

## 폐광산지역 토양 식생복원 과정 내 토양특성 및 미생물 군집 변화 분석

박민정<sup>1,2</sup> · 윤민호<sup>2\*</sup> · 남인현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국지질자원연구원 지구환경연구본부 환경지질연구실

<sup>2</sup>충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

### Analysis of Soil Properties and Microbial Communities for Mine Soil Vegetation

Min-Jeong Park<sup>1,2</sup> · Min-Ho Yoon<sup>2\*</sup> · In-Hyun Nam<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM)

<sup>2</sup>Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University

#### ABSTRACT

Mine soil contamination by high levels of metal ions that prevents the successful vegetation poses a serious problem. In the study presented here, we used the microbial biocatalyst of urease producing bacterium *Sporosarcina pasteurii* or plant extract based BioNeutro-GEM (BNG) agent. The ability of the biocatalysts to bioremediate contaminated soil from abandoned mine was examined by solid-state composting vegetation under field conditions. Treatment of mine soil with the 2 biocatalysts for 5 months resulted in pH increase and electric conductivity reduction compared to untreated control. Further analyses revealed that the microbial catalysts also promoted the root and shoot growth to the untreated control during the vegetation treatments. After the *Sporosarcina pasteurii* or plant extract based BNG treatment, the microbial community change was monitored by culture-independent pyrosequencing. These results demonstrate that the microbial biocatalysts could potentially be used in the soil bioremediation from mine-impacted area.

**Key words :** Mine soil vegetation, Urease, Plant extract, CaCO<sub>3</sub> precipitation, Microbial community analysis

#### 1. 서 론

국내 휴·폐광산에는 광미와 광재, 갱도 등의 방치로 폐석 내 함유된 황철석 등 유화광물의 화학적 풍화를 통해 황산이나 중금속 원소들이 방출되어 주변 하천수와 지하수의 오염, 토양산성화 및 중금속오염 등을 야기하고, 사면파괴와 산사태 등이 발생하여 주변 도로 및 주거지역의 파손을 일으키기도 하며, 광물찌꺼기 적치장 사면에서 광물찌꺼기가 강우에 의해 유실되거나 바람에 의해 비산하면서 인근지역까지 퍼져 2차적인 대기과 수질의 오염도 발생시키고 있어 인근지역의 농토, 임야 및 생활환경이 오염될 가능성이 상존하고 있다(Choi et al., 2009; Hong et al., 2010; Min et al., 2005). 이렇게 과거에 폐광된 광산폐기물 적치 사면은 현재까지도 자연적으로 식생회복

이 되지 못하여 미관을 저해하는 요소로 남아있어 광산지역의 발전을 저해하는 요인으로 작용하므로 이를 방지하기 위해 광산지역에 사면을 생육기반을 조성한 후 자생식물로 녹화하여 복구하는 사면 보호공법의 개발이 필요하다(Choi et al., 2009; Jung et al., 2012).

Urease (요소분해효소)는 요소(Urea)를 가수분해시키는 활성을 가져 주변의 pH를 상승시켜 광물 이온인 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>가 CaCO<sub>3</sub>로 이온결합을 하도록 유도하는 것으로 매우 잘 알려진 효소이다(Mobley and Hausinger, 1989; Roh et al., 2015). Urease 활성은 다양한 미생물과 일부 식물에서 발견되어 지고, 특히 잣두콩(Jack bean)에 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Riddles et al., 1991). 선행 연구결과들로 이렇게 Urease 활성을 가지는 미생물 및 식물을 이용하여 토양 압축강도 증진 및 균열보수를 위한

\*Corresponding author : nih@kigam.re.kr, mhyoon@cnu.ac.kr

Received : 2015. 5. 12 Reviewed : 2015. 5. 20 Accepted : 2015. 5. 26

Discussion until : 2015. 8. 31

연구, 오염토양 내 중금속 안정화 등의 연구가 보고된 바 있다(Lee and park, 2012; Park et al., 2011; Roh et al., 2015). 상대적으로 느슨한 상태의 지반이 Urease 효소반응에 의해 광물질을 생산하여 토양 입자간 공극을 메우고, 투수계수 저하로 인한 오염물질의 차단과 같은 효과를 기대할 수도 있다는 것이다. 또한, 보다 구체적인 중금속 종을 지정하여 환경적인 응용으로 중금속 오염토양 내 특정 중금속을 CdCO<sub>3</sub> 혹은 PbCO<sub>3</sub> 등으로 침전시켜 해당 중금속을 안정화 시킨 연구 결과들도 동일한 효소 작용에 의해 연구된 바 있다(Kang et al., 2015; Li et al., 2010).

토양미생물은 유기 혹은 무기물질의 순환과 토양구조의 유지에 매우 중요한 역할을 한다(Conrad, 1996). 미생물 군집 다양성의 변화와 활성의 변화는 토양생태계에 특이적인 영향을 미치므로 이에 대한 모니터링이 필요하다(Kennedy and Smith, 1995). 일반적으로 세균의 분포와 다양성을 조사하는 방법으로 다양한 분자생물학적 방법이 이용되고 있으며, 미생물 군집을 분석한 대부분의 연구에서는 Community-Level Physical Profile(CLPPs), Fatty Acid Methyl Ester(FAME), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)와 Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis(T-RFLP)와 같은 non-sequencing based method를 사용하였다(Hur et al., 2011). 그러나, 이러한 fingerprinting methods는 미생물군집의 작은 변화와 구성을 감지하는데 한계가 있다. 16S rRNA 유전자를 기초로 한 분석은 미생물 다양성과 분포에 대한 다양한 정보를 제공하며, 배양이 불가능하거나 특정 미생물을 확인할 경우 해당 미생물이 가지고 있는 functional gene을 이용하여 연구한다. 그러므로, Next-Generation Sequencing(NGS) 기법을 이용한 조사가 미생물 군집의 보다 다양하고 정확한 평가를 위해 사용된다. NGS 기법은 미생물그룹이 환경에 낮은 밀도로 분포하고 있더라도 DNA 분석으로 간단하게 확인할 수 있는 장점이 있으나(McLellan et al., 2010; Gobet et al., 2012), 현재까지 중금속오염토양 내 미생물 군집분석을 NGS 방법으로 분석을 수행한 연구는 중금속 오염토양의 만연성에 비해 적용 초기 단계에 있다고 할 수 있다(Leloup et al., 2006; Hur et al., 2011).

