아산화질소 환원 세균 컨소시움의 특성

박형주, 권지현, 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Received: August 13, 2019 / Revised: September 11, 2019 / Accepted: October 8, 2019

Characterization of a Nitrous Oxide-reducing Bacterial Consortium

Hyung-Joo Park, Ji-Hyeon Kwon, and Kyung-Suk Cho*

Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

Nitrous oxide (N_2O) is a greenhouse gas with a global warming potential 310 times higher than that of carbon dioxide. In this study, an N_2O -reducing consortium was obtained by enrichment culture using advanced treatment sludge as the inoculum. The dominant bacteria in the consortium were *Sulfurovum* (17.95%), *Geobacter* (14.63%), *Rectinema* (11.45%), and *Chlorobium* (8.24%). The consortium displayed optimal N_2O reducing activity when acetate was supplied as the carbon source at a carbon/nitrogen ratio ($mol \cdot mol^{-1}$) of 6.3. The N_2O reduction rate increased with increasing N_2O concentration at less than 3,000 ppm. Kinetic analysis revealed that the maximum N_2O reduction rate of the consortium was $163.9 \mu g \cdot N \cdot g \cdot VSS^{-1} \cdot h^{-1}$. Genes present in the consortium included *nosZ* (reduction of nitrous oxide to N_2), *narG* (reduction of nitrate to nitrite), *nirK* (reduction of nitrite to nitric oxide), and *norB* (reduction of nitric oxide to nitrous oxide). These results indicate that the N_2O -reducing consortium is a promising bioresource that can be used in denitrification and N_2O mitigation.

Keywords: Nitrous oxide, denitrification, enrichment culture, consortium, functional gene, greenhouse gas

서론

아산화질소(nitrous oxide, N_2O)는 지구온난화 잠재력(global warming potential)이 이산화탄소보다 약 310배인 온실가스로 성층권 오존층을 파괴한다[1, 2]. 아산화질소는 질산화 및 탈질 반응과 같은 생물학적 질소 순환 과정에서 배출된다[3–8]. 질소비료를 많이 사용하는 농업분야와 생물학적 고도처리 분야는 아산화질소의 주요 인위적 발생원으로, 향후 배출량이 지속적으로 증가할 것으로 예측되고 있다[5, 6]. 따라서, 이들 발생원에서의 아산화질소 배출 저감을 위한 다각적인 측면의 노력이 필요하다[7–15].

주요 아산화질소 배출원인 탈질공정을 개선하여 아산화질소 배출량을 최소화하고자 하는 연구가 진행되고 있다[8]. 아산화질소 배출 저감의 여러 가지 전략으로 pH, 용존 산소

(DO) 농도의 조절 및 새로운 운영체제의 도입과, 폐수 내 질소 제거를 위해 생물반응기에 탈질 세균을 접종하는 연구도 시도되어왔다[9–13]. 아산화질소를 직접적으로 제거하기 위해 아산화질소 환원효소(*nosZ* gene)를 이용하여 아산화질소를 질소로 환원할 수 있는 미생물(*Pseudomonas* sp., *Thauera* sp. 및 *Paracoccus* sp. 등)을 활용하여 배출된 아산화질소를 질소로 환원시켜 처리할 수 있다[14, 15]. 이를 위해 아산화질소 환원 미생물 컨소시움을 확보하거나, 아산화질소 환원 균주를 분리해내는 연구가 진행되었지만[14, 15], 신규 아산화질소 환원 미생물 자원 확보에 대한 필요성이 지속적으로 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 고도 처리 슬러지를 접종원으로 농화배양을 수행하여 아산화질소를 환원할 수 있는 세균 컨소시움을 확보하였다. Illumina Miseq 염기서열 분석법을 통해 본 컨소시움의 세균 군집 특성을 조사하였다. 아산화질소 환원속도와 관련 기능성 유전자 거동에 미치는 아산화질소 농도, 탄소원 종류 및 C/N 비의 영향 평가를 통해 아산화질소 환원을 위한 최적조건을 도출하였다.

*Corresponding author

Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

재료 및 방법

접종원 및 농화배양

아산화질소 환원 미생물의 농화배양을 위한 접종원으로 중앙 물 재생 센터(서울 특별시)에서 채취한 고도 처리 슬러지를 사용하였다. 생물학적 질소 제거 공법인 MLB 공정에서 배출되는 잉여슬러지를 채취 하였다. 채취한 슬러지를 11,000 ×g로 10분동안 원심분리 하여 회수한 침전물을 인공폐수에 현탁하여 최종 농도 3,000 mg-MLVSS ·l⁻¹가 되도록 하였다.

