

## 혐기성 슬러지를 첨가한 오염 토양에서 전자 수용체 조건에 따른 디젤 분해 및 미생물 군집 변화

이태호, 최선열\*, 박태주\*

부산대학교 환경기술개발연구센터, \*부산대학교 환경공학과 (leeth55@pusan.ac.kr)

### <요약문>

Effect of electron accepters on anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons by an anaerobic sludge taken from a sludge digestion tank in a soil artificially contaminated with 10,000 mg/kg soil of diesel fuel was tested. Treatments of soil with 30 mL of the digestion sludge (2,000 mg/L of vss (volatile suspended solids)) were incubated under several anaerobic conditions including nitrate reducing, sulfate reducing, methanogenic, and mixed electron accepters conditions for 120 days. Treatments with the digested sludge showed significant degradation of diesel fuel under all anaerobic conditions compare to control treatments with an autoclaved sludge and without the sludge. The amount of TPH degradation after 120days incubation was the largest in the treatment with the sludge and mixed electron accepters (75% removal of TPH) followed in order by sulfate reducing, nitrate reducing, methanogenic condition as 67%, 53%, 43%, respectively. However, the rate of TPH degradation in the nitrate- and sulfate reducing condition within 105 days were comparable with that of the mixed electron accepters condition. Microorganisms in each electron acceptor condition were plated on solid mediums containing nitrate or sulfate as sole electron acceptor and several nitrate- and sulfate reducing bacteria showed effective degradation of diesel fuel within 30 days incubations. These results suggest that anaerobic degradation of diesel fuel in soil with digested sludge is effective for practical remediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons.

**Keywords:** Soil contamination, diesel fuel, bioaugmentation, anaerobic digestion sludge, electron acceptor condition

### 1. 서론

유류의 사용은 현대 사회에서 아직 필수불가결한 요소로 인식되고 있다. 이에 따른 유류오염의 정도도 심각하다. 유류는 크게 자연적 유입원과 인위적 유입원에 의해 오염되나 대부분의 원인은 해양과 유류저장 시설에서의 누출 사고로 인한 인위적인 오염이다.

오염된 토양의 복원에 대한 미생물 이용은 지금까지 호기성 미생물에 주로 국한되어 왔다(Ghirose and Balkwill, 1983). 그러나 비용절감이나 대부분의 유류 오염 토양이 혐기적 상태에 있음을 고려한다면 혐기성 미생물을 이용한 유류 오염 토양의 복원이 보다 바람직한 것으로 사료된다 (Boopathy,

2004). 특히 1년 이상의 긴 처리기간을 요구하는 혐기성 미생물의 느린 대사 속도를 보완하기 위해 별도의 전자수용체를 주입하거나, 새로운 종을 발견하기 위한 연구가 필요하다 (이태호, 2004).

유류의 분해는 상호작용하는 미생물 군집의 혼합 공동체(mixed consortium)의 결과이기도 하고 (Alexander, 1980), 또한 여러 전자수용체를 개별적으로 이용하는 특정 공동체(specific consortium)의 소산이기도 하다(Aeckerberg et al.,1991). 본 연구는 여러 전자수용체 조건에서 혐기성 소화 슬러지 첨가에 의한 디젤의 분해를 살펴보았다. 또한, 하수처리장에서 발생하는 하수슬러지를, 친환경적으로 재활용함과 더불어 토양 오염 정화 가능성을 검토하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 전자수용체 조건에 따른 혐기성 슬러지첨가 토양에서의 디젤 분해

인위적으로 10,000 mg TPH/kg soil 농도의 디젤로 오염시킨 토양 50g에 S하수 처리장의 소화조 유출 슬러지 30ml를 혼합한 후, 125mL용량의 serum병에 주입하고, 기상을 He가스로 치환하여 밀봉하였다. 전자수용체에 따른 TPH분해를 조사하기 위하여, table 1에 나타낸 바와 같이 6개의 set를 구성하였으며, 각각의 set는 동일하게 처리한 9개의 serum 병으로 이루어졌다. 15일 간격으로 각 set에서 1개의 serum병을 개봉하여 토양 내 TPH농도를 분석하였다.

