

《原著》

전자공여체와 황산염 이용 토착미생물에 의한 침철석(α -FeOOH) 환원 연구

권만재^{1*} · 양중석¹ · 심무준¹ · 이승학¹ · Maxim Boyanov² · Kenneth Kemner² · Edward O'Loughlin²

¹한국과학기술연구원

²알곤국립연구소

Biotic and Abiotic Reduction of Goethite (α -FeOOH) by Subsurface Microorganisms in the Presence of Electron Donor and Sulfate

Man Jae Kwon^{1*} · Jung-Seok Yang¹ · Moo Joon Shim¹ · Seunghak Lee¹
Maxim Boyanov² · Kenneth Kemner² · Edward O'Loughlin²

¹Korea Institute of Science and Technology, Korea

²Argonne National Laboratory, USA

ABSTRACT

To better understand dissimilatory iron and sulfate reduction (DIR and DSR) by subsurface microorganisms, we investigated the effects of sulfate and electron donors on the microbial goethite (α -FeOOH) reduction. Batch systems were created 1) with acetate or glucose (donor), 2) with goethite and sulfate (acceptor), and 3) with aquifer sediment (microbial source). With 0.2 mM sulfate, goethite reduction coupled with acetate oxidation was limited. However, with 10 mM sulfate, 8 mM goethite reduction occurred with complete sulfate reduction and x-ray absorption fine-structure analysis indicated the formation of iron sulfide. This suggests that goethite reduction was due to the sulfide species produced by DSR bacteria rather than direct microbial reaction by DIR bacteria. Both acetate and glucose promoted goethite reduction. The rate of goethite reduction was faster with glucose, while the extent of goethite reduction was higher with acetate. Sulfate reduction (10 mM) occurred only with acetate. The results suggest that glucose-fermenting bacteria rapidly stimulated goethite reduction, but acetate-oxidizing DSR bacteria reduced goethite indirectly by producing sulfides. This study suggests that the availability of specific electron donor and sulfate significantly influence microbial community activities as well as goethite transformation, which should be considered for the bioremediation of contaminated environments.

Key words : Goethite, Acetate, Glucose, Sulfate, Microorganisms

1. 서 론

지중환경에서 미생물 활동에 의한 철과 황의 변환 및 순환은 원소의 생지구화학적 순환뿐만 아니라 오염물질의 저감에 직·간접적으로 관여하는 중요한 요소로 알려져 있다(Madigan et al., 2003; Lovley, 2000). 철은 지하에 존재하는 대표적인 4대 원소 중 하나로써, 생명체에 중요한 역할을 하는 필수 미량원소이다(Lovley, 2000). 특히, 사이토크롬(cytochrome), 페레독신(peredoxin) 등에 함유되어 전자를 전달하는 기능을 수행하는 등 생물체 내 핵심

적인 대사 작용에 관여한다(Lovley, 1993, 2000). 황은 생명체 6대 필수 원소 중 하나이며, 지표수나 지하수 내에 황산염 이온(SO_4^{2-}) 형태로 흔하게 존재한다(Barton and Hamilton, 2007).

이러한 철과 황산염은 지중 미생물의 에너지 생성 관점에서 매우 중요한 성분으로서 산소가 부족한 지중환경 내에서 특정 혐기성 미생물이 3가철(Fe(III))과 황산염을 전자 수용체로 이용하여 에너지를 생성할 수 있다. 즉, 철환원 미생물은 수소나 유기산 등의 탄소원을 전자공여체로 이용하여 Fe(III)을 Fe(II)로 환원시키고, 황산염 환원미생

*Corresponding author : mkwon@kist.re.kr

Received : 2014. 1. 2 Reviewed : 2014. 2. 5 Accepted : 2014. 2. 7

Discussion until : 2014. 4. 30 까지

물의 경우는 황산염을 황화물(S^{2-})이나 황원소(S^0) 등으로 전이시킬 수 있다. 또한, 이러한 혐기성 미생물들은 지중 환경 내 탄소의 순환과 밀접한 관련을 갖는다. 지중 미생물들은 유기산류(예: acetate, lactate, formate, propionate, butyrate) 알코올류(예: ethanol, methanol, 2-propanol), 당류(예: glucose, sucrose) 등을 탄소원 또는 전자공여체로 사용한다고 알려져 있다(Lovley, 1987; Madigan et al., 2003). 지중 미생물에 의한 유기물 전자공여체의 산화와 함께 연계된 철과 황산염의 환원은 탄소, 철, 황의 생지구화학적 순환 관점에서 주목받고 있다.

Geobacter, *Shewanella* 같은 철환원 미생물과 *Desulfovibrio* 같은 황산염 환원 미생물, 그리고 이들 미생물 작용에 의해 생성된 반응성 산물(예: 2차철광물, 황화수소 등) 들은 유기오염물질(예: 화약류, 염소화합물)의 혐기성 분해와(Kwon et al., 2011), 중금속(예: Cr), 방사성핵종(예: U, Tc)등의 고정화를 직간접적으로 촉진시킨다고 보고된 바 있다(Lloyd, 2003; Rui et al., 2013). 따라서, 철환원, 황산염환원 미생물에 의한 생물학적 오염정화 처리 기법에 대한 연구가 최근에 활발하게 진행 중이다. 특히, 원위치 생물학적 오염정화 기술은 효율적이고 경제적인 기술로 여겨지고 있으며, 실제로 우리나라 오염 지중환경에 전자공여체 주입을 통해 미생물 성장을 촉진시킴으로써 우리나라를 고정화한 현장사례가 보고 되었다(Anderson et al., 2003). 철환원 또는 황산염환원 미생물은 지중환경에 매우 흔히 존재하고 있고 계통학적으로도 다양한 미생물종이 존재한다(Barton and Hamilton, 2007; Lovley, 1993). 따라서, 이러한 지중 미생물들을 이용한 방사성 핵종을 포함한 전이금속의 고정화 또는 유기오염물질의 환원성 분해는 오염된 토양환경의 정화에 지속가능한 해답이 될 수 있을 것이다.

