

Pseudomonas sp. KDi19를 이용한 액체배지내에서 경유의 생물학적 분해

윤민우 · 정정화 · 장순웅* · 공성호** · 이종렬*** · 강동효**** · 이상섭†

경기대학교 생명공학과 · *경기대학교 환경공학과 · **한양대학교 화학공학과 · ***아름다운환경건설(주) · ****부산환경시설공단

(2005년 11월 14일 접수, 2005년 12월 18일 채택)

Biodegradation of Diesel with *Pseudomonas* sp. KDi19 in Liquid Medium

Min-Woo Yun · Jeong-Hwa Jeong · Soon-Woong Chang* · Sung-Ho Kong**

Jong-Yeol Lee*** · Dong-Hyo Kang**** · Sang-Seob Lee†

Department of Biological Engineering, Kyonggi University · *Department of Environmental Engineering, Kyonggi University,

Department of Chemical Engineering, Hanyang University · *Beautiful Environmental Construction Co.,Ltd,

****Busan Metropolitan City Environmental Installations Corporation

ABSTRACT : In this study, we isolated bacteria from petroleum contaminated soil which were near to underground storage tanks(UST). Through the screen test, we selected high efficiency bacterium, KDi19, for biodegradation of diesel. KDi19 was identified as *Pseudomonas* sp. by 16S rDNA, fatty acid, and morphological · physiological characteristics. KDi19 degraded 956.3 mg/L(95.6%) of 1,000 mg/L diesel for 48 hours(incubation condition : temperature; 30°C, cell concentration; 1.0 g/L, pH 7). At low temperature, 20°C, 15°C, 10°C, KDi19 respectively removed 63.9%, 18.5% and 17.0% of 1,000 mg/L diesel for 48 hours(cell concentration 1.0 g/L, pH 7). At low concentration of diesel, 50 mg/L and 100 mg/L, KDi19 degraded 97.9% and 96.2% of diesel for 24 hours(temperature; 30°C, cell concentration: 1.0 g/L, pH 7), respectively.

Key Words : Biodegradation, Diesel, TPH, *Pseudomonas* sp.

요약 : 본 연구에서는 유류로 오염된 주유소 저장 창고 및 부분의 토양에서 경유 분해 균주를 순수분리한 후, 스크린 테스트를 거쳐 고효율의 경유분해균주 KDi19를 선별하였다. KDi19균주는 16S rDNA 분석, 지방산 분석, 생리·생화학적 특징 그리고 형태학적 특징을 확인한 결과 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. KDi19는 온도 30°C, pH 7, 그리고 농도 1.0 g/L의 조건에서 48시간 동안 초기 1,000 mg/L의 경유 중 956.3 mg/L(95.6%)를 제거하였다. 또한 농도 1.0 g/L, pH 7의 조건에서, 낮은 온도(20°C, 15°C, 10°C) 적용 시, 경유 1,000 mg/L을 48시간 동안 각각 63.9%, 18.5%, 17.0% 제거하였다. 마지막으로 농도 1.0 g/L, pH 7, 온도 30°C 조건일 경우, KDi19는 저농도 경유 50 mg/L와 100 mg/L를 24시간 동안 각각 49.0 mg/L(97.9%)와 96.2 mg/L(96.2%)를 제거하였다.

주제어 : 생물학적분해, 경유, 총탄화수소화합물, *Pseudomonas* sp.

1. 서론

산업화에 따른 유류 소비의 비약적인 증가와 다양한 종류의 유기합성물질이 개발되고, 그 사용량이 지속적으로 증가함에 따라 이들 물질들은 생산, 운반, 저장 등의 과정에서 사고나 고의적인 방류 등으로 인해 자연환경에 유출되어 심각한 환경오염을 야기해 왔다. 이에 따라 최근 들어 오염 토양 및 지하수 복원 기술의 개발이 절실히 요구되고 있다.¹⁾ 유류는 휘발성이 큰 가솔린(C₄~C₁₀)과 끓는점이 160~250°C 정도인 등유(C₉~C₁₃) 및 끓는점이 200~370°C 정도인 경유(C₁₀~C₂₈)로 구분할 수 있으며 이들을 총칭하여 총 석유 탄화수소(TPH: Total Petroleum Hydrocarbon)로 분류한다. 그러나 주로 TPH는 경유(diesel)를 의미한다.²⁾ 이러한 경유(diesel)는

물리적·화학적으로 처리 되고 있지만,^{3,4)} 그 비용과 부산물의 생성으로 인해 최근 생물학적처리가 높게 평가되고 있다.

