

회분식반응조 실험을 통한 탄소원(Fumarate) 주입조건에 따른 지하수 중 탈질율 및 탈질 관련 기능성 유전자 분석

박선화¹ · 김현구¹ · 김문수¹ · 이경미¹ · 전상호¹ · 송다희¹ · 김덕현¹ · 김 영² · 김태승^{1*}

¹국립환경과학원

²고려대학교 대학원 환경공학과

Evaluation of Denitrification Efficiency and Functional Gene Change According to Carbon(Fumarate) Concentration and Addition of Nitrate Contaminated-soil in Batch System

Sunhwa Park¹ · Hyun-Koo Kim¹ · Moon-su Kim¹ · Gyeong-Mi Lee¹ · Sang-Ho Jeon¹
Dahee Song¹ · Deok-hyun Kim¹ · Young Kim² · Tae-seung Kim^{1*}

¹National Institute of Environmental Research

²Korea University

ABSTRACT

Nitrate is on the most serious pollutant encountered in shallow groundwater aquifer in agricultural area. There are various remediation technologies such as ion exchange, reverse osmosis, and biological denitrification to recover from nitrate contamination. Biological denitrification by indigenous microorganism of the technologies has been reviewed and applied on nitrate contaminated groundwater. In this work, we selected the site where the annual nitrate (NO_3^-) concentration is over 105 mg/L and evaluated denitrification process with sampled soil and groundwater from 3 monitoring wells (MW4, 5, 6). In the results, the nitrate degradation rate in each well (MW 4, 5, and 6) was 25 NO_3^- mg/L/day, 6 NO_3^- mg/L/day, and 3.4 NO_3^- mg/L/day, respectively. Nitrate degradation rate was higher in batch system treated with 2 times higher fumarate as carbon source than control batch system (0.42 M fumarate/1 M NO_3^-), comparing with batch system with soil sample. This result indicates that increase of carbon source is more efficient to enhance denitrification rate than addition of soil sample to increase microbial dynamics. In this work, we also confirmed that monitoring method of functional genes (nirK and nosZ) involved in denitrification process can be applied to evaluated denitrification process possibility before application of field process such as in-situ denitrification by push-pull test.

Key words : Nitrate, Denitrification, Fumarate, Functional genes (nirK, nosZ)

1. 서 론

농·축산지역에 최근(2011년도 이후) 구제역 발생에 따른 다수의 가축매몰지가 조성되면서 지하수 이용 안전성을 확보하기 위해 매몰지 주변 관정수질 조사가 진행되었다(NIER, 2013a; NIER, 2014). 이를 통해 일반적인 농·축산지역 지하수가 주로 축산분뇨 및 비료 등으로 인해 질산성질소 오염이 광범위하게 되어 있고, 이에 대한 실

질적 대책 마련이 필요함을 확인하였다(NIER, 2013b). 장기간 고농도 질산성질소로 오염된 농촌지역 지하수의 근본적인 수질 개선을 위해서는 축산분뇨 등 오염원 관리와 함께 오염된 지하수를 적극적으로 저감시켜 확산을 최소화 할 수 있는 기술 적용이 필요할 것으로 사료된다. 질산성질소 저감 기술로는 역삼투, 이온교환, 생물학적 탈질 등이 있으나 역삼투와 이온교환법은 많은 비용과 시간이 필요하며 대량의 지하수를 처리하기 위한 방법으로는 비

*Corresponding author : tskim99@korea.kr

Received : 2015. 9. 3 Reviewed : 2015. 10. 12 Accepted : 2015. 11. 24

Discussion until : 2016. 2. 29

효율적이며 적용하기 어려운 상황이다(Health Canada, 2013; ITRC, 2000; Fonseca et al., 2000). 최근에는 경제적 또는 환경적인 측면을 고려하여, 고농도 질산성질소 오염부지에 탄소원 주입을 통한 토착미생물활성 증대를 야기하여 오염원을 저감시키는 원위치 생물학적 공정이 주목받고 있다(Israel et al., 2011; Khan and Spalding, 2004; Kim, et al., 2005; Yun, et al., 2002). 생물학적 탈질은 질산성질소를 혐기적 환원과정 통하여 질소기체로 변환하는 반응으로 상대적으로 비용이 저렴한 것으로 보고되고 있다(Michael, 2002; Rittmann et al., 2001). 탈질 반응의 중간 생성물로는 nitrite, nitric oxide, nitrous oxide가 있으며, 각 스텝에 관여되는 효소로는 nitrate reductase, nitrite reductase(nirS, nirK), nitric oxide reductase, nitrous oxide reductase(nosZ) 등이 있다(Bannert et al., 2011; Michotey et al., 2000). 이중 탈질 반응의 가장 핵심적인 효소는 nitrite reductase이며, 탈질 미생물은 cytochrome cd1(nirS)과 copper nitrit(nirK)를 포함한다(Bannert et al., 2011; Braker et al., 1998; Park et al., 2014).

본 연구에서는, 회분식반응조 실험을 통해서 고농도 질산성질소로 오염된 지하수에 탄소원(Fumarate)주입 및 다양한 조건(토양주입, 탄소원주입 농도, 현장지하수 특성)에서 질산성질소 저감 가능성을 비교 평가하였다. 또한, 탈질화관련 유전자(nirK, nosZ)농도와 질산성질소 저감율과의 상관관계를 분석하였다. 이를 통하여 탄소원 주입 등을 통한 조사대상 지하수에서 탈질가능성 및 탈질율을 회분식반응조에서 도출하고, 향후 원위치 탈질공정을 위한 과학적 근거자료를 마련하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 관측정 설치 및 지하수 현장조사

