

Characterization Study of Crude Oil Degrading Microbiology Isolated from Incheon Bay

Hye Jin Choi^{1,2}, Bo Young Oh¹, Young Sun Han¹, Myung Je Hur¹ and Jong-Guk Kim^{2*}

¹Incheon Research Institute of Public Health and Environment, Incheon 400-101, Korea

²Department of Life Sciences and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received December 12, 2013 / Revised June 19, 2014 / Accepted June 25, 2014

Indigenous microorganisms play decisive roles in biodegradation. In this study, eighty strains of hydrocarbon-degrading microbes were isolated from Incheon Bay. Among them, 12 strains were selected by an oil film collapsing method. The bacterial strain 'Incheon9' was eventually selected based on its relatively higher lipase and emulsification activities, and was identified as *Acinetobacter* sp. (NCBI accession code: KF54854). The optimum condition for the growth and emulsification activity of *Acinetobacter* sp. Incheon9 was 20°C, pH 7, and 1% NaCl. The optimum time for the best production of biosurfactant was 72 hrs. The oil degradation ability of *Acinetobacter* sp. Incheon9 was investigated by measuring the residual oils in the culture medium by gas chromatography (FID). This research provides foundational data for eco-friendly environmental remediation by microorganisms.

Key words : *Acinetobacter* sp., bioemulsifier, biosurfactant, lipase, oil-degradation

서 론

한 해 1300만 톤의 원유가 선박 등의 이동수단에 의해 지속적으로 바다로 유출되고 있으며, 유조선 사고 등의 일시적인 원인으로 다량의 원유가 바다를 오염시키고 있다[1]. 유출된 소량의 원유는 자연 분해되기도 하지만 일시에 다량의 원유가 유출되게 되면 모일펜스를 전장하여 유출유를 포획하고 유흡착재를 이용하여 기름을 회수하는 물리적인 방법이 우선 시행된다. 동시에 유처리제를 살포하여 잔여 유류를 분산처리하는 화학적 방법 이용되고 있으나 이러한 방법들은 지속적인 효과를 내기 어려울 뿐만 아니라 추후 유처리제에 의한 2차 독성을 유발하여 생태계의 자정능력을 저하시킨다. 이에 최근에는 미생물을 이용한 친환경방법인 생물정화기법(bioremediation)이 선호되고 있다. 이 방법은 환경정화능력이 있는 미생물을 오염된 환경에 투입하거나 토착 미생물의 생존이 최적화 되도록 생태계의 환경을 변화시키는 것으로 주로 부유 퇴적물의 오염도가 높은 곳, 습지나 갯벌 지역, 생물 자원이 풍부한 지역 등에 권장되고 있다[11, 13, 15]. 실제 Exxon Valdez호의 유류 유출 사고 시 알래스카 해안을 오염시킨 원유를 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 일부 제거하였으며 현재에도 *Acineto-*

bacter, *Norcadia*, *Micrococcus*, *Bacillus*속 등 원유 분해 미생물을 분리하여 환경에 적용하고자 하는 연구가 이뤄지고 있다[2, 9, 10].

원유 분해 미생물은 원유를 에너지원으로 이용하는 과정에서 기질을 생분해하며 생물계면활성제를 생산한다. 생물계면활성제(biosurfactant)는 양친매성(amphiphilicity)을 가지며 원유를 유화시켜 다른 종류의 생물들이 에너지원으로 이용하기 용이하도록 만들어준다. 미생물이 생산하는 생물계면활성제는 화학적 물질보다 독성이 낮고 환경에 적응하기 위해 다양한 구조를 가지고 있으며 발효에 의한 대량생산이 가능하여 선호되고 있다. 그 중에서도 갯벌과 해안에 서식하는 미생물이 생성하는 물질은 지구환경의 생화학적 순환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 비영양성, 내염성 등의 특징을 가지며, 특히 저온에서도 안정적인 활성을 가져서 다양한 분야에서 활용도가 높다[5, 6].

