

요소분해효소 기반 식물추출액을 이용한 광산폐기물 내 중금속 오염 저감

노승범^{1,2} · 박민정^{1,3} · 전철민¹ · 김재곤¹ · 송호철² · 윤민호³ · 남인현^{1*}

¹한국지질자원연구원 지구환경연구본부 환경지질연구실

²세종대학교 공과대학 환경에너지융합학과

³충남대학교 농업생명과학대학 환경생물화학학과

Bioremediation of Heavy Metal Contaminated Mine Wastes using Urease Based Plant Extract

Seung-Bum Roh^{1,2} · Min-Jeong Park^{1,3} · Chul-Min Chon¹ · Jae-Gon Kim¹
Hocheol Song² · Min-Ho Yoon³ · In-Hyun Nam^{1*}

¹Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM)

²Department of Environment and Energy, Sejong University

³Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University

ABSTRACT

Acid mine drainage occurrence is a serious environmental problem by mining industry, it usually contains high levels of metal ions, such as iron, copper, zinc, aluminum, and manganese, as well as metalloids of which arsenic is generally of the greatest concern. An indigenous plant extract was used to produce calcium carbonate from *Canavalia ensiformis* as effective biomaterial, and its ability to form the calcium carbonate under stable conditions was compared to that of purified urease. X-ray diffraction and scanning electron microscopy were employed to elucidate the mechanism of calcium carbonate formation from the crude plant extracts. The results revealed that urease in the plant extracts catalyzed the hydrolysis of urea in liquid state cultures and decreased heavy metal amounts in the contaminated soil. The heavy metal amounts were decreased in the leachate from the treated mine soil; 31.7% of As, 65.8% of Mn, 50.6% of Zn, 51.6% of Pb, 45.1% of Cr, and 49.7% of Cu, respectively. The procedure described herein is a simple and beneficial method of calcium carbonate biomineralization without cultivation of microorganisms or further purification of crude extracts. This study suggests that crude plant extracts of *Canavalia ensiformis* have the potential to be used in place of purified forms of the enzyme during remediation of heavy metal contaminated soil.

Key words : Urease, Plant extract, CaCO₃ precipitation, Heavy metal, Soil remediation

1. 서 론

국내에 산재되어 있는 광산은 약 2,100여 개의 휴/폐 금속광산, 약 394여 개의 폐석탄광산과 비금속광산을 중심으로 하는 약 593여 개의 가행광산 등 총 5,396여 개의 광산이 있다(Jung and Jung, 2006; Mine Reclamation Corporation, 2012). 이 중 대부분의 휴·폐광산에서 시기적으로 적절한 복원이 이루어지지 않아 폐광석과 광미사 등의 광산폐기물을 주변에 방치하고 있으며, 중금속 및 황

화광물을 함유한 광산폐기물의 유실이 빈번하게 이루어지고 있다. 특히, 수계가 발달한 광산 주변은 이러한 광산폐기물들이 하천수 및 지하수로 유입이 되고, 주변 토양에는 산성광산배수(AMD, Acid Mine Drainage)가 흘러 들어와 환경오염을 초래하고 있다(Choo et al., 2007; Ji and Cheong, 2005; Nam et al., 2012). 이러한 결과로 휴·폐광산지역 토양 중금속 오염은 산성광산배수 혹은 침출수가 유출되거나, 광산폐기물의 유실 및 그로부터 발생한 분진 등이 분산되는 것에 기인하는 경우가 대부분인

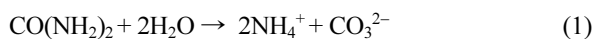
*Corresponding author : nih@kigam.re.kr

Received : 2014. 12. 24 Reviewed : 2015. 1. 21 Accepted : 2015. 1. 21

Discussion until : 2015. 4. 30

것으로 알려져 있다(Lee and Chon, 2004; Nam et al., 2012). 상기 과정으로 국내 휴·폐광산 주변 토양이나 농경지에서도 고농도의 중금속 오염을 보이고 있으며, 주로 As, Cd, Cu, Zn 등의 중금속이 기준을 초과하는 농도로 오염되어 광산 주변뿐만 아니라 인근 생태계로 오염이 확산되고 있다(Choi et al., 2012; Jung et al., 2004). 이러한 고농도의 중금속 오염은 해당 토양에서 자란 식물 등을 통해 인체에 축적되게 되며, 위해성 평가를 통해 살펴보면 암 등 치명적인 질병의 발병확률을 매우 높이는 원인이 될 수 있다(Lee and Chon, 2004). 또한, 많은 휴·폐광산 지역 토양은 산성인데, 이를 통해 중금속의 용해도와 이동 속도가 증가하여 오염 부담을 가중시키고 있다(Park et al., 2001). 이러한 산성화된 토양을 중화시키고 회복시키기 위한 중화제 물질로는 주로 무기물질인 석회석(CaCO₃), 소석회(Ca(OH)₂), 생석회(CaO), 카바이드 재(주성분이 Ca(OH)₂) 등이 사용되고(Yun et al., 2011), 부가적으로 알루미늄 제조 시 발생하는 산업 부산물인 Red mud(적니, 적토), 상수도 정수장에서 폐기물로 발생하는 슬러지(alum sludge) 등을 활용한 산성토양 중화 및 개량을 위한 연구개발이 진행되기도 했다(Kang et al., 2011). 그러나, 이런 물질들의 실제 현장 적용 시 부적절한 사용으로 염류토양화로 인한 식물 뿌리 생육저해, 투수계수 저하, 경반층 형성 등의 문제점들을 야기하고 있다. 따라서, 폐광산 지역 중금속 오염 산성 토양에 적절하게 활용할 수 있는 식생을 고려한 친환경 중화제 개발도 필요하다. 이와 같이, 휴·폐광산으로부터 기인한 주변 토양 및 수계의 중금속 오염은 시급한 환경 복원 대상이며, 이를 보다 효율적인 방법으로 복원하는 다양한 방법들이 요구되고 있다.

