

## Evaluation of Petroleum Oil Degrading Mixed Microorganism Agent for the Bioremediation of Petroleum Oil Spilled in Marine Environments

Jae Hak Sohn\*

Department of Bio-food material, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received September 27, 2011 / Revised November 14, 2011 / Accepted November 17, 2011

To evaluate the effects of microorganism agents on oil biodegradation, treatability and microcosm studies were conducted. Petroleum oil degrading bacteria were isolated from enriched cultures of oil-contaminated sediment samples using a mineral salts medium (MSM) containing 0.5% Arabian heavy crude oil as the sole carbon source. After a 5 day-incubation period using MSM, mixed microorganisms of three species (strains BS1, BS2 and BS4) degraded 48.4% of aliphatic hydrocarbons and 30.5% of aromatic hydrocarbons. Treatability and microcosm tests were performed in the three different treatment conditions (AO: Arabian heavy crude oil, AO+IN: Arabian heavy crude oil+inorganic nutrient, AO+IN+MM: Arabian heavy crude oil+inorganic nutrient+mixed microorganism agents). Among these, significantly enhanced biodegradation of aliphatic hydrocarbons were observed in AO+IN and AO+IN+MM conditions, without showing any different biodegradation rates in either condition. However, the degradation rates of aromatic hydrocarbons in an AO+IN+MM condition were increased by 50% in the treatability test and by 13% in the microcosm test compared to those in an AO+IN condition. Taken together, it can be concluded that mixed microorganism agents enhance the biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons in laboratory, a treatability test, and a microcosm test. This agent could especially be a useful tool in the application of bioremediation for removal of aromatic hydrocarbons.

**Key words** : Bioremediation, microcosm test, petroleum degrading microorganism, petroleum hydrocarbon, treatability test

### 서 론

유류에 오염된 토양환경을 정화하기 위한 생물정화기술(Bioremediation)은 토착미생물에 의한 유류화합물의 분해를 가속시킬 수 있는 물질 또는 유류분해미생물을 첨가하거나 조작하는 기술을 일컫는다[3,4,12,19].

자연계에서 미생물은 유류화합물을 분해하는 다양한 종들이 존재하나[2] 유류오염으로 인한 과량의 탄소에 비해 질소와 인의 상대적인 고갈은 토착미생물에 의한 생물분해를 제한하곤 한다[3,13]. 따라서 생물정화기술에서 다양한 형태의 무기 영양원 공급은 미생물의 성장을 촉진하고 유류화합물의 생분해를 향상시킬 수 있다[5,7,8,10,14-16,25].

토착미생물은 다양한 범위의 유류탄화수소화합물을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있으나 쉽게 분해되지 않는 난분해성 탄화수소의 생분해를 향상시킬 수 있도록 고려되어야 한다[11]. 따라서 유류화합물에 오염된 환경에서 토착미생물의 군집이 빈약하거나 난분해성 화합물의 생분해를 촉진할 목적으로 생물접종법(Bioaugmentation)이 활용되고 있다[6].

Aldrett 등[1]은 상업적으로 판매되는 12개의 미생물제제를

대상으로 생물정화실험을 28일간 수행하였을 때 4개의 제품에서 지방족 및 방향족 탄화수소에 대하여 유의한 분해율을 나타내었다. Venosa 등[24]은 10개의 다른 상업적으로 판매되는 미생물제제를 대상으로 microcosm 시험을 수행하였을 때 2개의 제품에서 유의한 결과를 얻었다. 이와 같이 생물접종에 대한 실험실 및 microcosm 연구에서 상이한 결과들이 보고되었으며 유의한 결과를 얻은 미생물제제도 현장에 적용하였을 때 그 유효성을 보장할 수 없는 경우가 있다. 따라서 생물정화기술에 적용하기 위해서는 생물접종을 위한 미생물제제의 개발단계에서부터 현장조건을 가정한 유효성검증의 확보가 무엇보다 중요하다.

다환 방향족 탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)는 독성, 돌연변이성, 낮은 용해성 및 구조적인 안정성 등의 이유로 생물분해를 제한하며[3], PAH를 분해하는 미생물 종 또한 제한되어 있다. PAH의 용해성을 증가시킬 목적으로 생물유화제(Inipols EAP, cyclodextrin 등)나 토양 및 조건대에 존재하는 humic compounds 등을 처리할 경우, PAH는 생물이용성(bioavailability)을 증가하여 미생물의 대사활성이나 생물분해를 향상시키는 것으로 알려져 있다[17,23].

본 연구에서는 유류에 오염된 연안지역의 생물정화를 목적으로 Arabian heavy crude oil을 대상으로 지방족 및 방향족 탄화수소의 분해능이 높은 미생물을 농후배양방법에 의해 선

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5629, Fax : +82-51-999-5458-  
E-mail : jhsohn@silla.ac.kr

발하고 균주 간의 경쟁이 낮고 방향족탄화수소에 대한 분해능력이 우수한 혼합미생물제제를 개발하였다. 현장적용을 위한 정화용 미생물제제로의 가능성을 검토하기 위해 처리성능 (treatability) 및 microcosm 시험을 수행하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 유류분해미생물의 분리 및 분해능

유류분해미생물의 분리를 위한 시료는 낙동강하구의 유류저장창고 주변의 오염된 토양을 채취하였다. 시료 1 g은 20 ml의 0.5% (v/v) Arabian heavy crude oil을 유일 탄소원으로 첨가된 최소액체배지(Mineral Salts Broth, MSB; 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 750 ml 숙성해수, 250 ml 증류수 [21])에 첨가한 후 15일간 25°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 농후배양을 위해 20 ml의 신선한 MSM배지에 1차 배양액 1 ml를 접종하여 동일 배양조건 하에서 15일간 추가적으로 배양하였다. 농후배양액으로부터 유류분해미생물을 분리하기 위해 Marine agar (MA; Difco Co., USA)에 도말하여 25°C에서 5일간 배양하였으며 성장된 colony는 단일 배양체로 순수분리 하였으며 20% glycerol 용액을 이용하여 -70°C에 보존하였다.

