연구논문

생체모방형 토양개량제를 이용한 산성토양 안정화 적용성 평가

권준욱^{1*} · 백기정² · 백상현³

¹(주)지오미래이앤씨 기업부설연구소 연구소장, ²(주)지오미래이앤씨 기업부설연구소 선임연구원
³(주)지오미래이앤씨 기업부설연구소 연구원

Evaluation of Acid Soil Stabilization Applicability by using Biomimetic Soil Improvement Agents

Joon-uk Kwon^{1*}, Ki-jeong Baek² and Sanghyun Baek³

¹Director, Geomire Engineering&Construction Research Institute

²Senior Researcher, Geomire Engineering&Construction Research Institute

³Assistant Researcher, Geomire Engineering&Construction Research Institute

Received 13 October 2020 Final version Received 3 December 2020 Accepted 22 December 2020

Abstract : Neutralization experiments for acid soil near mining area were conducted using indigenous microorganism and biomineralization microorganism named *Myxococcus xanthus*, *M. xanthus* and indigenous microorganism extracted from acidic soil showed neutralization ability through the experiment. Optimum microorganism input and nutrient broth ratio was determined as *M. xanthus* 100 ml + nutrient broth 120 ml, indigenous microorganism 80 ml + nutrient broth 80 ml. The experiment conducted in 4°C showed no neutralization effect which implies that, application of microorganism should be cautious to field temperature.

Key words : Acid soil, Biomineralization, Indigenous microorganism, *Myxococcus xanthus*

요 약 : 생체모방형 토양개량제인 생광물화균 *Myxococcus xanthus*와 토착미생물을 활용하여 국내에 산재되어 있는 휴·폐광산의 산성토양에서 중화실험을 수행하였다. 토양에서의 중화능력 확인 실험 결과 *M. xanthus*와 산성 토양에서 추출한 토착미생물에서 중화능력이 확인되었다. 미생물 투입비와 영양배지의 배합비는 *M. xanthus* 100 ml + NB배지 120 ml, 토착미생물 80 ml + NB배지 80 ml로 산정하였다. 미생물을 처리한 토양의 배양온도를 4°C로 조절한 실험에서는 미생물의 생장이 진행되지 못해 토양의 중화가 확인되지 않았다.

주요어 : 산성토양, 생광물화, 토착미생물, *Myxococcus xanthus*

서 론

광산지역 대부분의 휴·폐광산들은 사후처리 없이 적절한 관리가 이루어지지 못한 채 방치되어 산성광산배수와 함께 중금속 유출을 일으켜 주변지역 지하수, 하천 및 토양의 오염을 발생시키므로 이에 대한 복구의 필요성이 요구된다. 이는 생명체에 축적되어 치명적인 피해를 유발할 수 있다. 현재 사용되고 있는 토양의 안정화제는 주로 석회석, 석회고토, 제강슬래그 등으로 토양을 개량하는 효과가 있지만 장기적으로 자연생태계 파괴, 산림 훼손 등의 문제를 야기할 수 있기 때문에 이를 대체할 친환경적 재료의 개발

이 필요하다(Heo *et al.*, 2010).

생광물화(Biomineralization)기술은 생체 또는 자연계에서 광범위하게 이루어지고 있는 CO₂ 고정 또는 전환 현상을 모방한 기술로 미생물의 신진대사 작용을 통해 이산화탄소를 탄산염(CaCO₃)형태로 고정시키는 방법이다(Dupraz, S. *et al.*, 2009).

탄산염화 반응은 식 (1)과 같이 수중에 용존된 이산화탄소가 Bicarbonate 이온으로 전환되며, 이렇게 전환된 Bicarbonate 이온은 식 (2)와 같이 Carbonate 이온으로 전환된다. 이러한 환경에서 Ca이온과 같은 2가 이온이 존재하면 식 (3)과 같이 Carbonate 이온과 반응하여 탄산칼슘으로 침

*Corresponding Author, Joon-uk Kwon, injoon98@naver.com, GEOMIRE Engineering&Construction Research Institute, Director, Seoul, Korea

전한다(Lee, S. W. *et al.*, 2010).

