

원유 분해 미생물의 분리, 동정 및 특성

오경택 · 이용운 · Motoki Kubo* · 김성준 · 정선용

전남대학교 공과대학 환경공학과
*입명관대학교 이공학부 화학생물공학과

(1999년 9월 16일 접수, 2000년 8월 11일 채택)

Isolation, Identification and Characterization of Bacteria Degrading Crude Oil

Kyoung-Taek Oh · Yong-Woon Lee · Motoki Kubo* ·
Seong-Jun Kim · Seon-Yong Chung

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University
**Department of Bio Science & Technology, Faculty of Science and Engineering,*
Ritsumeikan University, Japan

ABSTRACT

Crude oil-degrading bacteria were isolated from the sites contaminated by oil products. The isolates were identified as *Acinetobacter* sp. A132, *Pseudomonas putida* A422, *Pseudomonas aeruginosa* F721, F722, and *Xanthomonas maltophilia* B823. The results of investigation on the degradability of crude oil indicated that the strain A132 had the highest rate of 6.04 g/L · day. Also, the strain A132 and F722 almost degraded each of *n*-alkane compounds between *n*C₁₀ and *n*C₃₂. The strain A422 degraded benzene and xylene but not *n*-alkane. The strain B823 grew somewhat in crude oil but did not entirely degrade other substrates used in this study. The results of the GC/FID analysis on the degradability of the mixed *n*-alkane compounds showed that the strain F722 could degrade 100% of the compounds with *n*C₇~*n*C₁₀ and more than 80% of those with *n*C₁₁~*n*C₂₄.

Key Words : *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*,
Xanthomonas maltophilia, Crude Oil, Degradability, *n*-alkane

요약문

원유를 분해하는 미생물을 석유화합물로 오염된 토양으로부터 분리하였고, 이들은 *Acinetobacter* sp. A132, *Pseudomonas putida* A422, *Pseudomonas aeruginosa* F721, F722, 그리고 *Xanthomonas maltophilia* B823으로 동정되었다. 이들 미생물의 유류 분해율을 조사한 결과, strain A132가 6.04 g/L·day로 가장 높은 분해율을 나타내었다. 탄소수가 10개에서 32개 사이의 *n*-alkane 화합물을 기질로 사용하여 각각의 화합물에 대한 분해능력을 조사한 결과, strain A132와 F722는 대부분의 기질에 대하여 분해능력을 보였다. Strain A422는 *n*-alkane 화합물에 대한 분해능력은 높지 않았으나, benzene과 xylene을 분해하는 능력을 가지고 있었다. Strain B823은 원유에서는 조금 생장하였으나, 본 연구에서 사용한 다른 기질들에 대해서는 전혀 분해능력을 보이지 않았다. 한편, *n*-alkane 혼합화합물에 대한 분해율을 GC/FID로 분석한 결과, strain F722는 $nC_7 \sim nC_{10}$ 에서 100%, $nC_{11} \sim nC_{24}$ 에서는 80% 이상의 높은 분해율을 나타내었다.

주제어 : *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia*, 원유, 분해능력, *n*-alkane

1. 서론

원유는 원자력 발전, 석탄 다음으로 많이 사용되는 에너지원으로 전량 국외 수입에 의존하고 있으며, 해상 교통로를 이용하여 수송하고 있다. 또한 경제 성장과 비례하여 해상 물동량 역시 증가하고 있다.¹⁾ 하지만, 여러 가지 요인으로 인하여 해안오염 유출 사고가 많이 발생하고 있는 추세이다.²⁾ 국외 해양에서 일어난 대형 오염 사고들을 살펴보면 1989년에 일어난 미국의 Exxon Valdez호 사고, 1993년에 일어난 영국의 Braer 사고, 1996년의 Sea Empress호 사고, 프랑스의 Amoco Cadiz호 사고가 있다.³⁾ 국내 해안에서 발생된 유류 5,000 kL 이상의 유출 사고로는 1993년에 일어난 프론티어 익스프레스호 사고, 1995년의 씨프린스호 사고가 있다. 이러한 원유유출사고 발생시 그 대처방법을 보면, 기름회수 장치를 사용하여 회수하는 방법, 흡착포와 회수망 등을 사용하여 회수하는 방법, 유화제에 의한 분산처리 방법 등을 들 수 있다. 하지만 이러한 방법들은 일시적인 처리 방법에 불과하고 근본적인 처리방법이 되지 못한다. 벵커A와 C유와 같은 물질은 탄화수소의 탄소수가 많기 때문에 유처리제와 서로 혼합하게 되면 비중이 높아져 해저로 침전되어 2차적인 환경오염을 발생시키고, 또한 해저

