

<포항공과대학 환경공학대학 하계 연수 프로그램 결과 보고서>

Analyzing microbial communities in anaerobic digester by using next generation sequencing

고려대학교 환경생태공학부

최수진

Contents

1. Introduction

2. Methods

2.1 Preparation of data

2.2 Ranking

3. Results & Discussion

3.1 Bacteria

3.2 Methanogen

4. Conclusion

1. Introduction

혐기성 소화처리의 목적은 폐수 및 폐기물을 처리하는 동시에 바이오 가스, 그 중 메탄 가스를 생산하여 에너지를 얻는 것에 있다. 즉, 소화 처리는 혐기 조건에서 분해 가능한 유기물들을 분해시켜 메탄으로 전환시킨다.

혐기성 소화 공정은 총 3 단계로 이루어진다. 1) 유기물을 액화 및 가수분해하는 과정; 2) 유기산 생성 과정; 3) 메탄 생성 과정이다. 각 단계마다 관여하는 미생물은 모두 다르다. 1), 2) 단계는 미생물 중 대부분은 세균역에 있는 미생물이 관여하며 3) 단계에서는 미생물 중 고세균역, 그 중 메탄균이 관여한다.

각각의 과정을 살펴보면 첫 번째 단계인 가수분해는 미생물의 외분비 효소에 의해 작용한다. 가수분해의 반응속도는 반응기 내부의 폐수 농도, 세포의 체류시간, pH 등 여러 요인에 의해 조절된다. 속도는 Michaelis-Menten kinetics 를 통해 구할 수 있다. 두 번째 단계인 유기산 생성 과정은 산 생성과 아세트산 생성으로 나뉜다. 메탄 생성균이 이용할 수 있는 기질은 메틸기, 무기물, formate 이기 때문에 syntrophic bacteria 가 메탄생성균이 직접 이용할 수 없는 발효산물을 아세트산과 수소로 분해한다. 따라서 혐기 소화조에서 메탄 생성 반응은 박테리아와 메탄균의 상호작용이 군집을 이루는데 중요한 역할로 작용한다. 본 연구에서는 안정된 소화조 샘플 안에 있는 미생물들의 군집을 분석하여 주요한 미생물들을 찾아내고자 한다. 군집 분석으로는 Next generation sequencing (NGS)분석 기법을 사용하였다. 이는 과거 미생물 염기서열 분석에 사용하였던 DGGE 방법에서 한 차원 개선된 방법으로 수백만 개의 DNA 조각들을 한 번에 병렬로 시퀀싱하는 방법이다. NGS 에는 여러 가지 플랫폼이 있으며 본 실험에서 쓰인 플랫폼은 그 중 Ion torrent 이다.

본 연구에서는 전국 61 개의 소화시설 중 22 개의 소화조로부터 얻은 샘플에 있는 미생물들을 동정하여 주요 미생물들을 각각 세균역과 고세균역으로 나누어 밝히고자 한다 (국가하수도 정보시스템, 2015). Standardization 시킨 density 와 frequency 를 통해 주요 미생물들을 판별하였다. Density 와 frequency 라는 변수는 생태학에서 통용되는 importance value 의 formula 를 따랐다. 고세균역에 속하는 주요 메탄균들의 에너지 대사 과정 즉, 메탄 생성 경로를 알아보고 그에 따른 그들의 역할과 중요성을 살펴보고자 한다.

2. Methods

2.1 Preparation of data

Sampling

Table 1: Sampling sites classified based on substrate

Substrate Category	Food waste (FW)														
City	Seoul	Incheon			Goyang			Cheongju		Busan	Daegu			Gwangju	Gimhae
Abbreviation	DD	SL			GY			CJ		SG	DG			GJ	GH(KH)
Site (Korean)	동대문	수도권			고양			청주		생곡	대구			광주	김해
Type of sample	A	A	B	C	A	B	C	A	B	A	Wet	A	B	A	A
1 st	○	x	x	○	○	○	○	x	○	x	○	○	x	○	○
2 nd	○	x	x	○	○	○	○	x	○	x	○	○	x	○	○
3 rd	○	x	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	○
4 th	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	○

Substrate Category	Sludge (SL)			SL-FW						Animal (AM)				AM-FW			
City	Changwon	Jecheon	Seoul	Seoul	Seoul	Seoul	Busan	Busan	Ulsan	Jeju		Halla		Yangsan		Ulsan	Jeongup
Abbreviation	MS	JC	TC	JR	NJ	SN	GB	SY	SB	JE		HA		YS		OS	JU
Site (Korean)	마산	제천	탄천	중랑	난지	서남	강변	수영	용연 SBK	제주		제주한라		양산		온산	정읍
Type of sample	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B
1 st	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	○	x	x	x	○	○	x
2 nd	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	○	○	○	x	○	○	x
3 rd	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	○	○	○	○
4 th	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	○	○	x	○

총 22개의 지역에서 소화조별 시기별로 달리하여 107 개의 군집으로부터 각각 1L의 샘플을 얻었다. 시기는 1년에 4차례 걸쳐 계절별로 달리하여 샘플링을 하였다. 색칠해진 부분은 4차례 모두 샘플링을 한 소화조를 나타낸 것이다. Wet으로 표시되어 있지 않은 소화조는 모두 Dry methanogenic 소화조다. 또한 지역마다 소화조의 기질도 모두 다르다.

