

포항근해 원유분해세균의 분포 및 원유분해능

이창호 · 권기석 · 서현효 · 김희식 · 오희목 · 윤병대

한국과학기술연구원 생명공학연구소 환경미생물전문연구Unit

Distribution and Biodegradation of Crude oil-Degrading Bacteria in P'ohang Coastal Area

Chang-Ho Lee, Gi-Seok Kwon, Hyun-Hyo Suh, Hee-Sik Kim, Hee-Mock Oh, and
Byung-Dae Yoon

*Environmental Microbiology Research Unit
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST*

ABSTRACT

Seawater samples were collected from P'ohang coastal area during April 1995 - January 1996. The distribution of total heterotrophic bacteria and crude oil-degrading bacteria (CDB) were studied. In addition, biodegradation of crude oil was investigated through mono and mixed culture. The heterotrophic bacterial distribution was in the range of 4.1×10^4 - 1.2×10^5 CFU/ml, respectively. The percent of crude oil-degrading bacteria against total heterotrophic bacteria was 0.05 - 0.54% which was lower than other marine samples reported. Therefore it could be suggested that the distribution of crude oil-degrading bacteria in the seawater of P'ohang coastal area was highly affected by presence of petroleum hydrocarbon. Taxonomical characteristics of 26 isolates were investigated. The results of identification were showed 7 genera which were *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Citrobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Moraxella* spp., *Rhodococcus* spp., and *Serratia* spp. Appearance of Enterobacteriaceae indicated that the seawater was polluted with wastewater. Also genus of *Bacillus* had predominant in CDB on P'ohang coastal area. In flask culture, biodegradation of crude oil was enhanced by addition of mixed culture of CDB.

Key word : Crude oil-degrading bacteria, distribution, biodegradation

요약문

포항근해의 정점을 대상으로 1995년 4월부터 1996년 1월까지 3개월 간격으로 중속영양세균과 원유분해세균의 분포를 조사하였다. 또한, 분리된 원유분해세균의 단일 및 혼합배양을 통하여 원유분해능도 조사하였다. 중속영양세균의 분포는 $4.1 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$ CFU/ml 이었으며 중속영양세균에 대한 원유분해세균의 분포비는 0.05 - 0.54%로서 지금까지 보고된 타지역보다 낮은 수치였다. 이 결과에서 포항근해의 원유분해세균의 분포는 육지로부터 유입되는 석유계 탄화수소에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 사료된다. 원유분해능이 우수한 26 균주를 분리·동정한 결과 *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Citrobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Moraxella* spp., *Rhodococcus* spp., 그리고 *Serratia* spp. 등의 7개 속이 나타났고, 장내세균의 출현은 해수내 오수의 유입을 반영하고 있었다. 또한 *Bacillus* 속 균주가 포항근해의 원유분해세균의 우점종으로 밝혀졌다. 원유분해세균을 이용한 플라스크 배양에서 원유분해는 혼합배양에 의해 증가하였다.

주제어 : 원유분해세균, 분포, 생분해

1. 서론

유해화학물질에 의한 환경오염 부하가 급증하여 인류보건 및 생태계에 위협을 주고 있다. 이러한 유해화학물질 중 유류는 현대사회에서 에너지원 및 각종 화학물질의 원료로 사용되어 그 이용범위와 사용량이 계속적으로 증가하고 있으며, 해양에 있어서 전 세계적으로 매년 천만톤 이상이 오염되고 있어 생태계에 큰 피해를 유발시키고 있다¹⁾. 해상활동의 선박사고와 선박청소 및 항만에 위치한 공장폐기물의 무단방류 등에 의한 것으로 볼수 있으며 유류에 의한 생태계 오염의 피해는 Exxon Valdez호의 Alaska oil spill²⁾을 비롯하여 국내에서도 1986년 부산 영도 앞바다와 1987년 인천의 유조선 사고, 1995년 여천의 유조선 좌초 등 해마다 증가하고 있는 실정이다³⁾. 해양에 유출된 유류는 저비등점의 방향족 화합물등이 대기층으로 휘발하게 되며 수용성 성분들이 녹아들게되고 그 외의 성분들이 얇은 피막을 형성하여 넓은 지역에 분포하게 되는데⁴⁾, 이러한 현상이 지속될 경우 유피막에 의한 산소

