

## Biopile을 이용한 유류 오염토양의 복원에 관한 연구

박중천, 오재영, 정용욱, 이우범\*

서남대학교 의과대학 미생물학교실

\* 여수대학교 건설환경공학부

*pjcoli@tiger.seonam.ac.kr*

### 요 약 문

To investigate the effect of on-site bioremediation in soil that have been contaminated by hydrocarbon fuel spills, petroleum-degrading bacteria isolated from soil around petroleum chemical industry and microbial agents were constructed. We investigated biopiles for on-site bioremediation of soil contaminated (5000 mg per kg) with bunker A fuel in five independent lab-scale experiments. Five biopile units constituting the following treatments: (1) control with no nutrients and microbial agents (2) microbial agent M plus nutrients (3) microbial agent C plus nutrients (4) only microbial agent C (5) control with only nutrients. The results were highly different one another. After 30 days in treatments with optimal condition, total petroleum hydrocarbons were reduced to below 10 mg per kg of soil at the biopile units mixed with microbial agents, but control biopile units show that were reduced from 1,105 to 2,588 mg per kg of soil. Our results show that microbial agents at on-site bioremediation of fuel-contaminated soil is highly effective.

**key word** : biopile, petroleum, microbial agents, contaminated soil

### 1. 서론

원유는 여러 가지 탄화수소 화합물(방향족, 지방족)을 포함하고 있는데 그중 방향족 탄화수소(벤젠, 톨루엔, 크실렌, 에틸벤젠, 스틸렌, 벤조피렌)는 미국 환경청에서 규정한 유해 독성 화합물로서 검출빈도가 높은 주요 오염물질로 분류되는 휘발성 유기화합물(VOC ; volatile organic compounds) 이다(Clark, 1992). 실제로 1989년 미국 알래스카주에서 일어난 원유 유출사고를 보면, 미국의 정유회사인 Exxon의 유조선이 천백만 갤런의 원유를 유출시켰는데 그중 25%가 방향족 탄화수소였다(Flathman, *et. al.*, 1993). 이러한 방향족 탄화수소는 독성이 심하면서 분해속도가 느린 특징을 가지고 있다. 각종 유류 유출사고가 발생하면 일반적으로 유화제살포, 흡착물질에 의한 흡착 및 제거, 오일펜스에 의한 확산방지, 소각 등의 물리·화학적방법을 사용하지만, 특히 화학물질에 의한 처리는 2차 오염문제를 일으키며 저층과 지하수에 잔존하는 유류는 거의 제거가 되지 않는 문제점이 발생하게 된다(Al-Lihaib and Al-Omran, 1996). 따라서 1980년대부터 국내외적으로 자연계에서 분해자로 중요한 역할을 하는 미생물의 기능을 이용하여 유류오염 물질을 제거하기 위해 막대한 예산을 투입, 연구하고 있다. 이러한 bioremediation 기술은 광역적으로 적용할 수 있고, 경제적이며, 오염이 회복된 현장에 2차 오염의 우려가 화학적처리에 비해 적은 장점을 가지고 있다(Irving, 1995 ; EPA, 1993).

따라서 본 연구에서는 다양한 환경으로부터 유류분해능이 우수한 균종들을 분리동정하고,

대량배양조건을 확립한 다음 유류제거 효율이 우수한 미생물제제를 개발하고자 하였으며, 개발된 미생물제제를 먼저 bioremediation의 하나인 on-site biopile 공법에 적용 효율을 평가하는데 목표를 두었다. 향후 지속적인 유류분해능이 우수한 다양한 복합미생물제제를 완성하여 in-site bioremediation 공법 등에 활용·현장에 적용하고자 한다.