따라서, 본 연구에서는 광산폐기물 적치사면에 Urease 활성을 가지는 식물추출물과 Urease 생성 박테리아를 각각 투입하여 토양 내 중금속을 안정화시키는 과정 중에서 발생한 미생물 군집의 변화와 토양특성의 변화를 모니터링하고, 이와 같은 처리방법이 식생에 미치는 영향성을 관찰하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 현장시험

본 연구는 부산에 위치한 폐광산 지역 내 광산폐기물 적치사면에서 진행하였다. 총 3가지 처리구를 진행했으며, 대조군 무처리(No treatment)와 실험군 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리로 구분하였다. 실험군 내 미생물처리 군은 Urease 생성 박테리아로 가장 잘 알려진 *Sporosarcina pasteurii*(KCTC3558T) 균주를 분양받아 활용하였고(Bang et al., 2001; De Muynck et al., 2010), 식물추출물 처리군은 작두콩을 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0)에 1:10 비율로 섞어 불린 후 믹서기로 곱게 갈아 추출한 추출물질을 동결건조하여 준비하고 요소(Urea), 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)과 중량비 1:2:1로 혼합하여 생화학적 제제 BNG를 제작하여 실험에 이용하였다(Roh et al., 2015). 현장시험 시 모든 처리구는 동시에 사면정리 및 구획분할을 하고 상기와 같은 방법으로 토양 처리를 진행한 후에 식생시험을 진행하였다. 식생확인에 이용된 씨앗은 알팔파(낭아초) 150 g, 한지형 잔디 3종(페러니얼, 톨레스큐, 크레핑 등)을 각 100 g 처리하였다. 1차 seed spray와 복합비료를 처리한 후, 코아넷트를 설치하고 grass fiber 처리 및 2차 seed spray를 진행하였다. 그 후, 녹화용 접착제를 살포하였고 짚거적을 덮고 관수하였다. 토양처리 및 식생시험을 완료한 후, 토양공극수 수질 및 식생성장 상태를 5개월간 2주의 간격으로 모니터링하였다. 식생 상태의 모니터링은 전반적인 식생 정도와, 뿌리상태, 줄기길이를 직접 측정하였다.

### 2.2. 토양분석 및 공극수 수질 모니터링

현장시험 후, 토양 환경의 변화를 관찰하기 위해 대조군 무처리(No treatment)와 실험군 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리로 구분하여 실험한 토양 시료를 각각 채취하여 기본적인 특성을 분석하였다. 토양의 pH, EC(Electric Conductivity) 측정을 위해 토양 4g과 증류수 40 mL을 50 mL 원심분리 튜브에 담고, 6시간 진탕한 후 실온에서 원심분리 하였다(2,000 rpm, 3 min., 25°C). 원심분리 후 상등액을 0.45 μm membrane filter로 여과하고, pH와 EC를 각각 pH/COND METER(D-54, Horiba, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한, 동일한 상등액을 분취하여 ICP-AES(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, ULTIMA2, Horiba, Japan)를 이용해 수용성 양이온 농도를 측정하고, IC(Ion Chromatography, 881 compact IC pro, Metrohm, Switzerland)를

이용해 수용성 음이온 농도를 측정하였다. 식물가용성 AI의 농도 분석은 건조한 토양 5g과 1.0 M KCl 용액 25 mL를 원심분리 튜브에서 6시간 진탕시킨 후 원심분리 하였다(2,500 rpm, 5 min., 25°C). 원심분리 후 상등액을 0.45 µm membrane filter 로 여과하여 반응액을 얻고, 이 반응액을 분광광도계(DR 5000 spectrophotometer, HACH)를 사용하여 기기 내 저장된 10 Aluminum alumin program을 사용하여 522 nm에서 발색 방법으로 식물가용성 AI의 농도를 측정하였다. 또한, 토양 내 중금속 농도 분석은 왕수추출법을 이용하여 함량을 측정하였다. 원심분리 튜브에 건조한 토양 3g과 35% HCl, 70% HNO<sub>3</sub>를 3:1로 섞은 용액 12 mL를 가한 후에 반응액을 70°C에서 2시간 중탕하였다. 반응 종료 후, 증류수 18 mL를 첨가하여 희석한 후 원심분리 하고(2,000 rpm, 5 min., 25°C) 0.45 µm membrane filter로 여과하여 ICP-AES 분석을 수행하였다.

토양 공극수 모니터링은 현장시험 후 5개월 간에 걸쳐 2주 간격으로 토양 공극수를 채취하여 pH와 EC를 측정하였고, 양이온과 음이온 농도를 분석하였다. 토양 공극수 채취를 위해 현장시험 시 토양 공극수 용액자동화 채취시스템을 적용하였는데, 본 시스템의 설치는 대조군 무처리(No treatment)와 실험군 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리구에 각각 20 cm 깊이에 설치하였다. 공극수가 자동으로 채취되는 컵의 재질은 광산지역의 특성을 고려하여 중금속 분석에 최적화된 Borosilicate glass 재질을 사용하였고, 튜빙은 모두 Teflon 재질을 사용하였다. 공극이 크고 보수 특성이 강우사상에 따라 차이가 큰 광산지역 토양의 물리적 특성을 고려하여 자동으로 음압을 조절할 수 있는 자동 토양용액채취 펌프를 동시에 설치하여 모니터링을 수행하였다. 이렇게 5개월 간 2주 간격으로 채취한 공극수 시료들은 상기한 방법대로 각 처리구 별로 pH와 EC를 측정하였다.