DNA extraction

샘플 1L 중 1mL를 automated nucleic acid extractor (Magtration System 12GC, PSS, Chiba, Japan)을 통해 DNA를 추출하였다. DNA 추출 전에는 200μL 의 샘플을 10분간 16,000g 원심분리기를 돌렸다. pellet의 상등액 부분은 100μL를 덜어내고 같은 양의 증류수를 넣어주어 deionization시키고 원심분리기를 돌리는 과정을 두 차례 진행하였다. 이 후 이 pellet을 automated nucleic acid extractor를 통해 DNA를 추출하였다.

Next generation sequencing

Next generation sequencing 분석은 어떤 유전자 부분이 발현되고 전사되는 양을 알아보기 위한 분석이다. 각 소화조 내에 미생물은 세균역과 고세균역으로 나뉜다. 각 군집의 종 동정은 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 이루어졌다. NGS platform 중 Ion PGM™ System (Life Technologies)을 이용하였으며 유전자 중 V3에 해당하는 염기서열들을 분석하였다. 그리고 그 유전자들을 Ion 16S Metagenomics™ kit(Life Technologies)를 통해 증폭시켰다. 유전자들은 Ion Reporter™ software를 이용하여 16S rRNA를 97%의 유사도로 묶은 operational taxonomic units (OTUs)에 따라 분류하였다. OTUs 분류는 UPRASE (usearch version v7.0.1090)을 이용하였다.

세균역의 동정은 그 결과 총 시퀀스들은 4157개의 OTUs로 분류되었다. 각 OTUs에 대한 분석은 SILVA database를 통해 genus level까지 동정하였다. 고세균역 또한 OTUs에 따라 분류하였으며 그 결과 총 시퀀스들은 241개의 OTUs로 분류되었고 각 OTU에 대한 분석은 세균역과 달리 species level 까지 밝힐 수 있었다. SILVA database를 통해 분석한 결과 99%의 OTUs는 모두 메탄균으로 분류되었으며 각 OTU에 대한 종 동정은 NCBI BLAST를 이용하였다. 각 OTU를 대표하는 염기서열에 해당하는 종들 중 가장 높은 유사도를 띠는 종으로 동정하였다.

각 OTU에 해당하는 시퀀스들이 얼마만큼 있는지 알아보기 위해서는 Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) (LightCycler 480, Roche)을 이용하였다.

2.2 Ranking

Database

일반적으로 미생물의 우점종을 판별하기 위해서는 Relative abundance를 사용한다(Ley.R, 2006). 대개 종마다 빈도가 크게 달라질 정도로 샘플 수가 많지 않아 어느 정도 점유율이 높은 종이 빈도 역시 높기 때문에 큰 변수로 고려하지 않는다. (김재수, 2010) 그러나 107개의 샘플을 분석한 결과 단순히 점유율만을 고려하여 우점종을 판단하기에는 종 간의 빈도 변화가 커서 본 연구에서는 빈도에 대한 가중치를 두기로 하였다. 실제로 생태계에서도 빈도에 대한 개념은 무시할 수 없는 변수다 (Kevin, 2010). 따라서 본 연구에서는 Relative abundance와 Frequency를 모두 고려하는 importance value를 미생물 우점종 판단에 도입하고자 하였다.

생태학에서 통용되고 있는 importance value에 대한 식은 다음과 같다.

$$Importance\ value\ (IV) = Relative\ Density + Relative\ Frequency + Relative\ Dominance$$

그러나 실질적으로 미생물들의 relative dominance를 구하기란 쉽지 않고 이렇듯 relative dominance를 구하기 어려운 종들의 경우:

$$Importance\ value\ (IV) = Relative\ Density + Relative\ Frequency$$

이와 같이 식을 변형하여 사용하는 사례들이 있다. (James, 1973; Williams-Linera, 2005)

Relative Density 와 Relative Frequency에 대한 식은 다음과 같다.

$$\text{Relative density (\%)} = \frac{\text{Density of a species} * 100}{\text{Total density of all species}}$$

$$\text{Relative frequency (\%)} = \frac{\text{Frequency of a species} * 100}{\text{Total frequency of all species}}$$

따라서 본 연구에서 importance value의 총 합은 200이 된다. Relative density는 미생물 우점종을 판별할 때 쓰는 Relative abundance와 같은 개념이다. Density는 각 소화조마다 총 sequence read 수가 다르므로 0~1 사이로 표준화시켜 구하였다 (Bolstad, 2003). 이 후 한 종에 대한 총 sequence read 수를 모든 종의 sequence read로 나누어 계산하였다. 따라서 하나의 read를 하나의 개체로 간주하여 계산하였다는 오차가 발생한다. Frequency는 몇 개의 소화조에 나타나는지로 구하였다.

