

Modified BAF 공정을 이용한 독립적인 무산소조에서 탈질미생물 군집의 특성

박정진 · 정영록 · 유재철 · 허성호 · 최원석* · 변임규** · 이태호*** · 박태주†

부산대학교 환경공학과 · *(주)바이오엔텍 · **부산대학교 환경기술산업개발연구센터 · ***안동대학교 환경공학과

(2006년 5월 26일 접수, 2006년 7월 27일 채택)

Characterization of Denitrifier Community in Independent Anoxic Reactor Using Modified BAF Process

Jeung-Jin Park · Young-Rok Jeung · Jae-Cheul Yu · Sung-Ho Hur
Won-Seok Choi* · Im-Gyu Byun** · Tae-Ho Lee*** · Tae-Joo Park†

Department of Environmental Engineering, Pusan National University · *Biotech company, Ltd.

**Institute for Environmental Technology and Industry, Pusan National University

***Department of Environmental Engineering, Andong National University

ABSTRACT : The independent anoxic reactor was introduced in biological aerated filters as the regulation of water quality requirement, especially total nitrogen, had been strengthened. The process studied in this work was upflow Biobead® process which was used commercially, invented for removal of organic materials and nitrification. For the purpose of evaluating the independent anoxic reactor, PCR-DGGE, one of the molecular biological methods, was performed. Two types of nitrite reductase genes were selected. One is *nirS* represented cytochrome *cd₁* nitrite reductase gene and the other is *nirK* represented Cu-containing nitrite reductase gene. Denitrifier community in the independent anoxic reactor was analyzed with PCR-DGGE using these two denitrifying functional genes. As the result of the PCR, only *nirS* gene was detected between *nirS* and *nirK*. With the result of the DGGE, specific bands became strong, as the operating days were longer, nitrate loading rate was increased. otherwise those of the initial activated sludge showed various bands. In the consequence of the sequence of the DGGE bands, various denitrifiers were sequenced in the initial activated sludge, while specific denitrifiers like *alcaligenes faecalis* were predominant in the anoxic reactor. Consequently, introduction of the independent anoxic reactor made it possible to achieve 96% denitrification efficiency, and was proper for the modification of BAF process.

Key Words : Denitrification, PCR, DGGE, Biological Aerated Filter, Microbial Community

요약 : 최근 수계의 총질소(T-N) 규제가 강화되면서 기존 BAF 공정의 개선을 위해 독립적인 무산소조가 추가로 도입되었다. 본 연구에 사용된 공정은 유기물과 질산화 중심으로 개발된 기술인 Biobead® 공법으로 상용화된 상향류의 BAF공정의 하나이다. 독립적인 무산소조의 도입의 타당성을 검토하기 위해 분자생물학적 방법의 하나인 PCR-DGGE기법이 수행되었다. 두 가지 type의 nitrite reductase genes를 통해 진행되었는데, *nirS*로 암호화된 cytochrome *cd₁* nitrite reductase gene과 *nirK*로 암호화된 Cu를 함유한 nitrite reductase gene이다. 이러한 탈질 기능유전자를 이용하여 PCR-DGGE를 통해 탈질 목적으로 순화된 독립적인 무산소조의 탈질미생물의 군집을 해석하였다. PCR 증폭결과, 탈질을 수행하는 무산소조 내에서는 *nirS*와 *nirK* 유전자 가운데 *nirS* 유전자만 검출되었고, DGGE 분석결과, 최초 식종원으로 이용된 활성슬러지에서는 상대적으로 많은 band들이 검출되는 반면, 무산소조 내에서는 운전일수와 nitrate 부하량이 증가할수록 단일 band로 우점화 하는 경향을 나타내었다. DGGE band에 대한 열기서열 분석결과, 식종 슬러지의 경우 다양한 *uncultured bacteria*가 나타났으나, nitrate 제거율이 높은 안정화된 무산소조에서는 *alcaligenes faecalis* 등 특정 탈질미생물이 우점화 되는 것으로 확인되었다. 결론적으로 이러한 탈질미생물 군집특성을 가지는 무산소조의 도입은 96%이상의 안정적인 탈질을 가능하게 하였으며, BAF 공정 개선을 위한 독립적인 무산소조의 도입은 적절한 것으로 판단되었다.

