

《原著》

***Sphingobacterium* sp. KM-02에 의한 Fluorene 분해에 미치는 배지 내 중금속 영향**

남인현 · 김재곤 · 전철민*

한국지질자원연구원 지구환경연구본부 지질재해연구실

Heavy Metal Effects on the Biodegradation of Fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02 in liquid medium

In-Hyun Nam · Jae-Gon Kim · Chul-Min Chon*

Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM), Daejeon, 305-350, Korea

ABSTRACT

The heavy metal effects on the degradation of fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02 was determined in liquid cultures. The results showed that 10 mg/L cadmium, copper, zinc, and lead not only affected the growth of KM-02 with fluorene but also the ability of growing or resting cells to degrade this compound. Growth and fluorene degradation were strongly inhibited by cadmium and copper at 10 mg/L, while the inhibitory effect of zinc and lead at the same concentration or at 100 mg/L were not significant. In contrast, arsenic did not affect degradation or growth, even at very high concentrations of 100 mg/L. Subsequent analyses additionally revealed that concentrations of arsenic remained unchanged following incubation, while those of cadmium and copper decreased significantly.

Key words : Fluorene; Biodegradation; *Sphingobacterium* sp. KM-02; Heavy metal effects

1. 서 론

폐광산지역 토양은 광산개발 후 오랜 기간 방치되어 다양한 물질로 광범위하게 오염되어 왔으며, 국내에서 발생하는 폐광산 주변 토양의 중금속 오염은 산성광산배수 혹은 침출수가 유출되거나, 광산폐기물의 유실 및 광미와 그로부터 발생한 분진 등이 분산되는 것에 기인한다(Lee et al., 2004). 국내에 산재되어 있는 광산은 약 1,000여개의 휴폐금속광산, 약 340여개의 폐석탄광산과 비금속광산을 중심으로 하는 약 700여개의 가행광산 등 총 2,000여개의 광산이 있다. 이 중 대부분의 휴폐광산이 폐광 이후 적절한 환경복원 시설 없이 방치되어 있는 경우가 많은 실정이다(Jung and Jung, 2006; Lee et al., 2004). 이미 조사된 전국 휴폐광산의 개황조사 및 정밀조사를 종합하면, 금은광산의 개발로 인한 비소 오염이 강한 특성을 보이며, 지역에 따라 Cd, Cu, Pb, Al 등의 오염도가 높은

것으로 평가되고, 토양오염도는 전체에서 약 50% 수준의 광산이 토양오염 우려기준을 초과한다(Jung and Jung, 2006). 대다수의 광산이 주로 금, 은을 대상으로 개발되었기 때문에 이들의 광화작용과 밀접한 관계에 있는 As의 오염현상이 두드러지며, 일부 Cu, Pb, Zn 등을 개발한 금속광산에서는 Cd의 오염이 자주 관찰된다(Jung and Jung, 2006). 이와 같이, 휴폐광산에 의한 토양 및 주변지역의 중금속 오염은 심각한 수준이며, 해당 지역에 있는 미생물들의 생장이나 미생물에 의한 유기오염물질 분해시 발생하는 중금속에 의한 영향성을 평가하는 것이 필요하다고 사료된다.

PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 다환방향족 탄화수소류)는 환경 내에 널리 분포되어 있는 난분해성 오염물질이며, 석탄, 석유 등 화석연료의 불완전연소에 의해 다양한 배출원을 가지며 발생한다(Antizar-Ladislao et al., 2006; Kolomytseva et al., 2009; Wilcke, 2007).

*Corresponding author : femini@kigam.re.kr

원고접수일 : 2012. 11. 19 심사일 : 2012. 12. 6 게재승인일 : 2012. 12. 6
질의 및 토의 : 2013. 2. 28 까지

화학적 구조는 기본적으로 2개 이상의 벤젠고리를 가지는 방향족 유기화합물의 형태이고 물질이 가지고 있는 독성 및 여러 환경 매체 내의 잔류성, 낮은 휘발성, 난분해성 등의 특징으로 잠재적인 발암원 및 돌연변이원으로 작용한다(Kanaly and Harayama, 2000; Wilcke, 2007). PAHs 물질 중 본 연구에서 분해 실험을 진행한 Fluorene은 인위적으로 농약, 염색약 등에 첨가되어 배출되거나, 자동차 배기가스 및 소각 과정에서 불완전 연소로 생산된다(Keith and Telliard, 1979; Wattiau et al., 2001). 특히, Fluorene은 다양한 PAHs 물질 중에서 Naphthalene 및 Phenanthrene 등과 함께 비교적 작은 분자량을 가지는 군에 해당하는데, 이러한 물질들은 Pyrene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[g,h,i]perylene 등과 같이 4개나 그 이상의 벤젠화합물을 가지는 큰 분자량의 PAHs 물질 대비 물에 대한 용해도가 크기 때문에 지하수나 지표수로 침투하거나 그렇지 않으면 토양 내 잔류하는 특성을 가지고 있어서 주요한 토양 오염원으로 인식되고 있다(Keith and Telliard, 1979; Wattiau et al., 2001). 또한, 미국 EPA에서 지정한 PAHs 우선규제대상물질 중 Fluorene(C₁₃H₁₀)과 Phenanthrene(C₁₄H₁₀)이 오염지역에서 가장 빈번하게 나타나고 있어 저분자량 PAHs의 처리가 더욱 중요하다고 보고한 바 있다(Amor et al., 2001; Baath, 1989). 기존 연구들에서 Fluorene은 다양한 미생물에 의해 분해되는 것으로 보고되고 있으며, 해당 균주는 *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium* 등이 있다(Casellas et al., 1997; Grifoll et al., 1994; Monna et al., 1993; Nam et al., 2011; Wattiau et al., 2001; Pagnout et al., 2007; Schuler et al., 2008; Thangaraj et al., 2008).

