

## 고체 당밀정화제와 종속영양 탈질미생물을 이용한 질산염 제거

이병선<sup>1,2</sup> · 이규연<sup>2</sup> · 신도연<sup>2</sup> · 최종학<sup>1</sup> · 김영진<sup>2</sup> · 남경필<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>한국농어촌공사 농어촌연구원, <sup>2</sup>서울대학교 건설환경공학부

### Denitrification by a Heterotrophic Denitrifier with an Aid of Slowly Released Molasses

Byung Sun, Lee<sup>1,2</sup> · Kyuyeon, Lee<sup>2</sup> · Doyun Shin<sup>2</sup> · Jong Hak, Choi<sup>1</sup>  
Young Jin Kim<sup>2</sup> · Kyoungphile, Nam<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Rural Research Institute, Korea Rural Community Corporation

<sup>2</sup>Dept. of Civil and Environmental Engineering, Seoul National University

#### ABSTRACT

This study was conducted to determine the potential applicability of slowly released molasses (SRM) to treat nitrate-contaminated groundwater. SRM was made by dispersing molasses in hydroxy propyl methyl cellulose-silica-microcrystalline cellulose matrix. Column test indicated that SRM could continuously release molasses with slowly decreasing release rates of 64.6 mg-COD/L · h up to 65 hrs, 12.1 mg-COD/L · h up to 215 hrs, and 4.4 mg-COD/L · h up to 361 hrs. A batch test using an isolated indigenous heterotrophic denitrifier *Pseudomonas* sp. KY1 having nitrite reductase (*nirK*) and liquid molasses demonstrated that the bacterium decreased 100 mg-N/L of nitrate to less than 10 mg-N/L at the C/N ratio of 10/1 in 48 hours. In a *Pseudomonas* sp. KY1-attached Ottawa sand column which continuously received molasses from a SRM-containing reservoir, the bacterium successfully removed nitrate from 20 mg-N/L to 3 mg-N/L during the 361 hours of column operation. The results showed the possibility that SRM can be used as a reliable, long-term extra carbon source for indigenous heterotrophic denitrifiers.

**Key words :** Slowly released molasses (SRM), *Pseudomonas* sp. KY1, Heterotrophic denitrification, Nitrate

#### 1. 서 론

외부 유기탄소원과 종속영양성 탈질미생물을 이용한 질산염(NO<sub>3</sub>) 정화 연구는 그동안 여러 연구자들에 의해 수행되어져 왔다. 그 예로 탈질미생물에 의한 이용이 쉽고 수일 내 우수한 탈질효율을 보이는 알코올(메탄올과 에탄올)(Kapoor and Viraraghavan, 1997; Louzeiro et al., 2003)과 아세트산(Her and Huang, 1995; Mohseni-Bandpi et al., 1999), 포도당(Chou et al., 2003) 등을 이용한 연구가 있다. 그러나 이 물질들은 상대적으로 비싼 가격 때문에 실용화에 문제점이 있는 것으로 드러났다. 반면 구입이 용이하고 가격이 저렴한 밀집·벧집(Avnimelech et al., 1993; Soares and Abeliovich, 1998; Aslan and

Türkman, 2003), 톱밥(Robertson and Cherry, 1995; Schipper and Vojvodic-Vukovic, 1998), 종이(신문지)(Volkita et al., 1996b), 슝(Volkita et al., 1996a; Su and Puls, 2007) 등의 자연유기물을 외부 탄소원으로 이용하는 탈질 연구도 진행된 바 있다. 그러나 이들 자연유기물의 경우에는 셀룰로우스, 헤미셀룰로우스, 리그닌 등의 난분해성 물질이 전체의 많은 부분을 차지하고 있기 때문에 분해미생물의 종류가 제한적이고 분해속도 또한 느리다. 이 외에도, 가격이 저렴하고 미생물 이용성이 상대적으로 우수한 양조장 잔류액, 치즈 잔류액, 효모 그리고 당밀 등의 액상 유기잔류물을 탄소원으로 활용하여 탈질을 시도한 연구가 진행되기도 하였다(Monteith et al., 1980; Skrinde and Bhagat, 1982; Boaventura and

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

원고접수일 : 2010. 4. 2 심사일 : 2010. 5. 13 게재승인일 : 2010. 7. 26  
질의 및 토의 : 2010. 10. 31 까지

Rodrigues, 1997; Lee et al., 2001). 이 가운데 당밀(molasses)은 탈질에 있어 경제성과 미생물에 의한 이용성 모두(1,500원/리터, 설탕, 포도당, 과당 등 단당류와 이당류의 합량 48~56%)에서 만족스러운 결과를 나타내었다(Eckenfelder, 1989; Horan, 1990; Ten Have et al., 1994, Boaventura and Rodrigues, 1997). 최근에 들어서는 이러한 당밀과 종속영양 탈질미생물을 이용한 지하수 중 질산염 정화연구가 성공적으로 수행된 바 있다(Cunningham et al., 2003; Dutta et al., 2005). 이들 연구에서는 액상 당밀을 지상주입설비를 이용하여 질산염으로 오염된 지하수에 주입하고, 대수층 내 탈질 미생물을 활성화시켜 질산염 오염 지하수를 정화하는 전략을 사용하였다. 그러나 지상주입설비를 이용한 액상 당밀의 지속적 주입은 시설비, 운영비, 인건비 등이 지속적으로 요구되므로 정화 비용이 꾸준히 소요되는 단점이 있다. 따라서 질산성질소로 오염된 지하수를 현장에 존재하는 종속영양 탈질미생물과 장기 제어방출이 가능한 고체형태 당밀(이 후, 고체 당밀정화제)이 충전된 원위치 정화 반응벽체를 이용하여 처리하면, 한 번 시공으로 장기간 정화가 실현가능하므로 제반 비용을 절감할 수 있고, 나아가 저비용 고효율로 처리할 수 있을 것이다. 본 연구는 질산염으로 오염된 농촌 지역의 지하수를 관정형 반응벽체공법을 이용하여 정화하는 기술을 개발하기 위한 연구의 일부로서, 질산염 오염 대수층 현장에서 분리한 종속영양 탈질미생물이 고체 당밀정화제로부터 방출된 당밀을 유일 탄소원으로 이용하여 질산염을 제거하는 효율에 대한 내용을 다루고 있다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 탈질미생물 분리 · 동정 및 탈질유전자 확인

