

해양퇴적토내 다환방향족탄화수소 생분해 증진 조건 연구

정홍배 · Tian Yun¹ · 이희순 · 권개경 · 김상진[†]

한국해양연구원 마린바이오신소재연구단

Condition of *ex situ* Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediments

Hong-Bae Jung, Tian Yun¹, Hee-Soon Lee, Kae Kyoung Kwon and Sang-Jin Kim[†]

Marine Biotechnology Research Center, KORDI, Ansan P.O. Box 29, 425-600, Korea

요 약

다환방향족 탄화수소는 주요한 독성환경오염물질중의 하나이며 해양퇴적물에 축적이 된다. 다환방향족 탄화수소가 가지고 있는 위해성으로 인해 해양퇴적물내의 다환방향족 탄화수소 제거는 많은 관심사가 되어오고 있다. 본 연구에서는 다환방향족 탄화수소로 오염된 해양퇴적물의 생물정화를 위해 bioslurry reactor를 사용하기 위한 전단계로 *ex situ* bioremediation을 위한 최적 조건을 찾기 위해 멸균 유무의 퇴적물에서 균주접종과 혼합 cyclodextrin (M-CD) 공급의 효과를 알아보았다. 비멸균상태의 퇴적물에서 분해균주의 접종여부에 상관없이 M-CD가 첨가된 실험구의 전자전달계활성이 증가되었고 멸균상태의 퇴적물에서는 분해균주가 접종되고 M-CD가 첨가된 실험구의 전자전달계활성이 증가되었다. 멸균상태의 퇴적물에서 M-CD와 함께 단일 균주가 접종되었을 때 퇴적물내의 다환방향족 탄화수소의 분해율이 9-20%로 나타났으며 동일한 조건에서 혼합균주가 접종되었을 때는 24-37%로 나타났다. 비멸균상태의 퇴적물에서 동일한 조건으로 실험하였을 때는 유의한 분해가 일어나지 않았으며 균집분석 결과 접종 균주도 감소하였다. 또한 M-CD 첨가 없이는 2일후 접종균주를 찾아볼 수 없었다. 결론적으로 퇴적물내의 다환방향족 탄화수소 제거를 위해 퇴적물내의 토착미생물과 포식자가 제거된 상태에서 적절한 탄소원과 함께 균주를 접종하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

Abstract – Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a kind of toxic environmental pollutants and has been accumulated usually in marine sediments. Due to their potential hazardous to human, removal of PAHs from environments has been great concern. In the present study, the effect of microbial inoculation and the supplementation of mixed form cyclodextrin (M-CD) was assessed in the pre-sterilized or nonsterilized microcosms for optimizing operational conditions for *ex situ* bioremediation of sediments contaminated by PAHs. Activity of electron transport system (ETSA) was increased by the addition of M-CD regardless of inoculation of microorganisms in microcosms without sterilization. The degradation rate of PAHs in sterilized microcosms was app. 9-20% by the inoculation of single strain and 24-37% by the inoculation of microbial consortium supplemented with 1% M-CD, respectively. The degradation was not observed in microcosms without sterilization under the same conditions. The proportion of inoculated microorganisms also decreased in nonsterilized microcosms. Signals of inoculated bacteria were decreased to detection limit after 2 days in the microcosms without M-CD. In conclusion, microbial inoculation with appropriate carbon sources and removal of natural flora and grazers are required for the efficient *ex situ* bioremediation of sediments contaminated by PAHs in bioslurry reactor.

Keywords: PAHs(다환방향족 탄화수소), Bioslurry reactor(슬러리 생물정화 반응기), Mixed form cyclodextrin(혼합 사이클로덱스트린), Bacterial community(세균 군집), ETSA(전자전달계활성), *ex situ* bioremediation(현장외 생물정화)

[†]Corresponding author: s-jkim@kordi.re.kr

¹Present address: Institute of applied and environmental microbiology, school of life science, Xiamen university, Xiamen, 361005, P.R. China. tianyun_xmu@263.net

1. 서 론

다환방향족 탄화수소 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 2개 이상의 벤젠고리가 중합된 방향족 탄화수소를 의미한다. 난분해성의 환경오염물질로 알려진 PAHs는 유기물의 불완전 연소에 의해 생성이 되며 석유의 주요 구성성분이기도 하다 (Blumer[1976]). 매년 $(1.7-8.8) \times 10^6$ 톤 정도의 석유가 해양으로 유입되고 있는 것으로 추정되며 이중 5-35%가 PAHs 이다 (Alan[2005]). 해양환경에 유입된 PAHs는 유기물, 특히 휴믹산의 농도가 높은 해양퇴적토에 다량 축적되고 있다 (Means *et al.* [1980], Fernandez *et al.* [1992], Schlautman & Morgan[1993], Juhasz & Naidu[2000], Kim *et al.* [2004]). PAHs는 비교적 낮은 농도에서 급성, 만성 독성을 지니며 환경에 오염된 PAHs는 먹이망을 거쳐 인간에게까지 피해를 줄 수 있으므로 오늘날 오염된 PAHs의 제거는 주요 관심사 중의 하나가 되고 있다 (Juhasz & Naidu[2000]). 이에 따라 해양퇴적토에 오염된 PAHs를 제거하기 위한 다양한 기술의 개발이 진행 중이다 (Vollmuth & Niessner [1995], Nam *et al.* [2001], Guieysse *et al.* [2004]).

