

제련소 인근 토양에서 분리한 박테리아 생장에 미치는 중금속 및 pH 영향

금미정^{1,2} · 윤민호^{2*} · 남인현^{1*}

¹한국지질자원연구원 지구환경연구본부 환경지질연구실

²충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

Effects of Heavy Metal and pH on Bacterial Growth Isolated from the Contaminated Smelter Soil

Mi-Jung Keum^{1,2} · Min-Ho Yoon^{2*} · In-Hyun Nam^{1*}

¹Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM)

²Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University

ABSTRACT

The contaminated soil at abandoned smelter areas present challenge for remediation, as the degraded materials are typically deficient in nutrients, and rich in toxic heavy metals and metalloids. Bioremediation technique is to isolate new strains of microorganisms and develop successful protocols for reducing metal toxicity with heavy metal tolerant species. The present study collected metal contaminated soil and characterized for pH and EC values, and heavy metal contents. The pH value was 5.80, representing slightly acidic soil, and EC value was 13.47 mS/m. ICP-AES analytical results showed that the collected soil samples were highly contaminated with various heavy metals and metalloids such as lead (183.0 mg/kg), copper (98.6 mg/kg), zinc (91.6 mg/kg), and arsenic (48.1 mg/kg), respectively. In this study, a bacterial strain, *Bacillus cereus* KM-15, capable of adsorbing the heavy metals was isolated from the contaminated soils by selective enrichment and characterized to apply for the bioremediation. The effects of heavy metal on the growth of the *Bacillus cereus* KM-15 was determined in liquid cultures. The results showed that 100 mg/L arsenic, lead, and zinc did not affect the growth of KM-15, while the bacterial growth was strongly inhibited by copper at the same concentration. Further, the ability of the bacteria to adsorb heavy metals was evaluated.

Key words : Smelter soil, Heavy metal, Bacteria, Adsorption, Soil bioremediation

1. 서 론

다양한 산업의 발전으로 야기된 토양 오염은 토착미생물 등 여러 생물체의 생장을 억제하여 토양 자체의 생태 복원력을 저해하며, 유류 및 PCBs (Polychlorinated Biphenyls), PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), Chlorophenol 등의 특정 유해물질과 중금속으로 대표되는 무기오염물질의 오염이 복합적으로 나타날 수 있다(Brown and Cartwright, 1990; Cotter-Howells and Caporn, 1996; Seon, 2009). 그 중, 비철금속을 주로 제련했던 시설에서 배출된 매연, 분진, 폐기물 등의 유해물질이 제련소 부지 및 인근 토양에 유입되어 토양오염을 유발하였다(Yang

and Lee, 2007). 이러한 현상으로 인해 토양 오염에 대한 사회적 관심이 증대됨에 따라 오염토양 복원기술이 요구되어 다양한 기술이 적용되고 있으며, 이들을 분류하면, 열적 처리기술, 고형화 및 안정화 기술, 물리화학적 처리 기술, 생물학적 처리기술 등으로 나눌 수 있다(Korea Ministry of Environment, 2009). 열적 처리기술 중 저온 열탈착 방법은 휘발성 및 비휘발성 폐기물의 처리에 효과가 있고, 고온소각의 경우 다양한 유기오염물질 분해 및 제거에 효과가 있으나, 열에 노출된 토양이 비가역적인 변화로 본연의 기능을 잃을 수 있으며 열을 발생시키는 데에 발생하는 경제적인 비용이 상승한다는 한계점이 있다(Yang and Lee, 2007). 고형화 및 안정화 기술은 중금속

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

Received : 2015. 8. 10 Reviewed : 2015. 8. 21 Accepted : 2015. 8. 25

Discussion until : 2015. 10. 31

및 방사능물질은 포함하는 무기물질에는 좋은 효과를 나타내지만, 유기오염물질의 경우에는 효과가 좋지 않은 단점이 있다(Korea Ministry of Environment, 2009). 물리·화학적 처리기술은 유류 및 유기오염물질, 중금속 등에 효과가 좋으며 경제적인 비용도 기타 방법 대비 상대적으로 낮은 장점이 있으나, 오염물질이 함유된 미세입자의 경우 2차적인 처리가 필요하다는 단점이 있다(Cha et al., 2010). 특히, 본 연구에서 채취한 토양 시료는 제련시설에 의해 장기적으로 중금속에 의해 오염된 미세입자가 포함된 토양을 대상으로 하였으므로 앞서 열거한 문제점들을 고려하여 생물학적인 처리 기술의 일환으로 중금속 내성 및 흡착능을 가지는 박테리아를 분리하여 토양 복원 시에 부분적으로 활용할 수 있는 가능성을 살펴보고자 하였다.

