

# Distribution of viable indigenous bacteria in different size fractions of ozonated soils

안영희, 박은정, 정해룡\*, 최희철\*, 양지원

한국과학기술원 생명화학공학과, \*광주과학기술원 환경공학과  
(e-mail : yahn@kaist.ac.kr)

## <요약문>

This study investigated the effect of ozonation on indigenous microorganisms distributed in different size fractions of soil aggregates. Soil was ozonated from 0 to 300 minutes. The treated soils were fractionated into 3 groups (small, <math><53 \mu\text{m}</math>; medium, 53-500  $\mu\text{m}</math>; and large, 2000-500  $\mu\text{m}</math>) and total heterotrophic bacteria in the soils were enumerated. Cell number decreased rapidly within 120 minute ozonation and showed slow decrease upon longer ozonation. Abundance of total heterotrophic bacteria in each fraction was in the following order regardless of ozonation time: small>medium>large fractions. Difference in microbial abundance among the fractions was smaller as ozonation time increased.$$

**Key word** : ozonation, indigenous microorganism, phenanthrene, hexadecane, diesel

## 1. 서론

오존분자나 오존의 분해산물, 즉 hydroxyl radicals은 유기화합물과 반응하여 산화 시키는 성질이 있으므로 오존처리는 빠른 시간 내에 토양에 있는 석유계탄화수소(petroleum hydrocarbons, PH)와 같은 난분해성 오염물을 제거하는데 효과적이라는 연구 결과들이 많이 보고되었다(1-3). 오존은 가스상이나 액상으로 토양의 포화층만 아니라 불포화층에 있는 오염물도 제거가 가능하며, 수직 또는 수평정에 의해 쉽게 오염지역으로 오존을 전달할 수 있다는 적용상의 이점도 있다. 우리나라의 협소한 국토와 높은 인구 밀도를 고려하면, 오존처리는 국내의 토양 유기오염물을 효과적으로 제거하는 처리기법으로서 관심이 집중되고 있다.

그러나 오존을 발생하기 위해서는 고압의 전기를 사용해야하는 경제적인 단점과 토양내에 존재하는 토착미생물을 사멸시킨다는 생태학적 단점이 있다. 지금까지 오존처리에 의한 토양복원에 대한 대부분의 연구는 오염물의 제거효율에만 치중해왔다(1, 2, 4). 국외적으로 오존 처리된 토양에서의 토착미생물에 대한 보고는 아직 미미한 수준이다(5). PH 분해균들은 유류로 오염된 토양에서 흔히 분리가 되는데(6, 7, 13), 이러한 토양을 오존처리 할 경우 PH뿐만 아니라 PH를 분해하는 토착미생물도 오존처리에

노출된다. 전 연구(6, 7)에 의하면 오존과 그 분해산물의 강한 산화력으로 말미암아 오존처리로 인해 토양오염물의 제거뿐만 아니라 토착미생물에 대한 사멸효과도 큰 것으로 조사되었다. 분자오존이나 그 분해산물(예, OH)은 세포성분(단백질, 핵산, 세포벽성분 등)과 반응하여 빠르게 미생물을 싹살 시키거나 파괴한다고 알려졌다(8, 9).

실제 토양은 크기가 다른 토양입자와 이 입자들의 aggregates로 구성되어 있고, 토양의 입자크기에 따른 SOM, PH, 그리고 토착미생물 분포가 다른 것으로 보고되었다(10, 11). 그래서 본 연구에서는 오염된 토양을 구성하는 다른 크기의 토양 aggregates 에 분포하는 미생물수가 오존 처리에 따라 감소하는 특징을 조사하였다. 오존처리 후 생존하는 미생물 수의 정도로서 오존처리 후에 잔존하는 PH의 생분해에 대한 잠재능을 예측하고자 한다. 이는 궁극적으로 오존처리 후 잔존하는 오염물이 토착미생물에 의해 분해되는 것을 바탕으로 한 오염된 토양의 새로운 복원전략을 위한 기초정보를 제공하기 위한 것이다.

