

유류분해 미생물의 표면특성에 따른 분해성 및 기동성 변화

류두현, 목지에*, 최명석, 김진명, 김동일, 전경화, 박소연

전주대학교 환경과학과, *(재)자연환경연구소

<요약문>

The adhesion of hydrocarbon degrading bacteria(HDB) differing in surface hydrophobicity was investigated. Cell wall hydrophobicity was modified chemically and physiologically. Modified adhesion deficient mutant of HDB was selected in a soil column assay. Physiologically and chemical modification increased cell surface hydrophobicity. Cell surface characteristics including BATH and FTIR were measured. Physiological modification using ampicillin was not stable, but chemical modification was stable. Hydrocarbon degrading efficiency was measured of TPH modified and unmodified HDB.

key word : Hydrocarbon degrading bacteria(HDB), Cell Surface, FTIR, Hydrophobicity

1. 서론

전세계적으로 토양내 유기성 오염물질의 분해속도를 가속화하기 위해서 오염물질 분해성이 우수한 미생물을 분리 증식하여 첨가하는 연구가 많이 진행되어 왔다. 인공제조된 미생물 첨가가 특정오염물질의 분해율을 촉진시킬 수도 있지만, 이러한 미생물은 토양에 존재하고 있는 토착 미생물에 비하여 경쟁력이 낮으므로 시간이 지남에 따라 미생물 첨가의 영향이 감소하는 경향을 보인다. 그러나 오염물질에 순응된 미생물을 첨가하는 것은 초기의 분해속도를 가속화시킴으로써 오염토양 정화기간을 단축시켜 줄 수 있다. 바이오벤팅(bioventing)과 같은 *in-situ* 기술에서는 적정 미생물을 오염토양 내에 균일하게 주입하는 데에 많은 제약이 따른다. 지금까지는 미생물을 주입하기 위하여 토양내에 미생물 주입정을 설치한 후 미생물을 주입하면서 공기압으로 밀어 넣거나 자연유하시키는 방법에 의존하여 왔다. 그러나 이러한 방법들로 미생물을 토양에 주입할 경우 미생물 대부분이 토양상부층에서 여과(filtering)되어 오염지역 심부까지 미생물을 이동시키기가 어려우므로 고가의 인공제조 미생물 사용시 만족할 만한 효과를 얻는 것은 어렵다. 소수성(hydrophobic)을 보이는 유류는 토양 공극에 강하게 흡착되어 액상에서의 이동이 제한되고 미생물이 오염물질을 분해하기 위해서는 수분에 녹아있는 오염물질을 세포내로 흡수하여야 하므로 일반적으로 소수성 물질은 친수성 물질보다 생물학적 분해가 용이하지 않다. 미생물 세포벽의 특성이 변화하는 경우도 미생물의 토양입자에 대한 물리적 흡착성과 토양내 미생물의 이동성에 영향을 미치므로 이에 대한 연구도 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구에서는 *in situ* 생물학적 정화기술 적용시 오염물질의 분해속도를 가속화하기 위하여 미생물을

주입할 경우에 미생물의 토양내 이동성을 개선하기 위한 기초연구로 실시하였으며, 주요 연구내용으로 세포벽 조성 변화에 따른 오염물질의 분해율 및 토양의 이동성에 대하여 검토하였다.

2. 본론

국내 유류오염토양에서 분리된 미생물 중 유류 분해성이 좋다고 판명된 미생물 *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter caucerogenus* 등을 methyl methanesulfonate(MMS, Sigma)를 이용한 chemical mutagenesis를 수행하여 투과성을 증진시켰다. 이 미생물들을 M9 최소배지에 30°C, 180rpm으로 16~18시간 배양한 후 다시 M9 배지에 OD₆₀₀ 0.05~0.1 상태로 재접종한 후 동일한 방법으로 배양하여 OD₆₀₀ 0.6~0.8(exponential phase)에서 배양을 종료하여, 배양된 미생물을 8,000rpm, 10min 동안 원심분리(VS-15 CFN, VISION, KOREA)하여 상등액을 제거하고 미생물을 0.1M phosphate buffer solution(0.1M PBS, pH 7)를 이용하여 3회 세척하였다. 세척된 미생물 현탁액의 농도가 OD₅₅₀ 2가 되도록 M9 배지에 희석하여 현탁액을 제조하였으며 이 현탁액을 멸균된 세 개의 microcentrifuge tube에 각 1.25ml씩 주입하였다. 이 중 두 개의 tube에 MMS를 각각 6.25 μ l, 12.5 μ l씩 첨가한 후, 진탕기를 이용하여 30초 동안 적당히 진탕시켰다. 적정농도의 미생물 현탁액과 MMS가 완전 혼합된 현탁액을 30°C에서 한 시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 상등액을 제거한 후 25 ml M9 배지로 세척하였다. 다시 원심분리후 10ml의 M9 최소배지로 세척하고 모아진 미생물을 10ml M9 최소배지에 현탁시켰다. 이 현탁액을 30°C에서 한 시간 동안 배양시키고, 이중 일부를 PBS를 이용하여 적정 농도로 희석하고 LB plate에 도말하였다. 나머지 배양액을 M9 최소배지에 16~18시간동안 배양하고 이를 다시 M9 최소배지에 OD₆₀₀ 0.05~0.1 상태로 재접종하여 OD₆₀₀ 0.6~0.8(exponential phase)까지 배양한 후 PBS로 3회 세척하여 토양 컬럼을 이용해 수 차례 반복 투과실험 하여 투과성이 우수한 미생물을 선별하였다.

