KURT 지하심부 지하수 내 토착 금속환원미생물의 종 다양성 및 철/망간의 환원과 생광물화작용

김유미¹ · 오종민¹ · 정혜연² · 이승엽³ · 노 열^{1*}

¹전남대학교 지구환경과학과, ²한국기초과학지원연구원 광주센터, ³한국원자력연구원 방사성폐기물기술개발부

Characterization of Microbial Diversity of Metal-Reducing Bacteria Enriched from Groundwater and Reduction/Biomineralization of Iron and Manganese

Yumi Kim¹, Jong-Min Oh¹, Hea-Yeon Jung², Seung Yeop Lee³ and Yul Roh^{1*}

¹Department of Earth and Environmental Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Korea Basic Science Institute, Gwangju 500-757, Korea

³Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

The purposes of this research were to investigate the enrichment of metal-reducing bacteria from KURT groundwater and the identification of the microbial diversity by 16S rRNA as well as to examine microbial Fe(III)/Mn(IV) reduction and to analyze morphological features of interactions between microbes and precipitates and their mineralogical composition. To cultivate metal-reducing bacteria from groundwater sampled at the KURT in S. Korea, different electron donors such as glucose, acetate, lactate, formate, pyruvate and Fe(III)-citrate as an electron acceptor were added into growth media. The enriched culture was identified by 16S rRNA gene sequence analysis for the diversity of microbial species. The effect of electron donors (i.e., glucose, acetate, lactate, formate, pyruvate) and electron acceptors (i.e., akaganite, manganese oxide) on microbial iron/manganese reduction and biomineralization were examined using the 1st enriched culture, respectively. SEM, EDX, and XRD analyses were used to determine morphological features, chemical composition of microbes and mineralogical characteristics of the iron and manganese minerals. Based on 16S rRNA gene analysis, the four species, *Fusibacter*, *Desulfuromonas*, *Actinobacteria*, *Pseudomonas* sp., from KURT groundwater were identified as anaerobic metal reducers and these microbes precipitated metals outside of cells in common. XRD and EDX analyses showed that Fe(III)-containing mineral, akaganite (β -FeOOH), reduced into Fe(II)/Fe(III)-containing magnetite (Fe_3O_4) and Mn(IV)-containing manganese oxide (λ - MnO_2) into Mn(II)-containing rhodochrosite (MnCO_3) by the microbes. These results implicate that microbial metabolism and respiratory activities under anaerobic condition result in reduction and biomineralization of iron and manganese minerals. Therefore, the microbes cultivated from groundwater in KURT might play a major role to reduce various metals from highly toxic, mobile to less toxic, immobile.

Key words : metal-reducing bacteria, iron, manganese, biomineralization, groundwater

이 연구의 목적은 KURT(KAERI underground research tunnel) 지하수 내에 금속이온을 환원시키는 미생물의 존재 여부를 확인하고 배양하여, 이들의 활동에 따른 철과 망간 환원의 관찰과 환원물의 광물학적 특성을 연구함으로써, 금속환원미생물에 의한 산화상태로 존재하는 철과 망간의 환원과 광물 상전이 가능성을 확인하는 것이다. KURT 지하수 내 금속을 환원하는 미생물은 전자공여체로 포도당, 초산, 젖산, 개미산, 피루브산을, 전자수용체로 Fe(III)-citrate

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided original work is properly cited.

*Corresponding author: rohy@jnu.ac.kr

를 사용하여 농화배양 하였으며, 16S rRNA 분석을 통해 종 다양성을 확인하였다. 농화배양된 금속환원미생물에 의한 철과 망간의 환원과 생광물화작용을 알아보기 위해 전자공여체로 포도당, 초산, 젖산, 개미산, 피루브산, 전자수용체로 철수산화물인 아카가나이트(*akaganeite*, β -FeOOH)와 망간산화물(*manganese oxide*, λ -MnO₂)을 이용하여 금속환원 실험을 실시하였다. 미생물 활동에 의해 형성된 환원물의 광물학적 특성은 SEM, EDX, XRD 분석을 통해 확인되었다. 연구 결과 KURT 지하수에서 금속을 환원하는 혐기성 미생물로는 *Fusibacter*, *Desulfuromonas*, *Actinobacteria*, *Pseudomonas* sp. 등이 확인되었고, 이 미생물들은 체외에서 철과 망간을 환원하여 이들 광물의 상전이를 확인하였다. 철(Fe)은 Fe³⁺을 포함한 아카가나이트(β -FeOOH)에서 Fe²⁺/Fe³⁺를 포함한 자철석(Fe₃O₄)으로 환원되었고, 망간(Mn)은 Mn⁴⁺를 포함한 망간산화물(λ -MnO₂)에서 Mn²⁺을 포함한 능망간석(MnCO₃)으로 환원되었다. 이러한 지하 140 m의 KURT 지하수에서 서식하는 미생물들에 의해 철과 망간이 환원됨은 다른 중금속과 핵종원소의 환원 가능한 환경이 조성되었을 뿐 만 아니라, 미생물에 의하여 환원된 철의 재산화에 의해서도 주변 핵종원소가 환원될 수 있음을 의미한다. 따라서 이러한 직·간접적인 산화-환원 반응에 의해 KURT 지하수 내에서는 금속환원미생물들이 유해금속물질을 침전시켜 이동성을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 고준위 폐기물에서 유해물질의 유출시 핵물질의 확산을 막는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