에서 장시간 잔류하게 된다. 국내에서 1995년 7월 23일 여천군 남면 소리도에서 좌초된 씨프린스호에서 유출된 원유 및 연료유 5,035 kL가 인근 해안어장에 막대한 피해를 주었다. 해양유류오염의 영향은 짧게는 수년에서 길게는 수십 년까지 피해를 가져다 준다.⁴⁾ 또한, 기름 저장 탱크 주변 토양의 오염 역시 심각성을 주고 있다. 환경부의 '97년도 토양오염도 실태조사 현황' 자료에 의하면 전국 1만여개 주유소 및 지하 기름 탱크 시설중 1백 33곳이 토양 오염우려 기준을 초과해 시설개선 명령을 받은 것으로 나타났다.⁵⁾ 원유유출사고로 인한 해안오염과 원유제품 저장 탱크 및 주유소 주변의 오염된 토양을 정화하기 위한 방법으로 미생물을 이용한 생물정화(Bioremediation)법이 도입되기 시작하고 있다. 유류 분해 미생물로서는 *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas* 등^{6~8)}이 알려져 있고, 이들의 분해 특성에 관하여 어느 정도 연구가 진행되어 있다. 그리고 이 중에서 *Acinetobacter*, *Pseudomonas* sp.에 관해서는 유류 분해에 관련된 유전자에 관하여 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 유류로 오염된 지역을 정화시키는데 자연계로부터 우수한 원유 분해 미생물을 분리하고 분리된 미생물을 이용하여 생물정화기술에 도입

하는데 필요한 기초 연구로서, 유류를 탄소원으로 이용할 능력이 있는 미생물을 자연계로부터 분리하여 최적 성장조건을 조사하고, 여러 가지 탄화수소에 대한 기질분해 특이성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용배지

미생물을 분리하고 배양하기 위해서 C-배지를 사용하였다.⁹⁾ C-배지는 증류수 1 L당 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 2.93 g, K_2HPO_4 5.87 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 2 g, CaCl_2 0.03 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mg, yeast extract 0.2 g, trace elements solution 2 mL로 조성되었다. 그리고 pH는 7.0으로 조절되었으며, trace elements solution의 조성은 순수 1 L당 MoO_3 4 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 28 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, H_3BO_3 4 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg이다. 탄소원으로는 L 정유회사에서 원유(blended crude oil), 휘발유, 등유, 경유, 벙커A유, 벙커C유를 제공받아서 기질로 사용하였다. 그 외 기질로서는 자동차 폐유, 자동차엔진 폐오일, 그 밖의 탄화수소, 방향족화합물을 0.1에서 2.0% 사이에서 필요에 따라 조절하여 사용하였다. 순수분리를 위하여 Luria Broth(LB) 고체배지 및 액체배지(배지 조성: 증류수 1 L당 Trypton, 10 g, Yeast Extract, 5 g, NaCl, 10 g 고체배지의 경우 Agar 1.5%(w/v) 첨가)를 사용하였다.

2.2. 미생물 분리

주유소의 저장 탱크 주위, 세차장 주변의 토양, 그리고 하수 종말 처리장의 활성오니 등 여러 곳에서 시료를 채취하여 미생물의 분리시료로 하였다. 채취한 시료를 C-배지가 10 mL 들어 있는 시험관에 1%(w/v) 접종을 하고 탄소원으로서 원유를 1%(w/v) 첨가한 후에 35°C, 150 rpm으로 일주일간 진탕배양(SW-90F, Sangwoo Scientific Co.) 하여 육안으로 성장이 확인된 시험관에 한하여 같은 조건

