

유류 오염 토양에서 분리된 *Rhodococcus fascians*를 이용한 해수에서의 디젤유의 분해

구자룡 · 문준형 · 윤현식*

인하대학교 생물공학과

Biodegradation of Diesel in Sea Water by *Rhodococcus fascians* Isolated from a Petroleum-contaminated Site

Ja-Ryong Koo, Jun Hyung Moon, and Hyun Shik Yun*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Abstract Contamination of marine environment with hazardous and toxic chemicals is more common these days. Bioremediation is the application of microorganism or microbial processes to degrade environmental contaminant. Because of low water solubility and volatility of diesel, bioremediation is more efficient than physical and chemical methods. The objective of this study is biodegradation of diesel in sea water by using *Rhodococcus fascians* which is isolated petroleum-contaminated soil. *R. fascians* was cultured on sea water containing diesel to determine the diesel degradability. Changes in biodegradability of diesel with various inoculum sizes, diesel concentrations, initial pH, and culture temperature were analyzed by TPH analysis using gas chromatography. The inoculum size 2% was effective for biodegradation of diesel in sea water by *R. fascians*. When diesel concentration was 5%, the growth of cell was inhibited by the toxicity of diesel. The optimal temperature and initial pH for degradation of diesel in sea water were 27°C and pH 8.

Keywords: Bioremediation, Biodegradation, Diesel, *Rhodococcus fascians*, Sea water

서 론

경제발전에 따른 인구의 집중 및 생활수준의 향상은 오염 물질의 대량 방출을 초래하였다. 지금까지의 오염물질과는 다른 자연계에 존재하는 않는 합성 유해화학물질 (xenobiotics)에 의한 환경오염도 빠른 속도로 증가하여 인류보건 및 생태계에 중대한 위협요소가 되고 있다. 생태계 오염의 주요형태는 지표수 및 지하수의 수자원 오염, 산업화 추세에 따른 유류오염 등이 있으며 이로부터 해양, 토양, 그리고 지하수가 오염되었다. 따라서 오염원을 최종적으로 생분해 또는 무독화 과정을 통하여 재순환시킬 수 있는 기

술이 필요하게 되었다. 특히 해상에서 발생하는 유류 유출 사고나 노획된 선박에서 지속적으로 유출되는 유류의 경우, 생태계를 파괴하는 파급효과가 매우 크다. 국내에서 소비량이 가장 많은 연료이면서 해양오염 유발물질로 상당 부분을 차지하고 있는 디젤유의 경우 대부분의 구성 물질이 비휘발성이므로 일반적인 처리방법으로 적절한 효과를 얻기 어렵다 [1,2]. 디젤유는 우리나라에서 소비량이 가장 많은 연료이며, 비점이 190°C-350°C로 200여종의 유기화합물로 구성되어 있다. 약 70% 이상이 파라핀계 물질들로서 디젤엔진의 연료나 기계부품의 세척용제 등으로 주로 사용되며, 대부분의 선박의 연료로 이용되고 있다 [3]. 가솔린에 비해 상대적으로 휘발성과 용해도가 낮은 특성이 있어 자연계에서 잘 분해되지 않으며, 인간의 피부와 호흡기에 침투하였을 경우 빈혈, 혈액응고장애 등이 발생하고 두통, 피부염, 폐렴, 폐수종 등 신체적 이상

*Corresponding author

Tel: +82-32-860-7517, Fax: +82-32-876-8751

e-mail: hyunshik@inha.ac.kr

증상이 일어날 수 있다 [4].