및 태양광선의 차단으로 생물체의 성장에 큰 피해를 주게된다⁵⁾. 유류의 대부분은 휘발과 미생물에 의해 제거되는데 1946년 ZoBell⁶⁾에 의해 매우 다양한 미생물이 유류분해에 관여하며 이러한 미생물이 자연계에 널리 분포하고 있다는 사실이 밝혀진 이후로 유류오염문제를 미생물학적 측면에서 해결하려는 노력들이 계속되어 왔고 국내에서도 유류분해세균의 분포 및 분해특성에 관한 많은 연구가 보고되고 있다⁶⁻¹⁰⁾. 일반적으로 탄화수소 분해세균의 분포와 총세균수에 대한 비율은 탄화수소의 오염정도를 나타내는 환경지표로 볼 수 있고, 총세균에 대한 탄화수소 분해세균의 비율은 탄화수소의 오염에 대한 정도를 정량적으로 표시할 수 있을 정도로 매우 유용한 환경인자로 사용된다.

본 연구는 한국 포항의 포구를 대상으로 원유분해세균의 비율을 살펴봄으로써 이 부근의 석유계 탄화수소 오염정도를 파악하고자 계절별로 시료를 채취하여 이화학적 성질과 총 중속영양세균에 대한 원유분해세균의 비율을 측정하였고, 우수한 원유분해세균의 분리와 균주동정 및

혼합배양에 의한 원유의 분해정도를 gas chromatography를 이용하여 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 분리용 시료 및 배지조성

분리용 시료는 1995년 4월 부터 1996년 1월 까지 3개월 간격으로 포항의 포구를 정점으로 채취하여 원유분해세균 분리를 위한 시료로 사용하였다 (Fig. 1). 원유분해세균을 분리하기 위하여 원유를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 Arabian light 원유를 1.0% (v/v) 첨가한 무기염 최소배지를 이용하여 분리하였다.

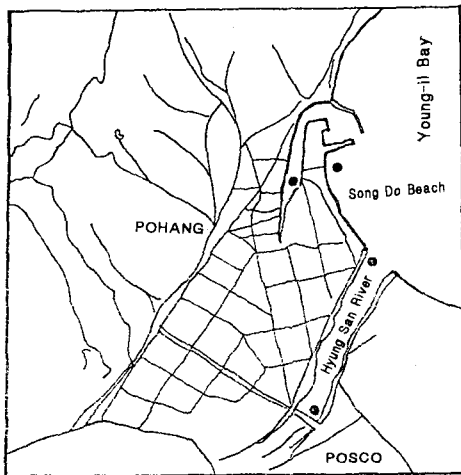


Fig. 1. 1A map of sampling-site in P'ohang coastal area.

2.2 이화학적 환경인자 분석

채취한 시료의 이화학적 성질을 조사하기 위하여 수질오염공정시험법¹¹⁾에 준한 방법으로, 수온, pH, 염분, DO 등은 현장에서 측정하였으며, COD, SS, 총질소(T-N), 총인(PO₄-P) 등은 멸균된 bottle에 담아 4℃의 저온상태로 운반하여 실험실에서 분석하였다.

2.3 원유분해세균수 및 분포비

원유분해세균의 계수는 Standard Method에 준

하여 MPN (most probable number) method를 사용하였으며, 진탕배양기를 사용하여 실온에서 120 rpm으로 14일 배양 후 탁도 및 oil층의 제거를 양성반응으로 판정하고 MPN표¹²⁾를 기준으로 원유분해세균수를 산출하였다. 원유분해세균의 분포비는 NaCl이 포함된 영양한천 평판배지 상에서 3일간 생육시킨 후 계수한 총 증속영양세균수와 MPN법에 의해 산출된 원유분해세균수와의 비로서 측정하였다.

2.4 원유분해세균의 분리 및 동정

정점에서 채취한 시료는 분리용 최소배지에 접종하여 30℃, 진탕배양기(130 strokes/min)에서 4-5일간의 농화배양을 4번 반복한 후 원유분해능을 가지는 세균만을 순수분리하였다. 분리된 원유분해세균의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성은 Bergey's manual of determinative bacteriology¹³⁾와 Manual for the identification of medical bacteria¹⁴⁾에 준하여 조사하였으며, 그 결과를 바탕으로 "Bergy's Manual of Systematic Bacteriology"¹⁵⁾를 참조하여 동정하였다.

