

하수 슬러지와 혐기성 입상슬러지를 식종한 혐기성 암모니아 산화 반응기의 미생물 탐색

박경순^{*,**} · 배효관^{*} · 정운철^{*} · 박용근^{**} · 정진영^{*,†}

^{*}한국과학기술연구원 환경기술연구단

^{**}고려대학교 생명과학대학

Investigation of Microbial Communities in the Anammox Reactor Seeded with Sewage Sludge and Anaerobic Granule

Kyung-Soon Park^{*,**} · Hyokwan Bae^{*} · Yun-Chul Chung^{*} · Yong Keun Park^{**} · Jin-Young Jung^{*,†}

^{*}Center for Environmental Technology Research, Korea Institute of Science and Technology

^{**}School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

(Received 6 December 2006, Accepted 16 May 2007)

Abstract

Anammox reactor seeded with sewage sludge from RBC reactor and anaerobic granule from full-scale UASB reactor treating distillery wastewater was operated. Mixed granule and suspended sludge in the ammonium oxidizing process were taken and analyzed to investigate microbial community structure by molecular methods such as gene cloning and phylogenetic tree analysis after 250 days of continuous cultivation. The average nitrogen removal rate showed 0.9 kg N/m³-day after 250 days of continuous operation, then the maximum nitrogen removal rate showed 1.9 kg N/m³-day when 2.1 kg N/m³-day of nitrogen loading rate was applied. As results of gene cloning and phylogenetic tree analysis, Three kinds of phylum were found to be Proteobacteria, Acidobacteria and Planctomycetes (anammox bacteria) in mixed granule. Five kinds of phylum were found to be Proteobacteria, Chlorobi, Planctomycetes, Nitrospirae and Verrucomicrobia in suspended sludge. We found *planctomycete KSU-1* and putative new anammox bacteria in the reactor. Microbial structure represented different consortia depending on the types of sludge in the anammox reactor.

keywords : Anaerobic granule, Anammox, Clone library, Distribution, Phylogenetic tree, Sewage sludge

1. 서론

수계의 부영양화를 유발하는 질소제거를 위한 생물학적 질산화/탈질소화 공정은 기존의 물리화학 공정에 비하여 경제적인 장점을 가진다. 그러나 고농도의 질소를 함유한 폐수의 경우에는 재래식 생물학적 질산화/탈질 공정보다 더욱 경제적이고 처리시간을 단축할 수 있는 기술적 진보가 요구되고 있다. 질소부하를 적절히 줄일 수 없을 경우, 생물학 처리 공정의 용적을 증가시키는 문제를 야기하기 때문이다.

최근 이러한 문제점을 해결할 수 있는 혐기성 암모늄 산화반응인 ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation) 공정이 주목을 받고 있다(Hellinga et al., 1998; Mulder et al., 2001; Jetten et al., 2001, 2003).

혐기성 암모늄 산화반응은 nitrite가 전자 수용체로 활용되면서 암모늄이 산화되고, 동시에 질소가스가 생성된다(Mulder et al., 1995). 혐기성 암모늄 산화반응을 일으키는

anammox bacteria는 nitrite를 전자 수용체로 CO₂를 고정하여 사용하는 절대 독립영양 미생물로서 혐기성 조건에서 nitrate를 생산한다(Güven et al., 2005).

Anammox 미생물이 과량 배양되면 질소농도가 높은 방류수, 침출수, 축산폐수 등에 효과적으로 적용될 수 있다.

과거 미생물 탐색은 배양에 기초한 전통적인 방법으로 그 존재를 확인하였다. 그러나 대부분의 자연계의 미생물은 anammox 미생물과 같이 독립배양이 불가능하다. 따라서, 독립배양이 불가능한 미생물의 확인을 위해서는 배양과정을 거치지 않는 분자생물학적인 분석 기법을 사용하는 추세이다. 배양에 비의존적인 분자생물학적 방법은 환경 샘플의 다양함을 밝히고 미생물의 존재를 확인할 수 있는 장점을 가지고 있다. 분자생물학적인 미생물 탐색은 생태계에 다양한 미생물군이 존재할 때, 우점종 및 특정 역할을 수행하는 미생물의 유전자 탐지를 위해 DNA 및 RNA를 분석하는 것이다. 이는 미생물의 생태학적 연구에 있어 보다 많은 정보를 얻을 수 있는 방법이며, 이러한 정보를 바탕으로 세부적인 유전자 상관관계를 해석할 수 있다(Schmid et al., 2005).

