

혐기성 상태에서 암모니움 이온과 질산성 질소를 제거하는 미생물의 분리 및 배양조건

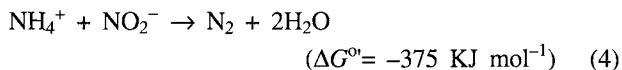
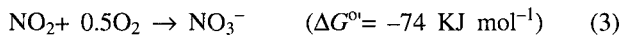
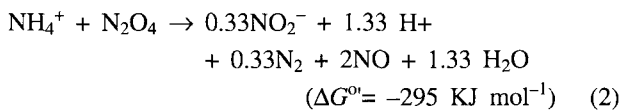
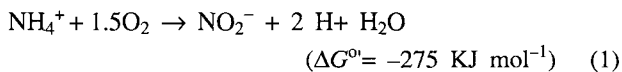
김영주 · 송영채¹ · 김종오² · 박흥석*

울산대학교 건설환경공학부, ¹한국해양대학교 토목환경시스템공학부, ²경상대학교 건설공학부

Isolation and Culture Conditions of a *Pseudomonas* Strain Capable of Removing NH_4^+ and NO_3^- Simultaneously in Anaerobic Conditions. Kim, Young-Ju, Young Chae Song¹, Jong Oh Kim², and Hung-Suck Park*. Department of Civil and Environmental Engineering, University of Ulsan, P.O.Box 18 Ulsan, 680-749 Korea, ¹Division of Civil and Environmental System Engineering, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea, ²Division of Construction Engineering Kyeongsang Nation University, Jinju 900, Korea – A bacterial strain AE-1-3, isolated from soil and wastewater identified as *Pseudomonas* strain, removed NH_4^+ and NO_3^- simultaneously in anaerobic cultivation in a medium containing 0.1% NH_4NO_3 and 3.0% glucose. The strain removed NH_4^+ , NO_3^- and NO_2^- completely in 15 days of anaerobic cultivation. Though NO_3^- removed completely, 33% of NH_4^+ remained in 15 day of incubation in 1% glucose and 0.1% NH_4NO_3 medium. The bacterium could remove 0.1% NH_4NO_3 completely in a short time by addition of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} in 0.5% glucose medium. By changing the metal concentration, 0.3% NH_4NO_3 could be removed completely.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, anaerobic conditions, ammonium nitrate, metal ions, glucose conditions

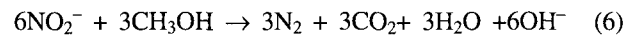
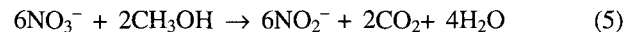
현재 일반적으로 사용되는 생물학적 질소제거는 질산화와 탈질산으로 이루어지며, 질산화는 3그룹의 화학독립영양 미생물 (chemolithotrophic bacteria)에 의하여 이루어지고 있다. 이 3그룹의 독립영양 미생물은 호기성 암모니아 및 아질산 산화균(Eqs.1-3)과 혐기성 암모니아 산화균(anaerobic ammonia oxidizers, ANAMMOXs)(Eq. 4)이며, 미생물 성장에 필요한 에너지는 무기질소 성분의 산화로부터 얻고 있다[5].



탈질균은 유기 또는 무기성 전자공여체를 사용할 수 있는 화학영양균(chemotrophs)이며, 유기물을 이용하는 것이 종속 영양균이고 이들은 proteobacteria 중에 널리 존재한다.

유기물을 전자공여체로 하는 아래와 같이 탈질화는 2 단

계로 이루어 진다.



또한, *Thiobacillus denitrificans* 등의 제한된 그룹의 독립 영양 균은 H_2 및 환원상태의 황을 사용할 수 있는 것으로 알려지고 있다[1].

따라서, 생물학적 처리법은 위에서 나타난 질산화와 탈질 산과정을 조합하여 경제적이고 안정적인 처리가 되도록 다양한 프로세스가 개발 및 실용화되고 있다.

