

Community structure analysis of nitrifying biofilms by 16S rRNA targeted probe and fluorescence *in situ* hybridization(FISH)

한동우, 김동진

한림대학교 환경학과

전화 (031) 240-1537, FAX (031) 256-3420

Abstract

The microbial community structure and *in situ* spatial distribution of ammonia oxidizing and nitrite oxidizing bacteria in nitrifying biofilm of an upflow biological aerated filter system were investigated. The reactor had been continuously operated under high free ammonia concentration and low DO concentration for nitrite accumulation more than 2 years before the experiment. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) revealed that numerically dominant population was the *Nitrosomonas* spp. as ammonia oxidizer while *Nitrospira* spp. as nitrite oxidizer was less abundant in the nitrifying biofilm system. Furthermore, spatial distribution of nitrifying bacteria in the biofilm could be shown by the combination of confocal laser scanning microscopy and *in situ* hybridization. Whereas most of the ammonia oxidizing bacteria were presented throughout the biofilms, the nitrite oxidizing bacteria were restricted in the inner parts of the biofilms.

서론

생물학적 질소 제거는 질산화 공정에 뒤이은 탈질 공정에 의해 수행된다. 폐수중의 ammonium은 ammonia oxidizers에 의해 nitrite로 산화되며 곧바로 nitrite oxidizers에 의해 nitrate로 산화됨으로써 질산화가 이루어진다. 기존의 연구 결과 질소제거를 위한 폐수처리 시설에서 성공적인 질산화를 보여주지만, 이에 관여하는 미생물들의 군집구조 및 종 다양성에 대한 정보는 매우 제한적이다. 또한 질산화 미생물의 느린 성장 속도와 환경변동 요소(독성 충격, 온도, pH)에 대한 민감성 때문에 폐수처리 시설에서 안정된 질산화를 이루는데 종종 실패해 왔다. 그러므로 질산화 미생물의 생물학적 특징과 생태를 정확히 이해하는 것이 향상된 공정수행과 조질에 있어 필수적이다.¹⁾

질산화 반응에 관여하는 미생물들의 특성을 알아보기 위해 사용된 배양 의존적인 방법들(MPN, selective plating)은 많은 시간이 소요될 뿐만 아니라, 배지에 대한 선택성과 미생물 상호간의 기질 경쟁 등으로 인한 오차를 보여주었다. 최근 rRNA oligonucleotide probe를 통한 fluorescent *in situ* hybridization(FISH) 기법의 발전은 자연 환경 및 폐수처리장에 존재하는 미생물 군집 구조 분석 및 정량화, 그리고 미생물 동정에 있어 배양에 따른 오차 없이 빠르고 믿을만한 정보를 제공하여 주었다. 특히 생물막(biofilm) 내 질산화 미생물의 경우 confocal laser scanning microscopy(CLSM)와 결합된 FISH 방법은 ammonia oxidizers 및 nitrite oxidizers의 공간적 분포에 대한 관찰을 가능하게 하였다.^{1,2)}

본 연구에서는 장기간 nitrite 축적을 위해 운전된 질산화 생물여과 반응기 시스템을 완전한 질산화 반응이 일어나도록 운전한 뒤 생물막 내 미생물 군집 구조 및 종 다양성을 CLSM과 결합된 FISH 기법을 통해 알아보았다.

재료 및 방법

1) 미생물 sampling 및 고정

2년 이상 성공적인 nitrite 축적을 보이는 질산화 생물여과 반응기 시스템을 완전한 질산화가 이루어지도록 약 30일 정도 운전하였다. 질산화가 가장 활발하게 일어나는 반응기 하단 15 cm에서 폴리우레탄 여제를 꺼내 생물막을 분리한 뒤 4% paraformaldehyde 용액에 4°C, 1시간동안 고정하였다. Phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 2 ~ 3차례 세척한 뒤 gelatin으로 코팅된 슬라이드에 고정된 생물막을 부착시켜 최종적으로 에탄올 희석액(50, 80, 100%)으로 탈수화 과정을 수행하였다.

2) Oligonucleotide probes

실험에 사용된 oligonucleotide probe들과 이들의 sequence, specificity 그리고 hybridization condition을 Table 1에 나타내었다. 이 probe들은 fluorescein isothiocyanate (FITC), hydrophilic sulfoindocyanine dye (CY3, CY5)로 형광 label하여 합성하였다.