이 기술에서의 미생물 작용과 역할에 대해서는 다음과 같은 대략적인 작용을 통해서 관련 맺을 수 있다. 첫째로, 미생물의 신진대사 시 생성되는 물질이 반응에 관여한다. 둘째, 세포막을 통한 이온교환 작용이 생광물화에 기여하고, 마지막으로 세포 밖에 있는 고분자 물질에 의한 작용이다. 즉, 미생물에 의해서 만들어지는 고분자 화합물은 칼슘 이온을 끌어들이거나 결정화하는데 제어할 수 있는 인자가 된다(Min, D. H. *et al.*, 2011).

생광물화 기술에는 다양한 미생물 종이 사용될 수 있으며, 미생물 종에 따라 침전되는 탄산염의 결정 형태가 다양한 것으로 알려져 있다(Lian, B. *et al.*, 2006; Jansson, C. and Northen, T., 2010).

생광물화균 중 *Myxococcus xanthus*의 경우 비병원성이고, 경작지와 같은 유기물이 풍부한 토양에서 많이 발견된다. 이 미생물은 황산염(barite, taylorite), 탄산염(calcite, Mg-calcite, vaterite), 인산염(struvite, newberyite)을 형성시킬 수 있다(Gonzalez-Munoz, M. T. *et al.*, 2000; Mendez-Vilas, A, 2007).

M. xanthus 균은 탄산칼슘의 세포 외 침전을 유발하며, 신진대사 활동에 의해 CO_2 와 NH_3 를 생성하여 세포 주변의 pH를 증가시킨다고 알려져 있다(식 4) (Piñar, G. *et al.*, 2010). 또한, 아미노산의 산화적 탈아미노 반응(oxidative deamination)에 의해 세포주변을 알칼리화한다(Rodriguez, N. C. *et al.*, 2003).

선행 연구에서 SAR(Simulated Acid Rain)을 이용하여 초기 pH를 4.0, 4.5, 5.0으로 조절한 액체배지에서 *M. xanthus*를 적용한 실험의 결과 최종 pH가 최대 7.3까지 증가하여 중화능력이 확인되었다. *M. xanthus*의 대사과정에 의해 발생하는 NH_4^+ 의 농도도 함께 증가하여 pH 상승이 *M. xanthus* 균에 의한 것임을 확인하였다(You, 2016).

따라서 본 연구에서는 생체모방형 토양개량제인 생광물화균 *M. xanthus*를 활용하여 위와 같은 생광물화 반응 메커니즘에 의한 산성 토양의 안정화제로서 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

실험방법

토양시료 채취

연구에 활용할 토양시료 및 현황조사를 위해 환경부에서 실시하는 연도별 토양측정망 및 토양오염실태조사 결과(Ministry of Environment, 2015~2017)와 한국광해관리공단의 기술개발 보고서(Mine Reclamation Corp., 2014), 광해방지사업 시의 토양정밀조사, 광상실태조사 자료를 활용하였다. 자료 분석을 통해 토양시료 채취지역을 선정하고 현장조사 및 토양시료 채취를 실시하였다.

본 연구에서는 실제 산성화된 지역의 토양을 대상으로 한 실험을 통해 현장 적용성을 평가하였다. 이에 따라 연구에 활용된 토양시료는 현장 pH 측정으로 pH 4~6범위의 토양을 선별 채취하였으며, 각 시료는 풍건 후 10 mesh(2 mm) 체거름을 통해 분석 및 실험에 사용하였다.

또한, 현장조사를 통해 채취된 시료 중 중금속오염 토양(2점), 산성토양(1 점)에서 토착미생물을 분리하였다(토착미생물 A, B, C). 분리된 토착미생물을 활용하여 액체배지 내에서의 산성 중화 가능성을 평가하고 이와 병행하여 실제 산성토양에서 중화실험을 통해 활용 가능한 토착미생물을 발굴하기 위한 연구를 수행하였다.