요소분해효소(Urease)는 아래 화학식과 같이 요소(Urea)의 가수분해작용을 활성화시켜 이산화탄소와 암모니아를 생산하여 주변의 pH를 높임으로써 광물 이온인 Ca²⁺과 CO₃²⁻가 CaCO₃로의 이온결합을 유도하는 매우 잘 알려진 효소이다(Mobley and Hausinger, 1989). 이를 화학식으로 나타내면 다음 (1), (2)식과 같다.



요소분해효소는 박테리아를 포함한 일부 미생물과 여러 생물 중에 분포하며, 식물에서는 콩과류에 가장 많이 존재하여 작두콩에는 건조중량의 0.1% 정도 함유되어 있고, 효소 특징으로는 무색의 팔면체 결정으로 분자량 483,000,

등전점 pH 5.0, 최적 pH 8.0, 활성기로서 -SH기를 가지며, 수은, 은 등의 이온과 산화제에 의해 효소활성이 저해된다(Riddles et al., 1991). 이러한 요소분해효소의 생화학적 반응을 이용하면 주어진 pH, 온도, 습도, 물에 녹아 있는 이온 등의 조건이 적합할 경우 상기 화학식과 같이 CaCO₃과 같은 광물질을 생성하게 된다. 이렇게 재료의 표면이나 분리된 공간 사이에 미생물로 인하여 광물질이 쌓이거나 형성되는 것을 Biodeposition이라고 하고, 입자 사이에 미생물 작용으로 생성된 광물질이 고결을 일으키는 것을 Biocementation이라고 하는데, 이는 미생물(cell)에 요소가 들어가면 암모니아와 탄산이온으로 바뀌면서 주변에 있는 칼슘이온과 결합하여 CaCO₃과 같은 광물이 생성되는 과정을 나타낸 바 있다(De Muynck et al., 2010). 이와 같은 생화학적 반응을 실제 토양 입자에 활용을 하면 토양의 압축강도 증진과 균열 보수를 위한 연구로 응용할 수 있는데, 느슨한 상태의 지반이 이러한 효소반응에 의해 광물질을 생성하여 토양 입자 간 공극을 효과적으로 메울 수 있다(Park et al., 2011). 그러나, 아직까지 생화학적인 효소 등의 BT 방법을 활용한 중금속 제거 및 토양 복원 기술의 연구개발은 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 폐광산 지역 및 주변에 방치된 광산폐기물 내 중금속을 안정화시켜 그로부터 발생하는 침출수 내 중금속 농도를 저감하기 위해 생화학적인 요소분해효소 기반의 식물추출액과 요소(CO(NH₂)₂), 칼슘원인 염화칼슘(CaCl₂) 등을 활용하여 CaCO₃을 생성시키는 과정을 실제 중금속 오염 폐광산지역 토양을 활용한 컬럼 실험을 통해 중금속 저감 효율 및 토양강도 증가, 생태독성 감소 등의 영향성을 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. CaCO₃ 생성을 위한 컬럼 실험

중금속으로 오염된 폐광산지역 내 광산폐기물(이하 토양)을 부산 지역에서 채취하여 이 오염 토양을 대상으로 현장 모사 컬럼 실험을 진행하였다. 컬럼 실험은 요소분해효소를 처리하지 않은 대조군(No treatment), 식물추출액(Plant extract) 처리군, 정제된 요소분해효소(Purified Urease) 처리군 등으로 구분해서 진행하였다. 정제된 요소분해효소는 Sigma사에서 구매하여 100 mg의 요소분해효소를 50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.0)에 녹여 사용하였고, 식물추출액의 경우는 요소분해효소가 많이 함유된 것으로 알려져 있는 콩과류 식물 중 *Canavalia ensiformis* 50 g을 분쇄기(Homogenizer)로 20 mM Phosphate buffer

(pH 7.0)와 함께 분쇄 및 원심분리(12,000 rpm, 20 min) 시킨 후, 그 상등액을 시료로 사용하였다. 20 mM Phosphate buffer는 기존 연구와 동일하게 제조하여 사용하였다(Nam et al., 2006; 2008). 칼슘원인 CaCl_2 과 기질 요소 용액의 농도는 각각 CaCl_2 4 g/100 mL, 요소 2 g/100 mL로 제조하여 컬럼에 순차적으로 공급하였다. 컬럼 실험 방법은 오염 토양을 컬럼에 1 kg씩 충전하고 모든 컬럼에 CaCl_2 , 요소 용액을 100 mL씩 주입한 후에 정제된 증류수, 정제된 요소분해효소, 식물추출액 등을 각 해당 컬럼에 50 mL씩 주입하였다. 용액 주입 후부터 72시간까지 상온에서 반응시키면서 시간에 따라 CaCO_3 정량, 효소활성 측정 및 중금속 분석용 시료 채취를 진행하였다.