갯벌은 조수간만의 차이에 의해 육지가 되는 지역으로 심해 퇴적물, 습지 등과 다른 독특한 생태학적 특징을 가지며 육지와 해양의 경계지점으로 지리적 특이한 구조를 이루고 있어 오염물질의 영향을 많이 받으며 오염된 이후 회복하는데 장시간이 필요하다[4]. 또한 갯벌은 예전부터 새우잡이, 꽃게잡이 어선들에 의해 꾸준히 항구로 활용되어 해양 오염의 가능성이 상존해왔다. 최근 선박의 대형화와 물류량의 증가로 그 위험성이 높아지고 있는 인천 연안의 갯벌에서 원유를 탄소원과 에너지원으로 사용 할 수 있는 미생물을 분리하였다. 이들 미생물을 대상으로 원유를 분해할 수 있는 리파아제(lipase)의 활성과 계면활성을 시킬 수 있는 유화활성(emulsification activity)을 측정하여 추후 환경정화에 사용 될 생물학적 자원을 확보하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5379, Fax : +82-53-955-5379

E-mail : kimjg@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

시료 채취 및 원유 분해 미생물 선별

시료는 인천 연안의 동막(latitude: 37°35'27.90", 37°35'18.18", 37°35'03.65", longitude: 126°27'26.80", 126°27'20.61", 126°27'11.36), 북항(latitude:37°29'28.07", 37°29'29.40", 37°29'44.40", longitude: 126°37'10.58", 126°37'10.10", 126°38'18.30"), 아라뱃길(latitude:37°32'37.10", 37°32'38.50", 37°32'39.60", longitude: 126°34'22.20", 126°34'26.20", 126°34'29.70")에서 채취하였으며 각 지역 당 3지점의 갯벌을 표면에서 10 cm 깊이에서 멸균 도구를 이용하여 채취하고 아이스 팩에 담아 이동하였다.

미생물의 분리를 위해 0.05% K₂HPO₄, 0.1% NH₄Cl, 0.2% Na₂SO₄, 0.0001% CaCl₂*6H₂O, 0.1% MgSO₄*7H₂O, 0.0001% FeSO₄에 1% crude oil를 첨가하여 원유를 유일 탄소원으로 하는 최소배지를 이용하였다. 갯벌 5 g을 0.85% 생리식염수 45 ml 에 희석하여 최소배지에 도말 한 후 다양한 모양의 집락을 순수분리하여 20℃에서 14일간 배양하였다. 증류수 5 ml에 원유 20 µl를 떨어뜨려 oil film을 형성한 뒤 분리된 균주의 배양액 5 µl를 oil film 중앙에 떨어뜨려 형성된 clear zone의 지름으로 oil film collapsing 활성 정도를 측정하여 원유 분해 능이 있는 미생물을 1차 선별하였다[8]. 선택 된 균주는 20% glycerol 첨가 Brain Heart Infusion (Difco, USA)배지에 현탁하여 -70℃에 보관하면서 실험하였다.

균주 동정 및 생화학특성 분석

원유를 유일 탄소원으로 하는 배지에서 7일간(20℃) 선택된 균주들을 배양하여 total genomic DNA (G-spin DNA extraction kit, INTRON Biotech, Korea)를 추출하였다. 유전자를 통한 종(species)분석을 위해 16s rRNA 유전자를 증폭하였으며 이때 bacterial universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA-

CTT-3')를 이용하였다. Primer (10 pmol)를 각각 5 µl, 주형 DNA 5 µl, PCR premix 10 µl (Intron, Korea)을 혼합물로 하여 핵산증폭기(2720 thermal cycle, AB, USA)를 이용하여 증폭하였다. 조건은 94℃에서 10분간 반응 후 94℃에서 1분, 54℃에서 45초, 72℃에서 45초로 35회 반복 반응하고, 72℃에서 10분간 추가반응 시켰다. 증폭된 유전자를 정제(Labo-gel extraction kit, Cosmo_genetech, Korea)하여 pGEM-T vector (Promega, USA)에 ligation시킨 후 One shot Top 10-chemically competent cell (Invitrogen, USA)에 transformation시켜 X-gal과 IPTG가 첨가된 Luria-Bertani (Difco, USA)배지에서 형질전환 된 colony를 선택하고 플라스미드를 추출(plasmid-purification kit, cosmo_genetech, Korea)하였으며 Cosmo genetech (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 genbank의 유전자 데이터와 비교 분석하였으며 유전자가 유사한 균주들과 염기서열 유사도를 확인하기 위해 Bio-Edit (ver 7.2.3.)과 Phylogenetic Tree version MEGA (ver 5.2)를 통해 phylogenetic tree를 그렸다.

