

미생물제제를 이용한 유류오염지역의 토양정화

심두섭, 송현주, 박수진, 고성환
(주)에코필 부설연구소
dssimtm@hanmail.net

요 약 문

Bioremediation is often used for in situ remediation of petroleum-contaminated site. We studied the microbial degradation of hydrocarbon in an artificially diesel contaminated soil in laboratory microcosm.

In control soil, about 30% of the initial TPH was diminished and the degradation of diesel oil was significantly enhanced by the addition of bioremediation agent (70% of TPH reduction).

key word : bioremediation agent, diesel, bioremediation, TPH, TLC/FID

1. 서론

토양과 지하수의 주요한 오염원은 가솔린, 디젤 및 윤활유 등이 있다. 가솔린은 비교적 높은 휘발성 때문에 증기 및 스티프추출 등의 방법으로 제거가 용이하나, 디젤과 윤활유는 물에 대한 용해도가 낮고 점성이 높아 비교적 제거가 어렵다. 생물정화기술에 의한 오염물의 제거는 물리·화학적인 방법에 비해 비용이 저렴하며, 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 고농도의 디젤로 오염된 점토성 토양을 정화하기 위하여, 미생물제제와 복합영양염제를 이용한 생물정화기술을 적용하였다.

2. 본론

- 분석방법

미생물 분석

중속영양세균(heterotrophic bacteria, HB)의 검출은 LB 평판배지에 도말한 후 30 °C에서 3일간 배양한 후 계수하였다. 유류분해미생물(petroleum degrading bacteria, PDB)은 최적확수(most probable number, MPN) 계수법을 이용하여 측정하였다. MPN배지로는 Bushnell-hass(Difco)배지를 사용하였고, 유일한 탄소원으로는 diesel(5%, v/v)을 이용하였다. 접종된 배지는 25 °C에서 1주간 배양하고 0.3% INT 50 μ l을 첨가하고 24시간 더 배양하여 색깔의 변화를 양성반응으로 간주하였으며 Thomas' simple formula를 이용하여 유류분해세균수를 계수하였다.

유류함량 분석-TLC/FID(Thin Layer Chromatography/Flame Ionization Detection) Iatroscan MK6s (Iatroscan Lab., Japan)을 이용하여 스캐닝하여 각 성분의 상대면적을 계산하면 측정 대상 유류내의 성분을 알아 볼 수 있다. 분석은 ChromStar Software를 이용하였다.

- 미생물제제 준비

디젤로 오염된 토양에서의 생물정화기술을 적용하기 위하여 7종의 유류분해능이 우수한 균을

선별하였다. 실험에 이용된 균은 분해능이 우수하고 재현성이 좋은 *Acinetobacter sp.*, *Corynebacterium variabilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Spingomonas yanoikuyae*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Rhodococcus equi* 이다. 각각의 균은 고체배양하에서 배양한 후 담체와 혼합하여 미생물제제로 사용하였다. 또한 영양염을 공급하기 위하여 무기계 복합영양염제를 사용하였다.

- 실험방법

점토성 토양에서 디젤의 분해율을 확인하기 위하여 생물정화기술을 적용하였다. 실험구는 가로 x 세로 x 높이가 각각 12 cm x 14 cm x 14 cm인 stainless steel box를 사용하였다. 토양은 자연건조 시킨 후 2 mm 체를 이용하여 선별 한 후 사용하였다. 선별된 토양에 diesel을 인위적으로 오염시켰으며, 풍화시키기 위하여 약 7일 동안 방치하여 쉽게 휘발가능한 유류는 제거하였다.

풍화시킨 후 토양내에서의 diesel 오염농도를 TLC/FID를 이용하여 분석한 결과 대략 38,000 ppm으로 측정되었으며, aliphatic, aromatic 및 asphalts 화합물의 비율이 각각 71.8%, 26.2% 및 2.0%로 나타났다.

