



하수처리장에서의 암모니아 전환 미생물군의 생태학적 연구

Microbial ecology of the anaerobic and aerobic ammonia-oxidizers in full-scale wastewater treatment systems

박흥근¹ · 김영모¹ · 이재우² · 김성표^{2*}

Hongkeun Park¹ · Young Mo Kim¹ · Jaewoo Lee² · Sungpyo Kim^{2*}

1 콜럼비아대학교 지구환경공학과 · 2 고려대학교 환경시스템공학과

(2012년 4월24일 접수; 2012년 5월24일 수정; 2011년 5월30일 채택)

Abstract

The overall goal of this study was to characterize and quantify ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in four different full-scale sequence batch reactor (SBR) wastewater treatment plants. Also, this study focused on assessing the occurrence of the alternative ammonia-oxidizing microbes such as anammox (anaerobic ammonia oxidation) bacteria (AMX) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) in these systems. Based on total AOB numbers and the estimated cell density in the mixed liquor samples, AOB constituted 0.3 - 1.8% of the total bacterial population in the four WWTPs. Based on clone library, Nitrosomonas ureae-like AOB were dominant in plant A and B, while plant C and D had Nitrosomonas nitrosa-like AOB as major AOB group.

The four different AMX primer sets targeting AMX 16S rRNA gene produced PCR amplicons distantly related to Chlamydia and Planctomycetales group bacteria. However, it was not clear these groups of bacteria perform anammox reaction in the SBR plants. Also, molecular evidence of AOA was found in one of the SBR plants, with a sequence located in the deep branch of the sediment creanarchaeota group.

Key words : SBR, AOB, anammox, AOA, qPCR

주제어: 회분식 반응조, 질산화 미생물, anammox, 질산화 고세균, 정량중합효소 연쇄 반응

1. 서론

하수처리에서 생물학적 질소 제거는 용존산소 고갈문제와 수생생태계의 독성저감, 그리고 방류하천의 수질개선을 위해 필수적인 공정이다. 생물학적 질산화는 암모니아성 질소 산화와 아질산성 질소 산화로 나뉘며 암모니아성 질소 산화는 호기성 상태에서 암모니아 산화균에 의하여 하이드록실 아민으로 산화된 후 최종적으로 아질산성 질소로 산화되는 반응이다. 아질

산성 질소 산화는 호기성 상태에서 아질산성 산화균에 의하여 질산성 질소로 전환되는 과정을 말한다. 그러나, 암모니아 산화균의 기질 이용률 (substrate utilization rate; q) 이 아질산성 질소 산화균에 비해 현저히 낮기 때문에 ($q_{n, AOB} = 2.3 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N/mg VSSa/d}$, $q_{n, NOB} = 9.8 \text{ mg NO}_2^- \text{-N/mg VSSa/d}$) 암모니아의 산화과정이 전체 질산화 과정의 속도제한 단계(rate-limiting step)가 된다고 알려져 있다 (Rittmann and McCarty, 2001). 이에 본 연구에서

*Corresponding author Tel : (041) 860-1457, E-mail : ub10905ub@korea.ac.kr(S. P. Kim)

는 AOB의 대표적 미생물종으로 *N. europaea*, *N. oligotropha*, *Nitrosospira spp.*를 선정하여 각각 정량분석하였다 (Harms *et al.*, 2003, Regan *et al.*, 2007).

최근 다수 연구결과에 따르면 암모니아 산화 고세균 (AOA; ammonia-oxidizing archaea)이 자연계 내에서의 질소 순환에 커다란 영향을 주는 것으로 밝혀졌으나 (Church *et al.*, 2010) 이들 AOA의 하수처리장내에서의 질산화에 관여 정도는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이에 대해서는 여러 이유가 있겠으나, 처리장 별 AOA 및 AOB간의 관계, 정확한 AOA *amoA* 검출의 어려움 등이 문제점으로 거론된다 (Kayee *et al.*, 2011). 다시 말해 AOA의 분자학적 증거인 *amoA* 과 AOB *amoA*의 비율은 처리장별로 매우 다르며, AOA *amoA* 검출을 위한 특정 primer의 비특이적 증폭이 다소 발생되어 (Zhang *et al.*, 2011) 정확한 AOA의 정량분석에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 이러한 이유들로 인해 AOA가 하수처리장내 질산화 공정에 끼치는 기여도는 현재까지 명확히 밝혀져 있지 않은 실정이다.

Anammox (anaerobic ammonia oxidation) 세균 (AMX)은 1990년대 후반에 발견되었으며 암모니아와 아질산성 질소를 각각 전자 공여체와 수용체로 사용하여 혐기성 조건에서 질소가스를 발생시키는 균주이다. 현재까지 알려진 바로는 일산화질소 (nitric oxide)와 하이드라진 (hydrazine)을 중간 산물로 발생시키며 성장속도가 매우 느리고 (doubling time, 증배시간= 12일) 산소와 아질산성질소, 메탄올에 노출되었을 경우 활성이 떨어지는 것으로 보고되고 있어 AMX를 실용화한 사례가 세계적으로 많지는 않은 형편이다 (Strous *et al.*, 1999). 그러나, 산소를 소모하지 않고, 아산화질소 등의 온실가스를 배출하지 않으며 오히려 이산화탄소를 탄소원으로 사용하여 자가증식하는 장점들로 인하여 주로 소화조 상등액등의 side stream 처리에 중점을 두고 있는 반면, AMX를 이용하여 유입 하수를 직접 처리하는 활용 사례는 아주 드

물다. 따라서 본 연구와 같이 활성슬러지 포기조 내에서의 AMX의 분자생물학적 발견은 매우 의미 있는 일이라 할 수 있겠다.

