

질산성 질소로 오염된 지하수의 생물복원을 위한 적정 전자공여체의 결정 및 반응속도 비교 연구

어성욱[†] · 이윤희 · 김건하^{*} · 김 영^{**}

우송대학교 철도건설환경공학과

^{*}한남대학교 토목환경공학과

^{**}고려대학교 환경시스템공학과

Electron Donor Determination and Comparisons of Reaction Rates for Bioremediation of Nitrate Contaminated Groundwater

Oa, Seongwook[†] · Lee, Yoonhee · Kim, Geonha^{*} · Kim, Young^{**}

Department of Railroad, Civil and Env. Engineering, Woosong University

^{*}Department of Civil and Environmental Engineering, Hannam University

^{**}Department of Environmental System Engineering, Korea University

(Received 13 July 2005, Accepted 31 August 2005)

Abstract

Groundwater contamination by nitrate exceeding water quality criteria (10 mg NO₃⁻-N/L) occurs frequently. Fumarate, acetate, formate, lactate, propionate, ethanol, methane and hydrogen gas were evaluated for their nitrate removal efficiencies and removal rates for *in situ* bioremediation of nitrate contaminated groundwater. Denitrification rate for each substrate was in the order of: fumarate > hydrogen > formate/lactate > ethanol > propionate > methanol > acetate. Microcosm studies were performed with fumarate and acetate. When fumarate was used as a substrate, nitrate was removed 100 percent with rate of 0.66 mmol/day while conversion rate from nitrate to nitrogen gas or another by-product was 87 percent. 42 mg of fumarate was needed to remove 30 mg NO₃⁻-N/L. When using acetate as carbon source, 31 percent of nitrate was removed during initial adjustment period. Among removed fraction, however, 83 percent of nitrate removed by cell growth. Overall nitrate removal rate was 0.37 mmol/day. Acetate showed longer lag time in consumption compared to that of nitrate, which implying that acetate would be better carbon source compared to fumarate as more amount was utilized for nitrate removal than cell growth.

keywords : Groundwater, Nitrate, Bioremediation, Microcosm test, Fumarate, Acetate

1. 서론

지하수 내의 주 오염물질의 출현빈도는 질산성 질소(NO₃⁻), 농약, Volatile Organic Compounds (VOC) 그리고 석유화학 제품의 순으로 보고 되고 있다(Philip et al. 1999). 오염원 별로 분석한 결과는 지하저장탱크에 의한 오염이 가장 빈번한 것으로 보고 되고 있으며 그 다음이 부패조, 농업활동, 도시 폐기물 매립지 등의 순으로 나타나고 있다. 국내의 지하수 수질에 대해 1999년 - 2002년 사이 각 지자체가 검사한 자료를 토대로 지하수수질 기준을 기초로 해서 연도별 지하수 수질기준을 초과한 빈도를 분류해 보면 1999년도에 초과율이 7.1%였고, 2000, 2001년도에는 6.8%, 2002년도에는 5.7%로 나타났다(환경부, 2003). 음용수에 존재하는 고농도의 질산성 질소는 청색증(Methemoglobinemia, Blue baby 증후군), 암 유발 등 인간 건강에

매우 위협적이다(Dermont et al., 1992). 미국은 질산성질소의 농도기준을 10 mg NO₃⁻-N/L, 1.0 mg NO₂⁻-N/L로 정하고 있으며(US EPA, 2003), 우리나라는 음용수 기준을 NO₃⁻-N만 10 mg/L으로 규정하고 있다. 질산성 질소는 농경지, 산업 활동 및 점원, 비점원 오염원으로부터 지하수에 침투되어 오랜 기간에 걸쳐 머물러 있게 되어 지하수내 오염도는 시간이 경과함에 따라 심화되고 있다. 2000년부터 2002년까지 전국 시도에서 당시 먹는 물로 사용하던 지하수 중 총 4,534개소의 물 시료를 채취 분석한 결과 인간 활동이나 산업 활동으로 생성된 각종 오염원으로부터 유래된 질산성질소로 오염된 지하수는 2.2-5.0%로 질산성질소는 가장 주된 지하수 오염원으로 대두되고 있다(환경부, 2003).

생물학적 탈질산화 반응은 크게 두 가지 대사 경로를 통해 이루어진다. 첫째는 세포의 합성을 위한 질산성질소동화(assimilatory nitrate) 환원으로 질산성 질소를 암모니아로 환원시켜 생체합성에 필요한 질소원을 얻기 위한 반응이며 전체 탈질 반응에 미치는 영향이 제한적이어서 일반적으로

[†]To whom correspondence should be addressed.
swoa@wsu.ac.kr

그 양은 무시한다. 다른 하나는 질산성질소 이화 환원효소(dissimilatory nitrate reductase)에 의한 환원으로 탈질산화 반응의 주를 이룬다. 일반적인 탈질산화 반응은 무산소(anoxic)상태에서 종속영양 탈질미생물에 의해 NO₂⁻, NO₃⁻를 분자상의 질소가스(N₂, N₂O, NO)로 환원시키는 과정을 말한다. 이들 탈질 미생물들은 성장에 필요한 에너지를 질산성질소를 질소가스로 환원하는 과정에서 얻지만 세포합성을 위한 전자공여체(Electron Donor: 이하 ED)로 탄소원(Carbon Source: 이하 CS)이 필요하게 된다.