연평균 105.3 mg/L NO_3^- 가 검출된 지점에 10 m(내경 0.1 m)깊이 관측정 3공(MW4, MW5, MW6)을 기존 관측정(MW2, 3) 주변에 추가적으로 설치하였다(Fig. 1). 관측정 설치 시 천공장비를 이용하여 심도 1 m 간격으로 토양시료를 채취하였다. 채취된 심도별 토양의 입자크기, 자갈의 함유율, 토양의 색상을 목측하고, 수분함량, pH, EC를 분석하였다. 또한, 유기물함량, 암모니아성질소, 질산성질소, 치환성 Ca, 치환성 Mg, 치환성 K, 치환성 Na, 유효인산, 가비중 진비중, 공극률을 분석함으로써 심도별 토양 물리·화학적 특성을 조사하였다. 지하수 시료는 현장 수질측정항목(EC, pH 등)의 측정값이 안정될 때까지 지

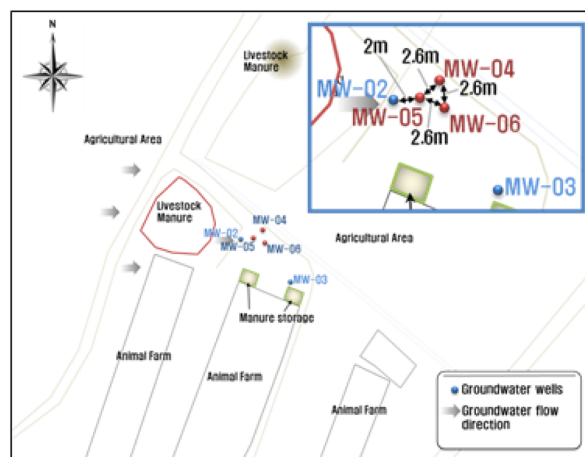


Fig. 1. Groundwater wells (MW2, 3, 4, 5, 6) location and flow direction in nitrate-contaminated site.

하수를 양수한 후 채취 하였다. 현장수질측정값의 안정화 여부는 미국지질조사국(USGS)의 자료(USGS, 2008)를 기준으로 판단하였다.

2.2. 회분식 반응조 실험을 통한 지하수 중 탈질을 평가

2.2.1. 탄소원(0.63 M Fumarate) 주입에 의한 탈질 효율평가

혐기성조건의 실험을 위해 반응조는 500 ml 배양병(wheaton, Millville, New Jersey)으로, 뚜껑은 테플론 부틸 고무와 플라스틱 septum으로 구성하였으며 150°C에서 20분 동안 고압 멸균한 후 사용하였다. 또한 탄소원으로는 이전의 연구에서 탈질효율이 가장 높은 것으로 확인된 Fumarate를 사용하였다(Kim et al., 2005). 고농도로 오염된 지하수시료를 배양병의 헤드스페이스를 최대한 줄이기 위하여 전체부피의 90%인 630 ml를 각각 주입하고 탄소원(fumarate)과 질소의 이론적 반응비(0.42 M : 1 M)의 1.5 배인 0.63 M fumarate/1 M NO_3^- 를 적용하여 첨가한 후 다른 영양성분의 주입 없이 19°C에서 약 85 rpm으로 연속교반 하였다. 질산성질소, 그 대사산물 및 주입된 탄소원(fumarate)의 변화를 측정하기 위하여 매일 10 mL의 액체시료를 0.45 μm PES membrane filter로 여과한 후 -20°C에서 냉동하여 분석 시까지 보관하였다. 또한, DNA추출을 위해서 2일 간격으로 15 mL의 액체시료를 채취하여 여과 없이 -20°C에서 분석 전까지 보관하였다(Table 2).

2.2.2. 탄소원 주입농도 변화, 토양주입 및 관측정 위치에 따른 탈질 효율평가

관측정(MW5, MW6)에서 채취된 지하수 및 토양시료를

이용하여 적극적 질산성질소 저감율을 평가하였다. 탄소 원(fumarate)은 이론적 반응비의 1.5배인 0.63 M fumarate/1 M NO₃와 이론적 반응비의 2배인 0.84 M fumarate/1 M NO₃를 적용하였으며, 0.63 M fumarate/1 M NO₃를 주입한 시료에는 미생물증대를 위해 토양 10 g을 추가로 주입하였다. 기타 조건들(반응조와 시료 주입량, 운전조건, 시료채취 주기, 채수 방법, 분석기기 등)은 현장부지 지하수의 질산성질소 저감 가능성 평가실험과 동일하게 진행하였다.

2.3. 양 · 음이온 및 Fumarate 분석

양이온(Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Mg²⁺)과 음이온(NO₃⁻, NO₂⁻)을 분석하기 위해 CH/850 Professional IC(Metrohm, Herisau, Switzerland)을 이용하였다. 이때 컬럼은 Metrosep C4, 150/4.0(Metrohm)을, 이동상은 0.1 mM H₂SO₄를 사용하였다. Fumarate분석을 위해서 SIMADZU사의 HPLC 시스템(LC-30AD, SIL-30AC auto sampler)을 이용하였다. 분석 조건은 9 mM H₂SO₄을 이동상으로 하여 1 mL/min의 유속으로 Dr. Maisch(Repre-Gel H⁺ 9 µm, 250 × 8 mm)컬럼에서 분리 후 UV디텍터 SPD-20A (210 nm)로 측정하였다.

2.4. DNA 추출

냉동 보관한 시료를 해동하여 멸균된 원심분리용 튜브로 옮겨 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 조심스럽게 상등액을 덜어내고 cell pellet은 DNeasy Tissue Kit(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출 · 분리하였다. 사용설명서에 따라 처음에

용해완충용액(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/mL lysozyme)에 균을 부유한 후 37°C에서 30분간 반응, Proteinase K를 넣고 70°C에서 30분간 반응 과정을 순차적으로 진행하였다. 에탄올 첨가 후 컬럼을 이용하여 DNA를 정제하였다. 정제한 DNA는 Nanodrop ND-1000 분광광도계(Nanodrop Technologies, Rockland, USA)를 이용하여 DNA농도와 순수도(260/280 ratio)를 확인하였다.

