한국생물공학회지 제17권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 3, 247-254(2002)

미생물을 이용한 원유 및 원유제품의 분해 특성

오 경 택 · [1]박 귀 환 · [1]이 정 일 · [1]이 중 기 · 김 성 준 · [2]Kubo Motoki · †정 선 용
전남대학교 환경공학과, [1]전남보건환경연구원
[2]Department of Bio Science & Technology, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University
(접수 : 2002. 4. 13., 게재승인 : 2002. 6. 17.)

Biodegradation of Crude Oil and Petroleum Products by Crude Oil-degrading Microorganism

Kyoung-Taek Oh, Gue-Hwan Park[1], Jeong-Il Lee[1], Joong-Ki Lee[1], Seong-Jun Kim, Kubo Motoki[2], and Seon-Yong Chung†
[1]Health & Environment of Chollanamdo Institute, Kwangju 502-201, Korea,
[2]Department of Bio Science & Technology, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University 525-8577, Japan, Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
(Received : 2002. 4. 13., Accepted : 2002. 6. 17.)

Two kinds of crude oil-degrading microorganisms from soil and one kind from sea were isolated and named strain A132, strain F722 and strain OM1, respectively. These microorganism were identified *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter calcoaceticus,* respectively. The optimum cultivation temperature of *Acinetobacter* sp. A132 and *P. aeruginosa* F722 was 35°C and optimum growth pH was 8 and 9, respectively. The growth was the highest at 2.0% (w/v) substrate concentration when crude oil was only carbon source. The growth of *A. calcoaceticus* OM1 isolated from sea was the highest at 3.0% (w/v) of crude oil. In inspection of crude oil degradability, strain A132 showed 5.49 g/L · day with Eleuthera (OMAN), 2.0% (w/v). *P. aeruginosa* F722 showed 1.19 g/L · day with L-Zakum (AFRICA). In case of kerosene ($nC_9 \sim nC_{20}$) and diesel ($nC_9 \sim nC_{28}$), *A. calcoaceticus* OM1 was degraded 95% and 75%, respectively, for 7 days culture, and *P. aeruginosa* F722 was 80% after 10 days.

Key Words : *Acinetobacter* sp. A132, *Pseudomonas aeruginosa* F722, *Acinetobacter calcoaceticus* OM1, degradability

서 론

Crude oil은 많은 종류의 탄화수소화합물인 straight chain alkane, branched alkane, cycloparaffins, aromatics, cycloparaffinic aromatics으로 구성되어 있고(1), 제품으로는 항공유, 휘발유, 등유, 경유, 중유로 구분할 수 있다. 주유소 저장탱크 부근 토양은 가장 많이 취급하는 휘발유와 경유로 인해 오염 가능성이 크며, 우리나라 해양유류 유출 사고시 주 오염물질로는 원유 및 벙커C유이다(2,3). 2000년도에 우리나라 해안에서 발생되는 오염사고 발생건수는 480건 이상이며, 방제비용으로 수십억을 지출했다. 연 원유생산량 20억톤 가운데 해상 수송되는 원유는 연간 10억톤 정도이며, 그 가운데 0.3~0.8% 정도가 해상으로 유출되고 있다. 과거와 비교하여 해양유류유출 사고건수는 점차 감소되고 있는 추세이나 유조선 등이 대형화되면서 한번 사고가 발생하면 대량의 유류가 해양으로 유출되어 해양생태계를 위협하고 있다(4~10). 그리고 이 유분은 1 L가 10~2,000 m^2에 달하는 해면에 퍼지거나 바다속에 분산되어 어류와 생물에 영향을 끼친다(11). 유류유출 사고 후 제거되지 않은 유류 성분들이 생태계에 노출되었을 경우에는 심각한 환경문제를 일으키는 오염원이 되기도 한다. 석유에 포함된 탄화수소화합물의 유출 및 석유 송유관의 파손, 손상 등에 의한 누설로 발생된 토양오염은 지하수 오염으로 확산될 수 있다. 여기에 토양오염을 일으킬 수 있는 잠재력을 가진 주유소가 2000년말까지 11,000개 이상이 영업하고 있다.

최근에는 원유유출사고로 인한 해안오염과 원유제품 저장탱크 및 주유소 주변의 오염된 토양을 정화하기 위한 방법으로 미생물을 이용한 생물정화(Bioremediation)법이 지속적으로 도입되고 있다. 생물정화는 환경 중에서 최소한의 적좌(Niche)를 제공하여 미생물의 분해능력을 이용한 오염물질 및

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1858, Fax : +82-62-530-0742
E-mail : sychung@chonnam.chonnam.ac.kr

유해한 물질을 분해하여 무독화 시키는 처리기술이다. 그 중에는 오염토양에 산소, 질소, 인, 수분을 공급하여 오염물질을 제거하는 Biostimulation, 오염물질을 제거할 수 있는 미생물을 도입하여 분해효율을 높이는 Bioaugmentation, 오염된 지역에 관을 뚫고 산소, 영양염, 수분을 공급함으로써 호기성 미생물의 활동성을 높여 분해시간을 단축시키며 공기를 과량 주입하였을 때는 독성이 강한 오염물(방향족화합물)의 휘발을 촉진시켜 도입종 및 재래종의 환경저항성을 최소화시키는 Bioventing 방법 등이 있다(12,13). 이러한 방법들은 많은 관심을 가지고 있다. 왜냐하면 물리·화학적 정화방법보다 경제적이고, 환경친화적이며, 미생물에 의하여 오염물질을 CO_2, 물, Biomass로 전화시켜 독성을 감소시킬 수 있기 때문이다.

본 연구에서는 토양으로부터 분리된 우수한 유류 분해균주와 해양으로부터 우수한 유류 분해균주를 분리하여 각각에 대하여 원유 및 원유제품에 대한 특성을 조사한 후, 원유 및 원유제품으로 오염된 토양 및 해양을 정화시키는데 일조를 할 수 있는 생물정화(14,15)법에 미생물을 도입하는데 필요한 기초 자료를 공급하는 데 있다.

