

Pseudomonas aeruginosa F722로부터 유래된 biosurfactant를 이용한 등경유 혼합물의 생분해율 향상

오경택 · ¹박귀환 · ²강창민 · ³Kubo Motoki · †정선용

전남대학교 환경공학과, ¹전남보건환경연구원, ²초당대학교 환경공학과, ³입명관대학교 이공학부 화학생물공학과
(접수 : 2003. 6. 10. 게재승인 : 2003. 12. 23.)

Biodegradation Enhancement of The Mixture of Kerosene and Diesel by using Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* F722

Kyung-Taek Oh, Gue-Hwan Park¹, Chang-Min Kang², Motoki Kubo³, and Seon-Yong Chung[†]
Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea,

¹Health and Environment of Chollanamdo Institute, Gwangju 502-201, Korea,

²Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea,

³Department of Bio Science and Technology, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University 525-8577, Japan

(Received : 2003. 6. 10. Accepted : 2003. 12. 23.)

We studied degradation effects of hydrophobic substrate such as kerosene and diesel by adding a biosurfactant originated from *Pseudomonas aeruginosa* F722 and chemical surfactants (Tween 80 and detergent) with aeration. The surface tensions of the biosurfactant, Tween 80 and detergent were 30 mN/m, 39 mN/m and 31 mN/m, respectively. When the concentration of biosurfactant added in C-medium was 0.01 and 0.15% (w/v), the ratios of hydrocarbon degradation were 94.3% and 94.2% respectively. It was 6.2% (w/v) higher than when the concentrations of added biosurfactant were 0.05, 0.1 and 0.2%. The degradation ratios of the chemical surfactants (Tween 80 and detergent) were 94.5% and 93.5% respectively. The effects of the biosurfactant and chemical surfactants were similar on the degradation ratio in mixtures of kerosene and diesel. However, the population of viable *P. aeruginosa* F722 at the end of the cultivation period was twice as higher in the biosurfactant than that in the chemical surfactant. We also studied the effect of aeration (0.5 vvm) on the degradation ratio. The biosurfactant addition experiment was conducted with 0.5 vvm air, 35°C, 150 rpm, pH 8.0, 3 days, 1.0% (w/v) substrate. When *P. aeruginosa* F722 and 0.15% (w/v) biosurfactant were added, the degradation ratio of hydrocarbon was 94.8%. Without *P. aeruginosa* F722, it was 68%. Thus, with aeration, the degradation ratio of hydrocarbon was increased by 26.8%. In addition, the cultivation time was shortened by 1/3. The degradation ratios of hydrocarbon in shaking culture (cultivation time; 3 days) and stationary culture (cultivation time; 10 days) were 94.8 and 93.7% respectively. Thus, the addition of biosurfactant and aeration enhanced the degradation of hydrocarbon originated kerosene and diesel.

Key Words : *Pseudomonas aeruginosa* F722, degradation ratio, biosurfactant, chemical surfactant

서 론

석유제품으로 인한 생태계 오염이 빈번하게 발생되고 있으며, 그 결과 해양 및 토양복원에 관한 많은 연구가 진행되어

왔다(1-3). 생태복원에 대한 관심이 높아지면서 물리·화학적 처리보다 유용 미생물과 그 대사물질을 이용한 유류 생분해 연구가 많이 수행되고 있다(4-8). 토양정화기술은 오염된 토양을 굴착하여 소각 후 복토로 사용하는 현장의 생물복원과 원위치에서 바로 처리하는 현장 생물정화의 두 가지로 나눌 수 있다(1, 2). 일반적으로 후자가 전자보다 더 경제적이면서 환경저항성이 적어 많이 선호되고 있다. 특히, 생물처리법은 물리·화학적 처리법에 비해 2차 오염의 위험이 적어 보다 친환경적인 처리법으로 주목받고 있다. 현장 생물정화 기술의 하나인 토양정화공법은 경작을 통하여 토착 및 외래종

† Corresponding Author : Department. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1858, Fax : +82-62-530-0742

E-mail : sychung@chonnam.ac.kr

미생물 활성화에 필요한 산소(9-11), 질소(6), 인(7), 무기염류, 수분(10) 등을 공급하여 오염물질의 분해속도를 촉진시키는 처리공법이다. 특히, 미생물을 이용하여 유류중의 탄화수소(12, 13)를 분해시키기 위해서는 최적의 산소 공급이 필요하며 원활한 산소공급을 위해서는 적합한 토양 구조, 수분, 그리고 깊이 등의 물리적 조건이 충족되어야 한다. 공기 농도가 10% 이하일 때는 미생물의 활성 저하로 생물 정화율이 떨어진다고 보고되어 있다(9).