2.5 원유분해세균의 분해특성

분리된 원유분해세균의 분해특성은 분해능이 우수한 균주를 대상으로 무기염 최소배지에 유일 탄소원 및 에너지원으로 Arabian light 원유 (sulfur 함량, 0.1%)를 1%(v/v)되게 첨가한 후 배양시간에 따른 균체수 및 유화활성¹⁶⁾과 원유전환율¹⁷⁾을 측정하여 나타내었다.

2.6 혼합배양에 의한 원유분해능

단일 및 혼합배양에 의한 원유분해능의 차이를 조사하기 위하여 대조구(no bacteria)와 포항의 포구에서 분리한 원유분해세균인 PO2-3, PO7-2 그리고 PO8-2를 접종(10⁴ cells/ml)한 경우 그리고 PO4-3(10⁴ cells/ml)를 접종한 경우를 gas chromatography를 사용하여 비교하였다.

2.7 Gas chromatography 분석

분석에 사용된 gas chromatography는 Varian 3700, 불꽃 이온화 검출기(FID)를 사용하였으며, silicon OV-101을 10% 침윤시킨 chromosorb w (80-100 mesh) stainless steel column을 사용하였다. Carrier gas로는 질소를 사용하였고, 유속은 분당 30 ml로 하였고 공기와 수소는 각각 50 psi로 조정하였다. Column은 90-270°C로 분당 5°C씩 증가 시켰으며, injector와 detector는 200°C와 240°C로 각각 조정한 후 시료 1.0 µl를 주입하여 분석하였다. 시료는 분액깔대기에 배양액과 2배의 n-hexane을 넣고 잘 혼합한 유분을 n-hexane층으로 이동시킨 후 회수한 n-hexane층을 화학분석용 여지(Whatman No. 42) 위에 무수 황산나트륨 10 g을 채운 깔대기에 통과시켜 여과한 다음 여액을 회전식 진공증발기를 이용하여 용매를 제거한 후 남은 여액을 검액으로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 시료의 이화학적 특성

1995년 4월 부터 1996년 1월 까지 채취한 포항 포구의 시료에 대한 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 수온은 1월을 제외하고 평균 20°C였으며 pH는 6.5~6.7로 일반해수의 pH인 약알칼리성보다 낮은 약산성을 보여주고 있다. 용존산소농도는 1월과 4월은 4.3~6.0 mg/l로 호기적환경이었지만 7월과 10월은 낮은 용존산소농도를 보여주고 있으며 염분농도는 일반적인 근해의 염분농도인 2~3%를 나타냈다. 화학적산소요구량은 비교적 높은 상태는 아니었으나 1월에는 103 mg/l로 산소요구량이 높은 것이 특징이다. 영양염류의 농도는 대부분이 저농도로써 영양염류(질소와 인)가 미생물 증식의 제한인자로 사료된다. 이와 같은 포항 포구의 이화학적 성질은 주변의 생활하수가 유입되고 선박의 잦은 왕래로 인하여 오염이 심화되고 있는 상태로 보

Table 1. Physicochemical characteristics of sea water sampling time in P'ohang

Sampling time	Temp. (°C)	pH	COD (mg/l)	DO (mg/l)	SS (mg/l)	Salinity (%)	Conductivity (µmho/cm)	T-N (mg/l)	TP (mg/l)
Apr. 15, 1995	17.2	6.68	56	4.33	136.4	2.17	30.8	10.64	2.49
Jul. 27, 1995	23.9	6.50	30	1.96	297.5	2.73	49.6	8.89	0.58
Oct. 9, 1995	20.7	6.75	17	3.08	189.5	2.47	38.9	22.09	7.65
Jan. 31, 1996	7.1	6.73	103	6.02	116.0	1.95	24.2	13.54	3.56

인다. 그러나 유류의 농도는 시료의 gas chromatography 분석을 통하여 미량 검출되었다.

