

지속성 영양염제와 유분산제가 해변모래에 오염된 유류의 생분해에 미치는 영향

손재학[†] · 권개경 · 김상진*
한국해양연구원 미생물연구실

해변에 오염된 유류의 생분해를 증진시키기 위한 지속성 영양염제(Slow Release Fertilizer; SRF)와 유분산제(Corexit 9527[®])의 처리효과를 평가하기 위하여 2 회의 mesocosm 실험을 실시하였다. 1 차 현장실험에서 SRF 처리구의 지방족 탄화수소 분해율과 $n\text{-C}_{17}$ /pristane, $n\text{-C}_{18}$ /phytane 비의 감소율은 시험 37일에 각각 85%, 69%, 61%로 뚜렷한 생물정화 효과를 보였다. 반면에 Corexit 9527[®] 처리구에서 지방족 탄화수소의 분해율은 실험기간 동안 56%로 대조구(50%)보다 뚜렷한 생물정화효과가 나타나지 않았으며 $n\text{-C}_{17}$ /pristane과 $n\text{-C}_{18}$ /phytane 비의 감소율 또한 27%, 17%로 대조구(60%, 46%)보다 낮아 유류화합물의 생물정화가 오히려 억제되었다는 사실을 알 수 있었다. 그러나 2 차 현장실험에서 SRF와 Corexit 9527[®]을 함께 첨가한 처리구의 생물정화 결과는 지방족 탄화수소의 양, $n\text{-C}_{17}$ /pristane과 $n\text{-C}_{18}$ /phytane 비의 변화를 관찰한 결과 억제효과는 크지 않았다. 이러한 결과로부터 유류유출시 영양물질의 첨가는 유류분해도를 향상시키는 반면, 유분산제를 이용한 처리방법은 자연적인 생물정화기능을 오히려 억제 또는 제한하기 때문에 사용여부가 신중하게 고려되어야 함을 확인할 수 있었다. 따라서 유류오염사고 국가 긴급방제계획에 의한 유분산제의 대량 사용은 생물정화기술의 적용을 염두에 두고 재평가가 되어야 한다.

Key words □ bioremediation, biodegradation, slow release fertilizer, dispersant, Corexit 9527[®], oil-degrading bacteria

유류에 의해 오염된 토양환경을 정화하기 위한 생물정화기술(Bioremediation)은 토착미생물에 의한 오염물질의 분해를 가속화시킬 수 있는 물질 혹은 유류분해미생물을 첨가하거나 조작하는 기술을 일컫는다(6,8,15,26). 빈영양상태의 해안 모래환경의 유류 오염은 과량의 탄소원에 비하여 부족한 질소와 인이 토착세균에 의한 생물분해를 제한하곤 한다(5,17). 따라서 유류분해를 제한하는 질소와 인의 추가적인 공급은 유류분해미생물의 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라 유류 생분해를 향상시킬 수 있다(12-14, 18, 19,21,23,31). 유류의 생물정화연구에서 무기영양물질을 공급하는 방법으로는 1) 무기영양물질을 수용액형태로 직접 공급하는 방법, 2) 무기영양물질을 지속적으로 일정량을 공급시킬 수 있는 지속성 영양염제(Slow Release Fertilizer; SRF)를 공급하는 방법, 3) 지용성 용매에 무기영양물질을 용존시킨 지용성 영양염제(Oleophilic fertilizer, 예; Inipol EAP)를 공급하는 방법 등이 주로 사용되고 있다.

이러한 무기영양물질의 첨가는 토양환경에서 무기영양물질의 용해도와 환경내 농도를 조절하는 물리적인 인자와의 상호작용에 의해 유류분해미생물의 증가와 분해활성에 미치는 효과에 차

이를 가져오는 것으로 알려져 있다(23,28). 예로서 Exxon Valdez 호에 의한 유류유출사고 후 Prince William Sound에서 오염된 유류를 제거하기 위한 생물정화실험에서 지용성 영양염제(Inipol EAP 22[®])와 지속성 영양염제(Customblen[®])의 처리는 모두 대조구에 비해 높은 수의 분해세균을 유지하였으며 분해율도 증가하였다(11). 한편 유류유출 중간대 mesocosm 실험구에서 Inipol EAP 22[®]와 지속성 영양염제를 비교한 결과 지속성 영양염제가 유류분해를 활성화 시켰으며(12) 이때 높은 유류분해도를 유지하기 위해서는 최적농도의 무기영양물질 공급의 중요성이 확인되었다(23). 또한 자갈로 구성된 미소환경을 가정한 mesocosm 실험에서도 Inipol EAP 22[®]보다 지속성 영양염제가 오염된 유류의 분해와 분해세균의 성장을 증가시켰다(2). 그러나 Swannell 등(28)에 따르면 유류가 유출된 중간대지역을 가정한 실험에서 Inipol EAP 22[®]의 처리가 지속성 영양염제인 Max Bac[®]보다 뚜렷하게 유류분해를 증가시켰으므로 같은 종류의 영양염제에 대해서도 실험조건과 환경에 따라 상반된 결과를 나타낼 수 있다.

유류화합물을 구성하고 있는 탄화수소 화합물은 소수성이므로 토양에 흡착되거나 물과 분리된 상태로 존재한다. 유분산제와 같은 계면활성제(surface active agents)는 표면장력을 감소시켜 미세한 방울의 유화입자(micelle)형태로 탄화수소를 전환시킴으로써 생물이용성을 증가시키기 때문에 미생물에 의한 유류의 생분해를 향상시키는 것으로 알려져 있다(16). 따라서 우리나라에서는

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 031-400-6240, Fax: 031-406-2495

E-mail: s-jkim@kordi.re.kr

[†]Present address: Marine Biotechnology Center, Silla Univ., Busan

해상에 유출된 유류의 분산과 바위, 자갈 및 모래로 구성된 연안 환경에서 오염유류 세척을 위하여 현재 긴급방제수단으로 활용하고 있다. 그러나 지금까지 유분산제의 적용에 대한 실험실규모 연구에서 미생물에 의한 유류 및 탄화수소의 분해를 향상시키거나, 억제시키거나 혹은 어떠한 영향도 미치지 않는 등 매우 상반된 결과들이 보고되고 있다(10,16). 또한 유류유출사고 발생시 국가 긴급방제수단으로 다량으로 사용되고 있는 화학 유분산제가 특히 조건대 오염유류의 생물정화에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 연구된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 모래로 구성된 해안에 유출된 유류의 생물정화를 위한 방법으로서 지속성 영양염제와 유분산제인 Corexit 9527[®] 처리가 토착미생물의 성장과 유류분해에 어떠한 영향을 미치는가를 평가하기 위한 현장 mesocosm 실험을 실시하였다. 특히 국내에서 빈번히 사용되는 유분산제가 토착미생물의 분해활성에 미치는 영향 및 빈영양환경에서 지속성 영양염제의 유류 생분해 활성에 미치는 효과에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