주제어 : 탈질, PCR, DGGE, BAF, 미생물 군집

1. 서론

생물학적 폐수처리공정에서 일반적으로 사용되고 있는 활성슬러지법은 비교적 처리효율이 안정되지만, 대부분 유기물

제거를 목적으로 개발되어 부영양화의 원인물질인 질소의 제거효율은 저조한 실정이다. 또한 활성슬러지법은 고도의 유지관리기술과 넓은 부지면적을 필요로 하며 잉여슬러지가 많은 단점이 있다. 따라서 최근에는 이러한 단점을 보완한 질소제거공정이 다양하게 변화하여 SBR, A²O, Bardenpho, UCT, VIP, BAF 등의 다양한 공정이 개발되었다. 특히, 생물여과공정(Biological Aerated Filter, BAF)은 일종의 생물막 공정으

† Corresponding author
E-mail: taejoo@pusan.ac.kr
Tel: 051-510-2432

Fax: 051-514-9574

로 충전여재에 부착된 미생물에 의한 유기물제거 및 질산화와 생물여채층에 의한 물리적 여과가 동시에 일어나는 공정이다. 이러한 생물여과공정은 생물반응기 규모가 작아지고 2차침전지가 필요 없어 시설비가 저렴하고, 소요부지면적이 적고, 자동운전이 쉬운 경제적 이점과 함께 처리수질이 우수한 장점이 있어 하·폐수의 고도처리에 많이 적용되고 있다.^{1~4)}

본 연구에 사용된 공정은 Biobead[®]공법⁵⁾으로 상향류의 BAF 공정의 하나이다. 본 기술은 유기물 제거와 질산화 중심으로 개발된 기술로써, 최근 총질소(T-N) 규제가 강화되면서 탈질공정이 추가로 필요하게 되어 공정에 독립적인 무산소조가 도입되었다.

탈질이란 질산 및 아질산을 질소가스로 전환시키는 과정을 말하며 Nitrate(NO₃)로 출발하여 Nitrite(NO₂), Nitric oxide(NO), Nitrous oxide(N₂O)를 거쳐 Nitrogen(N₂) gas로 이어지는 일련의 순환반응이다. 그러나 이러한 과정에서 발생하는 환원물질들은 미생물의 성장에 이용되는 형태가 아니므로, 생물권에서 환경으로 질소를 돌려보내는 질소순환경로이다.⁶⁾

탈질미생물은 자연환경에서 광범위하게 발견되며, 대사와 활성이 매우 다양하다. 이러한 탈질미생물의 분자생물학적 연구들은 nitrate reductase, nitrate reductase, nitric reductase, nitrous reductase 등의 탈질 기능 유전자와 그러한 유전자에 기초하여 제작된 probe나 primer 등을 이용하여 수행되어 왔다. 탈질에 관여하고 있는 유전자들은 통상 유전자 probe를 개발할 수 있을 정도로 잘 보존된 DNA영역을 지닌다.⁷⁾ 이들 유전자 중 nitrite reductase는 nitrite를 nitric oxide로 전환시키는 반응에 관여하는데 반응산물이 최초로 가스형태로 변환하는 과정이기 때문에 탈질경로를 파악할 수 있는 중대하고 결정적인 단계이다.⁸⁾

탈질과 관련된 대부분의 분자생물학적 연구는 두 가지 type의 nitrite reductase에 대한 probe를 통해 진행되었다. 즉 탈질미생물은 *nirS*로 암호화된 cytochrome *cd₁(cd₁ NIR)*와 *nirK*로 암호화된 Cu를 함유한 nitrite reductase(Cu NIR)의 두가지 중의 하나를 가지고 있다. 그런데, *nirS*는 *nirK*보다 탈질미생물 간에 널리 분포하나 *nirK*보다는 덜 보존적인 염기서열을 가지기 때문에 *nirK*처럼 다양한 균종에서 널리 통용되는 universal PCR primer나 probe로서의 활용에는 제한된다.⁹⁾