특히, 최근에는 질소성분의 규제가 강화되면서 고농도의 질소 함유 폐수의 경제적 처리에 대한 관심이 증대되면서 질산화에 필요한 공기량과 알칼리 소모를 절감하고 탈질화에 필요한 유기물 양을 감소시키기 위한 방법에 대한 연구가 진척되면서 ANAMMOXs 반응에 대한 관심이 크게 증가되고 있다.

그러나, ANAMMOXs 반응은 독립영양계 미생물에 의한 반응으로 미생물 성장속도가 매우 느리며, 유기물을 제거하지 못하는 단점이 있어 제한된 범위의 적용성이 있다. 김[13]은 이와 같은 단점을 극복하고 유기물과 암모니아성 질소 및 질산성 질소를 혐기성 상태에서 동시에 제거하는 균주를 분리하고, 배양조건을 확립한 바 있다.

본 연구에서는 이와 같이 혐기조건에서 유기물과 NH_4^+ 와 NO_3^- 를 동시에 제거할 수 있는 종속영양계 미생물을 분리해 내고, 유기물과 질소의 비가 NH_4^+ 와 NO_3^- 제거에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 공학적 적용성을 높이기 위한

*Corresponding author
Tel: 82-52-259-2258 Fax: 82-52-259-2629
E-mail: parkhs@ulsan.ac.kr

유기물 절감방안으로 첨가한 미량원소의 효과를 평가하여 배양조건을 확립하는 것을 목표로 하였다.

재료 및 방법

분석방법

NH₄⁺, NO₂⁻ 및 NO₃⁻ 분석은 일정한 양의 시료를 채취하여 NH₄⁺ 항목은 Spectrophotometer(Hach, DR-2000)로 정량 하였으며, NO₂⁻와 NO₃⁻ 항목은 IC(Dionex, DX-80)을 사용하여 분석하였다. 또한 COD는 Standard Methods에 따라 분석하였다[2].

분해배지

Table 1에 균주 배양에 사용된 분해배지의 조성을 나타냈다. NH₄NO₃와 Fe²⁺를 뺀 나머지 배지성분과 NH₄NO₃와 Fe²⁺를 별도로 조제하여, 고압멸균기로 살균하였다(121, 13분). 냉각 후 고압 멸균한 3 배지를 혼합하였다. 이 분해 배지에 1.5% 한천을 첨가하여 0.1% NH₄NO₃ 한천배지를 조제하였다.

균주분리 및 동정

농경지, 임야, 매립지 등의 토양에서 13점, 슬러지 4점, 그리고 오염된 하천수에서 1점 등 총 18점의 시료를 채취하여 그 중 1g의 샘플을 0.8% NaCl용액 10 ml에 혼합해 10분간 정치시킨 후, 상등액 1.0 ml를 0.1% NH₄NO₃ 배지 9 ml에 첨가시켜 질소가스로 치환시킨 후 30에서 정치배양(혐기배양) 하였다. 이 시험관 중에서 기포가 발생한 시험관속의 배양액을 추출하여 0.1% NH₄NO₃한천배지에 도말하였다. 여기서 생육한 콜로니를 0.1% NH₄NO₃ 한천배지에 이식한 후에 생육한 균주를 0.1% NH₄NO₃액체배지에 넣어 배양하면서 2일 간격으로 배양액의 OD(optical density)를 660 nm에서 측정하고, 남아있는 NO₃⁻ 및 NH₄⁺를 정량하여 NO₃⁻ 및 NH₄⁺를 완전히 제거한 균주를 선택하였다.

최종 분리 선정된 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사하고 16S RNA유전자를 해석하여 동정하였다[3].

