

## 지하수 중 탄소원으로 fumarate 주입과 유전자분석을 통한 질산성질소 자연저감도 평가

박선화<sup>1</sup> · 김현구<sup>1</sup> · 김소현<sup>1</sup> · 이민경<sup>1</sup> · 이경미<sup>1</sup> · 김 영<sup>2</sup> · 김문수<sup>1</sup> · 김태승<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립환경과학원

<sup>2</sup>고려대학교 대학원 환경공학과

## Evaluation of Natural Attenuation by Addition of Fumarate as Carbon Source and Gene Analysis in Groundwater Sample

Sunhwa Park<sup>1</sup> · Hyun-Gu Kim<sup>1</sup> · Sohyun Kim<sup>1</sup> · Min-Kyeong Lee<sup>1</sup>  
Gyeong-Mi Lee<sup>1</sup> · Young Kim<sup>2</sup> · Moon-Su Kim<sup>1</sup> · Taeseung Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Environmental Research

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Korea University

### ABSTRACT

In the results of monitoring nitrate concentration in more than 8,000 groundwater wells around agro-livestock, the average and maximum nitrate concentration was 9.4 mg/L and 101.2 mg/L, respectively. Since about 31% of the monitoring wells was exceed the quality standard for drinking water, nitrate control such as remediation or source regulation is required to conserve safe-groundwater in South Korea. Typical nitrate-treatment technologies include ion exchange, reverse osmosis, and biological denitrification. Among the treatment methods, biological denitrification by indigenous microorganism has environmental and economic advantages for the complete elimination of nitrate because of lower operating costs compared to other methods. Major mechanism of the process is microbial reduction of nitrate to nitrite and nitrogen gas. Three functional genes (*nosZ*, *nirK*, *nirS*) that encode for the enzyme involved in the pathway. In this work, we tried to develop simple process to determine possibility of natural denitrification reaction by monitoring the functional gene. For the work, the functional genes in nitrate-contaminated groundwater were monitored by using PCR with specific target primers. In the result, functional genes (*nosZ* and *nirK*) encoding denitrification enzymes were detected in the groundwater samples. This method can help to determine the possibility of natural-nitrate degradation in target groundwater wells without multiplex experimental process. In addition, for field-remediation application we selected nitrate-contaminated site where 200~600 mg/L of nitrate is continuously detected. To determine the possibility of nitrate-degradation by stimulated-natural attenuation, groundwater was sampled in two different wells of the site and nitrate concentration of the samples was 300 mg/L and 616 mg/L, respectively. Fumarate for different C/N ratio was added into microcosm bottles containing the groundwater to examine denitrification rate depending on carbon concentration. In the result, once 1.5 times more than amount of fumarate stoichiometry required was added, the 616 mg/L of nitrate and 300 mg/L of nitrate were completely degraded in 8 days and 30 days. The nitrite, byproduct of denitrification process, was also completely degraded during the experimental period.

**Key words :** Biological denitrification, Stimulated-natural attenuation, Fumarate, Functional genes (*nosZ*, *nirK*, *nirS*)

### 1. 서 론

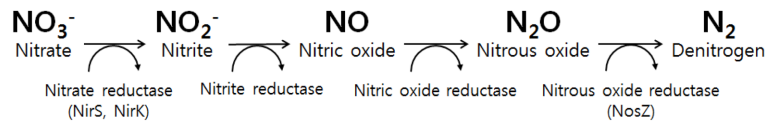
환경부(NIER, 2011)는 구제역 및 AI 등 가축전염병 발병으로 인해 전국적으로 매몰지가 약 4,000개소 이상

발생되어 가축 매몰지 주변 300 m 이내 이용 중인 지하수 관정을 대상으로 일반항목 수질조사를 실시한 바 있다. 그 결과, 1/4분기 가축 매몰지 주변 지하수 관정의 수질 기준 초과율은 25%로 보고되었으며, 2/4분기 수질기준 초

\*Corresponding author : tskim99@korea.kr

Received : 2014. 5. 29 Reviewed : 2014. 8. 1 Accepted : 2014. 8. 13

Discussion until : 2014. 10. 31



**Fig. 1.** Denitrification process by Nitrate reductase, Nitrite reductase, Nitric oxide reductase, and Nitrous oxide reductase (Bannert et al., 2011; Michotey et al., 2000; Braker et al., 1998).

