

부산근해에서 분리한 Bunker Oil 관련화합물 분해세균의 특성

최진·김종구·박근태·손홍주·김희구·이상준[†]
부산대학교 자연과학대학 미생물학과·밀양대학교 생물공학과
(1999년 4월 28일 접수)

Characterization of Bunker Oil-Related Compounds Degrading Bacteria Isolated from Pusan Coastal Waters

Jin Choi, Jong-Goo Kim, Geun-tae Park, Hong-Joo Son^{*},
Hee-Gu Kim, and Sang-Joon Lee[†]

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

[†]Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

(Manuscript received 28 April, 1999)

Microorganisms utilizing petroleum as substrate were screened from the seawater in Pusan coastal area. Among them, fifty strains utilized bunker-A oil as a sole carbon and energy source. Five of these fifty strains were selected to experiment this study. According to the taxonomic characteristics of its morphological, cultural and biochemical properties, the selected strains were named *Pseudomonas* sp. EL-12, *Flavobacterium* sp. EL-15, *Acinetobacter* sp. EL-18, *Enterobacter* sp. EL-27 and *Micrococcus* sp. EL-43, respectively. The optimal medium compositions and cultural conditions for assimilation of bunker-A oil by the selected strains were 1.5-2% bunker-A oil, 0.1% NH_4NO_3 , 1-1.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05-0.15% KCl, 0.1-0.15% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5-3.5% NaCl, initial pH 8-9, temperature 30°C and aeration, respectively. The utilization and degradation characteristics on the various hydrocarbons by the selected strains were showed that bunker oil, *n*-alkane and branched alkane compounds were highly activity than cyclic alkane and aromatic hydrocarbon compounds.

Key words : bunker oil, degradation, pollution, hydrocarbon

1. 서론

해양은 지구 표면적의 70%를 차지하며, 지구상에 있는 수량의 99%를 점하고 있다. 또한 해양은 약 500,000종의 생물종을 포함하고 있으며, 이중 녹색식물에 의한 1차 생산력은 연간 175~700억 ton carbon/m²에 달하는 막대한 양으로서 인류에게 귀중한 자원의 제공과 개발의 가능성이 무한히 잠재된 곳이라 할 수 있다.¹⁾ 그러나 산업화이후 무분별한 개발로 인하여 해양으로 유입되는 오염원의 종류와 규모는 증가하는 추세에 있는데, 대표적인 오염원으로 현대산업의 발전에 따라 에너지원 및 각종 화학물질의 원료로 광범위하게 사용되고 있는 유류를 들 수 있다. 현재 유류 소비량의 증가에 따라 유전으로부터의 유출, 운송사고, 산업폐수 등으로부터의 해양내 유입이 급증하고 있다.²⁾

환경에 유입된 유류의 제거는 파도, 광선 등의 물리적 요인이나 생물체에 의한 분해와 같은 자연적인 현상에 의해 이루어지게 되나 유류에 의한 해양환경 오염이 날로 심각해지면서 이를 인위적으로 해결하기 위한 여러가지 방안들이 모색되었다.^{3,4)} 즉, 오일펜스를 설치하여 유

류의 지역 확산을 막은 후, 그 안의 유류를 수거, 흡착, 소거하는 등 물리적 방법과 유분산제나 집유제, 겔화제 사용 등의 화학적 방법을 들 수 있다. 그러나 이 방법들은 시간과 기상의 제약을 받으며, 또한 유분산제의 독성에 의한 2차적인 오염문제를 일으킬 수 있으므로 선진국에서는 유분산제의 종류와 사용범위를 엄격하게 제한하고 있다.^{5,6)}

미생물에 의한 유류분해는 비록 느린 속도로 이루어 지지만 해양의 정화방법으로는 가장 이상적인 과정이다.⁷⁾ 따라서 유류오염 문제를 극소화하고 수산자원 및 연안환경을 보전하기 위해서는 근본적으로 유류 오염물질을 제거할 수 있는 미생물학적인 기술이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 경질중유이며 저유황유로서 소형엔진에 많이 사용되는 bunker-A oil 분해세균을 해양에서 분리하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 조사하여 분류학적인 위치를 검토하고, bunker-A oil의 미생물학적 분해에 미치는 환경인자 및 최적생육조건을 알아보았으며, 석유탄화수소의 구성성분들에 대한 분해능을 살펴봄으로써 유용가치가 높은 석유탄화수소 분해

