

다환방향족 탄화수소가 광양만 퇴적토의 미생물 군집구조에 미치는 영향

권개경 · 정성영¹ · 이경현 · 현정호 · 김상진*

한국해양연구원 해양미생물연구실

Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contamination on the Community Structure of Microorganisms in Gwangyang Bay Sediments

Kae Kyoung Kwon, Sung-Young Jung¹, Jung-Hyun Lee, Jung-Ho Hyun and Sang-Jin Kim*

Marine Microbiology Lab, Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan P.O. Box 29, 425-600 Korea

Abstract - Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on the community structure of indigenous microorganisms in Gwangyang Bay sediments was investigated in Mar. & Aug., 2000. Microbial community structure was analyzed using 5' -terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) method. Microbial community structure based on T-RFLP method revealed that community differentiated by sampling period except station 1 located near the stream discharge site from Yeosu Industrial Complex. Even, microbial diversity was higher at stations showed relatively high concentrations of PAHs. The microbial community structure was severely changed during the enrichment culture with 1,000 ppm of PAHs mixture. It was also different between cultivated at 8°C and 30°C. The results implied that temperature, porosity, organic content and etc were more responsible than PAHs on the microbial community structure.

Key words : PAHs, T-RFLP, Microbial diversity, marine sediments

서론

석유의 주요 구성성분인 다환 방향족 탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)는 2개 이상의 벤

젠고리가 중합된 방향족 탄화수소를 의미하며 인간활동의 증가와 함께 PAHs는 환경내의 어디에나 분포하는 오염물질로서 점차 그 양이 증가하고 있다. 해양에서 PAHs는 유기물, 특히 휴믹 산의 농도가 높은 해양의 퇴적토에 축적된다 (Means *et al.* 1980; Schlautman and Morgan 1993). 실제 많은 연구결과에서 PAHs는 인간활동의 영향이 큰 연안역과 대륙붕의 퇴적토에서 상대적으로 높은 농도로 검출되었다 (Kim *et al.* 1999; Sanger *et al.* 1999).

* Corresponding author: Sang-Jin Kim, Tel. 031-400-6240, Fax. 031-406-2495, E-mail. s.jkim@kordi.re.kr

¹ Samsung Advanced Institute of Technology, San 14-1, Nongseo-ri Kiheung-eup, Yongin-Si, Kyungki-do, Korea

PAHs는 일반적인 독성 외에도 발암성, 돌연변이 유발성, 유전독성을 지니는 물질로서 (Hidelberger 1975) 내분비계 장애물질 (endocrine disruptor, 일명 환경호르몬)로도 알려져 있다. 퇴적토에 오염된 PAHs 중 고분자 PAHs는 토착미생물에 의한 분해가 어려우므로 오랜 기간동안 잔류하게 되고 생물체내에 축적된 후 먹이사슬을 거쳐 인간에게까지 영향을 줄 수 있다. 따라서 오염된 환경으로부터 PAHs를 제거하는 것은 중요한 관심사가 되어왔으며 저분자의 PAHs로 오염된 토양의 경우에는 생물정화기술의 적용이 유효한 것으로 보고되고 있다 (Juhasz and Naidu 2000).

한국은 1960년대 이래로 급격한 산업화와 함께 연안역의 개발이 이루어졌으며 대형 유조선 사고도 끊이지 않아 연안환경에서 각종 유기독성화합물에 의한 오염도가 높을 것으로 추측된다. 연안환경에 오염된 유기독성화합물 중 정부에서 TBT의 사용규제를 계획하고 있고, PCB는 생산 및 사용을 금하고 있으므로 이들 오염물에 의한 퇴적물의 오염도는 점차 개선될 것으로 기대된다. 그러나 PAHs의 경우에는 화석연료를 계속 사용하고 화학공업이 지속되는 한 특단의 조치가 없다면 최종 도착지인 연안 퇴적물에서의 오염도는 계속 상승할 것으로 예상된다. 이미 국내 연안의 일부 퇴적토에서 NOAA에서 제시한 퇴적물의 총 PAH ER-L (Effective range low) value인 4 ppm을 초과한 해역이 나타나고 있으며 진해만에 서식하는 굴 (*Crassostrea gigas*)에서 278~1,170 ppb의 PAHs 화합물농도를 보였다 (임 1998). 또한 이 등 (1999)은 1995년도 씨프린스호, 호남 싸파이어호 사고로 인해 유출된 유류에 의해 사고해역의 어패류에 PAHs가 농축될 수 있음을 경고하였다. 그러나 근래까지 연안역 퇴적토의 PAHs 오염의 위험성은 간과되어왔으며 생물정화 연구도 조간대 상부에 오염된 PAHs를 포함한 석유화합물에 관한 것이 일부 보고되고 있다 (서와 송 1995; 심 등 1997; 황과 송 1999; Oh *et al.* 2001; Choi *et al.* 2002; Oh *et al.* 2003). 한편 고 등 (1998)은 단일세균의 탄화수소 이용 특성을 연구한 결과 특성이 다른 균주들 간의 혼합은 탄화수소 분해능을 떨어뜨리는 것으로 보고함으로써 토착미생물의 군집특성이 생물정화기술 적용 방법에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. 그동안 많은 연구자들이 토양과 퇴적토양에서 미생물 군집구조를 연구하였으나 고분자 PAHs와의 관계에서 그 영향을 연구한 예는 찾아보기 어렵다 (Chandler *et al.* 1997; Berardesco *et al.* 1998; Shi *et al.* 1999; Scala and Kerkhof 2000; Sessitsch *et al.* 2001; Röling *et al.* 2002). 본 연구팀은 퇴적토에 오염된 PAHs의 생물정화기술을 개발하기 위한 전단계로 광양만 퇴적토에서 PAHs 오염도와 PAHs가 토

착미생물에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. PAHs가 토착미생물에 미치는 영향을 파악하기 위해 말단제한절편다형성 (Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 분석방법을 이용하여 토착미생물의 군집구조를 파악하고 PAHs 농도와 비교하는 한편 고농도 PAHs가 미생물 군집구조에 미치는 영향을 농후배양방법을 이용하여 조사하였다. 연구 결과 고농도의 PAHs는 미생물 군집구조에 직접적인 영향을 미치지 않지만 실제 연안 환경에서는 미생물 군집구조가 PAHs의 농도보다는 온도, 유기물 농도 및 입도와 같은 환경요인에 의해 좀 더 직접적인 영향을 받는 것으로 추정된다.

