한국생물공학회지 제 11권 제 6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 11. No. 6. 654-662(1996)

원유 분해균주 *Nocardia* sp. H17-1의 분리 및 특성

이창호 · 권기석 · 김희식 · 서현효 · 안극현 · 오희목 · *권태종 · †윤병대
한국과학기술연구원 생명공학연구소 환경미생물전문연구Unit, *건국대학교 미생물공학과

Isolation and Characterization of a Crude oil-Degrading Strain, *Nocardia* sp. H17-1

Chang-Ho Lee, Gi-Seok Kwon, Hee-Sik Kim, Hyun-Hyo Suh, Keuk-Hyun Ahn, Hee-Mock Oh, Tae-Jong Kwon*, and Byung-Dae Yoon†
Environmental Microbiology Research Unit
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Seoul 136-791, Korea
*Dept. of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 143-140, Korea

ABSTRACT

Bacterial strains which degrade crude oil were isolated by liquid culture from oil-spilled soil, and four isolates were selected among them. The strain H17-1 was finally selected after testing emulsifying activity and oil conversion rate. The strain H17-1 was identified as a *Nocardia* sp. based on the test for morphological, biochemical and physiological characteristics. It appears to be highly specialized for growth on crude oil in minimal salts medium since it showed preference for oil or degradation products as substrates for growth. It was found that it could grow on at least fifteen different hydrocarbons. The optimum cultural and environmental conditions were seeked. Cell growth and emulsification activity as a function of time were also determined. Crude oil degradation and the reduction of product peak was identified by the analysis of remnant oil by gas chromatography after 3 days of cultivation. Approximately 83% of oil were converted into a form no longer extractable by organic solvents.

서 론

현대 산업사회에 있어서의 원유는 그 이용범위와 사용량이 계속적으로 증가하고 있다. 그러나 원유는 수송하는 도중 사고 또는 고의적인 유출, 산업폐수 등으로 인하여 전세계적으로 매년 천만톤 이상 해양으로 유출되어 생태계에 커다란 피해를 유발 시키고 있다(1). 유출원유의 대부분은 휘발과 미생물에 의해 제거되며 1946년 Zobell(2)에 의해 매우 다양한 미생물이 원유분해에 관여하며 이러한 미생물이 자연계에 널리 분포하고 있다는 사실이 밝혀진 이후로 원유오염문제를 미생물학적 측면에서 해결하려는 노력들이 계속되어 왔다. 최근에 우리나라에서도 여러번의 선박사고에 의한 원유오염이 발생하여 큰 피해를 입은 바 있으나 적당한 처리방법이 아직까지도 마련되지 않고 있으며, 현재 사용하고 있는 물리-화학적인 방법은 경제적 부담 및 2차적인 오염문제가 대두되고 있어 궁극적으로 이에 관여하는 미생물

† Corresponding Author

에 의해 해결하려는 연구가 다양하게 진행되고 있다(3-5). 또한, 자연환경에 유출된 원유를 생물학적인 방법에 의해 환경을 복원시키는 in site 또는 on site bioremediation 기술이 현재 활발하게 연구가 진행되고 있으며 실제로 오염현장에 적용하고 있다는 보고가 있다(6, 7). 오염 유류의 분해속도 및 그 정도를 증가시키기 위한 방법으로 nutrients, fertilizer 등의 첨가, 미생물의 투여 등 다양한 방법을 이용하여 유출된 유류를 빠르게 분해시키고자 하는 연구가 진행되어 왔다(1). 그러나 지금까지의 연구결과를 볼 때 실험실에서 배양한 세균의 투여가 효과적이라고 할 수는 없으며, 현재까지 가장 성공적인 결과는 제어된 환경에서의 오염물질을 제거하는것이 효과적이었다(4). 이러한 생물학적인 방법은 물리화학적인 방법에 비하여 시간이 오래걸리는 대신 처리비용이 저렴하고 2차적인 오염문제가 유발되지 않기 때문에 오염처리에 있어서 적당한 방법이 될 수 있다. 또한, 유류분해 세균의 투여는 오염생태계의 특성과 유류의 성상에 크게 영향을 받는 것으로 보인다.

본 연구는 자연계로 방출된 원유의 미생물학적 처리를 위하여 원유분해 미생물의 탐색과 이들 미생물의 분해, 변환기능 등의 기능강화를 통하여 오염현장에 적용 가능한 기술 개발을 확립하는데 있다. 본 고에서는 그 첫단계로서 원유를 분해하는 미생물을 다양한 균원시료로부터 분리 · 선별하였으며, 선별된 원유분해균주의 특성과 균체생육 및 유화활성에 미치는 환경요인들에 관한 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

원유에 오염된 다양한 토양을 균원시료로 하여 150여 균주를 순수분리하여 원유에 대한 유화 및 분해능이 우수한 10여 균주를 선별하여 본 실험에 사용하였다.

