

Acinetobacter sp. A54에 의한 Arabian Light 원유의 분해

이창호 · 김희식 · 서현호 · 최성훈¹ · 오희목 · 윤병대*

생명공학연구소 환경미생물전문연구Unit, ¹한미환경

Microbial Degradation of Arabian Light Crude Oil by *Acinetobacter* sp. A54. Chang-Ho Lee, Hee-Sik Kim, Hyun-Hyo Suh, Soung-Hun Choi¹, Hee-Mock Oh and Byung-Dae Yoon*. *Environmental Microbiology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea, ¹Han-Mi Environmental Industry, Seoul 138-190, Korea* - Bacterial strains which degrade Arabian Light crude oil were isolated by enrichment culture from oil-spilled soil. The strain A54 was finally selected after testing emulsifying activity and oil conversion rate. Strain A54 was identified as a *Acinetobacter* sp. based on the morphological, biochemical and physiological characteristics. It appears to be highly specialized for growth on Arabian Light crude oil in minimal salts medium since it showed preference for oil or degradation products as substrates for growth. It was found that it could grow on at least fifteen different hydrocarbons. The optimum cultural and environmental conditions were as follows; 25°C for temperature, 7.5 for pH, 2.0% for NaCl concentration and 2.0% for crude oil concentration. Additionally, the optimal concentration of NH₄NO₃ and K₂HPO₄ were 12.5 mM and 0.057 mM, respectively. Cell growth and emulsifying activity as a function of time were also determined. Crude oil degradation and the reduction of product peaks were identified by the analysis of remnant oil by gas chromatography. Approximately 63% of crude oil were converted into a form no longer extractable by mixed organic solvents.

원유는 수송하는 도중 사고 또는 고의적인 방출, 산업 폐수 등으로 인하여 전세계적으로 매년 천만톤 이상 해양으로 유출되어 생태계에 커다란 피해를 유발시키고 있다(1). 1946년 ZoBell(2)에 의해 매우 다양한 미생물이 원유분해에 관여하며, 이러한 미생물이 자연계에 널리 분포하고 있다는 사실이 밝혀진 이후로 원유오염 문제를 미생물학적 측면에서 해결하려는 노력들이 계속되어 왔다. 또한, 현재 사용하고 있는 물리-화학적인 방법은 경제적 부담 및 2차적인 오염문제가 대두되고 있어 궁극적으로 미생물을 이용하여 해결하려는 연구가 다양하게 진행되고 있으며, 원유를 생물학적인 방법에 의해 환경을 복원시키는 *in situ* 또는 *ex situ* bioremediation(생물학적 오염현장처리)기술에 대한 연구가 현재 활발하게 진행되어 실제로 오염현장에 적용되고 있다(3-6). 그러나 지금까지의 연구결과를 볼 때 실험실에서 배양한 미생물의 투여가 효과적이라고 할 수는 없으며, 현재까지 가장 성공적인 결과는 제어된 환경에서의 오염물질을 제거하는 것이 효과적이었다(3). 이러한 생물학적인 방법은 물리-화학적인 방법에 비하여 시간이 오래 걸리는 대신 처리 비용이 저렴하고 2차적인 오염문제가 유발되지 않기 때문에 오염처리에 있어서 적당한 방법이 될 수 있다. Bio-

remediation 기술이란 미생물이 갖는 화학물질의 분해, 변환, 축적 기능을 이용하여 환경에 방출된 유해화학물질을 무해화 하는 환경수복기술로서 자연에 순응하는 기술로서의 특징이 있다.

본 연구는 자연계로 방출된 원유의 미생물학적 처리를 위하여 Arabian Light 원유를 분해하는 미생물을 다양한 균원시료로부터 분리·선별하였으며, 선별된 원유분해 균주의 특성과 균체생육 및 유화활성에 미치는 환경요인들에 관한 영향을 검토하였다. 또한 배양시간에 따른 잔류원유의 분석을 통하여 원유분해 정도를 대조구와 비교하였다.

재료 및 방법

균주 분리

균주의 분리는 유류에 오염된 다양한 토양을 균원시료로 하여 200여 균주를 순수분리 하였고, 분리된 균주의 액체배양에 의한 유화활성 및 원유 전환율이 우수한 균주를 선별하였다.

배지 및 배양방법

본 실험에 사용한 원유 액체배지는 nutrient broth에 Arabian Light 원유(sulfur 함량, 1.0%)를 1.0%(v/v) 농도로 첨가하여 사용하였으며, 균주의 보존은 tryptic soy broth agar(Difco) 배지에 배양하여 4°C에서 냉장 보

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4320, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: bdyoon@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: Microbial degradation, Crude oil, *Acinetobacter* sp. A54, Oil conversion rate

존하였다. 원유분해를 위한 균체생육 및 유화활성의 최적조건과 환경인자들에 관한 영향을 검토하기 위한 최소배지의 조성은 yeast extract 0.2 g/l, NH_4NO_3 1.0 g/l, K_2HPO_4 1.5 g/l, NaH_2PO_4 0.2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/l을 함유하며, pH는 7.0으로 조정하여 사용하였다.

원유 분해능 조사를 위한 전 배양은 원유가 첨가된 액체배지에서 배양하였다. 즉, 시험관(25×250 mm)을 사용하여 원유 액체배지 10 ml에 균주를 한 백금이 접종한 후 30°C의 진탕배양기(130 strokes/min)에서 36시간 배양하였다. 본 배양은 250-ml Erlenmeyer flask에 원유 액체배지 50 ml을 넣어 121°C, 15분간 습윤 가압멸균한 후 전 배양액을 2.0%(v/v)되게 접종하여 30°C에서 4일간 진탕배양 하였다.

균주의 동정

균주의 형태적, 생리적 그리고 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of determinative bacteriology (7)와 Manual for the identification of medical bacteria(2nd ed.) (8)에 따라서 균주 동정을 실시하였다.

균체수 측정

균체수 측정은 각 실험에 사용된 배양액을 배양시간에 따라서 $10^3 \sim 10^6$ 배율로 생리식염수에 희석하여 희석된 배양액 0.1 ml을 plate count agar(Difco)배지에 도말한 후 48시간 배양하여, 30~300개의 colony를 형성한 plate를 선택하여 계수 하였다.

유화활성 측정

유화는 서로 섞이지 않는 두 액체가 계면활성물질 혹은 고체입자들의 작용에 의하여 한액체가 다른 액체내에 작은 입자 형태로 분산되는 현상을 말한다. 배양액을 이용한 원유의 유화활성은 Reisfeld 등(9)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 배양액을 현탁한 다음 5 ml을 시험관(14×150 mm)에 넣고 5분간 정지시킨 후 액의 중간 부위에서 2 ml을 취하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 540 nm에서 흡광도 값으로 유화활성을 나타내었다. 유화활성은 흡광도 0.1을 1 unit로 하여 표시하였다.

