

목재재질의 담체를 혼합한 토양에서 *Bacillus subtilis* 에 의한 PAH분해에 대한 연구

권성현¹ · 유승희² · 조대철^{3*} · 허남수³ · 김종향⁴

A Study of PAH (polyaromatic hydrocarbon) Biodegradation in Soil by *Bacillus subtilis* mixed with Wooden Media

Sung Hyun Kwon¹, Seung Hye Yoo², Daechul Cho^{3*},
Nam Soo Huh³ and Jong Hyang Kim⁴

요 약 PAHs는 2개 이상의 벤젠링을 가지는 방향족 탄화수소로, 특성과 분자량에 의해 크게 두 가지로 구분되며, 독성 유기물질들이 직·간접적으로 인간에게 피해를 준다. 이러한 PAHs에 오염된 토양을 복구하기 위해서 PAHs를 완전분해 또는 무독성 화합물로 전환시켜야 한다. 본 연구에서는 PAHs분해를 위해 *Bacillus subtilis*을 사용하였고, 담체로 코르크분말과 톱밥을 선정하였다. Phenanthrene을 분해한 경우 코르크분말 담체와 톱밥담체가 비슷한 분해양상을 보였으며, pyrene을 분해한 두 담체의 경우 톱밥 담체가 우수하다고 판명되었다. 또한 토양함수율은 분해제거효율의 주 영향요소로서 45~55%의 함수율 일 때 최적의 효율을 나타냈다.

Abstract PAHs are aromatic hydrocarbon compounds with two or more benzene rings. Because they are mostly toxic to human life, they need to be converted to non-toxic compounds or to be degraded completely. This work aims to degrade PAHs (phenanthrene and pyrene) using *Bacillus* bacteria covered on cork or sawdust. The results show that media effect on phenanthrene was negligible whereas biodegradation ability of sawdust carrying the bacteria was better than that of biofilm-covered cork when pyrene was tested. PAH removal was also affected by soil moisture content with 45~55% of the optimal content.

Key Words : PAH, *Bacillus subtilis*, phenanthrene, pyrene

1. 서 론

PAH는 2개 이상의 벤젠링을 가지는 방향족 탄화수소로, 특성과 분자량에 의해 크게 두 가지로 구분된다. 2, 3개의 벤젠핵을 가진 naphthalene~anthracene 류와 4, 6개의 벤젠핵을 가진 fluoranthene~indeno(1, 2, 3-c, d) pyrene 류이다. 분자량이 적은 2, 3개 핵을 가진 PAH는 급성독성이 높으며, 분자량이 큰 방향족 중에서 어떤 것들은 발암성이 매우 높다고 알려져 있다[1]. 이러한 PAH는 화석연료나 유기물질의 불완전연소에 의한 인위적 요인에 의해 주로 발생하고 있으며[2], 여러 경로를 통해 마지막으로 토양으로 방출하게 되는데, 소수

성과 잔류성으로 미생물이나 화학적 반응에 의해 쉽게 분해되지 않기 때문에 퇴적물중에서 높은 농도로 축적될 수 있다. PAH의 분해나 무독성 화합물로의 전화를 위해 최근 선진국에서는 미생물을 이용한 생물학적 정화법이 안정성, 효율성, 친환경성, 경제성 차원에서 각광받고 있다[3, 4].

