

자갈로 구성된 미소환경에서 미생물제제에 의한 유류분해

심두섭 · 손재학 · 김상진*

한국해양연구소 해양생물연구부 미생물연구실

지속성영양염제(Slow Release Fertilizer, SRF)와 유류분해미생물을 이용한 생물학적 방법으로 오염된 자갈환경으로부터 유류를 제거하는 방법을 연구하기 위해 microcosm 실험을 수행하였다. Microcosm은 직경 40 mm 이하의 자갈을 직경 10 cm, 높이 20 cm의 glass column에 충전하여 준비하였으며, 전 실험구에 유류 약 2.4%(w/v)를 첨가하였다. 실험구 I은 대조구로서 아무 것도 첨가되지 않았으며, 실험구 II에는 Inipol EAP-22(Elf Aquitaine, France)와 미생물제제, 실험구 III에는 SRF와 미생물제제, 실험구 IV에는 Inipol EAP-22가 첨가되었다. 유류의 생물학적 분해도를 C_{17} /Pristane과 C_{18} /Phytane 비율로 나타내었을 때, 실험구 III에서 유류분해도가 가장 높은 것으로 나타났다. 종속영양미생물 및 유류분해미생물의 전체적인 변화와 전자전달계 활성도는 유류분해도의 변화와 유사한 양상을 보이며 변화하는 것으로 나타났다. 무기영양염류의 분석 결과 실험구 III에서는 전 실험기간에 걸쳐 질소와 인이 제한요인으로 작용하지 않은 것으로 나타났으며, 이는 SRF가 지용성영양염제인 Inipol EAP-22에 비해 지속적으로 영양염류를 제공함으로써 자갈환경에서 유류분해가 증가되었다고 추정할 수 있다. 따라서 본 실험결과로부터 SRF와 유류분해 미생물제제를 사용하여 해안 자갈지역의 유류오염을 효율적으로 제거할 수 있는 가능성이 확인되었다.

KEY WORDS □ bioremediation, crude oil, pebble

유류오염을 처리하기 위한 방법으로서 bioremediation은 여러 해 동안 많은 연구가 되어 왔다(26). 특히, 이러한 연구를 통하여 토착세균에 인(P)이나 질소(N)와 같은 영양염을 제공할 수 있는 친유성영양염제(oleophilic fertilizer)와 지속성영양염제(slow release fertilizer, SRF)를 함께 사용함으로써 유류분해가 가속화될 수 있다는 결과가 발표되고 있다(10, 13, 14, 17, 18, 19, 24). 유류오염 현장에서 실험한 결과에 의하면 영양염제를 첨가하지 않은 대조구에 비하여 영양염제(Inipol, Customblen)를 첨가한 해안의 경우 유류분해율이 3~5배 이상 높은 것으로 나타났다(6). 이러한 bioremediation은 강한 물리적인 세척방법에 의한 것과 비교하여 유류제거가 빠르지 못하다는 단점을 가지고 있으나, 물리적인 세척법과는 달리 유류를 생체량과 물, 그리고 이산화탄소와 같은 무해한 가스 형태로 전환시키게 된다. 현장에서 오염 유류제거의 성과는 유류의 농도와 형태, 기후조건, 오염된 해안의 형태, 그리고 영양염의 함량과 해안 간극수의 pH 등에 의존한다. Bioremediation의 현장적용 시도는 sand, marsh, 및 cobble 해안에서 수행되어 왔다. Salt marsh에서 낮은 농도의 유류는 영양염제의 첨가로 성공적으로 처리되었지만, 높은 유류 농도에서는 유류가 sediment의 무산소층으로 침투하여, 산소고갈로 인하여 분해가 제한되게 된다. 이러한 곳에서는 tilling에 의하여 bioremediation의 효과가 향상될 수 있는 것으로 알려져 있다(26). Bioremediation의 효과를 향상시키는 방법으로 seeding이 사용되기도 하는데, 일반적으로 토착미생물군이 탄화수소를 분해하는데 불충분한 상황에 사용되게 된다. 한국해양연구소에 의해 수행된 야외실험에서 무기영양염제만을 첨가한 실험구에서 보다는

무기영양염제와 유류분해미생물을 첨가한 실험구에서 85% 이상의 높은 유류분해가 관찰된 결과는 seeding의 효과를 확실하게 증명하고 있다(2, 4).

