디젤의 미생물 분해와 군집에 관한 연구

A Study on Microbial Community and Microbial Degradation of Diesel

최희철 · 조윤아* · 최상일 · 이태진†,*
Hee-chol Choi · Yoon-a Cho* · Sang-il Choi · Tae-jin Lee†,*

광운대학교 환경공학과, *서울산업대학교 환경공학과
**Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology*
Department of Environmental Engineering, Kwangwoon University

(2009년 12월 17일 접수, 2010년 5월 27일 채택)

ABSTRACT : This study investigates characteristics of diesel degradation and variations of microbial community with the soil enrichment cultures. The cultures has yellow(YE-5) and transparent color's(WH-5) colony on solid plate medium. The bacillus type of YE-5 and WH-5 cultures showed diesel degradation at the rate of 99.07mg-Diesel/L·day and 57.82 mg-Diesel/L·day in the presence of 1%(v/v) initial diesel concentration. Diesel degradation was 1.7 times faster than WH-5 culture. YE-5 or WH-5 culture could degrade a wide range of diesel compounds from C_8 to C_{24}. Microbial community analysis by PCR-DGGE technique shows that *Psedomonas, Klebsiella, Escherichia and Stenotrophomonas* as *proteobacteria* take role on the diesel degradation. uncultured *Senotrophomonas sp.* was only detected with YE-5 culture. It is concluded that proper combination of the microorganism should be present to stimulate the degradation of diesel and further studies are recommended for the effect of uncultured *Senotrophomonas sp.* or *Escherichia hermannii* on diesel degradation.
Key Words : *Soil micrbes, Diesel degradation, Proteobacteria*

요약 : 토양으로부터 농화배양된 두 미생물 군집의 디젤 분해 특성과 미생물의 군집 양상을 살펴보았다. 간균 형태를 띄는 두 군집은 육안으로 뚜렷히 구별되는 황색(YE-5)과 투명한 형태(WH-5)의 콜로니를 형성하였으며 1% 디젤 오염된 배지에서 26일간 배양하였을 때 디젤 분해율은 99.07 mg-Diesel/L·day와 57.82 mg-Diesel/L·day로 YE-5가 약 1.7배정도의 빠른 분해속도를 나타내었다. YE-5에 의한 디젤의 분해양상은 C_8-C_{24} 전반에 걸쳐고르게 분해되는 양상을 보여주었다. PCR-DGGE 기법을 이용하여 YE-5를 동정한 결과 *Psedomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas* 등이 관찰되었으며 모두 단백세균에 속하는 것으로 분석 되었고 YE-5에서만 Uncultured *Stenotrophomonas sp.*가 관찰되었다. 본 실험을 통해 디젤의 효과적 분해를 위해 적절한 군집의 조합이 필요하다는 것을 알 수 있었으며 *Escherichia hermannii*나 Uncultured *Stenotrophomonas sp.*와 같은 기 보고되지 않은 종들이 디젤 분해에 미치는 영향에 관한 후속연구가 필요할 것으로 판단하였다.
주제어 : 토양미생물, 디젤분해, 단백세균

1. 서 론

석유계탄화수소는 연료나 섬유의 원료로 사용되고 있으며 많은 양이 환경에 노출되고 또 오염을 유발하여 자연생태계에 나쁜 영향을 미친다. 또한 석유계 탄화수소는 지하공간으로 유입되면 잔류물로 공극 사이에 갇히기도 하고 지하수면 위에 쌓이게 되거나 용해도에 따라 지하수 속으로 용해되어 진다. 용해된 석유 탄화수소의 성분들은 지하수의 흐름에 따라 다른 지역으로 퍼져나가 오염의 확산을 야기한다.[1)]

우리나라에서는 1996년 토양환경보전법이 시행되었으며 토양환경영향평가 신설을 골자로 하는 개정이 2002년 이루어졌고 최근 규제물질을 세분화하고 벤조피렌과 같은 규제물질을 신설하는 것을 골자로 하는 개정이 완료되어 2009년 6월 시행되고 있다. 이는 토양오염에 대한 증가하는 사회적 관심을 반영하여 법적으로 또 제도적으로 엄격히 토양을 관리하고자 하는 일련의 조치로 이해되고 있다.

토양오염 정화기술은 1990년대 이후 대학이나 연구소 중심으로 많은 연구가 진행되어왔으나, 국내 토양정화 시장의 규모의 증가와 더불어 많은 기술적 발전을 이루어왔다. 환경부 및 관계부처에서는 법적 개선과 더불어 오염토양을 복원하기위한 토양 및 지하수오염 정화기술에 대한 연구개발을 집중 육성 하고 있으며, 최근에 이르러 오염토양 정화기술에 대한 현장 적용성을 갖춘 다양한 기술이 개발되고 있고 실현장에 적용되고 있다. 현재 국내 정화시장의 기술 적용 현

†Corresponding author : E-mail : leetj@snut.ac.kr Tel : 02-970-6614 Fax : 02-971-5776

황을 살펴보면 총 434개 오염토양 정화현장 내에서 적용된 796개 정화기술 중 지중처리기술이 83.3%로 지상처리기술 16.7% 보다 현저하게 많이 적용된 것으로 조사되었다.[2] 이는 국내 토양정화 공사가 대부분 주유소 등을 대상으로 수행되었고 이러한 사업장은 사업장을 유지하면서 복원사업을 수행하는 지중처리 기술을 주로 사용하였기 때문으로 판단된다. 지상처리기술은 지중처리기술에 비해 넓은 부지와 굴착공사 등에 따라 비교적 많은 정화비용이 소요되므로 초기에는 많이 적용되지 않았으나, 최근 일부 복원사업 현장에서는 부지 활용을 위해 오염토양의 신속한 처리가 요구됨에 따라 지상처리기술의 적용이 증가하고 있는 추세이다.

