

(사) 한국토양환경학회
추계 학술 발표회 논문집
1999년 10월 29일 제주대학교

유류오염지역의 미생물 분포 및 활성도에 관한 연구

김무훈, 강순기, 이원권, 정우성*, 박덕신*

삼성엔지니어링 기술연구소

* 한국철도기술연구원

The Study of Microbial Population & Dynamics in Hydrocarbon Contaminated Areas

Moo-Hoon Kim · Sun-Ki Kang · Won-Kwon Lee

Samsung Engineering R & D Center

Usung Chung · Duck-Shin Park

Korea Railroad Research Institute(KRRI)

Abstract

The purpose of this study is to see the effect of microbial population and dynamics of the indigenous microorganisms on hydrocarbon contaminated areas. The microbial structures and activities to determine the microbial capabilities of the contaminated sites are very important for the remedial action technology selection. Throughout microbial studies on different conditions by ETS(Electron Transport System) and microbial activity analysis, it was found that aeration and water contents are the most important factors in this site remediation. According to test results, *Burkholderia spp.* was dominant species, and acclimation is also an important factor for the accelerated biodegradation.

Key words : microbial population and dynamics, ETS system, remedial action, *Burkholderia spp.* species, biodegradation

I. 서론

환경 오염유발 물질들은 수질, 대기, 토양 등의 다양한 매체를 통하여 이동하면서 변화와 변형을 계속하면서 인간을 포함한 자연생태계에 영향을 미치고 있는데, 특히 토양을 매개체

로 한 오염물의 거동 및 영향은 수질과 대기를 통한 피해보다 상대적으로 노출속도가 느리고 전달경로도 복잡하여 그 조사와 정확한 현황의 파악이 매우 어렵다. 따라서 토양오염의 정확한 진단과 조사 및 이를 바탕으로 한 오염토양의 정화기술 개발은 장기적이고 체계적으로 연구하여야 할 중요한 과제 중의 하나라 할 것이다. 유류오염된 토양에 있어서의 사전 정밀조사가 완료된 후, 실제 복원기술을 적용시키기 위해서는 여러 가지의 사전조사방법(토양의 특성, 투수성 등)이 이루어져야 하는데, 이에 못지 않게 생물학적 복원기술을 적용시키기 위해서는, 유류오염된 토양에서의 생분해가능성을 진단해보는 것이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 유류오염된 토양에서의 기존오염물질 내에 존재하는 순화된 미생물의 농도를 알아보는 방법(Colony Forming Units, 계수법)과 그 중에서 실제 오염물질의 생분해에 강력한 영향력을 끼치는 미생물의 활성정도(ETS)를 알아보는 두 가지 연구를 통하여 미생물의 유류오염물질 분해능력을 알아보고, 또한 인위적인 통기를 통해 미생물의 오염물질에 대한 산화능력의 변화를 알아보아 실제현장에서의 생물학적 복원가능성을 예측해보는데 있다.

II. 실험재료 및 방법

1 토양의 물리적 특성 및 균주수/동정

토양의 물리적 특성으로 pH, 함수율을 측정하였다. pH는 토양에 증류수를 1:2(w/v)의 비율로 첨가하여 10분 이상 잘 섞고 다시 10분 이상 정치시켜서 토양 입자를 가라앉힌 다음 pH미터로 측정하였다. 토양의 함수율은 일정량의 토양을 105℃에서 24시간 건조한 후, 건조 전후의 질량을 측정하여 계산하였다. 실험에 사용된 토양 시료는 유류오염 지역 표층과 2m 깊이의 토양을 코어 샘플러(Geoprobe)를 사용하여 채집하였으며, 채집된 토양 시료는 1.7mm 채로 거른 후 실험에 사용하였다. 통기에 의한 미생물학적 요인의 영향은 각각의 토양 시료를 Erlenmeyer 플라스크에 일정량씩 분주하여 넣은 후, 전혀 통기하지 않은 조건과 항시 통기, 2일 간격으로 통기, 일주일 간격으로 통기한 조건으로 유지하면서 시료를 채취하여 실험하였다.

2. 미생물균주 수

총세균수(TBC)는 DAPI로 염색하여 형광현미경(fluorescence microscope, Axioscop, Zeiss)와 image analyzer를 사용하여 1,600배의 배율에서 계수하였으며(Fig 7), 중속영양세균수(HBC)는 영양염천배지(Nutrient Agar Media)에 배양하여 계수하였다. 유류분해세균의 수(PDB)는 유일한 탄소원으로 등유(kerosene)와 경유(diesel)을 각각 공급한 후 96-well microtiter plates를 사용하여 MPN법으로 계수하였다.

3. 세균의 분리 및 동정

등유와 경유를 유일한 탄소원으로 사용한 농화배양을 통해 유류분해세균을 분리하였으며, 지방산(fatty acid)을 추출하여 GC로 분석하고 미생물검증 시스템(Microbiological Identification System)으로 동정하였다.