생물정화는 폐기물에서 유래하는 환경적으로 유해한 물질을 제거, 감소, 변형시키기 위해 환경 적응성이 좋고 2차 환경오염의 발생이 적은 미생물을 이용하여 현재의 오염 정도를 완화시키는 처리 방법이다 [5]. 유류의 해양유출은 근해에서 발생하는 해양 재해중 하나로 해양 생태환경 및 해양자원에 큰 영향을 미친다. 유류에 의한 토양오염의 복원에 대한 연구는 많이 수행되어 왔으나 유류에 의한 수질오염의 복원에 관련된 연구는 많지 않으며, 특히 나날이 증가하는 유류에 의한 해양 오염의 생물학적으로 관련된 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 유류 오염 토양에서 분리한 균주를 이용하여 디젤유로 오염된 해수의 분해와 분해에 영향을 미치는 인자에 대하여 연구하였다. 본 연구에 사용된 균주는 여러 *Rhodococcus* 종 중에서도 특히 JP-8의 분해에 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며 [6,7], 본 연구에서는 온도, pH 및 접종량과 디젤의 농도가 *Rhodococcus fascians*의 해수중의 디젤 분해에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

재료 및 방법

Strains

본 연구에서는 유류 오염 토양에서 분리된 *Rhodococcus fascians*를 이용하였다. 이전 연구에서 본 연구에 사용된 *R. fascians*는 액체 배양시 JP-8 분해능력이 우수하고 토양킬럼실험을 통하여 토양중의 JP-8 분해 능력도 우수한 것으로 나타났다 [6,7].

Sea water

본 연구에 사용된 해수는 인천에 있는 생선 횡집에 공급되는 해수를 매주 받아 사용하였다.

Biodegradation

분리된 균주의 디젤 분해능을 측정하기 위해 LB 배지에서 24시간 seed culture 한 후, 접종량, 디젤유의 농도, 배양 온도, 그리고 초기 pH 에 따른 분해 효과를 해수 배지에서 관찰하였다.

Effect of inoculum size

균주의 양이 분해능에 미치는 영향을 고찰하기 위해 각각의 균주의 접종량을 달리하여 그 분해능을 측정하였다. 접종량을 각각 1% (0.5 mL), 2% (1 mL), 4% (2 mL), 그리고 6% (3 mL)로 하여 디젤유를 포함하는 해수에서 15일간 배양하였다.

Effect of diesel concentration

디젤유의 농도가 분해능에 미치는 영향을 고찰하기 위해 해수와 인공해수에 포함되는 디젤유의 농도를 달리하여 그 분해능을 측정하였다. 각각 2%, 3%, 4% 그리고 5%의 디젤유를 해수에 첨가한 후 각각의 균주를 2% 접종하여 15일간 배양하였다.

Effect of culture temperature

18°C, 22°C, 27°C 그리고 32°C의 다양한 온도 범위에서 2% 균주를 접종한 것과 함께 대조군으로서 접종을 하지 않은 것으로 분류하여 해수에서 디젤유의 분해능을 측정하였다. 포함된 디젤유의 농도는 2% 이었으며, 배양 시간은 15일이었다.

Effect of initial pH

해수의 초기 pH인 8을 기준으로 초기 pH 6, 7, 8 그리고 9에서 디젤유의 분해 양상을 각각 측정하였다. 균주의 접종량은 2% 이었고, 2%의 디젤유 농도에서 15일간 측정하였다.

Analysis of residual diesel fraction

배양 후 해수 내의 잔류 디젤유의 분석은 EPA method 8015에 준하여 수행되었다 [7]. 해수 내의 잔류 디젤유를 *n*-hexane (10 mL)으로 추출한 후 gas chromatography (GC)를 사용하여 분석하였다. 분리된 디젤유는 탄화수소 총량을 비교하는 total petroleum hydrocarbon (TPH) 방법으로 정량하였다.

Gas chromatography (Shimadzu GC-17A)를 사용하였으며 GC column으로는 HP-5 capillary column (30 m, 0.25 mm diameter, 0.25 µm film thickness)을 사용하였다.

