

工學碩士 學位論文

천연분말상 유흡착제가 유류분해에
미치는 영향

Effect of the Powdered Natural Oil Absorbent on
Oil Degradation

指導教授 金 仁 洙

2002 年 2 月

韓 國 海 洋 大 學 校

土 木 · 環 境 工 學 科

金 香 美

本 論 文 을 金 香 美 의 工 學 碩 士 學 位 論 文 으 로 認 准 함 .

委 員 長 : 고 성 철 (印)

委 員 : 송 영 채 (印)

委 員 : 김 인 수 (印)

2001년 12월

韓 國 海 洋 大 學 校

土 木 · 環 境 工 學 科

金 香 美

ABSTRACT

Effect of the Powdered Natural Oil Absorbent on Oil Degradation

The accidental oil spills in the world have been gradually increasing due to a strong demand for energy and resources consumption caused by rapid industrialization and population growth. These oil spills resulted in harmful effects on the marine ecosystems throughout the world. Physical and chemical oil clean-up technologies such as oil skimmer, herders, dispersants, and oil absorbents have been typically used to prevent an expansion and contamination of the spilled oil. These technologies, however, have some limitations in extensive applications because of geographical limitation and secondary pollution. The objective of this study was to develop a powdered natural oil absorbent carrying PAH degrading bacteria which may have a less environmental impact. The PAH degrading bacteria used in this study were the specific oil degrading species, *Sphingomonas* sp. KH3-2, *Yarrowia lipolytica* 180, and *Corynebacterium* IC 10. The control experiments was also performed utilizing commercial oil degrading agents A and B of "V" company and putative indigenous bacteria in the seawater. To investigate the effect of the powdered natural oil absorbent made of dried pine needles on the oil biodegradation, several batch assays were conducted in Erlenmeyer flasks containing the powdered natural oil

absorbent (4.3g) supplemented with *Sphingomonas* sp. KH3-2, and oil (0.15%, v/v) in 100ml MSM under a shaking condition. The extent of oil biodegradation was determined by measuring the growth of *Sphingomonas* sp. KH3-2 and the amount of TPH (total petroleum hydrocarbon) removed. In addition putative natural oil degrading bacteria in the seawater were examined in the same manner compared with *Sphingomonas* sp. KH3-2. The oil degrading potential of the three different bacterial species were tested on Petri dish in the presence of the powdered natural oil absorbent (10g) and oil (10g). The extent of oil degradation was evaluated by measuring the weight removal of oil on a daily basis. Besides, commercial oil degrading agents, A and B of "V" company, were inoculated into the powdered natural oil absorbent at 5 different concentrations [0(v/v)%, 25%, 50%, 75%, and 100%]. Here 75% addition of agent A or B was the most effective in the oil removal. However, most of the removal appeared to be caused by volatilization of the oil because of the obvious oil removal at control was also observed. In the experiment employing the three PAH-degrading bacteria, the similar oil removal patterns. In the experiment employing the microbial agents, the oil removal effects seemed to depend upon amount of the powdered natural oil absorbent added. It was plausible that this resulted from an enhanced aeration in the bulk matrix formed by the powdered natural oil absorbent added. It might be possible to stimulate biodegradation activity of the oil degraders when their nutrient requirements and other growth conditions were met.

It is, therefore, suggested from this study that effectiveness of the

powered natural oil absorbent could be improved by adding appropriate oil degraders and nutrients that can stimulate growth of indigenous degraders as well as the selected degraders. Once these conditions will be fulfilled, it may be worthwhile to go through various oil degradation experiments at pilot and field scales for a commercial application of oil-degrading absorbents to be developed in the future.

< 목 차 >

ABSTRACT	I
목 차	IV
List of Tables	VI
List of Figures	VII
I 서론	1
II 문헌연구	3
2.1 해양오염현황	3
2.2 유류의 특성	4
2.2.1 유류의 구성성분	4
2.2.1.1 알칸	5
2.2.1.2 시클로 알칸	5
2.2.1.3 방향족 화합물	6
2.2.2 유류의 물리·화학적 분해	7
2.2.2.1 확산	7
2.2.2.2 증발	8
2.2.2.3 용해	9
2.2.2.4 분산	9
2.2.2.5 산화	10
2.2.2.6 침전	10
2.3 생물학적 분해	11
2.3.1 유류분해 미생물	11
2.3.2 환경인자	14

2.3.3 분해 경로	15
2.4 유흡착제	19
2.4.1.1 무기질 흡착제	19
2.4.1.2 천연(자연유기질) 흡착제	19
2.4.1.3 합성질 흡착제	21
2.4.2 유흡착제의 기름 흡착	22
III. 실험방법	23
3.1 재료	23
3.1.1 유흡착제	23
3.1.2 사용 균주	23
3.1.3 사용 유류	24
3.2 균주의 배양조건	25
3.3 측정 방법	27
3.3.1 흡광광도법	27
3.3.1 노르말 핵산 중량 감소법	27
IV. 결과 및 고찰	34
4.1 슬인흡착제가 유류분해에 미치는 영향	34
4.2 해수내 자연계 토착미생물과 <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2와의 유류분 해능 비교	36
4.3 미생물의 종류에 따른 유류분해 영향	39
4.4 상용화 된 미생물처리제제를 이용한 미생물 접종량에 따른 유류분 해 영향	42
V. 결론	46
참고문헌	47

< List of Tables >

Table 2-1 Source of petroleum input to the ocean.	3
Table 2-2 Composition of oil.	4
Table 2-3 Major genera of hydrocarbonoclastic bacteria and fungi isolated from marine and brackish water environment.	13
Table 2-4 Limiting factors in oil degradation.	14
Table 2-5 Properties of various floating oil absorbents.	21
Table 3-1 Degradation of aromatic hydrocarbons by <i>Sphingomonas</i> sp. KH3-2.	24
Table 3-2 Degradation of aromatic hydrocarbons by <i>Yarrowia</i> <i>lipolytica</i> 180.	24
Table 3-3 Physical characteristics of bunker B oil.	25
Table 3-4 Composition of mineral salt medium.	26
Table 3-5 Experimental conditions for microcosm test for oil degradation affected by powdered pine needle absorbent and natural seawater.	29
Table 3-6 Experimental conditions for microcosm test for oil degradation affected by powdered pine needle absorbent and PAH-degrading bacteria.	31
Table 3-7 Experimental conditions for microcosm test for oil degradation affected by powdered pine needle absorbent and commercial oil degrading agents under static condition.	32

< List of Figures >

Fig. 2-1 Structure of alkanes.	5
Fig. 2-2 Structure of cycloparaffins.	6
Fig. 2-3 Structure of aromatics.	7
Fig. 2-4 Schematic diagram of oil spill processes at sea and shorelines.	11
Fig. 2-5 Metabolic pathway for the degradation of alkane.	17
Fig. 2-6 Metabolic pathway for the degradation of a cycloalkane.	17
Fig. 2-7 Metabolic pathway for the degradation of benzene.	18
Fig. 2-8 Schematic representation of oil absorption by the powdered natural oil absorbent.	20
Fig. 3-1 Protocol for oil measurement by normal hexane extraction method.	28
Fig. 3-2 Scheme of microcosm test for oil degradation by a known oil degrader <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2(growing in MSN) and indigenous organism from seawater in the presence of powdered pine needle absorbent under a shaking condition..	30
Fig. 3-3 Microcosm used for oil degradation test under a static condition.	31
Fig. 3-4 Microcosm test using commercial oil degrading agent under a static condition.	33
Fig. 4-1 Effect of powdered natural absorbent on the growth of <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 in medium.	35
Fig. 4-2 Effect of powdered natural absorbent on the oil removal by <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 in medium.	36

Fig. 4-3 Comparison of cell growth between indigenous microorganisms in the seawater and <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 in the MSM medium containing oil(1500ppm).	38
Fig. 4-4 Comparison of oil removal activity between indigenous microorganisms in the seawater and <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2.	39
Fig. 4-5 Time course of oil removal by <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 in the presence of powdered pine needle absorbent.	40
Fig. 4-6 Time course of oil removal by <i>Yarrowia lipolytica</i> 180 in the presence of powdered pine needle absorbent.	41
Fig. 4-7 Time course of oil removal by <i>Coryne bacterium</i> IC 10 in the presence of powdered pine needle absorbent.	42
Fig. 4-8 Variation of oil removal by a commercial oil degrading agent A of "V" company.	44
Fig. 4-9 Variation of oil removal by a commercial oil degrading agent B of "V" company.	45

I 서론

유류오염은 국제적, 정치적, 경제적으로 가장 큰 주목을 받아왔다. 선박들이 석탄에서 유류로 동력원을 바꾸기 시작한 1930년대부터 실제적인 해양유류오염 문제가 대두되기 시작한 이후 에너지 수요량이 지속적으로 증가함에 따라 유류 오염 사고도 증가하였다. 해양으로 유입되는 유류의 총량은 연간 약 300만톤 정도로 추정되고 있다.

우리나라에서도 1995년 7월 24일 원유 운반선 '씨프린스'호에서 병커유가 유출되어 방제 비용으로 약 180억원이 소요되었다(6). 이 사고로 어패류, 해조류 양식장에 끼친 경제적 손실은 막대하였으며 더욱 심각한 문제는 기름유출로 인한 해양생태계의 치명적인 영향에 있었다. 그러나 이렇게 해양에 막대한 피해를 끼치는 유류오염에 대해 효과적이고 신속한 대처방법이 아직도 미비한 실정이다.

현재 사용하고 있는 해양오염사고의 방제 방법으로는 유출유의 흐름을 차단하거나 흡착하는 오일펜스(oil fence), 오일펜스내의 기름 및 해안의 양식장 주변의 기름제거에 사용하는 유흡착제(oil absorbent), 기름의 회

수시 사용하는 유회수기(oil skimmer)등의 물리적 방법과 기름 입자를 수중에서 유화 또는 분산시키는 유분산제(oil dispersant)와 같은 화학적 방법, 탄화수소 분해균을 이용한 생물학적 방법 등이 있다. 그러나 유회수기(oil skimmer)의 경우 구입가가 높으며, 유층에 따른 사용 차별성, 사용지역의 협소함 등 여러 가지 제약 조건이 따른다. 또한, 유흡착제는 수거와 살포에 많은 인력을 요하고 기름과 흡착제가 약간만 떨어져 있어도 흡착이 불가능하며 폐기처분에 대해 항상 대기오염의 위험성을 가지고 있다. 유화제 역시, 초동방제단계에서 해양에 유출된 유류를 제거하기 위하여 주로 사용하고 있으나 2차적인 오염으로 해양생태계 파괴를 초래할 수 있다. 이러한 문제들을 극복하기 위해 주로 이탄이끼를 사용한 천연 분말상 유흡착제가 해양유류오염방제에 사용되고 있으며(8), 국내에서도 이탄이끼와 그 성상이 비슷한 천연산 재질의 낙엽솔잎을 이용한 분말상 유흡착제가 개발되어 있다. 이것은 수량이 풍부하며 국내에서 쉽게 그 원료를 확보할 수 있고, 저흡수성과 고흡유성능을 나타내며 재질 자체의 소각 처분시 대기오염배출이 없는 것으로 평가되고 있다(6).

본 연구에서는 유류를 흡착한 천연분말상 유흡착제의 유류분해 효과를 파악하고자 기존에 분리된 미생물과 상용화된 유류분해 미생물 처리체제를 각각 첨가하여 유류 분해과정을 관찰하고 그 분해효율을 평가하였다.

본 연구의 결과는 유류분해 미생물을 포함한 천연분말상 유흡착제를 이용한 해양오염방제에 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

II 문헌연구

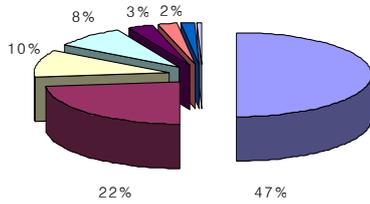
2.1 해양오염현황

해양으로 유입되는 기름의 주범은 Table 2-1과 같이 선박으로부터의 배출 수, 선박사고 및 산업폐수와 생활오수로 인한 것이 대부분이다. 석유소비와 유류 물동량이 급격히 증가함에 따라 해양오염사고도 증가 일로에 있다. 이와 함께 원유를 함유하고 있는 지층으로부터의 자연적인 유출과 원유 수송중의 사고 및 선박으로부터의 유출로 인해 연간 약 300만톤 이상의 유류가 환경을 오염시키고 있는 실정이며, 유조선 등이 대형화되면서 한번 사고가 발생하면 대량의 유류가 해양으로 유출되어 해양생태계의 파괴위험성은 날로 증가하고 있다.

