

디젤오염지역에서 분리한 세균 *Sphingomonas* sp. 3Y의 석유계 탄화수소분해 특성

안영희* · 정병길 · 성낙창 · 이영옥¹

동아대학교 환경공학과, ¹대구대학교 생명과학과

Received April 6, 2009/Accepted May 22, 2009

Characterization of Petroleum Hydrocarbon Degradation by a *Sphingomonas* sp. 3Y Isolated from a Diesel-Contaminated Site. Yeonghee Ahn, Byung-Gil Jung, Nak-Chang Sung and Young-Ok Lee¹. Department of Environmental Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Department of Biological Science, Daegu University, Jillyang, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-714, Korea - Bacterial stain 3Y was isolated from a site that was contaminated with diesel for more than 15 years. The strain could grow on various petroleum using hydrocarbons as the sole carbon source. The strain grew not only on aliphatic hydrocarbons but also on aromatic hydrocarbons. 3Y grew on aliphatic petroleum hydrocarbons hexane or hexadecane, and aromatic petroleum hydrocarbons BTEX, phenol, biphenyl, or phenanthrene. The strain showed aromatic ring dioxygenase and *meta*-cleavage dioxygenase activities as determined by tests using indole and catechol. Aromatic ring dioxygenase is involved in the initial step of biodegradation of aromatic hydrocarbons while *meta*-cleavage dioxygenase catalyzes the cleavage of the benzene ring. Based on a nucleotide sequence analysis of its 16S rRNA gene, 3Y belongs to the genus *Sphingomonas*. A phylogenetic tree was constructed based on the nucleotide sequences of closest relatives of 3Y and petroleum hydrocarbon degrading sphingomonads. 3Y was in a cluster that was different from the cluster that contained well-known sphingomonads. The results of this study suggest that 3Y has the potential to cleanup oil-contaminated sites. Further investigation is warranted to optimize conditions to degrade petroleum hydrocarbons by the strain to develop a better bioremediation strategy.

Key words : Biodegradation, diesel, oil, phenanthrene, petroleum hydrocarbons

서 론

석유는 매우 다양한 탄화수소의 혼합물이다. 그러나 석유계 탄화수소는 기본적으로 지방족 화합물과 방향족 화합물로 구성되어 있다. 석유계 탄화수소를 차지하는 비율은 전자가 후자보다 훨씬 많다. 지방족 화합물인 alkanes 은 비교적 분해가 용이하여 oxygenase 활성을 통해 알코올 화합물로 전환되고 지방산합성경로를 통해 최종적으로 지방산을 형성하는 것으로 보고되었다[8].

한편 방향족 화합물은 환경에서 생분해가 잘되지 않아 지속적으로 남아있는 것으로 보고되었다[4]. 특히 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)는 벤젠환이 2 이상 융합된 화합물의 총칭으로 환경에 널리 존재하고 물에 대한 용해도가 낮아 생분해가 잘 되지 않는다. 게다가 일부 방향족 탄화수소는 발암물질로 알려져 있으므로 환경에서 그 농도를 법에 의해 규제를 하고 있다[11,12]. 우리나라의 토양환경보존법에 의하면 유류의 경우는 유류성분 중 BTEX (benzene, toluene, ethyl benzene, xylene)와 석유계 총탄화수소(TPH)에 대해 토양오염기준이 설정되어 있다[12].

석유계 탄화수소로 오염된 토양에서는 이 화합물들을 분해하는 미생물이 종종 분리된다[1,2,6,7,8,11]. 이는 토착미생물들 중에서 선택압력(selective pressure)에 의해 석유계 탄화수소를 분해하는 미생물들이 농화배양된 것으로 여겨진다. 다양한 미생물이 방향족 또는 지방족 석유계 탄화수소를 분해하는 것으로 보고되었다. 대부분의 이들 미생물은 *Proteobacteria*나 높은 G+C 함량을 가진 Gram 양성 세균에 속하는 것으로 보고되었다[2,4,6,7]. 예를 들면 *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, 그리고 *Mycobacterium* 속들이다. 이 중에서 첫 3 속은 α -, β -, 그리고 γ -*Proteobacteria*에 각각 해당되고, 나머지 2 속은 높은 G+C 함량을 가진 Gram 양성 세균에 속한다. 지금까지 보고된 방향족과 지방족 석유계 탄화수소를 분해하는 미생물의 계통발생학적 다양성에도 불구하고 대부분의 분리균들은 γ -*Proteobacteria*에 해당하는 것으로 보고되었다[2,4,6,7]. 그러나 최근 연구에 의하면 α -*Proteobacteria*에 속하는 *Sphingomonas* 속 세균들이 다양한 화합물을 분해하는 능력이 있어 유류오염토양의 정화에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다[9].

