

토양에 유출된 염소계 휘발성 유기물질의 자연저감 : 수분과 탄소원의 영향

조장환^{1*} · 최상일²

¹환경관리공단, ²광운대학교 환경공학과

Natural Dissipation of Chlorinated Volatile Organic Compounds Released in Soil : Effect of Moisture Content and Carbon Source

Chang-hwan Cho^{1*} · Sang-il Choi²

¹Environmental Management Corporation

²Department of Environmental Engineering, Kwangwoon University

ABSTRACT

This study was to evaluate sorption and biodegradation rate affecting the natural dissipation of chlorinated volatile organic compounds (CVOCs) in surface soil. To show the effect of sorption and biodegradation on the natural dissipation of 1,1,1-trichloroethane (TCA), trichloroethylene (TCE) and tetrachloroethylene (PCE), three types of vial experiments were employed; (1) sterilized, (2) non-sterilized, (3) non-sterilized/substrate enriched. Also three moisture contents was applied to find the moisture effect in each vial; (1) wilting point (12%, w/w), (2) field capacity (29%, w/w), (3) saturation (48%, w/w). The results suggested that keeping the soil moisture content at field capacity was desirable for TCA and TCE natural dissipation in the vial study.

Key words : Chlorinated volatile organic compounds, Sorption, Biodegradation, Natural dissipation, Moisture content

요 약 문

본 연구에서는 토양에 유출된 염소계 휘발성 유기물질의 자연저감에 대한 흡착과 미생물분해의 영향을 알아보았다. 대표적인 염소계 휘발성 유기물질인 TCA (1,1,1-trichloroethane), TCE (trichloroethylene) 및 PCE (tetrachloro ethylene)의 자연저감을 비교하기 위해 세 가지 조건에서 바이얼 실험을 수행하였다; (1) 멸균, (2)비멸균 그리고 (3) 비멸균/탄소원첨가. 또한 각각의 조건에서 수분함량에 의한 영향을 알아보기 위해 세 가지로 적용하였다; (1) wilting point (12%, w/w), (2) field capacity (29%, w/w), (3) saturation (48%, w/w). 100일 경과 후, TCA 및 TCE는 field capacity에서 미생물에 의한 자연저감이 상대적으로 활발히 일어났다. 비멸균/탄소원 첨가 토양은 멸균한 토양에 비해 유기물질의 제거율에서 현격한 차이를 나타내었다. PCE는 미생물 및 탄소원 첨가에 의한 영향을 보이지 않았다.

주제어 : 염소계 휘발성 유기물질, 흡착, 미생물 분해, 자연저감, 수분함량

1. 서 론

공업용 용제 및 드라이 클리닝의 세척제 등으로 무분별하게 사용된 염소계 휘발성 유기물질(Chlorinated Volatile

Organic Compounds, CVOCs)은 현재 토양 및 지하수에서 자주 발견되는 오염물질로 알려져 있으며, 암 유발 가능성 등 그 위해성 또한 심각하다(US EPA, 1996a). 토양에 유출된 CVOCs는 비휘발성 물질에 비해 상변화 및

*Corresponding author : cho6272@emc.or.kr

원고접수일 : 2005. 2. 14 게재승인일 : 2005. 3. 11

질의 및 토의 : 2005. 8. 31 까지

거동 특성이 매우 복잡하기 때문에 오염토양 및 지하수를 정화하기 위해서는 이에 대한 정확한 이해가 필요하다 (Domenico and Schwartz, 1990).

CVOCs는 휘발, 흡착, 확산 및 분산, 화학작용 및 미생물 분해 등 생태계의 자정능력에 의해 일정농도까지는 자연적으로 감소하게 되는데, 이 중에서 휘발, 흡착 및 미생물분해는 유기물질의 감소에 영향을 미치는 대표적인 메카니즘이라 할 수 있다.

토양에 유출된 CVOCs의 일부는 휘발하여 대기중으로 노출되지만, 상당량이 중력에 의해 지하수면까지 이동하게 되며, 지하수와 접촉한 오염물질은 물에 용해되어 지하수의 유동에 의해 지하수 전체로 확산된다(LaGrega et al., 1994).

