



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월20일
(11) 등록번호 10-0830704
(24) 등록일자 2008년05월13일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) C02F 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0007749

(22) 출원일자 2007년01월25일

심사청구일자 2007년01월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050043506 A*

US20060178269 A1*

JP2004121068 A

JP2001046058 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

조경숙

서울 서초구 방배동 764-16 서래빌딩 501호

홍선화

인천 계양구 계산3동 인정프린스 102-1708

김지영

서울 영등포구 양평동3가 거성파스텔아파트
104-1801

(74) 대리인

특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 4 항

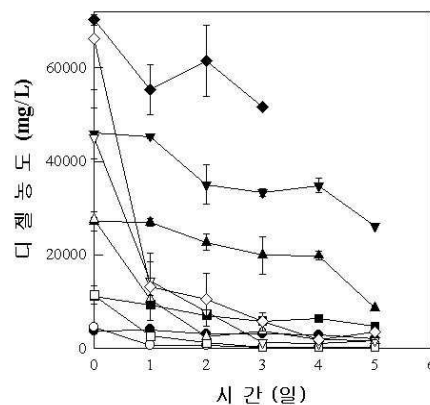
심사관 : 김준경

(54) 고르도니아 속 미생물, 이를 이용한 유류오염 토양정화방법 및 식물 성장촉진방법

(57) 요약

본 발명은 고르도니아 속(*Gordonia* sp.) 미생물, 이를 이용한 유류 오염 토양 정화방법 및 식물성장 촉진 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 장기간 유류로 오염된 토양에서 자라는 식물의 근권토양에서부터 분리된, 우수한 유류 분해능을 나타내고, 식물 성장을 촉진시킬 수 있는 고르도니아 속 SD8 균주, 고르도니아 속 SD8 균주를 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법, 고르도니아 속 SD8 균주를 식물과 함께 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법 및 고르도니아 속 SD8 균주를 이용하여 식물의 성장을 촉진시킴으로써 식물을 이용한 유류로 오염된 토양의 정화 효율을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

근권토양에서 분리한 유류분해활성을 나타내는 미생물 *Gordonia* sp. SD8 균주(KCCM10832P).

청구항 2

제 1항의 미생물 *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법.

청구항 3

제 1항의 미생물 *Gordonia* sp. SD8 및 식물을 함께 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법.

청구항 4

제1항의 미생물 *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용하여 오염된 환경에서 식물의 성장을 촉진시키는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 고르도니아 속(*Gordonia* sp.) 미생물, 이를 이용한 유류 오염 토양 정화방법 및 식물성장 촉진 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 장기간 유류로 오염된 토양에서 자라는 식물의 근권토양에서부터 분리된, 우수한 유류 분해능을 나타내고 식물 성장을 촉진시킬 수 있는 고르도니아 속 SD8 균주, 고르도니아 속 SD8 균주를 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법, 고르도니아 속 SD8 균주를 식물과 함께 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법 및 고르도니아 속 SD8 균주를 이용하여 식물의 성장을 촉진시킴으로써 식물에 이용한 유류로 오염된 토양의 정화 효율을 향상시키는 방법에 관한 것이다.
- <6> 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.
- <7> 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.).
- <8> 이 중에서 생물학적 복원 기법은 유류오염토양을 복원하는 데 있어서 경제적이고 환경친화적인 기술로서, 적용 가능성이 높은 기술이며 성공적으로 적용되고 있는 기술이다 (Lindstrom et al., 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2514-2522; Ruberto et al., 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Actarctic soil. *Int. Biodeterior. Biodeg.* **52**: 115-125. ; USEPA, 2004 Abstracts of remediationcase studies, pp. 20-21. vol. 8, U.S.A.).
- <9> 최근에는 특히, 유류오염물질을 분해할 수 있는 미생물과 토양 내의 미생물량을 증가시킬 수 있는 고등식물을 함께 이용함으로써 생물복원기술의 효율을 극대화할 수 있는 식물을 이용한 복원공법(phytoremediation)이 주목을 받고 있다. 이 공법은 식물과 식물에 결합해있는 미생물을 이용해서 오염된 환경을 정화하는 방법으로, 식물과 근권 미생물 사이의 상호작용을 이해한 후 적용하는 것이 성공적인 토양 복원을 수행하기 위해서는 매우

중요하다.