본 연구의 목적은 질산성 질소로 오염된 지하수의 원위치 생물복원(In situ bioremediation)을 위해 수행되고 있는 연구의 일부로써 현장과 같은 조건의 microcosm 운전을 통해 생물학적 탈질산화를 위한 ED로 acetate, ethanol, formate, fumarate, lactate, methanol, propionate, hydrogen의 적정 ED/CS 비를 결정하였다. 이 중 fumarate와 acetate의 질산성질소 제거효율 및 제거속도, 탈질부산물 축적률을 중점적으로 비교하였다. 탈질산화 속도 결정을 통해 탄소원의 최적 주입량을 결정하고, 탈질산화 미생물의 동정을 통한 미생물 활동을 검증하였다.

2. 연구 방법

2.1. Microcosm 제작방법

질산성질소로 오염된 지하수의 원위치 생물복원의 가능성을 평가하기 위하여 Kim 등(1997)이 제시한 microcosm method를 이용하였다. Microcosm 제작에는 압력멸균(autoclave)이 가능한 160 mL 용량의 serum bottles (Wheaton, Millville, New Jersey), caps and septums (Teflon™ butyl rubber, Aluminum Septum 20 mm)를 사용하였고, 다른 미생물로부터의 오염을 막기 위해 laminar hood(제일상사)안에서 제작되었다. 제작된 microcosm bottle은 진탕기(Vision Scientific co., LTD)에서 20°C로 진탕 배양되었다. ED 및 CS 로써 sodium acetate (98.5%, Yakuri Pure, Osaka), sodium fumarate (99%, Fluka, Chemical GmbH), 그밖에 formate, lactate, propionate, ethanol, methanol을 사용하였고, EA로써 sodium nitrate (99%, Dongyang chemical, Seoul), 억제제(inhibitor)로써 sodium azide(98%, Junsei, Tokyo)를 사용하였다. 실험에 사용되는 모든 도구는 압력 멸균시켰다.

160 mL 용량의 serum bottle에 습윤 토양시료 10 mL, 지하수 80 mL를 laminar flow hood 안에서 일정하게 주입한 뒤 Teflon™ butyl rubber, aluminum septum으로 마개를 닫고 crimper로 microcosm bottle을 제작하였다. Fig. 1은 microcosm bottle의 개략을 보이고 있다. 비교 기질(substrate)로 1,166 ppm acetate와 1,503 ppm fumarate 그리고 3,558 ppm formate, 1,174 ppm lactate, 825 ppm propionate, 607 ppm ethanol, 871 ppm methanol을 각 20 mL씩 주입하였다.

미생물을 투입한 microcosm bottle(active)에는 aquifer solids, ground water, nitrate(30 mg NO₃⁻-N/L of sodium

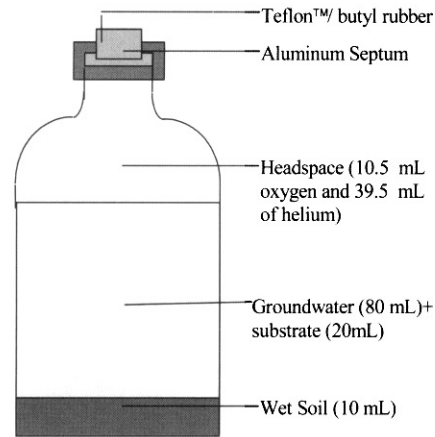


Fig. 1. Schematic Description of Microcosm Bottle.

nitrate), and growth substrate(233 mg/L of sodium acetate or 301 mg/L of sodium fumarate)를 주입하였고, poison control은 aquifer solids, groundwater, nitrate, and poison (e.g., 25 mg/L of sodium azide)을 주입하여 미생물의 inactivate로 작용시켰다. 각 대상 기질 당 미생물 투입된 microcosm bottle 3개, 억제제를 투입한 microcosm bottle 2개 등 5개가 한 세트가 되도록 하였다. 또한 Aquifer solids, ground water, nitrate, no growth substrate 만을 투입한 live control을 준비하여 탄소원이 없는 상태에서의 미생물 반응에 의한 질산성질소 제거 능력을 비교하였다.