의 신선한 배지에 옮겨, 같은 배양조건에서 재차 배양(subculture)을 하였다. 두 번 반복한 후 LB 고체배지에서 순수분리를 하였다. 순수분리된 미생물은 최종농도가 15~30%가 되도록 glycerol을 첨가하여 혼합한 후 -80°C에 보존하고, 사용 빈도가 많은 균은 LB고체배지에 배양한 후 냉장고에 보관하여 사용하였다. 분리된 미생물은 Bergy's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 동정하였다.¹⁰⁾

2.3. 최적 온도, pH 및 최적 기질농도 조사

분리된 미생물에 대하여 최적 온도, pH, 그리고 최적 기질농도를 조사하였다. 최적 온도 조사는 25, 30, 35, 45°C로 온도를 달리하여 pH 7.0, 150 rpm, 그리고 기질인 탄소원(blended crude oil)은 1%로 하였다. 최적 pH 조사는 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 하였고, 온도는 선행된 최적 온도 조사에서 미생물의 생장이 가장 높은 조건으로 하였다. 그리고 나머지 조건은 최적 온도 조사와 동일하게 하였다. 최적 기질농도 조사는 원유의 농도를 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%로 하여 조사하였다. 4시간마다 배양액 일정량을 취하여 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(Optical Density)를 측정하였다.

2.4. 석유화합물에 대한 분해능력조사

분리된 미생물에 대하여 원유, 벙커A유, 벙커C유, 휘발유, 등유, 경유와 자동차에서 나오는 여러 가지 오일인 자동차 폐유, 그리고 여러 가지 오일이 혼합되지 않은 페엔진 오일 등을 기질로 하여 분해능력을 조사하였다. 검사방법은 C-배지에 각 기질을 1%(w/v) 첨가하여 2.2. 미생물 분리와 동일한 조건에 7일간 배양하여 미생물의 성장여부로서 확인하였다.

2.5. 원유 분해율 조사

본 연구에 사용된 분해율 측정 방법으로 Chloroform-Methanol 추출법(크로메타법)을 사용하였다. 먼저 500 mL-플라스크에 C-배지 100 mL, 기

질(원유) 1%, 미생물 1%를 접종하여 30°C, 120 rpm에서 3일간 진탕배양을 한 후, chloroform-methanol 추출용매(체적비 3 : 1) 30 mL를 첨가하여 교반한 후, 1,500 rpm에서 7분간 원심분리기(J-61B Beckman)로 원심분리하여 하층의 chloroform-methanol층을 분리하여, 50 mL 원심분리관에 옮긴다. 다시 중간층을 다른 원심분리관에 옮겨 추출용매 5 mL를 첨가하여 교반한 후, 실온에서 몇 분간 정치한 후 chloroform-methanol 층을 취하여 최초의 50 mL 원심분리관에 첨가하고, 전량이 30 mL가 되도록 추출용매로 맞춘다. 잔존수분을 제거하기 위하여 Sodium sulfate 4 g을 넣어 1~4시간 방치한 다음 5 mL 취하여 칭량병에 넣는다. 칭량병을 50°C 항온하에서, 8시간 이상 후드내에 방치하여 chloroform-methanol을 증발시키고, 칭량병의 무게를 달아서 잔존유분 증량을 측정한다. 이렇게 얻어진 잔존유분 증량으로부터 분해율을 계산한다.

2.6. BTX 및 *n*-alkane에 대한 분해능 조사

Benzene, Toluene, Xylene 및 *n*-alkane 화합물(C₁₀~C₃₂)을 기질로 하여 분해능력을 조사하였다. 사용한 배지는 C-배지이고, 기질의 농도는 0.1%였다. LB 액체 배지에서 전 배양한 미생물을 1% 접종하였다. 배양시 휘발을 막기 위해서 screw capped test tube를 사용하였고, 배양조건은 35°C, 150 rpm에서 7일간 진탕배양한 후, 균의 성장여부로서 분해능력을 판단하였다.