분리된 균주의 유류분해능력을 확인하기 위해 각 균주들은 Marine broth (MB)를 이용하여 전 배양한 후 원심분리 (10,000× g 4°C, 10 min)를 통하여 균체를 회수하였으며 동량의 MSB에 부유하여 균체를 확보하였다. 균체는 50 ml의 MSB에 흡광광도(A<sub>660</sub>)가 0.05가 되게 접종한 후 0.5% (v/v) Arabian heavy crude oil을 유일 탄소원으로 첨가하여 5일간 25°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 대조구는 미생물을 첨가하지 않은 0.5% (v/v) Arabian heavy crude oil이 첨가된 MSB를 동일배양조건으로 배양하였다. 배양액 내 잔류유류화합물은 추출 및 분획과정을 통하여 Gas Chromatography/Flame Ionization Detector (GC/FID)를 이용하여 분석하였다.

### 혼합배양

혼합배양에 따른 유류분해능을 검증하기 위해 다음과 같이 수행하였다. 우수 유류분해균주 4종(strain BS1, BS2, BS3와 BS4)을 대상으로 5개의 혼합조(M-1; BS1+BS2+BS4, M-2; BS2+BS3+BS4, M-3; BS1+BS3+BS4, M-4; BS1+BS2+BS3, M-5; BS1+BS2+BS3+BS4)를 설정하였다. 4종의 균주는 MB를 이용하여 전 배양하였으며 원심분리(10,000× g 4°C, 10 min)를 통하여 균체를 수확하였다. 50 ml의 MSB에 각 조합별로 흡광광도(A<sub>660</sub>)가 0.05가 되도록 조절한 후 유일 탄소원으로 0.5% (v/v) Arabian heavy crude oil을 첨가하여 25°C, 150 rpm에서 5일간 배양하였다. 배양 후 잔류유류화합물은 추출 및 분획과정을 통하여 GC/FID를 이용하여 분석하였다.

### 미생물제제

처리성능 및 microcosm 시험을 위한 미생물제제는 이탄 (Peat moss)을 담체로 하여 다음과 같이 제작하였다. 3종의 미생물은 MB를 이용하여 25°C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양하였다. 각각의 배양액은 원심분리(10,000× g 4°C, 10 min) 후 멸균된 해수로 세척하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포의 계수는 4'6-diamidine-2-phenylindol (DAPI)염색 후 형광현미경하에서 계수하였다[26]. 이탄((주)그린볼텍스, 한국)은 고압멸균기를 이용하여 121°C에서 30분간 멸균한 후 건조하여 준비하였다. 처리성능 시험용 제제는 1.5×10<sup>9</sup> cells/g-peat moss로, microcosm 시험용 제제는 2.6×10<sup>9</sup> cells/g-peat moss로 준비하였으며 시험에 사용하기 전까지 냉장보존 하였다.

### 처리성능 시험

미생물혼합제제의 처리성능 시험을 위한 시험조는 다음과 같다. 50 ml의 신선한 해수와 0.5% (v/v) Arabian heavy crude oil만을 첨가한 대조 시험구인 Test I, Test I에 무기영양염제를 첨가한 영양염제 시험구인 Test II, 그리고 Test II에 1g의 우수 미생물제제를 첨가한 미생물혼합제제 시험구인 Test III로 구성하였다. 신선한 해수는 부산 태종대 해수를 실험 당일 채수하여 사용하였으며 무기영양염제는 Kim [9]의 방법에 의해 제조하여 사용하였다. 각 시험구는 각 9개씩 준비하였으며 배양은 25°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 시료의 분석은 0, 7, 28일째에 시험구 당 3개의 flask를 대상으로 중속영양미생물의 수와 잔류유류화합물을 분석하였다.

### Microcosms test

시험에 사용된 영양염제는 (주)조선비료사(한국)에서 제작된 지속성 영양염제를 사용하였다. 실험구 당 총 1.5 l의 실험구에 요소형비료 15 g, 혼합형비료(요소 및 인산) 0.6 g씩을 첨가하였으며 이는 C:N:P mole 비를 100:10:3으로 유지하도록 계산되었다. 해수는 사용하기 전에 채(3 mm 이하)로 거른 후 사용하였다.

시험구는 화분(3 l)을 이용하였으며 준비된 해수를 1.5 l씩 첨가하였으며 시험구의 조건은 Table 1에 요약하였다. 각 실험구는 2반복 수를 갖도록 준비하였으며 각각의 실험구에 150 ml의 해수혼합액(멸균해수:증류수=1:1)을 첨가하여 land farming을 수행하였다. 또한 실험기간 동안 지속적인 수분유지를 위해 일주일에 3회 해수 혼합액 150 ml을 첨가하였다. 시료는 0, 7, 14, 28일에 균질화한 후 채취하여 멸균된 유리병에 담아서 유류분석용 시료는 냉동상태로, 일반분석용 시료는 냉장상태로 실험실까지 운반하여 MA를 이용한 중속영양세균의 계수와 유류화합물을 분석하였다.

