大韓環境工學會誌 · 논문
J. of KSEE Vol. 23, No. 12, pp. 2077~2086, 2001.
Journal of Korean Society of Environmental Engineers

PAHs로 오염된 토양복원을 위한 *Pseudomonas* sp.의 분해특성에 관한 연구

조용말† · 조기철* · 강지순* · 조상원** · 오광중*

POSCO 기술개발실
*부산대학교 환경공학과
**대구기능대학 환경화학과

(2000년 12월 13일 접수, 2001년 10월 29일 채택)

A Study on Degradation Characteristic using *Pseudomonas* sp. for Remediation of PAHs Contaminated Soil

Yong-Mal Jo† · Ki-Chul Cho* · Ji-Soon Kang* · Sang-Won Cho** · Kwang-joong Oh*

Technology Development Division, POSCO
**Department of Environmental Engineering, Pusan National University*
***Department of Environmental and Chemical Engineering, Daegu Polytechnic College*

ABSTRACT

As a basic study for the development of bioreactor to remediate PAH contaminated soil, this experiment was performed and the biodegradation rate of PAHs(naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene) by *Pseudomonas fluorescence* and *Pseudomonas putida* was obtained. As a result, naphthalene, phenanthrene, fluoranthene, anthracene and pyrene were decomposed in orders. When the number of benzene ring of PAHs is decreased and solubility of PAHs is increased, the biodegradation rate of each PAH was increased. In case of individual cultures, *Pseudomonas fluorescence* showed better biodegradation capability on any PAH comparing *Psudomonas putida*. Furthermore, the mixed culture of these two bacteria showed better efficiency than that of individuals.

Key Words : PAHs, Soil Remediation, *Pseudomonas* sp.

† Corresponding author
E-mail: joym@posco.co.kr Tel: 054-220-0711 Fax: 054-220-5772

요 약 문

PAHs로 오염된 토양의 복원을 위한 생물반응기 개발의 기초연구로서 *Pseudomonas fluorescence*와 *Pseudomonas putida*를 이용하여 5가지의 PAHs(naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene)에 대한 분해속도를 구하는 실험을 수행하였다. 분해양상은 고리수가 적은 naphthalene이 먼저 분해되고, 세 개인 방향족 고리화합물 중에서는 용해도가 높은 순으로 phenanthrene, fluoranthene, anthracene이 분해되었으며 네 개의 방향족 고리화합물인 pyrene이 마지막으로 분해되었다. 즉, 각각의 PAHs 물질의 분해는 방향족 고리수가 적은 순서로, 같은 고리수의 화합물의 경우는 용해도가 높은 순서대로 분해되는 결과를 보였다. 또한, 균주별 분해속도의 경우에는 단일균주의 경우 모든 PAHs 물질에 걸쳐 *Pseudomonas putida*에 비해 *Pseudomonas fluorescence*가 빨랐으며, 최대 분해율 또한 *Pseudomonas fluorescence*가 빠른 것으로 나타났고, 혼합균주의 경우에는 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* 모두에 비해 분해율이 빠르게 나타났다.

주제어 : 방향족 고리화합물, 토양복원, *Pseudomonas* sp.

1. 서 론

수질, 대기, 토양, 해양오염을 비롯한 환경오염은 인간생활에 직접적으로 영향을 미치며, 이중 수질오염과 대기오염은 피해의 전달속도가 빠름으로 인해서 사회적으로 많은 관심을 불러일으킨 반면, 지금까지 토양오염은 피부에 직접적으로 와닿는 환경문제가 아니었기 때문에 다른 환경오염문제에 비해 상대적으로 관심이 적었던게 사실이다. 그러나 산업사회가 더욱 발달하면서 각종 유해물질들이 대량 발생함에 따라 토양오염이 야기되었고 이들을 처리하는 것이 심각한 문제로 대두되고 있어서 오염토양 정화기술의 개발은 매우 시급한 실정이다.[1,2]

토양오염은 축적성이 있는 오염현상이기 때문에 정화의무를 과거까지 소급하지 않으면 안되는 특성을 가지고 있다. 1980년 미국에서 제정된 슈퍼펀드(Superfund)법과 1996년 일본의 개정된 수질오염방지법에는 오염토양 복원시 오염자에 대한 정화의무가 명시되어 있으며, 우리나라에서도 1996년 1월부터 토양환경보전법이 시행됨에 따라 토양오염 우려기준을 초과하는 지역에 대해서는 시정명령, 오염토양 개선사업 등을 통해 이전 상태로 복원하도록 법적으로 규제할 수 있게 되었다.

