

탈질미생물을 이용한 질산성 질소의 산소 및 질소 동위원소 분석법 소개

임보라 · 김민섭 · 윤숙희 · 박재선 · 박현우 · 정현미¹ · 최종우*

국립환경과학원 환경측정분석센터, ¹국립환경과학원 환경기반연구부

Introduction of Denitrification Method for Nitrogen and Oxygen Stable Isotopes ($\delta^{15}\text{N-NO}_3$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3$) in Nitrate and Case Study for Tracing Nitrogen Source. Lim, Bo-La (0000-0002-1188-2112), Min-Seob Kim (0000-0002-0365-7468), Suk-Hee Yoon (0000-0003-2224-8632), Jaeseon Park (0000-0003-2660-5924), Hyunwoo Park (0000-0003-3658-9497), Hyen-Mi Chung¹ (0000-0002-9288-5699) and Jong-Woo Choi* (0000-0003-2331-3213) (Environmental Measurement & Analysis Center, NIER; ¹Fundamental Environment Research Department, NIER)

Abstract Nitrogen (N) loading from domestic, agricultural and industrial sources can lead to excessive growth of macrophytes or phytoplankton in aquatic environment. Many studies have used stable isotope ratios to identify anthropogenic nitrogen in aquatic systems as a useful method for studying nitrogen cycle. In this study to evaluate the precision and accuracy of denitrification bacteria method (*Pseudomonas chlororaphis* ssp. *Aureofaciens* (ATCC[®] 13985)), three reference (IAEA-NO-3 (Potassium nitrate KNO_3), USGS34 (Potassium nitrate KNO_3), USGS35 (Sodium nitrate KNO_3)) were analyzed 5 times repeatedly. Measured the $\delta^{15}\text{N-NO}_3$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3$ values of IAEA-NO-3, USGS 34 and USGS35 were $\delta^{15}\text{N}$: $4.7 \pm 0.1\%$, $\delta^{18}\text{O}$: $25.6 \pm 0.5\%$, $\delta^{15}\text{N}$: $-1.8 \pm 0.1\%$, $\delta^{18}\text{O}$: $-27.8 \pm 0.4\%$, and $\delta^{15}\text{N}$: $2.7 \pm 0.2\%$, $\delta^{18}\text{O}$: $57.5 \pm 0.7\%$, respectively, which are within recommended values of analytical uncertainties. Also, we investigated isotope values of potential nitrogen source (soil, synthetic fertilizer and organic-animal manures) and temporal patterns of $\delta^{15}\text{N-NO}_3$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3$ values in river samples during from May to December. $\delta^{15}\text{N-NO}_3$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3$ values are enriched in December suggesting that organic-animal manures should be one of the main N sources in those areas. The current study clarifies the reliability of denitrification bacteria method and the usefulness of stable isotopic techniques to trace the anthropogenic nitrogen source in freshwater ecosystem.

Key words: denitrification bacteria method, $\delta^{15}\text{N-NO}_3$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3$ values, tracing nitrogen source

서 론

지하수에 존재하는 질산성 질소(NO_3^- , Nitrate)의 농도는 일반적으로 2 ppm 이하이며 (Davis and Suarez, 1974),

먹는 물 기준의 질산성 농도는 10 mg L^{-1} 이하로 규정하고 있다 (Ministry of Environment of Korea, 2012). 그러나 질산성 질소는 종종 외부 기원 질소원의 유입으로 인하여 농도가 증가하여 식수로서 수질오염 문제를 야기하거나 부영양화 과정을 일으켜 생태계에 악영향을 미친다 (Spalding et al., 1993). 이러한 수질오염은 농경지에 살포된 농약 및 비료 (유기, 무기, 합성비료), 축산폐수, 공장폐수, 생활하수 등에서 기원된 질소원이 강우에 의해 유출되어 발생되며,

Manuscript received 23 December 2017, revised 30 December 2017,

revision accepted 31 December 2017

* Corresponding author: Tel: +82-32-560-8383, Fax: +82-32-568-7905,

E-mail: cjl111@korea.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

비점오염원이 소규모 형태로 넓은 지역에 산재되어 있기 때문에 배출원의 파악과 제어가 어렵다(Choi *et al.*, 2002).

이러한 측면에서, 질소 안정동위원소의 자연 존재비는 다양한 지역에서 지표수와 지하수의 질소 오염원 규명에 활용되어 왔다(Kohl *et al.*, 1971; Kellman and Hillaire-Marcel, 2003; Oren *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2011). 수질, 토양 등의 환경매체로 외부 기원 유기물(비료 등)이 유입되어 기존에 존재하는 질소와 혼합되어 구분이 어려울 수 있지만, 질소 동위원소 추적자의 사용은 외부 기원 유기물의 기원을 밝힐 수 있는 유일한 방법이다(Smith *et al.*, 1990). 예를 들어, 사탕수수는 광합성을 통하여 성장하면서 그 영양분을 다양한 질소원(토양, 합성화학비료, 축산비료 등)으로부터 흡수한다. 일반적으로 합성 화학 비료는 $-8\sim 5\%$ 사이의 낮은 $\delta^{15}\text{N}$ 값을 나타내며, 유기 물질의 자연 산화에 의해 형성된 토양 질산염은 대기 중 질소로부터 직접 합성되기 때문에 $3\sim 6\%$ 범위의 $\delta^{15}\text{N}$ 값을 나타내고, 가축분뇨는 탈질산화 과정을 거치기 때문에 상대적으로 무거운 $8\sim 16\%$ 범위의 $\delta^{15}\text{N}$ 값을 나타낸다(Deutsch *et al.*, 2006; Chae *et al.*, 2009; Frnech *et al.*, 2012). 그러므로 사탕수수의 질소 안정동위원소비 분석을 통하여 사탕수수가 흡수하는 질소원의 기원 유추가 가능하다. 또한 사탕수수가 뿌리를 통해 흡수하는 다양한 질산이온의 기원(지하수, 생활하수, 축산폐수 등) 구분이 가능하다. 이는 암모니아화 혹은 탈질산화 과정을 거치는 질소원(Ammonification and Denitrification, 축산폐수)이 질산화 과정(Nitrification, 생활하수)을 거치는 질소원보다 상대적으로 질소 안정동위원소비가 무겁기 때문이다.

그러나 다양한 질소원별 질소 동위원소 값이 서로 유사한 경우가 있어 질소 기원 추정의 한계점이 보고되었다(Kellman and Hillaire-Marcel, 2003). 이러한 문제점을 보완하기 위하여 최근에는 질산성 질소의 질소($\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3$)와 산소($\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3$) 안정동위원소를 이중으로 사용하는 기법이 대두되고 있다(Fig. 1)(Kendall, 1998; Silva *et al.*, 2002; Payet *et al.*, 2010; Marconi *et al.*, 2015). 이론적으로, 질산화(Nitrification)를 통해 형성된 질산성 질소(NO_3)의 산소원자는 총 3개이며, 그중 2개는 물(Nitrite, NO_2^-)에서 기원되고 1개는 대기(Nitric Oxide, NO)에서 기원된다(Böttcher *et al.*, 1990). 따라서 질산성 질소의 질소 및 산소 안정동위원소비는 생성 당시 존재하는 수체 내 질산염(Nitrogen pool) 특성 및 화학적 동위원소 분별 작용에 의하여 결정된다. 질산염의 질소 및 산소 안정동위원소비의 자연 존재비는 농경지(Cey *et al.*, 1999), 산림저수지(Burns and Kendall,

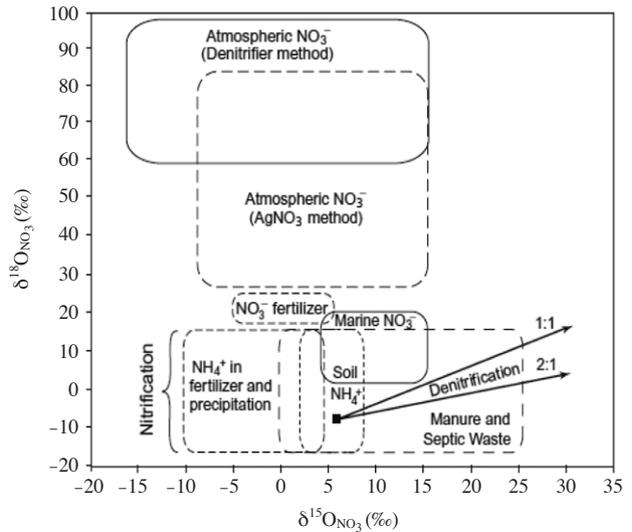


Fig. 1. Typical range of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of nitrate from various sources (from Kendall, 1998).

