

Article

## 계면활성제 생성능과 세포 표면 소수성을 가진 세균 균주들에 의한 석유탄화수소의 생분해

권선룰 · 송홍규\*

강원대학교 생명과학과

### Biodegradation of petroleum hydrocarbons by bacteria with surfactant producing capability and cell surface hydrophobicity

Sun-Lul Kwon and Hong-Gyu Song\*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received August 18, 2017; Revised November 27, 2017; Accepted November 30, 2017)

Some bacteria with different mechanisms for hydrocarbon degradation were isolated from oil-contaminated soils in Korea. Isolate *Acinetobacter calcoaceticus* SL1 showed biosurfactant-producing activity in oil-spreading test, and it exhibited a good emulsifying activity of 43.6 and 54.5% for diesel oil and *n*-hexane, respectively. It also has high cell surface hydrophobicity which can make it easily attaches to hydrocarbons and degrade them. It degraded 100% of 1,000 mg/L of *n*-octadecane and naphthalene, respectively in 3 days, 72.3% of 1,000 mg/L diesel oil in 7 days and 78.0% of 10,000 mg/L diesel oil in oil-contaminated soil during 28 days. Isolated strains *Bacillus amyloliquefaciens* S10 and *B. subtilis* GO9 can produce biosurfactant and formed 6.34 and 2.5 cm diameter of clear zones, respectively in oil-spreading test. Surface tension of their culture supernatant reduced from 74.6 to 34.4 and 33.3 mN/m, respectively during incubation, and critical micelle concentrations of culture supernatants were 2.0 and 5.9%, respectively. Consortium of *A. calcoaceticus* SL1 and *B. amyloliquefaciens* S10 degraded 77.8% of 10,000 mg/L diesel oil in 3 days, which indicated more efficient oil degradation than that by *A. calcoaceticus* SL1 alone. If these bacteria were applied together as a consortium to oil-contaminated sites, they may show a high removal rate of petroleum hydrocarbons.

**Keywords:** biodegradation, biosurfactant, cell surface hydrophobicity, emulsification, petroleum hydrocarbons

대부분의 석유탄화수소는 소수성과 연관된 독성과 돌연변이성 및 발암성을 가지며 또한 난분해성 화합물이 많아 생산, 가공, 저장, 사용 중 유출 시 토양 및 수환경에 장기간 잔류하면서 심각한 환경오염문제를 일으키기 때문에 주요 환경오염물질로 분류되고 있다(Keith and Telliard, 1979). 유류오염 환경을 정화하기 위한 다양한 기술들이 개발되었는데 물리, 화학적 방법에 비해 생물학적 정화 방법은 저비용이고 물리화학적 방법의 단점을 보완할 수 있지만, 석유탄화수소의 조성과 다양한 환경조건 때문에 유류정화용 미생물들의 생분해능이 실제 오염 환경에서 감소해 효율성이 떨어지는 문제가 흔히 발생하고 있다(Cohen, 2002).

석유탄화수소는 대부분 소수성으로 물에 대한 용해도가 낮고 octanol/water 분배 계수가 높아 토양에 유입되면 입자 표면에 강하게 흡착되어 유류분해 미생물들이 이를 효율적으로 분해하지 못하게 된다(Edwards *et al.*, 1991). 이러한 생물가용성의 감소 문제를 해결하기 위해서 계면활성 물질을 이용하기도 하는데 유류를 분산시키고 물에 대한 용해성을 증가시켜 더욱 쉽게 분해미생물이 이를 이용할 수 있게 한다(Dean *et al.*, 2001; Wick *et al.*, 2002). 이중 화학계면활성제는 저렴하나 독

\*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;  
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

성이 있으며 움직임을 조절하지 못했을 때 흡수, 상의 분리, trapping 그리고 bypassing 등으로 인해 손실 및 피해가 일어날 수 있다(Laha and Luthy, 1991; Strand *et al.*, 2003). 반면 생물 계면활성제는 여러 미생물들이 생성하며 저독성으로 다양한 연구에서 탄화수소의 용해와 생분해에 유용하다고 보고되었다(Laha and Luthy, 1992; Chang *et al.*, 2004; Bordas *et al.*, 2005).

