

유류 오염 토양에서 분리된 *Rhodococcus fascians*를 이용한 JP-8의 분해 특성

남보현 · 박봉제 · 윤현식[†]

인하대학교 생물공학과
402-751 인천광역시 남구 용현동 253
(2008년 5월 8일 접수, 2008년 6월 5일 채택)

Biodegradation of JP-8 by *Rhodococcus fascians* Isolated from Petroleum Contaminated Soil

Bo Hyun Nam, Bong Je Park and Hyun Shik Yun[†]

Department of Biological Engineering, Inha University, 253 Yong Hyun-dong, Nam-ku, Incheon 402-751, Korea
(Received 8 May 2008; accepted 5 June 2008)

요 약

유류 오염 토양으로부터 항공유 JP-8을 분해하는 능력이 우수한 균주를 분리하여 16S rDNA 염기서열 분석한 결과 *Rhodococcus fascians*로 확인되었다. 분리된 *R. fascians*를 MSM 배지에 JP-8을 탄소원으로 배양하여 그 성장특성과 JP-8 분해 특성을 고찰하였다. 분리된 *R. fascians*는 2% JP-8을 포함하는 배지에서 5일 이내에 JP-8 대부분을 분해하였다. 16% JP-8을 포함하는 배지에서는 10일 동안 배양액 내 JP-8의 농도를 초기 농도의 14%까지 낮출 수 있었다. 17°C 부터 32°C 까지 JP-8의 분해에 미치는 영향을 살펴본 결과 5일 후에는 모든 시료에서 JP-8의 대부분이 제거되었으며 온도가 낮을수록 *R. fascians*에 의하여 분해되는 JP-8의 양이 많은 것으로 나타났다. 배지의 초기 pH는 pH5에서 초기 분해속도가 비교적 낮았으나 pH8 까지 모두 5일만에 JP-8의 대부분이 제거되었다.

Abstract – Microorganisms isolated from petroleum contaminated site were tested for their ability to grow on JP-8 by culturing them on the culture medium that contains JP-8 as a carbon source. The microorganism which grew on JP-8 containing minimal salt medium was separated and identified as *Rhodococcus fascians*. Changes in JP-8 biodegradation of *R. fascians* that was isolated from petroleum contaminated site was investigated with various inoculum sizes, JP-8 concentrations, medium pHs, and culture temperatures. The amount of JP-8 was analyzed by TPH using Gas Chromatography.

Key words: Biodegradation, Jet Fuel, JP-8, *Rhodococcus fascians*

1. 서 론

최근 유류에 의한 환경오염의 심각성이 알려지고 있지만 국내의 경우 관련조사 및 오염의 처리에 대해 극히 미비한 상태이다. 특히 석유 지하 저장시설 및 주유소의 누출로 인한 오염, 군부대에서 토양의 부적절한 관리로 인한 유류 오염은 토양 및 지하수를 오염시켜 그 피해범위가 계속적으로 확산되어 나가고 있다. 이러한 토양 및 지하수의 오염문제는 주변 생태계와 인근 주민들에 대한 잠재적인 위해성을 가짐으로써 새로운 환경문제가 되고 있다. 국내외적으로 유류오염토양 및 지하수를 정화하기 위해 다양한 기법들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나[1-3] 국내 여건은 기술적으로나, 제도적으로 매우 미흡한 실정이다.

JP-8은 케로제네 항공유로서 최근 군부대를 중심으로 군용 연료

로 많은 양이 생산 및 소비되고 있으며, 토양 내로 유입될 경우 지하수오염까지 이어져 주변 환경에 큰 피해를 끼칠 수 있는 것으로 알려져 있다[4]. JP-8은 C₈-C₉ aliphatic carbon 9%, C₁₀-C₁₄ aliphatic hydrocarbon 65%, C₁₅-C₁₇ aliphatic carbon 7%, aromatics 18%로 구성되어 다른 항공유에 비하여 휘발성이 낮고, flash point가 높다. 항공유에 의한 토양 및 지하수의 오염은 심각한 환경문제가 되고 있으며, JP-8을 증기, 에어로졸, 또는 액체 상태로 인체에 노출시킬 경우 위해성이 있다고 알려져 있다[5-7]. Table 1에 나타난 것처럼 JP-8의 수용성 성분에는 BTEX 화합물들이 많이 포함되어 유출될 경우 유해한 BTEX와 방향족 화합물에 의한 지하수 오염이 우려된다[8].

