

Pseudomonas aeruginosa KS47에 의한 절삭유의 생물학적 분해

김란희 · 이상섭*

경기대학교 일반대학원 생명공학과

본 실험은 생분해가 어려운 절삭유를 단일 균주에 의해 생물학적 처리를 하는 데에 목적이 있다. 절삭유, 절삭페 유로부터 호기 균주 81개를 분리하여 이중 절삭유 분해능이 가장 높은 균주로, 48시간 내에 90.4%를 제거한(초기 농도 699.1 mg/L) KS47을 선별하였다. KS47은 형태학적, 생리·화학적, 16S rDNA 염기서열, 그리고 지방산 분석을 통해 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다. *P. aeruginosa* KS47은 절삭유를 탄소원으로 사용하여 성장할 수 있었으며, 절삭유 분해시, 최적 분해 조건은 1.5 g/L(wet weight), pH 7.0, 30°C이었다. 최적 조건 하에서 절삭유의 제거능을 본 결과, 1,060 mg/L의 절삭유를 12시간 내에 83.7% 제거함을 확인하였다.

Key words □ biodegradation, cutting oil, *Pseudomonas aeruginosa* KS47

절삭유는 금속가공 과정에서 절삭공구와 금속간의 마찰을 줄이고, 윤활, 냉각 기능을 하는 것으로 알려져 있다(2, 5, 10, 21). 절삭유는 원유를 정제한 기유(base oil)에 공정특성에 맞는 첨가제를 혼합함에 따라 비수용성 절삭유(straight or insoluble oil), 수용성 절삭유(water-soluble oil), 합성 절삭유(synthetic oil) 및 준합성 절삭유(semi-synthetic oil)로 구분한다(7). 최근, 환경적 측면에서 비수용성 절삭유의 작업 중과 작업 후에 발생하는 오일 미스트로 인한 유독성 문제가 제기됨에 따라, 수용성 절삭유의 사용이 점차 증가하고 있다(1). 또한, 수용성 절삭유는 비수용성 절삭유에 비해 비용이 절감되고 냉각성이 우수하여 일반적인 금속 절삭에 많이 사용되고 있다. 수용성 절삭유는 주로 mineral oil (60~85%)과 emulsifier (5~20%), 첨가제(surfactants, biocides, etc.)들로 구성되어 있다. 사용 후, 절삭유는 오염을 일으키고, 화학물질, 방부제 등등이 혼합되어 있기 때문에, 불쾌한 냄새를 동반한다(8). 절삭유 폐기물의 발생량은 기계, 철강, 자동차 등 금속산업의 발달에 따라 매년 약 13.8%씩 증가하고 있는데, 폐 절삭유의 발생량은 연간 140만 톤을 상회하는 것으로 알려져 있다(15). 이러한 절삭유를 처리하기 위해 물리적, 화학적, 그리고 생물학적 처리에 대한 연구가 수행되었다(12, 13, 14, 15, 16). 1990년대 초에는 주로 물리적, 화학적 방법, 또는 ultrafiltration, 그리고 증발의 방법으로 절삭유를 처리하였고(6, 15), 생물학적 처리에 의한 절삭유 제거는 거의 이루어지지 않았다. 생물학적 처리는 때에 따라 물리적 방법에 의한 처리와 함께 병행하여 이루어졌다(11, 21). 최근에는 물리, 화학적 처리방법 보다 경제적인 생물학적 처리가 선택되어 사용되어지는 경우가 늘고 있다(8). 그러나, 현재까지 미생물에 의한 절삭유의 생분해에 관한 연구는 혼합균주(10, 23, 25)에 의해 분해된다고 보고되어져 있다.

Agrobacterium radiobacter, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Microbacterium esteraromaticum*, 그리고 *Microbacterium saperdae*의 혼합균주는 48,000 mg/L의 절삭유를 100시간 내에 80% 제거하지만, 이들을 모두 혼합하여 주었을 때, 적용 가능성이 있었다(23). 혼합균주에 의한 절삭유 분해 연구에 반해, 단일 균주에 대한 연구는 절삭유를 탄소원으로 써 사용하여 성장하는 균주분리에 관한 연구는 수행되었으나(1, 3, 20, 24), 이들의 절삭유 분해능에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 현재까지 보고된 연구 중, *Pseudomonas aeruginosa* EMS1이 4일 만에 2,800 mg/L의 절삭유를 45% 제거할 수 있다는 보고만 되어 있을 뿐이었다(1).

따라서, 본 실험에서는 생분해가 잘되지 않는 절삭유를 단일 균주를 사용하여 단시간 내에 생물학적으로 처리하는 것을 목적으로 실험을 수행하였다. 창원 공업단지 산업폐수 내 슬러지로부터 호기성 균주를 분리하였고, 이 중 고효율로 절삭유를 분해하는 단일 균주를 찾아내어 동정하였다. 또한, 다양한 조건의 농도, pH, 그리고 온도에 따른 절삭유 최적 분해 조건을 확립하였다.