Dominant species (genus) selection

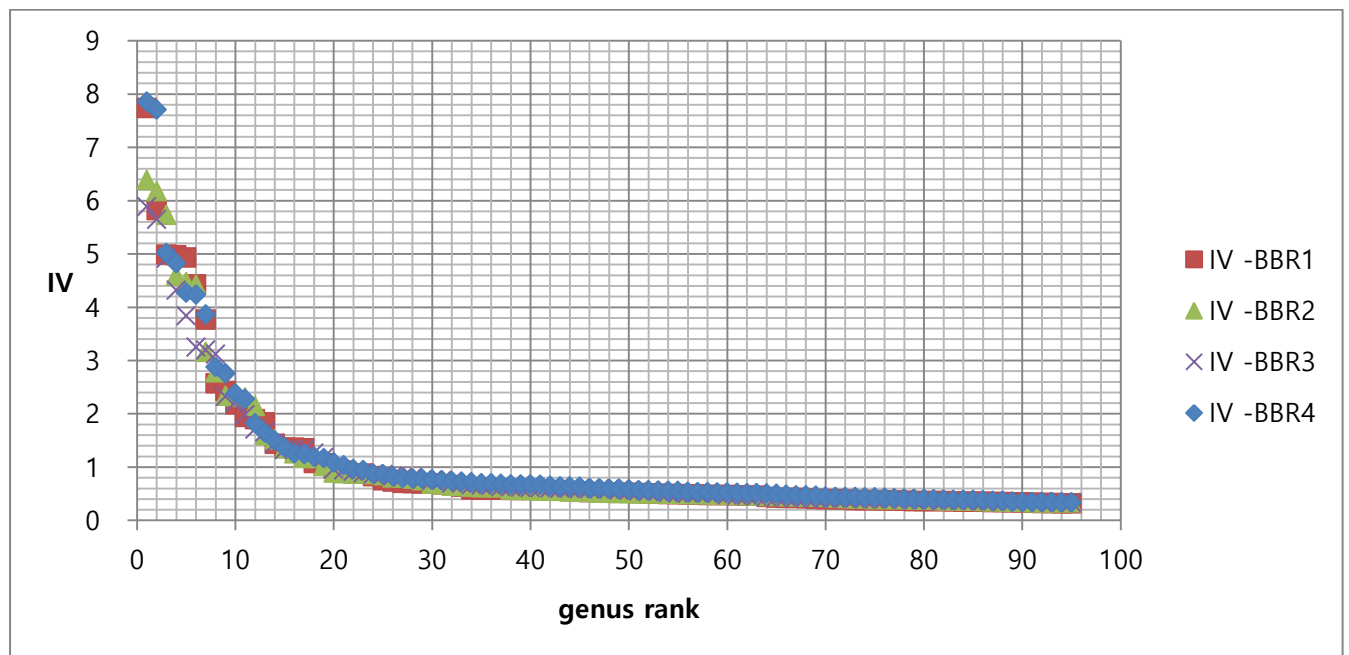
<Table 1>에서 4차례 모두 샘플링을 한 소화조를 기준으로 시기별로 분류하여 IV값에 따라 순위를 매겼다. 이후 IV값을 그래프로 나타내어 편차가 크게 나타나는 부분을 하한선으로 정하고 그 이상으로 매겨진 순위를 시기별로 비교하여 교집합으로 나타나는 종을 안정된 소화조에서 나타나는 주요 미생물로 판별하고자 하였다.

3. Results & Discussion

3.1 Bacteria

Importance value

Figure 1: genus rank – importance value (bacteria)



Bacteria의 경우 genus level 까지만 동정이 가능하였다. 따라서 genus rank에 따른 IV 그래프를 그렸을 때 다음과 같은 그래프가 나타났다. 그래프는 시기별로 비슷하게 Inx 그래프를 그렸다. 위의 그래프는 uncultured genus를 제외하고 나타낸 것이며 각 시기별로 genus rank 100까지의 IV를 나타낸 것이다. Bacteria는 그래프가 완만해지는 rank 구간을 20으로 임의로 정하였다.