## 2. 본론

유류분해능이 우수한 미생물의 분리 및 제제화

석유화학공단 주변 토양 및 주유소 주변 토양 등 상시 유류 노출 지역으로부터 토양을 채취한 후, 농화 배양기법(Enrichment Culture Method)을 사용하여 유류 형태에 따른 분해 균종을 분리하였다. 농화배양을 위한 배지는 Glucose-MM2 최소배지에 유일한 탄소원으로 10% Crude Oil(Abudabi)과 2% n-hexadecane을 첨가한 액체배지를 각각 사용하였다. 각 분리균에 대한 증식율 및 분해율을 확인하기 위해 1% crude Oil, Bunker C Oil, Diesel, n-hexadecane, PAH(Anthracene, Naphtalene, Phenanthrene)가 첨가된 MM2 최소배지와 1000 ppm/day의 BTEX가 첨가된 5 ml MM2 최소배지에 준비된 배양액을 각각 0.1 ml씩 접종하여 25°C에서 7~15일 동안 150 rpm으로 진탕 배양하면서 유화현상과 탁도의 변화를 관찰함으로써 각 Hydrocarbon이 함유된 배지에서의 증식 및 각 hydrocarbon의 분해여부를 확인하였다. 그 결과 10% crude Oil과 2% n-hexadecane이 함유된 Glucose-MM2 배지에서 증식할 수 있는 균주, 75종을 1차로 분리하였다. 이들 1차 분리균은 10% Crude oil과 2% n-hexadecane이 함유된 배지에서 10일 안에 증식하는 균종이며, 몇몇 종은 3일 안에 활발하게 증식할 뿐만 아니라 crude oil의 유화 현상이 뚜렷하게 나타났다. 분리된 75개의 균종을 다시 1%(10,000 ppm)의 Crude oil, Bunker C 유, Diesel, n-hexadecane, PAH(Anthracene, Naphtalene, Phenanthrene) 등이 첨가된 MM2 최소배지 5 ml에 0.1 ml 씩 접종하여 각 유류에 대한 분해 여부를 확인하였다. 이들 중 NW-6과 NW-7은 Diesel, Bunker C 유를 포함하여 다양한 유류가 함유된 배지에서 활발하게 증식하였으며, 대부분의 유류를 제거하는 것으로 나타났다. 순수분리된 이들 균주를 YEPE, TSA, 그리고 MacCongkey 고체배지(Difco laboratory, Detroit, USA)에 배양한 후 균체의 형태학적 특성을 파악하고 Gram 염색을 수행한 결과 대부분 Grm 음성과 단간균으로 나타났으며(Fig. 1), 생리·생화학적 특성은 Bergcy's Manual of Systematic Bacteriology와 API kit(Api BioMeriux sa, France) 등을 이용하여 동정한 결과 *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*속 등으로 동정되었다. 그 중 NW-6는 *Pseudomonas* 속으로 대부분의 Hydrocarbon에서 활발하게 증식하였으며, Crude Oil을 3일 안에, Diesel을 5일 안에 거의 95%이상 분해하는 것으로 나타났다. 현재 이 균종을 포함하여 유류 분해능이 우수한 4종은 각각 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii/cacoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*로 밝혀졌으며, rDNA 서열을 밝혀 유연관계 및 정확한 종명을 확인하는 중에 있다.

유류 분해능은 Growing Cell Assay 방법으로 각 균주를 TSA Broth에서 16시간 동안 전 배양한 다음 균주를 Potassium Phosphate Buffer로 세척 후 MM2 배지 50 ml에 Crude Oil, Bunker C, 그리고 Diesel을 10,000ppm(1%)을 각각 첨가하여 전 배양액 0.5 ml씩 접종하여 이들을 144 시간에서 183시간 동안 25°C에서 150 rpm으로 배양하여 증식곡선을 작성하였다.

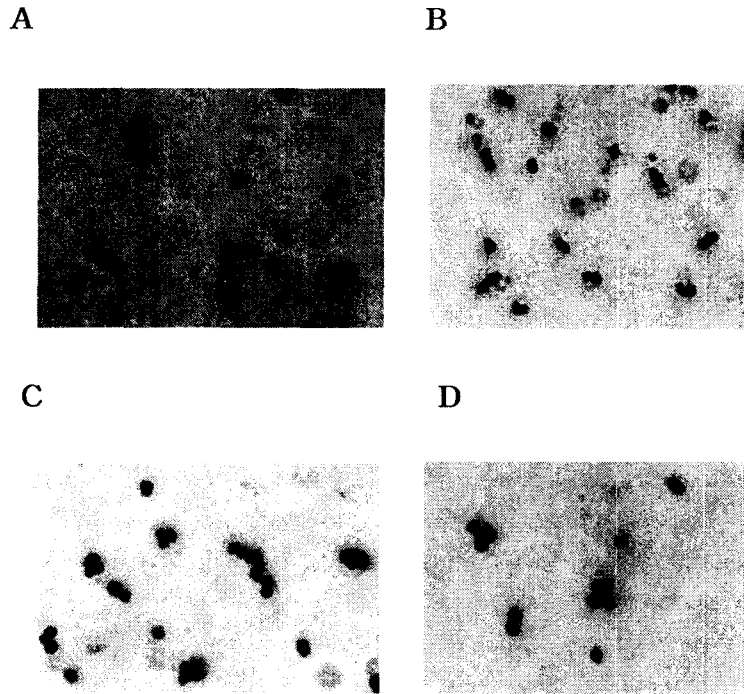


Fig.1. Petroleum-degrading bacteria by Gram stain

A, *Acinetobacter junii/jonssonii* ; B, *Acinetobacter baumannii/cacoaceticus* ;  
 C, *Pseudomonas* spp. ; D, *Acinetobacter lwoffii*

