라 생각된다. 반면에 Actinobacteria 계열에서 생성 가능한 442~446 bp의 T-RF와 *Cardococcus*, *Frankia*, *Paenibacillus*에 의해 관찰 가능한 151 bp의 T-RF는 NRL 시스템에서만 관찰되었다. 특히 151 bp의 T-RF는 진정세균의 군집을 분석했을 때에도 NRL 시스템에서만 관찰할 수 있었던 군집이었다. 암모니아 산화 세균 군집 분석을 통해 관찰 가능했던 주요 군집은 부상여재를 이용한 시스템, NRL 시스템, SBR 시스템의 진정세균의 군집에서 각각 19.03%, 21.48%, 23.85%의 비율을 차지하였다.

염기서열 분석이 가능한 T-RFLP 방법을 이용하여 세 BNR 시스템에서 공통적으로 확인된 565~568 bp, 364~367 bp, 205 bp, NRL 시스템의 151 bp의 band를 gel에서 분리하여 염기서열을 분석 하였다(Table 2). 그 결과 부상여재를 이용한 시스템 reactor 2의 담체시료의 565 bp의 T-RF는 *Aquaspirillum*과 94%, 364 bp의 T-RF는 *Nitrosomonas*와 98%, 205 bp의 T-RF는  $\beta$ -Proteobacteria 계열의 uncultured eubacterium과 94%의 유사도를 갖는 서열이었다. NRL 시스템 oxic tank 1 담체시료의 568 bp의 T-RF는 uncultured beta proteobacterium과 93%, 365 bp의 T-RF는 uncultured bacterium과 94%, 205 bp의 T-RF는 *Aquaspirillum*과 84%, NRL 시스템에서만 관찰되었던 151 bp의 T-RF는 *Cardococcus*와 95%의 유사도를 갖는 서열이었다. SBR 시스템 담체시료의 568 bp의 T-RF와 367 bp의 T-RF는 *Nitrosomonas* sp. JL21과 94% 이상, 205 bp의 T-RF는 *Nitrosolobus multififormis*와 100%의 유사도를 갖는 서열이었다. 염기서열 분석 결과 암모니아 산화 세균이라 추정되었던 T-RF를 갖는 세 BNR 시스템 중에서 SBR 시스템과 부상여재를 이용한 시스템에서만

*Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* 속과 유연관계가 있는 서열이 확인되었다.

### 고 찰

T-RFLP 분석방법은 미생물 군집의 구조 분석을 위한 분자생물학적 기법으로 최근까지도 세균군집의 연구에 많이 이용되고 있다(23). Regan 등(20)은 nested PCR을 이용한 T-RFLP 방법은 수돗물배급망에서 암모니아 산화 세균인 *Nitrosomonas*와 *Nitrosospira* 사이의 구별과 아질산 산화 세균인 *Nitrobacter*와 *Nitrospira*의 검출에 민감하고 효과적이라고 보고하고 있다.

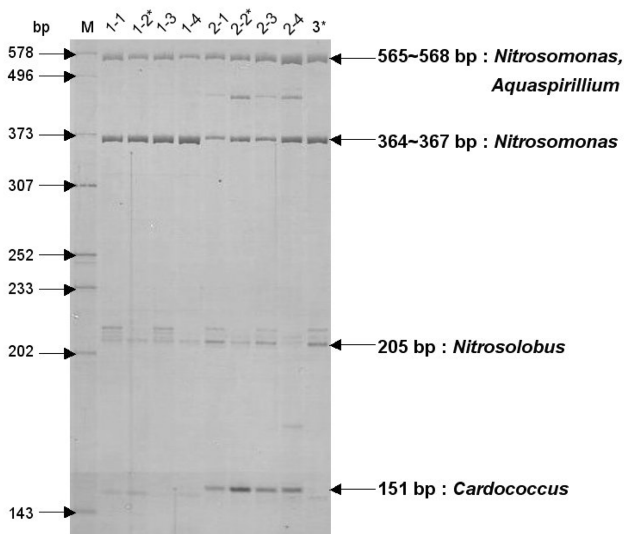
본 연구에서는 세 종류의 BNR 시스템에서 질산화반응을 일으키는 반응조에 서식하는 세균의 군집 구조를 분석하기 위하여 T-RFLP 방법을 이용하였다. 분석 결과, *HaeIII*와 *HhaI*을 처리한 결과에서 공통으로 관찰 가능한 우점 군집은 *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* 등의 암모니아 산화 세균과 *Algaligenes*, *Aquaspirillum*, *Comamonas*, *Clostridium*, *Dechlorimonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Thiobacillus*로 추정되며, *Clostridium*과 *Pseudomonas*를 제외하고는 모두  $\beta$ -Proteobacteria 분류군에 속하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2). 집괴 분석을 통해서 알 수 있듯이 유입되는 폐수가 같음에도 불구하고 처리 방식의 차이에 의한 서식 환경의 변화에 따라서 서로 다른 군집이 형성되어 각 시스템 별로 구분되었다. 또한 전단과 후단의 반응조의 차이보다 용액시료와 담체시료 사이의 차이가 더 컸는데 이는 부착 성장 세균과 부유 성장 세균 간의 군집 차이가 더 크기 때문이라 생각된다.

