

영양원 변화가 Kerosene 분해율 및 분해균주 성장에 미치는 영향

정규혁
성균관대학교 약학부

The Effect of Nutrient Amendments on Biodegradability of Kerosene and Growth of Kerosene-degrading Microorganisms

Kyu Hyuck Chung
College of Pharmacy, Sungkyunkwan University

ABSTRACT

Bioremediation is the technology to harness nature's biodegradative capabilities to remove or detoxify pollutions that threaten public health as environmental contaminants. Composting may become one of major bioremediation technologies for treating soils contaminated with petroleum if the fate of contaminants during composting is better understood. Most composting research of petroleum was primarily focused on removing contaminant by optimizing composting conditions. Accordingly, laboratory feasibility studies may be useful to establish a realistic basis in co-composting complex substrate such as petroleum hydrocarbons. The purpose of this study was to assess the optimal conditions of kerosene biodegradation following supplementation with nutrient amendments under simulated composting conditions. Although it increased the growth of bacterial consortium, addition of co-substrates 0.5%(w/v) such as acetic acid, citric acid, glucose, and malic acid was not beneficial. Combination of nitrogen and phosphorous source enhanced kerosene biodegradation and reduced VOC evolution. These results showed that kerosene was able to utilize in bioremediation technology.

Keywords : Kerosene, Composting, Biodegradability, Consortium, Nutrient amendments

I. 서 론

Composting이란 최적의 조건하에서 유해한 유기물질을 분해하여 위생적이고 생물학적으로 안정한 산물로 전환시키는 환경복원기술(bioremediation) 중 하나로, 이 과정은 탄소원의 산화에 의해 발생하는 열과 분해미생물에 의해 생성되는 여러 가지 길항작용을 갖는 화합물 그리고 다양한 유기영양요구성 미생물간의 경쟁에 의해 무해하고 안정된 허용수준까지 오염물질의 농도를 감소시키게 된다. 또한 composting은 생물학적 과정으로서 미생물의 성장과 활성화에 필요한 여러 기본적인 환경인자 즉, 온도, 영양분, 수분량, 산소, C/N비, pH, compost의 입자크기 등에 의해 영향을 받는다. Composting을 효율적으로 수행하기 위해서는 무엇보다 토양환경 중의 제한인자를 최소화하여 미생물군의 성장과 활성을 위한 최적의 여건을 유지하는 것이 바람직할 것이다.¹⁾

Composting 과정에 따른 compost내의 변화를 관찰한

보고에 따르면^{2,3)} 초기단계에는 오염물질에 순응된 중온성(mesophilic) 미생물들이 자연적으로 증식하여 분해를 시작하며 그 과정에서 열을 발생하게 된다. 온도가 45°C 이상까지 상승함에 따라 포자를 제외한 대부분의 중온성 미생물이 사멸하고 고온성(thermophilic) 미생물이 증식하며, 이들로부터 방출되는 세포의 효소에 의해 다당류, 단백질 그리고 지질과 같은 기질이 분해된다. 반면, 60°C 이상의 온도에서는 방선균(actinomycete)과 진균(fungi)에 의해 hemicellulose와 리그닌이 분해되며 양질의 토양냄새도 내게 된다. 대부분의 분해가능한 유기물이 분해되면 분해속도가 느려지고 온도가 40°C 이하로 떨어지며 숙성(curing, or stabilization) 단계에 이르게 된다. 이와 같은 유기물질의 산화에 따른 온도변화는 composting의 진행과정을 나타내는 지표가 되며, 고온성 미생물의 활성을 촉진시킬 뿐 아니라 compost를 살균하는 역할을 한다.