PAH의 분해 연구를 하기 위한 모델 화합물로 3개의 벤젠고리를 가지고 있는 phenanthrene이 사용되고 있다. phenanthrene은 PAH에 오염된 환경시료에 고농도로 존재하고 생명체에 대한 발암성이 없으나 구조면에서는 다른 발암성이 있는 고분자 PAH와 매우 유사하기 때문이다. 또 phenanthrene은 여러 종류의 PAH중에서 용해도와 물리적 특성이 중간 단계이기 때문에 생물학적 연구를 통해 분해경로가 자세하게 연구되고 있다. 이러한 phenanthrene의 미생물에 의한 분해경로는 크게 두 가지로 알려져 있다. 하나는 phenanthrene이 1-hydroxy-2-naphthoate까지 분해된 다음 다시 salicylate, catechol을

¹경상대학교 해양환경공학과(해양산업연구소)

²경상대학교 해양환경공학과

³순천향대학교 환경공학과

⁴경남보건환경연구원

*교신저자: 조대철(daechul@sch.ac.kr)

거쳐 완전 분해 되는 salicylate 분해 경로이고, 또 다른 하나는 phenanthrene이 1-hydroxy-2-naphthoate까지 분해 된 후 salicylate가 아닌 phthalate, protocatechuate를 거쳐 완전 분해 되는 phthalate 분해경로이다. 지금까지 밝혀진 phenanthrene 분해 세균의 속(genus)은 *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* 등이다[5].

Pyrene은 4-ring을 갖는 고분자 PAHs의 종류로, 1988년 Heitakemp 등[6]이 처음으로 *Mycobacterium* sp.가 분해할 수 있음을 밝힌 이후 *Alcaligenes denitrificans* 와 *Rhodococcus* sp.에 의해 분해 된다는 보고가 있었다. 그러나 pyrene을 포함하는 고분자량 PAH의 경우 분해에 관여하는 균의 종류도 적을 뿐만 아니라 그 생태, 생리, 분자생물학적 연구가 매우 적은 형편이다.

현재 미국 유럽 등의 선진국에서는 PAH 오염 토양의 복원에 대한 연구가 오래전부터 활발히 연구를 거듭하고, 특히 미생물을 이용한 PAH 오염 처리프로그램을 개발하여 상용화까지 되고 있다. 하지만 국내의 경우에는 토양오염에 관한 법규마저 체계적이지 못하고 규제 화합물의 종류 또한 미비하다. 이러한 이유로 국내에서 이미 공업지역 및 지하수 등에서 PAH가 검출되고 있음에도 불구하고, 이에 대한 연구는 아직 초보적인 단계에 불과하다.

본 연구에서는 오염된 토양을 *Bacillus subtilis* 에 의한 미생물 분해 능력을 검토하였다. 이 때 미생물의 생존능력을 높이기 위해서 미생물을 고정화 하였다. 고정화 하는 담체로는 코르크분말과 톱밥을 이용하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험 균주 배양

본 실험에서 사용한 균주는 *Bacillus subtilis* (ATCC23059) [7]이며 한국미생물보전센터에서 동결·건조된 것을 분양 받은 것이며, nutrient broth(Difco 0003) 액체배지에 seeding하여 24시간 배양 하여 활성화 시켰다. 미생물을 코팅할 담체로 코르크분말과 톱밥을 선정하였고, 각각의 담체 100 g(Autoclave에 멸균)에 미생물이 포함된 액상배지를 10 ml 접종 시킨 후 상온에서 일주일 동안 20 rpm으로 혼합하여 담체에 배양하였다. 배양하는 동안 이틀에 한번씩 60% 수분유지와 영양분주입을 위해 액상배지를 적절하게 주입하였다.

2.2 오염토 제조와 수분조절

이 실험에 사용된 토양은 경남 통영시 경상대학교 해안과학대 인근 산에서 채취한 토양이다. 채취한 토양은 2 mm체로 자갈이나 불순물을 거른 후 수분함량을 조사

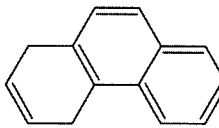
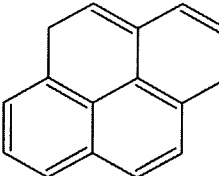
하였다. 수분함량은 직접법 중에서 중량법으로 105°C에서 Drying oven에 24시간 동안 건조하여 전후의 무게차로 계산하였다(원토양 30.3%).