결과 및 고찰

*Rhodococcus fascians*에 의한 디젤의 분해

토양에서 분리한 *Rhodococcus fascians*에 의한 JP-8의 분해에 대한 연구는 알려져 있으나 디젤 분해에 관련된 연구는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *R. fascians*의 디젤 분해를 고찰하기 위하여 디젤유 (2%)가 포함된 MSM에 *R. fascians*만 접종하였을 때와 접종하지 않았을 경우 디젤유의 분해능을 알아보았다 (Fig. 1). 미생물에 의한 유류 분해의 경우 유류의 휘발성에 의한 자연적인 감소와 미생물에 의한 생물학적 분해로 구분할 수 있다. 따라서 미생물에 의한 유류의 분해는 총 유류 감소분에서 미생물이

접종되지 않은 대조군과의 비교 분석에 의해 계산되어야 한다. 이를 위해 본 연구에서 모든 실험은 *R. fascians*를 접종한 실험군과 미생물을 접종을 하지 않은 대조군으로 실험이 수행 되었다. 대조군은 10일 후 자연적인 디젤유의 분해량은 50% 정도였으나, 시간이 길어질수록 분해속도는 감소하여 자연적인 분해에는 한계가 있음을 알 수 있었다. 균주 접종시 10일 배양 후 디젤유가 95%가량 분해되었으며, 대조군과 비교시 44.5% 높은 분해효율을 보였다. GC를 이용한 TPH 분석 결과는 균주에 의한 생분해의 탄소 개수가 많은 탄화수소 (C₁₂~C₁₅) 보다 탄화수소 개수가 적은 탄화수소 (C₈~C₁₁)가 먼저 분해되는 것으로 나타났다 (data not shown).

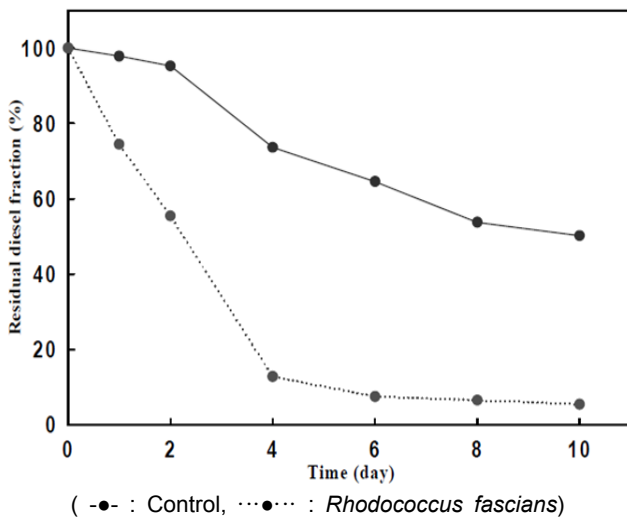
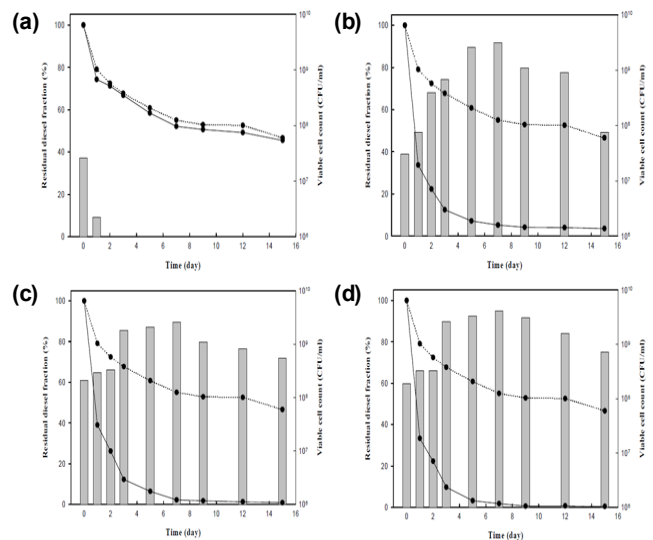


Fig. 1. Degradation of diesel in MSM media.

