

해양에서 분리된 *Klebsiella* sp. KCL-1에 의한 원유분해 특성의 규명

차재영 · 정선용¹ · 조영수 · 최용락 · 김범규² · 이영춘*

동아대학교 생명자원과학부, ¹전남대학교 공과대학 환경공학과, ²경상대학교 유전공학연구소

Characterization of Crude Oil Degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 Isolated from Sea Water. Cha, Jae-Young, Seon-Yong Chung¹, Young-Su Cho, Yong-Lark Choi, Beom-Kyu Kim², and Young-Choon Lee*.
Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea, ¹Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, ²Genetic Engineering Research Institute, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea – Several bacterial strains utilizing crude oil as their sole carbon and energy sources were isolated from marine. One of the strains named KCL-1 showed the highest degradative activity for crude oil and the best growth rate. This strain was identified as a *Klebsiella* sp. based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics. The optimum cultural conditions were as follows; 32°C~37°C for temperature and 7.0 for initial pH. Additionally, the optimal concentration of sodium chloride was 3.0%, indicating that this strain was derived from sea water. KCL-1 could use several kinds of *n*-alkane hydrocarbons from octadecane to hexacosane as a sole carbon source. The degradation of crude oil by KCL-1 was stimulated by addition of octadecane in the culture. The emulsifying activity by KCL-1 was highest after 3 days of cultivation under the condition of 3.0% sodium chloride, pH 7.0 and 37°C.

Key words : *Klebsiella* sp. KCL-1, crude oil, octadecane

전 세계적으로 유류수송은 대부분 해양수송에 의존하고 있으며, 유조선의 사고 등에 의한 유류 유출 및 각종 폐유 방출 등으로 해양오염이 늘어나면서 해양 생태계에 커다란 피해를 유발시키고 있다. 최근, 유류수송 선박이 대형화, 자동화 및 고속화 됨에 따라 해양사고시 수만톤에서 수십만톤에 이르는 초대형 오염사고도 발생하고 있는데, 1989년 Exxon Valdez호 오염사고, 1991년 걸프전쟁 당시의 고의유출사고, 1993년 영국 Braer호 유출사고 등 전세계적으로 원유가 해양으로 유출되는 양은 엄청나다[9, 10, 12]. 우리나라에서도 해양유류 오염사고가 수시로 발생되어 해양오염에 의한 자연 생태계의 파괴와 연안 해역에서의 양식업에도 중대한 피해를 입히고 있다. 이러한 해양 유류 오염의 발생증가와 아울러 이들을 해결하려는 노력들이 다방면에서 많은 연구자들에 의해 활발하게 진행되어 왔다 [8, 16, 17]. 해양의 유류 오염물질인 *n*-,*iso*-,*cyclo*-alkane 계열의 탄화수소원과 원유(crude oil) 및 경유, 중유 등의 석유 제품에 대한 다양한 탄화수소원의 기질을 분해시키는 균주를 분리, 동정하여 실제로 오염현장에 적용되고 있다[5, 6, 11, 17]. 이러한 유류 분해의 해양 미생물로서는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas* 등이 대부분을 차지하고 있으며[3, 6, 14], 또한 이들 균주

가 생산하는 유화제 등이 분리 정제되어 실제로 이용되고 있다.

해양 유류 사고시 유류오염의 조기포착, 오염의 확산 방지 및 효율적인 방제를 위한 생물학적 처리 방법으로서 오염정도를 측정 판단 할 수 있는 신속한 경보시스템의 개발이 대단히 중요한 의의를 지닌다고 할 수 있을 것이다. 따라서, 해양 유류 오염에 대한 계측용 바이오센서 개발을 위한 생물소자를 해양 미생물 자원으로부터 얻는 일이 시도 되어야 한다. 본 연구실에서는 해양 원유 분해 세균의 생리학적 특성과 분자유전학적 특성을 밝히기 위하여 해양으로부터 이러한 미생물 자원을 탐색하고 있으며, 또한 이상과 같은 배경 하에서 유류 오염에 대한 계측용 바이오센서 개발용 생물소자를 해양 미생물로부터 얻기 위한 기초 자료를 얻을 목적으로 원유 분해능이 우수한 균주를 해양으로부터 분리, 동정하여 분류학상의 위치를 확인하고, 선별된 원유 분해 균주의 특성, 균체 생육도, 유화도 및 원유의 분해능에 미치는 촉진인자의 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

