

차세대염기서열분석을 이용한 서울시 2개 하수처리장의 A₂O공정 미생물 군집 특성

(Characteristics of microbial community of A₂O process in two wastewater treatment plants in Seoul by next generation sequencing analysis)

한지선 · 최연규 · 최병도 · 장신요 · 차영섭 · 김복순
서울물연구원(Seoul Water Institute)

INTRODUCTION

· 최근 염기서열분석기술이 발전함에 따라 하수처리공정의 미생물군집분석에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있음
· 차세대염기서열분석(Next Generation Sequencer)은 기존의 배양 및 클로닝 등에 의존한 sanger 방식의 염기서열분석 방법과 달리 시료 내의 전체 미생물 유전자의 병렬 데이터 생산이 가능한 방법으로써 전체 군집의 특성을 확인할 수 있는 유용한 기술임
· 본 연구에서는 solid-phase amplification 방식(illumina)을 사용하여 환경시료 중 미생물 군집 분석을 실시

· 미생물 군집 분석기술의 발달로 환경 생태계 및 하수처리장과 같은 생물학적 공정 등의 메타지놈(Metagenome) 분석이 활발해지고 있어 생태계를 구성하고 있는 미생물 군집 분석이 가능해짐에 따라 차세대염기서열분석은 환경/공정의 생물학적 반응을 판단하는 주요 도구로 사용되고 있음
· 본 연구에서는 서울시의 J와 N 2개 하수처리장에서 하수처리를 위해 운영하고 있는 A₂O(anaerobic/anoxic/oxic) 공정의 미생물 특성을 파악하여 주요 미생물 종을 확인하고 비교함

· A₂O공정은 질소와 인을 동시에 제거할 수 있는 공정으로서 혐기조(Anaerobic), 무산소조(Anoxic), 호기조(Oxic)를 순서대로 거치고 내부반응을 통하여 혐기조에서는 인의 방출, 무산소조에서는 탈질, 호기조에서는 질산화와 인의 과잉섭취를 유도함
· 수처리 반응의 모든 과정에 해당 역할을 하는 미생물이 주된 역할을 하므로 이러한 생물학적 수처리 공정에서 실제 관여하고 있는 미생물 종과 분포를 확인할 필요가 있었음

METHODS

○ 연구대상 및 지점

- 대상시설 : 서울시관할 J 하수처리장 및 N 하수처리장의 A₂O공정
- 채수시기 : '18년 7월
- 채수시료 : 유입하수, 반응조(호기조, 무산소조, 혐기조) 별 활성슬러지 및 유출수 각각 1 L



Fig. 1. 서울시 하수처리장 위치 및 처리범위

Table 1. 대상 하수처리장 일반운영사항

| 구분 | J 하수처리장 | N 하수처리장 |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|
| 위치 Location | 서울특별시 성동구 | 경기도 고양시 |
| 처리방법 Treatment process | A ₂ O공법 (표준활성슬러지 및 MLE공법 병행) | A ₂ O공법 |
| 시설용량 Capacity (m ³ /d) | 2처리장 46만m ³ /d | 1.2 처리장 69만m ³ /d |
| HRT (h) | 7.2 | 6.8 |
| SRT (d) | 12.2 | 7 |
| Influent/effluent BOD (mg/L) | 151.0/56 | 125.7/43 |
| Influent/effluent SS (mg/L) | 95.3/38 | 77.9/28 |
| Influent/effluent TN (mg/L) | 36.5/13.4 | 29.9/14.4 |
| Influent/effluent TP (mg/L) | 3.5/0.2 | 3.1/0.2 |