다양한 중금속 중 몇몇은 생물체가 살아나가는 데에 필요한 것도 있으나, 고농도의 중금속 오염은 다양한 경로를 통해 필수 생물화학적 작용을 저해하기도 한다(Nies, 1999). 토양에 노출된 대부분의 중금속들은 토양 입자에 흡착되어 존재하며, 이온 형태로 산화 및 환원되어 보다 자유롭게 움직일 수 있어서, Al, Co, Cd, Ni, Cu, Zn, Pb, Hg 등 다양한 종류의 중금속들이 생화학적 산소요구량(BOD, Biological Oxygen Demand) 혹은 유기오염물질 분해작용을 저해하는 등 다양한 부작용을 야기한다는 많은 결과들을 찾을 수 있다(Amor et al., 2001; Baath, 1989; Nies, 1999; Mittal and Ratra, 2000; Sokhn et al., 2001). 그러나, 현재까지 Fluorene을 포함한 PAHs

물질들을 생분해하는 과정에서 발생할 수 있는 중금속 영향성에 관해서는 많은 연구가 진행된 것이 없어 관련 정보가 많지 않다. 더욱이, 폐광산지역 토양에서 유래하는 유기오염물질 분해 시 나타날 수 있는 중금속 영향성에 관해서는 현재까지 고려된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 기존에 PAHs 농도가 높은 폐광산지역 PAHs 오염토양으로부터 분리한 미생물 균주 *Sphingobacterium* sp. KM-02와 해당 균주로 분해 가능한 Fluorene을 Model compound로 하여 액상 배지에서의 성장 및 Fluorene 분해를 등을 측정 및 비교함으로써 미생물 성장 및 활동에 미치는 중금속들의 영향을 관찰하였다(Nam et al., 2011). KM-02 균주를 분리한 휴폐광산지역 토양 내 비교적 높은 농도로 존재하는 As, Cd, Cu, Pb, Zn 등 5종류의 중금속의 영향을 살펴보고, 토양 환경 내 특정 농도로 존재하는 중금속들이 미생물에 의한 PAHs 분해에 영향을 미치는지의 여부를 판단하였다. 또한, 상기 기술한 바와 같이 휴폐광산지역 토양 내 다양한 중금속이 고농도로 존재한다는 연구 결과가 많이 보고되어 일반화되어 있는 가운데, 생물복원 방법이 포함된 휴폐광산지역 토양의 무독화 시스템을 보다 체계적으로 설계 및 관리하기 위한 기초 자료로서 중금속 영향을 파악하는 이러한 연구가 필요하다고 사료된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 표준물질 및 시약

2% 질산용액에 녹여져 있는 ICP 표준물질 용액(SPEX plasma standard, 1,000 mg/L of H₃AsO₄, Cd, Cu, Pb(NO₃)₂, Zn)을 미생물 배양액에 첨가하는 데 이용하였는데, 각 표준물질은 SPEX(Metuchen, NJ, USA)에서 구매하여 사용하였고, Fluorene 및 기타 화학물질들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 유기용제 Ethyl acetate와 85% 인산용액 등은 Merck(Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. *Sphingobacterium* sp. KM-02 균주의 성장배지 및 Buffer 등은 기존 연구와 동일하게 사용하였다(Nam et al., 2011).

2.2. KM-02 균주 성장 및 Fluorene 분해 상의 중금속 영향 실험

Sphingobacterium sp. KM-02 균주가 Fluorene을 탄소원으로 이용하여 성장하는 동안 중금속이 미치는 영향을 관찰하기 위해, 균주를 얻기 위한 전 배양과 실제 중금속 영향을 관찰하기 위한 본 배양으로 나누어 실험하였다. 전

배양은 고온 가압으로 멸균된 MSM(Minimal Salts Medium) 100 mL을 1 L 용량의 삼각플라스크에 10 mg/mL 농도의 Fluorene과 72시간 동안 항온 교반기에서 호기적으로 배양하였다(28°C, 160 rpm). 이와 같이 전 배양에서 얻은 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 15분, 4°C)하고 20 mM Phosphate buffer(pH 7.0)로 pellet washing을 2회 실시한 후, MSM에 녹여서 전 배양과 동일한 조건으로 항온 교반 배양했다. KM-02 균주 농도는 흡광도 기준으로 0.1에 맞추어 실시하였고, 5종의 중금속을 각각 첨가한 배지를 10 mg/L의 농도와 100 mg/L의 농도로 각각 2 set 실험하였으며, 대조군 실험을 위해 중금속을 첨가하지 않은 배양기와 5종의 중금속이 녹여져 있는 2% 질산용액 만을 첨가해 준 배양기 등 14개의 삼각플라스크에 배양을 동시에 시켰다. 시간에 따른 균주의 성장은 UV-visible spectrophotometer(Biochrom, Cambridge, UK)로 600 nm의 파장에서 각 Sampling 시간 별로 시료를 채취하여 측정하였고, 배양 시간에 따라 감소하는 Fluorene의 양은 Sampling 시간 별로 시료채취 후에 -20°C에 보관하였다가 배양 120 시간 후, 반응을 종료하고 모든 시료를 2.4 절에 기술한 바와 같이 GC/MS분석을 통해 정성 및 정량 분석을 수행하였다.

2.3. KM-02 균주 Resting cell에 의한 Fluorene 분해상의 중금속 영향 및 감소 실험

휴폐광산 지역 토양에서 분리한 *Sphingobacterium* sp. KM-02 균주의 Resting cell에 의한 Fluorene 분해 실험 중 발생하는 중금속 영향 및 감소량을 관찰하기 위해 고농도의 균주를 상기 기술한 바와 같이 전 배양을 통해 얻은 후, 배양액을 20 mM Phosphate buffer(pH 7.0)에 녹이고, 10 mg/ml 농도의 Fluorene과 120시간 동안 항온 교반기에서 호기적으로 배양하였다(28°C, 160 rpm). 배양 초기 Resting cell 균주 농도는 흡광도 기준으로 4.0에 맞추어 실시하였고, 5종의 중금속을 각각 첨가한 배지를 10 mg/mL의 농도와 100 mg/mL의 농도로 실험하였다. 중금속들이 Fluorene 분해율에 미치는 영향을 관찰하기 위한 대조군으로 Growing cell 실험과 동일하게 중금속을 첨가하지 않은 배양기와 각 중금속이 녹여져 있는 2% 질산용액 만을 첨가해 준 배양기 등을 사용했고, 중금속 감소 수준을 관찰하기 위한 실험의 대조군으로는 동일한 흡광도 수준의 Resting cell을 준비한 후 NaN_3 를 첨가하고 70°C에서 열을 가한 Inactivated cell을 동시에 배양하였다(Nam et al., 2006). 배양 120시간 후에 감소한 Fluorene 및 중금속의 양은 2.4절과 같이 분석하였다.

