MMPH-0 (*Enterobacter aerogenes*)에 의한 6가 크롬 오염 지하수의 생지화학적 정화

서현희¹ · 이성근² · 김강주³ · 박은규⁴ · 김영규⁴ · 전철민⁵ · 문지원⁶ · 노열^{1*}

¹전남대학교 자연과학대학 지구환경과학부, ²충북대학교 자연과학대학 미생물학과

³군산대학교 공과대학 환경공학과, ⁴경북대학교 자연과학대학 지질학과, ⁵한국지질자원연구원 지구환경연구본부

⁶오크릿지 미국립연구소 미생물 생리학 및 병리학 그룹

Biogeochemical Remediation of Cr(VI)-Contaminated Groundwater using MMPH-0 (*Enterobacter aerogenes*)

Hyunhee Seo¹, Sung-Keun Rhee², Kangjoo Kim³, Eungyu Park⁴, Yeongkyoo Kim⁴,
Chul-Min Chon⁵, Ji-Won Moon⁶ and Yul Roh^{1*}

¹Department of Earth and Environmental Sciences, Chonnam National University, Gwangju, Korea

²Department of Microbiology, Chungbuk National University, Chungju, Korea

³Department of Environmental Engineering, Kunsan National University, Kunsan, Korea

⁴Department of Geology, Kyungpook National University, Daegu, Korea

⁵Geologic Environment Division, Korea Institute of Geosciences and Mineral Resources, Daejeon, Korea

⁶Biosciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA

Indigenous bacteria isolated from contaminated sites play important roles to remediate contaminated groundwater. Chromium has the most stable oxidation states. Cr(VI) is toxic, carcinogenic, and mobile, but Cr(III) is less toxic and immobile. In this study, indigenous microorganism (MMPH-0) was enriched from Cr(VI) contaminated groundwater, and identified by 16S rRNA gene analysis. Using MMPH-0, the effect of stimulating with e-donors (glucose, lactate, acetate, and no e-donor control), respiration conditions, biomass, tolerance, and geochemical changes on Cr(VI) reduction were investigated in batch experiments for 4 weeks. The changes of Cr(VI) concentration and geochemical conditions were monitored using UV-vis-spectrophotometer and Eh-pH meter. And the morphological and chemical characteristics of MMPH-0 and precipitates in the effluents were characterized by TEM-EDS and SEM-EDS analyses. MMPH-0 (*Enterobacter aerogenes*) was able to tolerate up to 2000 mg/L Cr(VI) and reduce Cr(VI) under aerobic and anaerobic conditions. MMPH-0 performed faster and higher efficiency of Cr(VI) reduction with electron donors (over 70% after 1 week with e-donor, 10-20% after 4 weeks without e-donor). The changes of Eh-pH in effluents showing the tendency from oxidizing to reducing condition and a bit of acidic change in pH due to microbial oxidation of organic matters donating electrons and protons suggested the roles of MMPH-0 on Cr(VI) in the contaminated water catalyzing to transit geochemical stable zone for more stable Cr(OH)₃ or Cr(III) precipitates. TEM/SEM-EDS analyses of MMPH-0 and precipitates indicate direct and indirect Cr(VI) reduction: extracellular polymers capturing Cr component outside cells. These results suggested diverse indigenous bacteria and their biogeochemical reactions might enhance more effective and feasible remediation technology of redox sensitive heavy metals in metal-contaminated in groundwater.

Key words : indigenous bacteria, *Enterobacter aerogenes*, Cr(VI), biogeochemistry, reduction-oxidation reaction

오염환경에 서식하는 토착미생물은 환경정화에 중요한 역할을 담당하며 이 연구는 6가 크롬 오염 지하수에서 분리한 미생물을 이용해 반응성, 이동성, 발암성 높은 6가 크롬을 당대사 조효소인 3가 크롬으로 환원/침전시켜 경제적, 친환경적, 생지화학적 정화의 효율성을 알아보았다. 미생물 농화배양과 조성분석, 호기와 혐기환경의 6가 크롬 환원과

*Corresponding author: rohy@jnu.ac.kr

내성, 전자공여체별 6가 크롬 환원, 지화학적 변화, 미생물 외형과 Cr(III) 침전물의 광물특성을 연구한 결과, 분리한 MMPH-0(*Enterobacter aerogenes*)는 혐기/호기환경에서 6가 크롬 내성과 환원능(유기산 주입 1주 후 70%, 주입 안한 경우 4주 후 10 ~ 20%)이 있고, Eh는 미생물의 유기산 산화로 생성된 전자에 의해 산화에서 환원환경, pH는 중성에서 약산성으로 변화되어 Cr(OH)₃/Cr(III) 침전물이 형성되었다. SEM/TEM-EDS 결과 2~5 μm 막대형 미생물과 세포 밖 Cr(III) 침전물은 지화학적 환경변화와 유기산 산화에 따른 전자공여에 의한 환원의 근거가 된다. 지화학적 촉매제 토착미생물의 활성화로 산화환원에 민감한 중금속 오염 지하수 정화에 효율적 기술 응용이 기대된다.

주요어 : 토착미생물, *Enterobacter aerogenes*, 6가 크롬, 생지화학, 산화환원반응

1. 서 언

우리나라에서 연간 지하수 이용량은 2006년 말 전국 130여만 개소에서 37.5억 m³으로 총 용수 이용량의 약 11%를 차지하며 지속적인 용수개발로 지하수의 수자원으로서의 중요성도 커지고 있다(Moon, 2007). 반면 유기화합물과 중금속 오염과 같은 지하수장해에 대한 체계적인 대응이 요구되고 있다. 크롬은 세계적으로 자동차, 항공산업 등에 합금, 도금 및 강화제, 방부제, 방식제, 착색제, 피혁처리제, 촉매제, 제련제 등에 가장 광범위하게 사용되는 전략적 산업 물질이지만(Guertin *et al.*, 2005), 다양하고 광범위한 사용으로 토양이나 지하수의 주요 오염원이기도 하다. 이러한 크롬은 여러 산화형태를 가지며 주로 0가 크롬(금속), 3가 크롬, 6가 크롬 형태로 안정하게 나타나며 3가 크롬은 이동도, 독성, 활성도가 낮은 반면 6가 크롬은 강력한 산화제로서 토양/ 지하수 내에서 이동도와 반응성이 높고 독성도 매우 높다. 인체에 미치는 영향으로도 3가 크롬의 경우 포도당과 지방의 대사작용에 필요한 필수미량원소인 반면 6가 크롬은 발암, 기형, 돌연

변이성 물질로 알려져 있다. 특히 6가 크롬은 중크롬 산염(H₂CrO₄⁰, HCrO₄⁻, CrO₄²⁻, CrO₇²⁻)으로 존재하고 수용액의 농도에 따라서 진노랑에서 진주황 빛을 띄게 된다. 3가 크롬은 주로 pH = 3.5 이하에서 Cr³⁺로 존재하나 pH가 높아짐에 따라 CrOH²⁺, Cr(OH)₂⁺, Cr(OH)₃⁰, Cr(OH)₄⁻로 수화되면서 거의 녹색을 띄게 된다. 이러한 3가 크롬은 약산성-염기성 환경에서 침전되어 비정질의 수산화크롬(Cr(OH)₃)으로 형성되어 결정질의 수산화크롬(Cr(OH)₃·3H₂O)이나 에스콜라이트(Eskolaite, Cr₂O₃)가 된다(Rai *et al.*, 1987; Swayambunathan *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 2002; Daulton *et al.*, 2007).

지하수 환경에서 크롬의 화학적 특성과 거동은 pH와 Eh 범위에 따라 크게 달라지며 침전과 해리, 흡착과 탈착 등의 반응에 따라 크롬의 산화형태가 변화될 수 있어(Fig. 1A) 이러한 지화학적 특성은 6가 크롬 오염의 정화방법에 주요한 변인이 된다(Guertin *et al.*, 2005). 특히 6가 크롬 오염 지하수의 원위치 정화방법으로 양수처리(Pump-and-treat)방법이 오랜 동안 사용되어 왔으나 최근에는 지화학적 고정, 투수성 반응막

Fig. 1. (A) Geochemical reactions between Cr(VI) and Cr(III) species based on Bartlett (1991) and (B) Eh/pH diagram showing geochemically stable zonation of Cr species modified from Palmer and Wittbrodt (1991).

처리, 자연저감, 식물정화처리, 생물학적 정화(생환원반응, 생축적반응, 생광화작용, 생침전반응 포함) 등 다양하게 접근되고 있다(Berkeley lab., 2003; Turick *et al.*, 1997). 이 가운데 생지화학적 방법은 오염지역의 생태적 환경을 유지, 보존하여 친환경적이며 2차 오염물을 파생시키지 않고 비용과 효율성이 뛰어난 연구 결과가 있었다.

