

미생물 종별 특성과 토양에 장기간 노출된 화합물들의 Bioavailability와의 상관 관계

Microbial Properties Influencing The Bioavailability of Aged Chemical in Soil.

박성희, 조재경, 이남영

현대엔지니어링(주) 환경기술연구소,

ABSTRACT

A chemical has been aging in soil environment is more less bioavailable than freshly added chemical. The amount of bioavailability of the aged chemical is different by bacterial strains. The difference could be depend on physiochemical properties of each strain. Phenanthrene was employed as an aged chemical. Seven bacteria were isolated from activated sludge and petroleum disposed soil. These strains were able to degrade phenanthrene and to grow using phenanthrene as a sole carbon source. According to the result of materialization and chemical extraction experiment, the bioavailable amount of aged phenanthrene which has been aged in Lima loam is different by each bacteria. Several physiochemical properties of each strain were tested to certify correlation with their different amount of bioavailability.

Key word : Aging effect, Bioremediation, Biodegradation

I. 서론

산업활동이 이루어진 지난 수십년간 전 세계 지표면 하부의 토양 및 수자원은 폐기물 매립장, 공업단지, 농약, 지하 저장탱크(원자로 폐기물, 산업폐기물, 주유소)등의 다양한 오염원으로부터 오염물의 누출으로 급격히 오염되어, 환경문제에서 가장 중요한 주제로 등장 하였다. 많은 오염지역의 토양층들이 최근에 와서 복원(remediation)의 대상으로 고려 되어 다양한 연구들이 진행 되고 있다. 대개 이러한 오염들은 우리가 지금처럼 이렇게 심각한 문제를 야기하다고 판단하기 이전부터 오염 되기 시작 하였다. 따라서 현재에 와서는 다양한 오염원들과 토양과의 상호관계 즉, 오염 메카니즘, 오염의 심도, 구체적으로 이들이 에코시스템(Eco-system)에 미치는 영향등을 중점 적으로 연구하고 있으며 그결과 상당 부분 오염원을 제거 시키는 연구가 성공적으로 수행되어 여러 가지 오염제거 방안들이 제시되고 현장에서 활용되기도 하는 실정이다.

한편, 다양한 오염원들의 토양내에서 거동을 연구하는 연구자들 중 흡착/탈착(adsorption/desorption) 메카니즘 및 생분해(biodegradation)를 연구하는 그룹의 연구결과들을 살펴보면 애초에 토양에 가해진 화합물들을 여러 가지 반응을 거친후 변화량을 확인하는 작업의 일환으로 초기에 투여된 화합물의 농도를 확인 하는 작업인 메스 발란스(mass balancing) 확인 과정을 거치게 된다. 이때 화합물들을 토양에 넣은 후 일정 시간이 지나게 되면, 상당량이 미생물의 분해에 의한것도 아님에도 불구하고 토양 속으로 사라져 다시 탈리(脫離) 되어 나오지 않는 경우가 있어 왔다. 애초에는 이것이 실험적인 예러로 기록 되는 경우가 많았는데 최근 Hatzinger등은 어떤 화합물들은 토양에 노출되고 난 뒤 일정 시간이 흐르고 나면 이들의 bioavailability가 줄어 든다는 연구 결과를 발표 하였고, 이후 이와 관련된 연구를 진행해온 Alexander는 이러한 현상을 'aging effect' 혹은 'sequestration'이라고 정의 하였다.

이들의 작업이 의미가 있는 것은, 이 availability의 감소와 sequestration 현상은 어떤 독성 화합물들의 토양잔류 위해성을 측정하거나, 독성 물질에 의한 오염의 복원에 있어 의미있는 (meaningful) 규제치를 결정하는 것과 밀접한 연관이 있다. 요컨데 어떤 화합물들이 토양에 노출되어 일정 시간이 지나고 난 뒤 bioavailability가 현격하게 감소된 상태라며, 당연히 그에 따라 에코시스템에 미치는 독성도 줄어든 상태 이므로 극단적인(vigorous) 추출방법에 의해 측정된 화학적분석 결과의 잔류농도치와는 현격한 차이가 있을수 있다는 얘기가 된다.

