Microbiol. Biotechnol. Lett. (2019), 47(2), 296–302
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1809.09014
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

부식토 유래 질산화세균 consortium의 질산화 유전자 거동 특성

서윤주, 이윤영, 최형주, 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Received: September 25, 2018 / Revised: October 25, 2018 / Accepted: October 26, 2018

Nitrifying-genes Dynamics in the Enriched Bacterial Consortium Inoculated with Humic Soil

Yoon-Joo Seo, Yun-Yeong Lee, Hyung-Joo Choi, and Kyung-Suk Cho*
Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

In this study, the effects of ammonium concentration (117.5–1155.0 mg-N·l^{-1}), nitrite concentration (0–50.0 mg-N·l^{-1}), and temperature (15–35℃) on nitrification performance and its functional genes (*amoA*-arc, *amoA*-bac, *hao*) in an enriched consortium inoculated with humic acid were determined. Notably, the maximum nitrification rate value was observed at 315 mg-N·l^{-1} of ammonium, but the highest functional gene copy numbers were obtained at 630 mg-N·l^{-1} of ammonium. No inhibition of the nitrification rate and functional gene copy numbers was observed via the added nitrites. The optimum temperature for maximum nitrification performance was observed to be 30℃. The *amoA*-bac copy numbers were also greater than those of *amoA*-arc under all test conditions. Notably, *amoA*-arc copy numbers and nitrification efficiency showed a positive relationship in network analysis. These results indicate that ammonium-oxidizing archaea and bacteria play important roles in the nitrification process.

Keywords: Nitrification, functional gene, ammonium, nitrite, ammonium-oxidizing archaea, ammonium-oxidizing bacteria

미생물에 의한 질산화(nitrification)와 탈질반응(denitrification)은 질소의 생지화학적 순환에 있어 매우 중요한 과정이다[1, 2]. 질산화과정은 암모늄을 아질산염으로 산화시키는 암모니아 산화세균(ammonium oxidizing bacteria, AOB)과 아질산염을 질산염으로 산화시키는 아질산염 산화세균(nitrite oxidizing bacteria, NOB)에 의해 이루어진다[1]. AOB는 암모늄을 하이드록실아민으로 산화시키며, 이 과정에 ammonia monooxygenase (AMO) 효소가 관여한다. AOB 유래 AMO 유전자인 *amoA*-bac는 AMO 효소의 α-subunit을 encode하는 핵심 기능성 유전자로서, 모든 AOB에 존재하기 때문에 AOB의 잠재적 활성을 판단하는 마커 유전자로 활용되고 있다[1, 3]. AOB 뿐만 아니라 암모니아 산화 고세균(ammonium oxidizing archaea, AOA)도 질산화과정에 중요한 영향을 끼친다는 것이 밝혀짐에 따라, AOA 유래 AMO 유전자인 *amoA*-arc도 암모니아 산화과정의 중요 마커 유전자로 고려되고 있다[4]. 하이드록실아민은 hydroxylamine oxidoreductase (HAO)에 의해 아질산염으로 산화된다. HAO 효소를 부호화하는 핵심 기능 유전자인 *hao* 유전자는 *amoA*와 더불어 AOB를 정량화하기 위해 이용되는 마커 유전자이다[5].

질산화공정에 대한 연구는 대부분 암모늄과 아질산염 농도, 온도, 용존산소, pH 등과 같은 환경인자가 질산화 효율 및 속도에 미치는 영향을 중심으로 이루어지고 있기 때문에[6–8], 질산화에 관여하는 주요 기능성 유전자의 거동에 대한 정보는 부족하다[4]. 따라서 본 연구에서는 질산화 농화배양액을 대상으로 암모늄 농도, 아질산염 농도 및 온도가 질산화 효율에 미치는 영향을 조사하고, 각 조건에서 주요 기능성 유전자인 *amoA*-bac, *amoA*-arc 및 AOB 유래 *hao*를 정량 PCR (qPCR) 방법으로 분석하였다. 또한, 네트워크 분석법을 활용하여 이들 인자들이 질산화 효율과 기능성 유전자 거동에 미치는 영향을 평가하였다.