이러한 bioremediation의 대부분이 sand 지역에서 진행되어 왔고(15, 16, 23, 28), 그 가능성에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 자갈지역의 유류오염에 관한 bioremediation 연구는 부족한 현실이다. 자갈로 이루어진 해안에 유입된 유류는 자갈지역에 즉시 스며들어 매장되기 때문에 장시간(수십년까지) 동안 남아 있을 가능성이 높다. 이러한 자갈해안은 표면으로부터 유류가 스며들기 쉬운 높은 침투성과 다공성을 갖고 있으며 파도에 의한 높은 운동성으로 유류가 매장되기 쉽기 때문에 asphalt pavements와 같은 유류 침전물을 만들어내기도 한다. 1974년의 Metula spill, 1978년의 Amoco Cadiz spill, 그리고 1989년의 Exxon Valdez spill은 대표적인 자갈해안에서 발생한 유류유출 사고로, 다양한 물리, 화학, 생물학적 제거방법이 적용되었다(12). 그러나 국내에서는 통상적으로 화학유화제를 이용하여 자갈 표면의 유류를 제거하는 것이 보통이다. 따라서 본 연구에서는 이러한 자갈 환경의 유류를 제거하는 방법의 하나로 생물학적인 방법, 즉 지속성영양염제와 유류분해미생물을 이용하여 처리하고자 microcosm 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험구 설치

자갈에서의 유류분해능을 확인하기 위하여 유리관(10 cm × 20 cm)을 제작하여 microcosm 실험을 수행하였다(Fig. 1). 유리관 밑면에는 stainless 망을 설치하여 자갈이 빠지지 않도록 하였고 윗면에는 통기가 가능한 뚜껑을 씌웠다. 각 실험

*To whom correspondence should be addressed

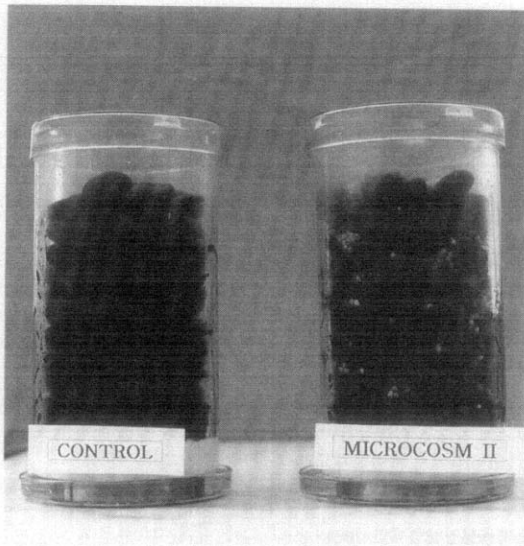


Fig. 1. Photograph of pebble microcosms.

Table 1. Experimental conditions of each microcosm

	Organism ¹	Inipol ²	SRF ³
Microcosm I	-	-	-
Microcosm II	+	+	-
Microcosm III	+	-	+
Microcosm IV	-	+	-

1: Mixed microorganisms (1.0×10^6 cells/cm³ of glass column), 2: Inipol EAP-22 (10% (w/w) of oil), 3: SRF (Slow Release Fertilizer).

험구는 duplicate로 하였고, 조건은 Table 1과 같다. 각 실험구에 이용된 자갈은 오염되지 않은 거제도 해안으로부터 채취하였으며, 이용된 자갈의 평균 크기는 길이가 33.31 mm (SD=5.15), 폭이 22.96 mm (SD=3.28), 그리고 높이가 14.10 mm (SD=2.68)이었다. 각 실험구는 약 50 g의 Arabian light crude oil을 이용하여 인위적으로 오염되었으며(약 2.41%, w/v), Table 1의 조건에 따라 영양염제와 미생물제제가 첨가되었다. 영양염제로는 지속성영양염제(SRF)로 원예용 완효성복합비료(조비(주), 울산)와 지용성영양염제(Inipol EAP-22)가 사용되었는데, 지속성영양염제로 요소형(N-source, 419.7 mg-N/g)과 혼합형(N-source, 67.7 mg-N/g, P-source, 50.4 mg-P/g)이 각각 6.12 g과 26 g 첨가되었고, 지용성영양염제는 첨가된 유류량의 10%(약 5 g)가 첨가되었다. 수분공급은 2일 간격으로 해수를 30 mL씩 spray로 천천히 뿌려주어 되도록 자갈표면에 많은 수분이 접촉할 수 있도록 하였다.

시료채취

시료는 실험구 설치 당일과 3일, 15일, 36일 그리고 92일 차에 취하였고, 시료채취 전 30 mL의 해수를 뿌린 후 자갈과 자갈 아래층으로 흘러나온 침출수를 채취하여 즉시 분석하였다. 상층의 자갈은 두 개를 취하여 1개는 유류 분석을

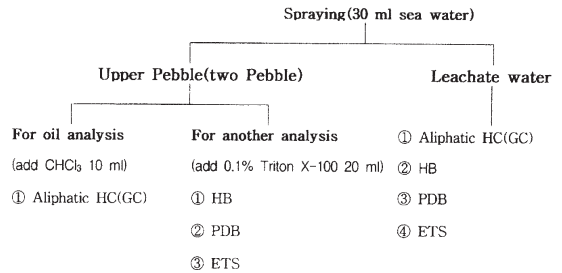


Fig. 2. Experimental design for sampling from the glass column.

