

## 유류오염 지역에서 분리된 *Klebsiella* sp. KCL-2에 의한 원유분해 특성

차재영 · 김혜선 · 조영수 · 이영춘 · 최용락\*

동아대학교 생명자원과학부

### Characterization of Crude Oil Degradation by *Klebsiella* sp. KCL-2 Isolated from Sea Water

Jae-Young Cha, Hae-Sun Kim, Young-Su Cho, Young-Choon Lee and Yong-Lark Choi\*

Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

#### Abstract

Several bacterial strains utilizing crude oil as their sole carbon and energy source were isolated from polluted marine by crude oil. One of the strains, named KCL-2 showed strong degradation activity for crude oil. This strain was identified as a *Klebsiella* sp. based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics. The optimum cultural conditions were as follows, 27°C~37°C for temperature and 7.0 for initial pH. Additionally, the optimal concentration of sodium chloride was 3.0%, confirming indicating that this strain was derived from sea water. The strain KCL-2 could use several kinds of *n*-alkane hydrocarbon from octadecane to octacosane as a sole carbon source. The emulsifying activity by KCL-2 was the highest after 3 days of cultivation under the condition of 3.0% sodium chloride, pH 7.0 and 32°C. This strain had several cryptic plasmids.

**Key words** – *Klebsiella* sp. KCL-2, crude oil, *n*-alkane hydrocarbon, emulsifying activity,

#### 서 론

해양에 유출된 유류는 점성이나 휘발성의 물리적 성질, 유류의 화학적 성질, 해양상태나 태양광선 등의 기상상태, 해수의 온도, 유속, 부유물질 및 존재하는 박테리아의 성장에 따라 변한다[7]. 유치리 방법중의 하나인 생물학적 방법으로는 해양의 유류 오염물질인 *n*-, iso-, cyclo-alkane 계열의 탄화수소원과 원유(crude oil) 및 경유, 중유 등의 석유 제품에 대한 다양한 탄화수소원의 기질을 분해시키는 균주

를 분리, 동정하여 실제로 오염현장에 적용되고 있다[5,6,12,18]. 이러한 유류 분해의 해양 미생물로서는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas* 등이 대부분을 차지하고 있으며[3,6,15], 또한 이들 균주가 생산하는 유화제 등이 분리 정제되어 실제로 이용되고 있다.

우리나라의 유류 연안 물동량은 최근 10년간 13% 이상 증가하였고, 유류의 수출입 물동량은 16% 이상이나 증가하였다. 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 수십 만톤에 이르는 초대형 오염사고도 발생하고 있는데, 전세

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel: 051-200-7585, Fax: 051-200-6993  
E-mail: ylchoi@mail.donga.ac.kr

계적으로 원유가 해양으로 유출되는 양은 엄청나다[10,11, 13]. 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 다 방면에서 많은 연구자들에 의해 활발하게 진행되어 왔다 [9,17,18].

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 시도되어야 한다. 본 연구에서는 해양 원유 분해 세균의 생리학적 특성과 분자유전학적 특성을 밝히기 위하여 해양으로부터 이러한 미생물 자원을 탐색하고, 또한 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 분해 특성에 대하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 배지 및 배양방법

유류 분해 미생물을 분리하기 위하여 배지중에 탄소원이 결핍된 C-배지(Carbon-minimal medium)를 사용하였으며, 배지의 조성은  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L,  $\text{CaCl}_2$  10mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg/L,  $\text{NaCl}$  30g/L, yeast extract 0.2g/L 및 trace element 용액 2mL ( $\text{MoO}_3$  1mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  6mg/L,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1mg/L)를 함유하고 있으며, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 탄소원으로 원유를 1% 첨가한 C-배지에 채취한 해수를 1% 첨가하여 37°C에서 200rpm으로 7일간 진탕배양하여 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 액

