

Quinone Profile법을 이용한 폐광산 광미내에 존재하는 깊이별 미생물 군집구조해석

임병란[†] · 김명진* · 안규홍** · 황현정** · 이기세

명지대학교 환경생물공학부 및 산업기술연구소 · *한국해양대학교 토목환경시스템공학부 · **한국과학기술연구원

(2005년 3월 21일 접수, 2005년 6월 23일 채택)

Analysis of Microbial Community Structure in Mine Tailings of Abandoned Mines Over the Depth Using Quinone Profiles

Byung-Ran Lim[†] · Myoung-Jin Kim* · Kyu-Hong Ahn** · Hyun-Jung Hwang** · Kisay Lee

Dept. of Environmental Eng. and Biotechnology & Institute of industrial Technology, Myongji University

*Korea Maritime University · **Korea Institute of Science and Technology

ABSTRACT : The respiratory quinone profile was used as a tool for the study on microbial community structure in the mine tailings of abandoned mines over the depth. For the study, the area of Jingok mine located in Bongwha, Korea has been selected. The distributions of Cd, Cu, Pb, Al, Fe and Mn showed the following common patterns; the highest values in the upper part of mine tailings (0-20 cm), rapid decrease with increasing depth. The dominant quinone species of the mine tailings were UQ-9 followed by UQ-10, suggesting that microbes had contributed to heavy metal degradation. The quinone contents in mine tailings ranged from 5.0 to 24.9 nmol/kg. The microbial diversity in the upper part of mine tailings (0-40 cm) was higher than that of lower part of mine tailings (100-120 cm).

Key Words : Heavy Metal, Microbial Community Structure, Mine Tailings, Quinone Profile

1. 서론

폐 금속 광산 주변지역은 주로 1920~1930년대 이후 개발되어 대부분 방치된 상태이며 제련과정에서 발생하는 광미의 유실, 갱내수 유출 등으로 토양과 하천뿐만 아니라 지하수로 및 주변 농경지 등에 유입되어 심각한 환경오염 문제를 일으키고 있다.

특히, 폐 광산 주변 농경지와 같은 토양의 오염은 작물 자체의 생육저하와 같은 직접적인 피해뿐만 아니라 이들 토양에서 재배된 작물을 섭취한 가축이나 인간에게 치명적인 병해를 일으키게 하는 등 먹이그물로 인한 연속 증독 현상을 야기 시킬 수 있기 때문에 중요시되고 있다. 광석을 채굴하거나 버려진 광산은 고농도의 중금속 오염원일 뿐만 아니라 금속유화물의 산화에서 유래되는 산성 배출수를 흘러보내는 경우가 있기 때문에 하류의 하천 수에서는 높은 농도의 중금속이 관찰되는 경우가 많고 물고기나 수서 곤충 등의 고등생물이 사멸되거나 광미 등이 농경지 등으로 유입되어 토양오염이 되는 경우가 많다. 따라서 채굴되고 있는 광산은 물론이고 버려진 광산에 대해서도 적절한 관리가 요구되고 있다.

그러므로 중금속으로 인한 오염지역을 효과적으로 정화하고 복원하기 위해서는 폐 광산에 대한 오염정도를 정확히 파악하고 이에 대한 지화학적 특성을 이해하며, 오염물질의 이동경로를 예측하고¹⁾ 토양 내 복합미생물생태계의 동태를 해석할 필요가 있다. 토양 내 미생물생태계의 동태 해석을 위한 기존방법으로는 직접계수법, 배양법, biomass 법 등이 이용되어 왔지만, 미생물군집구조를 파악한 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 미생물 군체의 구성성분(세포막, 세포벽의 지질, 퀴논(quinone), 다당, 아미노산 등)을 지표로 하는 화학분류법²⁻⁴⁾과 더불어 최근에는 분자 생물학적 방법(DNA probe법, DNA hybridization법, in situ hybridization, 유전자중복-hybridization법, 16S rDNA profile법 등)⁵⁾이 미생물생태계의 해석에 급속히 적용되고 있다. 그 중 quinone은 biomarker로서 많이 이용하고 있으며, 많은 미생물들은 하나의 우점 퀴논 종을 가지고 있을 뿐만 아니라 respiratory quinone profile (퀴논프로파일)법은 미생물 군집의 변화를 정량화 할 수 있다. 이러한 특징을 가지고 있는 퀴논프로파일법은 혼합 배양계내 미생물의 동태해석을 하기 위한 도구로서 유용하고, 간단하므로 많이 적용하고 있다.⁶⁻⁹⁾