### 2.3. 세균군집분석

상기한 바와 같이 대조군과 실험군으로 나누어 시험을 완료한 후, 표토로부터 5 cm 깊이의 토양 시료를 멸균된 채취도구로 각 3곳에서 Random sampling을 진행하고, 이를 섞은 후 DNA sequencing을 Chunlab, Inc.(Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, Roche/454 GS FLX Titanium platform을 사용하여 NGS 분석하였다. 토양으로부터의 DNA 추출은 FastDNA<sup>®</sup> SPIN kit for Soil(MP BIO)을 사용하였으며, PCR primer로는 27F universal primer를 이용한 Fusion primer(B16S-F; 5'-CCTATCCCCTGTGT

GCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 518R universal primer를 이용한 Fusion primer(B16-7-4; 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGAGCTG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')를 사용하였다. PCR 반응 조건은 Initial denaturation 단계로 95°C에서 5분간 진행 후, 총 30 cycle 동안 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 반응하였으며, Final extension 단계로 72°C에서 7분간 반응하였다. 각 샘플의 sequencing reads는 각각의 barcode에 의해 분류하였고, sequencing reads의 양쪽에 존재하는 barcode, linker, PCR primer를 제거하였다. 이때 Primer 및 linker 서열을 제외한 부위가 300 base pair 이상인 sequencing reads만 분석에 이용하였다. 개별 reads의 primer 서열부분과 실험에 사용된 primer 서열을 degeneracy를 고려하여 pairwise alignment를 수행하였고, mismatch가 생긴 read는 분석에서 제외하였다. Hmmer(<http://hmmer.janelia.org/>)로 구성된 16S rRNA profile을 이용하여 non-16S rRNA reads를 제거하였고, 이를 blast search를 통해 다시 non-16S rRNA read를 제거했다. chimera reads를 제거하기 위하여 개별 read를 반으로 나눈 후 2개의 짧은 read를 각각 blast하여 다른 균이 동정되면 분석에서 제외했다. ExTaxon database를 이용하여 개별 read를 유사성 기반으로 동정하였다. 그리고 각 reads를 CLcommunity program을 사용하여 통계분석을 진행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 현장처리 및 식생분석

폐광산지역 토양 적치사면을 대상으로 중금속 오염 토양 복원을 위한 Bioremediation 처리를 진행한 후, 식생 복원시험을 실시하였다. 식생시험 5개월 후, 1개의 대조군과 2개의 실험군의 식생을 확인한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대조군 무처리(No treatment, a) 및 미생물처리군(*S. pasteurii*, b)과 비교하였을 때, 식물추출물 처리군(BNG, c) 내 식생 상태가 가장 양호한 것으로 관찰되었다. 또한, 식생이 상대적으로 양호하지 않은 대조군 무처리(No treatment, a) 및 미생물처리군(*S. pasteurii*, b)은 부분적으로 식생이 이루어지지 않은 것으로 보아 토양 pH 및 EC 등의 화학적 특성 및 중금속 등의 영향으로 식생 초기부터 뿌리 내림이 원활하지 못했던 것으로 사료된다. 미생물처리군(*S. pasteurii*, b)의 경우에는 실험실 내 연구 결과에서는 Urease의 높은 활성으로 CaCO<sub>3</sub> 생성 효율이 높은 것으로 나타났으나(Bang et al., 2001;

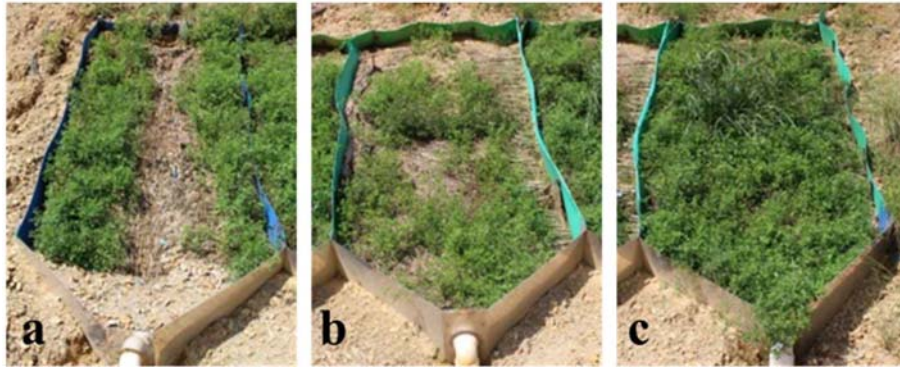


Fig. 1. View of the mine soil vegetative remediation after 5 months. a, No treatment; b, *Sporosarcina pasteurii* treatment; c, BNG treatment.

