

Hydrocarbon Uptake Modes에 따른 유류분해 미생물 혼합제의 원유분해능

고 성 환 · 이 홍 금 · †김 상 진

한국해양연구소 해양생물부 미생물연구실
(접수 : 1997. 7. 20., 게재승인 : 1998. 10. 13.)

Effect of Hydrocarbon Uptake Modes on Oil Degradation Rate by Mixed Cultures of Petroleum Degraders

Sung-Hwan Ko, Hong Kum Lee, and Sang-Jin Kim†

Microbiology Lab., Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 425-600, Korea

(Received : 1997. 7. 20., Accepted : 1998. 10. 13.)

In this study, biodegradation rate of Arabian light crude oil by mixed cultures of selected petroleum-degraders was determined. Their modes of hydrocarbon uptake were then observed to determine whether there are differences in biodegradation rate by the mixed cultures. By the mixed cultures of petroleum-degraders having same modes of hydrocarbon uptake, such as strain US1 and K1(using pseudo-solubilized hydrocarbons by a biosurfactants), K2-2 and P1(using hydrocarbons by direct contact), CL180 and IC-10(mixed type of uptake modes), the biodegradation rates of aliphatics in the crude oil were increased more than those by their pure cultures, about 40%, 25% and 20%, respectively. Biodegradation rate of strain KH3-2(using only water-dissolved hydrocarbons) was increased by mixed cultures with strain K1, CL180 or IC-10 possessing high emulsifying activity. However, the biodegradation rate of the crude oil was decreased about 20%-40% by the mixed cultures of petroleum-degraders having different mode of hydrocarbon uptake, such as addition of strain US1 or K1 in the cultures of K2-2 or P1. Biosurfactants produced by US1 or K1 seems to enhance the emulsification of crude oil in aqueous phase but inhibit the attachment of K2-2 or P1 to crude oil. As same phenomena, the addition of Triton X-100 into the culture of strain US1, K1, CL180, IC-10 or KH3-2 increased the biodegradation rate, but the addition in the culture of strain K2-2 or P1 decreased the biodegradation rate. The mixed culture made of CL180, IC-10 and KH3-2 degraded 61.5% of aliphatics and 69% of aromatics in 3% (v/v) of Arabian light crude oil added

Key Words · Hydrocarbon uptake mode, Mixed Culture, Biodegradation, Crude oil, Surfactant

서 론

환경은 그 스스로의 자연정화 능력이 있어 원유나 석유화학 제품 등을 포함한 많은 xenobiotics compounds에 의해 오염이 일어 날 지라도 자연계에 존재하고 있는 미생물에 의해 생분해가 가능하다. 그러나 이와 같은 자연정화는 그 속도가 매우 느리게 진행되므로 정화속도를 빠르게 할 목적으로 생물정화기술이 등장하게 되었다. 또한, 최근 해상 유류유출 사고에 의해 오염된 환경을 복원하기 위한 방법으로 생물정화기술(bioremediation)이 많은 관심의 대상이 되고있다(26, 31).

생물정화기술에는 영양분첨가(질소원, 인원, 산소공급 등)에 의한 토착미생물 활성증가방법, 계면활성제 첨가 및 분해능이 우수한 미생물의 첨가에 의해 분해속도를 증진시키는 방법 등이 존재하며, 이와 같은 방법은 한가지만을 이용하기보다는 서로 병행하여 실시하는 경우가 많다. 실제로 현재까지 특허출원 되어 사용하고 있는 많은 생물정화제의 경우 영양분과 미생물 혹은 계면활성제와 미생물이 혼합되어 있다(26). 특히 이와 같은 미생물정화제는 단일 균주만을 사용하는 것이 아니라 여러 균주가 혼합되어 사용된다. 이는 원유의 대표물질인 aliphatics, aromatics, resins와 asphaltenes 등의 분해경로가 달라 단일 균주에 의한 완전분해는 기대하기 어렵기 때문이다(5-6, 10).

한편, 혼합 미생물정화제의 현장적용에 대해서는 다양한 결과가 보고되고 있다(32). Rosenberg 등(28)은 heavy crude oil 유출에 의해 오염된 이스라엘의 한 모래해변을 정화하기 위해 F-1이라는 친유성 영양염제와 이 체제를 분해하여 이용할 수 있는 3종류의 유류분해 미생물을 혼합하여 처리한 결과, 25일 후에

† Corresponding Author : Microbiology Lab, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 425-600, Korea
Tel : 0345-400-6241, Fax : 0345-408-5934

약 84.5% 정도가 분해되어 대조구에 비해 그 정화속도가 훨씬 빠르게 진행되었다고 보고하였다. 또한 김 등(3)도 Bunker-C에 오염된 거제도 동부해변에서 수행된 현장실험에서 3종류의 유류분해 미생물을 혼합하여 처리해 준 결과 14일 후에 약 44% 정도가 분해되어 대조구에 비해 그 정화속도가 훨씬 빠르게 진행되었다고 보고하였다. 그러나, Lee와 Levy(17) 및 Tagger 등(33)은 유류분해능이 우수한 해양 미생물 혼합제제를 유류오염 지역에 첨가한 결과 대조구와 별 차이를 나타내지 않았을 뿐만 아니라 60일 이후에는 첨가한 미생물들을 거의 찾아볼 수가 없었다고 보고하였고, 이는 첨가한 제제내의 미생물이 자연환경 변화(특히 온도변화)에 적응하지 못하였기 때문이라고 하였다. 또한 Ko(16)는 유류분해능이 우수한 두 균주를 가지고 혼합배양을 하였을 경우 두 미생물의 hydrocarbon uptake mode 및 성장특성 차이에 따라 유류분해 속도가 토착 미생물만을 이용할 경우보다 저하됨을 보고하였다.

이와 같이 원유분해능 향상을 위한 혼합 미생물제제의 개발시 유류분해능이 우수한 미생물을 혼합할 경우라도 혼합된 미생물의 성장특성에 따라 오히려 전체적인 원유분해에는 역효과를 초래할 수도 있다 따라서 본 연구에서는 우수 유류분해 미생물의 혼합배양에 따른 유류 분해를 변화시킬 혼합된 균주들의 hydrocarbon uptake mode로 설명하고, 최적의 혼합조건을 찾고자 한다.

재료 및 방법

배양 배지 및 배양 조건

유류분해 미생물의 분리 및 배양과 탄화수소 분해능 실험 등에 사용한 최소배지(MSM: Mineral Salt Medium)의 조성은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 2.0 g, $(\text{Na})_2\text{HPO}_4$ 2.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.05 g, FeCl_3 10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mg, Na_2MoO_4 2 mg, ZnCl_2 2 mg, aged sea water 750 mL, distilled water 250 mL이고 pH는 7.0으로 조절하였다. 특별한 언급이 없는 경우 hydrocarbon의 농도는 3% (v/v)가 되도록 첨가하였고, 온도는 25°C에서 배양하였으며 진탕배양시 진탕 속도는 120 rpm으로 하였다.

