

## 시화호 인공습지의 수질정화 및 암모니아 산화균의 분포 연구

김세윤 · 김미순 · 이성희 · 임미영 · 이영민 · 김지열 · 고광표<sup>†</sup>

서울대학교 보건대학원 환경보건학과

### The Efficacy of Water Purification and Distribution of Ammonia Oxidizing Bacteria in Shihwa Constructed Wetland

Seiyoon Kim · Misoon Kim · Sunghee Lee · Miyoung Lim · Youngmin Lee · Zhiyeol Kim · GwangPyo Ko<sup>†</sup>

Department of Environmental Health, School of Public Health, Seoul National University

(Received 24 April 2009, Revised 24 November 2009, Accepted 14 December 2009)

#### Abstract

Water quality and the distribution of ammonia oxidizing bacteria were characterized in constructed wetland of Shihwa lake. Both physico-chemical parameters and fecal indicator microorganisms including total coliforms, *E.coli*, *Enterococcus* spp. were measured. In addition, denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) was carried out after PCR amplification of *amoA* gene from input, output, and wetland sites of the Banwol, Donghwa, and Samhwa stream in Shihwa lake area. Physico-chemical parameters were in proper range for typical nitrifying bacteria to grow and perform their biological activities. Average concentrations of fecal indicator microorganisms of wetland samples were lower than those of input sites. These results suggested that microbial water quality improved by the process of constructed wetland. According to phylogenetic information obtained from DGGE from study sites, distribution of nitrifying bacteria from each of input, output, and wetland were generally distinctive one another. In addition, distribution of nitrifying bacteria between Banwol and Donghwa streams showed higher similarity (52.6%) than this of Samhwa stream (15.2%). These results indicated that characteristics of ammonia oxidizing bacteria in Samhwa were unique in comparison with those of Banwol and Donghwa stream.

**keywords** : *amoA*, Constructed wetland, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Nitrifying bacteria, *Nitrosomonas* sp., Shihwa lake

## 1. 서론

시화호는 수도권 인구의 분산, 농업용지, 농림용지의 조성 과 담수호 조성으로 인한 수자원 확보를 목적으로 안산시·시흥시·화성시에 걸쳐 조성된 인공호수이다. 방조제 완공 이후 산업적 목적으로 담수화가 진행되었다. 그러나 호수로 유입되는 특별한 유입 수원이 없는 상태에서, 인근 공단과 주거지구 및 축산농가 등으로부터 오염물질이 유입되어 시화호 내에 장기간 정체하게 되어 수질이 크게 악화되기 시작하였다(한국해양연구소, 1997). 시화호를 정화하기 위한 여러 노력 가운데 하나로 갈대 등 수생식물을 이용, 자연 정화처리식 하수종말처리장으로 하수를 처리하기 위한 시설물인 104 ha 면적의 대규모 인공습지가 조성되었다(한국수자원공사, 2002). 시화호의 인공습지는 경기도 안산시 사동, 본오동, 화성시 비봉면 일원이며, 반월천, 동화천, 삼화천 합류부 공유수면에 조성된 면적 1,037,500 m<sup>2</sup>, 습지면적 750,923 m<sup>2</sup>, 수심 3.2 m, 수리학적 체류시간이 6일, 표면부터 처리수를 배출시키는 표면류 방식이다(한국수자원공사,

2002). 습지에서 오염물질은 그 특성에 따라 물리적(흡착, 침전 및 여과), 화학적(탈질 및 암모니아 휘산), 생물학적(정수식물 및 미생물에 의한 흡수 동화) 기작에 의해 제거된다(박재홍 등, 2004; 최동환과 김태섭, 1999).

인공습지 내 습지에서 질소는 대부분 질산화와 탈질화의 과정 및 식물의 성장과정에서 영양분으로 이용 과정에서 제거된다(한국수자원공사, 2002). 기존 연구에 따르면 실험실적으로 디자인된 인공 습지 환경에서의 질화세균의 질산화 제거 효율은 0.56 ~ 2.15 g m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>로 보고되어 있다(Tanner et al., 2002). 호기성 독립영양 미생물에 의한 질산화 반응은 암모니아 산화균(ammonia oxidizing bacteria)에 의해 암모니아성 질소가 아질산성 질소로 산화되는 암모니아 산화(nitritation)와 아질산 산화균(nitrite oxidizing bacteria)에 의해 아질산성 질소가 질산성 질소로 산화되는 아질산 산화(nitratation)로 이루어진다. 질산화균은 독립 영양성이며 편성 호기성균, 그람 음성의 특성을 가진다. 이러한 질화세균을 포함한 세균의 분포 및 활성은 환경변화에 민감하게 반응하여 장기적인 모니터링 뿐만 아니라 단기간의 환경변화에 따른 영향을 파악하는데도 유용한 분석방법이 된다(권개경 등, 1998).

본 연구에서는 물환경의 이화학적 상태, 분변오염 지표세

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.  
gko@snu.ac.kr

균의 분포 농도, DGGE를 이용한 암모니아 산화균의 군집 분포를 살펴보았다. 이러한 연구는 일정한 물환경 상태의 습지 환경에서 분포하는 질화세균 중 암모니아 산화균의 군집에 대한 정보를 제공할 것으로 기대된다. 또한, 인공습지의 건설노력이 활발한데 반해, 습지에서 진행되는 수질정화 기작에 관한 연구는 부족한 실정(송근예와 강호정, 2006)에서 습지의 동태 파악, 정화 기능, 작용에 대한 차후 연구에 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 2. 연구 방법

### 2.1. 연구대상 지역의 특성 및 오염원 조사

Table 1에는 시화호로 유입되는 3개 하천의 유역현황이 정리되어 있다. 인구는 반월천이 가장 많았고, 반월천 및 삼화천은 토지의 절반 이상이 임야이며, 동화천은 주로 농업에 이용하였다(한국수자원공사, 2002). Table 2는 시화호로 유입되는 3개 하천의 축산폐수와 산업폐수량 및 오염부하량이 나타나 있다. 축산폐수량을 보면 반월천, 동화천, 삼화천에서 각각 50,775 L/일, 323,446 L/일, 16,703 L/일이고, 산업폐수량은 각각 4,496 L/일, 891 L/일, 30 L/일로 조사되었다. 축산폐수량은 동화천에 의한 영향이 크고, 산업폐수 및 생활하수량은 반월천에 의한 영향이 크다는 것을 알 수 있다. 유기물의 경우(BOD) 반월천, 동화천, 삼화천에 의한 부하량이 각각 2,282 kg/일, 4,991 kg/일, 338 kg/일이며, COD의 부하량은 각각 2,525 kg/일, 5,567 kg/일, 481 kg/일로 조사되었다. 총질소(T-N)의 부하량은 각각 663 kg/일, 1,418 kg/일, 205 kg/일이고, 총인(T-P)의 부하량은 각각 185 kg/일, 666 kg/일, 46 kg/일로 조사되어, 동화천에 의한 영향이 가장 크다는 것을 알 수 있다. 이것은 다른 두 하천에 비해 상대적으로 축산폐수 및 생활하수 발생량이 많기 때문이라 생각할 수 있다.