생물학적 복원(bioremediation)은 미생물을 이용하여 오염된 토양을 정화하는 것으로서 처리 비용이 저렴하고, 환경친화적인 장점이 있다. 그래서 생물학적 복원은 석유계 탄화수소로 오염된 부지를 정화하는데 널리 이용되고 있다[6,8,9]. 생

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7677, Fax : +82-51-200-7683

E-mail : yahn@dau.ac.kr

물학적 복원을 위한 전략을 세우기 위해서는 그 지역에 존재하는 석유계 탄화수소 분해 생물의 존재와 더불어 그들의 분해능을 확인할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 생물학적 복원전략을 위한 기초 정보를 얻기 위해 경유로 오염된 지역에 존재하는 토착 미생물 중에서 우점 개체군으로 분리된 균주의 계통발생학적 위치를 조사하고 석유계 탄화수소를 분해하는 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

오염부지

본 연구에 사용된 균주가 분리된 곳은 경유로 15년간 오염된 국내의 한 군부대내 지역으로서 이곳은 지하 3.5 m부터 오염층이 존재하였다. 오염토양은 pH 6.5의 사질 식양토로 약 10,000 mg/kg의 TPH로 오염되어있었다[3]. 토양 유기물과 물의 함량은 각각 $4.3 \pm 0.3\%$ (w/w)과 $7.8 \pm 0.4\%$ (w/w)이었다.

오염부지의 토양에 존재하는 중속영양형태를 나타내는 총생균수는 6.3×10^7 CFU/g soil 이었으며 한편 경유성분인 phenanthrene과 hexadecane을 분해하는 세균 수는 각각 1.3×10^7 CFU/g soil와 9.5×10^6 CFU/g soil인 것으로 나타났다[3]. Phenanthrene과 hexadecane은 석유계 방향족과 지방족 탄화수소를 대표하는 화합물로 사용되었다. 본 연구에 사용된 토양시료에 존재하는 토착세균 중에서 phenanthrene spray plate 법에 의해 양성을 나타낸 세균들은 대부분 노란색의 집락을 형성하였다[1]. Phenanthrene spray plate 법에 의해 양성을 나타낸 균주 중에서 비교적 성장을 잘하고 phenanthrene spray plate 법을 실시하였을 때 투명한 큰 균주를 순수 분리하여 3Y라고 명명하고 석유계 탄화수소분해특성을 조사하였다.

균주와 화합물

본 연구에 사용된 균주 3Y는 지하 3.5 m 오염층에서 채취한 토양시료에서 분리하였다. 채취한 토양은 0.1%(v/v) pyrophosphate buffer에서 vortex 처리한 후 연속 희석하여 YEPG agar 배지에 도말한 후 25°C에서 4일 배양하였다[1]. Colony가 형성된 agar 배지에 phenanthrene spray plate assay를 실시하여 colony 주위에 투명환을 형성하는 균주는 phenanthrene 분해능이 있을 가능성이 큰 것으로 간주하고 순수 분리하여 본 연구에 사용하였다[1].

YEPG 배지는 일반적인 배양에 사용되었고, 한편 특정 화합물에 대한 성장조사에는 mineral salt medium (MSM)에 특정 화합물을 유일 탄소원으로 공급하였다. MSM 배지 조성은 다음과 같다(1 당): 4 g NaNO₃, 1.5 g KH₂PO₄, 0.005 g FeCl₃·6H₂O, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g CaCl₂·2H₂O, 0.5 g Na₂HPO₄, pH7.2. 본 연구에 사용된 화합물은 Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI, USAS)로부터 구입

하였으며 가장 순도가 높은 것이었다.