재료 및 방법

균주분리 및 사용배지

창원공업단지의 산업폐수 처리시스템 내 슬러지를 채취하여 1% (v/v)를 Nutrient Broth (Difco, USA)에 넣어주고, 28°C에서 48시간 동안 호기배양해 주었다. Nutrient Agar (Difco, USA)에 streak plate method를 사용하여 균주를 분리하였다. 본 실험의 분해실험에서 사용된 절삭유는 S사에서 제조된 수용성 절삭유로, micro emulsion type, pH 9.4, 그리고 희석시 우유 빛을 띠는 특징을 갖는다. 일반적으로, mineral oil이 60~85%로 가장 많은 비중을 차지하고 있고, emulsifier, surfactant가 5~20%를 차지하고

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-249-9642, Fax: 82-31-249-9139
E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

Table 1. Composition of Bushnell-Haas medium^a

Component	Amount
K ₂ HPO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
FeCl ₃	0.05 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g

^apH 7.0±0.2, DW (1000 ml)

있다. 그 이외에 첨가물질(chelating agents, coupling agents, anti-weld agent, anti-foaming agents, alkaline reserve, dyes, corrosion inhibitors, biocides bioresistant components)이 포함되어 있다. 최소배지는 Bushnell-Haas (BH) medium이 사용되었다. BH medium의 조성은 다음과 같다(Table 1). 고형 배지는 1.5% 한천을 첨가하여 제조하였다.

절삭유 고효율 분해 균주 선별

절삭유를 고효율로 분해하는 균주를 선별하기 위하여, 스크린 테스트를 실시하였다. 배지는 절삭유를 filtering하여 1/5 희석한 후, 이것을 BH medium에 0.3% (v/v) 첨가해 준 것을 사용하였다. 멸균된 40 ml test tube에 16 ml의 멸균된 배지를 넣은 후, NB 배지에서 24시간 동안 배양한 균주 1% (v/v)를 각각의 tube에 접종하였다. 접종한 균주는 28°C에서 48시간 동안 진탕 호기 배양을 실시하였다. 24, 48시간에 40 ml test tube로 부터 2 ml씩 채취한 후, membrane filter (ADVANTEC MFS Inc., 0.2 µm, 47 mm)로 여과하였다. Filter 여과시, 손실되는 절삭유의 양은 공시험(blank)을 같이 측정함으로써, 측정되었다. 시험의 유기물 양은 CODcr 측정법(9)에 의해 분석되었다.

고효율 균주 동정

절삭유를 고효율로 분해하는 균주로 선정된 균주는 형태학적 특징 및 생리·생화학적 특성, 유전학적 분석, 그리고 지방산 분석을 검정하여 동정하였다. 형태학적 특징은 그람 염색을 하여 광학현미경(BX50F, Olympus, Japan)을 통하여 형태, 크기 및 그람 양성/음성을 판별 하였으며, 생리·생화학적 특징은 API Kit 20NE (Biomérieux, France)를 사용하여 효소 작용, 다양한 탄수화물의 가수분해, 당 발효, 다양한 탄소원 이용 여부 등의 검정 실험을 하여 판별하였다. 이에 따른 분석 결과와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (4)를 참고하여 동정하였다. 또한, 16S rDNA 추출, 지방산 분석(18)을 실시하였다.

(1) 16S rDNA 추출

선별 균주의 16S rDNA 염기서열 분석은 universal primer인 forward primer, 27F; 5'-CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'와 reverse primer, 1492R; 5'-GGA TCC CAG GCC GGG AAC GTA TTC AC-3'을 사용하였다. PCR을 하기 위해

50 µl의 PCR tube에 template DNA 약 50 ng, 2.5 mM dNTP 2.5 µl, PCR buffer 5 µl, primer 각각 2 µl (20 pmol), DNA polymerase 0.5 µl (2.5 U, super biotech Inc, Korea)을 넣은 후, 증류수를 이용하여 최종 부피 50 µl의 반응액을 만들었다. PCR은 iCycler (BioRad, USA)를 사용하여 수행하였다. 반응 조건은 94°C 5분간 반응, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초를 30회 실시하였으며, 마지막으로 72°C에서 30초로 DNA를 증폭하였다. PCR 산물은 1.0% agarose gel에 전기영동 하였으며 전기영동을 통해서 분리된 각 PCR 산물은 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 pGEM-T vector (Promega, USA)에 삽입하였으며 이를 *E. coli* DH5α에 형질전환 시킨 후 blue/white screening을 통하여 clone을 선별하였다. Clone은 플라스미드를 정제한 후 플라스미드에 삽입된 유전자의 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 basic local alignment search tool (BLAST)를 이용하여 GenBank database의 염기서열과 비교분석하여 동정하였다.

