

폐수처리장치에서의 아질산염 산화 세균 군집 분석

정순재¹ · 이상일² · 이동훈^{1*}

¹충북대학교 미생물학과, ²충북대학교 환경공학과

질소는 하수처리과정에서 제거되어야 하는 주요 오염물질 중의 하나이며, 세균 군집을 이용한 고도처리 시스템에서 생물학적 질소제거는 중요한 기술이다. 질산화반응은 생물학적 질소제거 시스템의 첫 단계로 미생물에 의해 진행된다. 암모니아는 암모니아 산화세균에 의해 아질산염으로 산화되며, 그 후에 아질산염은 아질산염 산화세균에 의해 질산염으로 산화된다. 실험실 규모의 생물학적 질소제거 시스템인 변형된 eBAF 시스템, Nutrient removal laboratory 시스템과 반추기법을 적용한 rSBR 시스템의 질산화반응조 시료에서 16S rRNA 유전자를 이용한 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 방법으로 아질산염 산화세균 군집을 분석하였다. 제한효소로 형성된 단편의 클러스터분석에서 *Nitrobacter* 군집은 각각의 폐수처리 시스템에 따라 군집의 차이가 있음이 나타났다. 그러나 *Nitrospira* 군집의 클러스터분석에서는 액체와 담체의 서식지 환경 차이에 의해 군집이 구분되었다.

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

우리나라 하수는 낮은 유기물 농도와 많은 질소성분을 함유하는 특성을 가지므로 기존의 단일 슬러지 공정과 재래식 SBR (sequencing batch reactor) 공정을 이용한 하수처리는 영양염류 제거에 대한 한계점을 가지고 있다(1). 또한 지속적인 오염부하량의 증가와 저조한 질소 제거효율로 인해 하수처리에 많은 문제가 제기되고 있다. 하수도법 시행규칙 제3조 1항 별표1에 의거, 2007년 방류수 수질기준을 살펴보면 특례기준의 T-N은 20 mg/L 이하이며, 기타지역은 60 mg/L 이하이다. 하지만 2008년 1월 1일부터 기타지역도 T-N의 기준이 20 mg/L 이하로 강화된다.

하수에 존재하는 질소성분 중 암모니아성 질소가 많은 양을 차지하고 있으며, 생물학적 질소제거는 질산화반응과 탈질화반응에 의해 진행된다(9). 특히 질산화반응은 폐수처리장의 생물학적 질소제거과정의 초기반응을 담당하므로 매우 중요하다(6, 21). 질산화반응은 암모니아 산화 세균(Ammonia-oxidizing bacteria; AOB)에 의해 암모니아(NH_4^+)가 아질산염(NO_2^-)으로 산화되는 과정과 아질산염 산화 세균(Nitrite-oxidizing bacteria; NOB)에 의해 아질산염(NO_2^-)이 질산염(NO_3^-)으로 산화되는 과정으로 구분된다. 암모니아 산화 세균은 *Nitrosomonas*, *Nitrospira* (β -Proteobacteria), *Nitrosococcus* (γ -Proteobacteria) 등이 알려져 있다(25). 이들은 계통분류학적으로 유사한 그룹을 형성하며, universal primer를 이용한 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭 및 분자생물학적 분석이 가능하다(22). 그러나 아질산염 산화 세균은 *Nitrospira* (Nitrospirae), *Nitrobacter* (α -Proteobacteria), *Nitrococcus* (γ -Proteobacteria), *Nitrospina* (δ -Proteobacteria)의 네 그룹으로 구분되어 계통분류학적으로 암모니아 산화 세균보다 다양하다(7). 이중에

서 폐수처리시설에서는 *Nitrospira*와 *Nitrobacter*가 우점하는 것으로 알려져 있다(13).

생물학적 폐수처리시설의 질산화세균 군집 분석은 낮은 성장률과 긴 세대시간을 갖는 질산화세균의 특성 때문에 전통적인 배양법을 이용한 분석방법보다 분자생물학적 분석방법이 적합하다(10, 12). 따라서 근래에는 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)와 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)과 같은 유전자지문을 이용한 방법과 Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)과 같은 형광 염색 방법이 사용되고 있다. 이중 유전자지문을 이용한 방법은 세균 군집 분석에서 많이 사용되고 있으며, 특히 T-RFLP 분석법은 DGGE 분석법보다 군집 분석에 있어 높은 해상도를 나타내는 것으로 알려져 있다(15).

본 연구에서는 질소의 안정적 제거를 위해 국내에서 개발되고 있는 biological nitrogen removal (BNR) 시스템의 아질산염 산화 세균 군집 분석을 하였다. 실험실 규모로 제작한 변형된 Edited biological aerated filter (eBAF) 시스템, Nutrient removal laboratory (NRL) 시스템, Rumination type sequencing batch reactor (rSBR) 시스템의 질산화반응조에서 시료채취를 하였다. T-RFLP 방법 및 terminal restriction fragment (T-RF)의 16S rRNA 염기서열분석법을 이용하여 아질산염 산화과정의 우점 세균 검색 및 군집 구조 분석을 통해 BNR 시스템의 효율적인 처리 공정을 위한 주요 세균에 대한 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취 및 핵산 추출

상온에서 운영된 실험실 규모의 세 가지 BNR 시스템의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-3261, Fax: 82-43-264-9600
E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr

질산화반응조에서 시료를 채취하였다(Fig. 1). 첫 번째 시스템은 질산화세균이 부착된 여재를 이용하여 여과하는 방법인 BAF 공정을 변형시킨 eBAF 시스템이었다. 질산화반응조의 총 부피는 약 75 L이며 그 중 40%를 비표면적 2,000 m²/m³ 이상, 직경 2~3 mm인 입상 발포 폴리스티렌(Expanded Polystyrene) 여재로 충전하였다. 역세척 주기는 2회/day로 각 회당 약 20초간 수행하였다. 두 번째 시스템은 기존 DEPHANOX 공정의 재포기조를 간헐 포기조와 재포기조로 나누어 질소제거를 목적으로 고안된 NRL 시스템이었다. 처리용량 6.76 m³/day인 장치를 운영하였다. 질산화반응조에 충전한 유동상 담체는 Linpor (12×12×15 mm)였으며, 충전율은 약 18%였다. 그리고 세 번째 시스템은 SBR 공정에 반주기법을 적용한 rSBR 시스템이었다. 기존의 SBR공정과 달리 동일한 부피의 질화반응조를 하나 더 두어 흡착-침전후의 상등수는 저류조로 이송되고, 질화조에서 질화가 끝난 동일량의 처리수가 또 다른 반응조로 유입되는 시스템이었다. 각각의 SBR

반응조는 아크릴수지로 제작되었으며, 용량은 7.8 L이었다. 질산화반응조에 충전한 담체는 크기가 12×12×15 mm인 폴리우레탄(polyurethane)을 사용하였으며, 충전율은 약 20%로 하였다. 질화조를 제외한 반응조에 패들을 설치하여 혼합을 원활하게 하였다. 각 BNR 시스템에 사용된 유입수는 청주시 하수종말처리장의 유입 폐수였으며, 공정이 안정화된 후에 용액시료와 담체시료를 채취하였다. 유입수와 유출수의 수질측정은 TCOD_{Cr}, SCOD_{Cr}, TKN, NH₄⁺-N, PO₄³⁻-P, TP를 Standard Methods (2)에 준하여 분석하였다.

채취한 시료의 핵산을 추출하기 위하여 bead beating 방법을 변형하여 이용하였다(14). 담체시료는 인산완충용액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM NaH₂PO₄, 1.4 mM K₂HPO₄)에 현탁시켜 사용하였다(Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA). 원심분리(14,000×g, 10분, 4°C)하여 농축된 용액시료와 담체시료에 0.1 mm zirconia glass bead (Biospec, USA) 0.5 g, phosphate buffer (100 mM NaH₂PO₄, pH 8.0) 300 µl, SDS solution [10% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8.0] 300 µl, chloroform:isoamylalcohol (24:1) 300 µl를 넣고, microtube mixer (TOMY SEIKO, Japan)를 이용하여 7분 동안 파쇄하였다. 파쇄한 시료를 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 3시간 이상 방치하여 핵산을 침전시켰다. 원심분리(14,000×g, 30분, 4°C)한 후, 에탄올로 세척하고 건조시켜 핵산 침전물을 얻었다. 추출된 핵산은 Ultraclean™ DNA Purification Kit (MO BIO, USA)로 정제하였고, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

T-RFLP 분석을 위한 핵산의 증폭

Nitrobacter 군집의 16S rRNA 유전자 증폭에 27FB (*E. coli* numbering 8-27; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 NIT3 (*E. coli* numbering 1035-1048; 5'-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3') primer 쌍을 사용하였다(28). *Nitrospira* 군집의 16S rRNA 유전자 증폭에 사용된 primer는 27FB와 본 연구에서 직접 설계한 Nts0687 (*E. coli* numbering 670-687; 5'-GAATTCGCGCTCC TCTC-3')이었다. T-RF 분리를 위하여 biotin이 수식된 primer 27FB를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 1× 반응용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA, pH 8.3), 160 µM dNTP, 0.3 µM primer, 주형 핵산(10~100 ng/µl)과 1.5 unit의 *Taq* polymerase (SolGent, Korea)를 첨가하여 총 50 µl의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 27FB-NIT3 primer 쌍은 56°C, 27FB-Nts0687 primer 쌍은 54°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 반응시킨 후 중단시켰다. PCR product는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, GENEALL PCR SV Purification Kit (General Biosystem, Korea)로 정제하였다.

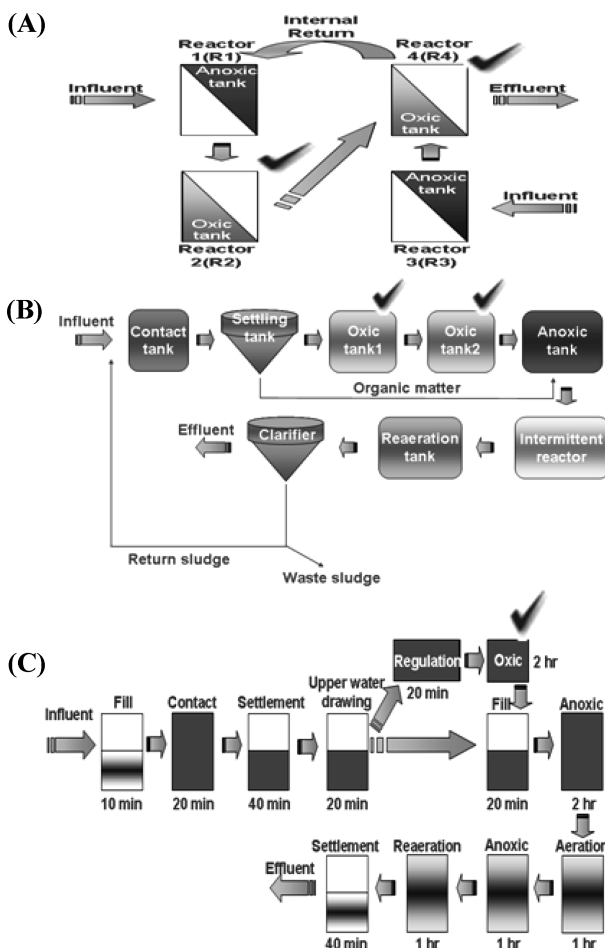


Fig. 1. Scheme of Biological Nitrogen Removal (BNR) systems. (A) Edited biological aerated filter (eBAF) system, (B) Nutrient removal laboratory (NRL) system, (C) Rumination type sequencing batch reactor (rSBR) system. Check marks indicate the sampling sites of nitrification reactors.

