

혼합배양 해양세균에 의한 Bunker-C유의 생물분해

박인식 · 박중연 · 서근학* · 홍용기**
부산수산대학 자원생물학과 · *부산수산대학 응용화학과 ·
**부산수산대학 생물공학과
(1987년 1월 27일 수리)

Biodegradation of Bunker-C Oil by the Mixed Enrichment Culture of Marine Bacteria

In-Sick PARK, Jung-Youn PARK, Kuen-Hack SUH*, and Yong-Ki HONG**

Department of Marine Biology, National Fisheries University of Pusan,
Nam-gu, Pusan, 608 Korea

*Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan,
Nam-gu, Pusan, 608 Korea

**Department of Biological Science and Technology, National Fisheries University of
Pusan, Nam-gu, Pusan, 608 Korea
(Received January 27, 1987)

A mixed population of marine bacteria was obtained to catalize the biodegradation of bunker-C fuel oil by means of the enrichment culture technique. Samples used for the enrichment culture were collected from sea water and sediments in the vicinity of Pusan, Chungmu, and Ulsan in Korea. As the biodegradation of bunker-C oil proceeded, the number of bacteria increased from 1.1×10^6 to 8.7×10^8 cells per ml when pH was bufferized by 0.1 M Tris-HCl buffer to 7.6, then oil dispersion increased to OD₅₄₀ 2.2 and approximately 48% of the oil was biodegraded in 10 days. Oil dispersion was absolutely dependent on the addition of nitrogen and phosphate sources in sea water. High and low sulfur-containing bunker-C and crude oil could be dispersed similarly. Bunker-C oil was dispersed rapidly at the pH ranging from 7.0 to 8.0 and dispersed to the amount of 7.5 g per liter of sea water medium.

서 론

근년 석유정유공업과 석유화학공업의 발전에 따라 이들 공장에서의 폐수 및 수송도중의 유출등으로 석유오염이 자연생태계 특히 연안해역에 큰 공해문제로 대두되고 있다. 이들 유류는 쉽게 부유되어 넓은 해역에 얇은 피막을 형성하고, 수용성 성분은 해양생물에 직접 독성을 나타내거나, 만성적으로 이들 성분의 자연분해시 용존산소의 소비등으로 해양생물에 많은 악영향을 미친다¹⁻³⁾. 그러나 이들 오염된 유류는 자연계에서 수개월 또는 수년만에 자연분해되어지는데 이는 휘발성분의 증발, 광분해, 침전등의 물리화학적 작용과 해양미생물등에 의한 생물분해작용에 의하여 주로 이루어진다^{1,4)}. 이와같은 석

유이용세균이 유류에 견디는 기작을 가지고 이를 영양원으로 이용할 수 있다는 사실⁵⁾이 알려진 이후로, 미생물의 배양기질로서 석유계 탄화수소의 이용에 관한 많은 발표가 있었다⁶⁻⁸⁾. 이로서 석유류오염을 해양미생물을 이용하여 제거시키고자 많은 시도를 하였으나 이들 대부분은 원유의 분해에 관한 연구이었다⁹⁻¹²⁾.

우리나라 연안해역의 유류오염중 주종을 이루는 연료용 bunker-C유에 대한 생물분해 연구는 거의 볼 수 없었으므로 본 실험에서는 bunker-C유와 함께 enrichment culture시켜 만든 혼합배양세균을 사용하여 해수중의 bunker-C유 분해에 미치는 영향을 조사하여 발표하고자 한다.

재료 및 방법

1. 배지조성

Bunker-C유를 탄소원으로 이용할 수 있는 혼합배양세균을 얻기 위해서 bunker-C유 7.8 g, K_2HPO_4 0.01 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, Tris-aminomethane 12.1 g 을 천연해수 1 l에 녹여 pH를 7.6으로 조정 한 후 enrichment culture 시켰다.

2. 균원시료

혼합배양세균은 부산의 용당, 자갈치 앞바다, 해운대, 울산의 태화강 하부와 방어진 내항·외항, 그리고 충무항에서 채취한 해수 및 해저질을 상기의 배지에 접종하여 5일간격으로 5회 이상 enrichment culture 시켜 보존하면서 각 실험에 사용하였다. 이때 세균들의 분포는 gram 양성 균이 17%, gram 양성 구균이 24%이고, gram 음성 균이 25%, gram 음성 구균이 34%를 차지하였으며 전체중 약 30% 세균이 plasmid를 가진 균으로 구성되어 있었다.