(2) 지방산 분석

선별된 균주를 1.5% tryptic soy agar plate에 streak한 후, 28°C에서 24시간 동안 호기배양 하였고, 40~60 mg의 콜로니를 시험관에 옮겼다. 15%의 NaOH를 첨가 한 50% methanol 용액 1 ml를 가하고, 10초 동안 vortex를 이용하여 섞어주고, 100°C에서 25분 동안 열을 가하고, 1분 동안 식혀주었다. 여기에 2 ml의 methanolic-HCl (6 N HCl 325 ml + Methanol 275 ml)을 첨가한 후, vortex를 이용하여 10초 동안 섞어주었다. 80°C에서 10분 동안 열을 가한 후, 5분 동안 식혀 주었다. 1.25 ml의 hexane/methyl-tert-butylether (1:1)을 첨가하고, 10분 동안 섞어준 다음, 반응액을 실온에 정치하여 2개의 층으로 분리시킨 후, 하층액을 제거하였다. 3 ml의 희석 NaOH (10.8 g NaOH/900 ml 증류수)를 첨가하고 5분 동안 섞어주고, saturated NaCl을 몇 방울 떨어 뜨려, 불순물을 가라앉히고, 지방산이 추출된 상층액의 2/3를 GC vial로 옮겨주었다. GC 분석은 flame ionization detector (FID)를 장착한 HP 6890N gas chromatography (Agilent, USA)를 이용하였으며, TSBA50 5.00 library (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA)를 통하여 library 내의 균주들과 비교 분석 후, 동정하였다.

성장도 측정

분리된 고효율 균주가 절삭유를 탄소원으로 사용하여 성장하는지 여부를 확인하기 위해 절삭유가 포함된 무기배지에서의 성장도를 측정 하였다. 1 L 배양병에 500 ml의 NB (Difco, USA) 배지를 넣은 후, 0.1% (v/v)의 균주(5.04×10^8 cells/ml)를 접종하여 주었다. 24시간 후, NB에서 배양된 균(5.54×10^8 cells/ml) 0.1% (v/v)를 500 mg/L 절삭유가 포함된 500 ml 무기배지에 접종하여 주었다. 분리된 고효율 균주는 NB에 0.1% (v/v) 접종하여 주었을 경우, 2시간 동안 유도기(lag phase)를 보였으며 (OD 0.028), 이후 7시간까지 성장하다가(OD 0.294) 8시간 때부터(OD 0.309) 평형을 이루었다. 세포수를 측정하기 위해 1시간 간격으

로 대수성장기(exponential phase)인 8시간 동안 1 ml씩 채취 후, haemocytometer를 사용하여 균성장을 측정하였다.

회분식 실험

Screening을 통해 얻은 절삭유를 고효율로 분해하는 균주의 최적배양 인자를 구하기 위하여, 균주 접종 농도, pH, 온도에 따른 회분식 실험을 실시하였다. 균주의 성장을 위해 500 ml bottle에 200 ml의 NB (Difco, USA) 배지를 넣고 멸균한 후, 균주를 1% (v/v) 접종하였다. 28°C에서 24시간 동안 진탕 호기 배양하였다. 배양된 균주는 원심분리(6,500×g, 15분)하여 획득하였다. 실험조 건은 각각 균주 농도(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/L), pH (4, 6, 7, 8), 온도(15, 25, 30°C)이었다. 이외의 조건은 균농도 1.0 g/L (wet weight), pH 7, 온도 30°C, 그리고 절삭유 농도 1,060 mg/L였다. 각 최적 조건 확립 후, 최적조건 하에서 고효율 균주에 의한 절삭유 분해능을 관찰하였다. 모든 실험에서 균주 접종 후 0, 3, 6, 9, 12시간에 각각의 배양 병에서 15 ml의 시료가 채취되었다. 시료는 원심분리(6,500×g, 15분)한 후, 상등액을 membrane filter (ADVANTEC MFS Inc., 0.2 µm, 47 mm)로 여과하여 유기물의 양을 CODcr법(9)에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

균주 순수 분리

창원공업단지 산업폐수 슬러지로 부터 호기 균주 81개를 분리하였다. 분리된 균주는 모두 그람 음성균이었으며, 이 중 5개는 cocci 형태였고, 나머지 76개의 균주는 0.8~1.0 × 1.0~3.0 µm 크기의 rod 형태였다. 분리된 균주는 산업폐수 내의 다양한 절삭유, 첨가제들에 대해 내성을 갖고 있을 것이라 사료된다.

