

미생물에 의한 탈질 과정 동안의 비소 동시 산화 특성 평가

오설란^{1,2} · 김동훈¹ · 문희선^{1,2*}

¹한국지질자원연구원 지질환경연구본부 지하수연구센터

²과학기술연합대학원대학교 광물·지하수자원학과

Characteristics of Microbial Arsenic Oxidation under Denitrification Environment

Seolran Oh^{1,2} · Dong-Hun Kim¹ · Hee Sun Moon^{1,2*}

¹Groundwater Research Center, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM)

²Department of Mineral and Groundwater Resources, Korea University of Science and Technology (UST)

ABSTRACT

Recently, groundwater contamination by mixed occurrence of arsenic (As) and nitrate (NO₃⁻) has been a serious environmental issue all around world. In this study, we investigated the microbial As(III) oxidation characteristic under denitrification process to examine the feasibility of the microbial consortia in wetland sediment to simultaneously treat these two contaminants. The detail objectives of this study were to investigate the effects of NO₃⁻ on the oxidation of As(III) in anaerobic environments and observe the microbial community change during the As oxidation under denitrification process. Results showed that the As(III) was completely and simultaneously oxidized to As(V) under denitrification process, however, it occurred to a much less extent in the absence of sediment or NO₃⁻. In addition, the significant increase of As(III) oxidation rate in the presence of NO₃⁻ suggested the potential of As oxidation under denitrification by indigenous microorganisms in wetland sediment. Genera *Pseudogulbenkiania*, and *Flavisolibacter* were identified as predominant microbial species driving the redox process. Conclusively, this study can provide useful information on As(III) oxidation under denitrifying environment and contribute to develop an effective technology for simultaneous removal of As(III) and NO₃⁻ in groundwater.

Key words : Groundwater, Arsenic oxidation, Nitrate, Microorganism, Denitrification

1. 서 론

비소(Arsenic, As)는 강한 독성을 가진 준금속(metalloid)으로, 인위적 혹은 자연발생적 원인에 의한 지하수 내 As 농도 증가는 지하수 오염 측면에서 최근 심각한 환경 이슈 중의 하나이다(Bulut et al., 2014, Chatterjee and De, 2017, Xie et al., 2018). As에 의한 지하수 오염은 제초제, 농작물 건조제 사용 등과 같은 인간 활동에 의한 인위적인 요인뿐만 아니라 암석의 풍화 반응, 미생물과 광물의 반응 및 화산 배출 등으로 인한 자연적인 요인에 의해서도 발생할 수 있다(Nguyen et al., 2017, Sharma and Sohn, 2009). As로 오염된 지하수를 섭취할 경우, 암, 호흡기, 소화기 계통 및 피부병을 비롯한 많은 심각한

질병을 유발할 수 있다(Liu et al., 2003, Li et al., 2015).

한편, 질산염(Nitrate, NO₃⁻)은 As와 더불어 가장 흔한 지하수 오염물질 중 하나로, 고농도의 NO₃⁻으로 오염된 음용수를 섭취하게 되면 고혈압을 발생시키며, 특히 영아에게 치명적인 청색증을 발생시킨다고 밝혀져 있다(Shakya and Ghosh, 2018). NO₃⁻에 의한 지하수 오염은 비료 사용에 의한 농업 활동(Lin et al., 2002), 매립지 침출수, 축산 폐수 및 생활 하수 등이 지하수로의 유입에 의해 주로 발생한다(Benkovitz et al., 1996, Xue et al., 2009).

이러한 As와 NO₃⁻로 동시에 오염된 지하수의 사례는 전 세계적으로 종종 보고되고 있으며, 특히 방글라데시,

*Corresponding author : hmoon@kigam.re.kr

Received : 2019. 7. 22 Reviewed : 2019. 7. 24 Accepted : 2019. 7. 30

Discussion until : 2019. 10. 31

네팔, 인도, 호주, 미국, 남아메리카에서는 고농도의 As와 NO₃⁻에 의한 지하수 동시 오염의 심각함이 보고된 바 있다(Fytianos and Christophoridis, 2004, Ghurye et al., 1999, Upadhyaya et al., 2010). 일반적으로 이러한 지역은 As를 함유한 황화물이 지하수면이 낮아지면 산화되어 As가 지하수로 용출되거나, 무산소 환경에서 환원적 용해(reductive dissolution) 과정 동안 철산화물(iron-oxides(FeOOHs))이 환원됨에 따라 철산화물에 흡착되어 있던 As가 지하수로 용출되어 오염되는 경우와 같은 지질 기원에 의한 As 오염지역에서 농업 활동에 의한 비료 사용 등에 의해 NO₃⁻가 동시에 오염되는 사례가 많다(Zahid et al., 2007). 한편, 국내의 경우에도, 지하수에서 As와 NO₃⁻ 농도가 먹는 물 기준(각 0.01 mg/L, 10 mg-N/L)을 초과하는 사례가 보고된 바 있다(Ahn et al., 2005, Kim et al., 2010).

일반적으로 As와 NO₃⁻로 동시에 오염된 지하수를 처리하는 방법으로는 이온교환, 역삼투법 같은 물리 화학적 처리 방법이 사용된다(Min et al., 2006, Upadhyaya et al., 2010). 그러나, 이러한 처리 방법은 비용이 많이 들고, 친 환경적이지 못하며, 효율적인 As의 제거를 위해서는 As(III)를 As(V)로 화학적으로 산화시키는 과정이 추가로 필요하다는 단점이 있다(Nerenberg and Rittmann, 2004, Shakya and Ghosh, 2018). 따라서 이러한 단점을 보완하고 지하수 내의 As와 NO₃⁻을 동시에 처리할 수 있는 생물학적 처리에 대한 연구가 필요하다.

일반적으로 혐기성 조건 하에서 미생물에 의한 As(III)의 As(V)로의 산화 기작은 많은 연구 결과가 보고되어 왔으며, *Alcaligenes faecalis*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* sp., 등과 같은 미생물에 의한 As 산화 기작이 꾸준히 보고되고 있다(Osborne and Ehrlich, 1976, Santini et al., 2000, Silver and Phung, 2005). 한편, 최근 혐기성 환경에서 산소가 아닌 Fe(III)나 NO₃⁻를 전자 수용체로 사용하여 As(III)를 As(V)로 산화시킬 수 있는 미생물의 존재에 대해 보고된 바 있다(Hoeft et al., 2002, Rhine et al., 2007, Zhang et al., 2017). 특히, *Alkalimnicola ehrlichii* MLHE-1, *Sinorhizobium* sp. DAO10은 혐기성 환경에서 NO₃⁻ 환원에 결합하여 As(III)를 산화시킬 수 있는 화학 독립영양미생물로 보고되었다(Rhine et al., 2007, Zhang et al., 2017).