3. 사용한 유류

유류는 울산 유공정유공장에서부터 구입한 것으로 황함량이 4.0%인 고험 함유 bunker-C유를 주로 사용하였으며 황함량이 1.6%인 저황 함유 bunker-C유, 황함량이 0.1%인 Brunei Champion 산 원유와 황함량이 2.57%인 Kweit 산 원유를 비교 사용하였다.

4. 배양조건

20 ml bunker-C유 배지를 넣은 500 ml Linger병에 enrichment culture 한 혼합배양세균 700 μ l를 접종하고 18°C에서 분당 12회씩 360° 회전하는 회전식 배양기를 제작하여 배양시켰다.

5. 분산정도 측정

유류의 분산정도를 측정하기 위하여 Reisfeld의 방법¹⁾과 같이 bunker-C유 배양액을 골고루 심하게 흔들 후 5 ml를 시험관(150×14 mm)에 즉시 옮기고 5분동안 정치시킨 다음, 액의 중간부위로부터 2 ml의 시료액을 조심스럽게 뽑아내어 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 분산정도를 표시하였다.

6. Bunker-C유 분해량 측정법

Bunker-C유 분해량을 측정하기 위하여 배양액 10 ml에 동량의 CCl_4 를 가하여 석유류성분을 완전히 용출되게 한 뒤 CCl_4 로 적당히 희석하여 oil content analyzer(Horiba OCMA-200)로써 잔존 유량을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 배양시간에 따른 분해효과

Enrichment culture시킨 혼합배양세균을 유일한 탄소원으로 bunker-C유만이 첨가된 배지에서 배양시키면서 생균수변화, pH 변화 및 bunker-C유의 유화분산정도를 조사한바 Fig.1과 같다. Fig.1A에서는 0.1M Tris-HCl 완충용액으로 pH를 7.6으로 일정하

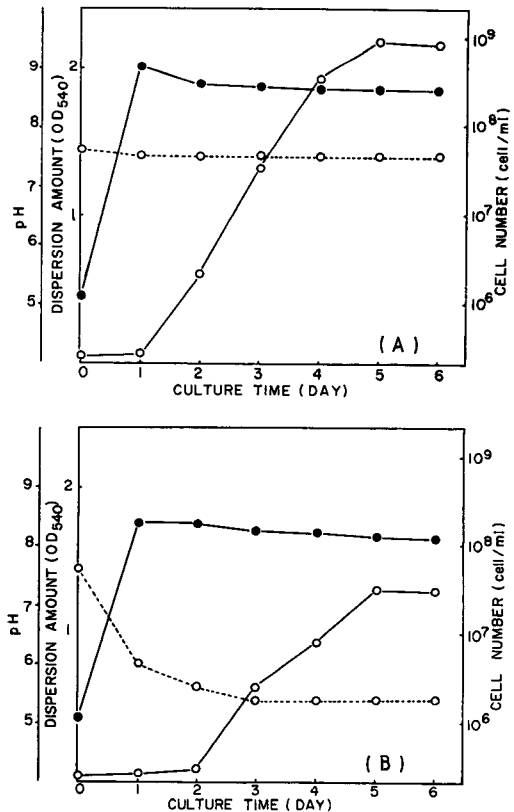


Fig. 1. Changes in the pH, cell number and dispersion of Bunker-C oil during incubation of the mixed culture. The medium was stabilized (A) and not stabilized (B) by Tris-HCl buffer; pH(○··○), cell number (●—●), and dispersion amount (○—○).

게 유지시켜 줌으로써 생균수는 1.1×10^6 cell/ml 에서 배양 1일이 지나면서 8.7×10^8 cell/ml 으로 약 800배 정도 증가하였고 유탁도도 5일후 2.2까지 증가하였다. 반면에 pH 완충제가 없는 Fig. 1B에서는 접종시 pH 7.6에서 3일후 pH 5.4로 떨어졌고 생균수도 5×10^8 cell/ml 정도로만 증가하고 유탁도도 5일째 1.3정도만 나타내었다. 그러므로 유류의 분해에 따른 pH의 감소를 반드시 제어해 주어야만 한다는 사실을 알 수 있다.