2.4. 분석방법

본 연구에 사용한 휴폐광산지역 토양 및 배양 후 배지 내 잔류하는 중금속 농도 분석을 위해 염산과 질산을 3:1의 비율로 가하여 시료를 녹이고, 흡수용기에 0.5 M 질산 15 mL를 추가한 후에 흡수용기와 환류냉각관을 반응용기에 연결시켜 상온에서 2시간 이상 반응시켰다. 반응 후 온도를 올려 환류조건에 도달하면 2시간 동안 상태를 유지하고 냉각시킨 후에 0.5 M 질산으로 세척한 후 Inductively Coupled Plasma(ICP) mass spectrometry (Thermo Elemental, Franklin, MA, USA)로 분석하였다. 미생물 배양액 내 잔류하는 Fluorene 농도 분석을 위해 해당한 시료들은 10 mL의 Ethyl acetate로 8회 추출을 하고 그 농축액을 GC/MS(HP6890 MSD, Newark, USA)로 분석하였다. GC/MS 분석조건은 기존 연구와 동일하게 진행하였다(Nam et al., 2011).

3. 결과 및 고찰

3.1. PAHs 오염토양 내 중금속 오염도 분석

Sphingobacterium sp. KM-02를 분리한 폐광산 지역 토양 내에서 검출된 10종의 PAHs 농도는 총량 129.0 ng/g에 Fluorene의 평균 농도는 46.9 ng/g이었다(Nam et al., 2011). 본 연구에서는 동일 지역에서 채취한 토양 시료 내 중금속 농도를 분석하였는데, 그 결과는 Table 1과 같다. 검출된 중금속 중 10 mg/kg 이상의 값을 나타낸 종은 As(121.65 mg/kg), Zn(62.38 mg/kg), Pb(47.02 mg/kg), Cu(40.94 mg/kg), Cd(13.52 mg/kg) 등 5종이었다. 따라서, 본 연구의 목적이 향후 실제 토양복원 시 발생할 수 있는 중금속 영향을 관찰하는 것이므로 상대적으로 높은 농도를 나타낸 이상 5종의 중금속들로 KM-02 균주가 Fluorene 분해 시 발생할 수 있는 중금속 저해 효과를 최소값과 최대값 구간 등을 고려해 각각 10 mg과 100 mg 등의 농도 범위로 관찰하였다. 본 분석 결과와 같이 휴폐광산 지역 내 토양은 As의 오염이 두드러지는 경우가 많으며, 제련 등의 과정에서 발생하는 광미가 유실되고 갱내수 등의 유출로 Zn, Pb, Cu, Cd 등의 중금속으로 오염되어 있는 경우가 발생한다(Jung and Jung, 2006; Kim, 2010).

3.2. KM-02 균주 생장 Fluorene 분해 시 발생하는 중금속 저해효과

기존 연구에서 보고한 바와 같이 *Sphingobacterium* sp. KM-02는 Fluorene을 분해할 수 있는 능력이 있어서 해

Table 1. Heavy metal concentrations in mine-impacted soil containing *Sphingobacterium* sp. KM-02

Heavy metal	Concentration (mg/kg)
As	121.65
Zn	62.38
Pb	47.02
Cu	40.94
Cd	13.52
Mn	9.65
Cr	2.35
Co	1.95

당 물질로 오염된 환경을 정화하는데 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다(Nam et al., 2011). 본 KM-02 균주를 활용하여 복원할 수 있는 지역 중 휴폐광산지역은 중금속 오염이 광범위하게 오염이 되어 있어 본 연구에서 *Sphingobacterium* sp. KM-02 균주를 분리한 폐광산지역 토양 내에 비교적 고농도로 존재하는 5종의 중금속(Table 1)을 이용해 Fluorene 분해 시 나타날 수 있는 영향성을 관찰하고자 하였다. 우선적으로 KM-02 균주가 Fluorene를 탄소원으로 하여 생장을 할 때, 발생할 수 있는 중금속의 영향을 관찰한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 As를 제외한 실험에 사용한 대부분의 중금속들이 KM-02 균주의 생장을 저해하는 것으로 관찰되었다. 중금속 종류별 혹은 첨가해 준 농도 별로 정도의 차이가 있는데, 10 mg/L의 농도로 중금속들을 첨가해 준 경우 저해효과가 강했던 순으로 나타내면 Cu = Cd > Zn > Pb > As의 순으로 나타났다. As는 KM-02 균주 생장에 특별한 영향을 미치지 않는 것으로, Pb의 경우에는 KM-02 균주의 생장이 중금속을 첨가하지 않았거나 중금속 표준물질이 녹아있는 2%의 질산을 첨가해 준 반응기 대비 약 30%의 성장 저해효과를 나타내고 있고, Zn의 경우에는 약 66%의 감소효과를 보여주고 있다. Cu, Cd 등은 비슷한 수준으로 KM-02 균주가 생장을 할 수 없게 완전히 저해하는 영향성을 Fig. 1에서 나타내고 있다. 100 mg/L의 농도로 중금속들을 첨가해 준 경우에도 비슷한 결과를 나타냈는데 (Fig. 2), As의 경우에는 KM-02 균주의 생장에 영향을 미치지 않았고, Pb의 경우에는 약 61%, Zn의 경우에는 Pb와 유사하게 63%의 성장 저해효과를 나타냈다. 10 mg/L의 중금속을 첨가해 준 반응기의 결과와 동일하게 Cu와 Cd는 KM-02 균주의 생장을 확실히 저해하는 효과를 보였다. 다양한 중금속들에 의해 미생물 생장이 저해된다는 여러 연구결과들 중, As가 KM-02 균주와 같은 그람음성균이 오염물질 분해 시의 생장에 크게 저해 요소

