

7. PAHs로 오염된 광양만 퇴적토의 미생물 군집분석

권개경, 정성영, 이정현, 바실리 스페타체프, 김상진
한국해양연구원 자원연구본부

요 약

연안에 가까운 광양만 퇴적토를 대상으로 하여 PAHs 오염도와 말단제한절편 다형성 분석방법 (T-RFLP method)을 이용하여 미생물 군집구조를 조사하였다. 조사된 10개 정점의 PAHs오염도는 $80 \pm 20 \sim 5,690 \pm 580$ (평균 $1,499 \pm 1,716$) ng/g dry wt.였으며 폐수종말처리장이 위치하는 하천 입구에 위치한 정점 (W1)과 광양제철소 우수배출구 입구에 위치한 정점에서 상대적으로 높은 농도를 보였다. T-RFLP방법으로 조사한 미생물 군집은 10개 정점이 4개의 그룹으로 구분되었으며 정점 W1에서 다른 정점과 다른 독특한 군집구조를 형성하였다. PAHs 농후배양시료에서의 미생물군집구조 변화와 비교해 볼 때 조사대상지역 퇴적토의 미생물 군집구조는 PAHs의 오염에 부분적으로는 영향을 받지만 입도, 유기물 등과 같은 환경요인이 군집구조를 결정하는 주된 요인인 것으로 생각된다.

Key Worlds : PAHs, T-RFLP, Bacterial diversity

서 론

다환 방향족 탄화수소 (PAHs)는 2개 이상의 벤젠고리가 중합된 방향족 탄화수소를 의미하며 석유의 주요 구성성분이다. 또한 대부분의 유기물이 불완전하게 연소될 경우에도 발생한다 (Blumer, 1975). 인간활동의 증가와 함께 PAHs는 환경내의 어디에나 분포하는 오염물질로서 점차 그 양이 증가하고 있다. PAHs는 물에 대한 용해도와 증기압이 대단히 낮기 때문에 유기물이나 입자성 물질에 대한 흡착도가 대단히 높고 결과적으로 유기물, 특히 humic acids의 농도가 높은 해양의 퇴적토에 축적된다 (Means *et al.*, 1980; Schlautman and Morgan, 1993).

PAHs는 일반적인 독성 외에도 발암성, 돌연변이 유발성, 유전독성을 지니기 때문에 PAHs에 의한 환경오염은 인간에게까지 영향을 줄 수 있는 잠재적인 위험요인이 된다 (Hidelerger, 1975). 따라서 그간 오염된 환경으로부터 PAHs를 제거하는 것은 중요한 관심사가 되어왔다. 이와 같은 관점에서 그간 PAHs의 제거에 미생물을 이용하고자 하는 노력들이 시도되어왔으며 실제 많은 종류의 미생물들이 자연환경 내에서 PAHs의 전환과 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 나아가 현장에 존재하는 미생물을 이용한 오염된 PAHs의 생물정화 연구가 여러 지역에서 시도되어 왔으며 그 결과 저분자의 PAHs로 오염된 토양의 경우에는 생물정화기술의 적용이 유효한 것으로 밝혀졌다 (Juhasz and Naidu, 2000). 한국은 1960년대 이래로 급격한 공업화와 함께 연안역의 개발이 이루어졌으며 그간 대형

유조선 사고도 끊이지 않았다. 그러나 연안역 퇴적토의 PAHs 오염 현황에 관한 연구는 많지 않아 오염실태에 대한 충분한 자료가 부족한 실정이다 (충청남도, 1998; 한국해양연구소, 1999a; 환경부, 1999; Khim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999). 그동안의 연구를 통하여 오염된 PAHs의 생물정화 처리시 환경요인 외에 퇴적토의 미생물군집구조가 영향을 줄 가능성을 확인하였다. 이에 본 연구에서는 광양만 퇴적토를 대상으로 하여 PAHs의 오염도와 말단제한절편다형성분석방법 (T-RFLP)을 이용한 미생물 군집구조간의 관계를 조사하였다.

재료 및 방법

연구지역 및 시료채취

퇴적물 시료는 PAHs에 의한 오염이 의심되는 광양만의 10개 정점에서 채취하였다 (Fig. 1). 시료는 소형 van Veen grab sampler를 이용하여 채취한 후 표층을 취하였다. 화학분석용 시료는 바로 냉동시켜 분석직전까지 보관하였으며 미생물활성 분석용 시료는 냉장상태로 연구실로 운반하여 처리하였다.