불포화 대수층에서 토양의 수분함량은 CVOCs의 흡착 및 미생물 분해율에 큰 영향을 미친다. 수분함량이 과도할 경우 토양공극이 수분으로 채워져 토양과 접촉할 기회가 줄어들며, 수분함량이 과도하게 적을 경우에는 미생물의 대사가 활발하지 않게 된다.

CVOCs는 혐기성 상태에서 미생물에 의해 탈염소화 (dechlorination)된다. 대표적인 CVOCs인 TCE (trichloroethylene) 및 PCE (tetrachloro ethylene)는 혐기성 미생물에 의해 DCEs (dichloroethylenes), VC (vinyl chloride), ethylene과 ethane으로 변환된다(Anderson and McCarty, 1997). 이 과정에서 여러 기질(substrate), hydrogen, formate, acetate, benzoate, methanol, ethanol 그리고 glucose이 전자 공여체(electron donor)로 연구되었다. 그러나 오염토양 및 지하수에 적용하는 기질은 저렴하고 환경 친화적이어야 한다. 화학물질을 기질로 이용하는 경우 부가적인 오염이 발생할 가능성이 있기 때문이다(Gibson and

Sewell, 1992; Tandoi et al., 1994; Mayno-Gatell et al., 1995).

사탕수수 당밀(Sugar cane molasses)은 토양에 존재하고 있는 미생물에 탄소원으로 작용하여 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Wu et al., 1998). Wu 등(1998)은 매탄이나 알코올에 비해 상대적으로 저렴한 사탕수수 당밀을 오염토양에 적용한 결과 20~30%의 분해효율 상승을 확인하였다.

본 연구에서는 토양에 유출된 CVOCs 자연저감 정도를 알아보고자 하였다. 바이얼 실험을 통하여 세 가지 수분 조건에서 흡착과 미생물 분해의 영향을 알아보았다. 또한 토양 미생물의 탈염소화 과정에 필요한 기질로서 사탕수수 당밀의 적용성을 알아보았다.

2. 재료 및 방법

토양은 미국 Texas 주의 Texas A&M 대학교 농업실험 농장 인근에서 채취하였다. 채취한 토양을 눈금 2 mm 체로 분리한 후, 48시간 동안 풍건 건조하였다. 밀도와 공극률은 부피비로 측정하였으며, 유기물 함량은 Walkley-Black 습식 연소법을 이용하였다. 토양의 유기물 함량은 0.8%이었으며, 토성구분은 미사질양토(silt loam)이었다. 실험에 이용된 토양의 물리·화학적 특성을 Table 1에 나타내었다.

염소계 휘발성 유기물질(CVOCs)은 TCA (99.8% ACS reagent, Sigma), TCE (99.5%, spectrophotometric grade, Aldrich), PCE (99.9%, HPLC grade, Aldrich)을 이용하였으며, 추출용매는 Hexane (99.8%, HPLC grade, EM)을 이용하였다. 실험에 이용된 오염물질의 물리·화학적 특성을 Table 2에 나타내었다. TCA, TCE 및 PCE 표준 용액(Supelco Chemical Co.)은 메탄올에 5,000 mg/L로 용해된 제품을 사용하였다.

CVOCs의 흡착 및 미생물 분해율을 조사하기 위해 세 가지 조건의 토양을 준비하였다; (1) 멀균, (2) 비멀균, (3) 비멀균/탄소원 첨가. 또한 각각의 조건에서 수분함량에 따른 영향을 알아보기 위해 세 가지의 수분 조건을 적용하였다; (1) wilting point (12%), (2) field capacity (29%), (3) saturation (48%). 각각의 수분함량은 토양의 입도 분포를 통하여 구하였다(Saxton et al., 1986).