이러한 규제기준이 정립되면서 미국을 비롯한 일본, 독일, 프랑스에서 토양정화사업이 본격적으로 시작되었으며, 미국의 경우 최소 20,000여 개에 이르는 유해화학물 폐기지역에 정화사업이 수행되었고, 국내에서도 토양환경보전법이 시행에 들어감에 따라 토양오염의 복구를 위한 제반기술의 확립이 절실히 요구되고 있는 실정이다.[3]

본 연구의 대상인 PAHs는 석유정제, 코크생산, 폐수처리와 같은 산업공정 등에서 발생되며 지하에 매설된 유류탱크 누출사건의 증가 또한 주요한 오염원이 되고 있다. 미국의 Exxon Valdez 누출사고들이 그러한 사례이며, 현재 산업공단 주변지역이나 누출사고에 의한 PAHs 오염지역이 북미에서만 해도 약 3000~4000여 지역이 넘고, 미국에 있는 700만개의 지하탱크 중 30% 이상이 누출되고 있다고 보고되고 있다.[4]

최근 오염토양 정화기술 개발에 대한 필요성이 인식되면서 많은 연구가 수행되었는데 이들 대부분은 물리화학적인 처리에 큰 비중을 둔 것으로, 많은 비용과 장비들을 필요로 하며 2차 오염을 일으킨다는 점에서 궁극적인 오염물질 제거방법이라 할 수 없다. 그러나, 미생물에 의해서 자연계에서 오염물질이 완전히 분해된다는 사실을 고려하면, 오염토양은 다양하고 새로운 미생물학적 처리법의 개발에 의해 보다 안전하고 간단하며 경제적으로 복원될 수 있다. 이를 위해서는 토양내의 여러 오염물질들에 대해 뛰어난 분해능을 가진 미생물들을 확보하고 고

농도의 오염물질의 존재하에서 미생물의 활성을 극대화할 수 있는 생물반응기의 개발이 필수적이라 하겠다.

따라서, 본 연구에서는 PAHs로 오염된 토양의 복원을 위한 생물반응기 개발의 기초연구로서 *Pseudomonas fluorescence*와 *Pseudomonas putida*를 이용하여 5가지의 PAHs(naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene)에 대한 분해특성을 살펴보고 각 균주의 PAHs에 대한 분해속도를 도출하고자 한다.

2. 이론적 고찰

2.1. PAHs의 미생물 분해 Mechanism

생태계에서 PAHs는 소수성 특징 때문에 토양 내 유기물질이나 미립자에 주로 흡착되어 존재하고 있으며, 여러 가지 원인에 의해 이동 또는 소멸될 수 있다. 물리적으로는 휘발에 의해 대기 중으로 확산되며 화학적인 반응에 의해 분해되기도 하고 생물학적으로는 미생물에 의해 biomass로 축적되거나 CO_2와 H_2O로 완전히 무기화된다.

PAHs의 생물학적 분해는 그 물질의 화학적, 생물학적 특성, 농도, 토양 및 수계에서의 확산속도, 물질의 bioavailability 등에 의존한다. 이들은 또한 soil type, 물과 산소의 이용율, 영양분의 존재, 미생물군집의 활동성, pH, 온도 등의 영향을 받으므로 최대 분해율을 얻기 위해서는 변수의 최적화가 선행되어야 한다.

PAHs의 박테리아 분해는 호기상과 혐기상에서 모두 관찰되나 혐기상 PAHs분해는 속도가 느리고 그 메카니즘이 밝혀져 있지 않은 반면, 호기상 생물분해경로는 지난 수년간 활발히 연구되어 왔다.[5)]

PAHs의 생물학적 분해는 산소분자의 공격에 의해 개시되며 각 물질의 개시위치는 Fig. 1과 같고, 개시 이후 미생물의 생물학적 분해경로는 Fig. 2에 나타나듯이 크게 박테리아에 의한 것과 곰팡이에 의한 경로로 나누어진다. PAHs의 초기 활성화와 산화는 미생물에 의해 생성된 oxygenases라 불리우는 효소와 관련되며 곰팡이류는 monooxygenases를,

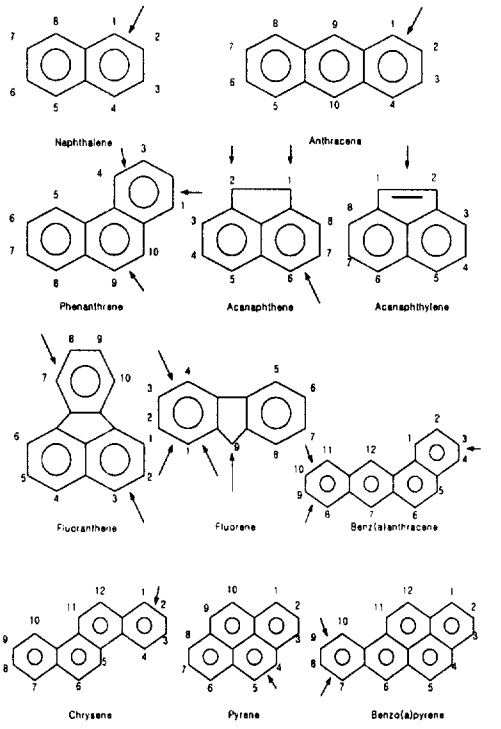

Fig. 1. Chemical structures of PAHs.(→: the first positions attacked by oxygen)

