

## 지하수 인공함양시스템의 생물학적 평가를 위한 생물막 형성 조건 및 형성도 분석 방법에 관한 기초연구

공인철<sup>1</sup> · 이소라<sup>1</sup> · 하규철<sup>2</sup> · 고경석<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>영남대학교 환경공학과

<sup>2</sup>한국지질자원연구원 지하수연구실

## Basic Study on Conditions and Analytical Methods of Biofilm Formation for the Bioassessment of Artificial Groundwater Recharge System

In Chul Kong<sup>1</sup> · So Ra Lee<sup>1</sup> · Kyoochul Ha<sup>2</sup> · Kyung-Seok Ko<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Yeungnam University

<sup>2</sup>Groundwater Department, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources

### ABSTRACT

For the preliminary investigations of the bioclogging on groundwater artificial recharge system, studies for conditions and analytical methods of biofilm formation on sediments were performed. Based on the tested results, following conditions were determined for biofilm formation on batch process: optimum period for biofilm formation (30 days), the proper inoculating water (pond water), medium (minimum salt medium with 0.1% yeast extract). Procedures for the measurement of ATP and DHA were also determined. Biomass extract was used for ATP measurement, while sediment itself for DHA. Effects of metals on the biofilm formation were investigated under the determined conditions. Different sensitivities and orders were found depending on tested metals and measurement methods. In general, biomass measurement by ATP and viable cell count showed higher sensitivity than that of DHA. Following toxicity orders were also appeared for ATP and viable cell: Cu ≈ Cd > As(III).

**Key words :** Bioclogging, Artificial recharge system, Biofilm, ATP, DHA

### 1. 서 론

지구 온난화의 영향은 극지역 기온 상승, 사막화, 강수 패턴 변화, 해수면 상승, 이상 기상 현상으로 나타나고 있으며 우리나라도 예외는 아니다(Kim and Kim, 2009). 산업 혁명이 시작된 1830년대부터 현재까지 지구의 평균 기온은 0.6°C 상승하였으며, 우리나라의 경우 과거 100년 동안 서울의 기온은 1.3°C 상승한 것으로 나타났다(IPCC, 2007). 2011년 국토해양부에 의해 수립된 수자원장기 종합계획(2011~2020)에 따르면 2020년 물 수급 전망 분석 결과, 과거 최대 가뭄 발생 시 전국적으로 약 4.3억 m<sup>3</sup>의 물 부족이 전망되고 있다. 기후변화에 따른 물 부족 해결을 위해서는 댐저수지 건설, 빗물 이용, 용수 재이용

등의 다양한 방안이 제시되고 있지만 환경 문제 및 비용 경제적인 효과 등의 문제로 현실적인 대안이 되지 못하는 실정이다. 따라서 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 대안으로 떠오르고 있는 지하수 인공함양 기술은 기후 변화에 의해 야기되는 물 부족을 해결하고 지역별 및 시기별 차별화된 수자원의 확보와 공급 및 수질 개선의 효과를 얻을 수 있는 미래 대응 기술로 평가되고 있다.

일반적인 인공 함양의 목적은 크게 지하 저장을 통한 수자원 확보, 지하 수위 회복, 지반 침하 방지, 지하수 염수화 방지, 대수층 축열 이용, 수온 조절 등의 물리적 분야와 관개용수 개선, 수질 개선, 지하 오염원 제어의 화학적 분야로 나눌 수 있다(Bu et al., 2005; Kim et al., 2008). 지하수 인공함양 기술은 함양 방법에 따라서 직접

\*Corresponding author : kyungsok@kigam.re.kr

Received : 2015. 3. 13 Reviewed : 2015. 4. 28 Accepted : 2015. 6. 4

Discussion until : 2015. 10. 31

함양과 간접 함양으로 구분하는데 직접 함양은 협의의 인공 함양 기술을 의미하며 여유 수자원을 외부로부터 대수층으로 바로 주입하는 방식이고, 간접함양은 대수층의 여과나 흡착의 물리적 특성 및 자정 작용의 생화학적 특성을 간접적으로 활용하는 방법이다(Huisman and Olsthoorn, 1983; Kim et al., 2003; Gale, 2005; Pyne, 2005; Kim et al., 2008).

인공함양 기술은 많은 장점을 보유하고 있고 다양한 환경에 맞게 적용이 가능하지만 모든 환경에 적용할 수 있는 것은 아니다. 관정 주입 방식으로 지표수 및 하천 처리수를 지하 대수층에 주입하다 보면 다양한 요인에 의해 관정 및 관정 주변 대수층의 클로킹 현상이 발생한다. 또한 지표 침투의 경우에도 분지 바닥이 점토나 유기물 등에 의한 클로킹 현상이 발생하기도 한다. 관정 주입 방식으로 지표수 및 하천 처리수를 지하 대수층에 주입하다 보면 다양한 요인에 의해 관정 및 관정 주변 대수층의 클로킹 현상이 발생한다. 또한 지표 침투의 경우에도 분지 바닥이 점토나 유기물 등에 의한 클로킹 현상이 발생하기도 한다. 주입수와 함께 유입된 공기 및 부유 물질에 의한 물리적인 클로킹 뿐만 아니라 미생물의 성장에 의한 막힘과 화학적 침전 작용의 결과에 의한 클로킹이 발생할 수 있다(Kim and Kim, 2010). Dillon and Pavelic(1996)에 의하면 조사된 ASR(Artificial Storage and Recharge) 부지의 80%에서 클로킹 문제가 보고할 정도로 클로킹은 인공함양에서 가장 많은 문제를 일으키는 원인으로 인식되었다. 조사 부지의 50% 정도는 부유고형물에 의한 물리적 클로킹을, 15%는 생물 증식에 따른 문제를, 그리고 10%는 화학적 침전에 의한 클로킹을 보고하였다. 이 외에도 다른 클로킹의 원인들로는 공기 혼입(10%), 점토광물 팽창 및 분산(5%) 그리고 대수층 퇴적물의 역학적 막힘과 이동(5%)이 있는 것으로 조사되었다. 일반적으로 클로킹은 대부분 인공함양수의 수질과 관련된 운영 문제이지만 대수층과 지하수 특성, 관정 건설과 함양시설 설계 같은 부지특성 조건들 모두가 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