최근 경유의 생물학적처리 연구는 액체배지내에서 순수 분리된 균주와 혼합균주를 이용하여 경유 25,000 mg/L를 14일 동안 최고 42%의 제거율을 보여주었다.⁵⁾ 그리고 단일균주의 혼합액을 이용하여 10,000 mg/L의 경유를 20일 동안 90% 제거하였으며,⁶⁾ 낮은 온도(4, 10, 20°C)에서 혼합균주를 이용하여 20일 동안 최고 60%의 경유 분해율을 확인하였다.^{7,8)} 단일균주를 이용한 실험에서는 10,000 mg/L 경유를 4일 동안 약 95% 제거하였으며,⁹⁾ 각각의 단일 탄화수소 제거율을 확인하였다.¹⁰⁾ 10,000~50,000 mg/L 농도 경유의 생물학적 처리에 관한 연구에서는 유류에 오염된 토양과 유기물을 혼합하여 생물학적 분해를 유도하거나, 혼합균주를 이용하여 토양에 오염된 경유의 생물학적 처리 연구를 실시하였다.^{11,12)} 그리고 경유(diesel), 등유(kerosene), 그리고 광물성기름(mineral oil)의 생물학적 처리에서는 200일 이상의 처리기간으로도

† Corresponding author
E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr
Tel: 031-249-9642

Fax: 031-251-4721

완전한 처리는 보여주지 못하고 있다.¹³⁾

이러한 고농도 경유에 대한 생물학적 처리 연구는 계속적으로 진행되고 있으나, 2003년도 환경부에서 실시한 '토양측정망 및 실태조사결과'에 따르면, 전국적으로 TPH의 오염농도가 최고 2,947.0 mg/L, 평균 35.2 mg/L으로, 대부분 1,000 mg/L 이하의 농도로 오염되어 있는 것으로 발표되었다.¹⁴⁾

따라서, 본 연구에서는 경유 1,000 mg/L 이하의 농도에 초점을 맞추어, 고효율 균주를 분리, 동정하였고, 회분식 실험을 통하여 고효율 균주의 최적배양조건을 도출하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 증식배양과 균주분리

인천 소재의 A 주유소의 저장탱크로부터 새어나온 유류에 오염된 토양을 채취하였다. 채취된 토양 1%는 경유 5%가 포함된 100 mL 무기배지에 접종하였다. 무기배지의 조성(g/L)은 KH₂PO₄ 2.0, K₂HPO₄ 2.0, KNO₃ 1.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, NaCl 0.4, MgSO₄ · 7H₂O 0.4, CaCl₂ · 2H₂O 0.04, FeCl₃ · 7H₂O 0.02, trace element solution SL-6 1.0 mL, and vitamin solution 1.0 mL와 같았다. 배양액은 온도 28~30°C, 150 rpm으로 4~5일 진탕배양하였다. 배양 중, 균의 성장은 매일 위상차 현미경(×1,000, BX50, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

균의 성장을 확인한 후, 균주분리는 streak plate method와 spread plate method를 이용하여 실시하였다. Agar plate 제작시, 무기배지에 1.8%의 agar powder를 첨가하였으며, 습윤 멸균(121°C, 15 min) 후, 경유는 1,000 mg/L의 농도로 agar 배지에 첨가되어 고행배지로 제작하였다. 고행배지는 28~30°C에서 호기 배양되었다. 증식배양에서 얻은 배양액은 혼합균주로 사용하였다.

2.2. 분리 균주 동정

형태학적 특징은 단순 염색(simple staining)과 그람 염색(Gram staining)후, 광학현미경(×1,000, BX41, Olympus, Japan)하에서 형태와 크기, 균집 형태, 그람 양성/음성 박테리아로 판별하였으며, 분리 균주의 운동성은 위상차 현미경(×1,000, BX50, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다. 고효율 균주 동정을 위하여 16S rDNA 분석과 지방산 분석을 실시하였으며, 생리·생화학적 특징은 API 20NE kit(BioMerieux, France)를 이용하여 확인하였다. 그리고 16S rDNA의 염기서열을 분석하기 위하여 primer는 forward primer 5'-CTGCAGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3'와 reverse primer 5'-GGATCCCAGGC CCGGAACGTATTAC-3'를 사용하였다. PCR은 BIO-RAD사의 iCycler를 이용하여 수행하였으며, 반응조건은 94°C에서 5분간 반응 후, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초를 30회 실시하였으며, 마지막으로 72°C에서 30초로 DNA를 증폭하였다. 지방산 분석은 flame ionization detector (FID)를 장착한 HP 6890N gas chromatography(Agilent, USA)를 이용하여, MIDI사의 SHERLOCK system software를 이용하여 균을 동정하였다.

2.3. 경유 분해 균주 스크린

본 실험에서는 국내 대표 정유회사 3곳으로부터 상품화되고 있는 경유의 구성성분을 GC/MS(HP 6890N gas chromatography/5970 inert Mass selective detector(Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다.