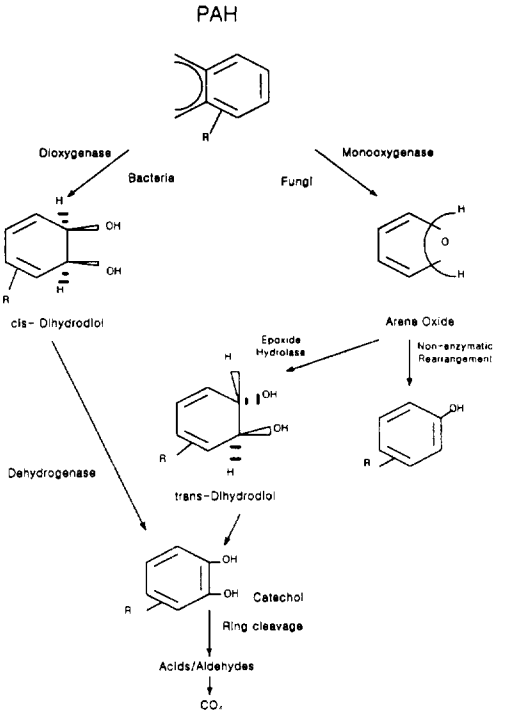

Fig. 2. Pathways for microbial degradation of PAHs.

박테리아는 dioxygenases라는 효소를 이용하여 기질의 분해가 개시된다. 곰팡이류는 기질과 하나의 산소원자가 반응하도록 하여 arene oxides를 형성한 후, 효소에 의한 수분 첨가로 trans-dihydrodiols와 phenol을 생성하게 된다. 반면, 박테리아는 기질과 두 개의 산소원자와의 반응을 촉진하여 dioxyethanes, cis-dihydrodiols, dihydroxy product를 순차적으로 생성시킨 후 최종적으로 CO_2를 생성하게 된다.

PAHs의 생물분해 반응에서 속도 제한 단계는 최초의 고리 산화 단계이며, 그 이후는 분해가 빨라 중간생성물의 축적이 거의 없다. PAHs의 종류에 따라 초기반응에서 생성되는 초기산화물은 조금씩 다르긴 하지만, 대부분 catechol을 형성한 후 고리가 깨지면서 최종적으로 CO_2로 전환된다.[6)]

2.2. 미생물 분해속도

미생물에 의한 반응속도는 일반적으로 Michaelis-Menten kinetic equation으로 나타내며 식 (1)로 표현할 수 있고, 이 식은 $0.1\ K_M < S < 10\ K_M$ 영역에서 적용이 가능하다. 한편, Fig. 3에서 볼 수 있는 것과 같이 저농도에서는 $S \ll K_M$으로 식 (2)와 같이 1차 kinetics으로 표현되며 고농도에서는 $S \gg K_M$으로 식 (3)과 같이 0차 kinetics으로 설명할 수 있게 된다.

$$r_S = \frac{V_{max} S}{K_M + S} \tag{1}$$

여기서, S : 기질농도 (mol/L)
K_M : Michaelis constant (mol/L)
r_S : 분해 속도 (mol/L · hr)
V_{max} : 최대 분해율 (mol/L · hr)

$$r_S = \frac{V_{max} S}{K_M} \tag{2}$$

$$r_S = V_{max} \tag{3}$$

Fig. 4는 속도식 매개변수인 V_{max}와 K_M을 구하기 위해 Michaelis-Menten 식을 선형의 형태로 변형한 Lineweaver-Burk double-reciprocal plot을 나타내고 있다.

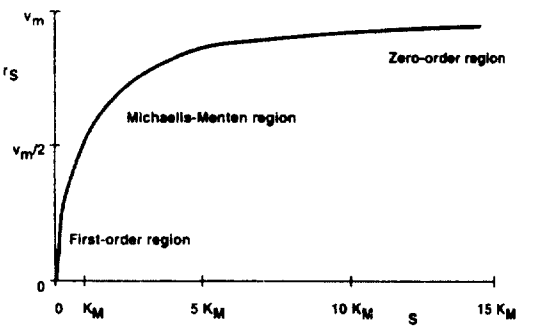

Fig. 3. Michaelis-Menten plot.