미생물에 의한 생지화학적 지하수 정화에 관한 관심과 연구는 더욱 더 높아지고 있으며 미생물에 의한 직접적, 간접적 대사 및 호흡활동으로 다양한 유독성 중금속들 예를 들어 6가 크롬, 2가 납, 6가 우라늄 등을 용해도와 이동성이 낮은 3가 크롬, 0가 납, 4가 우라늄으로 환원시켜 중금속과 방사능오염물질의 고정화에 활용되고 있다(Lovley *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2005). 특히 6가 크롬 환원에 관여하는 미생물에 대한 연구보고에 의하면 호기성의 *Agrobacterium* (Llovera, *et al.*, 1993), *Bacillus* (Cheung and Gu, 2005), *Escherichia coli* (Shen and Wang, 1993; Ackerley *et al.*, 2004), *Pseudomonas* (Hussein *et al.*, 2004; McLean, and Beveridge, 2000), 혐기성의 *Deinococcus radiodurans* (Appukuttan *et al.*, 2006), 통성혐기성의 *Shewanella* (Lowe *et al.*, 2003), *Enterobacter cloacae* (Iyer *et al.*, 2004), *Pantoea agglomerans* (Francis *et al.*, 2000), 그리고 황 환원 미생물의 *Desulfovibrio vulgaris* (Lovley *et al.*, 1993; Smith and Gadd 2000; Goulhen *et al.*, 2006), 저온성 미생물의 *Arthrobacte aurescens* (Horton *et al.*, 2006), 호산성 미생물의 *Acidiphilium cryptum* (Cummings *et al.*, 2007) 등 다양하게 분포되어 있다.

다양한 미생물의 다양한 호흡환경에 따른 다양한 대사작용에 대한 연구가 활발해지고 6가 크롬 환원 기작에 대한 다양한 경로에 대한 이해도도 높아지고 있다. *Enterobacter aerogenes*의 경우 6가 크롬 오염된 알칼리성 산업폐기물에서 분리되었고 pH = 8의 알칼리환경에서 생변형과 해독작용에 의한 6가 크롬 환원에 대한 기존 연구(Piñón-Castillo *et al.*, 2010)가 있었지만 많은 연구가 진행되지 않아 호기환경과 혐기환경 모두에서 6가 크롬 환원과 미생물의 성장(생체량 증가), 환원기작, 침전물의 특성 등의 연구가 필요한 실정이다.

미생물에 의한 생물학적 환원의 주요 기작으로 미생물의 호흡의 일환으로서 최종수용체로 6가 크롬의 환원이 이루어지거나, 환원 효소의 활성화에 의한 6가 크롬의 환원의 경우로 나눌 수 있다. 3가 크롬의 침전물은 수소이온농도의 6.5에서 9.5 범위의 염기성 환경에

서 3가 크롬의 용해도가 상승하고 이어서 용해도가 낮은 3가 크롬 중의 침전이 이루어지는데 이는 유기물의 농도와 깊은 상관관계를 갖는다. 특히 유기산이 증가할수록 수소이온농도에 영향을 미쳐 3가 크롬의 용해성의 증가를 연구한 결과도 있다(Remoundaki *et al.*, 2007). 또한 크롬 침전물은 순수한 수산화크롬형태, 철과 공침하여 형성된 $Cr_xFe_{1-x}(OH)_3$ 형태, 그리고 고분자 유기산 물질인 휴믹산 복합체와 결합된 형태가 있다는 보고가 있었다(Palmer and Puls, 1994). 미생물의 효소에 의한 3가 크롬의 최종산물에 대한 다양한 추정 가능성이 미생물의 효소에 의해 시토크롬이나 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드(NAD^+)와 같은 유기환원제와 결합하여 다양한 형태의 3가 크롬 화합물을 형성한다는 연구 결과가 있었다(Puzon *et al.*, 2005; Remoundaki *et al.*, 2007). 따라서 *Enterobacter aerogenes*에 의한 6가 크롬 환원과 내성, 유기산의 농도 차이에 따른 6가 크롬 환원량의 비교보다는 유기산의 종류별 6가 크롬 환원량과 유기산을 넣지 않은 대조군의 6가 크롬 환원량의 비교를 통해 자연저감법과 생축진법의 효율성 비교, 미생물의 활성화를 통한 지화학적 환경 변화에 따른 크롬의 화학종 변화, 미생물과 침전물의 형태적, 화학적 특성에 대한 연구가 필요했다.

2005년도 국내 지하수장해 관련 문제 해결 방안과 체계적 대응책 마련을 위해 실시한 수질 관측에서 6가 크롬 오염이 관측된 대전(문평) 지하수의 정화방안에 대한 연구가 진행되었으며 특히 토양의 6가 크롬 유효 환원능(Chon *et al.*, 2007)과 6가 크롬 오염 지하수의 6가 크롬 자연저감 가능성(Chon *et al.*, 2008)에 대한 연구가 진행되었다. 이 연구는 6가 크롬 오염 지하수에서 농화배양 및 분리된 미생물을 이용하여 독성과 이동도가 낮은 3가 크롬으로의 생환원반응을 통한 지화학적 정화기술의 확보와 효율성을 알아보기 위하여 6가 크롬 오염 지하수에서 내성과 환원능이 있는 토착 미생물의 농화배양 및 분리, 유전적 조성분석, 호흡환경과 전자공여체에 따른 6가 크롬 환원, 생체량과 생지화학적 변화, 미생물 외형과 침전물의 화학적, 광물학적 특성을 파악하여 자연저감보다 신속하고 효율적인 원위치 생지화학적 정화방법으로 오염원을 고립 및 고정화할 수 있는 방안을 모색하게 되었다.

2. 연구방법

2.1. 연구지역 지질 및 수질 특성

연구지역은 대전 3·4 산업단지 내 폐수종말처리장

Fig. 2. Location of MPH-0 and MPH-1 groundwater quality monitoring wells in Daejeon Moonpyung Industrial Complex (Modified from <http://ysgeo.yonsei.ac.kr/map>).

에 위치한 대전문평지하수관측정 MPH-0에서 MPH-7까지 8개 중 2개인 MPH-0와 MPH-1이며, 위치는 대전 대덕구 문평동 69-1(위도: N 36° 26'48.9", 경도: 127° 24'17.2")에 해당하는 지역이다(Fig. 2). 관측소가 위치한 문평동 지역은 북류하던 갑천이 서류하는 금강과 합류하는 지점과 가깝고 이들 두 하천을 따라 충적층이 널리 발달하고 있다. 조사지역의 기반암은 선캄브리아기의 변성암으로서 주로 흑운모편마암으로 구성되어 있고 주변에는 중생대 복운모화강암이 분포한다(Kim, 2004). 조사지역의 대부분을 차지하는 복운모화강암은 풍화가 심해 대체로 낮은 지형에 분포하며 전반적으로 충적층을 형성하는데, 이는 지표에서 오염물질이 유입될 경우 토양 내에 고정될 가능성이 높고, 강수 시 이동 가능성을 시사하고 있다. 또한 대전문평지하수관정에 대한 연구보고에 MPH-0의 전기전도도는 324-369 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 로 일반수의 범위 이내에 속하며, pH 또한 6.6-7.5의 범위로 나타났다, 수온은 18 ~ 21°C로 높은 특징을 나타낸다. 이 지역의 지하수 유동방향은 지하수 수위로 흐름을 판단할 때 MPH-0는 금강으로 향하는 북동방향으로, MPH-1은 갑천으로 향하는 북서방향으로 지하수가 유동하는 것으로 판단된다(Ministry of Land and Transport Affairs *et al*, 2006).

2006년 10월과 11월 두 차례 진행된 수질분석 결과

MPH-0와 MPH-1의 온도, pH는 거의 비슷하였으며 먹는 물 수질기준 중 유해영향 무기물질 항목에 포함되는 Pb, Cr, Cd, B의 기준값은 각각 50, 50, 5, 300 $\mu\text{g}/\text{L}$ 이나 지하수의 미량원소 분석 결과 1차 시료 대부분에서 수질기준 이하의 값을 보이고 있다(Chon *et al*, 2007). 그러나 1차 지하수시료 중 대전문평지하수관측소의 충적층 관정(MPH-0)에서는 6가 크롬 함량이 3.2 ~ 3.4 mg/L 범위로 검출되어 수질기준의 약 60 배를 초과하는 것으로 나타났다. 충적층 관정(MPH-0)의 6가 크롬 및 총 크롬 함량을 비교하여 볼 때 대부분의 크롬은 6가 크롬으로 존재하는 것으로 파악되었다. 또한 수질 분석 결과를 토대로 MPH-0의 주요 양이온들의 함량을 살펴보면 2006년 10월 자료에서는 $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^{+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^{+}$ 순이며 주요 음이온들의 함량은 $\text{HCO}_3^{-} > \text{NO}_3^{-} > \text{Cl}^{-} > \text{SO}_4^{2-}$ 순으로 나타났다며 11월 자료에서 주요 양이온의 함량 대비는 10월 자료와 같은 경향으로 나타났으나 음이온 함량 대비는 $\text{HCO}_3^{-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^{-} > \text{Cl}^{-}$ 순으로 나타났으며 CaHCO_3 형의 수질 유형을 보였다. MPH-1의 경우에도 10월과 11월 자료를 토대로 하였을 때 CaHCO_3 형으로 나타나 일반적인 천부지하수의 특성을 보였다(Seo and Kim, 2006; Lee *et al*, 1997). 이 연구는 반경 50 m 이내의 두 충적층 관정, MPH-0과 MPH-1에서 6가

크롬 오염도가 다르게 측정되었고 특히 탁도 등의 육안관찰을 통한 차이점이 뚜렷하여 같은 오염원의 영향권 안에서 6가 크롬 농도의 차이를 가져올 수 있는 영향인자에 대한 연구가 제기되었다.