국내 경제도 급속히 발전함에 따라 석유수요 증가율이 매년 10-20%씩 증가하고 있는데, 우리나라 연근해의 해양오염사고는 1980년대 이후 증가 추세를 보여, 1990~1992년에 년 평균 오염사고가 272건이었으나, 1993~1996년에는 년 평균 362건으로 증가하였다. 대표적인 선박사고들을

살펴보면, 씨프린스호, 제3오성호, Honam sapphire호, 제1유일호, Jutha,

Table 2-1 Source of petroleum input to the ocean (14).



Marine transport	47.0 %
Municipal and industrial waste	22.0 %
Atmosphere	10.0 %
Natural seep, erosion	8.0 %
Refinery	3.0 %
Urban and river run off	2.0 %
Offshore production facility	1.5 %
Ocean dumping	0.6 %

Jessica호, 코리아호프호, 하카다호, 제5금동호, 경신호, 뉴바론호, 여명호, 오션제이드호 등이며, 이에 따른 방제비용도 1993년에 이미 100억원을 넘어섰다(1,8).

2.2 유류의 특성

2.2.1 유류의 구성성분

유류는 탄화수소의 복잡한 물질로서, 생성 연대 및 생성 과정 중의 조건 등에 의하여 구성성분이 매우 다르게 나타나지만, Table 2-2에서 보는 바와 같이 대체적으로 알칸, 시클로 알칸, 방향족 화합물 및 질소와 황화합물로 구성되어 있다(5).

Alkanes의 불포화 유도체인 alkenes은 원유에서는 찾아보기가 극히 힘들지만 cracking 과정에 의해 그 종류가 더욱 많아진다. 더구나 소량의 산소(phenols, naphthenic acids), 질소(pyridine, pyrrole, indole), 유황(alkylthiol, thiophene)이 함유된 화합물 즉 resins와 부분적으로 산화되고 농축된 화합물 상태로 존재하는 asphartic 화합물들은 정제된 유류에서는 발견할 수 없으나 원유에는 함유되어 있다(7,14).

Table 2-2 Composition of oil (18).

Alkanes	15-35	%
Cycloalkanes	30-50	%
Aromatics	5-20	%
O-,S-,N-containing aromatic	2-15	%
Sulfur	1-7	%
Nitrogen	0.8	%
Metals	0.1-100	ppm

2.2.1.1 알칸 (Alkanes)

알칸은 메탄(methane), 에탄(ethane), 프로판(propane)이 대표적인 물질로 탄소와 수소의 일반적 구조는 C_nH_{2n+2} 이며, 노말 부탄, 이소 부탄도 여기에 해당된다. 상온에서 보통 분자당 탄소원자가 5개 이하이며 기체, 5~15개이면 액체, 15개 이상이면 고체의 형태로 존재한다. 또한 탄소수가 작은 알칸은 저농도인 경우 생물을 마비시키며, 고농도인 경우에는 세포를 파괴하고 여러 종류의 생물을 치사시킨다(4).

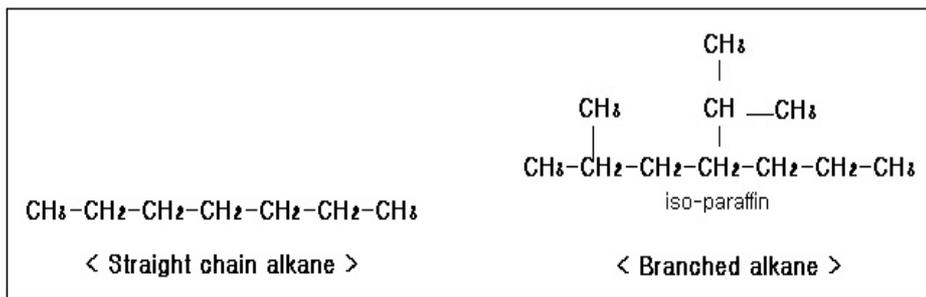


Fig. 2-1 Structure of alkanes (7).

2.2.1.2 시클로 알칸 (Cycloalkanes)

시클로 알칸은 알칸과 유사하나 탄소원자들이 단일결합에 의해 고리모양의 형태를 하고 있다. 일반적 구조는 C_nH_{2n} 이며, 시클로 펜탄, 시클로 헥산, 메틸 시클로 헥산이 대표적이다. 이것은 물에 용해되지 않고 동일 탄소수의 알칸보다 $10\sim 20^\circ C$ 이상의 고온에서 끓는 특징이 있다(2,20).

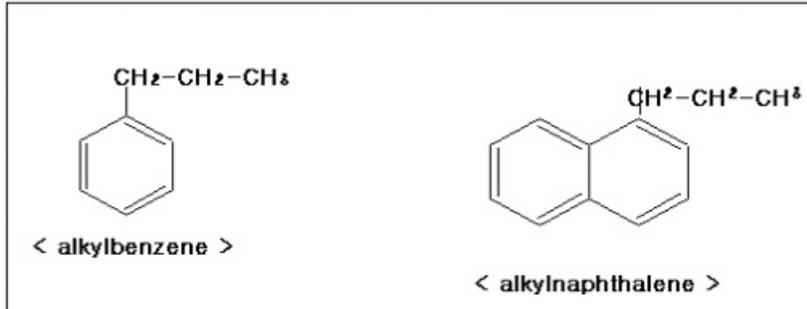


Fig. 2-2 Structure of cycloparaffins (7).

2.2.1.3 방향족 화합물 (Aromatics)

방향족 화합물은 한 개 또는 그 이상의 벤젠(benzene) 고리로 구성되어 있는 것을 말하며, 벤젠, 톨루엔, 나프탈렌 등이 이에 해당된다. 이들 화합물의 대부분이 좋은 냄새를 가지고 있기 때문에 방향족 화합물이라 불리며, 수계에 용해됨으로써 해양생물에 나쁜 영향을 미친다. 일부 방향족 화합물은 장기적 독성과 발암성 물질을 가지고 있다(4,20).

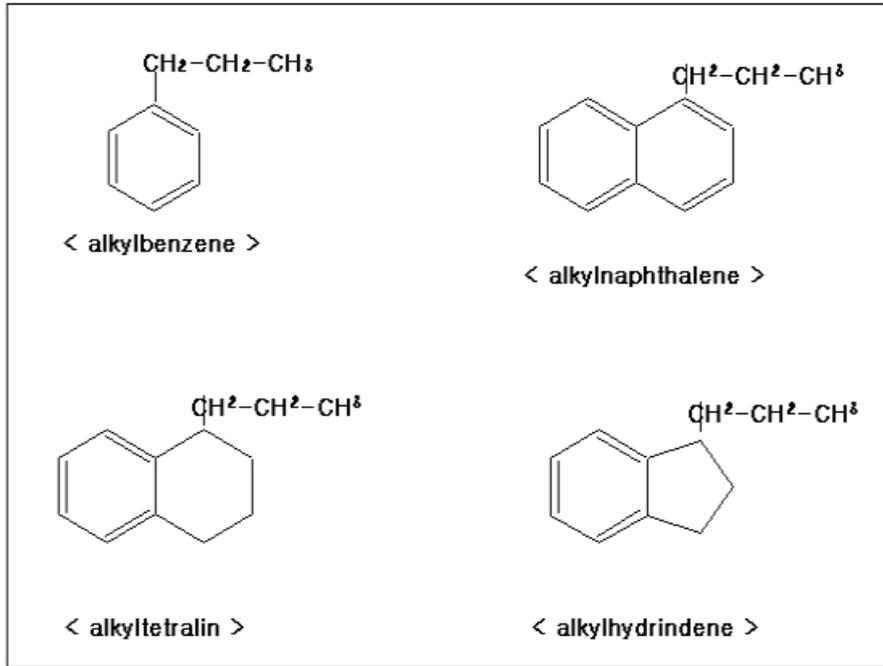


Fig. 2-3 Structure of aromatics (7).

2.2.2 유류의 물리·화학적 분해

2.2.2.1 확산 (Spreading)

확산은 유류가 해상에 유출되어 변화되는 가장 첫 번째 단계로, 수온이 유출유의 유동점 이하가 되지 않는 한 지속적으로 확산된다. 확산이 진행됨에 따라 유막의 크기는 증가하고, 이에 따라 증발과 용해가 촉진된다. 유출된 유출수는 중력에 의해 옆으로 퍼지게 되는데, 이러한 작용은 유류의 점도가 퍼지는 힘과 서로 균형이 될 때까지 지속된다. 해면에서의 유류 확산 정도와 유막의 두께는 유출량과 해수온도 및 유종, 점도 등에 따라 다르며, 일반적으로 유출량이 많을수록 확산이 잘 되고 얇은

유막을 형성하게 된다. 유출후 수 시간이 지나면 유막은 바람에 의해 분리되어 풍향에 평형하게 긴 띠를 형성하게 되며, 이 단계에서는 유류의 확산은 기름 자체의 유동성보다는 해, 조류 및 풍속 등 해면 상태에 따라 변화를 받게 된다. 유출 후 약 12시간이 지나면 유출유는 약 5km² 정도로 확산되기 때문에 유출유 제거 작업은 매우 제한된다. 토리 캐년호의 유출 사고 시에도 1967년 3월 24일 관측한 슬릭의 크기는 폭이 10마일 그리고 길이가 40마일로 관측되었다. 관측결과를 유출량으로 산출하면 약 30,000톤에 해당하는 양이며 모두가 슬릭으로 되었다고 가정하면 슬릭의 평균 두께는 0.0025인치에 달하는 막대한 양이 된다.(8,14).

2.2.2.2 증발 (Evaporation)

증발은 유류가 수면에 퍼져 유막이 생성되는 과정에서 생겨나는 것으로 유류가 유출되어 없어지는 과정에서 증발에 의해 소실되는 비율이 매우 크다. 유류의 증발 정도는 기름의 성분 및 물리적 특성, 유막의 면적 및 두께, 풍속 및 해면상태, 기온 및 수온, 일사량 등에 의해 결정된다. 등유, 가솔린과 같은 정유제품이 가장 먼저 증발하고 경질원유는 유출 후 하루동안 약 40%가 증발하나 중질원유, 연료유는 거의 증발하지 않는다. 증발에 의한 손실량은 원유 성분 중 증발 성분의 양에 비례하는데 증발 성분은 비등점이 270℃ 이하인 성분이며, 이러한 성분들은 또한 물에 잘 용해도 되나 특히 중등도의 분자량으로 된 방향성 탄소수소류가 더욱더 물에 잘 용해된다. 제 2연료유를 이용한 실험 결과에 의하면 409시간이 경과한 후, 증발 성분 함량 26% 중 13%가 증발하였으며, 불과 0.053%에 해당하는 양이 물에 용해된다고 한다. 증발 및 용해 등과 같은 유출유 중 자연 손실량은 탄화수소류의 탄소의 수와 상관관계가 있는데, 탄소 원자의 수가 13 또는 그 이하인 탄화수소류는 유출 후 수일내에 자연 손실되며 탄소 원자수가 13~20개인 탄화수소류는 수주 내에 자연 손

실된다. 원유 중 자연 손실 후 남아 있는 유류는 비중이 증가되어 결국에는 타르 덩어리로 된다. 1967년 토리 캐년호에서 유추된 원유와 유사한 쿠에이트산 원유를 가지고 실험한 결과에 의하면, 사고 당시 영해협에서와 같은 상황하에서 24시간 동안 유출유의 25%가 증발하였다고 보고하고 있다.

2.2.2.3 용해 (Dissolution)

유출유가 해면에서 슬릭으로 되면 미세한 소적으로 재분산되고 또한 해수 중에 용해되어 자연적으로 상당량이 소실되며, 가벼운 탄화수소 성분은 물에 잘 용해됨과 아울러 쉽게 증발된다. 탄소 원자 수가 10~17인 석유가 가장 잘 용해되며 탄소 수가 많은 성분들은 잘 용해되지 않는다. 일반적으로 증발 성분은 생물체에 미치는 독성이 큰 것으로 알려져 있으나 이들은 빨리 증발하기 때문에 해양 생태계에 미치는 영향은 그리 크지 않다. 일부 방향성 성분의 휘발성은 용해도가 저조하여 장시간 체류하기 때문에 이로 인한 악영향이 더욱 크다(14).