해양으로부터 유류 분해 미생물을 분리하기 위하여 유류 유출이 빈번하다고 생각되는 전남 여천의 호남정유 원유선

*Corresponding author
Tel. 051-200-7591, Fax. 051-200-7505
E-mail: ycleee@mail.donga.ac.kr

착장과 인근 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하여 탄소 원으로서 crude oil (원유)가 함유된 인공 해수배지를 사용하여 균주를 분리하였다.

배지 및 배양방법

유류 분해 미생물을 분리하기 위하여 배지중에 탄소원이 결핍된 C-배지 (Carbon-minimal medium)를 사용하였으며, 배지의 조성은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, CaCl_2 10 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, NaCl 30 g/L, yeast extract 0.2 g/L, 및 trace element용액 2 mL (MoO_3 1 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg/L, H_3BO_3 1 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg/L, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L)를 함유하고 있으며, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 탄소원으로 원유를 1% 첨가한 C-배지에 채취한 해수를 1% 첨가하여 37°C에서 200rpm으로 7일 간 진탕 배양하여 균의 생육이 확인되면 새로운 C-배지에 균주 및 원유를 각각 1%로 첨가하여 다시 배양하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB-고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 선별된 단일 균주를 LB 액체배지 (NaCl 10 g, Trypton 10 g, Yeast extract 5 g/L)에서 각각 전배양 시킨 후, 1% 원유가 첨가된 C-배지에 1% 접종하여 37°C 배양기에서 7일간 200 rpm으로 배양한 후 유류 분해능이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

균주의 동정

선별된 균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology를 근거로 하여 동정하였다[4].

균주의 생육도 측정

선별된 균주의 생육온도를 조사하기 위하여, 500 ml 삼각 플라스크에 crude oil 1%를 함유한 C-배지를 200 ml 넣고, LB액체 배지에서 전배양 시킨 균주 1%를 접종하여 25°C, 32°C, 37°C 및 42°C에서 각각 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 이때 배양시간에 따른 균체의 성장은 1, 3, 5 일에 진탕 배양한 배양액을 일정량 취하여 UV-VIS spectrophotometer (U-1100, Hitachi, Japan)를 사용하여 600nm에서 흡광도 (optimal density)를 측정하였다.

생육 pH의 영향은 배지중의 pH를 5, 6, 7, 8 및 9로 각각 조정하여, 배양시간에 따른 균체의 성장은 1, 3, 5일에 진탕배양한 배양액을 일정량 취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 균생육이 양호한 pH 7과 8의 배양액을 원심분리(3000 rpm, 10 min)하여 상등액을 취한 후 유화도 측정에 이용하였다.

염분(NaCl)농도의 영향은 C-배지의 염분농도를 2%, 3%, 4% 및 5%로 각각 조정하여 배양시간에 따른 균체의 성장은 처음 3일간은 12시간 단위로, 그 이후로는 1일 단위로

진탕배양한 배양액을 일정량 취하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한, benzene, toluene, xylene 및 *n*-alkane계열 C_{10} 에서 C_{28} 까지의 각기 다른 탄화수소원의 분해 및 균생육도를 조사하기 위하여 10 ml의 C-배지에 각각 0.1%씩 첨가하여 37°C에서 200 rpm으로 5일간 배양시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균 생육도를 확인하였다.

Crude oil 분해능 촉진인자 탐색

선별된 균주의 crude oil 분해능을 촉진 시킬 수 있는 인자를 탐색하기 위하여, crude oil를 함유하고 있는 10 ml의 C-배지에 *n*-alkane계열 C_{10} 에서 C_{28} 까지의 각기 다른 탄화수소원을 첨가시켜 5일간 진탕배양 시킨 후 균체의 성장은 600 nm에서 흡광도로 측정하였다. 이때 배양에 사용된 원유의 분해능을 측정하기 위하여 chloroform-methanol (C:M, 2:1 v/v) 추출용매를 동량 혼합하여 원유성분을 완전히 추출한 후 진공 건조기를 사용하여 chloroform 용매를 완전히 제거시켜 대조구 (균체 무첨가)와 무게를 측정하여 상대 증량비로 나타내었다.