따라서, 본 연구에서는 최근 혼합 배양계내에 미생물의 동태해석을 하기 위한 도구로서 많이 적용하고 있는 respiratory quinone 분석법을 이용하여 광미내의 미생물군집 구조 변화에 대해 알아보고, 깊이에 따른 광미내의 중금속

[†] Corresponding author
E-mail: limbr@hotmail.com
Tel: 031-330-6820

Fax: 031-336-6636

오염 농도의 분포에 대해서도 비교 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

본 연구를 위해 경북 봉화군 봉성면 우곡리에 있는 폐광산인 진곡광산 주변에서 시료를 채취하였다. 광산 활동이 활발했던 진곡광산에서는 Au, Ag, Pb, Zn 등이 채광되었다. 당시 광미 등의 폐기물이 다량 생성되었고, 적절한 처리 없이 광산 주변 계곡에 쌓여 있었다. 이 광미시료를 hand auger를 가지고 채취하였으며 수직으로 10 cm 간격으로 나누어서 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 비닐백에 넣어 밀봉한 다음 실험실에 돌아올 때까지 ice box에 보관 후 실험실에 돌아와 시료를 freeze-drier에서 건조시키고, 2 mm 체로 거른 후 잘 섞어서 균질화한 다음, 냉동고에 보관하였다.

다른 깊이에서 채취한 광미를 EPA 6010 방법으로 처리한 후 As, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Fe, Mn, Al의 총 함량을 Atomic Absorption Spectrometer(AAS, HITACHIZ-8200, Polarized Zeeman AAS)를 이용하여 측정하였다.^{10,11)}

광미내의 미생물군집구조는 Hu 등¹²⁾에 의해 개량된 quinone 분석법을 이용하여 HPLC로 정성 및 정량하였다. 광미 20~40 g을 채취하여 클로로포름과 메탄올혼합액(2:1 v/v%)을 이용하여 추출·분리한 후, Sep-Pak[®]Plus Silica를 이용하여 menaquinone과 ubiquinone를 분리하였으며 쿼논의 type과 농도는 ODS 칼럼 (Mightysil RP-18, 4.6(I.D.)×250 mm, Kanto Chemical Co., Japan)을 사용하였다. 칼럼내 이동상(mobile phase)으로 메탄올과 이소프로필에테르 혼합액(9:2, v/v)을 1.0 mL/min의 유속으로 주입하였으며, 검출기는 photodiode array detector (SPD-M10A, Shimadzu Co., Japan)와 자외선흡광광도검출기를 병용해 칼럼의 유지시간 뿐만 아니라 spectrum에 의해 쿼논 분자종의 동정을 행하였다. 정량을 위한 흡수파장은 유비쿼논은 275 nm, 메나쿼논은 270 nm를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 깊이별 광미종의 중금속 함량

깊이별 광미에 함유된 중금속의 총 농도를 Table 1에 나타내었다. 본 연구에서 조사한 광미의 pH는 평균 4.91로 일반 토양(평균 5.21)보다 낮게 나타났으며, 약간 붉은 갈색을 띠고 있는 것으로 보아 광미에 함유된 황화광물이 산화해서 수소이온이 생성되었기 때문이라고 사료된다.¹³⁾ 광미의 상층부(0~20 cm)에서 Cd, Cu, Pb, Al, Fe, Mn 등의 중금속 농도가 가장 높고, 깊이에 따라 농도가 감소하다가 깊이 40 cm 지점 이후부터 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 광미 상층부에 중금속 농도가 높은 것으로 보아 그 원소들을 포함한 황철석(FeS₂), 황비철석(FeAsS), 방연석(PbS), 황동석(CuFeS₂) 등의 다양한 황화광물의 산화가 그곳에서 이미 일어났거나 현재 진행 중인 것으로 사료된다.

