



인공오염토양에서 분리한 디젤분해세균의 동정 및 특성

이수진, 송인근, 김영준[†]

가톨릭대학교 생명공학부 환경공학전공
(2006년 9월 4일 접수, 2006년 9월 18일 채택)

Identification and Characterization of Diesel Degrading Bacteria Isolated from Soil Artificially Contaminated with Diesel Oil

Su-Jin Lee, In-Geun Song, Young-Jun Kim[†]

Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea

ABSTRACT

Potential hydrocarbon degrading bacteria were screened from the site artificially polluted with 20,000 ppm of diesel. Among the isolates, two strains, SJD2 and SJD4, showed higher activities to degrade diesel on the Bushnell-Hass broth medium containing 2% of diesel. 16S rDNA sequence analysis revealed that SJD2 and SJD4 were *Bacillus fusiformis* and *B. cereus*, respectively. Both strains were found to grow in a wide range of temperature between 20°C – 55°C, with the best at 30°C – 37°C. This is the first report, as far as we know, that *B. fusiformis* is capable of degrading diesel. We hope that a new isolate, *B. fusiformis*, will efficiently conduct bioremediation at the contaminated sites with petroleum hydrocarbons.

Keywords: Diesel Degrading Bacteria, Bioremediation, *Bacillus fusiformis*

초 록

20,000ppm의 디젤로 오염시킨 토양으로부터 디젤 분해 활성이 있는 균주를 순수분리 하여 이를 동정하고 디젤유 분해능과 특성을 조사하였다. 분리된 균주는 각각 SJD2 및 SJD4로 명명하였으며, 최소배지에 디젤을 유일 탄소원으로 첨가하여 잔류 디젤 농도를 분석한 결과, SJD2 균주는 29.3%의 분해 효율을 가진 것으로 확인되었다. 각 균주의 16s-rDNA 염기서열 분석을 통해 SJD2 균주는 *Bacillus fusiformis*, SJD4 균주는 *Bacillus cereus*로 동정되었다. 실제 토양에서의 적용을 위해 microcosm을 제작하여 14일간 토양에서의 디젤 분해능을 측정된 결과, SJD2 균주가 24.9%의 분해 효율을 보였다. 두 균주 모두 2

[†]Corresponding author (yjunkim@catholic.ac.kr)

5℃-37℃에서 생장이 활발히 일어나 실제 토양에서도 이용이 가능할 것으로 예상되며 pH 7-8, 디젤 농도는 2%일 때 디젤 분해 효율이 가장 높은 것으로 나타났다.

핵심용어 : 디젤분해세균, 생분해, *Bacillus fusiformis*

1. 서론

산업화의 가속화로 유류는 중요한 에너지 자원으로 산업과 가정에서 널리 사용되고 있다. 그러나 많은 양의 원유 또는 정제된 석유 제품들이 생산, 운반, 저장 등의 과정에서 사고 또는 고의적인 방출에 의해서 생태계로 유출되어 커다란 피해를 유발시키고 있다¹⁾. 유류 유출사고의 발생시 방제작업으로 일부분이 제거되지만 대부분은 환경 내에 잔류하여 물리학적, 화학적, 생물학적 기작에 의해 복합적으로 분해가 일어난다²⁾. 대부분의 저장연료는 매우 복잡한 석유계 탄화수소로 구성되어 있고, 인체 및 토양생물에 유해한 성분들이 많이 포함되어 있기 때문에 오염토양은 반드시 적절하게 처리되어야 한다. 그 동안 사용되었던 유류 오염토양의 정화기술 방법은 그 자체가 많은 문제점을 지니고 있다. 예를 들어 흔히 사용되고 있는 물리화학적 처리방법은 완전한 제거효과를 기대하기 어렵고 방제 비용이 많이 들며, 화학물질인 유류분산제의 경우 독성으로 인한 2차오염이 문제점으로 대두되고 있다³⁾. 화학적 방법의 하나인 소각법은 대기오염을 야기하며, 지하 혹은 지상매립은 유독가스의 발생과 지하수의 오염을 유발한다⁴⁾. 세척에 의한 방법으로 화학합성 유화제, 미생물 유화제, 전극과 유화제 등을 이용한 토양 세척 방법이 있지만 오염 유류의 완전한 분해가 아닌 세척에 의한 제거로서 2차적인 처리의 문제점이 있으며, 이로 인하여 생물학적인 방법이 중요시 되고 있다⁵⁾. 유기오염물질의 생물학적 처리란 미생물이 증식하거나 생존하는데 필요한 에너지원이나 탄소원으로 유기오염물질을 사용하는 과정에서 변환되거나 소멸되는 현상을 보다 효과적인 처리가 되도록 인위적으로 조절하는 것을 말한다. 더욱이 1946년 ZoBell에 의해 자연계에 매

