

*Rhodococcus fascians*를 이용한 모래 컬럼내 디젤유 분해

문준형, 구자룡, 윤현식*

Biodegradation of Diesel by *Rhodococcus fascians* in Sand Column

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

접수: 2011년 1월 27일 / 게재승인: 2011년 2월 23일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Contamination of soils, groundwater, air and marine environment with hazardous and toxic chemicals is major side effect by the industrialization. Bioremediation, the application of microorganism or microbial processes to degrade environmental contaminant, is one of the new environmental technologies. Because of low water solubility and volatility of diesel, bioremediation is more efficient than physical and chemical methods. The purpose of this study is biodegradation of diesel in sand by using *Rhodococcus fascians*, a microorganism isolated from petroleum contaminated soil. This study was performed in the column containing sand obtained from sea sides. Changes in biodegradability of diesel with various flow rates, inoculum sizes, diesel concentrations, and pH were investigated in sand column. The optimal condition for biodegradation of diesel by *R. fascians* in sand column system was initial pH 8 and air flow rate of 30 mL/min. Higher diesel degradation was achieved at larger inoculum size and the diesel degradation by *R. fascians* was not inhibited by diesel concentration up to 5%.

Keywords: Bioremediation, Biodegradation, Diesel, *Rhodococcus fascians*, Sand column

1. 서론

디젤유는 디젤엔진의 연료나 기계부품의 세척용제 등으로

주로 사용되며, 우리나라에서는 소비량이 가장 많은 연료이며, 대부분의 선박의 연료로 이용되고 있다. 디젤유는 정류탑으로부터 중간비점 (300 °F ~ 700 °F)에서 유출된 탄화수소류로 비교적 가벼운 탄화수소류와 BTEX와 같은 대부분의 VOCs는 증류되는 동안 제거되어진 대부분 탄소수가 6개에서 22개사이의 탄화수소로 이루어져있는 혼합물이다. 가솔린과 비교하여 휘발성과 용해도가 낮으며 자연계에서의 분해가 어렵고, 인체에 침투시 빈혈, 혈액응고장애 그리고 백혈구의 파괴로 저항력이 떨어져 신체에 이상이 생길 수 있다 [1]. 디젤유는 여러 화합물로 이루어지며, 조성은 원유의 종류, 증류 및 정유회사에 따라 다르지만 파라핀 (alkanes)이 약 40%, 방향족 화합물이 약 30%를 구성하고 있다.

유류는 가솔린을 제외하면 휘발성이나 용해도가 낮아 단기적인 위해성은 상대적으로 높지 않기 때문에 비용이 많이 들더라도 신속하고 완벽하게 처리하는 기술은 적합하지 않다고 볼 수 있다. 처리시간이 어느 정도 걸리더라도 비용이 적게 드는 방법 또는 최소비용을 들여서 최대의 위해성 저감이 가능한 접근방법을 이용하는 것이 유리하다. 이런 측면에서 볼 때 생물학적 처리기술 (bioremediation)은 여러 가지 장점을 가지고 있으며, 미국 등의 사례에서 볼 수 있듯이 가솔린과 같이 휘발에 의해 쉽게 제거되는 경우를 제외하고 대부분의 유류 오염지역의 정화에 활용되고 있다 [2]. 특히, 디젤유의 경우 오염된 지역의 토양에 간단한 발효를 거쳐 배양된 미생물체를 이용하여 약 45일간의 처리 후 오염되었던 토양내의 디젤유가 90%이상 제거된 사례가 보고되었다 [3].

