

디젤유 분해균주의 특성 및 토양배양

안민정 · 한윤전 · 임현섭¹ · 최기현¹ · 권오범¹ · 최영출 · 정병철*

명지대학교 생명과학과, ¹주식회사 효성 화학연구소 BIO연구팀

디젤유로 오염된 토양으로부터 분리한 디젤 분해 우수 균주를 HS 균주로 명명하고, 각 균주의 디젤유 분해능과 특성을 조사하였다. 분리된 HS 균주의 동정결과 HS1 균주는 *Acinetobacter* sp., HS2, HS3 균주는 *Pseudomonas* sp. 로 동정되었다. 최소배지에서 디젤유 2%, pH 7.0, 25°C, 교반속도 200 rpm의 조건으로 5일간 배양한 결과 HS1 균주는 88% 이상의 높은 분해효율을 나타내었다. 소수성과 유화능의 측정 결과 HS1 균주가 가장 높은 소수성을 나타내었고, 유화능은 HS3 균주가 가장 높게 나타났다. 위의 결과를 토대로 액체 배양시 분해효율이 가장 높은 HS1 균주를 선택하여 토양배양을 실시한 결과 30일이 경과된 후 80% 이상의 디젤유 분해효율을 나타내었고, 디젤유 분해효율은 미생물 활성과 비례하는 것으로 확인되었다. 따라서 신규 분리된 디젤유 분해균주는 높은 디젤유 분해능과 토양 생존능으로 실제 유류오염 환경에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

Key words □ bioremediation, diesel oil, emulsifying activity, hydrophobicity, microcosm

산업의 급성장으로 유류의 사용량이 폭발적으로 증가하고 있다. 이로 인해 유류 유출사고의 발생빈도 또한 급증하고 있는 것이 사실이다. 유류 유출사고가 발생하면 방제작업으로 일부분이 제거되지만 대부분은 환경내에 잔류하여 물리학적, 화학적, 생물학적 기작에 의해 복합적으로 분해가 일어난다(1, 2). 그 동안 사용되었던 유류 오염토양의 정화기술 방법은 그 자체가 많은 문제점을 지니고 있다. 예를 들어 흔히 사용되고 있는 물리화학적 유출유 처리방법만으로는 완전한 효과를 기대할 수 없을 뿐만 아니라 방제 비용이 많이 들고, 화학물질인 유류 분산제의 경우 독성으로 인한 2차 오염이 문제점으로 대두되고 있다. 화학적 방법인 소각법은 공기를 오염시키고, 해양투기는 해양 오염과 해양 생태계를 파괴시키는 문제를 야기하며, 지하 혹은 지상매립은 유독가스의 발생과 지하수의 오염을 유발시킨다(2). 세척에 의한 방법으로 화학합성 유화제를 이용한 세척, 미생물 유화제를 이용한 세척, 전극과 유화제를 이용한 토양 세척 등의 방법이 있다(3, 7, 22, 29). 그렇지만 오염 유류의 완전한 분해가 아닌 세척에 의한 제거로서 2차적인 처리의 문제점이 있으며, 이로 인하여 생물학적인 방법이 중요시 되고있다(3, 7, 22, 29).

토양오염은 대기오염이나 수질오염에 비하여 확산속도는 비교적 작으나 인근지역에 미치는 영향은 매우 지속적이며, 많은 경우 지하수 오염과 연계되어 예상보다 광범위한 지역에 영향을 미칠 수 있다(12, 13, 16, 21, 26, 27). 토양오염의 원인이 되는 물질은 매우 다양하나, 국내의 경우 주유소와 석유정제 공장지역 토양의 유류 오염이 심각한 문제로 인식되고 있다. 일반적으로 유류는 원유 또는 정제된 석유제품들의 형태로 생산, 운반 저장

되는 과정에서 자연환경에 유출된다. 예를 들어 주유소 토양은 가장 많이 취급되는 휘발유와 경우에 의해 오염되었을 가능성이 매우 높다(13).

