

원유오염농도와 미생물 농도가 탄화수소의 생분해에 미치는 영향

백경화^{1,2} · 김희식¹ · 이인숙² · 오희목¹ · 윤병대^{1*}

¹한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ²이화여자대학교 생명과학과

Effects of Oil Contamination Levels and Microbial Size on Hydrocarbon Biodegradation. Baek, Kyung-Hwa, Hee-Sik Kim, In-Sook Lee, Hee-Mock Oh, and Byung-Dae Yoon*. ¹Laboratory of Environmental Biotechnology, KRIBB, Daejeon 305-333, Korea, ²Department of Life Science, Ewha Womans University 120-750, Korea – The purpose of this study was to evaluate the influence of oil concentration and inoculum size on petroleum biodegradation in soil by *Nocardia* sp. H17-1, isolated from oil-contaminated soil. To investigate the effect of initial oil concentration on total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation, the soil was artificially contaminated with 10, 50 or 100 g of Arabian light oil per kg of soil, respectively. After 50 days, *Nocardia* sp. H17-1 degraded 78, 94 and 53% of the each initial TPH concentration, respectively. Also, it produced 1.35, 4.21, and 5.91 mmol of CO₂ per g of soil, respectively. The degradation rate constant (*k*) of TPH was decreased in proportion to the initial oil concentrations while CO₂ production was increased with the concentration. The growth of *Nocardia* sp. H17-1 was remarkably inhibited when it was inoculated into soil containing 100 g of oil per kg of soil. To evaluate the effect of the inoculum size, the soil was artificially contaminated with 50 g of Arabian light oil per kg of soil, and inoculated with 3×10⁶, 5×10⁷, 2×10⁸ cells per g of soil, respectively. After 50 days, the degradation of TPH was remained with similar in all treatment but degradation rate constant (*k*) and evolved CO₂ was increased with increasing the inoculum size.

Key words: Biodegradation, *Nocardia* sp. H17-1, inoculum size, oil concentration, total petroleum hydrocarbon (TPH)

현대 사회에서 원유는 그 이용범위와 사용량이 지속적으로 증가하고 있으나 생산, 운반, 저장 등의 과정에서 사고나 고의적인 유출 등으로 인하여 자연환경에 유출되어 환경을 오염시켜 전세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있다[20]. 유출원유의 제거는 물리·화학적인 방법이 널리 이용되고 있으나, 경제적인 부담 및 2차적인 오염문제가 대두되고 있어 자연계에 다양하게 분포되어 있는 유류분해 세균에 의해 해결하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다[3-5]. 최근 오염된 토양의 처리를 위해 시도되고 있는 생물학적 정화방법에는 오염지에 존재하는 토착미생물의 이용[16], 오염지에서 분리된 미생물의 재적용[18], 분해능이 우수한 균주의 적용과 같은 방법이 있지만 지금까지의 연구결과를 볼 때 실험실에서 배양한 미생물의 현장적용이 성공한 예는 많지 않다. 이는 오염지역의 생태계를 고려하지 않은 제어된 환경에서의 연구 결과를 현장에 적용하였기 때문이다[6, 24].

오염토양의 생물학적 정화시 처리효율에 영향을 미치는 인자들은 온도, 수분, pH, soil texture 등의 환경요인[8, 14], 오염토양에 존재하는 미생물의 종과 수와 같은 생물학적 요인[21]과 오염원의 화학적 구조, 형태 및 양과 같은 화학적 요인[23]이 있으며, 이들 환경이 적합하지 않을 경우에는 분

해효율이 낮아지므로, 적절한 조건을 유지시키는 일이 중요하다[19]. 특히, 유류의 오염은 현장조건이나 농도 분포에 따라 다르지만 일정농도 이상에서는 미생물에 독성을 유발하여 미생물의 활성과 유류의 분해속도에 영향을 미치므로 미생물의 활성에 영향을 주지 않는 농도에 적용하는 것이 바람직하다[7, 18]. 또한 집중되어지는 균은 토양에 존재하는 토착미생물과의 경쟁 및 오염환경으로의 적응으로 일정농도 이상의 집중이 요구되어진다[10, 11]. 본 연구는 유류오염토양에서 분리한 원유의 분해능이 우수한 *Nocardia* sp. H17-1 [1]을 오염토양에 적용할 때 고려되어야 할 여러 환경인자 중 초기오염농도와 초기집중 농도에 따른 탄화수소의 분해 정도와 균의 생육에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