탄화수소 생분해 시 생물계면활성제를 이용한 분해미생물과의 접촉 증가 이외에 표면 소수성이 높은 세균이 소수성 탄화수소를 잘 분해하는 한 가지 방법이 될 수 있으며(Xue *et al.*, 2015), Zhang and Miller (1994)는 세균이 분비한 생물계면활성제가 표면 소수성을 높여서 생분해 활성을 높인다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 계면활성, 유화활성 및 표면 소수성이 우수한 세균들을 분리하고 다양한 석유탄화수소에 대해 분해능이 우수한 균주를 선별하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 탄화수소 분해균주의 분리 및 동정

석유탄화수소 분해 세균을 분리하기 위해 춘천지역 주유소의 유류오염토양을 채취하였다. 균주 분리를 위해 시료와 생리식염수(0.85% NaCl)를 1:1 비율(w/v)로 섞어 추출진탕기(Recipro shaker RS-1, Jeio Tech)로 진탕하여(300 stroke/min, 30분) 토양 현탁액을 만들었다. 이 토양 현탁액을 2% 경유 또는 mineral oil이 첨가된 mineral salt medium (MSM) (Tam *et al.*, 2002)에 토양 현탁액을 접종한 후 5일간 배양하고(30°C, 150 rpm) 배양된 균을 같은 조성의 배지에 5회 계대배양하였다. 경유, *n*-hexadecane 또는 phenanthrene이 1% 첨가된 MSM 한천배지에 배양된 균을 연속 희석하여 도달한 후, 30°C에서 48시간 배양하였다. 빠르게 자란 집락을 선별하여 경유 1%를 첨가한 MSM 한천배지에서 순수분리 하였다. Drop assay (Tanase *et al.*, 2012)를 이용한 2차 선별을 위해 MSM 한천배지에 분리균주를 도달하고 배지 중앙에 원유를 한 방울 떨어뜨린 후 배양하여(30°C, 48시간) 원유가 퍼진 것을 통해 유류 분해 세균을 선별하였다.

석유탄화수소 분해 세균의 동정을 위해 균주 배양 후(주)코스모진텍에 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 전체 염기서열을 미국의 National Center for Biotechnology Information 등록 균주의 염기서열과 비교하여 상동성이 가장 높게 나온 균주를 검색하여 균주를 동정하였다. 또한 균주의 생리생화학적 특성을 검사하기 위해 API test를 수행하였는

데, API 20NE와 API 50CHB kit (bioMérieux)를 사용하여 균주를 접종하고 배양 후 기질 이용 결과를 조사하였다.

### 분리균주의 계면활성 및 유화활성

균주의 생물계면활성능을 조사하기 위해 Luria Bertani (LB) 배지(Difco Lab)에 48시간 배양하고 원심분리(4,500 × g, 15분)하여 세포를 제거하고 상등액을 얻었다. 먼저 Morikawa 등(2000)와 Youssef 등(2004)의 방법을 이용하여 oil-spreading test를 진행하였다. Petri dish에 50 ml 증류수를 넣고 그 위에 20 μl의 원유를 첨가하여 원유가 증류수 표면에 퍼지게 하고 그 위에 준비한 배양 상등액 10 μl를 첨가한 후 생성된 투명환의 직경을 측정하였다.

균주가 생산하는 생물계면활성제의 유화활성을 측정하기 위해 Emtiazi 등(2009)의 방법을 이용하였다. 배양 상등액을 석유탄화수소[등유(kerosene), *n*-hexane]와 1:1 (v/v)로 시험관에 넣고 2분간 교반하고 하룻밤 동안 상온에 두어 석유탄화수소와 배양 상등액이 분리되도록 하였다. 석유탄화수소와 배양 상등액 사이에 생기는 유화된 층의 높이를 측정하여 유화활성을 측정하였으며 계산 공식은 다음과 같다.

$$\text{유화활성}(E_{24} \%) = (\text{유화층의 높이} / \text{전체 높이}) \times 100$$

한편 배양 상등액의 표면장력을 측정하였는데 상등액을 증류수로 희석하며 표면장력을 Du Nouy ring method를 이용해 측정하였고 최대 표면장력 감소 정도와 critical micelle concentration (CMC)을 조사하였다(Fernandes *et al.*, 2007).

### 분리균주의 표면소수성

균주의 표면 소수성은 먼저 균주를 LB 배지에 48 h 배양 후 BATH (bacterial adherence to hydrocarbon) buffer로 2회 세척하고 10<sup>10</sup> CFU/ml로 개체수를 맞추는(Pruthi and Cameotra, 1997) 대신 간편하게 분광광도계를 이용해 OD<sub>600</sub>을 1로 보정하였다. 균주 현탁액 1.2 ml과 석유탄화수소 0.2 ml을 1.5 ml tube에 넣고 선배양(25°C, 10분) 후 2분간 교반하고 15분간 상온에 두어 석유탄화수소가 분리되도록 하고 OD<sub>600</sub>을 측정하여서 그 혼합물의 탁도를 구하였다. 결과는 다음의 공식으로 계산하였다;