일부 중금속은 생물체에 대해 필요한 요소로 작용하기도 하지만 이들이 필요 이상의 농도로 존재할 때에는 다양한 경로를 통해 생존에 필수적인 대사 작용을 저해한다(Volesky and Holan, 1995; Nies, 1999; Nam et al., 2012). 또한, 토양 내 존재하는 중금속들은 대부분 토양 입자에 흡착되어 이온 형태로 산화 및 환원되어 환경에 따라 비교적 자유롭게 거동을 하므로 토착 미생물의 활동을 저해하기도 한다(Baath, 1989; Nies, 1999; Mittal and Ratra, 2000; Amor et al., 2001; Sokhn et al., 2001; Nam et al., 2012). 미생물을 활용하여 토양으로부터 중금속을 제거하는 메커니즘은 세포 내로의 금속 이온의 전달을 수반하여 더 많은 양의 중금속을 축적할 수 있는 대사 의존형과, 세포의 세포벽, 고분자물질 등에 의해 중금속과 방사성물질이 표면 흡착을 하여 흡착 속도가 빠른 대사 비의존형 등 두 가지로 분류할 수 있다(Gadd, 1992). 미생물의 중금속 저항성에 대해 응용 가능한 분야를 Nies (1999)는 크게 세가지로 분류하였다. 첫째, 특정 생물학적 처리 공정에 중금속 저항성을 가지고 있는 미생물을 추가하여 공정을 용이하게 하고 두 번째로, 중금속 저항 박테리아가 산업공정에서 금속을 회수하는데 사용하거나 직접 채광에 이용될 수 있으며 마지막으로, 중금속 저항 박테리아로 오염된 환경에서 직접적인 Bio-remediation 공법으로 사용할 수 있다고 제시하였다(Nies, 1999). 기존 연구들에서 알려진 중금속에 내성이 있는 박테리아들은 *Bacillus* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella aerogenes* 등이 잘 알려져 있고(Aiking et al., 1985; Gadd, 1992; Volesky and Holan, 1995; Cho et al., 1997; Kim et al., 2005; Hong et al., 2010; Xie et al., 2010), *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 균주들은 Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , La^{3+} 등을 효율적으로 제거한다고 보고된 바 있다(Mullen et al. 1989; Volesky and Holan, 1995; Nies, 1999; Arivalagan et al., 2014).

따라서, 본 연구에서는 제련 활동에 의해 장기적으로 중금속에 오염된 토양을 복원하는 데에 활용할 수 있는 다양한 방법들 중 생물학적인 방법으로 처리하기 위한 기초 연구로 오염된 중금속 중을 효율적으로 흡착할 수 있는 박테리아를 분리하여 이들의 생장에 미치는 중금속 영향성에 대한 평가 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 박테리아 균주의 분리 및 동정

중금속 흡착능을 가진 박테리아 균주를 분리하기 위해 장기간 중금속으로 오염된 제련소 주변 토양을 멸균된 Falcon tube에 채취하였고, 오염토 3.0 g을 증류수와 토양 분산용액 6.12 g/L($NaPO_3)_6$ (Sodium Hexametaphosphate)을 1:1의 비율로 28°C, 13일 동안 진탕 배양한 후, 고체배지에 접종하여 분리 여부를 확인하면서 28°C에서 24시간 정치 배양하여 분리 균주의 순수 분리를 진행하였다. 본 연구에서 사용한 박테리아 분리 액체 배지는 Nutrient broth(BD Difco, USA)를 사용하였고, 분리의 확인을 위한 고체 배지는 Nutrient agar 배지를 사용하였다. 약 20종의 다양한 균주를 Nutrient agar 배지에 Steaking하여 순수하게 균이 분리 될 때까지 5회의 계대 배양을 실시하여 총 12종의 균주를 순수 분리하였다. 이 중에서 생장속도가 빠르고, 10 mg/L의 As, Pb, Cu, Zn(SPEX plasma standard, 1,000 mg/L of H_3AsO_4 , $Pb(NO_3)_2$, Zn, Cu) 등이 포함된 중금속 첨가 배지에서 내성을 나타낸 균주들을 순수 분리하여 얻은 colony를 16S rRNA 유전자의 염기 서열을 분석하였다. 해당 염기 서열의 증폭을 방지하기 위해 primer는 518F(5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') (Lu et al., 2000)와 800R(5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') (Vannini et al., 2004)을 사용하였고, 분석된 염기서열은 The National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) algorithm을 통해 Gene Bank database와 비교하여 미생물을 동정하였다. 16S rRNA gene 염기서열은 Bioedit(Ver. 7.0)을 이용해 정렬하였고, Phylogenetic analysis에 사용한 16S rRNA gene sequence는 NCBI data base에 근거하였으며, Phylogenetic tree는 MEGA(Ver.6.0) 프로그램을 이용하여

neighbor-joining method를 사용하여 1,000회의 bootstrap analysis를 진행하여 미생물의 종 유연성 분석을 하였다.

2.2. 토양 기본특성 및 중금속 분석

상기한 바와 같이 중금속 흡착능을 가지는 박테리아를 분리한 토양 시료의 기본적인 특성을 분석하기 위해 채취한 토양 4.0 g과 증류수 40 mL(1 : 10)를 원심분리 튜브에 넣어 6시간 동안 진탕시킨 후, 3분간 2,000 rpm으로 원심분리 하였고, 상등액을 0.45 µm membrane filter로 여과하여 pH/COND METER(D-54, Horiba)로 pH와 EC (Electric Conductivity)를 측정하였다. 동일한 토양 시료 내 중금속 오염도를 분석하기 위해 채취 시료를 50°C Dry oven에서 24시간 건조시킨 후, 2 mm 체거름한 토양을 토양환경보전법에 의거하여 왕수추출법을 적용하여 분석하였다(Korea Ministry of Environment, 2009). 건조 및 체거름된 토양 3.0 g을 250 mL 반응용기에 넣어 정제수로 시료를 적신 후, 35% HCl 21 mL, 70% HNO₃ 7 mL를 가하고 흡수용기에 0.5 M HNO₃ 15 mL를 첨가하여 흡수용기와 환류 냉각관을 반응용기에 연결하였다. 이를 2시간 동안 정치시켜 토양 내 유기물이 천천히 산화되도록 반응 혼합물의 온도를 서서히 올려 환류 조건에 도달한 상태로 상태를 유지시켰다. 분해 후, 반응용기를 냉각시켜 흡수용기 내 내용물을 환류 냉각관을 통해 반응용기에 첨가하였고 흡수용기와 환류 냉각관을 0.5 M HNO₃로 세척하였다. 반응용기를 정치시켜 불용성 잔류물이 현탁액에서 침전되도록 하여 고형분이 없는 상등액을 Whatman No. 40 여과지로 100 mL 부피플라스크에 여과하고 여과지에 남은 불용성 잔류물을 0.5 M HNO₃로 세척하며 표시선 까지 0.5 M HNO₃로 채운 후 이 시료의 원액과 증류수로 희석한 시료를 ICP-AES로 분석하였다(Korea Ministry of Environment, 2009).