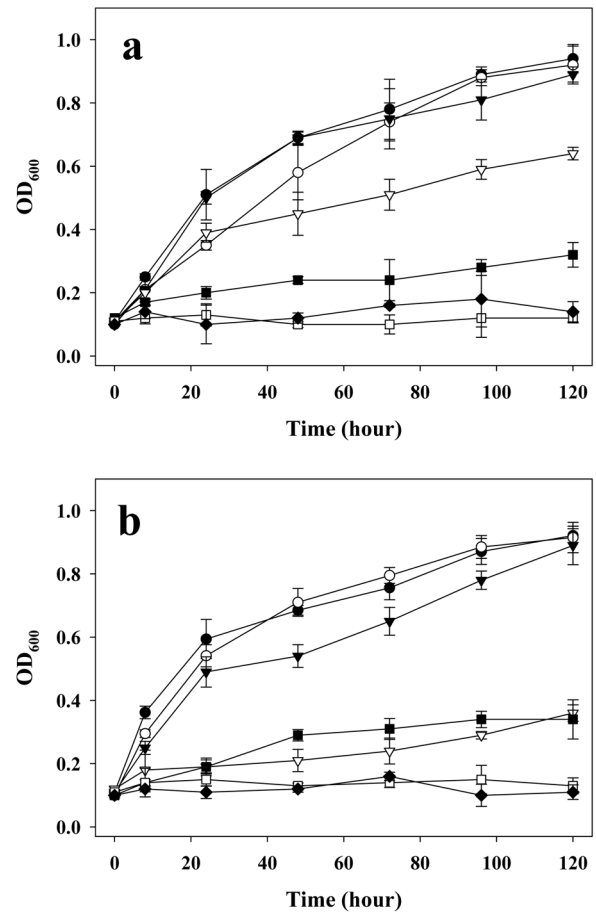


Fig. 1. Effects of 10 mg/L (a) and 100 mg/L (b) heavy metals on the growth of *Sphingobacterium* sp. KM-02. The values represent the mean of 3 independent experiments. Symbols; Without heavy metals (●), with 2% nitric acid solution (○), arsenic (▼), lead (▽), zinc (■), copper (□), and cadmium (◆). OD₆₀₀, Optical density at 600 nm.

로 작용하지 않는다는 연구결과가 있었으며(Hong et al., 2007), 해당 연구에서는 Pb도 큰 저해 활동을 하지 않는 것으로 보고되었으나, 본 연구에서 관찰한 KM-02 균주에 대해서는 농도별로 약 60% 이상의 저해효과가 나타나 미생물 생장에 미치는 중금속의 영향에는 균주의 차이도 적용된다는 점을 시사한다. 이러한 결과들이 나타날 수 있는 배경은 중금속 이온들이 유기오염물질 분해에 있어서 생분해 작용 및 그 속도에 영향을 주는 미생물의 특정 대사활동을 저해하기 때문이다(Amor et al., 2001; Hattori, 1992). 이러한 저해 작용의 수준은 배지 내 존재하는 중금속 농도 및 미생물의 탄소원이나 중금속 이온들에 대한 특이적인 유효성 등과 밀접한 관련이 있으며, 특정 중금속 이온의 특징, 배지 내 조성, 균주의 특이적 활동 등 다양한 요인들이 관여하는 복합적인 과정에 의존한

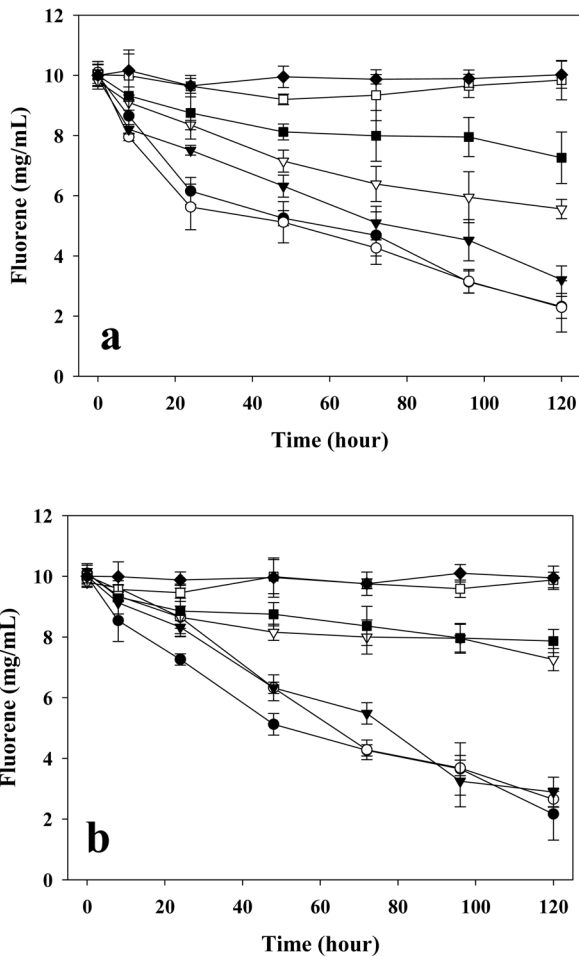


Fig. 2. Effects of 10 mg/L (a) and 100 mg/L (b) heavy metals on the fluorene degradation by *Sphingobacterium* sp. KM-02. The values represent the mean of 3 independent experiments. Symbols; Without heavy metals (●), with 2% nitric acid solution (○), arsenic (▼), lead (▽), zinc (■), copper (□), and cadmium (◆).

다(Tyler, 1974; Chen and Lin, 2001). 또한, 일부 미생물들은 다양한 중금속에 대해 높은 수준의 저해 저항성을 가지고 있는 연구 결과도 보고된 바 있다(Chen and Lin, 2001). As의 경우에는 본 연구에서와 같이 As로 오염된 곳에서 장기간 미생물들이 생존하여 자연적으로 As에 대해 내성을 가지게 된 균주들을 분리하여 특성 분석을 진행한 연구 결과가 보고된 바 있으며(Pepi et al., 2007), 특이한 것은 KM-02 균주의 성장 배지에는 미량금속원소로 $ZnSO_4$ 와 $CuCl_2$ 가 각각 0.1 g/L, 0.01 g/L 함유되어 있는데(Nam et al., 2011), 해당 중금속에 대해 다소 강한 성장 저해 효과를 보이고 있다. 실제로 대부분의 미생물이 활성을 가지기 위해서는 탄소원 뿐 아니라 미량금속 원소가 필요하며, 해당 금속원소들이 존재하는 농도나 형

태에 따라서 필수적인 원소가 되거나 성장을 저해하는 독성요소로 작용하기도 한다. 일반적으로 독성이 잘 알려져 있지 않은 Zn의 경우, 본 연구에서는 10 mg/L와 100 mg/L의 농도로 KM-02 균주 성장실험을 수행했을 때, 각각 66%, 63%의 저해효과를 나타낸 결과를 보여주고 있어 본 연구 결과를 실제 환경 적용 시 등의 응용 연구에 초기 농도 설정 등의 기초자료로 활용될 수 있을 것을 기대한다. 반면에, 향후 적용을 하고자 하는 토양 내에는 As의 농도가 가장 높았는데(Table 1), 본 연구 결과로 미루어보아 KM-02 균주가 해당 오염지역에 긍정적으로 적용될 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

