

중금속오염 토양 세척수의 생물학적 처리

정경화 · 서필수* · 공성호** · 서승원** · 김민경** · 이종렬*** · 이상섭†

경기대학교 생명공학과 · *경기대학교 생물자원특성화 사업단 · **한양대학교 화학공학과 · ***아름다운환경건설(주)

(2006년 11월 9일 접수, 2006년 11월 28일 채택)

The Biological Treatment of Soil Washing Water Contaminated with Heavy Metal

Jeong-Hwa Jeong · Pil-Soo Seo* · Sung-Ho Kong** · Seung-Won Seo**

Min-Kyoung Kim** · Jong-Yeol Lee*** · Sang-Seob Lee†

Department of Biological Engineering, Kyonggi University · *Department of Korea Biological Resource Center, Kyonggi University

Department of Chemical Engineering, Hanyang University · *Beautiful Environmental Construction Co., Ltd

ABSTRACT : In this study, nine strains were isolated from heavy metal-contaminated soil in a mine. The high efficiency bacteria, JH1, to be able removal cadmium and copper, was selected by the screen test. JH1 was identified as *Ralstonia eutropha* by 16S rDNA analysis, fatty acid analysis, and its morphological and biochemical characteristics. After the cadmium-contaminated soil was washed with citric acid solution(pH 6, 10 mM), *Ralstonia eutropha* JH1 was inoculated in the soil washing water. In order to determine the optimal cell concentration for inoculation, cell concentrations were considered in 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g/L, respectively. The removal efficiencies for cadmium in each cell concentration of *Ralstonia eutropha* JH1 were 49.9, 84.4, 89.7% and 89.9% of 110 mg/L(Cd), after 5 days culture in soil washing water. When *Ralstonia eutropha* JH1 was inoculated in soil washing water containing each cadmium(110 mg/L) and copper(100 mg/L), each of them was removed completely during 6 days culture. The completely removing time for cadmium and copper in each low concentration, 10, 30 and 60 mg/L were 12, 18 and 48 hrs, respectively.

Key Words : Citric Acid, Heavy Metal, Metal-tolerant Bacteria, *Ralstonia Eutropha*, Washing Water

요약 : 중금속으로 오염된 폐 · 광산에서 중금속(카드뮴, 구리)에 내성을 가지는 총 9개의 균주를 순수 분리한 후, 스크린 테스트를 거쳐 고효율의 중금속 제거 균주 JH1을 선별하였다. JH1 균주는 형태학적, 생리 · 생화학적 특징, 지방산 분석 그리고 16S rDNA 분석 결과 *Ralstonia eutropha* JH1으로 동정되었다. 카드뮴으로 오염된 토양을 구연산(10 mM, pH 6.0)으로 세척 한 후, 그 세척수(카드뮴 110 mg/L)에서 균 농도(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g/L)에 따른 카드뮴 제거율을 확인한 결과, 5일 동안 각각 49.9, 84.4, 89.7, 89.9% 제거되었다. 또한 카드뮴(110 mg/L)과 구리(100 mg/L)를 함유하고 있는 구연산-세척수에서 *Ralstonia eutropha* JH1을 1.0 g/L로 접종했을 때, 6일 동안 카드뮴과 구리가 100% 제거 되었다. 저농도(10, 30, 60 mg/L)의 카드뮴과 구리를 각각 함유한 세척수 내에 *Ralstonia eutropha* JH1을 1.0 g/L로 접종하고 시간에 따른 제거율을 확인한 결과, 카드뮴과 구리 모두 10, 30, 60 mg/L에서 각각 12, 18, 48시간에서 100% 제거되었다.

