

## 호기성환경에서 비소의 지구화학적 거동에 미치는 미생물의 영향 및 오염 복구에의 적용 가능성

이종운\* · 이상우 · 김경웅

광주과학기술원 환경공학과

### Microbial Effects on Geochemical Behavior of Arsenic under Aerobic Condition and Their Applicability to Environmental Remediation

Jong-Un Lee\*, Sang-Woo Lee and Kyoung-Woong Kim

Department of Environmental Science and Engineering, Kwangju Institute of Science and Technology, Kwangju, 500-712, Korea

The effects on arsenic geochemistry of indigenous microorganisms isolated from an area contaminated with high concentration of arsenic were investigated. Arsenite exerted higher inhibitory effects on the microbes' growth than arsenate. During incubation of the microbes in an arsenate-spiked medium over 24 hours, decrease in microbial growth was observed as arsenate content increased. Arsenate of 150 mM or over apparently inhibited cell growth. However, further incubation for up to 4 days in the high arsenate concentration medium resulted in cell growth, implying that the microorganisms adjusted their biochemical functions to detoxify arsenic and maintain growth. Two types of microbes were observed during 20 hours to reduce arsenate to arsenite in solution through a detoxification mechanism. As well, decrease in the total arsenic content occurred over a 4-day incubation with the same microbes in an arsenate-spiked medium. Therefore it is suggested that microorganisms can influence arsenic speciation in natural settings and this may be applied to efficient bioremediation of arsenic-contaminated sites.

**Key words:** microorganism, arsenic, speciation, geochemistry, bioremediation

높은 함량의 비소로 오염된 지역으로부터 분리해 낸 토착미생물들이 비소 지구화학에 미치는 영향을 조사하였다. Arsenite는 arsenate에 비하여 더욱 높은 미생물 성장 저해효과를 나타내었다. Arsenate를 함유한 배양액에 분리된 미생물들을 24시간 동안 배양한 결과, arsenate의 함량이 높을수록 미생물들의 성장은 감소하였으며 150 mM 이상의 arsenate 조건에서는 성장이 확연히 중단되었다. 그러나, 동일 배양액에서 4일간에 걸쳐 추가 배양한 결과 미생물들의 성장이 다시 관찰되었으며 이는 미생물들이 비소를 해독하고 성장을 유지할 수 있도록 그들의 생화학적 기능을 조절하였음을 의미한다. 분리된 것 중 두 종의 미생물을 arsenate를 함유한 배양액에서 20시간 가량 배양한 결과, arsenate를 arsenite로 환원시켰음이 관찰되었고 이는 해독기계에 의한 것으로 추측된다. 또한 동일조건 배양액에서 4일간 추가 배양한 결과 총 용존 비소함량의 감소가 관찰되었다. 미생물은 자연조건에서 비소의 화학종 결정에 영향을 미치며 이러한 특성은 비소로 오염된 지역의 복구에 유용하게 사용되어 질 수 있을 것으로 예상된다.

**주요어:** 미생물, 비소, 화학종, 지구화학, 생물학적 처리

## 1. 서 론

비소는 지각 중에 널리 분포하며 특히 유비철석 (FeAsS), 계관석(AsS), 용황(As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) 등의 형태로 합철

광석, 화성기원 황화물, 해양세일 등에 주로 존재한다 (Bhumbla and Keefer, 1994). 비소는 이들 자연적으로 존재하는 함비소광물의 용해에 의해 주로 환경으로 유입되나, 최근 들어 다양한 인위적 원인-광산활동, 제련활동, 황산제조 과정, 살충제 살포 등(Bhumbla and Keefer, 1994)-에 의한 유입량은 자연적 유입량의 약

\*Corresponding author: jlee@kjist.ac.kr

4배에 이른다(Nriagu and Pacyna, 1988).

비소는 그 산화상태에 따라 자연계에서 arsenate (As(V)), arsenite(As(III)), arsenic metal(As<sup>0</sup>), arsine (As(-III))의 형태로 존재하나, 이 중 As<sup>0</sup>의 자연적 존재량은 매우 작고 As(-III)는 전기화학적으로 높은 환원환경에서만 존재하므로, 상대적으로 일반적 자연환경에서의 비소 거동의 초점은 As(V)와 As(III)에 맞추어져 있다. 이외에 일부 박테리아 및 식물성 플랑크톤은 메틸기와 결합한 형태의(methylated) 비소를, 바다가재, 어류, 식물성 플랑크톤은 다른 유기물과 결합한 형태의 비소를 생성하지만 이들이 자연수계에서 비소 지구 화학에 미치는 영향은 매우 적거나 또는 환경에 따라 그 중요도의 변이가 심하다 (Cullen and Reimer, 1989; Anderson and Bruland, 1991).

비소의 주된 용존종인 As(V)와 As(III)는 모두 매우 독성이 강하나 특히 As(III)는 As(V)에 비해 약 200배나 강한 독성을 띤다(Williams and Silver, 1984). 또한, 중성 및 약산성의 pH 조건에서 As(V)는 망간산화물, 알루미늄산화물 및 주로 철산화물의 입자 또는 콜로이드에 흡착되거나 공침전되어(Mok and Wai, 1994) 퇴적물로 유입되는데 반하여, As(III)의 자연수계에서의 이동도는 훨씬 큰 것으로 알려져 있다(Gulens and Champ, 1979). 이외에 카올리나이트나 일라이트 등의 점토광물 또는 휴믹산(humic acid)이나 펠빅산(fulvic acid) 등의 유기물질에 의한 흡착 또는 용탈이 비소의 이동도에 영향을 미치기도 한다(Mok and Wai, 1994; Manning and Goldberg, 1997).

지난 20여년간 계속되어 온 비소의 지구화학적 순환에 대한 연구를 통해 박테리아가 자연조건에서 비소의 전기화학적 종(species) 결정 및 순환에 있어 매우 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(미생물이 금속의 산화환원상태 변화에 미치는 영향은 이종운과 전효탁(2001)을 참조할 것). 박테리아는 몇 가지 과정을 통해 As(III)를 As(V)로 산화하거나 반대로 As(V)를 As(III)로 환원시킨다.