지중환경 내에는 다양한 종류의 철광물이 존재하며, 결정성에 따라 혹은 2가 및 3가 철 비율에 따라 구분될 수 있다. 철(수)산화광물은 페리하이드라이트(ferrihydrite)와 같은 비결정질 광물로부터, 결정질의 레피도크로사이트(lepidocrocite), 침철석(goethite), 적철석(hematite), 자철석(magnetite) 등으로 구성되어 있다(Schwertmann and Cornell, 2000). 이들 철(수)산화광물들의 환경 내 다양한 역할에 대한 수많은 연구가 진행되어 왔다. 특히, 침철석(goethite, α -FeOOH)은 자연 상에서 가장 흔히 산출되는 결정질 철(수)산화광물로서, 지표에서 일반적으로 일어나는 대부분의 풍화작용 또는 광화작용으로 생성될 수 있다고 알려져 있다(Gao and Mucci, 2001; Özdemir and Dunlop, 2000; Schwertmann and Cornell, 2000). 또한,

환경 정화분야의 관점에서 침철석은 다른 철(수)산화물들과 마찬가지로 비표면적이 크고 비소와 같은 산화음이온(oxyanions) 형태의 오염물질들과 유해한 중금속들에 대한 흡착력이 우수하여 관심의 대상이 되고 있다(Kim et al., 2009).

전자수용체로서 철은 광물학적 특성에 따라 미생물에 의한 이용성이 달라진다. 예를 들면, *Geobacter*와 같은 철환원 미생물은 비결정질 철수산화광물을 효과적으로 환원시킬 수 있는 반면에 적철석이나 침철석과 같은 결정질의 철광물은 쉽게 환원시키지 못한다고 알려져 있다(Lovley, 2000). 따라서, 결정질 철(수)산화광물의 미생물학적 환원에 대한 심도 있는 연구가 부족하며, 특히 단일 미생물 종을 이용한 결정질 철(수)산화광물 환원에 관한 연구가 소수의 연구자에 의해 이루어졌으나(Roden and Zachara, 1996), 자연계에 존재하는 혼합 미생물 군집에 의한 결정질 철(수)산화광물의 연구는 부족한 실정이다.

철환원 미생물에 의한 철(수)산화광물의 환원반응 못지않게, 반응성 황화물에 의한 철환원 역시 지중환경에서 철환원 속도와 정도를 결정하는 중요한 반응 중 하나이다. 황산염환원 미생물 작용으로 생성된 용존 황화물은 화학적으로 철(수)산화광물을 환원시킬 수 있다고 알려져 있다(dos Santos Afonso and Stumm, 1992; Poulton, 2003; Pyzik and Sommer, 1981). 또한, 열역학적인 관점에서 철과 황산염이 동시에 존재할 경우 철환원 미생물은 황산염 환원 미생물에 비해 우세하다고 알려져 있지만, 실제 현장연구 및 모델링에서는 두 반응이 동시에 나타날 수 있음이 보고 되어왔다(Bethke et al., 2011; Jakobsen and Postma, 1999; Kirk et al., 2004; Koretsky et al., 2003). 따라서, 황산염과 결정질 철(수)산화광물이 동시에 존재할 때 발생할 수 있는 철환원 반응에 관한 연구가 필요하다.

이에 본 연구에서는 자연상태에 존재하는 토착 미생물 군집이 결정질인 침철석과 황산염이 동시에 존재하는 경우, 발생할 수 있는 철과 황산염 환원 정도와 속도를 평가하고자 하였다. 또한, 전자공여체의 종류에 따른 철과 황산염의 미생물학적 환원 정도와 속도를 살펴보고자 하였다. 본 연구를 위해 토착 미생물 군집 원인 대수층 퇴적물을 전자공여체(아세트산 또는 글루코스) 그리고 전자수용체(침철석 그리고 황산염)와 함께 배양하였으며 다양한 지구화학적 분석과 함께 광물변이 분석결과를 통해 탄소, 철 및 황의 복잡한 생지구화학적 반응을 이해하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료

침철석은 기존 문헌을 바탕으로 합성하여 준비하였다(Schwertmann and Cornell, 2000). 간략하게, 1 M $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 용액 100 mL를 5 M KOH 180 mL와 혼합하고, 혼합된 용액은 다시 증류수 (18 Mohm-cm)를 이용해 2 L로 희석한 후 70°C 오븐에서 약 60시간 방치하였다. 합성된 침철석은 잔류염을 제거하기 위해 증류수로 5회 이상 세척하였다. 최종산물은 powder X-ray diffraction (pXRD)를 이용하여 침철석 임을 확인하였다. 토착미생물을 대표하기 위해 선정된 대수층 퇴적물은 미국 콜로라도 라이플 지역에서 채취하였다(Rifle, CO, USA). 대수층 퇴적물은 실험 전까지 4°C 이하에서 냉장 보관하였다. 실험에 필요한 모든 시약은 가능한 고순도 물질을 사용하였으며, 분석용 시약은 표준규격에 맞는 시약을 사용하였다.

