

해양세균 *Achromobacter* sp. M-1220균주에 의한 Bunker-C 油의 乳化

박중연¹·박인식¹·서근학²·홍용기^{1*}

¹부산수산대학 생물공학과 ²응용화학과

Emulsification of Bunker-C Oil by a Marine Bacterium *Achromobacter* sp. M-1220

Park, Jung-Youn¹, In-Sick Park¹, Kuen-Hack Suh² and Yong-Ki Hong^{1*}

¹Dept. of Biological Science and Technology, ²Dept. of Applied Chemistry,
National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

A marine bacterium *Achromobacter* sp. M-1220 was isolated from enrichment culture for emulsification of Bunker-C oil. The bacterium can emulsify approximately 7.5g of Bunker-C oil per liter in sea water medium within 7 days at 18°C and multiply from 8×10^5 cells to 9×10^9 cells per ml. Optimum pH and salt concentration were pH 7.5 and 3% for the emulsification of Bunker-C oil. Emulsification takes place actively in both high sulfur-containing Bunker-C oil and high sulfur-containing crude oil. The amount of emulsification depends on the exogenous addition of nitrogen and phosphate sources. The bacterium can also utilize *n*-hexadecane, *n*-paraffin and benzene among the petroleum compounds as a sole carbon source.

현재 전세계적으로 해양 油類 오염에 의한 피해가 지속적으로 증가하는 추세에 놓여 있으며 이러한 해양 油類 오염의 근원은 크게 선박사고 및 선박청소, 공장폐기물 등으로 볼 수 있다(1, 2). 해양에 유출된 油類는 우선 저비등점의 방향족화합물들이 대기중으로 휘발하게 되며 동시에 수용성성분들이 해수중으로 녹아 들어가게 된다. 그리고 그외의 잔여성분들은 얇은 피막을 형성하여 넓은 해역을 덮게 되는데, 이러한 현상이 지속될 경우 단기적으로는 油피막에 의한 산소 및 태양광선의 차단으로 생물체의 성장에 큰 피해를 주게 되며 또한 장기적으로는 油類의 유독성분들이 지속적으로 잔존하면서 생태계에 막대한 피해를 끼치며 석유취까지 남기게 된다. 이러한 油類의 성분들이 자연계에서 완전히 제거되는 데는 수십년이 소요된다는 보고가 있다(2-4). 이에 본 연구에서는 우리나라 연근 해역의 해양오염물질중 주종을 이루고 있는 Bunker-C油중 특히 연료용으로 값싸게 대량으로 이용되고 있는 고탄함유의 Bunker-C

油를 대상으로 해양세균 혼합배양을 통한 乳化분산 능력실험(5)에 이어, 해양 저온성 분리세균 *Achromobacter* sp. M-1220의 한 균주만을 사용한 乳化분산 촉진능력을 조사하여 발표하고자 한다.

재료 및 방법

해수배지 조성

Bunker-C油를 탄소원으로 이용할 수 있는 해양세균의 분리 및 배양실험을 위하여 Bunker-C油 해수배지 즉 Bunker-C油 7.8g, K_2HPO_4 0.01g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, Tris-aminomethane 12.1g을 천연해수 1l에 녹여 pH 7.6으로 조정한 후 실험을 행하였으며 인공해수배지는 Baumann 등의 배지조성(6)에 따라 만들었다.

균주의 분리

만성적인 油類 오염이 예상되는 부산의 용당, 자

Key words: Bunker-C oil, emulsification, marine *Achromobacter* sp.

*Corresponding author

갈치 앞바다, 층무 내항, 울산 방어진 내·외항에서 채취한 해수 및 해저질을 Bunker-C油 해수배지에 접종하여 5일 간격으로 5회 enrichment culture(7) 시킨 뒤, 변형된 Marine Agar(8; Bacto peptone 5g, yeast extract 1g, Ferric citrate 0.1g, NH₄NO₃ 1.6 mg, Na₂HPO₄ 8 mg, agar 15g, sea water 1l, pH 7.6)평판에 도말하여 형성된 128개의 집락중 가장 乳化능력이 우수한 *Achromobacter* sp. M-1220 균주(9)를 선별하였다.

사용 유류

주식회사 유공 울산정유공장으로부터 제공받은 황 함량이 4.0%인 고허 함유 Bunker-C油를 주로 사용하였으며, 油類 종류별 비교 실험에는 황 함량이 1.6%인 저황 Bunker-C油와 황 함량이 2.57%인 Kuwait산 원유, 황 함량이 0.1%인 Brunei Champion산 원유도 사용하였다.

