

PAHs 오염토양에서 분리된 *Sphingobacterium* sp. KM-02를 이용한 Fluorene 분해 및 토양복원 연구

남인현* · 전철민 · 김재곤

한국지질자원연구원 지구환경연구본부 지질재해연구실

Biodegradation of fluorene and bioremediation study by *Sphingobacterium* sp. KM-02 isolated from PAHs-contaminated soil

In-Hyun Nam* · Chul-Min Chon · Jae-Gon Kim

Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM)

ABSTRACT

The fluorene-degrading strain *Sphingobacterium* sp. KM-02 was isolated from PAHs-contaminated soil near a mine-impacted area by selective enrichment techniques. Fluorene added to the *Sphingobacterium* sp. KM-02 culture as sole carbon source was 78.4% removed within 120 h. A fluorene degradation pathway is tentatively proposed based on identification of the metabolic intermediates 9-fluorenone, 4-hydroxy-9-fluorenone, and 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin. Further the ability of *Sphingobacterium* sp. KM-02 to bioremediate 100 mg/kg fluorene in soil matrix was examined by composting under laboratory conditions. Treatment of microcosm soil with the strain KM-02 for 20 days resulted in a 65.6% reduction in total amounts. These results demonstrate that *Sphingobacterium* sp. KM-02 could potentially be used in the bioremediation of fluorene from contaminated soil.

Key word : Fluorene, *Sphingobacterium* sp. KM-02, Metabolic intermediates, Microcosm test, fluorene contaminated soil

1. 서 론

PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 다환방향족 탄화수소류)는 2개 이상의 벤젠고리를 가지는 방향족 유기화합물을 일컫는 말로 토양, 지하수, 저질 등의 주변 환경에 널리 퍼져있는 오염물질이며 독성이 매우 강해 몇 가지 물질은 발암물질 및 돌연변이원으로 지정되어 있고, 미국환경보호청(EPA)에서는 이들 PAHs 중 16종을 유해성 있는 물질로 지정하여 관리하고 있다(Antizar-Ladislao et al., 2006; Kolomytseva et al., 2009; Wilcke, 2007). 이 중 Fluorene은 물질의 독성 및 환경 내 존재하는 높은 농도에 의해 16가지 물질 중 하나로 선정되어 관리되고 있으며, 주로 농약이나 염색약 등의 의도적 생산 시에 첨가되거나, 자동차 등 화석연료를 사용하는 오염원이나

소각 등의 과정 중 불완전 연소로 비의도적으로 생산된다(Keith and Telliard, 1979; Wattiau et al., 2001). 물에 대한 용해도가 낮은 Fluorene은 토양 내로 오염이 되면 계속 잔류하는 특성을 가져 오염 토양이 다수 보고된 바 있으며, 그 범위는 ~180 mg/kg 수준의 상대적으로 높은 농도로 환경 내 침투해있다(Achten and Hofmann, 2009; Mostert et al., 2010). 따라서, 이렇게 고농도로 토양을 오염시키는 Fluorene은 장기적으로 주변 토양 및 지하수로의 2차 오염을 야기시킬 뿐만 아니라 주변 생태계를 교란시킬 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 이 물질을 분해하기 위해 물리학적, 화학적, 또는 생물학적인 방법들을 포함한 다양한 노력들을 진행해왔다(Alcintara et al., 2009; Haapea and Tuhkanen, 2006; Nam et al., 2001; Navarro et al., 2008). 많은 연구 결과들 중 보다 친환경

*Corresponding author : nih@kigam.re.kr

원고접수일 : 2011. 10. 11 심사일 : 2011. 10. 20 게재승인일 : 2011. 10. 20
질의 및 토의 : 2011. 12. 31 까지

