

다환 방향족 탄화수소(PAH) 분해 미생물 탐색을 위한 승화법의 개발

권태형 · 김준태 · 김종식*
경북해양바이오산업연구원

Application of a Modified Sublimation Method to Screen for PAH-Degrading Microorganisms

Tae-Hyung Kwon, Jun-Tae Kim, and Jong-Shik Kim*

Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry (GIMB), Uljin 767-813, Republic of Korea

(Received February 4, 2010/Accepted March 11, 2010)

Recent studies have described various microorganisms that can degrade PAH, however, there are currently limited methods available to screen for PAH-degrading microorganisms. To screen for PAH-degrading microorganisms, a sublimation method (Alley, Jeremy F. and Lewis R. Brown. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 439-442) was modified to produce a simple screening system. In our results, there were several bacterial species capable of pyrene degradation including genera, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, and *Streptomyces*, which have been screened from 350 bacterial isolates of commercial gasoline and oil-spilled sediment by the sublimation method. The main advantage of this method is that it (i) safely deposits an even, thin and visible layer of PAH onto the agar surface without the use of solvents and (ii) the quantity of PAH sublimed onto the agar can be easily controlled. Overall, this sublimation method may be an effective and simple technique to screen for PAH-degrading microorganisms.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), PAH-degrading microorganisms, sublimation method, screening

PAH는 2개 이상의 벤젠고리가 중합된 방향족 탄화수소를 의미하며 환경 내의 어디에나 분포하는 오염물질로서 주로 산업공정에서 발생되어 점차 그 양이 증가하고 있다. PAH는 물에 대한 용해도가 낮고 유기물이나 미립자에 대한 흡착도가 높아 육상 및 해양 퇴적물에 높은 농도로 축적되며 분해가 잘 되지 않는 난분해성 물질이다. 또한 PAH는 독성이 매우 강하고 발암성, 돌연변이 유발물질로서 인간에게 위험요인이 될 뿐만 아니라 생태계를 파괴시킬 수 있기 때문에 점차 그 관심이 높아지고 있다(6, 9, 10). 이에 PAH에 대한 연구는 오염된 환경으로부터 이를 제거하는데 초점을 맞추어 진행되어 왔고, 최근 미생물들이 자연환경 내에서 PAH의 전환과 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 PAH를 분해하는 미생물의 탐색 및 이를 활용하고자 하는 노력들이 많이 시도되고 있다. 특히 단일 균주뿐만 아니라 복합 균주를 이용하여 PAH를 분해하는 생물학적정화(bioremediation)가 많이 연구되고 있다(4).

PAH를 분해할 수 있는 미생물을 탐색하기 위한 방법으로 1982년 분무법이 활용되었고(7), 이후 2010년 1월 현재 213회 인용되어 그 사용빈도가 높아졌지만(3, 5), PAH를 유기용매에 용해시켜 직접 미생물에 분무하기 때문에 미생물 생장에 영향을 준다. 또한 정확한 분석에 있어서 분무법의 경우 사용되는 PAH의 양을 조절할 수 없다는 단점이 있다. 다른 PAH 분해 미생물 탐색방법으로는 1992년 한천증증법이 활용되었고(2), 이후 86회 인용되었으며, 이는 PAH를 유기용매에 용해시켜 시료를 포함하는 액체 한천배지와 혼합한 후 이미 제조된 고체 평판배지 위에 부어 굳히고 일정시간 배양 후 미생물을 선별하는 방법으로서 이 또한 유기용매의 영향으로 미생물의 생장을 저해하고 분무법에 비해 투명한 형성이 뚜렷하지 않은 단점이 있다.

승화법은 불용성의 PAH를 열에 의해 승화시켜 시료가 도말된 고체평판배지 표면에 흡착시키고 일정시간 배양 후 투명한 형성을 하는 균주를 PAH 분해 미생물을 선별하는 방법으로서, 기존의 분무법과 한천증증법에 비해 유기용매를 사용하지 않

* For correspondence. E-mail: jskim@gimb.or.kr; Tel: +82-54-780-3451; Fax: +82-54-780-3469

