

아미노산의 농도 특성을 이용한 축산폐수와 침출수의 유사도 분석

김지영* · 유은진 · 남용재 · 이원석 · 최성현 · 한진석 · 최종우†

국립환경과학원 환경기반연구부 환경측정분석센터

Similarity Analysis of Livestock Wastewater and Carcass Leachate using Concentration Pattern of Amino Acid

Jee-Young Kim*, Eunjin Yoo, YongJae Nam, Won-seok Lee, Sunghun Choe,
Jinseok Han, and Jong-Woo Choi†

*Environmental Measurement & Analysis Center, Environmental Infrastructure
Research Department, National Institute of Environmental Research*,
Environmental Research Complex, Incheon 404-708, Korea*

Received December 3, 2012/Revised December 20, 2012/Accepted December 26, 2012

This study was conducted to analyze the composition of amino acids to develop of a method for tracing contamination sources in groundwater which is polluted by livestock wastewater or leachate from carcass burial sites. In this study, the FALCON (Fingerprinting Analysis of Leachate Contaminants) procedure was used to find unique characteristics in the samples of livestock wastewater and carcass leachate. For the livestock wastewater samples, Lysine accounted for the largest portion (23.39%), followed by alanine (21.93%) and glycine (6.94%). As for the composition of amino acids in carcass leachate, on the other hand, valine made up the highest percentage (28.72%), followed by leucine (19.25%) and isoleucine (15.40%). To identify distinct characteristics between livestock wastewater and carcass leachate in terms of their amino acid composition, individual data sets were estimated for the statistical reproducibility/comparability of fingerprint patterns, and consequently six amino acids such as valine, isoleucine, leucine, lysine, methionine and tryptophan were selected to develop the indicators. To statistically estimate the suitability of these six amino acids, the hierarchical clustering method was used. As a result, all samples except one livestock wastewater sample were clearly divided into two groups: livestock wastewater and carcass leachate. The similarity was 0.665 among the seven samples of livestock wastewater and 0.500 among the seven samples of carcass leachate, which shows that there are similar distribution patterns of amino acids among the samples of each group. On the other hand, the similarity between the two groups turned out to be 0.121, which indicates that livestock wastewater and carcass leachate have significantly different characteristics from each other in terms of amino acid concentration. Therefore, this method of analyzing the composition of amino acids may be useful to trace contamination sources at monitoring locations with pollution fingerprints.

Key words: amino acids, carcass leachate, livestock wastewater, trace contamination sources, tracer

1. 서 론

질산성 질소는 지하수 오염물질 중 국내에서 빈번하게 음용수 기준 및 상수용수 기준을 초과하고 있는 항목으로서¹⁾ 음용하였을 시 영유아에게 blue-baby syndrome을 일으킬 수 있어²⁾, 국내에서는 음용수 수질기준 10

mg/L으로 세계보건기구(WHO)가 제시한 수준과 동일하게 규제하고 있다. 주요 오염원은 자연적으로 발생하기도 하나 지표수와 토양을 통해 유입된 유기/무기성 비료, 생활하수 및 농축산 폐액 등이 있다³⁾. 농업분야에서는 질산성 및 암모니아성 비료, 원예용 아미노산 비료의 사용으로 인해 토양에 유입되어 $\text{NH}_4^+(\text{aq})$, NO_2^-

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cjw111@korea.kr

(aq.) NO_3^- (aq.)의 질산화과정을 거쳐 지하 수맥으로 유입된다. 암모니아는 질산성 질소로 산화된 후 음이온 형태를 띠기 때문에 토양 및 대수층과 친화력이 매우 낮아 지하수에서 높은 이동성을 가지게 된다⁴⁾. 축산분야에서는 소, 돼지 등의 축사시설로부터 배출되는 분뇨가 토양에 유입되어 상기와 같은 과정(Fig. 1)을 거쳐 지하수 관정을 오염시킨다^{5,6)}.

일반적으로 배출되는 생활하수나 축산분뇨의 경우, 하·폐수 처리장에서 처리 후 방류하게 되어있으나, 구제역과 같이 질병으로 인한 대량몰살의 경우 매립에 의한 처리를 하기 때문에 침출수에 의한 지하수의 오염이 우려되고 있고, 일부에서는 매몰지 침출수의 영향으로 지하수 중의 질산성 질소 농도가 기준을 초과하는 것으로 주장하고 있다.