접종원으로 부식토(humic soil)를 이용하여 질산화세균 컨소시엄(consortium)을 다음의 방법으로 농화배양하였다. 600 ml 혈청병에 무기염 배지 18 ml와 부식토 2 g을 넣은 후 30℃에서 2주일 동안 배양하였다. 무기염 배지 조성은 $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g·l^{-1}, Na_2HPO_4 13.5 g·l^{-1}, KH_2PO_4 0.7 g·l^{-1},

***Corresponding author**
Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr
© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 $g \cdot l^{-1}$, $NaHCO_3$ 0.5 $g \cdot l^{-1}$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.014 $g \cdot l^{-1}$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.18 $g \cdot l^{-1}$ (pH 7.5)이었다[9]. 이후 배양액 2 ml를 새로운 무기염 배지 18 ml에 접종하여 동일한 방법으로 계대배양하였는데, 각 계대배양 과정에서 배지에 첨가한 암모늄이 질산염으로 산화되는 것을 확인하였다. 이 과정을 5회 반복하여 최종 질산화세균 컨소시엄을 확보하였다.

질산화세균 컨소시엄을 접종원으로 하여 암모늄 농도, 아질산염 농도 및 온도가 질산화과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 다음과 같이 회분식 실험을 수행하였다. 120 ml 혈청병에 배지 3.6 ml와 접종원 0.4 ml를 혼합하였고, 부틸고무마개와 파라필름으로 밀폐한 후, 30℃에서 14–18일 동안 배양하였다. 암모늄 농도(117.5, 210.0, 315.0, 630.0, 1155.0 mg-N·l^{-1}), 아질산염 농도(0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 mg-N·l^{-1}) 및 배양 온도(15, 20, 25, 30, 35℃)를 상이하게 설정한 조건에서 실험을 수행하였다. 아질산염 농도 및 배양 온도 영향을 평가한 실험에서 배지 중 암모늄 농도는 210.0 mg-N·l^{-1}가 되도록 첨가하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

각 혈청병에서 1–3일 간격으로 배양액과 혈청병 상부의 가스를 채취하여 질소화합물의 농도 변화를 측정하였다. 배양액 중 질산염 및 아질산염 농도는 음이온컬럼(L 150 mm × ID 4 mm, Metrohm AG, Switzerland)과 검출기(IC Conductivity Detector, Metrohm AG, Switzerland)가 장착된 이온크로마토그래피(883 Basic IC plus, Metrohm AG, Switzerland)를 사용하여 분석하였다. 혈청병 내부 기상 아산화질소의 농도는 충진컬럼(L 365.76 cm × ID 3.18 mm, PC9975, Restek Corporation, USA)과 전자포획검출기(Agilent Technologies, USA)가 장착된 가스크로마토그래피(HP 6890 Series, Agilent Technologies)를 사용하여 분석하였다.

질산화에 관여하는 기능성 유전자를 정량 분석하기 위해, 배양액을 원심분리(11,400 ×*g*)하여 회수한 Biomass 시료로부터 DNA 시료를 Nucleospin® Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH, Germany)와 BeadBeater-8 system (Biospec, USA)을 사용하여 추출하였다. 추출 DNA template를 대상으로 16S rRNA, 암모늄 산화(*amoA*-arc, *amoA*-bac) 및 하이드록실아민 산화(*hao*)에 관여하는 기능성 유전자 정량 분석을 위해 Table 1에 제시한 프라이머를 이용하여 qPCR (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)을 수행하였다[10–16]. 16S rRNA 유전자의 C_T 값은 gene copy number 10^3–10^7 값을 가지는 synthetic 16S rRNA의 standard curve를 이용해 절대 정량한 gene copy number로 환산하였다. *amoA*-arc, *amoA*-bac 및 *hao* 유전자의 C_T 값은 접종원에 사용된 부식토의 C_T 값을 대조군으로 하여 상대 정량한 gene copy number로 환산하였다.

암모늄과 아질산염 농도 및 온도별 상이한 조건에서 질산화반응(질산염 생성 효율 및 질산화 속도)과 기능성 유전자(*amoA*-arc, *amoA*-bac 및 *hao*) copy number의 상관성을 파악하기 위해 extended local similarity analysis (eLSA) algorithm을 이용하여 네트워크 분석을 수행하였다[17]. 각 인자 사이의 상관성은 $p < 0.05$ 조건에서 분석하였으며, Cytoscape program (version 3.4.0)을 이용하여 가시화(visualization)하였다[17].

암모늄 첨가 농도별 배양시간에 따라 배지에 축적된 아산화질소, 아질산염 및 질산염 농도 변화를 Fig. 1에 도시하였다. 아산화질소는 모든 실험군에서 전 기간에 걸쳐 검출되지 않았다. 암모늄 첨가 농도가 630 mg-N·l^{-1}인 조건에서 배양 4일째에 아질산염 농도가 278.9 mg-N·l^{-1}으로 최대로 축적되었으나 그 이후 아질산염 농도는 급격하게 감소하였다(Fig. 1A). 1,155 mg-N·l^{-1}의 암모늄을 첨가한 조건에서 10 일째에 아질산염 농도 118.4 mg-N·l^{-1}으로 최대로 축적되었고, 실험 종료 시까지 계속 유지되었다(Fig. 1A).

