

## 유류분해세균 *Providencia rettgeri* 4A3의 분리 및 원유분해 특성

김상우 · 유주순 · 이상철 · 조영수 · 이영춘 · 최용락\*

동아대학교 생명자원과학부

### Isolation of Oil-Degrading Bacterium, *Providencia rettgeri* 4A3 and Characterization of Crude Oil Degradation

Sang-Woo Kim, Ju-Soon Yoo, Sang-Cheol Lee, Young-Su Cho, Young-Choon Lee and Yong-Lark Choi\*

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

#### Abstract

Several bacterial strains utilizing crude oil as their sole carbon and energy source were isolated from marine environment polluted by crude oil. Among them, the selected strain 4A3 showed strong degradation activity for crude oil. This strain was identified as a *Providencia rettgeri* 4A3 based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics. The optimum cultural conditions were as follows; 26°C for temperature and 7.0 for initial pH. Additionally, the optimal concentration of sodium chloride was 2.0%, indicating that this strain was derived from sea water. The emulsifying activity by 4A3 was the highest after 3 days of cultivation under the condition of 2.0% sodium chloride, pH 7.0 and 26°C. This strain had one cryptic plasmid in 7.0kb size.

**Key words** – *Providencia rettgeri* 4A3, crude oil, cryptic plasmid, emulsifying activity,

#### 서 론

유조선의 사고 등에 의한 유류 유출 및 각종 폐유 방출 등으로 해양오염이 늘어나면서 해양 생태계에 커다란 피해가 나타나고 있다. 우리나라의 유류 연안 물동량은 최근 꾸준히 증가하였고, 유류의 수출입 물동량 또한 계속하여 증가하였다. 최근, 유류수송 선박이 대형화, 자동화 및 고속화됨에 따라 해양사고시 수만톤에서 수십만톤에 이르는 초대형 유류 유출 사고도 발생하고 있는데, 전세계적으로 원유가 해양으로 유출되는 양은 엄청나다[11,12,14]. 우리나라

에서도 해양 유류 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. 최근에는 주유소 등의 증가로 인하여 농경지 주변 토양이 유류에 오염되는 경우가 증가되고 있는 실정이다. 따라서 친환경적이며 효율적인 유류제거 방법의 개발이 필요한 실정이다 [10,19,20].

해양에 유출된 유류는 점성이나 휘발성의 물리적 성질, 유류의 화학적 성질, 해양상태나 태양광선 등의 기상상태, 해수의 온도, 유속, 부유물질 및 존재하는 박테리아의 종류에 따라 변한다[8]. 유처리 방법중의 하나인 생물학적 방법

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 82-51-200-7585, Fax : 82-51-200-6993  
E-mail : ylchoi@mail.donga.ac.kr

으로는 해양의 유류 오염물질인 *n*-, *iso*-, *cyclo-alkane* 계열의 탄화수소원과 원유(*crude oil*) 및 경유, 중유 등 다양한 기질을 분해시키는 균주를 분리, 동정하여 실제로 오염현장에 적용시키는 방법이 있다[1,6,7,13,20]. 이러한 유류 분해의 해양 미생물로서는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* sp. 등이 대부분을 차지하고 있으며[4,7,16], 또한 이들 균주가 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 판단할 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 자원으로 부터 얻는 일이 시도되어야 한다. 본 연구에서는 원유 분해 세균의 생리학적 특성과 분자유전학적 특성을 밝히기 위한 미생물 자원을 탐색할 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

### 사용시약 및 플라스미드 DNA분리

각종 제한효소, Wizard miniprep DNA purification system은 Promega에서 구입하였고, ampicillin, 등의 항생제 및 기타 여러 시약들은 Sigma 사 혹은 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다. 단백질 정량을 위하여는 Bio-rad 사의 protein assay kit를 사용하였다.

선별된 균주로부터 플라스미드 DNA의 분리는 Maniatis 등의 방법[17]에 따라 행하였으며, 유전자 재조합 실험을 위한 플라스미드 DNA 분리는 Promega의 Wizard miniprep 정제 kit로 분리하여 준비하였다.