Table 1. 16S and 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes

Probe	Specificity	Probe sequence (5'-3')	% FA ^a	NaCl (mM) ^b
EUB338	Bacteria	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	20	225
ALF1b	α subclass of <i>Proteobacteria</i> , genus <i>Nitrospira</i>	CGTTTCGYTCTGAGCCAG	20	225
BET42a	β subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	80
NSO1225	Ammonia oxidizing β proteobacteria	CGCGATTGTATTACGTGTGA	35	80
NSM156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTTCGAT	5	636
NSV443	<i>Nitrospira</i> spp.	CCGTGACCGTTTCGTTCGG	30	112
NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	56
NSR1156	Freshwater <i>Nitrospira</i> spp.	CCCGTTCTCCTGGGCAGT	30	112

^a Percentage formamide in the hybridization buffer.

^b Millimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

3) *In situ* hybridization 및 관찰

고정과 탈수화 과정의 전처리를 거친 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide; Table 1)와 probe로 hybridization chamber에서 46°C, 90분 동안 반응시켜주었다. Probe 농도는 25 ~ 50 ng/L이다. Hybridization이 끝난 후 미리 예열된 washing buffer(20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, NaCl; Table 1)로 48°C에서 10분 동안 세정하였다. 반응이 끝난 시료를 증류수로 washing buffer를 제거한 뒤 공기 건조하여 25 μ l의 mounting medium으로 처리하였다. 생물막 내 질산화 미생물의 관찰은 Zeiss Axiovert 형광현미경과 Kr/Ar ion laser(488 nm, 560 nm, 633 nm)가 장착된 MRS-1024(Bio-Rad, U.K.) confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 사용하였다.

결과 및 고찰

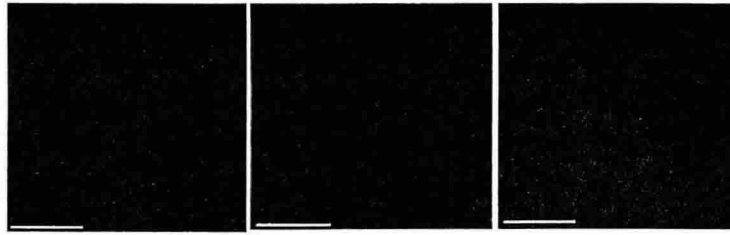
질산화 생물여과 반응기 시스템은 유입 폐수의 ammonium 농도가 1000 mg/L, 부하가 1.2kg N/m³·d, 공기 주입 속도를 0.5 L/min으로 낮게 유입하여 주었을 때 95% 이상의 질산화와 nitrite 축적을 보였다(data not shown). 본 실험은 ammonium 농도를 500 mg/L로 낮추어 완전 질산화가 이루어진 상태에서 ammonia oxidizers와 nitrite oxidizers의 동정 및 군집구조 분석을 수행하였다. 반응기 내 수리학적 체류시간을 줄여주는 방법으로 ammonium 부하를 1.2kg

$N/m^3 \cdot d$ 로 유지하였고 공기 주입 속도 또한 0.5 L/min으로 유지하여 주었다.

Fig. 1에 probe EUB338에 specific한 생물막 내 미생물의 FISH 결과와 공간적 분포를 나타내었다. Fig. 1의 [A]는 생물막의 가장 바깥 부분에 해당되며 [B], [C], [D]로 갈수록 생물막의 안쪽에 해당되는 그림을 나타내었다. 형광물질이 결합된 probe의 signal이 관찰되는 생물막의 두께는 20 ~ 30 μm 이었다. 이를 통해 대부분의 미생물들이 단일 미생물 관찰을 위한 충분한 ribosome을 포함하고 있으며, 생물막 각 층별로 probe의 침투가 원활하였음을 알 수 있었다. Fig. 2는 ammonia oxidizers를 포함하는 *Proteobacteria*의 β 아강에 specific한 probe BET42a 와 nitrite oxidizers를 포함하는 *Proteobacteria*의 α 아강에 specific한 probe ALF1b로 염색된 미생물의 FISH 결과 및 공간적 분포를 보여준다. Probe BET42a로 염색된 미생물의 경우 5 ~ 30 μm 크기의 clusters를 형성하며 생물막 전역에서 관찰되는 반면, probe ALF1b로 염색된 미생물은 2 ~ 10 μm 크기의 clusters를 형성하고 생물막 안쪽에 주로 분포함을 보여주었다. 이들 미생물은 장기간 고농도의 ammonium이 주입된 반응기에서 선택적으로 자란 미생물들로 *Proteobacteria*의 β 아강에 속하는 미생물들은 대부분 ammonia oxidizers로, *Proteobacteria*의 α 아강에 속하는 미생물들은 대부분 nitrite oxidizers로 생각된다. Fig. 3에는 ammonia oxidizers 중 *Nitrosomonas* spp.에 specific한 probe NSM156과 nitrite oxidizer인 *Nitrospira* spp.에 specific한 probe NSR1156의 FISH 결과를 나타내었다. Fig. 2에서와 마찬가지로 대부분의 *Nitrosomonas* spp는 생물막 전역에서 큰 clusters를 형성하며 분포하며, 생물막 안쪽으로 갈수록 *Nitrospira* spp가 작은 cluster를 형성하며 분포함을 보여주었다. 이는 유입 폐수 내 ammonium을 우선 생물막 바깥쪽의 ammonia oxidizers가 기질로 먼저 사용하여 nitrite로 산화시킨 뒤 이를 nitrite oxidizers가 연속적으로 nitrate로 산화시키는 반응에 의한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 Okabe 등(1999)에 의한 결과와도 일치하였다. 숫적으로는 *Nitrosomonas* spp가 *Nitrospira* spp에 비해 약 3 ~ 5 배 이상 많이 관찰되었다. 이러한 결과는 본 실험이 완전한 질산화가 일어나는 기간 중에 수행되었지만, 오랜 기간동안 nitrite 축적을 위해 높은 free ammonia 및 제한된 산소 농도에 nitrite oxidizers들이 제한 받았기 때문인 것으로 판단된다. 낮은 ammonium 농도에서 우점종을 차지한다고 보고된 *Nitrospira* spp. 및 기존의 대표적 nitrite oxidizers인 *Nitrobacter* spp에 각각 specific한 probe NSV443 및 NIT 3에 결합되어 나타난 signal은 관찰되지 않았다.