NCBI accession number

분석한 16s rRNA 유전자를 NCBI의 Genbank 유전자 데이터 베이스에 등록하여 accession code (KF548540)를 부여 받았다.

리파아제 활성 측정

Bulow와 Mosbach의 방법을 변형하여 p-nitrophenyl-butyrate 10 µl, ethanol 40 µl, 50 mM Tris-buffer (pH 8.0) 950 µl를 기질 용액으로 하여 원심분리 한 배양액 500 µl을 넣고 30℃에서 30분간 반응시켰다. TCA (Trichloroacetic acid)용액 300 µl를 첨가하여 원심분리(9,000 g, 5분) 한 후 410 nm에서

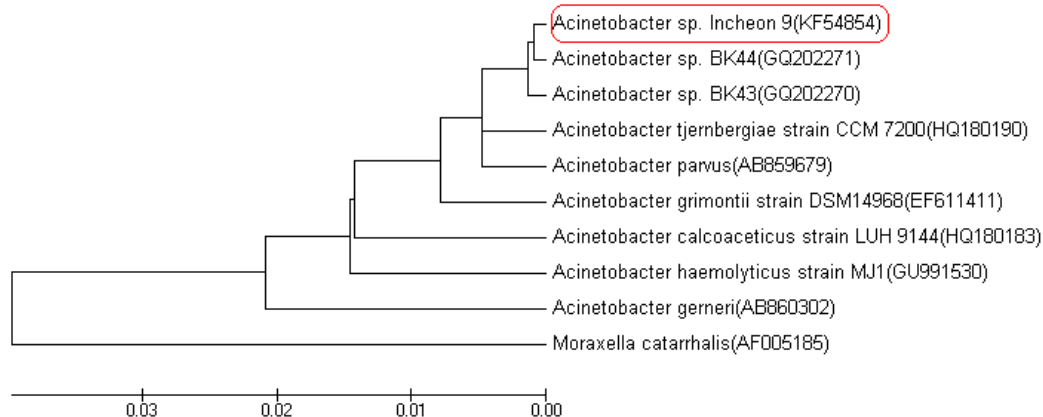


Fig. 1. Phylogenetic relationships of the *Acinetobacter* sp. Incheon9 related bacteria based on the partial 16s rRNA gene sequence. The phylogenetic tree was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap value, expressed as percentages of 10,000 replication, are given at major branching points.

흡광도(Infinite M200 Pro, Tecan, 540 nm)를 측정하여 리파아제 활성을 측정하였다. 이때 standard는 p-nitrophenol을 사용하였다[3].

유화활성 및 유화안정성 측정

유화활성(emulsification activity)측정은 7일간 배양한 액체 배지를 원심분리(13,000 g, 10분)한 상등액 2 ml에 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml를 혼합 한 후 유화기질로 n-hexanedecane 1 ml를 첨가하여 1분간 강하게 교반하여 유화시킨 후 10분간 정지시키고 하층부의 200 μ l를 유화활성을 측정(540 nm)하였다[16]. 이때 생물계면활성제를 생산하는 *Acinetobacter* sp. (KACC14342)와 *Pseudomonas aeruginosa* (KACC10186)를 농업진흥청의 농업자원센터에서 분양 받아 비교 균주로 사용하였다.

기질에 따른 유화활성과 유화안정성 측정

탄화수소의 길이에 따라 여러 종류의 탄화수소를 기질로 하여 균주의 유화활성을 측정하였다. 유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법으로 실험하고 실온에서 방치하면서 매 10분마다 총 60분간 흡광도를 측정하였으며 그 값을 log값으로 환산하여 나타냈고 이 값들간의 기울기를 유화활성의 안정도 상수 Kd(시간당 붕괴되는 유화활성의 기울기 값)로 나타내었다.

