

## 토양 내 토착 미생물에 의한 바이오필름 형성과 흡착을 통한 용존 중금속 제거

김상호<sup>1</sup> · 전효택<sup>2\*</sup> · 이종운<sup>3</sup>

<sup>1</sup>STX 에너지, <sup>2</sup>서울대학교 에너지자원공학과, <sup>3</sup>전남대학교 에너지자원공학과

### Removal of Dissolved Heavy Metals through Biosorption onto Indigenous Bacterial Biofilm Developed in Soil

Sang-Ho Kim<sup>1</sup>, Hyo-Taek Chon<sup>2\*</sup> and Jong-Un Lee<sup>3</sup>

<sup>1</sup>STX Energy Co. Ltd, STX Namsan Tower, Seoul 100-958, Korea

<sup>2</sup>Department of Energy Resources Engineering, Seoul National University, Seoul 151-744, Korea

<sup>3</sup>Department of Energy and Resources Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

In situ stabilization of heavy metals through adsorption onto indigenous bacterial biofilm developed on soil particles was investigated. Biofilms were developed in soil columns by supply of various carbon sources such as acetate, lactate and glucose. During development of biofilms, acetate, lactate, and glucose solutions were flew out from the soil columns with volume ratios of 98.5%, 97.3%, and 94.7%, respectively, when compared with soil column supplied with deionized water. Decrease in effluent amounts through the soil columns amended with carbon sources over time indicated the formation of biofilms resulting in decrease of soil porosity. Solutions of Cd, Cr(VI), Cu, Pb, and Zn were injected into the biofilms supported on soil particles in the columns, and the dissolved heavy metals in effluents were determined. Concentrations of dissolved Cd, Cr(VI), Cu, and Zn in the effluents through biofilm columns were lower than those of control column supplied with deionized water. The result was likely due to enhanced adsorption of the metals onto biofilms. Efficiency of metal removal by biofilms depended on the type of carbon sources supplied. The enhanced removal of dissolved heavy metals by bacterial biofilms in this study may be effectively applied to technical development of in situ stabilization of heavy metals in natural soil formation contaminated with heavy metals.

**Key words** : biofilm, biosorption, heavy metals, indigenous bacteria, in situ stabilization

토양 입자 표면에 형성한 토착 미생물 바이오필름에 의하여 중금속을 흡착하므로써 하부 생태계로 이동하지 않고 원위치에 고정화하는 실험을 수행하였다. 토양으로 충전한 컬럼에 초산염, 유산염, 포도당 등의 탄소원을 10일간 공급 함으로써 토양에 바이오필름을 형성하였다. 바이오필름 형성 기간 중, 초산염, 유산염, 포도당을 공급한 컬럼의 유출 수량은 탈이온수를 공급한 컬럼의 유출수량에 비하여 각각 98.5%, 97.3%, 94.7%인 것으로 나타났다. 이러한 유출수량의 감소는 형성된 바이오필름에 의한 토양 공극 폐색에 의한 것으로 판단된다. 바이오필름이 형성된 토양 컬럼에 Cd, Cr(VI), Cu, Pb, Zn 용액을 주입하며 시간에 따라 유출수를 채집, 중금속을 정량하였다. 바이오필름 컬럼을 통과 하여 나온 유출수 중 Cd, Cr(VI), Cu, Zn 농도는 탈이온수 컬럼에 비하여 낮았으며, 이는 토양 입자에 비하여 바이오필름에 의한 이들 중금속 흡착 효율이 높기 때문인 것으로 여겨진다. 바이오필름에 의한 중금속 제거 효율은 토착 미생물에 공급한 탄소원의 종류에 따라 다르게 나타났다. 이러한 연구 결과는 중금속으로 오염된 토양 내에 중금속을 원위치 고정화하는 기술 개발에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대한다.

**주요어** : 바이오필름, 미생물학적 흡착, 중금속, 토착 미생물, 원위치 고정화

\*Corresponding author: chon@snu.ac.kr

## 1. 서 론

용존 중금속 제거와 관련한 미생물 반응 과정은, 미생물 또는 미생물이 분비하는 세포의 중합체(EPS; extracellular polymeric substances) 표면에 분포하는 음전하 작용기로서의 중금속 양이온 흡착(biosorption), 미생물 대사작용(metabolism)을 통한 세포 내로의 중금속 축적(bioaccumulation), 대사작용에 의해 형성되는 황화이온(sulfide) 또는 인산이온(phosphate) 등 음이온과의 반응에 의한 침전물 형성, 산화·환원·메틸화 과정 등을 통한 biotransformation 등을 들 수 있다(Valls and de Lorenzo, 2002). 이 중 미생물 흡착은 미생물 또는 EPS 표면에 존재하는 리간드에 용존 중금속 이온이 결합하여 용액으로부터 제거되는 과정으로서 세포의 생존과 관계없이 세포벽 구조만 깨지지 않는다면 중금속 흡착이 가능하다. 반면 생체 축적은 대사작용을 하는 미생물에 의해서만 가능하다. 따라서 살아 있는 미생물을 이용한 중금속 흡착 시 생체 축적 등 대사 의존형 작용과 흡착 등 대사 비의존형 작용이 동시에 발생하기 쉽다.

미생물 흡착에 의한 용존 중금속 제거 기술은 물리·화학적 흡착 기술에 비해 다음과 같은 장점을 가지고 있다. 미생물의 활성에 관계없이 중금속 흡착이 진행되며 물리·화학적 흡착제(sorbents)에 비해 월등히 저렴하다(Trudinger and Swaine, 1979; Vecchio *et al.*, 1998). 미생물의 대사 작용에 비의존적이며 단위 질량당 표면적이 크므로 중금속 제거 속도가 빠르다(Volesky, 1990; Lovely and Coates, 1997). 미생물 표면의 작용기가 음전하를 가지므로 중금속 양이온에 대해 높은 흡착능력을 가진다(Beveridge and Murray, 1980). 미생물 종류에 따라 중금속을 선택적으로 흡착 가능하고(Valls and de Lorenzo, 2002), 적용 pH 범위가 넓고 상온 흡착이 가능하다(Ceribasi and Yetis, 2001).