2002; Ohte *et al.*, 2004), 지하수(Cole *et al.*, 2006; McMahon and Bohlke, 2006), 호소수(Ostrom *et al.*, 2002; Rock and Mayer, 2004) 등에서 다양한 질소 오염원 규명에 활용되어 왔다. 국내에서는 하천수와 지하수의 질소오염원을 판별하기 위한 연구가 진행되고 있지만(Choi *et al.*, 2002, 2011; Min *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2015), 질소와 산소 안정동위원소비 분석방법 소개(Kim *et al.*, 2012)를 제외한 현장 적용 연구사례는 거의 없는 실정이다.

수질에서 입자성물질의 질소 안정동위원소비 측정은 분석절차가 간단하고 보편화 되어 있지만, 용존 형태의 질산성 질소($\text{NO}_3\text{-N}$)의 안정동위원소비 측정은 분석방법이 용이하지 않아(Sigman *et al.*, 2001) 국내에서는 널리 사용되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구는 환경 및 식수에서의 질산성 질소 오염원을 밝혀내기 위하여 질산염(NO_3^-)의 질소($\text{NO}_3\text{-}\delta^{15}\text{N}$)와 산소($\text{NO}_3\text{-}\delta^{18}\text{O}$) 동위원소를 동시에 분석할 수 있는 분석법을 국립환경과학원에 정립하고자 한다. 기초과학지원연구원에 분석방법이 정립되어 있지만 기존에 국내 환경분야에서 탈질미생물법(Bacterial denitrification method)을 이용한 질산성 질소의 산소 및 질소 안정동위원소를 활용한 사례는 전무한 실정이다. 국내 최초로 지하수 환경시료에 적용함으로써 오염 기원 추적 기법을 확립하는 데 목적을 두고 있으며, 질산성 질소($\text{NO}_3\text{-N}$)의 질소 및 산소 안정동위원소 분석방법(Bacterial denitrification method, 탈질박테리아법)을 소개하고, 처리과정에서 주의해야 할 절차(시료 농도, 배양시간 등) 및 환경시료에의 적용가능성에 대해서 기술하고자 한다.

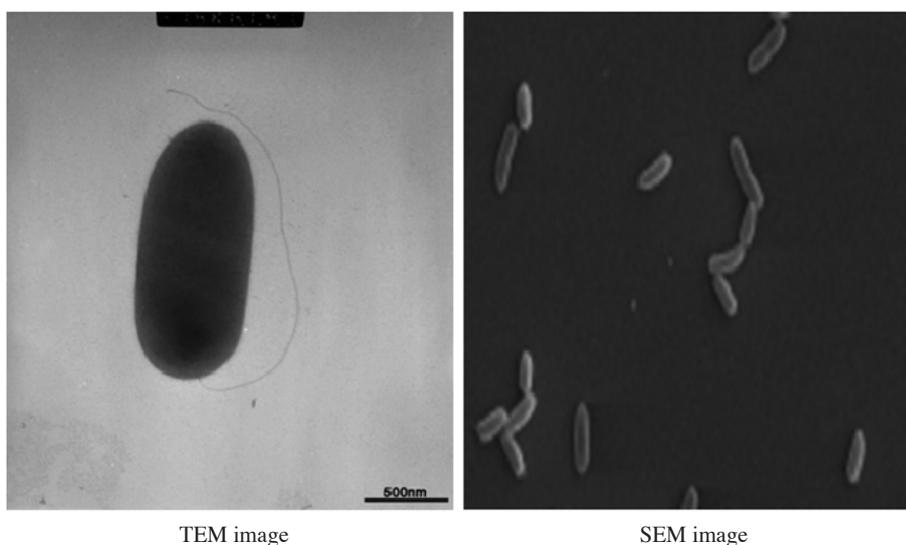


Fig. 2. TEM and SEM images of *P. chlororaphis* ssp. *aureofaciens* (ATCC® 13985).

재료 및 방법

1. 미생물 (*Pseudomonas chlororaphis* ssp. *aureofaciens*) 선택

질소 안정동위원소비 (^{15}N)에 대한 연구는 대개 지하수 내의 질소 오염물질로 작용하는 질산염의 기원과 거동을 해석하기 위하여 시행되어 왔다. 그러나 여러 오염원이 혼재할 경우, 상이한 오염원 간의 차이가 명확히 드러나지 않는 경우도 있다. 최근에는 이러한 점을 보완하기 위하여 질산염 내의 질소 및 산소 동위원소를 함께 분석하는 방법이 (dual isotope analysis)이 세계적인 연구 추세이다 (Chae *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2011).

양이온 교환수지, 음이온 교환수지 등 기존에 사용하던 전처리 방법에 사용되는 시약은 독성이 강하고 긴 전처리 시간이 소요되는 단점이 있다 (Revesz *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000; Fukada *et al.*, 2003; McIlvin and Altabet, 2005). 하지만 현재 질소 및 산소 동위원소 분석법 (Sigman *et al.*, 2001)은 탈질미생물인 *P. chlororaphis*나 *P. aureofaciens*를 사용하여 질산염을 아산화질소 (N_2O)로 탈질시킨 후, 이를 IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer)로 분석하는 방법이다. 소량의 질산염을 사용하기 때문에 기존 방법에 비해 분석에 사용되는 시료의 부피를 1/100까지 감소시켜 과거 분석이 어려웠던 해수, 공극수에 대한 분석이 가능해졌다.

탈질 박테리아 균주인 *Pseudomonas chlororaphis* (ATCC® 43928) 및 *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *aureofaciens* (ATCC® 13985)는 아산화질소 환원 효소 활성이

부족한 것으로 알려져 있다 (Sigman *et al.*, 2001; Casciote *et al.*, 2002). 또한 수체 내 질산성 질소 (NO_3)를 아산화질소 가스 (N_2O)로 전환시키는 시간 및 공시료 (Blank)에서의 질소 안정동위원소 측정값이 유사하여 두 균주 모두 적합하다. 그러나 *P. chlororaphis* (ATCC® 43928) 균주는 산소 동위원소를 측정할 수 없으며 드물게 질소 안정동위원소 측정이 실패하는 연구사례가 보고되어 대부분의 연구에서 *P. chlororaphis* ssp. *aureofaciens* (ATCC® 13985)를 계속 사용하고 있다. 그러므로 본 연구에서는 한국미생물 보존센터에서 *P. chlororaphis* ssp. *aureofaciens* (ATCC® 13985) 균주를 배양받아 본 연구에 활용하였다.