Mesocosm의 설치 및 시료 채취

Mesocosm은 경기도 시흥시 군자에 위치한 시화 간척지구내 모래로 구성된 해안에 설치하였다. Mesocosm을 구성하는 각 실험구(plot)는 지름(d) 360 mm, 높이(h) 250 mm의 밑이 뚫려 있는 원형 플라스틱 용기를 묻어 주변환경과 격리시켰다(Fig. 1). 각 plot은 5,000 cm³ 모래와 150 ml의 Arabian light 원유 (3%, v/v)를 첨가하여 균질하게 혼합하여 인위적으로 오염시켰다. Mesocosm 실험은 총 2 회에 걸쳐 진행되었으며 설치된 실험구의 구성조건은 다음과 같다.

1 차 실험에서는 무기영양염제와 유분산제의 처리 효과를 분석하였다. 오염 대조구인 plot I은 3%의 Arabian light 원유를 인위적으로 오염시킨 것 외에 어떠한 처리도 하지 않았다. 무기영양염제의 처리효과를 알아보기 위한 plot II는 C:N:P비를 100:10:1이 되도록 170 g의 요소형(urea form, 419.7 mg-N g⁻¹)과 240 g의 혼합형(urea form, 67.7 mg-N g⁻¹; phosphate form,

50.4 mg-P g⁻¹) 지속성 무기영양염제((주)조선비료, 한국)를 첨가하였다. 유분산제의 효과를 확인하기 위한 plot III은 Corexit 9527[®](Exxon Chemical Co.), 48% nonionic surfactants (Tween 80, Tween 85, Span 80), 35% anionic surfactant (sodium dioctyl sulfosuccinate), 17% solvent (ethylene glycol monobutyl ether)을 체적 비의 약 0.12%(6 ml)가 되게 첨가하였다.

2 차 실험에서는 무기영양염제와 유분산제를 동시에 처리하였을 때의 영향을 분석하였는데, plot I과 II는 1 차 실험 때와 각각 동일한 조건으로 설치하였으며, plot III은 영양염제와 유분산제를 동시에 처리하였다. 시료 채취는 1 차 실험의 경우 실험구 설치 당일, 3, 8, 16, 37 일차에, 2 차 실험의 경우 설치 당일, 3, 7, 15, 30, 50일차에 수행하였다. 채취된 시료는 멸균된 100 ml 용량의 specimen cup ((주)녹십자, 한국)에 담아 실험실까지 냉장 상태로 운반하였다. 또한 시료 채취 후 수분의 공급을 위하여 동량의 속성해수와 증류수 혼합액 2 L를 각 plot에 공급하였고 산소공급을 위하여 land farming을 수행하였다.

물리·화학적 요인분석

실험지역 주변의 대기온도는 중앙기상대의 인천지역자료를 이용하였다. 함수율과 건조중량은 시료 1 cm³을 80°C에서 하루 밤 건조시킨 전·후의 차이를 환산하여 구하였다(4). 암모니아염 질소(NH₄-N), 아질산염 질소(NO₂-N), 질산염 질소(NO₃-N), 인산염 인(PO₄-P)는 1 cm³의 시료를 100 ml의 멸균된 탈이온수에 첨가하여 Blender (Waring Co., U.S.A.)로 high speed에서 1 분간 혼합시켜 용출시킨 후 각각 standard method (4)에 따라 분석하였다.

시료의 표면장력(Surface tension)은 Mulligan 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 10 cm³의 시료를 10 ml의 탈이온수와 혼합한 후 ultrasonic bath (Branson 8210, U.S.A.)을 이용하여 10 분간 sonication하였다. 그리고 원심분리(8,000×g, 10 분) 한 후 시료의 중간층을 0.22 μm 구경의 여과지(diameter, 25 mm)로 여과하였다. 여과액의 표면장력은 Surface Tensiomat (Fisher Co., U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

잔류 유류성분 분석

실험구내 잔류 유류성분을 분석하기 위하여, 30 ml 유리 원심분리관에 시료 1 g과 표준물질로 squalane (C₃₀H₅₂; Sigma Co., U.S.A.)을 250 μg씩 첨가한 후 수분과 황성분 제거를 위하여 무수 황산나트륨 1 g과 구리 5 mg을 첨가하고 잘 섞어주었다. 잔류 유류성분의 추출을 위하여 20 ml의 클로로포름을 원심분리관에 첨가하고 ultrasonic bath (Branson 8210, U.S.A.)를 이용하여 15 분간 처리하였다. 추출이 끝난 시료는 1,800×g에서 1 분간 원심분리하여 클로로포름 층을 모래로부터 분리하였으며 이 과정을 10 ml과 5 ml의 클로로포름을 첨가하여 2 회 반복하였다. 추출된 유류는 rotary evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 농축시킨 후 silica-alumina column을 이용하여 지방족 탄화수소(aliphatic hydrocarbon)를 분리하였다(32). 내경 18 mm의 chromatography column에 silica gel을 3.5 cm 높이로 충전시킨

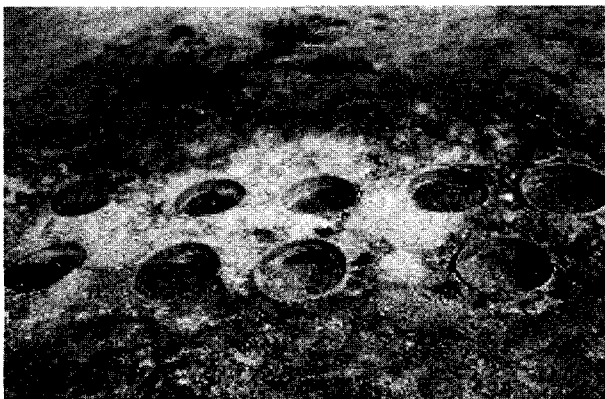


Fig. 1. Photograph of mesocosm.