원유 전환율(oil conversion rate) 측정

배양에 사용된 원유의 분해정도는 원유성분을 혼합유기용매를 사용하여 원유 전환율로 나타내었다. 즉, 배양액에 benzene: pentane: diethylether(3:1:1, v/v/v)를 동량 혼합하여 원유성분을 완전히 추출한 후 실온에서 진공건조기를 사용하여 용매를 완전히 제거하여 대조구(no bacteria)와 처리구의 무게를 측정하여 원유 전환율

을 구하였다(10).

Gas chromatography 분석

Gas chromatography(GC)는 불꽃 이온화 검출기를 장착한 Varian 3700를 사용하였으며, silicon OV-101을 10% 침윤시킨 chromosorb W/HP(80~100 mesh) stainless steel column을 사용하였다. Carrier gas는 질소를 사용하였으며, 유속은 30 ml/min로 하였다. Column온도는 90-270°C로 분당 5°C씩 증가 시켰으며, injector 및 detector온도는 200°C와 240°C로 조정한 후 시료 1.0 μl 를 주입하여 분석하였다.

잔류원유의 회수는 분액깔대기에 배양액을 넣은 후 2배의 *n*-hexane을 넣고 잘 혼합한 유분을 *n*-hexane층으로 이동시킨 후 회수한 *n*-hexane층을 화학분석용 여지(Whatman No. 42)위에 무수 황산나트륨 10 g을 채운 깔대기에 통과 시켜 여과하였다. 이 여액을 진공건조기를 이용하여 용매를 제거한 후 남은 여액을 검액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

원유 분해균주의 분리 및 선별

균원시료로부터 분리된 200여 균주를 원유 액체배지에서 3일간 배양한 후 유화활성이 우수한 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율은 Table 1과 같다. 유화활성은 A6, A10, 그리고 A54균주 순으로 높았다. 원유 전환율은 B24-2와 A6균주가 약 74%와 69%로서 높았으며, A54균주는 약 63%였다. 이와 같은 결과는 Reisfeld 등(9)의 RAG-1 균주가 9×10^7 cells/mg의 균체수와 약 65%의 원유 전환율을 얻었다는 보고와 Horowitz 등(10)의 1.6×10^8 cells/mg의

Table 1. Growth, emulsifying activity, and oil conversion by oil-degrading bacteria*

Strains	Cell growth (CFU/ml)	Emulsifying activity (unit/ml)	Oil conversion (%)
A6	2.0×10^8	361.4	69
A10	6.1×10^8	403.6	68
A44	2.3×10^5	14.2	6
A54	7.2×10^9	468.6	63
B12	4.6×10^6	46.8	34
B24-2	9.6×10^9	328.2	74
D1	7.6×10^9	314.0	19
E24-1	1.1×10^7	86.8	60

*250-ml flasks containing 50 ml of nutrient broth and 1.0% (v/v) crude oil were inoculated with approximately 10^4 bacteria per ml and cultured at 30°C with reciprocal shaking. After 3 days viable cell numbers and oil conversion were determined. The data are averages of at least two experiments.

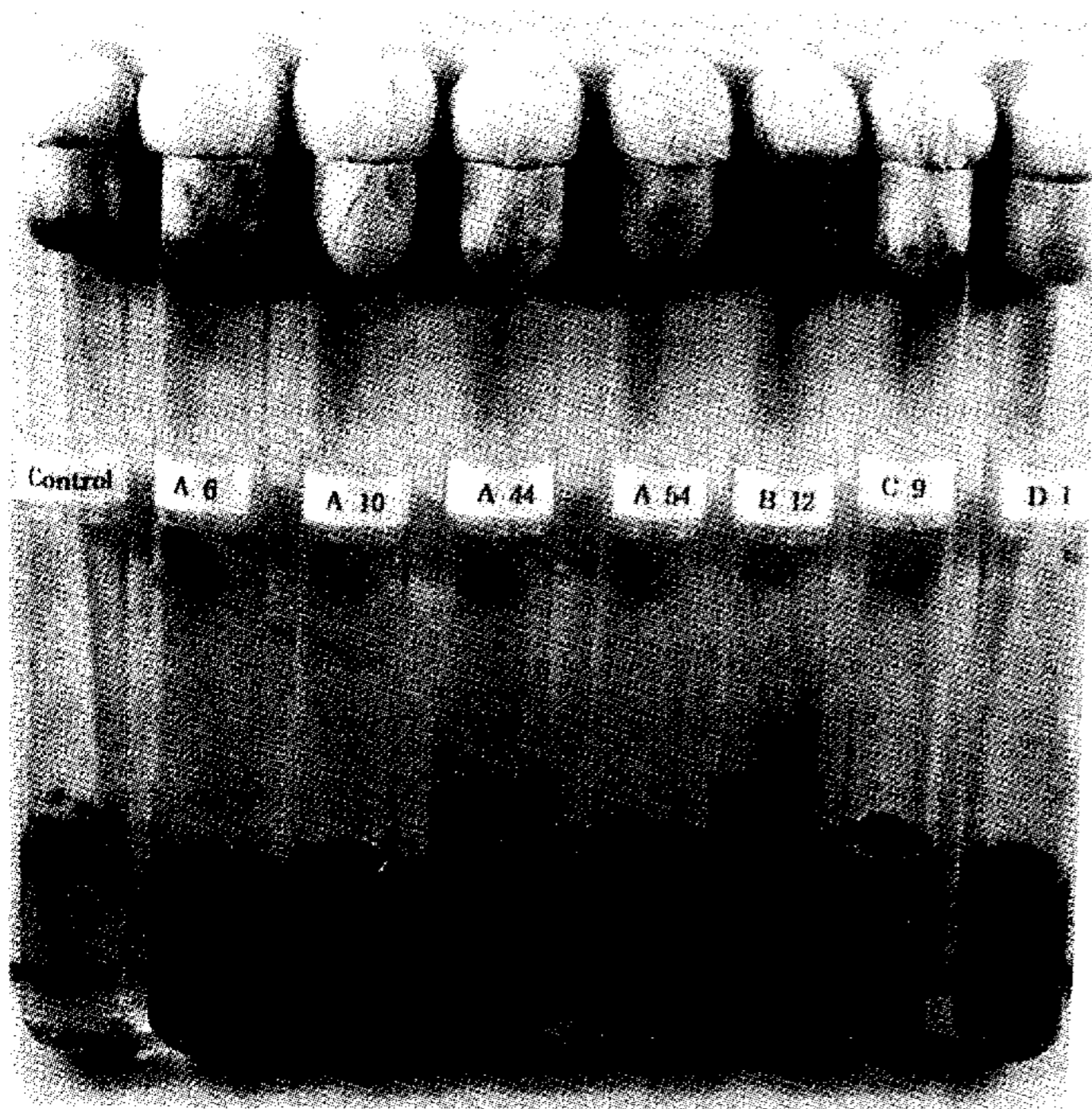


Fig. 1. Microbial dispersion of crude oil after growth of the selected strains for 3 days.

