Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2015;34(3):244-251. Korean
Published online 2015 September 25. http://dx.doi.org/10.5338/KJEA.2015.34.3.34

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

상용 휘발유로부터 분리한 다환 방향족 탄화수소(PAH) 분해 세균의 특성

권태형§, 우정희§, 박년호, 김종식*

경북해양바이오산업연구원

Characterization of PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)-Degrading Bacteria Isolated from Commercial Gasoline

Tae-Hyung Kwon§, Jung-Hee Woo§, Nyun-Ho Park and Jong-Shik Kim* (Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry, Uljin 36314, Korea)

Received: 27 July 2015 / Revised: 8 September 2015 / Accepted: 19 September 2015
Copyright ⓒ 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

BACKGROUND: Recent studies have described the importance of bacteria that can degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Here we screened bacterial isolates from commercial gasoline for PAH degraders and characterized their ability to degrade PAHs, lipids and proteins as well as their enantioselective epoxide hydrolase activity, salt tolerance, and seawater survival.
METHODS AND RESULTS: One hundred two bacteria isolates from commercial gasoline were screened for PAH degraders by adding selected PAHs on to the surface of agar plates by the sublimation method. A clear zone was found only around the colonies of PAH degraders, which accounted for 13 isolates. These were identified as belonging to *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Arthrobacter* sp., and *Gordonia* sp. based on 16S rRNA sequences. Six isolates belonging to *Corynebacterium* sp., 3 of *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. S49, and *Gordonia* sp. H37 were lipid degraders. *Arthrobacter* sp. S49 was the only isolate showing high proteolytic activity. Among the PAH-degrading bacteria, *Arthrobacter* sp. S49, *Brevibacterium* sp. S47, *Corynebacterium* sp. SK20, and *Gordonia* sp. H37 showed enantioselective epoxide hydrolase activity with biocatalytic resolution of racemic styrene oxide. Among these, highest enantioselective hydrolysis activity was seen in *Gordonia* sp. H37. An intrinsic resistance to kanamycin was observed in most of the isolates and *Corynebacterium* sp. SK20 showed resistance to additional antibiotics such as tetracycline, ampicillin, and penicillin.
CONCLUSION: Of the 13 PAH-degraders isolated from commercial gasoline, *Arthrobacter* sp. S49 showed the highest lipid and protein degrading activity along with high active epoxide hydrolase activity, which was the highest in *Gordonia* sp. H37. Our results suggest that bacteria from commercial gasoline may have the potential to degrade PAHs, lipids, and proteins, and may possess enantioselective epoxide hydrolase activity, high salt tolerance, and growth potential in seawater.

Key words: Biodegradation, Commercial gasoline, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH), PAH-degrading bacteria

§These authors contributed equally to this work
*Corresponding author: Jong-Shik Kim
Phone: +82-54-780-3451; Fax: +82-54-780-3469;
E-mail: soilmicrobiome@gmail.com

서 론

유류 오염지역 및 생태계 또는 토양 침전물에 존재하는 (Kim and Lee, 2008) 다환방향족탄화수소(PAHs; Polycyclic

aromatic hydrocarbons)는 유해한 물질로서 독성이 매우 강하며 발암성 유발물질로서 인간에게 위험요인이 될 뿐만 아니라 생태계를 파괴시킬 수 있기 때문에 점차 그 관심이 높아지고 있다(Wang *et al.*, 2000; Kallimanis *et al.*, 2007; Uyttebroek *et al.*, 2007). PAH는 탄소 고리수에 따라 저분자 물질과 고분자 물질로 나누어진다. 전자에는 naphthalene, phenanthrene 등이 있으며 후자에는 pyrene, anthrene, benzopyrene 등이 있고(Maccormack and Frail, 1997; Kanaly and Harayama, 2000; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003a, 2003b), 저분자 물질은 물에 대한 용해도가 크며 고분자 물질은 물에 대한 용해도가 작다(Moody *et al.*, 2001, 2004). 미국 환경 보호청(EPA)에서는 약 200여종의 PAH물질을 보고하였고, 이중 16가지 물질을 유해성이 있는 물질로 판정하고 있고(Alloy and Brown, 2000), 고리가 많을수록 자연계에서 분해가 어려워 해양생태계 및 인류환경에 큰 영향을 미친다(Schneider *et al.*, 1996). PAH 물질을 처리하는 방법은 물리적인 방법과 생물학적인 방법으로 나누며 이중 생물학적 복원 방법은 오염물질을 분해하는 능력을 이용하여 오염된 환경을 정화하는 방법으로 자연의 정화작용 원리를 공학적으로 활용하는 방법이다. 이는 PAH 분해능이 우수한 미생물을 인위적으로 오염현장에 접종시켜 분해를 향상시키는 방법이라고 할 수 있으며 많은 연구가 이루어지고 있다(Tiehm, 1994; Moody *et al.*, 2004; Kim and Freeman, 2005; Nichadhain *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007 Hilyard *et al.*, 2008). 본 연구에 사용된 상용 휘발유는 인간에게 수송, 저장, 운반 등의 연료로서 유용한 자원으로 많이 쓰이고 있으나 어떤 미생물이 생육하고 있는지, 어떤 특성을 가지고 있는지에 대한 보고는 되지 않고 있으며 비슷한 예로 등유를 이용한 생물학적 분해에 관한 연구가 보고 된 바 있는 정도이며(Hwang and Song, 1999), 휘발유에 대한 대부분의 연구는 휘발유 및 여러 원유의 배출 특성, 휘발유 경유, 등의 정성분석에 관한 연구이고 휘발유 주위의 토양이나 유류오염지역 및 해수에서 세균을 분리하여 PAH 분해에 관한 연구가 진행되어 왔다. 이에 본 연구에서는 상업적인 휘발유에서 세균을 분리하여 벤젠고리수가 3개 이하인 phenanthrene 같은 저분자 물질과 벤젠고리수가 4개 이상인 pyrene 등을 분해 할 수 있는 균주를 분리 및 동정하여 PAH 분해 특성을 조사하고 주된 오염 지역인 해양환경에서의 적용 여부를 통하여 미생물학적 복원에 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