유화력 측정

KCL-1 균주의 유화력 측정은 pH 7과 8의 배양조건에서 균체 생육이 높았기 때문에 배양 시간에 따른 유화력의 변화를 보기위해 균배양액을 원심분리한 후 상등액을 얻어 사용하였다. 0.5 M NaCl이 첨가된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.8) 5 ml에 상등액 1 ml를 가하고, 기질로서 2% crude oil를 첨가하여 1분간 강하게 교반한 다음 10분간 정지시켜 중간부위의 반응액 2 ml를 취하여 610 nm에서 흡광도 측정값으로 유화 활성을 나타내었다 [18].

결과 및 고찰

균주의 분리

전남 여천의 호남정유 원유 선착장과 인근의 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하여, crude oil 분해능을 가진 미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200 ml에 crude oil 1% 및 해수 1%를 첨가하여 37°C, 200 rpm으로 진탕배양한 후 균생육과 동시에 crude oil 분해능을 확인하였다. 배양액의 일부를 crude oil 1%를 함유한 새로운 C-배지에 첨가한 실험을 3회 반복 하였다. 이렇게 하여 얻어진 균주를 LB 고체배지상에 도말하여 단일 균주를 얻고, 이 단일 균주를 다시 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 전배양 시킨 후, crude oil 1%를 함유한 C-배지에 전배양 한 균주를 2% 첨가하여 37°C에서 7일간 진탕 배양 시켰다. 이때 대조구로 C-배지에 crude oil 1%만을 첨가 시킨것과, C-배지에 2% 균주만을 첨가시킨 것을 두었다. 대조구와 함께 7일간 배양 시킨 후, crude oil 분해능

Table 1. Morphological and physiological characteristics of crude oil degrading marine bacteria

Chararacteristics	<i>Klebsiella</i> sp. KCL-1
Morphological	
Gram strain	-
Mobility	+
Pigmentation of colony	Yellow white
Optimum temperature	37°C
Growth in air	+
Physiological	
Orthonitroiphenyl β -D-galactopyranoside	+
Arginine dehydrolase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Simmons citrate	+
Production of H ₂ S	-
Urease	+
Tryptophane deaminase	-
Indole	+
Acetoine	+
Proteolysis of gelatin	-
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Saccharose	+
Melibiose	+
Amygdaline	+
L(T)arabinose	+
Reduction of nitrates to nitrites	+
Reduction of nitrates to N ₂	-
Oxidase	-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

을 가진 균주를 식별하여 50여 균주를 1차로 분리 하였으며, 이중에서 가장 분해능이 우수한 KCL-1 균주를 분리하였다.

균주의 동정

선별된 균주의 동정을 위하여 그램 염색법, 형태학적 관찰 및 생화학적 실험을 하였다. 그램 염색법에 의해서는 그램 음성균으로 확인되었으며, 전자현미경 관찰에서는 활발한 운동성을 가진 균주로 확인되었다. 생화학적 실험은

미생물 동정 kit인 API 20 NE Kit를 이용하여 Bergey's manual of systematic bacteriology[4]에 준하여 동정한 결과, *Klebsiella* sp.으로 판명되어 *Klebsiella* sp. KCL-1로 명명하였다 (Table 1). 우리나라 및 외국의 유류 오염 지역에서 주로 분리되고 있는 균주로 *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp. 및 *Arthrobacter* sp. 등이 보고 되고 있다[3, 5, 15]. 그러나, 본 실험에서 분리된 *Klebsiella* sp. 균주는 이들과는 다른 종으로서, 앞으로의 생물유화제 생산, 유전공학적 수법에 의한 우량 균주의 개발 및 유류 분해능의 촉진 인자 탐색 등 많은 연구가 기대된다.