Cultivation was made in a minimal salts medium containing crude oil (1%, v/v) for 3 days at 30°C on a reciprocal shaking (130 strokes/min).

균체수와 약 66%의 원유 전환율을 얻었다는 보고와 비슷한 균체생육과 원유 전환율을 보였으나 유화활성은 훨씬 우수한 것으로 나타났다.

원유 액체배지에 배양한 후 원유의 dispersion은 유화가 우수한 균주일 수록 진한 고동색을 나타내었으며, 배양액 표면에 원유여액이 없었다(Fig. 1). 따라서 이후에 실험은 A54균주를 최종 선별하여 실험에 이용하였다.

분리균주의 동정

분리균주 A54의 크기는 0.5~0.6×0.8~1.1µm으로 Gram 음성균이며 약간의 운동성을 나타내었다. 단간균의 호기성 세균으로서 catalase는 가지나 oxidase는 없었으며, glucose에서 산을 형성하지 못하였다. MR(methyl red)반응, VP(Voges-Proskauer)반응, indole에서는 음성이었으며 urease, arginine, lycine 그리고 nitrate reduction에서는 양성을 나타내었다. 탄소원의 이용성은 사용된 당류에서 산을 형성하지 못하였다(Table 2). 이상의 결과로부터 A54균주는 *Acinetobacter* sp.와 유사한 균주로 밝혀져 최종적으로 *Acinetobacter* sp. A54로 명명하였다. 이 균주는 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 기탁하였으며, 그 수탁번호는 KCTC 8702P이다.

원유분해 및 탄화수소 이용성

Table 2. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of the strain A54

Characteristics	A54	Characteristics	A54
Gram staining	-	Carbohydrates,	
Shape	short rod	acid from	
Size (µm)	0.5~0.6×	arabinose	-
	0.8~1.1	lactose	-
Spore	-	cellobiose	-
Optimum Temp.	30°C	maltose	-
Growth at 42°C	-	sucrose	-
Motility	+	raffinose	-
Growth in air	+	xylose	-
Catalase	+	galactose	-
Oxidase	-	mannitol	-
Glucose (acid)	-	salicin	-
OF	-		
Urease	+	Asculine hydrolysis	-
Arginine	+	Starch hydrolysis	-
Lysine	+	Casein hydrolysis	-
Citrate utilization	-	McConky agar	-
Indole	-	Gelatin liquefaction	-
MR	-	DAP type	LL
VP	-	KCN	+
Nitrate reduction	+		

OF, oxidation/fermentation; MR, methyl red; VP, voges-proskauer; DAP, diaminopimelic acid.

Acinetobacter sp. A54에 의한 배양 시간별 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Fig. 2). 균체

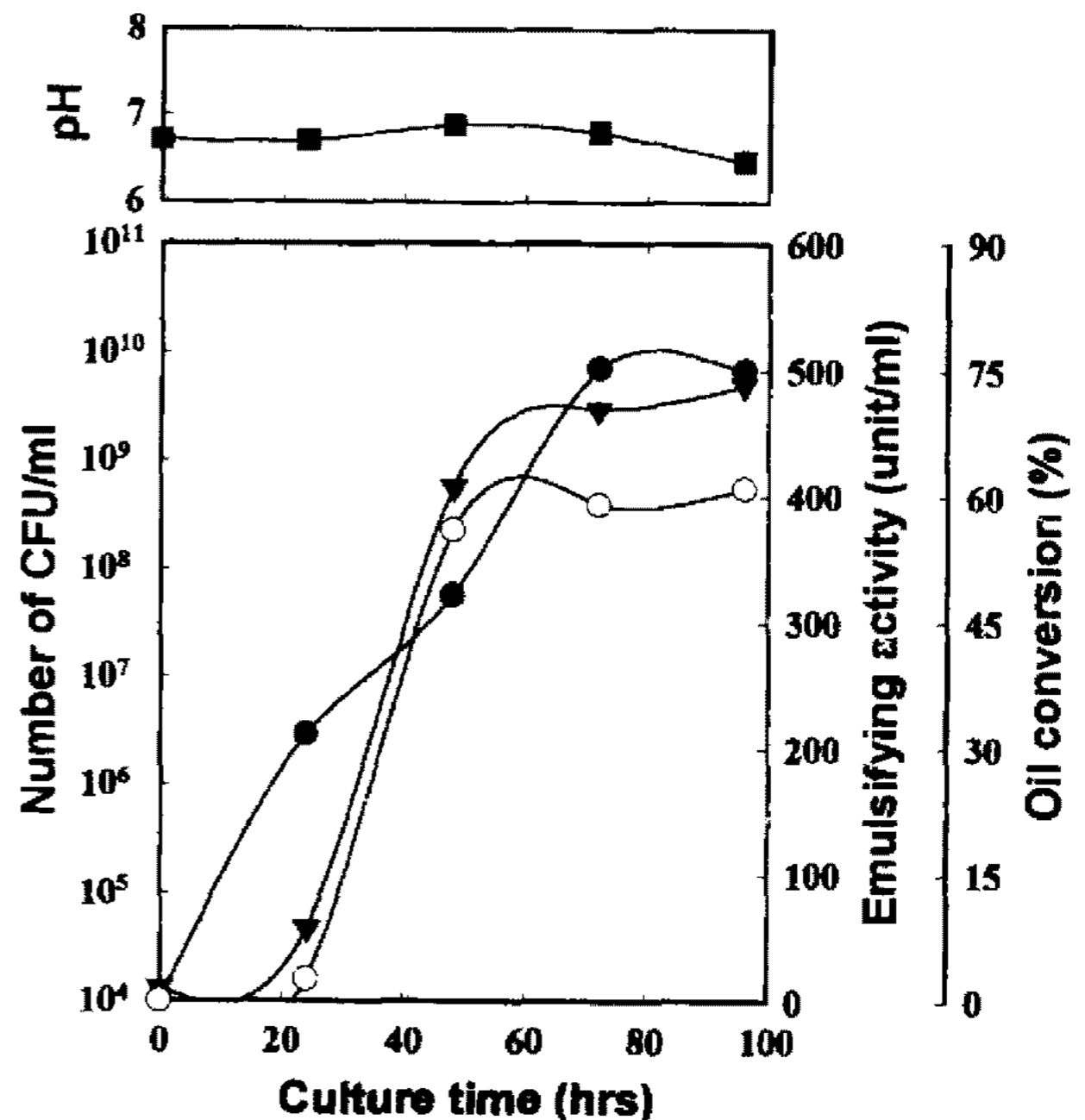


Fig. 2. Growth, emulsifying activity, and oil conversion as a function of time by *Acinetobacter* sp. A54.

●, Cell growth; ○, Emulsifying activity; ▼, Oil conversion; ■, pH. Cultivation was carried out using 250-ml flasks containing 50 ml minimal salts medium for 4 days at 30°C on a reciprocal shaking.