재료 및 방법

균주분리

원유 및 원유제품으로 오염 가능성이 있는 해안 부두, 인근 주유소 저장 탱크 주위, 세차장 주변, 그리고 하수 종말처리장의 활성오니 등에서 분해미생물 시료를 채취하였다. 채취한 시료를 무기성분으로 구성된 C-배지(16)의 시험관에 일정량을 접종하였다. C-배지 조성은 증류수 1 L 당 $(NH_4)_2SO_4$ 5 g, KH_2PO_4 2.93 g, K_2HPO_4 5.87 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, NaCl 2 g, $CaCl_2$ 0.03 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 mg, yeast extract 0.2 g, trace elements solution 2 mL로 조성되었다. 그리고 pH는 7.0으로 조절되었으며, trace elements solution의 조성은 순수 1 L당 MoO_3 4 mg, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 28 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 mg, H_3BO_3 4 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 mg이다.

상기의 배지에 원유(Eleuthera; OMAN, L-Zakum; AFRICA)를 유일한 탄소원으로 하여 검색하였다. 즉 원유 1.0% (w/v)를 함유한 C-배지에 미생물 분리용 시료 1.0% (v/v)를 접종하여, 35°C, 150 rpm으로 일주일간 건식배양(SW-90F, Sangwoo Scientific Co.)하여 육안으로 생장이 확인된 시험관에 한하여 같은 배지 및 같은 배양조건에서 계대배양을 실시하였다. 계대배양이 끝난 후, petri dish에 Luria-Bertani (LB) 고체배지(배지 조성: Deionized Water, 1 L; Trypton 10 g; Yeast Extract 5 g; NaCl 10 g; Bacto agar(Difco Lab.) 15 g/L)에 도말을 하여 단일 종의 미생물을 분리하였다. 순수 분리된 미생물은 -70°C에 보관하고, 연속 실험용의 미생물은 LB 고체배지에 도말하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

균주동정

분리된 미생물을 광학현미경 (Olympus CX40, Japan)으로 검경하여 운동성과 미생물의 형태를 조사한 후, 그람염색(Gram stain)을 실시하였다(17). 그람염색 결과 그람음성으로 bioMerieux sa, France)를 사용하여 동정하였다(18). API 20E kit에서 정확한 동정이 되지 않은 균주에 대해서는 universal primer를 사용하여 PCR법으로 16S-rDNA (약 1.3kb)를 증폭시킨 후 증폭된 DNA에 대하여 부분적으로 약 0.3 kbp의 염기서열을 결정하여 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST에서 상동성 검색을 하였다(19).

분리된 유류 분해균주의 최적 생장 조사

분리된 원유 분해 미생물에 대하여 최적 온도, pH, 기질 농도를 조사하였다. 최적 온도조사는 25, 30, 35, 45°C로 온도를 달리하여 pH 7.0, 150 rpm에서 배양을 하였고, 그리고 탄소원은 Eleuthera (OMAN) 원유를 1.0% (w/v)로 하여 실험을 하였다. 원유 분해 미생물의 생장 측정은 4시간마다 배양액 일정량을 취하여 분광광도계 (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다(16, 20, 21). 이 방법을 최적 pH 및 기질 농도조사에도 동일하게 적용하였다. 최적 pH 조사는 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 하였고, 온도는 선행된 최적 온도조사에서 결정된 온도로 하였다. 최적 기질 농도조사는 선행된 최적 온도, pH조사에서 결정된 조건으로 하여 원유의 농도를 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v)로 하여 실험을 실시하였다. 해양으로부터 분리된 원유 분해 미생물의 경우는 원유 기질에 대한 미생물의 생장이 토양 미생물에 비하여 높았기 때문에 원유 기질 농도를 3.0, 5.0, 7.0, 10.0% (w/v)로 하여 실험을 실시하였다.

NaCl 농도가 유류 분해균주에 미치는 영향

O.D. (Optical Density) 600 nm에서 미생물의 생장을 측정하였는데 $O.D_{600nm}$ 값은 기질의 영향, 미생물 사체, 미생물의 분비물에 의한 영향을 완전하게 배제할 수 없기 때문에 실질적으로 살아있는 미생물만을 측정할 수 있는 CFUs (colony-forming units)를 $O.D_{600nm}$ 값과 같이 측정하여 서로 비교하였다(20,21). 사용한 기질은 Eleuthera (OMAN) 원유이며, 원유 분해 미생물은 strain A132, F722, OM1을 이용하였다. 배양조건은 토양 미생물의 경우 35°C, pH 8, 기질 농도 1.0% (w/v), 150 rpm에서 실시하였고, Strain OM1은 동조건의 25°C에서, strain F722는 동조건의 pH 9에서 실험을 수행하였다.

분리된 원유 분해 미생물에 대하여 배양온도 25, 35°C, pH 8, 미생물 농도 1.0% (v/v), 기질 (crude oil)농도 2% (w/v)로 하여 최적 염농도를 조사하였다. NaCl 농도는 0, 0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0% (w/v)로 하여 생장을 비교하였다(22). 이때 미생물 생체량은 $O.D_{600nm}$에서 측정하여 생장특성을 평가하였다.