적인 오염물질 처리에 대한 기반을 마련하고, 이 물질의 분해 경로를 명확하게 규명하기 위해 순수 배양에 의한 박테리아를 이용한 연구들이 지속적으로 진행되어 왔는데, 지금까지 알려진 Fluorene을 분해하는 균주들은 *Burkholderia cepacia* F297(Grifoll et al., 1995), *Mycobacterium* sp. BB1(Boldrin et al., 1993) 등과 같이 Fluorene을 3,4-dioxygenation의 반응으로 3,4-dihydroxy-fluorene의 분해산물을 통해 Salicylate로 분해하여 무기화 되거나, *Arthrobacter* sp. F101(Casellas et al., 1997), *Staphylococcus auriculans* DBF63(Monna et al., 1993) 등의 균주들과 같이 1,2-dioxygenation 반응을 통해 Fluorene의 분해를 시작하는 경로, *Brevibacterium* sp. DPO1361(Trenz et al., 1994), *Pseudomonas* sp. F274(Grifoll et al., 1994), *Sphingomonas* sp. LB126(Wattiau et al., 2001) 등과 같이 Fluorene C-9 위치에서 Monooxygenation을 통해 분해과정을 시작하는 등의 다양한 분해 경로가 규명되었다. 그러나, 현재까지 파악된 다양한 Fluorene 발생 인벤토리 중 폐광산 지역에 잔류하는 PAHs를 조사하거나 해당 지역에서 분리한 균주로 Fluorene을 분해 혹은 복원 연구를 진행 한 적은 많지 않아 관련 자료의 확보가 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구는 오염된 토양을 생물학적 복원기술로 처리하기 위한 기초연구로 PAHs로 오염된 폐광산 지역 토양에서 분리한 박테리아를 이용해 Fluorene에 대한 분해능을 평가하고, 분해과정 중에 나타나는 분해산물 분석을 통해 분해 경로를 도출하였으며, 인위적으로 오염시킨 토양의 Microcosm test를 통해 오염토양 복원에 대한 가능성 및 효율을 관찰하고자 했다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주의 분리, 동정 및 배지 조성

Fluorene 분해 박테리아 분리를 위해 폐광산 지역에서 PAHs로 오염된 토양을 채취하고, 오염토양 1g을 10 mL MSM(제한배지, Minimal Salts Medium)에 넣고 24시간 동안 항온교반(28°C, 160 rpm)시킨 후, 100 µL를 취하여 10 mg/mL의 Fluorene을 탄소원으로 첨가한 MSM에 48 시간 동안 교반시켜 배양시킨 후(28°C, 160 rpm), 고체의 한천배지에 스프레딩(Spreading) 하여 단일 콜로니가 얻어질 때까지 5회 이상 상기와 같은 조건으로 계대 배양을 실시하였다. 사용된 MSM은 Fortnagel et al.(1990)이 제시한 배지를 변형시켜 사용하였는데, 그 조성은 Table 1과 같다. Table 1에 나타난 배지 조성으로 Phosphate

Table 1. Minimal salts medium composition used in this study

Solution	Component	Amount
Phosphate buffer	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	140 g
	KH ₂ PO ₄	40 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
Mineral salts solution	MgCl ₂ × 6H ₂ O	5 g
	Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	2.5 g
	FeCl ₂ × 4H ₂ O	0.5 g
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0.1 g
Trace elements solution	MnCl ₂ × 4H ₂ O	0.03 g
	H ₃ BO ₃	0.3 g
	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0.2 g
	CuCl ₂ × 2H ₂ O	0.01 g
	NiCl ₂ × 6H ₂ O	0.02 g
	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.03 g

buffer 20 mL과 Mineral salts solution 20 mL, Trace elements solution 0.5 mL을 혼합하여 최종 1 L의 배지를 제조하고, pH를 7.25로 맞춘 후 사용하였다(Nam et al., 2008). 분리된 균의 동정은 16S rDNA 염기서열 분석 및 NCBI의 GenBank와 EMBL등의 Database와 비교를 통해 균주를 동정하였다.

2.2. 토양 내 PAHs 분석

폐광산 지역에서 채취한 토양 내 PAHs의 농도 수준을 확인하기 위해 오염 토양을 건조 및 균질화를 시킨 후 2g을 취하고, 동량의 Na₂SO₄(Sodium sulfate)를 첨가한 후에 Dionex 사 기기를 이용하여 ASE(Accelerated Solvent Extraction, Dionex, USA)를 수행하였다. ASE 추출 조건은 Methylene chloride와 Acetone을 1:1로 혼합한 유기용매를 사용하고, 온도는 100°C, 압력은 1,500 psi, Static time은 10분, Flush volume은 60%, Purge time은 60초, Static cycle은 3회 수행하였다. 추출 후에는 추출액을 농축하고 *n*-hexane으로 용매 치환을 한 다음 Silica gel column을 통해 정제를 하고 유기용매 농축 후에 GC/MS를 통해 정성 및 정량 분석을 실시하였다. GC/MS 분석 조건은 Table 2에 명시하였으며, 해당 물질의 정성 및 정량 분석은 16종의 PAHs 표준물질(Accustandard, New Haven, USA)을 이용하여 비교 분석하였다.

