

비소제거효율이 향상된 식물상 정화공법의 현장적용가능성 평가

정슬기¹ · 문희선² · 양우진³ · 남경필^{3*}

¹한국기초과학지원연구원 서울센터

²한국지질자원연구원 지구환경본부 지하수연구실

³서울대학교 건설환경공학부

Applicability of Enhanced-phytoremediation for Arsenic-contaminated Soil

Seulki Jeong¹ · Hee Sun Moon² · Woojin Yang³ · Kyoungphile Nam^{3*}

¹Seoul Center, Korea Basic Science Institute

²Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources

³Dept. of Civil and Environmental Engineering, Seoul National University

ABSTRACT

A siderophore-producing bacterium (i.e., *Pseudomonas aeruginosa*) capable of chelating Fe³⁺ from its mineral form (i.e., iron oxides) was used to enhance As uptake by plants. Since As in soil is mainly associated with iron oxides, siderophore can play an important role in As mobilization through the dissolution of As-bearing iron oxides. A series of pot experiment using *Pteris cretica* showed that As removal by *P. cretica* with siderophore-producing bacteria addition increased more than three times compared to that without bacteria addition. Competition between indigenous bacteria and introduced bacteria (i.e., *P. aeruginosa*) was also observed, but such competition seemed not to be significant. This study suggests that enhanced-phytoremediation by siderophore-producing bacteria addition could be a visible option for long-term As removal in the forest area at the former Janghang smelter site.

Key words : Former Janghang smelter, Phytoremediation, Siderophore, Arsenic, Pyrosequencing

1. 서 론

비소로 인한 토양오염문제는 농경지, 휴 · 폐광산 지역 및 산업시설 등 다양한 부지에서 발생하고 있으며(Singh et al., 2015), 최근 (구)장항제련소 부지 주변 토양의 광범위한 비소오염이 알려지면서 그 유해성과 독성 영향에 대한 우려가 점차 증가하고 있다. 이에 (구)장항제련소 주변 비소오염토양의 정화를 위해 토양정밀조사를 수행하고 토양세척공법, 동전기공법, 열탈착공법, 식물상 정화공법 등 다양한 정화공법에 대한 기초 연구 및 실증 연구가 이루어져 왔으며(Kim et al., 2012; Im et al., 2014; Jeong et al., 2014; Yang et al., 2014), 현재 이를 바탕으로 (구)장항제련소 부지 및 주변 지역에서 비소오염토양에 대한 정화가 계획 중에 있다.

본 연구에서 (구)장항제련소 부지 내 비소오염토양에 대한 정화대상지역은 제련소 굴뚝을 중심으로 반경 1.5 km 이내의 구역으로(환경부 매입구역) 대부분 논과 밭, 임야로 구성되어 있다. 논과 밭으로 사용되었던 지역은 현재 폐쇄되어 사용되고 있지 않지만 임야로 분류 되는 지역은 송림 산림욕장(이하 송림지역)으로 이용되고 있다. 또한 송림지역은 소나무 숲을 이루고 있어 오염토양 정화를 위한 폐쇄 및 굴착이 어려우므로 기존에 많이 적용되었던 적극적 처리방법(active treatment)에 의한 정화가 곤란한 지역이다. 따라서 송림지역 내 입지여건, 지형 및 사용현황을 고려하여 정화대상 부지에서 오염토양의 굴착이 수반되지 않으면서 생태계 교란을 최소화 할 수 있는 식물상 정화공법이 송림지역의 비소오염토양 정화를 위한 대안이 될 수 있다(Wuana and Okieimen, 2011; Ahmadvour et al., 2012).

*Corresponding author : kpnam@snu.ac.kr

Received : 2015. 8. 10 Reviewed : 2015. 8. 14 Accepted : 2015. 8. 25

Discussion until : 2016. 4. 30

식물상 정화공법은 오염토양에 정화식물을 식재하여 식물 근권에서 오염물질의 분해, 흡수, 안정화 기작 등을 이용하는 수동적 처리방법(passive treatment)으로 (구)장항제련소 부지와 같은 중금속 오염토양의 경우 식물 뿌리를 통해 오염물질을 흡수하여 제거하는 추출기작(phytoextraction)이 적용된다(Jadia and Fulekar, 2009). 식물상 정화공법은 식물의 생장을 기반으로 하기 때문에 토양세척공법 등 다른 물리·화학적 정화공법에 비해 정화효율이 낮고, 정화기간이 길다는 단점이 있다(Wuana and Okieimen, 2011). 이러한 저효율성을 극복하기 위해 근권 미생물을 적용한 식물상 정화공법의 효율 향상 연구에 대한 관심이 증가하고 있으며(Lugtenberg and Kamilova, 2009; Jeong et al., 2013), 최근 사이드로포어를 주입하여 식물생장을 촉진하고 토양 내 비소의 식물에의 이용성을 증가시키는 기작을 통한 효율 향상 연구가 이루어지고 있다(Wang et al., 2011; Jeong et al., 2014).