이와 같이 오염원이 2개 이상인 경우 미국 EPA에서는 환경 오염물질의 추적을 위한 법의학적 도구로 FALCON(Fingerprint Analysis of Leachate Contaminants)기법을 개발하였다⁷⁾. 이를 간략히 살펴보면 첫째, 전체적인 데이터를 분석하고 둘째, 적용 가능한 특징적인 데이터를 선별하고 셋째, 각기 값을 백분율값으로 환산하여 비교하기 쉽게 만든다. 넷째, 히스토그램을 작성하고 다섯째, 통계 분석을 통해 패턴의 재현성을 확인한다. 마지막으로, 정해진 오염원의 fingerprint를 다

른 데이터를 통해 확인함으로써 오염원 내의 두 개 이상의 측정값에서 특정한 비율이나 패턴을 찾아내어 오염물질의 배출기원을 추적할 수 있게 된다. 이를 개발한 Russel H.(2004)은 제지공장 폐수의 dioxin-furan의 congener 패턴을 통해 각 오염원의 fingerprint를 확인하였고, 구리광산 시범연구에서 기간별로 지역 우물의 Alkalinity, Ca, Cl, F, Mg, NO_3^- , K, Na, SO_4 , TTM (total trace metals) 항목을 분석하여 퍼센트 비율로 하였을 시 특징적인 패턴을 찾아 침출수의 누출 시기를 알아낼 수 있었다.

그리고, 환경 중 오염원 추적에 널리 적용되는 방법으로 질소 또는 산소 동위원소를 분석하여 오염원을 구분한다.^{8,9,10,11,12)} 그러나 근원이 비슷한 경우 혹은 자연적인 분별(Fractionation)현상 영향에 의하여 특징적인 동위원소비가 나타나지 않을 수 있다. Xue 등(2009)에 의하면, 생활하수와 축산분뇨의 $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ 값은 -5~20‰로 유사한 범위를 나타내었고⁸⁾, 질소와 산소를 동시에 분석하는 다중 동위원소 분석 시에도 생활하수와 축산분뇨는 유사한 범위를 보였다.⁹⁾ 이러한 단점을 보완하기 위하여 일반적인 수질 분석 항목과 함께 특이적인 chemical marker가 개발되어지고 있다. 이중 사람과 동물에 사용되는 의약품질이 수중에 누출되는 점을 이용하여 잔류의약품질을 이용한 질소 오염원을 구분

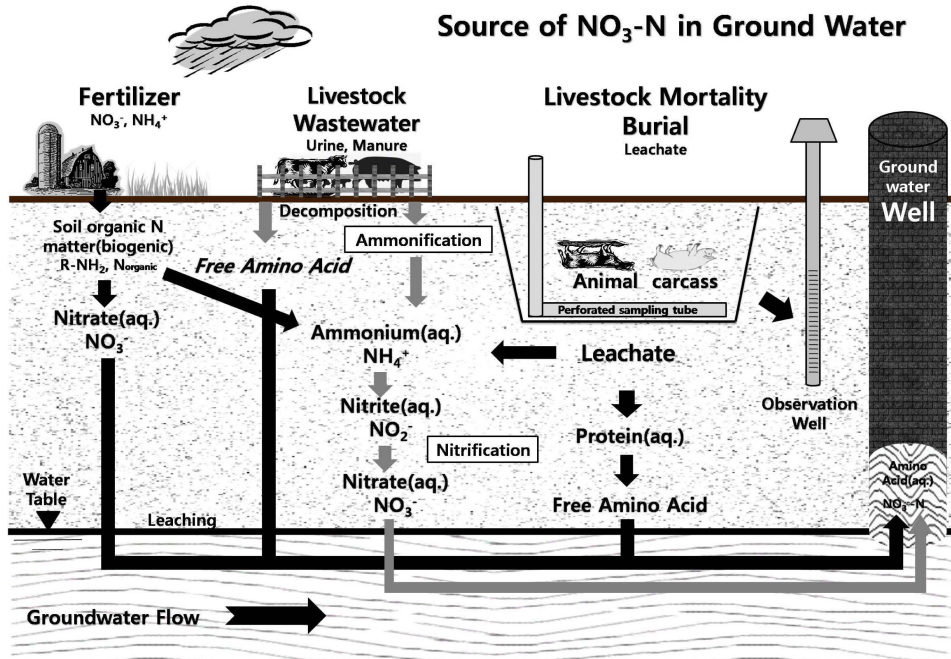


Fig. 1. Contamination of groundwater by fertilizer, manure and leachate leaking from a land disposal site.