샘플 채취 및 PAHs 사용

경북 울진군에 소재하고 있는 4곳의 주유소(SK, GS, Hyundai-oil bank, S-oil)에서 상용 휘발유를 1L 구입하였으며 시료로서 사용하였다. PAHs는 naphthalene, phenanthrene, pyrene (각 0.1%, Sigma Chemical Co., USA 순도 98% 이상)을 사용하였다.

균 분리 및 배양

울진군에 소재한 봉평, 죽변, 북면 지역의 주유소에서 샘플을 채취한 후 marine고체 (Difco2216) 배지에 100 μL씩 접종 후 도말 하였다. 배지 1 L에 대한 조성은 다음과 같다. peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric citrate 0.1 g, sodium chloride 19.45 g, magnesium chloride 8.8 g, sodium sulfate 3.24 g, calcium chloride 1.8 g, potassium chloride 0.55 g, sodium bicarbonate 0.16 g, strontium chloride 34 mg, boric acid 22 mg, sodium silicate 4 mg, sodium fluoride 2.4 mg, ammonium nitrate 1.6 mg, disodium phosphate 8 mg, agar 15 g이며, 28℃ 배양기에서 약 2주간 배양 하였다. 단일 균주 분리를 위해 3차 분리하여 독립된 개체를 얻었다.

PAHs 분해 테스트 및 동정

PAHs 분해 활성이 있는 균주 확인을 위해 승화법(Alley and Brown, 2000; Kwon *et al.*, 2010)을 이용하였으며, 고체 평판배지는 mineral salts agar (Alley and Brown, 2000) 또는 mineral medium (Seo *et al.*, 2006) 배지를 이용하였다. PAH 분해 활성 관찰은 28℃에서 5일 동안 진행하였고 투명환을 나타내는 균주를 최종 선별하여 본 연구에 사용하였다. PAH에 대해 분해 활성을 보인 13개의 균주를 16S rRNA 유전자의 분석을 통한 동정을 실시하였다. 분석은 ㈜마크로젠에 의해서 수행되었다. 얻어진 유전자는 DDBJ (DNA Data Bank of Japan)에 등록하였으며, accession numbers는 GU576168 (*Bacillus* sp. GS31), GU576169 (*Gordonia* sp. H37), GU576170 (*Brevibacterium* sp. S47), GU576171 (*Arthrobacter* sp. S49), GU576172 (*Corynebacterium* sp. SK20), LC068961 (*Micrococcus* sp. SK13), LC068962 (*Micrococcus* sp. SK22), LC068963 (*Micrococcus* sp. SK26), LC068964 (*Micrococcus* sp. SK57), LC068965 (*Micrococcus* sp. SK66), LC068966 (*Brevibacterium* sp. S6), LC068967 (*Micrococcus* sp. S29), LC068968 (*Micrococcus* sp. GS57)로 부여 받았다.

지질분해 활성 분석

지질분해 활성분석은 marine (Difco, USA) 배지에 tributyrate (tributyrin, TBN; C4; Sigma, USA) 1%를 첨가하여 배지와 골고루 섞이게 하여 균 접종 시 투명환을 보기 쉽게 하기 위해 sonication을 28~30℃에서 10~30분 하였다. 여기에 agar를 8 g 첨가하여 sonication 후 121℃ 15분간 멸균을 하였다. 지질분해 활성 관찰은 PAHs 분해 활성이 확인 된 균주를 접종하여 28℃에서 5일 동안 진행하였고 투명환을 나타내는 균주를 선별하였다.

단백질분해 활성 분석

단백질분해 활성 분석은 marine 배지에 skim milk (Difco, USA) 를 0.5%와 agar를 8 g 첨가하여 121℃ 15분간 멸균을 한 후 skim milk 배지를 제작했고, 단백질분해 활

성 관찰은 skim milk 배지에 PAHs 분해 활성이 확인 된 균주를 접종하여 28℃에서 5일 동안 진행하였고 투명환을 나타내는 균주를 선별하였다.