### 유류화합물의 분석

유류화합물의 추출, 분획 및 분석은 다음과 같다. 액체시료

Table 1. Microcosm conditions

Microcosms	Petroleum oil <sup>1)</sup>	Inorganic nutrients <sup>2)</sup>	Microorganism agent <sup>3)</sup>
I	+	-	-
II	+	+	-
III	+	+	+

<sup>1)</sup>Arabian heavy crude oil: 7.5 ml/microcosm

<sup>2)</sup>Slow release fertilizer: Urea/Phosphate form 15 g, Urea form 0.6 g

<sup>3)</sup>Microorganism agent (strain BS1, BS2 and BS4):  $10^7$  cells/cm<sup>3</sup>

의 경우는 내선표준물질인 166.9  $\mu$ g의 d<sub>10</sub>-phenanthrene (Sigma Co., USA)과 220.8  $\mu$ g의 squalane (C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>, Sigma Co., USA)을 첨가하여 혼합한 후 추출용매인 20 ml의 dichloromethane을 이용하여 유류화합물을 회수하였으며 이후 추출용매로 2회 반복하여 추출하였다. 이후 무수황산나트륨 1 g과 구리분말 5 mg이 첨가된 여과지를 통과하여 수분과 황성분을 제거하였다.

유류화합물에 오염된 토양시료의 추출과정은 30 ml의 원심분리관에 시료 1 g과 표준물질인 squalane과 d<sub>10</sub>-phenanthrene을 상기와 같이 동량을 첨가하고 후 수분과 황성분을 제거하기 위하여 무수황산나트륨 1 g과 구리분말 5 mg을 첨가하고 잘 혼합하였다. 이후 20 ml의 dichloromethane을 첨가하고 ultrasonic bath (Brason 8210, USA)를 이용하여 15분간 처리한 후 1,800× g에서 1분간 원심분리한 후 dichloromethane층만을 회수하였으며 dichloromethane을 이용한 추출과정을 2회 반복하였다.

추출된 유류화합물은 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 추출용매를 제거하여 농축하였다. 유류화합물 내 지방족과 방향족화합물의 분리를 위해 실리카-알루미나 컬럼(40 cm×12 mm, 2 g silica gel (70~230 mesh), 2 g alumina, 2 g 무수황산나트륨)에 농축된 유류화합물을 loading하였다. 이후 지방족 탄화수소 fraction은 15 ml의 hexane을 이용하여 용출하였으며, 방향족 탄화수소 fraction은 15 ml의 dichloromethane-hexane (2:3, v/v)을 이용하여 용출하였다. 두 fraction은 감압농축기로 용매를 제거하였다. 분획된 fraction은 GC standard로 50.53  $\mu$ g의 Deca-F-biphenyl (Sigma Co., USA)을 첨가한 후 hexane으로 용해하여 Autosampler vial에 첨가하였으며 최종적 부피는 hexane을 이용하여 1 ml로 조정하였다.

유류화합물의 분석은 Fused Silica Capillary Column (30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m, SPB<sup>TM</sup>)이 장착된 GC/FID (GC-2010, Shimadzu, Japan)를 사용하여 분석하였다. GC분석을 위한 온도조건은 80°C에서 2분간 유지한 후 분당 5°C씩 315°C까지 승온하여 15분간 유지하였다. 주입부 및 검출기온도는 320°C, 이동가스는 고순도 헬륨, 컬럼압력은 4 kgf/cm<sup>3</sup>이었다. 검출된 peak들은 지방족 탄화수소의 경우 n-C<sub>17</sub>/pristane, n-C<sub>18</sub>/phytane 비로 biomarker로 이용하였다[15]. 지방족과 방향족 탄화수소의 농도는 검출된 peaks와 표준물질의 비로

결정한다[9].

## 결과 및 고찰

### 유류분해 미생물의 분리 및 분해능

유류분해 미생물은 유류저장창고주변의 오염된 토양으로부터 0.5% (v/v) Arabian heavy crude oil이 첨가된 MSB를 이용한 농후배양을 통하여 4종의 균주(BS1, BS2, BS3와 BS4)가 분리되었다. 분리 균주들의 유류분해능을 조사한 결과는 Fig. 1에 요약하였다. BS1, BS2 및 BS3 균주는 지방족 탄화수소의 경우 75~78%의 생분해율을 나타내었으나 BS4 균주는 거의 분해하지 못하였다(Fig. 1A). 지방족 탄화수소 중 생물학적 생분해지표로 n-C<sub>17</sub>/Pristane 및 n-C<sub>18</sub>/Phytane 비를 이용하는 데[15], 4종의 균주를 대상으로 그 비를 조사한 결과, BS1 균주가 대조구와 비교하여 가장 낮은 비를 나타내었으며 이는 생물학적인 분해가 어려운 pristane이나 phytane에 비하여 알칸족인 n-C<sub>17</sub>과 n-C<sub>18</sub>에 대한 생물학적인 분해가 빠르게 진행되었음을 의미한다(Fig. 1B).

방향족 탄화수소의 생분해율을 조사한 결과 BS4와 BS2 균주는 30.0%와 22.3%로 20% 이상을 그리고 BS1과 BS3 균주는 8.4%와 1.0%로 10%이하의 생분해율을 나타내었다. 이러한 결과로부터 지방족과 방향족 탄화수소를 합한 총 탄화수소에 대한 분해능력은 BS2 (49.8%), BS1 (43.8%), BS3 (39.6%) 그리고 BS4 (16.6%) 균주의 순으로 나타났다(Fig. 1A).