16S rRNA를 이용한 균주의 동정

분리균으로부터 total DNA 를 추출하여 PCR로 16S rRNA 유전자를 증폭하는데 사용하였다. Primers로는 27f와 1492r 를 사용하여 total DNA로부터 약 1.5 kb의 16S rRNA 유전자를 증폭하였다[10]. Primer 27f와 1492r의 염기서열(5'에서 3')은 각각 CGATCCCCTGCTTTTCTCC와 AGAGTTTGATCMTG GCTCAG이었다. 이 PCR 산물은 솔젠트(주)(대전, 대한민국)에 의뢰하여 Applied Biosystems 3730XL capillary DNA Sequencer (Foster City, CA, USA)를 사용하여 부분적으로 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 BLASTN (version 2.2.10)을 이용하여 GenBank database에서 가장 비슷한 염기서열을 찾는데 사용하였다[5].

검색 결과를 토대로 하여 유연 미생물들의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 수집한 후, CLUSTAL X 프로그램을 사용하여 multiple alignment를 수행하였다[9]. Multiple alignment의 결과를 TreeView 프로그램상에서 neighbor-joining법으로 계통수를 작성하였으며 Boot strap은 1,000번을 수행하였다.

지방족 탄화수소의 분해능 조사

본 연구에 사용된 지방족 탄화수소는 hexane, hexadecane, 그리고 chloroform이었다. 각 지방족 탄화수소의 분해능은 그 화합물을 유일 탄소원으로 공급하여 평판배지에서 14일 배양 후 집락 형성 유무에 따라 판단하였다. MSM agar 배지에 균주를 접종하고, Petri dish 뚜껑에 각 화합물을 두어 증기상태로 균주에 공급하였으며 각 Petri dish는 비닐 봉지로 봉하여 탄소원의 증기가 밖으로 세지 않게 하였다. 한편 hexadecane을 이용한 성장은 filter 여과한 hexadecane을 유일 탄소원(1%, v/v)으로 포함하는 MSM agar 에 미생물을 도말 하여 집락 형성을 재 확인하였다. 대조균은 탄소원을 포함하지 않은 것 외는 실험균과 동일한 조건에서 배양되었다. 달리 언급하지 않는 미생물 배양은 25°C에서 실시하였다. 특정 석유계 탄화수소에서의 성장은 동일 실험을 2번 이상 실시하여 그 성장 여부를 결정하였다.

방향족 탄화수소 분해능 조사

본 연구에 사용된 방향족 탄화수소는 benzene, toluene, ethyl benzene, *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene, phenol, biphenyl, naphthalene, 그리고 phenanthrene이었다. Phenanthrene을 제외한 방향족 화합물의 분해능은 지방족 화합물의 분해능 조사방법과 같이 특정 방향족 화합물을 유일 탄소원으로 사용한 성장여부로서 판단하였다. 이 때 각 방향족 화합물은 증기상태로 공급해주었다.

한편 휘발성이 없는 phenanthrene의 경우는 phenanthrene spray plate assay로 먼저 분해능을 조사하고 또한 phenan-

threne을 유일 탄소원으로 포함하는 MSM배지에서 성장은 600 nm에서 OD증가로 측정하였다. Phenanthrene 10 mg을 0.4 ml chloroform에 녹여 autoclave된 250 ml Erlenmeyer 플라스크에 넣고 hood에서 filter 멸균된 질소를 주입하여 chloroform을 제거하였다. Phenanthrene이 남겨진 플라스크에 멸균된 MSM 배지 40 ml을 넣어 150 rpm에서 12시간 진탕하여 phenanthrene이 포화된 MSM 배지를 만들었다. 여기에 phenanthrene을 포함하는 MSM배지에서 전배양된 균주를 취하여 접종하였다. 전배양은 YEPG 평판배지에서 colony를 한 백금이 취하여 phenanthrene과 20 ml MSM이 포함된 125 ml 플라스크에 접종하여 150 rpm에서 배양한 후 대수 증식기 때 취하여 접종균으로 사용하였다.