As(III)를 산화시키는(arsenite-oxidizing) 박테리아는 1918년에 처음 보고되었다(*Bacillus arsenoxydans*; Green, 1918). As(III)의 산화를 유발하는 미생물학적 과정은 그것이 As(III)를 에너지원으로, CO<sub>2</sub>를 탄소원으로 사용하는 chemolithotrophic 박테리아에 의한 것인지 또는 유기물질을 에너지원으로 사용하는 heterotrophic 박테리아에 의한 것인지의 여부에 따라 나뉜다(지구화학분야에서 chemolithotrophic 박테리아의 예로서 가장 전형적이고도 널리 알려져 있는 것은 산

성광산패수의 원인이 되는 *Thiobacillus ferrooxidans*를 들 수 있다. 이 박테리아는 Fe(II)를 Fe(III)로 산화하며 성장에 필요한 에너지를 얻는다).

전자의 대표적인 박테리아로는 *Pseudomonas arsenitoxidans*(Ilyaletdinov and Abdrashitova, 1981)를 들 수 있으며 이는 유기물의 공급없이도 As(III)를 산화시킴으로써 성장에 필요한 에너지를 얻을 수 있다. 최근에는 *P. arsenitoxidans*에 비해 성장속도가 월등히 빠른 NT-26 균주가 분리된 바 있다(Santini et al., 2000). 한편, heterotrophic 박테리아의 대표적 예인 *Alcaligenes faecalis*(Osborn and Ehrlich, 1976)의 경우, 성장을 위해서는 유기물질이 반드시 존재하여야 하며 이 때 관찰되는 As(III) 산화는 에너지 생성을 위한 것이 아니고 해독(detoxification) 기제에 의한 것으로 생각되어지고 있다.

As(V)를 환원시키는 미생물학적 과정 역시 그 과정 중 박테리아의 성장이 수반되는 것과 그렇지 않은 것으로 나뉜다. 첫 번째 과정은 혐기성 조건에서만 진행되는 것으로서 As(V)를 최종 전자수용체로 사용하여 호흡(respiration)을 하는 과정이다(Ahmann et al., 1994; Oremland et al., 1994; Laverman et al., 1995; Dowdle et al., 1996; Macy et al., 1996; Newman et al., 1997a; Harrington et al., 1998). 이러한 호흡 과정을 통하여 박테리아가 성장에 필요한 에너지를 얻는다는 점에서 아래에 기술할 환원성 해독작용(reductive detoxification)과 구별된다. 수소분자를 전자공여체로 간주할 경우, As(V)를 호흡함으로써 얻을 수 있는 에너지는 질산염, Mn(IV), Fe(III)를 호흡하는 경우보다 적다. 따라서 이들 산화제가 동시에 분포하는 환경-예를 들면, 토양이나 퇴적물-에서 미생물에 의한 이화적(dissimilatory) As(V) 환원이 발생하려면 열역학적으로 질산염, Mn(IV), Fe(III) 등이 모두 환원된 후에야 가능하다(Newman et al., 1998). 현재까지 As(V)를 호흡하여 성장하는 4 종류의 박테리아가 다음과 같이 분리되었다; *Chrysiogenes arsenatis* strain BAL-1<sup>T</sup>(Macy et al., 1996), *Sulfurospirillum arsenophilus* strain MIT-13(Ahmann et al., 1994), *Sulfurospirillum barnesii* strain SES-3(Oremland et al., 1994; Laverman et al., 1995), *Desulfotomaculum auripigmentum* strain OREX-4(Newman et al., 1997a).

두 번째 과정에 관여하는 박테리아는 다양하게 발견되는데 As(V)를 As(III)로 환원시키며 해독작용을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, 영양소인 인을 인산염(phosphate)의 형태로 흡수하는 과정 중에 화학적 성질

이 유사한 arsenate(As(V))를 같이 흡수하게 되는데, 이러한 방식으로 흡수된 arsenate는 세포 내에서 독성을 미치게 되므로 이를 arsenite(As(III))로 환원한 후 세포 밖으로 배출하게 된다(Cervantes *et al.*, 1994; Rosen *et al.*, 1994; Ji and Silver, 1995). 이러한 환원성 해독작용은 호기성 및 혐기성 조건에서 모두 가능하며 이 과정을 통해 박테리아 성장에 필요한 에너지가 생성되지는 않는다.

As(V)를 As(III)로 환원시키는 과정은 용존 비소의 이동도와 독성을 증가시킬 것이다. 그러나 최근에 발견된 As(V) 호흡 박테리아인 *D. auripigmentum*은 혐기성 조건에서 As(V)와 S(VI)를 각각 As(III)와 S(-II)로 환원시킴으로서  $As_2S_3$ 를 침전시키는 것으로 밝혀졌다(Newman *et al.*, 1997a, b). 그간 열수용액이나 온천 지역에서만 관찰되어져 온 이 광물의 형성은 무생물적 기원인 것으로 알려져 왔으므로 생물체의 작용에 의하여 이 광물이 생성될 수 있다는 사실은 광물학적으로도 매우 중요한 발견이라 할 수 있다. 또한 환경 지구화학적으로도 이러한 비소 침전물의 형성은 비소 이동도를 낮추는 한 방안으로서 오염된 지역의 처리에 유용하게 이용되어질 수 있음을 시사한다.

한편, 비소의 지구화학적 거동에 미치는 미생물의 간접적인 영향으로서 다음과 같은 것을 들 수 있다. 철 및 황산화 박테리아인 *Thiobacillus ferrooxidans*는 유비철석, 용황, 에나자이트(enargite,  $Cu_5AsS_4$ ) 등을 산화시킴으로써 이들 광물 내에 구조적으로 존재하는 비소를 수계로 유입시킨다(Ilyaldinov and Abdrashitova, 1981; Ehrlich, 1963, 1964). 한편, 무산소환경에서는 이화적 철환원박테리아가  $Fe(III)O_x$ 를 용해시킴으로써(reductive dissolution) 철산화물에 흡착되어 있던 비소가 용탈되기도 한다(Lovley, 1993).

