

Pseudomonas aeruginosa 표면에 대한 비소의 흡착특성

이종운* · 박현성

전남대학교 지구시스템공학과 미생물지구화학연구소

Arsenic Adsorption onto *Pseudomonas aeruginosa* Cell Surface

Jong-Un Lee* and Hyun-Sung Park

Microbial Geochemistry Lab. (MIGEL), Department of Geosystem Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Adsorption experiments for As(V) and As(III) onto the surfaces of aerobic *Pseudomonas aeruginosa*, which can be readily isolated from natural media, were conducted under nutrient-absent conditions. While a small amount of As(III) was adsorbed on the bacterial cell surfaces, As(V) was not effectively removed from the solution through adsorption. The result was likely due to the electrostatic repulsion between anionic compounds of aqueous As(V) and cell surfaces of *P. aeruginosa*. However, the bacteria forming biofilm reduced a large amount of aqueous As(V) to As(III), which indicated that microorganisms in most oligotrophic, natural geologic settings can mediate the behavior of aqueous As. Biobarriers designed to remove the various heavy metals in contaminant plume may practically lead to the enhancement of toxicity and mobility of As.

Key words : arsenic, adsorption, bacteria, biobarrier

지질매체에서 흔하게 발견되는 호기성 박테리아인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여 영양분을 공급하지 않은 상태에서 As(V) 및 As(III) 흡착실험을 수행하였다. As(III)의 경우 *P. aeruginosa*에 의한 소규모의 흡착이 관찰된 반면, As(V)는 효과적인 흡착이 적용되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 As(V)는 수용액 상태에서 음전하 화합물로 존재하고 박테리아 표면 역시 음전하를 띠고 있기 때문에 상호 인력이 작용하지 않기 때문인 것으로 파악된다. 그러나 바이오필름 상태의 박테리아는 많은 양의 용존 As(V)를 As(III)로 환원하는 것으로 나타났다. 이는 빈영양 환경인 대부분의 지질환경에서도 미생물이 용존 비소의 거동에 미치는 영향이 크다는 것을 의미한다. 다양한 증급속으로 오염된 지하수를 처리하기 위하여 구축된 미생물 반응벽체는 비소의 흡착을 촉진하기 보다는 오히려 비소의 독성과 이동도를 증가시키는 부의 효과를 유도할 수도 있다.

주요어 : 비소, 흡착, 박테리아, 생물학적 벽체

1. 서 론

비소는 현재 전 세계적으로 가장 큰 우려의 대상이 되고 있는 환경독성 물질 중 하나이다. 고농도의 비소로 오염된 지하수가 미국(Moore and Woessner, 2003; Schreiber *et al.*, 2003)을 비롯하여 인도 및 방글라데시(Das *et al.*, 1996; Nickson *et al.*, 1998; Chowdhury *et al.*, 1999), 태국(Williams *et al.*, 1998), 베트남(Berg *et al.*, 2001) 등을 포함하는 남·동 아시아

(Smedley, 2003) 등 세계 각처에서 보고되고 있다. 최근 비소의 위해성을 인식한 미국 환경청에서는 음용수 내 비소 기준치를 기존의 50 µg/L에서 10 µg/L로 낮춘 바 있으며, 이처럼 낮아진 기준치에 의하면 지하수를 음용수로 사용하는 미국 내 뉴잉글랜드(Ayotte *et al.*, 2003), 미시간(Kolker *et al.*, 2003), 뉴멕시코(Bexfield and Plummer, 2003) 지역의 많은 주민들이 기준치 이상의 비소가 함유된 음용수를 섭취하게 된다. 국내의 경우 아직 심각한 비소 증독현상은 보고된 바 없으나,

*Corresponding author: jongun@chonnam.ac.kr

휴·폐광된 금속광산 내 무방비로 적치된 광미 및 폐석이 전국에 산재되어 있음을 감안할 때(민정식 등, 1997) 주변 지역에 대한 심각한 비소오염의 가능성에 노출되어 있다고 할 수 있다.

토양 및 지하수 환경에서 비소의 지구화학적 거동에 중요한 역할을 하는 것은 비소의 산화상태(oxidation state)이다. 일반적인 자연계에서 비소는 주로 +3과 +5의 산화상태로 존재하나, 용존 상태에서 양전하를 갖는 대부분의 중금속 원소들과는 달리 비소는 산화음이온(oxyanion) 또는 비전하(uncharged) 상태로 나타난다. 즉 +5가인 As(V)(비산이온, arsenate)는 $H_2AsO_4^-$ 와 $HAso_4^{2-}$, +3가인 As(III)(아비산이온, arsenite)는 $H_3AsO_3^0$ 와 $H_2AsO_3^-$ 의 형태로 존재하게 된다. 비소의 독성은 그 산화상태와 유기·무기 형태에 좌우되며, 이때 환원/무기형태가 산화/유기형태보다 일반적으로 독성이 크다. 예를 들어, 산화상태인 As(V)에 비해 환원상태인 As(III)가 용해도 및 이동도가 높으며 독성도 20~60배 이상 높은 것으로 알려져 있다(Bhumbla and Keefer, 1994).

비소는 전형적인 지하수의 pH 및 산화환원전위 환경에서 다른 중금속이나 준금속과는 상이한 이동 특성을 나타낸다. 즉 수용액 상태에서 양이온으로 존재하는 대부분의 독성 중금속 원소들은 pH가 감소함에 따라 용해도가 증가하는 반면, 중성 및 알칼리성의 pH에서는 산화물, 수산화물 및 탄산염 또는 인산염 광물들과 공침전되거나 또는 수화된 금속 산화물, 점토나 유기물질에 강하게 흡착됨으로 인해 용해도가 저하된다. 반면, 비소를 포함한 대부분의 산화음이온을 형성하는 원소들은 pH가 증가함에 따라 흡착력이 떨어져 수계 내의 함량이 증가하는 특성을 보인다. 또한 비소는 다른 산화음이온과도 지구화학적 특성이 구별되는데, 즉 다른 산화음이온들이 환원상태에서 이동도가 낮아지는 반면에 비소는 산화상태에서 주변의 철 산화물 등에 쉽게 흡착하는 등 상대적으로 낮은 이동도를 보인다(Gulens and Champ, 1979). 따라서 토양, 퇴적물, 대수층 내에서 비소의 산화상태를 정확히 파악하고 이를 조절하는 다양한 메커니즘을 이해하는 것은 비소의 순환 및 환경 위해도를 파악하는데 있어 가장 중요하다고 할 수 있다.