우리나라의 경우 서해안과 남해안은 낮은 수심과 큰 조석간만의 차이로 인해 선박 항로와 접안시설 유지를 위해 주기적으로 퇴적토가 준설된다. 준설되는 연안 퇴적토의 대부분이 공단에 인접해 있거나 선박의 항로에 위치해 있기 때문에 PAHs에 의한 오염 가능성이 매우 높다. 따라서 PAHs로 오염된 준설 퇴적물 처리 기술의 개발이 중요하다. 외국의 경우 PAHs 제거를 위한 다양한 형태의 reactor들이 연구되고 있다 (Ramiswami & Luthy[1997], Potter *et al.* [1999], Zeng *et al.* [2000]). 본 연구진 또한 PAHs로 오염된 준설 퇴적물 처리를 위한 효율적인 bioslurry reactor를 개발하기 위해 다양한 생분해 조건들을 최적화하기 위한 연구를 수행하였다.

PAHs는 수용액상에서 용해도가 매우 낮기 때문에 미생물의 PAHs 이용성이 제한되어 생분해가 어려운 문제점을 가지고 있다 (Bardi *et al.* [2000], Schneider *et al.* [1996]). 이러한 문제점을 해결하기 위해 계면활성제를 첨가하고 있으나 사용된 계면활성제의 독성, 또는 PAHs가 미셀(micelle) 내로 분리되는 현상(sequestration)으로 인해 오히려 생분해가 저해되는 문제점이 있다. 최근에 기존의 계면활성제를 대신해 benzene, phenol, PAHs 등 소수성인 지속성 유기화합물에 대한 미생물의 이용성을 증가시키기 위해 cyclodextrin계 화합물(CDs)이 이용되고 있다 (Bardi *et al.* [2000], Gao *et al.* [1998], Lindsey *et al.* [2003], Schwartz & Bar[1995], Song *et al.* [1999]). Sohn *et al.* (2004)은 PAHs의 생분해 연구과정에서 PAHs 분해 미생물인 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 균주와 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin(β -HPCD)을 처리할 경우 benzo[a]pyrene(BaP)를 비롯한 고분자 PAHs의 분해율을 향상시킬 수 있음을 확인하였다. 그러나 β -HPCD의 경우 kg당 십 만원이 넘는 높은 가격으로 인하여 실제로 bioslurry reactor에 사용하기에는 무리가 있다. 이에 따라 강 등(2004)은 β -HPCD를 대체할 수 있는 보다 저렴한 물질을 탐색하였고 혼합-cyclodextrin(M-CD)이 효과

적으로 β -HPCD를 대체할 수 있음을 확인하였다. 이에 따라 본 연구에서는 경제성을 고려하여 β -HPCD를 M-CD로 대체 하였다. 이와 같은 연구에 기반하여 30% slurry 농도에서 미생물의 전자전달계 활성도와 PAHs 잔류량 및 미생물 군집구조 변화를 조사함으로써 PAHs 분해균주의 접종 유무, 토착미생물의 존재유무, M-CD 첨가 유무 및 무기영양원의 첨가 유무가 PAHs 제거에 미치는 영향을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험구의 구성 및 균주 준비

현장퇴적토는 PAHs 오염이 심한 평양만의 퇴적토(total PAHs concentration: 12.06 ± 1.89 ppm)를 이용하였고 멸균해수를 첨가하여 30%(v/v) slurry로 만들었다. 실험구는 크게 멸균한 퇴적토를 사용한 그룹과 멸균하지 않은 퇴적토를 사용한 그룹으로 나누었다. 또한 각 그룹은 대조구, M-CD 1%((주)두산콘프로덕츠코리아)와 yeast extract 0.01%를 첨가한 실험구, 앞의 실험구에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 KH_2PO_4 의 형태로 N, P(C:N:P=100:10:1)를 첨가한 실험구로 나누었다. 각각의 실험구는 다시 균주접종 여부에 따라 균주가 들어가지 않은 대조구, 한 가지 또는 세 가지 혼합 균주를 함께 접종한 실험구의 세 가지로 구성된다. 각 실험구는 100 ml baffie 플라스크에 30% sediment slurry 30 ml 씩을 첨가하여 준비하였다. 멸균 실험구는 동량의 slurry를 플라스크에 넣고 121°C에서 15분간 고압멸균하여 준비하였다.

실험에 사용된 균주는 *N. pentaromativorans* US6-1 (Shon *et al.* [2004]), *Kytococcus sedentarius* PAH5, *Bacillus aquimaris* YSR9이다. PAH5, YSR9 균주는 ZoBell 액체배지에서, US6-1 균주는 M-CD 1%가 첨가된 ZoBell 액체배지에서 1일간 전배양한 후 사용하였다. 최종 접종 농도는 배양액 기준 $\text{OD}_{660}=0.3$ 이 되도록 하였다(강 등 [2004]). 30°C에서 일정기간(0, 2, 4, 6일) 배양 후 시료를 채취하여 전자전달계(ETS) 활성도와 PAHs 농도의 변화, 접종균주의 유지여부 및 군집구조 변화를 분석하였다.