비소의 용존종 결정에 미생물의 작용이 지대한 영향을 미친다는 사실은 비소의 지구화학적 순환 중 무생물적 모델만으로는 설명할 수 없었던 부분이 생물학적 역할을 고려한다면 규명될 수 있다는 것을 의미한다. 또한 미생물에 의한 비소의 전기화학적 변환 특성을 이용한다면 비소로 오염된 환경의 복구에 이들 미생물을 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

이 연구의 목적은 호기성 조건에서 비소에 내성을 가지는 미생물을 분리한 후, 이들이 용존 As(V) 및 As(III)의 speciation에 미치는 영향과 그 기제를 조사하는 것이다. 이러한 연구의 결과를 통해 실제 비소로 오염된 지하수, 토양 및 퇴적물에서의 비소의 지구화학적 거동을 규명할 수 있고, 나아가 이들 환경에 대

하여 보다 효율적인 생물학적 비소 저감기술을 수립할 수 있을 것으로 기대된다. 국내에서는 하천에서 분리한 비소 내성 박테리아에 대한 유전적 특성 연구가 수행된 바 있으나(정미경과 이호자, 1991), 미생물이 비소의 지구화학에 미치는 영향에 대한 연구로서는 이것이 국내 최초로 시도되는 것으로 생각된다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 미생물 분리 및 배양

높은 비소농도를 갖는 환경 내에 자연적으로 생존하고 있는 미생물은 비소의 독성에 대하여 높은 내성을 가지는 것으로 여겨진다. 이러한 특성을 갖는 토착(indigenous) 미생물을 분리하기 위하여 높은 비소농도를 보이는 전남 보성 명봉 폐금광산의 광미와 퇴적물, 충남 부여 임천 폐금광산의 광미를 채취하였다. 채취한 광미 내의 중금속 함량을 알아보기 위하여, 질산과 염산을 각각 2 mL 및 6 mL로 혼합한 후 증류수로 40 mL를 채운 왕수에 광미시료 2 g을 70°C에서 1 시간 반응시킨 후 침출액 내의 As, Cd, Cu, Pb, Zn을 ICP-AES(Thermo Jarrel Ash, U.S.A.)로 분석하였다.

광미 및 퇴적물 시료로부터 미생물을 분리하기 위하여 0.1M  $(NH_4)_2HPO_4$  원충액을 이용, 1:3 w/v의 비로 시료와 원충액을 혼합하여 25°C에서 120 rpm으로 30 분간 진탕시켰다. 이 때 사용된 원충액은 자연적인 광미 및 퇴적물의 pH와 동일하게 하기 위해서, 농질산을 이용, pH를 5.0으로 조정하였다. 진탕 결과 부유된 입자를 자연침강시킨 후 상등액 100  $\mu$ L를 채취, As(V) 5 mM과 As(III) 1 mM을 첨가한 TSA(tryptic soy agar: Difco, U.S.A.) 평판배지에 도말하여 25°C 호기성 조건에서 24 시간 동안 배양하였다. 이 때 사용된 TSA 배지의 화학적 조성은 다음과 같다; trypton pepton 15.0 g/L, soyton pepton, 5.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, agar 15.0 g/L. As(V) 및 As(III)를 함유한 배지는 autoclave를 이용하여 멸균한 TSA가 고형화하기 전에 각각  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma, U.S.A.) 및  $NaAsO_2$ (Sigma, U.S.A.)를 용해시켜 제조하였다. 접종한 배지를 24 시간 배양한 후, 배지 표면에 상이한 형태로 형성된 각 균체들을 분리, 각각의 함비소 TSA 배지에 10회 이상 연속 배양함으로써 순도를 높였다.

### 2.2. 미생물 성장실험

단일 균체로 분리된 각 미생물들을 As(V)가 각각 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200 mM 함유된 TSB(tryptic soy

broth: Difco, U.S.A.) 배양액 5 mL에, As(III)가 각각 1, 5, 10, 20, 50 mM 함유된 TSB 배양액 5 mL에 접종하여 25°C, 200 rpm의 호기성 조건하에서 24 시간 배양하였다. 특히 As(V)가 150 mM 및 200 mM 함유된 배양액 내의 미생물들은 동일조건에서 최대 4 일까지 추가 배양하였다. 사용된 TSB 용액의 화학적 조성은 다음과 같다: trypton pepton 17.0 g/L, soyton pepton, 3.0 g/L, dextrose 2.5 g/L, NaCl 5.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L. 각 비소 농도에 따른 미생물의 성장 정도를 관찰하기 위하여 24 시간(또는 4 일)의 배양 후에 배양액을 채취하여 자외선-가시광선분광광도계(UV-vis spectrophotometer; Perkin-Elmer model Lambda 12, U.S.A.)를 이용, 600 nm 파장에서 광밀도(optical density)를 측정하였다. 측정된 광밀도는 성장한 미생물의 생물량 지표로 사용하였다.

위에 언급한 실험 결과, As(V)의 독성에 가장 내성이 높은 것으로 파악된 두 개의 균주(MB-7, MB-10)를 30 mM의 As(V)를 첨가한 TSB 배양액에 접종하여 25°C, 200 rpm의 조건에서 약 20 시간까지 배양하였다. 배양 도중 일정 시간별로 용액을 채취하여 광밀도와 As(V) 농도를 측정하였다. 또한 이들을 동일한 실험조건에서 약 14 일간 추가 배양한 후 용액을 채취하여 As(V) 및 As(III) 농도를 측정하였다. 14 일간 배양한 실험의 경우, As(III) 배지에서 분리한 한 균주(MB-12)를 As(III) 10 mM이 함유된 TSB 배양액에 접종한 것을 포함시켜 같이 배양하였으며 이 용액에 대해서도 역시 As(V) 및 As(III) 분석을 수행하였다.

### 2.3. As(V) 및 As(III) 분석방법

As(V) 및 As(III) 농도는 molybdenum blue 비색법으로 측정하였다(Murphy and Riley, 1962; Johnson, 1971; Johnson and Pilson, 1972). 이 때 사용되는 molybdate 시약은 As(V) 및 인산염과 동시에 반응하여 청색을 내며(생성되는 청색의 흡광도는 As(V)와 인산염 함량의 축합된 양에 비례) 환원상태인 As(III)와는 반응하지 않는다. 따라서 동일시료를 각각 산화처리, 환원처리 및 처리하지 않은 후 molybdate 시약과 반응시켜 각각의 흡광도를 측정하는데, 이 때 산화처리한 것은 As(V)+As(III)+인산염, 환원처리한 것은 인산염, 비처리한 (untreated) 것은 As(V)+인산염의 함량을 각각 나타내게 된다. 따라서 As(V), As(III) 및 인산염의 각 함량은 아래와 같은 흡광도의 차이로부터 구할 수 있다.