토양이 유류에 오염되었을 때 복원하는 대표적인 방법인 생물학적 처리법은 경제적이고 환경 친화적인 기술로 적용가능성이 높고 복원에 성공적으로 적용되고 있는 기술로 알려져 있다.[3~5] 이 과정에서 유류오염토양을 복원하는데 결정적 역할을 수행하는 토착미생물에 대한 연구가 최근 많이 수행되고 있으며 특정 미생물이 오염물질의 생분해과정에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[6] 토양 오염은 크게 유류나 중금속에 의한 오염이 대부분이나 유류오염 중에는 특히 디젤유가 유류저장탱크의 부분적인 파손이나 수송사고로 토양과 지하수를 오염시키고 있어 디젤오염 토양 복원에 관한 연구가 많은 관심을 받고 있다. 디젤은 비교적 생물학적으로 분해되기 쉬운 물질이지만 디젤의 구성물질 중 분자량이 큰 난분해성 탄화수소는 분해과정에서 독성을 가지는 중간대사물질을 생성하기도 하고 토양에 유출된 디젤은 높은 농도에서 토양 내 미생물의 호흡활성과 탈수소효소의 활성을 감소시키는 등 독성효과를 가지기 때문에 디젤분해 미생물의 활성을 저해한다고 보고된 바 있다.

석유계 탄화수소로 오염된 토양에서는 디젤 화합물들을 분해하는 미생물이 종종 분리된다.[7~12] 다양한 미생물이 방향족 또는 지방족 석유계 탄화수소를 분해하는 것으로 보고되고 있는데 대부분의 미생물은 *Proteobacteria*나 높은 G+C 함량을 가진 Gram 양성 세균에 속하는 것으로 보고 되었다.[8~10,13]

본 연구에서는 디젤에 오염된 토양 정화에 기여하는 토양 미생물 군집을 분리하여 농화 배양함으로서 미생물 군집들에 의한 디젤의 분해 양상과 더불어 디젤 분해과정에 기여하는 미생물들을 분석하고자 하였다. 이를 통하여 디젤 분해 시 미생물의 군집 간 상호작용을 이해할 수 있을 뿐 아니라 미생물을 통한 디젤 오염된 토양의 효율적 복원을 위한 기초적 연구 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단하였다.

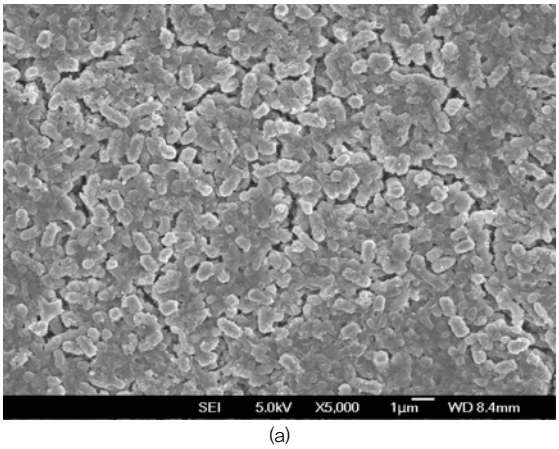
2. 재료 및 방법

2.1. 미생물의 배양

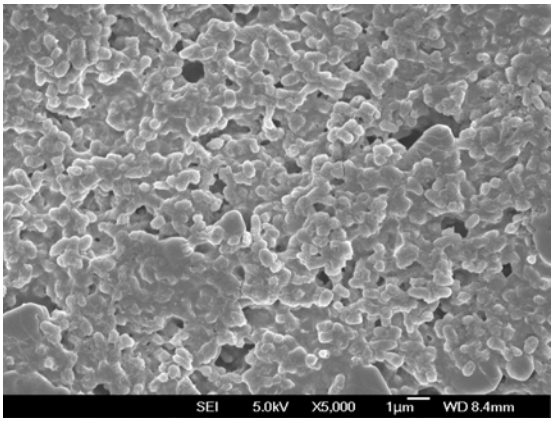
주유소 인근 토양 10 g을 100 mL 증류수에 넣고 25℃, 125 rpm에서 24 hr shaking 한 상등액 1 mL를 디젤 1%가 첨가된 Minimal Salt Medium(MSM) 액체배지에 접종하여 25 ℃로 조정된 배양기에서 일주일간 배양하였다. 이 배양

Table 1. Compositions of Minimal Salt Medium(MSM) for aerobic cultures

Components	Concentration (g/L)	Components of trace element	Concentration (g/L)
$NaNO_3$	0.85	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.32
KH_2PO_4	0.56	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.78
Na_2HPO_4	0.86	H_3BO_3	0.56
K_2SO_4	0.17	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.37	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.39
$CaCl_2.H_2O$	0.007	KI	0.66
Fe(Ⅲ) EDTA	0.004	EDTA	1.0
Trace element solution	0.25 mL	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4
		$NiCl \cdot 6H_2O$	0.004



(a)



(b)

Fig. 1. Morphology of the YE-5(a) and WH-5(b) cultures with scanning electron microscopy(SEM).