각 조건에서 질산염이 생성되는 특성을 살펴보면, 암모늄을 117.5 및 315 mg-N·l^{-1} 첨가한 조건에서 4 일째에 질산염 농도가 최대로 축적되었으나, 630 mg-N·l^{-1}의 암모늄을 첨가한 조건에서는 8일째에 질산염 농도가 최고 농도(712.2 mg-N·l^{-1})에 도달하였다(Fig. 1B). 암모늄 첨가 농도가 630 mg-N·l^{-1} 이하인 조건에서는 암모늄의 첨가량이 증가할수록 질산염 축적 농도도 증가하였으나, 1,155 mg-N·l^{-1}의 고농도 암모늄 첨가 조건에서는 오히려 감소(32.4 mg-N·l^{-1})하

Table 1. Functional gene targeted primer sets for qRT-PCR.

Target gene	Primer	Related enzyme	Sequence (5'-3')	Reference
Bacterial 16S rRNA	340F 805R	16S rDNA sequence of *Escherichia* coli	TCCTACGGGAGGCAGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	[10]
amoA-arc	Arch-amoAF Arch-amoAR	ammonia monooxygenase in archaea	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	[11, 12]
amoA-bac	amoA-1F amoA-2R	ammonia monooxygenase in bacteria	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	[11, 13, 14]
hao	*hao*F4 *hao*R2	hydroxylamine oxidoreductase	AAYCTKCGCTCRATGGG GGTTGGTYTTCTGKCCGG	[15, 16]

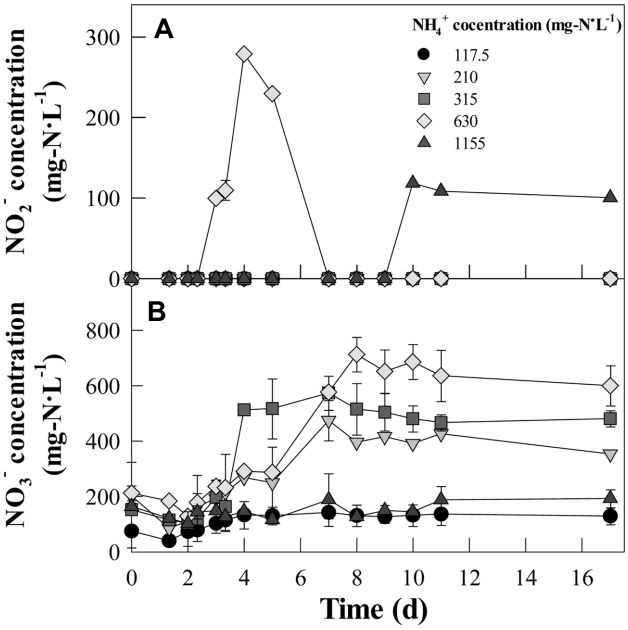

Fig. 1. Time profiles of nitrogen compound concentrations under different ammonium concentrations. (A) NO_2^--N, (B) NO_3^--N concentration (unit: mg-N·l^{-1}).

는 경향이 보였다.

Fig. 1의 결과값을 이용하여 암모늄 농도별로 질산염 생성 효율과 질산화 속도를 계산하여 Fig. 2에 도시하였다. 또한 3 종의 기능성 유전자를 분석한 결과도 Fig. 2에 함께 제시하였다. 질산염 생성 효율과 질산화 속도는 암모늄 농도 315 mg-N·l^{-1}까지는 농도가 증가할수록 값이 증가하였으나, 630 mg-N·l^{-1} 이상의 고농도 조건에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

암모늄 농도가 높은 폐수를 용존산소(DO) 농도가 낮은 조건에서 처리하면 아질산염이 축적된다[18–20]. DO 0.7 mg·l^{-1} 이하인 조건에서 암모늄 농도 610 mg-N·l^{-1}의 폐수를 처리했을 때 유입된 질소의 65% 이상이 아질산염 형태로 축적되었고[18], 암모늄 농도 200 mg-N·l^{-1}의 폐수를 처리했을 때, 유입된 질소의 약 80%가 아질산염 형태로 축적되었다[19]. 또한 DO 2.0 mg·l^{-1} 이하의 조건에서 암모늄 농도 1253–1255 mg-N·l^{-1}의 폐수를 처리했을 때, 질소 부하량 중 93.4–97.7%가 아질산염까지만 산화되었고, 질산염까지 완전 산화된 것은 2.0 mg-N·l^{-1}을 초과하지 않았다[20].