우수 유류분해 미생물 선발

우수 유류분해 미생물 선발을 위해 150종의 유류분해 세균(해양연구소, 1-4)에 대한 탄화수소 분해능을 정밀 조사하였다.

탄화수소 분해능은 LB 배지(trypton 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L)에서 24시간 배양한 후 이 배양액을 20 mL MSM 배지가 첨가된 250 mL 삼각플라스크에 2% (v/v)가 되도록 접종하고, 탄소원으로 SHM(saturated hydrocarbon mixture: nC8 2 mL, nC10 3 mL, nC12 5 mL, nC13 5 mL, nC14 5 mL, nC16 5 mL, nC17 5 mL, nC18 5 mL, pristane 5 mL, cyclohexane 5 mL, methylcyclohexane 5 mL) 및 AHM(aromatic hydrocarbon mixture: benzene 15 mL, toluene 15 mL, xylene 15 mL, naphthalene 4 g, fluorene 1 g, acenaphthene 2 g, fluoranthene 1 g, phenanthrene 2 g, anthracene 1 g, chrysene 0.3 g, pyrene 0.5 g, benzo(a)pyrene 0.5 g)를 3% (v/v)가 되도록 첨가하여 25°C에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하여 분해능이 우수하고 재현성이 좋은 균주를 선

발하였다.

이 방법에 의해 분해능이 우수하고 재현성이 좋은 *Acinetobacter* sp. US1, *Corynebacterium variabilis* IC-10, *Yarrowia lipolytica* CL180, *Spingomonas yanoikuyae* KH3-2, *Acinetobacter* sp. K2-2 등 5종의 균주(1-4)와 프랑스 품피엔뉴 공대에서 분양 받은(16) *Pseudomonas aeruginosa* K1과 *Rhodococcus equi* P1을 선발하였다.

선발된 미생물을 HCM(hydrocarbon mixture: 1.5% (v/v) SHM + 1.5% (v/v) AHM) 및 Arabian light crude oil을 20 mL MSM 배지에 3% (v/v)가 되도록 첨가하여 25°C에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하여 분해능을 조사하였다.

선발 유류분해 미생물의 성장특성

선발균주의 성장특성은 현미경상으로 기름구 형성정도 및 미생물의 성장형태(기름층 혹은 수층에 존재하는 비율) 등을 관찰하였으며, cell hydrophobicity 측정(27) 및 유화능을 측정(37)하여 각 균주의 특성을 분류하였다.

Cell surface hydrophobicity 측정은 탄화수소가 첨가된 MSM배지에 배양된 배양액을 2 mL 취한 뒤 0.4 mL Triton X-100을 첨가하고 강하게 1분간 교반한다. 이를 원심분리(10,000×g, 15 min)한 다음 침전된 균체를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척하여 동량의 MSM 배지로 현탁시킨다. 이 액에 n-hexadecane 0.2 mL을 첨가한 후 1분간 강하게 교반한다. 20분간 정지 후 수층만을 조심스럽게 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 초기치와 비교하여 %로 나타낸다.

$$\text{Hydrophobicity}(\%) = [1 - (\text{후기흡광도}/\text{초기흡광도})] \times 100$$

유화도 측정은 배양액을 2 mL 취한 뒤 원심분리(10,000×g, 15 min)하여 기름층과 균체를 제거시킨 후 여액을 여과(Seoul Science Co, pore size 0.45 μm)한다. 여과액 0.5 mL을 취하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 첨가한 다음 이 액에 n-hexadecane 0.1 mL을 첨가한 후 1분간 강하게 교반한다. 10분간 정지 후 수층에 유화되어 있는 n-hexadecane을 610 nm에서 흡광도로 측정한다. 이 방법으로 배양액에 있는 제면활성물질의 존재 유무와 활성을 간접적으로 측정할 수 있다.

선발된 유류분해 미생물의 혼합배양

선발된 우수 유류분해 미생물을 대상으로 이들의 혼합배양이 유류분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 선발된 미생물을 LB배지에 접종하여 24시간 진탕배양한 후 3% (v/v) Arabian light crude oil이 첨가된 20 mL의 MSM 배지에 균체 현탁액을 접종하여 25°C에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하였다. 균체 현탁액을 접종할 때 순수배양은 단일균주를 2% (v/v) 접종하였고, 혼합배양은 혼합된 수에 비례하여 총 2% (v/v)로 조정하여 접종하였다.

탄화수소 분해능 실험은 duplicate로 3회 이상 반복 수행하여 그 결과를 통계 처리하였다.

Triton X-100 첨가효과

Triton X-100 첨가가 유류분해에 미치는 영향을 보기 위해

3% (v/v)의 Arabian light oil이 첨가된 MSM 배지에 0.05% (v/v)의 Triton X-100을 첨가한 후 균체 현탁액을 접종하여 25°C에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하였다. 첨가된 Triton X-100이 유류분해 미생물의 활성에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 LB 배지에 0.05% (v/v)를 첨가하여 Triton X-100이 첨가되지 않은 대조구와 성장속도를 비교하여 영향이 없음을 확인하였다.

잔류 탄화수소 분석

탄화수소 분석은 배양액을 분액 깔대기에 넣고 표준물질로 stearyl alcohol을 최종 3750 mg/L가 되도록 첨가한 후 동량의 chloroform으로 2회 추출하였다. 추출과정 중 emulsion이 형성될 때에는 1 N HCl 혹은 NaOH을 첨가하거나 원심분리 등을 통하여 제거시켜 주었으며 수분제거를 위해서는 1 g의 무수황산나트륨을 사용하였다. 잔류성분 함량을 분석하기 위하여 TLC/FID를 이용하였다(12, 25)

본 연구에서는 Goto 등(12)의 방법에 준하여 분석방법과 표준곡선을 잡았으며 자세한 과정은 다음과 같다

Chloroform으로 추출된 유류 1 μ L를 TLC/FID용 전개 유리막대(Chromarod-SIII, coated with silica, Iatroscon Lab., Japan)에 점적한다 점적된 유리막대는 100% n-hexane을 1차 전개용매로 하여 10 cm정도 전개시킨다(약 30분 소요). 2차 전개용매로는 n-hexane: toluene(1:4, v/v)을 사용하며 약 5 cm정도 전개시킨다(약 10분 소요) 2차에 걸친 전개 후 aliphatic 성분이 약 10 cm정도, aromatic 성분이 약 5cm정도 전개되며, 원점에는 resin 및 asphaltene 성분이 남아있다. 마지막으로 dichloromethane:methanol(19:1, v/v)로 2분간 전개하면 resin이 이동하고 원점에는 asphaltene이 남는다. 3차 전개 결과 유류를 aliphatic과 aromatic, resin, asphaltene의 네 가지 성분으로 분석할 수 있다. Iatroscon MK5(Iatroscon Lab., Japan)를 이용

하여 scanning하여 각 성분의 상대면적을 계산하면 측정대상 유류내의 성분을 알아볼 수 있다. Carrier gas로 수소를 160 mL/min으로 주입하였다.

