

호기성 생물막 반응기에서 Ammonia Oxidizing Bacteria에 대한 DO 농도의 영향

유재철 · 박정진 · 허성호 · 김유진 · 변임규* · 이태호** · 박태주[†]

부산대학교 환경공학과 · *부산대학교 환경기술산업개발연구센터 · **안동대학교 환경공학과

(2006년 10월 19일 접수, 2007년 1월 11일 채택)

Effect of DO Concentration on Ammonia Oxidizing Bacteria in Aerobic Biofilm Reactor

Jae-Cheul Yu · Jeung-Jin Park · Sung-Ho Hur · Yu-Jin Kim · Im-Gyu Byun* · Tae-Ho Lee** · Tae-Joo Park[†]

Department of Environmental Engineering, Pusan National University

*Institute for environmental technology and industry, Pusan National University

**Department of Environmental Engineering, Andong National University

ABSTRACT : Ammonia oxidizing bacteria(AOB) oxidize ammonia to nitrite and are important microorganisms which control nitrification. Several environmental factors such as dissolved oxygen(DO), temperature and pH influence the growth of AOB. In this work, to assess the effect of DO concentration on AOB, four aerobic biofilm reactors packed with ceramic media were operated 1, 3, 5 and 7 mgDO/L, respectively. The optimal DO concentration with stable nitrification efficiency in aerobic biofilm reactor was above 5.0 mg/L. To assess the relationship between the DO concentration and the characteristics of AOB in aerobic biofilm reactor, DGGE and cloning based on PCR targeting 16S rRNA and amoA gene were performed. Additionally, INT-DHA activity test was proceeded to estimate the activity of AOB. As the results of DGGE and cloning, the community of AOB and the ratio of *Nitrosomonas* sp. changed little in spite of different nitrification efficiencies. INT-DHA activity test showed that the activity of AOB decreased as DO concentration decreased. It means that DO concentration does not affect the community of AOB, but the activity of AOB.

Key Words : Ammonia Oxidizing Bacteria, DGGE, Biofilm, INT-DHA, 16S rRNA, amoA

요약 : Ammonia oxidizing bacteria(AOB)는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 을 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 으로 산화시키며, 생물학적 질산화 단계에서 윗 단계로 작용하기 때문에 중요한 미생물이다. AOB의 성장은 용존산소, 온도, pH 등의 환경 인자에 영향을 받는다. 본 연구에서는 DO 농도가 AOB에 미치는 영향을 조사하기 위해 세라믹 미디어가 충전된 4개의 호기성 생물막 반응기의 DO 농도를 각각 1, 3, 5, 7 mg/L로 운전하였다. 운전결과, 5 mg/L 이상에서 안정적인 질산화 효율을 얻을 수 있었다. AOB의 특성을 조사하기 위해 AOB의 16S rRNA와 amoA gene을 target으로 PCR을 이용한 DGGE와 cloning을 실시하였으며, 이들의 활성을 조사하기 위해 INT-DHA를 측정하였다. DO 농도 변화에 따른 각 반응기별 질산화 효율에 차이가 있었음에도 불구하고, DGGE 및 cloning 결과, AOB 군집 및 *Nitrosomonas* sp.의 비율의 변화는 거의 없었다. DO 농도가 감소함에 따라 AOB의 활성도가 감소한다는 것을 INT-DHA 측정으로 확인할 수 있었다. 따라서 DO 농도는 AOB 군집의 변화 보다는 활성에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

주제어 : Ammonia Oxidizing Bacteria, DGGE, 생물막, INT-DHA, 16S rRNA, amoA

1. 서론

하수의 생물학적 질소제거는 ammonia oxidizing bacteria (AOB) 및 nitrite oxidizing bacteria(NOB)에 의한 질산화 반응과 종속영양미생물에 의한 탈질 반응으로 구성된다. 특히 AOB는 질산화 단계에서 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 을 NH_2OH 을 거쳐 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 으로 산화시키는 중요한 미생물이다.¹⁾ 하지만 AOB는 성장속도가 느리고 외부 환경인자에 민감하기 때문에 공정 내 AOB의 유지가 어렵다. 생물막 공정은 단위 면적당 미생물의 농도를 높일 수 있고, AOB와 같은 성장 속도가 느린 미생물

의 유지가 가능하다.^{2,3)} 그러나 생물막 공정에서 운전 조건과 다양한 외부 환경인자는 생물막내 AOB 군집의 성장과 활성에 큰 영향을 미치기 때문에 효율적인 생물막 공정의 운전 및 설계를 위해서는 외부 환경인자에 대한 AOB 군집의 변화를 연구할 필요가 있다.^{4,5)} 특히 DO 농도는 중요한 운전 인자로서, AOB의 성장 속도 및 구성에 영향을 미친다. 일반적으로 부유성장을 이용한 생물학적 영양염 제거 공정에서 AOB 군집의 안정성과 효율적인 질산화를 위해서 DO 농도가 2 mg/L 이상을 유지해야 한다고 보고되고 있다.⁶⁾