유류오염에 대한 환경복원기술 개발에 있어서 경제적이고 적용이 쉬운 기술의 개발이 필요하다. 유류는 가솔린외에는 휘발성이나 용해도가 낮아 단기적인 위해성은 높지 않기 때문에 처리시간이 어느 정도 길더라도 비용이 적게 드는 처리방법 또는 적은 비용을 들여서 위해성 저감이 많은 처리방법을 이용하는 것이 적합하다. 이

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hyunshik@inha.ac.kr

[‡]이 논문은 인하대학교 정성택 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

Table 1. The composition of JP-8 [8]

Component	Percent (w/w)
Undecane	24.0
Dodecane	18.0
Decane	15.2
Tridecane	10.8
Tetradecane	7.2
Methyl naphthalene	4.8
Nonane	4.4
Trimethyl benzene	4.0
Pentadecane	4.0
Dimethyl naphthalene	3.1
Dimethyl benzene(xylene)	2.4
Naphthalene	1.0
Ethyl benzene	0.6
Diethylene glycolmonomethyl ether	0.3
Methyl benzene(toluene)	0.2

린 점에서 생물학적 처리기술은 장점을 가지고 있으며, 가솔린과 같이 휘발에 의해 쉽게 제거되는 경우를 제외하고 대부분의 유류 오염지역의 정화에 많이 활용되고 있다[9, 10].

유류오염에 대한 생물학적 처리에 대한 연구는 대부분이 미생물을 이용하여 원유, 디젤, BTEX를 생물학적으로 처리하는 연구가 많이 수행 되었으며[11-14] 항공유의 생물학적 처리에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 유류 오염지역의 토양에서 분리한 균주로부터 얻어진 JP-8 분해 균주를 확인하고 균주의 성장특성과 JP-8분해특성에 대하여 알아보았다. 얻어진 결과는 실제 JP-8에 오염된 하천이나 지하수를 미생물을 이용하여 복원하는데 유용한 자료로 사용될 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

2-1. JP-8 분해 균주의 분리 및 성장속도 측정

유류로 오염되어있는 지역의 토양 시료를 채취한 후, JP-8의 분해에 적합한 균주를 분리하였다. 분리방법은 5g의 토양시료를 증류수 95 ml에 풀어 LB agar 배지에 도말하였으며 모든 콜로니를 분리하여 각각 배양하였다. 위에서 얻어진 콜로니를 JP-8(2%)이 포함된 minimal salt media (MSM)에서 1주일간 배양한 후 JP-8 분해가 가장 뛰어난 균주를 선발하였다. 분리된 균주의 생장은 LB 배지와 MSM 배지에서 진탕배양기를 이용하여 27 °C, 200 rpm에서 배양하며 흡광도를 측정하였다.

2-2. 액체 배양을 통한 JP-8의 분해

균주의 접종량이 JP-8의 분해에 미치는 영향을 고찰하기 위해 MSM에 포함되는 JP-8의 양을 변화시켜 GC를 이용하여 잔류하는 JP-8의 양을 측정하였다. 접종량을 각각 0.5%, 1%, 2%, 4%로 조절하여 JP-8을 포함하는 MSM에서 10일간 배양하였다. JP-8의 농도가 균주의 분해에 미치는 영향을 고찰하기 위해 MSM에 포함되는 JP-8의 농도를 변화시켜 기체크로마토그래피를 이용하여 잔류하는 JP-8의 양을 측정하였다. 각각 1%, 2%, 4%, 8%, 12%, 그리고 16%의 JP-8을 MSM에 첨가한 후 각각의 균주를 접종하여 10일간 배양하였다. 17 °C, 22 °C, 27 °C 그리고 32 °C의 다양한 온도 범위에서

2% 균주를 접종한 것과 대조군으로서 균주를 접종을 하지 않은 것으로 구분하여 JP-8 분해에 미치는 온도의 영향을 고찰하였다. MSM 배지의 JP-8 농도는 2%이었으며 배양시간은 5일이었다. 배지의 초기 pH를 pH 5, 6, 7 그리고 8로 변화시켜 균주의 JP-8 분해에 미치는 MSM 배지의 pH의 영향을 고찰하였다. 균주의 접종량은 2%이었으며 2%의 JP-8 농도에서 5일간 배양하였다.