하는 방법이 시도되고 있다.¹⁰⁾ 그러나, 각 지역에서 검출되는 의약품물질의 종류가 다를 뿐 아니라 하·폐수 처리장의 처리 효율에 따라 누출 농도가 다양하게 나타나기 때문에 일반적인 추적기법으로서 한계점이 있다.

이와 같이 다양한 방법이 있음에도 불구하고 가축매몰지 인근 지하수의 오염원 추적이 어려운 점은 가축사체 폐액에는 순수한 가축 몸통과 분뇨가 함께 섞여 있기 때문에 지하수 관정 중의 질산성 질소 오염도만으로 축산분뇨인지 아니면 가축사체 폐액인지 판단하기에는 무리가 있다. 즉, 질산성 질소, 암모니아성 질소, 염소, 아미노산 등 오염물질이 지하수계에 노출되면 막대한 량의 지하수에 희석되며, 희석비를 확인한다는 것이 거의 불가능하므로 어느 한 항목만을 가지고 오염원을 추정하는 것은 매우 어려운 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 지하수 오염원인 축산분뇨 폐액과 가축사체 매몰지 유공관 폐액 중의 아미노산 농도를 분석하고, 시료별 고유 peak pattern과 특징적인 요소를 찾고자 미국 EPA의 FALCON 기법을 응용하여 오염원별 아미노산 peak pattern을 추적자로서의 활용 가능성이 있는지를 타진해 보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용된 시료 중 축산분뇨는 축산분뇨처리시설 7곳으로 수거된 폐수를 사용하였고, 가축사체

폐액은 2011년 구제역이 발생한 7지역의 가축사체 매몰지의 유공관을 통해 뽑아 올린 폐액을 축산분뇨처리장으로 이송한 폐액을 이용하였다. 아미노산 표준물질은 Sigma(USA)사, pyridine과 triethylamine은 Fluka (Switzerland)사의 분석급 시약, LC 용매는 acetonitrile, methanol, water(J.T. Baker, USA)를 HPLC급, 유도체화 시약인 PITC는 Thermo(Rockford, USA)사의 아미노산 분석용 시약을 사용하였다.

2.2. UFLC-MS/MS(ESI) 분석조건

분석에 Shimadzu(Kyoto, JAPAN)사의 UFLC-(ESI) MS/MS (LCMS-8030)에 shim-pack XR-ODSII 컬럼(2.0×150 mm, 1.7 μm)을 장착하였으며, 컬럼온도는 40°C로 등온 모드로 유지하였다¹³⁾. 나머지 기기 분석 조건은 김 등(2012)의 조건을 적용하였다¹⁴⁾. 20종 아미노산 전 물질에 대하여 음이온 모드로 검출하였으며, MRM(multiple reaction monitoring) 방식을 사용하였다.

2.4. 전처리방법

시료에 혼탁물질이 있는 경우에는 3,000 rpm으로 원심분리하여 상정액만을 취하여 전처리 시료로 취하였다. 시료별로 PTC-Amino acid(phenylthiocarbonyl-amino acid derivatives) 유도체화는 PITC(MW 135.19)를 pH 9에서 아미노산을 반응시켰다^{15,16)}. 10 μL의 시료를 질소로 농축하여 수분을 완전히 제거 후 coupling

