

## 질산성 질소 제거를 위한 독립영양 황탈질 칼럼에서의 미생물 적응에 관한 연구

신도연 · 문희선 · 김재영 · 남경필\*

서울대학교 지구환경시스템공학부

## Microbial Adaptation in a Nitrate Removal Column Reactor Using Sulfur-Based Autotrophic Denitrification

Do Yun Shin · Hee Sun Moon · Jae Young Kim · Kyoungphile Nam\*

School of Civil, Urban and Geosystem Engineering, Seoul National University

### ABSTRACT

Two sulfur-based column reactors inoculated with a bacterial consortium containing autotrophic denitrifiers were operated for 100 and 500 days, respectively and nitrate removal efficiency and the adaptation of microbial communities in the columns were monitored with column depths and time. For better understanding the adaptation phenomenon, molecular techniques including 16S rDNA sequencing and DGGE analysis were employed. Although both columns showed about 99% of nitrate removal efficiency heterotrophic denitrifiers such as *Cenibacterium arsenioxidans* and *Geothrix fermentans* were found to a significant portion at the initial stage of the 100-day reactor operation. However, as operation time increased, an autotrophic denitrifier *Thiobacillus denitrificans* became a dominant bacterial species throughout the column. A similar trend was also observed in the 500-day column. In addition, nitrate removal efficiencies were different with column depths and thus bacterial species with different metabolic activities were found at the corresponding depths. Especially, *T. denitrificans* was successfully adapted and colonized at the bottom parts of the columns where most nitrate was reduced.

**Key words :** Sulfur-based autotrophic denitrification, Permeable reactive barrier, 16S rDNA, DGGE, *Thiobacillus denitrificans*

### 요 약 문

본 연구에서는 독립영양 황탈질반응을 이용한 질산성 질소 처리 반응 벽체의 탈질능과 미생물학적 안정성을 확인하기 위하여 황/석회석과 독립영양 황탈질 미생물을 이용한 칼럼 반응기를 상향식으로 500일간 운전하여 시간과 깊이 에 따른 질산성 질소의 제거 효율을 분석하였으며, 반응기 내부의 미생물 군집 변화를 16S rDNA-cloning 염기서열 분석법 및 DGGE 기법으로 분석하였다. 실험 결과, 미생물의 대사 활동에 따라 칼럼 깊이 별로 질산성 질소 제거율 및 미생물 군집 분포의 큰 차이가 나타났다. 칼럼 반응기의 질산성 질소 제거율은 99%에 달하였으며, 특히 칼럼 아래쪽에서 질산성 질소 제거율이 매우 높게 나타났다. 시간에 따른 제거율은 칼럼 운전 100일 후부터 큰 차이를 나타내지 않았다. 초기 접종원에서는 독립영양 황탈질 미생물인 OTU DE-1, *Thiobacillus denitrificans*의 비율이 15%에 불과하였으며 반응기 운전 초기에는 접종원 및 100일 운전 후 반응기의 윗부분에서 종속영양 탈질 미생물인 OTU DE-2, *Cenibacterium arsenioxidans*와 DE-3, *Geothrix fermentans*가 78%와 90%로 높은 비율을 차지하여 종속영양 탈질 미생물들이 우점종을 차지하였다. 그러나 OTU DE-1은 100일 후에 칼럼 아래쪽에서 94%의 비율을 차지하여

\*Corresponding author : kpnam@snu.ac.kr

원고접수일 : 2005. 9. 5    게재승인일 : 2006. 1. 31

질의 및 토의 : 2006. 6. 30 까지

우점종이 되었으며, 500일 운전 후 분석한 결과 칼럼 전체에서 86%를 차지하여 독립영양 황탈질 미생물이 안정적으로 적응하였음을 알 수 있었다.

**주제어** : 독립영양 황탈질 반응, 반응벽체, 16S rDNA, DGGE, *Thiobacillus denitrificans*

## 1. 서 론

현재 지표수는 물론 지하수의 상당량이 질산성 질소에 의해 오염된 것으로 보고되고 있다. 2004년 환경부 지하수측정망 운영 결과에 따르면 수질기준을 초과한 지점 중 23%가 질산성 질소에 의해 오염된 것으로 나타났다(환경부, 2005). 일반적으로 질산성 질소의 오염원은 무기비료 및 생활 하수, 축산 폐수나 공장 폐수 등으로, 이들이 장기간 토양에 유입되면서 지하수 오염으로 확산된다. 질산성 질소는 인체 내에서 아질산성 질소로 환원되며 6개월 미만의 영아에서는 헤모글로빈과 결합하여 산소 전달을 저해하여 청색증을 일으키는 것으로 보고되어 있다. 또한 아질산성 질소는 체내에서 아민과 결합하여 nitrosamine이라는 발암성 물질을 형성한다고 알려져 있다(Fan and Steinberg, 1996).