Table 1. Concentrations of heavy metals in mine tailings over the depth

Metals	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn	Fe	Mn	Al
Unit	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Bulk*	5,224	12.2	3.8	102	2,274	2,175	36,213	16,376	2,341
10 cm	5,265	16.0	3.1	384	690	2,500	54,600	17,500	3,800
30 cm	5,218	13.3	3.5	123	276	2,400	51,350	18,450	3,100
40 cm	5,145	18.6	2.2	132	332	2,750	39,300	22,350	2,800
100~120 cm	5,820	9.8	4.8	65	178	1,650	34,850	14,000	1,700

* Average value

As 농도는 광미의 깊이에 따라 큰 변화는 나타나지 않았으나 약간 감소하는 경향이였으며 100-120 cm 지점에서 약간 높은 값을 나타내었다. Zn 농도는 깊이에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, 100-120 cm 정도에서는 감소하였으며, Cr 농도는 상층부에서는 큰 변화가 없었으나 100-120 cm 깊이에서 다소 높은 농도로 검출된 것으로 보아 이 깊이가 이하로 갈수록 일정하거나 다소 높아질 가능성이 있을 것으로 추측된다.

3.2. 미생물군집구조의 변화

Table 2는 광미의 깊이에 따라 quinone 분자종의 구성을 정리한 것이다. Quinone은 대부분의 미생물에 존재하는 전자전달계의 지용성 물질로서 Ubiquinone(UQ)과 Menaquinone(MK)으로 크게 나눌 수 있다.¹⁴⁾ 쿼논의 표기방법에 대해 예를 들어 설명하면 MK-9(H₂)는 isoprenoid units 9개를 가진 menaquinone을 나타내며, 9 units 중의 하나는 2개의 수소분자로 수소화된 것을 의미한다. Quinone profile의 증감을 그 생태계에서 우점종의 증감으로 볼 수 있으며 이것을 이용해서 미생물동태해석 및 생태계 평가의 지표로 활용할 수 있다.

광미의 깊이에 따라 quinone의 조성을 보면 UQ-9, UQ-10, 그리고 UQ-8 등이 가장 많이 포함되어 있었으며, 30~40 cm에서는 MK-9, MK-7(H₂), MK-8(H₂) 그리고 MK-7(H₄)이 일부 검출되었다. 반면, 산립토양의 쿼논조성을 보면 광미와는 달리 다양한 쿼논종이 존재하는 것으로 나타났다. 광미내 쿼논 조성 중 가장 우점빈도가 높게 나타난 것은 UQ-9 (γ -Subclass of Proteobacteria, Fungi)와 UQ-10 (α -Subclass of Proteobacteria)이었다. Ubiquinone-9를 함유하는 *Pseudomonas*, *Acetobacter*나 UQ-10을 함유하는 *Sphingomonas*, *Thiobacillus*, *Paracoccus* 등은 비소 등의 중금속을 분해, 전환 할 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.^{15,16)} Quinone 분석결과를 통하여 비소와 중금속으로 오염된 폐 광산 지역의 생물학적 복원을 위한 기초정보를 제공할 수 있었으나 추후 분자생물학적방법을 병행하여 중금속 분해, 전환에 직접 관여하는 미생물을 구체적으로 탐색할 필요가 있다고 사료된다.