본 연구는 하수처리장 활성슬러지 내의 암모니아 전환 미생물들의 존재 여부확인 및 분류에 관한 연구를 수행하여 추후 각각 미생물들의 정량분석에 대한 기반을 마련하고자 하는 것을 목표로 하였다. 이를 위해, 본 연구에서는 4개의 실규모 연속회분식 하수처리장에서의 AOB, AOA 그리고 AMX의 다양성에 관한 연구를 각각 *amoA*와 16S rRNA gene을 통하여 수행하였고, 유전자 증폭을 통하여 AOB의 정량분석을 실시하여 이를 이용한 각 하수처리장의 비질산화율을 도출하였으며 AOB 다양성과 하수처리장 운전인자와의 상관관계를 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 연속회분식 반응조

본 연구에서는 뉴욕주(Guilderland), 펜실베이니아주(Moon twp, Warminster)와 노스캐롤라이나주(Conover) 등지에 위치한 네 개의 서로 다른 실규모 연속회분식 반응조에서 슬러지를 각 1회 채취하였으며 처리장 세부 사항은 Table 1에 기술하였다.

2.2 DNA 추출 및 PCR

각 처리장에서 채취한 슬러지는 원심분리기로 원심분리 한 후 상등액을 제거하여 얻은 시료(슬러지)를 즉시 PowerSoil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 정량 및 정성분석은 전기영동과 발색법을 사용하여 실시하였다. 16S rRNA gene과 *amoA*을 증폭하기 위하여 Table 2의 프라이머를 사용하였다.

AOB *amoA*를 대상으로 하는 25 μ L PCR 반응물을 위해, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM인 각각

Table 1. Operating conditions of the four SBR systems.

WWWP	Flow rate(m ³ /d)	Temp ¹ (°C)	pH	HRT (h)	SRT (day)	Inf. BOD (mg /L)	Ammonia Loading (kg N/m ³ /d)	DO (mg/L)	MLSS (mg/L)
A	3,400	18.4	6.3	29.9	N/A	280	15.7	5.5	4,270
B	7,950	16.0	7.5	20.8	60.0	160	30.3	6.8	3,570
C	3,400	N/A	7.5	46.0	60.6	166	17.1	N/A	3,740
D	2,270	N/A	7.1	46.0	27.4	169	9.9	N/A	3,740

Table 2. PCR primer TaqMan probe sets for this study

Primer or probe	Sequence(5' -3')	Target	Reference
<i>amoA</i> -1F <i>amoA</i> -2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	Bacterial <i>amoA</i> gene	(Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997)
Planc-0046F Amx-0368R Amx-820R BS-820R Scabr-1114R	GGATTAGGCATGCAAGTC CCTTTCGGGCATTGCGAA AAAACCCCTCTACTTAGTGCC TAATTCCTCTACTTAGTGCC CCCGCTGGTAACTAAAAACAAG	<i>Planctomycetales</i> All Anammox <i>Ca. Brocadia</i> <i>Ca. Scalindua</i> <i>Ca. Scalindua</i>	(Schmid <i>et al.</i> , 2005)
Arch- <i>amoA</i> F Arch- <i>amoA</i> R	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	Archaeal <i>amoA</i>	(Mota <i>et al.</i> , 2005)
<i>amoA</i> -Nm,e	[FAM]TGTCGATGGCTGAYTACATGGG[BHQ]	<i>N. europaea amoA</i>	(Regan <i>et al.</i> , 2007)
<i>amoA</i> - Nm,o	[HEX]ATCATGTTGCTGACCGGTAAGTGG[BHQ]	<i>N. oligotropha amoA</i>	
<i>amoA</i> -Ns	[FAM]CCGACSCACCTGCCGCTGG[BHQ]	<i>Nitrosospira amoA</i>	

의 dNTP, 25 U/mL Taq polymerase (Promega, Madison, WI), Thermophilic Taq polymerase buffer (Promega, Madison, WI), 200 nM 의 각각 primers, 0.1 mg/mL 의 BSA 그리고 20 - 30 ng 의 1 µL DNA template 를 사용하였다. PCR 증폭조건은 95°C 5 분; 30 cycle 인 95°C 60 초, 58°C 90 초, 72°C 90 초; final extension 72°C 10 분으로 구성되었다. AOA *amoA* 를 타겟으로 하는 PCR reagent 조성은 AOB *amoA* PCR 조성 과 같았으며 증폭조건은 참고문헌을 따라 실시하였다 (Mota *et al.*, 2005). AMX 검출을 위해서는 4개의 primer set 를 이용하여 부분적인 AMX 의 16S rRNA gene 을 증폭하고자 하였다. Forward primer (Planc-0046F) 는 모든 *Planctomycetales* 를 타겟으로 하고 있으며, 각기 다른 네 개의 reverse primers (Amx-0368R; all AMX, Amx-820R; *Candidatus Brocadia*, BS-820R 와 Scabr-1114R; *Candidatus Scalindua*.) 를 사용하여 개별적인 PCR 증폭이 시행되었다. PCR mixture 는 AOB *amoA* PCR 과 같

았으며 증폭조건은 참고문헌을 따라 실시하였다 (Schmid *et al.*, 2005).