2. 미생물 배양

P. chlororaphis ssp. *aureofaciens* (ATCC® 13985) 균주의 배양액을 만들기 위하여 500 mL 배양용기 및 증류수를 멸균기 (Autoclave)에서 멸균한 후 무균대 (Bio-hazard Safety Cabinet)에서 보관하였다. 배지는 멸균된 배양용기에 30 g Tryptic Soy Broth, 1 g KNO_3 , 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.9 g KH_2PO_4 을 첨가하여 멸균된 3차 증류수 1L와 혼합한 후 또 다시 멸균하여 무균대에 보관하였다. 실온에서 식힌 후 15 mL 원심분리 튜브에 10 mL씩 주입하였으며, 구입한 미생물을 첨가하여 미생물 인큐베이터 (Shaking Incubator)에서 28°C의 환경으로 2~3일 동안 배양하였다. 배양된 미생물을 멸균된 배양액과 충분히 혼합하여 멸균된 배양용기에 증류수 300 mL와 함께 첨가하여 다시 28°C의 온도에서 2~3일 동안 미생물 인큐베이터에서 배양하였다. 배양

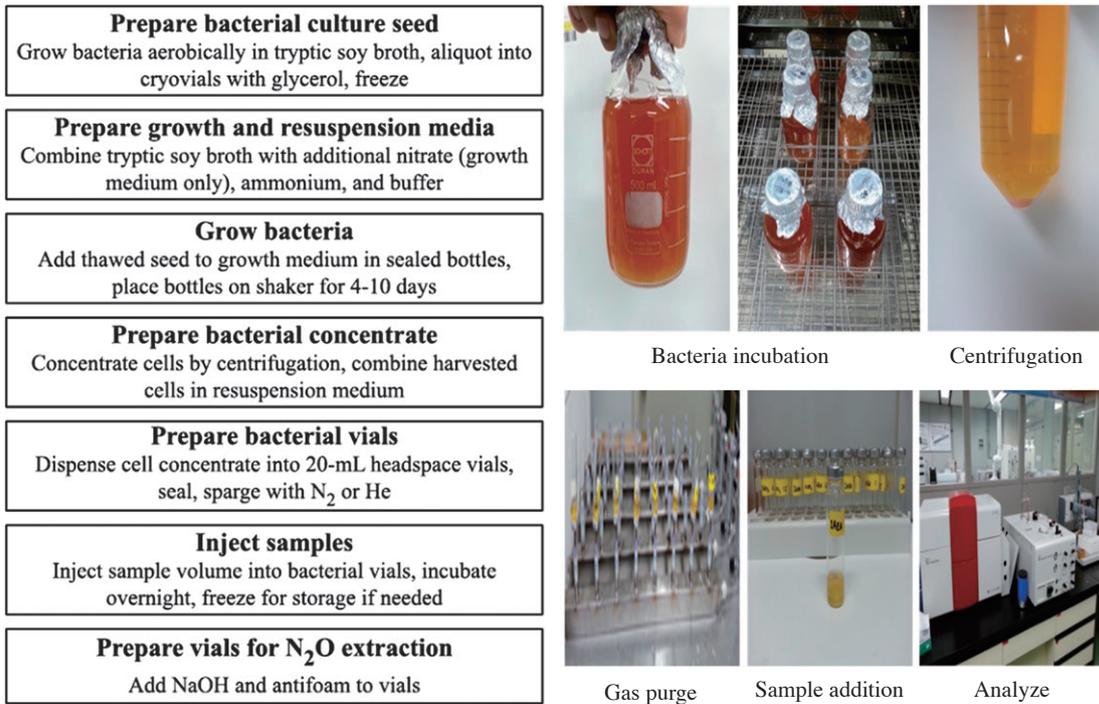


Fig. 3. A protocol summary chart for the bacterial denitrification method procedure.

된 미생물 균체는 50 mL 원심분리튜브에 주입하여 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 털어내고 여러 번 농축하여 멸균된 글리세롤(glycerol)과 혼합하여 2 mL 원심분리튜브에 주입한 후 저온 냉동고(Ultra low temperature freezer, -70°C)에 보관하였다. 배양된 미생물은 16sRNA 유전자 분석(Cosmo Genetech)을 통하여 종을 확인하였으며, SEM (Scanning Electron Microscope) 및 TEM (Transmission Electron Microscope)을 이용하여 모양을 확인하였다(Fig. 2).

3. 미생물을 이용한 탈질산화 과정

저온 냉동고에 보관되어 있던 균체를 멸균된 배양용기에 배양액과 함께 첨가하여 혼합한 후 28°C 미생물 인큐베이터에서 3일간 배양하였다. 배양된 미생물을 50 mL 원심분리튜브에 넣은 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 상등액을 제거하여 균체만 취하였다. 미생물 3 mL를 멸균되고 밀봉된 20 mL 바이오편에 넣어준 후 자체 제작된 헬륨 공급장치에 연결하여 지속적으로 헬륨을 흘려줌으로써 용기 내부의 질소 가스를 제거하였다. 기존의 연구에서는 2시간(Casciotti *et al.*, 2002), 16시간(Kim *et al.*, 2012)의 각각 다른 배양시간을 보고하였으나, 본 연구에서는 이를 확인하기 위하여 배양시간을 달리하여 분석을 수행하였다.

배양이 완료되면 10N NaOH 0.1 mL를 투여하여 반응을 중단시켰다.

4. 미량가스 동위원소 분석 과정

배양이 완료된 20 mL 샘플 바이오편을 미량가스 분석기의 맞춤형 알루미늄 렉에 고정시킨다. 미량가스 분석기의 주사기 시스템은 별도의 가스 입력(He) 및 유출(He + 시료 가스)을 조절할 수 있도록 되어 있어 헬륨 캐리어 가스를 흘려주거나 샘플 바이오편 내 가스를 추출할 수 있다. 가스 흐름은 “load”와 “inject”라고 하는 두 가지 위치를 갖는 8 포트 및 6포트 Valco 밸브(A4C8WE)에 의해서 이루어진다. 로드 모드(Fig. 4)에서, 오토 샘플러 바늘은 바이오편 중격부를 관통하여 헬륨(He) 캐리어 가스(25 mL min^{-1})를 흘려주며, 용기 내부에 있는 가스를 완전히 포집한다. 바이오편에서 포집한 가스는 Nafion 건조기(Perma Pure Inc., MD-050-72S-1) 및 화학적 트랩(과염소산 마그네슘 및 아스카라이트)을 통과하여 질량분석기로 들어가기 전에 물과 이산화탄소 가스를 완전히 제거한다. 순수하게 포집된 아산화질소(N_2O) 가스는 6-port 벨코 밸브를 통해 T1 (Cryo) 트랩을 통과하며 이때 액체질소에서 약 10분 동안 아산화질소(N_2O) 가스가 응축된다. 그 후 벨코 밸브는 인젝트 모드(inject mode)로 바뀌고 아산화질소(N_2O) 가스는 T1, T2

