

## 유입하수 첨가 배지를 이용한 세균 신분류군의 분리

이시원, 박수정, 김창수, 조양석, 정현미, 박상정\*  
국립환경과학원 상하수도연구과

Received: February 16, 2016 / Revised: March 23, 2016 / Accepted: March 24, 2016

### Isolation of Novel Taxa Using Complex Media with Influent Sewage Water

Siwon Lee, Su Jeong Park, Changsoo Kim, Yangsoek Cho, Hyen-Mi Chung, and Sangjung Park\*

Water Supply & Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea

**In this study, we evaluated complex media with influent sewage water (ISW) to isolate novel taxa of bacteria. It was possible to cultivate 13 genera using the complex media with ISW. Additionally, more diverse genera were identified at 37°C than at 25°C, using the complex media with ISW. Total 12 strains of 179 bacterial isolates were shared less than 97% 16S rRNA gene sequence similarities with any known species. These isolates could be assigned to genera *Tessaracoccus*, *Paracoccus*, or *Candidimonas* (or *Paracaligenes*).**

**Keywords:** Influent sewage water, novel taxa, sewage

미생물은 지구생태계를 유지시켜주는 중요한 생물이자 현대의 생명공학에서는 핵심 소재로 활용되고 있는 유용자원이다[4, 7]. 환경 중 존재하는 다양한 미생물의 종류를 알기 위해 최근 pyrosequencing 등 분자생물학적 기법을 활용한 연구들이 수행되고 있으나[5, 15], 이러한 결과로 알 수 있는 사실은 짧은 단편의 핵산 염기서열에 근거한 동정 등 극히 제한적이다. 환경에 존재하는 미생물의 생태학적 지위, 기능 및 생리생화학적 특성 등 후속적인 연구를 위해서는 미생물을 배양하기 위한 효과적인 방법이 지속적으로 개발되어야 하며, 난배양성 미생물을 발굴할 수 있는 단서가 제시된 바 있다[6, 13].

한편, 하수처리장은 특수한 환경이 조성되어 탈질 등 기능성 미생물 또는 총대장균군과 같은 특정 미생물에 대한 연구를 중심으로 다양한 연구들이 보고되어 왔다[2, 11, 12]. 하수처리장은 다양한 형태의 하수들이 빗물과 함께 유입되어 특정 공정을 거쳐 방류되는 형태로, 미생물에 대한 연구는 공정과 방류에 집중되어 있어 유입수에 대한 연구는 상대적으로 미흡하였다. 또한 하수가 유입되어 처리되는 과정 중에는 공정 별 특수환경이 조성되어 우점하고 있는 미생물들과

의 경쟁을 피할 수 없고, 자외선 또는 오존 등의 소독과정을 거치면서 방류수 중 미생물 다양성은 유입하수에 비해 상당히 감소할 것이라고 예상되었다. 하수처리장 중 새로운 분류군을 발굴하기 위해서는 공정 또는 방류수에 비해 유입하수가 적합할 것으로 기대되었다. 이에 따라 본 연구에서는 유입하수를 대상으로 유사 환경을 만들어주기 위한 배양 전략을 활용하여 신분류군의 분리 가능성을 검토하였다.

2015년 11월 P 하수처리장 유입하수 시료를 멸균 채수병에 채수하였으며, 당시 온도는 약 27.6°C, pH는 약 7.7이었다. 채수한 물을 Whatman® filter paper 및 0.45 공극의 membrane filter paper (Whatman, USA)로 여과하여 멸균 증류수로 10배 희석하였다. 미생물 배양을 위한 배지는 Tryptic soy agar (TSA; BD, USA), Reasoner's 2A agar (R2A; BD, USA), Nutrient agar (NA; BD, USA) 및 Plate count agar (PCA; BD, USA)를 기초로 제작한 1/10 유입하수 용액을 증류수 대신 첨가 후 121°C에 15분간 멸균하였다. 한편 대조구로는 일반 복합배지인 TSA, R2A, NA 및 PCA를 사용하였다. 유입하수 시료를 단계 희석하였고, 각각의 배지에 2 반복으로 접종 후 25°C와 37°C에서 48시간 동안 배양하였으며, 사용한 배지와 같은 배지 및 조건에서 임의로 집락을 분리하였다. 유입하수 첨가배지에서는 총 197개의 미생물을 순수 분리 하였으며, 형태(색, 투명도, 광택 및 규칙성) 관찰 후 멸균된 20% glycerol을 사용하여 -80°C에 보존하였다.