생물학적 처리 기술의 적용은 다양한 환경에서 이루어지고 있는 것을 볼 수 있다. 환경 조건을 통한 미생물의 활성으로 대상 오염 물질을 효율적으로 제거하는 방법으로서 오염된 장소에 이전부터 살고 있는 토착 미생물을 이용하기 위해 미생물 활성을 촉진시키기 위한 전자수용체, 영양염, 온도, pH 등을 조절하는 방법과 자연에서 분리한 오염원의 분해가

인하대학교 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, 253
Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7517, Fax: +82-32-876-8751
e-mail: hyunshik@inha.ac.kr

뛰어난 미생물이나 유전공학 기술을 이용한 미생물을 첨가하는 방법을 이용한 생물학적 처리 기술이 이용된다 [4]. 오염 상황에 맞추어 처리법을 선택하며 다른 물리화학적 처리방법을 같이 사용하는 경우도 많다. 오염 물질의 제거 효율을 높이기 위한 다단 토양층 시스템의 연구가 활발히 진행되고 있으며 유류 오염 외에 타 오염물질 처리에 토양킬럼을 이용하여 높은 농도의 오염물질을 90% 이상 제거한 경우도 보고되었다 [5].

본 연구에서는 모래 킬럼을 이용한 실험을 통해서 통기 속도, 접종량, 디젤유 농도, 그리고 초기 pH의 변화에 따른 *Rhodococcus fascians*의 디젤유 분해를 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 모래킬럼 내 생분해

유류 오염 토양에서 분리된 균주인 *R. fascians*를 이용하여 바다모래에서의 디젤유 분해율을 알아보기 위해 모래 킬럼을 제작하였다 [6,7]. 킬럼의 총 부피는 2 L이며 킬럼과 덮개 사이는 고분자 물질로 채워져 공기 및 수분의 노출을 방지하였다. 킬럼의 아래와 위에는 공기의 입구와 출구가 설치되어 있고 실험 도중에 영양 염류 용액의 첨가와 시료 채취가 가능하도록 6개의 sampling port가 고안 되었다. 모래 킬럼에서 킬럼내 모래의 수분 농도는 32%였으며 통기속도, 미생물 접종량, 디젤유의 농도, 그리고 초기 pH 등의 조건을 변화시키며 디젤유 분해를 관찰하였다.

2.2. 모래와 미생물

실험에 사용된 모래는 을왕리 해수욕장의 모래를 30 cm 깊이에서 채취하였으며, US sieve 12 (10 mesh)와 US sieve 30 (28 mesh)을 이용하여 고르게 체를 쳐 각기 다른 크기의 입자로 0.45 kg 씩 준비하였다. 준비된 시료 0.9 kg은 3회에 걸쳐 30분 가압멸균과정을 거쳐 9 g의 디젤유를 골고루 혼합시키고, LB 배지에서 24시간 동안 배양된 균주를 원심분리 후 증류수에 희석하여 오염된 토양시료와 골고루 혼합하고 킬럼에 충전하였다. 토양의 시료 채취에는 내경 1 cm, 길이 20 cm에 중간에 10 cm 가량이 파인 sampler를 사용하였다. 토양시료는 킬럼내 모래토양의 5 cm 깊이에서 채취되었으며, sampling port로부터 채취된 시료는 고르게 섞은 후 분석에 사용하였다.

2.3. 통기의 영향

일반적으로 호기성 미생물에게 공기의 공급은 미생물 성장에 중요한 영향을 미치므로 공기의 공급 속도를 조절하며 디젤유의 분해양상 및 미생물 생장을 관찰하였다. 공기의 공급속도는 0 mL/min, 10 mL/min, 30 mL/min, 50 mL/min으로 조절하였으며, 5.0×10^8 CFU/mL의 접종농도로 접종한 것을 대조군으로서 접종을 하지 않은 것과 함께 14일 동안 관찰하였다.

2.4. 접종량의 영향

접종량을 변화시키며 모래 킬럼 안에서 디젤유의 분해와 균주의 성장에 대하여 관찰하였다. 접종농도 5.0×10^8 CFU/mL

의 균주 현탁액 25 mL, 50 mL, 100 mL 각각을 총 부피 100 mL로 조절하여 모래와 혼합하였다. 접종농도는 1.25×10^8 CFU/mL, 2.5×10^8 CFU/mL, 5.0×10^8 CFU/mL, 공기의 공급은 30 mL/min의 속도로 14일 동안 관찰하였다.

