

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/264172550>

Stabilization of Heavy Metals using Ca-Citrate-Phosphate Solution: Effect of Soil Microorganisms

Article · January 2009

CITATION

1

READS

655

8 authors, including:



Hocheol Song

Sejong University

123 PUBLICATIONS 2,492 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Dong-Wan Cho

Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources

60 PUBLICATIONS 731 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Byong-Hun Jeon

Hanyang University

273 PUBLICATIONS 4,448 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Interspecies interaction between different bacteria [View project](#)



Bioenergy fermentation through FOG co-digestion [View project](#)

구연산/칼슘/인산염 용액을 이용한 토양 중금속 안정화: 토양 미생물이 미치는 영향

송호철 · 송두섭* · 조동완** · 박성원 · 최상훈* · 전병훈** · 이장호*** · 박준홍†,***

한국지질자원연구원 · *충북대학교 지구환경과학과 · **연세대학교 환경공학부 · ***연세대학교 사회환경시스템공학부

(2009년 2월 3일 접수, 2009년 4월 17일 채택)

Stabilization of Heavy Metals using Ca-Citrate-Phosphate Solution: Effect of Soil Microorganisms

Hocheol Song · Doo-Sup Song* · Dong-Wan Cho** · Sung-Won Park ·
Sang-Hun Choi* · Byong-Hun Jeon** · Jangho Lee*** · Joonhong Park†,***

Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources

*Department of Earth and Environmental Sciences, Choongbuk National University

**Department of Environmental Engineering, Yonsei University

***School of Civil and Environmental Engineering, Yonsei University

ABSTRACT : A farming area located near an abandoned copper mine in GuPo-ri, Choongchung province is heavily contaminated with heavy metals such as As, Pb, Cd, Cu and Zn of which concentrations are higher than the values typically detected in Korean soil environment. In this work, laboratory and field studies were conducted to examine feasibility of using Ca-citrate-phosphate solution in stabilizing heavy metals in the polluted soils. In laboratory batch experiments with field soil, the addition of Ca-citrate-phosphate solution resulted in decrease of aqueous phase concentration of phosphate and improvement of heavy metal stabilization, compared to those for sterilized soil samples. This indicates that microbial uptake of phosphate may have provided positive effects on availability of phosphate toward heavy metal stabilization. According to microbial community analysis for the field experiment, the use of Ca-citrate-phosphate led to increased diversity of microbial populations, and strict anaerobic microorganisms such as *Anaerofilum* and *Treponema* became the most dominant populations in the solution-amended field experiments. These findings suggest that, when Ca-citrate-phosphate is used for heavy metal stabilization in soils, microbial processes may have important roles in improving the stabilization of heavy metals by providing reducing conditions to the treatment locations or/and by making phosphate available to heavy metal stabilization.

Key Words : Heavy Metal Stabilization, Phosphate Availability, Soil Microorganisms

요약 : 거풍광산 주변 밭의 오염된 중금속을 토양오염공정시험법과 TCLP를 이용하여 분석한 결과 비소, 납, 카드뮴, 구리, 아연과 같은 중금속의 농도가 전국 토양 평균치를 초과하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 중금속 오염된 토양의 안정화를 위해서 구연산칼슘인산염 용액을 이용하는 방안에 대한 기초연구를 실험실 조건과 현장 조건에서 수행하였다. 실험실 조건에서 구연산칼슘인산염 용액을 투여한 실험 결과, 고압멸균처리한 반응조에 비해 토착미생물 군집이 존재하는 반응조에서 용존 인산염의 농도가 현격히 감소하였으며, 중금속 안정화율도 높다는 것을 확인하였다. 현장 실험에서도 구연산칼슘인산염 용액 투여가 용존 인산염 감소와 중금속 안정화 결과를 가져왔다. 이는 미생물의 인산염 사용이 중금속 안정화 향상에 도움이 되었음을 의미한다. 현장 실험에서 미생물군집을 분석한 결과, 구연산칼슘인산염 용액 투여로 다양성이 증대되었으며, *Anaerofilum*과 *Treponema* 같은 혐기성 미생물 개체가 우점종으로 발현되는 결과를 얻었다. 이러한 결과들을 살펴볼 때, 구연산칼슘인산염의 투여로 인한 토착미생물 신진대사 활성화를 통해서 토양 내 혐기성 환원 조건을 제공하거나 토양미생물이 인산염을 중금속 안정화에 이용되기 쉽게 도와주는 미지의 기작을 통해서 해당 현장의 중금속 안정화에 기여한 것으로 해석된다.

주제어 : 중금속 안정화, 인산염 이용가능성, 토양미생물

1. 서론

오염된 토양 내 중금속 정화를 위해 많은 연구가 진행되고 있으나, 토양 내 중금속 성분은 화학적으로 분해되지 않는 특성 때문에 효과적인 처리기술이 제시되지 않고 있

다. 토양세척법(Soil Washing)은 중금속 정화에 비교적 효과적이거나 비용이 높은 문제점을 가지고 있으며, 광범위한 오염부지에 적용할 수 없다는 단점이 있다. 현장에서 세정액을 주입하여 중금속을 제거하는 토양세정법(Soil Flushing)은 중금속 제거에 효과적이거나 중금속을 함유하는 침출액을 처리해야하는 2차적 공정이 필요한 단점이 있다. 최근 대두되고 있는 동전기법(Electrokinetic Remediation) 및 식물정화법(Phytoremediation) 등은 기술의 현장적용에

† Corresponding author

E-mail: parkj@yonsei.ac.kr

Tel: 02-2123-5798

Fax: 02-312-5798

있어서 그 효율성이 아직 입증되지 않은 상태이다. 상기된 지상굴착처리(Ex-Situ) 기법들은 대체로 중금속 정화에 효과적이거나 경제성이 낮으며, 광범위한 오염부지의 토양에 적합하지 않아 원위치(In-Situ)기법에 근거한 오염 복원 기술개발이 필요하다.¹⁾

