

계면활성제에 따른 다환방향족탄화수소(PAHs)의 생물학적 분해 양상

김영미¹ · 안치규¹ · 우승한² · 박종문³

¹포항공과대학교 환경공학부

²국립 한밭대학교 화학공학과

³포항공과대학교 화학공학과/환경공학부

e-mail: jmpark@postech.ac.kr

요약문

유류오염토양의 자연복원 시 생물이용도(bioavailability)를 높이기 위해 사용되는 계면활성제의 영향을 살펴보고자 제지 폐수로부터 분리한 미생물과 5가지 계면활성제를 사용하였다. 계면활성제로는 Brij 35, Brij 30, Triton X-100, Tween 40, Tween 80을 사용하였으며 유류오염물질로는 PAHs를 사용하여 계면활성제 별 미생물의 성장을 및 PAHs 분해율을 살펴보았다. 그 결과 각각의 계면활성제에 따라 서로 다른 미생물 성장 및 PAHs 분해능을 보였다. 계면활성제에 따른 미생물 성장은 Tween 계열에서 뚜렷했으며 이들 중 Tween 40에서는 PAHs의 분해능 또한 가장 활발하였다.

key word : PAHs, 계면활성제, 생물학적 분해

1. 서론

PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) 는 대표적인 난분해성 유류오염물질로 화석연료의 불완전연소 및 저장, 운반과정에서 자연계에 유출되며, 발암물질 등으로 알려져 있다. 이들로 오염된 토양을 복원하기 위해서는 여러 가지 방법들이 제안되고 있지만 이 중 생물학적인 처리 방법은 물리·화학적 방법에 비해 환경친화적이고 경제적인 방법으로 각광받고 있다. 그러나 생물학적 처리방법을 이용한 복원 시 PAHs의 매우 낮은 물에 대한 용해도로 인해 토양과 강한 결합을 형성하여 생물이용도가 떨어지게 된다. 따라서 PAHs의 물에 대한 용해도를 높이는 것이 성공적인 생물학적 처리를 위한 필수 요건이 된다. 물에 대한 낮은 용해도를 극복하기 위해 계면활성제를 사용하게 되는데 이로 인하여 PAHs와 같은 소수성 물질의 용해도를 높이는 효과 뿐 아니라 계면활성제의 물리·화학적 특성에 따라 미생물에 독성을 주거나, 미생물의 성장 및 PAHs 물질의 분해를 증가 또는 저해시킬 수 있다. 이에 본 연구에서는 제지 폐수로부터 분리한 미생물을 대상으로 하여 대표적인 비이온성 계면활성제인 Brij 35, Brij 30, Triton X-100, Tween 40, Tween 80을 이용하여 계면활성제가 미생물의 성장 및 PAHs의 생물학적 분해에 미치는 영향을 살펴보았다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 실험재료

대표적인 유류 오염물질로 PAHs를 선정하였으며 본 연구에서는 3개의 벤젠고리를 가지는 phenanthrene (Sigma)을 사용하였고, 계면활성제로는 비이온성 계면활성제인 Brij 35, Brij 30, Triton X-100, Tween 40, Tween 80 (Sigma)을 사용하였다. 이들의 물리·화학적 특성은 Table

1 및 Table 2 에 나타난 바와 같다. PAHs 분해를 위해 미생물은 제지 폐수로부터 순수 분리한 미생물을 사용하였다.

2.2. 계면활성제의 독성 실험

미생물의 성장에 미치는 계면활성제의 영향을 살펴보기 위해 250 mL 삼각플라스크를 사용하여 5가지 계면활성제 농도를 2 g/L 로 주입한 후 초기 OD_{600nm} 값이 약 0.02 가 되도록 미생물을 접종하였으며, 회전식 교반기에서 160rpm 으로 상온에서 배양되었다. 배지는 50 mM NH₄Cl, 5 mM NaH₂PO₄, 11.3 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 2 mM Na₂SO₄, 1.25 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.02 mM CaCl₂, 0.0001 mM Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.0006 mM HCl, 0.006 mM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.025 mM FeSO₄ · 7H₂O, 0.1 mM MnSO₄ · H₂O, 0.05 mM CuSO₄ · 5H₂O, 0.0001 mM CoCl₂ · 6H₂O, 0.0004 mM H₃BO₃ 를 포함하는 SM배지 완충용액을 사용하였다. 완충용액은 8.5 g/L NaCl, 0.6 g/L KH₂PO₄, 0.3 g/L Na₂HPO₄ 를 포함한다. 계면활성제에 따른 미생물의 성장을 알아보기로 일정 시간 간격으로 OD_{600nm} 값을 측정하였다.