원유분해능 측정

Eleuthera (OMAN산), L-Zakum (AFRICA산)을 기질로 사용하여 25, 30, 35°C, pH 8, 9, 미생물 농도 1% (w/v), 기질 농도 2% (w/v), NaCl 농도 0.2, 1.0, 2.0, 3.5% (w/v)로 하여 원유 분해능을 비교 조사하였다. 원유 분해능 측정을 위해 chloroform-methanol 추출법을 사용하였다. 먼저 500 mL-플라스크에 무기성배지 (C-배지) 100 mL, 기질농도 2% (w/v), 미생물 농도 1% (w/v)를 접종하여 3일간 진탕배양을 실시한 후 chloroform-methanol 추출용매(3:1, v/v) 30 mL를 첨가하

Table 1. Properties of petroleum products

Properties	Petroleum products			
	Gasoline	Kerosene	Diesel	Heavy oil
Carbon number	C_5~C_{12}	C_9~C_{18}	C_{14}~C_{23}	C_{16}~
Boiling point (°C)	30~180	170~250	240~350	350~
Specific weight (15/4°C)	0.73~0.76	0.78~0.81	0.80~0.84	0.84~0.96
Cal/L (Cal/kg)	8,400 (11,200)	8,800 (11,100)	9,000 (11,000)	9,600 (10,700)
Flash point (°C)	-40 〉	30~60	40~70	55~100
Spontaneous point (°C)	500~550	400~500	300~400	300~450

여 교반한 후, 1,500 rpm에서 7분간 원심분리를 실시한다. 하층의 chloroform-methanol 층을 추출하여 전량이 30 mL가 되게 추출용매로 조절한다. 잔존한 수분제거를 위하여 sodium sulfate를 적당량 넣어 수분을 제거하고 일정량을 취하여 후드내에서 50°C 온도에서 8시간 휘발시킨 후 공시험에서 본시험을 뺀 잔존유분의 중량을 측정하였다. 모든 실험은 2회 이상 반복실험을 행하여 재현성을 확인하고 평균값을 사용하였다.

n-Alkane 및 원유제품에 대한 자화능력 조사

n-Alkane (C_{10}-C_{32})로 구성된 시료 및 원유제품인 벙커A유, 벙커C유, 휘발유, 등유, 경유를 기질로 하여 각 기질에 대한 자화능력을 조사하였다(3,23). 검사방법은 C-배지에 각 기질 농도 1.0, 2.0% (w/v) 첨가하여, 25, 35°C, pH 8, NaCl 농도 0.2, 1.0, 2.0, 3.5% (w/v), 150 rpm 조건에서 배양하여 미생물의 생장여부를 $O.D_{600nm}$에서 흡광도를 측정하여 생장능력을 평가하였다.

GC/FID를 이용한 petroleum hydrocarbons의 분해 특성 조사

원유제품 중에서 등유 (Kerosene), 경유 (Diesel)를 기질로 사용하여, 배양온도 25°C (해양으로부터 분리된 균주), 35°C (토양으로부터 분리된 균주), 기질농도 1.0% (w/v), NaCl 농도 1.0, 2.0% (w/v), 미생물 접종농도 1% (v/v), pH 8로 하여 배양하여, petroleum hydrocarbons의 분해 pattern을 조사하였다. 원유제품 중 휘발유, 등유, 경유, 중유의 일반적인 특성을 Table 1에 나타내었다(3). 원유제품의 분해 특성은 gas chromatography (Varian Star 3400, USA)/flame ionization detector를 이용하여 정량 및 정성 분석을 조사하였다. 추출방법은 국립환경연구원의 土壤汚染公定試驗方法(24)을 기초로 하였고, 분석 조건은 다음과 같다. 사용된 capillary column; Rtx-5, 길이; 60 m, 내경; 0.32 mm, 박막; 0.25 μm, 운반가스 (N_2); 30 mL/min, 컬럼온도; 80°C (1 min)-9°C/min-300°C (32.56 min).

결과 및 고찰

원유 분해 미생물의 분리 및 동정

토양 및 해양으로부터 분리된 원유 분해 미생물을 검색한 결과 7종류가 분리되었으나, 그 중 원유 및 원유제품에 대한 분해성능이 우수한 3종류를 선별하였다. 이중 토양으로부터 분리된 유류 분해균주를 strain A132, F722로 명명하였으며, 해양으로부터 분리된 유류 분해균주를 strain OM1으로 명명하였다. Oh 등(25)에 의하여 strain A132, F722 균주 특성에 관한 실험은 선행되었다. 분리된 원유 분해 미생물을 광학현미경으로 운동성과 형태학적 특성을 검경한 결과 strain A132를 제외한 모든 미생물들은 활발한 운동성을 나타냈으며, 모두 막대모양의 간균이었다. 그리고 분리된 미생물을 그람 염색법으로 확인한 결과 모두 그람음성을 띄었다. 따라서 그람음성 간균을 동정하는데 적합한 API 20E kit를 이용하여 생화학적 실험을 하여 동정을 실시하였다. 그 결과, strain A132는 *Acinetobacter* sp., strain F722는 *Pseudomonas aeruginosa*로 판명되었다. 그러나 해양으로부터 분리된 원유 분해 미생물인 strain OM1은 API 20E kit를 사용하여, 수 차례의 반복동정을 실시하였으나, 정확한 동정이 되지 않아 보다 정확한 분자 생물학적 동정법인 16S rDNA 검색법을 이용하여 strain OM1을 동정하였으며, 그 결과 *Acinetobacter calcoaceticus*의 16S rDNA와 98%의 동질성을 나타내었다(19).

원유 분해 미생물의 생장조건

분리된 원유 분해 미생물의 최적 온도, pH, 기질 농도조사 결과는 다음과 같다. *Acinetobacter* sp. strain A132의 최적 온도조사(25)에서 25, 30, 35°C에서 비슷한 $O.D_{600nm}$ 값이 나왔으나, 35°C에서 다소 높은 $O.D_{600nm}$ 값이 나왔다. 다양한 pH 조건에서는 pH 7, 8에서만 꾸준한 $O.D_{600nm}$ 값의 증가가 보였는데, pH 8의 $O.D_{600nm}$ 증가치가 pH 7보다 높았다. 그리고 기질의 농도 변화에 따른 조사에서는 2% (w/v)에서 가장 높은 $O.D_{600nm}$ 값이 나왔다. Strain F722의 최적 온도조사(25)에서는 35°C에서 높은 $O.D_{600nm}$ 값을 나타내었다. pH 6-9에서는 배양 시간 72hr까지는 비슷한 $O.D_{600nm}$ 값이 나왔으나, 72 hr 이후, pH 9에서 높은 $O.D_{600nm}$ 값을 나타냈으며, $O.D_{600nm}$ 값이 10에 가까웠다. 그리고 최적 기질 농도조사에서는 0.5-2.0% (w/v)까지 비슷한 $O.D_{600nm}$ 값이 나왔으나, 기질농도 2% (w/v)에서 더 높은 $O.D_{600nm}$ 값이 나왔다.