배양조건

500 ml의 Linger병에 Bunker-C油 해수배지 20 ml와 2일간 전배양한 유도세균 400 μl를 접종한 뒤 18°C에서 12 rpm으로 회전 배양시켰다.

乳化度 측정

Bunker-C油 해수배지 배양액을 Reisfield(10-12) 방법과 같이 우선 심하게 혼든 다음 5 ml를 시험관(150×14 mm)에 넣고 5분동안 정지시킨 뒤 액의 중간부위에서 2 ml의 시료액을 뽑아내어 540 nm에서 흡광도를 측정하여 유탁도로서 乳化량을 나타내었다.

결과 및 고찰

乳化능력의 적응효과

Bunker-C油에 계속 적응배양된 세포와 변형된 marine broth에서만 생육시킨 세포를 각각 Bunker-C油만을 유일 탄소원으로 넣은 배지에서 배양시키면서 생균수의 변화, pH의 변화 및 乳化분산정도를 조사한 바 Fig. 1과 같이 나타났다. Fig. 1A는 적응된 세포의 경우로서 0.1 M Tris-HCl 완충용액으로 pH를 7.6으로 일정하게 유지시킨 것은 유탁도가 1일이 경과하면서 서서히 증가하여 8일만에 10정도의 乳化度 값을 보여주었으며 생균수도 9×10⁹ cell/ml로 접종시보다 최고 1000배 정도까지 증가했지만 완충용액을 사용하지 않은 것은 유탁도의 변화가 거의 나타나지 않았으며 생균수도 큰 증가를 보이지 않았다. 반면에 적응시키지 않은 세포를 사용한 Fig. 1B

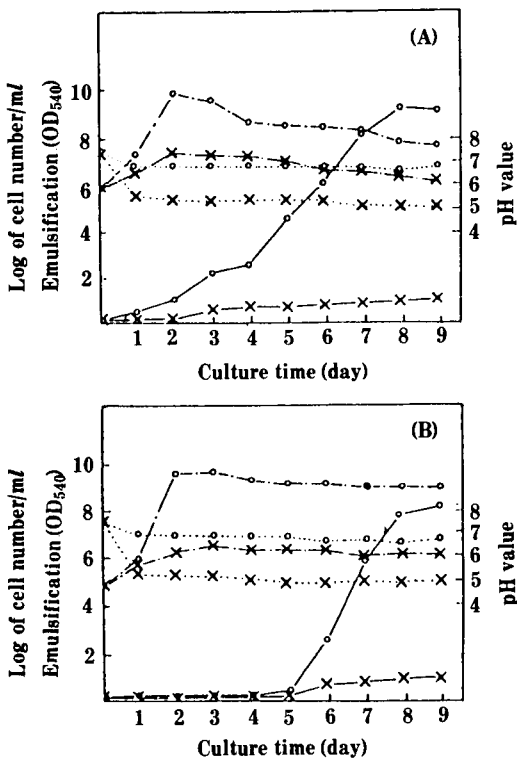


Fig. 1. Changes of emulsification, cell growth and pH value of Bunker-C oil by induced cell (A) or non-induced cell (B) at 18 C

Open circle was bufferized by 0.1M Tris-HCl, pH 7.6, and cross was not bufferized. —, optical density; - - -, viable cell number; ·····, pH value

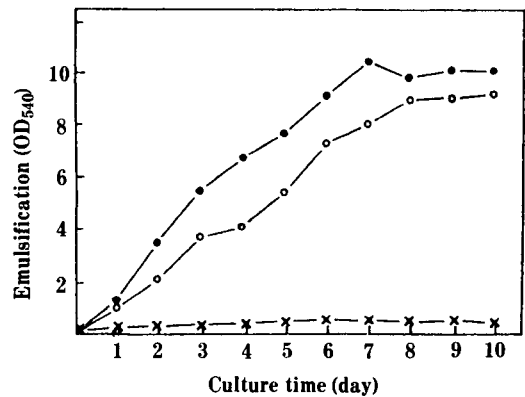


Fig. 2. Effect of nutrients on the emulsification of Bunker-C oil.

● - ●, sea water with (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ and yeast extract; ○ - ○, sea water with (NH₄)₂SO₄ and K₂HPO₄; × - ×, sea water with (NH₄)₂SO₄ or K₂HPO₄

의 경우는 Tris-HCl 완충용액을 첨가했을 경우 생균수는 적응된 세포를 사용한 경우와 거의 일치하였으나 유탁도는 5일이 경과된 후부터 서서히 증가되는 경향을 보여주었다. 그러나 완충용액을 사용하지 않은 것은 유탁도 및 생균수의 증가를 거의 볼 수 없었다. 따라서 복합 油類의 분해에 있어서 pH의 조절이 필수적이며 유류에 적응된 세포는 배양초기부터 이용가능한 油類 성분들을 선차적으로 乳化분산시켜 이용하는 것으로 보인다(13).