체배지 (NaCl 10g, Trypton 10g, Yeast extract 5g/L)에서 각각 전배양 시킨 후, 1% 원유가 첨가된 C-배지에 1% 접종하여 37°C 배양기에서 7일간 200rpm으로 배양한 후 유류 분해능이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

### 균주의 분리

유류가 오염된 해양으로부터 유류 분해 미생물을 분리하기 위하여 유출이 빈번하다고 생각되는 전남 여천의 호남정유 원유선착장과 인근 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하여 탄소원으로 유일하게 1%의 crude oil이 함유된 C-배지를 사용하여 배양하였다. 수일간 배양하여 생성된 콜로니를 반복하여 배양시킨 결과 유류 분해능을 확인하였으며, 단일 콜로니를 분리하였다.

### 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, 500ml 삼각 플라스크에 crude oil 1%를 함유한 C-배지를 200ml 넣고, LB액체 배지에서 전배양시킨 균주 1%를 접종하여 25°C, 32°C, 37°C 및 42°C에서 각각 200rpm으로 진탕배양하였다. 이때 배양시간에 따른 균체의 성장은 1, 3, 5일에 진탕배양한 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 실시하였으며, 배양시간에 따른 균체의 성장은 1, 3, 5일에 진탕배양한 배양액을 일정량 취하여 600nm에서 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 실시하였으며, 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*-alkane 계열 C<sub>10</sub>에서 C<sub>28</sub> 까지의 각기 다른 탄화수소원의 분해 및 균생육도를 조사하기 위하여 10ml의 C-배지에 각각 0.1%씩 첨가하여 37°C에서 200rpm으로 5일간 배양시킨 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 균 생육도를 확인하였다.

#### Crude oil 분해능 측정

선별된 균주의 crude oil 분해능을 촉진시킬 수 있는 인자를 탐색하기 위하여, crude oil를 함유하고 있는 10ml의 C-배지에 *n*-alkane 계열 C<sub>10</sub>에서 C<sub>28</sub> 까지의 각기 다른 탄화수소원을 첨가시켜 5일간 진탕배양시킨 후 균체의 성장은 600nm에서 흡광도로 측정하였다. 이때 배양에 사용된 원유의 분해능을 측정하기 위하여 chloroform-methanol(2:1 v/v) 추출용매를 동량 혼합하여 원유성분을 완전히 추출한 후 진공 건조기를 사용하여 chloroform 용매를 완전히 제거시켜 대조구(균체 무첨가)와의 무게차이를 측정하여 상대 증량비로 나타내었다. KCL-1 균주의 배양 시간에 따른 유화력의 변화를 보기위해 균배양액을 원심분리한 후 상층액을 얻어 사용하였다. 유화력 측정은 0.5M NaCl이 첨가된 20mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.8) 5ml에 상층액 1ml를 가하고, 기질로서 2% crude oil를 첨가하여 1분간 강하게 교반한 다음 10분간 정치시켜 중간부위의 반응액 2ml를 취하여 610nm에서 흡광도 측정값으로 나타내었다 [19].

## 결과 및 고찰

#### 균주의 분리

전남 여천의 해안 10여곳, 원유 선착장과 인근의 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하여, crude oil 분해능을 가진 미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200ml에 crude oil 1% 및 해수가 1% 되게 첨가하여 37°C, 200rpm으로 진탕배양한 후, crude oil 분해능을 가진 분해균이 생육하는 것을 확인하였다. 배양액의 일부를 crude oil 1%를 함유한 새로운 C-배지에 첨가한 실험을 3회 반복하였다. 이렇게 하여 얻어진 균주를 LB 고체배지상에 도말하여 단일 콜로니를 얻었다. 이 단일 콜로니들을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 전배양시킨 후, crude oil 1%를 함유한 C-배지에 전배양한 균주를 2% 첨가하여 37°C에서 7일간 진탕배양시켰다. 이때 대조구로 C-배지에 crude oil

1%만을 첨가 시킨것과, C-배지에 2% 균주만을 첨가시킨 것을 두었다. 대조구와 함께 7일간 배양시킨 후, crude oil 분해능을 가진 수집여 종의 균주를 분리하였으며, 이 중에서 분해능이 강력한 KCL-2 균주에 대하여 계속하여 실험하였다.