유류오염토양의 복원방법으로서 composting 기술 적용의 가능성이 평가된 이후 폐유, PAHs, 합성혼합연료,

유상 슬러지 등으로 오염된 토양을 대상으로 많은 연구가 시도되었다.⁴⁾ 현장적용에서 성공적인 성과를 거둔 사례도 있으나 아직까지 이 기술은 실제 적용에 있어 많은 어려움이 수반되고 있다. 이를 해결하기 위해 실험실적으로 시뮬레이션한 방법에 의해 오염물질의 특징과 관여하는 미생물의 특성 그리고 복원과정의 설계와 운영에 따른 여러 사항을 조사하게 된다.

본 연구에서는 유류오염의 생물학적 복원기술로서 composting의 적용에 유용한 정보를 제공하기 위해 원유의 주성분 중 대표적 포화탄화수소인 kerosene으로 오염된 토양의 실험실적 composting 진행과정에서 영양원을 변화시켰을 때 kerosene 분해율과 분해균의 성장에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하고 최적화 조건을 조사하였다.

II. 실험 방법

영양원의 공급에 의한 균주의 성장들과 kerosene의 분해율을 조사하였다. 영양원으로는 탄소원과 질소, 인 및 유황을 대상으로 조사하였다. 또한 탄소원과 질소원의 비의 변화에 따른 영향도 관찰하였다. Kerosene의 생분해성을 조사하기 위하여 n-hexadecane-1-¹⁴C을 이용한 mass balance를 측정하였다.

1. Consortium 준비

Kerosene 오염토양의 bench 규모 composting 실험⁵⁾ 으로부터 36°C 온도에서 분리하여 보관 중인 kerosene 분해균주(*Corynebacterium*속과 *Pseudomonas*속 총 13 종)를 PY(Peptone-Yeast) 사면배지에 옮겨 36°C에서 24시간 계대배양한 후 PY 10 ml에 1백금을 접종하여 36°C에서 24시간 진탕배양(120 rpm)하였다. 이 세포 배양액을 4°C에서 10분간 원심분리(9,000 g)하여 얻은 균체를 멸균된 식염수로 2회 세척 후 재원심분리하여 균현탁액으로 사용하며, 원심분리한 균체를 멸균한 희석수에 적당하게 희석하여 consortium을 제조하였다.

2. 영양원첨가 효과조사

Kerosene 분해균을 함유한 액체 배지상에서 영양원의 첨가에 따른 영향을 조사하였다. 각 액체 배지에 kerosene을 골고루 분산시키기 위해 계면활성제를 첨가하였는데 이때 사용된 계면활성제는 polyoxyethylene sorbitan ester계열인 tween 80을 사용하였다. Kerosene 100 ppm당 첨가하는 tween 80량은 추출효율이 양호한 1:2.5(v/v) 비율로 선정하였다. 각각의 영양원첨가 배지는 다음과 같다. 미생물의 증식을 관찰하기 위해 주기

적으로 시료를 취하여 O.D.(Optical Density, 600 nm)를 측정하였다.

1) 탄소원 첨가 배지

Co-metabolism에 대한 kerosene 분해균주의 영향을 관찰하기 위하여 co-substrate로서 acetic acid, citric acid, malic acid 및 glucose를 첨가하였다. 유기영양성(heterotrophic) 액체배지 150 ml당 co-substrate 0.5% (w/v)와 kerosene 100 ppm을 넣고 kerosene과 배지가 잘 섞이도록 충분히 흔들어 준 후 consortium 일정량을 접종하여(최종 O.D. 0.5 at 600 nm) 36°C에서 100 rpm으로 진탕배양하였으며 모든 조작은 무균적으로 수행하였다. 이때 액체배지와 농축한 co-substrate 용액은 따로 고압증기멸균(121°C, 15 min.)하며 kerosene은 membrane filter를 이용하여 멸균하였다. 대조군에는 co-substrate를 첨가하지 않았으며 유기영양성 배지의 조성은 다음과 같다. 즉, K₂HPO₄ 7.0 g; KH₂PO₄ 3 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g; NaCl 0.1 g; (NH₄)₂SO₄ 0.25 g; peptone 0.5 g; yeast extract 0.1g; D.W. 1 l을 넣는다.