인공함양에 따른 생물학적 클로킹은 생물증식에 의한 것으로 대부분 함양수의 수질과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 생물증식에 의한 생물학적 클로킹(bioclogging)은 생물막 형성의 최적 조건과 활동도를 측정함으로써 알 수 있다. 일반적으로 생물막을 형성하는 미생물의 생체량과 활동도는 클로로필-a 농도, 박테리아 직접 계수, ATP 농도, 탈수소효소(dehydrogenase, DHA) 활성도, 종속 영양력, 단일 기질에 대한 최대 비성장률과 전자전달계 활

동도 등의 다양한 직간접 측정법들을 이용하여 측정한다. 특히, 이 중에서 ATP와 탈수소효소 활성도(DHA)은 미생물의 활성을 짧은 시간에 간편하게 간접적으로 측정할 수 있는 매우 효과적인 방법인 것으로 알려져 있다. ATP는 아데노신삼인산(adenosine triphosphate)이라고 하는 고에너지 화합물이며 루시페라아제(luciferase) 반응의 제한 요소인 경우에 빛의 강도는 ATP의 농도에 비례하게 된다. 탈수소효소(DHA)는 모든 생명체가 가지고 있는 효소로 활성도는 TTC(triphenyl tetrazolium chloride), NBT(nitroblue tetrazolium), INT(2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride), 레조아주린(resazurin)과 같은 산화 환원성 염료의 환원에 따른 색변화에 의해 측정되어진다(Bitton, 1996). 이 중에서 TTC를 이용하는 Lenhard (1956)의 방법이 탈수소효소(DHA) 활성도 분석에 가장 많이 이용되고 있는데, 이 방법은 토양 미생물에 의해 열은 노란색을 띠는 TTC가 탈수소효소 활동의 환원 반응으로 생성되는 진한 붉은색의 TPF(2,3,5-triphenyl formazan)로 변화도를 이용하여 활성도를 결정한다(Ko, 2004).

산업화 및 도시화에 따라 다양한 종류와 형태의 오염물질들이 인위적으로 생성, 배출되고 있으며 이들에 의한 토양이나 지하수의 오염은 세계적으로 중요한 문제로 인식되고 있다. 특히 중금속은 토양 또는 퇴적물 입자에 흡착되어 중금속 축적을 유발할 뿐 아니라, 수질 오염 및 식생 파괴 등의 2, 3차 오염을 유발할 수 있다. 중금속은 생물체 내 고농도로 축적되어 독성물질로 작용할 수 있으며 생분해되지 않기 때문에 반영구적으로 생태계 내에 잔류하여 악영향을 미칠 수 있다(Koo and Cho, 2006; Rajkumar et al., 2006). 오염 토양은 처리가 용이하지 않으며 지하수 등 주변 수 환경오염을 유발시켜 생태계는 물론 사람의 건강 및 생활환경에 여러 가지 악영향을 줄 수 있다. 또한 오염 토양이나 퇴적물은 인공함양의 관점에서 볼 때 함양지의 생물막 형성에 영향을 줄 수도 있기 때문에 중금속이 다양한 생태계에 미치는 잠재적인 영향에 대한 평가도 필요하다(Katnoria et al., 2008).

본 연구의 목적은 지하수 인공 함양 과정에서 발생할 수 있는 생물학적 클로킹을 평가하기 위해 필요한 생물막 형성 특성 및 중금속 오염물이 미치는 영향을 알아보고자 하는 것이다. 이를 위해 인공함양 예정지의 하상층퇴적 퇴적물 시료를 이용한 생물막 형성 실내 실험 연구가 수행되었다. 생물막 형성 실험은 생물학적 클로킹 조사를 위한 기초 단계의 연구로 수행되었으며, 실험을 통하여 회분식 조건에서 퇴적물 생물막 형성의 최적 조건과 ATP 농도와 DHA 활성도를 측정하여 생물막 형성을 평가하는

방법을 정립하고자 하였다. 또한 이렇게 정립된 방법에 근거하여 중금속 오염물이 생물막 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 하는 것이 연구의 목적이었다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 생물막(biofilm) 형성 최적 조건 실험

인공합양 과정에서 발생하는 생물학적 클로킹의 영향을 평가하기 위하여 낙동강 내 하상층적층으로부터 퇴적물 시료를 채취하여 생물막 형성의 최적조건을 도출하기 위한 실내 실험을 수행하였다. 본 연구에서 기본적인 배양 실험은 접종수(5 mL)와 배지(45 mL)를 혼합하고 접종수로는 연못수, 멸균수 및 순수균주배양액을 사용하였다. 실험에 사용한 하상 층적층 퇴적물 시료는 풍건한 후 유기물 함량(organic matter), 공극률(porosity), 용적밀도(bulk density) 및 pH 등 물리화학적 특성을 토양오염공정시험 기준에 근거하여 분석을 실시하였다(Table 1(a)). 하상층적층 퇴적물 시료의 투수성에 대한 정보를 제공하는 퇴적물 입도분석 결과 중립질 모래(80.8%)로 대부분 구성되어 있었다(Table 1(b)).