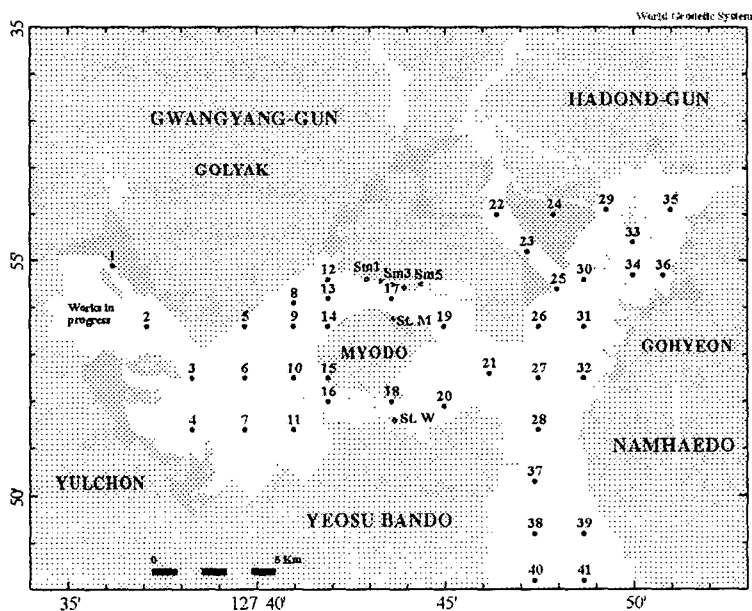


Fig. 1. Station map of the kwangyang Bay study area

PAHs 농도분석

약 10 g의 젖은 시료 (한 정점당 2회 반복)를 동결건조시킨 후 막자사발에서 곱게 갈아주었다. 약한 극성을 지닌 PAHs 화합물을 CH_2Cl_2 용매 20, 10, 5 ml씩을 넣

고 5분씩 3회 sonication 시켜서 추출하였다. PAHs가 추출된 용매는 GF/F filter로 여과하여 sediment 입자를 걸러주었으며 이때 무수황산나트륨 층을 통과시켜 수분을 제거시켰다. 추출 전에 농도측정을 위한 표준물질로 10 μg 의 deuterium-phenanthrene을 첨가하였다. 추출된 시료를 감압농축한 후 3 g의 silica가 충전된 내경 11 mm의 glass column에 얹었다. 여기에 10 ml의 hexane-dichloromethane (2:3)을 흘려주어 PAHs성분을 분리하였다. 회수된 용매는 감압농축시킨 후 hexane으로 치환하여주었다. GC standard를 첨가한 후 GC/MS를 이용하여 PAHs 성분을 분석하였다 (Fang & Findlay, 1996, Gerbino *et al.*, 1993).

말단절편 다형성 (T-RFLP) 방법을 이용한 미생물 군집분석

세균군집의 다양성은 T-RFLP방법을 이용하여 조사하였다 (한국해양연구소, 1999b). 퇴적물 시료 0.5 cm로부터 핵산을 추출한 후 PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone; Sigma Chem. Co.) microspin 컬럼을 이용하여 PCR의 저해물질로 알려진 Humic 물질을 제거하였다 (Lee *et al.*, 1998). 추출된 핵산으로부터 형광 물질로 표지된 primer 27F와 1518R을 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭시킨 후 4 염기서열을 인지하는 제한효소 *HhaI* (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 자동염기서열 장치 (모델 377; Applied Biosystems Instrument)를 사용하여 GS Run 36D-2400 옵션으로 4시간 전개시킨 후 형광물질로 표지된 5' 말단 제한절편의 크기를 표준 내부시료를 기준하여 GeneScan 프로그램을 이용하여 크기를 비교하여 결정하였다.