영양염의 영향

해수에서의 Bunker-C油 乳化에 필요한 영양염의 요구를 조사하기 위하여 질소원으로 7.6mM(NH₄)₂SO₄를, 인산원으로는 0.057 mM K₂HPO₄, 미량 성분으로 0.05% yeast extract를 각각 조합하여 첨가해 본 결과 Fig.2에서 보는 바와 같이 질소원과 인산원의 첨가만으로도 乳化가 잘됨을 보여주었으며 그중 어느 한 성분이라도 부족할 경우에는 乳化가 거의 일어나지 않으므로 이 두 요소가 乳化의 제한인자로서 작용된다는 것을 알 수 있었다(14, 15).

Bunker-C油 농도의 영향

Bunker-C油의 해수배지에서의 농도를 2.5g/l부터 12.5g/l까지 2.5g/l 단위씩 달리하여 乳化능력을 조사하여 본 결과 Fig.3과 같이 나타났다. Bunker-C油의 농도가 7.5g/l까지는 쉽게 乳化분산시킬 수 있음을 볼 수 있었으나 유류의 양이 10g/l를 넘으면 어느 정도의 乳化는 5일동안 진행되나 그 이상의 지속적인 효과를 나타내지 못하는 것으로 보아 Bunker-C油가 고농도인 경우에는 균의 성장 및 乳化에 저해영향을 미치는 화합물들로 인한 것으로 추측할 수

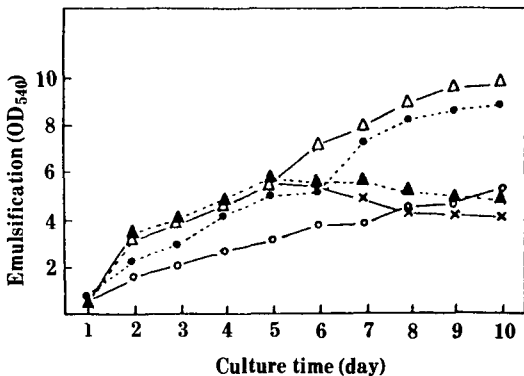


Fig. 3. Effect of Bunker-C oil concentration on the emulsification.

○-○, 2.5 g/l; ●-●, 5 g/l; △-△, 7.5 g/l; ▲-▲, 10 g/l; ×-×, 12.5 g/l

있다.

pH의 영향

乳化에 미치는 pH의 범위를 조사하기 위하여 각 완충용액을 0.1M 농도로 첨가하여 초기배지 pH를 일정하게 조절하였다. pH5에서 6까지는 구연산 완충용액을, pH6.5에서 7까지는 인산 완충용액을, pH7.5에서 9까지는 Tris-HCl 완충용액을, pH9.5에서 10까지는 NaHCO₃-Na₂CO₃ 완충용액을 사용하였으며 그 결과 Fig.4에서 보는 바와 같이 시간의 경과에 따라 pH6.5에서 8.5까지 비교적 넓은 범위까지 乳化분산이 일어났으며 그 중에서도 특히 pH7과 8범위에서 가장 높은 유탁도를 보임으로서 실험에 사용된 *Achromobacter* M-1220 균주가 해수의 약알카리성 범위에서 최적으로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