인공 폐수의 성분은 KH₂PO₄ 169.7 mg ·l⁻¹, MgSO₄ ·7H₂O 751.1 mg ·l⁻¹, CaCl₂ ·2H₂O 451.6 mg ·l⁻¹, EDTA 5.0 mg ·l⁻¹, FeSO₄ ·7H₂O 5.0 mg ·l⁻¹, Trace element 용액 1 ml ·l⁻¹이다. Trace element 용액의 성분은 ZnSO₄ ·7H₂O 0.43 mg ·l⁻¹, CoCl₂ ·6H₂O 0.24 mg ·l⁻¹, MnCl₂ ·4H₂O 0.99 mg ·l⁻¹, CuSO₄ ·5H₂O 0.25 mg ·l⁻¹, Na₂MoO₄ ·2H₂O 0.22 mg ·l⁻¹, NiCl₂ ·6H₂O 0.19 mg ·l⁻¹, Na₂SeO₄ 0.21 mg ·l⁻¹이었다[16]. Traces element 용액은 1000배 높은 농도로 제조한 후 인공 폐수에 1 ml ·l⁻¹ 만큼 주입하였다. 탄소원으로 포도당(C₆H₁₂O₆) 0.09 g ·l⁻¹ (100 mg-COD ·l⁻¹)와 아세트산(CH₃COONa ·3H₂O) 0.21 g ·l⁻¹ (100 mg-COD ·l⁻¹)을 각각 100배 높은 농도로 농축 제조한 후, 인공폐수에 주입하였다.

슬러지 현탁액 200 ml를 1.2 L 혈청병(serum bottle)에 담은 후 혐기적인 환경을 조성하기 위해 고순도 질소 가스로 3분간 치환하였고, 입구를 부틸고무마개로 밀봉하였다. 탄소원 농축액을 최종 농도 200 mg-COD ·l⁻¹ (포도당 100 mg-COD ·l⁻¹, 아세트산 100 mg-COD ·l⁻¹)가 되도록 일회용 주사기로 첨가하였다. 아산화질소(99%, 동아산업가스, Korea)는 Gas-tight syringe를 이용해 최종 농도가 200 ppm_(v/v)이 되도록 주입하였다. 73일간 30℃에서 120 rpm으로 교반배양(VS-8480SR, Vision Scientific Co., Korea)을 실시하였다. 혈청병 내의 상부 가스를 주기적으로 분석하여 아산화질소 농도가 검출한계 미만(5 ppm)으로 확인되면 동일 농도의 아산화질소 가스를 배양액에 주입하였다. 배양액의 아산화질소가 5회 이상 완전히 고갈되는 것을 확인하였을 때, 농화배양액을 새로운 인공폐수 배지에 계대배양 하였다(농화배양액:인공폐수 = 2:8, v/v). 10차 계대배양을 통해 최종 아산화질소 환원 컨소시움을 확보하였다.

아산화질소 환원 컨소시움의 세균 군집 분석

접종원인 슬러지와 아산화질소 환원 컨소시움의 세균 군집 분석을 위해, 각각의 시료 3 ml씩 채취하였다. 원심분리(11,000 ×g, 1분)를 통해 회수한 바이오매스로부터 NucleoSpin® DNA soil kit (Macherey-Nagel GmbH, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

Miseq 분석은 16S 박테리아 DNA 유전자에 대한 V4

region을 대상으로 하였다. Multiplex PCR에 사용된 primer는 515F (5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GC CGC GCG TAA-3') 및 806R (5'-GTC TCG TGG GCT CGC AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACG VGG GTW TCT AAT-3') [17]. PCR 조건은 95℃에서 3분간의 initial denaturation, 95℃에서 30초 동안 denaturation, 30초 동안 55℃에서 annealing, 30초 동안 72℃ extension, 5분 동안 72℃에서 final extension으로 설정하였다. PCR 산물은 HiYield Gel/PCR DNA Kit (Real Biotech Corporation, Taiwan)을 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 98℃에서 3분간의 initial denaturation, 30초 동안 97℃에서 denaturation, 30초 동안 52℃에서 annealing 30초 동안 72℃에서 extension, 5분 동안 72℃에서 final extension의 조건으로 index PCR을 수행하였다.

PCR 산물은 2% low-melting agarose gel에 loading하여 타겟 DNA 밴드가 포함된 agarose gel을 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands)로 당사 매뉴얼에 따라 정제한 후, Illumina Miseq 염기서열 분석을 수행하였다(Macrogen, Korea). 염기서열 분석 결과는 NCBI Gene Bank에 등록하였다(SRP194148).

세균 컨소시움의 아산화질소 환원 특성

본 연구에서 확보한 세균 컨소시움의 아산화질소 제거 속도에 영향을 미치는 탄소원 종류, COD/N₂O-N 몰 비율(C/N molar ratio), 아산화질소의 농도의 영향을 관찰하였다. 조건별 아산화질소 환원 평가는 600 ml 혈청병 내 슬러지 현탁액 100 ml를 접종한 뒤 질소 가스로 치환하여 진행하였다. 탄소원 종류는 포도당과 아세트산의 혼합액(COD 농도 기준 1:1). 아세트산, 프로피온산, 포도당, 에탄올 및 메탄올이었고, 주입 농도는 200 mg-COD ·l⁻¹가 되도록 하였다. 이때 아산화질소의 주입량은 1000 ppm으로 하였다. C/N ratio는 아산화질소 농도를 1000 ppm으로 고정한 조건에서 탄소원(포도당과 아세트산의 혼합액)의 첨가량을 조절하여 C/N 3.1, 4.9, 6.3, 9.4, 12.5의 5가지 조건을 수행하였다. 초기 아산화질소 주입 농도는 400, 800, 1000, 2000 및 3000 ppm의 5가지 조건에서 탄소원은 포도당과 아세트산 혼합액을 200 mg-COD ·l⁻¹ 첨가하여 평가를 실시하였다.