우 다양한 유류 분해 미생물이 분포하고 있다는 사실이 밝혀진 이후 다양한 분리방법이 개발되고 있으며, 유류 분해 미생물을 확보하여 유류 오염 문제를 미생물학적인 측면에서 해결하려는 노력이 계속되어 왔다⁶⁾. 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 있다⁷⁾.

기존의 유류 분해 미생물을 분리하는데 사용된 배지에는 yeast extract가 포함되어 있다⁸⁾. yeast extract는 영양매지에 첨가되어 미생물의 탄소원과 영양원으로 작용하며 미생물의 생장에 영향을 미치는 성분이 다량 함유되어 있기 때문에 미생물이 탄소원으로 디젤을 이용하지 않고 yeast extract를 이용했을 때에는 균주가 디젤을 분해한다고 보기 어려워진다. 이러한 이유로 본 연구에서는 균주의 유일 탄소원으로 디젤만이 이용될 수 있도록 디젤 분해 균주의 분리에 이용하는 배지의 조성에서 yeast extract를 제외하여 실험을 진행하였다.

환경조건의 최적화를 통한 미생물의 활성 증대로 오염물질을 효율적으로 제거하는 bioremediation은 크게 두 가지 방법으로 구분되는데, 서식하는 토착 미생물의 활성을 촉진시키기 위해 영양염, 전자수용체, 온도, pH 등을 조절하는 방법인 biostimulation과 자연계에서 분리한 오염물에 대한 분해능이 우수한 미생물이나 유전공학적으로 변형된 미생물을 첨가하는 방법인 bioaugmentation이 있다. 본 연구에서는 bioaugmentation을 이용한 처리를 목적으로 하여 디젤에 오염된 토양으로부터 디젤 분해능을 가진 균주를 분리·동정하고, 분리 균주의 특성 및 최적 성장조건을 분석하였으며 또한 인위적으로 토양을 디젤로 오염시킨 microcosm에

분리 균주를 적용하여 미생물학적 유류오염 복원의 현장 적용 가능성을 확인하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 디젤 분해 세균의 분리 및 배양

디젤 분해능이 있는 균주를 분리하기 위해 디젤로 오염된 토양을 채취하여 시료로 사용하였으며, 유일 탄소원으로 디젤이 첨가된 디젤 분해 평판 배지(Bushnell-Haas Broth 3.27 g/l, 0.25% Tween80, 2% diesel oil, agar 18g/l)에 시료를 접종하고 37°C에서 5일간 배양한 후 배지에 colony를 형성한 균주를 선별하였다⁸⁾.

2.2 디젤 분해능 실험

분리균주의 디젤 분해능을 확인하기 위하여 우선 septum bottle에 디젤 액체 배지(Bushnell-Haas Broth 3.27g/l, 0.25% Tween80, 2% diesel oil) 10ml를 넣고 LB 배지에서 전 배양한 균주를 200 μ l 접종한 후, 37°C, 150rpm에서 5일간 배양하였다. 배양후 배양액 내의 잔류 디젤량을 측정하기 위하여 배양액 10ml에 20ml의 dichloromethane (Sigma, USA)을 첨가하여 1분씩 3회 sonication 하였으며, 이후 상층부의 수용성 배양액을 제거하고 여분의 수분을 무수황산나트륨을 첨가하여 제거한 후, Gas Chromatography를 이용하여 배양액내 잔류 디젤의 양을 분석하였다.

2.3 Gas Chromatography

디젤분석을 위한 Gas Chromatography (HP 6890, USA)는 HP-5 capillary column[30m \times 0.32mm (ϕ) 0.25 μ m(film thickness)]을 사용하여 injector temperature 280°C, detector temperature 300°C, 초기온도 60°C에서 5분간 정지, 분당 10°C 승온, hold time 280°C에서 5분으로 설정하였으며, carrier gas로 N₂를 사용하였고 flow rate를 2.0ml/min에 맞추어 최종적으로 FID(Flame Ionization Detector)로 분석하였다. 시료는 autosampler를 이용하여 각 1 μ l씩 주입하였다. 분해효율은 초기 디젤유의 양을 배양후 잔류

디젤유의 양으로 나눈 값의 백분율로 나타내었다.