균체의 성장은 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 흡광도에 영향을 주는 경유 성분을 제거하기 위하여 배양액을 6000 rpm으로 15분 동안 원심분리(CENTRIKON T-124, KONTRON, Italy)하여 균체를 얻은 후, 새로운 무기배지에 균체를 부유시켜 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하였다. 성장률이 우수한 균주를 선별하고, 스크린 테스트를 실시하여 경유의 제거능을 확인하였다. 본 실험에서 사용된 120 mL bottle은 경유의 휘발을 최소화하기 위하여 Teflon-silicon septa와 aluminum seal로 밀봉하였다. 배지는 10 mL, 경유 1,000 mg/L, 균농도는 1 g/L(w/w)로 접종하여 6일간 28~30°C에서 진탕배양하였고, 배양병 내에 잔류 경유의 농도를 측정하여 그 효율을 평가하였다.

2.4. 시료의 전처리와 분석

경유의 분석을 위하여 배양액내의 경유는 추출용매 methylene chloride를 1:1 비율로 사용하여 추출하였다(30 min, 150 rpm, 28°C). 추출된 용매 5 mL를 얻은 후, 2.0 g의 무수황산나트륨을 이용하여 수분을 제거한 후, 2 mL sample vial에 담아 ACME 6000 Auto sampler를 장착한 gas chromatography(ACME 6000, Younglin Instrument, Korea)를 이용하여 분석하였으며, 검출기는 flame ionization detector(FID)와 컬럼은 HP-5 column(30 m×0.32 mm×1 μm)을 사용하였다. GC 조건은, 주입구와 검출기 온도는 각각 250°C, 290°C를 유지하였으며, 오븐의 온도는 초기 40°C에서 1분간 대기 후, 분당 15°C씩 290°C까지 승온하였으며, 290°C에서 5분간 대기하였다.

2.5. 배양조건에 따른 경유분해능 조사

고효율로 선별된 균주에 배양조건을 다양하게 제시하여 최적 배양조건을 도출한 후, 경유의 제거능을 개선하고자 하였다.

배양조건은 온도 10, 20, 30, 40°C, pH 5, 6, 7, 8, 9, 균농도 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g/L(w/w), 그리고 경유의 농도 1,000, 5,000, 10,000, 20,000 mg/L로 다양하게 제시하여 72시간 배양한 후, 배양액내의 경유 잔류 농도를 확인하였다.

2.6. 수용액내의 경유의 포화농도 조사

수용액내 경유의 포화농도를 측정하기 위하여 무기배지 50 mL에 경유 10%를 접종하여, 1시간 동안 혼합해주었다(20°C, 150 rpm). 혼합 후, 정치시켜 5분, 10분, 20분, 30분, 그리고 60분에 배지를 5 mL씩 샘플링하여 배지내의 경유 농도를 측정하였다.

2.7. 회분식 실험

KDi19는 경유 1,000 mg/L에 대해 최적 배양 조건으로 도출된 온도 30°C, pH 7, 균 농도 1.0 g/L(w/w) 조건 하에서

48시간 동안 시간별 제거능을 확인하였으며, 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하여 균체량의 증가를 측정하였다. 그리고 같은 조건하에서 혼합균주의 48시간 후 제거능도 확인하여 KDi19의 제거능과 비교하였다. KDi19에 대한 저온도에서의 경유 제거실험은 48시간 동안 균농도 1.0 g/L, pH 7, 경유 1,000 mg/L로 실시하였으며, 저온도는 3가지(10, 15, 20℃)를 제시하였다. 저농도의 경유, 50 mg/L와 100 mg/L에 대한 제거 실험은 균 농도 1.0 g/L, 온도 30℃, pH 7로 조건을 제시하여 24시간 동안 시간별 제거율을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주 선별 및 동정

유류 오염 토양에서 총 39개 균주를 분리하였고, 형태학적 관찰 결과 30개의 균주는 형태 rod, Gram negative, 0.5~0.8 μm × 1.5~2.0 μm(폭×길이)의 크기로 관찰되었고, 9개 균주는 rod형, Gram positive, 크기는 0.3~0.5 μm × 0.8~1.2 μm로 관찰되었다.