2.2.2.4 분산 (Dispersion)

유류가 유출되었을 때, 해상의 날씨가 거칠면 소적으로 되면서 수평 및 수직으로 상당량이 분산하게 된다. 애로호의 유출사고시 중유인 벵커-C유가 유출되었는데 유출유가 수면으로부터 30m 깊이까지도 내려갔으며, 그 농도는 0.001ppm에서 표층으로 가까워질수록 유류의 농도는 증가하였다. 유막은 폭이 10~25km에 달하였으며, 약 250km에 달하는 노바스코티아 연안에까지 이르렀다고 한다. 유류와 물이 에멀전 상태로 되면 대기와 일광에 노출면적이 적어져서 증발 및 중합률이 매우 저조하게 된다. 또한 유류와 물의 경계면에서 유류를 분해하는 박테리아는 영양염류와 산소를 다량으로 필요로 하기 때문에 박테리아에 의한 분해율도 현저

하게 저하된다. 따라서, 유출유가 에멀전화 되면 원래의 원유보다 자연 환경에서 매우 안정한 상태로 되어 쉽게 연안에 축적되며 잘 분해되지 않는다. 이러한 분산작용은 바람이나 조석조류에 의한 것이 대부분이다 (15).

2.2.2.5 산화 (Oxidation)

바다에 떠있는 원유 및 기타 모든 종류의 유류는 대기의 산소와 일광에 의하여 화학적 변화가 일어난다. 광화학적인 산화력과 속도는 유류의 상태에 따라 다르게 나타나며, 얇은 유막이나 소적의 상태로 있을 때는 두꺼운 층이나 유-중-수적형, 무스 또는 에멀션 상태로 있을 때보다 쉽게 산화되고, 얇은 유막이나 미세한 방울로 분리되어 있는 경우에는 표면적 대 체적의 비율이 증가되어 산소 및 일광에 많이 노출되기 때문에 산화로 인해 제거되는 양은 증가한다. 원유에 색상이 있는 얇은 유막은 상당량의 자외선을 흡수하며, 흡수 강도는 수심이 깊어지면서 감소 하나, 대부분의 유류는 해수 표면에 부상하고 있어서 빛에 의한 광화학 반응이 잘 일어난다. 광화학 반응으로 인해 최종 산물로서 저분자 물질과 고분자 물질이 생성되며, 고분자량의 부산물은 라디칼 재결합이나 응축의 과정에 의해 발생된다. 이러한 화합물은 비용해성이고, 점착성인 타르로 되어 상당 기간 표류하게 된다. 그러나, 대부분의 저분자 화합물은 유막으로부터 물 속으로 용해되어 쉽게 산화된다. 연구에 의하면, 낮 8시간 동안 0.2톤/km²가 산화될 수 있다는 결과를 보고하고 있다(10,11).

2.2.2.6 침전 (Sedimentation)

중질유 잔류물 중 비중이 1보다 큰 유류는 담수 중에서 침강하기도 하지만 대부분의 원유는 비중이 작기 때문에 유류 단독으로는 해수중에 침강되기가 힘들고, 대개 해수 중에 있는 다른 입자상 물질이나 유기물이

기름에 부착되어 비중이 커져 해수 중에 부유하거나 침강하여 해저에 침전한다. 수중에서의 물질부력은 수온과 밀접한 관계가 있다. 수온 10℃ 변화에 따라 해수의 밀도는 0.25% 변하게 되나, 유류의 밀도는 0.5% 정도 변하게 된다. 따라서, 낮 동안 해수 중에 부유하던 유류가 밤 동안에는 수온이 낮아짐에 따라 밀도증가로 비중이 커져 해수 중에 잠기게 되기도 하며, 다시 수온이 상승하면 부상하기도 한다(14).

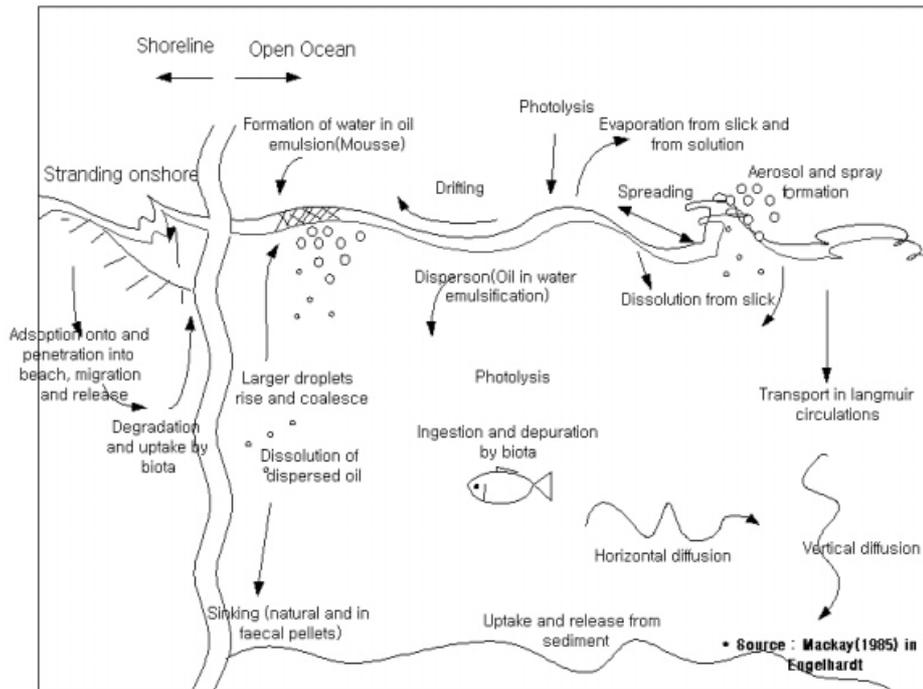


Fig. 2-4 Schematic diagram of oil spill processes at sea and shorelines (Redrawn from reference 14).

2.3 생물학적 분해

2.3.1 유류분해 미생물 (Oil degrading microorganism)

미생물이 유류를 분해할 수 있다는 것은 1895년 Miyoshi가 파라핀을 이용하는 미생물을 연구하면서 알려지기 시작하였다(2). 탄화수소의 분해에는 여러 종류의 박테리아들이 관여하고 있으나, 일반적인 종들은 *Pseudomonads*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Alcaligenes*, *Mycobacteria*, *Penicillium* 등이 알려져 있다(12,20). 자연 유류 이외에 유출되는 유류의 유입에 의하여 이들은 급속하게 번식을 하며, 오염 해역에서는 수일 사이에 매우 높은 양으로 번식을 한다. 연구보고에 의하면 지방족 탄화수소는 나프탈렌 계열의 화합물보다 쉽게 미생물에 의하여 분해되며 방향족 화합물은 분해가 매우 저조한 것으로 알려져 있다. 마찬가지로 *peudomonad*종은 아스팔트유 보다 파라핀유를 더 잘 분해하며, 대부분의 유류분해 미생물들은 n-알칸류를 선택적으로 대사에 이용하여 분해한다. 그러나, 어떤 특정한 한 종의 미생물이 모든 원유성분을 다 분해할 수 있는 것은 아니며, 유류 분해미생물이 알칸류나 벤젠, 나프탈렌 등과 같은 방향족 화합물에 대해 선택성을 지니고 있기 때문에, 특정 종이 동일 계열의 유류 성분을 모두 다 분해할 수는 없다. 따라서, 원유가 완전 분해되어 이산화탄소와 물이 되는데는 상이한 여러 종류의 복잡한 상호작용에 기인한다 판단된다(2,3). *Sphingomonas*는 naphthalene, fluorene, biphenyl, dibenzothiophene, phenanthrene과 같은 aromatic hydrocarbon compounds를 분해하는 능력을 가지고 있으며, 이 종의 주요 특징은 Gram-negative, rod이며, yellow colony를 형성한다(13,22). Yeast 속의 일종인 *Yarrowia lipolytica*는 citric 산을 생성하는데 이는 유류분해에서 생물계면활성제(biosurfactant)의 역할을 하며 이러한 생물계면활성제(biosurfactant)는 유류의 표면장력을 떨어뜨림으로써 유류 분해를 보다 용이하게 한다(14,16).

Table 2-3 Major genera of hydrocarbonoclastic bacteria and fungi isolated from marine and brackish water environments (5).

Bacteria	Fungi
<i>Achromobacter</i>	<i>Allescheria</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Aureobacidium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Alcalogenes</i>	<i>Candida</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Debaromyces</i>
<i>Coryneforms</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Gonytrichum</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Hansenula</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Helminthosporium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Mucor</i>
<i>Leucothrix</i>	<i>Oidiodendrum</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Paecylomyces</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodosporidium</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Spherotilus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Spirillum</i>	<i>Saccharomycopsis</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Xanthomyces</i>	<i>Torulopsis</i>
	<i>Trichoderma</i>
	<i>Trichosporon</i>

2.3.2 환경인자 (Factors of hydrocarbon degradation)

대체적으로, 모든 유류 화합물들은 미생물과 광물화에 의해 최종적으로 이산화탄소(CO₂)와 물(H₂O)로 전환된다(2).



그러나, 각기 다른 분자량을 가진 모든 화합물들이 동시에 미생물에 의해 분해되지는 않는다. 생물분해는 화합물의 종류에 따라 다르며, 일반적으로 복잡한 화합물일수록 분해는 느리게 진행된다. 즉, 분자량이 높을수록, 사슬이 길수록, 가지가 많을수록 분해가 어렵다. 또한, 유류 분해는 수분, 영양분(질소, 인), 용존 산소, 수온, 기름입자의 크기에 크게 좌우된다.

Table 2-4 Limiting factors in oil degradation (5).

Limiting factor	Examples
PHC composition	Structure, amount, toxicity
Physical state	Aggregation, spreading, dispersion, adsorption
Weathering	Evaporation, photoxidation
Water potential	Osmotic and matric forces, exclusion of water from hydrophobic aggregates
Oxygen	Influence on initiate ; O ₂ , NO ₃ , SO ₄ ²⁻ to sustain PHC biodegradation
Mineral nutrients	N, P, Fe may be limiting
Reaction	Low pH may be limiting
Microorganism	PHC degraders may be absent or low in numbers

2.3.3 분해 경로

자연서식지에서 미생물의 유류 분해에서 알칸은 비교적 다른 방향족 탄화수소보다 빠르게 분해되며, 그 중에서도 직쇄형이 가지달린쇄형 보다 분해가 용이하다. 체인의 길이가 10에서 18사이인 것은 매우 빠르게 산화하지만, 메탄, 에탄, 프로판은 특히 미생물에 의해서만 분해된다. 방향족 계열(aromatic series) 중에서 알킨으로 치환된 벤젠과 다중고리 화합물은 벤젠보다 빨리 분해된다. Fig. 2-5, Fig. 2-6, Fig. 2-7은 알칸, 시클로알칸, 방향족류의 대사경로를 나타내고 있다. 유류가 완전 분해되어 이산화탄소와 물로 분해되기 위해서는 유류 1mg 당 3~4mg의 산소를 필요로 한다. Fig. 2-5에서와 같이 Alkanes의 경우 Mono-oxygenase의 공격에 의해 alcohols 형태로 바뀐다. 이때 대부분의 미생물은 alkanes의 말단을 공격하지만 그렇지 않은 미생물도 몇몇 종이 있다. alcohol 생산물은 계속 aldehyde 형태로 산화되어 최종적으로 지방산으로 전환되고 생성된 지방산은 β -산화에 의해 계속 분해된다.

