

## 해양환경에서 Pyrene의 생분해

황순석 · 송홍규\*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

난분해성 다핵방향족 탄화수소인 pyrene의 생분해를 해수와 해사로 구성된 microcosm에서 조사하였다. 농도 100~1,000 ppm pyrene의 5주 동안 자연분해도는 5~20°C에서 1~11%이고 이때 전환율은 310~2,200 ng/(g/ml)/day이었다. 생분해에 미치는 분해균주 접종량, pyrene 농도, 온도와 계면활성제 첨가의 영향 등을 영양염류(Inipol EAP 22)가 투여된 시료에서 조사하였다. 혼합 분해균주접종시 해수보다는 해사에서 전환율이 전체적으로 높았으며  $10^7$  cells/ml 접종시 pyrene 200 ppm 농도의 해사에서 대조구보다 분해도가 7.8배 높았다. 가장 높은 전환율 4,860 ng/(g/day)는 1,000 ppm pyrene이 첨가된 해사에 복합균주를 접종한 시료에서 측정되었다. Glucose 첨가시 해사에서는 배양초기에만 분해도의 증가가 나타났으며, 해수에서는 분해도가 8~10% 증가하였다. 계면활성제와 mineral oil의 첨가는 오히려 pyrene 분해도를 대부분 감소시켰는데 CMC가 생분해에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다.

KEY WORDS □ PAH, pyrene, biodegradation, bioremediation, surfactant

탄화수소로 이루어진 석유는 전세계적으로 가장 중요한 원자재 및 에너지원으로 널리 이용되고 있다. 그러나 많은 양의 원유와 정제된 유류제품, 폐유, 유류 함유 폐수 및 폐기물들이 생산, 수송, 저장, 사용 및 처리 처분 과정 중에서 우발적으로 또는 고의적으로 자연환경에 방출되고 있다. 특히 해양은 원유 및 정제유류 제품의 수송에 주로 이용되고 있기 때문에 해양 유류누출 사고의 위험이 상존하고 있다. 따라서 전세계적으로 크고 작은 해양 유류오염이 끊이지 않고 있으며 근래들어 우리나라 연안에서도 여러 번의 선박사고에 의한 유류오염이 발생하였다(2). 이런 해양 유류오염 사고가 나면 석유류의 주성분인 석유탄화수소(petroleum hydrocarbon, PHC)들이 해수면을 덮으면서 널리 퍼져서 동식물에 큰 피해를 주게 되며 일부는 침전되어 해저를 덮게 되어 장기간 악영향을 미치게 된다(5). 또한 조류와 파도의 작용으로 인접 해안도 PHC에 의해 오염되게 된다.

자연환경에 유출된 PHC를 처리하는 방법은 여러 가지가 있으며 이중 생물학적인 작용을 이용하는 방법들은 물리화학적 방법들에 비해 시간이 오래 걸리지만 처리비용이 비교적 저렴하며 자연환경에 2차적인 해를 미치지 않기 때문에 적당한 처리방법이 된다. 현재까지 시도되어온 생물학적 유류 제거 기술들은 주로 외국에서 시작된 것들로서 해수나 sediment 또는 해변에서의 PHC 제거를 위한 여러 가지 생물학적인 방법들이 개발 또는 연구중에 있다(4, 11, 13, 14). 그러나 PHC 성분 중 가장 문제가 되는 난분해성 성분이나 독성이 강한 탄화수소 성분의 제거에 대한 연구는 많지 않았다. 우리나라 연안에서도 근래들어 빈번히 유류오염이 일어나고 있으나 이러한 생물학적인 유류 제거기술이나 현장 처리 방법들의 연구개발이 많지 않은 실정이며 특히 난분해

성 탄화수소 성분의 비율이 높은 Bunker C fuel oil의 유출 사고가 많은 편이므로(2) PHC 성분 중 난분해성 성분이며 독성이 강한 다핵방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)의 제거를 위한 방제기술의 개발이 절실하다. 이에 본 연구에서는 우리나라 해양환경에서의 PAH의 동태와 생분해양상에 대하여 조사하였다. 난분해성 PAH 성분 중 4-ring으로 이루어진 pyrene의 해수 및 해사에서의 자연분해도 및 분해촉진 조건 등을 알아 보았으며 이의 제거를 위한 여러 bioremediation 방법 등을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 및 실험 균주

다핵방향족 탄화수소로는 benzene ring 4개로 이루어진 pyrene을 선택하였으며 석유탄화수소로 오염되지 않은 강원도 양양군 오산리의 해변에서 채취한 해수와 해사를 생분해 실험에 이용하였다. 분해균주로는 한국해양연구소에서 분양 받은 *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp.를 접종물로 사용하였다. 각 균주를 0.5% glucose, 0.1% yeast extract를 첨가한 Bushnell Haas broth에 접종하여 25°C에서 7일간 진탕배양(150 rpm)한 후 원심분리하고 세척하는 과정을 2회 반복하고 각 균주들을 같은 수로 혼합하여 총균수가  $10^7$  cells/ml, 또는 희석하여  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  cells/ml의 개체수로 이루어진 microbial consortium을 만들어 bioaugmentation을 위한 접종물로 이용하였다. 부동화 균주 실험시에는 지름 2 mm 이하의 담체 vermiculite(Aldrich Chemical)에 inoculum을 흡착시켜 접종하였다.