39개 균주에 대해서 성장률을 측정하여 16개의 균주를 1차 스크린 하였고, 16개 균주에 대해서 GC분석을 통하여, 경유 분해율이 뛰어난 KDi19 균주를 선별하였다(Table 1). 고효율 균주로 선별된 KDi19는 API 20NE kit를 이용한 동정결과, oxidase와 arginine dihydrolase 활성은 양성으로 나타났으며, reduction of nitrates, indole production, acidification, urease, β-glucosidase, protease, β-galactosidase 활성은 음성으로 판명되었다. 탄소원 이용에 대한 성장 측정 결과, glucose, gluconate, caprate, malate, citrate, phenyl-acetate는 탄소원으로 이용 할 수 있었고, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, adipate는 탄소원으로 이용 할 수 없었다. 위와 같은 생리·생화학적 특성의 결과는 API 20NE V6.0로 분석하여, KDi19는 *Pseudomonas putida*와 99.6%의 높은 유사도를 나타내었다. 이 결과는 유류오염토양에서 분리된 미생물 중 경유분해능을 가진 균주로 *Pseudomonas* sp.가 대표적으로 잘 알려져 있는 것과 같은 결과를 나타내고 있다.⁶⁾ 그리고 KDi19의 16S rDNA 염기서열을 GenBank database를 이용하여 분석한 결과 *Pseudomonas citronellois*¹⁵⁾와 99%의 높은 유사도를 보였다. 그리고 지방산 분석 결과에서 KDi19는 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다. 3가지 결과 모두 Genus *Pseudomonas*로 동정되었지만 종(species) 수준에서 서로 다른 결과를 보여서 KDi19의 16s rDNA 염기서열을 GenBank database의 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Pseudomonas putida*의 염기서열과 비교하였다. 그 결과, 각각 96%와 95%의 유사도를 확인하였다. 16s rDNA염기서열분석과 생리·생화학 테스트에서 각각 다른 결과를 보여준 것과 같은 경향을 보이고 있다.^{9,15)}

결과적으로, KDi19는 3가지 종들과 다른 새로운 균주의 가능성을 제시하고 있어, KDi19는 *pseudomonas* sp. KDi19로 명명하고, KDi19에 대한 동정은 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Table 1. Biodegradation of diesel during screen test with 16 strains in 6 days (unit: mg/L)

Strains	Initial conc.	Residual conc.	Rem.(%)	Strains	Initial conc.	Residual conc.	Rem.(%)
KDi19	904.4	14.2	98.4	KDi6	904.4	568.7	37.1
KDi 3	904.4	235.0	74.0	KDi16	904.4	570.1	37.0
KDi18	904.4	317.8	64.9	KDi30	904.4	579.0	36.0
KDi4	904.4	425.5	53.0	KDi1	904.4	600.5	33.6
KDi10	904.4	487.1	46.1	KDi13	904.4	607.1	32.9
KDi11	904.4	516.3	42.9	KDi21	904.4	651.7	27.9
KDi15	904.4	550.7	39.1	KDi2	904.4	664.7	26.5
KDi17	904.4	555.2	38.6	KDi28	904.4	674.3	25.4

※ Rem.: removal efficiency

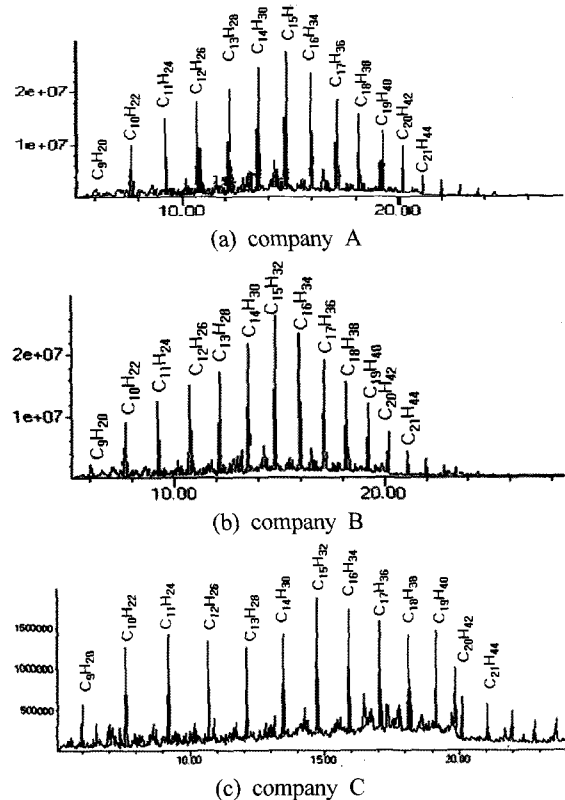


Fig. 1. Gas chromatograms(GC/MS) of 1% diesel from three oil refining companies.

그리고 본 실험에서는 국내 대표 3사의 경유의 성분을 비교하였다(Fig. 1.) 그 결과 3사의 경유 구성성분 각각의 농도는 차이가 있었지만, 구성성분 자체는 유사함을 확인할 수 있었다. 따라서 국내의 최대 주유소를 소유한 C사의 경유를 본 실험에 사용하기로 하였다.¹⁷⁾

고효율 균주로 선별된 KDi3과 KDi19를 배양한 후, 경유의 잔류농도측정 결과, KDi3은 48시간 배양된 후 배지 내의 C₁₅ 이하 탄화수소의 제거를 확인 할 수 있었으나(Fig. 2(b)), C₁₅ 이상의 고분자 탄화수소는 완전히 제거되지 않았다. 반면에, KDi19의 경우, C₁₅ 이하의 탄화수소의 제거를 시작으로 배양 24시간 이후에는 고분자의 탄화수소를 제거하여 모

