

조류성장에 따른 하수 박테리아 군집 변화에 관한 분자생태학적 연구

Molecular Ecological Characterization of Wastewater Bacterial Communities in Response to Algal Growth

이주연 · 이장호 · 박준홍[†]
Juyoun Lee · Jangho Lee · Joonhong Park[†]

연세대학교 사회환경시스템공학부
School of Civil and Environmental Engineering, Yonsei University, Seoul

(2011년 10월 26일 접수, 2011년 11월 28일 채택)

Abstract : To deal with issues from global climate changes, renewable bioenergy has become important. Algae have been regarded as a good resource for biorefinery and bioenergy, and also have potential capability to remove nutrient and non-decompositional pollutants for wastewater advanced treatment. Although algal-bacterial ecological interaction would be a crucially important factor in using algae for wastewater advanced treatment and resource recovery from wastewater, very little is known about ecological interaction between algae and bacteria in a real wastewater environment. In this study, under a real municipal wastewater condition, we characterized wastewater pollutant treatability and bacterial communities in response to growth of *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2, which can grow in wastewater and has a high lipid contents. The growth of algal population using the wastewater was inhibited by increase in wastewater bacteria while bacterial survival and cellular decay rate were not influenced by the algal growth. Removals of recalcitrant organic matters and total nitrogen were improved in the presence of algal growth. According to T-RFLP and statistical analysis, algal growth affected time-course changes in bacterial community structures. The following 16S rRNA gene amplicon, cloning results showed that the algal growth changes in bacterial community structure, and that bacterial populations belonging to *Sediminibacterium*, *Sphingobacterium*, *Mucilaginibacter* genera were identified as cooperative with the algal growth in the wastewater.

Key Words : Algae, Wastewater Treatment, Wastewater Biorefinery, Algal-Bacterial Ecological Interaction, Bacterial Community

요약 : 주요 신재생에너지인 바이오에너지의 일환으로 조류를 이용한 바이오에너지 및 자원화 기술에 대한 관심이 높아지고 있다. 조류는 영양염류 제거 능력을 활용해서 하수와 같은 오폐수 내 난분해성오염물질과 영양염류 제거의 고도처리도 가능하다. 조류와 박테리아 간의 생태적인 상호작용이 조류를 활용한 하수처리 및 하수자원화에 중요한 역할을 함에도 불구하고, 실제 하수 조건에서 조류와 박테리아간의 생태학적인 상호작용에 관한 과학적인 정보가 부족하다. 본 연구에서는 하수에서 배양이 잘 되고, 지질함량이 높다고 알려진 국내 조류 종인 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2의 하수오염물질 제거 특성과 조류 주입에 따른 하수 박테리아 군집의 반응을 실제 하수 조건에서 연구하였다. 하수 박테리아의 수가 증가는 조류의 성장 속도를 감소시켰으나, 반면 조류의 성장은 박테리아의 생존 및 내성호흡 생분해 속도에는 영향을 주지 않았다. 조류가 주입된 하수에서 난분해성 유기물질 및 총질소의 제거 향상이 관찰되었다. 박테리아 16S rRNA 유전자 T-RFLP 분석에 따르면 조류의 주입은 시간에 따라 박테리아 군집에 영향을 주었다. 박테리아 16S rRNA 유전자 PCR 증폭, clone 및 염기서열 분석 결과, 하수 내 조류의 성장은 박테리아 군집 구성을 변화시키며, 조류와 함께 공동 성장 가능한 박테리아는 *Sediminibacterium*, *Sphingobacterium*, *Mucilaginibacter* 속에 속하는 개체로 판명되었다.

주제어 : 조류, 하수처리, 하수자원화, 조류-박테리아 생태학적 상호작용, 박테리아 군집분석

1. 서론

청정 연료의 공급과 환경보전은 미래 사회에 갖춰져야 할 필수요건이며, 이는 세계적 안정과 번영은 물론 삶의 질을 높이는 방법이다. 바이오에너지는 기존 에너지원인 석유, 천연가스, 석탄 등의 고갈과 대기오염물질 배출을 극복할 수 있는 친환경적 에너지원이라 할 수 있다. IEA (International Energy Agency, 2007)에 의하면 세계 바이오에너지 수요는 성장세를 보일 것으로 전망하였다.¹⁾ 또한 세계 각국의 바이오연료 정책에 따르면 미국은 2022년까지 수송용 연료에 바이오 에탄올을 20%까지 혼합할 계획을 갖고 있으며 유럽과

중국도 2020년까지 수송용 연료의 10%를 바이오연료로 사용하겠다는 정책을 발표하였다. 이산화탄소 감축을 위한 각국의 노력이 본격화됨에 따라 바이오 연료의 중요성과 그 시장성은 지속적으로 확대될 것으로 보인다.

바이오연료시장의 수요가 확대됨에 따라 1세대 바이오연료는 옥수수, 콩, 사탕수수 등의 식용작물을 대상으로 하였다. 하지만 곡물가격 상승과 저소득층 식량난을 가중시킨다는 비난이 있다.^{2,3)} 1세대 바이오 연료의 대안으로 목질섬유소나 바이오 폐기물을 이용한 2세대 바이오연료가 등장했으나, 수율이 낮고 폐목재 채집 비용이 높아 상용화에 어려움을 겪고 있다. 이와 같은 부작용 해결을 위해 3세대 바이오연료인

[†] Corresponding author E-mail: parkj@yonsei.ac.kr Tel: 02-2123-5798 Fax: 02-346-5300