2. 분해량 측정

혼합배양세균에 의한 bunker-C 유의 생물분해에 따라서 유탁도증가에 이어 잔존유량의 감소를 oil content analyzer로 비교 조사해 본 바 Fig. 2에서와 같이 초기 7,800 ppm에서 배양이 진행됨에 따라 유탁도의 증가는 보이나 mineralization에 의한 유분량은 별로 감소하지 않다가 유탁도가 최고치에 달하는 5일째에 7,200 ppm으로 감소하였고 그 후 급격히 감소하여 10일째 4,100 ppm만이 잔존하여 약 48%의 bunker-C 유가 분해되었다.

Aclas 등¹¹⁾은 원유에 대하여 18일이 지나면서 약 70%, 그리고 Dibble 등¹²⁾은 3주일만에 약 70%가 생물분해되었다고 하였으나 본 실험의 bunker-C 유는

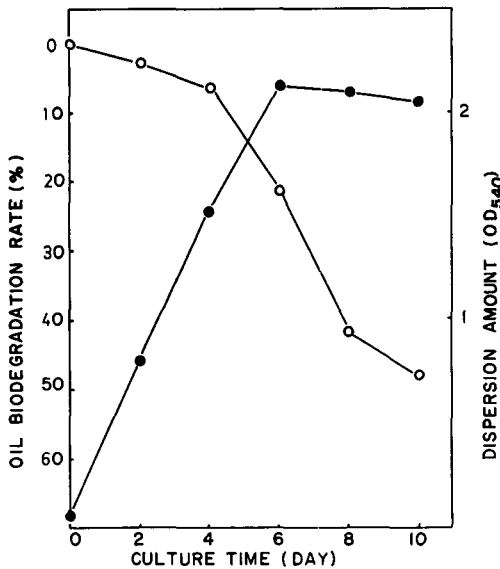


Fig. 2. Relationship between dispersion and biodegradation amount during incubation. Biodegradation rate measured by oil content analyzer (○—○), and dispersion amount measured by spectrophotometer (●—●).

원유보다 난분해성물질을 더 많이 함유하고 있으므로 이같은 차이가 난다고 생각된다.

3. 영양염의 영향

해수에서의 bunker-C 유 분산에 필요한 영양염의 요구를 조사하기 위하여 질소원으로 7.6 mM(NH₄)₂SO₄, 인산원으로 0.057 mM K₂HPO₄, 미량성분으로 0.05% yeast extract를 각각 조합하여 첨가해 보았다.

그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 질소원과 인산원만 첨가된 경우에서 yeast extract가 더 첨가된 경우와 마찬가지로의 분산 효과가 있었으므로 본 혼합배양 세균은 bunker-C 유 분산에 미량성분이 반드시 필요하지는 않다는 것을 알 수 있으며, 또 해수에서 유류분해에 질소원과 소량의 인산원 첨가가 제한요인으로 반드시 필요하다는 것을 확인할 수 있었다.

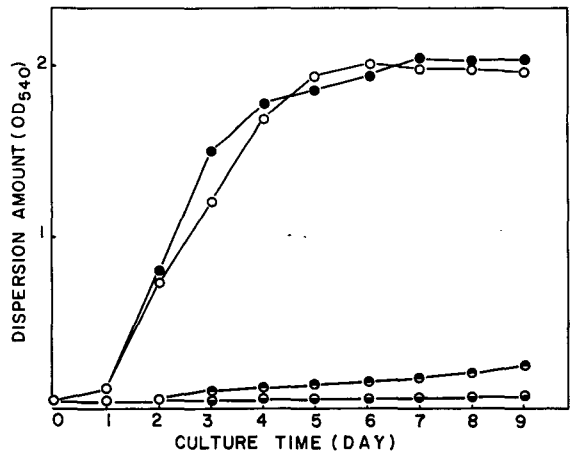


Fig. 3. Effect of nutrients affecting on the dispersion of Bunker-C oil. Sea water was supplemented with (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ and Yeast extract (●—●); (NH₄)₂SO₄ and K₂HPO₄ (○—○); (NH₄)₂SO₄ (●—○); K₂HPO₄ or sea water only (○—●).