디젤유는 일반적으로 비점 190~350°C, 비중 0.82~0.84정도이고 탄소수가 15~30정도인 긴 사슬 탄화수소 혼합물이며 주된 구성성분은 포화탄화수소로 74~79%(w/w)를 차지한다. 디젤유는 가솔린에 비해 휘발성이 낮고 비중 및 점도가 큰 물질이기 때문에 토양 내에서의 이동성이 작은 편이며, 친수성 및 물에 대한 용해도가 낮아 기존 물리화학적 처리방법으로는 토양 입자로부터의 제거가 용이하지 않다. 그러나 최근 연구되고 있는 유류 오염 토양의 생물학적 처리는 기존의 물리화학적 방법과는 달리, 토양 내 디젤유를 미생물에 의해 분해하기 때문에 2차 처리에 소요되는 비용과 오염을 줄일 수 있어 국내외에서 활발히 연구되고 있다(12, 13, 16, 21, 26, 27).

본 연구에서는 디젤 오염토양의 정화를 위하여 디젤분해능이 우수한 균주를 분리하고, 분리 균주의 특성 파악과 더불어 최적 유류분해 조건을 파악하여 디젤 오염환경에의 생물학적인 정화를 위한 기초적인 데이터를 얻고자 하였다. 또한 환경에 적용했을 경우 효과를 확인하고자 실제환경을 모사한 환경을 조성하여 디젤유의 제거능을 확인하는 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

본 연구에서는 36개 지역의 디젤 오염토양 시료를 채취, 농화배양을 실시하여 디젤 분해능이 있고 높은 유화활성을 나타내는 총 150여 균주를 분리하였다. 이들 균주를 디젤유 최소배지에 접종하여, 최종적으로 디젤유 분해능이 높은 3개의 균주를 선별하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-330-6196, Fax: 031-335-8249
E-mail: bcjeong@mju.ac.kr

이들 균주를 HS1, HS2, HS3라 명명하였고 본 연구에 이용하였다.

분리균주의 동정을 위하여 Biolog(metabolic fingerprint) assay와 균체지방산 조성 분석, 16S ribosomal DNA 염기서열 분석을 실시하였다. Biolog assay의 경우 시험균주를 BUGM agar (Biolog Universal Yeast Agar, BIOLOG Inc., USA.)에 접종하여, 배양한 균체 현탁액을 Biolog GN plate에 150 µl/well 씩 접종, 배양한 후 ELISA reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA.)를 이용, data library (Biolog, Inc.)와 비교 분석하였다. 균체지방산 조성 분석은 배양된 균체를 saponification, methylation하여 메틸화 된 균체지방산(fatty acid methyl esters; FAMES)을 분석하였다. 메틸화된 균체지방산은 GC (HP 6890, Hewlett packard, USA.)를 사용하여 microbial identification system으로 동정하였다. 16S ribosomal DNA 염기서열 분석을 통한 동정은 forward primer 로 5'-CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'를, reverse primer로는 5'-GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC-3'를 사용, PCR을 실시하고, 염기서열 분석과 BLAST 검색을 통해 동정하였다.

균주배양

균주의 배양은 복합배지인 TSB (tryptic soy broth, Difco)를 사용하였고, 액체배지에서의 디젤분해능을 측정하기 위해서는, 탄소원으로 디젤유가 첨가된 최소배지를 사용하였다. 최소배지의 조성은 NH₄Cl 0.5 g/L, Na₂HPO₄·7H₂O 1.89 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L로 20 ml의 배지에 디젤유는 2%(v/v)로 첨가하였으며, 모든 배지는 121°C, 15분간 가압멸균하여 사용하였다. 각각의 균주는 TSB에서 12시간동안 배양한 후 최소배지에 1%(v/v)로 접종, 25°C 200 rpm으로 5일간 배양한 후 결과를 분석하였다. 균주의 성장은 배양액을 96 well plate에 200 µl씩 분주, ELISA reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

디젤유 분해능의 확인

디젤유의 분해능 확인을 위해 배양액 20 ml에 n-hexane 20 ml을 가하여 배양액 속의 잔류 디젤을 추출하였다. 배양액과 n-hexane을 30초간 강하게 교반하고 9,297 g에서 원심분리 후 분리된 n-hexane층을 tube에 담아 65°C에서 n-hexane을 증발시켰다. 이후 tube의 무게를 측정, 잔류된 디젤유의 무게를 환산하는 partiton gravimetric method(Standard methods, 5520B)와 GC(HP 6890)를 사용하여 분석하였다. GC 분석조건은 FID (Flame Ionization Detector) detector, HP-1 capillary column (crosslinked methylsiloxane, 30 m (length)×0.32 mm (φ)×0.25 µm (film thickness)), injector temperature 250°C, detector temperature 290°C, rate 30°C/min, hold time 295°C에서 10분, 초기온도 50°C에서 3분, carrier gas는 He, flow rate은 54.0 ml/min으로 분석하였다. 분해효율은 균을 접종하지 않고 배양한 대조구와 비교하여 제거된 디젤유의 양을 백분율로 나타내었다.