$$\text{BATH} (\%) = (\text{최종 흡광도} / \text{초기 흡광도}) \times 100$$

### 분리균주의 석유탄화수소 분해능

분리균주를 LB 배지에서 배양하고(48시간, 30°C, 150 rpm),

생리식염수로 두 번 세척 후 OD<sub>600</sub>을 1로 보정하여 접종물로 이용하였다. 먼저 단일 탄화수소의 생분해 측정을 위해 *n*-octadecane, naphthalene과 phenanthrene을 각각 acetone에 녹인 후 25 ml MSM 배지에 첨가하여 농도를 조정하였다. 하루 동안 상온에서 acetone을 증발시킨 후 균주를 접종하고 7일간 배양하여 (30°C, 150 rpm) 잔류량을 측정하였다. 경유(diesel oil)의 생분해는 25 ml MSM 배지에 농도 1,000과 10,000 mg/L으로 첨가하고 균주 접종 후 7일간 배양하였으며, 원유의 경우는 40 ml MSM 배지에 10,000 mg/L이 되도록 추가하고 균주를 접종하여 18일간 배양한 후 잔류 유류를 측정하였다. 다른 탄화수소 분해 방법을 가진 두 가지 균주로 이루어진 접종물에 의한 탄화수소 분해능을 조사하기 위해 25 ml MSM 배지에 경유를 10,000 mg/L 첨가하고 각 균주를  $1 \times 10^6$  CFU/ml로 조정된 두 가지 균주를 1:1로 혼합하여 접종하고 배양하였다(30°C, 150 rpm).

균주의 토양에서의 유류 생분해능 측정을 위해 강원대학교 구내에서 유류 비오염 토양을 채취 후 2 mm 체로 거르고 토양의 건조중량과 수분보유능(WHC)을 측정하고 토양 수분을 WHC의 70%로 조절하였다. 탄산칼슘으로 토양의 pH를 7.5로 보정하고 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>로 C:N:P 비율을 100:10:1로 조정하였다. 경유를 10,000 mg/L가 되도록 첨가하고 균주를  $6 \times 10^6$  CFU/g이 되게 접종하여 배양하였다(30°C). 토양의 산소 공급을 위해 3일마다 토양을 고루 섞었고 수분함량은 WHC의 70%를 유지하도록 하였다.

위의 탄화수소 생분해 실험 시 잔류 탄화수소를 측정하기 위해 일정 기간 배양한 시료로부터 methylene chloride를 용매로 하여 추출진탕기(300 spm, 30 min)를 이용하여 잔류 탄화수소를 추출하고 농축한 후 flame ionization detector가 장착된 gas chromatograph (Model YL6500, Younglin)를 이용하여 정량하였다. 이동상은 질소이며 컬럼은 HP-1 (길이 30 m; 직경 0.32 mm; 두께 1 μm)을 사용하였다. 분석 조건은 단일 탄화수소의 경우 주입구와 검출기의 온도는 모두 280°C이고, 초기 오븐 온도는 80°C, 2분 유지 후 160°C까지 15°C/min으로 승온, 220°C까지 4°C/min 승온, 300°C까지 20°C/min 승온 후 10분 유지시켰다. 경유 분석 조건은 주입구 온도 250°C, 검출기 온도 310°C, 오븐 온도는 초기 50°C, 3분 유지, 300°C까지 8°C/min로 승온 후 3분간 유지시켰다. 원유 분석 조건은 대한민국의 1010659590000 (Korea University, 2011)의 방법을 이용하였다.

모든 실험은 triplicate로 실시하였으며 결과는 Student's *t*-test를 통해 통계적 유의성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 탄화수소 분해균주의 분리 및 동정

다양한 유류오염 토양에서 채취 분리한 균주들을 drop assay을 통해 2차 선별하여 총 71 종의 균주를 선별하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 SL1 균주가 *Acinetobacter calcoaceticus* B9 (GenBank accession No. JQ579640)와 99%의 상동성을 보였으며 GO9와 S10 균주는 각각 *Bacillus subtilis* A32 (DQ631809)와 *Bacillus amyloliquefaciens* UASWS BA2 (KU060802)와 99%의 상동성을 보였다. API kit를 이용한 분리균주들의 생리·생화학적 특성은 Table 1에 나타내었으며 이를 API web (<https://apiweb.biomerieux.com>)을 통해 비교한 결과 유전자 염기서열 분석을 통한 동정종의 결과와 일치하여 최종적으로 각각 *Acinetobacter calcoaceticus* SL1, *Bacillus subtilis* GO9와 *B. amyloliquefaciens* S10으로 명명하였다.