미생물 흡착의 효율성은 미생물 특성, 오염물 성질, 반응 조건 등에 의해 영향을 받는다. 미생물 특성에는 흡착 과정에 투입하는 미생물의 종류, 수, 생육 단계, 오염 환경에 대한 순응도 등이 있으며, 오염물 성질로는 오염물질의 종류, 양, 존재 형태 등을 들 수 있다. 반응 조건으로는 미생물 성장이나 중금속 형태에 영향을 미칠 수 있는 인자들이 포함되는데, 온도, pH, 산소, 물, 영양분 등이 있다(Andres *et al.*, 2000; Klimmek *et al.*, 2001; Aksu, 2001).

그간 미생물학적 흡착을 통한 중금속 제거 기술은 조절 가능한 공정 하에 산업 폐수 처리 등에 주로 적

용되어 왔다. 이 연구에서는 중금속으로 오염된 자연 상태의 토양을 대상으로 미생물학적 흡착 기술을 적용함으로써 용존 중금속이 허부 생태계로 유입되지 않고 토양 중에 원위치 고정화(in situ stabilization)가 가능한지의 여부를 파악하고자 하였다. 이 때 중금속을 흡착한 미생물이 토양 내에서 자유유영(planktonic) 상태로 존재한다면 토양수 및 지하수의 흐름을 따라 허부 생태계로 이동하므로 고정화의 효과를 전혀 기대할 수 없게 된다. 그러나 미생물이 바이오필름(biofilm)을 형성하여 토양 입자 표면에 부착된 상태로 존재한다면 물의 흐름에 관계없이 중금속의 고정화 효과를 기대할 수 있을 것이다.

바이오필름은 고체 매체의 표면에 부착된 미생물과 미생물이 분비한 EPS가 결합하여 형성된 층을 말한다. 미생물들은 일반적으로 유체를 따라 이동하다가 고체 매체 표면에 단단하게 부착되는 특성을 가지고 있다. 많은 종류의 미생물들이 분비하는 EPS는 생합성 고분자 물질로서 바이오필름을 구성하는 총 유기물의 50~90%에 이를 정도로 큰 부분을 차지하고 있으며, 성분은 주로 다당류, 단백질, 핵산, 지질 등으로 구성되어 있다. 이렇게 분비된 EPS는 다양한 중금속 이온과 선택적으로 결합하고 자유유영 상태의 미생물을 토양 매질에 부착시켜 중금속 이온의 이동도를 낮추고 고정시키는 역할을 한다(Langley and Beveridge, 1999; Lee and Beveridge, 2001).

바이오필름을 이용하여 자연 상태의 토양수 또는 지하수 중의 중금속을 흡착, 제거하는 연구는 선진국에서 수행된 바 있으나(예를 들면, Hiebert, 1998) 국내에서는 연구된 사례가 거의 없다. 따라서 이 연구에서는 유기물과 같이 생물학적으로 분해되는 물질이 아닌 분해되지 않는 중금속으로 오염된 토양에서 바이오필름 형성을 촉진하고 미생물의 흡착 반응을 유도함으로써 용존 중금속의 이동을 억제하는 방법이 가능한지의 여부를 파악하고자 하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 토양 분석

실험에 사용한 토양은 유류와 중금속으로 오염된 것으로 알려진 토양으로서 인천광역시에서 채취하였다. 채취한 토양으로부터 자갈과 식물 잔해를 육안으로 선별, 제거하고 상온에서 10일간 건조하였다. 2 mm 입경을 통과한 토양 시료를 대상으로 하여 지구화학적 특성인 토양 pH, 양이온교환능력(CEC, cation exchange

capacity), 작열감량(LOI, loss-on-ignition)을 측정하고 입도분석(size analysis)을 실시하였다.

오염 토양 특성 규명의 일환으로서 다양한 추출제(extractant)를 가하였을 경우 나타나는 중금속(Cd, Cu, Pb, Zn)의 용출 특성을 파악하기 위해 Table 1과 같은 추출제를 사용하였다.

다양한 염산 농도에 따른 중금속의 용출 특성을 파악하기 위하여, 토양 시료 10 g에 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 N 염산 용액을 각각 제조하여 50 mL씩 투입하였고 6 시간 동안 항온수평진탕기에서 30°C, 100 rpm으로 반응시켜 용출하였다. 독성용출시험법(TCLP, toxicity characteristic leaching procedure, EPA SW-846 Method 1311)에서는 토양 pH가 5 미만이면 토양 2 g에 pH 4.93인 CH<sub>3</sub>COOH 40 mL을 넣고, 토양 pH가 5 이상이면 토양 2 g에 pH 2.88인 CH<sub>3</sub>COOH 40 mL을 넣어 30 rpm으로 18 시간 반응시켜 용출하였다. 인공강우용출시험법(SPLP, synthetic precipitation leaching procedure, EPA SW 846, Method 1312)에서는 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 HNO<sub>3</sub>을 3:2로 혼합한 용액을 증류수로 희석하여 pH 4.2로 조정하여 2 g의 토양에 40 mL의 혼합 용액을 첨가한 후 30 rpm으로 18 시간 반응시키며 용출하였다. 독일 표준 방법(DIN 38313)인 왕수(aqua regia)를 이용한 용출법에서는 0.25 g 토양에 염산 3 mL과 질산 1 mL을 넣어 70°C로 1시간 가열하며 용출한 후 최종 부피가 10 mL이 되도록 증류수를 채워 넣었다. 이들 각 최종 용출액을 대상으로 하여 AAS(atomic

absorption spectrometer, Perkin Elmer, AAnalyst 100)를 이용하여 중금속의 함량을 측정하였다. 현재 우리나라 토양오염공정시험법에서는 Cd, Cu, Pb에 대해서는 0.1 N 염산, As에 대해서는 1 N 염산, Zn, Ni에 대해서는 왕수를 이용한 추출을 규정하고 있다(환경부, 2002).

토양 내 각 중금속의 존재 형태를 규명하기 위하여 연속추출법(sequential extraction)을 적용하였다. 이 실험에 사용된 연속추출법은 Davidson *et al.*(1994)이 제시한 방법을 따랐으며 이 때 사용한 각 추출제와 단계별 중금속의 존재 형태는 Table 2와 같다.

