

## 황입자를 이용한 독립영양탈질 미생물 군집분포 특성분석에 관한 연구

### A study on characteristics analysis of autotrophic denitrification microbial community using sulfur granule

윤수철\* · 주재영 · 남덕현 · 박철휘

Su-chul Yoon\* · Jae-young Joo · Duck-hyun Nam · Chul-hwi Park

서울시립대학교 환경공학부

(2007년 12월 26일 접수; 2008년 4월 15일 1차수정; 2008년 12월 1일 2차수정; 2008년 12월 4일 채택)

#### Abstract

The representative microorganism of autotrophic denitrification using sulfur granule, oxidizes the reduction from S and performs denitrification by reducing  $\text{NO}_3^-$ -N to  $\text{N}_2$  gas. The sampling of autotrophic denitrification microorganisms has been performed from foreshore sludge, condensed sludge, and active sludge, but the analysis of autotrophic denitrification microbial community characteristics has been lacking. Based on the separation and identification of each sample using the PCR and DGGE methodologies, many types of sulfuric microorganisms and autotrophic denitrification microorganisms were found.

**Key words :** PCR, DGGE, autotrophic denitrification

**주 제 어 :** PCR, DGGE, 독립영양탈질

#### 1. 서론

일반적으로 하·폐수 중에 함유되어 있는 질소 제거를 위해 가장 많이 이용되고 있는 방법으로는 독립영양 미생물을 이용한 질산화와 중속영양 미생물에 의한 탈질을 하는 생물학적 질소 제거법이다. 현재 질산화의 경우 수많은 연구자들에 의해 여러 가지 공법들이 연구되고 발전되어져 왔다. 반면, 탈질반응은 무산소 상태에서 *Bacillus*, *Pseudomonas* 등과 같은 중속영양 미생물에 의해 질산성 질소가 질소가스로 전환되는 과정을 말한다. 탈질 반응에서 C/N비는 중요한 인자중의 하나로서 유기물이 부족하게 되면 완벽한 탈질을 기대하기 어렵다. 이 경우 부족한 유기물을 보충하기 위해

메탄올을 첨가할 경우에는 경제적으로 큰 비용이 들어가고, 처리수에 메탄올이 잔존하여 유출수 수질을 악화시킬 위험이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 중속적인 방법 대신 수소(A. Koenig, L. H. Liu, 1996), 철(Kurt M, Dnn IJ, Bourne JR, 1987), 황(Brian AT, Lenly JW, Alvarez JJ, 1998)등을 이용한 독립영양탈질이 연구되어지고 있으며, 그 중에서도 황은 다른 물질에 비해 값이 싸고 효과적으로 탈질을 수행하므로 많은 연구가 되어지고 있는 실정이다.(황 등, 2007; 이 등, 2004; 추 등, 2002).

황을 이용한 독립영양탈질의 대표적인 미생물인 *T. denitrificans*는 환원된 형태의 황을 산화시키면서  $\text{NO}_3^-$ -N을  $\text{N}_2$ 로 환원하여 탈질을 수행한다. *T. denitrificans*의

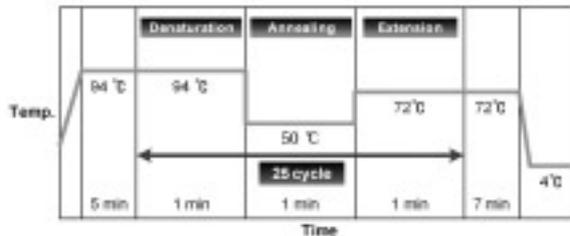


Fig. 1. PCR amplification reactions carried out in an automated thermal cycler.

채취는 해변에서의 개펄(변 등, 2000), 농축슬러지(오 등, 2000), 활성슬러지(심 등, 2004)등에서 실시되어져 왔으나 이에 대한 미생물의 군집분포 특성분석은 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 개펄토양, J하수처리장의 농축슬러지 그리고 Y하수처리장의 활성슬러지를 이용하여 독립영양탈질에 이용되고 있는 슬러지를 PCR, DGGE의 분자유전학적방법으로 분리 및 동정을 실시하였다.