<10> 그러나, 현재까지는 오염물질에 대한 내성과 분해능이 있는 식물을 파종하고, 이 식물과는 별개로 오염물질을 분해하는 기능성 미생물을 살포함으로써 인공적인 근권을 형성시켜 오염물질의 분해효율을 모니터링하는 수동적인 복원 기술에 국한되어 왔다. 따라서 보다 효율적으로 유류 오염 토양 복원을 촉진시키기 위해서는, 오염물질 정화효율이 높은 식물과 오염물질분해능력 및 식물 생장촉진능력이 있는 근권 미생물을 적극 활용한 정화기법의 개발이 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<11> 이에 본 발명자는 이러한 종래의 문제점을 해결하기 위하여 연구, 노력한 결과, 장기간 유류로 오염된 토양에 서식하고 있던 돌피, 흰여뀌, 닭의장풀, 사초과 식물의 근권 토양으로부터 우수한 유류 분해 활성을 나타내고 식물 생장을 촉진시킬 수 있는 신규 미생물 고르도니아 속(*Gordonia* sp.) SD8을 분리하였다. 이에 본원발명의 미생물이 저분자 석유계 탄화수소 화합물 뿐만 아니라, 탄소수 16 이상의 고분자 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있는 분해능이 우수하며, 유류를 이산화탄소로 완전히 광물화시킬 수 있으며 ACC 디아미네이즈 활성을 나타냄을 확인하였고, 또한 본원발명 미생물의 단독처리 또는 미생물 및 옥수수 등의 식물의 병행처리가 유류로 오염된 토양 정화시키면서 또한 옥수수 등의 식물의 생장을 촉진시킬 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<12> 따라서 본 발명은 장기간 유류로 오염된 토양에 서식하고 있던 돌피, 흰여뀌, 닭의장풀, 사초과 식물의 근권 토양으로부터 유래된 고르도니아 속 미생물을 제공하는데 그 목적이 있다.

<13> 또한, 본 발명은 상기 미생물을 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<14> 또한, 본 발명은 상기 미생물과 옥수수 등의 식물을 함께 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<15> 또한, 본 발명은 상기 미생물을 이용하여 식물의 생장을 촉진시키는 방법 및 이렇게 식물생장을 촉진시킴으로써 식물을 이용한 유류로 오염된 토양의 정화 효율을 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

<16> 본 발명은 유류분해활성을 나타내는 고르도니아 속(*Gordonia* sp.) SD8 균주 (KCCM10832P)를 제공한다.

<17> 본 발명의 균주는 장기간 유류로 오염된 토양에서 자라는 돌피, 흰여뀌, 닭의장풀 또는 사초과 식물의 근권토양에서부터 디젤 분해 활성을 기준으로 하여 분리한 식물생장촉진 능력 및 우수한 유류 분해능을 가진 균주이다.

<18> 본 발명의 SD8 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 SD8 균주는 30,000 mg/L의 고농도의 디젤을 분해가능하며, 유류를 이산화탄소로 완전히 광물화 (mineralization)하는 특징을 나타낸다.

<19> 또한, 본 발명의 SD8 균주는 ACC 디아미네이즈 활성을 나타내어 식물 생장을 촉진시킬 수 있다.

<20> 이러한 본 발명의 균주는 유류 오염 현장에 직접 투여하거나, 적절한 형태의 미생물 제제로 제조되어 사용할 수 있다.

<21> 본 발명은 또한, *Gordonia* sp. SD8 균주(KCCM10832P)를 함유하는 유류 분해용 미생물 제제를 제공한다.

<22> 상기 본 발명의 미생물 제제는 유효성분인 본 발명의 SD8 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 사용할 수 있다.

<23> 본 발명은 또한, *Gordonia* sp. SD8 균주(KCCM10832P) 또는 이를 함유한 유류 분해용 미생물 제제를 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공한다.