당밀을 유일 탄소원으로 이용하는 종속영양 탈질미생물을 분리하기 위하여 경기도 ○○지역 충적 대수층의 토양 시료를 채취하였다. 채취된 시료 10 g과 0.8% 식염수 20 mL를 원심분리용 50 mL 튜브에 넣고 2~3분 동안 교반기로 강하게 흔들어 준 뒤 15분간 정지하였다. 이 후 상등액 1 mL를 취하여 당밀을 유일 탄소원으로 하는 액체배지에 접종하였다. 액체 선택배지의 조성은 KNO<sub>3</sub> 4 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 0.4 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, 미량성분용액 SL-10(DSMZ 320) 10 mL/L, 당밀 2 g/L이었다. 액체배지 100 mL를 160 mL의 내열 유리 재질 시료병에 채우고, 아르곤 기체로 20분 동안 퍼징(purging)하여 산소를 제거한 후 부틸 고무마개와 알루미늄 뚜껑으로 닫아서 탈질 환경을 조성하였다. 이를

121°C, 15 ps에서 18분 동안 고온가압 멸균하고 상온에서 식힌 뒤 미생물을 접종, 배양하였다. 2주 이상 25°C 160 rpm 조건으로 배양시킨 배양액을 유일 탄소원이 당밀인 고체배지에 분주하여 순수분리균을 배양하였다.

순수 분리된 종속영양 탈질미생물균은 분자생물학적 방법을 이용하여 동정하였으며, 기본적으로 Burr et al. (1978)의 방법을 따랐다. 동정을 위해 우선 16S rDNA의 universal primers 27F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1522R(5'-AAGGAGGTGATCCANCC RCA-3')를 사용하여 DNA 단편을 증폭시켰다. 중합효소연쇄반응(이하 PCR)은 GeneAmp® PCR System 9700(Applied Biosystem, USA)을 사용하여 수행되었으며, 처음 반응은 94°C에서 10분, 다음 각 단계에서 94°C에서 45초, 56°C에서 45초, 72°C에서 45초 동안 가열하여 16S rDNA 유전자를 증폭하는 반응을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 7분 동안 반응시켜 증폭을 완결하였다. 반응 후에는 10% agarose gel을 이용하여 전기영동법으로 DNA 증폭 성공 여부를 확인하였다. 증폭 성공 후 DNA 염기서열이 확인된 16S rDNA 유전자는 BLAST(Altschul et al., 1990) 검색을 통해 GenBank(NCBI, USA), EMBL(Hinxton, UK), DDBJ(Mishima, Japan) 등의 데이터베이스와 비교된 후, 16S rDNA 유전자의 염기 서열 자료는 CLUSTAL X(Higgins and Sharp, 1988)를 사용하여 정렬하였고 MEGA2(Kumar et al., 1993)를 사용하여 neighbor-joining method(Saitou and Nei, 1987)로 계통학적 분류를 시도하였다. 분류의 정확성을 위해 1,000번의 bootstrap resampling analysis(Felsenstein, 1985)를 수행하였으며 이를 통해 분리된 미생물의 계통학적 위치를 확인할 수 있었다.

분리된 탈질미생물의 분자생물학적 탈질능을 확인하기 위해, 아질산염 환원효소(*nirK*, *nirS*)를 코딩하는 DNA 부위를 두 종의 primer를 이용하여 증폭하였다. *nirK*를 증폭하기 위하여 사용한 primer는 F1aCu(5'-ATCATGGTSC TGCCGCG-3')와 R3Cu(5'-GCCTCGATCAGRTTGTGGTT-3')였고, *nirS*는 cd3aF(5'-GTSAACGTSAAAGGARACS-3')와 R3cd(5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3')가 사용되었다(Hanllin and Lindgren, 1999, Throbäck et al., 2004). 아질산염 환원효소의 증폭은 처음 94°C에서 2분, 다음의 각 반복단계에서 94°C에서 30초, 51°C에서 1분, 72°C에서 1분 조건으로 35회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켜 증폭을 완결하였다. 증폭된 탈질유전자의 확인 및 데이터베이스 검색은 RCSB PDB(Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)를 활용하였다.

## 2.2. 분리균의 회분식 수준 탈질능 확인

분리된 미생물의 탈질능을 확인하기 위하여 회분식 실험을 실시하였다. 회분식 실험에 사용된 배지의 조성은  $\text{KNO}_3$  0.722 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.4 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L, 미량성분용액 SL-10(DSMZ 320) 10 mL/L 및 당밀 2.375 g/L였다. 상기 당밀배지의 초기 질산염 농도는 100 mg-N/L, 초기 당밀 농도는 2,400 mg-COD/L, C/N 비율은 10/1이었다. 상기 당밀 배지 100 mL를 160 mL 용량의 내열 유리 재질 시료병에 채우고, 아르곤 기체로 20분 동안 퍼징하여 산소를 제거한 후 부틸 고무마개와 알루미늄 뚜껑으로 닫아서 탈질 환경을 조성한 뒤 121°C, 15 psi에서 18분간 멸균하였다. 이후 25°C에서 160 rpm으로 교반하며  $10^8$  CFU/mL 이상이 될 때까지 12일(288시간)동안 배양하였다. 배양된 탈질미생물은 상기 멸균배지에 현탁액 상태로 2 mL 접종하고 0, 30, 36, 48, 96, 144, 192, 240, 288시간에 멸균 주사기를 이용하여 2 mL씩 시료를 채취한 뒤, 이온크로마토그래피(DX-80, Dionex, U.S.A.)와 분광광도계(DR-2800, HACH, U.S.A.)를 이용하여 질산염 및 당밀 농도를 분석하였다.