재료 및 방법

1. 연구지역 및 시료채취

주변에 대규모 공단이 있어 PAHs에 의한 퇴적토의 오염이 심각할 것으로 예상되는 광양만의 11개 정점에서 퇴적물 시료를 채취하였다 (Fig. 1). 2000년 3월에는 여수공단 폐수중말처리장과 연결되는 월내천 입구 3곳과 중흥천 입구 4곳, 코크스 처리과정에서 발생하는 폐수가 함께 유출되는 것으로 생각되는 광양제철소의 우수배출구 입구 주변 3곳에서 시료를 채취하였으며, 2000년 8월에 월내천 입구 3곳과 광양제철소 주변 3곳에서 추가로 시료를 채취하였다. 각 해역에서 정점간의 거리는 200 m 내외였으며 월내천 입구의 정점 1은 간조시 공기에 노출되

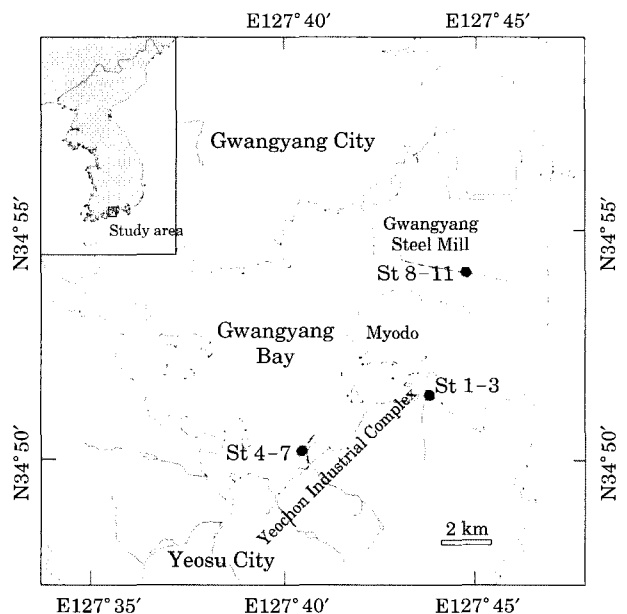


Fig. 1. Map of the study area.

며 슬러지가 하천의 골을 따라 쌓여 있었다. 중흥천 입구는 매립작업으로 인하여 해변에 가까운 지점은 토사로 뒤덮여 있는 등 최근 들어 급격한 환경변화가 있었다. 광양제철소 우수배출구 입구는 동쪽에 위치하는 정점 8에서 서쪽에 위치하는 정점 11까지 약 500 m 거리에서 퇴적토가 사질에서 사니질로 변화하는 지점에 위치하였다. 시료는 소형 van Veen grab sampler를 이용하여 채취한 후 표층을 취하였다. 화학분석용 시료와 균집구조 분석용 시료는 바로 냉동시켜 분석직전까지 보관하였으며 미생물활성 분석용 시료는 냉장상태로 연구실로 운반하여 처리하였다.

2. PAHs 혼합물 투여에 의한 토착미생물의 호흡변화

PAHs가 토착미생물에 미치는 영향을 파악하기 위한 방법으로 2000년 8월, 정점 1번과 8번, 11번의 퇴적토 시료에 인위적으로 PAHs를 첨가한 후 PAHs를 첨가하지 않은 시료와 CO₂ 발생량의 차이를 비교하였다. 본 실험은 Oh *et al.* (2000)의 방법을 부분적으로 변형하여 수행하였다. 250 ml 용량의 갈색 유리병에 최종 1,000 ppm ($\mu\text{g g}^{-1}$)이 되도록 PAHs 혼합물(Naphthalene, Fluorene, Acenaphthene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene and Benzo[a]pyrene)를 준비하였다. 채취된 퇴적토 시료를 당일 연구지역 인근의 실험실로 운반한 후 PAHs가 주입된 갈색병과 주입되지 않은 갈색병 각각 2개씩에 10 cm³씩 주입하였다. 시료가 접종된 병은 3~4 주간 배양하면서 발생하는 CO₂의 양을 측정하였다. 발생하는 CO₂는 0.1 M의 KOH용액 2 ml로 포집하였다. 배양 중 2~4일 간격으로 KOH용액을 새 용액으로 교체하고 빼낸 KOH용액에 지시약으로 phenolphthalein 용액을 첨가한 후 색이 없어지는 순간까지 0.05 M의 HCl로 적정하였다. 이때 퇴적토시료가 없는 빈 병을 대조군으로 하여 포집된 CO₂의 양을 계산하였다. KOH 2 M에는 CO₂ 1 M이 포집되는 것으로 계산하였다.

