

실규모 하수처리 생물반응기에서 발견되는 암모니아산화균 군집조성 및 특징

박희등

고려대학교 건축사회환경공학부

질소제거 하수고도처리공정에서 암모니아산화균은 질소제거에 핵심 역할을 하는 독립영양세균이다. 하수처리 생물반응기에는 다양한 암모니아산화균이 서식하며 군집조성도 시간에 따라 변화한다. 본 연구에서는 생물반응기의 운전인자 및 환경조건이 암모니아산화균 군집구조의 조성 과 다양성에 영향을 미친다는 가설을 설정하였다. 이 가설을 검증하기 위해 질산화반응이 활발한 포항, Palo Alto, Nine Springs, Marshall 하수처리장 활성슬러지 생물반응기로부터 암모니아산화균의 ammonia monooxygenase subunit A 유전자 clone library를 제작하였다. 하수처리 생물반응기에는 *Nitrosomonas europaea*, *N. oligotropha*, *N.-like*, *Nitrospira* lineage에 속하는 암모니아산화균이 주로 발견되었으며, *N. communis*, *N. marina*, *N. cryotolerans* lineage에 속하는 암모니아산화균은 주종을 이루지 못했다. 암모니아산화균 군집조성은 하수처리장별로 차이를 보였는데, 포항, Palo Alto, Marshall 하수처리장에서는 *N. oligotropha* lineage에 속하는 암모니아산화균이 가장 빈번히 발견되었고, Nine Springs 하수처리장에서는 *N. europaea* lineage에 속하는 암모니아산화균이 주종을 이루었다. 한편, 암모니아산화균 군집조성과 생물반응기 운전인자(HRT, SRT, MLSS) 및 환경조건(온도, pH, COD, NH₃, NO₃⁻)의 연관성은 다변수 통계 분석법인 Redundancy Analysis 방법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 생물반응조의 COD와 NO₃⁻ 농도가 하수처리 생물반응기에서 암모니아산화균 군집구조를 결정하는 통계학적으로 유의한 변수로 나타났다.

Key words □ ammonia-oxidizing bacteria, ammonia monooxygenase subunit A (*amoA*), nitrification, redundancy analysis

질소가 과량으로 포함된 하수 방류수는 인간 활동 및 자연환경에 여러 가지 해를 입힐 수 있다. 급작스런 조류번식 및 하천수의 용존산소 고갈, 이로 인한 수생 생물의 폐사, 암모니아 및 질산성 질소 독성 등은 널리 알려진 악영향들이다(20). 국내에서도 질소를 포함한 영양염류가 과량으로 포함된 하천수 및 연근해 바닷물에서 조류의 이상 증식으로 어류의 집단 폐사 등이 종종 보고되고 있다. 이에, 최근 환경부에서는 하수 처리수의 질소 방류농도를 엄격히 규제하고 있으며(1), 여러 하수처리장은 질소 방류수 기준을 맞추기 위해 질소 고도처리공정으로 개선하여 운영하고 있다.

유입수에 포함된 질소를 제거하기 위한 방법으로는 물리적, 화학적, 생물학적 방법 등이 제안되고 있으나, 하수처리에 있어서는 경제성 및 처리의 안정성 등의 이유로 생물학적 방법이 전 세계적으로 선호되고 있다(11, 20). 생물학적 방법은 일반적으로 생물반응조를 호기조와 무산소조의 두 개 반응조로 나누어 각각 질산화(nitrification)와 탈질(denitrification)을 유도하는 방식으로 운영하는 것이다(11). 호기조에서는 암모니아산화균(ammonia-oxidizing bacteria)과 아질산산화균(nitrite-oxidizing bacteria)이 순차적으로 암모니아(NH₃)를 아질산(NO₂⁻)과 질산(NO₃⁻)으로 산화하며, 무산소조에서는 탈질균이 아질산 혹은 질산을 질소가스

(N₂)로 환원하게 된다. 두 그룹의 질산화 미생물 중 암모니아산화균은 아질산산화균에 비해 성장속도가 느리기 때문에 암모니아산화균이 질산화속도를 결정하는 것으로 알려져 있다(20).

암모니아산화균은 독립영양세균으로 암모니아를 산화하면서 에너지를 얻고 물속에 녹아있는 이산화탄소를 이용해 세포구성물질을 합성한다(22). 하수처리장의 활성슬러지에는 *Nitrosomonas europaea* 암모니아산화균이 우점한다고 보고되고 있으나(7), 이는 *N. europaea*가 다른 암모니아산화균보다 성장이 빠르며 배양방법으로 분리를 시도했을 때 가장 빈번하게 확인이 되기 때문이다(7). 최근에 개발된 배양에 의존하지 않는 분자생물학적 기법들을 이용한 실험결과에 의하면 보다 다양한 암모니아산화균이 활성슬러지에 포함되어있는 것을 알 수 있다.

Hiorns 등(4)에 의하면 *Nitrospira* spp.가, Wagner 등(21)에 의하면 *Nitrosococcus mobilis*가, Dionisi (3)에 의하면 *N. oligotropha*가 우점한다고 보고되고 있다. 한편, Purkhold 등(15)과 Limpiyakorn 등(9)의 실험에 의하면 하수처리장 활성슬러지에는 *N. communis*와 *N. cryotolerans*를 포함해 보다 다양한 암모니아산화균이 존재하는 것으로 보고되고 있다.