## 2. 실험장치 및 방법

### 2.1. 시료 채취

황이용 탈질미생물의 분리를 위해 인천 영종도의 개펄토양, 서울시 J 하수처리장의 농축 슬러지, Y 하수처리장의 활성슬러지로 현재 sulfur/limestone을 이용하여 운전되어지고 있는 슬러지를 채취하였고, 미국의 ATCC에서 순수한 *T. denitrificans*를 분양받았다. 시료는 혐기상태로 보존하여 실험실로 운반하였다.

### 2.2. DNA 추출

개펄토양과 농축슬러지, 활성슬러지로부터 total genomic DNA를 얻기 위하여 bead-beater와 FastDNA SPIN kit for soil (Bio101, USA.)를 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA의 농도와 순도는 Nanodrop (ND-1000 spectrophotometer, USA)를 이용하여 260 - 280 nm에서 측정하였다. 얻어진 DNA 시료들은 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다.

Table 1. Sequence and target site of the primer used in this study about 16S rDNA

Primer	Sequence(5' to 3')	Position
9Fa	GAGTTTGTATCCTGGCTCAG	9-27 <sup>c</sup>
1542R <sup>b</sup>	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	1522-1542
GC 341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	341-358
786R	CTACCAGCGTATCTAATC	768-786

a. Forward primer

b. Reverse primer

c. The number of position is based on E.coli 16S rDNA

### 2.3. PCR 증폭

PCR 반응은 50  $\mu$ l 안에 1  $\times$  PCR buffer, 2 mM dNTP mixture, 1  $\mu$ M each primer, template DNA and 2.5 U Taq polymerase(Intron Co., Korea)를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 반응조건은 우선 94°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 1 min, 50°C에서 1 min, 그리고 72°C에서 1 min로 25 cycles를 시행한 후 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. 각각의 PCR 산물은 ethidium bromide 염색 후 1% agarose gel에서 확인하였다. Table 1은 16S rDNA에 대한 염기서열을 나타낸 표이다. Fig. 1은 PCR 방법을 기술한 그림을 나타내고 있다.

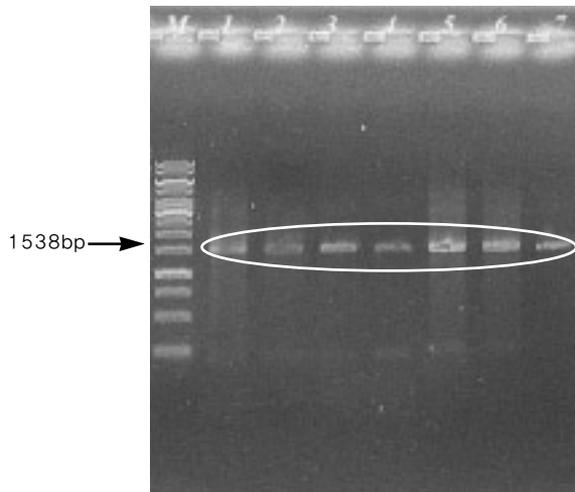
### 2.4. 각 시료의 functional gene (*nirS*, *nirK*, *nosZ* gene) 분석

각 시료에서 functional gene의 확인을 위하여 nitrite에서 NO로의 환원은 nitrite reductase(*nirS*와 *nirK*)에 의해 촉매 되어진다. *nirS* gene을 확인하기 위한 primer로는 *nirS*-1F(5'-CCTAYTGGCCGCCRCART-3')와 *nirS*-6R(5'-CGTTGAACTTRCCGGT-3')을 이용하였으며, *nirK* gene을 확인하기 위한 primer로는 *nirK*-1F(5'-GGMATGGTKC CSTGGCA-3')와 *nirK*-5R(5'-GCCTCGATCAGRITRTTGG-3')을 이용하여 PCR을 수행하였다. 한편 NO에서 N<sub>2</sub>로의 환원은 nitrous reductase(*nosZ* gene)에 의해 촉매 되어지며, *nosZ* gene을 확인하기 위해 *nos661F*와 *nos1772R*을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 우선 95°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 1 min, 50°C에서 1 min, 72°C에서 2 min으로 30 cycle을 시행한 후 72°C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. 각각의 PCR 산물은 ethidium bromide 염색 후 UV trans illuminator에서 확인하였다.