### 균주분리 및 배양방법

유류 분해 미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지(Carbon-minimal medium)를 사용하였으며, 배지의 조성은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L, CaCl<sub>2</sub> 10mg/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10mg/L,

NaCl 30g/L, yeast extract 0.2g/L 및 trace element 용액 2mL (MoO<sub>3</sub> 1mg/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 7mg/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1mg/L, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 6mg/L, NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1mg/L)를 함유하고 있으며, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 유류가 오염된 해양으로부터 유류 분해 미생물을 분리하기 위하여 유출이 빈번하다고 생각되는 부산의 자갈치 선착장과 인근 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하였다. 탄소원으로 *crude oil*을 1% 첨가한 C-배지에 채취한 해수를 1% 첨가하여 37°C에서 200rpm 으로 7일간 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 10g, trypton 10g, yeast extract 5g/L)에서 각각 전배양시킨 후, 1% 원유가 첨가된 C-배지에 1% 접종하여 37°C, 7일간 200rpm으로 배양한 후 유류 분해능이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

### 균주의 동정

선별된 균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology[5]를 근거로 하여 동정하였다.

### 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 26°C, 32°C, 37°C 및 42°C에서 각각 180rpm으로 진탕배양하였다. 이때 배양시간에 따른 균체의 성장은 1, 3, 5일에 진탕배양한 배양액을 일정량 취하여 spectrophotometer (U-1100, Hitachi, Japan)를 사용하여 600nm에서 흡광도를 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 측정하였다. 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 배양

액을 일정량 취하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

Crude oil 분해능 측정

4A3 균주의 배양 시간에 따른 유화력의 변화를 보기 위해 균배양액을 원심분리한 후 상층액을 얻어 사용하였다. 유화력 측정은 0.5M NaCl이 첨가된 20mM Tris-HCl 완충 용액(pH 7.8) 5ml에 상층액 1ml를 가하고, 기질로서 2% crude oil를 첨가하여 1분간 강하게 교반한 다음 10분간 정지시켜 중간부위의 반응액 2ml를 취하여 610nm에서 흡광도 측정값으로 나타내었다. 또한 분리균주의 유류분해 정도는 4% crude oil이 첨가된 배지에 진탕배양 시키면서 경시적으로 관찰하였다 [21].

결과 및 고찰

균주의 분리

부산시 남항 인근의 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200ml에 crude oil 1% 및 해수 1%를 첨가하여 37°C, 200 rpm으로 진탕배양한 후, crude oil 분해능을 가진 분해균이 생육하는 것을 확인하였다. 배양액의 일부를 crude oil 1%를 함유한 새로운 C-배지에 첨가하는 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 1% 첨가하여 37°C에서 7일간 진탕배양시켰다. 이때 대조구로 C-배지에 crude oil 1%만을 첨가시킨 것과 C-배지에 1% 균주만을 첨가시킨 것을 사용하였다. 대조구와 함께 7일간 배양시킨 후, crude oil 분해능을 가진 수십여 종의 균주를 분리하였으며, 이 중에는 형태학적 및 생리학적 특성으로 보아 기존에 알려져 있는 *Klebsiella* sp., *Aeromonas* sp. 및 *Pseudomonas* sp. 속으로 추정되는 균주도 있었으나 그 중에서 분해능이 우수하면서 새로운 균주로 보여지는 4A3 균주에 대하여 계속하여 실험하였다.

균주의 동정

선별된 4A3의 동정을 위하여 그램 염색법, 형태학적 관찰 및 생화학적 실험을 수행한 결과를 Table 1에 나타내었다. 그램 염색법에 의해서는 그램 음성균으로 확인되었으

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

	<i>Providencia rettgeri</i> 4A3	<i>Ent. aerogenes</i> 4A12	<i>K. Pneum. Pneumoniae</i> 2A1
Gram strain	-	-	-
Arginine	-	-	-
Lysine	-	+	+
Sodium citrate	+	+	+
Tryptophane	+	-	-
Glucose	+	+	+
Inositol	+	+	+
Sorbitol	-	+	+
Rhamnose	+	+	+
Sucrose	-	+	+
Arabinose	+	+	+