2.3. Fluorene 분해 실험

Fluorene 분해 실험을 위해 전 배양은 멸균된 MSM 10 mL을 100 mL 용량의 삼각플라스크에 10 mg/ml의

Table 2. GC/MS analytical conditions

	Injection mode	Splitless
GC	Injection volume	1.0 L
	Injector temp.	250°C
	Column	DB-5 MS 60 m 80°C (3 min)
	Column oven	→ 10°C/min to 280°C → 280°C (5 min)
	Carrier gas	Helium
MS	Ion source temp.	250°C
	Ionization energy	EI 70 eV
	Mass range	50-650 amu
	Scan time	1 sec/scan

Fluorene과 48시간 동안 항온 교반기에서 호기적으로 배양하였다(28°C, 160 rpm). 본 배양은 전 배양과 같은 조건으로 새로운 멸균 배지에 접종하여 배양했으며, 전 배양에서 얻은 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 15분, 4°C)하고 20 mM Phosphate buffer로 pellet washing을 2회 실시한 후, 전 배양과 동일 조건으로 항온 교반 배양했다. 시간에 따른 균주의 성장은 UV-visible spectrophotometer(Biochrom, Cambridge, UK)로 600 nm의 파장에서 측정하였고, 실험 초기의 균주 농도는 흡광도 기준으로 0.1에 맞추어 실시하였다. 모두 12개의 삼각플라스크를 준비하여 분해실험을 위한 6개와 10 mM의 NaN_3 (sodium azide)를 넣고 70°C에서 열을 가해 Dead cell을 제조(Nam et al., 2006)하여 다른 6개의 삼각플라스크에 접종을 하고 동시 배양하였다. 매 24시간마다 배양기로부터 Control(Dead cell) 1개와 Live cell 1개를 꺼내어 냉동고에 보관하고, 실험 종료 후에 동시 분석하였다. 모든 실험은 각각 3회씩 독립적으로 수행하였고, 감소하는 Fluorene양과 분해산물은 GC/MS분석을 통해 정성 및 정량 분석을 수행하였다.

2.4. Microcosm test

Fluorene을 분해하는 *Sphingobacterium* sp. KM-02 균주의 토양 내 활성을 관찰하기 위해 Microcosm test를 수행하였다. 채취한 폐광산지역 토양 1 kg을 수조에 넣고 해당 토양에 Fluorene을 100 mg/kg의 농도로 오염시킨 후, *Sphingobacterium* sp. KM-02 균주를 2 L 삼각플라스크에 10 mg/ml 농도의 Fluorene을 포함하는 200 mL의 배양액을 전 배양을 통해 얻고, 원심분리(12,000 rpm, 15분, 4°C)를 통해 확보된 균주를 20 mM Phosphate buffer로 2회 Pellet washing(12,000 rpm, 15분, 4°C)후, 파장 600 nm의 흡광도 2.0의 농도로 토양에 분산 접종하

여 섞어주고 28°C 항온 배양기에서 composting 실험을 수행하였다. 시간에 따른 토양 내 Fluorene농도의 변화를 관찰하기 위해 균주 접종 당일(0일차)부터 매 5일마다 2 g씩의 Microcosm 토양을 채취해 추출 및 분석을 수행하였다.

2.4. 분석방법

Fluorene 분해 실험에서 배지 내 감소하는 Fluorene의 농도 변화는 24시간마다 배양기로부터 꺼내어 냉동고에 보관한 12개의 삼각플라스크를 녹이고, 10 mL의 Ethyl acetate로 8회 추출을 하고 그 농축액을 GC/MS로 분석하였다. 위와 같이 추출 및 농축한 시료를 통해 Fluorene의 농도 및 분해산물 분석을 수행하였다. Microcosm test에서 시간에 따라 토양 내에서 감소하는 Fluorene의 농도는 시료채취 날짜 별로 2 g의 토양을 채취하여 동량의 Na_2SO_4 (Sodium sulfate)를 첨가하고, ASE로 추출한 후에 유기용매 농축하여 GC/MS(HP6890 MSD, Newark, USA)를 통해 정량분석을 실시하였다. Fluorene 농도 및 분해산물 분석을 위한 GC/MS 조건은 Table 2와 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PAHs 오염토양 분석

본 연구에서 사용된 PAHs 오염토양의 분석 결과는 Fig. 1과 같다. 미국 EPA에서 지정한 우선규제대상 16종의 PAHs 물질을 분석하였는데, Benzo(a)pyrene, Benzo(g,h,i)perylene, Benzo(k)fluoranthene, Chrysene, Dibenz(a,h)anthracene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene 등 6종의 물질은 검출되지 않았고, Fig. 1에서 나타난 바와 같이 10종의 물질이 검출되었다. 10종의 PAHs 총 농도는 129.0 ng/g 이었으며, 농도가 가장 높은 물질은 Fluorene으로 평균 농도가 46.9 ng/g으로 분석되었다. 본 결과에서 Fluorene은 16종 PAHs 중 검출된 10종의 PAHs 총량의 36.36%를 차지하고 있었다. 기존 문헌상에 보고되었던 오염토양 내 Fluorene 농도 수준은 3-180 $\mu\text{g/g}$ 으로(Achten and Hofmann, 2009; Mostert et al., 2010), 본 연구에 사용된 토양 내 Fluorene 농도가 다소 낮은 경향을 보이고 있다. 본 연구에서 사용된 폐광산지역 오염토양에서 Fluorene이 검출된 것은 토양 채취지역에서 과거 광산활동 시 선광 및 제련 활동 등 다양한 과정에서 발생했던 소각 및 화약발파 등의 이력에 기인한 것으로 판단된다. 실제로 산불 등의 불완전한 소각 활동 및 콜타르 등에서 Fluorene을 포함한 다양한 PAHs가 생성되고, 검출되는 것