2) 질소원 첨가 배지

질소원이 kerosene 분해균주에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 soil extract broth⁵⁾ 150 ml당 질소(NH₄NO₃), 질소와 인(NH₄NO₃/Na₂HPO₄ · 12H₂O), 그리고 질소, 인 및 유황(NH₄NO₃/Na₂HPO₄ · 12H₂O/(NH₄)₂SO₄)을 0.2% (w/v)씩 첨가하고, kerosene 100 ppm과 consortium을 접종하여 36°C에서 배양하였다. 대조군에는 질소원을 첨가하지 않고 kerosene만 첨가하였다.

Soil extract broth의 조성은 다음과 같다. 즉, yeast extract 5.0 g; glucose 8.0 g; K₂HPO₄ 40.5 g; KH₂PO₄ 0.5 g; soil extract 400 ml; D.W. 600 ml를 넣은 후 pH를 초기 soil값으로 조정한다. Soil extract는 soil 1,000 g에 증류수 3,000 ml를 넣고 끓인 후, 상층액을 가아제로 여과하여 원심분리(3,000 g, 10 min) 후 사용하였다.

3) C/N 비 변화 배지

미생물의 성장과 증식에 중요한 토양 환경인자인 C/N비가 kerosene 분해균주의 성장에 미치는 영향을 조사하여 최적 C/N비를 구하고자 하였다. Soil extract broth 150 ml당, 질소원은 NH₄NO₃ 0.2%(w/v)로 고정시키고 탄소원으로 glucose의 양을 변화시켜가며 C/N비를 각각 5, 25, 100, 180으로 맞추었다. 여기에 kerosene 100 ppm과 consortium을 접종하고 36°C에서 배양하였으며 kerosene을 첨가하지 않은 배지를 대조군으로 하였다.

3. Mass balance 측정

Kerosene 5%로 오염시킨 토양에 mass balance 측정 을 위한 지표물질로 n-hexadecane-1-¹⁴C을 2 μCi 첨가 한 후 미리 조제한 compost(우분, 감자, 볏짚 2:4:4) 와 균일하게 섞어 4l 반응조에 넣은 후, bench composting 시스템과 동일한 온도조건(25°C 2일, 55°C 5일, 36°C 15일, 25°C 42일)으로 배양기내에서 진행하 였다.

Composting 기간동안 초기와 4일, 14일, 22일 및 64 일의 주기로 시료 20 g을 취하여 무수 Na₂SO₄을 섞어 탈수시킨 후 삼각 플라스크에 넣고, dichloromethane 20 ml를 넣어 3시간동안 180 rpm으로 rotator shaker에서 추출하였으며 이 과정을 3회 반복시행하였다. 각 추 출액을 모아 회전감압식농축기로 최종량이 1.5 ml가 되 도록 농축한 후 scintillation vial에 옮기고 15 ml의 Beckman Ready Safe cocktail을 첨가한 용액을 만들 어 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 반응조 로부터 생성되는 ¹⁴CO₂는 0.5N-NaOH용액 500 ml을 함유한 포집병에 Whatman paper(PA1)를 넣어 포집하 였으며 이를 꺼내어 scintillation vial에 옮겨 방사능을 측정하였다. Activated charcoal trap에 포집된 ¹⁴C-VOC는 dichloromethane으로 탈착시켜 측정하였다.

영양원으로는 질소와 인(NH₄NO₃/Na₂HPO₄ · 12H₂O) 을 0.2% 첨가하였다. 이상의 모든 실험은 3회씩 수행 하였으며 그 평균값으로 나타냈다.