깊이에 따른 ubiquinone과 menaquinone의 몰비는 그람 음성균과 그람 양성균의 비를 나타낸 것이다. 광미의 상층부(0~10 cm)에서는 menaquinone이 검출되지 않아 계산할

Table 2. Composition(Mole fraction) of quinones in mine tailings over depth

Quinone types	Mountain soil	Mine tailings over the depth				
		Bulk	10 cm	30 cm	40 cm	100-120 cm
Ubiquinones						
UQ-8	0.028	0.057	0.436	0.053	0.004	0.144
UQ-9	0.067	0.517	0.361	0.673	0.413	0.571
UQ-10	0.123	0.329	0.104	0.162	0.315	0.285
UQ-9(H ₂)	-	0.097	0.073	0.097	0.200	*
Menaquinones						
MK-6	0.066	-	-	-	-	-
MK-7	0.030	-	-	-	-	-
MK-8	0.053	-	-	-	-	-
MK-9	0.027	-	-	0.006	0.008	-
MK-10	0.028	-	-	-	-	-
MK-7(H ₂)	-	-	-	0.008	-	-
MK-8(H ₂)	0.062	-	-	-	0.017	-
MK-9(H ₂)	0.019	-	-	-	-	-
MK-10(H ₂)	0.135	-	-	-	-	-
MK-11(H ₂)	0.021	-	-	-	-	-
MK-7(H ₄)	0.061	-	-	-	0.044	-
MK-8(H ₄)	0.005	-	-	-	-	-
MK-9(H ₄)	0.011	-	-	-	-	-
MK-10(H ₄)	0.244	-	-	-	-	-
MK-11(H ₄)	0.003	-	-	-	-	-
MK-9(H ₆)	0.015	-	-	-	-	-
UQ/MK	0.279	-	-	67.99	13.55	-

*-: Not detected

수 없었으나 깊이 30 cm부터 다소 적은 양의 menaquinone 이 검출되어 깊이 30 cm와 40 cm의 UQ/MK비의 값을 계산한 결과 각각 68.0과 13.6이었다. 하층으로 갈수록 그람 양성균을 가진 박테리아가 존재하는 것을 알 수 있었다.

또한 깊이에 따른 광미의 quinone양과 미생물 다양성지표를 계산하여 Table 3에 나타내었다. 광미에 함유되어 있는 quinone의 을 보면, 표면층이 5.0 nmol/kg 으로 가장 적었으며 깊이 20 cm에서 24.9 nmol/kg 으로 최대 값을 나타내었으나 더 깊이 내려갈수록 quinone양이 감소하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 토양세균은 거의 대부분이 상층부 1 m 내에 존재 하며 주로 표층에 많이 있으며, 토양의 가장 위쪽 표면층은 수권에서와 같이 태양광의 조사와 낮은 수분함량으로 미생물 군집이 조밀하지 못하며 개체수도 그 아래 수 cm 지역보다는 적게 나타나는 것으로 알려져 있다.

Ubiquinone과 menaquinone profile을 지표로 하여 미생물 혼합 배양계의 다양성을 나타내는 지표인 미생물 다양성지표(DQ)¹⁷를 다음과 같이 계산하였다.

$$DQ = (\sum f_k^{1/2})^2 \quad (1)$$

Table 3. Quinone content(nmol/kg) and microbial diversity in mine tailings over the depth

Quinone content (nmol/kg)	Mine tailings over the depth				
	Bulk	10 cm	30 cm	40 cm	100-120 cm
Quinone content (nmol/kg)	5.0	24.9	21.1	11.5	5.6
DQ(-)	3.39	4.41	3.75	4.58	2.79

여기서, f_k 는 퀴논종 k의 molar 분율을 나타낸 것이다.

DQ값은 퀴논 분자종의 수가 많을수록 크게 되며 전부의 분자종이 평등하게 존재할 때 퀴논 분자종의 수와 동등하다.

퀴논 composition으로부터 계산한 광미내의 미생물다양성지표를 Table 3에 나타내었다. 표면에서부터 깊이 40 cm까지는 퀴논 다양성은 3.39~4.58로 큰 차이는 없었으나, 깊이 100~120 cm에서는 2.79로 다소 작게 나타났다. 이와 같이 광미 내 미생물다양성지표는 Fujie⁶ 등에 의해 보고된 토양이나 다이옥신 등으로 오염된 토양¹⁸의 총 퀴논종의 다양성지표(13.4~16.8)보다 훨씬 작은 것으로 나타났다.