본 실험에서는 표준물질로 stearyl alcohol을 이용하였는데, 이는 3차 전개 후 resin 부분과 겹치게 되므로 2차 전개까지만 하였고 그 결과 유류성분은 aliphatic, aromatic, stearyl alcohol 순으로 전개되어지고 resin과 asphaltene은 원점에 머물게 된다.

이 방법은 휘발성이 높은 물질은 상당부분 제거되고, 자연계에 유출된 유류의 경우 휘발성이 높은 물질은 유출 후 24시간 이내에 대부분이 제거(휘발)되므로(26) 본 연구에서도 고려대상에 포함하지 않았다 분해를 측정은 균을 첨가하지 않은 대조 플라스크에 넣은 유류량에 대한 비로 잔류량을 계산하여 표시하였다

결 과

우수 유류분해 미생물 선별

선별된 7종의 우수균주(*Acinetobacter* sp. US1, *Corynebacterium variabilis* IC-10, *Yarrowia lipolytica* CL180, *Spingomonas yanokuyae* KH3-2, *Acinetobacter* sp. K2-2, *Pseudomonas aeruginosa* K1과 *Rhodococcus equi* P1)의 탄화수소 분해능은 Table 1에서 보는바와 같이 strain US1, K1, CL180, K2-2와 P1은 지방족 탄화수소의 분해능이 우수하였고, 이중 CL180과 P1 균주의 분해능이 90% 이상으로 특히 우수하였다. KH3-2는 방향족 탄화수소 분해능이 주로 존재하였고, IC-10은 지방족 및 방향족 탄화수소 분해능을 소유하였다. 한편, 인위적으로 제조된 탄화수소 혼합물(HCM)의 분해에서 K1, CL180 및 P1 균주는 지방족 탄화수소뿐만 아니라 방향족 탄화수소도 분해하였다. 또한 KH3-2의 경우 naphthalene, phenanthrene, fluorene, biphenyl, benzothiophene 등만을 분해하는

Table 1. Biodegradation rate (%) of various hydrocarbons by selected strains

Strains	SHM ^a	AHM ^b	HCM ^c		Arabian light oil ^d	
			Aliphatics	Aromatics	Aliphatics	Aromatics
US 1	60.5±0.8	11.9±4.7	35.6±0.2	11.2±1.4	31.8±3.0	19.6±2.9
K 1	80.0±1.5	7.7±2.6	53.4±0.5	46.2±3.4	34.5±0.8	28.2±2.7
K 2-2	60.4±1.1	9.4±1.5	38.4±0.9	10.5±1.2	27.5±8.1	16.9±0.4
P 1	96.7±0.6	15.2±3.3	48.7±0.2	56.1±0.7	34.9±2.0	18.4±7.1
KH3-2	1.4±0.4	46.2±0.9	27.6±0.4	47.6±1.1	40.1±3.4	8.2±2.4
CL180	92.2±0.5	3.1±1.7	80.4±0.4	60.3±0.8	43.9±2.9	9.6±4.5
IC-10	42.8±0.7	43.2±2.6	71.7±0.6	77.0±1.5	39.2±0.7	15.9±2.2

SHM^a had the following composition: 2ml of nC8, 3ml of nC10, 5ml of nC12, 5ml of nC13, 5ml of nC14, 5ml of nC16, 5ml of nC17, 5ml of nC18, 5ml of Pristane, 5ml of Cyclohexane and 5ml of Methylcyclohexane. It was added to 3% (v/v).

AHM^b had the following composition: 15ml of Benzene, 15ml of Toluene, 15ml of Xylene, 4g of Naphthalene, 2g of Acenaphthene, 1g of Fluorene, 2g of Phenanthrene, 1g of Anthracene, 1g of Fluoranthene, 0.5g of Pyren, 0.3g of Chrysene, 0.5g of Benzo(a)pyrene. It was added to 3% (v/v).

HCM^c was the mixture of SHM (1.5%, v/v) and AHM (1.5%, v/v).

Arabian light oil was added in 3% (v/v).

The remaining hydrocarbons were detected by TLC/FID.

The culture was incubated at 25°C, 120 rpm for 7days.

것으로 나타났으나(4), 이 균주를 AHM에서 배양한 결과 pyrene, chrysene, benzo(a)pyrene 등 난분해성 PAHs(polycyclic aromatic hydrocarbons)도 분해되는 것으로 나타났다(data 생략). 이와 같이 K1, CL180, P1 및 KH3-2가 단일기질로는 이용하지 못하였던 것을 자신이 이용할 수 있는 기질과 혼합시켰을 때 분해된 것은 co-oxidation 현상으로 사료되며(21, 23, 25), 이에 대해서는 좀 더 세부적인 연구를 수행 할 필요성이 있다. 또한 co-oxidation 현상을 이용하면 난분해성 물질인 cyclo-alkanes, PAHs 및 원유내의 극성물질인 NSO(Nitrogen, Sulfur, Oxygen) 화합물 분해 등에 많은 효과를 볼 수 있으리라 기대된다(13, 24, 29).

Arabian light oil에 대한 이들 균주의 분해능은 비교적 낮아 지방족 탄화수소가 약 30-40% 정도 분해되었고 방향족은 10-20% 정도만이 분해되었는데, 이는 복합화합물인 원유내의 어떤 toxic effect에 의한 것으로 추정된다

선발 유류분해 미생물의 성장특성

선발된 우수 유류분해 미생물의 탄화수소 배지에서 성장특성을 현미경상으로 기름구 형성정도 및 배양액내 기름구로의 미생물 흡착정도 등을 관찰하였으며, Rosenberg 등(27)의 방법에 의한 cell hydrophobicity 측정 및 Zajic 등(37)에 의한 유화능을 측정하여 각 균주의 특성을 분류하였다.

