



Research Paper

Ars Genotype of Arsenic Oxidizing Bacteria and Detoxification

Jin-Soo Chang^{1†} · Hyun-Jung Kim¹ · Won-Seok Kim^{2,3} · Seyong Lee^{4,5}

¹Molecular Biogeochemistry Laboratory, Biological & Genetic Resources Institute (BGRI), Sejong, Republic of Korea

²Research Institute, NCSQUARE, 77, Chenogam-ro, Nam-gu, Pohang, Republic of Korea

³Division of Advanced Nuclear Engineering, POSTECH, 77, Cheongam-ro, Nam-gu, Pohang, Republic of Korea

⁴Chungju chemical disaster joint prevention center, Chungju regional environmental management office, Republic of Korea

⁵Training and education team, National institute of chemical safety, Republic of Korea

(Received April 1, 2024; Revised April 14, 2024; Accepted April 15, 2024)

Objectives : The objectives of this study is bioremediation and detoxification of arsenite using arsenic resistance system (*ars*) genotypes of Arsenic Oxidizing Bacteria (AOB) isolated from highly As-contaminated mine.

Methods : Bacterial strains that are resistant to arsenic were isolated from the Samkwang mine. The identification of AOB was conducted by analyzing the 16S rRNA gene using universal primers. To determine the genotypes of the arsenic resistance system (*ars*), specific primers were used for each gene. The extent of arsenic resistance was measured, and the efficiency of arsenite oxidation was assessed through a batch test. Arsenic concentration was measured using ICP-MS.

Results and Discussion : The arsenic concentrations at site 1 of the Samkwang mine were found to be 1,322 mg/kg. This concentration is 26.4 times higher than the standard for soil pollution concerns (50 mg/kg) and 8.8 times higher than the standard for soil pollution measures (150 mg/kg). The appropriate remediation is studied such as bacterial remediation. The three efficient AOBs were identified as *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870), *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK4 (MF928873), *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881), respectively. The arsenic resistance system (*ars*) genotype were detected, which is the leader genes of the arsenic oxidation system (*arsR* and *arsD*), and the membrane gene (*arsB*). The *arsB* is involved in the encoding of the efflux/influx pumping system and moves arsenite into the bacterial cells. Arsenite-oxidizing (*aox*) genes are activated to oxidize arsenite into arsenate. The AOBs biotransform arsenite to arsenate with the regulation of *ars* genes, which detoxify highly As-contaminated mine.

Conclusion : The AOBs from Samkwang mine are known for their resistance to highly toxic arsenic environments. They play a crucial role in the bioremediation of abandoned mines by transforming As(III) into As(V) through biotransformation.

Keywords : Arsenic oxidizing bacteria (AOB), Arsenic resistance system (*ars*) genotype, Bioremediation, Detoxification

The Korean text of this paper can be translated into multiple languages on the website of <http://jksee.or.kr> through Google Translator.

† Corresponding author

E-mail: jinsoosu@daum.net

Tel: 044-864-0416 Fax: 044-864-0417

© 2024, Korean Society of Environmental Engineers



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

연구논문

비소 산화 박테리아의 유전자입과 비소 독성 저감 연구

장진수^{1*} · 김현정¹ · 김원석^{2,3} · 이세용^{4,5}

¹생물유전자원연구소 분자지구화학연구소

²엔씨스퀘어 연구소

³포항공과대학교 첨단원자력공학부

⁴포항주기방환경관리청 총주화학재해합동예방센터

⁵국립화학물질안전원 훈련교육팀

목적: 비소내성시스템 (arsenic resistance system: *ars*) 기능을 갖고 있는 비소 산화 박테리아 (Arsenite Oxidizing Bacteria: AOB)를 고농도의 비소로 오염된 폐광산에서 순수 분리하여 활용함으로써 비소 독성을 저감하고 생물학적 복원 가능성을 제시하는 것이 본 연구의 목적이다.

방법: 삼광광산에서 비소 내성 박테리아 균주들을 순수 분리하였고, 비소산화 효율이 높은 박테리아를 선별하였다. 순수 분리된 미생물의 비소내성시스템 유전자 탐지로 기능을 확인하였다. 각 균주의 비소 내성을 측정하였고 비소산화능력의 batch test를 5시간 간격으로 샘플링 하면서 총 50시간으로 실시하여 종 변환 및 독성 저감을 평가하였으며, 비소 농도의 측정은 ICP-MS를 이용하였다.

결과 및 토의: 삼광광산의 총비소농도는 지점1에서 1,322 mg/kg으로 토양오염우려기준(50 mg/kg)을 26.4배 초과하였고 대책기준 (150 mg/kg)을 8.8배 초과하였으며, 다른 샘플링지점에서도 규제기준을 초과하여 적절한 처리가 시급하다. 비소의 생물학적 산화에 탁월한 3개의 박테리아 균주는 Alphaproteobacteria 강 (class)에 속하는 *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870), *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK4 (MF928873), *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881) 이다. 비소내성시스템 유전자는 리더 유전자인 *arsR*과 *arsD*가 탐지되었고, 멤브레인 유전자인 *arsB* 유전자도 탐지되었다. *arsB*는 efflux/influx pumping system의 encoding에 관여하여 3가 아비산염 (arsenite)을 박테리아 세포 안으로 이동시킨다. 비소산화유전자 (*aox*)가 작동하여 3가 아비산염 (arsenite)을 5가 비산염 (arsenate)으로 산화한다. 이러한 비소내성시스템 유전자 (*ars* genotype)의 조절작용을 통하여 비소 산화 박테리아는 독성이 강한 3가 아비산염 (arsenite)을 독성이 약한 5가 비산염 (arsenate)으로 생변환 (biotransformation)한다.

결론: 삼광광산에서 효율이 우수한 비소 산화 박테리아를 확보하였다. 비소 산화 박테리아는 비소의 독성이 높은 환경에 내성을 가지며, 독성이 강한 As(III)을 독성이 약한 As(V)으로 생변환 (biotransformation)하여 폐광의 생물학적 복원에 핵심 역할을 수행한다.

주제어: 비소 산화 박테리아, 비소내성시스템 유전자, 생물복원, 독성저감

1. 서론

비소 (As)는 독성 준금속성 물질로 지하수 및 토양에 많이 분포하며, 전세계적으로 많은 사람들이 다양한 경로로 노출되고 있다.^{1,2} 비소 오염은 사람의 건강과 동식물 생태계에 중대한 위해성 (Risk)을 야기하는 환경 문제이며, 3가 아비산염 (arsenite)의 LD₅₀은 4.5 mg/kg이고, 5가 비산염 (arsenate)의 LD₅₀은 14~18 mg/kg로 보고된다.³ 세계보건기구 (World Health Organization: WHO)는 먹는 물의 무기 비소에 대해 최대 오염 수준 (Maximum Contaminant Level: MCL)을 10 µg/L (=0.01

mg/L)로 설정했으나,⁴ 개발도상국에서 토양과 지하수의 비소 오염은 여전히 심각하다.^{1,5,7} 전세계적으로 비소의 저감을 위해 많은 노력을 기울였으며,^{2,6} 생물학적 처리방법은 친환경적이고 비용대비 처리 효과가 뛰어나 주목을 받고 있다.⁷ 박테리아⁸⁻¹², 플랑크톤¹³, 식물을 이용하는 방법^{4,15} 등이 보고된다.