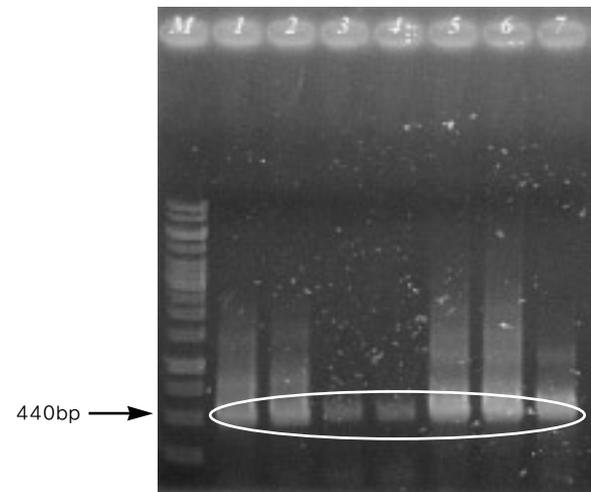
### 2.5. DGGE법

DGGE analysis를 위해 Muyzer et al.의 방법을 변형하여 실시하였다. 추출된 DNA는 9F(GAGTTTGTATCCTGGCTCAG, *E. coli* 9-27 position) primer와 1542R (AGAAAGGAGGTGATCCAGCC, *E. coli* 1522-1542 position)을 이용하여 1차로 direct PCR 후 2차로 nested PCR을 실시하였다. 이때, 40-base GC clamp가 함유된 341F-GC(CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCAGGGGCGGCTACGGGAGGCAGCAG, *E. coli* 341-358 position) primer와 786R primer(CTACCAGCGTATCTAATC, *E. coli* 768-786 position)를 이용하여 위의 조건으로 nested PCR을 수행하였다.

DGGE는 D-Code 16/16-cm gel system (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 60°C로 유지된 1  $\times$  TAE (20



**Fig. 2.** The direct PCR amplification using 9F-1542R primer for *T. denitrificans* isolation from DNA, M: 1kb marker, 1: sludge in Young jong do from sample 1, 2: sludge in Young jong do from sample 4, 3, 4: sludge from concentrated sludge, 5, 6: sludge from active sludge, 7: *T. denitrificans*.



**Fig. 3.** The nested PCR amplification using GC 341F-786R primer for *T. denitrificans* isolation from DNA.

mM Tris acetate, 0.5 mM EDTA [pH 8.0]), 60 V, 15hr 동안 수행하였다. 이때, gels는 8% acrylamide(37.5:1 = acrylamide: disacrylamide)를 함유하게 제조하였으며, 40%~70%의 gradient를 이루도록 urea와 formamide의 양을 조절하였다. 15 시간 후 gel은 ethidium bromide로 30분간 염색 후 관찰하였다.

### 2.6. 16S rDNA 염기서열 분석

DGGE gel상에서 잘 분리된 bands는 칼로 자른 후 341F-GC와 786R primer set을 이용하여 재증폭을 실시한 후 purification(PCR purification kit, Qiagen, Germany) 과정을 거친 다음 ABI automatic DNA sequencer(model 377, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)로 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열은 BLAST search(www.ncbi.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 분석하였다.

## 3. 실험결과 및 고찰

### 3.1. 16S rDNA 미생물 분리 및 동정

#### 3.1.1. 각 시료들에 대한 16S rDNA 분리 및 동정

개펄토양, 농축슬러지, 활성슬러지 내에 어떠한 미생물들이 군집 분포를 이루고 있는지 알아보기 위하여 추출한 DNA로부터 계통분류학적으로 고유한 특성을 가지는 16S rDNA를 증폭하기 위하여 9F-1542R primer를 이용하여 1차 direct PCR을 수행하였다. 결과로써 1538bp에서 증폭이 되었다. Fig. 2는 16S rDNA 증폭 결과를 나타낸다.

16S rDNA의 특정부위를 증폭하여 DGGE를 수행할 때 좀 더 많고 정확한 미생물 분집군포를 파악하기 위하여 1차적으로 증폭된 PCR 산물을 주형으로 40-base GC clamp가 함유된 341F-786R primer를 이용하여 nested PCR로 2차 PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 3에서 나타낸 결과와 같이 440bp에서 증폭이 되었다.