하수처리 생물반응기에 존재하는 암모니아산화균의 다양성 원인은 아직까지 명확하지 않으며, 이에 대한 연구도 아직까지 미진한 편이다. 특히, 암모니아산화균 군집구조를 하수처리 생물반응기의 운전인자 및 환경조건과 연관시킨 보고는 많지 않다. 본 연구에서는 하수처리 생물반응기 체류시간과 포기방식 같은 운

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-3290-4861, Fax: 82-2-928-7656
E-mail: heedeung@korea.ac.kr

Table 1. Wastewater treatment plants analyzed in this study and operational data for them

WWTP	Location	Type of process	Flow rate (m ³ /day)	Solids retention time (days)	Conc. of influent COD (mg/L)	Conc. of influent nitrogen (mg TKN/L)
Pohang	Pohang, Korea	Conventional activated sludge	80,000	6.1	150	31
Palo Alto	Palo Alto, California, USA	Trickling filter+nitrification	114,000	7.0	97	30
Marshall	Marshall, Wisconsin, USA	Aerated-anoxic Orbal™	1,000	14.9	450	33
Nine Springs	Madison, Wisconsin, USA	Modified UCT	150,000	9.6	300	30

영인자, 온도와 pH 같은 생물반응기의 환경조건, 암모니아농도와 유기물농도 같은 하수의 특성이 암모니아산화균 군집구조와 다양성에 영향을 준다는 가설을 세웠다. 이러한 가설은 여러 연구자들에 의해 제시되었으나(8, 9, 13, 14) 대부분의 연구가 지리적으로 근접한 몇몇 하수처리장을 대상으로 제한된 데이터를 이용하여 연구되었으며, 그 결과 일관성 있는 결과가 부족한 편이다. 그래서, 본 연구의 목적은 지리적으로 멀리 떨어져 있는 여러 하수처리장을 대상으로 보다 체계적으로 접근하여 상기 가설을 검증하는 것이다.

이를 위해 본 연구는 한국과 미국에 있는 4개 실규모 하수처리 생물반응기로부터 암모니아산화균 ammonia monooxygenase subunit A 유전자의 clone library를 제작하였으며, 각각의 clone들을 계통수 분석을 통해 7개의 lineage로 분류하였다. 이렇게 분류된 암모니아산화균 군집의 분포는 다변수 통계분석법의 하나인 Redundancy Analysis (10)를 이용하여 하수처리 생물반응기의 운전조건 및 하수특성과의 연관관계를 조사하였다.

재료 및 방법

실규모 하수처리 생물반응기

본 연구에 사용된 활성슬러지 시료는 포항하수처리장(포항, 한국), Palo Alto 하수처리장(Palo Alto, Calif., USA), Nine Springs 하수처리장(Madison, Wisc., USA), Marshall 하수처리장(Marshall, Wisc., USA)에 위치한 4개 실규모 활성슬러지 생물반응기로부터 얻었다. 포항하수처리장은 시료채취 당시 일반적인 활성슬러지 공정으로 운영되고 있었다. 질산화를 위해 생물반응기가 설계되어있지는 않았지만 시료채취 당시(2005년 5월) 생물반응기 온도가 높게 유지되어(~20°C) 유입질의 상당부분이 질산화가 진행되고 있었다(Fig. 1). Palo Alto 하수처리장은 살수여상과 질산화를 위한 생물반응기로 구성되어있다. 유입하수는 1차 침전지를 거친 후 살수여상으로 유입된다. 살수여상에서는 약 65%의 유기물 부하가 저하되기 때문에 이후 질산화를 위한 생물반응기의 부하를 줄일 수 있었다. Palo Alto 하수처리장에는 별도로 탈질을 위한 단위공정은 설치되어 있지 않았다. 다만, 처리수를 관계용수 등으로 재이용하기 위해 2차 침전지 이후에 모래여과지가 설치되어 있었다. Marshall 하수처리장은 aerated-anoxic 공정(13)으로 운영되는 처리장으로 산화구 형태의 생물반응기로 구성되어 있었다. 유입하수는 혐기물을 제거하는 스크린

을 거친 후, 1차 침전지를 거치지 않고 바로 생물반응기로 유입되었다. 가장 바깥쪽 산화구는 공기공급률을 이론적인 산소요구량보다 적게 공급하여 용존산소 농도를 0 mg/L 부근에서 유지시켰다. 이는 동시 질산화/탈질반응(simultaneous nitrification and denitrification)을 유도하는 환경이 된다. 하지만, 안쪽의 두 번째와 세 번째 산화구는 0.5~5 mg/L 정도의 비교적 높은 용존산소 수준으로 운전하고 있었다. Nine Springs 하수처리장은 University of Cape Town (UCT) 공정의 변형으로 운영되고 있었다(13). 유입하수는 1차 침전지를 거친 후 무산소조로부터 반송된 활성슬러지와 혼합되어 혐기조로 유입되었다. 혐기조 활성슬러지는 무산소조를 거쳐 호기조로 이동하였다. 2차 침전지의 침전슬러지는 무산소조로 이송되었다. 일반적인 UCT 공법과의 차이점은 호기조에서 무산소조로 활성슬러지의 내부반송이 생략된 형태로 운영되며, 주로 생물학적 인체거와 질산화에 초점을 맞추었다는 것이다. 각 하수처리장의 위치, 용량, 운전조건, 유입수 특성 등은 Table 1 및 이전의 논문(13)에 서술되어있다.