Alcaligenes faecalis NCIB 8687 (AY297781)⁸은 As(III)를 산화하는 효소 (arsenite oxidase)를 보유하고 있으며 betaproteobacteria에 속한다는 것을 Silver는 보고하였다. *Pseudorhizobium banfieldiae* NT-26⁹는 호주의 금광에서 분리한 gram-negative의 화학무기독립영양 (chemolithoautotrophic) 박테리아로, 최적

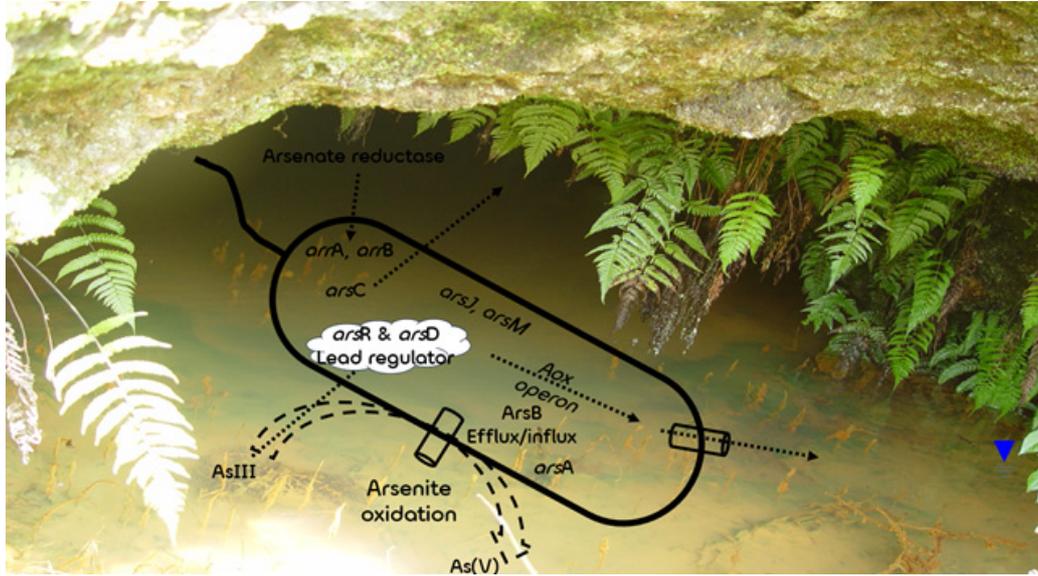


Fig. 1. Schematic diagram of arsenic resistance system (*ars*) function and microorganisms that can purify As-contaminated abandoned mines: *arsR*: a transcriptional regulator¹⁹; *arsD*: an arsenic chaperone & metallochaperone¹⁸; *arsB*, *arsA*: an membrane pump & MFS membrane¹⁸; *arsH*: organoarsenical oxidase²⁰; *arsC*: an cytoplasmic arsenate reductase²³; *arsM*: S-adenosyl-methionine methyltransferase¹⁸; *aox* operon: As(III) oxidizing operon^{18, 22, 24}; *arrA* & *arrB*: an respiratory arsenate reductase subunit²².

pH 5.5에서 As(III)를 periplasmic arsenite oxidase에 의해 As(V)으로 산화되며, 대사과정에서 As(III)를 전자전달계의 전자공여자 (electron donor)로 사용하여 As(V)으로 산화하며, 산소를 전자수용체 (electron acceptor)로 사용하고, CO₂와 HCO₃⁻를 탄소원 (carbon source)으로 사용한다고 보고되었다. *Herminiimonas arsenicoxydans* (AY509588)¹⁰는 고농도의 비소를 함유한 산업 폐수 슬러지에서 분리한 박테리아로 호기성 환경에서 아세테이트, 락테이트, 펩톤을 유기탄소원으로 사용하며 As(III)를 As(V)으로 산화하는 능력을 확인하였다. 덕읍광산의 토양에서 분리한 *Alcaligenes* sp. RS-19 (AY866407)¹¹는 1 mM의 As(III)를 40시간 이내에 As(V)로 산화하는 능력이 있음이 보고되었다. Kepel은 비소로 오염된 토양에서 *Stenotrophomonas* sp., *S. maltophilia*, *Pseudomonas* sp. 그리고 *P. putida* 4 종류의 gram-negative 비소내성박테리아¹²를 분리하였으며 72시간 안에 As(III)를 As(V)로 산화하는 것을 확인하여 생물 복원의 잠재성을 확인하였다.

박테리아를 이용한 비소 처리방법의 원리는 다음과 같이 보고되었다.⁸⁻¹² 산소의 공급이 원활한 호기성 환경에서 박테리아는 독성과 이동성이 높은 3가 아비산염 (As(III), arsenite)을 생변환 (biotransformation)하여 독성과 이동성이 낮은 5가 비산염 (As(V), arsenate)으로 산화시킨다.¹¹ 박테리아가 As(III)를 산화하는 생화학적 원리는 다음의 두가지로 보고되었다.¹¹ 첫 번째 독립영양 (autotrophic) 미생물은 As(III)를 대사과정에서 에너지원으로 사용하여 전자전달계에서 전자공여자 (electron donor)로 사용하는 경우가 있고,⁹ 두 번째 종속영양 (heterotrophic) 미생물이 유기물 (carbon source)을 산화하는 과정에서 As(III)도 같이 산화되어 해독작용 (detoxification)이 되는 경우도 있다. 두 가

지 비소 산화 메커니즘 모두 폐광산의 생물학적 복원에 중요한 역할을 수행한다. 비소의 독성을 무해화하고, 비소의 물을 통한 이동성을 줄여서 토양 복원 공법인 안정화, 고정화¹⁰와 같은 역할을 할 수 있기 때문이다. 산소가 부족한 혐기성 환경에서 비소가 환원상태로 존재할 경우 인체 및 생태계에 대한 독성과 환경 중 이동도가 증가하기 때문에 토양 및 지하수가 혐기성 상태로 있는 심층에서는 지하수를 통한 비소의 확산과 독성 증폭이 문제가 된다.¹⁷

비소의 생물학적 복원을 위한 잠재적 미생물 자원을 확보하기 위해 유전자와 효소에 대한 연구도 활발하다.¹⁸⁻²³ 유전학적 측면에서 비소 내성과 생변환은 박테리아의 비소내성시스템 (arsenic resistance system: *ars*) 유전자에 의해 좌우된다. 삼광 폐광산은 방치되어 있으며 광미 및 수계는 고농도 비소 오염으로 인근 마을 및 주변 생태계는 위험하고 복원이 시급한 실정이다. 본 연구의 목적은 비소내성시스템 (arsenic resistance system: *ars*) 기능을 갖고 있는 비소 산화 박테리아 (Arsenite Oxidizing Bacteria: AOB)를 고농도의 비소로 오염된 폐광산에서 순수 분리하여 활용함으로써 비소 독성을 저감하고 생물학적 복원 가능성을 제시하는 것이다.