### 유류분해 우수미생물조합 선별

유류화합물은 지방족 및 방향족탄화수소 등 다양한 화합물들로 구성되어 있어 신속한 생물분해를 위해서는 단일 종보다 혼합종을 이용할 경우 그 분해능을 향상시킬 수 있다. 4종의 유류분해미생물을 이용한 5개의 혼합조합을 대상으로 유류화합물의 생물분해에 미치는 효과를 분석하여 Fig. 2에 나타내었다. BS1, BS2 및 BS4 균주의 혼합조합인 M-1은 5일의 배양기간 동안 지방족 및 방향족 탄화수소에 대한 분해율이 각각 48.4%, 30.5%를 나타내었다. 따라서 기존 단일균주의 경우 유류화합물 중 지방족과 방향족 탄화수소의 분해에서 편향적인 특성을 보였으나(Fig. 1), 우수혼합조합인 M-1은 지방족 탄화수소의 생분해능력은 BS1과 BS2와 비교하여 약 40% 정도 감소하였으며

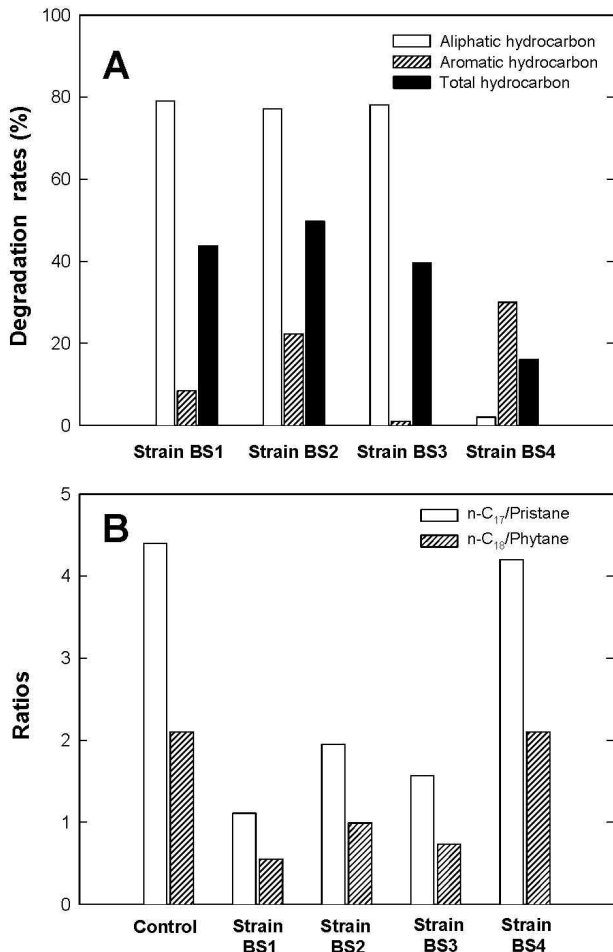


Fig. 1. Degradation rates of petroleum hydrocarbon (A), n-C<sub>17</sub>/Pristane and n-C<sub>18</sub>/Phytane ratios (B) by isolated petroleum degrading bacteria. Each bacteria was cultured in MSM contained 0.5% Arabian heavy crude oil as a sole carbon source at 25°C, 150 rpm for 5 days.

이는 혼합배양에 따른 균주간의 상호작용으로 인한 저해효과로 판단된다. 반면 M-1조합에서 방향족 탄화수소의 분해율은 30%로 향상되어 균주 간의 상호작용에서 저해효과는 나타나지 않은 것으로 판단된다. 특히, 방향족 탄화수소의 분해능력을 갖고 있는 BS4균주가 포함된 M-3조합의 경우 방향족 탄화수소의 분해율은 3%로 나타나 균주조합에 따라 편차가 높게 나타남을 알 수 있다(Fig. 2). 총 탄화수소의 분해율은 M-1가 38.7%로 M-2 (25.0%), M-3 (17.7%), M-4 (17.4%), M-5 (25.5%) 혼합조에 비하여 상대적으로 가장 높은 분해율을 나타내었다(Fig. 2). 결과적으로 유류분해미생물을 이용한 혼합조의 선별을 통하여 M-1은 지방족 및 방향족 탄화수소의 균형적인 생물분해를 유도하여 단일종이 갖는 불균형적인 분해능력을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

M-1조합을 구성하는 3종의 균주를 동정을 위해 각 균주로부터 16S rRNA 염기서열을 결정한 후 GeneBank의 NCBI

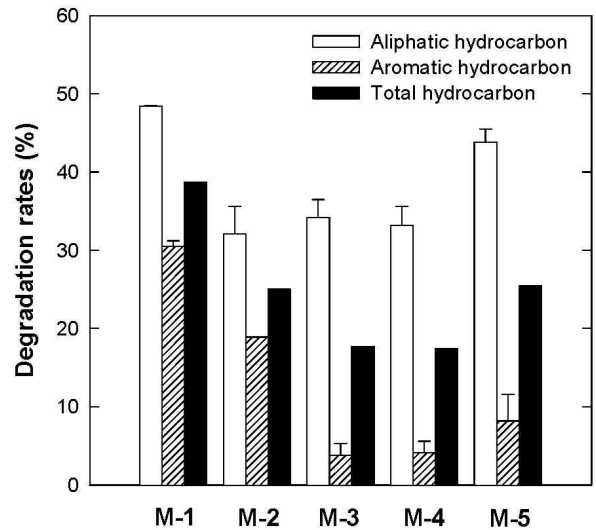


Fig. 2. Degradation rates of petroleum hydrocarbons of mixed cultures after incubation at 25°C, 150 rpm for 5 days (M-1 cultures was consisted of strain BS1, BS2 and BS4; M-2 cultures was consisted of strain BS2, BS3 and BS4; M-3 cultures was consisted of strain BS1, BS3 and BS4; M-4 cultures was consisted of strain BS1, BS2 and BS3; M-5 cultures was consisted of strain BS1, BS2, BS3 and BS4).