결과 및 고찰

PAHs 분포

조사 대상 10개 정점에서 $80 \pm 20 \sim 5,690 \pm 580$ (평균 $1,499 \pm 1,716$) ng/g dry wt.의 PAHs 화합물이 검출되었다 (Table 1). 첫 번째 조사대상 지역인 여수시 월내천 입구인 정점 W1에서 $5,690 \pm 580$ ng/g dry wt.로 가장 높은 농도의 PAHs 오염도를 보였으며 천의 입구에서 멀어질수록 급격히 그 농도가 감소하여 100 m 떨어진 정점 2에서 $1,990 \pm 250$, 300 m 떨어진 정점 3에서 110 ± 20 ng/g dry wt.의 PAHs 오염도를 보였다. 제2 조사대상지역인 중흥천 입구에 위치한 정점에서는 $80 \pm 20 \sim 720 \pm 120$ (평균 393 ± 275) ng/g dry wt.의 PAHs 오염도를 보여 조사대상 3개 지역 중 가장 낮은 오염도를 보였다. 제 3 조사대상지역인 광양제철 우수배출구 입구 주변의 경우 $1,300 \pm 180 \sim 2,760 \pm 580$ (평균 $1,877 \pm 777$) ng/g dry wt.의 PAHs 오염도를 보였다. 광양제철 우수배출구 주변의 경우 퇴적물이 사질 ~

사니질로 이루어져 있는데 PAHs가 주로 유기물의 농도, mud성분의 함량에 비례하여 증가한다는 보고와 비교할 때 주성분이 사질인 경우에 비추어 조사지역의 퇴적물이 PAHs로 심각하게 오염되었음을 시사하는 것으로 사료된다.

Table 1. The concentrations and the major components of PAHs compounds detected from 10 sediment samples of KwangYang Bay in Mar., 2000.

	Conc.*	Conc.**	Major components
Site W1	5.69±0.58	6.51±0.66	Perylene, Pyrene, Flan ¹ , Chry ² , Banthr ³
Site W2	1.99±0.25	2.28±0.29	Chry, Pyrene, B[k]F ⁴ , B[a]Flu ⁵ , B[b]Flu ⁶
Site W3	0.11±0.02	0.12±0.02	Biphenyl, Flan ⁷ , 1M-Naph ⁸ , Flu ⁹ , Chry
Site JH1	0.08±0.02	0.09±0.02	Biphenyl, Perylene, 1M-Naph, Flu, Anthr ¹⁰
Site JH2	0.49±0.09	0.56±0.10	Biphenyl, Pyrene, B[b]Flu, DBT ¹¹ , Flan
Site JH3	0.28±0.09	0.33±0.10	Perylene, Pyrene, IndenoPyrene, Chry, Anthr
Site JH4	0.72±0.12	0.83±0.14	Perylene, Pyrene, Flan, Biphenyl, B[b]F ¹²
Site SM5	1.30±0.18	1.49±0.20	Flan, Pyrene, Phen, AceN ¹³ , B[b]F
Site SM4	1.57±0.29	1.80±0.34	Perylene, Pyrene, Flan, B[b]F, Phen
Site SM3	2.76±0.58	3.16±0.67	Flan, Pyrene, Phen, Perylene, B[b]F
Average	1.49	1.71	

*: total concentration of 16 PAHs compounds specified by USEPA.