2. 실험 방법

2.1. 시료 채취

충청남도 청양군에 위치한 폐광산인 삼광 광산에서 시료를 채취하였다. 샘플링 장소는 Fig. 2과 같고 비소오염 정도는 Table 1과 같다.

Table 1. Levels of arsenic contamination at sampling sites.

Samples	Sites	As Conc. (mg/kg soil) (mg/L water)	Regulatory criteria (mg/kg soil) ¹⁾ (mg/L water) ²⁾		Excess (times)	
			Concern ¹⁾	Measure ¹⁾	Concern	Measure
Control	Dajeon 2	0				
EBC-SK1	Sediment soil	1,322 ± 0.2	50	150	26.4	8.8
EBC-SK4	Sediment soil	459.6 ± 0.5	50	150	9.2	3.1
EBC-SK12	Tailing	3,596 ± 0.3	50	150	71.9	24.0
BGRI-SK6	Water	6.004 ± 0.2 mg/L	0.01 mg/L			600.4

¹⁾Enforcement Ordinance of Ministry of Environment 1032, 토양오염우려기준/대책기준, 2023, <https://www.law.go.kr/>

²⁾Enforcement Ordinance of Ministry of Environment 1061, 먹는물수질기준, 2023, <https://www.law.go.kr/>

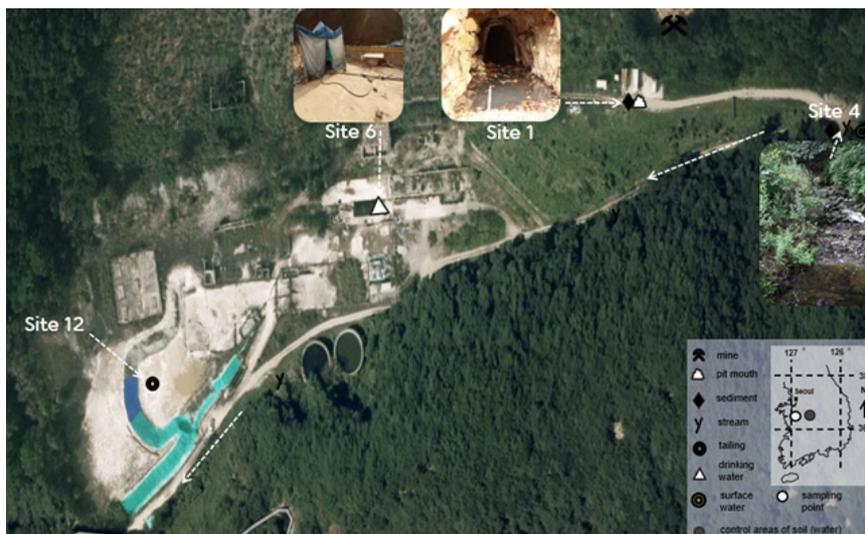


Fig. 2. The location of samples in Samkwang Au-Ag mine the republic of Korea.

2.2. 박테리아 분리 및 비소내성테스트

박테리아를 배양하기 위해 사용한 배지는 3가 비소 (NaAsO₂) 가 함유된 MSB 배지이며, 성분 조성은 기존의 논문²⁰⁾과 동일하며, 다음의 세가지 용액을 혼합하여 제조한다. Solution A: 4.8 × 10⁻⁴ mM Na₂HPO₄ (Sigma, USA) and 1.5 × 10⁻⁴ mM KH₂PO₄ (Sigma, USA); solution B: 3.0 × 10⁻⁴ mM C₁₀H₁₂N₂O₈Na₄·2H₂O, EDTA (Sigma, USA), 2.7 × 10⁻³ mM ZnSO₄·7H₂O (Sigma, USA), 4.0 × 10⁻⁴ mM MnSO₄·H₂O (Sigma, USA), 8.0 × 10⁻⁶ mM CuSO₄·5H₂O (Sigma, USA), 3.5 × 10⁻³ mM Co(N·O₃)·6H₂O (Sigma-Aldrich, USA), 5.4 × 10⁻² MgSO₄·7H₂O mM (Sigma, USA), 2.2 × 10⁻² mM CaCl₂·2H₂O (Sigma, USA), 7.0 × 10⁻⁶ mM (NH₄)₆Mo·7H₂O (Junsei, Japan), 3.0 × 10⁻⁴ mM FeSO₄·8H₂O (Sigma, USA), 1.0 · 10⁻⁴ mM Cl₂H₁₇C₁₂N₄OS-HCl, Tiamine HCl (Sigma, USA), 1.0 × 10⁻⁴ mM Biotin (Sigma, USA), 1.8 × 10⁻² mM KNO₃ (Junsei, Japan) and 1.7 × 10⁻⁴ mM NaCl (Sigma-Aldrich, USA); solution C: 1.5 × 10⁻⁴ mM (NH₄)₂SO₄ (Sigma, USA) 또 MSB 배지 (pH 7, 30 °C, 호기성 환경)에 1 mM의 D(+)-glucose 를 carbon source로 첨가하였다. 비소 내성 실험은 3가 아비산염 (NaAsO₂)의 다음 농도에 대해 실시하였고 (0, 5, 10, 15,

20, 26 mM), 5가 비산염 (Na₂AsO₄)의 다음 농도에 대해 실시 하였다 (0, 5, 10, 15, 20, 26, 40, 53, 66.7 mM).

2.3. 16S rRNA 유전자 분석 및 ars genotype 발현 분석

형태학적으로 단일한 선별된 균주로부터 genomic DNA extraction kit (GeneAll)을 이용하여 16S rRNA 유전자를 추출 하여 PCR로 증폭하였다. PCR 수행 프로그램은 다음과 같다. 1) (초기 DNA 변성) 5분 95 °C, 2) (35회 반복수행) 1분 94 °C, 1분 55 °C, 1.5분 72 °C의 1회 주기, 3) (마지막 신장, final extension) 7분 72 °C.