- <24> 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 석유탄화수소농도로 1,000~50,000 mg/kg일 경우, 오염토양 1kg 당 SD8 균주 농도가 약 $10^8 \sim 10^{10}$ CFU 가 되도록 가하여 사용하는 것이 바람직하다. 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.
- <25> 본 발명의 일 실시예에서, 상기의 방법으로 유류오염토양을 정화시켰을 때 20일째 유류 제거효율이 92% 이고, 30일째는 94%로 나타나, 본 발명에서 분리한 *Gordonia* sp. SD8 균주를 활용한 생물정화법으로 유류오염토양을 정화하는 것이 효과적임을 알 수 있다.
- <26> 이에 더하여 본 발명은 *Gordonia* sp. SD8 균주 또는 이를 함유하는 미생물 제제를 식물과 함께 이용하여 유류로 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공한다.
- <27> 본 발명의 SD8 균주 또는 미생물 제제는 식물 재배시 식물이 재배되는 유류 오염 토양에 처리하여 오염을 정화시킬 수 있는데, 상기 식물은 유류 오염에 내성이 있으며 유류 분해 활성이 있는 식물로서, 옥수수, 소리쟁이, 닭의장풀, 해바라기 등의 식물을 포함한다. SD8 균주 또는 미생물 제제의 사용량은 유류오염토양의 평균 오염도가 총 석유탄화수소농도로 1,000~50,000 mg/kg일 경우, 식물이 재배되는 오염토양 1kg당 SD8 균주 농도가 약 $10^8 \sim 10^{10}$ CFU 가 되도록 사용하는 것이 바람직하다. 또한, SD8 균주 또는 미생물 제제의 투여시점은 유류로 오염된 환경에 따라 적절하게 조절될 수 있는데, 유류오염토양에 식물의 종자 파종과 동시에, 또는 파종 후 일정기간 재배하여 생장시킨 후 SD8 균주를 살포할 수 있다.
- <28> 본 발명의 일 실시예에서, 상기의 방법으로 식물(옥수수)과 *Gordonia* sp. SD8 균주를 함께 활용하여 유류 오염토양을 정화 처리한 경우는 디젤 제거 효율이 95%로, 식물만을 이용한 경우(디젤 제거 효율 88%)보다 유류 오염 제거율이 향상된다.
- <29> 본 발명의 *Gordonia* sp. SD8 균주를 식물과 함께 유류 오염 토양에 적용함으로써 식물만을 이용하는 경우에 비하여 유류로 오염된 토양의 정화 효율이 극대화되는 작용효과를 나타낸다.
- <30> 또한 본 발명은 *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용하여 식물의 생산을 촉진시키는 방법을 제공한다.
- <31> 또한, 본 발명은 *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용하여 식물의 생장을 촉진시킴으로써 식물을 이용한 유류로 오염된 토양의 정화 효율을 향상시키는 방법도 제공한다.
- <32> 본 발명의 SD8 균주는 유류로 오염된 토양에서 자라는 식물의 근원토양으로부터 분리한 균주로서, ACC 디아미네이즈 활성을 나타내므로 옥수수, 소리쟁이, 닭의장풀, 해바라기 등의 식물 배양시 식물의 근원토양에 SD8 균주를 함께 사용하면 식물의 생장을 촉진할 수 있다.
- <33> 본 발명의 일 실시예에서 유류 분해능을 가진 *Gordonia* sp. SD8 균주를 접종함으로써 옥수수와 같은 식물의 생장이 1.6배 정도 향상됨을 알 수 있다.
- <34> 이에 유류로 오염된 토양에 유류오염을 정화하는 식물과 함께 *Gordonia* sp. SD8 균주를 식물상 정화에 적용할 경우 유류 오염을 정화할 뿐만 아니라 식물의 생장도 촉진하는 효과를 나타내며, 이렇게 식물 생장이 촉진됨에 따라 식물을 이용한 유류로 오염된 토양 정화 효율이 더욱 향상되는 효과를 나타낸다.
- <35> 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는 바, 본 발명이 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <36> **실시예**
- <37> **실시예 1 : *Gordonia* sp. SD8 의 분리, 동정 및 특이활성 확인**
- <38> (1) 유류 분해 근원 세균의 분리
- <39> 디젤로 장기간 오염된 곳에서 성장한 돌피, 흰여뀌, 닭의장풀 및 사초과 식물을 채취한 후 이들 식물의 근원 토양을 혼합하여, 이 토양에서 유류 분해 근원 세균을 하기와 같이 분리하였다.
- <40> 위의 토양 10 g에 멸균수 20 mL을 넣고 잘 흔든 후, 상등액 0.5 mL을 디젤을 10,000 mg/L의 농도로 첨가한 MSM(무기염배지) 50 mL에 접종하여 30℃에서 농화배양하였다. MSM 배지 조성은 다음과 같다.

<41> MSM 배지: KH_2PO_4 , 1.5g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g/L; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L.

<42> 위의 농화배양한 배양액을 LB 아가 플레이트 배지(LB agar plate medium)에 도말하여 30℃에서 배양시킨 후, 형성된 콜로니 종류별로 다시 MSM(10000 ppm 디젤 포함)에 접종하여 30℃에서 진탕 배양하였다. 이 배양액의 잔류디젤농도를 가스 크로마토그래피(gas chromatography)를 이용하여 분석한 뒤 디젤분해능이 관찰되는 순수균을 분리하였다.