III. 결과 및 고찰

1. 탄소원의 첨가효과

Co-substrate로서 여러 가지 탄소원 기질을 제공하여 kerosene 분해 균주의 성장을 관찰하였다. 먼저 쉽게 이용할 수 있는 co-substrate로서 acetic acid, citric acid, glucose, malic acid를 첨가하였을 경우, 대조군과 비교할 때 acetic acid를 제외한 모든 실험군에서 유기 영양요구성 미생물의 성장이 증가하였다. Fig. 1에서 보 는 바와 같이 영양원을 첨가하지 않고 kerosene만을 가 한 대조군에 비해 malic acid 및 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 배양후 4시간 이후 부터는 균주의 성장 이 유의성있게 증가(p<0.05)하였다. 따라서 초기에는 이 들이 탄소원으로서 kerosene보다 co-substrate를 이용합 에 따라 kerosene 분해가 저해될 것이며 활성이 증가되 고 영양원이 소모된 이후에는 kerosene의 분해가 촉진 될 것으로 추정되었다. 이와 같은 co-metabolism에 대 한 연구는 오염물질이 미생물의 증식에 직접 이용되지 못할 경우, 유사한 구조를 지닌 co-substrate의 첨가를 통해 오염물질의 대사속도를 증가시키기 위한

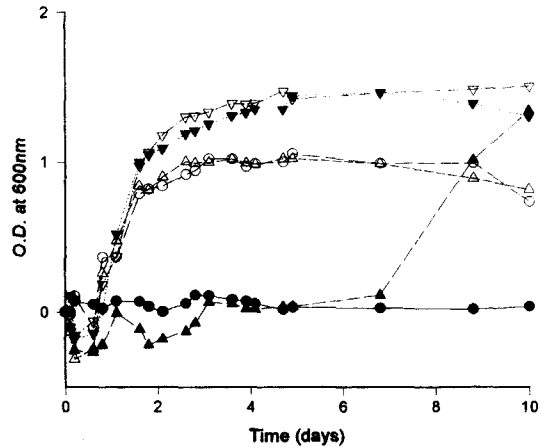


Fig. 1. Growth curves of kerosene-degrading consortium in heterotrophic medium supplemented with various co-substrates and kerosene 100 ppm.

Symbols: ● ; control, ○ ; kerosene only, ▲ ; acetic acid, △ ; citric acid, ▼ ; Glucose, ▽ ; malic acid.

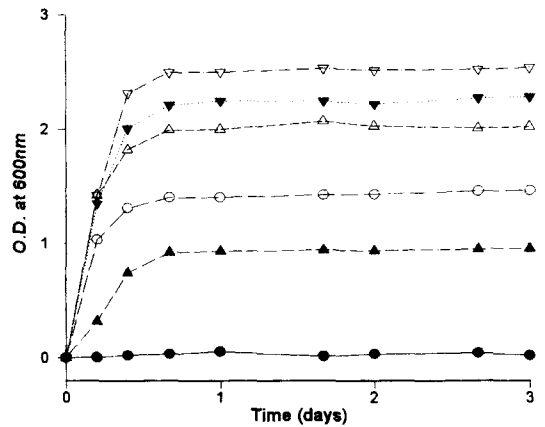


Fig. 2. Growth curves of kerosene-degrading consortium in soil extract broth supplemented with various nutrient amendments and kerosene 100 ppm.

Symbols: ● ; control, ○ ; kerosene only, ▲ ; ammonium nitrate, △ ; phosphate, ▽ ; ammonium nitrate/phosphate, ▼ ; ammonium nitrate/phosphate/sulfate.

bioremediation 기술로서 시도되고 있다.^{8,9)} 실제로 환경 중에는 cyclohexane, PCBs, chlorophenol, pesticide, 2, 4-D 등 많은 화합물이 co-metabolism되며 이 때 다양한 효소활성을 갖는 미생물들이 관여한다고 보고되어 있다.⁹⁾ Citric acid를 첨가하였을 때는 kerosene만을 가한 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 acetic acid의 경우에는 초기에는 증식이 나타나지 않다가 배양 6일 후부터 급격한 성장이 관찰되었다. 이

러한 초기의 미생물 증식 억제현상은 acetic acid 자체의 pH 영향과 kerosene의 중간산물인 acetate가 hexadecane의 이용을 감소시킨다는 보고⁷⁾와 관련이 있을 것으로 본다.