3.2 종속영양세균수 및 원유분해세균의 분포

포항근해에 존재하는 종속영양세균수와 원유분해세균수를 측정 비교한 후 그 분포비를 조사한 결과는 Fig. 2와 Table 2와 같다. 해양에 유류 관련 화합물의 오염유무가 환경내 유류분해에 영향을 미친다는 많은 연구가 보고되고 있으며 오염에 따라 종속영양세균에 대한 유류분해세균의 수준이 오염정도를 반영한다고 볼 수 있다. 포항근해의 종속영양세균수는 $4.1 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$ CFU/ml로 나타났고, 총 종속영양세균에 대한 원유분해 세균의 분포비는 0.05% ~ 0.54%

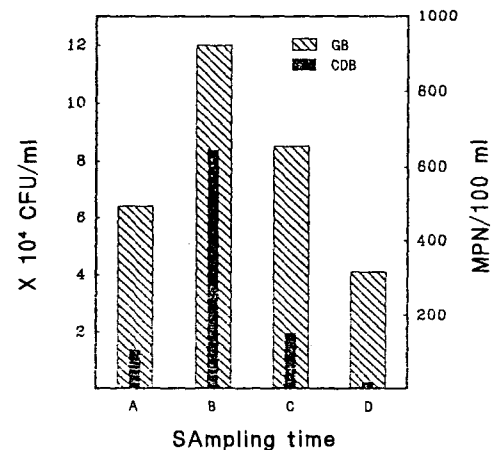


Fig. 2. 1Seasonal variation of heterotrophic bacteria and crude oil degrading bacteria in P'ohang sampling site.

(A), Apr. 15, 1995; (B), Jul. 27, 1995; (C), Oct. 9, 1995; (D), Jan. 31, 1996.

Table 2. Distribution ratio of crude oil-degrading bacteria on the sampling time
(Unit; MPN/ 100 ml)

Sampling time	GB	CDB	CDB ratio (%)
Apr. 15,	1995	64,000	106
Jul. 27,	1995	120,000	645
Oct. 9,	1995	85,000	153
Jan. 31,	1996	41,000	19

Symbols : GB, general bacteria; CDB, crude oil degrading bacteria; CDB ratio (%), CDB/GB X 100.

로서 낮은 비율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 지금까지 보고된 낙동강하구⁸⁾의 0.01% ~ 0.16%, 부산근해⁷⁾의 0.1% ~ 9.2%에 비해 매우 낮은 경향을 보였고, 경기만⁶⁾에서도 비슷한 결과를 보였다. 그러나 김 등⁹⁾의 남해해역에서의 탄화수소 분해세균 분포비는 1.2% ~ 67.4%로서 높은 분포비를 보였다. 본 연구의 결과 원유분해세균의 분포는 수온의 영향을 많이 받는 것으로 나타났으며 높은 온도에서 원유분해세균의 활성이 높다는 이 등⁹⁾과 오 등¹⁰⁾의 보고와도 일치하였다. 또한 수온이 높은 7월 말에 최대치를 나타낸 것은 수온의 증가에 따른 종속영양세균의 증가에 비해 원유분해세균이 상대적으로 높은 증가율을 의미하는 것으로 사료된다.

3.3 원유분해세균의 분리 및 동정

원유분해세균의 분리는 분리용 최소배지에 접종하여 4~5일간의 농화배양을 4번 반복한 후 원유분해능이 우수한 26여 균주를 순수분리하였다. 또한 원유분해능이 우수한 분리균주를 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하여 균주동정을 실시하였고 시료채취 시기에 따른 균주의 genus 수준에서 조사한 결과는 Table 3과 같다. 분리된 원유분해세균은 모두 7개의 속으로 나타났고 계절별로 다양하였다. *Bacillus* 속 세균이 우점으로 나타났으며 다음으로

Table 3. Number of crude oil degrading bacteria

3Strains (Genus level)	Number of individuals				Sum
	A	B	C	D	
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	2	1	1	5
<i>Bacillus</i> spp.	2	4	3	2	11
<i>Citrobacter</i> spp.	1	0	2	0	3
<i>Micrococcus</i> spp.	0	1	0	0	1
<i>Moraxella</i> spp.	0	0	0	1	1
<i>Rhodococcus</i> spp.	1	0	3	0	4
<i>Serratia</i> spp.	0	0	1	0	1
Total number of individuals	5	7	10	4	26
Total number of genus	4	3	5	3	7

Symbols indicate sampling time : A, Apr. 15, 1995; B, Jul. 27, 1995 C, Oct. 9, 1995; D, Jan. 31, 1996.

