

## 낙동강에서의 유기성 오염 유무에 따른 질화세균의 변화

진선영 · 이영옥\*

대구대학교 자연과학대학 생명과학과

### Changes of Nitrifying Bacteria Depending on the Presence and Absence of Organic Pollutant in Nak-Dong River

Seon-Yeong Jin and Young-Ok Lee\*

Department of Biological Science, Daegu University, Kyung-San 712-714, Republic of Korea

(Received April 19, 2013 / Accepted May 14, 2013)

This study was performed at 2 sites of Nak-Dong River to investigate the changes of nitrifiers depending on the presence and absence of organic pollutants (due to the effluents of domestic wastewater treatment plant, WWTP). Conventional chemical parameters such as T-N, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N were measured and the quantitative nitrifiers at the 2 sites were analyzed comparatively by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with NSO190 and NIT3, after checking the presence of gene *amoA* of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and 16S rDNA signature sequence for *Nitrobacter* sp. that belongs to nitrite oxidizing bacteria (NOB). Also  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -*Proteobacteria* were detected using FISH to get a glimpse of the general bacterial community structure of the sites. Based on the distribution structure of the  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -*Proteobacteria* and the measurement of nitrogen in different phases, it could be said that the site 2 was more polluted with organics than site 1.

Corresponding to the above conclusion, the average numbers of AOB and NOB detected by NSO160 and NIT3, respectively, at site 2 [AOB,  $9.3 \times 10^5$ ; NOB,  $1.6 \times 10^6$  (cells/ml)] was more than those at site 1 [AOB,  $7.8 \times 10^5$ ; NOB,  $0.8 \times 10^6$  (cells/ml)] and also their ratios to total counts were higher at site 2 (AOB, 27%; NOB, 34%) than those at site 1 (AOB, 18%; NOB, 23%). Thus, it could be concluded that the nitrification at site 2 was more active due to continuous loading of organics from the effluents of domestic WWTP, compared to site 1 located closed to raw drinking water supply and subsequently less polluted with organics.

**Keywords:** FISH, nitrifier, organic pollutant, PCR-DGGE

세균 군집은 해당 생태계에 존재하는 유·무기물을 다양한 방법 및 형태로 전환시키거나 동화하여(assimilated) 상위 영양단계 생물의 생존을 가능하게 하는 물질 순환의 매개자(microbial loop)이다. 수계로 유입된 질소 화합물 역시 세균에 의해 암모니아로 분해된 후, 질화세균(nitrifying bacteria)에 의해 질산염으로 변화된다. 이 질화작용(nitrification)은 2단계에 걸쳐 일어나는데 우선 *Nitrosomonas* sp. 등 암모니아 산화세균(ammonia oxidizing bacteria, AOB)에 의해 암모니아(NH<sub>3</sub>)가 아질산(NO<sub>2</sub>)으로 산화된 후, *Nitrobacter* sp. 등, 아질산 산화세균(nitrite oxidizing bacteria, NOB)에 의해 질산으로 산화된다(Wagner *et al.*, 1996; Kowalchuk *et al.*, 1999). 그런데 질소순환의 주역을 담당하는 이 질화세균은 느리게 성장해 20일 이상 배양해야 하므로 시간 소모가 많을 뿐 아니라(Belser, 1979) 배양법에 근거한 연구결과 또한 수계의 실제적인 질화세균 군집구조를 반영하

지 못한다는 문제점이 있었다(Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1996; Purkhold *et al.*, 2000; Hornek *et al.*, 2005). 최근에는 다른 세균군들과 마찬가지로 질화세균에 대한 연구도 fluorescent *in situ* hybridization (FISH)과 polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) 등, 질화세균이 가진 유전정보에 근거한 분자생물학적 연구기법을 사용해 담수(Glöckner *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 1999; Cebren and Garnier, 2005; Hornek *et al.*, 2005), 해양(Glöckner *et al.*, 1999; McCaig *et al.*, 1999), 토양(Degrange and Bardin, 1995; Stephen *et al.*, 1999) 등의 자연생태계 뿐 아니라 인공적인 생태계인 하수처리시설의 슬러지(Liu and Capdeville, 1994; Wagner *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1998; Purkhold *et al.*, 2000; Regan *et al.*, 2003; Hornek *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006)에서 기존의 질화세균과 다른 질화세균들의 존재를 확인하거나, 그 기능에 관한 새로운 사실들이 차츰 밝혀지고 있다(Amann *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2012).

\*For correspondence. E-mail: ecolomi@daegu.ac.kr; Tel.: +82-53-850-6456; Fax: +82-53-850-6459

**Table 1.** Monthly average of effluent from Dalsuh-Cheon domestic wastewater treatment plant in 2010. Korean standard limit of treated sewage effluent is represented in parenthesis.

mg/L	BOD	COD	SS	T-N	T-P
Feb	4.1(≤10)	13.2(≤40)	2.8(≤10)	10.66(≤20)	1.06(≤2)
Apr	4.0(≤10)	14.8(≤40)	3.2(≤10)	12.20(≤20)	1.00(≤2)
Jun	2.4(≤10)	17.6(≤40)	2.2(≤10)	12.38(≤20)	1.11(≤2)

(Daegu Metropolitan City Facilities Management Corporation)

또한 그간에는 질화 작용이 호기 환경에서만 일어난다고 인지되어왔으나 최근에는 그 일부인 암모니아의 산화가 혐기적 혹은 무산소(anoxic) 환경에서도 가능함이 입증되었다(Schmidt *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2009). 즉, Planctomycetes 계열에 속하는 *Brocardia anammoxidans* 등 세균의 ‘anammoxosome’이라는 지질막 구조물에 암모니아와 아질산이 공존할 경우, 암모니아가 히드록실아민, 히드라진 등의 중간대사 산물을 거쳐 질소가스( $N_2$ )로 산화된다. 이와 같은 혐기적 환경에서 암모니아가 산화되는 ‘anammox (anoxic ammonia oxidation) 반응’은 담수 및 해양 퇴적층 혹은 하수 슬러지 등 암모니아와 질산염이 공존하는 모든 혐기적 환경에서 일어나 상당량의 질소가 제거(혹은 손실)될 것으로 추정된다(Schmidt *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2009).