해양으로부터 분리된 원유 분해 미생물 OM1의 최적 pH 및 기질 농도를 조사 결과, pH 6-9 범위에서 좋은 성장을 보였으며 특히 pH 7에서 높은 $O.D_{600nm}$ 값을 나타내었다. 그리고 기질농도 3.0% (w/v)에서 높은 생장을 보였다(data not shown).

NaCl 농도가 유류 분해균주에 미치는 영향

Eleuthera (OMAN), 기질상에서 시간에 따른 유류 분해균주의 성장 pattern을 Figure 1에 나타내었다. Strain A132의 경우 초기 주입된 CFUs 값이 4시간 후에 약간 떨어졌으며, 이는 원유 성분 중에서 strain A132의 생장에 저해하는 물질이 포함되었기 때문으로 사료된다. 또한 strain A132의 최대

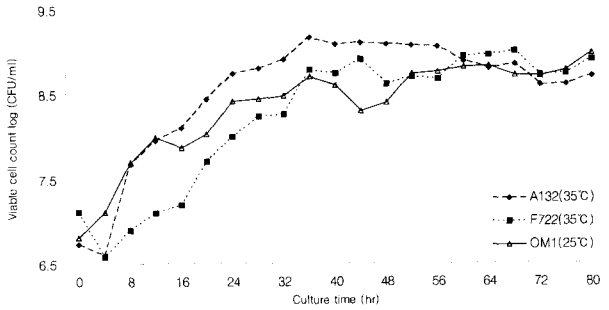

Figure 1. The time course of crude oil-degrading strains growing on crude oil of Eleuthera (OMAN).

생장은 36시간 부근으로 조사되었다. Strain F722는 접종 후 CFUs 값이 감소되었다. Strain OM1의 경우는 배양 초기부터 생장을 하였으며, CFUs 값이 다른 균주에 비하여 전체적인 실험에서 정지기에 도달되는 배양시간이 오래 걸렸다. Sidorov 등(20)은 기질의 영향으로 인하여 균체수가 10^8-10^9 cells/g soil에서 10^3-10^6 cells/g soil으로 감소하였다고 보고했다. 하지만 본 연구에서는 그렇게 큰 폭으로 균체수가 감소하지 않았다. 이는 분리된 유류 분해균주가 기질로 이용된 crude oil에 대한 저항성을 가지고 있기 때문으로 사료된다.

NaCl 농도 변화에 따른 토양 및 해양으로부터 분리된 원유분해 미생물의 생장에 어떠한 변화를 미치는가에 대한 조사 결과를 Table 2에 나타내었다. Strain A132의 경우는 NaCl 농도가 생장에 상당히 영향을 주는 것으로 조사되었다. Kim 등(5)과 Kapley 등(22)의 경우에는 LB 액체배지에서 분리된 미생물의 NaCl 농도 실험을 수행하였으나, 본 연구에서는 원유를 기질로 사용하여 수행하였다. Strain F722는 토양 미생물임에도 불구하고 NaCl 농도 3.0%까지도 큰 영향이 없었다. 해양에서 분리된 strain OM1는 본 수행된 최고 NaCl 농도 5.0%에서도 뚜렷한 생장을 보였다. 또한 조건의 NaCl 농도에서 배양온도만 25°C에서 35°C로 변화를 주어 미생물의 생장을 조사하였을 때, 그 결과 토양 미생물인 strain A132는 25°C에서 생장한 것보다 더 높은 생장을 나타내었다. 하지만 strain OM1은 생장이 다소 감소되었다. 그 이유로는 대부분의 해양미생물의 최적온도는 30°C를 전후로 한 협온성 미생물이기 때문에 35°C는 OM1의 성장에 저해영향을 미쳤다고 사료된다.

기질 분해 특이성 조사

Eleuthera (OMAN), L-Zakum (AFRICA), 두 원유를 기질로 하여 strain A132, F722, 그리고 OM1을 가지고 토양 미생물이 생장하는데 저해하지 받지 않은 것으로 판단되는 NaCl 농도로 하여 원유 분해능을 비교하였다. Eleuthera (OMAN), 원유에서는 strain A132가 5.49 g/L · day로 가장 높은 분해능을 나타내었다. 다음으로는 strain OM1이 2.47 g/L · day로 높았다. 한편, L- Zakum (AFRICA), 원유에서는 strain F722가 1.19 g/L · day로 가장 높은 원유 분해능을 가진 것으로 조사되었고, 그 다음으로는 strain A132와 strain OM1은 원유 분해능이 비슷하게 조사되었다. Eleuthera (OMAN), 원유에서 strain OM1은 25°C에서 원유 분해능이 높았다.