Table 2. forward and reverse PCR primers and GC Clamp

primer pair (Target)	nucleotide sequence (5′ – 3′)	size of PCR product(bp)	reference
EUB10f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	1408	(18)
EUB 1400r (bacteria 16S rDNA)	ACG GGC GGT GTG TAC AAG		
341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	193	(16)
518r (V3 region)	ATT ACC GCG GCT GCT GG		
GC clamp	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	233	(16,19)

* f : forward primer r : reverse primer

액을 디젤 1%로 오염된 한천배지(디젤 1%, MSM broth, tween 80 0.2%)에 농화 배양(enrichment) 시킨 후 colony를 형성하게 하였다. 이 한천배지에 colony가 형성되면 백금봉을 이용하여 두 종류의 colony를 각각 분리하였다. 하나의 colony는 황색을 띄었으며 선이 매끄럽고 볼록한 형태의 colony로 YE-5라 명명하였으며, 다른 하나는 투명하며 colony의 크기가 매우 작았고 WH-5라 명명하였다. YE-5와 WH-5의 두 집단은 복합균주의 형태로 계대배양되어 농화되었으며 배양을 위하여 사용한 배지의 구성을 **Table 1**에 나타내었다.

미생물 군집의 형상 관찰을 위해 SEM(Scanning Electron Microscopy) 분석을 실시하였으며 **Fig. 1**은 SEM을 통해 배율 5,000배로 관찰한 YE-5와 WH-5 군집의 사진이다. 군집의 형상은 간균 형태로 관찰되었다.

2.2. 분석방법

2.2.1. 디젤 및 미생물의 생체량 분석

균체량(volatile suspended solids)의 측정은 일정량의 배양액을 취하여 600 ηm에서 흡수된 광량을 기존에 건조중량으로 검량된 곡선에 대입하여 환산 측정하였다.[14] 배양액에 존재하는 디젤의 농도는 환경부 토양공정 시험방법[15] 중 Total Petroleum Hydrocarbon(TPH) 분석방법에 준하여 정량 하였으며 디젤의 분석을 위하여 GC-FID(Shmazu-17A)를 이용하였다.

2.2.2. DNA 추출

각각의 미생물 배양액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제외한 침전물을 약 0.25 g이 되도록 한 후, Power Soil DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, Inc.)를 사용하여 DNA 추출을 하였다. DNA 추출여부는 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

2.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)을 통한 16S rDNA 증폭

추출한 DNA template에서 16S rDNA의 가변 부위인 V3 region 증폭을 위해 서로 다른 2개의 primer sets을 사용하여 nested PCR을 실시하였다.[16] 실험에 사용된 primer (Bionics, Korea)의 sequence은 **Table 2**와 같다. 먼저 Bacteria의 16S rDNA 증폭을 위하여 EUB 10f와 EUB 1400r primer를 사용하여 1차 PCR을 수행하였으며, 이때 생성된 PCR product를 이용하여 V3 region을 증폭하고자 341f와 518r primer로 2차 PCR을 수행하였다. 또한 DGGE 수행을 위해 341f에 GC clamp를 부착하여 2차 PCR을 다시 수행하였다.

DNA 증폭을 위한 PCR 기기(UVIgene™ State of art Thermal Cycler)의 온도조건은 95℃에 9 min 동안 pre-denaturation 한 후, 95℃에서 1 min denaturation, 53℃에서 1min annealing, 72℃에서 2 min extension을 35 cycles 반복 수행한 후, 마지막으로 72℃에서 10 min final-extension 하였다.[16,17]

2.2.4. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 및 Gel Elution

DGGE는 40%~60%의 변성제 농도 구배(변성제 농도 100%는 7 M Urea, 40% Formaide)를 가지는 8% Polyacrylamide Gel을 이용하여(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 Gradient delivery system) 실시하였다. Polyacrylamide Gel을 1 X TAE buffer를 채운 DGGE 전기영동 기기(Bio-Rad D-code system, Hercules, CA, USA)에 부착시켜 GC clamp를 부착한 primer로 PCR을 실시하여 얻은 약 200 bp의 동일한 크기의 PCR product을 gel에 Loading 한 후 200 V, 300 min(runing time)[17]으로 전기영동을 실시하

였다. 전기영동 후 UV transilluminator에서 DGGE 밴드 확인 후 원하는 band 부위를 잘라낸 후 30 ㎕의 1X TE Buffer 첨가하여 gel에서 DNA가 분리되도록 하였다.[20] 분리된 DNA를 341f와 518r를 primer로 PCR을 재 실시하여 생성된 PCR product를 이용하여 sequence하였다.