에폭사이드 가수분해 활성 분석

PAHs 분해 활성이 확인 된 균주를 marine 액체배지에 접종하여 28℃에서 3일간 배양 하였고 원심분리 후 균체를 얻어 생촉매로 사용하였다. 에폭사이드 가수분해 활성 반응은 각 균주의 균체 0.2 g과 4 mM의 라세믹스티렌옥사이드 (styrene oxide; Aldrich, USA) 기질을 1 mL의 50 mM 인산완충액(pH 8.0)에 현탁 시킨 후 28℃, 200 rpm에서 교반하면서 반응을 진행하였다. 반응 후 에폭사이드를 hexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 Gas Chromatography (GC; Agilent, USA)로 분석하였다. 분석에 사용한 칼럼은 베타-DEX 120 (Supelco, USA; 0.25 mm ID, 30 m length, 25 μm film thickness)을 사용하였으며, Gas Chromatography 조건은 문헌치를 이용하였다(Woo *et al.*, 2013).

항생제 분석

Chloramphenicol, streptomycin, ticarcillin, kanamycin, tetracycline, ampicillin, vancomycin, rifampin, penicillin, erythromycin 등 10가지의 항생제를 이용하였다. Marine 액체 배지에 미리 2일간 배양하여 활성화 시켜 연구에 사용하였다. Marine고체 배지에 4%의 액체배지 배양액을 접종하고 이 고체 배지에 항생제 테스트 디스크(BD, Antimicrobial susceptibility test discs)를 올려 놓으면 내성이 있는 균주는 투명환 형성을 하지 않고 항생제에 대해 내성이 없는 균주는 투명환 형성을 하는 것으로 측정하였으며, 접종 후 28℃에 배양하여 측정하였다.

염 내성 분석

PAH분해 미생물의 염내성 분석을 위하여 NaCl (0, 2, 5, 10, 15, 20%)함량을 다르게 하고 평판배지에 배양되어 있는 단일 균주를 한 백금이 취하여 액체 배양하여 활성화시켜 사용하였다. 즉, 50 mL의 marine 액체배지에 28℃에서 약 24시간 세균을 배양하여 배양액을 사용하였다. 96 well plate에 배지 180 μL에 배양액을 10 μL를 접종하고 배양하면서 Multiskan Spectrum 600 nm에서 측정하였다(Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

해수를 이용한 세균 생육 분석

상용휘발유로부터 분리된 PAH분해 미생물이 해수에 적용 할 수 있는지 여부를 판단하기 위하여 울진 지역에 위치한 후정 해수욕장 (경북 울진군 죽변면 위치), 망양정 해수욕장 (울진군 근남면 위치) 부근에서 해수를 취하여 여과한 후, 증류수 대신에 해수를 이용하여 marine 배지(Modified-marine medium)를 제조하여 PAH 분해 미생물의 생육분석을 측정하였다. 분리된 균주는 평판배지에 배양되어 있는 단일 균주를 한 백금이 취하여 액체 배양하여 활성화시켜 사용하였다. 즉, 50 mL의 marine 액체배지에 28℃에서 약 24시간 세균을 배양하여 배양액을 사용하였다. 96 well plate에 modified-marine 액체배지 180 μL에 배양액을 10 μL를 접종하고 20℃, 28℃에서 배양하면서 측정하였다. 또한 적은 영양분 함량에서의 균의 배양특성을 측정하기 위하여 modified-marine 액체배지를 수집한 해수로 10^{-1}, 10^{-2}으로 희석하여 균을 접종한 후 배양특성을 조사하였다.

Table 1. Bacterial isolation from commercial gasoline

Taxa	SK(42)	S[1](18)	H[2](18)	GS(17)	
Acinetobacter			1		1
Agrococcus			1		1
Arthrobacter		1			1
Bacillus	8	5	7	9	29
Brevibacterium	1	3	1		5
Corynebacterium	1			1	2
Curtobacterium	1				1
Enterobacter		4		1	5
Geobacillus	10				10
Gordonia			1		1
Knoellia	1				1
Kytococcus		1	1		2
Microbacterium			1		1
Micrococcus	8	2	1	1	12
Micromonospora			1		1
Oceanobacillus	1			1	2
Staphylococcus	18	2	2	2	24
Streptomyces	2			1	3
	51	18	17	16	102

S[1], S-oil; H[2], Hyundai-oil bank

결과 및 고찰

상용 휘발유로부터 균 분리 및 PAH 분해 세균 선별

상용 휘발유로부터 102 균주를 분리 하였는데, 분리한 균은 잘 생육되지 않았으며 colony의 발생률이 아주 작았다(Table 1). 약 20개의 plate를 만들 경우 1~2개의 colony가 분리되었고, 여러 종류의 배지(Difco Nutrient agar, Difco Tryptic soy agar, Difco LB agar)를 이용하여 균의 분리를 했으나 marine agar 배지에서 균의 성장이 가장 잘 이루어 졌다. 한편 PAH 분해는 승화법을 이용하였으며 약 200균주 중에 13균주가 PAH 분해 활성을 보였다. PAHs 물질은 낮은 용해도로 인해 환경에 존재하고 있는 탄화수소 분해 세균들도 기질로 이용하기 쉽지 않아 분해 속도가 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Hwang and Song, 1999). 또한 많은 연구에 의하면 PAHs 분해 활성이 있지만 저온에서는 생육이 힘들어 분해 활성을 나타내지 못하는 것으로 알려져 있