Effect of inoculum size

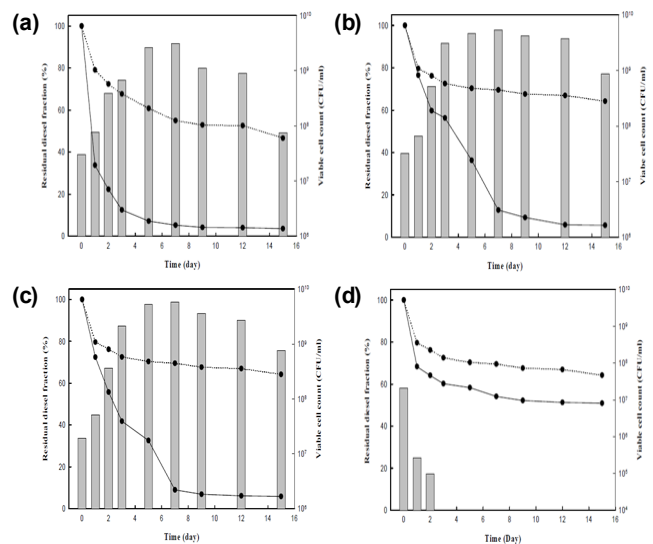
토양에서 분리한 *Rhodococcus fascians*를 이용하여 해수 중의 디젤의 분해를 위하여 해수에 접종 후 배양한 결과 해수에서 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. 미생물에 의한 디젤의 생분해에 영향을 미치는 여러 요인들 중 접종량의 양에 따른 영향을 보기 위해 접종량을 변화시켜 실험을 수행하였다 (Fig. 2). 1%의 균주를 접종하였을 경우를 제외 하고는 2%의 디젤유로 오염된 해수의 디젤 잔류량이 7일 후 10% 이하로 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 1% 접종량의 경우 디젤 잔류량은 대조군과 비슷한 경향을 보였고 생균수는 2일 이후로는 관찰되지 않았다. 2% 이상의 접종량에서는 8일 이후에 해수 내의 디젤유 잔류량이 약 3.9%로 감소하고 균주의 생균수도 활발히 유지됨을 관찰 할 수 있었다. 4%와 6% 접종량에 따른 잔류량은 2% 접종량 실험때보다 각각 1.2%, 0.5%로 더 낮은 수준으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 접종량이 2%이상일 때 잔류량의 차이가 크지 않은 것으로 나타나 가장 효율적인 미생물 접종량은 2% 라고 볼 수 있다.



(---○--- : Control, -●- : *Rhodococcus fascians*, ■ : Viable cell count)
 Fig. 2. Degradation of diesel in sea water at various inoculum sizes. (a) 1% inoculum, (b) 2% inoculum, (c) 4% inoculum, (d) 6% inoculum.

Effect of Diesel concentration

*Rhodococcus fascians*의 해수 중의 디젤 분해를 디젤유 농도 2%, 3%, 4%, 5%에서 분해능의 변화를 알아보았다 (Fig. 3).



(---○--- : Control, -●- : *Rhodococcus fascians*, ■ : Viable cell count)
 Fig. 3. Degradation of diesel in sea water at various diesel concentrations. (a) 2% diesel, (b) 3% diesel, (c) 4% diesel, (d) 5% diesel.

*R. fascians*에 의한 생분해에 의한 디젤 잔류량은 2%, 3%, 4% 농도에서 최종 분해량은 큰 차이가 없었지만 분해되는 속도는 2% 농도에서 제일 빠르게 나타났다. 2% 농도의 디젤유에서는 4일 후 약 5%로 감소하였으며 3%와 4%의 디젤유

농도에서는 7일 후에도 약 10%로 나타났다. 반면, 5%의 디젤 유 농도에서는 15일 후 50% 정도의 디젤 잔류량을 보임으로써 *R. fascians*에 의한 분해가 대조군과 비교 10% 정도 밖에 이루어지지 않았음을 알 수 있었다. 2일 이후에는 생균수가 거의 없어 이는 과량의 디젤유의 독성에 의해 생장의 저해를 받은 균주의 영향으로 추정된다. 디젤유의 polycyclic aromatic hydrocarbon은 미생물의 활성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [8,9]. 항공유인 JP-8의 경우 같은 균주로 동일 조건에서 분해능을 관찰하였을 때, 10% 이상의 농도에서도 분해가 원활하게 이루어졌다 [10]. 따라서 디젤유가 항공유보다 미생물에게 미치는 독성이 더욱 강하다는 사실을 알 수 있었다.