T-RFLP 분석

16S rRNA 유전자의 PCR 증폭 산물에 제한효소 *HhaI* (TaKaRa, Japan) 5 unit을 첨가하여 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 0.5× SSC 완충용액(75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate, pH 7.3)으로 3회 세척한 Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega, USA)와 1× SSC 완충용액을 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 0.1× SSC 완충용액으로 4회 세척하여 T-RF를 회수하였다. 0.2 N NaOH를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 0.1× SSC 완충용액으로 세척하여, single-stranded terminal restriction fragment (ssT-RF)만을 회수하였다. 25% NH₄OH를 넣고 65°C에서 10분간 반응시킨 후 원심분리(14,000×g, 5분, 4°C)하여 Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles에서 ssT-RF만을 분리하였다. 상층액을 20분 동안 진공 건조하여 암모니아를 제거하였다. ssT-RF 시료 3.5 µl와 loading dye buffer (95% formamide, 10 mM NaOH, 20 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue, 0.02% xylene cyanol FF) 1.5 µl를 섞어 3분 동안 95°C에서 변성시킨 후, 얼음에서 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 2시간동안 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝나고 Silverstar Staining Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 염색하였다. GelComparII program (Applied Maths, Belgium)을 이용하여 각 T-RF pattern의 상관관계를 분석하고, UPGMA (26) 형태의 dendrogram을 작성하였다. SPSS v10 software (SPSS Inc., USA)를 이용하여 T-RF pattern의 상관관계를 다차원 척도법으로 나타냈다. 또한 T-RFLP 결과에서 확인된 T-RF의 수와 비율을 이용하여 Richness와 Shannon-Weiner diversity index를 계산하였다(5).

T-RF 염기서열 분석

Polyacrylamide gel에서 silver staining 방법으로 확인된 T-RF의 염기서열을 분석하기 위해 amplified fragment length polymorphism (AFLP) 방법을 적용하였다(28). 제한효소 *HhaI*에 의해 절단된 PCR 산물에서 0.2 N NaOH 반응과정을 제외하여 ssT-RF 분리와 동일하게 double-stranded terminal restriction fragment (dsT-RF)만을 회수하였다. 분리된 dsT-RF에 *HhaI*-adapter를 ligation한 후, 27FB와 A2 primer; 5'-GACTAGAGTACACTGTCGATCGCG-3' 쌍으로 PCR 증폭하였다. *HhaI*-adapter는 A1 primer; 5'-CGATCGACAGTGTACTCTAGTC-3'와 A2 primer를 각각 25 µM씩 첨가하여 95°C에서 10분 반응 후, 상온에서 20분 반응하여 제작하였다. 27FB와 A2 primer 쌍을 이용한 PCR 산물로부터 다시 ssT-RF를 분리한 후, 6% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 주요 T-RF band를 멸균된 주사기 바늘로 잘라내어, 멸균된 3차 증류수를 넣고 30°C에서 12시간 교반시켰다. 상층액을 주형으로 하여 27F와 A2 primer 쌍으로 재증폭하였다. 재증폭된 PCR 산물은 pGEM-T vector (Promega, USA)에 ligation한 후, *E. coli* DH10B에 형질전환 시켰다. 그 후 ampicillin (50 ng/ml)이 포함된 LB (Luria-Bertani)

agar palte (trypton, 10 g/L; yeast extract, 5 g/L; NaCl, 5 g/L; agar 15 g/L)에서 재조합 클론을 선별하였다. 선별된 재조합 클론들을 대상으로 T7 primer; 5'-TAATACGACTCACTATAGG GGCA-3'와 SP6 primer; 5'-ATTTAGGTGACACTATAG로 삽입된 16S rRNA 단편을 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 BaseStation™ DNA Fragment Analyzer (MJ Research, USA)를 이용하였다.

결 과

유입수의 성상과 처리 효율

연구에 사용된 유입 폐수의 TCOD_C은 217.2±30.8 mg/L이었으며, SCOD_C은 96.6±21.2 mg/L이었다. TKN과 NH₄⁺-N은 각각 42.0±7.4 mg/L와 34.5±4.0 mg/L이었다. 또한 TP는 6.4±1.7 mg/L, PO₄³⁻-P는 2.5±0.9 mg/L이었다. 유입수의 TCOD_C/TKN 비는 평균 5.2이었으며, 방류수의 수질을 측정하여 처리 효율을 분석하였다. eBAF 시스템의 TCOD 처리 효율과 SCOD 처리 효율은 각각 87%, 85%였으며, NH₄⁺-N 처리 효율은 93%였다. NRL 시스템에서 측정된 TCOD 처리 효율은 91%, SCOD 처리 효율은 85%였다. 그리고 NH₄⁺-N 처리 효율은 94%였다. rSBR 시스템에서는 TCOD 처리 효율과 SCOD 처리 효율이 각각 89%, 86%였다. NH₄⁺-N 제거효율은 98%였다. 세 BNR 시스템 중에서 rSBR 시스템의 NH₄⁺-N의 처리 효율이 가장 높았다.

Nitrobacter 속 아질산염 산화 세균의 군집 분석

세 BNR 시스템에서 *Nitrobacter* 군집 분석을 위해 27FB와 NIT3 primer 쌍을 이용하였다. T-RF pattern을 분석한 결과 738~741 bp와 341 bp의 T-RF가 우점하였다(Fig. 2). 738~741 bp의 T-RF는 세 BNR 시스템에서 47%~100%의 높은 비율을 차지하였으며, 341 bp의 T-RF는 NRL 시스템과 rSBR 시스템에서 40%~53%의 비율을 차지하였다.