2.2 전자전달계 활성

전자전달계 활성 측정은 Vosjan(1982)의 방법을 변형하여 실시하였다. 각 실험구에서 0.25 ml의 시료를 채취하여 2 ml microtube에 넣었다. 각각의 microtube에 0.2% Iodonitrotetrazolium chloride (INT) 1 ml을 첨가하고 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. 배양이 끝난 후 포르말린 0.1 ml을 첨가하고 10,000×g로 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 메탄올 1 ml을 첨가하여 INT-formazan을 추출하였다. 다시 원심분리시키고 상등액을 취하여 UV-spectrophotometer(at 495 nm)로 OD를 측정하였다. 전자전달계 활성값은 아래에 있는 방정식을 사용하여 계산하였다. 메탄올과 INT만 첨가된 blank와 INT 반응 전에 포르말린을 첨가한 killed control을 두어 ETS 활성값 계산에 이용하였다.

Activity of Electron Transport System(ETSA, $\mu\text{gO}_2/\text{ml}/\text{hour}$)=(Ab/15.9)×32/2×(1/S×t)

S: sample amount, t: incubation time, Ab: absorbance/cm(OD), 15.9: molar absorbance of formazan, 32/2: factor.

2.3 잔류 PAHs 분석

각 실험구의 잔류 PAHs를 분석하기 위해 sediment slurry를 -20°C에서 냉동시킨 후 3일간 동결건조시켜 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 시료를 잘게 갈아주고 dichloromethane(DCM) 50 μl 에 내부표준물질(Internal standard)로 d_8 -naphthalene, d_{10} -phenanthrene, d_{12} -perylene(Sigma Aldrich)을 각각 5 μg 씩을 녹여 첨가하였다. 20 ml의 DCM을 시료가 들어있는 flask에 첨가하고 ultrasonic bath(Branson 8210)에서 10분간 처리한 후 용매를 sodium sulfate 적당량이 없혀진 GF/F filter에 여과시켜 퇴적물 입자와 잔여 수분을 걸러주었다. 이 과정을 10 ml의 DCM으로 2번 반복하고 회수된 DCM은 자동시료농축장치(TurboVap[®])를 이용하여 1 ml 정도로 농축시켰다. 외부표준물질로 DCM 50 μl 에 녹인 decafluorobiphenyl(Sigma Aldrich) 5 μg 을 첨가하고 2 ml 용량의 autosampler vial에 옮긴 뒤 GC/MS (Varian CP3800 GC, Varian Saturn 2000 MS)로 분석하였다. 분석 방법 및 조건은 Table 1과 같다.

2.4 균집 변화 분석

세균균집의 다양성은 미생물 다양성의 지문분석 방법(Fingerprinting method) 중 민감도가 높고 분석시간이 짧은 말단 제한절편다형성(T-RFLP: Terminal restriction fragment length polymorphism) 방법을 이용하여 조사하였다(Liu *et al.* [1997]). 배양 2일 후와 6일 후 시료 1 ml를 채취하여 1×PBS(pH8.0)을 첨가하고 시료를 충분히 분산 시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 핵산 추출 과정의 기본적인 방법은 Kuske *et al.*(1998)의 방법에 따랐다. PCR 저해 물질로 알려진 humic acid는 GENE CLEAN[®] Turbo Kit(Q-BIOgene)를 이용하여 제거하였다. 추출한 핵산으로부터 16S rDNA 증폭 과정 및 이에 사용된 primer의 구성은 기존(한국해양연구소 [1999])의 방법에 따라 시행하였다. 증폭된 유전자는 4 염기서열을 인지하는 제한효소 *Hae*III(Promega) 5unit를 사용하여 37°C에서 4시간 동안 반응시

킨 후 *Hae*III 5unit를 더 넣어 주고 2시간 동안 추가 반응시켰다. 반응이 끝난 후 생성된 말단제한절편(T-RF; terminal restriction fragment)의 크기는 자동염기서열 분석장치(모델 ABI 3100 Automated sequencer, Applied Biosystems Instrument)와 GeneScan 프로그램(ver. 3.7)을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 전자전달계 활성

세균의 성장과 활성을 간접적으로 나타내는 지표인 ETS 활성도를 측정한 결과 토착미생물이 살아있는 비멸균실험구에서는 분해균주의 접종 여부가 ETS 활성도에 별다른 영향을 미치지 않았다. M-CD가 첨가되지 않은 실험구에서 2일 배양 후 ETS 활성도는 $1.73\pm 0.13 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$, 4일 배양 후 $2.12\pm 0.48 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ 로 M-CD가 첨가된 실험구의 2일 배양 후 $3.40\pm 0.61 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$, $4.04\pm 1.68 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ (N, P 첨가구), 4일 배양 후 $3.66\pm 0.11 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$, $3.45\pm 0.82 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ (N, P 첨가구)에 비해 1/2~2/3 수준의 낮은 값을 보였다(Fig. 1a).