미세조류를 활용한 친환경 바이오연료 생산기술이 대두되었다.⁴⁾ 미세조류는 기존 작물에 비해 그 번식력이 뛰어나고 단위 면적당 생산량이 높다는 점, 식용 자원 가격에 영향을 미치지 않는다는 점 그리고 이산화탄소 고정 효과 측면에서 주목받고 있으며,⁴⁾ 미세조류로 바이오디젤을 생산하고 부산물을 활용해 수소, 전기, 바이오플라스틱 등을 생산할 수 있다.^{5,6)}

또한 조류의 영양염류 제거 능력을 활용한 하수처리는 기존 하수처리의 문제점인 낮은 질소 제거율을 극복할 수 있어 1960년대부터 연구가 진행되었다⁷⁾. 조류의 하수처리공정의 도입은 하수 내 영양염류 제거와 조류의 생체 성장을 통해 하수처리와 바이오에너지 생산이라는 동시 목적을 달성할 수 있다. 조류 기반의 하수처리 공정을 위해서는 하수 내 조류-박테리아의 상호작용에 대한 이해가 필수적이다. 이는 하수 내 유기물 제거에 관여하는 박테리아가 조류 주입으로 인한 환경 변화에 조류와 박테리아가 서로 영향을 끼칠 수 있기 때문이다. 1970년대부터 환경 내 조류와 박테리아의 상호작용 연구가 시작되면서 조류-박테리아 군집 간에 서로 자극이 되어 성장을 촉진시켜 긍정적인 영향을 나타낸다는 연구 결과가 있으나, 조류와 박테리아의 복합 군집 내에서는 서로 긍정적 영향뿐만 아니라 경쟁적 관계라는 부정적 영향을 줄 수도 있다.^{8,9)} 이러한 연구들이 해양이나 호수와 같은 자연환경 내에서 관찰된 자료에 근거한 추측기반의 정보들이고, 미생물생태학적 관점에서 체계적으로 박테리아와 조류의 군집내 상호작용에 대해서는 연구가 미미한 듯하다. 특히 하수 조건에서 조류와 박테리아 간의 생태적인 상호관계에 대해서는 과학적인 지식이 문헌에 아직 충분히 축적되어 있지 않은 것으로 파악된다.^{10,11)}

특히 하수처리에서 중요한 질소제거 관점에서 보면, 조류의 암모늄 질소와 질산성 질소의 섭취와 박테리아의 질산화에 따른 암모늄 질소의 제거 및 탈질화로 인한 질산성 질소의 제거 작용에 의해 하수 내 질소의 상호 보완적 구조를 갖는다고 할 수 있다.¹²⁾ 반면 조류와 박테리아가 질소자원을 경쟁적으로 사용한다면 조류의 성장에 저해가 될 수도 있고, 조류 지질함량 증진을 가져 올 수도 있다.¹³⁾ 이러한 문헌조사 결과들을 분석해 보면, 조류-박테리아 복합군집 내에서 질소신진대사 관점에서의 상호작용에 대한 정보는 하수를 이용해서 조류를 생성하고 이를 이용하는 biorefinery 관점뿐만 아니라 조류를 이용해서 영양염류를 제거하려는 오페수처리 관점에서도 매우 중요하다. 하지만 조류-박테리아 복합 군집 간에 일어나는 생태학적인 상호작용에 대한 보다 과학적인 지식의 축적이 필요하다.

본 연구는 하수에서 배양한 조류와 박테리아의 수질오염물질 제거와 생태학적인 상호관계를 파악하여 하수처리 및 바이오에너지 생산에 도입하기 위한 기초연구 목적으로 수행하였다. 이를 위하여 실제 하수에서 성장이 가능하고 바이오매스에 지질함량이 높다고 알려진 조류 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2와 활성슬러지 내 박테리아를 하수에 주입하여 조류의 유무에 따른 조류-박테리아 복합군집의 하수

내 용존 유기물질(COD)과 총질소(TN) 제거 거동과 박테리아의 군집의 변화에 대한 반응을 분석하였다.^{10,11)}

2. 연구방법

2.1. 하수 이용한 조류 배양

서남 하수처리장의 하수 유입수를 시료로 실험 장치를 구성하고자 2010년 4월 채취하였다. 채취한 하수는 1.2 μm GF/C Glass filter (Whatman) 여과지로 걸러 하수 내 존재할 수 있는 조류를 제거하였다. 실험에 사용한 조류는 *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2로 국내 하수 적응성과 하수처리 능이 우수하다고 연구된 종으로 한국생명공학연구원(KRIBB)의 생물자원센터로부터 분양 받았다.¹⁰⁾

4개의 5 L 크기의 유리 반응조, 1.2 μm 크기의 여과지로 거른 하수와 1.2 μm 크기의 여과지로 거른 활성슬러지를 준비하고 2개의 반응조에는 여과된 하수 5 L를, 나머지 두 개의 반응조에는 여과된 하수 4.5 L와 여과된 활성슬러지 0.5 L를 넣어 4개 반응조 모두 5 L로 맞추어 준비하였다. 하수 5 L반응조와 하수 + 활성슬러지 5 L 반응조 각각 한 개씩에 선정된 조류 *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2를 주입하였다. 조류 *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2는 3차 증류수에 두번 세척하여 초기농도 43 μg/L로 주입하였다. 이러한 반응조의 구성은 조류 주입에 따른 하수 내 박테리아의 영향과 하수 거동을 확인하고자 한 것이며, 하수 내 박테리아보다 더 높은 농도의 박테리아를 식중함으로서 박테리아가 조류의 성장에 어떤 영향을 끼치는지를 확인하기 위해 활성슬러지를 식중하였다.

총 4개의 반응조는 회분식으로 장착하였으며 공기 0.3 vvm, 온도 24~25°C, 빛 132 μE의 조건으로 110 rpm으로 교반하여 진행하였으며 2일 간격으로 9일 동안 시료를 채취하였다.