** : total concentration of all PAHs compounds determined by GC/FID system under the given condition.

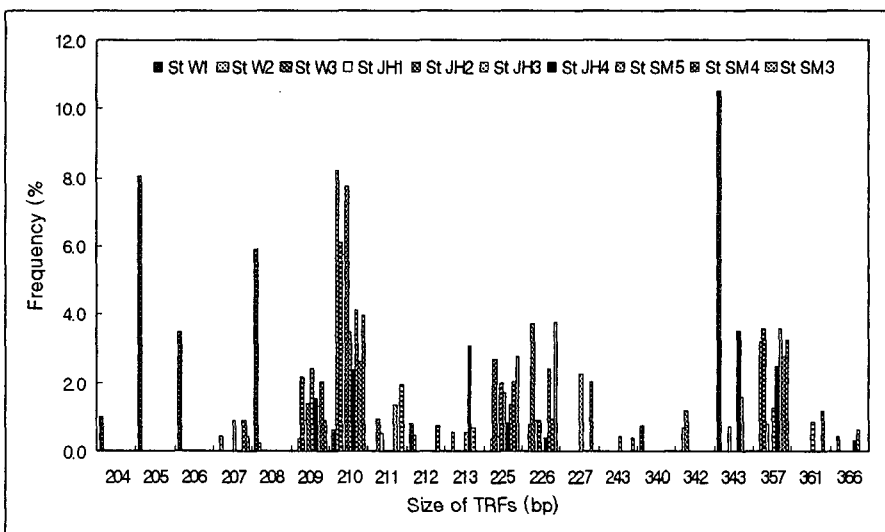
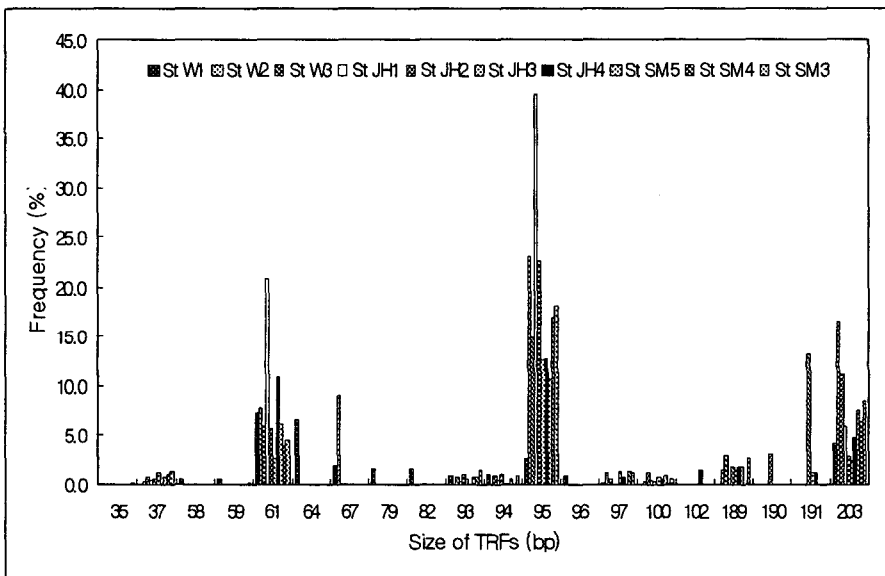
concentration: ug/g dry wt.

1. Flan : Fluoranthene, 2. Chry : Chrysene, 3. Banthr : BenzAnthrathene, 4. B[k]F : Benz[k] Fluoranthene, 5. B[a]Flu : Benz[a]Fluorene, 6. B[b]Flu : Benz[b]Fluorene, 7. Flan : Fluoranthene, 8. 1M-Naph : 1-Methyl-Naphthalene, 9. Flu : Fluorene, 10. Anthr : Anthrathene, 11. DBT : Dibenzothophene, 12. B[b]F : Benz[b]Fluoranthene, 13. AceN :Acenaphthylene

T-RFLP방법으로 본 광양만 퇴적토의 미생물 군집구조

그림 2에 광양만 10개 정점 퇴적물에 서식하는 미생물의 T-RFLP 결과를 표시하였다. 세균의 16S rDNA를 제한효소 *HhaI*으로 잘랐을 때 5'-terminal restriction fragment base pair (T-RF) 숫자는 정점에 따라 19~73개였으며 1% 이상의 비율을 보인 T-RF의 개수는 11~26개였다. T-RF의 개수로 본 다양성은 정점 W1, JH3, JH4, SM4, SM5에서 높았으며 1% 이상의 T-RF가 차지하는 비율은 정점 W2, JH1, JH2, SM3에서 90%이상의 높은 비율을 보여 특정군집이 우점하는 경향을 보였다. 검출된 세균군집 중 T-RF의 길이가 61, 95, 203, 210, 379, 543, 544, 571, 586인 미생물이 정점 W1을 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 W1에서는 64, 205, 206, 208, 343, 369, 371, 514, 526, 569 bp길이의 T-RF를 보이는 미생물도 높은 비율을 보였으며 0.1%이상의 비율을 보인 34개의 T-RF 중 15개의 T-RF가 다른 정점에는 존재하지 않는 등 독특한 미생물 군집을 형성하고 있음을 확인할 수 있었다. 정점 W1의 경우 월내천을 통한 담수의 유입, 간조시의 노출에 따라 시기적으로 microalgae의 spring bloom 등의 독특한 환경조건이 미생물군집의 차이를 가져온 원인인 것으로 생각된다.