4. 유류종류별 분산정도

황합량이 서로 다른 4종류의 유류 즉 황합량이 4.0%인 고험합유 bunker-C 유를 비롯하여 1.6%인 저황합유 bunker-C 유, 0.1%인 Brunei Champion 원유 및 2.57%인 Kweit 원유를 탄소원으로 배양한 결과 Fig. 4에서와 같은 결과를 보였다. 일반적으로 석유의 유기황화합물들이 생물에 변이원이나 발암원

이 될수 있다고 알려져 있으나^{14,15)} 본 혼합배양세균들은 bunker-C유와 원유 모두 황함량과 유류의 질에 크게 관계없이 잘 유화분산시킬 수 있었으며 고�황함유 원유경우만 그 유도기가 조금 길었다.

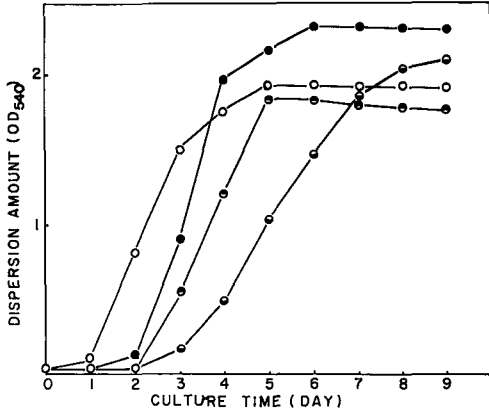


Fig. 4. Dispersion of high and low sulfur-containing bunker-C oil and crude oil. 4.0% sulfur-containing bunker-C oil(○—○), 1.6% sulfur-containing bunker-C oil(●—●), 0.11% sulfur-containing Brunei Champion crude oil (○—○), and 2.57% sulfur-containing Kweit crude oil (○—○).

5. pH의 영향

Bunker-C유의 분산에 미치는 pH의 범위를 조사하기 위하여 초기 배지 pH를 일정하게 pH 4에서 pH 6까지는 0.05 M citric acid-Na·citrate 완충용액으로 조정시키고 pH 7에서 pH 9까지는 0.1 M Tris-HCl

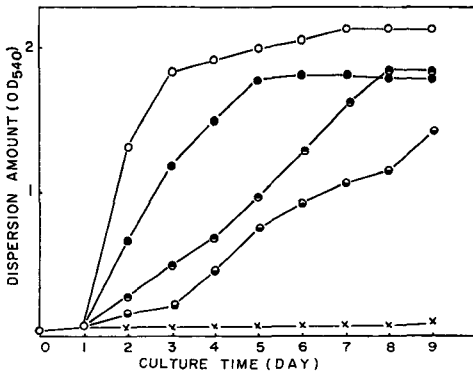


Fig. 5. Effects of pH on the dispersion of bunker-C oil. pH 5 (○—○), pH 6 (○—○), pH 7 (○—○), pH 8 (○—○), pH 4 and pH 9 (○—○).

완충용액으로 조정하여 실험하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 5에서 pH 8사이의 비교적 넓은 범위에서 유화분산시킬 수 있으며 그 중에서도 특히 pH 7과 pH 8사이에서 가장 높은 유탁도 증가를 나타냄으로서 이는 해양의 중성과 약알칼리성 범위에서 잘 작용할 수 있다는 것을 알 수 있다.

6. Bunker-C유 농도에 따른 영향

Bunker-C유의 농도를 12.5 g/l 까지 2.5 g/l 단위씩 첨가하여 분산정도를 조사해본 결과 Fig. 6에서와 같이 2.5 g/l에서는 초기 유류농도가 너무 낮아서 완전 유화 분산후에도 유탁도가 낮게 나타났으며 7.5 g/l까지는 쉽게 분산시킬 수 있다는 것을 볼 수 있고 12.5 g/l까지는 적응시간이 약간 더 길었지만 서서히 유화분산 될수는 있었다.