Blast search 프로그램을 이용하여 유사도를 조사한 결과 BS1은 *Rhodococcus ruber* (99%), BS3은 *Dietzia psychralcaliphila* (99%), 그리고 BS4는 *Novospingobium pentaromativorans* (100%)로 판정되었다(자료미제시).

#### 처리성능 시험

처리성능 시험은 자연해수 내에 존재하는 토착미생물군집과의 상호경쟁에서 미생물제제가 생분해를 촉진시킬 수 있는가를 검증하고자 하였다. 국내 해양유류오염정화제의 시험기준[10]을 변형하여 수행한 실험결과는 Fig. 3과 같다. 지방족 탄화수소의 경우(Fig. 3A) 자연해수와 Arabian heavy crude oil만을 첨가한 대조구인 Test I는 28일 동안 88%의 잔존율을 나타내었다. 반면 무기영양염을 첨가한 Test II와 무기영양염과 미생물제제를 첨가한 Test III에서 지방족 탄화수소의 잔존율은 각각 32%와 40%를 나타내어 Test II가 다소 높은 분해효과를 나타내었다. 그러나 배양 7일째에 지방족 탄화수소의 잔존율은 Test II보다 Test III에서 낮게 나타나 Test III가 초기 저감효과가 높은 것으로 판단된다.

방향족 탄화수소의 경우 Test I은 28일 동안 88%의 잔존율을 나타낸 반면 Test II와 Test III는 각각 72%와 58%의 잔존율을 나타내었다(Fig. 3B). 특히 Test III는 배양 7일 그리고 28일째에 무기영양염만을 처리한 Test II에 비하여 유의한 방향족 탄화수소의 제거효과를 나타내 첨가된 미생물제제가 처리기간동안 방향족 탄화수소의 생분해를 유도한 것으로 판단된다. 지방족과 방향족 탄화수소를 합한 총 탄화수소의 잔존율에서

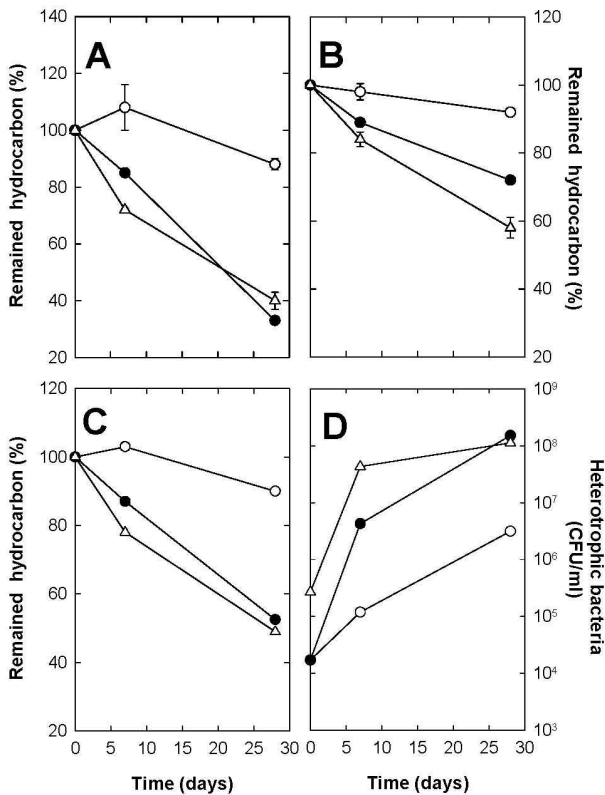


Fig. 3. Fluctuation of aliphatic hydrocarbon (A), aromatic hydrocarbon (B), total hydrocarbon (C) and heterotrophic bacteria (D) in treatability test. ○ Test I (natural seawater+0.5% Arabian heavy crude oil), ● Test II (natural seawater+0.5% Arabian heavy crude oil+inorganic nutrients), △ Test III (natural seawater+0.5% Arabian heavy crude oil+inorganic nutrients+microorganism agent)

(Fig. 3C), Test II와 III는 실험기간 유의한 차가 없는 것으로 나타났다. 그러나 Fig. 3A와 B에서와 같이 Test III는 지방족 탄화수소에 비하여 난분해성이며 잔류독성이 높은 방향족 탄화수소의 높은 생분해능력을 나타내어 토착미생물에 의한 분해효과와 구분된다고 판단된다.

결과적으로, 자연계에 오염된 유류화합물의 생물정화를 위한 무기영양염제의 첨가는 지방족 및 방향족 탄화수소의 생분해를 촉진한다는 기존의 보고들과 일치하였다[5,7,8,14-16, 20,21,25]. 특히 유류분해 미생물제제를 첨가한 Test III는 자연해수의 토착미생물이 존재함에도 불구하고 지방족 탄화수소의 저감효과는 다소 낮으나 방향족 탄화수소는 혼합조시험 결과(Fig. 2)와 같이 우수한 저감효과를 나타내었다.

