(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0050095
(43) 공개일자 2010년05월13일

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0109220
(22) 출원일자 2008년11월05일
심사청구일자 2008년11월05일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
박혜림
경기도 부천시 원미구 중2동 위브더스테이트 103동 306호
박선화
서울특별시 서대문구 홍제4동 인왕산현대아파트 103동 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 네오사르토리아 속 미생물, 이를 이용한 유류 및 중금속 오염 토양 정화방법

(57) 요 약

본 발명은 네오사르토리아 속 미생물, 이를 이용한 유류 또는 중금속 오염 토양 정화방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 서열목록 1의 염기서열을 가지는 미생물 *Neosartorya* sp. BL4 (KCCM10954P) 및 중금속에 내성을 갖는 상기 미생물을 이용하여 유류 및 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 분리한 *Neosartorya* sp. BL4 균주는 고농도의 중금속에 내성을 가지고 있어 고농도의 석유계 탄화수소를 분해할 수 있고, 유류의 탄소원을 먹이로 이용하여 분해하므로 저분자 및 고분자의 석유계 탄화수소의 분해가 모두 가능한 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이은희

서울특별시 구로구 구로1동 1259 구일우성아파트 201동 703호

조경숙

서울 서초구 방배본동 764-16 서래빌딩 501호

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 1의 염기서열을 가지는 미생물 *Neosartorya* sp. BL4 (KCCM10954P).

청구항 2

제 1항의 미생물 *Neosartorya* sp. BL4균주를 이용하여 중금속 및 유류로 혼합 오염된 토양에서 유류의 정화 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 중금속은 비소, 카드뮴, 구리 및 납을 포함하는 것인 정화방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 유류는 저분자 또는 고분자 석유계 탄화수소를 포함하는 정화 방법.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 중금속 또는 유류는 고농도인 것을 특징으로 하는 정화 방법.

청구항 6

제 2항에 있어서, 25 ~ 50℃의 온도에서 제 1항의 미생물과 토양을 반응시키는 정화 방법.

청구항 7

제 2항에 있어서, pH 5 ~ 7의 범위에서 제 1항의 미생물과 토양을 반응시키는 정화 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 네오사르토리아 속 미생물, 이를 이용한 유류 및 중금속 오염 토양 정화방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 서열목록 1의 염기서열을 가지는 미생물 *Neosartorya* sp. BL4 (KCCM10954P) 및 중금속에 내성을 갖는 상기 미생물을 이용하여 유류 및 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 산업현장 곳곳에서 다량으로 배출되어 환경으로의 유입이 가속화되고 있는 중금속은 토양 입자 등에 강력하게 흡착하여 독성이 적은 물질로 분해되거나 안정화되지 않고 장기간 체류하여 생태계 내에 고농도로 축적된다 (Rajkumar et al., 2005 Chemosphere 62, 741-748). 이러한 환경 내 중금속은 먹이사슬을 통해 생물체 내 고농도로 축적되어 DNA 손상이나 암 등의 문제를 일으키며, 토양 미생물의 여러 가지 효소 활성, 세포막의 기능

장애 그리고 핵산의 손상을 야기하는 등의 독성을 가지고 있다 (Beveridge and Doyle, 1989 Metal ions and bacteria. John Wiley and Sons, Inc, New York.; Foster, 1983 Microbiol. Rev. 47, 361-409.; Freedman, 1995 Environmental Ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses. Acadeimc Press, San Diego, CA.; Gadd, 1986 Fungal reponses towards heavy metals. In: Herbert, R.A., Codd, G.A. (eds), Microbes in extreme environments. Academic Press, New York, pp. 83-110; Gadd, 1992 Microbial control of pollution. Cambridge Press, Cambridge, pp. 59-88). 또한, 토양 미생물의 군집 수준에서 보았을 때, 중금속은 전반적인 대사 활성을 떨어뜨리고, 군집의 다양성 및 군집 내 개체수를 감소시킨다 (Heggo and Angle, 1990 Soil Biol. Biochem. 22, 865-869.; Ietswaart et al., 1992 Appl. Envion. Microbiol. 33, 1225-1228; Reber, 1992 Biol. Fertil. Soils 13, 181-186; Roane and Kellogg, 1996 Can. J. Microbiol. 42, 593-603).

[0003] 원유, 디젤, 가솔린 등과 같은 석유계 탄화수소 화합물은 환경 오염을 일으키는 주요 오염원이다. 이들 석유계 탄화수소 화합물은 생산과정, 운반, 저장 등의 경로뿐 아니라 사고로 인한 배출 및 저장 탱크의 누수로 오염물질이 환경으로 유입된다. 석유계 탄화수소 화합물은 일반적으로 중금속과 같이 환경으로 유입되는데 이러한 오염은 야생동물 및 수자원 그리고 토양에 악영향을 미친다.