사이드로포어는 근권 미생물이 분비하는 철 이온 친화적인 킬레이트 물질로(Nair et al., 2007), 식물 생장에 필수 원소인 철 이온의 공급을 도와 식물 생장을 촉진하는 역할을 할 뿐 아니라 사이드로포어-비소 복합체 형성을 통해 비소의 식물에의 이용성도 증가시킬 수 있다(Jeong et al., 2014). 오염토양 내 비소는 대부분 철산화물과 결합한 형태로 존재하고 있으므로(Sharma and Sohn, 2009), 사이드로포어를 주입하게 되면 사이드로포어-철 이온 복합체 형성으로 철산화물 해리가 발생하고 이로 인해 철산화물에 결합하고 있던 비소가 토양 공극 내로 탈착된다. 이 과정에서 탈착된 비소가 사이드로포어-비소 복합체를 형성하게 되고(Jeong et al., 2014), 이는 비소가 토양 입자로 재흡착되는 것을 방지하여 토양 내 비소의 식물에의 이용성을 증가시키게 되고 궁극적으로 식물상 정화공법 효율 향상에 기여할 수 있다.

본 연구는 (구)장항제련소 부지 내 송림지역의 비소오염토양 정화를 위한 식물상 정화공법의 현장적용가능성 확인을 목적으로 한다. 송림지역의 토양 및 비소오염 특성을 파악하여 식물상 정화공법의 적용가능성을 판단하고, 사이드로포어 주입의 현장적용가능성을 확인하기 위해 미생물 활성화 실험과 파이로시퀀싱(pyrosequencing)기법을 이용한 현장 토양의 미생물 군집 분석을 수행하였다. 또한, 비소 과축적종으로 알려진 고사리(큰 봉의꼬리, *Pteris cretica*)를 이용한 실험실 규모의 화분실험을 수행하였다.

2. 연구방법

2.1. 송림지역 토양 특성 및 비소 오염도 분석

본 연구는 충청남도 서천군 장항읍에 위치한 (구)장항제련소 내 송림산림욕장으로 사용되고 있는 임야지역(이하 송림지역)을 대상으로 한다. 송림지역의 면적은 260,352 m²로 이는 환경부 매입구역(제련소 굴뚝 중심 반경 1.5 km 이내 지역) 전체 면적인 1,158,000 m²의 약 22%에 해당한다. 송림지역의 물리·화학적 토양특성 분석을 수행하고, 토양 내 비소 농도 및 비소 오염형태를 파악하였다.

토양시료를 지표면에서 깊이 15 cm 이내의 표토 시료를 17개 채취하였고, 풍건하여 2-mm 체로 거른 후 분석에 사용하였다. 토양 pH는 토양과 증류수를 1:5 비율로 혼합한 뒤 1 시간 방치 후 측정하였고(SSSA, 1996), 유기물함량은 Walkley-Black 방법을 이용해 측정하였다(Walkley and Black, 1934). 토성은 입자간 침강 속도 차이를 이용한 pipet법을 사용해 입경 분석을 하고, 미국 농무성법(USDA)에 따라 결정하였다. 토양 내 철, 알루미늄, 망간 산화물 함량은 Dithionite-Citrate-Bicarbonate method(DCB method)을 사용하여 측정하였다(SSSA, 1996).

송림지역 토양 내 비소 농도는 현행 토양오염공정시험기준에 따라 왕수추출법으로 측정하였고(KMOE, 2013), 비소의 오염도 파악을 위한 존재형태 분석은 Wenzel에 의해 제안된 5단계 연속추출법을 수행하였다(Wenzel et al., 2001). 이 방법은 토양 내 음이온 중금속의 존재형태를 구분하기 위해 널리 활용되는 방법으로 토양 내 비소를 비특이적 결합 비소(non-specifically bound As, fraction 1), 특이적 결합 비소(specifically bound As, fraction 2), 비결정질 철-알루미늄 산화물 결합 비소(amorphous Fe-Al oxide bound As, fraction 3), 결정질 철-알루미늄 산화물 결합 비소(crystalline Fe-Al oxide bound As, fraction 4), 그리고 잔류 비소(residual As, fraction 5)의 5가지 형태로 구분한다. 추출된 토양 내 비소 농도는 유도결합플라즈마발광광도기(ICP-OES, iCAP 7400 DUO, Thermo Scientific, USA)를 이용해 측정하였다.

2.2. 토양 미생물 활성화도 측정

(구)장항제련소 내 송림지역 토양에 사이드로포어 분비 미생물을 주입할 경우 주입 미생물의 생존가능성을 확인하기 위해 토양 내 미생물 활성화도를 측정하였다. 송림지역의 비소오염토양에 미생물은 16주 동안 2주 간격으로 반복적으로 주입되었고, 미생물 활성화도는 미생물 주입 후

4, 16 주에 측정하였다. 모든 실험은 삼반복으로 수행되었다. 토양 내 미생물의 활성 측정을 위해 가장 대표적으로 사용되는 탈수소효소활성측정법(dehydrogenase activity)과 인산기수분해효소측정법(phosphatase activity)을 수행하였다.

탈수소효소활성측정법은 전자수용체로 INT(2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium)를 사용하는 방법이다(Gong et al., 2001). 토양시료 2.5 g(wet wt.)에 2.5 mL의 0.1%(w/v) INT 용액을 넣고 혼합한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 때 INT 용액은 0.5 M tris buffer를 이용하며 pH 7.6에 적정하여 사용한다. 배양 후 10 mL의 tetrahydrofuran(HPLC grade)을 넣은 후 혼합하여 0.45 µm filter(SmartPor® GHP syringe filter)로 여과하여 환원된 INF(iodonitrotetrazolium formazan)를 436 nm 파장에서 분광광도계(OPTIZEN 2120UV, MECASYS, Korea)로 측정하였다.