2. 질소, 인 및 유황 영양원 첨가효과

토양환경 중 주요 제한인자인 질소와 인의 공급에 따른 kerosene 분해균주의 성장을 조사하였다. 일반적으로 미생물에 의한 분해속도는 환경 중에 존재하는 이용가능한 질소와 인의 농도에 의해 제한되며, 유류로 오염된 해양에 대해 질소와 인을 동시에 공급하였을 경우 분해속도가 증가된다는 보고가 있다.¹⁰⁾

본 실험에서 kerosene 100 ppm당 ammonium nitrate와 phosphate salt를 0.2% 첨가하여 실험한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 질소/인을 첨가한 배지에서 미생물의 증식이 가장 높게 나타났으며 질소/인/유황을 혼합하여 첨가한 배지의 순으로 균주 증식이 활발한 것으로 나타났다. 한편 질소원만을 공급하였을 때는 kerosene만 첨가한 배지보다 오히려 증식이 억제되었다. 질소원만 단독으로 처리한 군에 있어 미생물의 성장 억제현상은 과잉의 질소원에서 유래한 NH_3 등에 의한 독성영향 때문인 것으로 예상할 수 있다. 실제로 현장(field)에 이러한 강산의 ammonium salt를 사용할 경우 pH가 점차 감소하며 높은 수용성으로 인해 효율성이 떨어지게 된다. 따라서 최근 이러한 문제를 해결하기 위해 탄화수소에 대한 친화성을 지니며 낮은 C/N, C/P 비를 갖는 다양한 영양분이 개발되어 유류오염의 처리에 성공적으로 이용되고 있다.^{11,12,15)} 따라서 질소 단독의 영양원 공급 보다는 인 및 유황을 함께 공급하는 것이 분해균주의 활성을 증진시키는데 유용할 것으로 판단되었다.

3. C/N 비 변화에 대한 영향

Composting 진행동안 미생물의 동화작용과 유지에 있어 매우 중요한 요소가 compost 혼합물내의 C/N비이다. 일반적으로 최적의 C/N 비는 30~40으로 알려져 있다. C/N비가 높을 경우 질소원의 제한으로 인해 안정한 상태에 도달할 때까지 biomass의 합성과 분해를 반복하게 되며 이에 따라 composting 과정이 지연된다. 반면 C/N비가 최적한계보다 상당히 낮을 경우에는 질소원이 미생물 군집에 대해 독성을 나타내며 암모니아 형태로 소실되게 되는데, 이것은 토양환경 중 제한요소인 질소원의 손실일 뿐 아니라 불쾌한 냄새를 내는 원인이 되기도 한다. 본 실험에서 미생물의 증식과 활성에 중요한 환경인자인 C/N비를 변화시킨 후 kerosene

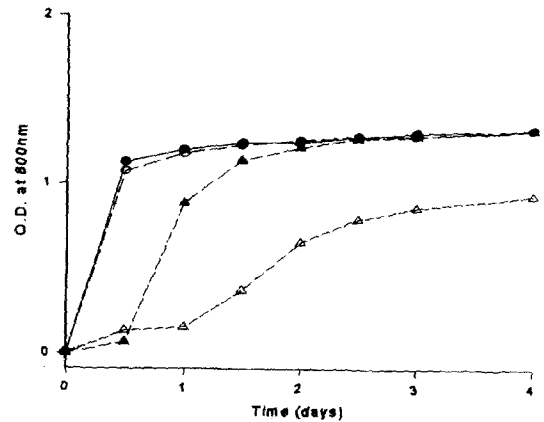


Fig. 3. Growth curves of kerosene-degrading consortium in soil extract broth supplemented with various C/N ratios and kerosene 100 ppm.

Symbols: ● ; C/N 5, ○ ; C/N 25, ▲ ; C/N 100, △ ; C/N 180.