2.3. 분리 균주의 성장곡선 및 pH 영향성

중금속을 흡착할 수 있는 분리 균주들의 성장곡선 및 생장에 미치는 각기 다른 3개의 영역에서의 pH 영향성을 분석하기 위해 Nutrient broth 배지를 pH 3.0, 7.0, 11.0 등의 3조건으로 조성한 후 각 분리 균주들의 성장곡선을 측정하였다. pH 3.0 배지의 제조에는 1 N HCl을 사용하였고, pH 11.0 배지의 제조에는 1 N NaOH를 사용하였으며, 모두 멸균한 배지에 0.25 µm syringe filter를 사용하여 주입하였다. 각각의 균주를 얻기 위한 전 배양과 성장 곡선을 관찰하기 위한 본 배양 등으로 나누어 실험을 진행하였으며, 전 배양은 멸균된 Nutrient broth를 상기한

바와 같이 pH별로 조성된 배지 20 mL에 순수 분리한 Colony를 접종하여 28°C에서 24시간 동안 항온 교반하였고, 그 이후에 전 배양에서 얻은 배양액으로 본 배양을 실시하여 동일 조건에서 항온 교반하며, 시간 별로 시료를 채취하여 UV-visible spectrophotometer(Biochrom, Cambridge, UK)로 600 nm 파장에서 Turbidity를 측정하였다. 배양 72시간 후에는 각 배지의 pH를 측정하여 그 변화를 관찰하였다.

2.4. 분리 균주의 중금속 흡착능 평가

분리 균주들의 중금속 저항성을 알아보기 위해 Nutrient Broth(pH 7.0) 배지 100 mL에 균을 접종하여 24시간 진탕 배양을 실시하여(160 rpm, 28°C) 얻은 전 배양액 10 µL를 본 배양 배지에 접종한 후 124시간 동안 UV-visible spectrophotometer(Biochrom, Cambridge, UK)로 600 nm 파장에서 각 Sampling 시간 별로 시료를 채취하여 흡광도를 측정하였다. 본 배양배지는 Nutrient Broth 배지에 2% 질산용액에 녹여져 있는 ICP 표준물질 용액을 100 mg/L 농도로 첨가 후, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 반응 후에 각 배양액은 10,000 rpm, 20 min 조건으로 원심분리 하여 중금속 농도를 분석하기 위한 상등액(Supernatant)과 균체(pellet)를 분리하였다. 균체에 흡착되어 존재하는 중금속의 농도를 파악하기 위해 각 균체 시료에 에 왕수 14 mL(35% HCl 10.5 mL, 70% HNO₃ 3.5 mL)를 넣어 16시간 방치 후 중탕으로 50~60°C에서 4시간 반응시키고 상온에서 냉각한 다음 상등액을 회수하여 희석한 시료를 ICP-AES에 주입하여 정량 분석을 실시하였다.

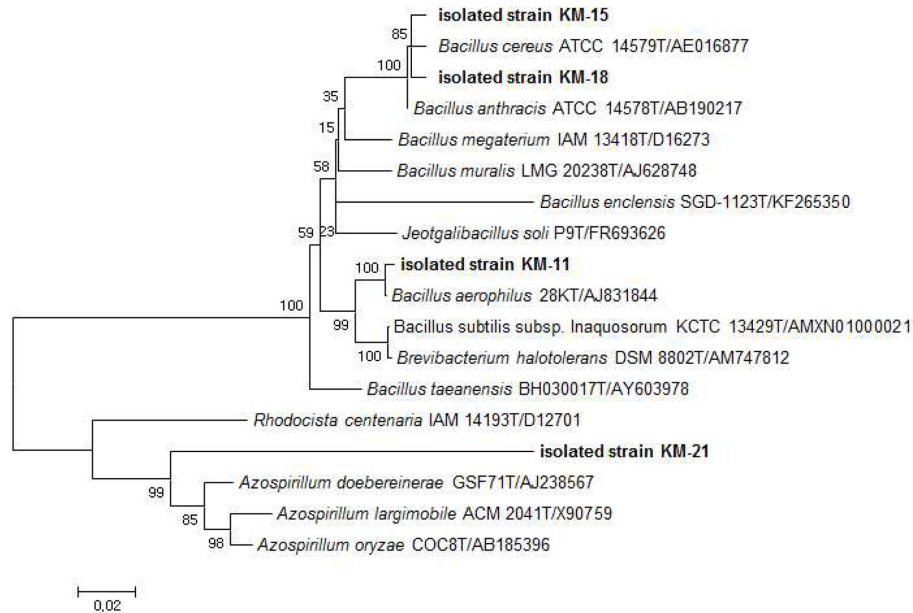
3. 결과 및 고찰

3.1. 중금속 오염 토양 분석

본 연구에서 중금속 흡착능이 있는 박테리아 균주를 분리한 제련소 인근 토양 내 중금속 오염도를 파악하기 위해 채취한 토양시료 3.0 g을 왕수 추출 후, ICP-AES를 통해 분석된 중금속 농도를 Table 1에 나타내었다. 본 분석에서 다양한 중금속 종이 검출되었으나, 토양오염우려 기준치를 초과하거나 용출 함량이 비교적 높게 나타난 As (48.1 mg/kg), Pb(183.0 mg/kg), Cu(98.6 mg/kg), Zn(91.6 mg/kg) 등을 본 연구의 대상으로 하였다. 또한, 동일한 토양 시료의 기초 특성 분석 결과에서 토양 pH는 5.80으로 약산성을 나타내었고, EC 값은 13.47 mS/m로 분석되었다. 분석 결과를 바탕으로 본 연구에서 채취 및 연구한