우리나라에는 2002년 현재 11,000개 이상의 주유소가 영업하고 있으며, 가장 많이 취급되는 원유제품으로는 휘발유, 등유, 경유이다. 이들 원유제품 중에서 휘발성이 강한 휘발유는 토양으로 유출되었을 경우 잔존할 가능성이 등유와 경유에 비하여 낮기 때문에 토양정화에 관하여 연구가 미흡한 편이며 등유와 경유에 관한 연구는 매우 활발한 편이다. 원유제품인 등유 및 경유로 오염된 지역을 정화시키는데 있어 소수성 물질을 잘 용해시킬 수 있는 유류분해 균주로부터 유래된 생물계면활성제를 이용한 연구가 매우 활발하게 수행되고 있다(7, 14-16). 유류분해 능력을 지니면서 생물 계면활성제를 생성할 수 있는 유기체로서 *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Torulopsis*, *Acinetobacter*, *Bacillus* 등이 있다(5, 7). 첨가제로 사용되는 생물계면활성제는 소수성 물질의 용해를 촉진시켜 자연계에 서식하는 토양미생물이 탄화수소를 탄소원으로 이용할 수 있게 한다. 동시에 탄화수소의 생태계 잔류기간을 단축시켜 생태계 복원을 촉진시키는 장점을 함께 가지고 있다(7). 하지만 유류로 오염된 현장에 다량의 생물계면활성제 공급이 어려워 화학계면활성제도 사용되고 있으며 이러한 화학계면활성제는 현장 내에 서식하는 미생물의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다(17, 18).

생물복원의 소요 기간을 단축시키기 위해서 생물계면활성제 이외에 영양염류, 계면활성제, 공기 (biorecultivation or bioventing) 등을 공급하기도 한다(10, 11, 17, 18). 최근 경유로 오염된 극지 및 한대지역에서 영양염류를 첨가시켜 오염물질의 분해율을 조사한 결과, 자연조건상의 대조실험보다 약 20% 높게 나타났다(7). 원유 및 원유제품으로 오염된 토양 및 해양을 복원시키는데 있어 물리·화학적 처리방법으로 현장의 처분할 때보다 생물학적 처리방법으로 현장 처리할 경우, 토양에서는 \$2.8 million/km², 해안에서는 \$1 million/km 정도 절약할 수 있다고 한다(2). 따라서 현장 생물학적처리법은 적정조건이 충족될 경우, 처리효율 및 처리경비절감 등의 많은 이점을 가진 공법이라 사료된다.

본 연구에서는 유류분해 균주 *Pseudomonas aeruginosa* F722로부터 생산된 생물계면활성제를 이용하여 주유소에서 많이 취급되는 원유제품인 등유와 경유의 혼합물로 오염된 지역에 원위치 생물정화법을 적용하여 처리할 때 필요한 인자들을 실험실 규모 하에서 검토하는 것과 생물계면활성제 대신 화학계면활성제 (Tween 80, detergent: 주방세제)를 첨가하였을 때 사용균주 및 탄화수소 분해율에 미치는 영향에 관한 것이 연구의 목적이다.

재료 및 방법

유류분해 균주 및 배양 조건

실험에 사용된 유류분해 균주는 토양으로부터 분리되어 본 실험실에서 분리·동정된 간균인 *P. aeruginosa* F722 (Fig. 1)를 사용하였다(14, 15, 19). *P. aeruginosa* F722를 본 배양에 접종하기 전에 영양원인 LB 배지 (Luria Bertani, 배지조성: 증류수 1 ℓ당 trypton 10 g, yeast extract 5.0 g, NaCl 5.0 g, bacto agar 15 g)를 조제하고 백금이로 일회 접종하여 35℃, 150 rpm에서 배양한 것을 이용하였다. 본 배양 배지인 C-배지의 조성은 Oh 등(19)에서의 동일한 방법으로 조제하여 사용하였다. LB 배지에서 성장된 사용균주를 C-배지량의 1.0% (w/v) 농도로 접종하였다. 그리고 연구에 필요한 생물계면활성제를 얻기 위해 3.0% (w/v) glucose를 탄소원으로 한 BS 배지 (증류수 1 ℓ당 NH₄Cl 0.5 g, K₂HPO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, yeast extract 1.0 g, 이하 C-배지와 동일)에 *P. aeruginosa* F722를 1.0% (w/v) 접종하여 35℃, 150 rpm, pH 7.0으로 5일간 배양하였다.

탄화수소 생분해 수행에 사용된 탄소원은 시판되고 있는 등유와 경유를 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 사용하였고, C-배지 100 ml에 1.0% (w/v) 농도가 되도록 주입한 후 실험조건에 따라 사용균주 (strain F722), 생물계면활성제 (biosurfactant) 또는 화학계면활성제 (Tween 80, detergent), 그리고 공기를 공급하면서 35℃, pH 8.0, 150 rpm의 조건에서 3~10 days간 배양하였다.