최적 배양 및 유화활성 조건

균주의 최적 성장 조건 조사를 위해 균주를 McFarland 3.0으로 탁도로 맞추고 LB broth (Difco, USA)에 1% 해당량의 균주를 접종하였다. 20 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 42 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 온도별 성장속도를 측정하였고, 1N HCl과 1N NaOH를 이용하여 pH 5, pH 7, pH 8, pH 9로 만든 LB배지에 각각 균주를 접종 후 20 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 배양하면서 염의 농도가 균주의 성장에 미치는 영향을 측정하였다. 배지에 NaCl을 첨가하여 0~5%의 염에 따른 성장도를 측정하였다. 또 시간별 균주의 성장속도를 측정하기 위해 1% NaCl을 첨가 한 LB broth (pH 7)에 균을 접종하고 20 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 600 nm에서 성장도(Infinite M200 Pro, Tecan)를 측정하였다. 그리고 각각의 다른 조건의 배양액을 원심분리하여 상등액을 시험용액으로하여 유화활성 실험을 시행하였으며 이를 통해 배양조건에 따른 유화활성을 측정하였다.

Gas chromatography분석

유일한 탄소원 및 에너지원으로서 crude oil을 공급하여 배양한 미생물에 의해 분해되고 남은 잔류 원유량을 추출하여 분석하였다. 잔류 원유를 추출하기 위해 균주 배양액 50 ml에 1% crude oil를 첨가하여 7일 배양하였다. 이 배양액에 HCl 2 ml를 첨가하여 반응을 멈춘 후 추출 용매로 hexane 25 ml를

이용하여 3회 반복 추출하였다. Na₂SO₄를 이용하여 수분을 제거한 후 질소가스로 hexane잔류물을 제거하고 잔류 원유를 농축하였다. 농축된 시료를 hexane 2 ml에 녹여 gas chromatography (Agilent technologies, USA)분석하였다. 이때 FID (Flame Ionization Detector) 검출기와 HP5 column (30 m \times 0.320 mm I.D., 0.25 μ m film thickness, Agilent technologies, USA)을 이용하였으며 carrier gas로 질소를 사용하여 1.0 ml/min 유속으로 흘려주었다. 주입온도는 250 $^{\circ}$ C, 측정온도는 250 $^{\circ}$ C, 오븐 온도는 80 $^{\circ}$ C에서 300 $^{\circ}$ C까지 승온 온도 15 $^{\circ}$ C/min로 하여 분석하였다.

결과 및 고찰

원유 분해 미생물의 분리 및 동정

해양에는 석유탄화수소를 탄소원과 에너지원으로 사용하는 미생물이 존재하며 이러한 미생물은 산업폐수 또는 생활하수가 유입되는 지점에 널리 분포한다[4]. 선박의 이동이 잦으면서 수도권과 인접하여 생활하수의 유입이 많고 정유공장 등의 지대가 인접한 인천연안의 갯벌에서 원유(crude oil)를 탄소원으로 하는 80균주를 순수분리 하고 이들 균주에 대해 oil film-collapsing assay법을 이용하여 생물계면활성을 보유하여 원유를 유화시킬 수 있는 12균주를 2차 선별하였다.

이들 중 활성이 좋았던 Incheon9의 16s rRNA유전자를 분석한 결과 *Acinetobacter* sp. 종과 유전자가 유사하였고 이들 균주들과 유전적 상관성을 알아본 결과 *Acinetobacter* sp. BK44 (GQ202271)와 유전적 연관도가 99%로 상동성이 높았다. 이에 *Acinetobacter* sp. Incheon9라 명명하고 NCBI에 유전자 염기서열을 등록하여 accession code KF548540을 부여 받았다(Fig. 1).

리파아제 활성

리파아제는 triacylglycerol을 분해하여 저분자로 만드는 효소로 물과 기질의 계면에서 기질을 용해하는 계면활성현상(interfacial activation)을 가진다[17]. 이러한 리파아제의 성질을 이용하여 세제산업에서는 *Humicola lanuginosa*를, 유화제 산업에서는 *Chromobacterium viscosum* 균주를 이용하고 있다[5]. 이외에도 환경분야에서 기름으로 오염된 토양이나 모래, 유공장의 폐수처리를 위해 미생물의 리파아제를 이용하고 하는 연구가 진행되고 있다[7, 18]. p-nitrophenyl-butyrate를 기질로 하여 분리된 균주들의 lipase의 활성을 측정한 결과 Incheon9가 28.32 unit/ml로 가장 활성이 좋았다. 이는 *Acinetobacter* sp. KACC14342의 16.82 unit/ml, *Pseudomonas aeruginosa* KACC10186의 24.53 unit/ml보다 활성이 좋은 것으로 측정되었다(Table 1, A).