사용 배지

본 실험에 사용한 원유 액체배지는 nutrient broth(Difco)에 Arabian light 원유(sulfur 함량, 1.0 %)를 1.0%(v/v) 농도로 첨가하여 사용하였으며, 균주 보존은 원유가 제외된 nutrient broth에 bacto agar를 1.5% 농도로 첨가한 고체배지에 배양하여 4℃에서 냉장 보존하였다. 배양조건 검토를 위한 최소배지의 조성은 증류수 1 L에 yeast extract 0.2 g, NH_4NO_3 1.0 g, K_2HPO_4 1.5 g, NaH_2PO_4 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 g을 함유하며, pH는 7.0으로 조정하여 사용하였다.

균주의 동정

균주의 형태적, 생리적 그리고 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of determinative bacteriology(8)와 Manual for the identification of medical bacteria(2nd ed.) (9)에 따라서 균주 동정을 실시하였다.

배양 방법

원유 분해능 조사를 위한 전배양은 원유가 첨가된 액체배지에서 배양하였다. 즉, 시험관(25×250 mm)을 사용하여 원유 액체배지 10 mL에 균주를 한 백금이 접종한 후 30℃의 진탕배양기(130strokes/min)에서 36시간 배양하였다. 본 배양조건은 원유 액체배지 30 mL을 250-mL Erlenmeyer flask에 121℃, 15분간 습윤 가압멸균한 후 전배양액을 2.0 %(v/v)되게 접종하여 30℃에서 4일간 진탕배양(130 strokes/min) 하였다.

균체수 측정

각 실험에 사용된 배양액을 배양시간에 따라서 10^3-10^8 배율로 생리식염수에 희석하여 희석된 배양액 0.1 mL을 plate count agar (Difco)배지에 도말한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 plate에 나타난 colony중 30-300개의 colony를 형성한 plate를 선택하여 계수하였다.

유화도 측정

배양액을 이용한 원유의 유화도는 Reisfeld 등(10)의 방법으로 측정하였다. 즉, 현탁한 다음 배양액 5 mL을 시험관(14×150 mm)에 넣고 5분간 정치시킨 후 액의 중간 부위에서 2 mL을 취하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 540 nm에서 흡광도 값으로 유화도를 나타내었다. 유화도는 흡광도 0.1을 1unit로 하여 표시하였다.

Gas chromatography 분석

Gas chromatography는 Varian 3700, 불꽃 이온화 검출기를 사용하였으며, silicon OV-101을 10 % 침윤시킨 chromosorb w (80-100 mesh) stainless steel column을 사용하였다. Carrier gas로는 질소를 사용하였으며 유속은 분당 30 mL로 하였고

공기와 수소는 각각 50 psi로 조정하였다. Column 온도는 100-270℃로 분당 5℃씩 증가시켰으며, injector 및 detector 온도는 200℃와 240℃로 조정한 후 시료 1.0 μL를 주입하여 분석하였다.

잔류원유의 회수는 Bartha와 Atlas(11)의 방법으로 분액깔대기에 배양액을 넣은 후 2배의 n-hexane을 넣고 잘 혼합한 유분을 n-hexane층으로 이동시킨 후 회수한 n-hexane층을 화학분석용 여지(Whatman No. 42) 위에 무수 황산나트륨 10 g을 채운 깔대기에 통과시켜 여과한 다음 여액을 회전식 진공증발기를 이용하여 용매를 제거한 후 남은 여액을 검액으로 사용하였다.

원유 전환율(oil conversion rate) 측정

원유 전환율은 Reisfeld 등(10)과 Horowitz 등(12)의 방법으로 배양액에 benzene-pentanediethylether (3:1:1, v/v/v)를 동량 혼합하여 완전히 추출한 후 용매를 실온에서 진공건조기를 사용하여 용매를 완전히 제거하여 대조구(no bacteria)와 처리구의 무게를 측정하여 원유 전환율을 구하였다.