2.2. 사용 시료의 성상

실험에 사용된 토양시료는 충남 연기군 지역의 현장에 관측정을 설치한 뒤 비교관시료를 채취하였다. 관측정 깊이는 8.4 m였는데 지하 1 m까지는 점토와 모래가 섞여 있었고 1.0 - 5.7 m까지는 화강풍화토가 존재하였으며 그 밑은 풍화암이 존재하였다. 실험에 사용한 토양의 특성은 관측정의 4.5 m 깊이에서 채취한 화강풍화토로써 함수율은 11.9%, 습윤밀도 1.86 g/cm³, 비중 2.65, 간극률은 0.37이었다. Table 1은 본 연구에서 시료로 사용한 토양 및 다른 깊이에서 채취한 토양의 특성을 요약한 것이다. 채취한 토양은 No.8체(체눈 크기=2.8 mm)로 큰 입자를 제거하였고, 지하수는 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과하였다. 현장의 지하수를 분석한 결과 Cl⁻ 농도는 14 ppm, NO₃⁻-N 농도는 4.8 ppm, 용존산소(Dissolved Oxygen : DO) 농도는 6 ppm이었다.

2.3. 분석방법

Microcosm bottle로부터 1 mL씩 시료를 채취하여 0.2 µm 멤브레인 여과지로 여과하여 농도를 분석하였고, 미생물 반응으로 인해 발생하는 진공을 보충하기 위하여 He 가스를 주입하여 1 기압으로 유지하였다. 질산성질소(NO₃-N)와 아질산성질소(NO₂-N)는 Ion Chromatography(Shimadzu, 10A)로 분석하였다. 분석시 Shodex IC SI-90-4E column을 사용하였고, Na₂CO₃와 NaHCO₃를 혼합하여 이동상으로 사용하였다. 기질 농도는 HPLC(High Performance Liquid

Table 1. Characteristics of Residual Soil Used in This Research

Depth (m)	3 M	4.5 M	7.5 M
Water content (%)	12.2	11.9	11.9
Dry bulk density (g/cm ³)	1.62	1.66	1.69
Wet bulk density (g/cm ³)	1.82	1.86	1.90
Specific gravity	2.75	2.65	2.62
Porosity	0.41	0.37	0.35
Void ratio	0.7	0.6	0.55

Chromatography) 및 UV Spectrophotometer (@ 210 nm)로 분석하였는데 HPLC에는 ICsep 87H column (300×7.8 mm)을 사용했으며, 0.008 N H₂SO₄를 이동상으로 0.67 mL/min으로 흘렸다. N₂O는 Gas Chromatography (Donam, DS6200)로 분석하였고 TCD detector를 이용하였다. Injector 온도 250°C, detector 온도 250°C, carrier gas는 He, flow rate은 48 mL/min, 초기 오븐 온도는 40°C(for 1min), 10°C/min으로 220°C까지 올렸다. 시료는 냉동보관 (-10°C)하여 24시간 내에 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 전자 수용체 screening test 결과

전자수용체(Electron Acceptor: 이하 EA)당 소요되는 ED의 비율(ED/DA)을 에너지론(Energetics)을 사용하여 계산하였다(Rittman et al., 2000). Table 2에서 1)은 EA가 nitrate

30 mg-N/L일 때 소요되는 ED의 양이고, 2)는 지하수내 DO가 6 mg/L(@20°C)일 때 소요되는 ED의 양을 계산한 것이다. 계산식에 의하면 질산성질소 1 mol을 제거하기 위한 ED로써 propionate가 0.36 mol로 가장 효율적인 것으로 나타났으며 그 다음은 fumarate, lactate, ethanol이 0.42로 나타나고 있다. Formate의 경우는 2.5 mol로 같은 질산성 질소를 제거하기 위한 기질 소모량이 큰 것으로 계산된다.

Table 3은 acetate, fumarate, formate, lactate, propionate, ethanol, methanol, hydrogen 등 8가지 기질을 ED/CS로 사용한 microcosm 실험결과와 요약이다. Fig. 2는 각 기질에 대한 질산성질소의 제거량을 시간의 함수로 나타내고 있다. ED를 제한인자로 하였을 때, 그 결과 fumarate와 acetate를 제외한 다른 기질은 완전 질산화가 이루어지지 않고 부산물로 NO₂-N가 생성되었다. ED로써 수소 이온은 현장에서 기체상태의 수소를 토양내로 직접 주입하는 데에 어려움이 있다. Haugen 등(2002)은 질산성 질소로 오염된 지하수에 수소가스를 주입하여 효율적으로 질산성 질소를 제거하였는데 독립영양 탈질미생물에 의한 세포증식률이 총속영양 탈질미생물보다 낮기 때문에 토양 내에서는 적용성이 우수하였다. 본 연구에서는 질산성 질소 제거 효율이 53%로 저조하였다. 본 실험에 이용된 대상 전자수용체들의 탈질율은 fumarate > hydrohen > formate/lactate > ethanol > propionate > methanol > acetate의 순으로 fumarate가 가장 빠르게 나타나고 있다.