첫 번째 실험구(CONTROL)는 대조구로서 수분만을 공급하였으며, 두 번째 실험구(TREAT)는 영양염제와 미생물제제를 첨가하였다. 영양염제는 C/N/P = 100/10/3의 비율로 공급하였으며, 미생물제제는 5,000 ppm(w/w)를 첨가하였다. 수분공급은 WHC(수분유지력)의 40%가 되도록 첨가하였다. 또한 모든 실험구는 2일간격으로 tilling을 통하여 산소공급을 하였다.

- 결과 및 고찰

Fig. 1은 미생물의 동태를 살펴본 것이다. 총미생물수를 나타내는 HB는 대조구와 처리구 모두에서 7일 후 약 100배 정도 증가함을 볼 수 있었으며, 7일 이후에는 커다란 변화가 없었다. PDB는 약 35일차부터 대조구와 처리구사이에 뚜렷한 변화를 보여주고 있으며, 이는 처리구에 넣어준 유류분해미생물이 활성화 되었기 때문으로 사료된다. 총미생물수(HB)에 대한 유류분해미생물(PDB)의 비(Ratio, PDB/HB)를 살펴보면, 35일 차를 시점으로 처리구에서 유류분해미생물이 급격히 증가했음을 알 수 있다.

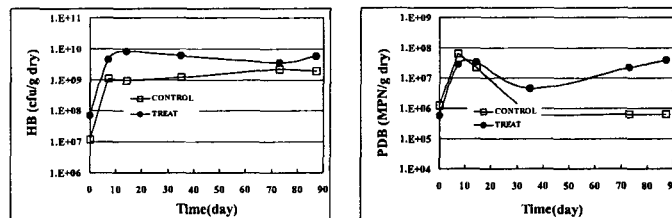


Fig. 1. Fluctuations of heterotrophic bacteria(HB) and petroleum degrading bacteria(PDB) in each microcosms.

Fig. 2는 155일 배양 후 잔류유류량을 분석한 결과이다. 석유계총탄화수소(TPH)의 감소율을 확인하여 보았다. 대조구의 경우 초기 35일차까지는 28.3 mg/day의 율로 TPH가 감소하고 있음을 알 수 있다. 그러나 35일차 이후 2.2~4.0 mg/day의 낮은 율로 감소하고 있다. 또한 처리구의 경우 초기 감소율이 약 41.7 mg/day 였으며, 35일차 이후 4.6~17.3 mg/day의 율로 감소되고 있다. 이와 같은 결과로부터 초기의 감소율은 휘발에 의한 감소와 생물학적인 영향에 의한 감소가 주된 요인인 것으로 사료된다. 35일차 이후 대조구에서는 거의 변화가 없는 반면, 처리구에서는 상당한 감소가 진행되고 있음을 알 수 있다. 그러나 87일차 이후 감소율이 상당히 낮아졌으

며, 거의 대조구의 감소율과 비슷한 수준으로 낮아지고 있음을 알 수 있다. 일반적으로 물리·화학적으로 감소된 것으로 추정되는 대조구는 155일 진행되는 동안 약 35%정도 제거된 것으로 나타났다. 이중 25%는 초기 35일 이내에 제거 되었으며, 나머지 10%가 약 120일에 걸쳐 감소된 것으로 볼 수 있다. 즉 35일 이후 물리·화학적 제거는 거의 없음을 알 수 있다. 반면에 처리구의 경우 155일 동안 약 70%의 제거를 보여 주었다.

Aliphatic의 감소율도 TPH와 비슷한 양상으로 나타났다. 대조구의 경우 초기에 감소된 이후 35일 차 이후 거의 변화가 없으나, 처리구에서는 87일차 까지 지속적으로 감소되고 있다. 이는 처리구에서의 생물학적인 분해가 진행되고 있음을 알 수 있다.