As(III) = "산화처리 용액"의 흡광도 - "비처리용액"의 흡광도

As(V) = "비처리용액"의 흡광도 - "환원처리 용액"의 흡광도

인산염 = "환원처리 용액"의 흡광도

이 때, 색을 내기 위한 비색시약은 Murphy and Riley(1962)를 따라 5N 황산 125 mL, 40 g/L ammonium molybdate((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O) 용액 37.5 mL, 0.1M 아스코빅산(ascorbic acid(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)) 용액 75 mL, 1 mg/mL 안티모니 함량을 갖도록 조제한 potassium antimonyl tartrate(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KO<sub>7</sub>Sb) 용액 12.5 mL을 순서에 맞게 혼합하여 제조하였다. 산화시약은 Johnson and Pilson(1972)을 따라 50% 포화상태의 potassium iodate(KIO<sub>3</sub>) 용액을 제조하여 사용하였다. 환원시약은 Johnson (1971)을 따라 3.5N 황산 20 mL, 0.74 M sodium metabisulfite(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 용액 40 mL, 0.056M sodium thiosulfate(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 용액 40 mL을 순서에 맞게 혼합하여 제조하였다. 이상의 과정에 소요되는 모든 시약은 시약등급 이상의 것(Sigma, U.S.A.)을 사용하였다. As(V), As(III) 및 인산염의 표준용액은 각각 Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, NaAsO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 용해시켜 제조하였다. 비색절차는 Johnson and Pilson(1972)과 동일하게 수행하였으며 흡광도는 865 nm 파장에서 읽었다. 공시험(blank)로서 탈이온수를 같은 방법으로 처리한 후 동일 파장에서 흡광도를 읽어 "산화처리 용액", "환원처리 용액", "비처리용액"의 각 흡광도에서 제하므로써 보정된 흡광도를 구하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 미생물의 분리

임천 폐금은광산 광미의 경우 As(V) 5 mM 및 As(III) 1 mM이 첨가된 TSA 배지에서 미생물이 전혀 성장하지 않은 반면, 명봉 폐금광산 광미 퇴적물의 경우 함As(V) 배지에서 10개, 함As(III) 배지에서 3개의 균체가 각각 형성, 분리되었다. As(V) 조건에서 분리된 균주에 대하여 MB-1부터 MB-10까지의 일련번호를, As(III) 조건에서 분리된 균주에 대하여 MB-12에서 MB-14까지의 일련번호를 부여하였다.

임천광산의 광미로부터 미생물을 분리할 수 없었던 이유는 광미에 함유되어 있는 높은 중금속 농도로 인해 토착미생물의 성장이 제한을 받기 때문일 것이다. 임천광산 광미에 존재하는 비소는 명봉광산 광미에 비

**Table 1.** The concentrations of As, Cd, Cu, Pb and Zn present in tailings of the Myungbong Au mine and the Imcheon Au-Ag mine (units: mg/kg). Elemental determination was performed for tailing samples which were classified in accordance with their colors (green, yellow, and mixture (bulk)).

Particle size less than 2.54 mm						
Mine	Tailing type	As	Cd	Cu	Pb	Zn
Myungbong	Green tailing	6130	4	23	770	50
	Bulk tailing	6250	4	12	300	54
Imcheon	Green tailing	380	22	370	7680	2290
	Yellow tailing	250	18	100	1670	1430

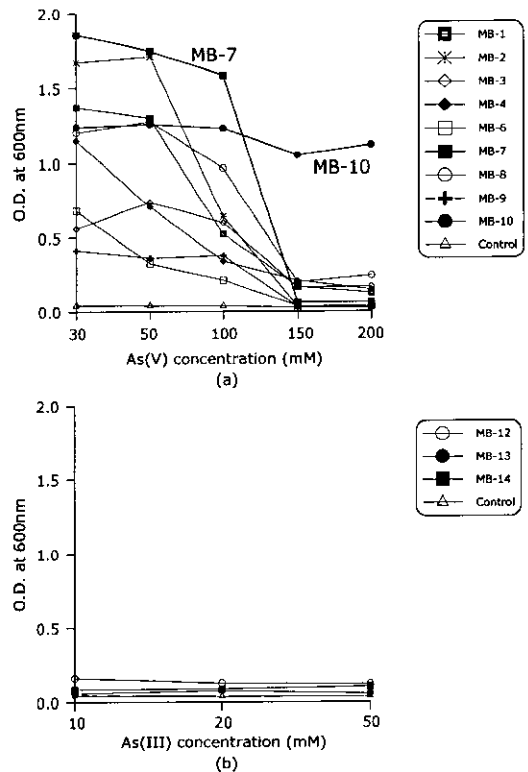
Particle size less than 0.318 mm						
Mine	Tailing type	As	Cd	Cu	Pb	Zn
Myungbong	Green tailing	6860	4	17	820	41
	Bulk tailing	7350	5	17	370	56
Imcheon	Green tailing	580	47	750	1450	2990
	Yellow tailing	330	28	150	1490	1840

하여 수습 배 낮은 값을 나타내고 있으나 Cd, Cu, Pb, Zn 등 중금속의 함량은 명봉광산에 비하여 수습 배에서 수백 배 높은 값을 보이고 있다(Table 1). 이 중 Cd와 Pb는 미생물에게 “독성금속”으로 분류되어 있으며, Cu와 Zn은 산화·환원 및 수화반응, 저분자의 이동 및 저장반응 등의 효소촉매 과정에 관여하고 있는 등 미생물의 정상적인 생화학적 기능수행을 위해 필요한 “필수금속”으로 분류되고 있으나 임천광산의 광미에서와 같이 고농도로 존재할 경우 도리어 미생물에게 독성을 나타낼 수도 있다(Beveridge *et al.*, 1997). 또한 광미 내에 여러 중금속들이 동시에 부화되어 있다는 사실도 이들이 미생물에 복합적인 독성을 나타내었을 가능성을 암시하므로, 명봉광산에 비하여 임천광산의 광미에서는 토착미생물에 대한 중금속 독성이 더욱 크게 작용할 수 있다.

그러나 현장에 존재하는 중금속이 미생물 및 다른 생물체에게 독성을 나타내는 정도는 토양, 퇴적물, 광미 내 중금속의 총합량 결과로 표시되는 것은 아니며 도리어 이들 중금속이 얼마나 ‘생물체에 의해 용이하게 흡수되는 형태로 존재하는가(bioavailability)’가 더 중요하다(예를 들면, O'Day *et al.*, 2000). 따라서 임천광산의 광미에서 단지 중금속 총 함량이 더 높게 나타난다는 것만으로 미생물에 대한 독성을 추측하기에는 그 근거가 다소 미약하므로, 이에 관해서는 추가적인 연구가 있어야 할 것이다.