분해 균주의 증식을 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 C/N비가 5 및 25인 배지에서는 초기부터 신속한 증식을 관찰할 수 있었으나 C/N비를 100 및 180으로 증가시킬수록 증식이 억제되는 현상이 나타났다. 또한 C/N비 5와 25의 경우 12시간내에 정지기(stationary phase)에 도달하였으며 C/N비가 높아짐에 따라 지연기(lag phase)가 길어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이로 미루어보아 유류와 같이 난분해성인 물질의 분해를 위해서는 최적 C/N비에 의해 초기의 미생물의 급격한 증식과 신속한 소멸을 나타내기보다 오히려 C/N비를 높여 오염물질에 순응된 미생물의 증식과 활성을 장기적으로 유지시키는 것이 필요할 것으로 사료된다.

4. Mass balance 측정에 의한 영양원 첨가 영향 조사

미생물에 의한 kerosene의 분해과정에 대한 보고에 따르면¹⁶⁾ monoterminal oxidation에 의해 alcohol과 aldehyde 그리고 monocarboxylic acid를 형성하며 지방산은 β -oxidation cycle에 의해 acetyl Co-A를 형성하여 최종적으로 CO_2 와 H_2O 로 방출된다. 하지만 지방산 중 일부는 독성이 있으며 생분해과정 동안 축적된다는 보고도 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾

Composting 기간동안 반응조내의 compost 중에 함유된 kerosene의 mass balance를 측정하기 위해 지표물질로서 ^{14}C -hexadecane을 이용하여 compost에 잔류하는 방사능과 CO_2 및 VOC로 분해된 방사능을 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 compost 중의 방사

Table 1. Mass Balance of Cumulative ¹⁴C-Radioactivity(%) During Composting without Nutrient Amendments by Using ¹⁴C-Hexadecane(air flow : 1 m³/kg, vs) (%)

Days	Compost	VOC trap	CO ₂ trap	Total
initial	100.0	-	-	100.0
4	78.3	19.6	1.2	99.1
14	44.8	40.8	12.2	97.8
22	33.0	44.6	18.9	96.5
64	14.8	55.4	22.4	92.6

Table 2. Mass Balance of Cumulative ¹⁴C-Radioactivity(%) During Composting with Nutrient Amendments by Using ¹⁴C-Hexadecane(0.2% nitrogen and phosphate ; air flow : 1 m³/kg,vs) (%)

Days	Compost	VOC trap	CO ₂ trap	Total
Initial	100	-	-	100
4	77.8	16.6	4.4	98.8
14	51.2	24.5	21.5	97.2
22	36.5	28.8	31.8	97.1
64	16.9	30.4	48.2	95.5

능은 composting 기간이 경과할 수록 감소하여 64일 후에는 85.2%가 감소되었으며, 무기질화되면서 발생하는 CO₂ trap 중의 방사능은 점차 증가하여 초기량의 22.4%가 검출되었다. 반응조 내에서 감소된 방사능에 비해 ¹⁴CO₂의 발생량이 적은 것으로 보아 중간분해물의 생성이 예상되었으며 실제로 CO₂ trap에 포집되는 방사능보다 VOC trap에 포집되는 방사능이 더욱 많아 64일 후에는 55.4%의 방사능이 검출되어 많은 양이 VOC로 전환되었음을 확인하였다.

영양원인 질소와 인을 첨가하여 composting을 진행하면서 ¹⁴C-hexadecane을 이용한 mass balance를 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 compost내의 방사능은 83.1%가 감소되었고 CO₂ 발생량은 초기량의 48.2%가 검출되었으며 VOC는 30.4%가 검출되었다. 질소 및 인을 영양원으로 첨가하였을 때와 영양원을 첨가하지 않은 경우를 비교해 보면 Fig. 4에서 보는 바와 같이 compost에 잔류하는 ¹⁴C방사능량은 서로 유사하였으나, ¹⁴CO₂ 발생량은 증가하고 ¹⁴C-VOC 생성량은 감소되는 현상을 관찰하였다. 이로 미루어 보아 영양원의 첨가에 의해 생분해 속도가 촉진됨을 추정할 수 있다.