Data

Table 2 : genus rank by IV for BBR1

BBR1 (16.08)				
rank	Genus	IV	relative density	relative frequency
1	Fastidiosipila	7.735	7.260	0.474
2	Rikenellaceae RC9 gut group	5.820	5.345	0.474
3	vadinBC27 wastewater-sludge group	4.984	4.533	0.451
4	Candidatus Cloacamonas	4.975	4.572	0.403
5	Proteiniphilum	4.929	4.431	0.498
6	Petrimonas	4.429	3.955	0.474
7	Syntrophomonas	3.765	3.267	0.498
8	Defluviitoga	2.573	2.336	0.237
9	Christensenellaceae R-7 group	2.426	1.951	0.474
10	Gelria	2.177	1.679	0.498
11	Tepidimicrobium	1.941	1.586	0.356
12	Sedimentibacter	1.899	1.425	0.474
13	Lentimicrobium	1.839	1.602	0.237
14	Acholeplasma	1.437	0.987	0.451
15	Smithella	1.364	1.079	0.285
16	Clostridium	1.362	0.864	0.498
17	Caldicoprobacter	1.348	0.898	0.451
18	Thermovirga	1.073	0.741	0.332
19	Ottowia	1.066	0.639	0.427
20	Mesotoga	0.970	0.709	0.261

Table 3 : genus rank by IV for BBR2

BBR2(16.10)				
rank	Genus	IV	relative density	relative frequency
1	Rikenellaceae RC9 gut group	6.384	5.900	0.484
2	Fastidiosipila	6.176	5.716	0.459
3	Proteiniphilum	5.729	5.270	0.459
4	Petrimonas	4.587	4.079	0.508

5	vadinBC27 wastewater-sludge group	4.468	4.009	0.459
6	Syntrophomonas	4.423	3.915	0.508
7	Candidatus Cloacamonas	3.158	2.820	0.338
8	Christensenellaceae R-7 group	2.777	2.293	0.484
9	Gelria	2.334	1.827	0.508
10	Defluviitoga	2.323	2.032	0.290
11	Sedimentibacter	2.304	1.796	0.508
12	Tepidimicrobium	2.144	1.781	0.363
13	Lentimicrobium	1.597	1.379	0.218
14	Caldicoprobacter	1.518	1.034	0.484
15	Clostridium	1.343	0.836	0.508
16	Acholeplasma	1.253	0.818	0.435
17	Alkaliphilus	1.171	0.833	0.338
18	Ottowia	1.164	0.752	0.411
19	Smithella	1.022	0.756	0.266
20	Blvii28 wastewater-sludge group	0.895	0.654	0.242

Table 4 : genus rank by IV for BBR3

BBR3(17.02)				
rank	Genus	IV	relative density	relative frequency
1	Fastidiosipila	5.889	5.402	0.487
2	Petrimonas	5.646	5.108	0.538
3	Rikenellaceae RC9 gut group	4.919	4.381	0.538
4	Proteiniphilum	4.319	3.781	0.538
5	Defluviitoga	3.837	3.453	0.384
6	vadinBC27 wastewater-sludge group	3.250	2.737	0.513
7	Candidatus Cloacamonas	3.194	2.707	0.487
8	Christensenellaceae R-7 group	3.119	2.581	0.538
9	Syntrophomonas	2.322	1.783	0.538
10	Gelria	2.224	1.686	0.538
11	Sedimentibacter	1.984	1.472	0.513
12	Lentimicrobium	1.710	1.453	0.256
13	Acholeplasma	1.660	1.198	0.461
14	Smithella	1.443	1.161	0.282
15	Sphaerochaeta	1.327	0.815	0.513
16	Simplicispira	1.321	1.039	0.282
17	Erysipelotrichaceae UCG-004	1.320	0.884	0.436
18	Caldicoprobacter	1.261	0.722	0.538

19	Clostridium	1.174	0.636	0.538
20	Dechloromonas	0.960	0.704	0.256

Table 5 : genus rank by IV for BBR4

BBR4 (17.04)				
rank	Genus	IV	relative density	relative frequency
1	Fastidiosipila	7.855	7.285	0.569
2	Rikenellaceae RC9 gut group	7.706	7.107	0.599
3	Petrimonas	5.016	4.417	0.599
4	Candidatus Cloacamonas	4.826	4.316	0.509
5	Defluviitoga	4.270	3.851	0.420
6	Proteiniphilum	4.236	3.607	0.629
7	vadinBC27 wastewater-sludge group	3.860	3.321	0.539
8	Syntrophomonas	2.877	2.247	0.629
9	Christensenellaceae R-7 group	2.755	2.155	0.599
10	Gelria	2.377	1.748	0.629
11	Sedimentibacter	2.278	1.679	0.599
12	Caldicoprobacter	1.820	1.220	0.599
13	Acholeplasma	1.643	1.044	0.599
14	Clostridium	1.498	0.869	0.629
15	Alkaliphilus	1.368	0.889	0.479
16	Sphaerochaeta	1.256	0.716	0.539
17	Tepidimicrobium	1.243	0.793	0.450
18	Erysipelotrichaceae UCG-004	1.193	0.653	0.539
19	Lentimicrobium	1.168	0.868	0.300
20	Smithella	1.086	0.787	0.300

다음 표는 4차례 모두 상위 20위안에 들어간 종들을 선별한 것이다.