암갈색의 투명한 액체인 사탕수수 당밀(Sugar cane molasses; Greenfire Inc., CA)을 5 g/L로 희석하여 토양에 첨가하였다. 실험에는 암갈색 20 mL 용량의 바이얼을 사용하였다. 마개는 휘발된 오염물질이 누출되지 않도록

Table 1. Physicochemical characteristics of the soil used in this study

Bulk density (g/cm ³)	1.38±0.04
Porosity	0.48±0.01
Soil texture	Silt loam
Organic matter (%)	0.8
pH	8.15±0.4
Sand (%)	22
Clay (%)	18
N* (ppm)	6.5
P* (ppm)	39
K* (ppm)	220
Wilting point (cm ³ /cm ³)	0.12
Field capacity (cm ³ /cm ³)	0.29
Saturation (cm ³ /cm ³)	0.48

Table 2. Physicochemical characteristics of the chemicals

Name of chemicals	Trichloroethylene (TCE)	Tetrachloroethylene (PCE)	1,1,1-trichloroethane (TCA)
Formula	C ₂ HCl ₃	C ₂ Cl ₄	C ₂ H ₃ Cl ₃
Molecular weight (g/mole)	131.39	165.83	133.40
Density (g/cm ³)	1.461	1.623	1.339
Vapor pressure (mmHg) at 25	69	20	124
Water solubility (mg/L)	1,400	240	1,250
Henry's law constant at 25	0.366	0.610	0.651
Soil sorption coefficient, log <i>K_{oc}</i>	1.66~2.83	2.25~2.65	2.017
Octanol/water partition coefficient, log <i>K_{ow}</i>	2.29~3.30	2.10~2.53	2.17~2.49

Montgomery, J.H., Groundwater Chemicals Desk Reference, 2nd Edition, Lewis Publishers, Chelsea, MI (1996)

3겹으로 자체 제작하였는데, 테프론으로 피복된 실리콘 재질의 고무 septum 앞뒤로 납 호일과 테프론 테이프를 붙여 사용하였다(Hwang, 2000). 멸균방법은 토양을 autoclave에서 121°C, 압력 103.4 kPa로 1시간동안 멸균 후, 24시간동안 25°C에서 배양하였다. 이러한 과정을 세 번 반복하였다(Sheremata et al., 1997).

유기물질은 TCA (1,005.1 mg), TCE (960.5 mg) 및 PCE (986.1 mg) 원액을 아세톤과 혼합하여 40 mL가 되도록 혼합하였다. 아세톤의 유기물질 농도는 각각 25,127, 24,013 및 24,653 mg/L이었다. Syringe (10, Hamilton, NE)를 이용하여 토양 10 g에 10 µL의 용액을 첨가한 후 즉시 밀폐하였다. 오염토양의 농도는 TCA, TCE 및 PCE가 각각 25.1, 24.0 및 24.6 mg/kg이었다. 회전혼합기(touch-mixer, vortex)를 이용하여 토양을 혼합한 후, 실온(23 ± 2°C)에 정치시켰다.

오염물질의 총 농도는 토양에 존재하는 부분과 가스상태의 합으로 계산하였다. 오염물질은 휘발성이 매우 강하기 때문에 한번 분석한 시료는 더 이상 이용하지 않고, 시간에 따른 분석횟수 만큼 동일한 시료를 준비하여 오염물질의 변화량을 예측하였다. 즉 동일한 시료를 4개씩 준비하여 시간에 따라 각각을 분석한 후, 이 결과를 시간에 따른 오염물질의 변화로 가정하였다.

$$M_t = M_{air} + M_{soil} \quad (1)$$

여기서,

M_t = 유기물질의 총량

M_{air} = 가스상태의 유기물질의 총량

M_{soil} = 토양에 존재하는 유기물질의 총량

바이얼 실험의 기체의 농도는 EPA SW846 Methods 5021과 3520C를 이용하여 분석하였다(US EPA, 1996b; US EPA, 1996c). 바이얼 상부 가스 5 µL를 syringe (10 µL,

Hamilton, NE)를 이용하여 채취한 후, GC에 직접 주입하여 분석하였다. 가스분석 후 황산나트륨(sodium sulfate; Na₂SO₄, EM science, Gibbstown, NJ)을 첨가하여 수분을 제거하였다. 토양에 잔류하는 오염물질은 hexan과 아세톤 혼합용매(1v:1v)를 첨가하여 12시간 동안 추출 후 30분간 정치시켜 상등액을 GC로 분석하였다.