시료채취 및 화학분석

포항하수처리장은 2005년 5월에, Palo Alto 하수처리장은 2004년 9월에, Nine Springs 하수처리장은 2000년 8월과 2001년 1월에, Marshall 하수처리장은 2000년 8월과 2001년 1월에 각각 활성슬러지 시료를 채취하였다. 암모니아산화균 군집분석에 사용된 활성슬러지 시료는 각 처리장의 생물반응기 포기조 말단에서 시료채취기를 이용해 grab sampling 방법으로 채취한 후 바로 아이스박스에 보관하였다. 시료를 실험실로 옮긴 후에는 DNA 추출 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. NH₃-N, NO₃⁻-N, PO₄³⁻-P 등을 측정하기 위한 시료는 기공 크기가 0.2 µm의 여과지를 이용하여 시료채취 현장에서 바로 여과하였으며, BOD, COD, TKN, T-P 등은 여과 없이 바로 아이스박스에 보관하여 실험실로 옮겼다. 모든 측정항목은 Standard Methods (2)에 준하여 분석을 실시하였다.

DNA 추출, DNA 증폭, cloning, 염기서열 분석

시료 준비는 우선 1.5 ml 활성슬러지를 Tris-EDTA (pH 7.6) 완충액으로 세정한 후 원심분리기로 활성슬러지를 수거하였으며, 이 때 수거된 활성슬러지를 250 µl Tris-EDTA (pH 7.6) 완충액으로 다시 재현탁시켰다. 이 현탁액을 genomic DNA 추출시료로 이용하였으며, 추출은 Soil Extraction kit (MoBio Laboratories,

USA)를 이용하였다. 약 20~50 ng의 genomic DNA를 유전자증폭 반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)에 이용하였다. 유전자증폭은 암모니아산화균의 ammonia monooxygenase subunit A (*amoA*) 유전자를 목표로 하였으며, primer 세트 *amoA*-1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3')와 *amoA*-2R (CCCCTCKGSAAA GCCTTCTTC-3'; K는 G 혹은 T; S는 C 또는 G를 나타냄)을 이용하였다(16). 유전자 증폭은 PCR Core System I (Promega, USA)을 이용하였다. 증폭된 DNA는 전기영동을 거친 후, QIAEX[®] II Gel Extraction kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 정제한 후 cloning의 시료로 이용되었다. Cloning은 pGEM-T easy vector system (Promega)을 이용하였다. 형질전환된 대장균으로부터 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)을 이용해 plasmid DNA를 추출하였다. Insert의 염기서열 결정은 ABI Prism BigDye terminator (Applied Biosystems, USA)를 이용하였다. 본 연구에 사용된 포항 하수처리장, Nine Springs 하수처리장, Marshall 하수처리장 등의 암모니아산화균 *amoA* 염기서열 정보는 이전의 논문에서 소개되어 있으며(12, 13), Palo Alto 하수처리장의 암모니아산화균 *amoA* 염기서열은 Stanford 대학교 환경공학과 Chok Hang Yeung에 의해 분석되었다.

암모니아산화균 군집분석

본 연구에서 얻은 각 하수처리장의 *amoA* 유전자 염기서열과 암모니아산화균 순수배양에서 얻은 *amoA* 유전자 염기서열로부터 CLUSTAL X version 1.83 (19)을 이용해 각 유전자 염기서열의 distance matrix를 얻었다. 같은 소프트웨어로부터 distance matrix를 이용하여 neighbor-joining 계통수[Saitou and Nei method, (17)]를 계산하였다. 역시 같은 소프트웨어를 이용하여 Bootstrap 값을 100번의 재추출 시도(resampling trials)를 통해 얻었다.

계산된 계통수는 Tree Explorer version 1.6.6 (http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/TE_man.html)을 이용해 형상화하였다. 계통수에 형상화된 하수처리장의 *amoA* 유전자는 Purkhold 등(15)이 제안한 6개 암모니아산화균 lineage (즉, *Nitrosomonas europaea*, *N. oligotropha*, *N. communis*, *N. marina*, *N. cryotolerans*, *Nitrospira*)를 토대로 분류되었다.