Table 1. Emulsification activity and lipase activity of *Acinetobacter* sp. KACC 14342, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 101806 and *Acinetobacter* sp. Incheon 9

Bacterial strain	A) Lipase activity	B) Emulsification activity
<i>Acinetobacter</i> sp. KACC 14342	16.82	0.14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 101806	24.53	0.06
<i>Acinetobacter</i> sp. Incheon 9	28.32	0.38

A) Lipase activity B) Emulsification activity

유화활성 측정

생물계면활성제를 생산하는 미생물들은 n-alkane의 탄소를 이용하며 이 과정에서 고분자의 탄화수소 화합물이 미세한 입자로 유화되고 세포와 기질의 접촉면이 넓어진다. 이러한 작용에 의해 고분자 물질이 보다 쉽게 분해 할 수 있으며 추후 유류 유출에 의한 해양 오염에도 응용 될 수 있다[6, 12]. 이에 고분자물질인 n-hexadecane (C16)을 분해하는 정도로 생물 유화활성도를 측정한 결과 Incheon9는 0.38 (OD 540 nm)로 활성이 가장 좋았다. 이는 생물계면활성제를 생산한다고 알려진 *Acinetobacter* sp. KACC14342의 0.14, *Pseudomonas aeruginosa* KACC101806의 0.06보다 활성이 좋은 것으로 측정되었다 (Table 1, B). 기존 연구에 의하면 *Candida rugosa*와 *Pseudomonas aeruginosa*가 생성하는 리파아제는 계면활성능력이 없으며 *Proteus vulgaris*가 생성하는 리파아제는 부분적으로 계면활성을 가진다고 알려져 있다[7]. 그러나 Incheon9의 경우 리파아제 활성도 가지면서 동시에 계면활성도 가지는 것으로 사료된다.

기질에 따른 유화활성과 유화안정성 측정

탄소원의 길이에 따른 여러 종류의 탄화수소화합물을 기질로 하여 기질별 유화활성을 측정하였고, 또 시간에 따라 유화활성이 줄어드는 정도를 측정하여 유화안정성을 측정하였다. 탄소원에 따른 기질별로 유화활성은 olive oil을 분해할 때 유화능이 1.63으로 가장 좋았으며 hexane (C6)은 0.33, octane (C8)은 0.27, decane (C10)은 0.28, tetradecane (C14)은 0.31,

hexadecane (C16)은 0.38로 C6~C18은 기질별 유화활성이 비슷하였다(Table 2, A). *Acinetobacter* sp. BE-254와 *Nocardia* sp. L-417가 비교적 긴 탄화수소화합물인 n-tetradecane, n-hexadecane에서 유화활성이 좋았던 기존의 연구와 달리 Incheon 9는 탄화수소수가 적은 tributyrin에서 유화활성이 높게 측정되었다[16].

유화안정도는 기질에 대한 유화안정화 정도를 나타내는 값으로 시간의 지남에 따라 유화정도가 붕괴되는 정도를 기울기 (Kd, decay constant)로 나타내며 Kd값과 유화안정도는 반비례 관계이다. 대부분의 기질에 대해 *Acinetobacter* sp. Incheon9는 대부분의 탄화수소기질에 대해 음의 Kd값을 가져서 안정적인 유화활성을 보였다(Table 2, B).

최적 배양 및 유화활성 조건

Acinetobacter sp. Incheon9의 성장 조건별 유화활성을 측정한 결과 서로 상관성이 있었다. 온도의 영향은 20℃가 성장과 유화활성의 최적의 온도였으며 30℃, 37℃, 42℃에서는 유화활성뿐 아니라 성장도 감소하였다(Fig 2, A). 이는 기존에 보고된 *Acinetobacter* sp. 2-3A의 최적 온도 25~30℃, *Acinetobacter* sp. BE-254의 30℃보다 낮은 온도에서 활성도가 좋은 것으로 측정되었다[16]. 우리나라 해양의 연평균 수온이 15.8℃, 토양은 25℃로 Incheon9는 토양뿐 아니라 해양에서도 활성을 유지할 것으로 사료된다[14].

또, 배지의 초기 pH에 따른 성장과 유화활성의 영향을 조사한 결과 pH 7이 가장 최적인 것으로 측정되는데, 이는 *Acinetobacter* sp. 2-3A가 pH 7에서 활성이 좋았던 기존 연구와 유사한 결과였다(Fig. 2, B).