Table 2. Antibiotics resistance and tributyrin test of PAH-degrading bacteria

Resistance	C	S	Tic	K	Te	Am	Va	Ra	P	E	tributyrin
Micrococcus sp. SK13	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	
Corynebacterium sp. SK20	-	-	-	o	o	o	-	-	o	-	o
Micrococcus sp. SK22	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	
Micrococcus sp. SK26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micrococcus sp. SK57	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	o
Micrococcus sp. SK66	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	o
Bacillus sp. GS31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o	o
Micrococcus sp. GS57	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	
Brevibacterium sp. S6	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	
Micrococcus sp. S29	-	-	-	o	o	-	-	-	-	-	
Brevibacterium sp. S47	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	
Arthrobacter sp. S49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o
Gordonia sp. H37	-	-	o	-	-	o	-	-	o	-	o

C : chloramphenicol, S : streptomycin, Tic : ticarcillin, K : kanamycin, Te : tetracycline, Am : ampicillin, Va : vancomycin, Ra:rifampin, P : penicillin, E : erythromycin, o : no clear zone (antibiotic resistance), - : clear zone (no antibiotic resistance)

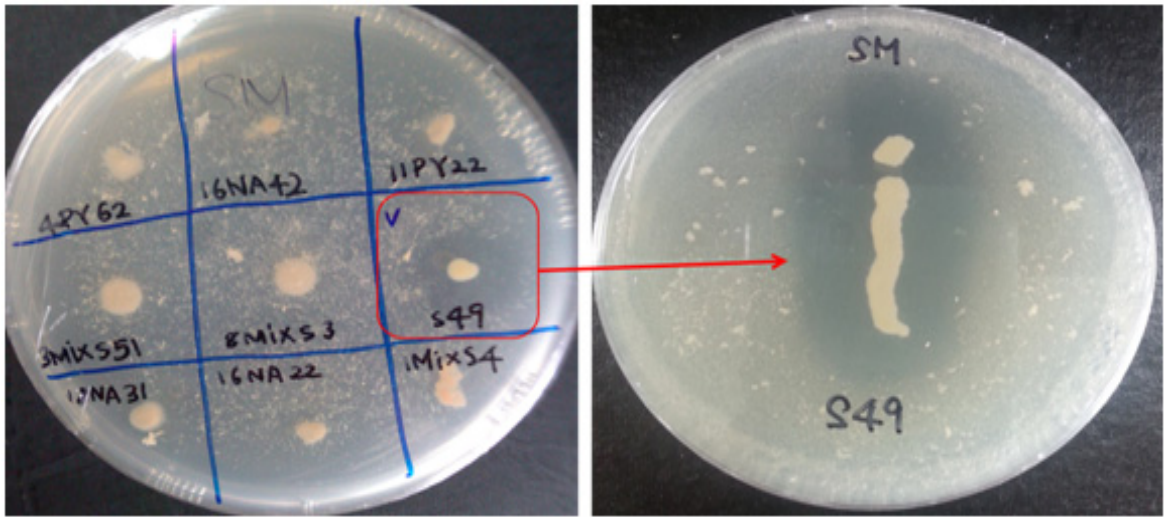

Fig. 1. Photos of protease producing bacteria (*Arthrobacter* sp. S49) by using skim milk agar plate.

다(Lee *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2010).

PAH 분해 균의 동정

PAH 분해력을 보인 13균주를 16S rRNA 유전자를 분석하였다. 13균주중 7균주가 *Micrococcus* sp. 이고 *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Gordonia* sp. 의 균주가 각 1균주, *Brevibacterium* sp.가 2균주 동정되었다. *Arthrobacter* sp.의 경우 PAH 중에 phenanthrene 분해에 관한 연구가 있으며(Samanta *et al.*, 1999), *Bacillus*의 경우 *Bacillus cereus*가 pyrene을 분해한다는 보고가 있다(Kazunga and Aitken, 2000).

지질분해 활성

지질분해 활성이 있는 저온성 미생물은 유류사고 시 화학약품을 이용한 유류 제거의 대안방법으로 인위적으로 살포해 친환경적인 환경 정화 방법으로도 이용하고 있다(Seo *et al.*, 2006). 13개의 균주 중 *Corynebacterium* sp. SK20, *Micrococcus* sp. SK57, SK66, GS31, *Arthrobacter* sp. S49, *Gordonia* sp. H37 총 6개 분리 균주에서 tributyrin (TBN) 분해 활성이 있었다(Table 2). Tributyrin의 경우는 지방의 분해능을 판단하기 위해 연구하였으며 해양의 선박이나 폐수 등으로 인하여 해양오염의 원인이 되고 있는 물질이며 분리 균주를 이용 분해능을 측정하였다. 실제로 디젤 오일