이러한 bioavailability의 감소는 여러 가지의 물리화학적 요인에 따라 기인한 것이지만 본고 에서는 생물학적 특성이 aging effect에 미치는 영향을 다양한 미생물들을 이용 하여 실험한 결과를 보고 하고자 한다. 이때 사용한 화합물은 석유류의 오염시 나올수 있는 보편적인 중간 산물인 phenanthrene을 사용하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약류 및 재료

Phenanthrene 은 mineralization을 측정하는데 사용하기 위하여[9-¹⁴C]phenanthrene(8.3 or 13.1 mCi/mmmol, 98% purity)과 isotope로 라벨링이 되지 않은 것(Sigma, >98%)을 사용 하였다. 그의 시약은 reagent grade를 사용 하였다.

2. 토양시료 및 처리

Lima loam 토양(pH: 6.85, 유기탄소 함량 2.9%)을 New York주 Aurora 지역에서 채취하여 풍건 한 뒤 2-mm 채에 걸러준비 하였다. 토양의 살균을 위해서는 γ -radiation(2.5 Mrad of γ -radiation from a ⁶⁰Co source) 행하였다. 이토양에 methylene chloride에 녹인 phenanthrene (isotope labeling 된 것 1% + labeling 되지 않은 것 99%)을 무균 적으로 넣은 다음 용매를 충분히 제거 시키고 실리콘 마개에 테플론 테잎을 두르고 막아 밀 봉한 다음 330일간 상온에 정치시켜 aging을 시켰고, 미생물 접종을 행할 때 토양 일부를 LB-broth 배지에 접종해 보아 무균 상태가 유지되었는지 여부를 확인 한후 사용 하였다. 또 각 sample은 3개의 시험구(triple duplicate)를 사용 하였다.

3. 미생물 및 mineralization

토양 시료로부터 phenanthrene을 유일한 탄소원으로 하여 자랄수 있는 균주를 선별하고 이중, 세균류만을 선택하되, 세포모양, capsule의 두께, cell surface의 hydrophobicity등 생리학적 특성이 뚜렷이 대별되는 균주 7종을 선별하여 실험에 사용 하였다.

Mineralization을 위한 basal medium은 증류수 1l를 기준으로 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, FeCl_3 0.01g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, NH_4NO_3 0.1g, K_2HPO_4 0.2g 과 KH_2PO_4 0.8g을 각각 넣어 살균한 것을 사용 하였다. 여기에 유일한 탄소원으로 phenanthrene을 각기 실험시마다 목적하는 바대로 농도에 맞게 첨가하였다. 액체 배양을 하면서 mineralization을 모니터링 하기 위해서는 250 ml 삼각플라스크에 100ml 되게 배지를 넣고 그위에 작은 vial을 실리콘 마개와 함께 고정을 시킨다음 이속에 1.5ml의 0.5N NaOH를 넣고, 실리콘 마개를 통해 16-gauge의 금속 cannula를 꼽아 경시적으로 이 알칼리 용액을 뽑아 내어 포집된 $^{14}\text{CO}_2$ 를 Liquid scintillation counter에서 측정 하는 방법으로 mineralization을 모니터링 하였다. 액체배양시 조건은 30°C 에서 120r.p.m 속도로 shaking 하면서 배양 하였다. 또 토양 속에서 mineralization을 모니터링 할 때는 살균된 토양 10g을 50ml screw-cap 시험관에 넣고 수분을 80%로 맞춘 다음 분리 배양된 균주를 buffer로 씻은 다음, 10^8 cell/g 농도가 되게 접종 하였다. 여기에 위의 액체 배양과 마찬가지로 $^{14}\text{CO}_2$ 를 포집 할수 있는 장치를 하고 상온 ($23^\circ\text{C} \pm 2$)에 정치 해 두고 경시적으로 mineralization을 모니터링 하였다.