[0004] 한편, 산업 발달로 토양 오염이 심각해지면서 오염 토양의 복원과 관련된 다양한 기술들이 제안되어 왔다. 현재, 오염된 토양을 정화하는 방법은 크게 물리·화학적 처리기술, 열적 처리기술 및 생물학적 처리기술의 3가지로 구분할 수 있는데, 우선 (1) 물리·화학적 처리기술에는 토양증기추출법, 토양세척법 및 고형화·안정화법이 있고, (2) 열적 처리기술에는 소각, 열분해, 휘발 및 열탈착법이 있으며, (3) 생물학적 처리기술에는 토양경작법(landfarming), 바이오파일(biofile), 생물학적 반응기법(Bioreactor), 식물을 이용한 복원공법(phytoremediation) 등이 있다.

[0005] 오염의 종류에 따라, 휘발성이 큰 물질에 의해 오염되어 있는 경우에는 토양증기추출법을 이용하는 것이 유리하며, 정화대상 오염물질이 생물학적으로 분해되기 쉬운 물질인 경우에는 생물학적 복원 기법(bioremediation)이 사용된다. 정화대상 오염물질이 다른 기법으로 정화하기 곤란한 비휘발성 물질, 생물학적 난분해성 물질, 중금속 등인 경우에는 토양세척법이 유리한 것으로 보고되고 있다 (최 et al., 2001. 토양오염 처리기술. 토양오염개론. 동화기술. pp. 237-244.).

[0006] 지금까지 석유계 탄화수소 화합물로 오염된 토양을 경제적이면서 환경 친화적인 방법으로 복원하기 위한 것으로서 생물, 특히 미생물의 석유계 탄화수소 화합물의 분해활성을 활용하는 생물복원(bioremediation)이 주목받고 있다.

[0007] 최근에는 많은 세균과 미생물가 석유계 탄화수소 화합물을 분해한다고 보고되었다. 그러나 대부분의 석유계 탄화수소 화합물의 생분해에 관련 연구 및 방법은 석유계 탄화수소 화합물로만 오염된 토양복원에 국한된 것이나, 실제 석유계 탄화수소 화합물로 오염된 토양에서는 중금속이 고농도로 검출되는 경우가 매우 많다. 중금속의 미생물의 활성을 저해하는 독성 물질이므로, 중금속과 석유계 탄화수소 화합물로 동시에 오염된 토양에서 석유계 탄화수소 화합물을 분해하기 위해서는 중금속에 대해 내성을 가진 미생물을 활용하는 것이 필요하다.

[0008] 이에 본 발명자는 이러한 종래의 문제점을 해결하기 위하여 광범위한 연구를 수행한 결과, 중금속 및 유류로 혼합오염된 토양으로부터 중금속에 대해 내성을 가지면서 디젤 등과 같은 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있는 네오사르토리아 속 (*Neosartorya* sp.) BL4 미생물을 분리함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 종래의 미생물은 중금속에 의하여 전반적인 대사활성이 떨어지고, 석유계 탄화수소 화합물로만 오염된 토양의 생분해에만 관여하므로 중금속이 고농도로 검출되는 유류에 오염된 토양에의 적용에 한계가 있었다. 본 발명은 이러한 문제점을 극복하여, 중금속과 유류로 동시에 오염된 토양을 정화시킬 수 있는 미생물 및 이를 이용한 토양 정화 방법을 제공하고자 한다.

[0010]

과제 해결수단

[0011] 본 발명은 서열목록 1의 염기서열을 가지는 미생물 *Neosartorya* sp. BL4 (KCCM10954P) 및 중금속에 내성을 갖는

상기 미생물을 이용하여 유류 및 중금속으로 오염된 토양의 정화 방법을 제공한다.

[0012]

효 과

[0013] 본 발명에서 분리한 *Neosartorya* sp. BL4 균주는 고농도의 중금속에도 내성을 가지고 있으며, 유류의 탄소원을 먹이로 이용하여 분해하므로 저분자 석유계 탄화수소 화합물 뿐만 아니라, 탄소수 16 이상의 고분자 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있으며, 고농도의 유류의 분해도 가능하다. 따라서, 본 균주를 이용하여 중금속과 유류로 혼합 오염된 토양을 정화하는 것이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 서열목록 1의 염기서열을 가지는 미생물 *Neosartorya* sp. BL4 (KCCM10954P)에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 미생물은 중금속 및 유류로 오염된 토양에서 석유계 탄화수소 분해 활성 기준에 따라 분리한 우수한 유류 분해능을 가진 균주이다. 따라서, 본 발명의 미생물은 중금속 및 유류로 혼합 오염된 토양을 유류의 분해를 통하여 정화시키는 것이 가능하다.