결과 및 고찰

원유 분해 균주의 선별

균원시료로부터 분리된 150여 균주를 원유 액체배지에서 3일간 배양한 후 유화능이 우수한 10균주를 1차 선발하였다. 1차로 선발된 10균주의 균체수 및 유화도, 원유 전환율은 Table 1과 같다. Table 1에서와 같이 유화도는 A54, H17-1, F6, 그리고 H17 균주 순으로 높은 유화도를 나타내었다. 원유 전환율은 H17-1과 H17균주가 약 77%로서 높았으며, 이와 같은 결과는 Reisfeld 등(10)의 RAG-1 균주가 9×10^7의 균체수와 약 65%의 원유 전환율을 얻었다는 보고와 Horowitz 등(12)의 1.6×10^8의 균체수와 약 66%의 원유 전환율을 얻었다는 보고에 비하여 높은 균체증식과 원유 전환율을 보였다.

Fig. 1은 원유 액체배지에 배양한 후의 원유 dispersion을 나타낸 사진으로서 유화가 우수한 균주일수록 진한 고동색을 나타내었으며 배양액 표면에 원유여액이 없음을 알 수 있다. 따라서 이후에 실험은 H17-1균주를 최종선별하여 실험에 이용하였다.

분리균주의 동정

H17-1균주의 전자현미경 사진은 Fig. 2와 같으며 크기는 0.3-0.6×0.7-1.3 μm이다. Gram 양성균이며

Table 1. Growth, emulsifiaction, and oil conversion by oil-degrading bacteria*.

Strains	Cell growth (CFU/mL)	Emulsification activity (unit/mL)	Oil conversion (%)
A6	2.0×10^8	361.4	69
A10	6.1×10^8	403.6	68
A44	2.3×10^5	14.2	6
A54	7.2×10^9	468.6	59
B12	4.6×10^6	46.8	34
D1	7.6×10^9	314.0	19
E24-1	1.1×10^7	86.8	60
H17	4.0×10^9	443.6	77
H17-1	9.1×10^9	463.0	77
F6	1.5×10^{10}	462.0	75

*250-mL flasks contaning 30 mL of nutrient broth and 1.0%(v/v) crude oil were inoculated with approximately 10^4 bacteria per mL and cultured at 30℃ with reciprocal shaking. After 3days viable cell numbers and oil conversion were determined.
The data are averages of at least two experiments.

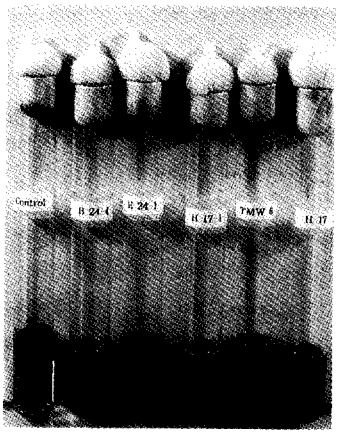

Fig. 1. Microbial dispersion of crude oil after growth of the selected strains for 3days. Cultivation was done in minimal salts medium containing crude oil(1%, v/v) for 72 hours at 30℃ on a reciprocal shaker.

약간의 운동성을 가지는 간균의 호기성 세균으로서 catalase는 가지나 oxidase는 없었으며 glucose에서 산을 형성하지 못하였다. Methyl red 반응, VP 반응, indole에서는 음성이었으며 urease, nitrate

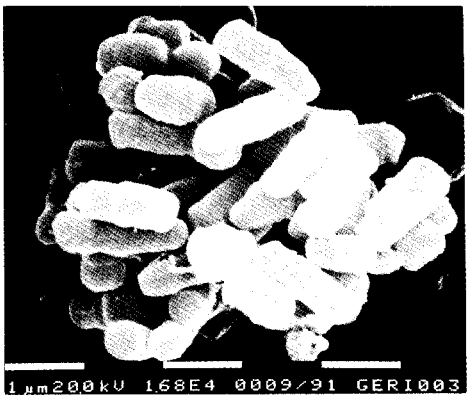

Fig. 2. Scanning electric microscophic photogram of the selected strain H17-1.
The strain was cultivated with isolation medium for 3days(x 8,050, bar indicates 10μm).