2.2. 시료채취

중금속 오염물질인 6가 크롬의 생물학적 정화 가능성을 알아보기 위한 지하수 시료 채취는 총 2회에 걸쳐 1차는 2007년 6월 1일과 2차는 2007년 8월 27일에 진행되었다. 채취 장소는 대전 대덕구 문평동 69-1(위도: N 36° 26'48.9", 경도: 127° 24'17.2")에 위치하고 6가 크롬으로 오염된 충적층 관정인 MPH-0와 MPH-1이다. 1차 채취 때 지하수의 측정 관정의 수위는 7-8 m였으며 pH는 6-7, 수온은 18-20°C, 탁도는 MPH-0의 경우 물체가 뚜렷하게 보일만큼 맑은 반면 MPH-1의 경우 회색으로 뿌옇게 보여 탁도가 매우 높은 편이었다. 두 차례의 지하수시료는 배일러 샘플러로 채취되었으며 채취시료는 멸균된 2 L 실험병에 넣어 냉장 보관 후 금속 환원 실험을 위한 미생물의 농화 배양 및 분리에 이용되었다.

2.3. 금속 환원 미생물 농화배양 및 동정

대전 문평지역 내 MPH-0의 지하수에서 채취한 시료를 이용하여 금속 환원 미생물의 존재를 확인하기 위한 미생물 성장배지의 성분은 다음과 같다(g/L): 2.5 NaHCO₃, 0.08 CaCl₂·2H₂O, 1.0 NH₄Cl, 0.2 MgCl₂·6H₂O, 10 NaCl, 0.5 Yeast Extract, 7.2 HEPES (Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 1 mL Vitamin, 10 mL Trace minerals. Trace mineral 용액의 조성성분은 다음과 같다(mg/L): 1500 Nitrilotriacetic acid, 200 FeCl₂·4H₂O, 100 MgCl₂·6H₂O, 20 Sodiumtungstate, 100 MnCl₂·4H₂O, 100 CoCl₂·6H₂O, 1000 CaCl₂·2H₂O, 50 ZnCl₂·2CuCl₂·2H₂O, 5 H₃OBO₃, 10 Sodiummolybdate, 1000 NaCl, 17 Na₂SeO₃, 24 NiCl₂·6H₂O. 또한 Vitamin 용액은 다음 조성성분을 포함한다(g/L): 0.02 Biotin, 0.02 Folic acid, 0.1 B₆(Pyridoxine)HCl, 0.05 B₁(Thiamine)HCl, 0.05 B₂(Riboflavin), 0.05 Nicotinic acid(niacin), 0.05 Pantothenic acid, 0.001 B₁₂(Cyanobalamine) crystalline, 0.05 PABA(p-Aminobenzoic acid), 0.05 Lipic acid(thioctic). 위의 성분으로 제조된 성장배지는 100 mL씩 125 mL 병에 넣고 질소를 주입하여 용존산소를 제거하고 고무마개와 알루미늄 캡으로 고정한 후 고온멸균기를 이용하여 121°C, 100 kPa 압력 조건에서 15 ~ 20분 동안 멸균

처리 후 사용되었다. 1차 농화배양은 대전문평지하수 관측정의 MPH-0 시료와 MPH-1 시료를 위의 성장배지에 2 mL씩 주입하고 5 mM의 Fe(III)-citrate를 전자수용체로, 각각 글루코스(Glucose, C₆H₁₂O₆), 락테이트(Lactate, C₃H₆O₃), 아세테이트(Acetate, C₂H₃O₂)를 전자공여체로 이용하여 금속 환원 미생물을 농화배양하였으며 2주 정도 후 탁도의 증가로 뿌옇게 색이 바뀌면 같은 조건의 성장배지에 2 mL을 주입하는 방법으로 3차에 걸쳐 연속적으로 진행되었으며 이는 주로 혐기나 통성혐기균에 적합한 환경에서 Fe(III)-citrate를 환원할 수 있는 미생물을 선택적으로 배양하기 위해서였다. 배양된 미생물은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 미생물 동정이 이루어졌다.

2.4. MMPH-0의 유전자 조성분석

지하수 1 L를 0.22 µm 필터를 이용하여 미생물 및 부유물을 회수하고 원심분리를 이용하여 미생물 균체를 농축하여 -70°C에 보관하였다. 시료는 MoBio Soil DNA extraction Kit을 이용하여 총 DNA를 추출하였고, 1.2% Agarose gel에서 확인한 후, -20°C에서 보관하였다. 미생물의 다양성을 확인하기 위하여 시료로부터 얻은 DNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. 사용된 Primer는 Universal primer로 알려진 9F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'), 1542R (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')을 이용하였다. PCR 반응은 50 ng의 주형 DNA, dNTP Mixture (Final conc. 200 µM each), 10 µM Primer 그리고 2.5 unit Taq polymerase (Rexgene biotech, Cheongwon, Korea)를 첨가하여 최종 부피가 100 µL가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 94°C에서 1분간 변성시키고, Annealing 온도는 50°C에서 하였으며, 72°C에서 1분 30초간 반응시키고, 30 회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 처리하고 반응을 완료하였다. PCR 증폭 산물은 1.2% Agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 이렇게 얻어진 증폭산물은 double DG-DGGE를 위하여 341FGC와 536R을 이용하여 Nested PCR을 수행하였다. PCR 반응은 주형 DNA는 1.0 µL의 PCR 산물, dNTP Mixture(final conc. 200 µM each), 10 µM Primer 그리고 2.5 unit Taq polymerase (Rexgene biotech, Cheongwon, Korea)를 첨가하여 최종 부피가 100 µL가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 상기 조건과 같았으며, PCR 반응 산물은 1.6% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. PCR산물은

Dcode™ System (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 DG-DGGE를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel은 8~12% Polyacrylamide (37.5:1=acrylamide:bisacrylamide)에 Urea와 Formamide 변성제를 20~50%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 Double gradient gel을 제작하였다. 이와 같이 제작된 gel에 PCR증폭산물을 30 µl 씩 Loading하여 1× TAE buffer 완충용액(40 mM Tris, 20 mM Acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 70 V로 14시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 Gel은 Ethidium bromide에서 염색한 후, UV로 확인하였다. Denaturing gradient gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 Band를 잘라내어 TE buffer 50 µl를 첨가하고, Deep freezer -70°C에서 얼리고, 50°C Water bath에서 녹이는 과정을 3회 반복한 후 원심분리(6,300 × g, 1 min)하여 상등액을 취하였다. 각 Band에서 회수한 DNA를 주형으로 341F와 536R primer를 이용하여 위와 같은 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 PCR Purification kit (General Biosystem, Seoul, Korea)을 이용하여 정제하였다. 정제된 산물은 Automatic DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank를 이용하여 BLAST Search program을 통해 분석하였다. 위의 분석은 충북대학교 미생물학과 환경미생물학 연구실에서 수행되었다. 분석 결과 MPH-1에서는 9개, MPH-0에서는 1개의 균종(*Enterobacter aerogenes*)으로 나타났다. 따라서 이후 6가 크롬 환원 실험은 MPH-0에서 배양되어 균종이 확인된 미생물을 MMPH-0으로 명명하여 이후 6가 크롬 환원 실험 전반에 이용하였다.

2.5. MMPH-0에 의한 6가 크롬 환원

2.5.1. 호흡환경에 따른 6가 크롬 환원

MMPH-0(주종, *Enterobacter aerogenes*)에 의한 6가 크롬 환원 실험은 0.05 mM 중크롬산($K_2Cr_2O_7$, Sigma-Aldrich, USA)을 전자수용체로, 각각 10 mM의 글루코스, 락테이트, 아세테이트를 전자공여체로 이용하였으며 전자공여체를 주입하지 않은 대조군과 함께 진행되었다.

