

## Fluorescence *in situ* hybridization 기법을 이용한 생물학적 폐수처리장의 질산화 미생물 분포 및 특성 연구

최은주, 이수철<sup>1</sup>, 김동진\*  
한림대학교 환경시스템공학과, (주)에코비전<sup>1</sup>  
(dongjin@hallym.ac.kr\*)

### A study on distribution and characteristics of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment plant by fluorescence *in situ* hybridization

Eunju Choi, Soochoul Lee<sup>1</sup>, Dongjin Kim\*  
Department of Environmental Systems Engineering Hallym University,  
Ecovison Co. Ltd.<sup>1</sup>  
(dongjin@hallym.ac.kr\*)

#### 서론

최근까지 폐수에서 유기물과 더불어 질소나 인을 함께 제거할 수 있는 처리 공정의 개발이 활발하게 이루어져 왔으며 현재 국내외에서 5-Stage Bardenpho, SBR(Sequencing batch reactor), VIP(Virginia initiative plant), A<sub>2</sub>/O(Anoxic/Anaerobic/Oxic) 등 많은 상업적 규모의 처리시설이 가동되고 있다. 생물학적 질소제거 공정은 기존의 유기물제거 공정에 비해 처리시설의 규모가 더욱 복잡하고, 별도로 질산화와 탈질을 위해 부수적으로 유기물을 첨가해야 되는 등, 경제적으로 많은 부담을 가져왔다. 또한 이들 공정을 최적으로 운전하기 위해 필요한 생물반응기에서 일어나는 생물학적 대사기작 및 복잡한 미생물의 생태에 관한 배경적 이론이 크게 부족한 실정이다.

슬러지와 같은 복합미생물계의 미생물 분포와 활성화에 관한 특성 연구는 분자 생물학 방법의 적용으로 가능하게 되었으며 특히 질소제거에 관여하는 미생물의 동정 및 구조 분석 등이 가능하게 되었다. 대표적으로 rRNA oligonucleotide probe을 이용한 fluorescence *in situ* hybridization (FISH)은 자연 환경 및 폐수 처리장에 존재하는 미생물 군집구조 분석 및 정량화, 그리고 미생물 동정 및 분포를 이해하는데 배양에 따른 오차 없이 빠르고 믿을만한 정보를 제공하여 주었다. 특히 FISH 결과를 confocal laser scanning microscope(CLSM)를 사용하여 관찰함으로써 미생물의 특성을 공간적으로 분석할 수 있게 되었다.

16S rRNA gene(rDNA) sequence 비교 분석에 의하면 *Nitrosomonas*와 *Nitrospira* 속(genera)을 포함하는 ammonia oxidizer는 *Proteobacteria*의  $\beta$  아강(subclass) 내 미생물 그룹에 속한다. 또한 오랫동안 민물환경에서 분리된 모든 nitrite oxidizer들은 *Proteobacteria*의  $\alpha$  아강 내 *Nitrobacter* 속을 포함한다고 여겨왔다. 그러나 최근 모스크바의 부식된 철관에서 분리된 *Nitrospira* 속의 *Nitrospira moscoviensis*와 *Nitrospira marina* 종이 nitrite oxidizer로써 주요 역할을 수행하는 것으로 밝혀지고 있다[1]. 이러한 rRNA gene(rDNA) sequence 비교 분석을 바탕으로 한 최근의 rRNA-targeted oligonucleotide probe을 통한 fluorescent *in situ* hybridization(FISH) 기법의 발전은 자연 환경 및 폐수처리장에 존재하는 미생물 군집의 구조 분석 및 정량화 그리고 미생물 동정에 있어 배양에 따른 오차 없이 빠르고 믿을만한 정보를 제공하여 주었다.

본 연구의 목적은 전형적인 생물학적 폐수처리장에서 CLSM을 이용한 FISH 결과 분석으로 활성슬러지법을 이용하는 포기조 내에서 계절적 환경 요인에 따른 질산화 미생물의 분포 및 암모니아 산화균(ammonia oxidizer)과 아질산 산화균(nitrite oxidizer)의 동정과 군집구조를 분석하는 것이다.