### 2.2. 시료 채취 지점 선정 및 시료 수집

시화호 갈대습지는 유입되는 하천에 따라 크게 3개의 습지로 나뉘어지는데, 이는 동화천습지(면적 27 ha), 반월천습지(42 ha), 삼화천습지(7 ha)이다. 반월천, 동화천 습지는 습지 조성지역의 지형 특성상 고습지와 저습지로 구분되고,



Fig. 1. Sampling sites in Shiwha constructed wetland.

B<sub>i</sub>: input sites of Banwol stream; B<sub>p</sub>: wetland sites of Banwol stream; B<sub>o</sub>: output sites of Banwol Stream; D<sub>i</sub>: input sites of Donghwa stream, D<sub>p</sub>: wetland sites of Donghwa stream; D<sub>o</sub>: output sites of Donghwa stream; S<sub>i</sub>: input sites of Samhwa stream; S<sub>p</sub>: wetland sites of Samhwa stream

삼화천은 고·저습지 구분이 없다. 고·저습지 구분이 없는 삼화천을 제외한 모든 채수는 저습지에 비해 습지 내 수량이 일정하게 유지되는 고습지를 대상으로 실시하였다. 시화호 갈대습지 수질의 이화학적 분석과 분변오염 지표세균 분포 농도 분석, 질산화세균의 군집 분포 확인을 위한 채수 지점은 Fig. 1과 같다. 동화천습지, 반월천습지는 갈대습지 유입부, 갈대습지 내, 습지 통과 후 방출 부의 지점인 각 세 지점에서 채수하였고, 삼화천은 접근상의 어려움으로 유출부를 제외한 습지 유입부와 습지내의 두 지점에서 채수하였다. 이에 더하여 뿌리부착세균을 분석하기 위하여 습지 내의 두 개의 지점인 동화천 습지 부위와 반월천 습지 부위에서 갈대뿌리를 채취하였다.

시료 수집은 2008년 6월 24일부터 26일까지 10개소에서 반복하여 실시하였고, 수온 변화의 영향을 줄이기 위해서 오전 9시에서 10시 사이에 수행하였다. 채수 방법은 수질공정 시험법에 고시된 방법을 따랐다. 모든 지점에서 채수는 무균성 폴리에틸렌(polyethylen)재질의 1 L 채수병을 이용하여 실시하였다. 채수병을 각 샘플링 위치의 시료로 3회 이상 행군 다음, 미생물학적 분석을 위한 시료는 1.5 L, 이화학적 분석을 위한 시료는 채수한 시료 분석결과와 평균값을 결과로 이용하기 위하여 30분 간격으로 3회(각 1 L) 총 3L

Table 1. Summary of land use in watersheds of 3 streams (Korea water resources corporation, 2002)

Streams	Stream length (Km)	Drainage area (Km <sup>2</sup> )	Population (Persons, 1997)	Current status in land use (Km <sup>2</sup> )			
				Paddy field	Dry field	Forest	etc.
Banwol	10.5	40.9	21,337	6.79	7.07	21.53	5.15
Donghwa	12.2	43.0	20,591	7.08	10.07	14.84	5.31
Samhwa	3.75	16.9	2,587	2.36	5.12	12.61	1.72

Table 2. Levels of water pollution originated from livestock and industry wastes (Korea water resources corporation, 2002)

Streams	Livestock waste (L/day)	Industry waste (L/day)	BOD (Kg/day)	COD (Kg/day)	T-N (Kg/day)	T-P (Kg/day)
Banwol	50,775	4,496	2,282	2,525	663	185
Donghwa	323,446	891	4,991	5,567	1,418	666
Samhwa	16,703	30	338	481	205	46

를 채수하였다. 채수 시 pH등의 현장 측정 항목들을 분석하기 위해 head space가 없도록 채수하였고, 갈대뿌리는 1개 소 당 1점씩 뿌리줄기와 잔뿌리를 포함하여 채취하였다. 분석을 위한 시료는 아이스박스에 넣은 상태로 이동하였다. 채취된 시료는 가능한 빠른 시간 내에 시료 분석을 하였고, 보관이 필요한 경우에는 4°C 냉장 보관하였다.

### 2.3. 이화학적 분석

시료 채취 시 현장에서 측정된 수질기본항목과 측정기기는 다음과 같다. pH, conductivity, 수온은 pH/ISE/Conductivity meter 415CP (ISTEK, Korea), 탁도는 2100P Turbidimeter (HACH, USA)를 사용하였다. 본 연구에 분석된 모든 액체 상의 샘플은 0.45  $\mu\text{m}$  MCE membrane filter(Advantec MFS Inc., USA)를 이용하여 입자상의 물질을 제거한 후 분석하였다. 암모니아성 질소( $\text{NH}_4^+$ ), 질산성 질소( $\text{NO}_3^-$ )는 DX-120 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, Dionex Co., USA)를 사용하여 분석하였다.  $\text{NH}_4^+$ 인 양이온(cation)의 측정에는 Ionpac CS-12A(4×25 mm) 컬럼을 사용하였고,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  등의 음이온(anion)의 측정 시에는 Ionpac AS-14 (4×25 mm) 컬럼을 사용하였다. 사용한 eluent는 양이온(cation)의 측정 시에 20 mM의 methane sulfonic acid (Sigma Aldrich, USA)를 사용하였고, 음이온(anion)의 경우 3.5 mM의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 와 1 mM의  $\text{NaHCO}_3$ (Sigma Aldrich, USA)를 혼합하여 사용하였다. 유속은 양이온의 경우 1.0 mL/min, 음이온의 경우 1.2 mL/min으로 분석하였다.

### 2.4. 미생물 분석

#### 2.4.1. 분변오염 지표세균의 분석

본 연구에서 검사한 분변오염 지표세균 항목은 총대장균군(total coliform), 대장균(*E. coli*), 장내연쇄상구균(*Enterococci* spp.)이었다. 이 항목들을 Colilert<sup>®</sup>과 Enterolert<sup>®</sup> (IDEXX, USA) kit를 이용하여 제조사의 지시에 따라 정량 검사를 실시하였다. 효소발색법을 기반으로 한 이 방법은 우리나라 먹는 물 수질공정 시험법에 등재된 방법이다(환경부, 2002). 정성 검사는 채수한 물 100 mL가 담긴 검사용 플라스틱 용기에 해당 시약(Colilert<sup>®</sup> 또는 Enterolert<sup>®</sup> 시약)을 넣는다. 시약이 모두 녹을 때까지 섞어준 후 해당 온도(Colilert<sup>®</sup>: 35 ± 0.5°C, Enterolert<sup>®</sup>: 41 ± 0.5°C)에서 24시간 동안 배양한다. 이후 색 변화 정도를 comparator와 비교하여 결과를 판정하는데, comparator보다 진하면 양성, 진하지 않으면 음성으로 판독한다. 총대장균군 양성의 경우 육안으로 노란색을 나타내고, 이 시료를 10 cm 거리에서 UV 램프로 비추어 봤을 때 파란색 형광을 나타내면 대장균 양성으로 판정한다. Enterolert<sup>®</sup> 시약을 사용한 시료는 양성의 경우 UV상에서 파란색 형광을 나타낸다. 정량검사는 정성검사와 같은 원리로 검사용 플라스틱 용기 대신 Quanti-Tray<sup>®</sup>/2000를 사용한다. 이때 표본수를 10배, 100배, 1000배 희석한 후 이 트(Tray)에 용액을 넣고 sealer로 봉한 후 정성검사와 같은 조건으로 배양한다. 배양을 완료한 후 IDEXX에서 제공하는 최적확수시험법(Most Probable Number,

MPN) 표를 기준으로 결과를 판독하였다. 그 결과는 MPN/100 mL의 단위로 나타났다.