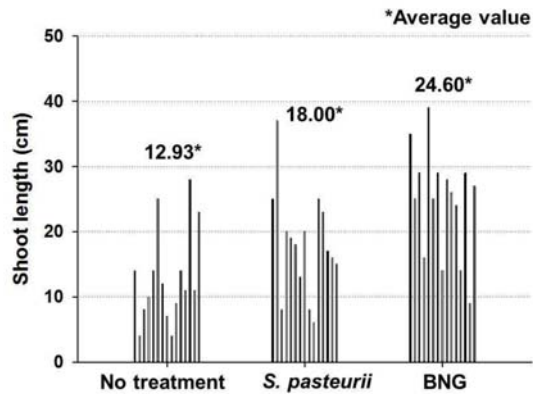
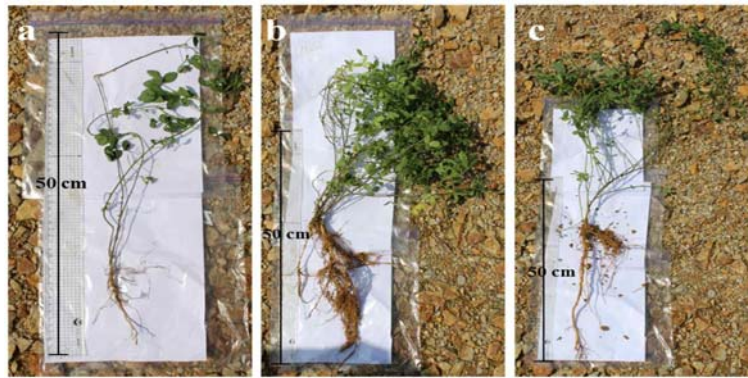


Fig. 2. View of the plants grown in the mine soil vegetative remediation (top) and shoot length measurement results (bottom) with different treatments after 5 months. a, No treatment; b, *Sporosarcina pasteurii* treatment; c, BNG treatment.

DeJong et al., 2006; De Muyne et al., 2010; Le Metayer-Levrel et al., 1999), 실제 현장에서는 온도 등의 기후조건, 강수량 등의 수분, 토양 영양분 및 오염물질 등의 주변 환경이 적절치 않아 박테리아 자체의 생존에 영향을 미쳤을 것으로 유추된다. 현장의 환경을 *S. pasteurii* 등의 박테리아 생존에 유리하게 조성을 하면 본 실험에서 얻은 결과 보다는 높은 효율의 Urease 활성으로 보다 최적화된 식생을 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 식생들의 뿌리 상태 및 식물의 전체 길이를 15개의 Random sampling을 하여 평균값 및 특징적인 상태를 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 이 결과에서도 무처리(No treatment, a) 대조군 보다 미생물처리군(*S. pasteurii*, b) 과 식물추출물 처리군(BNG, c)에서 자란 식물들의 뿌리가 보다 길고 잔뿌리도 많은 것을 관찰할 수 있었으며, 식물 자체의 길이 및 잎의 개수도 증가했음을 확인할 수 있었다(Fig. 2 top). 이는 대조군 대비 각 실험군에서의

식물 생장이 보다 건강한 상태로 유지되었음을 암시한다. 줄기길이 또한 Random sampling을 통해 측정 및 비교한 후 결과를 나타내었다(Fig. 2 bottom). 평균값 기준으로 무처리(No treatment) 대조군에서는 12.93 cm, 미생물처리군(*S. pasteurii*)에서는 18.00 cm, 식물추출물 처리군(BNG)은 24.60 cm의 값을 각각 나타내었고, 이 결과 값은 기타 식물성장 상태를 관찰한 결과들과 그 경향성이 일치하였다. 미생물처리군(*S. pasteurii*, b)의 경우, 식물이 고르게 분포하면서 자라지는 않았으나 식물 총 길이 및 뿌리의 형태를 관찰하였을 때 무처리(No treatment, a) 대조군보다는 건강한 상태를 나타내는 것으로 보아 식생이 가능한 환경이 조성되었음을 유추할 수 있다. 따라서, 상기한 바와 같이 미생물처리군(*S. pasteurii*, b)의 경우에는 실제 토양환경 조건의 영향으로 부분적으로 식생에 악영향이 있었을 것으로 예상되며, 식생이 이루어진 곳은 무처리(No treatment, a) 대조군과 비교했을 때에는 식생이 가능한 환경이 조성되었음을 알 수 있다. 식물추출물 처리군(BNG, c)의 경우는 식물의 분포도, 총 길이, 뿌리상태, 줄기길이와 같은 전반적인 측면에서 식생에 유리한 환경이 조성되어 가장 원활한 식물 생장이 이루어진 것을 관찰할 수 있었다.

3.2. 토양 특성분석 및 공극수 분석

폐광산지역 토양에 대한 복원 및 식생시험 후, 토양 환경의 변화를 관찰하기 위해 대조군 무처리(No treatment)와 실험군 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리로 구분하여 기본적인 특성 분석 및 공극수 자동 채취 시스템에 의해 채취한 시료들로 pH와 EC를 분석하였다. 토양분석 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 실험군 처리구들 내 토양 pH가 대조군 무처리(No treatment)보다 높아진 것과 EC 값이 감소한 결과를 관찰할 수 있었다. EC 값이 감소한 것은 pH가 증가하면서 중금속이온의 용출이 감소한 영향으로 사료된다. 또한, 식물 가용성 AI의 농도를 측정된 결과에서는 대조군 무처리(No treatment)에서 나타낸 87.1 mg/kg과 비교하여 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리의 실험군에서 각각