2.7. GC/FID를 이용한 *n*-Alkane 화합물의 농도 분석

분리된 미생물의 *n*-alkane 화합물에 대한 분해 특성을 조사하기 위하여, 탄소수가 *n*C₆~*n*C₄₄의 *n*-alkane 표준용액(Petrocol 2887, Cat. No 4-8882, SUPELCO)을 이용하여 실험을 하였다. *n*-alkane 표준용액의 농도는 1%(w/v), 전 배양한 미생물 배양액의 농도를 1%(w/v)로 하여 C-배지에서 10일간 진탕배양하였다. 배양후 chloroform-methanol(3 : 1 v/v)로 추출하여 GC/FID(GC 8000 TOP, CE instruments, Italy)로 분석하였다. 분

석 조건은 Petrocol 2887 Capillary column(5 m × 0.53 mm ID, 0.5 μm film), Initial Oven Temp. 30°C, Final Oven Temp. 280°C, Temp. Rate 8°C/min, Injection Detector Temp. 280°C, Carrier Gas N₂-5 mL/min, Sample 0.5 μL, Split ratio 50 : 1이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 원유 분해 미생물의 분리 및 동정

여러 가지 환경으로부터 원유 분해 미생물을 검색한 결과 5종류가 분리되었다. 이들 미생물을 A132, A422, F721, F722, 그리고 B823으로 명명하였다. 이들 미생물은 Gram 염색시험에서 모두 음성을 나타내었고, 운동성을 가지고 있었다. 이들 미생물에 대하여 생물화학적인 실험을 하여 동정한 결과, strain A132는 *Acinetobacter* sp., strain A422는 *Pseudomonas putida*, strain F721, F722는 *Pseudomonas aeruginosa*, 그리고 strain B823는 *Xanthomonas maltophilia*로 판명되었다. 이들 미생물에 대한 물리적, 생물화학적인 특성을 Table 1에 나타내었다.

3.2. 최적 배양조건 및 원유 분해능 조사

분리된 각 미생물에 대하여 최적 온도, pH, 기질 농도에 대한 최적 성장조건과 원유의 분해능을 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. *Acinetobacter* sp. A132의 최적 배양조건은 35°C, pH 8, 그리고 2%의 원유 기질농도를 나타내었다. *P. putida* A422는 온도와 pH는 strain A132와 같았으나, 원유에 대한 최적 기질농도는 4%를 나타내었다. *P. aeruginosa* F721, F722는 같은 종이지만 서로 다른 특징을 보여주었다. 먼저 strain F721의 최적 성장조건은 25°C, pH 8, 원유 기질농도 2%를 나타내었고, strain F722는 35°C, pH 9, 원유 기질농도 2%를 나타내었다.

각 미생물에 대한 원유의 분해능을 조사한 결과, strain A132는 최적 배양조건에서 원유를 6.04

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strains

Characteristics	Isolated Strain				
	A132	A422	F721	F722	B823
Morphological					
Gram staining	-	-	-	-	-
Mobility	+	+	+	+	+
Physiological					
Orthonitrophenyl β -D-Galactopyranoside	-	-	-	-	+
Arginine Dihydrolase	-	+	+	+	-
Lysine Decarboxylase	-	-	-	-	+
Ornithine Decarboxylase	-	-	-	-	-
Simmons Citrate	+	+	+	+	+
H ₂ S Production	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	+	-
Tryptophane Desaminase	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	+	+	-	-	-
Gelatin Hydrolysis	+	-	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-
Melibionse	+	+	+	+	-
Amygdaline	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	-
Nitrite Production	+	+	-	-	-
Nitrogen Production	-	-	+	+	-
Oxidation	+	+	+	+	+
Fermentation	-	-	-	-	-
Oxidase	-	+	+	+	-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

g/L · day로 분해할 수 있는 능력을 나타내었다. 이와 같은 미생물은 원유로 오염된 지역의 bioremediation을 위해서 유용한 미생물로서의 이용가능성이 크다고 사료된다. 그 다음이 strain F721

Table 2. Optimal growth conditions of the isolated strains and degradability of crude oil

Strain	O.T. ¹⁾ (°C)	pH	C. ²⁾ (%)	Degradability (g/L · days)
A132	35	8	2	6.04
A422	35	8	4	0.48
F721	25	8	2	1.60
F722	35	9	2	0.83
B823	25	8	2	0.33

1) O.T. : optimal temperture

2) C. : concentration of crude oil(%)

(1.60 g/L · day), F722(0.83 g/L · day), A422 (0.48 g/L · day)의 순이었고, strain B823(0.33 g/L · day)이 가장 낮은 분해능력을 보였다.