세 BNR 시스템에서 우점한 T-RF band를 gel에서 분리하여 염기서열을 분석하였다(Table 1). 그 결과 741 bp의 T-RF에서 *Nitrobacter*와 유사한 서열을 확인하였다. eBAF 시스템 반응조 2 용액시료의 T-RF는 *Nitrobacter hamburgensis* (CP000319)와 97% 유사한 서열이었다. 또한 반응조 4 용액시료의 T-RF는 *Nitrobacter*를 포함하는 Bradyrhizobiaceae 과(科)의 세균인 *Afipia broomeae* (U87760)와 97%의 유사도를 갖는 서열이었다. 반응조 2와 반응조 4 담체시료의 T-RF는 각각 *Nitrobacter* sp. (L11662)와 95%, *Nitrobacter* 속과 유사한 uncultured alpha proteobacterium (AY921742)과 98%의 유사도를 나타냈다. NRL 시스템에서 나타난 741 bp의 T-RF를 염기 서열 분석한 결과, 반응조 1 용액시료의 T-RF는 *Afipia lausannensis* (DQ123622)와 99% 유사한 서열로 확인되었다. 반응조 1 담체시료와 반응조 2 용액시료와 담체시료의 T-RF는 모두 uncultured *Nitrobacter* sp. (AY876607)와 97~98% 유사한 서열이었다. rSBR 시스템의 741 bp의 T-RF에서도 uncultured *Nitrobacter* sp. (AY876607)와 97%의 유사도를 나타냈다.

341 bp의 T-RF의 염기서열 분석결과에서도 *Nitrobacter*와 유사한 서열을 확인하였다. NRL 시스템 반응조 1 용액시료와 담체 시료의 T-RF는 모두 uncultured *Nitrobacter* sp. (AY876609)와 98% 유사한 서열로 확인되었으며, 반응조 2의 용액시료와 담체 시료에서 확인된 T-RF는 각각 질산화반응에 관여하는 nitrite-oxidizing bacterium (AY135357)과 99%, Bradyrhizobiaceae 과(科)의 *Oligotropha carboxidovorans* (AB099659)와 100%의 유사도를 나타냈다. rSBR 시스템에서도 시료에서 확인된 T-RF는

Nitrobacter winogradskyi (CP000115)와 100%의 유사도를 갖는 서열이었다.

Nitrospira 속 아질산염 산화 세균의 군집 분석

27FB와 Nts0687 primer 쌍을 이용하여 *Nitrospira* 군집 분석을 하였다. 우점하는 T-RF는 345~368 bp, 270 bp, 246 bp, 173~180 bp 이었으며(Fig. 2), 세 BNR 시스템에서 7~21%의 비율로 나타났다. 우점하는 T-RF band를 gel에서 분리하여 염기서

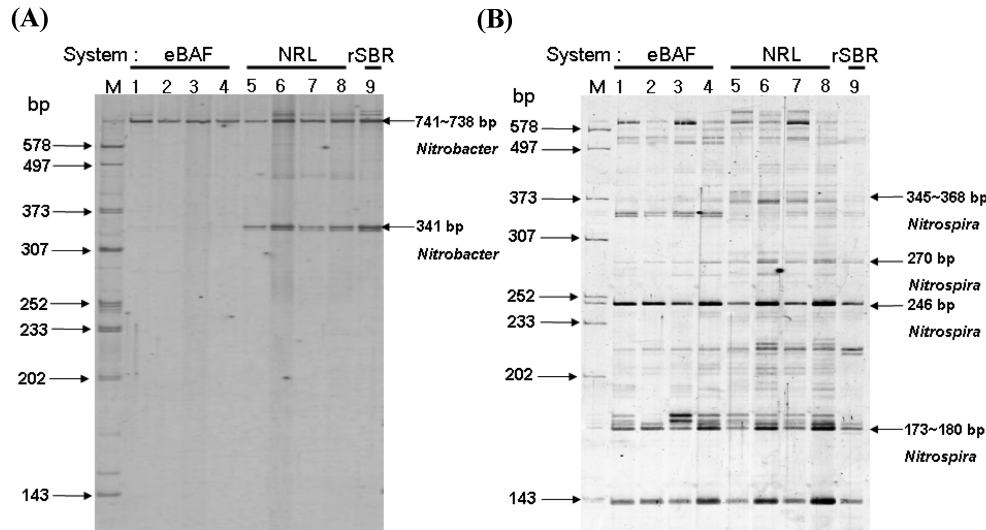


Fig. 2. PAGE of the *HhaI* digested T-RFs of nitrite-oxidizing bacteria. (A) *Nitrobacter* group, (B) *Nitrospira* group. Lane M; Size marker, 1; Reactor 2 solution of eBAF (eBAF2S), 2; Reactor 2 media of eBAF (eBAF2M), 3; Reactor 4 solution of eBAF (eBAF4S), 4; Reactor 4 media of eBAF (eBAF4M), 5; Solution of NRL oxalic tank 1 (NRL1S), 6; Media of NRL oxalic tank 1 (NRL1M), 7; Solution of NRL oxalic tank 2 (NRL2S), 8; Media of NRL oxalic tank 2 (NRL2M), 9; Oxidic tank of rSBR (rSBR).

Table 1. 16S rRNA sequence similarities of the representative bands in T-RFLP gels of *Nitrobacter* group

Sample ^a	Length of T-RF (bp)	Closest organism or clone name (accession no.)	Similarity (%)
eBAF2S	741	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14 (CP000319)	97
eBAF4S	741	<i>Afipia broomeae</i> (U87760)	97
eBAF2M	741	<i>Nitrobacter</i> sp. (L11662)	95
eBAF4M	741	Uncultured alpha proteobacterium (AY921742)	98
NRL1S	741	<i>Afipia lausannensis</i> (DQ123622)	99
NRL2S	741	Uncultured <i>Nitrobacter</i> sp. (AY876607)	98
NRL1M	741	Uncultured <i>Nitrobacter</i> sp. (AY876607)	97
NRL2M	741	Uncultured <i>Nitrobacter</i> sp. (AY876607)	98
NRL1S	341	Uncultured <i>Nitrobacter</i> sp. (AY876609)	98
NRL2S	341	Nitrite-oxidizing bacterium MPN2 (AY135357)	99
NRL1M	341	Uncultured <i>Nitrobacter</i> sp. (AY876609)	98
NRL2M	341	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> (AB099659)	100
rSBR	741	Uncultured <i>Nitrobacter</i> sp. (AY876607)	97
rSBR	341	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255 (CP000115)	100

