

원유 누출 오염토양으로부터의 석유 탈황용 미생물 분리

Isolation of Microorganisms for Petroleum Desulfurization from Oil Contaminated Soil

손 호용¹, 장 제환¹, 장 용근¹, 장 호남¹, 류 희옥², 조 경숙³

¹한국과학기술원 화학공학과 생물공정연구센터,

²승실대학교 화학공학과, ³이화여자대학교 환경공학과

Introduction

석유속에 포함되어 있는 황성분은 연소시 대기오염의 주원인인 아황산가스를 발생시킨다. 이는 산성비를 유발하여 건물 등의 부식을 일으키고 더불어 토양의 오염도 야기한다. 또한 최근에는 GR(Green Round)과 환경에 대한 국내외적 관심의 고조로 인해, 원유중의 황성분에 대한 규제가 전세계적으로 강화되고 있는 실정이다. 따라서 석유내의 황성분을 보다 효율적으로 제거하고자 하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있으며, 그 대부분은 현재의 수침탈황 공정의 개량 및 화학촉매의 개발에 집중되고 있다. 그러나 이러한 화학적 수침탈황공정은 고온, 고압조건에서 가능하므로 많은 장치비 및 운영비가 필요하며, 고가의 화학촉매의 부가적인 경비를 요구하며, 고심도 탈황이 어려운 문제점을 가지고 있다. 생물학적 탈황은 시설 투자비, 운전비 등을 감소시킬 수 있으며, 현재 탈황공정에 부가적으로 결합 가능하므로 그 파급효과가 즉효적이며, 또한 방향족 화합물의 동시제거도 가능한 등 여러 장점이 있을 것으로 사료된다. 본 연구진은 석유 탈황을 위한 생물 촉매 개발 및 이를 사용하는 생물학적 공정에 관한 연구의 일환으로, 석유내의 DBT (Dibenzothiophene)를 모델 화합물로 선정하여, 원유 누출 오염토양으로부터 DBT를 효율적으로 제거할 수 있는 균주의 탐색을 시도하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

국내 정유회사의 원유 저장탱크 및 주변토양 30 여점과 원유 누출 오염 토양 및 원유 오염폐수 20 여점, 탄광주변 토양 10 여점으로부터 탈황용 균주를 분리하였다. 이들 토양 및 폐수, 원유 등을 멸균 생리식염수에 현탁하여 10 분간 방치한 후 각각 LB 배지에서 1일간 배양하고, 이 배양액을 DBT를 유일황원으로 하는 포도당 최소배지에 접종한 후, 2-3개월 연속배양하였다. 이후 연속 배양한 배양액을 대상으로 DBT minimal agarose배지에서 DBT를 유일황원으로 생육이 가능한 탈황균주를 순수분리하였다. 탈황 균주의 배양을 위해서는 250 ml 삼각플라스크에 10 ml basal salt media를 첨가하여 사용하였으며, DBT 농도는 1-2 mM로 조정하였으며, 30 °C에서 5일간 진탕 배양하였다. 이때 DBT는 물에 녹지 않으므로 무수 ethanol에 100 mM농도로 녹인 후, 실험목적에 따라 적절한 농도로 배지에 첨가하였다.

배양액으로부터 DBT 추출

배양액으로부터 잔존 DBT를 정량하기 위해 배양액과 동일량의 n-butanol 또는 hexane을 첨가하여 액-액 추출하였으며, 충분한 평형에 도달시키기 위해 상온에서 30분간 방치하였다. 이후 상등액을 회수하여 3분간 원심분리(10,000 rpm)한 후, 그 상등액을 HPLC의 분석시료로 사용하였다.

분석방법

세포의 성장은 spectrophotometer(Beckman DU-65)를 이용하여 600nm에서 측정하였으며, DBT의 정량은 Hitachi사의 HPLC(Novopak C18 column, UV detector 280 nm, solvent : methanol 또는 70% acetonitrile, Injection 5 μ l)를 이용하여 측정하였다. 대사산물 중 phenolic ring을 포함한 물질의 정성조사에는 Gibbs method를 이용하였다.

결과 및 고찰

탈황 균주의 분리

다양한 토양 및 폐수시료로부터 3개월간의 연속배양 및 DBT 최소배지에서의 집식배양을 통하여 60여주의 탈황균주를 분리하였으며, 이 균주들은 별도의 배지첨가물 없이 DBT-glucose 최소배지에서 양호한 생육을 나타내었다. 전반적인 분리과정은 Fig.1에 나타내었다.

Fig. 1. The screening procedure of desulfurization bacteria.

- ↓ Soil sample 1g
- ↓ Add 10 ml d-H₂O and vortex
- ↓ Agitate for intracellular sulfur consumption
- ↓ 0.1 ml spread on LB and DBT-MM
or continuous culture in glucose-DBT media
- ↓ Single colony isolation by tooth pick in DBT-MM
- ↓ Liquid culture (10ml DBT-MM/250ml baffle flask)
- ↓ 4-5 days culture at 30°C in rotary shaker (150 rpm)
- ↓ Tested by Gibbs reagent
- ↓ If positive, culture broth was extracted by n-butanol
- ↓ HPLC analysis for residual DBT

탈황균주의 배양 및 탈황능 평가

DBT-glucose 최소 액체배지에서 60여주의 분리균주를 각각 5일간 진탕 배양하

였으며, 빠른 생육도, 높은 탈황능, 실제적 이용가능성을 기준으로 9 균주를 2차 선별하였다. 이 9 균주들은 배양시 pH 감소현상이 나타났으며, pH 3.5-4.0정도에서 일정하게 유지되었다. 또한 phenolic compound와 반응하는 Gibbs reagent에 강하게 발색되어 배양액중에 phenolic compound를 생성함을 알 수 있었다. 2차 선별된 균주들을 1mM DBT-glucose최소배지와 DBT 최소배지에서 5일간 배양한 결과는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Residual DBT concentration of microorganisms- treated broth.

Strain \ Medium	DBT + BSM	DBT + glucose-BSM
ATCC 21198	0.310	0.767
A23-3	0.194	0.648
A23-4	0.140	0.230
J3	0.200	0.231
Jar-7	0.110	0.182
J2	0.321	0.310
S9	0.180	0.120
Q10	0.173	0.148
A33-2	0.423	0.360
QP ₃ B	Not determined	0.160

Unit : residual DBT(mM)

initial DBT 1 mM, 5 days culture

참고문헌

1. M. van Afferden, *Arch. Microbiol.*, **153**, pp324 (1990)
2. I. M. Cambell, *CHEMTECH*, Oct., pp43 (1993)
3. J. J. Kilbane et. al., *CHEMTECH*, Dec., pp747 (1990)
4. T. Omori et. al., *Appl. & Environ. Microbiol.*, **58**(3), pp911 (1992)
5. Yoshikazu et. al., *Appl. & Environ. Microbiol.*, **60**(1), pp223 (1994)
6. B. H. Kim et. al., *Korea J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**(1) pp31 (1990)
7. W. R. Finnerty, *Environ. Biotech.*, **3**, pp1277 (1992)
8. M. Mack, *Genetic Eng. News*, Oct., **15** pp20 (1993)