퀴논프로파일의 변화를 정량적으로 표시하기 위한 목적으로 dissimilarity(비유사도, D)가 이용되고 있다. 각기 다른 2개의 미생물 군, i와 j의 퀴논프로파일간의 비유사도 $D(i,j)$ 를 다음의 식으로 정의하여 계산하였다.¹⁹⁾

$$D(i,j) = (1/2) \sum |f_{ki} - f_{kj}| \quad (2)$$

여기서, f_{ki} 와 f_{kj} 는 i와 j군집내에 퀴논종 k의 molar 분율을 나타낸 것이다. D값이 0.1 이하를 나타내는 것은 두 시료 간에 거의 차이가 없는 것을 나타내며, D가 0.2 이상이면 두 시료의 미생물군집간의 미생물상이 서로 다르다고 할 수 있다. 그러나, 비유사도에 의해 미생물군의 비유사성을 수량 해석하는 것은 가능하지만, 비유사도는 scalar량 밖에 없기 때문에, 비유사성의 내용에 대한 검토는 할 수 없다. 그러므로 cluster분석을 행함으로써 비유사성의 차별화를 할 수 있다. 비유사도의 결과를 바탕으로 cluster분석을 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 광미표면과 표면으로부터 깊이 100~120 cm내에 비유사성 level은 0.15 이내로 미생

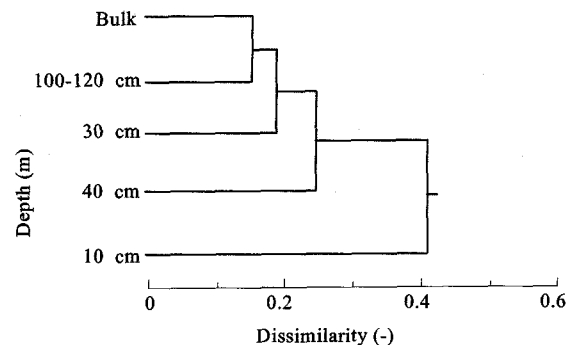


Fig. 1. Dendrogram showing differences in microbial communities among the samples based on D value matrix data.

물군집구조가 유사한 것으로 나타났으나 표면에서 10 cm 떨어진 경우는 그 이외의 다른 깊이와 비유사성이 0.4 정도 차이를 나타내었다. 이것은 다른 깊이보다 10 cm에서 증금속함량이 가장 높으므로 이로 인해 미생물군집구조에 큰 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

4. 결론

진폭광산 광미의 깊이별 비소와 증금속농도 분포를 조사하고 respiratory quinone profile법을 이용하여 광미 내 미생물군집구조를 검토한 결과 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1) 광미의 비소 및 증금속 농도는 상층부에서 매우 높게 검출되었으며, 깊이별 광미내의 미생물 군집구조는 다소 차이가 있는 것으로 나타났으며 퀴논양은 10~40 cm에서 가장 많이 함유하고 있었다.

2) 광미 내 우점 퀴논 종은 UQ-9과 UQ-10이었으며, 이 퀴논 종에 함유되어 있는 미생물군집 중에는 광미에 다량으로 함유되어 있는 비소나 증금속등을 분해, 전환할 수 있는 능력을 가지고 있을 것으로 사료된다.

3) 미생물 종의 다양성은 표면에서부터 깊이 40 cm까지는 3.39~4.58로 큰 차이는 없었으나, 깊이 100~120 cm에서는 2.79로 다소 낮은 것으로 나타났다.

결론적으로 퀴논 프로파일법을 이용하여 비소와 증금속으로 오염된 폐 광산 지역의 생물학적 복원사업의 기초 자료로써 정보를 제공할 수 있었으나 각 증금속의 분해, 전환, 내성에 관여하는 미생물의 계통학적 분류를 위해서는 분자생물학적방법을 병행하여 탐색할 필요가 있다고 사료된다.