## 재료 및 방법

춘천시 하수 종말 처리장의 포기조 슬러지를 채취하여 실험에 사용하였다. 샘플은 각 계절별로 채취하였으며, 포기조 여러 곳에서 측정된 평균값을 아래 표에 나타내었다.

계절	날짜	용존산소 (mg/l)	온도 (°C)	pH
여름	02년 8월 26일	1.95	25.7	7.9
가을	02년 9월 26일	2.34	24.3	6.81
겨울	03년 1월 25일	0.68	7.3	8.2
봄	03년 3월 10일	1.78	13.6	6.78

채취된 슬러지는 FISH 실험에 사용하기 위해 4% paraformaldehyde 용액에서 고정하여(4°C, 2-3 시간), 약 20  $\mu\text{m}$  양으로 well slide에 부착 시켰다. Ethanol 희석액(50, 80, 98%)으로 각 3분간 탈수 과정을 수행하였다. 고정과 탈수 과정의 전처리를 거친 시료는 hybridization buffer(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide; Table 1)와 probe로 hybridization chamber에서 48°C, 120분 동안 반응시킨다(Manz et al.,1992, Amann, 1995). probe 농도는 25-50 ng/L로 일정하게 첨가하여 주었다. Hybridization이 끝난 후 미리 예열된 washing buffer(20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, NaCl; Table 1)와 3차 증류수를 이용하여 46°C에서 30분간 세척 과정을 수행하였다. 세척단계가 끝난 시료는 공기 중에서 건조한 후 10  $\mu\text{L}$ 의 mounting medium을 첨가하고 cover slide로 덮어 slide 시료를 완성하였다.

FISH 실험에 사용한 oligonucleotide probe와 이들의 염기서열, specificity 그리고 hybridization condition을 Table 1에 나타내었다. 이들 probe는 fluorescein isothiocyanate(FITC), hydrophilic sulfoindocyanine dye(Cy3, Cy5)로 형광 표식(labeling)하여 합성하였다(MWG Biotech, Germany).

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

Probe	Specificity	Probe sequence (5'-3')	% FA <sup>a</sup>	NaCl (mM) <sup>b</sup>
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	225
ALF1b	$\alpha$ subclass of <i>Proteobacteria</i> ,	CGTTCGYTCTGAGCCAG	20	225
BET42a	$\beta$ subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCCTTCGTTT	35	80
NSM156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTTCGAT	5	636
NSR1156	Freshwater <i>Nitrospira</i> spp.	CCCG TTCT CCTG GGCA GT	30	112

<sup>a</sup> Percentage formamide in the hybridization buffer.

<sup>b</sup> Millimolar concentration of sodium chloride in the washing buffer.

*In situ* hybridization이 끝난 aggregate slides는 Zeiss Axiovert 형광 현미경과 Kr/Ar ion laser(Excitation wave length 494, 550, 650 nm)가 장착된 MRS-1024(Bio-Rad, U.K.) CLSM를 사용하여 관찰하였으며, FISH 이미지는 COMOS 프로그램(Bio-Rad, Hewell Hempstead, UK)를 사용하여 얻었다.

## 결과 및 고찰

생물학적 폐수처리장 내에서 환경조건에 따른 질산화 미생물의 분포와 활성을 FISH를 통하여 관찰 하였다. 시료는 계절별로 각 1회씩 총 4회에 걸쳐 채취하였으며, 이때 pH, 온도 및 용존 산소 등 포기조 내 환경 요인을 즉석에서 측정하였으며, 이는 앞서 표로 나타내었다.

Figure 1은 채취한 미생물 샘플의 FISH 결과를 CLSM으로 관찰한 이미지이다. Fig. 1-[A-D]는 실험에 사용된 미생물의 differential interference contrast(DIC) 이미지로써 이를 통해 슬라이드에 적용된 미생물들의 상태를 확인해 볼 수 있다. 관찰결과 실험에 사용된 슬러지는 슬라이드 전역에 걸쳐 두껍지 않게 고루 분포되어 있음을 알 수 있다. Fig. 1-[E-H]는 domain bacteria에 특이적으로 결합하는 CY-3로 labeling된 probe EUB338을 이용한 *in situ* hybridization 이미지를 나타낸 것이다. Fig. 1-[E-H]의 FISH 이미지들은 Fig. 1-[A-D]와 동일한 위치에서 550-650 nm의 형광 파장에서 관찰한 것이다. 이들을 DIC 이미지(Fig. 1-[A-D])와 비교하였을 때, 80-90% 이상의 미생물이 EUB338과 결합하여 붉은색 형광을 나타낸다. 이를 통해 실험에 사용된 미생물들이 FISH 실험을 위한 충분한 ribosomal RNA를 함유하고 있음을 알 수 있다.