온도의 영향

乳化분산에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하

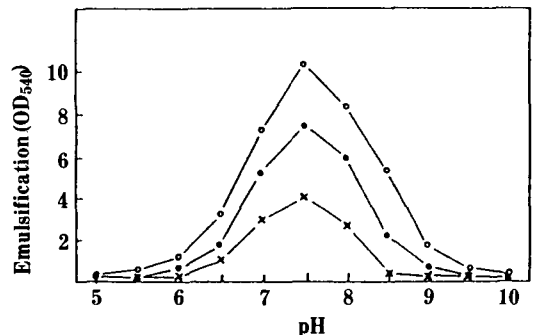


Fig. 4. Effect of pH on the emulsification of Bunker-C oil

○-○, 9 days; ●-●, 6 days; ×-×, 3 days

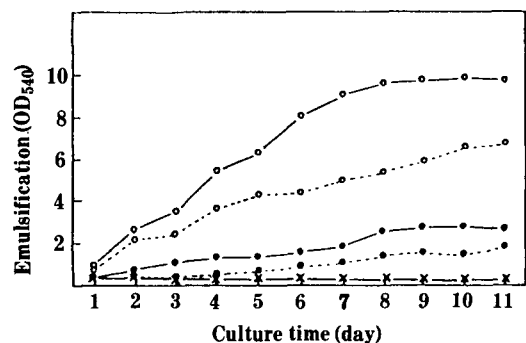


Fig. 5. Effect of temperature on the emulsification of Bunker-C oil

×-×, 4 C; ○-○, 10 C; □-□, 18 C; ●-●, 30 C; ●-●, 37 C

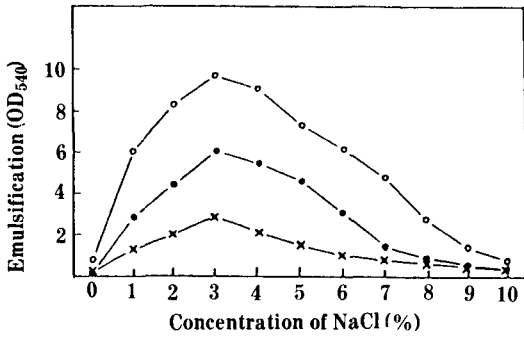


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on the emulsification of Bunker-C oil
○-○, 9 days; ●-●, 6 days; ×-×, 3 days

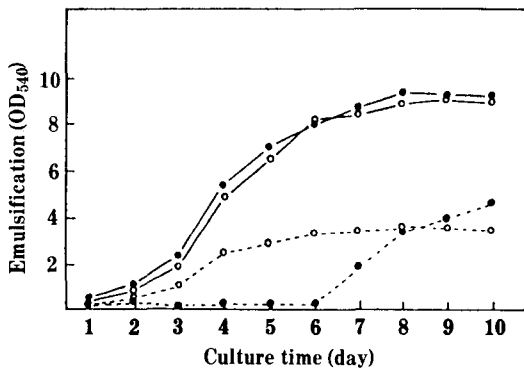


Fig. 7. Comparison of emulsification between Bunker-C oil and crude oil
●-●, 4.0% sulfur containing Bunker-C oil; ●-●, 1.6% sulfur containing Bunker-C oil; ○-○, 2.57% sulfur containing Kuweit crude oil; ○-○, 0.11% sulfur containing Brunei champion crude oil

여 4°C에서 37°C까지 나누어 실험한 결과 Fig. 5와 같이 M-1220 균주는 우리나라 연근해역의 년중 평균수온인 18°C 부근(16)에서 활발한 乳化능력을 보여 높은 유탕도를 나타내었으나 4°C 이하의 저온이나 30°C 이상의 온도가 되면 乳化능력이 저하됨을 볼 수 있었다. 이러한 현상은 Atlas(17), Reisfeld(7) 등의 최적온도와는 약간 상이하지만 우리나라 연근해역의 최저 3°C와 최고 24°C의 범주에는 더욱 적합한 것으로 생각된다.

NaCl의 영향

Bunker-C油의 乳化에 미치는 NaCl의 농도를 관찰하기 위하여 인공해수배지에 염분농도 10%까지 1% 간격으로 조절하여 실험해 본 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 2%에서 5% 범위까지 비교적 잘 乳化시켰으며 3% 때 가장 높은 유탕도의 증가를 나타냄으

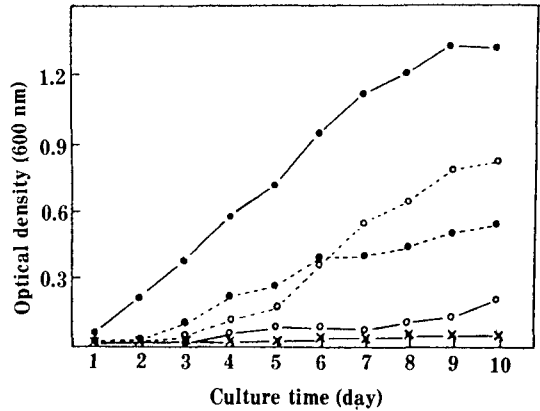


Fig. 8. Utilization of carbon sources originated from petroleum compounds
●-●, n-hexadecane; ○-○, n-paraffin; ●-●, benzene; ○-○, phenol; ×-×, toluene, xylene, dimethyl sulfoxide, cyclohexane, n-hexane, camphor, or methanol

로서 본 실험에 사용된 분리균이 해양환경에서의 乳化처리 능력이 아주 우수하다는 것을 알 수 있다.