따라서, 본 연구에서는 As와 NO₃⁻로 동시에 오염된 지하수의 생물학적 처리를 위한 기초 연구로 습지 퇴적토 토착 미생물을 이용하여 탈질환경에서 종속영양미생물에 의한 As의 산화 가능성을 확인하고자 하였다. 습지의 퇴

적토를 미생물원으로 하여 혐기성 환경을 조성하여 실험실 규모의 배치 실험을 실시하고, 시료를 주기적으로 채취하여 NO₃⁻의 환원 및 As의 산화 정도를 확인하였다. 또한, 탈질 환경에서 As 산화 기작 동안 미생물의 군집 특성 변화를 알아보하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 습지 퇴적토 시료 채취

본 연구에서는 미생물 접종원으로 사용하기 위하여 충청남도 논산시 광석면 신당리에 위치한 논밭 인근의 구당 습지(36°14'48.1"N, 127°04'18.1"E)의 퇴적토를 채취하였다. 퇴적토는 지표로부터 30 cm 깊이에서 무작위로 채취한 후, 균질하게 섞어서 사용하였다. 퇴적토의 pH는 5.6, 유기 물질(Organic matter) 함량은 2.52%였으며, NO₃⁻ 농도는 27.96 mg/kg 였으며, 탈질 미생물의 활성이 있을 것으로 판단하였다. 시료는 사용 전까지 4°C에서 보관하였으며, 2-mm 체로 거른 후 균질화하여 실험에 사용하였다.

2.2. 배치 실험

혐기 환경에서 습지 토착미생물에 의한 As 산화에 미치는 미생물 존재 유무와 탈질반응의 영향을 알아보하고자 실험실 규모의 배양 실험을 수행하였다.

배양 실험을 위해 K₂HPO₄ 0.25 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.062 g/L로 구성된 최소 배지를 제조하여 배양액으로 사용하였다(Li et al., 2015). 배지는 제조된 즉시 고온고압멸균기(Autoclave, Steam Sterilizer, JSR, Japan)를 이용하여 1.5 기압 121°C에서 20분 간 멸균하여 실험에 사용하였다.

첫 번째 조건 A는 최소 배지에 AsNaO₂ 1 mM(As(III)), KNO₃ 2 mM과 전자공여체로 C₂H₃NaO₂(sodium acetate)를 1 mM 첨가한 후 125 mL 세럼병(serum bottle)에 배양액 100 mL를 주입하고 미생물원으로 습지 퇴적토 10 g을 첨가하였다. 두 번째 조건 B는 최소 배지에 AsNaO₂ 1 mM, KNO₃ 2 mM과 전자공여체로 sodium acetate를 1 mM 첨가한 후 125 mL 세럼병에 배양액 100 mL를 주입하고 습지 퇴적토는 주입하지 않아 퇴적토의 미생물의 영향을 배제하였다. 마지막으로 세 번째 조건(C)은 최소 배지에 AsNaO₂ 1 mM를 첨가한 후 125 mL 세럼병에 배양액 100 mL를 주입하고 미생물원으로 습지 퇴적토를 10 g 주입하여 NO₃⁻의 영향을 배제하였다. 3 가지 조건 모두 혐기성 환경을 조성하기 위하여 고순도 질소 가스(99.99%)로 30분간 퍼징(purging)하였다(Fig. 1). 모든 배

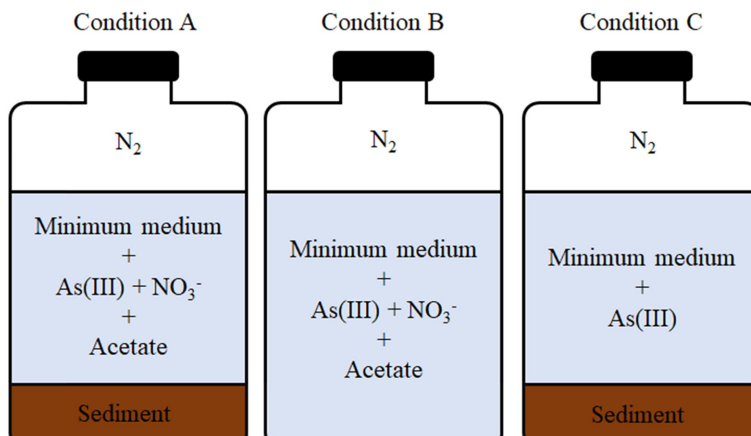


Fig. 1. Laboratory-scale batch experiments design. Condition A (A), with arsenite, nitrate, acetate and wetland sediment; Condition B (B), with arsenite, nitrate and acetate and without wetland sediment; Condition C (C), with arsenite and wetland sediment and without nitrate and acetate.

치 실험은 진탕배양기(shaking incubator, VS-8480SFN, VISION, Korea)에서 30°C, 150 rpm으로 8일 간 진탕 배양하였다. 실험은 모두 3 반복으로 진행되었으며, 주기적으로 시료를 채취하였다. 이 때, 시료 채취 전 충분히 흔들어서 현탁액 상태로 만들어 준 후, 공기가 유입되지 않도록 혐기성 상태를 유지하기 위하여 실린지를 이용하여 N₂ 가스를 시료 채취 용량만큼 주입 후, 시료를 채취 하였다.

채취한 시료는 원심 분리기에서 4000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후, 상등액은 0.45 µm PVDF 필터로 여과하여 냉장 보관하고, NO₃⁻, 아질산염(nitrite, NO₂⁻), sodium acetate 농도 및 As 농도 분석에 사용되었다. 침전된 샘플은 24시간 동안 동결 건조(FDS5512, IlshunBioBase, Korea)시킨 후 냉동 보관하고, 미생물 분석을 위해 사용 되었다.