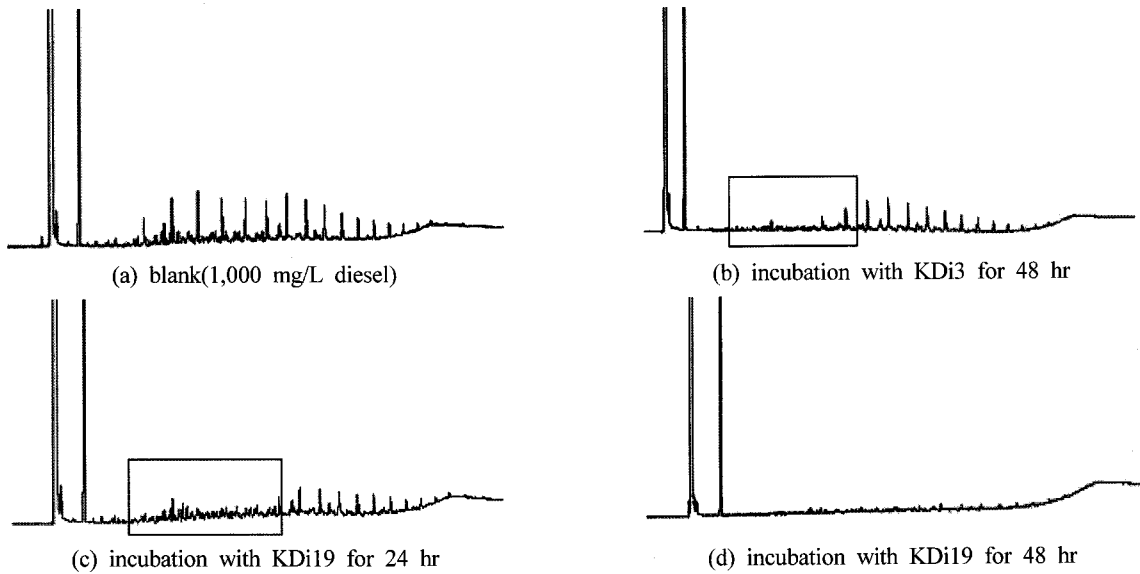


Fig. 2. Gas chromatograms(GC/FID) of diesel.

든 탄화수소의 제거를 보여주었다(Fig. 2(c), (d)). Fig. 2(b)에서 나타나는 C₁₅ 이하 탄화수소의 제거 경향은 스크린 테스트를 실시한 16개 균주 중, KDi19 균주만을 제외하고 모두 같은 경향을 보이고 있었다.

3.2. 배양조건에 따른 경유분해능 조사 결과

고효율 균주로 선별된 KDi19를 1일부터 6일까지 경유 1,000 mg/L에 대한 제거율을 확인한 결과, 72시간에서부터 제거율의 감소를 확인하였다(data는 첨부하지 않음). 따라서 배양조건에 따른 경유분해능 실험에서는 72시간 동안의 제거율을 확인하였다.

3.2.1. 균 농도의 변화

균 농도에 따른 경유의 제거 실험에서는 경유농도 1,000 mg/L, pH 7, 그리고 온도 30℃로 유지하였다. 그 결과 72시간 후, 4가지 조건(0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g/L) 모두 90% 이상의 제거능을 보여주었고, 그 중, 균농도 1.0 g/L 일 때, 95.9%로 가장 높은 제거능을 보여주었다(Table 2).

3.2.2. 경유 농도의 변화

경유의 농도에 따른 제거실험에서는 pH 7, 온도 30℃, 그리고 균농도 1.0 mg/L로 유지하였으며, 그 결과 72시간

후, 경유 1,000 mg/L일 때 98.4%, 5,000 mg/L일 때 93.5%, 10,000 mg/L일 때 53.1%, 20,000 mg/L일 때 44.1%의 제거율을 각각 보여주었다. 이것은 경유가 포함한 다양한 용해성 독성 성분으로 인해 미생물의 성장저해 효과를 나타낸 것으로 생각된다.⁹⁾ 결과적으로, KDi19는 경유 1,000 mg/L과 5,000 mg/L에서 높은 제거율을 보이고 있는 것을 알 수 있었고, 고농도 10,000 mg/L와 20,000 mg/L에 대한 제거율은 각각 52.1%와 44.6%를 나타내고 있어 고농도 경유의 제거 또한 가능함을 확인하였다(Table 3).

3.2.3. 배양 온도의 변화

배양 온도의 변화에 따른 제거실험에서는 pH 7, 균농도 1.0 g/L, 그리고 경유농도 1,000 mg/L로 유지하여, 72시간 후 배양온도 30℃일 때, 가장 높은 92.4%의 제거율을 보여주었고, 20℃와 40℃의 경우에는 각각 76.6%, 73.1%의 제거율을 보여주었다(Table 4).