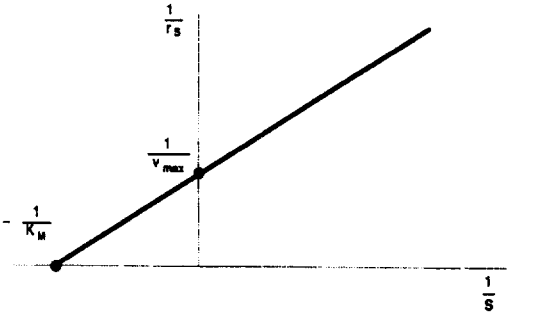

Fig. 4. Lineweaver-Burk double-reciprocal plot.

$$\frac{r_S}{V_{max}} = \frac{S}{K_M + S} \tag{4}$$

식 (4)의 역수를 취하여 정리하면 다음의 식으로 정리된다.

$$\frac{1}{r_S} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \tag{5}$$

3. 실 험

3.1. 실험 균주

PAHs 성분을 생물학적으로 분해하려면 토양 중에 자연적으로 존재하는 토양미생물을 이용하여야 하나, 분자량이 높고 벤젠고리가 많은 PAHs 화합물은 토양미생물의 에너지 및 탄소원으로서의 역할과

생물학적 분해가 어렵다[7]고 하기 때문에, 방향족화합물의 분해능이 우수하다고 알려져 있는 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* 균주를 선정하여 미생물의 성장특성을 알아보았다.

실험에 사용한 박테리아 독립균주 *Pseudomonas putida*(KCTC 1768)와 *Pseudomonas fluorescence* (KCTC 1767)는 한국유전자은행(KCTC)에서 분양받은 것으로 동결·건조된 것을 nutrient broth 배지(bacto beef extract 3 g, bacto peptone 5 g을 D.I water 1 L에 넣고 121℃에서 15분간 autoclave)에 seeding하여 24시간 배양을 통해 활성화시킨 후, 배양액을 백금막대에 묻혀 nutrient agar plate(0.8% nutrient broth, 2% agar in D. I. water를 멸균된 petri dish에 적당량 부어 24시간 굳히면서 식혀둔 것)에 삼분 도말하였다. 이 agar plate를 incubator에서 25℃, 1주일간 배양한 후, one colony씩 분리되어 발현된 박테리아를 다시 백금막대에 묻혀 nutrient agar plate에 적정 간격으로 점을 찍듯이 찍어서 다시 incubator에 넣고 25℃에서 4일간 배양하였다. 이렇게 one colony씩 분리해 둔 박테리아를 과다한 성장을 막기 위해 냉장고에서 4℃에 보관하면서 미생물이 필요할 때 백금막대로 one colony씩 따서 nutrient broth에 접종하여 배양시킨 후 반응기에 주입하여 사용하였으며, 적절한 배양시기를 맞추기 위해 전배양시 배양액을 시간에 따라 660 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 optical density를 측정하여 미생물의 성장곡선을 구하였다. 반응기의 본체는 drum 형태로 재질은 stainless steel(SS304)이며, 규모는 직경이 15 cm, 길이가 40 cm로 반응기의 총 부피는 7.07 L이다. 이 본체의 둥근 원통 속에 오염된 토양을 투입하고, 미생물을 접종하여 토양과 미생물이 혼합된 상태로 조업을 하며, 부착된 motor로 회전을 시키므로 일정한 속도의 회전조업이 가능하도록 하였다. 조정이 가능한 회전 조업범위는 0~30 rpm이다. 반응기 하부에는 열선이 설치되어 있어 미생물의 활성을 유지할 수 있는 온도로 조절이 가능하며 열전대(thermocouple)에 의해 내부 온도가 측정된다. Drum의 내부에는 screw 형식의 baffle이 달려있어 반응기 내 슬러리의 혼합이 잘 이루어지도록 설계되었으며 반응기 옆면에는 나사형식의 sampling ports가 달려있어 반응기 내부 시료의 채취가 가능하도록 하였다.

3.2. 미생물 농도 측정

3.2.1. 생균수 측정

균체의 성장을 나타내는 각각의 optical density에서 생균수를 측정하기 위하여 배지용액 1 mL를 취해서 멸균된 0.9% 생리식염수로 106~108배로 희석하고 희석된 용액 1 mL와 고형배지(성장배지 +1.5% agar) 15 mL를 멸균된 petri dish에 취한 후 잘 섞는다. 이 petri dish를 incubator에 넣고 30℃에서 2일간 배양한 후 생성된 균의 집락수를 세었다.

3.2.2. 건조 균체량

배양시간에 따른 미생물 농도 측정을 위하여 분광광도계(UV-1501, Shimadzu, Japan)를 사용하여 배양액을 optical density 660 nm에서 측정한 후 건조 균체량(DCW)과의 상관관계를 이용하여 건조 균체량으로 환산하였다.

건조 균체량 측정은 Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook[8]에 설명된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 흡광도를 알고 있는 일정량의 배양액을 4,000 rpm에서 15분간 원심분리 시킨 후 상등액을 버리고 5 M의 ammonium hydroxide로 채워 넣고 다시 원심분리 시켰다. 위와 같은 과정을 2회 반복한 후 에탄올 약 10 mL를 사용하여 세척하고 건조기에서 105℃, 16시간 건조하였다. 이것을 데시케이터에서 방냉시킨 다음 무게를 측정하여 건조 균체량을 산출하였다. 이를 다른 농도를 가진 배양액에 대해 되풀이하여 균체 농도에 대한 흡광도 관계를 구하여 균체량 측정을 위한 표준곡선을 만들었다.