2.4 분리 균주의 생화학적 특성

분리세균의 동정을 위하여 1차적으로 그람 염색을 실시하였으며, 세균의 생화학적 특성을 조사하기 위하여 API 20E Test Kit (Biomereux, France)을 제조사의 manual에 따라 실행하였다.

2.5 분리 균주의 분자생물학적 동정

분리 세균의 계통진화학적 분류를 위하여 세균으로부터 chromosomal DNA를 추출한 후, PCR을 통하여 16s-rDNA를 증폭하였다. 증폭을 위한 primer는 세균의 공통 primer인 9F (5'-GAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'), 1542R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하였다⁹⁾. 증폭된 DNA는 (주) 솔젠트에 의뢰하여 16s rDNA의 염기서열을 분석하였으며, 이후 NCBI(National Center for Biotechnology Intormation) BLAST 염기서열 분석을 통하여 동정하였다.

2.6 Microcosm 제작 및 실험

디젤 오염토양의 모방 Microcosm으로 적당한 크기의 멸균한 aluminum pan에 멸균토양 600g을 채우고 10,000ppm의 디젤로 오염시킨 후 영양배지에서 전 배양한 균주 배양액을 주입하고, 모든 pan을 aluminum foil로 덮었다¹⁰⁾. 이후 약 2주간 매 24시간마다 멸균한 M9용액을 10ml씩 주입하고 공기 주입을 위해 토양을 섞어주었다. 멸균토양의 조성은 내경 2mm sieve를 이용하여 입자의 크기를 고르게 한 후 사용하였으며, 토양내 총유기물 함량, 수분 보유능 및 토양 pH를 토양오염공정시험법¹¹⁾에 따라 측정하였다.

3. 결 과

3.1 디젤 분해 균주의 분리 및 디젤분해특성

디젤에 오염된 토양으로부터 시료를 채취하여 이를 디젤분해 평판배지에 도말하여 배양한 결과, 총 6종의 디젤분해세균을 분리하였으며, 이들 중 비

교적 우수한 성장능을 보인 2종을 각각 SJD2 및 SJD4로 명명하였다. 이들 두 균주의 디젤능을 Gas Chromatography로 분석한 결과 대조군에 의한 자연제거율이 9.9%의 값을 나타낸 반면, SJD2 및 SJD4는 각각 29.3% 및 21.1%의 디젤 분해율을 나타내어 대조군에 비하여 제거효율이 각각 2.9배 및 2.1배 높은 것으로 나타났다[Table 1]. SJD4보다 디젤분해능이 다소 높은 SJD2의 경우 디젤을 함유한 액체배양시 유화정도가 비교적 높게 나타났으며, 고체배양의 경우에도 빠른 성장을 보여주는 것으로 나타났다.

3.2 디젤 분해 균주의 생화학적 특성

SJD2의 집락형태는 고체배지상에서 얇은 분홍색을 띠고 점상(punctiform)이며 비교적 평평하였으며, SJD4는 크림색의 부정형(irregular)의 집락 형태를 보였고, SJD2와 마찬가지로 평평한 모양이었다. 두 균주 모두 그람 양성이며 간균의 형태를 나타내었다. 분리된 균주의 생화학적 특성은 [Table 2]와 같이 나타났다. SJD2 및 SJD4 균주 모두 catalase 양성 반응을 보였으며 glycerol과 N-acetyl-glucosamine을 탄소원으로 이용하였으나, 기타 영양원에 대해서는 SJD4 균주가 다양한 기질을 이용하고 있는 것으로 나타났다.

3.3 16s-rDNA sequence 분석에 의한 분자생물학적 동정

분리된 2종의 디젤분해세균의 Chromosomal DNA로부터 증폭된 16s rDNA의 염기서열 분석 및 이를 이용한 BLAST search 결과, SJD2 균주의 9F Primer로부터의 염기서열은 *Bacillus fusiformis*의 염기서열과 99%(746/747)의 유사

성을 나타내었으며, 1542R Primer로부터 얻은 염기서열의 비교 결과 *Bacillus fusiformis*의 염기서열과 99%(893/894)의 유사성을 보여 SJD2 균주는 *Bacillus fusiformis* strain으로 동정하였다. SJD4 균주의 경우 9F Primer로부터 얻은 염기서열의 비교 분석결과 *Bacillus cereus*의 염기와 99%(896/897)의 유사성을 나타내었으며, 1542R Primer로부터 얻은 염기서열의 비교 분석 결과 *Bacillus cereus*와는 100%(961/961)의 유사성을 보여 SJD4 균주는 *Bacillus cereus*로 동정되었다.