토양

초기오염농도가 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에 사용된 토양은 대전시 유성구에 위치한 야산에서 채취한 사양토(pH 7.1, organic matter 5.0%, clay 15.0%, silt 7.8%, sand 77.2%)를 사용하였다. 채취된 토양은 풍건한 후 2 mm sieve를 이용하여 고르게 체를 쳐 준비한 후, Arabian light oil을 각각 10, 50, 100 g/kg-soil의 농도로 균일하게 오염시켜 1주일간 실온에서 방치하였다. 준비된 토양시료는 100 g씩 500 ml bottle에 넣어서 121°C에서 30분간 멸균 후 사용하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-42-860-4320, Fax: 82-42-860-4594

E-mail: bdyoon@kribb.re.kr

실험은 2반복으로 50일 동안 실시되었다. 초기 접종농도가 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에 이용된 토양은 오염농도의 영향을 조사하기 위한 토양과 동일한 토양을 이용하였으며, 50 g/kg-soil의 농도로 균일하게 오염시켜 같은 방법으로 토양시료를 준비하였다.

사용균주

원유분해능이 우수하다고 보고된 *Nocardia* sp. H17-1을 대상으로 실험을 수행하였다. 접종원의 준비는 LB배지에서 대수 증식이 말까지 배양한 균체액을 원심분리한 후, 멸균 증류수에 두 번 현탁하여 초기오염농도가 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에는 10^6 cfu/g-soil의 농도가 되도록 주입하였고, 초기접종농도가 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 3×10^6 , 5×10^7 , 2×10^8 cfu/g-soil의 농도로 첨가한 후 균일하게 섞어주었다. 대조구로는 균주를 첨가하지 않은 실험구를 이용하였다.

균체수 측정

일정시간 간격으로 채취된 토양시료를 10^3 - 10^6 배율로 생리식염수에 희석하여 희석된 배양액 0.1 ml을 plate count agar(Difco, USA) 배지에 도말한 후 48시간 배양하여 30-300개의 colony를 형성한 plate를 선택하여 계수하였다.

잔류 오일 분석

일정시간 간격으로 채취된 토양에 methylene chloride을 넣고 30분간 초음파 추출을 실시하였다. 추출된 시료는 무수 Na_2SO_4 를 첨가하여 수분을 제거한 후 공극이 $0.45 \mu\text{m}$ PTFE filter로 여과한 후 불꽃 이온화 검출기(flame-ionized detector)가 장착된 gas chromatography(Varian 3400cx, USA)로 분석하였다. 잔류 오일 분석을 위한 column은 DB-1($0.25 \mu\text{m}$, $320 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$, J&W Scientific, USA)을 사용하였다. Carrier gas는 고순도 질소를 사용하여 50 ml/min로 공급하였다. Column 온도는 60 - 300°C 로 분당 5°C 씩 증가시켰으며, injector 및 detector 온도는 각각 250°C 와 300°C 로 조정된 후 Varian 8200cx autosampler를 이용하여 시료 $1.0 \mu\text{l}$ 을 주입하여 분석하였다.

이산화탄소 발생량 분석

Bottle의 마개 끝부분에 0.1 N NaOH가 들어있는 소형

bottle을 고정시켜 생성된 CO_2 를 포집하였다. 포집된 NaOH solution은 TOC analyzer(Shimadzu, Japan)를 이용하여 생성된 inorganic carbon의 양을 측정하여 CO_2 의 양으로 환산하였다.