<43> (2) 유류 분해 근권세균 동정

<44> 위의 (1)에서 디젤 분해능력이 있는 것으로 관찰된 순수균의 콜로니를 0.05N NaCl 30 μL 에 풀어서 95℃ 히트 블록(heat block)에서 30분간 끓인 후, 원심 분리하여($\times 13000\text{g}$, 10min) 게놈 DNA를 얻었다. 게놈 DNA를 주형으로 하여 표 1과 같은 조건으로 16S rDNA에 대한 PCR을 수행하였다. 이때 프라이머는 F27(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')과 R1492(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다. PCR 산물은 키트(QIAquick PCR purification kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용해 정제한 후, 1 % 아가로스 겔에서 100V, 25분 동안 전기 영동하여 확인하였다. 정제된 PCR 산물의 염기서열은 코어바이오시스템(Corebio system)사에 의뢰하여 분석하였다.

표 1

단계	온도(℃)	시간	사이클
프리-디네처레이션 (pre-denaturation)	93	2 분	-
디네처레이션 (denaturation)	92	1 분	
어닐링 (annealing)	55	1 분	35
익스텐션 (extension)	68	45 초	
파이널-익스텐션 (Final Extension)	72	2 분	-
홀드 (Hold)	4	-	-

<46> 디젤 분해능을 가진 근권세균 SD8의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과를 아래 표 2에 나타내었다. 분석된 SD8의 DNA 염기서열은 총 1029 bp이었고(도 1, 서열번호 1), NCBI 블라스트 검색한 결과 SD8은 파라핀계 탄화수소 또는 메탄계 탄화수소라 불리는 알칸(alkane)을 분해하는 고르도니아 속 SG11(NCBI accession number:AJ833920) 와는 1014/1019(99%), 헥산(hexane)을 분해하는 고르도니아 속 SP72-3(NCBI accession number:AY887068)와 1012/1019(99%)로 가장 유사하였다.

<47> 따라서 본 발명에서 분리한 디젤분해능을 가진 근권세균인 SD8은 고르도니아속(*Gordonia sp.*)에 속함을 알 수 있었다.

표 2

균주	계통분류학적으로 연관된 균	유사도
SD8	<i>Gordonia sp.</i> SG11(AJ833920)	1014/1019(99%)
	<i>Gordonia sp.</i> SP72-3(AY887068)	1012/1019(99%)

<49> 본 발명자들은 위와 같은 방법으로 얻어진 고르도니아 속 미생물을 *Gordonia sp.* SD8이라 명명하고 이를 2007년 1월 8일자로 기탁기관인 한국미생물보존센터에 기탁하였다 (수탁번호: KCCM10832P).

<50> (3) 유류 분해 근권세균의 디젤분해활성 확인

<51> 본 발명의 유류 분해능을 가진 근권세균 고르도니아 SD8 균주의 디젤 농도별 디젤 분해 활성을 알아보기 위해, 스크류 타입 테스트 튜브(screw type test tube)에 MSM 5 mL을 넣고 유류분해능을 가진 근권세균을 접종하여(접종 후 최종 균주 농도: 10^8 cfu/mL) 진탕 배양하면서 배양시간별 흡광도값 변화를 스펙트로포토미터(spectrophotometer)로, 디젤농도 변화를 가스 크로마토그래피를 이용하여 관찰하였다. 이때 MSM에 첨가하는 디젤의 농도를 달리하여(5000, 10000, 20000, 30000, 40000 ppm) 유류분해능을 가진 근권세균의 생리적 특성을 연구하였다. 디젤농도별 실험의 경우 배양온도는 30℃ 였고, 모든 실험은 3 번 반복 하였다. 그

결과를 도 2, 3 및 4에 나타내었다.