Acinetobacter 속 세균과 *Rhodococcus* 속 세균의 순으로 나타났다. 또한 타지성 미생물인 장내세균도 포함되어 있어 오수의 유입이 있음을 시사하고 있다.

3.4 원유분해세균의 원유분해능

원유분해세균의 원유분해능은 분리된 균주중 원유분해능이 우수한 4개 균주에 대하여 배양시간에 따른 균체수 및 유화활성과 원유전환율을 측정하였다 (Fig. 3). *Acinetobacter* sp. PO4-3 균주는 균체수가 3.6×10^8 CFU/ml의 높은 균체수를 나타내었으며, 유화활성과 원유전환율은 각각 38 unit/ml과 약 76%로 분리균주중 최대치를 보였다. *Bacillus* sp. PO2-3 균주는 3.0×10^7 CFU/ml의 균체수 그리고 25 unit/ml의 유화활성과 약 53% 원유전환율을 나타내었고 *Acinetobacter* sp. PO7-2 균주는 균체수가 1.2×10^7 CFU/ml이었으며 유화활성과 원유전환율은 각각 26 unit/ml과 약 57%로서 원유전환율이 균체수에 비해 높게 나타났다. *Micrococcus* sp. PO8-2에 의한 배양시간에 따른 균체수 및 유화활성과 원