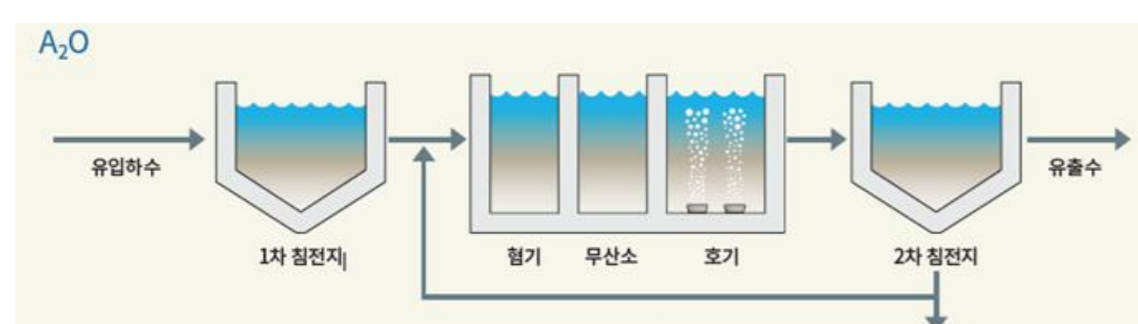


Fig. 2. A₂O 공정 개략도

○ 수질분석방법

- 현장분석 : 수온(°C), 전기전도도(mS/cm), DO(mg/L), pH 및 ORP(mV) 측정 Multiparameter (YSI 556MPS, USA)
- 실험실분석 : 각 공정의 유입수와 유출수에 대한 NO₃-N, NO₂-N, NH₃-N, PO₄-P 분석 Ion chromatography(Dionex ICS-5000, USA)

○ 미생물 군집 분석방법

- 전처리(농축) : 1 L를 3000xg에서 15분 원심분리 상등액 제거 후 10 mL TE buffer에 부유
- 유전자 추출 : 전처리 한 시료 각 1 mL씩 취하여 FastDNA™ SPIN kit for soil(MP, USA)
- 차세대염기서열분석 : 16S V3-4 region(2 x 250 bp)의 염기서열을 기반으로 Miseq(Illumina, USA) 및 CLcommunity 프로그램(Chunlab, Korea) 이용



Fig. 3. 군집분석 방법의 과정

RESULTS AND DISCUSSION

○ 수질분석결과

- J와 N 하수처리장의 유입 NH₃-N의 농도는 각각 26~28 mg/L였으며 제거율은 99~100 %였음. 그러나 공정 중에서 제거된 암모니아는 질산화되고 탈질되어 제거 되었으나 J는 약 7 mg/L, N은 11 ~ 12 mg/L의 NO₃-N이 잔류. 따라서 총질소의 제거율은 그림 4(우)와 같이 J의 경우 74%, N의 경우 2개 라인 모두 57%였음
- 유입 PO₄-P는 2.2~2.3 mg/L였으며, 생물학적 제거 및 화학적 응집제(PAC)의 투입으로 모두 제거

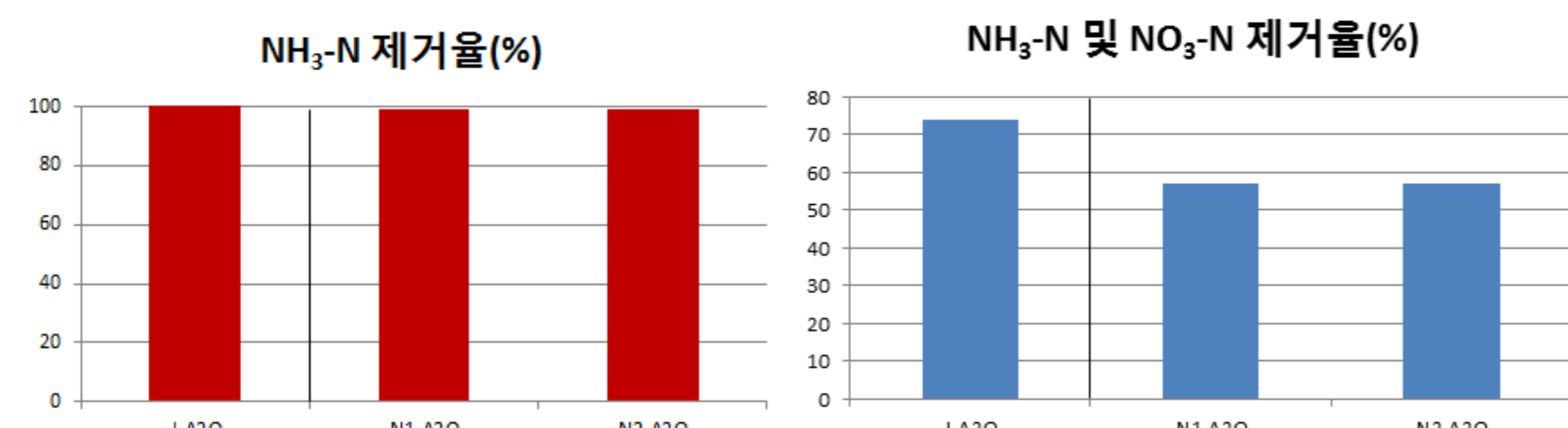


Fig. 4. J 및 N 하수처리장의 A₂O 공정의 암모니아성 질소 제거율(좌) 및 총질소(암모니아성 질소 및 생성된 질산성 질소)의 제거율(우)