Cycloalkanes은 아직 완전히 밝혀지지 않는 oxygenase system에 의해 cyclic alcohol로 전환되고 이것은 다시 탈수소화 되어 ketone로 된다. 앞에서 언급한 oxidase와는 완전히 다른 monooxygenase system에 의해 고리가 lactonize되고 이어서 lactone hydrolase에 의해 고리가 깨지게 된다. 위의 두 oxygenase system은 같은 미생물에서 동시에 발견되지 않으므로 cycloalkanes에서 성장하는 순수 균주를 분리할 수 없다. 그러나, 미생물 군집의 상승작용에 의하여 여러 종류의 cycloalkanes은 매우 효율적으로 분해되기도 한다. Alkanes의 경우와 마찬가지로 monocyclic 화합물인 cyclopentane, cyclohexane, cycloheptane 은 지질만을 용해할 수 있어 탄화수소분해 미생물 대부분에 대해 독성을 띤다. 한편, 중합된 cycloalkanes화합물은 그 구조와 물리적 형태 때문에 쉽게 생분해 되지 않는다. 방향족 탄화수소는 원핵미생물의 dioxygenase 작용에 의해 우선

trans-dihydrodiols로 전환되고 이어서 dihydroxy 생성물로 산화된다.

Fig. 2-5와 같이 벤젠의 경우는 catechol로 전환되고 진핵미생물의 monooxygenasem 작용에 의해서 벤젠 1,2-oxide가 생성되고 H₂O₂가 첨가되어 dihydroxydihydrobenzene(*cis*-dihydrodiol)로 전환된다. 이것은 catechol로 산화되는 방향족의 생분해과정에서 중요한 중간화합물인 이 물질은 *ortho*- 또는 *meta*- 분해경로를 통해 muconic acid와 2-hydroxy muconic semialdehyde로 각각 전환된다. 이 두 생성물은 TCA 사이클의 중간물질로 계속 전환된다. 중합된 polycyclic aromatics은 비슷한 기작에 의해 한 번에 하나씩 고리구조가 분해되는데 고리의 수가 많고 중합된 정도가 크거나 방향족 물질의 핵에 alkyl 치환기 수가 많을수록 생분해성은 감소하게 된다. 4개 이상의 고리가 중합된 방향족 화합물은 공대사(cometabolism) 전환과정에 의해 분해되기도 하나 미생물 성장에 필요한 기질로는 사용되지 않는다. 원유의 asphaltic 화합물은 생분해가 잘 되지 않을 뿐 아니라 그 과정 중 중합작용에 의해 새로 생성되거나 광분해과정 중간체로서 생성되므로 생분해 과정 중 오히려 양이 늘기도 한다 (5,7,9,12).

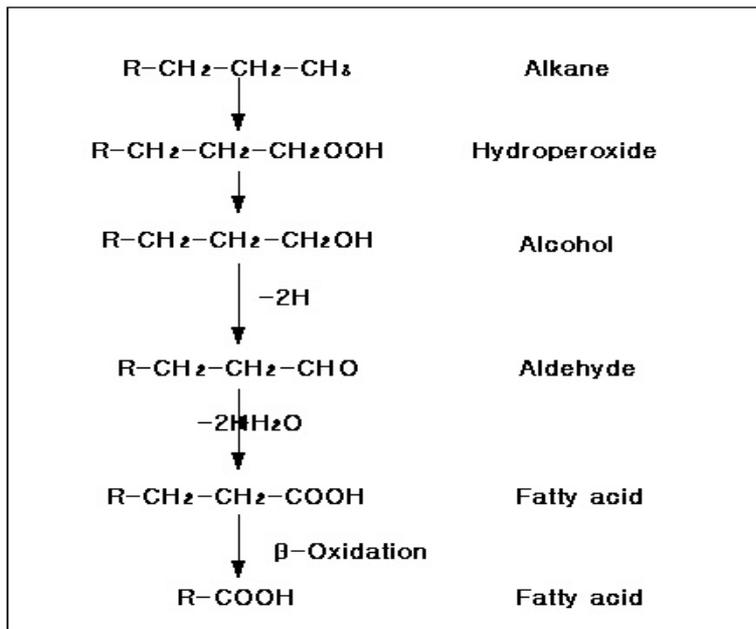


Fig. 2-5 Metabolic pathway for the degradation of alkane (2).

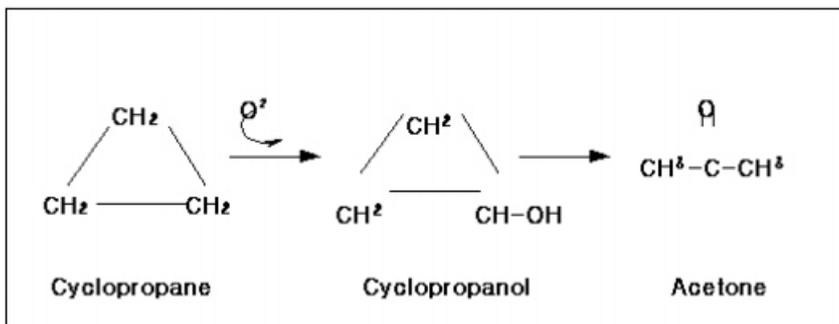


Fig. 2-6 Metabolic pathway for the degradation of a cycloalkane (7).

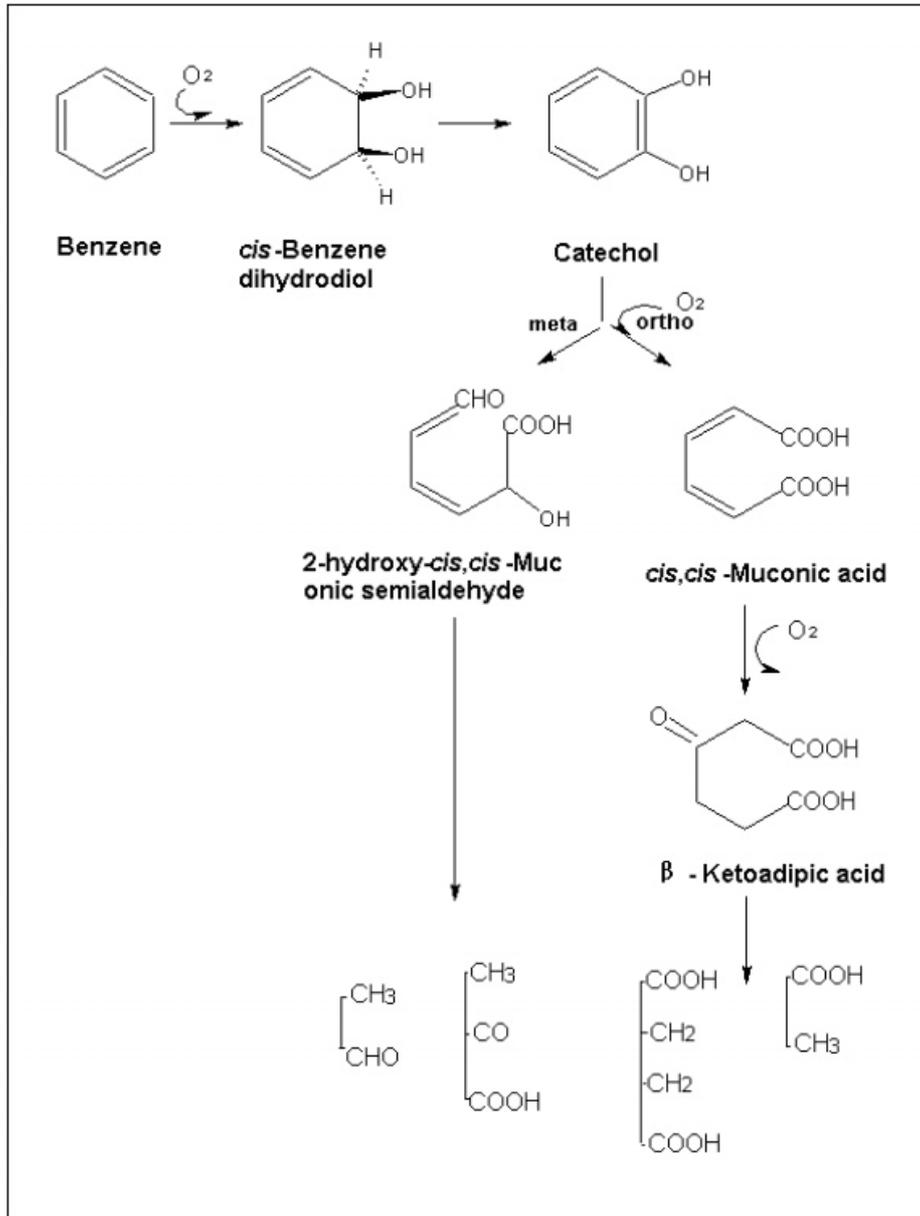


Fig. 2-7 Metabolic pathway for the degradation of benzene (2).

2.4 유 흡착제(Oil absorbent)

유류 유출시, 유흡착제를 사용한다면 흡착제가 어떤 종류든지 간에 부상된 유출유 부위에 살포 및 던져 주어야 한다. 최대의 효과를 얻기 위해서는 유흡착제의 재질과 그 살포방법이 관건이라 할 수 있으며, 또한 회수가 용이 해야하고 장기간 부유성을 지녀야 한다. 이들 흡착재질을 그 성분에 따라 고찰하면 다음과 같다.

2.4.1.1 무기질 흡착제

흡착제로 사용할 수 있는 무기물질로서는 유리솜(glasswool), 질석(vermiculite), 탈락된 운모(mica), 유기회성분(organic ash), 부석(pumice)이나 가공된 단열재(insulated materials), 광물면(minerals), 석면(asbestos fiber) 등을 들 수 있다. 점도가 낮은 유류는 매우 잘 흡착하지만 중유의 종류에는 그 표면이 빨리 막혀 흡착력이 저하되는 단점이 있으며, 소형 선박에 농약살포기와 같은 간단한 장비를 장착하여 쉽게 살포할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이들 무기물질들은 연소되지 않기 때문에 재사용이 가능하나, 이들은 소각시 대량의 매연을 발생시키고 완전 연소되지 않기 때문에 적절한 소각장치를 설치하고 효과적으로 운전해야 한다(23).

2.4.1.2 천연(자연유기질) 흡착제

우리 주위에 가장 많고, 아울러 세계 어느 곳에서나 가장 많이 사용되는 것이 자연 유기물질이다. 짚, 건초, 갈대, 해초, 이탄, 톱밥, 및 가지 금작화(grose) 등이 자연 유기물의 대표적인 예이나 지역에 따라 사탕수수 대에서 사탕을 짜낸 찌꺼기 또는 말린 야자잎 등과 같이 지역적으로 획득이 용이한 물질을 이용하기도 하는데, 이중 짚이 가장 많이 사용되

고 있으며, 가장 효율적이고, 자체중량에 8 - 30배 정도의 기름을 흡착할 수 있다고 알려져 있다. Table 2-5에서는 천연산 재질의 기름 흡착특성을 나타내고 있다(12).

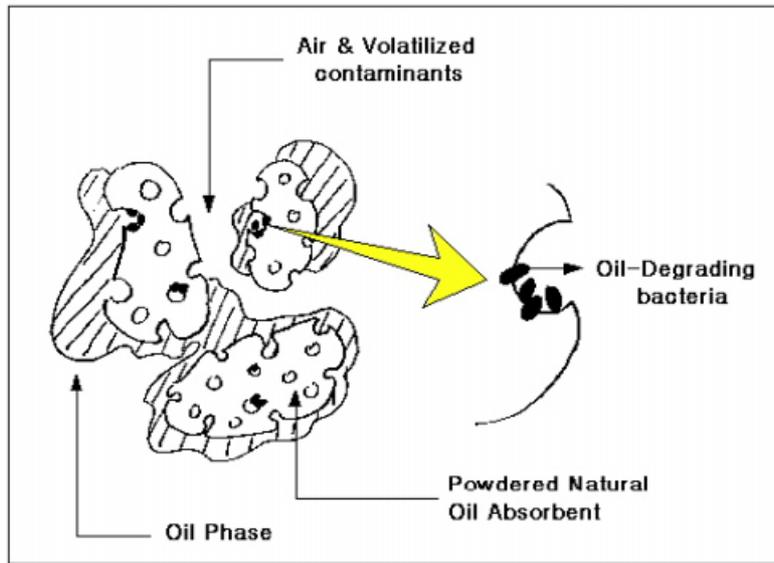


Fig. 2-8 Schematic representation of oil absorption by the powdered natural oil absorbent.

Table 2-5 Properties of various floating oil absorbents (23).

