

Pseudomonas sp. KM1을 이용한 PAHs 분해능 연구

김 만 · 김해영 · 박정훈

전남대학교 공과대학 건설지구환경공학부 환경공학과

I. 서론

PAHs(다환방향족탄화수소)는 여러 개의 벤젠고리가 융합된 형태를 지닌 유기화합물로서 석탄, 경유, 휘발유 등 화석 연료를 사용하는 내연기관의 불완전연소에 의해 많이 발생되며, 화산이나 산불 등 자연적인 요소에 의해서도 생성된다.¹⁾ 일반적으로 인위적인 발생량이 자연적인 것보다 훨씬 많으며, PAHs 화합물의 종류는 매우 다양하며 오염원에 따라 발생하는 물질의 분포가 다르다. 한편 토양에 유입, 부하되는 PAHs는 토양 미생물에 의한 부분적인 분해, 식물체내로의 흡수, 강우에 의한 용해 및 대기 중으로의 증발/휘발 등으로 일정기간이 지나면 없어지게 되는데, 이러한 토양의 오염물질에 대한 자체 수용능력을 토양의 완충능력 내지는 자정능력이라 하며, 이 능력을 초과하는 오염물질이 토양에 투입, 축적되면 동,식물뿐만 아니라 인간과 토양 생태계에 직·간접적인 위해를 일으키게 된다.²⁾ 더욱이 PAHs는 상대적으로 휘발성 및 용해도가 낮고, 미생물에 의한 분해가 어려운 유기오염물로 알려져 있어 이에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 PAHs로 오염된 토양시료를 채취하여 PAHs 분해능을 가진 균주를 분리한 후, 상기 균주를 동정한 다음 분리된 균주를 이용하여 2환-, 3환-, 4환-PAHs로 혼합된 오염물을 동시에 분해시키고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 균주의 분리

자연계에서 PAHs 분해균의 분리를 위해 PAHs를 포함하는 토양을 균 분리원으로 사용하였다. 균 분리에 사용된 배지는 다음과 같다. 배지(MSM)의 조성은 1L당 KH_2PO_4 3.4g, Na_2HPO_4 3.55g, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 1g, Hunter mineral base 10mℓ 이다. 균 분리용 토양1%(w/v)을 상기 배지 10mℓ에 yeast 1g과 함께 넣고, 균 성장은 탁도변화를 통해 확인하였다. 성장이 확인된 균주들은 다시 3회 계대배양 한 후 LB배지(1L당 tryptone 10g, yeast 5g, Nacl 5g)에서 도말하여 생성된 집락을 순수분리하여 선별하였다. 순수분리된 균들은 다시 0.1%(w/v)의 naphthalene 이 첨가된 최소염배지(MSM)에 접종하여 35°C, 150rpm의 호기적 조건에서 배양한 후 탁도와 색깔의 변화를 확인하여 PAHs 분해능을 가진 우수한 단일 균주를 선별하여 본 연구에 사용하였다.

2. 균주의 동정

PAHs 분해능이 우수한 균주에 관한 동정은 먼저 그람 염색을 통한 현미경상에서의 형태학적 관찰과 API 20E kit를 이용한 생화학적 특성을 검사하였으며, 분리 균의 형태는 전자현미경(SEM, DSM940A, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

3. 분리균주 *Pseudomonas* sp. KM1 에 의한 PAHs 의 분해능 분석

임의로 오염시킨 7종류의 혼합 PAHs의 분해능을 알아보는 것으로, 4.2ml vial에 초기농도 범위가 90~2400 $\mu\text{g}/\ell$ 인 PAHs(in methanol)를 넣은 후 시간에 따른 분해율을 액상크로마토그래피(HPLC)을 이용하여 분석하였다. 실험방법은 다음과 같이 실시하였다.