과율은 31.8%로 보고되었다(NIER, 2011). 축사 밀집지역에서 나타나는 토양오염과 지하수 수질특성을 해석하기 위해 제주도의 한림지역에서의 수행된 연구를 살펴보면(Hyeon, 2011), 지하수에 영향을 미칠 수 있는 질소부하량은 축산계에서 258 ton-N/yr로 지하수 오염원은 가축분뇨에서 가장 많이 기인하는 것으로 예측되었다. 또한, 심도별 지하수의 수리지구화학적 특성은  $\text{SO}_4$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  농도가 천부지하수로 갈수록 높게 나타나 지표의 영향을 받는 것으로 추정되었다. 음용수에서 고농도의 질산성질소는 청색증, 암유발 등 인간 건강에 매우 위협적이다(Ginocchio, 1984). USEPA는 질산성질소와 아질산성질소의 최대허용농도(MCLs)를 10 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , 1.0 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ 로 정하고 있으며, 우리나라의 음용수 기준은 질산성질소만 10 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ 로 규정하고 있다. 질산성질소는 농경지, 산업 활동 및 점원, 비점 오염원으로부터 지하수에 침투되어 생물학적 분해 및 흡착 등의 물리화학적 반응에 의한 제거 없이 오랜 기간에 걸쳐 대수층에 머물러 있게 되어 지하수내 오염도는 시간이 경과함에 따라 심화되고 있다. 질산성질소 처리공정은 주로 생물학적 탈질소화(denitrification)와 물리화학적 방법(ion-exchange)처리 형태를 이루고 있는데 ion exchange 공정은 대체로 처리효율이 높기는 하나 대량의 지하수를 처리하기에는 비용이 많이 드는 것으로 알려져 있다(Fonseca et al., 2000). 반면에 미생물을 이용한 생물학적 탈질소화 공정은 비용이 상대적으로 저렴한 것으로 보고하고 있다(Rittmann et al., 2012). 탈질화방법은 토착미생물에 의한 생물학적 탈질소화 모니터링 방법인 자연저감(MNA, monitored natural attenuation)방법과 자연저감 미생물에 적절한 전자공여체 주입을 통해 질산성질소의 분해율을 증가시키는 방법인 적극적 자연저감(SNA, stimulated natural attenua-

tion)이 있다. 탈질산화반응(denitrification)은  $\text{NO}_3$ 가  $\text{N}_2$ 가스로 최종적으로 환원되는 반응이다(Fig. 1). 이때에, 중간생성물로  $\text{NO}_2$ (Nitrite),  $\text{NO}$ (Nitric oxide),  $\text{N}_2\text{O}$ (Nitrous oxide)가 있으며, 각 스텝에 관여되는 효소로는 nitrate reductase, nitrite reductase(*nirS*, *nirK*), nitric oxide reductase, nitrous oxide reductase(*nosZ*) 등이 있다. 특히, nitrite reductase는 탈질산화반응의 가장 핵심적인 효소이며, 탈질산화 미생물은 cytochrome cd1(*nirS*)과 copper nitrite(*nirK*)를 포함한다. 또한, 탈질산화미생물은  $\text{NO}_2$  reductase의 catalytic subunit을 구성하는 *nosZ*를 포함한다(Bannert et al., 2011; Michotey et al., 2000; Braker et al., 1998).

본 연구에서는, 고농도 질산성질소로 오염된 국내 지하수 중에서의 탈질산화작용에 의한 자연저감 가능성 및 저감율을 평가하고자 하였다. 이를 위하여, 우선적으로 탈질산화 반응에 관여하는 효소를 구성하고 있는 기능성유전자(*nirK*, *nirS*, *nosZ*)를 분석하기 위한 기법을 확립한 후, 축산단지 주변 지하수 중에 고농도 질산성질소로 오염된 지역을 대상으로 지하수 중에 관련효소를 분석하여 자연저감 가능성을 평가하였다. 또한, 탈질산화 관련 기능성유전자가 존재하는 지하수를 대상으로 혐기성반응조를 제작한 후 질산성질소 자연저감을 및 탄소원 주입 후에 적극적 자연저감을 비교분석하였다.

## 2. 실험방법 및 재료

### 2.1. 현장항목측정 및 지하수 시료채취

지하수 시료는 채취 전 현장수질측정 항목(EC, pH 등)의 측정값이 안정될 때까지 지하수를 퍼징하였다. 현장수질측정값의 안정화 여부는 미국 지질조사소(USGS)의 자료를 기준으로 판단하였다(Table 1). 시료 채취 중 교란이

**Table 1.** Stabilization criteria for recording direct field measurements (USGS, 2008)

Content	Stabilization criteria
Electric Conductivity (EC)	· Conductivity $\leq 100 \mu\text{S/cm}$ , within 5 percent of full scale · Conductivity $> 100 \mu\text{S/cm}$ , within 3 percent of full scale
Temperature	· Within $\pm 0.2^\circ\text{C}$ of the thermistor thermometer
Hydrogen-ion concentration (pH)	· Within $\pm 0.1$ to $0.2$ pH unit
Dissolved Oxygen (DO)	· Within $\pm 0.2 \text{ mg/L}$ ( $\pm 0.3 \text{ mg/L}$ for continuous monitor)

나 기포가 발생하지 않도록 양수량을 조절하였으며, 대기 접촉으로 인한 시료의 변질을 방지하기 위해 채수병(무균 채수병 또는 멸균병) 상부의 빈 공간(headspace)이 발생하지 않도록 주의하여 시료를 채취하였다. 시료의 운반 및 보관은 냉장상태(0~4°C)를 유지하여 변질을 방지하였으며, 오염도가 높을 것으로 예상되는 시료는 별도로 분류하여 보관, 운반하였다.