3.3. 석유화합물에 대한 분해능력조사

동유, 경유, 휘발유, 병커A유, 병커C유, 자동차 폐유, 자동차엔진 폐오일 등을 기질로 하여 분리된 미생물에 대하여 분해능력을 조사하였다. 그 결과를 Table 3에 나타내었다. Strain A132는 경유와 자동차엔진 폐오일에서 좋은 분해능력을 보였고, strain A422는 동유, 경유, 휘발유, 병커A유, 병커C유에 대해 분해능력을 나타내었다. Strain F721은 동유와 경유에 대해서만 분해가능 하였고, 그 외의 기질에 대해서는 분해능력을 나타내지 않았다. Strain F722는 동유, 경유, 병커A유, 병커C유에 대하여 분해능력이 있는 것으로 조사되었다. 대부분 모든 미생물이 자동차 폐유에 대하여 분해능력을 나타내지 못하는 반면에 strain A132는 배양 6일째부터 분해능력을 나타내기 시작하였다. 이와 같이 분해능력에 있어서 차이를 나타내는 것은, 원유 자체가 여러 가지 화합물로 구성되어 있기 때문에, 이들 미생물들이 원유를 분해하는 능력을 가지고 있다고 하더라도, 원유의 구성성분 중에서 특정기질만을 선호 하면서 분해하고 있다는 것을 의미한다. 이와 같이 분해능력이 다양한 미생물들을 분리하여 미생물 library 혹은 미생물 혼합체를 구축하면, 원유 유출 사고 뿐만이 아니라, 주유소, 기름저장소 등과 같은 곳의 오염된 토양의 정화 및 자동차로부터 배출되는

Table 3. Degradability of oil products by the isolated strains

Strain	Substrate	Culture time (hr)						
		24	48	72	96	120	144	168
A132	Kerosene	-	-	-	-	-	-	-
	Diesel	-	+	+	+	++	++	++
	Gasoline	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-A	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-C	-	-	-	+	+	+	+
	Car's waste oil	-	-	-	-	-	+	+
	Car's waste engine oil	+	+	+	+	++	++	++
A422	Kerosene	+	+	+	+	+	+	+
	Diesel	-	+	+	+	+	+	+
	Gasoline	-	+	+	+	+	+	+
	Bunker-A	-	-	-	-	+	+	+
	Bunker-C	-	-	-	+	+	+	+
	Car's waste oil	-	-	-	-	-	-	-
	Car's waste engine oil	-	-	-	-	-	-	-
F721	Kerosene	+	+	+	+	+	+	+
	Diesel	+	+	+	+	++	++	++
	Gasoline	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-A	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-C	-	-	-	-	-	-	-
	Car's waste oil	-	-	-	-	-	-	-
	Car's waste engine oil	-	-	-	-	-	-	-
F722	Kerosene	+	+	+	+	++	++	++
	Diesel	+	+	+	+	++	++	++
	Gasoline	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-A	-	-	-	+	+	+	+
	Bunker-C	-	-	+	+	+	+	+
	Car's waste oil	-	-	-	-	-	-	-
	Car's waste engine oil	-	-	-	-	-	-	-

+ : good(O.D_{600nm}: 0.1~0.4), ++ : better(O.D_{600nm}: 0.5~1.0), +++ : best(O.D_{600nm} > 1.0), - : no growth

폐유의 생물학적 처리를 위해서도 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

3.4. BTX와 n-alkane 화합물에 대한 분해 능력 조사

석유의 증류공정에서 가장 많이 배출되는 방향족 화합물인 benzene, toluene, xylene, 그리고 원유의 주성분인 n-alkane 화합물을 기질로 하여 분리된 각 미생물의 분해능력을 조사하였다. n-alkane 화합물은 탄소수가 10~32개 사이의 것(15, 16, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30 제외)을 각각 사용하였다. 이들에 대한 결과를 Table 4에 나타내었다. Strain A132는 n-alkane 화합물의 거의 대부분을 분해할 수 있었고, 특히 탄소수가 12~19개의 n-alkane 화합물에서 양호한 성장을 보였다. 그리고 strain F721, F722도 n-alkane 화합물의 분해능력을 나타내었다. 그러나 strain A422, B823은 n-alkane 화합물을 분해하지 못했다. Strain A422는 benzene과 xylene에 대한 분해능력을 나타내었다. Strain A422는 *Pseudomonas putida*로 동정되었고, 이 미생물은 benzene, toluene, xylene과 같은 방향족화합물을 분해한다는 보고가 있다.¹¹⁾ 본 연구에서도 n-alkane에 대한 분해능력은 나타나지 않았으나, benzene과 xylene은 분해하였다. 따라서 본 미생물은 원유의 구성성분 중에서 benzene ring을 가지고 있는 화합물에 특이적으로 작용을 하여 탄소원을 획득하고 있다고 사료된다. Strain B823의 경우, 본 연구에서 사용한 기질을 거의 분해하지 못하지만, 원유를 탄소원으로 하여 생육이 가능하다. 이러한 이유는 원유의 구성성분 중에서 대표성이 없는 화합물, 즉 BTX와 n-alkane 이외의 화합물에 대한 특이성이 강한 것으로 사료된다. 이 미생물의 이와 같은 기질 특이성이 밝혀진다면, 원유로 오염된 지역의 보다 더 완전한 생물정화가 가능해 질 것으로 사료된다.