3. PAHs 분해에 미치는 산소공급의 영향

PAHs 오염도가 높게 나타난 정점 1번과 11번 퇴적토를 대상으로 하여 2000년 8월에 ¹⁴C-phenanthrene의 무기물화에 미치는 산소공급의 영향을 분석함으로써 PAHs의 완전분해에 미치는 환경요인 중 산소의 영향을 분석하였다. 슬러리상태(퇴적토: 해수 = 1:10)로 준비한 시료 각 10 ml를 160 ml 용량의 혈구병에 주입한 후 0.25 μCi 씩의 ¹⁴C-phenanthrene과 함께 밀봉하여 27일간 배양하였다. 산소공급 실험구에는 배양 20일 이후 하루 1 시간씩 공기를 주입하였다. 공기는 어항용 공기발생기를

이용하였으며 유량은 200 ml min⁻¹였다. 발생하는 CO₂의 포집을 위하여 병 안에 0.5 M의 KOH용액 0.5 ml이 든 시험관을 넣어 두었다. 배양이 끝난 후 KOH용액을 빼내어 scintillation vial에 옮긴 후 cocktail을 첨가하고 액체 섬광계수기(Packard Tri Carb 2200TR)로 방사선량을 측정하였다.

4. 말단제한절편다형성 (T-RFLP) 분석방법을 이용한 미생물 균집분석

세균균집의 다양성은 미생물 다양성의 지문분석 방법(Fingerprinting method) 중 민감도가 높고 분석시간이 짧은 T-RFLP방법을 이용하여 조사하였다(Liu *et al.* 1997; 한국해양연구소 1999). 퇴적물 시료 0.5 cm³로부터 bead beater를 이용하여 핵산을 추출한 후 PVPP(Polyvinylpolypyrrolidone; Sigma Chem. Co.) microspin 컬럼을 이용하여 PCR의 저해물질로 알려진 휴믹 물질을 제거하였다(이 등 1998). 분광광도계(Shimadzu UV-2401PC)를 이용하여 추출된 핵산의 농도를 측정 후 형광 물질로 표시된 primer Hex-27F와 1518R을 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭시켰다. 증폭된 유전자는 4 염기서열을 인지하는 제한효소 *Hha*I (Promega)으로 최종 부피 20 μl 로 하여 제조사의 방법대로 처리하였다. 반응이 끝난 후 생성된 말단제한절편(T-RF; terminal restriction fragment)의 크기를 정확히 측정하기 위해 자동염기서열장치(Model 377; Applied Biosystems Instrument)를 사용하여 GS Run 36D-2400 옵션으로 4시간 전개시킨 후 형광물질로 표시된 5' T-RFs의 크기를 표준 내부시료를 기준하여 GeneScan 프로그램을 이용하여 크기를 비교하여 결정하였다. 분석된 T-RFs들의 비율을 기준으로 하여 WPGMA 방법으로 Spearman coefficient를 구하여 집괴분석을 실시하였으며 Shannon-Weaver의 다양성지수(Magurran 1983)를 계산하였다. 집괴분석과 다양성지수 계산에는 MVSP ver 3.0을 이용하였다.

5. 고농도 PAHs가 미생물 균집구조에 미치는 영향

미생물 균집구조에 미치는 PAHs의 영향을 확인하기 위하여 1,000 ppm 농도의 PAHs 혼합물이 함유된 10 ml MM2((NH₄)₂SO₄ 2.38 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.02 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.02 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g, 1 M Phosphate buffer 10 ml, 해수 990 ml) 무기영양원 배지를 준비한 후 퇴적토 시료 1 cm³씩을 접종하였다. 시료가 접종된 플라스크는 2주일 간 배양한 후 배양액 중 1 ml를 새로운 배지에 접종하였다. 남은 배지로부터 DNA를 추출하여 T-RFLP 분석을 수행하였다. 이 과정을 3회 반복하여 고농

도 PAHs에 의한 미생물 군집구조 변화를 추적하였다. 배양온도는 8°C로 하였으며 2주차에 30°C로 배양하는 조건을 추가하여 PAHs 외에 온도가 미생물 군집구조에 미치는 영향을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. PAHs 분해에 미치는 환경요인의 영향

2000년 8월 정점 1, 8, 11에서 고농도 PAHs 투여에 따른 토착미생물의 호흡량 변화를 추적하였다. 또한 PAHs 농도가 높고 환경특성에서 큰 차이를 보이는 정점 1과 11에서 ^{14}C -phenanthrene의 무기물화에 미치는 산소공급의 영향을 평가하였다. 정점 1과 11의 phenanthrene 농도를 보면 정점 1에서 0.185 ppm, 정점 11에서 3.668 ppm의 농도를 보였다(한국해양연구원 2002).

시료에 1,000 ppm의 PAHs 혼합물을 투여할 경우 정점 8에서는 초기 CO_2 발생량이 PAHs를 투여하지 않은 대조구와 큰 차이를 보이지 않은 반면 정점 1과 정점 11에서는 배양 초기부터 PAHs를 투여하는 경우에 대조구에 비해 CO_2 발생량이 증가하는 것으로 나타나 두 정점 모두 PAHs 분해 미생물군집의 활성이 높은 것으로 판단된다(Fig. 2). 특히 정점 11에서는 배양 초기 PAHs 화합물 투여에 의한 CO_2 발생 증가율이 $1.47 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 로 정점 1의 $0.84 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 에 비해 두 배 정도 높은 CO_2 증가율을 보였으며 총 유기탄소에 대한 PAHs의 비율도 정점 11에서 정점 1에 비해 높은 것으로 보아 정점 11의 미생물군집 활성이 PAHs분해와 좀 더 밀접한 관계를 지니는 것으로 생각된다.