Table 2. Stoichiometry Calculated by Energetics for Electro Donors Studied in This Research

ED	Stoichiometry	Added mass (g)	Final concentration (mg/L)	Stock concentration (mg/L)
Sodium Acetate	0.63 ¹⁾ / 0.5 ²⁾	0.03	233	1,166(add 20 mL)
Sodium Fumarate	0.42 ¹⁾ / 0.33 ²⁾	0.04	301	1,503(add 20 mL)
Sodium Formate	2.5 ¹⁾ / 2 ²⁾	0.11	712	3,558(add 20 mL)
Sodium Lactate	0.42 ¹⁾ / 0.33 ²⁾	0.03	235	1,174(add 20 mL)
Sodium Propionate	0.36 ¹⁾ / 0.29 ²⁾	0.02	165	825(add 20 mL)
Ethanol	0.42 ¹⁾ / 0.33 ²⁾	0.01	121	607(add 20 mL)
Methanol	0.83 ¹⁾ / 0.67 ²⁾	0.02	174	871(add 20 mL)
Hydrogen	2 ¹⁾ / 2 ²⁾	37.99	380	dilution with 99.9%
Sodium nitrate		0.05	30	3,000(add 1 mL)
Sodium azide			25	10,000(add 1 mL)

¹⁾mol of Electron Donor/mol of Electron Acceptor

²⁾Amount of ED consumed for removing 6 mg DO/L in groundwater at 20°C

Table 3. Results from Microcosm Screening Studies of Nitrate Degradation for Different ED/CS

EDs/CSs	Nitrate removal percentage (%)	Nitrate removal rate (mmol/day)	Mass ratio of nitrite produced to nitrate degraded (-)
Sodium Acetate	43	0.08	0
Sodium Fumarate	100	0.40	0
Sodium Formate	100	0.14	0.5
Sodium Lactate	79	0.13	0.27
Sodium Propionate	61	0.05	0.15
Ethanol	79	0.01	0.17
Methanol	48	0.10	0.23
Hydrogen	53	0.15	0.17

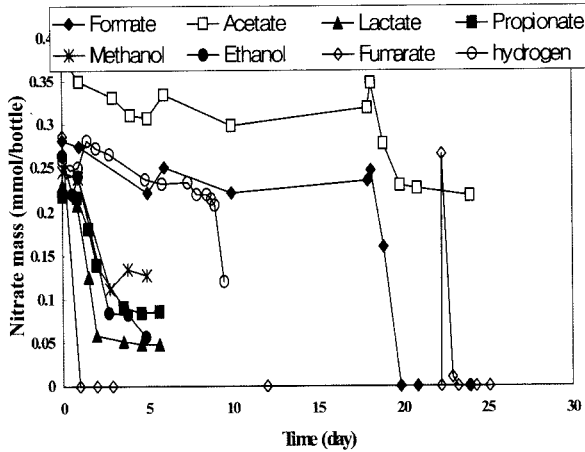


Fig. 2. Nitrate Mass Change in Active Microcosm for Different Electron Donor/Carbon Source.

3.2. Fumarate와 Acetate의 탈질 속도 비교

대상 기질 중 가장 효율이 좋은 fumarate와 가장 효율이 저조한 acetate에 대하여 증점적으로 실험을 계속하였다. Fig. 3은 acetate를 microcosm에 주입할 때 acetate의 농도 변화와 nitrate, nitrite의 농도변화를 시간별로 나타낸 것이다. Fig. 3(a)에서 초기에 acetate active microcosm에서는 약 3일 만에 acetate가 완전히 분해 되었으나, poison control microcosm에서는 약 25일 동안 acetate mass 변화가 거의 없었다. Fig. 3(b)에서 보인 것과 같이 active 및 poison control과 live control microcosm에서 시간에 따른 질산성질소량의 변화는 거의 없었고, 탈질분해 부산물인 nitrite (NO₂⁻)와 nitrogen oxide (N₂O)는 검출 되지 않았다. 20일경 acetate를 재주입하였을 때 약 43% 정도의 질산성 질소가 분해 되었다. 일반적으로 acetate는 미생물이 이용하기 쉬운 탄소원으로 알려져 있으며, Barak 등(1998)은 acetate를 탄소원으로 사용하여 *Pseudomonas* sp. strain JR12를 이용하여 질산성질소를 제거하였다. 그러나 본 연구의 결과에서는 acetate가 가장 이용 속도가 느린 탄소원으로 나타나고 있다. Acetate는 일반적으로 대다수 종류의 미생물이 선호하는 탄소원이기 때문에, 현장에 존재하는 다