### \*Corresponding author

Tel: +82-32-560-8353, Fax: +82-32-563-7085

E-mail: parkjoe@korea.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

유입하수 첨가배지에서 분리한 미생물을 동정하기 위하여 세균 16S rRNA 유전자를 증폭하였고[9], 197개 집락 중 179개 세균이 동정되었다. Phylum 또는 class-level에서 분석해본 결과 25°C에 비해 37°C에서 배양한 균주들이 일반 배지에서 분리된 대조구와 차이가 나타났다. 특히 37°C 배양 균주들은 Alphaproteobacteria가 우점(46.8%)하는 일반 배지와는 달리 유입하수 첨가 배지에서 분리한 균주들은 Betaproteobacteria가 34.2%로 우점하였으며, Gammaproteobacteria의 경우 일반 배지 평균(9.7%)에 비해 유입하수 첨가 배지에서 19.7%로 높게 나타났다. 또한 일반 배지에서는 Bacteroidetes 및 Firmicutes문에서 각각 6.8% 및 0.8%로 나타났으나, 유입하수 첨가배지에서는 각각 0.8% 및 11.5%로 차이가 분석되었다(Fig. 1). 한편 genus-level에서는 25°C에서 동정된 세균은 일반 배지 22개 속, 유입하수 첨가 배지

에서 20개 속이 동정되었고, 37°C에서 동정된 세균은 일반 배지 23개 속, 유입하수 첨가 배지에서 33개 속으로 나타났다(data not shown). 유입하수 첨가 배지에서만 동정된 세균 속은 25°C에서는 *Labrenzia*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Tessaracoccus* 및 *Uruburuella*속이었으며, 37°C에서는 *Alicyclophilus*, *Anoxybacillus*, *Arenimonas*, *Gordonia*, *Paracaligenes*, *Pseudoxanthomonas* 및 *Streptococcus*속으로 총 13개 속이었다. 그러나 *Aeromonas*, *Comamonas*, *Flavobacterium* 및 *Novosphingobium* 등 일부 속은 오히려 유입하수 첨가 배지에서 분리되지 않아 유입하수 첨가물이 일부 미생물을 오히려 억제할 가능성도 있는 것으로 나타났다(data not shown). 이에 따라 유입하수 첨가된 unknown growth factor(일부 미생물을 억제 또는 촉진)는 25°C에 비해 37°C에서 새로운 분류군을 발굴하는데