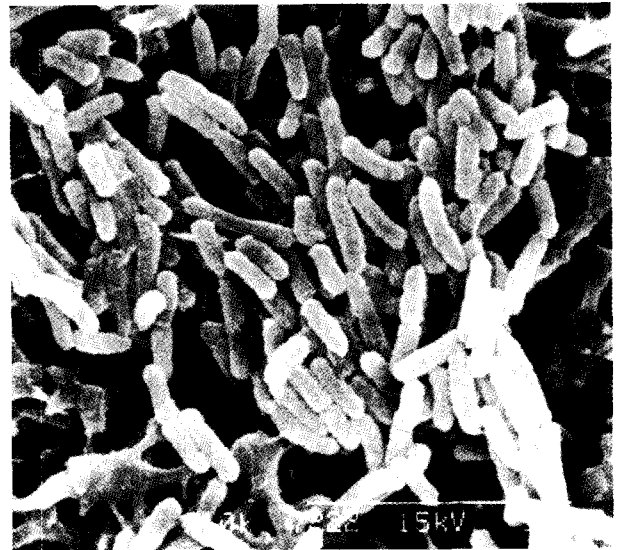


Figure 1. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* F722: crude oil-degrading and biosurfactant production bacterium.

생물 및 화학계면활성제 첨가 실험방법

P. aeruginosa F722로부터 생산된 생물계면활성제는 Oh 등(19)에서의 동일한 방법으로 추출하였다. 이렇게 얻어진 생물계면활성제를 C-배지 100 ml당 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2% (w/v)가 되도록 각각 첨가했다. 그리고 혼합된 등·경유 분해율은 gas chromatography (Varian Star 3400, USA)/flame ionization detector (GC/FID)를 이용하여 분석한 후, 그 분석 결과를 활용하여 탄화수소 분해율에 미치는 영향을 조사하였다. 생물계면활성제와 비교를 위하여 화학계면활성제인 Tween #80, 가정에서 주로 사용하는 주방세제 (종종 : 자연

퐁 = 1 : 1 (w/w)를 생물계면활성제 첨가농도와 같은 농도로 각각 첨가하여 배양한 후, 그 결과를 GC/FID로 분석하였다. 본 실험에 사용되는 생물계면활성제 및 화학계면활성제 (Tween 80, detergent)의 표면장력은 Du Nouy tensionmeter (Model No. 3010, Japan)를 이용하여 실온에서 측정하였다. 실험상의 오차를 최소화시키기 위하여 재현성 실험을 실시하였으며 대조 실험으로는 *P. aeruginosa* F722를 접종하지 않는 것과 생물·화학계면활성제를 첨가하지 않는 것으로 수행하였다.

공기주입 실험방법

본 실험에서는 생물계면활성제를 0.01~0.2% (w/v) 첨가하여 혼합된 등·경유의 분해율이 제일 높은 조건을 선정 한 후, 공기량을 0.5, 0.75, 1.0 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)으로 변화시켜 bioventing 공법과 같이 주입정과 추출정을 두어 공기 실험을 수행하였다(Fig. 2). 실험은 500 ml 플라스크에 100 ml C-배지를 첨가시킨 후 공기 주입량을 0.5~1.0 vvm으로 조절하여 수행하였다. 또한, 교반배양과 정치배양을 수행하여 GC/FID로 탄화수소 성분 함량을 분석하여 각 성분물질의 분해율을 산정한 후에 그 분석 결과를 비교하였다. 실험상의 오차를 줄이기 위하여 재현성 실험을 수행하였으며 대조 실험으로는 사용균주와 생물 및 화학계면활성제를 첨가하지 않은 조건에서 공기만을 주입하여 수행하였다.

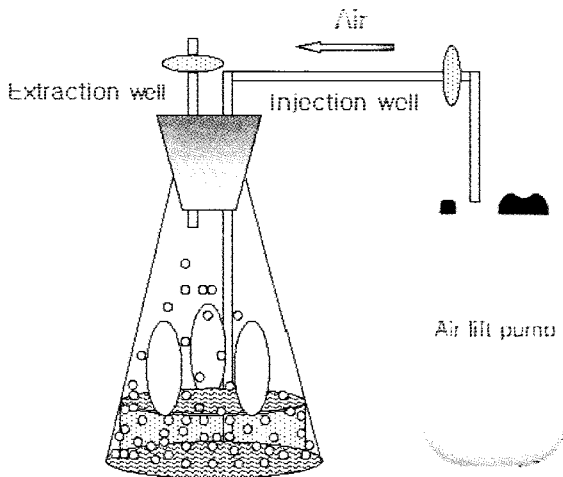


Figure 2. A schematic diagram of the experimental apparatus with an aeration pump.

시료 채취 및 혼합된 등·경유의 분해 특성 조사

생물 및 화학계면활성제를 첨가한 조건에서 혼합된 등·경유 분해율을 비교하기 위하여 배양 4일 및 10일 후에 배양액으로부터 잔류 등·경유를 토양오염공정시험법에 따라 추출하였다. 공기 공급에 따른 탄화수소 분해율 실험은 배양 3일 및 10일이 지난 후에 배양액으로부터 탄화수소를 추출하여 GC/FID로 분석하였다. 또한, 생물계면활성제를 0.01~0.2% (w/v) 첨가하여 혼합된 등·경유의 분해율이 제일 높은 조건에서 공기를 0.5~1.0 vvm으로 변화시켜 교반배양과 정치배양에서 탄화수소 분해율을 비교 조사하였다. *P. aeruginosa* F722의 생장측정은 직접계수법의 하나인 colony-forming units

(CFUs) 방법으로 하였다. GC/FID 분석 조건은 다음과 같다. Column; Rtx-5 (capillary, 60 m × 0.32 mm, I.D 0.25 μm), carrier; hydrogen at 30 ml/min, oven; 80°C to 270°C at 9°C/min, 270°C hold, injector; 260°C, 1.0 μl injection, detector; FID, 280°C (Varian Star 3400, USA.), 그리고 탄화수소의 정량 및 정성을 위한 표준시약은 탄소수가 n-C₆~n-C₄₄인 Petrocol 2887, Cat. No 4-8882를 이용하였다. 그리고 탄화수소 분해율 측정시 오차범위는 94 ± 6%이었다.

