

Rhizosphere 토양과 Non-rhizosphere 토양에서 Pyrene의 분해속도 비교

김상채 · 이의상* · 서성규**

목포대학교 공과대학 환경공업교육과

*한국도로공사 도로연구소 환경연구실

**여수대학교 환경공학과

Comparison of Biodegradation of Pyrene between Rhizosphere Soil and Non-rhizosphere Soil

Sang Chai Kim, *Euisang Lee, **Seong Gyu Seo

Dept. of Environ. Eng. Edu., College of Eng., Mokpo National University

**Korea Highway Corporation Highway Research Center,
Environment Research Division*

***Dept. of Environ. Eng., Yosu University*

ABSTRACT

Pyrene is a common petroleum contaminant. This compound is recalcitrant to biological degradation and persists long in contaminated environments. A microcosm experiment was conducted to investigate the degradation rate of pyrene in three different of soil : rhizosphere soil ; non-rhizosphere soil ; and sterilized soil. The degradation rate followed the order of rhizosphere soil>non-rhizosphere soil>sterilized soil. And the rate did not change significantly when organic acids commonly found in the rhizosphere were added to each soil but it seemed to be well related to the increase of the number of microorganisms. Overall, it appears that pyrene is degraded faster in the rhizosphere soil which has the higher microorganism density.

요 약 문

Pyrene은 보통 석유류로서 오염된지역에서 쉽게 발견된다. 이 화합물은 생물학적으로 난분해성물질 이므로 오염지역에서 장시간 존재한다. 세 종류의 토양(rhizosphere soil, non-rhizosphere soil,

sterilized soil)에서 pyrene의 분해속도를 조사하기 위하여 microcosm 실험을 수행하였다. Pyrene 농도감소속도는 rhizosphere soil>non-rhizosphere soil>sterilized soil 순서로 증가하였다. 또한 뿌리 유출물을 모사한 유기산의 첨가는 pyrene의 농도감소에 큰영향을 미치지 않았으나 pyrene 농도감소 속도와 토양미생물의 증가는 좋은 상관관계를 보여주었다. 따라서 본 연구에서는 미생물의 밀도가 높은 rhizosphere 토양에서 pyrene의 생물학적 분해가 효과적으로 진행되는 것으로 나타났다.

1. 서 론

PAHs(polycyclic aromatic hydrocarbons)는 유기화합물의 불완전연소에 의하여 생성되고 산불과 같은 자연현상에 의해서도 생성된다. 그러나 가장 중요한 발생원은 석탄과 다른 화석연료에 의한 것이며 coke 생성, 정유산업, 석탄과 oil shale 전환산업 그리고 화학산업에 기인한다. PAHs는 넓은 지역에 분포되어 있고 공단지역과 주유소에 가까운 토양에서 높은 농도로 발견된다. PAHs의 독성효과는 호흡, 피부접촉 그리고 소화기에 의해 신체에 흡수되어 나타난다. PAHs는 eucaryotic degradation pathway를 거쳐 대사되며 화합물은 초기에 liver monooxygenases에 의해서 arene oxides(epoxides), dihydrodiols, phenols 그리고 quinones로 전환된다. 특히 Epoxides는 유전물질과 결합하여 종양의 출발점이 된다^{1,2)}.

오염된 환경에서 PAHs를 제거하기 위한 과정은 휘발, 침출 그리고 광분해와 같은 메카니즘이 효과적일수도 있지만 주요과정은 미생물에 의한 분해이며 bioremediation 은 유망한 정화방법중의 하나이다³⁾. 최근에 식물을 이용한 PAHs의 정화방법은 넓은 범위에 걸쳐서 저농도로 오염되어 있는 토양인 경우에 적합한 것으로 주목받고 있다. 식물에 의한 토양중의 PAHs 제거의 효과적인 결과는 두가지 측면으로 고려할 수 있다. 첫 번째, 식물뿌리는 유기오염물질을 흡수, 축적하여 대사작용에 이용하거나 휘발시킨다. 두 번째는 식물뿌리 주위의 rhizosphere microflora가 오염물질의 미생물