Figure 1에서 보는바와 같이 이들 7종의 균주는 크게 4가지 형태의 hydrocarbon uptake modes로 분류할 수 있었다(11, 16, 30). 먼저 낮은 cell hydrophobicity와 높은 유화능을 가진 부류로 US1과 K1 등이었으며(Group 1), 현미경 관찰시 배양액내에 많은 기름구가 형성된 것을 관찰할 수 있었고 그 크기도 배양기간에 따라 점차 작아지는 것이 관찰되어 이 균주들은 탄화수소를 이용하기 위하여 어떤 biosurfactants를 생성하는 것으로 사료된다. 특히 이 균주들은 배지내에 형성된 기름구에 거의 흡착하고 있지 않은 것으로 미루어, 탄화수소를 이들이 생성한 biosurfactants에 의해 자신들보다 크기가 작은 유화된 탄화수소(pseudo-solubilized hydrocarbons)를 이용하는 것으로 사료된다.

그 다음, 첫번째 부류와는 특성이 정반대인 높은 cell

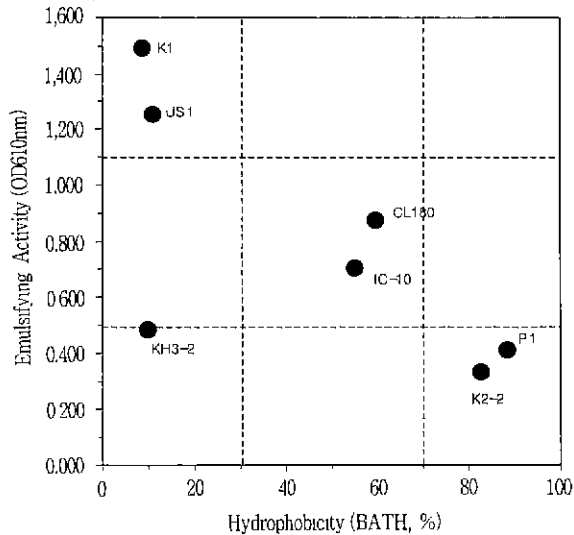


Figure 1. Properties of selected petroleum-degraders grown on 3% (v/v) of hydrocarbon mixture (HCM).

hydrophobicity와 낮은 유화능을 가진 부류로 이에는 P1 및 K2-2 등을 들 수 있고(Group 2), 배양액을 현미경으로 관찰한 결과 기름구를 전혀 관찰할 수 없었고 이 균주들 대부분이 기름층에 흡착되어 있는 것으로 미루어 탄화수소를 직접접촉에 의해 이용한다고 사료된다

세번째로는 cell hydrophobicity와 유화능 모두가 낮은 부류로 KH3-2가 속하였다(Group 3), 이 부류의 hydrocarbon uptake는 미미하나마 탄화수소가 물에 대한 용해도를 가지고 있으므로, 이와 같이 물로 용해되어 들어온 탄화수소만을 이용하게 된다(35-36) 마지막으로 이들의 혼합형태를 가지고 있는 부류로써 대부분의 미생물들이 이 형태를 취하고 있는 것으로 사료되며, 이에는 CL180 및 IC-10 등을 들 수 있었다(Group 4).

선발된 유류분해 미생물의 혼합배양

선발된 우수 유류분해 미생물을 대상으로 이들의 혼합배양이 유류분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 탄소원으로 3% (v/v) Arabian light crude oil이 첨가된 MSM 배지에 균체 현탁액을 2% (v/v)되게 집중하여 25℃에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하였다.

Table 2는 이들 균주의 순수 및 혼합배양시 원유내 지방족 탄화수소의 분해율을 나타낸 것으로 각각의 순수배양보다 분해능이 증가된 혼합은 Figure 1에 나타난바와 같이 hydrocarbon uptake mode가 같은 부류인 US1과 K1(Group 1), K2-2와 P1(Group 2) 및 CL180과 IC-10(Group 4)으로 각각 40%, 25% 및 20% 정도 증가되었고, KH3-2(Group 3)는 다른 균주와의 혼합에서 분해율이 대부분 증가되었다 특히 KH3-2와 IC-10의 혼합은 약 26% 정도의 증가율을 나타냈다. 이 외에 CL180에 K1이나 P1을 혼합한 경우도 약 20% 정도 분해율이 증가되었다. 반면, hydrocarbon uptake mode가 서로 상반되는 부류인 US1이나 K1에 K2-2나 P1을 혼합한 경우와 P1에 IC-10을 혼합한 경우는 분해능이 오히려 약 20-40% 정도 감소됨을 나타냈다.

Table 3은 방향족 탄화수소의 분해율을 나타낸 것으로 KH3-2에 K1 혹은 K2-2의 혼합과 P1과 CL180의 혼합에서 약 20% 정도 증가하였고, KH3-2에 CL180을 혼합한 경우 약 86%의 증가를 보였으나 실제 분해율은 18% 정도로 미미하였다. 그 외에 순수배양이나 혼합배양시 방향족 탄화수소의 분해율은 별 차이가 없었다

한편, 순효과를 나타낸 hydrocarbon uptake mode가 같은 부류의 혼합배양에 다시 다른 종을 첨가하여 원유 분해율을 관찰한 결과 원유내 지방족 탄화수소의 분해율을 보면, US1과 K1(Group 1)의 혼합 및 CL180과 IC-10(Group 4)의 혼합에 KH3-2를 첨가한 경우 각각 52.3%(9% 상승) 및 61.5%(17% 상승)의 분해율을 보였고, K2-2와 P1(Group 2)의 혼합에 CL180을 첨가한 경우 47.9%(9% 상승)의 분해율을 보였다(Figure 2) 반면 K2-2와 P1의 혼합에 hydrocarbon uptake mode가 서로 상반되는 부류인 US1이나 K1을 첨가한 경우 분해능이 50% 이상 감소됨을 관찰하였고, US1과 K1의 혼합에 K2-2이나 P1을 첨가한 경우는 25% 이상 분해능이 감소하였다. 또한, CL180과 IC-10의 혼합에 US1이나 K1을 첨가한 경우도 분해능이 약 30% 이상 감소하였다.

방향족 탄화수소의 경우, 각 혼합배양에 KH3-2를 첨가했을

Table 2. Biodegradation rate (%) of aliphatic compounds in Arabian light oil by pure cultures and mixed cultures of two strains.

		Group 1		Group 2		Group 3	Group 4	
		US 1	K 1	K 2-2	P 1	KH3-2	CL180	IC-10
Group 1	US 1	31.8±3.0						
	K 1	48.0±2.3	34.5±0.8					
Group 2	K 2-2	20.8±4.2	20.0±2.6	27.5±8.1				
	P 1	20.2±2.5	15.9±0.4	43.8±0.3	34.9±2.0			
Group 3	KH3-2	43.3±2.0	43.5±0.2	41.2±4.5	44.7±2.3	40.1±3.4		
Group 4	CL180	44.2±0.5	53.2±0.4	43.1±0.3	53.2±3.6	43.6±2.2	43.9±2.9	
	IC-10	31.3±4.7	40.6±2.6	37.3±1.3	23.8±1.5	50.6±1.8	52.5±0.5	39.2±0.7

Arabian light oil was added to 3% (v/v).