- <52> 도 2는 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주 접종여부 및 디젤 첨가농도 별로 시간(일)에 따른 균주 성장 정도를 측정한 결과도이고, 도 3은 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주 접종여부 및 디젤 첨가농도 별로 시간(일)에 따른 디젤 농도변화를 측정한 결과도이다 (검은색: SD8을 접종하지 않은 대조군; 흰색: SD8을 접종한 실험군; ●, ○: 5000 mg/L 농도의 디젤 첨가; ■, □: 10,000 mg/L 농도의 디젤 첨가; ▲, △: 20,000 mg/L 농도의 디젤 첨가; ▼, ▽: 30,000 mg/L 농도의 디젤 첨가; ◆, ◇: 40,000 mg/L 농도의 디젤 첨가.).
- <53> SD8 균주의 디젤 분해능에 미치는 디젤 농도의 영향을 조사한 결과, 30,000 mg/L 농도까지는 균주 성장과 디젤 분해능이 저해를 받지 않음을 알 수 있었다(도 2 및 3). 즉, SD8 균주는 30,000 mg/L의 고농도 디젤 조건에서도 큰 저해 없이 성장이 가능하고 디젤 분해 활성을 발휘할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, 디젤 농도가 40,000 mg/L의 고농도 조건에서는 균주 성장이 저해를 받았다.
- <54> 또한, 도 4는 디젤 농도 20,000 mg/L MSM 조건에서 고르도니아 속 SD8 균주를 접종, 배양한 후 0일 및 5일 후의 잔류디젤농도를 가스 크로마토그래피로 측정한 결과도이다. 본 발명의 SD8 균주는 저분자의 석유계 탄화수소화합물 뿐만 아니라, 탄소수 16(C16) 이상의 고분자의 석유계 탄화수소화합물을 모두 분해 가능함을 확인할 수 있었다.
- <55> (4) 방사선 동위원소를 이용한 유류 분해 근권세균의 유류 분해 기작 확인
- <56> 본 발명의 고르도니아 SD8 균주의 유류분해기작을 알아보기 위하여 ^{14}C -헥사데칸(Hexadecane)을 이용하여 하기와 같이 실험하였다.
- <57> 본 연구에서 분리한 근권세균 SD8 균주를 3일간 배양한 후 600 mL 혈청병에 각각 10 mL씩 넣어 주었다(접종 후 최종 균주 농도: 10^8 cfu/mL). 그 후 헥사데칸을 10 μL 넣어 준 후 30°C , 150 rpm에서 배양하였다. 이때 이산화탄소를 포집하여 측정하기 위해 5 mL 바이알(vial)에 1 N KOH를 1 mL씩 넣어 구리선을 이용해 혈청병 마개에 꽂아 함께 배양하였다. 위의 것은 방사선 동위원소가 표지된 ^{14}C -헥사데칸을 넣어 배양하고, 같은 디자인으로 방사선 동위원소가 표지되지 않은 헥사데칸만을 넣어 배양기에서 따로 배양한 후 크로마토그래피(5890 series, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 그 값을 분석하였다.
- <58> 헥사데칸의 분해가 다 끝나면, ^{14}C -헥사데칸을 넣어 준 세트를 추출하였다. 이때 기상으로 휘발된 ^{14}C -헥사데칸량, 배양액을 헥산으로 추출한 미분해 ^{14}C -헥사데칸량, 이산화탄소 발생량(^{14}C), 배양액 중의 잔류되어 있는 수용성 ^{14}C 양 및 균체에서의 ^{14}C 양을 각각 액체섬광계수법(Control Liquid Scintillation Counting)으로 측정하였다.
- <59> 기상으로 휘발된 ^{14}C -헥사데칸량은 각테일 병(bottle)에 각테일 용액을 9 mL 넣고, 실린지를 이용하여 혈청병의 기상 시료를 1 mL 추출 각테일 병에 넣어준 후 측정하였다. 미분해 ^{14}C -헥사데칸량은 배양액을 헥산으로 추출한 용액 1 mL 추출 각테일 병에 넣어준 후 측정하였다. 이산화탄소 발생량은 KOH를 넣어두었던 곳에서 1 mL 추출하여 각테일 병에 넣어 측정하였고, 배지에서의 ^{14}C 양은 배양액에서 1 mL 추출하여 각테일 병에 넣어 측정하였다. 균체에서의 ^{14}C 양은 9000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액은 새로운 각테일 병에 넣고 3차 D.W 를 1 mL 다시 넣어준 후 원심분리(4-5정도 반복)하여 모은 세포에서 측정하였다.
- <60> 표 3은 *Gordonia* sp. SD8에 의한 ^{14}C -헥사데칸 분해 경로상 헥사데칸양(%) 측정결과를 나타낸 것으로, SD8 균주는 유류를 이산화탄소로 완전히 광물화(mineralization)함을 확인할 수 있었다.

표 3

	Control(무접종)	SD8 접종
초기주입량(100 %)	100	100
기상으로 휘발된 양 (%)	1.7 $\pm$ 2.29	0.8 $\pm$ 1.15
수용성 분해산물 양 (%)	1.3 $\pm$ 0.31	34.0 $\pm$ 3.27
미분해 헥사데칸 양 (%)	77.1 $\pm$ 5.38	5.9 $\pm$ 4.57

CO ₂ 로 완전 분해된 양 (%)	0.0 ± 0.02	31.9 ± 0.39
균체로 동화된 양 (%)	0	5.5 ± 1.34
회수율 (%)	80.2 ± 2.95	78.1 ± 5.99