반응조를 나타내는 약자는 아래 Table 1과 같다. 하수가 들어있는 반응조에 조류를 주입한 경우 AWW, 하수만 있는 경우는 WW로 표기하였다. 조류와 하수, 활성슬러지 모두 주입한 경우는 AWWS, 하수와 활성슬러지의 반응조는 WWS라 표기하였다.

Table 1. Descriptions of 4 wastewater reactors

| Reactor | Algae | Wastewater (Bacteria) | Sludge (Sludge bacteria) | Description |
|---------|-------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| AWW | Y | 5 L | N | Algae + Wastewater |
| WW | N | 5 L | N | Wastewater |
| AWWS | Y | 4.5 L | 0.5 L | Algae + Wastewater + Sludge |
| WWS | N | 4.5 L | 0.5 L | Wastewater + Sludge |

2.2. 조류 및 박테리아 성장 분석

조류의 성장은 chlorophyll α 측정으로 진행하였다. 반응조로부터 채취한 시료는 1.2 μm GF/C Glass filter (Whatman) 여과지로 여과하여 95% 에틸알코올이 7.6 mL 들어있는 15 mL BD Falcon Tube에 잘 접어서 넣었다. Chlorophyll α 를 추출하기 직전까지 빛이 차단된 곳에 보관하였다. 에틸알코올에 담긴 조류생체는 그 후 70~73°C에서 20분 중탕으로 가열하고 완전히 식을 때까지 빛이 차단된 곳에서 방냉하였다. 3시간 후에 방냉한 시료는 실온에서 2분간(2400 rpm) 원심분리한 후, 상등액의 2 mL을 취하여 1 cm 셀에 옮겨 T60 UV/VIS Spectrophotometer (PG Instruments Ltd., UK)로 649 nm, 665 nm, 750 nm의 파장에서 각각의 흡광도를 두 번씩 측정하였다. 흡광도 측정 시 바탕용액(Blank)은 95% 에틸알코올 2 mL를 취하여 사용하였다. 측정된 흡광도는 아래 식에 대입하여 chlorophyll α 의 농도를 구하였다.¹⁴⁾

$$Chl\ a = \frac{[13.7(OD_{665} - OD_{750}) - 5.76(OD_{649} - OD_{750})] \times E}{F \times l}$$

E = Extraction volume in mL

F = Filtration volume in L

l = Cuvette path length in cm

ODx = Optical density at wavelength of \times nm

자연수중의 박테리아의 대부분은 유기물을 이용하여 생활하는 종속영양생물로 발생원이 하수, 잡배수인 저온일반박테리아의 경우 R2A Agar 배지에서 21°C, 72시간 배양하여 발생한 집락으로 시료 내 박테리아의 성장을 측정한다. 본 실험의 시료를 멸균한 3차 증류수로 연속적으로 희석한 후 100 μL 를 취하여 R2A (BD DIFCO) 고형 배지에 분주하여 멸균된 삼각 유리막대로 펼쳤다. 고형배지에 분주한 시료는 20°C에서 72시간 동안 배양하여 형성된 박테리아 집락의 수가 30~300개일 경우만을 선택하여 집락수를 세었으며 3차례 반복하였다.

2.3. 조류-박테리아 군집의 하수오염물질 제거 거동 측정 방법

반응조 내의 하수오염물질 제거 거동을 분석하기 위해 용존된 COD, 총질소(TN)를 측정하였다. 채취된 시료는 시료 내 박테리아를 제거하고 용존된 성분만을 분석하기 위해 0.2 μm

크기의 여과지로 여과하였다. COD와 TN은 HACH사에서 제공하는 COD Digestion vial (Cat. 21259-15), Total Nitrogen Reagent Set (Cat. 27141-00)를 사용하여 발색법으로 실험하고 DR 4000 Spectrophotometer (HACH Company, USA)로 흡광도를 분석하였다.

2.4. 조류-박테리아 군집 내 박테리아의 군집 분석 방법

반응조 내 박테리아의 군집 분석을 하기 위해 날짜별로 채취한 시료로부터 DNA를 추출했다. 채취한 시료는 1.2 μm 로 여과하여 조류와 부유물질을 제거하였다. 여과한 시료를 다시 0.2 μm 크기의 여과지로 걸러 여과지에 걸려진 박테리아를 이용하여 DNA를 추출하는 시료로 사용하였다. PowerSoil DNA Extraction kit (MoBio, CA, USA)을 사용하였으며, MoBio에서 제공하는 사용설명서에 따라 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA로부터 박테리아의 군집 분석을 수행하였다. 시료로부터 추출한 DNA는 16S rRNA 유전자를 증폭시킬 수 있는 primer 세트를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR을 통해 시료 내 박테리아의 유전자를 증폭하기 위한 primer 세트를 Table 2에 나타내었다.

PCR 반응액은 DNA template, 1 \times PCR buffer, 각각의 10 μm 의 prime, MgSO₄, 1.25 unit의 Taq-polymerase (Invitrogen, Inc., WI, USA)를 넣고 총 부피 25 μL 를 만들었다. PCR을 위한 온도 조건은 박테리아의 경우 94°C (3분); 40주기의 94°C (45초); 52°C (60초); 72°C (90초); 그리고 72°C (5분)으로 구성되었다. 고세균의 경우 94°C (2분); 40주기의 94°C (45초); 52°C (60초); 72°C (90초); 그리고 72°C (5분)으로 구성되었다. PCR은 C1000TM Thermal Cycler (BIO-RAD, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응을 마친 PCR 산물은 아가로오즈 젤 전기영동(agarose gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였다.