3.3. 중금속에 의한 Fluorene 분해 저해효과

상기 기술한 바와 같이, Fluorene을 탄소원으로 하는 KM-02 균주의 성장에 대한 중금속 저해효과를 살펴보고, 동일하게 Fluorene 분해율에 미치는 중금속의 영향성을 관찰하기 위해 KM-02 균주를 10 mg/mL의 농도로 Fluorene을 첨가한 배지에 반응을 시켜 120시간 동안 Sampling 시간 별로 배지 내 잔류하는 Fluorene 양을 측정하였다. Fig. 2에 나타낸 결과와 같이, 배지 내에 중금속을 10 mg/L 혹은 100 mg/L 첨가해 주었을 때 모두의 Fluorene 감소 경향은 KM-02 균주의 성장 저해 곡선과 동일한 경향성을 나타내었다. As가 10 mg/L의 농도로 배지 내에 존재할 때, 배지 내 남아있는 Fluorene의 양이 배양 시간에 따라 감소하다가 120시간 후에는 초기농도 10 mg/mL에서 평균 3.21 mg/mL로 감소하였는데, 이는 대조군으로 실험한 중금속을 첨가하지 않은 배지(2.32 mg/mL)와 2% 질산용액만을 첨가해 준 배지(2.29 mg/mL) 등과 유사한 수준의 Fluorene 분해율을 나타내어 Fluorene 감소에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다. 그러나, Pb, Zn, Cu, Cd의 경우에는 배양 120시간 후의 Fluorene 농도가 초기 10 mg/mL에서 각각 Pb(5.56 mg/mL), Zn(7.26 mg/mL), Cu(9.84 mg/mL), Cd(10.02 mg/mL) 등의 순서로 Fluorene 분해율이 변화한 것을 볼 수 있다. Cu와 Cd의 경우에는 Fig. 1의 성장 곡선에서 나타낸 바와 같이, 10 mg/L의 중금속 농도 환경에서 Fluorene 분해율도 완전히 저해됨을 나타내고 있다. 10 mg/L의 중금속을 넣어 준 반응기의 결과(Fig. 2a)에서도 100 mg/L의 중금속을 첨가한 반응기(Fig. 2b)에서 As에 의해 저해 효과가 거의 없고, Cu, Cd 등에 의해 KM-02 균주의 활성이 거의 모두 저해되는 결과는 유사하나, Zn(72.5%)에 의한 Fluorene 분해 저해 효과가 Pb(70.2%)보다 다소 높은 것을 볼 수 있는데, 서로 비슷한

수준의 저해효과를 KM-02 균주의 생장곡선에서 나타냈으므로 경향성은 같다고 판단된다. 따라서, KM-02 균주의 Fluorene 분해 시 생장이 저해되는 결과(Fig. 1)와 Fluorene이 감소하는 경향성(Fig. 2) 등을 종합해볼 때, 본 연구에서 사용한 중금속 5종에 대한 KM-02 균주의 Fluorene 분해 시 나타나는 저해효과는 $Cd = Cu \gg Zn > Pb \gg As$ 순으로 나타낼 수 있으며, As는 저해효과가 거의 없으나 Cd, Cu 등은 거의 완전한 미생물의 활성 저해라는 양극단의 결과를 나타내고 있다. 기존에 다양하게 보고되었던 중금속 이온들에 대한 미생물들의 흡착, 제거, 저해 등의 메커니즘들과 비교해보면 As, Cd, Pb의 경우처럼 부합되는 결과를 나타내는 경우도 있으나, Zn, Cu 등의 결과와 같이 KM-02 균주의 특이성을 보여주는 결과도 본 연구에서 나타나고 있다. 이와 같이 실험 결과에서 관찰할 수 있었던 KM-02 균주의 특이성과 기존에 알려진 일반적인 중금속-미생물의 관계 등을 고려하여 향후 응용 연구 및 실제 적용에 활용되어야 할 것이다.

3.4. 중금속의 Resting cell에 의한 Fluorene 분해 저해 효과

PAHs 중의 하나인 Fluorene을 분해하는 KM-02 균주의 중금속에 의한 생장 및 유기물질 분해에 미치는 영향을 Resting cell 실험에서도 동일하게 적용하여 확인하고자 했다. 일반적으로 고농도의 Resting cell을 이용하는 실험에서는 균주의 상태가 오염물질을 탄소원으로 분해하는 속도가 빠르기 때문에 분해산물 측정 혹은 분해율을 효과적으로 상승시키는 데에 이용하고 있다(Nam et al., 2005, 2008). 본 연구에서도 KM-02 균주의 Resting cell을 제작하여 10 mg/mL Fluorene을 첨가한 배지에 각각 10 mg/L 혹은 100 mg/L의 농도로 중금속을 첨가하고 120시간 배양 후에 Growing cell 대비 상승한 Fluorene 분해율을 관찰하였으며, 추가적으로 배지 내 잔류하는 각각의 중금속 농도를 분석하였다. 초기 실험 결과, 중금속을 첨가하지 않고 Fluorene만을 10 mg/mL의 농도로 넣어 준 배지에 Resting cell을 이용하여 120시간 배양했을 때, 배지 내 잔류하는 Fluorene은 GC/MS 분석에서 검출되지 않았다. 이를 기준으로 중금속을 10 mg/L 혹은 100 mg/L 첨가하였을 때, 배지 내 잔류하는 Fluorene분해율을 Fig. 3에 나타내고 있다. Growing cell 실험 결과와 동일하게 As는 KM-02 균주의 Resting cell에 의해 Fluorene 생분해 과정에서 특별한 저해 효과가 나타나지 않았고, Fluorene 제거율의 차이는 Growing cell 실험과 동일하게 $As \gg Pb > Zn \gg Cu > Cd$ 의 순으로 나타났다. 10 mg/L의

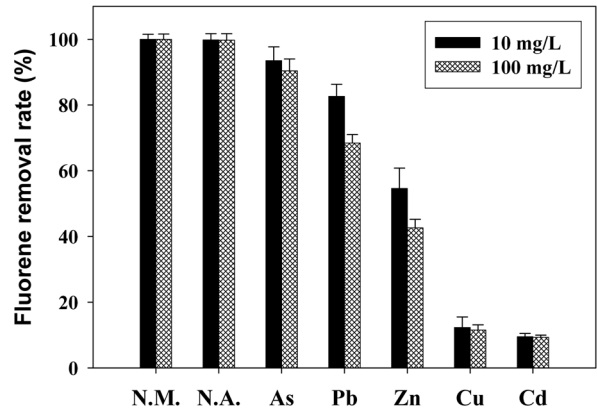


Fig. 3. Effects of 10 and 100 mg/L heavy metals on the degradation of fluorene by resting cells of *Sphingobacterium* sp. KM-02. The relative fluorene degradation rates are shown. Abbreviations; N.M., No heavy metal; N.A., the 2% nitric acid solution.