[0016] 이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0017] 본 발명의 *Neosartorya* sp. BL4 균주는 다양한 중금속에 내성을 나타내며, 상기 중금속은 비소, 카드뮴, 구리 및 납을 포함한다. 토양 오염은 상기 중금속 중 한가지 이상을 포함한 중금속 오염일 수도 있고, 다른 중금속에 의한 것일 수도 있다.

[0018] 종래의 미생물은 중금속에 의하여 전반적인 대사활성이 떨어지나, 본 발명의 미생물 BL4는 고농도의 중금속에도 내성을 가진다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 미생물 BL4는 500 mg/L의 AS, 100 mg/L의 Cd, 500 mg/L의 Cu가 첨가된 조건에서도 생장이 가능하였다. 특히, 1000 mg/L의 Pb에서도 성장에 큰 저해를 받지 않았고 3000 mg/L의 매우 높은 농도에서도 성장이 가능하였다.

[0019] 본 발명의 *Neosartorya* sp. BL4 균주는 저분자 석유계 탄화수소 화합물 뿐만 아니라, 탄소수 16 이상의 고분자 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있는 분해능을 나타내고, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *Neosartorya* sp. BL4 균주는 30,000 mg/L의 고농도의 디젤을 분해할 수 있다.

[0020] 본 발명의 Neosartorya sp. BL4 균주는 유류의 석유계 탄화수소 화합물을 탄소원과 에너지원으로 활용하여 성장하는 종속영양생물로, 석유계 탄화수소 화합물을 이산화탄소로까지 분해한다.

[0021] 따라서, 이러한 본 발명의 균주는 유류 오염 현장에 직접 투여하거나, 적절한 형태의 미생물 제제로 제조하여 사용할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 *Neosartorya* sp. BL4 균주를 함유하는 유류 분해용 미생물 제제를 제공한다.

[0023] 상기 본 발명의 미생물 제제는 유효성분인 본 발명의 *Neosartorya* sp. BL4 균주 외에 필요에 따라 담체, 영양물질, 기타 보조제 등을 함유할 수 있는데, 상기 담체는 균체 흡착, 활성유지, 환경에서의 안정화를 위해 첨가하며, 다공성, 흡착성 및 내구성이 우수한 소재를 사용할 수 있고, 영양물질은 미생물의 활성화를 위해 첨가하는 것으로 질소, 인 또는 황의 무기염류와 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미네랄을 사용할 수 있다. 보조제는 토양 또는 수질의 pH 교정, 수분유지, 염류장해 완화 등의 목적으로 첨가하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 미생물 제제는 배양물, 액상의 현탁액, 페이스트 또는 분말 형태로 제조될 수 있다.

[0024] 본 발명은 *Neosartorya* sp. BL4 또는 이를 함유한 유류 분해용 미생물 제제를 이용하여 유류 및 중금속으로 혼합 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 균주 또는 미생물 제제는 유류로 오염된 환경에 적절하게 처리하여 오염을 정화시킬 수 있는데, 사용량은 오염 정도 및 대상 환경에 따라 적절하게 가감할 수 있으며, 예를 들어 유류오염토양의 평균 오염도가 총 석유계 탄화수소 농도로 최대 30,000 mg/kg일 경우, 오염토양 1kg 당 BL4 균주 농도가 약 10^4 ~ 10^{10} CFU 가 되도록 가하여 사용하는 것이 바람직하며, 10^6 ~ 10^8 CFU인 것이 보다 바람직하다. 본 발명의 균주는 25 ~ 50℃의 온도, pH 5 ~ 7의 범위에서 토양을 정화시키는 것이 바람직하다. 25℃ 이하 또는 50℃ 이상의 온도 및 pH 5 이하 또는 pH 7 이상의 pH에서는 미생물의 유류 분해능이 나타나지 않는다.

[0026] 본 발명의 균주 또는 미생물 제제의 투여방법은 넓은 면적의 토양에 적용될 경우 소방차, 헬리콥터 등을 이용하여 골고루 살포하고, 좁은 면적의 토양에는 분무기 등을 이용하여 골고루 살포한다. 살포 후에는 정기적으로 경작기를 이용하여 토양층을 뒤집어주는 경작법 등을 추가로 수행하여 정화처리할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에서, 상기의 방법으로 유류오염토양을 정화시켰을 때 20일째 유류 제거율이 89 % 이고, 40일째는 96%로 나타나, 본 발명에서 분리한 *Neosartorya* sp. BL4 균주를 활용한 생물정화법으로 유류오염토양을 정화하는 것이 효과적임을 알 수 있다.