3.4 균주의 최적 성장 조건 규명

3.4.1 균주의 최적생장온도

SJD2 균주와 SJD4 균주를 LB 배지에 접종하여 20°C, 25°C, 30°C, 37°C에서 진탕 배양하면서 생장곡선을 작성하였다 [Fig. 1]. 두 균주 모두 25-37°C에서 안정적인 성장을 나타내었다. 최적의 생장온도는 두 균주 모두 37°C였으며, SJD2 균주는 상대적으로 저온인 25°C에서 적응기가 30°C와 37°C에 비해 2-3시간 길었으나 이후 활발한 성장을 보였고 특히 9시간 이후에는 배양조건이 30°C 및 37°C일 때와 같은 균체량을 보였다.

3.4.2 최적 pH

분리한 디젤분해 균주의 배양을 위한 최적의 pH를 확인하기 위해 디젤 분해 액체배지의 pH를 pH 4.0에서부터 pH 10.0으로 각각 조정후, 5일간 균주를 배양하여 흡광도를 측정후 결과, pH 7.0~pH 8.0에서 균체량이 가장 많이 증가하는 것으로 미루어 이들의 디젤분해능력이 pH 7~pH 8

[Table 1] Biodegradation Rate of Diesel by the Isolated Strains

Strains	Initial conc. of diesel (ppm)	Final conc. of diesel after 5 days (ppm)	Degradation rate (%)
control (no strains)	20,000	18,020	9.9
SJD2	20,000	14,140	29.3
SJD4	20,000	15,780	21.1

[Table 2] Physiological and Biochemical Characteristics of the Isolated Strains from the Soil Contaminated with Diesel

	SJD2	SJD4		SJD2	SJD4
Gram stain	+	+	Arbutin	-	+
Glycerol	+	+	Esculin	-	+
Erythritol	-	-	Salicin	-	+
D-Arabinose	-	-	Cellobiose	-	+
L-Arabinose	-	-	Maltose	-	+
Ribose	-	+	Lactose	-	-
D-Xylitol	-	-	Melibiose	-	-
L-Xylose	-	-	Sucrose	-	-
Adonitol	-	-	Trehalose	-	+
Methyl-B-D-Xylopyranoside	-	-	Innulin	-	-
Galactose	-	-	Melezitose	-	-
Glucose	-	+	Raffinose	-	-
Fructose	-	+	Starch	-	+
Mannose	-	-	Glycogen	-	+
Sorbose	-	-	Xylitol	-	-
Rhamnose	-	-	Gentiobiose	-	+
Dulcitol	-	-	D-Turanose	-	-
Inositol	-	-	D-Lyxose	-	-
Mannitol	-	-	D-Tagatose	-	-
Sorbitol	-	-	D-Fucose	-	-
Methyl-D-mannopyranoside	-	-	D-Arabitol	-	-
Methyl-D-glucoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+	Gluconate	-	-
Amygdalin	-	+	2-keto-gluconate	-	-

의 범위에서 가장 활발할 것으로 사료된다 [Fig. 2].