2.3 클로닝, 염기서열분석과 계통학적 분석

증폭산물들은 1% agarose gel 로 전기영동 수행하여 단일밴드를 검증한 후 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) 으로 정제하였다. 정제된 PCR product 는 pGEM®-T easy vector (Promega, Madison, WI) 에 삽입되었으며 그 후 JM109 Competent Cells (Promega, Madison, WI) 에 형질전환하여 X-gal/IPTG 와 100mg/L 의 ampicillin 으로 선택배양하여 plasmid 를 증폭하였다. Plasmid 내의 insert 의 염기서열 분석은 ABI Hitachi 3730XL DNA Analyzer 를 통하여 수행하였으며 염기서열의 얼라인먼트와 계통수의 제작은 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search 와 MEGA software (Kumar *et al.*, 2004) 를 이용하였다. 계통수는 1000 번의 반복적 bootstrap 을 이용한 Neighbor-Joining method 를 사용하여 제작되었다.

2.4 Real-time PCR

Real-time PCR reagent의 조성은 일반 PCR과 비슷하였으며 total AOB 정량시에는 $0.3 \times$ 농도의 SYBR Green I dye가 사용되었고 종 수준의 AOB 정량시 HEX와 FAM의 형광물질로 label된 100 nM의 TaqMan probe가 각각의 PCR반응에 이용되었으며 Table 2, real-time PCR 운전조건은 참고문헌을 따라 시행하였다 (Regan *et al.*, 2007). Real-time PCR을 위한 standard DNA는 *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Nitrosospira multififormis* (ATCC 25196), 그리고 정수처리장에서 채취한 *Nitrosomonas oligotropha*를 이용하여 plasmid DNA로 제조, 정제한 후 사용하였다. 정제된 plasmid는 10배의 serial-dilution을 통하여 standard curve를 작성하였다. standard DNA real-time PCR은 duplication으로 sample DNA real-time PCR은 triplication으로 각각 수행하였다.

2.5 비질산화율 (Specific nitrification rate)

각 하수처리장의 AOB정량과 비질산화율 계산을 위해 한 AOB 내에 평균 1.3개의 genome이 존재하고 있다고 가정하였으며(Hermanson and Lindgren, 2001), *Nitrosomonas* sp.는 2개의 *amoA* operon/genome을 갖고 있고 *Nitrosospira* sp.는 3개의 operon/genome을 갖고 있다고 가정하였다 (Jeanette *et al.*, 2002). 또한, 클론 라이브러리 결과를 바탕으로하여 unknown AOB는 모두 *N. ureae*와 *N. nitrosa*와 비슷한 AOB로 가정하였으며 그 결과 처리장 A, B, C, D의 *amoA* operon/genome은 각각 2.3, 2.2, 2.0, 2.0으로 나타났다 [식1]. 박테리아의 평균 세포밀도는 2.2×10^{11} cells/g (Harms *et al.*, 2003) 또한 active biomass (VSSa)는 총 VSS의 36%에 해당한다는 (Wentzel *et al.*, 1998) 가정하에 X_{TOTAL} 을 계산하였다 [식2].

[식1]

$$X_{AOB} \text{ (cells/L)} = \frac{\text{amoA operon (copies/L)}}{(1.3 \text{ genome/AOB}) \times (2.0 \sim 2.3 \text{ amoA operon/genome})}$$

[식2]

$$X_{TOTAL} \text{ (cells/L)} = \frac{\text{MLVSS (g/L)} \times 0.36 \text{ gVSSa/gVSS}}{2.2 \times 10^{11} \text{ (cells/g)}}$$

3. 결과 및 고찰

Table 1에 나타난 바와 같이 4개의 실험규모 하수처리장 일평균 처리용량은 2,270~7,950 m^3/day 로 소규모이며 수리학적체류시간(HRT: hydraulic retention time)은 1 ~ 2일, 고형물질체류시간(SRT: solid retention time)은 27.4 ~ 60.6 일로 다소 높게 운전 중이었다. MLSS농도는 모든 처리장에서 3,500 mg/L 이 넘었다. 암모니아 부하는 B 처리장이 30.3 $\text{kg}/\text{m}^3/\text{d}$ 로 가장 높았으며 D처리장이 9.9 $\text{kg}/\text{m}^3/\text{d}$ 로 가장 낮았다.