토착미생물에 의한 PAHs의 완전분해 여부와 효율을 확인하기 위하여 PAHs로 오염된 여천공단 주변의 퇴적토(정점 1)와 광양제철 우수배출구 주변(정점 11)을 대상으로 하여 ^{14}C -phenanthrene을 이용하여 PAHs의 미생물에 의한 무기물화를 추적하였다. 27일간의 배양기간 동안 두 정점에서의 phenanthrene 무기물화는 3%(정점 11)와 8%(St. 1) 수준으로 PAHs 혼합물을 투여했을 때의 호흡증가에 비해 낮은 수준을 보였다(Fig. 3). 또한 이 결과는 Milwaukee Confined Disposal Facility의 슬러리에 한달 동안에 측정된 phenanthrene의 무기물화 비율 23%에 비해서도 낮은 값이었다(Ringelberg *et al.* 2001). 한편 무기물화율을 퇴적토에 존재하는 phenanthrene 절대량으로 환산할 경우 정점 11에서 무기물화 되는 양은 27일간 약 110 ng cm^{-3} , 정점 1에서 약 15 ng cm^{-3} 로 정점 11에서 정점 1에 비해 7배 정도 높은 값을 보였다. 위의 결과로부터 실험 당시 두 정점의 퇴적토에 축적된

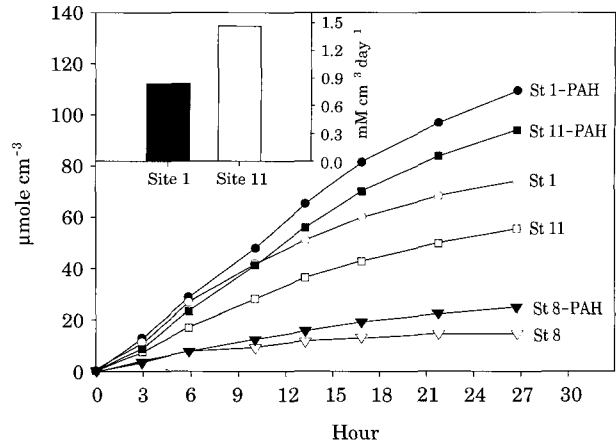


Fig. 2. Effect of PAH mixtures on the respiration rates of sediment microbial populations at selected stations in Gwangyang Bay, Korea.

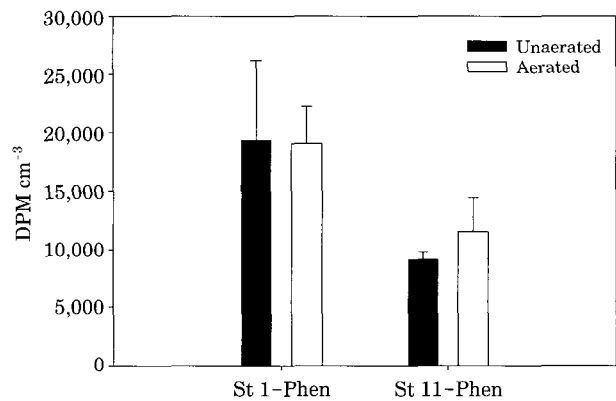


Fig. 3. The effect of aeration on the mineralization of ^{14}C -phenanthrene.

phenanthrene이 토착미생물에 의해 완전분해되어 무기물화되는 기간은 정점 1에서는 1년 이상, 정점 11에서는 약 2년 10개월이 걸리는 것으로 계산되었으며 이는 장기적으로 환경안전을 고려하여 광양만 일부 퇴적토의 경우 독성 유기오염물질의 정화작업이 필요함을 시사한다.

Phenanthrene의 무기물화를 촉진시켜주기 위하여 배양 도중 산소공급을 해 줄 경우 정점 1에서는 산소공급에 의한 차이가 거의 나타나지 않은 반면 정점 11에서는 산소가 공급될 경우 phenanthrene의 무기물화 속도가 증가되었다(Fig. 3). 혐기성환경에서의 PAHs 분해지연은 이미 여러 차례 지적되었으며(Leathy and Colwell 1990; Sharak Genthner *et al.* 1997) Murphy *et al.* (1995)은 고분자의 PAHs 화합물 분해를 촉진시키기 위해서는 산소 혹은 적절한 산화제의 처리가 필요함을 지적하였다. 정점 11의 경우 phenanthrene의 무기물화율이 산소공급에 의

해 크게 증진된 것은 위 보고들과 일치하는 결과에 해당한다. 그러나 정점 1에서는 산소의 공급이 PAHs 분해를 촉진시키지 못 하였으며 이는 산소 이외의 요인이 PAHs 분해의 제한요인으로 작용함을 시사한다. 정점 1 실험구에서 산소공급이 PAHs 분해를 촉진시키지 못한 요인으로는 퇴적토의 환경조건과 이에 따른 미생물 군집조성의 차이를 고려해 볼 수 있다. 육안으로 관찰할 때 정점 11은 혐기화가 크게 진행되지 않은 반면 정점 1은 혐기적인 환경조건이 형성되어 있으며 인지질 조성에서도 정점 1에서 정점 11보다 혐기성미생물의 지표가 약 3배 높은 것으로 보고되었다(한국해양연구원 2002). 이로 보아 산소공급은 정점 1의 혐기성 미생물군집 활성을 저해시킬 가능성이 높으며 결과적으로 산소공급이 정점 1에서의 PAHs 분해를 촉진시키지 못한 것으로 판단된다.

2. T-RFLP방법으로 본 광양만 퇴적토의 PAHs 오염과 미생물 군집구조의 상관성

2000년 3월 조사 정점의 세균 16S rDNA를 제한효소 *HhaI*으로 잘랐을 때 5'-말단절편(T-RF) 숫자는 정점에 따라 19~73개였으며 1% 이상의 비율을 보인 T-RF의 개수는 11~26개, DNA의 양은 11.9~39.8 $\mu\text{g cm}^{-3}$ 였다(Table 1). T-RF의 개수로 본 다양성은 정점 1, 6, 7, 8, 9에서 높았으며 5% 이상의 T-RF가 차지하는 비율은 정점 1~5에서 50% 이상의 높은 비율을 보여 특정 미생물 군집의 비중이 높은 것으로 나타났다. 검출된 세균군집 중 T-RF의 길이가 61, 95, 203, 210, 379, 543, 544, 571,