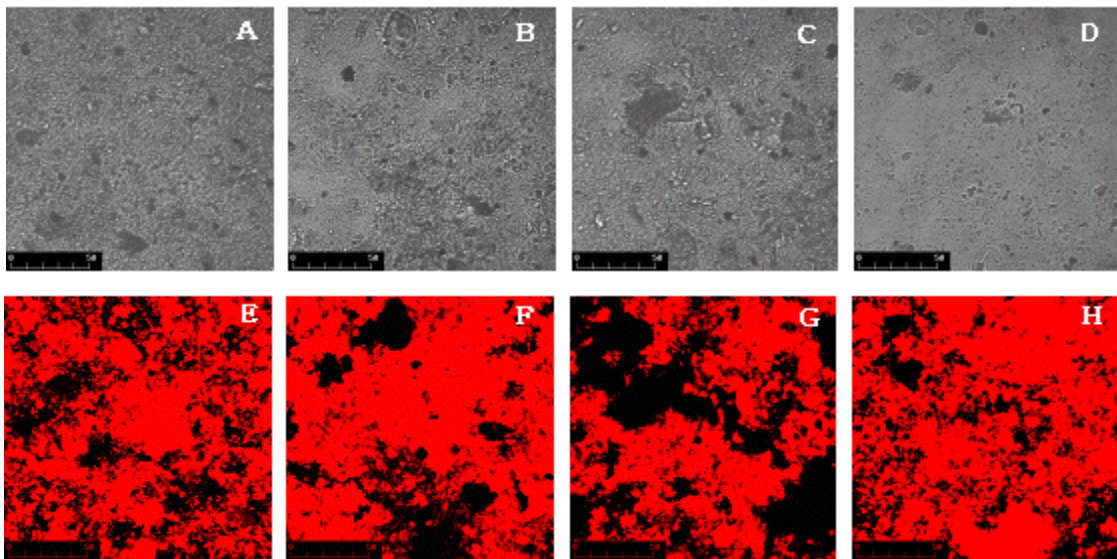


Fig. 1. *In situ* hybridization image of bacteria in Biological treatment wastewater system. DIC image[A-D] and hybridization with CY-3 labeled probe EUB338[E-H]. [A,E]: August, [B,F]: September, [C,G]: January, [D,H]: March. Bar = 50  $\mu$ m.

Figure 2는  $\alpha$ -*Proteobacteria*에 특이적으로 결합하는 probe ALF1b와  $\beta$ -*Proteobacteria*에 특이적으로 결합하는 probe BET42a의 FISH결과의 이미지이다.  $\alpha$ -*Proteobacteria*에는 아질산 산화균(nitrite oxidizer)에 속하는 *Nitrobacter* 속의 미생물이 포함되며,  $\beta$ -*Proteobacteria*에는 암모니아 산화균(ammonia oxidizer)에 속하는 *Nitrosomonas*, *Nitrospira* cluster가 포함되는 것으로 알려져 있다[2]. FISH 결과에서 이들은 서로 독립적으로 존재하며, 대부분 시료에서  $\alpha$ -*Proteobacteria*와  $\beta$ -*Proteobacteria*은 비슷한 개체수로 분포하였으나 8월에 채취한 미생물 시료(Fig. 2-[A])에서는  $\beta$ -*Proteobacteria*의 개체수가  $\alpha$ -*Proteobacteria*에 비해 월등히 많이 관찰되었다.