[0028] [실시예]

[0029] 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체적으로 설명하기 위한 것이며, 이에 의하여 본 발명의 범위가 결코 한정되어 해석될 수 없다.

[0030] **실시예 1 : *Neosartorya* sp. BL4의 분리 및 동정**

[0031] 중금속에 대해 내성을 가지면서 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있는 미생물를 분리하고자, 납, 구리 등과 같은 중금속 및 유류(디젤)로 오염된 토양을 정유공장 부지로부터 채취하였다. 위의 토양 10 g에 멸균수 20 mL을 넣고 잘 흔든 후, 상등액 0.5 mL을 구리와 납을 첨가한 유류를 PDA (potato dextrose agar) 배지에 접종한 후, 30℃에서 배양하였다. 구리와 납은 각각 $CuSO_4$와 $PbNO_3$ 용액을 이용하여 최종농도가 각각 1250 mg/L와 1000 mg/L 농도로 되도록 PDA 배지에 첨가하였다. PDA에서 성장한 미생물 중 모양과 형태에 따라 총 4종의 미생물를 선별하였다.

[0032] 선별한 미생물를 석유계 탄화수소을 10,000 mg/L의 농도로 첨가한 MSM(무기염배지) 10 mL에 접종하여 30℃에서 배양하였다. MSM 배지 조성은 다음과 같다.

[0033] MSN 배지: KH_2PO_4, 1.5g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 9 g/L; $(NH_4)_2SO_4$, 3 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.01 g/L; $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.15 g/L; $FeSO_4 \cdot H_2O$, 0.01 g/L.

[0034] 위의 배양액의 잔류 유류를 가스 크로마토그래피(gas chromatography)를 이용하여 분석한 뒤 석유계 탄화수소 분해능이 관찰되는 BL4 미생물을 순수분리하였다. 미생물 BL4를 동정하고자 18S rDNA 분석방법을 이용하였다. PDA배지에서 전배양한 미생물을 BIO101 키트를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였고, 추출된 게놈 DNA를 주형으로 이용하여 PCR (polymerase chain reaction) 과정을 통해 증폭시켰다. 증폭에 사용된 프라이머는 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')이고 PCR 조건은 표 1과 같다.

표 1

[0035]

단계	온도(℃)	시간	사이클
프리-디네처레이션 (pre-denaturation)	95	5 분	-
디네처레이션 (denaturation)	95	0.5 분	28
어닐링 (annealing)	60	0.5 분	
익스텐션 (extension)	72	0.5 분	
파이날-익스텐션 (final Extension)	72	5 분	-
홀드 (hold)	4	-	-

[0036] 순수균의 일부 18S rDNA 서열은 BLAST 검색을 이용하여 분석하였다. 18S rDNA 부분 염기서열을 분석한 결과 BL4 균주는 네오사르토리아 속 미생물(NCBI accession number: EF669953, EF669964, EF669948, EF669938, AB185272)와 98%의 유사성을 가지고 있었다 (표 2, 도 1). 따라서 본 발명에서 분리한 미생물 BL4는 네오사르토리아 속(*Neosartorya* sp.)에 속함을 알 수 있었다.

표 2

[0037]

미생물	계통분류학적으로 연관된 균	유사도
BL4	*Neosartorya* sp. NRRL 2392 (EF669953)	565/574 (98%)
	Neosartorya glabra NRRL 3434 (EF669964)	563/573 (98%)
	Neosartorya glabra NRRL 2163 (EF669948)	563/573 (98%)
	Neosartorya glabra NRRL 183 (EF669938)	563/573 (98%)
	Neosartorya glabra (AB185272)	560/569 (98%)

[0038] 본 발명자들은 위와 같은 방법으로 얻어진 네오사르토리아 속 미생물을 *Neosartorya* sp. BL4라고 명명하고 이를 2008년 6월 30일자로 기탁기관인 한국 미생물보존센터에 기탁하였다 (수탁번호: KCCM10954P).