박테리아의 군집 분석을 위하여 클로닝 분석 방법을 이용하였으며 9일째에 추출한 DNA를 27f와 1492r (Lane, 1991) primer 세트를 이용하여 PCR 증폭하였다. 증폭한 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, CA, USA)로 정제하고, TOPO cloning kit for sequencing (Invitrogen, Inc., WI, USA)을 이용하였다. PCR 산물을 vector(pCR 4-TOPO)에 붙여주기 위해서 ligation 과정을 거쳤으며, PCR 산물이 붙은 vector를 transformation 과정을 통해 TOP10 cell(일반 E. coli)에 CaCl₂를 장시간 처리하여 세포벽을 약하게 만든 E. coli)에 삽입하였다. PCR 산물이 삽입된 TOP10 cell은 LB (Luria-

Table 2. Primer sets for PCR and qPCR for bacterial and archaeal 16 S rDNA detections

| Target/Method | Primer Sequence (5'-3') | Amplicon length (bp) | Reference |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------|
| Bacteria | AGAGTTTGATCATGGCTCAG | 1465 | 17) |
| | TACGGTTACCTTGTTACGACTT | | |
| Bacteria | ATGGCTGTCGTCAGCT | 337 | 18) |
| | ACGGGCGGTGTGTAC | | |
| Archaea | GYGCASCAGKCGMGAAW | 450 | 19) |
| | GGACTACVSGGGTATCTAAT | | |

Bertani)액체 배지에서 1시간 배양한 뒤, 고체 kanamycin LB 고체 배지에 도말하여 하루가 지난 후 콜로니를 확인한다. 형성된 백색의 콜로니를 각 샘플 당 50개씩 plate well에 넣어 염기서열 분석을 마크로젠(Macrogen Inc. Seoul, South Korea)에 의뢰하였다. 얻은 염기서열 결과는 Greengene (<http://greengenes.lbl.gov>)의 BLAST 기능을 사용해서 가장 가깝게 일치하는 박테리아를 검색하여 그 군집을 분석하였다.

또한 박테리아와 고세균의 유전자의 정량적 분석을 위해 qPCR (Quantitative real-time PCR)을 수행하였다. qPCR 분석을 위해 Table 2에 제시되어 있는 primer를 사용하였고, 반응액 20 µL는 1 × SYBR Master Mix (BIO-RAD, USA), primer 세트(300 nM), 2 µL DNA를 포함한다. qPCR은 iQ5 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. qPCR을 위한 온도 조건은 박테리아의 경우 50°C (2분), 95°C (10분); 40주기의 95°C (15초); 60°C (60초); 72°C (30초); 그리고 95°C (15초), 52°C (60초)로 구성되었다. 고세균의 경우 50°C (2분), 95°C (10분); 40주기의 95°C (15초); 50°C (60초); 72°C (30초); 그리고 95°C (15초), 52°C (60초) qPCR의 검량선은 7단계로 10배씩 희석한 plasmid DNA를 이용하였으며, 유전자 copy number는 아래와 같은 식으로 구하였다.

16S rRNA copies

$$= \frac{DNA(ng/ul) \times (6.023 \times 10^{23} bp/mol) \times (1 copy plasmid size)}{(660g/1 mole DNA) \times (1000^3 ng/1g)} \times volume\ of\ template$$

반응조 내에서 박테리아의 군집이 조류의 유무에 따라, 또 한 시간이 흐름에 따라 어떻게 달라지는지 박테리아 군집의 경향을 분석하기 위해 분자생물학적인 방법인 T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism)을 이용하였다. 시간 별로 추출한 DNA에서 16S rRNA 유전자에서 형광물질인 FAM이 붙은 27f-FAM (6-FAM-AGAGTTTGAT-CATGGCTCAG)와 1492r (TACGGTTACC TTGTTACGACTT) primer 세트로 PCR 증폭하였다. 이때 PCR 반응액은 앞의 박테리아, 고세균의 PCR 반응액과 그 조성과 온도 조건이 같다.

PCR로 증폭하여 확보한 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, CA, USA)로 정제하였다. HhaI로 제한 효소처리(restriction enzyme digestion)를 하기 위해 PCR 산물 10 µL, 멸균한 3차 증류수 18 µL, 10X Buffer Tango™ 2 µL, 제한효소 2 µL를 잘 섞어 37°C에서 4시간 반응시켰다. 반응을 마치고 더 이상의 반응을 억제하기 위해 80°C에서 20분간 보관하였다. 이렇게 제한효소 처리된 PCR 산물은 서울대학교 농업과학공통기기센터(NICEM)에 단편분석을 의뢰하였다(96-capillary 3730xl DNA Analyzer, ABI). 얻은 미생물 군집의 경향은 peak height로 나타나는데 이는 Peak Scanner Software v1.0을 이용하여 peak를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 하수 내 조류와 박테리아의 성장 관계

하수 박테리아의 양에 따른 조류 성장의 반응을 조사하기 위해서, 활성슬러지의 주입이 없는 경우와 있는 경우 각각에 대해서 조류 *A. gracilis*를 접종한 반응조(AWW와 AWWS) 분석하여 보았다(Fig. 1). 그 결과 활성슬러지가 주입된 조류-박테리아 복합 군집 내(AWWS) 조류가 활성슬러지 주입되지 않은 경우(AWW) 보다 그 성장률이 현격하게 제한되었음을 볼 수 있었다. 이는 하수 박테리아의 증가가 조류성장을 제한하는 효과가 있음을 의미한다.