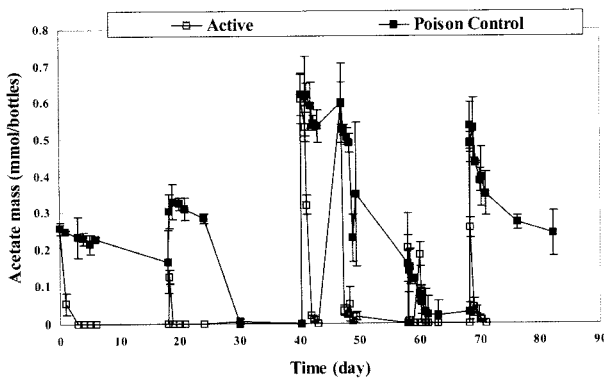
른 미생물과 탈질균이 경쟁을 하게 됨으로 탈질균의 증식이 느려지고, 그 결과 탈질반응의 시작이 fumarate보다 늦게 일어나는 것으로 보인다. 따라서 fumarate는 탈질 미생물에 있어서 acetate보다 우선적으로 이용되는 것으로 판단된다.

약 10일이 경과한 후 active bottles와 poison bottles 모두에 초기 acetate 주입량의 약 2.5배로 acetate를 재주입하였고, 질산성질소도 재주입하였다. Active microcosm에서 초기와 마찬가지로 약 3일만에 acetate가 모두 분해되었다. 그러나 질산성질소량의 변화가 없었던 초기상태와는 다르게 약 1.6일 만에 질산성질소가 완전 분해되고, 탈질분해 부산물인 nitrite (NO₂⁻)가 축적되었다가 acetate를 다시 주입하면 완전 분해되었다. 그 후 같은 방법으로 약 40일에 걸쳐 active microcosm에 acetate와 질산성질소를 반복하여 주입하였다. 거듭 주입한 결과 질산성질소를 완전히 제거시키는 속도가 0.16 mmol/day에서 0.37 mmol/day로 약 2.3배 증가하였다.

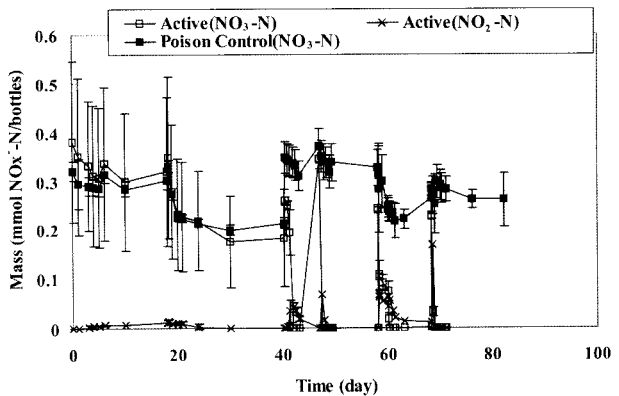
Acetate poison control에서는 초기에는 acetate와 질산성 질소량의 변화가 거의 없다가 약 50일부터 acetate와 질산성 질소가 감소되었다. 이는 임의로 주입한 독성물질(25 mg/L as azide)의 양이 미생물의 세포 성장으로 인해 상대적으로 부족하게 된 것으로 사료된다. 실험 70일경에 독성 물질을 약 50 mg/L정도 더 추가하여 높여주었다. 그 이후에는 질산성질소의 변화가 거의 없었다.

위의 결과로부터 현장 토양 내에 질산성질소를 제거하기 위한 ED/CS로써 acetate는 거의 모든 미생물에게 이용되기 쉬운 탄소원으로써 상대적으로 탈질미생물의 경쟁력이 떨어져 세포 성장이 저조한 것으로 사료된다. 때문에 초기에는 질산성질소를 제거하지 못하다가 어느 정도의 세포 성장이 이루어진 뒤에는 빠른 속도로 질산성질소를 제거하고 있다. 이는 배양 시간이 경과 할수록 그 반응속도가 더욱 증대되고 있는 것에 기인한 것이다.

Fig. 4는 fumarate microcosm에서의 fumarate 양과 질산성 질소 양 변화이다. Phase 1에서 fumarate active microcosm에서는 배양 1 일 후에 fumarate의 분해가 시작 되었



(a) Acetate Mass Change in Active and Poison-Controlled Bottle



(b) Nitrate and Nitrite Change in Active and Poison-Controlled Bottle

Fig. 3. Microcosm Test Results using Acetate as Substrate.