[0039] **실시예 2 : *Neosartorya* sp. BL4의 중금속 내성 확인**

[0040] 미생물 BL4의 중금속에 대한 내성을 평가하고자 Cu, Pb, As, Cd를 다양한 농도로 첨가한 PDA 배지에서의 미생물 성장을 측정하였다. 각각의 중금속 농도는 As 5 - 1500 mg/L, Cd 1.5 - 300 mg/L, Cu 50 - 1250 mg/L, Pb 100 - 3000 mg/L로 하였다. PDA에서 전배양시킨 미생물 BL4를 멸균한 면도칼을 이용하여 0.25 cm^2의 면적으로 자른 후 중금속으로 오염된 배지 중앙에 올려놓고 30℃에서 배양하였다. 배양 기간 동안 1-2일 간격으로 PDA 배지에서의 미생물의 성장을 면적으로 계산하여 측정하였다. 이때 중금속으로 오염시키지 않은 PDA를 대조군으로 하여 동시에 실험하였고, 모든 실험은 3 반복으로 진행되었다.

[0041] 중금속을 첨가한 PDA 배지에서의 미생물 BL4의 성장을 측정한 결과를 도 2에 나타내었다. 미생물 BL4는 As를 첨가한 PDA 배지에서는 AS의 첨가량이 증가할수록 생장이 거의 비례하여 저해받았다. 그러나, 500 mg/L의 고농도의 AS의 첨가된 조건에서도 생장이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, 100 mg/L의 Cd를 첨가한 PDA 배지에서는 미생물 BL4는 크게 저해를 받지 않고 성장이 가능하였다. Cu의 경우 50 mg/L의 농도에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않고 성장하였으나, 1,250 mg/L이상의 농도에서는 완전 저해를 받아 성장이 이루어 지지 않았다. 또한, 미생물 BL4는 1000 mg/L의 Pb이 첨가된 PDA 배지에서는 성장에 큰 저해를 받지 않았고 3000 mg/L의 매우 높은 농도에서도 성장이 약간 저해 받았다.

[0042] 미생물 BL4의 성장을 50% 저해하는 중금속 농도(EC50, half maximal effective concentration)를 도 1로부터 계산하여 표 3에 정리하였다. 미생물 BL4는 납에 대해 내성이 가장 크고 그 다음 구리, 비소 및 카드뮴 순서로 중금속에 대해 내성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

표 3

[0043]

중금속 종류	EC50 (mg/L)
비소	300
카드뮴	100 이상
구리	300
납	2,200

[0044] **실시예 3 : *Neosartorya* sp. BL4의 유류 분해능 확인 및 유류 농도에 따른 분해능**

[0045] 본 발명의 중금속에 대해 내성을 가진 네오사르토리아 속 BL4 미생물의 유류 농도별 분해 활성을 알아보기 위해, 스크류 타입 테스트 튜브(screw type test tube)에 MSM 5 mL을 넣었다. PDA 배지에서 전배양한 미생물 BL4를 0.25 cm^2 잘라서 접종하였다. 30℃에서 진탕 배양하면서 배양시간별 석유계 탄화수소농도 변화를 가스 크로마토그래피를 이용하여 관찰하였다. 이때 MSM에 첨가하는 유류의 농도를 달리하여(5000, 10000, 20000, 40000 mg/L) 미생물의 유류 농도에 따른 분해능을 조사하였다. 모든 실험은 3 번 반복하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0046] 도 2는 본 발명의 네오사르토시아 속 BL4 균주 접종여부 및 유류 첨가 농도 별로 시간(일)에 따른 유류 농도 변화를 측정한 결과도이다 (검은색: SD8을 접종하지 않은 대조군; 흰색: SD8을 접종한 실험군; (a) 5000 mg/L 농도의 유류 첨가; (b) 10,000 mg/L 농도의 유류 첨가; (c) 20,000 mg/L 농도의 유류 첨가; (d) 40,000 mg/L농도의 유류 첨가).

[0047] 미생물 BL4의 유류 농도에 따른 분해능의 영향을 조사한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 20,000 mg/L 농도까지는 유류 분해능이 저해를 받지 않음을 알 수 있었다. 즉, 미생물 BL4는 20,000 mg/L의 고농도 유류 조건에서도 큰 저해 없이 성장이 가능하고 유류 분해 활성을 발휘할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, 유류 농도가 40,000 mg/L의 고농도 조건에서는 미생물 성장뿐만 아니라 유류 분해능도 관찰되지 않았다.

[0048] 또한, 도 4는 유류 농도 20,000 mg/L MSM 조건에서 네오사르토시아 속 BL4 미생물를 접종, 배양한 후 0일 및 19일 후의 잔류 유류를 가스 크로마토그래피로 측정한 결과도이다. 본 발명의 미생물 BL4는 저분자의 석유계 탄화수소화합물 뿐만 아니라, 탄소수 16(C16) 이상의 고분자의 석유계 탄화수소화합물을 모두 분해 가능함을 확인할 수 있었다.