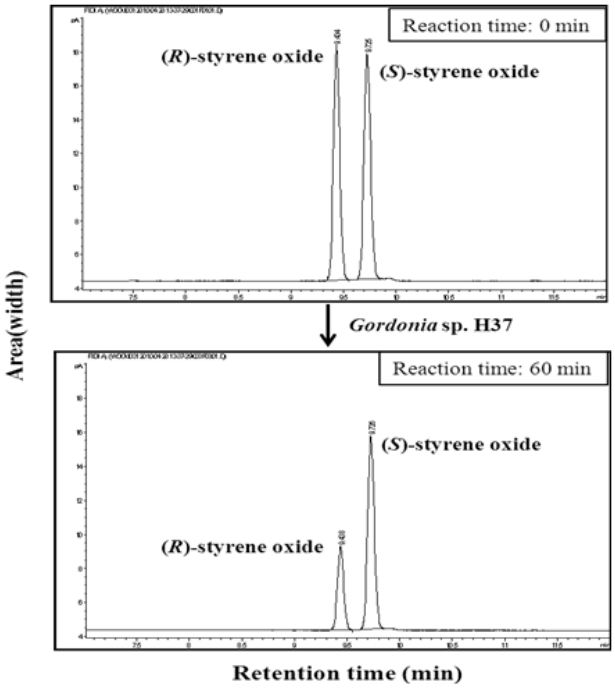

Fig. 2. The schematic representation of enantioselective hydrolysis of epoxide hydolase from *Gordonia* sp. H37 toward racemic styrene oxide (RSO) with GC analysis.

이나 바이오 디젤 오일 테스트를 위해 이용되고 있다(Janda-Ulfig *et al.*, 2000).

단백질분해 활성

단백질 분해효소는 전통적으로 식품의 가공과정에서 육질 연화와 발효음료 제조과정에서는 혼탁을 방지하고, 제약산업 분야에서는 소화제, 소염진통제로서, 또한 피혁산업, 세제산업 및 환경정화산업 등 여러 산업분야에서 널리 사용되고 있다(Kim, 2014). 단백질분해 활성은 13개의 균주 중에서 *Arthrobacter* sp. S49가 1일째부터 skim milk를 분해하여 투명환을 보이는 가장 높은 단백질분해 활성이 관찰되었다 (Fig. 1). 단백질분해 활성이 뛰어난 *Arthrobacter* sp. S49는 해수에서도 성장이 잘 되는 것으로 보아 양식장의 배출수 및 유기성 폐기물의 주된 성분인 단백질의 분해를 돕는 친환경적인 환경정화산업에 적용할 수 있을 것으로 사료되어 지속적인 연구가 필요하다.

에폭사이드 가수분해 활성

에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase, EHase) 바이오촉매를 사용하면 라세믹에폭사이드 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있으며, cofactor 재순환이 요구되지 않고, whole-cell biocatalyst로 사용할 수 있으며, 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 바이오촉매로 평가되고 있다. 광학활성 에폭사이드 제조에 활용할 수 있는 미생물 유래의 에폭사이드 가수분해 활성은 Gas Chormatography를 이용하여 측정할 수 있다(Woo and Lee, 2014). 13개 균주를 대상으로 라세믹스티렌옥사이드와 반응하고 헥산으로 추출을 시킨 후, 에폭사이드가 있는 유기용매층을 Gas Chromatography로 분석한 결과, *Arthrobacter* sp. S49, *Brevibacterium* sp. S47, *Corynebacterium* sp. SK20, 그리고 *Gordonia* sp. H37에서 광학활성 에폭사이드 가수분해 활성을 보였다. 특히, *Gordonia* sp. H37 는 1시간 반응에 4 mM 라세믹스티렌옥사이드(2 mM (*R*)-styrene oxide와 2 mM (*S*)-styrene oxide)를 광학선택적으로 분해하여 (*R*)-styrene oxide와 (*S*)-styrene oxide는 각각 0.66 mM과 1.60 mM이 남게 되었다. 이 결과로 *Gordonia* sp. H37 는 (*R*)-form의 에폭사이드를 먼저 분해하는 광학선택적 에폭사이드 가수분해 활성이 관찰되었다(Fig. 2). 미생물에 의한 다환방향족탄화수소(PAHs)의 대사과정에는 monooxygenase에 의해 에폭사이드가 형성되고 에폭사이드 분해를 위해 에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase)가 존재하게 된다(Bezalel *et al.*, 1997). 위 내용에 맞게 찾아진 PAHs 분해 균주에서도 에폭사이드 가수분해 활성을 볼 수가 있었고 그 중에서도 산업적으로 이용 가능성이 높은 광학활성에폭사이드를 제조 할 수 있는 균주를 찾게 되어 생촉매로서의 이용 가능성이 기대된다.