회분식 조건에서 생물막 형성 최적 조건을 조사하기 위하여 하상층적층에서 채취한 퇴적물 시료를 풍건 후 사용하였다. 먼저 풍건된 퇴적물 시료의 생물막 형성에 필요한 최적 배양기간을 알아보기 위하여 100 mL 삼각 플라스크에 퇴적물 20 g, 연못수 5 mL, 배지 45 mL를 주입하여 혼합한 후 강하게 흔들어서 산소를 공급하고 교반기를 이용하여 25°C, 130 rpm 조건하에 암소에서 10~40일 동안 배양 실험을 실시하였다. 배양하는 기간 동안 반응 용기내로 이물질이나 다른 균의 유입을 방지하는 한편 산소의 투과가 원활하도록 삼각플라스크를 호일로 덮어 마개와 같은 역할을 하도록 하였다. 또한 반응 용액에 산소 공급이 잘 이루어지도록 실험 초기와 배양기간 동안 하루에 1~2회 강하게 흔들어 혼합을 하고 10일 간격으로 배양 용액에 대한 조사를 하였다. 생물막 형성 최적 조건 도출 실험을 위하여 사용된 배지는 MSM(minimum salt medium;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g +  $CaCl_2$  0.1 g +  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 mg +  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.25 mg +  $K_2HPO_4$  0.43 g +  $KH_2PO_4$  0.23 g in distilled water 1000 mL)을 사용하였다. 생물막 형성에 있어 배지 성분이 회분식 조건에서 미치는 영향을 조사하기 위하여 yeast extract를 각각 0.1%와 0.5%를 첨가한 MSM에 대한 실험도 추가로 수행하여 결과를 비교하였다.

생물막이 형성되는 최적 조건 실험에 있어서 퇴적물 내

**Table 1.** The characteristics of sediment and pond water used in the study

(a) Physicochemical properties of sediment	
Parameters	Value
organic matter (%)	0.30
pH	6.41
bulk density ( $g/cm^3$ )	1.647
porosity	0.39
(b) sediment particle size distribution	
Opening (mm)	Proportion (% wt.)
fine sand (< 0.300)	13.2
medium sand (0.3-1.7)	80.8
coarse sand (> 1.7)	6.0
(c) Properties of pond water	
Parameters	Value
T-N (mg/L)	154.6
COD <sub>Mn</sub> (mg/L)	4.6
pH	7.81
Total coliform (MPN/100 mL)	1300

에도 생물막 형성을 위한 미생물이 존재하지만 생물막 형성이 보다 잘 이루어지기 위해서 필요한 배지 내 적정 접종수의 영향에 대한 실험도 수행하였다. 접종수로는 멸균수(DW: distilled water), 연못수(PW: pond water) 및 순수균주배양액(BC: broth culture)를 실험에 이용하여 생물막 형성에 대한 영향을 비교 분석하였다. 접종수로 이용한 연못수는 생물막 형성이 비교적 잘 이루어질 것으로 판단되는 영남대학교 내 자연자원대 연못의 물을 채취하여 이용하였으며 그 특징은 Table 1(c)에 나타나 있다. 일정한 균주 농도( $O.D_{600} = 0.2$ )의 순수균주배양액(BC)을 사용하는 경우의 실험에 있어서는 접종수 주입량(0.05~0.5 mL)에 따른 영향을 비교 분석하였다.

### 2.2. 생물막 형성도 분석

생물막 형성도는 생물량 간접 측정법인 ATP 농도와 DHA 활성도에 대한 측정 방법을 이용하여 확인하는 기법을 정립하였다. 생물막 형성 실험에 사용된 퇴적물은 분석하기 전 세척(0.85% NaCl)의 여부에 따라 생물막 형성도 측정 결과에 미치는 영향도 비교 분석하였다.

ATP 분석법 조사를 위해 퇴적물을 5분간 초음파(D250H, 대한과학) 처리하여 추출한 생물막의 ATP 추출에 끓인 탈이온수의 양이 미치는 영향을 조사하였다(Yang et al., 2002). 추출한 생물막 100  $\mu$ L를 10,000 g로 10분간 원심분리(CF-10, 대한과학)를 한 후, 세포 침전물에 끓

인 탈이온수를 각 1, 2, 3, 4, 5 mL씩 주입하여 강하게 혼합하였다. 본 연구에서는 기존의 연구결과(Yang et al., 2002)에 근거하여 끓인 탈이온수의 최소량을 1 mL로 결정하여 실험을 수행하였습니다. 또한 ATP 측정에 사용하는 시료량이 200  $\mu$ L(triplicate; total 600  $\mu$ L)이기 때문에 최소량을 1 mL로 설정하는 것이 적절할 것으로 판단되었다. 이후 다시 원심분리(10,000 g, 10 min)하고, 200  $\mu$ L를 분취하여 ATP를 포함하지 않는 물(free water) 100  $\mu$ L와 Luciferase/Luciferin(FF2000, promega) 200  $\mu$ L를 주입하여 발광측정기(Luminometer: TD-20/20, Turner Design, USA)를 이용하여 발광도를 측정하였다. 측정된 발광도는 ATP 검량선을 이용하여 ATP 양으로 환산하여 계산하였다. 발광도의 ATP 환산에 이용된 ATP 검량선은 다음과 같이 작성되었다. 먼저 ATP 표준용액  $10^{-7}$ M(Promega Co., USA)을 연속적으로 희석하여 ATP bioluminescence assay를 실시하였으며 발광측정기(luminometer)의 생물발광도(bioluminescence, RLU) 값을 측정하여 검량선을 작성하였다. 이때 검량선은  $10^{-11}$ ~ $10^{-7}$ M의 ATP 농도 범위에서 생물발광도(RLU) 값을 로그 그래프로 표시하여 검출 가능함을 알 수 있었다.

DHA 활성화에 어떤 형태의 시료가 적절한지 알아보기 위하여 퇴적물과 퇴적물 생물막 추출액을 이용한 실험을 수행하여 그 결과를 비교하였다. DHA 활성을 위하여 각각의 시료에 탄산칼슘( $\text{CaCO}_3$ )과 TTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride: Sigma Co., USA)를 첨가한 후 강하게 혼합하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 마개를 제거한 후 메탄올 10 mL를 넣고 혼합하여 20분간 교반하였다. 이러한 혼합 과정을 거치면 메탄올에 의해 탈수소 효소가 추출되면서 반응 용액이 붉은 색으로 변하게 되는데 이를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 485 nm에서 자외선가시선 흡광기(UV Visible Spectrophotometer: UVmini-1240, Shimadzu)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 TPF(1,3,5-triphenylformazan(Sigma Co., USA)의 검량선을 이용하여 DHA 활성도를 정량화하였으며 시료 조건별로 그 값을 비교 분석하였다(Hong et al., 2011).