Aromatic ring dioxygenase는 indole로부터 indigo를 형성할 수 있는 것으로 보고되었으므로 indole을 사용하여 문헌[1]에 기술된 것과 같이 분리균의 aromatic ring dioxygenase 활성을 조사하였다. 한편 benzene 환을 깨는 효소인 meta-cleavage dioxygenase의 활성은 0.1%(w/v) catechol 용액을 평판배지에 형성된 집락에 점적하여 형성된 노란색 산물(2-hydroxymuconic semialdehyde으로 추정) 근거로 판단하였다[6].

결과 및 고찰

16S rRNA 유전자의 비교분석

PCR로 증폭된 분리균의 16S rRNA 유전자는 GenBank database에 있는 세균들과의 계통발생학적 관계를 조사하기 위해 사용되었다. 분리균의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정하여 최종적으로 얻은 1453 개의 염기의 서열에 대한 정보는 GenBank database에 등록하였다(accession number, AY646154). 이 서열은 GenBank에서 *Sphingomonas* sp. JS5와 *Sphingomonas* sp. MBIC3990의 16S rRNA 유전자의 염기서열과 가장 비슷한 것(98%)으로 나타났다.

GenBank에 등록되어 있는 유연 미생물들, *Sphingomonas* 속 type strains, 그리고 지금까지 보고된 대표적인 *Sphingomonas* 속에 해당하는 석유계 탄화수소 분해균들의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 수집한 후 재료 및 방법에 기술한 것과 같이 계통수를 작성하였다(Fig. 1). 16S rRNA 유전자를 바탕으로 한 계통수에 의하면 다양한 석유계 탄화수소를 분해하는 것으로 보고된[7] *Sphingomonas* sp. EPA505, B1, Q1은 *Sphingomonas* sp. 3Y와 다른 cluster에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 1). EPA 505는 *S. chlorophenolica*와 같은 cluster에 속하였고, 균주 B1과 Q1은 *S. yanoikuyae*와 같은 cluster에 해당하는 것으로 나타났다. 한편 *Sphingomonas* sp. 3Y는 이들과는 달리 종이 아직 정해지지 않은 *Sphingomonas* sp. JS5 및 MBIC3990과 함께 같은 cluster를 이루었다.

Sphingomonas sp. 3Y의 지방족 탄화수소 이용

지방족과 방향족 탄화수소는 석유계 탄화수소의 주요성분

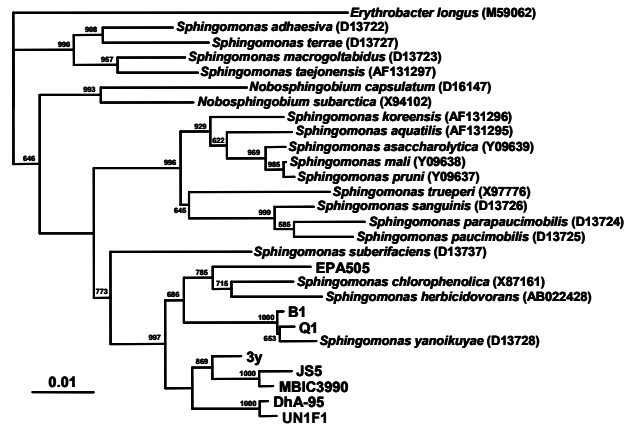


Fig. 1. Phylogenetic tree indicating the position of aromatic compound degrading bacteria within the radiation of members of the genus *Sphingomonas* and related taxa. Sequence accession numbers are given for each strain. Bar, 0.01 accumulated change per nucleotide.

이다. 지방족 탄화수소는 석유계 탄화수소의 상당한 부분을 차지함에도 불구하고 방향족탄화수소의 생분해에 비해 덜 연구되었다. 경유의 경우 지방족 탄화수소가 부피의 최고 90%를 차지하며 C14-C20 alkanes이 주를 이룬다[7]. 그래서 이 성분들에 대한 모델 화합물로서 hexadecane (C₁₆)을 본 연구에서 사용하였다. Hexadecane은 경유의 alkanes (경유 범위 유기화합물에 해당하는 C₁₀-C₂₄) 중에서 가장 높은 비율(22.2%, w/w)을 차지하는 성분이다. 본 연구에서 사용된 지방족 탄화수소 중에서 *Sphingomonas* sp. 3Y는 hexadecane 뿐만 아니라 hexane을 이용하여 성장하였다(Table 1).