본 연구에서는 이러한 탈질 기능유전자를 이용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)에 기반하여 젤 전기영동의 변성기울기법(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)을 통해 탈질 목적으로 순화된 독립적인 무산소조의 탈질미생물의 군집을 해석하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Modified BAF 공정 운전

Table 1. Influent characteristics of the pilot plant

Items	TCOD _{Cr}	SCOD _{Cr}	TSS	NH ₄ ⁺ -N	PO ₄ ³⁻ -P	Alkalinity	Temp.(°C)
Min.~Max.	60.0~318.0	36.4~98.6	26~200	9.0~38.0	0.3~2.0	130~256	24.3~30.9
Average	154.5	49.4	107.1	15.3	1.2	180	27.5

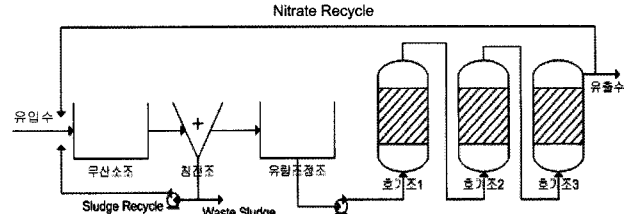


Fig. 1. Schematic diagram of the modified BAF process.

Table 2. Operating conditions of the anoxic reactor

Conditions	A	B1	B2	B3	C
operating day[days]	7	7	9	11	12
HRT[hr]	6.4	4.8	4.8	4.8	3.2
sludge recycle ratio[%]	100	100	100	100	100
nitrate recycle ratio[%]	50	50	50	50	100

본 연구에서 사용된 pilot 규모의 변형된 BAF 공정은 부산광역시 S하수처리장에 설치되었으며 총 유효용적이 46.3 m³이며, 무산소조의 용적은 7.9 m³이다. 공정의 개략도는 Fig. 1과 같이 무산소조, 침전조, 유량조정조, 그리고 3단의 상향류 호기의 호기조(Biobead[®]조)로 구성되었다. 호기조에 사용된 담체는 2-3 mm 크기의 polystyrene 재질이며, 각각 60% 충전하였다. 식종슬러지는 S하수처리장 호기조 슬러지를 사용하였다. 운전기간중의 무산소조의 평균 MLSS는 2,200 mg/L로 유지하였으며, 유입수의 성상 및 무산소조의 운전조건은 Table 1과 Table 2에 각각 정리하였다.

2.2. 수질분석방법

본 연구에 사용된 시료는 S하수처리장내 설치된 Pilot plant에서 2회/주의 주기로 채수하여 분석하였다. TCOD_{Cr}, Alkalinity, TSS, VSS, MLSS는 수질오염공정시험방법¹⁰⁾과 standard method¹¹⁾에 준하여 측정하였으며, SCOD_{Cr}, NH₄⁺-N, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N, PO₄³⁻-P는 AA3(Auto Analyzer 3, Bran+Luebbe, Germany)를 이용하여 분석하였다.

2.3. DNA 추출 및 PCR 증폭

DNA 추출은 무산소조의 슬러지를 vortex하고 원심분리하여 상등액을 제거하고 DNA extraction kit(MoBio Ltd Co., USA)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 1%의 Agarose gel에서 전기 영동하여 UV-transilluminator를 이용하여 DNA 추출여부를 확인하였다. 추출한 DNA는 0.5 mL 튜브에 10× Taq buffer 2.5 μL, 10 mM dNTP 0.5 μL, 각각의 primer 0.25 μL(25 pmol), DNA template 1 μL, Taq polymerase (Solgent Ltd. Co., Korea) 0.125 μL를 첨가하고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 25 μL가 되도록 stock solution