Effect of initial pH

실험에 사용한 해수의 pH는 약 8이다. 실제 해수는 해수의 염도, 적조 및 해양 미생물의 생태, 중금속 등에 의한 환경오염으로 pH가 약간씩 변하는 경향성을 보인다. 본 실험에서는 pH가 해수중의 디젤분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 에서의 디젤유 분해능을 살펴보았다 (Fig. 4). 이때 접종된 균주의 접종량은 2%, 해수중의 디젤의 농도는 2%이었다. 15일 후 디젤 잔류량을 살펴보면 4가지 pH 조건 모두 4~5% 값을 나타내었다. pH값이 6과 9사이에서 pH에 따른 해수중의 디젤 분해에 미치는 영향은 크지 않았지만 pH 8일 때 가장 분해가 빠르게 이루어졌다.

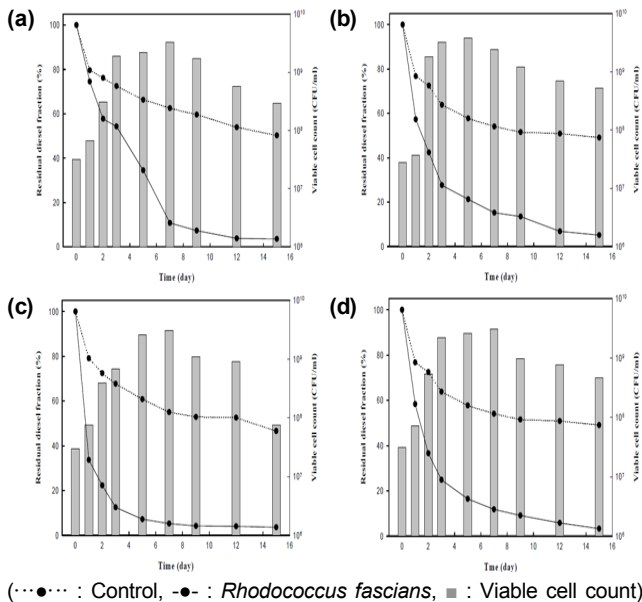


Fig. 4. Degradation of diesel in sea water at various initial pHs. (a) pH 6, (b) pH 7, (c) pH 8, (d) pH 9.

Effect of culture temperature

해수는 지역, 계절에 따라 넓은 온도 분포를 보이게 된

다. 온도는 미생물의 활동에 영향을 미친다. *R. fascians*는 27°C에서 가장 높은 성장률을 보였으나, 여러 온도 (18°C, 22°C, 27°C, 32°C)에서 *R. fascians*의 디젤 분해를 측정하였다 (Fig. 5). 이전 여러 조건들의 실험과는 달리 약 48%의 잔류량을 보이던 대조군이 18°C에서는 잔류량이 약 60%, 32°C에서는 33%으로 변화하였다. 이는 온도 변화에 의한 휘발성 차이에 의한 영향으로 보이며 22°C와 32°C에서 *R. fascians*에 의해 디젤 농도가 각각 약 19%까지 감소하였으나 대조군의 디젤농도는 각각 47%, 32%로 다르게 나타났다. 균주에 의한 분해능의 효율은 성장 최적 온도인 27°C에서 가장 높았다. 따라서, 미생물의 생장이 디젤 분해에 큰 영향을 미치며 해수중의 디젤유 분해의 최적온도는 27°C임을 알 수 있었다.