모든 조건에서 배양조건은 30℃, 120 rpm에서 교반하였으며, 주기적으로 혈청병 상부 가스를 채취하여 아산화질소 농도를 분석하였다. 가스상 아산화질소 농도(ppm)를 이용하여 용존 아산화질소 농도를 구하기 위해 헨리상수(H)를 이용하여 계산하였다(식 (1)). 본 실험은 3회 반복하였다.

$$C_{aq, N_2O} = C_{g, N_2O} \cdot H \cdot RT \quad (1)$$

C_{aq,N_2O} 는 용존 아산화질소의 농도를, C_{g,N_2O} 는 가스 상의 아산화질소 농도를 의미한다. R은 기체상수, T는 온도(K)를 의미한다. 식 (1)을 통해 얻어낸 용존 아산화질소 농도는 측정된 가스 상의 아산화질소 농도와 합산하여 최종 아산화질소 농도를 계산하였다.

기질로서 사용된 아산화질소 농도(S)별로 계산한 아산화질소 환원속도를 아래의 Michaelis-Menten 식(식 (2))을 이용하여 최대반응속도 V_{max} 와 포화상수 K_m 값을 구하였다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

탈질 관련 기능성 유전자 정량분석

세균 컨소시움의 아산화질소 환원에 미치는 조업인자 영향을 실험이 완료된 시점(아산화질소 농도가 5 ppm으로 감소)에서, 각각의 조건에서 탈질관련 기능성유전자의 정량분석을 real-time quantitative PCR (qPCR) 방법으로 수행하였다. 분석된 기능성 유전자는 nitrate, nitrite, nitric oxide 및 nitrous oxide의 환원에 관여하는 *narG*, *nirK*, *norB*, *nosZ*의 4가지 유전자이다. 또한, 각 배양액의 16S rDNA 양도 분석했다. 각 조건의 배양액 3 ml로부터 회수한 바이오매스로부터 DNA soil kit를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출 DNA 시료는 실험 사용 전까지 -25℃에 보관하였다. 각 기능성 유전자 분석에 사용한 primer는 *narG*-F (TCG CCS ATY CCG GCS ATG TC), *narG*-R (GAG TTG TAC CAG TCR GCS GAY TCS G) [18, 19], *nirK*876F (ATY GGC GGV CAY GGC GA), *nirK*1040R (GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT) [20], *norB*1-F (CGN GAR TTY CTS GAR CAR CC), *norB*6-R (TGC AKS ARR CCC CAB ACB CC) [21], *nosZ*2F (CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT), *nosZ*2R (CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA) [20]이다. 16S rDNA 분석을 위해 사용한 primer는 340F (TCC TAC GGG AGG CAG CAG)와 805R (GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC)이다[17]. Table 1에 16S와 각 기능성 유전자 정량분석을 위한 qPCR 조건을 정리하였다. DNA 농도

(ng·μl⁻¹)는 SpectraMax® QuickDrop™ Micro-Volume Spectrophotometer (Molecular Devices, USA)을 이용해 측정하였다. 각 유전자의 copy number는 각 유전자의 cycle threshold의 평균값을 최종적으로 DNA 농도로 환산한 후 log 값으로 표기하였다.

기기분석 및 통계분석 방법

아산화질소 농도는 전자포획검출기(μECD)가 장착된 가스 크로마토그래피(7890B, Agilent, USA)를 사용하여 분석하였다. 이 때 사용한 column은 HP-PLOT Q (직경 530.0 μm, 길이 30.0 m, 두께 40.0 μm, Agilent, USA)이다. 분석 method는 oven 온도 50℃, 주입구 온도 230℃, 검출기 온도 250℃, make-up gas (N₂) 유량 60 ml·min⁻¹, split ratio 5:1로 설정하였다.

아산화질소 환원속도와 qPCR 결과값의 유의차 분석은 Excel 프로그램(2016, Microsoft Co., USA)에서 제공한 ANOVA 분석방법을 이용하였다.

결과 및 고찰

아산화질소 환원 컨소시움의 농화배양 및 세균 군집 구조 특성

고도 처리 슬러지를 접종 후 배양 3일내에 아산화질소는 완전히 분해되었는데(결과 미제시), 이는 접종원으로 사용된 슬러지에 아산화질소 환원세균이 어느 정도 수준 이상 존재함을 시사한다. 계대배양을 거듭할수록 농화배양액의 색은 짙은 녹색으로 변화되었다.