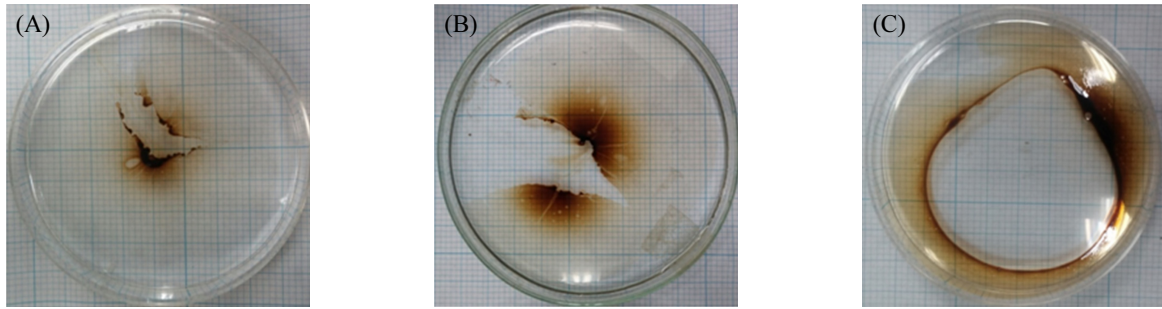
### 분리균주의 계면활성과 유화활성

생물계면활성제는 표면활성을 나타내는 화합물로 석유탄화수소를 유화시켜 생분해를 더욱 용이하게 만든다(Sifour *et al.*, 2007). 균주가 생산하는 생물계면활성제의 활성을 측정하기 위해 oil spreading test를 수행하였는데 *A. calcoaceticus* SL1, *B. subtilis* GO9 그리고 *B. amyloliquefaciens* S10의 배양 상등액이 각각 직경 1.5, 2.5와 6.5 cm의 투명환을 형성하여 생물계면활성제의 생산을 나타냈으며(Fig. 1), 이는 직경 1.4 cm 직경의 투명환을 형성한 *Gallaecimonas pentaromativorans* O15보다 월등히 우수하였다(Hassanshahian, 2014). 분리균주가 생산한 생물계면활성제에 의한 유화활성을 측정하였는데 *n*-hexane에 대해 *A. calcoaceticus* SL1, *B. subtilis* GO9와 *B. amyloliquefaciens* S10이 각각 54.5, 54.0과 56.0%의 유화활성(E<sub>24</sub>%)을 나타냈는데 Sifour 등(2007)의 *Pseudomonas aeruginosa* Rb28의 51.85% 보다 높은 것을 알 수 있었다. *n*-Hexane과 달리 kerosene에 대해서는 *B. subtilis* GO9이 55%로 52%의 S10 균주보다 약간 우수하였다.

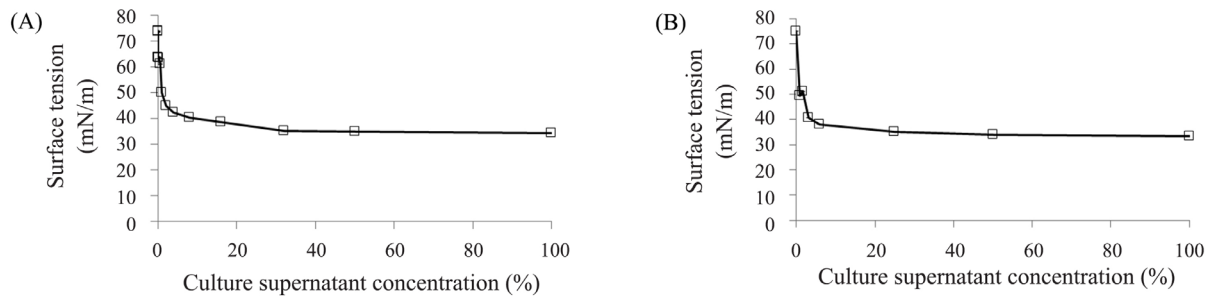
LB 배지에서 배양한 *B. amyloliquefaciens* S10과 *B. subtilis* GO9의 배양 상등액은 증류수와 혼합액에서 모두 낮은 농도로도 표면장력을 크게 감소시키는데 두 균주가 표면 장력을 초기의 74.6 mN/m에서 각각 34.4와 33.3 mN/m로 감소시켜 그 차이가 그리 크지 않았으나(Fig. 2), CMC 농도는 각각 2.0과 5.9%로 S10 균주가 더 낮은 농도에서도 micelle을 형성하여 표면장력을 낮출 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 *B. amyloliquefaciens* S10 균주는 높은 생물계면활성제 생성능

**Table 1.** Biochemical characteristics of isolated bacterial strains in API test (SL1 with API20NE, GO9 and S10 with API 50CHB)