균주의 유화능과 소수성

유화능(emulsifying activity)은 n-hexadecane을 유화기질로 이용

하여 측정하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에서 16,920 g으로 5분간 원심분리한 상층액 200 µl와, 150 µl의 buffer (50 mM Na-citrate buffer, pH 4.0), 50 µl의 n-hexadecane으로 반응액을 조성한다. 이후 반응액을 30초 동안 강하게 교반한 후 300 µl씩 96-well plate에 분주하여 유화활성을 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 소수성(hydrophobicity)은 n-hexadecane을 기질로 사용하여 BATH (bacterial adherence to hydrocarbon) 방법을 이용, 세포의 소수성을 백분율로 나타내었다(23, 29).

균주의 특성 확인

배양조건 변화에 의한 디젤유 분해능 확인을 위하여 pH (5.0, 7.0, 9.0)에 따른 디젤유 분해능을 확인하였다. 각각의 배양 pH는 50 mM의 zwitterionic buffer (pH 5; MES, pH 7; MOPS, pH 9 TRIS)를 이용하여 보정한 후 배양하였다. Branched alkane에 대한 분해능을 확인하기 위해서 branched alkane의 대표물질로 C19인 pristane을 최종 2%(v/v)로 첨가하였으며, 잔류 pristane의 양은 GC로 잔류 디젤의 분석방법과 동일한 조건에서 정량 분석하였다.

PAH(polycyclic aromatic hydrocarbon)의 분해능 확인

PAH의 분해능 확인을 위해서, 대표물질로 fluorene, phenanthrene, anthracene, pyrene을 ethyl acetate에 용해시킨 후 최종 200 µg/L의 농도로 최소배지에 첨가하여 10일간 배양하였다. 양성 대조구로 PAH 분해능이 높다고 알려진 곰팡이 균주인 *Phanerochaete chrysosporium* PSBL-1을 이용하였고, 배양액의 잔류 PAH 정량은 acetonitrile을 배양액에 75%가 되도록 첨가하여 분해되지 않은 PAH를 용해시킨 후 HPLC system (Spectra system, Thermo separation products, USA)을 이용하여 정량 분석하였다. C₁₈ Vydac column (15 cm×4.5 mm ID, 5 µm)을 이용하여, 분석은 이동상 75% acetonitrile, 유속 1 ml/min, 검출기 254 nm의 조건에서 20분간 실시하였다. 제거된 PAH의 양은 균을 접종하지 않은 대조구의 잔류 PAH 농도와 비교하여 산출하였다.

토양 시료 채취 및 분석

본 실험에서 사용한 토양은 경기도 용인시 명지대학교 야산 50 cm 깊이에서 채취하였으며, 내경 1.19 mm sieve를 이용하여 입자의 크기를 고르게 하였다. 토양의 특성은 총 유기물 함량, 수분 보유능 그리고 pH를 측정하였다. 총 유기물 함량은 토양 시료에 함유된 수분을 75°C의 건조기에서 12시간 이상 건조시킨 후, 일정 토양시료가 들어있는 도가니를 전기로 (High temp muffle furnace, Phillip, USA)에 넣어 500°C로 가열하고 매 두 시간 간격으로 도가니를 꺼내어 방냉하여 무게를 측정하였다. 위의 과정을 반복하여 무게의 변화가 없을 때까지(4~5시간) 실행하여 유기물 함량을 측정하였다. 수분 보유능(Water Holding Capacity, WHC)은 Kirsten의 방법으로 측정하였다(10). 토양의 pH는 100 ml flask에 토양 50 g과 50 ml의 증류수를 넣고, 1시간 동안 교반 후 측정하였다.

토양배양

배양에 사용한 균주는 분해능이 가장 높게 측정된 HS1 균주를 사용하였다. 50 g의 멸균된 토양에 2%(w/w, 675 µl)의 디젤유를 분주하여 분해능을 확인하였으며, 균주의 접종은 TSB에서 12 시간 배양한 균주를 16.920×g에서 10분간 원심 분리한 후 최소 배지로 현탁하여, 토양수분 보유능(0.58 ml/g soil)의 40%가 되도록 토양과 고르게 혼합하였다. 본 실험에서 사용한 토양의 pH는 4.17의 산성도를 나타내어 토양 10 g당 CaCO₃를 100 mg 첨가하여 pH를 7에 가까운 중성을 유지시켰다. 배양은 실온에서 29일간 실시하였다. 대조군으로 균을 접종하지 않은 최소배지를 동량으로 혼합한 후 동일한 조건에서 배양하였다.