접종원과 세균 컨소시움의 세균 군집 분석 결과를 Table 2와 Fig. 1에 정리하였다. 농화배양액의 OTUs 측정값은 control(접종원, 439 OTU) 대비 약 1/3로(158 OTU) 감소하였다. 종 풍부도를 나타내는 지표인 Chao 1과 Shannon index 값도 접종원에 비해 농화배양액에서 감소하였다(Table 2). 또한, 종 균등도를 나타내는 지표인 Simpson 값도 접종원에 비해 농화배양액에서 감소하였다(Table 2). 이렇게 종의 양이 감소하는 이유는 계대배양을 진행함에 따라 배양액

Table 1. Conditions of real-time quantitative PCR for 16S and functional genes.

Gene	Bacterial 16S rDNA		<i>narG</i>		<i>nirK</i>		<i>norB</i>		<i>nosZ</i>	
qPCR cycle	Temp.	Time	Temp.	Time	Temp.	Time	Temp.	Time	Temp.	Time
Initial denaturation	95 °C	3 min	95 °C	5 min	94 °C	5 min	95 °C	5 min	94 °C	5 min
Denaturation	95 °C	15 sec	95 °C	30 sec	94 °C	30 sec	95 °C	30 sec	94 °C	30 sec
Annealing	50 °C	30 sec	63 °C	30 sec	50 °C	30 sec	58 °C	30 sec	65 °C	30 sec
Extension	72 °C	30 sec	72 °C	60 sec	72 °C	60 sec	72 °C	60 sec	72 °C	60 sec
Final extension	82 °C	30 sec	82 °C	30 sec	82 °C	30 sec	82 °C	30 sec	82 °C	30 sec
Reference	[17]		[18, 19]		[20]		[21]		[20]	

Table 2. The OTUs and alpha-diversity indices of the bacterial community in the inoculum and consortium.

Sample name	No. of Reads ^a	No. of representative sequences ^b	No. of OTUs	Chao 1 ^c	Shannon ^d	Simpson ^e	Goods coverage ^f
Inoculum	474,225	1,039	439	495.63	6.48	0.98	1.00
N ₂ O-reducing consortium	475,737	1,039	158	189.80	4.73	0.92	1.00

^a No. of reads is the number of sequences after trimming.

^b No. of representative sequences is the number of sequences after alignment and chimeric sequences removal

^c Chao 1 is the index used to evaluate the bacterial population richness itself.

^d Shannon is the index used to evaluate the diversity within the bacterial population.

^e Simpson is the index of the probability that two randomly selected individuals in a habitat will belong to the same species.

^f Goods coverage is calculated as $C=1-(s/n)$, where s is the number of unique OTUs and n is the number of individuals in the sample. The index gives a relative measure of how well the sample represents the large environment.

의 종 다양성이 감소하고 아산화질소 환원세균이 우점화 되었기 때문이다.

접종원과 세균 컨소시움 군집의 문(Phylum)과 속(Genus) 수준에서 우점종 분포를 Fig. 1에 도시하였다. 점유율이 1% 미만인 것은 others로 분류하였다. 문 수준에서 접종원 내 균

주의 점유율은 *Proteobacteria* (24.37%), *Bacteroidetes* (13.10%), *Acidobacteria* (5.4%)인 반면, 아산화질소 환원 컨소시움의 문 수준 우점세균은 *Proteobacteria* (38.94%), *Spirochaetes* (11.45%), *Chlorobi* (8.24%) 순으로 확인되었다(Fig. 1A). 이 군집을 속 수준에서 비교해보면(Fig 1B), 접

Fig. 1. Comparison of the relative abundance of total bacterial genera and phyla in the control (inoculum) and enrichment culture. (A) phyla, (B) genera.

종원에서 우점세균은 *Puia* (5.72%), *Simplicispira* (5.55%), *Phaeodactylibacter* (3.98%), *Luteimonas* (3.47%), *Paracoccus* (3.45%) 이었다. 그러나 아산화질소 환원 컨소시움의 우점세균은 *Sulfurovum* (17.95%), *Geobacter* (14.63%), *Rectinema* (11.45%), *Chlorobium* (8.24%), *Moorella* (6.48%)이었다. 접종원의 우점세균들은 아산화질소 환원 컨소시움에서 전체 세균의 0.03% 미만으로 감소하였다.

*Sulfurovum*는 티오황산염 산화와 동시에 질산염을 환원시키는 chemolithoautotrophic 균주로 알려져 있다[22]. *Geobacter*는 *Sulfurovum*과 마찬가지로 질산염을 환원시키는 균주로 보고된 바 있다[23]. *Rectinema*와 질소화합물과의 직접적인 관계를 입증한 연구는 현재까지 확인되지 않았다. *Chlorobium*은 독립영양 미생물로서 질소고정을 수행하는 균주로 확인되었으며[24], *Moorella*는 아질산염을 전자수용체로 이용한다고 보고되었다[25]. 향후 이들 우점균주를 순수 분리한 후 아산화질소 환원활성을 평가하는 연구가 필요하다.