## 2.2. 회분식반응조 제작 및 구성

질산성질소 저감을 시험을 위하여 162 mL 멸균병(Wheaton, Ringoes, NJ, USA)을 150°C에서 20분 동안 고압 · 멸균한 후 사용하였다. 고농도 질산성질소로 오염된 지하수시료 100 mL와 탄소원(fumarate)을 주입하여 반응조를 구성하였다. 대조군(Control)에 대한 질산성질소 자연저감을 비교평가하기 위해, 일부 지하수 시료는 고온·고압(150°C, 2기압)에서 20분간 처리하였다. Fumarate는 이론적 반응비의 1.5~2.6배인, 0.63~1.08 M fumarate/1 M NO<sub>3</sub>-N을 적용하여 첨가한 후 고무마개와 알루미늄캡을 이용하여 밀봉하였다. 탄소원외에 다른 영양성분은 첨가하지 않았다. 밀봉된 멸균병은 20°C, 200 rpm으로 운전되는 교반기에서 배양되었으며, 일정 시간간격으로 질산성질소 및 주입 탄소원(fumarate)의 변화를 측정하기 위해서 10 mL의 액체시료를 0.45 µm PES membrane 필터를 통과하여 여과한 후 -20°C에서 분석 시까지 냉동 보관하였다. 또한, DNA추출을 위해서는 15 mL의 액체시료를 여과 없이 -20°C에서 분석 전까지 보관하였다.

## 2.3. 이온 크로마토그래피를 이용한 양 · 음이온 분석

음이온(NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>)은 이온크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 이온크로마토그래피 측정용 시료는 매일 10 mL 씩 채취하여 0.45 µm PES membrane 필터로 걸러낸 후, CH/850 Professional IC(Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용하여 분석하였다. 이때, 컬럼은 Metrosep C4, 150/4.0(Metrohm, Herisau, Switzerland)과 Metrosep A supp 5, 150/4.0(Metrohm)을 사용하였으며, 이동상은 0.1 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다.

## 2.4. 액체 크로마토그래피를 이용한 fumarate 분석

탄소원으로 주입된 fumarate분석을 위하여, 0.45 µm PES membrane filter로 여과한 지하수시료 중 20 µL를 UV/VIS detector가 장착된 Shimadzu HPLC system(LC-30AC pump, SIL-30AC autosampler)를 사용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 High performance LC-GMBH

(Repro-Gel H<sup>+</sup>, 9 µm, 250 mm\*8 mm)이었으며, 이동상은 9 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. 이동상의 유량은 1 mL/min으로 유지하고 210 nm 파장에서 측정하였다.

## 2.5. DNA추출

냉동된 시료를 해동하여 멸균된 원심분리기 튜브로 옮긴 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 후 조심스럽게 상등액이 제거된 cell pellet은 DNeasy Tissue Kit(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA를 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.

## 2.6. PCR 및 염기서열 분석

Genomic DNA를 추출한 후 유전자 증폭기기(MyGenie TM 32 Thermal Block, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 탈질산화 반응에 관여하는 효소를 구성하고 있는 기능성유전자(*nirK*, *nirS*, *nosZ*)를 증폭하기 위해 사용한 primer의 염기서열, PCR산물의 증폭크기 및 PCR조건은 Table 2과 같다. PCR반응을 수행한 후, agarose gel 전기영동을 수행하였다. 최종 염기서열을 확인하기 위해, agarose gel로부터 회수된 PCR산물을 pGEM-T vector에 ligation 한 후 *E. coli* JM109에 형질전환 하였다. 형질전환된 clone을 선별한 후 T7 promotor primer나 SP6 promotor primer를 이용하여 DNA sequencing을 수행하였다. DNA sequencing은 ABI 3100 자동염기서열 분석기를 이용하였다. 자세한 방법은 Maniatis방법(Kahng et al., 2002)에 따라 수행하였다. 밝혀진 염기서열의 분석은 Laser gene program(DNA STAR, Inc., Madison, WI, USA)과 GenBank의 blast search의 database를 이용하였다.