고, 3일 후에는 fumarate가 완전히 분해되었다. 질산성질소는 배양 후 3일 만에 완전히 분해되었다. Poison control microcosm에서는 fumarate와 질산성질소의 분해가 거의 없었다. Fumarate가 완전 제거된 후 1차 질산성질소 주입량의 약 7배 (0.7 mmol NO₃⁻-N, 430 mg NO₃⁻-N/L)를 배양 후 3 일째에 fumarate active microcosm에 재 주입 하였으나, 질산성질소의 분해가 일어나지 않았다. 그러나 배양 11 일 후에 fumarate를 주입하자 질산성질소가 빠른 속도로 분해되고, nitrite가 분해 부산물로 검출되었다. 미량의 nitrogen oxide가 nitrite 분해 시 검출되었다. 이 결과는 fumarate를 ED/CS로 사용하는 중속영양 탈질미생물이 현장에 존재하며, 그 미생물들의 활성도가 높다는 것을 증명하고 있다.

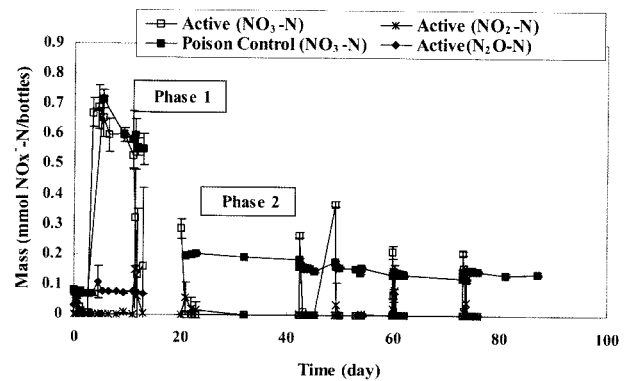
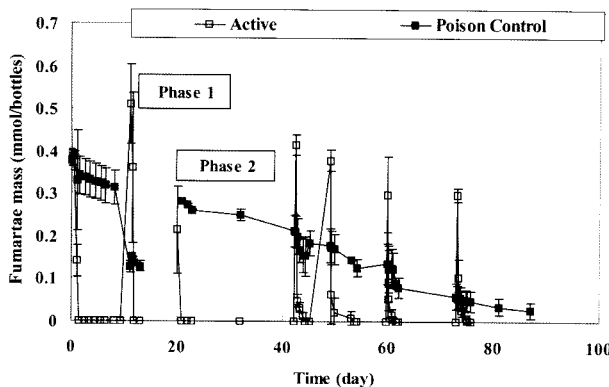
Fig. 4에서 phase 2는 phase 1과 같은 조건에서 제작된 microcosm이다. phase 2에는 초기에 0.29 mmol NO₃⁻-N, fumarate 0.2 mmol을 주입하였다. 주입 즉시 분해가 시작되어 1일 만에 질산성질소와 fumarate 모두 완전 분해되었고, nitrate 분해산물인 nitrite가 축적되었다가 완전히 분해되었다. Fumarate의 적정 주입량을 산출하기 위해 4회에 걸쳐 주입농도를 다르게 하여 반복 주입하였다. 그 결과 30 mg NO₃⁻-N/L 제거 시 소요되는 fumarate의 양이 초기에는 약 0.4 mmol이었고, 배양시간이 경과함에 따라 약

0.25 mmol로 감소하였다. 이는 fumarate를 이용하여 질산성질소를 제거시키는 탈질미생물의 증식으로 인해 EA로써 질산성질소를 이용하는 속도가 빨라졌기 때문이다. 질산성질소 제거 속도는 0.43 mmol/day에서 0.66 mmol/day로 증가하였고, 기질 이용 속도 역시 0.61 mmol/day에서 0.99 mmol/day로 증가하였다.

Fig. 4(b)에서 운전기간 동안 fumarate poison control 에서는 질산성질소의 변화가 거의 없었다. 그러나 Fig. 4(a)와 같이 fumarate의 양은 시간이 경과함에 따라 점차 줄어들었다. 이는 acetate poison control에서와 마찬가지로 임의로 주입된 독성물질의 양이 증가하는 미생물의 양에 비해 상대적으로 그 수용 능력이 떨어지는 것으로 사료된다.

Table 4는 acetate와 fumarate의 질소에 대한 물질수지를 나타낸 것이다. Fumarate active microcosm (phase 1)에서 91%의 질산성질소 분해효율을 보였으며, 87%의 탈질이 일어났다. 즉 주입 질산성질소 양의 87%가 nitrogen oxide보다 더 분해 되어 질소 가스 혹은 다른 부산물로 분해 되었다. Phase 2에서는 100%의 질산성질소 분해효율과 함께 전량 탈질이 일어났으며 반응속도 또한 증가하였다. Acetate는 질산성질소 제거율이 31%에서 83%로 증가하였고, 반응속도 또한 크게 증가하였다.

배양시킨 후 ED가 fumarate일 때 질산성질소의 이용 lag



(a) Fumarate Mass Change in Active and Poison-Controlled Bottle

(b) Nitrate and Nitrite Change in Active and Poison-Controlled Bottle

Fig. 4. Microcosm Test Results using Fumarate as Substrate.