효과적인 수분 조절을 위해 실험에 들어가기 전에 토양을 drying oven에 105°C에서 24시간 완전 건조하고, 토양 내 다른 유기화합물 및 불순물을 제거하기 위해서 phenanthrene(Acros organics Co. LTD C4H10 Purity 98%)과 pyrene(Benzo(a)pyrene Sigma chemical Co. LTD C₂₀H₁₂ Purity 97%)을 Acetone으로 녹여 토양 300 g에 혼합하여 50 ppm(50 mg total PAHs/kg-soil)으로 각각 오염시켰고, 균일하게 오염을 시키기 위해 계면활성제 brij35를 2.5 mg/L를 주입하고, 300 rpm에서 shaking한 후, 오염된 토양을 상온에서 이틀정도 방치하여 용매를 휘발시켰다[8]. 이에 미생물을 담지한 담체를 오염된 토양에 혼합 후 상온에 방치하면서 역시 담지 할 때 와 마찬가지로 이틀에 한번씩 수분유지를 하였고, 전체적인 산소공급을 위하여 주기적으로 토양을 뒤집어 주었다. 3일 간격으로 시료를 채취하여 실험을 하였다.

2.3 PAHs 분석

실험에 사용한 PAH는 phenanthrene 과 pyrene 두 종류이며 그들의 물리적 특성과 구조가 표 1에 나와 있다. 시료 3 g를 20 ml 바이알(유기물 제거를 위해 아세톤 세 번, 헥산 세 번으로 세척하여 완전히 건조시킴)을 채취하여 아세톤 10 ml를 넣고 5분 동안 200 rpm으로 shaking한 후, 1시간동안 40°C이하를 유지하며 Sonication에 초음파처리를 하였다. 유리갈때기에 거름종이를 깔고 무수황산나트륨(105°C에서 24시간 Drying Oven에 건조시킴) 약 10 g를 넣고 시료를 부어 여과시켰다. 그

표 1. Phenanthrene과 pyrene의 화학구조와 물리적 특성

 <p>(3 benzene rings)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 색상 : 무색 - 융점(°C) : 100.5 - 비점(°C) : 340 - 증기압 (Pa) : 1.6×10^{-2} - 밀도 : 0.980 - 옥탄올물분계수 : 4.6 - 수용해도(25°C) : 1.29×10^3 - 헨리상수(25°C) : 3.98×10^{-3}
 <p>(4 benzene rings)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 색상 : 무색 - 융점(°C) : 150.4 - 비점(°C) : 393 - 증기압 (Pa) : 6×10^{-4} - 밀도 : 1.271 - 옥탄올물분계수 : 5.18 - 수용해도(25°C) : 135 - 헨리상수(25°C) : 1.1×10^{-3}

중 1 ml를 취한 후 internal standard에 30 µl를 넣었다.

전처리한 시료는 GC/MS(Gas Chromatograph/Mass Spectrometer)를 이용하여 PAH를 분석하였다. GC는 HP6890 GC와 MSD 5973으로 구성된 장비를 이용하였으며, 칼럼은 HP5 crosslinked 5% ph Me silicon capillary column(50 m×0.2 mm×0.11 µm film thickness)를 사용하였다. 작업조건은 GC의 운반 가스로서 순도 99.999의 초고순도 헬륨(유니온 가스)을 사용하여 분당 1 ml로 흐르도록 유지하고, 온도 프로그램은 70°C에서 2분간, 5°C/min로 80°C까지 온도를 올리고, 30°C/min로 240°C까지 온도를 올려서 분석하였다. Injector의 온도는 200°C, 압력은 37psi이고, 시료는 GC용 10 µl짜리 syringe를 사용하여 1 µl를 주입하였고, 30:1의 split ratio로 GC 내로 주입되었다.