Table 6 : IV average for bacteria

Genus	IV -BBR1	IV -BBR2	IV -BBR3	IV -BBR4	IV average
Fastidiosipila	7.735	6.176	5.889	7.855	6.914
Rikenellaceae RC9 gut group	5.820	6.384	4.919	7.706	6.207
Petrimonas	4.429	4.587	5.646	5.016	4.920
Proteiniphilum	4.929	5.729	4.319	4.236	4.803
vadinBC27 wastewater-sludge group	4.984	4.468	3.250	3.860	4.141
Candidatus Cloacamonas	4.975	3.158	3.194	4.826	4.038

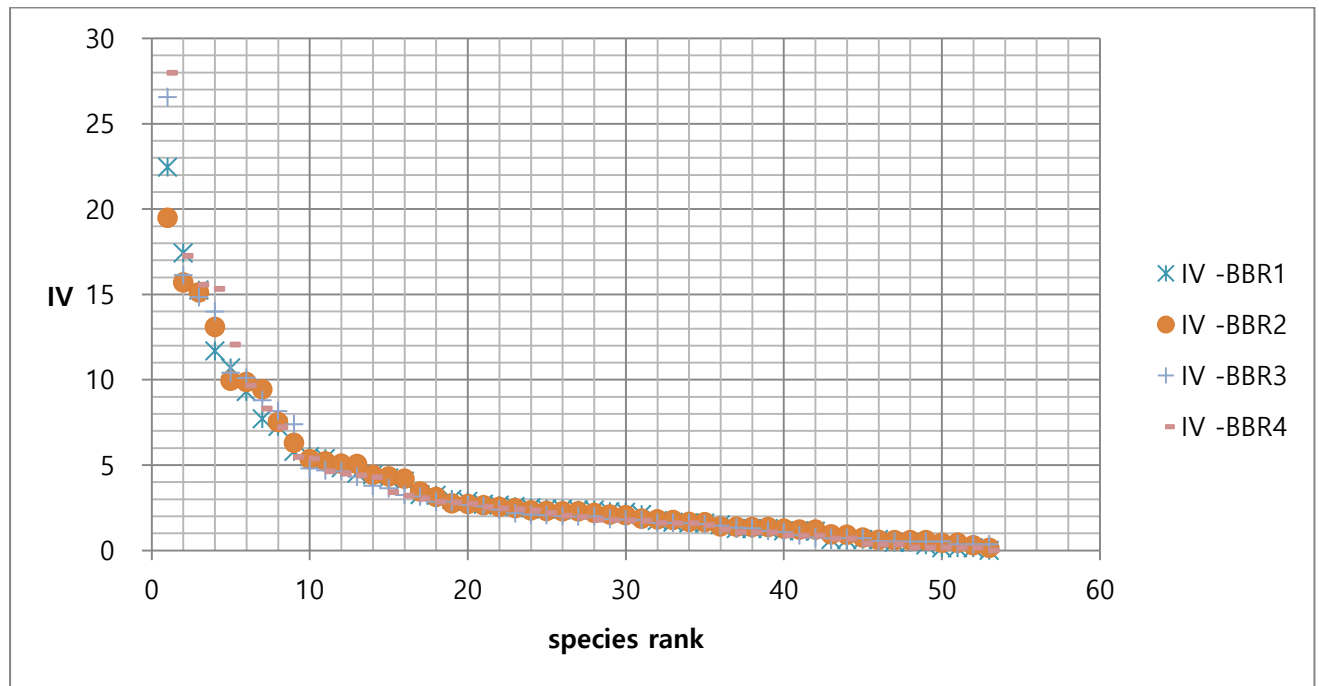
Defluviitoga	2.573	2.323	3.837	4.270	3.251
Syntrophomonas	3.765	4.423	1.443	2.877	3.127
Christensenellaceae R-7 group	2.426	2.777	3.119	2.755	2.769
Gelria	2.177	2.334	2.224	2.377	2.278
Sedimentibacter	1.899	2.304	1.984	2.278	2.116
Lentimicrobium	1.839	1.597	1.710	1.168	1.578
Acholeplasma	1.437	1.253	1.660	1.643	1.498
Caldicoprobacter	1.348	1.518	1.261	1.820	1.487
Clostridium	1.362	1.343	1.174	1.498	1.345
Smithella	1.364	1.022	1.321	1.086	1.198
sum of importance value	53.062	51.395	46.949	55.271	51.669
	(26.53%)	(25.70%)	(23.47%)	(27.64%)	(25.83 %)

위 16가지 genus들은 안정된 소화조에서 점유율과 빈도 모두 높게 나타난 genus들로 안정된 소화조에서 나타나는 주요 genus라 볼 수 있다. 16가지 종들의 평균 IV 합은 51.669로 대략 전체 784종들의 IV합의 25%를 차지한다.

3.2 Methanogen

Importance value

Figure 2 : species rank - IV



Species rank에 대한 IV값을 그래프로 그려보면 시기별 그래프가 모두 비슷하게 Inx 그래프 형태를 그리는 것을 볼 수 있다. 그래프 상에서 그래프가 대체로 완만해지는 구간을 rank가 10일 때로 임의로 정하였다.