Table 1. 0.1% NH₄NO₃ medium.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	15.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
D-Glucose	30.0 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g
NaCl	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28.0 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.0 mg
H ₂ O	1,000
	ph 7.1

분리균주에 NH₄⁺ 및 NO₃⁻의 제거효율

배지에 첨가하는 유기물양에 따른 NH₄⁺ 및 NO₃⁻의 제거 효율을 확인하기 위해 각 변화된 탄소원농도의 배지에 AE-1-3주를 첨가하여 혐기성조건에서 배양하였다. NH₄NO₃배지를 사용하여 배지에 첨가하는 탄소원의 농도를 3%, 2%, 1%와 0.5%, 0.2% 및 0%로 변화시켜가면서 일자별 NH₄⁺ 및 NO₃⁻의 제거 변화를 측정하였다.

또한, 배지에 첨가하는 탄소원의 농도를 최소한으로 하기 위해 배지에 첨가하는 NH₄⁺ 및 NO₃⁻의 제거에 관여하는 금속이온의 영향을 조사하였다.

우선 Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Sn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Ag⁺의 7종류 금속이온을 단독으로 사용하여 0.3 mM~0.3 nM의 농도로 10배 단위씩 희석하면서 분해배지에 첨가하여 총 49가지의 분해배지를 만들었다. 49개의 분해배지에서 균주를 배양하면서 2일 간격으로 잔존하고 있는 NH₄⁺와 NO₃⁻를 정량 하였다. 그리고 Cu²⁺, Zn²⁺, Sn²⁺의 효과를 좀 더 관찰해보기 위해서 Cu²⁺와 Zn²⁺, Cu²⁺와 Sn²⁺, Zn²⁺와 Sn²⁺ 두 가지씩 첨가한 경우와 Cu²⁺, Zn²⁺ 및 Sn²⁺를 모두 첨가한 경우로 분리하여서도 분해실험을 하였다.

결과 및 고찰

균주선택 및 동정

혐기적 조건에서 3.0% glucose가 포함된 분해배지를 가지고 실험한 결과 슬러지 시료에서 NH₄⁺ 및 NO₃⁻가 완전히 제거 된 4 점을 얻었다. 이 4점을 같은 배지조성을 갖는 고체배지에 도말 하여, 혐기조건에서 생육한 균 총 8주를 분리하였다. 이 8주를 다시 액체배지에 도말 하여 15일간 혐기배양 한 결과, 모든 균이 NO₃⁻는 완전히 제거하였으나 NH₄⁺까지 완전히 제거한 균은 AE-1-3하나 뿐이었다. 이 AE-1-3을 분리(Table 2)하여 본 실험에 사용하였다.

0.1% NH₄NO₃배지를 완전히 분해한 AE-1-3의 균학적 성질을 관찰하였다.

Table 2. Utilization of NH₄⁺ and NO₃⁻ by isolated strains under anaerobic condition.

Isolate	Remaining		Growth (OD ₆₆₀)
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	
S-3-1	96%	0%	1.5
S-6	54	0	1.5
A-1-1	100	0	0.8
AE-1-3	0	0	2.1
S-3-3	100	0	2.7
AN-1	50	0	1.4
AN-2	45	0	1.9
LW-1	95	0	1.2

Each isolated strains was incubated in the basal medium containing 0.1% NH₄NO₃ on anaerobic cultures. After incubation for 15 days, cell growth, remaining NH₄⁺ and NO₃⁻ were measured.

본 균은 그람 음성 간균으로 운동성을 갖고 있었다. 또, 16S rRNA 유전자 해석결과, AE-1-3은 *Pseudomonas aeruginosa*와 99.9%라는 높은 상동성[3]을 보였다. 이상의 결과에서 본 균은 *Pseudomonas aeruginosa*임을 알 수 있으며, 이에 *Pseudomonas aeruginosa* AE-1-3으로 명명하였다.