위하여, 다른 한 개는 그 외의 분석을 위하여 사용하였다. 유류 분석을 위하여 1개의 자갈을 클로로포름(CHCl_3) 10 mL에 넣어 유류를 추출한 후 분석하였고, 다른 1개의 자갈에 0.1% Triton X-100 20 mL를 넣고 vortex mixing하여 자갈에 붙어 있는 생물막을 회수하여 heterotrophic microorganism(HM), petroleum-degrading microorganism(PDM), dehydrogenase activity(ETS activity), 그리고 영양염류를 분석하였다. 분석에 사용된 자갈의 무게와 부피는 항상 측정되었으며, 시료채취의 과정을 간단히 도식화하면 Fig. 2와 같다.

유류분해 미생물

한국해양연구소에서 분리한 *Pseudomonas* sp.와 *Moraxella* sp.(1) 그리고 *Candida lipolitica*(2)을 각각 Zobell 2216 E broth에서 3일 동안 25°C에서 배양시켰다. 배양된 미생물은 원심분리 후 3회 멸균해수로 세척하여 회수된 균체와 diatomaceous earth(Sigma, 95% SiO_2)를 잘 혼합하였다. 준비된 미생물은 각각 동량으로 혼합된 후 접종을 위한 미생물 제제로 사용되었다.

물리·화학적 요인 분석

Microcosm에서의 온도는 최저·최고 온도계를 사용하여 측정하였다. 영양염류(urea, phosphate)는 자갈층과 침출수에서 얻은 시료를 1/10로 희석하여 여과지(pore size, 0.45 μm)로 여과한 후, APHA Standard method(3)에 의거하여 측정하였다.

세균 분석

자갈층과 침출수에서 얻은 시료를 적절히 희석하여 세균 분석을 위한 시료로 사용하였다. 종속영양미생물의 검출은 Zobell 2216 E 평판배지에 도말하여 접종한 후 25°C에서 7일간 배양하여 형성된 군락을 계수하였다. 유류분해미생물은 0.2% Arabian light crude oil이 포함된 mineral medium (NH_4Cl , 0.6 g; K_2HPO_4 , 0.26 g; Aged sea water, 750 mL; Distilled water, 250 mL; Agar, 15 g)에 도말·접종한 후 25°C에서 2주간 배양하여 형성된 군락을 계수하였다.

미생물 활성도 측정

미생물 활성도를 관찰하기 위하여 INT(2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride)를 이용하여 ETS(Electron Transport System) 활성을 조사하였다. 이는 인

공적인 전자 수용체인 INT와 전자공급원인 NADH^+ , NADPH^+ , succinic acid를 첨가 반응시킨 후 환원된 INT-formazan의 흡광도로 측정하는 방법이다(29). 자갈층과 침출수에서 얻은 시료 5 mL에 0.4 M succinic acid 0.5 mL, 0.88 mM NADH 0.25 mL, 0.02% nalidixic acid 1 mL 그리고 0.2% INT 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 배양한 후 포르말린으로 고정하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 침전시켰다. 상등액을 제거한 후 96% 메탄올 10 mL을 넣고 vortex mixing하여 세포내에 축적된 INT-formazan을 용출시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 부유물을 침전시켰다. 환원된 INT-formazan의 흡광도를 480 nm의 파장에서 측정하고 standard curve로부터 formazan의 양을 계산하여 이를 ETS 활성도로 나타내었다(27).

Crude oil의 분석

각 microcosm의 자갈층과 침출수로부터의 유류 시료는 10 mL과 20 mL의 클로로포름으로 각각 추출하였다. 추출이 끝난 시료는 무수황산나트륨 2 g이 올려진 여과지(Whatman No. 4)에 통과시켜 수분을 제거한다. 동일과정을 동량의 클로로포름을 첨가하여 2회 반복한다. 추출된 클로로포름 성분은 rotary evaporator(Eyela, Japan)를 이용하여 제거시킨 후 Gas Chromatography(Flame-Ionization Detector)를 이용하여 분석하였다. 추출된 유류는 silica-alumina column을 이용하여 aliphatic hydrocarbon을 분리하는데 사용되었다(30). 내경 18 mm의 glass chromatography column에 silica gel을 3.5 cm 높이로 충전한 후 alumina를 1.5 cm가 되게 충전하였다. 여기에 농축된 추출시료를 넣어 헥산 20 mL로 전개시킨 후 농축하여 aliphatic 성분 분석에 이용하였다. 분리된 aliphatic hydrocarbon은 적당량의 헥산을 첨가한 후 $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$ fused silica capillary column(SPBTM-1)이 장착된 GC/FID(HP 5890 series II, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다: initial temperature, 100°C for 3 min; rate, $3^\circ\text{C}/\text{min}$; final temperature, 320°C ; final time, 2 min; detector, 340°C ; injector, 340°C ; carrier gas(N_2), 40 mL/min. 또한 C_{17} /Pristane과 C_{18} /Phytane ratios를 분석하여 세균에 의한 유류분해 여부를 확인하는 지표로 삼았다(5, 8, 20).