Data

다음 표는 시기별로 rank 10까지의 종명과 IV, relative density, relative frequency를 나타낸 결과다.

Table 7 : species rank by IV for BBR1

BBR1 (16.08)				
rank	Species (NCBI)	IV	relative density	relative frequency
1	Methanoculleus bourgensis	22.451	19.117	3.333
2	Methanolinea tarda	17.428	14.095	3.333
3	Methanosaeta concilii	15.253	12.078	3.175
4	Methanospirillum hungatei	11.690	8.516	3.175
5	Methanobacterium beijingense	10.701	7.368	3.333
6	Methanobacterium petrolearium	9.315	5.981	3.333
7	Candidatus Methanoplasma	7.703	5.481	2.222
8	Methanoculleus receptaculi	7.260	3.926	3.333
9	WSA2	5.796	3.098	2.698
10	Methanomassiliicoccus luminyensis	5.504	2.171	3.333

Table 8 : species rank by IV for BBR2

BBR2(16.10)				
rank	Species (NCBI)	IV	relative density	relative frequency
1	Methanoculleus bourgensis	19.492	16.315	3.177
2	Methanolinea tarda	15.692	12.515	3.177
3	Methanosaeta concilii	15.113	12.087	3.026
4	Methanospirillum hungatei	13.100	10.377	2.723
5	Methanobacterium beijingense	9.945	6.919	3.026
6	Methanobacterium petrolearium	9.859	6.834	3.026
7	WSA2	9.429	6.403	3.026
8	Methanoculleus receptaculi	7.532	4.355	3.177
9	Candidatus Methanoplasma	6.299	3.727	2.572
10	Methanomassiliicoccus luminyensis	5.351	2.325	3.026

Table 9 : species rank by IV for BBR3

BBR3(17.02)				
rank	Species (NCBI)	IV	Relative density	Relative frequency
1	Methanoculleus bourgensis	26.565	22.841	3.723
2	Methanospirillum hungatei	16.130	13.116	3.014
3	Methanolinea tarda	14.837	11.291	3.546

4	Methanosaeta concilii	13.995	10.981	3.014
5	Methanoculleus receptaculi	10.419	6.695	3.723
6	WSA2	10.106	6.915	3.192
7	Methanomassiliicoccus luminyensis	8.802	5.078	3.723
8	Candidatus Methanoplasma	8.159	5.145	3.014
9	Methanobacterium beijingense	7.401	3.855	3.546
10	Methanosaeta harundinacea	4.806	3.211	1.596

Table 10 : species rank by IV for BBR4

BBR4 (17.04)				
rank	Species (NCBI)	IV	Relative density	Relative frequency
1	Methanoculleus bourgensis	27.980	24.315	3.665
2	Methanospirillum hungatei	17.257	14.116	3.141
3	Methanolinea tarda	15.576	12.086	3.490
4	Methanosaeta concilii	15.327	11.837	3.490
5	Methanoculleus receptaculi	12.066	8.401	3.665
6	Candidatus Methanoplasma	9.668	6.177	3.490
7	Methanomassiliicoccus luminyensis	8.318	4.653	3.665
8	Methanobacterium beijingense	7.222	3.732	3.490
9	Methanothermobacter wolfeii	5.471	2.329	3.141
10	Methanosaeta harundinacea	5.394	2.950	2.443

다음 표는 4차례 모두 상위 10위안에 들어간 종들을 선별한 것이다.

Table 11 : IV average for methanogen

species	IV – BBR1	IV – BBR2	IV – BBR3	IV – BBR4	IV average
Methanoculleus bourgensis	22.451	19.492	26.565	27.980	24.122
Methanolinea tarda	17.428	15.692	14.837	15.576	15.883
Methanosaeta concilii	15.253	15.113	13.995	15.327	14.922
Methanospirillum hungatei	11.690	13.100	16.130	17.257	14.544
Methanoculleus receptaculi	7.260	7.532	10.419	12.066	9.319
Methanobacterium beijingense	10.701	9.945	7.401	7.222	8.817
Candidatus Methanoplasma	7.703	6.299	8.159	9.668	7.957
Methanomassiliicoccus luminyensis	5.504	5.351	8.802	8.318	6.994
sum of importance value	97.991	92.522	106.308	113.414	102.559
	(49%)	(46.26%)	(53.15%)	(56.71%)	(51.28%)

위 8가지 종들은 안정된 소화조에서 점유율과 빈도 모두 높게 나타난 종들로 안정된 소화조에서 나타나는 우점종이라 볼 수 있다. 8가지 종들의 IV 합은 102.559 로 전체 종들의 IV의 51% 이상을 차지한다. 메탄 생성균은 메탄 생성 경로에 따라 크게 두 분류로 나뉜다. 수소 및 이산화탄소와 폼산을 이용하여 메탄을 생성하는 hydrogenotrophic methanogen과 아세트산을 이용하여 메탄을 생성하는 acetotrophic methanogen으로 나눌 수 있다. 다음 표는 밝혀낸 주요 8가지 종들의 메탄 생성 경로를 나타낸 것이다.