Table 3. Primers used in this study

primer	position	Sequence(5'-3')	Reference
<i>nirS</i> 1F	763-780	CCT A(C/T)T GGC CGC C(A/G)CA (A/G)T	12)
<i>nirS</i> 6R	1638-1653	CGT TGA ACT T(A/G)C CGG T	12)
Cd3aF	916-935	CT(C/G) AAC GT(C/G) AAG GA(A/G) AC(C/G) GG	13)
R3cd	1322-1341	GA(C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TTG A	14)
R3cd-GC clamp ^{a)}	1322-1341	GCclamp-GA(C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TTG A	14)
<i>nirK</i> 1F	526-542	GG(A/C) ATG GT(G/T) CC(C/G) TGG CA	15)
<i>nirK</i> 5R	1023-1040	GC(C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TTG A	12)

^{a)} The 33 bp GCclamp added for DGGE-PCR : 5' GGC GGC GCG CCG CCC GCC CCG CCC CCG TCG CCC 3'

Table 4. PCR Conditions used in this study

Primer	PCR conditions
<i>nirS</i> 1F-6R	5 min at 94°C, followed by 25 cycles of 30s at 94°C, 30s at 55°C, and 30s at 72°C, followed by 7 min final extension at 72°C
<i>nirK</i> 1F-5R	5 min at 94°C, followed by 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C, followed by 7 min final extension at 72°C
Cd3aF-R3cd	2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 91°C, 60 s at 51°C, and 1 min at 72°C, followed by 10 min final extension at 72°C

을 제조하였다. 탈질 유전자인 nitrite reductase gene을 증폭하기 위해서 *cd*₁-type nitrite reductase(*nirS*)와 Cu-type nitrite reductase(*nirK*)에 특이적인 primer를 이용하였다. 1차 PCR은 *nirS*1F/*nirS*6R와 *nirK*1F/*nirK*5R를 각각 이용하여 실시하였으며, DGGE를 위해서 *nirS*에 특이적인 Cd3aF/R3cd을 이용하여 2차 PCR을 실시하였으며, R3cd에 GC-Clamp를 부착시켰다. 실험에 사용된 primer는 Table 3과 같다.

DGGE 분석을 위한 PCR 증폭의 각 단계별 조건들은 Table 4에 나타내었다. 증폭된 PCR product는 1~1.5%의 agarose gel에서 전기영동하여 UV-transilluminator를 이용하여 DNA의 증폭여부를 확인한 후, PCR purification kit(Bioneer Ltd. Co., Korea)를 사용하여 정제하였다.

2.4. DGGE 분석 및 Sequencing

DGGE(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 Gradient delivery system) gel stock solution은 60%와 80%의 변성제 농도구배로 조제하여(변성제 농도 100%는 7 M Urea와 40% formamide) 각각 glass plate사이에 16 mL씩 주입하여 농도 구배가 있는 gel을 제조하였다. DGGE실험을 위해 PCR product 30 µL에 dye solution 5 µL를 혼합하여 gel에 loading한 뒤 60°C, 130 V에서 20시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 gel은 ethidium bromide으로 30분간 염색시킨 후 UV transilluminator(Uvitec gel documentation system, UK)를 사용하여 band를 확인하였다.

Band 확인 후 원하는 DNA band가 포함된 부위를 잘라낸 후 1.5 mL tube에 옮기고 TE buffer 30 µL를 첨가한 후

-70°C에서 15 min, 60°C에서 15 min씩 총 3회 반복하여 실행하였다. Gel에서 DNA를 추출한 후 동일한 primer를 이용하여 다시 PCR을 실시하였고, PCR product를 전기영동으로 확인한 뒤 정제를 하고 sequence(ABI 3730 XL DNA sequencer, USA)하였다. sequence 결과는 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST를 이용하여 nitrate reductase의 sequence를 분석하였다.