Table 1. Chemical characteristics and heavy metal and metalloid concentrations in the contaminated smelter soil containing bacterial isolates collected in this study

pH	EC	As	Pb	Cu	Zn
	mS m ⁻¹		----- mg kg ⁻¹ -----		
5.80	13.47	48.1	183.0	98.6	91.6

**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences for 4 bacterial isolates capable of adsorbing heavy metal isolated from contaminated smelter soil. Isolated strain 11, *Bacillus pumilus* KM-11; Isolated strain 15, *Bacillus cereus* KM-15; Isolated strain 18, *Bacillus thuringiensis* KM-18; Isolated strain 21, *Azospirillum* sp. KM-21.

토양 시료는 제련 등의 과정에서 상기 중금속들이 오염된 것으로 예상할 수 있으며, As, Pb, Cu, Zn 등의 오염이 두드러지는 현상은 휴폐광산 지역 토양 내 오염 경향과 유사하다(Jung and Jung, 2006; Kim, 2010).

3.2. 균주 분리 및 동정

중금속으로 오염된 제련소 인근 지역 토양으로부터 해당 중금속 중을 흡착할 수 있는 박테리아를 분리하기 위해 5단계의 Enrichment를 통해 나타난 Colony를 순수 분리하였다. 총 12종의 균주를 순수하게 분리하여 해당 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 12종의 균주는 *Bacillus cereus*를 포함한 *Bacillus* sp. 10종, *Lysinibacillus* sp. 1종, *Azospirillum* sp. 1종 등이었다. 이들 중 균주 활성이 좋고 10 mg/L 농도의 상기 중금속 종에 첨가된 배지에서 성장 속도가 비교적 빠른 4개의 균주를 선택하여 각각 *Bacillus pumilus* KM-11, *Bacillus cereus* KM-15, *Bacillus thuringiensis* KM-18, *Azospirillum* sp. KM-21 등으로 명명하였다. 본 4개 균주에 대해

phylogenetic Tree를 작성한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. KM-11, KM-15, KM-18 균주들은 모두 *Bacillus*속에 포함되어 유사한 관계를 나타내었으며, KM-21 균주는 *Azospirillum*속에 포함되어 비교적 독립된 관계를 나타내었다. 기존의 다양한 연구들에서도 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* 등의 균주들이 중금속을 포함한 다양한 오염물질을 흡착 및 제거한다고 알려져 있어(Mullen et al., 1989) 본 연구에서 분리한 중금속 흡착능이 있는 균주들은 기존에 알려진 균주들과 활성 면에서 유사성이 있다고 여겨지며, 본 연구에서 채취한 특이적인 제련소 인근 토양에도 장기간에 걸쳐 해당 균주들이 생존하며 오염 환경에 적응한 것으로 이해할 수 있다. 따라서, 본 연구에서 분리한 균주들을 해당 오염 토양의 복원 사업에 부분적으로 활용을 하면 보다 다양한 복원 방법을 적용할 수 있는 하나의 예시가 될 수 있을 것으로 생각된다.

3.3. 분리 박테리아 균주 성장에의 pH 영향성

본 연구에서 중금속 오염 토양으로부터 분리 및 선별된

Bacillus pumilus KM-11, *Bacillus cereus* KM-15, *Bacillus thuringiensis* KM-18, *Azospirillum* sp. KM-21 등의 4개

균주들의 생장에 미치는 pH 영향성을 확인하기 위해 배지의 pH를 3.0, 7.0, 11.0으로 조절하여 각 균주들을 배양하였고, 성장곡선 및 배양 후 배지 내 pH 변화를 관찰하였다. 각 균주들의 pH별 성장 곡선은 Fig. 2에 나타내었고, 배양 후 변화된 배지의 pH는 Table 2에 나타내었다. pH 3.0인 산성조건에서는 모든 균주들의 생장이 이루어지지 않는 반면에 pH 7.0인 조건에서는 대부분의 균주들이 활성을 나타내었다. 이는 본 연구에서 분리한 박테리아가 성장하는데 있어서 중성 혹은 약알칼리성 환경에서 생장이 활발하고 pH 4.5 이하의 산성 조건에서는 생장이 억제되는 생리학적 특성으로 볼 수 있으며, 기존 연구들에서도 *Bacillus* sp.를 pH 2.0-10.0 구간에서 배양한 결과 pH 4.0 이하의 산성 조건에서는 균주의 생장이 이루어지지 않음을 보고한 바 있다(Lee et al., 1983; Lee et al., 2002). 특히, KM-15 균주의 성장 곡선이 가장 이상적인 Sigmoid 형태를 나타내었고, KM-21 균주와 KM-11 균주는 성장을 진행하기는 하였으나, 그 효율이 KM-15 균주와 비교하였을 때 낮았다. 배양 후 72시간에 나타난 균주의 성장 정도는 KM-18 균주가 가장 좋았으나, 반복 실험을 통해 확인한 결과 배양 중간에 균주의 생장이 안정적이지 못했다. 이러한 경향성은 pH 11.0에서도 관찰할 수 있었는데, KM-15 균주의 경우에는 다소 더디지만 성장을 진행하는 현상을 관찰할 수 있었고, 기타 균주들은 성장 속도가 매우 느렸다. 본 연구에서 분리한 균주들은 호 알칼리성이 아님에도 불구하고 활성이 나타남을 확인하였는데, Table 2에 나타난 바와 같이 배양 72시간 후에 각 반응기 내 배지의 pH를 측정된 결과 생장이 진행되지 않은 pH 3.0 산성 조건에서의 pH는 많은 변화가 없었으나, pH 7.0 및 pH 11.0으로 조성한 경우에는 그 변화를 관찰할 수 있었다. pH 7.0의 초기 배지 pH가 배양 후에는 모든 배양기에서 증가하였다. 특히, 활성이 가장 좋았던 KM-15 균주가 포함된 배지의 pH가 9.07로 가장 큰 폭으로 상승하였다. 또한, 모든 균주들을 pH 11.0의 조건으로 조성된 배지에 접종하여 배양했을 때에는 반응기 pH가 9.0을 중심으로 감소하였다. 배지의 pH가 증가하는 현상은 박테리아 활동에 의한 생물학적 산화보다 산소에 의한 무기적 산화작용이 우세하게 일어나기