C/N 비 변화에 따른 NH_4^+ 및 NO_3^- 의 제거효율

P. aeruginosa AE-1-3은 3.0% glucose가 첨가된 0.1% NH_4NO_3 배지를 완전히 분해하였다. 그러나 일반적으로 질소 제거는 유기물의 함유량에 따라 영향을 크게 받는 것으로 알려져 있고, C/N 비가 적은 경우 질소를 제거하기 위하여 유기물을 추가하는 등 경제적인 어려움이 발생한다. Fig. 1은 배양 개시 후 15일째의 glucose 농도를 달리한 C/N별 잔존 NH_4^+ 를 측정된 결과이다. *P. aeruginosa* AE-1-3은 1.0% glucose가 존재하는 C/N 비 47에서는 0.1% NH_4NO_3 의 NO_3^- 및 NH_4^+ 를 완전히 제거하였고, C/N 비가 그 이하로 낮아질 경우 NH_4^+ 의 제거율이 감소하는 일반적인 경향을 보여 주고 있다.

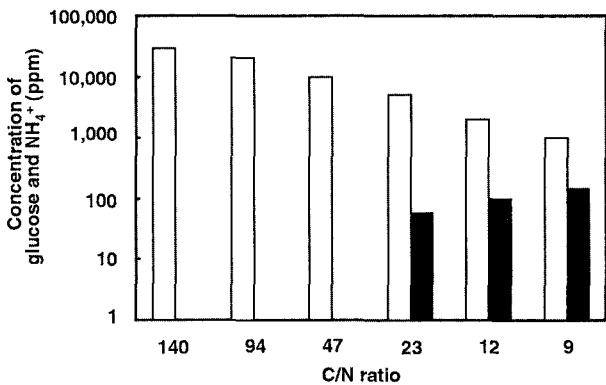


Fig. 1. The *P. aeruginosa* AE-1-3 was incubated at 30°C in 0.1% NH_4NO_3 medium containing various concentration of glucose. Cell growth and remaining NH_4^+ , NO_3^- , and NO_2^- were measured. Symbols: □, glucose ■, NH_4^+ .

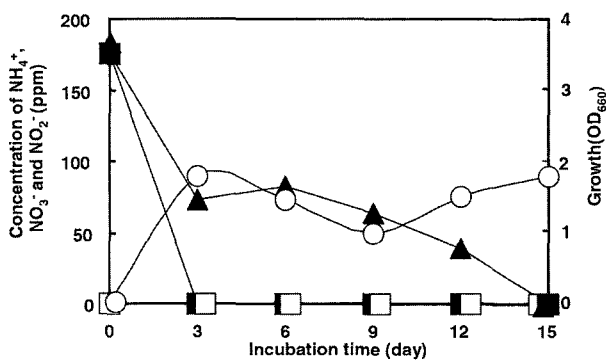


Fig. 2. The *P. aeruginosa* AE-1-3 was incubated at 30°C in 0.1% NH_4NO_3 medium 1.0% glucose and Cell growth and remaining NH_4^+ , NO_3^- , and NO_2^- were measured. Symbols: ▲, NH_4^+ ■, NO_3^- □, NO_2^- and ○, cell growth.

Fig. 2는 0.1% NH_4NO_3 을 완전히 제거할 수 있었던 1.0% glucose 첨가시의 배양시간 별 NO_3^- 및 NH_4^+ 잔존량을 나타낸 것이다. 배양 개시 후 3일 후에 NO_3^- 가 완전히 제거되었고 NH_4^+ 가 60%정도가 제거되었다. 그 이후 NH_4^+ 가 서서히 감소하면서 배양 개시 후 15일에는 NH_4^+ 도 완전히 제거되었다.

NH_4^+ 및 NO_3^- 의 제거에 관여하는 금속이온의 영향

배양 중 Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ 를 첨가하여 실험했을 때에는 첨가하지 않았던 경우와 비교해 균주의 생육이 저하되거나 NH_4^+ 제거효율이 오히려 더 떨어졌지만, Fig. 3-B에서와 같이 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} 모두를 첨가해 배양한 경우는 *P. aeruginosa* AE-1-3의 생육이 좋아졌고 NH_4^+ 의 제거효율도 향상되었다.