2.2.5. 염기서열 분석 및 Phylogenetic Tree 작성

염기서열 분석은 염기서열 분석 전문기관 (Bionics, Korea)에서 수행되었으며, 계통분류학적 확인을 위해 V3 region의 염기서열 결과는 NCBI BLAST Search Database에서 검색된 염기서열 정보를 이용하였다. phylogenetic tree의 작성 작업은 Mega 4.0 software의 neighbor-joining method을 이용하였으며 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura 2-parameter Model을 이용하였다. 또한 신뢰성 확보를 위해 1000회의 bootstrap을 시행하였다.[20~24]

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물 군집의 디젤 분해 효율

디젤분해 효율을 보기 위하여 MSM 액체배지에 디젤 1%(v/v)로 오염시킨 후 YE-5, WH-5로 명명된 두 군집을 각각 접종하였다. 미생물을 주입하지 않은 control을 포함하여 6 set의 배양액을 만들어 실험하였으며, control 배지는 실험과정동안 자연적으로 손실되는 디젤양을 관찰하기 위하여 접종된 배양액과 동일한 조건에서 실험을 수행하였다. Fig. 2은 YE-5, WH-5 군집의 디젤분해 효율과 미생물의 성장량을 나타낸 그래프이다. 초기 10,000 mg/L의 디젤은 약 10일 지나면서 대부분 분해가 완료되었으며 두 군집에서 디젤 분해는 12일째가 지나면서 YE-5가 86.4%, WH-5가 66.8% 로 YE-5의 군집 배양액에서 디젤 분해율이 높게 나타났으며 이는 초기농도 8,300~13,060 mg/L 으로 하여 *Rhodococcus ruber*등과 같은 단일 순수균주를 사용한 논문에서[6,25~27] 제시한 21.1~64.6%의 분해율 보다 높은 수치이며 초기농도는 10,290~35,000 mg/L 으로 하고 혼합균주를 사용한 논문에서[27~30] 제시한 52~80% 분해율과 유사한 수치이다. 미생물이 접종되지 않은 control 배지의 경우 약 29.6%의 디젤유가 감소하였는데 이는 실험과정동안 디젤의 자체적 휘발성에 의해서도 상당량의 디젤이 감소됨을 알 수 있었다.

디젤 분해와 더불어 YE-5 군집의 생체량의 성장 양상을

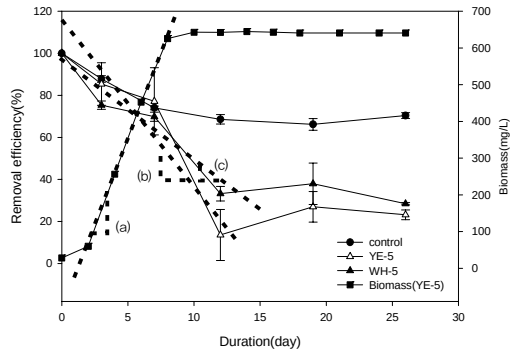


Fig. 2. Diesel degradation and microbial growth in YE-5 and WH-5 cultures. Mean values represent the average out of three experiments.(a) 94.62 mg-Biomass/L·day (R_2=0.999) (b) 99.07 mg-Diesel/L · day(R_2=0.881) (c) 57.82 mg-Diesel/L · day(R_2=0.886), Regression was conducted by SIGMA PLOT 2002, SPSS Science.

살펴보면 디젤유 농도가 급격하게 떨어지기 시작할 때 약 94.62 mg-Biomass/L·day의 속도로 급격히 성장 하였으며, 이때 디젤은 YE-5 군집에 의해 99.07 mg-Diesel/L·day의 속도로 소비되었다. WH-5 군집에 의한 디젤의 소비가 57.82 mg-Diesel/L·day인 것에 비해 YE-5 배양액에서 디젤은 약 1.7배정도의 빠른 분해속도를 가졌다. YE-5 군집에서 디젤 당 미생물 생체량의 성장량은 약 0.11 mg-Biomass /mg-Diesel로 나타났다.

3.2. 미생물 군집의 디젤 분해 특성 비교

Fig. 3는 control과 YE-5, WH-5의 배양액에서 디젤유 거동을 나타내는 그림이다. 디젤의 분해양상은 디젤유를 구성하는 탄화수소 전반(C_8~C_{24})에 걸쳐 일어나는데, 특히 분자량이 작은 탄화수소(C_8~C_{11})에서는 휘발에 의한 감소량이 두드러지는 반면 분자량이 큰 탄화수소(C_{11}~C_{24})에서는 주로 미생물에 의한 분해가 지배적이었다. Fig. 3a에 나타난 바와 같이 C_8~C_{12} 까지 작은 분자량의 노말 알칸류들은 휘발이 빨리 진행되고 있음을 나타내는 것이고 비교적 탄소수가 큰 분자(C_{14} 이상)들의 농도는 휘발성이 상대적으로 낮기 때문에 control배양액 내에서 크게 줄어들지 않은 것을 확인할 수 있었다. 특히 C_{10} 이하의 저분자 노말알칸류는 26일 후 control 배양액에서 검출되지 않았는데 이는 실험과정 동안 휘발된 것으로 판단되었다. 기존 연구보고서에서 탄소수가 작은 노말 알칸류(C_{10}~C_{15})가 탄소수가 큰 노말 알칸류(C_{16}~C_{20})보다 미생물 분해가 쉽게 이루어지는 것으로 보고되었으며 일반적으로 디젤의 미생물 분해와 휘발에 의한 디젤의 감소는 탄소수가 작은 노말알칸류에서 두드러지게 나타났었다.[25]