증폭된 16S rDNA 유전자를 PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였으며, 정제된 염기 산물은 ABI PRISM 3100 업그레이드 DNA 염기서열분석 (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts)를 사용하여 유전자 서열분석을 실시하였다. 비소내성시스템 유전자 (ars genotype)탐지는 겔 전기영동 (gel electrophoresis)으로 PCR 산물을 분석하여 실시하였다. 첫 번째 동정을 위하여 다음의 두가지 범용 primer를 사용 하였다. BGRI-09 sense (5'-ATC ATG GCT CA ATT GAA CGC-3')와 BGRI-15 antisense (5'-T ACC TTG TTA CGA

Table 2. Oligonucleotide primers used for amplification of the arsenic-resistant system genes.

Amplified region ¹⁾	Primer sequence ²⁾	T _m ^b (° C)
BGRI 0904 <i>ars</i> Sense (universal) BGRI1558 <i>ars</i> Anti-sense (universal)	5' - ATC ATG GCT CAG ATT GAA CGC - 3' 5' - T ACC TTG TTA CGA CTT CTA CCT - 3'	55
BGRI 0609 <i>arsR</i> Sense BGRI 0310 <i>arsR</i> Anti-sense	5' - ATC CAG CTC TTC AAA ACC - 3' 5' - GTT TTT CAG CTT CAT AC - 3'	53
BGRI 0725 <i>arsD</i> Sense BGRI 0726 <i>arsD</i> Anti-sense	5' - ATG TGC TGC AGT ACC GCC GT - 3' 5' - TAT TAC CAC CAC AGC AAC - 3'	60
BGRI 0923 <i>arsA</i> Sense BGRI 1230 <i>arsA</i> Anti-sense	5' - ACC CAC GCT TAG CAA TAT CAT CGA - 3' 5' - TGA AAG TCT TCA TAT AGG TCT TCC - 3'	55
BGRI 0929 <i>arsB</i> Sense BGRI 0226 <i>arsB</i> Anti-sense	5' - GTG GAA TAT CGT CTG GAA TGC GAC - 3' 5' - GGT AAT TTT CGG CCC CAA ATC G - 3'	57
BGRI 1117 <i>arsC</i> Sense BGRI 0822 <i>arsC</i> Anti-sense	5' - TGC GGC ACT TCG TGA AAC AC - 3' 5' - AAG TAT ATC CAG AAC CAC TT - 3'	57
BGRI 0507 <i>arsH</i> Sense BGRI 1103 <i>arsH</i> Anti-sense	5' - ATG GAC CAG TTC CCA GAC - 3' 5' - CTG ATT GGG GAT GGT GAA CA - 3'	55
BGRI- <i>arrA</i> Sense BGRI- <i>arrA</i> Anti-sense	5' - CTT TGA AGA AAT TCA AAC GTA CG - 3' 5' - TCA AAG TTT CGC TGT AAA ACT CA - 3'	59
BGRI- <i>arrB</i> Sense BGRI- <i>arrB</i> Anti-sense	5' - AAC ACG AAC GAC GGT ATT CAC TGG - 3' 5' - ATA CCT TGC TCT GTG GAT CAT CTA - 3'	59
BGRI- <i>aroA</i> Sense BGRI- <i>aroA</i> Anti-sense	5' - GT ATG TCA CGT TGT CAA AAC - 3' 5' - TTA TAG AAC GTT GGA CAG AC - 3'	59
BGRI- <i>aroB</i> Sense BGRI- <i>aroB</i> Anti-sense	5' - ACT CTT CAC CTA TAT CGC CGA - 3' 5' - TTC TCG TAA CCG AAC ATG ACA - 3'	59
BGRI- <i>aoxS</i> 0507 Sense BGRI- <i>aoxS</i> 0705 Anti-sense	5' - TTC ATC ATC TCC GAA CGC GTA TTG - 3' 5' - TTG CGT TTA GCA CGA GGT TCA AAA - 3'	59
BGRI- <i>aoxR</i> 0725 Sense BGRI- <i>aoxR</i> 1103 Anti-sense	5' - AAT CGC TCA TCC AGC GAC TTT CGC - 3' 5' - TTG CGT CCT CGC CAA GCG TAC TGA - 3'	57
BGRI- <i>aoxA</i> 0415 Sense BGRI- <i>aoxA</i> 1106 Anti-sense	5' - ATA AAG TAA GTC GTC GCA ATT - 3' 5' - GAG CTG AAT CTG AGG CAG ATT - 3'	55
BGRI- <i>aoxB</i> 0125 Sense BGRI- <i>aoxB</i> 1022 Anti-sense	5' - TGC GGC TAC CAC GCC TAC ACC - 3' 5' - TGC CCC AGG TGT TTT CGT AAC - 3'	59
BGRI- <i>aoxC</i> 0710 Sense BGRI- <i>aoxC</i> 1118 Anti-sense	5' - TGG CAT CGG GAG GAG GAT - 3' 5' - TGA CCT GGG AAG TAT GGC - 3'	57
BGRI- <i>aoxD</i> 1025 Sense BGRI- <i>aoxD</i> 1124 Anti-sense	5' - ATA TGC CAT TGC TAT TTG - 3' 5' - TAC TTG GCT CCA GCC AAT - 3'	57

¹⁾GenBank sequence similarity was evaluated using the BLAST program. (BLAST; National Center for Biotechnology Information [http://www.ncbi.nlm.nih.gov].

²⁾T_m, annealing temperature used in PCR cycle.

CCT-3'). 두 번째, 비소내성시스템 유전자 (*ars* genotype) 탐지를 위하여 사용된 primer는 다음 Table 2과 같다.²⁰⁾

2.4. 비소 산화 박테리아의 계통발생학적 분석

분석된 염기서열 정보를 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 사용하여 유전자 서열의 유사성 검사를 수행하였다. 그 후 Mega X 프로그램을 이용하여 염기서열들을 정렬하고 계통도는 MegaX에서 neighbor-joining 방법을 이용하였다.²¹⁾ 균주의 16S rRNA 유전자 서열 (ca. 1000bp)과 GenBank 데이터베이스에 보유된 기존 균주의 서열을 비교하였다. kimura 2-parameter model을 사용하였으며, *Escherichia coli* J01859.1을 비교군으로 사용하였다.

2.5. 비소 산화 배치 테스트

회분식 실험은 250 mL 유리플라스크에 1 mM sodium arsenite (NaAsO₂, Sigma, USA)와 1 mM D(+)-glucose를 포함하는 MSB 배지 60 mL를 넣어 실시하였다. 박테리아 접종액을 투입하여 호기성 조건, 28°C, 180 rpm에서 50시간동안 배양하였다. 멸균배지로 대조군 실험도 실시하였다. 회분식 실험은 세 번 반복하였다. 배양기간 동안 3가 아비산염 (arsenite)이 5가 비산염 (arsenate)로 산화되는 것을 모니터링하기 위해 비소농도 측정을 실시하였다. 3가 아비산염 (arsenite)은 실리카기반의 음이온교환수지 (LC-SAX SPE, Supelco, USA)를 이용하여 5가 비산염 (arsenate)과 분리하였고, 3가 아비산염 (arsenite)과 총비소의 농도를 유도결합플라즈마-질량분석기 (ICP-MS,

Table 3. Bacteria and arsenic resistance system (*ars*) genotypes.