중금속을 첨가한 경우에는 As(93.5%), Pb(82.6%), Zn (54.6%), Cu(12.3%), Cd(9.5%) 등의 Fluorene 제거율을 나타냈고, 100 mg/L 농도로 각각의 중금속을 넣어 준 경우에는 As(90.4%), Pb(68.4%), Zn(42.6%), Cu(11.5%), Cd(9.3%) 등의 Fluorene 분해율을 보였다. KM-02 균주의 생장이나 Fluorene 분해 시 저해효과를 특별하게 보이지 않았던 As의 경우와 Cu, Cd 같이 분명한 저해 효과를 나타낸 중금속 중들에서는 10 mg/L 혹은 100 mg/L 등 첨가해 준 중금속 농도의 차이에 따라 Fluorene 감소 경향이 유사했으나, Pb와 Zn의 경우처럼 중간 정도의 저해효과를 나타낸 중금속 중들에 대해서는 100 mg/L 경우에서 Fluorene 분해율 차이가 비교적 크게 나타났는데, 이 현상은 고농도 중금속에 의해 KM-02 균주의 활성이 직접적으로 저해된 결과라고 볼 수 있다. 본 실험의 결과 역시 상기 기술한 연구 결과들과 같이 중금속을 첨가해주지 않거나 2% Nitric acid만 첨가한 대조군에서는 특별한 저해 효과가 없었다. 또한, KM-02 균주의 Resting cell을 이용하여 Fluorene 분해 실험을 120시간 진행한 후 배지 내 중금속 농도 변화를 측정하여 KM-02 균주의 Live cell과 Sodium azide, 열 등을 가하여 Inactivated 시킨 Dead cell과의 중금속 잔류량 비교를 수행하였다. Table 2에 나타난 바와 같이, 저해 효과가 없었던 As의 잔류량은 10 mg/L의 중금속 농도에서 84.3%, 100 mg/L의 경우에는 91.4%가 잔류한 것으로 분석되어 As가 KM-02 균주와 Fluorene분해 관계에서 영향이 거의 없었다는 것을 확인할 수 있다. 반면에, 저해 효과가 강했던 Cd의 경우에는 10 mg/L의 중금속 농도에서 11.3%, 100 mg/L의 경우에는 22.1% 잔류했으며, 비슷한 수준의 저해

Table 2. Remained percentages of heavy metal concentrations after incubation of live and inactivated resting cells of strain KM-02 in the presence of 10 or 100 mg/L of heavy metals for 120 hours. Values are the average of 3 independent measurements

Heavy metal	Live resting cells (%)		Inactivated resting cells (%)	
	10 mg/L	100 mg/L	10 mg/L	100 mg/L
As	84.3 ± 2.4	91.4 ± 1.9	18.7 ± 2.1	19.4 ± 3.6
Pb	67.3 ± 3.2	55.6 ± 2.8	18.3 ± 1.6	16.2 ± 2.1
Zn	34.7 ± 5.6	46.4 ± 6.4	17.4 ± 2.6	15.4 ± 2.5
Cu	26.9 ± 4.6	14.6 ± 3.6	11.5 ± 1.9	10.9 ± 0.9
Cd	11.3 ± 1.8	22.1 ± 2.0	9.0 ± 0.8	8.6 ± 1.1

효과를 나타내었던 Cu의 경우에는 잔류율이 각각 26.9%(10 mg/L), 14.6%(100 mg/L)으로 나타나 KM-02 균주에 가장 많은 저해 효과를 보이는 중금속은 Cd와 Cu임을 재확인할 수 있었다. Pb와 Zn의 경우는 KM-02 균주의 성장 저해 및 Fluorene 분해 시 Growing cell에 나타난 저해 효과의 경향과 동일하게 Pb는 67.3%(10 mg/L), 55.6%(100 mg/L), Zn은 34.7%(10 mg/L), 46.4%(100 mg/L) 등의 중간 수준으로 남아있었다. 본 연구 결과로 미루어보아 KM-02 균주 Resting cell에 의한 Fluorene 생분해 작용에 영향을 미치는 중금속은 흡착 및 흡수, 대사활성도 등이 중요한 요인으로 작용하고 있고 Cell 내 침투하여 영향을 미치거나, 흡착에 의해 잔류량이 감소한 것으로 파악된다(Hattori, 1992; Sokhn et al., 2001; Tyler, 1974). Dead cell에 의해 중금속이 흡착하는 경향 등을 파악하기 위해 동시에 실험한 Inactivated cell의 경우는 예상대로 중금속 저해 효과의 경향과는 무관하였고, 직접적인 중금속의 영향 없이 균체에 흡착하여 잔류량이 다소 감소한 것으로 사료된다. 이와 같이 Growing cell과 Resting cell 실험 등의 결과에서 볼 수 있듯이 As에 의해 KM-02 균주의 성장 및 활성화에는 특정한 영향성을 관찰할 수 없었으나, Cd, Cu 등의 경우에는 활성을 완전히 저해하는 결과를 나타냈다. 특히, Resting cell 결과에서 관찰한 것처럼 Cd의 저해 효과가 가장 강한 것을 관찰할 수 있었다(Table 2). Pb와 Zn은 균주의 성장과 오염물질 분해 등 모든 결과에서 중간 수준의 저해효과를 나타내어 균주 성장, Growing cell 및 Resting cell 각각 탄소원으로 공급해 준 오염물질 분해 등의 일련의 과정들이 일치하는 결과를 보여주고 있다.