통계분석

암모니아산화균 군집구조와 하수처리 생물반응기의 운전인자 및 환경조건과의 연관관계를 규명하기 위해 다변수 통계방법인 Redundancy Analysis (RDA)를 이용하였다. RDA 분석법은 군집구조 데이터 분석에 종종 이용되는 방법으로 종(species)의 증감이 환경변수에 선형적으로 비례한다고 가정한다(10). 이 분석법은 3가지 매개변수(즉, 하수처리 생물반응기, 암모니아산화균 lineage, 운전인자 및 환경조건)의 분포를 하나의 도표에 표시한다. 즉, 도표에서 하수처리 생물반응기는 점(point)으로, 암모니아산화균 lineage와 운전인자 및 환경조건은 화살표로 표시된다. 이때 표시된 운전인자 및 환경조건 중에서 통계학적으로 유의한 매개변수는 검증방법인 forward selection법(18)으로 결정하였다. RDA 분석법은 Canoco 통계소프트웨어(Plant Research Interna-

tional, Netherlands)를 이용하였다. 한편, AOB 군집구조에 영향을 미칠 수 있는 환경변수들에 대한 상관관계는 Pearson correlation coefficient로 평가하였다. Pearson correlation coefficient는 두 변수 간의 선형적 상관도의 세기에 따라 -1에서 1로 표현된다. 이 분석은 Excel 2007 소프트웨어(Microsoft, Korea)를 이용하였다.

결 과

각 처리장의 질소제거 특성

암모니아는 암모니아산화균의 기질이 되므로 하수처리 생물반응기에서 암모니아를 포함한 질소제거 거동을 조사하는 것은 암모니아산화균 군집구조 특성을 이해하는 데 도움이 된다. 각 하수처리장의 유입수 총질소(total Kjeldahl nitrogen: TKN), 유입수 암모니아성 질소, 유출수 질산성 질소, 유출수 암모니아성 질소의 농도를 Fig. 1에 나타내었다. 각 처리장의 유입수 TKN은 29.7~35.4 mgN/L, 암모니아성 질소는 16.8~21.0 mgN/L로 처리장 별로 차이가 크지 않았다. 이에 반해 유출수의 질산성 질소와 암모니아성 질소는 처리장별로 다른 양상을 보였다. 포항하수처리장은 일반적인 활성슬러지공정을 채택하였기 때문에 충분한 질산화와 탈질반응이 이루어지지 않아 암모니아성 질소의 농도는 17.4 mgN/L, 질산성 질소의 농도는 13.1 mgN/L로 높게 측정되었다. Palo Alto 하수처리장에서는 질산화는 완벽하게 진행되었으나(유출수 암모니아성 질소: 0.2 mgN/L), 무산소조가 설치되지 않아 유출수의 질산성 질소의 농도는 높게 측정되었다(23.5 mgN/L). Nine Springs 하수처리장에서도 질산화는 완벽하게 진행되었으나(유출수 암모니아성 질소: 0.08 mgN/L(여름시료), 0.05 mgN/L(겨울시료)), 호기조에서 무산소조로 활성슬러지의 내부반송이 없었기 때문에 탈질반응 효율은 높지 않았다(유출수 질산성 질소: 11.5 mgN/L(여름시료), 14.6(겨울시료)). Marshall 하

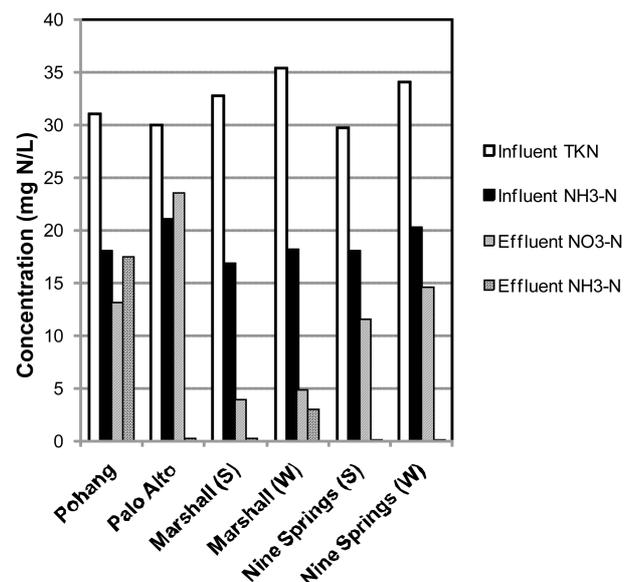


Fig. 1. Influent and effluent nitrogen compounds for the six samples taken from four different wastewater treatment bioreactors.