후 alumina를 1.5 cm가 되게 충전시켰다. 여기에 농축된 추출 시료를 얻어 20 ml 핵산을 전개시킨 후 농축하여 지방족 탄화수소의 분석에 이용하였다. 분리된 지방족 탄화수소는 30 m×0.32 mm×0.25 μm fused silica capillary column (SPB™-1)이 장착된 GC/FID (HP 5890 series II, Hewlett Packard, U.S.A.)를 이용하여 분석하였다. GC분석을 위한 온도조건은 초기에 100°C에서 3 분간 유지한 후 분당 3°C씩 280°C까지 승온한 후 2 분간 유지하였다. 주입부 및 검출기 온도는 280°C, 이동가스는 고순도 질소, flow rate는 40 ml min⁻¹로 이동시켰다. 또한 GC chromatogram상에서 *n*-C₁₇/pristane과 *n*-C₁₈/phytane 비를 각각 산출하여 미생물에 의한 생물분해 여부를 확인하는 지표로 삼았다 (12,21). 이때 초기 각 *n*-C₁₇/pristane, *n*-C₁₈/phytane 비는 실험에 사용한 원유의 종류에 따라 상이하며 본 연구에서 사용한 Arabian light 원유의 경우에는 각각 3.5, 2.5 내외로 나타났다.

미생물 분석

토양시료 1 cm³을 100 ml의 멸균된 해수에 첨가하여 Blender mixer (Waring Co., U.S.A.)로 1 분간 혼합한 후 상층액을 미생물 분석을 위한 시료로 이용하였다. 종속영양 미생물수는 ZoBell 2216e 평판배지(33)에 연속희석방법으로 희석된 시료를 접종한 후 25°C에서 7 일간 배양하였을 때 형성된 균락을 계수하여 환산하였다. 유류분해 미생물수는 0.2% Arabian light 원유가 포함된 최소배지((NH₄)₂SO₄, 1.0 g; K₂HPO₄, 0.3 g; 속성해수, 750 ml; 증류수, 250 ml; 한천, 15 g)에 시료를 접종한 후 25°C에서 2 주간 배양하였을 때 형성된 균락을 계수하여 환산하였다.

결 과

환경요인 및 유화도의 변화

연구기간동안 평균 대기온도는 1 차 실험에서 27.4±1.6°C, 2차 실험에서 11.9±3.8°C였다. 시료의 평균 함수율은 1 차 실험에서 14.15±3.19%, 2 차 실험에서 7.5±4.2%로 함수율은 2 차 실험 때보다 1 차 실험동안에 평균 약 2 배정도 높았다 (Table 1).

각 실험기간동안 측정된 처리구의 평균 무기질소와 인의 농도는 Table 1과 같다. 1 차 실험기간동안 지속성 영양염제를 첨가한 처리구(plot II)가 첨가하지 않은 대조구(plot I, III)보다 무기

질소 및 인 농도는 각각 약 7~8 배 및 16~70 배, 2 차 실험기간동안에는 지속성 영양염제를 첨가한 처리구(plot II, III)가 첨가하지 않은 대조구(plot I)보다 3 배 및 20~33 배 정도 각각 높게 나타났다. 또한 2 차 보다 1 차 실험에서 무기질소와 인의 농도 모두 약 2-3 배정도 높게 유지되었다. 이러한 차이는 수분이 지속성 영양염제로부터 영양염을 유리시키는 작용을 함으로 함수율 결과에서 나타난 바와 같이 약 2 배정도 높은 수분의 함량에 의한 것으로 사료된다(Table 1).

Fig. 2는 실험기간동안 각 처리구로부터 추출된 시료의 표면장력의 변화를 나타낸 것이다. 두번의 mesocosm 실험 모두 유분산제인 Corexit 9527[®] 처리구(plot III)에서 초기에 높은 유화활성이 검출되었으나 이후 감소하는 경향을 보였으며 이러한 감소는 1 차보다 2 차 실험에서 뚜렷하게 나타났다. 1 차 실험에서 plot III의 표면장력값은 초기 8 일 동안 43.7 dynes cm⁻¹을 유지하였으나 이후 점진적으로 증가하여 유분산제에 의한 유화활성이 오랜 기간 유지된 반면(Fig. 2A), 2 차 실험에서 영양염제와 유분산제를 동시에 처리한 plot III의 표면장력은 3 일에서 7 일 사이에 43.0에서 71.4 dynes cm⁻¹으로 급격히 증가하여 초기부터 빠르게 유화활성이 소실되었음을 알 수 있다(Fig. 2B). 1 차 실험에서 영양염제 처리구(plot II)의 표면장력은 8 일과 16 일후

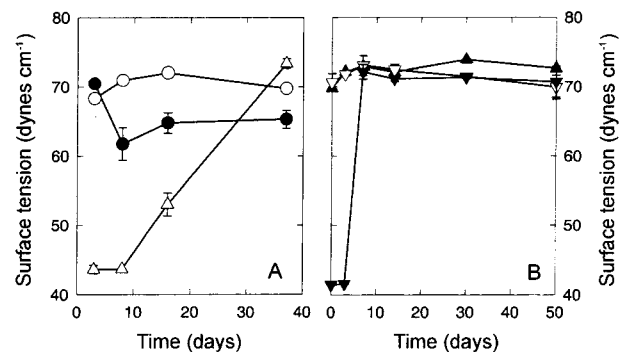


Fig. 2. Fluctuation of surface tension in the first (A) and the second (B) mesocosm tests. A: ○ plot I (Arabian light crude oil only), ● plot II (Arabian light crude oil + slow release fertilizer), △ plot III (Arabian light crude oil + Corexit 9527[®]). B: ▲ plot I (Arabian light crude oil only), ▽ plot II (Arabian light crude oil + slow release fertilizer), ▼ plot III (Arabian light crude oil + slow release fertilizer + Corexit 9527[®]).

Table 1. Average of water content and concentration of inorganic nutrients during the first and the second mesocosm tests

	1st mesocosm test			2nd mesocosm test		
	Plot I ³⁾	Plot II ⁴⁾	Plot III ⁵⁾	Plot I	Plot II	Plot III ⁶⁾
Water content (%)	14.98 ± 3.66	14.60 ± 3.13	12.88 ± 3.03	6.36 ± 4.66	8.35 ± 4.33	7.80 ± 3.58
Total dissolved nitrogen ¹⁾ (μg-N g ⁻¹ -sand)	8.22 ± 1.70	55.83 ± 7.19	7.34 ± 1.04	6.23 ± 1.27	19.50 ± 2.67	17.83 ± 2.00
Total dissolved phosphate ²⁾ (μg-P g ⁻¹ -sand)	1.26 ± 0.17	83.05 ± 133.03	5.60 ± 10.26	1.64 ± 1.04	54.32 ± 85.18	30.83 ± 47.81

¹⁾Sum of NH₃, NO₂ and NO₃; ²⁾PO₄; ³⁾Amended with Arabian light crude oil (3%); ⁴⁾Amended with Arabian light crude oil (3%) and slow release fertilizer (170 g urea form (419.7 mg-N g⁻¹) and 240 g mixed form (67.7 mg-N g⁻¹, 50.4 mg-P g⁻¹); ⁵⁾Amended with Arabian light crude oil (3%) and Corexit 9527[®] (0.12%); ⁶⁾Amended with Arabian light crude oil (3%), slow release fertilizer and Corexit 9527[®].