원위치 안정화기법은 오염물질이 토양으로부터 직접적으로 제거되지는 않지만, 오염물질을 화학적으로 유동성, 독성, 용해성이 가장 낮은 형태로 변환시켜 잠재적 위해성을 감소시키는 기법으로 안정화 반응물질과 토양 내 오염물질 상호간의 산화-환원, 중화, 침전, 복합체(complex) 및 이온교환 등의 반응으로 오염물질의 용해도를 감소시킴으로써 광범위한 저농도의 중금속 오염토양을 처리하는데 여타 오염토양 정화기술에 비하여 비용-효율적인 측면에서 매우 효과적인 기술로 인정받고 있다.¹⁾

하이드록시 아파타이트(hydroxyapatite, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$)는 인간을 포함한 동물 뼈의 광물요소로서 환경 친화적이며 중금속(Pb/Cd/Cu/Zn/Cr/As)에 대한 흡수·흡착력이 매우 높다.^{2,3)} 하이드록시 아파타이트에 의한 중금속 안정화는 이온교환, 공침, 흡착 등의 반응과정을 통하여 이루어진다고 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾ 하이드록시 아파타이트는 투수성반응벽체(Permeable Reactive Barrier)의 매질로서 지하수 내의 중금속을 제거하기 위한 용도로도 사용되고 있다. 그러나 PRB공법은 토양 내의 중금속을 정화하기에는 부적합하며 지하수 내의 중금속 정화에 사용된다라도 현장 적용상의 공간적 제한점과 광범위한 오염토양의 사용에 적합하지 않은 단점이 있다. 따라서 중금속에 대한 강한 친화성을 갖는 하이드록시 아파타이트를 오염토양의 정화에 이용하기 위해서는 하이드록시 아파타이트의 효율적인 적용 방법의 도출을 위한 연구가 필요하다.

수용액 내에서의 아파타이트(apatite) 광물의 생성은 칼슘과 인산염이 반응하여 발생하고 그 반응은 매우 빠른 속도로 진행되는 특성을 가지고 있다. 따라서 칼슘과 인산염이 별도의 처리없이 토양에 주입될 경우, 표토층이나 토양의 천부에서 빠르게 침전하여 심부에 있는 중금속 처리가 불가능하게 된다. 이 점을 보완하기 위해 본 연구에서는 칼슘용액에 구연산(citrate)을 첨가하여 Ca-citrate 복합체의 생성을 일차적으로 유도, 아파타이트가 토양의 표토층에서 침전하지 않게 하였다. Ca-citrate 복합체는 인산염 용액과 함께 지중으로 침투하게 되고 이 후 서서히 토착 토양미생물에 의한 구연산의 생분해가 이루어지면서 칼슘을 용출시키게 된다. 용출된 칼슘은 인산염과 반응하여 아파타이트를 생성하게 되고 그 과정에서 주변에 존재하는 토양 중금속을 흡착/흡수하거나 공침시켜 중금속의 안정화를 유도하게 된다. 본 공정의 특징은 기존에 사용되고 있는 액상 인산염 용액과 달리 상대적으로 깊이 존재하는 오염토양까지 정화할 수 있고, 복합적인 화학반응으로 중금속의 안정화를 극대화 할 수 있으며, 광범위한 토양오염 지역에 적용할 수 있다는 데 있다.^{1,7)} 본 연구는 폐광산 주변의 오염토양을 이용한 실내실험과 현장실험을 통하여

하이드록시 아파타이트의 생성에 의한 중금속 안정화의 전체적인 효율성을 고찰하고 안정화 과정에서 토양 미생물이 미치는 영향에 대한 기초 연구에 그 목적이 있다.

2. 연구방법

2.1. 현장위치와 특성

구연산칼슘인산염 용액의 현장 적용 평가를 위해 거풍광산 주변의 경작지 중 다양한 중금속 원소에 의해 오염된 지역(밭 토양)을 선정하여 현장토양을 대상으로 물리·화학·생물학적 조사 및 반응용액의 현장 적용시험을 수행하였다. 거풍광산(충북 옥천군 청선면 거포리)은 주로 금, 은, 동을 대상으로 일정 시대에 개항한 광산으로 상1갱, 상2갱, 통동갱 등이 개설되었으나 현재는 매몰, 폐쇄된 상태이다. 광산 주변 상황은 주로 폐갱구 주변에 폐광석이 적치되어 있으며, 일부 폐광석 적치장에 대한 옹벽설치 및 식생복원을 통해 관리하고 있으나 폐광석에서 유래하는 낮은 산성 요인으로 인해, 조성된 식생이 거의 고사한 실정이다. 폐광석 적치장 주변에는 황동석, 섬아연석 등이 다량 함유된 폐광석이 산재하고 있으며, 폐갱구 등에서 유래하여 폐광석 적치장을 통과한 낮은 산도의 산성침출수가 하류로 방류되고 있어 주변 하천에 큰 영향을 미치고 있는 실정이다. 또한 광미적치장 주변에서도 일부 광미가 지속적으로 하부 하천으로 유실되고 있다. 이러한 영향을 받아 거풍 발지역에는 전반적으로 오염도가 높은 것으로 확인되었다. 지역의 밭 토양시료는 광미적치장 하부에 위치한 밭의 중앙부에서 채취하였으며, 지표로부터 45 cm까지 15 cm 간격으로 3개의 구간으로 나눈 후 혼합하였다. 토양의 오염현황을 파악하기 위해 각 심도별 중금속 분석(토양오염공정시험법, Toxicity Characteristic Leaching Procedure)과 미생물 군집 분석을 수행하였다.