Materials	Availability	Ease of application	Oil absorption	Efficiency when wet	Oil leakage	Ease of recovery from water	Ease of disposal
Straw	++++	++	++++A	+	+	++	+++
Untreated sawdust	++++	++++	++B	+	+	++	++
Pine Bark	+++	++++	++B	+++	+++	+	++
Peat	+++	++++	++B	+++	+++	+	+
Vermiculite	+	++++	+				
Polystyrene Pellets	+	++	+				
Polystyrene Foam	++	++	++++B	++++	++++	+++	++++
Polystyrene Fiber	++	+++	++++A	++++	++++	++++	+++

A : less effective with thin oils B : less effective with heavy oils

Note : The more +, the better

2.4.1.3 합성질 흡착제

합성재질은 종류에 따라 상이한 특성을 가지고 있으며, 성분, 밀도 및 흡착공 등을 인위적으로 조절할 수 있다. 현재까지 유출유 흡착제로서 폴리우레탄(polyurethane), 폴리에테르(polyether), 요소 힘 알데이드(urea-formaldehyde)의 거품, 나일론(nylon), 폴리에틸렌(polyethylene) 등과 같은 재질로 만든 섬유와 폴리스터(polyster) 재질로 만든 입자 등을 사용하고 있다. 이중 폴리에틸렌 재질의 조방사는 거의 물을 흡수하지 않아 유류의 흡착력이 뛰어난 것으로 알려져 있다.

현재 우리나라의 해안에서 발생한 오염제거에 주로 사용되는 Pp (polyproprene) 부직포의 경우 자중의 15-20배의 흡유능을 나타내어 비교적 효율이 높은 기름 흡착성을 가지나 가격이 비싸므로, 방제비 절감

을 위해서 양식장이나 배양장 및 특수 방제 지역에만 사용하고 있다. 합성재질은 제조시, 필요한 특정화합물을 섞어 제조하거나 살포시에 첨가할 수 있는 장점이 있으나, 구입비용이 고가인 단점이 있다(7).

2.4.2 유흡착제의 기름 흡착

유흡착제의 흡착현상은 크게 두 가지로 분류할 수 있는데, 첫 번째로 흡착제 및 재질의 표면 특성에 의해 흡착이 일어난다. 단일 분자층(monomolecular layer)으로 된 재질이 이론적으로는 가장 이상적이나 유류의 점도에 의하여 실제로는 두꺼운 표면을 가진 재질을 이용하고 있는데, 유출유의 점도가 높을수록 주어진 표면에 두껍게 부착 및 흡착되기 때문이다. 두 번째로는 유출유가 모관인력(capillary attraction)에 의하여 집적된다. 즉, 흡착제질의 구멍에 유류가 유입된 후에 유류의 모관력에 의하여 유류가 흡착제의 표면으로 유동하게 된다. 이러한 유류의 흡착제질 투과율(rate of penetration)은 모관 반경에 비례하며, 유류의 점도와는 반비례한다. 유류의 점도는 종류와 상태에 따라 매우 다르므로, 흡착제질의 유형이나 성분이 무엇이든지 간에 흡착 효율성은 유류의 종류에 지배적인 영향을 받게 된다.

이러한 석유계 탄화수소물질의 흡착현상은 특정물질에 대한 연구는 활발히 진행되었으나, 해양에 유출된 다종 다양한 유류의 흡착모델이나 흡착속도에 관한 연구는 전무한 상태이다. 이는 원유의 특성이 다양하여, 그 종류가 수천 가지에 이르고, 거동 변화가 심하기 때문이다(8,23).

Ⅲ. 실험방법

솔잎 흡착제가 유류분해에 미치는 영향과 해수내 자연계 미생물과 *Sphingomonas* sp. KH3-2과의 유류분해능의 비교를 위하여 흡착제를 해상에 직접 살포한다는 가정 하에 액체 배지내 유류와 솔잎을 뿌리는 방식으로 Table 3-2, Fig. 3-1와 같이 시료를 구성하였으며, 유류를 흡착한 천연 흡착제를 수거하여 고정화 된 상태라는 가정하에 미생물의 종류에 따른 유류분해 영향과, 미생물 처리제제의 접종량에 따른 유류분해의 영향을 살펴보기 위하여 Table 3-3, Fig. 3-2와 Table 3-4, Fig 3-3와 같이 실험 방법을 구성하였다.

3.1 재료

3.1.1 유흡착제

흡착제로 솔잎(해송)을 이용하여 실험하였고, 입자의 크기는 355-425 μm 로 180 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 고온 건조한 분말형을 사용하였다. 입자의 크기는 한국공업규격(KS)에 따라 분류된 체를 이용하여 선별하였다.

3.1.2 사용 균주

유류분해능이 우수하다고 입증된(3,15,22), *Sphingomonas* sp. KH3-2, *Yarrowia lipolytica* 180, *Corynebacterium* IC 10을 한국해양연구소 해양미생물연구실에서 분양 받아 사용하였다. 또한 상용화된 미생물처리 제제로는 V사 A제품, V사 B제품의 2종을 사용하였다.

Table 3-1 Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. KH3-2 (22).

PAHs	Degradation
Phenanthrene	+
Naphthalene	+
Fluorene	+
Biphenyl	+
Dibenzothiophene	+

Table 3-2 Degradation of aromatic hydrocarbons by *Yarrowia lipolytica* 180 (15).

Aliphatic hydrocarbon	Degradation
Iso-alkanes	+
n-Alkanes	+
Cyclopentane	+
Cyclohexane	+
Tricyclic naphthene	+

3.1.3 사용 유류

유류는 한국해양대학교 내 한바다호에 적용하고 있는 선박용 기름, 병커 B 유류를 이용하였으며, 기름의 특성은 Table 3-4 와 같다.

Table 3-3 Physical characteristics of bunker B oil (SK Corporation).

Characteristics	B oil
Gravity API@60°F	21.8
S.G.@15/4°C	0.9225
Viscosity Kin. cst	37@50°C
Flash point (°C)	78
Water and sediment (Volume %)	0.05
Sulfur (Weight %)	2.48

3.2 균주의 배양조건

솔잎 흡착제가 유류분해에 미치는 영향, 해수내 자연계 미생물과 *Sphingomonas* sp. KH3-2과의 유류분해능의 비교를 위하여, TSA 고체배지(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 48시간 순수 배양하여 Table 3-1과 같은 MSM 배지에서 액체 배양하였다. 시료 배양을 위해 250ml 삼각 플라스크를 사용하였다. 탄소원으로 중유를 사용하였으며, 오염을 방지하기 위하여, 각각의 염을 분리하여 혼합시킨 후 Autoclave(SANYO Labo)에서 180°C, 15 min 살균하였다. pH는 Electrode pH meter(Istek, Model 735p)를 사용하여 1M NaOH 와 1M HCl으로 조정하였다. 교반 인큐베이터에서 25°C, 150rpm으로 배양하였다. 해수내 자연계 토착 미생물과 *Spingomonas* sp. KH3-2와의 유류분해능을 비교하기 위하여 동일한 조건에서 해수내 자연계 미생물로 해수 5%(V/V)를 주입하였다.

유류를 흡착한 솔잎 흡착제를 수거하여 고정화 된 상태에서 미생물의

종류에 따른 유류분해 영향을 알아보기 위하여 *Sphingomonas* sp. KH3-2는 TSA 액체배지(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서, *Yarrowia lipolytica* 180은 YM 액체배지에서, *Corynebacterium* IC 10은 NB액체배지에서 일주일간 농화 배양하여 유류가 흡착된 솔잎 흡착제에 각각 액상의 미생물을 5%(W/W)씩 주입하였다(솔잎(10g) : Oil(10g) : Microorganism(5g)). 미생물 주입시 *Sphingomonas* sp. KH3-2, *Yarrowia lipolytica* 180, *Corynebacterium* IC 10의 O.D.는 차례대로 각각 2.86, 2.89, 3.27이었다. 시료배양은 Glass Petri Dish (90mm in internal diameter)를 사용하였으며, 25℃ 인큐베이터에서(Dong Won Scientific system Model:D-Es-3)에서 수행하였다.

또한, 미생물 처리제제의 접종량에 따른 유류분해의 영향을 살펴보기 위하여 시판되고 있는 V사의 상용화된 미생물 처리제제 A, B의 2종을 Glass Petri Dish (90mm in internal diameter)를 사용하여, 미생물 처리제제의 비율을 0%, 25%, 50%, 75%, 100%로 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 시간에 따른 무게 감소량을 살펴보았다.

Table 3-4 Composition of mineral salt medium(MSM) (19).

Composition	Liquid medium(g/L)
Heavy Oil(carbon source)	0.15ml/100ml
K ₂ HPO ₄ (1M)	10ml
NaH ₂ PO ₄ (1M)	3ml
MgSO ₄ (1M)	10ml
Trace element stock solution(1M)*	10ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1M)	10ml

*Trace element stock solution

Components	(mg/L)
CaSO ₄	200
FeSO ₄ · 7H ₂ O	200
MnSO ₄	20
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	10
CuSO ₄	20
CoSO ₄ · 7H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	5

3.3 측정 방법

3.3.1 흡광광도법

유류분해에 따른 미생물 성장을 측정하기 위하여 분광광도계 (Jasco V-500 UV-VIS Spectrophotometer)를 이용하여 660nm에서 시간에 따른 Optical Density를 측정하였다.

3.3.2 노르말 헥산 중량 감소법

미생물의 유류 분해에 의한 중량 감소량을 측정하기 위하여 유류가 노말헥산에 용해되는 성질과 노말헥산의 끓는점의 원리를 이용한 노말헥산 중량감소법을 이용하였다. 시료로부터 원유성분을 Standard Methods를 기준으로 20배 희석한 후 pH를 4이하로 하여 노말헥산과 혼합한 다음 80℃, 30분간 가열한다. 그 후 방냉하여 남아있는 유류와 용기의 무게를 측정하여 총석유탄화수소(total petroleum hydrocarbon;TPH)의 농도를 산출하였다. 이때 채취한 시료는 용기를 5분간 교반하여 2분간 정체시킨 후 시료 깊이의 중간부분을 피펫을 이용하여 채취하였다. 노말헥산 중량

감소법은 Fig. 3-1과 같다.

$$\text{노말헥산 추출물질 농도 [ppm]} = (A - B) \times \frac{1000}{V}$$

A : 실험 후의 증발용기의 무게

B : 실험 전의 증발용기의 무게

V : 시료의 양

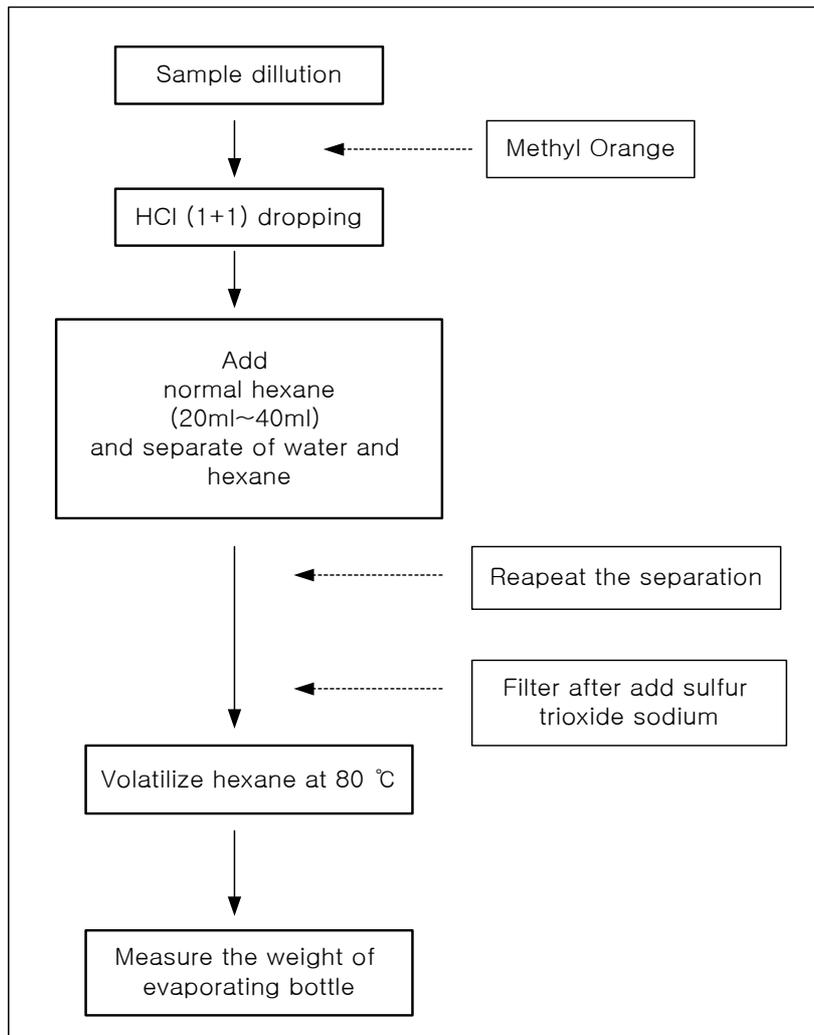


Fig. 3-1 Protocol for oil measurement by normal hexane extraction method.