중속영양세균의 변화에서도 대조구의 경우 초기 자연해수 내에  $1.7 \times 10^4$  CFU/ml의 토착세균이 존재하였으며 유류화합물을 인위적으로 첨가하여 28일의 배양기간 동안  $3.1 \times 10^6$  CFU/ml로 약 200배 증가하였다(Fig. 3D). 반면 무기영양염제를 추가적으로 첨가한 Test II는 초기  $1.7 \times 10^4$  CFU/ml에서

7일째에  $4.3 \times 10^6$  CFU/ml로 그리고 28일째에  $1.7 \times 10^8$  CFU/ml로 대조구와 비교하여 배양초기에 급격한 개체수의 증가를 보였다. 미생물제제를 첨가한 Test III은 초기  $2.7 \times 10^5$  CFU/ml에서 7일째에  $4.3 \times 10^7$  CFU/ml로 증가하여 토착세균뿐만 아니라 첨가된 유류분해 세균의 개체수가 유의하게 하였음을 알 수 있다. 특히 처리성능 시험은 유일 탄소원으로 유류화합물만 첨가하였기 때문에 미생물의 급격한 성장은 유류화합물을 대사적으로 이용한 결과로 판단된다.

일반적으로 유류분해미생물을 첨가할 경우 자연계 내에 존재하는 토착미생물과의 경쟁에서 실패함으로써 무기영양염제만을 처리한 경우보다 유류분해에 유의한 효과를 주지 못한다는 보고도 있으나[12,22] 유류분해 미생물의 수가 적거나 초기 유류오염 환경에서 자연계의 유류분해미생물이 활성화되는 데 시간이 걸리기 때문에 우수 유류분해미생물의 첨가는 경쟁에 영향을 받지 않고 유의한 생물분해가 진행된다는 보고도 있다[18].

#### Microcosm test

유류화합물에 오염된 모래 해변을 가정한 모의현장 시험인 microcosm test를 수행 하였으며 그 결과를 Fig. 4에 도식화하였다. 특히 이탄을 유류분해미생물 보존재로 사용하였으며 그 자체가 오염환경에서 산소의 공급과 수분유지 등 환경개선의 목적을 포함하였다.

실험기간 동안 microcosm 설치환경의 평균온도는 15℃를 유지하였으며 최고 18℃에서 최저 9.5℃의 범위를 나타내었고 microcosm 내 모래의 평균 함수율은 3일 간격으로 해수를 공급하여 약 15%를 유지하였다(자료 미제시).

대조구에서 유류화합물 중 지방족 탄화수소는 7일까지 초기농도를 유지하였으나 이후 28일째에 약 65%의 잔존율을 나타내었다(Fig. 4A). 반면 무기영양염제 처리구(microcosm II)와 무기영양염제와 미생물제제 처리구(microcosm III)에서 지방족 탄화수소는 14일째까지 급속히 감소되었으며 이후 28일째까지 유의한 감소는 이루어지지 않았다. 특히 microcosm II는 14일째에 20%의 잔존율을 나타내어 가장 빠른 분해효과를 보였다. 이러한 감소가 생물학적 분해에 의해 진행되었는가를 알아보기 위해 생물분해의 지표인  $n-C_{17}$ /Pristane 및  $n-C_{18}$ /Phytane 비를 확인한 결과 대조구는 생물학적 분해가 거의 이루어 지지 않은 반면 microcosm II와 III는 생물학적 분해가 진행되었으며 특히 microcosm II가 microcosm III보다 유의한 생물분해가 진행되었음을 알 수 있었다(Fig. 4D, E). 대조구에서  $n-C_{17}$ /Pristane 및  $n-C_{18}$ /Phytane 비에 감소 없이 지방족 탄화수소의 잔류농도가 감소되어 생물학적인 분해에 의한 감소보다는 수분공급과 밭갈이(tilling)과정 동안 화분의 아래로 유출되는 자연적인 감소가 더 큰 영향을 미친 것으로 판단된다.

방향족 탄화수소의 잔존율은 28일의 처리기간 동안 대조구

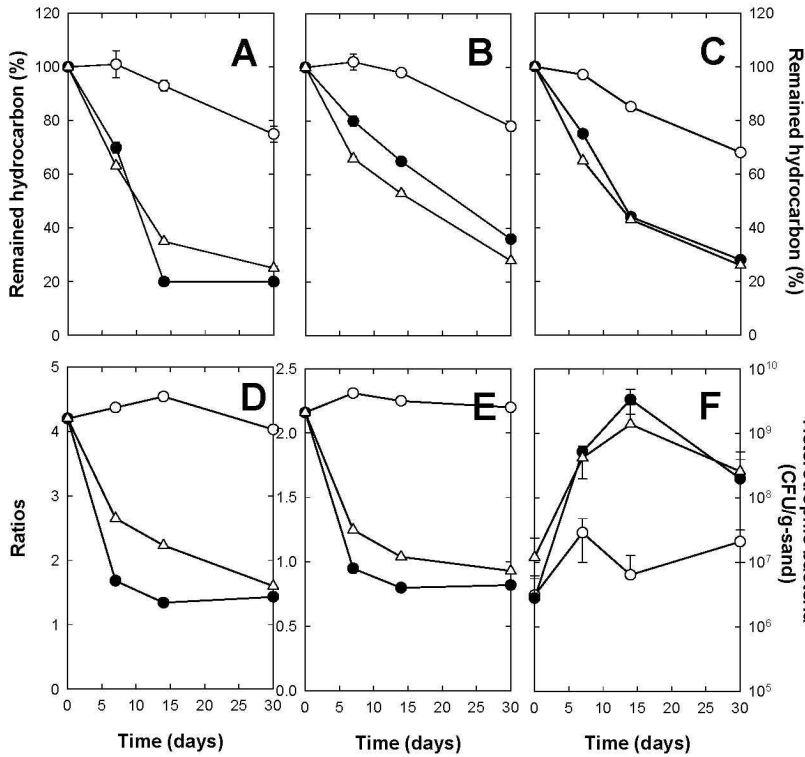


Fig. 4. Fluctuation of aliphatic hydrocarbon (A), aromatic hydrocarbon (B), total hydrocarbon (C), n-C<sub>17</sub>/pristane ratio (D), n-C<sub>18</sub>/phytane ratio (E) and heterotrophic bacteria (F) in microcosm test. ○ Microcosm I (Seasand+Arabian heavy crude oil), ● Microcosm II (Seasand+Arabian heavy crude oil+inorganic nutrients), △ Microcosm III (Seasand+Arabian heavy crude oil+inorganic nutrients+microorganism agent)