최근에는 적은 양의 DNA를 이용하여 많은 양의 DNA의 합성이 가능한 PCR(polymerase chain reaction)에 기반한 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)가 미생물 군집 해석에 이용되고 있다. DGGE는 전기 영동시 gel 내에 존재하는 변성체의 농도구배에 따른 DNA의 구조차이에 의해 이동속

[†] Corresponding author

E-mail: taejoo@pusan.ac.kr

Tel: 051-510-2432

Fax: 051-514-9574

도가 달라지는 원리를 이용한 분자생물학적 기법이다. 이 때 서로 다른 염기서열을 가진 DNA가 각기 다른 위치에서 band를 형성하며, 동일한 염기서열이 많을수록 band의 명도는 증가하게 된다. 따라서 시간과 공간 변화에 따른 전체적인 미생물 군집에 대한 수적, 양적 변화를 하나의 gel상에서 관찰할 수 있으며, 단시간에 여러 시료를 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다.^{7,8)}

AOB의 16S rRNA영역에 대한 연구에 있어서 AOB종들의 생리적인 기능과 형태가 다르다는 것이 보고되었지만, 일부 독립적으로 존재하거나 대부분의 자연환경에 많이 존재하는 AOB만을 검출한다는 한계를 지니고 있다. 이에 AOB가 가지고 있는 ammonia monooxygenase(AMO)와 같은 특정 효소(functional gene)들을 이용한 분석은 16S rRNA의 염기서열보다 변별도가 높기 때문에 군집분석용으로 더 적합한 도구가 될 수 있다.⁹⁾

또한 미생물의 활성도는 폐수처리 공정에서 성공적인 운전과 제어를 위한 중요한 요소로 작용하고 있다. INT(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazolium chloride)-DHA (Dehydrogenase activity)의 경우, 미생물의 활성도 측정에 있어 간단하고 신속하게 실험이 가능하며, 폭넓은 범위에서 적용이 가능하다.¹⁰⁾

따라서 본 연구에서는 호기성 생물막 반응기내 DO 농도 변화에 따른 유기물 제거 및 질산화 효율과 생물막을 구성하고 있는 AOB의 군집변화를 관찰하기 위하여 AOB에 특이성이 있는 CTO primer(16S rRNA)와 amoA primer를 이용하여 각각 PCR-DGGE를 실시하였으며, cloning 및 INT-DHA를 실시하여 AOB 군집의 특성을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

Table 1. Characteristics of the raw wastewater

pH	TCOD _{Cr} (mg/L)	SCOD _{Cr} (mg/L)	BOD ₅ (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)	SS (mg/L)	Alkalinity (mg/L as CaCO ₃)
7.12 ~ 7.42 (7.28)	106.0 ~ 175.5 (129)	71.0 ~ 136.6 (94.2)	62.5 ~ 70.4 (67.3)	13.5 ~ 33.9 (26.8)	2.3 ~ 3.2 (2.8)	53.8 ~ 58.9 (55.7)	230 ~ 340 (273)

() is mean value during operating days

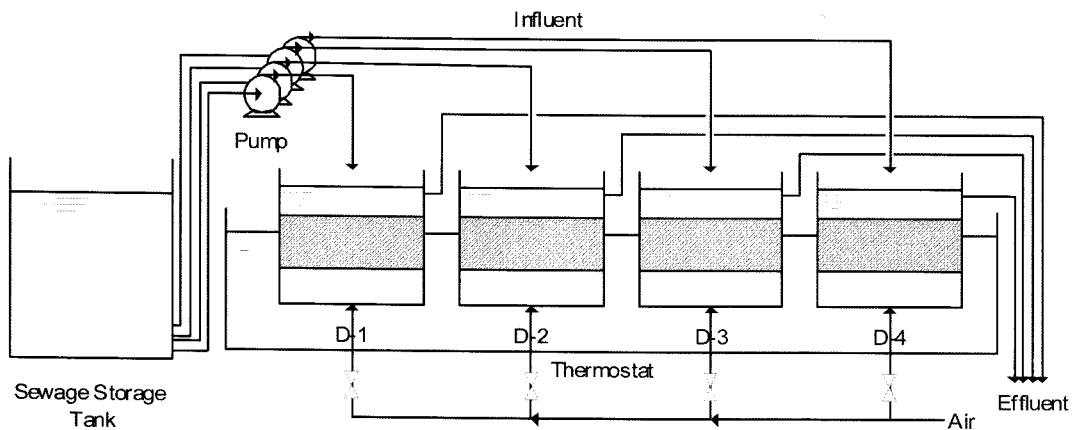


Fig. 1. Schematic diagram of the aerobic biofilm reactors.