주요어 : 금속환원미생물, 철, 망간, 생광물화작용, 지하수

1. 서 언

고준위폐기물처분장은 생물권으로부터 최소한 만년 이상 폐기물을 격리시키기 위해 지하수의 성분이 폐기물이나 폐기물 용기의 부식, 용해로부터 안정된 약알칼리 환경과 혐기성 환경을 갖는 지하 350 m 이하의 지하 심부에 만들어진다(Oh, 1996). 한국 원자력 연구원은 부지 내에 향후 고준위폐기물을 지하에 처분하는 경우에 대비하여 심부 지하 환경에서 지하수의 유동 및 지하수 내 각종 원소의 거동을 실험하기 위한 지하 처분연구시설(KURT; KAERI underground research tunnel)을 건설하였다. 이 지하처분 연구시설은 지하수의 유동이 거의 없는 심부 지하 처분환경의 안정성을 실증하기 위해 설립되었지만 우리나라 지질의 특성상 파쇄대의 발달이 두드러져 핵종원소의 유출 및 이동의 매개체가 되는 지하수와는 접촉은 불가피하다. 또한 고준위 핵종들은 지하심부의 지화학적 환경과 미생물의 활동에 따른 산화 또는 환원 반응 등에 매우 복잡하고 민감하게 반응하여 다양한 화학종을 가질 수 있다. 따라서 혐기성 환경인 지하심부에서 어떠한 종의 금속환원미생물이 존재하는지 파악하고 이 미생물들에 의해 주변 금속원소의 지화학적 반응 및 거동이 어떻게 진행되는지 이해하는 것은 매우 중요하다(Lee *et al.*, 2010). 기존 연구를 통해 금속환원미생물은 지각내에서 탄소와 금속 원소의 생지화학적 순환에 있어서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 유기물을 산화시켜 전자를 내놓음으로써 철과 망간과 같은 산화환원에 민감한 금속을 환원시키거나 광물을 형성하는 것으로 알려졌다(Lovley, 1991; Roh *et al.*, 2002). 이러한 미생물에

의해 형성되는 광물 및 침전물은 지하 암반의 파쇄대를 막을 수도 있고, 핵종원소의 이동을 지연하거나 차단시킬 수 있는 잠재성을 갖는다. 따라서 고준위폐기물 처분장의 장기간에 걸친 안전성에 있어서는 미생물의 영향을 고려하지 않을 수 없기에 한국형처분시스템에서의 토착미생물-지하매질-핵종원소간의 상호작용을 이해할 수 있는 연구가 필요한 상황이다. 최근 KURT 지하수 내에서 농화배양한 미생물을 통해 유출된 우라늄의 거동을 확인한 연구에서는 모든 금속환원미생물이 핵종원소의 환원 및 침전에 유리하게 작용하지 않을 수 있으며, 미생물 특성에 따라 특정원소와의 강한 선택적 반응(preferential reaction)을 가질 수 있음이 보고되었다(Lee *et al.*, 2010). 따라서 향후 국내 방사성 폐기물 처분에 있어서 핵종에 대한 생지화학적 작용을 이해하고 미생물을 이용한 효과적인 생물학적 처리를 위해서는 원소의 종류에 따른 금속환원미생물의 환원 특성 규명이 우선시 되어야 할 것이다. 그러므로 본 연구에서는 KURT 지하수 내에 서식하는 토착 혐기성 금속환원미생물의 종 다양성을 확인하고, 이러한 미생물이 다양한 전자공여체를 통해 배양되는 경우 산화·환원 환경에 민감한 철(Fe³⁺)과 망간(Mn⁴⁺)의 환원 및 생광물화작용에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