MSM 내의 잔류 JP-8의 정량분석은 EPA method 8015[15]를 따라 행하였다. MSM 내의 잔류 JP-8을 n-hexane (Sam Chun Pure Chemical Co.) 10 ml로 추출한 후 기체 크로마토그래피를 사용하여 탄화수소 총량을 비교하는 total petroleum hydrocarbon (TPH) 방법으로 정량하였다. 기체 크로마토그래피는 Shimadzu GC-17A를 사용하였으며 HP-5 capillary column (30 m, 0.32 mm diameter, 0.25 µm film thickness)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 균주의 분리 동정 및 특성

유류 오염지역으로부터 분리한 균주를 16S rDNA 염기서열 분석을 위하여 (주)마이크로아이에에 의뢰하여 분석하였다. 분석 결과 분리된 균주는 *Rhodococcus fascians*로 확인하였다. 분리된 *R. fascians*를 LB 배지에서 호기성 조건과 혐기성 조건에서 각각 배양한 결과 호기성 조건에서는 성장속도가 0.16 hr⁻¹으로 나타났고, 혐기성 조건에서는 성장속도가 0.14 hr⁻¹로 나타나 호기성 조건에서 뿐만 아니라 혐기성 조건에서도 잘 자라는 것으로 나타났다. MSM에서는 접종량을 0.5~2% 변화 시켰을 경우 접종량이 많을수록 높은 수치의 OD₆₀₀와 생균수를 나타내었으며 0.5%의 접종량에서는 lag phase가 길어졌으나, 최대 생균수는 1% 접종량과 2%의 접종량에서와 마찬가지로 30시간째 나타났으며, 2%의 접종량의 경우 최대 생균수가 얻어 졌으며 그 값은 LB배지에서 최대 생균수와 비교했을 때 약 2.5% 정도였다(data not shown).

3-2. 액체 배양을 통한 JP-8 분해

JP-8의 분해는 휘발에 의한 비생물학적 분해와 *Rhodococcus fascians*에 의한 분해로 이루어진다. JP-8의 구성성분의 높은 증기압으로 인하여 처리과정 중에 일어나는 휘발에 의한 JP-8의 농도 변화가 작지 않으며 이는 전체 분해 과정에서 고려되어야 한다. 따라서 대조군 시료를 준비하여 항공유의 휘발에 의한 감소를 측정하는 것이 필요하다.

이를 위해 모든 실험은 접종을 하지 않은 대조군과 함께 실시하였다. JP-8의 휘발에 의한 비생물학적 분해는 공기의 접촉과 함께 플라스크의 교반에 의해 이루어지는데, 이러한 비생물학적 분해를 최소화 하고 호기성 조건을 만족시키기 위하여 플라스크의 마개는 silicon stopper를 사용하였다. 10일간의 실험을 통한 휘발에 의한 JP-8 감소량은 초기 농도의 60% 정도였으나, 시간이 길어질수록 감소량은 점차 떨어져 비생물학적 처리에는 한계가 있었다. Fig. 1에 접종하고 3일, 6일, 9일 이 지난 다음 대조군과 *Rhodococcus fascians*로 접종한 시료의 크로마토그램을 비교하였다. 대조군의 항공유 성분을 나타내는 기체 크로마토그래피 결과 피크의 대부분이 *R. fascians*를 접종한 시료의 크로마토그램에서 크게 감소하는 것을 알 수 있었다.