2.2. 실험실 분석

미생물 존재 유무에 따른 중금속 안정화와 반응조 내의 화학적 변화에 대한 차이에 대해 알아보기 위하여, TCLP에 근거한 회분식 반응조 실험(batch test)을 수행하였다. 거풍지역의 토양시료의 존재하는 미생물을 제거하기 위하여 토양의 물리화학적 상태의 변화를 최소화하는 autoclave (121℃, 1.3기압)로 1시간 동안 고압/고온 처리 등 전처리 과정을 거친 미생물이 존재하지 않는 반응조(GA)와 현장 토양상태를 그대로 유지한 미생물이 존재할 것으로 추정되는 반응조(GX)로 나누었다.^{8,9)} 실험은 50 mL centrifuge tube에 각각 20 g씩 채워 넣어 총 56개 반응조를 구성하였고, 총 주입되는 시약들은 구연산나트륨(Sodium Citrate) 60중량%, 질산암모늄(Ammonium Nitrate) 1중량%, 인산나트륨(Sodium Phosphate) 25중량%의 분율로 조제하였으며, 혼합 물비율은 칼슘 농도 30 mM, 구연산염 농도 30 mM, 인산염 농도 20 mM으로 조성하여 Ca : Citrate : Phosphate

= 3:3:2가 되게 하였으며, 토양미생물의 성장을 돕는 영양분으로서 사용한 질산염 농도는 1 mM으로 조성하였다. 수중에서 칼슘과 구연산염이 만나 Ca-citrate 복합체를 형성하는 Ca/Citrate의 비는 3이지만, 칼슘이 인산염과 만나 침전물을 생성하기 전에 구연산 염과 반응하여 다량의 Ca-citrate 복합체를 조성해야 하기 때문에 구연산염의 비율을 높였으며, 중금속을 포함한 apatite의 Ca/P 최적비는 3/2 ($\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)이므로 범위를 상기된 내용과 같이 설정하였다.³⁾ 조제된 반응용액은 1 M NaOH를 사용하여 pH를 7.5로 조정하였다.³⁾ 반응 비율은 20 g/20 mL = 1:1로 맞추었으며, 총 10일간 7개 포인트를 보는 것으로 구성하였다. 반응조는 섭씨 22도의 조건에서 교반기를 이용하여 50 rpm을 유지하면서 교반하여 반응 후 토양의 중금속과 인산염 농도를 분석하였다.

2.3. 현장실험

안정화 용액에 포함된 인산염은 토양에 흡착되어 있는 As를 치환반응을 통하여 용액 상으로 용출시켜 오히려 As의 농도를 증가시키는 역효과를 초래할 수 있으므로, As에 대한 큰 흡착성을 갖는 적니(red mud)를 매 10 cm 간격으로 8 kg씩 채워 섞어주었다.^{10,11)} 현장토양의 pH는 복수의 시료를 채취하여 측정한 결과 6~6.5의 범위를 보였다. 처리용액의 농도는 Batch Test와 동일한 칼슘 농도 30 mM, 인산염 농도 20 mM, 구연산염 농도 30 mM, 질산염 농도는 1 mM을 사용하였다. 적용되는 토양과 안정화 용액의 비율은 2:1의 부피 비를 사용하였으며, 600 L의 안정화 용액이 적용되었다. 토양에 Ca-citrate를 먼저 적용하고 24시간 후에 인산염 용액을 적용하였다. 현장토양시료는 총 62일 동안 5회에 걸쳐 타격식 비교란 시료 채취도구를 이용하여 지중 30 cm까지 투입한 후 제거하여 10 cm 간격으로 분리하여 분석하였다. 중금속 측정을 위해서, 시료는 0.1 N HCl을 사용하여 약 4시간 동안 진탕한 후 ICP-AES를 사용하였다. 또한 토양에 존재하는 인산염의 농도와 미생물 군집 분석을 수행하였다. 실험기간동안의 평균기온은 8월 21.3도, 9월 19.9도, 10월 13.5도의 분포를 보였고 강우량은 8월에 5회에 걸쳐 총 39 mm, 9월에 10회에 걸쳐 총 51.8 mm, 10월에 3회에 걸쳐 2.2 mm를 나타냈다.

2.4. 분석방법

2.4.1. 토양의 물리화학적 특성

거품광산에서 채취한 밭토양에 대한 심도별 온도, pH, 유기물 함량, 주요원소 분석등을 수행하였다. 심도별 온도와 pH는 현장에서 측정하였으며 유기물 함량은 작열감량(LOI, loss on ignition) 시험을 통하여 측정하였다. 작열감량은 전기로에서 섭씨 450도로 4시간 동안 가열한 후 전후 질량 차이를 이용하여 계산하였다. 토양의 주원소는 XRF로 분석하였다.

2.4.2. 토양 중금속 분석

2.4.2.1. 토양오염공정시험법(Korea Standard Test, KST)

현장실험에 사용된 토양오염공정시험법상의 시료 전처리 규정에 정해진 바와 같이 미량원소의 용출함량을 측정하기 위해 토양을 건조한 후, 2 mm(10번체)체질한 토양의 1/4을 파쇄하여 100 mesh 체질을 수행하여 나온 토양을 이용하였다. 시료 1 g을 50 mL의 centrifuge tube에 담아 각각 0.1 N의 염산용액 10 mL를 넣은 후, 항온 수평 진탕기(100회/분, 진폭 10 cm)를 사용하여 30℃를 유지하면서 1시간 동안 진탕시킨 다음 0.45 µm 여과지로 거른 뒤 분석을 수행하였다. 비소(As) 함량을 측정하기 위해서 전처리 시에 염산용액(1 N)과 진탕시간(30분)을 달리하였다.¹²⁾ 아연(Zn)의 경우 왕수(aqua regia)를 이용하여 추출하였다. 왕수는 진한 질산 1부피와 진한 염산 3부피로 혼합하였으며, 후드에서 24시간 동안 상온 보관하였으며, soil과 혼합하여 16±2시간 동안 반응시킨 뒤 80℃에서 2시간 중탕하였다.