암모늄 초기 농도가 상이한 조건에서 3 종의 기능성 유전자 copy number 값을 Fig. 2C에 제시하였다. 질산염 생성효율 및 질산화속도는 암모늄 농도가 315 mg-N·l^{-1}인 조건에서 가장 높았으나, 3종 기능성 유전자의 총 copy number는 630 mg-N·l^{-1} 조건에서 가장 높았다. 그런데 질산염 생성량과 기능성 유전자 copy number 값이 높음에도 불구하고,

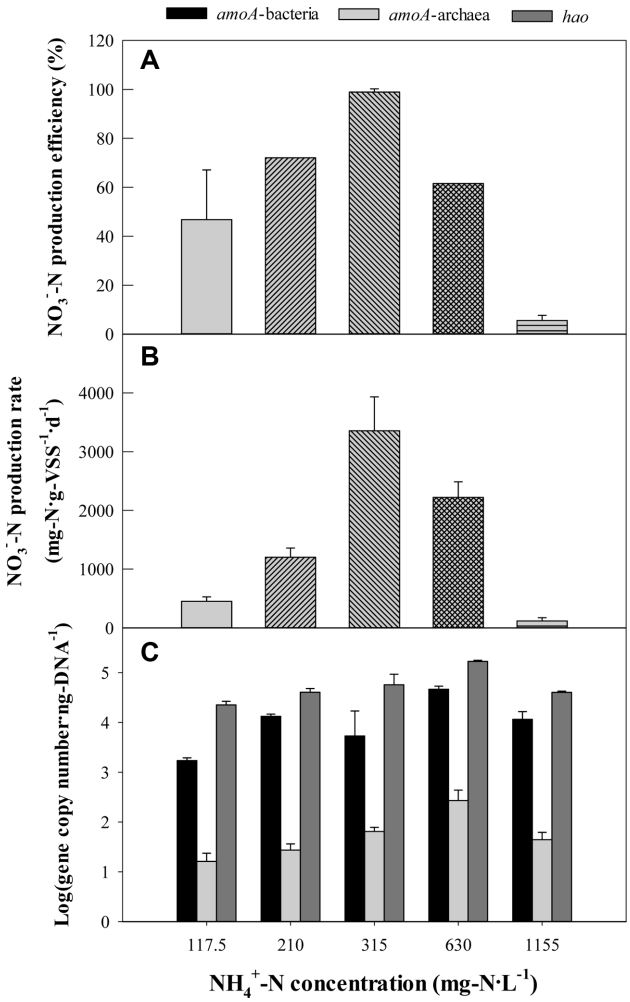

Fig. 2. Effects of ammonium concentration on nitrification and functional nitrification genes. (A) NO_3^--N production efficiency (%), (B) NO_3^--N production rate (μg-N·g-VSS^{-1}·d^{-1}), (C) functional nitrification gene copy number.

630 mg-N·l^{-1} 암모늄 농도 조건의 질산화속도는 315 mg·l^{-1} 암모늄 농도 조건보다 낮았는데(Fig. 2B), 이는 아질산염 축적에 의해 질산화 활성이 저해를 받았기 때문으로 사료된다. 즉, 암모늄 농도 630 mg-N·l^{-1}의 경우, 질산염이 최고 농도에 도달하기까지 0–8일의 기간 동안 높은 수준의 아질산염 축적되었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 이 기간 동안 질산화 속도를 좌우하는 주요 단계가 암모늄 산화 단계가 아닌 아질산염 산화 단계였다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 아질산염이 질산염으로 산화되는데 관여하는 유전자인 nitrite oxidoreductase (*nrxA* 유전자)의 거동을 측정하지 않았기 때문에 명확하게 설명할 수 없는 제한점이 있으며, 향후 이에 대한 자세한 추가 연구가 필요하다.