2.5. 디젤유 농도의 영향

디젤유의 양이 디젤유 분해율에 미치는 영향을 고찰하기 위해 킬럼에 포함되는 디젤유의 양을 변화시키며 분해율을 측정하였다. 각각 2%, 3%, 4%, 5%의 디젤유를 첨가한 후 접종농도는 5.0×10^8 CFU/mL, 공기의 공급은 30 mL/min의 속도로 14일 동안 관찰하였다.

2.6. 초기 pH의 영향

Acetate와 NH_4OH 를 이용하여 토양의 초기 pH를 6, 7, 8, 9로 조절한 뒤 14일 동안 접종농도 3.6×10^7 CFU/mL, 공기 공급 속도 30 mL/min에서 관찰하였다.

2.7. 디젤유 잔류량 측정

토양 시료로부터 디젤유의 잔류량 측정은 EPA method 3550 방법에 따라 실시하였다 [8]. 2 g의 토양시료에 2 g의 무수황 산나트륨과 5 mL의 n-hexane을 첨가한 후 1분간 강력하게 교반한 후 3분간 sonication을 한 후 그 상등액을 GC를 이용하여 TPH 분석을 하였다.

2.8. 생균수 측정

채취한 토양시료를 증류수 10 mL와 충분히 혼합한 후 증류수로 10의 배수로 serial dilution하여 LB 배지에 도말하였다. 도말 후 27 °C에서 3일간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 모래킬럼 내 생분해

Flask culture에서 디젤유의 분해 결과를 바탕으로 모래에 오염된 디젤유의 분해를 모래 킬럼을 통해 알아보았다. 모래 킬럼에서의 자연 분해는 14일이 지난 뒤 약 45% 정도로 측정되었다. 이는 flask culture에서 보였던 50%의 자연적 분해에 비해 적은 양으로 모래 내 디젤유의 분해가 여러 가지 조건들과 매우 밀접하게 연관되어 있음을 나타낸다. *R. fascians*를 접종하였을 때 처음 시작할 때와 비교하여 14일 후 Gas chromatogram의 잔류 디젤유 피크가 크게 감소하여 분해효과가 있음을 알 수 있다 (Fig. 1).

3.2. 통기의 영향

모래 킬럼 내에서의 공기의 공급 속도는 자연 분해되는 디젤유의 양에 영향을 미치는 것으로 나타났다. Fig. 2는 공기의 공급 속도와 시간에 따른 디젤유의 잔류량을 나타낸다. 미생물을 접종하지 않은 경우 약 47%, 10 mL/min에서 50%, 30 mL/min에서 55%, 50 mL/min의 통기속도에서는 59%의 디젤유 분해율을 보여 통기속도에 비례하여 분해율 또한 증가하는 형태로 나타났다. 그러나 미생물을 접종한 경우에