더 나아가 최근에는 Crenarchaeota (문, phylum)에 속하는 고세균 중에서도 암모니아를 산화하는 세균(AOA, ammonia-oxidizing archaea)이 발견되었다. AOA가 토양, 해양 등 자연 생태계와 하수 슬러지에 다수로 존재하는 것은 분자기법의 연구로 밝혀졌지만 (Park *et al.*, 2006), 아직 그들의 대사경로 및 생태적 기능에 대한 이해는 부족한 실정이다(You *et al.*, 2009). 그러나 이들 또한 생태계의 질소순환에 기여하는 바가 클 것으로 추정되고 있다(You *et al.*, 2009). 아울러 예전에는 화학독립영양세균(chemoautotrophs)만이 질화작용을 수행한다고 알려졌으나 근래에는 탈질세균으로 알려져 있는 *Pseudomonas* sp., *P. faecalis*, *Alcaligenes faecalis* 등의 종속영양세균도 이화적 질화작용(heterotrophic nitrification)을 한다고 보고되고 있다(Anderson *et al.*, 1993; Liu and Capdeville, 1994). 즉 분자기법이 생태계 연구에 도입됨에 따라 예전에는 몰랐던 질소 순환에 관여하는 세균의 종류 및 기작(mechanism)에 대해 이해하기 시작했다. 또한 기존의 배양기법으로는 자연계에 존재하는 세균 중, 극히 일부만을 파악할 수 있는 것으로 추정됨에 따라(Amann *et al.*, 1995) 현재는 세균이 가진 유전정보를 다양한 분자 기법으로 분석해 해당세균의 실체를 규명하는데 이 과정에서 도출된 연구결과들이 서로 상치하는 경우도 있다(Stephen *et al.*, 1999; Hornek *et al.*, 2006). 일례로 Stephan 등(1999)은 암모니아 산화 효소인 ammonia monooxygenase를 암호화하는 *amoA* 유전자 유무로 토양에 서식하는 암모니아 산화 세균의 종류를 조사했는데 해당 토양에는 토양에 주로 서식하는 것으로 알려진 *Nitrosomonas* sp.균은 없고 *Nitrospira* sp.만이 존재한다는 결과를 도출하였다. 그러나 Hornek 등(2006)은 *amoA* 유전자의 증폭에 Stephen 등(1999)이 사용한 동일 primer의 염기서열을 약간 변형해 사용함으로써 다양한 *Nitrosomonas* sp.도 담수 및 슬러지에서 검출할 수 있었다고 보고하였다. 이는 현재 생태연구 도입단계에 있는 분자기법

이 사용 조건에 따라 상이한 결과를 도출할 수도 있으므로 앞으로는 생태연구에 도입되는 다양한 분자기법 자체에 관한 비교 연구들도 수행해 연구 방법을 표준화해야 할 필요성이 있음을 시사하고 있다.

따라서 본 연구에서는 대표적인 질화세균으로 알려진 *Nitrosomonas* sp.과 *Nitrobacter* sp.의 존재유무를 PCR-DGGE법으로 검증한 후, 유기성 오염 정도가 다른 2개의 낙동강 수역에서 이들 질화세균수의 차이를 FISH법으로 비교하고자 하였다. 이를 위해 부가적으로 총 질소(T-N), 암모니아성 질소( $NH_4$ -N), 아질산성 질소( $NO_2$ -N), 질산성 질소( $NO_3$ -N)의 이화학적 환경요인을 측정하였고 해당 수역의 전반적인 세균학적인 수질을 점검하기 위해 수계에 주로 분포하는  $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ -Proteobacteria 세균군 크기도 조사하였다.

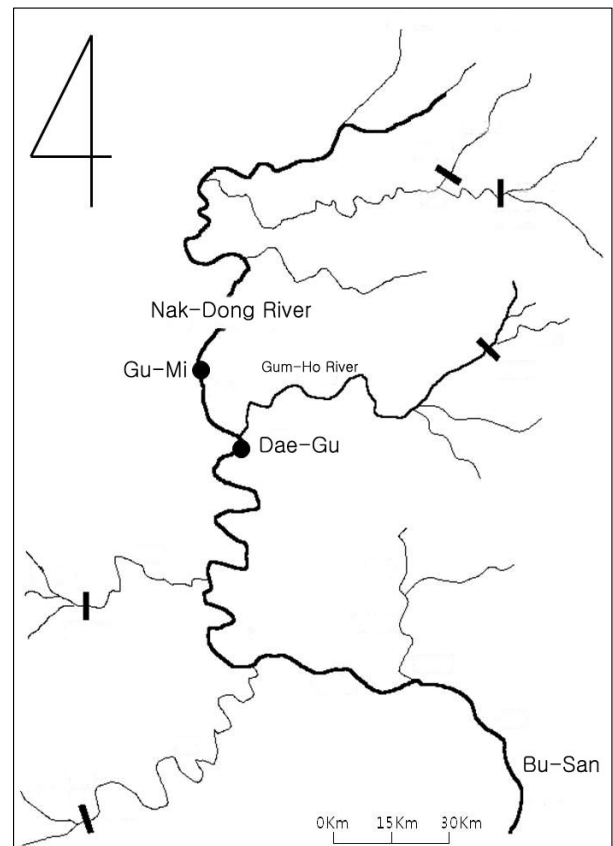
**Fig. 1.** Sampling sites. Site 1, Gu-Mi, is located near raw drinking water supply and site 2, Dae-Gu, is the water zone loaded by organics from the effluents of domestic WWTP in Nak-Dong River.

Table 2. Primers used in this study

Target organism	Primer	Sequence (5'→3')	References
AOB	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAFCTTCTTC	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Stephen <i>et al.</i> (1996)
	amoA1F-GC	CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGG GGGGGGGGITTYTACTGGTGGT	Stephen <i>et al.</i> (1996)
<i>Nitrobacter</i> specific	FGPS1269	TTTTTTGAGATTTGCTAG	Degrange and Bardin (1995)
<i>Nitrobacter</i> non-specific	FGPS872	CTAAAACTCAAAGGAATTGA	

## 재료 및 방법

### 조사지역

채수는 2010년 2월부터 2010년 6월까지 2개월 마다 총 3회, 월초 동일한 시간대에 실시하였다. 조사 대상 지역인 정점 1 (구미, 송선대교)은 상수원수를 취수하는 해평취수장에서 5 km 이내에 위치하므로 비교적 유기물 오염 가능성이 적은 수역이며 정점 2 (대구, 사문진교)는 생활하수를 처리하는 달서사업소(40만 톤/일, Table 1)의 방류수가 유입되는 진천천, 대구광역시를 관통한 금호강, 낙동강이 합류한 직후 지점으로 유기성 오염이 상존하는 수역이다.

### 이화학적 환경요인 분석

수온은 시료 채취 시 현장에서 바로 측정하였으며, pH는 시료 채취 후 실험실로 냉장 운반하여 pH meter (Orion Research Inc.)로 측정하였다. 또한 오염원의 유입 유·무에 따른 수계의 질소농도 변화를 알아보기 위해 총 질소(T-N), 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub>-N), 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N)의 농도를 수질오염 공정시험 방법(Minister of Environment, 2009)에 준해 UV-VIS spectrophotometer Optizen Series (Mecasys Inc.)로 측정하였다.

### 질화세균 등 세균 군집구조 분석

유기성 오염(생활하수 처리시설 방류수) 여부에 따른 질화세균의 동태를 조사하기 위해 2단계로 진행되는 질화작용에 관여하는 암모니아 산화 세균 및 아질산 산화 세균을 정성·정량적으로 분석하였다. 아울러 오염도가 상이한 두 수역의 전반적인 세균상을 비교하기 위해 수계 세균군집에서 큰 비중을 차지하는  $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ -*Proteobacteria* 세균군집의 조성도 조사하였다.