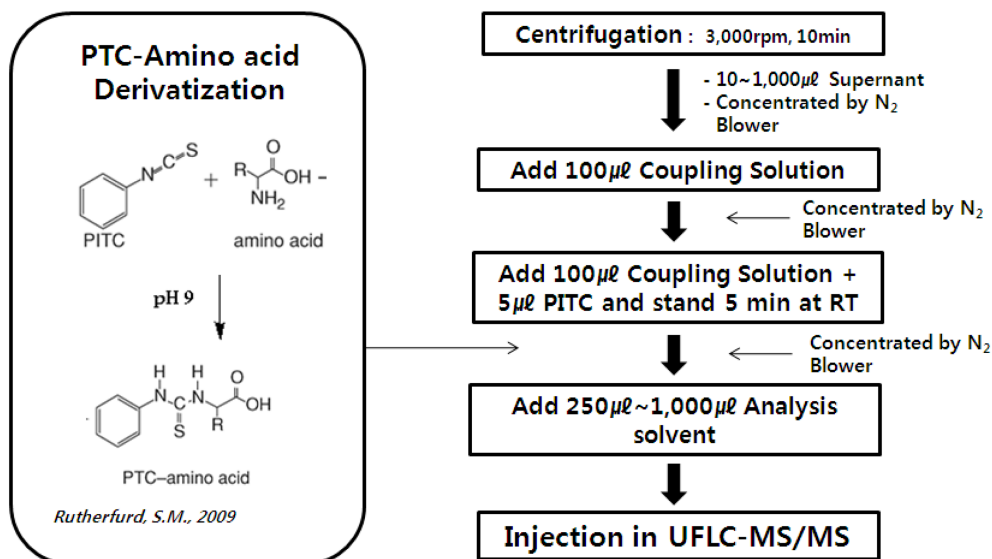


Fig. 2. Scheme of Phenylisothiocyanate derivatization with amino acids.

solution(acetonitrile : pyridine : triethylamine : water = 10:5:2:3) 100 μ L를 넣고 혼합하였다. 다시 질소로 농축하고, coupling solution 100 μ L와 phenylisothiocyanate(PITC) 5 μ L를 함께 넣고 5분간 반응 후 질소 가스로 농축하였다. 마지막으로 5 mM ammonium formate 100 μ L에 녹이고 0.2 μ m hydrophilic PTFE 필터로 걸러 분석에 사용하였다. 유도체화가 완료된 시료는 UFLC MS/MS를 이용하여 3시간 이내에 분석하였다(Fig. 2).

3. 결과 및 고찰

3.1. 축산분뇨 및 가축사체 매몰지 폐액의 아미노산 조성

축산분뇨 폐액과 가축사체 매몰지 폐액 각 7종의 시료에 대해 아미노산을 분석한 결과 축산분뇨 7개 폐액 중 아미노산 농도의 평균값은 0.00~0.776 mg/L 수준(0.011~8.720 μ mole/L)으로 대부분의 시료에서 아미노산이 농축 과정 없이 검출되었으며, 개별 아미노산이 총 아미노산 중에서 차지하는 비율은 라이신(23.39%), 알라닌(21.93%), 글리신(6.94%) 순이었다. 가축사체 매몰지 7개 폐액 중 아미노산 농도의 평균 값은 0.024~

139.074 mg/L(0.200~1188.667 μ mole/L) 수준으로 가축분뇨 폐액보다 매우 높은 농도를 나타내었으며, 개별 아미노산이 총 아미노산 중에서 차지하는 비율은 발린(28.72%), 류신(19.25%), 이소류신(15.40%) 순으로 축산분뇨 폐수와는 확연히 다른 조성을 나타내었다(Fig. 3).

가축사체 매몰지 침출수 중의 아미노산 조성 결과는 M. Okrouhla(2006)이 돼지 사체 중 주요 아미노산이 글루타민산 13~15%, 아스파르트산 10%, 라이신 9.8~10.5%로 침출수 결과와 다른 양상이었다.¹⁷⁾ 그러나 Mahan 등(1998)이 연구한 혈액 중의 아미노산 함량 분석결과 류신 13.0%, 발린 9.0%와는 유사한 경향을 보였는데,¹⁸⁾ 이는 가축사체 폐액의 처리를 위하여 매몰 후 1달 이내에 매몰지로부터 축산분뇨 처리장으로 이송되어온 폐액을 분석시료로 사용하였기 때문에 혈액에 근접한 아미노산 조성비를 나타낸 것으로 추정되었다.