# 3. 연구결과 및 토의

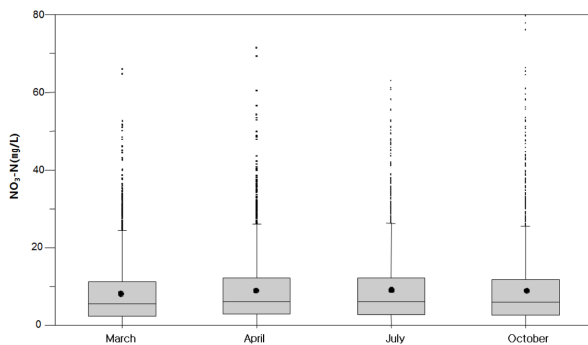
## 3.1. 지하수 중 질산성질소 농도

지하수 중 질산성질소 농도 현황 파악을 위해 농 · 축산지역 주변 지하수 관정약 2,500개를 분기별(총 8,000개

**Table 2.** Primer sequences for nirK, nirS, nosZ and PCR condition

Primer	Primer sequence	Size (bp)	Thermal profile	References
nirK876	ATYGGCGGBAYGGCGA	160	95°C, 10 min	(Henry, et al., 2004)
nirK5R	GCTCGATCAGRTTTRTGG		95°C, 15 sec 58°C, 30 sec 72°C, 30 sec	(Baker, et al., 1998)
cd3aF	GTNAAYGTNAARGARACNGG		95°C, 10 min	(Michotey et al., 2000)
R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	500	95°C, 30 sec 57°C, 45 sec 72°C, 45 sec	(Throback et al., 2004)
nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSST	259	95°C 10 min	(Baker, et al., 1998)
nosZ2R	CAKRTGCAKSGCARTGGCAGAA		95°C, 15 sec 60°C, 15 sec 72°C, 30 sec	

M = AC, Y = CT, S = CG, R = AG, K = GT, V = ACG

**Fig. 2.** Seasonal variations in the nitrate concentration of groundwater at selected monitoring wells.

관정)로 조사하여, 질산성질소의 경시적 변화를 모니터링 하였다(Fig. 2). 1월~3월 조사결과, 질산성질소 검출농도는 불검출~66.0 mg/L의 범위로 중앙값은 5.6 mg/L이며, 평균값은 8.2 mg/L이었다. 4월~6월 조사결과, 질산성질소 농도는 불검출~84.6 mg/L의 범위로 중앙값은 6.2 mg/L이며, 평균값은 9.0 mg/L이었다. 7월~9월 조사결과, 질산성질소 농도는 불검출~97.1 mg/L의 범위로 중앙값은 6.1 mg/L이며, 평균값은 9.1 mg/L이었다. 10월~12월 조사결과, 질산성질소 농도는 불검출~80.3 mg/L의 범위로 중앙값은 6.0 mg/L이며, 평균값은 8.9 mg/L이었다. 계절별 평균 강수량은 각각 38.2, 171.2, 281.2, 57.2 mm로 관측되었다(Meteorological Yearbook, 2011).

질산성질소는 월별 혹은 계절별 큰 변화 없이 평균 8.2~9.1 mg/L로 모니터링 되었다. 국내 축산지역 지하수 중 질산성질소 검출농도는 8.4~13.1 mg/L로 본 조사결과와 유사하였으며, 오염된 지하수의 원인은 대부분 축산분뇨에 의한 것으로 확인되었다(Hyun et al., 1994).

### 3.2. 회분식반응조

1 M NO<sub>3</sub>-N을 제거하기 위해 탄소원으로서 fumarate, formate, ethanol의 화학량론적 필요 탄소원 1 M당 0.42 M fumarate, 2.5 M formate, 0.42 M ethanol을 주입하여 비교 분석해본 기존 연구결과, 0.40, 0.14, 0.01 mM NO<sub>3</sub>/day의 분해효율을 각각 도출할 수 있었다(Kim and Kim, 2006). 본 연구에서는, 효율이 가장 높은 것으로 확인된 fumarate를 지하수 중 질산성질소 제거를 위한 탄소원으로 선정하였다.

탄소원 농도에 따른 질산성질소 저감율을 도출하기 위해 fumarate 0.92 M fumarate/1 M NO<sub>3</sub>-N(화학량론적 필요량의 2.0배)과 1.08 M fumarate/1 M NO<sub>3</sub>-N(화학량론적 필요량의 2.6배)를 적용하였고, 시료는 탈질산화 효소(nirK, nirS, nosZ) 분석을 통해 분해효소가 존재하는 지하수를 선정하여 질산성질소 저감시험을 진행하였다. 대조군 지하수와 fumarate 0.92 M fumarate/1 M NO<sub>3</sub>-N(화학량론적 필요량의 2.0배)을 주입한 각각의 반응조에서는 지하수 중 질산성질소 초기 농도값(114~120 mg/L)이 15일 이후 10.7%, 14.7% 감소하였다. 10일 이상 지속되는 반응기간 동안 질산성질소 농도는 추가적인 분해 없이 일정하게 유지되었다. 반면에, 1.08 M fumarate/1 M NO<sub>3</sub>-N를 주입한 반응조에서 초기 질산성질소 농도는 9일 이후 분해하기 시작하였으며, 26일 동안 지속적으로 감소되어 평균 1.13 mg/L/day의 분해율을 보였다(Fig. 3). 이러한 현상은, 동일한 지하수시료에 탄소원 농도를 높여 주었을 때 질산성질소 제거효율이 향상될 수 있음을 나타낸다.

혐기성 반응조에서 fumarate 분해율을 모니터링한 결과(Fig. 4), 열처리된 대조군 반응조(fumarate 0.92 M

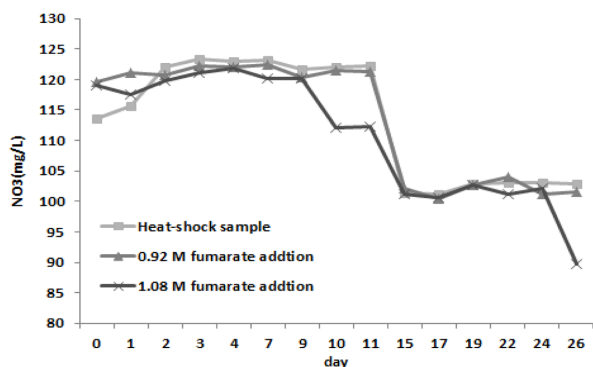


Fig. 3. Nitrate degradation in groundwater by addition of 0.92 M, 1.08 M fumarate for 26 days.