결과 및 고찰

물리·화학적 요인 분석

대부분의 자갈해안은 다양한 크기로 이루어지며, 크기에 따라 granules(2~4 mm in diameter), pebbles(4~64 mm), cobbles(64~256 mm) 및 boulders(256 mm 이상)로 구분한다. 본 연구에서는 pebble로 이루어진 microcosm을 실험실내에 설치하여 수행하였으며, 조간대의 자갈환경이 상층을 제외한 대부분이 빛의 영향을 받지 않다는 것을 고려하여 실험구는 실험기간 동안 빛으로부터 차단되었다. 실험기간 동안 침출수와 pebble 표면수로부터 측정된 영양염의 농도는 Fig. 3에 나타났다. 지속성영양염제가 첨가된 III번 실험구에서는 다른 실험구에 비해 무기인산염과 요소가 높은 농도로 92일차까지 지속적으로 용출되고 있음을 알 수 있다. 반면에 In-

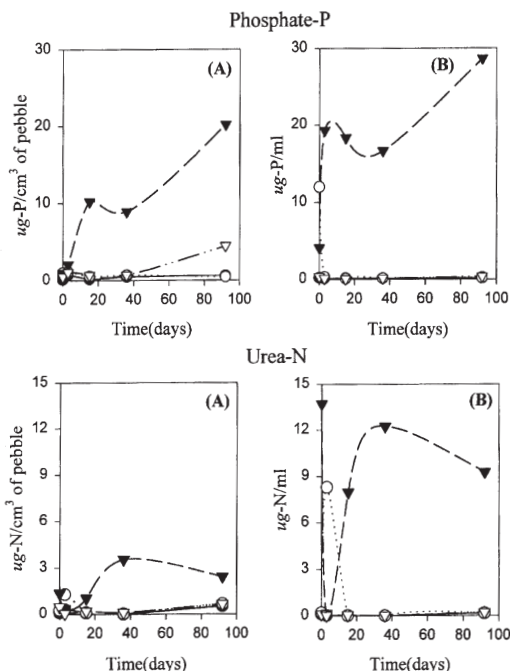


Fig. 3. Concentrations of inorganic phosphate and urea in the pebble surface (A) and leachate (B) in microcosms. -●- Microcosm I, -○- Microcosm II, -▼- Microcosm III, -▽- Microcosm IV.

ipol EAP-22를 첨가한 II, IV번 실험구에서는 낮은 농도로 용출되고 있음을 알 수 있다. 이는 Ladousse(13)와 Halmø (11) 등 대부분의 연구자들이 지용성영양염제로 사용된 Inipol EAP-22를 통상적으로 유류량의 5~10%로 사용하였으며, 본 실험에서도 유류량의 10%가 되도록 첨가하였다. 그러나 첨가된 Inipol EAP-22속에 들어 있는 인(P)과 질소(N)의 양은 SRF에 포함된 양(C:N:P=100:10:3)에 비하여 적은 양이 포함되어 있었다. 이와 같은 이유로 Inipol EAP-22를 첨가한 실험구 II, IV는 탄소원에 비하여 인과 질소원의 공급이 충분치 못하여 유류분해율이 SRF에 비하여 낮은 것으로 사료된다(Fig. 6). 뿐만 아니라 pebble surface로부터 SRF와 Inipol EAP-22의 용출상태를 살펴보면, Inipol EAP-22의 제거량은 측정할 수 없었지만, 이들 침출수에 이동된 유류의 양으로 예측할 수 있었다. 즉 시각적으로 관찰하였을 때 SRF가 첨가된 실험구의 경우 대조구에서와 비슷한 정도의 유류가 용출되었으나 Inipol EAP-22가 첨가된 실험구에서는 많은 양의 유류가 관찰되었다(data 생략). 이는 Inipol EAP-22가 인 및 질소의 영양분공급 이외에 유류를 유화시킬 수 있는 성분이 포함되어 있기 때문으로 사료된다(26). 이와 같은 결과로 Inipol EAP-22를 첨가한 실험구 II, IV는 SRF를 첨가한 실험구에 비하여 더 많은 인과 질소의 공급이 제한된 것으로 사료된다.

미생물 수의 변화

실험구에 접종한 유류분해 미생물은 분말형태의 혼합 미생물을 해수에 혼합한 후 spray를 이용하여 실험구 상층에서 분무하였다. 수분공급을 위하여 사용된 해수(인천 월미도에서 취수)에서의 종속영양미생물수와 유류분해미생물수는 각각 5.9×10^4 CFU/mL과 1.4×10^4 CFU/mL로 나타났다. 자갈 표면과 침출수에서의 미생물수의 변화를 비교하여 보면, 종속영양미생물과 유류분해미생물 모두에서 pebble surface(PS)/leachate water(LW) ratio가 실험초기인 0일차에는 0.3~3.2였으나, 최대생장기에 도달한 36일차에는 PS/LW ratio가 1.5~9.0으로 높아졌음이 관찰되었다. 이 ratio는 92일차에도 2.4~8.1로 유지되었다. 이와 같은 결과는 자갈 표면에 분무된 미생물이 일부는 아래로 씻겨 내려간 반면 일부는 pebble surface에 부착하여 미생물막을 형성하여 시간이 경과함에 따라 미생물막이 더욱 안정화되었기 때문이라고 사료된다. 특히 Inipol EAP-22를 첨가한 II, IV번 실험구에서 높은 값을 나타냈는데, 이것은 Inipol EAP-22가 기름을 씻는 효과도 있지만 친유성질에 의하여 미생물이 부착하여 생존하는데 도움을 받았으리라 사료된다.