2.4.2.2. Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP)

Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP)는 폐기물에서 위생매립지의 오염 침출수를 가정한 EPA SW-846 (Method 1311) 분석 방법이다.¹³⁾ 현장 중금속분석에서 시료의 pH에 따라 두가지 용출액을 사용하였으며, pH 4.93±0.05의 용출액 (1)의 경우, 5.7 mL의 glacial $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOH}$, 500 mL의 증류수 그리고 64.3 mL의 1 N NaOH를 혼합하여 만들었다. 용출액 (2)는 pH 2.88로 5.7 mL의 glacial $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOH}$ 에 증류수를 첨가하여 1 L로 희석하여 만들었다. 시료의 pH측정은 시료 5 g에 증류수 96.5 mL를 첨가하여 5분간 교반 후 pH를 측정하였다. 측정된 pH가 5보다 작을 경우, 용출액 (1)을 사용하였고, 5보다 큰 경우에는 3.5 mL의 1 N HCl을 첨가하여 50℃에 10분간 교반하여 재 측정하였다. 측정된 값이 5보다 작으면 용출액 (1)을 사용하였고 5보다 큰 경우는 용출액 (2)를 사용하였다. 용출방법은 토양시료 5 g를 100 mL의 Nalgene bottle에 넣고 용출액을 40 mL를 넣은 후에 진동장치에 넣어 30±2 rpm으로 상온에서 약 18±2시간 동안 진탕시킨 다음 0.45 µm Membrane Filter를 사용하여 여과한 후 분석하였다.¹³⁾

2.4.2.3. 인산염의 농도 분석

시료의 인산염 농도 분석을 위해 시료를 원심분리기를 이용하여 계층분리한 후, 0.45 µm 필터페이퍼(filter paper)로 여과시켰다. 여과시킨 시료는 DR/4000 UV-VIS 분광 광도계를 사용하였다.

2.4.3. 토양 미생물 군집 분석

토양미생물 중 다양성을 측정하기 위해서 다음과 같은 방법을 사용하였다. 채취한 토양 시료를 UltraClean™ Soil Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., USA)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 그 genomic DNA로부터 16S rDNA

유전자 증폭을 위한 bacterial universal primers 27f-FAM [fluorescence labeled](AGAGT TTGAT CATGG CTCAG)와 1492r(TACGG TTACC TTGTGA CGACTT)가 사용되었다. PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭을 위해, 10 μ M의 27f-FAM과 1492r primer-용액 0.5 μ L, 5 U/ μ L Taq polymerase (Fermentas, Germany)를 0.25 μ L, template DNA 20 ng에 증류수를 포함하여 최종부피 25 μ L로 실험하였다. 1000TM Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였으며, 처음 94 $^{\circ}$ C에서 3분, 그리고 30 cycle 동안 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 반응시켰고, 마지막 단계에서는 5분 동안 반응시켰다. 증폭한 16S rDNA 유전자를 QIAquick PCR purification Kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제한 후, 정제한 DNA를 TangoTM buffer, 증류수, 10U의 제한효소 *Hha*I을 사용하여 20 μ L로 맞추어 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응시켰다. T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 분석을 위해 제한효소로 처리된 DNA는 서울대학교 농업과학공동기기센터(NICEM)에서 단편분석을 하였다(96-capillary 3730xl DNA Analyzer, ABI). 결과로 얻은 electropherogram은 Gene Mapper Software v4.0 (ABI)를 사용하였으며, 이것은 다양한 peak height로 나열된 미생물 군집에 해당하는 profile이다. Electropherogram의 peak들을 사용하여 미생물 중 다양성 지수인 Shannon index (H), Evenness (e), species richness (d)를 계산하였다.

$$\text{Shannon index}(H) = \frac{C}{N} (N \log_{10} N - \sum n_i \log_{10} n_i)$$

$$\text{Richness}(d) = \frac{S-1}{\log N}$$

$$\text{Evenness}(e) = \frac{H}{\log S}$$

$C = 2.3$

$N = \text{sum of peak areas in a given T-RFLP}$

$n_i = \text{area of a T-RF(terminal-restriction fragment)}$

$i = \text{individual number of each T-RF in a T-RFLP chromatograph}$

$S = \text{abundance of T-RFs in each T-RFLP chromatograph}$

Shannon index는 Species richness, Evenness와 달리 시료 내 종의 수와 분포 균등 정도를 동시에 고려할 수 있는 장점이 있다.¹⁴⁾

3. 결과 및 토의

3.1. 현장의 중금속 오염

현장토양의 심도 별 온도, pH, 유기물함량은 Table 1에 나타내었다. 토양 pH는 전국 평균값인 6.7보다 높게 나타났으며 심도에 따라 감소하는 경향을 보였다.¹⁵⁾ 이는 토양 pH를 낮추는 광산 폐석이나 광미가 심부에 존재하고 있음

Table 1. Characteristics of Gupo-ri soil

Depth (cm)	Temp ($^{\circ}$ C)	pH	LOI (%)
1 ~ 15	24.4	5.86	5.58
16 ~ 30	23.5	5.14	4.99
31 ~ 45	23.0	4.8	3.08

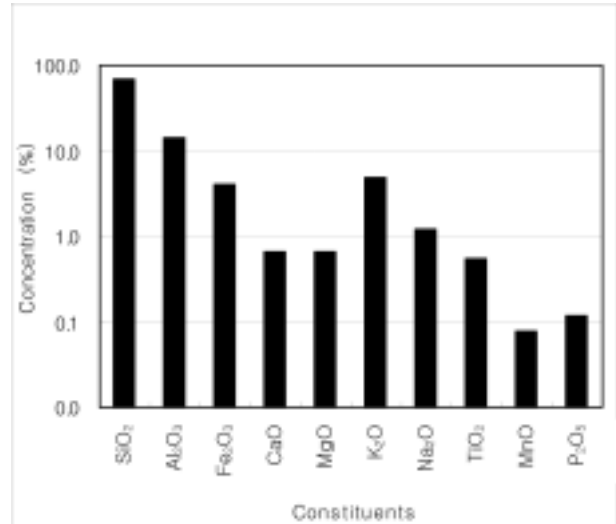


Fig. 1. Mineralogical composition of Gupo-ri soil.

을 추측할 수 있다. 토양의 유기물 함량은 평균 4.5%였으며 역시 심도에 따라 감소하는 특성을 보여주었고 이는 지표의 유기물이 지하로 용이하게 침투되지 못하고 있음을 나타낸다. 토양의 주성분은 Fig. 1에 나타내었다. 토양의 주성분 중 실리카와 알루미늄, 철, 포타슘의 함량이 높은 것으로 나타났다.