각각 61.8, 64.8 dynes cm⁻¹으로 감소하여 생물학적인 작용으로 인해 유화활성이 생성된 것으로 판단된다. 그러나 2 차 mesocosm에서 영양염제 처리에 따른 표면장력의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

유류분해

1 차 실험

Fig 3은 지속성 영양염제와 유분산제의 처리에 따른 지방족 탄화수소농도, *n*-C₁₇/pristane 및 *n*-C₁₈/phytane 비의 변화를 나타낸 그림이다. 지방족 탄화수소의 농도는 지속성 영양염제를 처리한 plot II에서 16, 37 일차에 각각 0.81, 0.37 mg g⁻¹-sand로 감소되어 각각 67, 85%의 분해율을 나타내었다(Fig. 3A). Plot III에서 지방족 탄화수소는 7 일차까지 2.21 mg g⁻¹-sand를 유지하였으나, 16 일차에 1.46 mg g⁻¹-sand로 감소하여 약 41%, 37 일차에 56%의 분해율을 각각 나타내었다. 반면에 대조구인 plot I에서 지방족 탄화수소는 16 일차까지 뚜렷하게 감소되지 않았으나 37 일 후에는 1.23 mg g⁻¹-sand수준으로 급격히 감소되었다.

지방족 탄화수소의 감소가 생물학적인 대사과정을 통하여 분

해되었는가를 나타내는 지표로서 *n*-C₁₇/pristane과 *n*-C₁₈/phytane 비를 이용하였다. 지속성 영양염을 처리한 plot II의 *n*-C₁₇/pristane 비는 초기 3.55에서 16 일차에 1.29로 감소되었으며 *n*-C₁₈/phytane 비 또한 초기 2.6에서 16 일차에 0.81로 감소되었다. 그러므로 plot II에서는 실험구설치 후 초기부터 지방족 탄화수소의 생물학적인 분해가 빠르게 진행되었음을 알 수 있다(Fig. 3-B, C). 유분산제를 처리한 plot III의 경우, *n*-C₁₇/pristane 및 *n*-C₁₈/phytane 비는 초기부터 16 일까지 유의한 변화가 없었으며 16 일 이후 37 일까지 각각 2.6, 2.2로 상대적으로 낮은 생물학적 분해도를 나타냈다. 반면에 대조구인 plot I에서 *n*-C₁₇/pristane 및 *n*-C₁₈/phytane 비는 16 일차까지 plot III와 유사한 경향을 보였으나 37 일차에 1.4와 1.42로 각각 감소하여 plot III보다 더 높은 생분해가 진행되었음을 알 수 있었다.

2 차 실험

2 차 실험에서는 지속성 영양염제와 유분산제인 Corexit 9527[®]을 동시에 처리하였을 때 유류의 생분해에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 4는 각 실험구의 지방족 탄화수소, *n*-C₁₇/pristane 및 *n*-C₁₈/phytane 비의 변화이다. 대조구인 plot I의 지방족 탄화수소농도는 초기 1.81 mg g⁻¹-sand에서 7 일차에 1.47 mg g⁻¹-sand로 빠르게 감소되었으며 50 일차에 1.17 mg g⁻¹-sand로 36%

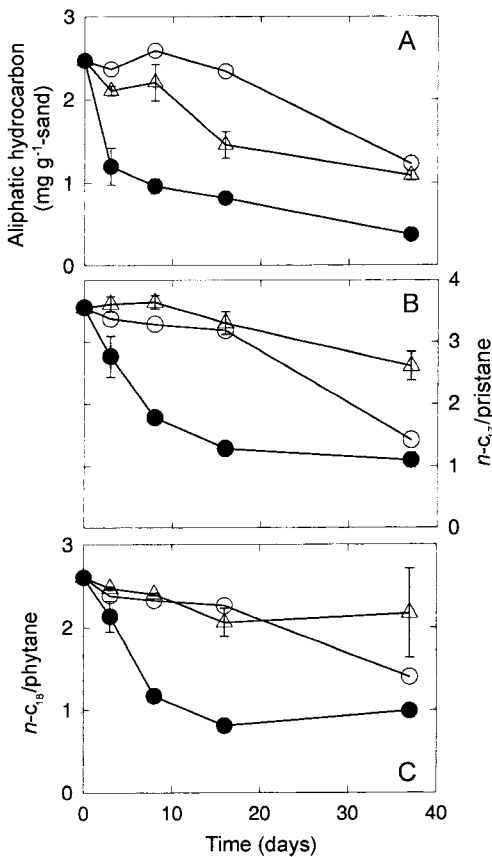


Fig. 3. Fluctuation of aliphatic hydrocarbon (A), *n*-C₁₇/pristane (B) and *n*-C₁₈/phytane (C) ratio in the first mesocosm test. ○ plot I (Arabian light crude oil only), ● plot II (Arabian light crude oil + slow release fertilizer), △ plot III (Arabian light crude oil + Corexit 9527[®]).

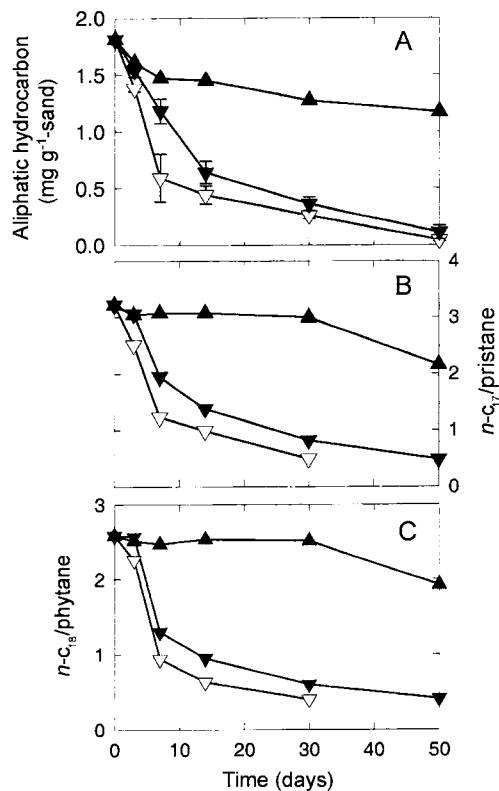


Fig. 4. Fluctuation of aliphatic hydrocarbon (A), *n*-C₁₇/pristane (B) and *n*-C₁₈/phytane (C) ratio in the second mesocosm test. ▲ plot I (Arabian light crude oil only), ▼ plot II (Arabian light crude oil + slow release fertilizer), ▽ plot III (Arabian light crude oil + slow release fertilizer + Corexit 9527[®]).