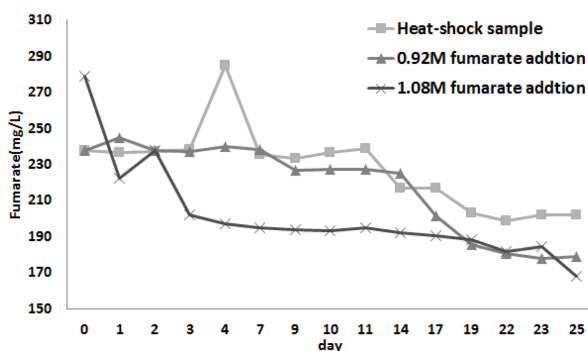


Fig. 4. Fumarate degradation in groundwater by addition of 0.92 M, 1.08 M fumarate for 26 days.

fumarate/1 M  $\text{NO}_3\text{-N}$  주입)와 0.92 M/1 M  $\text{NO}_3\text{-N}$  및 1.08 M/1 M  $\text{NO}_3\text{-N}$  fumarate가 주입된 반응조에서 fumarate 평균 분해율은 각각 1.41, 2.36, 4.45 mg/L/day였다. 대조군 반응조(0.92 M 탄소원 주입)와 0.92 M 탄소원을 주입

한 반응조는 유사하게 낮은 초기분해율을 나타냈으나, 14 일을 기점으로 열처리되지 않은 반응조는 탄소원 분해가 높게 나타났다. 열처리에 의해 영향을 받은 탈질산화 미생물은 탄소원 분해 및 탈질산화반응에서 저해를 보였지만, 완전히 활성을 잃지 않은 것을 확인할 수 있었다. 1.08 M/1 M  $\text{NO}_3\text{-N}$  fumarate를 주입한 반응조는 fumarate의 농도가 하루 안에 급속히 감소하였으며, 26일 동안 지속적으로 탄소원을 분해하며 전자공여체로서 수소를 공급한 것으로 보인다. 본 실험에서는, 모든 반응조에서 초기 질산성질소가 100% 분해되지 않았는데, 이는 사용된 현장 지하수의 탈질산화 분해 효소활성이 비교적 낮은 것으로 사료되며, 탈질산화 분해 효소 활성이 질산성 질소 분해율에 영향을 미칠 것으로 예상 할 수 있었다.

### 3.3. 현장부지 지하수 중 탈질산화 효율평가

고농도 질산성질소(300~600 mg  $\text{NO}_3\text{/L}$ )로 오염된 지역의 두 개의 지하수관정으로부터 시료를 채취하여, 혐기성 반응조를 제작하였다. 이때 실험에 사용된 지하수의 화학적 특성은 Table 3에 나타낸바와 같다. 앞에서 진행된 회분식반응조에 사용된 탄소원농도보다 적은 1 M 질산성질소당 0.63 M fumarate(화학량론적 필요량의 1.5배)를 탄소원으로 주입하였다. 제작된 반응조에서 질산성질소 및 아질산성질소 변화를 모니터링하여 질산성질소 분해율과 중간생성물인 아질산성질소 생성을 및 분해율을 평가하였다. Fig. 5에 나타난 것과 같이, 지하수 중 600 mg  $\text{NO}_3\text{/L}$ 의 초기 질산성질소농도는 20일까지 평균 28.2 mg/L/day로 급격하게 분해되어 26일 100% 분해되었다. 300 mg  $\text{NO}_3\text{/L}$ 가 모니터링된 지하수 시료에서는 초기농도가 8일까지

Table 3. Chemical characteristic of groundwater

	EC ( $\mu\text{S/cm}$ )	DO (mg/L)	pH	$\text{NH}_4$ (mg/L)	$\text{NO}_3$ (mg/L)
Numerical range	1061~1480	2.17~5.57	5.6~6.5	0~6	213.7~511.1

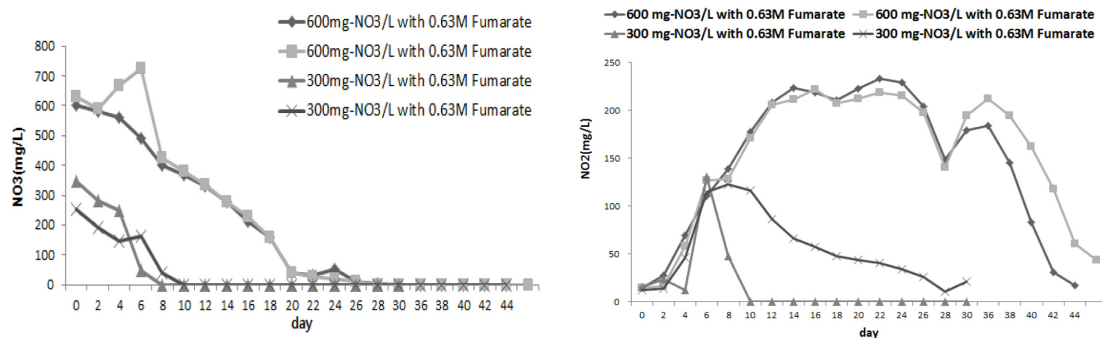


Fig. 5. Monitoring nitrate and nitrite changes in groundwater contaminated with 300~600 mg  $\text{NO}_3\text{/L}$ .