결과 및 고찰

적정 BS 주입농도 조사

Oh 등(14, 15, 19)에 의하면 *P. aeruginosa* F722는 원유 및 원유제품을 탄소원으로 이용할 수 있고, 또 생물계면활성제를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 등·경유 혼합물의 조성은 탄소수 10~14가 79.6%, 15~20가 18.6%로 전체의 98% 이상을 함유하고 있었다(Table 1). 생물계면활성제 첨가농도는 소수성 기질의 분해율에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(18).

Table 1. A composition of carbon source (kerosene:diesel = 1:1(v/v))

Carbon number	Percentage (%)	
10	19.8	
11	21.9	
12	14.1	C ₁₀ -C ₁₄
13	12.1	79.6%
14	11.8	
15	6.7	
16	3.3	
17	4.6	C ₁₅ -C ₂₀
18	1.5	18.6%
19	1.4	
20	1.1	
21	0.8	C ₂₁ -C ₂₃
22	0.6	
23	0.4	1.8%

0.05, 0.1, 0.15, 0.2% (w/v)농도의 생물계면활성제를 첨가하여 Oh 등(14)에 의해서 선행된 연구와 동일한 방법으로 수행하였다. 주입한 등·경유 혼합물의 total petroleum hydrocarbons (TPHs)를 기준하여 *P. aeruginosa* F722와 생물계면활성제를 주입하지 않은 10일 blank 시료에서는 분해율이 평균 19.4%로 조사되었다(Table 2). 반면 *P. aeruginosa* F722 단독이나 *P. aeruginosa* F722와 생물계면활성제를 동시에 주입한 경우는 분해율이 71.7%~100%까지 증가하여 분해균이나 생물계면활성제의 주입이 원유제품 분해에 매우 효과적임을 알 수 있었다. 한편 *P. aeruginosa* F722에 생물계면활성제를 주입한 경우와 주입하지 않은 경우를 비교하였을 때 주입한 경우의 향상효과는 6% 정도로 예상과는 달리 낮았고, 또한 생물계면활성제 농도를 변화시킨 경우도 0.15% (w/v)일 때를 제외하고는 농도증가에 따른 분해율 향상효과는 미미하였다. 하지만, 생물계면활성제를 첨가해줌으로서 *P. aeruginosa* F722 자체적으로 생물계면활성제를 생산하는데 필요한 에너지를 비축하여 그것을 정치기상의 탄화수소 분해

에 활용하기 때문에 생물계면활성제를 첨가하지 않는 경우보다 분해율보다 6.0% 이상 향상된 것으로 사료된다. 탄소수에 따른 분해율은 탄소수 20~23에서 100%에 가까워지며, 탄소수 16, 18, 19에서는 85.0~86.7%이었고, 탄소수 14~15에서는 71.7~89.2%, 그리고 탄소수 17에서 50.3~73.6%로 가장 낮았다. 이와 같은 결과는 Swannell 등(3)의 연구보고에서 탄소수 28 이상은 미생물에 의한 분해가 어렵고, 탄소수 17~28은 미생물에 의해서 분해될 수 있으며, 탄소수 17 이하는 미생물에 의해서 쉽게 분해될 수 있다고 기술된 부분과 불일치한다. 이러한 이유는 미생물의 탄소원으로 공급된 탄화수소 중에서 배양초기에는 탄소수가 작은 분자를 주로 이용하면서 미생물이 성장하고 배양시간이 증가되면서 분자량이 큰 탄화수소들은 미생물에 의해서 상당부분 분해되고, 일부는 교반에 의하여 작은 분자들로 쪼개져 탄소수가 낮은 분자들이 증가되어 상대적으로 탄소수가 낮은 분자의 분해율이 높지 않은 것으로 사료된다. 그리고 생물계면활성제를 첨가하여 배양하였을 때 *P. aeruginosa* F722의 개체수는 생물계면활성제를 첨가하지 않았을 때보다 1.8~3.9배 증가한 $12.6 \sim 27.5 \times 10^7$ cfu/ml이었다(Table 2). 이러한 결과로부터 생물계면활성제를 첨가에 의한 소수성 기질의 용해도 증가로 생분해율을 촉진시킬 수도 있으나, 배양환경에 따라 소수성 탄소원의 분해율 향상과 역제가 공존할 수 있는 가능성을 배제시킬 수는 없을 것으로 사료된다.

