

Pseudomonas aeruginosa K14를 이용한 등유(Kerosene)의 생물학적 분해

김지영 · 이상섭*

경기대학교 일반대학원 생명공학과

본 연구에서는 유류로 오염된 토양에서 증식배양을 통해 등유 분해 균주 32개체를 순수 분리하였다. 분리한 개체에 대하여 스크린테스트를 통해 고효율 제거 균주를 선별하였으며, 그 결과 K14가 kerosene 1,000 mg/L에서 6일간 가장 높은 제거율을 보였다. K14는 형태학적, 생리생화학적 테스트, 16S rDNA 및 지방산 분석을 통하여 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다. 위 균주를 사용하여 다양한 생장조건에서의 등유 제거를 측정할 결과, 최적분해조건으로 초기 접종 농도 1.0 g/L (w/v), 등유 1,000 mg/L, 온도 30°C, pH 7의 조건이 선정되었다. 이 조건으로 K14에 대한 회분식 실험을 실시하였으며, 위 균주는 72시간 동안 등유 1,000 mg/L를 78.3% 이상 제거하였다. 또한, 기질농도에 변화를 주어 실험한 결과 저농도의 등유 200 mg/L에 대하여 48시간 동안 95.8%, 고농도의 등유 5,000 mg/L에서 48시간 동안 42% 이상의 제거능을 보여주었다. 위 결과로 보아, K14에 의한 등유의 생물학적 처리는 유류에 오염된 지하수 및 토양에 적용하였을 시, 뛰어난 제거 효능을 보일 것으로 사료된다.

Key words □ biodegradation, kerosene, *Pseudomonas aeruginosa*

산업의 비약적인 발전과 그에 따른 유류의 소비가 증가됨에 따라 공단지역이나 가정난방 및 주유소 지하 유류저장창고의 배관시설의 누출에 의한 토양과 지하수의 유류오염이 심각한 환경 및 사회문제로 대두되었다(6). 유류물질의 누출에 의한 오염은 곧 생태계에 큰 영향을 주게 되며 토양의 자정 능력 상실, 미생물의 멸종, 본래 토양 및 지하수가 가지는 물리적·화학적 상태의 변화를 야기한다. 원유를 분류하는 과정 중, 등유분류는 큰 오염문제를 일으킨다고 알려져 있다(19). 등유의 분류는 제거하기 매우 어려우며(10), 함유하고 있는 방향족의 성장과 농도에 따라 생물계에 급성독성, 신경계 장애 및 발암의 위험 과도 같은 인체건강에도 심각한 위해성을 나타내는 잠재력을 가지고 있다(13). 또한 등유는 항공기 가스터빈과 제트기의 연료(kerosene type fuel)으로 사용되며 살충제에 스프레이 오일 및 난방유로도 널리 쓰이고 있다. 이에 따라 유류오염에 대한 생물학적 및 화학적 환경복원기술의 개발이 절실히 요구 되어지고 있는 실정이다. 현재 우리나라는 토양환경 보전법과 관련 법령을 통해 오염물질의 유출 및 유출지역의 복원에 대한 관리가 이루어지고 있으며, 1996년 1월 제정되어 2001년 2월 개정된 토양환경 보전법에서는 오염지역에 대한 관리강화와 주유소 및 유류저장시설에 대한 오염조사에 대해 총 석유계 탄화수소의 검사를 의무화하며, 매설된 송유관 시설에 대하여 특정토양오염 유발시설로 지정하여 유류오염에 대해 한층 강화된 내용을 제시하고 있다(1). 현재 사용되고 있는 유류오염의 정화방법으로는 물리적, 화학적 및 생물학적 처리 방법이 있다. 물리적 방법으로는 열 탈착법(thermal desorption), 소

각법(incineration) 등이 있으며, 화학적 방법으로는 토양 세정법(soil flushing), 토양증기추출법(soil vapor extraction) 및 토양 세척법(soil washing) 등이 사용되고 있다. 가장 널리 쓰이는 생물학적 방법으로는 생물학적 분해법(biodegradation), 생물학적 통풍법(bioventing), 토양 경작법(landfarming) 및 식물 재배 정화법(phytoremediation)이 있다. 선진국의 경우 미생물을 이용한 생물학적 처리 방법(biodegradation)이 주목 받고 있으며, 이는 정화 비용이 저렴하고 이차오염을 유발하지 않는 환경 친화적 특징이 있기 때문이다(3, 15). 등유는 화학적으로 보통 10가지 정도의 탄화수소로 이루어져 있으며, 각 탄화수소 한 분자당 10~16개의 탄소원자를 가지고 있다. 이를 구성하고 있는 비율은 알칸 및 환형 알칸계가 65~70%를 차지하고 있으며, 벤젠과 알킬벤젠이 10~15%를 차지하고 있고, 나머지 소수의 나프탈렌 및 나프탈렌 유도체 등으로 이루어져 있다(9). 자연상태에서 유류오염시, 미생물에 의한 분해가 위 물질의 주요 분해 기작이라 알려져 있다. 여러 연구에서 이들 탄화수소에 대한 생물학적 분해경로에 대해 밝혀져 왔다(5, 11, 14). 또한, 최근 몇몇 국내 외 연구자들에 의해 특수한 탄화 수소류 분해능을 가진 미생물을 첨가함으로써 생물학적 처리효율을 증진할 수 있다는 것이 밝혀졌다(4, 7, 8, 17, 21).