원유를 구성하는 성분 중에서 분리된 유류 분해균주가 선호하는 성분이 어떤 물질인지 조사하기 위하여, 원유제품인 휘발유, 등유, 경유, 벙커A유, 벙커C유를 기질로 이용하였다. 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 원유제품에 대한 분해능 실험 결과, 분리된 3가지 균주 모두 등유, 경유, 벙커C유에 대하여 다소 차이는 있지만 분해능을 가지고 있는 것으로 조사되었다. 일반적으로 해양에서 발생되는 사고의 경우, 유출되는 유류는 대부분이 벙커C유가 주 오염원인 점과 주유소에서 가장 많이 취급되는 원유제품 중의 하나인 등유가 하나

Table 2. Effect of NaCl concentration on the growth of the isolated strains at 25°C

Strains	NaCl (%)	Culture time (day)						
		1	2	3	4	5	6	7
A132	0	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	+	+	+	+	+
	3.0	-	-	-	+	+	+	+
	4.0	-	-	-	-	-	-	-
	5.0	-	-	-	-	-	-	-
F722	0	-	+	++	++	+++	+++	+++
	0.2	-	+	++	++	+++	+++	+++
	1.0	-	+	++	++	++	++	++
	2.0	-	+	++	++	++	++	++
	3.0	-	+	+	+	++	++	++
	4.0	-	-	-	-	-	+	+
	5.0	-	-	-	-	-	-	-
OM1	0	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	0.2	-	+	++	++	++	++	++
	1.0	-	+	+	++	++	++	++
	2.0	-	+	++	+++	++++	++++	++++
	3.0	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	4.0	-	-	+	++	+++	+++	+++
	5.0	-	-	-	+	++	++	+++

Table 3. Degradability of petroleum products by the isolated strains at 35°C

Strains	Substrates	Culture time (day)						
		1	2	3	4	5	6	7
A132	Kerosene	-	-	+	+	+	+	+
	Diesel	+	+	+	+	+	+	+
	Gasoline	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-A	-	-	-	-	-	+	+
	Bunker-C	+	+	+	+	+	+	+
F722	Kerosene	+	+	++	++	++	++	++
	Diesel	+	+	+	++	++	++	++
	Gasoline	-	-	-	-	-	-	+
	Bunker-A	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-C	-	-	-	-	-	-	+
OM1	Kerosene	+	+	++	++	++	++	++
	Diesel	-	+	+	+	+	+	+
	Gasoline	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-A	-	-	-	-	-	-	-
	Bunker-C	+	+	++	++	++	++	++

growth grades evaluated as $O.D_{600nm}$ values : + ; 0.1~0.4, ++ ; 0.5~1.0, +++ ; 1.1~2.0, ++++ ; 〉 2.1, - ; no growth

Table 4. Degradability of *n*-alkanes by the isolated strains at 35°C

Strains	Substrates	Culture time (day)						
		1	2	3	4	5	6	7
A132	*n*-C_8	-	-	-	-	+	+	+
	n-C_{10}	-	-	-	+	+	+	+
	n-C_{12}	+	+	++	++	++	++	++
	n-C_{14}	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	n-C_{18}	-	-	-	-	-	+	+
	n-C_{20}	-	+	+	++	++	++	++
	n-C_{22}	-	+	++	++	++	++	++
	n-C_{28}	-	+	+	+	+	+	+
	n-C_{32}	-	-	-	-	-	+	+
F722	*n*-C_8	-	-	-	-	+	+	+
	n-C_{10}	-	+	++	++	+++	+++	+++
	n-C_{12}	-	+	+	+	+	+	+
	n-C_{14}	-	-	+	+	+	+	+
	n-C_{18}	-	-	+	+	+	+	+
	n-C_{20}	-	-	-	-	+	+	+
	n-C_{22}	-	-	-	-	-	-	-
	n-C_{28}	-	-	-	-	-	-	-
	n-C_{32}	-	-	-	-	-	-	-
OM1	*n*-C_8	-	-	-	-	-	-	-
	n-C_{10}	-	-	+	++	++	++	++
	n-C_{12}	-	+	++	++	++	++	++
	n-C_{14}	+	+	+	++	++	++	++
	n-C_{18}	+	+	+	+	+	+	+
	n-C_{20}	-	-	-	+	+	+	+
	n-C_{22}	-	-	-	-	+	+	+
	n-C_{28}	-	-	-	-	+	+	+
	n-C_{32}	-	-	-	-	+	+	+

growth grades evaluated as $O.D_{600nm}$ values : + ; 0.1~0.4, ++ ; 0.5~1.0, +++ ; 1.1~2.0, ++++ ; 〉 2.1, - ; no growth

의 오염원이다. 유류로 오염된 해양과 토양을 정화시키는데 있어, 본 연구에서 분리된 유류 분해균주와 토착미생물간의 상호관계를 검토한 다면, 오염된 지역에 적용할 수 있을 것으로 사료된다. Strain OM1은 해양에서도 좋은 생장을 보이기 때문에 해양유류유출 사고시 bioremediation용 미생물로써 적용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

원유제품을 구성하고 있는 물질로는 *n*-alkane이 많은 부분을 차지하고 있다. 유류 분해균주에 의한 원유제품의 분해과정에서 미생물이 주로 어떠한 *n*-alkane을 이용하는지 조사하기 위하여 탄소수가 10, 12, 14, 18, 20, 22, 28, 32개의 단일 물질을 탄소원으로 이용하였다. Strain A132, F722, OM1에 *n*-alkane 물질을 각각 기질로 사용하여 배양 조건을 35°C, NaCl 농도 1.0% (w/v)로 분해능을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다. Strain A132는 배양 시간이 길어질수록 모든 기

질에 대한 생장이 다른 균주보다 높았다. 특히 n-C_{14}에서 생장이 가장 높았다. 이는 Cha 등(16)의 경우와는 달리 n-alkane의 탄소수가 10, 12, 14, 20에서 더 높은 생장을 하였다. Strain F722는 n-C_{10}에서 가장 생장이 높았으며, strain OM1은 대부분 기질에 대하여 분해 능력을 보였다. 같은 기질을 사용하여 배양 조건을 25°C, NaCl 농도 3.5% (w/v)로 하여 실험을 한 결과 토양 미생물은 기질에 대한 생장이 거의 미비하였으나, strain OM1은 35°C, NaCl 농도 1.0% (w/v) 조건에서 보다 생장이 높았다(data not shown). 특히 strain OM1의 경우는 탄소수가 10, 12, 14, 18에서 아주 높은 생장을 하였다. Strain A132, OM1은 탄소원으로 사용된 n-alkane에 대한 분해능을 가지고 있는 것으로 조사되었다. 이는 원유제품 중에서 등유, 경유, 중유에 대한 분해능을 가지고 있는 것으로 예측된다. Strain F722는 등유, 경유를 구성하고 있는 n-alkane, carbon number인 10~20까지 분해할 수 있는 능력을 가진 것으로 조사되었다.