2.3. 화학적 분석

배양 동안 배양액 내의 총 As의 농도는 유도결합플라즈마발광광도기(ICP-OES, Optima 7300 DV, PerkinElmer, USA)를 사용하여 측정하였다. 또한 시료 내 As의 산화 상태에 따른 화학 종별(As(III), As(V)) 농도를 확인하기 위하여 이온 교환 카트리지(Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Short Cartridge, Waters, USA)에 통과시켜 As(III)만을 분리해 농도를 측정하였으며(Dong et al., 2009), As(V) 농도는 As(Total) 농도와 As(III) 농도의 차로 계산하였다. 배지 내의 NO₃⁻ 및 NO₂⁻의 농도를 측정하기 위하여 이온크로마토그래피(IC, ICS-1500, DIONEX, USA)을 이용하였다. 가드 컬럼(guard column)과 분석 컬

럼(analytical column)은 Dionex IonPac™ AG14을 사용하였고, Flow rate는 1.2 mL/min로 운전하였다. 아세테이트(acetate) 분석을 위해 고성능 형광 검출 액체크로마토그래피(HPLC, Prominence, Shimadzu, Japan)를 이용하였다. 컬럼은 Shim-pack GIS-ODS 5µm를 사용하였으며, UV 210 nm에서 1.0 mL/min으로 운전하였다. 또한 배양 첫날과 마지막 날의 pH는 pH meter(ThermoFisher Scientific Orion™, USA)로 측정하였다.

2.4. DNA 추출 및 미생물 군집 분석

배양 첫날과 마지막 날에 채취한 시료를 각각 원심분리 후 침전물로부터 genomic DNA를 FastDNA SPIN Kit for soil(MB Biomedicals, USA)를 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. DNA는 16S rRNA 유전자의 V3에서 V4 영역을 타겟으로 하는 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시켰고, QIAquick PCR purification kit로 정제하였다. 차세대 염기서열 분석(NGS, Next generation sequencing)은 친랩(Chunlab, Inc., 서울, 한국)에서 이루어졌으며, Illumina MiSeq sequencing system(Illumina, USA)dh를 사용하였다. EzBioCloud 데이터베이스는 USEARCH를 이용하여 taxonomic assignment에 사용하였다.

2.5. 통계 분석

본 연구에서는 조건 A와 B, A와 C의 총 As, As(III), As(V)와 NO₃⁻, NO₂⁻ 및 acetate 농도와 차이와 조건 A와 C의 미생물 군집 변화에 대한 상관 분석을 실시하여 상호 관련성 검증하였다. 신뢰수준 95%에서 Analysis of

Variance(ANOVA) 분석을 수행하여 통계학적 유의성을 평가하였으며($p < 0.05$), 통계 분석에는 XLSTAT-Premium (Annual version 2019.3.1, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 비소(As) 산화 특성에 미치는 미생물의 영향

미생물에 의한 탈질 환경에서 As 산화 가능성을 확인하기 위해 미생물원인 퇴적토가 첨가된 조건 A와 첨가되지 않은 조건 B를 비교하였다. 습지 퇴적토가 주입된 조건 A에서는 배양을 시작함과 동시에 배양액 내의 NO_3^- 농도는 시간이 지남에 따라 감소하였고, 상대적으로 NO_2^- 농도는 배양 2일째까지 증가하다가 감소하여 배양 8일째에는 검출되지 않았다(Fig. 2(a)). 이는 배양액 내의 NO_3^- 가 미생물에 의해 환원되면서, 탈질 과정의 중간 생성물인 NO_2^- 가 생성되었다가 N_2 가스로 탈질된 것으로 사료된다(Nguyen et al., 2017, Shakya and Ghosh, 2018). 한편, NO_3^- 의 감소와 상응하여 전자공여체로 주입한 acetate는 급격하게 감소하여 배양 2일째에 거의 모두 소비되었다(Fig. 2(b)). 이는 퇴적토 내의 중속영양토착미생물에 의한 탈질 반응이 일어났음을 시사한다. 또한, acetate가 거의 모두 소비된 2일 이후에는 미생물원으로 첨가한 습지 퇴적토에 함유된 유기물(2.52%)이 미생물 성장을 위한 탄소원으로 사용되었을 것으로 사료된다.

한편, NO_3^- 농도의 감소와 함께 시간이 지남에 따라 초기에 주입한 1 mM의 As(III)는 배양 2일째부터 급격히 농도가 감소하여, 배양 5일 후에는 검출되지 않았다(Fig. 3(b)). 배양액 내의 As(III) 농도의 감소와 상응하여 As(V) 농도 증가하는 것으로 보아 습지 퇴적토 미생물에 의해 탈질 반응이 진행되는 동안 배양액 내의 As(III)가 As(V)로 산화되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3(c)). 한편, 배양액 내의 총 As 농도는 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 것을 확인할 수 있었는데, 이것은 배양액 내의 As의 일부가 퇴적토에 흡착된 것으로 판단된다(Goldberg, 2002, Mohapatra et al., 2007).

As의 산화 속도는 배양 2일에서 5일 사이에 급격하게 증가하였으며, 5일째 되는 날, As(Total)의 농도가 As(V)와 같이 0.87 mM(± 0.01)로 검출되었다. 이는 용액 내 존재하는 As(III)가 As(V)로 완전히 산화된 것을 시사할 수 있다. 또한 NO_3^- 도 배양 5일째 되는 날 100% 환원된 것을 확인할 수 있었고, NO_2^- 도 8일째 되는 날 모두 사라진 것을 확인할 수 있었다.

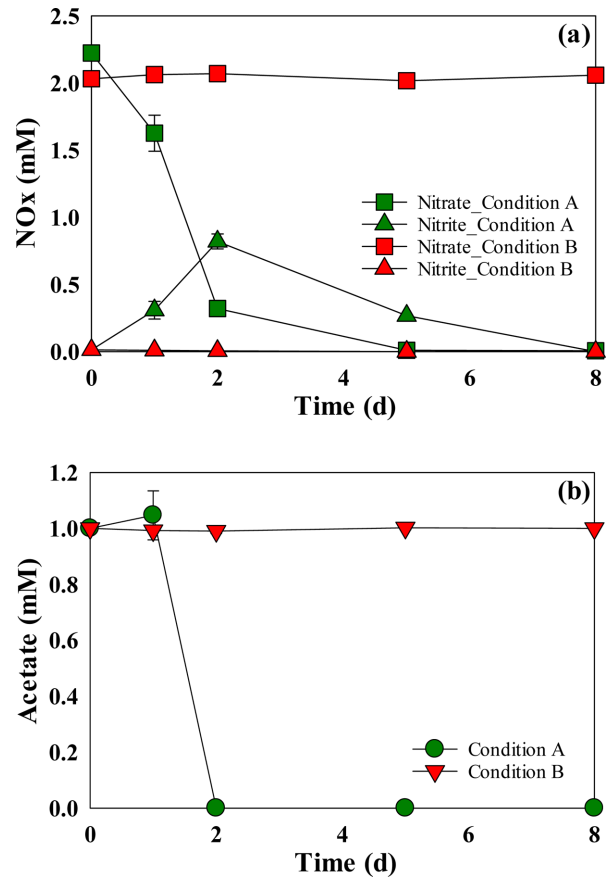


Fig. 2. Nitrate, nitrite (a) and acetate (b) concentrations with time in condition A (with arsenite, nitrate, acetate and wetland sediment) and B (with arsenite, nitrate and acetate and without wetland sediment).