미생물은 해당생태계의 기능과 상태의 정도를 나타내는

[†] To whom correspondence should be addressed.

jyung@kist.re.kr

유용한 지표로서의 정보체계를 내장하고 있다(김, 1993). 따라서 본 연구에서는 anammox 공정 반응기 내의 혼합 미생물을 분석하고자 한다.

Anammox 반응기 내의 혼합 입상슬러지와 부유 미세 슬러지를 채취하여 각 시료 미생물군의 16S rRNA gene을 분석하였다. 이와 같은 분석 자료를 토대로 혐기성 암모니아 산화공정 내의 미생물 군집구조를 분석하고 혐기성 암모니아 산화에 관여하는 anammox 미생물의 존재여부와 군집특성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 반응기 운전조건

Anammox 미생물들의 느린 성장기간(세대시간: 11 일) 동안 반응기내의 체류시간을 증가시키는데 매우 효과적인 UASB(Upflow Anaerobic Sludge Blanket) type의 반응기를 운전하였다. UASB는 반응기 전체에 걸친 기질, 생산물 등의 균일한 분포가 가능하게 하는 장점이 있다(Strous et al., 1998). 유효부피는 3.35 L, 항온조에서 히터를 이용하여 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 조건을 유지하였다. 식종 미생물의 유실을 방지하기 위하여 ceramic ball을 반응기 하부에 채웠으며, 또한 부유성 슬러지의 유실을 최소화하여 미생물의 성장을 촉진시키기 위해서 미생물 흡착이 용이한 탄소섬유판을 UASB 앞단에 설치하여 연속배양을 실시하였다. 식종 슬러지로는 주정폐수를 처리하는 UASB 반응기에서 채취한 입상혐기성 슬러지와 anammox 활성을 나타내는 우수처리용 회전원판집축식 반응기(Rotating Biological Contractor)에서 탈리된 부유성 슬러지를 각각 1 L씩 반응기 유효부피의 약 60% (v/v)로 충전하였다. Anammox 미생물의 연속배양을 위하여 합성폐수는 암모니아성 질소와 아질산성 질소를 각각 32~600 mg/L까지 변화시켜 제조하였다. 중탄산나트륨(NaHCO_3)을 첨가하여 알칼리도를 350 mg/L로 유지하였으며 KH_2PO_4 를 6 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 12 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 48 mg/L로 제조하여 첨가하였다. 또한 미생물의 성장에 필요한 미량 무기물질은 EDTA와 Fe이 주성분을 이루는 미량원소용액 I 과 Zn, Co, Mn, Cu, Mo, Ni, Se 등이 주성분을 이루는 미량원소용액 II를 각각 1 mL/L씩 첨가해 주었다(배 등, 2006).

2.2. 16S rRNA gene cloning 및 계통분류학적 분석

반응기내 미생물 분석을 위하여, 질소제거속도가 $0.9 \text{ kg N/m}^3\text{-day}$ 로 우수한 anammox 활성을 나타낸 운전 250일 이후의 연속반응기 하부의 시료 채취구에서 반응기내 슬러지를 채취하였다.

채취된 샘플은 체눈 크기 850 μm 로 체거름하여 입상슬러지를 일차적으로 분류하고, 체눈 크기 355 μm 로 이차 체거름하여 입상슬러지와 부유 미세 슬러지를 분류하였다.

각 샘플은 Power Soil™ DNA kit(Mo Bio Laboratories Inc., USA)을 사용하여 혼합 genomic DNA를 추출하였으며, 혼합 genomic DNA를 주형으로 이용하여 반응기 내의

다양한 원핵 미생물의 16S rRNA gene 증폭을 실시하였다. Table 1에 나타난 primer를 사용하였으며, PCR을 위한 혼합액은 총 20 μL 로 preincubation은 94°C 에서 4분 수행하였다. Denaturation 과정은 94°C 에서 1분, annealing은 55°C 에서 1분, extension은 72°C 에서 1분으로 30 cycle을 수행하였다. 72°C 에서 10분간 최종 extension을 실시하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Name	Target	Sequence (5' to 3')	Length
Eub 27F	Bacteria	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20 bp
Eub 1492R	Bacteria archaea	TAC CTT GTT ACG ACT T	16 bp

증폭산물은 100 mV에서 25분 전기영동(Mupid-a, Japan) 하여 확인하였으며, 단일 band에 대해서 Power Gel Extraction Kit(Dyne BioInc., Korea)를 사용하여 정제하였다.