1990년대부터 현재에 이르기까지 비소의 지구화학적 특성에 미치는 미생물의 영향에 관한 지구미생물학적(geomicrobiological) 연구가 활발히 수행되고 있다(이중운과 진효택, 2000; McLean *et al.*, 2002; Oremland and Stolz, 2003). 이러한 연구는 주로 As(III)의 미생물

학적 산화(Santini *et al.*, 2000; Gihring *et al.*, 2001; Salmassi *et al.*, 2002) 및 이화적 비소환원 박테리아(dissimilatory As-reducing bacteria)에 의한 As(V)의 환원(Ahmann *et al.*, 1994; Oremland *et al.*, 1994; Macy *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1997, 1998)에 관한 실험실적 연구 및 현장에서 비소의 거동에 미치는 미생물학적 영향을 파악하기 위한 현장 연구(Ahmann *et al.*, 1997) 등을 포함한다. 이러한 연구들은 박테리아가 성장에 필요한 에너지를 얻기 위하여(dissimilation) 또는 비소의 독성을 해독하기 위하여(detoxification) 효소가 관여된 대사작용을 수행할 때 수반되는 비소의 산화상태 변환에 초점을 둔 것이다. 국내의 경우, 고농도의 비소가 함유된 폐광산 또는 흑색 셰일 주변 지역의 광미, 토양, 퇴적물 내에 존재하는 토착 박테리아의 활동이 비소의 산화 및 환원 거동에 미치는 영향을 파악하려는 일련의 연구가 수행된 바 있다(이지민 등, 2005; Lee *et al.*, 2002, 2004, 2005; Park *et al.*, 2005).

다른 중금속과 마찬가지로 비소는 다양한 매질에 흡착되어 지하수로부터 제거될 수 있다. 비소 흡착에 관한 지금까지의 연구는 주로 철산화물, 알루미늄 산화물/수산화물, 망간산화물, 규소산화물, 점토광물, 탄산염광물, 휴민산 등에 의한 흡착을 다루고 있다(Stollenwerk, 2003). 반면, 박테리아 표면에 의한 비소 흡착에 관한 연구는 현재까지 거의 수행된 바가 없다. 그 이유는 박테리아 표면과 비소의 전기화학적 상호관계에 기인한다. 즉 박테리아의 세포벽에는 다양한 화학적 반응기가 분포되어 있으며, 주로 카르복실기(COO⁻), 인산기(PO₄³⁻), 수산기(OH⁻) 등이 이에 속한다(Beveridge and Murray, 1980; Fein *et al.*, 1997). 이러한 반응기들에 의해 박테리아의 세포벽 표면은 음전하를 띠게 되고, 결과적으로 다양한 용존 양이온을 효과적으로 흡착한다. 그러나 비소의 경우 용존 상태에서 산화음이온 또는 비전하 상태로 존재하므로 이론적으로 박테리아 표면에 분포하는 음전하 반응기와 정전기적 결합(electrostatic complexation)이 발생할 가능성이 없다.

그러나 최근 연구결과에 의하면 박테리아는 용존 상태에서 역시 산화음이온을 형성하는 Cr(VI)를 흡착할 뿐만 아니라 박테리아 표면에서 Cr(III)로 환원시킬 수 있음이 밝혀졌다(Fein *et al.*, 2002). Fein *et al.* (2002)은 이러한 결과를 박테리아의 대사작용과 관련 없이 단지 세포벽에 존재하는 Cr-환원 효소 또는 시토크롬(cytochromes)을 산화시키며 발생하는 것으로 제안하였

다. 따라서 일반적인 정전기적 결합에 의해 세포벽에 흡착되지 않는 비소에 대해서도 박테리아 표면 흡착 가능성을 실험적으로 확인할 필요가 있으며, 또한 대사작용과 관련 없는 박테리아의 표면특성이 흡수 비소의 산화상태 변화에 영향을 미치는지에 관한 실험적 확인 역시 필요하다.

영양분이 풍부하지 않은 자연 상태-토양, 호소, 퇴적물, 대수층 등에서 대부분의 박테리아는 광물 또는 토양입자 등의 표면을 피막한 바이오필름(biofilm) 형태로 존재한다. Watkins and Costerton (1984)은 자유유영 상태의 박테리아에 비해 약 1,000-10,000배의 박테리아가 고체 표면에 붙어있는 상태로 존재하는 것으로 추정하였다. 바이오필름이란 미생물과, 이들의 분비물로써 세포 주변을 둘러싸고 있는 점액질의 수화된(hydrated) 세포외 중합체(EPS: extracellular polymeric substances)를 말하며, 대부분의 경우 EPS는 다당류로 이루어져 있다(Costerton *et al.*, 1994). 자유유영 상태의 박테리아와 바이오필름을 형성하고 있는 박테리아는 그 생리학적·생화학적 특성이 상이하므로 흡착 거동에 있어서도 차이를 보일 것으로 예상되는 바(Lee and Beveridge, 2001) 이에 관한 확인이 필요하다.

따라서 이 연구에서는 토양 및 수계에 흔히 존재하는 호기성 박테리아인 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 산성 및 중성 pH 조건에서 과연 비소가 박테리아 표면에 흡착되는지, 또한 EPS의 존재가 비소의 흡착 및 전기화학적 변화에 영향을 미칠 수 있는지를 파악하고자 하였다.

2. 실험방법 및 재료

2.1. 박테리아 배양 및 세척

그램음성균인 *P. aeruginosa*는 기존의 많은 연구를 통하여 그 표면 특성이 잘 알려져 있는 종이다. *P. aeruginosa*는 자연 상태의 토양, 자연수, 식물 표면 등에서 쉽게 분리해 낼 수 있으며 따라서 자연적인 지구화학적 환경에서의 비소 거동에 영향을 미칠 가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

실험에 사용된 *P. aeruginosa* PAO1은 캐나다 Guelph 대학의 Beveridge 교수에게 분양받은 것으로 현재 37°C의 TSA (trypticase soy agar; Difco, U.S.A.) 상에서 일주일 주기로 계대배양하고 있는 것이다. TSA 상의 균체를 5 mL의 TSB (trypticase soy broth; Difco, U.S.A.)에 접종한 후, 37°C, 16시간, 200 rpm 조건으로 배양시킨 후 이를 다시 2L의 TSB에 접종하

여 동일 조건하에서 정지(stationary) 성장단계(36시간 경과)까지 대량 배양하였다. 배양된 박테리아는 고속 원심분리기($\times 10000$ RCF, 60분; VS-21SMT, Vision, Korea)를 사용하여 분리, 회수하였다. 표면세척을 위하여 회수된 박테리아는 0.1 M NaClO₄ 용액으로 2회 세척 하고, 0.03 M HNO₃ 용액에 1시간 동안 침치시킨 후 다시 0.1 M NaClO₄ 용액으로 5회 세척하였다. 세척 과정 후 고속 원심분리기를 사용하여 박테리아와 상등액을 다시 분리하였다. 세척과정 후의 박테리아는 살아있는(viable) 상태이지만 전자공여체(electron donor)나 탄소원과 같은 에너지를 주입하지 않는 한 에너지를 획득하여 성장할 수는 없다.