반면, 습지 퇴적토를 첨가하지 않은 조건 B에서는 배양 동안, NO_3^- 와 NO_2^- 농도, acetate 농도가 배양 동안 변화 없이 일정하게 유지되었고, 조건 A와는 달리 배양액 내에서 어떠한 생물학적 반응이 일어나지 않았음을 시사하였다($0.05 < p$)(Fig. 2). As(Total) 농도 또한 초기에 주입했던 1.02 mM(± 0.02)로 일정하게 유지되었으며(Fig. 3(a)), As(III) 농도와 As(V)의 농도에는 유의미한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3(b and c)). 조건 A와 비교하여 습지 퇴적토가 주입되지 않은 조건 B에서는 탈질 반응은 물론 As의 산화 또한 일어나지 않았다는 것을 알 수 있었다($0.05 < p$). 이러한 결과는 이전의 연구에서 미생물을 주입한 조건과 멸균한 조건에서 NO_3^- 를 첨가하였을 때, 미생물을 주입한 조건에서만 As 산화와 NO_3^- 환원이 일어난 것과 일치한다(Zhang et al., 2017). 따라서 퇴적토를 첨가한 조건(A)에서의 탈질과 As 산화 반응은 습지 퇴적토 내의 중속영양토착미생물에 의해 일어난 것임을 확인할 수 있었다.

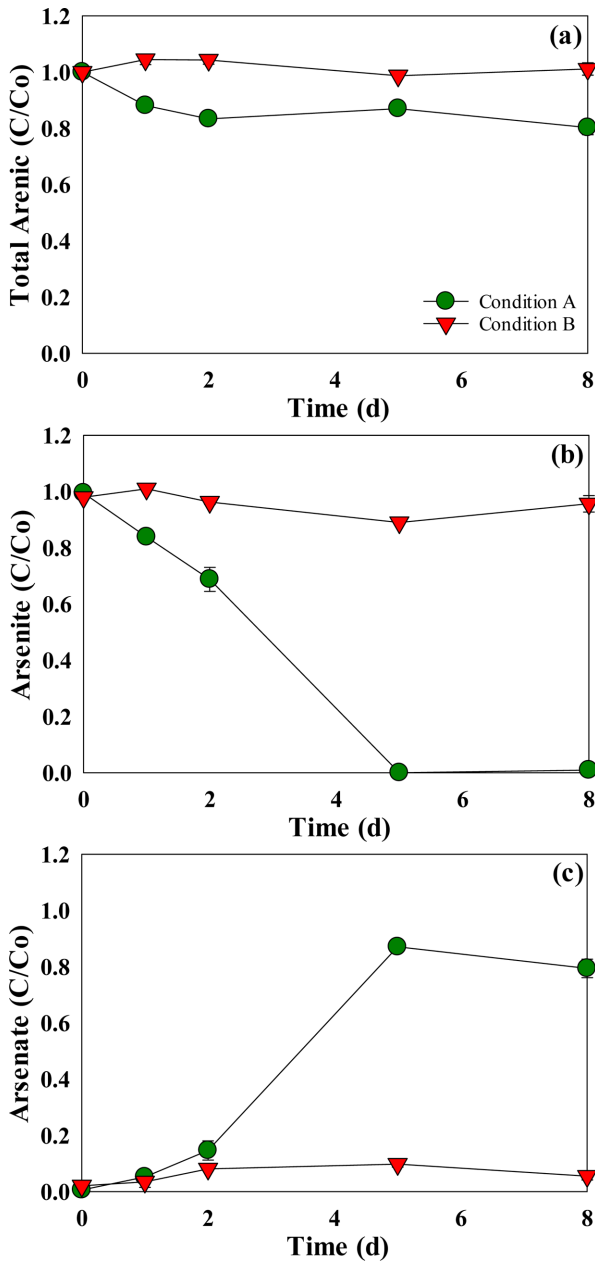


Fig. 3. Total arsenic (As) (a), arsenite (As(III)) (b) and arsenate (As(V)) (c) concentrations with time in condition A (with arsenite, nitrate, acetate and wetland sediment) and B (with arsenite, nitrate and acetate and without wetland sediment).

3.2. 비소(As) 산화 특성에 미치는 탈질 반응의 영향

앞선 실험에서 탈질 과정 동안의 As 동시 산화 특성이 탈질 과정과 연계하여 일어나는지 혹은 탈질화와 비소의 산화가 별개로 일어나는 기작인지를 알아보고자 탈질 반응 유무에 따른 영향을 실험하였다. 최소 배지에 As(III) 및 퇴적토 만을 주입한 조건 C에서는 배양 초기에 퇴적토 내에 존재하던 미량의 NO₃⁻(0.27 ±0.00 mM)의 환원

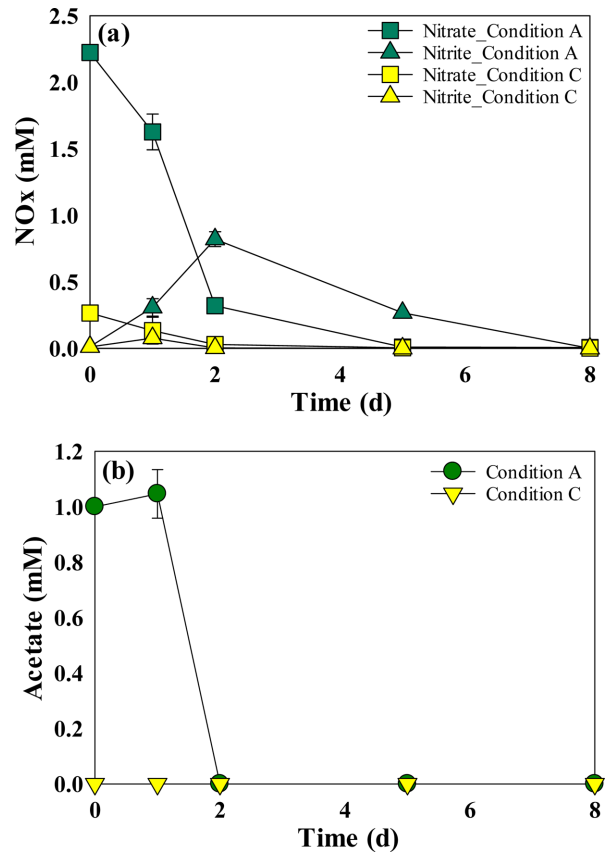


Fig. 4. Nitrate, nitrite (a) and acetate (b) concentrations with time in condition A (with As(III), NO₃⁻, acetate and sediment) and C (with As(III) and sediment, without NO₃⁻ and acetate).