인산기수분해효소측정법은 1 g(wet wt.)의 토양시료에 0.2 mL의 toluene과 4 mL의 Modified Universal Buffer (MUB) 용액, 1 mL의 *p*-nitrophenyl phosphate(*p*-NPP) 용액을 넣은 후 혼합하여 마개를 덮고 37°C에서 1시간 배양하였다(Turner, 2010). MUB 용액은 12.1 g의 tris-hydroxymethyl aminomethaoane(THAM), 11.6 g의 maleic acid, 14.0 g의 citric acid, 6.6 g의 boric acid를 488 mL의 1 N sodium hydroxide에 녹인 후, 증류수로 용액의 부피가 1 L가 되도록 희석하여 제조한다. 배양이 끝나면 0.5 M CaCl₂ 1 mL와 0.5 M NaOH 4 mL를 넣고 혼합한 뒤 0.45 µm filter(SmartPor® GHP syringe filter)로 여과하여 400 nm에서 분광광도계(OPTIZEN 2120UV, MECASYS, Korea)를 이용해 흡광도를 측정하였다.

2.3. 화분실험

실험실 규모의 화분실험은 비소의 과축적종으로 알려진 고사리류인 *Pteris cretica*(큰봉의 꼬리)를 대상으로 이루어졌다(Wei and Chen, 2006). 화분실험은 식물생장상(E15, Conviron Inc., Canada) 내에서 일정한 환경조건(25 ± 1°C, 18시간 광주기)을 유지하며 16주 동안 이루어졌다. 9.0 cm 지름, 10 cm 높이의 화분에 500 g의 송림지역 비소오염토양을 채우고 고사리를 식재하였고, 송림지역 토양의 토양 수분 보유능(WHC)인 7% 이상을 유지하며 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 식물상 정화공법의 효율 향상을 위한 사이드로포어(siderophore)의 적용은 사이드로포어 분비 미생물 중 하나인 *Pseudomonas aeruginosa*를 토양에 주입하거나(Visca et al., 1992) *P. aeruginosa*가 분비한 사이드

로포어가 포함된 배지상등액(SCF, siderophore containing filtrate)의 형태로 주입하는 것으로 구분된다. 미생물 형태의 주입을 위해 *P. aeruginosa*를 succinate medium에서 18-24시간 배양 후(≈10⁸ cfu/mL) 미생물을 원심분리하였다. 미생물을 succinate medium에 재부유(resuspension)시키고, 이 용액을 주사기를 이용해 WHC 만큼 근권에 주입하였다. 사이드로포어 포함 배지상등액(SCF)은 succinate medium에 *P. aeruginosa*를 18-24시간 배양한 후 원심분리하여 미생물을 제거하고, 미생물이 제거된 배지상등액을 주사기를 이용해 WHC 만큼 근권에 주입하였다. 미생물과 사이드로포어 포함 배지상등액은 16주 동안 2주 간격으로 근권에 반복 주입하였다.

화분실험은 비멸균오염토양에 고사리만 식재한 대조군과 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군, 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 사이드로포어 포함 배지상등액(SCF)을 주입한 실험군으로 구분된다. 또한 외부에서 주입한 미생물(*P. aeruginosa*)의 활성을 최대화시켜 효율을 비교하고, 토양 내 토착 미생물과 주입 미생물(*P. aeruginosa*)의 경쟁 여부를 확인하기 위해 비멸균오염토양에 감마선을 조사하여 멸균시킨 토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군을 추가하여 수행하였다. 모든 실험은 삼반복으로 수행되었다.

화분실험 후 식물체의 수확은 4주 간격으로 각각 4, 8, 12, 16주에 이루어졌으며, 식물체의 건조중량(biomass), 식물체 내 비소 농도를 관찰하였다. 수확한 식물체는 식물체 표면의 흙을 제거하기 위해 증류수로 세척한 뒤 뿌리, 줄기, 잎으로 구분하여 70°C 오븐에서 3일 동안 건조시켜 건조중량을 측정하였다. 식물체 내 비소 농도는 USEPA 3052 방법에 따라 1 g의 건조된 식물체에 HNO₃, H₂O₂, H₂O(9 : 1 : 1, v/v/v)를 넣고 마이크로웨이브(MSP1000, CEM, USA)로 전처리 후 ICP-OES(iCAP 7400 DUO, Thermo Scientific, USA)를 이용해 측정하였다.

2.4. 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 이용한 미생물 군집 분석

송림지역 토양 내 사이드로포어 분비 미생물의 존재 여부를 확인하여 사이드로포어 분비 미생물의 현장적용가능성을 확인하기 위해 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 이용하여 미생물 군집분석을 수행하였다. 송림지역에서 17개 토양시료를 채취하여 FastDNA SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals, USA)을 사용해 DNA를 추출하고, barcode가 포함된 fusion primer를 사용해 PCR 증폭 과정을 거친다. PCR 반응을 위한 혼합물은 10x Taq buffer 5 µL,

2.5 mM의 dNTP 4 μ L, forward/reverse primer 각각 2 μ L, Taq polymerase 0.5 μ L, DNA 1 μ L를 혼합하여 50 μ L 부피로 제조하였다. Forward/reverse primer로는 9F(5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-ACAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 541R(5'-CCATC TCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AC-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. PCR 증폭은 95°C에서 5분간 polymerase 활성화 후, denaturation (95°C, 30초), annealing(55°C, 30초), extension(72°C, 30초)과정을 30회 반복 하고, final extension을 72°C에서 5분간 수행한 뒤 4°C에서 정지(hold)하였다. 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit(Qiagen, Valencia, USA)로 정제한 후 미생물 군집분석을 수행하였다. 파이로시퀀싱은 서울대학교 내 천랩(Chunlab, Inc., 서울, 한국)에서 이루어졌으며, GS Junior Sequencing system (Roche, Branford, USA)를 사용하였다. 얻어진 염기서열들은 97% 유사도 수준에서 OUTs(Operational Taxonomic Units)을 결정하였고, 염기서열의 분류학적 동정은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 검색을 통하여 database 내에 축적된 염기서열 정보들과 비교 분석하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.5. 통계 분석

모든 실험 결과는 신뢰수준 95%에서 Analysis of Variance (ANOVA)를 이용해 결과의 통계학적 유의성을 평가하였다($p < 0.05$).