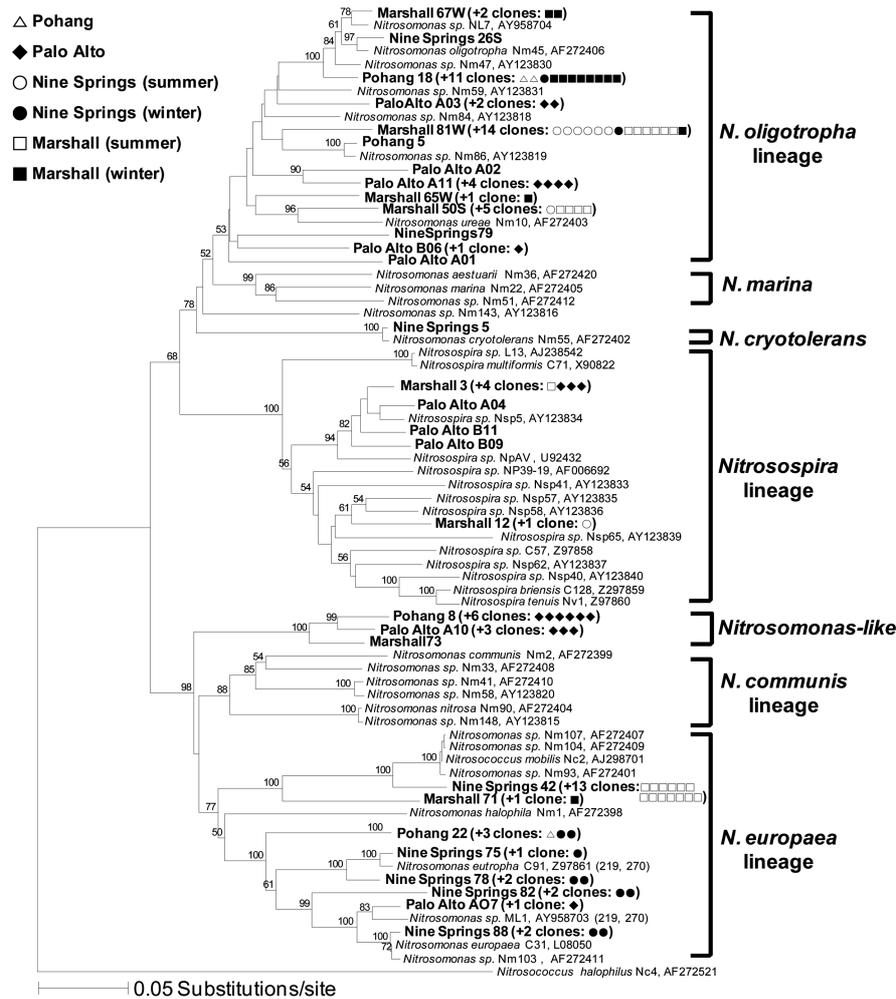


Fig. 2. Neighbor-joining tree based on *amoA* gene sequences retrieved from this study (boldface type) and pure-culture AOB strains. Clone sequences exhibiting >97% identity are indicated by symbols in parentheses. Bootstrap values were determined based on 100 trials and shown at nodes greater than 50.

수처리장에서는 동시 질산화/탈질반응의 효과로 질소제거율이 가장 높게 나타났다. 유출수 암모니아성 질소의 농도는 여름과 겨울시료에서 각각 0.2와 2.9 mgN/L로 측정되었으며, 유출수 질산성 질소의 농도는 여름과 겨울시료에서 각각 3.9와 4.8 mgN/L로 나타났다.

암모니아산화균 군집구조 특성

포항, Palo Alto, Nine Springs, Marshall 하수처리장으로부터 활성슬러지 시료를 채취하였으며, 각각의 시료에 대해 암모니아산화균 *amoA* 유전자 clone library를 제작하였다. 포항 시료로부터 8개, Palo Alto 시료로부터 31개, Nine Springs 여름(2000년 8월) 시료로부터 24개, Nine Springs 겨울(2001년 1월) 시료로부터 16개, Marshall 여름(2000년 8월) 시료로부터 15개, Marshall 겨울(2001년 1월) 시료로부터 18개의 *amoA* clone을 얻었다. 이들 *amoA* clone의 계통학적 유연관계를 조사하기 위해 *amoA* clone염기서열과 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)로부터 얻

은 42개 순수배양 암모니아산화균 *amoA* 유전자 염기서열을 합쳐 계통학적 분석을 실시하였다. Fig. 2의 계통수에서 볼 수 있듯이 *N. oligotropha* (총 clone 수의 49%), *N. europaea* (30%), *N.-like* (11%), *Nitrospira* (9%) 순서로 암모니아산화균의 군집이 분포하고 있었다. 본 연구에서는 *N. communis*와 *N. marina*에 속하는 clone은 발견되지 않았다. 또한, *N. cryotolerans* lineage에 속하는 clone도 1개만이 발견되었다. 이 결과로 볼 때 *N. communis*, *N. marina*, *N. cryotolerans* lineage에 속하는 암모니아산화균은 하수처리 생물반응기 활성슬러지에 흔하게 존재하지 않으며 질산화에도 중요한 역할을 하지 않는 것으로 사료된다. 총 clone 수의 11%를 차지하는 *N.-like* lineage는 Purkhold 등 (15)이 제시한 6개의 lineage에 속하지 않으며 계통학적으로 유연관계가 동떨어진 cluster에 해당한다.

각 처리장별로 암모니아산화균 군집구조는 다소 차이를 보이고 있다(Fig. 3). 포항하수처리장 시료에서는 *N. oligotropha* (50%)가, Palo Alto 하수처리장 시료에서는 *N. oligotropha*

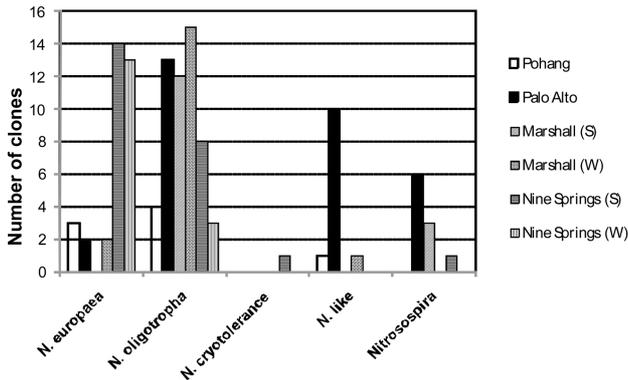


Fig. 3. Distribution of *amoA* clones based on seven different AOB lineages for the six samples taken from four different wastewater treatment bioreactors.