에 따른 NO₂⁻(0.08 ±0.00 mM)가 검출되었으나 배양 2일째 이후에는 검출되지 않았다(Fig. 4(a)).

탈질 반응이 일어나지 않은 조건 C에서도 매우 소량의 As(III)의 농도가 시간이 지남에 따라 감소하였으며, 배양 마지막 날에는 초기 농도보다 35%가 감소한 0.65 mM (±0.21)이 검출되었다(Fig. 5(b)). 또한 As(V) 농도는 배양 마지막 날에 0.13 mM(±0.22)이 검출된 것으로 보아 매우 미미한 양의 As가 산화된 것으로 보인다(Fig. 5(c)). 습지 퇴적토에 함유되어 있는 유기물(2.52%)을 미생물이 탄소 원료로 이용하여 퇴적토 내 미량의 NO₃⁻를 환원하는 과정 동안 As가 일부 산화된 것으로 사료된다.

탈질 반응이 활발하게 일어난 조건 A와 비교해서 탈질 반응이 일어나지 않은 조건 C에서는 환원이 일어나면서 매우 소량의 As만 산화된 것으로 보아, 미생물에 의한 활발한 NO₃⁻의 환원이 수반되어야 As가 산화될 수 있음을 알 수 있었다(0.05<p). 이는 Zhang 등 (2017)의 연구에서 NO₃⁻를 주입한 조건과 그렇지 않은 조건에 대하여, NO₃⁻를 주입한 조건에서만 As가 산화된 것을 확인한 것

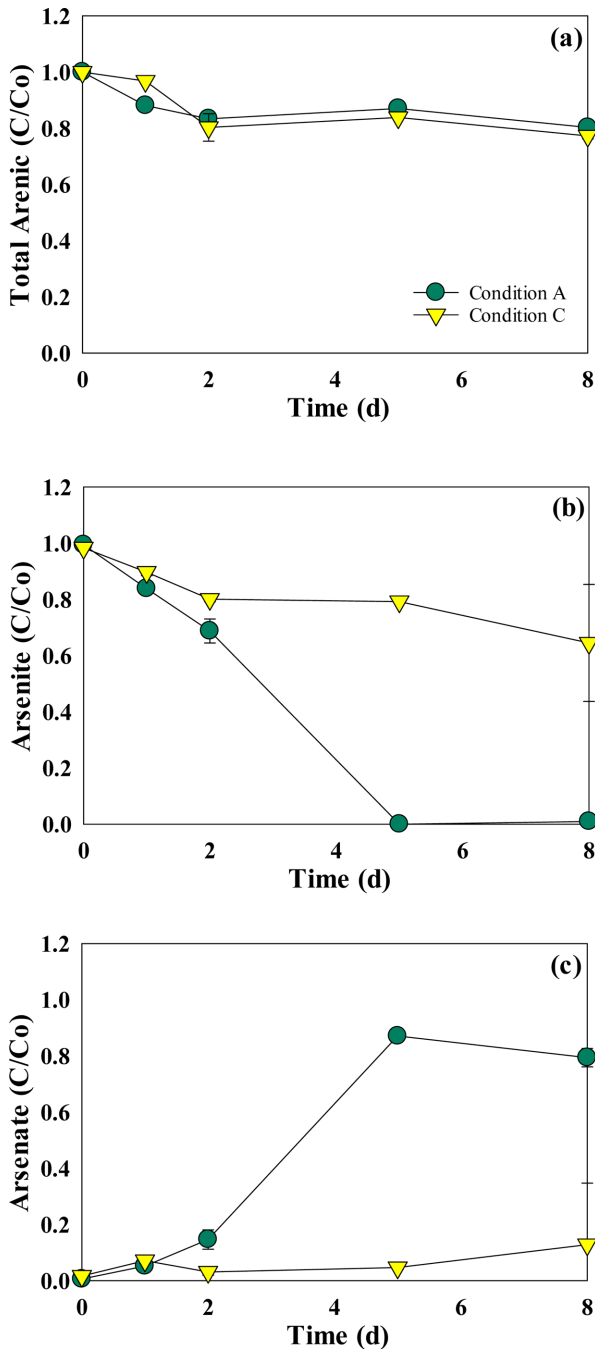


Fig. 5. Total arsenic (As) (a), arsenite (As(III)) (b) and arsenate (As(V)) (c) concentrations with time in condition A (with As(III), NO_3^- , acetate and sediment) and C (with As(III) and sediment, without NO_3^- and acetate).

과 일치하는 결과이다.

미생물에 의한 NO_3^- 의 환원에 대한 연구(Bazylnski and Blakemore, 1983, Shin and Cha, 2008, Zhang and Angelidaki, 2013) 및 호기적 환경에서 미생물에 의한 As의 산화에 관한 연구(Bahar et al., 2013, Osborne and

Ehrlich, 1976, Philips and Taylor, 1976, Santini et al., 2000, Santini et al., 2000, Silver and Phung, 2005)는 이미 오래전부터 다수의 연구가 보고되어 왔다. 그러나, 혐기적 환경에서 미생물에 의한 NO_3^- 의 환원과 As(III)의 동시 산화 기작에 관한 연구는 매우 드물다(Nguyen et al., 2017, Zhang et al., 2017). 본 연구에서는 기존 연구에서 보고되었던 단일 미생물 접종원이 아닌 습지 퇴적토 토착미생물을 미생물원으로 주입하였음에도 NO_3^- 의 환원과 As(III)의 동시 산화 반응이 일어났으며, 기존 선행 연구들과 차별성이 있다고 할 수 있다. 특히, 본 연구를 통해서, 습지 퇴적토 환경에도 NO_3^- 의 환원과 As(III)의 동시 산화 반응을 수행할 수 있는 미생물이 존재함을 확인할 수 있었다. 일반적으로 As는 산화환경에서 미생물에 의한 산화되는 것으로 알려져 있지만, 본 연구에서는 미생물에 의한 탈질이 일어나는 환원 환경에서 As가 산화될 수 있음을 확인하였다. 이는 환원 조건의 지하수에서 NO_3^- 와 As를 동시에 제거할 수 있는 공정 개발에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. 차세대 염기서열 분석(NGS)을 통한 미생물 군집 분석

NO_3^- 의 탈질 과정과 연계한 As 산화 과정 동안 배양액 내의 미생물 특성 변화를 확인하기 위하여 차세대 염기서열 분석(NGS, Next generation sequencing) 방법으로 조건 A와 C의 미생물 군집 변화를 비교 분석하였다.