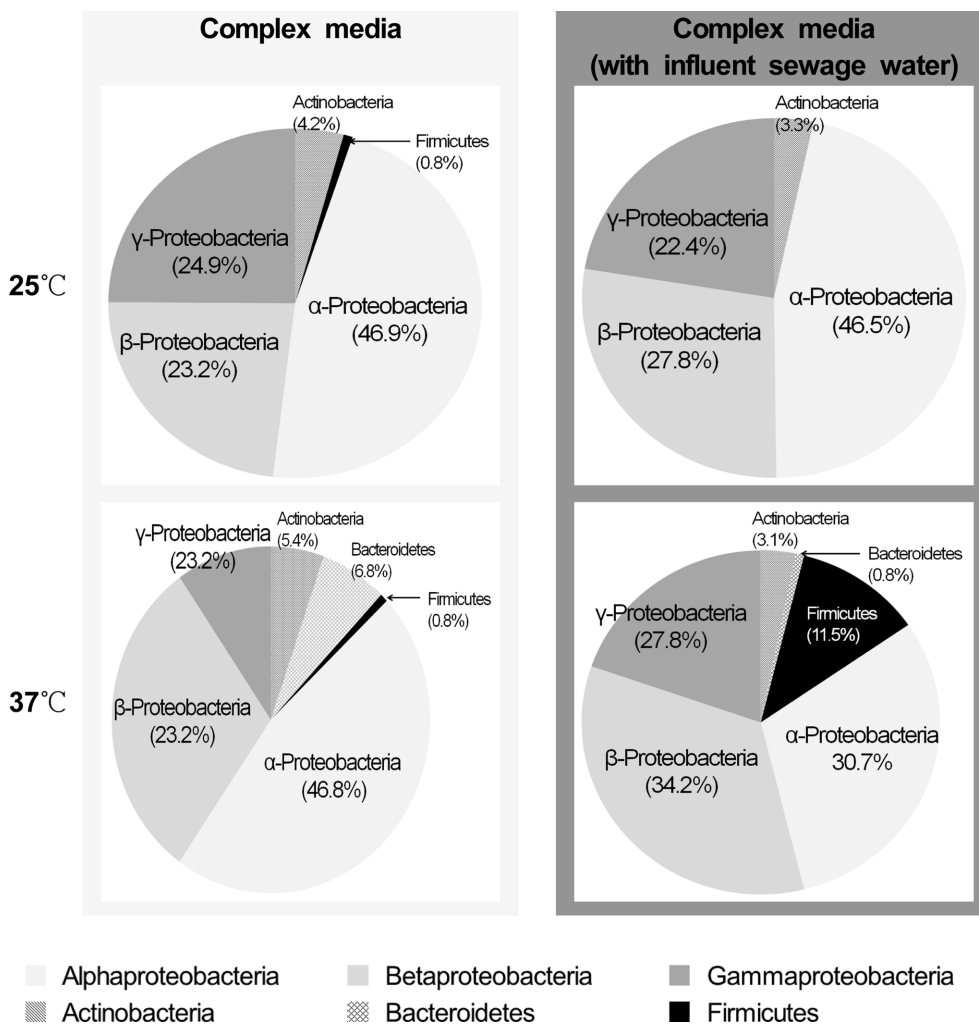
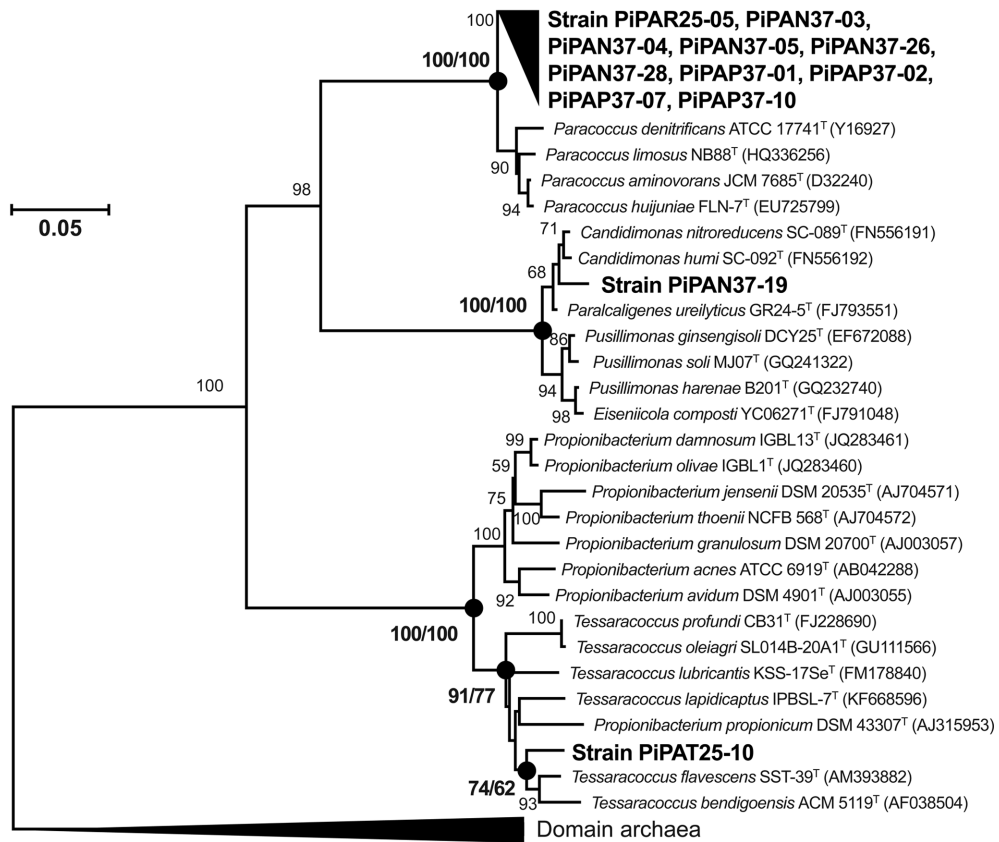


Fig. 1. Comparison of phylum-level composition using complex media and complex media with influent sewage water at 25°C and 37°C.