## 2.3. 고체 당밀정화제 제조

고체 당밀정화제는 주성분으로 액상 당밀(수분함량 25%, Hydex Co. Ltd., Korea) 49%와 부성분으로 화학약품 등급의 미결정셀룰로오스(Microcrystalline Cellulose, Sigma-Aldrich, U.S.A.) 28%, 무수규사(Samchun chemical, Korea) 9% 및 히드록시프로필메틸셀룰로오스(Hydroxypropyl Methylcellulose, Sigma-Aldrich, U.S.A., 점도 50 cps) 14%를 혼합하여 제조하였다. 우선, 액상 당밀을 분말화하는 결합제인 미결정셀룰로오스 27 g과 당밀의 분산을 용이하게 하는 무수규사 9 g을 섞고, 여기에 당밀 48 g을 혼합하였다. 상기 혼합물질에 마지막으로 당밀의 방출을 제어하는 첨가제인 히드록시프로필메틸셀룰로오스 14 g을 혼합하고 70°C 오븐에 넣어 24시간 이상 수분을 제거해서 1개 덩어리 형상의 고체 당밀정화제를 제조하였다.

## 2.4. 고체 당밀정화제를 이용한 질산염 제거

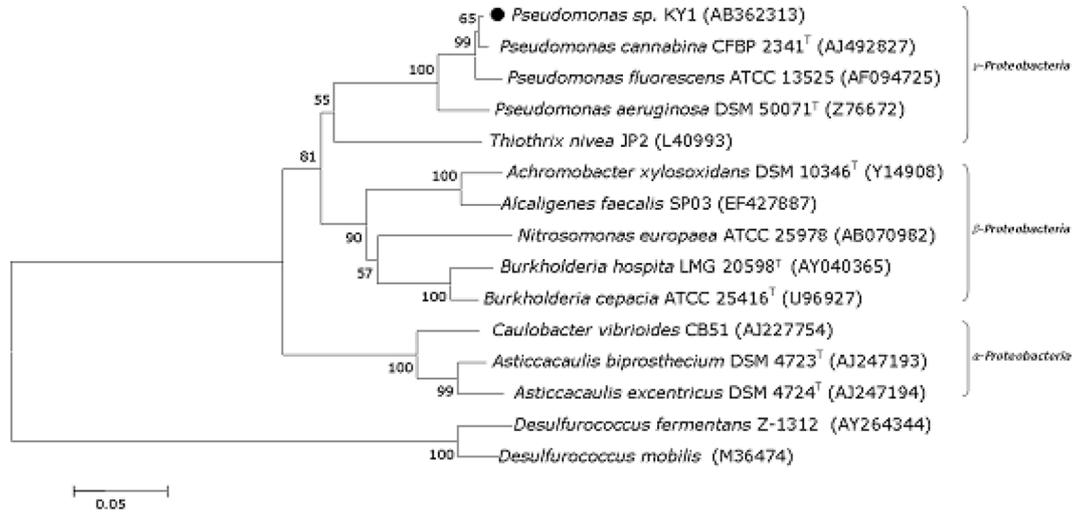
고체 당밀정화제를 이용한 컬럼규모 탈질실험을 위하여 이크릴 재질 컬럼(매질충전부피: 길이 × 내경 = 14 cm × 2 cm)을 제작하였다. 컬럼 내에는 입자크기 0.4 μm의 오타와 표준사(20-30 mesh; Fisher Scientific, U.S.A.)를 충전하였으며 그 공극율은 0.36이었다. 컬럼 내 오타와 표준사에 본 연구에서 분리한 탈질미생물을 부착하기 위하

여, 액체 당밀선택배지에서 생장시킨 탈질미생물 배양액 (i.e.,  $>10^8$  CFU/mL)을 유량조절펌프를 이용하여 유량 6 mL/h(유속 1.3 m/d)로 24시간 동안 컬럼에 유입시키면서 순환시켰다. 이후 매질에 대한 탈질미생물의 부착성을 높이기 위해 컬럼의 유입·유출구를 모두 닫고 48시간 동안 정지하였다. 탈질미생물이 부착된 컬럼에 당밀과 질산염 오염수를 공급하기 위하여, 3.2 L 용량의 유리재질 수조에 20 mg-N/L 농도의 질산염 오염수를 제조하여 381시간 동안 약 2.3 L를 주입하였다. 질산염 오염수는  $\text{KNO}_3$  145 mg/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  14.5 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.4 mg/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  14.5 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14.5 mg/L과 미량성분용액 SL-10(DSMZ 320) 0.38 mL/L으로 제조되어 121°C, 15 psi에서 18분간 멸균시킨 뒤 사용하였다. 멸균시킨 질산염 오염수의 오염을 방지하기 위하여 먼저 유리재질 수조를 70% 에틸알코올에 담귀 세척하였고, 이후 수조에 연결시킨 공기통로에는 평균직경이 0.2 μm인 실린지필터를 달았다. 질산염 오염 수에는 실험 중 포식성 원생동물이 생장하여 컬럼내로 유입된 후 탈질미생물을 용균하는 것을 방지하기 위하여 200 mg/L 농도의 시클로헥시마이드(cyclohexamide) 3.2 mL를 첨가하였다. 이렇게 제조된 질산염 오염수에 1개 고체 당밀정화제(82 g)를 메쉬망(눈금간격 1 cm × 1 cm)으로 묶어서 수조의 중앙 부분에 띄웠다. 이후 고체 당밀정화제에서 방출되는 당밀을 포함하는 질산염 오염수는 유량조절펌프를 이용하여 유량 6 mL/h(유속 1.3 m/d)로 컬럼 내로 주입하였다. 시간 경과에 따른 질산염 농도 저감을 살펴보기 위하여 컬럼 유출수에서 실험 시작 후 20, 27, 65, 95, 143, 167, 215, 236, 336, 361시간에 수질 시료를 채수하여 곧바로 이온크로마토그래피(DX-80, Dionex, USA)로 질산염( $\text{NO}_3^-$ )과 아질산염( $\text{NO}_2^-$ )을 분석하였다. 그리고 당밀의 시간에 따른 농도변화는 컬럼의 유입수에서 27, 73, 361, 381시간, 유출수에서 실험 시작 후 27, 65, 73, 95, 143, 167, 215, 236, 336, 361, 381시간에 수질시료를 채수 즉시 분광광도계(DR-2800, HACH, USA)로 COD 농도를 분석하였다 (Boaventura et al., 1997; Canter, 1997; Lee et al., 2001; Cunningham et al., 2003; Dutta et al., 2005; Quan et al., 2005). 수조 내 질산염 오염수는 주기적으로 보충되었으며, 모든 실험은 상온에서 수행되었다.