세균을 확보하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용균주 및 배양조건

만성적 유류오염 지역으로 간주되어 온 부산근해로부터 분리하여 본 실험실에서 보관중인 유류 분해세균중 bunker-A oil에 분해능을 가지는 50 균주를 선택하여 본 실험에 사용하였다. Bunker-A oil을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 무기염 배지의 조성은 NaCl 200 mM, MgSO₄·7H₂O 50 mM, KCl 10 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM의 조성을 갖는 인공해수에 Tris-HCl 100 mM, NH₄Cl 19 mM, K₂HPO₄ 0.33 mM, FeSO₄·7H₂O 0.1 mM, bunker-A oil 0.2-2.0%가 함유되었다.⁸⁾ Bunker-A oil은 (주)유공, Tris-HCl은 Sigma(미국)사의 특급제품을 사용하였고 기타 시약은 Junsei(일본)사의 특급제품을 사용하였다. Bunker-A oil 분해균의 보존용 배지로는 0.2% oil을 함유한 무기염 배지와 2% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar(Difco Co., USA) 사면배지를 사용하였다.¹⁾

2.2. Bunker-A oil 분해균의 분류 및 동정

예비동정된 Bunker-A oil 분해균 중 다수로 나타난 5개의 속 중에서 생육도와 분해활성을 고려하여 5개의 균주를 본 실험의 공시균으로 선정하였다. 선정된 bunker-A oil 분해균의 분류학적인 위치를 정확하게 알아보기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 Manual of Methods for General Bacteriology,⁹⁾ Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria¹⁰⁾ 및 API 20E, 20NE(bioMerieux Co, France) 등 동정용 kit를 병행하여 조사하였으며, 분류와 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1,²⁾ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제9판¹²⁾을 참조하였다.

2.3. 공시균의 최적생육조건 조사

각 공시균의 bunker-A oil에 대한 최적생육조건을 알아보기 위해 bunker-A oil의 농도(0.1-3%), 배양온도(4-45°C), 초기 pH(5-10), 질소원 및 무기염의 종류 및 농도, 통기량(배지 30-150 ml/250ml flask) 등에 따른 생육도를 5일간 배양 후, 측정하였다.^{13,14)} 또한 염분도에 따른 본 공시균들의 생육도를 알아보기 위하여 NaCl의 농도를 0-4%까지 단계적으로 조절하여 배양한 후, 생육도를 측정하였다.

2.4. Hydrocarbon 이용능 조사

본 공시균들의 hydrocarbon 화합물에 대한 이용능을 조사하기 위해 bunker-A oil 대신 bunker-B, C oil(각각 2%), dodecane, tetradecane, hexadecane(각 0.5%), iso-octane, isopropyl alcohol, isopropyl ether(각 0.5%), cyclopentane, cyclohexane(각 0.1%) 및 benzene, toluene, phenol(각 0.1%)를 첨가하여 30°C, 180 rpm에서 5일간 진탕배양한 후 생육도를 측정하였다. 사용된 oil은 (주)유공의 제품을 사용하였고 기타 시약은 Fluka(스위스)사의 특급제품을 사용하였다.

2.5. 분석방법

생육도는 배양액에 CHCl₃를 첨가하여 잔존유류를 추출한 후, 상등액의 흡광도를 spectrophotometer(Milton Roy, Spectronic Genesis 5, USA)로서 600 nm에서 측정하여 나타내었다. 또한 잔존유류 분석은 유류의 최대흡수 파장에서의 흡광도를 측정함으로써 나타내었으며 이때 bunker-A oil의 최대흡수파장은 246 nm이었다(Fig. 1).