그 결과 A 균주는 Crude Oil과 Diesel에서 24시간 이후에 지속적으로 활발하게 증식하였으나 Bunker C에서는 증식하지 않았다. B 균주는 첨가된 모든 기질에서 모두 활발하게 증식하였으며, 특히 Bunker C에서 가장 높은 증식율을 나타냈다. 그리고 C 균주는 전체적으로 Lag Phase가 길었으며, Crude Oil과 Diesel에서는 높은 증식율을 나타낸 반면 Bunker C에서는 90시간 이후부터 증식하기 시작하는 특징을 나타내었다. D 균주는 Diesel을 가장 잘 이용했으며, Bunker C에서는 증식정도가 비교적 낮은 것으로 나타났다. 한편, 4개의 균종을 혼합(Consortium)하여 각 기질에 대한 분해특성을 조사한 결과 Crude Oil, Diesel 그리고 Bunker C Oil 순으로 증식정도가 높았으며, 전체적으로 분해효율이 향상되는 것으로 나타났다. 또한 10 ~ 35℃에서 분해특성을 조사하기 위해 A, B, C, 그리고 D 균종을 MM2에 1% Diesel이 함유된 배지에 각각 배양한 결과 A와 B 균종이 활발히 증식함으로써 기질 이용율이 높은 것으로 나타났다.

미생물 제제를 제조하기 위해 우수한 유류 분해균종으로 선발된 4개의 균종을 TSA 배지에서 전배양 한 후에 Diesel이 유일한 탄소원으로 함유된 MM2최소 배지에서 대량 배양한 후 혼합제제와 잘 혼합한 다음 자연 건조시켜 제제화 하였다. 이들 제제에 함유된 미생물의 개체밀도는 타사 제품에 비해 훨씬 높은  $2.0 \times 10^9 \sim 10^{12}$  정도였다. 이것은 제제화 과정 중에 사용된 carrier를 특수처리(열처리)하여 미생물 고정화율을 증가시켰고, 제제를 자연 건조시킴으로써 미생물의 생존율과 보존기간을 향상시킬 수 있도록 하였기 때문으로 판단된다.

#### Lab Scale의 Biopile Unit 제작 및 biopile 공법에서의 적용성 실험

Lab Scale의 Biopile Unit(50×35×30 cm) 5개를 제작하여 미생물제제와 오염 토양과 대조구 토양을 첨가하여 Lab Test를 수행하였다. Test 방법은 오염 토양만을 첨가한 대조구, 오염 토양과 영양소만 첨가한 시험구, 미생물제제와 오염토양을 첨가한 시험구, 미생물제제와 오염토양 및 영양소를 첨가한 시험구를 각각 준비하여 일정한 시간 간격으로 미생물의 적응성(Monitoring)

과 유류 제거율을 분석하였다. 제작된 Lab Scale의 Biopile Unit에 5,000 mg/kg의 Bunker A가 오염된 토양 18 kg(BP-1), 오염된 토양에 Nutrient(일주일에 500 ml)만 첨가한 것(BP-5), 미생물 혼합제제 18g(0.1%)(BP-2), 혼합제제 18 g 과 Nutrient(BP-3), 그리고 미생물제제 C 18 g(BP-4)을 첨가하여 혼합한 대조구와 시험구를 각각 제조하여 30일 후, 미생물의 개체수의 변화와 TPH의 양의 변화를 분석하였다. 그 결과 미생물의 개체수 변화는 토양만 첨가한 것과 Nutrient만 첨가한 대조구에 비해 미생물제제가 혼합된 시험구에서 100배 이상 높은 개체밀도를 보여 주었으며, 제제에 함유된 미생물종의 우점도가 20% 이상 증가하는 것으로 나타났다. 잔존하는 TPH 양의 변화를 확인하기 위해 GC로 분석하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 BP-1은 토양만 첨가한 대조구로 약 2,588 mg/kg의 TPH가 검출되었으며, 다음으로는 Nutrient와 토양을 첨가한 BP-5가 1,105 mg/kg으로 잔존 TPH 농도가 아직 높은 반면에 오염된 토양과 미생물제제인 consortium(혼합제제) M, 미생물제제 C 및 Nutrient가 함유된 BP-2와 BP-3, 그리고 오염된 토양과 미생물제제 C만 함유된 BP-4는 모두 TPH 농도가 10 mg/kg 이하 E는 거의 검출되지 않은 것으로 나타나 미생물제제에 의해 Bunker A의 분해가 높은 효율로 이루어지고 있음을 확인하였다(Fig. 2).