#### 균주의 동정

선별된 KCL-2의 동정을 위하여 그램 염색법, 형태학적 관찰 및 생화학적 실험을 수행한 결과를 Table 1에 나타냈다. 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-2로 명명하였다. 우리나라 및 외국의 유류 오염 지역에서 주로 분리되고 있는 균주로는 *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., 및 *Arthrobacter* sp. 등이 보고 되고 있다[3,5,16]. 그러나, 본 실험에서 분리된 *Klebsiella* sp. 균주는 이들과는 다른 종으로서, 앞으로의 생물유화제 생산, 유전공학적 수법에 의한 유량 균주의 개발 및 유류 분해능의 촉진 인자 탐색 등을 위한 많은 연구가 기대된다.

#### 균주의 생육특성

분리균의 생육을 조사하기 위해 C-배지에 탄소원으로 crude oil 1%를 첨가하고 염농도를 달리하여 *Klebsiella* sp. KCL-2를 진탕배양하면서 시간별로 시료를 채취하여 균주의 성장을 조사하였다. 그 결과, 본 실험에 사용된 KCL-2 균은 염분농도 3% 배지에서 가장 성장이 양호하였으며, 3일 정도의 배양에서 최대성장을 보였다(Fig. 1). 염농도 2%에서는 배양시간과 함께 균체생육이 점점 증가하는 경향을 나타내었으나 3%보다는 생육이 저조하였다. 이때 염분농도 4% 및 5%에서는 균의 생육속도가 느리거나 생육이 거의 정지되어, KCL-2 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[8], *Acinetobacter* sp.의 염분농도는 3%[10], *Xanthomonas campestris* M12 및 *Pseudomonas maltophilia* N246은 3.0-3.5%로 보고[1,8]된 것과

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

Characteristics	<i>Klebsiella</i> sp. KCL-2
<b>Morphological character</b>	
Gram strain	-
Mobility	+
Pigmentation of colony	Yellow white
Optimum temperature	32°C
Growth in air	+
<b>Physiological character</b>	
Orthonitrophenyl $\beta$ -D-galactopyranoside	+
Arginine dehydrolase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Simmons citrate	+
Production of H <sub>2</sub> S	-
Urease	+
Tryptophane deaminase	-
Indole	+
Acetoin	+
Proteolysis of gelatin	-
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Saccharose	+
Melibiose	+
L(T)arabinose	+
Reduction of nitrates to nitrites	+
Reduction of nitrates to N <sub>2</sub>	-
Oxidase	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction

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 환경요인으로 작용하는 것이 보고된 바 있다[14].

분리균인 *Klebsiella* sp. KCL-2의 생육에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 27°C, 32°C 및 37°C에서 비슷한 양상으로 생육이 왕성하였으며, 32°C의 범위에서 최고의 생육 상태를 보여주었으며(Fig. 2), 42°C에서는 거의 생육이 이

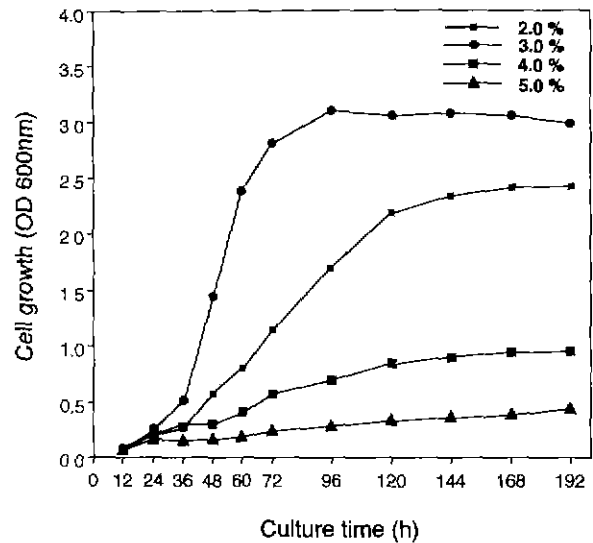


Fig. 1. Effect of salt concentrations on the cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-2(B) in C-medium containing crude oil.