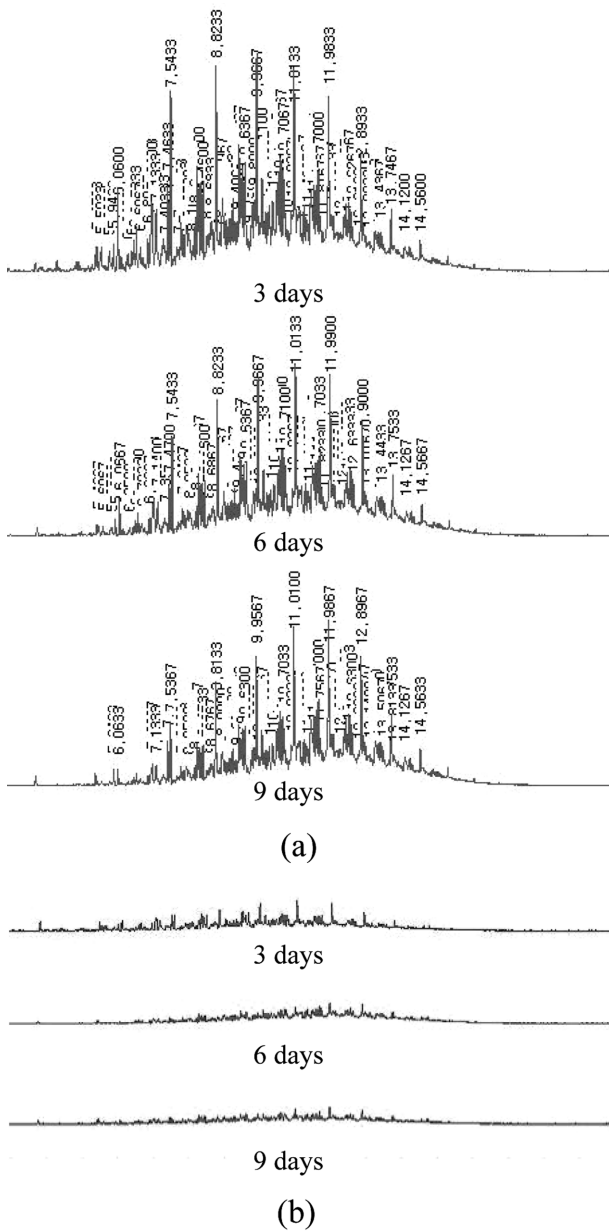


Fig. 1. Chromatograms of JP-8 containing samples not treated with *Rhodococcus fascians* (a) and treated with *Rhodococcus fascians*.

3-3. 접종량의 변화에 따른 분해효과

Fig. 2는 *Rhodococcus fascians*의 접종량을 달리하였을 때 시간에 따른 분해 실험 결과이다. 4%의 JP-8로 오염된 MSM은 접종을 하지 않은 대조군을 제외하고는 모든 접종량에서 8일 뒤 분해가 이루어졌다. 0.5% 접종량의 경우 4일까지의 분해율이 떨어짐을 보이는데 이는 작은 양의 접종으로 인한 lag phase가 길어진 것으로 사료된다. 접종량에 상관없이 JP-8의 잔존량은 6일 후 거의 0에 도달하였다. 2%의 접종량에서 가장 높은 최대 생균수가 얻어졌으며, 생균수의 최대값은 4일째 나타나고 있으며, 분해를 또한 4일째부터 대조군과 차이가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 이시기에 *R. fascians*에 의한 분해가 활발하게 일어나고 있음을 의미한다.

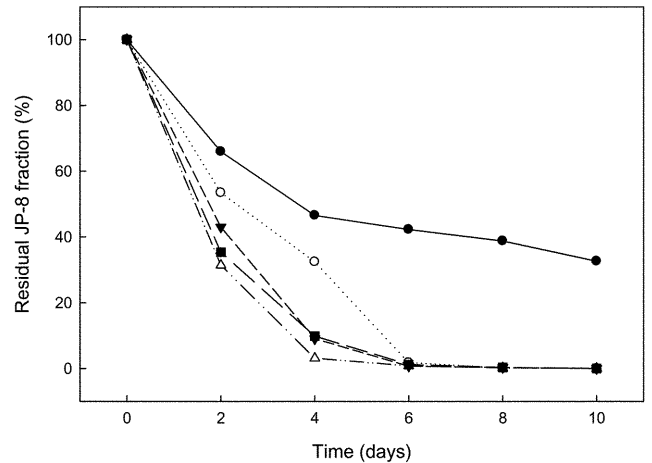


Fig. 2. Degradation of JP-8 in MSM at various inoculation sizes. (●: control, ○: 0.5%, ▼: 1%, ■: 2%, △: 4%)

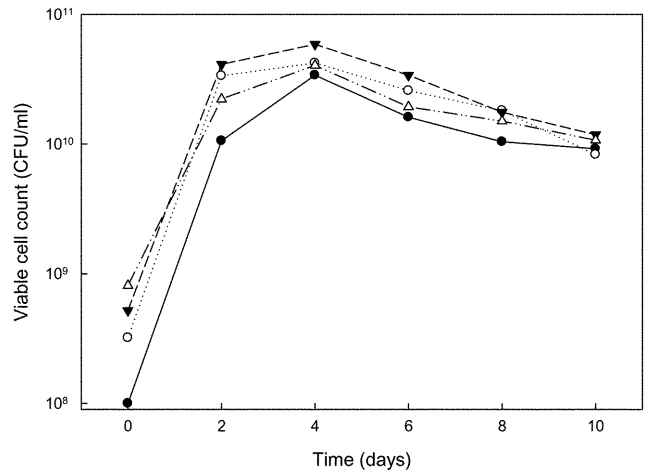


Fig. 3. Cell growth at various inoculation sizes. (●: 0.5%, ○: 1%, ▼: 2%, △: 4%)