T&A cloning vector (Real Biotech Corp., Taiwan)를 사용하여 정제된 16S rRNA gene을 ligation 시킨 후 HIT™ competent cells (Real Biotech Corp, Taiwan)을 사용하여 형질전환을 시행하였다. 이후, X-gal과 ampicillin이 첨가된 한천배지에 형질전환된 미생물을 도말하여 선택배양 하였다. 16S rRNA gene의 삽입이 확인된 미생물을 ampicillin이 첨가된 LB Broth에서 과량배양 후, Plasmid Miniprep Kit(DyneBioInc., Korea)를 이용하여 plasmid를 순수정제 하였다. 16S rRNA gene의 염기서열은 DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit(GE Health Care, USA)와 MegaBACE 1000 DNA sequencer(GE Health Care, USA)로 분석하였다. 미생물의 염기서열은 CHIMERA_CHECK 프로그램을 이용하여 chimera를 스크리닝 하였으며 Chimera가 아닌 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST Network Service에 입력하여 탐색하였다. Forward primer로부터 500bp의 정렬된 염기서열 정보를 MEGA 3.1으로 분석하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Phylogenetic tree 작성 시 method는 neighbor-joining method를 사용하였으며, 1000회의 bootstrap을 시행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 연속배양 반응기

연속배양기의 운전초기(약 45일까지)에는 아질산성 질소의 저해를 방지하기 위하여 유입 암모니아성 질소 농도는 30 mg/L, 아질산성 질소 농도는 35 mg/L로 운전하였다. 혐기성 암모늄 산화반응이 안정화된 약 80일 이후부터는 약 90%의 총질소 제거율을 나타내었다.

암모니아성 질소의 경우 Fig. 1과 같이 운전 38일부터 비교적 안정적으로 제거되기 시작하였고, 운전 80일 이후에는 지속적으로 안정적인 질소제거율을 나타내었다.

운전 169일에 유입농도를 200에서 300 mg/L까지 상승시켰을 때에도 안정적인 암모니아성 질소농도를 지속적으로 나타내어 우수한 연속배양특성을 나타내었다. 반응기 운전

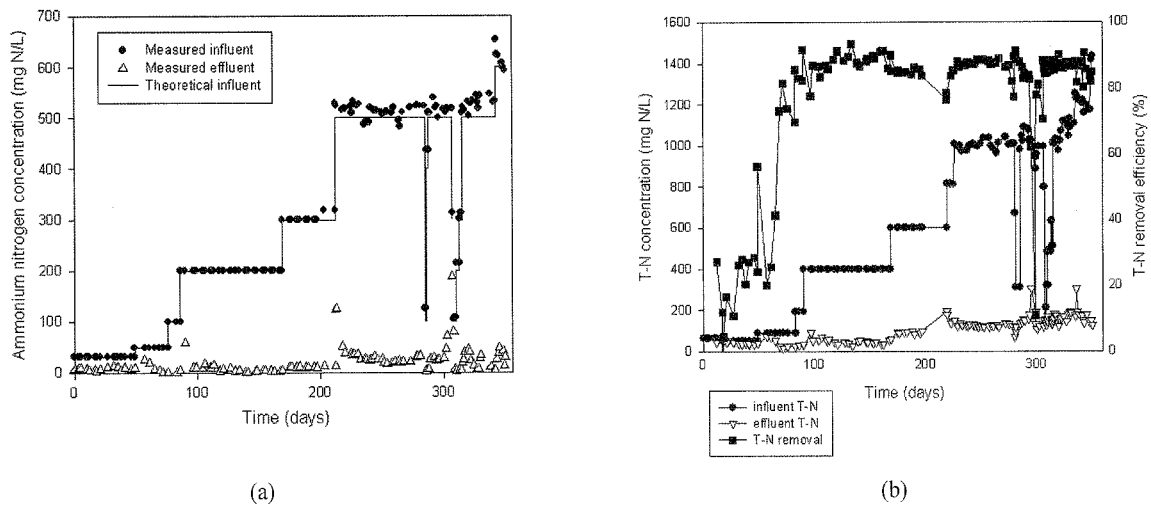
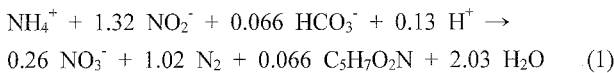


Fig. 1. Operational efficiency of anammox UASB reactor: (a) variation of ammonia nitrogen concentration in the anammox reactor (b) variation of T-N removal in the anammox reactor.