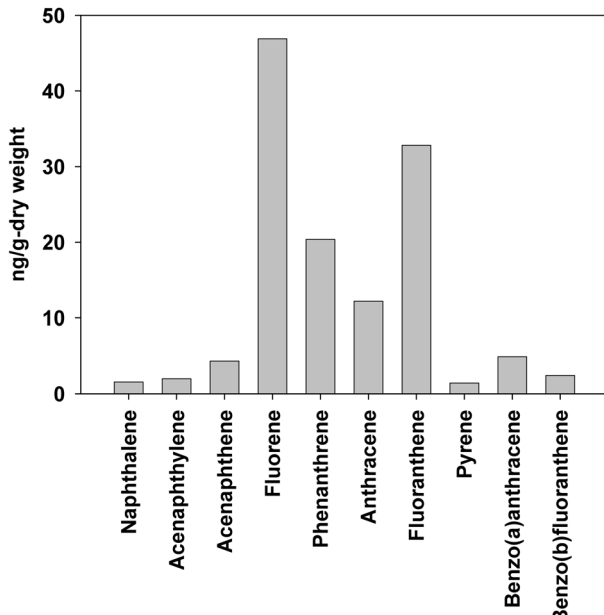


Fig. 1. PAHs concentrations in mine-impacted soil containing *Sphingobacterium* sp. KM-02.

으로 알려져 있다(Antizar-Ladislao et al., 2006; Storelli and Marcotrigiano, 2000).

3.2. Fluorene 분해 균주의 분리 및 동정

Fluorene을 분해할 수 있는 박테리아를 분리하기 위해 PAHs로 오염된 폐광산 지역으로부터 토양을 채취하여 Enrichment culture 및 계대 배양을 통해 단일 콜로니로 분리하여 순수 배양하였다. 분리된 여러 균주 중 Fluorene에 대해 가장 분해 활성이 좋은 균주를 이용해 실험했는데, 그 균주는 진한 노란색을 나타냈고, 점성이 높은 특징을 나타내었다. Fluorene 분해 활성을 가지는 분리 균주의 동정을 위해 16S rDNA gene을 PCR 로 증폭시켜 Direct sequencing을 실시하여 얻은 약 1,520 bp의 염기서열을 가지고 NCBI의 GenBank와 EMBL등의 Database를 통해 알려진 16S rDNA 염기서열들과 비교 분석한 결과, 해당 균주는 *Sphingobacterium* sp. GF2B 와 가장 유사하여 99.1% 이상의 유사도를 갖는 것으로 확인되었다(GenBank Accession Number, FJ548749). 이상의 16S rDNA 염기서열분석의 결과를 바탕으로 본 균주를 *Sphingobacterium* sp. KM-02로 명명하였다.

3.3. *Sphingobacterium* sp. KM-02에 의한 Fluorene 분해 및 균주의 성장 특성

폐광산 지역 내 PAHs 오염토양에서 분리된 *Sphingo-*

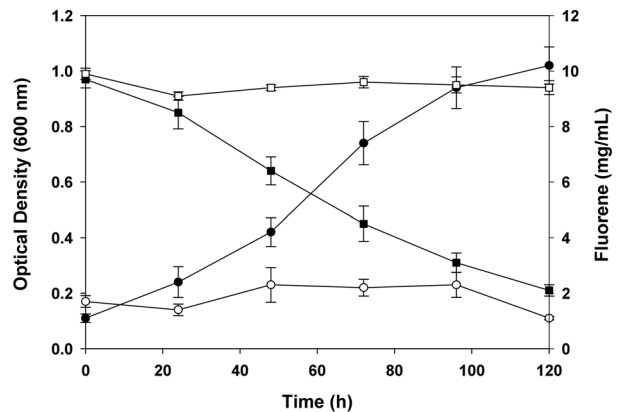


Fig. 2. Growth of *Sphingobacterium* sp. KM-02 with fluorene as the sole carbon source. *Sphingobacterium* sp. KM-02 poisoned dead cells (treated with 10 mM sodium azide and heating) show no growth and no depletion of fluorene with poisoned controls. All values represent the mean of three independent measurements. Symbols: -●-, OD₆₀₀ of the untreated KM-02; -○-, OD₆₀₀ of poisoned KM-02; -■-, fluorene concentration in the presence of untreated KM-02; -□-, fluorene concentration in the presence of poisoned KM-02.