Table 3. Growth of *Acinetobacter* sp. A54 on different carbon sources

Carbon sources	Growth	Carbon sources	Growth
Crude oil	+++	Benzene	+
Methanol	+	Naphthalene	+
Ethanol	+++	<i>n</i> -Octane	+
Benzyl alcohol	+	<i>n</i> -Decane	+
<i>n</i> -Propyl alcohol	+++	<i>n</i> -Hexadecane	+++
<i>n</i> -Heptyl alcohol	-	<i>n</i> -Heptadecane	+++
Glycerol	+	Glucose	++
Pentane	+	Olive oil	+++

The strain was inoculated to minimal salts medium containing carbon source at the concentration of 1.0% (v/v), and the growth was measured. Symbols indicate turbidity values at 660 nm: +++, >2.0 after 24 hrs; ++, 1.0 to 2.0 after 48 hrs; +, 0.3 to 0.99 after 48 hrs; -, <0.2 after 48 hrs.

수가 배양 24시간 이후에 급격히 증가하여 배양 72시간에 7.2×10^9 CFU/ml의 높은 균체수를 나타내었으며, 유화활성과 원유 전환율도 각각 468 unit/ml와 약 63%로서 최대치에 도달하였다. 또한, 각기 다른 탄화수소를 최소배지에 1.0%(v/v)되게 첨가하여 48시간 동안 진탕배양한 후 생육정도를 측정된 결과 *n*-hexadecane, ethanol과 olive oil 등에서 왕성하게 생육하였으며 특히, alcohol류의 탄화수소에서는 생육이 우수하여 다양한 탄화수소를 탄소원으로 이용함을 알 수 있었다(Table 3). 이와 같은 결과는 Zajic 등(11)의 탄수화물과 탄화수소를 이용한 유화활성에 있어서, *n*-alkane에서 유화활성 및 균체생육이 더 우수하였다는 보고와 유사하였다.

배양온도에 따른 영향

원유의 유화활성에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 10°C에서 35°C까지 5°C간격으로 72시간 배양한 후 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 25°C에서 가장 높은 균체생육과 유화활성을 나타내었으며, 20°C와 35°C에서는 다소 낮은 결과를 얻었다. 그러나 저온에서는 균체생육 및 유화활성이 거의 이루어지지 않았다. 이와 같은 결과는 낮은 온도는 탄화수소의 물리적 성질을 결정하는 주요인으로 작용하기 때문에 10°C 이하에서 미생물의 유류분해 속도는 급격히 감소한다는 보고(4)와 탄화수소를 분해하는 미생물이 유류와 경계수막에서 작용하게 되므로 낮은 온도로 인해 고체상태가 되거나 점성이 증가되어 표면적이 감소되면 미생물에 의한 분해가 어려워 진다는 보고(12)와 일치하였다. 한편, Son 등(13)이 보고한 30°C와 윤 등(14)이 보고한 15°C와는 상이한 결과를 나타내었다.

초기 pH의 영향

원유의 유화활성과 균체생육에 미치는 pH의 영향을

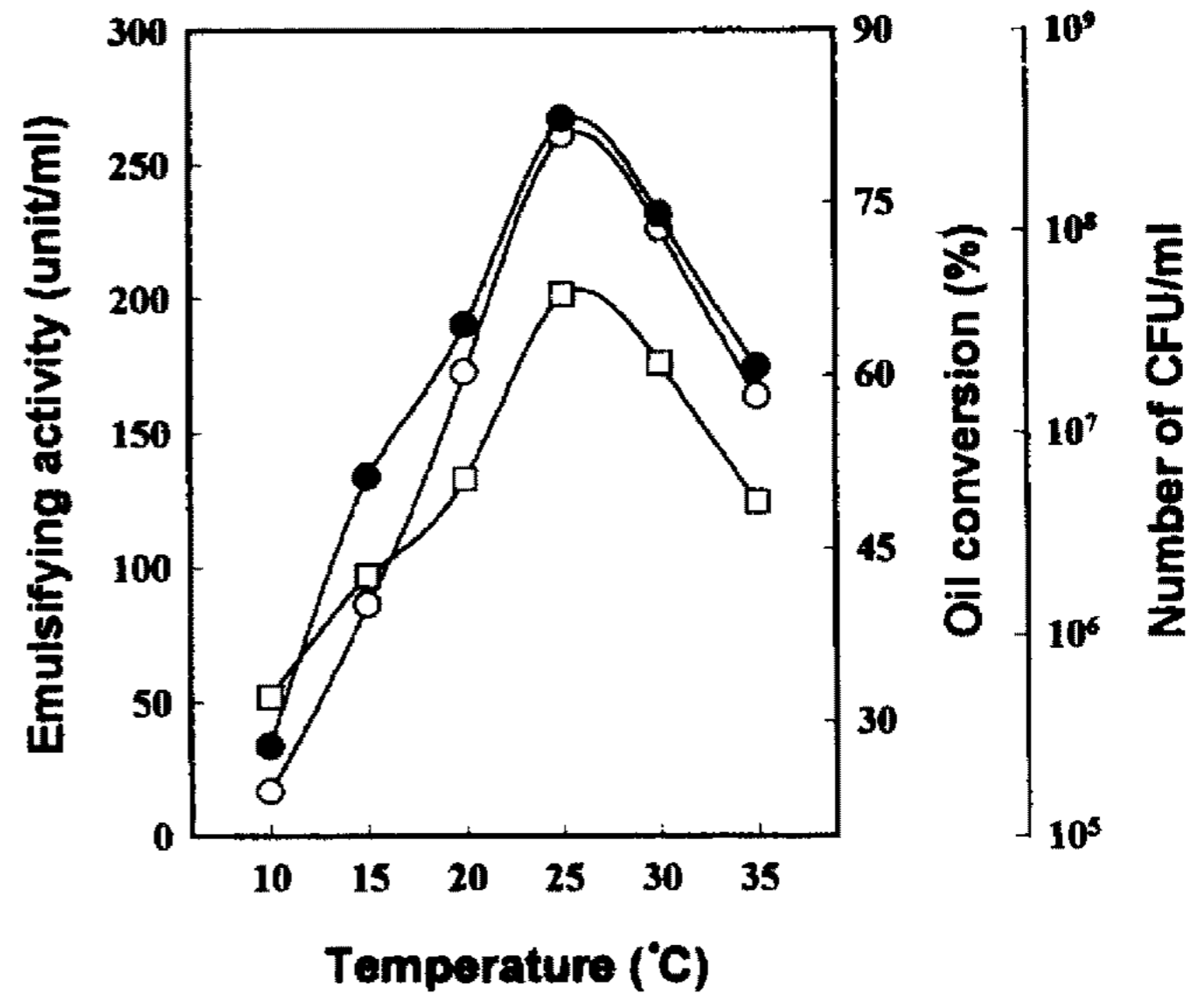


Fig. 3. Effect of culture temperature on emulsifying activity, oil conversion, and cell growth in minimal salts medium containing crude oil.