#### Microcosm의 구성

해수 10 ml을 100 ml 삼각 flask에 넣은 후 acetone에 녹인 pyrene solution을 주입하고 acetone을 증발시킨 다음 해

\*To whom correspondence should be addressed  
Tel: 0361-250-8545, Fax: 0361-241-4627  
E-mail: hgsong@cc.kangwon.ac.kr

수 20 ml을 넣고 nutrients나 기타 첨가물을 주입하고 aluminium foil로 덮어 해수 microcosm을 구성하였다. 해수 microcosm의 경우에는 먼저 30 g의 해사를 250 ml 비이커에 넣은 후 pyrene solution을 주입하고 철사로 pyrene이 고루 섞이도록 저어준 다음 유기용매를 증발시킨다. 증류수를 넣어 자연상태 해사와 유사한 수분 보유능으로 맞춘 다음 기타 다른 물질을 주입하고 비이커를 aluminium foil로 덮었다.

### Bioremediation 처리방법

분해균주의 consortium을 접종하고 NP source로는 Inipol EAP 22(Elf Aquitaine, France)를 pyrene 양의 10%(w/w) 첨가하였다. 분해균주의 생분해능에 미치는 온도와 기질농도의 영향을 조사하기 위해 배양온도를 각각 5, 10, 15, 20°C로 맞추고 pyrene 농도는 100, 200, 500, 1,000 ppm으로 첨가한 후 일정기간 배양 후 잔류량을 측정하였다.

별도의 생장기질로 glucose를 각각 0.1, 0.01%(v 또는 w/w) 첨가하여 생분해에 미치는 영향을 조사하였다. 미국에서 시판, 사용되고 있는 유처리제인 PRP(Petrol Rem, Inc.)의 효능을 조사하기 위해 pyrene 양과 동일한 양을 첨가하였다. 계면활성제(surfactant)와 mineral oil 첨가의 영향을 조사하였는데 각 계면활성제의 CMC(critical micelle concentration) 값이 차이가 나는데 Brij 30, TritonX-100, Tween 40, Tween 80을 각각 32, 105, 62.8, 60 mg/L 농도로 시료에 첨가하였다. Mineral oil(Squibb Inc.)의 경우에는 증류수에 유사시키지 않고 직접 0.8%인 0.24 g을 시료에 주입하였다.

### Pyrene 잔류량 분석

해사 시료는 methylene chloride를 첨가하여 잘 섞어 추출한 후 무수황산나트륨 층을 통과시켜 수분을 제거하는 과정을 6번 반복한 후 추출된 pyrene solution의 최종 부피를 methylene chloride로 30 ml가 되게하였다. 해수 시료는 methylene chloride를 넣고 1분간 섞은 후 separatory funnel에 넣어 10분간 방치하여 층이 분리되게한 후 methylene chloride 층만을 분리한다. 이 과정을 3회 반복한 후 무수황산나트륨 층을 통과시켜 수분을 제거하고 추출된 pyrene solution을 30 ml로 맞춘 후 분석하였다. Pyrene 정량은 gas chromatograph(Hewlett Packard, HP-series II)를 사용하였고 GC 분석 조건들은 다음과 같다. Column HP5(25 m×0.20 mm×0.33 μm), Injector 300°C, detector 300°C, oven temp.: initial 200°C, 온도증가 10°C/min, final 250°C 10 min. Data 보정을 위한 내부표준물은 dodecane을 사용하였으며 결과의 수집과 처리는 Autochro-WIN(영린기기)으로 하였다.

## 결 과

### 해수와 해사에서 pyrene의 자연분해도

자연해수와 해에서의 pyrene의 자연분해도는 매우 낮았다. 해사의 경우 모든 pyrene 농도에서 배양온도 5°C와 10°C에서는 pyrene의 분해가 거의 일어나지 않았으며 15°C와 20°C에서도 배양초기 2주까지는 거의 모든 시료에서 pyrene의 분해가 관찰되지 않았다(Table 1). Pyrene의 분해율이 가장 높았던 배양조건은 100 ppm, 20°C로 분해량은 11%로

**Table 1.** Natural degradation of pyrene in fresh seawater and beach sand

	Temperature (°C)	Residual percentage			
		Pyrene concentration (ppm)			
		100	200	500	1000
Beach sand	5	100	100	100	99.8
	10	100	99	100	100
	15	91	97	96.6	99.9
	20	89	93	98.1	99.4
Seawater	5	100	100	98.6	95.7
	10	100	100	98	95
	15	100	100	99.2	92.3
	20	100	100	98.5	96.4

가장 높았지만 단위 시료당 일정 시간에 제거된 전환율(transformation rate)은 314 ng/g/day로 가장 높지는 않았다. 전환율이 가장 높았던 배양조건은 500 ppm, 15°C로 분해도는 3.4%이지만 전환율이 486 ng/g/day이었다. 해수는 해사와 달리 모든 배양온도에서 100, 200, 500 ppm 농도의 pyrene의 분해가 관찰되지 않았으나 1,000 ppm의 경우 1주 후 pyrene이 분해되기 시작하였으며 5주 후 분해도는 15°C에서 7.7%로 가장 높았고 이때 pyrene 전환율도 2,200 ng/ml/day로 가장 높게 나타났다.