아산화질소 환원에 미치는 아산화질소 농도 영향

본 연구에서 확보한 컨소시움의 아산화질소 환원활성에 영향을 미치는 아산화질소 주입 농도의 영향을 Fig. 2에 도시하였다. 본 컨소시움은 3,000 ppm의 고농도 아산화질소를 지연기 없이 환원할 수 있었다(Fig. 2A). 컨소시움의 아산화질소 환원 속도는 아산화질소 농도가 높아질수록 증가하였다(Fig. 2B). 이 결과를 통해 본 연구에서 확보한 컨소시움은 3000 ppm의 고농도 아산화질소를 저해없이 환원할 수 있다는 것을 시사한다. Michaelis-Menten 식(식 2)을 이용하여 계산한 최대 아산화질소 환원속도(V_{max})는 $163.9 \mu\text{g-N g-VSS}^{-1} \text{h}^{-1}$, 포화상수(K_m)는 1.01 mM이었다(Fig. 2C).

Okereke [26]의 연구결과에 따르면, *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*와 *Pseudomonas perfectomarinus*의 경우 최종전자수용체로 공급된 아산화질소의 농도가 높을수록 균의 성장속도가 증가한다는 사실을 입증하였다. 위 연구에서는 균주의 성장을 확인하기 위해 배양액을 640 nm에서 흡광도 측정을 주기적으로 수행하였지만, 본 연구에서는 배양액 내의 균주가 시간에 따라 응집되는 현상으로 인하여 흡광도 측정이 불가능하였다. 또한, Okereke [26]은 아산화질소 환원 균주에서 아산화질소 환원효소가 발현되는 정도는 배양액의 환경을 이루고 있는 산소농도에 따라 달라질 수 있다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 아산화질소를 공급하기 전 질소가스로 배양기 내부를 치환하였지만 용존 산소까지 완전히 제거되었는지 확인하지 않았다. 따라서 향후 컨소시움을 이용하여 산소농도에 따른 아산화질소 환원능력을 평가하는 연구가 수행될 필요가 있다. 또한, 컨소시움 내에서 아산화질소 환원을 활발히 수행하는 균주를 분

Fig. 2. Effect of N₂O concentration on N₂O-reducing rate of the consortium. (A) Time profiles of N₂O concentrations at different N₂O concentrations; (B) N₂O reduction rates at different N₂O concentrations; (C) Kinetic analysis of N₂O reduction rate.

리한다면 효과적인 아산화질소 배출저감에 기여할 수 있을 것이다.

아산화질소 환원에 미치는 탄소원 영향

아산화질소 환원에 영향을 미치는 주된 요인 중 하나는 미생물 대사경로에서 전자공여체로 작용하는 탄소원이다[27].

컨소시움의 아산화질소 환원에 미치는 다양한 탄소원의 영향을 평가한 결과는 Fig. 3에 나타났다. 6가지 탄소원 중에서 아세트산, 프로피온산, 에탄올 및 포도당과 아세트산 혼합액의 경우, 지연기 없이 아산화질소가 제거되었으나, 포도당과 메탄올은 각각 22시간과 60시간의 지연기 후에 아산화질소 제거가 관찰되었다(Fig. 3A). 40시간 이내 아산화질소 환원이 확인된 4종의 탄소원 공급 조건에서 컨소시움의 아산화질소 환원속도를 상대 비교한 결과, 아세트산과 에탄올을 탄소원으로 공급하였을 때 아산화질소 환원속도가 가장 좋았다(Fig. 3B). 아세트산 혹은 에탄올을 탄소원으로 공급하였을 때 아세트산-포도당 혼합물보다 약 2배 높은 아산화질소 환원속도를 보였다. 프로피온산을 탄소원으로 공급하였을 때 아세트산 및 에탄올 공급조건보다 약 2배 가량 많은 시간이 소요되었다. 포도당을 사용했을 때 아산화질소가 완전히 환원되기까지의 시간은 아세트산과 에탄올을 사용했을 때 보다 약 2.8배만큼의 시간이 더 소요되었다.

메탄올은 주로 반응기, 탈질공정과 폐수처리공정에서 가장 많이 사용되는 것으로 알려져 있지만[28–30], 본 실험에서의 아산화질소 환원속도는 가장 낮았다. 아세트산, 에탄올, 메탄올 중 아세트산은 폐수의 탈질 효율을 즉각적으로 증가시키지만, 에탄올과 메탄올은 최대 탈질률을 달성하기 위해

더 긴 시간이 소요되었다[31–35]. 본 실험에서도 메탄올을 사용하였을 때 아산화질소를 완전히 환원시키기 위해 아세트산을 사용하였을 때보다 약 4배의 시간이 더 소요되었다. 본 연구결과와 유사하게 Ribera-Guardia *et al.* [36]는 아세트산과 에탄올을 사용하였을 때 메탄올보다 높은 아산화질소 환원속도를 얻을 수 있었다고 보고하였다.

아세트산은 탈질세균의 일반적인 경로인 TCA (tricarboxylic acid cycle) cycle을 통해 소비되며[37, 38], 에탄올의 경우 두 개의 특정 효소를 통해 산화되어 아세트산으로 전환되고, 전환된 아세트산은 다시 TCA cycle을 통해 추가적으로 산화된다. 그러나 메탄올은 catalase-H₂O₂ system 및 cytochrome P450 (CYP2E1)의 중간산화물을 통한 다른 두 가지 다른 대사 경로를 거쳐 소비된다[31, 39].