지하수 내의 오염 물질을 제거하기 위한 기법 중 잘 알려진 기법인 반응벽체(Permeable Reactive Barrier, PRB)를 질산성 질소 제거 반응에 응용할 수 있다. 반응벽체 기법은 반영구적이고 지하수가 통과 가능한 반응 매질을 용존 물질로 오염된 지하수의 경로에 매설하여 지하수가 통과하면서 물리적, 화학적 또는 생물학적 반응을 통해 정화되는 시스템을 말한다(US EPA, 1998). 특히, 독립영양 미생물을 이용한 생물학적 반응벽체의 경우 슬러지 발생량이 낮기 때문에 통과 전후의 수리학적 특성에 큰 변화가 없고 반응 매질의 수명이 길다는 점 등의 장점을 기대할 수 있다. 본 연구의 주제인 질산성 질소 제거를 위한 독립영양 황탈질 미생물은 0가 상태의 황을 전자 공여체로 이용하고, 이산화탄소를 탄소원으로 이용하며, 질산성 질소를 최종 전자 수용체로 사용하여 질산성 질소를 질소 기체로 환원시킨다. 탈질 반응 동안 황은 황산 이온으로 산화된다(Balows et al., 1992). 이러한 반응을 이용하여 물 속의 질산성 질소를 제거하는 칼럼 실험은 이미 여러 연구자들에 의해 수행된 바 있다(문희선 등, 2005; Koenig and Liu, 1996; Moon et al., 2004; Zhang and Lampe, 1999). 가장 널리 알려진 독립영양 황탈질 미생물로는 *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans* 등이 있으며 이들에 대한 미생물학적, 생리학적 특성은 이미 잘 알려져 있다(Holt et al., 1994; Hoor, 1975; Kelly and Wood, 2000).

자연계에는 수많은 종류의 미생물들이 존재하며 이들은 다양한 환경에 적응하여 생존할 수 있는 능력을 가지고 있다. 산소와 영양분이 미미한 지하수에서도 다양한 종의 미생물들이 발견되는데(Stevens and McKinley, 1995), 지하수의 질산성 질소 제거를 위해 반응벽체에 주입되는 독립영양성 탈질균은 이러한 토착 미생물들과 경쟁하면서 그들의 생리적 활동 공간(niche)을 구축하고 반응벽체 내에서 구조적 안정성(structural stability)을 확보해야만 한다. 따라서 본 연구에서는 질산성 질소가 공급되는 상황에서 외부에서 주입된 독립영양 황탈질균이 다른 미생물들과의 상호작용에서 우위를 점하고 고유의 기능을 수행할 수 있는지 칼럼 실험을 통하여 알아보았다. 이를 위하여 칼럼 내 미생물들의 변화를 분자생물학적 기법을 이용하여 모니터링 하였다.

기존의 배양에 의존한 균집 분석 방법과 달리, 분자생물학적 기법을 이용한 미생물 균집 분석은 여러 면에서 장점이 있다. 배양에 의존한 방법의 경우 미생물은 다양한 생리적 특성을 가지며 복합 영양 생물이 많아 개별적으로 분리하기 어렵기 때문에 실제 미생물 균집 구조를 반영하기 어려운 것에 반해, 16S rDNA 염기서열 분석에 기반한 미생물 균집 분석은 다양한 기질을 이용하는 배양이 어려운 미생물까지 검출할 수 있어 더욱 정확한 분석이 가능하다(Wagner et al., 1993; Amann et al., 1995). 그리하여 본 연구의 목적은 독립영양 황탈질반응을 이용하여 지하수 내 질산성 질소를 제거하는 반응벽체 개발의 기초실험으로서 황/석회석 칼럼 반응기의 장기간 운전을 통해 질산성 질소의 제거 효율을 시간 별 및 깊이 별로 알아보고, 미생물 균집 구조의 변화를 분자생물학적 기법을 이용하여 분석하는 것이다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 미생물 분리 및 배양