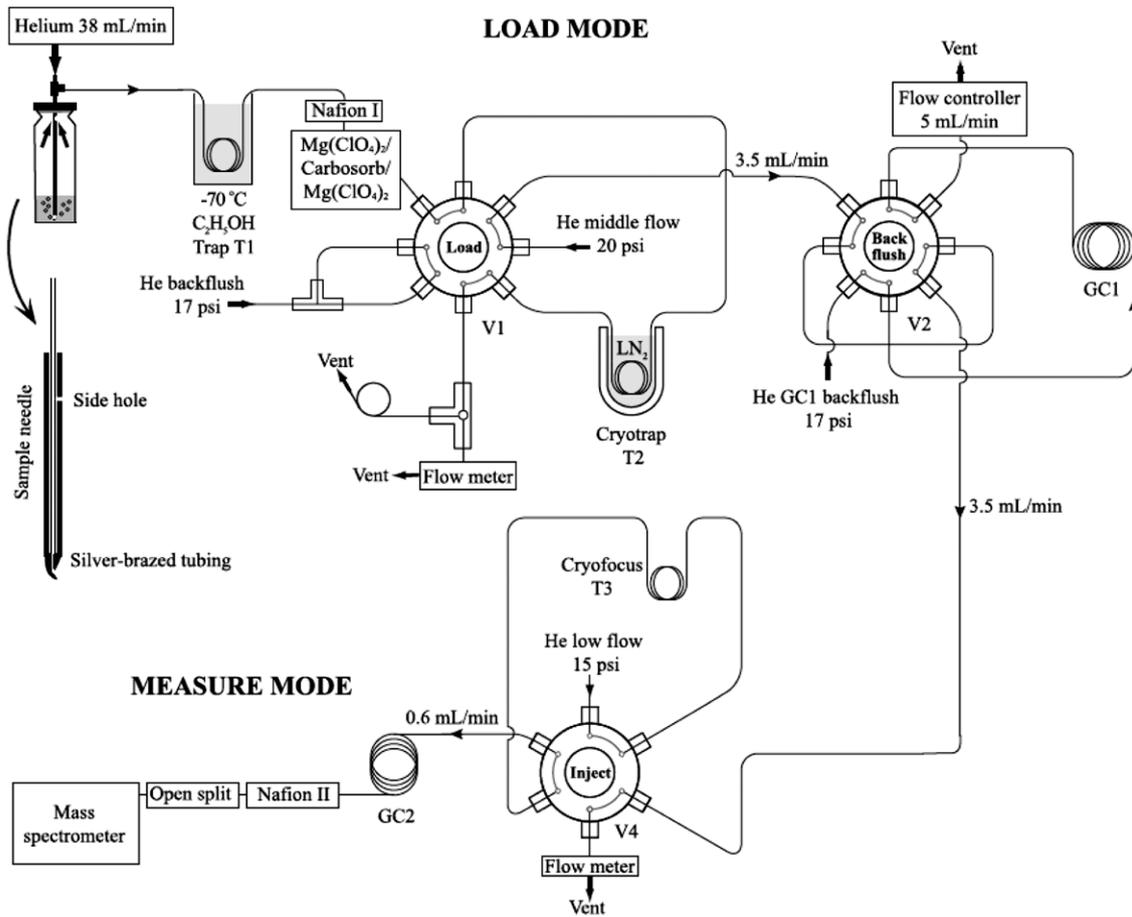


Fig. 4. The system for automated extraction and preparation of the bacterially produced N₂O prior to isotopic analysis by mass spectrometry (Alexandra Weigand *et al.*, 2015).

트랩(3분 포집)을 거쳐 나피온 튜브를 통과하면서 다시 한번 수분이 제거된다. 이후 모세관 컬럼을 통과하면서 아산화질소를 제외한 다른 가스들이 분리되어 순수한 아산화질소만 안정동위원소 질량 분석기로 주입되어 질소 및 산소 안정동위원소비가 측정된다.

5. 안정동위원소 표준시료의 조제

탈질미생물법을 이용한 안정동위원소 분석법의 정확도 및 정확성을 확보하기 위하여 국제표준기구(IAEA)에서 판매하는 IAEA-NO-3 (Potassium nitrate KNO₃, δ¹⁵N 4.7‰, δ¹⁸O 25.6‰), USGS34 (Potassium nitrate KNO₃, δ¹⁵N -1.8‰, δ¹⁸O -27.9‰), USGS35 (Sodium nitrate KNO₃, δ¹⁵N 2.7‰, δ¹⁸O 57.5‰)를 3차 증류수에 녹여 표준시료로 사용하였다. 미량가스 안정동위원소 분석기(TG-IRMS: Trace Gas Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometry, Trace Gas-Isoprime, U.K)를 이용하여 질소 및 산소 안정

동위원소비를 총 5회 반복 분석 측정하였으며, 도출된 결과값으로 본 연구결과의 신뢰도를 조사하였다.

6. 시료농도 및 배양시간

표준시료(IAEA-NO-3, USGS 34)를 3차 증류수에 녹여 다양한 농도 범위(0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg L⁻¹)로 조제하여 탈질미생물 기법을 통하여 얻어진 시료의 질소 및 산소 안정동위원소비를 5회 반복 실험하였다. 또한 정확한 안정동위원소비 측정값을 얻기 위한 미생물 배양시간을 파악하기 위하여 다양한 배양시간(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 36, 48) 범위에서 5회 반복 분석 실험하였다.

7. 안정동위원소비 분석

20 mL 밀봉된 바이오펀에 포집된 미량가스를 안정동위

원소분석기(TG-IRMS : Trace gas Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometry, Trace gas-Isoprime 100, U.K)를 이용하여 질소 안정동위원소비를 분석하였다. 안정동위원소비는 ‰로 표현되며 δ 계산식은 아래와 같다.

$$\delta = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

$$R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}, {}^{18}\text{O}/{}^{17}\text{O}$$

$\delta^{15}\text{N}$ 분석을 위한 표준물질은 IAEA-N-2 (Ammonium Sulfide), IAEA-NO-3 (Potassium nitrate)을 사용하였으며, $\delta^{18}\text{O}$ 분석을 위한 표준물질은 VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water)를 사용하였다. 각각의 분석 표준편차는 0.1‰, 0.2‰이다.

8. 환경시료에의 적용

지표수, 하천수, 토양 등으로 유입되는 가축분뇨, 합성비료, 유기비료 등의 외부 기원 유기물이 질소 오염원으로 관심을 받고 있다. 지하수 및 하천수에서의 효율적인 질소 관리의 일환으로 질소화합물 간의 분포 특성 파악을 위하여 안정동위원소비를 이용한 질산성 질소의 기원을 파악하는 연구를 수행하였다. 토양 및 오염원으로 여겨지는 외부 기원 유기물 특히, 합성비료(화학비료, 무레타, 복합비료 등), 가축비료(소, 돼지, 닭 분뇨로 만들어진 퇴비 등)을 채취하여 3차 증류수를 첨가하여 10분간 sonication 후 탈질 박테리아 방법을 활용하여 질산성 질소의 질소 및 산소 안정동위원소비를 분석하였다. 또한, 하천수(50지점) 시료를 계절별로 채취하여 각각 질산성 질소(NO_3)의 질소($\delta^{15}\text{N}$ -N) 및 산소($\delta^{18}\text{O}$ -N) 안정동위원소 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 시료 농도 변화에 따른 안정동위원소비의 정밀 · 정확도 연구

표준물질 IAEA-NO-3 (Potassium nitrate KNO_3 , $\delta^{15}\text{N}$ 4.7‰ $\delta^{18}\text{O}$ 25.6‰), USGS34 (Potassium nitrate KNO_3 , $\delta^{15}\text{N}$ -1.8‰ $\delta^{18}\text{O}$ -27.9‰), USGS35 (Sodium nitrate KNO_3 , $\delta^{15}\text{N}$ 2.7‰ $\delta^{18}\text{O}$ 57.5‰)를 증류수에 녹여 0.01 mg L^{-1} 에서 10 mg L^{-1} 까지 20개의 시료를 만든 후 농도구배에 따른 질소 안정동위원소비의 변화를 살펴보기 위하여 탈질 미생물법 실험을 진행하였다(Fig. 5). 시료 농도 0.01~20 ppm까지 안정동위원소 분석값이 1) IAEA-NO-3 : $\delta^{15}\text{N}$: 4.7±0.1‰ $\delta^{18}\text{O}$: 25.6±0.5‰, 2) USGS 34 : $\delta^{15}\text{N}$: -1.8±

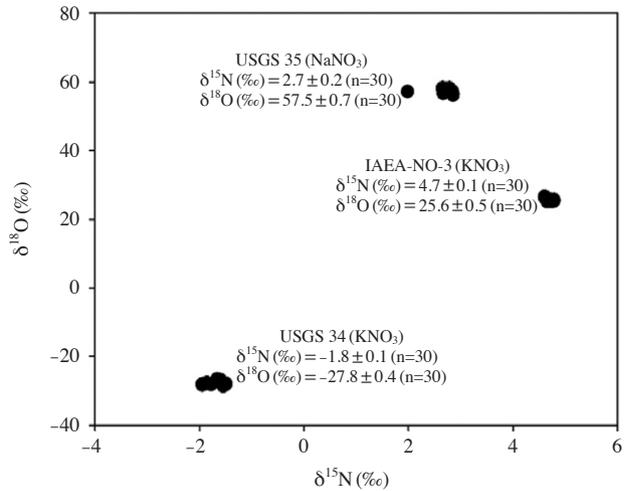


Fig. 5. Plot of $\delta^{18}\text{O}$ against $\delta^{15}\text{N}$ for IAEA standards.