2.5. PCR 및 real-time PCR

Genomic DNA를 추출한 후 유전자 증폭기기(Mygenie TM 32 Thermal Block, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR분석을 수행하였다. 탈질화 반응에 관여하는 효소를 구성하고 있는 기능성 유전자(nirK, nosZ)를 증폭하기 위해 사용한 primer의 염기서열, PCR산물의 증폭 크기 및 PCR 조건은 Table 1과 같다. PCR반응을 수행한 후 전기영동을 수행하였다. 또한, PCR과 동일한 조건으로 ABI 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Inc.)을 실시하여 nirK와 nosZ유전자양을 모니터링 하여, 질산성질소 분해율과 비교분석하였다.

3. 연구결과 및 토의

3.1. 관측정별(MW4, 5, 6) 토양특성 분석결과

조사지역에 3개의 관측정을 설치하였으며 굴착 깊이는 10 m로 하였다. 토양특성 분석결과(Table 2)를 토대로 판단한 결과, 모든 관측정의 0~4 m 사이 지점에서 입자크기가 모래이상의 굵은 입자를 갖는 토양층이 분포하는 것을

Table 1. Primer sequence of functional genes involved in denitrification enzyme and PCR condition

Primer	Primer sequence	Size (bp)	Thermal profile	
nirK876	ATYGGCGGBAYGGCGA	165	95°C, 10 min	
nirK5R	GCTCGATCAGRTTTRTGG		95°C, 15 sec	5 cycle touchdown (-1°C)
			63~58°C, 30 sec	
			72°C, 30 sec	
			95°C, 15 sec	40 cycle
		58°C, 30 sec		
		72°C, 30 sec		
nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	259	95 10min	
nosZ2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA		95°C, 30 sec	5 cycle touchdown (-1°C)
			65~60°C, 30 sec	
			72°C, 30 sec	
			95°C, 15 sec	40 cycle
		60°C, 15 sec		
		72°C, 30 sec		

Table 2. Soil Physical Characteristics with depth in each well (MW4, MW5, MW6)

Soil depth	Soil texture			Gravel content (%)			Water content (%)		
	MW4	MW5	MW6	MW4	MW5	MW6	MW4	MW5	MW6
0~1 m				15	3	3	18.6	16.1	16.9
1~2 m	Silty sand	Silty sand	Silty sand	3	3	1	17.2	14.9	21.2
2~3 m				1	3	1	18.9	17.7	17.6
3~4 m				3	1	1	22.1	16.3	19.6
4~5 m	Sandy clay	Clay	Sand	1	0	15	23.6	18.9	15.7
5~6 m				1	0	25	27.7	19.9	13.0
6~7 m	Sand	Sand	Sandy clay	15	15	1	16.7	13.3	13.5
7~8 m				25	30	1	11.6	18.1	9.2
8~9 m			Sand	40	15	15	14.5	17.7	16.2
9~9.5 m				40		30	15.1		9.4

Table 3. Soil chemical and physical analysis results in soil sampled from three wells

Content	MW-4 (4~7 m)	MW-5 (5~7 m)	MW-6 (5~7 m)	Unit
Organic	0.69	0.19	0.06	%
EC	420	75.4	74.4	($\mu\text{S}/\text{cm}$)
pH	5.95	5.51	5.3	
Moisture	22.9	16.6	13.25	%
Ammonium ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)	3.432	17.845	2.745	mg/kg
Nitrate ($\text{NO}_3^-\text{-N}$)	36.376	29.513	41.867	mg/kg
Exchangeable Ca	573.7	721	668.9	mg/kg
Exchangeable Mg	201.2	259.7	234.7	mg/kg
Exchangeable K	90.25	98.3	74.96	mg/kg
Exchangeable Na	28.93	61.86	42.22	mg/kg
Available phosphate (P_2O_5)	26.85	8.04	1.97	mg/kg
Bulk density	1.36	1.4	1.31	g/cm^3
Real density	2.36	2.35	2.45	g/cm^3
Porosity	40.68	42.13	46.53	%
Soil texture	sandy loam	sandy loam	sandy loam	

확인하였으며, 착공당시 지하수의 수위는 2.4~3.9 m 가량의 깊이였고, 이는 해당지역의 깊은 입자로 구성된 토양층으로 인해 물의 침투가 용이하기 때문인 것으로 사료된다. 4~10 m에서는 자갈과 암석의 함량이 높았다. 층위별 수분함량 및 전기전도도를 살펴보면, 토층이 깊어질수록 지하수 수위가 모니터링된 3~6 m까지 수분함량은 증가하였으며 전기전도도 역시 낮아지는 경향을 보였다. 토양 pH는 토층이 깊어질수록 높아지는 경향을 보였다(Fig. 2). 원위척 생물학적 탈질화가 이루어지는(지하수위 아래 혐기성 지점) 4~6 m 지점의 관정별 토양의 이화학적특성을 분석한 결과, 유기물함량은 0.06~0.69%, 암모니아성질소는 2.75~17.85 mg/kg, 질산성질소는 29.51~41.87 mg/kg, 유효인산 1.97~26.85 mg/kg로 검출되었다(Table 3). 치환성양이온을 분석한 결과, Ca함량은 평균 654.5 mg/kg으로

가장 높았고, Mg(231.87 mg/kg), K(87.84 mg/kg), Na(44.34 mg/kg)순으로 검출되었다. 관측정별로 검출된 농도는 상이하나 경향성은 유사하였다. 조사된 층위는 4~5 m 지점으로 풍화작용이 미약한 부분으로 Ca, Mg 함량이 높게 검출된 것으로 사료된다.