또한 두 가지 이온만 첨가한 경우에 비해서 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} 를 모두 첨가한 경우가 효율이 더 좋았으며 3 μM 이하의 농도에서 좋은 결과를 보였다. 3 μM ~0.3 nM 농도에서는 NH_4^+ 의 제거효율은 차이가 없었으며, 30 μM 을 첨가했을 때에는 균 생육에는 영향이 없으나 NH_4^+ 가 완전히 제거되지 않았고, 300 μM 에서는 균의 생육도 낮아지고 NO_3^- 및 NH_4^+ 의 제거율도 떨어졌다. Fig 3-B에서 알 수 있듯이 0.5% glucose 조건에서도 0.1% NH_4NO_3 배지가 완전히 제거되었으며 제거되는 시간도 15일에서 9일로 오히려 단축이

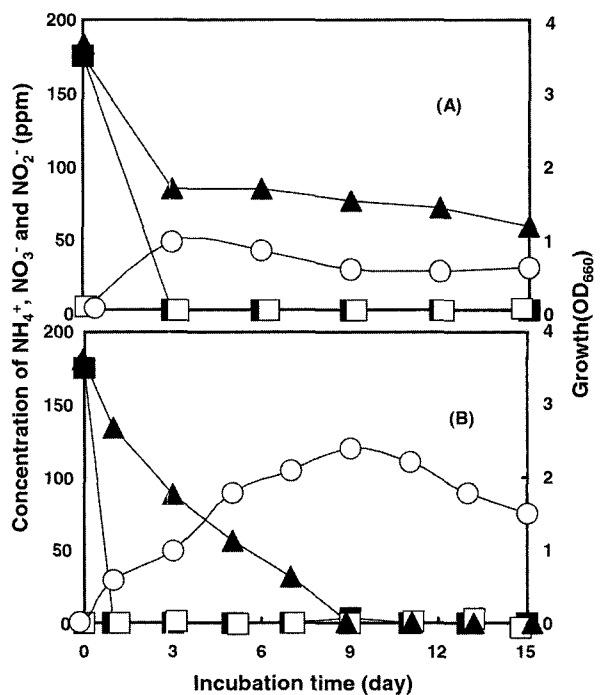


Fig. 3. The *P. aeruginosa* AE-1-3 was incubated at 30°C in 0.1% NH_4NO_3 medium containing 0.5% glucose and 0 M (A), 3 μM (B) Cu^{2+} , Sn^{2+} and Zn^{2+} . Cell growth and remaining NH_4^+ , NO_3^- , and NO_2^- were measured. Symbols: ▲, NH_4^+ ■, NO_3^- □, NO_2^- and ○, cell growth.

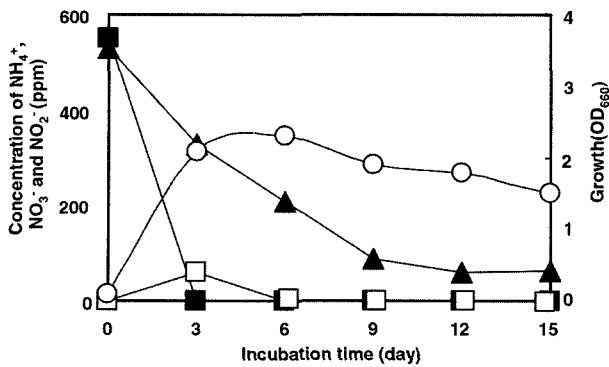


Fig. 4. The *P. aeruginosa* AE-1-3 was incubated at 30°C in 0.3% NH_4NO_3 medium containing 0.5% glucose and 30 nM Cu^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} . Cell growth and remaining NH_4^+ , NO_3^- , and NO_2^- were measured. Symbols: \blacktriangle , NH_4^+ \blacksquare , NO_3^- \square , NO_2^- and \circ , cell growth.

되었다는 것을 보여준다. 세가지 이온을 첨가하지 않은 경우에 0.5% glucose의 존재 하에서는 15일만에 NO_3^- 는 제거되었으나 NH_4^+ 는 33%가 남아있었다(Fig. 3-A)는 사실과 비교해 보면 위의 세가지 이온이 NH_4^+ 제거효율을 높이는데 효과가 있다는 것을 보여준다.