(42%)가, Nine Springs 하수처리장 여름시료에서는 *N. europaea* (58%)가, Nine Springs 겨울시료에서는 *N. europaea* (81%)가, Marshall 하수처리장 여름시료에서는 *N. oligotropha* (80%)가, Marshall 하수처리장 겨울시료에서는 *N. oligotropha* (83%)가 각각 가장 큰 비율을 차지하는 암모니아산화균 lineage이었다. 이러한 군집구조의 차이는 각각의 하수처리 생물반응기의 서로 다른 운영조건 및 환경조건이 영향을 미친 것으로 추정된다. 한편, Nine Springs와 Marshall 하수처리장 결과에서 볼 수 있듯이 같은 처리장이라도 계절별로 다소 다른 양상을 보였다. 예를 들면, Marshall 하수처리장 여름시료에서는 *Nitrosospira* lineage 속하는 암모니아산화균이 20%나 발견이 되었지만, 겨울시료에서는 전혀 발견되지 않았다. Nine Springs 하수처리장의 경우 여름시료에서는 *N. europaea* lineage 속하는 암모니아산화균이 58%였지만, 겨울시료에서는 그 비율이 81%로 증가하였다. 이는 암모니아산화균 군집이 고정되어있는 것이 아니라, 생물반응기 운영인자 및 환경조건에 영향을 받아 계속적으로 시간에 따라 변화한다는 간접적 증거이다.

암모니아산화균 군집구조와 운전인자 및 환경조건과의 연관관계

각 하수처리장의 암모니아산화균 군집구조와 생물반응기 운전인자 및 환경조건과의 연관관계는 다변수 통계분석법인 Redundancy Analysis 방법을 이용하여 평가하였다. 총 4개 처리장의 6개 시료를 대상으로 *amoA* clone을 *N. europaea*, *N. oligotropha*, *N. like*, *Nitrosospira* lineage의 4개 그룹으로 나누어 통계 분석을 실시하였다. *N. communis*, *N. marina*, *N. cryotolerans* lineage에 속하는 *amoA* clone은 본 연구에서 빈번히 발견되지 않아 통계분석에서 제외시켰다. 암모니아산화균 군집구조에 영향을 주는 매개변수로는 유입수의 유기물(COD_{in}), 총킬달질소(TKN_{in}), 암모니아성 질소(NH₃-N_{in}), 생물반응기의 온도(Temp), 수리학적 체류시간(HRT), 고형물체류시간(SRT), 미생물(MLSS), 유기물(COD), 암모니아성 질소(NH₃-N), 질산성 질소(NO₃-N) 등 총 11개 변수가 이용되었다. 이 중 통계적으로 유의한 변수

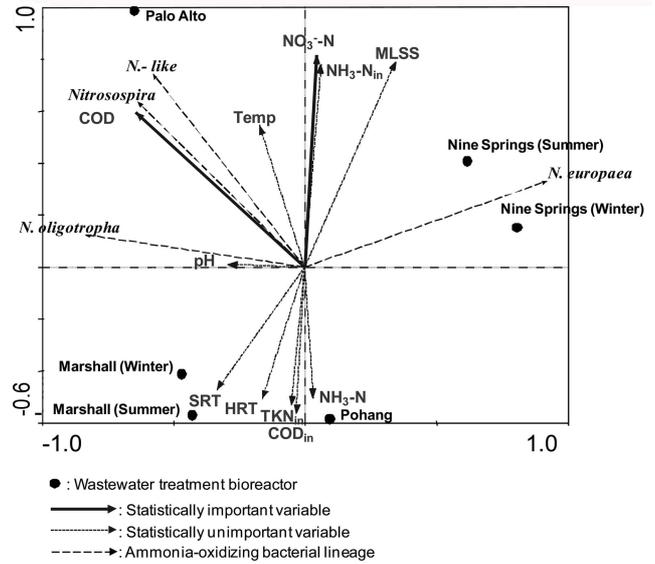


Fig. 4. RDA analysis of AOB lineages for the six different samples of activated sludge bioreactors and correlation with operational and environmental variables. The length of an arrow indicates the relative importance of the explanatory variables to the T-RF patterns, and the angle of an arrow indicates whether the explanatory variables increases or decreases in magnitude with respect to the indicated AOB lineage.

($P < 0.05$)는 생물반응기의 COD와 NO₃-N이었으며, 다른 변수들은 암모니아산화균 군집구조에 덜 영향을 미치는 것으로 나타났다($P > 0.05$). Fig. 4는 RDA 통계분석 결과를 나타내는데, 암모니아산화균 종류, 하수처리장, 운전인자 및 환경조건 등 세 가지 매개변수의 상관관계를 하나의 그래프에 표시하였다. 그래프에서 볼 수 있듯이, 생물반응기의 COD 농도는 *N. like*와 *Nitrosospira* lineage와 양의 상관관계(positive correlation)를 가지고 있었다. 한편, 생물반응기 NO₃-N 농도는 *N. oligotropha*, *N. like*, *Nitrosospira* lineage와 양의 상관관계(positive correlation)를 가지고 있었으나, *N. oligotropha*와 *N. europaea* lineage와는 상관관계가 떨어졌다.