절삭유 고효율 분해 균주 선별

절삭유로부터 분리한 81개 균주 중 수용성 절삭유 분해능이 높은 균주를 선별하기 위하여 스크린 테스트를 실시하였다. KS 27, 47, 62, 63, 64는 절삭유 초기 농도 699.1 mg/L에서 48시간 내에 각각 71.1, 90.4, 69.0, 77.1, 그리고 74.3% 제거하였다. 또한, KS 31, 35 균주는 771.8 mg/L의 절삭유를 각각 48.1, 42.7% 제거하였고, KS 39, 40 균주는 8.0, 8.9%의 제거율을 보였다(초기농도 1075.9 mg/L). 이 결과들로부터, 절삭유를 고효율로 분해하는 5개의 균주(KS 27, 47, 62, 63, 64)가 선별되었다. 5개 균주 중, 가장 제거율이 높은 KS47 (90.4%)이 절삭유 고효율 분해 균주로 선별되었다(Table 2).

고효율 분해 균주 동정

스크린을 통해서 얻은 고효율 절삭유 분해 균주 KS47의 형태학적 특성조사와 생리·생화학적 실험을 실시한 결과, *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다. 형태학적으로 그람 음성 균으로써, 1.0~1.2 × 1.5~1.7 µm의 크기를 가지고, 막대형이었다(Fig. 1). Pyocyanin production, catalase, oxidase, gelatin hydrolysis, glucose, gluconate, capronate, adipate, malate, citrate 이용에서

Table 2. Comparison of removal efficiency by selected strains

(Unit : mg/L)

Strain No.	Time (hr)		Rem. (%) ^a
	0	48	
27	699.1(±5.1)	202.4(±6.9)	71.1
47	699.1(±5.1)	67.3(±12.8)	90.4
62	699.1(±5.1)	216.9(±63.4)	69.0
63	699.1(±5.1)	160.0(±3.4)	77.1
64	699.1(±5.1)	179.4(±15.4)	74.3
31	771.8(±1.7)	400.5(±52.3)	48.1
35	771.8(±1.7)	442.3(±49.7)	42.7
39	1075.9(±13.7)	989.8 (±1.7)	8.0
40	1075.9(±13.7)	980.1(±39.4)	8.9

^a Removal efficiency

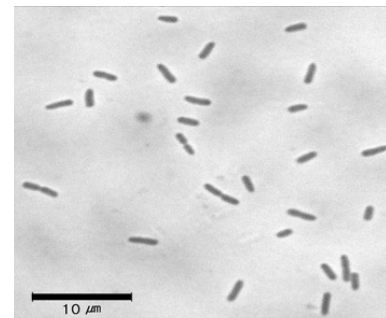


Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of KS47 strain that has high removal ability. Gram-negative and rod shape (1.0~1.2×1.5~1.7 µm) (BX50F, Olympus, Japan).

양성반응, arabinose, mannose, maltose, phenylacetate는 음성반응으로 생리·생화학적 분석에 의해서 *Pseudomonas aeruginosa*와 99.9% 일치하였으며, *P. fluorescens*와는 0.1% 일치하여 *P. aeruginosa*로 동정되었다. Bergey's manual의 *P. aeruginosa* type strain (ATCC 10145^T) 균주(4)와 생리·생화학적 특성을 비교한 결과, 서로 일치하는 것을 확인하였다(Table 3). 16S rDNA 염기서열을 GenBank database를 이용하여 분석한 결과, *Pseudomonas* sp.와 99%의 유사도를 보였다(Fig. 2). 또한, 지방산 분석 결과 C_{10:0}, C_{10:0} 3OH, C_{12:0}, C_{12:0} 2OH, C_{12:1} 3OH, C_{12:0} 3OH, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{17:1} ω8c, C_{17:0} cyclo, C_{18:1} ω7c, C_{18:0}와 C_{19:0} cyclo ω8c가 검출되었다. C_{16:0}이 24.99%, C_{18:1} ω7c가 36.12%로 주요 지방산 성분으로 검출되었다. TSBA50 5.00 library (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA) 내의 균주들과 비교 분석하여 *Pseudomonas aeruginosa* (82.9%)로 동정되었다(Table 4).

고효율 분해 균주의 성장 측정 및 회분식 실험

P. aeruginosa KS47은 절삭유가 포함된 무기배지에서 1.0×10⁶ cells/ml의 농도에서 8시간 내에 1.8×10⁷ cells/ml로 성장하였다.

Table 3. Morphological and physiological characteristics of strain KS47

Character	Strain KS47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a
Gram stain	-	-
Shape	Rod	Rod
Size (width×length)	1.0~1.2 µm × 1.5~2.0 µm	0.5~0.7 µm × 1.5~3.0 µm
Pyocyanin production	+	+
Catalase	+	+
oxidase	+	+
Gelatine	+	+
Glucose	+	+
Arabinose	-	-
Mannose	-	-
Gluconate	+	+
Capronate	+	+
Adipate	(+)	+
Malate	+	d
Citrate	+	+
Phenylacetate	-	-

^a ATCC 10145^T, data obtained from Bergey's manual of Systematic Bacteriology (4).