2.5. Accession Numbers

본 연구를 통해 얻어진 *NirS* gene sequence는 GenBank database에 등록하였으며, 등록된 염기서열의 accession number는 DQ667145-DQ667148, DQ649465-DQ649472이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 전탈질 반응조의 처리효율

호기조 매디아의 생물막 부착을 위해 공정은 30일간 적응기간을 거쳤다. 운전기간동안 호기조의 NH₄⁺-N 농도는 평균 4.0 mg/L였고 질산화 효율은 73.9%였다. Fig. 2는 수리학적 체류시간 변화에 따른 무산소조의 SCOD_{Cr} 및 NO₃⁻-N의 처리효율을 나타낸 그림이다. 탈질에 이용된 탄소원 소모량은 평균 3.4 mgSCOD/mgNO₃⁻-N이었으며, 약 96%의 높은 탈질율을 나타내었다. 따라서 BAF 공정 개선을 위한 독립적인 무산소조의 도입은 적절한 것으로 판단되었다.

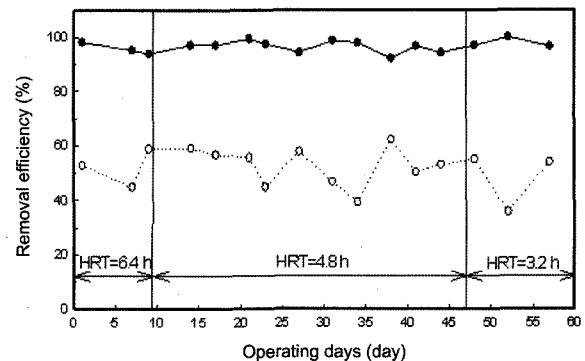


Fig. 2. NO₃⁻-N(●) and SCOD_{Cr}(○) removal efficiency according to the different HRT in the anoxic reactor.

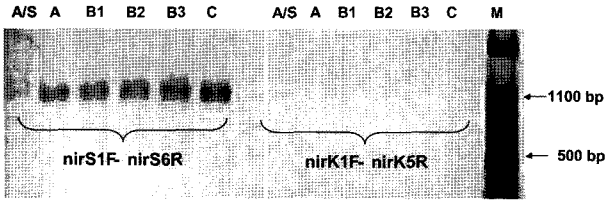


Fig. 3. PCR amplification of DNA samples according to the conditions; A/S : seeding sludge, A, B1, B2, B3, C : operating conditions, M: DNA ladder.

3.2. PCR 결과

Fig. 3은 nitrite reductase genes을 검출하기 위하여 *cd1*-type nitrite reductase(*nirS*)와 Cu-type nitrite reductase(*nirK*)에 특이적인 primer인 *nirS1F-nirS6R*과 *nirK1F-nirK5R*을 이용하여 수행한 PCR 증폭결과를 나타내었다. 그 결과, *nirS* PCR products만 검출된 반면 *nirK* PCR products는 검출되지 않았다. 이를 통해, 무산소조 내 탈질과정 중 아질산염 환원에 관여하는 nitrite reductase genes의 종류가 *cd1*-type nitrite reductase(*nirS*)인 것을 확인 할 수 있었다. *cd1*-type nitrite reductase(*nirS*)는 일반적으로 수계, 생물학적 처리공정 및 유기물이 풍부한 혐기성 습지에서 나타나는 것으로 보고되고 있다.^{16,17)} 반면, Cu-type nitrite reductase(*nirK*)의 경우 현재까지 연구된 탈질 미생물의 약 30% 정도에 존재하며, 토양 및 수계 등 광범위한 생태적 환경에서 관찰되는 것으로 알려지고 있지만,^{16,18)} 무산소조 내에는 존재가 미비한 것으로 판단된다. 또한, 대조군으로 사용된 활성슬러지의 경우에는 증폭결과가 미약하여 탈질균의 활성이 낮은 것으로 나타났다.