2. 연구방법

2.1. 연구지역 및 지하수 채취

대전광역시 유성구 덕진동 150번지 한국원자력연구원에 위치한 KURT는 길이 약 180 m, 폭 6 m, 그리고 높이 6 m의 말굽형 단면을 가진 터널로서 지하

약 90 m 깊이에 위치하고 있다(Lee and Baik, 2007). KURT 주변의 지질은 선캄브리아기의 편마암류와 중생대의 심성암과 맥암류가 주를 이루며 처분시설이 위치한 지역은 시대미상의 편상 화강암과 중생대 복운모 화강암으로 이루어져 복운모 화강암이 편상 화강암을 관입한 상태로 산출된다(Lee and Baik, 2007). KURT 지하수 내에 존재하는 금속환원미생물을 농화배양하고 미생물의 종 다양성을 분석하기 위하여 KURT 내 지하 약 140 m 부근의 지하심부 단열대를 따라 흐르고 있는 지하수를 채수하였다. 지하수는 지하시추공에 이중패커 장치를 설치하여 수 개월의 안정기를 거친 후 채수되었으며, 채수된 지하수는 혐기성 상태를 유지하기 위해 멸균 상태의 1 L 유리병에 head space 없이 가득 채우고 고무마개로 밀봉한 후 아이스박스를 이용하여 실험실로 옮겼다. 실험용 지하수는 pH가 8.5정도로 약 알칼리이며 Eh는 약 -80 mV의 약환원성 물이다.

2.2. 미생물 성장배지 제조 및 금속환원미생물 농화배양

KURT 지하수 내 금속환원미생물 활동 여부를 확인하고 농화배양하기 위해 사용된 미생물 성장배지의 성분은 다음과 같다(g/L) (Kim *et al.*, 2011): 2.5 NaHCO₃, 0.08 CaCl₂·2H₂O, 1.0 NH₄Cl, 0.2 MgCl₂·6H₂O, 10 NaCl, 7.2 HEPES (hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 0.5 yeast extract, 10 mL trace mineral, 1 mL vitamin. Trace mineral 용액은 다음과 같은 시약을 포함하고 있다(mg/L): 1500 nitrilotriacetic acid, 200 FeCl₂·4H₂O, 100 MgCl₂·6H₂O, 20 sodium tungstate, 100 MnCl₂·4H₂O, 100 CoCl₂·6H₂O, 1000 CaCl₂·2H₂O, 50 ZnCl₂, 2 CuCl₂·2H₂O, 5 H₃BO₃, 10 sodium molybdate, 1000 NaCl, 17 Na₂SeO₃, 24 NiCl₂·6H₂O. 또한 vitamin 용액은 다음과 같은 시약을 포함하고 있다(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 lipoic acid (thioctic). 제조된 성장배지는 혐기성 환경을 만들어주기 위해 질소로 충전하면서 125 mL 배지 병(serum bottle)에 100 mL씩 옮겨 담은 후 고압멸균기(autoclave)를 이용하여 121°C 온도와 1.2 kgf/cm²의 압력 조건에서 멸균하였다. 이때 미생물 성장 배지의 pH는 7.8~8.0 이다. KURT 지하수 내 존재하는 금속환원미생물은 100 mL의 미생물 성장 배지에 전

자수용체로 10 mM의 Fe(III)-citrate를 주입하고 전자공여체로 10 mM의 초산(acetate, C₂H₃O₂), 포도당(glucose, C₆H₁₂O₆), 젖산(lactate, C₃H₆O₃), 개미산(formate, CH₂O₂), 피루브산(pyruvate, C₃H₄O₃)을 각각 주입한 후, KURT 지하수 3 mL를 주입하여 상온·상압의 조건에서 농화배양하였다. 이와 같은 조건으로 2차에 걸쳐 농화배양된 미생물을 금속환원 및 생광물화작용 실험에 이용하였다.