고찰

배양에 의존하지 않는 분자생물학적 기법에 의하면 하수처리 생물반응기에서는 *N. oligotropha*, *N. europaea*, *N. communis*, *Nitrosospira* lineage에 속하는 암모니아산화균이 자주 발견되는 것으로 보고되었다(9, 15). 본 연구의 결과(Fig. 2 and 3)도 이전 보고들과 대체적으로 일치하지만 몇 가지 차이점이 존재하였다. 첫째, *N. communis* lineage에 속하는 암모니아산화균은 발견되지 않았다. 이 그룹에 속하는 최초의 암모니아산화균(*N. communis* Nm2 strain)은 Kooops 등(5)에 의해 분리동정 되었으며, 주로 토양에 서식하는 것으로 보고되고 있다. 하지만, *N. communis*의 어떤 생태학적 특성이 활성슬러지 서식에 적합한 지는 아직까지 자세히 규명되지 않았다. 둘째, Palo Alto, 포항, Marshall 하수처리

장에서는 *N.-like lineage*에 속하는 암모니아산화균이 발견되었다. 특히, Palo Alto 하수처리장의 경우 총 31개의 *amoA* clone 중에서 10개가(32%) *N.-like lineage*에 속하는 것으로 밝혀져, 이 그룹에 속하는 암모니아산화균이 Palo Alto 하수처리장에서 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, *N.-like lineage*는 생물반응기의 COD와 질산성 질소 농도와 양의 상관관계를 가지고 있음을 알 수 있다. Palo Alto 하수처리장의 경우 생물반응기의 COD와 NO₃-N 농도는 각각 55.8 mgN/L와 23.5 mgN/L로 다른 하수처리장에 비해 농도가 매우 높아 이 분석결과에 신뢰성을 지지하고 있다. 아직까지 *N.-like lineage*에 속하는 암모니아산화균이 분리동정되지 않아, 이 그룹에 속하는 암모니아산화균의 생리학적 특성은 규명되지 않았지만, 다른 암모니아산화균에 비해 COD와 질산성 질소에 의하여 성장에 덜 저해를 받거나 혹은 성장이 촉진되는 것으로 예상된다. Watson 등 (22)의 보고에 의하면 몇몇 암모니아산화균은 유기물의 존재여부에 따라 성장에 저해를 받거나 촉진이 유발된다고 한다. 예를 들면, *Nitrosococcus mobilis*는 유기물(COD) 농도에 매우 민감해 대부분의 유기물에 의해 nitrite 생성에 영향을 받는다고 하며, *Nitrospira tenuis*는 formate와 glucose가 존재하면 성장이 촉진된다고 한다.

흥미로운 발견은 암모니아산화균 군집구조가 생물반응기 질산성 질소의 농도에 영향을 받는다는 것이다. 질산성 질소는 암모니아산화균이 아니라 아질산산화균의 최종산물로 직접적으로 암모니아산화균에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 주목할 부분은, 비록 RDA분석결과 유입수의 암모니아성 질소가 암모니아산화균 군집구조에 영향을 주는 통계적으로 유의한 매개변수는 아니었지만, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 유입수의 암모니아성 질소와 생물반응기의 질산성 질소가 매우 높은 상관관계를 가지고 있다는 것이다(Pearson correlation coefficient=0.86). 또한, 암모니아성 질소가 암모니아산화균 군집구조에 영향을 미친다는 몇몇 연구결과로 볼 때(6, 9), 본 연구에서는 질산성 질소가 직접적으로 암모니아산화균 군집구조에 영향을 주었다기 보다는 유입수 암모니아성 질소가 하수처리 생물반응기의 암모니아산화균의 군집에 영향을 미친 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 실규모 하수처리 생물반응기의 질소제거 특성, 암모니아산화균 군집조성, 암모니아산화균 군집구조와 생물반응기 운전인자 및 환경조건과의 상관관계를 분석하였다. 조사된 하수처리 생물반응기는 체류시간, 온도, 무산소조 운영방식 등의 차이를 보였으며 질소제거 특성도 균일하지 않았다. 암모니아산화균 군집구조는 *N. europaea*, *N. oligotropha*, *N.-like*, *Nitrospira lineage*에 속하는 미생물이 주로 발견되었으며, 하수처리장에 따라 혹은 계절적인 특성에 따라 세부적인 암모니아산화균 군집구조는 차이를 보였다. 다변수 통계분석법인 RDA분석결과 이러한 암모니아산화균 군집조성과 생물반응기 운전인자 및 환경변수의 차이는 서로 상관관계를 나타내었다. 모든 결과를 종합

해 볼 때, 하수처리 생물반응기의 운전인자 및 환경조건이 암모니아산화균 군집구조에 영향을 주며, 이는 생물반응기의 질소제거 특성과 연관이 있다는 결론을 얻었다.