2.2. 효소 활성 측정

요소분해효소 활성 측정은 CaCO_3 석출 실험 72시간 후에 50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.0) 상에서 진행하였다. 정량의 기준이 되는 총 단백질 양을 측정하기 위해 BSA(Bovine Serum Albumin)를 표준물질로 하여 Bradford 방법을 이용하여 단백질 양을 정량하였고(Bradford, 1976), 50 mM Tris-acetate buffer 0.8 mL와 250 mM 요소 1.0 mL, 요소분해효소 0.2 mL 등을 넣고 28°C에서 반응을 시켰다. 그리고, 10분 후에 10% trichloroacetic acid 용액 1.0 mL를 첨가하여 반응을 멈추게 한 후에 암모니아 발생량을 405 nm에서 UV-spectrophotometer(Biochrom, Cambridge, UK)로 측정하였다. 단위는 1분에 1 mmol로 발생하는 암모니아 양을 측정함으로써 효소의 활성을 측정하였다(Burbank et al, 2012).

2.3. 토양 강도 테스트

오염 토양 내에서 식물추출액 혹은 정제된 요소분해효소에 함유된 효소의 생화학적 작용으로 CaCO_3 이 생성되어 수행한 정성 및 정량 분석 결과들을 기반으로 토양 입자가 CaCO_3 으로부터 그 공극이 메워져 전체적인 지반 강도가 증가하는 현상을 Fall cone 시험을 Fall cone 시험기(GEONOR, Canada)를 활용하여 확인하였다. 본 연구에서 활용한 Fall cone 시험은 식물추출액 혹은 정제된 요소분해효소에 의해 CaCO_3 를 침전시켜 중금속 오염 토양의 강도를 강화함으로써 지반에 미치는 영향을 확인하기 위해 토양 액성한계를 정적으로 결정하는 방법 중의 하나로 토양 관입량 5-15 mm 범위에서 4회 이상 실시하여 관입량-함수량 그래프에서 10 mm 관입에서의 함수비를 액성한계로 하는 시험이다. 따라서, 대조군 및 식물추출액 처리군, 요소분해효소 처리군에 대한 오염 토양 시

료를 홀더에 만들어서 각각 5회 이상 측정하고 그 평균값을 취하여 결과로 활용하였다. 이를 위해 요소분해효소를 처리하지 않은 홀더와 식물추출액 및 정제된 요소분해효소를 처리한 각각의 홀더를 제작한 후, 그곳에 토양을 각 50 g씩 충전하고 상기 컬럼 실험 방법에서 기술한 바와 같은 비(Ratio)로 CaCl_2 , 요소, 요소분해효소 및 식물추출액 등을 순차적으로 주입하여 28°C에서 72시간 동안 항온 및 항습 배양하였다. 배양 종료 후, 상온에서 10시간 동안 건조시킨 후 Fall cone 시험기를 이용하여 토양의 강도를 비교하였다.

2.4. 분석방법

본 연구에서 진행한 X-선회절분석 및 정량은 리트벨트법에 기반한 DIFFRAC PLUS TOPAS 소프트웨어를 이용하여 실험결과로 얻은 CaCO_3 및 다양한 물질의 구성광물 조성 및 비정질 함량을 정량화하고 이에 따라 발생하는 정량 산출값의 변화를 평가하였다. 분석 대상 시료에 대하여 각각 분말시료 3 g과 내부표준시료(α -Aluminium Oxide, Corundum, Al_2O_3 , 99.9%) 0.3333 g을 아게이트 막자사발에서 잘 혼합하여 분말화 하였다. X-선회절분석 조건은 Cu target과 LynxEye position sensitive detector가 부착된 D8 Advance diffractometer(Bruker-AXS, Germany)를 이용하여 수행되었다. 회절 패턴은 5° to 95° 2 θ 구간, 0.01° step size, step 당 1 sec의 조건으로 취득되었으며, 0.3° divergence slit과 2.5° secondary soller slit이 사용되었다. 시료의 정성분석 및 기기 인자의 표준화(Fundamental parameter)를 위해서 동일한 조건으로 원 시료와 표준시료(α -Aluminium Oxide, Corundum, Al_2O_3 , 99.9%)에 대하여 각각 X-선 회절패턴을 취득하였다. 분석결과는 리트벨트법에 기반을 둔 구성광물의 정량 분석을 위하여 TOPAS 4.2(Bruker-AXS, Germany)소프트웨어를 사용하였다. CaCO_3 침전의 형태학적인 확인을 위해 전자현미경 SEM(Scanning Electron Microscope, JSM-7000F, Jeol, Japan) 분석을 실시하였다. 대조군 및 식물추출액과 요소분해효소를 처리한 실험군 등으로 제작한 시료를 상온에서 완전히 건조시킨 후, 0.5 cm cube pieces로 제작하고 Gold sputter 코팅을 통해 SEM으로 관찰하였다. 가속 전압 범위는 10 kV로 수행하였다.