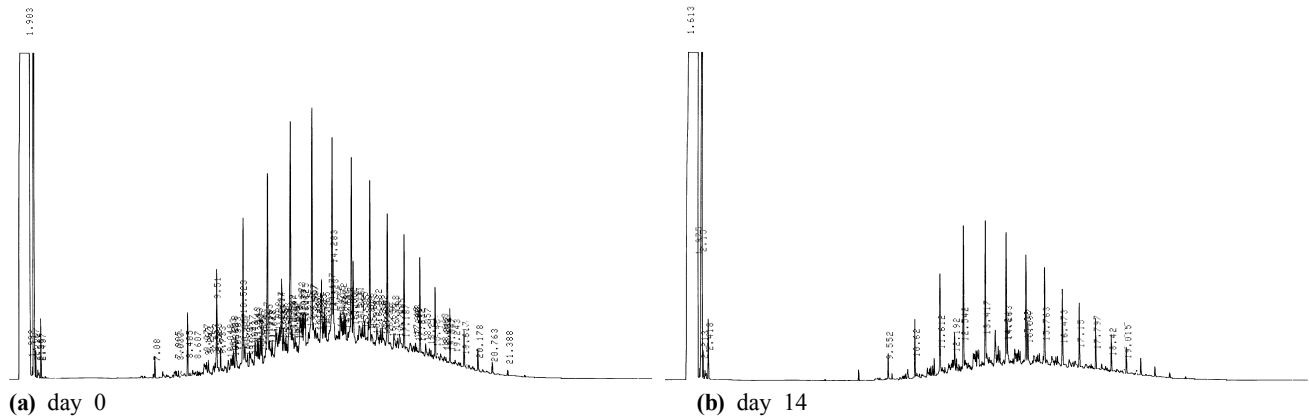


Fig. 1. Gas chromatogram of diesel day 0 and day 14.

는 30 mL/min와 50 mL/min에서 모두 약 85%의 분해율을 나타내어 통기속도 30 mL/min 이상에서는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 세포수는 접종 후 증가하여 6일째 생균수가 가장 높았으며 이후 감소하였다. 세포 성장시 잔류량이 급격히 감소하는 것으로 보아 디젤유가 *R. fascians*의 성장에 필요한 탄소원으로 이용됨을 알 수 있다.

3.3. 접종량의 영향

Fig. 3은 *R. fascians* 접종량이 모래 컬럼 내에서 디젤유 분해

에 미치는 영향을 분석한 것이다. 30 mL/min의 통기속도에서 접종을 하지 않은 것은 10일 뒤에 약 53%의 분해율이 측정되었으며 통기속도 및 균주의 접종이 없는 대조군과 비교하여 15%의 분해율 증가를 보인 반면, 25 mL의 *R. fascians*를 접종한 경우에는 22%, 50 mL의 *R. fascians*를 접종한 경우에는 29%, 그리고 100 mL의 *R. fascians*를 접종한 경우에는 분해율이 33% 상승하였다. 접종량이 증가할수록 최대 생균수는 증가하였지만 14일 후 생균수에는 큰 차이가 없었다. 접종량이 증가 할수록 생균수가 증가하여 *R. fascians*에 의한