### Microbial consortium의 pyrene 분해능 조사

해수와 해사에서 탄화수소 분해세균 집종의 영향을 조사하기 위하여 pyrene 농도를 200 ppm으로 일정하게 주입하고 Inipol을 첨가한 후 접종량을 달리하여 20°C에서 배양하면서 pyrene의 분해양상을 조사하였다. 분해균주를 접종한 해사에서 pyrene의 분해는 모든 접종량에서 초기부터 지속적으로 일어났다. 배양 초기에는 inoculum이 10<sup>7</sup> cells/ml인 경우가 분해율이 가장 높게 유지되었으나 3주 후에는 10<sup>4</sup> cells/ml의 접종량 시료 이외에는 분해율이 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 1). 배양 5주 후 10<sup>7</sup> cells/ml의 접종량 시료가 분해도 54.6%로 가장 높게 나타났고 이때 pyrene의 전환율은 3,120 ng/g/day로 같은 조건의 자연분해율보다 7.8배나 높았다. 해수에서도 5주에 걸쳐 10<sup>7</sup> cells/ml의 접종량 시료가 19.6%의 가장 높은 분해도를 나타냈으며 이때 전환율은 1,120 ng/ml/day가 되었다. 해사와 해수에서 pyrene의 분해도를 비교해 보면 모든 접종량에 걸쳐 해에서의 분해도가 높다는 것을 알 수 있는데 10<sup>7</sup> cells/ml의 경우 해사가 해수보다 무려 2.8배나 분해율이 높게 나타났다.

해사와 해수에 pyrene 200 ppm과 Inipol을 일정하게 주입한 후 혼합균주(10<sup>6</sup> cells/g)를 접종한 후에 배양온도만을 달리하고 pyrene의 분해정도를 비교하였다. 해사에서 배양온도에 따른 pyrene의 분해양상을 보면 자연상태의 분해와 마찬가지로 20°C일 때 분해도가 배양기간 전반을 통해 가장 높았으며 배양온도가 낮아질수록 분해도가 작아지는 것을 볼 수가 있었다(Fig. 2). Pyrene 분해도가 51.4%로 가장 높았던 20°C에서의 pyrene의 전환율은 2,937 ng/g/day로 나타났고 온도가 낮아질수록 분해도와 전환율이 감소하는 것을 알 수가 있다. 해수에서는 해사보다 전체적으로 분해도는 다소

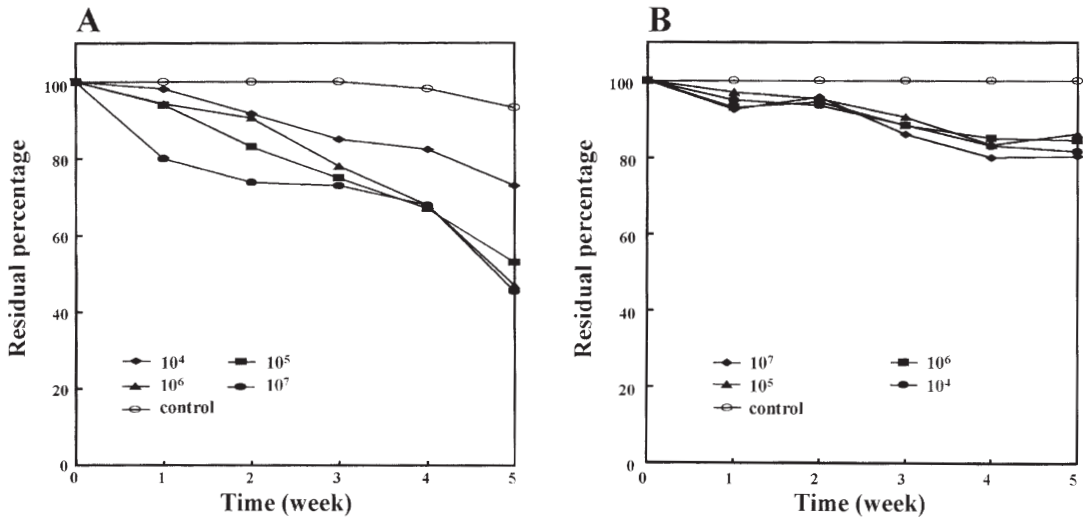


Fig. 1. Effect of inoculum size on the biodegradation of pyrene in beach sand (A) and seawater (B).

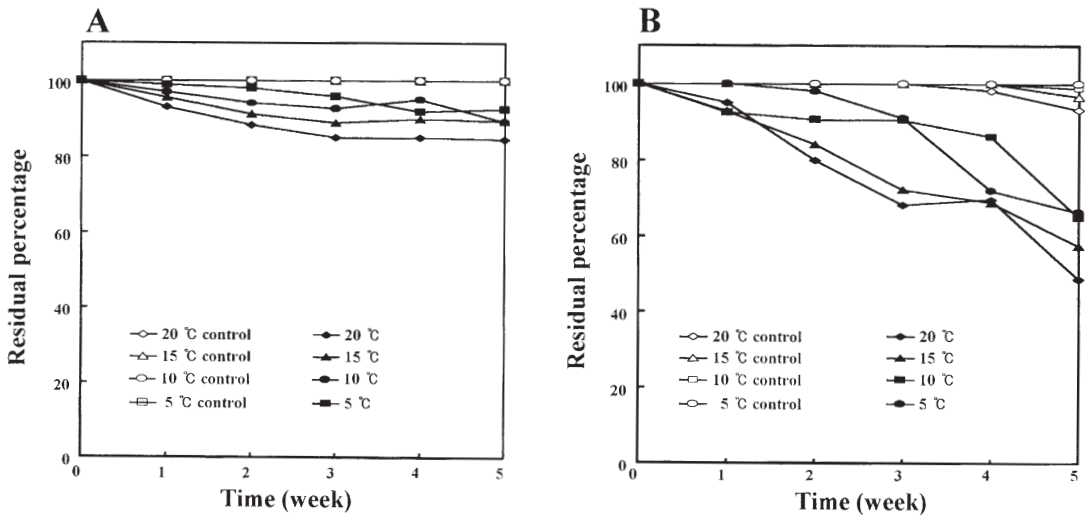


Fig. 2. Effect of temperature on the biodegradation of pyrene in the bioaugmented beach sand (A) and seawater (B).