#### 2.4.2. 암모니아 산화균의 군집 분포 분석

##### 2.4.2.1. 표본수의 농축 및 갈대의 전처리

암모니아 산화균의 분석을 위해서 지표수, 갈대 뿌리의 두 종류의 실험재료를 대상으로 실험을 진행하였다. 각 지표수 1 L를 막여과(직경 47 mm, 구멍 크기 0.45  $\mu\text{m}$ , 니트로셀룰로오스 재질, Whatman, cat no. 7141 104)법을 이용하여 농축하였다. 여과 후 여과막을 멸균된 인산완충용액(phosphate buffered saline) 30 mL가 담긴 비커로 이동시킨 후 자석교반기(magnetic stirrer)를 이용하여 30분 동안 교반한 후 용출된 세균을 포함한 인산완충용액을 10,000 g, 5분의 조건에서 원심분리 후 침전물을 1 mL의 멸균된 3차 증류수로 재부유시키고 DNA 추출 준비를 하였다. 갈대 샘플은 5 mL의 멸균 생리식염수를 넣어준 후 막자사발을 이용하여 분쇄하고 분쇄물을 물에서 분리한 물질과 동일 방법으로 DNA 추출하였다.

##### 2.4.2.2. 샘플에서의 총 DNA 추출

농축된 샘플에서의 총 DNA는 샘플의 특성상 부식산이 일부 포함되어 있을 것으로 추정되어 매뉴얼에 근거하여 사용하였다. MoBio Soil DNA Extraction kit(MoBio)는 라이스자임, 변성제 그리고 비드의 물리적 작용으로 DNA를 추출하여 증합효소연쇄반응에서 생성물의 순도를 높이는 등의 효율이 뛰어난 것으로 이미 보고되었다. 최종 부피는 pH 8.0의 Tris-EDTA 버퍼에 40  $\mu\text{L}$ 였고, 실험 수행 전까지 -20°C에서 보관하였다.

##### 2.4.2.3. DGGE semi nested-PCR을 이용한 *amoA* 유전자의 증폭

Nested PCR 방법을 사용하여 *amoA* 유전자의 증폭을 수행하였다. 프라이머 쌍은 AmoA-1F(332-349), AmoA-2R-TC(802-822)를 이용(Table 3)하여 베타-프로테아박테리아로부터 *amoA* 유전자를 증폭하기 위해 증합효소연쇄반응을 실시하였다. 반응 조건은 10×PCR reaction buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP mix (10 mM) 1  $\mu\text{L}$ , forward, reverse primer (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 각 0.25  $\mu\text{L}$ , G-taq polymerase (Cosmo, Korea) 0.25  $\mu\text{L}$ , water 18.3  $\mu\text{L}$ , sample 2.5  $\mu\text{L}$ 의 조성으로 pre-denature 94°C 5분 반응한 다음 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초의 세 단계를 35 cycle 반복한 후, 72°C 5분 final extension 한 PCR 산물을 4°C에 보관하였다. PCR 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 수행한 후 491 bp의 밴드를 확인하였다. 이 밴드는 AmoA-1F 프라이머 5' 말단에 GC로 구성된 40개의 뉴클레오타이드를 부착함으로써 Tm값이 더 안정화되도록 한 2차 프라이머 쌍인 AmoA-1F-GC, AmoA-2R-TC를 이용(Table 3)하여 1차 PCR과 동일한 조성으로 pre-denature 95°C 5분 반응한 다음 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초의 세 단계를 25 cycle 반복한 후 72°C 5분 final extension을 수행하여 531 bp 크기를 DNA gel extraction kit (Qiagen, USA)으로 정제하여 DGGE 수행 시 사용하였다.

**Table 3.** Primers used for PCR-DGGE analysis in this study

	Sequence	Reference
<i>AmoA</i> -1F-GC	5'-Clamp·-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3' Clamp· : 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3'	(Hornek et al., 2006)
<i>AmoA</i> -1F	5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3'	(Nicolaisen and Ramsing, 2002)
<i>AmoA</i> -2R-TC	5'-CCC CTC TGC AAA GCC TTC TTC-3'	(Nicolaisen and Ramsing, 2002)

2.4.2.4. DGGE의 실시

증폭된 *amoA*의 PCR 산물을 DGGE D-code system (BioRad, CA, USA)을 이용하여 DGGE를 실시하였다. 폴리아크릴아마이드 gel은 8%(37:1 비스아크릴아마이드와 0.5 × TAE 버퍼의 혼합물), 변성도 25~50%를 D-code system의 가이드라인에 따라서 제조하였다. 변성제는 우레아(urea)와 포름알데히드(formaldehyde)를 사용하였다. Gel은 60°C 조건 하에 20 V로 20분간 pre-running하고 전기영동은 200 V로 420분간 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 0.5 µg/mL의 ethidium bromide가 포함된 1 × TAE 버퍼에 20분간 염색을 실시하고, ethidium bromide를 포함하지 않는 1 × TAE 버퍼에 30분간 탈색을 실시하였다.

2.4.2.5. DGGE 밴드패턴 분석

DGGE의 밴드 패턴 분석 및 통계처리는 BioNumerics 소프트웨어 버전 5.1(Applied Maths, Kortrijk, Belgium)(BVBA, 2000)을 이용하여 실시하였다. DGGE 밴드의 다양성 분석은 Simpson's index of diversity와 Shannon-Weiner index of diversity를 이용하였고, 밴드의 패턴 분석은 dendrogram, multi-dimensional scaling (MDS)을 각각 이용하였다.