2.2. 실험조건

실험에 사용된 모든 배지 및 표준용액은 N_2 (100%) 또는 $\text{N}_2 : \text{CO}_2$ (80% : 20%)를 사용하여 혐기성으로 만들어 주었고, 표준용액 주입과 샘플링을 위해 사용된 멸균 주사기 또한 사용 전에 혐기성 가스로 퍼징(purging)한 후에 사용하였다. 배지용액은 혐기성가스($\text{N}_2 : \text{CO}_2 = 80 : 20$)로 30분간 퍼징하고 기체상 압력수두(head space)를 약 5분간 추가 퍼징한 후 알루미늄 뚜껑과 부틸 고무를 이용하여 밀폐하였다. 배지는 30 mM 중탄산염 완충용액을 이용하여 pH를 중성으로 조절하였다. 실내 배치실험은 160 mL serum 병에 기본배지(basal medium) 110 mL를 주입하고 기타 전자공여체, 전자수용체를 주입하여 최종 부피가 120 mL가 되도록 조절하였다. 전자공여체(또는 탄소원)로서 아세트산 또는 글루코스 20 mM, 전자수용체로서 침철석 50 mM($\sim 4.44 \text{ g L}^{-1}$) 또는 황산염(SO_4^{2-}) 10 또는 0.2 mM을 주입하였다. 본 실험에서는, 대수층 퇴적물을 토착 미생물 균집원으로 사용하여 인위적으로 미생물을 주입하지 않고 대수층 퇴적물에 존재하는 토착 미생물균집의 영향을 파악하고자 하였다. 대수층 퇴적물의 균질성 확보를 위해 혐기성 챔버($\text{N}_2 : \text{H}_2 = 95 : 5$) 안에서 멸균된 약수저를 이용하여 골고루 섞어주었다. 최종 혼합배지는 H_2 를 제거하기 위해 상층부를 $\text{N}_2 : \text{CO}_2$ 기체를 이용하여 약 5분간 퍼징시켜 주었다. 모든 실험은 혐기성 조건에서 ($\text{N}_2 : \text{CO}_2 = 80 : 20$) 실시하였다. 실험에 사용된 배지조성과 조건은 Table 1에 정리하였다. 멸균조건 control 실험을 제외한 모든 실험은 각 조건마다 3개의 중복 실험

Table 1. Summary of experimental conditions

Experimental Conditions	
Temp (°C)	18
Reaction Volume (mL)	120
Anoxic	$\text{N}_2 : \text{CO}_2 = 80 : 20$
Aquifer material (g)	6
Electron donor (mM)	
Acetate	20
Glucose	20
Electron acceptor (mM)	
Goethite	50
Sulfate	10 or 0.2
Bicarbonate buffer (mM)	30
<hr/>	
Medium Composition	/L
Milli QH ₂ O (mL)	800
NaHCO ₃ (g)	2.5
NH ₄ Cl (g)	0.25
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (g)	0.6
KCl (g)	0.1
Vitamin mix (mL)	10
Mineral mix (mL)	10
1 mM Na ₂ SeO ₄ (mL)	1
<hr/>	
Vitamin Mix	mg/L
Biotin	2.0
Folic acid	2.0
Pyridoxine HCl	10.0
Riboflavin	5.0
Thiamine	5.0
Nicotinic acid	5.0
Pantothenic acid	5.0
B-12	0.1
p-aminobenzoic acid	5.0
thioctic acid	5.0
<hr/>	
Mineral Mix	g/L
Nitilotriacetic acid (NTA)	1.5
MgSO ₄	3.0
MnSO ₄ -H ₂ O	0.5
NaCl	1.0
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.1
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.1
ZnCl ₂	0.13
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.01
AlK(SO ₄) ₂ -12H ₂ O	0.01
H ₃ BO ₃	0.01
Na ₂ MoO ₄	0.025
NiCl ₂ -6H ₂ O	0.024
Na ₂ WO ₄ -2H ₂ O	0.025

(triplicate)을 실시하였다. 아세트산, 글루코스, 용존 2가 철, 총 2가철, 황산염 농도, 광물동정 및 존재형태, pH 분석을 위해 혐기성기체로 퍼징한 멸균된 주사기를 사용하여 주기적으로 고체 및 액체상 시료 샘플링을 실시하였다. 총 샘플링 횟수는 부피 감소에 따른 오류를 최소화하기 위해 초기 부피 120 mL 대비 60-70% 이상이 되도록 11번 이내에서 실시하였다.

2.3. 분석방법

주기적으로 샘플링 한 시료는 광물분석 및 화학분석을 위해 아래와 같이 적절한 처리를 하였다. 황산염 및 음이온 농도 분석을 위한 샘플은 25,000 g로 10분간 원심분리 후 얻어진 상등액 0.05 mL를 15% C_3H_7OH (isopropanol) 0.95 mL에 저장하였고, 유기산 분석을 위해 상등액 0.05 mL를 5 mM H_2SO_4 0.95 mL에 보관하였다. 용존 2가철 분석을 위하여 원심분리된 상등액 0.2 mL에 1 N HCl 0.2 mL를 주입하여 저장하였으며, 총 2가철 분석용액은 원심분리되지 않은 원 샘플 0.25 mL에 1 N HCl 0.75 mL를 주입하여 보관하였다. 용존 2가철 및 총 2가철 함량은 Ferrozine assay를 바탕으로 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Carey 100, USA)를 사용하여 562 nm에서 측정하였다(Stookey, 1970). 황산염이온 농도는 Ion Chromatography(Dionex 3000, USA)를 이용하여 측정하였다. 아세트산을 비롯한 유기산은 High Performance Liquid Chromatograph(Agilent 1100, USA)와 UV detector를 이용하여 측정하였다. pH는 Semi Micro pH electrode (Thermo Scientific Inc., USA)를 사용하여 1-18일 간격으로 측정하였다. 싱크로트론 기반 X-ray 분석(Extended X-ray Absorption Fine Structure(EXAFS))은 미국 알곤 국립연구소에서 이루어졌으며 자세한 분석 방법은 기존 문헌에 제시되어 있다(O'Loughlin et al., 2010).