3-4. JP-8 농도변화에 따른 분해 효과

JP-8의 농도에 따른 *Rhodococcus fascians*의 분해 특성을 고찰하기 위하여 MSM배지의 *R. fascians*의 유일한 탄소원으로 이용되는 JP-8의 농도를 변화시켜 보았다. Fig. 4는 탄소원인 JP-8의 농도별

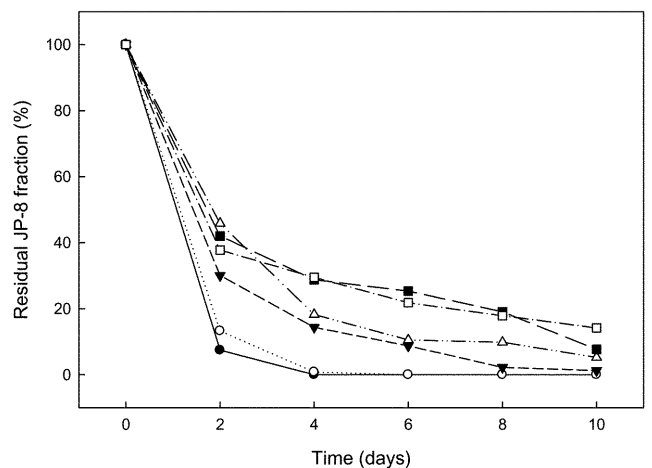


Fig. 4. Degradation of JP-8 in MSM at various JP-8 concentrations. (●: 1%, ○: 2%, ▼: 4%, △: 8%, ■: 12%, □: 16%)

Table 2. Change in the viable cell count with different concentration of JP-8

JP-8 concentration (%)	Viable cell count (CFU/ml)
1	7×10^9
2	4.2×10^{10}
4	2.4×10^{10}
8	2.0×10^{10}
12	1.2×10^{10}
16	5.5×10^9

시간에 따른 잔류량을 나타낸 것이다. 2%까지의 농도에서는 4일이 지난 뒤에 대부분의 JP-8이 분해되었으나 4% 이상의 농도에서는 10일이 지난 뒤에도 JP-8이 잔류하는 것으로 나타났다. 10일 뒤에 JP-8 4%농도에서는 초기 농도의 1.3%, 16%에서는 초기 농도의 14%의 JP-8이 잔류하였다. 상대적인 분해율에서 16% JP-8에서 가장 낮은 분해율을 보였지만 JP-8의 절대 양으로 볼 때 가장 많은 분해가 이루어졌음을 알 수 있는데, 이로부터 분리된 *R. fascians*가 높은 농도의 JP-8에 큰 저항성을 지니고 있는 것으로 사료된다. 최대 평균수는 6일째 2%의 JP-8 농도에서 4.2×10^{10} CFU/ml로 가장 높게 나타났는데, 이는 *R. fascians*의 JP-8 분해에 있어서 가장 적절한 기질로서 JP-8 농도는 2%인 것을 나타낸다(Table 2).

3-5. 배지의 초기 pH 변화에 따른 분해 효과

Fig. 5는 JP-8 (2%)이 포함된 MSM의 초기 pH가 분해에 미치는 영향을 보이고 있다. pH 5부터 pH 8까지 *Rhodococcus fascians*의 분해 능력은 큰 영향을 받지 않았다. 약산성인 pH 5에서 JP-8의 분해속도가 낮았으며 pH 7에서 처음에 분해속도가 높았으나 5일 후에는 분해 정도에 큰 차이가 없었다.