생광물화균 *M. xanthus* 배양

본 연구에서는 선행 연구(Park, 2014; You, 2016)를 통해 액체 배지와 인공토양에서 중화능력을 확인한 생광물화균인 *Myxococcus xanthus*(ATCC® 25232™)를 American Type Culture Collection에서 분양받아 SP broth에서 배양하였으며 배양액의 조성은 다음과 같다; SP Broth : 1.0 g raffinose, 1.0 g sucrose, 1.0 g galactose, 5.0 g soluble starch, 2.5 g casitone(BD 225930), 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g K_2HPO_4 , 증류수 1,000 ml.

SP broth에서 배양된 *M. xanthus*는 CT medium(1% Casitone, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 10 mM phosphate buffer (pH 6.5))을 제조하여 121°C에서 20분간 고압멸균(Autoclave)한 후 배양액 5 ml를 접종하여 30°C, 160 rpm 조건 하에 진탕 배양기(shaking incubator; Vision scientific, VS-8480)에서 24시간 동안 배양하여 연구에 사용하였다.

토착미생물 추출

토착미생물의 분리는 1) 0.85%(w/v) NaCl solution과 soil을 5:1로 섞어 미생물을 solution 내로 용출, 2) 상등액 2 ml를 LB배지 100 ml에 넣어 농화배양 후 범용 영양 한천배지(LB, NB, TSB, R2A)에 도말하여 토양 내 토착미생물 중분석을 실시(농화배양 배지조성 및 배양 조건: LB Broth, 호기성 상태 30°C 120 rpm), 3) 분리된 토착미생물의 종 다양

성 분석을 위하여 차세대 염기 서열 분석(Next generation sequencing, NGS)을 진행 4) 다양한 영양 한천배지(LB, NB, TSA, R2A)에서 집락을 형성하는 균주를 분리, 배양하였으며, 각 single colony는 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit(BIOFACT, Korea)로 추출하여 16S rRNA gene sequencing을 수행하였다.

산성토양 중화실험

산성토양의 중화실험은 *M. xanthus* 와 추출된 토착미생물의 실제 산성토양에서의 중화능력을 확인하고 각 미생물의 중화 효율성을 비교하기 위해 *M. xanthus* 와 함께 토착 미생물 A, B, C를 활용한 비교실험을 수행하였다.

먼저 미생물 배양 및 영양원으로는 Nutrient broth(NB) medium를 사용하였고 그 조성은 다음과 같다; Nutrient broth : 5.0 g peptone, 3.0 Beef extract, 증류수 1,000 ml. 미리 배양한 미생물 배양액에서 5%(v/v)에 해당하는 배양액

을 채취하여 원심분리(5000 rpm, 15분)하고, 상등액을 제거하고 남은 미생물 침전물을 취해 0.85% NaCl 용액으로 2번 세척한 후 멸균한 NB 배지에서 배양하였다. 미생물을 접종한 NB배지는 30°C, 160 rpm 조건의 진탕 배양기에서 48 시간동안 배양하였다.

pH 4~6범위 내의 토양시료에 대해 Fig. 1과 같이 토양시료 200 g를 각각 500 ml 비커에 담은 뒤 미생물 투입은 *M. xanthus*를 배양한 NB 배지를 원심분리하여 상등액을 제거하고 남은 침전물을 0.85% NaCl 용액으로 2번 세척한 후 ① 미생물 침전물을 NB배지 120 ml와 함께 투입한 처리구 ② 미생물 침전물을 증류수 120 ml와 함께 투입한 무처리구로 구분하였다. 각 시료는 정치배양기를 활용하여 30°C, 호기성 조건에서 배양하여 24시간 마다 pH측정을 통해 변화를 확인하였다. 또한, 토착미생물 A, B, C를 동일한 조건으로 토양에 투입하여 영양배지 투입 유/무에 따른 중화능력을 확인하였다.