주제어 : 구연산, 중금속, 중금속 내성 균주, *Ralstonia eutropha*, 세척수

1. 서 론

토양 오염은 산업과 생산 활동, 즉 인간의 활동에 의하여 만들어진 여러 가지 물질이 토양에 들어감으로써 그 성분이 변화되어 환경에 악영향을 미치는 것으로 원인물질은 유기물, 무기염류, 중금속류, 그리고 합성화합물 등이 있다. 특히 카드뮴, 구리, 아연, 납, 비소 등의 중금속류는 분해되지 않아 거의 영구적으로 잔존하며,¹⁾ 많은 양이 인체에 축적될 경우 치명적인 영향을 미친다.

토양세척기법은 적절한 세척제를 사용하여 토양입자에 결합되어 있는 유기오염물질의 표면장력을 약화시키거나 토양

입자로부터 중금속을 액상으로 변화 분리시켜 처리하는 기법으로, 현장 적용성이 크고 경제적으로도 효율성이 뛰어난 정화기법의 하나로 인식되고 있다.²⁾ 합성 퀼레이트제로는 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 우수한 것으로 알려져 있으나 EDTA를 사용하는 세척수는 재사용이 힘들고 건강에 위해를 미칠 염려가 있어서³⁾ 최근에는 중금속 오염 토양 처리에 중금속 추출력이 우수하고 약산인 구연산 같은 유기산을 이용한 연구가 많이 진행되고 있다.⁴⁾ 그러나 세척용액과 오염토양이 접촉하게 되면 오염물질은 용해작용(solubilization), 유탕액의 형성(formation of an emulsion), 또는 세척용액과의 물리 · 화학적 작용에 의해 토양으로부터 세척용액으로 이동하게 되어 세척 유출수(contaminated elutriate)가 생성되므로⁵⁾ 2차오염이 생성된다.

미생물을 이용한 생물학적 처리방법은 저렴한 비용으로 다양한 바이오매스(biomass)를 얻을 수 있고, 고정화된 미생물은 재

* Corresponding author

E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

Tel: 031-249-9642

Fax: 031-251-4721

사용할 수 있을 뿐만 아니라, 미생물 균체처리가 크게 문제 시되지 않으므로 중금속 오염물질을 처리하는데 효과적이라 할 수 있다.⁶⁾ 따라서 생물학적 처리방법에 의한 중금속등 독성 오염물질의 처리 및 회수에 관한 기술개발은 중요한 일이다.

본 연구에서는 카드뮴과 구리에 내성이 있는 균을 분리 동정하였으며, 구연산-세척수 내의 카드뮴과 구리의 제거능에 대해 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 중금속 제거 균주 분리

폐·광산으로부터 시료를 채취한 후, 카드뮴 100 mg/L로 오염시킨 nutrient broth(DifcoTM, USA)에 1%(W/V)의 토양을 넣고, 30°C, 150 rpm으로 24시간 동안 증식 배양하였다. 증식 배양 후 streak plate method로 순수 분리하여 카드뮴으로 오염된 nutrient broth에서 배양하였다. Nutrient broth의 조성은 리터당 peptone 5 g, yeast extract 3 g과 같으며, 폐·광산으로부터 채취한 토양은 중금속(카드뮴, 구리, 총 크롬, 납, 아연, 비소, 니켈)과 pH를 측정하여 토양의 오염도를 확인하였다.⁷⁾

2.2. 중금속 제거 균주 동정

분리균주의 형태학적 특징은 그램 염색을 통하여 광학현미경($\times 1,000$, BX41, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 또한 분리 균주의 정밀한 외형을 관찰하기 위하여 0.2 μm mixed cellulose ester membrane filter(MTS, USA) 위에 2.5% glutaraldehyde 용액으로 고정 시키고, 에탄올 50, 60, 70, 80, 90, 100%로 10분씩 탈수시킨 다음, 건조하여 gold coating한 뒤 주사전자현미경(S-3000N, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 생리·생화학적 특징은 API 20NE kit(BioMerieus, France)를 이용하여 확인하였으며, 지방산 분석은 동결 건조한 균을 Sherlock Microbial Identification System의 전처리 방법에 따라⁸⁾ flame ionization detector(FID)를 장착한 gas chromatography(HP 6890, USA)를 이용하여 분석하였다. 16S rDNA 염기서열분석은 27F(5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하였으며, SolGent사(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 Genbank database의 염기서열과 비교 분석하였다.