**질화세균의 종류 확인을 위한 PCR-DGGE법:** 암모니아를 아질산으로 산화시키는 암모니아 산화세균에 존재하는 효소, ammonia monooxygenase를 암호화하는 유전자 일부인 *amoA* (Rotthauwe *et al.*, 1997; Hornek *et al.*, 2006), 아질산 산화세균에 존재 유무를 확인하기 위해 각 시료에서 추출한 DNA에서 16S rRNA 중 특정 기호서열 부위(Degrange and Bardin, 1995)를 증폭시켜 PCR-DGGE를 실행하였고(Table 2) 생성된 밴드의 염기서열을 분석한 후, 그 결과를 NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 사용해 동정하였으며, MEGA4 program을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

**DNA 추출:** 정점 별로 채수한 시료 1,000 ml을 filter 여과법으로 농축시킨 후, Qiagen DNeasy kit를 이용하여 DNA를 추출하였다. 세균 외의 조류 등 이물질을 제거하기 위해 Whatman No 4 filter-paper로 우선 여과한 시료를 ISOPORE™ MEMBRANE FILTERS (0.2  $\mu$ m)로 여과시켜 여과지에 남은 부유물에서 DNA를 추출하였다.

**Polymerase chain reaction (PCR):** 암모니아 산화 세균에 있는 ammonia monooxygenase A (*amoA*) 유전자에 대응하는 primer인 *amoA1F*와 *amoA2R* primer (Table 2)를 이용해 추출된 DNA를 증폭하였다. 이때 사용한 forward·reverse primer의 농도는 제조사 추천대로 각각 10 pmole이었으며, PCR mixture는 Taq 1.25 U/25  $\mu$ l, dNTP Mixture 0.4 mM, PCR buffer-20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>의 premix Taq™ (TaKaRa)이다. 그리고 증폭에 적용한 PCR 조건은 95°C, 2분간 pre-denaturation을 실행한 후, 35회 걸쳐 denaturation (94°C, 30초), annealing (53°C, 1분), elongation (72°C, 1분) 순서로 하고 종결단계인 elongation을 72°C에서 8분간 하였다.

아울러 두 번에 걸쳐 추출한 DNA로 PCR을 수행하였는데 1차 PCR에서는 GC-clamp가 없는 forward primer를 사용하였으나, DGGE를 수행하기 위한 2차 PCR에서는 5'에 GC-clamp가 포함된 forward primer를 이용하였다.

**Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE):** 2차 PCR product로 DGGE를 수행하였는데 수행 조건은 1X TAE buffer가 포함된 6% polyacrylamide gel [20 mM Tris acetate; pH 7.4, 10 mM sodium acetate, 0.5 mM sodium ethylene-diamine-tetraacetate (Na<sub>2</sub>-EDTA), 6% acrylamide stock solution (acrylamide; N,N'-methylene-bisacrylamide, 37.5:1, w/v)에 urea와 formamide (40-60%)의 변성제를 포함시켰다. 이렇게 제조된 gel의 running buffer로는 1X TAE buffer를 사용하였고 DCode System™ (Bio-Rad, USA)으로 DGGE법을 수행했으며, 이때 running buffer의 온도는 60°C로 유지되었고 60 V에서 600분간 running하였다. 이후 생성된 gel의 band를 직접 elution하여 염기서열 분석을 의뢰하였고 그 결과를 토대로 NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 사용해 동정하였으며, MEGA4 program으로 phylogenetic tree를 작성하였다.

**FISH법으로 세균군집의 정량분석:** 암모니아 산화 세균인 *Nitrosomonas* sp.와 아질산 산화 세균인 *Nitrobacter* sp. 그리고  $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ -*Proteobacteria* 세균군의 크기를 정량화하기 위해

**Table 3.** Oligonucleotide probes used for Proteobacteria and nitrifying bacteria by FISH

Gene probe	Probe sequence (5'→3')	Target site <sup>a</sup>	Target organisms	References
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	19-35	<i>α-Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> (1992)
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	1027-1043	<i>β-Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> (1992)
non-GAM42a	used as competitor together with BET42a			(1992)
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	1027-1043	<i>γ-Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> (1992)
non-BET42a	used as competitor together with GAM42a			(1992)
NSO190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	190-208	Ammonia-oxidizing bacteria	Wagner <i>et al.</i> (1996)
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	1030-1047	Nitrite-oxidizing bacteria	Schramm <i>et al.</i> (1998)
CNIT3	used as competitor together with NIT3			(1998)

<sup>a</sup> 16S rRNA position according to *E. coli* numbering

FISH법을 아래와 같이 행하였다.

**시료 고정:** 각 정점에서 채취한 시료를 즉시 4% paraformaldehyde 용액(시료:고정액 = 3:1)으로 4°C에서 24시간 이상 고정시킨 후, 고정된 시료, 1-5 ml를 polycarbonate membrane filter (pore size 0.2 μm, diameter 25 mm)로 여과하였다. 고정된 시료에서 고정액을 씻어내기 위하여 1X phosphate buffer saline (PBS)으로 2회 이상 세척한 다음 50, 70, 90% 에탄올로 각각 3분간 탈수 시켰다.

**Gene probe:** 본 연구에 적용한 gene probe의 염기서열(Table 3)은 주문 제작(TaKaRa, Japan)하여 사용하였으며 probe에 붙인 형광물질은 CY3 (indocarbocyanine dye)이다.

**In situ hybridization:** 전처리 과정을 거친 filter를 gelatin coated slide glass에 올려놓고 예열해둔 hybridization solution [0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7.4, 0.01% SDS, formamide (농도 ALF 20%; BET·GAM 35%; NIT3 40%; NSO190 55%) 16 μl와 gene probe 3 μl를 첨가하여, 46°C hybridization chamber에서 90분 동안 배양하였다. *β-γ-Proteobacteria* 및 NIT3-group 세균 검출 시에는 mismatching을 방지하기 위해 각각 동일한 양의 non-GAM42a, non-BET42a, CNIT3 probe를 첨가한 후 혼성화하였다(Wagner *et al.*, 1996). 배양 후, 배양온도보다 2°C 높은 온도에서 미리 예열시킨 hybridization washing solution [20 mM Tris-HCl; pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.01% SDS, NaCl (농도 ALF 0.225 M; BET·GAM 80 mM; NSO190·NIT3 0.056 mM)으로 filter를 15분간 세척하였다. 세척 후, 총세균수(total counts) 측정을 위한 DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole; Sigma, 0.33 μg/ml)염색을 20분간 실행(Hicks *et al.*, 1992)하였고 DAPI 염색 후, 형광현미경(Axioplan 2, Zeiss, Germany)으로 관찰하였는데 총세균수는 UV filter (G365, LP395, FT420), 그 외의 세균 그룹들은 green filter (BP546/12, LP580, FT590)를 사용해 계수하였다. 또한 이 모든 과정은 암실에서 행해졌다.