ATP 함량과 DHA 활성으로 조사한 생물막 형성도는 퇴적물 생물막 추출액에 대한 생균수를 도말평판법(spread plate method)을 이용하여 계수하여 비교하였다. 이때 실험에 사용된 배지는 R<sub>2</sub>A(yeast extract 0.5 g, proteose peptone No. 3 0.5 g, casamino acids 0.5 g, dextrose 0.5 g, soluble starch 0.5 g, sodium pyruvate 0.3 g, dipotassium phosphate 0.3 g, magnesium sulfate 0.05 g, agar 15 g, 증류수 1000 mL)이었으며, 실험과정은 생물막 추출액을

0.85% NaCl로 단계적( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ 배) 희석한 후 0.1 mL를 분취하여 평판에 가한 후 멸균된 하키 스틱으로 분산 도말한 후 25°C에서 24시간 배양하여 계수하였다.

### 2.3. 중금속이 생물막 형성에 미치는 영향

생물막 형성 실험을 통해 얻어진 최적 조건에 근거하여 퇴적물 생물막 형성에 As(III), Cu, Cd의 단일 중금속이 미치는 영향을 조사하였다. 일반적으로 As(III), Cu, Cd은 생물 독성이 강한 중금속으로 알려져 있으며  $\text{Na}_2\text{HAsO}_2$  (Sigma, 96%),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Yakuri, 97%),  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Junsei, 98%) 등의 중금속염이 실험에 사용되었다.

중금속이 생물막 형성에 미치는 영향은 미국 환경청 노출평가모델링(US EPA's CEAM; Center for Exposure Assessment Modeling)에서 제공하는 SPEARMAN(Trimmed Spearman Karber method) 프로그램을 사용하여 EC<sub>50</sub>(균주의 50% 발광 억제를 나타내는 농도)으로 나타내었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 생물막 형성도 측정법 평가

본 연구에서는 연구 대상 시료인 인공함양 지역의 하상층 퇴적물 시료에 대한 생물막 형성 정도를 ATP 함량 및 DHA 측정 결과에 근거하여 비교 분석하여 최적 분석 방법을 정립하였다.

퇴적물 생물막 ATP 추출에 주입되는 끓는 물의 양이 ATP 측정 결과에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 초음파처리를 통해 추출된 생물막을 원심분리한 후 세포 침전물(cell pellet)에 끓는 물 1, 2, 3, 4, 5 mL를 주입하여 ATP 측정 결과를 비교하였다(Fig. 1). 실험 결과 끓는 물 1 mL를 첨가하였을 때 생물발광은  $368 \pm 65.8$  RLU로 2~5 mL 첨가하였을 때( $98 \pm 30.7$ ~ $178 \pm 67.0$  RLU)보다 약 2.1~3.8배 발광을 높게 나타냈다. Yang et al.

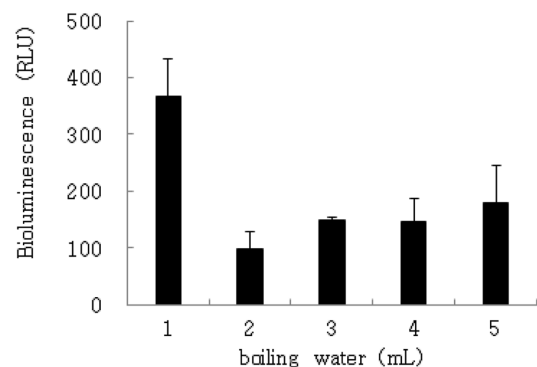


Fig. 1. Effects of boiling water quantity on ATP extraction.

(2002)은 ATP 추출에 이용되는 용액의 종류와 농도에 따른 영향을 알아보기 위하여 탈이온수, 2% HClO<sub>4</sub>, 0.0005% HClO<sub>4</sub>, Lysis buffer, PBS 등의 시약을 다양한 농도 범위에서 사용하여 ATP 농도를 측정하였다. 실험 결과에 따르면 측정된 상대강도(relative intensity)는 각각의 용액에서 100±6.7%, 1.0±0.0%, 101±0.1%, 5.0±0.2%, 9.9±0.3%이었으며 따라서, 탈이온수와 0.0005% HClO<sub>4</sub>가 ATP 추출에 적합한 용액임을 알 수 있었다. 이중 ATP 추출에 적합한 끓는 탈이온수를 사용하여 추출하였을 경우 그 안정성이 30분 정도 지속되었으며 60분까지도 끊이지 않는 탈이온수를 사용하였을 때보다 지속률이 높은 것으로 나타났다. 따라서 Yang et al.(2002)과 본 실험 결과를 종합한 결과 퇴적물 생물막 ATP 추출에는 끓인 탈이온수(DW)를 사용하는 것이 적합하며 본 연구의 실험조건에서는 1 mL인 경우 가장 높은 생물발광을 나타내었다.

DHA 활성은 오염물이 미생물 생장에 미치는 정도를 정량적으로 측정하여 퇴적물 중금속 오염 정도를 평가하는 지표로 사용되며, 미생물의 호흡활동과 밀접한 관련이 있어 미생물의 활성을 측정할 수 있는 우수한 방법 중의 하나로 보고되고 있다(Mresi and Schimmer, 1991; Wyszowska et al., 2005). 본 실험에서는 연구 대상 퇴적물 시료에 적합한 DHA 측정 방법을 알아보기 위하여 먼저 생물막 형성 퇴적물 자체와 퇴적물 생물막 추출액에 대한 DHA 활성도를 비교하였다. DHA 활성도 비교 실험을 위하여 먼저 접종수의 양을 퇴적물과 생물막 추출액에 각각 0, 0.05, 0.1, 0.5 mL로 주입하여 10일 간 배양한 후 TPF 농도를 분석하여 활성도를 비교하였다(Fig. 2). 실험 결과 접종수 주입량이 각각 0, 0.05, 0.1, 0.5 mL일 때, 퇴적물 자체를 이용하여 DHA 활성을 분석한 결과 TPF 양이 각각 12±0.9, 15±3.3, 15±5.5, 12±2.2 µg/g의 값을 얻을 수 있었으며, 퇴적물 생물막 추출액의 경우에는 각각 7±1.7, 3±0.7, 3±0.5, 3±1.1 µg/g으로 조사되었다. 따라서 두 종류의 시료에 대한 DHA 활성도 비교 분석 결과, 퇴적물과 퇴적물 생물막 추출액의 DHA 활성은 각각 평균 13±1.7 µg/g과 4±1.9 µg/g로 퇴적물만으로 실험한 경우의 활성도가 생물막 추출액의 것에 비해 3.3배 높았다. DHA 활성도에 Student t test를 수행한 결과 통계적으로 뚜렷한 유의성( $p = 0.0015$ )을 보여주어 퇴적물과 퇴적물 생물막 추출액의 DHA의 활성도는 명확한 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 두 종류의 시료에 첨가된 접종수의 양에 따라서는 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. 이러한 실험 결과로부터 연구대상 하상층적층 퇴적