The culture was incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days.

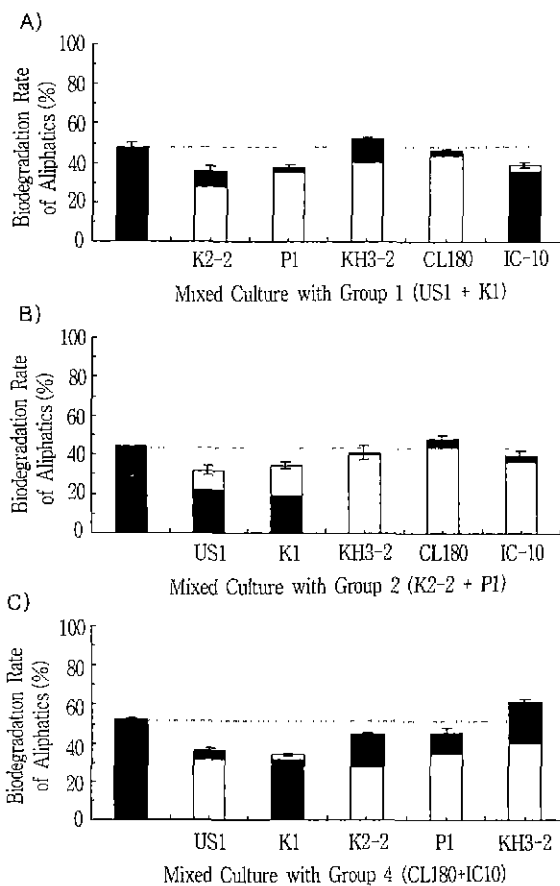


Figure 2. Effect of mixed cultures on biodegradation rate (%) of aliphatics in Arabian light oil. White bar represents the biodegradation rate by pure cultures, and solid bar represents the biodegradation rate by mixed culture.

때 분해율 향상이 관찰되었고, 특히 CL180과 IC-10의 혼합에 KH3-2를 첨가한 경우 69%(3.5배 상승)의 높은 분해율을 보였다(Figure 3). 그러나 K2-2와 P1에 US1이나 K1을 첨가한 경우 지방족 탄화수소와 마찬가지로 분해능이 50% 이상 감소됨을 관찰하였다.

따라서 우수 유류분해 미생물계 개발을 위한 최적 균주혼합은 CL180, IC-10과 KH3-2의 혼합이었고, 이들 혼합균주에 의

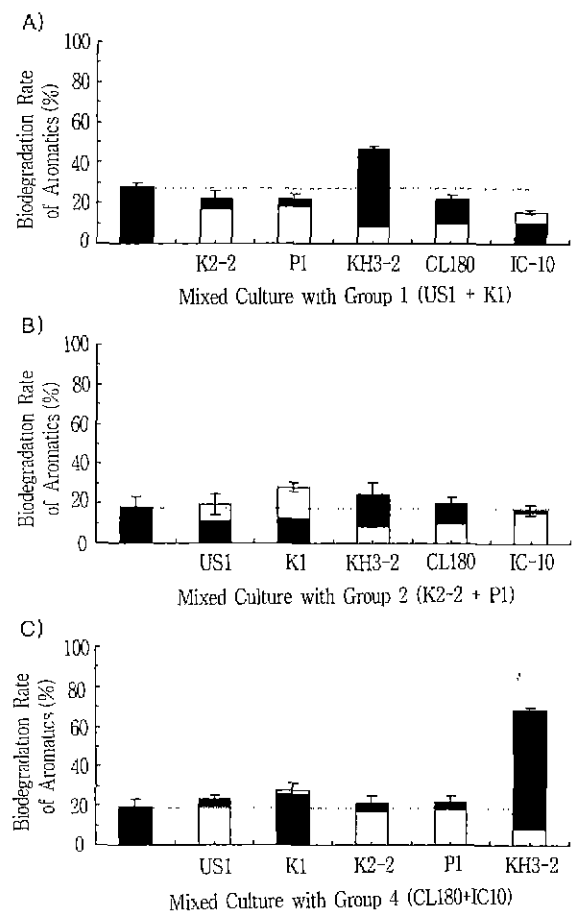


Figure 3. Effect of mixed cultures on biodegradation rate (%) of aromatics in Arabian light oil. White bar represents the biodegradation rate by pure cultures, and solid bar represents the biodegradation rate by mixed culture.

해 첨가된 3% (v/v) Arabian light oil의 지방족 및 방향족 탄화수소가 각각 61.5% 및 69% 제거되는 높은 분해율을 보여주었다.

Triton X-100 첨가효과

계면활성제 첨가가 유류분해에 미치는 영향을 보기 위해 3% (v/v)의 Arabian light oil이 첨가된 MSM 배지에 0.05% (v/v)

Table 3. Biodegradation rate (%) of aromatic compounds in Arabian light oil by pure cultures and mixed cultures of two strains.

		Group 1		Group 2		Group 3	Group 4	
		US 1	K 1	K 2-2	P 1	KH3-2	CL180	IC-10
Group 1	US 1	19.6±2.9						
	K 1	28.2±1.5	28.2±2.7					
Group 2	K 2-2	16.0±4.7	14.4±4.5	16.9±0.4				
	P 1	14.7±1.6	18.3±1.4	18.2±5.1	18.4±7.1			
Group 3	KH3-2	17.7±1.8	34.0±1.9	20.7±1.5	14.8±3.4	8.2±2.4		
Group 4	CL180	14.4±0.9	18.8±1.6	12.4±3.6	23.0±3.5	17.9±3.0	9.6±4.5	
	IC-10	15.0±1.3	17.6±5.2	12.1±3.4	12.5±6.1	13.0±0.5	19.7±3.4	15.9±2.2

Arabian light oil was added to 3% (v/v).

The culture was incubated at 25°C, 120 rpm for 7days.

Table 4 Effect of Triton X-100 on the biodegradation rate (%) of alphatic compounds in Arabian light oil.

		without Triton X-100	with Triton X-100		without Triton X-100	with Triton X-100
Group 1	US1	32.6±0.5	36.4±1.2	US1+K1	46.7±1.3	53.5±0.8
	K1	34.6±0.7	40.5±2.3			
Group 2	K 2-2	25.5±4.6	16.5±3.5	K2-2+P1	40.6±0.7	22.3±3.1
	P1	36.2±2.5	24.3±3.1			
Group 3	KH3-2	34.1±1.2	34.2±0.3	CL180+IC-10	51.0±2.0	56.3±1.6
Group 4	CL180	45.0±2.3	52.4±2.1			
	IC-10	31.6±1.3	46.9±2.3	CL180+IC-10 +KH3-2	60.8±3.4	62.5±0.4

Triton X-100 was added to 0.05% (v/v) and Arabian light oil was added to 3% (v/v).