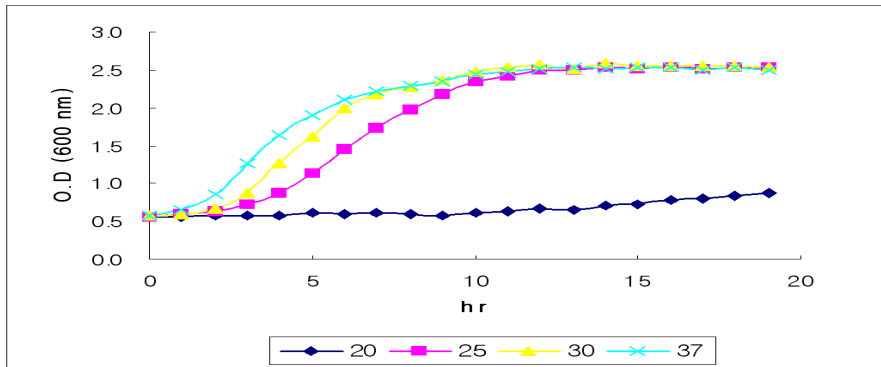
3.4.3 최적 디젤 농도

분리 균주의 유일 탄소원으로 이용되는 디젤의 최적 분해 농도를 확인하기 위하여 디젤의 농도를 0.1%, 1%, 2%, 5%로 조정된 디젤 액체 배지에 균주를 접종하여 5일간 배양시킨 후, 배양액 1 ml 을 취하여 흡광도를 측정하였다(Fig. 3). SJD2 균주는 2%의 디젤 농도에서 가장 높은 성장 활성을 보였으나 5% 농도에서는 성장률이 다소 감소

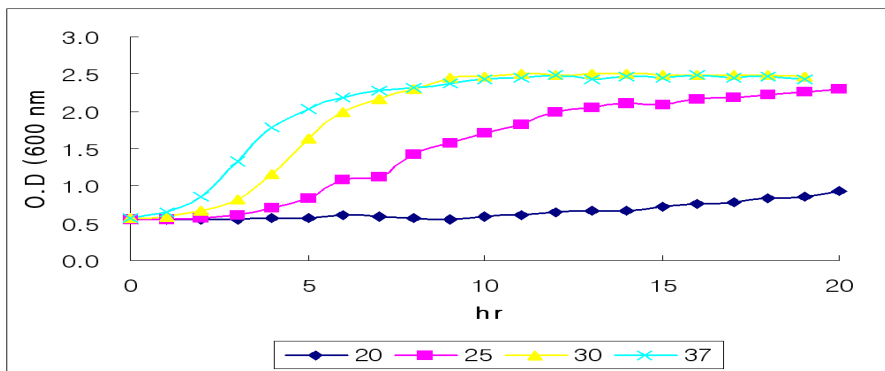
하였다. 그러나 SJD4 균주의 경우, 1% 이상의 디젤 농도에서 농도의 증가에 관계없이 생장의 안정성을 보였다.

3.5 Microcosm 실험

microcosm에 적용된 토양의 총 유기물 함량은 0.82% 이었으며, 수분 보유능은 1.77%, 토양 pH는 6.3으로 약산성의 토양인 것으로 나타났다. 제작된 microcosm에서 14일간 균주의 분해능을 분석한 결과, SJD2는 24.9%, SJD4는 24.7%의 분해효율을 보여주었다(Fig. 4).

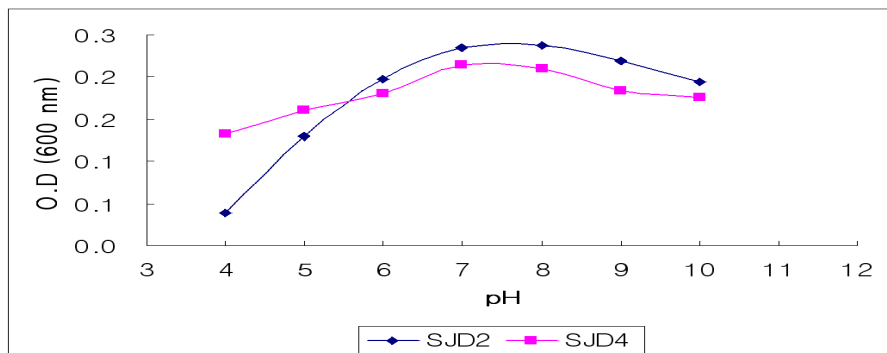


(a)

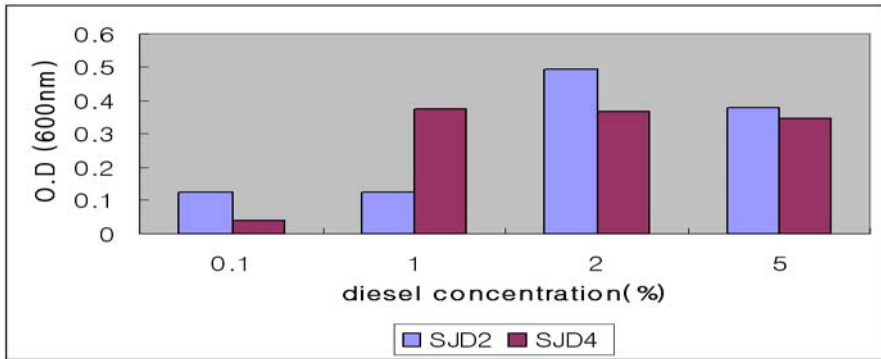


(b)