탄소원 종류별 아산화질소 환원실험 종료 후, 컨소시움의 기능성 유전자 정량분석한 결과는 Fig. 3C에 도시하였다. 탄소원 종류에 무관하게 분석한 4종의 탈질 관련 기능성 유전자가 모두 검출되었다. 아산화질소 환원활성에 직접적으로 관여하는 기능성유전자 *nosZ* gene은 전체적으로 다른 기능성유전자들보다 낮은 수준으로 검출되었다. 특히, 메탄올을 사용한 농화배양액에서 가장 낮게 나타났으며, Fig. 3A와 3B에서 제시한 바와 같이 아산화질소 환원속도와 상통하는 결

Fig. 3. Effect of carbon source on N₂O-reducing rate of the consortium. (A) Time profiles of N₂O concentrations at different carbon sources; (B) N₂O reduction rates at different carbon sources; (C) Gene copy numbers at different carbon sources.

Fig. 4. Effect of C/N ratio on N₂O-reducing rate of the consortium. (A) Time profiles of N₂O concentrations at different C/N ratio; (B) N₂O reduction rates at different C/N ratio; (C) Gene copy numbers at different C/N ratio.

과로 확인되었다. 기능성유전자 중 아질산염 환원에 관여하는 *nirK* gene은 가장 높은 log 값으로 검출되었다. 특히, *nirK* gene은 아세트산을 처리한 농화배양액에서 가장 높은 수준으로 확인되었으며, 메탄올을 사용하였을 때 가장 낮은 수준으로 검출되었다. 이는, 컨소시움에 존재하는 아질산염 환원에 관여하는 균주는 메탄올보다는 다른 탄소원을 선호한다는 것을 시사한다.

반면, 포도당은 아세트산, 에탄올에 비해 컨소시움의 아산화질소 환원에 적합하지 못한 전자공여체였다(Figs. 3A, 3B). 또한, 본 연구결과와 유사하게 아세트산과 포도당을 토양에 적용하였을 때 포도당보다 아세트산이 더 높은 탈질 효율을 나타낸 연구결과도 보고되었다[40].

아산화질소 환원에 미치는 C/N비 영향

C/N비 3.1, 4.9, 6.3, 9.4 및 12.5 총 5가지의 조건에서 아산화질소 제거 활성을 관찰한 결과, 아산화질소가 완전히 환원되는데 가장 빠른 속도를 보인 조건은 C/N비 6.3이었다(Fig. 4). C/N비 6.3 조건에서의 아산화질소 환원속도($39.3 \mu\text{g} \cdot \text{VSS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)는 C/N비 12.52 조건의 환원속도($9.96 \mu\text{g} \cdot \text{VSS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)보다 약 4배 정도 더 높게 관찰되었다. 5일차까지 모든 조건이 유사한 속도의 환원속도를 보였지만, 이후 모든 조건이 시간경과에 따라 환원속도의 차이가 커졌다. 특히,

C/N비 6.3 조건에서 가장 빠른 아산화질소 환원속도를 나타낸 반면, C/N비 6.3보다 높아질수록 아산화질소 환원속도가 점차 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이는 일정 농도 이상의 탄소원이 공급 될 시 미생물 성장을 억제시킬 수 있다는 것을 알 수 있다. C/N비 12.5에서 C/N비 3.1의 결과를 비교하였을 때 탄소원의 공급량을 줄여도 더 빠른 아산화질소 환원속도를 갖기 때문에, 과잉의 탄소원을 공급해주는 것보다 비용적인 관점에서 보았을 때 더 효율적이라고 볼 수 있다. 이를 토대로, 추후 연구는 C/N비 3.1 보다 더 낮은 탄소원을 공급하여, 비용과 환경을 고려한 종합적인 평가가 이루어져야 할 것이다.

C/N비 조건 별 수행한 아산화질소 제거 활성 실험이 종료된 직후, 기능성 탈질유전자의 정량분석을 실시한 결과를 Fig. 4C에 도시하였다. 전체적으로 조건 별 발현되는 탈질 유전자는 서로 유사한 log 값을 나타냈다. 그러나 미생물이 기질로 사용하는 전자수용체는 아산화질소를 단독으로 제공하였지만, 아산화질소 환원에 직접적으로 관여하는 *nosZ* gene의 발현 정도가 가장 낮은 것이 확인되었다. 게다가 *nosZ* 를 C/N ratio 조건별로 비교하였을 때, 유의한 차이를 얻을 수 없었다. 이는 활성 시험이 최대 약 30시간 이내에 수행되었기 때문에 유전자양이 변화하는 데에 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 본 연구에서 확보한 아산화질소 환원 컨소

시움은 아산화질소를 질소로 환원할 뿐만 아니라, 질산염, 아질산염, 일산화질소도 환원할 수 있는 기능성 유전자도 보유하고 있었다(Fig. 3C, 4C).