위 미생물들은 호기적 상태에서 등유를 단일 탄소원으로 사용할 수 있었으나, 대부분의 경우 분해에 필요한 기간이 매우 길었으며(4, 19), 등유 단일기질에 대한 연구보다, 복합적인 기질에서의 연구 또는 경유 및 휘발유의 생물학적 분해에 대한 연구가 주로 이루어져 왔다. 또한, 실제 오염된 농도에 적합하지 않은 농도범위에서의 실험이 주로 이루어져왔으며, 복합 균주를 이용한 등유의 제거실험이 주로 이루어져 온 실정이다(21). 그러므로 본 연구에서는 무기 배지 상에서의 단기간 동안 단일 균주에 의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-249-9642, Fax: 82-31-245-8868
E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

한 다양한 농도범위 에서의 등유의 호기적 분해를 연구하였다.

재료 및 방법

샘플채취

인천소재 A 주유소의 지하 유류저장탱크 부근에서 유류에 오염된 토양을 채취하였다. 채취지점의 pH 및 온도 측정 후, 샘플을 채취하여 샘플병에 공간이 없도록 채워 밀봉하였으며 4°C 아이스박스에 보존하여 실험실로 이동하였다.

증식배양 및 단일 균주 분리

채취된 유류 오염 토양은 100 ml의 무기배지를 담은 500 ml 용량의 유리 배양병에 1% (v/v)로 접종하여 증식배양을 실시하였다. 실험에 사용된 무기배지의 조성(g/L)은 다음과 같다. KH_2PO_4 2.0, K_2HPO_4 2.0, KNO_3 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, NaCl 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, trace element SL-6 1.0 ml, vitamin solution 1.0 ml (trace element SL-6: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g; H_3BO_3 , 0.3 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; distilled water, 1,000 ml, VA-vitamin solution : biotin, 10 mg; nicotinamide, 35 mg; thiamine dichloride, 30 mg; p-aminobenzoic acid, 20 mg; pyridoxal chloride, 10 mg; ca-pantothenate, 10 mg; vitamin B12, 5 mg, distilled water, 100 ml) 배양온도는 28°C로 유지시켰으며 150 rpm으로 이틀간 진탕배양 하였다. 균의 접종 및 계대 배양 역시 위의 조건과 동일하였다. 균의 분리를 위하여, 등유 1,000 mg/L (w/v)가 단일 탄소원으로 포함된 무기 한천 배지에 균액을 접종하여 streak plate method와 spread plate method를 실시하였다.

균주 동정

순수 분리된 균주들은 그람 염색 후 형태관찰(BX 41, Olympus, Japan; $\times 1,000$)하였으며, 각기 균주의 운동성은 위상차 현미경으로 관찰하였다(BX50, Olympus, Japan; $\times 1,000$). 스크린 테스트를 통해 선별된 고효율 균주들에 대하여 API 20NE (Biomérieux, France)를 사용하여 생화학적 테스트를 실시하였으며, 16S rDNA 분석 및 지방산 분석을 통한 동정을 실시하였다. 16S rDNA의 분석을 위하여 균주의 Genomic DNA를 추출하였으며, intronbio사의 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit를 사용하였다. PCR 시 Universal primer로 27F primer; 5'-AGAGTTTGATC(AC)TGG CTCAG-3'와 1492R primer; 5'-ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하였다. PCR은 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30 cycle로 수행하였다. PCR product는 전기영동하여 elution 후, 버퍼에 녹아진 상태로 Solgent사에 sequencing을 의뢰하였으며, 결과분석은 CLUSTAL W software (20)를 사용하여 정렬하였다. 정렬된 데이터는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 BLAST하여 16S rDNA 유사도 수치를 계산해내었다. 지방산 분석은 TSA (tryptic soy agar) 배지에 24시간 배양 후 세포 벽의 지방산을 추출하여 FAME (fatty acid methyl ester)를 GC

로 분석하였다. 지방산의 추출 및 분석은 KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)에 의뢰 하였다.

스크린테스트

분리된 균주는 1차적으로 성장도 테스트를 통하여 스크린 되었다. 등유 20,000 mg/L으로 오염된 무기배지에서 24시간 키운 균주를 동일 농도의 등유로 오염된 배지에 계대배양하여 시간 별로 흡광도를 측정하였다. 등유자체에 의한 탁도를 없애기 위하여 10,000xg에서 1분간 원심분리 하였으며, 상등액을 제거하고 펠렛만을 무기배지에 부유하여 측정에 사용하였다. 3일간 배양 후에, 흡광도 0.5 이상의 균주를 선택하였으며 위 균주를 등유 제거 테스트에 사용하였다. 등유 제거 실험에 쓰인 용기는 등유에 포함된 휘발성 유기 화합물의 증발을 막기 위하여 완전히 밀봉되었다. 120 ml 용량의 갈색 배양병에 10 ml의 무기배지를 담고 테플론-실리콘 셉타와 알루미늄 실로 밀봉한 후 등유 1,000 mg/L로 오염시켰다. 접종균은 등유 20,000 mg/L로 오염된 무기배지에서 24시간 배양하여 6,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 새 무기배지에 균을 부유한 뒤, 위 과정을 두번 반복하여 균이나 배지에 남아있을 여타의 유류성분을 제거하여 주었다. 무기배지에 부유된 균을 1 g/L (w/v)로 접종한 후 28°C, 150 rpm에서 6일간 배양하여, 용매에 추출하여 잔류 유류를 GC로 측정하였다.