**Fig. 2. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree and Kimura 2-parameter showing phylogenetic position of novel taxa based on 16S rRNA gene sequences.** Closed circle was used for corresponding branches recovered in the NJ and maximum likelihood (Tamura-Nei distance model) trees. Five sequences of the domain archaea were used as an out-group. Bootstrap values were over than 50% based on 1,000 replications. Bar: 0.05 substitutions per nucleotide.

효과적이었으며, 일반 배지를 사용할 때에 비해 13개 속에 포함되는 종들에 대한 배양 가능성이 분석되었다. 이러한 결과는 토양 추출액, 부식질산 유사체, 정족수인식 신호물질, 과산화물 등 물질의 첨가, 배양 기간의 연장 및 배지를 굳히는 시약 변형 등을 활용한 신분류군 배양 가능성[6, 13] 결과와 유사하게 나타났다.

신분류군 탐색을 위하여 Eztaxon database [8]에서 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성을 분석하였다. 신분류군은 97% 이하의 상동성을 기준으로 선정하였으며[1], 총 12개의 분리주가 탐색되었다. 신분류군 추정 분리군주는 strain PiPAN37-19 (*Paralcaligenes*속 추정, 1개 isolate), PiPAT25-10 (*Tessaracoccus*속 추정, 1개 isolate) 및 *Paracoccus*속(10개 isolates) 균주들과 96.5% 이하의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Table 1).

신분류군들에 대한 정밀 동정 및 유연관계 분석을 위하여 계통수를 작성하였다. 계통수 구축을 위해 분리군주 10개의 유사군주에 대한 염기서열 및 out-group으로 사용할 고세균

의 염기서열 [*Halobacterium piscisalsi* JCM 14661 (NR\_113057), *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M (NR\_102878), *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* OPF8 (NR\_074112), *Desulfurococcus fermentans* Z-1312 (AY264344) 및 *Caldisphaera lagunensis* DSM 15908 (NR\_102472)]을 미국 국립생물정보센터(NCBI)로부터 수집하였다. 다중염기서열 정렬은 PHYDIT version 3.2 [3]과 Bioedit ver. 7.1.3.0을 사용하였으며[10] 계통수는 MEGA version 5.1을 사용하여[14] maximum likelihood (ML)-Tamura-Nei 및 neighbor joining (NJ)-Kimura 2 parameter 방법에 따라, bootstrap 1,000 반복으로 계통수를 구축하였다.

유입하수 첨가 배지에서 분리된 신분류군 추정군주 strain PiPAN37-19은 *Paralcaligenes ureilyticus*와 96.5%로 가장 최상위 유사성이 분석되었으나, 계통수를 통해 분석한 결과 *Candidimonas*속 및 *Paralcaligenes*속과 모두 유연관계가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). Strain PiPAT25-10은 *Tessaracoccus*속에 포함되는 새로운 종으로 추정되고, *T.*

**Table 1. List of potential novel taxa isolated from influent sewage using the complex media with influent sewage water.**

Genus type	Strain	Culture condition		Hit	16S rRNA gene similarity (%)	Seq. length (bp)
		Medium	Temp. (°C)			
A	PiPAN37-19	NA (with ISW)	37	<i>Paralcaligenes ureilyticus</i>	96.5	901
B	PiPAT25-10	TSA (with ISW)	25	<i>Tessaracoccus flavescens</i>	96.6	901
	PiPAR25-05	R2A (with ISW)	25			
	PiPAN37-03					
	PiPAN37-04					
	PiPAN37-05	NA (with ISW)				
C	PiPAN37-26			<i>Paracoccus aminovorans</i>	96.7	850
	PiPAN37-28		37			
	PiPAP37-01					
	PiPAP37-02	PCA (with ISW)				
	PiPAP37-07					
	PiPAP37-10					