혐기성 조건에서의 MMPH-0에 의한 6가 크롬 환원 실험은 혐기챔버(Coy Laboratory Products Inc. Vinyl Anaerobic Airlock Chamber)를 이용하였으며 수소

3~4%를 포함한 질소(96~97%)를 주입하였다. 가열과 질소 충전으로 혐기상태가 된 500 mL의 미생물성장배지를 고온압력기에서 멸균한 다음 MPH-0에서 MMPH-0 5 mL, 중크롬산염(K_2CrO_4) 0.05 mM에 각기 다른 전자공여체를 10 mM 씩 넣은 다음 고무마개로 막고 플라스틱 마개로 돌려 닫은 다음 Nerve block needle 21G × 100(긴 주사바늘)을 꽂아 시료 채취구로 이용하였고, 20G 소형 주사바늘을 꽂아 질소가스가 주입되도록 하였으며 두 주사바늘에 0.22 µm (Millipore Millex syringe filter) 여과용 마개를 이용하여 외부로부터 세균침입을 차단하였다.

호기성 조건의 6가 크롬 환원 실험은 미생물성장배지, 주입균, 전자수용체, 전자공여체 등의 실험내용은 동일하다. 5 mL의 농화배양된 MMPH-0, 0.05 mM의 중크롬산염(K_2CrO_4)에 각각 10 mM의 글루코스, 락테이트, 아세테이트를 전자공여체로 넣은 다음 고무마개로 막고 플라스틱 마개로 돌려 닫은 다음 nerve block needle 21G × 100 (긴 주사바늘)을 꽂아 시료 채취구로 이용하였고, 20G 소형 주사바늘을 꽂아 질소가스가 주입되도록 하였으며 두 주사바늘에 0.22 µm (Millipore Millex syringe filter) 여과용 마개를 이용하여 외부로부터 세균침입을 차단하였다. 다만 실험실내 선반에 두어 공기와 접촉하게 했다. 이들 실험군은 중복실험으로 진행되었으며 미생물 주입 전과 미생물 주입 후로 나누어 6가 크롬 농도, Eh, pH를 측정하였으며 처음 10일 간은 3 mL씩을 일회용 주사기로 뽑아 12시간 간격으로, 다음은 1주 간격으로 하루 2회 측정되었으며 측정결과는 평균값을 이용하였다.

2.5.2. MMPH-0의 6가 크롬 내성

MMPH-0의 6가 크롬 내성을 확인하기 위해 이용된 고체아기배지 실험은 다음과 같은 시약을 포함하고 있다(g/L): 1000 mL 플라스크에 500 mL 증류수를 넣고 막대자석을 넣은 후 가열교반기에 올려 계속 저어 주면서 위의 시약 중 Aga technical, $NaHCO_3$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, NH_4Cl , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, NaCl, HEPES, Yeast Extract를 차례로 넣어 녹인다. 차츰 온도를 높여 맑아질 때까지 약 10분 정도 끓인다. 맑아지면서 약간 걸죽해지면 다시 멸균기에 넣고 30분 정도 고온 고압멸균을 시킨 후 10~20분 정도 식힌 다음 글루코스 0.01 M과 trace mineral, vitamins를 넣는다. 에탄올로 살균 처리된 무균작업대에서 50 mL 비이커에 20 mL씩 넣고 K_2CrO_4 농축액을 각각 2000, 1500, 1000, 500, 0 (mg/L)을 한 쌍씩 중복실험을 실시했다.

페트리디쉬에 1회용 주사기를 이용하여 0.5 mL씩 넣고 페트리디쉬 바닥에 고르게 퍼지도록 한 다음 파라필름(Parafilm)으로 밀봉하였다. 24시간 이후 고체가 배치가 단단하게 굳었을 때 0.5 mL의 MMPH-0를 주입하고 화염멸균한 삼각유리막대를 이용하여 고르게 편 후 파라필름으로 밀봉하여 실온에서 40일 동안 배양 후 고체배지에 배양된 균수를 측정하였다.

2.5.3. 6가 크롬 환원에 따른 지화학적 변화

MMPH-0에 의해 6가 크롬이 3가 크롬으로 환원될 때 지화학적 환경변화를 Eh/pH 변화를 통해 분석하였다. Eh와 pH는 Thermo Electron Corporation Orion Eh/pH Meter를 이용하여 측정하였다. Eh는 ORP(Oxidation Reduction Potential)용액으로 보정한 후 RmV를 측정하였으며, pH는 측정할 때 마다 pH 4, 7, 10의 표준용액으로 보정하였고 4주 동안 1주 간격으로 측정하였다.

2.5.4. 6가 크롬 농도, MMPH-0, 침전물 분석

6가 크롬 농도는 자외선-가시선 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer, SHIMADZU사제 UV-1650PC, Japan)를 이용하여 DPC 방법으로 의해 측정되었다. 6가 크롬 표준액은 CrK_2O_4 (MW: 194.20 g, Sigma-Aldrich, USA) 99.5%를 이용하여 0.03735 g를 정량 플라스크에 넣고 증류수를 넣어 100 mL를 채워 100 mg/L 6가 크롬 농축액을 만들었고 자외선-가시선 분광광도계를 이용하여 DPC방법으로 6가 크롬 농축액과 반응시켜 540 nm 파장대의 흡광도로 6가 크롬 농도를 측정하였다. 6가 크롬 농도의 적정곡선은 다음과 같이 작성되었다. ① 0.25 g의 1,5-Diphenylcarbazine ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNHCONHNHC}_6\text{H}_5$)를 아세톤 50 mL에 용해 (DPC 용액) ② K_2CrO_4 100 mg/L 표준용액 제조 ③ DPC 용액 0.1 mL, H_3PO_4 0.02 mL, 증류수 4 mL에 K_2CrO_4 표준용액을 농도별로 1 mL 씩 10분 정도 반응시켜 UV-Vis spectrophotometer로 540 nm 파장대에서 흡광도에 따른 적정곡선 작성 ④ Diphenyl carbazine 용액 0.1 mL, H_3PO_4 0.02 mL, 증류수 4 mL에 시료 1 mL와 반응시켜 자외선-가시선 분광광도계로 540 nm 파장대의 흡광도로 6가 크롬 농도 측정한다.

MMPH-0와 침전물의 화학적 조성 및 모양, 크기, 결정도, 표면 등의 형태적 특성은 TEM-EDS 분석을 이용했다. 성장배지에서 추출한 침전물을 탈수 처리한 후 미생물과 침전물을 함께 고정된 후, 고정된 고체 시료를 검정용 박편 절단기(Microtome)로 잘라

TEM-EDS 분석을 하였다. TEM-EDS 분석은 FE-TEM(Field Emission-Transmission Electron Microscope)인 Phillips 사제 Tecnai F20을 이용하였고 가속전압은 200 keV로 측정하였다.

침전물과 미생물의 크기 등 외형적 특성과 화학적 조성분석은 SEM 분석을 이용하였다. 성장배지에서 시료 일부를 0.22 μm size filter (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730) 위에 떨어뜨린 후 진공펌프를 이용하여 성장배지 조성성분을 증류수로 제거하고 고체시료만 남기고 건조한 후 FE-SEM (Field Emission-Scanning Electron Microscope, Hitachi사제 S-4700, Japan)으로 가속전압 15 keV로 분석하였다.

3. 연구결과 및 토의

3.1. 16S rRNA 유전자 조성분석 결과

대전문평지하수관정 MPH-0과 MPH-1에서 채취한 지하수에서 농화배양과 분리된 미생물의 종을 확인하기 위해 16S rRNA 분석을 실시하였다. PCR - DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)로부터 염기서열을 이용한 지하수의 미생물 계통수 분석결과 대전문평지하수관정에서 확인된 미생물 Band는 1, 2, 3, 6, 7, 8, 19, 20, 21번이었다(Fig. 3). MPH-0와 MPH-1의 시료에서 확인된 미생물 종을 Phylotype의 BLAST 분석결과(Table 1) 가장 가까운 종으로 알려진 대표성을 가진 Clone들을 이용하여 계통수를 작성한 결과 MPH-1에서 나타난 90% 이상의 유사성을 가진 종을 정리하면 band 1의 경우 혐기조건의 퇴적물에서 배양된 *Clostridium lituseburense*와 98%, band 3의 경우 유기오염원을 분해시키는 *Serratia marcescens*와 92%, band 6과 7의 경우 폐수에서 분리된 *Enterobacter aerogenes*와 98%, band 19는 *Acidovorax*와 98%, band 20과 21은 uncultured *Vogesella* sp.와 99%의 유사성을 나타냈다. 그 중 MPH-0에서는 6번과 7번 band가 나타났으며 이는 *Enterobacter aerogenes*와 98%의 유사성을 가지며 한 균주가 가장 우세하며 이는 감마프로테오 박테리아이며, 폐수처리장 등에서 자주 발견되는 종으로 알려졌다(Lee, 2007).

이러한 16S rRNA 유전자 중 분석결과 *Enterobacter aerogenes*로 알려진 MPH-0에서 농화배양된 미생물이 가장 우세한 하나의 균주로 분리되어 이후 이 연구에서는 MMPH-0으로 명명하고 혐기와 호기 환경에서의 6가 크롬 내성과 환원, 환원기작에 대한 실험에 이용하였다.