배양 최적조건 확립

스크린 테스트를 통하여 선택된 고효율 균주에 대하여 온도, pH, 초기 접종 균농도, 기질농도를 다양하게 주어 등유제거의 최적 배양 인자를 도출하였다. 온도는 10, 20, 30, 40°C pH는 5, 6, 7, 8, 9, 초기 접종 균농도는 0.5, 1, 2, 3 g/L (w/v), 기질농도 1,000, 5,000, 10,000, 20,000 mg/L로 실험하였으며, 72시간 후, 배지에 남아있는 잔류 등유농도를 분석하였다.

회분식 실험

K14를 이용하여 등유 1,000 mg/L에 대하여 72시간 동안 최적 조건에서의 제거 효율을 측정하였다. 온도 30°C, pH 7, 초기 접종 균농도 1.0 g/L. 기질의 제거 기간 동안, 분광광도계(DR4000, HACH, USA)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정 함으로써 균의 성장을 알아보았다. 또한, 초기 기질 농도별 회분식 실험을 실시하여 각 기질농도에 대한 균의 분해 양상을 보았다.

등유 추출 및 분석 방법

배양액 내의 등유를 추출하기 위하여 동일비율(v/v)의 dichloro-methane을 주입하고 28°C, 150 rpm에서 30분간 진탕하였다. 상층부의 유기 용매층 5 ml을 20 ml vial에 담긴 sodium sulfate anhydrous 2 g에 잘 섞어 시료에 남아있을 수분을 제거하고 2 μm pore size 테플론 필터로 거른 후, 2 ml vial에 담아 GC 분석하였다. 분석물질의 농도는 노말 알칸계 17 물질이 각 500 $\mu\text{g/ml}$ 씩 헥산에 녹아있는 DRH-FTRPH (AccuStandard, USA)를 단계별로 희석하여 분석하였으며, 분석된 데이터를 바탕으로 표준물질의 농도와 피크의 총 면적에 대한 상관 관계선을 5포인트 이상으로

작성하였으며, 이에 따라 분석 시료의 총 피크 면적량을 적용해 검량선으로 부터 농도를 구해 내었다.

GC 분석조건

7683B series autosampler (Agilent Technologies, USA)를 장착한 6890N Network Gas Chromatography system (Agilent Technologies, USA)을 사용하여 등유의 잔류 농도를 측정하였다. 검출기의 종류는 불꽃이온화검출기(Flame ionized detector)였으며, 컬럼은 HP-5 (30 m×0.32 μm×0.25 μm, J&W, USA)를 사용하였다. 주입구의 온도는 250°C, 검출기의 온도는 290°C이었다. 오븐온도는 40°C에서 1분간 유지하다 15°C/min으로 승온하여 290°C에서 5분간 유지하는 온도프로그램을 사용하였다.

결 과

단일균주분리

총 34개의 호기성 등유 분해 균주를 분리하였으며 그람 염색 후, 모양 및 크기를 관찰하였다. 이 중, 네 균주는 그람 양성으로 타원형(2.0~3.0×3.0~4.0 μm)이었으며, 나머지 30균주는 그람 음성으로 짧거나 긴 막대형(0.4~0.6×1.2~1.4 μm)의 간균이었다.

스크린테스트 및 동정

흡광도 측정을 통하여 분리된 균주들의 성장도 측정 결과, 등유를 탄소원으로 사용하는 균주 중 성장율이 좋았던 23개 균주를 1차적으로 선별하였으며 이 균주에 대하여 등유의 제거 실험을 실시하였다. 그 결과, K14가 등유 1,000 mg/L에서 6일간 83.3%를 제거하여 가장 높은 효율을 보였다(Table 1). K14는 그람 음성이며, Rod형태로 크기는 0.8~0.9×1.2~1.4 μm (size: width×length)이었다. API 20NE Kit (Biomérieux, France)에 의한 생리·생화학 적 특징을 이용하여 동정한 결과, nitrate의 nitrites, nitrogen으로 환원, arginine dehydrolase, protease, cytochrome oxidase 테스트에 양성을 나타내었으며, glucose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate를 사용하여 성장 할 수 있었다. 그러나 indole 생산, acidification, urease, β-glucosidase, β-galactosidase 테스트에 음성을 나타냈으며, arabinose, mannose, maltose, phenyl acetate는 탄소원으로 사용하지 못했다. 결과는 apiweb™ (<http://apiweb.biomerieux.com>)에 생화학적 테스트 결과를 매칭해본 결과 *Pseudomonas aeruginosa* (99.5%)로 동정되었다.

또한 16S rDNA 분석 및 지방산 분석을 통하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa* strain 8과 1,400 bp에서 99% 일치하였다. 위 균주는 유류 분해능이 있다고 알려져 있다. 지방산 분석의 결과, 그 성분은 표 2와 같았으며 유사도 0.488로 *P. aeruginosa* 라 동정되었다.

최적 배양인자

미생물의 생장은 배양온도 및 pH에 영향을 받으며, 또한 초기 균 접종 농도에 따라라도 달라지게 된다. 또한, 등유의 제거에

Table 1. The results of screen test for kerosene degradation by bacteria after 6 days (initial substrate concentration : 1,000 mg/L)

Strain name	Residual conc. (mg/L)	Rem. (%)
Blank	993.9(±22.0)	
K14	166.6(±22.0)	83.3
K6	228.7(±26.0)	77.1
K12	249.1(±1.4)	75.1
K31	249.2(±16.7)	75.1
K17	294.6(±1.9)	70.5
K8	331.8(±58.6)	66.8
K9	483.3(±12.4)	51.7
K24	509.6(±41.9)	49.0
K29	578.9(±18.8)	42.1
K4	584.0(±142.4)	41.6
K18	597.7(±7.1)	40.2
K7	625.8(±13.6)	37.4
K19	667.4(±42.7)	33.3
K26	773.9(±75.8)	22.6
K10	788.5(±0.1)	21.2
K5	816.6(±93.2)	18.3
K20	821.5(±115.2)	17.8
K22	826.3(±20.0)	17.4
K1	839.8(±29.5)	16.0
K23	843.6(±98.1)	15.6
K3	875.6(±102.6)	12.4
K2	876.9(±83.8)	12.3
K30	886.5(±58.3)	11.3