참고문헌

- Ribet, I., Ptacek, C. J., Blowes, D. W., and Jambor, J. L., "The potential for metal release by reductive dissolution of weathered mine tailings," *J. Contam. Hydrol.*, **17**, 239~273(1995).
- Fang, J. and Barcelona, M. J., "Biogeochemical evidence for microbial community change in a jet fuel hydrocarbons-contaminated aquifer," *Org. Geochem.*, **29**(4), 899~907(1997).
- Hedrick, D. B. and White, D. C., "Microbial respiratory quinones in the environment I. A sensitive liquid chromatographic method," *J. Microbiol. Methods*, **5**, 243~254(1986).
- Fujie, K., Hu, H.-Y., Tanaka, H., and Urano, K., "Ecological studies of aerobic submerged biofilter on the basis of respiratory quinone profiles," *Water Sci. Technol.*, **29**, 373~376(1994).
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H., "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143~169(1995).
- Fujie, K., Hu, H.-Y., Tanaka, H., Urano, K., Saito, K., and Katayama, A., "Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of microbiota," *Soil Sci. Plant Nutr.*, **44**(3), 393~404(1998).
- Kunihiro, T., Hu, H.-Y., Lim, B.-R., Goto, N., and Fujie, K., "Analysis of the differences in microbial community structures between suspended and sessile microorganism in rivers based on quinone profile," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **48**, 35~41(2002).
- Lim, B.-R., Hu, H.-Y., Huang, X., and Fujie, K., "Effect of seawater on the treatment performance and microbial population in a biofilter treating coke-oven wastewater," *Process Biochemistry*, **37**, 943~948(2002).
- Hiraishi, A., Miyakoda, H., Lim, B.-R., Hu, H.-Y., Fujie, K., Suzuki, J., "Toward the bioremediation of dioxin-polluted soil: structural and functional analyses of in situ microbial populations by quinone profiling and culture-dependent methods," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 248~256(2001).
- Keith, L. H., *Compilation of EPAs Sampling and Analysis Methods*, 2nd ed., Lewis, 99~100(1998).
- Kim, M.-J., Ahn, K.-H., and Jung, Y., "Distribution of inorganic arsenic species in mine tailings of abandoned mines from Korea," *Chemosphere*, **49**, 307~312(2002).
- Hu, H.-Y., Fujie, K., and Urano, K., "Development of a novel solid phase extraction method for the analysis of bacterial quinones in activated sludge with a higher reliability," *J. Biosci. Bioeng.*, **87**(3), 378~382(1999).
- Morrell, W. J., Stewart, R. B., Gregg, P. E. H., Bolan, N. S., and Home, D., "An assessment of sulphide oxidation in abandoned base-metal tailings, Te Aroha, New Zealand," *Environ. Pollut.*, **94**(2), 217~225(1996).
- Collins, M. D. and Jones, D., "Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications," *Microbiol. Rev.*, **45**, 316~354(1981).
- Richard, E. M., Jacob, T. W., Timothy, R. M., and William, P. I., "Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings," *Environ. Sci. Technol.*, **35**(18), 3676~3682(2001).
- Malhotra, S., Tankhiwale, A. S., Rajvaidya, A. S., and Pandey, R. A., "Optimal conditions for bio-oxidation of ferrous ions to ferric ions using *Thiobacillus ferrooxidans*," *Bioresour. Technol.*, **85**, 225~234(2002).
- Hu, H.-Y., Fujie, K., Nakagome, H., Urano, K., and Katayama, A., "Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinones," *Water Res.*, **33**(15),

- 3263~3270(1999).
18. 임병란, 안규홍, Fujie Koichi, “퀴논프로파일법을 이용한 다이옥신 오염 토양내의 미생물군집해석,” 대한환경 공학회지, 1283~1288(2003).
 19. Hiraishi, A., Morishima, Y., and Takeuchi, J., “Numerical analysis of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment system,” *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **37**, 57~70(1991).