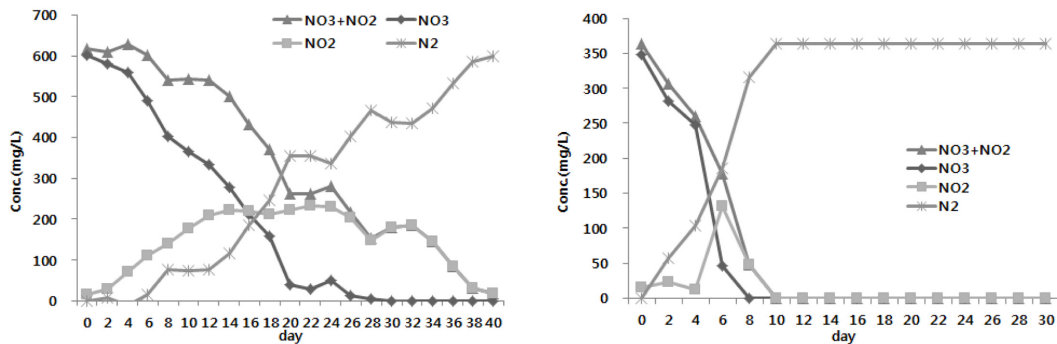


Fig. 6. Total mass balance of  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ , and  $\text{N}_2$  in denitrification.

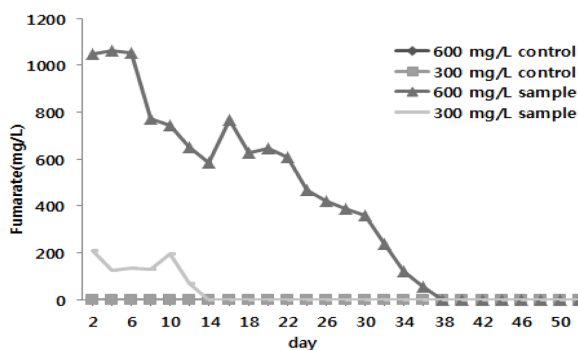


Fig. 7. Monitoring fumarate degradation in groundwater contaminated with 300–600 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$ .

평균 34.8 mg/L/day로 급격히 분해되어 10일안에 100% 분해되었다. 특히 실험기간 동안 중간생성물인 아질산성 질소를 모니터링한 결과, 600 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$  시료에서 아질산성 질소는 질산성질소가 분해되는 동안 꾸준히 축적되었다가, 질산성질소 분해율이 감소하는 시기를 기점으로 아질산성질소가 저감되기 시작하여 44일 정도에는 90% 이상 분해된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 300 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$  시료는 아질산성질소 축적 없이 10일안에 100% 분해된 것을 확인할 수 있었다. 앞에서 진행된 회분식반응조 결과와 비교하여, 현장지하수는 25배 이상 높은 질산성질소 분해율이 확인되었다. 이는, 상대적으로 적은 화학량적인 탄소원을 주입할지라도, 지하수 관정의 질산성질소 오염 정도(농도 및 기간) 및 탈질산화 분해 미생물의 활성도 등에 따라 질산성질소 분해기간 및 분해율은 상이한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 고농도로 오염된 지하수는 탈질산화미생물 활성도가 매우 높기 때문에, 지하수 중에 300–600 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$ 는 충분히 자연미생물에 의한 탈질산화를 통해 중간생성물인 아질산성질소의 축적 없이 제거될 수 있음을 최종 확인하였다.

Fig. 6은 질산성질소가 완전 분해되어 아질산성질소로

전환된 후 질소가스로 완전 제거된다고 가정한 그래프이며, 초기 전체농도는 초기 아질산성질소 농도에 초기 질산성질소 농도를 더한 값으로 설정하였다. 두 지하수시료 모두에서 질산성질소가 감소하는 동안에는 아질산성질소가 증가하였으며, 질산성질소가 거의 분해되면 아질산성질소 역시 감소하는 양상이 나타났다. 질산성질소 분해율은 두 시료 모두 초기농도와 관계없이 동일한 비율의 fumarate를 주입하였을 때 20 mg/L/day로 유사하였으며, 단지 완전분해까지 걸리는 시간만 상이하였다. 분해율 증가를 통한 분해시간 단축은 탄소원 증가 또는 현장 환경(토착탈질산화미생물 분포 등)에 따라 다를 것으로 판단된다.