**3.2. 미생물의 성장**

As(V)가 첨가된 배지에서 분리한 미생물을 최대 200 mM까지 다양한 농도의 As(V)가 첨가된 TSB 배양액에 접종하여 24 시간 배양한 결과, 대부분의 미생물은



**Fig. 1.** Aerobic growth of the microbes isolated from tailings and sediments in the Myungbong mine under the condition of various concentrations of (a) As(V) and (b) As(III) over 24 hours.

As(V) 농도가 증가할수록 성장이 제한되는 모습을 보였다. 특히 150 mM 이상의 As(V)를 첨가한 배양액에서는 MB-10을 제외한 모든 균주의 성장이 두드러지게 감소함으로써 150 mM 이상의 As(V)는 이들 미생물에

심각한 독성을 미침을 알 수 있었다(Fig. 1). MB-10의 경우 As(V) 농도가 증가함에도 불구하고 성장속도가 크게 감소하지 않는 것으로 나타나 비소에 대한 내성이 상대적으로 매우 강한 것으로 나타났다. 그러나 명봉광산 광미의 경우 약 6130~6250 mg/kg의 비소를 함유하므로 100 mM(약 7490 mg/kg) 이하의 비소농도에서 활발히 성장하는 것으로 관찰된 다른 미생물도 광미 내에서의 정상적인 생장에 심각한 장애는 받지 않을 것으로 예상된다.

한편, 동일한 호기성 조건하에서 As(V)와 As(III)가 미생물에 미치는 독성은 큰 차이를 보이고 있다. As(III) 1 mM 조건에서 분리된 미생물들은 5 mM의 As(III) 농도에서는 성장하는 것이 관찰되었으나 10 mM 이상의 농도에서는 거의 성장하지 못함으로써, As(III)의 경우 As(V)에 비해 미생물에 한층 높은 독성을 나타내고 있음을 알 수 있다(Fig. 1). 이는 비소로 오염된 지역에 대하여 오염처리의 목적으로 미생물의 생태학적, 생리학적 특징을 파악하려고 할 경우 비소의 총 함량을 분석하는 것 보다 비소의 각 화학종을 정량하는 것이 더 중요하다는 것을 암시한다.

150 mM 이상의 높은 As(V) 농도에서 24 시간 배양한 결과 그 성장에 크게 제한을 받는 것으로 나타났던 미생물은 동일 농도의 As(V)에 장기간 노출될 경우 다시 활발히 성장하는 특징을 보였다. 즉 Fig. 1에서 보듯이 150 mM의 As(V) 농도에서 그 성장률이 크게 저하되었던 균주는 동일 조건에서 약 4 일간 추가 배양한 결과 모두 대폭 성장한 결과를 나타내었다(Fig. 2). 또한 As(V) 200 mM 조건에서도 역시 4 일간의 배양 후 MB-3, MB-6 및 MB-9를 제외한 모든 균주가 다시 활발히 성장하였다. MB-3, MB-6, MB-9 균주의 경우, 매우 희석된 As(V) 조건에서도 가장 낮은 성장을 보였던 것들로서 이들은 주어진 실험조건에서 활발히 성장하지 못 하는 것들이거나 또는 비소에 대한 내성이 상대적으로 약한 것으로 추정된다.

이처럼 장기간에 걸친 As(V) 노출에 대하여 미생물이 활발히 성장하는 특징을 보이는 것은, 증가된 비소 농도에 대하여 초기에는 적응을 하지 못하였으나 점차 비소의 독성을 처리할 수 있는 효소 생성의 기체가 세포 내에 새로 형성되거나(induced) 또는 더욱 활발해지기 때문인 것으로 추정된다(예를 들면, Oremland *et al.*, 1994). 이러한 결과는 비소로 심하게 오염된 지역에서 미생물이 스스로 생존할 수 있도록 자신의 생리생화학적 기능을 변화시킬 수 있으며 따라서 자연적인 비소오염 지역에서 비소독성에 내성을 갖는 미생물이

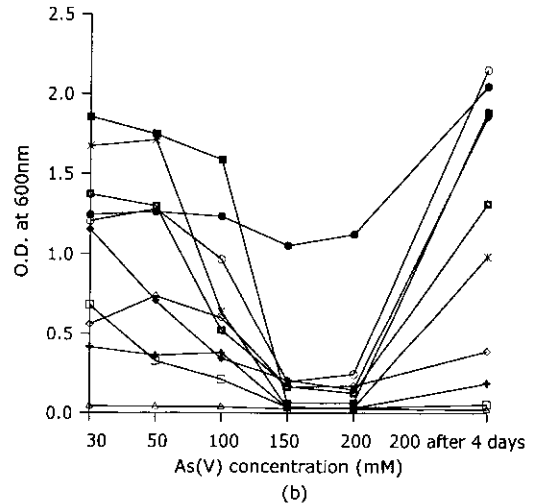
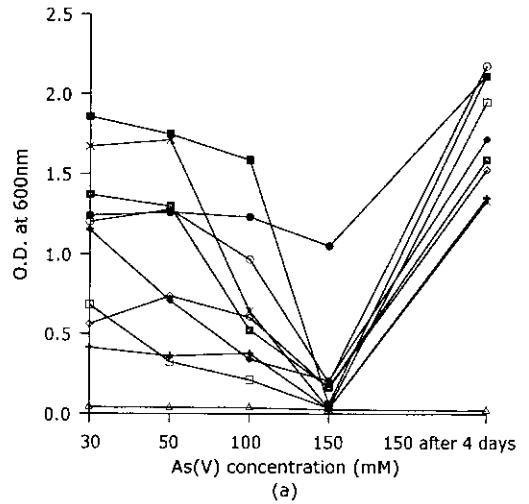
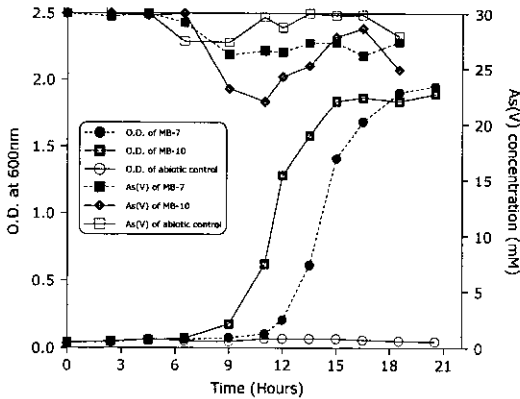


Fig. 2. Aerobic growth of the microbes isolated from tailings and sediments in the Myungbong mine under the condition of various concentrations of As(V) over 24 hours or 4 days ((a) 150mM and (b) 200mM). Four-day data are separately marked by a label below abscissa in the Figure. The symbols have the same meanings as in Fig. 1(a).