* REM. ; removal efficiency

있어, 기질농도에 따른 미생물의 활성 또한 영향을 받게 된다. 미생물의 활성에 의해 기질의 제거 효율이 달라지기 때문에, 이에 따른 균의 최적 배양 조건을 찾아 적용하고자 하였다. 초기 균접종 농도에 따른 등유 제거 실험의 배양조건은 기질농도 1,000 mg/L, pH 7, 그리고 온도 30°C로 유지하여 주었다. 72시간 동안 배양 후, 초기 접종 균농도 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g/L의 조건으로 실험한 결과, 초기 접종 균농도 1.0 g/L일 때 81.5%로 가장 높은 제거능을 보여주었다(Table 3). 등유의 농도에 따른 제거 실험에서는 pH 7, 온도 30°C, 그리고 초기 접종 균농도 1.0 g/L로 유지하였으며, 그 결과 72시간 후, 등유 1,000 mg/L일 때 81.0%, 5,000 mg/L일 때 57.4%, 10,000 mg/L일 때 47.7%, 20,000 mg/L일 때 23.6%의 제거율을 각각 보여주었다. 결과적으로, K14는 등유 1,000 mg/L에서 높은 제거율을 보이고 있는 것을 알 수 있었고, 농도가 낮을수록 제거율이 높아짐을 알 수 있었다(Table 4). 배양 온도의 변화에 따른 등유제거실험에서는 pH 7, 초기 접종 균농도 1.0 g/L, 그리고 등유농도 1,000 mg/L로 유지하여 주

Table 2. The fatty acid composition of *P. aeruginosa* K14

Retention time	Shorthand name	Systematic name	%
2.988	10:0	Decanoic acid	0.35
4.040	10:0 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	5.93
4.557	12:0	Dodecanoic acid	4.15
5.046	11:0 3OH	3-Hydroxy-9-methyldecanoic acid	0.09
5.099	unknown 12.484		0.17
5.912	12:0 2OH	2-Hydroxydodecanoic acid	6.90
6.060	12:1 3OH	3-Hydroxydodecanoic acid	0.47
6.284	12:0 3OH	3-Hydroxydodecanoic acid	6.22
7.016	14:0	Tetradecanoic acid	0.70
8.530	15:0	Pentadecanoic acid	0.36
9.328	Sum in feature 2		0.10
9.870	Sum in feature 3		18.26
10.018	16:1 w5c	cis-5-Hexadecenoic acid	0.11
10.171	16:0	Hexadecanoic acid	20.82
11.528	17:1 w8c	cis-8-Heptadecenoic acid	0.27
11.689	17:0 CYCLO	cis-Methylenehexadecanoic acid	0.31
11.879	17:0	Heptadecanoic acid	0.12
13.229	18:1 w9c	cis-9-Octadecenoic acid	0.15
13.321	18:1 w7c	cis-7-Octadecenoic acid	34.05
13.625	18:0	Octadecanoic acid	0.34
15.194	19:0 CYCLO w8c	cis-8-Methyleneoctadecanoic acid	0.13

Table 3. Removal efficiencies of kerosene according to initial inoculated cell concentration (temperature : 30°C, substrate concentration : 1,000 mg/L, pH 7)

Cell conc. (g/L)	Residual conc. (mg/L)	Rem. (%)
0.5	205.9(±50.9)	79.8
1	188.5(±0.1)	81.5
2	193.4(±1.4)	81.0
3	216.6(±58.0)	78.7

* conc.; concentration, Rem.; removal efficiency

Table 4. Effects of substrate concentration in removal efficiencies of Kerosene by *P. aeruginosa* K14 (temperature : 30°C, pH 7, initial inoculated cell concentration : 1.0 g/L)

Initial conc. (mg/L)	Residual conc. (mg/L)	Rem. (%)
895.9(±52.3)	170.6(±8.0)	81.0
4643.1(±15.8)	1976.3(±225.9)	57.4
9672.2(±51.2)	5057.1(±165.8)	47.7
18569.4(±350.2)	14187.5(±172.1)	23.6

* conc.; concentration, Rem.; Removal efficiency

Table 5. Characteristics of the effect of temperature on the kerosene biodegradation activity of *P. aeruginosa* K14 (substrate concentration : 1,000 mg/L, pH 7, initial inoculated cell concentration : 1.0 g/L)

Temperature (°C)	Residual conc. (mg/L)	Rem. (%)
10	811.8(±32.2)	20.3
20	465.0(±8.6)	54.3
30	189.8(±8.2)	81.4
40	225.7(±3.1)	77.8

* conc.; concentration, Rem.; Removal efficiency

Table 6. Effect of pH in kerosene biodegradation by *P. aeruginosa* K14 (temperature : 30°C, initial substrate concentration : 1,000 mg/L, initial inoculated cell concentration : 1.0 g/L)

pH	Residual conc. (mg/L)	Rem. (%)
5	544.2(±48.0)	46.5
6	273.8(±14.4)	73.1
7	200.8(±7.3)	80.3
8	214.0(±10.7)	79.0
9	278.2(±35.0)	72.7