Strain	NCBI No. ^{A)}	<i>ars</i> genotype	Dt(h)	Tolerance (mM)
<i>Pseudomonas putida</i> OS-5d	AY952321	<i>arsB</i>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EBC-SK1	MF928870	<i>arsD, arsB, arsH, arsl, aoxR, aoxB</i>	48	30 / 30
<i>Ochrobactrum anthropi</i> EBC-SK4	MF928873	<i>arsD, arsB, arsl, arsX, aoxB</i>	60	40 / 150
<i>Ochrobactrum anthropi</i> EBC-SK12	MF928881	<i>arsR, arsD, arsB, arsH, arsX, aoxR</i>	24	25 / 30
<i>E. coli</i> J01859.1		<i>arsD, arsB</i>		control
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> OW-2	AY866408	<i>arsB arsA arsH</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
<i>Pseudomonas putida</i> OS-3	AY952322	<i>arsB</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
<i>Serratia marcescens</i> RS-2	DQ112331	<i>arsH</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
<i>Achromobacter</i> sp. GIST-SW8	EF555455	<i>arsB</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
Arsenite-oxidizing bacterium NT-10	AY027500	<i>aioA</i>		Santini et al. (2000) ⁹
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> ULPAs1	AY728038	<i>aoxA, aoxB, aoxC, aoxD</i>		Arsène-Ploetze et al. (2010) ¹⁹
<i>Pantoea agglomerans</i> RS-18	DQ112330	<i>arsB</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
<i>Citrobacter freundii</i> VTan8	DQ481469	<i>arsC arsH</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
<i>Aquaspirillum</i> sp. VTs22	DQ481472	<i>arsD arsB aoxR</i>		Chang et al. (2018) ²⁰
Arsenite-oxidizing bacterium NT-14	AY027497	<i>aoxB</i>		Santini et al. (2000) ⁹
<i>Alcaligenes faecalis</i> SRR-11	EF446888	<i>aoxR</i>		Chang et al. (2018) ²⁰

^{A)} NCBI (National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Bank

Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Agilent 7500) 를 이용하여 측정하였다. 5가 비산염 (arsenate)의 농도는 총비소의 농도와 3가 아비산염 (arsenite) 농도의 차이로 결정되었다. 세포농도는 600 nm에서 UV Spectrophotometer로 optical density를 측정하여 정량하였다.²⁰⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. 삼광광산의 비소오염 특성

음용수로 사용된 지하수는 지점 6 비소농도는 6.0 mg/L로 먹는물 기준²⁵⁾인 0.01 mg/L보다 600배가 높으며, 폐광 전 작업자들을 위한 기숙사로 사용하던 곳여서 광부의 건강이나 환경에 위해를 미칠 우려되는 상황이다. 갭구 1의 지점 1 토양 비소농도는 1,322 mg/kg로 토양오염우려기준²⁵⁾보다 26배 초과하였으며, 토양오염대책기준²⁶⁾보다 8.8배 초과하였다. 지점 4의 비소 농도는 459.6 mg/kg로 토양오염우려기준보다 9.2배를 초과하였으며, 대책기준보다 3.1배를 초과하였다. 지점 12의 경우 3,596 mg/kg로 토양오염우려기준보다 71.9배를 초과하였으며, 대책기준보다 24배를 초과하였다. 샘플링을 수행한 모든 지점에서 환경규제기준을 초과하여 적절한 처리가 시급한 상황이다. 자세한 내용은 **Table 1**에 정리하였다.

3.2. 비소 산화 박테리아의 동정과 계통도 분석 및 비소 내성 분석

삼광광산에서 채취한 시료로부터 3가 아비산염 (arsenite)과 5가 비산염 (arsenate)에 내성을 가지는 박테리아를 분리하였다. 형태학적으로 구분되는 미생물 단일 균집을 순수분리 (Isolation)

하였으며, 이중 비소산화능이 특히 우수한 3종류의 균주를 *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870), *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK4 (MF928873), 그리고 *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881)로 동정 (Identification)하였다. 자세한 내용은 다음 **Table 3**과 같다. 기존에 연구된 다른 비소내성시스템 균주들과 비교를 실시한 결과 계통발생학적 분석도를 **Fig. 3**과 같이 도출하였다. 본 연구에서 동정한 균주들이 Alphaproteobacteria 강 (class)에 속하는 것과 비교하여 기존의 균주들은 Betaproteobacteria 강 (class)과 Gammaproteobacteria 강 (class)에 속한다. *Herminiimonas arsenicoxydans*은 고농도의 비소를 함유한 산업폐수로부터 분리한 박테리아이며 비소 산화 박테리아로 보고된다.¹⁰⁾ 비소 산화 박테리아는 비소 오염 지역에서 비소의 독성과 이동성을 줄이는 데 중요한 역할을 한다.

비소내성 실험 결과는 다음과 같다. 3종의 박테리아로 아비산염 (arsenite) 3가 내성 실험을 실시한 결과, *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870)는 30 mM까지, *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK4 (MF928873)는 40 mM까지, *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881)는 25 mM까지 내성을 보였다. 비소의 환경농도와 내성의 상관관계 분석한 결과는 유의미하지 않았다. 지점 12의 비소농도 (3,596 mg/kg)는 지점 4의 비소농도 (459 mg/kg)보다 7.8배 높았으나, 비소 내성은 지점 4 (40 mM)가 지점 12 (25 mM)보다 1.6배 높았다. 비소의 환경농도가 높다고 해서 박테리아의 비소 내성이 더 강한 것은 아님을 도출하였으며, 내성이 전혀 없으면 비소의 독성 때문에 박테리아가 생존을하지 못하는 것으로 관찰된다.