P. aeruginosa KS47의 최적배양인자를 도출하기 위하여 균주 접종 농도, pH, 온도에 따른 회분식 실험을 실시하였다. 균 농도 0.5, 1.0, 1.5, 그리고 2.0 g/L (wet weight)를 접종 하였을 때, 12 시간 후에, 각각 73.6(±1.0), 82.6(±0.5), 83.7(±0.2), 그리고 80.8 (±1.6)%의 제거율로, 균주 농도가 1.5 g/L (wet weight)일 때가 제거율이 가장 높았다(Fig. 3). pH 4, 6, 7, 그리고 8의 조건에서는 각각 29.2(±0.1), 79.9(±1.6), 81.8(±0.1), 그리고 69.0(±0.2)%의 제거율로, pH 7일 때 제거효율이 가장 높았다(Fig. 4). 온도별 조건 15, 25, 그리고 30°C에서는 각각 77.1(±0.8), 81.2(±0.8), 그

Table 4. Fatty acid profiles of strain KS47

Shorthand name	Systematic name ^a	Content (%)
10:0	Capric acid	0.28
10:0 3OH	3-Hydroxycapric acid	3.71
12:0	Lauric acid	4.58
12:0 2OH	2-Hydroxylauric acid	5.34
12:1 3OH	3-Hydroxylauric acid	0.25
12:0 3OH	3-Hydroxylauric acid	5.21
14:0	Myristic acid	0.73
16:0	Palmitic acid	24.99
17:1	Heptadecenoic acid	0.17
17:0 cyclo	cis-9,10-Methylene hexadecanoic acid	0.60
18:0	Stearic acid	0.35
18:1 ω7c	-	36.12
19:0 cyclo ω8c	-	0.38

^a Data obtained from reference (18).

리고 83.4(±0.3)%의 제거율을 보여, 30°C에서 가장 효율이 높음을 알 수 있었다(Fig. 5). 위의 결과들을 통해, KS47의 최적 배양 조건은 균농도 1.5 g/L (wet weight), pH 7, 그리고 배양온도 30°C임을 알 수 있었다. 최적 배양 조건 하에서 절삭유 분해능을 관찰한 결과, 12시간 내에 1,060 mg/L의 절삭유를 83.7% 제거(74.1 mg/L/h)하였다(Fig. 6). 이전 연구에서 몇몇 균주들은 절삭유를 탄소원으로 사용하여 성장할 수 있다고 보고되어 졌다(1, 3, 20, 24). 특히, *Pseudomonas*는 절삭유로부터 가장 흔히 발견되는 균주이다(8). 절삭유에서 분리된 균주 중, 35%를 *Pseudomonas* sp.가 차지하고 있었고, 이 중, *P. aeruginosa* 15%, *P. alcaligenes* 3 %, *P. mendocina* 3%, *P. pseudoalcaligenes* 8%, 그리고 *P. stutzeri* 7%의 비율로 나타났다(22). 절삭폐유로부터 분리된 균주 중, 가장 성장도가 좋은 균주인 *Alcaligenes*, *Pseudomonas*,

TTCGATTCACGATTACTAGCGATTCGACITCAGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGA TCGGTTTATGCGA TTAGCTCCAGC
TCGCGGCTTGGCAACCCCTTTGTACCGACATTG TAGCAGCTG TGA GCGCTGGCCGTAAAGGGCCA TGATGACTTGACG TCATCCGACCTTCCT
CGGGTTTGTACCGGCGAGCTCCTTAGAGTGCCACCCGAGG TGCTGTAAC TAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCGAACAT
CTCAGCAGACGAGCTGACGACAGCCATG CAGCAGCTG TGCTGAGTTCCGGAAGG CACCAATCCA TCCTGGAAGTTCTCAGCATG TCAAGGC
CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAA TTAACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCGCTCAATTCATTGAG TTTTAACTTGGGCG
GTACTCCCGAGGCGCTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGA TCCTAAGGA TCCCAACGGCTAGTCGACA TCGTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCTGTTTGGCTCCGACGCTTTCGCACTCAGTG TCAGTATCAGTCCAGGTGG TCGCCTTCGCGAC TGGTGTTCCTTCTAT
ATCTACGCAATTTCACCGCTACAGAGAAATTCACCAACCTCTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTGGATGCA GTTCGAGGTTGAGCCCGGG
GATTTTCAGATCCCACTTGTG TGAACACCTAGCGCGCTTTACGCGCGTAATTCGGATTACGCTTSCACCGCTTCGTA TTACGCGCGCTGCTGG
CAGCAAGTTAGCGGCTGCTTATTC TGTGGTACGTC AAAACAGCAAGGTA TTAACCTTAC TCGCC TCGC TCGCACTTAAGTGGCTTACAA TC
CGAAGACCTTCTTACACACGCGGCTAGCTGGATCAGGCTTTCGCGCAATTGTCCCAATATTCGGCAGCTGCTGCC TCGCGTAGGAGTC TGGACCG
TGCTCAGTTCCAGTGTGATGATCATCTCTCAGACAGATTACGGATCGCTCGCTTGGTAGGGCTTTTACCGCAACCACTAGGTAATCCGACCT
AGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCGGAAGATCCCGACCTTTC TCGC TCAGGACGATAGCGGTATTAGGCGCGCTTTCGGGAGCTTATCCCGCAC
TACGAGGCGAGATTCTTAGGCATTACTACCGCTCGCGCGCTGAATCAGGAGGCAAGCTCGCTTCA TCGGCTCGACTTGCATGTGTTAG