멸균실험구의 균주를 접종하지 않은 대조구에서도 2일 배양 후 $0.53\pm 0.13 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$, 4일 배양 후 $0.42\pm 0.16 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ 로 낮지만 ETS 활성이 나타났는데 이것은 퇴적물에 잔류하는 환원 물질의 영향으로 사료된다. 균주를 접종한 실험구는 M-CD 및 N, P를 첨가하였을 때 ETS 활성이 2일 배양 후 $4.99\pm 0.39 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$, $6.07\pm 1.37 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ (N, P 첨가구), 4일 배양 후 $3.03\pm 0.22 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$, $3.73\pm 1.33 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ (N, P 첨가구)로 M-CD 및 무기영양염을 첨가하지 않은 실험구의 ETS 활성값 $2.13\pm 1.05 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ (2일 배양), $1.59\pm 0.22 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ (4일 배양) 보다 2배 이상 높게 나타났으며 배양 기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 멸균실험구 중 M-CD와 N, P를 첨가한 후 혼합 균주를 접종한 실험구의 2일차 ETS 활성값이 $7.04\pm 0.44 \mu\text{g-O}_2/\text{ml}/\text{hour}$ 로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 1b).

접종 균주의 수는 ETS 활성값에 영향을 미치지 않은 반면 M-CD가 첨가된 모든 실험구에서 ETS 값이 크게 증가한 것으로 볼 때 접종한 균주와 토착미생물 모두 M-CD를 탄소원으로 이용해 성장한 것으로 판단된다. M-CD가 첨가된 실험구의 경우 비멸균실험

Table 1. Operating conditions of GC/MS

Instrument settings		Temperature Program	
Injection volume	1 μl	Initial temperature	1.5 min at 60°C
Injection technique	splitless	Increasing rate	4°C/min to 300°C
Splitter closing time	0.75 min	Isothermal pause	8.5 min at 300°C
Injector temperature	300°C	<u>Column</u>	
Trap temperature	180°C	Material	fused silica tubing
Manifold temperature	50°C	Length	30 m
Xferline temperature	200°C	Int. Diameter	0.25 mm
Carrier gas	He	Phase Composition	Arylene/methyl modified
Column flow	1 ml/min	Film thickness	0.25 μm

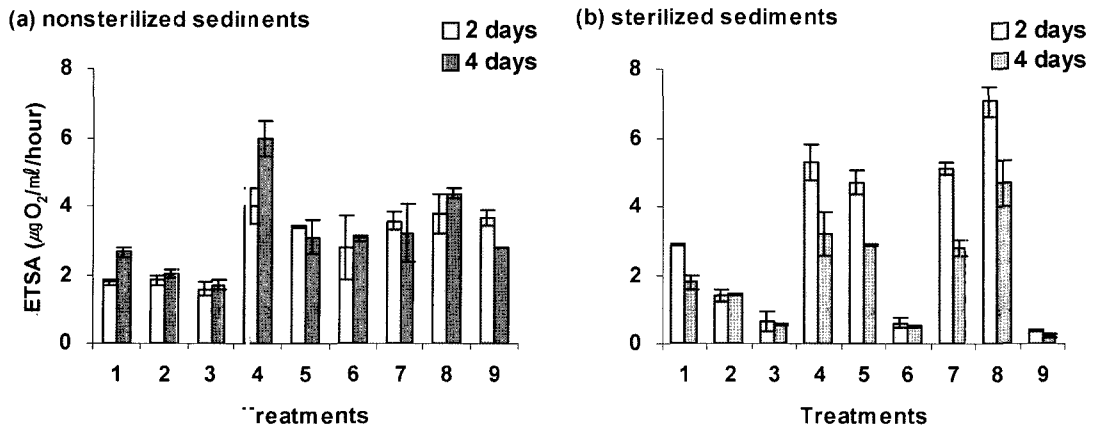


Fig. 1. Comparison of ETS activity under various treatment conditions after 2 and 4 days of incubation. 1: Sterilized sea water (SSW)+ US6-1, 2: SSW+ 3 Strains (US6-1, PAH5, YSR9), 3: SSW, 4: SSW+ Mixed-CD (M-CD)+ US6-1, 5: SSW+ M-CD+ 3 Strains, 6: SSW+ M-CD, 7: SSW+ M-CD+ N/P+ US6-1, 8: SSW+ M-CD+ N/P+ 3 Strains, 9: SSW+ M-CD+ N/P.

구의 ETS 활성값이 멸균실험구의 ETS 활성값에 비해 2일 배양 후에는 낮게 나타났으나 4일 배양 후에는 유사한 수준을 보였다.

3.2 PAHs 분해력

PAHs 분해율을 분석하기 위해 배양 초기와 4일 배양 뒤 검출 한계 값 이상의 농도를 보인 13 PAHs(Naphthalene, 2-Methylnaphthalene, 1-Methylnaphthalene, Biphenyl, Acenaphthylene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benz[a]anthracene, Chrysene) 잔류 농도를 측정하여 4일 후의 잔류 비율을 표시하였다(Fig. 2). 모든 비멸균실험구에서는 PAHs의 분해가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2a). 멸균실험구의 경우 균주를 접종하지 않은 대조구는 유효한 분해율을 보이지 않았고 균주를 접종한 실험구에서 US6-1만을 접종했을 때 9~20%, 혼합 균주를 접종했을 때 24~37%의 분해율을 보였다. PAHs 분해율은 M-CD를 첨가한 실험구에서 추가하지 않은 실험구에 비해 높은 값을 보였으며 N, P를 추가로 첨가하는 것은 PAHs 분해에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2b). 멸균실험구 #5에서 배양전과 4일