bacterium sp. KM-02 균주가 Fluorene을 탄소 및 에너지원으로 이용하여 성장 가능한지의 여부를 확인하기 위해 10 mg/mL의 농도의 Fluorene이 첨가된 MSM에서 순수 배양하면서 시간에 따른 *Sphingobacterium* sp. KM-02의 성장률과 Fluorene의 분해능을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 120시간 내에 약 78.4%의 Fluorene이 분해되었으며, 초기 균주의 농도가 600 nm 흡광도 기준으로 0.11에서 120시간 후에 1.02까지 값이 상승하며 균주가 성장하는 것을 관찰하였다. 그러나, 동시에 같은 조건에서 실험한 *Sphingobacterium* sp. KM-02 Dead cell을 접종한 배지에서는 균주의 성장뿐 아니라 Fluorene의 분해 경향도 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이는 본 분해 반응이 *Sphingobacterium* sp. KM-02로부터 생산되는 효소에 의한 반응임을 시사하고 있으며, 본 박테리아 균주는 Fluorene을 탄소원으로 이용해 분해하면서 성장할 수 있음을 확인하였다. *Sphingobacterium* sp. KM-02가 분리된 토양시료에는 여러 PAHs물질 중 Fluorene의 농도가 가장 높았는데(Fig. 1), 이러한 환경에서 Fluorene을 탄소 및 에너지원으로 활용할 수 있는 활성을 가진 균주가 해당 지역에 토착 미생물로 생존하고 있었음을 나타내고 있다.

3.4. *Sphingobacterium* sp. KM-02에 의한 Fluorene 분해 경로

10 mg/mL의 농도의 Fluorene이 첨가된 MSM에서

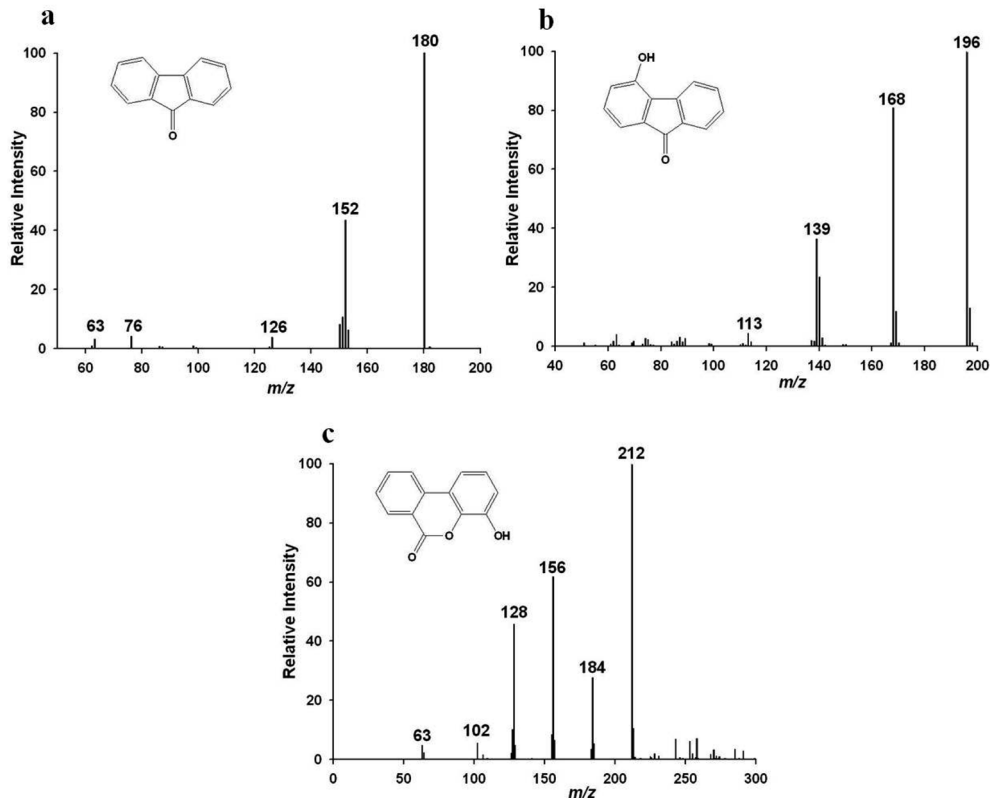


Fig. 3. Detected metabolites for the degradation of fluorene by *Spingobacterium* sp. KM-02. a, 9-fluorenone; b, 4-hydroxy-9-fluorenone; c, 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin. All metabolic intermediates were confirmed by comparing mass spectra using authentic standards.