3.1 호기성내 암모니아 전환(질산화)에 관여하는 박테리아의 하수처리장내에서의 거동

AOB 개체 정량 분석을 위해 4개의 각기 다른 처리장으로부터 얻은 시료를 가지고 *amoA* 을 대상으로 real-time PCR을 수행하였다 Fig. 1. 처리장 C가 가장 많은 Total AOB를 가지고 있었으며 처리장 A의 *N. europaea* 와 *Nitrosospira* 비율이 네 처리장 중 가장 높았다. Total AOB에서 세가지 종(*N. europaea*, *N. oligotropha*, 그리고 *Nitrosospira* spp.)의 AOB 정량 수치를 빼서 계산한 unknown

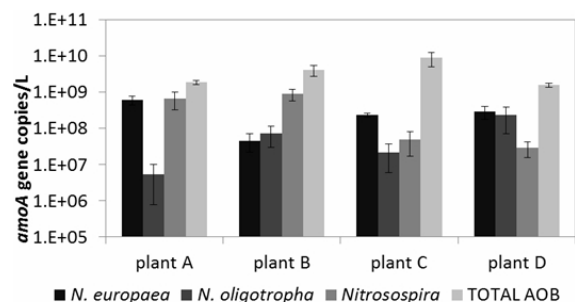


Fig. 1. The abundance of AOB *amoA* in the four SBR WWTPs.

AOB의 경우 각각 처리장 A, B, C, D에서 35%, 81%, 97%와 66%의 Total AOB를 차지하는 것으로 나타났다. 이는 모든 처리장에서 TaqMan probe로 검출되지 않는 unknown AOB가 AOB의 주종을 이루고 있음을 알 수 있었다.

각 처리장에서 채취한 시료의 AOB 정량 계산 결과는 Table 3에 나타내었다. 계산된 각 처리장의 AOB는 $6.0 \times 10^8 - 3.4 \times 10^9$ cell/L로 나타났으며 이는 전체 박테리아중 0.3 - 1.8%를 차지하는 것으로 나타났다. 또한 AOB정량을 바탕으로 계산된 비질산화율은 12 - 59 fmol NH₃/X_{AOB}/h로 나타났다. 비질산화율의 경우 문헌상에 의하면 16-43 fmol NH₃/X_{AOB}/h (Daims *et al.*, 2001), 4-23 fmol NH₃/X_{AOB}/h (Belser, 1979)등으로 본 연구결과와 비슷한 범위로 보고되고 있다.

각 처리장에서 *amoA* 을 대상으로 한 클론 라이브러리를 바탕으로 계통수를 Fig. 2에 나타내었다. 처리장 C와 D는 *N. nitrosa*-like AOB가 각각 7 OTUs (operational taxonomic units)와 11 OTUs가 검출되었으며 처리장 C의 대표적인 OTU와 *N. nitrosa* Nm90 (acc. No. AJ238495)의 시퀀스 유사도는 79%로 다소 낮았다. 또한 처리장 B에서 검출된 13 OTUs는 모두 *N. ureae*와 유사종으로 밝혀졌다. 문헌에 따르면 *N. nitrosa* 와 *N. ureae* 유사AOB는 산업폐수처리장에서 동시에 배양 되었으며 낮은 SRT와 높은 암모니아 부하조건에서 *N. ureae* 유사AOB가 선택적으로 우점이 되었음이 보고된 바 있다(Kuo *et al.*, 2006). 이는 암모니아 부하가 가장 높았던 처리장 B에서 *N. ureae* 유

사종이 우점으로 밝혀진 본 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 또한, *N. oligotropha* 는 다른 AOB에 비하여 매우 낮은 K_{s,NH3} (half saturation coefficient for ammonia)를 가지고 있다고 (K_{s,NH3}=0.07 mg N/L) 보고된 바 있으며 (Zhang *et al.*, 2009), 이는 암모니아 부하가 가장 낮았던 처리장 D에서 네 처리장 중의 *N. oligotropha* 정량이 가장 높았던 본 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다.

또한, 세 개의 특정 TaqMan probe를 이용하여 검출한 각기 다른 AOB cluster 결과물을 계통수에 표시하여 본 결과 이들 TaqMan probe는 각 처리장의 대표우점 AOB로 밝혀진 *N. ureae*와 *N. nitrosa*를 검출할 수 없는 것으로 나타났다. 이는 앞서 기술한 Real-time PCR의 분석결과 unknown AOB가 모든 처리장에서의 우점이라는 것과 일치함을 알 수 있었다.

3.2 호기성내 암모니아 전환(질산화)에 관여하는 고세균의 하수처리장내에서의 거동

AOA *amoA* 을 검출하기 위해 Arch-*amoA*F/ Arch-*amoA*R primer PCR을 수행한 결과 모든 하수처리장 시료에서 multiple bands가 발견되었다. 이는 PCR조건이 본 시료와 완벽히 반응하기 위한 최적화 과정이 수행되지 않아 specificity가 낮았기 때문으로 사료되었다. 그러나, 오직 D처리장에서만 예상 PCR base pair length인 635bp의 product가 뚜렷이 확인되었다. 이에 band isolation을 실시하여 클로닝과 염기서열분석을 진행하였다. Fig. 3에 나타난 바

Table 3. AOB ratio and specific nitrification rate in the four SBR WWTPs.