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

며, 활발한 운동성을 가진 균주로 확인되었다. 생화학적 실험은 미생물 동정 kit인 API 20 NE Kit를 이용하여 실시한 후, *Bergey's manual of systematic bacteriology*[5]에 준하여 검토한 결과, *Providencia rettgeri*로 동정되어 *Providencia rettgeri* 4A3로 명명하였다. 우리나라 및 외국의 유류 오염 지역에서 주로 분리되고 있는 균주로는 *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp. 및 *Arthrobacter* sp. 등이 보고 되고 있다[4,6,18]. 그러나, 본 실험에서 분리된 *Providencia rettgeri* 4A3 균주는 이들과는 다른 종으로서, 앞으로의 생물유화제 생산, 유전공학적 방법에 의한 우량 균주의 개발 및 유류 분해능의 촉진 인자 탐색 등을 위한 많은 연구가 기대된다.

균주의 생육특성

항생제 존재하에서의 분리균의 생육을 조사하고자 chloramphenicol을 비롯한 12 종류의 항생제를 사용한 paper disc를 사용하여 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 12 종류의 항생제 중에서 내성을 보이는 것은 penicillin, colistin, bacitracin 및 polymycin 등 4종류였다. 이는 분리균주의 형질전환을 통한 유전학적인 실험을 수행 할 때에 잘 활용될 것으로 생각된다.

분리균의 생육을 조사하기 위해 C-배지에 탄소원으로 crude oil 1%를 첨가하고 NaCl 농도를 달리하여 *Providencia*

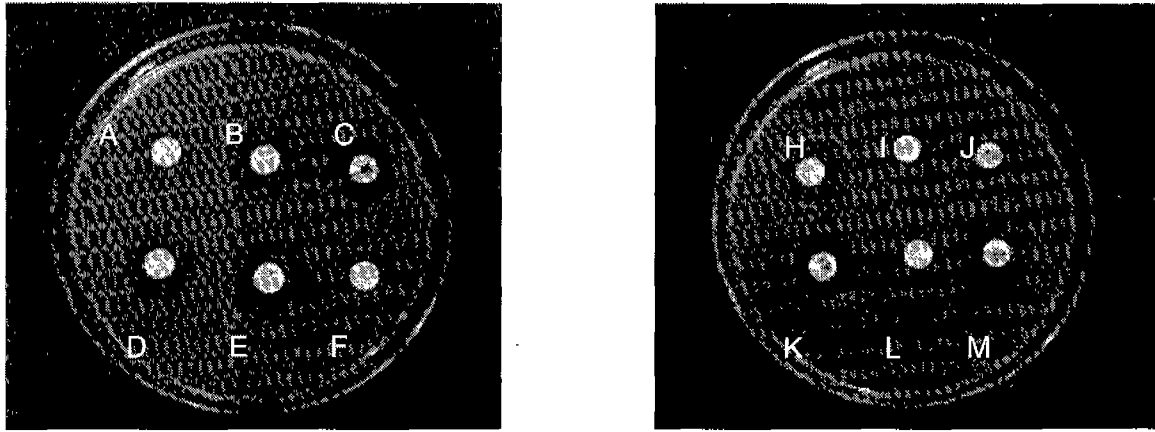


Fig. 1. Test to antibiotic resistant of *Providencia rettgeri* 4A3.

Paper susceptibility test discs were loaded on the plate spreaded with the strain 4A3 and cultured for 24 hr at 30°C.

A: Chloramphenicol, B: Tetracycline, C: Kanamycin, D: Gentamycin, E: Ampicillin, F: Penicillin, H: Cephalothin, I: Colistin, J: Bacitracin, K: Neomycin, L: Polymixin, M: Streptomycin

*rettgeri* 4A3을 진탕배양하면서 시간별로 시료를 채취하여 균주의 성장을 조사하였다. 그 결과, 본 실험에 사용된 4A3 균은 NaCl 농도 2%에서 가장 성장이 양호하였으며, 3일 정도의 배양에서 최대성장을 보였다(Fig. 2). NaCl 농도 3%, 4% 및 5%에서는 균의 생육속도가 느리거나 생육이 저해를 받아 2일 이상의 배양에서 성장이 점차 억제되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 유류분해 해양세균인 *Klebsiella pneumoniae* L25는 NaCl 농도 3.0 및 3.5%에서 최대의 성장을 보여 준 결과[9], *Acinetobacter* sp.의 NaCl 농도는 3% [11], *Xanthomonas campestris* M12 및 *Pseudomonas maltophilia* N246은 3.0-3.5%로 보고[2,9]된 것 보다는 약간 낮은