의 분해율을 나타냈다(Fig. 4A). 반면에 지속성 영양염제를 처리한 plot II에서 지방족 탄화수소는 7 일차에 0.59 mg g⁻¹-sand를 나타내어 초기농도와 비교하여 분해율이 61%로 급격히 증가하였으며 50 일차에는 잔류농도 0.04 mg g⁻¹-sand로 98%의 높은 분해율을 나타냈다. 지속성 영양염제와 유분산제를 동시에 처리한 plot III의 지방족 탄화수소농도는 7 일차에 1.18 mg g⁻¹-sand로 35%의 분해율을 나타내 지속성 영양염제만을 처리한 plot II보다 낮은 분해율을 보였다. 그러나 7 일 이후 지방족 탄화수소는 14 일까지 빠르게 감소하여 잔류농도 0.64 mg g⁻¹-sand를 나타냈으며 50 일차에 0.11 mg g⁻¹-sand로 감소하여 89%의 분해율을 나타냈다.

생물분해 지표인 n-C₁₇/pristane과 n-C₁₈/phytane 비는 대조구인 plot I에서 초기 30 일차에 각각 2.99, 2.51로 유의한 생물분해가 진행되지 않았으나 50 일차에 각각 2.15, 1.92로 약간의 생물분해만이 진행되었음을 알 수 있다. 지속성 영양염제만을 처리한 plot II의 n-C₁₇/pristane과 n-C₁₈/phytane 비는 초기 7 일까지 급격한 감소를 보였고 30 일차에 0.49, 0.40을 나타냈다. 특히 50 일차에는 pristane과 phytane화합물도 완전히 분해되어 n-C₁₇/pristane과 n-C₁₈/phytane 비를 환산할 수 없었다. 반면에 지속성 영양염제와 유분산제를 함께 처리한 plot III의 n-C₁₇/pristane과 n-C₁₈/phytane 비는 초기 3 일까지 대조구와 유사한 값을 보여 생물분해가 진행되지 않았으나 이후 14 일까지 빠르게 감소하여 지속성 영양염제만을 첨가한 plot II보다 다소 낮지만 유사한 감소경향을 나타냈다.

미생물 분석

Fig. 5는 연구기간 중 각 mesocosm내 증속영양미생물(Heterotrophic Microorganism; HM) 및 유류분해미생물(Petroleum Degrading Microorganism; PDM)의 현존량 변화를 보여준 그림

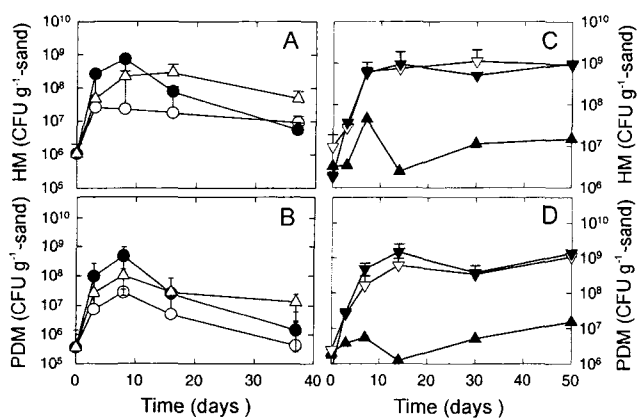


Fig. 5. Fluctuation of heterotrophic microorganism (HM) and petroleum degrading microorganism (PDM) numbers in the first (A & B) and the second (C & D) mesocosm tests. A: ○ plot I (Arabian light crude oil only), ● plot II (Arabian light crude oil + slow release fertilizer), △ plot III (Arabian light crude oil + Corexit 9527[®]). B: ▲ plot I (Arabian light crude oil only), ▽ plot II (Arabian light crude oil + slow release fertilizer), ▼ plot III(Arabian light crude oil + slow release fertilizer + Corexit 9527[®]).

이다. 1 차 실험에서 HM 및 PDM은 모든 실험구에서 초기 3 일차에 10~100 배까지 급격히 증가하였으며 이후에도 지속성 영양염제 처리구와 유분산제 처리구의 미생물은 높은 증가를 보였다(Fig. 5A). 지속성 영양염을 처리한 plot II의 경우 HM은 7 일차에 7.4×10⁸CFU g⁻¹-sand로 최고치를 나타냈으며 이후 점진적으로 감소하여 36 일차에는 대조구에 비하여 낮은 값을 나타냈다. 반면 유분산제를 처리한 plot III에서 HM은 16 일차에 2.9×10⁸CFU g⁻¹-sand로 최고치를 나타냈으며 이후 36 일까지 4.9×10⁷CFU g⁻¹-sand 수준을 유지하여 지속성 영양염제를 처리한 plot II보다 높은 개체 수를 보였다. 대조구의 경우 HM은 초기 10⁶CFU g⁻¹-sand에서 3 일차에 10⁷CFU g⁻¹-sand의 수준으로 10 배정도 증가하였으며 이후 36 일차까지 큰 변화없이 10⁷CFU g⁻¹-sand 수준을 유지하였다. PDM은 역시 HM의 변화양상과 유사하였다(Fig 5B).

2 차 실험에서 지속성 영양염제만을 처리한 plot II와 지속성 영양염제와 유분산제를 함께 처리한 plot III의 HM은 초기 8 일 동안 급격히 증가하여 10⁸CFU g⁻¹-sand 수준에 도달한 후 50 일차까지 일정한 수준을 유지하였다(Fig 5C). 또한 plot II와 III에서 HM의 수는 연구기간동안 평균 5.59±4.5×10⁸CFU g⁻¹-sand와 5.00±4.16×10⁸CFU g⁻¹-sand로 두 plot간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며 평균 1.32±1.61×10⁷CFU g⁻¹-sand를 나타낸 대조구와 비교하여 약 50 배정도 높았다. PDM의 분포는 HM의 변화와 유사한 경향을 보여 1 차 실험의 경우와 같았다(Fig. 5D). 그러나 지속성 영양염제와 유분산제를 첨가한 plot III에서 PDM은 7 일과 14 일 사이에 지속성 영양염제만을 첨가한 plot II보다 매우 높은 분포를 나타내었고 전 실험기간동안 대체로 높은 개체수를 나타냈다.