*Thiobacillus denitrificans*는 황을 산화하고 질산성 질소를 전자수용체로 이용하는 다양한 환경에 존재하는 통성 혐기성 균이다(Kelly and Wood, 2000). 본 연구를 위해, *Thiobacillus denitrificans*를 포함하는 황 산화 미생물 mixture를 활성슬러지로부터 농화배양을 통하여 분리하였다. 배양 조건은 thiosulfate와 질산성 질소를 포함하고 있

**Table 1.** 16S rDNA-targeted oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence of primer (5'-3')	Target site <sup>a</sup>	Reference
27F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-27	Lane (1991)
338F-GC <sup>b</sup>	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT	339-358	Muyzer et al. (1993)
518R	GTATTACCGCGGCTGCTG	536-519	Muyzer et al. (1993)
1522R	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	1522-1509	Johnson (1994)

<sup>a</sup> 16S rDNA position according to *E. coli* numbering.

<sup>b</sup> When used for DGGE, this primer has the following GC clamp at its 5' end  
: 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3'

는 액체배지(2 g KNO<sub>3</sub>, 5 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, and 0.01 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O/L)를 이용하여 30°C에서 배양시키면서 실험에 이용하였다(Koenig and Liu, 1996; 문희선 등, 2005).

## 2.2. 칼럼 실험

독립영양 황탈질 반응을 수행하기 위한 반응기는 지름/높이 70/700 mm(100일 운전 칼럼), 500/1000 mm(500일 운전 칼럼)의 파이레스 칼럼을 이용하였으며, 여기에 2 mm 크기의 입자상 황과 2-5 mm의 석회석을 부피 비 3 : 1로 충전하였다(Flere and Zhang, 1999). 독립영양 황탈질반응은 알칼리도를 소모하여 pH가 낮아지는 경향이 있으므로 반응 중 pH를 중성으로 유지시키기 위해 석회석을 사용하였다. 미생물 군집 분석을 위해 두 개의 연속식 반응기를 운전하였는데, 위와 같은 조건으로 농화 배양된 mixture를 충전된 칼럼에 주입하고 3일 동안 재순환시켜 입자상 황에 미생물이 충분히 부착될 수 있도록 하였다. 황 입자 표면에 형성된 미생물 군락을 확인하기 위해 SEM(Scanning Electronic Microscopy)을 통해 관찰하였다.

질산성 질소로 오염된 유입수는 0.433 g KNO<sub>3</sub>, 0.05 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/L의 조성의 인공지하수를 사용하였으며, 칼럼 반응기는 20°C에서 침투속도 1 m/day, 유량 1.0 mL/min으로 상향식 운전을 하였다. 각 칼럼은 세 등분으로 나누어 sampling port를 설치하였으며(100일 칼럼의 경우 0, 17, 33 cm; 500일 칼럼의 경우 0, 30, 80 cm) 반응기 운전 기간 동안 주기적으로 Ion chromatography(Dionex DX500)를 이용하여 질산성 질소이온(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 아질산성 질소이온(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 황산이온(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)의 농도를 분석하였다.

100일과 500일 운전 후, 각 칼럼으로부터 반응 매질을 깊이 별로 아랫부분과 윗부분(100일 칼럼의 경우 0-17 cm, 33-50 cm, 500일 칼럼의 경우 0-30 cm, 80-100 cm)에서 채취하여, 미생물 군집을 분석하였다.

## 2.3. DNA 추출

황 입자에 부착된 미생물을 분리하기 위하여 약 50 g의 반응매질을 50 mL conical tube에 인산염 완충용액(pH 7.0) 10 mL과 함께 넣고 20°C, 200 rpm에서 2시간 동안 현탁시키고, 현탁액을 10,000 rpm에서 15-20분간 원심분리시켰다. 원심분리를 통해 얻은 미생물로부터, FastDNA SPIN Kit(QBiogene, USA)와 UltraClean Mega Prep Soil DNA Kit(MoBio, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 TE(Tris-EDTA) buffer solution에 용해시켜 -20°C에 보관하였다. DNA 농도는 UV/VIS Spectrophotometer Optizen 2120 UV(Mechasys Co. Ltd., Korea)를 사용하여 260 nm에서 측정하였다.