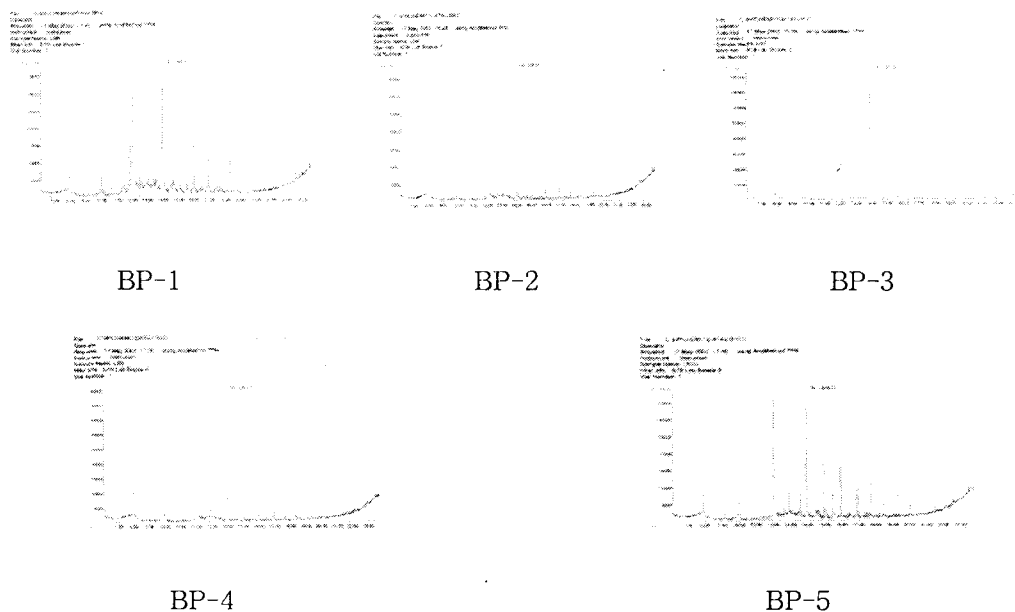


Fig.2. GC chromatogram of soil at each biopile units.

BP-1, contaminated soil; BP-2, contaminated soil+microbial agent M+nutrient; BP-3, contaminated soil+microbial agent C+nutrient; BP-4, contaminated soil+microbial C; BP-5, contaminated soil+nutrient

### 3. 결론

본 연구에서는 석유화학공단 주변토양의 유류오염 복원 기술개발 시스템에 중요하게 활용될 미생물제제 적용 및 새로운 개념의 미생물제제 개발을 목표로 연구를 수행하였다. 다양한 환경으로부터 시료를 채취하여 유류분해능이 있는 균종 70여종을 분리하여 그 중에서 분해효율이 우수한 균종 4개종을 선별하여 동정하고, 각종 생리 Test 및 유류형태에 따른 적응성 등을 분석하여 일차적으로 4종의 미생물제제를 제조하였다. 이들 제제를 오염된 토양에 처리하여 분해효율을 시험한 결과 기존 제품에 비해 처리 효율이 우수한 것으로 나타났다. 또한 이들의 제제는 Diesel,

Crude Oil, Bunker C, Bunker A 등의 유류에 대한 분해능을 가지고 있으며, pH와 온도, 산소 존재 여부 등의 조건에서 시험한 결과 균종에 따라 생육 범위가 넓은 것으로 나타나 유류 유형과 토양 성상에 따른 적용가능 범위가 큰 것으로 나타났다.

#### 4. 참고문헌

1. Mohn WW, Radziminski CZ, Fortin MC, Reimer KJ. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Oct;57(1-2):242-7.
2. Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B. In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Curr Microbiol.* 2001 Nov;43(5):328-35.
3. Richmond SA, Lindstrom JE, Braddock JF. Assessment of natural attenuation of chlorinated aliphatics and BTEX in subarctic groundwater. *Environ Sci Technol.* 2001 Oct 15;35(20):4038-45.
4. Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Sep;56(5-6):650-63.
5. Mohn WW, Radziminski CZ, Fortin MC, Reimer KJ. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Oct;57(1-2):242-7.
6. Taylor LT, Jones DM. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. *Chemosphere.* 2001 Aug;44(5):1131-6.
7. Gan P, Fan Y, Wang M. [Experiment of biodegradation of chlorobenzenes]. *Huan Jing Ke Xue.* 2001 May;22(3):93-6. Chinese.
8. Gabriel J, Shah V, Nesmerak K, Baldrian P, Nerud F. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the copper(II)-hydrogen peroxide system. *Folia Microbiol (Praha).* 2000;45(6):573-5.