## 3. 결과 및 토의

### 3.1. 탈질미생물 분리 및 동정

현장토양에서 분리한 미생물은 *Pseudomonas fluorescens*



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of *Pseudomonas* sp. KY1 and closely related bacteria. *Desulfurococcus fermentans* Z-1312 (AY264344) and *Desulfurococcus mobilis* (M35474) in the Archaea domain were selected as the outgroup species. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. Numbers at the nodes are the bootstrap values.

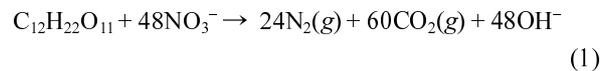
와 99% 유사한 미생물이었다. *Pseudomonas fluorescens* 는  $\gamma$ -Proteobacteria에 속하며, 토양에 존재하는 가장 흔한 탈질미생물 중 하나로 알려져 있다(Tiedje et al., 1989; Zumft, 1992). 분리된 중속영양 탈질미생물은 DDBJ에 *Pseudomonas* sp. KY1(Accession number: AB362313)으로 등록하였으며, 16S rDNA 염기서열분석으로 확인된 계통학적 관계는 Fig. 1과 같다.

분리된 미생물의 탈질능을 유전학적으로 확인하기 위해서 아질산염을 일산화질소(기체)로 환원시키는(Zumft, 1997) 아질산염 환원효소(Nitrite reductase)를 전사하는 유전자(*nirS*와 *nirK*)를 확인하였다. 아질산염 환원효소는 탈질 판단의 중요 효소로서, 질산염을 기체(일산화질소, NO)로 전환시키는 첫 번째 단계에 관여하는 효소이기 때문이 이의 존재 여부로부터 질산염계거미생물(nitrate-reducing bacteria)과 탈질미생물(denitrifier)을 구분 지을 수 있다(Zumft, 1997). 탈질미생물들은 *nirS*와 *nirK* 유전자 둘 중 하나를 가지거나, 둘 다 가진다(Zumft, 1997; Hallin and Lindgren, 1999; Throbäck et al., 2004). 실험결과, *Pseudomonas* sp. KY1은 *nirK* 유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 일반적으로 *nirS*를 가진 토양미생물이 *nirK*를 가진 미생물에 비하여 발견빈도가 높은 편이나, 실제 기능적인 차이는 없다. 상기한 유전자 확인 실험을 통해서 컬럼실험에 사용한 현장미생물이 아질산을 일산화질소로 환원시킬 수 있는 탈질미생물임을 확인하였다. 이규연(2010)에 의하면, 본 연구에 사용한 탈질미생물 단일균주를 이용하여 질산염이 질소기체까지 완전히 탈질시킴을

보인 바 있다.

### 3.2. 회분식 실험을 이용한 분리 미생물의 탈질능 확인

본 연구에서 사용한 액상 당밀은 전체 중량의 65%가 유기물질로 이루어져 있으며, 유기물의 대부분이 당 성분이다. 이중 자당(sucrose, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)이 60% 정도를 차지하는데, 주성분인 자당을 전자공여체로 하는 탈질반응의 식을 나타내면 다음 Eq. 1과 같다(Boaventura et al., 1997).



위 식에서 계산된 이론적인 C/N 비율은 0.214이지만, 이는 미생물의 성장은 배제하고 미생물이 탈질만 수행하였을 때의 최적 비율을 의미한다. 실제로 Her and Huang (1995)은 이보다 훨씬 더 높은 비율에서 완전한 탈질이 발생한다고 보고한 바 있다. 상기 연구에 따르면 아세트산(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)을 탄소원으로 이용할 경우 C/N 비율 1.9, 메탄올(CH<sub>4</sub>O)의 경우 0.9~10.0에서 완전한 탈질이 이루어진다고 보고하였다. 더불어, Lorrain et al.(2004)은 탄소원의 구조가 복잡해질수록 완전한 탈질에 요구되는 C/N 비율은 높아진다고 보고한 바 있다. 본 회분식 실험은 현장에서 분리한 *Pseudomonas* sp. KY1의 탈질능을 확인하는 것이 목적인만큼 충분한 당밀을 공급하기위해서 C/N 비율 10/1을 사용하였다. 실험결과, 초기농도 100 mg-N/L의 질산염 수용액은 실험 시작 후 30시간에 ~30%,

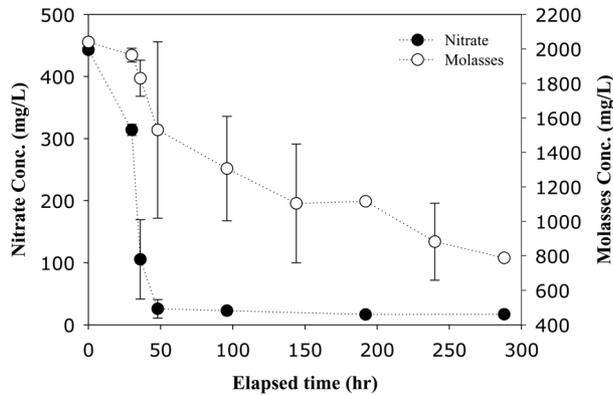


Fig. 2. Changes in nitrate and molasses concentrations by *Pseudomonas* sp. KY1 at the C/N ratio of 10/1 (batch experiment). Molasses concentrations were expressed as molasses-COD.