종속영양미생물의 전체적인 변화는 초기 15일까지는 증가하는 추세를 나타내었으나, 그 이후 거의 일정한 상태가 유지되었다(Fig. 4). 이러한 경향은 유류분해미생물의 경우에도 비슷하게 나타났다. 실험구에 따른 미생물변화를 보면, 대조구인 I번 실험구와 Inipol EAP-22를 첨가한 IV번 실험구의 경우 접종 초기에는 대조구인 I번 실험구에서 Inipol EAP-22를 첨가한 IV번 실험구에서 보다 높게 나타났으나, 36일차 이후 Inipol EAP-22를 첨가한 IV번 실험구에서

더 높게 나타났다. 이것은 첨가된 Inipol EAP-22의 영양염 효과로 인하여 아무 것도 첨가되지 않은 I번 실험구보다 더 많은 미생물이 증식한 것으로 사료된다. 종속영양미생물과 유류분해미생물은 자갈과 침출수의 경우 모두 미생물과 SRF를 첨가한 실험구에서 가장 높은 것으로 관찰되었는데, 이러한 결과는 거제도의 sand 지역에서 행한 microcosm 시험시 미생물과 영양염제를 첨가한 실험구에서 유류분해미생물이 다른 실험구에 비하여 46% 정도 높다는 결과와 유사하였다(2).

미생물 활성도 변화

전자전달계(ETS) 활성도는 분해, 호흡량을 측정하는 간접 방법으로 ETS는 산소소모량 즉 호흡량과 일치한다(22). 이 방법에 의한 미생물 활성도를 보면, 36일차에 최고의 활성도를 나타내고 있으며(Fig. 5), 이러한 결과는 미생물수와 유류분해율과도 비슷한 양상을 나타내고 있다. 그러나 92일차에는 전체적으로 종속영양미생물과 유류분해미생물의 수에는 큰 변화가 나타나지 않았음에도 불구하고 자갈표면에서의 활성도가 급격히 감소하는 양상을 나타내고 있다. 이러한 결과는 미생물에 의해 쉽게 이용될 수 있는 물질들이 생물학적 분해에 의해 고갈되었기 때문에 나타났다고 해석된다. 자갈표면에 형성된 생물막에는 oil gradient가 존재하게

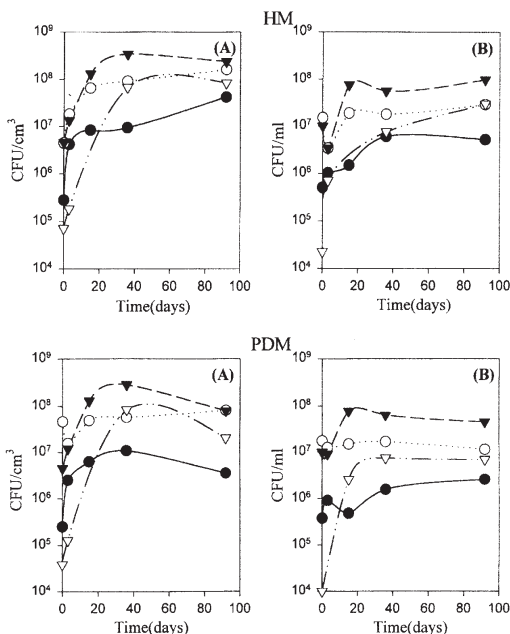


Fig. 4. Fluctuation of heterotrophic microorganism (HM) and petroleum-degrading microorganism (PDM) in the pebble surface (A) and leachate (B) in microcosms. —●— Microcosm I, —○— Microcosm II, —▲— Microcosm III, —▽— Microcosm IV.