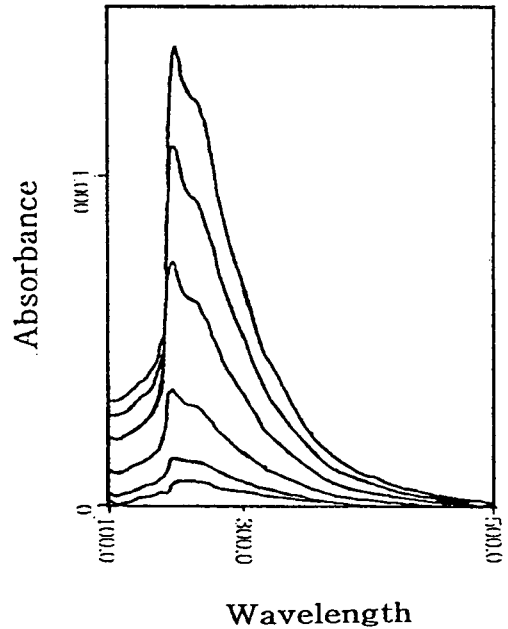


Fig. 1. Spectrophotogram of bunker-A oil.

3. 결과 및 고찰

3.1. Bunker-A oil 분해균의 동정

본 실험실에서 보관중인 bunker-A oil 분해균중 분해양식이 자화의 특징을 나타내는 50 균주들의 동정용 Kit를 사용하여 속(genus) 수준에서 예비동정하였다. 동정된 속은 모두 10종류의 속으로 *Pseudomonas*속 9균주, *Flavobacterium*속 6균주, *Acinetobacter*속 6균주, *Enterobacter*속 6균주, *Micrococcus*속 5균주, *Moraxella*속 6균주, *Serratia*속 2균주, *Vibrio*속 2균주, *Chryseomonas*속 5균주, *Aeromonas*속 3균주로 나타났다. 이 중에서 생육특성과 분해활성을 고려하여 EL-12, EL-15, EL-18, EL-27 및 EL-43균주를 본 실험의 공시균으로 선정하였다.

공시균들의 형태학적, 배양적, 생화학적 제 특성을 조사하여 분류학상의 위치를 검토한 결과는 Table 1, 2, 3과 같으며 이들 특성을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, 2와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제 9판과 비교한 결과 각각 *Pseudomonas*속, *Flavobacterium*속, *Acinetobacter*속, *Enterobacter*속, *Micrococcus*속으로 동정되어 편의상 *Pseudomonas* sp. EL-12, *Flavobacterium* sp. EL-15, *Acinetobacter* sp. EL-18, *Enterobacter* sp. EL-27, *Micrococcus* sp. EL-43으로 명명하여 본 실험에 사용하

였다.

Table 1. Morphological characteristics of bunker-A oil degraders

Contents	Characteristics				
	EL-12	EL-15	EL-18	EL-27	EL-43
Cell shape	Rod	Rod	Cocobacillus	Rod	Spherical
Cell size(μm)	1.0~1.5 ×0.5~0.6	1.3~1.8 ×0.6~0.7	0.7~0.8 ×0.5~0.6	0.8~1.3 ×0.4~0.6	0.6~0.7
Gram stain	-	-	-	-	+
Spore	-	-	-	-	-
Motility	+	-	-	+	-
Cell division	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple

Table 2. Cultural characteristics of bunker-A oil degraders

Contents (Colony)	Characteristics				
	EL-12	EL-15	EL-18	EL-27	EL-43
Shape	Circular	Circular	Puntiform	Circular	Circular
	Entire	Entire	Entire	Undulate	Entire
	Convex	Convex	Convex	Umbonate	Convex
Surface	Smooth	Smooth	Smooth	Rough	Smooth
Color	Pale-yellow	Yellow	Cream	Cream	Cream
Opacity	Opaque	Opaque	Translucent	Opaque	Opaque

Table 3. Biochemical characteristics of bunker-A oil degraders

Contents	Characteristics				
	EL-12	EL-15	EL-18	EL-27	EL-43
Oxidase	+	+	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidation/Fermentation	-	F	-	F	O
β-Galactosidase	-	+	-	+	-
Arginine dehydrolase	+	-	+	+	-
Lysine decarboxylase	-	+	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	-	-	+	-
Citrate utilization	+	+	-	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-
Urease	+	+	-	-	+
Tryptophan deaminase	+	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	-	+	+
Gelatin liquefaction	-	+	-	-	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	-