3.3. 오염토의 제조

오염토의 제조는 2 mm 이상의 자갈을 체로 선별하여 버리고 dry oven에서 건조한 다음, 토양 내 다른 유기화합물을 제거하기 위해 아세톤으로 세척하여 상온에서 휘발시켰다. 본 실험의 대상물질인

naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene을 각 5 mg씩 용매인 methylene chloride에 녹인 후 미리 세척해 둔 토양 500 g에 혼합한 후 상온에서 이틀정도 방치하여 용매를 휘발시켰다. 이 때 오염된 토양의 PAHs 농도는 50 mg total PAHs/kg-soil이었으며, 동일한 방법으로 PAHs의 양을 증가시켜 100, 200, 300, 500 mg total PAHs/kg-soil 농도를 만든 후 대수성장기의 미생물이 포함된 액상 배지를 토양상에 주입하여 160 rpm, 25℃ 조건에서 실험을 수행하였다.

3.4. PAHs 분석

30~40% 수분함량의 slurry sample을 먼저 2,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 고상은 Soxhlet 추출법으로 액상은 용매추출법으로 각각 수행하여 두 가지를 합산하여 총 sample 농도로 하였다.

Soxhlet 추출법은 여과지로 사용되는 thimble에 고상시료(~5 g)와 무수황산나트륨(~5 g)을 잘 혼합하여 넣은 후, 환저플라스크에 methylene chloride 200 mL를 넣고 soxhlet bath(Jisico)의 수온을 75℃로 맞추어 환저플라스크, 추출기, 냉각기를 모두 조립하였다. 냉각수는 tap water를 공급하였으며 시간당 6 cycle을 유지하면서 16시간동안 추출을 수행하였다.

용매추출법은 액상시료를 용매 methylene chloride 100 mL와 함께 분액깔대기에 주입하고 마개를 하여 210 rpm으로 수직진동이 가능한 separatory funnel shaker(Jisico)에 고정하여 16시간동안 추출한 후 정치시켜 아래층의 용매를 회수하였다.

추출이 끝난 후, 시료를 closed cell concentrator (TurboVap500, Zymark)에 주입하여 45℃ 수욕에서 총 용매량이 1 mL가 될 때까지 농축한 후, GC/MS를 통해 오염물질의 농도를 분석했다.

일정 간격으로 시료를 채취하여 GC/MS를 이용하여 PAHs를 분석하였다. GC는 HP 6890 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. 조업조건은 GC의 carrier gas로서 He의 흐름은 37 psi와 1.1 mL/min(superficial velocity 27 cm/sec)를 유지하고, oven내 온도는 70℃에서 2분간, 5℃/min으로 80℃까지 승온하고, 30℃/min으로 240℃까지 승온시킨 후, 1℃/min으로 245℃까지 승온시키도록 프로그램하여 분석하였다. Injector의 온도는 200℃, 압력은 37 psi이고, 시료는 GC용 10 μL짜리 syringe를 사용하여 1 μL를 주입하였고, 30 : 1의 split ratio로 GC 내로 주입되었다.

각 PAHs 물질의 정성분석은 기본적으로 GC에서 나타난 peak의 retention time으로도 증명되며 mass spectrometry detector를 사용하였으므로 물질의 고유한 mass spectrometry 대조작업을 통해서도 확인하였다. 오염물질의 농도는 미리 농도와 peak area의 관계를 구하여 작성해 둔 검량선에 peak area를 대입하여 계산하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1. 미생물 성장곡선

본 연구에 사용된 *Pseudomonas putida*(KCTC 1768)와 *Pseudomonas fluorescence*(KCTC 1767) 박테리아 균주는 호기성 중온균으로 PAHs 물질로 오염된 토양으로부터 추출, 분리되었으며 이들 물질을 기질로 소모하면서 분해시키고 성장이 가능한 균주이다.

Fig. 5와 6으로부터 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* 두 균주를 각각 nutrient broth 배지에서 25℃, 160 rpm으로 배양시 시간에 따른 성장곡선을 optical density와 균주생체량으로 확인한 결과, 두 균주 모두 배양 13시간째부터 활성을 찾기 시작하나 *Pseudomonas putida*는 약 20시간이 지나면서 대수성장이 마무리되며, *Pseudomonas fluorescence*는 이보다 조금 늦은 25시간까지 지속됨을 알 수 있었고, 균주생체량(mg/L)을 구한 결과 *Pseudomonas putida*의 경우 약 810 mg/L, *Pseudomonas fluorescence*는 약 760 mg/L의 균체량을 가지며 정체기에 이르는 것을 알 수 있다.