배양 후의 PAHs 분해율을 비교하면 타 PAHs에 비해 농도가 높았던 fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene 등의 중·고분자 PAHs 분해율이 높게 나타났다(Fig. 3). Coates *et al.*(1997)은 San Diego만의 퇴적토를 대상으로 한 연구에서 PAHs 오염도가 높은 퇴적토에서 미생물에 의한 PAHs 분해가 진행되지만 PAHs 오염도가 낮은 퇴적토에서는 PAHs 분해가 진행되지 못한 것으로 보고하고 있다. 이는 오염도가 낮은 퇴적토의 경우 토착미생물들이 PAHs에 접촉할 기회가 적어 분해능이 발현 될 수 없었던 것이 원인으로 추정된다. 본 연구에서도 오염농도에 따라 개별 PAHs의 분해도가 다르게 나타난 것은 미생물과 PAHs의 접촉 기회의 차이에 의한 것으로 생각된다.

비멸균실험구의 경우 ETS 활성도가 동일 조건의 멸균실험구와 유사한 수준이었지만(Fig. 1) PAHs의 분해율은 매우 낮게 나타났다(Fig. 2). Ramadan *et al.*(1990)의 연구에 의하면 *p*-nitrophenol (PNP)의 분해에 있어 투입해준 균주의 수가 적은 상태에서는 원생동물의 포식에 의해 투입균주가 소멸되는 것을 보고하고 있다. 본 연구에서도 비멸균실험구의 경우 퇴적토 내에 존재하는 토착

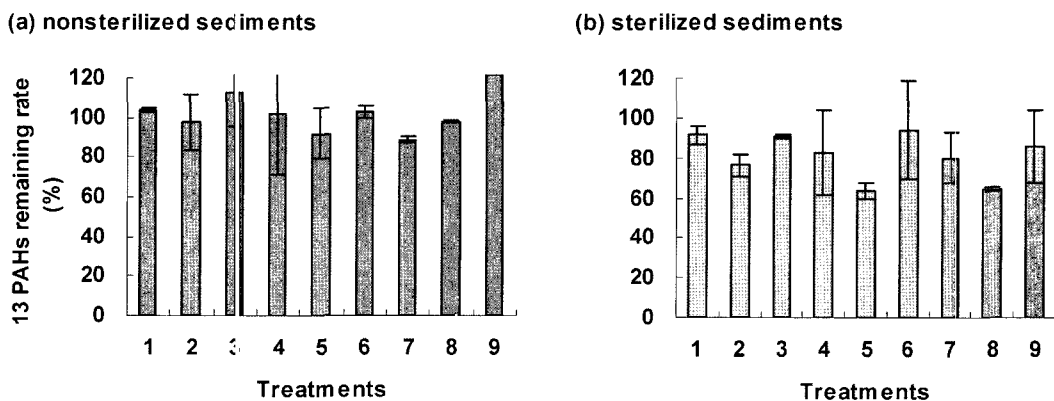


Fig. 2. Remaining rates of PAHs in each microcosm after 4 days of incubation. Condition of each microcosm was same with that of Fig. 1.

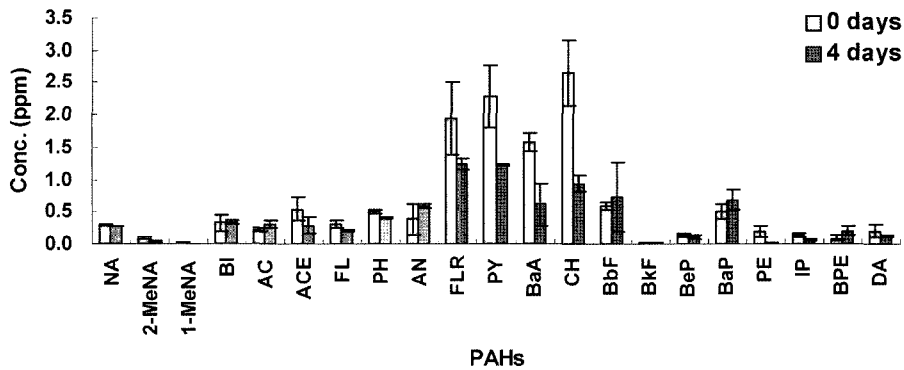


Fig. 3. Concentrations of each PAHs in sterilized #5 microcosm before and after 4 days of incubation. Condition of each microcosm was same with that of Fig. 1. NA: Naphthalene, 2-MeNA: 2-Methylnaphthalene, 1-MeNA: 1-Methylnaphthalene, BI: Biphenyl, AC: Acenaphthylene, ACE: Acenaphthene, FL: Fluorene, PH: Phenanthrene, AN: Anthracene, FLR: Fluoranthene, PY: Pyrene, BaA: Benz[a]anthracene, CH: Chrysene, BbF: Benzo[b]fluoranthene, BkF: Benzo[k]fluoranthene, BeP: Benzo[e]pyrene, BaP: Benzo[a]pyrene, PE: Perylene, IP: Indeno[1,2,3-cd]pyrene, BPE: Benzo[ghi]perylene, DA: Dibenz[a,h]anthracene.