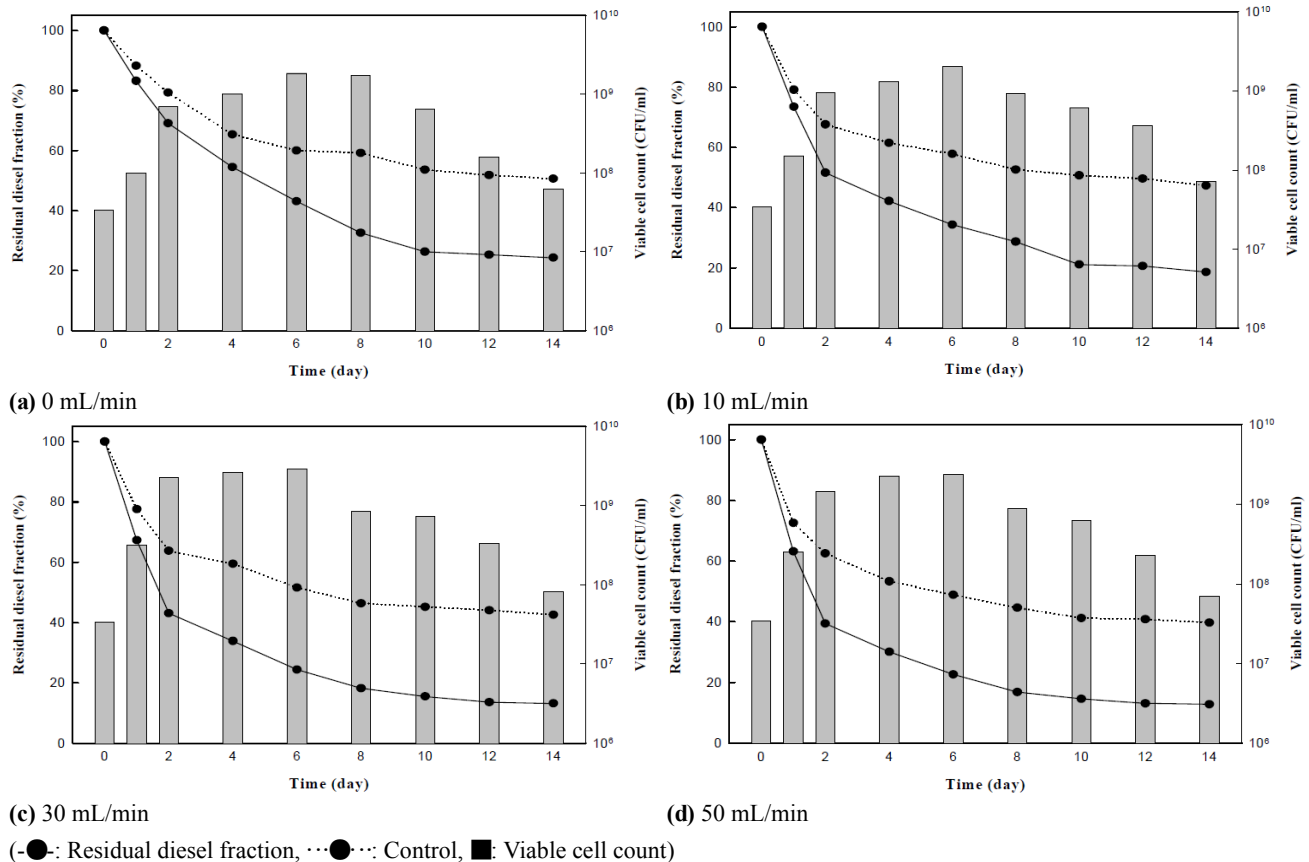
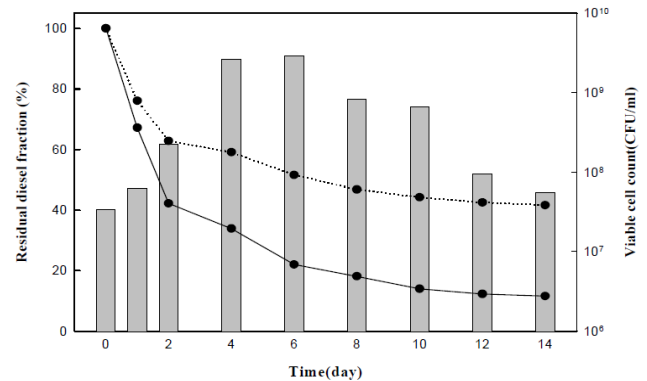
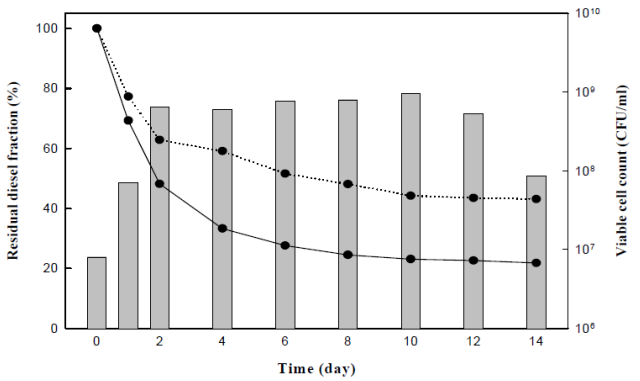


Fig. 2. Degradation of diesel by *R. fascians* in sand column at various air flow rates.