2.4.2.6. DGGE 밴드의 염기서열 분석

DGGE 절편은 깨끗한 면도칼을 사용하여 잘라낸 다음 Tris-EDTA buffer (pH 8.0) 100 µL에 담겨 4°C에서 12시간 이상 보관하여 DNA를 용출시킨다. 다음날 DNA를 함유한 Tris-EDTA buffer는 *AmoA*-2R TC와 *AmoA*-1F GC primer를 사용하여 2차 PCR을 수행한다. 10 × PCR reaction buffer 2.5 µL, dNTP mix (10 mM) 1 µL, forward, reverse primer (50 pmol/µL) 각 0.25 µL, G-taq polymerase (Cosmo, Korea) 0.25 µL, water 19.75 µL, sample 1 µL의 조성으로 pre-denature 94°C 5분 반응한 다음 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 세 단계를 20 cycle 반복한 후 72°C 5분 final extension한 PCR 산물을 4°C에 보관하였다. PCR 산물을 1% agarose gel에 전기영동을 수행한 후, 531 bp의 밴드를 잘라내어 gel extraction kit (Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였다. 정제된 산물의 염기서열 분석을 위해 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)와 혼합하여, T4 DNA ligase를 사용하여 1시간 동안 실온에서 ligation하였다. 합성된 재조합 DNA는 competent *E.coli*에 heat shock을 통하여 형질전환하였고, LB plate에서 ampicillin과 X-gal을 통해 PCR 산물이 삽입된 *E.coli* 클론을 selection 하였다. 선택된 colony는 LB broth 3 mL에 16 시간 배양하여 plasmid mini prep kit (Cosmo, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 plasmid는 염기서열 분석을 위해 의뢰하였다(Cosmo, Korea).

3. 결과 및 고찰

3.1. 이화학적 특성

연구기간 동안 측정된 수온은 평균 21~27°C의 범위로, 각 하천의 유입점에서 가장 높았고 갈대습지(고습지) 조성지점에서 비교적 낮았다(Table 4). pH는 평균 7.32~8.36의 범위로 약알칼리성이었고, 각 하천의 유입점에서 가장 높았고 반월천 유입에서 그 변화폭이 가장 컸다(Table 4). pH가 너무 높거나 낮으면 질산화세균을 포함 세균의 활동을 저해하는데, 특히, pH가 5.8 이하로 감소하면 질산화 반응이 방해를 받는 것으로 알려져 있다(Princic et al., 1998). 관찰 기간 동안 pH는 질산화세균의 질산화 최적 pH 조건인 7~8.5(Sharma and Ahlert, 1977)를 벗어나지 않는 범위였다. 전기전도도는 평균 465.78~759.33µS의 범위를 나타냈으며, 동화천 유출점에서 가장 낮았고 반월천 유입점에서 가장 높았으며 반월천의 영향을 받는 B1~B3에서는 그 변화폭이 가장 컸다. 동화천의 영향을 받는 D1~D3에서는 대체적으로 낮은 전기전도도를 유지하였다(Table 4). 탁도는 평균 2.12~20.94 NTU의 범위를 나타냈으며 대체적으로 각 하천의 유입점에서 가장 높았고 갈대습지(고습지) 조성지점에서 가장 낮았다(Table 4). 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)는 평균 94.16~180.01 ppm(mg/L)의 범위를 나타내었다. 반월천 유입점과 유출점에서 최대였으며 갈대습지를 관류한 뒤에는 약간 감소하였다. 반월천과 동화천에서의 암모니아성 질소의 변화량은 유입점에서 갈대습지를 관류한 후 감소하다 유출점에서 다시 증가하였다. 그러나, 삼화천에서는 유입점에서 갈대습지를 관류한 후 오히려 증가하였다(Table 2). 질산성 질소(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)는 평균 0.36~15.28 ppm(mg/L)의 범위로 반월천 갈대습지 조성지점과 동화천 유입점에서 가장 높게 나타났고, 동화천 갈대습지 조성지점과 삼화천 갈대습지 조성지점에서 가장 낮게 나타났다. 동화천과 삼화천에서의 질산성 질소의 변화량은 유입점에서 갈대습지를 관류한 후 큰 폭으로 감소하였으나, 반월천에서는 유입점에서 갈대습지를 관류한 후 오히려 큰 폭으로 증가하였다(Table 4). 이와 같은 결과는 독립영양 미생물인 암모니아 산화균의 질산화 과정에 영향을 주는 환경 조건을 알 수 있는 이화학적 검사에서 이들 환경요인이 암모니아 산화균의 증식 및 활동에 적합한 정도로 유지되고 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 내용은 영향을 줄 수 있는 환경 조건 중에서도 특히 중요한 수온, 용존 산소, pH 중 측정 기기 부족의 문제로 측정하지 못한 용존 산소를 제외한 측정 결과를 바탕으로 얻은 결과이다.

**Table 4.** Environmental factors in constructed wetland of Lake Shiwha in this study

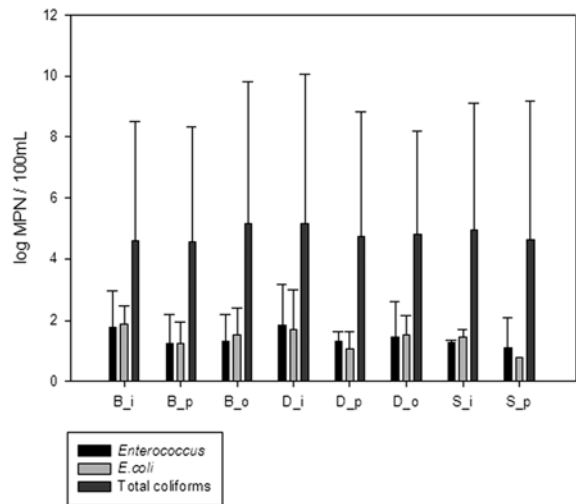
Sites	pH		Cond. (μs) <sup>a</sup>		Cond. (μs)		Temp. (°C)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	mean	S.E. <sup>b</sup>	mean	S.E. <sup>b</sup>	mean	S.E. <sup>b</sup>		mean	S.E. <sup>b</sup>	mean	S.E. <sup>b</sup>
Banwoul Input (B1)	8.36	0.37	759.33	20.17	20.94	2.71	25.00	178.62	4.20	14.57	0.12
Banwoul Pond (B2)	7.49	0.03	586.22	8.03	3.03	0.48	21.00	128.72	1.86	1.43	0.26
Banwoul Output (B3)	7.54	0.03	734.78	11.10	19.41	3.65	24.00	180.01	2.89	0.97	0.09
Donghwa Input (D1)	7.80	0.04	505.33	11.62	20.87	1.99	25.00	96.91	1.22	15.28	0.26
Donghwa Pond (D2)	7.36	0.03	490.45	14.34	2.12	0.33	24.00	94.16	1.09	9.18	0.04
Donghwa Output (D3)	7.34	0.04	465.78	11.87	3.02	0.71	23.00	88.70	3.55	2.91	0.09
Sanhwa Input (S1)	8.26	0.12	528.33	6.02	15.12	0.72	27.00	103.97	1.47	2.75	0.25
Sanhwa Pond (S2)	7.32	0.05	583.22	13.86	7.77	1.71	23.00	129.53	1.00	0.36	0.02