	MLVSS	X _{TOTAL} ¹	X _{AOB}	AOB ratio	Specific nitrification rate
	(g/L)	(cells/L)	(cells/L)	(%)	fmol/X _{aoB} /h
plant A	2.83	2.2×10^{11}	6.3×10^8	0.3	59
plant B	2.52	2.2×10^{11}	1.4×10^9	0.7	48
plant C	2.40	1.9×10^{11}	3.4×10^9	1.8	12
plant D	2.86	2.3×10^{11}	6.0×10^8	0.3	52

¹Average cell density was assumed to be 2.2×10^{11} cells/g (Harms *et al.*, 2003).

와 같이 처리장 D의 AOA amoA 의 염기서열은 AOA sediment lineage에 속해 있었으며 가장 유사한 염기서열은 HM637859와 HQ645844 이었다. 이들은 wetland sediment에서 발견된 crenarchaeota로 체류시간이 긴 처리장에서 주로 발견된다고 보고되고 있다(Park *et al.*, 2006). 그러나 본 연구결과 처리장 D의 SRT는 타 처리장에 비해 상대적으로 짧았던 것으로

나타났다. 또한, 본 연구에서는 primer set의 non-specificity에 의한 multiple-band PCR product가 전기영동시 확인되어 이를 이용한 AOA의 정량분석이 불가능하였다.

문헌에 의하면 AOA의 specific nitrification rate은 0.179 fmol NH₃/X_{AOA}/h (Enrichment from North Sea;(Wuchter *et al.*, 2006)), 0.167 fmol NH₃/X_{AOA}/h (C. Nitrosopumilus

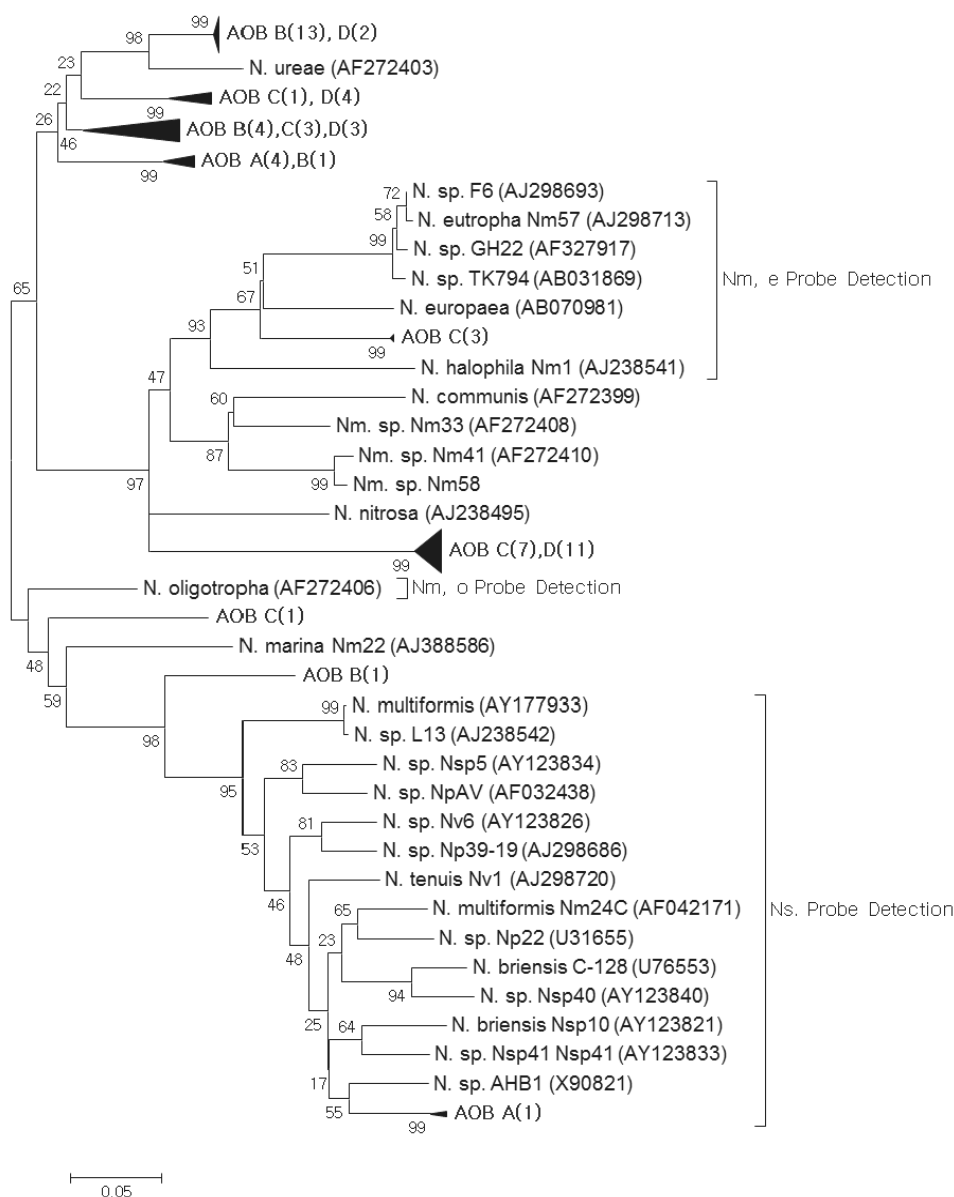


Fig. 2. Phylogenetic tree of *amoA* in four different SBR WWTPs. Parentheses represent the number of OTUs, The tree tested with 1000 replicates of bootstrap using Neighbor-Joining method, The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method. The tree was conducted in MEGA4. Each bracket represents the coverage of the three different TaqMan probes.

maritimus;(Konneke *et al.*, 2005))등으로 앞서 기술한 네 처리장 시료의 AOB specific nitrification rate ($12 - 59 \text{ fmol NH}_3/X_{\text{AOB}}/\text{h}$)에 비하여 백배이상 차이나는 것으로 나타났다. 따라서, AOA의 정량이 AOB에 비하여 월등한 우점을 차지하지 않는다면 처리장 D에서 질산화에 대한 기여도는 그리 높지 않을 것으로 사료되었다.