2.3. 철/망간의 환원 및 생광물화작용 실험

KURT 지하수 내 금속환원미생물에 의한 철과 망간의 환원 및 생광물화작용 연구를 위하여 전자공여체는 미생물의 에너지원이 되는 포도당, 초산, 젖산, 개미산, 피루브산을 이용하였다. 그리고 미생물의 활동으로 인한 금속의 환원과 생광물화작용 연구를 위한 전자수용체로는 철산화물인 아카가나이트(β -FeOOH)와 망간산화물(λ -MnO₂)을 실험에 이용하였다. 아카가나이트는 다음과 같은 방법으로 제조하였다(Roh *et al.*, 2001). 2 L 플라스크에 FeCl₃·6H₂O(0.4 M)를 1 L의 증류수에 용해시킨 후, NaOH(10 N)를 주사기(30 mL)와 주사바늘(21G)을 이용하여 pH = 7이 될 때까지 중력의 힘만으로 떨어뜨리면서 적정을 하였다. 적정 후 침전된 갈색의 침전물을 원심분리기를 이용하여 전해질 용액을 3회에 걸쳐 증류수로 씻은 후 수확하여 전자수용체로 이용하였다. 망간산화물은 2 L 플라스크에 KMnO₄(20 mM)를 1 L 넣고 stir bar를 돌리면서 MnCl₂(30 mM)를 500 mL까지 천천히 섞어 주고, 육안 상으로 보았을 때 갈색의 침전물이 형성 될 때까지 H₂O₂를 천천히 주입하였다. 생성된 침전물은 증류수로 씻은 후 수확하여 전자수용체로 이용하였다(Oh, 2009).

금속 환원 실험은 미생물 성장배지에 전자공여체로 10 mM의 포도당, 초산, 젖산, 개미산, 피루브산을 주입하고 전자수용체로 40 mM의 아카가나이트와 30 mM의 망간산화물을 각각 주입한 후 농화배양된 미생물 3 mL를 첨가하여 25°C 온도로 고정된 진탕배양기(shaking incubator)에서 배양시키며 한 달 동안 진행하였다. 또한 각각의 조건에서의 실험은 미생물을 주입하지 않은 대조군을 두어 미생물학적 반응 여부를 비교하였다.

2.4. 미생물 및 광물학적 특성 분석

농화배양된 미생물의 유전자 염기서열을 비교분석하여 미생물 종 다양성을 알아보기 위하여 16S rRNA 분석을 실시하였다. 약 2 L의 지하수 시료를 0.22 μ m

filter를 통한 미생물 회수법을 이용하여 균체를 확보하였다. 이렇게 확보된 균체를 포함한 filter를 N₂-Grinding법을 통하여 DNA(RNA) 추출·정제하였다. 분리한 균의 1 µl template DNA와 1 µl 10 pmol eubacterial universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 0.1 µl Taq polymerase (5 unit/µl, TAKARA), 2 µl 10X PCR buffer, 1.6 µl dNTP등의 20 µl 반응 혼합물을 만들어 세균의 16S rRNA의 일부를 PCR로 증폭했다. PCR은 94°C에서 5분간 초기 변성화 시킨 후 95°C에서 1분간 변성, 50°C에서 1분간 부착, 72°C에서 증폭 과정을 35회 반복하였고 최종 신장은 5분간 실시하였다. PCR 증폭 산물은 1% Agarose gel electrophoresis 과정을 수행한 뒤 ethidium bromide에 염색 한 뒤 PCR 산물의 생성여부를 확인하였다. 이 PCR 산물은 다시 GC clamp가 붙은 primer를 이용하여 증폭한 후에 DGGE를 실시하였다. DGGE상의 band를 추출하여 sequence 분석을 수행하였다.

금속환원미생물에 의해 형성된 철산화물과 망간산화물의 환원물은 광물 동정을 위해 X-선 회절분석(이하, XRD, X-ray diffraction)을 실시하였다. 일정량의 시료를 채취하여 플라스틱 튜브(conical tube)에 넣고 2000 rpm에서 3분간 원심분리를 하였다. 시료가 손실되지 않게 상층액을 조심히 버리고 이온화 되어있는 Cl⁻ 등을 제거시키기 위해 세척 과정을 3회 반복하였

다. 세척된 침전물 시료에 알코올을 약간 섞어 혼합한 뒤 피펫에이드(pipet aid)를 이용하여 시료를 한 방울씩 유리판(slide glass)에 떨어뜨리고 질소(N₂)를 이용하여 건조하여 XRD 분석을 실시하였다. X-선 회절분석은 Rigaku사제 Dmax 1200을 이용하였으며, Cu-Kα 타겟과 Ni-필터를 사용하여 전압 40 kV, 전류 20 mA로 분석하였다. 또한 환원물의 광물조성, 입자의 모양 및 크기를 관찰하기 위해 주사전자현미경(이하 SEM-EDX, scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy) 분석을 실시하였다. SEM-EDX 분석은 건조된 침전물을 이용하였으며, FE-SEM으로 Hitachi사제 S-4700을 이용하였고 가속전압은 15 kV로 분석하였다.