- <62> (5) 유류 분해 근권세균의 ACC 디아미네이즈 활성 확인
- <63> 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주에 대하여 ACC 디아미네이즈(1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase) 활성을 나타내는지를 다음과 같은 방법으로 평가하였다.
- <64> ACC 디아미네이즈는 에틸렌의 전구체인 ACC의 아미노기를 절단하여 분해함으로써 에틸렌 생성을 차단하는 효소로, ACC 디아미네이즈 활성을 지닌 세균은 식물의 성장을 향상시킬 수 있다. 따라서 근권세균의 ACC 디아미네이즈 활성 유무를 배지에 유일한 질소원으로서 ACC를 첨가한 배지에서 세균을 배양하여 세균의 생장이 관찰되면 ACC로부터 아미노기를 절단하여 질소원으로 이용한 것을 의미하며, 즉, ACC 디아미네이즈 활성이 있는 것으로 평가한다.
- <65> 본 평가를 위하여 (NH₄)₂SO₄ 대신 3 mM의 ACC를 넣은 DF 배지를 사용하였으며 (Dell'Amico et al., 2005), DF 배지의 조성은 다음과 같다: 글루코오스 5 g; KH₂PO₄, 4 g; Na₂HPO₄ · 12H₂O, 15 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.2 g; FeSO₄ · 7H₂O, 1.0 mg; B(H₃BO₃으로서), 10 µg; Mn(MnSO₄ · H₂O으로서), 11 µg; Zn(ZnSO₄ · 7H₂O으로서), 125 µg; Cu(CuSO₄ · 5H₂O으로서), 78 µg; Mo(Na₂MoO₄ · 2H₂O으로서), 17 µg; 증류수, 1 L.
- <66> 상기의 ACC를 유일 질소원으로 첨가한 DF 배지 20 mL을 100 mL 삼각플라스크에 넣고 SD8 균주를 접종한 후, 30 °C에서 180 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액의 흡광도를 흡광광도계를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주 성장 여부를 측정하였다. 대조군으로 ACC를 첨가하지 않는 배지에 SD8 균주를 접종한 후 동일한 방법으로 배양한 후, 균주의 성장여부를 측정하였다.
- <67> 그 결과(표 4), SD8 균주는 질소원을 첨가하지 않는 DF배지에서는 생장이 불가능하였으나, ACC를 유일 질소원으로 첨가한 배지에서 생장이 가능하였다. 즉, SD8 균주는 ACC로부터 아미노기를 절단하여 질소원으로 이용할 수 있도록 ACC 디아미네이즈 활성을 가지고 있음이 확인되었다.

표 4

<68>	배지조건	SD8 균주 성장 여부
	ACC 무첨가 DF 배지	-
	ACC 첨가 DF 배지	+

- <69> 따라서 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주는 ACC 디아미네이즈 활성을 나타내므로 식물의 성장을 향상시킬 수 있음을 확인할 수 있다.
- <70> 실시예 2 : 본 발명의 *Gordonia* SD8 균주를 이용한 유류 오염 토양의 정화 효과 확인
- <71> 본 발명의 *Gordonia* SD8 균주를 이용하여 유류로 오염되어 있는 토양을 정화처리하기 위하여 토양경작법을 사용하였다. 주유소 부지로 사용된 유류 오염 토양의 평균 오염도는 총 석유탄화수소 농도로 약 7,200 ± 2,450 mg/kg 이었다. 미생물 배양액을 원심분리 후 MSM 배지로 재 현탁시켜 제조되고, SD8 균주 농도가 10⁹ - 10¹⁰ CFU/mL 인 미생물 제제를 1kg의 오염토양 당 10⁹ CFU가 되도록 골고루 살포하였고, N, P, S가 주성분인 영양제를 C/N/P 비율이 100:10:1 이 되도록 투여하였다. 오염토양 층은 약 50cm가 되도록 하였고, 매 2일 마다 경작기를 사용하여 토양층을 뒤집어 주었다. *Gordonia* sp. SD8 균주로 처리하는 동안 토양 시료를 채취하여 총 석유탄화수소 농도를 분석한 결과를 표 5에 나타내었다. 토양 시료 중의 총 석유탄화수소의 농도는 토양 시료를 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피를 사용하여 분석하였다.
- <72> 표 5는 *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용한 오염 토양의 경작법의 효율을 나타낸 것으로, 본 실시예에 의한 정화방법은 약 20일 경과 후에 총 석유탄화수소의 약 92%, 약 30일 경과 후에 총 석유탄화수소의 약 94%를 제거할 수 있었다. 따라서 본 발명의 *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용한 유류 오염 토양의 정화 효과가 우수함을 확인하였다.

표 5

<73>

처리기간 (일)	윤활유 농도 (mg/kg)	제거효율 (%)
0	7,200±2,450	0
10	2,170±730	70
20	580±340	92
30	450±170	94

<74>

실시예 3 : 본 발명의 *Gordonia* sp. SD8 균주와 식물을 이용한 유류 오염 토양의 정화 효과 확인

<75>

본 발명의 *Gordonia* sp. SD8의 배양액을 원심분리 후 MSM 배지로 재현탁시켜 제조한 액상 미생물제제와 유류 내성 식물인 옥수수를 이용하여 디젤로 오염된 토양 정화 처리를 하였다.