## 2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭반응

분리된 genomic DNA로부터 16S rDNA 증폭을 위하여 universal primers 27F, 338F, 518R, 1522R가 사용되었다(Table 1). PCR 증폭을 위해, 10 pmol/L의 27F와 1522R primer 용액 1 µL, template DNA 20 ng을 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)에 증류수를 이용하여 최종 부피 20 µL로 맞추어 실험하였다. 모든 PCR 반응은 GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 수행하였으며, PCR 조건은 처음 반응은 94°C에서 10분, 다음 각 단계에서는 94°C에서 45초, 56°C에서 45초, 72°C에서 45초 동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 30번 반복하고, 마지막으로 72°C에서 7 min동안 반응시켜 완결하였다. DNA 클로닝을 위한 PCR 반응에서도 같은 방법을 사용하였으나, 주 사이클은 25 cycle로 수행하였다. 모든 PCR 산물은 Mini Gel system B1A(Owl, USA)를 사용하여 전기영동법으로 분석하였다.

## 2.5. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 분석

Denaturing gradient gel은 100% denaturant(7 M urea, 40% formamide)와 40%C acrylamide stock 용액(acryla-

amide-*N*, *N'*-methylene-bisacrylamide, 37.5 : 1)으로 35-45%의 gradient를 가지는 9%(wt/vol) polyacrylamide gel을 만들었다. 이후 응고제와 촉매제로서 10% APS (Ammonium PerSulfate) 용액과 TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)을 주입하였다. DGGE는 1×TAE buffer(40 mM Tris, 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA at pH 8.3)를 running buffer로, D-Code system(Bio-Rad, USA)을 사용하여, 100V, 60°C에서 7시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후에 1×GreenStar staining dye로 15분간 염색하여 UV illuminator(302 nm)로 band 양상을 확인하였으며 Bio-Rad Quant\_One(v 5.2)를 사용하여 밴드의 강도를 비교함으로써 상대적인 정량화를 시도하였다.

**2.6. 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통학적 분류 (Phylogenetic tree)**

PCR에 의해 증폭된 16S rDNA는 WIZARD PCR Preps DNA purification system(Promega, USA)을 사용하여 정제한 후 pGEM-T vector cloning system(Promega, USA)을 사용하여 클로닝하였다. Competent cell은 *Escherichia coli* JM109(Promega, USA)를 사용하였으며, X-Gal 과 IPTG를 함유하는 LB ampicillin 배지 상에서 하얀색을 띠는 콜로니를 100개씩 선택하였다. 선택된 클론들은 T7-SP6 primer로 colony PCR하고 27F-1522R primer을 사용하여 위와 같은 조건으로 다시 PCR하였다. 이렇게 하여 얻은 100개의 16S rDNA 클론들은 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 기법을 사용하여 대표적인 10여 개의 그룹으로 분류하였다. 제한 효소로는 *Alu I*과 *Hae III*(Promega, USA)을 사용하였고 절단된 DNA는 2.0%(wt/vol) agarose gel을 사용하여 전기영동 방법으로 패턴을 분석하였다. 10여 개의 그룹으로 분류된 16S rDNA 클론들은 ABI model 3731(Perkin-Elmer Ltd., Foster city, CA)을 사용하여 염기서열을 분석하였으며, 얻어진 염기서열은 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) search(Altschul et al., 1990)를 통해 GenBank (EMBL, DDBJ, PDB)에 등록되어 있는 기존 미생물들과 비교하여 16S rDNA 클론들의 미생물학적 정보를 얻었다. 염기 서열 자료는 CLUSTAL X(Higgins and Sharp, 1988)를 사용하여 정렬하고 MEGA2(Kumar et al., 1993)를 사용하여 neighbor-joining method(Saitou and Nei, 1987)로 phylogenetic tree를 구성하여 계통학적 분류를 시도하였다. Phylogenetic tree의 정확성을 위해 1,000번의 bootstrap resampling analysis(Felsenstein, 1985)를 수행하였다.