^aSampling site: eBAF2S; Reactor 2 solution of eBAF, eBAF2M; Reactor 2 media of eBAF, eBAF4S; Reactor 4 solution of eBAF, eBAF4M; Reactor 4 media of eBAF, NRL1S; Solution of NRL oxalic tank 1, NRL1M; Media of NRL oxalic tank 1, NRL2S; Solution of NRL oxalic tank 2, NRL2M; Media of NRL oxalic tank 2, rSBR; Oxidic tank of rSBR

열을 분석하였다(Table 2). 그 결과 eBAF 시스템의 반응조 2 용액시료에서 확인된 345 bp의 T-RF는 uncultured *Nitrospirae* bacterium (AY921886)과 99%의 유사도를 갖는 서열이었다. NRL 시스템 반응조 2 용액시료와 rSBR 시스템의 시료에서 확인된 368 bp의 T-RF는 *Nitrospira* sp. (AF035813)와 각각 96%, 97% 유사한 서열이었다. 270 bp의 T-RF를 분석한 결과, eBAF 시스템 반응조 2 용액시료와 담체시료의 T-RF는 uncultured *Nitrospira* sp. (AY150907), uncultured *Nitrospira* sp. (DQ414439)와 각각 99%의 유사도를 나타냈다. 또한 NRL 시스템 반응조 2의 용액시료 T-RF는 *Nitrospirales* bacterium (AY146671)과 100%, 담체시료 T-RF는 *Nitrospira* sp. (AJ224040)와 82%의 유사도를 갖는 서열이었으며, rSBR의 T-RF는 uncultured *Nitrospira* sp. (Y14643)와 99% 유사한 서열이었다. 246 bp의 T-RF 분석결과, eBAF 시스템 반응조 2의 용액시료와 담체시료 T-RF는 각각 uncultured *Nitrospira* sp. (DQ414436)와 97%, *Nitrospira* sp. (AF035813)와 98% 유사한 서열이었다. NRL 시스템 반응조 2의 용액시료 T-RF는 *Candidatus Nitrospira defluvii* (DQ059545)와 95%의 유사도를 가졌으며, 담체시료 T-RF는 uncultured *Nitrospirae* bacterium (DQ451477)과 98% 유사한 서열이었다. rSBR 시스템 246 bp의 T-RF는 uncultured *Nitrospirae* bacterium (AY921886)과 97%의 유사도를 갖는 서열이었다. 173 bp의 T-RF는 eBAF 시스템 반응조 2 용액시료의 T-RF에서 *Nitrospira cf. moscoviensis* (AF155154)와 99%, NRL 시스템 반응조 2 용액시료의 T-RF에서 uncultured *Nitrospira* sp. (DQ414436)와 100% 유사한 서열을 확인하였다. 그리고 rSBR 시스템의 T-RF는 *Nitrospira* 속과 유사한 uncultured bacterium (AY375077)과 96%

의 유사도를 나타냈다.

다차원척도법을 이용한 세균 군집 분석

Nitrobacter 군집과 *Nitrospira* 군집의 T-RFLP 결과를 다차원척도분석법(multi-dimensional scaling; MDS)에 적용하였다(23). *Nitrobacter* 군집의 MDS 분석 결과 eBAF 시스템, NRL 시스템, rSBR 시스템이 각각의 클러스터를 이루었다(Fig. 3). 따라서 시스템에 따른 *Nitrobacter* 군집의 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 각 시스템의 클러스터 내부에서 용액시료간의 유사도와 담체시료간의 유사도가 더욱 높게 나타났다. *Nitrospira* 군집 분석 결과에서는 용액시료와 담체시료가 각각의 클러스터를 이루었으며, 서식환경의 영향에 의해 *Nitrospira* 군집의 차이가 나타났다. 클러스터 내부에서는 담체시료의 유사도가 용액시료의 유사도보다 더욱 높은 것으로 나타났다. 또한 세 BNR 시스템의 공정차이에 의한 *Nitrospira* 군집 차이는 크지 않았다.

고 찰

T-RFLP 분석방법은 세균의 군집 연구에 많이 사용된다. Siripong 등(25)은 T-RFLP 방법을 이용하여 폐수처리장의 *Nitrosomonas*와 *Nitrospira*와 같은 질산화세균 군집이 거울에 다 양해짐을 밝혔으며, Terahara 등(27)은 폐수처리 반응조에서 질산화반응의 초기 단계에 질산화세균의 수가 증가함을 보고하였다. 그러나 T-RFLP를 이용한 군집분석은 동일한 크기의 T-RF를 생성하는 다수의 분류군에 의한 문제점 때문에 T-RF의 크기만으로 군집구조를 해석하는 데는 어려움이 있다. 따라서 clone library

Table 2. 16S rRNA sequence similarities of the representative bands in T-RFLP gels of *Nitrospira* group

Sample ^a	Length of T-RF (bp)	Closest organism or clone name (accession no.)	Similarity (%)
eBAF2S	345	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium (AY921886)	99
eBAF2S	270	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. (AY150907)	99
eBAF2M	270	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. (DQ414439)	99
eBAF2S	246	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. (DQ414436)	97
eBAF2M	246	<i>Nitrospira</i> sp. (AF035813)	98
eBAF2S	173	<i>Nitrospira cf. moscoviensis</i> SBR2016 (AF155154)	99
NRL2S	368	<i>Nitrospira</i> sp. (AF035813)	96
NRL2S	270	<i>Nitrospirales</i> bacterium K21 (AY146671)	100
NRL2M	270	<i>Nitrospira</i> sp. (AJ224040)	82
NRL2S	246	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (DQ059545)	95
NRL2M	246	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium (DQ451477)	98
NRL2S	173	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. (DQ414436)	100
rSBR	368	<i>Nitrospira</i> sp. (AF035813)	97
rSBR	270	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. (Y14643)	99
rSBR	246	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium (AY921886)	97
rSBR	173	Uncultured bacterium (AY375077)	96