Table 1. Conditions of soil treatments amended with various electron acceptors

	Treatments	Sludge <sup>a</sup>	Nitrate <sup>b</sup>	Sulfate <sup>c</sup>	Carbonate <sup>d</sup>
Set 1	Control 1 <sup>e</sup>	-	-	-	-
Set 2	Control 2 <sup>f</sup>	+	-	-	-
Set 3	Sulfate reducing condition	+	-	+	-
Set 4	Methanogenic condition	+	-	-	+
Set 5	Nitrate reducing condition	+	+	-	-
Set 6	Mixed condition	+	+	+	+

<sup>a</sup> 30mL of the anaerobic digested sludge was added; <sup>b</sup> 20mM of nitrate was added as form of NaNO<sub>3</sub>; <sup>c</sup> 20mM of sulfate was added as form of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; <sup>d</sup> 20mM of carbonate was added as form of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; <sup>e</sup> Control 1:treatment without the digested sludge; <sup>f</sup> Control 2:autoclaved soil treatment with an autoclaved sludge.

+,added with the sludge or chemicals; -,no addition.

### 2.2. 질산염환원 미생물 및 황산염 환원 미생물 계수

각 전자 수용체 조건에서 120일간 배양된 토양 1g을 9ml의 멸균된 증류수를 이용하여 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 그리고 10<sup>-5</sup>의 농도로 연속 희석하였다. 이후 각 희석액 100 μl를 질산염 환원 평판 배지 및 황 환원 평판 배지에 도말하여 35±1℃에서 배양하였으며, 배양 5일 이후 형성된 미생물 군락을 계수하였다. 혐기성 조건은 Anaerobic kit(BBL GasPak Plus, Becton Dickinson)를 이용하여 조성하였다.

### 2.3. 순수 분리 미생물에 의한 디젤 분해

평판배양법으로 배양된 각각의 미생물종 가운데에서 형태가 다른 10여종의 미생물을 선택하여, 같은 조성의 평판 배지에서 계대배양 함으로써 순수분리 하였다. 최종적으로 순수 분리한 미생물을 단일 탄소원으로 디젤을 첨가한 황 환원 또는 탈질 배지 100ml 내 접종하여 30일간 35℃에서 배양하였다. 배양액내의 TPH 변화는 GC-FID(HP 5890)로 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 전자수용체 조건에 따른 혐기성 슬러지 첨가 토양 내 TPH의 변화

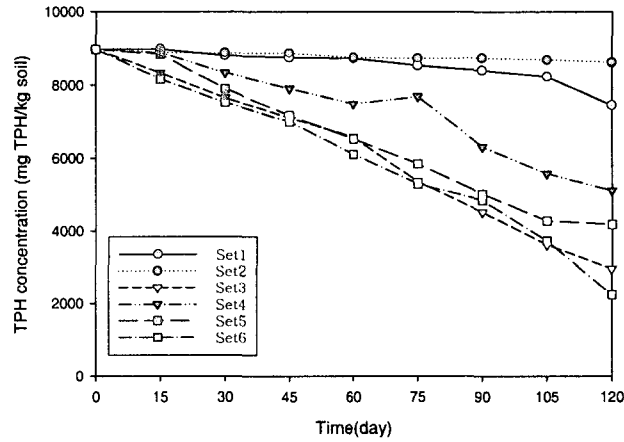


Figure 1. Variation of residual TPH concentration in soil treatments with the digestion sludge under various electron accepters conditions.

여러 전자수용체 조건에 따른 혐기성 슬러지 첨가 토양 내 TPH의 변화를 Fig.1에 나타내었다. 전자수용체를 첨가한 조건에서는 첨가하지 않은 control에 비하여 명확한 TPH분해를 나타내었다. 120일 배양 기간동안 제거된 TPH의 양은 혼합 전자수용체 조건(set6)에서 75%로 가장 많았으며, 다음으로 황 환원 조건(set3)에서 67%, 질산염 환원 조건 (set5)에약 53%, 메탄생성 조건(set4)에서 43%의 순이었다. 그러나, 105일 이전까지의 질산염 환원 조건과 황 환원 조건에서의 TPH분해 속도는 혼합 전자수용체 조건에서의 속도와 대등하였다. 이는 첨가한 전자수용체의 고갈에 기인한 것으로 사료해 볼 수 있으나, 보다 정확한 해석을 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

#### 3.2 전자수용체 조건에 따른 질산염환원 미생물 및 황산염 환원 미생물 수

여러 전자 수용체 조건에서 TPH 분해를 조사한 결과 탈질 미생물과 황 환원 미생물이 유류 분해에 중심적인 역할을 수행하는 것으로 사료되었다. 따라서, 각 전자 수용체 조건 내 존재하는 황 환원 미생물과 탈질 미생물의 수를 조사하였다.