균주의 생육특성

Klebsiella sp. KCL-1의 생육을 위해 C-배지에 탄소원으로 crude oil 1%를 첨가하고 염농도를 달리하여 진탕배양하면서 시간별로 시료를 채취하여 균주의 성장을 조사하였다. 그 결과, 본 실험에 사용된 KCL-1균은 염분농도 3% 배지에서 가장 성장이 양호하였으며, 염농도 2%에서는 배양시간과 함께 점점 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 이때 염분농도 4% 및 5%에서는 균의 생육속도가 느리거나 생육이 거의 정지 되어, KCL-1 균은 염분농도 4% 이상에서 성장이 억제되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 유류분해 해양세균인 *Klebsiella pneumoniae* L25는 염분농도 3.0 및 3.5%에서 최대의 성장을 보여주었으며[7], *Acinetobacter* sp.[15]의 염분농도는 3%, *Xanthomonas campestris* M12 및 *Pseudomonas maltophilia* N246은 3.0-3.5%로 보고[9]된 것과 일치하였다. 염분농도 5% 이상에서의 균생육과 유화활성의 감소는 호흡증가 및 스트레스 작용에 의한 원인[2]으로 지적되고 있으며, 또한 염농도가 수계의 모든 생물군집에 중대한 영향을 미치는 환경요인으

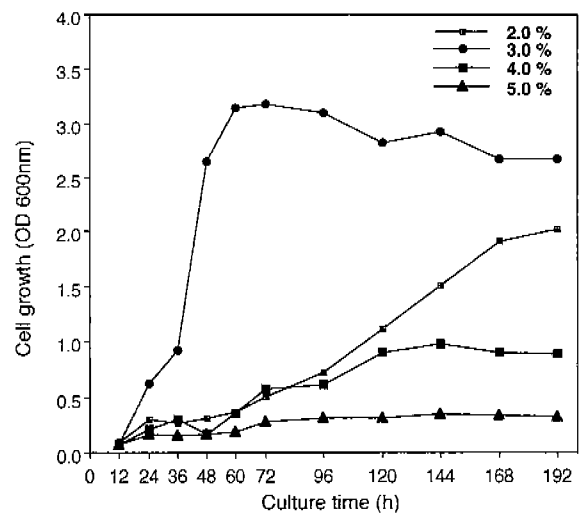


Fig. 1. Effect of salt concentrations on the cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-1 in C-medium containing crude oil.

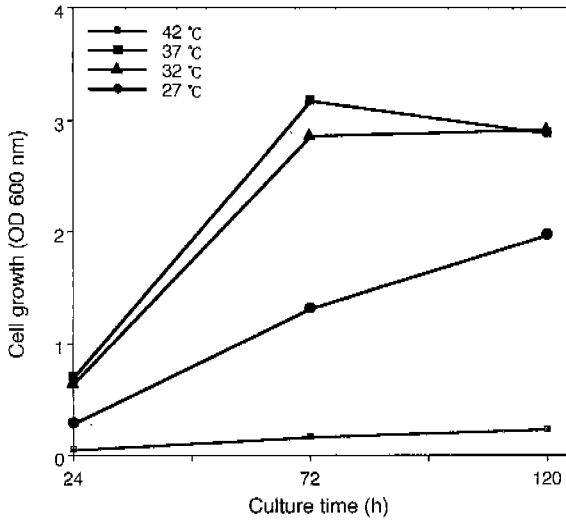


Fig. 2. Effect of temperature on the cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-1 in C-medium containing crude oil.

로 작용[13]하는 것이 보고된 바 있다.

KCL-1 균의 생육에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 32°C 및 37°C의 범위에서 최고의 성장을 보여주었으며 (Fig. 2). 42°C에서는 거의 생육이 이루어지지 않았다. 석유 탄화 수소의 분해는 매우 광범위한 온도 범위에서 일어날 수 있다고 알려져 있으나, 지금까지의 보고[1, 7]된 것을 보면, *Xanthomonas campestris* M12, *Xanthomonas* sp. N246 및 *Pseudomonas maltophilia* N246 들은 37°C에서 거의 최고의 생육을 나타내어 대체로 30°C에서 37°C의 범위에서 잘 생육하는 것으로 나타났다.