**질화세균 및 Proteobacteria ( $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ )의 총세균수에 대한 비율 산출:** 각 세균군에서 도출된 결과치의 유의성(significance)을 위해 시료 당, 최소한 10개 이상의 임의적인 fields안에 존재하는 해당 세균을 계수하여 얻어진 평균 세균수를 결과치로 간주하였다. 또한 해당 세균군이 총세균수에서 차지하는 비율(%) 역시 동일한 방법으로 산출하였다(Glückner *et al.*, 1999).

## 결과 및 고찰

### 이화학적 분석

수온, pH, 질소순환과 관련이 있는 총질소(T-N), NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N의 측정결과가 Table 4에 제시되어 있다. 수온 측정 결과를 보면 생활하수처리시설의 방류수가 유입되는 정점 2의 수온이 정점 1보다 1°C 높았을 뿐 별차이가 없었고, 2개월마다 약 10°C 상승하는 양상을 보였는데 이는 기온 상승 때문으로 사료된다. 질화세균 생장의 적정 온도 범위는 8-35°C라고 보고되었는데(Liu and Capdeville, 1994) 정점들의 수온이 2월(정점 1, 4°C; 정점 2, 5°C)을 제외하고는 14-25°C에서 변화하므로 수온이 질화세균 성장에 큰 장애를 되지 않았을 것이다. pH 또한 변화 없이 7을 유지하였으므로 질화세균 생장 최적 pH인 7.2-7.8 (Belsler, 1979)에 근접했다고 할 수 있다.

**조사수역의 질소 양태:** 유기성 질소, 무기성 질소인 NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N 을 포괄하는 총 질소(T-N)는 두 정점 모두에서 증가하는 양상을 나타냈으며 방류수가 유입되는 수역인 정점 2의 측정치가 정점 1의 그것에 비해 약 2배 높았고 특히 6월에는 정점간의 격차가 더 컸다(정점 1, 2.91 mg/L; 정점 2, 8.27 mg/L). 이와 같은 수온 증가에 따른 총질소의 증가는 조류(algae) 생장이 왕성해지면서 조류 배설물(exudates) 및 조류 사멸에 따른 유기성 질소 증가와도 관련이 있을 것으로 사료된다.

NH<sub>4</sub>-N는 정점 1 (0.14-0.17 mg/L) 보다 생활하수 처리시설의 방류수가 유입되는 수역인 정점 2 (0.23-0.26 mg/L)에서 약 2배 높게 측정되었는데 이는 정점 2의 인근수역으로 유입되는 방류수에 포함된 질소원의 주된 형태가 암모니아성 질소이기 때문일 것이다.

아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)는 보통 불안정하여 암모니아성 질소나 질산성 질소로 변환되는 것으로 알려져 있는데(Winkler *et al.*, 2012), 본 조사수역에서도 미량으로 존재하였다. 정점 1에서는 0.01-0.02 mg/L, 정점 2에서는 0.02-0.04 mg/L의 농도로 두 정점간의 차이는 크지 않았다

반면에 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N)의 경우, 정점 간의 농도차이가 컸다(정점 1, 평균 0.51 mg/L; 정점 2, 평균 2.31 mg/L). 특히, 6월에 정점 2 (4.77 mg/L)에서 정점 1 (0.81 mg/L)보다 5배 이상의 높은 측정치를 나타냈다.

질화작용에 관여하는 질화세균의 개체수, 활성도 등은 NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N 등의 농도 영향을 받지만 수온의 영향도 크다고 하였다(Liu and Capdeville, 1994). 질화세균의 최적 성장 온도는 30℃, 최저 8℃에서 최고 35℃에서 생장을 하며 10-30℃에서는 비교적 온도 변화에 덜 민감하다고 한다(Liu and Capdeville, 1994). 본 연구에서는 2월(정점 1, 4℃; 정점 2, 5℃)보다 4월(정점 1, 14℃; 정점 2, 15℃)과 6월(정점 1, 23℃; 정점 2, 24℃)에 수온이 상승함에 따라 질화세균의 활성도가 증가하였고 그에 따라 질산성 질소의 농도가 증가한 것으로 보인다. 낙동강 상·중·하류 전 수역의 여러 정점에서의 질산성 질소의 농도를 측정할 결과에서도 하수 처리시설의 방류수가 유입되는 지점에서 질산성 질소의 농도가 높았던 것처럼(Lee, 2008) 본 연구에서도 상수원수 취수장 인근 수역인 정점 1보다 유기성 오염원을 함유한 생활하수 처리시설의 방류수가 유입되는 정점 2에서의 질산성 질소의 농도가 높게 나타났다.

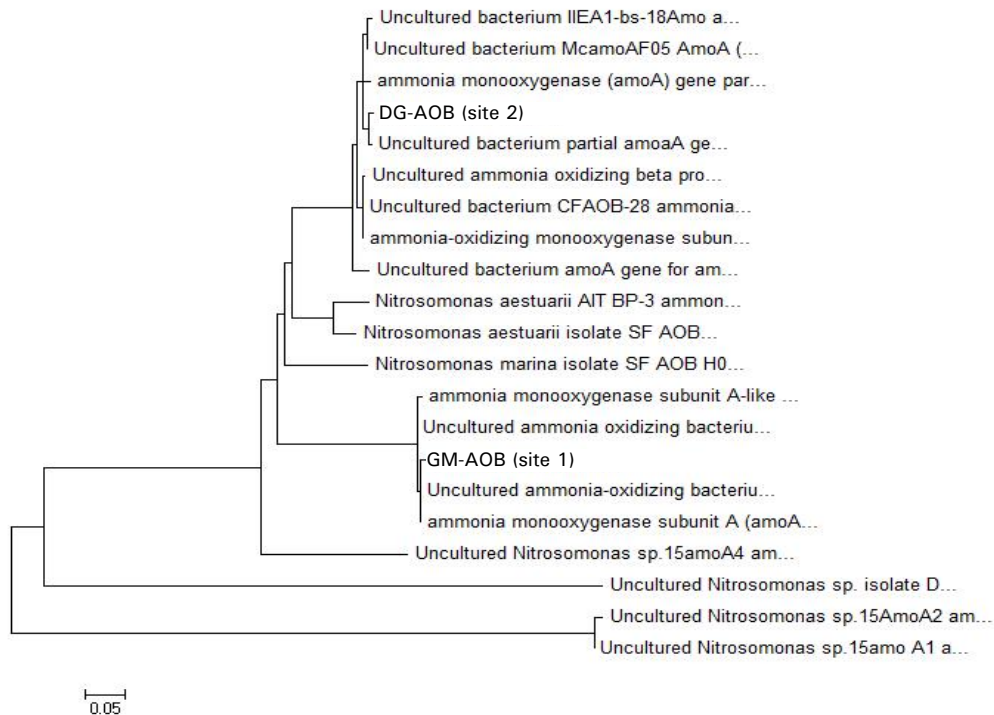
**조사 수역에 존재하는 질화세균의 종류 확인**

두 조사 정점에 존재하는 암모니아 산화세균의 종류를 확인하기 위해서 채수한 시료에서 추출한 DNA에 primer를 붙여 PCR-DGGE를 수행한 결과, 두 정점 모두에서 암모니아 산화세균에 존재하는 ammonia-monooxygenase에 대응하는 유전자 *amoA*를 함유한 암모니아 산화세균 균주들을 얻을 수 있었다. 균주들의 염기서열을 NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 이용해 동정(identification)한 결과, 두 정점의 균주 모두에서 *Nitrosomonas* sp.와 96%의 낮은 유사도(similarity)를 나타냈고