낮지만 배양온도에 따른 차이가 비교적 뚜렷하게 나타났다. 5주 동안 20°C에서 pyrene의 분해도는 계속 높았으며 온도가 낮아질수록 분해도가 감소하였다.

해사와 해수에서 pyrene의 농도를 100, 200, 500, 1,000 ppm으로 달리한 후 혼합균주( $10^7$  cells/ml)를 접종하고 20°C에서 pyrene의 분해 양상을 관찰하였다. 해사에서 분해도는 자연 분해시와 같이 100 ppm에서 가장 높았으며 200, 500, 1,000 ppm 순서로 분해도가 감소하였다(Fig. 3). 분해도가 58%로 가장 높게 나타난 100 ppm의 전환율은 분해도와 반대로 가장 낮은 1,657 ng/g/day였다. Pyrene의 농도가 높을수록 분해도가 감소하였지만 실제 전환율은 농도가 높을수록 증가하여 1,000 ppm의 경우 4,857 ng/g/day로 100 ppm의 3배 정도를 나타내었다. 해수에서도 해사와 같이 분해도가

1,000 ppm에서 가장 낮았으나 나머지 농도에서는 커다란 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 분해도는 농도가 증가함에 따라 감소하였지만 전환율은 해사에서처럼 농도가 증가할수록 높아졌는데 해사와 달리 500과 1,000 ppm에서의 pyrene의 전환율은 유사하였다. 해수와 해사의 분해도와 전환율을 비교해 해사가 모든 pyrene 농도에서 분해도와 전환율이 높았으며 자연분해도와 전환율에서의 증가폭이 월등히 큰 것을 알 수가 있다.

#### 생분해 촉진 방법

해수와 해사에 pyrene 200 ppm, inoculum( $10^7$  cells/ml), Inipol을 투여한 후 glucose 첨가가 pyrene 분해에 미치는 영향을 조사하였다. 해수에서는 배양 5주째에는 glucose 미첨

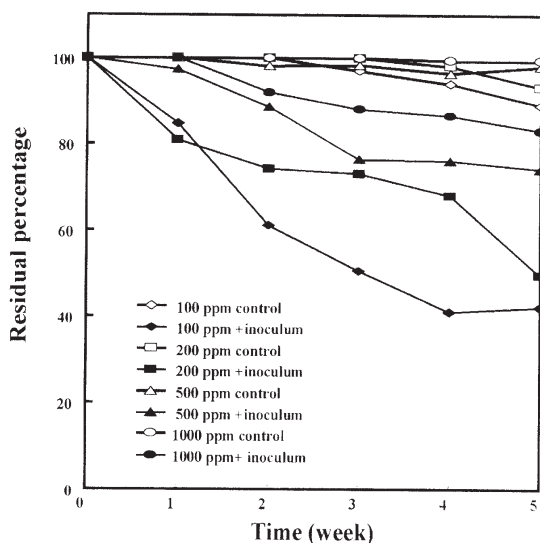


Fig. 3. Biodegradation of different concentration of pyrene in the bioaugmented beach sand.

가 시료가 분해도가 높았지만 그 이전까지는 glucose 첨가 시 분해도가 약간 증가했던 것을 볼 수 있다(Fig. 5). 해수에서 glucose 첨가 시 5주 동안 계속 control보다 높은 분해도를 나타내어 glucose 0.1과 0.01% 첨가시료에서 분해도를 각각 1.53배와 1.4배 증가시킬 수 있었다.

Vermiculite에 부동화시킨 복합균주( $10^7$  cells/ml)를 접종하여 pyrene 분해에 있어서 부동화 균주接种의 효과를 조사하였는데 해수와 해사에서 모두 부동화 균주를 접종한 시료가 액상 접종물을 접종한 시료보다 분해도가 오히려 낮았다(결과 미제시).

PAHs의 용해도를 증가시켜 생분해를 촉진시킬 수 있는

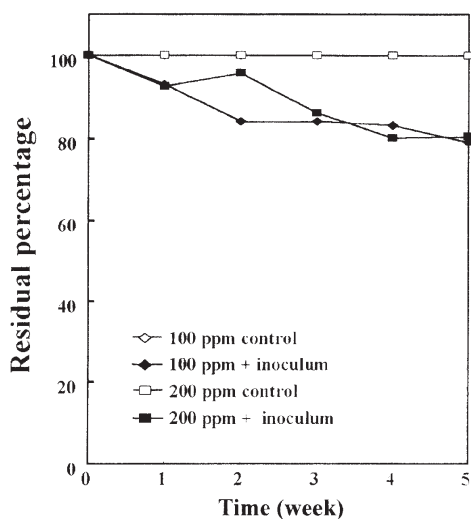


Fig. 4. Biodegradation of different concentration of pyrene in bioaugmented seawater.