본 실험에서는 YE-5 군집과 WH-5 군집에 의한 디젤의 분해특성을 살펴보기위해 분해과정 동안의 디젤의 분해양상을 Fig. 3 (b)와 (c)에 나타내었다. 먼저 YE-5의 배양된 디젤의 분해특성을 살펴보면 낮은 탄소수에서 높은 탄소수까지 전반에 걸쳐 분해되었으며, 미량의 C_{18}(n-Octadecane)의 잔류만이 관측되었다. 이러한 양상은 기존 연구에서는[25] 단일 균주를 사용하여 디젤의 분해가 특정한 탄소수의 범위에 국한되어 나타나는 양상을 띄었다면 본 연구에서는 복합균주를 이용하여 분해하였기 때문에 저분자의 탄화수소 뿐만 아니라 고분자의 탄화수소까지 분해 할 수 있는 미생물 군집이 배양액에 존재하고 있음을 유추할 수 있었다. WH-5의 군집의 디젤 분해 양상은 최종적으로는 YE-5과 같은 양상을 나타냈으나 분해율이 약 20%정도 차이 났던 12일째 시점에서는 그 분해양상이 다소 다르게 나타났다. YE-5군집에 비해 WH-5군집의 분해 속도는 현저히 느렸고, 12일째 YE-5 군집은 작은 노말 알칸류 부터 탄소수가 큰 노말 알칸류를 골고루 분해하며 성장 한 반면 WH-5 군집은 특히 C_{14}~C_{18} 의 분해가 더디게 진행되고 전체적인 분해가 미진하다가 배양 26일째가 지나가면서 YE-5군집에 의한 분해양상과 같이 낮은 탄소수에서 높은 탄소수에 걸쳐 전반적인으로 고르게 분해되는 경향을 나타내었다. 이는 군집에 따른 분해양상과 효율의 차이가 있음을 나타내는 것으로 이를 살펴보기 위해 농화 배양된 YE-5 군집과 WH-5 군집에 존재하는 미생물 해석을 통하여 분해 특성과 군집과 상관관계를 알아보고자 PCR-DGGE 실험을 수행 하였다.

3.3. 디젤 분해 미생물 군집의 동정

3.3.1. 두 군집 간 군집 특성 비교

Power Soil DNA Isolation Kit(MO BIO Labortories, Inc.)를 이용하여 반복된 YE-5, WH-5 군집의 DNA를 추출하여 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 DGGE를 실행한 결과 YE-5 군집에서는 5가지 균을 나타내는 band가 확인 되었으며 WH-5 군집에서는 4가지 균을 나타내는 band가 확인 되었다. Fig. 4는 분리된 5가지 미생물의 DNA를 추출하여 PCR을 이용해 증폭하여 얻은 16S rDNA의 V3 region의 DGGE 수행을 통한 미생물의 군집을 나타낸 결과이다. YE-5의 군집을 나타낸 Fig. 4a의 각 균주의 band 선명도를 살펴보았을 때 3번 band의 미생물이 우점종임을 알 수 있었다. 또 WH-5 군집을 나타낸 Fig. 5b 역시 3번 band의 미생물이 우점종임을 알 수 있었는데 다양하게 분포되어