GC 341F-786R primer set을 사용하여 증폭된 PCR 산물을 이용하여 DGGE를 수행하였으며, 16S rDNA의 염기

**Table 2.** The primers to analysis the functional gene(nirS, nirK, nosZ gene)in this study

Primers	Sequence(5' to 3')	Specificity
nirS-1F	CCTAYTGCCGCCR CART	nitrite reductase
nirS-6R	CGTTGAACTTRCCGGT	
nirK-1F	GGMATGGTKCCSTGGCA	nitrate reductase
nirK-5R	GCCTCGATCAGRTTRTGG	
nos661F	CGGCGTGGGGCTGACCAA	nitrous reductase
nos1772R	ATRTCGATCARCTGBTCGTT	
TD-F	TGAAGTGGCAGTCTAGAGTGC GT	<i>T. denitrificans</i>
TD-R	TGCCCGAAAGGGAATTGGAAC	

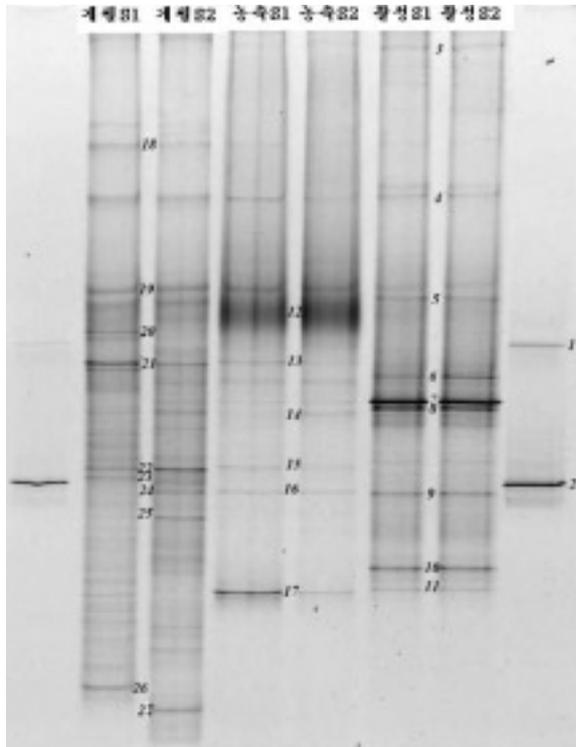


Fig. 4. DGGE profile based in 16S rDNA generated from all samples. The DGGE bands (No. 1-27) were excised and sequenced.

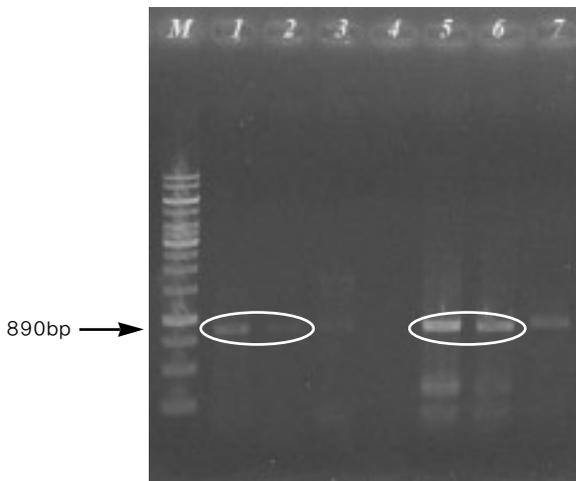


Fig. 5. PCR amplification of the nirS gene from each sample.

서열을 분석하여 채취해 온 3개의 sample인 개펄토양, 농축슬러지, 활성슬러지로부터 어떠한 미생물들이 군집 분포를 이루고 있는지 분석하였다. DGGE profile에서 얻은 각 밴드들에 대하여 염기서열을 결정하여 NCBI의 Genbank database를 이용하여 Table 3를 보면 알 수 있듯이 총 27개의 밴드들에 대해 상동성을 비교 검색하였다. 밴드 16번에 대해서는 어떤 종인지 염기서열을 분석할 수 없었다.

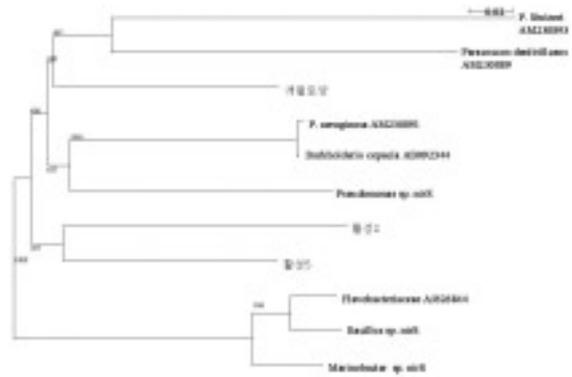


Fig. 6. Phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method using nirS sequences. The branch points are bootstrap support values higher than 50% obtained 1000 replicons. The scale bar represents substitutions per site.