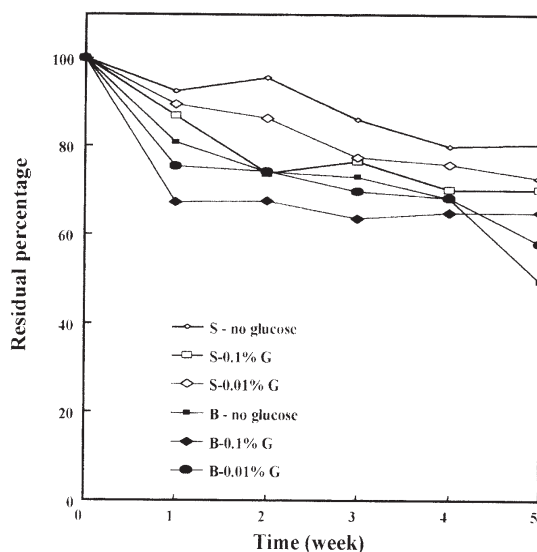
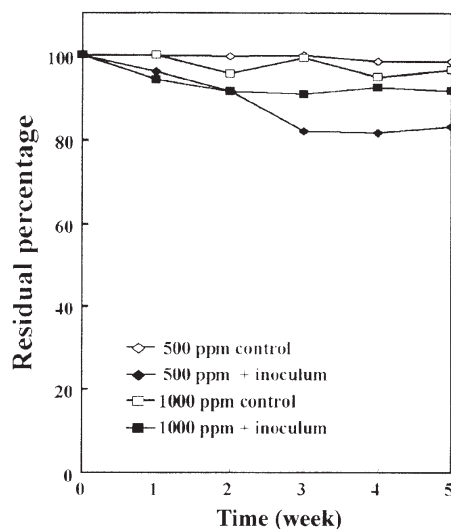


Fig. 5. Effect of glucose addition (G) on the biodegradation of pyrene in bioaugmented beach sand (B) and seawater (S).

것으로 알려진 계면활성제들을 inoculum( $10^7$  cells/ml), pyrene (200 ppm), Inipol이 첨가된 해수와 해수시료에 주입하여 계면활성제가 pyrene 분해에 미치는 영향을 비교하였다. 해수에서는 배양 초기 3주 동안 Tween 80을 첨가한 해수에서만 분해도가 대조구보다 높았으며 5주 후에는 모든 계면활성제 첨가시료에서 대조구보다 분해도가 낮게 나타났다(Fig. 6). 해수에서도 해수와 유사하게 계면활성제의 첨가로 pyrene의 분해를 향상시킨 결과를 얻지 못하였다. 배양 3주 동안 mineral oil, Triton X-100과 Tween 80, Brij 30만이 대조구와 유사한 수준의 pyrene 분해도를 보였으며 5주 후에는 모든 계면



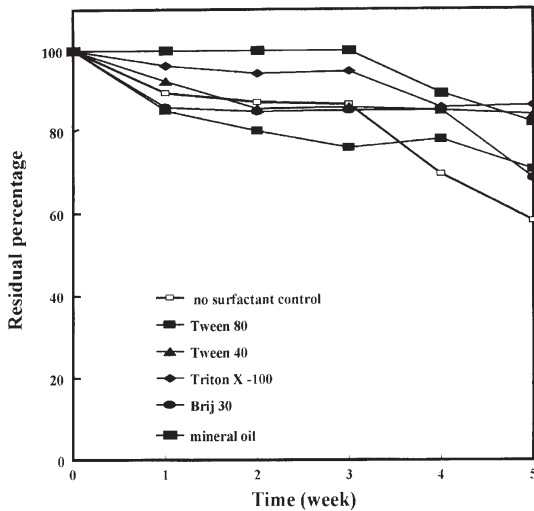


Fig. 6. Effect of surfactant addition on the biodegradation of pyrene in beach sand.

활성제가 대조구보다 4~7% 정도 낮은 분해도를 나타내었다.

본 실험에서 사용한 복합균주와 미국에서 유처리제로 생산된 PRP의 pyrene 제거능을 비교하기 위해 해사와 해수 시료에 pyrene을 주입하고 PRP와 복합균주를 각각 첨가한 후 pyrene의 분해도를 측정하였다. 해사에서는 모든 pyrene 농도에서 PRP 첨가시의 pyrene 분해도가 복합균주 접종시의 분해도보다 낮게 나타났지만(Fig. 7) 해수에서는 반대로 모든 pyrene의 농도에서 복합균주의 pyrene 분해도보다 높게 나타났다(Fig. 8). 각각의 pyrene 농도에 대한 복합균주의 분해도와 전환율을 PRP 첨가시료와 비교해 보면 해사에서는 PRP 첨가시 pyrene 100, 200, 500, 1,000 ppm의 분해도가 복합균주의 분해도보다 각각 16.1, 25.6, 14, 11% 정도

낮게 나타났으며 해수에서는 각각 8.3, 5.4, 3.0, 7.5% 더 높은 분해도를 보였다. 특히 pyrene 1,000 ppm에 PRP를 투여한 해수의 경우 복합균주 접종시료보다 pyrene의 전환율이 1.9배 높은 것으로 나타났는데 이때의 전환율은 4,571 ng/ml/day로 가장 높은 전환율을 나타내었던 복합균주를 접종한 1,000 ppm 해사시료와 유사한 수준이었다.

## 논 의

PAHs들은 낮은 용해도로 인해 환경에 존재하고 있는 탄화수소 분해세균들도 기질로 이용하기 쉽지 않아 그 생분해도가 매우 낮은 것으로 알려졌다(6, 7). 이에 본 연구에서는 PAHs 분해능이 높은 균주와 oleophilic fertilizer를 이용하여 해양환경에서 난분해성의 4-ring PAH인 pyrene에 대한 생분해를 조사하였다. 해사와 해수 microcosm에 pyrene을 첨가한 후 관찰한 pyrene의 자연분해도는 5주까지 각 조건에서 10%를 넘지 못하였다. 해사에서는 pyrene의 농도가 낮고 배양 온도가 높은 조건에서 분해도가 높았지만 해수에서는 pyrene의 농도가 높은 조건에서 분해도가 높은 것으로 나타났으며 저농도의 pyrene은 분해가 일어나지 않았는데 이는 낮은 농도의 pyrene이 바닥에 침전되고 용해도도 낮아 미생물과의 접촉이 어려워져서 pyrene의 생물학적 이용도가 해사보다 상대적으로 낮아졌기 때문인 것으로 추정된다. 다른 종류의 PAH인 anthracene과 phenanthrene은 동일 지역의 해수와 해사에서 1,000 ppm 농도의 자연분해도가 배양 10~20주 후 20~40% 정도로 보고되었는데(3) 이는 pyrene 1,000 ppm의 자연분해도 7.3%보다 3~5.7배 높으며 이렇게 pyrene의 분해도가 상대적으로 낮은 것은 3-ring PAHs보다 용해도가 더 낮고 난분해성이 높는데 기인한 결과가 된다.