기존 연구들에서 알려진 바와 같이, Cu는 생물체가 살아가는 데에 있어서 필수적인 미량금속원소에 포함되지만 고농도로 존재할 때에는 오히려 대사 활동을 저해한다고 알려져 있다(Burgess et al., 1999). 예를 들면, PAHs의 하나인 Phenanthrene 분해 시 0.4 mM의 농도의 Cu에는 영향을 받지 않다가 4.4 mM 이상의 Cu 농도에서

Phenanthrene 분해가 저해 받는 연구 결과와(Sokhn et al., 2001), 0.1 mM의 적은 농도의 Cu가 포함된 배지에서 Dibenzofuran 및 *tert-butyl ether* 등의 분해 작용에 저해 작용을 일으키는 경우들이 있다(Hong et al., 2007; Lin et al., 2006). 또 다른 연구에서는 디젤로 오염된 토양을 호기성 박테리아로 복원하는 과정에서 0.5 mM 이상의 Cu 농도 조건에서 미생물의 산소소모속도를 단계적으로 감소시켜 디젤 분해 속도가 현저히 감소하는 결과를 나타낸 바 있다(Riis et al., 2002). 미생물 종류에 다소 차이는 있으나, 전반적으로 1.0 mM 이하의 Cu 농도 범위에서 유기오염물질 분해 시 대사 저해 작용이 많이 관찰되는데, 그 원인으로는 Cu가 세포 내 축적되어 Dioxygenase 등의 오염물질 분해 관련 효소들의 활성을 감소시키는 현상으로 사료된다(Said and Lewis, 1991). 본 연구에서 관찰한 결과도 10 mg/L의 농도에서부터 KM-02 균주가 Cu에 의해 생장이 저해되고 Fluorene 분해율이 현저히 감소하며, Cu 농도가 높아짐에 따라 저해 작용이 강해지는 것을 확인하여 기존에 보고된 연구결과들과 일치하는 경향성을 보여주고 있다. Cd은 이미 미생물의 대사 활동에 미치는 악영향 정도가 Cu, Zn, Pb 등의 중금속 대비 더 강한 것으로 알려져 있다(Baath, 1989). 그 원인으로 Cd이 미생물 내 단백질의 Sulfhydryl 작용기 혹은 Glutathione 등에 붙어서 Cysteine 합성을 방해하거나 직접적으로 DNA 자체의 손상을 준다고 알려져 있다(Helbig et al., 2008; Mitra and Bernstein, 1978). 또한, 박테리아 내 세포막에 침투하여 물질 투과성을 감소시켜 대사 작용에 필수적인 물질들의 세포 외 혹은 세포 내 배출 등을 원활히 하지 못하게 하는 현상이 저해 작용의 기능성으로 제기된 바 있다(Bruins et al., 2000). 이상의 기능성들을 고려할 때, 본 연구 결과에서 관찰한 Cd의 저해효과가 KM-02 균주의 성장 및 Fluorene 분해율에 완전한 수준의 영향성을 보이는 현상이 기존의 결과들과 부합된다. 비슷한 수준의 저해효과를 나타낸 Cu의 경우에는 농도에 따라 저해 작용의 유무 혹은 수준이 결정되지만, Cd의 경우

에는 DNA 손상, 세포막 기능 마비 등의 직접적인 요인에 따라 농도와 관계없이 세포의 활성이 모두 없어지는 결과를 초래하는 것으로 사료된다. Pb 역시 미생물을 포함한 다양한 생물 중에서 독성이 이미 잘 알려져 있으며, 다양한 원인으로 발생하여 환경매체에 널리 퍼져 쉽게 접할 수 있는 오염물질이므로 본 연구에서처럼 KM-02 균주 같은 미생물이 현장에 적용될 경우 그 영향성이 사전에 확인되어야 할 것이다. 본 연구결과에서는 KM-02 균주 액체배지 내 고농도의 Pb를 첨가한 배양기에서 Zn보다도 낮은 중간 이하 수준의 저해 효과만 나타났으나, 약 10^{-54} 정도되는 Pb의 매우 낮은 용해도 때문에 KM-02 균주가 이용 가능한 생물학적 효용성 범주를 초과할 수도 있다는 가능성을 배제해서는 안되겠다. 즉, 일정 농도 이상의 Pb가 용해될 수 있는 환경인 경우, 보다 강한 저해 작용을 나타낼 수 있는 개연성은 충분히 있다. 또 다른 가능한 설명으로는 Pb를 포함한 대부분의 중금속이 가지는 BOD 상의 중금속 자체 산화작용이다. 액체 배지 내 용존산소(Dissolved Oxygen, DO)는 크게 2가지 방법으로 소모되는데, 유기물질이 산화될 때 소모되거나 중금속 이온들과 반응하여 Oxide 형태로 나타나는 과정에서 중금속 이온들의 산화 포텐셜이 KM-02 균주의 Fluorene에 대한 성장 및 분해에 작용했을 수 있다(Mittal and Ratra, 2000). 그러나, 본 연구에서는 KM-02 균주에 대해 영향성을 관찰한 중금속 5종에 대해서 산화포텐셜 영향에 대한 충분한 증거는 얻지 못했다. 일례로, KM-02 균주의 대사 활동에 가장 높은 수준의 저해 효과를 나타낸 Cu와 Cd는 중성 pH 조건에서 매우 작은 산화포텐셜 값을 가지고 있다. 또한, KM-02 균주가 Fluorene을 탄소원으로 이용하면서 성장하는 배양기 혹은 Resting cell에 의해 분해를 시키는 과정이 발생하는 액체배지 상에서 중금속들이 산화된 침전물로 변화할 수 있다고 해도, 이러한 가능성은 강산에 의해 해리된 후 반응한 용액들의 재분석을 통해 배제될 수 있을 것이다.

4. 결 론

Sphingobacterium sp. KM-02 균주가 액체 배지 내에서 PAHs 중의 하나인 Fluorene을 분해하는 과정에서 발생하는 중금속 영향을 As, Zn, Pb, Cu, Cd 등을 이용하여 관찰하였다. KM-02 균주를 분리한 폐광산지역 토양 내에 비교적 고농도로 존재하는 5종의 중금속을 배지에 첨가하여 배양했을 때, 균주의 성장 및 Fluorene 분해를 가장 저해하는 중금속은 Cd, Cu 등이었고, Zn, Pb 등은

중간 수준의 저해 효과를 나타냈으며, As는 KM-02 균주 활성에 특별한 저해효과가 없었다. 이 결과는 Growing cell 혹은 Resting cell 등으로 균주가 소모하는 Fluorene 감소량 및 배지 내 잔류하는 중금속의 양을 측정하였을 때도 동일한 경향성을 나타냈다. 본 연구 결과는 유기물과 중금속 등이 복합적으로 오염되었을 때 관련 영향을 모니터링 하는 데에 있어서 유용한 자료가 될 것이며, 본 연구 결과에서처럼 중금속 종류, 농도와 유기오염물질 분해에 대한 영향성 등을 일부 예측할 수 있는 결과를 제공할 수 있다. 또한 생물복원 시에 영향을 미치는 다양한 파라미터 중의 하나로 실제 복원 사업을 관리 및 모니터링, 유지하는 데에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 한국지질자원연구원 주요사업(KIGAM-3212) 지원으로 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Achten, C. and Hofmann, T., 2009, Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - A hardly recognized source of environmental contamination, *Sci. Total Environ.*, **407**, 2461-2473.