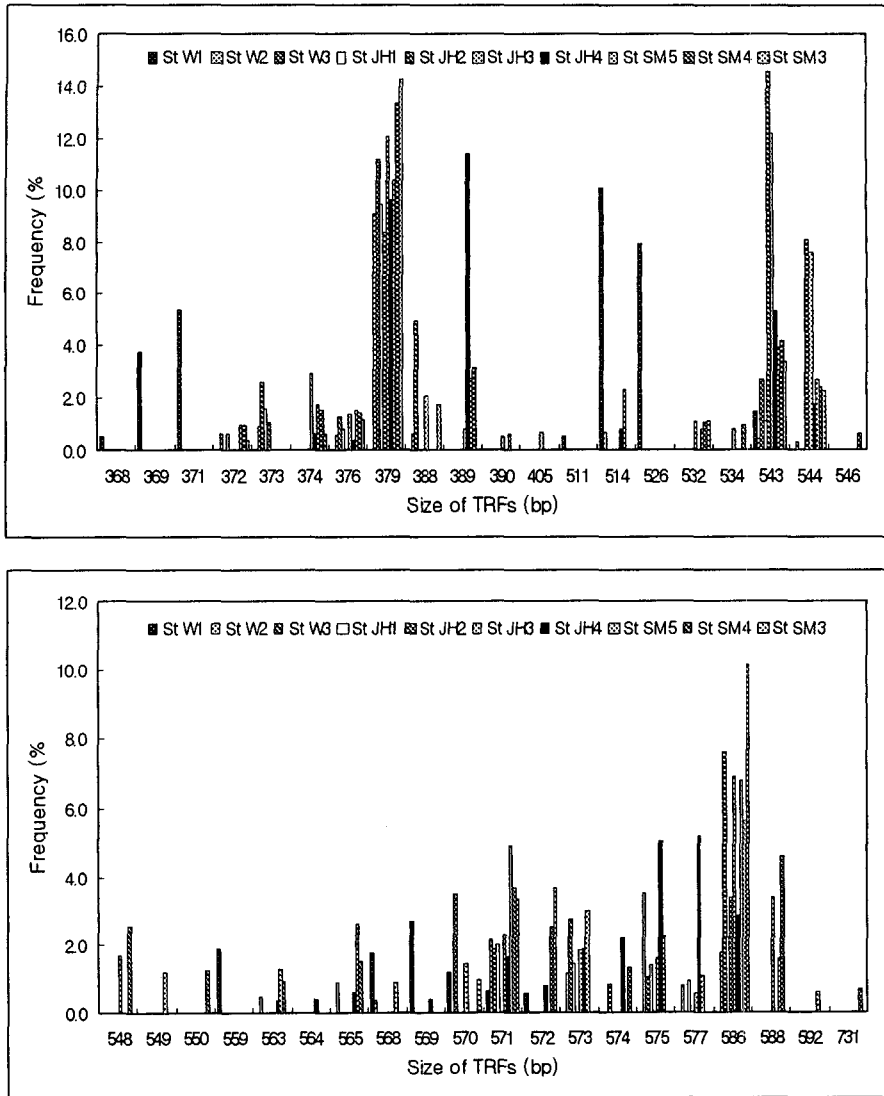


Fig. 2. Frequency distribution profile of terminal fragments froman *HhaI* digestion of 16S rDNsamA amplified from total community DNA IO sediment ples in Gwangyang Bay.

각 정점에서의 T-RFLP 결과를 바탕으로 미생물 군집구조에 따른 집괴분석 결과 정점 W2, JH4, SM5가 75% 유사도 수준에서 한 group으로 구분되었으며 정점 W3, JH1, JH2와 SM3이 2번째 group으로 구분되었다. 정점 JH3과 SM4가 3번째 group으로, 정점 W1이 별도의 group으로 구분되어 조사정점의 미생물군집은 크게 4 group으로 나뉘어졌다 (Fig. 3).