2.3. 중금속 제거 고효율 균주 선별

고효율의 카드뮴 제거 균주를 선별하기 위하여 카드뮴 40 mg/L로 오염시킨 nutrient broth 50 mL에 분리 균주를 각각 0.2 mL로 접종하여 30°C, 150 rpm의 조건에서 48시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액은 6000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 상동액을 0.2 μm mixed cellulose ester membrane filter로 여과 시킨 후, 여과액을 ICP(Vista-PRO, Varian, USA)로 카드뮴의 잔류량을 분석하였다.

2.4. 구연산-세척수 제조 및 구연산 내의 중금속 제거

2.4.1. 구연산-세척수 제조

인공오염토양을 제조하기 위하여 오염되지 않은 자연 토양을 채취하여 충분히 건조 시킨 후, No. 4의 표준망체를 사용하여 coarse 성분을 제거하였다. 토양에 copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)와 cadmium chloride($\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$)를 이용하여 1,000 mg/kg로 오염시키고, 토양에 흡착되지 않은 중금속은 중류수로 세척하여 건조시켰다. 유기산 용출제는 구연산을 각각 10 mM농도로 제조하였고, 0.1 N HCl과 0.1 N KOH를 이용하여 pH 6으로 조정하였다. 제조된 유기산 용출제 100 mL와 카드뮴과 구리가 각각 867.5 mg/kg, 947.5 mg/kg으로 오염된 인공오염토양 20 g을 250 mL 삼각플라스크에 넣고, 항온 진탕기를 이용하여 25°C, 150 rpm의 조건으로 24시간 동안 교반하여 구연산-세척수를 제조하였다. 구연산-세척수는 자연토양내의 미생물을 따로 전처리를 하지 않았으므로 분리 균을 접종하지 않은 구연산-세척수는 대조군으로 비교 분석 하였다.

2.4.2. 구연산-세척수 내의 중금속(카드뮴, 구리) 제거

균 농도에 따른 카드뮴 제거효율을 확인하기 위하여 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g/L를 접종하고 5일간 배양하여 제거율을 확인하였다. 또한 카드뮴 110, 60, 30, 10 mg/L를 각각 함유하고 있는 구연산-세척수에 분리 균을 1.0 g/L으로 접종하여 초기 카드뮴 농도에 따른 카드뮴 제거효율을 확인하였고, 구리를 함유한 구연산-세척수에서도 초기 구리 농도(100, 60, 30, 10 mg/L)에 따른 구리 제거효율을 확인하였다. 구연산-세척수 내의 저농도의 중금속 농도는 카드뮴과 구리 농도가 각각 110, 100 mg/L의 구연산-세척수를 60, 30, 10 mg/L의 농도로 희석하여 사용하였다. 모든 배양조건은 30°C, 150 rpm으로 배양하였으며, 배양액을 6,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 얻어진 상동액을 0.2 μm mixed cellulose ester membrane filter로 여과한 다음 여과액을 ICP로 분석하였다.

3. 결과

3.1. 중금속 제거 고효율 균주 분리 및 동정

중금속 고효율 균주를 분리하기 위하여 폐·광산으로부터 토양을 채취 후 토양의 중금속 오염도를 분석한 결과, 아연이 13,482~14,656 mg/L로 가장 높은 오염을 보였으며, 그 밖에도 니켈 38~57 mg/L, 구리 25~45 mg/L, 카드뮴 26~28 mg/L, 비소 2~11 mg/L, 납 4~8 mg/L, 크롬 0.1~0.2 mg/L 순으로 오염되어 있었다(Table 1). 또한 채취한 토양의 pH는 6.0으로 확인되었다.