3.2. 공시균의 최적생육조건

Bunker-A oil 농도에 따른 본 공시균들의 생육도는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. *Enterobacter* sp. EL-27은 oil 농도 1.5%에서 생육도가 가장 높았으며, 나머지 공시균들은 2%의 oil 농도에서 우수한 생육도를 나타내었다. Oil 농도 3%에서는 미미한 생육도를 나타내어 고농도의 oil에 노출될 경우, 그 독성으로 인해 균체 생육이 저해됨을 알 수 있었다.

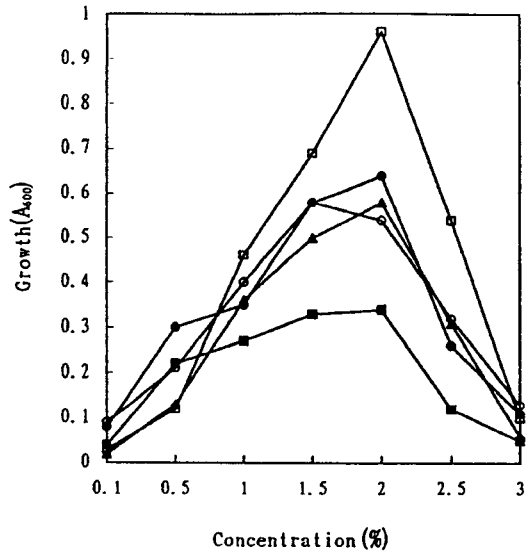


Fig. 2. Effect of bunker-A oil concentration on the growth of bunker-A oil degraders.

●, *Pseudomonas* sp. EL-12; ■, *Flavobacterium* sp. EL-15; ▲, *Acinetobacter* sp. EL-18; ○, *Enterobacter* sp. EL-27; □, *Micrococcus* sp. EL-43.

배양온도에 따른 본 공시균들의 생육도를 측정된 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 20-37°C에 걸쳐 양호한 생육을 보였으며, 4°C와 45°C에서는 생육이 거의 나타나지 않아 전형적인 중온성 세균의 특징을 보여주고 있다.

배지의 초기 pH에 따른 공시균들의 생육도를 측정된 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 즉, pH 8.0-9.0의 약 알칼리성 영역에서 가장 높은 생육도를 나타내었고, pH 5.0-6.0에서는 거의 생육하지 못하였다. 따라서 본 공시균 모두 분리환경인 해수에 적응된 균주임을 알 수 있었다.

기본배지에 각종 질소원을 0.1%의 농도로 첨가하여 공시균들의 생육도를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 유기질소원이 무기질소원에 비해 전반적으로 생육이 우수하였으며, 질소원이 첨가되지 않은 배지에서도 생육을 나타내어 oil 내의 질소성분이 분해과정에서 이용되는 것으로 사료되었다. 적용환경이 해수인 것을 감안하여 무기질소원 중에서 공시균 모두 우수한 생육도를 나타낸 NH₄NO₃를 최적 질소원으로 선정하였다.

MgSO₄·7H₂O는 1.0-1.5%에서, KCl은 0.05-0.15%에서, CaCl₂·2H₂O는 0.15-0.1%에서 가장 생육도가 높았다(미제시).

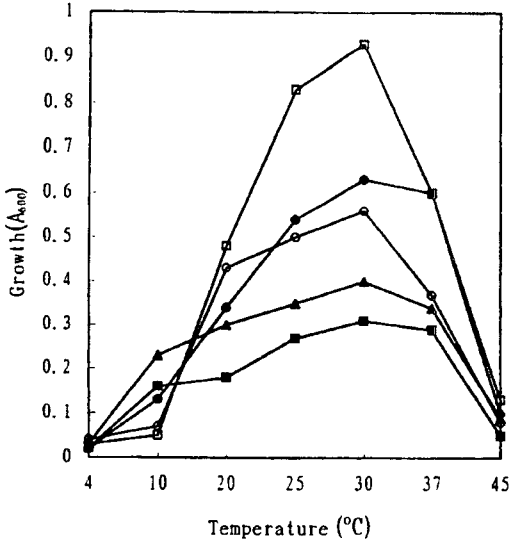


Fig. 3. Effect of temperature on the growth of bunker-A oil degraders.
 ●, *Pseudomonas* sp. EL-12; ■, *Flavobacterium* sp. EL-15; ▲, *Acinetobacter* sp. EL-18; ○, *Enterobacter* sp. EL-27; □, *Micrococcus* sp. EL-43.