조건 A와 C의 첫날과 마지막 날의 퇴적 침전물 시료로부터 41,382-69,776개의 read 수를 얻었다. Good's coverage는 98.9% 보다 높았고, OTUs(operational taxonomic units)는 3,638-7,266 범위로 얻어졌다(Table 1).

조건 A와 C에 동일한 퇴적토를 주입하였기 때문에 문(phylum) 수준에서 조건 A와 조건 C의 배양 첫날의 미생물 군집은 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 6). 반면, 각 조건의 배양 마지막 날의 미생물 군집은 유의한 차이를 보였다($0.05 < p$). 문(phylum) 수준에서, 배양 첫날에 A와 C 모두에서 *Proteobacteria*가 각각 29.8%, 28.9%로, *Acidobacteria*가 각각 24.8%, 27.3%로 우점하였다. 반면, 조건 A의 배양 마지막 날에는 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*가 각각 35.9%, 24.2% 및 16.7%로 우세하였다. 초기 24.8%를 차지하던 *Actinobacteria*가 반응 후기에는 4.1%로 급격히 감소한 반면, *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*가 초기에 비해 각각 15.7%와 16.7% 증가하면서 전체 군집에서 큰 비중을 차지하였다.

조건 C에서는 초기에 비해 군집 구조에서 큰 변화를 보이지 않았지만 조건 A와 동일하게 *Acidobacteria*의 비

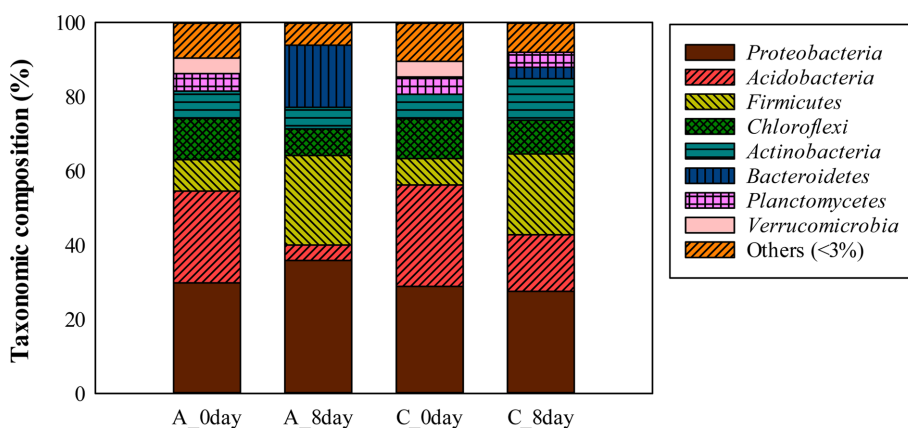


Fig. 6. Microbial taxonomic composition of Bacterial phylum-level in the sediment of condition A (with As(III), NO₃⁻, acetate and sediment) and C (with As(III) and sediment, without NO₃⁻ and acetate) in the first (0) and last (8) day.

Table 1. Number of valid sequence, OTUs, Good's coverage for 16S rRNA libraries of condition A (with As(III), NO₃⁻, acetate and sediment) and C (with As(III) and sediment, without NO₃⁻ and acetate) in the first (0) and last (8) day

Sample ID	Valid reads	OTUs	Goods Lib. Coverage (%)
A-0d	41,382	5,998	98.97
A_8d	44,963	3,638	99.19
C_0d	58,303	7,232	99.26
C_8d	69,776	7,266	99.37

중이 감소하고 *Firmicutes*가 증가하는 경향을 보이며 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*가 각각 27.6%, 21.7% 및 11.2%로 우점하고 있었다.

속(Genus) 수준에서 살펴보면, 배양 마지막 날(8 day) 조건 A에서는 *Pseudogulbenkiania*(16.7%), *Flavisolibacter* (15.9%), *Bacillus*(9.0%), *Clostridium*(7.3%), *Bradyrhizobium* (2.1%), *Pseudolabrys*(1.7%) 속이 검출된 반면, 조건 C에서는 *Bacillus*(7.4%), *Clostridium*(6.2%), *Pseudogulbenkiania* (3.3%), *Pseudolabrys*(2.6%), *Solibacter*(2.4%), *Flavisolibacter* (2.3%) 및 *Bradyrhizobium*(2.2%) 속이 검출되었다. Heat map 분석을 통해 속(Genus) 수준에서 배양 전후 시료의 미생물 군집 특성의 유사성에 대하여 더 유의미한 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 속(Genus) 수준에서, 조건 A와 조건 C는 배양 첫날(0 day)에 미생물 군집 구조가 거의 유사한 것으로 확인되었지만, 배양 마지막 날(8 day)에는 조건 C에 비하여 조건 A에서는 *Pseudogulbenkiania*, *Flavisolibacter*가 우세한 것을 확인할 수 있었다. 배양 첫날(0 day)의 조건 C를 기준으로 유사성을 확인하면, 조건 A의 배양 첫날(0 day)이 가장 유사하고 그 다음이 배양 마지막 날(8 day)의 조건 C이며, 가장 유사하지 않은 그룹이 조건 A의 배양 마지막 날(8 day)인 것을 확인할 수 있었다. 이는 배양 동안 조건 A와 C가 유의하게 달라진

것을 시사한다.

조건 A의 배양 마지막 날의 침전물에서 *Pseudogulbenkiania* 속과 *Flavisolibacter* 속, *Bacillus* 속, *Clostridium* 속이 각각 16.7, 15.9, 9.0, 7.3%로 우점한 것을 확인할 수 있었다. 이전 연구에서는 *Pseudogulbenkiania* 속은 전자수용체로 NO₃⁻을 이용하여 Fe²⁺을 산화 시킨 후 As(III)를 고정하여 공침 제거할 수 있다고 보고하였으나, As(III)의 산화는 보고되지않았다(Xiu et al., 2016). *Flavisolibacter* 속은 As로 오염된 토양 및 대수층 퇴적토 등에서 주로 발견되는 미생물로 철 혹은 알루미늄 광물의 환원적 용해(reductive dissolution) 기작을 통한 As의 지하수 용출에 기여하는 미생물로 알려져 왔다(Das et al., 2016, Gu et al., 2017, Zou et al., 2018).