NaCl농도에 따른 성장과 유화활성을 조사한 결과 0~1%의 NaCl첨가 배지로 배양 결과 활성이 높게 나타났으며 NaCl이 0% 일 때 보다 1%에서 유화능과 성장도가 좋았다(Fig. 2, C). Incheon9는 낮은 염분에서 활성이 좋은 것으로 측정되어 해수와 담수가 섞이는 하구지역에서 활용도가 높을 것으로 사료된다.

Acinetobacter sp. Incheon9의 성장과 유화활성과의 상관관계를 알아보기 위해 배양시간에 따른 생물계면활성제의 유화활성을 측정한 결과 균체의 성장과 함께 유화능도 증가하고 대수증식기에서 정지기가 되는 72시간에서 96시간까지가 최고의 활성도를 보였다(Fig. 3). 이는 대수증식기까지 균의 증식

Table 2. Emulsification activity and stabilization of various substrate by biosurfactant solution

Substrate	A) Emulsification activity (OD 540 nm)	B) Decay constant (Kd, 10 ⁻²)
Olive oil	1.63	-3.0
Triacetin (C2:0)	0.69	-3.2
Tributyrin (C4:0)	1.49	-2.3
Hexane (C6)	0.33	-5.6
Octane (C8)	0.27	-4.2
Decane (C10)	0.28	-5.2
Tetradecane (C14)	0.31	-1.2
Hexadecane (C16)	0.38	-0.3

A) Emulsification activity B) Decay constant, Kd

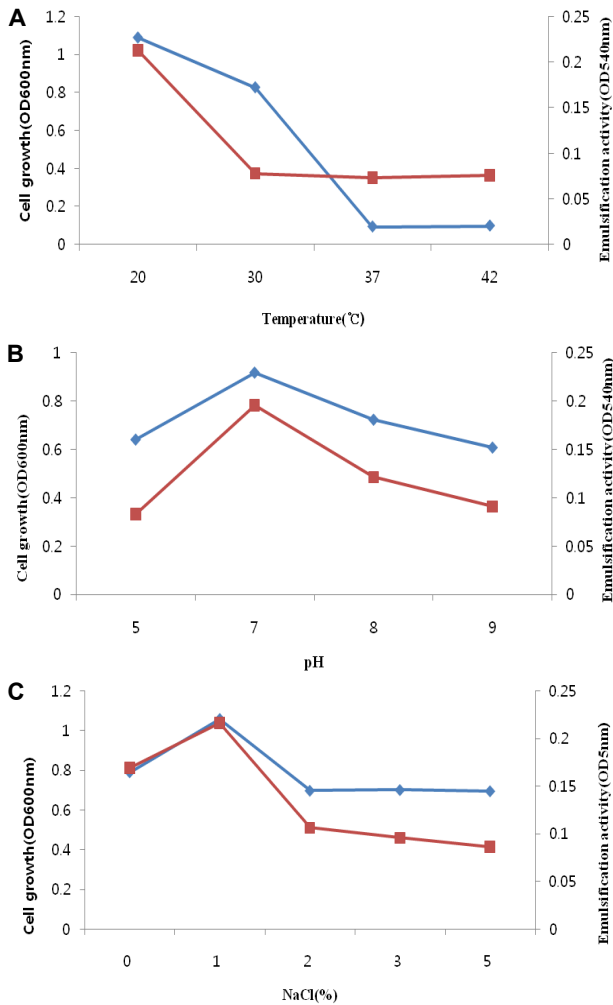


Fig. 2. Effects of temperature, pH and NaCl concentration of the growth and emulsification activity of *Acinetobacter* sp. Incheon9. A) Temperature : 20°C, 30°C, 37°C and 42°C for 72hr B) pH: pH 5, pH 7, pH 8, pH 9 at 20°C for 72hr C) NaCl: 0%, 1%, 2%, 3%, 5% (■ : Emulsification activity, ◆: Cell growth).