모든 실험 조건에서 암모늄 산화에 관여하는 유전자인

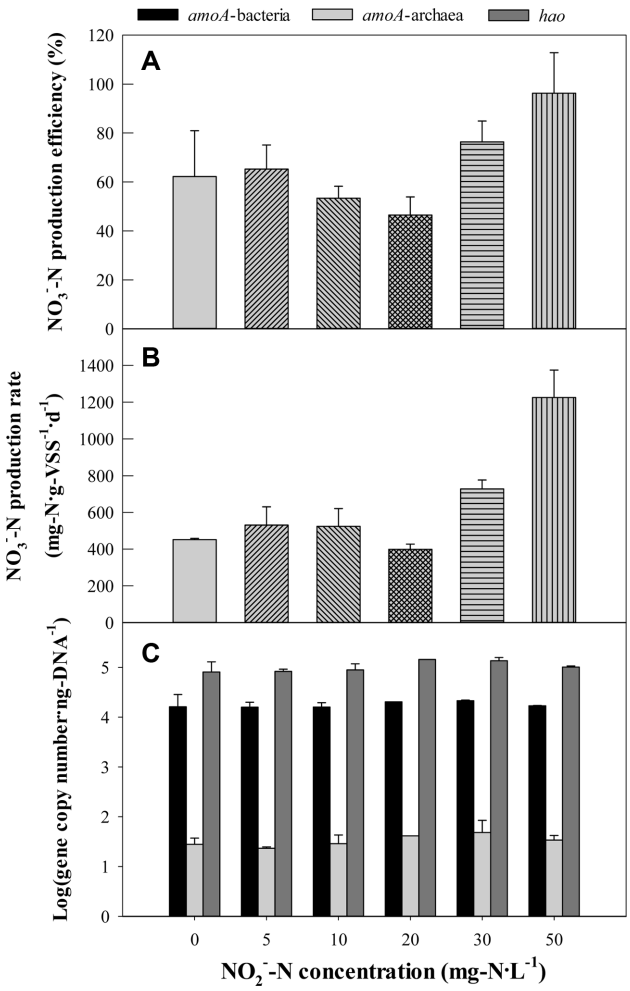

Fig. 3. Effects of nitrite concentration on nitrification and functional nitrification genes. (A) NO_3^--N production efficiency (%), (B) NO_3^--N production rate (μg-N·g-VSS^{-1}·d^{-1}), (C) functional nitrification gene copy number.

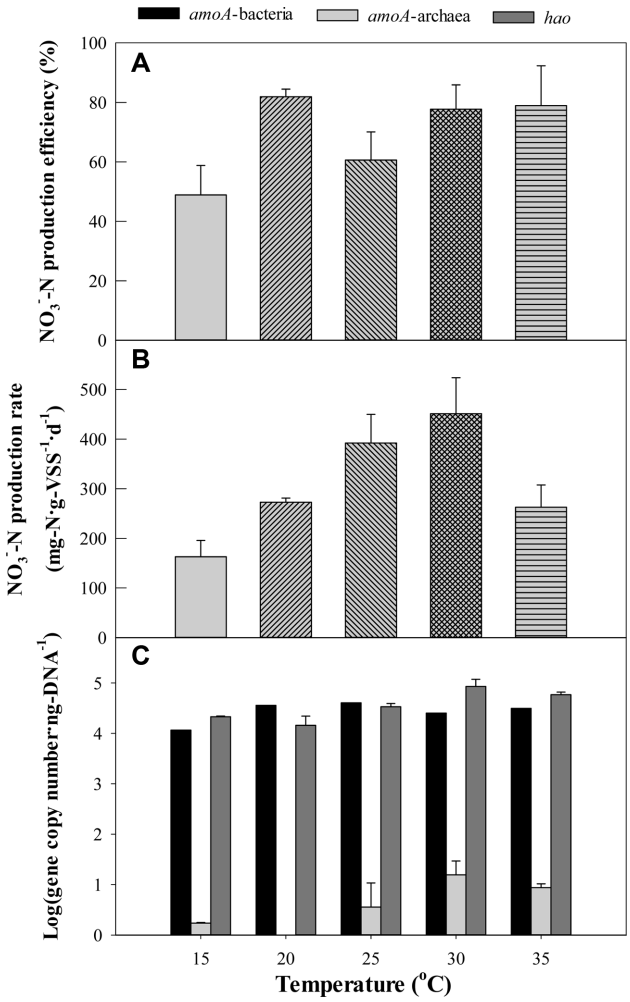

Fig. 4. Effects of temperature on nitrification and functional nitrification genes. (A) NO_3^--N production efficiency (%), (B) NO_3^--N production rate (μg-N·g-VSS^{-1}·d^{-1}), (C) functional nitrification gene copy number.