결과 및 고찰

초기 오일 농도의 영향

원유 초기오염농도의 변화에 따른 H17-1에 의한 탄화수소의 토양에서의 분해양상을 Fig. 1과 Table 1에 나타내었다. H17-1을 첨가하지 않은 토양(sterile soil)에서 50일 후 탄화수소의 제거효율은 초기오염농도 10, 50, 100 g/kg에 대해 각각 17.6, 42.0, 36.3%이었다. 이러한 결과는 토양의 불균일성과 토양입자에 유류 성분의 흡착에 의한 결과 및 휘발성 화합물의 제거에 의한 결과로 판단되어진다[8]. 반면, H17-1을 첨가한 토양에서는 H17-1 균주 접종 직후부터 배양 10일 동안 탄화수소가 빠르게 감소되는 것이 관찰되었으며, 이때 초기오염농도 10, 50, 100 g/kg에 대해 76, 86, 39%의 탄화수소 제거효율을 나타냈다. 이후 탄화수소의 제거속도는 급격히 감소하거나 더 이상 분해가 이루어지지 않은 것으로 조사되었고, 50일 후 탄화수소의 제거효율은 초

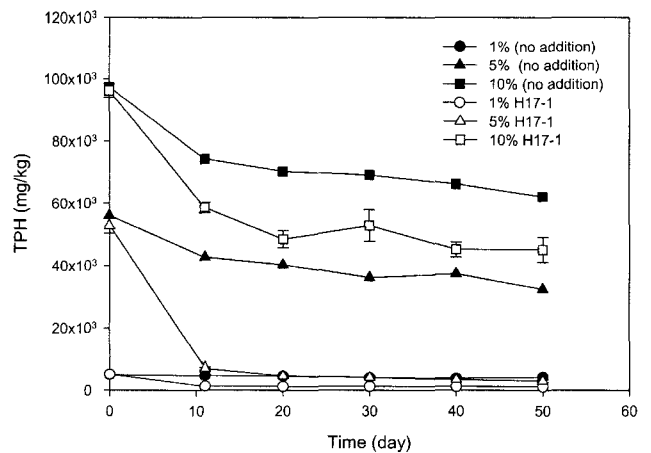


Fig. 1. Degradation of TPH by *Nocardia* sp. H17-1 in soil contaminated with different initial oil concentrations. *Nocardia* sp. H17-1 was inoculated with 10^6 cfu/g-soil. The experiment was carried for 50 days at room temperature.

Table 1. Effects of oil concentration on biodegradation of hydrocarbons in crude oil-contaminated soil.

No addition					H17-1 addition				
Initial conc. (mg/kg)	Final conc. (mg/kg)	Degradation (%)	k (1/d)	r^2	Initial conc. (mg/kg)	Final conc. (mg/kg)	Degradation (%)	k (1/d)	r^2
5,314	4,378	17.6	0.035	0.85	5,429	1,162	78.5	0.342	0.99
56,122	32,468	42.0	0.071	0.96	52,803	3,035	94.3	0.234	0.99
97,406	62,092	36.3	0.096	0.97	96,120	45,053	53.2	0.129	0.98

k is the first order degradation rate constant.

r^2 is correlation coefficient.

기오염농도 10, 50, 100 g/kg에 대해 각각 78.5, 94.3, 53.2% 이었다. 유기화합물의 반응속도 모델에 관한 연구결과는 오염물질의 거동을 예측하고 오염토양의 정화를 위한 설계인자로 사용될 수 있다[2]. 일반적으로 0차, 1차 반응 속도모델이 많이 사용되며, 본 실험에서는 0차 반응속도 모델보다는 1차반응속도 모델에서 더 높은 상관관계를 보여(data not shown), 모든 실험결과를 1차 반응속도 모델로 해석하였다. 그 결과(Table 1) 오염농도가 높을수록 k값은 낮게 나타났다. 원유 10과 50 g/kg의 초기농도에서는 10일 이내에 탄화수소의 제거가 거의 완료되었으며, 원유 100 g/kg의 초기농도에서는 50일 동안에 걸쳐 탄화수소가 지속적으로 제거되었다. 원유 10과 50 g/kg의 초기농도에서 탄화수소의 분해는 C₁₀-C₂₈의 지방족 탄화수소의 빠른 분해로부터 설명되어질 수 있으며, 원유 100 g/kg의 초기농도는 영양원이나 산소공급에 제한요인으로 작용되어 탄화수소의 생분해를 억제하며, 휘발성 화합물의 독성에 의한 미생물 생장이 저해된 것으로 사료된다[13].