이렇게 생분해도가 매우 낮은 pyrene의 효율적인 제거를 위해 여러 가지 bioremediation 방법을 적용시켜 보았는데 먼저 석유탄화수소 분해능이 높은 혼합 분해균주를 접종하여 그

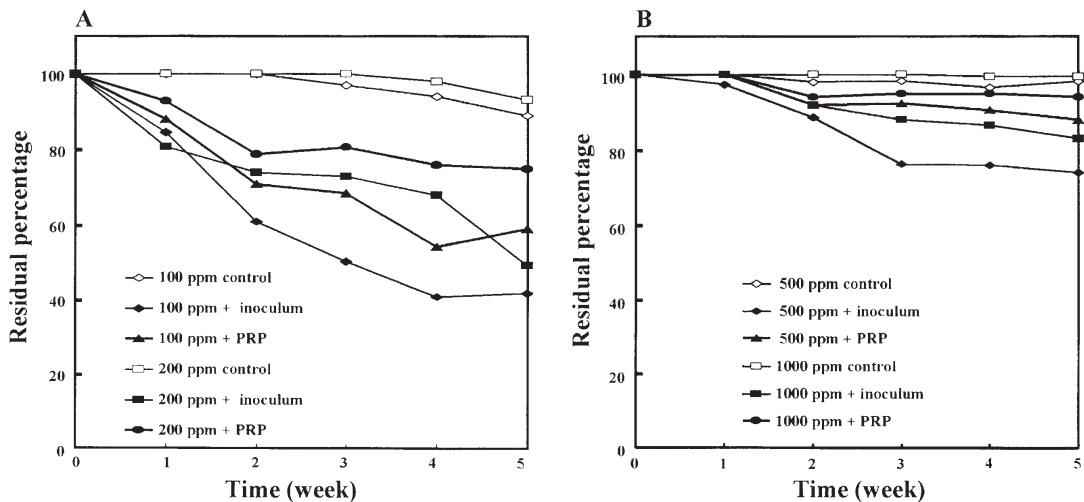


Fig. 7. Effect of PRP addition on the biodegradation of pyrene in the beach sand.



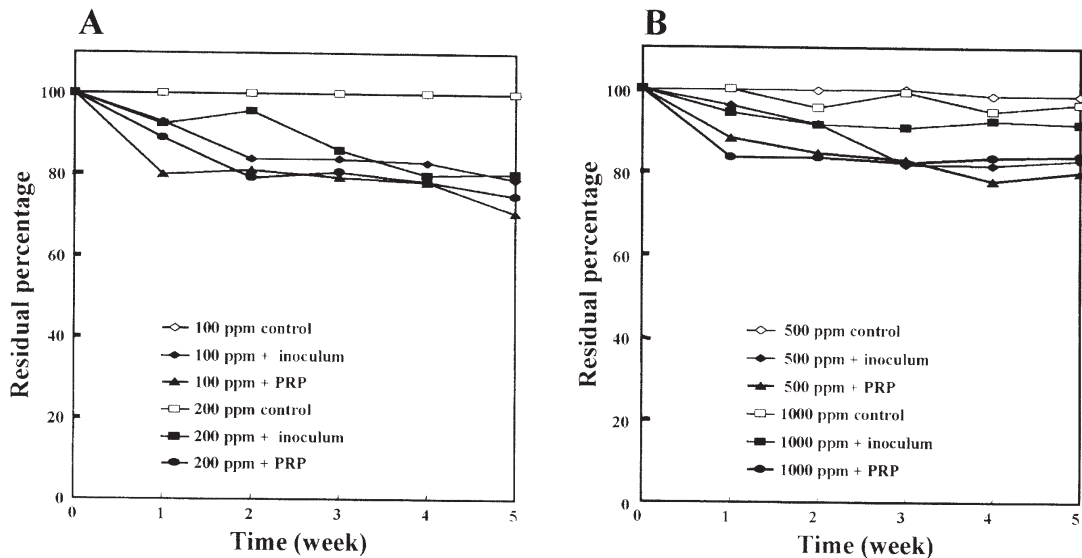


Fig. 8. Effect of PRP addition on the biodegradation of pyrene in seawater.

효과를 조사하였다. Consortium의 개체수는 bioremediation 처리시 중요한 문제가 되는데 Kastner 등(9)은 토양에서  $10^7 \sim 10^8$  cells/g 정도의 접종량이 적당하다고 보고한 바 있으며 본 혼합균주의 경우  $10^6 \sim 10^7$  cells/g이 유사한 정도의 Bunker C유 분해능을 나타낸 바 있다(1). 본 연구에서는 해사의 경우 각각  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  cells/ml을 접종했을 때 모두 배양 5주 후에는 비슷한 수준의 pyrene 분해도를 보였지만 배양초기에는  $10^7$  cells/ml 접종시료가 가장 높은 제거율을 보였다(Fig. 1). 해수에서는  $10^7$  cells/ml의 접종량이 가장 높은 pyrene의 분해도를 나타내었지만 그다지 큰 차이는 아니었는데 그 이유는 침전된 pyrene과의 접촉성 문제로 인한 것으로 추정된다.