Table 1. Bacteria able to degrade PAH by sublimation method

Sampling site	Sample	Bacteria showing a clear zone on agar plate containing the PAH	GenBank accession no.
Gas stations (Ulsan, Korea)	Commercial gasoline	<i>Corynebacterium</i> sp. SK20 ^{a,b,c}	GU576172
		<i>Bacillus</i> sp. GS31 ^a	GU576168
		<i>Gordonia</i> sp. H37 ^{a,c}	GU576169
		<i>Brevibacterium</i> sp. S47 ^a	GU576170
		<i>Arthrobacter</i> sp. S49 ^{a,b}	GU576171
Oil-contaminated site (Taean, Korea)	Sediment	<i>Rhodococcus</i> sp. TA24 ^{a,b,c} <i>Streptomyces</i> sp. TA27 ^{a,b,c}	GU576173 GU576174

^a Naphthalene-degrading bacteria

^b Phenanthrene-degrading bacteria

^c Pyrene-degrading bacteria

아 안전하고 조작성이 쉬우며 탐색 배지에 PAH를 고르게 분포시킬 수 있어 보다 개선된 방법으로 PAH 분해 미생물을 탐색할 수 있다.

승화법은 위의 두 탐색방법의 단점을 보완하기 위하여 이용되었으며(1), 두 개의 알루미늄 접시와 시료가 적용된 고체 평판배지[mineral salts agar (MSA)(1); KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.38 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, FeCl₃ · 6H₂O 0.05 g, agar 17 g, pH 7.0 또는 mineral medium (MM)(8); Na₂HPO₄ 3.58 g, NaCl 2.32 g, KCl 0.15 g, NH₄Cl 0.54 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.04 g, 미량원소용액 10 ml, agar 17 g, pH 7.0], 온도계, 모래를 담을 수 있는 내열성 패트리 디쉬로 구성된다.

PAH 분해능이 우수한 미생물을 찾기 위하여 승화장치를 hood 안에 넣고 다음과 같이 수행하였다. 핫플레이트 위에 내열성 상자(280 mm×200 mm×50 mm, ㈜대한과학)를 놓고 그 안에 체눈 크기가 1.7 mm인 체를 통과시킨 모래(1.8 kg)를 채웠다. 그 위에 시험하고자 하는 PAH가 담긴 알루미늄 접시가 반 정도 묻힐 정도로 놓은 후 시험하고자 하는 균주를 미리 접종 및 배양시킨 고체 평판배지를 뒤집어서 놓으면 PAH가 열에 의해 승화되어 배지에 흡착되는데, 열에 의해 패트리 디쉬

(㈜녹십자)가 깨어지는 것을 방지하기 위하여 얼음을 첨가한 알루미늄 접시를 배지 위에 올린다(Fig. 1). 본 연구에서 일체형 승화 장치를 제안하였으며, 재현성있는 장치가 기능함을 입증하였다. PAH 분해 활성 관찰은 28°C에서 5일 동안 진행하였고 투명환을 나타내는 균주들을 최종 선별하였다(Fig. 2).

PAH는 naphthalene, phenanthrene, pyrene (각 0.1%, Sigma Chemical Co., USA)을 각각 80°C, 100°C, 150°C의 녹는점에서 1분 30초, 6분, 7분 동안 열을 가하여 승화시킴으로써 균주가 배양된 최소배지에 흡착시켰다. 사용한 균주는 상용 휘발유와 태안 유류오염 지역 퇴적물로부터 Marine agar (Difco 2216) 배지를 사용하여 주입 평판법(Pour-plate method)으로 분리된 것들 중, 350균주를 승화법에 적용하여 최종 7균주로부터 투명환을 관찰할 수 있었다(Table 1). 특히 *Corynebacterium* sp. SK20, *Rhodococcus* sp. TA24, *Streptomyces* sp. TA27은 pyrene, phenanthrene, naphthalene에 분해능을 보였으며, *Gordonia* sp. H37은 pyrene, naphthalene, *Arthrobacter* sp. S49는 naphthalene, phenanthrene에 분해활성을 보였다.