36시간에 ~70%, 48시간에 ~90% 이상 제거되었고, 실험 종료(288시간)시에는 ~96%의 제거효율을 보였다(Fig. 2). 당밀은 초기농도 2,400 mg-COD/L에서 실험 시작 후 36시간에 1,964 mg-COD/L, 48시간에 1,530 mg-COD/L로 저감되어, 초기 당밀농도 대비 각기 13%, 25%가 소모되었고, 실험종료(288시간) 시에는 788 mg-COD/L로 62%가 소모되었다(Fig. 2). 시간에 따른 질산염 농도를 바탕으로 미생물에 의해 저감되는 질산염의 양상을 1차 반응으로 가정하여 그 값을 얻었다. 질산염 농도 저감을 기준으로 반응상수를 구한 이유는 실험 전, 미생물이 최대 성장 상태(exponential growth phase)일 때 실험에 사용되었기 때문이며 접촉 이후 48시간이라는 매우 짧은 시간 동안만 실험하였기 때문이다. 이를 바탕으로 계산된, 질산염이 선형적으로 줄어드는 48시간 내의 유사 1차 반응속도 상수(pseudo 1st order reaction coefficient)는  $0.0033 \text{ h}^{-1}$ 이었다. 특이할 점은, 48시간 이후부터 288시간까지 제거된 질산염은 초기농도 대비 약 6%(27 mg/L)였음에 비해, 같은 시간 동안 소모된 당밀은 약 742 mg-COD/L이었다. 이론적으로 27 mg/L의 질산염을 제거하는 데에 필요한 당밀은 약 3.5 mg-COD/L이다(Eq. 1). 그러나 소모된 당밀의 양은 이론적인 소모량보다 약 216배 이상이었다. 이는 탈질과 무관하게 미생물의 성장 등과 관련되어 소모된 당밀의 양이 존재함을 추정케 한다.

### 3.3. 고체 당밀정화제를 이용한 컬럼실험 결과

#### 3.3.1. 고체 당밀정화제의 당밀방출 결과

컬럼실험을 이용한 고체 당밀정화제의 당밀방출 실험 결과, 고체 당밀정화제는 실험 종료시간인 381시간까지 지속적으로 당밀을 방출하는 것으로 나타났다. 실험 초기

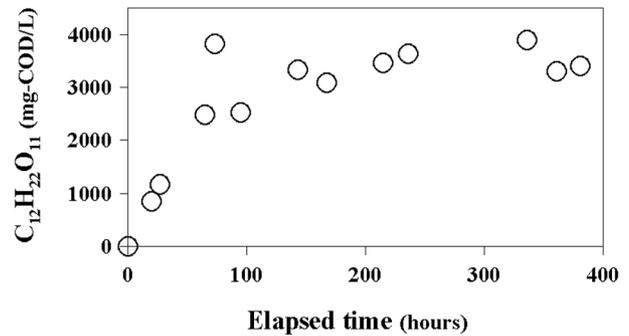


Fig. 3. Change in molasses concentration (expressed as molasses-COD) from effluent in the column.

에 물과 접촉한 고체 당밀정화제는 유화제인 히드록시프로필메틸셀룰로우스(HPMC)의 작용으로 당밀을 미약하게 방출하였다. HPMC는 비이온성 물질로, 낮은 온도의 물에서도 잘 용해되어 점성이 있는 콜로이드 용액을 형성하는 물질이며 특정온도에서 겔로 변화하는 성질을 가져(김병수 외, 2007) 당밀분자가 지하수계로 무분별하게 용출되는 것을 막아준다. 또한, HPMC에 의한 용질의 용해 시에는 pH에 관계없이 일정한 용해속도를 가지므로(김병수 외, 2007), 지하수의 성상에 관계없이 일정하게 당밀을 방출시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이 때문에 당밀은 꾸준히 방출되며 포화농도에 이르러 정상상태에 도달한다. 실험을 통해 본 연구에 사용된 고체당밀정화제의 방출을 경험값을, 당밀이 컬럼으로 유입되기 직전 측정된 농도(COD)를 바탕으로 계산하였다. 실험 시작 후 65시간까지 당밀 방출율은  $64.6 \text{ mg-COD/L} \cdot \text{h}$ , 215시간까지  $12.1 \text{ mg-COD/L} \cdot \text{h}$ , 이후 실험 종료 시까지  $4.4 \text{ mg-COD/L} \cdot \text{h}$ 이었다(Fig 3). 그러나 상기 방출율은 제한된 용적의 수조(3.2 L)에 담긴 오염수에 고체당밀정화제가 투입된 조건에서 산출된 결과물이므로, 지하수 유동이 활발한 다공질 내지 균열암반 대수층 내에서의 방출율을 의미하지는 않는다. 따라서, 현장 또는 현장을 재현한 대수층에서 고체 당밀정화제의 당밀 방출율에 대한 연구가 필요하다.