●, Cell growth; ○, Emulsifying activity; □, Oil conversion. Cultivation was made for 3 days at each temperature on a reciprocal shaking.

조사하기 위하여 최소배지의 초기 pH를 4.0에서 9.0으로 각각 조절한 후 30°C에서 72시간 배양한 후 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Fig. 4). 본 균주는 7.0에서 8.0사이에서 높은 유화활성과 균체생육을 나타내었으며, pH 4.0에서 6.0범위에서 유화활성과 균체생육이 급격히 감소하였다. 이상의 결과로부터 *Acinetobacter* sp. A54의 생육 최적 pH는 약알칼리 조건인 7.5 이고,

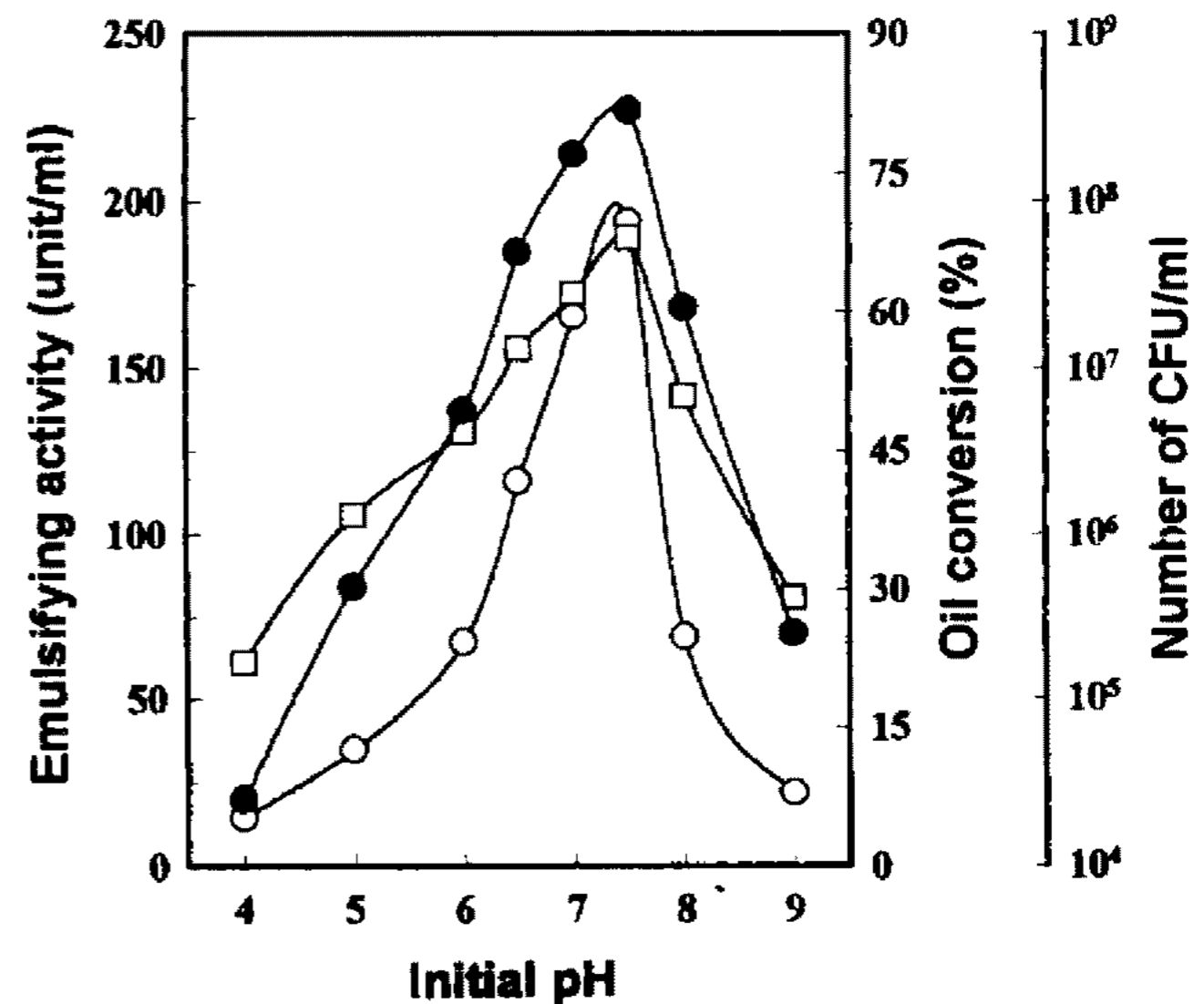


Fig. 4. Effect of initial pH on emulsifying activity, oil conversion, and cell growth in minimal salts medium containing crude oil.

●, Cell growth; ○, Emulsifying activity; □, Oil conversion. Cultivation was made for 3 days at 30°C on a reciprocal shaking. Initial pH of minimal salts medium containing 1% crude oil was adjusted with 1 N NaOH or 1 N HCl.