항생제 내성 특성

PAHs 분해능을 가진 13개 균주를 이용하여 항생제 분석을 하였다. 균 마다 항생제에 대한 내성을 알아보기 위해 측정하였으며 분석 결과 *Corynebacterium* sp. SK20가 다양한 항생제에 대한 내성이 강한 것으로 측정되었으며 kanamycin, tetracycline, ampicillin, penicillin 4가지 종류에 대해서 내성이 있는 것으로 판단되었고, *Gordonia* sp. H37의 경우 3가지 종류에 대해 내성이 있는 것으로 조사되었으며 대부분의 균주가 kanamycin에 대해서는 내성을 가지고 있었다(Table 2). 항생제 분석의 경우 분리 균주의 생리적 활성을 보고자 연구하였으며 순천만 갈대 근권 토양으로부터 분리한 PAH 분해세균의 특성 분석 연구를 보면 *Burkholderia* sp. 와 *Alcaligenes* sp.는 다양한 PAHs를 분해하였고, *Burkholderia* sp.의 경우 chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracyclin을, *Alcaligenes* sp.는 ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracyclin에 대하여 항생제 내성을 가지는 것으로 보고하고 있다 (Kim *et al.*, 2005). Meguro *et al.* (2005) 에 의하면 유기용매 내성과 약제 내성에 관여하는 배출펌프가 세포내에 내재하고 있음을 보였는데, 본 연구에서도 상용휘발유에서 분리한 세균들에 있어서도 항생제 내성을 보였다. 이는 유기용매 내성과 항생제 내성이 깊은 관련성이 있을 가능성을 시사한다.

염 내성 특성

본 연구에서는 균의 증식에 영향을 미치는 인자 중 하나인 식염 함량에 따른 균의 성장변화를 측정하였다. 즉, 96 well

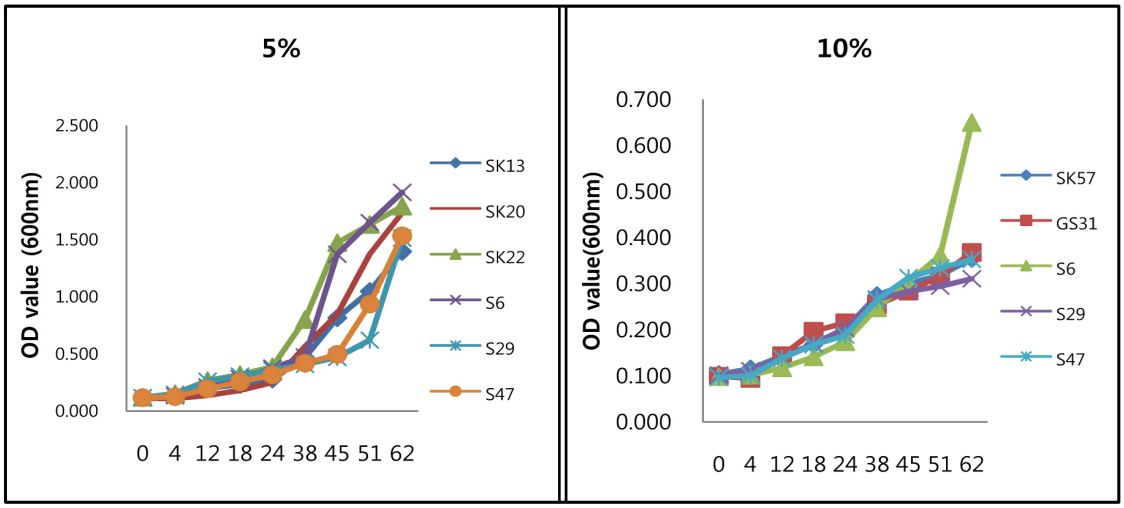

Fig. 3. Effect of salt concentration on survival of PAH-degradation bacteria.

Table 3. Effect of salt concentration and temperature on survival of PAH-degrading bacteria in seawater.

Incubation and temperature	after 2 days						after 4 days					
	20℃			28℃			20℃			28℃		
	A[1)]	B[2)]	C[3)]	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Micrococcus sp. SK13	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Corynebacterium sp. SK20	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Micrococcus sp. SK22	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Micrococcus sp. SK26	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Micrococcus sp. SK57	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Micrococcus sp. SK66	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Bacillus sp. GS31	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Micrococcus sp. GS57	-	-	-	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Brevibacterium sp. S6	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Micrococcus sp. S29	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Brevibacterium sp. S47	-	-	+	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Arthrobacter sp. S49	-	-	-	+	+	++	-	-	++	++	++	++
Gordonia sp. H37	-	-	--	-	-	-	-	-	++	++	++	++

-: no growth, +: good growth, ++: very good growth
[3)]: Sea water only, [4)]: 1x1/10 marine medium, [5)]: 1x1/100 marine medium

plate에 배지 180 μL에 배양액을 10 μL를 접종하고 배양하면서 600 nm에서 O.D.값을 측정하였다. 상용 휘발유에서 분리한 균 중 PAH 분해능이 있는 13개 균주에 대하여 염 내성 분석을 하였다. 염 농도는 0, 2, 5, 10, 15, 20%로 조절하였고, 그 결과 13개의 균주가 0-2% 농도에서 O.D.값이 48시간 후에는 0.5 이상으로 균이 잘 자랐으며, 10%의 높은 농도에서는 *Brevibacterium* sp. S6이 가장 잘 성장하였다(Fig. 3). 염 농도가 낮은 상태뿐만 아니라 염 농도가 높은 곳에서도 잘 자라는 것으로 보아 내성이 강하다고 생각되며 대부분의 균이 높은 염의 농도에서도 균의 성장률이 높았다. 이로 인해 분리한 균의 특성은 염의 내성이 높은 곳에서도 활발한 증식을 할 것으로 사료된다.