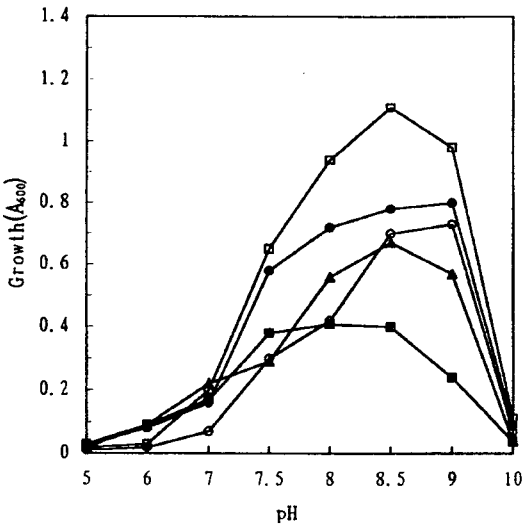


Fig. 4. Effect of initial pH on the growth of bunker-A oil degraders.
 ●, *Pseudomonas* sp. EL-12; ■, *Flavobacterium* sp. EL-15; ▲, *Acinetobacter* sp. EL-18; ○, *Enterobacter* sp. EL-27; □, *Micrococcus* sp. EL-43.

통기량에 따른 공시균들의 생육도를 조사한 결과, 배지량이 30-50 ml일 때 생육도가 가장 우수하였고, 배지량이 증가하여 통기량이 적어질수록 생육도가 감소하는

것을 알 수 있었다(미제시). 따라서 oil 분해에 aeration이 positive 영향을 미치는 것으로 보아 oil 분해과정이 호기적 과정임을 알 수 있었다.

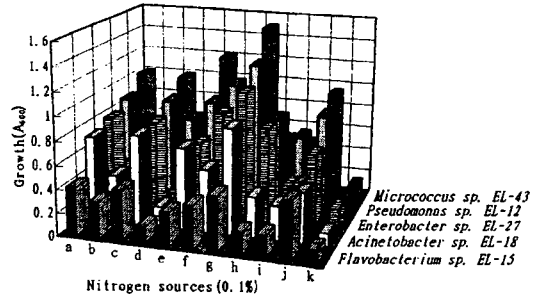


Fig. 5. Effect of nitrogen sources on the growth of bunker-A oil degraders. a, NH_4Cl ; b, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; c, NH_4NO_3 ; d, NaNO_3 ; e, KNO_3 ; f, tryptone; g, yeast extract; h, malt extract; i, beef extract; j, peptone; k, none.

염분도에 따른 공시균의 생육도를 측정한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. *Enterobacter* sp. EL-27은 2.5%에서, *Acinetobacter* sp. EL-18은 3.5%에서, 그 외 공시균들은 3.0%에서 생육도가 우수하였다. 해양의 평균 염분도가 3.5%인데 비해 본 공시균들의 평균 최적 염분도는 3.0%로 조금 낮았다. 이것은 본 공시균들이 담수의 유입이 많은 부산 근해로부터 분리되었기 때문으로 사료되어진다.