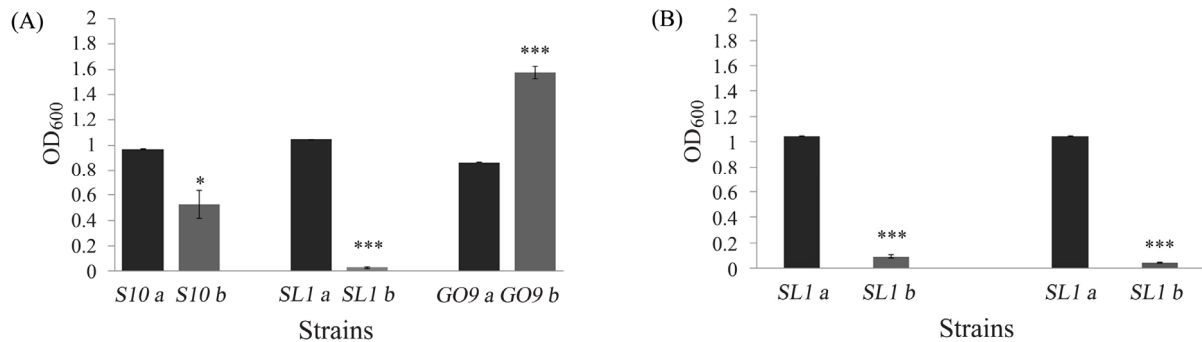
Strain		SL1	
Gram stain		-*	
Morphologie		coccus	
Optimum temperature (°C)		30	
Potassium nitrate		-	
L-Tryptophane		-	
D-Glucose		-	
L-Arginine		-	
Urea		-	
Esculm ferric citrate		-	
Gelatine(bovine origin)		-	
4-Nitrophenyl-βD-galactopyranoside		-	
Assimilation			
D-Glucose		-	
L-Arabinase		-	
D-Mannose		-	
D-Mannitol		-	
N-Acetyl-glucosamine		-	
D-Maltose		-	
Potassium gluconate		-	
Capric acid		+	
Adipic acid		+	
Matic acid		+	
Trisodium citrate		+	
Phenylacetic acid		+	
Strain	S10	Strain	S10
Gram stain	+	Melibiose	-
Morphologie	rod	Sucrose	-
Optimum temperature(°C)	30	Trehalose	+
Control	+	Inuline	-
Glycerool	+	Melezitose	-
Ertythritol	-	D-Raffinose	+
D-Arabinose	-	Starch	+
L-Arabinose	+	Glycogen	+
Ribose	+	Xylitol	-
D-Xylose	+	β-Gentiobiose	-
L-Xylose	-	D-Turanose	-
Adonitol	-	D-Lyxose	-
β-Methyl-xylopyranside	-	D-Tagatose	-
Galactose	-	D-Fucose	-
D-Glucose	+	L-Fucose	-
D-Fructose	+	D-Arabitol	-
D-Mannose	+	L-Arabitol	-
L-Sorbose	-	Gluconate	-
Rhamnose	-	2-Keto-gluconate	-
Dulcitol	-	5-Keto-cluconate	-
Inositol	+	2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	-
Mannitol	+	L-Arginine	-
Sorbitol	+	L-Lysine	-
α-Methyl-D-mannopyranside	-	L-Omithine	-
α-Methyl-D-glucoside	+	Trisodium citrate	-
N-Acethyl-glucosamine	-	Sodium thioisulfate	-
Amygdaline	+	Urea	-
Arbutine	+	L-Tryptophane (TDA)	-
Esculine	+	L-Tryptophane (IND)	-
Salicine	+	Sodium pyruvate	+
Cellobiose	+	Gelatin (bovine origin)	+
Maltose	+	D-Glucose	-
Lactose	+		



**Fig. 1.** Formation of clear zone in oil spreading test with 20  $\mu$ l of crude oil and 10  $\mu$ l of culture supernatant of *A. calcoaceticus* SL1 (A), *B. subtilis* GO9 (B), and *B. amyloliquefaciens* S10 (C).



**Fig. 2.** Decrease of surface tension in mixture of distilled water and different concentration of culture supernatant of *B. amyloliquefaciens* S10 (A), and *B. subtilis* GO9 (B) from LB broth.



**Fig. 3.** Decrease of OD value in reaction mixture by cell surface hydrophobicity of *B. amyloliquefaciens* S10, *A. calcoaceticus* SL1, and *B. subtilis* GO9 with xylene (A) and *A. calcoaceticus* SL1 with diesel oil (B left) and *n*-hexadecane (B right). a, before treatment; b, after treatment of BATH with diesel oil, *n*-hexadecane and xylene. \*\*\*, statistically significant at  $P < 0.001$ ; \*, statistically significant at  $P < 0.05$ .

로 표면장력을 낮춤으로써 소수성의 석유탄화수소를 보다 잘 분산시켜 물과의 접촉을 용이하게 하여 생분해를 증진시킬 수 있을 것으로 예상된다.