다음은 0.1% NH_4NO_3 제거실험에서 다른 금속이온보다 효율이 좋았던 농도인 3 μM 의 금속이온을 이용해서 0.3% NH_4NO_3 제거 실험하였다. 그러나 3 μM 농도의 금속이온에서는 균주의 생육이 오히려 불안정해지고 NH_4^+ 의 제거효율도 떨어졌다.

그래서 0.1% NH_4NO_3 제거실험과 같은 방법으로 금속이온 농도를 줄이면서 제거실험을 수행했는데 금속이온을 30 nM 이하(30 mM~0.3 nM)로 줄였더니 균주의 생육도 좋아지고 NH_4^+ 의 제거효율도 높아졌다(Fig. 4). NH_4NO_3 제거에 Cu^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} 가 반드시 필요하며 금속이온의 농도가 NH_4NO_3 의 농도와 깊은 관계가 있다는 것을 보여준다.

NO_3^- , NH_4^+ 및 glucose의 경시거동을 통한 반응기작 검토

혐기조건에서 0.5% glucose를 첨가하여 배지를 배양하면서 각 시간 별 잔존 NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ 및 glucose양을 측정 한 결과, NO_3^- 및 NO_2^- 가 완전히 제거되고 NH_4^+ 가 50% 감소 될 때까지도 glucose가 감소하지 않았으며 그 이후 NH_4^+ 가 조금씩 감소됨과 함께 glucose가 감소되었다. 이후 glucose가 감소되는 것은 균의 생육에 쓰인 것으로 보인다(Fig. 5).

NO_3^- 에서 N_2 에 도달하는 탈질 과정에 있어서 Nitrate · Nitrite reductase 등의 효소를 필요로 하는데 이 효소들은 NO_2^- 에서 NO 의 변환, NO 에서 N_2O 로의 두 변환과정에서 시토크롬C를 포함한 동 단백질인 호흡형 아질산환원효소가 관여하고 있다는 것은 알려져 있다[10]. *P. aeruginosa* AE-1-3도 Cu^{2+} 및 Sn^{2+} , Zn^{2+} 가 배지에 첨가되면 혐기조건에서도 NH_4^+ 가 제거 된다는 것을 생각해볼 때, 이 균이 시토크

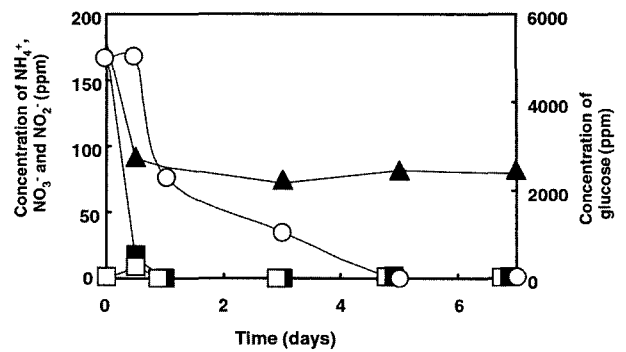


Fig. 5. The *P. aeruginosa* AE-1-3 was incubated at 30°C in 0.1% NH_4NO_3 medium containing 0.5% glucose and 30 nM Cu^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} . Cell growth and remaining NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , and glucose were measured. Symbols: \blacktriangle , NH_4^+ \blacksquare , NO_3^- \square , NO_2^- and \circ , glucose.

롬C 를 포함한 동 단백질 효소를 가지고 있으며 NH_4^+ 안의 N원자를 N_2 또는 N_2O 의 형태로 제거하는 것으로 보여진다.