<sup>a</sup>Cond. : Conductivity <sup>b</sup>S.E. : Standard Error

**3.2. 미생물 분석**

**3.2.1. 유입수, 갈대 조성 지역 및 유출수의 분변오염 지표 세균 분포 농도**

분변오염 지표세균 분포 농도 시험 시, 표본수마다 최확수(MPN)를 계산하기에 적당한 농도가 되도록 표본수를 원액, 10배, 100배, 1000배 희석하여 배양한 후, MPN을 측정하기에 적당한 농도가 되는 희석배수의 표본수를 선택하여 IDEXX에서 제공하는 최적확수시험법(MPN) 표를 기준으로 결과를 판독하였다. 대장균과 연쇄상구균은 희석하지 않은 원액, 총대장균군은 100배 희석한 샘플을 선택한 후 희석 배수를 고려하여 단위를 환산하여 계산하였다. 3일 동안 분변오염 지표세균인 총대장균군, 연쇄상구균, 대장균의 분포 농도의 결과값 중 이상치를 제외한 평균과 표준편차는 Table 5와 같다. 대장균, 연쇄상구균과 총대장균군의 값은 log 변환하여 Fig. 2에 나타내었다. 모든 지점에서 표본수 원액 100 mL로 검사시 대장균, 연쇄상구균, 총대장균군이 검출되었다. 동화천과 반월천, 삼화천의 갈대습지 유입수, 습지내, 유출수를 비교했을 때, 분변오염 지표세균별로 분포



**Fig. 2.** Levels of fecal contamination in wetlands.

B\_i : input sites of Banwol stream; B\_p: wetland sites of Banwol stream; B\_o: output sites of Banwol Stream; D\_i: input sites of Donghwa stream, D\_p: wetland sites of Donghwa stream; D\_o: output sites of Donghwa stream; S\_i: input sites of Samhwa stream; S\_p : wetland sites of Samhwa stream

**Table 5.** Levels of microbial contamination in constructed wetland of Lake Shiwha in this study

MPN / 100 mL	Enterococcus sp.		E.coli		Total coliforms	
	mean <sup>a</sup>	s.d.	mean	s.d.	mean	s.d.
B_i <sup>b</sup>	57.9	16.8	73.3	4.2	40,290.0	8,216.6
B_p	18.1	8.6	17.9	4.8	36,805.0	6,017.5
B_o	21.0	7.4	33.4	7.7	138,945.0	48,571.2
D_i	67.9	22.4	49.3	20.9	142,615.0	79,217.2
D_p	20.1	2.2	12.0	3.5	52,405.0	12,593.6
D_o	28.6	14.2	33.9	4.2	63,055.0	2,467.8
S_i	18.7	0.8	29.3	1.7	87,520.0	14,877.5
S_p	13.0	9.5	6.3	0.0	44,275.0	34,499.7

<sup>a</sup>Mean: average value for 3 days (except outliers), s.d.: standard deviation

<sup>b</sup>B\_i: input sites of Banwol stream, B\_p: wetland sites of Banwol stream, B\_o: output sites of Banwol Stream, D\_i: input sites of Donghwa stream, D\_p: wetland sites of Donghwa stream, D\_o: output sites of Donghwa stream, S\_i: input sites of Samhwa stream, S\_p: wetland sites of Samhwa stream

농도 양상이 달랐는데 대장균과 연쇄상구균의 경우 반월천 (63 MPN/100 mL, 44 MPN/100 mL), 동화천(85 MPN/100 mL, 50 MPN/100 mL)의 유입수에서 높게 나타났다. 이 유입수가 습지에 머무르면서, 연쇄상구균은 반월천에서 36%, 동화천에서 46%, 대장균은 반월천에서 78%, 동화천에서 85% 감소하였다. 총대장균군의 경우 반월천은 유입수, 습지에서 거의 변화가 없었으며(1.7% 증가) 동화천은 62% 감소하였다. 삼화천은 대장균의 경우 유입수보다 습지에서 48% 감소하였지만 연쇄상구균은 오히려 증가하였다. 유입수와 습지와의 비교에서 유입수보다는 습지에서 분변오염 지표세균의 농도가 전반적으로 감소한 것은 이미 알려진 것처럼(김법철 등, 2000; 최동환과 김태섭, 1999) 습지의 정화 기능에 의한 것이거나, 습지의 갈대 줄기 등에 세균들이 부착한 결과일 것으로 추정된다(Arias et al., 2003; Ottova et al., 1997). 전반적인 경향과는 다른 결과를 보인 분변오염 지표세균은 유입수보다 습지내에서 분포 농도가 높았던 삼화천의 연쇄상구균(83% 증가), 총대장균군(74% 증가)이었는데, 이는 삼화천의 경우 다른 습지와는 다르게 강수량이 많을 때에만 수문을 열어 물을 공급하고, 평상시와 가뭄에는 습지 유지수량이 일정하지 않은 유지방법의 특성상, 습지 정화 기능이 유지될 수 있는 요소들이 부족한 이유 때문으로 추정된다. 습지 내부에 비해 유출수에서의 분변오염 지표세균 분포 농도가 증가한 것은 여러 다른 요인으로 인한 것으로 보이며 차후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

3.2.2. 암모니아 산화균 군집 분석

3.2.2.1. *amoA* gene에 대한 DGGE 밴드패턴 분석

암모니아 산화균의 *amoA* 유전자의 PCR 증폭 산물에 대한 DGGE profile은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Gel 상에서 다양한 위치의 밴드들을 확인할 수 있다. Fig. 3의 DGGE profile을 바탕으로 시료 채취 장소별 암모니아 산화균의 분포 차이를 보다 정확하게 파악하기 위하여, 밴드 강도와 수를 비교하여 2차원적으로 나타낸 Dendrogram (Fig. 4)과 3차원적으로 Multi-Dimensional Scailing (MDS) (Fig. 5)으로 분석을 수행하였다. Fig. 4는 밴드 패턴에 기초로 한 미생물 군집구조의 유사도를 결정한 UPGMA dendrogram을 설명하고 있다. 각 밴드 패턴 간 유사도는 100을 기준으로 각 가지마다 표기되어 있다(Ferrari and Hollibaugh, 1999; Lee et al., 2009). Fig. 4의 결과 3일간의 반월천 습지, 2일째의 반월천 유입수 시료(4개 시료)를 제외한 다른 시료 채취 장소에서 채취한 시료들(26개 시료)은 시료 채취 날짜에 따른 유사도에 큰 차이가 없었다. 3일간의 시료별로 시료 채취 장소가 다른 시료와는 독립적인 그룹을 나타냈다. 이러한 결과는 암모니아 산화균을 포함하는 질화세균은 성장 속도가 느린 독립영양생체균(Belser, 1979)으로, 3일 동안 암모니아 산화균의 성장으로 인한 큰 변화는 없었기 때문으로 사료된다. 습지, 유입수, 유출수 중 먼저, 습지 내 질화 세균의 분포는, Fig. 4의 제일 윗 그룹인 삼화천 습지의 경우 다른 시료채취장소와 15.2%의