토양시료의 디젤유 추출 및 분해능 측정

잔류 디젤의 양을 분석하기 위해서, 배양중인 토양시료 5 g을 취한 후, 20 ml의 hexane을 첨가하여 sonicator (Branson Sonifier 450, USA)를 이용, 3분간 2회 sonication (460 W/cm²)하였다. 이후 hexane층을 취하여 32,540 g에서 10분간 원심분리하여, 잔류 디젤량을 GC로 분석하였다.

미생물 활성도 측정

미생물의 활성도 측정에는 INT (2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride)를 이용하였다(2). 토양시료 0.2 g과 0.88 mM NADH 50 µl, 0.02% nalidixic acid 200 µl, 0.2% INT 200 µl, 0.4 M Tris-Cl (pH 7.0) 100 µl를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 5,922g에서 15분간 원심분리하여 현탁된 세균을 침전시켜 상등액을 제거하였다. Pellet에 96% methanol 1 ml을 넣고, 교반하여 세포내에 축적된 INT-formazan을 추출하였다. 추출된 INT-formazan은 540 nm의 파장에서 ELISA reader를 이용하여, 측정값을 미생물의 활성도로 나타내었다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

분리균주 HS1, HS2, HS3의 Biolog (metabolic fingerprint)분석 결과 HS1 균주의 경우 *Acinetobacter calcoaceticus*와의 유사성이 43%로 나타났으며, HS2 균주는 *Pseudomonas aeruginosa*와 유사성이 53%로 나타났다. HS3 균주의 경우 *Pseudomonas fluorescens*와의 유사성이 53%로 나타났다.

분리균주의 균체지방산 분석결과 HS1 균주는 C_{18:1}(39.19%), C_{16:0}(23.79%), summed feature 3[(15.66%)(12:0 alde or C_{16:1} ISO/C_{15:0} iso 2OH)]가 주성분으로서 *Acinetobacter*속의 특징을 나타냈으며, HS2 균주는 summed feature 3[(36.41%)(C_{16:1} ISO/C_{15:0} iso 2OH)], C_{16:0}(27.50%), C_{18:1}(17.04%)가 주요 성분으로 *Chromobacterium*/*Pseudomonas*속의 특징을 나타내었다. HS3 균주는 summed feature 3[(38.47%)(C_{16:1} ISO/C_{15:0} iso 2OH)], C_{16:0}(27.49%), C_{18:1}(16.55%)가 주성분으로서 *Chromobacterium*/*Pseudomonas* 속의 특징을 나타내었다.

분리균주의 16S rDNA 분석 결과 HS2 균주의 경우 *Pseudomonas*

putida 균주와 유의성이 높게 나타났으며(BLAST homology search score; 938), HS3 균주의 경우 *Pseudomonas borealis* 균주와 유의성이 높게 나타났으며(BLAST homology search score; 900). 따라서 두 균주 모두 *Pseudomonas* 속으로 동정하였다. 또한 HS1 균주에 대한 16S rDNA 분석결과 *Acinetobacter calcoaceticus* 균주와 유의성이 높게 나타났으며(BLAST homology search score; 837). 따라서 HS1 균주는 최종적으로 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정하였다.

분리균주의 특성

분리된 HS 균주의 소수성을 측정한 결과 HS1>HS2>HS3 순서로 소수성이 높게 나타났으며, 유화능은 이와 반대로 HS3>HS2 >HS1의 순서로 나타났다(Table 1). HS1균주의 경우 거의 100%에 가까운 소수성을 나타냈는데 이러한 특성은 각각의 균주가 디젤 분해 양상을 결정하는 요인인 것으로 생각된다. 즉 소수성이 높은 HS1 균주의 경우 세포 자체의 소수성으로 디젤유와 직접 접촉함으로써 디젤유를 탄소원으로 이용하는 것으로 보였고, 유화능이 높은 HS3 균주의 경우는 유화제 분비를 통해 디젤유를 작게 분산시켜 탄소원으로 이용하는 것으로 보여진다. HS2 균주는 다른 두 균주의 중간적인 형태를 나타내는 것으로 보여진다(Table 1). 실제로 균주 배양액의 현미경관찰 결과 HS1 균주의 경우 배양액에서보다 분해되지 않은 디젤유에 부착되어 있는 상태로 관찰되는 것을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