## 2. 본 론

토양시료는 강원도 춘천시의 한 군부대내의 디젤오염지역에서 채취하였다. 그 지역은 근처의 지하저장고로부터 디젤이 누출되어 15년간 오염이 된 곳이었다. core sampler를 이용하여 지표로부터 약 3.5 m지점에서 시료를 채취하였다. 토양은 실온에서 풍건하여 균일하게 혼합한 뒤에 미생물 분석과 오존 처리에 사용하였다. 이 연구에 사용한 토양의 특성은 Soil Science Society of America (12)에 기술된 방법에 따라 실시하였다. 본 연구에 사용된 토양의 특징은 표 1에 나타내었다. 본 연구에 사용한 토양은 65.7% sand, 4.2% silt 그리고 30.1% clay로 구성되었다. 토양 유기물과 물 함량은 각각  $4.0 \pm 0.3$  (w/w)와  $7.8 \pm 0.2$  (w/w)이었다. 토양의 pH는 증류수(1:1, w/v)에서 6.5이었다.

Table 1. Characteristics of soil used in this study.

Parameter	value
Soil organic matter	$4.0 \pm 0.3$ (w/w)
Water content	$7.8 \pm 0.2$ (w/w)
Soil texture	sandy clay loam (sand, 65.7% silt, 4.2%, clay, 30.1%)
pH	6.5
Soil particle density	$2.1 \text{ g/cm}^3$

내경 2.5 cm, 길이 10 cm인 SpectraChrom HPLC 유리 컬럼에 토양을 균일하게 충전하여 토양 컬럼을 만든 후 그림 1에 나타낸 것과 같이 CBCR을 이용하여 오존처리를 실시하였다. 오존농도 30 mg/L를 300 ml/min의 유속으로 토양컬럼하부에서 상부로 연속 주입하였다. 오존의 주입시간은 0, 10, 30, 120, 그리고 300분이었고, 오존 처리 후 토양시료는 질소가스를 30초간 주입하여 잔존 오존을 제거하였다. 일정시간 오존 처리된 토양은 sieving에 의해 토양 aggregate의 크기에 따른 분획을 실시하였고 각 분획의 특징은 그림 2에 나타내었다. 토양내의 토착미생물은 plate count method에 의해 25 oC에서 4일 배양 후 형성된 집락을 계수하여 total heterotrophic bacteria를 계수하였다 (13, 14).

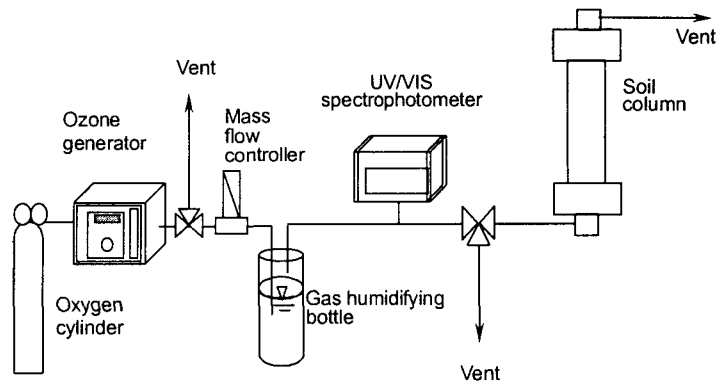


Figure 1. Schematic of the batch column reactor system used to ozonate soil.

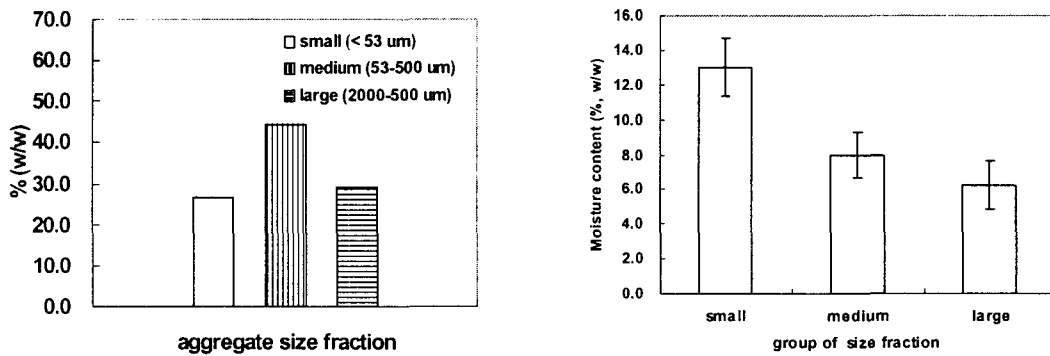


Figure 2. Aggregate size fraction of soil used in this study (left) and moisture content of each fraction (right).