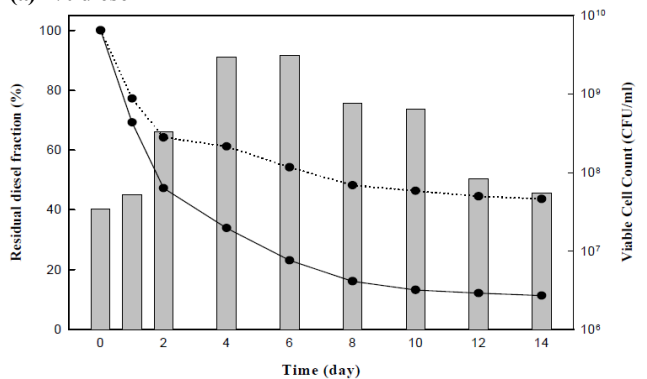
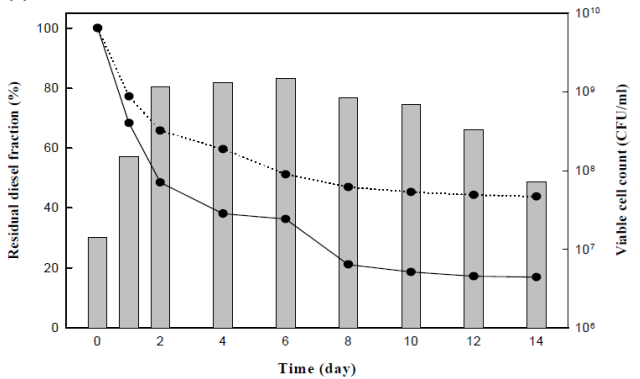
디젤유의 분해가 증가한 것으로 생각된다.

탄소원의 배지내 다른 영양원의 결핍에 의한 것으로 생각된다.



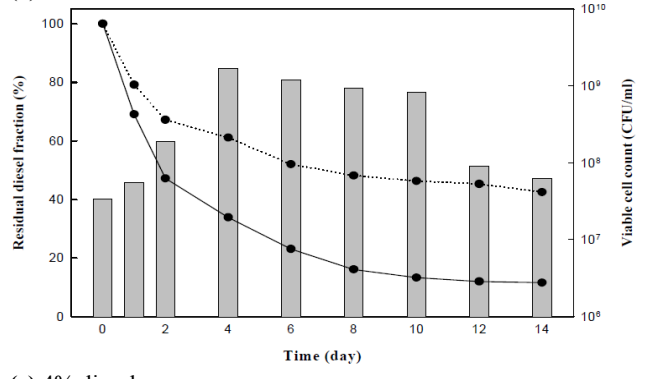
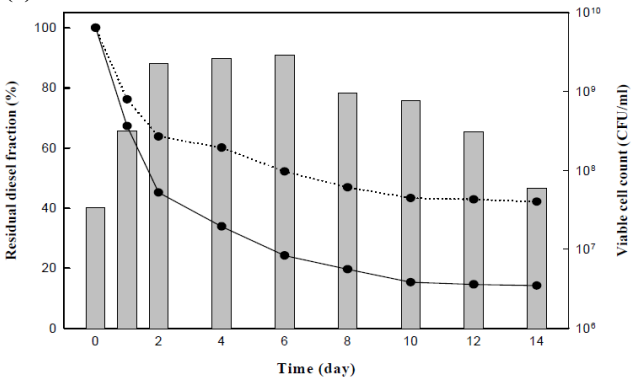
(a) 25 mL

(a) 2% diesel



(b) 50 mL

(b) 3% diesel



(c) 100 mL

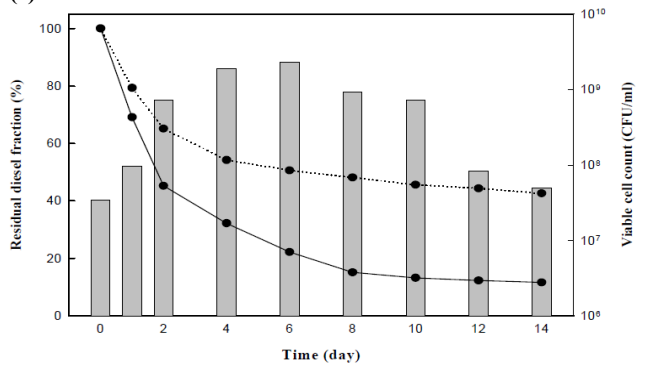
(c) 4% diesel

(-●-: Residual diesel fraction, ···●··: Control, ■: Viable cell count)

Fig. 3. Degradation of diesel by *R. fascians* in sand column at various inoculation sizes.