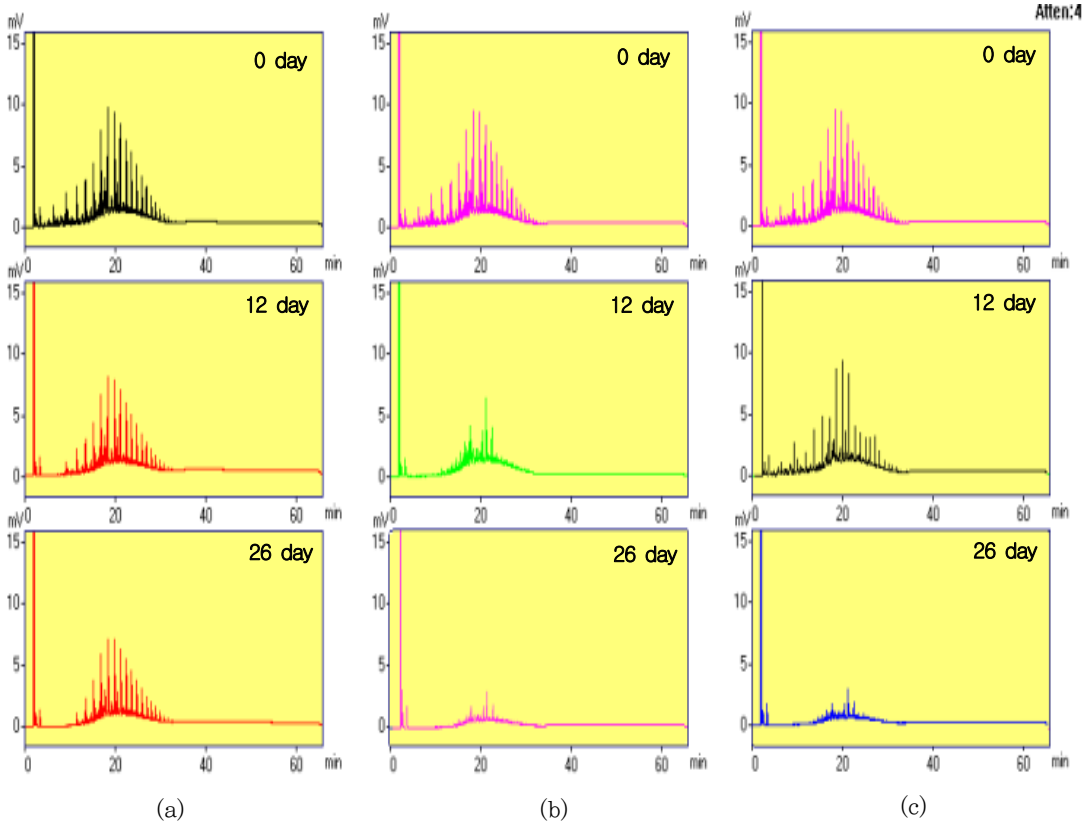


Fig. 3. GC Chromatograms of (a) control samples (no inoculation of YE-5) and (b) samples with YE-5 incubation and (c) samples with WH-5 incubation.

가시화된 DGGE band의 미생물 군집을 파악하기 위해 각각의 band의 sequence를 NCBI BLAST을 이용하여 GenBank database와 비교 분석하고 가장 유사도가 높은 종을 검색하여 **Table 3**에 나타내었다. 반복된 DGGE 실험에서 선명하게 나타난 YE-5와 WH-5 군집의 3번 band는 *Pseudomonas aeruginosa* 로 규명되었다. *Pseudomonas aeruginosa*는 이전 연구에서 유류 분해에 탁월한 효과를 보였다고 보고된 바 있는 균이다.[31,32] 이외 에도 유류분해에 관여하는 미생물로는 *Aeromonas, Arthrobacter, Corollospora, Dendryphiella, Pseudomonas, Klebsiella sp., Bacillus, Acinetobacter, Rhodococcus*등이 유류 분해에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며,[33] 본 실험에서도 기존의 연구결과와 마찬가지로 *Pseudomonas, Klebsiella sp.* 등이 검출되었다.

Uncultured *Stenotrophomonas* sp.는 YE-5 군집에서는 관찰 되었으나 WH-5 군집에서는 관찰되지 않았는데 이것으로 보아 앞서 말한 노말 알칸 분해 특성 중 다른 분해 양상이 나타나게 영향을 미치는 균주는 Uncultured *Stenotrophomonas* sp.일 것이라 판단되어 진다. *Stenotrophomonas maltoilia*의 경우 이전 연구에서 TNT, 아닐린, PAH 분해에 기여하는 것으로 보고된 바 있다.[34] 따라서 기존에 디젤 분해 미생물로 알려져 있지 않은 *Escherichia hermannii*나 Uncultured *Stenotrophomonas* sp.종에 의한 디젤의 분해에 관해 보다 세밀한 후속 연구가 필요할 것으로 판단되어진다.

Fig. 5은 DGGE band로부터 판명 된 미생물의 계통학적 유연관계를 도시한 결과이다. *Pseudomonas aeruginosa* 와 Uncultured *Stenotrophomonas* sp., *Escherichia hermannii* 모두 단백세균(Proteobacteria)에 속하는 세균으로 분석 되었다.

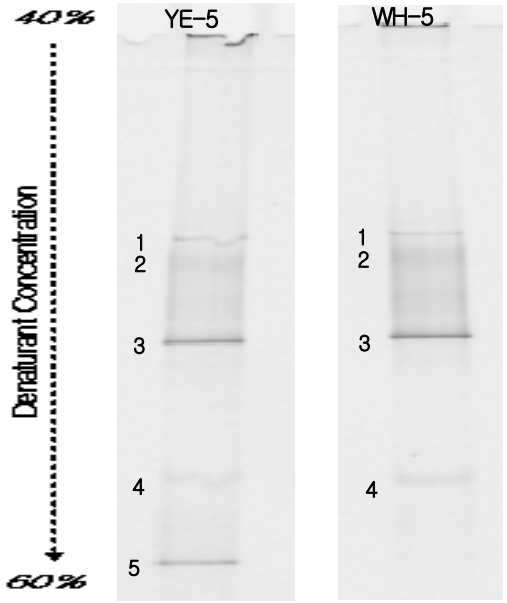


Fig. 4. DGGE results of 16S rDNA V3 region for the aerobic cultures. Numbers beside bands are 16 S DNA region of the growth medium.

Table 3. Characteristic of DNA fragments obtained from DGGE gel for the aerobic cultures

band no.	Accession	Description	Query coverage	Max ident
1	FJ555520.1	*Klebsiella sp. C611 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	96%	97%
2	FJ355969.1	*Pseudomonas sp. 1S2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	98%	97%
3	DQ459316.1	*Pseudomonas aeruginosa strain NRRL B-14935 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	95%	98%
4	FJ544365.1	*Escherichia hermannii strain st6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	97%	98%
5	AM711577.1	Uncultured *Stenotrophomonas sp. partial 16S rRNA gene, isolate DGGE band A4A*	97%	97%