0.1‰ $\delta^{18}\text{O}$: -27.8±0.4‰, 3) USGS 35 : $\delta^{15}\text{N}$: 2.7±0.2‰ $\delta^{18}\text{O}$: 57.5±0.7‰의 범위 안에서 정밀 · 정확도를 확보하였고, 0.01~0.09 mg L^{-1} 농도에서는 정확한 분석값을 얻기 어려웠다. 그러나 배양 용기를 20 mL 바이오펀이 아닌 60 mL 바이오펀을 사용하고 시료량을 보다 많이 투여하여 신뢰성 있는 분석값을 확보하였다. 그러므로 TG-IRMS를 이용한 환경시료 측정 시 최소 0.01 mg L^{-1} 수준의 질산성 질소 농도 범위에서 분석 신뢰도를 확보하였다. 이러한 분석값은 기존 국외 연구들에 의해 보고된 값과도 일치하였다(Bohlke *et al.*, 2003). 이러한 결과를 통하여 분석법이 성공적으로 개발되었음을 확인하였고 해외에 전적으로 의존하였던 질산성 질소의 질소와 산소 동위원소 동시 분석이 국내에서 가능해짐에 따라 분석에 소요되었던 시간과 비용 절감 등 경제적인 면 이외에도 국내에 질산성 질소 오염원 판별연구에 많이 활용될 것이다.

기존에 수행하였던 연구는 주로 Kjeldahl 증류법을 활용하여 질산성 질소의 질소 동위원소비를 분석하였다. Kim *et al.*(2012)의 연구 결과에 따르면, 본 연구에서 활용한 표준물질 USGS34 (Potassium nitrate KNO_3 , $\delta^{15}\text{N}$ -1.8‰)을 이용하여 0.01~20 mg L^{-1} 농도 범위를 분석한 결과 0.01~0.3 mg L^{-1} 에서는 검출이 되지 않았고 0.4~20 mg L^{-1} 의 농도에서는 ±0.3‰의 편차를 보여 정확도가 상대적으로 떨어졌다. Kjeldahl 증류법은 고온조건에서 NH_4^+ 를 NH_3 로 휘산시키며, 휘산된 NH_3 는 차가운 콘덴서를 지나면서 냉각되어 pH가 낮은 0.01N 황산(H_2SO_4)에 포집되어 NH_4^+ 상태로 존재하게 된다. 그 이후 NO_3^- 는 Devada's alloy에 의해 NH_4^+ 로 환원된다. 시료 내에서 NH_4^+ 를 먼저 휘산시킨 후 NO_3^- 분석이 이루어지기 때문에 저농도에서의 분석은

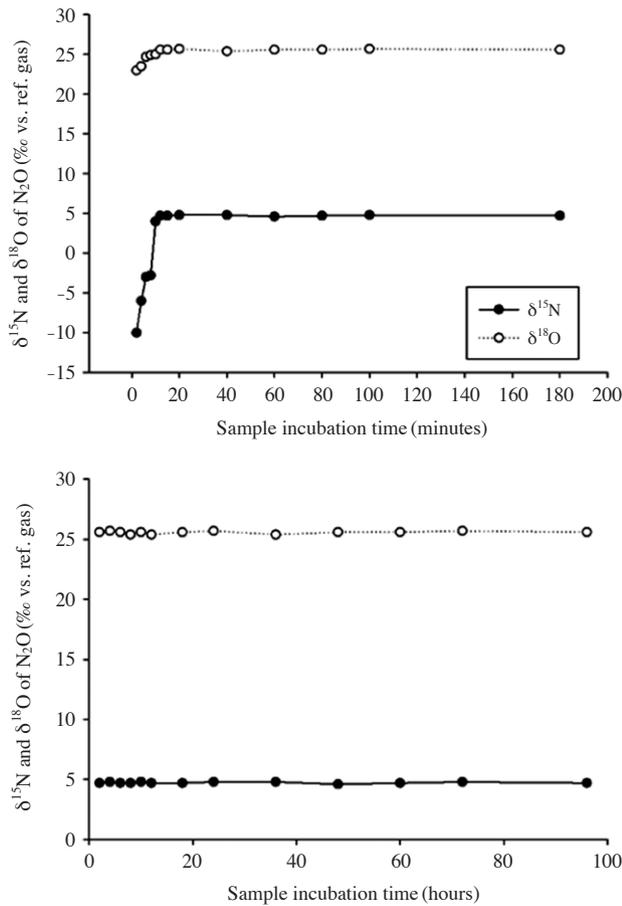


Fig. 6. Time course of the yield, $\delta^{18}\text{O}$ against $\delta^{15}\text{N}$ of N_2O produced from IAEA-NO-3 by *P. chlororaphis* ssp. *aureofaciens* (ATCC® 13985).

용이하지 않는 것으로 여겨진다. 또한, 시료를 준비하는 과정에서 오븐건조 혹은 동결건조 시에 동위원소의 분별 작용이 나타나 측정값 보정이 필요하다. 분석 신뢰구간의 농도범위에서 ($0.4\sim 10\text{ mg L}^{-1}$) 오븐건조 시에 $-8.1\sim -2.0\%$ 로 6.1% 의 광범위한 질소 안정동위원소비 변화를 보이지만, 동결건조 시에는 $-4.9\sim -4.1\%$ 로 0.8% 의 미비한 변화를 보인다. 동결건조는 시료 내 수분을 제거하는 가장 일반적인 방법으로 안정동위원소 분석에 적합하며 (Carabel *et al.*, 2006), 오븐건조 시 고온에 약한 일부 세포 및 유기물의 분해 및 파괴과정이 동반될 수 있다 (Lecea *et al.*, 2011). 일부 연구에서 오븐건조, 동결건조를 이용한 시료 건조방법이 $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ 값에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였지만 (Bosley and Wainright, 1999; Kaehler and Pakhomov, 2001), 일부 연구에서는 다양한 의견을 제시하고 있다. Brearley (2009)는 60°C 이상의 온도에서 시료를 건조할 경우에 대부분의 시료에서 $\delta^{15}\text{N}$ 값이 가벼