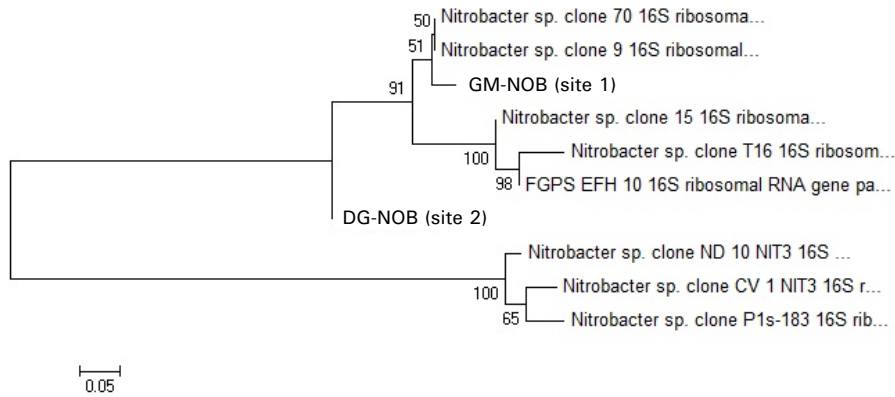
정점 2에서는 추가로 uncultured bacterium *amoA* gene과 98%의 유사도를 가진 균주들도 검출되었다. 현재 통용되는 세균 종(species)과 속(genus)의 정의가 16S rRNA 유전자 염기서열의 상동성을 기준해 상동성이 97% 이상이면 종으로 간주되고 95% 이상이면 속으로 간주되는 것을 상기하면(Rossello-Mora and Amann, 2001) 본 조사수역에서 검출한 균주들은 *Nitrosomonas* sp. 일 가능성이 크지만 단정하기는 어렵다고 판단된다(Fig. 2). 아질산 산화세균의 경우에는 *Nitrobacter* sp.의 16S rRNA 특정 기호서열 부위를 PCR-DGGE로 확인한 결과, 각 밴드의 염기서열이 *Nitrobacter* sp.와 각각 98%(정점 1), 99%(정점 2)의 유사도를 나타냈다(Fig. 3). 따라서 조사 수역에 *Nitrosomonas* sp.과 *Nitrobacter* sp.가 존재한다고 판단하고 FISH법 수행 시, 해당 세균 검출에 적절한 탐침자(gene probe)로 NSO190 (*Nitrosomonas* sp.), NIT3 (*Nitrobacter* sp.)를 사용하였다(Wagner et al., 1996; Schramm et al., 1998).

**두 수역의 전반적인 세균 군집( $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ -Proteobacteria) 구조의 차이**

두 수역의 전반적인 세균군집의 차이를 비교하기 위해 FISH법으로  $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ -Proteobacteria 세균의 크기를 총세균수(total counts)에서 차지하는 비율(%)로 나타냈다(Fig. 4). 이를 위해 총세균수도 계수하였는데 두 정점에서의 총세균수는 좁은 범위(2.1-4.5×10<sup>6</sup> cells/ml)에서 변화하였으며 정점간의 차이(정점 1, 2.1-3.9×10<sup>6</sup> cells/ml; 정점 2, 3.1-4.5×10<sup>6</sup> cells/ml)도 크지 않았다(자료 미제시).



**Fig. 2.** Phylogenetic tree of the ammonia oxidizing bacteria strain, GM-AOB, DG-AOB based on *amoA* gene obtained from the samples of 2 sites in Nak-Dong River. The scale bar represents a 0.05 substitution per nucleotide position.



**Fig. 3.** Phylogenetic tree of *Nitrobacter* sp. strain, GM-NOB, DG-NOB based on 16S rRNA gene (FGPS1269) obtained from the samples of 2 sites in Nak-Dong River. Numbers at nodes are the percentages of bootstrap replicates in which the cluster was found. The scale bar represents a 0.05 substitution per nucleotide position.

두 수역에서의  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -*Proteobacteria* 세균군들의 조성을 보면,  $\alpha$ -*Proteobacteria* 세균의 경우, 유기오염부하가 적은 정점 1 (평균 46±9.92%)에서 오염원이 유입되는 지점인 정점 2 (평균 28±8.1%) 보다 많이 검출되었는데 이 세균군은 저농도의 유기물 이용능력이 좋아 소양호에서도 용존성 유기물(DOC, 1.5 mg/L)과 엽록소-a (2.0 mg/L)가 낮을 때,  $\alpha$ -*Proteobacteria*가 우점했다고 하였다(Kim *et al.*, 1999).

$\alpha$ -*Proteobacteria*과 마찬가지로 비교적 빈영양 상태의 수계에서 많이 검출된다고(Glöckner *et al.*, 1999) 보고된  $\beta$ -*Proteobacteria* 세균군이 정점 2 (2월, 10±2.86%; 4월, 7±1.46%; 6월, 16±5.08%; 평균, 11±3.13%)보다 정점 1 (2월, 23±5.03%; 4월, 21±5.24%; 6월, 39±5.94%; 평균, 27±5.4%)에서 높은 검출비율을 나타냈다.  $\beta$ -*Proteobacteria*는 *Nitrosomonas* sp., *Thiobacillus* sp. 등 화학독립영양세균(chemoautotrophs)을 포함하며(Pernthaler *et al.*, 1998), 빈영양호(Alfreider *et al.*, 1996), 바이칼 호수의 심수층(Hick *et al.*, 1992) 등 분해가 용이한 유기물이 거의 없는 곳에서 상당 수 존재하는 것으로 보고되고 있다. 또한 저수지에서 남세균, *Microcystis aeruginosa*에 의한 녹조(algal bloom)가 발생한

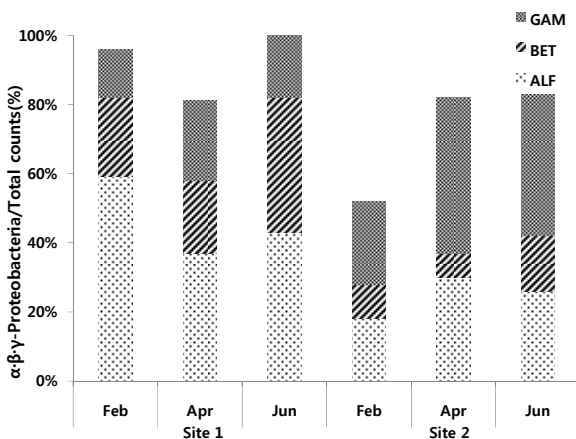
시기에 총세균수 대비  $\beta$ -*Proteobacteria* 검출비율(1.7-2.8%)이 특히 낮다고 보고되었다(Lee *et al.*, 2002). 이와 같은 타 연구 결과로 미루어볼 때 정점 1에서  $\beta$ -*Proteobacteria* 세균군이 많이 검출된 이유는 정점 2에 비해 분해가 용이한 유기물질이 적고 분해가 어려운 고분자물질이 많기 때문일 것으로 사료된다.