Table 2. The number of bacterial colony on the nitrate- and sulfate-reducing plates

	Colony forming units per gram soil on	
	the nitrate-reducing plate	the sulfate-reducing plate
Set 1	$2.0 \pm 2.0 \times 10^3$	$1.0 \pm 3.0 \times 10^3$
Set 2	$4.0 \pm 3.0 \times 10^3$	$3.0 \pm 2.0 \times 10^3$
Set 3	$2.5 \pm 2.0 \times 10^5$	$5.0 \pm 3.0 \times 10^6$
Set 4	$3.5 \pm 4.0 \times 10^5$	$6.0 \pm 5.0 \times 10^4$
Set 5	$6.0 \pm 2.0 \times 10^6$	$4.5 \pm 1.0 \times 10^4$
Set 6	$4.0 \pm 3.0 \times 10^6$	$3.5 \pm 2.0 \times 10^5$

질산염 환원 배지에서 가장 많은 미생물 수를 보인 것은 예상대로 질산염을 전자 수용체로 첨가한 Set5였고, 황 환원 배지에서는  $5.0 \times 10^6 \pm 3.0$  CFU/g soil로서 황산염을 전자 수용체로 첨가한 Set3에서 가장 많은 미생물 수가 관찰되었다. 혼합 전자수용체 조건에서는 황 환원 배지와 탈질 배지 모두에서 비교적 많은 미생물 개체수를 나타내었으며, 따라서, 혼합 전자수용체 조건에서의 가장 높은 TPH의 분해 효율은 많은 수의 질산염 또는 황산염 환원 미생물의 존재에 기인한 것으로 사료된다. 시간 경과에 따른 이러한 미생물들의 군집변화에 대한 연구를 위하여 PCR-DGGE법에 의한 군집해석을 수행하고 있다.

### 3.3 순수 분리된 질산염환원 미생물 및 황산염 환원 미생물에 의한 디젤 분해

질산염 환원 평판배지와 황 환원 평판배지에서 순수 분리된 미생물들에 의한 디젤 분해를 조사한 결과, 14종의 미생물 가운데 11종의 미생물이 디젤의 분해활성을 나타내었다. 특히, 혼합 전자수용체 조건에서 순수 분리된 질산염 환원 미생물은 높은 디젤분해 활성을 나타내었다. 현재 순수 분리된 미생물의 계통학적 분류를 수행하고 있으며, 순수 분리된 미생물의 이용한 혐기성 디젤오염 토양 복원과 복원 과정에서 첨가한 미생물의 거동을 조사하는 연구를 수행하고자 한다.

## 4. 참고문헌

- 1) Aeckerberg, F., Bak, F., Widdel, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. Arch. microbiol. 16, 5-14
- 2) Alexander, M., (1980). Biodegradation of chemicals of environmental concern. Science 211, 132-133
- 3) Chi M. S. and Young. L. Y. (1999). Isolation and Characterization of a Sulfate-Reducing Bacterium That Anaerobically Degrades Alkanes. Applied and Environmental Microbiology, July 1999, 2969~2976
- 4) Ghiose, W.C., Balkwill, D.L., (1983). Enumeration and morphological characterization of bacteria indigenous to subsurface environments. Dev. Ind. Microbiol. 24, 213-224
- 5) R. Boopathy (2004). Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study. Bioresource Technology 94, 143~151
- 6) 이태호, 박현철, 최선열, 박태주 (2004). 슬러지 식중에 따른 디젤연료에 오염된 토양내 n-alkane 및 isoprenoid의 변화. 지하수토양환경학회 춘계학술대회. p131-134