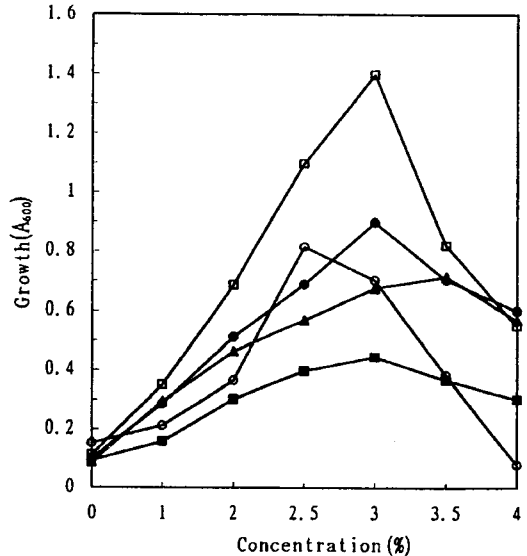


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on the growth of bunker-A oil degraders.
 ●, *Pseudomonas* sp. EL-12; ■, *Flavobacterium* sp. EL-15; ▲, *Acinetobacter* sp. EL-18; ○, *Enterobacter* sp. EL-27; □, *Micrococcus* sp. EL-43.

이상의 최적배지에 각 공시균을 접종하여 시간대별로 생육도 및 잔존 oil를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 약 36시간의 유도기를 거친 후 대수증식기에 접어들었으며, 약간의 차이는 있으나 96시간만에 최대정지기에 도달하였다.

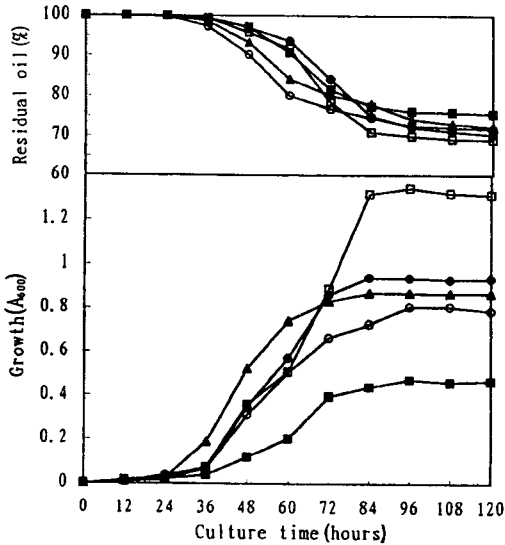


Fig. 7. Growth and biodegradability of bunker-A oil degraders in the optimal medium.

●, *Pseudomonas* sp. EL-12; ■, *Flavobacterium* sp. EL-15, ▲, *Acinetobacter* sp. EL-18; ○, *Enterobacter* sp. EL-27; □, *Micrococcus* sp. EL-43.

3.3. Hydrocarbon 이용능

석유탄화수소는 *n*-alkane, branched alkane, cyclic alkane, aromatic hydrocarbon의 복합체이다.¹⁴⁾ 따라서 석유탄화수소의 구성성분에 대한 공시균들의 이용능을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 본 공시균들은 bunker oil, *n*-alkane, branched alkane에 대해서 높은 자화활성을 나타내는 반면, cyclic alkane, aromatic hydrocarbon에 대해서는 자화능이 상당히 낮음을 알 수 있었다. 공시균에 따른 이용특성을 보면 *Flavobacterium* sp. EL-15는 석유탄화수소 중 *n*-alkane에서의 이용능이 우수하였으며, 특히 tetradecane의 이용능이 매우 우수하였다. *Acinetobacter* sp. EL-18은 branched alkane에서의 이용능이 상당히 낮았으며, *Enterobacter* sp. EL-27은 석유탄화수소의 구조적 특성에 따른 이용능의 변화가 매우 커서, branched alkane의 경우 그 이용능이 우수하였으나 cyclic alkane에 대해서는 거의 이용능을 나타내지 않았다. *Pseudomonas* sp. EL-12와 *Micrococcus* sp. EL-43은 다른 공시균에 비해 전반적으로 자화능이 우수하였다. 그러나 본 공시균 모두 실험한 모든 탄화수소에 고른 이용능을 보여 생태계 적용시 그 유용가치가 클 것으로 사료되어진다.