100일부터 350일까지의 연속배양시, 2.1 kg N/m³-day의 유입 질소부하의 조건에서 운전하였을 때, 최대 질소제거율은 1.9 kg N/m³-day로 나타났다.

본 반응에서 소모 및 생성된 NH₄⁺-N : NO₂⁻-N : NO₃⁻-N의 비는 1 : 1.05 : 0.24로서 기준에 보고된 식 1에 근거한 값 1 : 1.32 : 0.26과는 다소 차이를 나타내었으나, 가스발생량이 이론적인 값과 유사하게 발생하였고, 발생가스의 100%가 질소로 분석되어 본 반응은 Anammox반응에 기인하여 질소가 제거된 것으로 판단된다.



3.2. 계통분류학적 분석

계통분류학적 분석을 통하여 phylum의 개수로 군집구조의 다양성을, 총 clone중 해당 phylum에 속한 clone의 비율로 우점도를 계산하였다.

입상슬러지의 분석대상 염기서열은 모두 66개로 파악되었다. 최상의 유사도를 가지는 미생물의 clone은 Proteobacteria, Acidobacteria와 Planctomycetes의 세 가지 phylum에 속하는 미생물로 분류되었다(Fig. 2). 전체 clone 중 anammox 미생물이 속하는 Planctomycetes의 clone 개수는 planctomycete KSU-1(AB057453)과 100%의 유사도를 가지는 clone 3개, uncultured bacterium #0319-7F4(AF234144)와 94%의 유사도를 가지는 clone 2개, unidentified bacte-

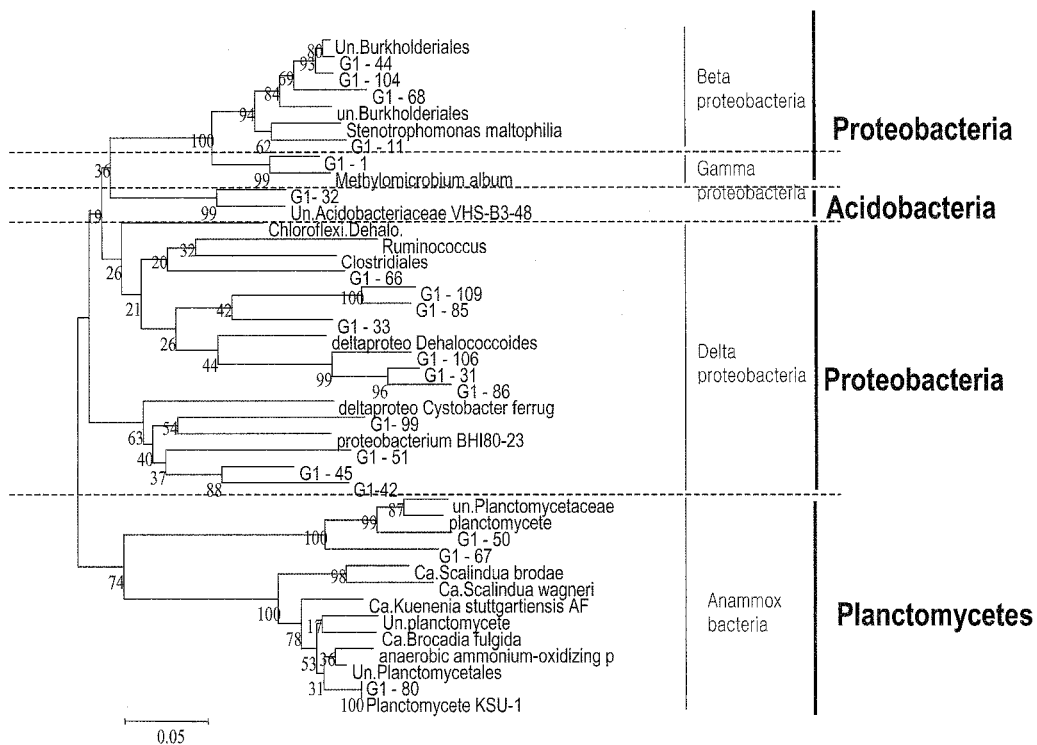


Fig. 2. Phylogenetic tree of granule in the anammox reactor.