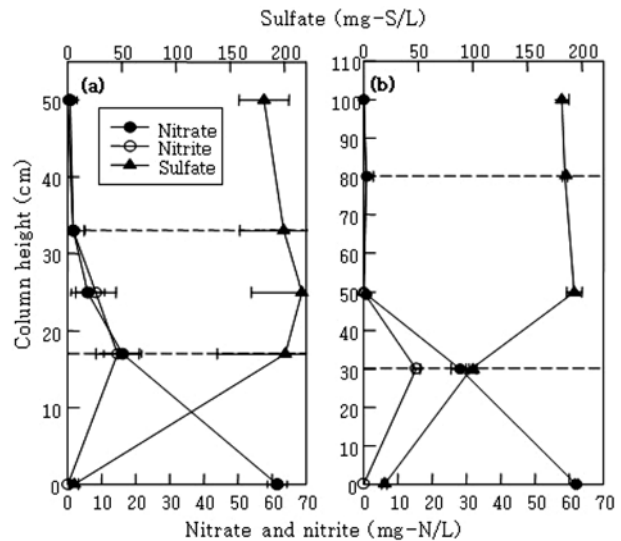


Fig. 1. Vertical distribution of nitrate, nitrite, and sulfate concentrations in (a) 100-day column and (b) 500-day column.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 황석회석 칼럼의 깊이 별 질산성 질소 제거율 확인**

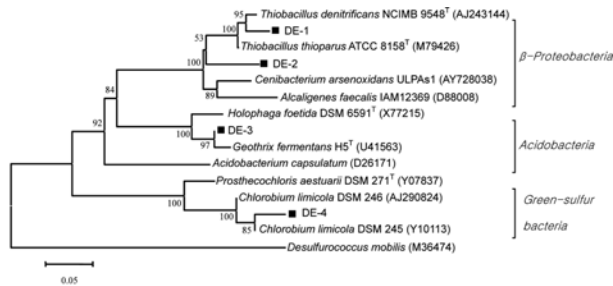
100일과 500일 동안 60 mg-N/L 농도의 질산성 질소를 주입하여 칼럼을 운전하면서 질산성 질소의 제거 효율을 측정하였다. 두 반응기 모두 거의 99%의 질산성 질소 제거율을 나타내었다. Fig. 1에 질산성 질소, 아질산성 질소, 황산 이온의 깊이 별 분포를 도시하였다. 대부분의 질산성 질소 제거는 두 칼럼 모두 주로 칼럼 하부에서 이루어졌는데 이는 다른 문헌에서 보고하는 결과와 일치한다(Ahn et al., 2004; Moon et al., 2004). 상향식으로 운전되는 칼럼에서 질산성 질소로 오염된 인공 지하수가 도입되는 부분인 칼럼 하부에서의 제거율이 가장 높으므로, 독립영양 황탈질반응이 즉각적·효과적으로 수행되고 있음을 알 수 있다. 운전 기간에 관계 없이, 질산성 질소 제거율과 경향은 두 칼럼에서 유사하게 나타났다.

**3.2. 미생물 군집의 시간 별, 깊이 별 변화**

시간과 깊이에 따른 독립영양 황탈질 칼럼 반응기에서의 미생물 군집의 변화를 알아보기 위해 칼럼 운전 100일과 500일 후 칼럼의 아랫부분과 윗부분의 두 부분에서 시료를 채취하여 16S rDNA-cloning 분석법으로 분석하였다. 각 부분의 클론 약 100여 개를 RFLP 기법을 이용하여 4개의 OTUs(Operational Taxonomic Units)로 분류하였다. 네 개의 주 OTUs(i.e., DE-1, DE-2, DE-3, DE-4)와 BLAST search를 이용해 GenBank에서 검색한 가장

**Table 2.** Sequence lengths, their closest species, and similarities of four key OTUs

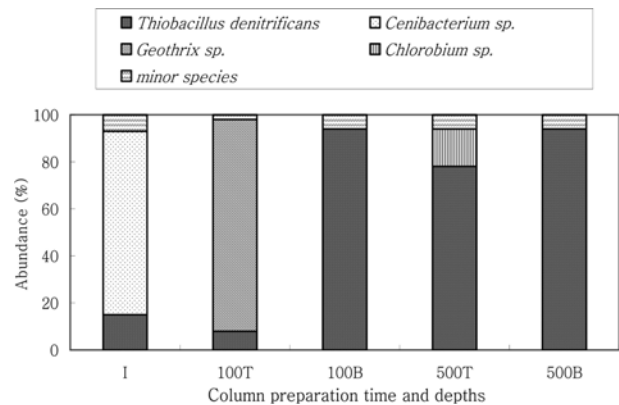
OTU	Closest species in GenBank	Similarity (%)	Electron donor	Electron acceptor
DE-1	<i>Thiobacillus denitrificans</i> NCIMB 9548 <sup>T</sup>	97	S <sup>0</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
DE-2	<i>Cenibacterium arsenioxidans</i> UIPAs1	94	OM	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
DE-3	<i>Geothrix fermentans</i> H5 <sup>T</sup>	98	OM	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
DE-4	<i>Chlorobium limicola</i> DSM 246	98	H <sub>2</sub> S	CO <sub>2</sub>