### 분리균주의 표면 소수성

표면 소수성이 높은 세균이 소수성 석유탄화수소에 대해 부착이 용이하여 생분해에 유리할 수 있는데, 표면 소수성 측정 시 액체상에서 세포가 소수성 기질에 많이 달라 붙으면 액체상의 흡광도가 낮아져서 BATH (%) 값이 낮아지므로 세포

의 표면 소수성이 높은 것으로 간주된다(Xue *et al.*, 2015). Xylene에 대해서 *B. amyloliquefaciens* S10과 *B. subtilis* GO9의 표면 소수성은 높지 않으나 경우, *n*-hexadecane과 xylene에 대한 *A. calcoaceticus* SL1의 표면 소수성은 높아서 배지의 흡광도가 감소하고(Fig. 3) 이로부터 계산된 BATH가 각각 2.9, 8.8과 4.2%로 낮았다. *Serratia marcescens* MTCC 86, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297, *Bacillus pumilus* MTCC 2296, *B. laterosporous* MTCC 2298과 *A. calcoaceticus* MTCC 2409의 *n*-hexadecane에 대한 표면 소수성이 각각 13, 12, 18과 16%인

것으로 보고되었는데(Pruthi and Cameotra, 1997), 이들의 연구에서는 개체수가  $10^{10}$  cells/ml로 본 연구의 개체수  $3.5 \times 10^6$  cells/ml보다 훨씬 크므로 결과를 절대적으로 비교하기 어렵지만 본 연구에서의 개체수가 낮음에도 불구하고 소수성 기질을 많이 흡착하여 흡광도가 크게 감소된 결과로부터(Fig. 3) *A. calcoaceticus* SL1의 표면 소수성이 상당히 높은 것으로 판단된다. 한편 *A. calcoaceticus* SL1 균주는 지방족 탄화수소인 *n*-hexadecane보다 방향족 탄화수소인 xylene에 대해 더 높은 표면 소수성을 나타내었는데, 이것이 세균의 표면 구조와 성분으로 인한 지방족과 방향족 탄화수소 종류와의 상호작용의 차이 때문인지 더 조사할 필요가 있다.

### 분리균주의 석유탄화수소 분해능

*A. calcoaceticus* SL1은 1,000 mg/L의 *n*-octadecane과 naphthalene을 모두 3일째에 100% 분해하였으며 이는 Liu 등(2010)의 *Alcanivorax* sp. 2B가 500 mg/L *n*-octadecane을 4일째에 100% 분해한 것이나 Xu 등(2014)의 *Streptomyces* sp. QWE-5가 100 mg/L naphthalene을 6일째에 100% 분해한 것과 비교하여 각 탄화수소에 대해 분해능이 더 높았다. *B. subtilis* GO9는 10 mg/L의 phenanthrene을 7일째에 73.3% 분해하였는데 이는 Haritash와 Kaushik (2016)의 *Micrococcus luteus* 균주가 phenanthrene 1 mg/L에 대해 15일 후 62.9% 분해한 것보다 우수하였다.

석유탄화수소에는 수백 가지 이상의 종류가 있으며 환경에 유출되는 탄화수소는 대부분이 원유나 원유 증류물이며 이런 다양한 석유탄화수소들이 혼합되어 비수용성 액체로 존재하게 되면 세균들에 의한 분해에 영향을 미치게 된다(Xue *et al.*, 2015). 또한 원유나 그 증류물들의 조성이 다르기 때문에 이러한 혼합 석유탄화수소들에 대해 분리균주의 분해능 실험을 측정하였다. *A. calcoaceticus* SL1은 경유 1,000 mg/L을 7일간

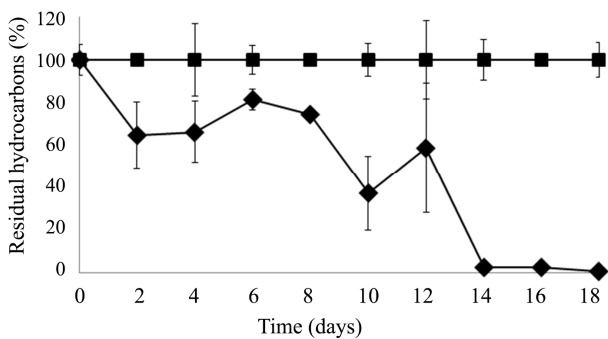


Fig. 4. Degradation of 10,000 mg/L of crude oil by *A. calcoaceticus* SL1 in MSM medium. Symbols: ◆, SL1; ■, uninoculated control.

82.2% 분해하였으며, 원유 10,000 mg/L에 대해서는 18일째에 99.5%를 분해하였는데(Fig. 4) 이는 Bayat 등(2016)의 BHA36 균주가 같은 농도의 원유를 15일째 75.62% 분해한 것과 Rahman 등(2002)의 세균 컨소시엄이 20일째에 78% 분해한 것보다 우수하였다. 균주의 이런 분해능은 플라스크 내의 배지에서만 나타나는 것이 아니라 경유 10,000 mg/L로 오염시킨 토양에서도 4주 동안 84%를 제거하였다(Fig. 5). 이는 *Pseudomonas* sp. 제네코-1 균주(Samsung Engineering Co., 2010)가 10,000 mg/L의 경유오염 토양에서 4주 간 67% 분해한 것보다 높은 분해능이었다.