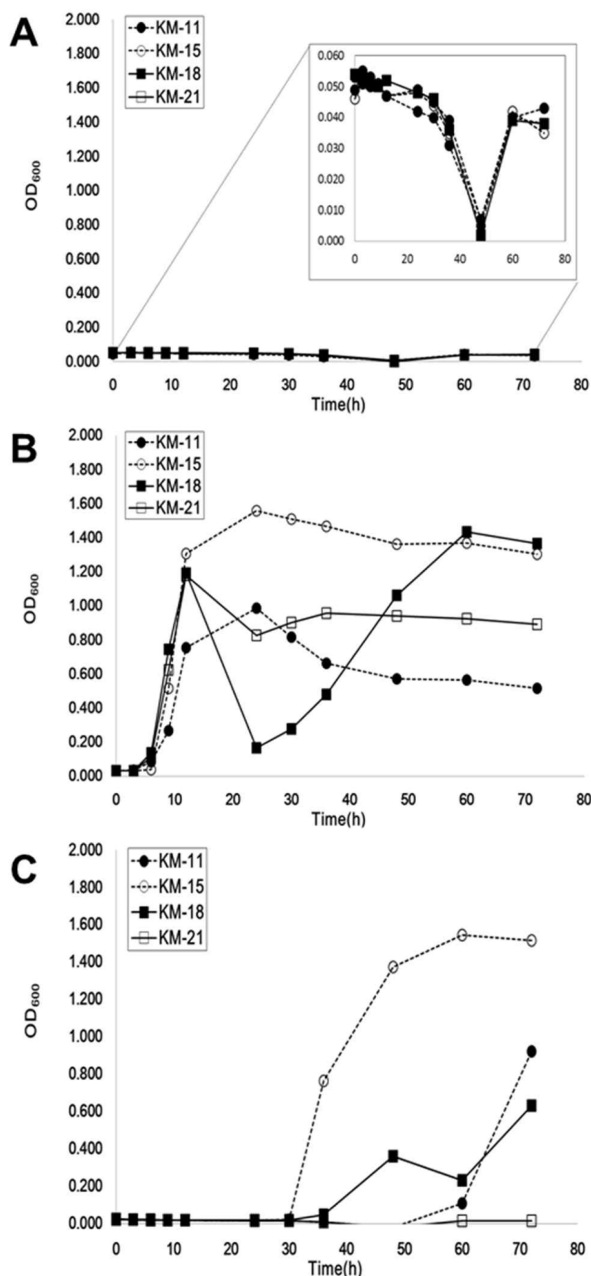


Fig. 2. Effects of pH on the growth of isolated 4 bacteria from the contaminated smelter soil. A, pH 3.0; B, pH 7.0; C, pH 11.0.

Table 2. pH change after 72 h incubation of bacterial strains isolated from contaminated smelter soil. All isolates were inoculated to the adjusted media pH 3.0, 7.0, and 11.0, respectively

	<i>B. pumilus</i> KM-11			<i>B. cereus</i> KM-15			<i>B. thuringiensis</i> KM-18			<i>Azospirillum</i> sp. KM-21		
Before incubation pH	3.0	7.0	11.0	3.0	7.0	11.0	3.0	7.0	11.0	3.0	7.0	11.0
After incubation pH	3.34	8.68	8.89	3.28	9.07	9.27	3.26	8.97	9.22	3.28	8.73	9.05

때문으로 해석되며 H^+ 이온이 소비되어 나타난 현상으로 볼 수 있다(Mousavi et al., 2005). 따라서, 본 연구에서 적용한 4종의 박테리아가 조성된 조건에서 pH 9.0 주변에서 최적의 조건을 가질 것으로 생각되며, 알칼리 조건에서는 각 균주 별로 생존에 필요한 물질을 발생하거나 특히 대사 활동에 의해 배지의 pH를 각각 감소시켰을 것으로 예상할 수 있다. 이는 Fig. 2에 도시한 바와 같이 pH 7.0 배지 조건에서 보다 pH 11.0의 조건에서 성장할 수 있는 균주들의 Lag phase가 다소 길어진 것을 관찰할 수 있었는데 이는 최적 pH 조건에 도달하기까지 필요한 시간으로 생각된다. 본 연구는 오염 토양을 복원하는 데 활용할 수 있는 방법들에 이와 같은 박테리아를 추가적으로 처리하여 복원 효율을 높일 수 있는 가능성을 제시하고자 하는 목적이 있으므로 보다 다양한 환경에서 생존할 수 있는 균주를 분리하고 하였다. 따라서, 상기한 바와 같이 알칼리 환경에서도 비교적 안정한 상태로 성장을 유지할 수 있는 KM-15 균주를 활용하여 중금속 영향성을 관찰하였다.