감사의 말

본 연구에 사용된 하수처리 생물반응기 운영자료를 제공한 포항하수처리장, Palo Alto 하수처리장, Nine Springs 하수처리장, 그리고 Marshall 하수처리장 운영 관계자 여러분께 감사를 드립니다. 본 연구는 고려대학교 특별연구비에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. 이정수. 2005. 하·폐수처리: 최신 이론 및 응용. 서울, 도서출판 동화기술.
2. APHA, AWWA, and WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed. APHA, AWWA, WPCF. Washington, D.C., USA.
3. Dionisi, H.M., A.C. Layton, G. Harms, I.R. Gregory, K.G. Robinson, and G.S. Saylor. 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 245-253.
4. Hiorns, W.D., R.C. Hastings, I.M. Head, A.J. McCarthy, J.R. Saunders, R.W. Pickup, and G.H. Hall. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrospiras in the environment. *Microbiology* 141, 2793-2800.
5. Koops, H.P., B. Bötcher, U.C. Möller, A. Pommerening-Röser, and G. Stehr. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas urea* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1689-1699.
6. Koops, H.P. and A. Pommerening-Röser. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 1-9.
7. Kowalchuk, G.A. and J.R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55, 485-529.
8. Limpiyakorn, T., F. Kurisu, and O. Yagi. 2006. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria populations in full-scale sewage activated sludge systems and assessment of system variables affecting their performance. *Wat. Sci. Technol.* 54, 91-99.
9. Limpiyakorn, T., Y. Shinohara, F. Kurisu, and O. Yagi. 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 205-217.
10. McCune, B. and J.B. Grace. 2002. Analysis of ecological communities. Gleneden Beach, OR, MJM Software Design.
11. Metcalf and Eddy. 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse. 4th ed. New York, NY, McGraw-Hill.
12. Park, H.D., S.Y. Lee, and S. Hwang. 2008. Redundancy analysis demonstrated the relevance of temperature to ammonia-oxidizing bacterial community compositions in a full-scale nitrifying biore-

- actor treating saline wastewater *J. Microbiol. Biotechnol.* in print.
13. Park, H.-D., J.M. Regan, and D.R. Noguera. 2002. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic Orbal processes. *Wat. Sci. Technol.* 46, 273-280.
 14. Park, H.D., L.M. Whang, S.R. Reusser, and D.R. Noguera. 2006. Taking advantage of aerated-anoxic operation in a full-scale University of Cape Town (UCT) process. *Wat. Environ. Res.* 78, 637-642.
 15. Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.-P. Koops, and M. Wagner. 2000. 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, 5368-5382.
 16. Rothauwe, J.H., K.P. Witzel, and W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4704-4712.
 17. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 18. ter Braak, C.J.F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 67, 1167-1179.
 19. Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
 20. US-EPA. 1993. Manual: Nitrogen control. Cincinnati, OH, US-EPA.
 21. Wagner, M., D.R. Noguera, S. Juretschko, G. Rath, H.P. Koops, and K.H. Schleifer. 1998. Combining fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* 37, 441-449.
 22. Watson, S.W., E. Bock, H. Harms, H.-P. Koops, and A.B. Hooper. 1989. *Nitrifying bacteria*, pp. 1808-1834. In J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, and J.G. Holtz (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.

(Received March 31, 2009/Accepted April 21, 2009)

ABSTRACT: Characterization and Composition of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community in Full-Scale Wastewater Treatment Bioreactors

Hee-Deung Park (School of Civil, Environmental and Architectural Engineering, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea)

Ammonia-oxidizing bacteria (AOB) are chemolithoautotrophs that play a key role in nitrogen removal from advanced wastewater treatment processes. Various AOB species inhabit and their community compositions vary over time in the wastewater treatment bioreactors. In this study, a hypothesis that operational and environmental conditions affect both the community compositions and the diversity of AOB in the bioreactors was proposed. To verify the hypothesis, the clone libraries based on ammonia monooxygenase subunit A were constructed using activated sludge samples from aerobic bioreactors at the Pohang, the Palo Alto, the Nine Springs, and the Marshall wastewater treatment plants (WWTPs). In those bioreactors, AOB within the *Nitrosomonas europaea*, *N. oligotropha*, *N.-like*, and *Nitrosospira* lineages were commonly found, while AOB within the *N. communis*, *N. marina*, and *N. cryotolerans* lineages were rarely detected in the samples. The AOB community structures were different in the bioreactors: AOB within the *N. oligotropha* lineage were the major microorganisms in the Pohang, the Palo Alto, and the Marshall WWTPs, while AOB within the *N. europaea* lineage were dominant in the Nine Springs WWTP. The correlations between the AOB community compositions of the wastewater treatment bioreactors and their operational (HRT, SRT, and MLSS) and environmental conditions (temperature, pH, COD, NH₃, and NO₃⁻) were evaluated using a multivariate statistical analysis called the Redundancy Analysis (RDA). As a result, COD and NO₃⁻ concentrations in the bioreactors were the statistically significant variables influencing the AOB community structures in the wastewater treatment bioreactors.