3. 실험 결과 및 토의

3.1. 송림지역 토양 및 비소오염 특성 분석을 통한 식물상 정화공법의 적용가능성 확인

(구)장항제련소 내 송림지역 토양 특성 및 토양 내 비소의 오염특성은 Table 1에 정리되어 있다. 송림지역 토양은 pH가 6.6-7.3으로 평균 7.0, 유기물 함량은 5.9-6.3% 범위를 가지며 평균 6.2%로 나타났다. 이는 (구)장항제련소 부지 내 논과 밭으로 사용되는 다른 지역의 pH가 4.9-6.3이고 유기물 함량이 2.4-3.7%에 비해 상대적으로 높은 pH와 유기물함량을 가진다. 또한 86.7%의 모래, 7.1%의 실트, 6.2%의 점토로 이루어져 있어 사질토(sand)의 토성을 가지며, 철, 알루미늄, 망간 산화물은 각각 1,941, 182, 34.9 mg/kg의 함량을 보였다.

현행 토양오염 공정시험기준에 따라 왕수추출법으로 토양 내 비소 농도를 분석한 결과 14.4-170 mg-As/kg-soil의 범위를 가지며 평균 85.9 mg-As/kg-soil 농도의 비소로 오염되어 있었다. Wenzel et al.(2001)이 제안한 방법에 따라 토양 내 비소의 존재형태 분석 결과, 토양 내에서 상대적으로 약한 결합을 하고 있어 생물학적 이용성이 높을 것으로 예상되는 형태인 비특이적 결합 비소(fraction 1)와 특이적 결합 비소(fraction 2)의 비율은 약 11.1%였다. 토양 내 대부분의 비소는(약 75.0%) 철-알루미늄 산화물에 결합한 형태(fractions 3 and 4)로 존재하였고, 그 중에서도 비결정질 철-알루미늄 산화물에 결합한 형태(fraction 3)가 54.1%로 많은 비율을 차지했다.

식물상 정화공법의 현장적용성평가에서 가장 우선적으

Table 1. Physicochemical soil properties and chemical forms of As in forest soil used in this study

	Properties	Value	Unit
Soil	pH	7.00	-
	Organic matter	6.20	%
	Texture	Sand	-
	Sand	86.8	%
	Silt	7.10	%
	Clay	6.20	%
	Fe oxide content	1,941	mg/kg
	Al oxide content	182	mg/kg
	Mn oxide content	34.9	mg/kg
As concentration	Total As (aqua regia extractable)	85.9	mg/kg
	Non-specifically bound As (fraction 1)	1.00	%
	Specifically bound As (fraction 2)	10.1	%
	Amorphous Fe oxide bound As (fraction 3)	54.1	%
	Crystalline Fe oxide bound As (fraction 4)	20.9	%
	Residual As (fraction 5)	14.0	%

로 고려되어야 것이 식물의 생육 가능 여부이다. 토양에서 식물의 생육은 토성(토양입자 분포), 토양산도(pH), 유기물함량, 오염물질 존재와 농도 등에 영향을 받는다(Ndema et al., 2010). 고사리류(e.g., *P. cretica*)는 내습 및 내건성이 모두 양호하여 양지부터 음지까지 다양한 환경조건에서 생육이 가능하며, 특히 통기성이 좋은 사토 토양이 재배적지라고 알려져 있다(농촌진흥청, 2011). 송림지역 토양이 배수가 잘되는 사질(sand) 토양일 뿐 아니라 식물의 생장을 위한 적정 토양산도(pH)가 6.0~7.0, 유기물함량이 3~5% 이상임을 고려해 볼 때(국립농업과학원, 2010), 송림지역 토양에서 식물상 정화공법을 수행하기 위한 고사리류의 생육이 충분히 가능할 것으로 판단된다. 또한 철 산화물 결합 비소의 식물에의 이용성 향상을 주요 기작으로 하는 사이드로포어(siderophore)는 결정질 철 산화물 결합 비소에 비해 비결정질 철 산화물 결합 비소에 보다 효과적으로 적용할 수 있다(Jeong et al., 2014). 송림지역은 오염토양 내 대부분의 비소가 철-알루미늄 산화물에 결합한 형태로(약 75.0%) 존재할 뿐 아니라 비결정질 철-알루미늄 산화물 결합 비소가 더 많은 비율을(약 54.1%) 차지하고 있으므로 사이드로포어(siderophore)를 적용했을 때 식물상 정화공법의 효율이 향상될 수 있는 가능성이 높은 지역으로 판단된다.