2.1. 운전 조건 및 실험 장치

본 실험에 사용한 반응기는 Fig. 1의 개략도와 같다. 5.3 L의 유효 용적을 가지는 4개의 반응기에 세라믹 매디아를 각각 15% 충전하였으며, 일정한 온도를 유지하기 위하여 항온조 내에 반응기를 설치하였다. DO 농도 변화 실험을 위해서 반응기에는 각각의 air line이 설치되었다.

유입수는 하수종말처리장 1차 침전조 유출수를 사용하였으며, 유입수의 특성은 Table 1과 같다. 4개의 반응기는 60일간 DO 농도를 4 mg/L에서 운전하였고, 그 후 DO 농도 변화 실험을 위해서, D1, D2, D3, D4 반응기를 각각 1, 3, 5, 7 mg/L로 운전하였다. 운전 기간 동안 온도는 25℃, 수리학적 체류시간은 6시간으로 유지하였다.

2.2. 수질분석방법

각 반응조의 DO 농도 및 온도는 4회/일 주기로 측정하여 유지하였다. TCOD_{Cr}, BOD, Alkalinity, TSS, VSS, MLSS는 수질오염공정시험방법¹¹⁾과 standard method¹²⁾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. PCR Primer

본 실험에 사용한 PCR primer는 Table 2와 같다. AOB의 16S ribosomal ribonucleic acid(rRNA)를 증폭하기 위해서 AOB에 특이성이 있는 CTO 189F/654R을 이용하였으며, AOB의 특정 유전자인 ammonia monooxygenase(AMO)를 증폭하기 위해서 amoA1F/2R-TC를 이용하였다. DGGE를 위해서 GC-Clamp를 부착한 CTO 189F primer와 amoA1F primer를 이용하였다.

Table 2. PCR Primers used in this study

Primer	Sequence(5'-3')	Target	Reference
CTO 189F	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G		
CTO 654R	CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C	β -AOB	13)
CTO 189F - GC Clamp ^{a)}	GC Clamp - GGA GRA AAG CAG GGG ATC G		
amoA 1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT		
amoA 2R - TC	CCC CTC TGC AAA GCC TTC TTC	AOB	14)
amoA 1F - GC Clamp ^{a)}	GC Clamp - GGG GTT TCT ACT GGT GGT		

^{a)}The GC Clamp added for DGGE-PCR : 5'- CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GC - 3'

2.4. DNA 추출 및 PCR 증폭

DNA 추출은 전체 생물막을 탈리시킨 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고 biomass 0.1 g을 멸균수 1 mL에 재용해시켜 PowerSoil™ DNA isolation kit(MoBio Ltd., Co., USA)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 1%의 Agarose gel에서 전기 영동하여 추출여부를 확인하였다.

추출한 DNA는 0.5 mL 튜브에 10×Taq buffer 2.5 μ L, 10 mM dNTP 10 μ L, 각각의 primer 0.25 μ L(10 pmol), DNA template 2 μ L, Taq(or hot taq) DNA polymerase(Solgent Co., Korea) 0.125 μ L을 첨가하고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 25 μ L가 되도록 PCR stock solution을 제조하였다.

PCR-DGGE시 mismatch의 오류를 최소화하기 위하여 hot taq polymerase(Solgent Co., Korea)을 이용하여 PCR을 실시하였으며, 그 외 PCR은 일반 taq polymerase(Solgent Co., Korea)을 이용하였다. 각각의 PCR 조건은 Table 3과 같다. 모든 PCR 실시 후 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였으며, 다음 PCR 및 DGGE를 위해서 PCR purification kit(Bioneer Co., Korea)를 사용하여 PCR product를 정제하였다.

2.5. DGGE 및 염기서열 분석

DGGE(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 gradient delivery system) gel stock solution은 20%와 50%의 변성제 농도구배로 조제하여(변성제 농도 100%는 7 M urea와 40% formamide) 각각 glass plate사이에 16 mL씩 주입하여 농도 구배가 있는 gel을 제조하였다. DGGE 실험을 위해 PCR product 30 μ L에 dye solution 10 μ L를 혼합하여 gel에 loading한 뒤 60°C, 200 V에서 8시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기 영동한 gel은 ethidium bromide으로 30분간 염색시킨 후 UV transilluminator(Uvitec gel documentation system, UK)를 사용하여 band를 확인하였다.