* conc.; concentration, Rem.; Removal efficiency

었으며, 72시간 후 배양온도 30°C일 때, 81.4%의 가장 높은 제거율을 보여주었고, 40°C의 경우에는 77.8%의 제거율을 보여주었다(Table 5). pH 변화에 따른 제거실험에서는 온도 30°C, 초기 접종 균농도 1.0 g/L, 그리고 등유 농도 1,000 mg/L로 유지하여 주었다. 그 결과, pH 7에서 80.3%로 가장 높은 제거율을 보였으며, pH 6, 8, 9의 조건에서도 모두 70.0% 이상의 제거율을 보여 줌으로써, 넓은 범위의 pH에서도 기질 제거 효율을 보임을 알 수 있었다(Table 6). 최종적으로, 등유의 최적 분해 조건으로 초기 접종 균농도 1.0 g/L, 등유 1,000 mg/L, 온도 30°C, pH 7이 선정되었다.

회분식 실험

등유제거 고효율 균주인 *P. aeruginosa* K14를 이용하여 등유의 최적분해 배양조건으로 선정된 초기 접종 균농도 1.0 g/L, 등유 1,000 mg/L, 온도 30°C, pH 7의 조건으로 K14에 대하여 12 시간 간격으로 측정된 결과, 72시간 동안 80.0%의 높은 제거율을 보여주었다(Fig. 1). 저농도 기질실험으로 등유 200 mg/L에 대하여 동일한 배양 조건으로 12시간 간격으로 측정된 결과 48 시간 동안 95.8%의 제거능을 보여주었으며 최종 잔류 농도는 8.8 mg/L이었다. 또한, 500 mg/L의 등유에 대하여 같은 배양조건으로 실험한 결과, 72시간 동안 83.8%를 제거하였다. 이 결과로 보아, K14는 저농도의 등유에 적용 시에도 제거효율이 뛰어났으며, 다양한 농도 범위에서도 기질 제거효율이 높게 나타남을 알

수 있었다. 고농도 기질실험으로 등유 5,000 mg/L에 대하여 초기 접종 균농도 1.0 g/L (w/v), 온도 30°C, pH 7의 조건으로 12시간 간격으로 측정된 결과 48시간 동안 42.0%의 제거능을 보여주었으며 최종 잔류 농도는 2,917.2 mg/L이었다. 기질의 농도가 높아질 경우, 장기 배양시 그 제거효율은 더 높아질 것으로 보인다. 또한, K14가 단일균주로 적용되었을 시의 효율과 여러 미생물상과 함께 적용하였을 시 분해능의 차이를 알아보기 위하여 분리된 40개 등유분해 균주를 혼합 사용하여 K14와 비교실험을 실시한 결과, K14는 1,000 mg/L의 등유에 대하여 혼합균주와 유사한 제거 효율을 나타내었다(Table 7). 단일균주로도 혼합균주와 유사한 효율을 보이는 이유로서, K14가 혼합균주상에 기질을 제거하는 과정 중에 우점화 되었을 가능성이 있으며 또는, K14가 혼합균주상에 적용하여 여러 균과의 종합적인 기질의 제거효율

Table 7. Kinetic parameters of *P. aeruginosa* K14 for kerosene biodegradation

Initial kerosene concentration (mg/L)	Growth rate (h ⁻¹)	Y	Degradation rate (g kerosene/g cell/day)
200	0.0004	0.0679	1.8911
500	0.0017	0.0632	2.3136
1000	0.0030	0.1390	8.3943
5000	0.0033	0.0404	6.9180