**Fig. 2.** Phylogenetic tree of four key OTUs and their closely related bacteria based on 16S rDNA sequences. *Desulfurococcus mobilis* is the outgroup species as the *Archaea* domain. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. Numbers at the nodes are the bootstrap values. ■; OTUs obtained in this study.

가까운 종, 상동성, 전자 공여체 및 수용체 등을 Table 2에 나타내었으며 이들의 계통학적 분류는 Fig. 2에 phylogenetic tree로 표현하였다.

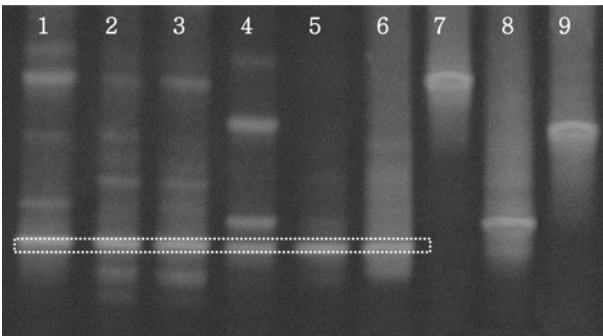
실험 결과, OTU DE-1이 시간이 지남에 따라 전체 칼럼에서 우점종이 되었다. OTU DE-1은 가장 가까운 종이  $\beta$ -Proteobacteria class에 속하는 *Thiobacillus denitrificans* NCIMB 9548<sup>T</sup>로 나타났으며, 초기 접종원에서는 탈질균 consortium의 15%를 차지하였으나 100일 후에 전체 칼럼에서 51%를, 500일 후에는 86%를 차지했다. *T. denitrificans*는 잘 알려진 독립영양 탈질 미생물로 탄소원으로 이산화탄소를 사용한다(Batchelor and Lawrence, 1978; Koenig and Liu, 1996; Moon et al., 2004). 특히 DE-1이 100일째에 칼럼 아래 부분에서 높은 비율(94%)을 차지한 것은 탈질율이 칼럼 아래쪽에서 가장 높게 나타난 결과와 일치한다고 할 수 있다.

DE-2와 DE-3은 초기 접종원과 100일째 칼럼의 윗부분에서 각각 78%와 90%를 차지했다. 이들의 가장 가까운 종은 *Cenibacterium arsenioxidans* ULPA1와 *Geothrix fermentans* H5<sup>T</sup>이며, 이들은 모두 중속영양 탈질 미생물로 칼럼 반응기가 충분히 독립영양 탈질 반응에 적응하지 못한 기간에 나타났다. 이들은 전자 수용체로 질산성 질소를 이용하며 전자 공여체로 유기물, 특히 사멸한 미생물의 분해 산물 등을 이용하는 것으로 여겨진다. 500일째

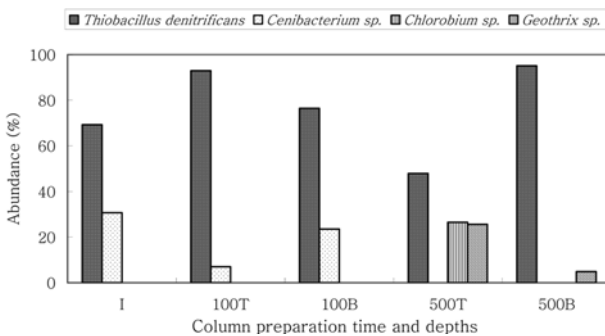
**Fig. 3.** Comparison of microbial community composition in columns with time and depths (I, inoculum; 100T, top part of 100-day column; 100B, bottom part of 100-day column; 500T, top part of 500-day column; 500B, bottom part of 500-day column).