3. 연구결과 및 토의

3.1. 금속환원미생물의 종 다양성

금속환원미생물의 1차 농화배양에서 전자수용체로 사용된 Fe(III)-citrate가 이온상태의 Fe³⁺에 의해 노란색을 띠고 있지만 환원되면서 무색으로 변하는 것을 관찰하였다. 이를 통해 KURT 지하수 내에 금속을 환원시키는 미생물이 존재함을 확인하였다. KURT 지하수에서 배양된 미생물의 종 다양성을 확인하기 위해 16S rRNA 분석한 결과, 미생물은 크게 4가지의 주요 미생물로 구성되어 있었다(Fig. 1). 모든 성장배지에서 확인된 미생물 종은 *Pseudomonas* 종과 *Desulfuromonas*

Fig. 1. 16S rRNA analysis of bacteria enriched from KURT groundwater.

종이다. *Pseudomonas* 종은 자연계에 광범위하게 분포하고 있는 그람 음성균이며 단극성 편모를 가지는 간균이다. 이 균은 통성혐기성균으로 토양이나 지하수 등의 혐기적 자연 서식처에서 탈질반응을 통해 에너지를 얻으며 크롬을 환원하는 능력을 가지고 있다(Mclean and Beveridge, 2001). *Desulfuromonas michiganensis*는 둥근모양을 가지는 혐기성 미생물로서 성장하는데 황화물을 필요로 하며 기존연구에서 PCE를 탈염소화작용을 통해 분해시키고, 황산염이나 철을 분해할 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Sung *et al.*, 2003). 또한 전자공여체로 젖산을 이용하였을 때는 *Actinobacteria*와 *Fusibacter paucivorans* 종의 존재가 확인되었는데, *Actinobacteria*는 대부분의 토양에 존재하는 그람 양성균으로 유기물질의 분해와 부식질의 형성에 중요한 역할을 하고, *Fusibacter paucivorans* 종은 혐기성의 그람 양성균으로 티오황산염을 황화물로 환원시키는 것으로 알려졌다(Ravot *et al.*, 1999). 이러한 복합세균(mixed culture)은 현장 특성에 따른 생지화학적 거동을 이해하고(Oh *et al.*, 2010), 현장에서의 적용가능성과 실효성을 높이는데 도움이 된다. 중 분석 결과, KURT 지하수 내에는 다양한 미생물이 존재하고 있음을 확인하였으며, 전자수용체는 Fe(III)-citrate로 모두 동일하나 전자공여체의 종류가 달라짐에 따라 생존하는 미생물의 종 또한 달라짐을 확인하였다. 이 미생물을 이용하여 철과 망간의 환원실험을 진행하였다.

3.2. 철수산화물의 환원 및 생광물화작용

아카가나이트는 미생물에 의해 환원이 되면 검은색의 침전물이 형성되며 Fe^{2+} 을 포함하는 자철석(magnetite) 또는 능철석(siderite)이 형성될 수 있다(Roh *et al.*, 2003). 5종류의 전자공여체를 이용하여

Fig. 2. Color changes resulted from iron/manganese reductions by metal-reducing bacteria enriched from KURT groundwater [electron donor-acceptor : lactate-akaganeite (A), formate-manganese oxide (B)].

실험한 결과, 미생물을 주입하지 않은 대조군에서는 변화가 관찰되지 않았지만, 젖산과 개미산을 사용한 경우에는 아카가나이트가 갈색에서 검정색으로의 색변화를 나타냈으며 이를 통해 미생물에 의해 활발한 환원작용이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 형성된 검은색의 침전물을 SEM 분석을 통해 관찰한 결과, 전자공여체로 젖산을 이용한 배지 내에는 약 1~2 μm 크기의 막대모양을 가지는 미생물과 주변에 구형의 침전물들이 존재함을 확인하였다. 침전물의 크기는 약 30 nm 이하이며 철(Fe)과 산소(O)로 구성되어 있었다(Fig. 3). 전자공여체로 개미산을 이용한 배지 내에서도 약 1.5~2.5 μm 로 긴 막대모양을 가지는 미생물과 주변에 철과 산소로 구성된 침전물들이 존재함을 확인하였다(Fig. 4). 전자현미경 관찰을 통해 두 실험조건에서

Fig. 3. SEM-EDX analyses of bacteria enriched from KURT groundwater using lactate as an electron donor and akaganeite as an electron acceptor.