토양의 미생물 활성도를 측정하는 방법으로는 이산화탄소 발생량, 산소소모량, 탈수소화효소활성, ATP 측정 등이 있다[15]. 본 실험에서는 생물학적 분해지표로서 호흡측정 방법 중 하나인 이산화탄소 발생량을 측정하였다(Fig. 2). H17-1 첨가구에서는 초기원유 농도가 높을수록 이산화탄소의 발생량은 급격하게 증가하였으며, 탄화수소의 분해가 활발히 일어나는 10일 동안 최대 CO₂의 생성을 나타내었다. 실험이

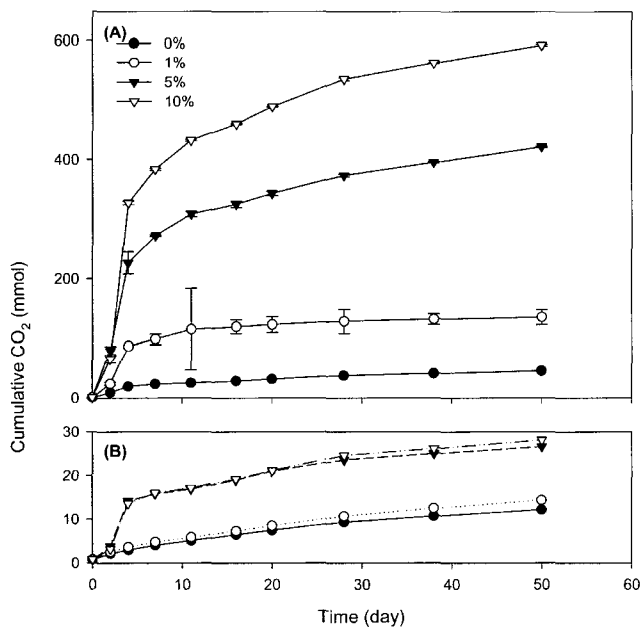


Fig. 2. CO₂ production during biodegradation of TPH in soil contaminated with different initial oil concentrations. (A) *Nocardia* sp. H17-1 was inoculated with 10⁶ cfu-soil. (B) *Nocardia* sp. H17-1 was not inoculated as abiotic control. The experiment was carried for 50 days at room temperature.

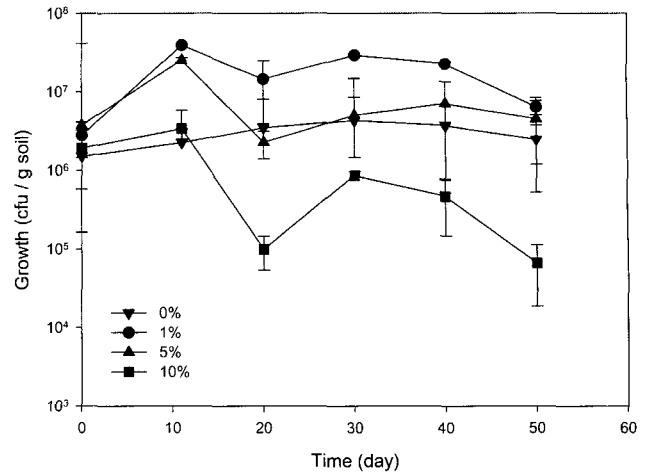


Fig. 3. Growth of *Nocardia* sp. H17-1 during degradation of crude oil in soil contaminated with different initial oil concentrations. *Nocardia* sp. H17-1 was inoculated with 10⁶ cells/g-soil. The experiment was carried for 50 days at room temperature.

진행되는 50일 동안 10, 50, 100 g/kg의 원유오염토양에서 각각 총 135, 421, 591 mmol의 CO₂를 생성하였다. 오염되지 않은 토양에서 H17-1에 의한 CO₂ 생성은 45.34 mmol로 이는 토양이 5.0%의 유기물을 함유하고 있으므로 이를 이용한 호흡의 결과라 할 수 있다[12]. 균을 접종하지 않은 처리구에서의 총 CO₂ 생성은 각각 14.0, 26.54, 28.04 mmol로 매우 낮았으며, 원유 성분 중 휘발성 물질이나 광분해에 의한 CO₂의 축적에 기인한 것으로 판단된다[9]. 이는 균주를 첨가하지 않은 실험구에서 생균수 측정시 균이 검출되지 않은 결과와 연관지어 해석되어질 수 있다.