Table 4. Mass Balance of Nitrogen in Active Microcosm for Acetate and Fumarate as Substrates

Substrate	Fumarate (phase 1)	Fumarate (phase 2)	Acetate (initial)	Acetate (after 40 day)
NO ₃ ⁻ Injected (mmol)	0.57	0.21	0.29	0.23
NO ₃ ⁻ Decomposed (mmol)	0.52	0.21	0.09	0.19
NO ₂ ⁻ Generated (mmol)	-	-	0.006	0.16
N ₂ O Generated (mmol)	0.07	-	-	-
N ₂ or Undetected by-product (mmol)	0.45	-	0.084	0.03
NO ₃ ⁻ removal rate (%)	91	100	31	83
Denitrification rate (%)	87	100	93	16
NO ₃ ⁻ Decompose coeff ^d (mmol/d)	0.40	0.66	0.06	0.37

^dNO₃⁻ Decompose zero-order reaction rate coefficient (mmol/d)

time(day)은 0.2 day이고, acetate일 경우에는 0.9 day였고, 반응속도 역시 fumarate가 더 큰 것으로 나타났다. 이는 기질을 제한요소로 보았을 때, 에너지론(Table 2)상에서 보여지는 것과 같이 acetate보다 fumarate가 에너지 효율이 더 큰 것과 일치한다. EA로써 에너지 효율이 좋음은 그 만큼 EA, 즉 질산성질소가 더 쉽게 환원될 수 있음을 뜻한다. 에너지론에 의한 acetate와 fumarate의 세포생산량은 각각 20.3 g cells/mol substrate, 46 g cells/mol substrate이다. 이로부터 fumarate가 acetate 보다 탈질을 더 효율적으로 증대시켜 현장의 적용성면에서 더 우수한 ED라고 사료된다.

3.3. 미생물 분석

탈질산화 과정에 관여하는 대표적인 박테리아는 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus* 그리고 *Propionibacillus* 등이 있다(Madigan et al. 2002). 이 중 *Pseudomonas* 종이 가장 대표적으로 널리 분포하고 있으며, 수소, 메탄, 탄화수소, 유기산, 방향족 화합물 등 다양한 유기화합물을 전자 공여체로 사용 한다(Magnusson et al., 1998). Fig. 5는 fumarate를 ED/CS로 사용한 microcosm bottle에서 채취한 토양 미생물을 분리 및 동정하여 광학 현미경(x 1,000)으로 관찰한 사진(a) 및 분리균 중 2종류의 16S rDNA 증폭산물을 전기

영동한 PCR (Polymer Chain Reaction)이다(b). 분리균의 16S rRNA의 염기서열을 결정하기 위해 분리균으로부터 총 염색체 DNA를 분리하여 이를 주형 DNA로 사용하여 PCR을 수행하였는데 PCR을 위한 primers는 세균의 16S rRNA의 보존적 염기서열 5'-TGCCAGCAGCCGCCCTA-3'(Escherchia coli 16S rRNA 유전자 염기서열의 515 - 531 지역), 5'-TTGTACACACCCGCCGTC-3'(E. coli 16S rRNA 유전자 염기서열의 1389 - 1406 지역)을 primers로 사용하였다. PCR 반응을 수행한 후 agarose gel 전기영동을 수행한 결과 약 1.5 kb의 DNA 단편이 증폭된 것이 확인되었으며, 이를 gel로부터 추출하여 염기서열 결정에 사용하였다. 분석결과 미생물은 그람음성 단간균으로 *Pseudomonas syringae* 그룹에 속한다. 그밖에 *Pseudomonas sp.*에 해당하는 여러 종류의 분리균이 동정되었다. PCR로 증폭하여 agarose gel에서 추출한 16S rRNA의 염기서열에 근거하여 동정된 분리균을 Table 5에 나타내었다.

4. 결론

원위치 생물복원(*in situ* bioremediation)을 위한 Electron Donor/Carbon Source 비교 실험 결과 탈질속도는 fumarate > hydrogen > formate, lactate > ethanol > propionate > methanol > acetate 순으로 fumarate와 formate가 가장 빠른 속도를 나타내었다. 대상 기질 중 fumarate와 acetate에 대한 microcosm test 비교 결과 질산성질소 제거효율, 탈질산화율, 분해속도가 acetate 보다 fumarate가 더 효율적인 전자공여체였다. Acetate는 초기에 질산성질소를 이용하기 위한 lag time이 길고 ED의 에너지 쓰임에 있어서 여러 미생물들에 대해 acetate를 이용하는 탈질미생물의 경쟁력이 떨어져 초기 적응기간에 세포생산량이 크지 않다. 따라서 효율적으로 세포를 증식시키지 못해 현장에서 탈질미생물을 증식시켜 질산성질소를 제거시키는데 적응기간이 길어지게 된다. 그러나 어느 정도의 세포증식이 이루어진 후에는 질산성질소를 빠르게 분해하고 저장되는 세포의 양이 증가할수록 그 제거 속도는 크게 증가할 것으로 사료된다. 본 연구에서도 제거속도가 0.16 mmol/day에서 0.37 mmol/day로 2배 이상 증가하였다.