이 토양으로부터 카드뮴(100 mg/L)에 내성을 가지는 총 9개의 균주를 순수 분리하였고, ICP분석 결과 카드뮴 제거에 뛰어난 JH1을 선별하였다(Table 4). JH1의 형태학적 관찰 결과 gram negative, rod(0.7 $\mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$)로 관찰되었고, API 20NE kit로 동정한 결과 Oxidase와 Reduction of nitrates는 양성, Urea, Esculin, p-Nitro-β-D-galactopyranoside,

Gelatine은 음성, Potassium gluconate, Capric acid, Adipic acid, Sodium citrate, Phenylacetate, DL-malate는 탄소원으로 이용할 수 있었고, Glucose, D-mannitol, Maltose, L-arabinose, D-mannose, N-acetyl-glucosamine, D-maltose는 탄소원으로 이용 할 수 없었다(Table 2). 위와 같은 생리 · 생화학적 특성은 *Ralstonia eutropha* EY 3798^T와 일치 하였다.⁹⁾ 또한 *Ralstonia eutropha* JH1의 지방산 분석 결과 C_{16:1} ω7c(34%), C_{16:0}(30%), C_{18:1} ω7c(20%), C_{14:0} 3OH(8%), C_{14:0}(3%), C_{18:0}(2% 미만), C_{15:0}(1% 미만), C_{17:0}(1% 미만)으로 *Ralstonia eutropha* EY 3798^T의 C_{16:1} ω7c(26%), C_{16:0}(32%), C_{18:1} ω7c(19%), C_{14:0} 3OH(13%), C_{14:0}(4%), C_{18:0}(4% 미만), C_{15:0}(1% 미만), C_{17:0}(1% 미만)과 비슷한 경향을 보였다(Table 3).⁹⁾ 16S rDNA 염기 서열을 분석한 결과에서도 *Ralstonia eutropha*와 99%의 높은 유사도를 보였다. 따라서 JH1은 *Ralstonia eutropha* JH1으로 동정되었다.

Schmidt 등¹⁰⁾의 연구에서 *Ralstonia eutropha*는 니켈에 내성을 가지며, Tibazarwa 등¹¹⁾의 연구에서는 니켈과 코발트가 함께 있는 경우에도 내성을 가진다고 보고되었다. 또한 Valls 등¹²⁾의 연구에서 카드뮴 이온을 흡착할 수 있는 능력을 향상시킨 *Ralstonia eutropha* MTB는 카드뮴에 오염된 토양에 접종하였을 때 tobacco plants의 성장으로 증금속의 독성이 감소되었음을 보고하였다. 따라서 폐 · 광산 토양에서 분리된 *Ralstonia eutropha* JH1은 일반적으로 증금속 제거

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of strain *Ralstonia eutropha*

Characteristic	<i>Ralstonia eutropha</i> JH1	<i>Ralstonia eutropha</i> EY3798 ^T
Oxidase	+	+
Reduction of nitrates	+	+
Urea	-	-
Esculin	-	-
p-Nitro-β-D-galactopyranoside	-	-
gelatine	-	-
Assimilation of		
Glucose	-	-
D-mannitol	-	-
Maltose	-	-
Potassium gluconate	+	+
n-caprate	+	+
Adipate	+	+
Sodium citrate	+	+
Phenylacetate	+	+
DL-malate	+	+
L-arabinose	-	-
D-mannose	-	-
N-acetyl-glucosamine	-	-

+: positive, -: negative

Table 1. Concentration of heavy metal in mine spoil
(unit: mg/kg)

Heavy metal	Concentration of heavy metal
Cd	26~28
Cu	25~45
Cr	0.1~0.2
Pb	4~8
Zn	13,482~14,656
As	2~11
Ni	38~57