3.3 혐기성내 암모니아 전환에 관여하는 Anammox의 하수처리장내에서의 거동

Anammox 16S rRNA gene을 대상으로 하는 PCR결과 amx368R primer는 모든 처리장에서 양성을, amx820 primer는 처리장 B에서, Scabr1114 primer는 처리장 A와 B에서 각각 PCR증폭 밴드를 확인하였다. Bs820 primer은 모든 처리장에서 PCR이 증폭되지 않았다.

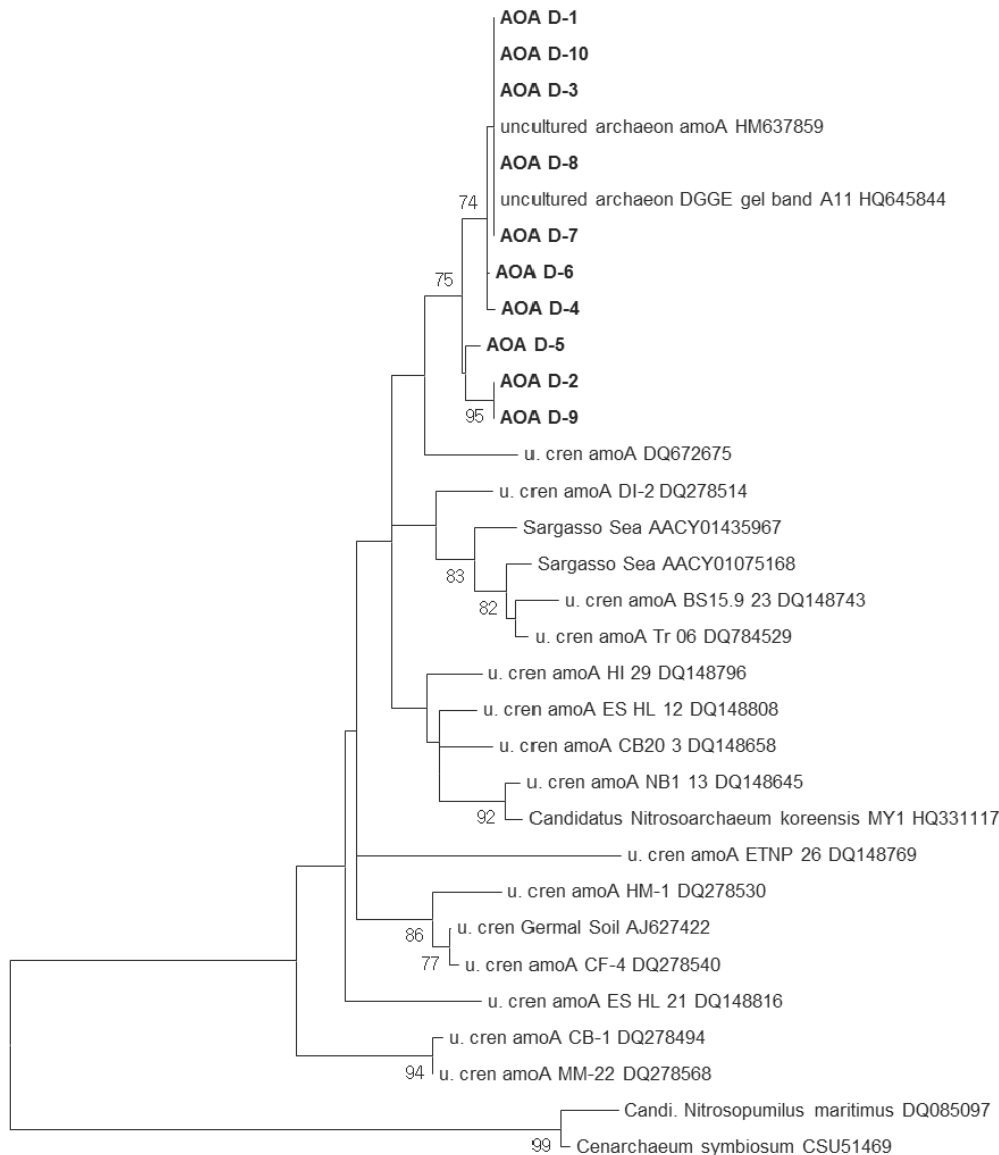


Fig. 3. Phylogenetic tree of AOA *amoA* in the plant D. The tree tested with 1000 replicates of bootstrap using Neighbor-Joining method. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method. The tree was conducted in MEGA4.