3.4. KM-15 균주 성장에의 중금속 영향성

Bacillus cereus KM-15 균주의 성장에 변화를 주는 중금속 영향성을 알아보기 위해 100 mg/L의 As, Pb, Cu, Zn 등의 4종의 중금속을 배지에 공급하여 성장곡선 변화를 관찰하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 KM-15 균주의 성장에 Cu를 제외한 대부분 중금속 중들의 영향성이 크지 않았으나, Zn의 경우에는 성장 초기에 영향을 받아 Lag phase가 다른 반응기들에 비해 비교적 길게 나타났다. 그러나, 균주 생장이 이루어지면서 특이적인 저해 효과를 관찰할 수는 없었다. 대조군으로 실험에 사용한 중금속을 첨가하지 않았거나 중금속 표준물질이 녹여져 있는 2% 질산을 첨가해 준 배지 내에서의 KM-15 균주의 성장 속도와 비교했을 때, As와 Pb를 첨가한 반응기에서는 KM-15 균주의 성장을 저해하는 유의차 있는 결과는 나타나지 않았다. 즉, KM-15 균주의 경우에는 Cu에 의해 생장이 저해되는 효과는 확인이 되었으나, As, Pb, Zn 등에 의해서는 큰 저해 효과가 없었으며, 본 연구에서 사용한 모든 중금속이 녹여져 있는 2% 질산에 대한 방해 효과는 없었다. 이와 같이 저해 효과가 미미한 원소들 중 As의 경우에는 미생물 성장에 미치는 중금속 영향성을 연구한 결과들 중에서 미생물 성장에 큰 저해 요소로 작용하지 않는다는 결과가 일부 나타난 바 있고(Nam et al., 2012), Pb도 큰 저해 활동을 하지 않는 것으로 보고된 바 있다(Hong et al., 2007). 중금속이 미생물의 대사작용

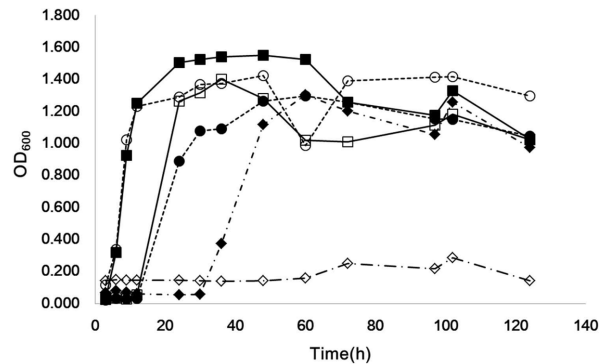


Fig. 3. Effects of 100 mg/L heavy metal and metalloid on the growth of *Bacillus cereus* KM-15. Values are the average of three independent measurements and OD₆₀₀ represent optical density value at 600 nm. Symbols; Without heavy metals (■), with 2% nitric acid solution (□), arsenic (●), lead (○), zinc (◆), and copper (◇).

및 성장을 저해하는 수준 및 특이성은 배지 내 이온 형태로 존재하는 중금속 농도 및 성상, 미생물에 작용하는 중금속 이온들의 특이적 유효성 등과 밀접하게 관련이 있고, 중금속 이온의 특징에 따르는 미생물 균주의 특이적 활동 등 다양한 요인들이 관여하는 복합적인 과정에 의존한다(Tyler, 1974; Chen and Lin, 2001). 또한, 일부 연구에서는 특정 미생물들은 다양한 중금속에 대해 높은 수준의 저항성을 가지고 있다고 알려져 있는데(Chen and Lin, 2001), 이에 대한 배경은 본 연구에서 채취한 토양 시료와 같이 장기간 제련 활동에 의해 침착된 As, Pb 등의 중금속에 대해 토착 미생물이 비교적 오랜 기간 적응 및 생존의 과정을 거치면서 자연적으로 특정 내성을 가질 수 있다(Pepi et al., 2007). 일반적으로 독성이 잘 알려져 있지 않은 Zn의 경우, 본 연구에서도 특정 저해효과를 나타내지 않는 결과를 나타내고 있다. 그러나, Cu의 경우에는 100 mg/L의 농도로 배지에 첨가되었을 때, KM-15 균주의 생장이 거의 저해되었는데, 기존 연구들에서도 Cu는 미량으로 존재할 때에 생물체가 생존하는 데에 필수적인 요소에 포함되나, 기준 농도 이상이 생물체 내 존재할 때에는 여러 대사활동을 저해한다고 알려져 있으며(Burgess et al., 1999; Xie et al., 2010), Sokhn 등은 유기오염물질을 분해하는 미생물에 0.4 mM의 Cu를 공급하였을 때 특정 영향이 없었으나, 4.4 mM 이상의 Cu를 배지에 공급하였을 때에는 오염물질 분해 대사 작용이 저해된다고 나타난 바 있다(Sokhn et al., 2001). 또한, Riis 등이 수행한 연구에서는 디젤오염토양 복원 시 0.5 mM 이상의 Cu가 박테리아의 산소소모속도(Oxygen Consuming Rates)를 감소시켜 디젤 분해 속도가 뚜렷하게 감소하는 결과를

Table 3. pH change after 124 h incubation of *Bacillus cereus* KM-15 with heavy metal treatment

	Without bacteria	NB* + 2% HNO ₃	NB + 100 mg/L As	NB + 100 mg/L Pb	NB + 100 mg/L Cu	NB + 100 mg/L Zn
pH	7.97	7.76	7.93	8.05	7.04	7.74