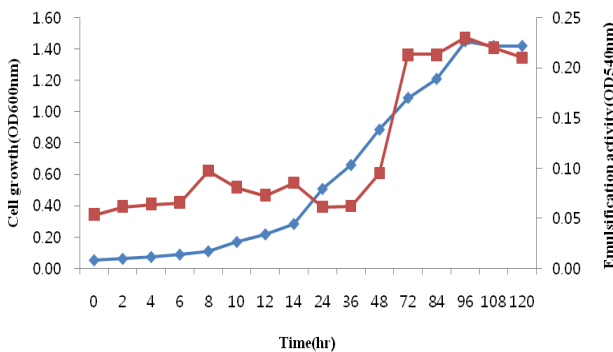


Fig. 3. Time course growth and biosurfactant production by *Acinetobacter* sp. Incheon9. The cell was cultured in LB medium 30°C, pH 7 added 1% NaCl for 72hr. (■ : Emulsification activity, ◆: Cell growth).

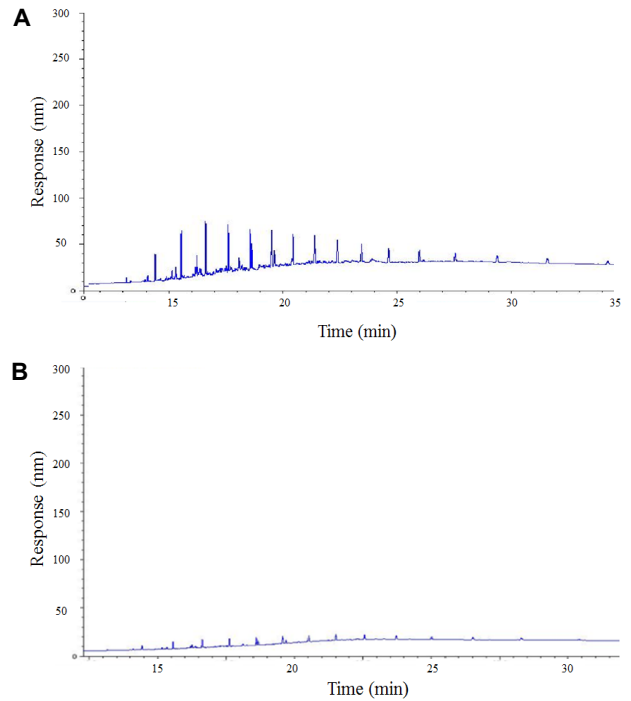


Fig. 4. Gas chromatograms of total hydrocarbon fractions from the undegraded substrate oil, crude oil. A) sterile control B) treated with *Acinetobacter* sp. Incheon9.

과 더불어 생물계면활성제의 활성이 증가하다가 정지기에 들어가면서 증가량이 감소한다는 기존 보고와 유사하였다[10].

원유 분해 활성 확인

원유에는 saturates (61%), aromatics (33%), resin (4%), asphaltenes (2%) 등이 함유되어 있으며 이들 원유 성분 중 paraffine계 탄화수소인 saturates의 분해정도를 gas chromatography로 분석하였다. Incheon9를 접종한 배양액과 무처리군 배양액을 동일한 환경에서 7일간 배양한 결과 carbon chain이 대부분 분해되었음을 정성적으로 확인하였다(Fig. 4).

인천연안 갯벌에서 원유를 유일 탄소원으로 하여 성장할 수 있는 균주를 분리하였으며 16s rRNA유전자 분석을 통해 *Acinetobacter* sp. Incheon9이라 명명하고 NCBI에 등록 (KF548540)하였다. 이 균주는 생물계면활성능력과 리파아제 활성을 동시에 가지며 Paraffine계 탄화수소를 분해함을 확인하였다. 그리고 20°C, pH 7, 1% NaCl첨가한 배지에서 배양시 최적 성장 및 유화활성을 보였으며 72시간에서 96시간까지의 대수증식기에 가장 활발한 유화활성능력을 가지는 것으로 측정되었다. 이번 연구는 환경정화에 활용 가능한 생물자원을 찾는 연구로 실제 활용을 위해서는 실제 환경에도 실험실과 유사한 활성을 가지는지에 대한 연구 등이 추가 되어 할 것으로 사료된다.