amoA-bac의 copy number가 *amoA*-arc보다 유의하게 높았다($p < 0.05$, Fig. 2C). 일반적으로 토양에서는 AOA가 AOB에 비해 높은 비율로 존재하는 것으로 알려져 있다[21, 22]. 본 연구에서는 부식토를 농화배양한 질산화세균 컨소시엄을 접종원으로 사용했음에도 불구하고 기존 연구 결과와는 달리 상대적으로 높은 *amoA*-bac 유전자 비율을 보이고 있는데, 이는 상대적으로 고농도의 암모늄을 주요 기질로 이용하여 농화배양을 했기 때문으로 예측된다. 본 연구 결과와 유사하게, 토양 시료에 반복적으로 암모늄을 주입하여 배양한 결과 *amoA*-bac 유전자의 copy number 값이 점차 증가하였다[23]. 또한, AOA와 AOB가 포함된 슬러지를 접종원으로 한 반응기를 암모니아 14–140 mg-NH_4·l^{-1} 범위에서 운전한 결과 모든 반응기에서 AOA 대비 AOB의 비율이 유의하게 증가했다[24].

질산염 생성 효율, 질산화 속도 및 3종의 기능성 유전자 copy number 값에 미치는 아질산염 농도의 영향을 조사한 결과를 Fig. 3에 도시하였다. 아질산염 농도 0–20 mg-N·l^{-1}에서 질산염 생성효율은 46.5–62.2%로 통계학적으로 차이가 없었으나($p > 0.05$), 아질산염 농도 30과 50 mg-N·l^{-1}에서는 질산염 생성 효율이 각각 76.4%와 96.3%로 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 3A). 또한, 아질산염 농도가 20 mg-N·l^{-1} 이하인 조건에서 질산화 속도는 큰 차이가 없었으나($p > 0.05$), 아질산염 농도 30과 50 mg-N·l^{-1}에서는 질산화 속도는 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$, Fig. 3B). 대부분의 질산화과정에서 아질산염이 질산화를 저해하는 수준까지 축적되는 경우가 거의 없으며, NOB의 활성 저해가 야기될 정도로 환경

조건이 급격하게 변화하지 않으면 AOB에 의해 생성된 아질산염은 곧바로 NOB에 의해 소모되었다[25]. 선행 연구결과와 유사하게 본 실험에서도 모든 아질산염 농도 조건에서 아질산염이 검출되지 않았으며(결과 미제시), 아질산염이 주입 후 빠르게 소모되었다.

아질산염 농도가 상이한 조건에서 3종의 기능성 유전자 copy number 값을 Fig. 3C에 제시하였다. 3종의 기능성 유전자 copy number 값은 아질산염 농도 조건에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 이는 배양액에 첨가된 0–50 mg-N·l^{-1} 범위의 아질산염이 AOB 및 AOA의 활성에 큰 영향을 미치지 않았다는 것을 의미한다. 모든 아질산염 농도 조건에서 *amoA*-bac의 copy number가 *amoA*-arc보다 높았는데, 이는 Fig. 2C의 결과와 일치하였다.

질산염 생성 효율, 질산화 속도 및 기능성 유전자 copy number 값에 미치는 온도의 영향을 Fig. 4에 도시하였다. 15℃에서 질산염 생성효율은 48.9 ± 9.9%이었으나, 20–35℃에서 질산염 생성효율은 61–82% 범위이었다(Fig. 4A). 온도가 증가함에 따라 질산화속도가 증가하다가, 35℃에서는 감소 하였다(Fig. 4B). 온도가 상이한 조건에서 3종의 기능성 유전자 copy number 값을 Fig. 4C에 제시하였다. 3종 유전자의 총 copy number 값은 0–30℃ 범위에서 온도에 따라 점차 증가하며 질산화속도와 비슷한 경향을 보였다($p < 0.05$). 또한, 모든 온도 조건에서 *amoA*-bac의 copy number가 *amoA*-arc 유전자보다 높게 나타났으며, 이는 Fig. 2C의 결과와 일치하였다. 질산화반응은 다른 생물학적 반응과 마찬가지로 저온에서 급격한 저해를 받았으며, 특히 15℃ 이하에선 효율이 급감하였다[26]. 30℃의 조건에서 가장 최적의 효율을 보였고, 15–25℃의 범위에선 온도에 따라 점차 증가하였다[27, 28]. 본 연구에서도 온도가 증가함에 따라 15–30℃에선 점차 질산화속도가 증가하였으며, 35℃에선 유의하게 낮은 값을 보였다(Fig. 4B).