Amor, L., Kennes, C., and Veiga, M.C., 2001, Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals, *Bioresour. Technol.*, **78**, 181-185.

Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J.M., and Beck, A.J., 2006, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in an aged coal-tar-contaminated soil using different in-vessel composting approaches, *J. Hazard. Mater.*, **137**, 1583-1588.

Baath, E., 1989, Effect of heavy metals in soil on microbial processes and population, *Water Air Soil Pollut.*, **47**, 335-379.

Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W., 2000, Microbial resistance to metals in the environment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45**, 198-207.

Burgess, J.E., Quarmby, J., and Stephensen, T., 1999, Role of micronutrients in activated sludge-based biotreatment of industrial effluents, *Biotechnol. Adv.*, **17**, 49-70.

Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J.M., and Solanas, A.M., 1997, New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 819-826.

Chen, S.Y. and Lin, J.G., 2001, Effect of substrate concentration on bioleaching of metal-contaminated sediment, *J. Hazard.*

- Mater. B*, **82**, 77-89.
- Grifoll, M., Selifonov, S.A., and Chapman, P.J., 1994, Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2438-2449.
- Hattori, H., 1992, Influence of heavy metals on soil microbial activities, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 93-100.
- Helbig, K., Grosse, C., and Nies, D.H., 2008, Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **190**, 5439-5454.
- Hong, H.B., Nam, I.H., Kim, Y.M., Chang, Y.S., and Schmidt, S., 2007, Effect of heavy metals on the biodegradation of dibenzofuran in liquid medium, *J. Hazard. Mater.*, **140**, 145-148.
- Jung, M.C. and Jung, M.Y., 2006, Evaluation and management method of environmental contamination from abandoned metal mines in Korea, *J. Korean Soc. Geosystem Eng.*, **43**(5), 383-394.
- Kanally, R.A. and Harayama, S., 2000, Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *J. Bacteriol.*, **182**, 2059-2067.
- Keith, L.H. and Telliard, W.A., 1979, Priority pollutants. I. A perspective view, *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 416-423.
- Kim, J., 2010, Heavy metal concentrations in soils and crops in the Poongwon mine area, *J. Korean Geoenviron. Soc.*, **11**, 5-11.
- Kolomytseva, M.P., Randazzo, D., Baskunov, B.P., Scozzafava, A., Briganti, F., and Golovleva, L.A., 2009, Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469, *Bioresour. Technol.*, **100**, 839-844.
- Lee, P.K., Jo, H.Y., and Youm, S.J., 2004, Geochemical approaches for investigation and assessment of heavy metal contamination in abandoned mine sites, *Econ. Environ. Geol.*, **37**, 35-48.
- Lin, C.W., Chen, S.Y., and Cheng, Y.W., 2006, Effect of metals on biodegradation kinetics for methyl *tert*-butyl ether, *Biochem. Eng. J.*, **32**, 25-32.
- Mitra, R.S. and Bernstein, I.A., 1978, Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd²⁺, *J. Bacteriol.*, **133**, 75-80.
- Mittal, S.K. and Ratra, R.K., 2000, Toxic effect of metal ions on biochemical oxygen demand, *Water Res.*, **34**, 147-152.
- Monna, L., Omori, T., and Kodama, T., 1993, Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* Dbf63, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 285-289.
- Mostert, M.M., Ayoko, G.A., and Kokot, S., 2010, Application of chemometrics to analysis of soil pollutants, *Trends in Anal. Chem.*, **29**, 430-445.
- Nam, I.H., Chon, C.M., and Kim, J.G., 2011, Biodegradation of fluorene and bioremediation study by *Sphingobacterium* sp. KM-02 isolated from PAHs-contaminated soil, *J. Soil Groundwater Env.*, **16**, 74-81.
- Nam, I.H., Hong, H.B., Kim, Y.M., Kim, B.H., Murugesan, K., and Chang, Y.S., 2005, Biological removal of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins from incinerator fly ash by *Sphingomonas wittichii* RW1, *Water Res.*, **39**, 4651-4660.
- Nam, I.H., Kim, Y.M., Murugesan, K., Jeon, J.R., Chang, Y.Y., and Chang, Y.S., 2008, Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst, *J. Hazard. Mater.*, **157**, 114-121.
- Nam, I.H., Kim, Y.M., Schmidt, S., and Chang, Y.S., 2006, Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas wittichii* strain RW1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 112-116.
- Nies, D.H., 1999, Microbial heavy-metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 730-750.
- Pagnout, C., Frache, G., Poupin, P., Maunit, B., Muller, J.F., and Féraud, J.F., 2007, Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. Strain SNP11: expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, *Res. Microbiol.*, **158**, 175-186.
- Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., and Focardi, S.E., 2007, Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization, *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 2299-2308.
- Riis, V., Babel, W., and Pucci, O.H., 2002, Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel, *Chemosphere*, **49**, 559-568.
- Said, W.A. and Lewis, D.L., 1991, Quantitative assessment of the effects of metals on microbial degradation of organic chemicals, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1498-1503.
- Schuler, L., Ni Chadhain, S.M., Jouanneau, Y., Meyer, C., Zylstra, G.L., Hols, P., and Agathos, S.N., 2008, Characterization of a novel angular dioxygenase from fluorene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LB126, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1050-1057.
- Sokhn, J., De Leij, F.A., Hart, T.D., and Lynch, J.M., 2001, Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil microorganisms, *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**, 164-168.
- Thangaraj, K., Kapley, A., and Purohit, H.J., 2008, Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds, *Bioresour. Technol.*, **99**, 2488-2494.
- Tyler, G., 1974, Heavy metal pollution and soil enzymatic activity, *Plant Soil*, **41**, 303-311.
- Wattiau, P., Bastiaens, L., van Herwijnen, R., Daal, L., Parsons,

J.R., Renard, M.-E., Springael, D., and Cornelis, G.R., 2001, Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis, *Res. Microbiol.*, **152**, 861-872.

Wilcke, W., 2007, Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil, *Geoderma*, **141**, 157-166.