분리균의 방향족 탄화수소 분해 특징

원위치 생물학적 복원(in situ bioremediation)을 위한 전략을 세우기 위해 그 지역에 존재하는 석유계 탄화수소 분해생물의 존재와 더불어 그들의 분해능을 확인할 필요가 있다. 오염지역에서 발견되는 토착미생물은 이미 그 곳의 환경요인에 적응이 되었으므로 다른 곳으로부터 도입된 미생물을 원위치 처리에 이용하는 것보다 복원에 효과적인 것으로 보고되었다[6,8].

본 연구에서는 국내의 한 경우 오염지역의 생물학적 복원전략을 위한 기초 정보를 얻기 위해 경유로 오염된 지역에 존재하는 토착 미생물 중에서 우점 개체군으로 분리된 균주의 계통발생학적 위치를 조사하고 석유계 탄화수소를 분해하는 특

Table 1. Growth of *Sphingomonas* sp. 3Y on aliphatic hydrocarbons

Test	Result
Growth on chloroform	-
Growth on hexane	+
Growth on hexadecane	+

성을 조사하였다.

Sphingomonas sp. 3Y는 다양한 종류의 방향족 석유계 탄화수소도 이용하여 성장할 수 있었다. Table 2에 나타난 것과 같이 현재 환경부에 의해 유류오염기준이 설정되어있는 BTEX는 물론이고 phenol, biphenyl, 그리고 phenanthrene에서 성장하였다. 한편 2개의 benzene 환이 결합된 naphthalene에서는 2주 만에 colony 형성이 관찰되지 않았으나 미세집락은 관찰되었다. Phenanthrene은 방향족 석유계 탄화수소를 분해하는 미생물을 연구하기 위해 흔히 사용되는 모델화합물이다. phenanthrene은 방향족 탄화수소 중에서 비교적 물에 대한 용해도와 생분해도가 높고 휘발성이 낮다. *Sphingomonas* sp. 3Y는 phenanthrene을 유일 탄소원으로 사용하는 MSM 배지에서 phenanthrene을 분해하며 성장하는 것을 OD의 증가로서 측정하였다(Fig. 2). *Sphingomonas* sp. 3Y는 배양 초기에는 OD가 급격하게 증가하다가 108시간부터는 OD=0.22 부근에서 더 이상 증가하지 않고 정지기에 도달하였다(Fig. 2).

Table 2. Characteristics of aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas* sp. 3Y.

Test	Result
Growth on benzene	+
Growth on toluene	+
Growth on ethyl benzene	+
Growth on <i>o</i> -xylene	+
Growth on <i>p</i> -xylene	+
Growth on <i>m</i> -xylene	+
Growth on phenol	+
Growth on biphenyl	+
Growth on naphthalene	-
Growth on phenanthrene	+
Phenanthrene spray plate assay	+
Dioxygenase test	+
<i>meta</i> -cleavage dioxygenase activity	+

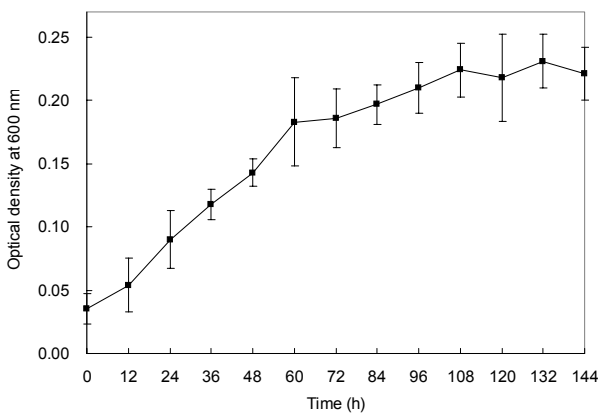


Fig. 2. Growth curve of *Sphingomonas* sp. 3Y in MSM containing phenanthrene as a sole carbon source. Data are given as mean±standard deviation (n=3).