클론 라이브러리 결과 amx368로 증폭된 PCR product는 *Chlamydia* group 에 속해 있었으며 Scabr1114 primer로 증폭된 PCR의 염기서열은 *Chlamydia*와 *Planctomycetales* group bacteria로 밝혀졌다. amx820 primer의 PCR product는 *Planctomycetales* lineage 에 깊숙이 존재하고 있음을 알 수 있었다 Fig. 4. 그러나, *Candidatus Brocadia* (accession No. AM285341) 와의 유사도는 83% 정도로, *Planctomycetales*-specific PCR 증폭의 bias

일 가능성과 새로운 AMX 종의 출현 가능성을 제기할 수 있으나, 실제 이 세균이 하수처리장내에서 anammox metabolism을 수행하고 있는지는 밝혀낼 수 없었다.

4. 결론

서로 다른 공정 인자로 운영되는 네 개의 실규모 연속회분식 하수처리장을 대상으로 16S rRNA gene 기반으로 PCR을 수행하여 세 종

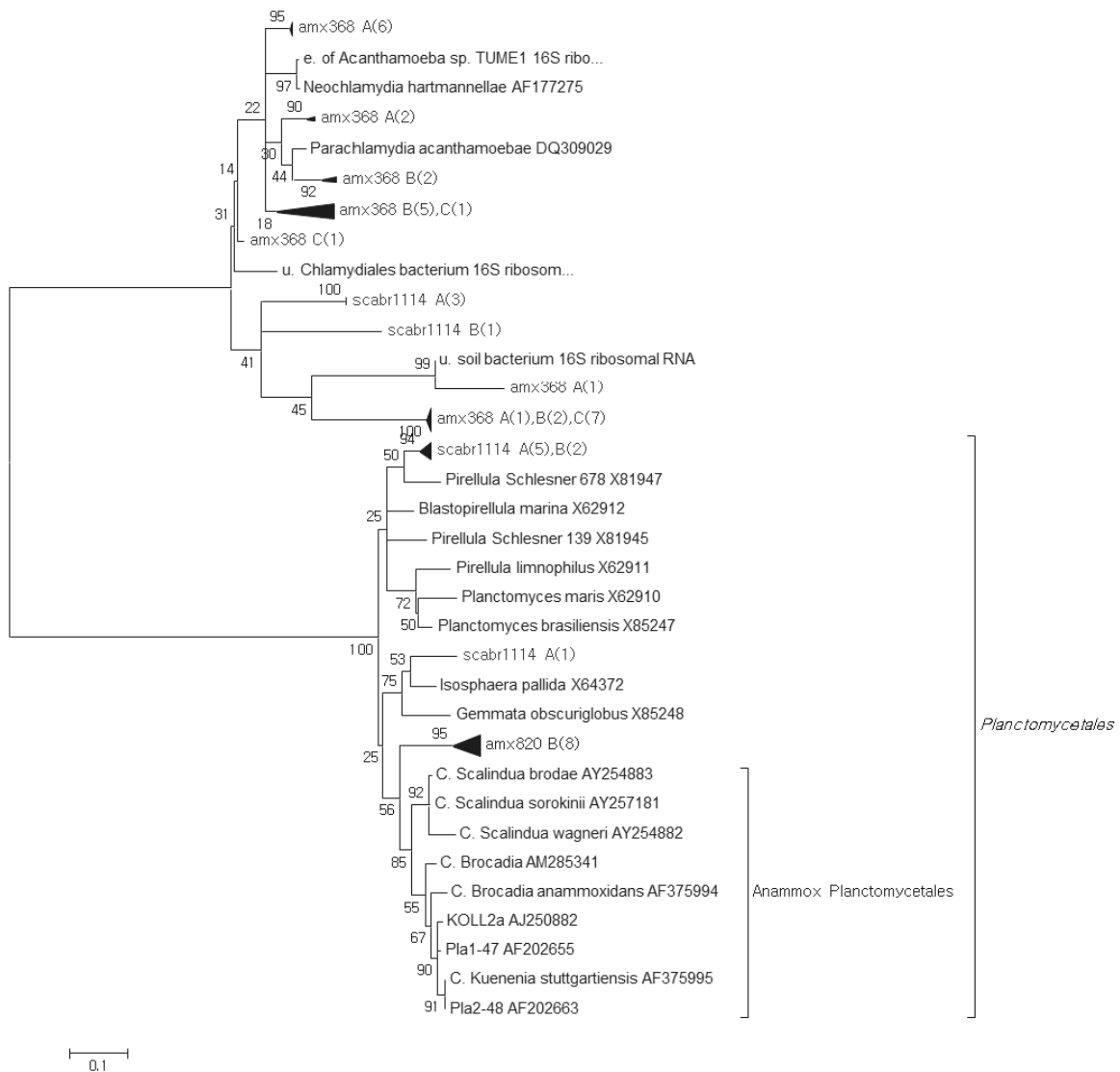


Fig. 4. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene targeting AMX *Planctomycetales* in the four SBR WWTPs. Each clone was named after the use of reverse primers followed by plant name. Parentheses represent the number of OTUs. The tree tested with 1000 replicates of bootstrap using Neighbor-Joining method. The evolutionary distances were computed using the Jukes-Cantor method. The tree was conducted in MEGA4.