Fig. 1의 조류 성장시 하수 박테리아의 성장을 조사하기 위해서 생균수의 변화를 평판법으로 분석하고 그 변화를 나타내었다(Fig. 2). 초기의 농도는 차이가 있었는데($6.4 \times 10^4 \sim 5.7 \times 10^5$ cfu/mL), 1일 이후에는 모든 반응조에서 초기 박테리아 수를 크게 벗어나지 않고 일정하게 유지되었으며, 7일째 보이는 차이는 평판계수법의 방법상에 나타날 수 있는 차이로 판단된다. 따라서 조류성장에 따른 박테리아 생균수의 변화는 관측되지 않았다.

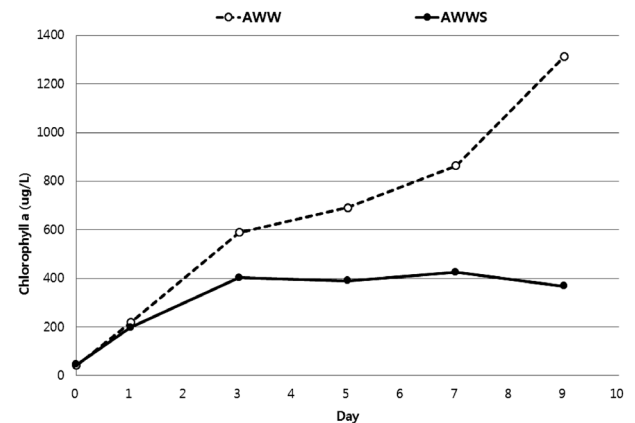


Fig. 1. Algal growth in wastewater with and without additional activated sludge (AWWS and AWW, respectively).

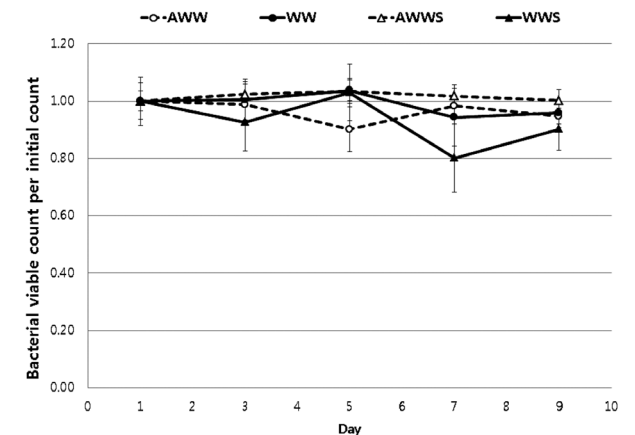


Fig. 2. Bacterial viable count changes in response to algal growth and/or addition of activated sludge.

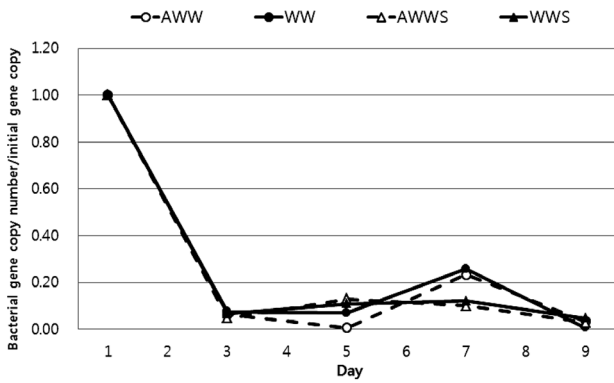


Fig. 3. Time course changes in bacterial 16S rRNA gene copies.

박테리아 생균수는 오직 해당 배지에서 배양이 되는 세균에 대한 것이므로, 대다수 배양되지 않는 세균과 고세균에 대한 정보제공에는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 정량적 PCR (qPCR)을 이용해서 조류-박테리아 군집 내 박테리아와 고세균의 16S rRNA 유전자를 정량적으로 분석하였다. 그 결과, 초기 16S rRNA 유전자의 양 대비 감소하는 속도가 조류성장의 유무나, 추가 활성슬러지의 첨가여부에 관계없이 유사하였다(Fig. 3). 초반 3일 사이에 약 90% 이상의 호기성 내생분해(aerobic endogenous decay)에 의한 손실을 보이다가 3일 이후에는 일정량을 유지하는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 조류의 성장이 박테리아의 생균수나 호기성 내생분해 손실에 영향을 주지 못함을 보이고 있다.

고세균의 경우 박테리아의 16S rRNA와는 달리 검출한계 값보다 적은 양이 측정되었다. 이러한 결과는 본 연구에서 대상으로 하는 시료 내에서 박테리아가 정량적으로 중요하고 고세균은 상대적으로 매우 소수임을 보이고 있다.

3.2. 조류 및 박테리아 복합군집에 의한 하수오염물질 제거 거동

조류가 있는 경우와 없는 경우의 용존 유기물질의 농도변화를 분석하였다(Fig. 4). 조류가 포함이 되지 않은 경우(WW와 WWS), 추가 활성슬러지를 주입 여부에 관계없이 COD가

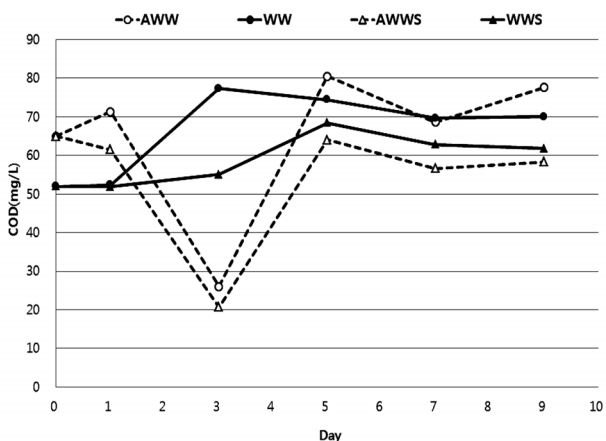


Fig. 4. Time course changes in soluble COD concentrations.