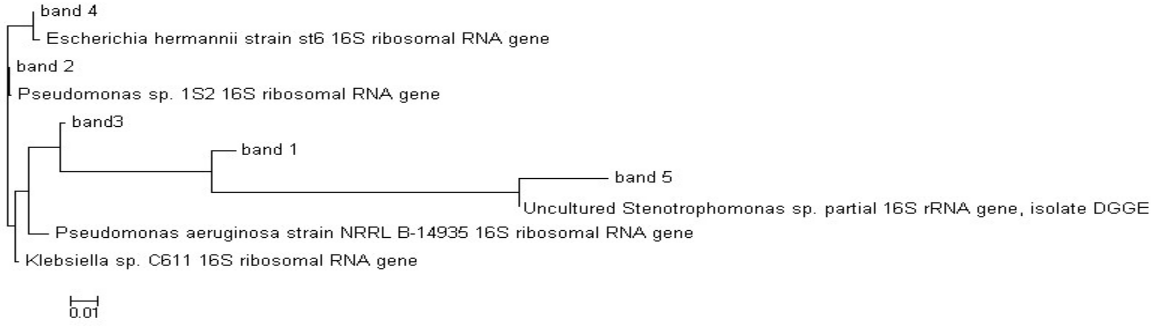


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the relationship among the closest relatives in the GenBank databases and the aerobic culture. The tree was produced using a neigbor-joining method. The bar indicates 5% sequence divergence. The numbers at the nodes of the branches refer to the Bootstrap values for 1000 replicates.

4. 결 론

오염된 디젤을 효과적으로 분해하기 위해 사용될 수 있는 토양미생물의 디젤의 분해특성과 미생물 군집을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 간균 형태로 관찰된 황색을 띈 선이 매끄럽고 볼록한 형태의 colony가 나타난 YE-5와 colony의 크기가 상대적으로 작으며 투명한 WH-5, 두 토양미생물 군집을 농화배양 한 후 디젤이 함유된 배지에서의 디젤의 분해율을 살펴보았을 때 배양 12일 째 YE-5 군집은 1% (v/v) 초기농도 대비 86.4% 그리고 WH-5 군집은 66.8%의 제거율을 나타내었다. 두 군집의 디젤 분해효율 비교에 있어서 YE-5 군집의 디젤을 분해효과가 더 높은 것으로 나타났으며 이는 디젤오염 토양 복원에 미생물의 적용은 적절한 군집을 사용하여야 함을 나타낸다.
2) YE-5 군집의 디젤 분해율은 99.07 mg-Diesel/L·day의 속도로 측정 되었으며, 이는 WH-5 군집의 디젤 분해율이 57.82 mg-Diesel/L·day인 것에 비해 약 1.7배 정도의 빠른 분해속도를 가지는 것을 알 수 있었다. YE-5에서 디젤 당 미생물 생체량의 성장량은 약 0.11 mg-Biomass/mg- Diesel로 나타났다.
3) 디젤을 구성하는 탄화수소에 있어서 탄소수가 작은 n-alkane(C_{10}~C_{15})이 탄소수가 큰 n-alkane(C_{16}~C_{20})보다 휘발성도 크고 미생물 분해가 쉽게 이루어지며 탄소수가 큰 (분자량이 큰) 탄화수소는 낮은 휘발성과 상대적으로 미생물 분해가 더디게 진행되나 본 실험에서는 YE-5 과 WH-5 군집에 의해 탄소수에 상관없이 전반에 걸쳐 분해되었으며 분해속도에 있어서 두 군집의 차이는 확연하였다. 따라서 디젤의 전반적인 분해는 YE-5나 WH-5에 존재하는 혼합미생물의 상호작용으로 전반적 분해가 이루어진 것으로 판단되었으며 미생물 군집의 조성과 디젤의 분해효율의 상관관계가 있음을 확인하였다.
4) DGGE 분석을 통해 YE-5 군집에서 디젤의 분해에 영향을 주는 미생물은 *Pseudomonas, Klebsiella sp. Escherichia hermannii*나 Uncultured *Stenotrophomonas sp.* 등으로 분석되었고 우점종으로 *Pseudomonas aeruginosa*가 검출되었다. WH-5에서 역시 우점종은 *Pseudomonas aeruginosa*으로 검출되었으나 YE-5에서 검출되었던 Uncultured *Stenotrophomonas* sp.은 검출되지 않았다. 효율이 좋았던 YE-5에서만 관찰된 Uncultured *Stenotrophomonas* sp.는 디젤분해에 영향을 미치는 미생물일 것이라 판단되었다. 이를 통하여 효과적인 디젤 분해를 위해 적절한 미생물 군집의 조합이 필요하다는 것을 알 수 있었으며 개별적 미생물의 디젤 분해에 미치는 영향을 해석하기 위해서는 미 보고된 *Escherichia hermannii*나 *Senotrophomonas sp.*가 디젤의 분해 미치는 영향에 관한 세밀한 후속 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