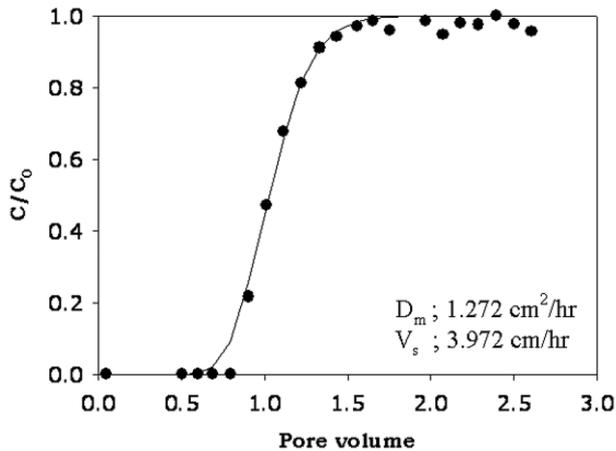
컬럼으로 유입된 당밀 농도는 유입수에서 1,278~6,744 mg-COD/L, 유출수에서 1,169~3,406 mg-COD/L 범위였다(Fig. 3). 선행된 추적자 실험에서 당밀 2,720 mg-COD/L이 녹아있는 용액을 멸균된 오티와 표준사로 충전된 컬럼에 주입한 결과를 살펴보면, 당밀용액은 분산계수(Dispersion coefficient)가  $1.272 \text{ cm}^2/\text{hr}$ 로 비반응성 물질과 유사하며 미생물에 의해 분해되지 않는 한 토양입자에 흡착되거나 자연적으로 분해되지 않는 것으로 밝혀졌다(Fig 4). 따라서 컬럼 유입수와 유출수 시료를 채수하여

**Table 1.** Changes in molasses concentration by *Pseudomonas* sp. KY 1 in the column

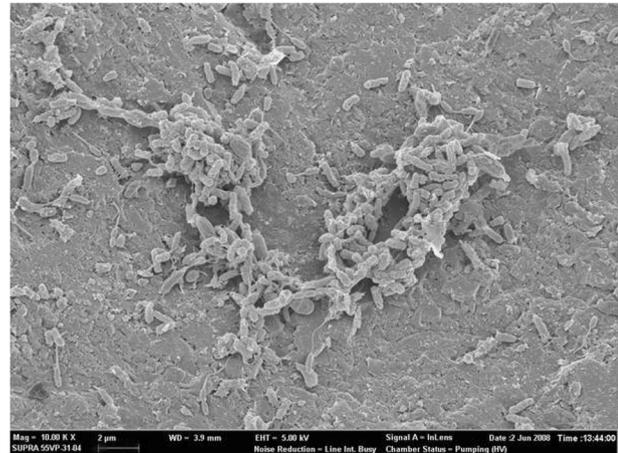
Elapsed Time (hr)	Molasses conc. expressed as COD (mg/L)		Uptake by <i>Pseudomonas</i> sp. KY 1 (mg/L)**
	Influent*	Effluent	
27	1,278	1,169	109
73	5,706	3,819	1,888
361	6,131	3,306	2,825
381	6,744	3,406	3,338

\*Molasses concentration released from the molasses-releasing test reservoir with time.

\*\*The difference of COD between influent and effluent concentrations

**Fig. 4.** Breakthrough curve using molasses as a tracer ( $D_m$ , Dispersion coefficient;  $V_s$ , seepage velocity).

COD 농도를 측정·비교하면 탈질미생물에 의한 시간별 당밀 소모량을 측정할 수 있다. 본 연구에서 사용한 길이 14 cm의 컬럼을 오염수가 통과하는데 소요되는 시간은 약 150분이므로 같은 시간 간격으로 유입수와 유출수 시료를 채수하여 COD 농도를 측정·비교하면 *Pseudomonas* sp. KY1에 의한 시간별 당밀 소모량을 측정할 수 있다. 본 연구에서는 유입수와 유출수 시료를 동일 시간에 채수하였기 때문에 정확한 당밀 소모량을 산출하기는 어렵겠지만, 전체 실험기간이 22,860분(381시간)임을 고려한다면 150분의 차이는 무시할만한 짧은 간격이므로 동일 시간에 채수한 유입수와 유출수 시료의 당밀 농도를 비교하여 당밀 소모량을 산출하였다. Table 1은 개별 시간에 측정된 컬럼 유입수와 유출수의 COD로 환산한 당밀 농도를 비교한 표이다. 27시간 경과 시 컬럼 유입수의 COD 농도는 1,278 mg-COD/L, 유출수는 1,169 mg-COD/L로 유출수가 유입수에 비해 약 109 mg-COD/L 낮게 검출되었다. 그리고 각 73, 336, 381시간 경과 시 컬럼 유입수의 COD 농도는 각 5,706, 6,131, 6,744 mg-COD/L이고, 유출수의 COD 농도는 각기 3,818, 3,306, 3,406 mg-COD/L

**Fig. 5.** Scanning electron microscopy image of *Pseudomonas* sp. KY1 on Ottawa sand granules ( $\times 10,000$ ).

L로 유출수가 유입수보다 각 1,888, 2,825, 3,338 mg-COD/L 낮은 농도로 검출되었다. 컬럼 유출수의 COD 농도가 유입수에 비해 상대적으로 낮게 검출된 것은, *Pseudomonas* sp. KY1이 109~3,338 mg-COD/L에 해당하는 당밀을 탈질을 통해서 꾸준히 증식하면서 소모하였기 때문으로 사료된다. 그리고 시간이 경과할수록 당밀 소모량이 증가하는데, 이는 *Pseudomonas* sp. KY1이 고체 당밀정화제로부터 당밀을 꾸준히 공급받아 개체수가 증가하게 되고, 증가한 *Pseudomonas* sp. KY1이 당밀을 이용함에 따라 당밀 소모량이 증가한 것으로 생각된다. 실험종료 후 컬럼을 해체하였고, 오타와 표준사 표면에 부착된 탈질미생물을 주사전자현미경(SEM; JSM 5410 LV, JEOL, Japan)으로 확대, 촬영하여 컬럼에 부착된 탈질미생물을 확인하였다(Fig. 5).