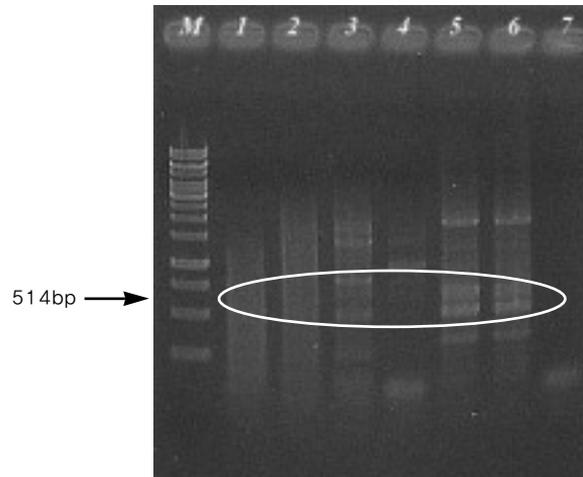


Fig. 7. PCR amplification of the nirK gene from each sample.

Fig. 4는 DGGE 후의 결과를 나타낸다.

### 3.1.2. 개펄토양 미생물

개펄토양에서는 황산화 미생물 종인 *Halothiobacillus sp.*와 99%일치함을 보였고 무기화학적 독립영양 미생물인 *Rhodocyclaceae bacterium*에 속하면서 유황을 이용하는 *T. thiooxidans*, 철분을 이용하는 *T. ferrooxidans*와 92% 일치함을 보였다. 또한, *Thiobacillus sp.* 역시 황을 산화하는 세균들로서 100% 일치함을 보였다. 활성슬러지에서 발견되어지는 광 독립영양 황산화 미생물인 *Comamonas sp. IA-30*과 97%일치함을 보였다.

### 3.1.3. 농축슬러지 미생물

J 하수처리장의 농축슬러지에서는 pH 2의 산성에서 생존하며 광산 근처에서 많이 발견되어지는 *Halothiobacillus sp. WJ18*과 93%일치함을 보였고 어류의 내장에 기생하는

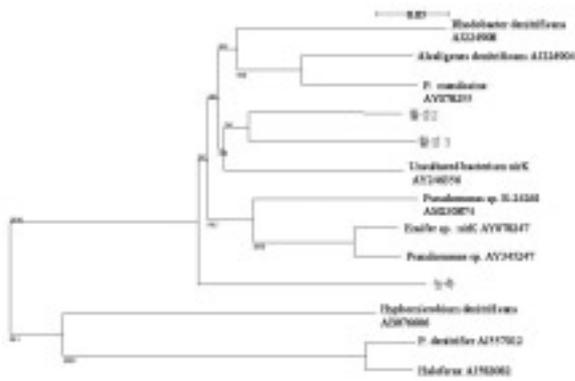


Fig. 8. Phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method using nirK sequences.

미생물인 *Acinetobacter xiaminensis*와 95%일치함을 알 수 있었다. 또, 식물뿌리에 생존하며 질소고정에 관여하는 미생물 종인 *Azoarcus sp.*와 96%일치함을 보였다.

3.1.4. Sulfur/limestone에 의한 슬러지 미생물

Y 하수처리장의 활성슬러지로부터 독립영양탈질에 운전되어지고 있는 슬러지에서는 아비산염을 산화하는 혐기성 독립영양 미생물인 *Alkalilimnicola ehrlichei*와 90%일치함을 보였고, 메탄산화에 관여하는 호열성 미생물인  $\gamma$ -*proteobacterium B2*와 99%일치함을 나타내었으며, 텔레프탈염산을 이용하여 동화작용을 하는 미생물 종인 *Delfiatsuruhatensis*와 99%일치함을 보였다. 또, 6가 크롬을 저감시키고 암모니아 제거에 관여하는 해양 미생물 종인 *Arthrobacter oxydans*와 95%일치함을 나타내었으며, 그람음성 호기성 중속영양 미생물인 *Gemmatimonadetes bacterium*과 99%일치하는 것으로 나타났다.