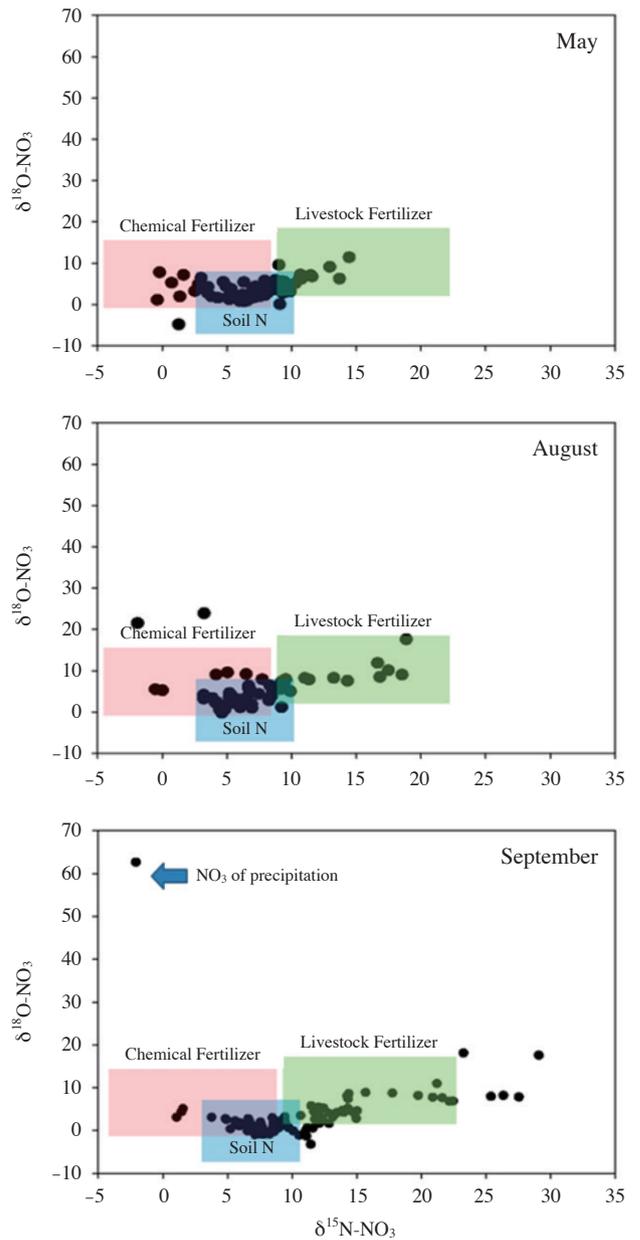


Fig. 7. Nitrate $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ for river sampling station in May, August and September.

워지는 경향을 보였으며, Lecea *et al.* (2011)는 $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ 값이 무거워지는 경향을 보인다고 보고하였다. 그러므로 $\delta^{15}\text{N}$ 의 변동은 일정하지 않는 것으로 여겨진다. 본 연구에서도 오븐건조에서 질소 안정동위원소비가 무거워지거나 가벼워지는 일정한 변화보다는 큰 변동폭이 관찰되었으며, 이러한 결과는 오븐건조 동안에 시료가 기체상 (gaseous ammonia) 형태로 증발하여 남아 있는 organic pool의 변동에서 기인한 것으로 여겨진다. 동결건조 방법은 증발

과정을 통해서 물을 제거하는 오븐건조 방식보다는 승화(sublimation) 과정을 통해서 물을 제거하기 때문에 시료 내의 안정동위원소비 변화를 최소화 할 수 있다.

이러한 결과들로 미루어볼 때 저농도에서 질산성질소($^{15}\text{NO}_3\text{-N}$)의 분석을 위해서는 많은 시료량(최소 200 mL)을 확보해야 하고 동결건조 방법을 사용해야 하는 Kjeldahl 증류법보다는 탈질 미생물법이 미량의 시료(0.1~20 mL)를 사용하기 때문에 기존 방법에 사용되었던 시료의 부피를 100배까지 감소시킬 수 있으므로 다양한 시료에서의 분석을 가능하게 하고 있다. 또한 Kjeldahl 증류법은 동결건조 등의 과정으로 인하여 10일 이상의 분석시간이 소요되지만 탈질 미생물법은 배양시간까지 포함하여 짧은 2일의 분석시간이 소요될 뿐만 아니라 기존의 질소 동위원소비 결과값 외에 산소 동위원소비 결과값도 얻을 수 있어 환경 중 질소원을 판별할 수 있는 유익한 분석법이라 할 수 있다.

2. 탈질 박테리아 배양시간 변화에 따른 안정동위원소비의 정밀 · 정확도연구

정확한 안정동위원소비 측정을 위한 미생물 배양시간을 파악하기 위하여 다양한 배양시간(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 36, 48) 범위에서 5회 반복 분석 실험하였다. 일반적으로 미생물 배양 30분 후에 표준물질(IAEA-NO-3 (Potassium nitrate KNO_3 , $\delta^{15}\text{N}$ 4.7‰ $\delta^{18}\text{O}$ 25.6‰)을 주입 후 분석하였을 때 질산염이 아산화질소(N_2O)로 완전히 전환되면서 일정한 값에 도달하였다(Fig. 6). 지속적으로 시료를 분석할 경우, 샘플 배치를 준비하고 분석하는 데 필요한 시간 최소한의 척도인 16시간째에도 안정적인 동위원소비를 나타내었다. 또한, 오랜 시간을 배양을 지속하더라도(표시되지 않음) 최소 72시간 동안 정밀도의 변화가 없음을 나타내었다. 그러나 30분 미만으로 배양할 경우, 첫 번째 측정(2분후)과 최종 측정(72시간) 사이의 안정동위원소비 변화는 질소($\delta^{15}\text{N}$ 3‰)가 산소($\delta^{18}\text{O}$ 15‰)보다 크게 나타났다.

질산성 질소의 안정동위원소비를 분석하기 위해서는 박테리아에 의하여 질산염 시료를 아산화질소로 완전히 전환시키는 것이 매우 중요하다. 완전한 전환이 이루어지지 않는다면 시료 내 남아 있는 질산성 질소의 동위원소비적 분별 작용이 나타나기 때문에, 생성물과 반응물 사이의 질소동위원소 질량 균형이 생겨나지 않는다(Sigman *et al.*, 2001). Christensen and Tiedje (1988)의 연구 결과에 따르면, *P. chloraraphis*에 의한 질산염의 아산화질소로의 전환은 10분 후에 완료되지만, 우리의 자료는 일반적으로 3분 후에 완료에 가까운 아산화질소로의 전환이 이루어진다

(Fig. 6). 그러나 정확한 동위원소 분석을 위해 우리는 시료의 질산염 농도와 부피(질산염 농도가 낮고 시료 용량이 더 많을수록 길어짐)와 세균 배양시간을 고려하여 완전한 환원에 필요한 시간을 찾아야 한다. 우리의 자료는 보다 더 긴 배양시간에서 해로운 영향을 나타내지 않으므로, 하루에 준비된 20 mL 멸균 바이오펀에 시료를 넣고 밤새 배양하여 다음 날 동위원소비를 분석하는 것이 바람직하다.

3. 지하수에서의 질소기원 유기물 변동 연구

질산염의 기원을 추적하기 위하여 질소 오염원별 질소, 산소 안정동위원소 라이브러리를 구축하고자 하였다. 시중에서 판매하고 있는 합성비료(화학비료, 무레타, 복합비료 등)의 경우, 질산성 질소의 질소 안정동위원소비는 -5~10‰, 산소 안정동위원소비는 0~15‰의 범위를 보였다. 소, 돼지, 닭 등이 배설물로 만들어진 가축비료의 경우, 질산성 질소의 질소 안정동위원소비는 10~23‰, 산소 안정동위원소비는 0~20‰의 범위를 보였다. 오염원의 영향을 받지 않은 토양의 경우, 질산성 질소의 질소 안정동위원소비는 3~10‰, 산소 안정동위원소비는 -5~5‰의 범위를 보여, 합성비료와 가축비료의 중간에 위치하였다(Fig. 7). 그러나 빗물의 경우 질산성 질소의 질소 안정동위원소비는 -3‰, 산소 안정동위원소비는 65‰의 값을 나타내어 매우 차별화된 분석값을 보였다.