미생물군집과의 경쟁 및 포식자의 존재 등으로 인해 집중된 PAHs 분해세균의 수가 PAHs 분해를 촉진시킬 수 있는 수준으로 증가하지 못한 것이 낮은 분해율을 보인 원인으로 판단된다.

멸균실험구에서 PAHs 분해와 ETS 활성도를 비교해 보면 초기에 높게 증가했던 ETS 활성도가 감소하는 기간에 PAHs 분해가 진행된 것으로 추정되는데 이것은 집중 균주가 첨가해준 M-CD를 이용해서 성장한 뒤 쉽게 이용할 수 있는 성분이 고갈된 다음 PAHs를 분해하는 과정을 거치는 것이 원인인 것으로 사료된다. 강 등(2004)의 보고에서도 benzo[a]pyrene의 분해는 분해미생물의 성장 이후에 진행되는 것을 볼 수 있으며 Rivet *et al.*(1993)의 연구에서는 해양 미생물이 투입해준 비료내의 지방산이 고갈된 이후 hexadecane을 분해한 것으로 보고되어있다.

3.3 군집 변화 분석

PAHs 분해균주로 선발된 US6-1, PAH5 및 YSR9 균주를 PAHs로 오염된 퇴적토에 접종하였을 때 집중균주의 유지여부 및 토착미생물과의 상관관계를 T-RFLP 방법을 이용하여 분석하였다. 집중된 세 균주의 16S rDNA를 제한효소 HaeIII로 잘랐을 때 생성되는 T-RF는 US6-1균주 226bp, YSR9 균주 310bp, PAH5 균주는 231bp이다. 비멸균실험구에서 균주를 접종하지 않은 초기 퇴적토에서 약 35개의 T-RFs가 검출되었으나 각각의 비율은 10% 미만으로 나타났다(Fig. 4A). US6-1균주만 접종한 실험구의 초기에 227bp의 T-RF는 32%의 비율을 보였고 그 외에 토착미생물의 절편이 다수 검출되었으며(Fig. 4B), 본 연구에는 표기하지 않았으나 세 균주를 접종한 실험구의 초기에 227bp는 25%, 310bp는 23%의 비율을 보였다.

M-CD를 첨가한 퇴적토에 PAHs 균주를 접종하고 2일 배양하였을 때 집중균주의 비율은 초기값에 비해 43~45%로 증가되었으나, 시간이 경과됨에 따라 집중 균주의 비율은 18~23%로 감소하였고 다른 다양한 T-RFs들의 비율이 높아져 토착미생물들이 성장하였음을 알 수 있었다(Fig. 4C). 이는 토착미생물의 존재가 집중

균주의 성장을 제한할 수 있다는 가정을 뒷받침하는 결과이다. 한편 첨가된 M-CD는 PAHs 분해균주만이 아니라 토착미생물 중 일부 군집의 성장을 촉진시키는 것으로 사료된다. Shi *et al.*(1999)는 microcosm에 nitrate와 toluene을 함께 투여할 경우 미생물의 활성만을 증가시키는 반면 toluene만을 투여할 경우 군집구조가 크게 변화한다고 보고하였으며, Röling *et al.*(2002)은 탄화수소로 오염된 토양에 무기영양염을 첨가하는 생물정화 작업과정에서 미생물 군집 구조가 단순하게 변화했다는 보고를 참조할 때, 본 연구에 사용한 M-CD는 탄소원으로 미생물의 활성과 토착미생물의 군집구조에 영향을 미치는 것으로 판단된다. M-CD를 첨가하지 않은 실험구에서는 집중한 PAHs 분해균주의 T-RFs는 검출되지 않았으며, 균주의 접종유무에 상관없이 초기 시료에서는 비율이 높지 않았던 552~556bp의 T-RFs를 보이는 미생물 군집이 20% 이상으로 급격히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D). 이는 유기 영양원의 고갈에 따라 급격한 군집구조 변화가 생긴 것이 원인으로 추정된다. M-CD가 첨가되지 않은 비멸균실험구에서 PAHs 분해가 일어나지 않았던 결과와 비교하면 토착미생물의 PAHs 분해력은 매우 낮은 반면 집중 균주는 토착미생물과의 경쟁으로 성장이 제한됨으로 인해 PAHs 분해가 진행되지 못한 것으로 사료된다.

멸균실험구에서는 집중 초기에 US6-1균주만 접종한 실험구에서 T-RF는 97%의 비율을 차지하였다(Fig. 4E). 균주를 접종하지 않은 실험구에서는 DNA가 추출되지 않아 검출할 수 없었다. 멸균실험구에서 집중한 PAHs 분해균주는 시간이 경과하여도 균주의 비율이 비멸균실험구와 달리 유지되는 것을 확인할 수 있었다. PAHs 분해균주가 접종된 각 실험구에서 부분적으로 비특이적인 T-RFs가 검출되었는데 이는 PCR 후 제한효소 반응 단계에서 불완전한 반응에 의해 발생한 오류로 추정된다. 한국해양연구원 보고서(1999)에 따르면 비특이적 피크의 출현은 서로 다른 DNA로부터 파생 될 수 있는 chimeric PCR 산물 일 가능성이 있으며, 부적당한 PCR의 조건, 제한효소의 불완전한 반응으로 생성될 수도 있다고 보고된다.