2.3. Phenanthrene의 분해능 실험

제지 폐수로부터 분리한 미생물의 phenanthrene 분해능을 알아보기 위해 5가지 계면활성제 농도를 2 g/L, phenanthrene 농도를 20 mg/L 로 조절하여 초기 OD_{600nm} 값이 약 0.02 가 되도록 미생물을 접종하였고, 회전식 교반기에서 160rpm 으로 상온에서 배양하였다. 사용된 배지는 상기와 동일하다. 계면활성제와 phenanthrene 용액에 따른 미생물의 성장은 OD_{600nm} 값을 측정하였고, phenanthrene의 농도는 whatman syringe filter (0.45µm, hydrophilic)로 거른 후 UV 검출기가 달린 HPLC (Dionex USA)를 이용하여 250 nm 파장에서 분석하였다. 분석에 사용한 칼럼은 역상 SUPELCOSIL LC-PAH (150 mm × 4.6 mm, 5 µm)를 이용하였고 유동상 (85% acetonitril 과 15% de-ionized water)은 1.5 mL/min의 유속으로 흘려주었다.

2.4. 미생물의 적응도 실험

미생물의 적응도와 탄소원으로 사용하는 계면활성제와의 관계를 보고자, 본 연구에서 계면활성제의 독성이 가장 적은 것으로 판단되는 계면활성제인 Tween 40과 가장 활발한 PAHs 분해능을 보이는 미생물을 접종하여 상기 방법과 동일하게 분석해보았다.

2.5. Phenanthrene 석출 실험

탄소원으로 사용되는 계면활성제의 감소로 인한 phenanthrene 석출 가능성을 알아보기로, 메탄올과 샘플을 1:1 로 혼합한 후 필터링한 용액과 샘플만을 필터링한 용액을 비교하여 석출 상태로 있는 phenanthrene의 존재 여부를 확인하였다.

Table 1. Structure and properties of selected surfactants ³⁾

surfactant	General structure	Hydrophobic Group	MW ^a (g/mole)	CMC ^b (mg/L)	HLB ^c	Na ^d	ThOD ^e (g O ₂ /g)
Brij 35	C ₁₂ E ₂₃	Dodecanol	1198	70-110	16.9	53	2.02
Brij 30	C ₁₂ E ₄	Dodecanol	362	7-14	9.7	120	2.48
Triton X-100	C ₈ ∅E _{9.5}	Octylphenol	624	110-150	13.5	140	2.19
Tween 40	C ₁₆ S ₆ E ₂₀	Palmitic Acid	1282	29	15.6		1.98
Tween 80	C ₁₈ S ₆ E ₂₀	Oleic Acid	1308	13	15.0	110	2.01

^aMW, molecular weight; ^bCMC, critical micelle concentration; ^cHLB: hydrophile-lipophile balance number; ^dNa, aggregation number; ^eThOD, theoretical oxygen demand; S6, sorbitan ring; E_n, ethylene oxide group; ∅, phenolic ring

Table 2. Properties of phenanthrene ¹⁾

Mol formula (average)	Mw (g/mole)	Solubility (mg/L)	chemical structure
C ₁₀ H ₁₄	178.2	1.30	

3. 결과 및 고찰

계면활성제만 넣었을 때의 OD_{600nm} 값은 phenanthrene과 계면활성제 혼합액에서와 비슷했다. (data not shown) Figure 1에서는 phenanthrene과 계면활성제 혼합액에서의 OD_{600nm} 값을 보여주는 결과로 전형적인 미생물의 성장곡선과 동일한 결과를 나타내고 있다. 특히 Tween 계열의 계면활성제에서 미생물의 성장이 활발함을 볼 수 있다. 이는 Triton X-100의 경우 미생물의 성장을 저해하는 반면 Tween 계열은 미생물의 탄소원으로 사용될 수 있다는 연구결과들과 일치한다. 그러나 Brij 계열은 미생물에 독성이 다소 있다고 알려져 있음에도 불구하고 본 실험에서는 Brij 35의 경우 계면활성제 자체의 OD_{600nm} 값을 고려하고도 미생물의 성장이 활발한 편이었다.

Figure 2에서는 5가지 계면활성제 용액에서의 phenanthrene 분해율을 보여주는 결과로 Tween 40에서 가장 뚜렷하게 phenanthrene의 농도가 감소함을 볼 수 있다. 이의 결과는 OD_{600nm}의 결과와 밀접한 관계를 가지는 것을 알 수 있다. 즉, Tween 40의 경우 미생물의 성장이 최고에 달하는 200시간부터 phenanthrene의 농도가 급격히 감소하기 시작한 것으로 미루어보아 미생물이 Tween 40을 탄소원으로 하여 성장을 한 후 phenanthrene을 탄소원으로 사용하기 시작한 것으로 판단된다. Brij 30과 Tween 80에서도 약간의 phenanthrene이 감소함을 볼 수 있는데 이는 미생물 cell에 흡착한 것일 수 있으므로 확실한 판단이 어렵다. 단, Tween 40의 경우 계면활성제의 고갈로 인하여 phenanthrene이 입자상으로 석출된 것일 수 있어 메탄올을 이용한 석출 실험을 수행하였다. 실험결과 미생물 cell에 흡착 또는 석출된 phenanthrene이 있음을 확인하였으나 초기 농도와 비교해 보았을 때 적어도 30% 이상의 phenanthrene이 감소함을 볼 수 있었다. 따라서 Figure 2의 결과는 cell에 흡착하는 경우, 석출되는 경우 그리고 미생물에 의해 분해되는 경우 등 복합적인 요인에 의한 결과로 사료된다.