0.1% NH_4NO_3 제거실험의 경우에는 금속이온 농도가 3 μM 이하의 농도에서 영향을 나타내었으며 더 낮은 농도인 30 nM의 경우에도 차이가 없었다. 이것은 NH_4NO_3 농도가 낮은 상태에서는 NH_4NO_3 독성이 낮아 3 μM 이라는 높은 금속이온 조건에서도 효소활성에 영향이 없었던 것으로 보인다. 그러나 이 금속이온들은 일정량 이상의 양을 첨가하면 활성이 떨어졌다[5, 11]. 그 이유는 NH_4NO_3 농도가 높아질수록 균에 미치는 영향이 높아지므로 효소활성에 악 영향을 미치게 되고, 그로인해 효소가 견딜수 있는 금속이온 농도가 더욱 낮아진 것으로 보인다. 0.3% NH_4NO_3 조건에서 30 nM 이상의 금속 이온을 첨가했을 때 균 활성이 급격히 떨어진 것도 그 이유로 보인다. 결국, *P. aeruginosa* AE-1-3가 NH_4^+ 및 NO_3^- 를 제거함에 있어서 금속이온을 반드시 필요로 하지만 많은 양을 필요로 하지 않으며 악영향을 미치는 금속이온의 농도는 NH_4NO_3 의 농도차이에 따라 달라질 것으로 보인다. NH_4^+ 및 NO_3^- 제거미생물인 *Klebsiella pneumoniae* 에서도 같은 결과를 보였다[8]. 이상의 결과에서 *P. aeruginosa* AE-1-3가 NH_4NO_3 를 제거함에 있어 금속이온이 반드시 필요하다는 것을 알 수 있다. 이후의 모든 실험에서는 배지에 30 nM의 금속이온을 첨가하기로 하였다.

본 미생물은 265 ppm의 NH_4^+ 및 NO_3^- 가 완전히 제거되어도 glucose는 전혀 감소하지 않았다. 혐기조건에서 본 균이 glucose가 아닌 NH_4^+ 를 사용하여 NO_3^- 를 제거한 것으로 생화학적 기작에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

분류학적으로 호기성 ammonia산화 균에 속하는 *Nitrosomonas* 몇몇 미생물들이 혐기성 상태에서 ammonium을 산화시킬 수 있음이 보고되었으나 호기적 질산화 미생물에 의한 혐기적 ammonium 산화 능력은 Anammox미생물에 비해 낮다[9]. 그러나 *P. aeruginosa* AE-1-3은 Anammox균보다 생육도 현저히 좋으며 빠른 시간 내에 혐기조건에서

NH_4^+ 및 NO_3^- 를 제거하는 능력을 보여주었다.

미생물을 이용해서 NO_3^- 및 NH_4^+ 를 동시에 제거하는 방법은 다 방면으로 연구되고 있으나 대부분이 NH_4^+ 를 제거함에 있어서 호기성 조건하에서 많은 유기물이 필요하다는 단점이 있다[8]. 또 혐기성 조건에서 NH_4^+ 를 제거하는 Anammox균인 *Candidatus Borcadia anammoxidans*는 매우 느리게 성장하여 NH_4^+ 를 제거하는데 장 시간이 소요되며 [5, 11, 12], 고농도의 NH_4^+ 를 제거할 수 없다는 단점이 있다. 그러나 *P. aeruginosa* AE-1-3은 외부 탄소원이 필요 없이 NO_3^- 및 NH_4^+ 를 제거하는 Anammox공정과 달리 낮은 유기물 조건하에서도 NO_3^- 및 NH_4^+ 를 동시에 제거할 수 있는 생육이 빠른 heterotrophic 이어서 NO_3^- 및 NH_4^+ 를 경제적으로 제거 하는 큰 이점을 갖고 있다. 계속되는 실험으로 지속적으로 glucose 농도를 낮출 수 있었으며 이를 바탕으로 금속이온 이외에 다른 조건도 검토한다면 더욱 더 낮은 유기물 농도에서 고농도의 NH_4NO_3 를 제거하는 조건을 확립할 수 있으리라 생각된다.