3.3. 비소내성시스템 유전자 (*ars* genotype)

본 연구에서 *ars* genotype을 분석한 결과 *Agrobacterium*

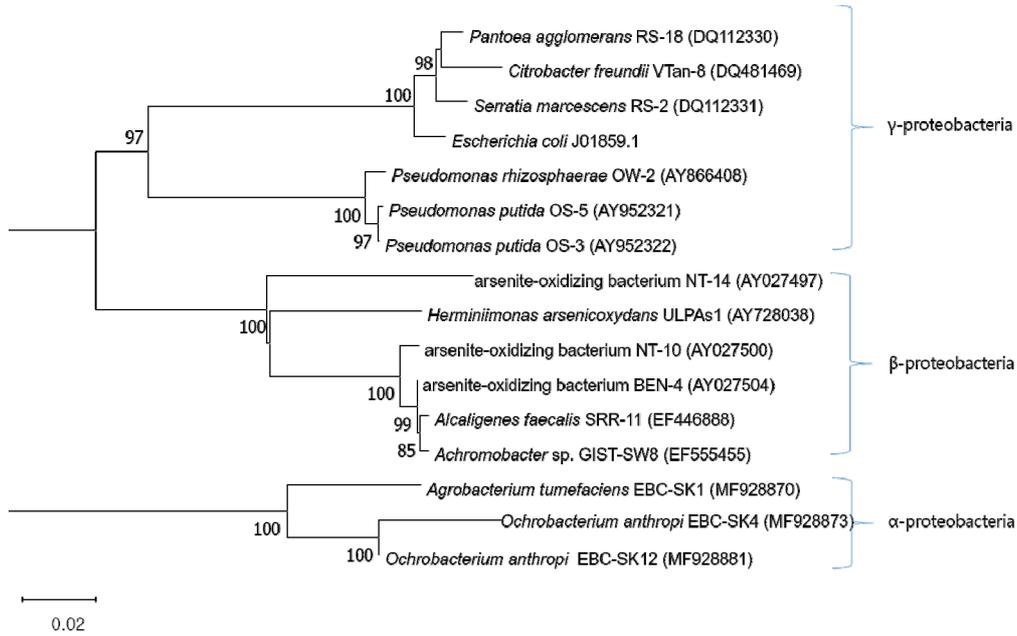


Fig. 3. Phylogenetic tree of bacteria with arsenic resistance system. This tree was constructed from a matrix of pair wise genetic distances by the neighbor-joining tree method.²¹⁾ The scale bar represents 0.02 substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence.

tumefaciens EBC-SK1 (MF928870)에서 *arsD*, *arsB*, *arsH*, *arsJ*, *aoxB*, *aoxB*가 관찰되었다. *Ochrobacterium anthropi* EBC-SK4 (MF928873)에서는 *arsD*, *arsB*, *arsJ*, *arsX*, *aoxB*가 관찰되었다. 그리고 *Ochrobacterium anthropi* EBC-SK12 (MF928881)에서 *arsR*, *arsD*, *arsB*, *arsH*, *arsX*, *aoxR*이 관찰되었다 (Table 3). 이러한 비소내성시스템 (*ars*) 유전자는 Fig. 1과 같이 시스템으로 연결된 조절 능력을 통해서, 비소의 생물학적 변환반응을 일으킨다. 첫번째로 비소 내성시스템의 전사 조절 (transcriptional regulator) 유전자인 *arsR*과 *arsD*가 탐지되었다.

Ochrobacterium anthropi EBC-SK12 (MF928881)에서 *arsR*, *arsD* 유전자 두가지가 동시에 발견되었다. *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870)와 *Ochrobacterium anthropi* EBC-SK4 (MF928873)에서는 *arsD*만 탐지되었다. 멤브레인 *arsB* 유전자는 모든 균주에서 발견되었다. *arsB*는 efflux/influx 펌핑 시스템의 안코딩에 관여하여 arsenite (III)를 박테리아 세포 안으로 이동시킨다. 그 후 *aoxB*, *aoxR* 등 비소산화 (*aox*) 유전자를 작동시켜 3가 아비산염 (arsenite)을 5가 비산염 (arsenate)으로 산화한다. 비소 산화 *arsH* 유전자는 *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870)과 *Ochrobacterium anthropi* EBC-SK12 (MF928881)에서 발견되었고, *Ochrobacterium anthropi* EBC-SK4 (MF928873)에서는 발견되지 않았다. 본 연구에서 순수분리한 비소 내성 토착 미생물의 비소 내성 시스템 *arsH*, *aroA*, *aroB*, *aoxR*, *aoxX* 기능을 이용하여 비소로 오염된 토양 및 수계 환경에서 비소의 산화를 통한 독성저감에 중요한 역할을 수행한다.¹⁸⁻²⁴⁾ 비소내성시스템 (Ars: arsenic resistance system)은 비소의 산화

및 환원을 촉매하는 효소로서 As(III)을 미생물 세포벽에 위치하는 *arsB* 유전자의 의해 유입되는 메커니즘을 Figure 1에 설명하였다. 비소내성시스템 전체를 움직이는 리더 유전자는 *arsR*과 *arsD*로 비소내성시스템에 명령을 내리는 역할을 한다. 리더 유전자가 존재할 경우 산화 또는 환원 유전자의 기능이 더욱 활발하게 작용합니다.²⁰⁾ *arsB*는 미생물 세포벽 (멤브레인) 안에 존재하는 유전자로, 비소를 미생물 안으로 유입하기도 하고 밖으로 배출하기도 하는 역할을 합니다. 비소는 미생물 멤브레인 안에 쉽게 바인딩되어 존재하는데, 해당 유전자는 His¹³¹, His¹³³, His¹³⁷, Arg¹³⁵, Arg¹³⁷, Arg¹⁶¹, Trp¹⁴², Trp¹⁶⁴, Trp¹⁶⁶ 및 Trp¹⁷¹과

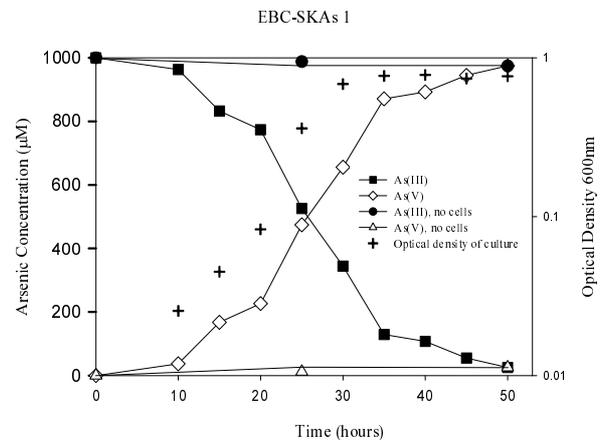


Fig. 4. Batch test of arsenite oxidation by *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870). The experiment was performed indocently in triplicate in batch modes with a working volume of 60 ml at 30°C.

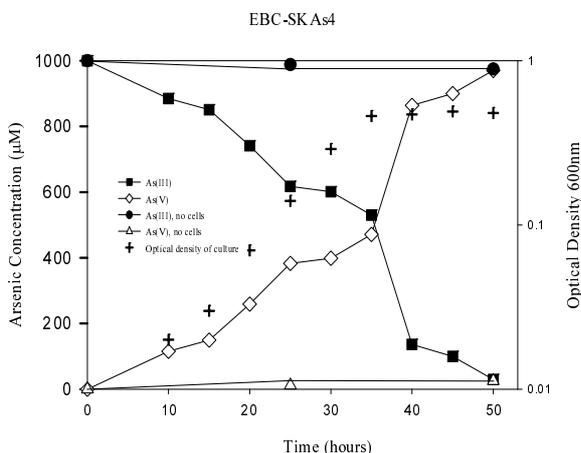


Fig. 5. Batch test of arsenite oxidation by *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK4 (MF928873). The experiment was performed indecently in triplicate in batch modes with a working volume of 60 ml at 30°C.