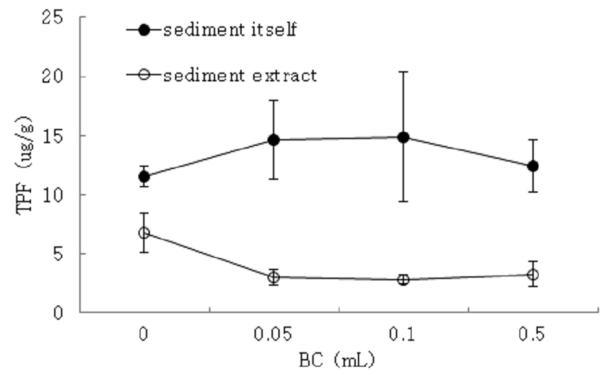


Fig. 2. DHA activity of soil itself and soil extract at different volume of inoculating water.

물 시료에 대한 DHA 활성도는 퇴적물을 직접 사용하여 측정하는 것이 적절한 것으로 사료되었다.

ATP와 DHA 측정 과정에서 퇴적물 시료를 멸균된 0.85% NaCl로 2~3 차례 세척하는 것과 그렇지 않은 경우에 대한 분석값의 차이가 발생하는지 알아보기 위한 실험도 실시하였다. 10일 동안의 생물막 형성 기간 후 세척 과정의 유무에 따른 ATP 농도는 각각 평균 4±1.3 ng/g, 3±1.4 ng/g( $p = 0.4114$ )의 결과를 보여주었으며, DHA 활성도 분석 결과는 TPF가 각각 평균 12±1.6 µg/g, 15±3.3 µg/g( $p = 0.2752$ )로 조사되었다. 분석된 평균값에 근거할 때 ATP 농도는 세척을 하지 않은 경우가 세척을 한 경우의 75%이었으며, DHA 활성도를 나타내는 TPF 농도는 세척하였을 때 세척하지 않은 경우의 80%를 나타내었다. 퇴적물 시료의 세척여부에 대한 실험 결과는 통계적으로 유의하지 않고 상반된 결과를 나타내어 ATP와 DHA 측정 과정에 세척여부가 어떤 영향을 준다는 결론을 얻을 수는 없었다. 하지만 본 실험에서는 퇴적물 시료 내 부유균의 영향을 최대한 배제하기 위해서는 생물막 형성도 측정 시 퇴적물을 세척 후 분석에 사용하는 것이 비교적 적합할 것으로 판단하여 실험을 수행하였다. 본 연구를 통해 정립한 생물막 형성도 분석 방법을 Fig. 3에 나타내었다.

### 3.2. 생물막 형성 기초 조사

인공함양 대상지역에서 채취된 하상층적층 퇴적물에 대한 최적 생물막 형성 조건을 규명하기 위하여 세 가지 다른 접종수와 배양 기간을 달리하여 이러한 인자가 생물막 형성에 미치는 영향을 비교 분석하였다. 접종수의 종류에 따른 영향을 규명하기 위하여 대상 퇴적물 시료에 접종수인 탈이온수(DW), 연못수(PW), 순수균주배양액(BC)를 각각 5 mL와 배지 45 mL를 주입하여 10~40일간

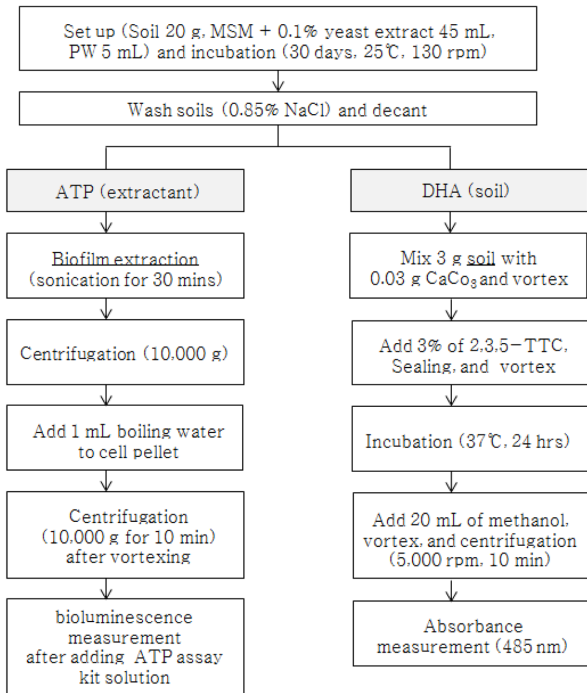


Fig. 3. Protocol for the measurement of ATP and DHA.

배양한 후 ATP와 DHA 값에 근거하여 생물막 형성도를 비교하였다(Fig. 4).