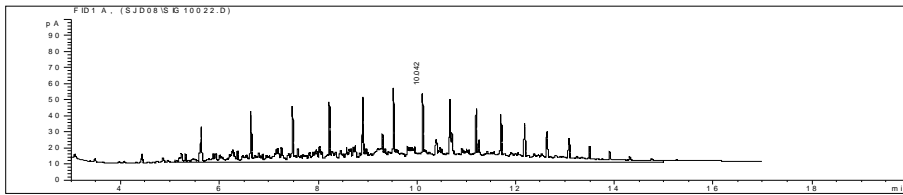
[Fig. 1] Effect of temperature on the growth of isolated diesel-degrading bacteria. (a) SJD2, (b) SJD4



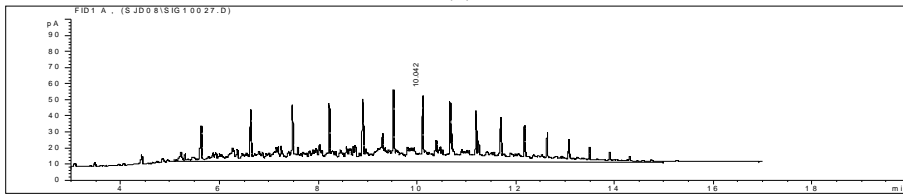
[Fig. 2] Effect of pH on the growth of isolated diesel-degrading bacteria in Bushnell-Haas medium containing 2% of diesel as a sole carbon source.



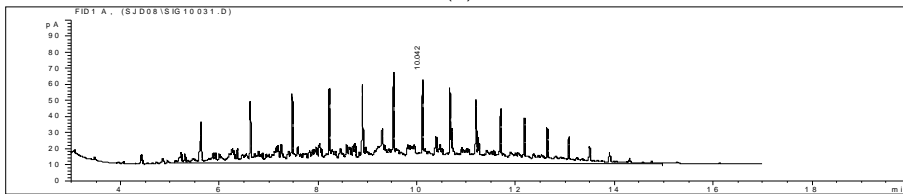
[Fig. 3] Effect of diesel oil concentration on the growth of isolated diesel-degrading bacteria.



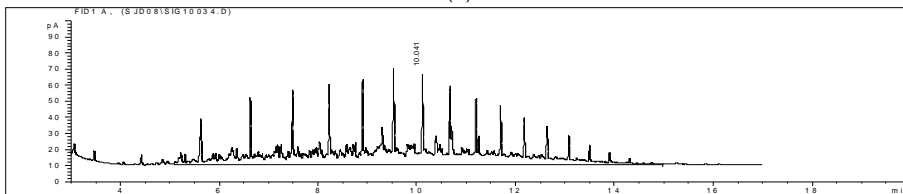
(a)



(b)



(c)



(d)

[Fig. 4] Gas chromatography profiles of residual diesel in isolated strains cultured on microcosms. (a) SJD2, (b) SJD4, (c) E.coli, (d) control

4. 고찰

본 연구에서는 디젤이 유일한 탄소원으로 사용될 수 있도록 조성한 고체배지를 이용하여 디젤로 오염된 토양으로부터 최종적으로 2종의 디젤분해세균을 분리, 동정하고, 이들의 디젤분해특성 및 최적성장조건, 디젤 오염 모방 microcosm을 이용한 디젤분해능 등을 분석하였다. 분리된 두 균주, SJD2와 SJD4의 경우, 디젤유가 20,000ppm으로 조성된 액체배지에서 각각 29.3% 및 21.1%의 분해율을 보여 주었다. 이는 기존에 보고된 디젤분해세균의 분해율¹²⁾보다 낮은 수치이나, 본 실험에서 사용된 디젤의 농도가 일반적으로 사용되고 있는 10,000ppm에 비하여 2배 높은 농도로서, 높은 농도의 디젤이 디젤 자체의 성분과 분해과정에서 발생하는 중간대사산물 등으로 인하여 세균의 생장에 악영향을 미치고 있음¹³⁾에도 불구하고 본 실험에서 분리한 균주들이 비교적 양호한 분해율을 보여주고 있는 것은 매우 고무적이라 할 수 있다.