의 칼럼 윗부분에서는 DE-4가 16%의 비율을 차지했다. DE-4의 가장 가까운 종은 *Chlorobium limicola* DSM 246으로, 이들은 혐기성 환경에서 황화수소(H<sub>2</sub>S)를 전자 공여체로 삼아 CO<sub>2</sub>를 고정하는 green-sulfur bacteria이다. 이들은 황화수소를 황산 이온으로 산화하면서 전자를 얻으며, 최종적으로 황 입자를 세포 속에 축적한다(Holt et al., 1994). 다른 연구자들은 독립영양 황탈질 반응기에서 green sulfur bacteria 그룹인 *Chlorobium phaeobacteroides*, *Pelodictyon luteolum*, *Chlorobium vibrioforme*와 *Chlorobium limicola*등과 가까운 uncultured photosynthetic bacterium PHOS-HE36(97% similarity)이 나타남을 보인 바 있다(Koenig et al., 2005). Fig. 3에 칼럼 깊이와 운전 시간 별 미생물 군집의 변화를 나타내었다. 결국 시간이 지남에 따라 칼럼 전체가 독립영양 황탈질 미생물이 우점종이 됨으로써 완전히 환경에 적응하였다고 할 수 있다.

Fig. 4는 깊이 별 시간 별 칼럼의 DNA 샘플과 클로닝한 결과를 DGGE를 통해 비교함으로써 미생물 군집 구조의 다양성을 나타낸 것이다. 밴드의 밝기 차이에 따른 군집 비율의 정량적 정보를 얻기 위하여 이미지 분석을 수행하였으며, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 밴드의 수를 통해 나타난 미생물 다양성을 비교해 보면, 100일 후의



**Fig. 4.** DGGE patterns of 16S rDNA fragments from sulfur-oxidizing autotrophic denitrification column and cloned samples. From left to right: lane 1, inoculum; 2, top part of 100-day column; 3, bottom part of 100-day column; 4, top part of 500-day column; 5, bottom part of 500-day column; 6, DE-1; 7, DE-2; 8, DE-3; 9, DE-4. The dashed rectangular on the gel denotes *Thiobacillus denitrificans*.



**Fig. 5.** Band intensities of DGGE analysis based on 16S rDNA sequences recovered from sulfur-oxidizing autotrophic denitrification columns (I, inoculum; 100T, top part of 100-day column; 100B, bottom part of 100-day column; 500T, top part of 500-day column; 500B, bottom part of 500-day column).

미생물 다양성이 500일 후보다 높게 나타나는데, 이는 미생물들의 환경에 대한 적응에 의한 결과라 생각된다. DE-1은 모든 샘플에서 시간 및 깊이에 크게 영향을 받지 않고 각 레인에서 50-80% 가량의 가장 밝은 밝기를 나타내어, 전체 운전 기간 중 계속하여 우점종임을 보여 주었다. 이는 100일과 500일 모두 탈질 효율에 큰 차이가 없다는 결과와 일치한다. 또한 앞서 기술한 바와 같이, DE-2가 초기 접종원과 100일 후에 23-30%의 비율로 나타나는 것은 칼럼운전 초기에는 종속영양 탈질 반응이 일어나고 있음을 시사한다. 또한, 황화수소를 전자공여체로 이용하는 미생물인 DE-4가 500일 후의 칼럼 윗부분에서 26.5%의 밝은 밴드를 보이는 것은 황을 이용한 탈질 반

응 결과 생성된 황산 이온이 환원되어 발생하는 황화수소를 이용하는 미생물이 증가했음을 보여준다.

#### 4. 결 론

지하수에서의 질산성 질소 제거를 위한 독립영양 황탈질 반응체의 미생물학적 적응성 및 반응의 안정성을 살펴보기 위하여 운전시간과 칼럼 깊이에 따른 질산성 질소 제거 효율과 미생물 군집 구조 변화를 살펴보았다. 500일의 운전 기간 동안 반응기의 질산성 질소 제거율은 거의 99%의 효율을 보였으며, 특히 칼럼 하부, 즉 기질이 처음 공급되는 지점에서의 제거율이 높게 나타났다. 반응 매질 표면에 형성된 생물막을 분자생물학적 방법에 의해 분석한 결과 시간이 지남에 따라 독립영양 황탈질 미생물인 *Thiobacillus denitrificans*로 분류되는 미생물이 칼럼 전체에서 우점종으로 나타났다. 또한 탈질 효율이 가장 높은 칼럼 아랫부분에서 독립영양 황탈질 미생물이 우점종으로 발견됨으로써 탈질을, 즉 기질 사용과 미생물 군집 변화와의 관계를 보여 주었다. 총 운전 기간 동안 관찰된 대표적인 미생물 종은 독립영양 미생물인 *Thiobacillus denitrificans*와 *Chlorobium sp.*, 그리고 종속영양 미생물인 *Cenibacterium sp.*와 *Geothrix sp.* 등이었으며 칼럼운전 시간이 증가할수록 독립영양 미생물 종들의 분포가 증가하였는데 이는 질산성 질소 제거에 직접적으로 관여하는 독립영양성 미생물들이 유입되는 기질에 대해 성공적으로 적응을 하였다는 것을 의미한다.