3.2. 주입 미생물의 토양 내 활성도 확인

식물상 정화공법의 효율 향상을 위해 외부에서 인위적으로 미생물을 주입할 경우 주입한 미생물의 토양 내 생존 및 활성도와 정화 효율은 높은 상관성을 가진다(Jeong et al., 2013). 따라서 식물상 정화공법의 효율 향상을 위한 사이드로포어의 현장적용가능성을 판단하기 위해 주입한 미생물이 토양 내에서 생태적 지위(ecological niche)를 확보하여 생존하고, 활성을 유지하며 서식 가능한지를 확인할 필요가 있다. Table 2는 송림지역의 비소오염토양에 *P. aeruginosa*의 주입한 후 시간에 따른 미생물 활성도 변화를 측정된 결과이다.

탈수소효소활성측정법(dehydrogenase activity)의 경우, 미생물을 주입하지 않은 오염토양은 4주와 16주에 각각 평균 2.52(±0.12)과 평균 2.61(±0.08)의 활성도를 나타내

시간에 따른 활성도가 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않고($p > 0.05$), 일정하게 유지되었다. 반면 미생물을 주입한 오염토양의 경우 주입 후 4주에는 평균 2.34(±0.43)로 나타나 미생물을 주입하지 않은 오염토양과 미생물 활성도의 차이가 없었으나, 16주에는 평균 3.20(±1.04)로 미생물의 활성도가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 인산가수분해효소측정법(phosphatase activity)으로 측정된 미생물 활성도의 경우에도 미생물 주입 후 4주에는 미생물을 주입하지 않은 토양과 주입한 토양 각각 평균 0.88(±0.02), 0.87(±0.12)로 나타나 미생물 주입여부에 관계없이 유사한 활성도를 나타냈다. 주입 후 16주가 되자 미생물을 주입하지 않은 토양은 평균 0.70(±0.05)으로 활성도가 다소 감소하였으나($p < 0.05$), 미생물을 주입한 토양은 평균 0.87(±0.06)으로 나타나 활성도가 일정하게 유지되었다.

탈수소효소활성측정법과 인산가수분해효소측정법 모두에서 *P. aeruginosa*를 주입하지 않은 오염토양에서는 시간이 지남에 따라 미생물 활성이 감소하거나 변화가 없었다. 하지만 *P. aeruginosa*를 주입한 오염토양에서는 초기에는 미생물을 주입하지 않은 토양과 활성도가 유사했으나 미생물을 반복적으로 주입하면서 시간이 지남에 따라 미생물 활성이 유지되거나 증가하는 경향을 보였다. 이는 토양에 주입한 *P. aeruginosa*가 시간이 지나도 토양 내에서 사멸하지 않고 미생물 활성을 유지하고 있음을 의미한다.

3.3. 파이로시퀀싱을 통한 송림지역 토양 내 미생물의 군집분석

송림지역 토양 내 사이드로포어 분비 미생물의 존재여부 및 분포를 확인하기 위해 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다. 대상 연구 부지의 17개의 비소 오염토양에서 토양 내 미생물 군집을 분석한 결과, 평균 6,070개(1,933-11,213 개)의 16S rRNA gene sequence를 획득하였다. 97%의 염기서열 간 유사도를 기준으로 OTUs(Operational Taxonomic Units)를 결정했을 때, 송림지역 토양에서는 최소 1,157개, 최대 4,688개로 평균 2,756개의 OTUs가 관찰되었다.

토양 내 미생물 군집을 속(genus) 수준으로 분류해보면

Table 2. Changes of microbial activity in forest soil with time

Microbial activity test	Dehydrogenase activity		Phosphatase activity	
	4	16	4	16
Soil without bacterial addition	2.52 ± 0.12	2.61 ± 0.08	0.88 ± 0.02	0.70 ± 0.05
Soil with bacterial addition	2.34 ± 0.43	3.20 ± 1.04	0.87 ± 0.12	0.87 ± 0.06

Table 3. Composition of microbial community at genus level in forest soil

Genus	Ratio (%)	Genus	Ratio (%)	Genus	Ratio (%)
<i>Bradyrhizobium</i>	1.21	<i>Nocardioides</i>	0.43	<i>Phenylbacterium</i>	0.26
<i>Sphingomonas</i>	1.20	<i>Telmatobacter</i>	0.42	<i>Microvirga</i>	0.25
<i>Pedomicrobium</i>	1.20	<i>Conexibacter</i>	0.41	<i>Mesorhizobium</i>	0.25
<i>Pseudolabrys</i>	0.93	<i>Dongia</i>	0.41	<i>Pseudomonas</i>	0.19
<i>Streptomyces</i>	0.84	<i>Devosia</i>	0.38	<i>Actinoplanes</i>	0.19
<i>Gaiella</i>	0.78	<i>Reyranella</i>	0.38	<i>Ramlibacter</i>	0.19
<i>Terrimonas</i>	0.75	<i>Pirellula</i>	0.36	<i>Micromonospora</i>	0.18
<i>Steroidobacter</i>	0.73	<i>Rhizomicrobium</i>	0.35	<i>Pseudonocardia</i>	0.15
<i>Solibacter</i>	0.70	<i>Rhizobium</i>	0.35	<i>Methylbium</i>	0.12
<i>Burkholderia</i>	0.58	<i>Solirubrobacter</i>	0.34	<i>Aciditerrimonas</i>	0.12
<i>Arthrobacter</i>	0.58	<i>Pedosphaera</i>	0.33	<i>Legionella</i>	0.12
<i>Acidobacterium</i>	0.58	<i>Bauldia</i>	0.30	<i>Opitutus</i>	0.12
<i>Bacillus</i>	0.56	<i>Flavitalea</i>	0.28	<i>Variovorax</i>	0.11
<i>Mycobacterium</i>	0.53	<i>Hyphomicrobium</i>	0.27	<i>Others (<0.1%)</i>	30.3
<i>Nitrospira</i>	0.50	<i>Paenibacillus</i>	0.27	<i>Uncultured</i>	50.4