분해를 가속화 시킨다⁴⁻⁷⁾. Rhizosphere 토양에서 미생물의 높은 밀도와 다양성 때문에 후자가 PAHs의 미생물분해를 위한 중요한 인자로 간주된다. Rhizosphere effect 는 non-rhizosphere 토양에서의 미생물의 수 대 rhizosphere 토양에서의 미생물의 수의 비로 보통 5~20 범위에 있다⁸⁾.

Tracy등⁹⁾과 Schnoor와 Licht¹⁰⁾는 식물은 토양중의 독성유기화학물질의 미생물분해를 증진시킬 수 있다고 보고하였다. Anderson¹¹⁾과 Foster등¹²⁾은 rhizosphere 토양에서 유기오염물질의 미생물 분해속도가 증가되는 것은 rhizosphere 토양에서 풍부한 미생물의 존재에 기인 한다고 보고하였다. Aprill과 Sims¹³⁾는 prairie grasses를 사용하여 PAHs로 오염된 토양을 정화시키기 위한 실험을 한 결과 prairie grasses를 사용한 토양이 prairie grasses를 사용하지 않은 토양보다 PAHs의 양이 감소되는 크기가 큰 것을 관찰하여 토양중 PAHs 제거에 식물의 유효한 효과를 보고하였다. Walton과 Anderson¹⁴⁾은 non-rhizosphere에서 보다 rhizosphere에서 trichloroethylene의 분해속도가 증가하는 것과 분해속도는 유기오염물질의 종류와 사용한 식물의 종류에 의존하는 것을 관찰하였다. 또한 저지등¹⁵⁾도 rhizosphere 토양에서의 rhizosphere effect의 수학적 모델식을 제시한바 있다. 이상과 같은 최근의 연구들은 rhizosphere에 있는 다양하고 풍부한 미생물이 인간의 건강과 환경오염에 관련된 유독물질을 분해할 수 있다는 것을 지적해주고 있다.

본연구에서는 간단한 microcosom을 모사하고

유기오염물질로 pyrene을 사용하여 rhizosphere 와 non-rhizosphere에서 pyrene의 분해속도를 고찰하여 식물에 의해 증진되는 유기물분해에 대한 기초적인 자료를 얻고자한다.

2. 실험

2-1. 토양과 처리

Rhizosphere와 non-rhizosphere 토양은 캔사스주 맨해탄근교에 있는 농장지역에서 수집하였다. Table 1에 토양의 조성을 나타냈다. 두종류의 토양을 사용하기전에 1/4" 체를 사용하여 처리하였다. 두 토양의 특성은 Table 2에 정리하였다. 대조구(control)는 non-rhizosphere 토양을 120°C, 10 psi에서 1시간동안 두 번 고압멸균기에서 처리하여 사용하였다. Pyrene(Sigma Co., G.R)은 아세톤(Fisher Scientific, G.R)에 녹여 사용하였다. 토양중의 pyrene 농도를 100mg/kg으로 조절하기 위하여 4000mg pyrene/L acetone 용액중

Table 1. Soil composition

Sample	Sand(%)	Silt(%)	Clay(%)
Non-rhizosphere soil	61.5	36.0	2.5
Rhizosphere soil	57.0	40.0	3.0

Table 2. Soil chemical analysis for experiment

Item	Non-rhizosphere soil	Rhizosphere soil
% Moisture	5.5	12.0
NH ₄ ⁺ -N(mg/kg)	1.6	2.5
NO ₃ ⁻ -N(mg/kg)	15.5	32.7
P(mg/kg)	82	91
K(mg/kg)	320	660
pH	6.2	5.7
CEC(meq/100g)	5.4	7.8
% Organic Matter	0.6	2.5

에서 25mL를 취하여 1kg의 토양에 분무시켜 혼합하였다.