References

1. Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon an environmental perspective. *Microbiol Rev* **45**, 180-239.
2. Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J. and Atlas, R. M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature* **368**, 413-418.
3. Bulow, L. and Mosbach, K. 1987. The expression in *E.coli* of a polymeric gene coding for and esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *FEBS Lett* **210**, 147-152.
4. Carling, P. A. 1982. Temporal and spatial variation in intertidal sedimentation rates. *Sedimentology* **29**, 17-23.
5. Choo, W. W., Kurihara, T., Suzui, T., Soda, K. and Esaki, N. 1998. A cold adapted lipase of an Alaskan psychrotroph *Pseudomona* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol* **64**, 486-491.
6. Gutnick, D. L. and Rosenberg, E. 1977. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Annu Rev Microbiol* **31**, 379-196.
7. Hemila, H., Koivula, T. T. and Palva, I. 1994. Hormone sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetyl cholinesterase and lipoprotein lipase: Identification of a super family of esterase and lipase. *Biochim Biophys Acta* **1210**, 249-253.
8. Jain, D. K., Collins, T. D. L., Lee, H. and Trevors, J. T. 1991. A drop collapsing test for screening surfactant producing microorganism. *J Microbiol Methods* **13**, 271-279.
9. Kim, H. S., Lee, C. H. and Suh, H. H. 1997. A lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* C9 selected through the oil film-collapsing assay. *J Microbiol Biotechnol* **7**, 180-188.
10. Kim, H. J., kim, B. J., Ha, S. D., Hwang, S. H. and Kong, J. Y. 1999. Biodegradation of crude oil by marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2 and composition of the biosurfactant. *KSBB J* **14**, 192-197.
11. Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 650-663.
12. Park, J. Y., Park, I. S., Suh, K. H. and Hong, Y. K. 1998. Emulsification of bunker-C oil by a marine bacterium *Achromobacter* sp. M-1220. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* **16**, 384-388.
13. Prince, R. C. 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit Rev Microbiol* **19**, 217-242.
14. Shim, S. H. and Park, K. R. 2006. Characteristics of Biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. G314. *Korean J Microbiol* **42**, 286-293.
15. Swannell, R. P., Lee, J. K. and McDona, M. 1996. Field Evaluation of marine oil spill bioremediation. *Microbiol Rev* **60**, 342-365.
16. Takeshi, S., Toru, N., Tatsou, K., Tokuzo, N. and Nobuyoshi, E. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. Strain No, 6. *J Biosci Bioeng* **92**, 144-148.
17. Van der Mei, H. C., Van der Belt-Gritter, B. and Busscher, H. J. 1995. Implication of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity adhesion mechanism. *Colloids Surf B Biointerfaces* **5**, 117-126.
18. Vaughan, M., Berger, J. E. and Steinberg, D. 1964. Hormone-sensitive lipase and mono glyceride lipase activities in adipose tissue. *J Biol Chem* **239**, 401-409.

초록 : 인천 연안에서 분리한 원유 분해 미생물의 특성 연구

최혜진^{1,2} · 오보영¹ · 한영선¹ · 허명제¹ · 김종국^{2*}(¹인천보건환경연구원, ²경북대학교 생명공학부)

토착 미생물은 친환경적 정화에 중요한 역할을 한다. 원유(crude oil)를 분해하는 80균주를 인천 연안에서 분리하고 oil film collapsing 방법을 이용하여 유화능이 있는 12균주를 선별하였다. 이들 균주에 대해 p-nitrophenyl butyrate를 기질로 이용하여 리파아제(lipase)활성과 n-hexadecane을 기질로 이용하여 유화(emulsification)활성을 측정하여 원유 분해 활성이 좋은 Incheon9를 선별하고 gas chromatography (FID)로 paraffine계 탄화수소를 감소시키는 것을 확인하였다. 이 균주의 16s rRNA 유전자 분석을 통해 *Acinetobacter* sp.로 동정하고 NCBI에 등록하여 accession code (KF548540)를 부여 받았다. *Acinetobacter* sp. Incheon9의 성장과 유화능이 최적 배양 조건은 20℃, pH 7, 1% NaCl였으며 대수증식기 기간에 가장 높은 유화능을 보였으며 탄화수소가 짧은 trybutyrin에서 분해능력이 좋았다. 이번 연구결과는 환경오염에 활용 가능한 미생물자원군의 확보를 위한 연구였으며 추후 활용을 위해서는 실제 환경에서 동일한 활성을 가지는지 여부에 대한 연구가 추가로 진행되어야 할 것이다.