각 PAHs 물질의 정성분석은 미리 준비한 표준 농도와 GC에서 나타난 peak area의 관계를 구하여 작성해 둔 검량선에 시료의 측정된 peak area를 대입하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

PAH를 분해하기 위해 *Bacillus subtilis*을 2 mm의 코르크분말가루와 톱밥에 각각 접종하여 오염된 토양에 혼합한 후 PAH의 분해 속도를 알아보았다. 25°C에서 50%의 수분율을 유지하며 실험을 수행하였다.

[그림 1]와 [그림 2]는 각각 토양, 코르크분말, 톱밥을 혼합한 경우의 phenanthrene 분해정도를 나타내고 있다. [그림 2]와 같이 톱밥에 접종한 경우 반응 초기에 톱밥에 의한 분해가 [그림 1]의 코르크분말에 의한 것보다 phenanthrene의 농도가 더 크게 감소했다. 반응 6일째를 넘어서는 정체기에 들어서면서, 비슷한 감소 속도를 가지고 각각 2.9 ppm, 0.8 ppm까지 감소하였다. 정체기부터 농도가 서서히 감소하는 시기는 톱밥에 접종했

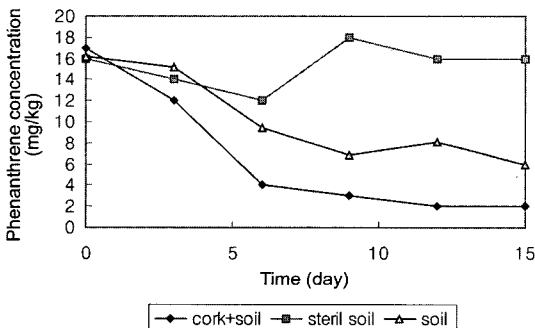


그림 1. 코르크혼합토양, 토양, 대조군(멸균)토양중의 phenanthrene 생분해

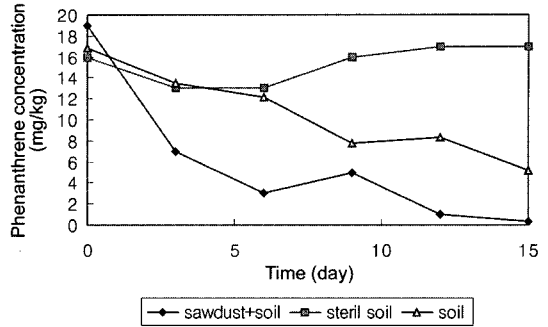


그림 2. 톱밥혼합토양, 토양, 대조군(멸균)토양중의 phenanthrene 생분해

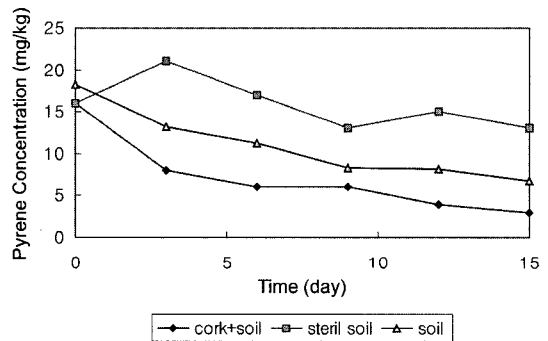


그림 3. 코르크혼합토양, 토양, 대조군(멸균)토양중의 pyrene 생분해

을 경우는 대체적으로 코르크와 비슷한 양상을 보이나, 토양에 혼합 했을 때부터 6일까지는 코르크분말에 섞인 토양은 톱밥과 섞인 토양보다 낮은 제거효율을 보였다. 멸균토의 대조군은 평균적으로 상당히 안정된 변화를 보였고, 일정한 농도변화를 유지하였다.