3. 결과 및 토의

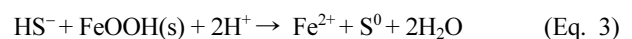
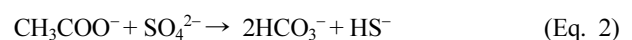
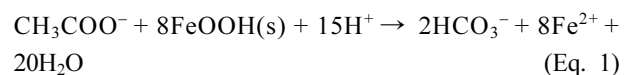
3.1. 황산염이 침철석의 미생물학적 환원에 미치는 영향

황산염농도가 침철석의 미생물학적 환원에 미치는 영향을 이해하기 위해 아세트산을 단독 전자공여체로 주입한 배치 실험을 실시하였다. 고농도 황산염 농도 조건 실험을 위해 10 mM 황산염을 추가로 주입하였고, 저농도 황산염 농도 조건 실험에서는 황산염을 추가로 주입하지 않았으나 배지 자체에 약 0.2 mM 황산염이 포함되어있다.

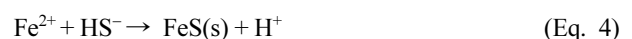
황산염이 10 mM 존재하는 경우, 50 mM 침철석으로부터 약 8 mM의 철이 2가 철 형태로 생성되었으며, 10

mM 황산염도 철환원이 시작됨과 동시에 환원되기 시작하여 53일 이후에 0.3 mM 이하로 감소하였다(Fig. 1b와 1c). pH는 초기 약 8에서 시작하였으나 철과 황산염 환원이 시작되는 시점부터 증가하여 최종적으로 8.5까지 증가하였다(Fig. 1a). 한편, 황산염이 미량 존재하는 경우 10 mM 황산염이 존재하는 경우와 마찬가지로 철과 황산염 환원이 동시에 발생하는 양상을 보였으나, 철환원 정도는 약 1 mM 정도로 매우 낮았다(Fig. 1e와 1f). 또한 시간에 따른 pH 변화도 뚜렷하지 않았다(Fig. 1d).

황산염 농도가 증가함에 따라 침철석 환원이 증가하고 황산염과 침철석이 동시에 환원되는 결과는 침철석 환원이 전적으로 철환원 미생물 작용에 의한 것이 아니라 황산염환원 미생물 작용에 의한 결과임을 지시해 준다. 즉, 침철석 환원이 아세트산을 전자공여체로 이용하는 철환원 미생물에 의한 반응(Eq. 1)이 아니라 아세트산을 이용하는 황산염 환원 미생물 작용(Eq. 2)으로 인한 황산염 환원 산물인 용존 황화물(HS^-)에 의해 간접적으로 발생함을(Eq. 3) 보여 준다. 황화물에 의한 철(수)산화광물의 환원은 기존의 연구를 통해 보고된 바 있으며(Canfield et al., 1992; Neal et al., 2001; Vaughan and Lennie, 1991), 이러한 반응은 수소이온을 소모하는 반응으로서 황산염환원 발생하는 시점에서 광물변이와 함께 pH가 상승하는 경향성과 잘 일치하는 결과이다(Fig. 1A).



아울러, Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) 분석을 통해 아세트산을 주입한 경우 주요 이차 생성광물은 황화철광물인 mackinawite(FeS)임이 밝혀졌다. 이러한 결과는 황산염 환원으로 생성된 황화물과 2가 철의 반응으로 침전되었음을 가능성을 시사해준다(Eq. 4).



아세트산은 *Geobacter*와 같은 철환원 미생물의 성장을 촉진시킨다(Lovley, 1987, 1993)라고 알려져 있기 때문에 본 실험조건에서 철환원 미생물 작용이 미미하게 관찰된 것은 흥미로운 결과이다. 열역학적 관점에서 철환원 미생물은 황산염 환원 미생물에 비해 에너지 생성면에서 유리하기 때문에 철과 황산염이 전자수용체로 동시에 존재할 때 철환원 미생물이 우세한 반응을 보인다고 알려져