[0049] **실시예 4 : *Neosartorya* sp. BL4의 유류 분해능에 미치는 온도 및 pH 영향**

[0050] 본 발명의 중금속에 대해 내성을 가진 네오사르토리아 속 BL4 미생물의 유류 분해능에 미치는 온도 및 pH의 영향을 조사하기 위해, 상기의 유류 농도별 분해 활성 조사와 거의 동일한 방법을 이용하여 연구를 수행하였다. 유류 첨가농도는 20,000 mg/L로 하였고, 온도는 15 - 50℃, pH는 5 -8에서 미생물 BL5에 의한 유류 분해능을 평가하였다. 배양은 30℃에서 수행하였고, 모든 실험은 3 번 반복하였다.

[0051] 미생물 BL4의 석유계 탄화수소 분해능에 미치는 온도 영향 결과를 도 5에 나타내었다. 미생물 BL4는 25℃ 이하의 온도와 50℃ 이상의 고온 조건에서는 유류를 분해할 수 없었다. 그러나, 30 - 42℃ 조건에서는 유류를 분해할 수 있었고, 30℃ 보다는 37 - 42℃의 조건에서 유류의 분해속도가 약간 증가하였다.

[0052] 미생물 BL4의 유류 분해능에 미치는 pH 영향 결과를 도 6에 나타내었다. 미생물 BL4는 pH 8의 약 알칼리성 조건에서는 유류를 분해할 수 없었으나, pH 5-7의 약산성 및 중성의 조건에서 유류를 분해할 수 있었다. pH 7의 중성 조건에서보다는 pH 5의 약산성 조건에서 유류 분해속도가 높음을 확인할 수 있었다.

[0053] **실시예 5 : *Neosartorya* sp. BL4에 의한 중금속 및 유류 혼합오염 토양의 석유계 탄화수소 정화 효과 확인**

[0054] 본 발명에 의한 네오사르토리아 BL4 미생물을 이용하여 중금속과 유류로 혼합오염되어 있는 토양을 정화처리하기 위하여 실험실 규모의 토양경작법 실험을 수행하였다. 가로, 세로 및 높이가 각각 1 m, 1 m 및 0.5 m인 사각 아크릴통에 중금속(납 500 mg/L, 구리 100 mg/L)과 석유계 탄화수소(10,000 mg/L)로 혼합오염된 토양을 높이 0.3 m로 채워 넣었다. 미생물 BL4 배양액을 원심분리 후 MSM 배지로 재현탁시켜 제조하고, 미생물 농도가 10^9 - 10^{10} CFU/mL 인 미생물 제제를 1kg의 오염토양 당 10^7 CFU가 되도록 골고루 살포하였고, N, P, S가 주성분인 영양제를 C/N/P 비율이 100:10:1 이 되도록 투여하였다. 매 2일마다 삽을 사용하여 토양층을 뒤집어 주었다. 네오사르토리아 속 BL4 미생물로 처리하는 동안 토양 시료를 채취하여 토양 시료 중의 총 석유계 탄화수소의 농도는 토양시료를 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피를 사용하여 분석하였다.

[0055] 표 4는 네오사르토리아 BL4 미생물을 이용한 중금속 및 유류 혼합오염 토양의 석유계 탄화수소 분해 효율을 나타낸 것으로, 본 실시예에 의한 정화방법은 약 20일 경과 후에 총 석유 탄화수소의 약 89%, 약 40일 경과 후에 총 석유 탄화수소의 약 96%를 제거할 수 있었다. 따라서 본 발명의 *Neosartorya* sp. BL4 미생물을 이용하면, 중금속과 유류로 혼합오염된 토양의 석유계 탄화수소 화합물을 효과적으로 정화시킬 수 있음을 확인하였다.

표 4

[0056]

처리기간 (일)	윤활유 농도 (mg/kg)	제거율 (%)
0	9,850 ± 1,670	0
10	5,890 ± 820	40
20	1,120 ± 395	89
30	750 ± 298	92
40	360 ± 142	96

도면의 간단한 설명

[0057] [도 1]은 네오사르토리아 속 BL4의 18S rDNA의 PCR 산물을 염기서열 분석한 결과이다.

[0058] [도 2]는 중금속 종류별 및 첨가 농도에 따른 네오사르토리아 속 BL4의 성장을 측정한 결과도이다.

[0059] [도 3]은 네오사르토리아 속 BL4 접종여부 및 석유계 탄화수소 첨가농도에 대하여 시간(일)에 따른 석유계 탄화수소 농도를 측정한 결과도이다.