온도가 pyrene 분해도에 미치는 영향은 예상한대로 배양 온도가 높은  $20^\circ\text{C}$ 에서 분해도가 높은 것으로 나타났다. 하지만 온도가 비교적 낮은( $10 \sim 15^\circ\text{C}$ ) 추운 지방에서도 탄화수소 분해세균의 활성이 크게 저해받지 않는다는 보고처럼(13) 해사의 경우  $15^\circ\text{C}$ 에서도  $20^\circ\text{C}$ 의 분해도에 근접한 제거율을 보였다. 특히  $5^\circ\text{C}$ 와  $10^\circ\text{C}$ 에서는 자연 분해가 거의 일어나지 않았던 반면 균주접종에 의해 이 온도 범위에서도 35% 정도의 pyrene이 제거된 결과가 나왔으며(Fig. 2) 온도가 낮아질수록 분해도와 전환율이 감소하는 것을 알 수가 있다. 해수에서도 온도 감소에 따라 분해도가 감소하는 것을 볼 수 있으며 균주접종시  $10$ ,  $15^\circ\text{C}$ 에서 대조구보다 2배 정도 pyrene 제거율이 높았다.

해사에서는 pyrene의 농도가 높을수록 분해도는 감소하였지만 실제 전환율은 농도가 높을수록 증가하여 1,000 ppm의 경우 4,857 ng/g/day로 100 ppm의 3배 정도를 나타내었다. 해사에서 균주접종시 자연분해도와 비교해 보면 100 ppm에서는 전환율이 5.3배 증가하였고 500 ppm에서는 13.7배, 1,000 ppm에서는 28배나 증가하였다. 해수에서의 분해양상을 보면 해사와 마찬가지로 1,000 ppm에서 잔류량이 가장 많았으며 나머지 농도에서는 분해도에 있어서 커다란

차이를 보이지 않았다. 해사가 모든 pyrene 농도에서 분해도와 전환율이 높았으며 생분해의 증가폭도 매우 큰 것을 알 수 있다. 자연상태의 분해와 마찬가지로 pyrene 전환율은 농도가 높아질수록 증가하였는데 이는 높은 농도에서도 토착미생물과 분해균주들이 pyrene의 독성에 큰 영향을 받지 않으며 기질로 작용하는 탄화수소 농도가 증가할 때 효소활성이 증가하기 때문인 것으로 추정된다. 이런 경향은 다른 연구에서도 보고된 바 있다(3, 16).

일반적으로 단일 배양시 접종량 및 기질의 농도가 높을수록 PAHs의 대사산물이 많이 생성되는 것으로 알려져 있지만 자연환경에서는 접종균주와 토착미생물의 상호작용이 PAHs의 분해에 중요한 역할을 한다고 한다(6). 이러한 이유로 토착미생물들의 활성을 높이기 위해 쉽게 이용될 수 있는 탄소원인 glucose를 첨가하였는데 그 효과는 해사에서 glucose 첨가시 pyrene 분해도가 glucose를 첨가하지 않은 대조구보다 약간 높았으며 특히 초기 1~2주 사이에는 분해율이 상당히 증가하였다. 해수의 경우에는 glucose 첨가시 항상 대조구보다 높은 분해도를 나타내었다(Fig. 5). 이러한 결과는 glucose가 cometabolism의 생장기질로 이용되거나 pyrene의 대사산물을 이용하는 second population을 증가시켰기 때문에 일어날 수 있으므로 glucose가 pyrene 분해에 synergistic effect를 보인다고 할 수 있으며 이런 유사한 경향은 phenols의 생분해에서도 보고된 바 있다(15). 그러나 glucose로 인한 catabolic repression을 고려하면 앞으로 더 연구가 진행되어야 할 부분이라 생각된다.

균주를 vermiculite에 부동화시켜 첨가할 때 해수에서는 pyrene의 분해가 거의 일어나지 않았다. 이것은 pyrene이 분말 상태로 침전하고 vermiculite에 흡착된 균주와 접촉하지 못하였기 때문인 것으로 판단되며 이러한 이유로 해사에서도 분해도가 액상 접종물로 첨가한 대조구보다 낮은 분해도를 보였다. Vermiculite가 균주 보존성이 높다고 알려져 있

으나(12) 실제 다른 보고에서도 유류의 분해도를 향상시키지는 못한 것으로 나타났으며(1) 따라서 앞으로 탄화수소를 쉽게 흡착할 수 있는 담체 등이 개발될 필요가 있다.

계면활성제들은 소수성 탄화수소의 용해도를 증가시키며 이러한 계면활성제들의 특성을 이용해 용해도가 낮고 흡착력이 높은 PAHs의 탈착력과 생물학적 이용도를 증가시켜 PAHs의 bioremediation 효과를 증가시킬 수 있다고 알려져 있다(17). 하지만 여러 연구결과들을 종합해 보면 계면활성제들의 효과는 아직 분명하지 않은 상태이다(8, 18). 계면활성제의 자체독성이 PAHs 분해균주를 저해한다고 보고되었고(10), CMC 값과 친유성이 독성정도를 결정짓는 중요한 요소라고 한다. 본 연구에서는 첨가된 모든 계면활성제들과 mineral oil이 해수와 해사에서 대조구보다 낮은 분해도를 나타내었으나(Fig. 6) 해사의 경우 Brij 30과 mineral oil만이 배양 3주간 대조구보다 높은 pyrene 분해도를 보였다. 대부분의 계면활성제와 mineral oil이 분해균주의 pyrene 분해에 저해 효과를 가지나 여전히 자연분해보다보다는 높은 분해도를 나타내었다. 상기 결과로 볼 때 계면활성제가 CMC 값 이상으로 첨가되어 계면활성제의 높은 친유성에 의한 독성으로 분해균주와 토착미생물군의 활성을 저해한 것으로 판단된다. 또한 mineral oil은 물과 유화가 거의 되지 않아서 시료 배양시 해수 상층에 부유하여 pyrene의 이용도를 높이는 데 큰 영향을 미치지 못하였다. 앞으로 CMC 값을 고려하여 계면활성제를 여러 농도로 처리하여 분해균주와 토착미생물군에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