4. 토양 미생물의 ETS 활성도

미생물의 활성도는 INT를 사용하여 전자전달계의 활성도를 측정하여 구하였다. 박테리아의 활성도만을 측정하는 시료는 사상균의 활성을 억제하는 cycloheximide 용액(16mg/ml)을 0.2ml 첨가하였다. INT를 첨가하여 25℃, 빛을 배제한 곳에서 24시간 배양한 후 메탄올을 넣어 INT-formazan을 추출한 다음 흡광광도계(Cary 3E, Varian)로 480nm에서 흡광도를 측정하여 ETS 활성도를 측정하였다. Cycloheximide를 첨가하지 않은 시료를 총미생물활성도로, 항생제를 첨가한 시료를 박테리아의 활성도로, 이 두 활성도의 차이를 사상균의 활성도로 계산하였다.

5. Selective plating 혹은 Enrichment 기술

유기물을 산화시킬 수 있는 종속영양세균계수(heterotrophic bacterial count)를 하기 위해 준비한 배지로서 NAM(Nutrient Agar Medium)를 이용(15g agar and 8g of Nutrient broth per liter of distilled water), 유류오염물질을 산화시킬 수 있는 미생물을 배양하였다.

6. Microcosm study

이 실험에서는 표층시료와 2m깊이 시료를 가지고 공기주입기간에 따른 미생물분포 및 활성효과에 대해서 고찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1 물리적 특성

표층시료와 2m 깊이 시료의 pH는 각각 7.10과 7.16으로 측정되었으며, 함수율은 각각 15.28%와 6.86%였다.

2. 통기조건이 미생물 분포에 미치는 영향

종속영양세균은 표층 및 2m 깊이 시료의 경우 항시통기 조건에서 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, 다른 aeration 조건에서는 거의 차이가 없거나 감소하는 경향이 관찰되었다. 반면에 다른 통기 조건과 표층 시료의 경우는 초기에 ETS 활성도가 증가하였으나 시간이 경과함에 따라 활성도가 급격히 감소하는 것이 관찰되어 통기조건이 미생물 활성도에 지속적인 영향을 나타내지 못하는 것으로 확인되었고, 그 이유로 수분함량에 의한 영향인 것으로 판단된다. 항시 aeration시 토양시료의 수분 손실이 지속적으로 일어나 본 실험 종료 후 측정된 함수율에서 거의 0%로 조사되었다.

3. 유류분해세균의 분리

본 실험결과에 의하면 미생물의 활성도는 aeration 효과에 의해 증진될 수 있으나 통기

조건의 경우는 aeration 효과와 더불어 토양시료의 수분감소로 인한 영향이 미생물 분포와 활성도에 더 큰 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 등유와 경유를 유일한 탄소원으로 사용하였을 때 표층과 2m 깊이 토양으로부터 *Burkholderia cepacia*와 *Burkholderia solanacearum* 두 종의 유류분해세균이 동정되었다.

IV. 결론

- 본 연구결과에 의하면 미생물의 활성도는 aeration 효과에 의해 증진될 수 있으나 통기 조건의 경우는 aeration 효과와 더불어 토양시료의 수분감소로 인한 영향이 미생물 분포와 활성도에 더 큰 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 결과적으로 본 실험에서는 aeration 한 가지 factor로 결과를 평가할 수 없으며, 시간 경과에 따른 시료의 함수율이 결과 해석에 중요한 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.
- ETS 시스템을 이용한 미생물활성도 측정에서는 2m지점에서의 토양의 활성도와 표층토양의 활성도가 거의 유사하게 나타났고, 이것은 통기를 통해 2m지점에서의 유류산화미생물의 분포도를 증가시키는 결과를 가져온 것으로 보여진다.

등유와 경유를 유일한 탄소원으로 사용하였을 때 표층과 2m 깊이 토양으로부터 *Burkholderia cepacia*와 *Burkholderia solanacearum* 두 종의 유류분해세균이 분리 동정되었다.

참 고 문 헌

1. Kim, Moo-Hoon et. al., " The Use of DPT methodologies for the site characterization in Korea ", Proceedings of 4th International Symposium on Environmental Geotechnology and Global Sustainable Development, Boston, Massachusetts, U.S.A.(accepted)(1999)
2. Kim, Moo-Hoon and L.C Clesceri., " The assessment of the bioremediation potential on MGP soils ", Journal of the Environmentally Conscious Design and Manufacturing, New Mexico, U.S.A. vol 8(2):35-42 (1999)
3. 김 무 훈, 이 원 권, 박 대 원., 국내 토양오염 유발시설별 오염현황조사 "○○매립지 오염현황조사", 한국폐기물학회지, 15(4):889-894 (1998)
4. 김 무 훈, 곽 무 영., 국내 토양오염 유발시설별 오염현황조사 " XX인근 주유소 오염현황조사 ", 한국토양환경학회지, 3(1):49-57(1998)
5. 김 무 훈., 국내 토양오염 유발시설별 오염현황조사 "○○인근 주유소 오염현황조사", 한국토양환경학회지, 2(3):9-24 (1997)