생물계면활성제 생산능이 높은 *B. subtilis* GO9와 *B. amyloliquefaciens* S10을 표면 소수성이 높고 석유탄화수소 분해능이 우수한 *A. calcoaceticus* SL1과 각각 혼합하여 경유 10,000 mg/L에 대한 분해능을 측정하였는데, 배양 1일째에 SL1 + S10과 SL1 + GO9 혼합균주가 각각 46.1과 47.4%로 유사한 분해능을 보였으나 배양 3일째에 SL1 + S10 혼합균주가

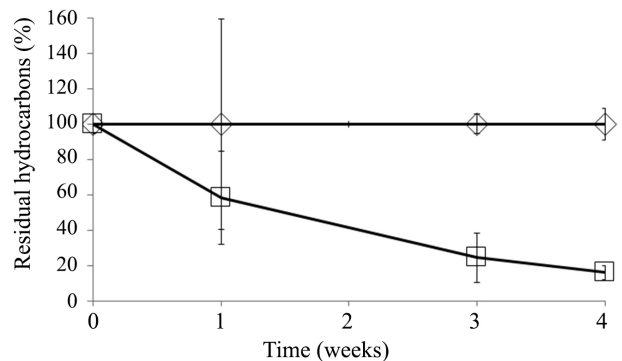


Fig. 5. Degradation of diesel oil by *A. calcoaceticus* SL1 in soil contaminated with 10,000 mg/L of crude oil. Symbols: □, SL1; ◇, uninoculated control.

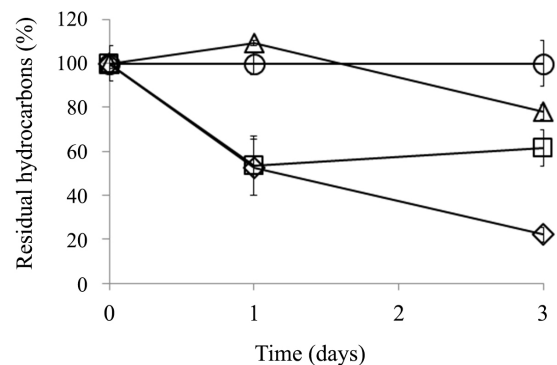


Fig. 6. Degradation of 10,000 mg/L of diesel oil by *A. calcoaceticus* SL1 and bacterial consortium in MSM medium. Symbols: △, *A. calcoaceticus* SL1; □, *A. calcoaceticus* SL1+*B. subtilis* GO9; ◇, *A. calcoaceticus* SL1+*B. amyloliquefaciens* S10; ○, uninoculated control.

77.8%를 분해한 반면 SL1 + GO9는 더 이상 분해하지 못하였다(Fig. 6). 동일 조건에서 SL1 + S10 혼합균주가 SL1 단독 처리보다 55.6% 더 높은 분해를 나타내었는데 균주의 혼합으로 상승효과가 일어난 것으로 추정되며, 생물계면활성제 생산 균주를 분해균주와 동시에 접종하였을 때 더 높은 탄화수소 분해능을 나타낸 이전의 보고들과 유사하였다(Oberbremer *et al.*, 1990; Dean *et al.*, 2001).

## 적 요

다른 탄화수소 분해 방법을 가진 여러 세균을 유류-오염 토양에서 분리하였다. *Acinetobacter calcoaceticus* SL1은 기름-분산 시험에서 계면활성제-생성능을 보였으며 경유와 *n*-hexane에 대해 각각 43.6과 54.5%의 유효활성을 나타내었다. 또한 높은 세포 표면 소수성을 가졌는데 이는 탄화수소에 쉽게 부착하여 그것을 분해할 수 있게 한다. 이 균주는 1,000 mg/L의 *n*-octadecane과 naphthalene을 3일 내에 100% 분해하였으며, 1,000 mg/L의 경우는 7일 동안 72.3%, 그리고 10,000 mg/L로 오염시킨 토양에서는 4주 간 78%를 제거하였다. 다른 분리균주 *Bacillus amyloliquefaciens* S10과 *B. subtilis* GO9는 생물계면활성제를 생산할 수 있으며 기름-분산 시험에서 각각 6.34와 2.5 cm 직경의 투명대를 형성하였다. 배양 중 그들의 배양 상등액은 표면장력이 74.6 mN/m으로부터 각각 34.4와 33.3 mN/m으로 감소하였으며, 배양 상등액의 critical micelle concentration은 각각 2.0과 5.9%이었다. *A. calcoaceticus* SL1과 *B. amyloliquefaciens* S10의 컨소시엄은 10,000 mg/L의 경우를 3일만에 77.8% 분해하였는데 이는 *A. calcoaceticus* SL1 단독에 의한 것보다 높은 분해능이었다. 만일 이 세균들을 유류-오염 부지에 컨소시엄으로 같이 처리한다면 높은 석유탄화수소 제거율을 나타낼 수 있을 것이다.