Spingobacterium sp. KM-02를 순수배양 하는 과정 중 Fluorene이 분해되면서 생성된 중간 분해산물 분석을 통해 Fluorene 분해 경로를 확립하였다. GC/MS 분석을 통해 검출한 분해산물의 Mass Spectra는 Fig. 3과 같으며, 9-fluorenone(Fig. 3a), 4-hydroxy-9-fluorenone(Fig. 3b), 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin(Fig. 3c) 등의 분해 산물이 검출되었다. 검출된 분해산물의 Mass spectra는 해당 표준물질의 Mass spectra와 비교하여 구조를 검증하였다. 이와 같이 검출된 분해 산물들을 기반으로 Fig. 4와 같이 *Spingobacterium* sp. KM-02에 의한 Fluorene 분해 경로를 Fig. 4에 나타내었다. *Spingobacterium* sp. KM-02에 의해 분해되는 Fluorene은 Fluorene oxygenase에 의해 9-fluorenone(Fig. 4a)으로 분해된 후 9-fluorenone dioxygenase에 의해 4-hydroxy-9-fluorenone(Fig. 4b)의 분해 산물을 생성한 것으로 판단된다. 또한, 검출된 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin(Fig. 4c)도 역시 9-fluorenone으로 부터 생성된 것으로 예상되는데, 4-hydroxy-9-fluorenone을 생성할 때와는 다른 위치에서 Angular dioxygenation을 통해 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin의 분

해 산물이 생성되어 검출된 것으로 판단된다. 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin 이 검출된 기존 연구결과와 같이 (Grifoll et al., 1995; Wattiau et al., 2001), 이후에 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin은 Phthalic acid 등의 추가 분해 산물을 생성하는 경로를 통해 Fluorene은 완전분해가 될 것으로 예상된다. 기존 연구결과들에서(Grifoll et al., 1995; Wattiau et al., 2001) 검출된 Phthalic acid는 본 연구에서 검출되지 않았는데, 이는 *Spingobacterium* sp. KM-02가 Phthalic acid를 생성한 후 그 물질이 검출 한계 이상으로 축적되기 전에 분해하기 때문으로 사료되며, *Spingobacterium* sp. KM-02의 성장이 확인됨에 따라 본 경로를 통해 분해가 진행되었을 것으로 예상하고 있다.

3.5. Microcosm test 시험 결과

상기 기술한 바와 같이 PAHs 오염토양에서 분리한 *Spingobacterium* sp. KM-02는 MSM 내에서 Fluorene을 탄소원으로 이용하면서 성장 가능성을 관찰하였는데, *Spingobacterium* sp. KM-02에 의한 실제 오염 토양 내

Table 3. Removal of fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02 in microcosm test contaminated soil*

Time(d)	Amounts (mean ± SD**, µg/g soil)			Decreased amounts and Percentage			
	Control	With dead cells	With live cells	By cells dead		By cells alive	
				µg/g-soil	% ^a	µg/g-soil	% ^b
0	99.5±2.7	98.2±3.7	97.5±2.7	1.3	1.3	2.0	2.0
5	98.1±2.8	83.2±4.6	75.2±5.8	14.9	15.2	22.9	23.3
10	94.6±3.9	74.9±7.2	64.6±7.9	19.7	20.8	30.0	31.7
15	89.0±5.4	72.0±8.0	48.0±8.4	17.0	19.1	41.0	46.1
20	91.4±6.5	68.2±9.5	31.4±9.5	23.2	25.4	60.0	65.6

%^a = [(Control - With dead cells) / Control] × 100, %^b = [(Control - With live cells) / Control] × 100

* Fluorene was determined by GC/MS analysis.