중금속 함량 분석은 본 연구에 사용한 폐광산지역 토양을 채취하여 해당 지역 초기 오염도와 컬럼 실험을 통해 발생하는 침출수 내 중금속 농도 분석을 위해 250 mL 반응용기에 시료 3 g 혹은 3 mL, HCl 21 mL, HNO_3 7 mL를 가한 후 흡수용기에 0.5 M HNO_3 15 mL를 첨가하고

흡수용기와 환류냉각관을 반응용기에 연결시켜 유기물이 천천히 산화되도록 상온에서 2시간 이상 정치시켰다. 그 후에 온도를 서서히 올려 환류조건에 도달하도록 하여 2시간 동안 상태를 유지시키고, 분해가 끝나면 반응용기를 냉각시켰다. 흡수용기 내 내용물을 환류냉각관을 통하여 반응용기에 첨가하는데, 흡수용기와 환류냉각관을 0.5 M HNO₃으로 씻어 반응용기에 넣었다. Whatman No. 40 여과지로 100 mL 부피플라스크에 여과하고 불용성 잔류물을 여과지 위에서 최소량의 0.5 M HNO₃을 이용하여 세척한 후 0.5 M HNO₃으로 100 mL까지 채운 후, ICP-OES(Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer, ULTIMA2, Horiba, Japan)로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 폐광산지역 토양 내 중금속 오염도 분석

폐광산 지역에서 채취한 토양 내 중금속 오염도를 확인하기 위해 채취한 토양 시료를 전처리 후, ICP-AES 분석을 통해 중금속들에 대한 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 그 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 수 종의 중금속들이 검출되었고 본 연구에서는 침출수 내 중금속 농도 분석을 목적으로 하므로 10 mg/kg에서 2,000 mg/kg 구간에 위치한 As, Mn, Zn, Pb, Cu, Cr 등의 금속 중들을 대상으로 하였다. 2,000 mg/kg을 초과하는 Al, Fe 등은 다른 중들에 미치는 영향으로 본 연구에서는 제외하였다. 결국, 본 연구에서 채취하여 분석한 폐광산지역 토양 내 가장 많은 농도로 존재하는 Al과 Fe은 산성배수 등의 영향으로 자주 나타나고, As 오염이 폐광산지역에서 두드러지는 경우가 많은데 현재까지 국내 대다수의 광산이 금과 은 광산 위주로 개발되어 광화작용과 밀접한 관계에 있는 As의 오염현상이 자주 관찰되기 때문이다(Jung and Jung, 2006; Nam et al., 2012). 또한, 제련 등의 과정에서 발생하는 광산폐기물이 유실되고 갭내수 등의 유출로 지역에 따라 Zn, Pb, Cu, Cd, Al 등의 중금속으

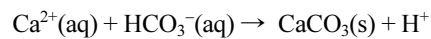
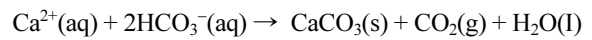
Table 1. Heavy metal concentrations in mine-impacted soil used in this study

| Heavy metal | Concentration (mg/kg) |
|-------------|-----------------------|
| As | 1291.32 |
| Mn | 98.94 |
| Zn | 62.34 |
| Pb | 34.77 |
| Cu | 21.40 |
| Cr | 18.35 |

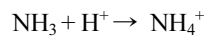
로 오염되어 있는 경우가 발생한다(Jung and Jung, 2006; Kim, 2010; Nam et al., 2012). 따라서, 본 연구에서 해당 시료를 침출수 내 중금속 저감 효율을 관찰하기 위한 컬럼 실험의 기반이 되는 충전제로 사용하여 실험을 진행하고 그 효율을 평가하였다.

3.2. 요소분해효소에 의한 CaCO₃ 생성

폐광산 지역에서 채취한 중금속 오염 토양 내에 CaCO₃ 침전을 위해 오염 토양을 충전한 컬럼 실험을 실시하여 식물추출액과 정제된 요소분해효소에 의해 생성된 CaCO₃을 X-선 회절분석(XRD) 및 전자현미경(SEM), EDS(Energy Dispersive Spectrometer) 원소 분석 등을 통해 확인하였다. 컬럼실험 후, 충전한 토양 입자들의 XRD 분석을 통해 CaCO₃이 석출되는지의 여부를 표준물질을 이용하여 확인하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 식물추출액 Fig. 1(a)과 정제된 요소분해효소 Fig. 1(b) 처리군 모두에서 CaCO₃이 생성됨을 확인하였다. 아무 처리를 하지 않고 동시에 실험한 대조군 토양에서는 CaCO₃ 생성이 관찰되지 않았다. CaCO₃생성 확인은 Fig. 1(c)에 나타낸 바와 같이 표준물질을 동시에 분석하여 피크를 확인하였으며, 칼슘원인 CaCO₃과 기질인 요소 등이 반응하여 생성된 NH₄Cl도 동일 분석에서 Fig. 1(d)와 같이 확인하였다. 또한, pH는 요소분해효소가 활성화 되기 위한 주요한 요인이므로(Labana et al., 2005), 컬럼 실험에서 용출되는 용액 pH를 측정된 결과 시료 모두에서 요소분해효소 투입 초기부터 pH 3.3에서 24시간 이내에 pH 7.5를 상회하는 값으로 측정되어 요소분해 작용이 잘 일어날 수 있는 환경을 제공하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 CaCO₃생성 및 침전 반응에서는 액체가 혼합된 컬럼에서 아래 식에 나타낸 것과 같이 CaCO₃과 CO₂ gas, H₂O 등의 생성물이 나타난다.



CaCO₃을 생성하는 다양한 생물화학적 시스템, 특히 요소분해효소 반응에서는 H⁺이온을 제거하는 기작을 수반하여 다음 식과 같이 요소 기반의 NH₃로부터 NH₄⁺를 생성하게 된다 (Bachmeier et al., 2002; McConnaughey and Whelan, 1997).