고 찰

유류분해 미생물은 토양 및 수계를 포함한 다양한 자연환경 내에 널리 분포한다. 그러므로 유류오염 지역에서 유류성분의 생분해는 유류를 분해할 수 있는 미생물군집의 잠재적인 능력에 의존하기 때문에 생물정화에서 분해미생물의 성장을 유도하는 전략은 무엇보다 중요하다. 본 연구에서 아라비아산 경질 원유에 오염된 해변의 모래사장에서 지속성 영양염제(Slow Release Fertilizer; SRF)와 유분산제인 Corexit 9527[®]의 처리는 모두 토착미생물의 성장을 효과적으로 촉진하였다(Fig. 5). 그러나 유류의 구성성분 중 지방족 탄화수소는 유분산제만을 처리한 것보다 SRF를 처리한 경우 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 4). 이러한 사실로 보아 미생물과 유류화합물과의 접촉빈도를 높여 분해를 향상시키도록 유도하는 유분산제의 처리는 토착미생물의 성장을 촉진하였지만 실질적으로 지방족 탄화수소의 생분해를 촉진시키는 못한 것으로 판단된다. 또한 빈영양환경인 해변의 모래사장 에서 미생물의 생분해를 촉진하는 가장 중요한 인자는 무기영양원인 질소와 인이라는 사실을 확인할 수 있었다.

대부분의 연구에서는 여러 생물정화기법의 적용을 통하여 유류화합물은 빠르게 생분해되고, 유류분해미생물의 수는 대략 10

배정도 증가되는 것으로 알려져 있다(24,29-31). 하지만 본 실험에서 무기질소와 인을 첨가한 SRF 처리구의 경우 종속영양 및 유류분해미생물은 긴 적응기없이 초기 3~7 일 이내에 100 배 이상 증가하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 Swannell 등 (28)의 결과와 유사한 수준이나 기준에 보고된 해안선의 모래사장을 대상으로 한 정화실험의 결과들보다는 뚜렷하게 높았다(7,19).

일반적으로 해안선은 다양한 형태로 구성되어 있기 때문에 영양염계의 처리효과는 미생물 및 유류가 존재하는 토양내로 용해되어 이동되는 정도와 환경내 지속성을 조절하는 물리적인 인자와의 상호작용에 의해 결정된다(8,23). 자갈과 모래 등으로 구성된 환경으로 공급된 영양염계는 파도 및 조수에 의해 대부분 소실되기 때문에 미생물에 의한 유류의 생분해가 비교적 낮은 것으로 알려져 있다(26). 따라서 조건대지역에서 영양염계의 처리효과는 유류분해도를 최적으로 유지할 수 있도록 하는 유류오염 토양내에 적절한 무기영양물질 공급유지가 매우 중요하다(12). 본 연구에서는 조수에 의한 영향이 상대적으로 적은 조건대 상부에 실험구가 설치되어 지속성 영양염계로부터 유리된 무기질소와 인은 연구기간동안 토양내에 지속적이며 일정한 농도로 유지될 수 있음을 확인할 수 있었다. 즉 SRF를 첨가한 처리구에서는 첨가하지 않은 처리구에 비해 1 차 실험기간동안 무기질소 및 인 농도는 각각 약 7~8 배 및 16~70 배, 2 차 실험기간동안에는 3 배 및 20~33 배 정도 높게 유지되었다. 또한 두 mesocosm 실험구에서 1 차실험구의 경우 2 차실험구보다 무기질소와 인의 농도 모두 약 2~3 배정도, 토양 수분함량은 약 2 배정도 높게 유지되었음을 알 수 있다(Table 1). SRF는 외부 코팅재료인 라텍스 재질의 두께를 조절함으로써 유입되는 수분의 양에 따라 지속적으로 서서히 영양물질이 유출되는 기작을 갖고 있다. 따라서 SRF 외부환경의 함수량은 SRF로부터 영양염의 유리를 결정하는 중요한 인자로 판단되며 이와 같은 차이가 1 차, 2 차 실험기간동안의 서로 다른 영양물질농도를 결정지은 것으로 사료된다.

SRF 처리구에서 $n-C_{17}$ /pristane과 $n-C_{18}$ /phytane 비는 지방족 탄화수소의 분해와 함께 빠르게 감소하여 유류의 감소가 미생물의 생분해작용에 의해 진행되었음을 알 수 있다(Fig. 3). 그러나 Corexit 9527[®] 처리구는 연구기간동안 지방족 탄화수소의 56%가 제거되었지만 $n-C_{17}$ /pristane과 $n-C_{18}$ /phytane 비는 2.6, 2.2로 SRF 처리구(1.1, 1.0) 뿐만 아니라 대조구(1.4, 1.4)의 수치보다도 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 사실로 보아 유분산제 처리구에서 감소된 유류의 대부분은 생물분해보다 세척효과에 의한 것으로 판단되며 또한 유분산제가 토착미생물에 의한 생분해를 억제하였을 가능성이 높은 것으로 사료된다.

유류생분해의 한 지표로서 널리 사용된 $n-C_{17}$ /pristane과 $n-C_{18}$ /phytane 비는 난분해성 탄화수소인 pristane, phytane의 생물학적인 분해가 일어나지 않는다는 전제하에 이용 가능하다. 그러나 이미 pristane과 phytane 화합물도 자연계에서 분해가 가능한 것으로 알려져 있어 이 비를 이용한 유류분해의 예측은 정화실험이 장기간 진행되거나 유류사고가 발생한지 오래된 탄화수소일 때는 불합리한 것으로 알려져 있다(20). 본 연구에서도 대조구의

경우에는 50 일이 경과한 후에 pristane, phytane 분해의 증거가 관찰되지 않았으나 영양염이 처리된 실험구에서는 pristane과 phytane도 50 일이 경과한 후에 완전히 분해되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 pristane과 phytane 두 화합물의 생분해가 활발하지 않은 오염 초기에는 생물분해의 지표로 사용이 가능하지만(2,27) 장기간 수행하는 실험의 경우 환경내에 존재하는 미생물에 의해 pristane과 phytane 화합물이 분해됨으로 생물분해 지표로 사용하는 것은 불합리한 것으로 판단된다.