○ 군집분석결과

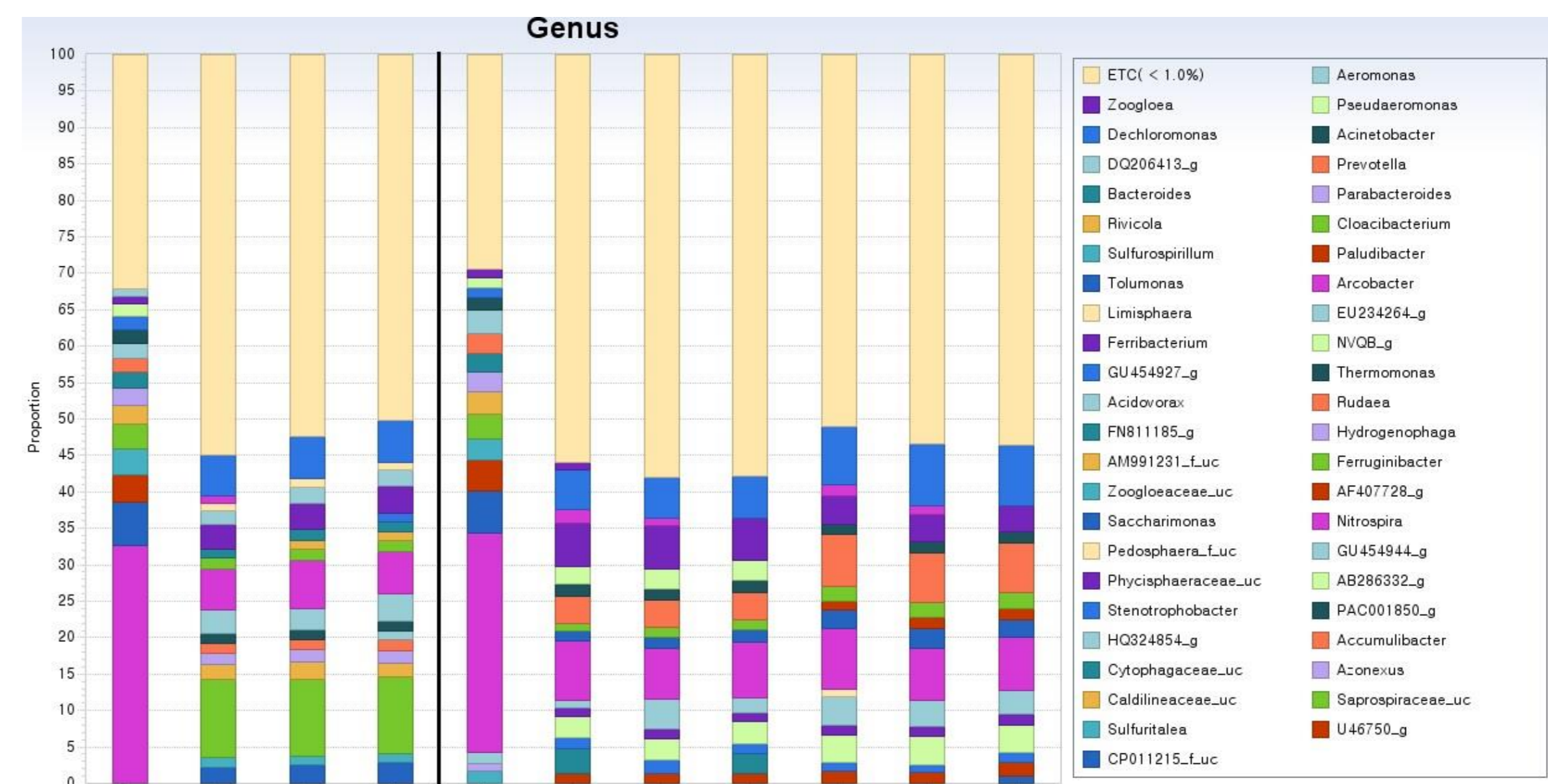


Fig. 5. J 및 N 하수처리장의 A₂O공정 군집구성 비교 (AN-혐기조, AO-무산소조, OX-호기조)