[0060] [도 4]는 네오사르토리아 속 BL4 접종 배양 후 0일 및 19일 후의 잔류석유계 탄화수소농도를 가스크로마토그래피로 측정한 결과도이다.

[0061] [도 5]는 네오사르토리아 속 BL4 접종여부 및 배양 온도에 대하여 배양시간(일)에 따른 석유계 탄화수소 농도를 측정한 결과도이며, (a) 30℃ (b) 37℃ (c) 42℃ (d) 50℃를 나타낸다.

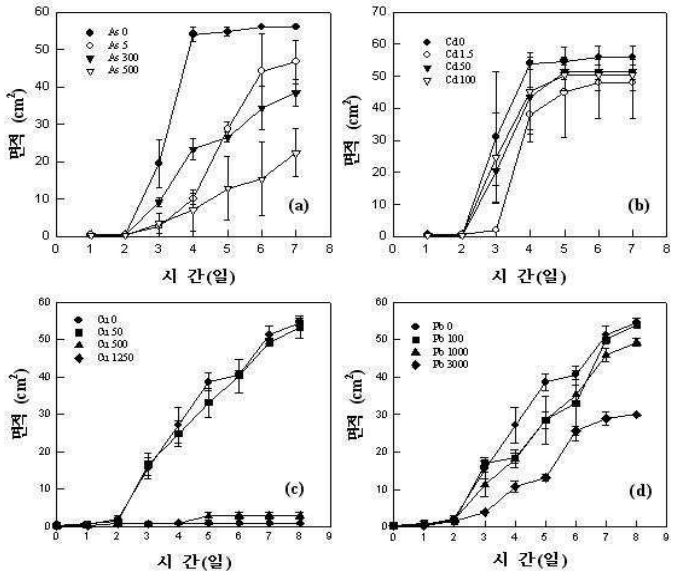
[0062] [도 6]은 본 발명의 네오사르토리아 속 미생물 접종여부 및 배지 pH 별로 배양시간(일)에 따른 석유계 탄화수소 농도를 측정한 결과도이며, (a) pH 5 (b) pH 6 (c) pH 7 (d) pH 8을 나타낸다.

도면

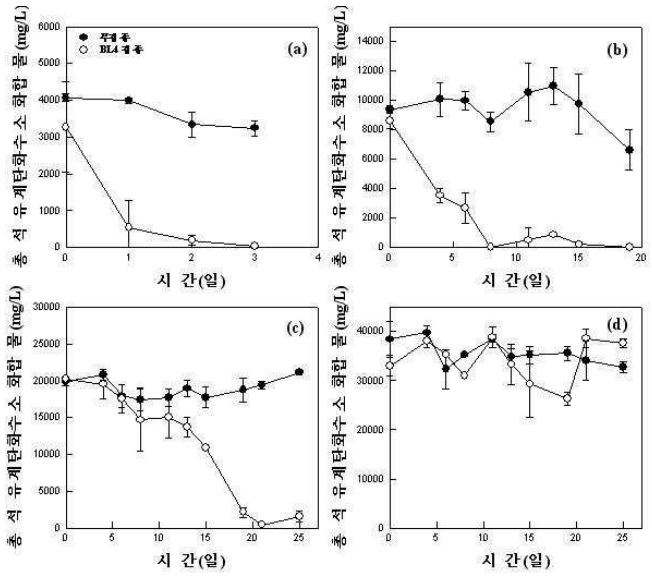
도면1



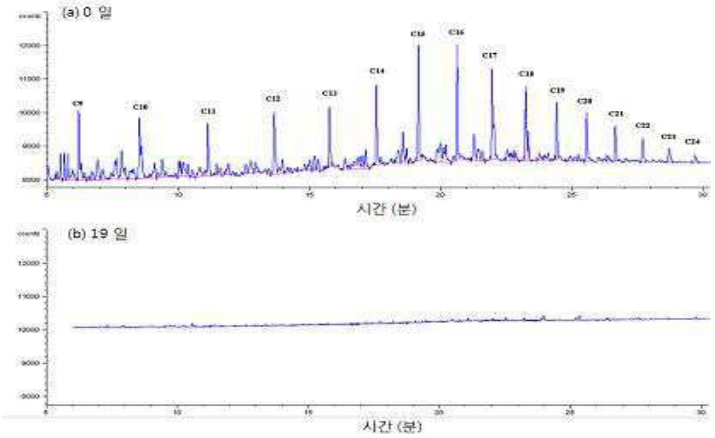
도면2


As 0
As 5
As 300
As 500
(a)
면적 (cm²)
시 간(일)
Cd 0
Cd 1.5
Cd 50
Cd 100
(b)
면적 (cm²)
시 간(일)
Cu 0
Cu 50
Cu 500
Cu 1250
(c)
면적 (cm²)
시 간(일)
Pb 0
Pb 100
Pb 1000
Pb 3000
(d)
면적 (cm²)
시 간(일)