Fig. 7에 나타낸 것과 같이, fumarate는 600 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$  시료에서 26.3 mg/L/day의 속도로 38일 동안, 300 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$  시료에서 16.7 mg/L/day의 속도로 12일 동안 완전 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 두 시료에서 아질산성질소가 분해 완료되는 시기인 38일, 10일과 거의 일치하였다. 즉, fumarate는 질산성질소를 분해하는데 수소공급원으로 작용할 뿐만 아니라 아질산성질소를 분해하는데도 수소공급원으로 원활히 사용된 것으로 보인다. 또한, 아질산성질소와 fumarate가 저감 완료되는 시기가 일치하는 것으로 보아, 적용된 탄소원 비율(0.63 M fumarate/1 M  $\text{NO}_3\text{-N}$ )이 적절했다고 판단된다.

### 3.4. 탈질산화관련 효소분석결과

본 연구에서는, 질산성질소로 오염된 국내지하수 중 탈질산화관련 효소를 구성하는 대표적인 기능성 유전자(functional gene)분석을 통해 탈질산화 기능성을 평가하고자 하였다. 이를 위해, 73.9–293.2 mg/L 농도의 질산성질소로 오염된 지하수 3개 시료에서 추출된 genomic DNA에서 *nirK*, *nirS* 및 *nosZ*를 증폭할 수 있는 primer (Table 2)를 이용하여 PCR을 한 후 전기영동으로 최종

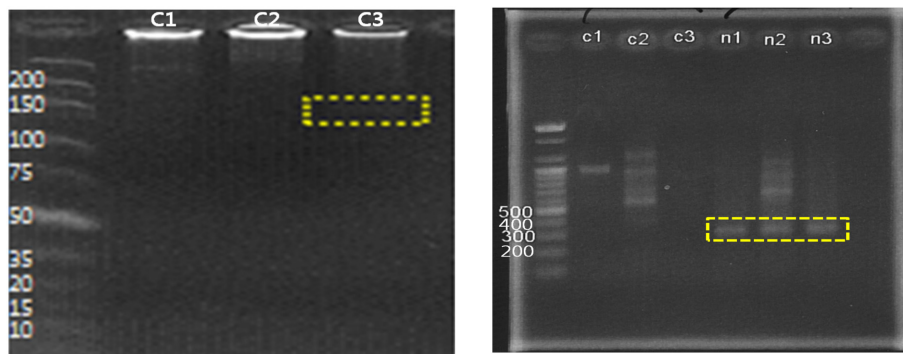


Fig. 8. Confirmation of *nirK* (L) and *nosZ* (R) in nitrate-contaminated groundwater samples by PCR and electrophoresis.

Table 4. Similarity of sequenced genes with *nirK* and *nosZ*

Size (bp)	Definition	Analyzed Sequence	Identify (%)
139	Uncultured bacterium clone MW00012 nitrate reductase ( <i>nirK</i> ) gene, partial cds	TGACCTTAGGGCAAGTCAGCACCGCGCCGAGACCGGGCTCGAGACCTGG TTCATCCGCGGCGGATCGGCGGGAGCGGCGATGTACACGTTCTGGAGC- CCGGCATCTATGCCTACGTACCCACAACCTGATCGAGGC	93
246	Uncultured <i>Azospirillum</i> sp. clone <i>nosZ</i> 3-52 <i>nosZ</i> gene, partial cds	TCGTTTTTGTTTTACAATTGTAAGTCTGCTTCACGTGCCGGTCTCGCGATCAGG TCGGCGACGAGGTACGCTGACCTTGACCAACCACGACAAGGTGGAA- GACTTGACCCACGGTTGCGCCATTCCGACGTTCAACATCAACTTCATCGT- CAACCCGCAGGAAACCAGGTTCGGTTCACGTTCAAGGCCGATCGTCTGGCGC CTACTGGATCTACTGCACCCACTTCTGCCACGCGCTGCACCTGAA	89

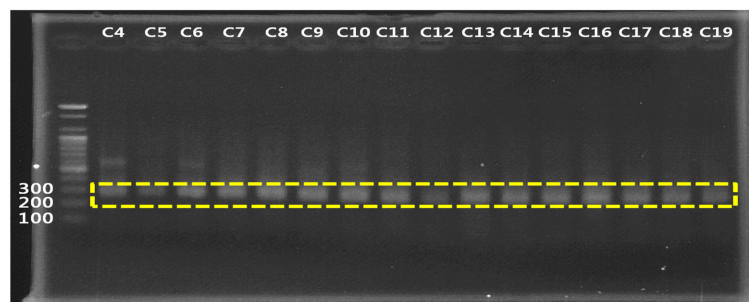


Fig. 9. Confirmation of *nosZ* in nitrate-contaminated 15 groundwater samples by PCR and electrophoresis.