3.2. 현장부지 지하수 중 탈질화율 평가

본 실험은 적정 반응비를 적용하여 오염현장 부지의 관측정별 질산성질소 저감 특성을 도출하기 위하여 실시되었다. Fig. 3은 관측정별 N_2 농도를 추정된 그래프이며, 초기 전체농도는 초기 아질산성질소 농도에 초기 질산성질소 농도를 더한 값으로 설정하였다. MW4 시료는 질산성질소 농도가 감소하는 동안 아질산성질소의 농도는 증가하였다가 질산성질소가 거의 분해되면 아질산성질소 역

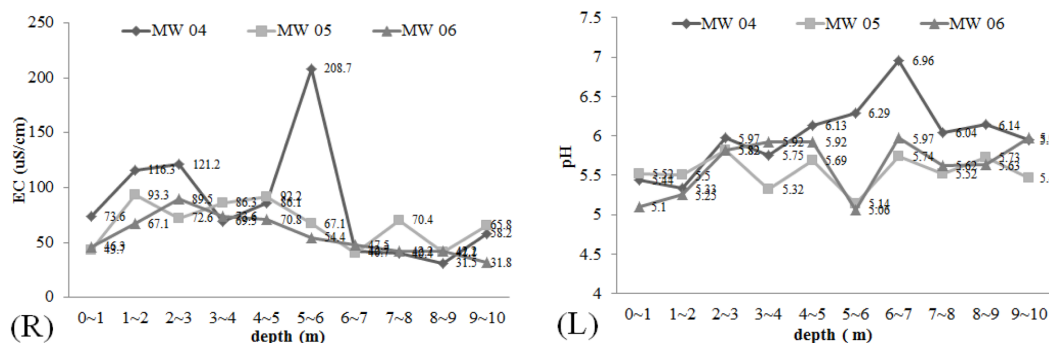
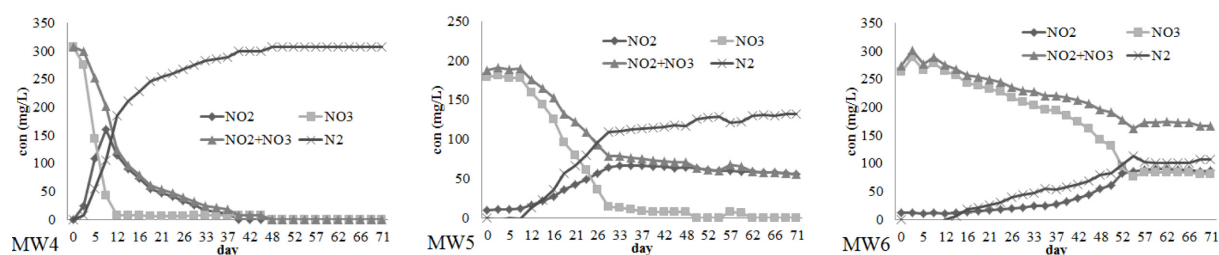
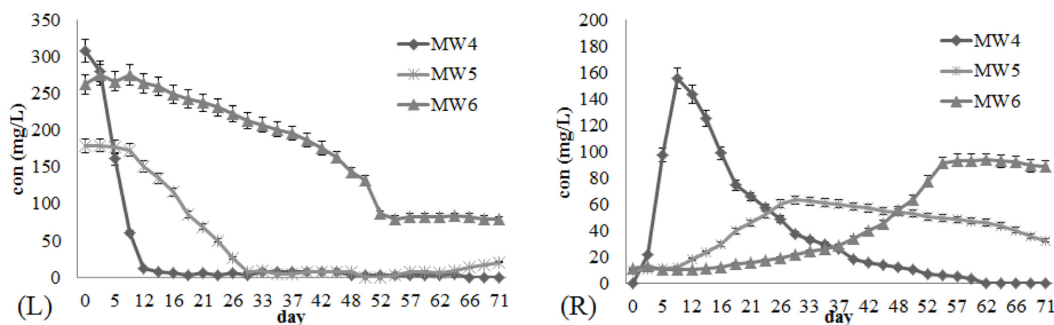


Fig. 2. Soil EC (R) and pH (L).

Fig. 3. Totalmass balance of NO₃, NO₂, and Calculated-N₂ in MW4, 5, 6.Fig. 4. Comparison of NO₃ (L) and NO₂ (R) concentration change in MW4, 5, 6.

시 감소하는 일반적 질산성질소 저감 결과와 동일한 양상이 나타난다. MW5 시료는 질산성질소 농도가 감소하자 아질산성질소의 농도는 증가하는 일반적 질산성질소 저감 패턴을 보였으나, 질산성질소가 완전 분해되어도 아질산성질소의 농도는 감소하지 않았다. MW6 시료는 55일째 시료채취로 발생한 감압현상을 해소하기 위하여 CO₂가스를 주입한 이후 질산성질소와 아질산성질소 모두 농도변화가 발생하지 않았다. 주입된 CO₂에 의해 pH가 감소하여 미생물활성이 감소된 것으로 사료된다. 질산성질소 분해율을 살펴보면, MW4 시료에서 8일까지 급격히 분해되었다가 10일에서 완전 분해되어 가장 높은 평균 25 mg/L/day 분해율을 보였으며, MW5 시료는 25일 동안 일정 농도로 감소하여 평균 6.2 mg/L/day 분해율로 완전 분해

되었다. MW6 시료에서는 50일 동안 천천히 감소하다가 55일째 CO₂를 주입한 이후 전혀 감소하지 않아, 55일 동안 평균 3.4 mg/L/day의 속도로 분해되었다(Fig. 4(L)). 관측정별 아질산성질소분해율은, MW4 시료에서 질산성질소가 급격히 분해되는 8일까지 증가되었다가 질산성질소 질소가 완전 분해되는 10일을 기점으로 감소하였고, MW5 시료는 질산성질소가 분해되는 25일까지 증가되었다가 감소하였다. MW6 시료에서는 질산성질소가 분해되는 52일까지 아질산성질소가 증가하였으나 CO₂ gas를 주입한 55일 이후 질산성질소와 마찬가지로 거의 감소하지 않았다(Fig. 4(R)). 질산성질소 분해시 소비되는 탄소원의 소모율을 Fig. 5과 같이 나타내었다. Fumarate는 MW4, MW5 시료에서 각각 12 day와 26 day에서 완전 분해되었으며

이는 아질산성질소가 분해 완료되는 시기와 일치하였다. MW4 시료에서 평균 fumarate 소모율은 25 mg/L/day이고, MW5 시료는 6.95 mg/L/day로 질산성질소 평균 분해율과 거의 동일하다. MW6 시료의 fumarate는 71 day까지 지속적으로 분해되었으나 아질산성질소는 55 day 이후로 거의 감소하지 않았으므로, fumarate는 55 day 이후 다른 물질의 탄소원으로 작용하였다고 추정가능하다. 실험 결과, 1 m 이내의 간격으로 설치된 관측정에서도 토양 및 지하수 환경에 따라 분해율은 상이한 것으로 확인되었다.