2.2. pH 4와 7 조건에서의 As(V) 흡착 및 산화상태 변화

As(V) 용액은 Na₂HAsO₄ · 7H₂O (Aldrich, USA)를 이용하여 5 mg/L로 제조하였으며, 이 때 자연수의 이온세기(ionic strength)를 모사하기 위하여 탈이온수 대신 0.1 M NaClO₄ 용액에 용해하였다(Lee and Fein, 2000). 제조한 As(V) 용액 250 mL을 폴리프로필렌 용기(Nalgene, USA)에 넣은 후 표면 세척한 박테리아를 각각 4.8 g/L(젖은 상태)씩 투입하였다. pH에 따른 흡착 정도의 차이를 보기 위하여 용액을 각각 pH 4와 7로 조절한 후 교반, 반응시켰다. 동일한 pH를 유지하기 위하여 주기적으로 pH를 측정, 차이가 발생할 경우 0.1 M HNO₃ 또는 0.1 M NaOH를 이용하여 실험 기간 내내 원하는 pH \pm 0.05를 유지하였다.

반응은 총 84시간에 걸쳐 수행하였으며, 반응 후 6시간 까지는 매 1시간 간격, 12시간 후부터는 매 12시간 간격으로 용액(3 mL)을 채취하였다. 채취된 시료는 0.2 μ m 필터를 통과시켜 박테리아와 용액을 완전분리한 후 용존 비소의 총 함량을 측정하였다. 또한 음이온교환카트리지(anion exchange cartridge; LC-SAX, Supelco, USA)를 통과시킴으로서 용액 중의 As(III)만 분리한 후 정량하였으며, As(V) 함량은 총 비소 함량과 As(III) 함량 간의 차이로 계산하였다. 한편 채취한 시료의 경우, 용액뿐만 아니라 교반에 의해 균일한 농도로 부유하고 있는 박테리아도 채취하였으므로 전체 용액의 감량에 따른 비소함량 보정은 수행하지 않았다. 박테리아의 영향과 무관한 화학적 반응으로 비소의 함량이 변할 수 있는지를 파악하기 위하여, 다른 조건들은 모두 위의 조건과 동일하게 하는 대신 박테리아를 첨가하지 않은 비교시료(control)를 동시에 운영하였다.

2.3. 저농도의 As(V)와 As(III) 흡착

자연적인 지하수 시료에서 발생할 수 있는 비소 오염 농도를 100 µg/L로 설정하여, As(V)와 As(III) 용액을 각각 제조, 위의 것과 동일한 방법으로 흡착 및 산화상태 변화 여부를 파악하는 실험을 수행하였다. As(III) 용액은 NaAsO₂ (Aldrich, USA)를 0.1 M NaClO₄에 용해하여 제조하였다. 이 때 표면 세척된 박테리아를 각 비소 용액 250 mL에 각각 8.4 g/L (젖은 상태)씩 투입하였다. pH를 7로 조절한 후 주기적으로 pH를 측정, 차이가 발생할 경우 조정하였으며 실험 기간 내내 원하는 pH±0.05를 유지하였다. 실험은 총 40시간에 걸쳐서 수행하였으며, 각각 0.5, 1, 6, 12, 24, 40시간 경과 후 용액을 3 mL 채취하여 위에 기술한 방법으로 총 비소 함량을 측정하였다.

2.4 EPS에 의한 As(V)와 As(III)의 흡착 및 산화상태 변화

박테리아 표면 세척에 따른 비소흡착 실험을 위해, 각각 5 mg/L 함량의 As(V)와 As(III) 용액을 제조하였고 역시 이온세기를 조절하기 위해 0.1 M NaClO₄에 용해하였다. 각 비소용액 250 mL에 위의 방법으로 표면 세척한 박테리아와 세척과정을 거치지 않은 박테리아를 10.4 g/L (젖은 상태)씩 투입하였다. 이 때 세척하지 않은 박테리아에는 EPS가 다량 존재하는 것이 육안으로 확인되었다. 박테리아 투입 후 pH를 7로 조절한 후에 주기적으로 pH를 측정, 차이가 발생할 경우 조정하였으며 실험 기간 내내 원하는 pH±0.3을 유지하였다. As(V) 용액 투입 실험은 총 96시간에 걸쳐 수행하였으며 각각 0.5, 6, 12, 48, 72, 96시간 경과 후 용액을 채취하였다. As(III) 용액 투입 실험은 총 108시간에 걸쳐 수행하였으며 약 12시간 주기로 용액 (3 mL)을 채취하였다. 채취한 용액에 대하여 위에 기술한 방법으로 총 용존 비소함량과 As(III) 함량을 측정하였다.

2.5. 분석방법

비소 정량은 토양관련전문기관인 광주과학기술원 내 환경분석센터에 의뢰하여 hydride generator가 부착된 흑연로 원자흡광분광광도계(AAS-GF; Perkin Elmer 5100)를 이용하여 수행하였다. 중복시료를 통한 분석의 정밀도(reproducibility)는 2.4-2.5%, 표준시료를 통한 정확도(accuracy)는 98.2-99.8%였다. As(V) 함량은 총 비소농도에서 As(III) 함량을 제하여 계산으로 구하였다.

3. 실험결과

3.1. pH 4와 7 조건에서의 As(V) 흡착 및 산화상태 변화

표면 세척한 *P. aeruginosa*를 5 mg/L As(V)와 반응시킨 후 시간에 따른 총 용존 비소 함량의 변화를 살펴보면, pH 4 및 7 조건 모두에서 박테리아를 투입하지 않은 비교시료의 경우 약 12시간까지 큰 변화가 없으나, 12시간 경과 후 약 3.5-3.6 mg/L로 크게 감소하였으며 이후 점진적으로 상승하여 84시간 경과 후에는 약 4.1-4.2 mg/L까지 상승하였다(Fig. 1). 비교시료에는 박테리아를 투입하지 않았으므로 이러한 반응은 전적으로 화학적 반응에 의한 것이다. 비교시료의 경우 흡착을 유발할 만한 물질이 용액 중에 존재하지 않음에도 불구하고 초기에 30% 정도의 비소가 용액 중으로부터 제거되었으며, 이러한 결과는 다른 실험에서도 공통적으로 나타났다. 이에 대한 정확한 원인은 알 수 없으나, 아마도 이온세기를 조절하기 위하여 첨가한 NaClO₄와의 반응 또는/그리고 폴리프로필렌 용기 벽면과의 흡착 반응에 의한 것으로 추측된다.