먼저 전 배양된 *Pseudomonas* sp. KM1를 포함하는 용액을 15ml centrifuge tube에 일정량 넣고, 3000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심 분리 후 상등액은 버리고 다시 멸균된 인산염완충액(PO_4^{2-} 20mM) 용액을 이용하여 기질로 이용되었던 나프탈렌을 3회 정도 세척하여 제거하였다.³⁾ 세척된 균주는 OD(600nm)값이 1.0 이상이 되도록 조절하고 다환 방향족 탄화수소로 오염된 4.2ml vial에 0.1ml씩 멸균된 syringe를 이용하여 접종하였다. 이 후 25 $^{\circ}\text{C}$, 150rpm에서 1일, 3일 또는 5일간 배양하고 원심분리한 후 HPLC 분석용 1ml vial에 옮겨 상등액의 PAHs의 농도를 HPLC(Supelcosil LC-PAH 15cm x 4.6mm(5 μm), acetonitrile:water(90:10), UV/VIS 254nm, flow rate 1.2ml/min)를 이용하여 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분리균주의 동정

본 연구에서 분리균주 KM1을 고체한천(LB)배지에서 배양한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 세포의 형태가 Figure 1와 같이 간균이었다. Table 1은 분리균주의 생리학적 성질을 조사한 결과로 Gram 음성이며, VP 시험 및 Oxidase 시험 음성, H_2S 를 생성하지 않았다. 이상의 형태 및 생리학적 특성을 토대로 하여 동정한 결과, *Pseudomonas* sp로 동정되어 분리균을 *Pseudomonas* sp. KM1으로 명명하였다.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolated strain KM1

Characteristics	isolated strain KM1
Morphology	
Gram strain	-
Shape	Rod
Oxidase	+
VP test	-
Gelatin liquefaction	-
Production of indole	-
Utilization of citrate	+
Urease	-
Arginine dehydrase	-
Ornithine decarboxylase	-
Lysine decarboxylase	-
Nitrate reduction	-
Production of H ₂ S	-
Acid form	
Glucose	+
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	-
Amygdalin	-
Arabinose	-

+ : positive reaction, - : negative reaction

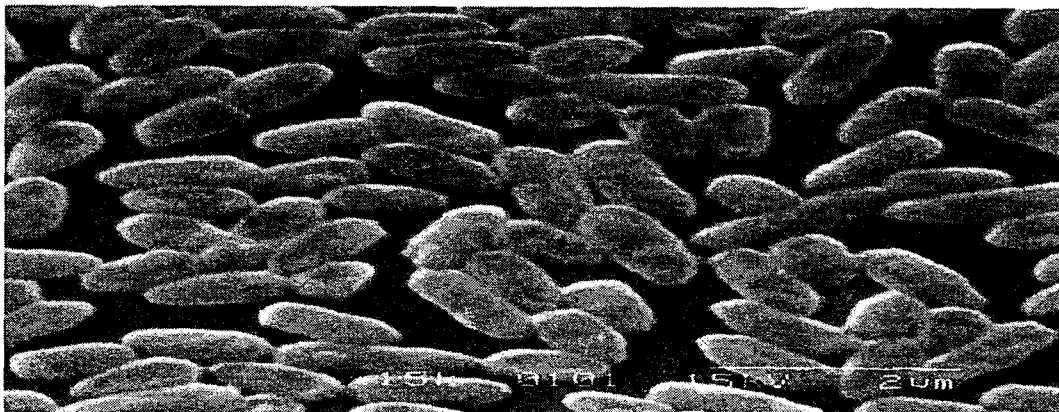


Figure 1. Scanning electron microscopy of isolated strain KM1

2. 분리균주 *Pseudomonas* sp.KM1의 PAHs(다환방향족탄화수소) 분해율 결과

Table 2 은 임의로 오염된 다환방향족탄화수소의 시간경과에 따른 분해율을 알아본 결과로 Flouranthene를 제외한 다른 PAHs의 경우 하루만에 100%의 높은 분해율을 나타내고 있다 (Figure 2). 반면 Flouranthene은 다른 오염물질의 분해율에 비해 초기 분해율은 낮지만, 시간이 지날수록 98%이상의 높은 분해율을 보여주고 있다. 즉, *Pseudomonas* sp. KM1은 짧은 시간동안에 혼합되어있는 다양한 PAHs 오염물질을 동시에 분해할 수 있는 것으로 나타났다.