Sphingomonas sp. 3Y는 indole을 indigo로 전환하는 활성조사에서 양성을 나타내었으므로 aromatic ring dioxygenase 활성을 가진 것으로 판단하였다(Table 2). Aromatic ring dioxygenase는 방향족 탄화수소의 생분해 과정의 맨 첫 단계 반응에 관여하는 효소로서 방향족 탄화수소의 benzene 환에 2 산소원자를 결합시키는 반응을 촉매 한다[6]. 또한 *Sphingomonas* sp. 3Y는 *meta*-cleavage dioxygenase 활성을 나타내었다. Table 1과 2에 나타난 것과 같이 *Sphingomonas* sp. 3Y는 방향족 탄화수소와 지방족 탄화수소를 포함하는 다양한 석유계 탄화수소를 유일 탄소원으로 성장하는 것으로 나타나 유류성분의 분해에 유용할 것으로 여겨진다. 이 균주가 분리된 경우 오염지역에 이미 적응된 토착미생물인 이 균주의 최적 분해 조건을 향후 조사한다면 그 결과는 그 오염지역의 생물학적 분해를 최적화하는데 기여할 것이다.

요 약

장기간 경유로 오염된 지역의 토양으로부터 분리한 세균 3Y는 석유계 탄화수소를 구성하는 다양한 화합물을 유일 탄소원으로하여 성장하였다. *Sphingomonas* sp. 3Y는 지방족 화합물은 물론이고 방향족 화합물을 이용해서 성장할 수 있었다. 지방족 화합물로서는 hexane과 hexadecane을 이용하여 성장하였고, 한편 방향족 화합물로서는 BTEX는 물론이고 phenol, biphenyl, 또는 phenanthrene을 유일 탄소원으로 이용하여 성장하였다. 본 균주는 indole과 catechol을 이용한 실험결과 방향족 탄화수소의 생분해 과정에서 맨 첫 단계 반응에 관여하는 효소인 aromatic ring dioxygenase 활성과 benzene 환을 깨는 효소인 *meta*-cleavage dioxygenase 활성을 나타내었다. *Sphingomonas* sp. 3Y의 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석과 계통수 작성 결과 본 균주는 α -Proteobacteria인 *Sphingomonas* 속에 해당하였으며 지금까지 잘 알려진 석유계 탄화수소를 분해하는 *Sphingomonas* sp. 균주들과는 다른 cluster를 형성하였다. 다양한 석유계 탄화수소 성분을 이용하여 성장하는 *Sphingomonas* sp. 3Y는 유류로 오염된 토양의 복원에 유용하게 사용될 것으로 여겨지며 이 균주의 최적 분해 조건을 조사한다면 그 결과는 이 균주가 분리된 오염지역의 생물학적 분해를 최적화하는데 기여할 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 2006학년도 동아대학교 학술연구비(신임교원과제)에 의하여 연구되었음.

References

1. Ahn, Y., J. Sanseverino, and G. S. Sayler. 1999. Analyses

- of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation* **10**, 149-157.
2. Ahn, Y., H. Jung, R. Tatavarty, H. Choi, J. W. Yang, and I. S. Kim. 2005. Monitoring of petroleum hydrocarbon degradative potential of indigenous microorganisms in ozonated soil. *Biodegradation* **16**, 45-56.
 3. Ahn, Y. 2007. Characterization of aromatic hydrocarbon degradation by a *Sphingomonas* sp. strain isolated from a diesel contaminated soil. *Research Report* **29**, 127-132.
 4. Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **45**, 180-209.
 5. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. J. Schifer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
 6. Johnsen, A. R., L. Y. Wick, and H. Harms. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollution* **133**, 71-84.
 7. Stolz, A. 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 793-811.
 8. Stroud, J. L., G. I. Paton, and K. T. Semple. 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 1239-1253.
 9. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
 10. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115-147, In Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd.
 11. Mastral, A. M. and M. S. Callen. 2000. A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3051-3057.
 12. Ministry of Environment. 2007. Soil Environment Conservation Act. Republic of Korea.