^a Sampling site: eBAF2S; Reactor 2 solution of eBAF, eBAF2M; Reactor 2 media of eBAF, NRL2S; Solution of NRL oxidic tank 2, NRL2M; Media of NRL oxidic tank 2, rSBR; Oxidic tank of rSBR

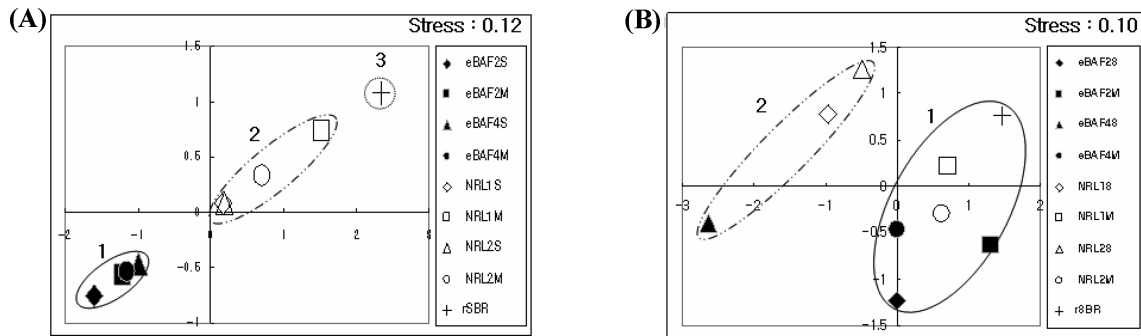


Fig. 3. MDS analysis of T-RF profiles of nitrite-oxidizing bacteria. (A) Analysis of *Nitrobacter* group, 1; eBAF system, 2; NRL system, 3; rSBR system, (B) Analysis of *Nitrospira* group, 1; Media samples, 2; Solution samples.

구축 후 염기서열 분석 작업을 통해 이를 보완하고 있으나(4, 19), adaptor ligation과 염기서열 분석방법을 이용하면 우점하는 T-RF의 해당세균을 정확하게 파악할 수 있다(30).

염기서열분석이 가능한 T-RFLP 방법을 이용하여 세 종류 BNR 시스템의 질산화반응조에 서식하는 아질산염 산화 세균 군집구조를 분석하였다. 27FB와 NIT3 primer 쌍을 이용한 *Nitrobacter* 군집의 T-RFLP 분석결과, 세 BNR 시스템에서 우점하는 T-RF는 738~741 bp와 341 bp이었다. 738~741 bp의 T-RF는 세 BNR 시스템에서 모두 관찰 가능하였으며, 341 bp의 T-RF는 NRL 시스템과 rSBR 시스템에서만 관찰되었다. 우점하는 T-RF의 형성이 다른 것은 공정의 차이로 인한 결과로 사료된다. NRL 시스템과 rSBR 시스템은 침전조에서 침전한 후 반응조에서 질산화반응이 일어나는 공정이며, eBAF 시스템은 질산화균이 부착된 여재를 통과시키는 공정이다. 침전조를 거쳐 반응조에서 질산화 반응이 진행될 때 341 bp의 T-RF를 형성하는 *Nitrobacter* 군집이 성장하기 적합한 환경이 되며, 따라서 eBAF 시스템보다 NRL 시스템과 rSBR 시스템의 *Nitrobacter* 군집의 구조가 더욱 다양한 것으로 생각된다.

T-RF의 염기서열 분석 결과, eBAF 시스템에서 우점하는 T-RF는 *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter* sp. 그리고 *Nitrobacter* 속과 유사한 uncultured alpha proteobacterium으로 확인되었다. NRL 시스템에서는 uncultured *Nitrobacter* sp., nitrite-oxidizing bacterium MPN2와 같은 아질산염 산화 세균을 확인했으며, rSBR 시스템에서도 uncultured *Nitrobacter* sp.와 *Nitrobacter winogradski*를 확인하여 세 BNR 시스템에서 아질산염을 질산염으로 산화되는데 관여하는 아질산염 산화 세균의 존재를 확인하였다. 세 BNR 시스템 모두 암모니아 성분의 제거효율이 93% 이상이므로 *Nitrobacter* 군집에 의한 아질산염의 산화가 효과적으로 이루어짐을 알 수 있다. 각 BNR 시스템에서 확인된 염기서열과 RDPII와 GenBank에 등록되어 있는 세균들의 16S rRNA 염기서열을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다(결과 미제시). 그 결과 다차원척도분석에서 나타난 결과와 마찬가지로 NRL 시스템과 rSBR 시스템에서 나타났던 *Nitrobacter* 군집이 같은 클러스터를 이루었다. T-RFLP의 결과와 염기서열의 분석결과를 통해 NRL 시스템과 rSBR 시스템의 *Nitrobacter* 군집이 유

사한 것으로 나타났다.

그러나 *Nitrobacter* 분석을 위한 primer를 사용하였음에도 불구하고 주요 T-RF의 염기서열 분석결과에서 *Nitrobacter* 군집이 아닌 Bradyrhizobiaceae 과(科)의 세균도 함께 확인되었다. Bradyrhizobiaceae 과(科) 세균의 경우 생리적 특성은 다르지만, 진화단계가 유사한 집단으로서 16S rRNA 염기서열의 유사도가 높기 때문에 이러한 결과가 관찰되었다고 생각된다(17). 아질산염 산화 세균 연구에서 *Bradyrhizobium japonicum*과 *Nitrobacter* 속의 16S rRNA 염기서열의 유사도가 98%로 매우 높게 나타났다고 보고된 바 있다(18). 또한 다른 연구결과에서도 *Azospira*, *Bradyrhizobium*, *Oligotropha*, *Rhodopseudomonas*와 유사한 서열이 확인된 바 있다(7). 환경시료에서 16S rRNA를 이용한 아질산염 산화 세균 군집 분석에서 *Nitrobacter* 군집만을 증폭할 수 있는 primer의 설계는 어려운 것으로 알려져 있다(18).