한편, Fig. 7로부터 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* 두 균주를 혼합하여

nutrient broth 배지에서 25℃, 160 rpm으로 배양시 시간에 따른 성장곡선을 optical density와 균주생체량으로 확인한 결과, 배양 12시간째부터 활성을 찾기 시작하여 17시간째 대수성장기에 이르렀으며, 균주생체량은 약 910 mg/L의 값을 나타내었다. 단일종을 이용하는 경우에는 5가지 PAH 물질 중에서 몇몇 물질에서만 좋은 분해능을 보이지만, 혼합종을 이용하는 경우에는 두 미생물이 각기 분해하기가 쉬운 물질부터 분해하므로 더 빠른 분해능을 보인 것으로 사료된다.

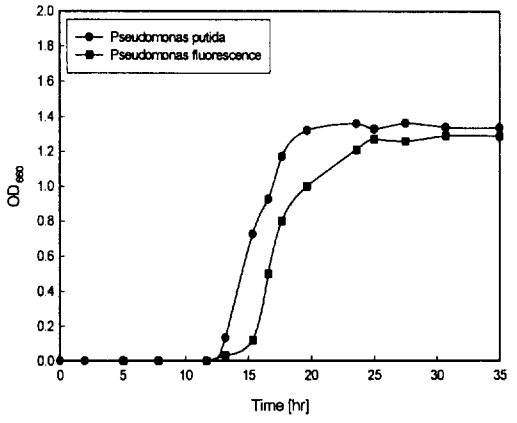

Fig. 5. Growth curves of individual bacteria.

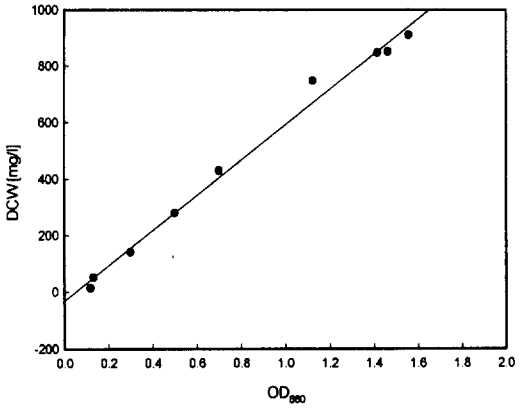

Fig. 6. The relationship between DCW and OD_{660}.

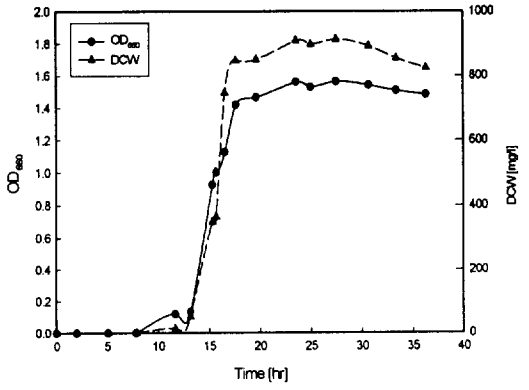

Fig. 7. Growth curves of mixed culture.

4.2. PAHs 농도에 따른 미생물 분해속도

PAHs 분해 미생물 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* 단일종 및 혼합종의 PAHs 분해속도를 알아보기 위해 25℃, 160 rpm의 조건에서 5가지의 PAHs 농도를 변화시키면서 실험을 수행하였다. Fig. 8은 농도와 시간에 따른 분해율의 차이를 나타내고 있으며 Fig. 9에서는 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence*의 혼합종을 이용하여 5가지 PAHs 물질의 농도에 따른 분해속도를 나타내었고, Fig. 10은 Michaelis-Menten식에 적용시킨 결과를 나타내고 있다. 그림에서 보는 바와 같이 분해양상은 고리수가 적은 naphthalene이 먼저 분해되고, 세 개인 방향족 고리화합물 중에서는 용해도가 높은 순으로 phenanthrene, fluoranthene, anthracene이 분해되었으며 네 개의 방향족 고리화합물인 pyrene이 마지막으로 분해되었다. 즉, 각각의 PAHs 물질의 분해는 방향족 고리수가 적은 순서로, 같은 고리수의 화합물의 경우는 용해도가 높은 순서대로 분해되는 결과를 보였으며,

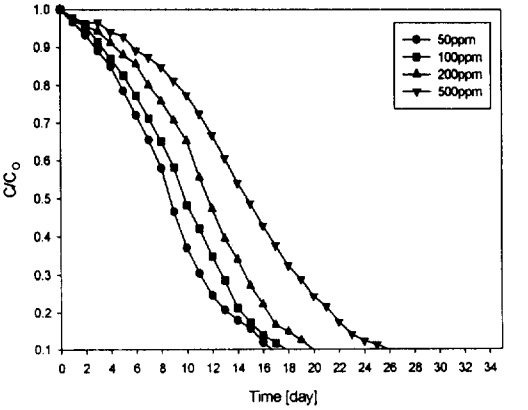

Fig. 8. The degradation of mixed culture with variation of PAHs concentration.