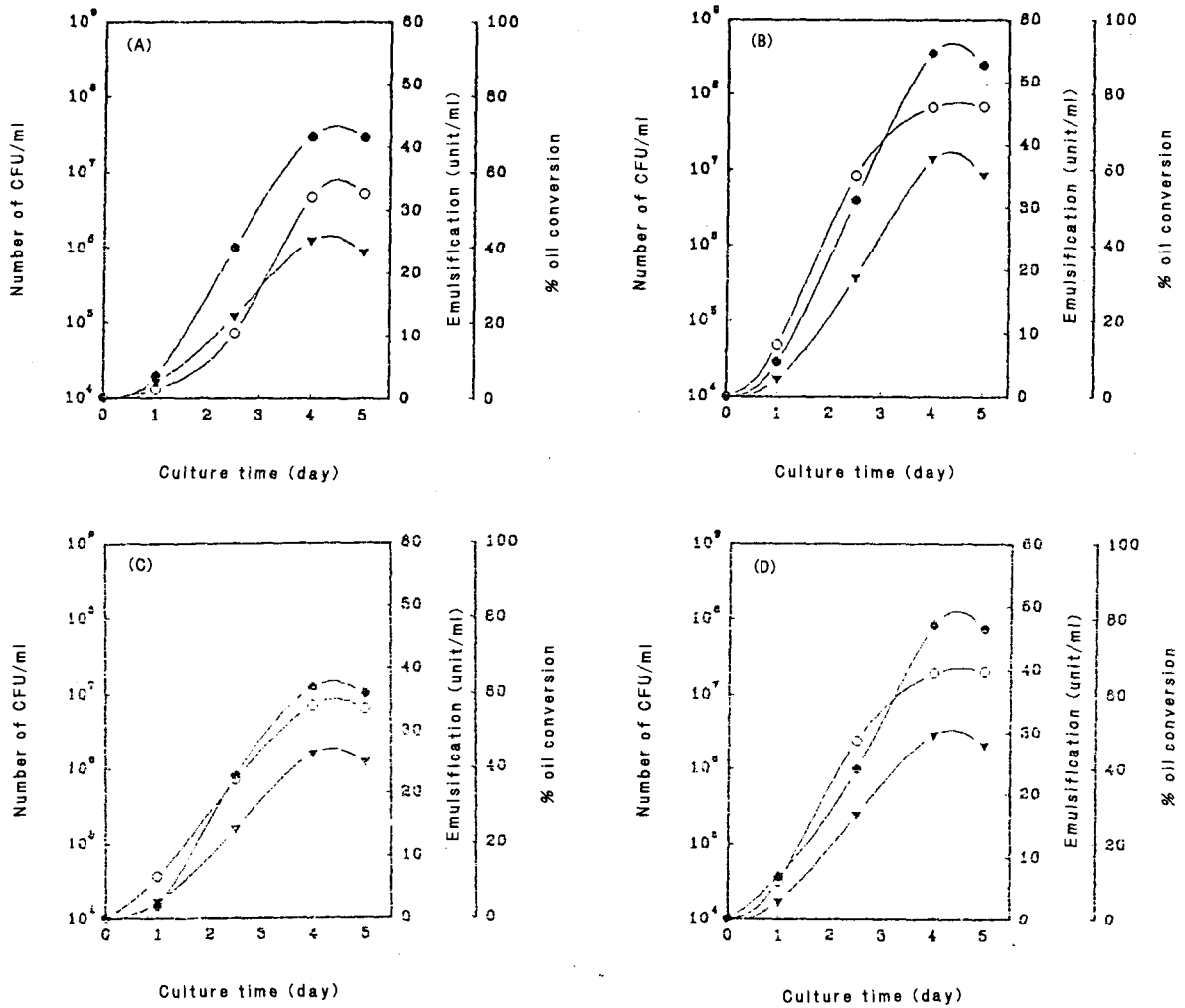


Fig. 3. 1Growth, emulsification and oil conversion by isolates as a function of time.

(A) *Bacillus* sp. PO2-3;

(B) *Acinetobacter* sp. PO4-3;

(C) *Acinetobacter* sp. PO7-2;

(D) *Micrococcus* sp. PO8-2.

●; Cell growth,

▼; Emulsification,

○; Oil conversion.

Cultivation was carried out on 250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml minimal salts medium on a shaker for 5 days at 30°C.

유전환율은 균체수가 8.5×10^7 CFU/ml, 유화활성과 원유전환율은 각각 30 unit/ml과 약 65%로서 높은 원유분해능을 나타내었다.

3.5 혼합배양에 의한 원유분해

본 실험에서 분리된 균주중 원유분해능이 우

수한 균주를 대상으로 단일(*Acinetobacter* sp. PO4-3) 및 혼합배양(*Bacillus* sp. PO2-3, *Acinetobacter* sp. PO7-2, *Micrococcus* sp. PO8-2)에 의한 원유분해를 무기염 최소배지에 단일 탄소원 및 에너지원으로 Arabian light 원유를 1.0%(v/v)되게 첨가하여 30°C에서 5일간 배양한

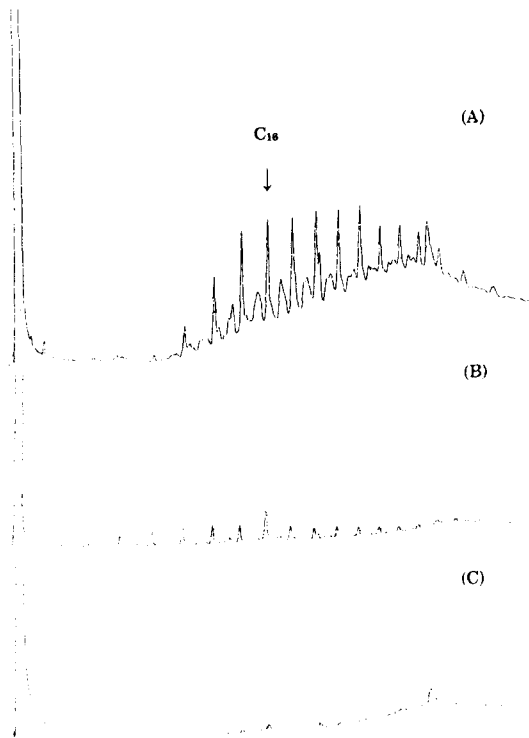


Fig. 4. Gas chromatograms of crude oil (1.0%, v/v) biodegradation.
 (A) Control (Arabian light crude oil), without bacteria;
 (B) Minimal salts medium inoculated with *Acinetobacter* sp. PO4-3;
 (C) Minimal salts medium inoculated with mixed culture.
 (*Bacillus* sp. PO2-3, *Acinetobacter* sp. PO7-2, and *Micrococcus* sp. PO8-2).
 The samples were extracted and concentrated 10-fold.