油類 종류별 乳化정도

황 함량이 서로 다른 4종류의 Bunker-C油 및 원유를 탄소원으로 하여 실험해본 결과 Fig. 7과 같이 고황 함유의 Bunker-C油 및 원유를 더 잘 乳化시킴을 볼 수 있었는데 이것은 석유의 유기황화합물들이 생물체에 변이원이나 발암원으로 작용(18, 19)하는 점을 고려해 볼 때 보다 유용하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

탄소원 자화능력

油類의 乳化에 있어서 탄소원으로 사용되는 Bunker-C油 대신에 각종 석유화합물(20, 21)을 0.1%의 농도로 첨가하여 배양하면서 자화능력을 조사하여 본 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 n-hexadecane, n-paraffin, benzene 등의 화합물을 잘 자화할 수 있었으나 toluene, xylene 등과 같은 화합물은 자화하지 못하는 특성을 가지고 있음을 볼 수 있다.

요 약

우리나라 연근 해역의 油類 오염물질중 주종을 이루는 고황 함유 Bunker-C油를 대상으로 이를 乳化 분산 처리시키는 해양세균 *Achromobacter* sp. M-1220 균주를 분리하여 그 乳化분산에 미치는 영향

을 조사하였다. 우선 Bunker-C油에 유도된 세포를 사용할 경우 생균수가 최고 1000배까지, 유탁도는 대략 10정도까지 증가되나, 적응되지 않은 세포를 사용할 경우는 5일 정도의 적응기를 거친 다음 乳化를 시작하였으며 pH 완충제를 첨가하지 않으면 적응된 세포나 적응되지 않은 세포 모두 유탁도의 변화를 나타내지 못하였다. 乳化능력은 염분농도 3%, 온도 18°C, pH 7.5 부근에서 가장 높게 나타났으며 또한 분리균의 乳化처리에 있어서 해수배지에 질소원과 인산원의 첨가가 필수적으로 요구되고 기질 油類의 양은 7.5 g/l까지 잘 乳化분산시켰다. 그리고 고황 함량의 Bunker-C油와 원유를 잘 乳化처리시킬 수 있었으며 석유계 화합물중에서 *n*-hexadecane, *n*-paraffin, benzene 등의 자화능력도 보여주었다.

참고문헌

1. Gerlach, S.A.: Marine pollution. Springer-Verlag, N.Y., 71-103 (1981).
2. Nelson, S.A.: *Adv. Mar. Biol.*, **8**, 215-306 (1970).
3. Petrakis, L. and F.T. Weiss: Petroleum in the marine environment. American Chemical Society, Washington, D.C., 1-22 (1980).
4. Charles, T.K.: *Science*, **197**, 484-487 (1977).
5. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel: The prokaryotes. vol. 2. Springer-Verlag, N.Y., 1308 (1981).
6. 박인식, 박중연, 서근학, 홍용기: 한국수산학회지 **20**, 152-156(1987).
7. Reisfeld, A.E., E. Rosenberg, and D. Gutnick: *Appl. Microbiol.*, **24**, 363-368 (1972).
8. Hiromi, K., C.W. Sullivan, and S. Hiroaki: *Appl. Env. Microbiol.*, **48**, 515-518 (1984).
9. 홍용기, 박중연, 박인식: 한국산업미생물학회지 투고예정
10. Devereuk, R. and R.K. Sizemore: *Dev. Ind. Microbiol.*, **22**, 409-414 (1980).
11. Atals, R.M. and R. Bartha: *Biotech Bioeng.*, **14**, 297-308 (1972).
12. Walker, J.D. and R.R. Colwell: *Appl. Env. Microbiol.*, **31**, 189-197 (1976).
13. Shailubhai, K.: *Trends in Biotechnology*, **4**, 202-206 (1986).
14. Dibble, J.T. and R. Bartha: *Appl. Env. Microbiol.*, **31**, 544-550 (1976).
15. Mulkins, P.G.J. and J.E. Stewart: *Appl. Microbiol.*, **28**, 915-922 (1974).
16. 강용균, 진명신: 한국해양학회지 **19**, 31-35 (1984).
17. Atlas, R.M.: *Appl. Microbiol.*, **30**, 369-403 (1975).
18. Walker, J.D., R.R. Colwell and L. Petrais: *Appl. Microbiol.*, **30**, 79-81 (1975).
19. Fedorak, P.M. and D.W.S. Westlake: *Can. J. Microbiol.*, **29**, 291-296 (1983).
20. Chakrabarty, A.M., D.A. Friello and L.H. Bopp: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 3109-3112 (1978).
21. Atlas, R.M.: *Microbiol. Rev.*, **45**, 180-209 (1981).

(Received August 23, 1988)