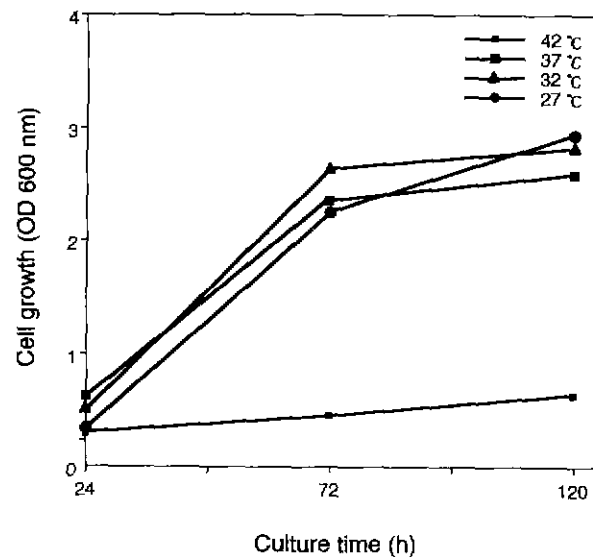


Fig. 2. Effect of temperature on the cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-2(B) in C-medium containing crude oil.

루어지지 않았다. 석유탄화수소의 분해는 매우 광범위한 온도 범위에서 일어날 수 있다고 알려져 있으나, 지금까지의 보고[1,8]된 것을 보면, *Xanthomonas campestris* M12, *Xanthomonas* sp. N246, 및 *Pseudomonas maltophilia* N246 들은 37°C에서, *Pseudomonas aeruginosa* BYK2는 25°C에서 최적

배양온도를 나타내어 유류분해균은 대체로 다양한 온도의 범위에서 잘 생육하는 것으로 나타났다.

초기 pH의 영향과 유화력 측정

Crude oil 분해 균주의 생육 및 생물유화제 생성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 C-배지의 초기 pH를 5, 6, 7, 8, 9로 각각 조절한 후 1, 3, 5일간 32°C에서 배양한 후 균체 생육을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타냈다. KCL-2 균주는 pH 6과 8사이에서 높은 균체 생육을 보였으며, pH 5 이하와 pH 9에서는 균주의 생육이 급격히 감소하였다. 이상의 결과로부터 *Klebsiella* sp. KCL-2 균주의 생육 최적 pH는 중성 조건인 7.0 정도의 좁은 범위를 나타내고, 산성 및 알칼리성 조건에서는 균주의 생육이 억제되는 제한요인으로 작용함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 해양 유류 분해 미생물의 생육에서 보여주는 pH 7.0과 7.5 등과 유사하였다[5,6,18].

최적 생육조건을 범위를 보인 pH 7과 8의 조건에서 배양시간에 따른 유화력의 변화를 보기위해 균배양액을 원심 분리하여 상층액을 얻어 사용하였다. 그 결과, 배양 3일째에 유화력이 가장 높게 나타났으며, pH 7의 조건에서 pH 8의 처리구보다 다소 높게 나타났으며 이는 pH 조건에 따른 균주의 성장상태와 비교적 일치하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. 으로부터