(Table 3), 발견된 미생물 중 uncultured 미생물이 50.4%였고, 전체 군집 중 차지하는 비율이 0.1% 이하인 미생물이 30.3%로 나타났다. 이들을 제외하면 *Bradyrhizobium*이 1.21%로 전체 군집 중 차지하는 비율이 가장 높았고, *Sphingomonas*, *Pedomicrobium*, *Pseudolabrys*순으로 각각 1.20, 1.20, 0.93%를 차지하여 상대적으로 높은 비율로 발견되었다. Table 3에서 굵은 글씨로 표기된 미생물 속(genus)은 사이드로포어 분비 미생물을 나타낸다. 본 연구에서 사이드로포어 분비 미생물로 사용한 *P. aeruginosa*가 속한 *Pseudomonas*는 0.19%로 나타났다. 속(genus) 수준에서 가장 높은 비율로 발견된 *Bradyrhizobium* (Guerinot et al., 1990; Abd-Alla, 1998)와 *Rhizobium* 속(genus)에 해당하는 미생물도 일반적으로 사이드로포어 분비 미생물로 알려져 있다(Berraho et al., 1997). 전체 미생물 군집 중 *Rhizobium* 속(genus)은 0.35%를 차지하였다. 토양 내 미생물 군집을 종(species) 수준으로 분석하면, 총 5,537종(species), 평균 6,069개(1,933-11,213개)의 미생물이 발견되었다. 대부분의 종(species)은 모두 uncultured 미생물이었으며, 염기서열이 확인된 미생물 종(species) 중에서 가장 많이 발견된 종(species)은 0.50%를 차지한 *Bradyrhizobium jicama*이었다. 본 연구에서 사용한 *P. aeruginosa*의 경우 0.02-0.03% 발견되었다. 검출된 미생물 종(species)의 최대 비율이 1.27%임을 감안 하더라도 *P. aeruginosa*와 같은 사이드로포어 분비 미생물이 송림지역 토양 내 미생물 군집에서 매우 낮은 비율을 차지하고 있다. 따라서 현장토양에 추가적인 사이드로포어를 주입하여 식물상 정화공법을 수행할 경우 비소정화효율 향상을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

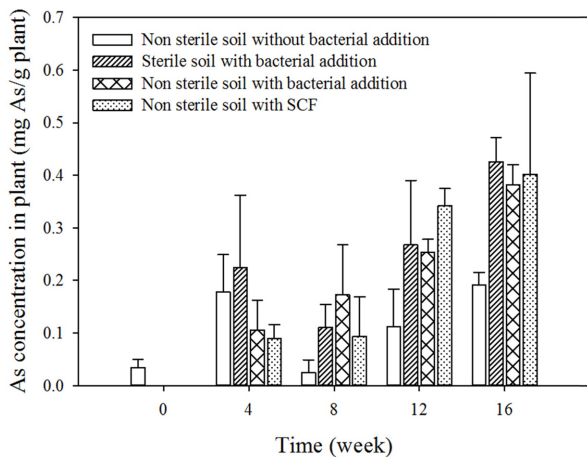
3.4. 화분실험을 통한 (구)장항제련소 송림지역에 대한 식물상 정화공법의 적용

송림지역 비소오염토양(비멸균오염토양)에 고사리(*Pteris cretica*)를 식재하여 수행한 화분실험 결과(Table 4), 식재 후 4주에 평균 0.18(±0.07) mg-As/g-plant의 비소가 식물체 내에 축적되었고, 16주에 식물체 내 비소의 농도는 평균 0.19(±0.02) mg-As/g-plant로 나타났다. 식물의 생체량(biomass)과 식물체 내 축적농도를 고려하여 계산된 고사리에 의해 토양으로부터 제거되는 비소의 양은 4주와 16주 각각 평균 0.58(±0.29), 0.48(±0.03) mg-As이었다. 이는 비소오염토양에서 자란 *P. cretica*를 수확하여 식물체 내 비소 축적을 확인한 결과 0.14-0.34 mg-As/g-plant의 비소가 축적되었고(Wei and Chen, 2006), 6주 동안 비소오염토양에 식재한 고사리를 수확하여 비소 농도를 분석한 결과 약 0.02-0.13 mg-As/g-plant의 농도를 나타낸(Fayiga and Ma, 2005) 다른 연구들과 유사한 고사리 내 비소 축적량을 나타낸다.