The culture was incubated at 25°C, 120 rpm for 7days.

Table 5. Effect of Triton X-100 on the biodegradation rate (%) of aromatic compounds in Arabian light oil.

		without Triton X-100	with Triton X-100		without Triton X-100	with Triton X-100
Group 1	US1	20.1±1.5	27.5±3.1	US1+K1	27.5±1.3	30.8±1.6
	K1	25.4±5.2	36.5±4.1			
Group 2	K 2-2	17.5±0.4	10.4±0.6	K2-2+P1	19.1±3.5	18.4±1.6
	P1	16.6±4.1	9.1±3.3			
Group 3	KH3-2	10.1±0.6	31.8±2.5	CL180+IC-10	19.1±1.2	34.8±0.3
Group 4	CL180	10.5±5.6	35.5±5.2			
	IC-10	17.5±2.3	47.4±0.6	CL180+IC-10 +KH3-2	65.5±2.3	69.2±0.9

Triton X-100 was added to 0.05% (v/v) and Arabian light oil was added to 3% (v/v).

The culture was incubated at 25°C, 120 rpm for 7days.

의 Triton X-100을 첨가한 후 균체 현탁액을 집중하여 25°C에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하였다.

Table 4와 5에서 보는바와 같이 US1, K1, KH3-2, CL180, 및 IC-10 등의 순수배양에서는 Triton X-100 첨가에 의해 원유 분해율이 향상되었는데, 특히 지방족 보다 방향족 탄화수소의 분해율 향상이 두드러졌으며 KH3-2, CL180 및 IC-10의 경우 약 3배정도 증가되었다. 반면에 K2-2와 P1의 순수배양에 Triton X-100을 첨가한 경우 지방족 및 방향족 탄화수소 분해율이 약 40% 정도 감소되었다.

혼합배양에 Triton X-100을 첨가한 경우 대부분 분해율이 향

상되었으며, 특히 CL180과 IC-10의 혼합에서 방향족 탄화수소의 분해율이 약 1.7배 향상되었다. 그러나 K2-2와 P1의 경우는 Triton X-100 첨가에 의해 원유 분해율이 감소하였으며, 특히 지방족 탄화수소의 분해율이 45% 감소되었다.

고찰

원유분해능 향상을 위해 선발된 유류분해 미생물을 대상으로 혼합배양을 실시한 결과 Tables 2와 3에서 보는바와 같이 혼합배양 형태에 따라 분해능이 순효과 혹은 역효과가 일어나는 것을 관찰하였다. 이와 같은 현상은 혼합된 균주들의 분해특성 차

이 및 hydrocarbon uptake mode 차이로 일부 설명이 가능할 것이다

즉, US1과 K1은 탄화수소를 이들이 생성한 biosurfactants에 의해 자신들 보다 크기가 작은 유화된 탄화수소(pseudo-solubilized hydrocarbons)로 만들어 이용하고, 이런 부류의 균주는 biosurfactants의 생성을 촉진시켜 주거나 계면활성제 첨가 등으로 micelle 형성을 증진시켜 줄으로서 성장속도를 증진시킬 수 있다(9, 11, 14-16, 20). 그러므로 이들 두 균주의 혼합은 서로의 hydrocarbon uptake mode가 일치함으로써 이들이 생성한 biosurfactants에 의해 micelle 형성이 촉진되어 원유 분해율이 약 40% 정도 증가되는 순효과를 가져온 것으로 사료된다. 또한 이들의 순수배양 및 혼합배양에 Triton X-100을 첨가시켜준 결과 원유 분해율이 향상되는 것으로도 확인할 수 있었다(Table 4-5)

K2-2와 P1 혼합의 경우는 이들 균주의 hydrocarbon uptake mode가 US1과 K1에 정반대로 탄화수소를 직접 접촉에 의해 이용하고, 이들 두 균주의 혼합도 hydrocarbon uptake mode가 서로 같아 원유 분해율이 약 25% 정도 증가되는 순효과를 가져온 것으로 사료된다. 반면, 이 부류의 미생물은 교반속도의 증가로 탄화수소의 available volume을 증가시켜 분해속도를 증가시킬 수 있으나 계면활성제 첨가 등은 직접 접촉을 방해하게 되어 오히려 분해속도를 저하시킬 수 있다(8, 11, 16, 19, 34, 38-39). 그러므로 US1이나 K1과 같이 biosurfactants를 생성하는 균주를 K2-2나 P1과 혼합배양 할 경우, 탄화수소 이용도 측면에서 K2-2나 P1에 대해서는 K1이나 US1에 의해 생성된 biosurfactants가 이들의 탄화수소의 직접 접촉을 방해하게 되어 이용도가 저하되게 되고, US1이나 K1에 대해서는 biosurfactants에 의해 유화된 탄화수소를 이의 이용도 낮은 K2-2나 P1과 공유하게 됨으로서 이용도가 저하되게 되어, 전체적인 원유 분해율이 약 20%-40% 정도 감소된 것으로 사료된다. 이와 같은 현상은 K2-2와 P1 혼합배양에 US1이나 K1을 첨가한 경우(Figure 2-3) 및 K2-2와 P1의 순수배양이나 혼합배양에 Triton X-100을 첨가시켜준 경우에서도 분해능이 감소됨을 제 확인하였다(Table 4-5)

KH3-2의 경우는 유화력 및 소수성이 낮은 것으로 관찰되어 물에 용해된 탄화수소만을 이용하는 것으로, 이 부류의 미생물은 교반속도 증가 및 계면활성제 첨가 등에 의해 탄화수소의 용해도 및 available volume을 증가시킴으로서 분해속도를 증가시킬 수 있다(11, 19). 따라서 biosurfactants를 생성하는 IC-10과의 혼합배양에 의해 지방족 탄화수소의 분해율이 약 25% 정도 증가되었고(Table 2), K1이나 CL180과의 혼합에서 방향족 탄화수소의 분해율이 각각 20% 및 86% 정도 증가되었다(Table 3). 또한 US1과 K1 및 CL180과 IC-10의 혼합배양에 KH3-2를 첨가한 경우도 분해능이 향상되었는데, 특히 CL180과 IC-10의 혼합에 KH3-2를 첨가한 경우 방향족 탄화수소의 분해율이 약 3.5배 증가함을 보여주었다(Figure 4). 이는 KH3-2의 순수배양에 Triton X-100을 첨가한 경우 방향족 탄화수소의 분해율이 약 3배정도 증가되는 것으로도 확인할 수 있었다(Table 5) 그러나 CL180, IC-10, KH3-2 혼합배양에 Triton X-100을 첨가한 경우는 분해율 증가효과가 나타나지 않았는데(Table 5), 이는 이들 혼합배양이 플라스크 내에서 수행된 관계로 영양분 고갈(특히, 산소공급 부족 등)로 분해가 더 이상 일어나지 않은 것으로

사료되어 좀 더 자세한 연구가 필요하다.