#### 사 사

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2006-000-10136-0)와 한국과학재단 지정 포항공과대학교 차세대바이오환경기술연구센터(AEBRC)의 연구 지원(R11-2003-0060-03003-0)으로 수행되었습니다. 또한, 본 연구를 위한 서울대학교 공학연구소의 기술적 지원에도 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

문희선, 장선우, 남경필, 김재영, 2005, 강변여과수의 질산성 질소 제거를 위한 생물학적 반응체의 준 과일릿 실험에 관한 연구, 대한환경공학회, 27(3), 302-308.

Ahn, Y., Park, W., Tatavarty, R., and Kim, I. S., 2004, Comparative analysis of vertical heterogeneity of microbial community in sulfur-packed reactor used for autotrophic nitrate removal, *J.*

- Environ. Sci. Health, Part A: Tox./Haz. Subs. Environ. Eng.*, **A 39**(7), 1805-1818.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. J., 1990, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H., 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143-169.
- Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H., 1992, *The Prokaryotes*, 2nd ed., Springer-Verlag, NY, p. 2638-2657.
- Batchelor, B. and Lawrence, A.W., 1978, Autotrophic denitrification using elemental sulfur, *J. Wat. Poll. Control Federation*, **50**, 1986-2001.
- Fan, A.M. and Steinberg, V.E., 1996, Health implication of nitrate and nitrite in drinking water: an update on Methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **23**, 35-43.
- Felsenstein, J., 1985, Confidence limits of phylogenies, an approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**(4), 783-791.
- Flere, J.M. and Zhang, T.C., 1999, Nitrate removal with sulfur-limestone autotrophic denitrification process, *J. Environ. Eng.-ASCE*, **125**(8), 721-729.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1988, CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, *Gene*, **73**, 237-244.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., and Williams, S.T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 361.
- Hoor, T.T., 1975, A new type of thiosulphate oxidizing, nitrate reducing microorganism: *Thiomicrospira denitrificans* sp. nov., *Neth. J. of Sea Res.*, **9**, 344-351.
- Johnson, J.L., 1994, Similarity analysis of rRNAs, In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (ed.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 683-700.
- Kelly, D.G. and Wood, A.P., 2000, Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the  $\beta$ -subclass of the *Proteobacteria*, with strain NCIMB 9548 as the type strain, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **50**, 547-550.
- Koenig, A. and Liu, L.H., 1996, Autotrophic denitrification of landfill leachate using elemental sulfur, *Water Sci. Technol.*, **34**, 469-476.
- Koenig, A., Zhang, T., Liu, L.H., and Fang, H.H.P., 2005, Microbial community and biochemistry process in autotrophic denitrifying biofilm, *Chemosphere*, **58**(8), 1041-1047.
- Korea Ministry of Environment, 2005, 2004 년 지하수 수질측정망 운영결과 .
- Kumar, S., Tomura, K., and Nei, M., 1993, MEGA, Molecular Evolution Genetics Analysis, Version 10. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Lane, D.J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, p. 115-175.
- Moon, H.S., Ahn, K.H., Lee, S., Nam, K., and Kim, J.Y., 2004, Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system, *Environ. Pollut.*, **129**(3), 499-507.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987, The neighbor-joining method, a new method for constructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, **4**(4), 406-425.
- Stevens, T.O. and McKinley, J.P., 1995, Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers, *Science*, **270**, 450-454.
- US EPA, 1998, Permeable reactive barrier technologies for contaminant remediation, EPA/600/R-98/125.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., and Schleifer, K.H., 1993, Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(5), 1520-1525.
- Zhang, T.C. and Lampe, D.G., 1999, Sulfur:limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: batch experiments, *Water Res.*, **33**(3), 599-608.