Fig. 3. (A) PCR-DGGE profiles of 16S rRNA gene fragment of enriched MPH-0 and MPH-1 and (B) dendrogram analysis of bacteria in enriched MPH-0 and MPH-1 from PCR-DGGE with the rank bases.

Table 1. BLAST result of base grade of PCR-DGGE bands from MPH-0 and MPH-1

Band No.	Closet Relatives	Similarity	Classification	Sample Source
1	<i>Clostridium lituseburense</i>	98%	Firmicutes	• Ohio River sediments: PCB-spiked sediment incubated anaerobically
2	<i>Cimex lectutlarius</i> <i>endosymbiot</i> (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)	83%	Gammaproteobacteria	• Unknown
3	<i>Serratia marcescens</i>	92%	Gammaproteobacteria	• <i>Serratia marcescens</i> Gas oil biodegradation by an emulsifier-producing <i>Serratia marcescens</i> strain
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	98%	Gammaproteobacteria	• Constructed wetland sewage outflow
7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	98%	Gammaproteobacteria	• <i>Klebsiella pneumoniae</i> Colorado potato beetle
19	<i>Acidovorax</i>	98%	Betaproteobacteria	• Influence of bacteria on growth and cadmium accumulation in the aquatic plant <i>Lemna minor</i> • Freshwater pond sediment
20	Uncultured <i>Vogesella</i> sp.	99%	Betaproteobacteria	• Denitrifying activated sludge
21	Uncultured <i>Vogesella</i> sp.	99%	Betaproteobacteria	• Denitrifying activated sludge • Uncultured <i>Vogesella</i> sp.

*Enterobacter*종 중에서 혐기성 조건에서 *Enterobacter cloacae*에 의한 6가 크롬 환원 연구결과가 보고된 바 있다(Ohtake *et al.*, 1989). 이 연구에 의하면 이 종은 오니에서 분리되었으며 *Enterobacter aerogenes*와 동일한 특성을 가진 그람음성인 막대모양의 미생물이다. 다만 *Enterobacter cloacae*는 혐기환경과 호기환경에서 모두 내성을 보이지만 오직 혐기환경에서만 6가 크롬 환원 반응이 나타나는데 *Enterobacter aerogenes*

의 경우 6가 크롬에 대한 내성뿐 아니라 혐기환경과 호기환경에서 모두 6가 크롬 환원력을 가지고 있어 *Enterobacter cloacae* 보다 더 다양한 환경에의 응용에 유리할 것으로 판단된다.

3.2. MPH-0의 6가 크롬 내성

MPH-0의 6가 크롬 내성을 확인하기 위한 중복실험에서 페트리 접시에 형성된 균체수 측정결과 6가 크

를 주입하지 않은 대조군에는 군체가 전혀 형성되지 않았고, 6가 크롬 500 mg/L에서 최대 109~137개, 1000 mg/L에서 100~143개, 1500 mg/L에서 77~79개, 2000 mg/L에서 최대 92~95개가 형성되었다. 이러한 결과는 *Enterobacter aerogenes*가 2000 mg/L의 고농도 6가 크롬 오염 지역에서도 생존할 수 있을 것으로 사료된다. 최근 연구에 따르면 *Leucobacter* sp.를 이용하여 호기환경에서 6가 크롬 농도가 1000에서 4000 mg/L까지 진행되었으나 고체배지를 이용한 초기 미생물량이 93~33% 까지 감소되었으며 액체배지를 이용한 경우에는 미생물량이 48시간 이후에 증가하는 것으로 보고되었으며(Zhu *et al.*, 2008) 높은 내성을 가질 수 있었던 것은 이들의 고농도 6가 크롬 서식 환경과 관련이 깊은 것으로 판단된다. 미생물의 크롬 내성과 6가 크롬 환원과의 관계를 연구한 Cheng and Gu (2007)에 의하면 *Pseudomonas aeruginosa*는 6가 크롬의 내성으로 인하여 세포벽에 의해 6가 크롬 유입을 감소시키거나 배출시키는 역할을 하며 반면에 *Pseudomonas fluorescences*의 경우 6가 크롬 내성을 지닌 돌연변이이나 6가 크롬의 환원과는 무관한 것으로 나타났다. 따라서 6가 크롬 오염 정화를 위해 활용될 수 있는 미생물은 6가 크롬 내성을 가지면서 환원도 시키는 미생물이 유리하다. 이런 면에서 6가 크롬으로 오염된 지하수에서 분리된 MMPH-0 (*Enterobacter aerogenes*)의 경우 6가 크롬에 대한 내성이 높을 뿐 아니라 6가 크롬 환원력도 높아 고농도의 6가 크롬 고정 및 정화 방법에 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

3.3. 호흡환경에 따른 MMPH-0의 6가 크롬 환원

MMPH-0(*Enterobacter aerogenes*)은 호기성 환경과 혐기성 환경에서 모두 6가 크롬 농도가 감소되었다. 호기성과 혐기성 환경에서 실험한 미생물 주입 전과 주입 4주 후에 성장배지의 색이 노란색에서 회색으로 변하면서 탁도가 증가하였다. 호기성 환경에서 6가 크롬 농도 감소와 미생물 생체량 변화가 가장 뚜렷한 1주일 경과 후 전자공여체별 생체량 흡광도는 글루코스에서 0.35로 가장 높았고 다음은 락테이트에서 0.2, 아세테이트와 대조군에서는 0.05로 미생물 활성이 가장 낮았다. 미생물 생체량 대비 6가 크롬 농도 변화는 락테이트, 아세테이트에서 75-80%로 글루코스의 70% 보다 높게 나타났다(Fig. 4A, 4C). 혐기성 환경에서는 1주일 경과 후 6가 크롬 농도의 변화는 글루코스의 경우 80%, 락테이트와 아세테이트에서는 90%가 감소되었으나 미생물생체량의 변화는 글루코스의 경우 0.3으

로 증가한 반면 락테이트와 아세테이트에서는 0.05 정도에서 크게 변화되지 않았다(Fig. 4B, 4D). 이러한 탁도 증가와 6가 크롬의 환원과 관련하여 Ohtake *et al.* (1989)의 연구에 의하면 6가 크롬 환원율은 배지 내의 미생물의 생체량과 직접적인 상관관계를 가지고 있으며 미생물의 밀도가 높을수록 6가 크롬 환원율도 높게 나타났고 미생물이 주입되지 않은 경우 6가 크롬 환원도 일어나지 않았다. 또한 탁도가 증가할수록 6가 크롬 환원율도 높게 나타나는 결과를 보였다. 그러나 본 연구의 경우 호기환경에서 침전된 회색 고형물질 등을 포함한 탁도가 혐기환경에서 보다 더 짙게 나타났으며 미생물 생체량(OD₆₀₀)도 최대값이 호기성 환경에서 약 0.35였고 혐기성 환경에서 약 0.3 정도로 나타났다. Ohtake *et al.* (1989)의 연구 결과와는 다르게 최대 6가 크롬 환원율은 오히려 혐기환경에서 높게 나타나는 경향을 보였다. 따라서 탁도와 생체량 증가가 곧 6가 크롬 환원율의 증가를 나타내는 것은 아니었다. Sharma (2002)는 생체량에 커다란 변화없이 6가 크롬이 환원되는 경우 유기산을 발효시키는 미생물(*Clostridium* sp.)의 존재 때문이라고 보고했다. 따라서 호흡환경에 따른 6가 크롬 환원기작도 다양한 것으로 연구되었으며, 호기환경에서는 세포벽에서 일어나는 다양한 효소작용, 예를 들어 NADH나 NADHP, ChrR 환원효소 등에 의해 환원되는 것으로 알려져 있어(Ackerley *et al.*, 2004) 생체량을 이루는 미생물과 이들이 생성해내는 다양한 효소와 연관이 있을 것으로 판단된다. 혐기성 환경에서 통성혐기균일 경우 산소나 다른 경쟁적 화학종에 의해 6가 크롬 환원이 저해될 수 있다는 연구결과가 있었으며(Wang *et al.*, 1989), 혐기챔버에서 진행된 이번 실험에서는 글루코스의 경우 생체량 증가와 6가 크롬 농도 감소 관계가 반비례 관계로 어떤 연관을 암시하지만 락테이트와 아세테이트의 경우 생체량 증가가 나타나지 않은 가운데 1주일 만에 약 80%의 6가 크롬 농도가 감소되었다. 생체량 변화에 따른 6가 크롬 환원과의 관계는 생체량 증가를 동반하거나 동반하지 않은 6가 크롬 환원으로 요약되거나 환원기작에 대한 구체적인 연구가 필요하다.