3-6. 배양 온도 변화에 따른 분해 효과

Fig. 6의 (a)는 *Rhodococcus fascians*를 접종하지 않은 것이고, (b)는 *R. fascians*를 2% 접종한 것이다. 접종을 한 시료는 5일 뒤 모든 JP-8이 분해 되었으며 *R. fascians*를 접종하지 않은 것의 경우 5일 뒤에도 다량의 JP-8이 잔류함을 확인할 수 있었다. 모든 온도에서 접종을 한 경우 분해 정도에 큰 차이는 없었으나 휘발되는 양이 많은 높은 온도에서 JP-8 분해율이 높게 나타났다. 높은 온도에서 낮

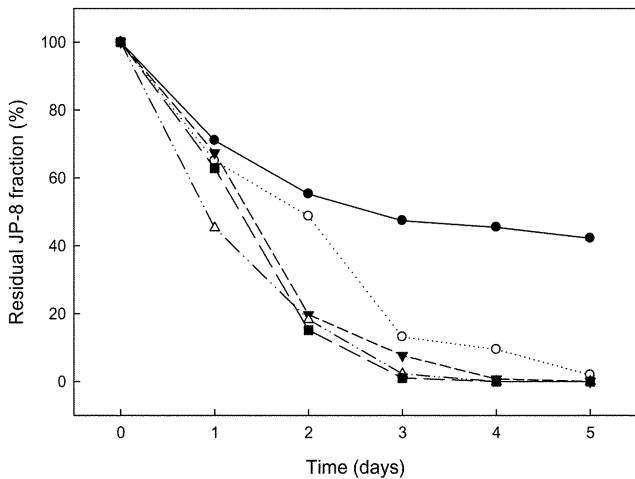


Fig. 5. Degradation in MSM at various initial pH.
(●: control, ○: pH 5, ▼: pH 6, △: pH 7, ■: pH 8)

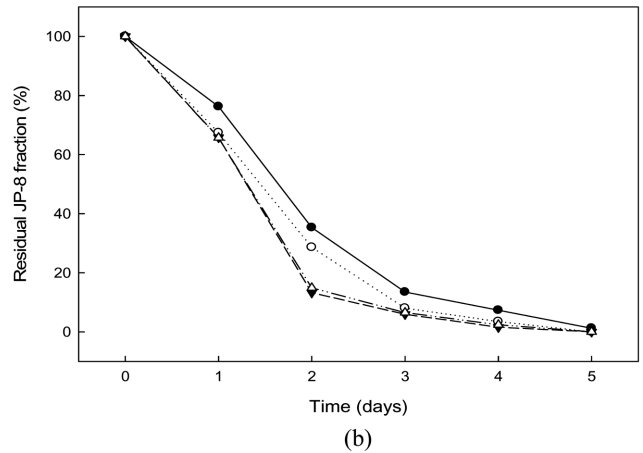
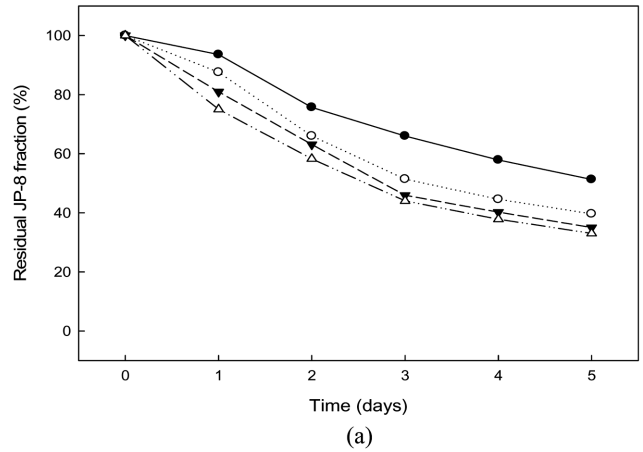


Fig. 6. Degradation of JP-8 in MSM at various culture temperatures.
(a) no inoculum, (b) 2% inoculation (●: 17°C, ○: 22°C, ▼: 27°C, △: 32°C).

은 온도 보다 많은 비생물학적 분해가 되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 대조군과 비교해 볼 때, *R. fascians*에 의한 분해는 5일 뒤에 17°C에서 50%, 22°C에서 40%, 27°C에서 35% 그리고 32°C에서 33%로 17°C에서 가장 높은 것으로 나타났다. 이것은 높은 온도에서는 휘발되는 양이 많아 JP-8의 농도가 낮아지기 때문인 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 실험에 사용된 균주는 유류로 오염된 지역의 토양시료로부터 직접 분리하여 동정하였다. 16S rDNA 염기서열분석결과 분리된 균주는 *Rhodococcus fascians*로 확인되었다. *R. fascians*는 호기성 조건과 혐기성 조건에서도 비교적 높은 성장속도와 JP-8 분해능을 보였다. 혐기성 조건에서의 높은 생장률은 *in situ* 처리 기술에 응용이 가능할 것으로 기대 된다.