3.2.4. pH 변화

pH 변화에 따른 제거실험에서는 온도 30℃, 균농도 1.0 g/L, 그리고 경유 농도 1,000 mg/L로 유지하여, pH 6, 7, 8에서 모두 96% 이상의 제거율이 나타났으며, 그 중 pH 7에서 96.8%의 제거율을 보여주었다(Table 5).

Table 2. Removal efficiency of diesel at various cell concentrations for 72 hr(Tem.: 30℃, pH 7, diesel conc.: 1.000 mg/L) (Unit: mg/L)

Cell conc.(g/L)	Initial conc.	Residual conc.	Rem.(%)
0.5	912.5(±19.7)	52.7(±0.7)	94.2
1	912.5(±19.7)	26.5(±6.8)	97.1
2	912.5(±19.7)	35.5(±6.1)	96.1
3	912.5(±19.7)	88.1(±0.04)	90.3

※ conc.: concentration, Rem.: removal efficiency, Tem.: temperature

Table 3. Removal efficiency of diesel at various diesel concentrations for 72 hr(Tem.: 30℃, pH 7, cell conc.: 1.0 g/L) (Unit: mg/L)

Initial conc.	Residual conc.	Rem.(%)
911.0(±8.9)	14.3(±3.0)	98.4
5146.7(±71.3)	335.5(±165.5)	93.5
11319.9(±1304.6)	5310.0(±563.0)	53.1
21355.3(±500.1)	11840.0(±637.1)	44.6

※ conc.: concentration, Rem.: removal efficiency, Tem.: temperature

Table 4. Removal efficiency of diesel at various temperatures for 72 hr(diesel conc.: 1,000 mg/L, pH 7, cell conc.: 1.0 g/L) (Unit: mg/L)

Temperature (°C)	Initial conc.	Residual conc.	Rem.(%)
10	931.2(±34.6)	806.5(±22.0)	13.4
20	931.2(±34.6)	217.8(±4.0)	76.6
30	931.2(±34.6)	70.4(±16.5)	92.4
40	931.2(±34.6)	250.2(±14.3)	73.1

※ conc.: concentration, Rem.: removal efficiency

3.3. 수용액내의 경유의 용해도 조사 결과

수용액내의 경유의 용해농도 조사 결과, 1시간 혼합 후, 정 치시간이 지날수록 경유의 농도가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 정치 5분후 수용액내의 경유 농도는 85.7 mg/L였으며, 10분, 20분, 30분, 1시간 후의 농도는 각각 47.5 mg/L, 41.2 mg/L, 41.7 mg/L, 40.8 mg/L로 나타났다(Table 6). 따라서 본 실험에서는 수용액에 용해되는 경유농도를 고려하여 두 가지 저농도, 100 mg/L와 50 mg/L를 실험에 적용하였다.

3.4. 희분식 실험

KDi19는 경유 1,000 mg/L에 대해서 온도 30°C, pH 7, 균 농도 1.0 g/L(w/w) 조건으로 48시간 동안 95.6%의 높은 제거율을 보여주었다. 이것은, 흡광도 측정 결과, KDi19 성장은 접종 후 36시간까지 지속됨을 확인 할 수 있었으며, KDi19의 성장률은 μ_{max} (the maximum net specific growth rate)는 0.02 hr⁻¹, 반응속도상수 K는 2.2×10⁻³ min⁻¹로 나타났다(Fig. 3). 위와 동일한 조건에서 혼합균주는 48시간 동안 99.4%의

Table 6. The residual concentrations of diesel during static condition (Unit: mg/L)

Time(min.)	5	10	20	30	60
Diesel concentration	85.7 (±4.2)	47.5 (±2.1)	41.2 (±3.5)	41.7 (±0.8)	40.8 (±1.2)

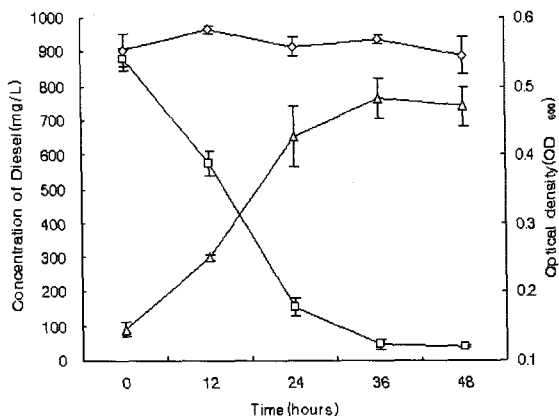


Fig. 3. Biodegradation of diesel(1,000 mg/L) by KDi19 for 48 hr. Control(◇), concentration of diesel(□) and optical density(OD₆₀₀)(△).