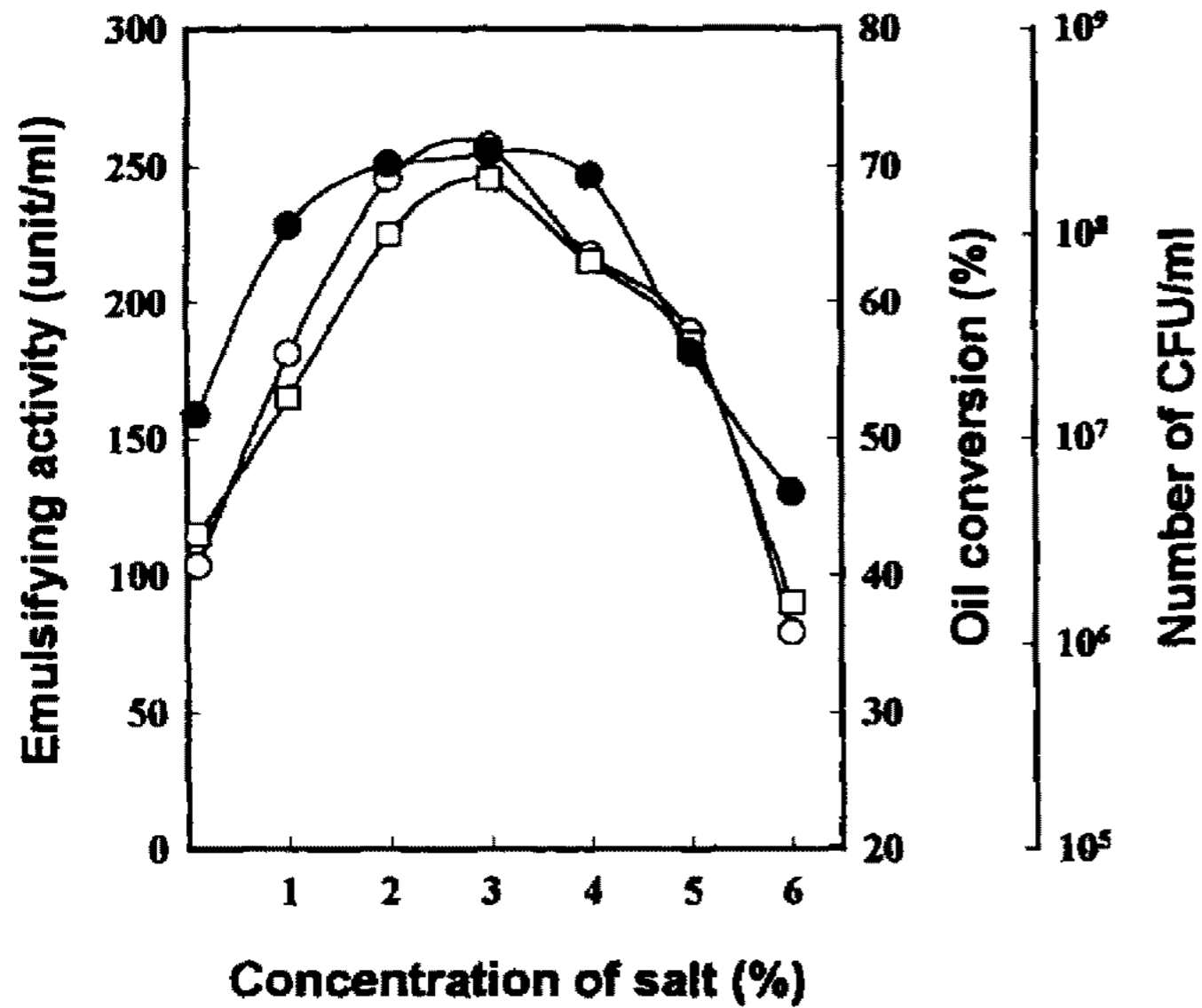


Fig. 5. Effect of salt concentration on emulsifying activity, oil conversion, and cell growth in minimal salts medium containing crude oil. ●, Cell growth; ○, Emulsifying activity; □, Oil conversion. NaCl ranging from 0.1 to 6% was added to minimal salts medium. Cultivation was done for 3 days at 30°C on a reciprocal shaking.

pH가 산성인 환경이 세균의 생육을 억제하는 제한요인으로 작용함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 Son 등(13)이 보고한 7.0과 윤 등(14)이 보고한 7.5와 유사하였다.

NaCl 농도의 영향

염분농도가 원유의 유화활성과 균체생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1~6.0% NaCl농도 범위의 원유 최소배지에서 72시간 배양한 후 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 조사하였다(Fig. 5). 그 결과 2.0~4.0%까지는 유화활성이 높았지만 5.0% 이상의 염분농도에서는 유화활성이 현저히 떨어졌다. *Acinetobacter* sp. A54는 넓은 범위의 염분농도에서 생육은 가능하나 0~4.0%에서 높은 유화활성을 보였으며, 5.0% 이상의 염분농도에서의 유화활성 감소는 환경적인 stress의 작용으로 사료된다. 이와 같은 결과는 미생물의 생육이 적정염분 이상 또는 이하에서 호흡률이 증가하게 되고, 이는 stress로 작용한다는 Griffiths 등(15)의 보고와 염분농도가 수계의 모든 생물군집에 중대한 영향을 미치는 환경요인으로 작용한다는 Rheinheimer(16)와 Ward 등(17)의 보고와 일치하였다.

원유농도의 영향

원유농도에 따른 유화활성과 균체생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 원유를 0.1~5.0%로 조절하여 최소배지에 첨가한 후 72시간 배양하여 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Fig. 6). 그 결과 2.0%에서 최고의 유화활성과 균체생육을 보였으나, 그 이상의

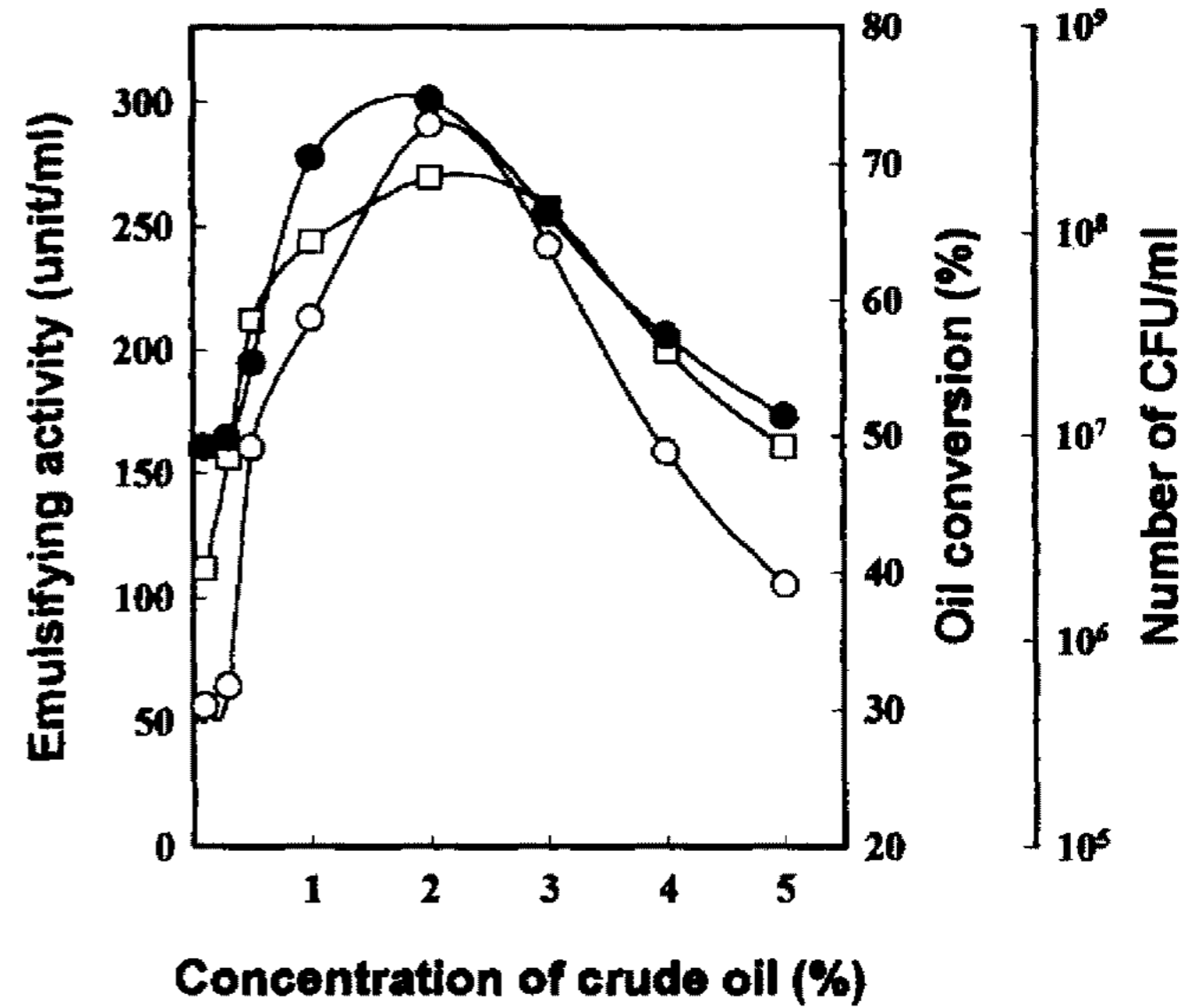


Fig. 6. Effect of crude oil concentration on emulsifying activity, oil conversion, and cell growth in minimal salts medium. ●, Cell growth; ○, Emulsifying activity; □, Oil conversion. Crude oil ranging from 0.1 to 5% was added to minimal salts medium. Cultivation was done for 3 days at 30°C on a reciprocal shaking.