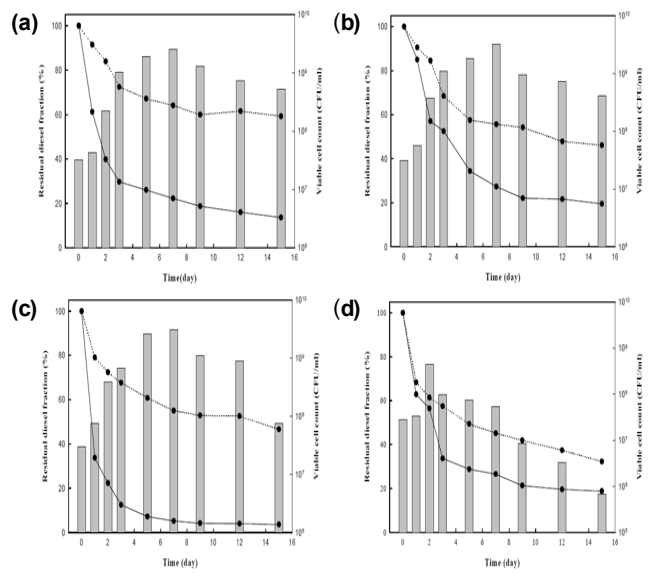


Fig. 5. Degradation of diesel in sea water at various temperatures. (a) 18°C, (b) 22°C, (c) 27°C, (d) 32°C.

요약

본 실험에 사용된 균주는 유류로 오염된 지역의 토양시료로부터 직접 분리한 *Rhodococcus fascians*로 이전 연구에서 항공유의 분해에 효과가 있는 것으로 밝혀진 균주이다. 디젤유가 항공유보다 *R. fascians*의 성장에 영향을 주는 것으로 나타났다. 해수중의 디젤 분해를 위해서는 2%이상의 접종량이 효과적이며 접종량이 증가할 경우 잔류량이 더 감소하였으나 큰 차이는 없었다. 해수중의 디젤이 5% 이상에서는 디젤유의 독성에 의해 *R. fascians*의 생장이 저해를 받아 디젤 잔류량이 높게 나타났다.

*R. fascians*는 pH 8에서 가장 높은 디젤 분해속도를 보였으며 비교적 넓은 pH 범위에서 디젤 분해도가 유지되는 것으로 나타났다. *R. fascians*의 최적 성장온도 보다 높은

32°C에서는 디젤의 분해에 온도증가에 따른 자연분해의 영향이 큰 것으로 나타났다. *R. fascians*의 해수중 디젤유 분해의 최적온도는 27°C로 최적 생장온도에서 분해가 활발히 이루어지는 것을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 9월 29일, 게재승인 : 2009년 10월 15일

REFERENCES

1. U. S. EPA (1997) *Analysis of Selected Enhancement for Soil Vapor Extraction*. EPA-542-R-97.
2. Cole, G. M. (1994) *Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites*. pp. 37-74. CRC Press, Inc., USA.
3. Mackay, D. W. (1985) *Environmental Fate of Diesel Fuel Spills on Land. Report for Association of American Railroads*. University of Toronto, Canada.
4. Suthersan, S. S. (1997) *Remediation Engineering: Design Concepts*. p. 24. Lewis Publishers, Inc, USA.
5. Hwang, E. Y., W. Namkoong, and J. S. Park (2000) Effect of environmental parameters on the degradation of petroleum hydrocarbons in soil. *J. KoSES*. 2: 85-96.
6. Nam, B. H., B. J. Park, and H. S. Yun (2008) Biodegradation of JP-8 by *Rhodococcus fascians* isolated from petroleum contaminated soil. *Korean Chem. Eng. Res.* 46: 819-823.
7. Park, B. J., Y. H. Noh, and H. S. Yun (2008) Biodegradation of JP-8 in soil column by *Rhodococcus fascians* isolated from petroleum contaminated soil. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 479-483.
8. Alexander, M. (1999) *Biodegradation and bioremediation*. pp. 317-362 Academic Press, Inc., San Diego, USA.
9. Andreoni, V., L. Cavalca, M. A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, M. Colombo, and L. Gianfreda (2004) Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57: 401-412.
10. Dickson, A. G. (1993) The measurement of sea water pH. *Marine Chem.* 44: 131-142.