Fig. 2. 16S rDNA gene alignment. Each 16S rDNA gene was compared by using BLAST function of the National Center for Biotechnology Information.

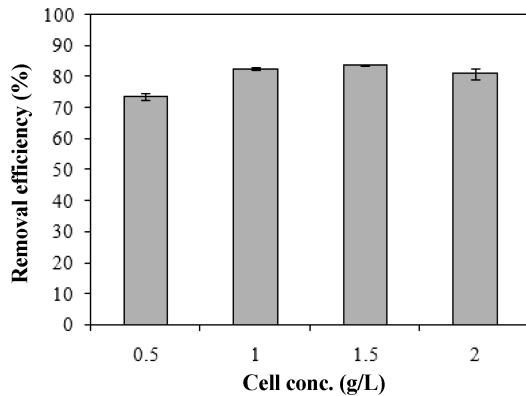


Fig. 3. Cutting oil removal efficiency at various cell concentrations. Cell concentrations were 0.5 g/L (wet weight), 1.0 g/L (wet weight), 1.5 g/L (wet weight) and 2.0 g/L (wet weight). Others conditions were set by cell concentration 1.0 g/L, pH 7.0, temperature 30°C, and substrate concentration 100 mg/L. Cutting oil removal efficiency at each inoculation ratio was 73.6%, 82.6%, 83.7%, and 80.8% for 12 hr. 1.5 g/L was determined as optimum.

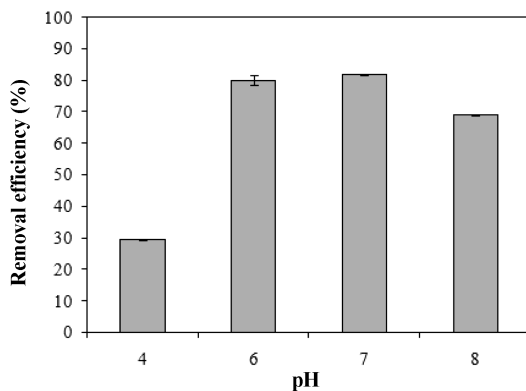


Fig. 4. Cutting oil removal efficiency at various pH conditions (4, 6, 7, 8). Others conditions were set by cell concentration 1.0 g/L, pH 7.0, temperature 30°C, and substrate concentration 100 mg/L. Cutting oil removal efficiency ratio was 29.2%, 79.9%, 81.8%, and 69.0% for 12 hr. pH 7 was determined as optimum.

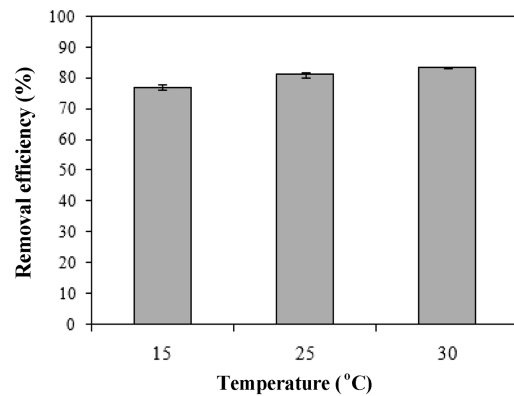


Fig. 5. Cutting oil removal efficiency at various incubation temperatures (15, 25, 30°C). Other conditions were set by cell concentration 1.0 g/L, pH 7.0, temperature 30°C, and substrate concentration 100 mg/L. Cutting oil removal efficiency ratio was 77.1%, 81.2%, and 83.4% for 12 hr. 30°C was determined as optimum.

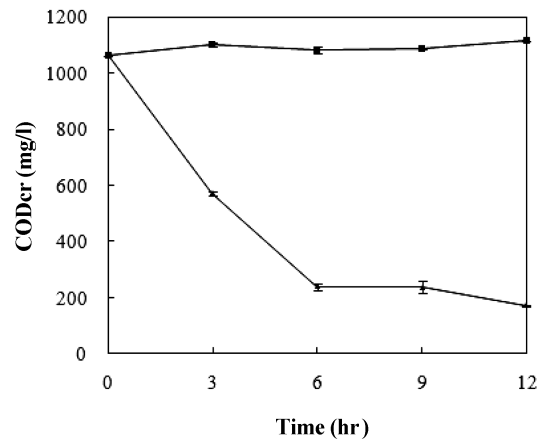


Fig. 6. Biodegradation of cutting oil by *P. aeruginosa* KS47 on optimum degradation conditions (cell concentration 1.5 g/L, pH 7, temperature 30°C) for 12 hr. Cutting oil concentration was 1,060 mg/L (■; blank, ▲; inoculated). Each curve represents the average of three independent experiments.