GC/FID를 이용한 petroleum hydrocarbons의 분해 특성 조사

앞에서 유류 분해균주인 strain A132, F722, OM1을 이용하여 수행된 원유분해능, 원유제품 분해능, n-alkane으로 구성된 단일물질 분해능실험을 근거로 하여 시중에 판매되고 있는 등유, 경유의 분해과정을 GC/FID를 사용하여 최종 확인 실험을 수행하였다. 최종 확인 실험에는 strain OM1, F722를 이용하였다. 그 결과를 Figure 2, 3에 나타내었다. Strain OM1은 배양을 시작한지 4일만에 탄소수가 9, 18-20인 n-alkane을 100% 제거하였고(Figure 2-b), 주입된 등유의 80% 이상의 분해율을 나타내었다. 7일 후에는 초기 peak와 비교하여 전체적으로 분해율이 95% 이상으로 조사되었다(Figure 2-c). 이러한 결과는 단일물질 성분인 n-alkane을 기질로 이용한 실험결과(Table 3)와 유사하게 조사되었다. Strain OM1의 생체량은 배양초기 10^5(cfu/mL) 정도였으며, 분해 특성을 조사한 당시에는 10^9(cfu/mL)이었고, 사멸기에 접어든 당시의 생체량은 10^8(cfu/mL)이었다. 반면에 strain F722는 배양 4일만에 탄소수가 9, 20인 n-alkane을 완전하게 분해하였고(Figure 2-d), 주입된 등유의 48%를 제거한 것으로 조사되었다. 배양 10일 후에는 탄소수가 9-11, 18-20인 n-alkane은 거의 분해하였으나, 탄소수가 n-C_{12}~n-C_{17}에 대한 분해율은 45~75%였고(Figure 2-e), 전체 등유의 분해율은 80% 이상으로 조사되었다. 등유에서의 strain F722의 생체량은 배양초기 10^7(cfu/mL)에 가까웠으며, 배양을 시작한지 4일 후, 분해 특성을 조사한 당시에는 10^9(cfu/ml)이었고, 10일 후에는 사멸기에 접어든 상태에서 분해 특성을 조사하였는데, 그 당시의 생체량은 10^7(cfu/mL)에 가까웠다.

Strain OM1을 이용한 경유의 분해 특성을 조사한 결과(Figure 3), 배양을 시작한지 4일 후에 n-C_{12}~n-C_{28} 중 n-C_{18}만 제외한 분해율은 85~100%이었고(Figure 3-b), 전체 경유에 대한 분해율은 70% 이상으로 조사되었다. 배양 7일 후