## 2.2. 바이오필름 흡착 실험

### 2.2.1. 바이오필름 형성

바이오필름에 의한 중금속 흡착 실험은 컬럼(column)식으로 수행하였다. 이 때 사용한 컬럼은 아크릴 재질로서 직경 5 cm, 길이 31.4 cm가 되게 제작하였으며 컬럼에 충전한 토양의 질량은 570 g이었다. 컬럼에 주입할 용액을 담을 수 있는 수조를 아크릴 재질로 만들었으며, 펌프는 6-line 연동식(peristaltic) 펌프(Cole Palmer Inc.)를 사용하였다. 컬럼 내 토양에 바이오필름 형성을 위한 탄소원을 공급하기 위하여 별도의 수조에 초산염(acetate), 유산염(lactate), 포도당(glucose) 각 10 mM을 넣고 연동식 펌프를 통해 컬럼에 상향식으로 주입하였다. 세 가지 탄소원을 사용한 것은 토양 내 토착 미생물 집단이 탄소원에 따라 바이

**Table 1.** Various soil leaching methods applied in the experiments

Type	Method	Leaching medium	Ratio of solution to sample (v/w)	Particle size (mm)
Diluted HCl	Korean Standard Leaching Procedure for Contaminated Soil	0.0, 0.1, 0.5, 1.0, and 3.0 N HCl	5:1	<0.2
TCLP <sup>1)</sup>	US EPA SW-846 Method 1311	Acetate buffer	20:1	<9.5
SPLP <sup>2)</sup>	US EPA SW-846 Method 1312	Deionized water (pH=4.2~5.0)	20:1	<9.5
Aqua regia	DIN <sup>3)</sup> 38414	Aqua regia	40:1	<0.2

<sup>1)</sup>TCLP: toxicity characteristic leaching procedure

<sup>2)</sup>SPLP: synthetic precipitation leaching procedure

<sup>3)</sup>DIN: Deutsche Industrie-Norm

**Table 2.** Extractants used in the sequential extraction procedure and nominal phases dissolved (Davidson *et al.*, 1994)

Extraction step	Extractants	Phases
1	CH <sub>3</sub> COOH (0.16 M)	Exchange site and carbonates (easily extractable)
2	NH <sub>2</sub> OH·HCl(0.1 M) at pH<2	Iron and manganese oxides (reducible)
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8.8 M), CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (1 M) at pH<2	Organic matters and sulfides (oxidizable)
4	HNO <sub>3</sub> (36%), HCl (62%)	Silicate minerals (residual)

오필름을 형성하는 속도에 차이가 있는지 여부를 파악하기 위해서였다. 초기 탄소원 용액 통과 속도는 0.34 mL/min로서 500 mL/day가 통과하도록 하였다.

이러한 조건으로 10일간 탄소원을 주입하여 바이오필름을 계속 형성시키는 동시에 24 시간 단위로 컬럼을 통과하여 나오는 유출수량을 관찰하였고, 유출수의 pH, 산화환원전위, 미생물 수를 측정하였다. 토양 내 공극에 바이오필름이 형성되면 주입수의 원활한 흐름을 저해할 것이므로 컬럼을 통과한 후 배출되는 유출수의 부피를 바이오필름 형성의 간접적인 지표로 사용하려 하였다. 미생물 수는 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 600 nm의 파장에서 유출수의 광밀도(optical density)를 측정하였다. 비교 시료(control)로서 탄소원이 없는 탈이온수를 컬럼에 주입하고 그 결과를 비교하였다. 모든 실험 용기는 10% 염산 용액에 24시간 세척하여 중금속을 제거하였다.

### 2.2.2. 바이오필름에 의한 중금속 고정화

위에서 기술한 방법으로 컬럼 내 토양에 바이오필름을 형성한 후, 중금속으로 오염된 토양수 또는 지하수가 토양 매체를 통과하며 바이오필름에 의해 흡착되고 고정화되는 정도를 파악하기 위하여 인위적으로 조제한 중금속 용액을 컬럼에 주입하였다. 컬럼에 주입할 중금속 오염 용액을 제조하기 위해 사용된 중금속은 Cd, Cu, Cr(VI), Pb, Zn으로 CdCl<sub>2</sub>(Aldrich), CuCl<sub>2</sub>(Junsei), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(Junsei), PbCl<sub>2</sub>(Junsei), ZnCl<sub>2</sub>(Junsei)를 사용하였다. 실험에 사용한 물은 이온교환수지를 통과시켜 18.2 MΩ/cm 저항을 갖는 초순수를 사용하였으며 완충 용액을 사용하지 않고 그대로 사용하였다. 중금속 용액의 주입 조건은 위에 기술한 탄소원 주입 조건과 동일하였으며 상온에서 상향식으로 수행하였다.

중금속 용액은 1차로 Cd, Cu, Cr(VI), Pb, Zn의 농도가 각각 30 mg/L이 되도록 제조한 후 혼합하여 수조에 넣고 연동식 펌프를 통해 초기 500 mL/day가 통과하도록 20.84 mL/h 속도로 주입하였다. 초기에는 컬럼의 안정화를 위해 중금속 용액 주입 후 기포를 제거하고 24 시간 동안 그대로 두어 안정화한 후 24 시간 단위로 유출수를 채취하여 중금속 함량을 분석하였다. 중금속 용액 주입과 유출수 채취는 10일간 지속하였다. 2차 주입 시에는 바이오필름에 의한 흡착 특성이 확인된 Cr(VI)을 제외하고, 비교시료에 비하여 바이오필름에 의한 뚜렷한 흡착 결과를 보이지 않는 Cd, Cu, Pb, Zn에 대하여 각각 100 mg/L의 농도로 제조한 후 혼합하여 16일간 동일 컬럼에 주입하였다. 컬럼

을 통과하여 컬럼 상부에서 나오는 유출수를 동일하게 24 시간 단위로 채취하여 중금속을 정량하였다.

유출수는 0.2 μm 필터를 통과시킨 후, 0.1 mL의 HCl(Ultra pure grade, Kanto chemical)를 주입하여 튜브의 벽면에 흡착될 수 있는 중금속을 탈착시켰다. 중금속 분석은 ICP-AES(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer, OPTIMA 300XL, Perkin Elmer)를 이용하여 수행하였다.