Fig. 1. Acid soil neutralization experiment (1) (*M. xanthus*, indigenous microorganism A, B, C).

Fig. 2. Acid soil neutralization experiment (2) (Determination of microorganism and nutrient broth input ratio).

Fig. 3. Acid soil neutralization experiment (3) (Neutralization experiment of each soil sample).

중화실험 결과를 종합하여 *M. xanthus*와 토착미생물의 투입비 및 영양배지 배합비를 확인하고자 Fig. 2와 같이 미생물 투입양에 따른 중화능력을 확인한 후 산정된 미생물 투입양을 기준으로 영양배지 투입량을 산정하기 위한 실험을 수행하였다.

실험결과를 통해 산정된 투입비를 채취지점이 다른 4개의 토양(S1, S2, S3, S4)에 적용한 중화실험을 Fig. 3과 같이 실시하였으며, 또한 토양의 배양온도를 4°C로 조정한 미생물 처리구를 추가하여 배양온도 변화에 따른 중화능력의 차이를 확인하였다.

실험결과

토양시료

토착미생물 추출에 활용된 중금속오염토양(A, B), 산성토양(C)의 분석 결과는 Table 1과 같다. 각 토착미생물은 *M. xanthus*와의 비교실험에 활용하였다.

pH 4~6범위 내의 현장 토양을 선별하여 활용하였으며 중화실험에 활용된 토양시료의 pH는 Table 2와 같다.

토착미생물 추출 및 활용

토착미생물 A, B, C를 대상으로 산성중화 가능성 균주를 확인하기 위한 실내시험을 수행하였다. 실내시험은 Methyl Red가 포함된 산성조건의 영양 한천배지에 혼합 토착미생물균주를 접종, 배양하여 미생물 집락 주변 배지의 색변화(적색→황색)를 관찰함으로써 산성중화 능력이 있는 미생물을 확인하였다. 그 결과 배지의 pH 값이 5일 때는 토착미생물 A, B, C 모두에서 중화능력이 있는 균주를 확인하였으나 pH 4.5 조건에서는 토착미생물 C만 중화반응을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

산성토양 중화실험

*M. xanthus*의 실제 산성토양(G, Y)에서의 중화실험 결과는 Fig. 5와 같다. 그 결과 *M. xanthus*와 NB배지를 함께 투입한 처리구에서는 토양의 초기 pH 값 대비 0.6~1.5가 상승하여 최대 7.2까지 상승하였으나 NB배지를 넣지 않은 무처리구에서는 토양 pH가 상승하지 않고 초기 pH가 그대로 유지되는 것을 확인하였다.

산성토양 시료 G를 활용한 토착미생물 A, B, C 중화실험

Table 1. Analysis of soil samples from which indigenous microorganisms have been extracted

Classification	Sampling station	Analysis results	Note
Soil A	36°54' 33.5" N 127°14'59.7" E	As : 97.66 mg/kg	Exceeding the standards of concern for soil pollution
Soil B	36°54' 00.8" N 127°15'33.8" E	As : 56.08 mg/kg	
Soil C	37°13' 39.3" N 127°07'48.0" E	pH : 4.6	

Table 2. pH of soil samples

Classification	pH	Classification	pH
G	5.3	S2	4.7
Y	4.7	S3	4.6
S1	4.8	S4	4.1

Fig. 4. Test to confirm neutralizing strain in liquid medium.

Fig. 5. Soil neutralization experiment results (1) (*M. xanthus*).

Fig. 6. Soil neutralization experiment results (2) (Indigenous microorganism A, B, C).

(Fig. 6)에서도 중화능력을 확인한 결과 토착미생물 A, B, C 모두에서 각각 0.9, 1.2, 1.9의 pH 상승이 확인되었다. 토착미생물 C의 경우 pH 상승이 가장 크게 나타났으며, 산성 중화 가능성 균주를 확인한 결과 pH 4.5의 조건에서도 중화

반응을 보이는 것으로 확인되어 토착미생물 C를 활용한 중화실험을 추가로 진행하였다.