Table 3-5 Experimental conditions for microcosm test for oil degradation affected by powdered pine needle absorbent and natural seawater^a.

Microcosm	Materials added
1	<i>Spingomonas</i> sp. KH3-2
2	<i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 + carbon source(oil) 0.15ml
3	<i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 + carbon source(oil) 0.15ml + powdered pine needle absorbent 4.34g
4	Natural seawater + carbon source(oil) 0.15ml + powdered pine needle absorbent 4.34g

^a Each microcosm was set up in erlenmeyer flask containing 100 ml of MSM.

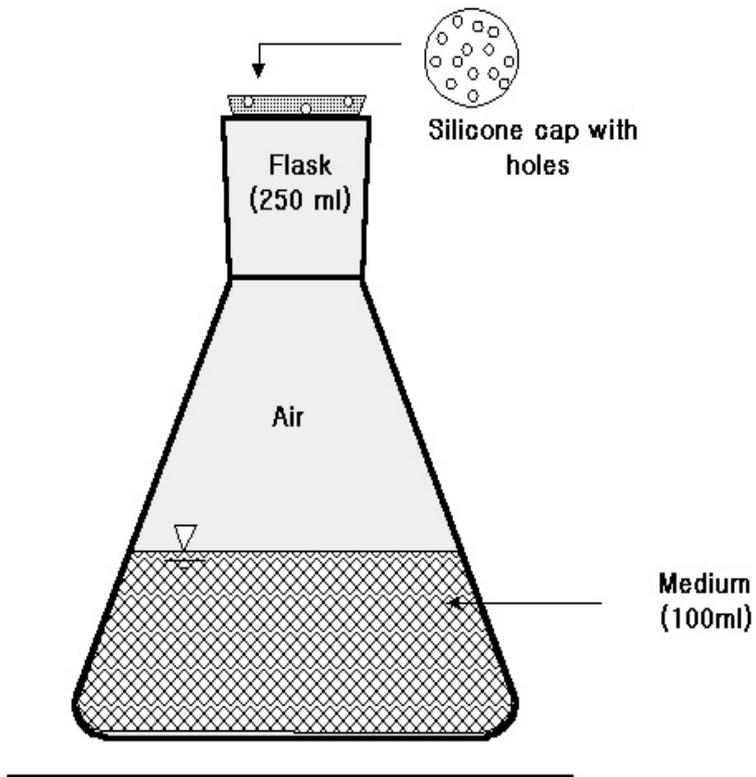


Fig. 3-2 Scheme of microcosm test for oil degradation by a known oil degrader *Spingomonas* sp. KH3-2 (growing in MSN) and indigenous organism from seawater in the presence of powdered pine needle absorbent under a shaking condition.

Table 3-6 Experimental conditions for microcosm test for oil degradation affected by powdered pine needle absorbent and PAH-degrading bacteria.

Microcosm	Materials added
1	Heavy oil(10g)+powdered pine needle absorbent(10g)
2	Heavy oil(10g)+powdered pine needle absorbent(10g) + <i>Spingomonas</i> sp. KH3-2 (5ml)
3	Heavy oil(10g)+powdered pine needle absorbent(10g) + <i>Yarrowia lipolytica</i> 180 (5ml)
4	Heavy oil(10g)+powdered pine needle absorbent(10g) + <i>Corynebacterium</i> IC 10 (5ml)

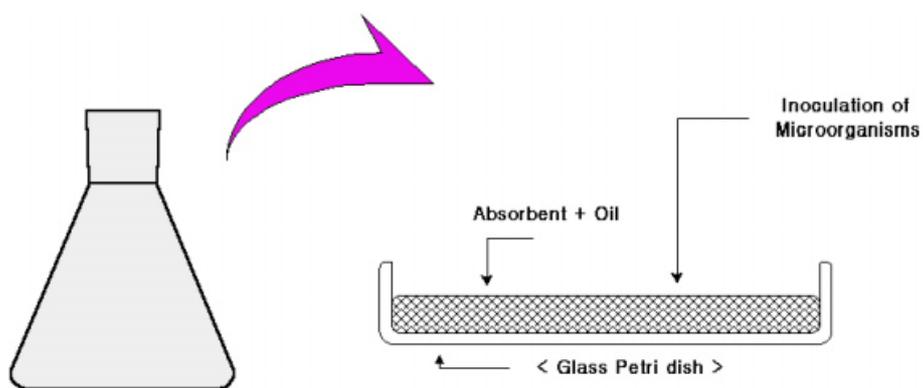


Fig. 3-3 Microcosm used for oil degradation test under a static condition. The experimental conditions were as shown in the Table 3-6.

Table 3-7 Experimental conditions for microcosm test for oil degradation affected by powdered pine needle absorbent and commercial oil degrading agents under a static condition.

Microcosm	Materials added
1	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g)
2	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g) + A(2.5g)*
3	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g) + A(5g)*
4	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g) + A(7.5g)*
5	Heavy oil(10g) + A(10g)*
6	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g) + B(2.5g)**
7	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g) + B(5g)**
8	Heavy oil(10g) + powdered pine needle absorbent(10g) + B(7.5g)**
9	Heavy oil(10g) + B(10g)**

* Commercial oil degrading agent A of "V" Company.

** Commercial oil degrading agent B of "V" Company.

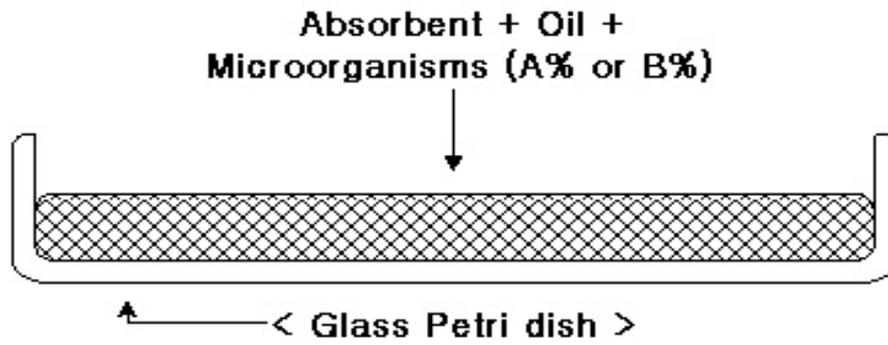


Fig. 3-4 Microcosm test using commercial oil degrading agent under a static condition. The experimental conditions were as shown in the Table 3-7.

IV. 결과 및 고찰

4.1 솔잎흡착제가 유류분해에 미치는 영향

솔잎흡착제가 유류분해에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 두 개의 시료 MSM 액체배지내에 Oil과 *Spingomonas* sp. KH3-2를 첨가한 다음 한 개의 시료에만 솔잎흡착제 4.34g을 첨가하여 미생물 생장의 간접지표인 Optical density (O.D.)를 측정하였다. 배양은 교반 인큐베이터, 25℃, 150rpm로 수행하였으며, O.D.는 분광광도계 660nm 파장에서 측정하여 Fig. 4-1과 같은 결과를 얻었다.

Fig. 4-1에서와 같이, 배양액내에 미생물만을 넣은 Blank의 O.D.는 시간이 경과함에 따라 거의 제로에 가까운 무변화로 보아 다른 잡균에 의한 영향은 없는 것으로 판단된다. 또한, 솔잎 흡착제가 첨가된 경우는 미생물 생장의 간접적인 지표인 O.D.가 0.09에서 0.4로 증가하였다. 이는 시간이 지남에 따라 분말상 솔잎 흡착제 성분에 의한 O.D.의 상승으로 여겨지며, 미생물만을 접종한 경우는 유류를 이용하여 증식하지 않았기 때문이다. Fig. 4-2와 같이 노말핵산 함량법에 의한 TPH의 농도 변화량은 솔잎 흡착제를 첨가한 것이 첨가하지 않는 것에 비해 보다 큰 기울기로 감소하고 있음을 볼 수 있다. 이것은 솔잎 흡착제를 첨가한 시료가 솔잎 흡착제를 첨가하지 않은 시료에 비하여 유류의 농도가 감소한 것이라 볼 수 있는데, 분해미생물에 의한 유류의 제거가 아니라면 솔잎흡착제에 흡착된 유류성분의 회수가 완전히 이루어지지 않은 것이 그 중요한 원인으로 파악된다.

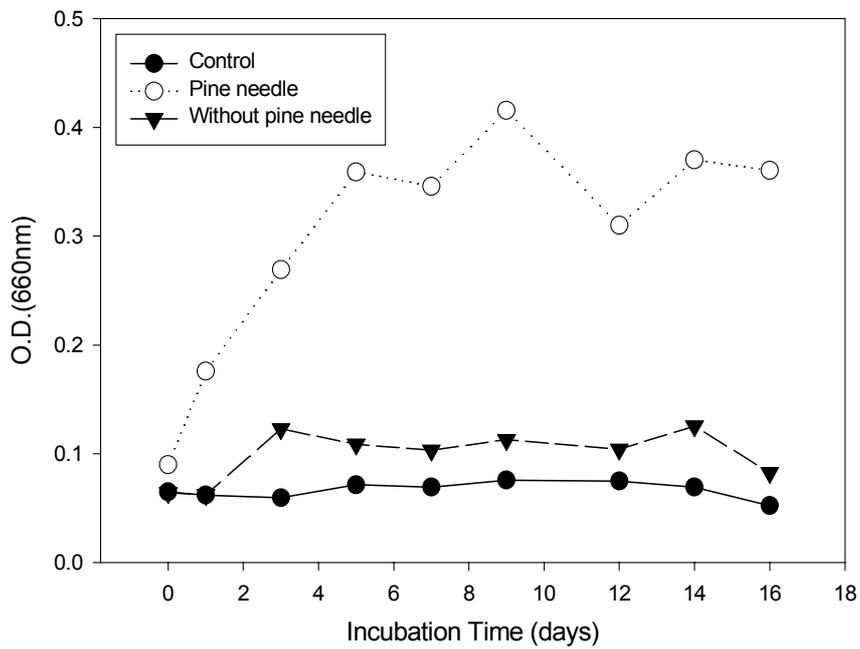


Fig. 4-1 Effect of powdered natural absorbent on the growth of *Sphingomonas* sp. KH3-2 in medium.

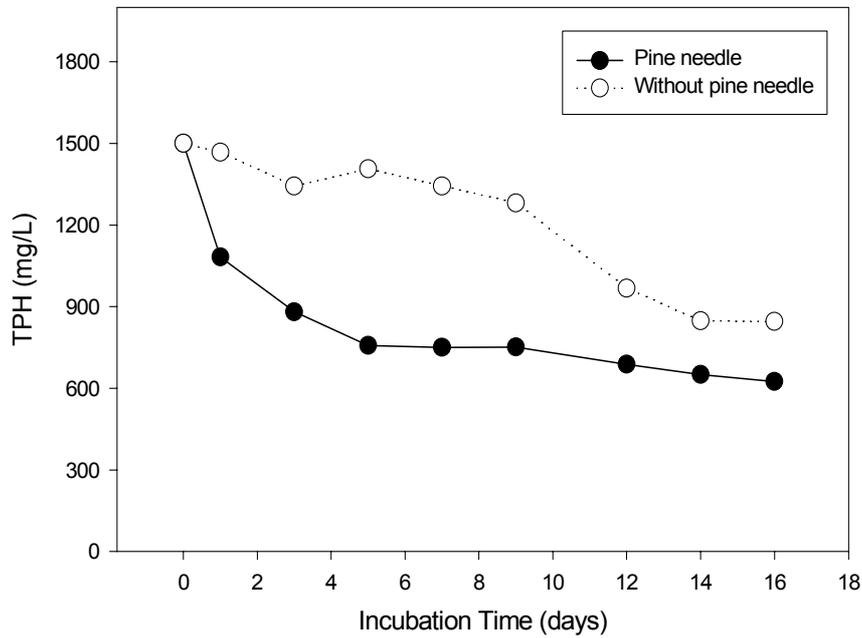


Fig. 4-2 Effect of powdered natural absorbent on the oil removal by *Spingomonas* sp. KH3-2 in medium.