Nitrobacter 군집을 분석한 T-RFLP 결과에서 생성된 T-RF의 수는 1~2개였다. *MspI*을 이용하여 T-RFLP 분석을 시도한 선행 연구에서도 1~2개의 T-RF 관찰결과를 보고하였다(24, 25). RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu>)에서 probe match를 검색한 결과, RDPII에 서열이 등록되어 있는 자료 중에서 NIT3 primer로 PCR이 가능한 세균은 Bradyrhizobiaceae 과(科)의 세균 68군주이며, 68군주 가운데 *Nitrobacter* 65주가 포함된다. NIT3 primer로 증폭이 가능한 68군주의 염기서열에서 제한효소 *HhaI*의 인식부위를 찾는 모의적 연산을 통해 분석한 결과 738~741 bp와 341 bp의 두 가지 T-RF를 생성하는 것을 확인하였다. 또한 *Nitrobacter* 군집의 T-RFLP 분석에 많이 사용되는 제한효소 *MspI*을 이용한 모의적 연산 결과에서도 형성되는 T-RF는 1~2개였다. 따라서 *Nitrobacter* 군집의 16S rRNA 염기서열이 갖는 유사도가 높아 제한된 종류의 T-RF가 형성되는 것으로 생각된다.

27FB와 Nts0687 primer 쌍을 이용한 *Nitrospira* 군집 분석결과에서는 *Nitrobacter*보다 더 많은 수의 T-RF가 관찰되었다. 세 BNR 시스템에서 345~368 bp, 270 bp, 246 bp, 173~180 bp의 T-RF가 공통적으로 우점하였다. Nts0687 primer의 경우, RDPII에 서열이 등록되어 있는 *Nitrospira* 114군주가 PCR 가능하다. 선행연구결과를 보면 폐수처리시설과 같은 높은 농도의 질소성분이 존재하는 환경에서는 *Nitrospira* 군집이 *Nitrobacter* 군집보

다 적응하기 적합하다고 보고된 바 있으며(3), 폐수처리장에서 *Nitrobacter* 군집보다 *Nitrospira* 군집이 더 많이 존재함이 보고되었다(8, 13, 16). T-RF의 비율을 이용하여 군집의 다양성 지수를 계산한 결과 *Nitrospira* 군집의 다양성이 *Nitrobacter* 군집보다 높았다. 또한 *Nitrospira* 군집은 DEPHANOX 공정을 변형한 NRL 시스템에서 가장 다양하게 존재하였다. *Nitrospira* 군집의 총 T-RF 수(richness)는 20~28개였으며, 다양성지수(Shannon-Weiner diversity index)는 eBAF 시스템이 3.81~4.25, NRL 시스템은 4.25~4.51, rSBR 시스템은 3.96으로 나타났다. NRL 시스템의 다양성이 높은 것은 간헐포기조와 재포기조를 분할함으로써 다양한 질산화세균의 성장에 필요한 환경을 만들어 준 결과로 생각된다.

세 BNR 시스템의 T-RFLP 결과를 다차원척도분석법으로 나타낸 결과, *Nitrospira* 군집은 용액시료와 담체시료의 서식지 특성에 따라 각각의 클러스터를 이루었다(Fig. 3). 세 BNR 시스템은 동일한 폐수성상과 고도처리방법이라는 공통요소를 가지고 있다. 하지만 *Nitrospira* 군집의 경우 용액시료내의 부유세균과 담체시료내의 부착세균의 특성이 세균 군집 형성에 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 액체시료의 경우 eBAF 시스템 반응조 2의 액체시료를 제외한 나머지 액체시료가 하나의 클러스터를 이루었으며, 담체시료의 경우 높은 유사도로 하나의 클러스터를 이루었다. 세 BNR 시스템에서 공통적으로 우점한 T-RF외에 648 bp, 530~540 bp, 263 bp, 175~180 bp 등의 일부 시료에서 나타난 T-RF에 의해 액체시료와 담체시료의 차이가 생기는 것으로 생각된다.

세 BNR 시스템에서 우점하는 270 bp, 246 bp, 173 bp의 T-RF를 염기서열 분석한 결과 모든 시스템에서 *Nitrospira*의 존재를 확인할 수 있었다. 각 시스템에서 공통적으로 우점한 T-RF는 대부분 슬러지의 생물막이나 생물반응조 그리고 질산화반응조에서 발견된 세균들과 유사하였다. 따라서 질산화반응조에서 아질산염 산화 세균에 의한 아질산염의 산화가 활발히 이루어지는 것으로 생각된다. eBAF 시스템에서 우점한 345 bp의 T-RF는 토양환경에서 발견된 uncultured *Nitrospirae* bacterium으로 확인되었으며, NRL 시스템과 rSBR 시스템에서 우점한 368 bp T-RF는 수생환경에서 발견된 *Nitrospira* sp가 우점하였다. 하지만 전체적인 T-RF의 패턴을 클러스터 분석한 결과와 우점하는 T-RF의 16S rRNA 염기서열을 이용한 phylogenetic tree에서는 세 BNR 시스템의 공정에 따른 *Nitrospira* 군집의 특성을 확인할 수 없었다(결과 미제시).

질소제거가 하폐수처리에서 중요한 문제로 인식됨에 따라 질산화세균에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 질산화세균 군집에 관한 연구는 암모니아 산화 세균에 초점을 맞춘 연구가 활발했지만(20, 29), 근래에 들어 암모니아 산화 세균과 아질산염 산화 세균에 관한 연구가 동시에 진행되는 추세이다(10, 25). 또한 FISH방법을 이용한 질산화세균의 군집 분석도 활발히 진행되고 있다(11).