*M. xanthus*와 토착미생물 C에 대한 투입비 확인 실험 결과 (Fig. 7) *M. xanthus*는 투입량이 100 ml일 때 pH 상승이 가장

Fig. 7. Soil neutralization experiment results(3) (*M. xanthus*, Indigenous microorganism C) (Determination of microorganism and Nutrient broth input ratio).

Fig. 8. Soil neutralization experiment results(4) (*M. xanthus*, Indigenous microorganism C) (Neutralization experiment of each soil sample).

크게 확인되었으며 미생물이 추가로 투입되어도 더 이상의 중화는 진행되지 않았다. 또한 *M. xanthus* 투입량이 100 ml 일 때 NB배지는 120 ml가 투입되어야 중화가 원활하게 진행되는 것으로 확인되었다. 토착미생물 C는 투입량이 80 ml 이상인 처리구와 미생물 투입량이 80 ml일 때 NB 80 ml 이상 투입된 처리구에서 유사한 pH 상승곡선이 확인되었다.

따라서 산성토양에서 *M. xanthus*와 토착미생물 C의 미생물 투입비와 영양배지 배합비 산정결과 ① *M. xanthus* : 배양액(100 ml) + NB배지(120 ml) ② 토착미생물 C : 배양액(80 ml) + NB배지(80 ml)의 조건에서 가장 효율적인 중화능력을 나타내는 것으로 확인하였다.

토양시료 S1, S2, S3, S4에 *M. xanthus*와 토착미생물 C를 산정된 투입비로 하여 수행한 중화실험의 결과 토양 시료 S1, S2, S3, S4 모두 토착미생물 C의 중화가 *M. xanthus*보다 더 빠르게 진행되어 그 값을 유지하는 것을 확인하였다(Fig. 8).

중화실험 결과와 투입비를 고려하였을 때 토착미생물 C를 토양에 적용하는 것이 경제적인 측면에서 더 효율적으로 보인다.

배양온도를 4°C 조정한 처리구의 pH를 측정한 결과 모든 실험구에서 초기 pH와 비슷한 값을 그대로 유지하는 것으로 확인되었다. 이는 저온으로 인해 미생물의 생장이 원활하게 이루어지지 못해 중화가 진행되지 못한 것으로 판단된다. 따라서 미생물을 활용한 중화를 현장에 적용하기 위해서는 계절적인 기후변화를 고려하여 처리시기를 고려해야 할 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 생체모방형 토양개량제인 생광물화균 *M. xanthus*를 실제 산성토양에 적용하여, 실험대상 토양의 pH 값을 초기대비 0.6~1.5가 증가시켜 최종 pH가 최대 7.2까지 상승하는 결과를 얻어, 생광물화균을 통한 산성토양의 중화능력을 확인하였다. 산성토양에서 추출한 토착미생물 C는 최대 1.9의 토양 pH 상승을 보였으며, pH 4.5 조건의 토양에서도 활성을 나타내는 것을 확인하여 실제 현장에 적용할 수 있는 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

영양배지 무무에 따른 중화능력 평가실험에서는 영양배지 투입시에만 pH 상승이 일어나는 것으로 나타나, 미생물에 의한 중화가 진행되기 위해서는 필수적으로 미생물의 영양원 공급이 이루어져야 할 것으로 판단된다. 아울러, 4°C로 진행된 실험에서는 미생물에 의한 중화효과가 나타나지 않아, 현장에 미생물을 적용할 경우 계절적인 온도변화를 감안하여 적절한 처리 시기를 설정해야 할 것으로 보인다.