탄화수소 분해에 미치는 생물·화학 계면활성제의 영향

생물계면활성제 첨가 농도실험에서 0.01%와 0.15%에서 소수성 탄소원의 생분해율이 상대적으로 높게 조사되었고(Table 2), 0.15% 생물계면활성제를 첨가하였을 때 특히 재현실험의 안정성이 높아 이후의 실험에서는 이 농도에서 실험을 수행했다. 화학계면활성제는 생물계면활성제과 같은 기능을 가지고 있으나, 생물계면활성제보다 더 안정된 구조를 가지고 있

기 때문에 적용지역에 잔존할 가능성이 있을 것으로 사료되며, 탄화수소로 오염된 지역 내에 서식하는 토착미생물 및 도입종의 활성을 저해할 것으로 판단된다. 반면, 생물계면활성제는 화학계면활성제와 비교했을 때, 미생물에 의한 분해가 가능하고 독성이 적은 것으로 알려져 있다(17, 18). 이러한 사실을 확인하고자 *P. aeruginosa* F722로부터 유래된 생물계면활성제와 화학계면활성제로 알려진 Tween 80, 일반 가정에서 사용되는 주방세제인 detergent를 0.15% (w/v)씩 첨가하여 탄화수소 분해율과 미생물에 미치는 영향에 관하여 수행하였다. 그 결과, 탄화수소 분해율은 생물계면활성제, Tween 80, detergent 첨가에 따라 별다른 영향을 받지 않았으나, *P. aeruginosa* F722의 개체수 변화에는 영향을 주었다(Fig. 3). 생물·화학계면활성제를 첨가하지 않은 실험에서는 *P. aeruginosa* F722의 개체수가 7.0×10^7 cfu/ml이며, 생물계면활성제를 첨가한 실험에서는 2.7배 증가한 19.0×10^7 cfu/ml이었다. 하지만, 대수증식기 이후인 배양 4일째에서 *P. aeruginosa* F722의 개체수는 생물계면활성제, Tween 80, 그리고 detergent 첨가했을 때 각각 63.5×10^7 cfu/ml, 84×10^7 cfu/ml, 57×10^7 cfu/ml이었다. Margesin 등(7, 16, 17)은 화학계면활성제의 경우 생물계면활성제에 비해 사용균주의 방어체계가 약한 정지기상에서 개체수 변화에 영향을 미친다고 보고하고 있다.

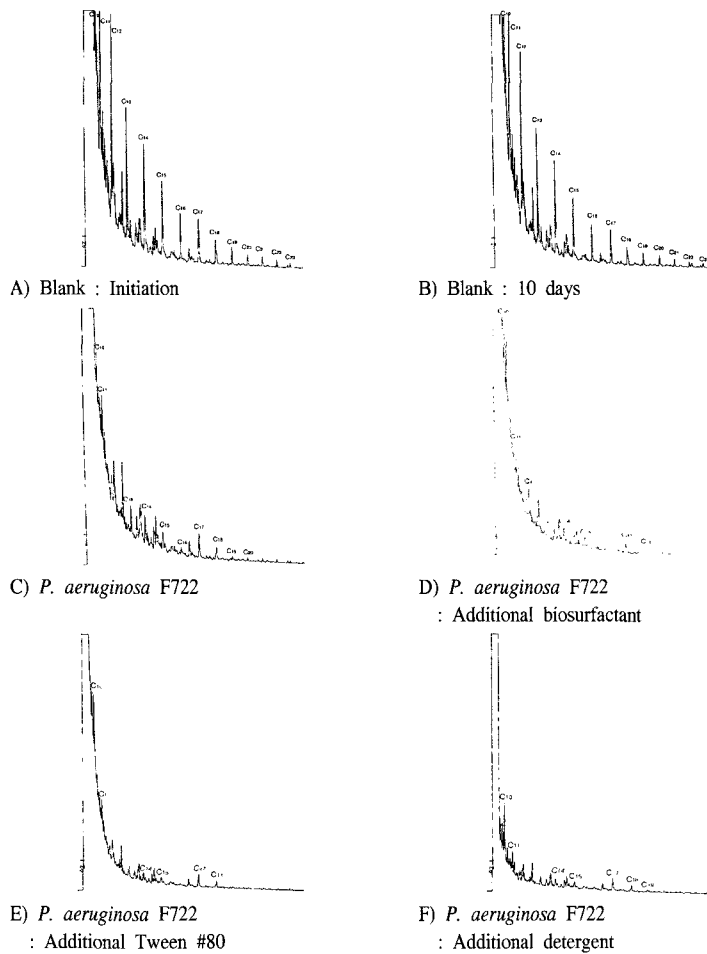
공기 공급시 교반·정지 배양에 따른 탄화수소 분해율 비교

생물계면활성제 첨가는 *P. aeruginosa* F722에 의한 탄화수소 분해율 향상을 가져왔고 화학계면활성제에 비해 사용균주의 증식에 효과적임을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 3). 원유 및 원유제품으로 오염된 생태계 복원에 적용하기 위한 유류 분해 특성과 생물계면활성제 생산조건들에 관한 실험실 자료는 충분하지만, Margesin 등(7)의 보고와 같이 실험실 결과와