* Y; Growth yield

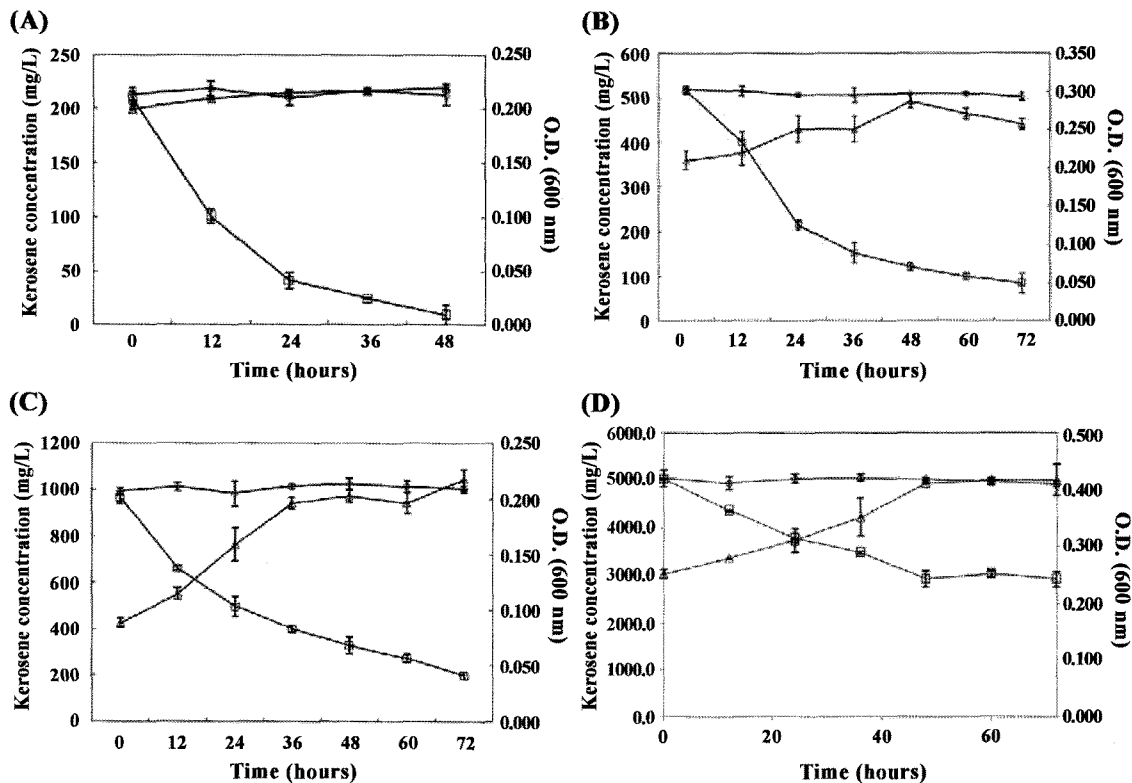


Fig. 1. Biodegradation of Kerosene by *Pseudomonas aeruginosa* K14 strain. Cell concentration: 1.0 g/L (w/v), temperature: 30°C. pH 7, initial substrate concentration: (A) 200 mg/L, (B) 500 mg/L, (C) 1,000 mg/L, (D) 5,000 mg/L (◇) control, (□) biodegradation, (△) cell growth.

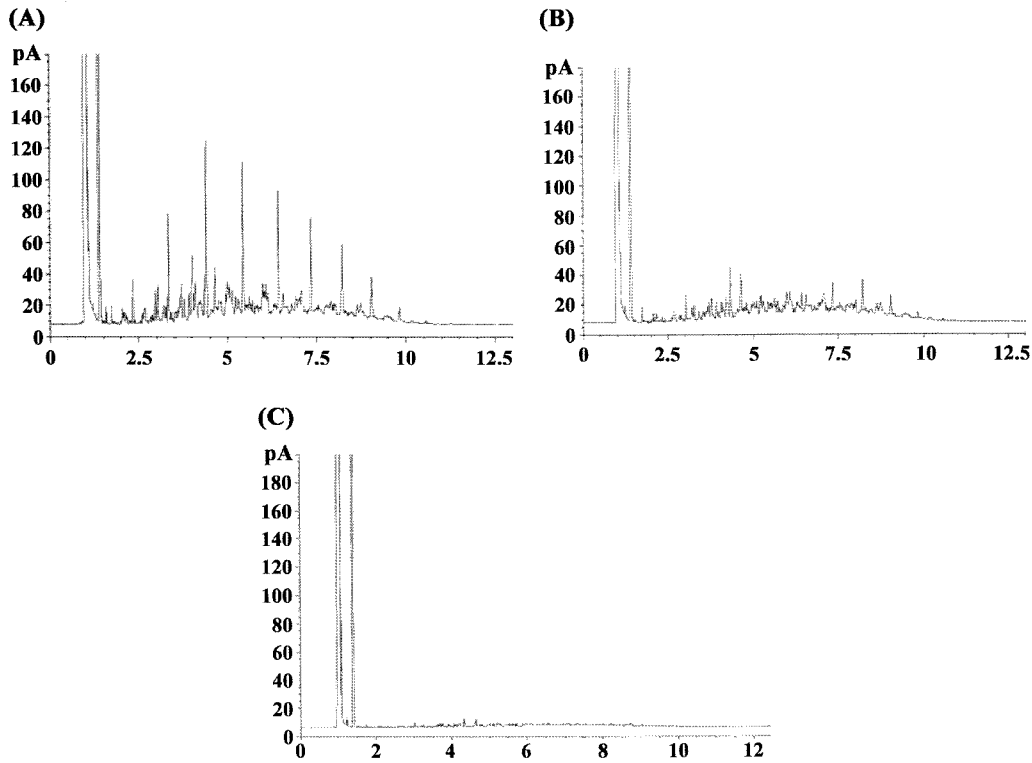


Fig. 2. Gas chromatographic profiles for medium extracts from *P. aeruginosa* K14 cultivated in presence of kerosene (A) 1,000 mg/L of kerosene, (B) biodegradation of 1,000 mg/L kerosene by K14, culture after 72 hr. The remaining kerosene was 198.7 mg/L and (C) biodegradation of 200 mg/L kerosene after 48 hr. The remaining kerosene was 8.8 mg/L.

을 발취하여 유사한 기질의 제거율을 보이는 것으로 사료된다.

등유 제거 양상 및 공학적 인자 도출

분해기간 후의 등유의 제거 피크 모습을 보아 *P. aeruginosa* K14는 알칸계의 피크를 다양하게 제거할 수 있는 것으로 보인다. 기질의 초기 농도가 각 1,000, 200 mg/L에서 일정 반응 시간 후 피크의 모양을 보면, 고농도 기질일 때, 주요 알칸계 피크가 감소하는 경향을 보이며 베이스라인은 들떠있는 경향을 보인다. 그러나 저농도 기질일 때, 주요 피크 및 베이스 라인까지 감소되는 경향을 볼 수 있다(Fig. 2). 또한, 기질의 초기 농도에 따른 균의 성장속도 및 기질 제거 속도를 구하였다(Table 8). K14는 농도가 높아질수록 균의 성장속도는 높아지는 경향을 보였다. 그러나, 기질의 농도에 따른 균의 수득율(cell yield)은 *Pseudomonas* sp.

에 있는 종이 포도당을 성장 기질로 사용할 때와 비교할 때보다 (5), 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다. 기질의 제거 속도는 초기농도 1,000 mg/L에서 가장 높은 수치인 6.092 g kerosene/g cell/day를 나타냈다.