2-2. 실험방법

Microcosom은 125mL Erlenmeyer 플라스크 180개로 구성하였다. 각 플라스크는 10g의 토양을 포함하고 있다. 그중에서 60개의 플라스크는 rhizosphere 토양에서 pyrene의 분해를 조사하기 위해 사용되었고 60개는 non-rhizosphere 토양에서 pyrene의 분해를 조사하기 위하여 사용되었다. 나머지 플라스크는 대조구로서 고압멸균 처리한 토양에서 pyrene의 분해를 조사하기 위해 사용되었다. Microcosom의 온도를 실온(22°C)으로 유지시켰고, 탈이온수와 유기산용액을 사용하여 토양미생물의 최적성장조건을 맞추기 위해 수분을 20~30%로 조절하였다. 세 종류의 토양을 포함하고 있는 각 60개의 플라스크에서 30개의 플라스크는 고압멸균된 탈이온수를 사용하여 수분 함유율을 20~30%로 유지시켰고, 나머지 30개의 플라스크는 유기산용액을 사용하여 수분함유율을 20~30%로 유지시켰다. 유기산용액은 40 μM acetic acid, 1.5 μM succinic acid 그리고 10 μM formic acid로 구성되었다. 유기산용액은 rhizosphere 토양에서 뿌리유출물을 모사한 것으로 사용에 앞서 0.22 μm 여과지로 여과하여 사용하였다. 실험은 100일동안 수행되었으며 샘플의 분석은 한번에 각 토양 종류별로 3개의 플라스크를 취해서 10일 간격으로 하였다.

2-3. 분석

10일 간격으로 각 플라스크로부터 2g의 토양을 채취하여 샘플을 준비하였다. 2g의 토양을 20mL scintillation vial에 넣고 10mL의 2-methoxyethanol을 첨가하였다. 이 vial들을 shaker box에서 1시간 동안 진탕처리하였다. 균

일상 혼합물을 #2 whatman filter에 통과시켜 여과시키고 다시 2mL의 2-methoxyethanol로 filter를 세척하였다. 여과된 액을 2-methoxyethanol/탈이온수용액(30/70)으로 만들기 위하여 희석하였다. C₁₈ cartridge에 2mL methanol, 6mL hexane, 다시 2mL methanol 그리고 2mL 2-methoxyethanol/탈이온수용액(30/70)을 순서대로 통과시켰다. 이 여과액을 포기시키고 2.5mL hexane을 첨가하였다. 이 액을 2.5g anhydrous sodium sulfate가 들어 있는 테스트튜브에 넣어 물을 완전히 제거하고 G.C vial에 담아 분석전까지 4℃에서 저장하였다. 내부표준물로서는 anthracene을 사용하였다. 분석은 J & W DB-5 fused silica capillary column 과 불꽃이온화검출기가 장착된 gas chromatography(Hewlett Packard 5890A)로 하였다. 분석온도는 35℃에서 5분 유지시키고 20℃로 승온하여 110℃에서 분석하였다. 각 분석에서 샘플의 주입부피는 1 µL였다.

2-4. Microbial characterization

토양미생물의 수는 plate count법으로 측정하였다. mineral salts medium을 포함하는, 즉 100ppm pyrene을 함유하는 mineral salts medium, pyrene을 함유하지 않는 mineral salts medium 두종류의 aga media를 준비하였다.

pyrene을 헥산에 용해시켜 2000ppm의 농도로 만들었다. 10mL pyrene/ hexane 용액을 200mL의 뜨거운(80~90℃) agar media에 첨가하여 agar media에서 100ppm이 되도록 조절하였다. 분석결과 agar media에서 헥산은 검출되지 않았고 pyrene은 agar에 고르게 분포되었다. 각 토양샘플로부터 추출된 미생물은 agar plate에 접종되어 22℃에서 배양되었고 bacterial colonies는

1일 간격으로 계산되었다.