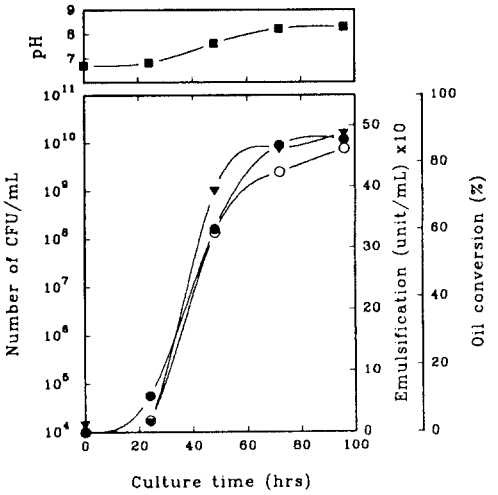

Fig. 3. Growth, emulsification, and oil conversion by *Nocardia* sp. H17-1 as a function of time. ●; Cell growth, ○; Emulsification, ▼; Oil conversion, ■; pH. Cultivation was carried out on 250-mL Erlenmeyer flask containing 50 mL minimal salts medium on a reciprocal shaker (130 strokes/min) for 4 days at 30℃.

reduction, citrate, arginine 그리고 lycine 등에서는 양성을 나타내었다. 탄소원의 이용성에서는 lactose

Table 2. Morphological, physiological, and biqshemical characteristics of the selected strain H17-1.

Characteristics	H17-1	Characteristics	H17-1
Gram staining	+	xylose	−
Shape	rod	galactose	−
Size(μm)	0.3-0.6 x 0.7-1.3	mannitol	−
Spore	−	salicin	−
Optimum Temp.	30℃	Urease	+
Growth at 42℃	−	Arginine	+
Motility	+	Lysine	+
Growth in air	+	Citrate utilization	+
Catalase	+	Indole	−
Oxidase	−	MR	−
Glucose(acid)	−	VP	−
OF	O	Nitarte reduction	+
Carbohydrates, acid from		KCN	+
arabinose	−	Asculine hydrolysis	+
lactose	+	Starch hydrolysis	−
cellobiose	−	Casein hydrolysis	−
maltose	−	McConky agar	−
sucrose	−	Gellatin liquefaction	−
raffinose	−	DAP type	LL

OF; oxidation/fermentation, MR; methyl red, VP; voges-proskauer, DAP; diaminopimelic acid

를 제외한 나머지 당류에서 산을 형성하지 못하였다 (Table 2). 이상의 결과로부터 H17-1 균주는 *Nocardia* sp. 균주로 밝혀져 최종적으로 *Nocardia* sp. H17-1로 명명하였다. 이 균주는 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 기탁하였으며, 그 수탁번호는 KCTC 8705P이다.

Nocardia sp. H 17-1의 배양시간별 원유분해

선별균주 *Nocardia* sp. H17-1에 의한 배양 시간별 균체수 및 유화활성과 원유 전환율을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 균체수가 배양 24시간까지 유

Table 3. Growth of *Nocardia* sp. H17-1 on different carbon sources.

Carbon sources	Growth	Carbon sources	Growth
Crude oil	+++	Benzene	++
Methanol	++	Naphthalene	++
Ethanol	++	n-Octane	++
Benzyl alcohol	+	n-Decane	++
n-Propyl alcohol	+++	n-Hexadecane	+
n-Heptyl alcohol	−	n-Heptadecane	+++
Glycerol	+++	Glucose	+++
Pentane	++	Olive oil	++

The strain was inoculated to minimal medium containing carbon source at the concentration of 1.0%(v/v), and the growth was measured.

Symbols indicate turbidity values at 660 nm: +++, > 2.0 after 24 hrs; ++, 1.0 to 2.0 after 48 hrs; +, 0.3 to 0.99 after 48 hrs; −, < 0.2 after 48 hrs.

도기가 유지되다가 배양 24시간 이후에 급격히 증가하여 배양 72시간에 9.1×10^9의 높은 균체수를 나타내었으며, 유화활성과 원유 전환율도 각각 480 unit/mL와 약 83%로서 최대치에 도달하였다.

탄소원 이용성

선별균주 *Nocardia* sp. H17-1의 탄소원 이용성을 조사하기 위하여 각기 다른 탄화수소를 최소배지에 1.0%(v/v)되게 첨가하여 48시간 동안 진탕배양한 후 생육정도를 측정한 결과는 Table 3과 같다. *Nocardia* sp. H17-1은 15가지 탄소원에서 생육을 보였으며, 특히 crude oil, glycerol, glucose와 olive oil 등에서 왕성하게 생육하고, alcohol류의 탄화수소에서는 생육이 다소 떨어졌으며 다양한 탄화수소를 탄소원으로 이용함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 n-alkane 계통의 탄화수소를 배양초기에 먼저 이용하고, 탄수화물과 탄화수소를 이용한 유화활성에 있어서 n-alkane이 유화활성 및 생육이 우수하였다고 보고(13)한 결과와 유사하였다.