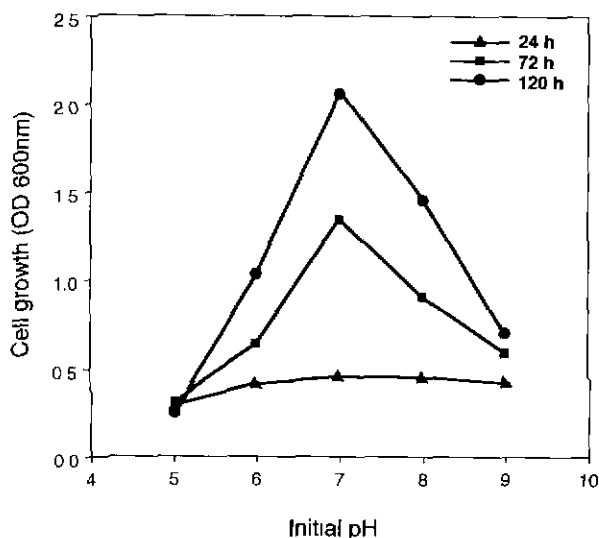


Fig. 3. Effects of pH on cell growth by *Klebsiella* sp. KCL-2(B) in C-medium containing crude oil.

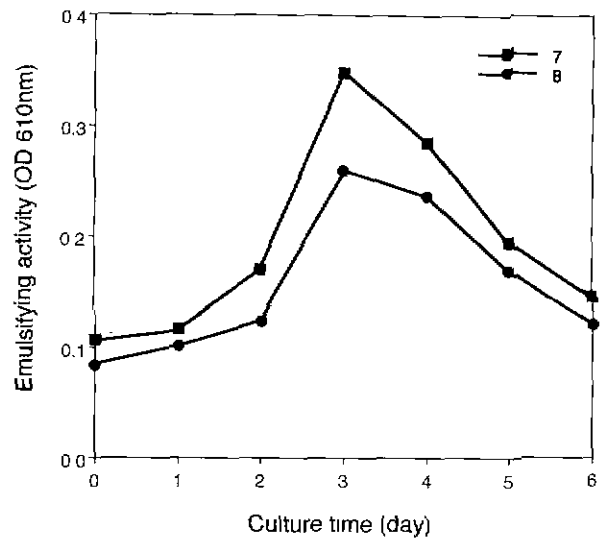


Fig. 4. Effects of pH on emulsifying by *Klebsiella* sp. KCL-2(B) in C-medium containing crude oil.

의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였다[3,13].

기질에 따른 유류의 분해능 특성

분리균주의 탄소원의 종류에 따른 유류분해 특성을 조사하고자 탄소수의 차이가 있는 기질을 사용하였다. Benzene, toluene, xylene 및 *n*-alkane (C<sub>10-28</sub> 짝수탄소) 계열의 각기 다른 탄화수소를 10ml C-배지에 0.1%(v/v) 첨가하여 5일간 진탕배양한 후 KCL-2 균주의 생육정도를 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. KCL-2 균주는 *n*-alkane 계열 C<sub>18</sub>과 C<sub>28</sub> 사이에서 왕성하게 생육하였고, benzene, toluene과 탄소수가 비교적 적은 *n*-alkane C<sub>10-16</sub> 에서는 생육이 거의 없었으며, xylene에서는 생육이 전혀 없었다. 또한, *Klebsiella pneumonia* L25도 hexadecane (C<sub>16</sub>) 및 octane (C<sub>8</sub>)을 기질로서 이용하지 못하였다[8]. *Klebsiella* sp. KCL-2 균주는 비교적 장쇄의 탄화수소 C<sub>18</sub> 이상을 탄소원으로 이용하는 것을 알 수 있었다. Lee 등이 보고한 유류분해 해양세균인 *Acinetobacter* sp. 균주도 C<sub>17</sub> 및 C<sub>18</sub>를 잘 이용하는 것으로 보고된 바 있다[10].