3.5. GC/FID를 이용한 n-alkane 화합물 농도 분석

각각의 n-alkane 화합물에서 성장이 좋은 strain A132, F721, 그리고 F722를 사용하여 nC6~nC44까지 함유된 n-alkane 표준용액(Petrocol 2887, SUPELCO)을 기질로 사용하여 배양한 후

Table 4. Degradability of BTX and *n*-alkane by the isolated strains

Substrate	Strain				
	A132	A422	F721	F722	B823
Crude Oil	+++	++	+++	+++	++
Benzene	+	+	-	-	-
Toluene	-	-	-	-	-
Xylene	-	+	-	-	-
<i>n</i> -C ₁₀	-	-	+	++	-
<i>n</i> -C ₁₁	+	-	+	+	-
<i>n</i> -C ₁₂	+++	-	+	++	-
<i>n</i> -C ₁₃	+++	-	+	+	-
<i>n</i> -C ₁₄	+++	-	+	+	-
<i>n</i> -C ₁₇	+++	-	+	+	+
<i>n</i> -C ₁₈	+++	-	+	++	-
<i>n</i> -C ₁₉	+++	-	+	++	-
<i>n</i> -C ₂₀	+	-	-	+	-
<i>n</i> -C ₂₂	+	-	-	-	-
<i>n</i> -C ₂₃	+	-	+	+	-
<i>n</i> -C ₂₈	++	nt	-	-	nt
<i>n</i> -C ₃₂	+	nt	-	-	nt

+ : good(O.D_{600nm}: 0.1~0.4), ++ : better(O.D_{600nm}: 0.5~1.0), +++ : best(O.D_{600nm} > 1.0), - : no growth, nt : no test

chloroform-methanol(3:1, v/v)로 추출하여 분해 능력을 GC/FID로 분석하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 10일간 배양한 후의 분석 결과, strain F722의 분해능력이 가장 뛰어난 것을 알 수 있다 (Fig. 1(d)). 이들 세 미생물의 분해능력을 Table 5에 나타내었다. 미생물 F722는 탄소수가 10개 이하의 *n*-alkane에 대하여 100%의 분해율을 보였고, 탄소수가 많은 것에 대하여도 80% 이상의 높은 분해율을 나타내었다. 그러나 *n*-alkane의 개개의 화합물에 대한 분해능력의 조사에서, 7일간 배양에서는 strain A132가 우수한 것으로 나타났다(Table 4). 이것의 차이점에 관해서는 정확하게 알 수는 없지만, *Pseudomonas*속의 경우 어떤 특정기질을 분해할 경우 특정기질의 분해산물에 의해서 분해효소 및 관련 유전자가 유도된다고 하는 보고가 있다.⁹⁾ 따라서 strain F722의 세포내에서 이와 같은 현상이 일어난다고 가정하면 배양 7일 이후에 분해산물에 의해서 다른 기질을 분해할 수 있는 효소가 유도되고, 그 결과 분해력이 향상되었을 가능성이 크다고 사료된다. 이러한 유도성 분해산물, 유도성 효소,