Table 2. 시간에 따른 균주 *Pseudomonas* sp. KM1에 의한 PAHs의 분해율(%)

	1일	3일	5일
Napthalene	100	100	100
Acenaphthylene	100	100	100
Acenaphthene	100	100	100
Fluorene	100	100	100
Phenanthrene	100	100	100
Flouranthene	42.9	66.1	98.2
Pyrene	100	100	100

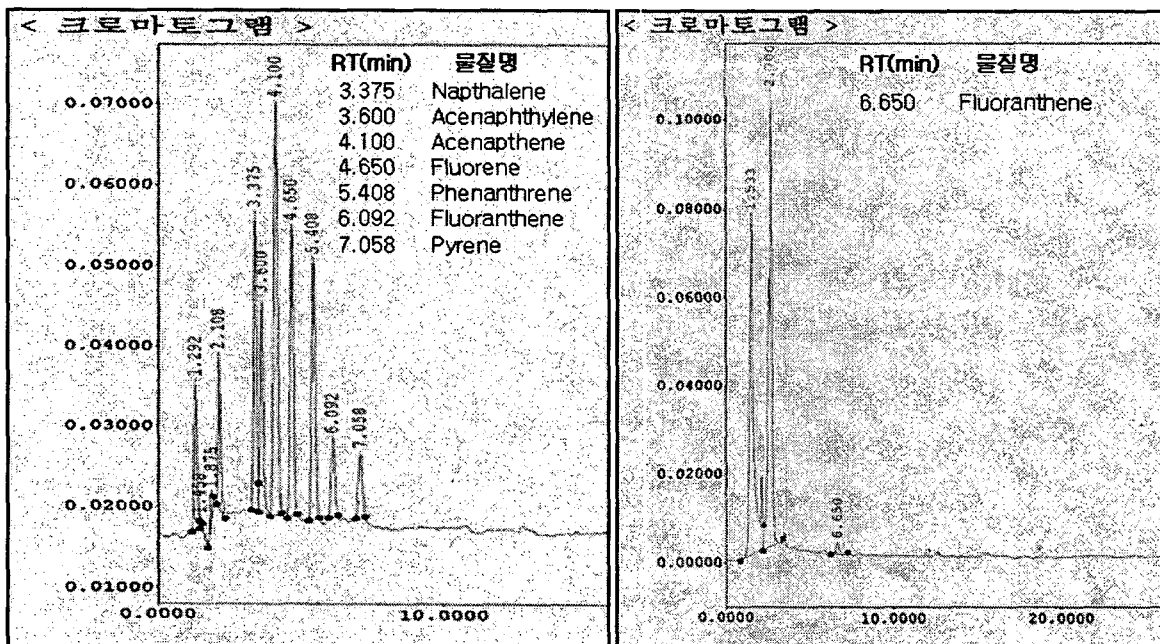


Figure 2. 5일후 *Pseudomonas* sp. KM1에 의한 7 PAHs에 대한 분해유무를 보여주는 HPLC 분석결과: 좌측은 대조군(균주를 넣지 않은 경우), 우측은 실험군(균주를 넣은 경우)

iv. 참고 문헌

1. 김태승, 신선경, 2001 “환경 중의 다환방향족탄화수소류의 배출 및 분석 현황”
2. 조용말, 조기철, 강지순, 정종현, 오광중, 2002 “회전생물반응기를 이용한 PAHs 오염토양 복원에 관한 연구”
3. JEONG-HUN PARK, XIANDA ZHAO, AND THOMAS C. VOICE, 2001 “Biodegradation of Non-desorbable Naphthalene in Soils”