Fig. 4. SEM-EDX analyses of bacteria enriched from KURT groundwater using formate as an electron donor and akaganeite as an electron acceptor.

Fig. 5. XRD patterns showing the mineral transformations by metal-reducing bacteria enriched from KURT groundwater when using akaganeite as an electron acceptor, and 5 types of electron donors such as glucose, acetate, lactate, formate, pyruvate.

공동적으로 철과 산소로 구성된 수 십 나노미터 크기의 광물들이 미생물 체외에 침전된 것으로 확인되었으나 미생물은 모양과 크기가 다른 것으로 보아 전자공여체의 영향으로 성장에 유리한 다른 종류의 미생물이 성장하여 철 환원에 참여한 것으로 판단되었다. 침전물의 정확한 광물동정을 위해 XRD 분석을 실시한 결과, 전자공여체로 초산과 포도당을 이용한 경우에는 아카가나이트의 변화가 관찰되지 않았고 피루브산을 이용한 경우에는 아카가나이트 피크가 사라지고 비정질의 철산화물로 판단되는 침전물이 형성된 것으로 나타났다. 반면 뚜렷한 색변화를 보인 젖산과 개미산을 이용한 경우에는 아카가나이트 피크가 사라지고 자철석 피크가 확인됨으로써 아카가나이트(β -FeOOH)의 Fe^{3+} 가 환원되어 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 로 구성된 자철석(Fe_3O_4)으로 광물상전이가 일어났음을 확인하였다(Fig. 5).

3.3. 망간산화물의 환원 및 생광물화작용

망간은 철과 같이 지각 내에서 풍부할 뿐 만 아니라 산화환원에 민감한 원소이다. 자연계에서 Mn^{4+} 로 존재하는 망간산화물이 환원되면 Mn^{3+} 을 포함하는 하우스먼나이트(Hausmannite, Mn_3O_4)나 능망간석(rhodochrosite, MnCO_3)이 형성 될 수 있다(Lovely, 1991; Fischer *et al.*, 2008). 전자수용체로 망간산화물을 이용하여 5종의 전자공여체를 주입한 후 미생물을 배양한 결과, 모든 실험 조건에서 침전물의 어두운 갈색이 점점 없어지면서 회색으로 변하는 색변화를 나타냈다

Fig. 6. SEM-EDX analyses of bacteria enriched from KURT groundwater using pyruvate as an electron donor and manganese oxide as an electron acceptor.

Fig. 7. SEM-EDX analyses of manganese oxide(A-B) and the minerals formed by metal-reducing bacteria when using acetate(C-D) and glucose(E-F) as electron donors.

(Fig. 2B). 미생물을 주입하지 않은 대조군에서는 아무 변화가 관찰되지 않았다. SEM 분석 결과, 피루브산을 이용하여 성장한 미생물은 크기 약 $1.5 \mu\text{m}$ 로 막대모양을 가지고 있으며 미생물 표면과 체외 주변에서 망간(Mn)과 산소(O)로 구성된 침전물이 관찰되었다(Fig. 6). 전자수용체로 이용한 망간산화물은 약 50 nm

Fig. 8. SEM-EDX analyses of the minerals formed by metal-reducing bacteria when using lactate(G-H), formate(I-J), pyruvate(K-L) as electron donors.

크기의 입자가 묻혀져 있는 것으로 관찰되지만, 5종의 전자공여체를 주입하여 미생물의 활동으로 형성된 환원물은 약 5~20 μm 이며 좁쌀 모양의 형태로 관찰되었다(Fig. 7 and 8). 정확한 광물 동정을 위해 XRD 분석을 실시한 결과, 모든 실험군에서 Mn^{4+} 상태인 망간산화물($\lambda\text{-MnO}_2$)이 Mn^{2+} 상태인 능망간석(MnCO_3)으로 환원되었음을 확인하였다(Fig. 9). 이는 배지의 성분인 NaHCO_3 와 미생물이 유기물을 산화하면서 형성되는 중탄산염(HCO_3^-)이 망간과 결합하여 탄산염광물인 능망간석이 형성한 것으로 사료된다.