이러한 과정으로 생성된 NH₄⁺는 요소분해효소의 가수

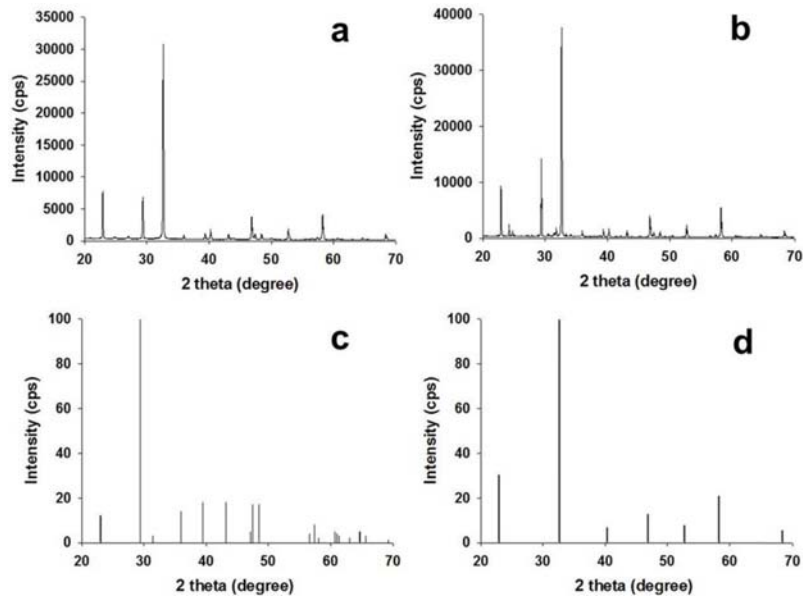


Fig. 1. XRD spectra confirming CaCO_3 precipitation induced by plant extract (a) and purified urease (b). The spectra were compared with corresponding authentic spectra as depicted in CaCO_3 (c) and NH_4Cl (d).

분해 작용을 가속화시켜 CaCO_3 생성을 유도하게 된다. 따라서, 오염 토양 내에서 유도한 상기 생화학적 반응이 투입한 식물추출액에 의해 진행되었음을 확인하였다. 더불어, 컬럼에 충전한 중금속 오염 토양 내에 식물추출액과 정제된 요소분해효소를 처리했을 때 CaCO_3 생성 여부를 형태학적으로 확인하기 위해 전자현미경(SEM)을 이용해 그 성상을 Fig. 2와 같이 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 정제된 요소분해효소를 이용한 처리군과 식물추출액을 처리한 시료에서 CaCO_3 이 생성됨을 직접적으로 확인할 수 있었다. 처리를 하지 않은 대조군 Fig. 2(a)에서는 관찰되지 않았던 CaCO_3 의 특징적인 결정 형태가 식물추출액 Fig. 2(b)과 정제된 요소분해효소 Fig. 2(c) 처리 시에서만 관찰되었다. 이와 동시에 SEM으로 관찰한 부분을 EDS 분석을 통해 성분 분석을 수행한 결과, Table 2와 같이 Ca 및 O 등의 상대적인 비(Ratio)가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 본 결과에서 볼 수 있듯이 식물추출액 및 정제된 요소분해효소 등에 각각 함유되어 있는 요소분해효소 반응에 의해 실제 중금속 오염 토양 내에서 CaCO_3 이 성공적으로 생성되었음을 알 수 있다.

추가적으로 컬럼 내에서 생성되는 CaCO_3 양이 시간에 따라 변화하는지를 알아보기 위해 실험방법에 기술한 바와 같이 리트벨트 법에 기반한 정량 분석을 실시한 결과, 72시간까지의 컬럼 실험 시 CaCO_3 의 양이 점차적으로 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 식물추출액을 포

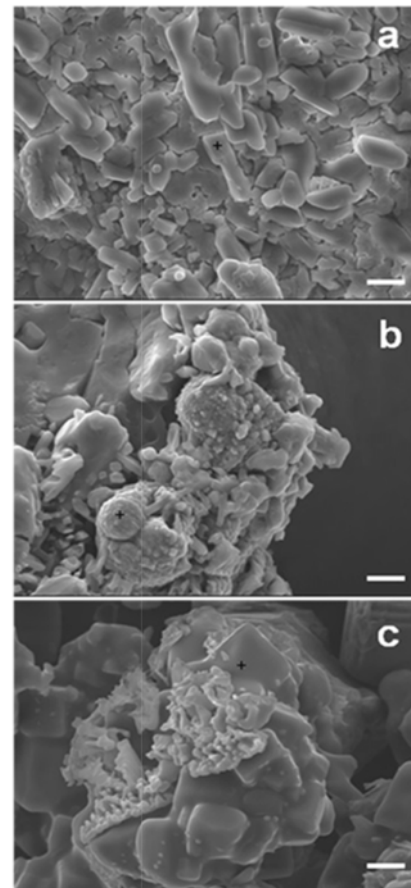


Fig. 2. Scanning electron microscope (SEM) images for showing CaCO_3 precipitation in the heavy metal contaminated soil. (a), No treatment; (b), Plant extract; (c), Purified urease. All data were obtained after 72 hours incubation (bar, 10 μm).