Table 3. PCR Conditions used in this study

Primer	PCR Conditions
CTO 189F	1 min 93°C, followed by 39 cycle of 1 min at 92°C
(GC Clamp)	1 min at 57°C, 45s at 68°C followed by a 5 min
/654R	final extension at 68°C
amoA 1F	5 min 94°C, followed by 42 cycle of 1 min at 94°C
(GC Clamp)	90s at 60°C, 90s at 72°C followed by a 10 min final
/2R-TC	extension at 72°C

Band 확인 후 원하는 DNA band가 포함된 부위를 잘라낸 후 1.5 mL tube에 옮기고 TE buffer 30 μ L를 첨가한 후 -70°C에서 15분, 60°C에서 15분 씩 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. 염기 서열 분석결과는 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST를 이용하여 16S rRNA와 *amoA*의 염기 서열을 분석하였다.

2.6. Cloning

16S rRNA CTO primer를 이용하여 증폭한 PCR product를 pGEM-T vector(Progema, USA), ligase, ligase buffer와 혼합한 후 16°C에서 incubation 하였다. Ligation mixture는 competent JM109 cell과 혼합한 뒤 heat shock 과정을 거친 후 800 μ L의 LB액체배지(Luria Bertani: 일반영양배지)를 주입한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양액을 ampiciline, IPTG, X-Gal이 주입된 LB고체배지에 도말한 후 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 white colony만을 선택하여 M13 primer를 이용하여 미리 만들어 둔 PCR solution에 주입하여 PCR을 실시한 후 정제과정을 거쳐 염기 서열을 분석하였다.

2.7. INT-Dehydrogenase activity test

생물막내 AOB의 활성을 평가하기 위해 미리 준비된 시료 5 mL를 15 mL tube로 옮긴 다음 전자 수용체로 0.1 mL의 nalidizic acid(20 mg/10 mL), 0.1 mL yeast extract(30 g/L)를 첨가하고 0.1 mL의 NH₄Cl(2,000 mg/L), 0.1 mL의 NaNO₂(2,000 mg/L)첨가한 것을 준비하여, 0.2%의 INT 1 mL를 첨가하고 20°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 37% formaldehyde 용액을 1 mL 첨가하여 시료를 고정시킨 다음 2,500 rpm에서 10분간 원심분리를 하고 상등수를 제거하였다. 남아 있는 INTF(INT Formazon)는 물에 불용성이므로 2+3 Aceton/Demethyl Sulfuroxid(DMSO) 유기 용매 5 mL를 가하여 혼합한 다음, 암소(20°C)에서 20분간 반응시켜 INTF를 추출하였다. 이를 다시 원심분리기에서 10분간 2,500 rpm으로 원심분리한 다음, 상등수만 취하여 흡광광도계를 사용하여 465 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이는 Koopman 등¹⁵⁾의 방법을

수정한 것으로 다음의 식 (1)을 이용하여 DHA(Dehydrogenase Activity, 탈수소 효소 활성도)를 구하였다.

$$DHA(mgO_2/gVSS/day) = \frac{905 \times D_{465} \times V_1}{C \times V_2 \times t \times F} \quad (1)$$

여기서, D_{465} : 465 nm에서 시료의 흡광도
 V_1 : 용매의 부피(mL)
 T : INT와 반응한 시간(min)
 C : VSS의 농도(g VSS/L)
 V_2 : 추출에 사용된 시료의 부피(mL)
 F : INT와 formaldehyde 용액에 의한 희석 보정 계수(0.714)

ATU(Allylthiourea)는 *Nitrosomonas* sp.의 활성을 저해하기 때문에 다음의 식 (2)와 같이 *Nitrosomonas* sp.의 활성분율을 구하였다.^{16,17)}

$$DHA \text{ of } Nitrosomonas \text{ sp.} = \frac{(A - C) - (B - C)}{(A - C)} \quad (2)$$

여기서, A : 일반 시료의 DHA
 B : ATU를 첨가한 시료의 DHA
 C : 37% formalin을 첨가한 시료의 DHA

2.8. Accession Numbers

본 연구를 통해 얻어진 16S rRNA와 *amoA* gene의 염기서열은 GenBank database에 등록하였으며, 등록된 염기서열의 accession number는 DQ91126-DQ911635이다.