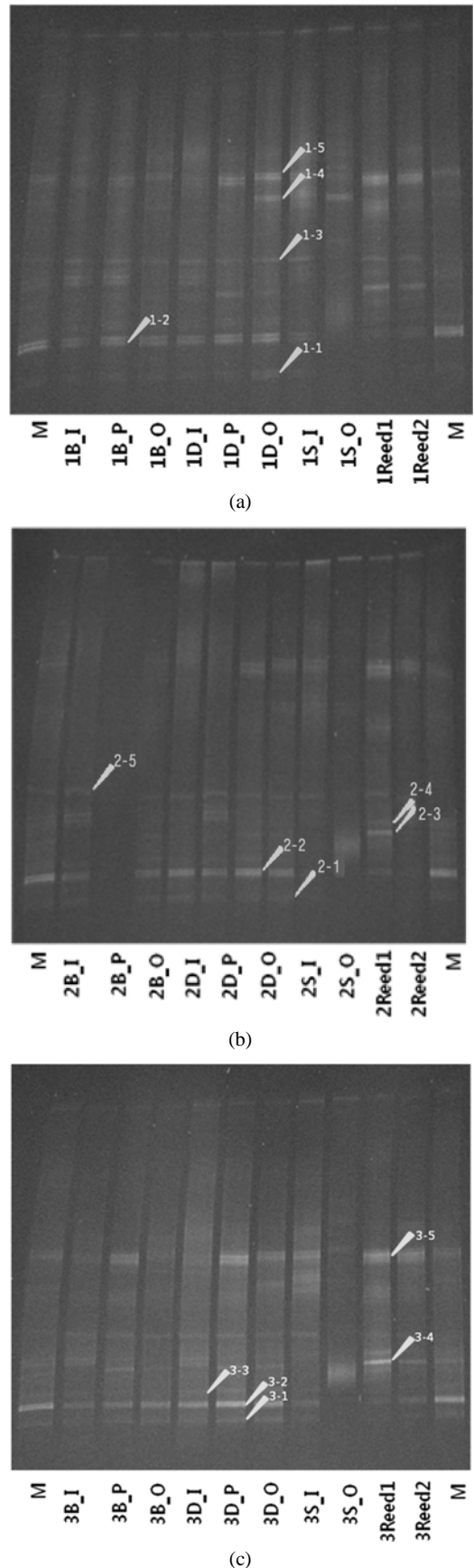
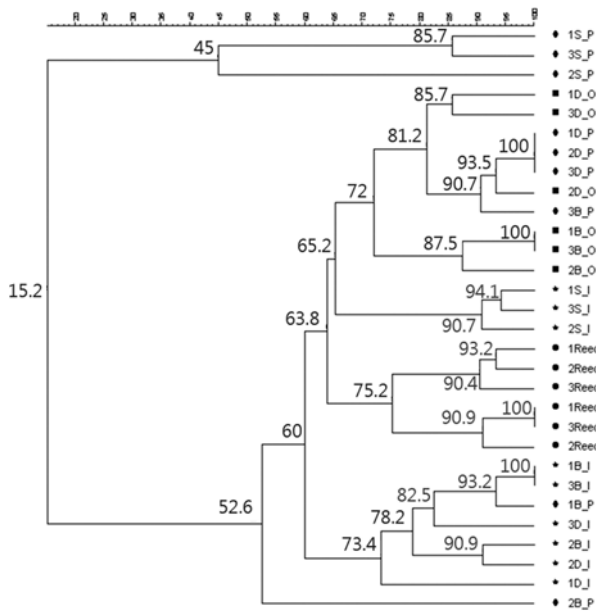
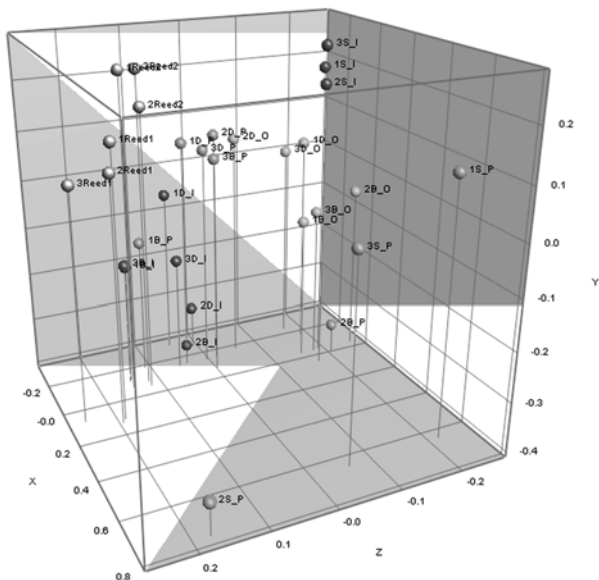


Fig. 3. The results from DGGE analysis in this study. (a) Day1 sample, (b) Day2 sample, (c) Day3 sample. 1:1-1, 2:1-2, 3:1-3, 4:1-4, 5:1-5, 6:2-1, 7:2-2, 8:2-3, 9:2-4, 10:2-5, 11:3-1, 12:3-2, 13:3-3, 14:3-4, 15:3-5



**Fig. 4.** Dendrogram of DGGE band pattern of ammonia oxidizing bacteria at each sampling sites. Similarity percentages between sampling sites are represented above. Similarity of banding patterns was estimated by a percentage of the Dice coefficient and UPGMA.  
 1: Day1 sample, 2: Day2 sample, 3: Day3 sample, B\_i: input sites of Banwol stream, B\_p: Wetland sites of Banwol stream, B\_o: Output sites of Banwol Stream, D\_i: input sites of Donghwa stream, D\_p: Wetland sites of Donghwa stream, D\_o: Output sites of Donghwa Stream, S\_i: input sites of Samhwa stream, S\_p: Wetland sites of Samhwa stream, Reed: Nitrifying bacteria of reed root



**Fig. 5.** A three-dimensional representation of a dendrogram resulting from cluster analysis based on DGGE banding patterns of nitrifying bacteria at each sampling sites.  
 1: Day1 sample, 2: Day2 sample, 3: Day3 sample, B\_i: input sites of Banwol stream, B\_p: Wetland sites of Banwol stream, B\_o: Output sites of Banwol Stream, D\_i: input sites of Donghwa stream, D\_p: Wetland sites of Donghwa stream, D\_o: Output sites of Donghwa Stream, S\_i: input sites of Samhwa stream, S\_p: Wetland sites of Samhwa stream

특이적으로 낮은 유사도를 보였으며, 그 이외의 두 시료채취장소인 반월천, 동화천은 서로 52.6%의 높은 유사도를 보였다. 이를 통해 지속적으로 유량이 유지되는 반월천, 동화천과 다른 하천에 비해 유량이 적은 심화천에 분포하는 암모니아 산화균이 다를 수 있다. 갈대 부착 암모니아 산화균, 유입수, 유출수도 다른 유사도 패턴을 보면 갈대, 유입수, 유출수, 습지내부가 대체적으로 군집을 이루는 것을 확인할 수 있었다. 각 시료 내 암모니아 산화균의 분포의 상대적인 위치를 3차원으로 나타낸 Fig. 5에서도 날짜별 채취된 시료들(30개 중 26개)이 Fig. 4와 비슷한 양상의 군집을 이루는 것을 확인할 수 있었다.