분리된 HS 균주의 디젤유 분해양상을 확인하기 위해 GC를 통한 잔류 디젤의 분석결과 세 균주 모두 디젤유의 탄소사슬의 길이에 관계없이 모든 종류의 지방족 탄화수소에 대해 분해활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 HS1 균주가 가장 높은 디젤유 분해효율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 각 균주의 배양조건을 최적화하기 위해 pH에 따른 디젤 분해효율을 확인한 결과 HS1, HS2 균주는 pH9의 높은 pH에서의 분해활성은 낮게 나타난 반면, HS3는 pH5의 산성 pH에서 분해활성이 매우 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Table 2). 각 균주를 혼합

Table 1. Hydrophobicity and emulsifying activity in HS strains

Strain	Hydrophobicity(%)	Emulsifying activity
HS1	98	0.11
HS2	53	0.24
HS3	46	0.74

Table 2. Diesel oil removal rate by HS strains at various pH

Strains	Diesel oil removal (%)		
	pH 5	pH 7	pH 9
HS1	90	92	70
HS2	64	57	24
HS3	80	52	64

pH was adjusted with 50 mM zwitterionic buffer (pH 5: MES, pH 7: MOPS, pH 9: TRIS). Measured pH after 5 day cultivation was adjusted pH±0.2.

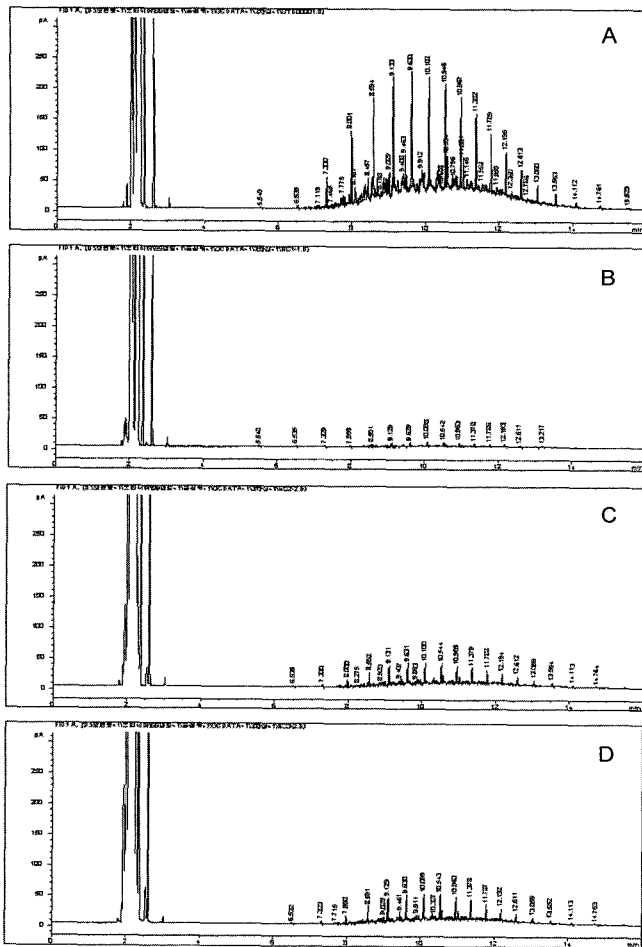


Fig. 1. Gas chromatography profile of residual diesel oil in HS strains culture. (A) No inoculation; (B) HS1; (C) HS2; (D) HS3.

Table 3. Co-cultivation result of HS strains

Mixed strain	Diesel oil removal(%)	Emulsifying activity
HS1, HS2	68±21	0.16
HS1, HS3	62±16	0.40
HS2, HS3	30±27	0.40
HS1, HS2, HS3	28±15	0.97

배양하여 각 균주와의 상호 관계에 따른 디젤 분해양상을 확인한 결과 혼합배양을 한 모든 경우 단독배양의 경우에서 보다 낮은 분해양상을 나타내었으며, 세 균주(HS1, 2, 3)를 모두 혼합하여 배양하였을 경우 배양액이 매우 높은 유화활성을 나타내는 반면 디젤유의 분해활성은 가장 낮은 28%의 디젤유를 분해하는 결과를 확인할 수 있었다(Table 3). 이러한 결과는 고 등(1)이 밝힌 바와 같이 탄화수소 이용방법에 따른 영향으로 보여진다. HS1 균주와 HS2 균주의 경우 낮은 유화능을 지니고 있는 균주로서 HS3 균주와 혼합 배양할 경우 유화능이 증가함으로 인하여 소수성을 이용한 탄화수소 이용능이 저해를 받게 된다. 따라서 HS1 균주와 HS2 균주에 의한 분해효율이 감소되고 HS3 균