IV. 결 론

Kerosene분해 유효균주로 구성된 consortium에 대한 영양원의 첨가에 따른 영향을 조사한 결과 malic acid

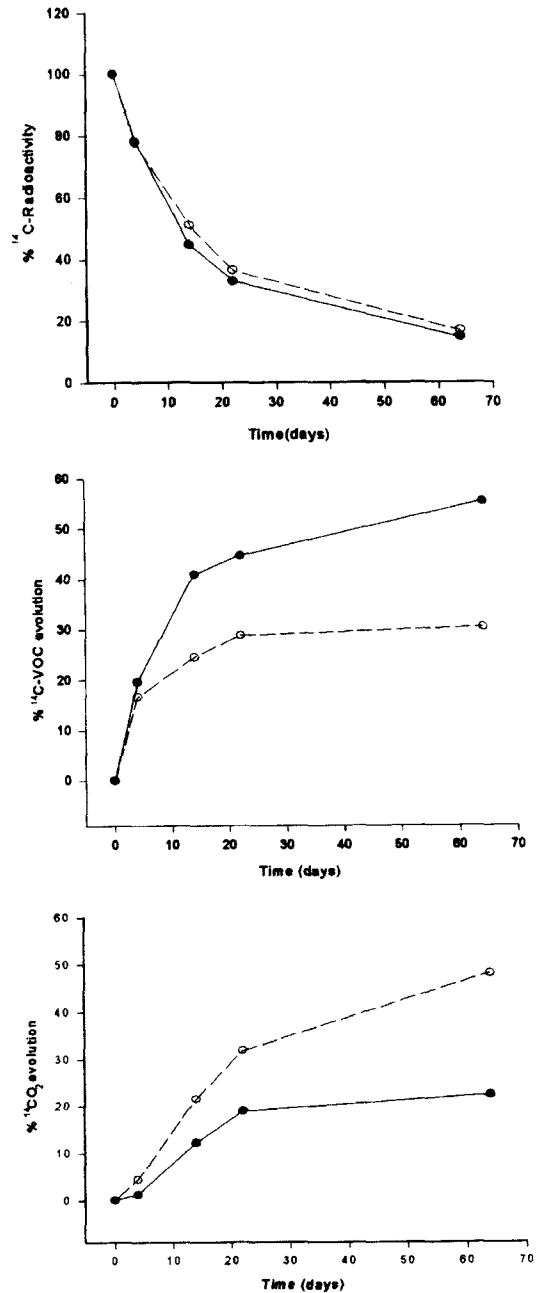


Fig. 4. ¹⁴C-radioactivity during composting with nutrient amendments Panel : A ; kerosene remaining in compost, B ; ¹⁴CO₂ evolution, C ; ¹⁴C-VOC evolution Symbols : ● ; 1.0 m³/kg, vs air flow without nutrient amendments, ○ ; 1.0 m³/kg, vs air flow with nutrient amendments (0.2% N, P).

또는 glucose를 co-substrate로 첨가하였을 때 양호한 미생물의 증식을 나타냈으며, 0.2% 질소원의 단독 공

급은 미생물의 증식을 억제하였으나, 질소와 인을 함께 공급한 결과 가장 양호한 증식을 나타내었다. C/N비의 변화에 의한 영향을 관찰한 결과 5 또는 25에서 빠른 증식을 나타내었다.

Compost 혼합물에 0.2%의 질소와 인을 첨가하여 composting을 진행한 결과, 영양원을 첨가하지 않은 군에 비해 compost에 남은 양은 큰 차이가 없었으나 ^{14}C -hexadecane을 이용한 mass balance를 측정한 결과 VOC량은 54.9%가 감소하고 CO_2 발생량은 48.9%가 증가하였다.