3.4. 미생물에 의한 철과 망간 환원의 생지화학적 의미

산화/환원 전위(이하 Eh, oxidation-reduction potential)를 고려해 볼 때, Fe^{3+} 에서 Fe^{2+} 로의 환원이 $\text{Eh}=0$ V에서 일어나며, 이는 다른 핵종원소들에 비해 더 낮은 값이다(Lloyd, 2003). 즉 미생물의 활동에 의해 철 환원이 일어났다면 철보다 높은 Eh에서 환원이 일어나는 우라늄(U, 약 0.08 V), 테크네튬(Tc, 약 0.4 V), 플루토늄(Pu, 약 0.64 V), 넵투늄(Np, 약 0.4 V)과 같은 원소들이 환원될 수 있는 환경이 이미 조성되었

Fig. 9. XRD patterns showing the mineral transformations by metal-reducing bacteria enriched from KURT groundwater when using manganese oxide as an electron acceptor, and 5 types of electron donors such as glucose, acetate, lactate, formate, pyruvate.

Fig. 10. Oxidation state of actinides as a function of standard reduction potential at pH 7, with redox potentials of common microbial respiratory processes (adapted from Lloyd, 2003).

음을 알 수 있다(Fig. 10). 따라서 철 환원 미생물을 이용하여 직접적으로 핵종 원소를 환원시키지 않더라도 철 환원 미생물에 의해 조성되는 환원환경은 주변 핵종원소들의 간접적인 환원에 기여할 것으로 판단된다. 또한 금속환원미생물에 의해 철이 환원되었다가 다시 재산화 될 경우, 전자를 U^{6+} , Cr^{6+} , Tc^{7+} 등의 중금속이나 핵종원소에 전달하여 용해도, 유동성, 독성이

Fig. 11. Indirect reduction of soluble heavy metals and radionuclides by iron-reducing bacteria (adapted from McCullough *et al.*, 1999).

더 낮은 U^{4+} , Cr^{3+} , Tc^{4+} 으로 환원시켜 간접적으로 환원시킬 수 있는 가능성을 가진다(Fig. 11). 다만 최근 연구에서 지하심부의 토착 미생물들이 주변에 존재하는 광물에 따라 특정 원소와의 강한 선택적 반응에 의해 반응 속도나 효과에 영향을 받는 것으로 확인됨으로써(Lee *et al.*, 2010), 지하심부 환경에서의 미생물-광물-용존원소 간의 상호작용에 대한 지화학적 거동 특성을 이해하기 위해서는 앞으로도 더 다양한 원소와 배양조건에서의 연구가 수행되어야 할 필요가 있다.

4. 결 론

지하 심부 환경의 KURT 지하수에서는 약 100여종의 미생물이 발견되었으며 그 중 금속 환원에 관여하는 미생물로 *Fusibacter*, *Desulfuromonas*, *Actinobacteria*, *Pseudomonas* sp. 등이 확인되었다. 전자공여체의 종류에 따라 배양된 금속환원미생물의 종류가 달라진 것으로 보아, 오염된 지역의 미생물학적 정화에 있어서는 미생물들의 선택적인 유기물 이용과 금속 이온과의 반응 특성을 먼저 파악하는 것이 중요할 것으로 판단된다. 농화배양된 금속환원미생물들은 다양한 전자공여체가 존재할 때, 아카가나이트와 망간산화물을 전자수용체로 이용함으로써 pH = 8과 상온·상압의 조건에서 광물상전이를 나타냈다. 전자수용체로 아카가나이트를 이용한 경우에는 전자공여체로 젖산과 개미산을 이용한 경우에만 검은색의 환원물이 미생물 체외에 형성되었으며, 이는 Fe^{3+} 인 아카가나이트(β - $FeOOH$)가 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 혼합광물인 자철석(Fe_3O_4)으로 환원된 것으로 나타났다. 전자수용체로 망간산화물을 이용한 경우에는 금속환원미생물이 모든 전자공여체를 이용하여 Mn^{4+} 인 망간산화물(λ - MnO_2)을 환원하여 Mn^{2+} 인 능망간석($MnCO_3$)을 형성하였다. 그러므로 지하 140 m의 KURT 지하수에서 서식하는 미생물의 활동에 의해 Fe와 Mn이 환원될 수 있음을 확인하였으며 이를 통해 대부분의 다른 중금속과 핵종원소의 환원에도 영향을 미칠 수 있음을 시사했다. 특히 철은 산화환원에 민감한 전이금속원소가 미생물에 의해 환원되더라도 주변