*flavescens*와 96.56%의 유사성이 분석되었으며, 계통수에서는 *T. flavescens* 및 *T. bendigoensis*와 유연관계가 분석되었다 (Fig. 2). 또한 strain PiPAN37-03 등 10개의 분리균주는 *Paracoccus*속으로 분류되는 새로운 종으로 추정되고, *P. aminovorans*와 96.7%의 유사성이 분석되었으며, 분리한 균주들끼리의 유연관계가 분석되어 10개는 모두 같은 종으로 추정되었다. 특히 분리된 세균 중 신분류군인 strain PiPAN37-19와 PiPAT25-10은 일반배지에서는 동정되지 않은 세균 속에 포함되었다.

본 연구에서는 유입하수 첨가 배지를 제조하는 배양전략을 사용하여 유입하수로부터 일반 배지에서는 분리 및 동정되지 않은 13개 세균속을 분리하였다. 또한 분리된 균주 중 12개는 16S rRNA 유전자 유사성 97.0% 미만의 신분류군이었으며, 3종류의 세균속에 포함되는 것으로 분석되었다. 이번 연구는 향후 신분류군의 발굴에 방법적 접근에서 기여할 수 있을 것이라고 사료되며, 신분류군의 발굴로 후속적인 연구들이 가능할 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 신분류군 탐색을 위하여 유입하수 첨가 배지를 제작하였다. 유입하수 첨가배지에서는 일반 배지에서 분리 또는 동정되지 않은 13속 세균들을 배양하였으며, 특히 25에 비해 37°C에서 다양한 균주들을 배양할 수 있었다. 또한 유입하수 첨가 배지에서 총 12개의 분리 균주들이 97% 이하의 유사성을 나타내는 것으로 분석되었으며, 이들은 *Tessaracoccus*, *Paracoccus* 및 *Candidimonas*속(또는 *Paralcaligenes*속)과 유연관계가 있었다.

## Acknowledgments

This study was supported by Post-Doctoral Fellowships Program of National Institute of Environmental Research, Republic of Korea.

## References

- Chun J, Bae KS. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 123–127.
- Chung WY. 2003. A study on the coliforms removal methods at wastewater treatment plants. Master Thesis. Seoul, Konkuk University.
- Hall TA. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- Hong JH, Chung JD. 2005. Effect of broth of purple photosynthetic bacteria on garbage. *J. Korea Soc. Waste Manag.* **22**: 113–119.
- Jiang X, Ma M, Li J, Lu A, Zhong Z. 2008. Bacterial diversity of active sludge in wastewater treatment plant, *Earth Sci. Fron.* **15**: 163–168.
- Kim DH, Lee SH, Cho JC. 2008. Evaluation of various oligotrophic media for cultivation of previously uncultured soil bacteria. *Korean J. Microbiol.* **44**: 352–357.
- Kim MS, Baek JS. 2005. Microbial hydrogen production: Dark anaerobic fermentation and photo-biological process. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**: 393–400.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 716–721.
- Lee S. 2010. Identification and characterization of *Methylobacterium dankookense* sp. nov. isolated from drinking water. Mas-

- ter Thesis. Cheonan, Dankook University.
10. Lee S, Chung HM, Park SJ, Choe B, Kim JH, Lee BR, *et al.* 2015. Identification and phylogenetic analysis of culturable bacteria in the bioaerosol from several environments. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 142–149.
  11. Lee SA. 2003. Taxonomic study of denitrifying bacteria isolated from Daejeon sewage treatment plan. Master Thesis. Daejeon, Hannam University.
  12. Sánchez O, Ferrera I, González JM, Mas J. 2013. Assessing bacterial diversity in a seawater-processing wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing of the 16S rRNA and *amoA* genes, *Microb. Biotechnol.* **6**: 435–442.
  13. Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, *et al.* 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2162–2169.
  14. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.
  15. Wang X, Hu M, Xia Y, Wen X, Ding K. 2012. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China, *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7042–7047.