배양온도에 따른 영향

탄화수소 분해는 미생물에 의해 0℃에서 70℃까지 넓은범위의 온도에서 일어날 수 있다고 보고된 바 있다(2, 14). 이에 본 실험은 H17-1의 균체생육 및 유화활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 10℃에서 5℃ 간격으로 35℃까지 72시간 배양

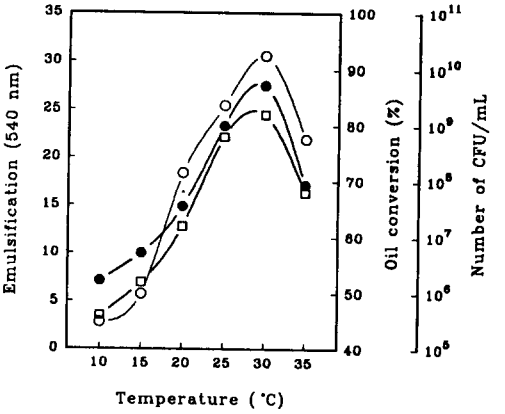

Fig. 4. Effect of culture temperature on emulsification, oil conversion, and cell growth of *Nocardia* sp. H17-1 in minimal salts medium containing crude oil. ●; Cell growth, ○; Emulsification, □; Oil conversion. Cultivation was done for 3 days at each temperature on a reciprocal shaker (130 strokes/min).

한 후 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 30℃에서 가장 높은 균체생육과 유화활성을 나타내었으며, 25℃와 35℃에서는 다소 낮은 결과를 얻었다. 그러나 저온에서는 균체생육 및 유화활성이 거의 이루워지지 않았다. Gatellier 등(15)은 탄화수소를 분해하는 미생물이 유류와 경계수막에서 작용하게 되므로 낮은 온도로 인해 고체상태가 되거나 점성이 증가되어 표면적이 감소되면 미생물에 의한 분해가 어려워 진다고 보고하였으며, Atlas(5)는 낮은 온도는 탄화수소의 물리적 성질을 결정하는 주요인으로 작용하기 때문에 10℃ 이하에서 미생물의 유류분해 속도는 급격히 감소한다고 보고하였다.

초발 pH의 영향

원유의 유화활성과 균의 생육에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 원유 최소배지의 초발 pH를 4.0에서 9.0으로 각각 조절한 후 30℃에서 72시간 배양한 후 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 7.0에서 8.0 사이에서 높은 유화활성과 균체생육을 나타내었으며, pH 4.0에서 6.0 범위에서 유화활성과 균체생육이 급격히 감소하였다. 이상의 결과로부터 H17-1 균주의

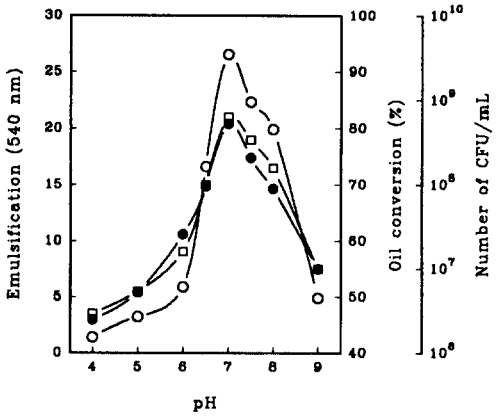

Fig. 5. Effect of initial pH on emulsification, oil conversion, and cell growth of *Nocardia* sp. H17-1 in minimal salts medium containing crude oil. ● ; Cell growth, ○ ; Emulsification, □ ; Oil conversion. Cultivation was done for 3 days at 30℃ on a reciprocal shaker. Initial pH of minimal salts medium containing 1% crude oil was adjusted with 1 N NaOH or 1 N HCl.

생육 최적 pH는 7.0이였다. 이는 pH가 산성인 환경이 세균의 생육을 억제하는 제한요인으로서 작용함을 알 수 있고 우리나라 연근해 해수의 pH가 7.0과 8.0 사이에 있다는 사실로 미루어 본 균주는 해양환경에서 적합한 균주로 사료된다.