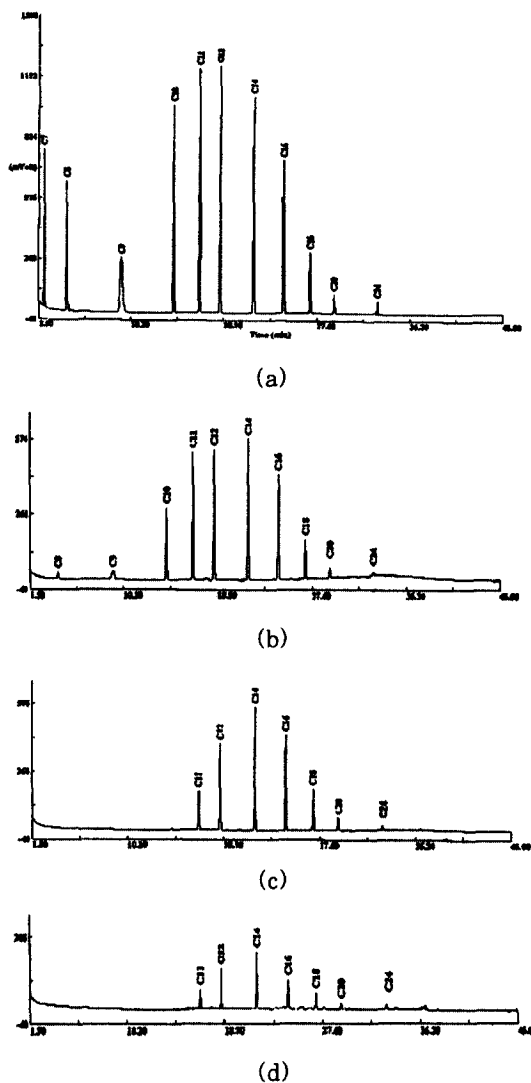


Fig. 1. Degradation of *n*-alkane compounds by the isolated strains; (a) standard *n*-alkane compound, (b) A132: 35°C, pH 8, 150 rpm, substrate 1%, strain 1%, and culture for 10 days, (c) F721: 25°C, pH 8, 150 rpm, substrate 1%, strain 1%, and culture for 10 days, (d) F722 : 35°C, pH 9, 150 rpm, substrate 1%, strain 1%, and culture for 10 days.

그리고 이들과 관련된 유전자에 관한 연구가 수행되어진다면, 분해미생물이 가지고 있는 기능의 인위적인 조절이 가능하게 될 것이고, 그리고 분해능력이 우수한 미생물의 육종이 가능할 것으로 사료된다.

Table 5. Degradation rate(%) of *n*-alkane compounds by the isolated strains

<i>n</i> -alkane	Strain		
	A132	F721	F722
<i>n</i> -C ₇	100	100	100
<i>n</i> -C ₈	97	100	100
<i>n</i> -C ₉	91	100	100
<i>n</i> -C ₁₀	78	100	100
<i>n</i> -C ₁₁	66	89	96
<i>n</i> -C ₁₂	66	75	91
<i>n</i> -C ₁₄	58	59	86
<i>n</i> -C ₁₆	56	56	90
<i>n</i> -C ₁₈	58	51	84
<i>n</i> -C ₂₀	65	52	82
<i>n</i> -C ₂₄	78	51	75

4. 결 론

석유화합물로 오염된 토양으로부터 원유를 분해하는 미생물을 분리하여 동정 및 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 혼합된 crude oil를 기질로 한 원유 분해 미생물을 검색한 결과 5종류의 미생물이 분리되었다. 이들을 strain A132, A422, F721, F722, 그리고 B823으로 명명하였으며, 명명된 미생물을 동정한 결과, strain A132는 *Acinetobacter* sp., strain A422는 *Pseudomonas putida*, strain F721, F722는 *Pseudomonas aeruginosa*, 그리고 strain B823는 *Xanthomonas maltophilia*로 판명되었다. 이 미생물들의 최적 성장조건은 A132는 35°C, pH 8, 그리고 2%의 원유 기질농도로 조사되었다. Strain A422는 온도와 pH는 strain A132와 같았으나, 원유 기질농도 4%가 최적 농도로 조사되었다. Strain F721, F722는 같은 종이지만 서로 다른 최적 배양조건을 나타내었다. Strain F721 경우 최적 조건은 25°C, pH 8, 원유 기질농도 2%를 나타냈으며, strain F722는 35°C, pH 9, 원유 기질농도 2%를 나타내었다. 이들의 원유 분해율 조사 결과, strain A132는 최적 성장조건에서 원유 기질농도 2%로 하였을 때, 6.04 g/L ·

day으로 분리된 미생물 중 가장 높은 분해율을 나타내었다.