JP-8이 *Rhodococcus fascians*에 의해 탄소원으로 사용될 경우 2%가 최적의 기질 농도임을 알 수 있었다. 그러나 16% 이상의 높은 JP-8 농도에서도 10일 뒤 JP-8의 초기 농도의 86%를 감소시키는 높은 분해율을 나타냄으로써, 분리된 *R. fascians*가 JP-8의 독성에 비교적 강한 것으로 판명되었다. 분리된 *R. fascians*는 중성 pH에서 가장 높은 분해율을 보였으나 넓은 pH 범위에서 사용이 가능한 것으로 나타났다. 한편 접종을 하지 않은 상태에서 JP-8의 휘발

에 의한 감소는 온도에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났는데, *R. fascians* 접종을 한 경우에 온도가 증가하면 잔류 JP-8의 농도가 더 낮아 지는 것을 알 수 있었으나 대조군과 비교하면 *R. fascians*에 의한 분해효과는 낮은 온도에서 더 높게 나타났다.

감 사

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Margesin, R., Walder, G. and Schinner, F., "Bioremediation Assessment of a BTEX-contaminated Soil," *Acta Biotechnol.*, **1**, 29-36(2003).
- Gallego, J. L. R., Loreda, J., Llamas, J. F., Vazquez, F. and Sanchez, J., "Bioremediation of Diesel-contaminated Soils: Evaluation of Potential in situ techniques by study of Bacterial Degradation," *Biodegradation*, **12**, 325-335(2001).
- Puskas, K., Al-Awadhi, N., Abdullah, F. and Literathy, P., "Remediation of Oil-contaminated Sandy Soil in a Slurry Reactor," *Environ. Inter.*, **21**, 413-421(1995).
- Rozkov, A., Krd, A. and Vilu, R., "Biodegradation of Dissolved Jet Fuel in Chemostat by a Mixed Bacterial Culture Isolated from a Heavily Polluted Site," *Biodegradation*, **8**, 363-369(1998).
- Mcdougal, J. N., Pollard, D. L., Weisman, W., Garrett, C. M. and Miller, T. E., "Assessment of Skin Absorption and Penetration of JP-8 Jet Fuel and its Components," *Toxicol. Sci.*, **55**, 247-255(2000).
- Monteiro-Riviere, N., Inman, A. and Riviere, J., "Effects of Short-term High-dose and Low-dose Dermal Exposure to Jet A, JP-8 and JP-8 + 100 Jet Fuels," *J. Appl. Toxicol.*, **21**, 485-494(2001).
- Riviere, J. E., Brooks, J. D., Monteiro-Riviere, N. A., Budsaba, K. and Smith, C. E., "Dermal Absorption and Distribution of Topically Dosed Jet Fuels Jet-A, JP-8, and JP-8(100)," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **160**, 60-75(1999).
- Cookson, D. J., Iliopoulos, P. and Smith, B. E., "Composition-property Relation for Jet and Diesel Fuels of Variable Boiling Range," *Fuel*, **74**, 70-78(1995).
- Brink, H. B. and Diane, S. H., "Bioremediation," McGraw-Hill, New York, NY(1994).
- Boopathy, R., "Factors Limiting Bioremediation Technologies," *Biores. Technol.*, **74**, 63-67(2000).
- Block, R. N., Allworth, N. and Bishop, M., "Assessment of Diesel Contamination in Soil In Hydrocarbon Contaminated Soil," *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **2**, 135-148(1991).
- Eriksson, M., Swartling, A. and Dalhammar, G., "Biological Degradation of Diesel Fuel in Water and Soil Monitored with Solid-phase Micro-extraction and GC-MS," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 129-134(1998).
- Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S., Ortiz, L. and Laborda, F., "Biodegradation of Diesel and Heating Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5; its possible Applications on Bioremediation," *Inter. Biodet. Biodeg.*, **35**, 269-285(1995).
- Marquez-Rocha, F. J., Hernandez-Rodriguez, V. and Lamela, M. T., "Biodegradation of Diesel Oil in Soil by a Microbial Consortium," *Water, Air, Soil Poll.*, **128**, 313-320(2001).
- Keith, L. H., "Compilation of EPA's Sampling and Analysis Method," 2nd ed., CRC Press, Inc., New York, NY(1998).