본 실험의 복합균주와 PRP의 pyrene 분해도를 비교해 보면 해사에서는 복합균주가, 해수에서는 PRP가 모든 pyrene 농도에서 각각 높은 분해도를 보였다(Fig. 7, 8). 해수에서 PRP가 consortium보다 분해도를 증가시킨 것은 실험 방법상의 문제인 것으로 추정된다. PRP는 높은 소수성 때문에 해수 표면에 존재하게 되어 pyrene을 PRP 첨가 후 그 위에 투여했던 것이 PRP와 pyrene의 접촉면적을 증가시켜 pyrene 분해도가 높아졌기 때문이다. 본 실험에 사용된 consortium이 PRP보다 pyrene 분해능이 높은 것으로 판단되는데 실제 PRP에 포함된 균주들중 탄화수소 분해균주보다 종속영양세균의 비율이 더 높기 때문에(11) 탄화수소 분해균주들로 구성된 consortium보다는 pyrene 분해능이 떨어질 것으로 생각된다. 다만 PRP는 탄화수소와 쉽게 덩어리를 형성하여 이를 회수하기 쉽기 때문에 흡착제로서의 기능은 뛰어난 것으로 나타났다.

이상의 결과를 볼 때 탄화수소 분해균주의 첨가는 자연상태의 난분해성 방향족 탄화수소의 분해율을 크게 증가시키며 여러 가지 다른 처리에 의해 이를 더욱 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이런 효과를 실제 오염 현장에 적용시키기 위해서는 분해균주의 지속성 및 잔류방법 등에 대한 연구와 현장실험 등이 뒤따라야 할 것이다.

### 감사의 말

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(해양수산과학 과제번호 KIOS-97-M-03)의 지원에 의하여 연구되었음.

### 참고문헌

1. 권창주, 송홍규. 1997. Bioaugmentation에 의한 해사에서의 Bunker C유류의 제거. *환경생물학회지* **15**, 45-52.
2. 김상진, 신수경. 1997. 생물정화용 제품의 유류분해능 비교. *미생물학회지* **33**, 157-162.
3. 서은영, 송홍규. 1995. 해양환경에서의 다핵방향족 탄화수소의 생분해. *미생물과 산업* **21**, 141-146.
4. Atlas, R. and R. Bartha. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation, p. 287-383. In K. Marshall (ed.), *Advances in Microbial Ecology* Vol. 12, Plenum Press, New York.
5. Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* **12**, 155-172.
6. Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351-368.
7. Dean-Ross, D. and C. Cerniglia. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 307-312.
8. Jahan, K., T. Ahmed, and W.J. Maier. 1997. Factors affecting the nonionic surfactant-enhanced biodegradation of phenanthrene. *Water Environ. Res.* **69**, 317-324.
9. Kastner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 359-362.
10. Laha, S. and R.G. Luthy. 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactant in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **25**, 1920-1934.
11. NETAC. 1993. Bioremediation product evaluation mesocosm field study PRP formulation #1. National Environmental Technology Application Corporation, Pittsburgh, Pennsylvania.
12. Pesenti-Barili, B., E. Ferdani, M. Mosti, and F. Degli-Innocenti. 1991. Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on various carriers for crown gall control. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2047-2051.
13. Pritchard, P.H., J.G. Mueller, J.C. Rogers, F.V. Kremer, and A. Glaser. 1992. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. *Biodegradation* **3**, 315-335.
14. Rosenberg, E., R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube, E. Adler, and E. Ron. 1992. Petroleum bioremediation - a multiphase problem. *Biodegradation* **3**, 337-350.
15. Shimp, R. and F. Pfander. 1985. Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrates on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 394-401.
16. Song, H., X. Wang, and R. Bartha. 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 652-656.
17. Sun, S. and S.A. Boyd. 1995. Sorption of nonionic organic contaminants in soil water systems containing petroleum sulfonate-soil surfactants. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 1340.
18. Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 258-263.

(Received September 23, 1998/Accepted December 26, 1998)

---

**ABSTRACT: Biodegradation of Pyrene in Marine Environment**

**Soon-Suk Hwang and Hong-Gyu Song\*** (Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701)

The biodegradation of recalcitrant polycyclic aromatic hydrocarbon, pyrene was investigated in microcosm simulating the beach sand and seawater. The natural biodegradation rates of pyrene were between 30~2,200 ng/(g(ml)/day) in beach sand and seawater when the pyrene loading rates were 100~1,000 ppm at 5~20°C. The effects of the inoculum size, pyrene concentration, incubation temperature and surfactant addition were investigated in fertilized (Inipol EAP 22) samples. Generally the biodegradation in beach sand was higher than that in seawater. A mixed inoculum (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*) showed the 3,120 ng/g/day of biodegradation rate in beach sand with 200 ppm pyrene, which was 7.8 times higher than the natural biodegradation rate. The highest transformation rate, 4,860 ng/g/day was obtained in the bioaugmented beach sand (1,000 ppm pyrene). The glucose and surfactant addition to enhance the removal have negatively influenced on the biodegradation of pyrene. In case of surfactants, CMC (critical micell concentration) might be the control factor for the biodegradation.