0.7 mg/kg, 4.9 mg/kg으로 현저하게 감소한 값을 나타내었다. 일반적으로 pH 5.0 이하의 토양에서는 식물가용성 AI의 양이 증가하여 식물의 생장에 많은 영향을 끼친다 (Bamhisel and Bertsch, 1982). 본 연구결과에서도 이와 같은 영향에 의해 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리로 토양의 pH가 증가함으로써 용출되는 AI의 농도가 감소하여 식생에 유리한 환경을 조성하는데 도움을 주었을 것으로 유추된다. 또한, 수용성 음이온 분석 결과에서도 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리의 실험군에서 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 이온의 증가와 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 이온의 감소가 관찰되어 식물이 가용할 수 있는 P가 증가하고 S가 감소하는 식생에 보다 유리한 환경으로 변화되었음을 생각해 볼 수 있다. 본 연구에서는 광산지역에서 강우사상에 따른 토양용액을 채취하였고, 공극이 크고 보수 특성이 강우사상에 따라 차이가 큰 광미의 물리적 특성을 고려하여 자동으로 음압을 조절할 수 있는 자동 토양용액채취 시스템을 설치하였고, 토양 전체의 전기전도도(EC)를 측정할 수 있는 센서를 토양 용액 채취기와 동일한 심도에 설치하여 토양용액의 분석값과 비교치로 사용하였다. 현장 식생시험 후, 토양 공극수를 2 주의 간격으로 채취하여 분석한 pH와 EC의 변화는 Fig. 3과 같다. 현장시험 후 초기부터 공극수 pH는 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리의 실험군에서 모두 상승한 결과를 관찰할 수 있었고, 전체적인 모니터링 기간 중 무처리(No treatment) 대조군에 비해 전반적으로 실험군에서 높은 pH를 확인하였다. 이 결과는 모니터링 기간 중 꾸준히 감소한 EC 측정 결과와 같은 경향성을 나타내어 Bioremediation 처리 후 토양 및 공극수 pH 증가 및 EC 감소로 처리한 토양 환경이 식생에 보다 유리한 환경으로 변화하였음을 나타낸다.

3.3. 세균군집분석

본 연구에서 실시한 폐광산지역 토양 식생복원 후 토양 내 Bacterial DNA sequences는 무처리(No treatment) 4105 reads, 미생물처리(*S. pasteurii*) 3092 reads, 식물추출물(BNG) 처리의 실험군에서 각각

Table 1. Chemical properties and metal concentrations after mine soil vegetative bioremediation

	pH	EC†	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	F <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Plant available AI
	mS/m		mg/kg										
No treatment	4.37	13.88	128.2	58.8	10.3	5.2	24.75	492.1	6.56	7.40	-	-	87.1
<i>S. pasteurii</i> treatment	5.88	5.84	35.3	52.1	16.3	10.5	8.11	126.2	8.28	26.35	4.40	54.17	0.7
BNG treatment	5.57	6.28	36.5	59.2	13.1	8.2	10.00	147.6	7.30	19.93	4.25	47.88	4.9

†EC: Electric Conductivity



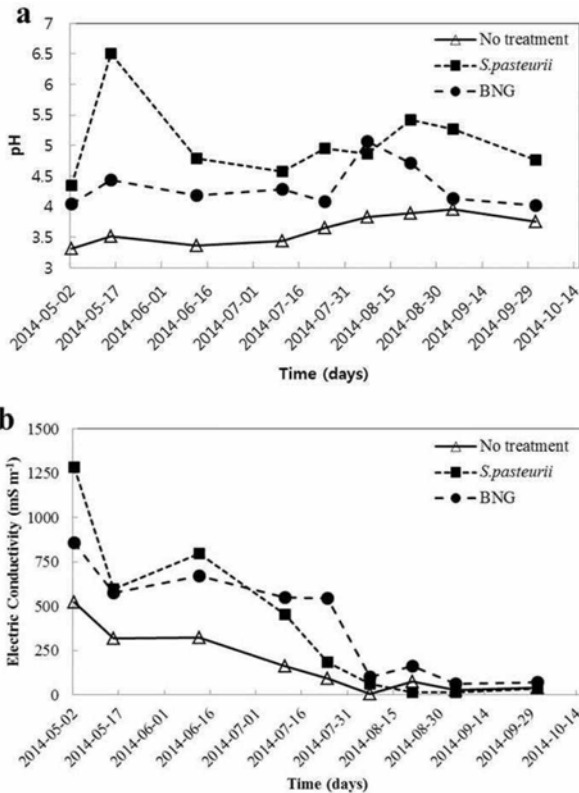


Fig. 3. Change in pH (a) and Electric Conductivity (b) values of the interstitial water collected from the different mine soil vegetative remediation for 5 months.

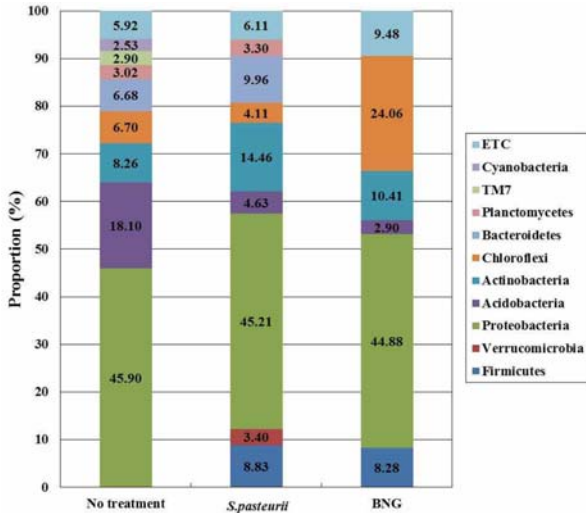


Fig. 4. Relative abundance of bacterial phyla containing >2% of total sequence tags in different treatment samples from the mine soil vegetative remediation.