얼마든지 생존할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 단기간에 수행되는 실험실적 금속-미생물 반응연구의 시간 범위를 벗어난 장기적인 규모에서 볼 때 여러 금속(또는 준금속)의 지구화학에 미치는 미생물의 영향이 예상외로 상당히 높을 수 있음을 나타낸다.

### 3.3. 비소의 화학종 변화 및 환경지구화학적 의의

비소내성을 가지는 미생물이 비소의 지구화학에 미치는 영향을 알아보기 위하여 합비소 배양액에 토착 미생물을 접종한 후 일정시간별로 용액을 채취, 미생



**Fig. 3.** Relationships between cell growth and arsenate reduction for the strains MB-7 and MB-10 which were incubated in 30 mM arsenate-spiked rich medium over a 20-hour period.

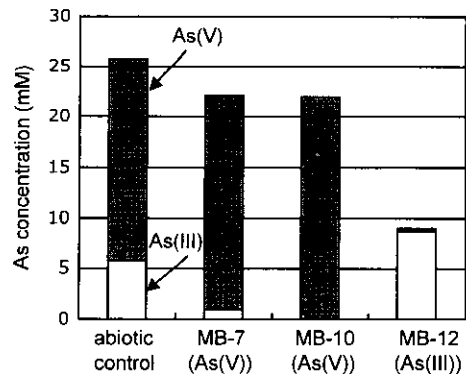
물 성장속도 및 As(V)와 As(III) 함량간의 관계를 조사하였다. 높은 비소 농도에서 가장 활발히 성장하는 것으로 파악된 MB-7과 MB-10을 30 mM의 As(V)를 첨가한 TSB 배양액에 접종한 후 약 20 시간 배양하며 이들 미생물의 성장속도와 As(V)의 함량 변화를 관찰하였다. MB-10의 경우 약 7 시간 이후부터, MB-7의 경우는 이보다 약간 늦은 약 10 시간 이후부터 지수성장(exponential growth) 시기에 접어드는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 미생물을 접종하지 않은 비교시료(control)의 경우 As(V) 농도는 대체적으로 초기의 30mM을 유지하고 있는 반면, 두 균주를 각각 접종한 배양액 내에서는 시간에 따른 As(V) 농도의 변화가 관찰되었다. MB-7을 접종한 경우, 6 시간 경과한 후 As(V) 농도가 감소하기 시작하여 20 시간 지난 후에는 최종적으로 약 3~4 mM의 As(V)가 감소하였다. MB-10의 경우는 시간에 따른 As(V) 농도에 있어 약간의 변화가 보이나 7 시간 지난 후 As(V) 농도가 감소하기 시작하여 최종적으로 20 시간 경과 후 약 5 mM 정도의 As(V)가 감소된 것으로 나타났다.

미생물을 접종한 경우 관찰된 As(V) 감소분은 비소의 전기화학적 특성상 모두 As(III)로 환원된 것으로 여겨진다. 이 실험은 호기성 조건하에서 수행되었기 때문에 무산소 환경에서만 진행되는 이화적 호흡성환원이 발생할 가능성은 없으므로 관찰된 As(V)의 환원은 미생물의 비소 해독작용의 결과인 것으로 추측된다 (Cervantes *et al.*, 1994; Rosen *et al.*, 1994; Ji and Silver, 1995). 미생물의 성장과 As(V) 환원이 거의 동일한 시기에 시작된 점을 보면 이화적 호흡성환원의 가능성을 시사하는 듯이 보이지만(이것은 이화적 금속

환원 박테리아를 확인하는 중요한 특징이기도 하다). 미생물이 지수성장을 함에도 불구하고 As(V) 환원이 비례하여 진행되지 않고 계속 일정 농도를 유지하고 있는 점도 역시 관찰되는 As(V) 환원이 해독작용에 의한 것임을 암시한다.

최근 들어 지구미생물학을 연구하는 이들에게 가장 큰 관심사 중 하나는 이화적 금속환원박테리아에 의한 혐기성 환경에서의 전기화학적 금속종 변환이다(이종운과 전효택, 2001). 그러나 이 실험의 결과는 호기성 조건하에서도 미생물이 용존 비소의 화학종 결정 및 그 순환에 큰 기여를 할 수 있다는 가능성을 나타낸다. 용존비소가 As(V) 상태로 존재한다면 토양, 퇴적물 또는 대수층 내에 분포하는 철산화물 등에 쉽게 흡착되므로 지구화학적인 이동도가 감소되며 또한 이를 오염 처리 측면에서 이용한다면 자연저감(natural attenuation)의 효과를 기대할 수 있지만, 미생물들이 이 실험의 결과처럼 호기성 환경에서 산화상태의 비소를 환원시킨다면 그 이동도와 독성을 크게 증가시키게 될 것이다. 따라서 만약 광미에서 인체에 이르는 비소 거동에 관한 환경지구화학적 이동 모델링을 설정하고자 한다면 반드시 생물학적 효과를 감안하여야 할 것이다.

이와 동일한 실험 조건하에서 MB-7과 MB-10을 14 일간 연장 배양한 후 용존 비소 화학종의 변화를 관찰하였다. 14 일의 배양 기간 후, 미생물을 접종하지 않은 비교시료에서는 As(V) 20 mM, As(III) 6 mM이 확인되었으나, MB-7의 경우, As(V) 21 mM, As(III) 1 mM, MB-10의 경우, As(V)만 22 mM이 검출되었다(Fig. 4). 한편 As(III) 10 mM이 첨가된 TSB 용액에 별도로 접종한 MB-12 균주는 비소의 화학종 변화에



**Fig. 4.** Arsenate and arsenite concentrations in the TSB medium after 14-day incubation of MB-7 and MB-10 with an abiotic control (in 30 mM As(V)) and MB-12 (in 10 mM As(III)).

거의 아무런 영향을 미치지 못했다(Fig. 4).