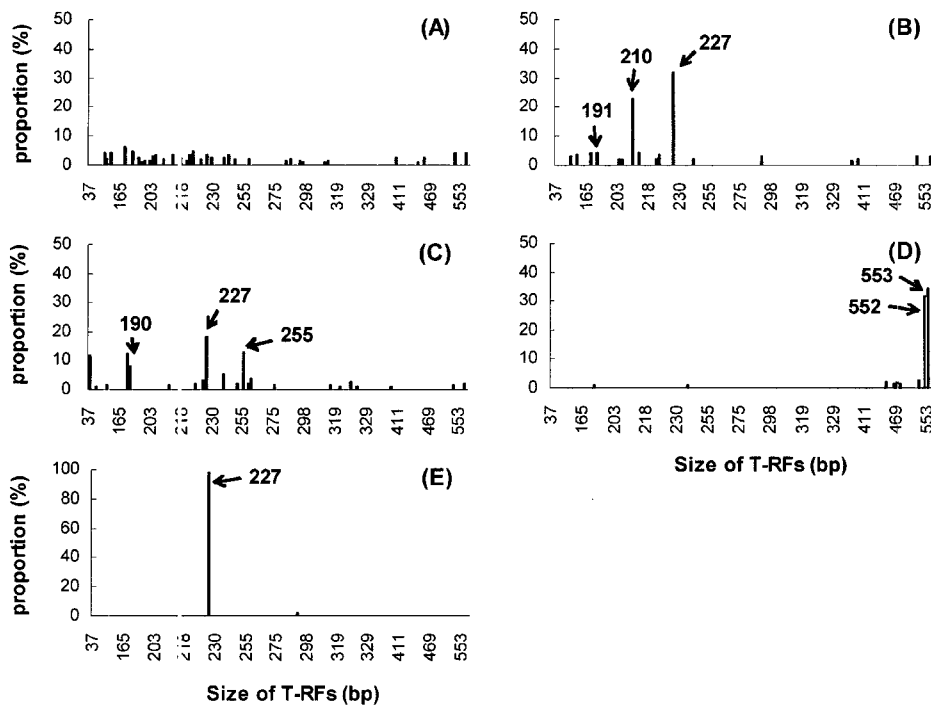


Fig. 4. Profiles of T-RFs in some nonsterilized(A-D) and sterilized(E) sediment microcosms during 6 days of incubation (A: Uninoculated control at initial phase, B: Inoculated by US6-1 only at initial phase, C: Inoculated by US6-1 accompanied with 1% M-CD after 6 days, D: Inoculated by US6-1 only after 2 days, E: Inoculated by US6-1 only at initial phase).

이상의 결과로 볼 때 멸균실험구에서 접종된 균주는 탄소원이 있을 경우와 경쟁 대상이 없는 경우 지속적으로 높게 유지되었으며, 이에 따라 접종 균주가 토착미생물과의 경쟁 혹은 포식압에 의해 적절한 수준으로 증가하지 못한 비멸균실험구에서와는 달리 PAHs 분해가 진행된 것으로 사료된다.

4. 요약 및 결론

멸균처리 하지 않은 퇴적토 slurry에서 M-CD의 첨가에 따라 ETS 활성도는 증가한 반면 분해균주의 접종 여부에 관계없이 PAHs의 분해는 관찰할 수 없었다. 또한 M-CD가 첨가되지 않을 경우 ETS 활성도도 낮게 유지되는 것을 볼 때 M-CD는 퇴적토 내 미생물의 성장원으로 작용한 것으로 생각된다. 또한 T-RFLP 방법으로 수행한 군집분석 결과로 볼 때 토착미생물은 접종균주의 성장을 억제하는 요인으로 작용한 것으로 사료된다. 한편 포식자와 토착미생물이 존재하지 않는 멸균실험구의 경우 분해균주와 M-CD 및 N, P를 첨가한 실험구에서 ETS 활성도가 높게 나타났으며 접종한 균주가 지속적으로 유지되고 있음을 확인할 수 있었다. 이들 실험구에서는 PAHs 분해율도 높게 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 bioslurry reactor에서 PAHs 생분해를 위한 균주접종의 효율을 높이기 위해서는 포식자와 토착미생물의 사전 제거와 적절한 탄소원의 첨가가 필요한 것으로 사료된다.

후 기

본 연구는 환경부 “차세대핵심환경기술개발사업”의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- [1] 강지현, 권개경, 김상진, 2004, “*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1에 의한 고분자 방향족 탄화수소 생분해과정에서 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin의 영향”, 해양환경공학회지, 7, 146-151.
- [2] 강지현, 이희순, 이숙영, 권개경, 김상진, 2004, “고분자 PAHs 분해증진을 위한 보조기질 탐색”, 한국해양환경공학회 추계학술대회 논문집, 134-139.
- [3] 한국해양연구소, 1999, “제한절편말단분석법(T-RFLP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군집 분석”, 한국해양연구소 보고서, BSPE 98731-00-1186-3.
- [4] Alan, S., 2005, “Environmental Biotechnology”, Oxford university press, New York, 179-184.
- [5] Bardi, L., A. Mattei, S. Steffan, and M. Marzona, 2000, “Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability”, *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 709-713.
- [6] Blumer, M., 1976, “Polycyclic aromatic compounds in nature”, *Sci. Amer.* 234, 34-45.