4.2 해수내 자연계 토착 미생물과 *Spingomonas* sp. KH3-2와의 유류분해능 비교

해수내 자연계 토착미생물과 *Spingomonas* sp. KH3-2와의 유류분해능을 살펴보기 위하여 *Spingomonas* sp. KH3-2와 자연계 토착미생물이 들어 있는 바닷물을 접종한 다음 시료의 O.D.를 측정하여 Fig.

4-3와 같은 결과를 얻었다.

Fig. 4-3에서와 같이, 자연계 토착미생물이 들어 있는 바닷물을 접종한 것의 O.D.가 0.07에서 0.35로 증가하였고, *Spingomonas* sp. KH3-2를 접종한 것의 O.D.는 0.07에서 0.44로 증가하였다. 두 시료 모두 증가하였는데, 해수내 자연계 토착미생물을 이용한 시료가 약 20%정도 낮은 양상을 보인다. 이것으로 유류를 에너지원으로 이용하는데 이미 적응된 *Spingomonas* sp. KH3-2에 비하여 자연계 토착미생물은 환경 적응 시간이 필요함을 알 수 있었다. 그러나, 일정 시간이 지난 후에는 해수내 자연계 토착미생물만으로도 유류분해가 가능함을 알 수 있었다. Fig. 4-4와 같이 노말핵산 함량법에 의한 TPH의 농도 변화는 *Spingomonas* sp. KH3-2를 접종한 경우가 해수내 자연계 미생물을 이용한 시료에 비하여 큰 기울기로 감소하고 있음을 알 수 있으며, 실험 9일, 12일째에 거의 0에 가까워 짐을 알 수 있다. 이것은 Table 3-1과 같이 두 시료 모두 솔잎 흡착제를 첨가한 상태에서 행해진 실험으로, 두 시료내에 있는 유류가 실험 9일째와 12일째에 대부분 솔잎 흡착제에 흡착되었기 때문이라 판단된다.

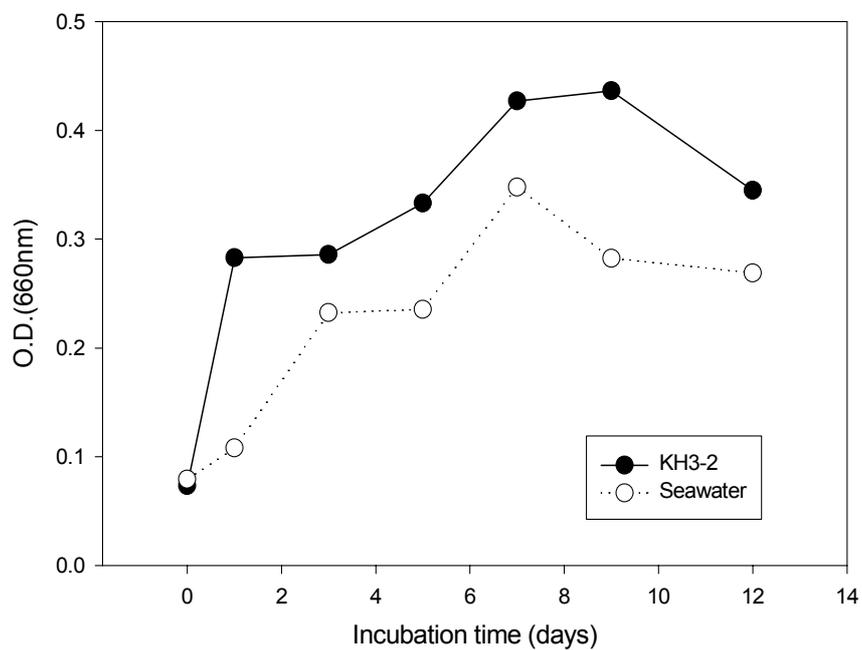


Fig. 4-3 Comparison of cell growth between indigenous natural microorganisms in the seawater and *Spingomonas* sp. KH3-2 in the MSM medium containing oil (1500ppm).

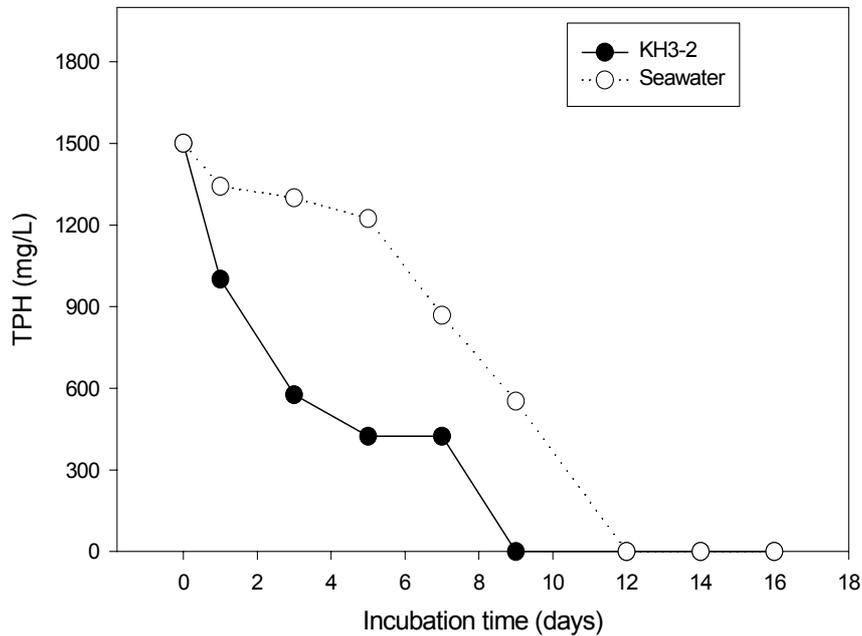


Fig. 4-4 Comparison of oil removal activity between indigenous microorganisms in the seawater and *Spingomonas* sp. KH3-2.

4.3 미생물의 종류에 따른 유류분해 영향

미생물의 종류에 따른 유류분해 영향을 살펴보기 위하여 유류분해능이 우수하다고 입증된(2,21,22) *Spingomonas* sp. KH3-2, *Yarrowia lipolytica* 180, *Corynebacterium* IC 10의 3종의 액상 배지내의 균주를 5g씩 투입하여 유류의 무게를 측정하여 Fig. 4-5, Fig. 4-6, Fig. 4-7의 결과를 얻었

다. Fig. 4-5, Fig. 4-6, Fig. 4-7와 같이 3종의 미생물 모두 초기 50시간동안 약 5g 정도의 무게감량 변화를 볼 수 있는데 이는 균주의 공급을 위해 투입된 액체배양액의 수분 증발에서 기인한 것으로 판단된다. 또한, 시간이 지남에 따라 미약하지만 조금씩 유류의 무게가 감소하고 있음을 볼 수 있는데 이는 유류의 휘발로 인한 것이라 여겨진다. 이같이 유류분해 특정미생물임에도 불구하고 뚜렷한 유류의 무게 감소를 볼 수 없었던 것은 미생물의 에너지원인 유류는 풍부하나 이외의 영양분의 부족으로 미생물이 성장을 하지 않았기 때문이라 사료된다.

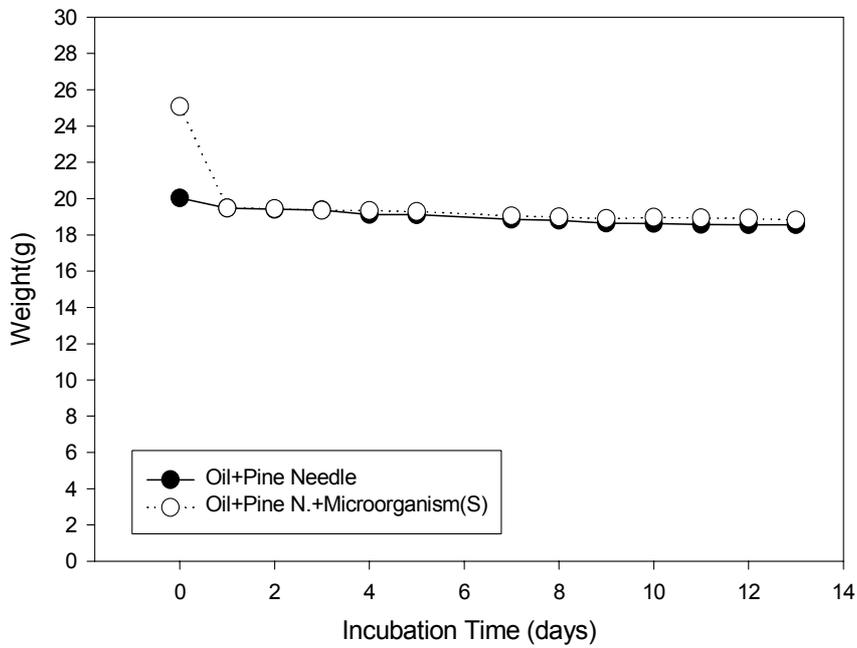


Fig. 4-5 Time course of oil removal by *Spingomonas* sp. KH3-2 in the presence of powdered pine needle absorbent.

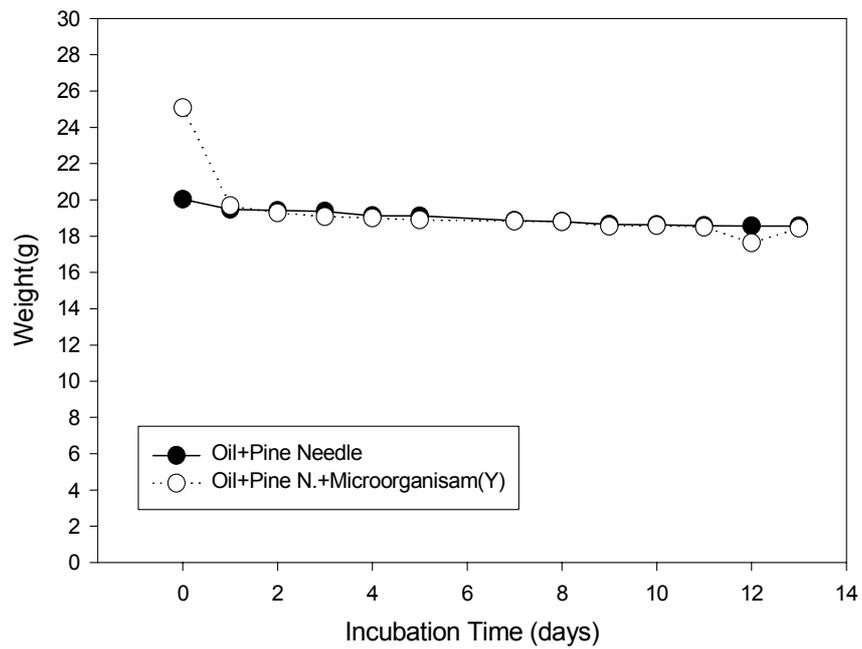


Fig. 4-6 Time course of oil removal by *Yarrowia lipolytica* 180 in the presence of powdered pine needle absorbent.