3.4. 디젤유 농도의 영향

Fig. 4는 초기 디젤유의 농도가 모래 컬럼 내에서 디젤유의 분해에 미치는 영향을 분석한 것이다. 각각 2%, 3%, 4%, 5%의 디젤유 농도에서 모두 85% 이상의 분해율을 보였다. 액체 배지에서는 디젤유 농도가 5% 이상일 때 세포의 생장이 저해를 받았으나 모래 컬럼 내에서는 5% 농도의 디젤유에서 저해를 받지 않아 액체 배양과 도양 컬럼 실험의 결과에 차이가 있어 직접 결과를 비교하는데 어려움이 있음을 알 수 있다. 6일이 지난 후 생균수가 감소하여 14일 이후에는 디젤유 농도가 달라도 생균수가 차이가 적은 것으로 볼 때 이는



(d) 5% diesel

(-●-: Residual diesel fraction, ···●··: Control, ■: Viable cell count)

Fig. 4. Degradation of diesel by *R. fascians* in sand column at various diesel concentrations.

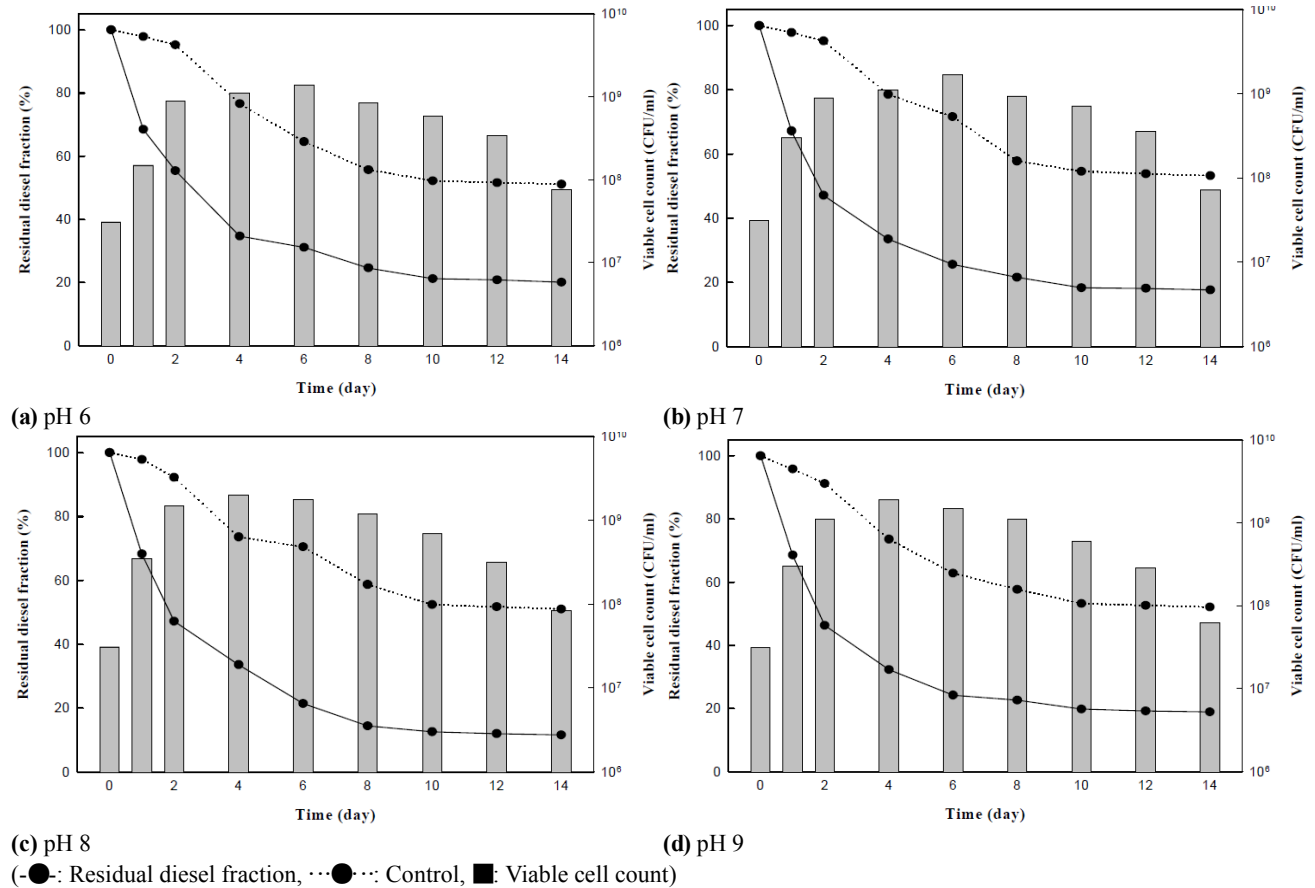


Fig. 5. Degradation of diesel by *R. fascians* in sand column at various pHs.

3.5. 초기 pH의 영향

디젤유의 분해는 미생물의 성장과 관련이 있으며 pH는 미생물에 영향을 미치는 주요한 환경인자이다. Acetic acid와 ammonia water로 pH 7을 중심으로 산성과 염기성 토양을 준비하여 *R. fascians*의 디젤유 분해율에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 5). *R. fascian*는 약산성 pH의 토양에서보다 약염기성 pH에서 상대적으로 높은 디젤유 분해율을 보였다. 본 연구가 수행된 pH 범위에서 생균수의 차이는 크지 않았지만 pH 8에서 가장 높은 디젤유 분해가 일어났다.

4. 결론

토양, 지하수, 대기, 해양환경의 독성 화합물에 의한 환경 오염은 최근산업화에 따른 주요 부작용 이며 생물정화는 미생물을 이용하여 오염지역을 정화하는 기술이다. 특히 디젤유의 경우 휘발도가 낮고 물에 대한 낮은 용해도의 특성을 갖기 때문에 휘발유와 같은 다른 유류에 비하여 생물학적 분해가 더욱 효과적이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 모래 컬럼을 이용하여 바다 모래 토양내 디젤유의 분해 연구를 수행하였다. 이 실험에서는 통기량, 접종량, 디젤유 농도, 그리고 초기 pH의 인자에 변화를 주며 모래 토양내 디젤유의 분해를 관찰하였다. 최적 분해조건은 초기 pH 8,