출물(BNG) 처리 2997 reads를 얻어 실험을 진행하였으며, 전반적인 구성을 전체 문(phylum) 중 2% 이상인 문(phylum) 수준으로 분석하여 나타내면 Fig. 4와 같다. 결

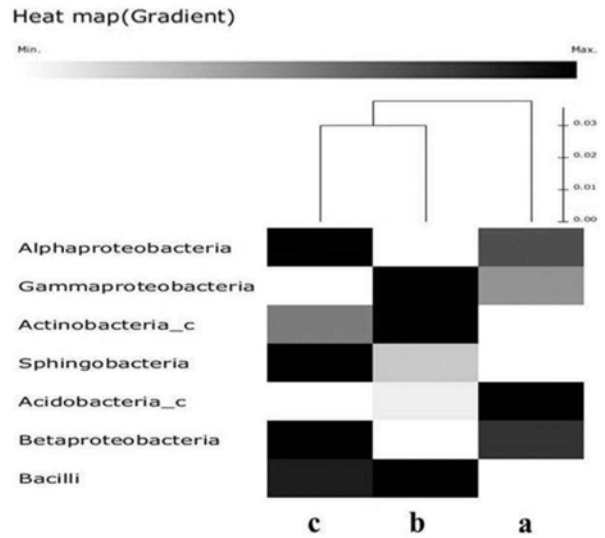
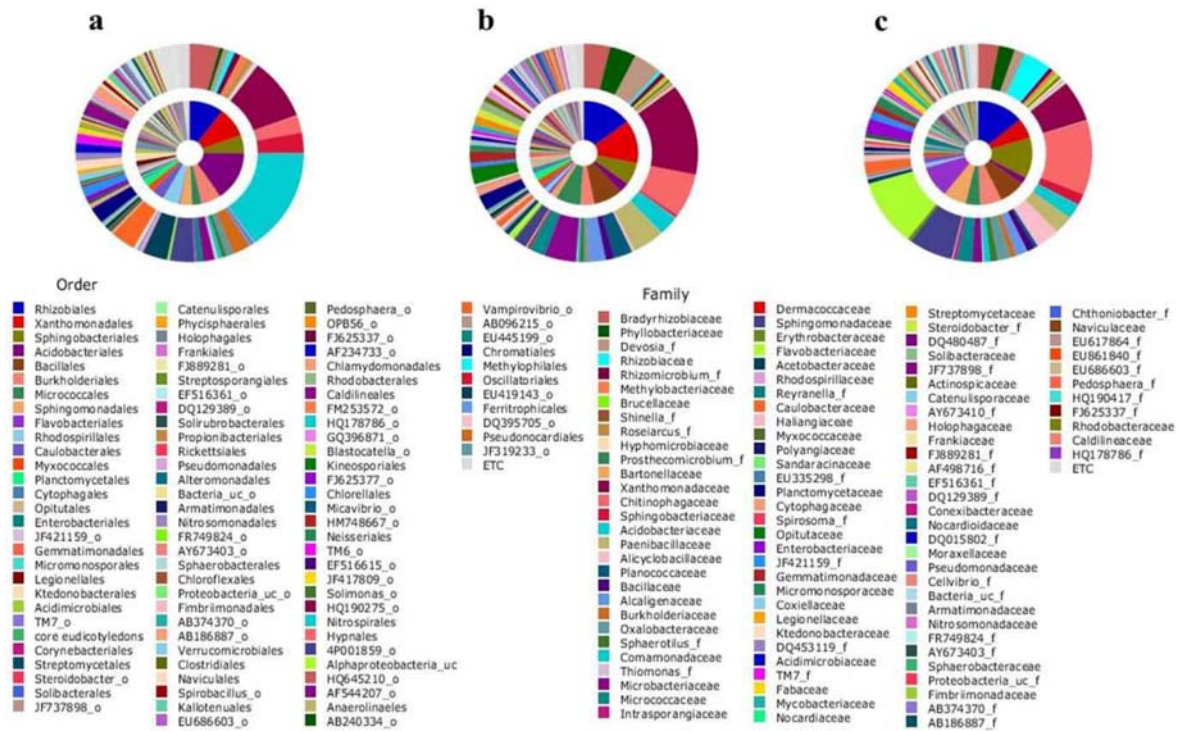


Fig. 5. Relative abundances of dominant bacterial taxa in mine soils with different treatments. The heat map shows the relative abundances of the 7 most abundant taxa and similarities with a gradient legend and scale provided. a, No treatment; b, *Sporosarcina pasteurii* treatment; c, BNG treatment.

과에 나타난 바와 같이 모든 분석에서 약 10종류의 문(phylum)의 다양성이 확인되었다. 미생물 군집구성의 가장 뚜렷한 차이는 무처리(No treatment) 대조군 내 *Acidobacteria*(18%)가 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리의 실험군에서 각각 5%, 3%까지 감소한 점이다. *Acidobacteria*는 기존 연구에서 *A. capsulatum*으로 산성광산배수 침전물로부터 분리되었으며 금속 중의 오염 토양 지표종으로 알려져있다(Ward et al., 2009; Hur et al., 2011). 따라서, 본 연구 결과에서 확인한 해당 미생물의 군집 감소는 미생물처리(*S. pasteurii*) 및 식물추출물(BNG) 처리에 의해 *Acidobacteria*가 생존하기에 보다 불리한 조건이 되었음을 나타내고, 이는 오염 토양의 정화가 이미 진행 된 것임을 유추할 수 있다. 또한, 시료 별 미생물 군집의 차이를 비교하기 위해 Gradient방법으로 5% 이상 존재하는 군집을 강(Class) 수준에서 Heat map을 작성한 결과를 Fig. 5에 나타내었는데, 이 결과에서도 *Acidobacteria*가 무처리(No treatment) 대조군에 비해 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리의 실험군에서 적은 비율로 존재함을 확인할 수 있다. 또한, 식생복원 시험 후 *Bacilli*, *Sphingobacteria*, *Actinobacteria*의 비율이 증가한 것으로 보아 무처리(No treatment) 대조군에 비해 미생물처리(*S. pasteurii*), 식물추출물(BNG) 처리 간의 미생물 군집 분포가 더욱 가까운 것을 알 수 있다. 이러한 관계는 Fig. 5에 나타난 시료들 간의



**Fig. 6.** Double pie charts of microbial communities of different treatment samples from the mine soil vegetative remediation. The inner pie shows the compositions of orders, and the outer pie represents the compositions of families. a, No treatment; b, *Sporosarcina pasteurii* treatment; c, BNG treatment.