Table 2. Alignment of target sequences of the Pla46 probe suite with the corresponding region of 16S rRNA. Mismatches with the Pla46 probe sequence are shaded

Pla46	G	G	A	T	T	A	G	G	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
G1-80	G	G	A	T	T	A	G	G	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
G1-67	G	G	C	T	A	A	A	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
G1-50	G	G	C	T	A	A	A	G	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
S-47	G	G	A	T	T	A	G	G	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
S-70	G	G	C	T	A	A	G	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
S-73	G	G	C	T	A	A	A	G	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C
S-62	G	G	C	T	A	A	A	G	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C

Table 3. Alignment of target sequences of the Amx368 probe suite with the corresponding region of 16S rRNA. Mismatches with the Amx368 probe sequence are shaded

Amx368	T	T	C	-	G	C	A	A	T	G	C	C	C	G	G	A	A	G	G
G1-80	T	T	C	-	G	C	A	A	T	G	C	C	C	G	G	A	A	G	G
G1-67	T	T	C	C	A	C	A	A	T	G	C	G	C	G	A	A	A	G	C
G1-50	T	T	C	C	G	C	A	A	T	G	G	G	C	G	C	A	A	G	C
S-47	T	T	C	-	G	C	A	A	T	G	C	C	C	G	G	A	A	G	G
S-70	T	T	C	C	G	C	A	A	T	G	G	G	C	G	A	A	A	G	C
S-73	T	T	C	C	G	C	A	A	T	G	G	G	C	G	C	A	A	G	C
S-62	T	T	C	C	G	C	A	A	T	G	G	G	C	G	C	A	A	G	C

생물일 가능성을 타진하기 위하여 탐침자인 Pla46과 Amx368을 기반으로 세밀히 염기서열을 조사하였다. *Planctomycetales*를 탐침하는 Pla46 탐침자와 조사대상 5개 clone을 비교한 결과, 네 개의 염기서열교체(mutation)가 일어난 것을 확인하였다(Table 2).

모든 anammox 미생물을 탐침 할 수 있는 Amx368 탐침자와 대상 염기서열을 비교한 결과, 4개 염기서열에서 염기서열교체(mutation)가 발생하고, 하나의 염기서열이 첨가(insertion)되는 현상을 보였다(Table 3).

몇 가지의 염기서열 교체와 첨가현상에도 불구하고 대부분의 염기서열이 동일한 것을 보였으며, 이 결과는 계통분류학적 분지도 결과와 더불어 5개 clone이 새로운 anammox 미생물로부터 유래한 것임을 뒷받침하고 있다.

4. 결론

본 연구에서는 하수처리용 RBC공정의 탈리슬러지와 혐기성공정의 입상슬러지를 식종한 UASB type의 혐기성 암모니아 산화공정 내의 미생물의 군집구조를 분석하였다. 0.9 kg N/m³-day의 안정적인 질소제거속도를 나타낸 운전 250일 이후 혐기성 암모늄 산화공정으로부터 입상슬러지와 부유 미세 슬러지를 채취하여 미생물 군집특성을 조사한 결과, anammox 반응기 환경이 혐기성 독립영양 조건임에도 불구하고 다양한 미생물 군이 존재하는 것을 확인하였으며, Proteobacteria의 종도 다양함을 밝혔다. 반응기에 충전된 슬러지 형태에 따라 군집구조도 달라짐을 확인하였으며 anammox 미생물과 함께 서식하는 미생물의 분포를 식별하였다. 또한 혐기성 암모니아 산화에 관여하는 anammox 미생물의 존재여부와 종류를 밝혔으며, 지금까지

알려지지 않은 독특한 anammox종일 것으로 추정되는 clone을 얻었다는데 의의가 있다. 추후 16S rRNA gene의 full length sequencing을 통한 추가적인 염기서열분석이 요구된다. 그리고 real-time quantitative PCR을 이용한 특이 anammox 미생물 정량을 통하여 공정과의 상관관계를 밝히고자한다.