오염물질은 ECD (필름 두께 1.8 µm) 검출기를 장착한 SRI 8610C GC를 이용하여 분석하였다. 칼럼은 MXT-1(30m×0.25 mm i.d.)이었으며, 온도는 50°C에서 150°C까지 20°C/min으로 프로그램 되었다. 액상시료의 최저 분석한계는 TCA, TCE 및 PCE가 각각 0.217 mg/L 이었다(US EPA, 1996d).

동일 시료를 세 개씩 준비하여 분석한 후, 분석결과를 통계프로그램인 SAS (SAS, Cary, NC)를 이용하여 유기물질의 잔류율 변화여부를 분석하였다. 분석방법은 Duncan's multiple range method ($p < 0.05$)를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

세 가지 수분함량에 따른 염소계 휘발성 유기물질(CVOCs)의 잔류량을 초기 CVOCs에 대한 비율로 나타내었다. 측정된 초기 CVOCs의 총량은 TCA, TCE 및 PCE가 각각 21.5~26.1, 21.2~32.6 및 23.5~28.0 µg/vial 이었다. CVOCs의 누출 방지를 위해 세 겹으로 제작된 마개를 사용하였으나, 토양이 들어있지 않은 대조구에서도 시간이 경과함에 따라 누출이 발생되었다. 100일 경과 후 유기물질의 누출율은 18~25%로 나타났으며, 이를 보정하여 유기물질의 잔류율을 계산하였다.

염소계 휘발성 유기물질의 분해에 있어서 그 분해 기작이 anaerobic reductive dechlorination 인지 aerobic cometabolic biodegradation인지를 구분하는 것은 매우 중요하다. 그러나 본 연구에 있어서 가장 먼저 염두에 둔 부분은

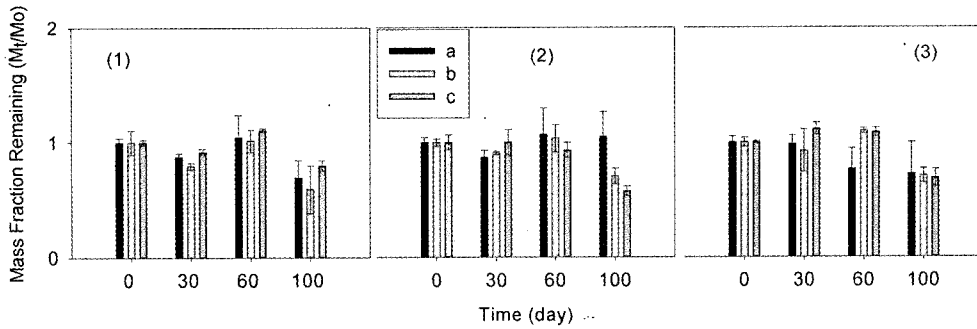


Fig. 1. Mass fraction remaining of TCA in microcosms at the wilting point (1), field capacity (2), and saturation (3). Error bars indicate standard error of the mean of three vials.(a:sterile, b:non-sterile, c:non-sterile/substrate enriched).