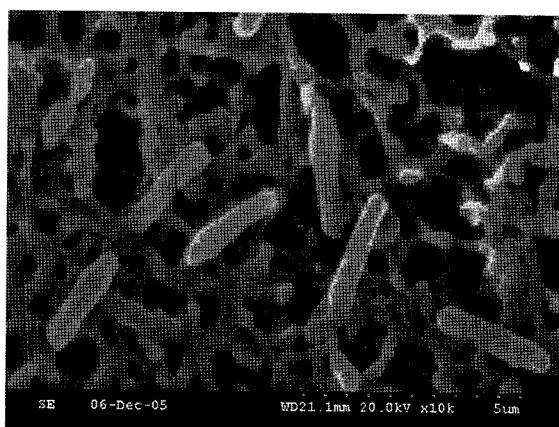


Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph of *Ralstonia eutropha* JH1($\times 10,000$).

Table 3. Cellular fatty acids composition of *Ralstonia eutropha*

Fatty acid	<i>Ralstonia eutropha</i> JH1	<i>Ralstonia eutropha</i> EY3798 ^T
C _{16:1} ω7c	34%	26%
C _{16:0}	30%	32%
C _{18:1} ω7c	20%	19%
C _{14:0} 3OH	8%	13%
C _{14:0}	3%	4%
C _{14:0} 2OH	2%	4%
C _{18:0}	tr%	tr%
C _{17:0}	tr%	tr%

tr<1%

균주로 알려진 *Ralstonia eutropha*와 같은 결과를 나타내고 있다. 또한 *Ralstonia eutropha* JH1이 분리된 폐 · 광산의 토양을 분석한 결과, 아연이 13,482~14,656 mg/L로 많은 오염이 되어 있었으므로 고농도의 아연에서도 내성을 보이며 (Table 1), 아연의 제거능도 있을 것으로 사료된다.

3.2. 증금속 제거 고효율 균주 선별

폐 · 광산으로부터 카드뮴에 내성을 보인 9균주를 분리하였고, 그 중 고효율 카드뮴 제거 균주를 선별하기 위하여 카드뮴 40 mg/L의 농도의 NB배지에서 균의 optical density와 카드뮴 제거율을 확인하였다. 그 결과 카드뮴 내성 균주 JH1~JH9는 optical density가 초기 0.01~0.03에서 48시간

Table 4. Removal efficiency and growth of nine isolated strains for 48 hr

Strain	Optical density(OD _{600nm})		Cadmium conc.(mg/L)		Rem. (%)
	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr	
JH1	0.03	1.00(± 0.01)	38.5	16.6(± 0.1)	56.9
JH2	0.03	0.97(± 0.01)	38.5	16.7(± 0.1)	56.6
JH3	0.02	0.99(± 0.01)	38.5	17.0(± 0.2)	55.9
JH4	0.01	0.96(± 0.01)	38.5	18.0(± 0.2)	53.3
JH5	0.01	0.96(± 0.02)	38.5	17.9(± 0.0)	53.4
JH6	0.02	1.00(± 0.02)	38.5	16.6(± 0.0)	56.8
JH7	0.01	0.96(± 0.01)	38.5	19.1(± 0.2)	50.3
JH8	0.01	0.96(± 0.03)	38.5	17.4(± 0.0)	54.9
JH9	0.01	0.94(± 0.02)	38.5	18.7(± 0.1)	51.3

* Conc. : concentration, Rem.: removal efficiency

후 0.94~1.00으로 비슷한 성장률을 보였으며, 제거율 또한 50.3~56.9%로 모두 비슷한 제거 양상을 보였다. 특히 JH1의 경우 56.9%로 가장 높은 제거율이 확인되어서 JH1 균주를 본 실험에 사용하였다(Table 4).

3.3. 세척수 내의 증금속 제거

3.3.1. 균 농도의 영향

균 농도에 따른 카드뮴의 제거율을 확인하기 위하여 카드뮴 110 mg/L이 포함되어 있는 구연산-세척수에 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g/L의 *Ralstonia eutropha* JH1을 접종하여 5일 동안 배양한 결과, 0.5 g/L에서 49.9% 제거율을 제외하고, 1.0, 2.0, 4.0 g/L에서 각각 84.4, 89.7, 89.9%로 비슷한 제거율이 확인되어 1.0 g/L를 최적 배양 인자로 선택하였다(Fig. 2).