마찬가지로 [그림 3]과 [그림 4]는 각각 토양, 코르크분말, 톱밥을 혼합한 경우의 pyrene 분해정도를 나타내고 있다. 코르크분말 담체를 이용한 경우엔 반응초기 3일후에는 톱밥과 비슷하게 농도가 급격히 감소하였으나, 5일 후부터 농도는 완만하게 감소하였다. 반응 12일 이후의 잔류 pyrene농도는 각각 5 ppm, 2 ppm이었다. 정리하면 톱밥담체가 코르크분말 담체보다 보다 더 생분해가 잘 되었으며, phenanthrene은 98%, pyrene은 88.8%의 분해율을 보였다. 멸균토에서는 농도의 감소가 적었으며, 영양분을 주입한 순수 오염토에서의 phenanthrene은 코르크분말에서 63.5%, 그리고 톱밥담체에서 69.2%의 제거효율을 보였다. 이는 오염토에 담체를 이용한 경우보다 매우 낮은 제거효율이다. Pyrene의 경우도 멸균한 대조군에서는 제거효과를 관찰할 수 없었으며, 순수 오염토에서는 코르크 분말에서 63.4%, 톱밥에서 67.9%

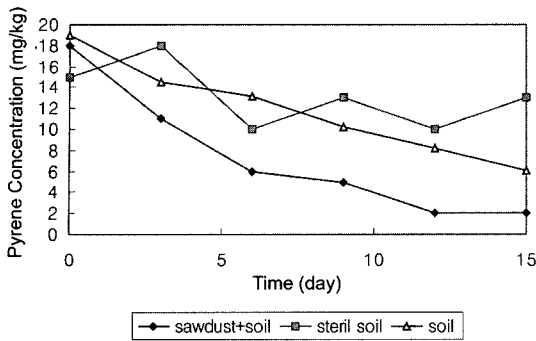


그림 4. 톱밥혼합토양, 토양, 대조군(멸균)토양중의 pyrene 생분해

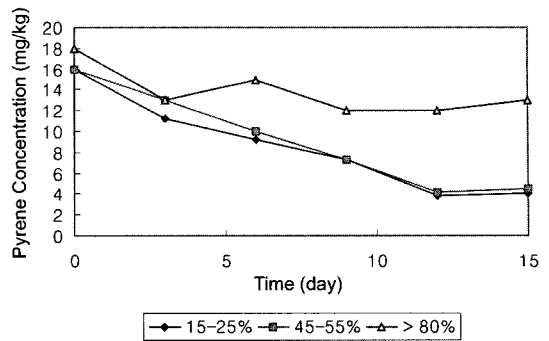


그림 7. 함수율에 따른 코르크혼합토양에서의 pyrene 생분해

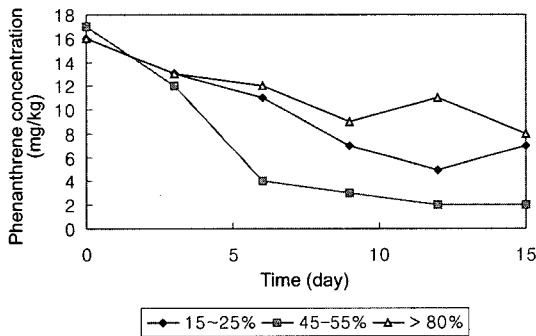


그림 5. 함수율에 따른 코르크혼합토양에서의 phenanthrene 생분해

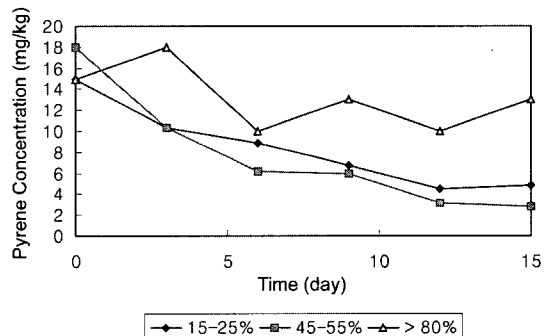


그림 8. 함수율에 따른 톱밥혼합토양에서의 pyrene 생분해

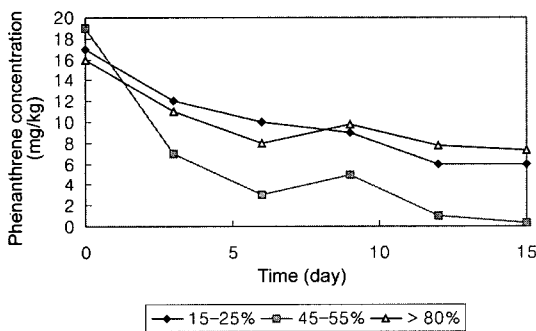


그림 6. 함수율에 따른 톱밥혼합토양에서의 phenanthrene 생분해

의 효율을 보여, 담체를 사용한 경우와 뚜렷한 대조를 보였다.

토양 수분을 효과를 보면, 두가지 담체 모두에서 분해제거율이 다르게 나타났다. [그림 5]~[그림 8]은 15~25%, 45~55%, 80%이상의 토양 함수율을 유지하여 phenanthrene, pyrene의 제거효율을 관찰한 것이다. 코르크 분말의 경우 80%이상의 함수율인 경우 phenanthrene이 완만하게 50%정도 제거된 것으로 관찰되었고, 15~25% 경