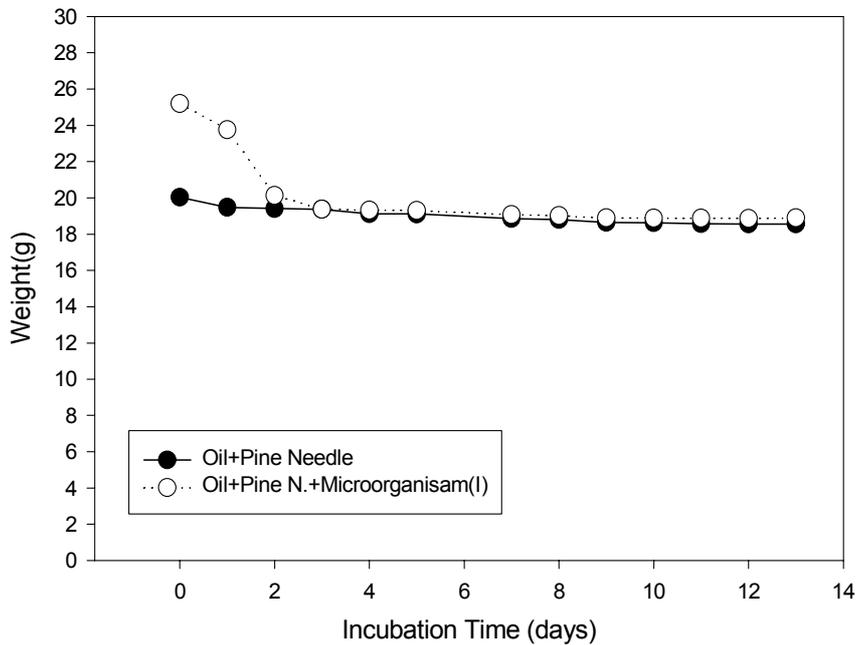


Fig. 4-7 Time course of oil removal by *Corynebacterium* IC 10 in the presence of powdered pine needle absorbent.

4.4 상용화 된 미생물 처리제제를 이용한 미생물 접종량에 따른 유류분해 영향

유류를 흡착한 천연 흡착제를 수거하여 고정화 된 상태라는 가정 하에 일정양의 솔잎흡착제에(10g) 미생물 처리제제 “V”사 A 제품과 “V”사 B 제품을 각각 0%(W/W), 25%, 50%, 75%, 100% 되게 첨가한 다음, 저울을 이용하여 시간에 따른 유류의 무게를 측정하여 Fig. 4-8, Fig. 4-9와 같은 결

과를 얻었다.

Fig. 4-8에서와 같이, 미생물 A의 첨가량이 증가함에 따라 유류무게 감소량도 30일째에 1.2%, 1.4%, 2%, 2.2%, 2%로 미약하지만 조금씩 증가하였다. 그러나, 25% 분말상 솔잎 흡착제를 포함하고 75%의 미생물처리제 A를 넣어준 것의 유류감량 비율이 2.2%인 것에 비하여 분말상 솔잎 흡착제 없이 100% 미생물처리제 A만을 포함한 경우는 2%로 25% 분말상 솔잎 흡착제를 포함하고 75%의 미생물처리제 A를 넣어준 것이 0.2%정도 유류 감량 효과가 높음을 알 수 있다. Fig. 4-9에서와 같이 미생물 B의 경우도 첨가량이 증가함에 따라 유류무게 감소량이 2%, 14%, 25%, 25.7%, 5%로 증가하였다. 그러나, 25% 분말상 솔잎 흡착제를 포함하고 75%의 미생물처리제 B를 넣어준 것의 유류감량 비율이 27.5%인 것에 비하여 분말상 솔잎 흡착제 없이 100% 미생물처리제 B만을 포함한 경우는 5%로 분말상 솔잎 흡착제를 포함하고 75%의 미생물처리제 B의 경우가 22.5%정도 유류 감량 효과가 높음을 알 수 있다.

이들 유류 감량 효과는 모두 유류의 자연 휘발에 의한 무게 감소량으로 보여지며, 25% 분말상 솔잎 흡착제를 포함하고 75%의 미생물처리제 A와 B의 경우에서 알 수 있듯이 솔잎 흡착제가 유류의 자연 휘발이 잘 일어날 수 있도록 유류 사이의 공극을 형성시켰기 때문이라 사료된다. 여기서 미생물에 의한 분해로 생각하기 어려운 것은 미생물의 성장에 필요한 C/N비의 비율이 잘 맞지 않은 것에 그 이유가 있는 것으로 판단된다. 그러나, 솔잎흡착제의 첨가는 공극 및 표면적을 증가 시켜 고밀도 미생물의 흡착이 가능할 것이며 또한 각종 영양성분 및 조건(무기염류 및 산소 등)의 이용성을 증가시키는 효과가 있어 궁극적으로 미생물의 증식 촉진효과를 나타낼 것으로 사료된다.

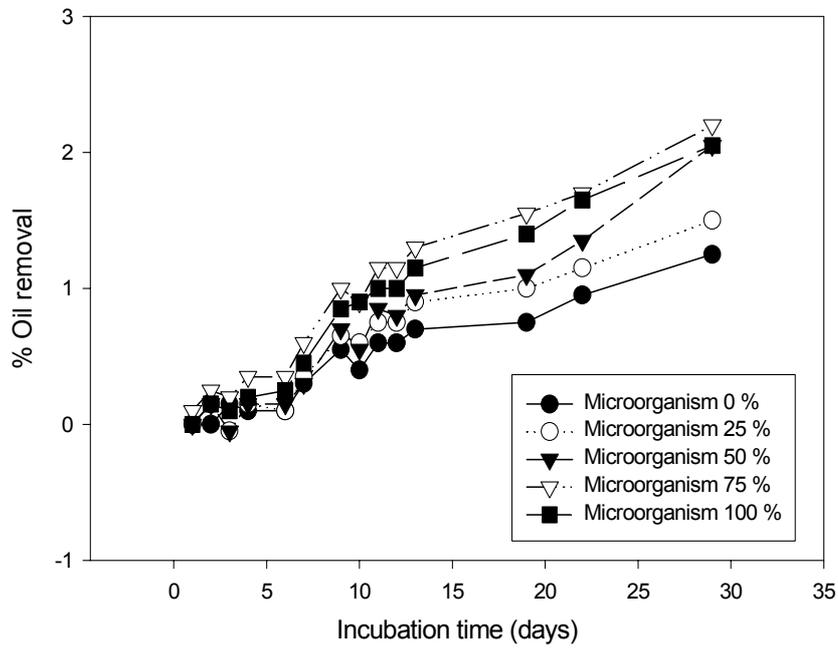


Fig. 4-8 Variation of oil removal by a commercial oil degrading agent A of "V" company.

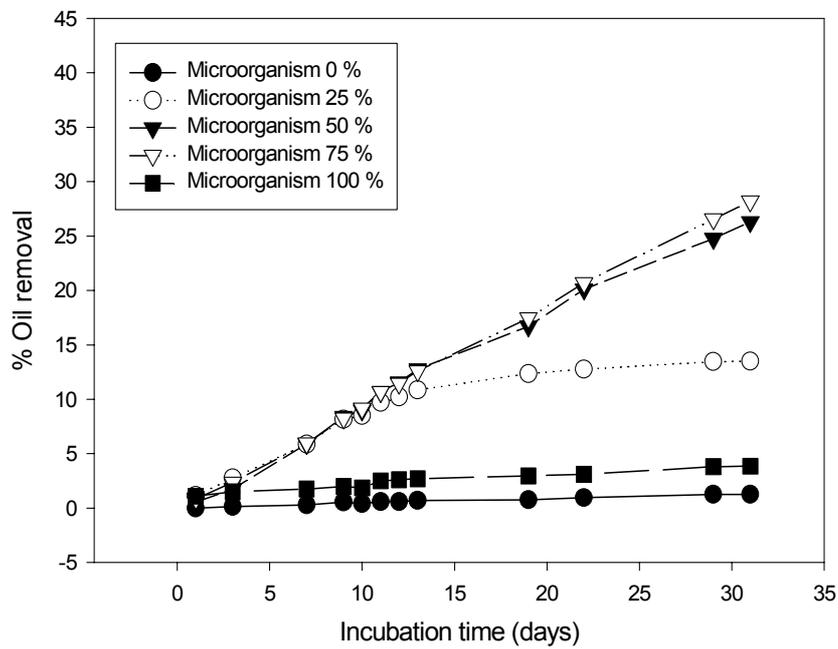


Fig. 4-9 Variation of oil removal by a commercial oil degrading agent B of "V" company.

V. 결론

해양 유류오염 방제시 분말상 슬럼프착제에 미생물을 적용하여 미생물에 의한 유류분해를 영향을 살펴보고자 해수내 자연계 토착미생물과 *Sphingomonas* sp. KH3-2와 유류분해능 비교, 미생물 종류에 따른 유류분해능, 상용화 미생물처리제제의 접종량에 따른 유류분해 영향을 검토한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

해수내 자연계미생물과 *Sphingomonas* sp. KH3-2와의 유류분해능을 조사한 결과 해수내 자연계 토착미생물을 이용한 시료가 약 20%정도 낮은 양상을 보였다. 이것으로 유류의 특정성분(phenanthrene, naphthalene, fluorene, biphenyl, dibenzothiophene)을 에너지원으로 이용하는데 이미 적응된 *Sphingomonas* sp. KH3-2에 비하여 해수내 토착미생물은 환경 적응 시간이 필요할 것으로 판단되나 그 미생물의 존재 및 그 분해 활성은 측정을 통해 검정되어야 할 것이다. 고정된 상태에서 미생물의 종류에 따른 유류분해 영향을 살펴본 결과 영양분의 부족으로 미생물의 종류에 따른 유류의 무게감량 효과는 살펴볼 수 없었다. 반면, 미생물 처리제제에 슬럼프착제가 존재할 경우 유류 무게 감량이 높은 것으로 보아 슬럼프착제가 통기(aeration)를 촉진시켜 유류의 생물학적 분해에 기여하리라 판단된다.

참고문헌

1. 강창구, (1998), "국내 해양유류오염사고 현황 및 대책", *첨단환경기술*, 2월호, 2-15.
2. 고범준, (1996), "원유의 토양슬러리상에서의 *Nocardia*에 의한 생물학적 분해", 한국과학기술원 석사학위논문.
3. 고성환, (1998), "유처리제 사용이 유류분해 미생물에 미치는 영향", *첨단환경기술*, 9월호, 2-9.
4. 권기석, 윤병대, (1996), "Bioremediation 기술개발과 미생물의 역할", *생물산업*, 9(3), 17-24.
5. 김상진, (1997), "유류오염 처리" *첨단환경기술*, 77-86.
6. 이진석, 박성진, 박상호, 김인수, (2001), "해양오염제거용 천연분말상 유흡착제의 흡착특성", *해양환경안전학회지*, 7(1), 7-14.
7. Atlas, R. M., and Bartha, R., (1998), "Microbial ecology; Fundamentals and applications", Forth edition, Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., 523-531.
8. Bishop, Paul L., (1983), "Marine pollution and its control", McGraw-Hill Companies, Inc., 139-178.

9. Dutta, T. K., and Harayama, S., (2000), "Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation", *Environ. Sci. and Tech.*, 34, 1500-1505.
10. Dutta, T. K., and Harayama, S., (2001), "Analysis of long side chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment", *Environ. Sci. and Tech.*, 35, 102-107.
11. Ehrhardt, M., (1987), "Photo-oxidation product of fossil fuel components in the water of Hamilton Harbour", *Mar. Chem.*, 22, 85-94.
12. Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P. Y., and Schroeder, E. D., (1998), "Bioremediation principles", McGraw-Hill Companies, Inc., 120-136.
13. Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Romine, M. F., Ringelberg, D. B., and White, D. C., (1995), "Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5), 1917-1922.
14. International Maritime Organization, (1993), "Impact of oil and related chemicals on the marine environment", Reports and Studies, No. 50, 13-65.

15. Kim, T. H., Lee, J. H., Oh, Y. S., Bae, K. S., and Kim, S. J., (1999), "Identification and characterization of an oil-degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180", *J. of Microbiology*, **37**(3), 128-135.
16. Kim, T. H., Oh, Y. S., and Kim, S. J., (2000), "The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180" *J. of Microbiol. Biotechnol.* **10**(3), 222-227.
17. Koons, C. B., (1987), *Environ. Prog.* **7**(4), 204-207.
18. Kosaric, N. ed., (1993), "Biosurfactants production, properties, application", Marxel Dekker, NY.
19. Krockel, L., and Focht, D. D., (1987), "Construction of chlorob - enzene - utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event", *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2470-2475.
20. Martin, A., (1994), "Biodegration and Bioremedation", Academic Press, Inc., 159-175.
21. Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., and Lal, B., (2001), "Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil" *Appl. Environ. Microbiol.*, 1675-1681.

22. Shin, S. K., Oh, Y. S., and Kim, S. J., (1999), "Biodegradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. Strain KH3-2" *J. of Microbiology*, **37**(4), 185-192.
23. Wardly-Smith, J., (1976), "The control of oil pollution on the sea and inland water", G raham and Trotman, Ltd., London.