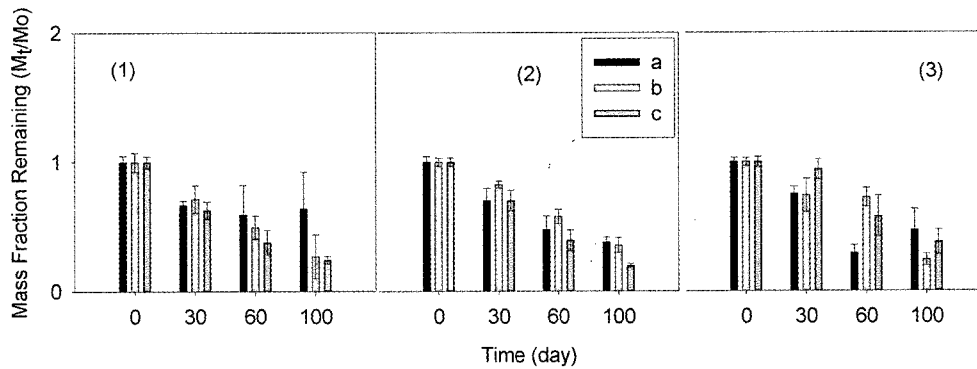


Fig. 2. Mass fraction remaining of TCE in microcosms at the wilting point (1), field capacity (2), and saturation (3). Error bars indicate standard error of the mean of three vials.(a:sterile, b:non-sterile, c:non-sterile/substrate enriched).

Table 3. Mass fraction remaining of VOCs in microcosm at field capacity

Treatment		100 days
TCA	Sterile soil	1.05 a
	Non-sterile soil	0.70 ab
	Non-sterile/substrate enriched soil	0.57 b
TCE	Sterile soil	0.38 a
	Non-sterile soil	0.35 ab
	Non-sterile/substrate enriched soil	0.19 b
PCE	Sterile soil	0.60 a
	Non-sterile soil	0.51 a
	Non-sterile/substrate enriched soil	0.43 a

The value of Mt (mass remaining at time t)/Mo (initial mass) at a given time followed by the same letter are not statistically different ($p < 0.05$)

염소계 유기물질의 휘발, 흡착 및 생물분해의 정도를 비교하는 것이었다. 본 연구는 실험실에서 수행되었지만 최대한 현장과 동일한 조건을 만들고자 하였다. 일반적으로 토양에 유출된 유기물질은 중력에 의해 하부로 이동하면서 호기성 지역과 혐기성 지역을 모두 거치며 분해된다.

세가지 수분함량인 wilting point (12%), field capacity

(29%) 및 saturation (48%)에서 100일 동안 잔류하는 TCA의 비율을 Fig.1에 나타내었다. 모든 수분조건에서 60일까지는 회수율이 거의 감소되지 않은 것으로 보아 흡착과 미생물 분해가 모두 활발하지 않은 것으로 판단된다.

100일 경과 후 멸균 토양과 비멸균 및 비멸균/탄소원 첨가 토양에서 모두 회수율이 감소되었다. CVOCs의 저감은 미생물분해 보다는 흡착에 의한 영향이 우세한 것으로 판단된다. 단 field capacity (29%)에서 100일 경과 후 멸균 토양의 흡착효과가 나타나지 않은 것은 토양의 불균일성에 의한 것으로 판단된다. 그러나 비멸균 토양에서 CVOCs의 회수율이 비멸균/탄소원 첨가토양에 비해 상대적으로 높았다(Fig. 1(2)). 이러한 결과는 토양의 수분조건을 field capacity(29%)으로 조절하는 것이 미생물 활성뿐만 아니라 탄소원의 이용에 효과적임을 나타낸다(Table 3).

토양에 잔류하는 TCE의 회수율은 시간에 따라 감소하였다. 멸균한 토양과 비멸균 및 비멸균/탄소원 첨가토양의 회수율이 비슷한 경향을 나타내는 것으로 보아 TCE는 TCA에 비해 흡착에 의한 회수율의 감소가 우세한 것으로 판단된다(Fig. 2).