유사도로 확인할 수 있었다. 따라서, 처리 방법에 따라 효율 및 미생물의 다양성 부분에서 다소 차이는 있지만 궁극적으로는 대조군 토양에 비해 2종류의 실험군들이 모두 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 각 처리구의 다른 분류 체계에서의 미생물군집 구성을 이중 원형 차트를 이용하여 분석하였다(Fig. 6). 안쪽 원은 목(Order) 수준을 나타내며, 바깥쪽 원은 과(Family) 수준의 미생물 군집을 나타낸다. 무처리(No treatment) 대조군의 경우 목(Order) 수준에서 *Acidobacteriales*(15.42%), *Rhizobiales*(10.16%), *Xanthomonadales*(9.31%)의 분포가 높고, 미생물처리(*S. pasteurii*) 실험군은 *Rhizobiales* (14.68%), *Xanthomonadales* (13.52%)이 대표적이었으며, 식물추출물(BNG) 실험군의 경우에는 *Rhizobiales*(13.98%), *Spingobacteriales*(12.75%)이 우점하였다. 대조군에서 2번째로 높은 비율을 차지했던 *Rhizobiales*은 그 군집의 분포가 늘어나면서 미생물처리(*S. pasteurii*) 실험군, 식물추출물(BNG) 실험군에서 그 군집 분포가 늘어나면서 각각 4.52%, 3.82% 증가한 수치를 나타내었고, 대조군에서 가장 높은 비율을 보인 *Acidobacteriales*는 2가지 실험군 모두에서 두드러지게 감소한 군집을 나타낸 것이 큰 차이로 분석되었다. 과(Family) 수준에서는 무처리(No treatment) 대조군의 높은

분포의 *Acidobacteriaceae*(15.35%), *Xanthomonadaceae* (9.23%)이 미생물처리(*S. pasteurii*) 처리 후 *Xanthomonadaceae*(13.52%), *Chitinophagaceae*(6.53%)으로, 식물추출물(BNG) 실험군의 경우에는 *Chitinophagaceae*(11.01%), *Flavobacteriaceae*(9.84%)의 순으로 군집이 구성되었다. 과(Family) 수준에서도 대조군에서 가장 높은 군집을 보인 *Acidobacteriaceae*는 실험군에서 큰폭으로 군집이 감소하였고, 실험군 내에서도 우점하는 군집의 종류가 미생물처리(*S. pasteurii*) 실험군의 경우는 *Xanthomonadaceae*, 식물추출물(BNG) 실험군의 경우는 *Chitinophagaceae*로 각각 다르게 나타나는 차이점을 보였다.

상기 결과들로부터 폐광산지역 토양을 Urease 생성 박테리아 혹은 식물추출액 기반의 BNG 제제로 처리한 후 식생복원을 실시하였을 때, 토양 자체 특성 및 토양 내 미생물 군집이 식생을 원활하게 하는 방향으로 변모하였음을 알 수 있었다. 이는 박테리아 혹은 BNG 제제가 Urease의 반응으로 산성화된 토양을 복구시키고, 토양에 오염되어 있는 다양한 종류의 중금속 종들을 안정화시켜 (Roh et al., 2015) 이로부터 발생하는 침출수 등으로부터 식물의 뿌리 성장을 저해하는 요소들을 차단하였음을 예상할 수 있다. 추후 연구에서는 이렇게 분석된 미생물 군

집들의 차이를 보다 면밀하게 관찰하여 각 미생물의 종류들이 어떠한 영향성을 가지는 지에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다. 이상의 결과들은 중금속으로 오염된 폐광산 지역 토양을 식생 복원하는 과정 중에 발생하는 미생물 군집의 변화를 분석하고, 이를 생물학적인 복원의 기초 데이터로 활용할 수 있을 것으로 기대한다. 향후 연구에서도 다양한 오염 지역 토양 내 시료들로부터 다양한 방법들을 통한 미생물 군집 분석 연구가 필요할 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 폐광산지역 토양에 Urease 생성 박테리아 *Sporosarcina pasteurii*와 Urease를 함유한 콩과류 식물추출물로 이루어진 제제 BNG를 처리한 후, 토양 내 기초적인 화학적 특성 및 미생물 군집 변화 등을 관찰하였다. 미생물처리(*S. pasteurii*) 및 식물추출물(BNG) 실험군은 모두 무처리(No treatment) 대조군과 비교했을 때 식생복원 후 자란 식물의 뿌리형태 및 길이가 보다 양호했으며, pH는 무처리 대조군 4.37에서 미생물처리(*S. pasteurii*) 및 식물추출물(BNG) 실험군에서 각각 5.88, 5.57으로 상승했음을 관찰하였다. 식생시험 후 토양 내 미생물 군집의 변화는 금속오염토양의 지표종으로 알려져 있는 *Acidobacteria*의 비율이 문(phylum) 수준에서 무처리 대조군 18%에서 미생물처리(*S. pasteurii*) 및 식물추출물(BNG) 실험군에서 각각 5%, 3%로 감소하였음을 확인하였고, 강(Class) 수준에서는 각 실험군 내에 *Bacilli*, *Sphingobacteria*, *Actinobacteria*이 높은 비율로 변화하였다. 목(Order) 수준에서는 식생복원 시험 후, *Acidobacteriales*(15.42%)가 주로 존재하던 군집이 *Rhizobiales*(14.68%)으로 변화한 모습을 나타냈고, 과(Family) 수준에서는 *Acidobacteriaceae*(15.35%), *Xanthomonadaceae*(9.23%)의 높은 분포가 미생물처리(*S. pasteurii*) 후, *Xanthomonadaceae*(13.52%), *Chitinophagaceae*(6.53%), 식물추출물(BNG) 처리 후, *Chitinophagaceae*(11.01%), *Flavobacteriaceae*(9.84%)의 분포로 미생물 군집이 변화하는 양상을 나타냈다. 결국, 대조군과 비교하여 미생물처리, 식물추출물 처리 간의 미생물 군집 분포가 유사하게 변화가 이루어지는 것을 확인하였다.