- 2) 원유제품 및 자동차 폐유, 자동차엔진 폐오일 등을 기질로 하여 분리된 미생물의 분해능력을 조사한 결과, strain A132는 경유와 자동차엔진 폐오일에 대한 높은 분해능력을 보였으며, 접종된 미생물의 대부분은 자동차 폐유에 대하여 분해능력을 나타내지 못하는 반면에 strain A132 미생물은 배양 6일째부터 분해능력을 나타내기 시작하였다. Strain A422는 원유제품에 대하여 분해능력을 나타냈으며, strain F721은 동유와 경유에 대해서만 분해가능성을 나타내었다. Strain F722는 동유, 경유뿐만 아니라 병커A유, 병커C유에 대해서도 분해능력을 나타내었다.
- 3) BTX와 *n*-alkane 화합물에 대한 분해능력을 조사한 결과, strain A422는 *n*-alkane 화합물에 대하여 분해능력이 미비하게 조사되었으나, benzene과 xylene에 대해서는 분해하는 능력을 가지고 있었다. 그리고 strain A132, F722는 탄소수가 10개에서 32개 사이의 *n*-alkane 화합물을 기질로 사용하여 각각의 화합물에 대한 분해능력을 조사한 결과에서 거의 대부분의 기질에 대하여 분해능력을 보였다.
- 4) GC/FID을 이용한 *n*-alkane 화합물의 농도를 분석한 결과, strain F722는 *n*C₇~*n*C₁₀에 대해 100%, *n*C₁₁~*n*C₂₄에서는 80% 이상의 높은 분해율을 나타내었다. 그러나 개별항목의 *n*-alkane를 기질로 사용하였을 때는 7일간 배양에서 strain A132가 우수한 것으로 조사되었다.

참 고 문 헌

1. 강창구, "국내 해양유류 오염사고 현황 및 대책," *침단 환경기술*, 6(2), 2~15(1998).
2. 이달석, "우리나라 석유 수유 구조의 추이와 전망," *계간 석유*, 63, 4~13(1995).
3. Boehm, P. D., Page, D. S., and Bence, A. E., "Study of the Fates and Effects of the

- Exxon Valdez Oil Spill on Benthic Sediments in Two Bays in Prince William Sound, Alaska. I. Study Design, Chemistry, and Source Fingerprinting," *Environ. Sci. Technol.*, **32**(5), 567~676(1998).
4. 강찬수, 대형 기름유출사고 속출, 중앙일보, 10면(1995, 12, 10).
 5. 양영유, 주유소 주변 토양 벤젠 등 '기름범벅', 중앙일보, 10면(1998, 10, 26).
 6. 차재영, 정선용, 조영수, 최용락, 김범규, 이영춘, "해양에서 분리된 *Klebsiella* sp. KCL-1에 의한 원유분해 특성의 규명," 한국산업미생물학회지, **27**(6), 452~457(1999).
 7. Atlas, R. M., Principles of microbiology, 2nd Ed., Wm. C. Brown Publishers, pp. 809~811(1996).
 8. Atlas, R. M. and Cerniglia, C. E., "Bioremediation of Petroleum Pollutants Diversity and Environmental Aspects of Hydrocarbon Biodegradation," *BioSci.*, **45**(5), 332~338(1995).
 9. Na, K. S., Lee, Y. W., and Chung, S. Y., "Isolation and characterization of polychlorinated biphenyls(PCBs) degrading bacteria from a municipal sewage treatment plant," *Environ. Eng. Res.*, **3**(2), 67~78(1998).
 10. Krieg, N. R., Holt, J., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Volume 2(1986).
 11. Syoko, K. N., Keiki, S., and Yuki, Y. I., "Construction of bacterial consortia that degrade Arabian Light Crude Oil," *J. Ferment. Bioeng.*, **82**(6), 570~574(1996).
 12. Purohit, H. J., Chhatre, S., Kapley, A., Khanna, P., and Chakrabarti, T., "Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium," *Bioresour. Technol.*, **67**, 241~245(1999).