3.2. 탈질 미생물 군집분포 특성파악

채취해 온 개펄토양, 농축슬러지, 활성슬러지 내에 탈질 관련 미생물들의 군집 분포를 알아보기 위하여 탈질과정 각각의 단계에 관여하는 특정한 유전자인 *nirS*, *nirK*, *nosZ* gene에 대해 PCR증폭 후 미생물을 분리 및 동정하여 염기서열을 분석하였다. Fig. 5, Fig. 7, Fig. 9는 각 시료들에 대

Table 3. Identity of the bands obtained from DGGE profile of all samples

Band no.	Closest relative	Accession no. <sup>a</sup>	Similarity <sup>b</sup> (%)
1	uncultured <i>Acinetobacter sp.</i>	DQ130041	373/409 (91%) <sup>c</sup>
2	<b><i>Thiobacillus denitrificans</i></b>	<b>CP000116</b>	<b>419/419 (100%)</b>
3	<i>Halothiobacillus sp.</i>	AY099401	416/419 (99%)
4	sulfur-oxidizing bacterium	AF170423	402/428 (93%)
5	uncultured thiobacillus sp.	AY082471	377/377 (100%)
6	Rhodocyclaceae bacterium FTL10	DQ451826	366/394 (92%)
7	<i>Thiobacillus sp.</i> 100B-B9	AB210275	418/418 (100%)
8	<i>Thiobacillus sp.</i> 100B-B9	AB210275	419/419 (100%)
9	<i>Rhodanobacter sp.</i>	AF494542	411/416 (98%)
10	<i>Comamonas sp.</i> IA-30	AB247270	417/427 (97%)
11	$\beta$ - <i>proteobacterium</i>	BPR17285	405/427 (94%)
12	<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	AF1731369	407/429 (94%)
13	<i>Halothiobacillus sp.</i> WJ18	AY096035	398/427 (93%)
14	uncultured <i>Acinetobacter sp.</i>	DQ130041	334/354 (94%)
15	<i>Acinetobacter xiamenensis</i>	EF030545	400/419 (95%)
17	<i>Azoarcus sp.</i>	DQ851175	408/424 (96%)
18	<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i>	CP000453	379/419 (90%)
19	<i>Halochromatium sp.</i>	AJ401219	340/377 (90%)
20	uncultured $\beta$ - <i>proteobacterium</i>	AJ318129	407/426 (95%)
21	$\gamma$ - <i>proteobacterium B2</i>	AY902202	415/419 (99%)
22	<i>Delfia tsuruhatensis</i>	AY302438	427/428 (99%)
23	uncultured $\alpha$ - <i>proteobacterium</i>	AY711784	283/294 (96%)
24	<i>Arthrobacter oxydans</i>	AJ871301	375/393 (95%)
25	uncultured <i>Actinobacterium</i>	AY124390	356/393 (90%)
26	uncultured <i>Acidobacteria bacterium</i>	DQ139451	393/424 (92%)
27	<i>Gemmatimonadetes bacterium</i>	AY217504	410/411 (99%)

a. Nucleotide sequence can be accessed via, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/  
 b. Sequences were aligned to the closet relative using BLAST  
 c. The part of the total sequence used in alignment

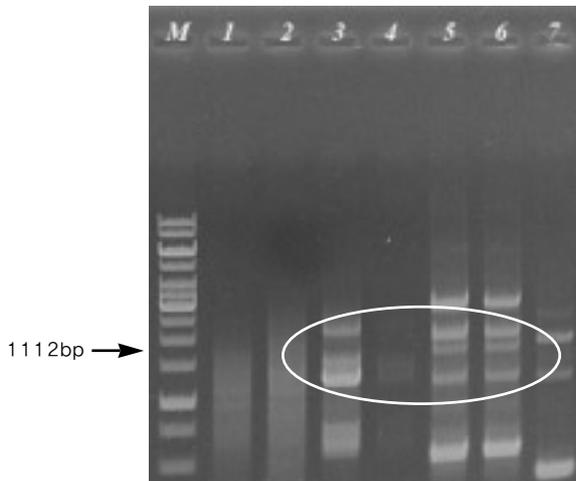


Fig. 9. PCR amplification of the nosZ gene from each sample.