Table 2. Effects of biosurfactant on the degradation ratio of hydrocarbons

Carbon number	Blank	<i>P. aeruginosa</i> F722					
		Blank	BS 0.01%	BS 0.05%	BS 0.1%	BS 0.15%	BS 0.2%
10	21.1	92.6	92.8	85.0	85.0	93.6	88.0
11	17.7	93.5	95.8	94.9	94.9	96.3	96.7
12	15.9	100	100	100	100	100	95.5
13	28.5	95.2	100	97.6	97.6	100	95.0
14	16.5	71.7	88.3	75.2	75.2	89.2	86.0
15	17.7	73.3	88.4	74.5	74.5	84.6	82.2
16	6.4	82.9	100	80.9	80.9	100	87.5
17	22.9	50.3	73.6	50.3	50.3	68.0	70.0
18	27.5	100	100	100	100	100	100
19	18.2	85.8	100	83.4	83.4	100	83.4
20	26.1	75.6	100	76.5	100	100	100
21	24.5	100	100	100	100	100	100
22	28.7	100	100	100	100	100	100
23	-2.8	100	100	100	100	100	100
pH	7.10	6.11	5.74	6.01	6.01	6.19	6.04
$\times 10^7$ cfu/ml	-	7.0	12.9	12.6	21.5	19	27.5

Mixture of kerosene and diesel as carbon source was added to C-medium containing 0.01~0.2% biosurfactant at 35°C, pH 8.0, 150 rpm, 10 days, 1.0% (w/v) strain, 1.0% (w/v) substrate. The degradation fraction of hydrocarbons was measured by gas chromatography/flame ionization detector (GC/FID). Each value in the table show from a representative experiment of three runs.



Carbon number	The degradation ratio of hydrocarbons (%)	
	Input surfactant	
	Tween 80(E)	Detergent(F)
10	90.3	90.5
11	97.6	97.5
12	100	100
13	100	100
14	90.5	89.2
15	90.4	90.5
16	100	100
17	70.6	71.9
18	36.9	40.9
19	100	93.0
20	100	100
21	100	100
22	100	100
23	100	100

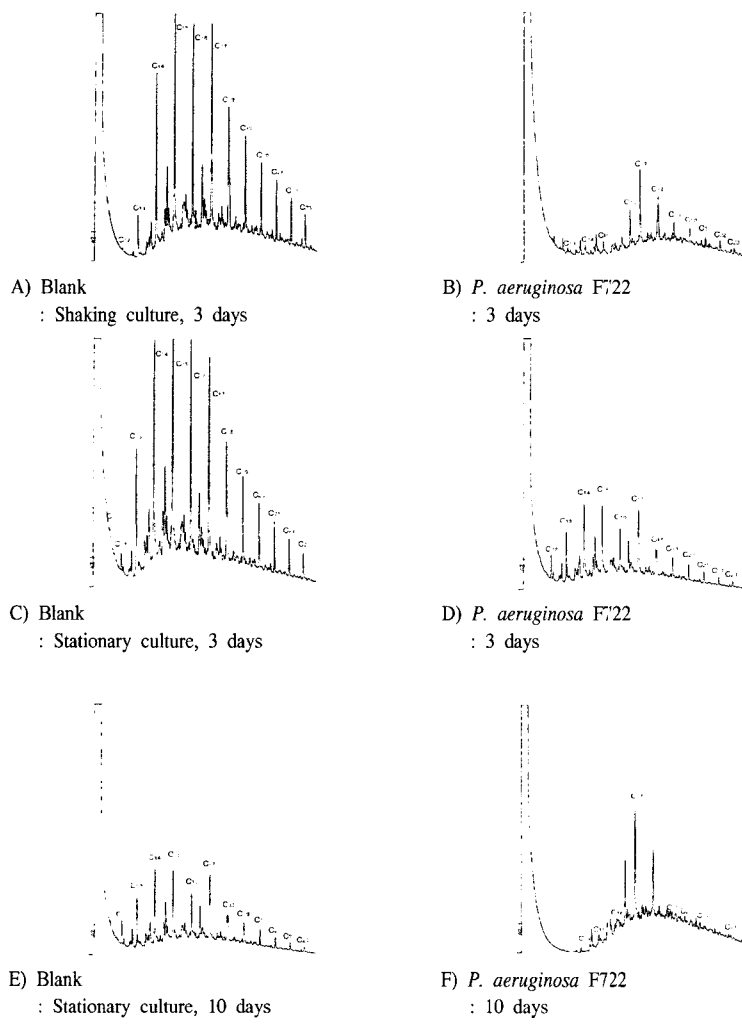
Figure 3. GC/FID analysis about the mixture-residuals degraded by *P. aeruginosa* F722. Mixture of kerosene and diesel as carbon source was added to C-medium containing 0.15% (w/v) biosurfactant or chemical surfactant at 35°C, pH 8.0, 150 rpm, 10 days, 1.0% (w/v) strain, 1.0% (w/v) substrate. A; pH 7.89, B; pH 7.10, C; pH 6.11, 7.0×10^7 cfu/ml, D; pH 6.19, 19.0×10^7 cfu/ml, E; pH 6.06, 8.8×10^7 cfu/ml, F; pH 6.15, 9.3×10^7 cfu/ml. The figure represents from a representative experiment of three runs.