본 실험에 사용된 토양은 J대학교 교정에서 채취하였으며, 그늘에서 풍건시킨 후 2 mm체로 거른 후 통과된 토양은 다시 #40~70 토양체로 선별하여 토양투과성 실험에 사용하였다. 3ml 용량의 플라스틱 주사기를 컬럼으로 사용하여 여과지 (Whatman No. 4)를 깎 후 위에서 선별된 토양 1.5g을 주입하였다. 실험 전 각 컬럼을 습윤 멸균 하였으며, 하루 이상 건조 오븐에 넣어 습기를 제거하여 균일한 조건의 습도를 유지하도록 하였다. 위와 같은 방법으로 직경 1cm, 길이 20cm인 유리 컬럼에 토양 8g씩을 주입하여 실험하였다. LB 배지에 OD₆₀₀ 0.05~0.1에서 OD₆₀₀ 0.6~0.8(exponential phase)까지 배양된 미생물을 8,000rpm, 10min 동안 원심분리하여 상등액은 제거하고 미생물을 분리한 후, 멸균증류수로 3회 반복 세척하여 영양원 및 이온성분을 제거하여 OD₆₀₀ 0.2의 현탁액을 제조하였다. 미생물 현탁액과 토양의 충분한 접촉을 위하여 상온에서 무균상에서 30분간 방치 후 현탁액을 중력배수 시켰고 컬럼을 통과한 여액을 멸균 증류수로 적당히 희석하여 LB agar 배지에 도말하고, 37°C, 16~18시간 배양하였다. 형성된 colony의 수를 측정하여 CFU(colony forming unit)값을 계산하고 투과성은 컬럼에 투여된 미생물의 개체수에 대한 투과된 미생물의 개체수의 비를 백분율하고, 다음 식에 의해 α (Sticking coefficient)값을 계산하였다. α 는 미생물이 토양 컬럼 투과시 토양 입자에 부착하는 정도를 나타내는 상수로써, 값이 작을수록 토양내 투과성이 증진된다.

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left[-\frac{3}{2} \frac{(1-\theta)}{d_r} \alpha \eta L\right]$$

α : column porosity

η : collector efficiency

L : distance

d_r : diameter of the porous medium particle

2일간 배양된 배양액을 OD600을 측정한 후 각각의 전체 배양액을 원심분리하여 미생물 및 고형분을 제거하고 상등액을 토양오염공정시험법에 의해 전처리한 후 TPH 분석을 실시하였다. TPH는 autosampler(AOC-21i, Shimadzu Ltd., Japan)가 부착된 가스크로마토그래프(GC-17A AFW, Shimadzu Ltd., Japan)로 분석하였다. TPH 분석을 위한 GC 조건은 Table 1과 같다.

또한 각 미생물의 표면 조성은 적외선 분광분석기(FTIR, NEXUS 870, USA)를 이용하여 확인하였다.