3.3.2. 증금속 농도의 영향

110 mg/L의 카드뮴이 함유된 구연산-세척수에 *Ralstonia eutropha* JH1 1.0 g/L로 접종하여 시간에 따른 제거율을 확인한 결과, 24, 48, 72, 96, 120, 144시간에서 각각 30, 60, 75, 88, 89, 100%의 제거율을 확인하였으며, 구리 100 mg/L

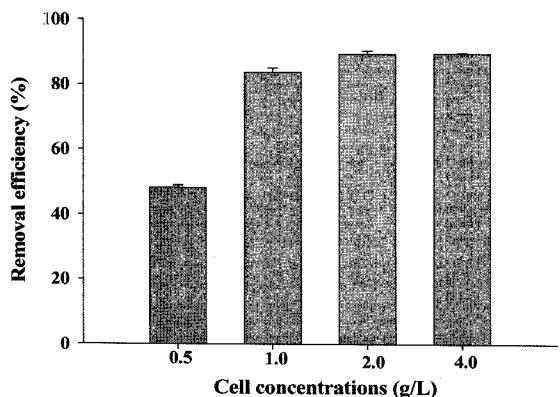


Fig. 2. Removal efficiency of cadmium at various cell concentrations in the soil washing water using citric acid solution(10 mM, pH 6) for 5 day(cell concentration: 1.0 g/L, temperature: 30°C, pH 6, initial concentration of cadmium: 110 mg/L).

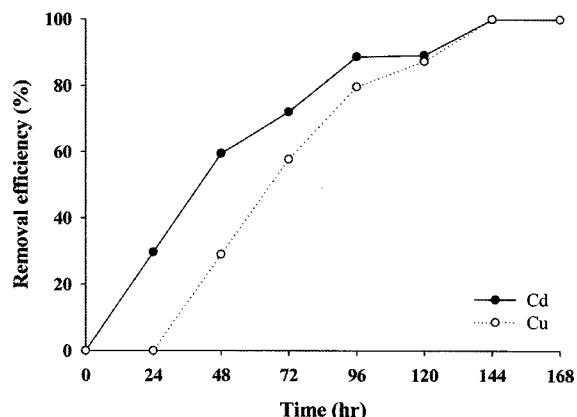


Fig. 3. Removal efficiency of cadmium and copper by *Ralstonia eutropha* JH1 in the soil washing water using citric acid solution(10 mM, pH 6). (cell concentration: 1.0 g/L, temperature: 30°C, pH 6, initial concentration of cadmium and copper: 110, 100 mg/L)

를 포함한 구연산-세척수에서도 24, 48, 72, 96, 120, 144 시간 간에서 각각 0, 30, 58, 80, 87, 100%로 96시간 후 카드뮴과 비슷한 제거율을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

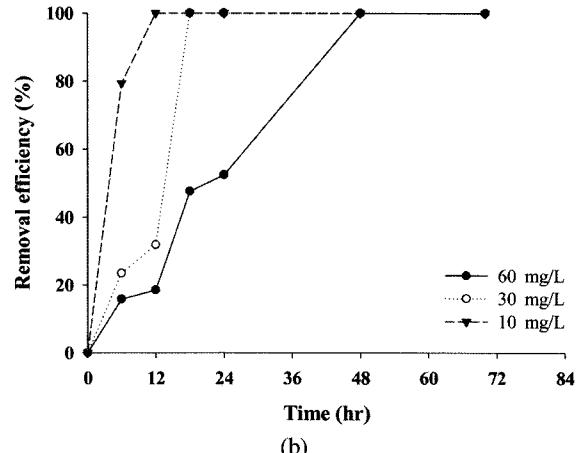
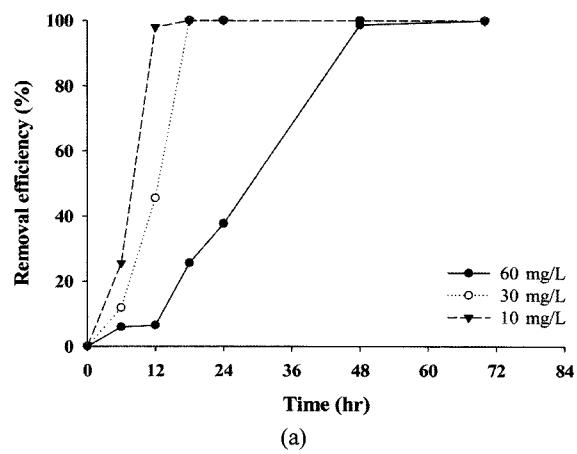