본 논문에서는 유기용매를 사용하지 않고 안전하고 조작성이 쉬우며 최소 배지에 PAH를 고르게 분포시킬 수 있어 보다 개선된 방법으로 PAH 분해 미생물을 탐색할 수 있는 승화법을

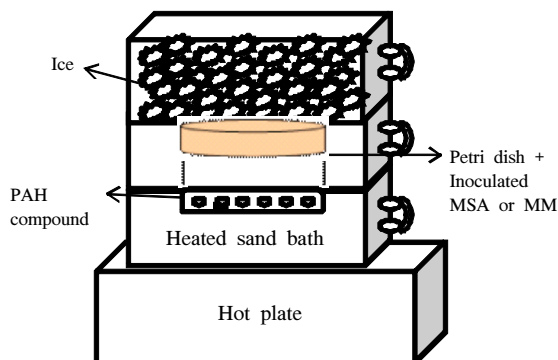


Fig. 1. A schematic drawing of modified sublimation system. The PAH to be sublimated and an inverted agar plate containing inoculated MSA (or MM) media was set onto a heated sand box, while the inverted agar plate was cooled by an upper box containing ice during sublimation. The sand bath was placed on a thermostatically controlled hot plate.

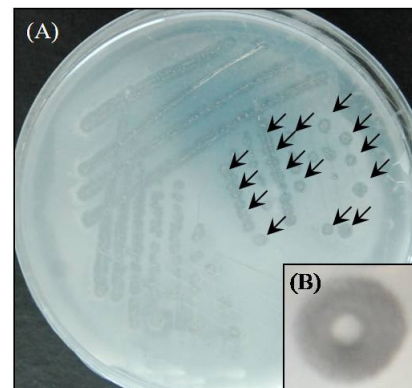


Fig. 2. PAH-degrading activity. (A) After incubation at 28°C for 5 days, clearing zones (arrows) were formed around colonies that degraded PAH. (B) The presence of clearing zones was more evident after more incubation.

소개하였다. 이는 PAH에 따라 승화조건이 다르기 때문에 각각의 PAH를 같은 장치에서 유사한 조건으로 승화시킬 수 있다면 좀 더 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

적요

다환 방향족 탄화수소(PAH; polycyclic aromatic hydrocarbon)는 발암성, 돌연변이 유발성, 유전독성을 지니기 때문에 인체위해성이 큰 물질로 알려져 있다. 기존 PAH 분해 미생물 탐색 방법중 독성이 강한 유기용매에 PAH를 용해시켜 미생물에 직접 분무하는 분무법, 미생물과 직접 혼합하는 한천중층법은 미생물 생장에 영향을 줄 뿐만 아니라, 특히 많이 쓰이는 분무법의 경우 분무되는 PAH의 양을 조절하기가 어렵고 멸균 상태를 유지하기가 힘들다는 단점이 있다. 그래서 본 논문에서는 이와 같은 단점을 보완한 방법으로 승화법(Alley, Jeremy F. and Lewis R. Brown. 2000. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 439-442)을 도입하여 적용하였다. 그 결과 상용휘발유 및 태안유류유출지 시료로부터 분리한 350분리균주 중에서 7균주가 단일 PAH 또는 복수의 PAH 분해에 관여했다. 특히 *Corynebacterium* sp. SK20, *Rhodococcus* sp. TA24, *Streptomyces* sp. TA27은 시험한 pyrene, phenanthrene, naphthalene에, *Gordonia* sp. H37는 pyrene, naphthalene에, *Arthrobacter* sp. S49는, naphthalene, phenanthrene에 활성이 있었다.

감사의 말

본 연구는 2009년 경상북도와 울진군의 지원 하에 경북해양 바이오산업연구원에서 연구되었습니다. 연구 지원에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Alley, J.F. and L.R. Brown. 2000. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 439-442.
2. Bogardt, A.H. and B.B. Hemmingsen. 1992. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2579-2582.
3. Grosser, R.J., M. Friedrich, D.M. Ward, and W.P. Inskeep. 2000. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2695-2702.
4. Hwang, S.S. and H.G. Song. 1999. Biodegradation of pyrene in marine environment. *Kor. J. Microbiol.* 35, 53-60.
5. Hilyard, E.J., J.M. Jones-Meehan, B.J. Spargo, and R.T. Hill. 2008. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1176-1182.
6. Kallimanis, A., S. Frillingos, C. Drinas, and A.I. Koukkou. 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 709-717.
7. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 454-457.
8. Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258-263.
9. Uyttbroeck, M., S. Vermeir, P. Wattiau, A. Ryngaert, and D. Springael. 2007. Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3159-3164.
10. van Hamme, J.D., A. Singh, and O.P. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 503-549.