요 약

NH_4NO_3 을 유일한 질소원으로 하는 배지를 제작하여 혐기적 조건에서 *P. aeruginosa* AE-1-3을 분리하였다. 이 균은 1.0% glucose를 배지에 첨가한 조건에서 0.1% NH_4NO_3 를 완전히 제거하였다. *P. aeruginosa* AE-1-3은 0.5% glucose 존재 하에서도 0.1% NH_4NO_3 를 완전히 제거 하였으며 균의 활성을 높이기 위해 배지에 Cu^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} 를 첨가함으로써 0.3% NH_4NO_3 도 제거할 수 있었다. 본 균의 NH_4NO_3 제거시의 유기물 이용경로를 알아보기 위해 COD를 측정 한 결과 0.1% NH_4NO_3 의 NO_3^- 가 완전히 제거되고 NH_4^+ 가 50% 제거되는 동안 glucose를 전혀 필요로 하지 않는 결과를 확인했다. 이 결과로 본 균이 heterotrophy 이지 만 혐기성 및 무유기물 조건에서 NO_3^- 및 NH_4^+ 를 제거한다는 것을 알 수 있다.

P. aeruginosa AE-1-3은 autotrophy보다 높은 생육과 높은 NH_4^+ 및 NO_3^- 제거 능력을 보여주었다. 본 균은 저 유기물상태에서 고농도 NH_4^+ 및 NO_3^- 를 완전히 제거할 수 있는 가능성을 보여 주고 있다. 본 균은 우리나라처럼 C/N비가 낮은 축산폐수 및 하·폐수를 처리하는데 응용될 수 있다면 폐수 속의 유기물만으로도 수중에서 질소를 효과적으로 제거할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구의 연구비(R01-2002-000-00401-0) 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Koenig, A. and L. H. Liu. 2001. Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. *Wat. Res.* **35**: 1969-1978.
2. APHA, 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater 20th ed., New York.
3. Anzai, Y., H. Kim, J. Y. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1563-1589.
4. Maartje, D., T. Vasiliky, G. Ines, L. Rosa, V. Carlos, and V. Javier. 2001. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 443-448.
5. Francisco, J. G., D. A. De la Rosa, and J. Gomez. 2001. nitrogen removal from wastewater at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Biores. Technol.* **79**: 165-170.
6. Ingo, S., S. Olav, M. Schmid, E. Bock, J. Fuerst, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten, and M. Strous. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 481-492.
7. Jetten, M. S. M., M. Sttous, K. T. van de Pas-schoonen, J. Schalk, U.G. J. M. van Dongen, M. M. C. van Loosdrecht, and J. G. Kuenen. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS. Microbiol. Rev.* **22**: 421-437.
8. Kim, Y-J., M. Yosizawa, S. Takenaka, S. Murakami, and K. Aoki. 2002. Isolation and cultural conditions of a *Klebsiella pneumoniae* strain that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously under controlled iron and molybdate ions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 996-1001.
9. Kim, Y-J., M. Yosizawa, S. Takenaka, S. Murakami, and K. Aoki. 2002. Ammonia assimilation in *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: Purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. *J. Biosci. Bioeng.* **193**: 584-588.
10. Kizai, H. M. 1997. Bukino tiltuso to ryoujou no ntaiya. *Tokyokagakutouinn*, pp. 258-260. In Saiboukinou totaiya Map, Japan.
11. van Dongen, L.G. J. M., M. S. M. Jetten, and M.C.M. van Loosdrecht. 2001. The combined Sharon/Anamox process. *Found. Appl. Wat. Res.* 23-29.
12. Strous, M., J. A. Fuerst, F. H. M. K. Ramer, S. logemann, G. Muyzer, van de Pas-Schoonen, K. T., Kuenen, J. G., and M. S. M. Jetten, 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446-449.
13. Kim, Y-J. 2002. Metabolism of ammonium and nitrate ions by *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 under anaerobic conditions. *Kobe University*, 43-52.

(Received Dec. 16, 2004/Accepted Mar. 7, 2005)