Fig. 4. Removal efficiency of (a) cadmium and (b) copper by *Ralstonia eutropha* JH1 in the soil washing water with citric acid(cell concentration: 1.0 g/L, temperature: 30°C, pH 6).

또한 *Ralstonia eutropha* JH1 1.0 g/L로 접종하여 카드뮴과 구리의 저농도 10, 30, 60 mg/L의 시간에 따른 제거율을 확인한 결과, 카드뮴과 구리 모두 각각 12, 18, 48시간에서 100% 제거됨을 확인하였다(Fig. 4).

이는 Cheng 등¹³⁾과 Tsezos 등¹⁴⁾의 연구에서 미생물에 의한 중금속의 흡착은 2단계의 반응 메카니즘에 의해 일어나는데, 1단계 흡착은 중금속 유입 직후 30~60분 사이에 매우 빠른 시간 내에 흡착반응이 일어나며, 주로 미생물의 생체 물질에 의한 물리적 흡착과 세포 표면에서의 이온 교환에 의해 일어나고, 2단계 흡착은 미생물 대사활성 또는 증식에 따른 흡착으로서 세포의 성장률에 의해서 결정된다고 보고하였다. 또한 조 등¹⁵⁾의 중금속 내성 균주들의 세포내 중금속 binding site를 조사한 연구에서 미생물의 세포내 중금속 흡착 형태는 주로 물질 대사와 관련이 있는 에너지 의존적인 과정과 물질대사와 관련이 없는 에너지 비의존적인 물리적 과정이 있으며, 미생물 종류와 중금속 종류에 따라 다양한 형태의 흡착양상을 나타내지만 일반적으로 이 두 가지 과정이 복합적으로 일어난다는 연구 결과를 보고한 바 있다. 따라서 *Ralstonia eutropha* JH1은 높은 농도의 카드뮴과 구리에서 내성을 가지며, 시간이 지남에 따라 점차 제거되는 양상을 보이므로 균이 성장하면서 카드뮴과 구리를 제거하는 것으로 추측되어 진다. 이는 단지 균 자체의 흡착에 의해 진행된다고 단정하기는 어려우므로 중금속 결합 능력이 있는 물질에 의해 빠른 속도로 결합되는 물리적 흡착과 미생물 대사작용에 의하여 세포내로 흡수되는 과정이 복합적으로 일어나는 것으로 추정되어지며, 이 부분에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

따라서 폐·광산으로부터 분리된 *Ralstonia eutropha* JH1은 구연산-세척수 내에서 고농도의 카드뮴과 구리에 내성을 가지면서 카드뮴과 구리를 제거 할 수 있으므로 2차 오염을 막을 수 있고, 그 세척수를 재활용함으로써 처리 비용을 절감하는데 기여 할 것으로 생각된다.

5. 결 론

중금속(카드뮴, 구리)을 함유한 구연산-세척수에서 미생물을 이용한 중금속 제거 실험으로 다음 같은 결론을 얻었다.