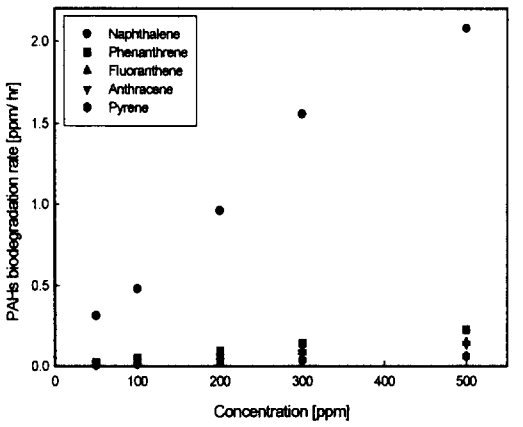

Fig. 9. The degradation rate of mixed culture with PAHs concentration.

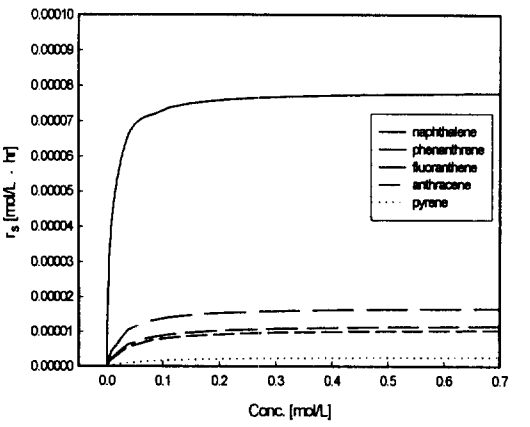

Fig. 10. Michaelis-Menten equation for respective PAHs.

Table 1. Michaelis-Menten constants of respective microorganism

	Pseudomonas fluorescence		*Pseudomonas putida*		Mixed culture	
	V_{max} [mol/L · hr]	K_M [mol/L]	V_{max} [mol/L · hr]	K_M [mol/L]	V_{max} [mol/L · hr]	K_M [mol/L]
Naphthalene	5.4161×10^{-5}	0.00911	5.0118×10^{-5}	0.00947	5.8816×10^{-5}	0.00899
Phenanthrene	1.1585×10^{-5}	0.02388	0.9778×10^{-5}	0.02600	1.2210×10^{-5}	0.02400
Fluoranthene	1.0244×10^{-5}	0.03972	0.6804×10^{-5}	0.04401	1.1132×10^{-5}	0.03548
Anthrethene	0.9297×10^{-5}	0.04024	0.6779×10^{-5}	0.04274	1.0921×10^{-5}	0.03701
Pyrene	0.6045×10^{-5}	0.05149	0.6338×10^{-5}	0.06040	0.6904×10^{-5}	0.05441

생물의 접근이 용이한 기질의 화학적 구조와 용해도가 미생물 성장을 유용하게 하는 매우 중요한 인자라는 것을 알 수 있었다.

Table 1은 농도를 변화시키면서 실험을 수행하여 *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas putida* 및 두 미생물의 혼합종에 대한 분해속도 결과를 Michaelis-Menten 식에 plot하여 얻은 V_{max}와 K_M을 정리한 자료이다. 혼합종의 경우를 살펴보면 고리수가 적은 naphthalene의 V_{max}가 5.8816×10^{-5} mol/L · hr로 가장 컸으며, phenanthrene은 1.2210×10^{-5} mol/L · hr, fluoranthene은 1.1132×10^{-5} mol/L · hr, anthracene은 1.0921×10^{-5} mol/L · hr, 그리고 고리수가 가장 많은 pyrene이 0.6904×10^{-5} mol/L · hr로 가장 작은 값을 나타내었다.

실험결과에 신뢰도를 더하기 위한 방법으로 Hand book을 이용하여 octanol-물분자 계수, K_{ow}와 용해도를 찾아서 실험결과와 비교해 보았다.

K_{ow}란 유기물질의 소수성 정도를 고찰하는데 이용되는 계수로써 n-octanol과 물의 혼합수에 측정하고자 하는 유기화학 물질을 투입한 후 mixing시킨 다음 물과 n-octanol에 용해된 유기물질의 비율을 측정한 것이다. K_{ow}는 탄화수소 화합물의 소수성과 흡착성을 평가하는 지표이며 K_{ow}값은 $\log K_{ow}$형태로 표현되며 $\log K_{ow}$의 부호가 양이면 소수성(hydrophobicity), 음의 값을 나타내면 친수성(hydrophilicity)임을 나타낸다.

K_{ow}=(octanol에 용해된 유기물질의 농도)
÷(물에 용해된 유기물질의 농도)

Naphthalene, phenanthrene, fluoranthene의 경우에는 $\log K_{ow}$가 작고 용해도가 클수록 분해가 잘

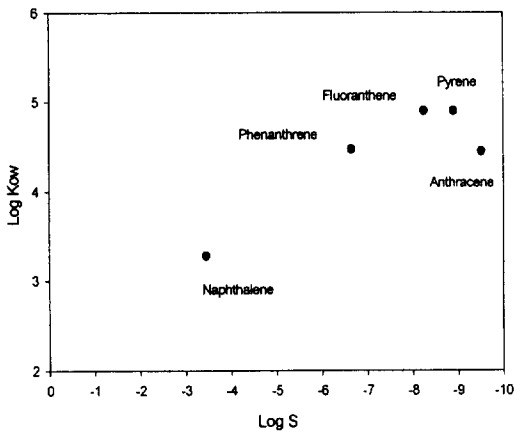

Fig. 11. Log(solubility) and Log(K_{ow}) of PAHs.