거풍지역의 발토양의 중금속 농도를 토양오염공정시험법 (KST, 0.1 N HCl)으로 분석한 결과(Table 2), 비소, 카드뮴, 아연의 경우 토양오염우려기준치 가 지역을 초과하고 있다. 납의 경우 우려기준치보다는 낮으나 전국평균치의 약 8배로 측정이 되었으며 구리의 경우 우려기준치에 근접하는 것으로 나타났다.¹⁶⁾ TCLP로 분석한 결과 또한 Table 2에 함께 나타내었다. TCLP로 측정된 값은 KST방법으로

Table 2. Results of heavy metals measured from Gupo-ri soil using KST (Korea Standard Test), and TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure)

Method	Items	As (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)
KST	A standard of soil pollution anxiety	6	50	1.5	100	300
	Korean average	0.48	3.6	0.08	5.4	32.3
	Content in nature	0.09	0.5	0.04	3.1	54.3
	Rice farm	0.47	3.4	0.07	5.6	65.2
	Vegetable farm	0.48	3.5	0.06	5.0	30.2
	Land farm in Gupo-ri	19.2	28.6	1.7	87.1	553
TCLP	Land farm in Gupo-ri	1.0	0.5	0.2	9.5	8.6

측정된 값보다 모든 경우에서 낮다. TCLP는 자연지중에서 용출이 최대 가능한 중금속의 농도를 의미한다는 점을 고려할 때, TCLP분석결과는 침투된 경우에 의해서 해당 토양내 중금속이 지하수로 용출될 수 있는 가능성이나 식생뿌리로 흡수될 가능성에 대한 정보를 제공한다고 할 수 있다.

3.2. 미생물의 영향

실험실 조건에서 회분식 반응조를 이용해서 현장의 토양 시료 내 미생물이 용존 인산염에 미치는 영향을 평가한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 토양미생물이 가압멸균 전 처리된 시료와 전 처리 되지 않은 시료에서 투여된 인산염은 토양에 흡착되는 경향을 보이고 있다. 초기(반응 1일째)에는 용존 인산염 농도(6.33~6.39 mM)와 저감속도가 가압멸균 처리한 시료와 처리하지 않은 토양시료에서 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 2일째 이후에는 처리하지 않은 토양시료가 가압멸균 전 처리된 시료보다 용존 인산염 농도의 저감속도가 크다는 것을 Fig. 2의 결과로 알 수 있다. 인산염이 수중에서 제거되는 기작은 토양에 흡착, 미생물 표면에 흡착, 그리고 미생물에 의한 이용으로 볼 수 있다. 초기에 가압멸균 처리한 경우와 그러하지 않은 경우의 결과가 차이가 없다는 것은 미생물에 의한 인산염 이용의 기여도가 미미하다는 것을 의미하고 이는 미생물의 양이 크지 않기 때문인 것으로 판단된다. 반면 2일째 이후에 용존 인산염의 농도가 토양시료에서 멸균 전 처리한 시료에서 보다 빠르게 감소하는 이유는 투여된 기질(구연산염)에 의해서 미생물이 성장하고 이렇게 증가된 미생물 양에 의해서 흡착 및 이용된 인산염의 양이 증가되었기 때문인 것으로 판단된다.

토양 미생물 유무에 따른 중금속의 용출가능성 정도의 변화를 관찰하기 위해 Fig. 2에서 사용된 회분식 반응조에서 일부 중금속을 TCLP 방법을 통해서 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 토양시료에서 멸균 처리된 토양시료보다 구리와 아연 용출가능성의 정도가 감소하였다. 이 결과

는 미생물의 성장 및 신진대사가 중금속 고정화에 순기능이 있다는 것을 의미한다. 미생물의 영향에 대한 가능한 설명은 첫째, 미생물이 칼슘구연산의 구연산염을 소모해서 칼슘이 가용하게 되었을 가능성이다. 일반적인 화학적 이론으로 보면 아파타이트의 생성은 높은 인산염 농도와 높은 칼슘이온 농도에 의해서 증가하고 이에 의해서 중금속 고정화가 증가되는 것인데 본 연구의 결과에서는 용존 인산염 농도가 낮은 경우인 비 멸균된 토양시료에서 중금속 고정화가 더 진행되었다. 이는 아파타이트 생성을 통한 중금속 고정화에 토양미생물이 어떠한 영향을 주는 것을 보여주는 결과이다. 이 현상을 설명해 줄 수 있는 가능성은 미생물이 흡수(uptake)한 인산염이 용존된 인산염보다 아파타이트 생성을 통한 중금속 고정화에 순기능적 이면서 직접적인 효과를 부여하기 때문일 것이다. 또한 구연산염의 미생물 신진대사에 따라서 해당 토양환경에 존재하던 산소를 완전소모해서 혐기성 환원조건을 부여하는 간접적인 효과도 가능한 설명이다.

본 연구에서 사용한 멸균방법에 의한 물리화학적 영향이 상기에 결론에 미칠 가능성에 대해서도 아래에서 고찰하여 보았다. 본 연구에서 사용한 고온가압(121°C, 1.3기압) 조건에서 미생물들은 효과적으로 멸균되지만 토양의 물리적

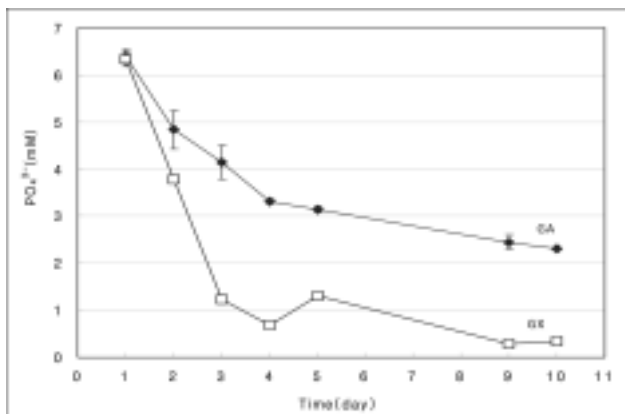


Fig. 2. Time-course changes of dissolved phosphate in laboratory batch experiments with autoclaved (GA) and non-autoclaved (GX) soil samples after adding Ca-citrate-phosphate solution.