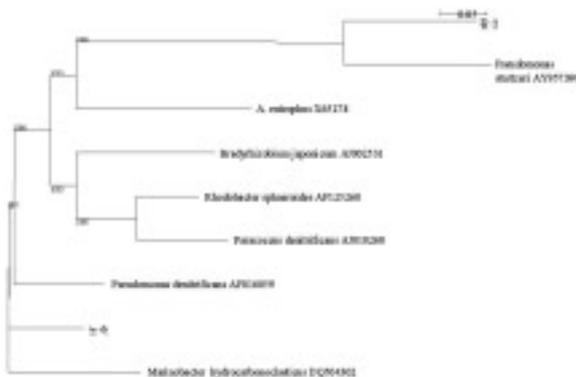


Fig. 10. Phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method using nosZ sequences.

한 nirS, nirK, nosZ의 PCR 수행결과를 나타내고 있다.

PCR 증폭이후 증폭되어진 산물을 이용하여 16S rDNA cloning을 실시하여 nirS, nirK, nosZ에 관여하는 탈질 미생물들을 동정하였다. Fig. 6, Fig. 8, Fig. 10은 nirS, nirK, nosZ에 관여하는 탈질 미생물들을 phylogenetic tree로 나타낸 결과이다. 그러나 대부분의 미생물들이 uncultured된 상태로 나타났으며 염기서열을 비교함으로써 가장 유사한 미생물이라 판단되어지는 미생물들을 나타낸 것이다.

nirS primer set을 이용해서 PCR을 증폭시킨 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 890bp에서 영종도에서의 개펄토양과 Y 하수처리장에서의 활성슬러지로 독립영양탈질에 이용되는 미생물에서 PCR 산물이 증폭되었음을 알 수 있었다.

이후 16S rDNA cloning을 통하여 nirS 유전자에 관련된 개펄토양 미생물들은 Fig. 6에 나타내었다. Pseudomonas stutzeri의 특성은 탄소원으로 4염화 탄소를 이용하는 호기성 탈질 미생물로 독성 유기화학물질 등의 생물학적 분해를

위해 연구되고 있다. Paracoccus denitrificans는 중속영양미생물로 탈질화를 수행하는 동안 전자공여체로 각각 수소, 환원된 황 화합물을 사용한다. Pseudomonas aeruginosa는 호기성 미생물로 메틸벤젠과 같은 다환 방향족 탄화수소를 탄소원으로 사용한다. Pseudomonas sp.는 호기성 탈질 미생물로 질소제거를 위한 독립영양탈질공정 이용시 질산성 질소의 농도가 증가하여도 탈질율에 큰 영향을 나타내지 않으며, 또한 낮은 C/N비에서 유기물을 첨가하였을 때 90% 이상의 탈질율을 나타내므로 황이용 탈질공정에 탁월한 효과가 있다.

활성슬러지에서는 호기성 미생물로 대부분 육지나 해양의 식물의 사체에서 존재하는 Flavobacteriaceae와 호기성 미생물이지만 무산소 조건에서도 성장이 가능하며 당과 유기산, 알콜류를 탄소원으로 사용하는 Bacillus sp. 그리고 수생식물에 존재하며 탈질의 역할을 수행할 수 있는 독립영양미생물인 Marinobacter sp.와 유사하게 나타났다.

nirK primer set을 이용해서 PCR을 증폭시킨 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 514bp에서 농축 슬러지와 Y 하수처리장에서의 활성슬러지로 독립영양탈질에 이용되는 미생물에서 PCR 산물이 증폭되었음을 알 수 있었다. 이후 16S rDNA cloning을 통하여 nirK 유전자에 관련된 미생물들을 동정하였으며 결과는 다음 Fig. 8과 같다. 활성슬러지에서 동정된 nirK 관련 미생물들은 그람음성간균이며 사람의 장관 내에 상재하는 Alcaligenes dehitrificans와 유사하게 나타났다. Pseudomonas sp.는 탈질균 중 가장 일반적이며 폭넓게 분포한다. 또한 H<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH, 탄화수소, 유기산, 알콜, benzoates, 방향족화합물등의 폭넓은 유기화합물을 사용하고 몇몇은 nitrate를 환원시키지 못하나 nitrite로 탈질을 하는 특성이 있다. 농축슬러지에서도 Pseudomonas sp.와 유사하게 나타났으며, 탄소원으로써 알콜과 간단한 1,2-탄소 산을 사용하는 Hyphomicrobium과 유사하게 나타났다.

nosZ primer set을 이용해서 PCR을 증폭시킨 결과 Fig. 9에 나타난 바와 같이 1112bp에서 J 하수처리장의 농축 슬러지와 Y 하수처리장에서의 활성슬러지로 독립영양탈질에 이용되는 미생물에서 PCR 산물이 증폭되었음을 알 수 있었다. 이후 16S rDNA cloning을 통하여 nosZ 유전자에 관련 미생물들을 동정하였고 결과는 다음 Fig. 10에 나타내었다. 활성슬러지에서는 Pseudomonas stutzeri, A. eutrophus, Bradyrhizobium japonicum, Rhodobacter sphaeroides, Paracoccus denitrificans와 유사하게 나타났다.