한편, 조건 C의 배양 마지막 날에는 조건 A와는 달리 상대적으로 통성혐기성균(facultative anaerobic organism)으로 NO₃⁻을 환원시키는 능력을 가진 *Bacillus* 속과 절대 무산소성균(Obligate anaerobe)으로 Fe²⁺를 산화시킬 때, NO₃⁻를 전자 수용체로 사용하는 미생물로 밝혀져 있는 *Clostridium* 속(Li et al., 2016, Okereke and Montville, 1992)이 각각 7.4% 및 6.2%로 우세한 것을 확인할 수 있었다.

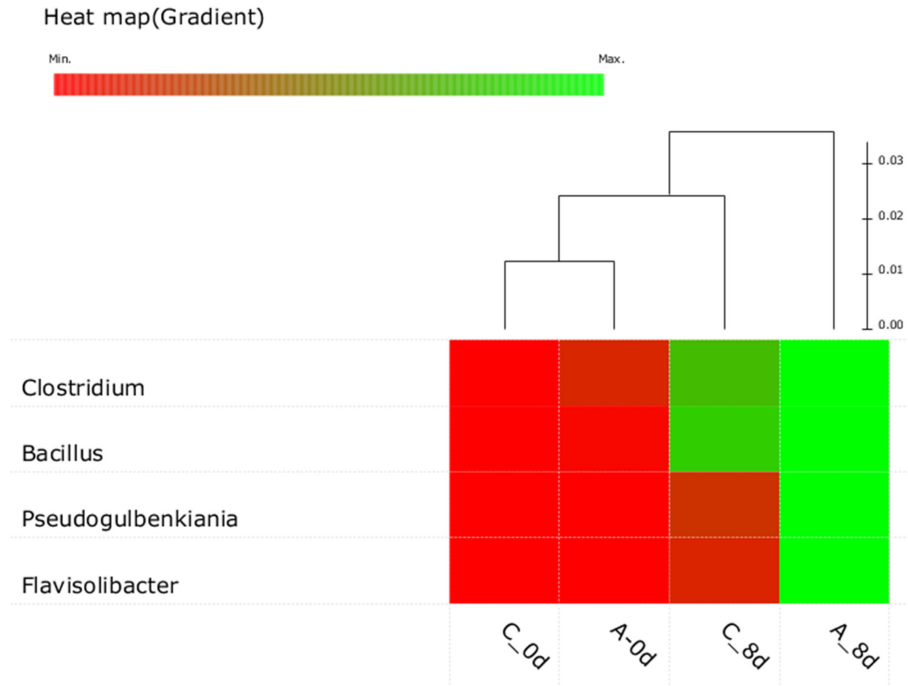


Fig. 7. Heatmap of the taxonomic at bacterial genus-level in the sediment of A (With As(III), NO_3^- , acetate and sediment) and C (With As(III) and sediment, No NO_3^- and acetate) in the first (0) and last (8) day.

4. 결 론

본 연구에서는 혐기성 습지 퇴적토 토착미생물을 이용하여 NO_3^- 가 환원되는 탈질 동안 수용상의 As(III)가 동시에 산화되는 가능성을 알아보고자 하였다. 실험실 규모의 배치 실험을 통해 습지 퇴적토 토착미생물에 의해 NO_3^- 환원 및 As의 산화가 동시에 일어날 수 있음을 확인할 수 있었으며, As의 산화 속도가 NO_3^- 환원반응이 활발할 때 유의하게 증가하고 산화 효율이 뛰어난 것을 확인함으로써 As의 산화가 미생물에 의한 NO_3^- 환원 과정과 연계하여 일어나고 있음을 알 수 있었다. 또한 군집 분석을 통해 *Pseudogulbenkiania*와 *Flavisolibacter* 속 등이 탈질 환경하에 As 산화 기작 동안 우점하는 것으로 나타났으며, 후속 연구를 통하여 이 공정에 기여하는 미생물의 분리 및 동정 과정이 필요할 것으로 사료된다. 이러한 결과는 향후 지하수에서 비소와 질산염을 동시에 제거할 수 있는 생물학적인 공정의 개발에 기여할 수 있을 것이라 사료된다.

사 사

본 연구는 한국지질자원연구원 주요 사업인 “(GP2017-008)” 과제의 재정적 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

References

- Ahn, J.S., Ko, K.-S., Lee, J.-S., and Kim, J.-Y., 2005, Characteristics of natural arsenic contamination in groundwater and its occurrences, *Econ. Environ. Geol.*, **38**, 547-561.
- Bahar, M.M., Megharaj, M., and Naidu, R., 2013, Bioremediation of arsenic-contaminated water: Recent advances and future prospects, *Water Air Soil Pollut.*, **224**, 1722.
- Bazylnski, D.A. and Blakemore, R.P., 1983, Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1118-1124.
- Benkovitz, C.M., Scholtz, M.T., Pacyna, J., Tarrasón, L., Dignon, J., Voldner, E.C., Spiro, P.A., Logan, J.A., and Graedel, T., 1996, Global gridded inventories of anthropogenic emissions of sulfur and nitrogen, *J. Geophys. Res.-Atmos.*, **101**, 29239-29253.
- Bulut, G., Yenial, Ü., Emiroğlu, E., and Sirkeci, A.A., 2014, Arsenic removal from aqueous solution using pyrite, *J. Clean Prod.*, **84**, 526-532.
- Chatterjee, S. and De, S., 2017, Adsorptive removal of arsenic from groundwater using chemically treated iron ore slime incorporated mixed matrix hollow fiber membrane, *Sep. Purif. Technol.*, **179**, 357-368.
- Das, S., Liu, C.-C., Jean, J.-S., Lee, C.-C., and Yang, H.-J., 2016, Effects of microbially induced transformations and shift in