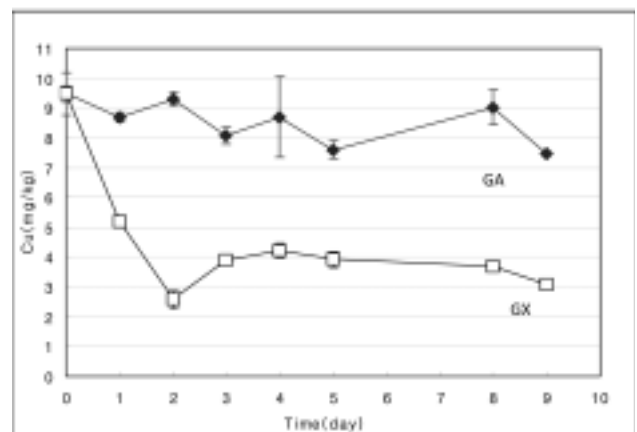
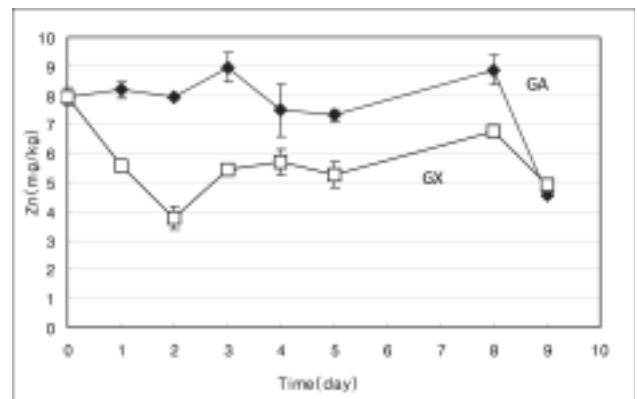


Fig. 3. Time-course changes of zinc and copper (measured by TCLP) in laboratory batch experiments with autoclaved (GA) and non-autoclaved (GX) soil samples after adding Ca-citrate-phosphate solution.

특성은 변하지 않으며, 인의 흡착 거동에는 변화가 없는 것으로 판단된다.^{8,9)} 단 고온처리 의해서 중금속의 침전이 생길 수 있는데, 만약 이러한 변화가 심각한 영향을 주었다면 멸균처리한 시료에서 중금속의 용출농도가 감소해야 한다. 하지만 실험결과는 멸균처리하지 않은 시료에서 중금속 용출농도가 감소한 것을 볼 수 있다. 이는 미생물에 의해 중금속 안정화가 증가했을 가능성을 반증한다. 따라서 본 연구에서 사용한 멸균 공시료 실험과 대조함으로서 미생물의 영향을 구체적이고 체계적으로 보이었다고 할 수 있다.

3.3. 현장실험

구연산칼슘인산염 용액을 토양에 투입시킨 후 각 심도 (1~10 cm, 11~20 cm, 21~30 cm)에서 채취한 토양에서 용출된 인산염의 농도는 몇 시료를 제외하고 대체로 10 mg/kg 내에서 분포하였다(Fig. 4). 가장 낮은 심도(1~10 cm)에서 일시적으로(35 days) 용출된 인산염이 10 mg/kg 이상의 농도로 검출되었으나 그 이후에 안정화됨을 보였다. 안정화 이후 용출 인산염 농도는 10 mg/kg 이내로서 이 수치는 인산염의 원주입량(1,425 mg/kg)의 0.7% 이하에 해당하는 농도이다. 상기 회분식 실험결과(Fig. 2)에 따르면 Fig. 4의 결과는 주입된 인의 대부분이 토양 내에서 토양물질에 흡착 혹은 여러 가지 광물질 등의 안정한 형태로 전이 되었거나 미생물에 의한 영향으로 판단된다.

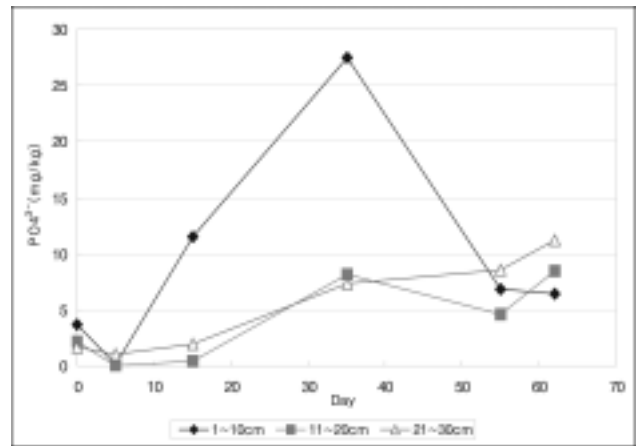


Fig. 4. Time-course changes of dissolved phosphate in the field experiment.

중금속은 전반적으로 심도에 관계없이 그 농도가 감소하는 추세를 보이면서 심도 30 cm의 깊은 곳까지 안정화가 진행된 것으로 관찰되었다(Fig. 5). Table 2에 나오는 아연의 농도(553 mg/kg)와 본 현장 실험 결과에서 도출된 아연의 농도(약 40 mg/kg)가 큰 차이를 보이는 이유는 Table 2는 토양 공정시험법에 의거하여 실험을 수행하기 위해 매우 강한 산성을 띄는 왕수(질산+염산)를 이용하여 추출한 것이고, Fig. 5에서 나타난 아연은 0.1 N HCl에 의해 용출되었기 때문이다. 토양공정시험법은 아연의 경우 왕