현장적용 결과는 일치하지 않는 경우가 많다. 따라서 좀 더 현장 자료를 확보하기 위해서 토양복원에 사용되는 방법 중 bioventing에 필요한 실험장치(Fig. 2)를 고안하여 수행하였다 (9, 19). 공기 공급량 (0.5~1.0 vvm)에 따른 분해를 실험 결과, 0.5 vvm에서의 재현성이 0.75 및 1.0 vvm보다 특히 효과적으로 조사되었다. 부연해서 설명하자면, 공기 공급량을 0.75 및 1.0 vvm으로 하여 탄화수소 분해율 실험을 수행하였을 때는 배양시간이 3일된 시점에 초기 배양액 100 ml 중에서 20 ml 이상이 증발되는 문제가 발생하였다. 이러한 문제로 인하여 탄화수소 분해율을 정확하게 측정할 수가 없었다. 또한 배양시간을 3일 이하로 수행하였을 때는 사용균주가 탄소원에 대하여 충분히 적응이 되지 않은 상태이기에 미생물에 의한 분해보다는 공기에 의한 증발이 더 컸다. 따라서 공기 주입량을 0.5 vvm으로만 수행하였다.

Fig. 4는 *P. aeruginosa* F722를 접종 여부에 따른 탄화수소 분해율을 나타내고 있다. 0.5 vvm으로 공기를 공급하면서 교반을 수행하였을 때, 배양 3일 후, 사용균주를 접종하지 않은 공시험에서 68.8%, 반면에 *P. aeruginosa* F722를 접종하였을 때는 94.8% 탄화수소 분해율이 조사되었다. *P. aeruginosa*

F722의 접종에 의해 분해율은 26% 향상하였다. 이러한 결과에서 알 수 있듯이 사용균주를 접종하지 않은 상태에서 교반과 공기 공급으로 68.8% 분해되었다. 공기를 공급하지 않은 경우와 공급한 경우를 비교했을 때, 동일한 분해율을 달성하는 데 소요되는 배양시간이 약 1/3로 단축되었다. 따라서 공기의 공급이 매우 효과적임을 알 수 있었다. 정치배양을 하면서 공기를 공급하였을 때, 공시험에서는 3일째 56.1%, 10일째 83.8%의 분해율을 나타내었다(Fig. 4; C-F). 그리고 사용균주를 접종하였을 때, 탄화수소 분해율은 공시험보다 각각 32.7 (3일), 9.9% (10일) 증가한 88.8, 93.7%로 조사되었다 (Fig. 4; C-F). 이 결과에서 알 수 있듯이 배양시간이 길어질수록 공시험과 본시험의 탄화수소 분해율의 차가 감소하였다. 또한, bioventing 기술에 대한 기초적인 보고 자료는 현재까지 보고 되지 않았으며, 본 보고에서 처음으로 보고하는 바이다.

C-배지에 0.15% 생물계면활성제 첨가하고 0.5 vvm으로 공기를 공급하면서 교반했을 때, 탄화수소 분해율은 C₁₀이 93.6%, C₁₁이 96.3%, C₁₄이 89.2%, C₁₅이 84.6%, C₁₇이 68.0%, C_{12,13,18-23}이 100%로 조사되었으나, 그 이상의 조건에



The degradation ratio of hydrocarbons (%)

Carbon number	Shaking culture(B)	Stationary culture(D, F)	
10	100	100	100
11	100	100	100
12	100	97.8	100
13	99.5	92.5	100
14	98.1	87.7	98.9
15	97.7	77.6	96.0
16	93.2	62.8	76.5
17	72.6	62.1	35.5
18	67.5	69.5	100
19	82.7	75.5	93.3
20	85.7	83.4	91.0
21	77.0	84.8	90.1
22	81.0	87.0	100
23	87.1	90.4	92.1

Figure 4. GC/FID analysis of the mixture-residual degraded by *P. aeruginosa* F722 in aeration condition. Mixture of kerosene and diesel as carbon source was added to C-medium containing 0.15% (w/v) biosurfactant at 35°C, pH 8.0, 150 rpm, 10 days, 1.0% (w/v) strain, 1.0% (w/v) substrate, 0.5 vvm air. A; pH 6.92, B; pH 6.41, 107×10^7 cfu/ml, C; pH 6.82, D; pH 6.61, 26.7×10^7 cfu/ml, E; pH 6.49, F; pH 6.40, 4×10^7 cfu/ml. The figure represents from a representative experiment of three runs.