통성혐기성으로 토양에서 주로 서식하며 수소를 산화하여 에너지를 생성시킬 수 있는 A. eutrophus, 그람음성 막대형 질소 고정 박테리아로써 두과작물의 근류 형성 박테리아인 Bradyrhizobium japonicum, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 존재 하에서 수소를 생성하는 홍색 비유황 광합성 미생물인

*Rhodobacter sp.* 그리고 *Paracoccus denitrificans*와 유사하게 나타났다.

농축슬러지에서는 *Pseudomonas sp.*와 해양에서 발견되어 지는 중속영양탈질 미생물로 수소를 기질로 이용하는 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*와 유사하게 나타났다.

#### 4. 결론

- 1) 개펄토양에서는 황산화 미생물 중, 무기화학적 독립영양 미생물, 황을 산화하는 미생물, 광 독립영양 황산화 미생물등의 미생물들이 나타났다.
- 2) J 하수처리장의 농축슬러지에서는 pH 2의 산성에서 생존하며 광산 근처에서 많이 발견되는 미생물, 어류의 내장에 기생하는 미생물, 식물뿌리에 생존하며 질소고정에 관여하는 미생물 중등이 미생물들이 나타났다.
- 3) Y 하수처리장의 활성슬러지로부터 독립영양탈질에 운전되어지고 있는 슬러지에서는 아비산염을 산화하는 혐기성 독립영양 미생물, 메탄산화에 관여하는 호열성 미생물, 텔레프탈염산을 이용하여 동화작용을 하는 미생물 중, 6가 크롬을 저감시키고 암모니아 제거에 관여하는 해양 미생물 중, 그람음성 호기성 중속영양 미생물들이 나타났다.
- 4) 여러 종의 황산화미생물이 발견되어졌고 독립영양탈질 미생물도 발견되어졌다. 또한, uncultured된 미생물들이 황이용 독립영양탈질을 수행할 가능성을 가지는 것으로 사료된다.



#### 참고 문헌

1. 변정섭, 범봉수, 조광명 (2000) 황을 이용한 독립영양탈질에서의 체류시간과 온도의 영향, *대한환경공학회지*, 22(3), pp. 405-415.
2. 심동민, 진창숙 (2004) 황 산화 독립영양탈질 미생물을 이용한 독립영양탈질과정에서 담체의 종류와 충전 방법에 따른 탈질 성능 평가, *대한환경공학회지*, pp. 185-192.
3. 오상은, 유영복, 이쌍구, 김인수 (2000) 황입자를 이용한 황산화 탈질 미생물의 탈질 특성(회분식 실험), *한국물환경학회지*, pp. 37-40.
4. 이수원, 김규동, 최영균, 김동한, 정태학 (2004) 미생물 성장 특성에 기초한 독립영양탈질의 화학양론식 연구, *상하수도학회지*, 18(2), pp. 121-127.
5. 추인준, 황용우, 김창균, 이시진 (2002) 황 충전 섬모상 담체를 이용한 질산화 탈질 동시수행, *대한환경공학회지*, 24(2), pp.185-194.
6. 황용우, 문진영, 가미선 (2007) 침지형 황 탈질 모듈을 이용한 고속의 질소제거, *상하수도학회지*, 21(4), pp. 429-437.
7. Koenig, A. and Liu, L.H. (1996) Autotrophic denitrification of landfill leachate using elemental, *Water Sic. Tech*, 34(5~6), 469-476.
8. Brian, A.T. and Alvarez, J.J. (1998) Fe(0)-supported autotrophic denitrification, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 634-639.
9. Kurt, M., Dnn, I.j., and Bourne, J.R. (1987) Biological denitrification of drinking water using autotrophic organics with H<sub>2</sub> in a fluidized bed biofilm reactor. *Biotechnol. Bioengng.*, 29, 493-50.