

Biodegradation of PAHs in anaerobic conditions

우승한, 임경희*, 박종문**

한밭대학교 화학공학과, *포항공과대학교 환경공학부, **포항공과대학교 화학공학과
(e-mail : ykh11@postech.ac.kr)

<요약문>

다양한 혐기성 조건에서 다환방향족탄화수소(PAHs)로 오염된 토양의 미생물 분해 연구를 수행하였다. 대표적인 다환방향족탄화수소인 phenanthrene과 fluorene을 토양과 물에 오염시켜서 약 100일 동안 저감 정도를 관찰하였고, 실제 다환방향족탄화수소로 오염된 현장 토양을 이용 혐기성하에서 다환방향족탄화수소의 생분해 가능성을 확인하였다. 미생물 접종원은 혐기성 조건에서 다환방향족탄화수소에 노출시킨 슬러리가 사용되었다. 황산염 환원조건, 질산염 환원조건, 메탄생성조건 등의 다양한 혐기성 조건에서 실험을 수행한 결과, 메탄생성조건 > 질산염 환원조건 > 황산염 환원조건의 순서로 분해가 잘 일어났다. 또한 현장오염토양의 경우 34일간 처리 후 메탄생성조건에서 최대 72%의 분해율을 보였다.

Key word : 혐기성, 다환방향족탄화수소(PAHs), 생물복원, 자연정화

1. 서론

자연정화(Natural attenuation)는 토양과 지하수 내에 존재하는 오염물의 자연적인 저감 현상을 활용하는 것으로 미생물에 의한 생분해가 가장 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 자연 정화는 비교적 분해 속도가 느림에도 불구하고 능동적인 복원방법에 비해 저 예산으로 복원이 가능하고, 현장 운전 중에도 방해 정도가 최소가 되는 장점을 갖고 있다.

주로 2~7개의 고리 화합물로서 연소된 물질이나 석유 잔재에 포함되어 있는 다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 암을 유발할 수도 있는 유해한 화합물로 알려져 있다. 지금까지 PAHs의 한 종류인 phenanthrene을 중심으로 호기성 액상에서 많은 연구들이 이루어졌다. 그러나 실제 토양은 표층으로부터 멀어짐에 따라 토양의 공극률이 낮아지면서 호기상태를 유지하는 데에는 한계가 있어, 토양 내 깊은 곳에서는 혐기성 상태를 이루게 된다. 따라서 대부분의 자연정화는 주로 혐기성하에서 이루어진다고 할 수 있다.

이미 2개의 고리구조를 가지는 Naphthalene의 경우, 황산염 환원조건, 질산염 환원 조건에서 박테리아에 의한 분해가 가능성이 밝혀졌다. 이후 3~4개의 고리로 이루어진 phenanthrene이나 pyrene 또한 혐기성에서 미생물에 의한 분해가 이루어질 수 있다는 가능성을 보인 결과들이 발표되었다. 그러나 대부분의 연구가 실제 토양 환경과는 큰 차이가 있는 액상이나 부유된 상태의 토양에서 수행된 것이었다.

따라서 본 논문에서는 대표적인 PAHs 중 phenanthrene과 fluorene을 이용하여 다양한 혐기성 조건하에서 액상과 인공 오염시킨 토양에서의 분해 가능성을 알아보고, PAHs로 오염된 실제 현장오염토양에

이를 적용하여 분해 정도를 평가하였다.

2. 본 론

2.1. 재료 및 방법

2.1.1. 인공오염토양

시료는 포항공단 내 운동장 토양을 2mm-mesh 채로 거른 후 약 2주간 상온에서 건조시켜 준비하였다. 건조된 시료는 각각 50ppm의 phenanthrene과 fluorene으로 오염시킨 후, 120ml의 시료병에 약 100g씩 담았다. 여기에 5ml 슬러리상태의 접종원과 전자수용체를 포함한 액체 배지를 포화될 정도로 주입했다. 이후 시료병은 고무마개로 닫고, 알루미늄 캡으로 밀봉하여 외부 공기가 출입하지 못하도록 하였다. 또한 알루미늄 호일로 빛을 차단하여 PAHs의 광분해를 방지한다. 위의 모든 과정은 혐기성 챔버(100%질소가스)에서 수행하였다.