초기오염농도가 TPH 제거에 미치는 영향을 조사하기 위한 균의 접종은 10⁶ cfu/g 이상으로 첨가하였다(Fig. 3). 원유로 오염되지 않은 토양에서는 실험이 진행되는 50일 동안 균체양의 급격한 증가가 관찰되지 않았으며, 이는 일반적으로 느린 성장 속도를 갖는 *Nocardia* sp.의 특성으로 H17-1 균주가 토양에 존재하는 유기물 등을 이용하여 생육하는 것으로 판단된다[12]. 원유를 10과 50 g/kg으로 오염시킨 토양에서 H17-1의 균체수는 배양 10일에 10배 정도 증가하였다. 그러나 100 g/kg의 원유로 오염된 토양에서는 시간이 경과될수록 균체의 수가 감소하는 것으로 나타났다. 한편, H17-1 균주를 접종하지 않은 구에서는 실험 종료시까지 미생물이 검출되지 않았다.

초기 접종농도의 영향

초기 H17-1의 접종농도에 따른 탄화수소의 농도 변화를 토양에서 실험한 결과는 Fig. 4와 Table 2에 나타내었다. H17-1을 첨가하지 않은 50 g/kg의 농도로 오염된 토양에서 50일 후 탄화수소는 앞의 초기오염농도 실험결과와 유사한 40-48%의 제거효율을 나타내었다. 초기 접종농도를 3 × 10⁶, 5 × 10⁷, 2 ×

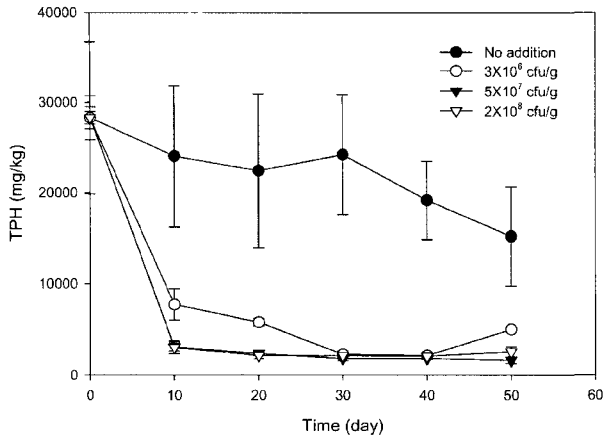


Fig. 4. Degradation of TPH in oil-contaminated soil inoculated with different inoculum size. The soil was artificially contaminated with Arabian light oil (50 g/kg-soil). The experiment was carried for 50 days at room temperature.

10^8 cfu/g로 각각 다르게 처리한 결과는 Fig. 4에 나타난 것처럼 탄화수소가 10일 동안 급격하게 감소되다가 30일 이후 접종농도와는 상관없이 유사한 양의 탄화수소가 잔류하였다. 그러나 낮은 접종농도에 의한 차이를 뚜렷이 나타내어 접종농도가 높을수록 k 값이 증가되었다(Table 2). 이는 Ramadan 등 [21]이 보고한 것처럼 미생물의 접종농도가 생분해를 위한 limiting factor이며, 동시에 균주의 접종농도가 분해속도에 중요한 영향을 미치는 인자임을 확인한 것이다.

초기 접종농도에 따른 CO_2 의 생성결과는 Fig. 5에서 나타난 것처럼 균의 접종농도가 높을수록 CO_2 의 생성량 또한 증가하여 실험이 진행되는 동안 3×10^6 , 5×10^7 , 2×10^8 cells/g의 농도로 H17-1 균주를 접종한 처리구에서 접종농도가 증가할수록 CO_2 발생량은 증가하여 50일후 각각의 총 CO_2 발생량은 110, 160, 215 mmol 이었다. 이러한 결과는 기존의 atrazine[22]이나 PCP[17]와 같은 다른 xenobiotics의 생분해 실험에서 보고된 것과 유사한 결과이다.