- N 하수처리장은 유입하수 중 1 % 이상 세균(속)이 동일시기 J 하수처리장과 약 82 %일치(14/17)하고, 구성비의 순서도 서로 유사하였음(두 곳 모두 병원균인 *Arcobacter*가 30 % 이상으로 우점)
- 두 하수처리장의 공정의 공통 미생물(1% 이상)은 *Nitrospira*, *Dechloromonas*, *Ferriferobacter*, *Ferruginibacter*였으며, J에서 가장 우점한 미생물은 유기물 분해에 관여하는 *Saprospiraceae*(10 %), 질산화균인 *Nitrospira*(6 %), 탈질 및 인제거에 관여하는 *Dechloromonas*(6 %) 순서였으나, N의 경우 최우점미생물은 질산화균인 *Nitrospira*(8 %) 및 탈질과 인제거에 관여하는 *Dechloromonas*(8 %)로 질소제거관련 미생물이 더 우점하고 있었음
- 두 지점을 서로 비교할 때 1 % 이상을 차지하는 공정내 미생물 중 J에 특이적으로 존재하는 세균은 *Saprospiraceae*(유기물분해), *Caldilineaceae*(인제거), *Azonexus*(탈질), *Sulfuritalea*(황산화·탈질), *Limishaera*(유기물분해)이었고, N의 특이 세균은 *Stenotrophobacter*(유기물분해), *Saccharimonas*(유기물발효), *Rudaea*(셀룰로오스분해) 및 *Thermomonas*(탈질)로 확인할 수 있었음

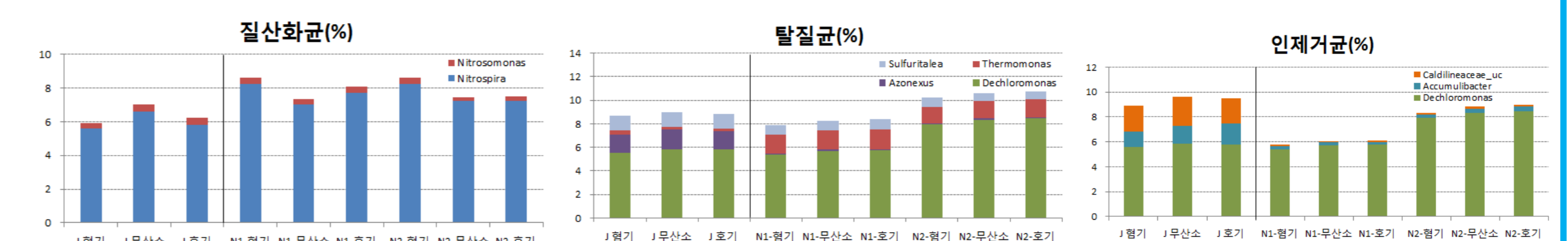


Fig. 6. J 및 N 하수처리장의 A₂O공정별 질산화균(좌), 탈질균(중), 인제거균(우) 구성비

- 질소와 인 제거 미생물을 살펴보면(그림 6), 질산화균의 경우 주요종은 *Nitrospira*로 일치하였으나, 구성비는 J(6 %)보다 N(8 %)가 더 컸음
- 탈질균의 경우 제 1 우점종은 *Dechloromonas*로 일치, 그러나 제 2 우점종은 중량은 *Azonexus*, 난지는 *Thermomonas*로 차이가 있어 탈질 효과와 연관된 것으로 추정됨
- 인제거균은 제 1 우점종은 탈질균이기도 한 *Dechloromonas*로 같으나, J는 N에 비해 인제거 주요종인 *Accumulibacter* 및 *Caldilineaceae*가 다양하게 분포, N의 경우 1처리장과 2처리장의 탈질 및 인제거를 담당하는 *Dechloromonas*가 1처리장에 비해 2처리장에 약 2% 가량 더 높게 존재함

○ 군집분석결과와 다양성

- 중량과 난지의 공정을 이루는 미생물 군집의 계통학적 다양성의 차이를 통계적 방법(Alpha-diversity, Diversity index, Phylogenetic diversity)으로 비교하였을 때 결과는 그림 7 및 8과 같음