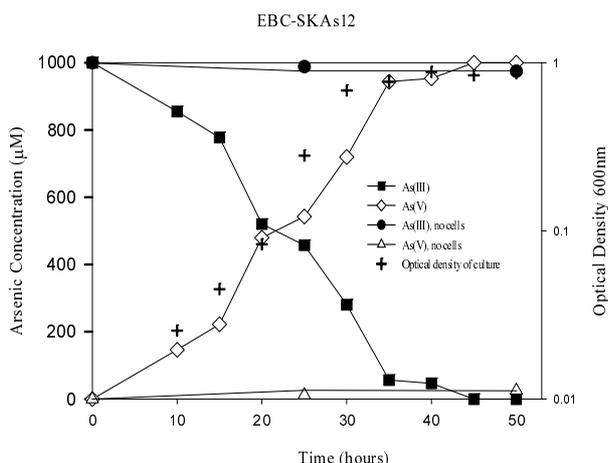


Fig. 6. Batch test of arsenite oxidation by *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881). The experiment was performed indecently in triplicate in batch modes with a working volume of 60 ml at 30°C.

같다.²⁰ 비소 내성 미생물 세포벽 외벽에서는 비소를 α-나선 구조 형태로 안정적으로 결합하는 현상을 확인할 수 있다.²⁰⁻²⁴ 미생물 내부에 있는 aox 시스템은 비소를 산화하는데 특화된 유전자이다. 비소(III)를 미생물 내부로 유입되며 aox 산화 유전자에 의해 비소(V)로 종 변환이 되고, 미생물 외부로 유출되어 환경에서는 독성이 감소되어 진다.

본 연구에서 균주 간에 탐지된 차이는 지점 1, 4, 그리고 12 중 모두 리더 유전자 *arsR*, *arsD* 탐지되었으며, *arsB* 유전자 및 산화 유전자 *aox* 시스템 기능이 확인된 지표로서 비소 저감에 대한 관리와 해답을 찾을 수 있을 것이다. 국내 토착 미생물은 리더 유전자 그룹인 *arsR*과 *arsD*는 탐지되었으며 비소 산화 유전자의 오페론 (단백질의 제조를 제어하는 유전자의 한 단위)은 비소 결합 및 생태계 독성 저감에 중요한 역할을 한다. 산화 유전자인 *ArsH*는 NAD(P)H 의존성 단핵구

(monocucleotide) 효소인 산화/환원 효소를 암호화하며 *Ser*⁴³, *Arg*⁴⁵, *Tyr*⁴⁹는 비소 결합 및 활성화에 필요한 촉매 효소이며 산화 기능으로 비소 독성 저감에 이용할 수 있다.^{20,27} *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870)와 *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881)는 *arsH*가 탐지되어 산화 유전자 기능을 확인하였으며 박테리아의 잠재적인 비소 해독 과정 중에서 종 변환은 극한 환경에서의 정화를 유도하고 관리할 수 있는 의미 있는 결과로 판단할 수 있다.

3.4. 생물학적 산화 반응 평가

회분실험결과 (Fig. 4~6)는 생물학적 비소 산화가 미생물의 성장곡선 중 대수성장구간 (exponential growth phase)에서 가장 활발히 일어났음을 보여준다. 대수성장구간에서 빠른 세포 분화가 일어나며 이때 비소의 산화도 가장 빠르게 발생하는 것으로 판단되며, As(III) 1,000 µM 반응은 초기 10시간부터 산화를 시작하여 50시간에 100% 산화되었다. Fig. 4는 *Agrobacterium tumefaciens* EBC-SK1 (MF928870)에 의해 As(III)에서 As(V)으로 산화되는 반응을 나타내었다. Fig. 5은 *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK4 (MF928873)에 의해 As(III)에서 As(V)으로 산화되는 반응을 나타내었다. Fig. 6는 *Ochrobactrum anthropi* EBC-SK12 (MF928881)에 의해 As(III)에서 As(V)으로 산화되는 반응을 나타내었다. 비소 산화 박테리아들은 독성이 강한 As(III)을 산화하여 독성이 약한 As(V)으로 생변환 (biotransformation)하기 때문에 비소 독성에 내성을 가질 수 있고, 폐광산 주변의 지구생물화학적 환경을 변화시킬 수 있다.¹¹ 따라서 비소 산화 박테리아는 폐광산의 생물학적 복원에 중요한 역할을 수행하며 생물지구화학적 (biogeochemical cycle) 비소순환에 기여한다.¹¹

4. 결론

박테리아가 As(III)를 산화하는 생화학적 원리는 다음의 두가지로 보고되었다.¹¹ 첫 번째 독립영양 (autotrophic) 미생물은 As(III)를 대사과정에서 에너지원으로 사용하여 전자전달계에서 전자 공여자 (electron donor)로 사용하는 경우가 있고⁹, 두 번째 종속영양 (heterotrophic) 미생물이 유기물 (carbon source)을 산화하는 과정에서 As(III)도 같이 산화되어 해독작용 (detoxification)이 되는 경우도 있다. 두 가지 비소 산화 메커니즘 모두 폐광산의 생물학적 복원에 중요한 역할을 수행한다. 토착 미생물에 존재하는 비소내성시스템은 미생물 내부로 비소(III)을 유입하고 미생물 외부로 비소(V)를 유출하여 폐광산의 환경 복원에 관여한다.

Acknowledgment

본 연구는 중소벤처기업부 기술혁신연구사업 시장대응형

2022 (S3244110) 및 한국연구재단 기초과학연구사업 교육부 2018 (NRF-2018R1D1A1B07049091)의 지원을 받아 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