Tsuneda 등(22)에 의하면 DGGE 방법을 이용한 aerobic upflow fluidized bed (AUFB)에서의 질산화세균을 분석 한 결과 *Nitrosomonas*와 유사한 세균이 우점한다고 보고한 바 있고, Kindaichi 등(10)은 질산화반응이 일어나는 biofilm에서 *Nitrospira*, *Nitrosomonas*와 유사한 세균이 각각 39%와 25%를 차지하고 있음을 밝힌 바 있다. 본 연구에서도 27F와 Nso1225R primer를 이용하여 T-RFLP 방법을 통한 암모니아 산화 세균의 군집구조를 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, *HhaI*을 처리한 진정세균의 군집 분석을 통해서 알 수 있었던 세 BNR 시스템에서 존재하는 565~568 bp, 364~367 bp, 205 bp의 T-RF는 암모니아

**Table 2.** Phylogenetic diversity of the nucleotide sequences of T-RFs identified by BLAST search

Sample <sup>a</sup>	Length of T-RF (bp)	Closest Microorganism (accession number)	Similarity(%)	Phylum
R2M-1	565	<i>Aquaspirillum arcticum</i> (AB074523)	94	$\beta$ -Proteobacteria
R2M-2	364	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is32 (AJ621027)	98	$\beta$ -Proteobacteria
R2M-3	205	Uncultured eubacterium clone from the denitrifying reactor (AJ412627)	94	$\beta$ -Proteobacteria
NRL IM-1	568	Uncultured beta proteobacterium clone from the river (AJ421928)	93	$\beta$ -Proteobacteria
NRL IM-2	365	Uncultured bacterium clone from the groundwater (AY662045)	94	$\beta$ -Proteobacteria
NRL IM-3	205	<i>Aquaspirillum serpens</i> (AB074518)	84	$\beta$ -Proteobacteria
NRL IM-4	151	<i>Cardococcus australiensis</i> (AY007722)	95	$\beta$ -Proteobacteria
SBRM-1	568	<i>Nitrosomonas</i> sp. JL21 (AB000700)	94	$\beta$ -Proteobacteria
SBRM-2	367	<i>Nitrosomonas</i> sp. JL21 (AB000700)	98	$\beta$ -Proteobacteria
SBRM-3	205	<i>Nitrosolobus multififormis</i> (L35509)	100	$\beta$ -Proteobacteria

<sup>a</sup>Sample: R2M; Media of reactor 2 in advanced treatment system with plotting media, NRL IM; Media of oxic tank 1 in NRL system, SBRM; Media of oxic tank in Sequencing Batch Reactor system



**Fig. 3.** PAGE of the *HhaI* digested T-RFs of ammonia-oxidizing bacteria. Lane M; Size marker, 1-1; Reactor 2 solution of an advanced treatment system with plotting media (R2S), 1-2; Reactor 2 media of an advanced treatment system with plotting media (R2M), 1-3; Reactor 4 solution of an advanced treatment system with plotting media (R4S), 1-4; Reactor 4 media of an advanced treatment system with plotting media (R4M), 2-1; Solution of NRL oxalic tank 1 (NRL1S), 2-2; Media of NRL oxalic tank 1 media (NRL1M), 2-3; Solution of NRL oxalic tank 2 (NRL2S), 2-4; Media of NRL oxalic tank 2 (NRL2M), 3; Media of Sequencing Batch Reactor oxalic tank (SBRM). Asterisks indicate lanes that nucleotide sequences of major bands were analyzed.