이 실험결과에서 가장 주목할만한 점은 비교시료에 비하여 MB-7과 MB-10을 접종한 용액 내의 총 용존 비소함량에 있어 공히 약 4 mM의 감소가 관찰된 것이다. 현재 단계에서 이처럼 장기간에 걸친 반응 결과 발생한 비소 감소의 원인을 정확히 지적하기는 어렵다. 그러나 비교시료 및 MB-7, MB-10 배양액 내의 As(V) 농도가 모두 동일하게 약 20 mM 내외로 관찰된 것에 비하여, 비교시료에서는 6 mM의 농도를 보이는 As(III)가 두 미생물 반응 용액에서는 거의 검출되지 않았다는 점은 없어진 비소가 As(III) 형성과 밀접하게 관련되었을 것이란 점을 암시한다. 특히 20 시간 동안 배양한 결과, 비교시료에 비하여 미생물을 접종한 용액에서 As(III)로의 환원이 더 많이 일어난 결과(Fig. 3 참조)를 감안할 때 이러한 추측은 신빙성을 갖는다. 그러나 원인 여부에 관계없이 '용존' 비소 총량이 미생물 반응 용액에서 감소하였다는 사실은 이러한 기체가 비소로 오염된 지역의 처리에 이용되어질 수 있다는 사실을 의미한다.

As(III) 감소의 가장 가능성 있는 기체는 광물상으로의 비소침전이다. 최근에 발견된 *D. auripigmentum*에 의한 As<sub>2</sub>S<sub>3</sub> 형성 및 침전(Newman *et al.*, 1997a; 1997b)은 이와 유사한 기체의 비소 침전 가능성을 제시한다. 그러나 Newman *et al.*(1997a, b)의 경우와는 달리 이 실험은 호기성 조건에서 수행되었으므로 황환원 발생(S(VI) → S(-II))이 가능할 정도의 환원조건이 유지되었는지의 여부와 무엇보다도 충분한 양의 황의 기원이 실험계 내에 존재하였는지의 여부를 파악하는 것이 중요할 것이다. 또한 아직 비소가 황과 결합한 형태 이외의 다른 화합물을 형성하여 침전한 예는 보고된 적이 없지만 이의 가능성도 배제할 수 없다. 한편, *Pseudomonas stutzeri* AG259의 경우, 미생물에게 가장 큰 독성을 나타내는 금속 중 하나로 알려진 은에 대한 해독작용으로서 결정질 구조를 가진 함은 나노입자(nanoparticles)를 세포질 내에 형성하는 것으로 발견되었다(Klaus *et al.*, 1999). 이 연구에서 분리된 미생물도 이와 동일하게 비소 입자를 세포질 내에 형성함으로써 반응도를 낮추는 방식을 택할 가능성도 있다.

이러한 의문을 해결할 수 있는 방법은 전자현미경 및 energy dispersive X-ray spectroscopy(EDS) 또는 selected area electron diffractometer(SAED)를 이용하여 미생물과 주변의 미세환경을 관찰하는 것이다(Brown *et al.*, 1998). 관찰 결과, 침전된 비소화합물이 확인되면 비소의 감소원인이 파악되어질 수 있고

특히 형성된 비소화합물의 위치가 세포내, 외 또는 표면에 존재하는지의 여부에 따라 그 형성 기체가 밝혀질 수 있다. 또한 이 연구에서는 토착 박테리아의 효과적 분리를 위하여 TSB 및 TSA 등의 영양분이 풍부한 배지를 사용하였으나, 자연계에서 미생물에게 이처럼 최적의 조건을 제공하는 환경은 거의 없다. 비록 비교시료를 사용하여 결과를 비교하기는 했지만, TSB 내의 화학조성들이 비소의 화학적 성질에 어떠한 영향을 미치는지를 명확히 확인할 수 없는 단점이 있다. 따라서 추후 연구에서 다루게 될 또 하나의 과제는 화학적으로 조정된 배양액(chemically defined medium)을 사용하여 비소의 지구화학에 미치는 이들 미생물의 영향을 보다 자세히 규명하는 일이 될 것이다.

#### 4. 결 론

고농도의 비소함량을 갖는 전남 보성 명봉광산의 광미와 퇴적물에서 토착 미생물을 분리한 후 이들이 비소의 화학종 결정에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 명봉광산의 광미와 퇴적물로부터 함As(V) 배지에서 10개, 함As(III) 배지에서 3개의 미생물이 각각 호기성 조건에서 분리되었다. 임천광산의 광미로부터 미생물을 분리해 낼 수 없었음은 복합적이고도 높은 중금속 함량이 미생물의 생존에 큰 제한을 유발하였기 때문이다. 또한 비소의 화학종(As(III) 및 As(V))을 달리하여 미생물 분리 및 배양을 수행한 결과 환원상태의 비소가 산화상태의 것에 비하여 미생물에도 더 큰 독성을 미침을 확인하였다.

2. 다양한 As(V) 함량을 포함한 TSB 조건에서 미생물을 24 시간 동안 배양한 결과, 150 mM 이상의 As(V) 농도는 미생물의 성장을 저지하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 동일 용액 내에서 미생물을 4 일간에 걸쳐 추가 배양할 경우, 200 mM의 As(V) 농도에서도 활발한 미생물 성장이 관찰되었다.

3. 분리된 미생물 중 MB-7과 MB-10을 20 시간 동안 As(V) 30 mM에서 배양한 경우, 약 3~4 mM의 As(V)를 As(III)로 환원시키는 것으로 확인되었다. 이때 비록 As(V) 환원과 미생물의 지수성장이 동일한 시기에 발생하였으나, 호기성 실험조건이었음을 감안할 때 이는 이화적 호흡성환원이 아니라 비소 독성을 저감하려는 해독작용의 결과인 것으로 추정된다.

4. As(V) 30 mM에서 14 일간 배양한 MB-7과 MB-10은 용액 내의 총 비소함량을 약 4 mM 가량 저



감시한다. 그 원인의 규명에 대해서는 추가적인 연구가 필요하나 비소화합물을 형성한 후 침전시키는 기제가 가장 가능성이 있다.

5. 미생물은 호기성 환경에서 비소의 지구화학에 큰 영향을 미치며 그러한 영향은 비소로 오염된 지역의 생물학적 복구에 유용하게 사용되어질 수 있는 것으로 보인다.

사 사

이 연구는 한국과학재단 지정 우수연구센터(ERC)인 환경모니터링신기술연구센터(ADEMRC)의 지원으로 수행되었으며, 이종운은 광주과학기술원 화학(환경)공학 사업단에 유치된 교육부 BK21 프로그램으로부터 재정적 지원을 받았다. 이에 감사드린다.