산물을 확인하였다. 그 결과, nitrate reductase( $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ )를 구성하는 *nirK*(160 bp)는 Fig. 8(L)에서 보이는 것과 같이 293.2 mg/L 질산성질소로 오염된 지하수시료에서 확인되었고, nitrous oxide reductase( $\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$ )를 구성하는 *nosZ*(259 bp)는 3개 지하수시료 모두에서 확인되었다. 전기영동으로 확인된 밴드는 재추출한 후 염기서열분석을 통해서 최종적으로 *nirK*와 *nosZ*임을 확인할 수 있었다(Table 4). 추가적으로 15개 시료에서 *nosZ*를 분석한 결과 모든 지하수시료에서 모니터링 되었다(Fig. 9). 효소 분석을 통해 *nirK*와 *nosZ* 유전자가 존재하는 지하수 시료를 바탕으로 회분식반응조 실험을 한 결과 앞에서 살펴

보았듯이 질산성질소 저감율을 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 국내 지하수 중에 탈질산화의 각 단계별 반응과 관련된 효소를 구성하고 있는 유전자가 있음을 확인할 수 있었고, 또한 이러한 유전자분석법을 통하여 실내실험 혹은 현장실험 이전에 질산성질소 자연저감 가능성을 평가할 수 있음을 확인하였다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통하여 확인한 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 농·축산단지 주변 지하수 중 질산성질소 농도는 월

별 혹은 계절별 큰 변화 없이 평균 8.2~9.1 mg/L가 검출되었다. 그러나, 일부 지역에서는 10 mg/L 이상이 검출되었고, 이는 기존의 연구결과들과 같이 대부분 농·축산활동에 의한 것으로 사료된다.

2. 고농도 질산성질소 오염지역을 대상으로 질산성질소 자연저감과 관련된 효소(Nitrate reductase, nitrite reductase (*nirS*, *nirK*), nitric oxide reductase, nitrous oxide reductase (*nosZ*) 등)를 구성하는 단계별 유전자를 분석한 결과, nitrate reductase( $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ )와 nitrous oxide reductase( $\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$ )이 존재함을 확인할 수 있었다. 특히 조사대상 시료 중 대부분의 지하수에서 nitrous oxide reductase( $\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$ )와 관련된 유전자를 확인할 수 있었다.

3. *nirK* 및 *nosZ* 유전자가 모니터링된 지하수를 대상으로 질산성질소 탈질산화를 시험한 결과, 탄소원(fumarate)의 존재할 때 분해율을 확인할 수 있었다. 이는, 현장에서 질산성질소 저감 효율을 높이기 위해 탄소원 공급이 필요함을 나타낸다.

4. 질산성질소 저감효율이 가장 좋은 fumarate를 탄소원으로 선정하였으며, 화학량론적 필요량의 1.5배(0.63 M) fumarate를 지하수 시료에 주입한 결과 300~600 mg  $\text{NO}_3/\text{L}$ 가 20 mg/L/day의 속도로 각각 26일, 10일 안에 분해되었다.

## 사 사

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

## References

- Bannert, A., Kleinedam, K., Wissing, L., 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 nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples, *App. Environ. Microbiol.*, **64**(10), 3769-3775.
- Final report of study on groundwater quality around animal burial sites, 2011, National Institute of Environmental Research.
- 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.
- Ginocchio, J., 1984, Nitrate levels in drinking water are becoming too high, *Water Services*, **88**(1085), 143-144.
- Hyeon, G.-T., 2011, Studies on the contamination properties of soil and groundwater in densely populated livestock area in Jeju island, Ph.D Dissertation, Che-ju university.
- Henry, S., Baudoin, E., Lopez-Gutierrez, J.C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., and Philippot, L., 2004, Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR, *J. Microbiol. Methods*, **59**(3), 327-335.
- Hyun, H.-N., Koh, S.-H., and Oh, S.-L., 1994, Concentrations of Pollutants in Groundwater and their Behavior in Soil in Che-ju Island, *Korea J. Environ. Agric.*, **13**(2), 151-159
- Kahng, H.Y., Nam, K., Kukor, J., Yoon, B.J., Lee, D.H., Oh, D.C., and Oh, K.H., 2002, PAH utilization by *Pseudomonas rhodesiae* KK1 isolated from a former manufactured-gas plant site, *App. Environ. Microbiol.*, **60**(4), 475-480.
- Kim, G.-H. and Kim, Y., 2006, Determination of electron donors by comparing reaction rates for in situ bioremediation of nitrate-contaminated groundwater. *J. Environ. Sci. Health A*, **41**(10), 2359-2372.
- Meteorological Yearbook, 2011, National Weather Service.
- Michotey, Valerie, Vincent Mejean, and Patricia Bonin., 2000, Comparison of methods for quantification of cytochrome cd 1-denitrifying bacteria in environmental marine samples, *App. Environ. Microbiol.*, **66**(4), 1564-1571.
- Rittmann, Bruce, E., and Perry, L., 2012, McCarty. Environmental biotechnology: principles and applications, Tata McGraw-Hill Education.
- Throback, I.N., Enwall, K., Jarvis, A., and Hallin, S., 2004, Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**(3), 401-417.
- US Geological Survey, 2008, <http://www.usgs.gov>