** The mean and standard deviation of 3 replicate determinations.

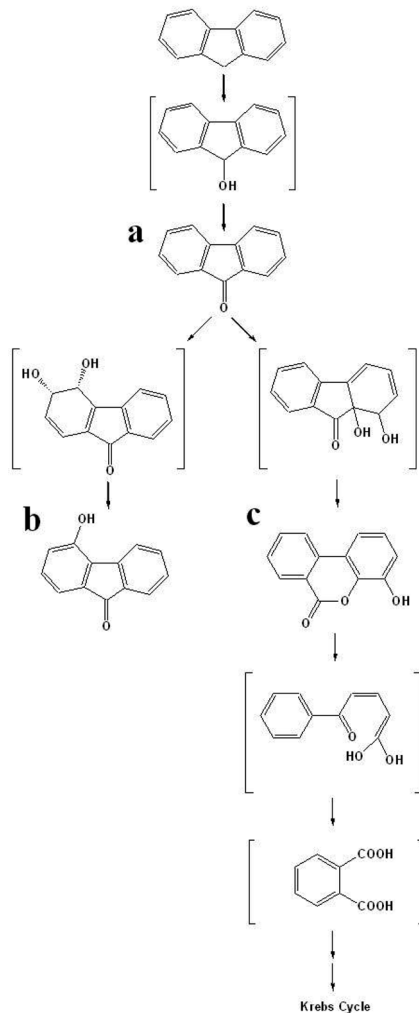


Fig. 4. Proposed pathway for the degradation of fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02.

에서의 복원 가능성을 제시하기 위해 Fluorene을 100 mg/kg의 농도로 토양을 오염시키고 *Sphingobacterium* sp.

KM-02를 접종하여 Microcosm test를 진행하였다. 실험 결과, 20일 내에 *Sphingobacterium* sp. KM-02 live cell을 접종한 처리를 기준으로 Fluorene이 65.6% 감소함을 관찰할 수 있었다(Table 3). 본 Microcosm test에서는 1 kg의 토양을 Fluorene과 혼합하여 Composting을 진행한 결과로 5일 간의 간격을 두고 시료채취를 하였다. *Sphingobacterium* sp. KM-02를 접종하지 않은 Control (대조군)과 NaN_3 (Sodium azide)와 열처리를 하여 사멸시킨 *Sphingobacterium* sp. KM-02 dead cell, 그리고 전 배양을 통해 얻은 *Sphingobacterium* sp. KM-02를 접종한 Live cell 등으로 구분하여 처리하였다. Control 시험에서는 Fluorene이 휘발되어 감소하는 양을 고려하여 적용하였는데, Test 종료 시점인 20일 경과 후까지 오차 범위에서 분석됨을 확인하였다. Table 3 결과에서 보는 바와 같이, Dead cell을 처리한 시험에서도 처리 시간에 따라 20일 후에 약 25.4%의 Fluorene 감소를 나타내고 있다. 이는 Fluorene 특성 상 수용해성이 매우 낮아 토양 입자에 흡착하여 존재하게 되는 경우가 많은데(Gan et al., 2009), 이렇게 토양 입자에 흡착된 Fluorene을 Dead cell에 의해 분비된 유기물질들이 안정화를 시켜 분석 시 모두 탈착되지 않고 감소한 현상으로 나타난 것으로 여겨진다. Dead cell로 처리한 시험의 결과에서 5일 후에 14.9%, 10일 후에 19.7% 등의 감소율이 증가함을 나타내다가 15일 후에는 19.1%로 10일 후 감소율 19.7% 보다 낮은 값을 나타내고 있는 것이 본 균주가 가지고 있는 효소시스템을 포함한 특정 메커니즘이 아닌 제어되지 않는 토양 및 다양한 유기물 입자에의 흡착, 균주의 불균등한 분산 등의 이유로 생각될 수 있다. 그러나, Dead cell에서 보여준 처리 효율과 Live cell을 처리했을 때 나타나는 처리효율 간 20일 경과 후 기준으로 약 40.2%의 현격한 감소율을 보이고 있는 것은 실제 토양 내에서도

Fluorene을 분해할 수 있는 효소가 활성을 갖는 것으로 판단된다. 실제로 Live cell 처리 시험에서는 시간에 따라 꾸준히 증가하는 처리 효율을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들을 기반으로 처리 효율을 높이기 위해 기존 연구결과들에서 제시된 계면활성제를 이용하거나 반복접종 시행하는 등의 추가 처리를 통해 제거 효율을 높일 수 있을 것으로 판단한다(Nam et al., 2005; Kolomytseva et al., 2009). 상기와 같은 결과들을 바탕으로 실제 Fluorene으로 오염된 토양 및 기타 다양한 환경 매체들을 복원할 때, 본 연구에서 분리 및 이용된 *Sphingobacterium* sp. KM-02가 잠재적인 생물촉매(Biocatalyst)로 적용될 수 있음을 시사한다.