계면활성제는 유류성분을 미세한 micells 형태로 분산시킴으로써 미생물과 접촉을 용이하게 하여 분해율을 증가시키지만 때로는 유류분해미생물의 성장과 분해능을 제한하는 것으로 알려져 있다(16). 그러나 Corexit 9527[®] 처리구에서 종속영양 및 유류분해미생물은 초기 7 일까지 약 100 배 이상 증가하여 유분산제의 처리에 따른 미생물의 성장억제는 나타나지 않았다(Fig. 5). Al-Hadhrani 등(3)은 *Pseudomonas aeruginosa*와 혼합균주는 유류와 Corexit 9527[®]을 함께 제공하였을 때보다 Corexit 9527[®]만을 제공하였을 때 CO₂ 생성율이 1.5~2.5배 증가된 것으로 보고하였다. 이는 미생물들이 Corexit 9527[®]을 탄소원으로 이용함으로써 호흡율이 증가된 것으로 판단하였다. 결국 본 실험에서 초기 종속영양 및 유류분해미생물의 증가에도 불구하고 생물분해가 뚜렷하게 나타나지 않은 것은 미생물이 오염된 유류화합물보다 Corexit 9527[®]을 탄소원으로 이용하였을 가능성이 높음을 시사한다. 특히 Corexit 9527[®]의 처리구에서 유화활성의 감소와 함께(Fig. 2) 미생물의 생장이 지속적으로 증가하였다는 결과가 이를 증명하고 있다. 또한 2 차 실험에서 영양염계와 유분산제를 함께 처리하였을 때 표면활성은 3 일 이후에 급격히 감소하여 7 일 이후에는 대조구와 동일한 표면장력을 나타냈다. 표면장력이 41 dynes cm⁻¹으로 유화활성을 나타낸 3 일차까지 지방족 탄화수소 뿐만 아니라 $n-C_{17}$ /pristane과 $n-C_{18}$ /phytane 비의 감소는 나타나지 않았으며 유화활성이 완전히 소실된 7일차에는 지방족 탄화수소와 함께 $n-C_{17}$ /pristane과 $n-C_{18}$ /phytane 비가 감소하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 토착미생물은 Corexit 9527[®]에 의해 탄화수소의 흡수와 산화과정이 억제되어 제한인자로 작용하는 유분산제를 우선적으로 분해하였을 가능성을 시사한다. 이러한 유분산제의 분해에 있어 무기영양염이 없는 빈영양환경에서는 그 속도가 늦은 반면, 무기영양염이 첨가된 환경에서는 분해속도가 빠르게 진행되는 것으로 추정된다.

음이온 및 비이온 계면활성제가 혼합구성된 Corexit 9527[®]은 *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 31012에 의한 알켄화합물의 산화를 억제하는 것으로 보고되었다(10). 반면 Al-hadhrani 등 (3)은 유류만을 처리하였을 때 보다 Corexit 9527[®]을 함께 처리하였을 때 알켄의 산화가 향상되는 것으로 보고하였다. Corexit 9527[®]의 구성성분 중 비이온성인 Span 80과 Tween 85는 4종의 유류분해 미생물에 의한 알켄 산화를 향상시키는 역할을 하는 반면 음이온 계면활성제인 sodium dioctyl sulfosuccinate (AOT)는 알켄 산화를 억제하는 것으로 보고되었다(10). 이와 같이 Corexit 9527[®]뿐만 아니라 다양한 계면활성제는 유류와 미생물간의 상호작용에 의해 생분해를 향상시키거나 억제할 수 있으며

때로는 어떠한 영향도 미치지 않기도 한다(1,20,25). 계면활성제의 처리가 이렇게 다양한 상반된 결과를 나타내는 이유는 미생물이 유류성분을 분해할 때 세포표면의 moiety에 따른 hydrophobic interaction에 의존하기 때문인 것으로 사료된다. 세포표면의 소수도가 높은 미생물은 탄화수소의 표면에 부착하여 탄화수소를 세포내로 흡수함으로써 분해하는 기작을 가지고 있는 반면 세포표면의 소수도가 낮은 세균은 생물유화제를 분비하여 세포내로 운반하여 분해하는 기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(1,9). 따라서 다양한 유류분해 미생물들은 탄화수소를 분해하기 위해 각기 다른 전략을 가지고 있기 때문에 유분산제나 계면활성제의 처리는 신중히 고려되어야 할 것이다.

우리나라 유출유류 국가 긴급방재계획에는 유류유출사고가 발생된 후 해안이나 바위, 자갈 및 모래 등으로 구성된 해안선에 오염된 유류를 제거하기 위한 목적으로 유분산제의 처리방법을 이용하고 있다. 대부분의 유분산제 처리는 긴급한 상황에서 이용되고 있으나, 결과적으로 자연환경내에서 오염된 유류화합물의 분해는 토착미생물이 담당하고 있기 때문에 유분산제가 처리된 환경에서도 유류의 생분해는 토착미생물의 조성에 의존될 것이다. 그러나 본 결과에 따르면 유분산제는 오히려 토착미생물에 의한 자연적인 생분해를 제한할 가능성을 가지고 있다. 따라서 유류사고시 유분산제의 사용은 충분한 연구와 검토과정을 거친 후 결정하는 것이 타당하며, 특히 민감도가 높고 생산력이 높은 조건대의 생물정화를 감안한 종합적인 긴급방재계획 수립이 요구된다.

감사의 글

본 연구는 G-7 환경공학기술개발사업의 일환으로 수행하였으며 연구비를 지원한 환경부와 시화지구 내 실험지역 사용을 협조한 (주) 한화화 해양경찰청에 감사드립니다.