우 56.3%의 제거효율이 관찰되었다. 45~55%의 토양 함수율일 경우 88.2%로 제거효율이 가장 높았으며, 이는 미생물의 대사 작용 및 토양상의 성장이동에 가장 적합하기 때문으로 추정된다. 톱밥담체의 경우도 80% 이상과 15~25%의 함수율에는 각각 64.7%, 54.5%의 비슷한 제거 효율을 보였으며, 역시 45~55%의 함수율에서는 최적의 효율을 보여주었다. 톱밥 담체의 경우에는 phenanthrene농도가 0.3 ppm이하로 검출되어 98.4%의 제거효율로서 코르크분말 담체보다 높은 효율을 보였다.

반면 pyrene이 있는 코르크분말 담체에서는 80% 이상의 함수율인 경우에는 pyrene의 농도변화가 거의 없었으며, 15~25%와 45~55% 경우에는 각각 74.4%, 71.8%(15일)의 제거효율로 비슷한 제거 양상을 보였다. 톱밥 담체를 이용한 경우에도 코르크분말 담체와 비슷하나 10일 후에는 톱밥 담체가 조금 더 농도가 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 즉, 토양 수분율이 증가함에 따라 제거효율은 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 80%의 높은 수분함유율은 미생물에 성장과 대사작용에 부적절한 것으로 판명되었으며, 이것은 토양의 일부분이 혐기화되는 것에 기인하는 것으로 보여진다.

4. 결 론

PAHs에 오염된 토양에서 톱밥과 코르크분말을 접종시킨 후 일정시간 성장을 시켜 오염토와 혼합하여 *Bacillus subtilis*의 분해 능력을 실험한 결과는 다음과 같다.

1. Phenanthrene을 분해한 경우 코르크분말 담체와 톱밥 담체 두 가지 모두 반응 초기에는 급격한 분해 속도를 보였으나 반응 12일째부터 분해 속도가 떨어지면서 비슷한 양상을 보였다. 이는 미생물의 성장곡선에 의한 대수성장기에 이르러 가장 높은 분해 속도를 보이다가 정체기에 들어가면서 미생물의 활동이 점점 감소하면서 분해속도가 떨어지는 것으로 보인다. 반응 초기 6일째 분해 속도를 보면, 코르크분말 담체에 접종한 경우 톱밥담체와 비슷하게 76%급격한 감소율을 보였다. 그 후에는 코르크분말 담체는 15일후에 2 ppm으로 88.2%의 제거효율을 보였다. 하지만 톱밥담체는 0.3 ppm으로 98%의 감소율을 보였다.