3. 결과 및 고찰

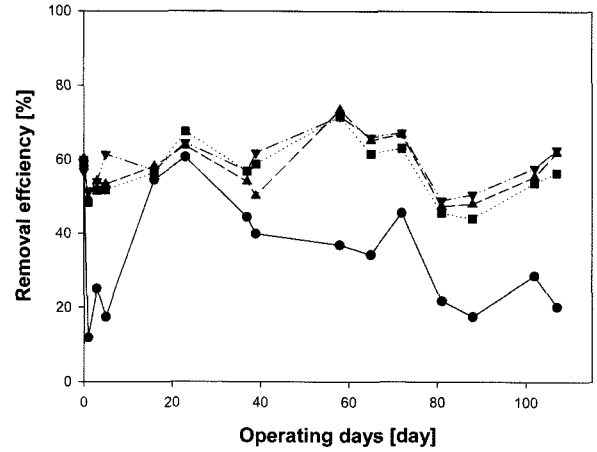
3.1. 호기성 생물막 반응기 운전 결과

4개의 반응기는 4 mgDO/L, 25°C에서 60일간 운전되었으며, NH₄⁺-N 제거효율이 80% 이상으로 안정화되었을 때, 1, 3, 5, 7 mgDO/L으로 변화하였다.

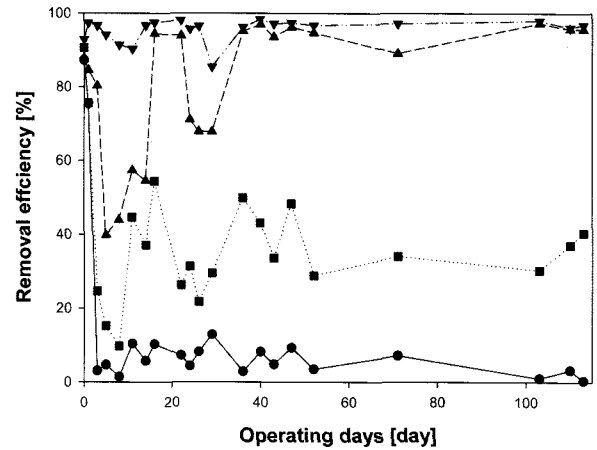
Fig. 2는 호기성 생물막 반응기의 SCOD_{Cr}, NH₄⁺-N 및 T-N 제거효율을 나타내고 있다. Fig. 2(a)를 살펴보면, D1 반응기에서만 DO 농도 변화에 대하여 SCOD_{Cr} 제거효율이 영향을 받는 것을 알 수 있다. D2, D3, D4 반응기에서는 운전기간이 경과하여도 유기물 제거효율은 평균 56.2, 57.2, 59.4% 정도로 변화가 거의 없는 반면에, D1 반응기는 평균 32.8%의 SCOD_{Cr} 제거효율을 보였다. D2, D3, D4의 유출 SCOD_{Cr} 농도를 살펴보면 40.4, 39.5, 37.4 mg/L이다.

Fig. 2(b)는 각 반응기의 NH₄⁺-N 제거효율을 나타내고 있다. D1, D2, D3, D4의 평균 NH₄⁺-N 제거효율은 각각 12.9, 38.4, 80.8, 95.5%이며, 유출수의 평균 NH₄⁺-N 농도는 23.4, 16.7, 5.3, 1.3 mg/L이다.

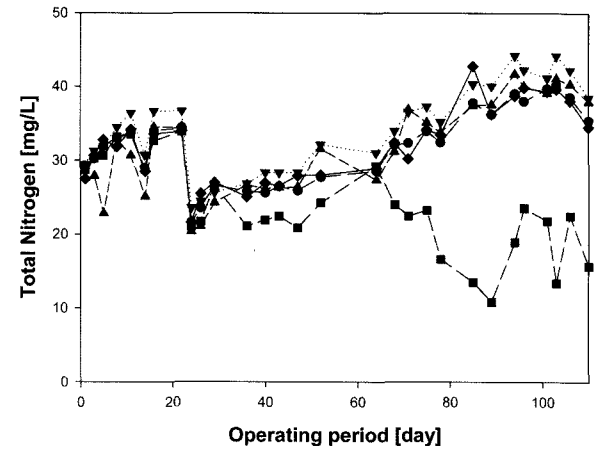
질산화 미생물은 호기성 종속영양미생물에 비해 산소에 대한 친화력이 낮아 종속영양 미생물보다 높은 용존산소가 필



(a) SCOD_{Cr}



(b) NH₄⁺-N



(c) T-N

Fig. 2. Removal efficiencies and T-N concentration of the each reactor with different DO concentrations; D1(●), D2(■), D3(▲), D4(▼).

요하고,¹⁸⁾ 안정적인 질산화에 필요한 DO 농도는 완전성장한 생물막 반응기에서 5.2 mg/L, 부분성장한 생물막 반응기에서 3.4 mg/L로 보고되고 있다.¹⁹⁾ 본 연구에서는 안정적인 질산화를 수행하기 위한 최적 DO 농도는 5 mg/L 이상이었다.