각각의 혐기성 조건은 황산염 환원조건, 질산염 환원조건, 메탄생성조건으로 수행되었고, 이 조건을 위하여 황산나트륨, 질산나트륨, 탄산나트륨 형태의 전자수용체가 약 80mM 첨가되었다. 미생물의 존재 여부에 따른 분해율을 비교하기 위하여, 첫 번째 대조군에는 미생물 접종원을 넣지 않고, 혐기성 미생물의 활성을 억제하는 것으로 알려진 BESA와 Molybdate를 첨가하였다. 두 번째 대조군은 미생물 접종원은 넣되, 부수적인 전자수용체를 첨가하지 않았다.

미생물 접종원은 실제 유류로 오염된 현장 토양과 phenanthrene과 fluorene을 포함한 5종의 PAHs로 인위적으로 오염시킨 토양을 혼합한 후, 전자수용체를 포함한 혐기성 액체 배지를 첨가하여 약 4개월 동안 배양한 것을 사용하였다. 이 때 접종원에는 낮은 농도의 전자수용체들을 포함하고 있었다.

2.1.2. 액상에서 인공오염

5ml의 미생물 접종원을 포함한 PAHs 오염시료 60ml를 120ml 시료병에 담았다. 이 때 phenanthrene과 fluorene은 계면활성제를 이용하여 최종 농도가 20ppm이 되도록 하였다. 이후 시료병은 고무마개로 닫고, 알루미늄 캡으로 밀봉하여 외부 공기가 출입하지 못하도록 하였다. 또한 알루미늄 호일로 빛을 차단하여 PAHs의 광분해를 방지하였다. 위의 모든 과정은 혐기성 챔버(100%질소가스)에서 수행하였다.

이때 1%의 Triton X-100을 계면활성제로 사용하였으며, 전자수용체는 각각의 조건에 40mM이 첨가되었고, 첫 번째 대조군에 미생물 활성 억제제는 첨가하지 않았다.

2.1.3. 현장오염토양

시료는 PAHs를 포함한 유류로 오염된 A지역의 오염 토양을 사용했다. 유류 오염지역의 지하 4m에서 채취되었으며, 약 24%의 함수율을 나타냈으며, 고농도의 황산염을 함유하고 있었다. 120ml의 시료병에 131g 슬러리(100g 건조토양)와 전자수용체를 첨가하였다. 이후 시료병은 고무마개로 닫고, 알루미늄 캡으로 밀봉하여 외부 공기가 출입하지 못하도록 하였다. 또한 알루미늄 호일로 빛을 차단하여 PAHs의 광분해를 방지했다. 위의 모든 과정은 혐기성 챔버(100%질소가스)에서 수행하였다.

이 때 현장 토양이 과량의 황산염을 함유하고 있었으므로, 황산염 환원조건 자체를 대조군으로 사용하였으며, 질산염 환원조건을 위하여 질산나트륨을, 메탄생성조건을 위하여 탄산나트륨을 첨가하였다.

2.1.4. 분석

잔류 PAHs의 농도를 분석하기 위하여 토양시료는 노르말 헥산으로 추출하였다. 액상 시료는

15000rpm에서 5분간 원심분리하였고, 추출액은 0.45mm필터로 여과한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석은 UV254nm에서 이루어졌으며, 이동상(Acetonitrile : 물 = 75 : 25)을 1.5ml/min의 유량으로 공급하여 분석하였다. 또한 잔류 전자수용체의 농도를 알아보기 위하여 이온 크로마토그래피를 사용하였으며, 상단부분의 가스를 포집하여 이산화탄소의 생성량을 총 유기탄소분석기(IC)를 이용하여 측정하였다.

3. 결론

3.1. 결과 및 토의

3.1.1. 인공오염토양

다양한 혐기성 조건하에서 fluorene과 phenanthrene으로 오염된 토양의 생분해 정도를 알아보았다. 약 100일 간의 처리 기간 동안 각각의 혐기성 조건하에서 분해율은 그림 1과 그림 2와 같았다. con1은 미생물 억제제를 첨가한 것을 나타내고, con2는 미생물 접종원만 포함되고 전자수용체는 포함되지 않은 것을, S는 황산염 환원조건을, N은 질산염 환원조건을, C는 메탄생성조건을 의미한다. 그 결과 fluorene의 경우 메탄생성조건과 질산염 환원조건이 82%의 분해율을 보이며 분해가 활발히 진행된 것을 볼 수 있었다. 반면 황산염 환원조건인 경우 분해율은 54% 정도였으며, con2는 47%정도, 65일 동안 배양한 con1의 경우 12%의 분해율을 보였다. 대부분의 분해는 40일 정도까지는 활발하게 이루어졌으나 더 이상의 분해는 거의 일어나지 않았다. phenanthrene의 경우 초기에는 메탄생성조건에서 가장 잘 분해 되었으나, 60일 후에는 질산염 환원조건에서 더욱 활발히 분해하여, 총 100일간의 배양 후 질산염 환원조건은 phenanthrene의 90%이상이 분해 되었다. 또한 메탄생성조건에서도 77%의 높은 분해율을 보였다. 반면 황산염 환원조건과 con2의 경우 약 40%의 분해율만 보였고, con1은 거의 분해가 이루어지지 않았다.