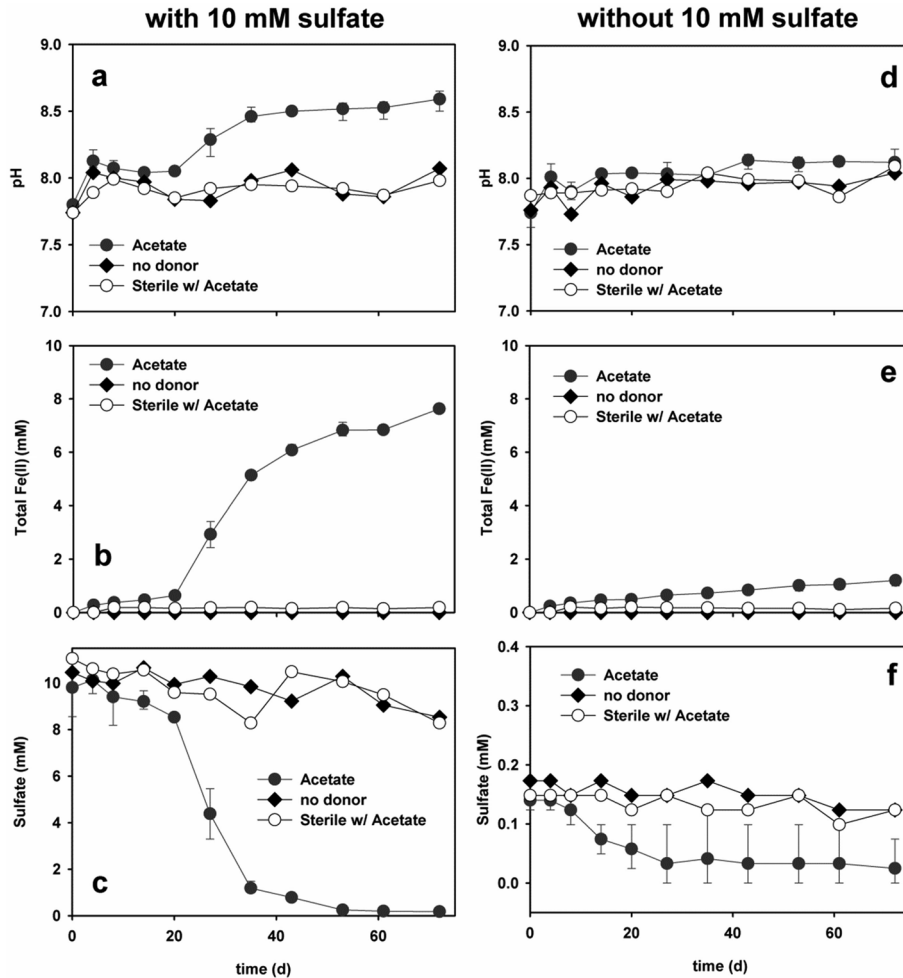


Fig. 1. Effects of sulfate concentrations on pH variation (a or d), total Fe(II) production (b or e), sulfate reduction (c or f) in the presence or absence of 10 mM sulfate in the incubations with goethite. The incubations were started with 20 mM acetate and with or without 10 mM sulfate amendments. Experimental points represent the mean of triplicate analyses and error bars indicate one standard deviation. The no donor- and the sterilized-control experimental points represent a single analysis.

있다(Chapelle, 2001). 따라서, 본 연구에서 아세트산을 이용하는 철환원 미생물 작용이 미미한 것은 초기 퇴적물 내 존재하는 철환원 미생물 종이 매우 적거나 배양액 내에 존재하는 인산염(PO_4^{2-}) 때문일 가능성이 있다. 인산염의 경우 철(수)산화광물의 표면에 흡착되어 철환원을 방해한다고 알려져 있다(Borch et al., 2007; Galvez et al., 1999; O'Loughlin et al., 2010). 또한, 침철석의 경우 결정질 철(수)산화광물로서 미생물에 의한 이용성이 떨어져 전자수용체 역할을 원활히 수행하지 못했을 가능성도 있다. 최근 연구에 따르면, 철광물의 종류 및 존재형태에 따라 오히려 황산염 환원 미생물이 우세하게 성장할 수 있음이 알려져 있다(Bethke et al., 2011).

본 연구는 지중 미생물, 특히 철 또는 황산염 환원 미생물 활동은 단순히 열역학적 특성을 바탕으로, 철환원 미

생물 활동이 우세하다고 예측할 수 없으며, 철광물의 종류와 존재형태, 황산염 농도, 산수음이온(Oxyanions)의 종류 및 농도, pH 등 다양한 요소에 의해 바뀔 수 있음을 시사해 준다.

3.2. 전자공여체가 침철석의 미생물학적 환원에 미치는 영향

전자공여체 종류에 따른 철(50 mM), 황산염(10 mM) 환원 속도와 정도를 파악하기 위해 아세트산과 글루코스를 각각 주입하고 시간에 따른 용존 그리고 총 2가 철 함량, 황산염농도, pH를 측정하였다(Fig. 2). 용존 2가 철은 수용액 상에 이온으로 존재하는 2가 철이며, 총 2가철은 0.5 N HCl로 추출 가능한 2가 철로서 용존 2가철, 퇴적물 입자에 흡착된 2가 철, 그리고 광물 구조에 포함된 2가 철을 포함한다. 아세트산은 철 또는 황산염 환원