산화 세균 군집 분석 시 모든 처리공정에서 관찰되었다. 442~446 bp와 151 bp의 T-RF는 NRL 시스템에서만 관찰할 수 있었던 군집이었으며, 특히 151 bp의 T-RF는 진정세균의 군집 분석과 마찬가지로 암모니아 산화 세균 군집 분석에서도 NRL 시스템에서만 관찰되었다. 이는 부상여재를 이용한 시스템 및 SBR 시스템과 운전 방식이 다른 NRL 시스템에서만 존재하는 고유군집이라 생각된다.

암모니아 산화 세균이라 추정되는 군집의 비율을 진정세균 군집에서 살펴보면, 부상여재를 이용한 시스템의 전단 반응조와 후단 반응조가 각각 16.59%, 21.47%, NRL 시스템의 전단 반응조와 후단 반응조가 각각 20.46%, 22.50%, SBR 시스템은 23.85%를 차지하였다. 후단 반응조로 가면서 암모니아 산화 세균 군집이 증가하였고, 후단 반응조를 두는 것이 암모니아 산화 세균의 농화 배양에 효과적이라 할 수 있다.

Table 2에서 보는 것과 같이 주요 T-RF의 염기서열을 분석하였다. SBR 시스템은 모두 암모니아 산화 세균의 분류군에 속하는 *Nitrosomonas* sp. JL21, *Nitrosolobus multiformis*와 94~100%의 유사도를 보였다. 이외는 달리 다른 BNR 시스템은 부상여재를 이용한 시스템의 *Nitrosomonas* sp. Is32와 유사한 364 bp의 T-RF를 제외하고는 모두 암모니아 산화 세균과는 다른  $\beta$ -Proteobacteria와 유사한 세균이라는 것을 확인하였다. 따라서 진정세균의 군집 분석을 통해서 암모니아 산화 세균이라 추정하였

던 565~568 bp, 364~367 bp, 205 bp의 T-RF는 SBR 시스템에서만 모두 암모니아 산화 세균에 의해 생성이 가능하였다. 부상여재를 이용한 시스템은 364 bp의 T-RF만이 암모니아 산화 세균에 의한 것이었고, NRL 시스템은 중속영양생물들에 의해 생성 가능한 T-RF였다. NRL 시스템에서만 관찰이 가능했던 151 bp의 T-RF는 *Cardococcus australiensis*와 유사하였다. Maszenan 등(16)에 의하면 *Cardococcus australiensis*는 호주의 활성슬러지에서 분리한 그람 음성 세균으로 슬러지에서 거품발생과 팽화현상을 완화시켜준다고 보고하고 있다. 따라서 SBR 시스템에서만 기존에 보고된 암모니아 산화 세균의 우점이 확인되었지만, 다른 두 시스템에서 관찰된  $\beta$ -Proteobacteria가 미확인된 암모니아 산화 세균일 가능성을 배제할 수 없다.

본 연구에서는 세 BNR 시스템의 질산화반응이 일어나는 반응조의 시료로부터 T-RFLP 방법을 이용하여 진정세균과 암모니아 산화 세균의 군집을 분석하였다. 진정세균의 군집 분석을 통해 전체의 세균 군집의 동태를 살펴보고 우점 군집에 대해서 추정하였으며, 암모니아 산화 세균의 군집 분석과 염기서열 분석이 가능한 T-RFLP 방법을 수행하여 더욱 정확한 군집 정보를 얻을 수 있었다. 암모니아 산화 세균이라 추정되는 T-RF의 염기서열 분석을 통해서 같은 크기의 T-RF를 갖는 세균일지라도 다른 종류의 세균들임을 알 수 있었다. 따라서 염기서열이 가능한 T-RFLP 방법을 이용하는 것이 더 정확한 군집의 정보를 얻을 수 있을 것이라 생각된다.

Nso1225R primer를 이용하여 암모니아 산화 세균의 군집을 분석하고, 염기서열을 분석해 본 결과, 암모니아 산화 세균과 다른  $\beta$ -Proteobacteria 계열의 세균이 확인되었다. Calvo 등(4)은  $\beta$ -Proteobacteria 계열에 속하는 암모니아 산화 세균을 조사하기 위해 널리 이용되는 Nso1225 FISH probe를 reverse primer로 사용하여 질산화세균의 다양성에 대하여 연구하였다. DGGE 방법을 통하여 질산화세균의 군집을 확인하고 염기서열 분석을 한 13 band 중 6개는  $\beta$ -Proteobacteria 암모니아 산화 세균과 유사하였지만 1개는  $\beta$ -Proteobacteria 메탄 산화 세균, 나머지 6개는 암모니아 산화 세균이 아닌  $\beta$ -Proteobacteria 분류군과 유사하다고 보고하고 있다.