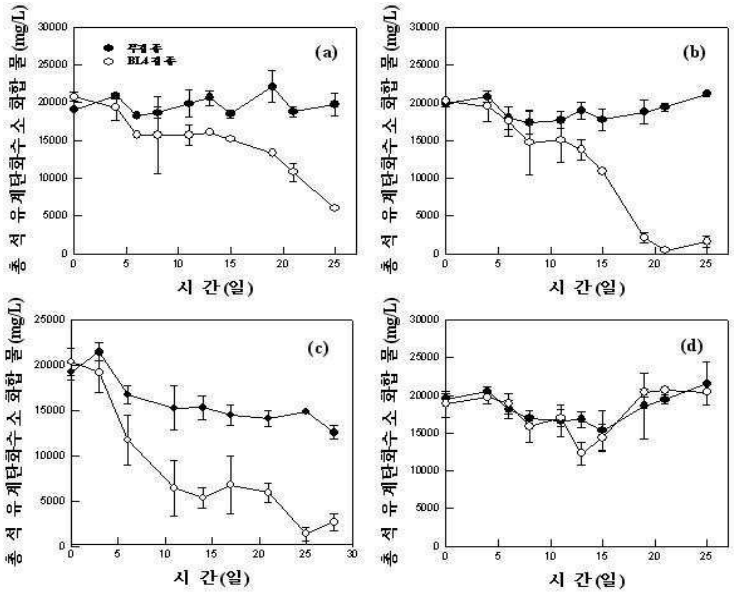
도면3


(a)
총 석 유계탄화수소 화합 물 (mg/L)
시 간(일)
(b)
총 석 유계탄화수소 화합 물 (mg/L)
시 간(일)
(c)
총 석 유계탄화수소 화합 물 (mg/L)
시 간(일)
(d)
총 석 유계탄화수소 화합 물 (mg/L)
시 간(일)

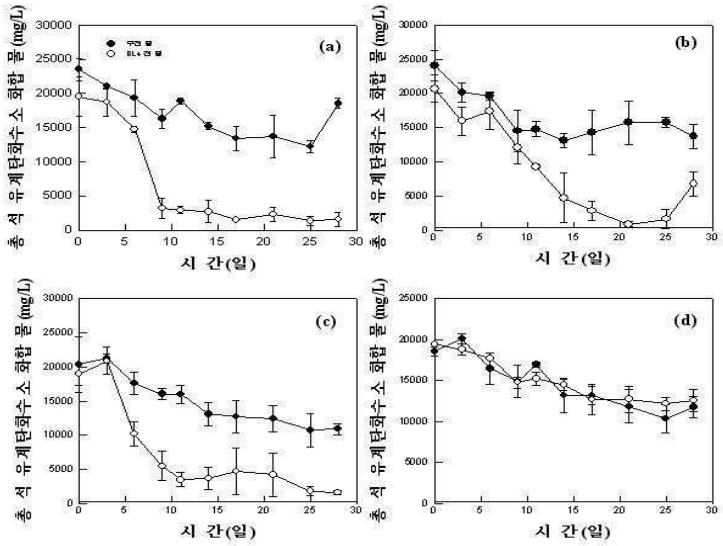
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> EHWA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
<120> Neosartorya sp. BL4, method for purifying heavy metal and oil-contaminated soil

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 574
<212> DNA
<213> Neosartorya sp.

<400> 1
cggaaggatc attaccgagt gagggccctc cgggtccaac ctcccacccg tgtctattgt 60

accttgttgc ttcggcgggc ccgccgttct ctcgaacggc cgccggggag ggcctcgtgc 120

ccccgggccc gcgcccgccg aagaccccaa catgaactct gttctgaaag tatgcagtct 180

gagtttgatt accataatca atcaaaactt tcaacaacgg atctcttggt tccggcatcg 240

atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga 300

gtctttgaac gcacattgcg ccccctggta ttccgggggg catgcctgtc cgagcgtcat 360

tgctgccctc aagcacggct tgtgtgttgg gcccccgtcc ccggttcacc ccggggacgg 420

gcccgaaagg cagcggcggc accgcgtccg atcctcgagc gtatggggct ttgtcacccg 480

ctmtgtaggc ccggccggcg ccagccgaca ccccaacttt attttctaag gttgacctcg 540

gatcaggtag ggatacccgc tgaacttaag cata 574