## 3. 실험 결과 및 고찰

### 3.1. 오염 토양의 지구화학적 특성

실험 토양의 지구화학적 특성을 분석한 결과, pH는 5.82~6.59로 나타났으며 평균값은 6.14로서 약산성의 pH를 보였다. 토양의 CEC와 LOI 측정 결과, 각각 평균 9.14 meq/100 g과 6.2%로 나타났으며, 입도분석 결과 모래 90.2%, 미사 8.7%, 점토 1.1%로서 사토의 토성을 보였다.

다양한 추출제에 의한 용출 특성을 알아본 결과, 토양 오염공정시험법에 제시된 0.1 N 염산(Cd, Cu, Pb 추출용) 및 왕수(Zn 추출용)를 이용한 산가용성침출법(환경부, 2002)에 의해 추출된 연구 대상 토양의 중금속 평균 함량은 Cd 0.6 mg/kg, Cu 3.2 mg/kg, Pb 55.7 mg/kg 및 Zn 226.8 mg/kg을 보였으며, 이는 환경부 규정 '가' 지역(농경지)에 대한 토양오염우려기준(Cd 1.5 mg/kg, Cu 50 mg/kg, Pb 100 mg/kg, Zn 300 mg/kg)과 비교하였을 때 모두 낮은 값이었다.

연구 대상 토양에 대하여 토양오염공정시험법에 제시된 0.1 N 염산을 비롯한 다양한 농도(0.3, 0.5, 1, 3 N)의 염산을 가한 경우와 SPLP 및 TCLP 방법에 의한 용출, 탈이온수와 왕수를 가하였을 경우에 추출된 중

**Table 3.** Concentrations of extracted Cd, Cu, Pb, and Zn and pHs of the studied soil after various leaching methods (unit: mg/L)

Extractants	pH	Cd	Cu	Pb	Zn
Deionized water	6.14	0.3	0.1	1.9	0.3
0.1 N HCl	1.46	0.6	3.2	55.7	37.5
0.3 N HCl	0.94	0.8	4.6	87.6	46.3
0.5 N HCl	0.84	0.8	5.4	111.3	53.9
1 N HCl	0.52	0.8	5.6	111.7	52.4
3 N HCl	0.18	0.8	5.8	108.4	57.3
SPLP		0.6	3.6	55.2	72.8
TCLP		0.4	0.4	21.5	35.2
Aqua regia		3.2	17.2	352.6	226.8

금속의 함량 변화 및 토양 pH 변화를 Table 3에 나타내었다. 추출하는 산의 농도가 증가함에 따라 pH의 급격한 감소와 그에 따라 추출되는 중금속의 함량이 증가하는 일반적인 결과를 나타내었다. 3N 염산으로 추출할 경우 0.1N로 추출할 때보다 약 2 배 정도 높은 추출을 보였으며, 0.1N 염산으로 용출했을 경우 왕수에 비해 중금속의 용출이 15~20% 정도를 나타내었다. SPLP에 의한 추출 방법은 0.1N 염산으로 용출하는 방법에 비해 Cd, Cu, Pb는 비슷한 양을 추출하였으나 Zn은 약 2배 정도 더 높은 함량이 용출되었고, TCLP에 의한 방법은 0.1N 염산으로 용출하는 방법과 비교하였을 때 Zn은 비슷한 양을 추출하였으나, Cd, Cu, Pb는 적은 양이 용출되었다(Table 3). 한편, 왕수 분해 결과치와 Kloke(1979)가 제시한 토양의 최대허용한계치(Cd 3 mg/L, Cu 100 mg/L, Pb 100 mg/L, Zn 300 mg/L)를 비교하였을 때, 왕수 분해 결과 토양 내 추출 가능한 총 Cd 농도가 4.7 mg/L, Pb가 375.5 mg/L로 Kloke 기준치를 초과하는 것으로 나타남으로써 시간이 경과함에 따라 Cd와 Pb가 용탈되어 지속적으로 수계로 유입될 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

토양 시료에 대한 연속추출 결과를 Table 4에 나타내었고 각 시료의 원소별 함량 백분율을 Fig. 1에 도시하였다. Cd는 다른 중금속에 비하여 4 가지 존재 형태가 거의 균일하게 분포하고 있으며, 비잔류상으로 존재하는 비율이 70% 정도로 높았다. 또한 Cu나 Zn에 비해 유기물이나 황화물과 결합한 '산화성 형태' 비율이 높았다. Cu는 토양에서 약 40% 정도가 잔류상으로 존재하고 있으며 비잔류상 형태 중에서는 '환원성 형태'의 비율이 높은 것으로 나타났다. Pb도 약 40%가 잔류상으로 존재하며 비잔류상 형태 중 '산화성 형태'의 비율이 다른 중금속에 비해 많은 부분을 차지하고 있다. 이는 Pb가 주로 광물 격자 내에 존재하여 이동도가 다른 금속에 비하여 낮고 황화물이나 유기물과 결합한 형태로 존재한다는 결과와 일치한다(Alloway, 1995). Zn은 다른 중금속에 비하여 '교환성 형태'의 비율이 약 30% 정도로 높게 나타나 생물학적 흡수도가 높을 것으로 예상되었다.

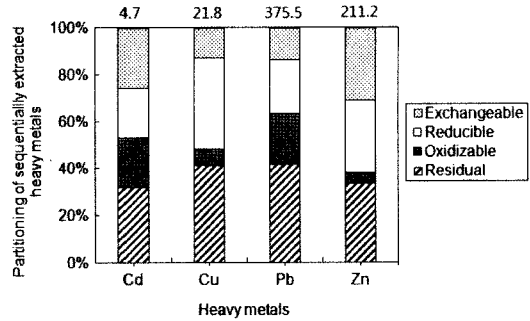


Fig. 1. Partitioning of sequentially extracted metal contents in the studied soil. The numbers above each bar represent the sum concentrations of 4 phases (unit: mg/kg).