해양 오염에 대한 유류의 분해 및 적응력을 분석하기 위하여 증류수 대신 채취한 곳이 다른 각각의 해수를 이용하여 실험하였다. 염 농도 및 온도는 탄화수소의 이용에 영향을 미치는데 세균의 경우 30℃에서는 쉽게 성장 할 수 있지만 4℃에서는 이용이 쉽지 않다. 반면 낮은 온도에서 *Acinetobacter*와 *Pseudomonas* 두 속은 잘 자라는 것으로 알려져 있고 원유를 잘 분해하는 것으로 알려져 있으며 탄화수소만으로도 생존 할 수 있다고 보고된바 있다(Lee *et al.*, 2008).

해수를 이용한 세균 생육

배지농도를 달리하고 채취한 곳이 다른 해수를 첨가하여 세균의 성장 유무를 측정하였으며 *Micrococcus* sp. SK26, *Arthrobacter* sp. S49는 1/10 marine 배지에서 잘 성장하였으며 나머지 균주들은 marine 배지에서 균이 잘 성장하였다(Fig 4). 한편 채취한 해수의 온도는 각각 25, 23℃이었고, pH는 7.54, 8.02로 측정되었다. 온도에 따른 변화에서는 20℃ 보다는 28℃에서 성장이 비교적 빨랐으며 낮은 농도의 배지 첨가 및 배지를 첨가하지 않은 실험에서도 균의 성장이 이루어져 13균주는 해양에 적용하는 것은 문제가 없을 것으로 보이나(Table 3), 해수 온도가 낮으면 영향을 끼칠 수도 있을 것으로 사료된다.

바다 환경의 독성, 수온, pH, 산소 등은 생물정화에 큰 영향을 끼친다. 그 중 수온은 미생물의 활성에 큰 영향을 주며 이러한 이유로 찬 바닷물에서의 유류분해가 따뜻한 바닷물에 비해 어려운 것으로 알려져 있다. 실제로 이러한 이유로 현장 적응에 한계가 있다(Kwon *et al.*, 2010).

결 론

본 연구는 상용 휘발유로부터 균을 분리하여 PAH의 분해 미생물을 탐색하고 분해 미생물의 특성을 살펴보았다. 그 결과 PAH 분해 활성이 있는 13개의 균주가 분리되었으며 13균주중 7균주가 *Micrococcus* sp. 이고 *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Gordonia* sp.이 각 1균주, *Brevibacterium* sp.가 2균주로 동정되었다. 지질분해균은 *Corynebacterium* sp. SK20, *Micrococcus* sp. SK57, SK66, GS31, *Arthrobacter* sp. S49, *Gordonia* sp. H37 총 6개의 분리 균주에서 지질 분해 활성이 있었다. 단백질 분해균은 *Arthrobacter* sp. S49가 강력한 단백질 분해 활성이 관찰되었다 (Fig. 2). 에폭사이드 가수분해 활성균은 *Arthrobacter* sp. S49, *Brevibacterium* sp. S47. *Corynebacterium* sp. SK20, 그리고 *Gordonia* sp. H37 이 광학활성 에폭사이드 가수분해 효과를 보였다. 그중에서 특히 *Gordonia* sp. H37은 라세믹스티렌옥사이드에 대한 뛰어난 광학선택적 에폭사이드 가수분해 활성이 관찰되었다 (Fig. 3). 염 내성 테스트에서는 10%의 높은 농도에서는 *Brevibacterium* sp. S6가 가장 잘 자랐다. 그러나 실질적인 오염시 온도 등에 의하여 미생물에 의한 방제가 힘든 것으로 알려져 본 연구에서는 증류수대신 해수를 이용하여 세균의 생육 조건을 살펴보았다. 배지의 농도를 달리하고 각각의 해수를 달리하여 세균의 성장을 측정하였으며 그 결과 배지의 농도를 달리 했을 경우 *Micrococcus* sp. SK26, *Arthrobacter* sp. S49는 0-2% 농도에서 가장 잘 생육하였으며 온도가 20℃ 보다는 28℃에서 세균성장이 비교적 빨랐으며 낮은 농도 및 배지를 첨가하지 않은 실험에서도 세균의 성장이 이루어져 이 13개 균주는 해양에 적응 가능할 것으로 생각되며, 이런 결과를 토대로 볼 때 이들 균주들은 추후 실증검증을 거쳐서 오염현장에서의 생물학적 처리에 활용되기를 기대한다.

Acknowledgment

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. NRF-2014R1A2A1A11052888).

References

Alley, J. F., & Brown, L. R. (2000). Use of sublimation to prepare solid microbial media with water insoluble substrates. Applied and Environmental Microbiology. 66(1), 439–442.

Bezalel, L., Hadar, Y., & Cerniglia, C. E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradationby the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 63(7), 2495-2501.