3.3. 탄소원 주입농도 및 관측정 위치별 저감을 비교평가

질산성질소저감 효율성 평가실험은 실온에서 한 달간 방치하여 미생물 활성도가 저하된 지하수에서 저감 효율성을 증진시키는 방안을 도출하기 위하여 실시하였다. 미생물 활성저감 실험은 질산성질소 저감을 in-situ가 아닌 ex-situ에서 실시하여 효율이 감소하였을 때의 추가조건을 검토하기 위해 실시되었다. 첫 번째 방법으로 지하수에 0.63 M fumarate와 토양 10 g을 주입하였고(MW5-Sam1, MW6-Sam1), 두 번째 방법으로 0.84 M fumarate를 첨가(MW5-Sam2, MW6-Sam2)하여 실험을 진행하였다. Fig.

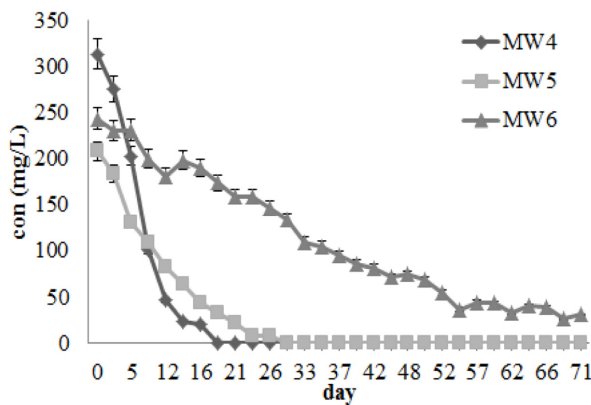


Fig. 5. Comparison of fumarate degradation in MW4, 5, 6.

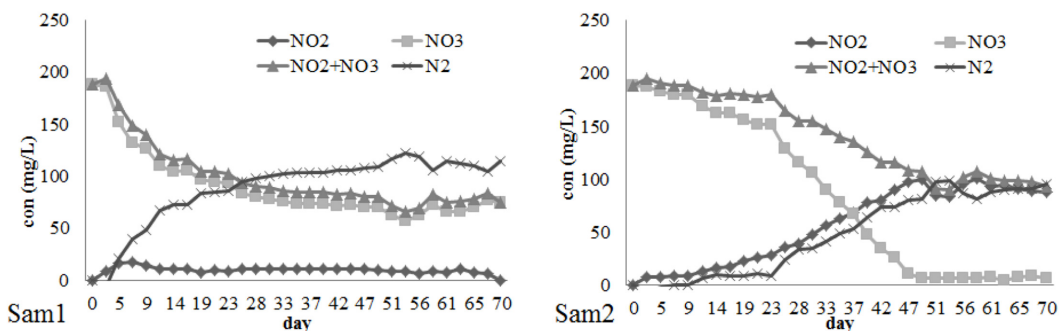


Fig. 6. Total mass balance of NO_3^- , NO_2^- , and Calculated- N_2 in MW5-Sam1 (0.63 M with soil) & Sam2 (0.84 M).

6, Fig. 7와 같이 0.63 M fumarate와 토양 10 g을 주입한 시료에서는 초기 농도와 상관없이 초반 저감 속도가 빠르게 진행되지만 이후 천천히 저감되어 일정 농도를 유지하는 패턴을 보인다. 0.84 M fumarate를 넣은 시료에서는 초반 저감속도가 천천히 진행되다가 20일을 기점으로 급격히 분해되어 완전 분해되는 양상을 보였다. 토양 10 g을 추가하여 미생물량을 증가시키는 것은 초기 분해율을 높이는데 도움이 되지만 미생물의 활성도를 증진시켜 질산성질소를 완전 분해하기 위해서는 토양첨가물을 통한 미생물군집 다양성을 높이는 것보다 탄소원인 fumarate를 추가 주입하는 것이 분해를 증가에 효과적인 것으로 확인되었다. 질산성질소는 0.63 M fumarate와 토양 10 g을 주입한 MW5-Sam1 시료에서 14 day까지 급격히 분해되었다가 이후 천천히 감소하여 평균 4.58 mg/L/day 분해율을 나타내었으며, 0.84 M fumarate를 넣은 MW5-Sam2 시료에서는 23 day까지 천천히 감소하다가 이후 급격히 분해되어 49 day까지 평균 3.86 mg/L/day의 속도로 완전 분해되었다. 또한, 0.63 M fumarate와 토양 10 g을 주입한 MW6-Sam1 시료에서는 19 day까지 급격히 분해되었다가 이후 천천히 감소하여 평균 7.82 mg/L/day 분해율을 나타내었으며, 0.84 M fumarate를 넣은 MW6-Sam2 시료에서는 33 day까지 천천히 감소하다가 이후 급격히 분해되어 53 day 동안 평균 5.15 mg/L/day의 속도로 완전 분해되었다(Fig. 8(L)). 0.63 M fumarate와 토양 10 g을 주입한 MW5-Sam1 시료와 MW6-Sam1 시료에서 아질산성질소가 발생하였으나, 질산성질소 농도가 감소하는 동안 아질산성질소의 농도는 증가하였다가 질산성질소가 거의 분해되면 아질산성질소 역시 감소하는 일반적 질산성질소 저감 패턴과는 다른 양상을 보인다. 이는 토양 중 존재하는 다양한 미생물 군집에 의한 복합된 영향이라고 사료된다. 0.84 M fumarate를 첨가한 MW5-Sam2 시료와 MW6-Sam2 시료에서는 일반적인 질산성질소 저감으로 인한 아