암모늄 농도, 아질산염 농도 및 온도가 다른 조건에서 질산염 생성효율, 질산화속도 및 기능성 유전자 copy number 사이의 상관관계를 통합적으로 해석하기 위해 eLSA 분석을 한 결과를 Fig. 5에 도시하였다($p < 0.05$). 각 node는 조건인자를 나타내며, 원 모양의 node(질산화 기능성 유전자)의 상대적인 크기는 해당 copy number의 수치를 반영한다. 각 edge는 인자 간의 local similarity (LS)가 있음을 보여주며, 실선의 edge는 양의 LS를, 점선의 edge는 음의 LS를 의미한다. 질산염 생성효율과 질산화속도, 또한, 질산화속도와 *amoA*-arc 유전자는 양의 LS를 보였다. *amoA*-arc 유전자를 가지는 AOA는 많은 폐수처리시설에서 발견되고 있으며 질산화 과정에서 이들의 역할이 부각되고 있다[29]. 폐수처리시설 내 질산화 효율과 AOA 풍부도는 서로 양의 상관성을 보였는데[30], 본 연구에서도 질산화속도와 *amoA*-arc copy number의 상관관계를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 암모늄 산화 고세균과 암모늄 산화 세균을 함께 이용함으로써 질산화 효율을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 본 연구에서

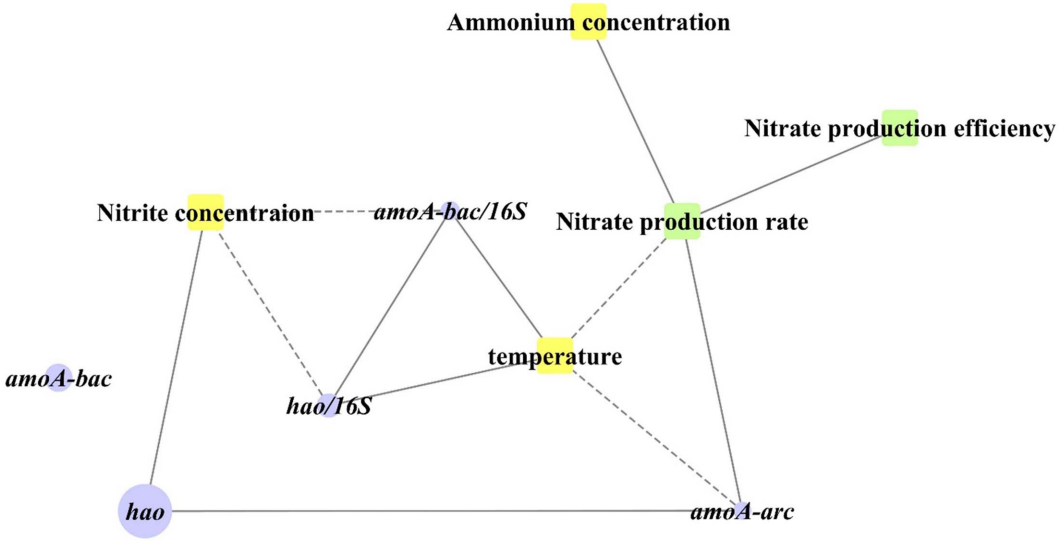

Fig. 5. Extended local similarity analysis between the key parameters ($p < 0.05$). Circle, yellow square and green square nodes indicate nitrification functional gene factors, environmental factors, and nitrification performance factors, respectively. Solid edges are positively associated while dashed edges are negatively associated ($p < 0.05$). Nitrate production efficiency, %; Nitrate production rate, μg-N·g-VSS^{-1}·d^{-1}; Ammonium concentration, mg-N·l^{-1}; Nitrite concentration, mg-N·l^{-1}; *amoA*-bac, gene copy number; *amoA*-arc, gene copy number; *hao*, gene copy number; *amoA*-bac/16S, ratio of *amoA*-bac gene copy number to 16S rRNA gene copy number; *hao*-bac/16S, ratio of *hao* gene copy number to 16S rRNA gene copy number.