반면에 분해가 용이한 유기물질을 이용해 빠른 성장을 하는 copiotrophs의 대부분을 포괄한다고 보고된  $\gamma$ -*Proteobacteria* 세균군(Manz *et al.*, 1993)은 오염부하가 적은 정점 1 (2월, 14±5.21%; 4월, 23±6.08%; 6월, 30±3.68%; 평균, 22±4.99%)보다 정점 2 (2월, 24±4.29%; 4월, 45±4.84%; 6월, 41±11.75%; 평균, 36±6.96%)에서 더 높은 검출비율을 나타냈다. 이는 정점 2에는 지속적인 유기성 오염원이 상존하기 때문으로 생각된다(Table 1; 생활하수 처리수의 수질 자료 참조).

결론적으로 정점 1에서는  $\alpha$ - $\beta$ -*Proteobacteria* 세균군이 우점하는 양상을 보인 반면에 정점 2에서는  $\gamma$ -*Proteobacteria* 세균군이 우점하는 것으로 보아 정점 1에 비해 정점 2 수역에 분해가 용이한 유기물이 많은 것으로 추정된다.

**두 수역에서의 질화세균(nitrifying bacteria)군의 차이**

**암모니아 산화세균(ammonia-oxidizing bacteria, AOB):** 탐침자 NSO190으로 검출이 가능한 암모니아 산화세균은 *Nitrosomonas oligotropha*, *N. communis*, *N. marina*, *N. europaea*, *N. cryotolerans* 등의 *Nitrosomonas* 속(genus)과 *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrospira* sp. 등이며 이들은  $\beta$ -*Proteobacteria* 세균군에 속한다(Schramm *et al.*, 1998). 정점 1에서 검출된 암모니아 산화세균수는 2월 ( $3.6 \times 10^5$  cells/ml), 4월( $10 \times 10^5$  cells/ml), 6월( $10 \times 10^5$  cells/ml)로 수온이 낮았던 2월(4°C)보다 10°C 상승한 4월에 검출된 세균수가 2배로 증가하였으나 6월에는 4월과 동일한 수치를 나타냈다(Fig. 5, Table 4). 반면에 정점 2에서는 매 조사 시기마다 10°C 씩 수온이 상승했음에도 불구하고 3회에 걸친 조사 결과에 별 차이가 없었다(2월,  $8.0 \times 10^5$  cells/ml; 4월,  $10 \times 10^5$  cells/ml; 6월,  $10 \times 10^5$  cells/ml). 질화세균의 개체수 및 활성도에 영향을 미치는 물리적 환경요인 중, 수온의 영향이 가장 크고 그들의 최적 생장 온도는 30°C이고 생장 가능온도가 8-35°C이지만 10-30°C에서는



**Fig. 4.** The variations of  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -*Proteobacteria* to total counts (%) in Nak-Dong River.

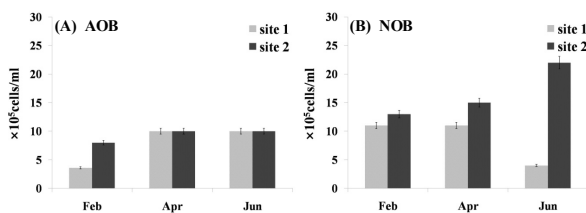
**Table 4.** Characteristics of physicochemical environmental factors in Nak-Dong River

Date	Site	Temp (°C)	pH	T-N (mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)
Feb	site 1	4	7	1.34	0.14	0.01	0.46
	site 2	5	7	3.42	0.23	0.02	0.84
Apr	site 1	14	7	1.55	0.15	0.01	0.67
	site 2	15	7	4.12	0.24	0.03	1.31
Jun	site 1	23	7	2.91	0.17	0.02	0.81
	site 2	24	7	8.27	0.26	0.04	4.77

비교적 온도 변화에 덜 민감하다는 연구결과(Liu and Capdeville, 1994)를 감안하면 정점 1에서의 세균수 증가는 수온 상승에 따른 결과로 사료된다. 정점 2에서 수온이 24°C로 상승한 6월에도 4월과 동일한 세균수를 나타낸 이유는 아마도 호기성 세균인 질화세균의 활성이 용존 산소(DO) 부족으로 저해되었기 때문으로 생각된다. 즉, 그 수역에 존재하는 여타의 호기성 종속영양세균과의 산소에 대한 경쟁에서 생장이 더딘 암모니아 산화세균이 뒤졌기 때문일 것이다(Belser, 1979). 하수처리시설의 슬러지 응집물(aggregates) 표면에 형성된 생물막에서의 질화세균을 산소와 연계해서 공촛점 주사 레이저현미경(confocal scanning laser microscope, CLSM)으로 관찰하였는데 생물막 두께 125 μm 이내에서만 질화세균의 존재를 확인할 수 있었고 더 깊은 응집물 내부에서는 질화세균을 전혀 볼 수 없었다고 하였다(Schramm et al., 1998). 암모니아 산화세균수를 총세균수에 대한 비율(%)로 나타내면, 정점 1 (2월, 10±1.92%; 4월, 14±3.41%; 6월, 32±4.36%; 평균, 18±3.22%)은 정점 2 (2월, 13±1.31%; 4월, 31±2.21%; 6월, 38±13.17%; 평균, 27±5.56%)의 절반을 약간 상회하는 수준이었다(자료 미제시). 세균수 절대치로 보면 두 정점간의 차이가 거의 없는 것으로 보이나 총세균수에 대한 암모니아 산화세균의 비율(%)은 정점 1 (18%)보다 정점 2 (27%)에서 높았다. 정점 2에서 검출된 질산성 질소 농도가 정점 1 수역의 그것보다 높다는 것으로도 정점 2 수역에서 질화 세균의 활성이 더 활발했을 것으로 추측할 수 있다(Table 4).