본 연구는 실험실 조건에서 단기간에 진행되었다. 생광물화균을 통한 산성토양중화를 현장에 적용하기 위해서는 1) 현장에서 발생하는 다양한 환경변수에 대한 영향, 2) 장기적인 토양의 재산성화 가능성, 3) 중화능을 갖춘 토착미생물에 대한 분리·동정, 4) Pilot test를 통한 중 장기적 관찰이 후속연구로 필요할 것으로 보인다.

사 사

본 연구는 환경부의 재원으로 환경산업기술원의 생태오염 기반 환경오염관리 기술개발사업(2019002800005)의 지원을 받아 연구되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

References

- Dupraz, S., Ménez, B., Gouze, P., Leprovost, R., Bénézech, P., Pokrovsky, O. S., and Guyot, F., 2009. Experimental approach of CO₂ biomineralization in deep saline aquifers. *Chemical Geology*, 265(1), p.54-62.
- Gonzalez-Munoz, M.T., Chekroun, K.B., Aboud, A.B., Arias, J.M., and Rodriguez-Gallego, M., 2000. Bacterially induced mg-calcite formation: Role of Mg²⁺ in development of crystal morphology. *Journal of sedimentary research Sedimentary petrology and processes*, 70(3), p.559-564.
- Heo, J.Y., Lee, S.T., Kim, M.G., Hong, K.P., Song, W.D., Rho, C.W., Cho, J.S., and Lee, Y.H., 2010. Relationship between the incidence of Bitter pit and the application level of crushed oyster shell in apple orchard. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 43(5), p.515-521.
- Jansson, C. and Norrhen, T., 2010. Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), p.365-371.
- Lee, S.W., Park, S.B., Jeong, S.K., Lim, K.S., Lee, S.H., and Trachtenberg, M.C., 2010. On carbon dioxide storage based on biomineralization strategies. *MICRON*, 41(4), p.273-282.
- Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J., and Teng, H.H., 2006. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(18), p.5522-5535.
- Mendez-Vilas, A., 2007. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Formatex, Spain, p.143-154.
- Min, D.H., Ahn, C.M., Han, J.S., Yoon, S.W., Jeon, E.J., Won, J.C., Chun, S.K., and Kim, C.G., 2011. Assessment for CO₂ biomineralization characteristics and its applicability for solidified sludge. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 33(11), p.812-820.
- Mine Reclamation Corporation, 2014. *Development of optimal*

- soil improvement and stabilization technologies*(in Korea), Technical General Book 2014-074, Seoul, 215p.
- Ministry of Environment, 2015~2017. *Soil monitoring network and soil contamination survey result*, Sejong-si, Korea
- Park, E.H., 2014. *The biomimetic acid soil amelioration*, MS Thesis, Inha University, Incheon, p.88.
- Piñar, G., Jimenez-Lopez, C., Sterflinger, K., Ettenauer, J., Jroundi, F., Fernandez-Vivas, A., and Gonzalez-Muñoz, M. T., 2010. Bacterial community dynamics during the application of a *Myxococcus xanthus*-inoculated culture medium used for consolidation of ornamental limestone. *Microbial ecology*, 60(1), p.15-28.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K. B., and Gonzalez, M. T., 2003. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), p.2182-2193.
- You, E.Y., 2016. *Biological neutralization of acid soil caused by acid rain using Myxococcus xanthus*, MS Thesis, Inha University, Incheon, p.51.

권 준 욱

2000년 인하대학교 일반대학원 자원공학과 공학석사
2016년 강원대학교 방재전문대학원 광해지질방재전공 공학박사
2012년 광해방지기술사

현재 (주)지오미래이앤씨 기업부설연구소 연구소장
(E-mail; injoon98@naver.com)

백 기 정

2001년 건국대학교 공과대학 토목공학과 공학사
2018년 광해방지기술사

현재 (주)지오미래이앤씨 기업부설연구소 선임연구원
(E-mail; peakkj@nate.com)

백 상 현

2011년 강원대학교 공과대학 지구·환경공학부 환경공학전공 공학사

현재 (주)지오미래이앤씨 기업부설연구소 연구원
(E-mail; edtoo7@naver.com)