잔류 전자수용체의 양을 측정한 결과 질산염 환원조건에서 초기 약 300mg/kg의 질산성질소가 40일 후 약 50mg/kg으로 급격히 감소하였고, 이 후에도 꾸준히 감소하여 전자수용체로 질산염이 사용됨을 확인할 수 있었다. 이에 반해 황산염 환원조건인 경우는 황산염의 함량이 초기와 나중에 거의 변동이 없음을 따라, 반응이 활발하지 않았음을 확인할 수 있었다. 그럼에도 불구하고, 황산염환원박테리아(sulfate reducing bacteria, SRB)는 존재하고 있음을 SRB kit를 이용하여 확인하였다.

또한 시간이 지남에 따라 분해산물인 이산화탄소가 지속적으로 발생되었는데, 이를 측정한 결과 C>S=con2>>N>>con1의 순서로 이산화탄소가 많이 발생됨을 알 수 있었다.

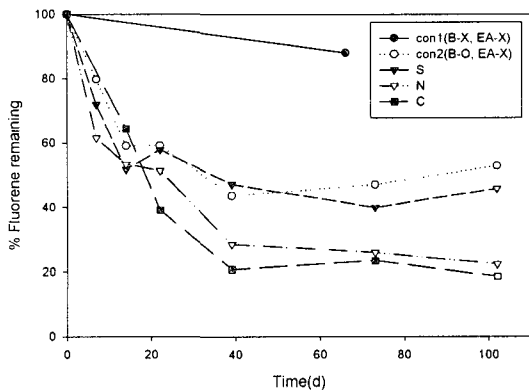


그림 1. 인공 오염 토양에서 다양한 혐기조건하에서 fluorene의 생분해도

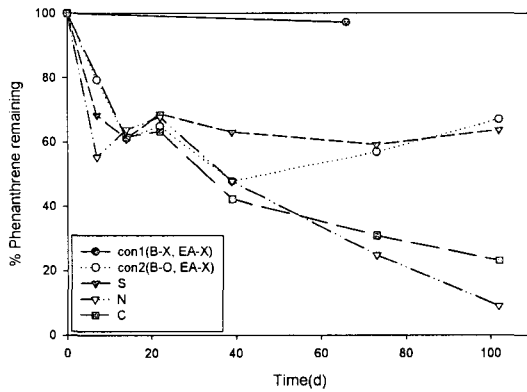


그림 2. 인공 오염 토양에서 다양한 혐기조건하에서 phenanthrene의 생분해도

3.1.2. 액상에서 인공오염

약 90일 동안 다양한 혐기성조건의 액상에서 PAHs의 분해를 살펴본 결과는 그림 3, 그림 4와 같았다. fluorene과 phenanthrene 모두 초기에는 활발한 분해를 보였으나, 이후 분해율이 둔화되는 경향을 보였다. 특히 phenanthrene의 경우는 20일 이후에는 더 이상 분해 되지 않았다. 분해 속도는 두 물질 모두 메탄생성조건에서 가장 빨랐으며, 질산염 환원조건, 황산염 환원조건, con2, con1의 순서로 분해가 잘 되는 것으로 나타났다. 이 중 메탄생성조건에서 fluorene의 경우 50%의 분해율을, phenanthrene의 경우 33%의 분해율을 보였다. 전자 수용체인 질산염의 경우 급속한 소비로 인해 재 주입을 하여 실험을 수행하였는데, 이로보아 질산염 환원조건에 미생물이 잘 적응한 것으로 보인다. 그러나 황산염의 경우 초기와 말기의 농도 차이가 거의 없었다. 또한 분해산물인 이산화탄소도 초기에는 급속하게 증가를 하였지만 그 발생량이 점점 둔화되는 것으로 관찰되어졌다.