Figure 3은 선행실험에 사용되었던 활성화된 미생물을 Tween 40과 phenanthrene 혼합용액에 접종한 것으로 phenanthrene에의 순응에 대한 영향을 알아보았다. T40 (Raw)는 순응시키지 않은 균주를 접종한 것이고, T40 (Adapted)는 선행실험에서 순응된 균주를 접종한 것이다. 전반적으로 선행실험보다 농도의 감소가 빠르게 일어나고 있으나 순응시키지 않은 균주와 비슷한 패턴을 보이는 것으로 미루어 보았을 때 순응에 의한 영향은 크지 않은 것으로 판단된다.

4. 결론

제지 폐수로부터 순수 분리한 균주를 대상으로 5가지 계면활성제의 영향을 조사해본 결과 Tween 계열에서 뚜렷한 성장을 보였고, 특히 Tween 40에서 phenanthrene의 감소가 큰 것을 알 수 있었다. Tween 80에서는 미생물의 성장이 활발했음에도 불구하고 phenanthrene의 감소가 적은 것으로 보아 Tween 40이 미생물에 의한 phenanthrene의 대사에 도움이 되는 것으로 판단된다. 그러나 이 결과는 복합적인 요인에 의한 것으로 추후 계면활성제의 정량 분석을 통해 해석할 수 있을 것이며, 순수 분리된 균주의 동정을 통해 미생물의 특성을 규명해야 할 것이다.

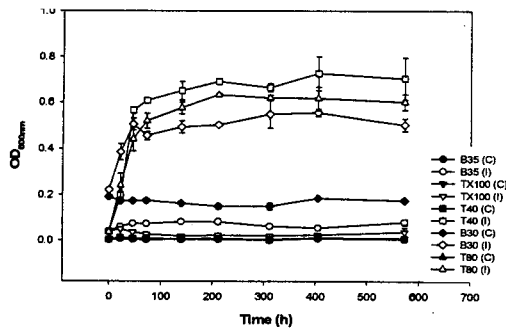


Figure 1. Microbial growth on various surfactants containing phenanthrene (B35: Brig 35, TX100: Triton X-100, T40: Tween 40, B30: Brij 30, T80: Tween 80, C: Control, I: Inoculum)

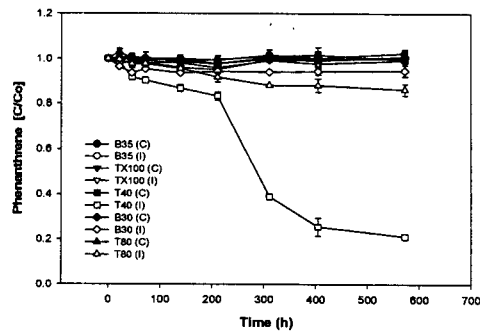


Figure 2. Degradation of phenanthrene in various surfactants

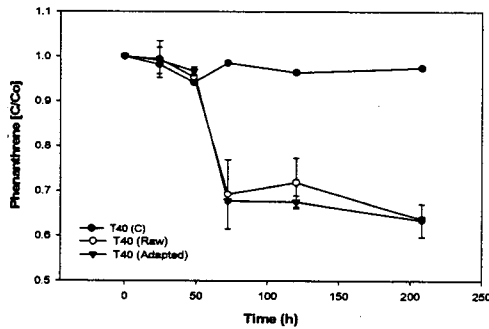


Figure 3. Effect of adaptation of bacteria on phenanthrene degradation

5. 사사

본 연구는 한국과학재단 지정 포항공과대학교 차세대바이오환경기술연구센터 (R11-2003-006)의 연구지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

6. 참고문헌

- 1) Bamforth SM, Singleton I, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions, *J. CHEM. TECHNOL. BIOT.*, 80 (7): 723-736, 2005
- 2) Kim IS, Park JS, Kim KW, Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry, *APPL. GEOCHEM.*, 16 (11-12): 1419-1428, 2001
- 3) Daniel H. Yeh, KurtD. Pennell and Spyros G. Pavlostathis, Toxicity and biodegradability screening of nonionic surfactants using sediment-derived methanogenic consortia, *WATER SCI. TECHNOL.* 38 (7): 55-62, 1998
- 4) Seung Han Woo, Che Ok Jeon and Jong Moon Park, Phenanthrene biodegradation in soil slurry systems: Influence of salicylate and Triton X-100, *K. J. Chem. Eng.*, 21(2): 412-418, 2004