실험이 진행되는 동안 3×10^6 , 5×10^7 cfu/g의 농도로 첨가된 H17-1은 10배 정도 균체양의 증가를 나타내었으나, 2×10^8 cfu/g의 농도로 첨가된 H17-1은 약 3배 정도의 균체양의 증가를 나타내었다(Fig. 6). 일반적으로 bioremediation의 성공을 위해서는 10^5 - 10^6 cfu/g 이상의 미생물 접종이 요구되어지며, 10^5 cell/g 미만의 적용은 오염원의 독성으로 인해 생육이 저해 받아 오염원의 효과적인 제거효과를 얻기 어

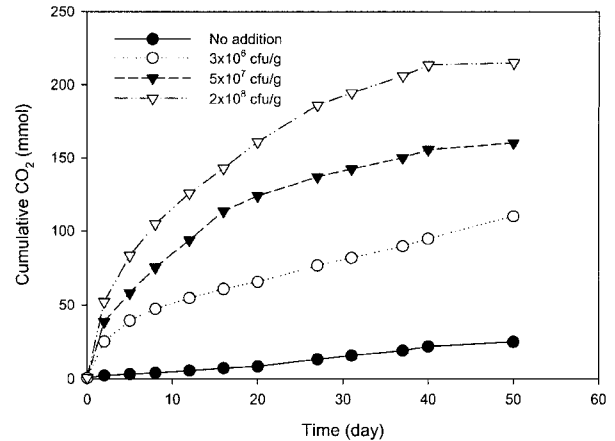


Fig. 5. CO_2 production during degradation of TPH in oil-contaminated soil inoculated with different inoculum size. The soil was artificially contaminated with Arabian light oil (50 g/kg-soil). The experiment was carried for 50 days at room temperature.

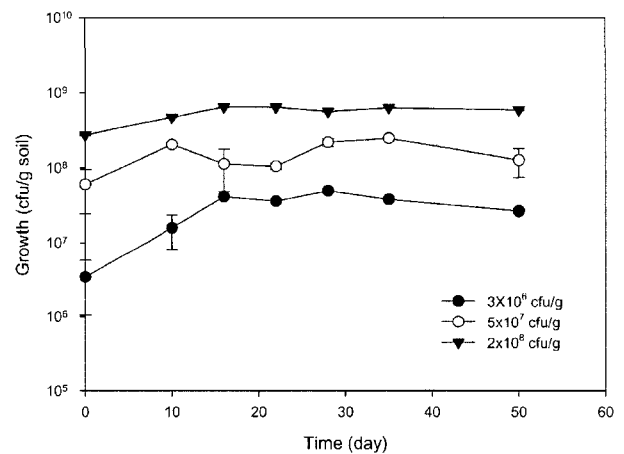


Fig. 6. Growth of *Nocardia* sp. H17-1 during degradation of oil-contaminated soil inoculated with different inoculum size. The soil was artificially contaminated with Arabian light oil (50 g/kg-soil). The experiment was carried for 50 days at room temperature.

렵다고 알려져 있다[10, 22].

이상의 결과로부터 H17-1은 50 g/kg의 원유로 오염된 토양에 적용시 빠른 제거 효과를 기대할 수 있으며, 10^8 cfu/g 이상의 농도로 첨가될 때 탄화수소류의 빠른 분해효과를 나타낼 것으로 기대된다. 앞으로 성공적인 bioremediation 효과를 거두기 위하여 접종되어지는 균주의 분해 특성 뿐 아

Table 2. Effects of the inoculum size on biodegradation of hydrocarbons in crude oil-contaminated soil.

Inoculum size (cfu/g-soil)	Initial conc. (mg/kg)	Final conc. (mg/kg)	Degradation (%)	k (1/d)	r^2
no addition	28,289	15,214	46.2	0.001	0.83
3×10^6	28,289	5,002	82.3	0.166	0.98
5×10^7	28,289	1,642	94.2	0.305	0.99
2×10^8	28,289	2,543	91.0	0.347	0.99

k is the first order degradation rate constant.

r^2 is correlation coefficient.

나라, 토양에서 H17-1의 원유분해 효율을 증진시키기 위한 N, P의 첨가비율 결정 및 계면활성제 첨가 등에 대한 실험이 이루어져야 할 것이다.