이 연구에서 호기성 환경과 혐기성 환경의 대조군에서도 미생물의 생체량 증가와 6가 크롬 농도가 감소되었는데 이는 실험과정에서 공기 중의 미생물에 의한 오염 때문인지 확실하게 확인할 수는 없었다. 또한 미생물의 생체량의 변화가 미생물 주입 1주째에 증가했다가 다소 감소하는 경향을 보이는데, 이는 미생물마다 차이가 있으나 생장곡선과 관련되었을 것으로 판단된다.

Fig. 4. Cr(VI) reduction rate (A and B), biomass (C and D), pH (E and F) Eh (G and H) under aerobic (A, C, E, and G) and anaerobic (B, D, F, and H) environments by MMPH-0(*Enterobacter aerogenes*) using different electron donors (Control, Glucose, Lactate, and Acetate).

3.4. MMPH-0의 6가 크롬 환원에서의 전자공여체 영향

서로 다른 전자공여체(글루코스, 락테이트, 아세테이트)와 전자공여체를 넣어주지 않은 대조군과 6가 크롬 농도의 변화를 호기와 혐기성 환경에서 4주 동안 관찰하였다(Fig. 4A). 4주 중에서 미생물 주입 1주째에 호

기성 환경에서 6가 크롬 농도가 글루코스 73%, 락테이트 78%, 아세테이트 82%, 대조군은 5%의 감소량을 보였다(Fig. 4A). 혐기환경에서의 6가 크롬 농도는 글루코스 70%, 락테이트 89%, 아세테이트 90%, 대조군 16%의 감소를 보였다(Fig. 4B). 호기성과 혐기성 환경에서 미생물 주입 1주째에 모두 대조군을 제외한 전자

공여체를 넣어준 경우 70% 이상의 6가 크롬 감소량을 나타내고 있다. 또한 주입 4주째는 호기환경에서의 6가 크롬 농도는 글루코스 78%, 락테이트 78%, 아세테이트 75%, 대조군 79% 감소를 보였으며 혐기환경에서의 글루코스 81%, 락테이트 91%, 아세테이트 91%, 대조군 55%의 6가 크롬 농도가 감소되었다. 즉, 호기와 혐기환경에서 1주째 전자공여체를 주입한 경우 6가 크롬 농도가 70% 이상을, 대조군은 4주째에서 70% 이상의 6가 크롬 농도 감소량을 보였다. 외부로부터 전자공여체가 공급되지 않은 대조군에서 미생물에 의해 6가 크롬이 소량 환원되는 것은 NADH 등을 이용한 크롬 환원 효소에 의한 작용이거나 체내에 존재하는 전자공여체로 저장되어있는 전자들에 의한 것으로 사료된다(Wang and Xiao, 1995; Tsezos *et al.*, 2007). 그럼에도 불구하고 전자공여체를 넣어주지 않은 경우의 자연저감방식 보다 전자공여체를 넣어주는 생물학적 활성법의 경우 6가 크롬 환원 반응속도와 효율을 높아 전자공여체를 이용한 미생물의 활동과 성장을 촉진시키는 것이 크롬으로 오염된 지하수의 정화에 기여할 것으로 판단된다.

미생물은 글루코스, 락테이트, 아세테이트 등의 전자공여체를 양분으로 흡수하여 세포분열 등을 통한 생식적 재생산이 이루어지는 과정과 용액 속의 크롬 등 다른 금속 이온들에 전자들을 주거나 받아 에너지원으로 활용하는 경로, 그리고 기타 부산물 등에 의한 화합물 형성으로 6가 크롬이 3가 크롬으로 환원되는 경로 등이 연구되었는데 이를 토대로 MMPH-0 미생물에 의한 6가 크롬 환원 기작에 대한 다양한 예측을 가능하게 한다. 즉 MMPH-0 미생물의 이화적 작용에 의한 호흡(호기, 혐기, 발효)과정과 전자공여체에서 파생된 작용기나 대사물질과 결합하면서 6가 크롬이 환원되어 질 수도 있음을 암시한다. 참고로 전자공여체를 넣지 않은 대조군을 설정한 이번 실험과는 달리 이전 실험에서는 미생물을 넣지 않은 대조군을 설정했을 경우 6가 크롬 농도에 변화를 보이지 않은 것으로 보아 생체량의 증가와 동시에 진행되는 6가 크롬 농도의 감소는 MMPH-0 미생물의 대사활동이나 호흡활동에 전자수용체로서 6가 크롬이 활용되어지거나, 부산물과의 화학적 결합 등 직, 간접 요인에 의한 3가 크롬으로의 환원되는 것으로 사료된다.

3.5. MMPH-0의 6가 크롬 환원과 지화학적 환경 변화

미생물이 6가 크롬을 환원될 때 지화화학적 특성을

알기 위해 Eh와 pH를 측정하였다. 크롬은 Eh-pH 조건에 민감한 전이금속의 하나로 알려져 있으며 6가 크롬 형태로 침전, 해리, 흡착되기도 하며, 3가로 환원되어 리간드와 결합되어 혼합물을 형성하기도 하고 침전과 해리, 또는 토양 및 미생물 표면에 흡착되거나 침전되기도 한다(Fig. 1A). 이러한 크롬의 산화형태는 Fig. 1B에서 나타나는 것처럼 주로 Eh-pH에 따라 크롬의 화학종의 안정화 영역이 나뉘어져 있다. 미생물은 호흡과 대사활동으로 산화환원반응을 이용하여 ATP와 같은 고에너지 저장물질을 생산하고 보존하는데 주로 유기산인 글루코스, 락테이트, 아세테이트 등을 산화시키면서 전자들의 이동을 촉진시켜 에너지를 얻게 되는데 이때 이동되는 전자나 양성자들의 양에 따라 Eh-pH의 환경이 달라진다(Madigan and Martinko, 2006). 이때 미생물의 호흡에 의해 6가 크롬이 최종 전자수용체로서 직접적 환원과 미생물의 유기산의 산화를 통해 생체량형성과 에너지 생성에 필요한 전자공여에 의한 간접적 환원으로 나뉘는데 이때의 Eh-pH의 변화는 6가 크롬 환원과 침전에 안정한 환경으로 변하게 된다.

MMPH-0를 이용한 6가 크롬 환원 실험에서 Eh-pH 측정 결과 호기성 환경에서 pH 변화는 미생물 주입 전 pH 7.3에서 MMPH-0 주입 후부터 조금씩 pH가 떨어지면서 4주째 약산성인 pH 6.5로 변화했다. MMPH-0 주입 후 2주와 4주째에 pH가 올라갔지만 처음 미생물 주입 전 pH 7.3 보다는 낮게 변화하였다(Fig. 4E). 혐기환경에서 pH 변화는 pH 7.3에서 4주째 6.5로 중성에서 약산성으로 변화했다. 3주째 pH가 커졌지만 미생물 주입 전 pH 7.3보다는 낮은 약산성이다(Fig. 4F). 호기성 환경의 Eh 변화는 MMPH-0 주입 전 Eh가 +339 mV에서 4주째 +220 mV로 감소하였다. 2, 4주에서 Eh가 증가했지만, 3주째 Eh가 +153 mV가 떨어졌는데 3주에서 4주째에 Eh는 +58 mV로 변화하였다. 전체적으로 MMPH-0 주입 후 Eh는 주입전의 Eh보다 낮은 값으로 변화하였다(Fig. 4G).

또한 혐기성 환경에서 Eh 변화를 보면 MMPH-0 주입 전에서 주입 후 Eh가 약 +80 mV정도 감소하다가 4주째에 Eh가 최대 감소하여 +32 mV로 낮아졌다(Fig. 4H). 일반적으로 6가 크롬이 3가 크롬으로 환원될 때 pH는 알칼리 환경에서 중성 환경으로 변하며, Eh는 산화환경에서 환원환경으로 변화된다고 알려져 있다. 이 실험에서는 pH가 중성 환경에서 약산성으로 변하였고, Eh는 낮아져 산화환경에서 환원환경으로 변화하는 경향을 보였다(Fig. 4G, 4H). 이 연구 결과

Eh-pH 변화영역은 Fig. 1B의 별표로 표시된 영역으로 pH의 변화는 미생물이 전자공여체를 분해하는 과정에서 생성되는 유기산의 영향과 산화환원반응에 따른 생성된 전자에 의하여 Eh가 산화환경에서 환원환경으로 변화하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 일반적으로 알려진 대로 3가 크롬이 지화학적으로 안정된 영역으로의 환경 변화와 같은 경향으로 나타나 6가 크롬 환원에서 미생물의 지화학적 환경변화를 통한 촉매역할의 중요성을 확인할 수 있었다.