586인 미생물이 정점 1을 제외한 모든 정점에서 우점하였다. 이 외에 미생물 군집에서 차지하는 비중이 관계없이 37, 93, 94, 97, 100, 189, 209, 225, 226, 357, 376 bp의 T-RF를 가지는 세균이 비교적 많은 정점에서 검출되었다. 정점 1에서는 64, 205, 206, 208, 343, 369, 371, 514, 526, 569 bp 길이의 T-RF를 보이는 미생물도 높은 비율을 보였으며 0.5% 이상의 비율을 보인 33개의 T-RF 중 10개의 T-RF가 다른 정점에는 존재하지 않는 등 독특한 미생물 군집을 형성하고 있음을 확인할 수 있었다. 2002년 8월 정점 1, 2, 3, 8, 10, 11의 T-RFs 숫자는 24~64개, 1% 이상 T-RFs의 숫자는 18~30개의 범위를 보였으며 DNA의 양은 21.5~96.4 $\mu\text{g cm}^{-3}$ 였다(Table 1). DNA의 양과 검출된 T-RFs의 개수를 보면 DNA의 양은

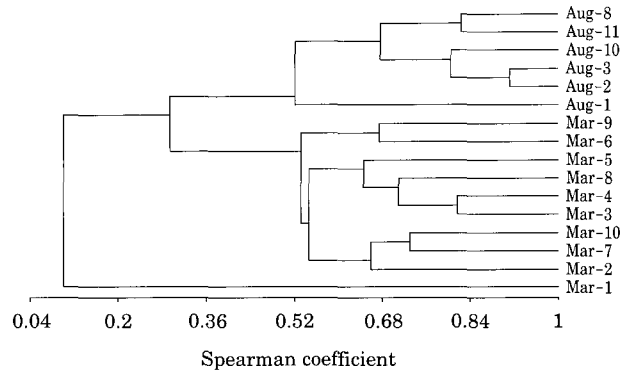


Fig. 4. Cluster analysis of microbial community based on the T-RFLP pattern.

Table 1. Summary of the bacterial T-RFs detected in each sediment samples

Station	Conc. of DNA ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	No. of T-RFs	Size range of T-RFs (bp)	Proportion of		Major T-RFs (bp)	Diversity index*	Evenness	
				1% <	5% <				
Mar., 2000	1	39.8±7.0	57	58~573	86.5	58.5	61,64, 205, 208, 343, 371, 514, 526	3.111	0.882
	2	17.8±2.0	35	37~586	88.4	74.0	61, 67, 95, 203, 210, 379	2.688	0.756
	3	16.8±2.4	27	37~586	95.2	57.1	61, 95, 203, 210, 379, 586	2.903	0.881
	4	12.9±3.6	25	37~586	91.2	60.6	95, 203, 210, 379	1.862	0.578
	5	-	19	37~586	98.2	67.2	61, 95, 210, 379, 543, 544	2.428	0.824
	6	11.9±3.8	73	35~735	87.2	48.5	95, 379, 543, 544, 586	3.128	0.866
	7	14.9±1.8	64	35~826	89.5	37.9	95, 379, 389, 543	2.996	0.850
	8	19.1±4.3	64	35~816	87.4	39.6	61, 95, 203, 379, 586	2.859	0.833
	9	13.6±2.2	69	35~775	82.3	32.7	95, 203, 379	3.112	0.875
	10	14.0±0.6	31	35~586	94.5	32.9	203, 379, 586	3.277	0.901
Aug., 2000	1	93.9±14.9	27	35~587	95.2	55.9	95, 526, 543, 549, 571, 587	2.870	0.871
	2	57.8±5.6	40	35~593	90.0	63.4	95, 203, 210, 379, 571, 587	2.917	0.791
	3	96.4±12.5	32	37~587	94.3	56.9	95, 210, 379, 571, 587	2.842	0.820
	8	21.5±1.2	54	35~814	88.3	42.2	95, 210, 379, 571, 587	3.377	0.846
	10	71.5±35.6	32	37~593	97.5	45.6	93, 95, 203, 379, 587	3.122	0.901
11	79.6±13.4	64	35~800	85.0	31.7	95, 379, 587	3.479	0.836	

- : not determined

* Shanon Weaver Index

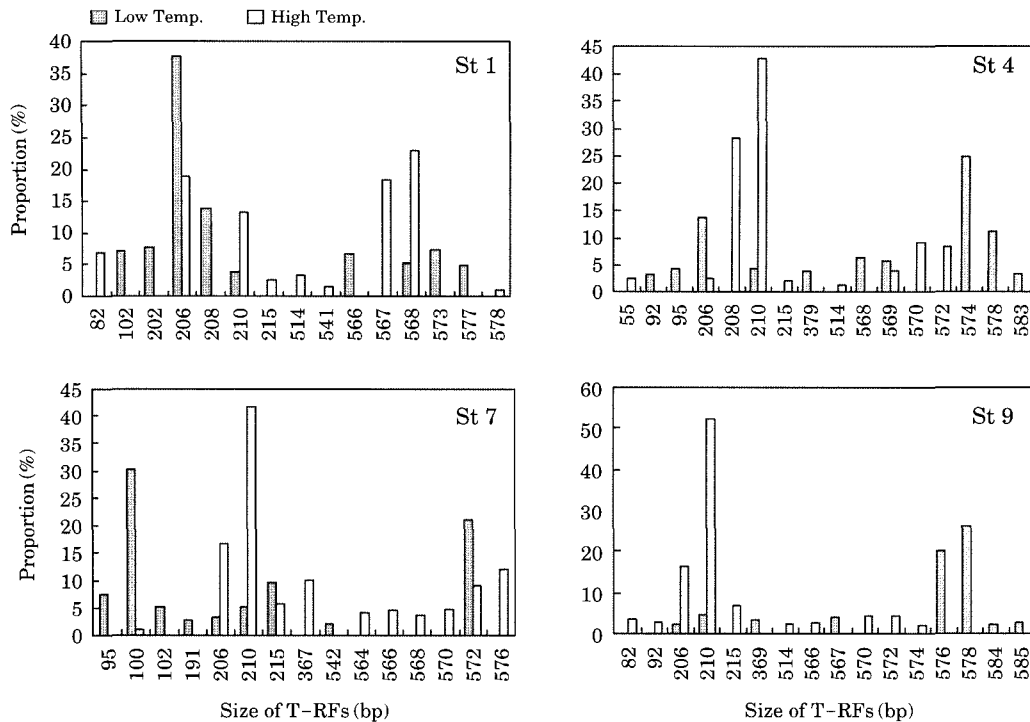


Fig. 5. The effect of temperature on the microbial community structure during enrichment culture with PAHs.