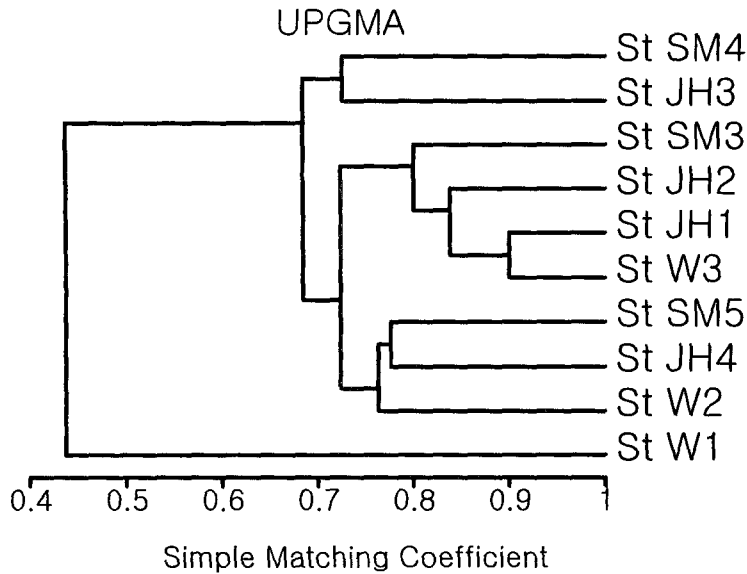


Fig. 3. Cluster diagram of similarity values for microbial community in 10 sediment samples based on the distribution of TRFs.

PAHs오염과 미생물 군집구조의 상관성

연안에 가까운 광양만의 일부 퇴적토는 비교적 높은 농도의 PAHs로 오염되어있다 (Table 1). 높은 농도의 PAHs 오염은 결과적으로 미생물 군집구조를 단순화시킬 것으로 예측하였으나 PAHs 오염도가 높은 정점들에서 상대적으로 다양한 미생물이 존재함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

각 정점의 시료를 고농도의 PAHs로 농후배양시켰을 때 초기에는 T-RF의 길이가 206bp인 미생물이 우점하였다. 이후 T-RF가 154, 567 bp인 미생물이 증가하였다. 이들 미생물 중 206bp의 T-RF를 가지는 미생물이 정점 W1에서 약 3.3%의 비율을 보였으나 다른 정점에서는 발견되지 않았으며 154, 567bp의 T-RF를 가지는 미생물도 정점 JH3에서 0.1%수준의 비율을 보인 것 외에는 다른 정점에서는 발견되지 않았다. 대개의 경우 PAHs 오염은 유기오염에 동반하는 것을 고려해 볼 때 (Means *et al.*, 1980; Schlautman and Morgan, 1993) PAHs의 오염 정도가 연구지역의 미생물 군집 구조에 부분적으로 영향을 미치는 것은 하지만 그보다는 입도, 유기물의 양과 같은 환경적인 요소들에 의해 미생물군집의 다양성이 결정되는 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한국해양연구원 기관고유사업으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Amer.* 234: 34-45.
- Fang, J., and R.H. Findlay. 1996. The use of a classic lipid extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments. *J. Microbiol. Methods.* 27: 33-71.
- Gerbino, T.C., G. Castello and U. Pettinati. 1993. Prediction of the retention of polynuclear aromatic hydrocarbons in programmed-temperature gas chromatography. *J. Chromatogr.* 634: 338-344.
- Hidelberger, C. 1975. Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 79-121.
- Juhasz, A.L. 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.
- Khim, J.S., K. Kannan, D.L. Villeneuve, C.-H. Koh and J.P. Giesy. 1999. Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan bay, Korea. 1. instrumental analysis. *Environ. Sci. Technol.* 33: 4199-4205.
- Kim, G.B., K.A. Maruya, R.F. 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. Pol. Bull.* 38: 7-15.
- KORDI. 1999a. A study on environmental changes in Shihwa Lake. KORDI Report No. BSPE 98705-01-34. p.363.
- KORDI. 199b. Bacterial community analysis of marine sediments using T-RFLP (Terminal-restriction fragment length polymorphism). KORDI Report No. BSPE 98731-00-1186-3. p.97.
- Lee, J.-H., H.-H. Shin, H.K. Lee, K.K. Kwon and S.-J. Kim. Efficient removal of humic substances in preparing DNA extract from marine sediments. *Kor. J. Microbiol.* 34(3): 132-136.
- Means, J.C., J.J. Hassett, S.G. Wood and W.L. Banwart. 1980. Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14: 1524-1528.
- Ministry of Environment. 1998. Methodologies for the quality assessment of benthic environment of Korean coastal waters. Project No. 9-4-1. p. 1000.
- Schlautman, M.A. and J.J. Morgan. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.* 27: 961-969.