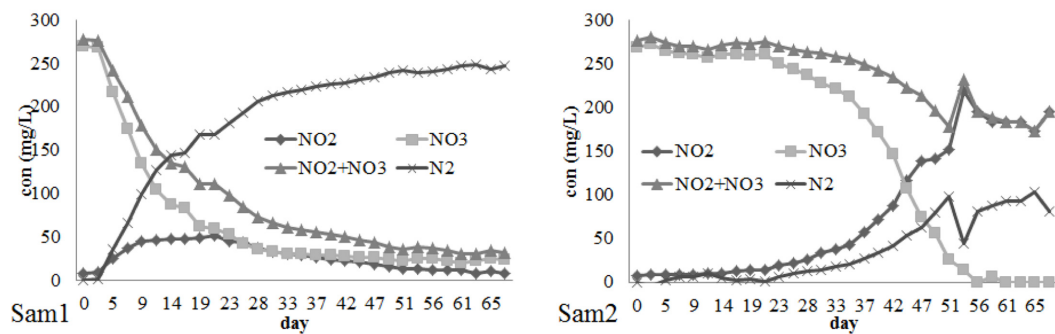


Fig. 7. Total mass balance of NO_3^- , NO_2^- , and Calculated- N_2 in MW6-Sam1 (0.63 M with soil) & Sam2 (0.84 M).

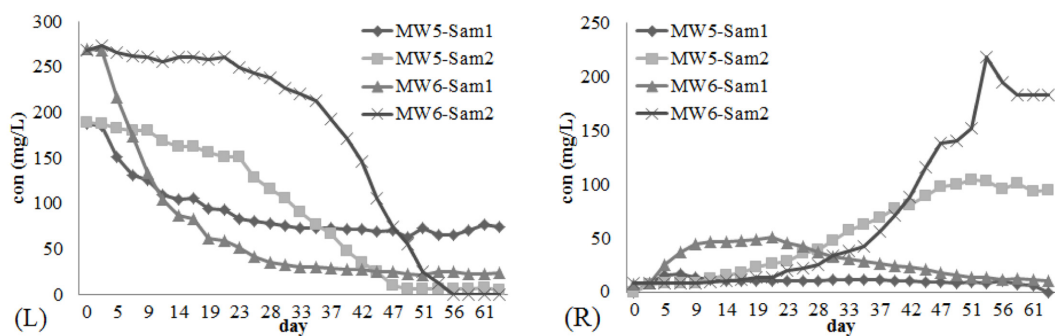


Fig. 8. Comparison of NO_3^- (L) and NO_2^- (R) concentration change in MW5-Sam1 (0.63 M) & Sam2 (0.84 M) and MW6-Sam1 (0.63 M) & Sam2 (0.84 M).

질산성질소 발생 패턴과 동일하였다(Fig. 8(R)). Fig. 9은 질산성질소 분해시 소비되는 탄소원(Fumarate)의 소모율을 나타낸 그래프로, MW5-Sam1 시료에서 14 day에서 완전 분해되었고, MW5-Sam2 시료에서는 47 day에서 완전 분해되었다. MW6-Sam1 시료에서는 25 day에서 완전 분해되었고, MW6-Sam2 시료에서는 70 day에서 완전 분해되었다. MW5-Sam1 시료와 MW6 sam1 시료에서 질산성질소가 분해 완료되기 이전에 fumarate가 완전 분해된 것은 토양 10 g을 주입하여 증가된 미생물량에 비해 탄소원이 부족했다고 판단된다.

3.4. 탈질물과 관련 기능성유전자의 상관관계 분석

지하수 중 탈질과 관련된 효소를 구성하는 기능성 유전자(nirK, nosZ, cd3aF)를 관련 primer를 이용하여 증폭한 후(Table 2), 생물학적 탈질반응을 확인하였다(Park, et al., 2014). 지하수 시료가 채취된 MW2, 3, 5관정 모두에서 nosZ 밴드를 확인할 수 있었다.

또한, RT-PCR을 이용해 관련 유전자와 탈질반응과의 상관관계를 분석하였다. 이를 위하여, MW2와 MW3에서 채취된 지하수에 질산염 1 M당 0.63 M Fumarate를 주입

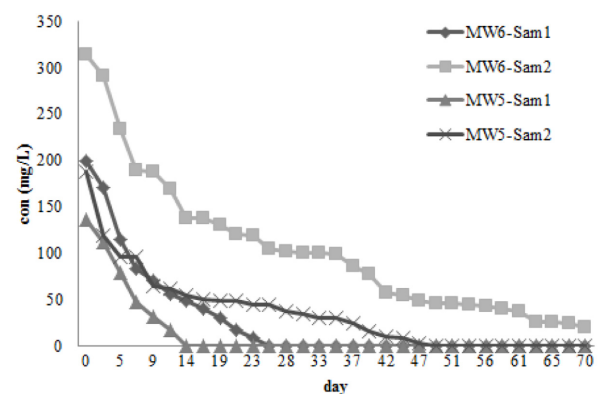


Fig. 9. Comparison of fumarate degradation in MW5-Sam1 (0.63 M) & Sam2 (0.84 M) and MW6-Sam1 (0.63 M) & Sam2 (0.84 M).

한 후, 실온에서 200 rpm으로 24시간 연속 교반하였다. MW2의 경우 $600 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ 가 20일 동안 급격히 분해되어, 약 26일 안에 완전 분해되었고 탈질 중간생성물인 아질산성질소는 질산염이 분해되어 감소하는 동안 증가하였다가 질소가스로 환원되면서 감소되었다(Fig. 10). MW3의 경우 200 mg/L 에서 8일까지 급격히 분해되어, 약 10일 안에 완전 분해되었다. 아질산성질소는 질산염이 급격

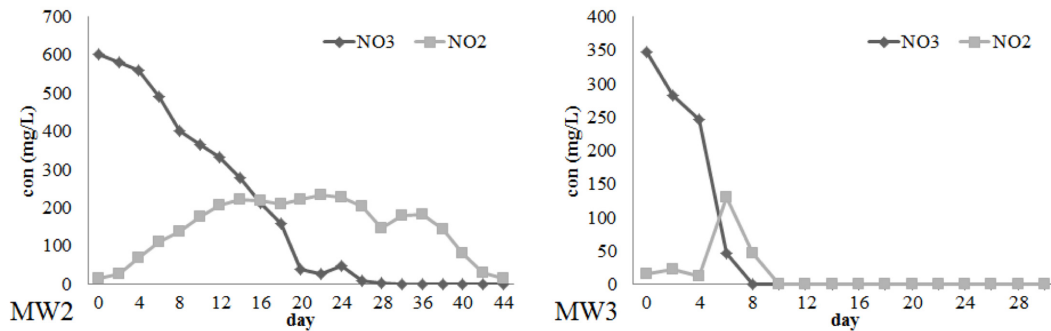


Fig. 10. Concentration change of NO_3 and NO_2 in MW2 & MW3.