Crude oil 분해 균주의 생육에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 C-배지의 초기 pH를 5, 6, 7, 8, 9로 각각 조절한 후 1, 3, 5일간 배양한 후 균체 생육을 측정하였

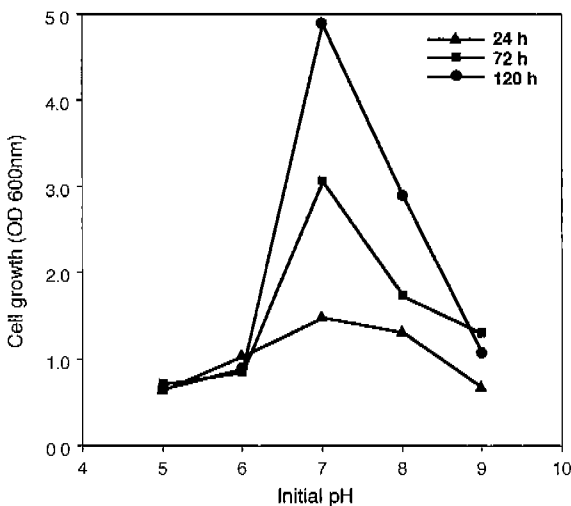


Fig. 3. Effect of initial pH on cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-1 in C-medium containing crude oil.

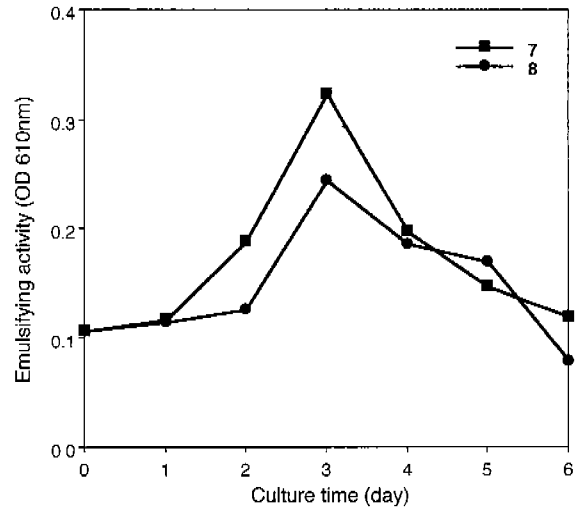


Fig. 4. Effect of pH on emulsifying activity by *Klebsiella* sp. KCL-1 in C-medium containing crude oil.

다. KCL-1 균주는 pH 6과 8사이에서 높은 균체 생육을 보였으며, pH 5에서는 균생육이 급격히 감소하였다 (Fig. 3). 이상의 결과로부터 *Klebsiella* sp. KCL-1 균주의 생육 최적 pH는 중성 조건인 7.0 이고, pH가 산성인 환경에서는 균주의 생육이 억제되는 제한요인으로 작용함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 해양 유류분해 미생물의 생육에서 보여주는 pH 7.0과 7.5 등과 유사하였다[5, 6, 17].

유화력 측정

KCL-1 균주의 유화력 측정은 pH 7과 8의 조건에서 균체 생육이 높았기 때문에 배양 시간에 따른 유화력의 변화를 보기위해 균배양액을 원심분리하여 상층액을 얻어 사용하였다. 그 결과, 배양 3일째에 유화력이 가장 높게 나타났으며, pH 7의 조건에서 다소 높게 나타났다 (Fig. 4). 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. 으로부터의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였다[3,12].

기질 특이성

Benzene, toluene, xylene 및 n-alkane (C₁₀₋₂₈ 짝수탄소) 계열의 각기 다른 탄화수소를 10 ml C-배지에 0.1%(v/v) 첨가하여 5일간 진탕 배양한 후 KCL-1 균주의 생육정도를 나타낸 결과는 Fig 5와 같다. KCL-1 균주는 n-alkane계열 C₁₈과 C₂₈사이에서 왕성하게 생육 하였고, benzene, toluene, n-alkane C₁₀₋₁₆ 에서는 생육이 거의 없었으며, xylene 에서는 생육이 전혀 없었다. 또한, *Klebsiella pneumonia* L25 도 hexadecane(C₁₆) 및 octane(C₈)을 기질로서 이용하지 못하였다[14]. *Klebsiella* sp. KCL-1 균주는 비교적 장쇄의 탄화수소 C₁₈ 이상을 탄소원으로 이용하는 것을 알 수 있었다. 유류분해 해양세균인 *Acinetobacter* sp. [9] 균주도