다양한 전자공여체를 이용한 6가 크롬의 환원실험에서 Glucose를 전자공여체로 이용하였을 때가 다른 전자공여체를 이용하였을 때보다 산성의 조건과 나타내는 것(Fig. 4E, 4F)은 Glucose의 산화작용을 생성된 유기산(예: 아세트산 등), 의 영향으로 생각된다. 또한 Glucose를 이용하였을 때 Glucose 이외에 Glucose의 산화에 따라 형성된 다른 유기산(예: 아세트산 등)을 전자공여체로 이용하여 미생물의 성장이 촉진되어 OD의 함량(Fig. 4C, 4D)이 다른 전자공여체를 이용하였을 때보다 높다고 생각된다. 하지만 Glucose를 전자공여체로 이용하였을 때가 다른 전자공여체를 이용하였을 때보다 6가 크롬의 환원이 초기실험에서 낮은 것은 이화작용으로 6가 크롬의 환원이 아닌 발효미생물의 성장에 따른 것으로 생각된다(Fig. 4A, 4B).

3.6. MMPH-0와 Cr(III)침전물의 외형과 광물학적 특성

미생물 주변에 형성된 침전물과 미생물의 형태를 알아보기로 성장배지 내에 형성된 침전물과 미생물을 SEM-EDS로 분석하였다. 주사전자현미경 분석은 미생물이나 모양, 크기 뿐 아니라 침전물의 표면적이나 결정도, 형태적 특성을 잘 나타낸다. 막대모양의 미생물

주변에 약 1 ~ 5 μm 크기의 침전물을 확인할 수 있었으며(Fig. 5) 다양한 형태의 침전물이 나타났다.

EDS 분석도 하였으나 침전물 내에 크롬이 검출되지 않았는데 이는 주사전자현미경의 검출한계 이하로 크롬 함량 미달 때문일 것으로 판단된다. 또한 짧은 막대 모양은 *Enterobacter aerogenes* 로 추정되나 이 미생물은 포자를 형성하지 않는다고 알려져 있어 작은 원형 모양의 물질을 규명하는 것도 중요할 것으로 사료된다.

성장배지 안의 지화학적 변화와 더불어 고형화된 침전물이 육안으로 발견되었을 때 투과전자현미경(TEM)으로 분석하였다. 분석 결과 미생물의 횡단면, 크기, 모양, 그리고 미생물과 침전물의 형태적 상관관계나 화학적 성분에 대한 자료를 얻을 수 있었다. 특히 6가 크롬 환원 미생물의 대사작용 중 NAD⁺와 관련하여 유기적인 Cr(III) 침전물을 TEM-EDS로 분석한 Puzon *et al.* (2008)에 의하면 미생물에 의한 6가 크롬의 환원이 이루어지는 초기에는 수용성 3가 크롬(NAD-Cr(III) 화합물)으로 존재하다가 점차 수용성 3가 크롬은 감소되고 육안으로 확인할 수 있는 결정화된 불용성 3가 크롬이 증가했을 때 TEM-EDS로 확인할 수 있었다고 한다. 미생물의 횡단면의 크기는 최대 약 300 nm ~ 800 nm이며 고상의 3가 크롬 침전물이 미생물 몸 밖에서 형성되어 있다(Fig. 6A, B, C). 미생물 체외에 형성된 침전물을 EDS로 분석한 결과 크롬 성분이 확인되었다(Fig. 6A-1, 6B-2, 6C-3). 반면 미생물 체내의 검은 물질을 EDS로 분석한 결과 크롬 성분이 검출되지 않았다(Fig. 6D-4). TEM-EDS 상에서 미생물의 특성과 금속의 반응에 따라 크롬 침전물은 체내와 체외, 그리고 세포막에서 존재하는데, 본 연구의 TEM-EDS분석으로 Cr(III) 침전물은 미생물의 체

Fig. 5. SEM images of MMPH-0(*Enterobacter aerogenes*) and precipitates showing shape, size, and morphological characteristics of cells and precipitates.

Fig. 6. TEM-EDS analyses of MMPH-0 (*Enterobacter aerogenes*) and precipitates showing shape, size, and morphological characteristics.

외에 존재하였다. 이는 Shen and Wang (1993)에 의해 성장배지 내의 상등액에서 Cr(III) 침전물의 대부분이 검출되어 미생물의 체내보다 미생물의 체외에서 형성되었음을 알 수 있고 이는 이화적 Cr(VI) 환원의 결과로 호흡이나 대사작용을 통한 6가 크롬 환원의 주요 기작을 이해하는데 중요한 근거를 제공하고 있다.

4. 결 론

6가 크롬의 음용수 최대허용기준 농도는 0.05 mg/L 인데 대전분평지하수관정에서는 약 3.3 mg/L로서 허용기준의 60배를 초과하여 6가 크롬 오염 지하수 관정을 받았다. 그러나 반경 50 m 이내에 위치한 MPH-0와 MPH-1의 수질 검사 결과 MPH-1 보다 MPH-0의 6가 크롬 오염이 더 심각하고 육안상 MPH-0의 경우 6가 크롬 농도는 높으나 탁도는 거의 없는 편이었고 MPH-1의 경우 6가 크롬 농도는 낮으나 탁도가 높아 6가 크롬 환원과 미생물과의 연관성에 대한 규명이 필요했고 이를 응용한 생지화학적 정화방법을 연구하고자 했다. 일단 토착지구미생물을 농화배양하여 16S rRNA 유전자 조성 분석을 하였고 이를 이용하여 6가 크롬 환원실험에 이용하였다. MPH-0에서 농화배양된

미생물을 농화배양하여 16S rRNA 유전자 분석 결과 주종이 *Enterobacter aerogenes*로 밝혀졌고 이를 MMPH-0이라 명명하였다. MMPH-0의 6가 크롬 환원 여부를 확인하기 위한 4주 동안의 실험에서 미생물 주입 1주 후 미생물 생체량(OD_{600})은 호기성 환경에서 0에서 0.4로 증가하였고 반면, 6가 크롬 농도는 0.15 mg/L에서 0.04 mg/L로 감소하여 상호관련성이 높지만 혐기성 환경에서 생체량(OD_{600})은 0에서 글루코스를 제외하고는 생체량의 증가는 미미하지만 6가 크롬의 농도는 0.11 mg/L에서 0.03 mg/L로 감소하여 상호관련성이 낮게 나타났다. 이는 생체량 증가만으로 6가 크롬 환원으로 단정할 수 없음을 의미한다. 또한 전자공여체인 글루코스, 락테이트, 아세테이트가 MMPH-0에 의한 6가 크롬 환원의 영향을 알아보기 위하여 전자공여체를 주입한 성장배지와 주입하지 않은 대조군의 환원률을 비교하였다. 실험 결과 호기성과 혐기성 환경에서 모두 대조군에 비해 전자공여체를 넣은 경우 미생물 주입 1주째에 80% 이상의 환원률을 보였다. 이는 전자공여체 등의 양분 주입을 통한 생촉진법(Biostimulation)은 자연저감법(Natural attenuation)에 비해 6가 크롬 환원 반응의 속도를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

주사전자현미경(SEM-EDS), 투과전자현미경(TEM-EDS) 분석 결과 미생물의 체외에 크롬 침전물을 확인할 수 있었으며 미생물 주변의 세포외중합물질(EPS, Extracellular polymer substances)과 함께 약 1~5 μm 의 다양한 크기의 침전물을 확인할 수 있었다. 이는 미생물에 의한 6가 크롬 환원의 직접적 간접적 기작을 예측할 수 있으며 이동성과 반응성이 크고 독성이 강한 6가 크롬이 이동성과 독성이 낮은 3가 크롬 형태로 세포 몸 밖에 침전된 것으로 지하수에서 미생물과 3가 크롬 침전물의 공존형태를 유추할 수 있다.

6가 크롬에 대한 내성실험을 통해 *Enterobacter aerogenes*가 6가 크롬에 강한 미생물임을 확인하였고 또한 6가 크롬 환원력도 높아 6가 크롬 농도가 높은 오염지역에서의 활용 가능성이 기대된다. 또한 6가 크롬 환원 환경인 pH, Eh 측정결과 호기와 혐기환경에서 모두 미생물 주입 전 pH 7.3에서 주입 후 4주째 pH 6.5로, 중성에서 약산성으로 변화하였다. Eh는 호기환경에서 미생물 주입 전 Eh +340 mV에서 주입 후 4주째 Eh +220 mV로, 혐기환경에서 주입 전 Eh +105 mV에서 주입 후 4주째 Eh +32 mV로 산화 환경에서 환원환경으로의 변화 경향을 보였다. 이는 MMPH-0(*Enterobacter aerogenes*)의 대사작용 및 호흡작용 그리고 대사물질 등의 직,간접적 기작에 의해 6가 크롬이 환원 될 수 있는 지화학적 환경변화(Eh-pH)와 전자제공에 기여하여 비수용성 Cr(III) 침전물로 고정시키는 것으로 사료된다.

본 연구결과 *Enterobacter aerogenes*가 고농도의 6가 크롬 오염 지역의 현장 정화에 응용되어 생물학적 정화 효율성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 한국연구재단 연구지원사업(과제번호: 2011-0010163)과 BK21 지구환경보존 및 복원인력양성 사업 일환으로 수행되었습니다. SEM-EDS 와 TEM-EDS 분석에 도움을 주신 박병규 연구원(한국기초과학 지원연구원 광주분소), XRD 분석에 도움을 주신 김철 연구원(전남대학교 공동실험실습관)께 감사드립니다.