3.3. DGGE 분석결과

3.3.1. *cd1*-type nitrite reductase gene의 DGGE profile

Fig. 4는 전탈질 무산소조내의 슬러지에 대한 DGGE profile을 보여주고 있다. 유입유량이 증가하고 운전시간이 증가함에 따라 DGGE band profile이 확연히 달라졌으며 band 역시 시간이 경과함에 따라 연속적으로 변화하였음을 확인할 수 있다. DGGE에서 개별 band는 개별 미생물 종의 func-

nal gene을 의미하므로 이는 슬러지를 구성하고 있는 탈질 미생물들이 연속적으로 변화하고 있음을 보여주는 것이다. 식중원으로 이용된 부산 S하수처리장 의 활성슬러지는 독립적인 무산소조에 비해 상대적으로 많은 band수가 검출되어 다양한 탈질미생물 종들이 슬러지를 구성하고 있음을 알 수 있다. 반면, 무산소조에서는 운전시간이 경과함에 따라 band 11과 band 12의 명도가 진해지는 것으로 나타나 이에 해당하는 탈질미생물의 우점화 경향을 보였다.

3.3.2. 미생물 군집의 염기서열 분석결과

Group specific PCR의 정확성과 어떤 미생물에서 유래한 band인지를 확인하기 위해서 Fig. 4에 나타난 DGGE gel 상의 특이적인 band를 추출하여 염기서열을 분석하였다. DGGE gel에서 나타난 단일 band를 추출하여 정제한 후 GC-clamp가 부착되지 않은 *nirS* primer를 이용하여 PCR한 후 sequencing을 하였다. 각각의 sequencing 결과는 Table 4와 같다. 활성슬러지에서 검출된 1~7번의 경우에는 활성슬러지에서 관찰되는 nitrite reductase gene을 지니는 *uncultured bacteria*로 나타났다. 반면에, 무산소조 슬러지에서 검출된 8~12번의 band의 경우 nitrite reductase gene을 지니는 *Alcaligenes faecalis*, *Ralstonia eutripha*, 그리고 *Thauera chlorobenzonia* 등의 탈질미생물이 검출되었다. 이는 독립적인 무산소조에서는 특정 탈질 미생물이 우점화 되는 것을 의미한다.

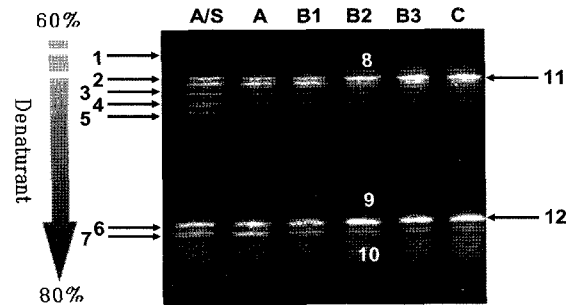


Fig. 4. DGGE analysis based on DNA fragment amplified with *nirS*(*cd3aF-R3cd*) primer.

Table 5. Sequenced bands from the DGGE bands

Source	Sample No.	AccessionNo.	Similarity(%)	Class/phylum	Ecological source
Activatedsludge	01	AB164110	89	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
	02	AB162306	90	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
	03	AB164109	88	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
	04	AB164125	84	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
	05	AB162265	86	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
	06	AB164146	91	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
	07	AB162304	86	<i>Uncultured bacterium</i>	Activated sludge
Anoxic reactorsludge	08	AJ224913	90	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Environmental sample
	09	AJ224913	92	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Environmental sample
	10	AF114789	90	<i>Ralstonia eutropha</i>	Activated sludge
	11	AY078263	87	<i>Thauera chlorobenzoica</i>	Environmental sample
	12	AJ224913	90	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Environmental sample

4. 결론

상용화된 BAF공정의 하나인 Biobead®공법 탈질 기능을 강화하기 위해 독립적인 무산소조가 도입되었다. 이러한 무산소조 내의 미생물 군집 특성의 변화를 분자생물학적 기법의 하나인 PCR-DGGE를 통해 평가하여 다음과 같은 결론들을 도출할 수 있었다.

1) 무산소조 내에서 탈질에 이용된 탄소원 소모량은 평균 3.4 mgSCOD/mgNO₃⁻-N으로 96% 이상의 안정적인 탈질을 달성할 수 있었으며, BAF 공정 개선을 위한 독립적인 무산소조의 도입은 적절한 것으로 판단되었다.