오존 처리된 토양은 sieving에 의해 토양aggregate의 크기에 따른 분획하였는데 크기가 53-500  $\mu\text{m}$ 에 해당하는 medium group이 44.4%(w/w)로 가장 많았고, small(<53  $\mu\text{m}$ )과 large groups(2000-500  $\mu\text{m}$ )은 각각 26.5와 29.1%로 나타났다 (그림 2). 수분함량(% w/w)은 small (13.0  $\pm$  1.7) > medium (8.0  $\pm$  1.3) > large (6.3  $\pm$  1.4) groups 순으로 나타났다. 토양유기물함량도 수분함량과 같은 순으로 나타났다: small, 4.2  $\pm$  0.3; medium, 3.8  $\pm$  0.2; large, 3.7  $\pm$  0.2.

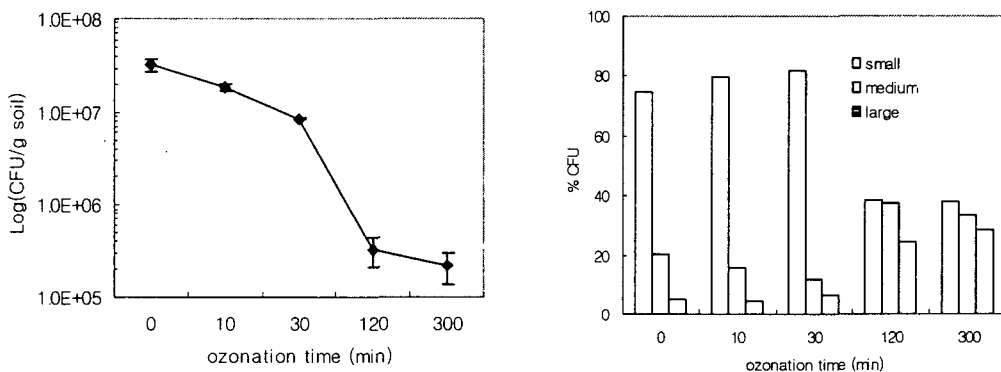


Figure 3. Total heterotrophic bacteria (left) and % CFU in each fraction (right).

그림 3에 오존 주입시간에 따른 total heterotrophic bacteria수가 감소하는 특성을 나타내었다. 120분 오존처리까지 미생물수가 급격히 감소하다가 그 이후론 300분 처리까지 거의 서서히 감소하였다. 오존

처리전후에 total heterotrophic bacteria수는 토양의 small>medium>large fractions 순으로 분포하는 것으로 나타났다. 그러나 각 fraction에 존재하는 미생물의 수는 오존처리 시간이 증가함에 따라 차이가 줄어들었다. Total heterotrophic bacteria는 small fraction에서 오존처리 전에는 74.7%수준으로 가장 많이 존재하다가 오존 주입이 120분이상일 경우는 약 38%를 유지하였다. medium과 large fractions의 경우는 오존처리전에 20.2%와 5.2%의 heterotrophic bacteria수를 각각 유지하다가 오존주입이 120분이상일 경우 small fraction에 존재하는 미생물의 수가 줄어들어 따라 상대적으로 %가 증가하였다. 이는 오존 처리시간이 증가함에 따라 오존 또는 그 분해산물이 토양내의 침투가 증가함에 따른 것으로 사료된다. 오염된 토양을 구성하는 다른 크기의 토양 aggregate에서 석유계탄화수소의 분포와 오존처리에 의한 석유계탄화수소의 감소는 Pressurized solvent extraction 방법을 이용하여 현재 분석 중에 있다.