박테리아를 투입한 경우, pH 4 및 7 모든 경우에 있어 비교시료와 매우 흡사한 변화양상 및 용존 함량을 보임으로써 박테리아에 의한 두드러진 비소 흡착 증가는 발생하지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 용존 상태에서 양전하를 띠는 다른 중금속 이온의 경우 박테리아 표면에 의하여 효과적으로 흡착, 제거되는 것과는 매우 대조적인 것으로서(예를 들면, Vecchio *et al.*, 1998; Klimmek *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2005), 용존 상태에서 산화음이온으로 존재하는 As(V)가 동일하게 음전하를 띠는 박테리아 표면과는 효과적인 흡착이 발생하지 않을 것이라는 예상과 잘 부합하는 것이다. 또한 Fein *et al.* (2002)이 대사작용을 수행하지 않는 박테리아의 표면을 이용하여 관찰한 Cr(VI) 환원을 통한 제거가 As(V)에는 적용되지 않음을 알 수 있었다.

양이온 흡착과 같이 뚜렷한 흡착양상은 나타나지 않았으나, 박테리아에 의하여 비소가 미세하나마 제거되었다는 것은 주목할 만하다. 즉 Fig. 1에서 보듯이, pH 4와 7의 경우, 반응 기간에 걸쳐 비교시료에 비하여 각각 평균 4.7%와 6.1%의 비소가 박테리아에 의하여 추가적으로 제거되었다. 현재로서는 이러한 박테리아에 의한 추가 흡착현상을 설명하기 어렵다. 가능한 원인으로는 세포 표면에 COO⁻, PO₄³⁻, OH⁻ 등의 반응기와 함께 분포하는 NH₄⁺ 기에 의한 정전기적 결합

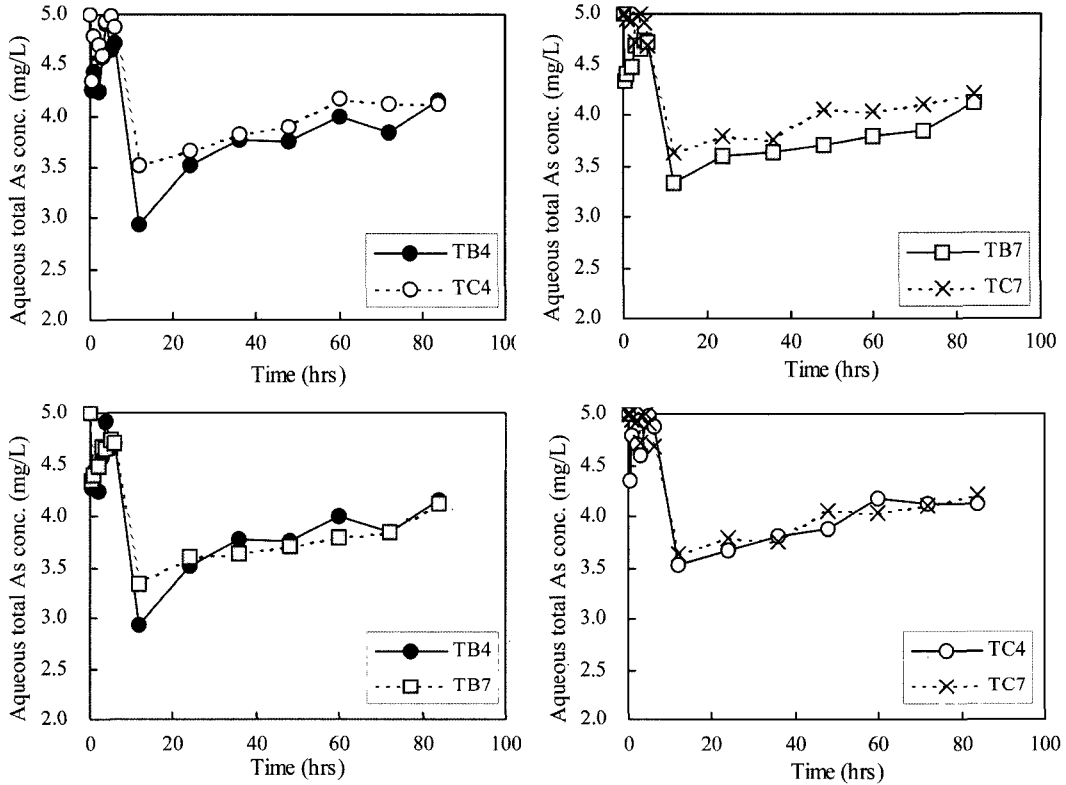


Fig. 1. The concentrations of aqueous total As with time after 5 mg/L of As(V) was reacted with *P. aeruginosa* (4.8 g/L wet basis) suspended in 250 mL of 0.1 M NaClO₄ solution. The bacterial surface was thoroughly washed before added.
 TB4: solution with bacteria at pH 4 TC4: solution without bacteria at pH 4
 TB7: solution with bacteria at pH 7 TC7: solution without bacteria at pH 7

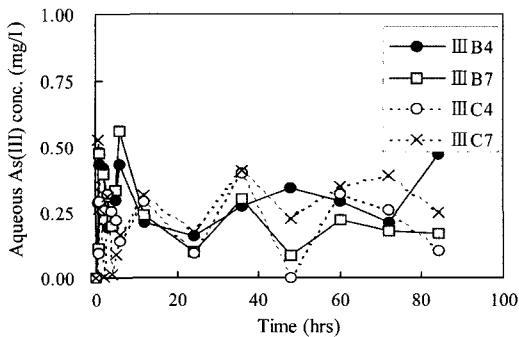


Fig. 2. The concentrations of aqueous As(III) with time after 5 mg/L of As(V) was reacted with *P. aeruginosa* (4.8 g/L wet basis) suspended in 250 mL of 0.1 M NaClO₄ solution. The bacterial surface was thoroughly washed before added.
 IIIB4: solution with bacteria at pH 4
 IIIB7: solution with bacteria at pH 7
 IIIC4: solution without bacteria at pH 4
 IIIC7: solution without bacteria at pH 7

이 될 수 없으므로 이에 대해서는 추가의 연구가 필요하다. 한편, 비교시료 및 박테리아 용액 모두에서 pH 4와 7 조건에서의 흡착량 차이는 관찰되지 않음으로써 주어진 조건에서의 pH 변화는 화학적 또는 미생물학적 비소 흡착량 조절에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

한편 박테리아의 표면 특성으로 인하여 용존 비소가 As(V)에서 As(III)로 환원될 수 있는지의 여부를 파악하기 위해 As(III)의 함량을 측정하여 본 결과, 측정된 As(III) 함량이 대부분 0.5 mg/L 이하의 값으로 미미하게 나타나며 각 pH에 따른 비교시료와 박테리아 용액 간에 큰 차이를 보이지 않아, 대사작용과 관계없이 단지 세포 표면 특성에 의해서 비소가 환원되지는 않은 것으로 나타났다(Fig. 2).