Table 4. PAH removal by HS strains in minimal media

Strains	PHA removal(μg)			
	Fluorene	Phenanthrene	Anthracene	Pyrene
HS1	772±90	624±121	197±105	279±62
HS2	1033±82	695±118	213±105	213±64
HS3	492±49	466± 36	92±150	137±10
PSBL-1 ^a	1268±76	842±113	191±106	167±64

^aKnown to PHA degrading microbe *Phanerochaete chrysosporium* PSBL-1 strain.

주에 의한 분해 효율이 매우 낮아져 전체적으로 분해효율이 감소되는 결과가 나타났다고 보여진다.

PAH 및 Branched alkane 에 대한 분해능

PAH 분해활성의 경우 모든 HS 균주가 *Phanerochaete chrysosporium* PSBL-1 균주와 비교하여 낮은 분해활성을 나타내었다(Table 4). 그러나 HS1, HS2 균주의 경우 PSBL-1 균주에 필적할 정도의 PAH 분해 활성을 나타내는 것으로 보여진다. HS3 균주의 경우 모든 PAH에 대하여 전반적으로 낮은 분해 활성을 나타내었는데, HS2 균주가 비교적 높은 분해활성을 나타낸 것과 관련하여 소수성과 유화능을 모두 갖춘 경우 높게 나타나는 것으로 사료된다. 또한 PAH의 ring 수가 증가할수록 분해가 잘 이루어지지 않는 결과를 나타내었는데, 이러한 결과는 PAH의 경우 ring의 개수에 비례하여 증가하는 소수성의 증가로 인해 분해율이 감소한 것으로 보여진다(25). Branched alkane에 대한 분해능을 확인하기 위해 탄소원으로 탄소사슬이 19개인 pristane을 사용하여 5일간 배양한 결과 세 균주 모두 10% 미만의 낮은 분해율을 나타내었고, GC chromatogram을 확인한 결과 pristane의 중요한 pick의 경우 거의 분해되지 않은 것을 확인하였다(결과 미제시).

토양배양

분리된 HS 균주 중 액체 배양시 디젤 분해율이 가장 높게 나타난 HS1 균주에 대하여 실제 토양에서의 생존능과 디젤분해능 확인을 위한 토양배양을 실시하였다. 실험에 사용한 토양의 분석 결과 수분 보유능(Water Holding Capacity, WHC)은 0.58 g H₂O/g soil, 총 유기물량은 9.66%(w/v), pH는 4.17을 나타내었다. 토양이 산성을 강하게 나타내어 CaCO₃를 첨가하여 토양의 pH를 7로 보정한 후 실험을 실시하였다.

29일간 배양한 결과 대조구에서 자연적으로 제거된 디젤유의 양이 20% 내외인 것으로 나타났다. 이것은 휘발성이 강한 작은 분자량의 디젤이 공기 중으로 휘발됨으로 인해 제거되었던 것으로 보여지며, HS1 균주에 의한 분해율은 초기 10일 안에 50%이상의 디젤유를 분해하고, 최종 29일에는 80%이상의 디젤유를 분해하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 미생물 활성도를 확인한 결과 초기 10일 이내에 미생물 활성이 급격히 증가한 후에 배양 18일이 경과된 후부터는 일정한 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 초기 미생물 활성도의 증가는 접종된 HS1 균

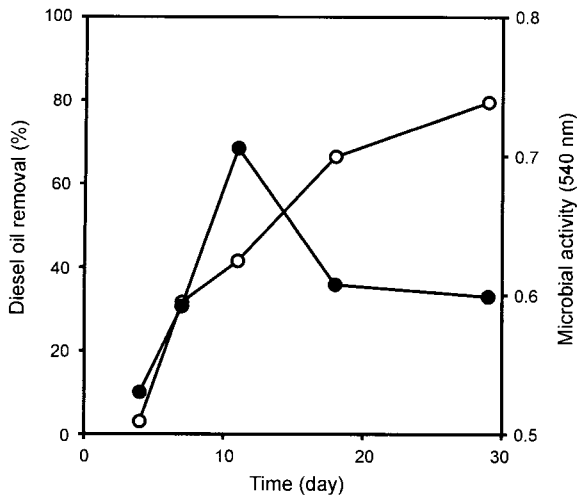


Fig. 2. Diesel oil removal and microbial activity in HS1 treated soil sample. (○) diesel oil removal; (●) microbial activity.