자연에서 질소 안정동위원소는 대부분 ^{14}N (99.6%)와 ^{15}N (0.4%)의 형태로 존재하며, 가장 거대한 질소 저장고인 대기중 질소의 안정동위원소비는 0‰이다. 또한 식물에 의한 생물학적 질소고정(biological N_2 fixation) 과정 중의 동위원소 분별은 매우 작아서 질소 안정동위원소비가 0‰에 가깝다(Fry, 1999). 그러므로 본 연구에서 토양 시료에서 질소 안정동위원소비가 이러한 영향을 받았을 것이라고 여겨진다. 합성 비료의 경우, 하버 제조법(Haber process)으로 만들어진 비료는 질소 안정동위원소비가 0‰에 가까우며, 가축 분뇨에서 발생한 암모니아 화합물로 만들어진 합성 비료는 20~30‰의 무거운 질소 안정동위원소비를 나타내고 있어서 이 차이를 이용한다면 질소 오염의 기원을 추적할 수 있는 참고자료로 활용할 수 있을 것이다(Costanzo *et al.*, 2001). 특히 가축비료의 경우 축종에 따라 동위원소비의 차이를 보였으며, 같은 축종이라도 운동장이나 노상에 상당기간 방치되어 부식이 진행된 경우 동위원소비가 무거워지는 경향을 보였다.

위에서 얻어진 결과를 활용하여 50지점의 하천수 시료를 채수하여, 탈질 박테리아 분석법으로 질산성 질소의 질소($\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3$) 및 산소($\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3$)의 안정동위원소비의 변

화를 관찰하였다(Fig. 7). 5월의 경우, 대부분의 시료가 토양 및 합성 비료의 영향을 받는 것으로 나타나고 있으나 ($\delta^{15}\text{N} -1\sim 15\%$, $\delta^{18}\text{O} -8\sim 12\%$) 11월의 경우 일부 시료에서 질소 안정동위원소비가 점차적으로 무거워지면서 가축비료 ($\delta^{15}\text{N} 2\sim 30\%$, $\delta^{18}\text{O} -3\sim 20\%$)의 영향을 받는 것으로 여겨진다. 이는 강우기 이후 농경지 및 축사에서 기인된 외부 기원 유기물들이 하천수로 유입된 결과로 여겨진다. 외부 기원 오염원은 점오염원과 비점오염원으로 나눌 수 있으며, 점오염원에는 하수처리장 및 폐수종말처리장, 축산농가에서 기인한 가축분뇨 등이 있고, 비점오염원에는 농경지에서 사용하는 질소비료나 산림에서 하천으로 유입되는 질소들이 있다(Camargo *et al.*, 2006). 이러한 질소의 증가로 인하여 식물플랑크톤, 저서조류, 대형 수생식물과 같은 일차생산자가 급속히 증식하여 수생태의 부영양화 현상을 초래한다(Kim *et al.*, 2014). 부영양화 평가 및 모니터링이 주로 질산염, 인 클로로필-a의 농도를 바탕으로 시행되지만 그 기원을 찾기에는 난해한 부분이 있었다. 그러나 박테리아 탈질법을 활용한 질산성 질소의 질소 및 산소 안정동위원소비를 조사한다면, 국내 하천수 및 지천에서 질소 오염원 기원 연구에 활용 가능할 것으로 여겨진다.

적 요

본 연구는 박테리아 탈질법을 이용하여 질산성 질소의 질소 및 산소의 안정동위원소 분석법을 연구하였으며, 시료 농도, 미생물 배양시간에 따른 분석값의 변화에 대하여 고찰하였다.

탈질미생물법을 이용하여 시료 내 질산염 농도가 0.1 mg L⁻¹까지 질산성 질소의 산소 및 질소 동위원소 분석이 가능하였고, 0.2%까지 정확도를 확보하였다. 환경시료(지하수) 내 질산염의 기원을 추적하기 위하여 잠재적 질소 오염원(합성비료, 축산비료)의 동위원소비를 조사한 결과, 합성비료 ($\delta^{15}\text{N-NO}_3 -5\sim 10\%$, $\delta^{18}\text{O-NO}_3 0\sim 15\%$)는 축산비료 ($\delta^{15}\text{N-NO}_3 10\sim 23\%$, $\delta^{18}\text{O-NO}_3 0\sim 20\%$)와 동위원소비가 현격한 차이를 보였다. 연구지역 지하수 동위원소비와 비교한 결과, 계절별로 서로 다른 질소 오염원의 영향을 받는 것으로 여겨진다.

과거 질산염의 안정동위원소를 분석하기 위해서 다양한 방법이 시도되었다. Revesz *et al.* (1997)은 양이온 교환 수지를 이용한 분리법을 보고하였으며, Silva *et al.* (2000)와 Fukada *et al.* (2003)은 음이온 교환 수지를 이용한 분리법을 보고하였고, McIlvin and Altabet (2005)는 카드뮴을 이용한 화학적 변환 방법을 보고하였다. 하지만 이러한 방법

에 사용되는 시약은 독성이 강하고 복잡한 전처리 과정으로 인한 긴 전처리 시간을 소요함으로 인하여 분석비용이 비싸다는 단점이 있었다. 하지만 탈질미생물법은 소량의 질산염을 이용하기 때문에 기존 방법에 비해 분석에 사용되는 시료의 부피를 1/100까지 감소시켜 과거 분석이 어려웠던 빙하, 공극수, 해수 등에 대한 분석이 가능한 장점이 있다.

수생태계로 유입되는 다양한 질소 기원을 파악하기 위하여 탈질미생물법으로 분석된 안정동위원소비를 활용한 다면 효율적인 수질 관리를 위한 해석기능을 제공할 것이다. 또한, 국내 최초로 지하수 환경시료에 적용함으로써 오염 기원 추적 기법을 확립하는 데 목적을 두고 있으며, 추후 정립된 분석기법을 토대로 환경분야에서 질산성 질소의 오염 인자 판별 연구에 널리 활용되기를 기대한다.

사 사

본 연구과제는 국립환경과학원 연구사업 R&D 예산으로 수행하였습니다.

REFERENCES

Bohlke, J.K., S.J. Mroczkoski and B.L. Weand. 1982. Process chemistry for water and wastewater treatment. Prentice Hall Inc, Englewood Cliff, New Jersey, 449.

Bosley, K.L. and S.C. Wainright. 1999. Effects of preservatives and acidification on the stable isotope ratios (¹⁵N: ¹⁴N, ¹³C: ¹²C) of two species of marine animals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **56**: 2181-2185.

Brearley, F.Q., J.D. Scholes and S.S. Lee. 2005. Nitrogen nutrition and isotopic discrimination in tropical ectomycorrhizal fungi. *Research in Microbiology* **156**: 184-190.

Böttcher, J., O. Strebel, S. Voerkelius and H.L. Schmidt. 1990. Using isotope fractionation of nitrate-nitrogen and nitrate-oxygen for evaluation of microbial denitrification. *Journal of Hydrology* **114**: 413-424.

Burns, D.A. and C. Kendall. 2002. Analysis of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of nitrate to differentiate nitrate sources in runoff at two watersheds in the Catskill Mountains of New York. *Water Resource Research* **38**(5): 1051.

Camargo, J.A. and A. Alonso. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystem: A global assessment. *Environmental International* **32**: 831-849.