<76>

토양에 디젤을 인위적으로 첨가하여 총 석유탄화수소 농도로 약 10,000 mg/kg이 되도록 오염을 시켰다. 디젤 오염 토양 10 kg을 화분에 넣고 옥수수씨를 파종하여 14일 동안 재배하였다. 14일 동안 재배 후, *Gordonia* sp. SD8 균주를 이용하여 제조한 액상의 미생물 제제($10^9 - 10^{10}$ CFU/mL)를 1kg의 오염토양 당 10^9 CFU가 되도록 골고루 살포한 후, 14일 동안 옥수수를 재배하였다. 옥수수를 재배하는 동안 2일에 한번 물을 주어 토양이 건조하지 않도록 하였다. 실험 종료 후, 옥수수는 수거하여 뿌리에 있는 토양을 물로 세척하여 완전히 제거한 후, 건조시켜 옥수수의 건조중량을 측정하였다. 또한, 토양시료는 채취하여 토양 중의 디젤(총 석유탄화수소)의 농도는 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피를 사용하여 분석하였다. 또한, *Gordonia* sp. SD8 균주 접종 효과를 비교 분석하기 위해, SD8 균주를 접종하지 않고 옥수수만을 동일한 방법으로 재배하는 실험을 동시에 수행하였다.

<77>

그 결과, 표 6에 나타난 바와 같이, 식물(옥수수)만을 이용하여 유류 오염 토양을 정화 처리한 경우에는 디젤 제거 효율이 88%이었으나, 식물(옥수수)과 *Gordonia* sp. SD8을 함께 사용한 경우에는 디젤 제거 효율이 95%로 향상됨을 확인 할 수 있었다.

<78>

또한, 상기 1-(5)에서 확인한 바와 같이, ACC 디아미네이즈 활성을 나타내는 *Gordonia* sp. SD8 균주를 접종함으로써 식물(옥수수)의 생장이 약 1.6배 정도 향상되어, 본원 *Gordonia* sp. SD8 균주가 식물의 생장을 촉진시킴을 확인할 수 있었다.

<79>

따라서, 본 발명의 균주는 유류로 오염된 토양에서 식물의 생장을 촉진시킴으로써 식물을 이용한 유류 오염 토양의 정화 효율을 더욱 향상시키는 효과를 나타낼 수 있다.

표 6

<80>

조건	옥수수	옥수수 + <i>Gordonia</i> sp. SD8
4주 경과 후 잔류 디젤 농도 (mg/kg)	1,240±260	460±70
4주 경과 후 디젤 제거 효율 (%)	88	95
4주 경과 후 옥수수 건조 중량 (g)	2.5±0.56	4.1±0.23

발명의 효과

<81>

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 분리한 *Gordonia* sp. SD8 균주는 저분자 석유계 탄화수소 화합물 뿐만 아니라, 탄소수 16 이상의 고분자 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있고, 고농도의 디젤을 분해가능하며, 유류를 이산화탄소로 완전히 광물화하는 우수한 유류 분해능을 나타내고, ACC 디아미네이즈 활성을 가지므로 식물생장을 촉진시킬 수 있는 신규한 미생물로서, 본 균주를 이용하여 유류 오염 토양을 정화하는 것이 가능할 뿐만 아니라, 본 균주를 식물과 함께 사용하여 유류 오염 토양을 정화할 때 식물만을 이용하는 경우에 비하여 유류 오염 정화 효율을 극대화하는 작용효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 균주는 식물상 정화에 적용할 경우에 유류 오염 토양에서 식물의 생장을 촉진시킴으로써 식물을 이용한 유류 오염 토양의 정화 효율을 향상시키는 효

과도 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 본 발명에서 분리한 고르도니아 속 SD8 균주의 16S rDNA의 PCR 산물을 염기서열 분석한 결과이다.
- <2> 도 2는 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주 접종여부 및 디젤 첨가농도 별로 시간(일)에 따른 균주 성장 정도를 측정한 결과도이다.
- <3> 도 3은 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주 접종여부 및 디젤 첨가농도 별로 시간(일)에 따른 디젤 농도를 측정 한 결과도이다.
- <4> 도 4는 본 발명의 고르도니아 속 SD8 균주 접종 배양 후 0일 및 5일 후의 잔류디젤농도를 가스크로마토그래피로 측정한 결과도이다.