(78%)와 비교하여 microcosm II (36%)와 microcosm III (28%)에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 4B). 특히, 미생물제제를 처리한 microcosm II에서 방향족 탄화수소의 잔존율은 배양 7일째에 80%를 보인 microcosm III와 비교하여 66%로 급격한 저감효과를 보였다. 이후 최종일까지 microcosm II는 microcosm III와 구별되는 효과를 보여주었다. 이는 유류화합물의 생물정화에서 난분해성과 잔류독성의 주된 역할을 하는 방향족 탄화수소의 신속한 저감에 있어 토착미생물의 촉진보다 방향족 탄화수소의 생분해능력이 우수한 미생물제제의 처리가 보다 유의한 효과를 얻을 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 효과는 처리성능 시험의 결과와도 일치하였다(Fig. 3). 그러나 지방족과 방향족 탄화수소의 합인 총 탄화수소의 변화에서는 microcosm II와 microcosm III의 시험구간 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 대조구와는 구별되는 차이를 보였다(Fig. 4C).

개방계인 microcosm 시험에서 탄화수소의 잔존율은 폐쇄계인 처리성능 시험에서 보다 향상되었으며(Fig. 3, 4) 이는 산소의 공급의 원활성, 지속성 영양염체에 의한 영양원 공급 그리고 수분유지 등 생물분해를 촉진할 수 있는 적절한 환경을 조성한 것 외에도 수분유지를 위해 공급된 해수의 과포화로 모래를 투과하여 손실될 때 유류화합물이 함께 제거되었을 뿐만 아니라 개방계에 따른 휘발성 화합물의 제거가 중요한 영향을 미친 것으로 판단된다. 이러한 결과는 자갈과 모래해변을 가상한 모의실험과 연구에서도 유사한 결과가 보고된

바 있다[21,22].

Microcosm test 동안 종속영양세균의 변화는 대조구의 경우 28일 동안  $3.1 \times 10^6$  CFU/g-sand에서  $2.1 \times 10^7$  CFU/g-sand으로 뚜렷한 증가를 보이지 않았다(Fig. 4F). 반면 microcosm II와 III에서 종속영양세균의 수는 배양 7일 이후 시험구간 구별되는 차이를 나타나지 않았으나 배양 0일째의 종속영양세균 수와 비교하여 7일째에 150~180배 그리고 14일째에 500~1,200배가 증가하여  $10^9$  CFU/g-sand 수준을 유지하였다. 그러나 배양 14일 이후 28일째까지 종속영양세균의 수는 점진적으로 감소하였다. 이는 지방족 탄화수소의 경우 14일째에 탄화수소의 분해가 거의 진행됨에 따라 이용 가능한 탄소원의 고갈에 따른 유류분해미생물의 성장감소로 판단된다 [16,20,21].

본 연구에서 해양환경에 오염된 유류화합물의 신속한 생물정화를 촉진시키기 위해 4종의 우수미생물을 분리하고 그 분해능력을 평가하였다(Fig. 1). 선발된 우수균주를 이용하여 지방족 및 방향족 탄화수소의 균형적인 생물분해능력을 가지고 있는 우수한 혼합 미생물조합을 선발하였으며 특히, M-1조합은 방향족 탄화수소에 대한 우수분해능력을 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 2). 우수 혼합미생물은 이탄을 보존제로 사용하여 미생물제제를 제작하였으며 상용화 가능성을 검토하였다. 그 결과 미생물제제는 자연해수를 이용한 처리성능 시험에서 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소 및 총 탄화수소에서 60%, 42% 및 51%의 분해율을 나타내었다(Fig. 3). 또한 모래해

변을 가정한 microcosm 시험에서 미생물제제는 지방족 탄화수소, 방향족탄화수소 및 총 탄화수소에서 75%, 72% 및 74%의 분해율을 나타내었다(Fig. 4). 특히, 미생물제제는 처리성과 microcosm 시험에서 토착미생물과의 저해효과 없이 방향족 탄화수소에 대한 차별화된 분해효과를 나타내었다. 일반적으로 해양환경인 모래해변이나 조간대 등 유류에 오염된 생물정화를 위해서는 오염환경의 다양한 물리·화학적 특성을 조사하고 현장실험을 통해 최종적인 처리방법이 결정된다. 따라서 향후 본 미생물제제가 생물정화를 위한 생물집중법으로 활용되기 위해서는 다양한 해양환경에 대한 현장적용실험의 DB화가 필요하며 이를 위한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