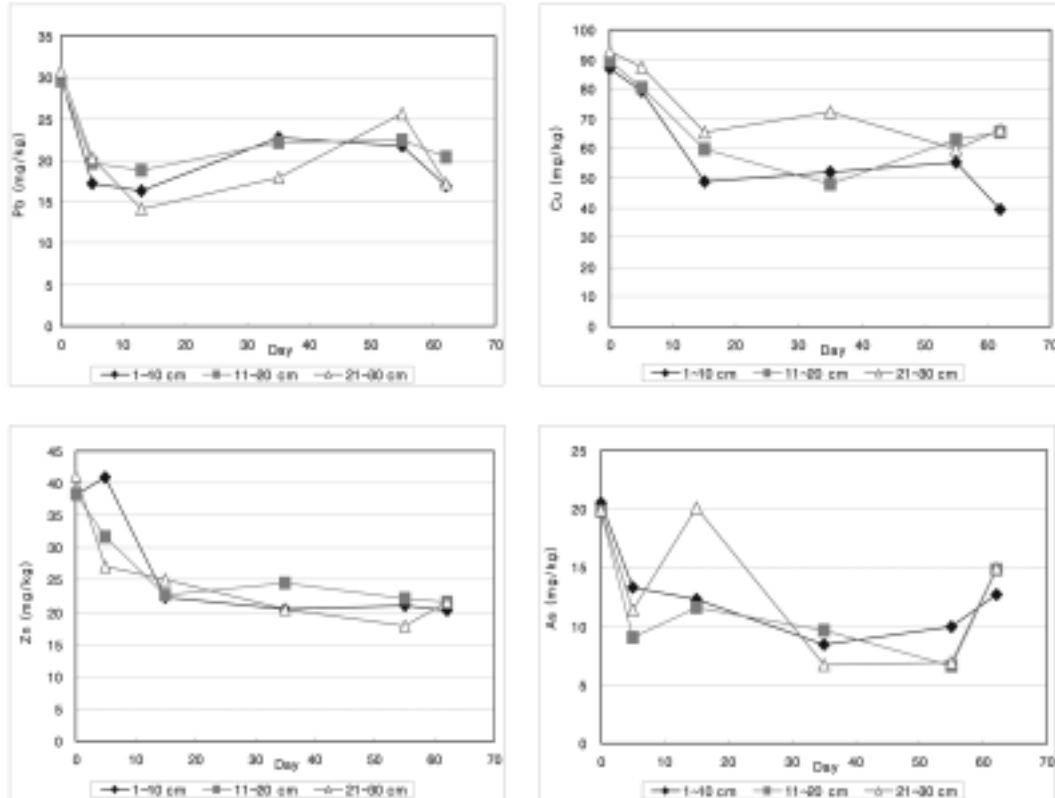


Fig. 5. Time-course changes of heavy metals (measured using 0.1 HCl) in the field experiments after applying Ca-citrate-phosphate solution.

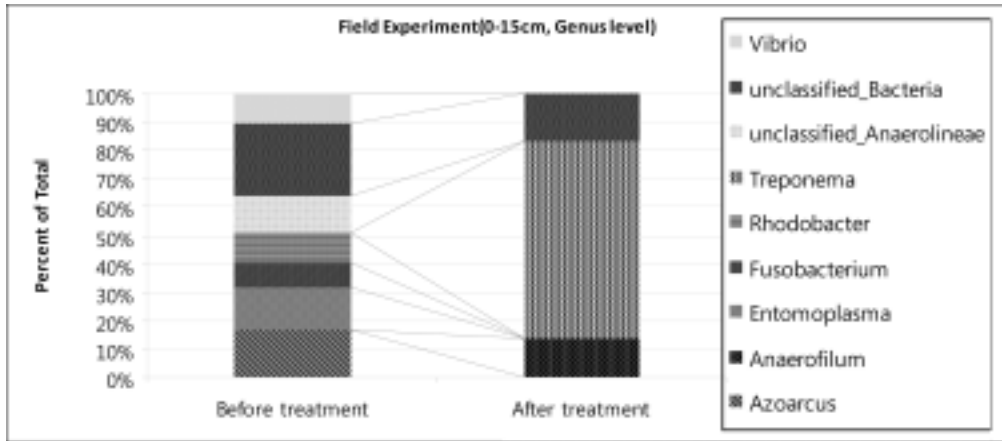


Fig. 6. Microbial community shift in the field experiment after applying Ca-citrate-phosphate solution.

Table 3. Microbial diversity results before and after Ca-citrate-phosphate solution treatment in the Gupo-ri field

The method of species diversity analysis	0 ~ 15 cm	
	Before treatment	After treatment
Shannon Index (H)	1.41	2.50
Richness (d)	3.58	3.84
Evenness (e)	1.17	2.03

수를, 비소의 경우 1 N HCl을, 그 외 기타중금속의 경우는 0.1 N HCl을 쓰도록 각각 명시되어 있다. 안정화된 상태로 추정되는 결정이 왕수에 의해 깨져 안정화 유무를 판단하기 어려우므로 현장 실험에서는 왕수 대신 0.1 N HCl을 사용하였다. 62일 동안의 안정화율은 Zn 37~47%, Cu 28~55%, Pb 29~40%로 나타났으나, As의 경우 측정치들이 불규칙한 진동을 보이고 있어 안정화의 유무를 판단하기 어렵다. As의 안정화 값들이 불규칙한 이유는 토양으로부터 용출된 As가 적기에 흡착되어 있다가 0.1 N HCl의 강한 산과 반응하여 액상으로 추출되어 나왔기 때문이라고 판단된다.

현장실험에서 미생물의 영향 분석을 위해서 미생물군집 분석을 구연산칼슘인산염 투여 전과 후에 각각 수행하여서 비교하였다. 구연산칼슘인산염을 투여 전과 투여 후, 각각의 미생물 다양성을 측정한 결과, Shannon index, Richness, Evenness가 투여 후에 커진 것을 알 수 있다(Table 3). Richness의 증가보다 Evenness의 증가가 두드러진 점을 감안할 때 개체의 개수의 증가보다 균등분포의 정도가 커짐으로써 Shannon index가 커졌다는 것을 알 수 있다. 즉, 토양 미생물의 종 다양성이 증대되었다고 판단된다. Ca-citrate solution과 phosphate solution을 적용하기 전과 적용 후의 미생물 군집 분석 결과(Fig. 6), 통기성 및 호기성 *Azoarcus*, *Hyphomonas*, *Rhodobacter*, *Vibrio*는 거의 사라진데 반해 혐기성 세균인 *Anaerofilum*, *Treponema*의 발현이 두드러지게 나타난 것을 볼 수 있다. 이 두 미생물 개체는 혐기성 조건에서 성장하는 특징이 있는데^{17,18)} 구연산칼슘인산염에 의해서 호기성 세균들에 의해서 산소가 고갈되고 이

러한 혐기성 미생물들이 구연산을 탄소에너지 기질로 해서 성장한 것으로, 구연산칼슘인산염의 투여로 표토층이 보다 더 혐기조건으로 전환한 것으로 판단된다. 이러한 혐기조건은 보다 더 환원조건을 부여하여서 중금속 안정화에 도움을 준 것이라고 판단된다.