### 3.3.2 방출된 당밀을 이용한 질산염 제거

오타와 표준사에 부착된 *Pseudomonas* sp. KY1은 고체 당밀정화제로부터 방출된 당밀을 이용하여 지속적으로 질산염을 제거하였다. 최초 20 mg-N/L이었던 질산염은 65

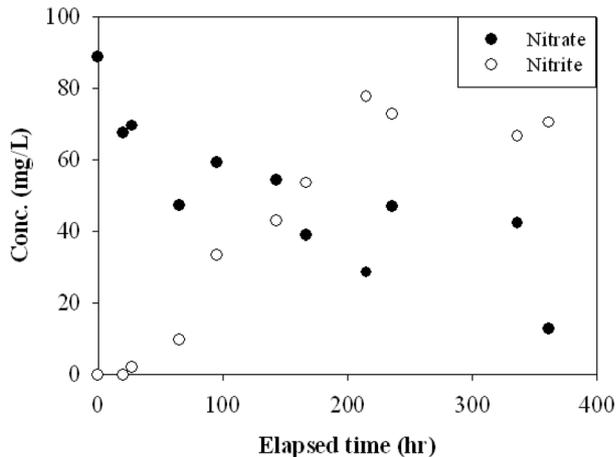


Fig. 6. Changes in nitrate and nitrite concentrations during denitrification in the column.

시간 경과 후 11 mg-N/L로 저감되어 약 ~47%가 제거되었다. 이후 167시간 경과 후에 ~56%, 그리고 최종적으로 361시간 경과 후에 최대 ~86%가 제거되었다(Fig. 6). 본 컬럼 실험에서 측정된 아질산염 농도는 질산염 농도와는 반비례적으로 시간 경과에 따라 증가함을 보였다. 아질산염은 20시간 내에는 검출되지 않았으나, 65시간 후에 ~3 mg-N/L, 167시간 후 ~16 mg-N/L, 그리고 최종적으로 361시간 경과 후 ~21 mg-N/L 농도로 검출되어 꾸준한 증가추세를 보였다(Fig. 6). 질산염을 아질산염으로 환원하는 효소는 탈질미생물 뿐만 아니라 질산염을 암모늄으로 환원시키는 미생물에서도 발견되기 때문에 질산염의 감소만으로 탈질을 단정할 수는 없다(Dandie et al., 2007). 그러나 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. KY1이 아질산염을 일산화질소로 환원시킬 수 있는 *nirK* 유전자를 가진 것을 확인하였으므로 Fig. 6의 아질산염 증가는 당밀과 질산염의 혼합 수용액이 상대적으로 빠른 유속(1.3 m/d)으로 미생물과 충분히 반응하지 못하고 지나가기 때문인 것으로 사료된다. Moon et al.(2004)은 본 연구에서 사용한 컬럼보다 규모가 큰 컬럼(지름 × 길이 = 7 cm × 70 cm)에 1,129 mg-N/L의 질산염을 1 m/d의 유속으로 주입하였을 때, 아질산염이 14일(약 330시간)까지 증가한 후 저감되기 시작하여 16일째부터는 축적이 일어나지 않았음을 보고한 바 있다. 아울러, Cunningham et al.(2003)은 현장 규모(길이 × 너비 × 깊이 = 180 ft × 130 ft × 21 ft)의 액상당밀 탈질실험에서, 본 연구의 탈질미생물과 유사한 *Pseudomonas fluorescens* strain CPC211A를 이용하여 100 mg-N/L의 질산염에 대한 탈질실험을 실시한 결과, 약 3개월 이후부터 아질산염의 축적이 거의 발생되지 않았음

을 보고한 바 있다.

#### 4. 결론 및 제언

질산염으로 오염된 국내 농경지의 대수층 토양시료로부터 *nirK*라는 아질산염 환원효소를 가진 종속영양 탈질미생물 *Pseudomonas* sp. KY1을 분리하였다. C/N 비율 10/1의 회분식 실험 결과, *Pseudomonas* sp. KY1은 48 시간 동안 870 mg-COD/L의 당밀을 소모하면서 100 mg-N/L 농도의 질산염을 ~90% 제거하였다. 당밀의 장기간 방출을 위해 미결정셀룰로오스, 무수규사, 히드록시프로필셀룰로오스를 첨가한 고체 당밀정화제를 개발하였으며, 고체 당밀정화제는 실험 초기부터 종료 시까지 1,278~6,744 mg-COD/L 농도의 당밀을 꾸준히 방출하였고, *Pseudomonas* sp. KY1은 109~3,338 mg-COD/L 농도의 당밀을 지속적으로 소모하면서 초기농도 20 mg-N/L의 질산염을 ~86%까지 제거하였다. 국내 질산염 오염 지하수의 먹는물 수질기준이 10 mg-N/L임을 고려하면, 고체 당밀정화제와 종속영양 탈질미생물을 이용한 질산염 오염수 정화방법은 오염수 내 질산염을 수질기준 이하로 효과적으로 제거할 수 있는 방법임을 보였다. 그러나 지하수의 희석효과를 고려한다고 하더라도, 일시적 혹은 국지적으로는 높은 농도의 당밀이 대수층에 잔류할 가능성이 있으므로, 목표정화부지의 효과적인 질산염 제거를 위한 당밀 구성성분의 최적비율, 주입방법, 조건 등에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하다.

#### 사 사

이 연구는 농림기술개발연구(과제번호 106108-3)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 서울대학교 공학연구소의 기술적 지원에도 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- 김병수, 윤주용, 김지용, 김문석, 강길선, 이해방, 2007, 약물 전달 체로서 HPMC(Hydroxypropyl Methylcellulose)의 응용, 고분자 과학과 기술, **18**, 549-553.
- 이규연, 2010, 당밀과 탈질미생물을 이용한 질산성 질소 오염 지하수의 현장정화 설계인자에 관한 연구, 서울대학교 석사학위논문집, p. 110.
- 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.