### 3.2. 바이오필름 흡착 실험

#### 3.2.1. 바이오필름 형성

토양 570 g을 충전한 컬럼에 각각 탈이온수와 10 mM 초산염, 유산염, 포도당 탄소원 수용액을 500 mL/day가 통과하도록 주입하였다. 컬럼을 통과해서 나오는 탄소원 수용액과 탈이온수의 유출수 부피를 시간에 따라 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 유출수는 48 시간 경과 후부터 점차적으로 감소하여 10일이 지난 시점에서는 탈이온수는 438 mL/day, 초산염은 430 mL/day, 유산염은 424 mL/day, 포도당은 413 mL/day가 각각 컬럼을 통과하여 배출되었다. 탈이온수를 주입한 경우에도 유출수의 부피는 점차 감소하였으며 이는 아마도

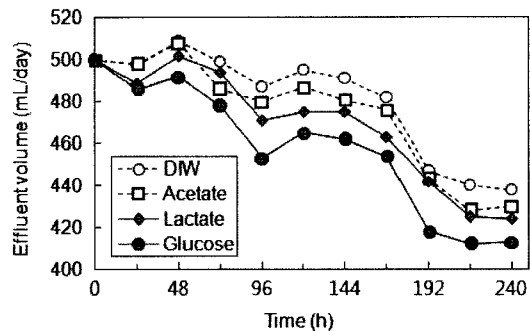


Fig. 2. Volume of effluents through the columns over time. DIW: deionized water.

Table 4. Heavy metal concentrations determined by sequential extraction (unit: mg/L)

	1 step (easily extractable)	2 step (reducible)	3 step (oxidizable)	4 step (residual)	total
Cd	1.2	1.0	1.0	1.5	4.7
Cu	2.8	8.5	1.5	9.0	21.8
Pb	52.1	85.8	81.8	155.8	375.5
Zn	65.2	65.5	10	70.5	211.2

물의 흐름으로 인해 물리적으로 토양 공극 일부가 붕괴되는 현상이 발생했기 때문에 판단된다. 10일 경과 후 초산염, 유산염, 포도당의 유출수 부피는 탈이온수 대비 98.5%, 97.3%, 94.7%의 비율을 나타내었다. 이는 10 mM의 탄소원을 지속적으로 토양에 공급함으로써 토양 내 토착 미생물에 의한 바이오필름이 형성되었고, 생성된 바이오필름으로 인하여 토양 내 공극이 감소되어 주입수의 흐름이 억제되었기 때문으로 여겨진다. 또한 유출수량의 감소 정도로 보아 연구 대상 토양 내 토착 미생물들은 포도당 > 유산염 > 초산염의 순으로 바이오필름 형성에 필요한 탄소원을 선호하는 것으로 나타났다.

중금속의 거동에 영향을 미치는 주요 인자 중 하나인 유출수의 pH 및 산화환원전위 변화를 24 시간 주기로 측정하였다. 반응 초기 24 시간 경과 후 탈이온수는 약 7.1의 pH를 나타낸 반면 탄소원을 주입한 컬럼들은 이보다 다소 낮은 6.4~6.8의 pH 값을 보였다 (Fig. 3(a)). 이러한 값들은 10일에 걸친 반응 기간 동안 모두 큰 변화를 보이지 않고 거의 일정하게 유지되었으며, 10일간의 평균 pH는 탈이온수 7.12, 초산염 6.63, 유산염 6.47, 포도당 6.29로 각각 측정되었다. 탈이온수에 비하여 탄소원을 주입한 컬럼의 유출수에서

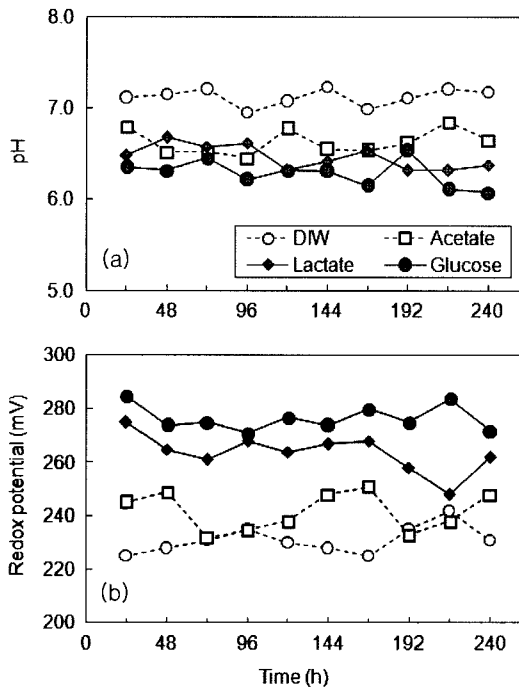


Fig. 3. Measurement of (a) pH and (b) redox potential of the effluents over time. DIW: deionized water.

약 0.5~1 정도 낮은 pH를 보인 것은 아마도 탄소원을 공급받아 상대적으로 대사작용이 활발해진 미생물들이 분비하는 유기산(organic acids)의 영향 때문인 것으로 여겨진다(Welch and Ullman, 1993).

유출수의 산화환원전위를 10 일간 측정된 결과를 Fig. 3(b)에 나타내었다. 시간에 따른 증류수와 각 탄소원의 유출수에서 측정된 산화환원전위 역시 반응 시간 동안 일정한 경향 없이 거의 변화하지 않았으며 다만 약 10~20 mV 정도로 미약한 변이가 관찰되었다. 탈이온수와 탄소원 상호 간에는 약간의 차이를 보여 10 일간 측정된 평균 산화환원전위는 탈이온수 231 mV, 초산염 241 mV, 유산염 264 mV, 포도당 277 mV로 나타났다. 비록 무시할만한 차이기는 하나 유산염과 포도당을 공급하였을 경우 산화환원전위가 다소 높게 나타난 원인에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

유출수에 존재하는 미생물의 개체수를 파악하기 위하여 UV-vis를 이용하여 유출수의 광밀도를 측정하였다. 이는 토양 내 바이오필름이 형성될 경우, 바이오필름을 통과하여 배출된 유출수 내에 존재하는 자유유형 상태의 미생물 개체수도 비례하여 증가할 가능성을 확인하기 위한 것이었다. 만약 바이오필름이 형성되며 유출수량이 감소하는 것과 비례하여 자유유형 미생물의 개체수가 증가한다면 유출수의 광밀도를 측정하는 간단한 방법으로 매질 내 형성된 바이오필름의 양을 유추할 수 있을 것이다. UV-vis를 이용하여 24 시간 간격으로 10일에 걸쳐 600 nm 파장에서 광밀도를 측정된 결과, 시간별 및 탄소원별로 아무런 경향성을 보이지 않아 유출수량의 감소 추이와는 아무런 연관성을 띠지 않았다(Fig. 4). 주어진 조건에서 UV-vis로 측정하기에는 배출된 자유유형 상태의 미생물 개체수가 극히 적었을 가능성도 있으나, 이러한 결과는 유출수 내