KCL-2 균주의 crude oil 분해능을 촉진시킬 수 있는 인자를 탐색하기 위하여, 10ml의 C-배지에 *n*-alkane 계열 C<sub>10</sub>에서 C<sub>28</sub> 까지의 각기 다른 탄화수소원과 crude oil을 동시에 첨가하여 5일간 진탕배양시킨 후 균체의 성장을 600nm

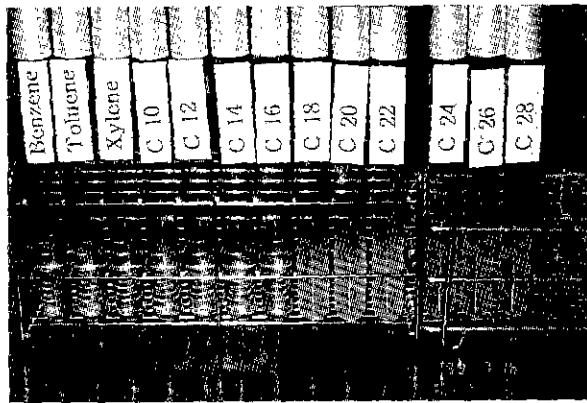


Fig. 5. Effects of carbon sources on crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-2(B) in C-medium at 37°C for 5 days.

에서 흡광도를 측정된 결과, C<sub>18</sub>에서 가장 왕성한 생육을 나타내었다. 이때 배양에 사용된 원유의 분해능은 chloroform-methanol(2:1 v/v) 추출법으로 측정하여 대조구(균체 무첨가)와의 상대 증량비로 나타내었다. n-Alkane계 탄화수소 C<sub>18</sub>과 C<sub>26</sub>에서 가장 왕성한 균생육도를 나타내었으나, C<sub>22</sub>, C<sub>26</sub> 및 C<sub>28</sub>에서는 균주의 생육이 느린 것으로 나타났다(미발표). 이러한 결과는 KCL-2균주가 배양액중의 유일한 탄소원으로 C<sub>18</sub>에서도 균생육이 양호하였기 때문에 crude oil과 동시첨가하여 배양하였을 경우에 균체량의 증가에 의하여 배양액중의 C<sub>18</sub>량이 감소하기 시작하면서 탄소원으로 원유를 이용하므로써 원유 분해능이 증가한 것으로 사료되었다. 한편, C<sub>18</sub>을 0~150 $\mu$ g/30 ml C-배지에 첨가시킨 상태에서 crude oil 분해능을 검토한 결과에서도 첨가농도 의존적으로 원유 분해능이 증가하여 이러한 결과를 더욱 지지해주었다.

## 요 약

원유 분해능이 강력한 해양균주를 얻고자 유류오염 지역으로부터 crude oil을 탄소원으로 이용하는 수십 종을 분리하였다. 분리된 균주중 원유분해능 및 성장속도면에서 가장 우수한 균주를 선별하여 KCL-2로 명명하였으며, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Klebsiella* sp.로 동정하였다. KCL-2 균주의 원유 분해를 위한 최적 배양조건은 배양온도 27°C~37°C였으며, 초기 pH는 7.0이

였다. 또한, 이 균주의 성장은 3.0% 염분농도에서 최대의 성장을 보여주어 해양유래의 균주임을 확인하였다. 비교적 장쇄인 n-alkane계 탄화수소의 C<sub>18</sub>~C<sub>28</sub>의 탄화수소를 탄소원으로 이용하였다. 원유분해시 C<sub>18</sub>의 첨가에 의해 균생육 및 원유 분해능이 촉진되는 것으로 나타났다. KCL-2 균주의 유효활성은 32°C, pH 7.0의 배양조건에서 배양 3일째에 가장 높게 나타났다.

## 감사의 글

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

## 참 고 문 헌

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 systematic 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, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong and H. S. Koo. 2000.

- Isolation and characterization of oil degrading bacteria from south sea of korea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 27-34.
8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Radwan S. S., N. A. Sorkhoh, I. M. El-Nemr and A. F. El-Desouky. 1997. A deasibility study on seeding as a bioremediation practice for the oily Kwaiti desert. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 353-358.
  15. Rheinheimer, G. 1981. *Microbiologie der gewässer*. 3rd. ed. p. 251. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. Ward, D. M. and T. D. Brock. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 353-359.