도출된 결과는 질산화 과정을 이해하고 질산화 효율을 향상시키는 기술 개발을 위해 유용하게 활용 가능하다.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (NRF-2016R1A2B4015007).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Levy-Booth DJ, Prescott CE, Grayston SJ. 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* **75**: 11-25.
2. Bru D, Ramette R, Saby NPA, Dequiedt S, Ranjard L, Jolivet C, *et al.* 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J.* **5**: 532-542.
3. Horz H-P, Barbrook A, Field CB, Bohannan BJM. 2004. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 15136-15141.
4. Gao J, Luo X, Wu G, Li T, Peng Y. 2014. Abundance and diversity based on *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 3339-3354.
5. Keluskar R, Desai A. 2014. Evaluation of hydroxylamine oxidoreductase as a functional and phylogenetic marker to differentiate *Nitrosomonas* spp. *J. Basic Microbiol.* **54**: 261-268.
6. Chen S, Ling J, Blancheton JP. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult. Eng.* **34**: 34179-97.
7. Shanahan JW, Semmens MJ. 2015. Alkalinity and pH effects on nitrification in a membrane aerated bioreactor: An experimental and model analysis. *Water Res.* **74**: 10-22.
8. Kinyage JP, Pedersen LF. 2016. Impact of temperature on ammonium and nitrite removal rates in RAS moving bed biofilters. *Aquacult. Eng.* **75**: 51-55.
9. Paerl HW. 1998. Microbially mediated nitrogen cycling, pp. 3-30. *In* Burlage RS, Atlas R, Stahl D, Sayler G, Geesey G (eds.), Techniques in microbial ecology. Oxford University Press, Oxford.
10. Kim TG, Yun J, Hong SH, Cho KS. 2014. Effects of water temperature and backwashing on bacterial population and community in a biological activated carbon process at a water treatment plant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 1417-1427.
11. Song K, Suenaga T, Hamamoto A, Satou K, Riya S, Hosomi M, *et al.* 2014. Abundance, transcription levels and phylogeny of bacteria capable of nitrous oxide reduction in a municipal wastewater treatment plant. *J. Biosci. Bioeng.* **118**: 289-297.
12. Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 14683-14688.
13. Rotthauwe J, Witzel K. 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.
14. Wu B, Lan T, Lu D, Liu Z. 2014. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination. *Environ. Sci. Process. Impacts* **16**: 1501-1509.
15. Schmid MC, Hooper AB, Klotz MG, Woebken D, Lam P, Kuypers MMM, *et al.* 2008. Environmental detection of octaheme cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environ. Microbiol.* **10**: 3140-3149.
16. Padhi SK, Tripathy S, Sen R, Mahapatra AS, Mohanty S, Maiti NK. 2013. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **78**: 67-73.
17. Ki BM, Ryu HW, Cho KS. 2018. Extended local similarity analysis (eLSA) reveals unique associations between bacterial community structure and odor emission during pig carcasses decomposition. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **53**: 718-727.
18. Ruiz G, Jeison D, Chamy R. 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Res.* **37**: 1371-1377.
19. Aslan S, Miller L, Dahab M. 2009. Ammonium oxidation via nitrite accumulation under limited oxygen concentration in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* **100**: 659-664.
20. Wang LK, Zeng GM, Yang ZH, Luo LL, Xu HY, Huang J. 2014. Operation of partial nitrification to nitrite of landfill leachate and its performance with respect to different oxygen conditions. *Biochem. Eng. J.* **87**: 62-68.
21. Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, *et al.* 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806-809.
22. He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG, *et al.* 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ. Microbiol.* **9**: 2364-2374.
23. Sterngren AE, Hallin S, Bengtson P. 2015. Archaeal ammonia oxidizers dominate in numbers, but bacteria drive gross nitrification in N-amended grassland soil. *Front. Microbiol.* **6**: 1350.
24. Gao J, Fan X, Wu G, Li T, Pan K. 2016. Changes of abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in three nitrifying bioreactors with different ammonia concentrations. *Desalin. Water Treat.* **57**: 21463-21475.
25. Van Cleemput O, Samater AH. 1995. Nitrite in soils: accumulation and role in the formation of gaseous N compounds. *Fertil. Res.* **45**: 81-89.

26. Verstraete W, Focht DD. 1997. Biochemical ecology of nitrification and denitrification, pp. 135-214. *In* Alexander M (ed.), Advances in microbial ecology, Springer US, Boston.
27. Jones RD, Hood MA. 1980. Effects of temperature, pH, salinity, and inorganic nitrogen on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from wetland environments. *Microb. Ecol.* **6**: 339-347.
28. Antoniou P, Hamilton J, Koopman B, Jain R, Holloway B, Lyberatos G, *et al.* 1990. Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Res.* **24**: 97-101.
29. Park HD, Wells GF, Bae H, Griddle CS, Francis CA. 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5643-5647.
30. Limpiyakorn T, Sonthiphand P, Rongsayamanont C, Polprasert C. 2011. Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* **102**: 3694-3701.
31. Sinthusith N, Terada A, Hahn M, Noophan P, Munakata-Marr J, Figueroa LA. 2015. Identification and quantification of bacteria and archaea responsible for ammonia oxidation in different activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic Hazardous Subst. Environ. Eng.* **50**: 169-175.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1809.09014