그리고 *Micrococcus*는 절삭폐유를 탄소원으로 사용할 수 있었다 (3). 또한 다양한 종류의 절삭유에서 *P. aeruginosa*, *P. oleovorans*의 성장도가 가장 좋았다(20). *Acinetobacter* 균주는 배양 24시간 내에 높은 성장률을 보였고(약 10^9 CFU/ml), *Pseudomonas*는 절삭유의 구성 성분인 oleic acid를 탄소원으로 사용하여 48시간 내에 10^9 CFU/ml까지 성장 하였다(24). *P. aeruginosa*는 절삭유의 구성성분인 항 미생물제와 방부제에 저항성을 가지고 있다고 보고되어져 있다(17, 19). *P. aeruginosa* KS47 또한 첨가제에 대한 저항성을 가지며 절삭유를 탄소원으로 사용하여 성장하는 것이라고 생각된다. 이와 같이 이전 연구들에서는 절삭유를 탄소원으로써 사용하는 단일 균주의 분리 및 동정에 대해서만 중점을 두고 있었고, 이들의 절삭유 분해연구는 거의 이루어지지 않았다. 절삭유를 분해한다고 알려진 *P.*

aeruginosa EMS1은 최적조건 하에서 균체는 초기 약 3.0×10^8 cells/ml에서 8.0×10^8 cells/ml로 증가하였고, 배양 96시간째부터 대수 증식기에 들어갔다. 2,800 mg/L의 절삭유는 4일 내에 87% 제거되었다(1). 이와 비교하여 보았을 때 *P. aeruginosa* KS47은 8시간 내에 1.0×10^6 cells/ml에서 1.8×10^7 cells/ml로 증식하였고, 1,060 mg/L의 절삭유를 12시간 내에 83.7% 제거할 수 있었다. 따라서, *P. aeruginosa* KS47의 분해효율(74.3 mg/L/hr)은 *P. aeruginosa* EMS1의 분해효율보다 훨씬 높음을 확인하였다(13.1 mg/L/hr). 이 결과로부터, *P. aeruginosa* KS47은 단일균주로써, 단기간에 고농도의 절삭유를 제거할 수 있을 것이라 사료된다. 또한, 본 연구의 모든 실험에서 *P. aeruginosa* KS47에 의한 절삭유 분해는 모두 6시간 내에 이루어 졌으며, 이후의 시간에서는 분해는 되지 않고, 평형의 그래프를 나타내었다(Fig. 3, 4, 5, 6).

이로보아, *P. aeruginosa* KS47은 6시간인 단시간 내에 1,060 mg/L의 절삭유를 80% 이상 분해할 수 있는 것으로 보인다. 이는 본 연구의 절삭유가 단순히 분해가 아닌 다른 요인에 의해 제거되는 것으로 생각되어 앞으로 이 부분에 관한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

감사의 말

이 논문은 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. R21-2005-000-10045-0)