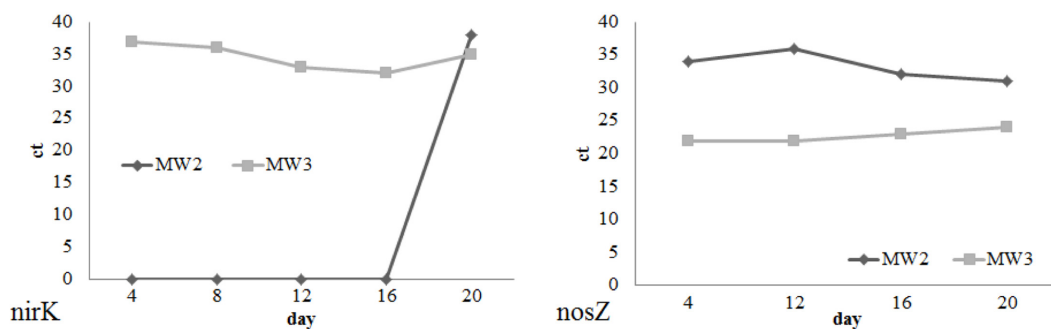


Fig. 11. Concentration change of nirK and nosZ in MW2 & MW3.

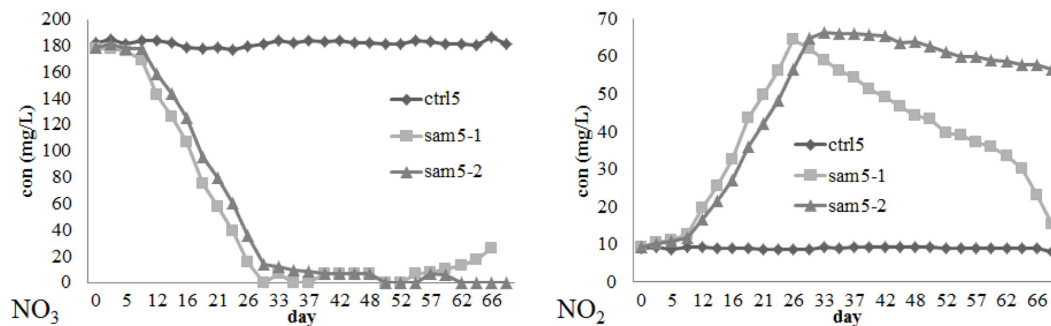


Fig. 12. NO_3 and NO_2 concentration variation in MW5.

히 감소되는 4일, 6일에 농도가 증가하였다가 감소한 것으로 보아 질소가스로 환원되었음을 유추 할 수 있다.

nirK, nosZ의 real-time PCR결과를 분석하면, ct 값이 작으면 관련유전자 양이 상대적으로 많다는 것을 의미한다. nirK는 MW2, 3관정 모두에서 검출되었고, MW3에서 상대적으로 지속적인 nirK가 검출되었다. nosZ 효소의 경우 MW3의 ct 값이 MW2의 시료보다 상대적으로 작은 것을 확인할 수 있었다. MW3 지하수 중 질산성질소 저감 속도가 MW2보다 빠른 것으로 나타나는데, 이는 유전자양과 관련된 것으로 사료된다(Fig. 11).

MW5관정 지하수를 이용한 실험에서도 동일한 양의

Fumarate를 주입한 후, 19°C로 일정한 온도 조건에서 fumarate를 주입하지 않은 대조군과 비교하였다. 대조군 시료에서는 질산성질소 농도가 일정하게 유지되고 있고, 탄소원이 주입된 두 반응조에서 질산성질소 저감속도는 비슷하게 나타났다(Fig. 12). 대조군 시료에서는 nirK가 모니터링 되지 않았고, 질산성질소 저감이 모니터링된 탄소원 주입 반응조에서는 비슷한 농도로 나타나는 것으로 확인되었다. nosZ 역시 대조군 시료보다 탄소원 주입 반응조의 ct 값이 낮게 나타나는 것으로 보아 관련 유전자양이 많은 것으로 예측된다(Fig. 13). 질산성질소가 저감되는 시료에서는 탈질과 관련된 유전자(nirK, nosZ)가 존재

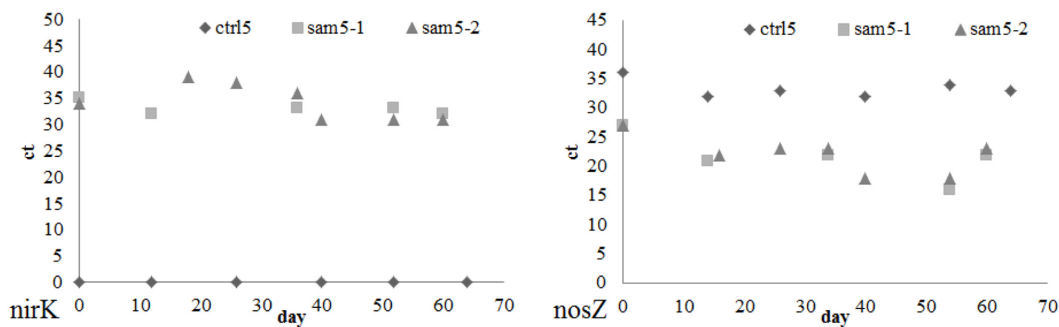


Fig. 13. Amount change of nirK and nosZ in MW5.