사 사

본 연구는 환경부에서 지원한 2006년도 차세대 핵심환경 기술개발사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

김종민, 환경과 미생물, *KEI 기술현황 분석 보고서*, pp. 19-20 (1993).
 배효관, 박경순, 정윤철, 정진영, 혐기성 암모늄 산화 반응기 내 붉은색 입상슬러지의 미생물 군집구조 분석, *대한 환경공학회지*, **28**(10), pp. 1055-1064 (2006).
 Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K.-H. and Wagner, M., In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(11), pp. 5273-5284 (2001).
 Egli, K., Fanger, U., Pedro, J. J. A., Siegrist, H., van der Meer, J. R. and Zehnder, A. J. B., Enrichment and Characterization of an Anammox Bacterium from a Rotating Biological Contactor Treating Ammonium-rich Leachate, *Arch. Microbiol.*, **175**, pp. 198-207 (2001).
 Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M. C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den

- Camp, H. J., Jetten, M. S., Strous, M. and Schmidt, I., Propionate Oxidation by and Methanol Inhibition of Anaerobic Ammonium-oxidizing Bacteria., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, pp. 1066-1071 (2005).
- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J., The SHARON Process: An Innovative Method for Nitrogen Removal from Ammonium-rich Waste Water, *Water Sci. Technol.*, **37**, pp. 135-142 (1998).
- Janssen, P. H., Pathway of glucose catabolism by strain VeGlc2, an anaerobe belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial decent, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(12), pp. 4830-4833 (1998).
- Jetten, M. S. M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. G. and Strous, M., Microbiology and Application of the Anaerobic Ammonium Oxidation ('anammox') process, *Curr. Opin. Biotech.*, **12**, pp. 283-288 (2001).
- Jetten, M. S. M., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op den Camp, H. J. M., Hulth, S., Nielsen, L. P., Abma, W., Third, K., Engstrm, P., Kuenen, J. G., Jrgensen, B. B., Canfield, D. E., Sinnighe Damst, J. S., Revsbech, N. P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M. and Strous, M., Anaerobic Ammonium Oxidation by Marine and Freshwater Planctomycete-like Bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, pp. 107-114 (2003).
- Kual, L. and Verstracte, W., Ammonium Removal by the Oxygen Limited Autotrophic Nitrification-denitrification System, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, pp. 4500-4506 (1998).
- Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., Hellinga, C. and van Kempen, R., Full Scale Application of the SHARON Process for Treatment of Rejection Water of Digested Sludge Dewatering, *Water Sci. Technol.*, **43**, pp. 127-134 (2001).
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A. and Kuenen, J. G., Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**, pp. 177-183 (1995).
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S. C., Treusch, A. H., Jürgen Eck, Schleper, C., Acidobacteria form a Coherent but Highly Diverse Group within the Bacterial Domain: Evidence from Environmental Genomics, *Molecular Microbiology*, **50**(2), pp. 563-575 (2003).
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijnstra, W. I. C., van de Pas-Schoonen, K. T., Verbruggen, M. J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Sinnighe Damsté, J. S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M. S. M., and Strous, M., Candidatus "Scalindua brodae," sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri," sp. nov.: Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria, *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, pp. 529-538 (2003).
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J. W., Schleifer, K. H. and Wagner, M., Molecular Evidence for Genus Level Diversity of Bacteria Capable of Catalyzing Anaerobic Ammonium Oxidation, *Syst. Appl. Microbiol.*, **23**, pp. 93-106 (2000).
- Schmid, M. C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Kartal, B., van Niftrik, L., Schmidt, I., Cirpus, I., Kuenen, J. G., Wagner, M., Sinnighe Damsté, J. S., Kuypers, M., Revsbech, N. P., Mendez, R., Jetten, M. S. and Strous, M., Biomarkers for in Situ Detection of Anaerobic Ammonium-oxidizing (anammox) Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, pp. 1677-1684 (2005).
- Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool to Study very Slowly Growing Micro-organisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, pp. 589-596 (1998).
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R. I., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M., Missing Lithotroph Identified as New Planctomycete, *Nature*, **400**, pp. 446-449 (1999).
- Thamdrup, B. and Dalsgaard, T., Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, pp. 1312-1318 (2002).
- Toh, S. K., Webb, R. I. and Ashbolt, N. J., Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters, *Microb. Ecol.*, **43**, pp. 154-167 (2002).
- Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. and Kuenen, J. G., Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium-oxidizing Microorganisms in a Fluidized Bed Reactor, *Microbiol.*, **142**, pp. 2187-2196 (1996).