Table 5. Removal efficiency of diesel at various pH conditions for 72 hr(diesel conc.: 1,000 mg/L, cell conc.: 1.0 g/L. Tem.: 30°C) (Unit: mg/L)

pH	Initial conc.	Residual conc.	Rem.(%)
5	918.7(±32.2)	302.2(±1.6)	67.1
6	918.7(±32.2)	73.1(±2.4)	92.0
7	918.7(±32.2)	59.4(±7.9)	93.5
8	918.7(±32.2)	61.3(±2.8)	93.3
9	918.7(±32.2)	411.8(±20.1)	55.2

※ conc.: concentration, Rem.: removal efficiency, Tem.: temperature

제거율을 나타냈다(Fig. 4). KDi19는 단일균주만으로 혼합균주의 제거능과 비슷한 제거율을 보여 고효율 균주임을 확인할 수 있었다.

KDi19는 낮은 온도 20°C, 15°C, 10°C에서 1,000 mg/L 경유를 48시간 동안 각각 63.9%, 18.5%, 17.0% 제거하였다(Fig. 5). 그리고 저농도 경유 50 mg/L과 100 mg/L에 대해서 24시간 동안 각각 97.9%와 96.2%를 제거하였다(Fig. 6). 이처럼 KDi19는 저농도에서도 뛰어난 제거능을 보였으나 배양 온도 10°C와 15°C에서의 경유 제거율은 20°C와 30°C를

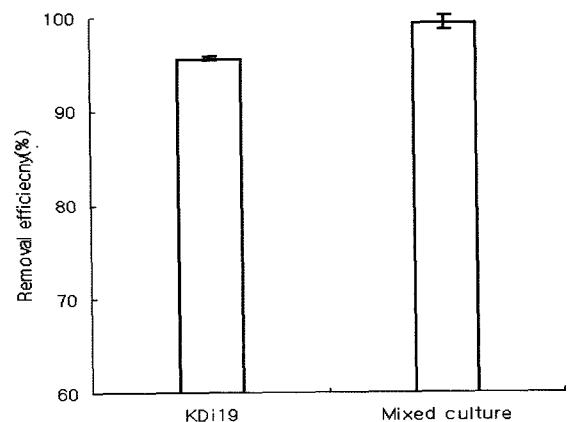


Fig. 4. Removal efficiency of diesel(1,000 mg/L) by KDi19 and mixed culture after 48 hours of biodegradation.

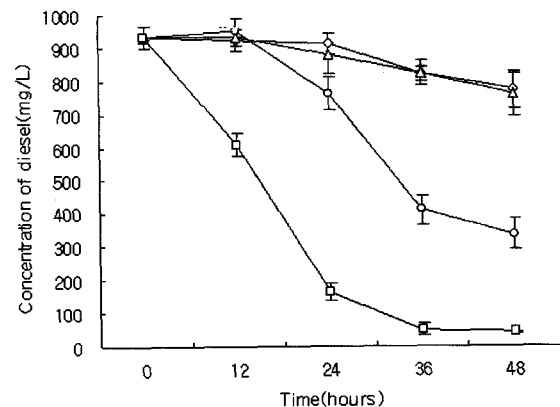


Fig. 5. Biodegradation of diesel(1,000 mg/L) by KDi19 at low temperature for 48 hr. 10°C(◇), 15°C(△), 20°C(○), 30°C(□).

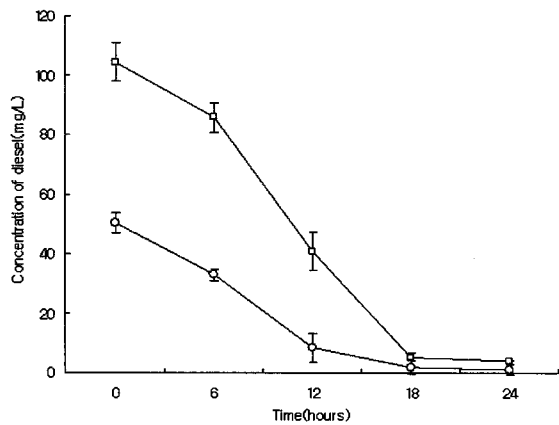


Fig. 6. Biodegradation of diesel(50 and 100 mg/L) by KDi19 for 24 hr. Initial concentrations of diesel: 100 mg/L(□), 50 mg/L(○).

비교하여 현저하게 떨어지는 결과를 보여주었다. 이는 경유 4,100 mg/L를 20일 동안 4°C와 10°C의 낮은 온도에서 41~60%의 제거능보다 낮지만,⁷⁾ 48시간 동안의 제거능만을 확인한 KDi19의 배양시간을 더 연장한다면 더 높은 제거능을 보여줄 것으로 생각된다. 따라서 낮은 온도에서 경유에 대하여 제거능을 높이기 위한 연구가 더 진행되어야 할 것이며, 또한 오염토양 적용 실험을 통하여 실제 현장적용에 적합한 배양조건을 찾아야 할 것으로 생각된다.