이상의 결과로부터 kerosene의 생분해에 의한 CO_2 발생과 중간반응물로서 생성되는 VOC의 휘발은 질소 및 인의 적절한 영양원 공급에 의해 영향을 받으므로 이를 최적화 함으로써 kerosene의 composting에 의한 생분해를 촉진시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 이와 같은 실험결과는 composting의 현장적용성 평가를 위한 정보를 제공할 뿐 아니라, 복잡한 성분으로 구성된 석유회합물을 co-composting을 하는데 있어 유용한 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Donnelly, K. C., Anderson, C. S., Barbee, G. C. and Manek, D. J. : Soil toxicology, in *Basic Environmental Toxicology*. Cockerham, L. G. and Shane, B. S., Eds. CRC Press, Inc., U.S.A., 321-352, 1994.
- 2) Mathur, S. P. : Composting processes in *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. Martin, A. M., Eds. Elsevier science publishers Ltd., New York, 147-183, 1991.
- 3) Miller, F. C. : Biodegradation of solid wastes by Composting, in *Biological Degradation of Wastes*. Martin, A. M., Eds. Elsevier science publishers Ltd., New York, 1-30, 1991.
- 4) Hinchee, R. E. and Alleman, B. C. : *Petroleum Hydrocarbons*, CRC Press, Inc., Florida, 1994
- 5) 정규혁, 류지성 : Composting 타당성 조사를 위한 Bench-Scale System, 환경위생학회지, 제 24권 4호 (4) : 97-104, 1998.
- 6) Rosenberg, E. and Ron, E. Z. : Bioremediation of petroleum contamination in *Bioremediation : principles and application*. Crawford, R. L. and Crawford, D. L., Eds. Cambridge University Press, New York, 100-124, 1996.
- 7) Currier, H. B. and Peoples, S. A. : Phytotoxicity of hydrocarbons. *Hilbardia* **23** : 155-174.
- 8) Overton, E. B., Sharp, W. D. and Roberts, P. (1994) Toxicity of petroleum, in *Basic Environmental Toxicology*. Cockerham, L. G. and Shane, B. S., CRC Press, Florida, 133-156, 1994.
- 9) Miller, E. C. and Miller, J. A. : Searches for the ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* **47** : 2327-2345, 1981.
- 10) Lapinskas, J. : Soil biotreatment : Bacterial degradation of hydrocarbon contamination in soil and groundwater. *Chemistry & Industry* **23** : 769-808, 1989.
- 11) Boguski, T. K., Hunt, R. G., Cholakis, J. M. and Franklin, W. E. : LCA Methodology, in *Environmental Life-Cycle Assessment*. Curran, M.A., Eds. McGraw-Hill Com. Inc., 2.1, 1996.
- 12) Haug, R. T. : *The Practical handbook of compost engineering*. Lewis Publisher, Florida, 1993.
- 13) Alexander, M. : *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, California, 1994.
- 14) Levin, M. A. and Gealt, M. A. : *Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste*. McGraw-Hill, New York, 1993.
- 15) Devine, K. : *Bioremediation Case Studies : An Analysis of Vendor Supplied Data*. Publ. EPA/600/R-92/043. Office of Engineering and Technology Demonstration, Washington, DC : U.S. Environmental Protection Agency, 1992.
- 16) Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E. and Ron, E. : Petroleum bioremediation : a multiphase problem. *Biodegradation* **3** : 337-350, 1992.
- 17) Atlas, R. M. and Bartha, R. : Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. Antonie van Leeuwenhoek. *J. Microbiol. Serol.* **39** : 257-271, 1973.
- 18) King, D. H. and Perry, J. J. : The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism, *Mycobacterium vaccae*. *Can. J. Microbiol.* **21** : 85-89, 1975.
- 19) Watkinson, R. J. and Morgan, P. : Physiology of aliphatic hydrocarbon degrading microorganisms. *Biodegradation* **1** : 79-92, 1990.