4. 결 론

만성적 유류 오염지역으로 간주되는 부산근해로부터 분리하여 보관중인 유류 분해세균중 bunker-A oil에 분해능을 가지는 50 균주를 선별하여 예비동정하였다. 예비동정된 결과와 분해활성을 고려하여 5개 속의 균주를 본 실험의 공시균으로 선택한 후 형태학적, 배양적, 생화학적 특성을 조사한 결과 각각 *Pseudomonas*속, *Flavobacterium*속, *Acinetobacter*속, *Enterobacter*속, *Micrococcus*속으로 동정되었다. 본 공시균들의 bunker-A oil 분해에 미치는 환경인자 및 최적생육조건은 bunker-A oil 1.5-2%, NH_4NO_3 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1-1.5%, KCl 0.05-0.15%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1-0.15%, NaCl 2.5-3.5%, 초기 pH 8-9, 배양온도 30°C, 통기량 30-50 ml/250ml flask, 배양시간은 84-96시간이었다. Hydrocarbon의 구조적 특성에 따른 bunker-A oil 분해세균의 이용능은 bunker oils, *n*-alkanes, branched alkanes에서 우수하였으며, 복잡한 구조의 cyclic alkanes, aromatic hydrocarbons에 대해서는 자화능이 상당히 낮았다.

Table 4. Utilization of various hydrocarbons by bunker-A oil degraders

Substrates		EL-12	EL-15	EL-18	EL-27	EL-43
Bunker oils	Bunker-A	+++	++	++	+++	+++
	Bunker-B	+++	++	++	+++	+++
	Bunker-C	+++	++	++	+++	+++
<i>n</i> -Alkanes	Dodecane	+++	++	+++	++	+++
	Tetradecane	+++	+++	++	+++	+++
	Hexadecane	+++	+++	++	+++	+++
Branched alkanes	Isooctane	++	+	+	+++	+++
	Isopropyl alcohol	+++	++	+	++	+++
	Isopropyl ether	++	+	++	+++	+++
Cyclic alkanes	Cyclopentane	+	-	+	-	+
	Cyclohexane	+	-	+	-	+
Aromatic hydrocarbons	Benzene	+	+	+	-	+
	Toluene	+	+	-	+	+
	Phenol	+	+	+	-	+

-, no growth; +, slightly growth; ++, growth; +++, good growth.

감사의 글

이 논문은 1995~1999년도 부산대학교 학술연구조성비와 환경기술·산업개발연구센터(RRC/IETI)의 지원에 의하여 연구되었으며 깊은 감사함을 드립니다(RRC 과제번호 : 99-10-05-02-A-3).

참 고 문 헌

- 1) Barnes, R. S. K. and R. N. Hughes, 1982, An Introduction to Marine Ecology, Blackwell Sci-

- entific Publication, London.
- 2) Annon, M. A., 1975, Petroleum in the Marine Environment, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
 - 3) Baker, J. M., 1975, Marine ecology and oil pollution, Wiley and Sons, New York.
 - 4) Gutnick, D. L. and E. Rosenberg, 1977, Oil tankers and pollution: A microbiological approach. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31, 379-384.
 - 5) Jobson, A., F. D. Cook, and D. W. S. Westlake. 1972, Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.*, 23, 1082-1089.
 - 6) Mulkins-Philips, G. J. and J. E. Stewart, 1974, Effect of environmental parameters on bacterial degradation of bunker-C oil, crude oils and hydrocarbons, *Appl. Microbiol.*, 28, 915-922.
 - 7) Davis, J. B., 1956, Microbial degradation of hydrocarbons, *Ind. Eng. Chem.*, 48, 1444-1448.
 - 8) Starr, M. P., N. Stlop, H. G. Truper, A. Balows and H. G. Schleger, 1981, *The Prokaryotes*, Vol. 2, pp 1308-1343, Springer-Verlag, N. Y.
 - 9) Gerhardt, P., R. E. G. Murry, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N R. Krieg, and G. B. Phillips, 1981, *Manual of Methods for General Bacteriolog.*, American Society for Microbiology, N.Y.
 - 10) Macfaddin, J. F., 1980, *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, The Williams and Wilkins Co., U.S.A.
 - 11) Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 2. The William and Wilkins Co., U.S.A.
 - 12) Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed, The William and Wilkins Co., U.S.A.
 - 13) Atlas, R. M., 1981, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective, *Microbiol. Rev.*, 45, 180-209.
 - 14) Dibble, J. T. and R. Bartha, 1979, Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 729-739.