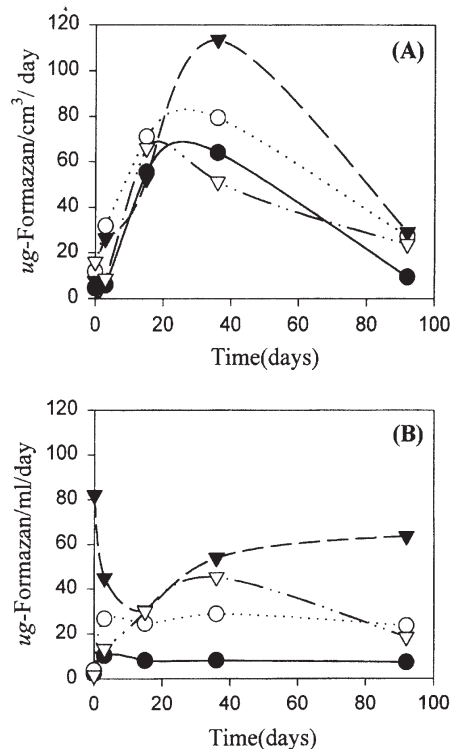


Fig. 5. Fluctuations of ETS (Electron Transport System) activity in the pebble surface (A) and leachate (B) in microcosms. —●— Microcosm I, —○— Microcosm II, —▲— Microcosm III, —▽— Microcosm IV.

되는데, 유류 농도가 높지 않은 경우에는 생물막 표면의 한정된 미생물들만이 유류와 접촉하며 유류 분해 활성을 갖게 된다. 그러나, 자갈시료 채취시 해수를 분무하는 과정에서 유류 분해 활성을 지닌 생물막 상층의 미생물들은 침출수로 제거되고 자갈시료에는 유류와 거의 접촉이 없었던 미생물들만이 남게 된다. 따라서 유류분해미생물의 수에는 변화가 없지만 유류 분해에 관여하고 있는 미생물 수가 급격히 감소함에 따라 활성도가 급격히 감소된 것으로 사료된다. 실험구에 따른 변화를 보면, 유류분해미생물과 지속성영양염제를 첨가한 III번 실험구에서 전 실험기간에 걸쳐 활성도가 가장 높은 것으로 나타났으며, 다음으로 미생물과 Inipol EAP-22를 첨가한 실험구에서 높은 값을 나타내고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 영양공급원으로서 지속성영양염제가 Inipol EAP-22에 비해 더 효과가 있기 때문으로 사료된다. 특히 이러한 지속성영양염제는 자갈 틈 사이에 존재하여 공급되는 수분에 따라 Fig. 3에서 보여진 것과 같이 지속적으로 용출되기 때문에 장시간의 정화작업에 유용하게 이용되리라 사료된다.

잔류 유류 변화

자갈은 단위 표면적에 따라 함유하는 유류의 양이 상당히 다르기 때문에 자갈에서 유류분해를 예측하는 것은 쉽지 않다. 따라서 현장에서의 유류분해를 예측하기 위해서는 다양한 분석방법을 이용하여 그 결과를 상호비교·분석하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 유류감소의 정량적인 측정보다는 생물체에 의한 유류분해의 지표로 사용되는 $C_{17}/\text{Pristane}$ 과 $C_{18}/\text{Phytane}$ ratio를 이용하여 미생물에 의한 유류감소를 예측하였다. $C_{17}/\text{Pristane}$ 과 $C_{18}/\text{Phytane}$ ratios에 의한 유류분해 예측은 remediation이 장기간 진행되었거나 유류사고가 일어난지 오래된 탄화수소일 때는 불합리한 것으로 알려져 있다(21). 그 이유로는 isoprenoid alkane인 pristane은 n-alkane에 비하여 생물학적으로 분해가 어려운 물질이기 때문에 bioremediation 초기단계에는 biomarker로서 사용될 수 있으나 미생물에 의한 분해가 불가능한 물질은 아니기 때문에 bioremediation 후기에는 biomarker로 사용하는 것이 부적합한 것으로 알려져 있다(7). 그러나 유류사고가 일어난 후 초기단계(몇주~몇달) bioremediation에는 유용하게 사용될 수 있다. Fig. 6에 보이는 바와 같이 미생물과 SRF를 첨가한 III번 실험구에서 $C_{17}/\text{Pristane}$ 과 $C_{18}/\text{Phytane}$ ratio가 가장 낮은 것으로 관찰되었다. 특히 III번 실험구에서 $C_{17}/\text{Pristane}$ 과 $C_{18}/\text{Phytane}$ ratio는 0일차에 비하여 이미 15일차에 53.9~82.5% 가량 감소한 것으로 나타나 생물학적 처리 초기에 상당량 분해가 진행되고 있음을 알 수 있었다. 또한 지속성영양염제인 Inipol EAP-22와 미생물을 첨가한 II번 실험구의 경우 Inipol EAP-22만 첨가한 IV번 실험구와 비교할 때 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. Fayad(9) 등에 의해 수행된 연구에서도 영양염제만을 넣은 실험구보다는 영양염제와 미생물을 함께 첨가한 실험구에서 120시간 처리후에 $C_{18}/\text{Phytane}$ ratio가 급격히 감소하는 결과가 관찰되었다. 또한 영양염제만을 첨가한 실험구에서도 spill된 유류의 분해가 향상되었으나, 영양염제와 미생물을 함께 첨가할 경우 n-alkane의 분해 뿐만 아니라 non-alkane의 상당량을 유화