Fig. 2(c)는 각 반응기별 T-N 농도를 나타내고 있다. D1, D3, D4 반응기는 운전기간 동안 T-N 농도의 변화가 거의

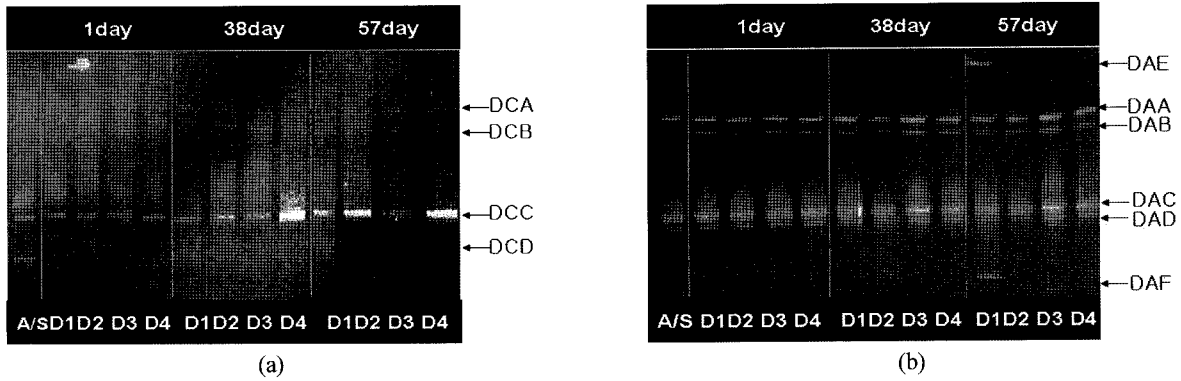


Fig. 3. DGGE analysis based of 16S rRNA with CTO primer(a) and *amoA* gene with *amoA* primer(b) from biofilm in reactors according to different DO; A/S: 식종 슬러지, D1: 1 mgDO/L, D2: 3 mgDO/L, D3: 5 mgDO/L, D4: 7 mgDO/L.

없는 것으로 나타났다. 그러나 D2 반응기의 경우 약 60일 경과 후 유출수의 T-N 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 이 기간 동안 평균 T-N 제거효율은 약 48%였다. 따라서 D2에서는 생물막 내부에서 탈질이 일어나는 것으로 판단되었다.

3.2. DGGE 및 염기서열 분석

Fig. 3(a)은 CTO primer를 이용한 DGGE 결과이다. DO 농도 변화에 따른 DGGE band를 살펴보면 식종 슬러지에서 보이던 band DCD가 없어졌으며, 그 외 band는 DO 농도 변화에 따라 운전기간이 경과하여도, 크게 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 염기 서열 분석 결과(Table 4), 운전기간 동안 변화가 없었던 band DCA와 DCB는 *β-proteobacteria*에 속하는 *uncultured beta bacterium*이며, 우점종으로 보이는 band DCC는 낮은 농도의 NH₄⁺-N가 유입되는 하수처리장에서 우점화 경향을 보이는 *Nitrosomonas oligotropha* 계열에 속하는 *Nitrosomonas* sp. Nm 59이었다.^{20,21)}

Fig. 3(b)은 *amoA* primer를 이용한 DGGE 결과이다. 운전기간이 경과함에 따라 band의 변화는 미미하였다. 하지만 57일 경과 후의 D1 반응기의 상부와 하부에서 각각 band DAE와 DAF가 검출되었다. *amoA*의 염기 서열 분석 결과(Table 4), 운전기간 동안 변화가 없었던 band DAA, DAB, DAC, DAD는 모두 *Nitrosomonas oligotropha* 계통에 가까운 *uncul-*

tured AOB였으며,²²⁾ D1의 band DAE와 DAF는 각각 *Nitrosospira multiformis*와 *Nitrosomonas oligotropha*이다.

amoA primer를 이용하여 DGGE를 실시하였을 때에만 *Nitrosospira* sp. 검출이 가능하였는데, *Nitrosospira* sp.는 질산화 과정에서 미량으로 존재하기 때문에 CTO primer를 이용했을 때에는 검출이 잘 되지 않으며, 중요하지 않다고 보고되고 있다.⁵⁾ 본 연구에서도 D1을 제외한 나머지 반응기에서는 *Nitrosospira* sp.가 미량으로 존재하기 때문에 검출이 되지 않은 것으로 판단된다.