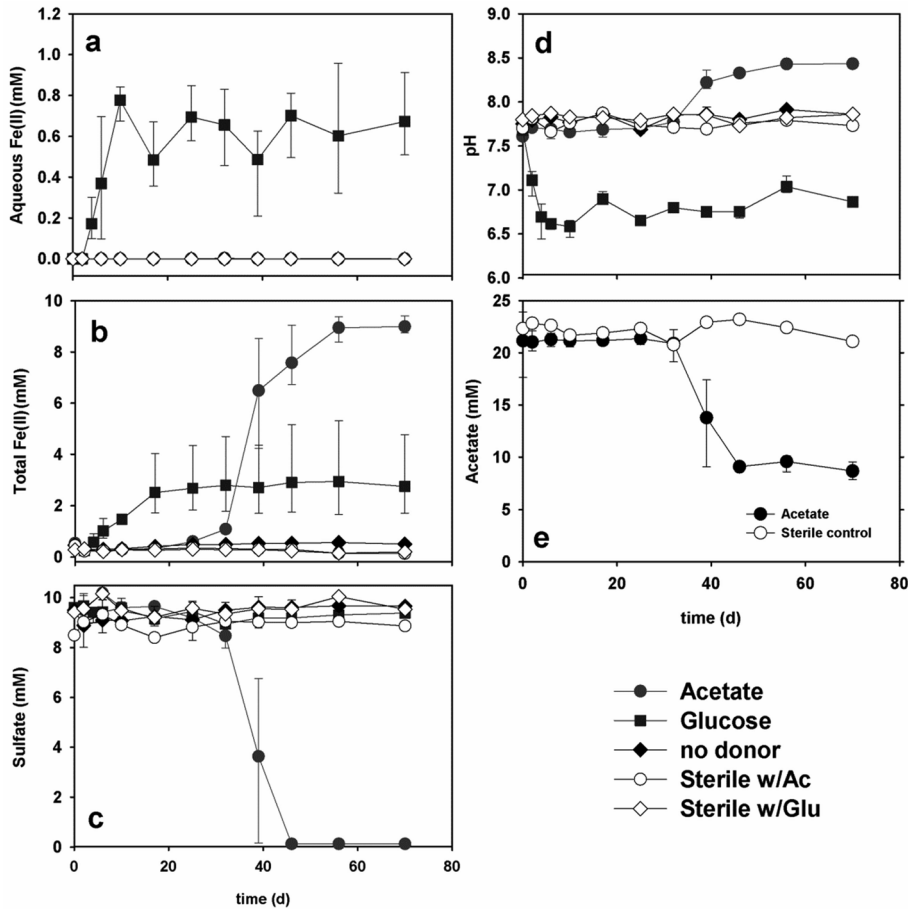


Fig. 2. Effects of electron donor on (a) aqueous Fe(II) production, (b) total Fe(II) production, (c) sulfate reduction, (d) pH variation, and (e) acetate oxidation. The incubations were started with 20 mM acetate or glucose and 10 mM sulfate amendments. Experimental points represent the mean of triplicate analyses and error bars indicate one standard deviation. The no donor- and the sterilized-control experimental points represent a single analysis.

미생물에 의해 완전산화가 가능한 유기산이고, 글루코스는 발효반응을 통해 지중미생물에게 다양한 탄소원을 제공할 수 있기 때문에 본 실험에서 전자공여체로 사용하였다. 본 실험은 실험상의 오차를 줄이기 위해 앞선 3.1절의 실험과는 별도로 추가로 새롭게 구성하여 실시하였으며, 전체적인 경향성은 매우 유사하게 나타났다. 평균하였거나 전자공여체를 주입하지 않은 배치에서는 철, 황산염, pH, 및 유기산 등의 농도 변화가 관찰되지 않았다.

아세트산을 주입한 경우 pH가 32시간 이후 급격히 증가하여 8.5에서 안정화 되었다. 반대로 글루코스를 주입한 경우는 실험시작 이후 4일 이내에 pH 7 이하로 급격히 감소하였고 이후 약 pH 6.6-7.0 사이를 유지하였다(Fig. 2d). 한편, 침철석 환원으로부터 기인하는 용존 2가철은 글루코스를 주입한 경우에서만 약 0.6 mM 정도 축적 되었으나, 다른 조건에서는 발견되지 않았다(Fig. 2a). 용존 2가철의 축적은 글루코스의 발효로 발생한 CO₂ 및 유기산

생성으로 인한 pH의 감소에 따른 영향으로 판단된다. 실제로 글루코스를 주입한 경우 상대적으로 기체상 압력(head pressure)이 높았으며, 다양한 종류의 아세트산, 젖산, 개미산 등 다양한 유기산이 생성됨을 정성적으로 확인하였다(data not shown). 아세트산과 글루코스 모두 침철석의 환원으로 인한 총 2가철 생성 정도 및 속도에 영향을 주었으나, 글루코스를 주입한 경우 초기 철환원 속도는 빨랐고 17시간 이후 약 3 mM로 유지되었다(Fig. 2b). 아세트산을 주입한 경우 총 2가 철은 초기에는 낮게 유지되다가 32시간 이후에 총 2가 함량이 급격히 증가하였고 56시간 이후부터 약 9 mM로 유지되었다. 초기 글루코스에 의한 철환원은 글루코스의 발효반응으로 생성된 잉여 전자에 의한 영향(electron sink) 때문으로 판단된다. 기존 문헌에 따르면 *Clostridium*과 같은 발효미생물은 유기탄소를 발효시키면서 발생한 잉여전자에 의해 철환원이 될 수 있음을 보고하였다(Francis and Dodge, 1988;

Burkhardt et al., 2011). 그러나, 발효반응을 통한 철환원 정도는 아세트산 산화와 철환원을 통해 에너지를 만들고 성장하는 이화철환원 미생물(dissimilatory iron reducing bacteria)에 비해 낮다.

한편, 황산염 농도의 경우는 아세트산을 주입한 경우에서만 감소되었다(Fig. 2c). 아세트산을 이용하는 황산염 환원 미생물은 지중환경에 흔히 존재하는 것으로 알려져 있다(Barton and Hamilton, 2007). 글루코스의 경우는 발효 미생물의 성장을 촉진시키는 전자공여체이기 때문에, 황산염 환원 미생물에 의해 직접적으로 사용되지 않았기 때문으로 판단된다.

아세트산(20 mM)을 주입한 경우 아세트산은 32일 간 변화가 없었으나, 철 및 황산염 환원이 시작되는 시기와 일치하여 감소하기 시작하였다(Fig. 2e). 이러한 결과는 아세트산의 산화와 동시에 철 그리고 황산염의 환원은 토착 미생물 군집 중에서 아세트산을 탄소원과 전자공여체로 사용하고, 철 또는 황산염을 전자수용체로 사용하는 미생물의 성장을 시사하고 있다. 아세트산을 사용하는 철환원 미생물의 성장에 따른 어느 정도의 철환원을 기대할 수 있으나, 앞선 3.1절에서 보여지듯이 황산염 환원으로 발생된 황화물에 의한 무생물학적 철환원이 더 우세한 것으로 판단된다. 또한, 약 20 mM 아세트산 중에서 약 10 mM만 산화되어 사용되고 황산염 환원(10 mM)이 완료된 시점에서 더 이상의 아세트산 산화가 없었다. 그리고, 아세트산 감소와 황산염 감소 물질분이 앞의 반응식 2와 잘 일치하는 것으로 판단할 때, 아세트산을 산화시키는 황산염 환원 미생물 반응에 의한 결과를 지시한다.