인공습지에 분포하고 있는 암모니아 산화균의 다양성 파악을 위해 실시된 Simpson's index of diversity, Shannon-Weiner index of diversity 값은 각각 76.55%, 1.3622이었다. Simpson's index of diversity(Simpson, 1949)와 Shannon-Weiner index of diversity(Shannon and Weaver, 1949)는 생물다양성을 표준화하기 위한 지수이다. Shannon-Weiner index of diversity는 총 개체수와 총 종수에 대한 정보를 바탕으로 군집의 상태를 표현하는 반면, Simpson's index of diversity가 조사지점에서 출현하는 각 종들이 편중되어 있는지 분산되어 있는지를 평가하는 우점도(dominance index)에 초점을 두는 것이 이 두 지수의 차이점이다(김성훈 등, 2007). 생물다양성을 표준화한 이 두 지수는 향후 암모니아 산화균 군집 분석을 실시하였을 때 다양성의 변화 정도를 확인할 수 있는 참고 자료로 활용될 수 있다. 즉, 수치가 증가하거나 감소한 경우, 분포하고 있는 암모니아 산화균의 다양성도 증가하거나 감소한 것으로 생각될 수 있다(Mosier and Francis, 2008).

3.2.2.2. DGGE 밴드들의 염기서열 분석

Fig. 3의 DGGE profile은 서로 다른 이동도를 가지는 밴드를 나타내는데 이 염기서열을 NCBI의 데이터를 바탕으로 비교한 결과 *amoA* 유전자와 87~99%의 상동성을 보였다(Table 6). 실험을 통해 얻은 밴드들의 염기서열과 NCBI 데이터 베이스의 *amoA* 유전자의 상대적인 유사도를 바탕으로 작성한 계통수를 Fig. 6에 나타내었다. 비교군으로 사용한 개체의 염기서열은 암모니아 산화균인 *Nitrosococcus* sp. C-113 strain의 *amoA* 유전자였다. 밴드들에서 얻은 유전자는 *Nitrosomonas*를 포함한 암모니아 산화균과 상동성 있는 균임을 확인하였다(Table 6, Fig. 6).

Fig. 6과 Table 6에서 3(1-3), 9(2-4), 10(2-5)은 Qin 등(2008)에 의해 보고된 암모니아 산화균의 *amoA* 유전자 DGGE gel 밴드의 염기서열과 비슷하였다. Qin 등(2008)에 의해 보고된 이 암모니아 산화균은 중국의 바이오필름 반응조에서 검출된 균이었다.

Fig. 3의 밴드 2(1-2), 7(2-2), 12(3-2)는 삼화천의 유입, 유출수에 비해 동화천의 습지, 반월천 습지, 유출수에서 강하게 나타났다. DGGE gel상의 각각의 밴드는 개체군을 의미하고 이 밴드의 강도는 특정 개체군의 상대적 풍부도를 나타낸다(Muyzer et al., 1993). 그러므로 2, 7, 12 밴드

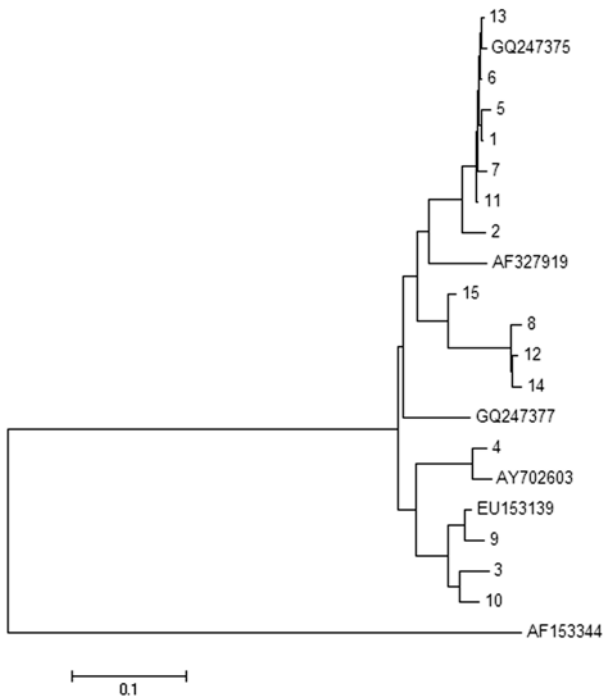
**Table 6.** Identification of the bands obtained from DGGE profile of ammonia oxidizing bacteria

Excised band <sup>a</sup>	Accession no.	Phylogenetic affiliation	Sequence identity(%) <sup>b</sup>
1	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	481/486(98) <sup>c</sup>
2	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	467/486(96)
3	EU153139	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium isolate DGGE gel band R2 ammonia monooxygenase ( <i>amoA</i> ) gene, partial cds	425/454(93)
4	AY702603	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone P22-3 ammonia monooxygenase ( <i>amoA</i> ) gene, partial cds	474/487(97)
5	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	477/486(98)
6	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	482/486(99)
7	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	479/486(98)
8	GQ247377	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab5 amoA gene, partial cds	422/482(87)
9	EU153139	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium isolate DGGE gel band R2 ammonia monooxygenase ( <i>amoA</i> ) gene, partial cds	443/453(97)
10	EU153139	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium isolate DGGE gel band R2 ammonia monooxygenase ( <i>amoA</i> ) gene, partial cds	435/454(95)
11	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	480/486(98)
12	AF327919	<i>Nitrosomonas</i> sp. JL21 ammonia monooxygenase subunit A ( <i>amoA</i> ) gene, complete cds	432/490(88)
13	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	482/486(99)
14	AF327919	<i>Nitrosomonas</i> sp. JL21 ammonia monooxygenase subunit A ( <i>amoA</i> ) gene, complete cds	431/490(87)
15	GQ247375	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone Ab2 amoA-like gene, partial sequence	451/489(92)

<sup>a</sup>Bands were extracted from the DGGE gel shown in Fig. 3

<sup>b</sup>Sequence identity based on maximum identity

<sup>c</sup>The part of the total sequence used in alignment.