환경에 의해 다시 재산화 될 수 있으며, 이때 발생하는 전자에 의해 또다시 주변 중금속이나 핵종원소가 간접적으로 환원될 가능성이 있다. 또한 우라늄이나 플루토늄과 같은 핵종원소보다 상대적으로 낮은 Eh에서 환원이 되는 철과 망간의 환원은 미생물의 활동에 의해 우라늄 및 플루토늄과 같은 핵종원소도 환원될 수 있는 환경이 조성됨을 지시한다. 그러므로 KURT 지하수 내에서 금속 환원 미생물들이 유해금속물질을 침전시켜 이동성을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 고준위 폐기물에서 유해물질의 유출시 핵물질의 확산을 막는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국원자력 연구원 후원으로 수행되었으며, 미생물 중 분석에 도움을 주신 이성근 교수(충북대학교), XRD 분석에 도움을 주신 이재기 연구원(전남대학교 공동기기센터), SEM, TEM, EDX 분석에 도움을 주신 김향옥 연구원과 박병규 연구원(한국기초과학지원연구원 광주분소)께 감사드립니다.

References

- Fischer, T.B., Heaney, P.J., Jang, J.H., Ross, D.E., Brantley, S.L., Post, J.E. and Tien, M. (2008) Continuous time-resolved X-ray diffraction of the biocatalyzed reduction of Mn oxide. *American Mineralogist*, v.93, p.1929-1932.
- Kim, Y.M., Park, J.E., Lee, J.Y. and Roh, Y. (2011) Metal reduction and biomineralization by bacteria enriched from intertidal flat sediments, Suncheon Bay, Korea. *Journal of the Geological Society of Korea*, v.47, p.19-30 (in Korean with English abstract).
- Lee, S.Y. and Baik, M.H. (2007) Characters of fracture-filling minerals in the KURT and their significance. *Journal of the Mineralogical Society of Korea*, v.20, p.165-173 (in Korean with English abstract).
- Lee, S.Y., Baik, M.H. and Oh, J.M. (2010) The effect of Fe-bearing minerals on the interaction between underground dissimilatory metal-reducing bacteria and dissolved uranium. *Journal of the Geological Society of Korea*, v.46, p.357-366 (in Korean with English abstract).

- abstract).
- Lloyd, J.R. (2003) Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews*, v.27, p.411-425.
- Lovely, D.R., (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, *Microbiological Reviews*, v.55, p.259-287.
- McCullough, J., Hazen, T.C., Benson, S.M., Metting, F.B. and Palmisano, A.C. (1999) Bioremediation of metals and radionuclides: What it is and How it Works. Lawrence Berkeley National Laboratory, a NABIR premier, 39p.
- Mclean, J. and Beveridge, T.J. (2001) Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.1076-1084.
- Oh, C.W. (1996) Evaluation of the safety for the disposal of high-level nuclear waste in the granite. *Economic and Environmental Geology*, v.29, p.215-225 (in Korean with English abstract).
- Oh, J.M. (2009) Geomicrobiological study of anaerobic microorganisms from KURT groundwater: Microbial diversity and reduction of Fe(III), Mn(III/IV), Cr(VI), Se(VI), Department of Earth and Environmental Sciences, Chonnam National University (M.S. Thesis).
- Oh, J.M., Lee, S.Y., Baik, M.H. and Roh, Y. (2010) Characterization of uranium removal and mineralization by bacteria in deep underground, Korea atomic energy research institute (KAERI). *Journal of the Mineralogical Society of Korea*, v.23, p.107-115 (in Korean with English abstract).
- Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M.L., Patel, B.K., Thomas, P., Garcia, J.L. and Ollivier, B. (1999) *Fusibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thio-sulfate-reducing bacterium from an oil-producing well, *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.1141-1147.
- Roh, Y., Lauf, R.J., McMillan, A.D., Zhang, C., Rawn, C.J., Bai, J. and Phelps, T.J. (2001) Microbial synthesis and the characterization of metal-substituted magnetites. *Solid State Communications*, v.118, p.529-534.
- Roh, Y., Liu, S.V., Li, G., Huang, H., Phelps, T.J. and Zhou, J. (2002) Isolation and characterization of metal-reducing *Thermoanaerobacter* strains from deep subsurface environments of the piceance basin, Colorado. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.6013-6020.
- Roh, Y., Zhang, C.L., Vali, H., Lauf, R.J., Zhou, J. and Phelps, T.J. (2003) Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization: magnetite and siderite formation. *Clays and Clay minerals*, v.51, p.83-95.
- Sung, Y.B., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M. and Löffler, F.E. (2003) Characterization of two tetrachloroethene -reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.2964-2974.

2014년 6월 10일 원고접수, 2014년 8월 29일 1차수정,
2014년 8월 31일 게재승인