3.2. 저농도의 As(V)와 As(III) 흡착

자연 상태의 지하수에서 발생 가능한 비소오염을 현실적으로 모사하기 위하여 용존 As(V) 및 As(III) 함

을 들 수 있겠으나(Beveridge and Murray, 1980), 아래 3.2 절의 실험결과에서 보듯이 이는 적합한 설명

량을 각각 100 µg/L의 저농도로 제조한 후 위와 동일한 조건에서 총 40시간에 걸쳐 흡착실험을 수행하였다. 이때 3.1 절의 결과에서 보듯이 pH 별로 흡착량의 차이를 보이지 않았으므로 pH는 모두 7로 조절하였으며, 박테리아는 표면 세척한 후 8.4 g/L(젖은 상태)을 투입하였다.

*P. aeruginosa*와 As(V)를 반응시킨 후 시간에 따른 총 용존 비소 함량에 대한 변화를 보면, 비교시료 및 박테리아 용액 모두 3.1 절의 결과와 흡사하게 반응 초기에 함량이 약 20% 가량 감소한 후 실험기간 내 유지되는 모습을 보였으며, 박테리아가 투입된 경우 미세한 흡착량 증가(약 2-6 µg/L)가 보이긴 하나 크게 두드러지지 않았다(Fig. 3(a)). 위에서 기술한 바와 같이 이러한 결과는 박테리아 표면에 분포하는 NH_4^+ 반응기가 정전기적 인력에 의해 As(V)를 흡착하지는 않는다는 것을 나타낸다. 즉 Fig. 1에서 보듯이 pH 7 조

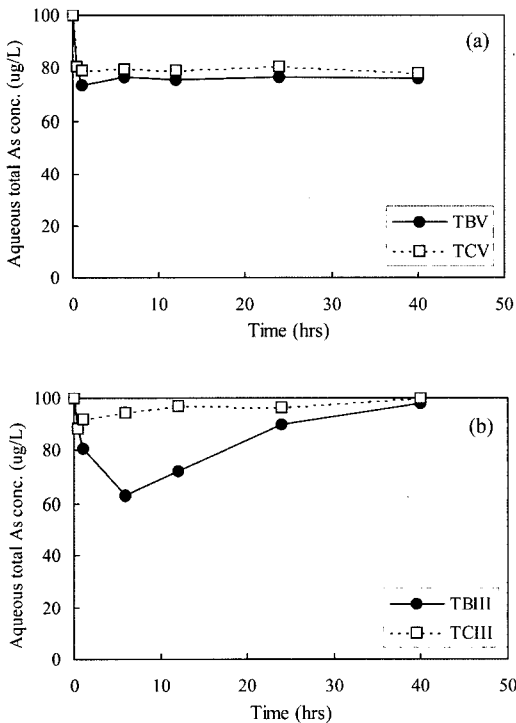


Fig. 3. The concentrations of aqueous total As with time after 100 µg/L of (a) As(V) and (b) As(III) was reacted with *P. aeruginosa* (8.4 g/L wet basis) suspended in 250 mL of 0.1 M NaClO_4 solution at pH 7. The bacterial surface was thoroughly washed before added.

TBV: As(V) solution with bacteria

TCV: As(V) solution without bacteria

TBIII: As(III) solution with bacteria

TCIII: As(III) solution without bacteria

건에서 5 mg/L의 As(V)와 박테리아가 반응한 경우 비교시료에 비해 평균 약 0.27 mg/L의 As(V)가 추가로 흡착되었는데, 이 함량은 Fig. 3에서 투입한 100 µg/L에 비해 2.7배나 높은 것이다. 또한 Fig. 3에서 투입된 박테리아의 질량은 Fig. 1에 비해 1.75배나 크므로 흡착점의 개수도 훨씬 크다. 따라서 100 µg/L의 As(V)가 NH_4^+ 반응기에 의하여 흡착되었다면 용액 중에 잔류하는 경우 없이 모두 흡착에 의해 제거되었을 것이다. 한편 반응 후 1시간 및 40시간 경과 후 As(III) 함량을 측정할 결과에 의하면 As(III)로의 환원은 거의 발생하지 않아, 비교시료의 경우 모두 검출한계 이하였고 박테리아 시료의 경우 3 µg/L 정도였다.

As(III)의 경우 박테리아에 의하여 용액으로부터 제거되는 결과를 보였다. 즉 6시간 경과 후 비교시료는 95 µg/L의 총 용존 비소 함량을 보인데 반해 박테리아 시료는 약 60 µg/L까지 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 3(b)). 이러한 총 용존 비소 함량은 약 24시간이 경과하며 점차 다시 증가하여 40시간 경과 후는 비교시료와 유사한 수준으로 증가하였다. 시간이 경과하며 다시 용존 함량이 증가하였으나 박테리아의 존재에 의해 최대 약 35 µg/L의 총 비소가 용액으로부터 제거된 것은 As(V)의 경우에는 관찰되지 않았던 결과이다. 현재로서는 이러한 제거의 원인을 알 수 없으나, 용존 As(III)가 주로 비전하 상태로 존재함을 볼 때 일반적인 정전기적 결합은 아닌 것으로 추측된다. *P. aeruginosa*가 존재할 때의 이러한 As(V)와 As(III)의 거동 차이는 지하수 내에 존재하는 비소의 산화상태에 따라 비소산화 또는 환원박테리아가 아닌 일반적인 미생물에 의해서도 그 용존 함량이 조절될 수도 있음을 나타낸다. 한편 약 40시간 경과 후 As(V)로의 화학적 산화는 약 13 µg/L 정도 발생하였으나, 박테리아에 의한 As(V)로의 산화는 관찰되지 않았다.