Table 12 : Metabolic pathway of methanogen species

genus	species	Metabolic pathway
Methanoculleus	Methanoculleus bourgensis	Hydrogenotrophic (H ₂ /CO ₂ and formate)
	Methanoculleus receptaculi	
Methanobacterium	Methanobacterium beijingense	
Methanospirillum	Methanospirillum hungatei	
Methanolinea	Methanolinea tarda	
Methanomassiliicoccus	Methanomassiliicoccus luminyensis	
Methanosaeta	Methanosaeta concilii	Acetotrophic
Candidatus	Candidatus Methanoplasma	hydrogen-dependent reduction of methanol or methylamine

Methanoculleus bourgensis(strain ATCC 43281 / DSM 3045 / OCM 15 / MS2) 는 바이오가스 반응기에서 우점하는 고세균으로 알려져 있다 (Maus, 2012). 다음 표는 대표 기질 종류에 따른 소화조에서만 데이터를 계산하였을 때 얻은 IV 값이다. Foodwaste(FW)는 상대적으로 다른 substrate 에 비해 유기물이 많으며 sludge(SL)는 상대적으로 다른 substrate 에 비해 유기물이 적다. Total 은 전체 소화조의 데이터에서 얻은 IV 값을 의미한다. 색칠된 부분은 FW 소화조에서 얻은 IV 값과 SL 소화조에서 얻은 IV 값이 5 배 이상 차이는 것을 나타낸 것이다. 흥미로운 사실은 M. bourgensis 의 경우 소화조 기질 종류가 FW 인 것에서만 importance value 는 42.5 가 나왔으며 SL 인 소화조에서만 데이터를 얻었을 때는 3.01 로 약 14 배의 차이를 보였다. 그리고 Methanolinea tarda 의 경우 SL 소화조에서 44.2, FW 소화조에서 4.13 으로 약 11 배 차이를 보였다. 42.5 는 전체 IV 의 약 21%이므로 FW 에서는 Methanoculleus bourgensis 가 우점한다고 볼 수 있으며, 44.17 로 약 22%를 보이는 Methanolinea tarda 는 SL 에서 우점한다고 볼 수 있다.

Table 13 : IV compared by substrate

species	FW- IV	SL- IV	Total- IV
Candidatus Methanoplasma	4.522526	4.27795	4.400
Methanobacterium beijingense	18.99265	3.400835	11.197
Methanoculleus bourgensis	42.50678	3.010889	22.759
Methanoculleus receptaculi	12.34338	2.865023	7.604
Methanolinea tarda	4.130954	44.17072	24.151
Methanomassiliicoccus luminyensis	6.132481	4.409255	5.271

Methanosaeta concilii	4.78791	27.07219	15.930
Methanospirillum hungatei	7.223311	9.826866	8.525
Sum of IV	100.64	99.03373	99.83686

Methanosaeta concilii 는 acetotrophic methanogen 으로 아세트산을 이용하여 메탄을 생성하며. 높은 LCFA 농도에서 건디는 종으로 알려져 있다 (Silva, 2016). LCFA 는 혐기성 미생물로부터 β -oxidation 과정을 통해 아세테이트와 수소로 분해되고 acetoclastic 과 hydrogenotrophic methanogens 에 의해 메탄 가스가 발생한다 (2016). 혐기성 생물공정 반응기에서 LCFA 로부터 발생하는 메탄가스의 70%는 acetoclastic 그리고 나머지 30%는 hydrogenotrophic 메탄균에 의해 발생한다 (Demirel, 2008). 그러나 LCFA 가 분해될 때 발생하는 수소는 메탄 생성 반응을 저해한다 (박종문, 2004). 그러나 표에 나타난 결과에 따르면 유기산이 더 높은 FW 에 비해 SL 에서 더 큰 IV 값을 보이는 것을 알 수 있다.

Methanospirillum hungatei 는 H_2 - CO_2 혹은 formate 를 이용하여 메탄을 생성한다 (G. SOUTHAM, 1990). M. hungatei 의 중요한 역할 중 하나는 프로피온산을 이용해서 syntrophic bacteria 와 성장을 촉진시킬 수 있다는 것이다 (1990). 또한 M. hungatei 는 탄소 순환과 유기물들의 분해에 keystone 종으로서 역할을 한다. (1990)

4. Conclusion

메탄균의 역할만 봤을 때는 그에 대한 해석과 결과가 들어맞지 않는다. 메탄균은 발효균이 생성한 물질로 직접 메탄을 생성할 수 없다. Syntrophic bacteria 에 의해 수소와 아세트산으로 분해된 후에야 그 물질들을 이용하여 메탄을 생성할 수 있다. 따라서 특정 메탄균들의 우점도는 박테리아의 군집 분석과 같이 이루어져야 해석이 가능할 것으로 판단된다.