3월(평균 $17.9 \mu\text{g cm}^{-3}$)에 비해 8월(평균 $70.9 \mu\text{g cm}^{-3}$)에 약 4배 증가한 반면 T-RFs의 개수는 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 T-RFs의 크기분포를 3월 조사시와 비교해 볼 때 주요 T-RFs는 크게 변하지 않았으나 그 비율은 상당한 차이를 보였다. 이에 따라 3월과 8월의 각 정점에서 각 T-RFs의 출현 여부와 비율을 기준으로 한 Shannon-Weaver의 다양성지수는 광양제철 주변 정점에서 상대적으로 높은 지수를 보였으나 계절에 따른 다양성의 차이는 발견할 수 없었다(Table 1). 그러나 WPGMA 방법으로 Spearman coefficient로 집괴분석을 실시할 경우 3월의 정점 1과 3월의 정점 2~10, 8월의 세균군집은 별개의 그룹으로 구분되어 다양성 여부와 관계없이 군집구조는 계절에 따라 크게 변화함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 단독으로 집괴를 형성한 3월 정점 1의 경우 월내천을 통해 고온의 담수가 유입된다는 점과 간조시 공기에 노출되며 시기적으로 microalgae의 spring bloom이 발생하는 등의 독특한 환경조건이 다른 정점과는 구별되는 미생물군집을 보이는 원인인 것으로 생각된다. 정점 1은 8월에도 다른 정점들과 구분되는 군집구조를 보였는데 8월의 경우 수온이 상승함에 따라 다른 정점들과의 군집구조 차이가 줄어든 것으로 사료된다. 실제로 퇴적토를 PAHs 혼합물과 함께 30°C 에서 농후배양시킬 경우 8°C 에서와는 달리 정점 1에서는 567, 568 bp의 T-RF를 보이는 세균군의

우점도가 높게 나타나며 정점 4, 7, 9에서도 8°C 에서 높은 우점도를 보인 세균군 중 206, 210 bp의 T-RF를 보이는 세균군의 우점도가 8°C 조건에 비해 높게 나타나고 8°C 에서는 검출되지 않았던 215, 514, 570 bp의 T-RF를 보이는 세균군이 검출되는 등(Fig. 5) 8°C 에서와는 다른 군집구조를 보였다.

미생물 군집구조 변화와 관련된 기존 연구를 보면 퇴적토에서 phenanthrene 분해세균의 분포는 시간에 가장 크게 영향을 받는 것으로 보고되었다(Berardesco *et al.* 1998). 탈질미생물의 경우에도 계절변화가 군집구조 변화의 가장 큰 원인이며 부차적으로 퇴적토 특성 차이에 따라 km단위의 거리변화가 군집구조에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Scala and Kerkhof 2000). 또한 토양의 미생물 다양성이 입자크기가 작아질수록 증가하는 것으로 보고되었다(Sessitsch *et al.* 2001). 본 연구 결과에서도 계절단위의 기온변화가 미생물 군집구조에 결정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 반면 집괴분석 결과가 정점들의 위치에 따라 구분되지 않은 것으로 볼 때 각 정점의 미생물 군집구조 차이는 정점간의 물리적인 거리보다는 퇴적토의 환경특성에 더 영향을 받는 것으로 생각된다. 또한 높은 농도의 PAHs 오염은 독성영향으로 인하여 미생물 군집구조를 단순화시킬 것으로 예측하였으나 Kwon *et al.* (2000)에 의해 PAHs의 농