#### 사 사

이 논문은 한국지질자원연구원 기관고유연구사업

(KIGAM 3414) 지원으로 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

#### References

- Bamhisel, R. and Bertsch, P.M., 1982, Method of Soil Analysis Part2 Chemical and Microbiological Properties, 2nd edition, Dinauer, R.C., Gates, K.E., Buxton, D.R., Madison, Wisconsin, USA, 282 p.
- Bang, S.S., Galinat, J.K., and Ramakrishnan, V., 2001, Calcite precipitation induced by polyurethane immobilized *Bacillus pasteurii*, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 404-409.
- Choi, G.S., Kim, T.H., and Kwon, H.H., 2009, A study on the protection method of mine site slope using mine green framework, *J. Kor. Soc. Rock Mechanics*, **19**, 526-533.
- Conrad, R., 1996, Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases ( $H_2$ , CO,  $CH_4$ , OCS,  $N_2O$ , and NO), *Microbiol. Rev.* **60**, 609-640.
- DeJong, J.T., Fritzges, M.B., and Nusslein, K., 2006, Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear, *J. Geotech. Geoenviron.*, **132**, 1381-1392.
- De Muynck, W., De belie, N., and Verstraete, W., 2010, Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review, *Ecol. Eng.* **36**, 118-136.
- Gobet, A., Böer, S.I., Huse, S.M., van Beusekom, J.E., Quince, C., Sogin, M.L., Boetius, A., and Ramette, A., 2012, Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands, *ISME J.*, **6**, 542-553.
- Hong, S.H., Lee, Y.H., Na, C.S., Kim, D.Y., Kim, J.G., Kang, B.H., and Shim, S.I., 2010, Analysis of weed vegetation in vicinity of abandoned mines, *Kor. J. Weed Sci.*, **30**, 17-24.
- Hur, M.S., Kim, Y.H., Song, H.R., Kim, J.M., Choi, Y.I., and Yi, H.N., 2011, Effect of Genetically Modified Poplars on Soil Microbial Communities during the Phytoremediation of Waste Mine Tailings, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 7611-7619.
- Jung, M.H., Ryu, J.H., Kim, T.H., Lee, H.J., Choo, C.O., Shin, Y.S., and Jeong, G.C., 2012, Development of green rehabilitation material for rock and abandoned mine debris slopes, *J. Eng. Geol.*, **22**, 439-448.
- Kang, C.H., Oh, S.J., Shin, Y., Han, S.H., Nam, I.H., and So, J.S., 2015, Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned mines in South Korea, *Ecol. Eng.*, **74**, 402-407.
- Kennedy, A. C. and Smith, K.L., 1995, Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils, *Plant Soil*, **170**, 75-86.
- Lee, M.N. and Park, H.D., 2012, Isolation and characterization



- of acidophilic yeasts producing urease from Korean traditional Nuruk, *Korean J. Food Preserv.*, **19**, 308-314.
- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T., and Petit, F., 2006, Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfitereductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, *FEMS Microbiol.Ecol.*, **55**, 230-238.
- Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubiere, J.F., and Perthuisot, J.P., 1999, Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony, *Sediment Geol.*, **126**, 25-34.
- Li, L., Qian, C., Cheng, L., and Wang, R., 2010, A laboratory investigation of microbe-inducing CdCO<sub>3</sub> precipitate treatment in Cd<sup>2+</sup> contaminated soil, *J. Soil Sediment*, **10**, 248-254.
- McLellan, S.L., Huse, S.M., Mueller-Spitz, S.R., Andreishcheva, E.N., and Sogin, M.L., 2010, Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent, *Environ. Microbiol.*, **12**, 378-392.
- Min, J.G., Park, E.H., Moon, H.S., and Kim, J.K., 2005, Chemical properties and heavy metal content of forest soils around abandoned coal mine lands in the Mungyeong area, *Korean J. Agric. For. Meteorol.*, **7**, 265-273.
- Mobley, H.L. and Hausinger, R.P., 1989, Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol. Rev.*, **53**, 85-108.
- Park, S.S., Kim, W.J., and Lee, J.C., 2011, Effect of biomineralization on the strength of cemented sands, *J. Korean Geotech. Soc.*, **27**, 75-84.
- Roh, S.B., Park, M.J., Chon, C.M., Kim, J.G., Song, H., Yoon, M.H., and Nam, I.H., 2015, Bioremediation of heavy metal contaminated mine wastes using urease based plant extract, *J. Soil Groundw. Environ.*, **20**, 56-64.
- Riddles, P.W., Whan, V., Blakeley, R.L., and Zerner, B., 1991, Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA, *Gene*, **108**, 265-267.
- Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., Xie, G., Haft, D.H., Sait, M., Badger, J., Barabote, R.D., Bradley, B., Brettin, T.S., Brinkac, L.M., Bruce D., Creasy T., Daugherty, S.C., Davidsen, T.M, Deboy, R.T., Detter, J.C., Dodson, R.J., Durkin A.S., Granpathy, A., Gwinn-Giglio, M., Han, C.S., Khouri, H., Kiss, H., Kothari, S.P., Madupu, R., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Paulsen, I., Penn, K., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Selengut, J.D., Shrivastava, S., Sullivan S.A., Tapia, R., Thompson, L.S., Watkins, K.L., Yang, Q., Yu, C., Zafar, N., Zhou, L., and Kuske, C.R., 2009, Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2046-2056.