Carabel, S., P. Godinez-Dominguez, L. Versimo, L. Fernandez and J. Freire. 2006. An assessment of sample processing

- methods for stable isotope analyses of marine food webs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **336**: 254-261.
- Casciotti, K.L., D.M. Sigman, M. Galanter Hastings, J.K. Böhlke and A. Hilkert. 2002. Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method. *Analytical Chemistry* **74**: 4905.
- Cey, E.E., D.L. Rudolph, R. Aravenab and G. Parkinc. 1999. Role of the riparian zone in controlling the distribution and fate of agricultural nitrogen near a small stream in southern Ontario. *Journal of Contaminant Hydrology* **37**(1): 45-67.
- Chae, G.T., S.T. Yun, B. Mayer, B.Y. Choi, K.H. Kim, J.S. Kwon and S.Y. Yu. 2009. Hydrochemical and stable isotopic assessment of nitrate contamination in an alluvial aquifer underneath a riverside agricultural field. *Agricultural Water Management* **96**: 1819-1827.
- Choi, W.J., G.H. Han, H.M. Ro, S.H. Yoo and S.M. Lee. 2002. Evaluation of nitrate contamination sources of unconfined groundwater in the North Han River basin of Korea using nitrogen isotope ratios. *Geosciences Journal* **6**: 47-55.
- Choi, Y.J., J.W. Jung, W.J. Choi, K.S. Yoon, D.H. Choi, S.S. Lim, J.H. Jeong, B.J. Lim and N.M. Chang. 2011. Estimation of pollution sources of Oenam watershed in Juam lake using nitrogen concentration and isotope analysis. *Journal of Korean Society on Water Quality* **27**: 467-474.
- Cole, M.L., K.D. Kroeger, J.W. McClelland and I. Valiela. 2006. Effects of watershed land use on nitrogen concentrations and $\delta^{15}\text{N}$ in groundwater. *Biogeochemistry* **77**: 199-215.
- Costanzo, S.D., M.J. O'Donohue, W.C. Dennison, N.R. Loneragan and M. Thomas. 2001. A new approach for detecting and mapping sewage impacts. *Marine Pollution Bulletin* **42**: 149-156.
- Davis, S.N. and J.J. Suarez. 1974. Chemical character of return irrigation water in tropical volcanic islands. *Environmental Geology* **1**: 69-73.
- Deutsch, B., M. Mewes, I. Liskow and M. Voss. 2006. Quantification of diffuse nitrate inputs into a small river system using stable isotopes of oxygen and nitrogen in nitrate. *Organic Geochemistry* **37**: 1333-1342.
- French, C., L. Rock, K. Nolan, J. Tobin and A. Morrissey. 2012. The potential for a suit of isotope and chemical markers to differentiate sources of nitrate contamination: A review. *Water Research* **46**: 2023-2041.
- Fry, B. 1999. Using stable isotopes to monitor watershed influences on aquatic trophodynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **56**: 2167-2171.
- Hubner, H. 1986. Isotope effects of nitrogen in the soil and biosphere, Handbook of environmental isotope geochemistry, Vol. 2, pp. 361-425.
- Kaehler, S. and E.A. Pakhomov. 2001. Effects of storage and preservation on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of selected marine organisms. *Marine Ecology Progress Series* **219**: 299-304.
- Kellman, L.M. and C. Hillaire-Marcel. 2003. Evaluation of nitrogen isotopes as indicators of nitrate contamination sources in an agricultural watershed. *Agriculture Ecosystem and Environment* **95**: 87-102.
- Kendall, C. 1998. Tracing sources and cycling of nitrate in catchments, In: Kendall, C. and J.J. McDonnell (eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*, pp. 519-576.
- Kim, I.S., K.S. Lee, Y.S. Bong, J.S. Ryu and K.J. Kim. 2012. Nitrogen and Oxygen analysis of nitrate using denitrification method. *Journal of the Geological Society of Korea* **48**(4): 351-356.
- Kim, M.S., J.M. Kim, J.Y. Hwang, B.K. Kim, H.S. Cho, S.J. Youn, S.Y. Hong, O.S. Kwon and W.S. Lee. 2014. Determination of the Origin of Particulate Organic Matter at the Lake Paldang using Stable isotope ratios. *Korean Journal of Environmental Ecology* **47**(2): 127-134.
- Kim, M.S., T.J. Park, S.H. Yoon, B.R. Lim, K.H. Shin, O.S. Kwon and W.S. Lee. 2015. Introduction of Kjeldahl Digestion method for nitrogen stable isotope analysis and case study for tracing nitrogen source. *Korean Journal of Ecology and Environment* **48**(3): 147-152.
- Kohl, D.H., G.B. Shearer and B. Commoner. 1971. Fertilizer nitrogen: Contribution to nitrate in surface water in a corn belt watershed. *Science* **74**: 1331-1334.
- Oren, O., Y. Yechieli, J.K. Bohlke and A. Doby. 2004. Contamination of groundwater under cultivated fields in an arid environment, central Arava Valley, Israel. *Journal of Hydrology* **290**: 312-328.
- Payet, N., E. Nicolini, K. Rogers, H.S. Macary and M. Vauclin. 2010. Evidence of soil pollution by nitrates derived from pig effluent using ^{18}O and ^{15}N isotope analyses. *Agronomy for Sustainable Development* **30**: 743-751.
- Lecea, A.M., A.J. Smit and S.T. Fennessy. 2011. The effects of freeze/thaw periods and drying methods on isotopic and elemental carbon and nitrogen in marine organisms, raising questions on sample preparation. *Rapid Communication Mass Spectrometry* **25**: 3640-3649.
- Marconi, D., M.A. Weigand, P.A. Rafter, M.R. McIlvin, M. Forbes, K.L. Casciotti and D.M. Sigman. 2015. Nitrate isotope distributions on the US Geotraces North Atlantic crossbasin section: signals of polar nitrate sources and low latitude nitrogen cycling. *Marine Chemistry* **177**: 143-156.
- McMahon, P.B. and J.K. Böhlke. 2006. Regional patterns in the isotopic composition of natural and anthropogenic nitrate in groundwater, High Plains, USA. *Environmental Science and Technology* **40**(9): 2965-2970.
- Ministry of Environment of Korea. 2012. <http://www.law.go.kr/DRF/MDRFILawService.jsp?OC=me&ID=7134> (July 3, 2012)
- Min, J.H., S.T. Yun, K. Kim, H.S. Kim and D.J. Kim. 2003. Geologic controls on the chemical behaviour of nitrate in

- riverside alluvial aquifers Korea. *Hydrological Processes* **30**: 1197-1211.
- Ohte, N., S.D. Sebestyen, J.B. Shanley, D.H. Doctor, C. Kendall, S.D. Wankel and E.W. Boyer. 2004. Tracing sources of nitrate in snowmelt runoff using a high-resolution isotopic technique. *Geophysical Research Letters* **31**: L21506.
- Oren, O., Y. Yechieli, J.K. Bohlke and A. Dody 2004. Contamination of groundwater under cultivated fields in an arid environment, Central Arava Valley, Israel. *Journal of Hydrology* **290**(3/4): 312-328.
- Ostrom, N.E., L.O. Hedin, J.C. von Fisher and G.P. Robertson. 2002. Nitrogen transformations and NO₃ removal at a soil-stream interface: A stable isotope approach. *Ecological Applications* **12**(4): 1027-1043.
- Rock, L. and B. Mayer. 2004. Isotopic assessment of sources of surface water nitrate within the Oldman River basin, Southern Alberta, Canada. *Water, Air & Soil Pollution* **4**: 545-562.
- Sigman, D.M., K.L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter and J.K. Bohlke. 2001. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Analytical Chemistry* **73**: 4145-4153.
- Silva, S.R., P.B. Ging, R.W. Lee, J.C. Ebbert, A.J. Tesoriero and E.L. Inkpen. 2002. Forensic applications of nitrogen and oxygen isotopes in tracing nitrate sources in urban environments. *Environmental Forensics* **3**: 125-130.
- Smith, S.J., J.S. Schepers and L.K. Porter. 1990. Assessing and managing agricultural nitrogen losses to the environment. *Advances in Soil Science* **14**: 1-43.
- Spalding, R.F., M.E. Exner, G.E. Martin and D.D. Snow. 1993. Effects of sludge disposal on groundwater nitrate concentrations. *Journal Hydrology* **142**: 213-228.