반면 fumarate는 배양 초기부터 탈질미생물을 효율적으로 증식시켜 질산성질소를 빠르게 제거하였다. 제거 속도는 0.66 mmol/day로써 이용되는 속도가 크고, 운전기간 중 질

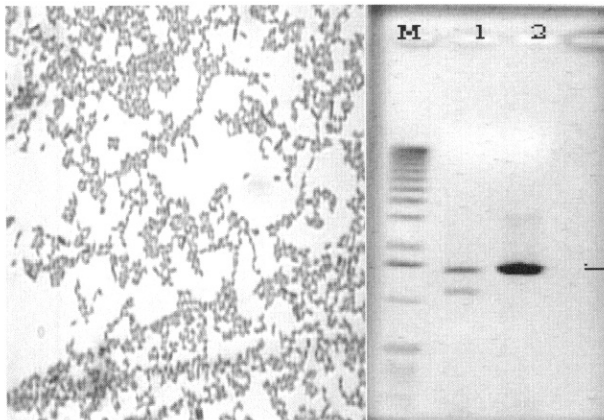


Fig. 5. Identification of *Pseudomonas sp.* in the Microcosm Bottle with Fumarate as Electron Donor/Carbon Source: (a) Microscopic Morphological shape(x1000) (b) Electrophoresis of PCR Product, Lanes M; Molecular size marker, 1; PCR Product of Strain LB2-2, 2; PCR Product of Strain N3-4.

Table 5. Nucleotide Sequence homology of the isolated strains 16S rRNA to others

Isolated Strains	Identity		Reference (GeneBank Accession No.)
	Similarity (%)	Genus	
LB2-2	98	Brachy bacterium sp.	X91030
LB2-4	99	Bacillus cereus	AY138271
LB2-3	99	Pseudomonas sp.	AJ492826
N3-1	99	Pseudomonas sp.	AB001448
N3-4	99	Pseudomonas sp.	AF074383
LB3-1	99	Pseudomonas sp.	AJ492826

산성질소가 N_2 gas 혹은 다른 미량의 부산물로 전환되는율은 87%이었다. Microcosm test 결과로부터 30 mg NO_3^- -N/L을 처리하기 위한 fumarate의 적정 주입량은 41.85 mg으로써 에너지론(energetics)에 의한 계산 결과와 일치한다. 본 연구 결과 fumarate는 탈질산화 미생물을 효율적으로 성장시켜 질산성 질소로 오염된 지하수를 생물복원하는데 효과적인 탄소원으로 밝혀졌다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- 환경부, 2002년도 지하수 수질측정망 운영결과, www.me.go.kr. (2003).
- Barak, Y., Tal, Y. and van Rijn, J., Light-Mediated Nitrite Accumulation during Denitrification by *Pseudomonas* sp. Strain JR12., *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, pp. 813-817 (1998).
- Dermont C. B., Mary K. W. and Rao Y. S., Nitrate Contamination of Groundwater: Sources and Potential Health Effects, *J. AWWA*, September of 1992, pp. 85-90 (1992).
- Haugen, K. S., Semmens, M. J. and Novak, P. J., A Novel In Situ Technology for the Treatment of Nitrate Contaminated Groundwater, *Water Research*, **36**(14), pp. 3497-3506 (2002).
- Kim, Y. and Semprini, L., Aerobic Cometabolism of Chloroform and 1,1,1-trichloroethane by Butane-Grown Microorganisms, *Bioremediation Journal*, **2**, pp. 135-148 (1997).
- Madigan, M. T., Martinko, J. and Parker, J., *Brock Biology of Microorganisms 10th ed.*, Prentice Hall, p. 1104 (2002).
- Magnusson, G., Edin, H. and Dalhammar, Characterization of Deficient Denitrifying Bacteria Strains Isolated from Activated Sludge by 16S-rRNA Analysis, *Wat. Sci. & Tech.*, **38**(8-9), pp. 63-68 (1998).
- Philip, B. B., Hanadi, S. R. and Charles, J. N., *Ground Water Contamination - Transport and Remediation*, 2nd Ed., pp. 75-83 (1999).
- Rittmann, B. E. and McCarty, P. L., *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, McGraw-Hill, p. 768 (2000).
- US EPA, *National Primary Drinking Water Standards*, EPA 816-F-03-016, www.epa.gov/safewater (2003).