류의 암모니아 전환미생물(AOB, AMX, AOA)의 군집구조와 염기서열을 분석하였고 서로 다른 세 종의 AOB를 정량화하였다. 그 결과, 우점 AOB는 *N. nitrosa* 유사 AOB와 *N. ureae* 유사 AOB인 것으로 관찰되었으며, *N. europaea*, *N. oligotropha*, *Nitrosospira*가 차지하는 비율은 그리 크지 않은 것으로 나타났다. 한편, AMX의 분자생물학적 증거는 발견되었으나 BLAST결과 기존의 AMX와 유사도가 낮았으며 처리장 D에서의 AOA의 존재 또한 염기서열로 규명할 수 있었다.

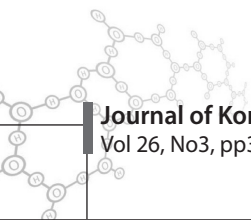
암모니아 산화 미생물의 군집 및 개체수를 처리장 별로 비교 분석한 본 연구의 접근방법은 향후 하수처리 내 질소제거 공정특성과 연계된다면 하수처리장 개선 및 이들 미생물의 생태학적 특성을 보다 잘 이해하는데 도움을 줄 것으로 사료된다. 예를 들어 보면, 하수처리장 내 *amoA* 정량 수치와 일반 미생물의 16srRNA를 대상의 정량 수치값의 비율과의 질산화율의 관계, 또한 *amoA* 유전자의 발현과 질산화율에 대한 연구가 지속된다면 새로운 관점에서 하수처리장 질소 관리가 가능하리라 판단된다.

사사

This work was supported by the National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean Government (NRF-2011-220-D00071).

참고문헌

- Rittmann, B. E. and McCarty, P. L. (2001) *Environmental biotechnology : principles and applications*. p xiv, 754 p. McGraw-Hill, Boston.
- Harms, G. *et al.* (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant, *Environ. Sci. Technol.*, 37(2), pp. 343-351.
- Regan, J. M., Cho, A.-Y., Kim, S. and Smith, C. D. (2007) *Monitoring Ammonia-Oxidizing Bacteria in Chloraminated Distribution Systems*; AWWARF: Denver.
- Church, M. J., Wai, B., Karl, D. M. and DeLong, E. F. (2010) Abundances of crenarchaeal *amoA* genes and transcripts in the Pacific Ocean, *Environ. Microbiol.*, 12(3), pp. 679-88.
- Kayee, P., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C. and Limpiyakorn, T. (2011) Archaeal *amoA* Genes Outnumber Bacterial *amoA* Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants in Bangkok, *Microb. Ecol.*, 62(4), pp. 776-788.
- Zhang, T., Ye, L., Tong, A., Shao, M.-F. and Lok, S. (2011) Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91(4), pp. 1215-1225.
- Strous, M., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (1999) Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(7), pp. 3248-3250.
- Mota, C., Head, M. A., Ridenoure, J. A., Cheng, J. J. and de los Reyes, F. L., III (2005) Effects of Aeration Cycles on Nitrifying Bacterial Populations and Nitrogen Removal in Intermittently Aerated Reactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12), pp. 8565-8572.
- Schmid, M. C. *et al.* (2005) Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(4), pp. 1677-1684.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment., *Brief. Bioinform.*, 5, pp. 150-163.
- Hermansson, A. and Lindgren, P.-E. (2001) Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2), pp. 972-976.
- Jeanette, M. N., Javier, J. A., Yuichi, S. and Martin, G. K. (2002) Diversity of ammonia monooxygenase operon in au-



- trophic ammonia-oxidizing bacteria, *Arch. Microbiol.*, V177(2), pp. 139-149.
- Wentzel, M. C., Ubisi, M. F. and Ekama, G. A. (1998) Heterotrophic active biomass component of activated sludge mixed liquor, *Water Sci. Technol.*, 37, pp. 79-87.
- Daims, H. et al. (2001) Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: Lessons from molecular approaches, *Water Sci. Technol.*, 43(3), pp. 9-18.
- Belser, L. W. (1979) Population ecology of nitrifying bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, 33, pp. 309-333.
- Kuo, D. H. W., Robinson, K. G., Layton, A. C., Meyers, A. J. and Sayler, G. S. (2006) Real-time PCR quantification of ammonia-oxidizing bacteria (AOB): Solids retention time (SRT) impacts during activated sludge treatment of industrial wastewater, *Environ. Eng. Sci.*, 23(3), pp. 507-520.
- Zhang, Y., Love, N. and Edwards, M. (2009) Nitrification in Drinking Water Systems, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 39(3), pp. 153-208.
- Park, H.-D., Wells, G. F., Bae, H., Criddle, C. S. and Francis, C. A. (2006) Occurrence of Ammonia-Oxidizing Archaea in Wastewater Treatment Plant Bioreactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8), pp. 5643-5647.
- Wuchter, C. et al. (2006) Archaeal nitrification in the ocean, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(33), pp. 12317-22.
- Konneke, M. et al. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon, *Nature*, 437(7058), pp. 543-546.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. and Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(12), pp. 4704-4712.