본 연구 결과 두 종류의 전자공여체 모두 침철석 환원을 촉진시켰으나, 글루코스가 아세트산에 비하여 철환원 속도는 빨랐지만, 총 2가 철의 축적 농도는 아세트산을 주입한 경우가 높았다(Fig. 2b). 그러나, 이러한 침철석 환원은 매우 다른 기작으로 발생되었다. 즉, 글루코스의 경우는 발효로 인해 발생한 잉여전자에 의한 침철석 환원으로 초기 환원속도는 빠르나 철환원 정도는 상대적으로 낮았다. 아세트산의 경우는 침철석의 환원에 직접적으로 기여한 것이 아닌 황산염 환원 미생물의 성장으로 인한 황화물의 발생, 그리고 황화물에 의한 침철석 환원이 이루어진 것으로 판단된다.

본 연구 결과는 전자공여체의 종류에 따라 특정 미생물 군집의 성장을 촉진시킬 수 있으며, 이들의 대사작용으로 인해 발생하는 지구화학적, 광물학적 변화가 매우 다양하게 진행할 수 있음을 시사해 준다. 또한, 비결정질의 철(수)산화광물을 쉽게 환원시키는 철환원 미생물(예:

Geobacter, *Shewanella*) 등이 부재하는 경우에도 발효미생물과 황산염환원 미생물에 의해 침철석과 같은 결정질의 철(수)산화광물이 환원될 수 있음을 보여준다.

3.3. 환경적 의의

토양·지하수 또는 지중미생물에 의한 철 또는 황산염 환원은 매우 흔한 생지구화학적 현상으로써 지중 탄소순환과 더불어 철과 황의 순환을 통해 생태계의 균형을 조절하는 중요한 반응 중의 하나이다. 철 또는 황의 생지구화학적 순환과정은 매우 다양하고 복잡하나 체계적으로 연결되어 있다. 특히, 철(수)산화광물의 종류, 유기 탄소원의 종류, 황산염의 농도, 산수음이온에 따라 1) 철과 황산염 환원을 동시에, 또는 2) 황산염 환원을 통한 황화물에 의한 철환원을 일으켜 철환원의 정도와 속도가 달라질 수 있음을 시사해 준다.

환경정화의 관점에서는 철환원 및 황산염 환원 미생물이 유기오염물질을 직접적으로 환원성 분해를 진행시킬 수도 있으며, 크롬과 같은 중금속, 니켈과 같은 방사성 핵종의 환원을 통해 고정화시킬 수 있다. 또한, 철환원과 황산염환원으로 발생될 수 있는 반응성 이차광물(예: Green rust, magnetite, ferrous sulfide)은 유무기 오염물질로 오염된 환경을 정화하는데 이용할 수 있을 것이다. 실제 환경정화설계를 위해서는 정확한 반응산물의 예측과 함께 반응성을 조사해야 하며, 이를 위해서는 기존환경에 존재하는 철 및 황산염의 농도를 측정하고, 철과 황산염 환원 미생물의 존재유무, 그리고 이들 미생물의 전자공여체에 의한 활성 유무를 미리 조사해야 할 것으로 판단된다.

4. 결 론

에너지 열역학 측면에서 혐기성 미생물 반응에 의한 철 환원은 황산염환원 반응에 비해 우세하다고 알려져 있다. 그러나, 본 연구의 실험 조건하에서 지중 미생물에 의한 황산염 환원반응이 침철석 환원 반응에 비해 우세하였다. 이는 1) 침철석의 경우 결정질이기에 때문에 미생물에 의해 전자공여체로 이용되기 어렵기 때문이거나 2) 원 대수층 물질 내 철환원 미생물이 부재, 또는 3) 인산염의 침철석 표면 흡착에 따른 철환원 방해하기 때문으로 판단된다.

전자공여체 종류에 따른 지중미생물작용에 미치는 영향에 대한 실험 결과, 아세트산은 황산염환원을 통해 발생한 황화물에 의해 간접적으로 철환원을 유발시켰으며, 글루코스 주입은 단지 발효반응으로 생성된 잉여전자에 의한 철환원만을 보여주었다. 이러한 결과는 전자공여체의

종류에 따라 철환원 및 황산염환원 정도 및 속도가 달라질 수 있음을 의미한다.

본 연구는 황산염 농도와 전자공여체의 종류가 지중 미생물의 대사작용에 매우 중요한 영향을 미칠 수 있음을 보여주는 결과로서, 지중 환경에서 생지구화학적 반응을 통한 탄소, 철과 황의 순환은 매우 복잡하나 유기적으로 연결되어 이루어지고 있음을 준다. 또한 침철석과 같은 결정질 철(수)산화광물도 황산염환원반응에 의해 간접적으로 환원이 가능함을 보여주었다. 본 연구결과는 생물학적 철 또는 황산염환원 반응을 응용한 오염 하폐수 및 토양·지하수 정화기술 적용을 위한 기초정보로 활용 가능할 것이다.

사 사

본 저자들은 퇴적물 샘플제공과 XAFS분석에 도움을 준 Kenneth Williams, Philip Long, Bhoopesh Mishra에 감사드립니다. This research is part of the Subsurface Science Scientific Focus Area at Argonne National Laboratory supported by the Subsurface Biogeochemical Research Program, Office of Biological and Environmental Research, Office of Science, U.S. Department of Energy (DOE), under contract DE-AC02-06CH11357. MRCAT/EnviroCAT operations are supported by DOE and the MRCAT/EnviroCAT member institutions. 본 연구는 환경부 “토양지하수오염방지기술개발사업(2013000540005, 2013000540002)”으로 지원받은 과제입니다.