참고문헌

- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Keyhan, M., Blake, R. and Martin, A. (2004) Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction, *Environmental Microbiology*, v.6(8), p.851-860.
- Appukuttan, D., Rao, A.S. and Apte, S.K. (2006) Engineering of *Deinococcus radiodurans* R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste, *Applied and Environmental Microbiology*, v.72(12), p.7873-7878.
- Bartlett, R.J. (1991) Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods, *Environmental Health Perspectives*, v.92, p.17-24.
- Berkeley Lab. (2003) Bioremediation of metals and radionuclides, 2nd edition. p.9-15.
- Cheung, K.H. and Gu, J.D. (2005) Chromate reduction by *Bacillus megaterium* TKW3 isolated from marine sediments, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, p.213-219.
- Cheung, K.H. and Gu, J.D. (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, p.8-15.
- Chon, C.-M., Ahn, J.S., Roh, Y., Rhee, S.-K., Seo, H., Kim, G.-Y., Koh, D.-C., Son, Y. -C. and Kim, J.-W. (2006) Seasonal variation of Cr(VI)-contaminated groundwater quality and the potential for natural attenuation. *Econ. Environ. Geol.*, v.41(6), p.645-655.
- Chon, C.-M., Moon, S.H., Ahn, J.S., Kim, Y., Won, J.-H. and Ahn, K.-H. (2007) Fate and transport of Cr(VI) contaminated groundwater from the industrial area in Daejeon. *Econ. Environ. Geol.*, v.40(4), p.403-417.
- Cummings, D.E., Fendorf, S., Singh, N., Sani, R.K., Peyton, B.M. and Magnuson, T.S. (2007) Reduction of Cr(VI) under acidic conditions by the facultative Fe(III)-reducing bacterium *Acidiphilium cryptum*, *Environmental Science Technology*, v.41, p.146-152.
- Daulton, T.L., Little, B.J., Jones-Meehan, J., Blom, D.A. and Allard, L.F. (2007) Microbial reduction of chromium from the hexavalent to divalent state, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.71, p.556-565.
- Ellis, A.S., Johnson, T.M. and Bullen, T.D. (2002) Chromium isotopes and the fate of hexavalent chromium, *Science* v.295(5562), p.2060-2062.
- Francis, C.A., Obraztsova, A.Y. and Tebo, B.M. (2000) Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1, *Applied and Environmental Microbiology*, v.66(2), p.543-548.
- Goulhen, F., Gloter, A., Guyot, F. and Bruschi, M. (2006) Cr(VI) detoxification by *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough: microbe-metal interactions studies, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.71, p.892-897.
- Guertin, J., Jacobs, J.A. and Avakian, C.P. (2005) Chromium(VI) Handbook. CRC Press. Florida. p.2-19.
- Horton, R.N., Apel, W.A., Thompson, V.S. and Sheridan, P.P. (2006) Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*, *BMC Microbiology*, v.6(5), doi:10.1186/1471-2180-6-5
- Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K. and Moawad, H. (2004) Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp., *Electronic Journal of Biotechnology*, v.7(1), p.30-37.
- Iyer, A., Mody, K. and Jha, B. (2004) Accumulation of

Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Keyhan, M., Blake, R. and Martin, A. (2004) Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative

- hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*, Marine Pollution Bulletin, v.49, p.974-977.
- Kim, P.G. (2004) Geotechnical characteristics of regional area in Korea: Deajeon-Chungnam area. Seminar and Meeting Report of Korean Geotechnical Society, p.158-164.
- Lee, J.-U., Chon, H.-T. and John, Y.W. (1997) Geochemical characteristics of groundwater with different geology an temperature-Comparative study with granitic groundwater, Journal of the Korean Society of Groundwater Environment, v.4(4), p.212-222.
- Lee, S.-E., Lee, J.-U., Lee, J.-S. and Chon, H.-T. (2005) Cr (VI) reduction by indigenous bacteria in anaerobic sediment, J. of Mineral and Energy Resources, v.42(6), p.618-624.
- Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M.D. and Congregado, F. (1993) Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916, Applied and Environmental Microbiology, v.59(11), p.3516-3518.
- Lovley, D.R., Widman, P.K., Woodward, J.C. and Phillips, E.J.P. (1993) Reduction of uranium by cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*, Applied and Environmental Microbiology, v.59(11), p.3572-3576.
- Lowe, K.L., Straube, W.B. and Jones-Meehan, J. (2003) Aerobic and anaerobic reduction of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* effects of cationic metals, sorbing agents and mixed microbial culture, Acta Biotechnology, v.23(2-3), p.161-178.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006) Brock Biology of Microorganisms 11th, Prentice Hall. Pearson Education Korea LTD, and World Science, Seoul, Korea, p.108-126.
- McLean, J. and Beveridge, T.J. (2000) Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate, Applied and Environmental Microbiology, v.67(3), p.1076-1084.
- Ministry of Land and Transport Affairs, K-Water, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources, 2006, 2006 research report on area of contaminated groundwater and countmeasure plan, p.249-310.
- Moon, H.J. (2007) Policies for the Rational Utilization and Management of Groundwater Resources. Korea Environment Institute, p.5-17.
- Ohtake, H., Wang, P.C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M. and Toda, K. (1989) Isolation and chracterization of an *Enterobacter cloacae* strain that ruduces hexavalent chromium under anaerobic conditions, Applied and Environmental Microbiology, v.55, p.1665-1669.
- Palmer, C.D. and Puls, R.W. (1994) EPA Ground Water Issue EPA/540/5-94/505
- Palmer, C.D. and Wittbrodt, P.R. (1991) Processes affecting the remediation of chromium-contaminated sites, Environmental Health Perspectives, v.92, p.25-40.
- Piñón-Castillo, H.A., Brito, E.M.S., Goñi-Urriza, M., Guyoneaud, R., Duran, R., Nevarez-Moorillon, G.V., Gutiérrez-Corona, J.F., Carretta, C.A. and Reyna-López, G.E. (2010) Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent, J. of Applied Microbiology, v.109, p.2173-2182.
- Puzon, G.J., Roberts, A.G., Kramer, D.M. and Xun, L. (2005) Formation of soluble organo-Chromium(III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics, Environmental Science & Technology, v.39, p.2811-2817.
- Puzon, G.J., Huang, Y., Dohnalkova, A. and Xun, L. (2008) Isolation and characterization of an NAD^+ -degrading bacterium PTX1 and its role in chromium biogeochemical cycle, Biodegradation, v.19, p.417-424.
- Rai, D., Sass, B.M. and Moore, D.A. (1987) Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide, Inorganic Chemistry, v.26, p.345-349.
- Remoundaki, E., Hatzikioseyan, A. and Tsezos, M. (2007) A systematic study of chromium solubility in the presence of organic matter: consequences for the treatment of chromium-containing wastewater, J. of Chemical Technology and Biotechnology, v.82, p.802-808.
- Rhee, S.-K. (2007) Analyses of microbial diversity of contaminated groundwater of Moonpyung, Daejeon based on microbial ecology. Consulting report
- Seo, J.K. and Kim, M.K. (2006) The characteristics of groundwater quality with different aquifer geology in the Samnam Area, Ogcheon, J. of Mineral and Energy Resources, v.43(4), p.359-368.
- Sharma, K. (2002) Microbial Cr(VI) reduction: Role of Electron Donors, Acceptors, and Mechanisms, with Special Emphasis on *Clostridium* spp., Ph D. thesis, University of Florida, USA, 36p.
- Shen, H. and Wang, Y.T. (1993) Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456, Applied and Environmental Microbiology, v.59(11), p.3771-3777.
- Smith, W.L. and Gadd, G.M. (2000) Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms, J. of Applied Microbiology, v.88, p.983-991.
- Swayambunathan, V., Liao, Y.X. and Meisel, D. (1989) Stages in the evolution of colloidal chromium(III) oxide, Langmuir, v.5, p.1423-1427.
- Tsezos, M., Hatzikioseyan, A. and Remoundaki, E. (2007) A systematic study of chromium solubility in the presence of organic matter: consequences for the treatment of chromium-containing wastewater, J. of Chemical Technology and Biotechnology, v.82, p.802-808.
- Turick, C.E. and Apel, W.W. (1997) Method for in situ or ex situ bioremediation of hexavalent chromium contaminated soils and/or ground water, US Patent Issued
- Wang, Y.-T. and Xiao, C. (1995) Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria, Water Research, v.29, p.2467-2474.
- Zhu, W., Yang, Z., Ma, Z. and Chai, L. (2008) Reduction of high concentration of chromate by *Leucobacter* sp. CRB1 isolated from Changsha, China, World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.24, p.991-996.