후 gas chromatography 분석을 통하여 비교하였다(Fig. 4). 대조구는 최소배지에 원유를 첨가하여 같은 기간동안 배양하였다. Gas chromatogram 상에서 분석한 결과 단일배양에 의한 분해보다 혼합배양에 의한 원유분해능이 우수하였고 gas chromatogram 상의 % area를 기준으로 분해능

을 비교해 보면 단일배양을 한 경우보다 혼합배양에 의한 원유분해가 약 2.5배 높은 결과를 얻었다. 이와 같은 결과는 Jobson 등¹⁸⁾의 혼합배양에 의한 원유의 분해능을 증가 시켰다는 결과와 미국 EPA¹⁹⁾ (Environmental Protection Agency)의 실험결과에서도 역시 단일균주보다는 혼합균주의 경우에 있어서 석유 분해능이 우수하였다는 보고와 일치하였다.

참고문헌

1. Oliveri, R., P. Bacchin, A. Robertiello, N. Oddo, L. Degen, and A. Tonolo "Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer", *Appl. Environ. Microbiol.* 31(2), pp.629~634 (1976).
2. Harvey, S., I. Elashvili, J.J. Valdes, D. Kamely, and A.M. Chakrabarty "Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from alaskan gravel by microbial surfactant" *Bio/Tech.* 8(3), pp.228~230 (1990).
3. 해양경찰대, 한국의 해양오염 현황과 대책, 시험연구보 (1990).
4. Blumer, M. "Scientific aspects of the oil spill problem", *Environ. Aff.* 1(1), pp.57~73 (1971).
5. ZoBell, C.E. "Action of microorganisms on hydrocarbons", *Bacteriol. Rev.* 10(1), pp.1~49 (1946).
6. 이정래, 황열순, 이기승, 이진형, 김상중 "경기만에서 석유분해세균의 분포 및 석유분해능", *한국미생물학회지*, 30(3), pp.187~192 (1992).
7. 남귀숙, 이진, 이상준 "부산근해 유류분해세균의 생태학적 특성", *미생물과 산업*, 21(2), pp.126~134 (1995).
8. 권오섭 "낙동강 하구생태계의 환경변화에 따른 종속영양세균의 생리학적 특성", *한국미생*

- 물학회지, 30(3), pp.193~198 (1992).
9. 김상진, 최성찬 “남해해역 퇴적토의 탄화수소 분해세균 분포”, 한국미생물학회지, 30(5), pp. 366~370 (1992).
 10. 오영숙, 이지영, 김창완, 김상종 “한국 수중 생태계에서의 미생물에 의한 유류분해”, 환경연보, 서울대학교 환경 안정 연구소, 3, pp.1~16 (1990).
 11. 산업공해연구소, 수질오염공정시험법 (1983).
 12. APHA, AWWA and WPCF. Standard method for the examination of water and wastewater. 17th ed. AWWA. American public health association. Washington. pp. 689~726 (1989).
 13. John, G. H., N. R. Krieg and P. H. A. Sneath “Bergey's manual of determinative bacteriology(9th ed.)”, Williams and Wilkins, Baltimore (1994).
 14. Cowan, N. R. and K. J. Steel “Manual for the identification of medical bacteria (2nd ed.)”, Cambridge University Press, London (1974).
 15. Peter, H. A. S., S. M. Nicholas, M. E. Sharpe, and J. G. Holt “Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. II”, Williams and Wilkins, Baltimore (1986)
 16. Reisfeld, A., E. Rosenberg and D. Gutnick “Microbial degradation of crude oil: Factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures”, *Appl. Microbiol.*, 24(2), pp.363~368 (1972).
 17. Horowitz, A., D. Gutnick and E. Rosenberg “Sequential growth of bacteria on crude oil”, *Appl. Microbiol.*, 30(1), pp.10~19 (1975).
 18. Jobson, A., F.D. Cook and D.W.S. Westlake “Microbial utilization of crude oil” *Appl. Microbiol.* 24(4), pp.1082~1089 (1972).
 19. EPA. Environmental Protection Agency, Water quality criteria. EPA-R3-73-033. Washington, D.C. pp.594 (1972).