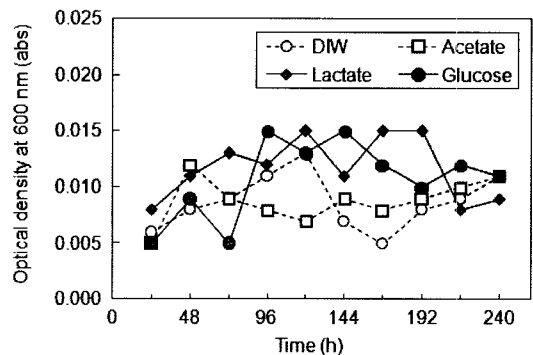


Fig. 4. Optical density at 600 nm of the effluents over time. DIW: deionized water.

의 자유유형 상태의 미생물 개체수가 토양이나 암반에 형성된 바이오필름 양의 지표가 될 수 없다는 것을 의미한다. 최근 수행되고 있는 다른 연구에서 암반 균열면에 다량의 바이오필름을 형성한 후 균열면을 통과한 유출수 내 미생물의 평판계수(plate counting) 및 광밀도를 측정한 결과에서도 실제 형성된 바이오필름 양과 유출수 내 미생물 개체수와는 관계가 없다는 것이 밝혀진 바 있다(미발표 자료).

3.2.2. 바이오필름에 의한 중금속 고정화

토양 컬럼에 10일간 탄소원을 주입함으로써 바이오필름을 형성시킨 후, 30 mg/L 농도의 중금속(Cd, Cu, Cr(VI), Pb, Zn) 수용액을 10일간 주입하였고 동일 컬럼에 연속적으로 100 mg/L의 중금속(Cd, Cu, Pb, Zn)을 16일간 주입하여 시간에 따른 유출수 내 각 중금속 농도를 측정하였다.

실험 결과, 다른 중금속들은 일차로 주입한 30 mg/L의 농도가 토양 입자에 의해 모두 흡착, 제거되는 결과를 보여 바이오필름에 의한 흡착 특성을 관찰할 수 없었으나(아래 설명 참조), 용존 Cr(VI)은 저농도에서도 바이오필름에 의한 제거 양상을 뚜렷이 나타내었다(Fig. 5). 탄소원을 공급하지 않고 탈이온수만을 넣어준 컬럼의 경우, 토양이 용존 Cr(VI)을 3일 동안 90% 이상 제거하였으나 그 이후에는 제거량이 급격하게 감소하여 15일 이후에는 제거 효율이 30% 이하로 감소하였다. 반면 탄소원을 공급하여 바이오필름을 생성시킨 경우에는 초산염, 유산염, 포도당 모두 9일 경과시까지 90% 이상의 높은 제거 효율을 나타내었다. 이후에는 지속적으로 제거 효율이 감소하였으나 15일 경과 후에도 약 50%의 높은 제거 효율을 보였다. 토양 입자의 Cr(VI) 제거 용량은 15일까지 212.7 mg/kg<sub>soil</sub>이며, 유산염을 주입한 경우의 토양과 바이오필름에 의한 제거 용량은 361.8 mg/kg<sub>soil</sub>로써 바이오필름만의 제거 용량은 149.1 mg/kg<sub>soil</sub>로 계산되었다.

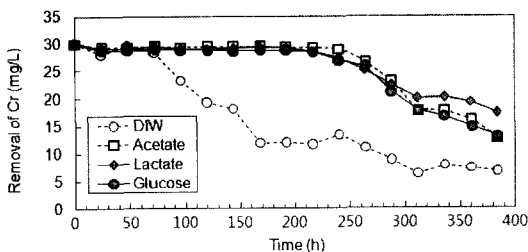


Fig. 5. Removed concentrations of dissolved Cr(VI) through soil columns over time. DIW: deionized water.

용존 Cr(VI)은  $\text{HCrO}_4^-$  또는  $\text{CrO}_4^{2-}$  형태인 산화음이온(oxyanion) 상태로 존재하므로 바이오필름이 형성되지 않은 토양 컬럼을 통과하며 제거된 Cr(VI)이 모두 흡착에 의해서 제거되었다고 보기는 어렵다. 토양 구성 광물에 대한 광물학적 분석을 수행하지는 않았으나 주어진 pH 조건에서 표면 양전하를 띠는 광물에 의한 흡착을 고려할 수 있으며 토양 내 존재하는 유기물에 의하여 조성된 미소 환원조건에서 Cr(III)으로 환원, 침전되었을 가능성도 있다.

한 가지 특기할만한 것은 토양 자체에 비하여 토양 입자 표면에 바이오필름을 형성한 경우 Cr(VI) 제거 효율이 증가하였다는 것이다. 이의 원인으로는 우선 EPS 중 양전하를 띠는 성분에 의한 흡착을 들 수 있다. 카울린 입자 표면에 형성한 *E. coli* 바이오필름에 Cr(VI)을 반응시키고 푸리어변환 적외선 분광기(FTIR; Fourier transformed infrared spectroscopy)로 관찰한 결과 Cr(VI)이 바이오필름의 아미노기 및 심지어 카르복실기와도 반응하는 것으로 밝혀진 바 있다(Quintelas et al., 2009). 또한 바이오필름 내부에 흔히 조성되는 산화환원전위의 내부 구배(gradient)에 의한 환원성 침전도 일부 원인이 되었을 것이다(Costerton et al., 1994). 이외에 환경 공정에서 널리 연구되는 미생물 활동에 의한 이화적(dissimilatory) 또는 해독적(detoxifying) Cr(VI) 환원에 의한 침전 메커니즘을 그 원인으로 들 수 있다(예를 들면, Cordoba et al., 2008).