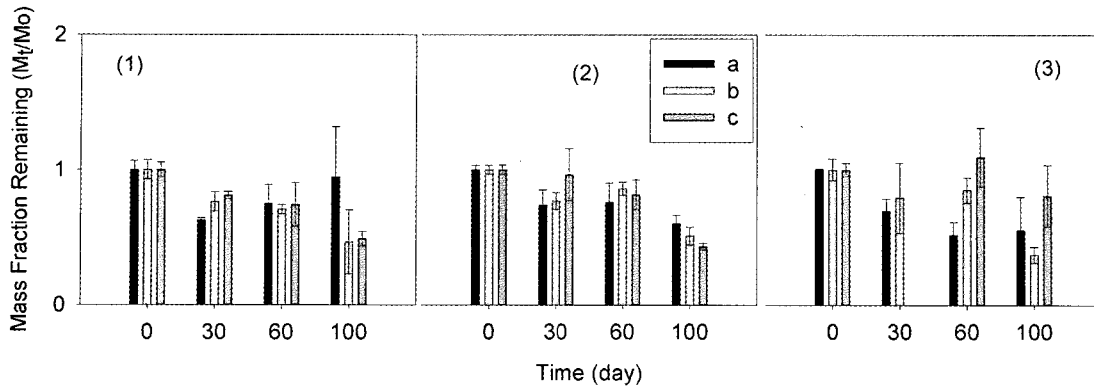


Fig. 3. Mass fraction remaining of PCE in microcosms at the wilting point (1), field capacity (2), and saturation (3). Error bars indicate standard error of the mean of three vials.(a:sterile, b:non-sterile, c:non-sterile/substrate enriched).

TCE는 모든 수분조건에서 30일부터 흡착에 의한 회수를 감소현상이 나타나지만, 100일 경과 후 field capacity (29%)에서는 미생물 분해에 의한 영향이 나타났으며, 탄소원 첨가에 의한 오염물질의 회수율 감소현상이 나타난다. Saturation (48%)에서는 TCE는 물에 의한 용해도 변화에 의한 영향이 흡착과 미생물 분해에 의한 영향보다 훨씬 큰 것으로 판단된다.

토양 수분함량에 따른 PCE의 회수율은 미생물 분해보다는 흡착에 의해 더 많은 영향을 받는 것으로 나타났다. Saturation (48%)에서의 비멸균/탄소원을 첨가 토양의 30일 시료에 대한 결과는 얻을 수 없었다. 30일 경과 후, 각각의 수분함량 조건에서 모두 회수율의 감소가 일어났으나, 멸균토양과 비멸균토양의 차이는 없었다.

또한 비멸균/탄소원 첨가 토양의 경우에도 멸균토양과 회수율면에서 큰 차이를 나타내지 않았다. PCE의 흡착에 의한 회수율은 TCA보다 크고, TCE보다는 적은 것으로 나타났다. PCE의 회수율은 수분조건에 의해 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 앞서 언급한 TCA 및 TCE와 비교할 때, CVOCs의 특성에 따라 흡착 및 미생물 분해의 정도가 다른 것으로 판단된다.

토양에 유출된 유기물질의 회수율은 멸균 > 비멸균 > 비멸균/탄소원 첨가의 순서로 나타날 것으로 예상되었지만, 반응시간과 조건에 따라 약간씩 상이하게 나타나기도 하였다. 이는 동일조건의 시료라 하더라도 혼합과정에서 불균일하게 제조되었기 때문이라고 판단된다. 60일 경과 후 모든 CVOCs의 회수율은 비멸균 및 비멸균/탄소원 첨가 토양보다 멸균토양이 높았다. 이는 멸균과정에서 토양구조의 변화 혹은 탄소원인 사탕수수 당밀이 CVOCs의 흡착을 방해하는 요인으로 작용하였을 것으로 판단되며, 향

후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

토양에 유출된 유기물질은 휘발, 흡착 및 미생물 분해에 의해 상당 부분이 제거된다. 또한 유출시간(aging time)에 따라 유기물질의 토양에 대한 흡착이 일정시간까지 지속적으로 일어나게 되므로 회수율이 감소하게 된다.

본 실험은 토양에 유출된 염소계 휘발성 유기물질의 자연 저감에 영향을 미치는 메카니즘 중 흡착과 미생물에 의한 영향을 알아보기 위해 수행되었다. 바이얼 실험과 실제 오염현장을 비교하는 데는 여러 가지 제약이 따르므로 예상되지만, 수분함량에 따른 각 오염물질의 흡착과 미생물 분해율을 파악하기에는 무리가 없을 것으로 판단된다.

또한 혐기성 미생물을 주입하거나 토양의 미생물 분포를 파악하지는 않았으나, 바이얼 내부의 산소는 5-10분경과 후 호기성 미생물에 의해 모두 고갈되고, 호기상태에서 혐기상태로 전환된 것으로 판단된다. 미생물 분해는 anaerobic reductive dechlorination이 우세한 것으로 판단된다.