마지막으로 hydrocarbon uptake mode가 위의 3가지 형태가 혼합된 경우인 IC-10과 CL180의 혼합배양에 의해 지방족 탄화수소의 분해율이 약 20% 정도 증가되는 순효과를 나타낸 것도 이들의 uptake mode가 서로 비슷한 형태를 취하고 있기 때문으로 사료된다. 그러나 이 부류에 속하는 미생물들은 hydrocarbon uptake mode가 혼합되어 있어 다른 형태의 미생물과 혼합배양시 그 결과를 예측하기 어려운 것으로 사료된다. 실제로 hydrophobicity가 높은 균주와의 혼합배양에서 CL180의 경우 K2-2와는 별 영향이 없었고 P1과는 지방족 및 방향족 탄화수소의 분해율이 약 20% 정도 증가되는 순효과를 나타낸 반면에 IC-10의 경우는 K2-2와의 혼합배양에서 별 영향이 없었고 P1과는 오히려 지방족 및 방향족 탄화수소의 분해율이 각각 30% 및 20% 정도 감소되는 역효과를 나타냈다

또한 이들 균주의 순수배양 및 혼합배양에 Triton X-100 첨가는 분해율을 향상시켜(Table 4-5) biosurfactants를 생성하는 균주와의 혼합배양이 순효과를 나타낼 것으로 예측하였다 그러나, CL180의 경우 US1과의 혼합배양시 별 영향이 없었고, K1과의 혼합배양에서는 지방족 탄화수소의 분해율이 약 21% 정도 증가되는 순효과를 나타냈다. 반면, IC-10의 경우는 US1이나 K1과의 혼합배양이 별 영향이 없었고, CL180과 IC-10 혼합배양에 US1이나 K1을 첨가한 경우는 오히려 지방족 탄화수소의 분해능이 약 45% 정도 감소하였다(Figure 2). 이는 이들 균주가 생성하는 서로 다른 특성의 biosurfactants가 혼합되면서 오히려 분해능을 감소시킨 것으로 추정되며, 탄화수소-계면활성제-미생물 사이의 정확한 관계가 규명되어야 할 것으로 사료된다.

결론적으로, hydrocarbon uptake mode가 상이하게 다른 유류분해 미생물의 혼합(US1이나 K1(Group 1)에 K2-2이나 P1(Group 2)의 혼합)은 전체적인 유류분해능이 저하될 수 있음을 관찰하였고, 또한 이들 uptake mode에 따른 계면활성제의 첨가효과가 다르게 나타남을 관찰하였다 이는 실제 유류오염 지역의 생물정화 때 매우 중요한 인자로 작용할 가능성을 제시한다

지금까지 생물정화의 한 방법으로 영양염제의 첨가는 토착 미생물의 활성을 증진시켜줌으로서 매우 긍정적인 효과를 얻은 반면(7, 18), 미생물의 첨가나 계면활성제의 첨가효과는 별 실효를 못 얻었다(17, 33). 미생물 첨가의 경우는 첨가된 미생물의 환경 변화에 대한 적응력 부족도 있으나 토착 미생물과의 분해특성 차이 및 hydrocarbon uptake mode 차이로 인한 측면도 고려할 수 있겠다. 또한, 특정 지역내 토착 미생물의 특성을 고려치 않은 무분별한 계면활성제의 첨가는 토착 미생물의 hydrocarbon uptake mode에 따라 우점종의 변화를 야기시킴으로 효과를 예측하기 어려운 것으로 사료된다

따라서 효과적인 생물정화를 위해서는 오염지역의 토착 미생물군의 전반적인 hydrocarbon uptake modes를 조사하여 이와 부합되는 처리(미생물 혹은 계면활성제 첨가)가 필요할 것이다.

요 약

우수 유류분해 미생물을 가지고 그들의 혼합배양 형태에 따라 원유분해에 미치는 영향을 혼합된 미생물의 hydrocarbon uptake mode로 설명하였다

선발된 유류분해 미생물의 혼합배양에서 hydrocarbon uptake modes가 서로 같은 부류인 US1과 K1(유화된 탄화수소 이용), K2-2와 P1(직접 접촉에 의한 탄화수소 이용) 및 CL180과 IC-10(혼합형태)의 혼합에 의한 원유내 지방족 탄화수소 분해율이 그들의 순수배양시 보다 각각 40%, 25% 및 20% 정도 증가되었다. KH3-2(물에 용해된 탄화수소만을 이용)는 높은 유효성을 소유한 K1, CL180 및 IC-10과의 혼합배양에 의해 분해율이 증가되었다. 그러나 hydrocarbon uptake modes가 서로 상반된 부류인 K2-2이나 P1에 US1이나 K1을 첨가한 경우는 K1이나 US1에 의해 생성된 biosurfactants가 이들의 탄화수소로의 직접 접촉을 방해하게되어 원유 분해율이 약 20%-40% 정도 감소되었다

Triton X-100 첨가는 원유의 micelle 형성 촉진 및 용해도를 증가시켜 US1, K1, CL180, IC-10 및 KH3-2에 의한 원유 분해율 향상을 가져왔으나, micelle 형성에 의한 탄화수소로의 직접 접촉을 방해하게되어 K2-2이나 P1에 의한 원유 분해율은 감소되었다.

최적 균주혼합은 CL180, IC-10과 KH3-2의 혼합으로 첨가된 3% (v/v) Arabian light oil의 지방족 및 방향족 탄화수소가 각각 61.5% 및 69% 제거되는 높은 분해율을 보여주었다.