주가 디젤유를 분해함으로써 탄소원을 얻어 급격한 성장을 나타내고 이에 따른 미생물 활성도가 높게 측정되는 것이다(2). 또한 배양 후반기에는 대부분의 디젤유를 분해하여 탄소원이 고갈되고, 따라서 성장과 활성이 감소함으로써 미생물 활성도가 일정수준을 유지하게 되는 것이며 이때 디젤유의 분해를 또한 일정 수준으로 낮아지는 것을 볼 수 있다(2).

본 연구에서는 유류 오염토양으로부터 디젤유 분해활성이 높은 미생물 균주를 분리하고, 그 중 활성이 높은 HS1, HS2, HS3 균주에 대한 특성을 파악하는 실험을 실시하였다. 균주에 대한 동정을 실시하여 각각 *Acinetobacter calcoaceticus* (HS1), *Pseudomonas* sp. (HS2, HS3) 균주로 동정되었다. 또한 분리된 균주의 경우 디젤유 분해 방법이 각기 다르게 나타남을 확인할 수 있었고, 이에 따라 디젤유의 분해율 또한 차이가 나타남을 알 수 있었다. 실제 세 균주의 경우 소수성과 유화활성이 다르게 나타났는데 이러한 특성이 균주의 유류분해 특성을 결정짓는 것으로 나타났다. 또한 분해활성이 높게 나타난 HS1 균주의 경우 디젤유 오염환경을 조성하여 토양배양을 실시한 결과 높은 디젤유 분해능을 나타내었고, 토양에서의 생존능 또한 높게 나타나는 것으로 확인되었다.

소수성이 높은 HS1 균주와 유화활성이 높은 HS3 균주에서 quorum sensing을 일으키는 것으로 알려져 있는 homoserine lactone (HSL)-type autoinducer를 검출하였다(결과 미제시). 기존의 여러 연구결과 *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp.의 경우 HSL-type autoinducer를 발현한다는 사실이 보고되었다(8, 17, 18). 상기의 결과는 HS1 균주와 HS3 균주가 정족수를 인식하는 신호 전달체계를 지니고 있다는 증거로서, 두 균주가 지니고 있는 유류 분해능과의 관련성을 확인하여 유류분해시 적용시킬 경우 유류분해 효율을 증가시킬 수 있는 방법으로서의 응용이 가능할 것으로 보여진다.

본 연구를 통해 분리된 디젤유 분해 균주들의 유류 분해조건을 최적화 할 경우 실제 오염환경에 적용할 수 있을 것으로 보

여지며, 이외에도 발현하는 유화제 등을 이용한 산업적인 응용 또한 가능할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 특정기초연구과제(과제번호 ; 97-05 02-07-01 3)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 고성환, 이홍금, 김상진. 1998. Hydrocarbon uptake modes 에 따른 유류분해 미생물 혼합체의 원유분해능. 한국생물 공학회지 13, 606-614.
- 서은영, 송홍규. 1994. 토양미생물군집의 개체수와 활성도에 미치는 경유의 영향. 한국미생물학회지 32, 163-171.
- 최경숙, 김순한, 정영기, 장경립, 이태호. 1997. *Tsukamurella* sp. 26A에 의한 계면활성제의 생산. 한국미생물학회지 33, 187-192.
- Birman, I. and M. Alexander. 1996. Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in non aqueous - phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 267-272.
- Bogardt, A.H. and B.B. Hemmingsen. 1992. Enumeration of phenanthrene - degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum - contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2579-2582.
- Dandie, C.E., S.M. Thomas, and N.C. McClure. 2001. Comparison of a range of green fluorescent protein-tagging vectors for monitoring a microbial inoculant in soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 26-30.
- De Acevedo, G.T. and M.J. McInerney. 1996. Emulsifying activity in the methophilic and extremely thermophilic microorganisms. *J. Inst. Microbiol.* 16, 1-7.
- Gonzalez, R.H., A. Nusblat, and B.C. Nudel. 2001. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol. Res.* 155, 271-277.
- Hawthorne, S.B., C.B. Grabanski, E. Martin, and D.J. Miller. 2000. Comparisons of soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J. Chromatography A* 892, 421-433.
- Kirsten, K. and H.L. Drake. 1995. Effect of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3667-3675.
- Langbehn, A. and H. Steinhart. 1995. Biodegradation studies of hydrocarbons in soils by analyzing metabolites formed. *Chemosphere* 30, 855-868.
- Loser, C., H. Seidel, P. Hoffmann, and A. Zehndorf. 1999. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 105-111.
- Margesin, R. and F. Schinner. 1999. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate. *Chemosphere* 38, 3463-3472.
- Margesin, R. and F. Schinner. 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 462-468.
- Monticello, D.J. 2000. Bidesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotech.* 11, 540-546.