고 찰

본 연구에서는 단일 균주에 의한 다양한 농도에서의 효율적인 등유의 생물학적 처리에 관한 연구를 수행하였다. 이전의 등유의 생물학적 처리에 관한 연구는 고농도의 오염에 집중되어 이루어져 왔으며, 제거기간이 길고, 제거가 끝난 시점의 잔류농도가 높게 나타났다. 또한, 미생물에 의한 등유 제거에 있어 공학적 인자가 명확히 밝혀지지 않았다. Gouda 등(2007)은 무기배지상에서 2%의 등유를 *Pseudomonas* sp.를 사용하여 21일만에 89%를 제거하였으며, 잔류농도는 2,200 mg/L였다. Wongsu 등(2004)은 *P. aeruginosa* WatG를 이용하여 10 g/L의 등유를 14일만에 70% 제거하였다. 잔류농도는 3,000 mg/L이었다. Saratale 등(2007)은 filamentous fungus인 *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146을 사용하여 20일간 50~51 mg/ml의 등유를 77.5% 제거하였다. 위 실험의 abiotic loss는 20~21%로 나타났다. 국내의 연구경우 오 등(1)은 *P. aeruginosa* F722를 이용하여 1%의 등유 및 경유 혼합물에 0.15% 생계면활성제를 첨가하여 3일간 제거실험을 실시한 결과, 94.8%의 제거효율을 보였으나 균을 접종하지 않은 대조군

Table 8. Comparison of kerosene removal efficiencies by mixed culture and K14 after 6 days (temperature : 30°C, initial substrate concentration : 1,000 mg/L, initial inoculated cell concentration : 1.0 g/L, pH 7)

Inoculate	Initial conc. (mg/L)	Residual conc. (mg/L)	Rem. (%)
Mixed culture	902.0(±65.3)	101.4(±3.8)	88.8
K14	993(±15.6)	166.6(±22.0)	83.3

* conc.; concentration, Rem.; removal efficiency

역시 68.8%가 감소하는 것을 보였다. Ortega-Trejo 등(15)은 *P. fluorescens*와 *Bacillus subtilis*가 등유를 단일 탄소원으로 사용하는 것을 입증하였으며, *P. fluorescens* 균주는 0.2%의 등유를 7일 만에 84%, *B. subtilis*는 70%를 제거하였다. 이는 등유가 낮은 농도에서도 상당히 긴 기간의 분해기간이 필요하다는 것을 보이며, 7일 후의 잔류 농도는 320 mg/L로 나타났다. 위 연구 대부분에서 초기 등유 농도 1~2%를 7~21일간의 분해기간 동안 70~90%의 제거효율을 보였다. 또한, 실험방법상 abiotic loss도 20~60%으로 나타나는 것을 알 수 있다. 이는 미생물만에 의한 등유의 제거라고 하기 힘든 실험 결과라고 볼 수 있으며, 미생물에 의한 정확한 분해 효율을 입증하기 위해서는 휘발성 유기화합물의 휘발을 막기 위한 시스템에서의 실험이 실시되어야 할 것으로 보인다. 현재 2006년도까지의 석유류 신고 업소는 19,223개 업소로 특정토양오염관리 대상으로 지정되어있으며, 정기적인 검사를 받게 되어있다. 우리나라의 경우, 2006년도 특정토양오염관리대상 시설 오염도 검사에서 석유류의 TPH로서의 누출된 농도는 800 mg/kg 미만이 10,979건, 800~2,000 mg/kg이 151건, 2,000 mg/kg 이상이 206건으로서 최고 오염농도는 3,992 mg/kg으로 나타났다. 2005년도의 경우도 마찬가지로 800 mg/kg 미만의 누출건수가 가장 많이 나타났으며 최고 2,317.4 mg/kg으로 나타났다. 현재 오염농도에 맞추어 본 실험에서는 200~5,000 mg/kg의 농도에서 단일균주에 의한 분해를 연구하였으며, 실험방법상 abiotic loss는 1% 미만으로 나타났다. 각기 초기 200, 500, 1,000 mg/L의 농도에서의 72시간 배양 후 등유의 농도는 8.8, 81, 200 mg/L로 나타났다. 유류로 오염된 토양에서 증식배양을 통한 등유 제거 균주를 분리한 후, 스크린 테스트를 실시하여 그 결과 *Pseudomonas aeruginosa* K14를 분리하였다. K14에 의한 등유의 최적 제거 배양 인자로, 온도 30°C, pH 7, 초기 접종 농도 1.0 g/L을 구해 내었으며, 기질의 농도가 1,000 mg/L이었을 때, 72시간 동안 80.0% 이상의 제거효율을 보여주었다. 기질의 제거 속도는 6.092 g kerosene/g cell/day로써, 여타의 초기 기질 농도 중 가장 높은 제거 속도를 나타내었다. 또한 같은 농도일 때, 혼합 균주를 이용한 제거 실험결과와 유사한 제거효율을 볼 수 있었다. 저농도 등유 200 mg/L에 대하여 48시간 동안 95.8% 이상의 제거효율을 보여주었으며, 최종 잔류 농도는 8.8 mg/L이었다. 제거 속도는 1.891 g kerosene/g cell/day로 나타났다. 500 mg/L의 등유에 대하여 같은 배양조건으로 실험한 결과, 72시간 동안 83.8%를 제거하였다. 제거 속도는 2.314 g kerosene/g cell/day로 나타났다. 고농도 경우 5,000 mg/L (w/v)에 대하여 제거효율을 측정한 결과, 48시간 동안 42.0%의 제거능을 보여주었다. 제거 속도는 6.918 g kerosene/g cell/day로 나타났다. K14는 기질의 초기 농도가 높아질수록 균의 성장속도는 높아지는 경향을 보였다. 그러나, 기질의 농도에 따른 균의 수득을 및 기질의 제거속도는 초기농도 1,000 mg/L에서 각기 가장 높은 6.092 g kerosene/g cell/day, 0.139로 나타났으며 그 이상의 농도에서는 낮아지는 경향을 보였다. 기질의 피크 변화 양상을 보면 고농도의 기질에서 주요 알칸계 피크가 감소하는 경향을 보이며 베이스라인은 들떠있는 경향을 보인다. 그러나 저농도 기질일 때, 주요 피크 및 베이스 라인까