염분농도의 영향

염분농도는 수계의 모든 생물군집에 중대한 영향을 미치는 환경요인으로 작용한다(16, 17). 따라서, 넓은 범위의 염분농도에서 원유의 유화활성과 균의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0~6% 염분농도 범위의 원유 최소배지에서 72시간 배양한 후 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 조사하였다 (Fig. 6). *Nocardia* sp. H17-1의 염분농도의 영향은 1~4%까지는 유화활성이 높았지만 5% 이상의 염분도에서 유화활성이 현저히 떨어졌다. 이것은 미생물이 5% 이상의 염분도에서 호흡률이 증가하게 되어 염분농도가 환경적인 하나의 stress 요인(18)으로 작용하는 것으로 사료된다. 따라서 *Nocardia* sp. H17-1은 넓은 범위의 염분도에서 생육은 가능하나 0~4% NaCl에서 높은 유화활성을 보였다. 이상의

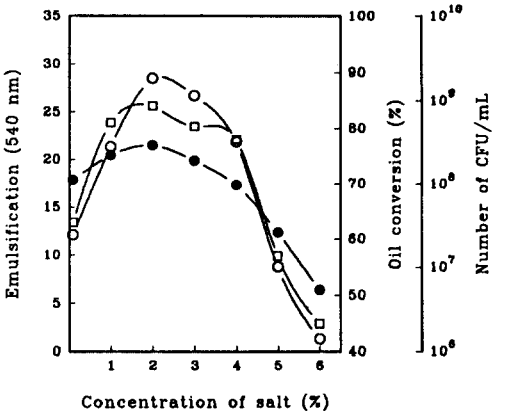

Fig. 6. Effect of concentration of salt on emulsification, oil conversion, and cell growth of *Nocardia* sp. H17-1 in minimal salts medium containing crude oil. ● ; Cell growth, ○ ; Emulsification, □ ; Oil conversion. NaCl ranging from 0 to 6% was added to minimal salts medium. Cultivation was done for 3 days at 30℃ on a reciprocal shaker.

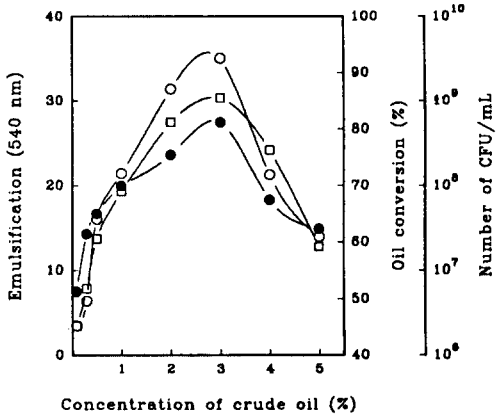

Fig. 7. Effect of concentration of crude oil on emulsification, oil conversion, and cell growth of *Nocardia* sp. H17-1 in minimal salts medium. ● ; Cell growth, ○ ; Emulsification, □ ; Oil conversion. Crude oil ranging from 0 to 5% was added to minimal salts medium. Cultivation was done for 3 days at 30℃ on a reciprocal shaker.

Table 4. Effect of concentration of NH_4NO_3 and K_2HPO_4 on emulsification, oil conversion, and cell growth of *Nocardia* sp. H17-1.

Supplement[a]		Cell growth[b] (CFU/mL)	Emulsification activity[b] (unit/mL)	Oil conversion[b] (%)
NH_4NO_3 (mM)	K_2HPO_4 (mM)			
0	0	2.6×10^5	39.2	32
0	0.057	2.1×10^6	90.1	46
1.25	0.057	5.1×10^7	237.6	65
6.25	0.057	2.5×10^8	323.5	80
12.5	0.057	9.8×10^8	405.2	84
25.0	0.057	4.7×10^8	358.0	79
12.5	0	3.2×10^6	121.3	48
12.5	0.0057	6.7×10^7	198.1	60
12.5	0.029	9.3×10^7	233.0	70
12.5	0.115	8.4×10^8	251.7	69

[a] In addition to supplement, each 250-mL Erlenmeyer flask contained 50 mL of minimal salts medium, 500 mg of curde oil and 1.0 mL of 1-day-old inoculum of H17-1. Cultivation was done at 30℃ with reciprocal shaking (130 strokes/min).

[b] Measurement were performed after 3 days ; the technique for estimating oil conversion, emulsifying activity, and viable cell count, as described in Materials ans Methods.

결과로부터 근해의 평균 염분도가 약 3~4% 정도임을 감안한다면 선별균주 H17-1이 원유가 오염된 해양 수계에서의 원유분해에 이용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

원유농도의 영향

원유는 미생물의 탄소 및 에너지원으로 이용되는 반면 다양한 용해성 독성성분이 포함되어있어 미생물의 생육을 저해하므로 배지내의 원유농도는 세균의 생육과 유화활성에 영향을 미친다(19). *Nocardia* sp. H17-1의 원유농도에 따른 영향을 조사하기 위하여 원유농도를 조절하여 최소배지에 첨가한 후 72시간 배양하여 균체생육 및 유화활성과 원유 전환율을 측정하였다(Fig. 7). 원유농도는 3%에서 최고의 유화활성과 균의 생육을 보였으나 그 이상의 농도에서는 균의 생육과 유화활성은 다소 감소하는 경향을 보였다.