### References

- Aldrett, S., J. S. Bonner, T. J. McDonalds, M. A. Mills, and R. L. Autenrieth. 1997. Degradation of crude oil enhanced by commercial microbial cultures. Proceedings of the 1997. Oil Spill Conference. American Petroleum Institute. Washington. DC.
- Alexander, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego.
- Altas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon: An environmental perspective. *Microbial Rev.* **45**, 120-209.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**, 63-67.
- Choi, S. C., K. K. Kwon, J. H. Sohn, and S. J. Kim. 2002. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil bioremediation in sand seashore mesocosms. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 431-436.
- Forsyth, J. V., Y. M. Tsao, and R. D. Blem. 1995. Bioremediation: when is augmentation needed, pp. 1-44, In Hinchee, R.E. et al. (eds.), Bioaugmentation for site remediation. Battelle Press, Columbus, OH.
- Glaser, J. A., A. D. Venisa, and E. J. Opatken. 1991. Development and evolution of application techniques for delivery of nutrients to contaminated shoreline in Prince William Sound. Proceedings of 1989 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- Head, L. M. and R. P. J. Swannell. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 234-239.
- Kim, S. J. 2002. Research for the form approval procedure of oil spill bioremediation agent. Korea Coast Guard
- Kim, S. J., J. H. Sohn, D. S. Sim, K. K. Kwon, and T. H. Kim. 1998. The effects of bioremediation on the oil bioremediation in oil polluted environments, pp. 181-188, In Le Gal, Y. and H.O. Halvorson (eds.), New developments in marine biotechnology, plenum Press. New York.
- Leahy, J. G. and R. R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Rev.* **53**, 305-315.
- Lee, K. and E. M. Levy. 1987. Enhanced biodegradation of a light crude oil in sandy beaches. Proceedings of the 1987 Oil Spill Conference. American Petroleum Institute. Washington. DC.
- Lee, K. and E. M. Levy. 1989. Enhancement of the natural biodegradation of condensate and crude oil on beaches of Atlantic Canada. Proceedings of the 1989 Oil Spill Conference. American Petroleum Institute. Washington. DC.
- Lee, K., G. H. Tremblay, and E. M. Levy. 1993. Bioremediation: Application of slow-release fertilizers on low-energy shoreline. Proceedings of 1993 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- Marty, P. and Y. Martin. 1996. Seed and feed strategy against oil spills in a marine environment: laboratory and simulated outdoor experiments with selected natural bacterial strain. *J. Mar. Biotechnol.* **4**, 155-158.
- Oh, Y. S., D. S. Sim, and S. J. Kim. 2001. Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 1367-1372.
- Ortega-Calvo, J. J. and C. Saiz-Jimenez. 1998. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3123-3126.
- Rosenberge, E., R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube, E. Adler, and E. Z. Ron. 1992. Petroleum bioremediation- A multiphase problem. *Biodegradation* **3**, 337-350.
- Safferman, S. I. 1991. Selection of nutrients to enhance biodegradation for the remediation of oil spilled on beaches. Proceedings of 1991 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute. Washington DC..
- Sim, D. S., J. H. Sohn, and S. J. Kim. 1998. Microcosm study for bioremediation of oil-contaminated pebble environments. *Korean J. Microbiol.* **34**, 101-107.
- Sohn, J. H., K. K. Kwon, and S. J. Kim. 2003. Effects of Slow Release Fertilizer and Dispersant on the Biodegradation of oil contaminated in sand seashore mesocosm. *Korean J. Microbiol.* **39**, 8-15.
- Tagger, S., A. Bianchi, M. Juillard, J. LePetit, and B. Roux. 1983. Effect of microbial seeding of crude oil in seawater in a model system. *Mar. Biol.* **78**, 13-20.
- Vacca, D. J., W. F. Bleam, and W. J. Hickey. 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3797-3805.
- Venosa, A. D., J. R. Haines, W. Nisamanepong, R. Govind, S. Pradhan, and B. Siddique. 1991. Protocol for testing bioremediation products against weathered Alaskan crude oil. Proceedings of the 1991 Oil Spill Conference. American Petroleum Institute. Washington. DC.
- Venosa, A. D., M. T. Suidan, B. A. Wrenn, K. L., Strohmeier, J. R. Haines, A. L. Eberhart, D. King, and E. Holder. 1996. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1764-1775.

26. Zimmerman, R. 1977. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy, pp. 103-120, In Rheinheimer, G. (ed.),

Microbial ecology of brackish water environment. Springer-Verlag, Berlin.

---

초록 : 해양유류오염정화를 위한 유류분해 미생물제제의 평가

손재학\*

(신라대학교 의생명과학대 바이오식품소재학과)

유류분해에 있어 혼합미생물제제의 효과를 평가하기 위해 미생물제제의 처리성과 microcosm test를 수행하였다. 유류분해세균은 0.5% Arabian heavy crude oil을 유일 탄소원으로 제공된 최소배지를 이용한 연속적인 농후배양을 통하여 분리하였다. 우수 유류분해 미생물조합인 3종의 균주(BS1, BS2, BS4)는 MSM배지에서 5일의 배양기간 동안 지방족 탄화수소를 48.4%, 방향족 탄화수소를 30.5% 생분해하였다. 처리성과 microcosm test는 Arabian heavy crude oil을 첨가한 후 3가지 처리조건인 무처리, 무기영양염처리 그리고 무기영양염 및 혼합미생물처리조건에서 유류화합물의 생분해에 미치는 영향을 조사하였다. 무기영양염처리구와 무기영양염 및 혼합미생물처리구에서 지방족 탄화수소의 분해율은 실험기간 동안 유의하게 향상되었으며 두 실험구간 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 무기영양염 및 혼합미생물처리구에서 방향족 탄화수소의 생분해율은 무기영양염제만을 처리한 시험구와 비교하여 처리성능 시험의 경우 50% 그리고 microcosm test의 경우 13%를 향상시켰다. 본 연구의 결과로부터 혼합미생물제제는 실험실, 처리성과 microcosm test에서 지방족뿐만 아니라 방향족 탄화수소의 생분해를 촉진하였다. 특히 혼합미생물제제는 방향족 탄화수소의 제거를 위한 생물정화기술의 적용에 있어 유용한 도구로 판단된다.