본 연구에서는 고도 처리 슬러지를 접종원으로 활용하여 농화배양을 통해 아산화질소를 환원할 수 있는 세균 컨소시움을 확보하여, Illumina Miseq 염기서열 분석법을 통해 본 컨소시움의 세균 군집 구조와 특성을 조사하였다. 또한, 아산화질소 환원속도와 관련 기능성 유전자 거동에 미치는 아산화질소 농도, 탄소원 종류 및 C/N 비의 영향 평가를 통해 아산화질소 환원을 위한 최적조건을 도출하였다. 본 연구에서 확보한 아산화질소 환원 컨소시움은 아산화질소를 질소로 환원할 뿐만 아니라, 질산염, 아질산염, 일산화질소도 환원할 수 있는 기능성 유전자도 보유하고 있었다. 따라서, 본 컨소시움은 향후 아산화질소 제거 공정 뿐 만 아니라, 하 폐수의 탈질 공정에서 아산화질소 배출량을 최소화하는데 활용 가능한 유용한 미생물 자원임을 알 수 있었다.

요 약

아산화질소는 이산화탄소보다 약 310배 높은 지구온난화 지수를 갖는 주요 온실가스이다. 본 연구에서는 아산화질소 배출저감을 위해 고도처리슬러지를 접종원으로 이용하여 아산화질소 환원 컨소시움을 확보하였다. 이 컨소시움의 우점종은 *Sulfurovum* (17.95%), *Geobacter* (14.63%), *Rectinema* (11.45%)와 *Chlorobium* (8.24%)이었다. 아산화질소 환원 컨소시움의 활성에 미치는 C/N 비(mol·mol⁻¹), 탄소원의 영향을 조사한 결과, C/N 비 6.3 및 아세트산을 탄소원으로 공급한 조건에서 최대 아산화질소 환원 활성을 나타냈다. 또한, 본 컨소시움의 3,000 ppm 이하의 아산화질소 농도 범위에서 아산화질소 농도가 증가할수록 환원속도도 증가하였다. 속도론적 해석 결과, 아산화질소 환원 컨소시움의 최대 아산화질소 환원 속도는 163.9 µg-N·g VSS⁻¹·h⁻¹이었다. 본 Consortium은 아산화질소를 N₂로 환원하는데 관여를 *nosZ* 뿐만 아니라, 질산염을 아질산염으로 환원하는 *narG*, 아질산염을 일산화질소로 환원하는 *nirK* 유전자 및 일산화질소를 아산화질소를 환원하는 *norB* 유전자를 모두 보유하고 있었다. 이는 본 컨소시움은 아산화질소 제거 공정 뿐 만 아니라, 탈질공정에도 활용 가능한 유용한 미생물 자원임을 의미한다.

Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean Ministry of Science and ICT (2016R1A2B4015007).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. IPCC. 2013. The Physical Science Basis. *Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, pp. 465-570. Cambridge Univ Press.
2. Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. 2009. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125.
3. Caranto JD, Lancaster KM. 2017. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**: 8217-8222.
4. Terada A, Sugawara S, Hojo K, Takeuchi Y, Riya S, Harper WF, et al. 2017. Hybrid nitrous oxide production from a partial nitrifying bioreactor: hydroxylamine interactions with nitrite. *Environ. Sci. Technol.* **51**: 2748-2756.
5. Massara TM, Malamis S, Guisasola A, Baeza JA, Noutsopoulos C, Katsou E. 2017. A review on nitrous oxide (N₂O) emissions during biological nutrient removal from municipal wastewater and sludge reject water. *Sci. Total Environ.* **596-597**: 106-123.
6. Law Y, Ye L, Pan Y, Yuan Z. 2012. Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **367**: 1265-1277.
7. Lee K. 2010. Biological removal of nitrogen oxides from combustion flue gases. *Appl. Chem. Eng.* **21**: 243-251.
8. Rodriguez-Caballero A, Aymerich Ricardo Marquesab I, Pochc M, Pijuan M. 2015. Minimizing N₂O emissions and carbon footprint on a full-scale activated sludge sequencing batch reactor. *Water Res.* **71**: 1-10.
9. Kampschreur MJ, Temmink H, Kleerebezem R, Jetten MSM, Loosdrecht MCM. 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res.* **43**: 4093-4103.
10. Song K, Suenaga T, Harper WF, Hori T, Riya S, Hosomi M, et al. 2015. Effects of aeration and internal recycle flow on nitrous oxide emissions from a modified Ludzak-Ettinger process fed with glycerol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 19562-19570.
11. Kinh CT, Suenaga T, Hori T, Riya S, Hosomi M, Smets BF, et al. 2017. Counter-diffusion biofilms have lower N₂O emissions than co-diffusion biofilms during simultaneous nitrification and denitrification: Insights from depth-profile analysis. *Water Res.* **124**: 363-371.
12. Domingo-Félez C, Mutlu AG, Jensen MM, Smets BF. 2014. Aeration strategies to mitigate nitrous oxide emissions from single-stage nitrification/anammox reactors. *Environ. Sci. Technol.* **48**: 8679-8687.
13. Yoon H, Song MJ, Yoon S. 2017. Design and feasibility analysis of a self-sustaining biofiltration system for removal of low concentration N₂O emitted from wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* **51**: 10736-10745.