### 3. 결론

토양 aggregate의 크기에 3 groups으로 분류하였다: small(<53  $\mu\text{m}$ ), medium group (53-500  $\mu\text{m}$ ) 그리고 large groups(2000-500  $\mu\text{m}$ ). 수분함량(% , w/w)은 small ( $13 \pm 1.7$ ) > medium ( $8.0 \pm 1.3$ ) > large ( $6.3 \pm 1.4$ ) groups 순으로 나타났다. 토양유기물함량도 수분함량과 같은 순으로 나타났다: small,  $4.2 \pm 0.3$ ; medium,  $3.8 \pm 0.2$ ; large,  $3.7 \pm 0.2$ . 오존 주입시간에 따라 total heterotrophic bacteria 수가 초기에는 급격히 감소하다가 오존주입시간이 증가함에 따라 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 120분 오존처리까지 미생물수가 급격히 감소하다가 그 이후론 300분 처리까지 거의 서서히 감소하였다. 오존처리전후에 total heterotrophic bacteria수는 토양의 small>medium>large fractions 순으로 분포하는 것으로 나타났다. 그러나 각 fraction에 존재하는 미생물의 수는 오존처리 시간이 증가함에 따라 차이가 줄어들었다.

### 사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호 R08-2003-000-11084-0)와 과학기술부의 국가지정연구실 프로그램(과제번호 M1-0203-00-0001)의 지원으로 수행되었으며, 저자(안영희)는 교육인적자원부의 Brain Korea 21 program 지원에 대해 감사 드립니다. 아울러 토양시료 채취에 도움을 주신 삼성엔지니어링의 김무훈님과 이두명님께 감사 드립니다.

### 참고문헌

- 1) Sung M & Huang CP (2002) Environ. Sci. Technol. 36: 2911-2918
- 2) Stehr J, Muller T, Svensson K, Kamnerdpetch C & Scheper T (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 803-809.
- 3) Choi H, Lim HN, Kim J, Hwang TM & Kang JW (2002) J. Contam.Hydrol. 57: 81-98
- 4) Lim HN, Choi H, Hwang TM & Kang JW (2002) Characterization of ozone decomposition in a soil slurry: kinetics and mechanism. Water Res. 36: 219-229
- 5) Lute JR, Skladany GJ & Nelson CH (1998) Evaluating the effectiveness of ozonation and combined ozonation/bioremediation technologies. In: Wickramanayake GB, Hincbee RE (Eds) Designing and

applying treatment technologies: remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle Press, Columbus, Ohio

- 6) 정해룡, 안영희, 김인수, 최희철(2002). 디젤 오염토양에서 화학적 산화에 의한 PAH분해특성 및 PAH 분해미생물의 거동. 지하수토양환경학회 춘계학술대회. p22-25.
- 7) 안영희, 정해룡, R. Tatavarty, 김인수, 최희철 (2003). Monitoring of petroleum hydrocarbon degradative potential of indigenous microorganisms in ozonated soil. 한국 지하수토양환경학회 추계 학술발표회. 2003년 9월 26-27일 제주대학교. p152-157.
- 8) Ahn Y, Sanseverino J & Sayler GS (1999) Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. Biodegradation 10: 149-157
- 9) Kowalski WJ, Bahnfleth WP & Whittam TS (1998) Bactericidal effects of high airborne concentrations of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Ozone Sci. Eng. 20: 205-221
- 10) Khadre MA, Yousef AE & Kim J-G(2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. J. Food Sci. 66: 1242-1253
- 11) Amellal N, portal J-M, Vogel T & Bertherlin J (2001). Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within soil aggregates. Biodegradation. 12: 49-57
- 12) Kukkonen J & Landrum PF (1996). Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. Chemosphere. 32: 1063-1076.
- 13) Soil Science Society of America (1986) Part 1, physical and mineralogical methods. In: Klute A (Ed) Methods of soil analysis, 2nd ed. Soil Science Society of America, Inc. Publisher. Madison, Wisconsin.
- 14) Ripp S, Nivens DE, Ahn Y, Werner C, Jarrell IV J, Easter JP, Cox CD, Burlage R & Sayler GS (2000) Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. Environ. Sci. Technol. 34: 846-853