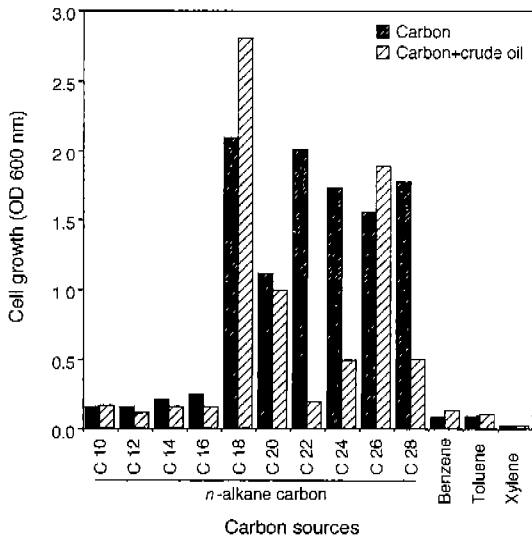


Fig. 5. Effect of carbon sources on cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-1 in C-medium at 37°C for 5 days.

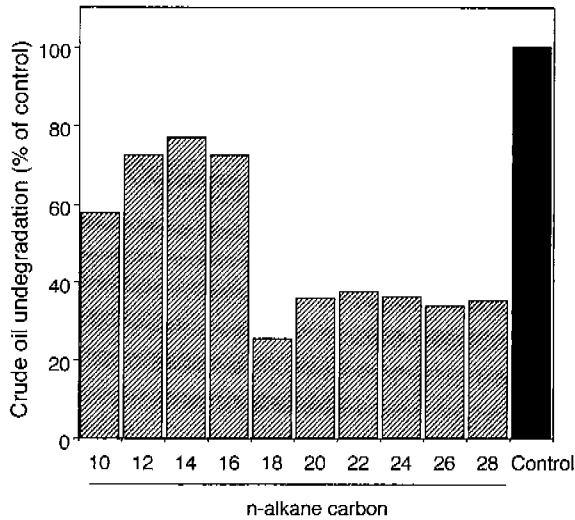


Fig. 6. Effect of carbon sources on crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 in C-medium at 37°C for 5 days.

C₁₇ 및 C₁₈를 잘 이용하는 것으로 보고된 바 있다.

Crude oil 분해능 촉진인자 탐색

KCL-1 균주의 crude oil 분해능을 촉진 시킬 수 있는 인자를 탐색하기 위하여, 10 ml의 C-배지에 n-alkane계열 C₁₀에서 C₂₈ 까지의 각기 다른 탄화수소원과 crude oil을 동시에 첨가하여 5일간 진탕배양 시킨 후 균체의 성장은 600 nm에서 흡광도로 측정하고 (Fig. 5), 이때 배양에 사용된 원유의 분해능은 chloroform-methanol (C:M, 2:1 v/v) 추출법으로 측정하여 대조구 (균체 무첨가)와의 상대 중량 비로 나타내었다 (Fig. 6). n-Alkane계 탄화수소 C₁₈과 C₂₆에서 가장 왕성한 균생육도를 나타내었으나, C₂₂, C₂₆, 및 C₂₈에서는 균주의 생육이 느린 것으로 나타났다. 이러한

결과는, KCL-1 균주의 생육도는 C-배지에 crude oil를 함유하지 않고 각각의 n-alkane계 탄화수소만을 첨가하여 배양한 결과와는 약간 다른 양상을 나타낸 것으로 이러한 정확한 기작에 대해서는 좀더 자세한 실험이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 한편, 원유 분해능을 측정된 결과에서는 균생육도와 마찬가지로 C₁₈에서 원유 분해능이 촉진되는 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 6). 이러한 결과는 KCL-1균주가 배양액중의 유일한 탄소원으로 C₁₈에서도 균생육이 양호하였기 때문에 crude oil과 동시첨가하여 배양하였을 경우에 균체량의 증가에 의하여 배양액중의 C₁₈량이 감소하기 시작하면서 탄소원으로 원유를 이용 하므로써 원유 분해능이 증가한 것으로 사료된다. 한편, C₁₈을 0~150 µg/30 ml C-배지에 첨가시킨 상태에서 crude oil 분해능을 검토한 결과에서도 첨가농도 의존적으로 원유 분해능이 증가하여 이러한 결과를 더욱 지지해준다 (미발표).