사이드로포어에 의한 식물상 정화공법의 비소제거효율 향상을 확인하였다. 사이드로포어 분비 미생물인 *P. aeruginosa*를 주입한 경우 식물체 내 비소 농도 증가가 더욱 두드러졌다(Fig. 1). 식재 후 4주에 식물체 비소농도는 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군에서 평균 0.11(±0.06) mg-As/kg-soil를 나타냈고, 식재 후 16주에는 0.38(±0.04) mg-As/kg-soil로 나타나 약 3배 이상 증가하였다($p < 0.05$). 사이드로포어를 주입하지 않은 비멸균오염토양에서 식물체 내 비소 농도가 4주와 16주에서 평균 0.18(±0.07), 0.19(±0.02) mg-As/g-plant로 일정하게 유지된 것에 비해 비소제거효

Table 4. As concentration in plant, plant biomass, and uptake As concentration by plant during pot experiment

Treatment	Time (week)	Concentration of As in plant (mg-As/g-plant)	Biomass (g)	Uptake As by plant (mg-As)
Non sterile soil without bacterial addition	4	0.18 ± 0.07	3.21 ± 0.94	0.58 ± 0.29
	16	0.19 ± 0.02	2.52 ± 0.13	0.48 ± 0.03
Non sterile soil with bacterial addition	4	0.11 ± 0.06	2.63 ± 0.63	0.30 ± 0.20
	16	0.38 ± 0.04	2.71 ± 0.18	1.03 ± 0.05
Sterile soil with bacterial addition	4	0.22 ± 0.14	2.55 ± 0.17	0.59 ± 0.31
	16	0.43 ± 0.05	4.10 ± 0.93	1.76 ± 0.42

**Fig. 1.** Changes of As concentration in *Pteris cretica* during pot experiment.

율이 매우 크게 향상되었다. 멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군의 경우에도 식재 후 4주와 16주에 식물체 내 비소 농도는 각각 평균 0.22 (± 0.14), 0.43 (± 0.04) mg-As/kg-soil로 나타나 시간이 지남에 따라 식물체 내 비소 농도가 증가하였다. 식재 후 4주 후에는 *P. aeruginosa*를 주입한 멸균오염토양에서의 고사리의 비소 축적 정도가 비멸균오염토양에 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군보다 높게 나타났지만 ($p < 0.05$), 16주에는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$).

식물체 생체량(biomass)과 식물체 내 축적된 비소의 농도를 고려하여 계산된 토양으로부터 제거되는 비소의 양도 시간이 지남에 따라 사이드로포어 주입 실험군이 사이드로포어를 주입하지 않은 대조군에 비해 증가하였다 (Table 4). 고사리 식재 후 4주에는 비멸균오염토양에 *P. aeruginosa*를 주입하지 않은 대조군과 멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군, 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군 모두에서 토양으로부터 제거되는 비소의 양이 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 하

지만 식재 후 16주에는 비멸균오염토양에 미생물을 주입하지 않은 대조군과 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군에서 각각 평균 0.48 (± 0.03), 1.03 (± 0.05) mg-As으로 나타나 미생물 주입에 의한 비소제거효율이 증가하였다. 또한 멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군에서 제거되는 비소는 평균 1.76 (± 0.42) mg으로 나타나 가장 많은 양의 비소가 제거되었다. 이는 *P. aeruginosa*를 주입한 멸균오염토양에 식재한 고사리의 생체량(biomass) 증가때문으로 판단된다. 앞서 언급했듯이 고사리 내 비소 농도의 경우 멸균 오염토양과 비멸균 오염토양에 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 하지만 식물 생체량은 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 경우 식재 후 16주 후에 평균 2.71 (± 0.18) g으로 나타난 반면 멸균오염토양에 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군의 고사리는 4.10 (± 0.93) g으로 나타나 오염토양의 멸균여부에 따라 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 이러한 차이는 비멸균 토양에 주입한 *P. aeruginosa*가 토착 미생물간의 경쟁에 의해 생태학적 지위(ecological niche) 확보가 토착미생물이 멸균된 토양에 비해 상대적으로 불리하기 때문으로 판단된다 (Li and Alexander, 1990; van Veen et al., 1997).

한편, 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 *P. aeruginosa*를 주입한 실험군과 비멸균오염토양에 고사리를 식재한 후 사이드로포어 포함 배지상등액(SCF)을 주입한 실험군에서의 비소제거효율은 통계학적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다 ($p > 0.05$) (Fig 1). 이는 오염토양에 사이드로포어의 주입형태는 식물상 정화공법의 효율에 큰 영향을 주지 않음을 의미한다. 따라서 송림지역에 사이드로포어의 적용으로 향상된 식물상 정화공법을 수행할 경우 배양액에서 미생물을 제거하는 전처리 과정이 필요한 사이드로포어 포함 배지상등액(SCF) 형태의 주입보다 사이드로포어 분비 미생물인 *P. aeruginosa*의 직접 주입이 경제적으로 더 효율적일 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 (구)장항제련소 내 송림지역의 토양 및 비소오염 특성을 파악하여 식물상 정화공법의 적용 가능성을 확인하였다. 송림지역 토양에서 대부분의 비소가 비결정질 철산화물과 결합한 형태로 존재함을 확인하였고, 식물상 정화공법을 수행할 경우 철 산화물 해리를 통해 비소의 이동성을 증가시킬 수 있는 사이드로포어를 주입하여 비소제거효율 향상을 확인하였다. 미생물 활성도 시험과 근집분석을 통해 외부에서 송림지역 오염토양에 주입한 미생물이 생존할 수 있으며, 송림지역에 사이드로포어 분비 미생물 주입에 의한 비소제거효율 향상 가능성을 확인하였다. 실험실 규모의 화분실험을 수행하여 송림지역 토양 내 비소의 과축적종인 고사리(*P. cretica*)에 의한 효과적인 비소 축적을 확인하였으며, 사이드로포어를 주입한 경우 비소제거효율이 약 3 배이상 증가함을 알 수 있었다. 본 결과는 향후 (구)장항제련소 내 송림지역의 비소오염토양 정화계획 수립을 위한 기초자료로 유용하게 활용될 수 있다.