3. 결과 및 고찰

표2에서 보는 바와같이 rhizosphere 토양은 non-rhizosphere 토양보다 미생물의 성장에 유리한 환경을 제공하기 때문에 미생물의 밀도가 높고 그종류도 다양하다. 본 연구에서 사용한 rhizosphere 토양은 미생물의 활동이 비교적 활발한 7월에 USDA(United States Department of Agriculture)농장 지역주변에서 서식하는 뿌리가 잘 발달된 alfalfa 뿌리주변의 토양을 채취하여 사용하였다. non-rhizosphere 토양은 식물이 자라지 않는 주변의 토양을 채취하여 사용하였다.

Fig.1은 rhizosphere 토양에서 시간에 따른 pyrene 농도변화를 나타낸 것이다. 실험조건은 온도는 22℃였고 수분함유율은 탈이온수로 조절하였다. 실험 시작 10일후의 pyrene의 농도는 약 80ppm 이었다. 시간이 경과함에 따라 pyrene의 농도는 점차 감소하였고 100일후에는 약 63ppm 까지 감소하였다.

Fig.2는 Fig.1과 동일한 조건에서 수분 함유율

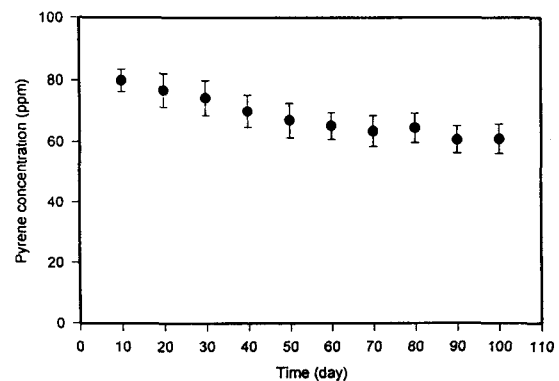


Fig 1. Pyrene concentration with time in rhizosphere soil treated with deionized water.

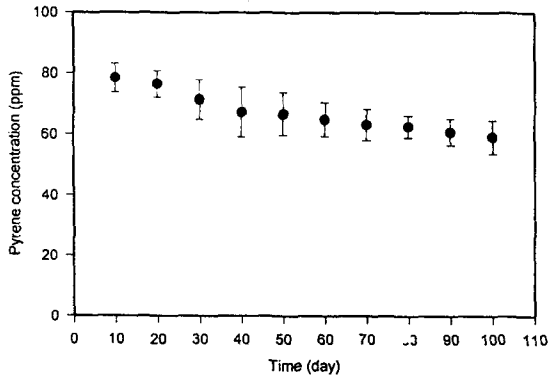


Fig 2. Pyrene concentration with time in rhizosphere soil treated with organic acid solution

만 유기산용액으로 조절하였다. 유기산은 뿌리유출물을 모사한 것으로 뿌리유출물이 rhizosphere 토양에서 서식하는 미생물의 성장에 영향을 미치므로 유기산을 이용하여 수분을 조절하였다. 전체적으로 Fig.1과 같은 경향을 보여주고 있으며 특별히 유기산에 기인한 pyrene 농도의 감소속도의 현저한 증가는 관찰되지 않았다. 따라서 뿌리유출물 효과를 관찰하기 위하여 사용된 유기산의 영향은 본 실험

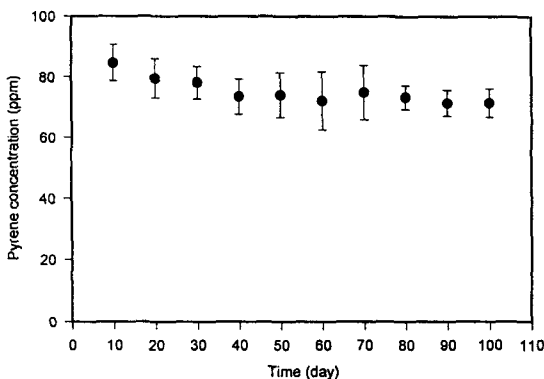


Fig 3. Pyrene concentration with time in non-rhizosphere soil treated with deionized water.