본 연구에서는 동일한 유입폐수를 처리하지만 공법이 서로 다른 세 종류의 BNR 시스템의 질산화반응조에서 염기서열 분석이

가능한 T-RFLP 방법을 이용하여 아질산염 산화 세균 군집 분석을 하였다. 그 결과 세 BNR 시스템에서 아질산염 산화 세균의 존재를 확인하였으며, BNR 시스템의 공정 특성과, 서식환경에 따라 형성되는 아질산염 산화 세균 군집의 차이가 존재함을 알 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 환경관리연구소. 2002. 2002 환경산업총람. 환경관리연구소 서울.
2. APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., USA.
3. Blackburne, R., V.M. Vadivelu, Z. Yuan, and J. Keller. 2007. Kinetic characterization of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Res.* 41, 3033-3042.
4. Dollhopf, S.L., S.A. Hashsham, and J.M. Tiedje. 2001. Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.* 42, 495-505.
5. Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C.R. Kiske. 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.
6. Egli, K., C. Langer, H.R. Siegrist, A.J.B. Zehnder, M. Wagner, and J.R. Van Der Meer. 2003. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3213-3222.
7. Freitag, T.E., L. Chang, C.D. Clegg, and J.I. Prosser. 2005. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8323-8334.
8. Harms, G., A.G. Layton, H.M. Dionisi, I.R. Gregory, V.M. Garrett, S.A. Hawkins, K.G. Robinson, and G.S. Saylor. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343-351.
9. Joo, H.S., M. Hirai, and M. Shoda. 2005. Characteristics of Ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 184-191.
10. Kelly, J.J., S. Siripong, J. McCormack, 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.
11. Kim, D., D. Lee, and J. Keller. 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour. Technol.* 97, 459-468.
12. Konuma, S., H. Satoh, T. Mino, and T. Matsuo. 2001. Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Sci. Technol.* 43, 107-114.

13. Li, H., M. Yang, Y. Zhang, T. Yu, and Y. Kamagata. 2006. Nitrification performance and microbial community dynamic in a submerged membrane bioreactor with complete sludge retention. *J. Biotechnol.* 123, 60-70.
14. Miller, D.N., J.E. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Hern. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724.
15. Nunan, N., T.J. Daniell, B.K. Singh, A. Papert, J.W. McNicol, and J.I. Prosser. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6784-6792.
16. Mota, C., M.A. Head, J.A. Ridenoure, J.J. Cheng, and F.L. De Los Reyes. 2005. Effects of aeration cycles on nitrifying bacterial populations and nitrogen removal in intermittently aerated reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8565-8572.
17. Orso, S., M. Gouy, E. Navarro, and P. Normand. 1994. Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 83-86.
18. Parker, M.A., B. Lafay, J.J. Burdon, and P. Van Berkum. 2002. Conflicting phylogeographic patterns in rRNA and *nifD* indicate regionally restricted gene transfer in *Bradyrhizobium*. *Microbiol.* 148, 2257-2565.
19. Pesaro, M., F. Widmer, G. Nicollier, and J. Zeyer. 2003. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1049-1061.
20. Phillips, C.K., D. Harris, S.L. Dollhopf, K.L. Gross, J.I. Prosser, and E.A. Paul. 2000. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5410-5418.
21. Prosser, J.I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30, 125-181.
22. Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Rser, and H.P. Kops. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1485-1494.
23. Ramrez-Moreno, S., M. Martnez-Alonso, S. Mndez-Ivarez, and N. Gaju. 2005. Seasonal microbial ribotype shifts in the sulfurous karstic lakes Ciso and Vilar, in northeastern Spain. *Int. Microbiol.* 8, 235-242.
24. Regan, J.M., G.W. Harrington, H. Baribeau, R.D. Leon, and D.R. Noguera. 2003. Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution system. *Water Res.* 37, 197-205.
25. Siripong, S. and B. Rittmann. 2007. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 41, 1110-1120.
26. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman, San Francisco, USA.
27. Terahara, T., T. Hohino, S. Tsuneda, A. Hirata, and Y. Inamori. 2004. Monitoring the microbial population dynamics at the start-up stage of wastewater treatment reactor by terminal restriction fragment length polymorphism analysis based on 16S rDNA and rRNA gene sequences. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 425-428.
28. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van De Lee, M. Honers, 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.
29. Webster, G., T.M. Embley, T.E. Freitag, Z. Smith, and J.I. Prosser. 2005. Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environ. Microbiol.* 7, 676-684.
30. Widmer, F., M. Hartmann, B. Frey, and R. Klliker. 2006. A novel strategy to extract specific phylogenetic sequence information from community T-RFLP. *J. Microbiol. Methods* 66, 512-520.

(Received November 28, 2007/Accepted January 8, 2008)

ABSTRACT: Community Analysis of Nitrite-Oxidizing Bacteria in Lab-Scale Wastewater Treatment System

Soonjae Jeong¹, Sang-Il Lee², and Dong-Hun Lee^{1*} (¹Department of Microbiology, ²Department of Environmental Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea)

Nitrogen is one of the major pollutants that should be removed by wastewater treatment systems. Biological nitrogen removal (BNR) is a key technology in advanced wastewater treatment systems operated by bacterial populations. Nitrification is the first step of microbiological processes in BNR system. Ammonia is oxidized to nitrite by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and then nitrite is subsequently oxidized to nitrate by nitrite-oxidizing bacteria (NOB). The diversity of NOB in nitrification reactors of 3 BNR systems, Edited biological aerated filter system, Nutrient removal laboratory system, and the Ruminant type sequencing batch reactor system, was investigated by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. Cluster analysis of T-RF profiles showed that communities of *Nitrobacter* group in each system were different depending upon the process of systems. However, the clusters of *Nitrospira* group were divided by the habitat of aqueous and solid samples.