3.2. 축산분뇨 폐액 및 가축사체 매몰지 폐액의 아미노산별 농도 특성

2종 폐액의 대표적인 아미노산 농도별 LC-MS/MS 크로마토그램은 Fig. 4와 같다. 축산분뇨 폐액에서는 라

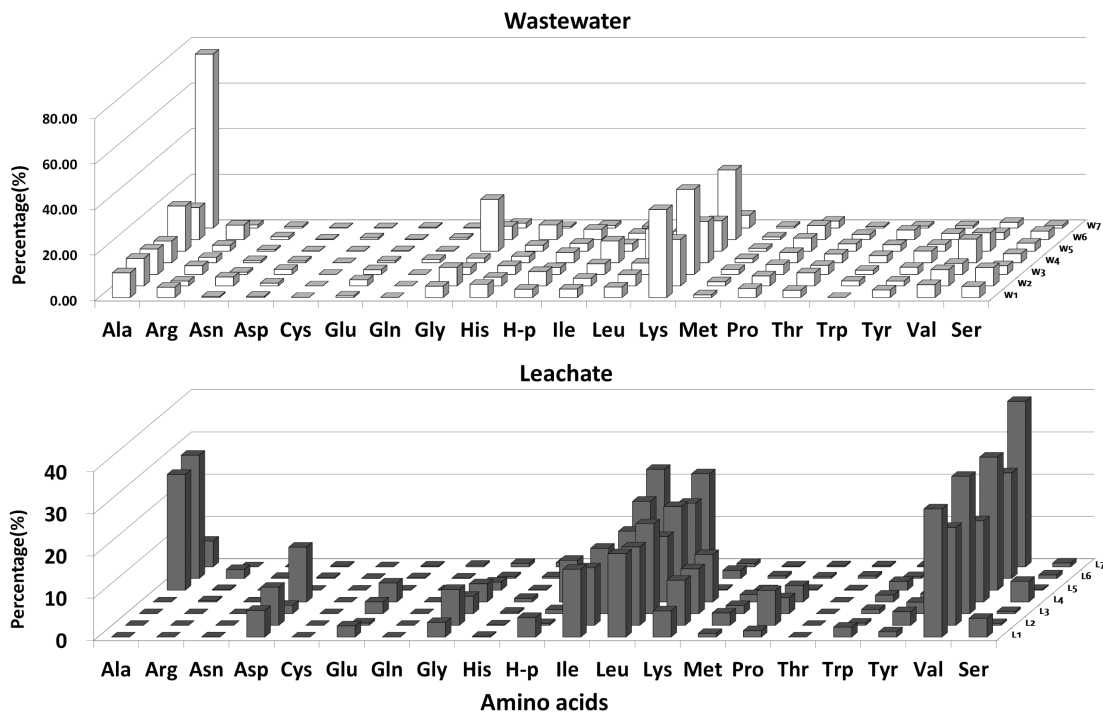


Fig. 3. Relative amino acid percentages of leachate versus livestock wastewater.

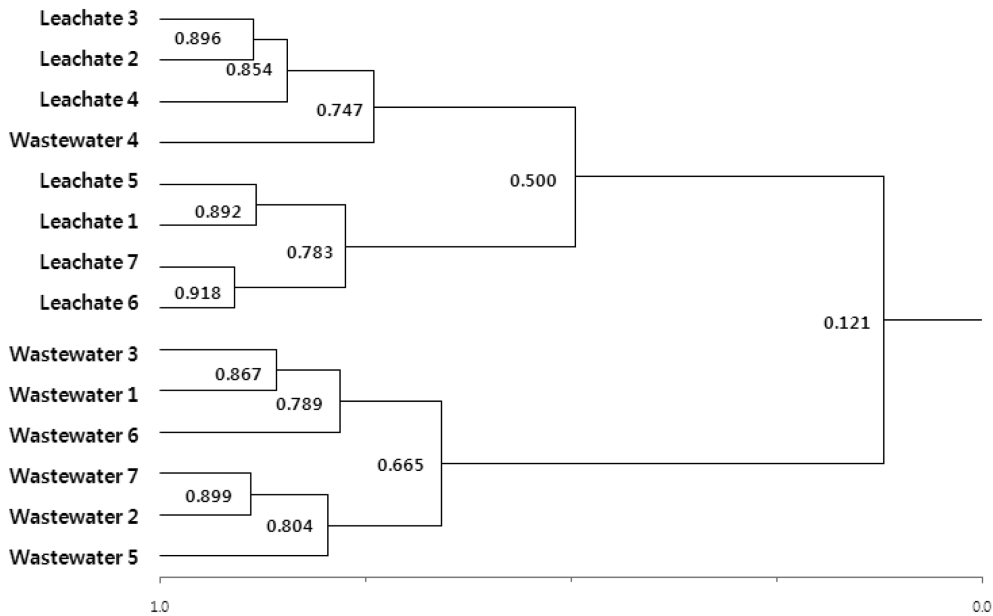


Fig. 5. Dendrogram of 14 sample of carcass leachate and livestock wastewater.