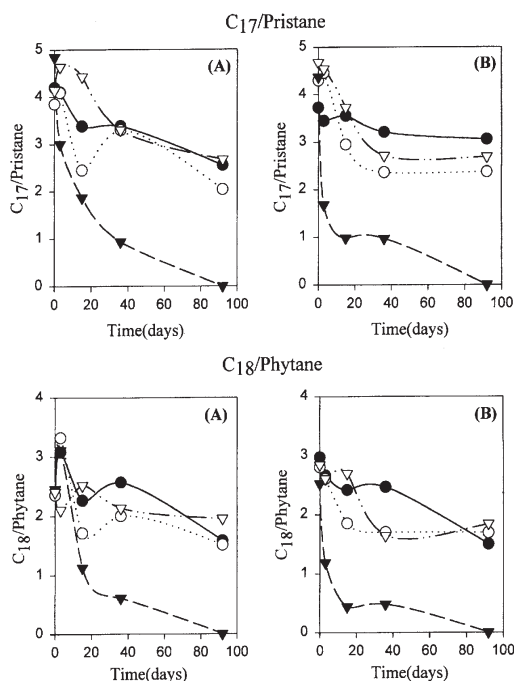


Fig. 6. Fluctuations of $C_{17}/\text{Pristane}$ ratio and $C_{18}/\text{Phytane}$ ratio in the pebble surface (A) and leachate (B) in microcosms. ● Microcosm I, ○ Microcosm II, ▲ Microcosm III, ▽ Microcosm IV.

시킬 수 있다고 보고했다. 1989년 Exxon Valdez 사고 현장에서 지속성영양염제인 Inipol EAP-22의 사용으로 2주 후에 오염된 해안이 시각적으로 기름이 제거된 것으로 보였으나, 탄화수소 농도의 측정에 의하면 제거되지 않은 것으로 알려져 있다(25). 본 조사에서도 Inipol EAP-22의 유류세척효과는 우수한 것으로 나타났으나, 초기제거에 의하여 실제 미생물에 의한 유류분해에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 본 연구에서 적용한 유류분해 미생물과 지속성영양염제의 첨가는 물리, 화학적으로 제거가 어려운 자갈환경으로부터 유류를 제거하는데 높은 가능성이 있음이 입증되었고, 이 방법을 적용하여 자연적인 정화기간을 줄일 수 있리라 예측한다. 그러나 현장적용에 앞서 자갈해안 환경의 bioremediation에 최적인 영양염제의 형태와 미생물의 적용 방법은 앞으로 더 연구해야 할 과제로 남아있다.

감사의 글

본 연구는 1996년 G-7환경과학기술개발사업(9-4-2)으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 한국해양연구소. 1994. 해양 유류오염 방제 및 환경회복 기술연구. 환경처, 과학기술처 환경 선도기술 개발사업