3.3. EPS에 의한 As(V)와 As(III)의 흡착 및 산화상태 변화

실제 지질 매체 내에서 대부분의 박테리아는 자유유영 상태로 존재하는 것이 아니라 EPS를 분비한 바이오필름 상태로 존재한다. 따라서 현실적으로 자연 상태에서 발생하는 박테리아의 영향을 규명하려면 바이오필름 상태의 박테리아가 비소의 지구화학적 과정에 미치는 효과를 조사하는 것이 필수적이라고 할 수 있다. 이를 위하여 세척과정을 거치지 않은 *P. aeruginosa*에 5 mg/L의 As(V)와 As(III)을 가하여 동일한 흡착실험을 수행하였다. 반응은 pH 7 조건 하에서 약 100시간에

걸쳐 수행하였으며 10.4 g/L (젖은 상태)의 박테리아를 투입하였다.

As(V)와 세척하지 않은 박테리아 간의 반응에서 매우 흥미로운 결과가 관찰되었다. 총 용존 비소 함량은 비교시료와 박테리아 시료 간에 또한 박테리아 표면 세척 여부에 관계없이 실험 기간 동안 평균 3.6 mg/L 정도로 유사하게 나타났다(Fig. 4(a)). 이는 EPS 역시 용존 비소의 흡착에 지대한 영향을 미치지 못함을 의미한다. 그러나 세척하지 않은 박테리아는 용존 비소의 산화상태에 큰 변화를 유도하였다. 즉 비교시료의 경우 6시간 경과하며 평균 약 0.4 mg/L 정도의 As(V)가 As(III)로 환원되었으며, 표면을 세척한 박테리아의 경우 평균 0.7 mg/L이 환원되는데 반해, 표면을 세척하지 않아 EPS가 보존되어 있는 박테리아의 경우 시간에 따라 As(III) 생성이 증가하여 최대 3.2 mg/L(총 용존 함량의 87%)까지 환원된 것이다(Fig. 4(b)). 흡착

과는 관계없이 비소의 산화상태가 변화하였으며, 이러한 산화상태 변화가 무영양 조건 하에서 EPS 또는 EPS에 둘러싸인 박테리아에 의해 발생했다는 사실은 매우 주목할 만하다. 이 때 EPS의 정확한 화학적 조성을 밝히는 것은 매우 어려운 일이나 구성 물질 중 일부가 전자공여체로 작용했을 것으로 예상된다.

As(III)를 투입했을 때, 표면을 세척한 경우는 비교시료에 비해 약 12시간 경과 후부터 최대 0.6 mg/L 정도의 용존 비소가 추가로 제거되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 5(a)). 이러한 대체적인 경향은 저농도의 As(III)를 투입한 경우(3.2절 참조)에서 관찰된 것과 동일하다. 반면 박테리아 표면을 세척하지 않은 경우는 시간에 따른 총 용존 비소 함량이 비교시료에 비해 큰 차이를 보이지 않으므로 EPS는 As(III)에 대한 흡착과는 관련이 없는 것으로 나타났다. 한편 투입된 As(III)를 As(V)로 산화시키는 능력은 박테리아 표면 세척 여

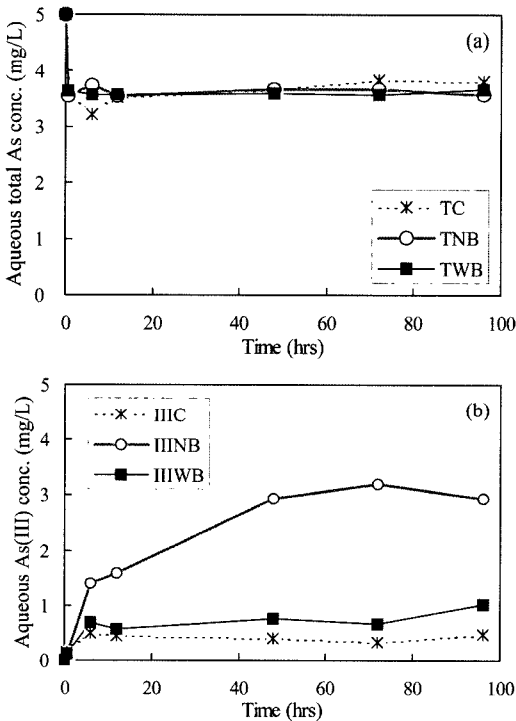


Fig. 4. The concentrations of aqueous (a) total As and (b) As(III) with time after 5 mg/L of As(V) was reacted with *P. aeruginosa* (10.4 g/L wet basis) suspended in 250 mL of 0.1 M NaClO₄ solution at pH 7. TC and IIIC: solution without bacteria TNB and IIINB: solution with unwashed bacteria TWB and IIIBW: solution with washed bacteria T and III mean the concentrations of total As and As(III), respectively.

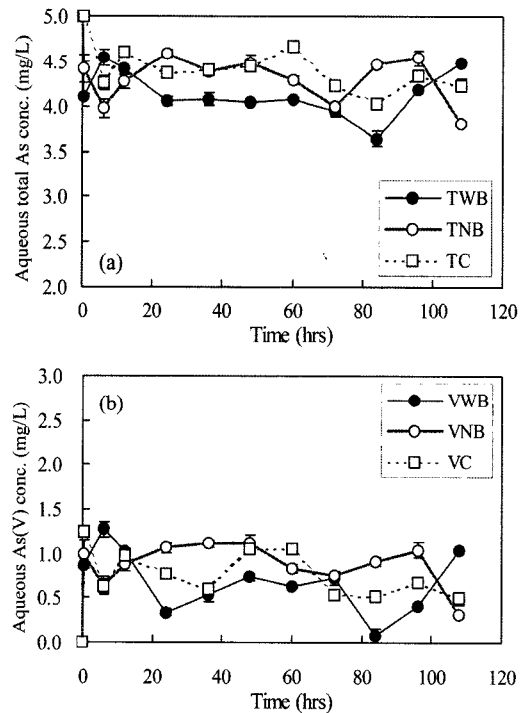


Fig. 5. The concentrations of aqueous (a) total As and (b) As(V) with time after 5 mg/L of As(III) was reacted with *P. aeruginosa* (10.4 g/L wet basis) suspended in 250 mL of 0.1 M NaClO₄ solution at pH 7. TWB and VWB: solution with washed bacteria TNB and VNB: solution with unwashed bacteria TC and VC: solution without bacteria T and V mean the concentrations of total As and As(V), respectively.