4. 결론

거풍지역의 오염된 토양내에 존재하는 중금속의 안정화를 위하여, 친환경 반응 매질인 구연산칼슘인산염 용액을 중금속으로 오염된 토양에 적용 시 토양미생물이 미치는 영향에 대해서 실험실 및 현장 조건의 실험을 본 연구에서 수행하였다. 주요 연구결과는 다음과 같다.

- 1) 본 연구의 실험실 결과, 용존 인산염 농도가 낮은 경우인 비멸균된 토양시료에서 중금속 안정화가 더 진행되었다. 이는 토양미생물이 아파타이트 생성을 통한 중금속 고정화에 영향을 준다는 것을 보여주는 결과이다. 미생물은 아파타이트 생성을 통한 중금속 고정화 및 공침에 순기능적이며, 직접적인 효과를 제공할 수도 있다. 또한, 기질인 구연산을 이용하여 신진대사를 하는 호기성 미생물에 의한 산소 소모가 토양환경을 혐기성 환원 환경으로 조성하여 중금속이 안정화되기 쉬운 화학적 형태로 전이하였을 가능성도 있다.
- 2) 심도별로 큰 차이 없이 중금속 농도가 감소하는 경향을 보인 현장 실험 결과를 통해 구연산칼슘인산염 용액은 천부에서 심부(~30 cm)까지 중금속 안정화에 효과가 있다는 것을 확인하였다.
- 3) 현장실험에서 구연산칼슘인산염 용액을 투여한 토양시료내 미생물 군집을 분석한 결과 종의 다양성이 증대되었고, *Anaerofilum*이나 *Treponema*과 같은 절대 혐기성 미생물 개체들이 성장할 수 있는 환원적 혐기성 조건이 조성되었음을 알 수 있었다. 이러한 환원조건에서 중금속이 안정화되기 쉬운 화학적 형태로 전환되었을 것으로 판단된다.

4) 상기의 실험실 조건과 현장조건에서 도출된 결과에 의하면 구연산칼슘인산염 용액을 중금속으로 오염된 토양에 적용하는 경우, 토양미생물이 중금속 안정화에 순기능적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이의상, 장영천, 이상봉, “중금속 오염토양에 대한 액상인산염 복원기술의 적용성 평가,” 한국폐기물학회지, **21**(7), 677~683(2004).
2. Fernane, F., Mecherri, O. M., Sharrock, P., Hadioui, M., Lounici, H., and Fedoroff, M., “Sorption of cadmium and copper ions on natural and synthetic hydroxylapatite particles,” *Mater. Charact.*, **59**(5), 554~559(2008).
3. Moore, R. C. and Sanchez, C., “Formation of hydroxyapatite in soil using calcium citrate and sodium phosphate for control of strontium migration,” *Radiochim. Acta*, **92**(9-11), 719~723(2004).
4. Ma, Q. Y., Traina, S. J., Logan, T. J., and Ryan, J. A., “In situ lead immobilization by apatite,” *Environ. Sci. Technol.*, **27**(9), 1803~1810(1993).
5. Xu, Y. and Schwartz, F. W., “Lead immobilization by hydroxyapatite in aqueous solutions,” *J. Contam. Hydrol.*, **15**(3), 187~206(1994).
6. Xu, Y., Schwartz, F. W., and Traina, S. J., “Sorption of Zn^{2+} and Cd^{2+} on hydroxyapatite surface,” *Environ. Sci. Technol.*, **28**(8), 1472~1480(1994).
7. 강정후, 최태범, 선용호, 장윤영, “Phosphate를 이용한 중금속 오염토양의 안정화,” 대한환경공학회지, **25**(5), 554(2003).
8. Andrew, V. O., Mark, L. M., James, B. H., Jeffrey, B., and Charles, A. P., “Effect of DNA polymer length on its Adsorption to soils,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(2), 393~396(1994).
9. Khanna, M. and Stotzky, G., “Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(6), 1930~1939(1992).
10. Genc-fuhrman, H., Bregnhøj, H., McConchie, D., “Arsenate removal from water using sand-red mud columns,” *Water Res.*, **39**(13), 2944~2954(2005).
11. Bertocchi, A. F., Ghiani, M., Peretti, R., Zucca, A., “Red mud and fly ash for remediation of mine sites contaminated with As, Cd, Cu, Pb and Zn,” *J. Hazard. Mater.*, **134**(1-3), 112~119(2006).
12. 환경부, 토양오염공정 시험방법(환경부고시 제 2002-122호), 2002.
13. U.S Environmental Protection Agency Home Page, [http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/1311\(1992\)](http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/1311(1992)).
14. 기동원, 박준홍, 이재진, 노백호, “현장 측정된 토양미생물 중 다양성과 생태자연도 등급 자료 간의 통계적 상관관계 평가와 토양생태의 질 산정방안 제안,” 대한토목학회논문집, **27**(6B), 703~710(2007).
15. 환경부, 2007년 토양측정망 및 실태조사 결과, [http://www.me.go.kr/depart/dev/info_menu_dept.jsp?depart_code=0063\(2007\)](http://www.me.go.kr/depart/dev/info_menu_dept.jsp?depart_code=0063(2007)).
16. 환경부, 토양환경보전법 시행규칙 별표3 토양오염우려기준.
17. Dupont, D. P., Duhamel, G. E., Carlson, M. P., and Mathiesen, M. R., “Effect of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper,” *Vet. Microbiol.*, **41**(1-2), 63~73(1994).
18. Zellner, G., Stackebrandt, E., Nagel, D., Messner, P., Weiss, N., and Winter, J., “*Anaerofilum pentosovorans* gen. nov., sp. nov., and *Anaerofilum agile* sp. nov., two new, strictly anaerobic, mesophilic, acidogenic bacteria from anaerobic bioreactors,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**(4), 871~875(1996).