참고문헌

1. 차미선, 한창민, 박근태, 조순자, 손홍주, 이상준. 2003. 수용성 금속가공유 폐액의 생물학적 처리. *Korean J. Life Sci.* 13, 917-923.
2. Baltzer, I.M., M. Sandin, B. Ahlstrom, S. Allenmark, M. Edebo, E. Falsen, K. Pedersen, N. Rodin, R.A. Thompson, and L. Edebo. 1989. Microbial growth and accumulation in industrial metal working fluids. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2681-2689.
3. Benka-Coker, M.O. and A. Olumagin. 1995. Waste drilling fluid utilising microorganisms in a tropical mangrove swamp oilfield location. *Bioresour. Technol.* 53, 211-215.
4. Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Edition, p. 354-358.
5. Bu, K.L.M., E.L. Prince, and C.J. Knowles. 1997. The ability of selected bacterial isolates to utilise components of synthetic metal working components of synthetic metal working fluids as sole sources of carbon and nitrogen for growth. *Biotechnol. Lett.* 19, 791-794.
6. Burke, J.M. 1991. Waste treatment of metal working fluids, a comparison of three common methods. *Lubr. Eng.* 47, 238-246.
7. Cookson, J.O. 1977. An introduction to cutting fluids. *Tribology Int.* 10, 5-7.
8. Cheng, C., D. Phipps, and R.M. Alkhaddar. 2005. Treatment of spent metalworking fluids. *Wat. Res.* 39, 4051-4063.
9. Clescerl, L.S., A.E. Greenberg, and A.D. Eaton. 1998. Standard methods. 20th ed., p. 5-17.
10. Deepak, D., K.V. Anand, and R. Bhargava. 1994. Biodegradation kinetics of metal cutting oil: evaluation of kinetic parameters. *Chem. Eng. J.* 56, B91-B96.
11. DTI (The Department of Trade and Industry). 2000. A guide to biological treatment for metalworking fluid disposal.
12. Kim, B.R., M.J. Matz, and F. Lipari. 1989. Treatment of a metal cutting fluids wastewater using an anaerobic GAC fluids wastewater using an anaerobic GAC fluidized bed reactor. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61, 1430-1439.
13. Kim, B.R., S.G. Anderson, and J.F. Zemla. 1992. Aerobic treatment of metal cutting fluid wastewater. *Wat. Environ. Res.* 64, 258-262.
14. Kim, B.R., J.F. Zemla, S.G. Anderson, D.P. Stroup, and D.N. Rai. 1992. Anaerobic removal of COD in metal cutting fluid wastewater. *Wat. Environ. Res.* 64, 216-222.
15. Kim, J.S. and J.S. Kim. 1997. Oily wastewater treatment of the metalworking fluid. *J. Nakdong Environ. Res. Inst.* 2, 13-30.
16. Kim, B.R., N.R. Devi, F.Z. Jerome, L. Frank, and P.V. Harvath. 1994. Biological removal of organic nitrogen and fatty acids from metal cutting fluid wastewater. *Wat. Res.* 28, 1453-1461.
17. Li, K., F. Aghazadeh, S. Hatipkarasulu, and T.G. Ray. Health risks from exposure to metal-working fluids in machining and grinding operations. *Int. J. Occup. Saf. Ergon.* 9, 75-95.
18. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis, p. 199-204. In Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands (eds.), *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
19. Sondossi, M., H.W. Rossmoore, and J.W. Wireman. 1985. Observations of resistance and cross-resistance to formaldehyde and a formaldehyde condensate biocide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Biodeterior.* 21, 105-106.
20. Tant, C.O. and E.O. Bennett. 1958. The growth of aerobic bacteria in metal cutting fluids. *Appl. Microbiol.* 6, 388-391.
21. Thomas, S.M. 2001. It's a bug's life for MWF disposal. *Mater. World* 9, 21-23.
22. Van Der Gast, C.J., C.J. Knowles, M.A. Wright, and I.P. Thompson. 2001. Identification and characterisation of bacterial populations of an in-use metal working fluid by phenotypic and genotypic methodology. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 47, 113-123.
23. Van Der Gast, C.J., A.S. Whitely, M. Starkey, C.J. Knowles, and I.P. Thompson. 2003. Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents. *Biotechnol. Prog.* 19, 1156-1161.
24. Van Aken, S.F., J.A. Brown, Jr., W. Young, I. Salmeen, T. McClure, S. Napier, Jr., and R.H. Olsen. 1986. Common components of industrial metal working fluids as sources of carbon for bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1165-1169.
25. Van Der Gast, C.J. and I.P. Thompson. 2005. Effects of pH amendment on metal working fluid wastewater biological treatment using a defined bacterial consortium. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 357-366.
26. Viaraghavan, T. and G.N. Mathavan. 1990. Treatment of oily waters using peat. *Wat. Poll. Res. J. Can.* 25, 73-90.

(Received November 16, 2007/Accepted January 7, 2008)

ABSTRACT: Biodegradation of Cutting Oil by *Pseudomonas aeruginosa* KS47

Lan-Hee Kim and Sang-Seob Lee* (Department of Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea)

Cutting oils are emulsionable fluids widely used in metal working processes. Their composition is mineral oil, water, and additives (fatty acids, surfactants, biocides, etc.) generating a toxic waste after a long use. Cutting oils

also affect colour, taste and odour of water, making it undesirable for domestic and industrial uses. In these days, conventional treatment methods as evaporation, membrane separation or chemical separation have major disadvantages since they generate a concentrated stream that is more harmful than the original waste. In this study, our purpose is to reduce cutting oils by using biological treatment. Eighty one strains were isolated from cutting waste oil of industrial waste water sludge under aerobic conditions. Among these strains, KS47, which removed 90.4% cutting oil in 48 hr, was obtained by screening test under aerobic conditions (pH 7, 28°C). KS47 was identified as *Pseudomonas aeruginosa* according to morphological, physiological and biochemical properties, 16S rDNA sequence, and fatty acid analysis. *P. aeruginosa* KS47 could utilize cutting oil as carbon source. In batch test, we obtained optimal degradation conditions (1.5 g/L cell concentration, pH 7, and temperature 30°C). Under the optimal conditions, 1,060 mg/L cutting oil was removed 83.7% (74.1 mg/L/hr).