최적 생육 NaCl 농도를 보였다. NaCl 농도 5% 이상에서의 균생육과 유효활성의 감소는 호흡증가 및 스트레스 작용에 의한 원인[3]으로 지적되고 있으며, 또한 염농도가 수계의 모든 생물군집에 중대한 영향을 미치는 환경요인으로 작용[15]하는 것이 보고된 바 있다.

분리균인 *Providencia rettgeri* 4A3의 생육에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과를 Fig. 3에서 보면, 26°C에서 최대로 생육이 왕성함을 나타냈다. 32°C 및 37°C에서 비슷한 양상으로 생육이 왕성하였으나, 26°C에서의 생육상태보다는 약간 뒤떨어졌다. 그러나 42°C에서는 생육이 매우 불량하였

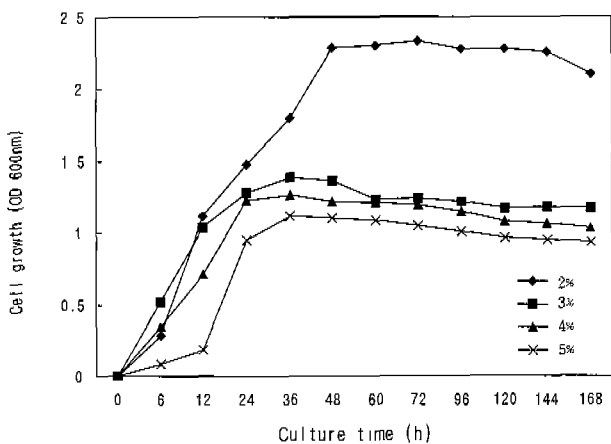


Fig. 2. Effect of NaCl concentrations on the cell growth by *Providencia rettgeri* 4A3 in C-medium.

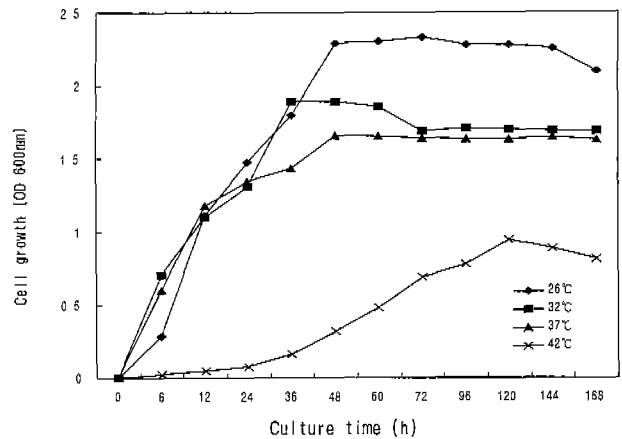


Fig. 3. Effects of temperature on the cell growth by *Providencia rettgeri* 4A3 in C-medium containing crude oil.

다. 석유탄화수소의 분해는 매우 광범위한 온도 범위에서 일어날 수 있다고 알려져 있으나, 지금까지의 보고[2,9]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 나타났으며, 분리균인 *Providencia rettgeri* 4A3은 *Pseudomonas aeruginosa* BYK2의 최적 배양온도와 비슷함을 나타내었다.

분리균주의 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 배양한 후 균체 생육을 측정된 결과, 4A3 균주는 pH 6과 8사이에서 높은 균체 생육을 보였으며, pH 5 이하와 pH 9 에서는 균주의 생육이 급격히 감소하였다(data not shown). *Providencia rettgeri* 4A3 균주의 생육 최적 pH가 중성 조건인 7.0 정도의 좁은 범위를 나타내는 결과는 해양 유류분해 미생물의 생육에서 보여주는 pH 7.0과 7.5 등과 유사하였다[6,7,20].