Table 1. Analytical condition of GC for the measurement of TPH

| GC | Shimadzu GC-17A AFW | Detector | FID |
|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------|
| Column | DB-1 | Injection volume | 2 μ l |
| Injector Temp. [°C] | | Detector Temp. [°C] | |
| Oven Temp. Program | Initial Temp. [°C] | 125oC | |
| | Temp. rate 1 [°C/min] | 2 (125 ~ 200°C) | |
| | Temp. rate 2 [°C/min] | 3 (200 ~ 240°C) | |
| | Temp. rate 3 [°C/min] | 2.5 (240 ~ 280°C) | |
| | Final Temp. [°C] | 280°C, 15min | |

3. 결론

토양내 이동성을 증진시키기 위해 MMS의 투입 농도를 다르게 하여 미생물의 세포벽 조성을 화학적으로 변화시켰는데, 원래의 균주보다 투과성이 향상됨을 알 수 있었다. *A. calcoaceticus* 경우 6.25 μ l의 농도의 MMS로 변이된 미생물의 투과성은 *A. calcoaceticus*가 0%일 때 14.7 \pm 2.9%로 투과성이 향상 되었으며, *K. pneumoniae* 경우 원균주의 토양 투과성이 0%일 때 6.25 μ l, 12.5 μ l의 농도로 변이시켜 변화된 것의 투과성은 각각 3 \pm 0.25%, 99 \pm 13.82%으로 상대적으로 향상됨을 알 수 있었다. 그러나 원래 세포벽의 친수성이 높은 *E. caucerogenus*의 경우는 원균주의 토양 투과성이 약 1 \pm 0.27%일 때 6.25 μ l, 12.5 μ l의 농도로 변화시킨 것의 경우 각각 3.3 \pm 1.13%, 2.2 \pm 0.95%로 토양 투과성이 향상되어 다른 균주에 비하여 상대적으로 토양 이동성의 증진이 크지 않음을 알 수 있다. 또한 FTIR을 실시한 결과에서도 *K. pneumoniae*의 경우 원균주가 mutation된 균주보다 PI/CH ratio와 PII/CH ratio가 커지는 것을 볼 수 있다. PI/CH ratio와 PII/CH ratio가 높을수록 소수성에 가까워지게 되는데 다른 두 미생물 및 chemical mutation시킨 미생물보다 높은 3.565와 10.388을 나타내었다. PI/CH ratio와 PII/CH ratio를 확인한 결과 *E. caucerogenus*의 표면은 가장 친수성이 가장 높은 것으로 확인되었고, 컬럼 실험 결과에서도 토양내 투과성이 가장 우수하였다. 따라서 *in-situ* 처리를 위해서는 세포벽의 친수성이 높은 미생물을 적용하는 것이 생물학적 복원에 더 효과적인 것으로 판단된다.

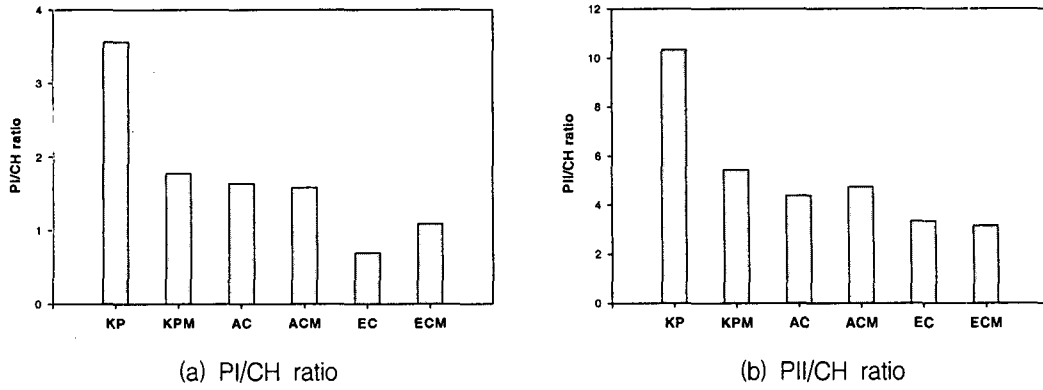


Fig. 1. The variation of PI/CH ratio and PII/CH ratio at various microorganisms

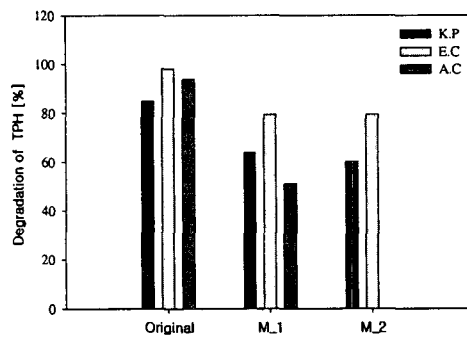


Fig. 2. TPH removal efficiency of Hydrocarbon degrading bacteria and chemical mutant

5. 감사의 글

본 연구는 '2004년도 차세대 핵심환경기술개발사업'의 연구과제로 수행되었으며, 연구비를 지원해주신 환경부에 감사드립니다.