References

1. J. Podgorski, M. Berg, Global threat of arsenic in groundwater, *Science* 368(6493), 845-850(2020).
2. R. Sushil Kanel, K. D. Tonoy, S. Rajender, K. Sudarshan, C. Sudip, T. P. Joshi, N. Achintya, N. Nadagouda, Arsenic contamination in groundwater: geochemical basis of treatment technologies., *ACS Environ. Au.*, 3(3), 135-152(2023).
3. M. Bissen, F. H. Frimmel, Arsenic - a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 31, 9-18(2003).
4. WHO (World Health Organization), Guidelines for drinking water quality. Fourth edition. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/en/(2011)
5. P. L. Smedley, D. G. Kinniburgh, A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters, *Appl. Geochem.*, 17(5), 517-568(2002).
6. P. Jeyakumari, C. Debnath, R. Vijayaraghavan, M. Muthuraj, Trends in bioremediation of heavy metal contaminations., *Environ. Eng. Res.*, 28(4), 220631(2023).
7. B. Jochen, A. A. Maria, M. S. Nury, A. A. Mohammad, D. L. López, D. Q. Valeria, D. Sebastian, S. Jerusa, T. Joseline, S. Ondra, C. Elianna, L. M. Parra, M. A. Espinoza, R. G. Luiz, G. Guilherme, N. N. Sosa, N. K. Niazi, B. Tomaszewska, K. L. Allende, K. Bieger, D. L. Alonso, P. F. B. Brandão, P. Bhattacharya, M. I. Litter, A. Ahmad, Arsenic in Latin America: New findings on source, mobilization and mobility in human environments in 20 countries based on decadal research 2010-2020, *Crt. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 51(16), 1727-1865 (2021).
8. S. Silver, Bacterial resistances to toxic metals-a review. *Gene* 179, 9-19(1996)
9. J. M. Santini, J. Sly, R. D. Schnagl, J. M. Macy, A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1), 92-97 (2000).
10. D. Muller, D. D. Simeonova, P. Riegel, S. Mangenot, S. Koechler, D. Lievremont, D., P. N. Bertin, M. C. Lett, *Herminiimonas arsenicoxydans* sp. nov., a metalloresistant bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56(8), 1765-1769(2006).
11. I. H. Yoon, J. S. Chang, J. H. Lee, K. W. Kim, Arsenite oxidation by *Alcaligenes* sp. strain RS-19 isolated from arsenic-contaminated mines in the Republic of Korea, *Environ. Geochem. Health.*, 31(1), 109-117(2009).
12. B. KepeL, W. B. Fatimawal, T. E. Tallei, Isolation and Identification of Arsenic-resistant Bacteria for Possible Application in Arsenic Bioremediation, *Pak. J. Biol. Sci.*, 23(1):63-67(2020).
13. S. Jagdeesh, U. Q. Shuai, X. C. Le, Arsenic biotransformation and an arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase in plankton., *J. Environ. Sci.*, 61, 118-121(2017).
14. P. Jeyakumar, C. Debnath, R. Vijayaraghavan, M. Muthuraj, Trends in bioremediation of heavy metal contaminations., *Environ. Eng. Res.*, 28(4), 220631(2023).
15. Z. W. Wang, G. Yang, J. Chen, Y. Zhou, A. Nunez Delgado, H. L. Cui, G. L. Duan, B. P. Rosen, Y. G. Zhu, Fundamentals and application in phytoremediation of an efficient arsenate reducing bacterium *Pseudomonas putida* ARS1., *J Environ Sci.*, 137, 237-244(2024).
16. S. H. Kim, J. Y. Choi, S. W. Jeong, Changes in the health of metal-contaminated soil before and after stabilization and solidification, *Environ. Poll.*, 331(1), 121929(2023).
17. J. U. Lee, S. W. Lee, K. W. Kim, J. S. Lee, H. T. Chon, Geomicrobiological effects on arsenic behavior in anaerobic sediment from abandoned gold mine area, *J. Geosy. Eng.*, 43(5), 448-45(2006).
18. G. K. Satyapal, R. Shikha, K. Mukund, K. Nitish, Potential Role of Arsenic Resistant Bacteria in Bioremediation: Current Status and Future Prospects, *J. Microb. Biochem. Technol.*, 8(3), 256-258(2016).
19. F. Arsène-Ploetze, S. Koechler, M. Marchal, J. Y. Coppée, M. Chandler, V. Bonnefoy, C. Brochier-Armanet, M. Barakat, V. Barbe, F. Battaglia-Brunet, O. Bruneel, C. G. Bryan, J. Cleiss-Arnold, S. Cruveiller, M. Erhardt, A. Heinrich-Salmeron, F. Hommais, C. Jouliau, E. Krin, A. Lieutaud, D. Lièvremont, C. Michel, D. Muller, P. Ortet, C. Proux, P. Siguiet, D. Roche, Z. Rouy, G. Salvignol, D. Slyemi, E. Talla, S. Weiss, J. Weissenbach, C. Médigue, P. N. Bertin, Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome., *PLoS Genet.*, 6(2), e1000859(2010).
20. J. S. Chang, I. H. Yoon, K. W. Kim, Arsenic biotransformation potential of microbial *arsH* responses in the biogeochemical cycling of arsenic-contaminated groundwater, *Chemosphere* 191, 729-737(2018).
21. T. Li, J. Hua, A. M. Wright, Y. Cui, Q. Xie, W. J. Bu, D. M. Hillis, Long-branch attraction and the phylogeny of true water bugs (Hemiptera: Nepomorpha) as estimated from mitochondrial genomes. *BMC Ecol. Evol.*, 14(1), 99(2014).
22. D. Molnler, D. Slyemi, D. Byrne, S. Lignon, R. Lebrun, E. Talla, An *arsR/smtB* family member is involved in the regulation by arsenic of the arsenite oxidase operon in *Thiomonas* arsenitoxydans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(20), 6413-6426 (2014).
23. S. Simon, L. T. Phung, Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2), 599-608(2005).
24. S. Koechler, C. A. Jessica, P. Caroline, S. Odile, M. A. Dillies, G. C. Florence, H. Florence, L. Didier, A. P. Florence, J. Y. Coppée, P. N. Bertin, Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *BMC Microbiol.*, 10(1), 53(2010).
25. Republic of Korea Ministry of Environment Ordinance no. 1061, Drining Water Quality Standards, <https://www.law.go.kr/>,

- (2023).
26. Republic of Korea Ministry of Environment Ordinance no. 1032, Soil pollution concern standards, countermeasure standards, <https://www.law.go.kr/>, (2023)
 27. J. S. Chang, X. Ren, K. W. Kim, Biogeochemistry cyclic activity of bacteria arsB in arsenic-contaminated mines. *J. Environ. Sci.* 20(11), 1348-1355(2008).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Authors and Contribution Statement

Jin-Soo Chang

Molecular Biogeochemistry Laboratory, Biological & Genetic Resource Institute (BGRI), Republic of Korea, Ph.D., [ORCID](#)[®] 0000-0001-8899-4094: Funding acquisition, Project administration, Resources, Conceptualization, Writing - review and editing.

Hyun-Jung Kim

Molecular Biogeochemistry Laboratory, Biological & Genetic Resource Institute (BGRI), Research Engineer, [ORCID](#)[®] 0009-0009-0306-6826: Data analysis, Visualization, Methodology.

Won-Seok Kim

Division of Advanced Nuclear Engineering, POSTECH, Republic of Korea, Ph.D., [ORCID](#)[®] 0000-0003-3929-3720: Data curation, Data analysis.

Seyong Lee

Training and education team, National institute of chemical safety, Republic of Korea, Ph.D., [ORCID](#)[®] 0009-0006-6938-7727: Data curation, Data analysis.