실제로 importance value index 를 미생물의 우점종을 판단하는데 쓰인 사례는 적다. Importance value index 는 forest 에 대한 군집을 파악하기 위해 통용된 index 였다(Curtis and McIntosh, 1950). 그러나 IV 와 같이 쓰이는 개념인 quadrat 은 미생물 생태에서도 쓰인 사례가 있기 때문에 충분히 IV 에 대한 개념 도입에 대한 가능성은 열려있다 (Frank B, 2010). 또한 Importance value index 의 경우 같은 시기에 대한 판단을 전제로 할 때 통용될 수 있는 index 이므로 본 연구에서는 같은 시기별끼리만을 비교대상으로 하여 계산하였다. 미생물에서 importance value index 도입 사례가 없었던 가장 큰 이유는 미생물의 dominant species 는 오로지 relative abundance 로만 판단하였기 때문이다. Relative abundance 는 importance value index 에서 relative density 와 같은 개념이다. 따라서 frequency 라는 변수를 함께 고려하여 dominant species 를 결정하지 않았기 때문에 본 연구와 같이 샘플 수가 많아 frequency 의 변이가 많이 나타나는 경우 relative abundance 만으로 dominant species 를 결정하기 어려웠다. 실제로도 relative density 만으로 결정한 dominant species 와 IV 로 결정한 dominant species 에 차이가 있었다. 데이터만으로 판단한 dominant species 에 대한 검증은 실험을 하지 못하였기 때문에 IV 에 따라 랭킹을 매기는 순위대로 그 미생물이 다른 미생물들에 비해 큰 역할을 한다는 증명은 하지 못하였다.

Reference

- Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M., & Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19(2), 185-193.
- Curtis JT and McIntosh RP. 1950. The interrelations of certain analytic and synthetic phytosociological characters. *Ecology* Tempe 31(3): 434-450.
- Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 173-190. doi:10.1007/s11157-008-9131-1
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., & Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(Pt 8), 1902-1907. doi:10.1099/ijs.0.033712-0
- Frank B. Dazzo. (2010). CMEIAS digital microscopy and quantitative image analysis of microorganisms. *Dept. of Microbiology & Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, Michigan, 48824, USA*
- Gaston, K. J. (2010). Valuing Common Species. *Science*, 327(5962), 154-155. doi:10.1126/science.1182818
- Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Kamagata, Y., Ohashi, A., & Harada, H. (2008). *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 1), 294-301. doi:10.1099/ijs.0.65394-0
- Lang, K., Schuldes, J., Klingl, A., Poehlein, A., Daniel, R., & Brunea, A. (2015). New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of "Candidatus methanoplasma termitum". *Appl Environ Microbiol*, 81(4), 1338-1352. doi:10.1128/AEM.03389-14
- Lee, J., Shin, S. G., Han, G., Koo, T., & Hwang, S. (2017). Bacteria and archaea communities in full-scale thermophilic and mesophilic anaerobic digesters treating food wastewater: Key process parameters and microbial indicators of process instability. *Bioresour Technol*, 245(Pt A), 689-697. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.015
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022. doi:10.1038/4441022a
- Ma, K., Liu, X., & Dong, X. (2005). *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 1), 325-329. doi:10.1099/ijs.0.63254-0
- Maus, I., Wibberg, D., Stantscheff, R., Eikmeyer, F. G., Seffner, A., Boelter, J., . . . Schluter, A. (2012). Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2(T), Isolated from a sewage sludge digester. *J Bacteriol*, 194(19), 5487-5488. doi:10.1128/JB.01292-12
- N., S. J. (1973). An Extension of the Concept of Importance Value in Analyzing Forest Communities. *Ecology*,

54(3), 655-656. doi:doi:10.2307/1935356

Silva, S. A., Salvador, A. F., Cavaleiro, A. J., Pereira, M. A., Stams, A. J., Alves, M. M., & Sousa, D. Z. (2016). Toxicity of long chain fatty acids towards acetate conversion by *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina mazei*. *Microb Biotechnol*, 9(4), 514-518. doi:10.1111/1751-7915.12365

Southam, G., Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F., Koval, S. F., & Beveridge, T. J. (1990). Isolation, characterization, and cellular insertion of the flagella from two strains of the archaeobacterium *Methanospirillum hungatei*. *J Bacteriol*, 172(6), 3221-3228.

Williams-Linera, G., Palacios-Rios, M., & Hernández-Gómez, R. (2005). *Fern richness, tree species surrogacy, and fragment complementarity in a Mexican tropical montane cloud forest* (Vol. 14).

김재수 (2010), 군부대와 주유소 주변에서 채취한 토양에서의 미생물 군집구조와 우점종의 파악. 대한환경공학회지, 32(3), 227-233.

김남천, 유기영, 안중우, 김영준, 허관, 정연구, 배재근. (2002). 혐기성소화공정에 의한 바이오가스화의 기술 원리 및 응용. 유기물 자원화, 10(1), 7-23.

박종문, 김근호. (2004). 혐기성 처리