부와 관계없이 비교시료와 비교했을 때 큰 차이가 없었다(Fig. 5(b)).

4. 결론 및 토의

현재까지 비소의 생물학적 흡착에 관한 연구는 거의 수행된 바가 없다. 이는 박테리아 표면과 용존 비소가 모두 음전하를 띠거나 또는 전하를 띠지 않음으로 해서 다른 용존 중금속과 같은 정전기적 인력(attraction)이 작용하지 않기 때문이다. 이를 실험적으로 확인해보기 위하여 지질 매체에서 흔하게 발견되는 호기성 박테리아인 *P. aeruginosa*에 대하여 pH와 표면 세척에 따른 As(V) 및 As(III)의 흡착실험을 수행하였다.

실험 결과, 주로 환원환경에서 존재하는 As(III)의 경우 *P. aeruginosa*에 의한 소규모의 흡착이 관찰된 반면, 산화환경에서 존재하는 As(V)는 기타 용존 양이온의 생물학적 흡착에서 흔히 관찰되는 것과 같은 효과적인 흡착이 적용되지 않음을 확인할 수 있었다. 위에서 말했듯이 이론적으로 As(V)는 수용액 상태에서 음전하 화합물로 존재하고 박테리아 표면 역시 음전하를 띠고 있기 때문에 상호 인력이 작용하지 않기 때문인 것으로 파악된다.

최근 들어 다양한 중금속으로 오염된 지하수를 처리할 경우, 오염운(contaminant plume)의 전면에 미생물을 포함한 벽체(barrier)를 설치하는 방안이 많이 거론되고 있다. 박테리아는 고농도의 중금속 조건 하에서도 생존할 수 있으므로 이러한 미생물 벽체 방법의 효율성을 기대할 수 있다. 이 실험에서 사용한 *P. aeruginosa*도 독성이 매우 높은 As(III) 5 mg/L에 약 100시간 노출시킨 후에도 여전히 생존하고 있음을 확인할 수 있었다. 이 때 구리, 납, 아연처럼 수용액 상태에서 양이온으로 존재하는 원소들은 미생물 벽체에 쉽게 흡착될 것으로 예상된다. 그러나 이 실험의 결과로 미루어 보아 비소처럼 수용액 상태에서 산화음이온으로 존재하는 원소는 미생물 벽체에 흡착되지 않고 통과하여 하부 대수층을 여전히 오염시킬 가능성이 있는 것으로 여겨진다. 따라서 비소로 오염된 자연수 및 토양을 미생물 벽체 등의 방법을 통해 흡착에 의해 복원하려고 할 경우 음전하를 띠는 오염물에 대한 다른 방법의 적용이 필요할 것이다.

실험 결과, 바이오필름을 형성하고 있는 EPS는 비소 흡착에 어떠한 영향도 미치지 못할 뿐만 아니라 오히려 많은 양의 용존 As(V)를 As(III)로 환원하는 것으로 나타났다. 실지로 토양이나 대수층에 존재하는 대

부분의 박테리아는 바이오필름을 형성하고 있고, 미생물 벽체의 구축 자체가 바이오필름 형성임을 감안할 때, EPS 또는 EPS와 수반된 박테리아가 비소 환원을 촉진시킨다는 연구 결과는 시사하는 바가 크다. 이 실험 결과에 의하면 바이오필름은 비소 흡착을 촉진하는 것이 아니라 오히려 독성과 이동도를 증가시키는 부의 효과를 유도할 수도 있다.

국내 명봉광산을 대상으로 비소-박테리아 간 상호작용에 대한 연구 결과, 비소로 오염된 호기성 퇴적물 내의 토착 박테리아에 적절한 유기물을 공급했을 경우, 용존 비소의 99% 이상이 As(V)로 산화됨을 관찰한 바 있다(Lee *et al.*, 2005). 그러나 대부분의 지질환경에서 박테리아는 풍부한 영양분을 공급받지 못하는 무영양 또는 빈영양 환경에서 존재하고 있다. 따라서 영양분을 공급받지 못한 상태의 박테리아 또는 EPS가 용존 비소의 거동에 영향을 미칠 수 있는지, 또한 그 영향의 종류 및 크기가 어느 정도인지를 밝히는 것은 자연적인 토양, 퇴적물, 대수층 내에서의 비소 거동을 규명하는데 매우 중요하다고 할 수 있다. 그러한 의미에서 이 연구 결과는 자연 상태의 비소 순환에 미치는 미생물의 영향이 예상 외로 클 수 있다는 단서를 제공한다.

사 사

이 연구는 2003년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 민정식, 정영욱, 이현주, 이동남 (1997) 광산지역 광해조사와 대책연구. 자원연구소 연구보고서. KR-97 (C)-32, 자원연구소, 479p.
- 이중운, 전효택 (2000) 원소의 지구화학적 거동에 미치는 박테리아의 영향: 지구미생물학의 최근 연구 동향. 자연환경지질, 33권, p. 353-365.
- 이지민, 하원경, 전효택, 이중운 (2005) 비소로 오염된 토양 및 퇴적물에서의 미생물학적 비소산화 연구. 한국지구시스템공학회 2005년도 춘계학술발표회 (제84회) 논문집, p. 57-62.
- Ahmann, D., Roberts, A.L., Krumholz, L.R. and Morel, F.M.M. (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, v. 371, 750p.
- Ahmann, D., Krumholz, L.R., Hemond, H.F., Lovley, D.R. and Morel, F.M.M. (1997) Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona Watershed. *Environ. Sci. Technol.*, v. 31, p. 2923-2930.
- Ayotte, J.D., Montgomery, D.L., Flanagan, S.M. and Robinson, K.W. (2003) Arsenic in groundwater in eastern