Hwang, S. S., & Song, H. G. (1999). Biodegradation of pyrene in marine environment. Korean Journal of Microbiology. 35(1), 53-60.

Hilyard, E. J., Jones-Meehan, J. M., Spargo, B. J., & Hill, R. T. (2008). Enrichment, isolaton, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria form Elizabeth river sediments. Applied and Environmental Microbiology. 74(4), 1176-1182.

Janda-Ulfig, K., Ulfig, K., Cano, J., & Guarro, J. (2008). A study of the growth of *Pseudaallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources of tributyrin, rapeseed oil, biodiesel oil and diesel oil. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 15(1), 45-49.

Kallimanis, A., Frillingos, S., Drainas, C., & Koukkou, A. I. (2007). Taxonomic identification, phenantrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. Applied and Environmental Microbiology. 76(3), 709–717.

Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Journal of Bacteriology. 182(8), 2059-2067.

Kazunga, C., & Aitken, M. D. (2000). Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 66(5), 1917–1922.

Kim, G. E. (2014). Isolation of protease producing microorganisms. Journal of Korean Society of Environmental Engineering. 36(4), 265-270.

Kim, J. Y., & Lee., S. S. (2008). Biodegradation of kerosene by *Pseudomonas aeruginosa* K14. Korean Journal of Microbiology. 44(2), 156-163.

Kim, J. Y., Hu, C. G., Lee, M. G., & Kam, S. G. (2003a). Photodegradation of pyrene, chrysene and benzo[a]pyrene in water. Journal of Environmental Sciences. 12(3), 337-344.

Kim, S. J., Kwon, O., Jones, R.C., Freeman, J.P., Edmondson, R.D., & Cerniflia, C.E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. Journal of Bacteriology. 189(2), 464-472.

Kim, S. H., Kang, S. M., Oh, K. H., Kim, S. I., Yoon, B. J., & Khang, H. Y. (2005) Characterization of PAH-Degrading bacteria from soils of reed rhizosphere in Suncheon bay using PAH consortia. Korean Journal of Microbiology. 41(3), 208-215.

Kim, T. J., Jo, G. S., & Ryu, H. U. (2003b). Degradation of phenanthren and pyrene by *Burkholderia* sp. D5. Korean Journal of Microbiology. 39(4), 267-271.

Kim, Y. H., & Freeman., J. P. (2005). Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium* vanbaalenii PYR-1. Applied Microbiology and Biotechnology. 67(2), 275-285.

Kwon, T. H., Kim, J. T., & Kim, J. S. (2010). Application of a modified sublimation method to screen for PAH-degrading microorganisms. Korean Journal of Microbiology. 46(1), 109-111.

Lee, E. J., Lee, S. M., Lee, G. T., Kim, I. S., & Kim, Y. H. (2008). Application of effective microorganisms for bioremediation of crude oil spill in Taean. Journal of Environmental Sciences. 17(7), 795-799.

Maccormack, W.P., & Frail, E.R. (1997). Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. Antarctic Science. 9(2), 150-155.

Meguro, N., Kodama, Y., Gallegos, M. T., & Watanabe, K. (2005). Molecular characterization of resistance-nodulation-division transporters from solvent-and drug-resistant bacteria in petroleum-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology. 71(1), 580–586.

Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., & Cerniglia, C. E. (2001). Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 67(4), 1476–1483.

Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P., & Cerniglia, C. E. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 70(1), 340–345.

Nichadhain, S. M., Norman, R. S., Pesce, K. V., Kukor, J. J., & Zylstra, G. J. (2006). Mirobial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. Applied and Environmental Microbiology. 72(6), 4078–4087.

Samanta, S. K., Chakraborti, A. K., & Jain, R. K. (1999). Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. Applied Microbiology and Biotechnology. 53(1), 98-107.

Schneider. J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., & Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a] anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. Applied and Environmental Microbiology. 62(1), 13-19.

Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E., & Li, Q. X. (2006). Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: initial 1,2- and 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. Chemosphere. 65(11), 2388-2394.

Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Applied and Environmental Microbiology. 60(1), 258–263.

Uyttebroek, M., Vermeir, S., Wattiau, P., Ryngaert, A., & Springael, D. (2007). Characterization of cultures enriched from acidic polycyclicaromatic hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. Applied and Environmental Microbiology. 73(10), 3159–3164.

Wang, R. F., Wennerstrom, D., Cao, W., Khan, A. A., & Cerniglia, C. E. (2000). Cloning, expression, and characterization of the *katG* gene, encoding catalase-peroxidase, from the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 66(10), 4300–4304.

Woo, J. H., & Lee, E. Y. (2014). Enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide and its substituted derivatives using newly-isolated *Sphingopyxis* sp. exhibiting a novel epoxide hydrolase activity. Biotechnology Letters. 36(2), 357-362.

Woo, J. H., Kwon, T. H., Kim, J. T., Kim, C. G., & Lee, E. Y. (2013). Identification and characterization of epoxide hydrolase activity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria for biocatalytic resolution of racemic styrene oxide and styrene oxide derivatives. Biotechnology Letters. 35(4), 599-606.