서도 탄화수소 분해율 향상에는 효과가 없었다. 이러한 결과들은 Margesin 등(7)이 보고된 것과 같이 분해율의 한계성으로 판단된다. 더 나아가, *P. aeruginosa* F722를 이용하여 얻어진 자료를 토양복원 현장에 활용하기 위한 충분한 적용성 검토를 수행하여 실험실 수준의 자료에서 벗어날 수 있도록 심도 있는 조사가 수행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 등·경유 혼합물을 *Pseudomonas aeruginosa* F722를 이용하여 분해시킬 때 생분해율에 미치는 생물계면활성제, 화학계면활성제 및 공기 공급량의 영향을 조사하였다. 그 결과, 탄화수소 분해율은 0.01%와 0.15% 농도의 생물계면활성제를 첨가하였을 때가 0.05%, 0.1% 및 0.2%농도의 생물계면활성제를 첨가하였을 때보다 최고 6.2% 높은 94.3, 94.2% 제

거율을 나타냈다. 하지만, 0.15% 생물계면활성제를 첨가하였을 때가 0.01% 생물계면활성제를 첨가하였을 때보다 탄화수소 분해율이 더 안정적이었다. 그리고 생물계면활성제 (surface tension; 30 mN/m)와 화학계면활성제 (Tween 80; 39 mN/m, detergent; 31 mN/m)를 0.15% 농도로 첨가하여 배양하였을 때, 탄화수소 분해율은 94.2, 93.5, 93.4%로 비슷하였다. 하지만, *P. aeruginosa* F722의 개체수는 생물계면활성제를 첨가했을 때가 화학계면활성제를 첨가했을 때보다 2배 이상 증가된 19×10^7 cfu/ml로 조사되었다. 0.5 vvm으로 공기를 공급하면서 교반을 수행하였을 때, 배양 3일 후, 사용균주를 접종하지 않은 공시험에서 탄화수소 분해율은 68.8%였으며, *P. aeruginosa* F722를 접종하였을 때는 94.8%이었다. 0.5 vvm으로 공기를 공급하였을 때가 공기를 공급하지 않았을 때보다 배양시간이 1/3로 단축되었다. 그리고 교반배양 (3일)과 정지배양 (10일)에서 탄화수소 분해율은 각각 94.8, 93.7%였다.

REFERENCES

1. Atlas, R. M. and C. E. Cerniglia (1995), Bioremediation of Petroleum Pollutants Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation, *BioScience* **45**, 332-338.
2. Atlas, R. M. and R. Unterman (1999), Bioremediation, In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd ed., A. L. Demain and J. E. Davies (Eds.), pp. 666-681, ASM press. Washington, DC.
3. Swannell, R. P. J., K. Lee, and M. McDonagh (1996), Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation, *Microbiol. Rev.* **60**, 342-365.
4. Bognolo, G. (1999), Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **152**, 41-52.
5. Desal, J. D. and I. M. Banat (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
6. Margesin, R. and F. Schinner (2001), Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine Glacier skiing area, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3127-3133.
7. Margesin, R. and F. Schinner (1997), Efficiency of indigenous and inoculated soil-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2660-2664.
8. Noordman, W. H., J. H. J. Wachter, G. J. de Boer, and D. B. Janssen (2002), The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability, *J. Biotechnol.* **94**, 195-212.
9. Freijer, J. I. (1996), Mineralization of hydrocarbons in soil under decreasing oxygen availability, *J. Environ. Qual.* **25**, 296-304.
10. Rhykerd, R. L., B. Crews, K. J. McInnes, and R. W. Weaver (1999), Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil, *Biores. Technol.* **67**, 279-287.
11. Sidorov, D. G., I. A. Borzenkov, R. R. Ibatullin, E. I. Milekhina, I. T. Khrarov, S. S. Belyaev, and M. V. Ivanov (1997), A field experiment on decontamination of oil-polluted soil employing hydrocarbon-oxidizing microorganisms, *Appl. Biochem. Microbiol.* **33**, 441-445.
12. Floriane, S. S., R. Marchal, S. Casarégola, C. Vasnier, J. M. lebeault, and J. P. Vandecasteele (2000), A mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2392-2399.
13. Korea Petroleum Association. (1995), *Petrolic understanding*, Korea.
14. Oh, K. T., G. H. Park, J. I. Lee, J. K. Lee, S. J. Kim, Kubo Motoki, and S. Y. Chung (2002), Biodegradation of Crude oil and Petroleum products by Crude Oil-degrading Microorganism, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 247-254.
15. Oh, K. T., Y. W. Lee, M. Kubo, S. J. Kim, and S. Y. Chung (2000), Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil, *Kor. J. Socie. Environ. Engine.* **22**, 1851-1859.
16. Van Hamme, J. D. and O. P. Ward (2001), Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4874-4879.
17. Ron, E. Z. and E. Rosenberg (2002), Biosurfactants and oil bioremediation, *Current Opinion Biotechnol.* **13**, 249-252.
18. Stelmack, P. L., M. R. Gray, and M. A. Pickard (1999), Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 163-168.
19. Oh, K. T., C. M. Kang, and S. Y. Chung (2003), The optimum culture condition for the increase of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* F722, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 145-148.