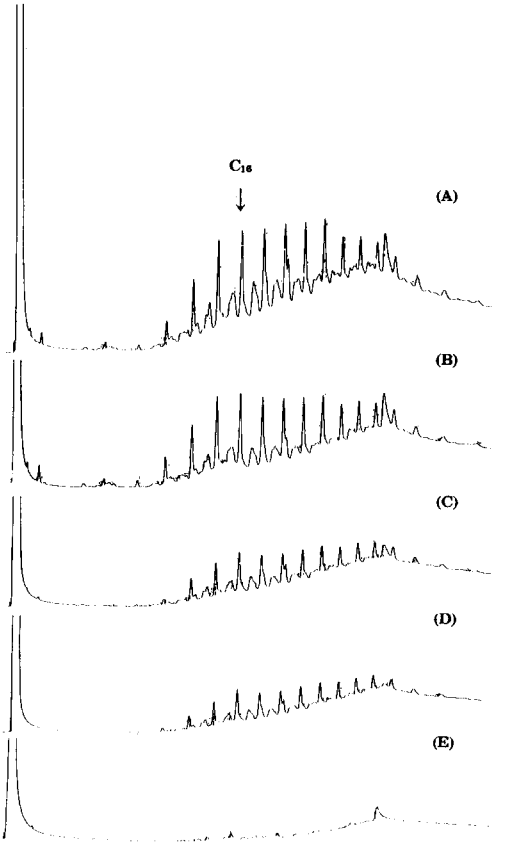

Fig. 8. Gas chromatograms of 1.0%(v/v) treated crude oil by *Nocardia* sp. H17-1. (A) Control after shaking for 4 days, without bacteria; (B) after growth for 1 day; (C) after growth for 2 days; (D) after growth for 3 days; (E) after growth for 4 days. The samples were extracted and concentrated 15-fold.

무기염류의 영향

Atlas와 Bartha(20)는 미생물에 의한 원유 분해시 질소 및 인의 농도가 중요한 제한요소로 작용한다고 하였고, 수계내에서는 질소 또는 인과 같은 무기영양물질이 낮은 농도로 분포되어 있어 무기영양물질이 미생물 생육에 제한요인으로 작용하게 된다고 하였다(4, 21). 질소와 인 등의 물질이 *Nocardia* sp. H17-1에 미치는 영향을 검토하기 위하여 원유 최소배지에 NH_4NO_3, K_2HPO_4를 각각 질소원과 인산원으로 하여 농도별로 첨가하여 균체생육 및 유화

활성과 원유 전환율을 측정하였다(Table 4). 그 결과 12.5 mM NH_4NO_3, 0.057 mM K_2HPO_4의 농도에서 최고의 유화활성과 균의 생육을 보였다. 반면에 질소, 인 중에서 어느 하나를 제외시키거나 두 성분 모두를 제외한 대조구의 경우는 낮은 유화활성과 균의 생육을 나타냄으로서 미생물에 의한 탄화수소의 분해에 있어 질소와 인 농도가 중요한 제한인자로 작용한다는 보고와 일치하였다(10, 20, 22).

잔류원유 성분분석

Nocardia sp. H17-1에 의한 원유 분해정도를 검토하기 위하여 배양시간별로 배양액에서 잔류원유를 회수하여 G.C로 분석하고, 대조구와 비교하였다(Fig. 8). Arabian light 원유는 (sulfer 함량, 1.0%) 주로 C_{14}~C_{24}의 n-alkane 성분을 함유하고 있다(23). 원유 액체배지에서 미생물을 접종하지 않은 상태의 대조구는 증발 또는 물리적인 요인에 의해 carbon 수 C_{11} 이하 의 짧은 탄화수소 화합물 peak는 휘발성이 강하므로 자연적 감소 되었을 것으로 사료된다. Fig 8과 같이 대부분의 균주가 C_{16}(n-hexadecane) 이상의 n-alkane peak가 현저히 감소한 것으로 보아 비교적 고분자의 탄화수소를 쉽게 이용하였고 특히, n-alkane계 석유화합물의 이용성이 우수하였다. 이러한 사실은 Raymond 등(24)과 Kator 등(25)의 결과에서 석유화합물 중에서 n-alkane계 물질이 가장 신속하게 분해된다는 결과와 일치하였다.