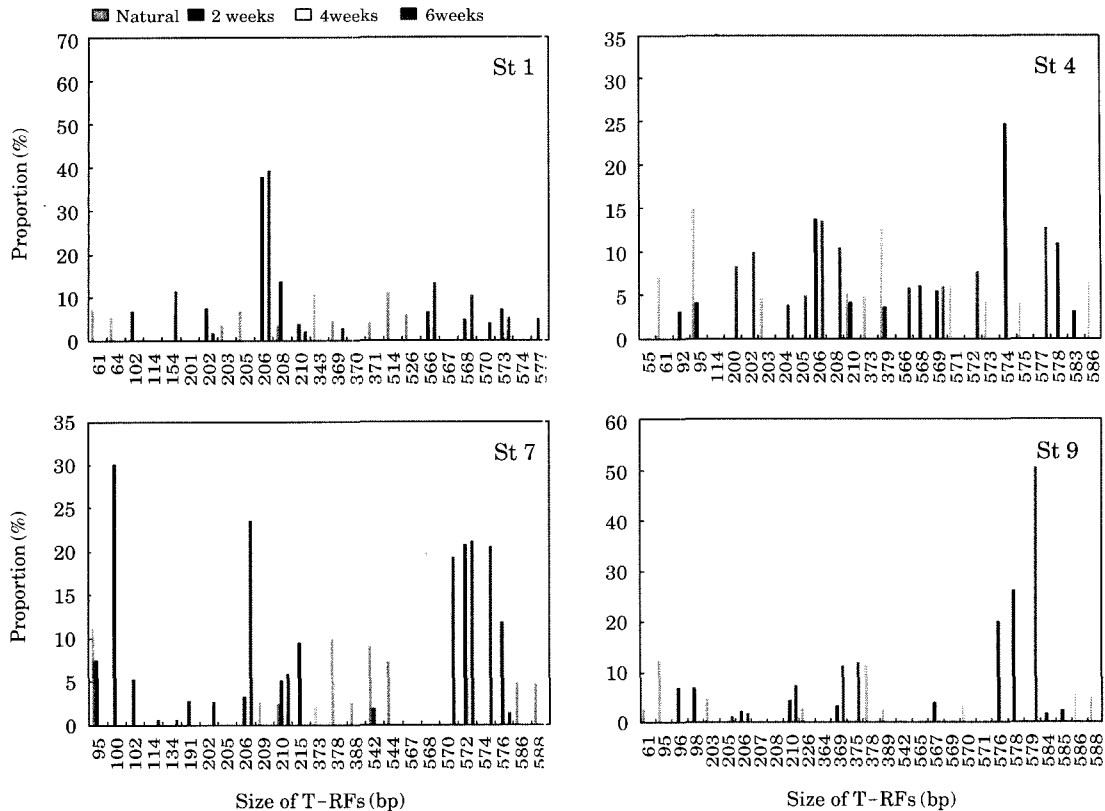


Fig. 6. Changes of microbial community structure during the enrichment culture with 1,000 ppm of PAH mixture.

도가 높은 것으로 보고된 정점에서의 다양성지수가 높으며 집괴분석결과도 PAHs 농도와 무관하게 구분되는 등 PAHs에 의한 군집구조 차이는 명확하게 나타나지 않았다 (Table 1, Fig. 4). 이상의 결과는 100 ppm 이내의 PAHs 오염은 퇴적토의 미생물 군집구조에 큰 영향을 미치지 않음을 시사한다.

2000년 3월 정점 1, 4, 7, 9의 시료를 고농도의 PAHs로 농후배양시켰을 때 정점 9를 제외하면 T-RF의 길이가 206 bp인 미생물이 크게 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 또한 정점 4에서는 205, 208, 574, 577, 582 bp의 T-RF를 보이는 세균군집의 우점도가 상대적으로 높게 나타났으며 정점 7에서는 100, 205, 570, 572, 574, 576 bp의 T-RF를 보이는 세균군집이 시기에 따라 높은 비율을 보였다. 반면 정점 9에서는 초기에 576, 578 bp의 T-RF를 보이는 세균군집이 높은 우점도를 보였으며 점차 210, 579 bp의 T-RF를 보이는 세균군집으로 우점종의 변화를 보였다. 자연시료에서는 이들 세균군 중 206 bp의 T-RF를 가지는 미생물이 정점 1에서 약 3.3%의 비율을 보였으나 다른 정점에서는 발견되지 않았으며 154, 567 bp의 T-RF를 가지는 미생물도 정점 6에서 0.1%수준의 비율을 보인 것 외에는 다른 정점에서는 발

견되지 않았다. 또한 검출되는 T-RFs의 수도 자연시료에 비해 줄어드는 경향을 보였으며 특정 bp를 보이는 세균군집에 의한 우점도도 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 군집구조 변화의 원인으로서는 우선 환경조건의 변화를 들 수 있다. 농후배양과정 중 퇴적토의 양이 점차 줄어들게 되며 이는 미생물 종조성에 차이를 줄 수 있는 근본적인 요인이 될 수 있다. 실제로 Chandler *et al.* (1997)은 퇴적물의 교란 여부에 따라 미생물 군집구조가 달라지며 이때 퇴적물의 교란이 없는 실험구의 경우에도 미생물 군집의 천이가 일어남을 보고하였다. 그러나 microcosm에 nitrate와 toluene을 함께 투여할 경우 미생물의 활성만을 증가시키는 반면 toluene만을 투여할 경우 군집구조가 크게 변화한다는 Shi *et al.* (1999)의 보고와 탄화수소로 오염된 토양에 무기영양염을 첨가하는 생물정화작업과정에서 미생물 군집구조가 단순하게 변화했다는 Røling *et al.* (2002)의 보고를 참조해 볼 때 PAHs 농후배양에 따른 미생물 군집구조의 변화에는 PAHs가 주요 요인으로 작용한 것으로 판단된다. 따라서 농후배양과정에서 고농도 PAHs에 의해 토착미생물 중 PAHs에 적응도가 높은 미생물 군집이 우점하는 방향으로 종조성의 변화가 일어난 것으로 생각할 수 있으며 이때 우점하는

미생물도 토착환경에서는 낮은 비율을 보이는 종들이므로 판단된다.

농후배양 결과로 볼 때 고농도의 PAHs 오염은 군집구조를 단순화시키는 방향으로 미생물 군집구조에 직접적인 영향을 미칠 수 있지만 광양만 퇴적토에 오염된 수준인 100 ppm 이내의 PAHs 오염도는 미생물 군집 구조에 미치는 영향이 크지 않은 것으로 사료된다. 반면 집괴분석 결과에서 보는 바와 같이 계절변화에 따른 온도변화는 미생물 군집구조 변화의 가장 큰 요인으로 작용하며 입도, 유기물의 양, 염도 등과 같은 환경적인 요소들이 부가적으로 작용하는 것으로 생각된다.