농도에서는 균체생육과 유화활성은 다소 감소하는 경향을 보였다. 원유는 미생물의 탄소 및 에너지원으로 이용되는 반면 다양한 용해성 독성성분이 포함되어 있어 미생물의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있으며(18), 본균주는 3.0% 이상의 원유농도에서 저해를 받는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 Son 등(13)의 2.0%와 같은 결과를 나타내었으나 윤 등(14)의 0.1%였다는 결과보다

Table 4. Effect of concentration of NH₄NO₃ and K₂HPO₄ on cell growth, emulsifying activity, and oil conversion of *Acinetobacter* sp. A54

Supplement ^a		Cell growth ^b (CFU/ml)	Emulsifying activity ^b (unit/ml)	Oil conversion ^b (%)
NH ₄ NO ₃ (mM)	K ₂ HPO ₄ (mM)			
0	0	2.6 × 10 ⁵	39.2	32
0	0.057	2.1 × 10 ⁶	90.1	46
1.25	0.057	5.1 × 10 ⁷	237.6	65
6.25	0.057	2.5 × 10 ⁸	323.5	80
12.5	0.057	9.8 × 10 ⁸	405.2	84
25.0	0.057	4.7 × 10 ⁸	358.0	79
12.5	0	3.2 × 10 ⁶	121.3	48
12.5	0.0057	6.7 × 10 ⁷	198.1	60
12.5	0.029	9.3 × 10 ⁷	233.0	70
12.5	0.115	8.4 × 10 ⁸	251.7	69

^aIn addition to supplement, each 250-ml Erlenmeyer flask contained 50 ml of minimal salts medium, 500 mg of crude oil and 1.0 ml of 1-day-old inoculum of A54. Cultivation was done at 30°C with reciprocal shaking (130 strokes/min). ^bMeasurements were performed after 3 days; the technique for estimating viable cell count, emulsifying activity, and oil conversion are described in Materials and Methods.

는 우수하였다.

무기질소 및 인의 영향

무기질소와 인 등의 물질이 유화활성과 균체생육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 최소배지에 NH₄NO₃, K₂HPO₄를 각각 농도별로 첨가하여 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Table 4). 그 결과 12.5 mM NH₄NO₃, 0.057 mM K₂HPO₄의 농도에서 최고의 유화활성과 균체생육을 보였다. 반면에 질소, 인 중에서도 어느 하나를 제외시키거나, 두 성분 모두를 제외한 대조구의 경우는 낮은 유화활성과 균체생육을 나타냄으로써 미생물에 의한 원유의 분해에 있어 질소와 인의 농도가 중요한 제한인자로 작용한다는 보고와 일치하였다(19-21).

잔류원유 성분분석

잔류원유의 분석은 배양시간별로 배양액에서 잔류원

유를 회수한 후 GC로 분석하여 원유분해 정도를 대조구와 비교하였다(Fig. 7). Arabian Light 원유는 주로 C₁₄~C₂₄의 n-alkane 성분을 함유하고 있다(22). 원유 액체배지에서 미생물을 접종하지 않은 상태의 대조구는 증발 또는 물리적인 요인에 의해 탄소수 C₇-C₁₁ 이하의 짧은 탄화수소 peak는 휘발성이 강하므로 weathering에 의한 자연적 감소되었을 것으로 사료된다(Fig. 7, A). 또한, 대조구와 비교해서 C₁₆(n-hexadecane) 이상의 n-alkane peaks는 배양시간에 따라 현저히 감소한 것으로 보아 비교적 고분자의 탄화수소를 쉽게 이용하고 특히, n-alkane계 석유화합물의 이용성이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 석유화합물 중에서 n-alkane계 물질이 가장 신속하게 분해된다는 결과와 일치하였다(23, 24).

요 약

Arabian Light 원유에 대한 분해능이 있는 균주를 순수분리하고, 이들 균주의 액체배양을 통하여 균체생육과 유화활성 및 원유 전환율을 검토하여 A54균주를 선별하였으며, 선별균주 A54의 형태학적 및 생화학적 그리고 생리학적인 특성을 조사한 후 *Acinetobacter* sp. A54로 명명하였다. *Acinetobacter* sp. A54의 배양 시간에 따른 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정된 결과, 균체수는 7.2×10⁹ CFU/ml였고, 유화활성과 원유 전환율은 각각 468 unit/ml와 약 63%로서 최대치에 도달하였다. 또한, 다양한 탄화수소를 탄소원으로 이용하였다. 원유분해를 위한 배양조건 및 환경인자의 영향을 조사한 결과 배양온도는 25℃, 초기 pH는 7.5, NaCl 농도는 2.0%이며, 5.0% 이상에서는 유화활성이 현저히 감소하였다. 원유농도는 2.0%, 무기염류의 농도는 12.5 mM NH₄NO₃, 0.057 mM K₂HPO₄로 나타났다. 또한, 잔류 원유의 GC 분석 결과 C₁₆(n-hexadecane) 이상의 n-alkane peaks가 현저히 감소하였다.

참고문헌

- Olivieri, R. P., A. Bacchin, N. Robertiello, L. O. Degen, and A. Tonolo. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 629-634.
- ZoBell, C. E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* **10**: 1-49.
- Bartha, R. and R. M. Atlas. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol.* **22**: 225-266.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradations of petroleum hydrocarbons: An environmental perspectives. *Microbiol. Rev.* **45**: 180-209.
- Atlas, R. M. and R. Bartha. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In K. Marshall(ed.)