KSEE

참고문헌

1. Marinelli, F. and Durnford, D. S., "LNAPL thickness in monitoring wells considering hysteresis and entrapment", *Ground Water*, **34**, 405-414(1996).
2. 윤상희, "2004년 특정오염유발시설 설치 및 관리현황 보고", 환경부(2005)
3. Vogel, T. M., "Bioaugmentation as a soil bioremediation approach", *Curr. Opin. Biotechnol*, 7, 311-316(1996).
4. Lindstrom, J .E., Prince, R. C., Clark, J. C., Grossman, M. J., Yeager, T. R., Braddock, J. F., and Brown, E. J., "Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediment affected by the T/V exxon Valdez oil spill", *Appl. Environ. Microbiol*., **57**, 2514-2522(1991).
5. Ruberto, L., Vazquez, S.C., Mac Cormack, W.P., "Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Actartic soil", *Interna Biodeterio. Biodegra*, **52**, 115-125(2003).
6. Lee, M, Kim, M. K., Singleton, I., Goodfellow, M., and Lee, S. T., "Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified Rhodococcus baikonurensis EN3 in the presence of micolic acid", *J Appl. Microbiol*., **100**, 325-333(2006).
7. Ahn, Y., Sanseverino, J., and Sayler., G. S., "Analyses Journal of Life Science 2009, Vol. 19. No. 5 663 of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolatedfrom contaminated soils", Biodegradation, **10**, 149-157(1999).
8. Ahn, Y., Jung, H., Tatavarty, R., Choi, H., Yang, J. W., and Kim, I. S., "Monitoring of petroleum hydrocarbon degradative potential of indigenous microorganisms in ozonated soil", *Biodegradation*, **16**, 45-56(2005).
9. Johnsen, A. R., Wick, L. Y., and Harms, H., "Principles of microbial PAH-degradation in soil", *Environ. Pollut.*, **133**,

71-84(2005).

10. Stolz, A., "Molecular characteristics of xenobiotic- degrading sphingomonads", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 793-811 (2009).
11. Stroud, J. L., Paton, G. I., and Semple, K. T., "Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation", *J. Appl. Microbiol.* **102**, 1239-1253(2007).
12. Mastral, A. M. and Callen, M. S., "A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation", *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3051-3057(2000).
13. Atlas, R. M., "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **45**, 180-209(1981).
14. Minnan, L., Jinli, H., Xuijuan, W., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z., Liangshu, X., "Isolation and characterization of a high H2-Producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring", *Research In Microbiol.*, **156**, 76-81(2005).
15. 환경부 토양지하수과, "토양오염공정시험방법", 송죽문화사, pp. 408-410(2007).
16. Vreas L., Forney L., Daae F. L., and Torsvik V., "Distribution of bacterioplankton in meromictic lake selenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3367-3373(1997).
17. Pedro, M. S., Haruta, S., Hazaka, M., Shimada, R., Yoshida, C., Hiura, K., Ishii, M., and Igarashi, Y., "Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter", *J. Bioscience and Bioengineering*, **91**(2), 159~165 (2001).
18. Ueno Y., Haruta S., Ishii M. and Igarashi Y., "Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora:", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**(4), 397-400(2001).
19. Hollibaugh J. T., Bano N. and Ducklow H., "Widespread distibution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to Nitrosospira-like ammonia-oxidizing bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478-1484(2002).
20. Hung C. H., Cheng C. H., Cheng L. H., Liang C. M., Lin C. Y., "Application of *Clrostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community", *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**(5), 1586-1592(2008).
21. Auch, A. F., Henz, S. R., Holland, B. R., and Goker, M., "Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences", BioMed Central Ltd(2006).
22. Felgenstein, J., "Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap", *Evolution* **39**, 783-791(1985).
23. Kimura, M., "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120(1980).
24. Saitou, N., and Nei, M., "The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425(1987).
25. 김지영, 조경숙, "유류분해 근권세균의 디젤 분해 특성과 실시간 PCR을 활용한 토양에서의 거동 모니터링", 2006 춘계학술연구발표회, 대한환경공학회, pp. 1377-1384(2006).
26. 이수진, 송인근, 김영준, "인공오염토양에서 분리한 디젤분해세균의 동정 및 특성", 유기물자원화학회, **14**(3), 148-156(2006).
27. Li, Y. Q., Liu, H. F., Tian, Z. L., Huazhu, L., Wu, Y. H., and Tang, H. Q., "Diesel Pollution Biodegradation: Synergetic Effect of Mycobacterium and Filamentous Fungi", *Bio. Env. Sci.*, 21, 181-187(2008).
28. 박천보, 허병기, 윤현식, "유류 오염지역으로부터 분리된 균주를 이용한 디젤유의 분해", 한국생물공학회지, **16**(6), 632-637(2001)
29. Boopathy, R., "Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study", *Biores. Technol.*, **94**, 143-151(2004).
30. Liu, P. W. G., Whang, L. M., Yang, M. C., and Cheng, S. S., "Biodegradation of diesel-contaminated soil: A soil column study", *J. Chinese Institute of Chemical Engineers*, **39**, 419-428(2008).
31. 김란희, 강동효, 이순복, 이상섭, "Pseudomonas aeruginosa에 의한 절삭유의 흡착", 2006 춘계학술연구발표회, 대한환경공학회, pp. 1636-1643(2006).
32. 안민정, 한윤전, 임현섭, 최기현, 권오범, 최영출, 정병철, "디젤유 분해균주의 특성 및 토양 배양", *The Korean Journal of Microbiology*, **39**(2), 108-113(2003).
33. 조미선, Rene, E. R., 박홍석, 김수홍, "디젤분해미생물의 성장에 미치는 온도 영향", 춘계학술발표회, 한국폐기물학회, pp. 376-379(2006).
34. 최창석, 이태진, 박진희, 김영식, 김진우, "stenotrophomonas maltophilia에 의한 방향족 화합물의 분해 특성", 폐기물자원화, **11**(4), 130-137(2003).