험조건하에서는 나타나지 않았다.

Fig.3은 Fig.1과 동일한 조건하에서 non-rhizosphere 토양에서 시간에 따른 pyrene 농도 변화를 나타낸 것이다. 시간에 따른 pyrene 농도는 실험시작 10일후는 약 80ppm이었고 100일후는 약 76ppm정도를 나타내어 감소속도가 rhizosphere 토양에서보다 상당히 둔화되는 것을 볼 수 있었다.

Fig.4는 Fig.3과 동일한 조건하에서 수분함유율을 유기산으로 조절한 결과를 보여주고 있다. Fig.3과 유사한 결과를 보여주고 있으나 여기서도 유기산에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

Fig.5는 Fig.1과 동일한 조건하에서 고압멸균기로 처리한 토양에서 시간에 따른 pyrene 농도 변화를 나타낸 것이다. 실험시작 10일후의 pyrene 농도는 약 81ppm이었고 100일후의 농도는 약 79ppm으로 pyrene 농도의 감소는 매우느린 속도로 일어났다.

Fig.6은 Fig.5와 동일한 조건하에서 수분 함유율을 유기산으로 조절한 결과를 보여주고 있다. Fig.5와 유사한 경향을 보여주고 있으며 유기산에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

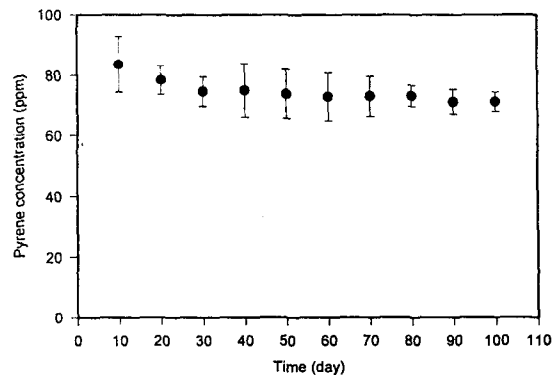


Fig 4. Pyrene concentration with time in non-rhizosphere soil treated with organic acid solution.

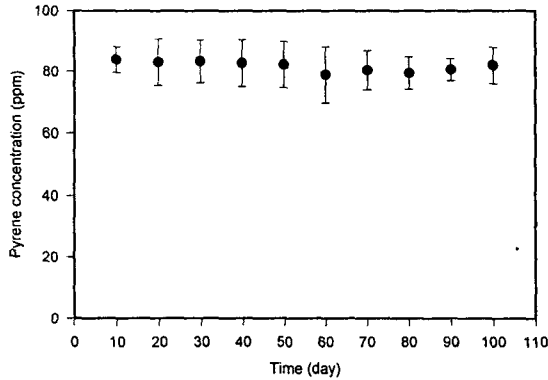


Fig 5. Pyrene concentration with time in sterilized soil treated with deionized water.

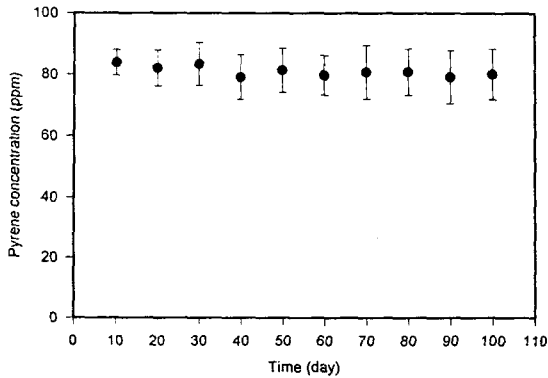


Fig 5. Pyrene concentration with time in sterilized soil treated with organic acid solution