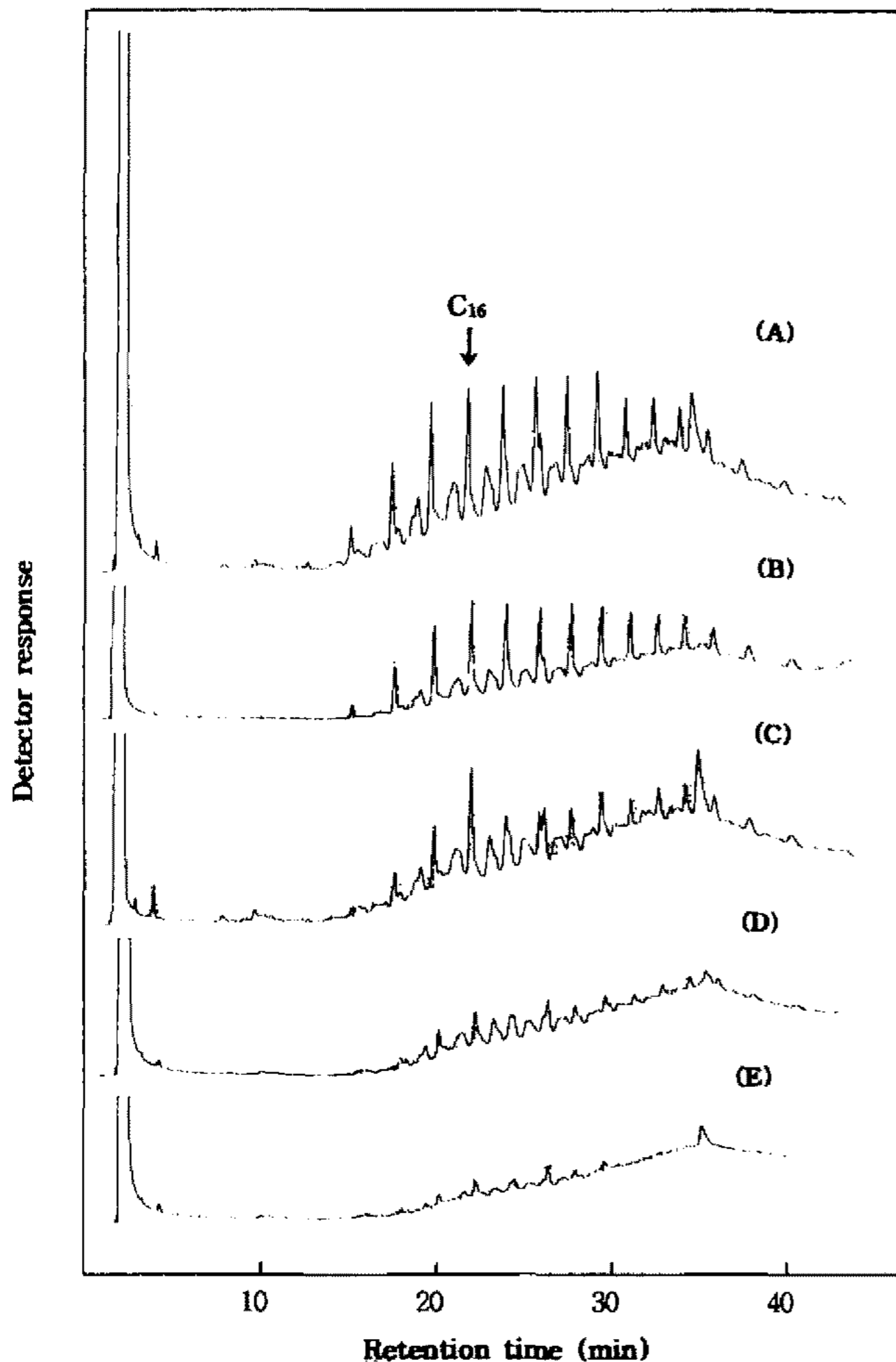


Fig. 7. Gas chromatograms of 1.0% (v/v) treated crude oil by *Acinetobacter* sp. A54. (A) Control after shaking for 4 days, without bacteria; (B) after growth for 1 day; (C) after growth for 2 days; (D) after growth for 3 days; (E) after growth for 4 days. The samples were extracted and concentrated 15-fold.

- Advances in Microbial Ecology Vol. 12, 287, Plenum Press, New York.
6. Hoff, R. Z. 1993. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Mar. Pollut. Bull.* **26**: 476-481.
 7. John, G. H., N. R. Krieg and P. H. A. Sneath. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.). Williams and Wilkins, Baltimore.
 8. Cowan, N. R. and K. J. Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria (2nd ed.). Cambridge University Press, London.
 9. Reisfeld, A., E. Rosenberg and D. Gutnick. 1972. Microbial degradation of crude oil: Factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Appl. Microbiol.* **24**: 363-368.
 10. Horowitz, A., D. Gutnick and E. Rosenberg. 1975. Sequential growth of bacteria on crude oil. *Appl. Microbiol.* **30**: 10-19.
 11. Zajic, J. E., H. Guignard and D. F. Gerson. 1977. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 1303-1320.
 12. Gatellier, C. R., J. L. Oudin, P. Fusey, J. C. Lacase and M. L. Priou. 1973. Experimental ecosystems to measure fate of oil spills dispersed by surface active products. In Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of oil spills. p. 497. American Petroleum Institute. Washington, D.C.
 13. Hong-Joo Son, Sun-Hee Go, Geon Lee, and Sang-Joon Lee. 1996. Emulsification of crude oil by *Acinetobacter* sp. SH-14. *Kor. J. Microbiol.* **34**: 363-369.
 14. 윤희정, 김상진, 민경희. 1993. 저온성 세균 *Acinetobacter calcoaceticus* A1-1의 원유분해 특성. *산업미생물학회지.* **21**: 74-81.
 15. Griffiths, R. P., B. A. Calduell and K. Y. Morita. 1984. Observations on microbial percent respiration values in arctic and subarctic marine waters and sediments. *Microb. Ecol.* **10**: 151-164.
 16. Rheinheimer, G. 1981. *Microbiologie der gewässerser.* 3rd. ed. p. 251. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
 17. Ward, D. M. and T. D. Brock. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 353-359.
 18. Oh, Y. S. and S. J. Kim. 1987. Numerical taxonomy of petroleum degrading bacteria isolated from Nakdong river Estuary. *J. Kor. Wat. Pollut. Res. Contr.* **3**: 30-39.
 19. Atlas, R. M. and R. Bartha. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 309-317.
 20. Ward, D. M. and T. D. Brock. 1976. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperature lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 764-772.
 21. Cooney, J. J., S. A. Silver and E. A. Beck. 1985. Factors influencing hydrocarbon degradation in the freshwater lakes. *Microbiol. Ecol.* **11**: 127-137.
 22. Colwell, R. R., J. D. Walker and L. Petvakis. 1975. Microbial petroleum degradation: Use of computerized mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.* **21**: 1760-1767.
 23. Raymond, R. L., V. W. Jamison and J. O. Hudson. 1967. Microbial hydrocarbon Co-oxidation. I. Oxidation of mono- and dicyclic hydrocarbons by soil isolates of the genus *Nocardia*. *Appl. Microbiol.* **15**: 857-865.
 24. Kator, H., R. Miget and C. H. Oppenheimer. 1972. Utilization of paraffin hydrocarbons in crude oil by mixed cultures of marine bacteria. Paper No. SPE 4206. Symposium on Environmental Conservation. Society of petroleum Engineers. Dallas, Tex.

(Received 2 May 1997)