적 요

다환 방향족 탄화수소(PAHs)에 의한 오염이 미생물 군집구조에 미치는 영향을 파악하기 위하여 연안에 가까운 광양만 퇴적토를 대상으로 하여 2000년 3월과 8월 2회에 걸쳐 PAHs 오염도와 말단제한절편 다형성(T-RFLP) 분석방법을 이용하여 미생물 군집구조를 조사하였다. T-RFLP방법으로 조사한 미생물 군집은 계절에 따라 군집이 구분되었으며 월내천입구에 위치한 정점 1에서 3월에 다른 정점과 다른 독특한 군집구조를 형성하였다. 또한 상대적으로 PAHs 오염도가 높은 정점들에서 미생물 다양성도 높은 것으로 나타났다. PAHs 농후배양시료에서의 미생물군집구조 변화와 비교해 볼 때 조사대상 지역 퇴적토의 미생물 군집구조는 PAHs의 오염에 부분적으로는 영향을 받지만 군집구조를 결정하는 주된 요인은 온도, 입도, 유기물 함량 등과 같은 환경요인인 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국해양연구원 기관고유사업(BSPE83600)과 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업의 지원으로 수행되었습니다. 현장연구에 도움을 주신 여수대학교 신현출교수님께 감사사를 전합니다.

참 고 문 헌

고성환, 이홍금, 김상진. 1998. Hydrocarbon uptake mode에 따른 유류분해 미생물 혼합계의 원유분해능. 한국생물공학회지. 13:606-614.
서은영, 송홍규. 1995. Bioremediation에 의한 해양환경에서의

anthrathene과 phenanthrene의 제거. 미생물과 산업. 21:141-146.
심두섭, 손재학, 김상진. 1997. 자갈로 구성된 미소환경에서 미생물제제에 의한 유류분해. 한국미생물학회지. 34:101-107.
이정현, 신현희, 이홍금, 권개경, 김상진. 1998. 해양퇴적물에서 humic substances의 효율적인 제거방법. 한국미생물학회지. 34:132-136.
이종협 등. 1999. 여수여천 해양환경 영향조사. 서울대 환경안전연구소.
임운혁. 1998. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Masan Bay, Korea. 서울대학교 대학원 이학석사학위논문. 99pp.
한국해양연구소. 1999. 제한절편말단분석법(T-RFLP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군집 분석. 한국해양연구소보고서 BSPE 98731-00-1186-3. 97pp.
한국해양연구원. 2002. 남해 특별관리해역의 환경오염 관리모델 연구. 한국해양연구소보고서 BSPE 819-00-1407-7. 485pp.
황순석, 송홍규. 1999. 해양환경에서 pyrene의 생분해. 한국미생물학회지. 35:53-60.
Berardesco G, S Dyhrman, E Gallagher and MP Shiari. 1998. Spatial and temporal variation of phenanthrene-degrading bacteria in intertidal sediments. Appl. Environ. Microbiol. 64:2560-2565.
Chandler DP, FJ Brockman and JK Frederickson. 1997. Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. FEMS Microbiol. Rev. 20:217-230.
Choi SC, KK Kwon, JH Sohn and S-J Kim. 2002. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms. J. Microbiol. Biotechnol. 12:431-436.
Hidelerger C. 1975. Chemical carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem. 44:79-121.
Juhasz AL and R Naidu. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. Int. Biodet. Biodeg. 45:57-58.
Kim GB, KA Maruya, RF Lee, J-H Lee, C-H Koh and S Tanabe. 1999. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Kyeonggi Bay, Korea. Mar. Pollut. Bull. 38:7-15.
Kwon KK, JH Hyun, JH Lee, HK Lee, VI Svetashev and SJ Kim. 2000. Distribution of PAHs and the degrading potential of PAHs by natural microbial communities in sediment of Kwangyang and Ulsan Bay. pp.177-182. In Proceedings of the KOSMEE Autumn Annual Meeting.

- Leathy JG and RR Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in environment. *Microbiol. Rev.* 54:305-315.
- Liu W-T, TL Marsh, H Cheng and LJ Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:456-422.
- Magurran AE. 1983. Ecological diversity and its measurement. Croom Helm. London.
- Means JC, JJ Hassett, SG Wood and WL Banwart. 1980. Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14:1524-1528.
- Murphy TP, A Moller and H Brouwer. 1995. In situ treatment of Hamilton Harbor sediment. *J. Aquat. Ecosyst. Health.* 4:195-203.
- Oh YS, WY Choi, YH Lee, SC Choi and SJ Kim. 2000. Biological treatment of oil-contaminated sand: Comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flame ionization detector and respirometric analysis. *Biotech. Lett.* 22:418-423.
- Oh YS, DS Sim and SJ Kim. 2001. Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. *Mar. Pollut. Bull.* 42:1367-1372.
- Oh YS, DS Sim and SJ Kim. 2003. Effectiveness of bioremediation on oil-contaminated sand in intertidal zone. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:437-443.
- Röling WFM, MG Milner, DM Jones, K Lee, F Daniel, RJP Swannell and IM Head. 2002. Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5537-5548.
- Ringelberg DB, JW Talley, EJ Perkins, SG Tucker, RG Luthy, EJ Bouwer and HL Fredrickson. 2001. Succession of phenotypic, genotypic, and metabolic community characteristics during in vitro bioslurry treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1542-1550.
- Sanger DM, AF Holland and GI Scott. 1999. Tidal Creek and Salt Marsh sediments in South Carolina coastal estuaries: II. Distribution of organic compounds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37:458-471.
- Scala DJ and LJ Kerkhof. 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1980-1986.
- Schlautman MA and JJ Morgan. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.* 27:961-969.
- Sessitsch A, A Weilharter, MH Gerzabek, H Kirchmann and E Kandeler. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4215-4224.
- Sharak Genthner BR, GT Townsend, SE Lantz and JG Mueller. 1997. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32:99-105.
- Shi Y, MD Zwolinski, ME Schreiber, JM Bahr, GW Sewell and WJ Hickey. 1999. Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2143-2150.

Manuscript Received: October 17, 2003

Revision Accepted: December 11, 2003

Responsible Editorial Member: Ho Yong Lee
(Sangji Univ.)