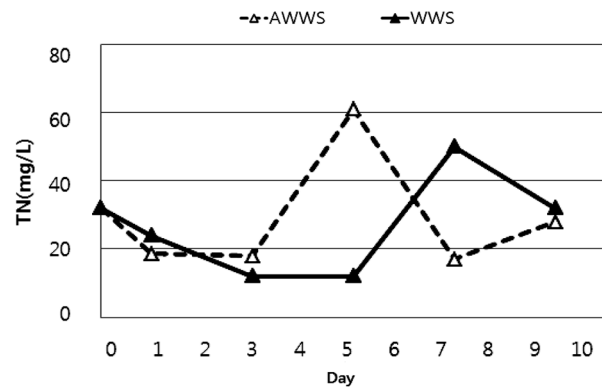
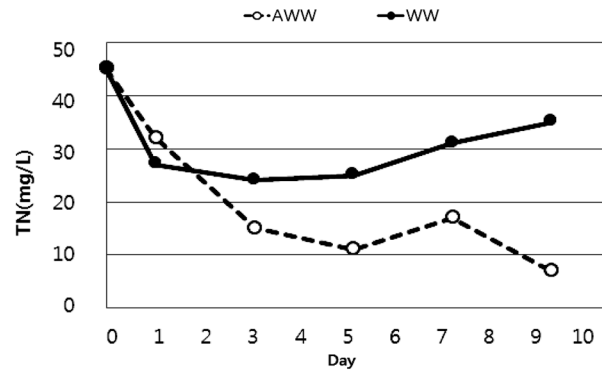


Fig. 5. Time course changes in dissolved total nitrogen (TN).

감소하지 않았다. 이는 초기 하수 내 유기물질들이 난분해성일 가능성을 시사하고, 시간이 지나면서 난분해성 유기물의 발생이 다소 증가한 것을 알 수 있다. 반면 조류를 주입한 경우에는(AWW, AWWs) 활성슬러지 추가 여부에 관계없이 초기 COD 65 mg/L에서 약 25 mg/L까지 감소하였다가 5일째에 다시 증가하여 그 선을 유지하는 경향을 나타냈다. 이는 혼합영양을 하는 *Ankistrodesmus gracilis*의 영향으로 초기 COD가 감소한 것으로 보이며,¹⁵⁾ 조류가 성장함에 따라 조류생체 혹은 발생 유기물질이 수중으로 용존되어서 COD가 증가한 것으로 판단된다. 그리고 이러한 조류생성 유기물질은 일정량 박테리아에 의해서 분해가 되어서 COD가 줄다가 난분해성 유기물이 누적이 되면서 COD 증가되다가 일정량에서 멈춘 것으로 판단된다.

수질 내 용존 총질소의 경우, AWW와 WW 반응조, AWWs와 WWS 반응조로 나눠서 비교하였다. AWW와 WW 반응조의 경우 초기에 두 반응조에서 모두 총질소가 감소하다가 조류가 없는 WW 반응조에서 농도가 증가하는 경향을 나타냈다. 따라서 추가의 활성슬러지의 주입이 없었던 하수의 경우, 조류의 주입이 총질소의 제거에 효과적임을 알 수 있었다. 반면 추가 활성슬러지를 주입한 AWWs와 WWS 반응조의 경우에는 좀 더 복잡한 경향을 보였다. 두 반응조에서 초기에 30 mg/L에서 20 mg/L 이하로 감소하다가 각각 60 mg/L, 50 mg/L까지 증가하다가 다시 30 mg/L로 감소하는 경향이 나타났다. 활성슬러지를 주입한 경우에, 반응조 내 유기 탄소원이 부족과 폭기 조건에서 박테리아의 호기성

Table 3. Comparison of bacterial community compositions (relative abundance, % of total clones)

| Class level population | AWW | WW | AWWS | WWS |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Actinobacteria | ND* | 12 | ND | 20 |
| Alpha-proteobacteria | ND | 8,0 | ND | 6,0 |
| Beta-proteobacteria | 42 | 52 | 44 | 26 |
| Delta-proteobacteria | 2,0 | 2,0 | ND | ND |
| Flavobacteria | ND | 8,0 | ND | 2,0 |
| Gamma-proteobacteria | ND | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Sphingobacteria | 56 | 16 | 54 | 42 |
| Unclassified | ND | ND | ND | 2,0 |
| Total | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |

* N,D. : non detected

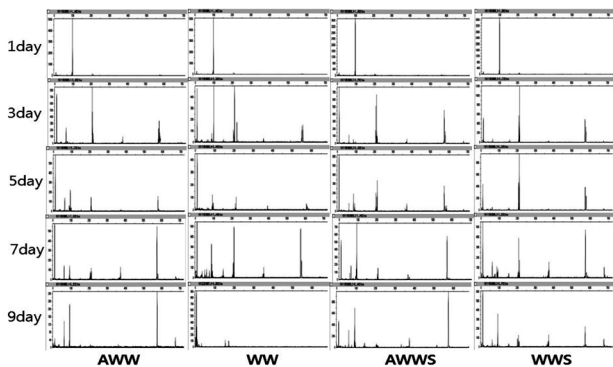


Fig. 6. Time course changes of T-RFLP patterns.