4. 추출 및 잔류량 분석

mineralization이 끝난 뒤 mass balacing을 위해 용매 추출을 통해 분해 후 잔류된 phenanthrene을 확인 하였다. 이때 잔류한 phenanthrene을 측정하기 위해 HPLC (Hewlett-Packard Series 1050, Hewlett-Packard Co., Avondale, PA, USA)를 사용 하였고, column은 5 μm ODS-2 (Octadecyl-bonded silica, Hewlett-Packard)을 사용하였고, mobile phase는 acetonitrile-water (85 : 15)를 1.0 ml/min속도로 elution 하였다. 한편 detection은 UV 254nm에서 하였다.

III. 결과 및 고찰

Phenanthrene을 유일한 탄소원으로 성장할수 있는 균주 약 360종 가운데 본 실험을 위해 선별된 7종의 균주의 특성은 Table 1과 같았다. 이들은 각기 생리적 특성이 뚜렷이 대별되는 특성을 가졌으며 모두 세균들만을 선별한 것이다.

Table 1. Brief characteristics of isolated strains

Strain	Gram	Cell shape	Pigment ^a	Catalase	Capsule ^b	Resistance/ plasmid ^c	Isolated from ^d
A1	positive	rod-cocci	none	positive	+	R/presence	A/S
B	negative	cocci	none	positive	+	R/presence	A/
C	negative	rod	none	positive	-(+)	R/presence	A/S
D1	negative	rod	none	positive	-(+)	R/presence	A/S
E1	negative	cocci	none	positive	+	R/presence	A/S
T	positive	(strepto) cocci	brown	negative	+++	R/presence	Soil-1
V	negative	rod-cocci	yellow	positive	-(+)	No / none	Soil-2

a, water diffusable pigment

b, result from capsule staining; -(+)poor, + fair, +++ thick

c, ampicillin(50ug/ml)-resistant, and plasmid extracted

d, A/S, activated sludge was sampled from Tompkins county wastewater-treatment plant, and soil sample were sampled from petroleum-contaminated area; soil-1, around a gas station at Rt89 and soil-2, around a garage at Rt.13, Ithaca, New York

한편, 토양에 바로 노출된(freshly added, 0 day) phenanthrene을 mineralization 하는 정도는 7종 모두에서 비슷한 정도를 보였으나, 330일 동안 aging된 phenanthrene을 mineralization 하는 비율은 상당한 차이를 보였다(Table 2).

Table 2. Extraction after mineralization of 330-days aged phenanthrene in Lima loam.

Strain	Amount of extract ^a ($\mu\text{g}/10\text{g}$ of soil)		Mineralization ^c (%)	
	Aged	Freshly added	Aged	Freshly added
A1	209 \pm 10	10 \pm 3	43.7	71.7
B	95 \pm 9	16 \pm 4	42.5	67.1
C	84 \pm 7	16 \pm 1	56.3	72.0
D1	88 \pm 6	22 \pm 2	52.8	70.0
E1	85 \pm 19	13 \pm 4	50.7	72.3
T	109 \pm 4	19 \pm 6	41.1	75.4
V	98 \pm 2	9 \pm 1	53.2	73.6
None ^b	1035 \pm 7	89 \pm 9	-	-

a, Concentration of added phenanthrene is 1000 $\mu\text{g}/10\text{g}$ of soil

b, It was treated at same condition with another, except for inoculation

c, Mineralized for 28 days at room temp.

이와 같은 결과로 보아 토양속에서 aging된 chemical들은 미생물들 중에 따라서 available한 정도가 다르다는 점을 알수 있고, 이러한 차이를 보이는 것은 현재까지는 이들의 여러 가지 생리화학적 특성중, surfactant 유사 물질들을 세포 외부로 생성 분비하는 능력에 따라 비례하는 결과는 얻었다.

IV . 참 고 문 헌

- 1) Hatzinger, P. B.; Alexander, M. *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29, 537-545
- 2) Martin Alexander, 1995, How Toxic are Toxic Chemical in Soil, *Environ. Sci. Technol.*, 29, 2713-2717
- 3) Kyungphile Nam and Martin Alexander, 1998, Role of Nanoporosity and Hydrophobicity in Sequestration and Bioavailability: Tests with Model Solids, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 71-74
- 4) Michael P. Labare and Martin Alexander, 1995, Enhanced mineralization of Organic compounds in Nonaqueous-phase Liquids, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 257-265