토양에서 유기화합물의 생물학적 분해는 일련의 효소촉매작용의 단계들을 거쳐서 일어나며 복잡한 유기화합물은 간단한 유기분자나 무기분자들로 전환되고 이러한 반응은 환경조건에 의해서 증진되거나 감소된다¹⁵⁾. 따라서 pyrene 농도의 감소속도가 rhizosphere soil>non-rhizosphere soil>sterilized soil 의 순서로 나타난 것은 미생물의 밀도가 rhizosphere soil>non-rhizosphere

Table 3. Composition of agar media

Mineral salts medium	
Component	Concentration (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	0.7
KH ₂ PO ₄	0.7
FeSO ₄	0.01
Na ₂ MoO ₄	0.01
MnCl ₂	0.01
CoCl ₂	0.01
glucose	10.0
agar	15.0
pH = 6.5 ± 0.3	

soil>sterilized soil 의 순서로 높기 때문에 이에 따라 생물학적 분해가 증진된 결과로 해석할 수 있다. 그러나 생물학적분해를 증진시킬수 있을것으로 예측된 뿌리유출물을 모사한 유기산을 사용하여 수분함유율을 조절할 때와 탈이온수로 조절할때의 pyrene 농도의 감소속도가 큰 차이가 없는 결과로부터 본 실험에서 사용한 유기산은 생물학적 분해에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

각 토양에서의 pyrene 농도 감소속도와 미생물의 밀도와의 상관관계를 조사하기위하여 plate counts법으로 각토양에서의 CFU(Colony Form Unit)/g을 표4에 나타내었다. 표4에서 본바와 같이 실험시작전과 100일후의 100ppm의 pyrene을 포함하는 mineral salts medium에서나 pyrene을 포함하지 않는 mineral salts medium에서 CFU/g의 값은 거의 같았으므로 pyrene이 CFU/g에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 농도 100ppm의 pyrene은 미생물의 성장에 부정적으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 실험개시 100일후의 각 토양의 CFU/g은 10배만큼 증가하였으나 CFU/g이 높은 rhizosphere 토

Table 4. Microbial plate counts of rhizosphere, non-rhizosphere and sterilized soils with mineral salts media amendments.

soils	No. of CFU/g			
	Oday		100day	
	without pyrene	with pyrene	without pyrene	with pyrene
Rhizosphere soil	1.1×10^6	1.2×10^6	1.3×10^7	1.5×10^7
Non-rhizosphere soil	0.5×10^5	0.4×10^5	1.2×10^6	1.1×10^6
Sterilized soil	0	0	0.2×10^2	0.1×10^2

양이 CFU/g이 낮은 non-rhizosphere 토양에 비하여 pyrene 농도 감소속도가 컸으므로 pyrene 농도감소속도와 CFU/g의 증가는 좋은 상관관계를 보여주고 있다. 또한 고압멸균된 토양은 비록 100 배 정도 CFU/g이 증가하였으나 pyrene 농도감소 속도에 크게 영향을 미치지 못하였으므로 미생물의 밀도가 어느정도 이상 되어야만 pyrene 농도감소 속도에 영향을 미치는 것으로 생각되며 이상의 결과로부터 미생물의 밀도가 높은 rhizosphere 토양에서 pyrene의 생물학적분해가 효과적으로 진행되는 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

Pyrene의 생물학적 분해속도를 조사하기 위하여 세 종류의 토양(rhizosphere soil, non-rhizosphere soil, sterilized soil)에서 microcosm 실험을 수행하였다. pyrene 농도감소 속도는 rhizosphere soil)non-rhizosphere soil)sterilized soil 순서로 증가하였으며 뿌리유출 물을 모사한 유기산의 첨가는 pyrene의 농도감소에 큰영향을 미치지 않았으나 pyrene 농도감소속도와 토양미생물의 증가는 좋은 상관관계를 보여주었다. 본 연구결과 미생물의 밀도가 높은 rhizosphere 토양에서 pyrene의 생물학적분해가 효과적으로 진행되는 것으로 나타났다. 따라서 실