산화로 유기질소로 유출되고 이는 암모니아 및 아질산성 질소로 산화된 것으로 판단된다.¹⁶⁾

3.3. 조류에 의한 박테리아 군집의 변화

T-RFLP finger-print 분석을 통해 각 반응조에서 시간에 따른 박테리아 군집변화를 관찰하였다(Fig. 6). 조류가 없는 경우에도 시간에 따라 군집구성의 변화가 관찰되었는데, 이는 회분식 반응조에서 유기 탄소원과 영양염류의 부족에 의해서 군집구성이 변화하는 것이다. 하지만 조류가 없는 경우에 비해서 조류가 있는 경우인 AWW, AWWS 반응조에서 peak가 전체적으로 비슷하게 나타났으며, 특히 570 bp에서 peak가 증가하는 경향을 확인할 수 있다. 대체적으로 비슷한 영역대의 peak가 존재하였으며, 시간에 따른 peak의 증감이 관찰되었다. 이는 시간에 따른 군집구성의 경향이 조류가 있는 경우와 없는 경우에 다르게 변한다는 것을 의미하고, 조류의 성장이 박테리아의 군집구성에 영향을 준다는 것을 정성적으로 보이고 있다. 또한 T-RFLP의 NMS 분석을 수행한 결과, 7일 이후에는 최초의 박테리아 군집과는 상이한 구성을 보이고 있음을 통계적으로 입증하였다(Fig. 7).

하수 내에서 조류의 성장률이 높고 그 반응조의 박테리아 군집을 Genus level에서 분석했을 때 가장 큰 변화를 나타낸 AWW 반응조를 분석한 결과, 초기 하수에서 검출되지 않은 *Sediminibacterium* 속이 우점종으로 나타났다(Table 4). 또한 조류를 주입하지 않은 WW 반응조와 비교했을 때, *Sedimi-*

nibacterium, *Sphingobacterium*, *Mucilaginibacter*가 각각 18%, 16%, 10%씩 증가하였다. 이 3종류의 박테리아 속은 모두 *Sphingobacteria* 강에 속한다. 따라서 *Sphingobacteria* 강에 속하는 *Sediminibacterium*, *Sphingobacterium*, *Mucilaginibacter* 이 하수 내에서 조류의 성장과 함께 성장할 수 있는 박테리아 개체라고 본 연구결과 추론하였다.

조류 하수내의 조류 성장과 상호작용을 하는 하수박테리아 개체 규명을 위해서, 하수 박테리아 군집 조성이 다른 일반 하수와 활성슬러지가 주입된 하수에서 조류 성장과 동시에 선별적으로 성장한 박테리아 개체를 파악하였다. 일반하수에 조류를 배양한 AWW의 경우, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Mucilaginibacter*, *Sediminibacterium*, *Sphingobacterium* 속이 증가하였으며, 슬러지가 주입된 하수에 조류를 배양한 AWWS의 경우, *Achromobacter*, *Chimaericella*, *Pedobacter*, *Pusillimonas*, *Sediminibacterium* 속이 조류가 성장함에 따라 증가하였다. 따라서 하수 박테리아군집의 조성이 다른 경우에 조류에 의해서 선별적으로 증가되는 박테리아 개체가 다른 것을 확인할 수 있었다. 그럼에도 불구하고 *Sediminibacterium* 속은 조성이 다른 하수박테리아 생태 환경에서 공통적으로 증

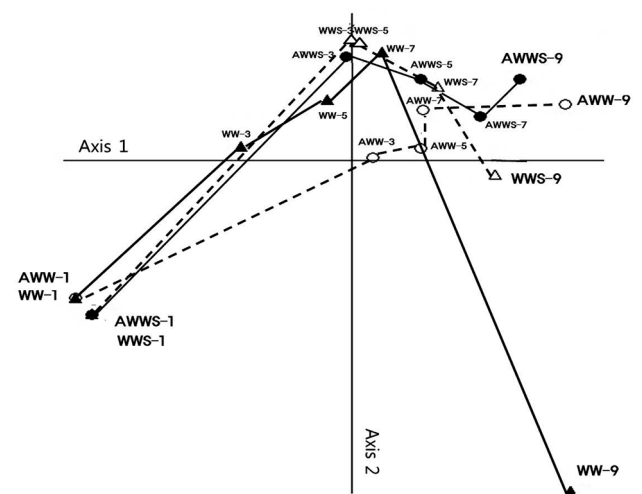


Fig. 7. 16S rRNA T-RFLP and NMS analysis results.
* Note that the second number after '-' beside each symbol is the corresponding sampling time for each reactor

Table 4. Comparison of bacterial community compositions (relative abundance, % of total clones, Genus level)

| Genus level population | AWW | WW | AWWS | WWS |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Achromobacter</i> | 12.0 | 20.0 | 16.0 | 8.2 |
| <i>Alcaligenes</i> | 10.0 | 0.0 | 4.0 | 4.1 |
| <i>Bordetella</i> | 10.0 | 0.0 | 4.0 | 4.1 |
| <i>Chimaericella</i> | 0.0 | 0.0 | 6.0 | 0.0 |
| <i>Curtobacterium</i> | 0.0 | 6.0 | 0.0 | 0.0 |
| <i>Flavobacterium</i> | 0.0 | 8.0 | 0.0 | 0.0 |
| <i>Leucobacter</i> | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 10.2 |
| <i>Mucilagibacter</i> | 10.0 | 0.0 | 12.0 | 14.3 |
| <i>Pedobacter</i> | 6.0 | 6.0 | 10.0 | 2.0 |
| <i>Propionivibrio</i> | 0.0 | 6.0 | 0.0 | 2.0 |
| <i>Pusillimonas</i> | 6.0 | 12.0 | 14.0 | 6.1 |
| <i>Sediminibacterium</i> | 22.0 | 4.0 | 2.0 | 0.0 |
| <i>Sphingobacterium</i> | 16.0 | 0.0 | 24.0 | 26.5 |
| Others | 4.0 | 24.0 | 6.0 | 16.3 |
| Uncultured | 4.0 | 6.0 | 2.0 | 6.1 |
| Total | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

* Others indicate bacterial genera below 5% of portion

가되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 본 연구대상의 조류들이 해당 하수 및 처리장 환경에서 배양될 수 있는지 여부를 판단하는데 *Sediminibacterium* 속에 해당하는 박테리아 개체의 존재 및 성장 여부 활용 가능성을 제시하고 있다.