**아질산 산화세균(nitrite-oxidizing bacteria, NOB):** 본 연구에 사용한 NIT3 probe로 검출이 가능한 아질산 산화세균은 *Nitrobacter winogradsky*, *N. hamburgensis*, *Nitrobacter* sp.이며 이들은 α-Proteobacteria에 속하는 것으로 알려져 있다(Schramm et al., 1998). 정점 1에서는 아질산 산화세균 개체수

가 수온 상승과 함께 약간 감소하는 경향(2월, 1.1×10<sup>6</sup> cells/ml; 4월, 1.1×10<sup>6</sup> cells/ml; 6월, 0.4×10<sup>6</sup> cells/ml)을 나타낸 반면에 정점 2에서는 오히려 증가하는 양상을 보였다(2월, 1.3×10<sup>6</sup> cells/ml; 4월, 1.5×10<sup>6</sup> cells/ml; 6월, 2.2×10<sup>6</sup> cells/ml). 특히 수온이 23-24°C에 달했던 6월에는 정점 1에서는 감소한 반면에 정점 2에서는 오히려 증가해 정점간의 격차가 2월, 4월보다 더 컸다. 이를 총세균수에 대한 아질산 산화세균수 비율(%)로 나타내면 정점 1 (2월, 30±3.2%; 4월, 23±2.99%; 6월, 18±4.6%; 평균, 23±3.59%), 정점 2 (2월, 28±3.15%; 4월, 37±6.24%; 6월, 37±4.91%; 평균, 34±4.76%)로 정점 1 보다 정점 2에서 아질산 산화세균 비율이 더 컸다(자료 미제시). 특히 6월에 정점 2에서 아질산을 질산으로 산화시키는 아질산 산화세균수가 증가했는데 이때 동일 지점에서 측정된 질산성 질소(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) 농도(정점 1, 0.81 mg/L; 정점 2, 4.77 mg/L; Table 4) 또한 급증한 것으로 보아 이때 아질산 산화 세균의 활성이 활발했을 것으로 추정된다. 처리시설의 방류수가 유입되는 정점 2에서 아질산 산화세균이 많이 검출되는 것은 이 수역에 많은 유기물과도 연관이 있는 것으로 사료된다. 왜냐하면 주로 토양에서 서식하는 *Nitrobacter* sp. 균(Degrange and Bardin, 1995)이 강우로 씻겨 수계로 유입되는데(Cebren and Garnier, 2005) 정점 2 수역과 같이 유기물이 많은 수계의 경우, 이들이 종속영양적으로 증식했을 가능성도 배제할 수 없다. Winkler 등(2012)에 의하면 호기적으로 가동되는 하수처리시설의 입자(granule)성 슬러지에서 암모니아 산화세균수보다 *Nitrobacter* sp., *Nitrospira* sp. 등의 아질산 산화세균수가 더 많이 관찰되었는데 그 까닭은 *Nitrobacter* sp.가 독립영양과 종속영양을 병행하는 혼합영양 방식(mixotrophically)으로 물질대사를 하기 때문이라고 하였다. 프랑스 세느강에서 질화세균을 검출한 Cebren과 Garnier (2005)은 아질산 산화 세균이 암모니아 산화세균에 비해 생장률이 낮으므로 동량의 암모니아가 아질산으로 산화되는 과정에 관여하는 암모니아 산화 세균수에 비해 아질산을 질산으로 산화시키는 아질산 산화세균수가 많을 수 밖에 없다고 하였다. 또한 하수처리시설 방류수가 유입되기 전의 세느강 상류 수역에서는 원래 토양 토속종인 (autochthonous) *Nitrobacter* sp. (Degrange and Bardin, 1995)가 우점한 반면, 유입 후에는 *Nitrospira* sp.가 우점한다고 보고된 것처럼(Cebren and Garnier, 2005), 하수 슬러지에 많은 것으로 알려진 *Nitrospira* sp. (Regan et al., 2003)균을 본 연구에서는 검출하지 않았으나 만약 검출했다면 정점 2에서 상당수 검출되었을 것으로 생각된다. 농업용 저수지에서도 아질산 산화세균



**Fig. 5.** The variations of ammonia oxidizing bacteria [(A) AOB] and nitrite oxidizing bacteria [(B) NOB] at 2 studying sites in Nak-Dong River. Error bars indicate standard deviation. n=10.

수가 암모니아 산화세균수보다 더 많았으며 본 연구의 조사수역에서 검출된 질화세균수의 약 1/10-1/100 수준으로 검출되었다 (Lee and Lee, 2002). 정체수 환경과 유수 환경에서의 이 같은 질화세균의 수적인 차이는 산소 가용성(availability)에서 기인하는 것일 수도 있을 것이다. 용존산소(DO)가 암모니아산화세균보다 아질산 산화세균의 활성에 더 큰 영향을 미치고(Schramm *et al.*, 1996) 저수지라는 정체수계에서는 더딘 성장을 하는 질화세균이 빠른 성장을 하는 호기성 종속영양세균과의 산소경쟁에서 뒤질수 밖에 없는 반면(Belser, 1979), 유수계인 낙동강에서는 대기 중의 산소가 수중으로 확산될 가능성이 더 클 것이므로 저수지보다는 산소 가용성이 양호할 것으로 생각된다.

결론적으로 유기성 오염도 차이에 따른 낙동강 수역에서의 질화세균의 종류 및 그 개체수를 gene probe (NSO 190, NIT3)를 사용해 FISH법으로 검출한 결과, 상수원수 취수지점 인근의 정점 1보다 생활하수 방류수가 유입되는 지점에서 멀지 않은 정점 2에서 질화세균의 활성이 더 활발한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구에 적용한 gene probe (NSO190, NIT3)로는 실제 해당 수역에 존재하는 모든 질화세균을 검출할 수는 없었을 것이다. 왜냐하면 혐기적인 환경에 아질산( $\text{NO}_2^-$ )이 존재할 경우, 암모니아를 산화시켜 질소가스( $\text{N}_2$ )를 생성하는 *Brocardia anammoxidans* 등의 anammox (anoxic ammonia oxidation)균 (Schmidt *et al.*, 2002)과 암모니아 산화 고세균(AOA) 등은 NSO190으로 검출할 수 없기 때문이다. 수중 식물의 근권(rhizosphere) 토양에서 AOA가 상당수 검출되었다는 보고(Herrmann *et al.*, 2008)를 제외하고는 담수계에서의 AOA에 관한 연구는 거의 없지만 해양과 토양, 그리고 질소제거를 위해 고안된 하수처리시설의 슬러지(Park *et al.*, 2006)에서 암모니아 산화 고세균(AOA)의 *amoA* 유전자가 확인되는 것으로 보아(You *et al.*, 2009) 담수계에도 AOA가 존재할 가능성은 농후하다. 또한 *Alcaligenes faecalis* 등 이화적 질화작용(heterotrophic nitrification)을 하는 세균들(Anderson *et al.*, 1993; Su *et al.*, 2006)도 본 연구에 적용한 연구방법으로는 파악이 불가능한 세균군이다. 앞으로 질화세균의 유전정보에 대해 더 많이 알게 되고 그에 따라 연구기법들이 발전하면 수계에서의 질소순환에 관여하는 세균의 종류 및 그 생태적 특성을 숙지하게 될 것이다. 그렇게 되면 인(P)과 함께 부영양화의 원인물질인 질소(N)의 관리방안, 더 나아가 수질관리 방안을 보다 과학적으로 확립할 수 있을 것이다.