Table 2. Energy-Dispersive X-ray Spectrometry (EDS) results of the sampling points indicated by the crosses in the SEM images depicted in Fig. 2 (a, b, and c)

| Element | No treatment | | Plant extract | | Purified urease | |
|---------|--------------|----------|---------------|----------|-----------------|----------|
| | Weight % | Atomic % | Weight % | Atomic % | Weight % | Atomic % |
| C K | — | — | 12.53 | 19.81 | 11.85 | 19.96 |
| O K | 2.78 | 6.83 | 54.33 | 64.49 | 46.77 | 59.15 |
| Cl K | 62.71 | 61.76 | — | — | — | — |
| Ca K | 34.51 | 31.41 | 33.14 | 15.70 | 41.37 | 20.89 |
| Totals | 100 | | 100 | | 100 | |

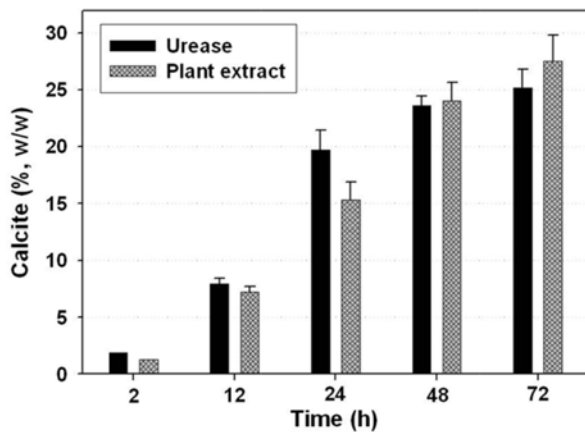


Fig. 3. Increase of CaCO₃ precipitation according to incubation time. In order to quantify precipitated CaCO₃ authentic standard α -Aluminium Oxide (Al₂O₃, 99%) was amended as an internal standard and the results are triplicate measurements \pm the standard deviation. The CaCO₃ precipitation was not observed in the No treatment experiments.

함하는 요소분해효소 작용이 오염 토양 입자 내에서 일정 시간 동안 지속적인 반응을 유지하는 것을 의미하며, 결과에서 나타나듯이 초기 CaCO₃ 생성량은 정제된 요소분해효소가 증가하다가 48시간 이후부터는 식물추출액에 의한 CaCO₃ 발생량이 증가함을 나타내어 본 연구에서 활용한 식물추출액이 실제 오염 토양에도 적용이 가능함을 시사한다.

3.3. 오염토양 내 중금속 침출 감소

중금속으로 오염된 폐광산지역 토양 내 존재하는 중금속의 농도를 측정 후, 각 중금속 오염토양으로 충전된 컬럼 실험을 통해 발생하는 침출수 내 중금속 농도를 대조군 및 각 실험군 처리에 대한 농도 변화를 ICP-OES 분석을 통해 Fig. 4와 같이 확인하였다. 그 결과, 식물추출액을 사용한 실험군에서 폐광산 지역 오염토양으로부터 기인한 침출수 내 비소 및 중금속의 최대 감소율은 As(31.7%), Mn(65.8%), Zn(50.6%), Pb(51.6%), Cr(45.1%),

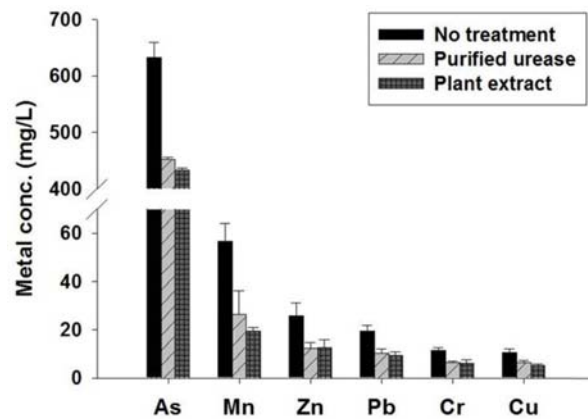


Fig. 4. Heavy metal amounts in the leachate from the contaminated soil collected from mine impacted area. All data represent three independent experiment values.

Cu(49.7%) 등이었으며, 중금속 중에는 특이성은 관찰되지 않았다. 또한, 정제된 요소분해효소 실험군에서도 식물추출액과 유사한 감소율을 나타내었다(Fig. 4). 이는 식물추출액을 포함한 정제된 요소분해효소 처리군에 의해 CaCO₃이 생성되어 토양의 입자 간 공극을 메워 중금속들의 이동이 저해됨으로써 토양으로부터 용출되는 중금속의 절대적인 양이 감소하거나, CaCO₃의 침전으로 토양 내 pH의 변화로 용출되는 비소 및 중금속의 양이 감소한 것으로 생각된다. 또한, 식물추출액 및 정제된 요소분해효소에 의한 반응에 의해 생성된 CaCO₃의 영향으로 토양 입자의 흡착 및 중금속 자체의 Speciation 변화에 야기할 수도 있다(Li et al., 2010). 따라서, 본 연구 결과는 폐광산 지역 토양 오염에 의한 지하수 혹은 하천수로 발생하는 침출수에 대한 2차 오염을 일정 부분 방지 및 감소시킬 수 있는 결과를 제공한다.

3.4. 요소분해효소 활성 측정 결과

상기한 결과들과 같이 중금속 오염토양 내에서 CaCO₃이 생성되는 반응들이 주변 화학적인 영향이 아닌 실제

Table 3. Enzyme activity assay of reaction suspensions after 72 hours of incubation. Protein contents were shown by Bradford's method

| Sample name | Total activity (U/mL) | Total protein content (mg/mL) | Specific activity (U/mg of protein) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Plant extract | 8,254 | 219.50 | 37.60 |
| Purified urease | 868 | 21.35 | 40.66 |

Table 4. Summary of Fall cone test results to measure soil strength

| Cone | Penetration depth (cm) | | |
|-----------|------------------------|---------------|-----------------|
| | No treatment | Plant extract | Purified urease |
| 60°/10 g | 0.92 | 0.44 | 0.45 |
| 60°/60 g | 1.23 | 0.67 | 0.68 |
| 30°/100 g | 2.23 | 1.18 | 1.01 |