Cd, Cu, Pb, Zn의 경우, 용존 상태에서 양이온으로 존재하므로 토양 입자 및 바이오필름에 의한 흡착에 의해 주로 제거되는 것으로 판단된다. 탈이온수 및 탄소원 세 종류를 공급한 컬럼에 30 mg/L의 농도로 주입한 결과, 컬럼을 통과한 유출수에서 반응 기간인 10일 내내 모두 검출한계 이하에서 3 mg/L에 이르는 매우 낮은 농도가 나타났다. 시간에 따른 각 중금속의 제거량 변화를 Figs. 6~9에 나타내었다. 탄소원 컬럼들의 흡착 효율은 90% 이상으로 매우 높았으나, 탈이온수와 탄소원을 넣어준 컬럼 간에 전혀 차이가 발생하지 않았으므로 토양 자체의 흡착 능력만으로도 주입한 중금속이 제거되었다고 판단된다. 바이오필름에 의한 흡착 효과를 파악하기 위해 추가적으로 100 mg/L의 Cd, Cu, Pb, Zn 용액을 주입하고 16일 동안 관찰하였다.

고농도의 중금속을 주입한 후 시간에 따라 각 컬럼을 통과하여 나온 유출수의 농도로부터 계산된 중금속 제거량을 살펴 보면(Figs. 6~9), Pb를 제외한 Cd, Cu, Zn의 경우, 탈이온수만 주입한 컬럼에 비하여 탄

소원을 주입한 컬럼에서 중금속의 흡착 제거량 및 지속 시간이 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

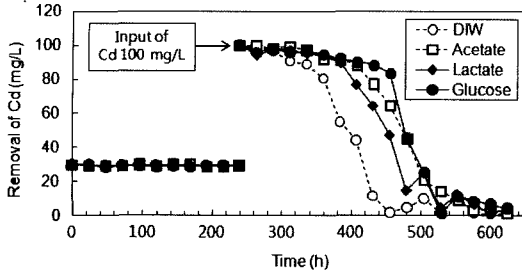


Fig. 6. Removed concentrations of dissolved Cd through soil columns over time. DIW: deionized water.

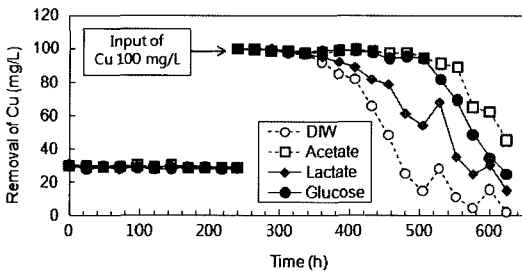


Fig. 7. Removed concentrations of dissolved Cu through soil columns over time. DIW: deionized water.

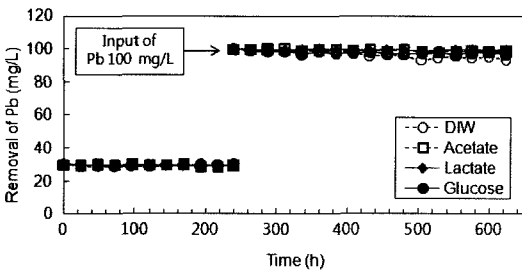


Fig. 8. Removed concentrations of dissolved Pb through soil columns over time. DIW: deionized water.

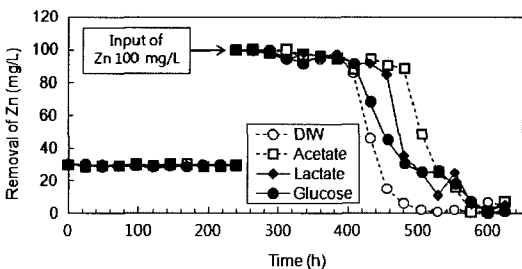


Fig. 9. Removed concentrations of dissolved Zn through soil columns over time. DIW: deionized water.

Cd의 경우, 탈이온수를 공급한 컬럼은 약 300 시간이 경과하며 Cd 제거량이 급감하기 시작하였으며 이는 토양 매질에 분포되어 있던 흡착점이 모두 포화되었기 때문으로 여겨진다(Fig. 6). 이에 비하여 탄소원을 공급하여 바이오필름을 형성한 컬럼에서는 약 400 시간이 경과하며 제거량이 감소하기 시작하였다. 전체적인 탄소원별 제거 효율은 포도당>초산염>유산염 순으로 나타났다. 토양의 흡착 능력은  $599.2 \text{ mg/kg}_{\text{soil}}$ 로 계산되었으며, 바이오필름의 흡착 능력은 최대 흡착효율을 보인 포도당의 경우에  $340.1 \text{ mg/kg}_{\text{soil}}$ 로 계산되었다. Cu의 경우, 탄소원별 흡착량이 Cd에 비하여 더욱 뚜렷이 나타났으며, 탄소원별 제거 효율은 초산염>포도당>유산염 순으로 나타났다(Fig. 7). 토양의 흡착 능력은  $863.5 \text{ mg/kg}_{\text{soil}}$ 로 계산되었으며, 바이오필름의 흡착 능력은 최대 흡착 효율을 보인 초산염의 경우에  $567.6 \text{ mg/kg}_{\text{soil}}$ 로 계산되었다. Pb의 경우, 탈이온수를 주입한 컬럼에서는 16일 경과 후 제거 효율이 약 94%로 감소하였고, 탄소원을 주입한 컬럼에서는 모두 97% 이상의 제거 효율을 보였다(Fig. 8). 그러나 다른 중금속에 비하여 이는 구별될만한 차이가 아니었으며 16일이 경과한 후에도 여전히 매우 높은 Pb 제거량을 나타낸 것이 특징적이었다. 이는 Pb에 대한 토양 자체의 흡착 능력이 매우 크기 때문으로 토양의 흡착 능력만으로도 주입된 Pb를 거의 모두 제거할 수 있는 것으로 나타났다. Zn의 경우, Cd, Cu와 마찬가지로 탄소원을 주입한 컬럼에서 향상된 제거 효율을 보였으며, 제거 효율은 초산염>유산염>포도당 순으로 나타났다(Fig. 9). 토양의 흡착 능력은  $753.2 \text{ mg/kg}_{\text{soil}}$ 로 계산되었으며, 바이오필름의 흡착 능력은 최대 흡착효율을 보인 초산염의 경우에  $294.1 \text{ mg/kg}_{\text{soil}}$ 로 계산되었다.