생물막 배양 기간(10, 20, 30, 40일)에 따른 ATP와 TPF의 평균값을 비교한 결과를 살펴보면 탈이온수(DW)에서 각각 3.8 ATP ng/g, 16.9 TPF µg/g, 연못수(PW)에서 각각 9.3 ATP ng/g, 20.1 TPF µg/g, 그리고 순수균주배양액(BC)에서 각각 9.0 ATP ng/g, 18.8 TPF µg/g으로 연못수(PW)가 접종수로 사용된 조건에서 가장 높은 값을 나타내었다. 그러나 ATP 측정 결과를 보다 자세히 살펴보면 탈이온수의 경우 배양 기간에 따른 별다른 차이를 보여주지 않았지만, 연못수에서 40일 배양하였을 때 30일 배양한 것보다 ATP가 50% 이상 감소하는 것을

제외하고는 연못수와 순수균주배양액 두 가지 경우 모두 배양 기간이 증가할수록 전반적으로 증가하는 양상을 보여주었다. DHA 활성은 TPF 양이 16~24 µg/g으로 유사한 값의 분포를 보여주어 오차범위를 고려했을 때 접종수와 배양 기간에 별로 영향을 크게 미치지 않는 것으로 조사되었다. 일반적으로 퇴적물에 생물막을 형성시키는 경우 배양 기간을 10일 이상으로 하는 연구 결과(Lee and Chon, 2000)와 본 연구를 통해 얻어진 ATP 값에 근거한 생물막 형성을 위한 최적 배양 기간은 30일 정도가 적절한 것으로 판단되었다.

최적 배양 기간인 30일의 실험결과를 보면, 접종수 종류에 따른 영향은 탈이온수(DW)가 각각 평균 4.7 ATP ng/g, 15.6 TPF µg/g, 연못수(PW)는 각각 22.2 ATP ng/g, 16.6 TPF µg/g, 그리고 순수균주배양액(BC)이 각각 13.8 ATP ng/g, 15.5 TPF µg/g으로 측정되어 ATP 함량과 DHA 활성에서 모두 연못수(PW)에서 높게 나타났다(Fig. 4). 이는 순수 균주만 존재하는 순수균주배양액(BC)과 균주가 없는 탈이온수(DW)와는 달리 연못수(PW)의 경우에는 다양한 종류의 토착 미생물들이 존재하므로 이들이 퇴적물 생물막 형성에 미치는 영향이 가장 높게 나타나기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 향후 생물막 형성 실험에서는 생물막 형성이 보다 용이하게 이루어질 수 있도록 하기 위하여 연못수(PW)를 접종수로 사용하였다.

생물막 형성에 배지 성분이 미치는 영향을 조사하기 위하여 회분식 조건에서 MSM 배지에 yeast extract를 각각 0.1%와 0.5%를 첨가한 실험을 수행하여 비교 분석하였다. 비교 실험은 MSM에 yeast extract의 농도(0.1, 0.5%)를 조절한 반응용액을 10일 간 배양하고 TPF 양에 의해 나타내어지는 DHA 활성도를 비교하여 그 영향을 알아보았다. DHA 활성도는 접종수로 연못수(PW)와 순수균주배양액(BC)를 이용한 경우 yeast extract 0.1%를 첨가하였을 때 TPF는 각각 29 ± 3.4 µg/g, 33 ± 3.5 µg/g이었으며, 0.5%

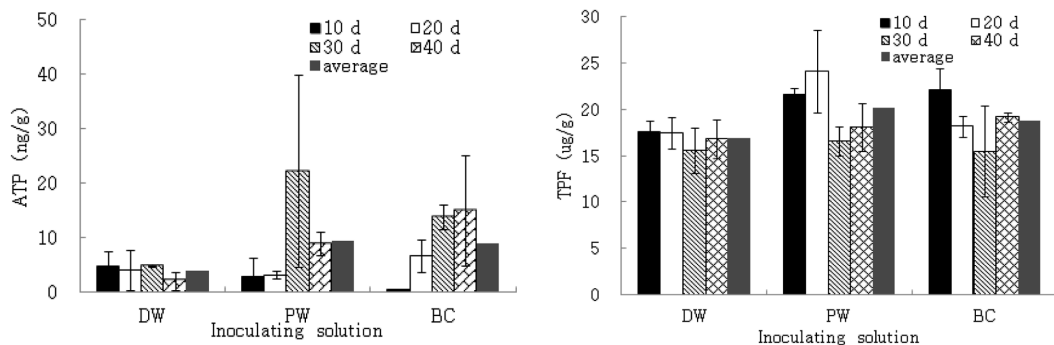


Fig. 4. Effects of inoculating solutions and incubation times on biofilm formation based on ATP content and DHA.

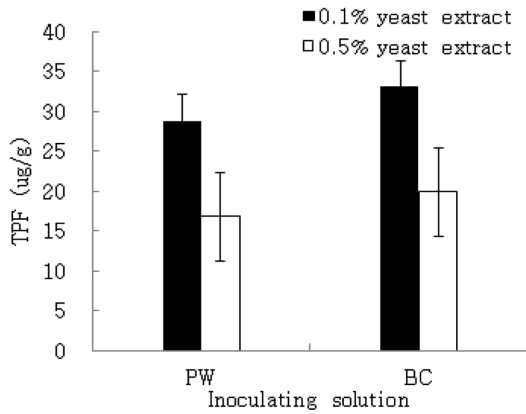


Fig. 5. Effects of yeast extract on biofilm formation, based on DHA activity.

를 첨가하였을 때 각각  $17 \pm 5.5 \mu\text{g/g}$ ,  $20 \pm 4.4 \mu\text{g/g}$ 로 조사되었다. 비교실험 결과 DHA 활성은 MSM 배지에 yeast extract 0.5% 주입한 경우에 0.1% 주입하였을 때의 60% 정도로 낮은 측정값을 보여주었다. 따라서 MSM에 yeast extract를 0.1% 첨가한 실험 조건이 생물막 형성에 적합한 조건임을 확인하여 이후 회분식 생물막 형성 기초 실험에서는 이러한 조건을 적용하여 실험을 수행하였다 (Fig. 5).