2. Pyrene을 분해한 경우 두 담체 모두 phenanthrene의 농도변화는 완만하게 감소되었고 각각의 반응 속도 차이도 크게 나지 않음을 알 수 있었다. 15일 후에는 81.3%, 88.8%의 제거효율을 나타냈으며, 코르크분말 담체와 톱밥 담체 중에서 톱밥 담체가 성능이 우수하다고 판명되었다.

3. 토양함수율의 경우 45~55% 일 때 최적이었다. 80%이상의 높은 함수율은 제거효율에 부정적으로 나타났으며, 톱밥담체의 경우 15%이상이면 좋은 제거효율을 기대할 수 있었으나 코르크분말 담체의 경우 그 기준은 45%이상이었다.

참고문헌

- [1] L. H. Keith and W. A. Telliard, "Priority pollutants I-A perspective view." Environ Sci Technol 13, 416-423, 1979.
- [2] E. Jackim and C. Lake, "Polynuclear aromatic hydrocarbons in estuarine and nearshore environments. In Estuarine Interactions", Ed. M. L. Wiley, pp. 415-428. Academic Press, NY, 1978.
- [3] R. M. Atlas, "Bioremediation of fossil fuel contaminated soils. In: Hinchee RE, Olfenbuttel RF (ed) Situ bioremediation". Butterworth-Heinemann, Boston, Mass, p. 14-32, 1991.
- [4] M. A. Heitkamp and C. E. Cerniglia, "Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field", Appl Environ Microbiol 54, 1612-1614, 1988.
- [5] C. E. Cerniglia, "Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", Adv Appl Microbiol 58, 3117-3121, 1984.
- [6] M. A. Heitkamp, J. P. Freeman, D. W. Miller and C. E. Cerniglia, "Pyrene degradation by a Mycobacterium sp.: identification of ring oxidation and ring fission products", Appl Environ Microbiol, 54, 2556-2565, 1984.
- [7] Catalogue of strains (6th Ed.), KCCM, 1998.
- [8] Z. Zheng, and J. P. Obbard, "Oxidation of PAH by the white rot fungus, Phanerochaete chrysosporium", En z. Microbial Technol., 31, 3-9, 2002.

권 성 현(Kwon, Sung Hyun)

[정회원]



- 1988년 2월 : 부경대학교 환경공학과 (공학사)
- 1997년 2월 : Univ. Southern California 환경공학과 (공학박사)
- 2000년 9월-현재 : 경상대학교 해양 환경공학과 부교수

<관심분야>

생물환경공학, 생물학적 토양정화, 생물학적 폐기물 처리

유 승 희(Yoo, Seung Hye)

[정회원]



- 2005년 2월 : 경상대학교 해양환경 공학과 (공학사)
- 2005년 3월-현재 : 경상대학교 해양환경공학과 연구조교

<관심분야>

생물학적 토양정화, 생물학적 폐기물 처리

조 대 철(Cho, Daechul)

[정회원]



- 1985년 2월 : 서울대학교 화학공학과 (공학사)
- 1996년 2월 : Purdue Univ.(공학박사)
- 2000년 3월-현재 : 순천향대학교 환경공학과 조교수

<관심분야>
박막계면현상, 생물환경처리, 토양정화

허 남 수(Huh, Nam Soo)

[정회원]



- 2005년 2월 : 순천향대학교 환경공학과 (공학사)
- 2005년 3월-현재 : 순천향대학교 환경공학과 연구조교

<관심분야>
생물학적 토양정화, 미생물 담체

김 종 향(Kim, Jong Hyang)

[정회원]



- 1981년 2월 : 경남대학교 화학공학과 (공학사)
- 1992년 2월 : 경상대학교 화학과 (이학박사)
- 2002년-현재 : 경남 하수도자문위원
- 현재 : 경남보건환경연구원 환경연구부

<관심분야>
물리화학적 처리(대상 : 난분해성유기물제거), 내분비계장애물질 분석방법, 나노기술