최적 생육조건을 보인 pH 7과 26°C에서의 조건에서 배양시간에 따른 유화력의 변화를 보기위해 균배양액을 원심분리하여 상층액을 얻어 사용하였다. 그 결과, 최대 생육이 왕성함을 나타낸 조건에서 유화력이 가장 높게 나타났다. 즉, 배양 3일째에 가장 높은 유화력을 보인 것은 균주의 성장상태와 비교적 일치하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. 으로부터의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였다[4,14]. 또한 분리균주의 유류분해 정도를 보고자 4% crude oil이 첨가된 배지에 진탕 배양시키면서 경시적으로 관찰한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 배양일수가 경과할수록 기름 층이 약간 감소 되어짐을 확인하였다. 배양액이 들어있는 시험관을 경사지게 놓혀 놓았을 때 상층으로 모여있던 유류가 2일째 부터는 유류의 작은입자가 전반적으로 분산되어지는 것을 관찰할 수 있었으며, 8일 정도의 배양액에서는 유류입자가 하층으로 모였다.

내재성 플라스미드 DNA의 특성

분리균주 4A3의 원유 분해능이 내재성 플라스미드 DNA

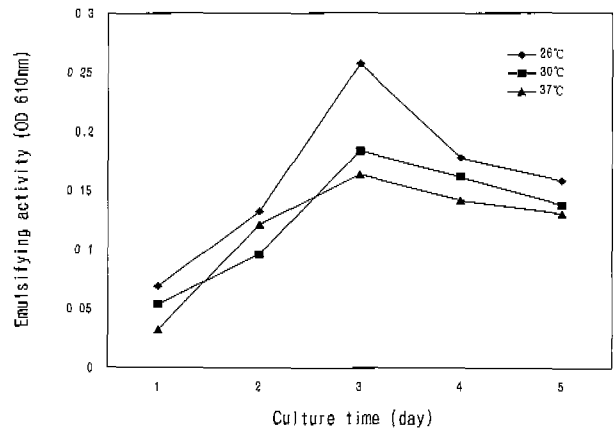


Fig. 4. Effects of temperature on emulsifying activity by *Providencia rettgeri* 4A3 in C-medium containing crude oil.

유래의 효소에 의한 것인지를 알아보기 위하여 분리균주로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 그들의 크기와 제한효소에 의한 절단형태를 분석하였다. 그 결과 존재하는 플라스미드의 크기는 대략 7kb에 해당하는 1종류의 플라스미드 DNA가 확인되어 pSW4A3 이라 명명하였다. Crude oil

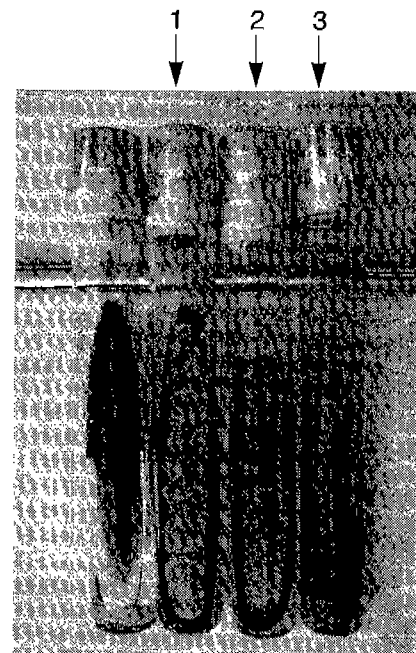


Fig. 5. Crude oil degradation pattern by cell growth of *Providencia rettgeri* 4A3 in C-medium containing crude oil(4% v/v) during 8 day at 26°C. 1; 2 day, 2; 5day, 3; 8 day