감 사

본 연구는 1997년 G-7환경공학기술개발사업(9-4-2) 및 한국과학재단 '98 국내 Post-Doc. 지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다

참 고 문 헌

- 김상진 외 10인 (1994), 해양유류오염 방지 및 환경회복기술 개발(1단계 2차년도 보고서). 9-4-2, 환경부, 과학기술처, p 214
- 김상진 외 9인 (1995), 해양유류오염 방지 및 환경회복기술 개발(1단계 3차년도 보고서). 9-4-2, 환경부, 과학기술처, p. 214.
- 김상진 외 11인 (1996), 해양유류오염 방지 및 환경회복기술 개발(2단계 1차년도 보고서). 9-4-2, 환경부, 과학기술처, p 245.
- 김상진 외 15인 (1997), 해양유류오염 방지 및 환경회복기술 개발(2단계 2차년도 보고서) 9-4-2, 환경부, p 241.
- Asperger, O. and H P Kleber (1991), Metabolism of Alkanes by *Acinetobacter*, The biology of *Acinetobacter* (K. J. Tomner, E. Bergogne-Bérézin and C. A. Fewson, eds), pp. 323-350, Plenum, New York.
- Atlas, R. M. (1984), Petroleum Microbiology, Macmillan, New York.
- Bragg, J. R., R. C. Prince, E. J. Harner, and R. M. Atlas (1994), Effectiveness of Bioremediation for the Exxon Valdez Oil Spill, *Nature*, **368**, 413-418.
- Efroymsen, R. A. and M. Alexander (1991), Biodegradation by an *Arthrobacter* species of Hydrocarbons Partitioned into an Organic Solvent, *Appl Environ. Microbiol.*, **57**, 1441-1447
- Foght, J. M., D. L. Gutnick, and D. W. S. Westlake (1989), Effect of Emulsan on Biodegradation of Crude Oil by Pure and Mixed Bacterial Cultures, *Appl Environ. Microbiol.*, **55**, 36-42.
- Foght, J. M., P. M. Fedorak, and D. W. S. Westlake (1990), Mineralization of [¹⁴C]Hexadecane and [¹⁴C]Phenanthrene in Crude Oil. Specificity among Bacterial Isolates, *Can. J. Microbiol.*, **36**, 169-175
- Goswami, P. and H. D. Singh (1991), Different Modes of Hydrocarbon Uptake by Two *Pseudomonas* Species, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 1-11.
- Goto, M, M. Kato, M. Asaumi, K. Shirai, and K. Venkateswaran (1994), TLC/FID Method for Evaluation of the Crude-Oil-Degrading Capability of Marine Microorganisms. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 45-50.
- Hill, G. A., B. J. Milne, and P. A. Nawrocki (1996), Cometabolic Degradation of 4-Chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 163-168.
- Humphries, M, F. Jaworzyn, and J. B. Cantwell (1986), The Effect of a Range of Biological Polymers and Synthetic Surfactants on the Adhesion of Marine *Pseudomonas* sp. Strain NCMB 2021 to Hydrophilic and Hydrophobic Surface, *FEMS Microbiol. Lett.*, **38**, 299-308.
- Kapfeh, O. and W. R. Finnerty (1980), Characteristics of Hexadecane Partition by the Growth Medium of *Acinetobacter* sp., *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 495-503.
- Ko, S. H. (1997), Biodégradation des Hydrocarbures Saturés: Étude des Mécanismes d'Assimilation et des Phénomènes de Co-oxidation. Ph.D. Thesis, Dept. of Chem. Eng., Université de Technologie de Compiègne, France.
- Lee, K. and E. M. Levy (1987), Enhanced Biodegradation of a Light Crude Oil in Sandy Beaches, Proceedings of the 1987 Oil Spill Conference (Prevention, Behaviour, Control, Cleanup), pp. 411-416, American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- 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 (Prevention, Behaviour, Control, Cleanup), pp 479-486, American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- Miura, Y., M. Okazaki, S-I Hamada, S-I Murakawa, and R. Yugen (1977), Assimilation of Liquid Hydrocarbon by Microorganisms: I Mechanism of Hydrocarbon Uptake, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 701-714.
- Oberbremer, A. and R. Müller-Hurtig (1989), Aerobic Stepwise Hydrocarbon Degradation and Formation of Biosurfactants by an Original Soil Population in a Stirred Reactor, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 582-586.

21. Ooyama, J. and J. W. Foster (1965), Bacterial Oxidation of Cycloparaffinic Hydrocarbons, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **31**, 45-65.
22. Pelz, B. and H.-J. Rehm (1971), Resistance of Decalin against Microbiological Oxidation, *Arch. Microbiol.*, **77**, 288-290
23. Perry, J. J. (1979), Microbial Cooxidations Involving Hydrocarbons, *Microbiol. Rev.*, **43**, 59-72.
24. Perry, J. J. (1984), Microbial Metabolism of Cyclic Alkanes, *Petroleum Microbiology* (R. M. Atlas, ed), pp. 61-70, Macmillan, New York.
25. Pollard, S. J., S. E. Hruday, B. J. Fuhr, R. F. Alex, L. R. Holloway, and F. Tosto (1992), Hydrocarbon Wastes at Petroleum- and Creosote-Contaminated Sites: Rapid Characterization of Component Classes by Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization Detection. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 2528-2534.
26. Prince, R. C. (1993), Petroleum Spill Bioremediation in Marine Environments. *Crit. Rev. Microbiol.*, **19**, 217-242.
27. Rosenberg, M., M. Gutnick, and E. Rosenberg (1980), Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell Surface Hydrophobicity, *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 29-33.
28. Rosenberg, E., R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube, E. Adler, and E. Z. Ron (1992), Petroleum Bioremediation - A Multiphase Problem. *Biodegradation*, **3**, 337-350.
29. Setti, L., M. Rossi, G. Lanzarini, and P. G. Pifferi (1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 515-520.
30. Singer, M. E. and W. R. Finnerty (1984), Microbial Metabolism of Straight-Chain and Branched Alkanes, *Petroleum Microbiology* (R. M. Atlas, ed), pp. 1-39, Macmillan, New York.
31. Swannell, R. P. J. and J. M. Head (1994), Bioremediation Comes of Age *Nature*, **368**, 396-397.
32. Swannell, R. P. J., K. Lee, and M. McDonagh (1996), Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation, *Microbiol. Rev.*, **60**, 342-365.
33. 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.
34. Tiehm, A. (1994), Degradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 258-263.
35. Wodzinski, R. S. and D. Bertolmi (1972), Physical State in which Naphthalene and Bibenzyl are Utilized by Bacteria, *Appl. Microbiol.*, **23**, 1077-1081.
36. Wodzinski, R. S. and J. E. Coyle (1974), Physical State of Phenanthrene for Utilization by Bacteria, *Appl. Microbiol.*, **27**, 1081-1084.
37. Zajic, J. E., H. Guignard, and D. F. Gerson (1977), Properties and Biodegradation of a Bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*, *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 1303-1320
38. Zhang, Y. and R. M. Miller (1994), Effect of *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2101-2106.
39. Zhang, Y. and R. M. Miller (1995), Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2247-2251.