3.3. 중금속이 생물막 형성에 미치는 영향 조사

생물막 형성의 최적 조건 및 분석 방법에 근거하여 퇴적물 생물막 형성에 As(III), Cu, Cd 중금속 오염물이 미치는 영향을 EC<sub>50</sub>(균주의 50% 발광 억제를 나타내는 농도)을 조사하여 알아보았다. 이때 중금속 농도는 0, 1, 10, 50, 100 mg/L로 노출하여 실험을 수행하였다. ATP 함량을 이용하여 측정된 결과는 모든 중금속에 있어 농도 증가에 따라 뚜렷한 ATP 감소가 관찰되었으며, 특히 Cu와 Cd은 0~1 mg/L의 농도 범위에서 ATP 농도가 크게 감소하는 특징을 보여주었다(Fig. 6). 실험결과 얻어진 EC<sub>50</sub>은 As(III)이 1.52 mg/L, Cu은 0.62 mg/L, 그리고 Cd는 0.83 mg/L로 조사되었다. 순수균주(*E. coli*)의 발광에 근거한 As(III), Cu, Cd의 EC<sub>50</sub>이 각각 1.11 mg/L, 5.95 mg/L, 1.34 mg/L로 조사된 다른 연구 결과와 비교해보면 중금속별 민감도 및 영향 정도는 다소 상이한 결과를 보여줌을 알 수 있었다(Lee, 2011; Kong and Lee, 2012).

DHA 활성을 이용하여 중금속의 영향을 분석한 실험 결과를 살펴보면 실험에 이용된 As(III), Cu, Cd 모두 중금속 농도 증가에 따라 TPF 농도가 감소되어 생물막 형성 과정에 영향을 받는 것으로 조사되었다. 그러나, 세가지 중금속 모두 DHA활성에 대한 영향이 0~1 mg/L에서

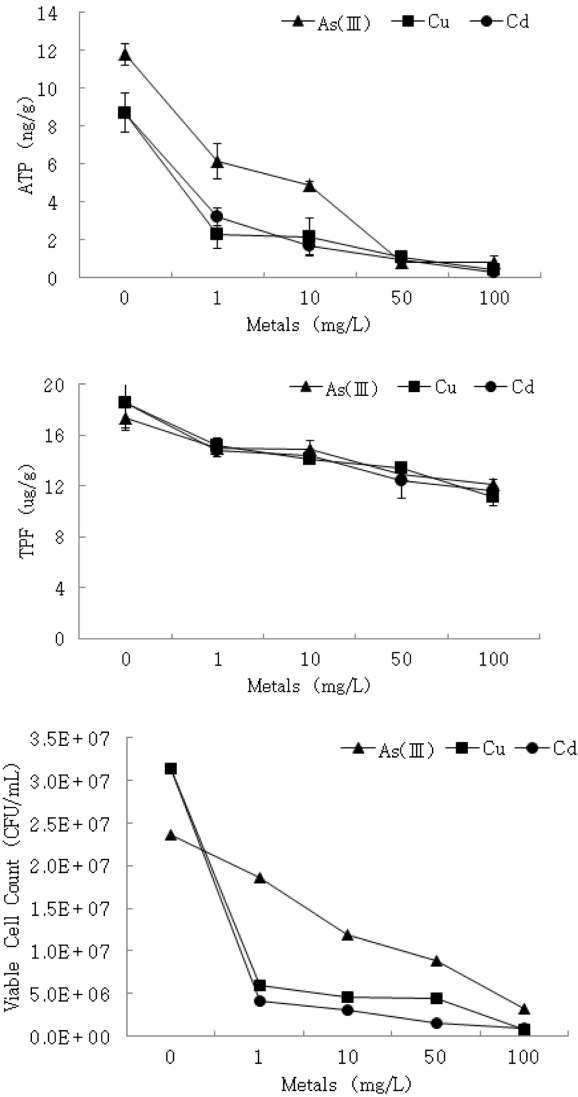


Fig. 6. Effects of metals on biofilm formation based on the ATP content, DHA, and viable cell counts.

만 크게 나타났고, 이후에는 뚜렷한 영향이 관찰되지 않았다. 전체적으로 DHA 활성은 ATP 활성과 다르게 노출한 모든 중금속 농도 조건에서 50% 이상 영향을 받지 않아 EC<sub>50</sub>을 구할 수 없었으며, ATP 분석에 비해 매우 낮은 생물막 형성 측정 민감도를 나타내었다.

중금속이 생물막 형성도에 미치는 영향은 생균수 계수(도말평판법) 변화에 의해서도 관찰되었다. 실험 결과 As(III), Cu, Cd 모두 농도 증가에 따라 생균수도 큰 폭으로 감소하였으며, 생균수 계수를 통해 측정된 EC<sub>50</sub>은 각각 As(III) 11.44 mg/L, Cu 0.60 mg/L, Cd 0.52 mg/L 이었으며, 이는 ATP의 분석 결과와 유사한 경향을 나타내었다. EC<sub>50</sub>이 가장 높게 나온 As(III)가 생균수 계수에

**Table 2.** Comparisons of metals toxicity on biofilm formation at batch experimental condition

	Heavy metal		
	As (III)	Cu	Cd
ATP (EC <sub>50</sub> , mg/L)	1.52 (0.26~8.76) <sup>a</sup>	0.62 (0.55~0.71)	0.83 (0.63~1.08)
DHA (EC <sub>50</sub> , mg/L)	> 100	> 100	> 100
VCC* (EC <sub>50</sub> , mg/L)	11.44 (7.52~17.39)	0.60 (0.54~0.67)	0.52 (0.46~0.59)

\* VCC : Viable Cell Count

<sup>a</sup> Values are the range of the 95% confidence level (low limit ~ high limit)

서도 영향을 적게 받았고, Cu, Cd는 두 분석법에 의한 EC<sub>50</sub>이 유사하게 조사되었다. 따라서 본 연구의 실험을 통해 얻어진 중금속 영향 즉 독성에 대한 결과는 ATP 함량과 생균수 계수 측정에 있어 모두 Cu ≈ Cd > As(III) 순서로 조사되었다(Table 2). 이러한 연구 결과로부터 ATP 분석과 생균수 계수는 DHA 측정보다는 오염물 농도 변화에 매우 민감한 생물막 형성 영향을 나타내었으며 서로 상관관계가 높은 변화를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 6).