본 실험에서 회수율은 실험초기에는 85% 이상인 것으로 나타났다. 시간이 경과함에 따라 흡착에 의해 회수율이 감소할 것으로 판단되었지만, 흡착율과 미생물 분해율과의 관계는 조사되지 않았다.

4. 결 론

토양에 유출된 염소계 휘발성 유기물질의 자연저감에 영향을 미치는 흡착과 미생물 분해율을 알아보기 위해 바이얼 실험을 수행하였다. TCA는 60일 이후에 흡착에 의한 영향이 나타났으며, 100일 경과 후 field capacity (28%)에서 탄소원 첨가의 영향이 나타났다. TCE는 초기부터

흡착에 의한 영향이 나타났으며, 수분함량이 field capacity (28%)인 조건에서만 미생물 및 탄소원 첨가의 영향이 나타났다. PCE는 수분함량에 따른 미생물 분해의 효과가 나타나지 않았다.

염소계 휘발성 유기물질이 유출된 토양의 자연저감 효과를 극대화하기 위해서는 토양의 수분함량을 field capacity (28%)로 조절하는 것이 유리한 것으로 판단된다. 이는 수분함량이 일정 비율 이하로 낮아지면 TCE의 미생물 분해율이 감소한다고 보고한 Fan and Scow (1993)의 결과와 비슷하다. 유기물질의 흡착율은 토양의 수분함량 보다는 오염물질의 화학적 특성에 더 영향을 받는 것으로 판단된다.

미생물 분해과정은 미생물의 유기물질에 대한 순응기간이 필요하며, 또한 이를 활성화시키기 위해 첨가되는 탄소원에 대한 적응기간이 필요한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Anderson, J.E. and McCarty, P.L., 1997, Transformation yields of chlorinated ethenes by a methanotrophic mixed culture expressing particulate methane monooxygenase, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **63**, 687-693.
- Domenico, P.A. and Schwartz F.W., 1990, Physical and Chemical Hydrogeology, John Wiley & Sons, NY, p. 421-540.
- Fan, S. and Scow, K.M., 1993, Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **59**, 1911-1918.
- Gibson S.A. and Sewell G.W., 1992, Stimulation of reductive dechlorination of tetrachloroethene in anaerobic aquifer microcosms by addition of short-chain organic acids or alcohols, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1392-1393.
- Hwang, I., 2000, Ph.D. Dissertation, Fe(II)-based reductive dechlorination of tetrachloroethylene in soils treated by degradative solidification/stabilization, Texas A&M University, College Station, TX.
- LaGrega, M.D., Buckingham, P.L., and Evans, J.C., 1994, Hazardous Waste Management, McGraw-Hill Inc., NJ.
- Mayno-Gatell X., Tandoi V., Gossett J.M., and Zinder S. H., 1995, Characterization of the H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3928-3933.
- Saxton, K.E., Rawls, W.J., Romberger, J.S., and Papendick, R. I., 1986, Estimating generalized soil-water characteristics from texture, *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, **50**, 1031-1036.
- Sheremata, T.W., Yong, R.N., and Guiot, S.R., 1997, Simulation and sterilization of a surrogate soil organic matter for the study of the fate of trichloroethylene in soil. *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.*, **28**, 1177-1190.
- Tandoi V., DiStefano T.D., Bowser P.A., Gossett J. M., and Zinder S. H., 1994, Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and halogenated ethanes by a high-rate anaerobic enrichment culture, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 973-979.
- US EPA, 1996a, *Clean up the nations waste sites: Markets and technology trends* (EPA542/R-96/005A), Washington, DC.
- US EPA, 1996b, SW-846, Method 5021.
- US EPA, 1996c, SW-846, Method 3520C.
- US EPA, 1996d, SW-846, Method 8260B.
- Wu, W., Nye, J., Jain, M.K. and Hickey, R.F., 1998, Anaerobic dechlorination of trichloroethylene (TCE) to ethylene using complex organic materials, *Water Research*, **32**, 1445-1454.