식물추출액 혹은 정제된 요소분해효소에 의해 나타난 생화학적 반응임을 확인하기 위해 각 처리군 시료들로 요소분해효소의 활성 측정을 수행하였다. 식물추출액과 정제된 요소분해효소 2가지의 시료들의 활성을 측정하여 비교하였는데, Table 3에 나타난 바와 같이 정제된 요소분해효소 처리군에서 발생한 효소 활성은 40.66 U/mg로 측정이 되었고, 식물추출액 시료의 경우에는 다소 낮지만 유사한 수준의 37.60 U/mg로 측정이 되었다. 따라서, 본 실험의 처리군으로서 관찰한 반응 모두 실제 요소분해효소에 의한 반응에 의해 CaCO₃이 생성되는 것을 확인하였고, 2가지 처리군에서 유사한 수준의 활성도를 나타낸 것으로 미루어보아 식물추출액 처리군 내 요소분해효소 양이 정제된 요소분해효소 처리군 대비 적은 양을 내재하고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 요소분해효소를 포함하는 총 단백질 량과의 관계에서 결과를 살펴볼 수 있었는데, 시료 내 총 단백질 양은 각각 식물추출액 내 219.50 mg, 정제된 요소분해효소 내 21.35 mg 등으로 측정되어 식물추출액 내 요소분해효소 외 기타 단백질 종류 및 양을 고려하면 높은 수준의 요소분해효소 절대량을 가지고 있음을 나타낸다. 그러나, 나타내는 요소분해효소 활성이 비슷한 것으로 보아 식물추출액 내 요소분해효소 활성이 다소 높은 것임을 확인할 수 있었다. 본 결과로 기존 문헌에 나타난 바와 같이 식물추출액에는 실제로 높은 활성을 가지는 요소분해효소가 함유된 것으로 확인할 수 있었다(Riddles et al., 1991; Sondi and Salopek-Sondi, 2005). 따라서, 기존 연구들에서 박테리아 등의 미생물로부터 분리되는 요소분해효소가 아닌 본 연구에서 새롭게 적용한 식물추출액의 효율을 근거로 향후 중금속 오염 토양의 처리제로 미생물 배양 혹은 추가 정제 과정을 거치지 않는 효과적이고 다루기 쉬운 재료로 활용될 수 있음을 기대할 수 있다.

3.5. 토양 강도 시험 결과

오염 토양에 CaCl₂으로 칼슘원을 공급하고 요소를 투입한 후에 요소분해효소에 의해 CaCO₃이 토양 내에서 생성됨을 확인하였다. 이는 토양 입자 사이의 공극을 CaCO₃이 메워 지반 고결화를 이룬 것으로 예상되어 이를 실험적으로 증명하기 위해 토양 강도 시험을 Fall cone 시험기를 이용하여 진행하였다. 그 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 대조군 대비 요소분해효소 기반의 식물추출액 및 정제된 요소분해효소에 의해 제조된 토양 시료들의 침투 깊이가 감소하였다. 침투 깊이의 감소는 해당 차이만큼 토양의 표층뿐만 아니라 이를 지지하는 하부층에서의 토양 강도가 증가했음을 의미한다. 그 상세한 값을 살펴보면, 60°/10 g Cone을 사용했을 경우에는 대조군 대비 식물추출액의 경우 52.2%, 정제된 요소분해효소의 경우 51.1% 침투 깊이가 감소하였다. 이 결과를 토대로 토양의 전반적인 강도가 해당 차이만큼 단단해졌다고 유추할 수 있다. 60°/60 g Cone을 사용해서 얻은 결과는 식물추출액의 경우 45.5%, 정제된 요소분해효소의 경우 44.7% 만큼의 차이를 보였다. 마지막으로 30°/100 g Cone 실험은 식물추출액의 경우 47.1%, 정제된 요소분해효소의 경우 54.7% 만큼의 차이를 확인할 수 있었다. Cone의 무게 및 각도에 따라 특이한 차이점은 없었으나, 전반적으로 50% 전후의 값으로 차이가 나타난 것으로 보아 요소분해효소에 의해 토양 내 생성된 CaCO₃에 의해 흙의 공극 등이 메워져 약 2배 정도의 지지력 강화 효과를 나타냄을 유추할 수 있다. 이는 식물추출액 내 요소분해효소 및 정제된 요소분해효소 등의 반응에 의해 토양 내 CaCO₃이 생성되면서 토양 내 강도 혹은 그 지반의 지지력이 증가했음을 확인할 수 있다. 이 결과는 앞서 살펴 본 효소활성 결과와 CaCO₃ 생성을 정량한 결과들과 일치하는 경향성을 나타낸다.

4. 결 론

중금속으로 오염된 폐광산 지역 광산폐기물(토양) 내에 식물추출액을 처리하여 추출액 내 존재하는 요소분해효소(Urease) 가수분해 반응을 요소 및 염화칼슘 등의 첨가로 유도하여 CaCO₃을 침전시켜 토양 내 중금속이 저감됨을 확인하였다. 중금속으로 오염된 토양을 충전한 컬럼 실험에서 중금속이 As(31.7%), Mn(65.8%), Zn(50.6%), Pb(51.6%), Cr(45.1%), Cu(49.7%) 등의 효율로 감소함을 확인할 수 있었으며, CaCO₃ 생성은 XRD, SEM 등의 분석으로 확인하였고, 컬럼 내 시료들로부터 요소분해효소 활성 측정을 통해 생화학적인 반응에 의해 생성되고, 이로 인해 주변 오염 토양 내 미생물 군집이 활성화 되어 생태 독성을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, CaCO₃ 생성으로 인해 토양 입자 공극을 메워 약 2배 정도의 지반 강도 증진도 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 중금속 오염 토양의 중금속 오염 저감, 생태독성 감소, 토양 강도의 증가 등의 효과를 가지며, 향후 중금속 오염 거동 및 침출수 혹은 지하수로의 이동성을 감소하는 데에 있어서 유용한 자료가 될 것이며, 토양 복원 시에 영향을 미치는 다양한 파라미터 중의 하나로 실제 복원 사업을 관리 및 모니터링, 유지하는 데에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 한국지질자원연구원 기관주요연구사업(KIGAM 15-3414 & 15-3451) 지원으로 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