제 식물이 서식하는 토양에서는 토양미생물의 밀도가 훨씬 높아지기 때문에 pyrene의 생물학적분해가 더욱 가속화될 것으로 생각되므로 석유류로 오염된지역에서 식물에 의한 정화법이 유지, 관리 및 경제적인 측면에서 효과적인 방법이 될 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Wright, A.S. "The Role of Metabolism in Chemical Mutagenesis and Chemical Mutagenesis.", *Mut. Res.*, 75, pp215-220 (1980).
2. Simmon, V. and Baden, J.M. "Mutagenic Activity of Vinyl Compounds and Derived Epoxides.", *Mut. Res.*, 78, pp227-233 (1980).
3. Warith, M.A., Ferehner, R. and Fernandes, L. "Bioremediation of Organic Contaminated Soil.", *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, 9(2), pp137 (1992).
4. Jaworski, E.G. "Chloroacetamides in Herbicides : Chemistry, Degradation and Mode of Action.", Volume 1, USDA, Pesticide Degradation Laboratory, Marcel Dekker, Inc., New York, NY (1975).
5. Paterson, K.G. and Schnoor, J.L. "Fate and Transport of Alachlor and Atrazine in an

- Unsaturated Riparian Zone.”, Proceedings of Conference on Hazardous Waste Research, ed. Erickson, L.E., Kansas State University, Manhattan, KS, 561 (1990).
6. Lee, E. and Banks, M.K. “Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil Using Vegetation ; a Microbial Study.”, *J. Environ. Sci. Health*, A28(10), pp2187-2198 (1993).
 7. Walton, B.T. and Anderson, T.A. “Microbial Degradation of Trichloroethylene in the Rhizosphere : Potential Application to Biological Remediation of Waste Sites.”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, pp1012-1016 (1990).
 8. Katznelson, H “The Rhizosphere Effect of Mangels on Certain groups of Microorganisms.”, *Soil Science*, 62, pp343-354 (1946).
 9. Tracy, J.C., Erickson, L.E. and Davis, L.C. “Modeling of the Use of Plants in the Remediation of Soil and Goundwater by Hazardous Organic Substances.”, EPA Hazardous Substances Research Center Progress Report, Kansas State University, Manhattan, KS. (1990).
 10. Schnoor, T.L. and Licht, L.A. “Deep-Rooted Poplar Trees as and Innovative Treatment Technology for Pesticides and Toxic Organics Removal from Groundwater.”, EPA Hazardous Substances Research Center Progress Report, Kansas State University, Manhattan, KS.(1990).
 11. Alexander, M. “Introduction to Soil Microbiology.”, 2nd ed., J.Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
 12. Foster, R.C., Rovira, A.D. and Cock, T.W. “Ultrastructure of the Root-Soil Interface.”, The American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota. pp5-11 (1983).
 13. Aprill, W. and Sims, R. “Evaluation of the Use of Prairie Grasses for Stimulating Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Treatment in Soil.”, *Chemosphere*, 20, pp253-265 (1990).
 14. Walton, B.T. and Anderson, T.A. “Plant-Microbe Treatment Systems fo Toxic Waste.”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3, pp267-270 (1992).
 15. Erickson, L.E., Davis, L.C., Santharam, S.K., Kim, S.C., Muralidharan, N. and Rice, C.W. “Biodegradation in the Rhizosphere : Analysis of Beneficial Effects of Vegetation, Air & Waste Management Association, 87th Annual Meeting & Exhibition, Cincinnati, Ohio (1994)”.
 16. Erickson, D.C., Loehr, R.C. and Neuhauser, E.F. “PAH Loss During Bioremediation of Manufactured Gas Plant Site Soils”, *Wat.Res.*, 27(5) pp911-919 (1993).