그간 카울린, 활성탄, 제올라이트 등의 담체에 미생물 바이오필름을 형성시킨 후 중금속 제거 메커니즘을 연구한 예는 특히 환경공학 분야에서 상당히 많이 시도된 바 있으나 이 연구처럼 자연 상태의 토양을 대상으로 하여 바이오필름을 형성하고 중금속 제거를 시도한 예는 극히 드물었다. 이 연구는 중금속으로 오염된 자연 토양에 토착 미생물을 이용한 바이오필름을 형성하면 중금속이 지하수 및 토양수를 따라 하부 생태계로 이동하는 것을 억제할 수 있는 가능성을 나타낸 것으로 판단된다. 자연 상태의 토양에 적용하므로 잘 조절된 공정 수립이 필요하지 않으며 매우 넓은 범위의 토양을 대상으로 적용할 수 있다는 장점이 있다. 이 연구에서는 주입한 탄소원의 종류에 따라 중금속 제거량이 상이하게 나타났으며 이는 토양 내 토착미생물



집단이 각 탄소원을 이용하여 성장하며 형성시킨 바이오필름의 생화학적 특성이 서로 다르기 때문에 여겨진다. 따라서 보다 효율적인 중금속 고정화를 위해서는 오염 부지별로 가장 적합한 탄소원을 선정하는 작업이 선행되어야 할 것이다. 또한 투입하는 탄소원의 양 및 경제적 대체 탄소원 - 예를 들면 퇴비 등 - 에 관한 조사 역시 수행되어야 할 것이다.

#### 4. 결 론

토양을 컬럼에 충전하고 토착 미생물을 이용하여 바이오필름을 형성하기 위해 탄소원과 탈이온수를 주입하였을 때, 초산염, 유산염, 포도당은 탈이온수 대비 각각 98.5%, 97.3%, 94.7%의 부피비를 갖는 유출수가 배출되었다. 이는 공급된 영양 물질에 의해 바이오필름의 생성으로 토양 내 공극이 감소되어 주입수의 흐름이 억제되기 때문에 발생한 결과로 생각된다. 탄소원을 주입한 경우에 pH 및 산화환원전위는 시간에 따른 변화가 발생하지 않고 거의 일정하게 유지되었다. 바이오필름 형성 후에 Cd, Cr(VI), Cu, Pb, Zn 용액을 컬럼에 주입하여 시간에 따른 제거 효율을 관찰한 결과, 탄소원에 따라 제거량이 다르게 나타났다. 30 mg/L 농도의 중금속 주입시, Cr(VI)은 토양 입자 자체에 비하여 바이오필름에 의한 제거 효과가 뚜렷하게 나타났으나 다른 중금속들은 토양 자체에 의한 흡착으로 인하여 바이오필름 효과가 나타나지 않았다. 다른 중금속에 대하여 연속적으로 100 mg/L 농도의 중금속 용액을 주입하자 Pb를 제외한 Cd, Cu, Zn은 바이오필름 흡착으로 인하여 탈이온수에 비하여 향상된 제거 효과를 보였다. Pb의 흡착량은 탈이온수를 공급한 컬럼과 탄소원을 공급한 컬럼 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 각 중금속 별로 공급된 탄소원 종류에 따라 제거량이 상이하게 나타났다. 토양 내 토착 미생물이 분비하는 EPS에 의해 바이오필름을 형성함으로써 중금속 흡착을 유도할 수 있는 것으로 나타났으며, 이러한 방법은 중금속 오염 토양에서 용존 상태로 존재하는 중금속 이온의 이동성을 감소시켜 토양 오염의 확산을 저지하는 기술에 활용될 것으로 기대된다.

#### 사 사

이 연구는 환경부 “토양·지하수오염방지기술개발사업”의 일환으로 수행되었습니다.

#### 참고문헌

환경부 (2002) 토양오염공정시험방법. 환경부고시 제2002-122호.

Aksu, Z. (2001) Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. *Separation and Purification Technol.*, v.3, p.285-294.

Alloway, B.J. (1995) Heavy metals in soils, 2nd ed. Chapman and Hall, 368p.

Andres, Y., Thouand, G., Boualam, M. and Mergeay, M. (2000) Factors influencing the biosorption of gadolinium by micro-organisms and its mobilisation from sand. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.54, p.262-267.

Beveridge, T.J. and Murray, R.G.E. (1980) Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v.141, p.876-887.

Ceribasi, I.H. and Yetis, U. (2001) Biosorption of Ni(II) and Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system - kinetics. *Water SA*, v.27, p.15-20.

Cordoba, A., Vargas, P. and Dussan, J. (2008) Chromate reduction by *Arthrobacter* CR47 in biofilm packed bed reactors. *J. Haz. Mater.*, v.151, p.274-279.

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.

Davidson, C.M., Thomas, R.P., McVey, S.E., Perala, R., Littlejohn, D. and Ure, A.M. (1994) Evaluation of sequential extraction procedure for the speciation of heavy metal in sediments. *Anal. Chimica. Acta*, v.291, p.277-286.

Hiebert, R. (1998) Using biological barriers to control movement of contaminated groundwater; Subsurface barrier technologies. *International Business Communications*.

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.

Kloke, A. (1979) Content of arsenic, cadmium, chromium, fluorine, lead, mercury, and nickel in plants grown on contaminated soil, UN-ECE Symp, 325p.

Langley, S. and Beveridge, T.J. (1999) Metal binding by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is influenced by growth of the cells as a biofilm. *Can. J. Microbiol.*, v.45, p.616-622.

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.

Lovely, D.R. and Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.8, p.285-289.

Quintelas, C., Rocha, Z., Silva, B., Fonseca, B., Figueiredo, H. and Tavares, T. (2009) Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an *E. coli* biofilm supported on kaolin. *Chem. Eng. J.*, v.149, p.319-324.

Trudinger, P.A. and Swaine, D.J. (Eds.) (1979) Biogeochemical cycling of mineral-forming elements.

- Elsevier Science Ltd., p.293-314.
- Valls, M. and de Lorenzo, V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.26, p.327-338.
- 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.
- Volesky, B. (1990) Biosorption and biosorbents. In Volesky, B. (Ed.) *Biosorption of heavy metals*, Boca Raton, CRC Press, p.3-6.
- Welch, S.A. and Ullman, W.J. (1993) The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v.57, p.2725-2736.

---

2009년 8월 20일 원고접수, 2009년 10월 5일 게재승인