30 mL/min의 통기량에서 얻어졌으며 접종량이 클수록 높은 분해율이 얻어졌으며, 5%까지 디젤유 농도가 증가하여도 디젤유의 분해에는 거의 차이가 없었다.

감사

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Koo, J. R., J. H. Moon, and H. S. Yun (2009) Biodegradation of diesel in sea water by *Rhodococcus fascians* isolated from a petroleum-contaminated site. *J. KSBB*. 24: 453-457.
2. Seo, E. Y. and H. G. Song (1994) Effects of diesel oil on the population and activity of soil microbial community. *Korean J. Microbiol.* 32: 163-171.
3. Gallego, J. L. R., J. Loredo, J. F. Llamas, F. Vazquez, and J. Sanchez (2001) Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. *Biodeg.* 12: 325-335.
4. Kim, S. C., W. Namkoong, and D. W. Park (1998) Effect of initial concentration and nutrients in treatment of petroleum

- hydrocarbon contaminated soils using a slurry-phase bioreactor. *J. KoSES*. 3: 45-53.
5. Cheong, K. H., B. G. Lim, H. I. Choi, S. I. Park, and O. R. Moon (2007) Nitrogen removal from synthetic domestic wastewater using the soil column. *J. Environ. Sci.* 6: 707-714.
 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. U.S. EPA (1995) How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: A guide for corrective action plan reviewers. *U.S. Government Printing Office*, Washington, DC. EPA 510-B-95-007.