사 사

본 연구는 환경부의 토양·지하수 오염방지기술개발사업인 GAIA(Geo-Advanced Innovative Action) Project의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Abd-Alla, M.H., 1998, Growth and siderophore production *in vitro* of Bradyrhizobium (Lupin) strains under iron limitation, *Eur. J. Soil Biol.*, **34**(2), 99-104.
- Ahmadpour, P., Ahmadpour, F., Mahmud, T.M.M., Abdu, A., Soleimani, M., and Hosseini Tayefeh, F., 2012, Phytoremediation of heavy metals: A green technology, *Afr. J. Biotechnol.*, **11**(76), 14036-14043.
- Berraho, E.L., Lesueur, D., Diem, H.G., and Sasson, A., 1997, Iron requirement and siderophore production in Rhizobium ciceri during growth on an iron-deficient medium, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**(5), 501-510.
- Fayiga, A.O. and Ma, L.Q., 2005, Arsenic uptake by two hyper-accumulator ferns from four arsenic contaminated soils, *Water Air Soil Pollut.*, **168**(1-4), 71-89.
- Gong, P., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., and Sunahara, G.I., 2001, Ecotoxicological effects of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine on soil microbial activities, *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**(5), 947-951.
- Guerinot, M.L., Meidl, E.J., and Plessner, O., 1990, Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*, *J. Bacteriol.*, **172**(6), 3298-3303.
- Im, J., Kim, Y.-J., Yang, K., and Nam, K., 2014, Applicability of soil washing with neutral phosphate for remediation of arsenic-contaminated soil at the former Janghang smelter site, *J. Soil Groundw. Environ.*, **19**(4), 45-51.
- Jadia, C.D. and Fulekar, M.H., 2009, Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques, *Afr. J. Biotechnol.*, **8**(6), 921-928.
- Jeong, S., Moon, H.S., Shin, D., and Nam, K., 2013, Survival of introduced phosphate-solubilizing bacteria (PSB) and their impact on microbial community structure during the phytoextraction of Cd-contaminated soil, *J. Hazard Mater.*, **263**, 441-449.
- Jeong, S., Moon, H.S., and Nam, K., 2014, Enhanced uptake and translocation of arsenic in Cretan brake fern (*Pteris cretica* L.) through siderophore-arsenic complex formation with an aid of rhizospheric bacterial activity, *J. Hazard Mater.*, **280**, 536-543.
- Kim, Y.-H., Kim, D.-H., Jung, H.-B., Hwang, B.-R., Ko, S.-H., and Baek, K., 2012, Pilot scale *ex-situ* electrokinetic remediation of arsenic-contaminated soil, *Separ. Sci. Technol.*, **47**(14-15), 2230-2234.
- KMOE (Korea Ministry of Environment), 2013, Official Test Methods of Soil Quality, 2013-113/2000000025462.
- Li, D.-M. and Alexander, M., 1990, Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to enhance rhizobial colonization and nodulation, *Plant and Soil* **129**(2), 195-201.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F., 2009, Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**, 541-556.
- Nair, A., Juwarkar, A., and Singh, S., 2007, Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil, *Water Air Soil Pollut.*, **180**(1-4), 199-212.
- National Academy of Agricultural Science, 2010, Soil and nutrient management in agricultural land, 11-1390802-000270-01.
- Ndema, N.E., Etame, J., Taffouo, V.D., and Bilong, P., 2010, Effects of some physical and chemical characteristics of soil on productivity and yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in coastal region (Cameroon), *Afr. J. Environ. Sci. Technol.*, **4**(3), 108-114.
- Rural Development Administration, 2011, Manual for improving agricultural income (special purpose crop), 11-1390000-002938-01.
- Sharma, V.K. and Sohn, M., 2009, Aquatic arsenic: Toxicity,

- speciation, transformations, and remediation, *Environ. Int.*, **35**(4), 743-759.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V.P., and Prasad, S.M., 2015, Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review, *Ecotox. Environ. Safe.*, **112**, 247-270.
- SSSA (Soil Science Society of America), 1996, Methods of Soil Analysis, Part 3- chemical methods, Soil Science Society of America Inc. and American Society of Agronomy Inc., Wisconsin, USA.
- Turner, B.L., 2010, Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**(19), 6485-6493.
- van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., and van Elsas, J.D., 1997, Fate and activity of microorganisms introduced into soil, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**(2), 121-135.
- Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N., and Chiancone, E., 1992, Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(9), 2886-2893.
- Walkley, A. and Black, I.A., 1934, An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method., *Soil Sci.*, **37**(1), 29-38.
- Wang, Q., Xiong, D., Zhao, P., Yu, X., Tu, B., and Wang, G., 2011, Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17, *J. Appl. Microbiol.*, **111**(5), 1065-1074.
- Wei, C.-Y. and Chen, T.-B., 2006, Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation, *Chemosphere*, **63**(6), 1048-1053.
- Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stinger, G., Lombi, E., and Adriano, D.C., 2001, Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure, *Anal. Chim. Acta.*, **436**(2), 309-323.
- Wuana, R.A. and Okieimen, F.E., 2011, Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation, *ISRN Ecol.*, 2011, 20.
- Yang, K., Im, J., Jeong, S., and Nam, K., 2014, Determination of human health risk incorporating experimentally derived site-specific bioaccessibility of arsenic at an old abandoned smelter site, *Environ. Res.*, **137**, 78-84.