또한 본 연구에서 RDP 검색을 통해서 Nso1225R primer는 374 균주와 결합하는 것을 알 수 있었다. 이들 중, 320 균주의 암모니아 산화 세균 외에도 *Sporobacter* 속 3 균주, *Nitrobacter* 속 1 균주, *Methylobacillus* 속 1 균주, unidentified  $\beta$ -Proteobacteria 42 균주 등 암모니아 산화 세균이 아닌 다른 세균들과도 결합할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 암모니아 산화 세균의 군집의 정확한 분석을 위해서 이들만을 검출할 수 있는 새로운 specific primer의 디자인이 필요하다고 생각된다.

## 감사의 말

이 논문은 2004학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. Akira, H., I. Mitsuru, and S. Hisashi. 2000. Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 148-156.
2. Amann, R., W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60, 360-365.
3. Bernet, N., O. Sanchez, D. Cesbron, J.-P. Steyer, and J.-P. Delgenes. 2005. Modeling and control of nitrite accumulation in a nitrifying biofilm reactor. *Biochem. Engineer. J.* 24, 173-183.
4. Calvo, L., X. Vila, C.A. Abella, and L.J. Garcia-Gil. 2004. Use of the ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 715-721.
5. 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.
6. Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-2950.
7. Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, and E.C. Botter. 1989. Isolation and direct complete determination of entire genes. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843-7853.
8. Feray, C. and B. Montuelle. 2003. Chemical and microbial hypotheses explaining the effect of wastewater treatment plant discharges on the nitrifying communities in freshwater sediment. *Chemosphere* 50, 919-928.
9. Kelly, J.J., S. Siripong, J. McCormick, L.R. Janus, H. Urakawa, S.E. Fantroussi, P.A. Noble, L. Sappelsa, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. 2005. DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Water Res.* 39, 3229-3238.
10. Kindaichi, T., T. Ito, and S. Okabe. 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1641-1650.
11. Konuma, S., H. Satoh, T. Mino, and T. Matsuo. 2001. Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Sci. Technol.* 43, 107-114.
12. Lee, S.H., C. Malone, and P.F. Kemp. 1993. Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 193-201.
13. Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522.
14. Liu, Y., T. Zhang, and H.H.P. Fang. 2005. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. *Bioresour Technol.* 96, 1205-1214.
15. Marsh, T.L., P. Saxman, J. Cole, and J. Tiedje. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3616-3620.
16. Maszenan, A.M., R.J. Seviour, B.K.C. Patel, and P. Schumann. 2002. *Quadricoccus australiensis* gen. nov., sp. nov.,  $\alpha$ , $\beta$ -proteobacterium from activated sludge biomass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 223-228.
17. Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724.
18. Moeseneder, M.M., J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Herndl. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518-3525.
19. Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.-P. Koops, and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5368-5382.
20. Regan, J.M., G.W. Harrington, and D.R. Noguera. 2002. Ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 73-81.
21. Sneath, P.H. A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
22. Tsuneda, S., T. Nagano, T. Hoshino, Y. Ejiri, N. Noda, and A. Hirata. 2003. Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Res.* 37, 4965-4973.
23. Vaisanen, R.K., M.S. Roberts, J.L. Garland, S.D. Frey, and L.A. Dawson. 2005. Physiological and molecular characterisation of microbial communities associated with different water-stable aggregate size classes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 2007-2016.
24. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.

(Received February 6, 2006/Accepted March 17, 2006)

---

**ABSTRACT : Structure of Bacterial Communities in Biological Nitrogen Removal System**

**Kyung-Mi Kim, Sang-Il Lee<sup>1</sup>, and Dong-Hun Lee\*** (Department of Microbiology and the Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, <sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

To understand the efficient process of biological nitrogen removal (BNR) system, the structure of bacterial communities in nitrification reactors was analyzed using PCR and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) methods. In this study, we used an advanced treatment system with plotting media, Nutrient Removal Laboratory system, or the rumination type sequencing batch reactor (SBR) system. The terminal restriction fragments of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and other  $\beta$ -proteobacteria were observed in all of three BNR systems. The nucleotide sequence analysis of terminal restriction fragments showed that *Nitrosomonas* and *Nitrosolobus* were major populations of AOB in SBR system, whereas uncultured  $\beta$ -proteobacteria and *Cardococcus australiensis* were the predominant groups in other two BNR systems. Also the SBR system may be more efficient to enrich AOB. These results indicate that the different structure of bacterial community may be developed depending on the wastewater treatment systems, although the same influent is used.