2) PCR 증폭결과, 탈질을 수행하는 무산소조 내 슬러지에서는 *nirS*와 *nirK* 유전자 가운데 *nirS* 유전자만 검출되었다. 이는 수처리 탈질공정에서는 주로 *nirS* 유전자의 탈질 미생물이 우점화를 이루고 *nirK* 유전자의 탈질미생물은 미미하게 존재한다는 것을 의미한다.

3) DGGE 분석결과, 최초 식종원으로 이용된 활성슬러지에서는 상대적으로 많은 band들이 검출되는 반면, 무산소조 내에서는 운전일수와 nitrate 부하량이 증가할수록 단일 band로 우점화 하는 경향을 나타내었다.

4) DGGE band에 대한 염기서열 분석결과, 식종 슬러지의 경우 다양한 *uncultured bacteria*가 나타났으나, nitrate 제거율이 높은 안정화된 무산소조에서는 *alcaligenes faecalis* 등 특정 탈질미생물이 우점화 되는 것으로 확인되었다.

향후, 이러한 결과를 바탕으로 독립적인 무산소조의 슬러지 발생량을 최소화하고, 무산소조 용적을 최적화하는 추가적인 연구가 진행될 예정이다. 그리고, 유기물이 무산소조에서 탈질로 이용되기 때문에 기존의 Biobead® 공법을 최적화하는 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 차세대핵심환경기술개발사업의 일환으로 한국환경기술진흥원의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Yukio, I. and Akihiro, T., "Nitrogen Removal from Municipal Wastewater by a Single Submerged Filter," *JWPCF*, **56**, 251~258(1984).
2. Frank, R., "Nitrification and Phosphorus Precipitation with Biological Aerated Filters," *JWPCF*, **62**, 169~176(1992).
3. Tom, S., Allan, M., and John, U., "The small Footprint Wastewater Treatment Process," *Chemistry & Industry*, **19**, 533~536(1993).
4. Tschui, M., "Tertiary Nitrification in Aerated Pilot Biofilters," *Water Sci. Technol.*, **29**(10-11), 53~60(1994).
5. 건설신기술 제289호, <http://www.bioentech.com>.
6. Barnes, D. and Bliss, P. J., "Biological control of nitro-

gen in wastewater treatment," *University Press, Cambridge, UK*(1983).

7. Zumft, W. G., "Cell biology and molecular basis of denitrification," *Microbiol. Mol. Bio. R.*, **61**, 533~616(1997).
8. Ye, R. W., Averill, B. A., Tiedje, J. M., "Denitrification : Production and Consumption of Nitric Oxide," *Appl. Environ. Microb.*, **60**(4), 1053~1058(1994).
9. Brader, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., and Tiedje, J. M., "Nitrite reductase genes(*NirK* and *NirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities," *Appl. Environ. Microb.*, **66**, 2096~2104(2000).
10. 환경부, 수질오염공정시험방법(2004).
11. APHA, "Standard methods for the examination of water and wastewater," *American Public Health Association, Washington, D.C.*(1995).
12. Braker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K. P., "Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes(*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples," *Appl. Environ. Microb.*, **64**, 3769~3775(1998).
13. Michotey, V., Mejean, V., Bonin, P., "Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd*₁-denitrifying bacteria in marine samples," *Appl. Environ. Microb.*, **66**, 1564~1571(2000).
14. Throback, I. N., Enwall, K., Jarvis, A., Hallin, S., "Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**(3), 401~417(2004).
15. Casciotti, K. L., Ward, B. B., "Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microb.*, **67**, 2213~2221(2001).
16. Song, B. K. and Ward, B. B., "Nitrate reductase genes in halobenzoate degrading denitrifying bacteria," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 349~357(2003).
17. Martin Wolsing and Anders Prieme, "Obsevation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **48**, 261~271(2004).
18. Gesche Braker, Andreas Fesefeldt, Kar-Paul Witzel, "Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes(*nirS* and *nirK*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples," *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3769~3775(1998).
19. Cho, S. J., "Analysis of nitrifying bacterial communities and characteristics of aerobic denitrifiers in biological nitrogen removal," Ph.D. thesis, *Department of Microbiology*, Pusan national university, Pusan, South Korea(2006).