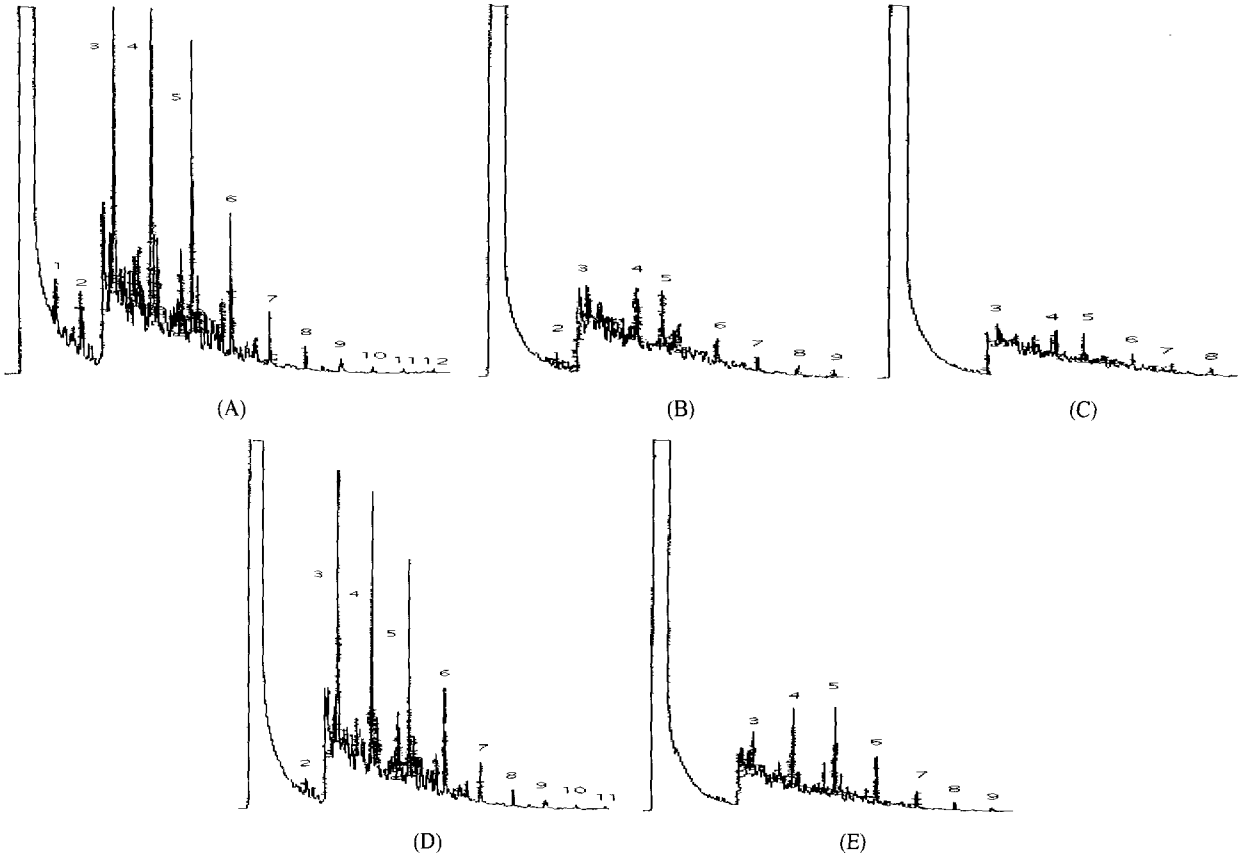

Figure 2. GC/FID analysis of kerosene by *Acinetobacter calcoaceticus* OM1 (NaCl conc. 2.0%(w/v), B, C) and *Pseudomonas aeruginosa* F722 (NaCl conc. 1.0%(w/v), D, E). (A) initiation, (B) after 4days, (C) after 7days, (D) after 4days, (E) after 10days. Peak No.; 1(nC_9)-12(nC_{20}).

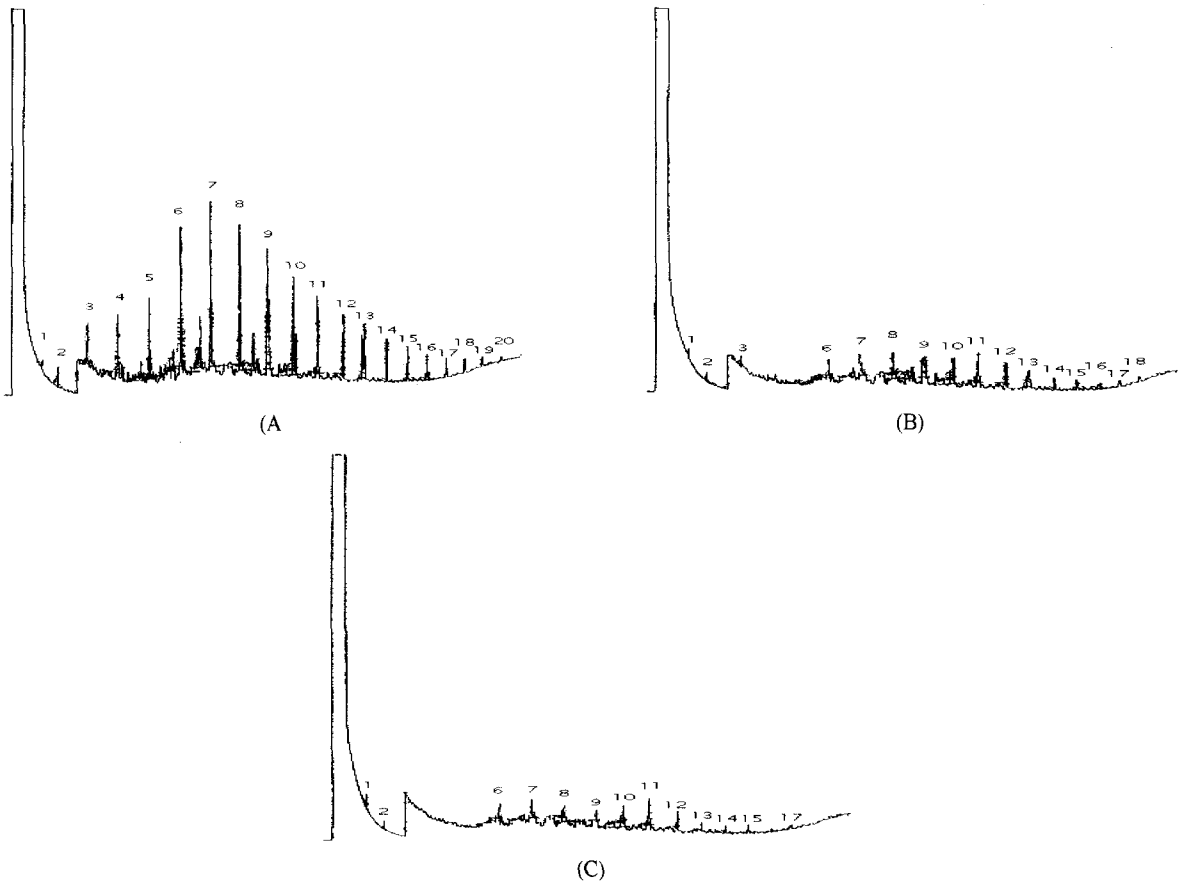

Figure 3. GC/FID analysis of diesel by *Acinetobacter calcoaceticus* OM1. (A) initiation, (B) after 4days, (C) after 7days. Peak No.; 1(nC_9)-20(nC_{28}).

분해율은 75% 이상으로 조사되었다(Figure 3-c). 배양 4일 후와 배양 7일 후, 분해율의 변화차이에는 큰 변화가 없었다. 반면 strain F722는 시판되는 경유에 대한 분해능 조사에서 재현성이 확인되지 않았다. 이는 경유를 구성하고 있는 *n*-alkane 성분 중에서 strain F722이 이용 가능한 부분이 극히 작은 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 통한 분리된 유류 분해균주들의 원유 및 원유제품에 대한 각각 상이한 분해 특성을 보여주고 있다. 이러한 연구결과가 유류로 오염된 현장에 적용되기 위해서는 이들 유류 분해균주와 토착미생물들간의 상호관계 규명에 관한 연구가 앞으로 더 진행되어야 할 것이다. 이러한 연구결과를 바탕으로 원유 및 원유제품으로 오염된 지역에 우수한 유류 분해미생물을 도입하면 효과적으로 오염된 지역을 정화할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