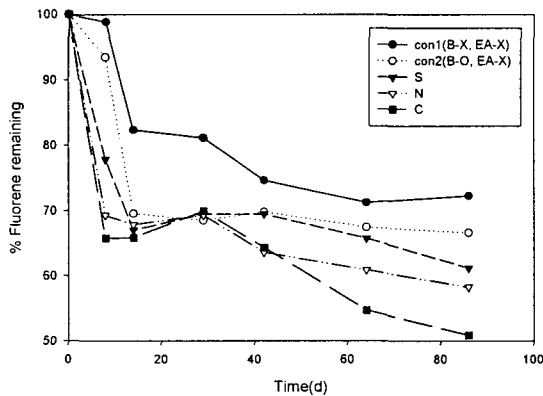


그림 3. 액상상태의 다양한 혐기조건하에서 fluorene의 생분해도

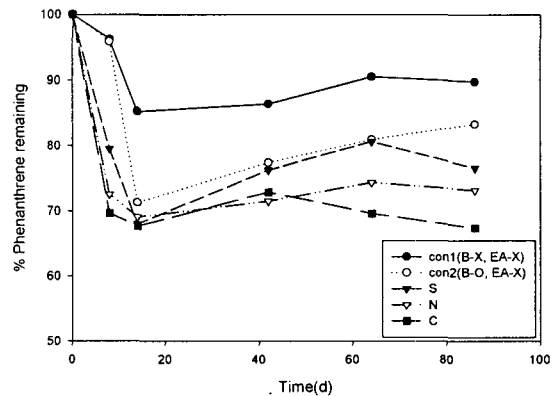


그림 4. 액상상태의 다양한 혐기조건하에서 phenanthrene의 생분해도

3.1.3. 현장오염토양

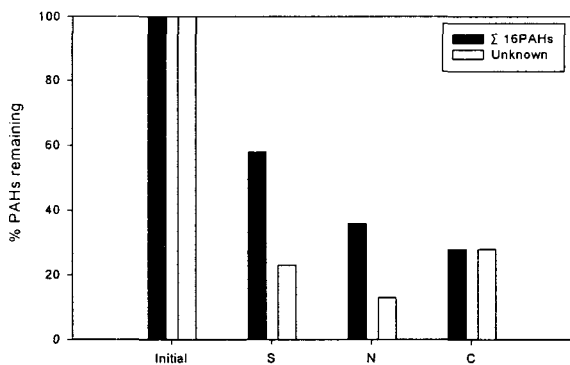


그림 5. 34일 간의 처리 전후 현장오염토양의 잔류 PAHs의 농도변화

현장오염토양으로 34일간 혐기성 분해실험을 한 결과는 그림 5와 같다. 초기 총 40ppm의 16개 PAHs가 34일간의 배양 후 모든 조건에서 40%이상 분해되었다. 이 중 메탄생성조건은 72%로 최대 분해율을 보였으며, 질산염 환원조건에서는 64%, 황산염 환원조건에서는 42%의 분해율을 보였다. 질산성 질소의 농도는 초기 180ppm에서 급격하게 감소하여 25일 후 모두 소모된 것으로 보아 질산염환원 박테리아의 활동이 왕성하였던 것으로 보인다. 또한 이산화탄소를 측정된 결과 질산염 환원조건과 황산염 환원조건은 메탄생성조건의 약 1/4 정도가 발생한 것으로 측정되었다.

참고문헌

1. Bregnard, T., Hoehener, P., Haener, A., Zeyer, J., 1996. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. Environ. Toxicol.

- Chem. 15, 299.307.
2. Chang, B.V., Chang, J.S., Yuan, S.Y., 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* 48, 717 - 724.
 3. Coates, J.D., Anderson, R.T., Lovley, D.R., 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfatereducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1099. 1101.
 4. Coates, J.D., Anderson, R.T., Woodward, J.C., Phillips, E.J.P., Lovley, D.R., 1996. Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* 3, 2784.2789.
 5. Langenho., A., Zehnder, A., Schraa, G., 1996. Behavior of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment column. *Biodegradation* 7, 267.274.
 6. Miller, K.M., Suidan, M.T., Sorial, G.A., Khodadoust, A.P., Acheson, C.M., Brenner, R.C., 1998. Anaerobic treatment of soil wash fluids from a wood preserving site. *Water Sci. Technol.* 38, 63.72.
 7. Wilfred F.M., Henk W. van Verseveld, 2002. Natural Attenuation : What does the subsurface have in store? *Biodegradation* 13: 53.64.