4. 결론

액체배지 내에서 단일균주를 이용한 경유의 분해실험으로 다음 같은 결론을 얻었다.

1) 유류오염 토양에서 고효율의 경유 분해균주, KDi19를 분리하였고, KDi19는 형태학적 특징, 생리·생화학적특징, 지방산 분석 그리고 16S rDNA 염기분석결과 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다.

2) KDi19는 경유 1,000 mg/L에 대해서 온도 30°C, pH 7, 균농도 1.0 g/L일 때, 48시간 동안 956.3 mg/L(95.6%)를 제거하였다. 또한 고농도 경유, 5,000 mg/L에서도 72시간 동안 93.5%의 높은 제거율이 관찰되었다. 그리고 KDi19는 혼합균주와 유사한 제거효율을 확인하였다.

3) 수용액내에 용해되는 경유의 농도는 고농도의 경유가 오염되더라도 실제 경유의 농도는 100 mg/L이하로 측정되었다. 따라서 본 실험에는 저농도 (50 mg/L, 100 mg/L)에 대해서 제거 실험을 실시하였고, 24시간 배양 후, KDi19에 의해서 각각 97.9%와 96.2%가 제거되었다. 그리고 낮은 배양 온도(20°C, 15°C, 10°C)에서의 제거율은 각각 63.9%, 18.5%, 17.0%로 나타났다. KDi19는 저농도에 대한 제거율은 월등히 뛰어났으나, 낮은 배양온도에서는 현저히 떨어지는 제거율을 보여주었다.

4) 따라서 KDi19는 저농도·고농도 경유에 오염된 토양과 수용액의 생물학적 처리시 적용에 적합할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업과 과학기술부 기초과학연구사업의 연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 이대성, 박종무, "토양 및 지하수오염 복원 기술," *DICER Techinfo part I*, 4(1), 1~16(2005).
2. 표희수, 박송자, 박성수, 홍지은, 이강진, "오염 토양중의 유류 분석법," *한국토양환경학회지*, 3(2), 3~12(1998).
3. Roberts, E. R., *Remediation of Petroleum Contaminated Soils*, LEWIS PUBLISHERS(1998).
4. Richard, J. W. and Samuel, E. D., "Evaluation of iron catalysts for the fenton-like remediation of diesel-contaminated soils," *J. of Hazard. Mater.*, 51, 209~224(1996).
5. Baryshnikova, L. M., Grishchenkov, V. G., Arinbasarov, M. U., Shkidchenko, A. N., and Boronin, L. M., "Biodegradation of oil products by individual degrading strains and their associations in liquid media," *Appl. Biochem. and Microbiol.*, 37, 542~548(2001).
6. Richard, J. Y. and Vogel, T. M., "Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel," *Int. Biodeter. & Biodegr.*, 44, 93~100(1999).
7. Margesin, R. and Schinner, F., "Biodegradation of diesel oil in liquid cultures and in soils at low temperatures," *DECHEMA Monographs*, 133, 295~300(1996).
8. Margesin, R. and Schinner, F., "Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 462~468(1997).
9. 이종광, 김무훈, 박형수, "유류 오염 토양으로부터 분리한 디젤 분해 세균 *Pseudomonas* sp. GENECO 1의 분리 및 특성 규명," *Kor. J. of Microbiol.*, 39(2), 102~107(2003).
10. Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., and Basri, M., "Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium," *Int. Biodeter. & Biodegr.*, 54, 61~67(2004).
11. Facundo, J. M., Vanessa, H. R., and Teresa, L. M. A., "Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium," *Water, Air, and Soil Poll.*, 128, 313~320(2000).
12. Namkoong, W., Hwang, E. Y., Park, I. S., and Choi, J. Y., "Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting," *Env. Poll.*, 119, 23~31(2002).
13. Nocentini, M., Pinelli, D., and Fava, F., "Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures : the residual concentration problem," *Chemosphere*, 41, 1115~1123(2000).
14. 환경부, 2003년도 토양 측정망 및 실태조사 결과 보고서(2004).

15. Susana, I. A. W., Jan, R. P., Tere, M., Alice, L., Andreas, K., and Thomas, L., "Transformation of isopropylamine to L-Alaninol by *Pseudomonas* sp. Strain KIE171 involves N-Glutamylated intermediates," *Appl. and Env. Microbiol.*, **68**(5), 2368~2375(2002).
16. John, G. H., Noel, R. K., Peter, H.A.S., James, T. S., and Stanley, T. W., *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*, 9th, Williams & Wilkins, 93~157(1994).
17. (사)한국주유소협회, <http://www.kosanet.or.kr>, July(2005).