미국 EPA에서는 침출수 오염물질의 범의학적 도구로서 Fingerprint Analysis of Leachate Contaminants (FALCON)이라는 empirical multi-variant contaminant fingerprinting process를 개발하였다.⁷⁾ 이 방법은 오염지역의 다양한 화학물질 분석 데이터를 이용해 독특한 그래픽적인 fingerprint나 multi parameter chemical signature를 생성하여 오염원을 구분할 수 있었다. 이와 유사하게, 본 연구에서는 추적자로서 특이적인 아미노산을 선택하여 효과적으로 오염원의 구분이 가능하다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

축산분뇨 폐액과 가축사체 매몰지 폐액 중 20종 아미노산 개별 농도를 분석하여 아미노산의 조성 특성을 농도비로 인근 지하수 오염원에 대한 추적자로서의 이용 가능성을 알아보았다. 축산분뇨 7개 폐액 중 개별 아미노산이 총 아미노산 중에서 차지하는 비율은 라이신(23.39%), 알라닌(21.93%), 글리신(6.94%) 순이었다. 가축사체 매몰지 7개 폐액 중 개별 아미노산이 총 아미노산 중에서 차지하는 비율은 발린(28.72%), 류신(19.25%), 이소류신(15.40%) 순으로 축산분뇨 폐수와는 다른 조성을 나타내었다. 축산분뇨폐액과 침출수 내 아미노산 함량이 비교적 일정한 수준으로 차이를 보이면

서 시료 모두에서 공통적으로 검출되는 아미노산은 발린, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 트립토판 총 6종의 아미노산을 이용하여 유사도를 분석한 결과 축산분뇨 폐액간 유사도는 0.665, 가축 매몰지 폐액은 0.500으로 높았으나, 두 폐액간 유사도는 0.121로 매우 낮아 두 폐액간의 고유특성을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. S. C. Jun, K. O. Bae, K. K. Lee, and H. J. Chung, *J. Environ. Qual.*, **2005**, 34, 804-815.
2. K. S. Lee, Y. S. Bong, Y. S. Lee, D. Kim, Y. Kim, and K. Kim, *Sci. Total Environ.*, **2008**, 395, 117-124.
3. G. M. Benkovitz, M. T. Scholtz, J. Pacyna, L. Tarrason, J. Dignon, E. C. Voldner, P. A. Spiro, J. A. Logan, T. E. Graedel, *Geophys. Res.* **1996**, 101, 29239-29253.
4. J. Behnke, *J. of Hydrology.* **1975**, 27, 155-167.
5. Abbey Nutsch and Mark Spire, "Carcass Disposal: A Comprehensive Review." **2004**, 43-53, National Agricultural biosecurity center Consortium USDA. Kansas State University, USA.
6. M. S. Lee, K. K. Lee, Y. Hyun, T. P. Clement, and D. Hamilton, *Ecological Modelling*, **2006**, 192, 143-159.
7. R. H. Plumb, "Fingerprint analysis of contaminant data : A forensic Tool for evaluating environmental contamination", **2004**, EPA/600/5-04/054, EPA technical

- support center issue, USA.
8. D. Xue, Botte, B. Jorin, F. Accoe, A. Nestler, P. Taylor, O. V. Cleemput, M. Berglund, and P. Boeckx, *Water research*, **2009**, 43, 1159-1170.
 9. C. Kendall, "Isotope Tracers in Catchment Hydrology", **1998**, 519-576 Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. In: Kendall, C., McDonnell, J.J.(Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Germany.
 10. C. Fenech, L. Rock, K. Nolan, J. Tobin, and A. Morrissey, *Water research*, **2012**, 46, 2023-2041.
 11. J. D. Karr, W. J. Showers, and T. H. Hinton, *GWMMR*, **2002**, 68-75.
 12. M. J. Singleton, K. N. Woods, M. E. Conrad, D. J. Depaolo, and P. E. Dresel, *Environ. Sci. Tech.*, **2005**, 39, 3563-3570.
 13. R. Checa-Moreno, E. Manzano, G. Miron and L. F. Captan-Vallvey, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 3817-3828.
 14. J. Y. Kim, J. Park, Y. Nam, E. Yoo, W. S. Lee, S. Choi, J. Han, J. W. Choi, *J. of Kor. Soc. Environ. Anal.*, **2012**, 15, 107-114.
 15. R. L. Heinrikson and S. C. Meredith, *Anal. Biochem.* **1984**, 136, 65-74.
 16. S. M. Rutherford, and G. S. Gilani, Unit 11.9 Amino acid analysis. *Curr. Protoc. Protein sci.*, **2009**, 58, 1-37.
 17. M. Okrouhla, R. Stupka, J. Citdk, M. Sprysl, E. Kluzakova, M. Trnka, and L. Stolc, *Czech J. Anim. Sci.*, **2006**, 51, 529-534.
 18. D. C. Mahan, and R. G. Shields, *J. of Anim. Sci.*, **1998**, 76, 513-521.