참고문헌

- 고성환, 이흥금, 김상진. 1998. Hydrocarbon uptake modes 에 따른 유류분해 미생물 혼합계의 원유분해능. 한국생물공학회지. 13, 606-614.
- 심두섭, 손재학, 김상진. 1998. 자갈로 구성된 미소환경에서 미생물제제에 의한 유류분해. 한국미생물학회지. 34, 101-107.
- Al-Hadhrami, M.N., H.M. Lappin-scott, and P.J. Fisher. 1996. Effects of the addition of organic carbon sources on bacterial respiration and n-alkane biodegradation of Omani crude oil. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 351-357.
- APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. APHA-AWWA-WEF, Washington, DC.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 185-209.
- Atlas, R.M. 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 178-182.
- Basseres, A., P. Eyraud, A. Ladousse, and B. Tramier. 1993. Enhancement of spilled oil biodegradation by nutrients of natural origin, p. 495-501. *In Proceedings of 1993 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Technol.* 74, 63-67.
- Bruheim, P. and K. Eimhellen. 1998. Chemically emulsified crude oil as substrate for bacterial oxidation: differences in species response. *Can. J. Microbiol.* 44, 195-199.
- Bruheim, P., H. Bredholt, and K. Eimhjellen. 1999. Effects of surfactant mixtures, including Corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1658-1661.
- Chianelli, R.R., T. Aczel, R.E. Bare, G.N. George, M.W. Genowitz, M.J. Grossman, C.E. Haith, F.J. Kaiser, R.R. Lessard, R. Liotta, R.L. Mastracchio, V. Minak-Bernero, R.C. Prince, W.K. Robbins, E.L. Stiefel, J.B. Wilkinson, S.M. Hinton, J.R. Bragg, S.J. McMillan, and R.M. Atlas. 1991. Bioremediation technology development and application to the Alaskan spill, p. 549-558. *In Proceedings of 1991 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- Choi, S-C., K.K. Kwon, J.H. Sohn, and S-J. Kim. 2002. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand sea-shore mesocosms. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 431-436.
- Glaser, J.A., A.D. Venosa, and E.J. Opatken. 1991. Development and evolution of application techniques for delivery of nutrients to contaminated shoreline in Prince William Sound, p. 559-562. *In Proceedings of 1989 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- Head, L.M. and R.P.J. Swannell. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 234-239.
- Kim, S-J., J.H. Sohn, D.S. Sim, K.K. Kwon, and T.H. Kim. The effects of bioremediation on the oil biodegradation in oil polluted environments. p. 181-188. *In Y. Le Gal and H.O. Halvorson (ed.), New developments in marine biotechnology*, Plenum Press. New York.
- Laha, S. and R.G. Luthy. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water system. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1367-1380.
- Lee, K. and E.M. Levy. 1989. Enhancement of the natural biodegradation of condensative and crude oil on beaches of Atlantic Canada, p. 479-485. *In Proceedings of 1989 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- Lee, K., G.H. Tremblay, and E.M. Levy. 1993. Bioremediation: Application of slow-release fertilizers on low-energy shoreline, p. 411-416. *In Proceedings of 1993 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC., USA.
- 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.
- Liu, Z., A.M. Jacobson, and R.G. Luthy. 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant system. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 145-151.
- Marty, P. and Y. Martin. 1993. Seed and feed strategy against oil spills in a marine environment: laboratory and simulated outdoor experiments with selected natural bacterial strain. *J. Mar. Biotechnol.* 4, 155-158.
- Mulligan, C.N., G. Mahmoudides, and G.F. Gibbs. 1989. The

- influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* 12, 199-210.
23. Oh, Y.-S., D.-S. Sim, and S.-J. Kim. 2001. Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1367-1372.
24. Prince R. C., R.E. Bare, G.N. George, C.E. Haith, M.J. Grossman, J.R. Lute, D.L. Elmendorf, V. Minak-Bernero, J.D. Senius, L.G. Keim, R.R. Chianelli, S.M. Hinton, and A.R. Teal. 1993. The effects of bioremediation on the microbial populations of oiled beaches in Prince William Sound, Alaska, p. 469-475. *In Proceedings of the 1993 Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC.
25. Rouse, J.D., D.A. Sabatini, J.M. Suflita, and J.H. Harwell. 1994. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 24, 325-370.
26. Safferman, S.I. 1991. Selection of nutrients to enhance biodegradation for the remediation of oil spilled on beaches, p. 571-576. *In Proceedings of 1991 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC.
27. Santas, R. and P. Santas. 2000. Effects of wave action on the bioremediation of crude oil saturated hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 434-439.
28. Swannell, R.P.J., B.C. Croft, A.L. Grant, and K. Lee. 1995. Evaluation of bioremediation agents in beach microcosms. *Spill Sci. Technol. Bull.* 3, 151-159.
29. Swannell, R.P.J., K. Lee, and M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60, 342-365.
30. Swannell, R.P.J., D. Michael, D.M. Jones, S. Petch, I.M. Head, A. Willis, K. Lee, and J. Lepo. 1999. Bioremediation of oil contaminated fine sediments, p. 751-756. *In Proceedings of 1999 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute. Washington DC.
31. Venosa, A.D., M.T. Suidan, B.A. Wrenn, K.L., Strohmeier, J.R. Haines, A.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.
32. 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.
33. ZoBell, C.E. 1946. Marine microbiology. Chronica Botanica, Waltham, Mass.

(Received November 18, 2002/Accepted February 21, 2003)

ABSTRACT: Effects of Slow Release Fertilizer and Dispersant on Biodegradation of Oil Contaminated in Sand Seashore Mesocosms

Jaе-Hak Sohn, Kae Kyoung Kwon, and Sang-Jin Kim* (Microbiology Lab, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 29, 425-600, Korea)

To evaluate the effects of slow release fertilizer and chemical dispersant on oil biodegradation, mesocosm studies were conducted on sand seashore. The rapid removal rates (85%) of aliphatic hydrocarbons and the simultaneous decreases of $n\text{-C}_{17}$ /pristane (69%) and $n\text{-C}_{18}$ /phytane (61%) ratios by the addition of slow-release fertilizer (SRF) within 37 days of experiment indicated that SRF could enhance the oil degrading activity of indigenous microorganisms in sand mesocosm. Although the growth of heterotrophic bacteria and petroleum-degrading bacteria in the mesocosm treated with Corexit 9527[®] was stimulated, the biological oil removal based on the ratios of $n\text{-C}_{17}$ /pristane and $n\text{-C}_{18}$ /phytane was inhibited. Removal rates of aliphatic hydrocarbons (56%), and $n\text{-C}_{17}$ /pristane (27%) and $n\text{-C}_{18}$ /phytane (17%) ratios by the addition of chemical dispersant Corexit 9527[®] were similar or lower than those values of control (50, 60, 46%), respectively. The biodegradation activity, however, when simultaneously treated with SRF and Corexit 9527[®], was not highly inhibited and even recovered after the elimination of chemical dispersant. From these results it could be concluded that the addition of SRF enhanced the oil removal rate in oligotrophic sand seashore and chemical dispersant possibly inhibit the oil biodegradation. Hence, in order to prevent the unrestrained usage of chemical dispersant in natural environments contaminated with oil, the National Contingency Plan of Oil Spill Response should be carefully revised in consideration of the application for bioremediation techniques.