되는 경향을 보이며 이것은 실험결과의 분해순서와 일치하였으며 Fig. 11을 통해서도 알 수 있었다. Anthracene과 pyrene의 경우, K_{ow} 값은 anthracene이 2.8배 정도 작아 분해속도가 pyrene 보다 빠른 경향을 가진다고 볼 수 있으나 반대로 용해도의 경우에는 pyrene이 anthracene보다 2.88배 정도 높은 값을 나타내므로 logK_{ow}가 작고 용해도가 클수록 분해가 잘 되는 경향을 적용하여 분해순서를 정하기에는 무리가 있었다. 실험 결과를 바탕으로 3개의 고리를 가진 anthracene이 4개의 고리를 가지는 pyrene보다 미생물의 접근이 용이한 화학적 구조를 가지고 있는 것이 분해순서를 결정하였다고 추론하였다.

5. 결 론

1) *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* 두 균주에 대한 성장곡선을 살펴본 결과, 두 균주 모두 배양 13시간째부터 활성을 찾기 시작하나 *Pseudomonas putida*는 약 20시간이 지나면서 대수성장이 마무리되며, *Pseudomonas fluorescence*는 이보다 조금 늦은 25시간까지 지속됨을 알 수 있었으며, 균주생체량은 *Pseudomonas putida*의 경우 약 810 mg/L, *Pseudomonas fluorescence*는 약 760 mg/L의 균체량을 가지며 정체기에 이르는 것을 알 수 있다. 또한, 두 균주를 혼합하였을 경우에는 배양 12시간째부터 활성을 찾기 시작하여 17시간째 대수성장기에 이르렀으며, 균주생체량은 약 910 mg/L의 값을 나타내었다.

2) 5가지 PAHs 물질의 농도에 따른 분해속도를 단일균주 및 혼합균주에 대해 실험을 수행한 결과, 세 가지 미생물 모두에 대해 고리수가 적은 naphthalene이 먼저 분해되고, 세 개인 방향족 고리화합물 중에서는 용해도가 높은 순으로 phenanthrene, fluoranthene, anthracene이 분해되었으며 네 개의 방향족 고리화합물인 pyrene이 마지막으로 분해된 것으로 나타나, 각 PAHs 물질의 분해능은 화학적 구조인 방향족 고리수와 용해도에 의존함을 알 수 있었다.

3) 각 미생물에 대한 분해속도를 Michaelis-Menten 식에 적용시켜 최대분해속도를 살펴본 결과는 *Pseudomonas putida* ≪ *Pseudomonas fluorescence* ≪ 혼합미생물의 순으로 나타났다. 혼합미생물의 경우 *Pseudomonas putida*에 비해 1.09~1.64배, *Pseudomonas fluorescence*에 비해 1.05~1.17배 더 빠르게 분해되었으며, 이는 두 미생물의 경쟁적 분해에 의한 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 2000년 지역대학 우수과학자 지원연구비(과제번호 : 2000-1-30700-007-2)에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비를 지원해 주신 당 재단에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Hicks, B. N. and Caplan, J. A., "Bioremediation: A natural solution," *Pollution Engineering*, **25**(2), 30~33(1993).
2. Manahan, S. E., Environmental Chemistry, 5th ed., Lewis Publishers(1991).
3. Domy, C. A., "Role of Soil Chemistry in Soil

Remediation and Ecosystem Conservation," *Soil Chemistry and Ecosystem Health*, **52**, 361~385(1998).

4. LaGrega, M. D., Buckingham, P. L., and Evans, J. C., Hazardous Waste Management, McGraw-Hill(1994).
5. Cutright, J. T. and Lee, S., "In situ Soil Remediation: Bacteria or Fungi?," *Energy Sources*, **17**, 413~419(1995).
6. Atlas, W. and Atlas, M. C., "Biodegradation of oil and Bioremediation of oil spills," *Current Opinion in Biotechnology*, **2**(3)(1991).
7. 류선정, 박갑성, "PAHs 오염토양의 Fenton 보조 동시산화," 한국토양환경학회 춘계학술발표회 논문집, **6**(5), pp. 53~59(1998).
8. Atkinson, B., Mavituna, F., Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, 2nd ed., Stockton Press, pp. 234~238(1991).
9. Song, H. G. and Bartha, R., "Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil," *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**(1990).
10. Stieber, M., "Investigations on the Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Contaminated Soils," *Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds*, Lewis Publisher, pp. 164~171(1994).