14. Wakako IO, Miyahara M, Kim SW, Yamada T, Matsuoka M, Watanabe A, *et al.* 2013. Bioaugmentation of a wastewater bio-reactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 37-42.
15. Yokoyama K, Yumura M, Honda T, Ajitomi E. 2016. Characterization of denitrification and net N₂O-reduction properties of novel aerobically N₂O-reducing bacteria. *Soil. Sci. Plant Nutr.* **62**: 230-239.
16. Su Q, Ma C, Domingo-Félez C, Kiil AS, Thamdrup B, Jensen MM, *et al.* 2017. Low nitrous oxide production through nitrifier-denitrification in intermittent-feed high-rate nitrification reactors. *Water Res.* **123**: 429-438.
17. Kim TG, Yi T, Lee EH, Ryu HW, Cho KS. 2012. Characterization of a methane-oxidizing biofilm using microarray, and confocal microscopy with image and geostatic analyses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**: 1051-1059.
18. Schreiber F, Wunderlin P, Udert KM, Wells GF. 2012. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: Biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Front. Microbiol.* **3**: 372.
19. Bru D, Sarr A, Philippot L. 2007. Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5971-5974.
20. Song K, Suenaga T, Hamamoto A, Satou K, Riya S, Hosomi M. 2014. Abundance, transcription levels and phylogeny of bacteria capable of nitrous oxide reduction in a municipal wastewater treatment plant. *J. Biosci. Bioeng.* **118**: 289-297.
21. Casciotti KL, Ward BB. 2005. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 197-205.
22. Giovannelli D, Chung M, Staley J, Starovoytov V, Bris NL, Vetriani C. 2016. *Sulfurovum riftiae* sp. nov., a mesophilic, thiosulfate-oxidizing, nitrate-reducing chemolithoautotrophic epsilon-proteobacterium isolated from the tube of the deep-sea hydrothermal vent polychaete *Riftia pachyptila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 2697-2701.
23. Regan HKM. 2017. No facultative nitrate reduction by electrode-respiring *Geobacter metallireducens* biofilms as a competitive reaction to electrode reduction in a bioelectrochemical system. *Am. Chem. Soc.* **49**: 3195-3202.
24. Wahlund MTM. 1993. Nitrogen fixation by the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.* **175**: 474-478.
25. Daniel CSLDL. 2003. Nitrite as an energy-conserving electron sink for the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Curr. Microbiol.* **46**: 0329-0333.
26. Okereke GU. 1993. Growth yield of denitrifiers using nitrous oxide as a terminal electron acceptor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 59-62.
27. Luo YH, Chen R, Wen LL, Meng F, Zhang Y, Lai CY, *et al.* 2015. Complete perchlorate reduction using methane as the sole electron donor and carbon source. *Environ. Sci. Technol.* **49**: 2341-2349.
28. Ginige MP, Bowyer JC, Foley L, Keller J, Yuan Z. 2009. A comparative study of methanol as a supplementary carbon source for enhancing denitrification in primary and secondary anoxic zones. *Biodegradation* **20**: 221-234.
29. Baytshtok V, Lu H, Park H, Kim S, Yu R, Chandran K. 2009. Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylophilic denitrifying bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **102**: 1527-1536.
30. Mokhayeri Y, Riffat R, Murthy S, Bailey W, Takacs I, Bott C. 2009. Balancing yield, kinetics and cost for three external carbon sources used for suspended growth post-denitrification. *Water Sci. Technol.* **60**: 2485-2491.
31. Hallin S, Pell M. 1998. Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge. *Water Res.* **32**: 13-18.
32. Purtschert I, Siegrist WGH. 1996. Enhanced denitrification with methanol at WWTP Zürich-Werdhölzli. *Water Sci. Technol.* **33**: 117-126.
33. Aravinthan V, Mino T, Takizawa S, Satoh H, Matsuo T. 2001. Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification. *Water Sci. Technol.* **43**: 191-199.
34. Tam NFY, Leung GLW, Wong YS. 1994. The effects of external carbon loading on nitrogen removal in sequencing batch reactors. *Water Sci. Technol.* **30**: 73-81.
35. Aesoy A, Ødegaard H, Bach K, Pujol R, Hamon M. 1998. Denitrification in a packed bed biofilm reactor (biofor)-experiments with different carbon sources. *Water Res.* **32**: 1463-1470.
36. Ribera-Guardia A, Kassotaki E, Gutierrez O, Pijuan M. 2014. Effect of carbon source and competition for electrons on nitrous oxide reduction in a mixed denitrifying microbial community. *Process. Biochem.* **49**: 2228-2234.
37. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. 2013. *The prokaryotes*, pp. 1-635. 4th Ed. Springer, New York, Berlin Heidelberg.
38. Gottschalk G. 1986. *Bacterial metabolism*, pp. 1-341. 2nd Ed. Springer, New York, Berlin Heidelberg.
39. Dorokhov YL, Shindyapina AV, Sheshukova EV, Komarova TV. 2015. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* **95**: 603-644.
40. Paul JW, Beauchamp EG, Trevors JT. 1989. Acetate, propionate, butyrate, glucose, and sucrose as carbon sources for denitrifying bacteria in soil. *Can. J. Microbiol.* **35**: 754-759.