4. 결론

본 연구는 하수에서 배양한 조류와 박테리아 복합군집에 의한 수질오염물질 제거능력과 생태학적인 상호관계를 파악하여 하수처리 및 바이오에너지 생산에 도입하기 위한 기초 연구 목적으로 수행하였다. 이를 위하여 실제 하수에서 성장이 가능하고 바이오매스에 지질함량이 높다고 알려진 조류 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2 주입 유무에 따른 조류-박테리아 복합군집의 하수 내 용존 유기물질(COD)과 총질소(TN) 제거 거동과 박테리아의 군집의 변화에 대한 반응을 분석하였다. 본 연구의 주요 결과는 다음과 같다.

- 1) 조류는 하수 내 박테리아의 농도가 높을 경우 조류의 성장에 저해 영향을 미쳤으나, 박테리아 군집 전체의 성장 및 생존율은 조류의 성장에 영향을 받지 않았다.
- 2) 하수 내 용존 유기물질과 총질소는 조류의 주입으로 인해 제거율이 향상하는 효과가 있었다.
- 3) 조류 성장이 박테리아 군집의 시간적 변화, 다양성, 군집구조에 미치는 영향을 T-RFLP/NMS와 염기서열 기법을 통해 분석한 결과, 하수 내 조류의 성장은 하수 박테리아 군집 구조에 변화를 주었다.
- 4) 분자생물학적인 분석 결과, 조류의 성장에 따라 함께 성장할 수 있는 하수 내 박테리아는 *Sediminibacterium*에 속하는 것으로 판명되었다.

본 연구에서 사용한 분자생물학적 분석결과로 조류에 의한 박테리아 군집의 변화를 입증하였고, 어떠한 박테리아가 조류와 성장차원에서 협력관계인지를 보이는 방법을 제시하였다. 조류가 주입된 경우 난분해성 유기물질 및 총질소 제거가 향상되었으므로, 조류와 협력적 관계에 있는 박테리아들도 이러한 고도하수처리에 기여를 한 것으로 추측된다. 이러한 생태학적 정보는 특정 조류자원을 활용해서 오폐수를 고도처리하고 자원화에 응용시 중요하게 활용될 수 있을 것이다. 보다 실용적인 연구를 위해서는 본 연구에서 사용한 회분식 반응조 보다는 연속식 반응조에서 실증적인 연구가 추가적으로 필요하고, 다양한 조류자원에 대해서도 추가 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국 연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2009-0081153).

KSEE

참고문헌

1. International Energy Agency Homepage, <http://www.worldenergyoutlook.org>(2007).
2. Hossain, A., Salleh, A., Boyce, A., Chowdhury, P. and Naquiddin, M., "Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, **4**(3), 250~254 (2008).
3. Demirbas, A., "Progress and recent trends in biodiesel fuels," *Energy Conversion and Management*, **50**, 14~34(2009).
4. Chisti, Y., "Biodiesel from microalgae," *Biotechnol. Adv.*, **25**

- (3), 294~306(2007).
5. Aaronason, S. and Dubinsky, Z., "Mass production of microalgae," *Experientia*, **38**, 36~40(1982).
6. Guschina, I. and Harwood, J., "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae," *Prog. Lipid Res.*, **45**, 160~186(2006).
7. Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J. and Ruan, R., "Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp.," *Bioresour. Technol.*, **101**, 2623~2628(2010).
8. Mouget, J., Dakhama, A., Lavoie, M. and Noue, J., "Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **18**(1), 35~43(1995).
9. Munoz, R. and Guieysse, B., "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review," *Water Res.*, **40**(15), 2799~2815(2006).
10. 이장호, 박준홍, "실제 하수조건에서 고지질 함량 조류자원의 생체생성과 하수처리 특성 분석," *대한환경공학회지*, **32**(4), 333~340(2010).
11. 이장호, "실제 하수에 적응한 조류-세균 복합군집의 영양염류 제거, 조류지질 생산과 미생물상호작용에 관한 연구," 연세대학교 대학원 석사학위논문(2009).
12. Fuhrman, J. A., Horrigan, S. G. and Capone, D. G., "Use of ^{13}N as tracer for bacterial and algal uptake of ammonium from seawater," *Mar. Ecol. Prog.*, **45**(3), 271~278(1988).
13. Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. and Lan, C., "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*," *Biotechnol. Products Proc. Eng.*, **81**, 629~636(2008).
14. Sartory, D. and Grobbelaar, J., "Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis," *Hydrobiol.*, **114**(3), 177~187(1984).
15. Eisele, R. and Ullrich, W. R., "Effect of Glucose and CO_2 on Nitrate Uptake and Coupled OH Flux in *Ankistrodesmus braunii*," *Plant Physiol.*, **59**, 18~21(1977).
16. Hao, Z., Wang, Q., Zhang, X., Cao, Y. and Mark Loosdrecht, C., "Experimental evaluation of decrease in bacterial activity due to cell death and activity decay in activated sludge," *Water Res.*, **43**, 3604~3612(2009).
17. Suzuki, M. and Giovannoni, S., "Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, 625~630 (1996).
18. Harms, G., Layton, A., Dionisi, H., Garrett, V., Hawakins, S., Robinson, K. and Sayler, G., "Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant," *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 343~351(2003).
19. Takai, K. and Horikoshi, K., "Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes," *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(11), 5066~5072(2000).