**Fig. 6.** Phylogenetic tree of ammonia oxidizing bacteria in constructed wetland of Lake Shiwha.

1;1-1, 2;1-2, 3;1-3, 4;1-4, 5;1-5, 6;2-1, 7;2-2, 8;2-3, 9;2-4, 10;2-5, 11;3-1, 12;3-2, 13;3-3, 14;3-4, 15;3-5, AF153344 is *Nitrosococcus* sp. C-113 strain C-113 ammonia monooxygenase subunit A (*amoA*) gene

에 해당하는 암모니아 산화균은 습지의 위치에 따라 분포 농도가 높아지거나 낮아지기도 하여, 다른 개체에 비해서, 인공습지의 정화 능력에 중요한 영향을 줄 수 있는 균으로

사료된다. 이 개체군은 GQ247375 (2, 7번 밴드, Uncultured *Nitrosomonas* sp. clone Ab2 *amoA*-like gene)과 AF327919 (12번 밴드, *Nitrosomonas* sp. JL21 *amoA* gene)과 유사한 염기서열(상동성 96, 98, 88%)을 가진 개체이다. 또한 8번 14번 밴드는 채수된 물에서보다 갈대뿌리 시료에서 비교적 강한 밴드를 나타냈다. 이 개체군은 갈대뿌리에 주로 부착하고 있는 암모니아 산화균으로 사료된다. 이 개체군은 GQ247377 (8번 밴드, Uncultured *Nitrosomonas* sp. clone Ab5 *amoA* 유전자)과 AF327919 (12번 밴드, *Nitrosomonas* sp. JL21 *amoA* gene)과 유사한 염기서열(상동성 87, 88%)을 가진 개체이다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 시화호 내의 갈대습지로 유입되는 하천별 습지(동화천, 반월천, 삼화천)에서 유입수, 습지, 유출수별 이화학적 분석 및 분변오염 지표세균 분포 농도와 암모니아 산화균의 군집 분포를 살펴봄으로써, 2002년도에 건립된 인공갈대습지 내 정화기능을 살펴보고, DGGE를 통해 분포하고 있는 암모니아 산화균의 군집을 살펴보았다. 본 연구를 통한 결론은 다음과 같다.

- 1) 수질의 이화학적 분석 결과 pH, 전기전도도, 탁도, 수온 면에서 시화호 인공습지는 암모니아 산화균을 포함한 질화세균이 증식하고 활동하기에 적당한 환경으로 사료된다.
- 2) 분변오염 지표세균 분포 농도는, 동화천과 반월천은 유입수에 비해 습지에서 감소하였다. 즉, 연쇄상구균은 36%



(반월천), 46%(동화천), 대장균은 78%(반월천), 85%(동화천), 총대장균군은 62%(동화천) 감소하였거나 거의 변화가 없었다(반월천의 총대장균군). 이는 습지의 정화 기능에 의한 것이거나, 습지의 갈대 줄기 등에 세균들이 부착한 결과일 것으로 추정된다. 반면, 습지의 관리 방식이 다른 삼화천에서의 대장균은 유입수보다 습지에서 감소(48%)하였지만 연쇄상구균과 총 대장균군은 증가(각각, 83%, 74%)하여 다른 양상을 보였다.

- 3) DGGE를 이용한 질산화세균의 군집 분포 면에서 우선, 유입수, 유출수, 습지내부가 대체적으로 비슷한 군집을 이루고 있었다. 유역별로는 반월천, 동화천은 서로 52.6%의 높은 유사도를 보이는 반면 삼화천 습지는 다른 시료채취장소와 15.2%의 낮은 유사도를 보였다. 이는 유량이 일정하게 유지되어 수질 정화의 기능을 적절하게 담당하고 있는 반월천, 동화천과 홍수 방지 기능 및 유량과 물순환이 일정하지 않은 삼화천 습지 내에는 다른 유형의 암모니아 산화균이 분포하고 있기 때문으로 보여진다.

## 사 사

본 연구는 서울대학교 환경보건학과 공동교과목인 지역사회보건실습으로 수행되었으며, 환경진흥원 차세대핵심환경기술개발사업(900-20080010)에 의해 일부 지원되었습니다.

## 참고문헌

- 권계경, 이정현, 손재학, 김상진, 이홍금, 이재학(1998). 시화호의 세균분포 및 종속영양활성의 연중변화. *학술대회는 문집, 한국해양환경공학회*, pp. 55-60.
- 김법철, 김호섭, 전만식, 황길순(2000). 습지에 의한 수질개선 효과. *한국유수학회지*, **33**(3), pp. 295-303.
- 김성훈, 김정환, 허 준(2007). 환경영향평가를 위한 생물다양성 분석의 표준화 연구. *학술대회논문집, 대한토목학회*, pp. 3802-3805.
- 박재홍, 최의소, 조일형(2004). 인공습지를 이용한 축산폐수의 처리. *수질보전 한국물환경학회지*, **20**(2), pp. 157-162.
- 송근예, 강호정(2006). [특집: 생태복원-인공습지] 수질정화를 위한 인공습지의 건설 및 적용. *지반환경*, **7**(1), pp. 6-10.
- 최동환, 김태섭(1999). 인공습지의 수질정화: 갈대인공습지의 수질정화를 중심으로. *농공기술*, **16**(9), pp. 78-85.
- 한국수자원공사(2002). 시화호 갈대습지 공원. <http://sihwa.kwater.or.kr/>.
- 한국해양연구소(1997). *시화호의 환경변화조사 및 보전대책 수립에 관한 연구*(1차년도 보고서).
- 환경부(2002). *먹는물수질공정시험방법*.
- Arias, C. A., Cabello, A., Brix, H., and Johansen, N. H. (2003). Removal of indicator bacteria from municipal wastewater in an experimental two-stage vertical flow constructed wetland system. *Water Sci. Technol.*, **48**(5), pp. 35-41.
- Belser, L. (1979). Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, **33**(1), pp. 309-333.
- BVBA, A. (2000). *BioNumerics: the integral study of biological relationships*, Manual, Version 2.00. *KortRijk, Belgium*.
- Ferrari, V. C. and Hollibaugh, J. T. (1999). Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean Basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. *Hydrobiologia*, **401**, pp. 55-68.
- Hornek, R., Pommerening-Roser, A., Koops, H. P., Farnleitner, A. H., Kreuzinger, N., Kirschner, A., and Mach, R. L. (2006). Primers containing universal bases reduce multiple amoA gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. *J. Microbiol. Methods*, **66**(1), pp. 147-155.
- Lee, S., Choi, B., Yi, S. M., and Ko, G. P. (2009). Characterization of microbial community during Asian dust events in Korea. *Sci. Total Environ.*, **407**, pp. 5308-5314.
- Mosier, A. and Francis, C. (2008). Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology*, **10**(11), pp. 3002.
- Muyzer, G., De Waal, E., and Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(3), pp. 695-700.
- Nicolaisen, M. H. and Ramsing, N. B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **50**(2), pp. 189-203.
- Ottova, V., Balcarova, J., and Vymazal, J. (1997). Microbial characteristics of constructed wetlands. *Water Sci. Technol.*, **35**(5), pp. 117-124.
- Princic, A., Mahne, I. I., Megusar, F., Paul, E. A., and Tiedje, J. M. (1998). Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(10), pp. 3584-3590.
- Qin, Y., Zhang, X., Ren, H., Li, D., and Yang, H. (2008). Population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in an aerated submerged biofilm reactor for micropolluted raw water pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**(1), pp. 135-145.
- Shannon, C. and Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL, U.S.A.
- Sharma, B. and Ahlert, R. C. (1977). Nitrification and Nitrogen Removal. *Water Research*, **11**, pp. 897-925.
- Simpson, E. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, **163**, pp. 688.
- Tanner, C. C., Kadlec, R. H., Gibbs, M. M., Sukias, J. P. S., and Nguyen, M. L. (2002). Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands - influence of wastewater characteristics. *Ecological Engineering*, **18**(4), pp. 499-520.