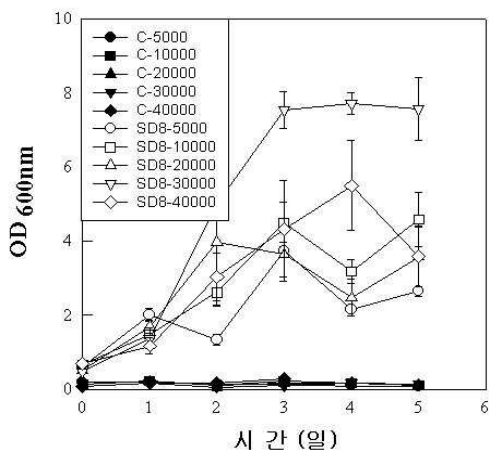
도면

도면1

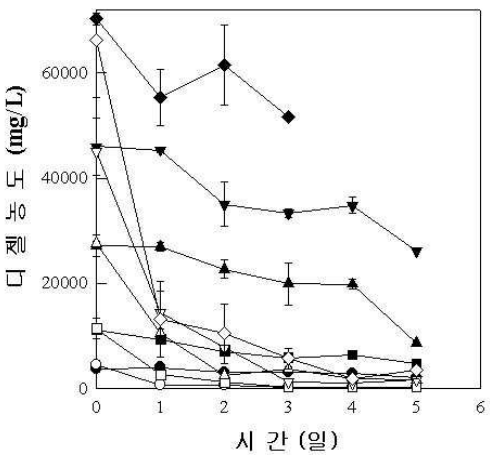
```

AACACGCTGGTGTGATCTGCCCTGGACTCTGGGTATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTACA
TCGCATGGTGTTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTCAGGATGGGCCCGCGCCTATCAACTTGTTGGTGGGGTAATGGC
CTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCACAGGGACGAAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAACAACGGCCAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGC
CGTCGTCTGTGAAATTCGCAACTCAATTGTAGGCGTGCAGCGGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACT
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAA
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTAC
TAGGTGTGGGGCTCATTTACGAGTTCGTCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTAAACTCAAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGAAAAGCTATAGAGATATAGCCCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTATTGCCAGCGGG
TTATGCCCGGGGACTTGCAAGGAACTGC
    
```

도면2

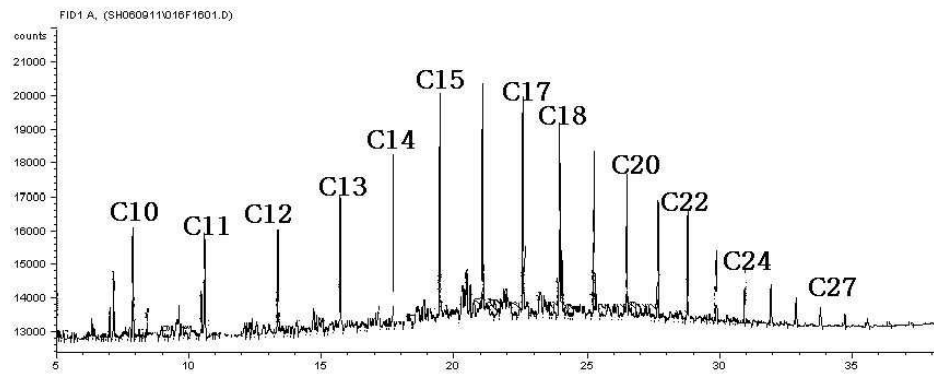


도면3

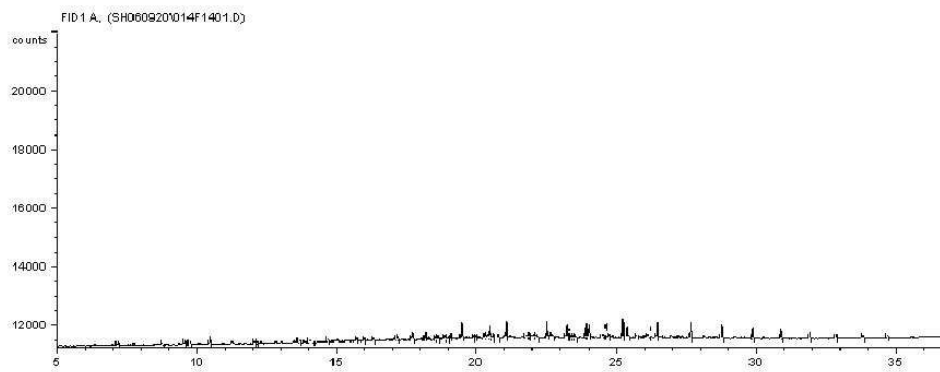


도면4

(a) 0 일



(b) 5 일후



서열 목록

서열목록 전자파일 첨부