3.3. Cloning 분석

CTO primer를 이용하여, 57일 제 동일한 시료에 대하여 각 반응기 별로 cloning을 실시하였으며, colony의 염기 서열 분석 결과는 NCBI GenBank database와 비교하여, Table 5에 나타내었다. D1에서는 낮은 DO 농도로 인하여 생물막 내부까지 산소 전달이 원활하지 못해 호기성 상태와 혐기성 상태가 공존하여 다양한 종이 존재하는 것으로 나타났다. DO 농도 변화에 따른 *Nitrosomonas* sp.의 비율을 살펴보면, D1, D2, D3, D4 각각 21.4, 25, 27.3, 26.3%로 크게 변화가 없는 것을 확인할 수 있으며, DO 농도의 변화는 *Nitrosomonas* sp.의 분율 변화에도 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

Table 4. Sequences of extracted DGGE bands

DGGE band	Accession No.	Species	Similarity (%)
DCA	AY274185	<i>uncultured beta bacterium</i>	97
DCB	AY274185	<i>uncultured beta bacterium</i>	96
DCC	AY123811	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59	97
DCD	AB234250	<i>uncultured bacterium</i>	96
DAA	AF293069	<i>uncultured ammonia-oxidizing bacterium</i>	98
DAB	AF293069	<i>uncultured ammonia-oxidizing bacterium</i>	98
DAC	AF293069	<i>uncultured ammonia-oxidizing bacterium</i>	96
DAD	AF293069	<i>uncultured ammonia-oxidizing bacterium</i>	99
DAE	U91603	<i>Nitrosospira multiformis</i> ATCC 25196	98
DAF	AJ298709	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	97

Table 5. Result of clone analysis based on 16S rRNA

Species	Number of AOB 16S rRNA clones(ratio %)			
	D1	D2	D3	D4
<i>Nitrosomonas</i> sp.	9(21.4)	6(25)	6(27.3)	5(26.3)
<i>uncultured</i> AOB	1(2.4)	3(12.5)	N.D.	1(2.4)
<i>uncultured β proteobacteria</i>	4(9.5)	1(2.4)	N.D.	2(10.5)
<i>uncultured bacterium</i>	24(57)	14(58.3)	16(72.7)	12(63.2)
<i>Acidobacteria bacterium</i>	1(2.4)	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Dechloromonas</i> sp.	1(2.4)	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Aquatic bacterium</i>	1(2.4)	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Methylobcillus flagellatus</i>	1(2.4)	N.D.	N.D.	N.D.
Total number of AOB 16S rRNA clones	42	24	22	19

N.D., not detected

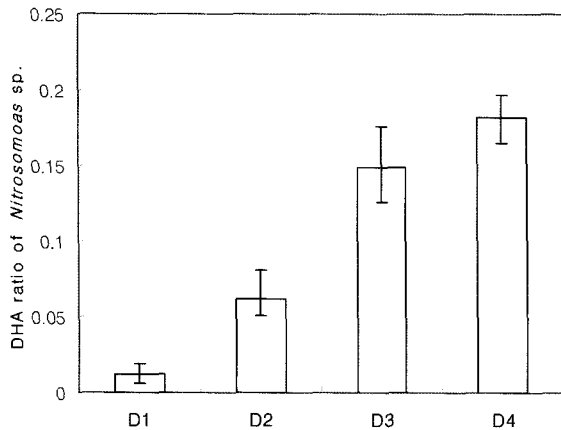


Fig. 4. DHA of *Nitrosomonas* sp. from biofilm in reactors according to different DO concentration.

3.4. Nitrosomonas sp.의 활성분율

Fig. 4는 DO 농도 변화에 따른 AOB의 활성분율을 나타내었다. D1, D2, D3, D4의 활성도는 각각 0.01, 0.06, 0.15, 0.18로 DO 농도가 증가함에 따라 활성분율도 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 DO 농도는 AOB의 활성에 영향을 주는 것으로 판단된다. Limpiyakorn 등²⁰⁾은 각각 6.6, 1.0 mg/L의 다른 DO 농도로 운전한 활성슬러지공정에서 총 AOB의 개체수는 2.9×10^{10} , 2.8×10^{10} cell/L로 유사하였으며, NH_4^+ -N oxidizing activity에는 61, 0 fmol/cell/h로 차이가 있었다고 보고하였다. 본 연구에서도 DO 농도의 변화는 *Nitrosomonas* sp.의 분율 변화보다는 *Nitrosomonas* sp.의 활성에 영향을 주는 것으로 나타났다.

4. 결론

본 연구에서는 DGGE와 cloning 및 INT-DHA에 의한 활성도 측정을 통하여 호기성 생물막 반응기에서 DO 농도 변화에 따른 AOB 군집의 특성을 살펴보았다.

1) COD 제거보다는 질산화에 더 높은 DO 농도가 필요하고, 호기성 생물막 공정에서 안정적인 질산화를 위해서는 DO 농도를 5 mg/L 이상으로 유지해야 하는 것으로 나타났으며, 3 mg/L일 때는 질산화와 탈질이 동시에 수행되어, 약 48%의 T-N 제거 효율을 보였다.