1) 폐·광산 토양에서 고효율의 중금속 제거균주 JH1을 분리하였고, JH1은 형태학적 특징, 생리·생화학적 특징, 지방산 분석 그리고 16S rDNA 염기분석 결과 *Ralstonia eutropha*로 동정되었다.

2) 카드뮴 110 mg/L을 함유한 구연산-세척수 내에 균 농도(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g/L)에 따른 실험 결과, 0.5 g/L를 제외한 1.0, 2.0, 4.0 g/L에서 각각 84.4, 89.7, 89.9%로 비슷한 제거율을 확인하였다.

3) 카드뮴과 구리의 농도가 각각 110, 100 mg/L을 함유하는 구연산-세척수에서 시간에 따른 제거율을 확인 한 결과, 카드뮴과 구리 모두 144시간에 100% 제거 되었고, 저농도(10,

30, 60 mg/L)의 카드뮴과 구리의 시간에 따른 제거율을 확인한 결과, 카드뮴과 구리 모두 각각 12, 18, 48시간에서 100% 제거됨을 확인 하였다.

4) 따라서 *Ralstonia eutropha* JH1은 구연산-세척수 내의 중금속(카드뮴, 구리)의 생물학적 처리에 적합하다고 생각되어진다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업과 과학기술부 기초과학연구사업의 연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 백정선, 현재혁, 조미영, 김수정, “세척을 통한 중금속(Cd, Zn)으로 오염된 토양의 정화,” 한국토양환경학회지, 5(2), 45~54(2000).
- West, C. C. and Harwell, J. F., “Surfactant and Subsurface Remediation,” *Environ. Sci. Technol.*, 26(12), 2324~2330(1992).
- Reed, B. E., Carriere, P. C., and Moore, R., “Flushing of a Pb(II) contaminated soil using HCl, EDTA, and CaCl₂,” *J. Environ. Eng.*, 122, 48~50(1996).
- 이동호, 박옥현, “폐금속광산 광미 및 주변오염토양 세정에 관한 연구,” 한국토양환경학회지, 4(2), 87~101(1999).
- U. S. Environmental Protection Agency, Handbook, “Remedial Action at Waste Disposal Sites(Revised), EPA/625/6-85/006, Hazardous Waste Engineering Research Laboratory, Cincinnati, Ohio and Office of Emergency and Remedial Response”, US-EPA, Washington, D.C.(1985).
- 이희무, 이장순, 이중복, “토양에서 분리된 아연내성균의 아연흡착에 관한 연구,” 환경연구논문집, 1, 55~66(2001).
- 환경부, 토양오염공정시험법.
- MIDI, “Sherlock Microbial Identification system operating Manual,” version 3.0, Newark(1999).
- Brenner, D. J., Krieg N. R., and Staley, J. T., “Bergery's manual of systematic bacteriology,” Second Edition(2005).
- Schmidt, T., Stoppel, R. D., and Schlegel, H. G., “High-level nickel resistance in *Alcaligenes xylosoxydans* 3A and *Acaligenes eutrophus* KTO2,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3301~3309(1991).
- Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L., and Lelie, D. V., “Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha*(*Alcaligenes eutrophus*) CH34,” *J. Bacteriol.*, 182, 1399~1409(2000).
- Valls, M., Atrian, S., Lorenzo de V., and Fernandez, L. A., “Engineering a mouse metallothionein on the cell

- surface of Ralstonia eutropha CH34 for immobilization of heavy metals in soil," *Net. Biochem.*, **6**, 331~665 (2000).
13. Chang, S. Y., Huang, J. C., and Liu, Y. C., "Effect of Cd(II) and Cu(II) on a biofilm system," *J. of Environ. Eng.*, **112**(1), 94~104(1986).
14. Tsezos, M., "The role of chitin in uranium adsorption by R. Arrhizus," *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2025~2040 (1983).
15. 조주식, 이홍재, 이영한, 손보균, 정연규, 허종수, "증금속 내성균의 세포내 증금속 결합위치," *한국환경농학회지*, **17**(3), 246~243(1998).