요 약

유류오염 지역으로부터 원유 분해능이 있는 해양균주를 crude oil을 탄소원으로 이용하여 분리하였다. 분리된 균주 중 원유분해능 및 성장속도면에서 가장 우수한 균주를 선별하여 KCL-1으로 명명 하였으며, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Klebsiella* sp.로 동정하였다. KCL-1 균주의 원유 분해를 위한 최적 배양조건은 배양온도 32°C~37°C 이었으며, 초기 pH는 7.0 이었다. 또한, 이 균주의 성장은 3.0% 염분농도에서 최대의 성장을 보여주어 해양유래의 균주임을 확인할 수 있었다. n-Alkane계 탄화수소 중에서 C₁₈~C₂₈의 비교적 장쇄의 탄화수소를 탄소원으로 이용하였다. 원유분해시 C₁₈의 첨가에 의해 균생육 및 원유 분해능이 촉진되는 것으로 나타났다. KCL-1 균주의 유효활성은 37°C, pH 7.0의 배양조건에서 배양 3일째에 가장 높게 나타났다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형 통합항만관리 연구센터 및 대우약품공업주식회사의 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Choi, S. Y., C. S. Kim, M. H. Lee, M. O. Hwang, and K. H. Min. 1991. Octane biodegradability by crude oil-utilizing bacteria carrying OCT plasmid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 82-87.
2. 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.
3. Hwang, K. A., J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim, and H. J. Ahn. 1999. Surface activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 159–165.
 4. John, G. H., N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
 5. Kim, H. J., B. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang, and J. Y. Kong. 1999. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 192–197.
 6. Kim, H. J., B. J. Kim, S. H. Hwang, D. J. Kim, H. W. Lee, and J. Y. Kong. 1997. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Aeromonas* sp. BES-741. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **24**: 443–448.
 7. Kim, S. H., C. S. Kim, I. S. Cho, S. Y. Choi, and K. H. Min. 1990. Microbial degradation of alkane components in crude oil. *Kor. J. Microbiol.* **28**: 71–75.
 8. Kim, S. J. and H. J. Yun. 1993. Isolation and identification of the crude oil-degrading psychrotrophic bacterium and the characteristics of OCT plasmid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 66–73.
 9. Lee, C. H., H. S. Kim, H. H. Suh, S. H. Choi, H. M. Oh, and B. D. Yoon. 1997. Microbial degradation of arabian light crude by *Acinetobacter* sp. A54. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 520–526.
 10. Lindstrom, J. E., R. C. Prince, J. C. Clark, M. J. Grossman, T. R. Yeager, J. F. Braddock, and E. J. Brown. 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2514–2522.
 11. Mibas, W. and D. L. Gutnick. 1993. Isolation, characterization, and sequences analysis of cryptic plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* and their use in the construction of *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2807–2816.
 12. Mulligan, C. N., G. Mahmoudides, and B. F. Giggs. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**: 199–210.
 13. Radwan, S. S., N. A. Sorkhoh, I. M. El-Nemr, and A. F. El-Desouky. 1997. A dcasibility study on seeding as a bioremediation practice for the oily Kwaiti desert. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 353–358.
 14. Rheinheimer, G. 1981. *Microbiologic der Gewalsser*, p. 251. 3rd. ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
 15. Schulz, D., A. Passeri, M. Schmidt, S. Lang, F. Wagner, V. Wray, and W. Gunkel. 1991. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganism from the North Sea. *Z. Naturforsch.* **46**: 167–203.
 16. Son, H. J., S. H. Go, G. Lee, and S. J. Lee. 1996. Emulsification of crude oil by *Acinetobacter* sp. SH-14. *Kor. J. Microbiol.* **34**: 363–369.
 17. Suk, W. S., H. J. Son, G. Lee, and S. J. Lee. 1999. Purification and characterization of biosurfactants produced by *Pseudomonas* sp. SW 1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 56–61.
 18. Ward, D. M. and T. D. Brock. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 353–359.

(Received September 2, 1999)