2) DO 농도 변화에 따라 질산화 효율에 차이가 보였지만, PCR-DGGE 결과 반응기별 band의 변화는 거의 없었으며, AOB 종의 변화는 관측되지 않았다. DGGE band의 염기 서열 분석 결과, 주로 저농도의 NH_4^+ -N가 유입되는 하수처리장에서 발견되는 *Nitrosomonas oligotropha* 계통의 *Nitrosomonas* sp. Nm 59와 uncultured AOB가 운전기간 동안 모든 반응기에서 관측되었다.

3) Cloning 분석 결과, D1, D2, D3, D4의 *Nitrosomonas* sp.의 비율은 각각 21.4, 25, 27.3, 26.3%로 큰 변화가 없었으며, DO 농도 변화는 *Nitrosomonas* sp. 분율 변화에도 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

4) INT-DHA 측정 결과, DO 농도가 감소함에 따라 *Nitrosomonas* sp.의 활성분율은 감소하였다. 따라서 DO 농도 변화는 *Nitrosomonas* sp. 군집의 변화 보다 활성에 영향을 주는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2003-000-11640-0) 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Laia, C. L. and Jesus, G. G., "Use of amoB as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria," *J. Microbiol. Methods.*, **57**(1), 69~78(2004).
2. Chih-Ju, G., Jou, and Huang, G. C., "A pilot study for oil refinery wastewater treatment using a fixed film bio-reactor," *Adv. Environ. Research*, **7**, 463~469(2003).
3. Hagopian, D. S. and Riley, J. G., "A closer look at the bacteriology of nitrification," *Aqua. Engineering*, **18**, 223~244(1998).
4. Okabe, S., Kindaichi, T., Ito, T., and Satoh, H., "Analysis of size distribution and area cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms," *Biotechnol. Bioeng.*, **85**(1), 86~95(2003).
5. Wagner, M. and Loy, A., "Bacterial community composition and function sewage treatment systems," *Biotechnology*, **13**, 218~227(2002).
6. Park, H., D. and Noguera, D., R., "Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge," *Water. Res.*, **38**, 3275~3285(2004).
7. Zhaojun Li, Jianming Xu, Caixian Tang, Jianjun Wu, Akmal Muhammand, and Haizhen Wang, "Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils," *Chemosphere*, **62**(8), 1374~1380(2006).
8. Muyzer, G. and Smalla, K., "Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology," *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127~141(1998).
9. Purkold, U., Pommerening-roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H-P., and Wagner, M., "Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16s rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys," *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(12), 5368~5381(2000).

10. Awong, J., Bitton, G., and Koopman, B., "ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams," *Water Res.*, **19**(7), 917~921(1985).
11. 환경부, 수질오염공정시험방법(2004).
12. APHA, "Standard methods for the examination of water and wastewater," American Public Health Association, Washington, D.C.(1995).
13. Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., and Woldendorp, J. W., "Analysis of ammonia oxidizing bacteria of the β subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1489~1497(1997).
14. Nicolaisen, M. H. and Niels, B. R., "Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria," *J. Microbiol Methods.*, **50**, 189~203(2002).
15. Koopman B., Bitton G., Logue C., John M. Bossart, and Juan Lopez, M., "Validity of tetrazolium reduction assays for assessing toxic inhibition of filamentous bacteria in activated sludge," Toxicity screening procedures using bacterial systems(Edited by Dickson Liu and Bernard J. Dutka), 147~162(1984).
16. Lee, S.-M., Jung, J.-Y., and Chung, Y.-C., "Measurement of ammonia inhibition of microbial activity in biological wastewater treatment process using dehydrogenase assay," *Biotechnology Letters*, **22**, 991~994(2000).
17. 임정훈, "생화학학적 측정기법을 이용한 생물막 질산화 공정 해석," 부산대학교, 박사 학위 논문, 86~89(2003).
18. Wiesmann, U., "Biological Nitrogen Removal from Wastewater," *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, **51**, 113~154(1994).
19. Lazarova, N. R., Manem, J., and Melo, L., "Influence of dissolved oxygen on nitrification kinetics in a circulating bed reactor," *Water Sci. Technol.*, **37**(4), 189~193(1998).
20. Limpiyakorn, T., Shionhara, Y., Kurisu, F., and Yagi, O. i., "Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in tokyo," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **54**(2), 205~217(2005).
21. Ulirike, P. M., Wagner, G. T., Andress, P., and Hans-Peter, K., "16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolate: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads," *Int. syste. evol. microbiol.*, **53**, 1485~1494(2003).
22. Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., and Schramm, A., "Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm," *Appl Environ Microbiol.*, **67**(3), 1351~62(2001).