토양으로부터 2종류 그리고 해양으로부터 1종류의 원유 분해 미생물을 분리하였고, 이들을 strain A132, strain F722 그리고 strain OM1으로 각각 명명하였다. 이들 미생물은 *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*로 각각 동정되었다. Strain A132, F722의 최적 배양 및 분해온도는 35°C이고, 최적 생장 pH는 각각 8과 9에서 나타났다. 원유를 유일한 탄소원으로 하여 배양을 하였을 때 원유농도 2.0% (w/v)에서 생장이 높았다. 한편, 해양에서 분리된 strain OM1은 pH 7, 원유농도 3.0% (w/v)에서 생장이 높았다. 원유 분해능 조사에서는 Eleuthera (OMAN) 원유를 2.0% (w/v) 기질로 하였을 때, strain A132가 5.49g/L · day의 분해능을 나타내었다. 반면, L-Zakum (AFRICA) 원유에서는 strain F722가 1.19 g/L · day의 분해능을 보였다. 등유(nC_9~nC_{20})와 경유 (nC_9~nC_{28})에 대하여 분해특성을 조사한 결과 strain OM1은 배양 7일 후 95, 75%를 각각 분해하였다. Strain F722는 배양10일 후 80%의 분해율을 나타내었다.

REFERENCES

1. Sugiura, K., M. Ishihara, T. Shimauchi, and S. Harayama (1997), Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil, *Environ. Sci. Technol.* **31**, 45-51.
2. Sin, S. C. (1996), Petroleum and Safety, Petroleum and Lubrication 46-51.
3. Rho, S. C., C. H. Lee, and D. J. Jahng (1999), Nutritional Factors Affecting Efficiency of a Bioremediation Process for Diesel-Contaminated Soil, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 503-510.
4. Ross, D. A. (1995), Introduction to Oceanography, p409, Harper Collins Press, United States.
5. Kim, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong, and H. S. Koo (2000), Isolation and Characterization Oil Degrading Bacteria from Southern Sea of Korea, *Kor. J. Biotechnol.*

Bioeng. **15**, 27-34.
6. Swannell, R. P. J., K. Lee, and M. McDonagh (1996), Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation, *Microbiol. Rev.* **6**, 342-365.
7. Venosa, A. D., M. T. Suidan, D. King, and B. A. Wrenn (1997), Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **18**, 131-139.
8. Boehm, P. D., D. S. Page, E. S. Gilfiilan, A. E. Bence, W. A. Burns, and P. J. Mankiewicz (1998), Study of the Fates and Effects of the Exxon Valdez Oil Spill on Benthic Sediments in Two Bays in Prince William Sound, Alaska, 1, Study Design, Chemistry, and Source Fingerprinting, *Environ. Sci. Technol.* **32**, 567-576.
9. Douglas, G. S., A. E. Bence, R. C. Prince, S. J. Mcmillen, and E. I. Butler (1996), Environmental Stability of Selected Petroleum Hydrocarbon Source and Weathering Ratios, *Environ. Sci. Technol.* **30**, 2332-2339.
10. Wang, Z., M. Fingas and G. Sergy (1994), Study of 22-Year-Old *Arrow* Oil Samples Using Biomarker Compounds by GC/MS, *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1733-1746.
11. http://www.nmpa.go.kr/menu6.htm
12. Foght, J., K. Semple, D. W. S. Westlake, S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang, and M. Fingas (1998), Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **21**, 322-330.
13. Eve, R. R. (1992), Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites, p121, C. K. Smoley. Press, New York.
14. Atlas, R. M. and C. E. Cerniglia (1995), Bioremediation of Petroleum Pollutants Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation, *BioSci.* **45**, 332-338.
15. Sohrabi, M. and A. Mogharei (1999), Some aspects of bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons, *Afinidad Lvi.* **56**, 307-312.
16. Cha, J. Y., S. Y. Chung, Y. S. Cho, Y. L. Choi, B. K. Kim, and Y. C. Lee (1999), Characterization of Crude Oil Degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 Isolated from Sea Water, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 452-457.
17. Atlas, R. M. (1996), Principles of Microbiology, 2nd ed., p44, Wm. C. Brown. Press.
18. Huy, N. Q., S. Jin, K. Amada, M. Haruki, N. B. Huu, D. T. Hang, D. T. C. Ha, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya (1999), Characterization of Petroleum-Degrading Bacteria from Oil-Contaminated Sites in Vietnam, *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 100-102.
19. Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. J. Chang, and D. C. White (1999), Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3566-3574.
20. Sidorov, D. G., I. A. Borzenkov, R. R. Ibatullin, E. I. Milekhina, I. T. Khramov, S. S. Belyaev, and M. V. Ivanov (1997), A Field Experiment on Decontamination of Oil- polluted Soil Employing Hydrocarbon-oxidizing Microorganisms, *Appl. Biochem. Microbiol.* **33**, 441-445.
21. Haines, J. R., B. A. Wrenn, E. L. Holder, K. L. Strohmeier, R. T. Herrington, and A. D. Venosa (1996), Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by 96-well plate most-probable-number procedure, *J. Ind. Microbiol.* **16**, 36-41.
22. Kapley, A., H. J. Purohit, S. Chhatre, R. Shanker, T. Chakrabarti, and P. Khanna (1999), Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium, *Biore. Tech.* **67**, 241-245.
23. Syoko, K. N., S. Keiji, Y. I. Yukie, T. Haruhisa, V. Kasthuri, Y. Satoshi, T. Hiroki, and H. Shigeaki (1996), Construction of Bacterial Consortia That Degrade Arabian Light Crude Oil, *J. Fermen. Bioeng.* **82**, 570-574.
24. Huesemann, M. H. (1995), Predictive Model for Estimating the Extent of Petroleum Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soils, *Environ. Sci. Technol.* **29**, 7-18.
25. Oh, K. T., Y. W. Lee, M. Kubo, S. J. Kim, and S. Y. Chung (2000), Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil, *Kor. J. Soci. Environ. Eng.* **22**, 1851-1859.