*Nutrient broth media

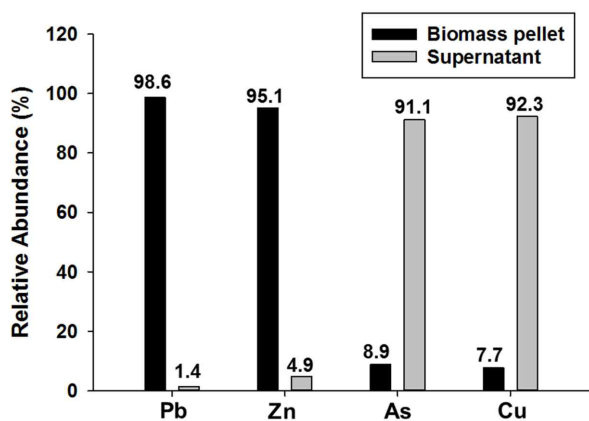


Fig. 4. Remained percentages of heavy metal concentrations in the biomass pellet or supernatant media after incubation of *Bacillus cereus* KM-15 in the presence of 100 mg/L of heavy metals for 124 hours. Values are the average of 3 independent measurements.

나타냈다(Riis et al., 2002). 이는 과량의 Cu가 박테리아 등의 미생물 대사 활동에서 모두 소모되지 않아 세포 내 축적이 되고, 이로 인해 오염물질 대사 등과 연관된 Dioxygenase 등의 효소 활성이 감소한 것에 기인한 것으로 이해될 수 있다(Said and Lewis, 1991). 또한, Fig. 4의 결과에서 보는 바와 같이 Cu가 균체에 흡착하는 Portion이 7.7%로 미미하였는데, 일부 필요한 부분을 균주가 활용하다가 생장에 영향을 받고 대사 활동이 저해되어 대부분의 Cu가 배지 내 잔류한 것으로 유추할 수 있다. 즉, 본 결과로 예상할 수 있는 부분은 Pb나 Zn와는 달리 Cu가 세포 내로 이동하여 세포 내 활동에 영향성을 미치다가 세포의 과쇄 등의 작용으로 배지로 모두 이동했을 가능성을 생각해 볼 수 있다. As는 KM-15 균주의 생장에 저해를 받지 않는 것으로, 균체에 흡착한 양은 8.9%로 적은 양이었다. 이는 상기한 바와 같이 여러 금속 원소들이 미생물 성장 환경에 존재하는 형태나 농도에 따라서 생장을 저해하는 요소로 작용할 수 있고, 반응을 하지 않아 잔류할 수도 있다는 예시로 생각된다. 반면에, Pb와 Zn는 KM-15 균주와 동시에 배양했을 때 각각 98.6%, 95.1% 등 많은 양이 균체에 흡착한 결과를 확인할 수 있었다. KM-15 균주의 배양은 pH 7.0으로 조성된 배지에서 124시간 동안 진행이 되었는데, 배양이 끝난 후 배지의 pH를 측정된 결과, 생장이 저해된 Cu

첨가 배지의 pH가 7.04로 거의 변화가 없었으나, 특이적 저해 영향성을 관찰할 수 없었던 기타 배지들의 pH는 모두 상승하였다(Table 3). 상기 Table 2에서도 나타난 바와 같이 KM-15 균주는 생장에 있어서의 최적 pH는 약 알칼리성으로 판단되며, 이와 같은 환경을 조성해 주기 위해 배지 내 pH를 상승시키는 특정 물질을 분비할 것으로 예상된다. 다만, 보다 명확한 이해를 위해 후속 연구에서 해당 물질을 정성, 정량적으로 분석하고 이 물질이 중금속 중들과 혹은 KM-15 균주와 어떠한 물질을 주고 받고 영향을 미치는 지에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이와 같은 결과들로 KM-15 균주의 특이성을 실제 오염된 환경에 적용할 때 흡착 가능한 중금속 중 혹은 오염 농도에 따른 복원 방법 설정에 기초 자료로 활용될 수 있을 것을 기대한다.

4. 결 론

중금속으로 오염된 제련소 인근 오염토양으로부터 중금속 내성을 가지는 박테리아 4종을 분리하여 동정한 결과 *Bacillus pumilus* KM-11, *Bacillus cereus* KM-15, *Bacillus thuringiensis* KM-18, *Azospirillum* sp. KM-21 등과 같았다. 본 박테리아 균주들이 분리된 토양을 왕수추출법으로 전처리하여 ICP-AES로 분석한 결과, 중금속의 오염도는 As(48.1 mg/kg), Pb(183 mg/kg), Cu(98.6 mg/kg), Zn(91.6 mg/kg) 등으로 분석이 되었다. 본 분리 균주들에 미치는 배지 내 pH 영향성을 관찰한 결과, 산성 배지(pH 3.0)에서는 모든 균주들의 활성이 저해되었고, pH 7.0 배지에서의 생장은 활발했으며 pH 11.0의 알칼리 조건에서는 미미한 생장을 나타내었다. 배양 후, 배지 내 pH 측정 결과 생장이 양호했던 배지의 pH는 약알칼리 수준으로 변화하였다. 또한, 이들 중 가장 생장이 활발했던 *Bacillus cereus* KM-15를 이용하여 중금속 영향성을 관찰한 결과 100 mg/L의 Cu를 첨가한 배지에서 생장이 저해되는 결과를 나타내었고, As, Pb, Zn 등에는 특이적인 생장 저해 효과가 나타나지 않았다. KM-15 균주의 생장이 저해되었던 Cu 첨가 배지에서는 pH의 변화가 미미하였으나, 영향성이 없었던 기타 배지들에서는 약알칼리 수준으로 배지 내 pH가 변화하였다. 본 연구결과는 중금속 오염토양에서

분리한 박테리아 균주들의 중금속 내성을 확인하여 향후 중금속 오염 토양에 적용시켜 중금속을 저감하거나 여러 복원 방법에 다양하게 응용할 수 있는 가능성을 제시한다.