16. Nocentini, M., D. Pinelli, and F. Fava. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41, 1115-1123.
17. Pearson, J.P., K.M. Gray, L. Passador, K.D. Tucker, A. Eberhard, B.H. Iglewsand, and E.P. Greenberg. 1994. Structure of the auto-inducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 197-201.
18. Pearson, J.P., L. Passador, B.H. Iglewski, and E.P. Greenberg. 1995. A second N-Acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1490-1494.
19. Piehler, M.F. and H.W. Paerl. 1996. Enhanced biodegradation of diesel fuel through the addition of particulate organic carbon and inorganic nutrients in coastal marine waters. *Biodegradation* 7, 239-247.
20. Piehler, M.F., J.G. Swistak, J.L. Pinckney, and H.W. Paerl. 1999. Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. *Microb. Ecol.* 38, 69-78.
21. Riis, V., D. Miethe, and W. Babel. 1995. Degradation of refinery products and oils from polluted sites by the autochthonous microorganisms of contaminated and pristine soils. *Microbiol. Res.* 150, 323-330.
22. Rosenberg, E., and E.Z. Ron. 1997. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 313-316.
23. Rosenberg, M., M. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbial Lett.* 9, 29-33.
24. Sepic, E., C. Trier, and H. Leskovsek. 1996. Biodegradation studies of selected hydrocarbons from diesel oil. *Analyst* 121, 1451-1456.
25. Harayama, S. 1997. Polycyclic hydrocarbon bioremediation design. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 268-273.
26. Taylor, C. and T. Viraraghavan. 1999. A bench-scale investigation of land treatment of soil contaminated with diesel fuel. *Chemosphere* 39, 1583-1593.
27. Weekers, F., P.H. Jacques, D. Springael, M. Mergeay, L. Diels, and P.H. Thonart. 1998. Effect of drying on bioremediation bacteria properties. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70, 311-322.
28. Williams, C.M., J.L. Grimes, and R.L. Mikkelsen. 1999. The use of poultry litter as co - substrate and source of inorganic nutrients and microorganisms for the ex situ biodegradation of petroleum compounds. *Poult. Sci.* 78, 956-964.
29. Zhang, Y. and R.M. Miller. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2101-2106.

(Received February 21, 2003/Accepted April 1, 2003)

ABSTRACT: Characterization of Diesel Oil-Degrading Bacteria

M. J. Ahn, Y. J. Han, H. S. Lim¹, K. H. Choi¹, O. B. Kwon¹, Y. C. Choi, and B. C. Jeong*
 (Department of Biological Science, MyongJi University, Yongin, 449-728, Korea, ¹R&D Center for Chemical Technology, Hyosung Corporation, Korea)

Diesel oil-degrading bacterial strains were isolated from diesel oil contaminated soil and called HS series (HS1, HS2 and HS3). These strains were identified as *Acinetobacter* sp. (HS1) and *Pseudomonas* sp. (HS2 and HS3) based on Biolog test, cellular fatty acid composition, and 16S rDNA sequence analysis. These strains were cultivated in liquid minimal media containing 2% diesel oil, and diesel oil-degrading activity was measured. As result, all strains degraded over 70% of total diesel oil. But PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)- and pristane-degrading rate of these strain was below 20% of total PAH and pristane. The HS1 strain showed highest hydrophobicity and low emulsifying activity among the experimental strains and high diesel oil-degrading activity. From the above-mentioned result, microcosm experiment was performed with the HS1 strain. The HS1 strain showed a degrading activity of over 80% of total diesel oil in microcosm test. And microbial activity was correlated to diesel oil-degrading activity. Therefore, it is suggested that the HS1 strains could be effectively used for the bioremediation for diesel oil.