대표적으로 알려진 질산화 미생물 중에서 암모니아 산화균인 *Nitrosomonas*에 특이적으로 결합하는 probe NSM156(green)과 아질산 산화균인 *Nitrospira*에 특이적인 probe NSR1156(red)을 이용한 동시 hybridization 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 9월에 채취한 미생물 시료의 결과(Fig. 3-[B])에서는 *Nitrosomonas*에 비해 *Nitrospira*가 더 많이 분포하는 것으로 관찰되었으나, 다른 결과에서는 *Nitrospira*는 *Nitrosomonas*와 비슷한 분포를 나타내었다. 이것은 아질산 산화균이 암모니아 산화균에 비해 산소에 대한 기질친화도가 더 낮기 때문으로 보인다. 이러한 결과는 일반적으로 암모니아 산화균의 경우 용존산소가 1 mg O<sub>2</sub>/L 이상, 아질산 산화균의 경우 2 mg O<sub>2</sub>/L 이하에서 활성을 저해 받는 것으로 알려진 이전의 결과와도 일치하는 것이다[3].

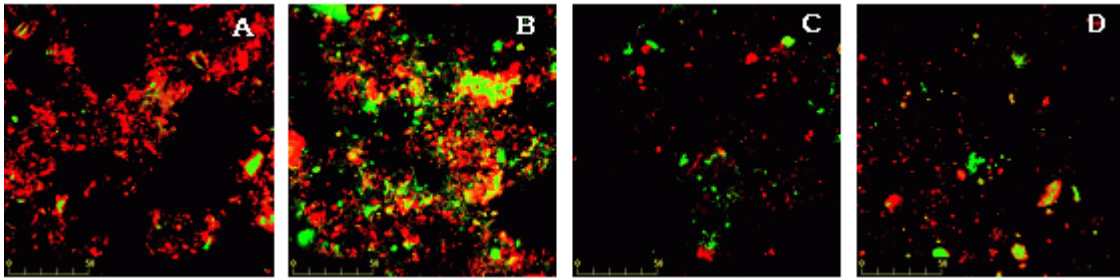


Fig. 2. *In situ* hybridization images of  $\alpha$  and  $\beta$ -Proteobacteria in biological wastewater treatment system. Hybridization with FITC labeled probe ALF1b and CY-3 labeled probe BET42a. [A]: August, [B]: September, [C]: January, [D]: March. Bar = 50  $\mu$ m.

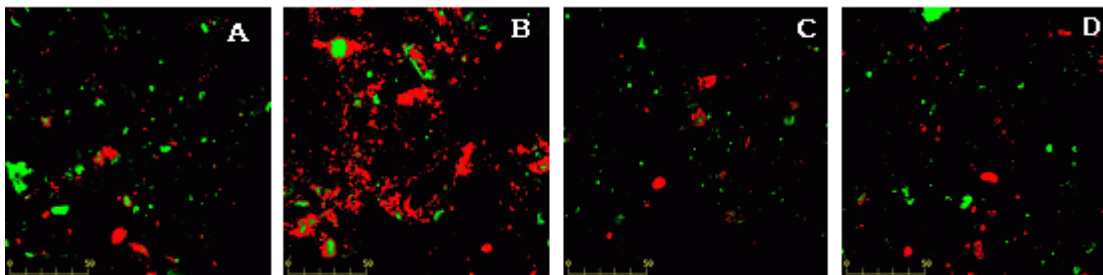


Fig. 3. *In situ* hybridization images of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* in biological wastewater treatment system. Hybridization with CY-3 labeled probe NSR1156 and FITC labeled probe NSM156. [A]: August, [B]: September, [C]: January, [D]: March. Bar = 50  $\mu$ m.

이러한 결과를 통해 계절의 변화에 따른 수온의 변화는 질산화 미생물의 활성과 개체수를 변화시키며, 대표적으로 암모니아 산화균인 *Nitrosomonas*와 아질산 산화균인 *Nitrospira*의 분포를 비교해 보았을 때, 용존산소가 2 mg O<sub>2</sub>/L 이하에서 암모니아 산화균과의 산소기질 경쟁에 의해 *Nitrospira*의 생육이 저해되는 결과를 볼 수 있었다.

### 참고문헌

1. Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. and Amann, R., "Identification and activity in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidised bed reactor", *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3480-3485 (1998).
2. Taske, A., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E. and Stahl, D., "Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria", *J. Bacteriol.* 176, 6623-6630 (1994).
3. Princic, A., Manhe, I., Megusar, F., Paul, E.A. and Tiedje, J.M., "Effects of pH and oxygen and ammonium concentration on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater", *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3584-3590 (1998).