- [7] Coates, J.D., J. Woodward, J. Allen, P. Philip, and D.R. Lovley, 1997, "Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3589-3593.
- [8] Fernandez, P., M. Grifoll, A.M. Solanas, J.M. Bayona, and J. Albalges, 1992, "Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediment", *Environ. Sci. Technol.*, 26, 817-829.
- [9] Gao, S., L. Wang, Q. Huang, and S. Han, 1998, "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by β -cyclodextrin and carboxymethyl- β -cyclodextrin", *Chemosphere*, 37, 1299-1305.
- [10] Guieysse, B., G. Viklund, A.-C. Toes, and B. Mattiasson, 2004, "Combined UV-biological degradation of PAHs", *Chemosphere*, 55, 1493-1499.
- [11] Juhasz, A.L. and R. Naidu, 2000, "Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene", *Int. Biodet. Biodeg.*, 45, 57-88.
- [12] Kim, S.-J., K.K. Kwon, J.-H. Hyun, and V.I. Svetashev, 2004, "Bioremediation of PAHs in marine sediment", *J. Ocean Sci. Technol.*, 1, 7-13.
- [13] Kuske, C.R., K.L. Banton, D.L. Adorada, P.C. Stark, K.K. Hill, and P.J. Jackson, 1998, "Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil", *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2463-2472.
- [14] Lindsey, M.E., G. Xu, J. Lu, and M.A. Tarr, 2003, "Enhanced Fenton degradation of hydrophobic organics by simultaneous iron and pollutant complexation with cyclodextrins", *The Science of the Total Environment*, 307, 215-229.
- [15] Liu, W.-T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney, 1997, "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4516-4522.
- [16] Means, J.C., J.J. Hassett, S.G. Wood, and W.L. Banwart, 1980, "Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediment and soil", *Environ. Sci. Technol.*, 14, 1524-1528.
- [17] Nam, K., W. Rodriguez, and J.J. Kukor, 2001, "Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction", *Chemosphere*, 45, 11-20.
- [18] Potter, C.L., J.A. Glaser, L.W. Chang, J.R. Meier, M.A. Dosani, and R.F. Hermann, 1999, "Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions", *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1717-1725.
- [19] Ramadan, M.A., O.M. El-Tayeb, and M. Alexander, 1990, "Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation", *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1392-1396.
- [20] Ramaswami, A. and R.G. Luthy, 1997, "Mass transfer and bioavailability of PAH compounds in coal tar NAPL-slurry systems. 1. Model development", *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2260-2267.
- [21] Rivet, L., G. Mille, A. Basseres, A. Ladousse, C. Gerin, M. Acquaviva, and J.-C. Bertrand, 1993, "n-alkane biodegradation by a marine bacterium in the presence of an oleophilic nutrient", *Biotechnol. Lett.*, 15, 637-640.
- [22] Röling, W.F.C., M.G. Milner, D.M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R.J.P. Swannell, and I.M. Head, 2002, "Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation", *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5537-5548.
- [23] Schlautman, M.A. and J.J. Morgan, 1993, "Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials", *Environ. Sci. Technol.*, 27, 961-969.
- [24] Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, and D. Warschawsky, 1996, "Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. RJG-135, isolated from a former coal gasification site", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 13-19.
- [25] Schwartz, A. and R. Bar, 1995, "Cyclodextrin-enhanced degradation of toluene and p-toluic acid by *Pseudomonas putida*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2727-2731.
- [26] Shi, Y., M.D. Zwolinski, M.E. Schreiber, J.M. Bahr, G.W. Sewell, and W.J. Hickey, 1999, "Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2143-2150.
- [27] Sohn, J.H., K.K. Kwon, J.H. Kang, H.-B. Jung, and S.-J. Kim, 2004, "*Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1483-1487.
- [28] Song, W., Q. Huang, and L.-S. Wang, 1999, " β -Cyclodextrin (β -CD) influence on the biotoxicities of substituted benzene compounds and pesticide intermediates", *Chemosphere*, 38, 693-698.
- [29] Vollmuth, S. and R. Niessner, 1995, "Degradation of PCDD, PCDF, PAH, PCB and chlorinated phenols during the destruction-treatment of landfill seepage water in laboratory model reactor (UV, Ozone, and UV/Ozone)", *Chemosphere*, 30, 2317-2331.
- [30] Vosjan, J.H., 1982, "Respiratory electron transport system activities in marine environments", *Hydrobiological Bulletin*, 16, 61-68.
- [31] Zeng, Y., P.K.A. Hong, and D.A. Wavrek, 2000, "Integrated chemical-biological treatment of benzo[a]pyrene", *Environ. Sci. Technol.*, 34, 854-862.

2005년 5월 6일 원고접수

2005년 11월 3일 수정본 채택