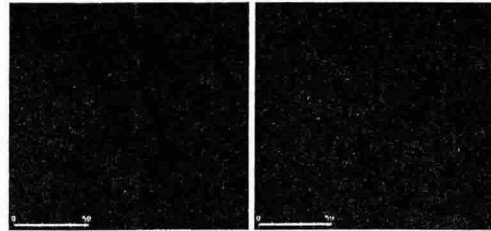
요약

질산화 생물여과 시스템 내 생물막 안에 존재하는 ammonia oxidizers 및 nitrite oxidizers의 군집 구조 및 공간적 분포를 조사하였다. FISH 분석 결과 생물막 내 숫적으로 우점종을 이루는 미생물은 ammonia oxidizer인 *Nitrosomonas* spp.로 나타났으며 nitrite oxidizer인 *Nitrospira* spp.에 비해 3 ~ 5 정도 더 많이 존재하였다. 이는 실험 기간동안 완전한 질산화를 보였지만 반응기가 2년 이상 nitrite 축적을 위해 높은 free ammonia 농도 및 낮은 용존 산소 상태에서 운전되어 nitrite oxidizers에 저해를 주었기 때문인 것으로 사료된다. FISH와 결합된 CLSM 관찰 결과 생물막 전체에 걸쳐 ammonia oxidizer가 분포하는 반면 안쪽으로 갈수록 nitrite oxidizers가 분포함을 보였다. 이는 폐수의 ammonium을 생물막 내 ammonia oxidizer가 먼저 nitrite로 산화시키고 이를 nitrite oxidizers가 곧바로 nitrate로 산화시키기 때문이다.



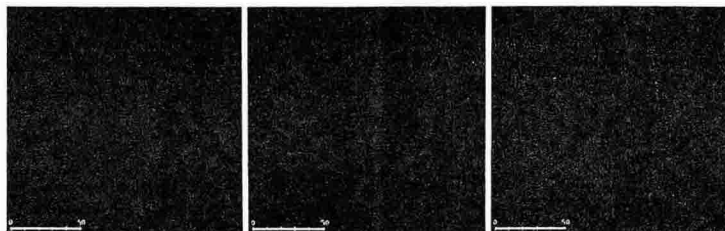
[A] [B] [C] [D]

Fig. 1. *In situ* hybridization of vertical sections of a nitrifying biofilm with CY-5 labeled probe EUB338. Cells of EUB338 stained bacteria. Bar = 50 μm



[A] [B] [C] [D]

Fig. 2. Simultaneous *in situ* hybridization of vertical sections of a nitrifying biofilm with CY-5 labeled probe BET42a and CY-3 labeled probe ALF1b. Cells of α -subclass of *Proteobacteria* are blue; cells of β -subclass of *Proteobacteria* are red. bar = 50 μm



[A] [B] [C] [D]

Fig. 3. Simultaneous *in situ* hybridization of vertical sections of a nitrifying biofilm with FITC labeled probe NSM156 and CY-3 labeled probe NSR1156. Cells of *Nitrosomonas* spp. are green; cells of *Nitrospira* spp. are red. bar = 50 μm

참고 문헌

1. Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koop, H.-P. and Schleifer, K.-H., "In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria"(1995), *System. Appl. Microbiol.* **18**, 251-264.
2. Okabe, S., Satoh, H. and Watanabe, Y., "In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes"(1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3182-3191.