## 적 요

유기성 오염원(생활하수 처리시설 방류수) 유무에 따른 질화세균의 변화를 알아보기 위해 낙동강의 2 조사수역에서 다양한 형태의 질소(T-N,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) 농도를 측정하였고 조사 수역에 있는 질화세균 종류를 확인한 후, fluorescent *in situ* hybridization (FISH)법으로 질화세균 수를 정량 평가하였다. 즉 암모니아 산화세균의 종류는 *amoA* 유전자, 그리고 아질산 산화세균인 *Nitrobacter* sp.는 SSU 16S rDNA 특정 기호서열을 목표로 한 PCR-DGGE를 수행한 후 염기서열 분석으로 그들이 각각 *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.임이 확인됨에 따라 그에 상응

하는 gene probe, NSO190와 NIT3을 사용해 FISH법을 수행하여 각 수역의 질화세균수를 비교하였다. 아울러 전반적인 세균학적 수질을 모니터링하기 위해 수계에 많은  $\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma\text{-Proteobacteria}$ 도 FISH법으로 검출하였다.  $\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma\text{-Proteobacteria}$  분포도와 모든 유형의 질소 측정 결과에 따르면 정점 1 보다 정점 2의 유기물 오염도가 높다고 할 수 있었다. 이에 상응해 NSO160과 NIT3로 검출한 평균 질화세균수도 정점 1 (암모니아산화세균,  $7.8 \times 10^5$ ; 아질산산화세균,  $0.8 \times 10^6$  cells/ml)보다 정점 2 (암모니아산화세균,  $9.3 \times 10^5$ ; 아질산산화세균,  $1.6 \times 10^6$  cells/ml)에 더 많았고 그들이 총세균수에서 차지하는 평균 비율(%) 역시 정점 1 (NSO190, 18%; NIT3, 23%)에 비해 정점 2 (NSO190, 27%; NIT3, 34%)에서 높았다. 따라서 유기오염도가 낮은 상수원수 취수장 인근 수역인 정점 1 보다 생활하수처리시설 방류수로 인해 유기성 오염원이 상존하는 정점 2에서의 질화작용이 더 활발하다고 결론 지을 수 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 2010학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Alfreider, A., Pemthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glöckner, F.O., Wille, A., and Psenner, R. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2138-2144.
- Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Anderson, I.C., Poth, M., Homstead, J., and Burdige, D. 1993. A comparison of NO and  $\text{N}_2\text{O}$  production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3525-3533.
- Belser, I.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 309-333.
- Cebon, A. and Garnier, J. 2005. *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Wat. Res.* **39**, 4979-4992.
- Degrange, V. and Bardin, R. 1995. Detection and counting of nitrobacter populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2093-2098.
- Glöckner, F.O., Fuchs, B.M., and Amann, R. 1999. Bacterioplankton composition of lake and oceans: A first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3721-3726.
- Herrmann, M., Saunders, A.M., and Schramm, A. 2008. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3279-3283.
- Hicks, R., Amann, R., and Stahl, D.A. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4, 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA



- sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2158–2163.
- Hornek, R., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P., Farnleitner, A., Kreuzinger, H., Kirschner, N., Mach, A., and Robert, L.** 2006. Primers containing universal bases reduce multiple *amoA* gene specific DGGE base patterns when analyzing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. *Microbiol. Methods* **66**, 147–155.
- Kim, D.J., Hong, S.H., and Ahn, T.S.** 1999. Seasonal and vertical change of bacterial communities in Lake Soyang. *Kor. J. Microbiol.* **35**, 242–247.
- Kowalchuk, G.A., Naoumenko, Z.S., Derikx, P.J.L., Felske, A., Stephen, J.R., and Arkipchenko, I.A.** 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 396–403.
- Lee, Y.O.** 2008. Changes of nitrifying bacteria in the different zone (upper-mid-lower part) of the Nak-Dong river. *J. Kor. Society Wat. Environ.* **24**, 214–220.
- Lee, Y.O. and Lee, H.S.** 2002. Seasonal variations of nitrifying bacteria in agricultural reservoir. *Kor. J. Limnol.* **35**, 152–159.
- Lee, H.S., Park, C.W., Kim, M.K., and Lee, Y.O.** 2002. Seasonal variation of eubacterial community structure and their structure affecting environmental parameters in reservoir. *Kor. J. Microbiol.* **38**, 31–37.
- Liu, Y. and Capdeville, B.** 1994. Kinetic behaviors of nitrifying biofilm growth in wastewater nitrification. *Environ. Technol.* **15**, 1001–1013.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.W., and Clark, D.P.** 2009. Anammox, pp. 603–604. In *Biology of microorganisms*. 12 ed. Pearson education.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., and Schleifer, K.H.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 593–600.
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.H., and Stenström, T.** 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2293–2298.
- McCaig, A.E., Phillips, C.J., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Harvey, S.M., Herbert, R.A., Emsley, T.M., and Prosser, J.I.** 1999. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 213–220.
- Minister of Environment.** 2009. Manual for the Examination of Water quality.
- 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**, 5643–5647.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R., and Amann, R.** 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4299–4306.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.P., and Wagner, M.** 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.
- Regan, J.M., Harrington, G.W., Baribeau, H., DeLeon, R., and Noguera, D.R.** 2003. Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems. *Wat. Res.* **37**, 197–205.
- Rossello-Mora, R. and Amann, R.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39–67.
- 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**, 4704–4712.
- Schmidt, I., Hermelink, C., van de Pas-Schoonen, K., Strous, M., den Camp, H.J., Kuenen, J.G., and Jetten, M.** 2002. Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) by two different lithotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5351–5357.
- Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., and Amann, R.** 1998. Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3480–3485.
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., and Schleifer, K.H.** 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4641–4647.
- Stephen, J.R., Chang, Y.J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Leung, K.T., Flemming, C.A., and White, D.C.** 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 95–101.
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., and Emsley, T.M.** 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4147–4154.
- Su, J.J., Yeh, K.S., and Tseng, P.W.** 2006. Piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan. *Curr. Microbiol.* **53**, 77–81.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Floos, J., and Amann, R.** 1996. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Technol.* **34**, 237–244.
- Winkler, M.K., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Sorokin, D.Y., and van Loosdrecht, M.C.** 2012. Unraveling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1657–1666.
- You, J., Das, A., Dolan, E.M., and Hu, Z.** 2009. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Wat. Res.* **43**, 1801–1809.