참고문헌

이종운, 전효택 (2001) 원소의 지구화학적 거동에 미치는 박테리아의 영향: 지구미생물학의 최근 연구 동향. 자연환경지질, 33권, p. 353-365.  
 정미경, 이호자 (1991) 하천에서 분리한 비소 내성세균의 유전적 특성. 한국미생물학회지, 29권, p. 63-68.  
 Ahmann, D., Roberts, A.L., Krumholz, L.R., and Morel, F.M.M. (1994) Microbe grows by reducing arsenic. Nature, v. 371, p. 750.  
 Anderson, L.C.D. and Bruland, K.W. (1991) Biogeochemistry of arsenic in natural waters: importance of methylated species. Environ. Sci. Technol., v. 25, p. 420-427.  
 Beveridge, T.J., Hughes, M.N., Lee, H., Leung, K.T., Poole, R.K., Savvaidis, I., Silver, S., and Trevors, J.T. (1997) Metal-microbe interactions: contemporary approaches. In Advances in microbial physiology v. 38, Academic Press, p. 178-243.  
 Bhumbra, D.K. and Keefer, R.F. (1994) Arsenic mobilization and bioavailability in soils. In Nriagu, J.O. (ed.) Arsenic in the environment, Wiley, New York, p. 51-82.  
 Brown, D.A., Beveridge, T.J., Keevil, C.W., and Sherriff, B.L. (1998) Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biofilm. FEMS Microbiol. Ecol., v. 26, p. 297-310.  
 Cervantes, C., Ji, G., Ramirez, J.L., and Silver, S. (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. FEMS Microbiol. Rev., v. 15, p. 355-367.  
 Cullen, W.R. and Reimer, K.J. (1989) Arsenic speciation in the environment. Chem. Rev., v. 89, p. 713-764.  
 Dowdle, P.R., Laverman, A.M., and Oremland, R.S. (1996) Bacterial dissimilatory reduction of arsenic(V) to arsenic(III) in anoxic sediments. Appl. Environ. Microbiol., v. 62, p. 1664-1669.  
 Ehrlich, H.L. (1963) Bacterial action on orpiment. Econ. Geol., v. 58, p. 991-994.

Ehrlich, H.L. (1964) Bacterial oxidation of arsenopyrite and enargite. Econ. Geol., v. 59, p. 1306-1312.  
 Green, H.H. (1918) Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. S. Afr. J. Sci., v. 14, p. 465-467.  
 Gulens, J. and Champ, D.R. (1979) Influence of redox environments on the mobility of arsenic in groundwater. In Jenne, E.A. (ed.) Chemical modeling in aqueous systems, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 81-95.  
 Harrington, J.M., Fendorf, S.E., and Rosenzweig, R.F. (1998) Biotic generation of arsenic(III) in metal(loid)-contaminated freshwater lake sediments. Environ. Sci. Technol., v. 32, p. 2425-2430.  
 Ilyaletdinov, A.N. and Abdrashitova, S.A. (1981) Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. Mikrobiologiya, v. 50, p. 197-204.  
 Ji, G. and Silver, S. (1995) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. J. Ind. Microbiol., v. 14, p. 61-75.  
 Johnson, D.L. (1971) Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. Environ. Sci. Technol., v. 5, p. 411-414.  
 Johnson, D.L. and Pilson, M.E.Q. (1972) Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate, and phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta, v. 58, p. 289-299.  
 Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., and Granqvist, C.-G. (1999) Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, p. 13611-13614.  
 Laverman, A.M., Blum, J.S., Schaefer, J.K., Phillips, E.J.P., Lovley, D.R., and Oremland, R.S. (1995) Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. Appl. Environ. Microbiol., v. 61, p. 3556-3561.  
 Lovley, D.R. (1993) Dissimilatory metal reduction. Annu. Rev. Microbiol., v. 47, p. 263-290.  
 Macy, J.M., Nunan, K., Hagen, K.D., Dixon, D.R., Harbour, P.J., Cahill, M., and Sly, L.I. (1996) *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. Int. J. Sys. Bacteriol., v. 46, p. 1153-1157.  
 Manning, B.A. and Goldberg, G. (1997) Adsorption and stability of arsenic(III). Environ. Sci. Technol., v. 31, p. 2005-2011.  
 Mok, W.M. and Wai, C.M. (1994) Mobilization of arsenic in contaminated river waters. In Nriagu, J.O. (ed.) Arsenic in the environment, Wiley, New York, p. 99-117.  
 Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta, v. 27, p. 31-36.  
 Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R., and Morel, F.M.M. (1997a) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. Arch. Microbiol., v. 168, p. 380-388.  
 Newman, D.K., Beveridge, T.J., and Morel, F.M.M. (1997b) Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomacu-*

- lum auripigmentum*. Appl. Environ. Microbiol., v. 63, p. 2022-2028.
- Newman, D.K., Ahmann, D., and Morel, F.M.M. (1998) A brief review of microbial arsenate respiration. Geomicrobiol., v. 15, p. 255-268.
- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature, v. 333, p. 134-139.
- O'Day, P.A., Carroll, S.A., Randall, S., Martinelli, R.E., Anderson, S.L., Jelinski, J., and Knezovich, J.P. (2000) Metal speciation and bioavailability in contaminated estuary sediments, Alamada Naval Air Station, California. Environ. Sci. Technol., v. 34, p. 3665-3673.
- Oremland, R.S., Blum, J.S., Culbertson, C.W., Visscher, P.T., Miller, L.G., Dowdle, P., and Strohmaier, F.E. (1994) Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. Appl. Environ. Microbiol., v. 60, p. 3011-3019.
- Osborn, F.H. and Ehrlich, H.L. (1976) Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. J. Appl. Bacteriol., v. 41, p. 295-305.
- Rosen, B.P., Silver, S., Gladysheva, T.B., Ji, G., Oden, K.L., Jagannathan, S., Shi, W., Chen, Y., and Wu, J. (1994) The arsenite oxyanion-translocating ATPase: bioenergetics, functions, and regulation. In Torriani-Gorini, A., Yagil, E., and Silver, S. (eds.) Phosphate in microorganisms. ASM Press, Washington, D.C. p. 97-107.
- 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., v. 66, p. 92-97.
- Williams, J.W. and Silver, S. (1984) Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. Enz. Microb. Technol. v. 6, p. 530-537.

---

2001년 6월 8일 원고접수, 2001년 8월 14일 게재승인.