- bacterial community on arsenic mobility in arsenic-rich deep aquifer sediments, *J. Hazard. Mater.*, **310**, 11-19.
- Dong, L., Zinin, P.V., Cowen, J.P., and Ming, L.C., 2009, Iron coated pottery granules for arsenic removal from drinking water, *J. Hazard. Mater.*, **168**, 626-632.
- Fytianos, K. and Christophoridis, C., 2004, Nitrate, Arsenic and Chloride Pollution of Drinking Water in Northern Greece. Elaboration by Applying GIS, *Environ. Monit. Assess.*, **93**, 55-67.
- Ghurye, G.L., Clifford, D.A., and Tripp, A.R., 1999, Combined arsenic and nitrate removal by ion exchange, *J. Am. Water Work Assoc.*, **91**, 85-96.
- Goldberg, S., 2002, Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **66**, 413-421.
- Gu, Y., Van Nostrand, J.D., Wu, L., He, Z., Qin, Y., Zhao, F.-J., and Zhou, J., 2017, Bacterial community and arsenic functional genes diversity in arsenic contaminated soils from different geographic locations, *PLoS one*, **12**, e0176696.
- Kim, G.B., Choi, D.H., Yoon, P.S., and Kim, K.Y., 2010, Trends of groundwater quality in the areas with a high possibility of pollution, *J. Korea Geo-Environ Soc*, **11**, 5-16.
- Hoefl, S.E., Lucas, F.O., Hollibaugh, J.T., and Oremland, R.S., 2002, Characterization of microbial arsenate reduction in the anoxic bottom waters of Mono Lake, California, *Geomicrobiol. J.*, **19**, 23-40.
- Li, B., Deng, C., Zhang, D., Pan, X., Al-misned, F.A., and Mortuza, M.G., 2016, Bioremediation of Nitrate- and Arsenic-Contaminated Groundwater Using Nitrate-Dependent Fe(II) Oxidizing *Clostridium* sp. Strain px12, *Geomicrobiol. J.*, **33**, 185-193.
- Li, B., Pan, X., Zhang, D., Lee, D.-J., Al-Misned, F. A., and Mortuza, M.G., 2015, Anaerobic nitrate reduction with oxidation of Fe(II) by *Citrobacter freundii* strain PXL1 – a potential candidate for simultaneous removal of As and nitrate from groundwater, *Ecol. Eng.*, **77**, 196-201.
- Lin, Y.-F., Jing, S.-R., Wang, T.-W., and Lee, D.-Y., 2002, Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands, *Environ. Pollut.*, **119**, 413-420.
- Liu, C.-W., Lin, K.-H., and Kuo, Y.-M., 2003, Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan, *Sci. Total Environ.*, **313**, 77-89.
- Min, J., Boulos, L., Brown, J., Cornwell, D., Gouellec, Y., Coppola, E., Baxley, J., Rine, J., Herring, J., and Vural, N., 2006, Innovative Alternatives to Minimize Arsenic, Perchlorate, and Nitrate Residuals, Water Environment Research Foundation, Denver, CO.
- Mohapatra, D., Mishra, D., Chaudhury, G.R., and Das, R.P., 2007, Arsenic adsorption mechanism on clay minerals and its dependence on temperature, *Korean J. Chem. Eng.*, **24**, 426-430.
- Nerenberg, R. and Rittmann, B., 2004, Hydrogen-based, hollow-fiber membrane biofilm reactor for reduction of perchlorate and other oxidized contaminants, *Water Sci. Technol.*, **49**, 223-230.
- Nguyen, V.K., Tran, H.T., Park, Y., Yu, J., and Lee, T., 2017, Microbial arsenite oxidation with oxygen, nitrate, or an electrode as the sole electron acceptor, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 857-868.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1992, Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2463-2467.
- Osborne, F. and Ehrlich, H., 1976, Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*, *J. Appl. Bacteriol.*, **41**, 295-305.
- Philips, S. and Taylor, M.L., 1976, Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 392-399.
- Rhine, E.D., Ni Chadhain, S.M., Zylstra, G.J., and Young, L.Y., 2007, The arsenite oxidase genes (aroAB) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 662-667.
- Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D., and Macy, J.M., 2000, A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 92-97.
- Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D., and Macy, J.M., 2000, A New Chemolithoautotrophic Arsenite-Oxidizing Bacterium Isolated from a Gold Mine: Phylogenetic, Physiological, and Preliminary Biochemical Studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 92-97.
- Shakya, A.K. and Ghosh, P.K., 2018, Simultaneous removal of arsenic and nitrate in absence of iron in an attached growth bioreactor to meet drinking water standards: Importance of sulphate and empty bed contact time, *J. Clean Prod.*, **186**, 304-312.
- Sharma, V.K. and Sohn, M., 2009, Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation, *Environ Int*, **35**, 743-759.
- Shin, K.-H. and Cha, D.K., 2008, Microbial reduction of nitrate in the presence of nanoscale zero-valent iron, *Chemosphere*, **72**, 257-262.
- Silver, S. and Phung, L.T., 2005, Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 599-608.
- Upadhyaya, G., Jackson, J., Clancy, T.M., Hyun, S.P., Brown, J., Hayes, K.F., and Raskin, L., 2010, Simultaneous removal of nitrate and arsenic from drinking water sources utilizing a fixed-bed bioreactor system, *Water Res.*, **44**, 4958-4969.
- Zahid, A., Hassan, M.Q., Balke, K.-D., Flegr, M., and Clark,

- D.W., 2008, Groundwater chemistry and occurrence of arsenic in the Meghna floodplain aquifer, southeastern Bangladesh, *Environ. Geol.*, **54**, 1247-1260.
- Xie, Z., Wang, J., Wei, X., Li, F., Chen, M., Wang, J., and Gao, B., 2018, Interactions between arsenic adsorption/desorption and indigenous bacterial activity in shallow high arsenic aquifer sediments from the Jiangnan Plain, Central China, *Sci. Total Environ.*, **644**, 382-388.
- Xiu, W., Guo, H., Shen, J., Liu, S., Ding, S., Hou, W., Ma, J., and Dong, H., 2016, Stimulation of Fe(II) Oxidation, Biogenic Lepidocrocite Formation, and Arsenic Immobilization by *Pseudogulbenkiania* Sp. Strain 2002, *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 6449-6458.
- Xue, D., Botte, J., De Baets, B., Accoe, F., Nestler, A., Taylor, P., Van Cleemput, O., Berglund, M., and Boeckx, P., 2009, Present limitations and future prospects of stable isotope methods for nitrate source identification in surface- and groundwater, *Water Res.*, **43**, 1159-1170.
- Zhang, J., Zhao, S., Xu, Y., Zhou, W., Huang, K., Tang, Z., and Zhao, F.J., 2017, Nitrate Stimulates Anaerobic Microbial Arsenite Oxidation in Paddy Soils, *Environ. Sci. Technol.*, **51**, 4377-4386.
- Zhang, Y. and Angelidaki, I., 2013, A new method for in situ nitrate removal from groundwater using submerged microbial desalination-denitrification cell (SMDDC), *Water Res.*, **47**, 1827-1836.
- Zou, Q., An, W., Wu, C., Li, W., Fu, A., Xiao, R., Chen, H., and Xue, S., 2018, Red mud-modified biochar reduces soil arsenic availability and changes bacterial composition, *Environ. Chem. Lett.*, **16**, 615-622.