지 감소되는 경향을 볼 수 있다. 이는 *P. aeruginosa* K14에 의한 등유 각 성분 별 이용도는 등유 초기 농도에 의존적으로 보이며, 저농도로 갈수록 다양한 성분에 대한 이용도가 높아지는 것으로 보인다. 결과적으로, K14는 넓은 범위의 기질 농도에서 높은 제거효율을 보여주었으며, 따라서 다양한 기질농도로 오염된 현장에서의 생물학적 처리에 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 경기대학교 기초과학연구지원비(2007-085)로 수행되었습니다.

참고문헌

- 오경택, 박귀환, 강창민, Kubo Motoki, 정선용. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* F722로부터 유래된 biosurfactant를 이용한 등 경유 혼합물의 생분해를 향상. 한국생물공학회지 18, 529-535.
- 환경부, 토양환경보전법 제 7, 8 조, 2001개정.
- ASTM (American society for Testing and Materials) Home Page, 2001. D396-01, Standard specification for fuel oils.
- Barathi, S. and N. Vasudevan. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Envint.* 26, 413-416.
- Baryshnikova, L.M., V.G. Grishchenkov, M.U. Arinbasarov, A.N. Shkidchenko, and L.M. Boronin. 1995. Biodegradation of oil products by individual degrading strains and their associations in liquid media. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 463-468.
- Geerdink, M.J., M.C.M. Loosdrecht, and K. Luyben. 1996. Biodegradability of diesel. *Biodegradation* 7, 73-81.
- Gouda, M.K., S.H. Omar, Z.A. Chekroud, and H.M.N. Eldin. 2007. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. *Chemosphere* 69, 1807-1814.
- Hans-Jurgen, B., B.M.D. Ewald, and L. Werner. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. *J. Biotechnol.* 47, 3-38.
- Joanna, D.M., J.P. Frank, and E.C. Carl. 2004. Degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 340-345.
- Kim, M.H. 1995. Microbial characterization for the assessment of the bioremediation potential on MGP soils. *J. Korea Solid Waste Eng.* 2, 223-230.
- Kyong, L. and D.T. Gibson. 1996. Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3101-3106.
- Li, G., W. Huang, D.N. Lerner, and X. Zhang. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Res.* 34, 3845-3853.
- Margesin, R. and F. Schinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine Glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2660-2664.
- Nocentini, M., D. Pinelli, and F. Fava. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixture: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41, 1115-1123.

15. Ortega-Trejo, T.X. and R.G. Edyvean. 2004. Kerosene biodegradation by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. In Poster in the 13th Int. Biodeter. Biodegr. Symposium, Madrid, Spain.
16. Edward, R.W. and J.C. Peter. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J. Bacteriol.* 52, 7542-7554.
17. Saratale, G., S. Kalme, S. Bhosale, and S. Govindwar. 2007. Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *J. Basic Microbiol.* 47, 400-405.
18. Solano-Serena, F., R. Marchal, J.M. Lebeault, and J.P. Vandecasteele. 2000. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by culture head space monitoring. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 19-22.
19. Song, H.G. and R. Bartha. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 646-651.
20. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
21. Vargas, J.P., H.M.P. Varaldo, G.C. Calva, E.R. Leal, R.R. Vázquez, R.F. Cerrato, and F.E. García. 2000. Nitrogen-fixing bacteria capable of utilising kerosene hydrocarbons as a sole carbon source. *Water Sci. Technol.* 42, 407-410.
22. Wongsu, P., M. Tanaka, A. Ueno, M. Hasanuzzaman, I. Yumoto, and H. Okuyama. 2004. Isolation and Characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr. Microbiol.* 49, 415-422.

(Received May 29, 2008/Accepted June 27, 2008)

ABSTRACT : Biodegradation of Kerosene by *Pseudomonas aeruginosa* K14

Jee-Young Kim and Sang-Seob Lee* (Department of Biological Engineering, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea)

In this study, we isolated 32 strains of kerosene degrading bacteria from oil contaminated soil by enrichment culture. Isolates were screened for kerosene degradation efficiencies and K14 were selected which had the highest removal efficiency for 1,000 mg/L of kerosene. K14 were identified as *Pseudomonas aeruginosa* by morphological, biochemical test and 16S rDNA analysis. The optimal culture condition were determined as initial inoculated cell concentration, 1.0 g/L; substrate concentration, 1,000 mg/L; temperature 30°C; pH 7. When we enforced batch test in this condition, K14 degraded 72% of kerosene with 1,000 mg/L during 72 hr. And, at low concentration (200 mg/L), K14 degraded 95.8% of kerosene during 48 hr. As a result, kerosene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* K14 could be useful for clean up of groundwater and soil contaminated with crude oil.