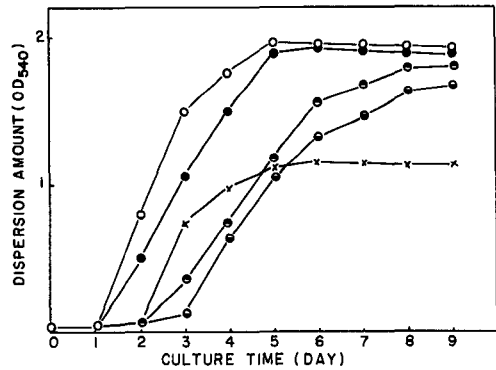


Fig. 6. Effects of bunker-C oil concentrations on the dispersion. 2.5 g/l(×—×), 5 g/l(○—○), 7.5 g/l(○—○), 10 g/l(○—○), and 12.5 g/l(○—○).

요 약

최근 석유류의 유출로 인하여 자연생태계의 오염이 심각한 문제로 대두되고 있으므로 본 연구에서는 부산, 충무, 울산 연근해의 해수 및 해저질을 채취하여 bunker-C유와 함께 enrichment culture 시켜 만들어진 혼합배양세균을 사용하여 소량의 영양염이 첨가된 해수에서 bunker-C유의 생물분해에 미치는 영향을 조사하였다. 혼합배양세균들의 배양시간에 따른 bunker-C유 유화분산 정도는 pH를 7.6으로 완충시켜주면 유탁도는 2.2까지 증가하고 생균수도 8.7×10^8 cell/ml 까지 증가하며 배양 10일만에

약 48%의 유류를 생물분해시켰다. 그리고 영양염의 영향에 있어서는 질소원과 인산원의 첨가가 필수적으로 요구되며, 유류의 황함량과 유류의 질에는 별로 영향을 받지 않고 높은 유탁도를 나타내었다. pH의 범위는 7.0에서 8.0사이에서 높은 유탁도 증가를 보이며, 유류의량은 7.5 g/l 농도까지 유화분산을 잘 시켰다.

文 獻

- Petrakis, L. and F.T. Weiss. 1980. Petroleum in the marine environment. American Chemical Society, Washington D.C., 1-22.
- Shailubhai, K. 1986. Treatment of petroleum industry oil sludge in soil. TIBTECH. 4, 202-206.
- Baker, J.M. 1975. Marine ecology and oil pollution. Wiley and Sons. New York, 255-277.
- Davis, J.B. 1956. Microbial oxidation of hydrocarbons. Ind. Eng. Chem. 48, 1444-1448.
- Chakrabarty, A.M., D.A. Friello and L.H. Bopp. 1978. Transposition of plasmid DNA segments specifying hydrocarbon degradation and their expression in various microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3109-3112.
- Devereux, R. and R.K. Sizemore. 1980. Incidence of degradative plasmids in hydrocarbon-utilizing bacteria isolated from the Gulf of Mexico. Dev. Ind. Microbiol. 22, 409-414.
- Mulkins-Phillips, G.J. and J.E. Stewart. 1974. Effect of environmental parameters on bacterial degradation of Bunker-C oil, crude oil and hydrocarbons. Appl. Microbiol. 28, 915-922.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons; an environmental perspective. Microbiol. Rev. 180-209.
- Reisfeld, A., E. Rosenberg and D. Gutnick. 1972. Microbial degradation of crude oil; factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure culture. Appl. Microbiol. 24, 363-368.
- Jobson, A., M. McLaughlin, F.D. Cook and D.W.S. Westlake. 1973. Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. Appl. Microbiol. 27, 166-171.
- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1972. Degradative and mineralization of petroleum in sea water; limitation by nitrogen and phosphorus. Biotech. Bioeng. 14, 309-318.
- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1972. Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal water. Biotech. Bioeng. 14, 297-308.
- Dibble, J.T. and R. Bartha. 1976. Effect of iron on the biodegradation of petroleum in sea water. Appl. Environ. Microbiol. 31, 544-550.
- Walker, J.D., R.R. Colwell and L. Petrakis. 1975. Microbial petroleum degradation; application of computerized mass spectrometry. Can. J. Microbiol. 21, 1760-1761.
- Fedorak, P.M. and D.W.S. Westlake. 1983. Microbial degradation of organic sulfur compounds in Prudhoe Bay crude oil. Can. J. Microbiol. 29, 291-296.