요 약

원유에 대한 분해능이 있는 균주를 분리하고, 이들 균주의 균체생육과 유화활성 및 원유 전환율을 검토하여 4균주 즉, A54, H17, H17-1 그리고 F6를 선별하였다. 이들 균주중 H17-1 균주를 최종선별하여 형태학적 및 생화학적 그리고 생리학적 특성을 조사한 후 *Nocardia* sp. H17-1로 명명하였다. *Nocardia* sp. H17-1의 배양 시간에 따른 균체생육, 유화도 그리고 원유 전환율을 측정한 결과, 균체수는 9.1×10^9 CFU/mL었고, 유화활성과 원유 전환율은 각각 480 unit/mL와 약 83%로서 최대치에 도달하였다. 또한, 다양한 탄화수소를 탄소원으로 이용하였다. 원유분해를 위한 배양조건 및 환경인자의 영향을 조사한 결과 배양온도는 30℃, 초발 pH는 7.0, 염분농도는 2.0%이며, 5% 이상에서는 유화활성이 현저히 감소하였다. 원유농도는 3%, 무기염류의 농도는 12.5 mM NH_4NO_3, 0.057 mM K_2HPO_4로 나타났다. 또한, 잔류 원유의 GC 분석 결과 C_{16}(n-hexadecane) 이상의 n-alkane peak가 현저히 감소하였다.

참고문헌

1. R. P. Oliveri, A. Bacchin, N. Robertiello, L. O. Degen, and A. Tonolo(1976), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 629.
2. C. E. Zo bell(1946), *Bacteriol. Rev.*, **10**, 1.
3. C. E. Zo bell(1946), *Adv. Water Pollut. Res.*, **3**, 85.
4. R. Bartha and R. M. Atlas(1977), *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 225.
5. R. M. Atlas(1981), *Microbiol. Rev.*, **45**, 180.
6. R. Atlas and R. Bartha(1992), Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In K. Marshall(ed.) Advances in Microbial Ecology, **12**, 287, Plenum Press, New York.
7. R. Z. Hoff(1993), *Mar. Pollut. Bull.*, **26**, 476.
8. G. H. John, N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath (1994), Bergey's manual of determinative bacteriology(9th ed.), Williams and Wilkins, Baltimore.
9. N. R. Cowan and K. J. Steel(1974), Manual for the identification of medical bacteria(2nd ed.), Cambridge University Press, London.
10. A. Reisfeld, E. Rosenberg, and D. Gutnick (1972), *Appl. Microbiol.*, **24**, 363.
11. R. Bartha and R. M. Atlas(1973), Biodegradation of oil in sea water, 147.
12. A. Horowitz, D. Gutnick, and E. Rosenberg (1975), *Appl. Microbiol.*, **30**, 10.
13. J. E. Zajic, H. Guignard, and D. F. Gerson (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1285.
14. M. J. Klug and A. J. Markovetz(1967), *J. Bacteriol.*, **93**, 1847.
15. C. R. Gatellier, J. L. Oudin, P. Fusey, J. C. Lacase, and M. L. Priou(1973), In Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of oil Spills, American Petroleum Institute, Washington D. C., 497.
16. G. Rheinheimer(1981), Microbiologic der gewalsser(3rd. ed.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 251.

17. D. M. Ward and T. D. Brock(1978), *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 353.
18. R. P. Griffiths, B. A. Caldwell, and R. Y. Morita(1984), *Microb. Ecol.*, **10**, 151.
19. Y. S. Oh and S. J. Kim(1987), *J. Kor. Wat. Pollut. Res. Contr.*, **3**, 30.
20. R. M. Atlas and R. Bartha(1972), *Biotech. Bioeng.*, **14**, 309.
21. D. M. Ward and T. D. Brock(1976), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 764.
22. J. J. Cooney, S. A. Silver, and E. A. Beck (1985), *Microb. Ecol.*, **11**, 127.
23. R. R. Colwell, J. D. Walker, and L. Petvakis (1975), *Can. J. Microbiol.*, **21**, 1760.
24. R. L. Raymond, V. W. Jamison, and J. O. Hudson(1967), *Appl. Microbiol.*, **15**, 857.
25. H. Kator, R. Miget, and C. H. Oppenheimer (1972), Utilization of paraffin hydrocarbons in crude oil by mixed cultures of marine bacteria. Paper No. SPE 4206. Symposium on Environmental Conservation. Society of petroleum Engineers. Dalas, Tex.