- New England: occurrence, controls, and human health implications. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, p. 2075-2083.
- Berg, M., Tran, H.C., Nguyen, T.C., Pham, H.V., Schertenleib, R. and Giger, W. (2001) Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: a human health threat. *Environ. Sci. Technol.*, v. 35, p. 2621-2626.
- Beveridge, T.J. and Murray, R.G.E. (1980) Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v. 127, p. 876-887.
- Bexfield, L.M. and Plummer, L.N. (2003) Occurrence of arsenic in ground water of the Middle Rio Grande Basin, central New Mexico. In Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G. (eds.) Arsenic in ground water - geochemistry and occurrence. Kluwer, Boston, p. 295-327.
- Bhumbla, 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.
- Chowdhury, T.R., Basu, G.K., Mandal, B.K., Biswas, B.K., Samanta, G., Chowdhury, U.K., Chanda, C.R., Lodh, D., Roy, S.L., Saha, K.C., Roy, S., Kabir, S., Quamruzzaman, Q. and Chakraborti, D. (1999) Arsenic poisoning in the Ganges delta. *Nature*, v. 401, p. 545-546.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 2137-2142.
- Das, D., Samanta, G., Mandal, B.K., Chowdhury, T.R., Chanda, C.R., Chowdhury, P.P., Basu, G.K. and Chakraborti, D. (1996) Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India. *Environ. Geochem. Hlth.*, v. 18, p. 5-16.
- Fein, J.B., Daughney, C.J., Yee, N. and Davis, T.A. (1997) A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 61, p. 3319-3328.
- Fein, J.B., Fowle, D.A., Cahill, J., Kemner, K., Boyanov, M. and Bunker, B. (2002) Nonmetabolic reduction of Cr(VI) by bacterial surfaces under nutrient-absent conditions. *Geomicrobiol. J.*, v. 19, p. 369-382.
- Gehring, T.M., Druschel, G.K., McCleskey, R.B., Hamers, R.J. and Banfield, J.F. (2001) Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environ. Sci. Technol.*, v. 35, p. 3857-3862.
- Gulens, J. and Champ, D.R. (1979) Influence of redox environments on the mobility of arsenic in groundwater. In Jenne E.A. (ed.) Chemical modelling in aqueous systems. ACS Press, Washington, DC., p. 81-95.
- Kang, S.-Y., Lee, J.-U. and Kim, K.-W. (2005) A study of the biosorption characteristics of Co^{2+} in wastewater using *Pseudomonas aeruginosa*. *Key Eng. Mater.*, v. 277-279, p. 418-423.
- Klimmek, S., Stan, H.-J., Wilke, A., Bunke, G. and Buchholz, R. (2001) Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environ. Sci. Technol.*, v. 35, p. 4283-4288.
- Kolker, A., Haack, S.K., Cannon, W.F., Westjohn, D.B., Kim, M.-J., Nriagu, J. and Woodruff, L.G. (2003) Arsenic in southeastern Michigan. In Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G. (eds.) Arsenic in ground water - geochemistry and occurrence. Kluwer, Boston, p. 281-294.
- Lee, J.-U. and Fein, J.B. (2000) Experimental study of the effects of *Bacillus subtilis* on gibbsite dissolution rates under near-neutral pH and nutrient-poor conditions. *Chem. Geol.*, v. 166, p. 193-202.
- Lee, J.-U. and Beveridge, T.J. (2001) Interaction between iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms attached to Sepharose surfaces. *Chem. Geol.*, v. 180, p. 67-80.
- Lee, J.-U., Lee, S.-W. and Kim, K.-W. (2002) Bioleaching of arsenic from mine tailing using indigenous microorganisms. In Proceedings of Environmental Biotechnology 2002, New Zealand, p. 355-362.
- Lee, J.-U., Lee, S.-W. and Kim, K.-W. (2004) The effects of indigenous bacteria on arsenic geochemistry in an abandoned gold mine sediment. In Abstracts from the 32nd International Geological Congress. Italy, p. 455.
- Lee, J.-U., Lee, S.-W., Kim, K.-W. and Yoon, C.-H. (2005) The effects of different carbon sources on microbial mediation of arsenic in arsenic-contaminated sediment. *Environ. Geochem. Hlth.*, v. 27, p. 159-168.
- 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.
- McLean, J.S., Lee, J.-U. and Beveridge, T.J. (2002) Interactions of bacteria and environmental metals, fine-grained mineral development, and bioremediation strategies. In Huang, P.M., Bollag, J.-M. and Senesi, N. (eds.) Interactions between soil particles and microorganisms: impact on the terrestrial ecosystem. John Wiley and Sons, England, p. 227-261.
- Moore, J.N. and Woessner, W.W. (2003) Arsenic contamination in the water supply of Milltown, Montana. In Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G. (eds.) Arsenic in ground water - geochemistry and occurrence. Kluwer, Boston, p. 329-350.
- Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R. and Morel, F.M.M. (1997) Dissimilatory arsenate, and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, v. 168, p. 380-388.
- Newman, D.K., Ahmann, D.E. and Morel, F.M.M. (1998) A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiol. J.*, v. 15, p. 255-268.
- Nickson, R., McArthur, J., Burgess, W., Ahmed, K.M., Ravenscroft, P. and Rahman, M. (1998) Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature*, v. 395, p. 338.
- Oremland, R.S. and Stolz, J.F. (2003) The ecology of arsenic. *Science*, v. 300, p. 939-944.
- 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.
- Park, J.M., Lee, J.S., Chon, H.T. and Lee, J.-U. (2005) Effects of indigenous bacteria on geochemical behavior

- ior of As in As-contaminated sediment. In Proceedings of the 4th Asia-Pacific Symposium on Environmental Geochemistry. Australia, p. O.19.
- Salmassi, T.M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Nealson, K.H., Newman, D.K. and Hering, J.G. (2002) Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol. J.*, v. 19, p. 53-66.
- 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.
- Schreiber, M.E., Gotkowitz, M.B., Simo, J.A. and Freiberg, P.G. (2003) Mechanisms of arsenic release to water from naturally occurring sources, eastern Wisconsin. In Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G. (eds.) *Arsenic in ground water - geochemistry and occurrence*. Kluwer, Boston, p. 259-280.
- Smedley, P.L. (2003) Arsenic in groundwater - south and east Asia. In Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G. (eds.) *Arsenic in ground water - geochemistry and occurrence*. Kluwer, Boston, p. 179-209.
- Stollenwerk, K.G. (2003) Geochemical processes controlling transport of arsenic in groundwater: a review of adsorption. In Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G. (eds.) *Arsenic in ground water - geochemistry and occurrence*. Kluwer, Boston, p. 67-100.
- Vecchio, A., Finoli, C., Di Simone, D. and Andreoni, V. (1998) Heavy metal biosorption by bacterial cells. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 361, p. 338-342.
- Watkins, L. and Costerton, J.W. (1984) Growth and biocide resistance of bacterial biofilms in industrial systems. *Chemical Times and Trends*, v. October, p. 35-40.
- Williams, T.M., Rawlins, B.G., Smith, B. and Breward, N. (1998) In-vitro determination of arsenic bioavailability in contaminated soil and mineral beneficiation waste from Ron Phibum, southern Thailand; A basis for improved human risk assessment. *Environ. Geochem. Hlth.*, v. 20, p. 169-178.

2005년 8월 9일 원고접수, 2005년 9월 5일 게재승인.