## 감사의 말

본 연구는 산학연협력기술개발사업(과제번호 C0331594)의 지원으로 연구되었음.

## References

- Bayat, Z., Hassanshahian, M., and Hesni, M.A. 2016. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* **105**, 120-124.
- Bordas, F., Lafrance, P., and Villemur, R. 2005. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. *Environ. Pollut.* **138**, 69-76.
- Chang, J.S., Radosevich, M., Jin, Y., and Cha, D.K. 2004. Enhancement of phenanthrene solubilization and biodegradation by trehalose lipid biosurfactants. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 2816-2822.
- Cohen, Y. 2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int. Microbiol.* **5**, 189-193.
- Dean, S.M., Jin, Y., Cha, D.K., Wilson, S.V., and Radosevich, M. 2001. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J. Environ. Qual.* **30**, 1126-1133.
- Edwards, D.A., Luthy, R.G., and Liu, Z. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* **25**, 127-133.
- Emtiazi, G., Saleh, T., and Hassanshahian, M. 2009. The effect of bacterial glutathione S-transferase on morpholine degradation. *Biotechnol. J.* **4**, 202-205.
- Fernandes, P.A.V., Arruda, I.R., Santos, A.F.A.B., Araujo, A.A., Maiors, A.M.S., and Ximenes, F.A. 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **38**, 704-709.
- Haritash, A. and Kaushik, C. 2016. Degradation of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by microorganisms isolated from contaminated soil. *Int. J. Environ. Sci.* **6**, 472-482.
- Hassanshahian, M. 2014. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Mar. Pollut. Bull.* **86**, 361-366.
- Keith, L.H. and Telliard, W.A. 1979. Priority pollutants I a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* **13**, 416-423.
- Korea University-Industry Cooperation Foundation. 2011. Enhanced oil degradation method by hydrocarbon degrading *Acinetobacter* sp. DR1. Korea Patent No. 1010659590000.
- Laha, S. and Luthy, R.G. 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **25**, 1920-1930.
- Laha, S. and Luthy, R.G. 1992. Effects of nonionic surfactants on the mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1367-1380.
- Liu, Y., Li, L., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L., Xu, L., Shen, Q., and Shen, B. 2010. Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene. *Bioresour. Technol.* **101**, 310-316.
- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 211-218.
- Oberbremer, A., Muhller-Hurtig, R., and Wagner, F. 1990. Effect of addition of microbial surfactant on hydrocarbon degradation in soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- 32, 485–489.
- Pruthi, V. and Cameotra, S.S.** 1997. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnol. Tech.* **11**, 671–674.
- Rahman, K., Rahman, T., Lakshmanaperumalsamy, P., and Banat, I.** 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* **85**, 257–261.
- Samsung Engineering Co.** 2010. Treatment of oil-contaminated wastes by oil-degrading *Pseudomonas* sp. Patent of Republic of Korea No. 1009980350000.
- Sifour, M., Al-Jilawi, M.H., and Aziz, G.M.** 2007. Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pak. J. Biol. Sci.* **10**, 1331–1335.
- Strand, S., Standnes, D.C., and Austad, T.** 2003. Spontaneous imbibition of aqueous surfactant solutions into neutral to oil-wet carbonate cores: effects of brine salinity and composition. *Energ. Fuel.* **17**, 1133–1144.
- Tam, N.F.Y., Guo, C.L., Yau, W.Y., and Wong, Y.S.** 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* **45**, 316–324.
- Tanase, A.M., Vassu, T., Csutak, O., Pelinescu, D., Robertina, I., and Stoica, I.** 2012. Phylogenetic analysis of oil polluted soil microbial strains. *Rom. Biotechnol. Lett.* **17**, 7093–7103.
- Wick, L.Y., de Munain, A.R., Springael, D., and Harms, H.** 2002. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 378–385.
- Xu, P., Ma, W., Han, H., Hou, B., and Jia, S.** 2014. Characterization of naphthalene degradation by *Streptomyces* sp. QWE-5 isolated from active sludge. *Water Sci. Technol.* **70**, 1129–1134.
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., and Wu, Y.** 2015. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: A review. *Curr. Microbiol.* **71**, 220–228.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., and McInerney, M.J.** 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **56**, 339–347.
- Zhang, Y. and Miller, R.M.** 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2101–2106.