Aromatic은 초기 35일차까지 대조구와 처리구 양쪽에서 감소율이 거의 비슷하게 나타났다. 이와 같은 결과는 aliphatic의 경우 비교적 미생물에 의한 분해가 용이하여 초기부터 대조구와 처리구에서의 차이가 분명하게 나타난 반면, aromatic은 aliphatic에 비하여 분해가 어려워 초기에 대조구와 큰 차이가 없는 것으로 사료된다. 그러나 35일차 이후 활성화된 유류분해미생물이 aromatic 성분을 분해하고 있음을 알 수 있다.

또한 120일차 이후 분해율이 급격히 감소하고 있으며, 이와 같은 상황에서 잔존하는 유류는 만성적으로 오염된 지역과 같이 난분해성물질과 2차대사산물이 축적된 상태일 것이며 이로 인하여 생물학적인 분해는 더 진전되지 않을 것으로 사료된다. 실험기간동안 약 35%가 확산, 희석 및 휘발과 같은 자연적인 현상(natural attenuation)에 의해 제거 되었으며, 35%는 생물학적인 작용에 의해 제거되었다. 또한 30%는 물리·화학·생물학적으로 제거되지 않고 남아 있다. 현재 남아있는 오염물의 농도는 대략 11,400 ppm 정도이며, 이를 제거하기 위해서는 다른 방법을 이용한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

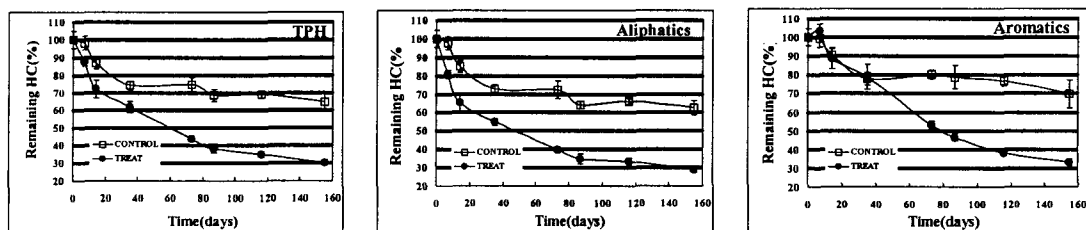


Fig. 2. Fluctuations of diesel recovered from polluted sand by TLC/FID in each microcosm.

3. 결론

본 연구에서는 고농도의 디젤로 오염된 점토성토양을 복원하기 위하여 미생물제제와 영양염제를 사용하였다. 연구결과 자연적인 물리·화학적방법에 의해 약 35%가 감소하였으며, 미생물제제와 영양염제를 이용한 처리구에 의해 총 70%가 감소되었다. 그러나 약 30%는 이 기간동안 감소되지 않고 남아 있었다. 남아있는 30%의 디젤이 제거되기 위해서는 오랜시간이 필요할 것으로 사료되며, 이 제거기간을 줄이기 위해서는 추가적인 물리·화학적방법을 이용하거나 또는 남아있는 오염물을 제거할 수 있는 최적화된 미생물제제의 개발이 뒷받침되어야 할 것이다.

4. 참고문헌

- 1) 심두섭, 손재학, 김상진. 1998. 자갈로 구성된 미소환경에서 미생물제제에 의한 유류분해. *The Korean Journal of Microbiology*. 34(3), 101-107.
- 2) Goto, M., M. Kato, M. Asaami, K. Shirai, and K. Venkateswaran. 1994. TLC/FID

method for evaluation of the crude-oil-degrading capability of marine microorganisms. *J. Mar. Biotechnol*, 2, 45-50.

3) Kim, S-J., J. H. Sohn, D. S. Sim, K. K. Kwon, and T. H. Kim. 1998. The effects of bioremediation on the oil degradation in oil polluted environments. *In* New Developments in Marine Biotechnology. p.181-188. Plenum Press, New York.

4) Oh, Y.-S, D. S. Sim, and S. J. Kim. 2001. Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. *Marine Pollution Bulletin*. 42(12), 1367-1372.