요 약

오염토양에 유류분해능을 가진 *Nocardia* sp. H17-1의 접종시 고려되어야 할 인자중 하나인 초기 오염농도에 의한 탄화수소 분해능과 초기 접종농도에 의한 분해능 및 균주의 생육을 조사하였다. H17-1은 실험 50일 동안 초기 오염농도 10, 50, 100 g Arabian light oil/kg of soil에 대해 각각 78.5%, 94.3%, 53.2%의 탄화수소를 제거하였으며, 오염농도가 높을수록 분해속도 상수(k)는 낮아졌다. CO₂의 생성량 또한 오염농도가 높을수록 증가하였으나, 100 g/kg-soil의 오염농도에서는 균의 생육이 저해를 받는 것으로 나타났다. H17-1의 초기 접종농도에 의한 영향은 균의 접종량에 따라 최종 남은 TPH의 양은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 분해속도 상수(k)는 균의 접종량이 늘어남에 따라 크게 증가되었으며, CO₂의 생성량 또한 균의 접종농도에 따라 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 한국생명공학연구원 2003년 기관고유사업에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. 이창호, 권기석, 김희식, 서현호, 안극현, 권태중, 윤병대. 1996. 원유 분해균주 *Nocardia* sp. H17-1의 분리 및 특성. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**: 654-662.
2. Alexander, M. 1999. Kinetics p. 73-104, In M. Alexander (2nd ed.) *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, New York.
3. Atlas, R. M. 1981. Microbial degradations of petroleum hydrocarbons: An environmental perspectives. *Microbiol. Rev.* **45**: 180-209.
4. Atlas, R. M. and R. Bartha. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In K. Marshall (ed.) *Advances in Microbial Ecology Vol. 12*, 287, Plenum Press, New York.
5. Bartha, R. and R. M. Atlas. 1977. The microbiology of aquatic oil spill. *Adv. Appl. Microbiol.* **22**: 225-266.
6. Bouchez, T., D. Patureau, P. Dabear, S. Juretschko, J. Dore, P. Delgenes, R. Moletta, and M. Wagner. 2000. Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* **2**: 179-190.
7. Del'Arco, J. P. and F. P. de Franca. 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environ. Pollu.* **110**: 515-519.
8. Dibble, J. T. and R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 729-739.
9. Foght, K. S. and D. W. S. Westlake. 1998. Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *J. Chromato. A* **809**: 89-107.
10. Forsyth, J. V., Y. M. Tsao, and R. D. Bleam. 1995. Bioremediation: when is bioaugmentation needed?, p.1-14. In R. E. Hinchee, J. Fredrickson, and B. C. Alleman (ed.) *Bioaugmentation for site remediation*. Battelle Press, Columbus, Ohio.
11. Goldstein, R. M., L. M. Mallory, and M. Alexander. 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 977-983.
12. Knaebel, D. B., T. W. Federle, D. C. Meavoy, and J. R. Vestal. 1994. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in a natural soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4500-4508.
13. Loser, H., H. Seidel, P. Hoffman, and A. Zehnsdorf. 1999. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 105-111.
14. Manial, V. B. and M. Alexander. 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 401-405.
15. Margensin R., A. Zimmerbauer, and F. Schinner. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* **40**: 339-346.
16. Margensin R. and F. Schinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminate soil in an Alpine Glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3127-3133.
17. Middeldrop, P. J. M., M. Briglia, and M. S. Salkinoja-Salonen. 1990. Biodegradation of pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Microbiol. Ecol.* **20**: 123-139.
18. Mishra, S., J. Jyot, R. C. Kuhad, and B. Lal. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate *in situ* bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1675-1681.
19. Moller, J., H. Gaarn, T. Steckel, E. B. Wedebye, and D. Westermann. 1995. Inhibitory effects on degradation of diesel oil in soil microcosm by commercial bioaugmentation product. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**: 913-918.
20. Olivieri, R. P., A. Bacchin, N. Robertiello, L. O. Degen, and A. Tonolo. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 629-634.
21. Ramadan M. A., O. M. El-Tayber, and M. Alexander. 1990. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1392-1396.
22. Rousseaux, S., A. Hartmann, B. Lagacherie, S. Piutti, F. Andreux, and G. Soulas. 2002. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effect of different inoculation densities. *Chemosphere* **51**: 569-576.
23. Sugiura K., M. Ishihara, T. Shimaichi, and S. Harayama. 1997. Physiological properties and biodegradation of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 45-51.
24. Vogel, T. M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 311-316.

(Received Sep. 29, 2003/Accepted Dec. 11, 2003)