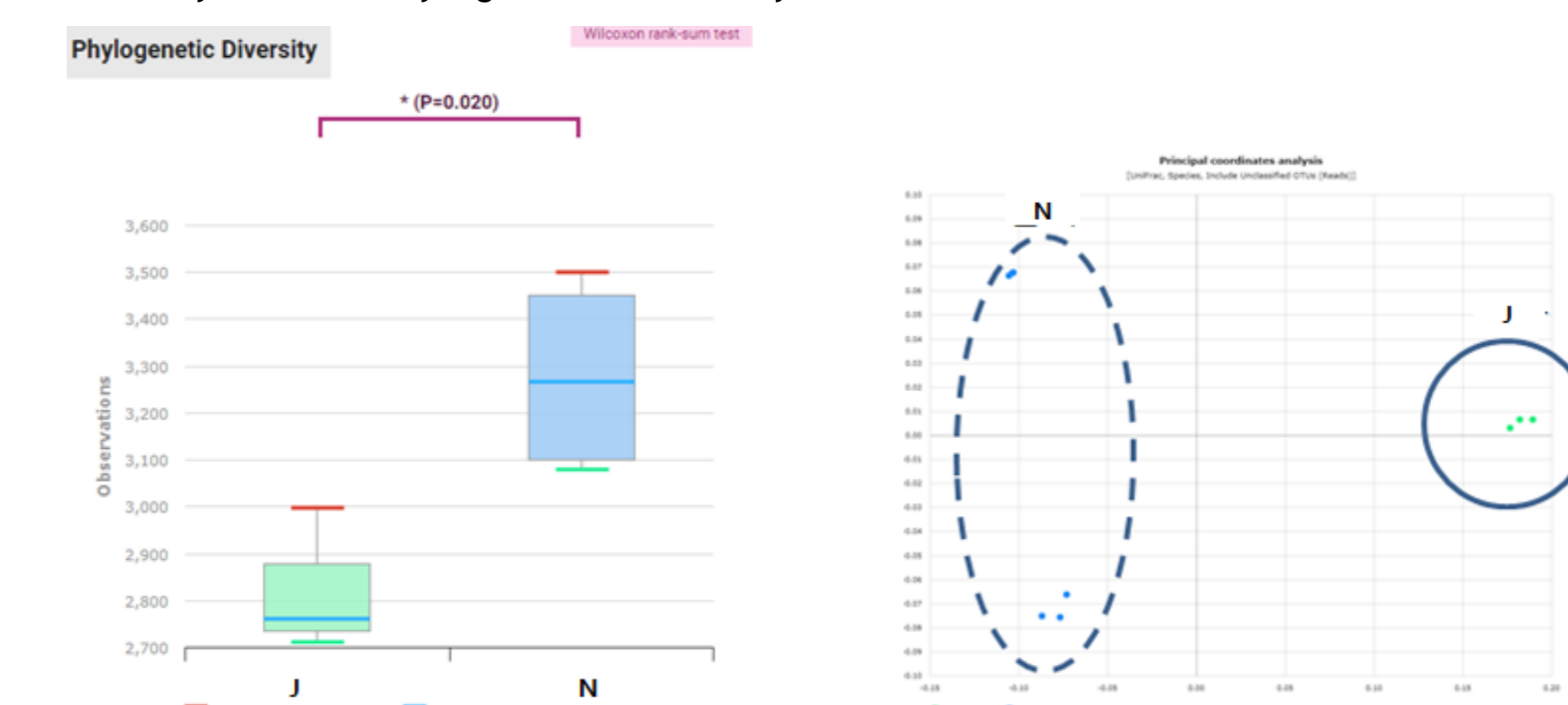


Fig. 7. 두 하수처리장(J, N) A₂O공정 미생물 계통학적 다양성 차이 Alpha-diversity, Shannon(p=0.020)

Fig. 8. 두 하수처리장(J, N) A₂O공정 미생물 군집 PCA 분석(PERMANOVA, p=0.012)

- 통계적 분석결과 J와 N의 미생물 군집은 통계학적으로 서로 다른 계통학적 다양성을 가진다고 판단 됨(p<0.05)
- 또한 PCA(Principal Components Analysis)분석을 통해서 동일하게 확인 가능하였음

CONCLUSIONS

- 1) 미생물 군집분석결과, N 하수처리장 유입하수 중 1 % 이상 세균(속)이 J 하수처리장과 약 82 %일치(14/17)하고 모두 *Arcobacter*가 30 % 이상으로 우점하고 있어 유사한 경향
- 2) 두 개의 A₂O공정의 공통 미생물(1% 이상 속)은 4속에 불과하고 최우점군도 서로 달라 통계학적으로 서로 다른 군집을 가지고 있었음, 그러나 질소 및 인제거와 관련한 우점군은 유사하였음
- 3) 차세대염기서열분석을 통해 두 공정의 미생물군집을 정확하게 파악 할 수 있어 향후 공정 운영을 위한 모니터링에 사용할 수 있는 미생물 정보를 확보할 수 있었음

REFERENCES

1. Cyzdik-Kwiatkowska, A. and Zielin'ska, M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems, World J Microbiol Biotechnol, pp. 32-66.
2. Tian, M. et al. (2015). The first metagenome of activated sludge from full-scale anaerobic/anoxic/oxic(A2O) nitrogen and phosphorus removal reactor using Illumina sequencing. J Environ Sciences, 35, pp. 181-190.