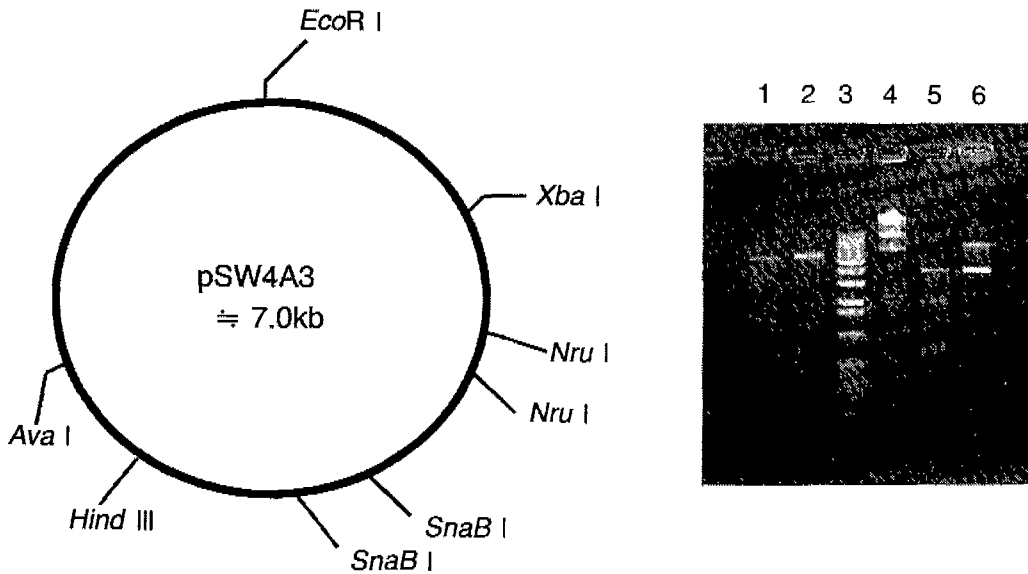


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis pattern(right) and physical map of the pSW4A3(left) derived from *Providencia rettgeri*. Lanes, 1; 4A3/*Xba* I and *EcoR* I, 2; 4A3/*Xba* I and *Nru* I 3; 1 kb ladder 4; *Hind* III size marker, 5; 4A3/*Xba* I and *SnaB* I, 6: uncutted pSW4A3 DNA

0.1%를 첨가 또는 미첨가에 따라 달리 배양한 경우 분리되는 플라스미드 DNA의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 제한효소 처리에 의한 분석결과 플라스미드 DNA상에는 다양한 제한효소 절단부위가 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 해양미생물에 존재하는 플라스미드 DNA가 원유분해와 관련되어 있다는 연구보고는 *Pseudomonas* sp.에서 알려져 있다. 한편, 분리 균주 유래의 이들 플라스미드 DNA가 보유하는 유전자가 crude oil의 분해와 관련된 영향을 미칠 것으로 예상하여 이들의 분자적 특성은 계속하여 조사할 필요가 있다.

### 요 약

원유 분해능이 강력한 해양균주를 얻고자 유류오염 지역으로부터 crude oil을 탄소원으로 이용하는 심수종을 분리하였다. 분리된 균주중 원유분해능 및 성장속도면에서 우수한 균주를 선별하여 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Providencia rettgeri* 4A3로 동정하였다. 4A3 균주의 원유 분해를 위한 최적 배양조건은 배양온도 26°C로 비교적 낮은 온도였으며, 초기 pH는 7.0이었다. 또한, 이 균주는 2.0% 염분농도에서 최대의 성장을 보여주어 해

양 유래의 균주임을 확인하였다. 4A3 균주의 유화활성은 26°C, pH 7.0의 배양조건에서 배양 3일째에 가장 높게 나타났으며, 유류분해의 경시적인 변화패턴을 관찰하였다. 분리균주는 약 7.0 kb의 크기를 나타낸 미지의 플라스미드 1개를 보유하고 있었다.

### 감사의 글

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

### 참 고 문 헌

1. Cha, J. Y., B. G. Kim, S. Y. Chung, Y. S. Cho, Y. L. Choi and Y. C. Lee. 1999 Characterization of crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 isolated from sea water. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 452-457.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. John, G. H., N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (9 th ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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 oil by *Acinetobacter* sp. A54. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 520-526.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Rheinheimer, G. 1981. *Microbiologic der gewalsser*. 3rd. ed. p. 251. gustav Fischer Verlag Stuttgart.
17. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Ward, D. M. and T. D. Brock. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 353-359.

(Received September 19, 2001; Accepted October 24, 2001)