

유류분해 미생물의 특성 및 제제화 기능성 평가

윤정기, 김태승, 노희정, 김 혁, 박종겸, 고성환*

국립환경연구원, *에코필(주) (e-mail : jkyun@me.go.kr)

<Abstract>

The various microbial tests were performed to determine bioremediation agent capacity for eight strains isolated from the oil contaminated regions. Two tests for isolated strains were conducted such as cell hydrophobicity and emulsifying activity. The biodegradation of SHM (saturated hydrocarbon mixture) and AHM (aromatic hydrocarbon mixture) with the strains also was carried out. The strains having higher cell hydrophobicity and emulsifying activity degraded petroleum oil effectively. The degradation capacity for SHM was represented more than 90% in YS-7 and WLH-1 of isolated strains, and KH3-2 were capable of degrading AHM. Especially, WLH-1 as yeast was shown more than two or three times in the degradation capacity of automobile engine lubricants and the biomonitoring results of contaminated soil for residual oil degrading test showed that the hydrocarbon biodegradation was increased in the second treatment by this strain.

key word : biopile, petroleum hydrocarbon, microorganism, contaminated soil

1. 서 론

석유류 오염의 증가와 함께 오염지역의 정화를 위한 다양한 방법이 개발되고 있다. 선진국에서는 비 용경제적이고 이차적인 환경오염을 유발시키지 않는 생물학적인 정화방법이 유류오염부지의 정화를 위해 적극적으로 개발되어 왔다. 생물학적 유류오염토양 정화방법에는 생물학적 분해법(Biodegradation), 생물학적 통풍법(Bioventing), 토양경작법(Landfarming), 바이오파일(Biopile), 식물재배정화법(Phytoremediation), 퇴비화법(Composting), 자연분해법(Natural attenuation) 등이 있다¹⁾.

이러한 생물학적 정화방법이 유류오염토양 정화를 위한 다양한 방법으로 개발·적용되고 있으며, 또한 정화효율을 높이기 위한 다양한 미생물제제가 개발되고 있다. 일반적으로 유류분해 미생물로 사용되는 박테리아는 *pseudomonas* sp.가 가장 많으며, 기타 유류 분해능이 매우 우수한 *acinetobacter* sp. 유류 분해능과 환경에 대한 적응력이 우수한 *corynebacterium* sp. 등 유류 분해에 탁월한 효과를 보이는 미생물 등이 있다. 그리고 *sphingomonas* sp.같은 경우에는 난분해성 물질인 PAHs(polyaromatic hydrocabons)분해에 있어 우수한 효과를 보이는 균주로 알려져 있다.²⁾ 대부분의 생물학적 유류분해 반응의 연구는 호기성 박테리아에 관한 것인데 최근 혐기적 상태에서의 PAHs 분해 가능성에 대한 연구도 진행되고 있다³⁾. 또한 유류분해 미생물은 세포표면 소수성(cell surface hydrophobicity)과⁴⁾ 유화능

(Emulsifying capacity)⁵⁾을 통하여 유류분해 능력을 판단하기도 한다.

본 연구에서는 생물학적 정화방법에 사용되는 미생물의 효율을 향상시키고 적용가능한 균주를 발굴하기 위하여 국내 유류오염토양에서 유류분해미생물을 분리하고 유류분해 특성 및 제제화 가능성을 평가하였다.

2. 연구내용 및 방법

(1) 우수 유류분해미생물 분리 및 성장특성 조사

우수 유류분해 미생물 선별을 위하여 유류오염 토양시료 5 g을 MSM배지 50 mL에 혼합한 후 경유가 2% 되도록 첨가한 후 25°C에서 진탕배양하여 분해능이 우수하고 재현성이 좋은 균주를 선별하였으며, 선별균주의 성장특성은 현미경상으로 기름구 형성정도 및 미생물의 성장형태 등을 관찰하였으며 세포소수성(cell hydrophobicity)과⁴⁾ 유화능(Emulsifying capacity)을 측정⁵⁾하여 각 균주의 특성을 분류하였다.

(2) 선별균주의 유류분해능 측정 및 제제화 가능성 조사

선별된 유류미생물에 대한 유류분해능을 정밀조사하기 위하여 각각의 균주를 LB배지(trypton 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)에서 24시간 배양한 후 이 배양액을 20 mL MSM배지가 첨가된 250 mL 삼각플라스크에 2%(v/v)가 되도록 접종하였으며, 이들을 이용한 유류분해 미생물 제제화 가능성을 조사하기 위해 순수 배양된 미생물을 일정비율로 혼합한 후 2%(v/v)가 되도록 접종한 다음 다양한 유류의 분해능을 조사하였다.

(3) Biomonitoring 효과 실험

유류로 오염된 토양에서 선별 미생물들을 혼합하여 만든 제제의 생물정화기술을 적용하기 위하여 경유로 오염된 현장시료를 사용하였다. 실험은 오염토양을 두가지로 나누어 하나는 처음 처리 후 실험 종료 시까지 특별한 2차 처리를 하지 않았으며, 다른 하나는 배양시작 후 17일째에 분해를 촉진시키기 위하여 2차 처리를 하여 2차 처리에 의한 분해율 및 분해속도에 대한 효과를 평가하고자 하였다.

3. 결과 및 고찰

(1) 우수 유류분해미생물 선별 및 성장 특성

우수 유류분해미생물의 분리 선별을 위하여 유류오염토양 시료로부터 경유를 기질로 하여 배양시킨 후 10여 회의 순차배양을 통하여 유류분해능이 우수한 균주 8종을 분리하였다. 이들 미생물을 진탕 배양한 후 세포소수성(cell hydrophobicity)과 유화능(Emulsifying activity)을 측정한 다음, 고 등(1988)⁶⁾이 분류한 성장특성표에 맞추어 그 성장특성을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 세포소수성과 유화능을 동시에 소유하고 있는 6종의 균주를 최종적으로 선별하였다.