- 2차년도 보고서 9-4-2. p. 214.
2. 한국해양연구소. 1995. 해양 유류오염 방제 및 환경회복 기술연구. 환경처, 과학기술처 환경 선도기술 개발사업 3차년도 보고서 9-4-2. p. 263.
 3. APHA, AWWA and WEF. 1992. Standard Method for the examination of water and wastewater. 18th ed. APHA, Washington, DC.
 4. Baud-Grasset, F. and T.M. Vogel. 1995. Bioaugmentation: Biotreatment of contaminated soil by adding adapted bacteria. Third International In situ and on-site Bioreclamation symp. Vol. 3, No. 3, p. 39-48. Battelle Press, Columbus, Ohio.
 5. Blumer, M., M. Ehrhardt and J.H. Jones. 1973. The environmental fate of stranded crude oil. *Deep-sea Res.* **20**, 239-259.
 6. Bragg, J.R., R.C. Prince, E.J. Harner and R.M. Atlas. 1993. Bioremediation effectiveness following the Exxon Valdez Spill. Oil Spill Conference. p. 435-447.
 7. Bregnard, T.P.-A., A. Haner, P. Hohener and J. Zeyer. 1997. Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(5), 2077-2081.
 8. Fayad, N.M. and E. Overton. 1995. A unique biodegradation pattern of the oil spilled during the 1991 Gulf War. *Marine Pollution Bulletin.* **30**(4), 239-246.
 9. Fayad, N.M., R.L. Edora, A.H. El-Mubarak and A.B. Polancos. 1992. Effectiveness of a bioremediation product in degrading the oil spilled in the 1991 Arabian Gulf War. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **49**, 787-796.
 10. Glaser, J.A., A.D. Venosa and E.J. Opatken. 1991. Development and evaluation of application techniques for delivery of nutrients to contaminated shoreline in Prince William Sound. Oil Spill Conference. p. 559-562.
 11. Halmo, G. 1985. Enhanced biodegradation of oil. Oil Spill Conference. p. 531-535.
 12. Hayes, M.O., J. Michel and D.C. Noe. 1991. Factors controlling initial deposition and long-term fate of spilled oil on gravel beaches. Oil Spill Conference. p. 453-460.
 13. Ladousse, A. and B. Tramier. 1991. Results of 12 years of research in spilled oil bioremediation: INIPOL EAP 22. Oil Spill Conference. p. 577-581.
 14. Lee, K. 1995. Bioremediation studies in low-energy shoreline environments. Second International Oil Spill Research and Development Forum. Vol. 1, p. 27-36. IMO, London.
 15. Lee, K. and E.M. Levy. 1987. Enhanced biodegradation of a light crude oil in sandy beaches. Oil Spill Conference. p. 411-416.
 16. Lee, K. and E.M. Levy. 1991. Bioremediation: Waxy crude oil stranded on low-energy shorelines. Oil Spill Conference. p. 541-547.
 17. Lee, K., G.H. Tremblay and E.M. Levy. 1993. Bioremediation: Application of Slow-Release Fertilizers on low-energy shorelines. Oil Spill Conference. p. 449-454.
 18. 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**(9), 2514-2522.
 19. Marty, P. and Y. Martin. 1993. Use of oleophilic fertilizer and selected bacterial communities to enhance biodegradation of crude oil in seawater. *J. Mar. Biotechnol.* **1**, 27-32.
 20. Marty, P. and Y. Martin. 1996. Seed and feed strategy against oil spills in a marine environment: laboratory and simulated outdoor experiments with selected natural bacterial strains. *J. Mar. Biotechnol.* **4**, 155-158.
 21. McMillen, S.J., N.R. Gray, J.M. Kerr, A.G. Requejo, T. J. McDonald and G.S. Douglas. 1995. Assessing bioremediation of crude oil in soils and sludges. Third International In situ and on-site Bioreclamation symp. Vol. 3, No. 5, p. 1-9. Battelle Press, Columbus, Ohio.
 22. Packard, T.T. and P.J. LeB. Williams. 1981. Rate of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the northwest Atlantic. *Oceanologica Acta.* **4**, 351-358.
 23. Scherrer, P. and G. Mille. 1990. Biodegradation of crude oil in experimentally-polluted clayey and sandy mangrove soils. *Oil & Chemical Pollution.* **6**, 163-176.
 24. Sveum, P. and A. Ladousse. 1989. Biodegradation of oil in the arctic: Enhancement by oil-soluble fertilizer application. Oil Spill Conference. p. 439-446.
 25. Swannell, R.P.J. and I.M. Head. 1994. Bioremediation comes of age. *Nature.* **368**, 396-397.
 26. Swannell, R.P.J., K. Lee and M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* **60**, 342-365.
 27. Trevors, J.T., C.I. Mayfield and W.E. Inniss. 1982. Measurement of electron transport system(ETS) activity in soil. *Microb. Ecol.* **8**, 163-168.
 28. Venosa, A.D., M.T. Suidan, B.A. Wrenn, K.L. Strohmeyer, J.R. Haines, B.L. Eberhart, D. King and E. Holder. 1996. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1764-1775.
 29. Vosjan, J.H. 1982. Respiratory electron transport system activities in marine environments. *Hydrobiological Bulletin.* **16**(1), 61-68.
 30. Wade, T.L., E.L. Atlas, J.M. Brooks, M.C. Kennicutt II, R.G. Fox, J. Sericano, B. Garcia-Romero and D. De-Freitas. 1988. NOAA Gulf of Mexico Status and Trends Program: Trace organic contaminant distribution in sediments and oysters. *Estuaries.* **11**, 171-179.

(Received June 1, 1998/Accepted July 13, 1998)

ABSTRACT: Microcosm Study for Bioremediation of Oil-Contaminated Pebble Environments

Doo-Suep Sim, Jae-Hak Sohn and Sang-Jin Kim* (Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P. O. Box 29, Seoul 425-600, Korea)

Biological treatment of Arabian light crude oil-contaminated pebble was investigated in laboratory microcosms after supplementation with inorganic nutrients and oil-degrading microorganisms. Glass columns (10 cm×20 cm) were used as microcosms and each microcosm was filled with pebbles of diameter less than 40 mm. After initial oil contamination of 2.4% (w/v), Inipol EAP-22 or slow release fertilizer (SRF) was added as inorganic nutrients and microorganisms were sprayed over pebbles. When C_{17} /pristane and C_{18} /phytane ratios were used as a marker for oil biodegradation, both ratios for microcosm supplemented with SRF and microorganisms were the lowest (below detectable range) after 92 days. Elimination of oil by abiotic processes, however, were minimal with decrease of C_{17} /pristane and C_{18} /phytane ratios from 3.55 and 2.41 to 3.06 and 1.50, respectively. The numbers of heterotrophic and oil-degrading microorganisms, and biological activity (dehydrogenase activity) corresponded to the course of biodegradation activities in all microcosms. During the whole experimental period, there was no significant nutrient deficiency only in the microcosm with SRF and microorganisms. It seemed that a continuous supply of inorganic nutrients using SRF was the most important factor for the successful performance of biological treatment in oil-contaminated pebbles.