References

Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warming, J.R., and Bang, S.S., 2002, Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation, *J. Biotechnol.*, **93**, 171-181.

Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

Burbank, M.B., Weaver, T.J., Williams, B.C., and Crawford R.L., 2012, Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria, *Geomicrobiol. J.*, **29**, 389-395.

Choi, J.W., Yoo, K.J., Koo, M.S., and Park, J.H., 2012, Compar-

ison of heavy metal pollutant exposure and risk assessments in an abandoned mine site, *J. Korean Soc. Civ. Eng.*, **32**, 261-266.

Choo, C.O., Jeong, G.C., and Lee, J.K., 2007, Characteristics of the Dalseong acid mine drainage and the role of Schwertmannite, *J. Eng. Geol.*, **17**, 187-196.

De Muynck, W., De Belie, N., and Verstraete, W., 2010, Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review, *Ecol. Eng.*, **36**, 118-136.

Ji, S.W. and Cheong, Y.W., 2005, Experiment of reactive media selection for the permeable reactive barrier treating groundwater contaminated by acid mine drainage, *J. Econ. Environ. Geol.*, **38**, 237-245.

Jung, M.C., Jung, M.Y., and Choi, Y.W., 2004, Environmental assessment of heavy metals around abandoned metalliferous mine in Korea, *J. Econ. Environ. Geol.*, **37**, 21-33.

Jung, M.C. and Jung, M.Y., 2006, Evaluation and management method of environmental contamination from abandoned metal mines in Korea, *J. Korean Soc. Miner. Energ. Resour. Eng.*, **43**, 383-394.

Kang, S.H., Ahn, J.Y., Hwang, K.Y., Seo, J.Y., Kim, J.G., Song, H.C., Yim, S.B., and Hwang, I.S., 2011, Stabilization of heavy metal-contaminated mine tailings using phosphate fertilizers and red mud, *J. Soil Groundw. Environ.*, **16**, 31-41.

Kim, J.K., 2010, Heavy metal concentrations in soils and crops in the Poongwon mine area, *J. Korean Geoenviron. Soc.*, **11**, 5-11.

Labana, S., Singh, O.V., Basu, A., Pandey, G., and Jain, R.K., 2005, A microcosm study on bioremediation of *p*-nitrophenol-contaminated soil using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 417-424.

Lee, J.S. and Chon, H.T., 2004, Human risk assessment of toxic heavy metals around abandoned metal mine sites, *J. Econ. Environ. Geol.*, **37**, 73-86.

Li, L., Qian, C., Cheng, L., and Wang, R., 2010, A laboratory investigation of microbe-inducing CdCO₃ precipitate treatment in Cd²⁺ contaminated soil, *J. Soil Sediment.*, **10**, 248-254.

McConnaughey, T.A. and Whelan, J.F., 1997, Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake, *Microbiol. Rev.*, **42**, 95-117.

Mine Reclamation Corporation, 2012, 2012 Yearbook of Mireco statistics.

Mobley, H.L. and Hausinger, R.P., 1989, Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol. Rev.*, **53**, 85-108.

Nam, I.H., Kim, Y.M., Schmidt, S., and Chang, Y.S., 2006, Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas wittichii* strain RW1, *Appl.*

Environ. Microbiol., **72**, 112-116.

Nam, I.H., Kim, Y.M., Murugesan, K., Jeon, J.R., Chang, Y.Y., and Chang, Y.S., 2008, Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst, *J. Hazard. Mater.*, **157**, 114-121.

Nam, I.H., Chon, C.M., and Kim, J.G., 2012, Heavy metal effects on the biodegradation of fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02 in liquid medium, *J. Soil Groundw. Environ.*, **16**, 74-81.

Park, B.Y., Uh, Y.W., Yang, S.Y., Jang, S.M., Kim, J.H., and Lee, D.H., 2001, A study on the acidification of soils, *J. Korean Environ. Sci. Soc.*, **10**, 305-310.

Park, S.S., Kim, W.J., and Lee, J.C., 2011, Effect of biomineralization on the strength of cemented sands, *J. Korean Geotech.*

Soc., **27**, 75-84.

Riddles, P.W., Whan, V., Blakeley, R.L., and Zerner, B., 1991, Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA, *Gene*, **108**, 265-267.

Sondi, I. and Salopek-Sondi, B., 2005, Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO₃ polymorphs: A comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases, *Langmuir*, **21**, 8876-8882.

Yun, S.W., Kang, S.I., Jin, H.G., Kim, H.J., Lim, Y.C., Yi, J.M., and Yu, C., 2011, An investigation of treatment effects of limestone and steel refining slag for stabilization of arsenic and heavy metal in the farmland soils nearby abandoned metal mine, *Korean J. Soil Sci. Fertil.*, **44**, 734-744.