4. 결 론

PAHs로 오염된 폐광산지역 토양으로부터 Fluorene을 탄소원으로 이용하면서 분해하고 성장할 수 있는 *Sphingobacterium* sp. KM-02를 분리하였다. *Sphingobacterium* sp. KM-02는 120시간 내에 Fluorene을 약 78.4% 분해할 수 있었으며, 분해 과정 중에 발생한 9-fluorenone, 4-hydroxy-9-fluorenone, 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin 등의 분해산물 분석을 통해 *Sphingobacterium* sp. KM-02에 의한 Fluorene 분해 경로를 확립할 수 있었다. 또한, 100 mg/kg의 Fluorene으로 오염시킨 토양에서 Microcosm test를 20일 동안 진행한 결과, 약 65.6%의 Fluorene이 토양 내에서 제거됨을 관찰하였다. 따라서, *Sphingobacterium* sp. KM-02는 Fluorene 등의 PAHs로 오염된 환경 매체의 생물학적 처리에 유용할 것으로 판단되며, 향후 다양한 환경 시료를 대상으로 하는 연구 결과들이 확보되면 PAHs 오염 환경의 생물 복원에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 한국지질자원연구원에서 주요사업(KIGAM 11-3411) 지원으로 수행된 결과임.

참 고 문 헌

Achten, C. and Hofmann, T., 2009, Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - A hardly recognized source of environmental contamination, *Sci. Total Environ.*, **407**, 2461-2473.

J. Soil & Groundwater Env. Vol. 16(5), p. 74~81, 2011

Alcantara, T., Gmez, J., Pazos, M., and Sanromn, M.A., 2009, PAHs soil decontamination in two steps: Desorption and electrochemical treatment, *J. Hazard. Mater.*, **166**, 462-468.

Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J.M., and Beck, A.J., 2006, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in an aged coal-tar-contaminated soil using different in-vessel composting approaches, *J. Hazard. Mater.*, **137**, 1583-1588.

Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C., 1993, Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1927-1930.

Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J.M., and Solanas, A.M., 1997, New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 819-826.

Fortnagel, P., Harms, H., Wittich, R.M., Krohn, S., Meyer, H., Sinnwell, V., Wilkes, H., and Francke, W., 1990, Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1148-1156.

Gan, S., Lau, E.V., and Ng, H.K., 2009, Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *J. Hazard. Mater.*, **172**, 532-549.

Grifoll, M., Selifonov, S.A., and Chapman, P.J., 1994, Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2438-2449.

Grifoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C.V., and Chapman, P.J., 1995, Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic-compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3711-3723.

Haapea, P. and Tuhkanen, T., 2006, Integrated treatment of PAH contaminated soil by soil washing, ozonation and biological treatment, *J. Hazard. Mater.*, **136**, 244-250.

Keith, L.H. and Telliard, W.A., 1979, Priority pollutants. I. A perspective view, *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 416-423.

Kolomytseva, M.P., Randazzo, D., Baskunov, B.P., Scozzafava, A., Briganti, F., and Golovleva, L.A., 2009, Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469, *Bioresour. Technol.*, **100**, 839-844.

Monna, L., Omori, T., and Kodama, T., 1993, Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* Dbf63, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 285-289.

Mostert, M.M., Ayoko, G.A., and Kokot, S., 2010, Application of chemometrics to analysis of soil pollutants, *Trends in Anal. Chem.*, **29**, 430-445.

Nam, I.H., Hong, H.B., Kim, Y.M., Kim, B.H., Murugesan, K., and Chang, Y.S., 2005, Biological removal of polychlorinated dibenzo-p-dioxins from incinerator fly ash by *Sphingomonas*

wittichii RW1, *Water Res.*, **39**, 4651-4660.

Nam, I.H., Kim, Y.M., Murugesan, K., Jeon, J.R., Chang, Y.Y., and Chang, Y.S., 2008, Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst, *J. Hazard. Mater.*, **157**, 114-121.

Nam, I.H., Kim, Y.M., Schmidt, S., and Chang, Y.S., 2006, Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas wittichii* strain RW1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 112-116.

Nam, K., Rodriguez, W., and Kukor, J.J., 2001, Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction, *Chemosphere*, **45**, 11-20.

Navarro, R.R., Iimura, Y., Ichikawa, H., and Tatsumi, K., 2008, Treatment of PAHs in contaminated soil by extraction with aqueous DNA followed by biodegradation with a pure culture of

Sphingomonas sp., *Chemosphere*, **73**, 1414-1419.

Storelli, M.M. and Marcotrigigano, G.O., 2000, Polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in sediment from the Mar Piccolo, Ionian Sea, Italy, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **65**, 537-544.

Trenz, S.P., Engesser, K.H., Fischer, P., and Knackmuss, H.J., 1994, Degradation of fluorene by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361: a novel C-C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one, *J. Bacteriol.*, **176**, 789-795.

Wattiau, P., Bastiaens, L., van Herwijnen, R., Daal, L., Parsons, J.R., Renard, M.-E., Springael, D., and Cornelis, G.R., 2001, Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis, *Res. Microbiol.*, **152**, 861-872.

Wilcke, W., 2007, Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil, *Geoderma*, **141**, 157-166.