- Aslan, Ş. and Türkman, A., 2003, Biological denitrification of drinking water using various natural organic solid substrates. *Water Sci. Technol.*, **48**(11/12), 489-495.
- Avnimelech, Y., Diab, S., and Kochba, M., 1993, Development and evaluation of a biofilter for turbid and nitrogen rich irrigation water, *Water Res.*, **27**(5), 785-790.
- Boaventura, R.A.R. and Rodrigues, A.E., 1997, Denitrification kinetics in a rotating disk biofilm reactor, *Chem. Eng. J.*, **65**, 227-235.
- Burr, T.J., Schroth, M.N., and Suslow, T., 1978, Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida.*, *phytopathology*, **68**, 1377-1383.
- Canter, L.W., 1997, Treatment measures for nitrate in groundwater. In: Nitrate in groundwater, Lewis publishers, New York, USA.
- Chou, Y.J., Ouyang, C.F., Kuo, W.L., and Huang, H.L., 2003, Denitrifying characteristics of the multiple stages enhanced biological nutrient removal process with external carbon sources. *J. Environ. Sci. Heal. A.*, **38**, 339-352.
- Cunningham, A., Sharp, R.R., Hiebert, R., and James, G., 2003, Subsurface biofilm barriers for the containment and remediation of contaminated groundwater, *Bioremediation Jour.*, **7**, 151-164.
- Dandie, C.E., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T., and Goyer, C., 2007, Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems, *System. Appl. Microbiol.* **30**, 128-138.
- Dutta, L., Nuttall, H.E., Cunningham, A., James, G., and Hiebert, R., 2005, In situ biofilm barriers: case study of a nitrate groundwater plume, Albuquerque, New Mexico. *Remediation*, Autumn, 101-111.
- Eckenfelder, W.W., 1989, Industrial water pollution control, 2nd ed. McGraw-Hill Book., New York, USA.
- Felsenstein, J., 1985, Confidence limits of phylogenies, an approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**(4), 783-791.
- Hallin, S. and Lindgren, P.-E., 1999, PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1652-1657.
- Her, J.J. and Huang, J.S., 1995, Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough, *Bioresource Technol.*, **54**, 45-51.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1988, CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, *Gene*, **73**, 237-244.
- Horan, N.J., 1990, Biological wastewater treatment systems, theory and operation, John & Wiley & Sons, Chichester, England.
- Kapoor, A. and Viraraghavan, T., 1997, Nitrate removal from drinking water- review, *J. Environ Eng ASCE*, **123**(4), 371-380.
- Kumar, S., Tomura, K., and Nei, M., 1993, MEGA, Molecular Evolution Genetics Analysis, Version 10. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA.
- Lee, D., Lee, I., Choi, Y., and Bae, J., 2001, Effects of external carbon source and empty bed contact time on simultaneous heterotrophic and sulfur-utilizing autotrophic denitrification, *Process Biochem.*, **36**, 1215-1224.
- Lorrain, M.-J., Tartakovsky, B., Peisajovich-gilkstein, A., and Guiot, S.R., 2004, Comparison of different carbon sources for ground water denitrification, *Environ. Technol.* **25**, 1041-1049.
- Louzeiro, N.R., Mavinic, D.S., Oldham, W.K., Meisen, A., and Gardner, I.S., 2003, Process control and design considerations for methanolinduced denitrification in a sequencing batch reactor, *Environ. Technol.*, **24**, 161-169.
- Mohseni-Bandpi, A., Elliott, D.J. and Momeny-Mazdeh, A., 1999, Denitrification of groundwater using acetate acid as a carbon source. *Water Sci. Technol.*, **40**(2), 53-59.
- Monteith, H.D., Bridle, T.R., and Sutton, P.M., 1980, Industrial waste carbon sources for biological denitrification, *Prog Water Tech.*, **12**, 127-141.
- 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**, 499-507.
- Robertson, W.D. and Cherry J.A., 1995, In-situ denitrification of septic-system nitrate using reactive porous media barriers: field trials, *Ground Water*, **33**, 99-111.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987, The neighbor-joining method, a new method for constructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, **4**(4), 406-425.
- Schipper, L.A. and Vojvodic-Vukovic, M., 1998, Nitrate removal from ground water using a denitrification wall amended with sawdust: field trials, *Jour. Environ. Qual.* **27**, 664-668.
- Skrinde, J.R. and Bhagat, S.K., 1982, Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification, *J. WPCF.*, **54**(4), 370-377.
- Soares, M.I.M. and Abeliovich, A., 1998, Wheat straw as substrate for water denitrification, *Water Res.*, **32**(12), 3790-3794.
- Su, C. and Puls, R.W., 2007, Removal of added nitrate in the single, binary, and ternary systems of cotton burr compost, zerovalent iron, and sediment: implications for groundwater nitrate remediation using permeable reactive barriers, *Chemosphere*, **67**, 1653-1662.

- Ten Have, P.J.W., Willers, H.C., and Derikx, P.J.L., 1994, Nitrification and denitrification in an activated-sludge system for supernatant from settled sow manure with molasses as an extra carbon source, *Bioresource Technol.*, **47**, 135-141.
- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, Å., and Hanllin, S., 2004, Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE, *FEMS*, **49**, 401-417.
- Tiedje, J.M., Simkins, S., and Groffman, P.M., 1989, Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods, *Plant Soil*, **115**, 261-284.
- Quan, Z.X., Jin, Y.S., Yin, C.R., Lee, J.J., and Lee, S.T., 2005, Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal, *Bioresource Technol.*, **96**, 1690-1695.
- Volokita, M., Abeliovich, A., and Soares, M.I.M., 1996a, Denitrification of groundwater using cotton as energy source. *Water Sci. Technol.*, **34**(1/2), 379-385.
- Volokita, M., Belkin, S., Abeliovich, A., and Soares, M.I.M., 1996b, Biological denitrification of drinking water using newspaper, *Water Res.*, **30**(4), 965-971.
- Zumft, W.G., 1992, The denitrifying procaryotes. In A. Balows et al. (ed.) Springer-Verlag, New York.. The prokaryotes, Vol. I. 2nd ed.
- Zumft, W.G., 1997, Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification, *Microbiol. Molecul. Biology Reviews*, **61**(4), 533-616.