본 연구에서 분리된 두 종류의 디젤분해세균 SJD2와 SJD4를 대상으로 염기서열을 분석한 결과, SJD2는 *Bacillus fusiformis*로 판명되었으며, SJD4는 *Bacillus cereus*와 100% 일치하는 것으로 나타났다. *Bacillus cereus* 등의 균주는 기존의 디젤분해 세균으로 많이 알려져 있으나¹⁴⁾, *Bacillus fusiformis*의 경우, 디젤 분해 활성을 보인 것은 본 연구에서 처음으로 보고된 것으로 알고 있으며, 본 세균이 *Bacillus cereus*보다 디젤 분해능이 높은 것으로 밝혀져 오염현장에서 본 세균에 의한 디젤분해의 보다 나은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

Microcosm의 실험에서 분리된 두 균주는 약 2주간의 배양후 SJD2와 SJD4가 각각 24.9%와 24.7%의 유사한 분해 효율로 다소 낮은 수치를 보여 주었다. 이는 microcosm에 사용한 토양 시료의 수분 보유능이 1.77%로서 미생물의 생장이 가장 활발하게 일어나는 토양의 수분 보유능이 60%인 것에 비해 매우 낮으며, 25°C 이하의 상온에서 실험이 진행되는 등, 균주의 최적 성장조건과 다소의 거리가 있는 환경에 기인한 것이라 사료된다. 실제

토양에서는 균주의 처리기간이 더 길고 다른 환경과의 상호작용도 활발히 일어나므로 실험 수준에서보다 더 높은 효율을 보일 것으로 예상된다¹⁵⁾.

사사

본 연구는 2006년도 가톨릭대학교 교비연구비로 이루어진 것으로써 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Moriarty, F. Exotoxicology: the study of pollutants in ecosystems, 2nd ed., Academic Press, London. (1988).
2. 고성환, 이홍금, 김상진, "Hydrocarbon uptake modes에 따른 유류분해 미생물 혼합체의 원유분해능", 한국생물공학회지, 13, pp. 606~614 (1998).
3. Kim, M.H., 1995. "Microbial characterization for the assessment of the bioremediation potential on MGP soil", J. Korea Solid Waste Eng. Soc., 2, pp. 223~230 (1995).
4. 서은영, 송홍규, "토양미생물군집의 개체수와 활성도에 미치는 경유의 영향", 한국미생물학회지, 32, pp. 163~171 (1994).
5. De Acevedo, G.T., and McInerney, M.J., "Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms", J. Inst. Microbiol., 16, pp. 1~7 (1996).
6. Alley, J.F., and Brown, L.R., "Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates", Appl. Environ. Microbiol., 66, pp. 439~442 (2000).
7. 안민정, 한운진, 임현섭, 최기현, 권오범, 최영출, 정병철, "디젤유 분해균주의 특성 및 토양 배양", 한국미생물학회지, 39, pp. 108~113 (2003).

8. 이종광, 김무훈, 박형수, “유류 오염 토양으로 부터 분리한 디젤 분해 세균”, 한국미생물학회지, 39, pp. 102~107 (2003).
9. 이건영, 송인근, 정재춘, 김영준, “산불토양복원을 위한 Extracellular Polymeric Substances (EPS) 생성세균의 분리, 동정 및 특성에 관한 연구”, 유기성자원학회지, 12(4), pp. 139~147 (2004).
10. Bento, F.M, Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., and Frankenberger, W.T., “Comparative bioremediation of soils contaminates with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation”, Bioresource Technology, 96, pp. 1049~1055
11. 환경부, 토양오염공정시험법, (1997)
12. Hong, Ji Hye, Kim, Jaisoo, Choi, Ok Kyung, Cho, Kyung-suk, and Ryu, Hee Wook, “Characterization of diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea”, World J. Microbiol. Biotechnol., 21, pp. 381~384 (2005).
13. Frankenberger, Jr., W.T., “The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons”, In: Calabrese, E.J., Kostecki, P.T (Eds.), Hydrocarbon contaminated soil and ground water. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 237~293 (1992).
14. Loser, C., H., Hoffmann, Seidel, P., and Zehnsdorf, A., “Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil”, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, pp. 105~111 (1999).
15. Atlas, R.M., “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective”, Microbiol. Rev., 45, pp. 180~209 (1981). 