사 사

본 연구는 한국지질자원연구원 주요사업(KIGAM-3451) 지원으로 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

References

- Aiking, H., Govers, H., and Van't Riet, J., 1985, Detoxification of mercury, cadmium, and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1262-1267.
- 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.
- Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., and Kaliannan, T., 2014, Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*, *Ecol. Eng.*, **71**, 728-735.
- Baath, E., 1989, Effect of heavy metals in soil on microbial processes and population, *Water Air Soil Pollut.*, **47**, 335-379.
- Brown, R.A. and Cartwright, R.T., 1990, Biotreat sludge and soils, *Hydrocarbon Processing*, **68**, 93-97.
- 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.
- Cha, M.W., Lee, H.U., and Park, J.W., 2010, A biological complex soil treatment process using selected soil bacterial strains, *Kor. Geo-Environ. Society*, **11**, 5-13.
- Chen, S.Y. and Lin, J.G., 2001, Effect of substrate concentration on bioleaching of metal-contaminated sediment, *J. Hazard. Mater.*, **82**, 77-89.
- Cho, J.S., Lee, W.K., Choi, H.S., and Heo, J.S., 1997, Distribution of heavy metal in the cell components of heavy metal-tolerant microorganisms, *Kor. J. Environ. Agri.*, **16**, 55-60.
- Cotter-Howells, J. and Caporn, S., 1996, Remediation of contaminated land by formation of heavy metal phosphates, *Appl. Geochem.*, **11**, 335-342.
- Gadd, G.M., 1992, Biosorption, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **55**, 302-304.
- 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.
- Hong, S.H., Koo, S.Y., Kim, S.H., Ryu, H.W., Lee, I.S., and Cho, K.S., 2010, Rhizoremediation of petroleum and heavy metal-contaminated soil using *Rhizobacteria* and *Zea mays*, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 329-334.
- Jung, M.C. and Jung, M.Y., 2006, Evaluation and management method of environmental contamination from abandoned metal mines in Korea, *J. Kor. Soc. Geosystem Eng.*, **43**, 383-394.
- Kim, J., 2010, Heavy metal concentrations in soils and crops in the Poongwon mine area, *J. Kor. Geoenviron. Soc.*, **11**, 5-11.
- Kim, S.U., Choi, I.W., Seo, D.C., Han, M.H., Kang, B.H., Heo, J.S., Shon, B.K., and Cho, J.S., 2005, Biosorption of heavy metal in aqueous solution by heavy metal tolerant microorganism isolated from heavy metal contaminated soil, *Kor. J. Env. Agri.*, **24**, 379-385.
- Korea Ministry of Environment, 2009, Regulations for Drinking Water Quality Standards and Examination, Drinking Water Policy Division, 67-90.
- Lu, J., Perng, C., Lee, S., and Wan, C., 2000, Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid, *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2076-2080.
- Lee, M.S., Choi, J.D., and Chang, D.S., 1983, Effects of pH, sodium chloride and potassium sorbate on the germination of *Bacillus cereus* spores in cooked rice homogenate, *Kor. Fish. Soc.*, **16**, 37-43.
- Lee, S.S., Kim, S.M., Park, U.Y., Kim, H.Y., and Shin, I.S., 2002, Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from Anchovy Sauce, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **34**, 283-289.
- Mittal, S.K. and Ratra, R.K., 2000, Toxic effect of metal ions on biochemical oxygen demand, *Water Res.*, **34**, 147-152.
- Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A., and Hoseini, S.A., 2005, Comparison of bioleaching ability of two native mesophilic and thermophilic bacteria on copper recovery from chalcopyrite concentrate in an airlift bioreactor, *Hydrometallurgy*, **80**, 139-144.
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Fleming, C.A., and Bailey, G.W., 1989, Bacterial sorption of heavy metals, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3143-3149.
- Nam, I.H., Kim, J.G., and Chon, C.M., 2012, Heavy metal effects on the biodegradation of fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02 in liquid medium, *J. Soil Groundw. Environ.*, **17**, 74-81.
- Nies, D.H., 1999, Microbial heavy-metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 730-750.
- 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.
- Seon, Y.H., 2009, The effect of microorganisms, nutrients, and surfactants on the bioremediation of oil-contaminated soil, *Kor. J. Biotechnol. Bioengineer.*, **24**, 53-58.
- 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.
- Tyler, G., 1974, Heavy metal pollution and soil enzymatic activity, *Plant Soil*, **41**, 303-311.
- Vannini, C., Rosati, G., Verni, F., and Petroni, G., 2004, Identification of the bacterial endocymbionts of the marine ciliate *Euplotes magnicirratu*s (Ciliophora, Hypotrichia) and proposal of 'Candidatus Devosia euplotis', *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1151-1156.
- Volesky, B. and Holan, Z.R., 1995, Biosorption of heavy metals, *Biotechnol. Prog.*, **11**, 235-250.
- Xie, X., Fu, J., Wang, H., and Liu, J., 2010, Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China, *African J. Biotechnol.*, **9**, 4056-4066.
- Yang, J.W. and Lee Y.J., 2007, Status of soil remediation and technology development in Korea, *Kor. Chem. Eng. Res.*, **45**, 311-318.