함을 확인하였다. 본 실험을 통해, 기능성유전자 분석을 이용해 지하수 중 탈질을 통한 질산성질소 저감 가능성을 현장실험 적용 전에 검증할 수 있다는 것이 확인되었다.

4. 결 론

농 · 축산지역 주변은 축사에서 배출되는 가축분뇨 및 경작지에서 사용되는 비료 등 잠재적인 오염원이 토양층을 통과하여 지하수로 유입되고, 유입된 질산성질소는 이동성이 매우커서 광범위한 오염을 야기하고 있다. 본 연구에서는 오염원 주변 고농도 질산성질소가 머물러 있는 hot-source zone 지하수를 대상으로 물리 · 화학적 방법 대신에 다량의 질산성질소를 저비용으로 제거할 수 있는 탈질화를 질산성질소 오염지하수 및 토양을 이용한 회분식 반응조 실험을 통하여 진행하였다. 그 결과는 아래와 같다.

1. 지하수 중에서 고농도 질산성질소가 검출된 지점의 토양층에서도 고농도 암모니아성질소 및 질산성질소가 검출되었다. 즉, 오염지하수 주변에 축산분뇨 등 잠재오염원으로 부터 유출된 암모니아성질소가 토양층에 흡착되고, 유입된 지하수 혹은 강우에 의해 토양층 암모니아성질소가 산화되어 지속적으로 질산성질소를 배출하는 것으로 사료된다.

2. 오염지하수 채취시료에 대한 최적조건의 배치실험에서 관측공별 질산성질소 평균분해속도는 MW4 시료에서 10일 동안 25 mg/L/day, MW5 시료에서 25일 동안 6.2 mg/L/day, MW6 시료에서는 55일 동안 3.4 mg/L/day로 나타났다. 즉, 동일한 지점에 설치된 관측정 간격이 1m이 내일 지라도 관측정 위치에 따라 탈질화율은 다른 것으로 확인되었다. 이러한 결과는, 일반적으로 원위치 생물학적 정화를 위해서 사용되는 주입-추출기술(Push-pull test) 적용시 사전 실내실험을 통해 높은 효율의 관측정 위치를 확인하는 것이 필요함을 나타낸다. 관측정별 탈질율은 상

이하였으나, 주입된 탄소원 비율(0.63 M fumarate/1 M NO_3^- , 이론적비율의 1.5배) 질산성질소를 제거하기에 충분함을 확인하였다.

3. 또한, 지하수 중 질산성질소 저감율을 향상하기 위해서는 fumarate의 주입 농도가 토양주입을 통한 미생물군집 다양성 및 미생물 양을 증가하는 것 보다 중요함을 확인할 수 있었다. 탈질과정에서 아질산성질소를 질소로 환원시키는 효소를 구성하는 유전자(nosZ)를 현장시료 MW2부터 MW6까지 모두 확인할 수 있었다. 또한 real-time PCR을 이용하여 탄소원을 주입 여부에 따른 nosZ를 상대적으로 정량한 결과 탄소원을 주입한 경우 활성이 보다 크게 나타남을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 국립환경과학원 “토양 · 지하수 중 오염물질 모니터링 및 자연저감 연구” 사업의 일환으로 수행되었습니다.

References

- Bannert, A., Kleinedam, K., Wissing, I., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G., and Schlöter, M., 2011, Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods, *App. Environ. Microbiol.*, **77**(17), 6109-6116.
- Braker, Gesche, Andreas Fesefeldt, and Karl-Paul Witzel., 1998, Development of PCR primer systems for amplification of nitrate reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples, *App. Environ. Microbiol.*, **64**(10), 3769-3775.

- Fonseca, A.D., Crespo, J.G., Almeida, J.S., and Reis M.A., 2000, Drinking water denitrification using a novel ion-exchange membrane bioreactor, *Environ. Sci. Technol.*, **34**(8), 1557-1562.
- Health Canada, 2013, Nitrate and nitrite in drinking water.
- Israel, S., Rsenov, A., Tredoux, G., and Jovanovic, N., 2011, In situ nitrate removal from groundwater using freely available carbon material at an industrially polluted site.
- ITRC, 2000, Emerging Technologies for Enhanced In Situ Biotenitrification (EISBD) of Nitrate-Contaminated Ground Water.
- Khan, I. A. and Spalding, R.F., 2004, Enhanced in situ denitrification for a municipal well, *Water Research*, **38**, 3382-3388.
- Kim, Y., Kim, J.H., Son, B.H., and Oa, S.W., 2005, A single well push-pull test method for in situ determination of denitrification rates in a nitrate contaminated groundwater aquifer, *Water Sci. Technol.*, **52**(8), 77-86.
- Michael H. Gerardi, 2002, Nitrification and denitrification in the activated sludge process, Wiley-interscience, John Wiley and Sons Inc., New York.
- Michotey, V., Mejean, V., and Bonin, P., 2000, Comparison of methods of quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine samples, *App. Environ. Microbiol.*, **66**(4), 1564-1571.
- NIER, 2013a, research on the actual pollution of livestock area background concentration.
- NIER, 2013b, Monitoring contamination sources and evaluating Bio-stimulated natural degradation of nitrate in soil and groundwater.
- NIER, 2014, Case study of groundwater management for drinking in highly contaminated area.
- Park, S.H., Kim, H.G., Kim, S.H., Lee, M.K., Lee, G.M., Kim, Y., Kim, M.S., and Kim, T.S., 2014, Evaluation of natural attenuation by addition of fumarate as carbon source and gene analysis in groundwater sample, *J. Soil Groundw. Environ.*, **19**(4), 62-69.
- Rittmann, Bruce E., and Perry L., 2001, McCarty. Environmental biotechnology: principles and applications, Tata McGraw-Hill Education.
- US Geological Survey, 2008, <http://www.usgs.gov>
- Yun, S.T., Kim, K.H., Chak, G., Choi, B. Y., Kim, S. O., Kim, K. J., Kim, H. S., Lee, H. S., and Lee, C. W., 2002, Nitrate contamination of alluvial groundwaters in the keum river watershed area: source and behaviors of nitrate, and suggestion to secure water supply, *12*(4), 471-484.