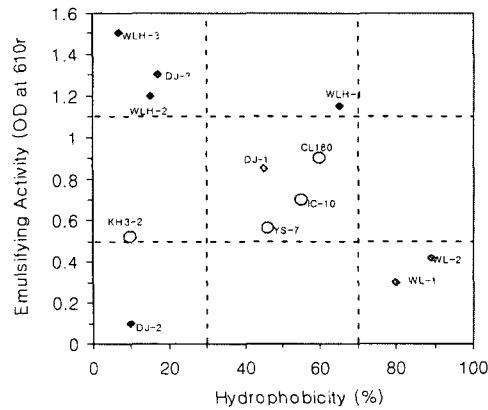


Fig. 1. Properties of selected strains grown on 2 % (v/v) of diesel.

(2) 선발균주의 유류분해능 측정 및 제제화 가능성 조사

선발된 6종의 우수균주의 제제화 가능성을 조사하기 위해 순수 배양된 미생물을 일정비율로 혼합한 후 2%(v/v)가 되도록 집중한 다음 유류분해능을 조사한 결과 지방족 탄화수소(SHM)의 경우 WLH-1, DJ-1, CL180과 YS-7 균주 등이 우수한 분해능을 나타냈으며 이중 YS-7, WLH-1과 CL180 균주의 분해능이 약 90% 이상으로 매우 우수하였다.

반면, KH3-2균주는 지방족 탄화수소보다는 방향족 탄화수소(AHM)의 분해능이 주로 존재하였으며, IC-10균주는 지방족 및 방향족 탄화수소 분해능이 우수하였다. 한편, WLH-1균주의 경우는 다른 선발 미생물에 비해 2~3배 이상의 높은 폐윤활유 분해율을 보여 폐윤활유 분해능이 우수한 것으로 나타났다.

또한 선발 미생물들을 혼합하여 만든 제제의 경우 유류분해능이 단일 균주보다는 월등히 높게 나오는 것을 볼 수 있었으며, 특히, 난분해성으로 알려져 있는 원유 및 폐윤활유의 경우는 분해율 상승이 2~3배 이상 높게 나타나 제제화의 가능성이 높은 것으로 판단된다.

따라서 본 연구결과에 의하면 개발제제가 정비공장 지역과 같은 폐윤활유로 오염된 지역에도 적용이 가능할 것으로 판단되며, 개발제제를 적용할 경우 co-metabolism에 의한 생물학적 처리 가능성이 매우 높을 것으로 추정된다.

(3) Biomonitoring 효과 실험

경유로 오염된 두 종류의 실험구에 동일한 처리를 하고 14일 후에 시료를 분석한 결과 약 26%의 경유가 제거되고 더 이상 분해가 진행되지 않은 것으로 나타났다. 그러나 이후 2차 처리를 실시하고, 약 17일 뒤인 34일째에 시료를 분석한 결과 대조구에서는 약 4%정도가 더 분해가 진행된 반면에 2차 처리를 한 실험구에서는 약 20%가 더 제거된 것으로 나타났다. 이러한 결과에 의하면 2차 처리에 의해 실제적으로 약 16% 정도가 더 분해 된 것으로 나타나 유류오염토양에서 생물정화기술을 적용할 때 분해속도가 낮은 시점에서 2차 처리를 수행함으로써 분해 대사산물 및 난분해성물질의 분해율을 향상됨을 확인하였다.

4. 결론

본 연구는 국내 유류오염토양에서 분리한 미생물에 대한 제제화 가능성을 검토하기 위해 미생물 특성인 세포소수성 및 유화능을 측정하고 포화탄화수소 및 방향족 탄화수소에 대한 분해능 시험 및

biomonitoring 효과를 실험하였다. 그 결과 이들 균주 중 YS-7, WLH-1 및 CL180는 지방족탄화수소류 (SHM, saturated hydrocarbon mixture)의 분해능이 약 90% 이상으로 우수하였고, KH3-2는 방향족 탄화수소(AHM)의 분해능이 있었다. 폐윤활유 분해특성 시험에서는 WLH-1균주의 경우 다른 선발 미생물에 비해 2~3배 이상의 높은 분해율을 보여 폐윤활유 분해능이 우수한 것으로 나타났다. 그리고 기존 미생물제제와의 혼합시 보다 높은 분해효과를 나타내었다. 만성오염토양에 대한 잔존유류의 분해시험을 위해 biomonitoring를 실시한 결과, 2차처리(2nd treatment)에 의해 탄화수소의 분해 가능성이 확인되었다.

참고문헌

1. U.S. EPA., (2002), Application, Performance, and Costs of Biotreatment Technologies for Contaminated Soils, EPA/600/R-03/037, National Risk Management Research Laboratory, Washington D.C.
2. Atlas, R. M., (1984), Petroleum Microbiology, Macmillan, New York.
3. Grishchenkov, V.G., Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Boronin, A.M., (2000), Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 35, 889~896.
4. Rosenberg. M., M. Gutnick, and E. Rosenberg, (1980), Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell Surface Hydrophobicity, *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, 29~33.
5. Zajic, J. E., H. Guignard, and D. F. Gerson, (1977), Properties and Biodegradation of a Bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 9, 1303~1320.
6. 고성환, 이흥금, 김상진, (1998), Hydrocarbon uptake modes에 따른 유류분해 미생물 혼합제가 원유 분해에 미치는 효과, *한국생물공학회지*, 13, 5, 606~614.