#### 4. 결 론

본 연구는 인공함양시스템에서 흔히 발생하는 생물학적 막힘 영향 평가를 위한 기초 실험으로 회분식 실험을 이용하여 퇴적물 표면 생물막 형성을 위한 적정 조건과 생물막 형성 정도를 분석하는 방법에 대해 조사하여 다음과 결론을 도출하였다.

(1) 회분식 실험 조건에서 생물막 형성을 위한 배양 기간은 30일, 집중수로는 연못수(PW), 배지는 0.1% yeast extract를 첨가한 MSM, 생물량 분석 시 퇴적물은 0.85% NaCl로 세척하는 것이 적절한 것으로 조사되었다.

(2) 생물량 분석을 위한 ATP 추출 방법으로 생물막 추출액에 끓는 물 1 mL 첨가하였을 경우 가장 높은 발광이 나타났으며, DHA 활성 측정의 경우 생물막 추출액보다는 퇴적물을 직접 이용하여 분석하는 것이 더 적절한 것으로 확인하였다.

(3) 중금속이 생물막 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, ATP 측정에 근거한 EC<sub>50</sub>은 As(III) 1.52 mg/L, Cu 0.62 mg/L, Cd 0.83 mg/L, DHA 활성에 의한 EC<sub>50</sub>은 As(III), Cu, Cd > 100 mg/L로 조사되었다. 따라서 생물막 형성도 관찰을 위해서는 ATP 함량 측정이 DHA 활성 측정보다 민감한 측정법으로 조사되었으며, 또한 생균수 계수도 ATP 측정과 유사하게 민감한 결과를 나타내었다.

따라서 이러한 연구 결과를 바탕으로 향후 인공함양 시

스템의 생물막 형성 및 막힘 현상에 대한 조사에서 생물막 형성도 측정을 위해서는 ATP 함량 및 생균수 계수 측정법이 보다 적절한 것으로 사료되었다.

#### 사 사

본 연구는 한국지질자원연구원의 주요사업인 '복합 인공함양 기법을 이용한 지하수 확보·활용기술 개발' 과제의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### References

- Bitton, G., 1996, Wastewater microbiology, 2nd ed., Donghwa press, Seoul, pp. 479-488.
- Bu, S.A., Song, S.H., Lee, G.S., Kim, J.S., and Kim, H.B., 2005, A study on prevent seawater intrusion and artificial groundwater recharge, KARICO Rural Research Institute, pp. 59.
- Dillon, P. and Pavelic, P., 1996, Guidelines on the Quality of Stormwater and Treated Wastewater for Injection into Aquifers for Storage and Reuse. Urban Water Research Association of Australia, Research Report 109. ISBN 1 876088 13 3.
- Gale, I., 2005, Strategies for Managed Aquifer Recharge (MAR) in Semi-arid Area, UNESCO IHP, pp. 30.
- Hong, S.H., Lee, S.M., and Lee, E.Y., 2011, Bioremediation efficiency in oil-contaminated soil using microbial agents, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **39**(3), 301-307.
- Huisman, L. and Olsthoorn, T.N., 1983, Artificial Groundwater Recharge, Pitman Press, pp. 320.
- IPCC, 2007, Climate change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Group I, II and III to the Fourth Assessment Report of the International Panel on Climate Change, Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A.(eds), IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 104.
- Katnoria, J.K., Arora, S., and Nagpal, A., 2008, Genotoxic potential of agricultural soils of amritsar, *Asian J. Sci. Res.*, **1**(2),



122-129.

Kim, J.Y., Davis, A., and Kim, K.W., 2003, Stabilization of available arsenic in highly contaminated mine tailings using iron, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 189-195.

Kim, Y. C. and Kim, Y. J., 2009, Artificial recharge of groundwater technical response to climate change, *Water for Future*, **42**(5), 58-65.

Kim, Y.C. and Kim, Y.J., 2010, A review on the state of the art in the management of aquifer recharge, *J. Geol. Soc. Korea*, **46**(5), 521-533.

Kim, Y.C., Kim, Y.J., Mun, D.C., Kang, B.R., Ko, K.W., and Park, K.H., 2008, Jeju-friendly aquifer recharge technology, in proceedings of *The 7th Jeju groundwater academic seminar*, Jeju Institute of Environment, Jeju, pp. 1-27.

Ko, H.K., 2004, Study on the microbial characteristics of municipal biodegradable refuses on the biodegradation process, The Graduated school, Yeungnam University Master's Thesis.

Kong, I.C. and Lee, S.R., 2012, Toxicity assessment of sole or mixture heavy metals and contaminated soil sample from the activity of seed germination, *J. Kor. Solid Waste Manage.*, **29**(6), 527-33.

Koo, S.Y. and Cho, K.S., 2006, Interaction between plants and rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal-contaminated soil, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **34**(2), 83-93.

Lee, J.U. and Chon, H.T., 2000, Bacterial effects on geochemical behavior of elements : An overview on recent geomicrobiological issues, *Econ. Environ. Geol.*, **33**(5), 353-365.

Lee, S.H., 2011, Bioassessment of heavy metal contaminated environment based on the various acute toxicity tests, The Graduated school, Yeungnam University Master's Thesis.

Lenhard, G., 1956, The dehydrogenase activity in soil as a measure of the activity of soil microorganisms, *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, **73**, 1-11.

Mresi, W. and Schinner, F., 1991, An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazilium chloride. *Biol. Fertil. Soils*, **11**, 210-220.

Pyne, R.D.G., 2005, Aquifer Storage Recovery: A Guide to Groundwater Recharge Through Wells, 2nd ed, ASR Systems, pp. 608.

Rajkumar, M., Nagendran, R., Lee, K.J., Lee, W.H., and Kim, S. Z., 2006, Influence of plant growth promoting bacteria and Cr<sup>6+</sup> on the growth of Indian mustard, *Chemosphere*, **62**(5), 741-748.

Wyszkowska, J., Kucharski, J., and Boros, E., 2005, Effect of nickel contamination on soil enzymatic activities, *Plant Soil Environ.*, **51**, 523-531.

Yang, N.C., Ho, W.M., Chen, Y.H., and Hu, M.L., 2002, A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP, *Anal. Biochem.*, **306**(2), 323-327.