참 고 문 헌

Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C.T., Long, P.E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S., Metzler, D.R., Peacock, A., White, D.C., Lowe, M., and Lovley, D.R., 2003, Stimulating the in situ activity of *geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5884-5891.

Barton, L. and Hamilton, W.A., 2007, Sulphate-reducing bacteria environmental and engineered systems, Cambridge University Press, Cambridge; New York.

Bethke, C.M., Sanford, R.A., Kirk, M.F., Jin, Q., and Flynn, T.M., 2011, The thermodynamic ladder in geomicrobiology, *Am. J. Sci.*, **311**, 183-210.

Borch, T., Masue, Y., Kukkadapu, R.K., and Fendorf, S., 2007,

Phosphate imposed limitations on biological reduction and alteration of ferrihydrite, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 166-172.

Burkhardt, E.-M., Bischoff, S., Akob, D.M., Büchel, G., and Küsel, K., 2011, Heavy metal tolerance of Fe(III)-reducing microbial communities in contaminated creek bank soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3132-3136.

Canfield, D.E., Raiswell, R., and Bottrell, S.H., 1992, The reactivity of sedimentary iron minerals toward sulfide, *Am. J. Sci.*, **292**, 659-683.

Chappelle, F.H., 2001, Ground-Water Microbiology and Geochemistry, John Wiley & Sons, New York, NY.

dos Santos Afonso, M., and Stumm, W., 1992, Reductive dissolution of iron(III) (hydr)oxides by hydrogen sulfide, *Langmuir*, **8**, 1671-1675.

Francis, A.J. and Dodge, C.J., 1988, Anaerobic microbial dissolution of transition and heavy metal oxides, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1009-1014.

Galvez, N., Barron, V., and Torrent, J., 1999, Effect of phosphate on the crystallization of hematite, goethite, and lepidocrocite from ferrihydrite, *Clay Clay Miner.*, **47**, 304-311.

Gao, Y. and Mucci, A., 2001, Acid base reactions, phosphate and arsenate complexation, and their competitive adsorption at the surface of goethite in 0.7 M NaCl solution, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **65**, 2361-2378.

Jakobsen, R. and Postma, D., 1999, Redox zoning, rates of sulfate reduction and interactions with Fe-reduction and methanogenesis in a shallow sandy aquifer, rømø, denmark, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **63**, 137-151.

Kim, S., Lee, W.C., Jeong, H., and Cho, H.G., 2009, Adsorption of arsenic on goethite, *J. Miner. Soc. Korea*, **22**, 177-189.

Kirk, M.F., Holm, T.R., Park, J., Jin, Q., Sanford, R.A., Fouke, B.W., and Bethke, C.M., 2004, Bacterial sulfate reduction limits natural arsenic contamination in groundwater, *Geology*, **32**, 953-956.

Koretsky, C.M., Moore, C.M., Lowe, K.L., Meile, C., DiChristina, T.J., and Van Cappellen, P., 2003, Seasonal oscillation of microbial iron and sulfate reduction in saltmarsh sediments (Sapelo Island, GA, USA), *Biogeochemistry*, **64**, 179-203.

Kwon, M.J., O'Loughlin, E.J., Antonopoulos, D.A., and Finneran, K.T., 2011, Geochemical and microbiological processes contributing to the transformation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in contaminated aquifer material, *Chemosphere*, **84**, 1223-1230.

Lloyd, J.R., 2003, Microbial reduction of metals and radionuclides, *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 411-425.

Lovley, D.R., 1987, Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review, *Geomicrobiol. J.*, **5**, 375-399.

- Lovley, D.R., 1993, Dissimilatory metal reduction, *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 263-290.
- Lovley, D.R., 2000, Environmental microbe-metal interactions, ASM Press, Washington, D.C.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J., 2003, Brock biology of microorganisms, 10th ed. Prentice Hall/Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.
- Neal, A.L., Techarnjanaruk, S., Dohnalkova, A., McCready, D., Peyton, B.M., and Geesey, G.G., 2001, Iron sulfides and sulfur species produced at hematite surfaces in the presence of sulfate-reducing bacteria, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **65**, 223-235.
- O'Loughlin, E.J., Gorski, C.A., Scherer, M.M., Boyanov, M.I., and Kemner, K.M., 2010, Effects of oxyanions, natural organic matter, and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) and the formation of secondary mineralization products, *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 4570-4576.
- Özdemir, Ö. and Dunlop, D.J., 2000, Intermediate magnetite formation during dehydration of goethite, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **177**, 59-67.
- Poulton, S.W., 2003, Sulfide oxidation and iron dissolution kinetics during the reaction of dissolved sulfide with ferrihydrite, *Chem. Geol.*, **202**, 79-94.
- Pyzik, A.J. and Sommer, S.E., 1981, Sedimentary iron monosulfides: Kinetics and mechanism of formation, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**, 687-698.
- Roden, E.E. and Zachara, J.M., 1996, Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth, *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1618-1628.
- Rui, X., Kwon, M.J., O'Loughlin, E.J., Dunham-Cheatham, S., Fein, J.B., Bunker, B., Kemner, K.M., and Boyanov, M.I., 2013, Bioreduction of hydrogen uranyl phosphate: Mechanisms and U(IV) products, *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 5668-5678.
- Schwertmann, U. and Cornell, R.M., 2000, Iron oxides in the laboratory : Preparation and characterization, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.].
- Stookey, L.L., 1970, Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron, *Anal. Chem.*, **42**, 779-781.
- Vaughan, D.J. and Lennie, A.R., 1991 The iron sulphide minerals: Their chemistry and role in nature, *Sci. Progr.*, **75**, 371-388.