

## 경유오염 토양의 생물정화공정에 대한 영양인자의 영향 분석

노상철·<sup>1</sup>이철효·<sup>†</sup>장덕진

명지대학교 환경생물공학전공 및 청정기술원, <sup>1</sup>삼성물산건설기술연구소  
(접수 : 1999. 7. 9., 게재승인 : 1999. 8. 4.)

### Nutritional Factors Affecting Efficiency of a Bioremediation Process for Diesel-Contaminated Soil

Sangchul Rho, Cheol-Hyo Lee<sup>1</sup>, and Deokjin Jahng<sup>†</sup>

Department of Environmental Engineering and Biotechnology and Research Institute for Clean Technology,  
Myongji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea

<sup>1</sup>Environmental R&D Team, Institute of Technology, Engineering & Construction Group, Samsung Corporation,  
Yongin, Kyonggi 449-900, Korea

(Received : 1999. 7. 9., Accepted : 1999. 8. 4.)

In order to analyze nutritional factors affecting in situ bioremediation of diesel-contaminated soil, diesel degradation and cell viability were studied by varying nutritional conditions. In column experiments packed with diesel-contaminated soil, nitrogen was found to be the major limiting nutrient. When nitrogen was added to soil at four different levels of C : N (100 : 5, 100 : 10, 100 : 15, and 100 : 20 mg N/kg dry soil), the greatest stimulation of microbial activity occurred at the lowest, rather than the highest nitrogen addition. However, no significant effects was observed when phosphorus and air were added. No matter how the incubation mode varied, less than 50% of the diesel was remained after 7 days of treatment, presumably because the residual hydrocarbons were adsorbed on soil particles, adsorption

Key Words : bioremediation, diesel, nutrient, aeration, adsorption

## 서론

토양오염은 대기오염이나 수질오염에 비하여 확산속도는 비교적 작으나 인근지역에 미치는 영향은 매우 지속적이며, 많은 경우, 지하수 오염과 연계되어 예상보다 광범위한 지역에 영향을 미칠 수 있다. 토양오염의 원인이 되는 물질은 매우 다양하나, 국내의 경우, 주유소와 석유정제 공장지역 토양의 유류 오염이 심각한 문제로 인식되어지고 있다(1). 일반적으로 유류는 원유 또는 정제된 석유제품들의 형태로 생산, 운반, 저장되는 과정에서 자연환경에 유출되어진다. 원유에 포함된 성분은 매우 다양하여 몇 가지 카테고리에 의해 물질의 종류를 구분하기는 어려우며, 연료유를 취급하는 주유소에 관심의 범위를 축소한다 하더라도 토양에 오염된 물질은 극도로 다양하다. 연료유는 원유의 증류에 의해 얻어지며 그 성상과 용도에 따라 흔히 휘발유(gasoline), 등유(coal oil), 경유(diesel fuel oil), 중유(fuel oil)로 구분하며, 주유소 토양은 가장 많이 취급되는 휘발유와 경유에 의해 오염되었을 가능성이 매우 높은 것으로 사료되며, 특히

휘발성이 휘발유에 비하여 낮은 경유의 오염이 토양오염의 주 원인물질일 것으로 추정된다.

경유는 일반적으로 비점 190~350℃, 비중 0.82~0.84 정도인 탄수소가 15~30의 긴 사슬 탄화수소 혼합물이며 국내의 주유소에서 판매되고 있는 경유를 구성하고 있는 탄화수소는 포화탄화수소 74~79%(w/w), 불포화탄화수소 0.6~1.5%, 방향족탄화수소 19~24%의 조성을 갖고 있다(2). 이러한 조성에서 나타나듯이, 경유는 가솔린에 비해 휘발성이 낮고 비중 및 점도가 큰 물질이기 때문에 토양 내에서의 이동성이 작은 편이며, 친수성 및 물에 대한 용해도가 낮아 기존 물리화학적인 처리방법으로는 토양입자로부터의 제거가 용이하지 않다. 그러나 최근 들어 연구되고 있는 유류로 오염된 토양의 생물학적 처리는 기존의 물리화학적 방법과는 달리 토양 내 경유를 분해하여 광물화하기 때문에 2차처리에 소요되는 비용과 오염을 줄일 수 있어 국내에서 활발히 연구되고 있다(3).

토양에 오염된 경유의 생물학적 처리에서와 같이 환경에 오염된 유해물질을 미생물을 이용하여 제거하는 기술을 생물정화기술(bioremediation)이라 하며(3), 현장처리 bioremediation 기술 중 분해담당 미생물의 외부공급 여부에 따라 biostimulation(영양분 및 전자수용체의 공급)(4)과 bioaugmentation(외부 미생물의 공급)(5)으로 분류할 수 있다. 일반적으로 biostimulation은 영양염류와 산소를 공급하여 오염 토양 내 상주하는 토착미생물의 활성을 증가시키는 것으로 외부 미생물의 유입에 따른 환경

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Myongji University, San 38-2, Nam-dong, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea.  
Tel : 0335-330-6340, Fax : 0335-337-2902  
e-mail : djahng@wh.myongji.ac.kr

변화 요인이 없는 장점이 있으나 bioaugmentation에 비하여 처리 시간이 길며 이에 소요되는 소모비용도 대체로 높다. 반면에 bioaugmentation은 유류분해능을 가진 미생물을 직접 현장에 접종함으로써 처리 시간을 단축시킬 수 있다는 장점이 있으나 외부 미생물의 현장 적용에 따라 처리의 성패가 결정되어지게 되는 문제점을 내포하고 있다.

생물정화기술을 이용한 실험 결과는 국내외적으로 매우 다양하게 보고되고 있다. 서 등은(6) 영양염류의 공급과 통기를 통하여 토착미생물의 활성을 증가시켜 16주 후 8~20%의 경유만이 잔류하였다고 보고하였으나, Loser 등(7)의 연구에서는 충분한 영양염류와 산소를 공급함에도 불구하고 단지 50%의 경유만이 분해되었다고 보고하였다. 또한 Margesin과 Schinner는(8, 9) biostimulation과 bioaugmentation을 비교 연구하였으며 biostimulation시 bioaugmentation에 비하여 유류분해능이 우수하다고 보고하였다. 반면에 Lestan(10)은 곰팡이류(fungus)를 접종한 bioaugmentation에서 토착미생물보다 우수한 분해율을 나타냄을 보고하였다. 이처럼 다양한 결과가 얻어지는 것은 오염현장의 환경조건과 토착미생물의 특성, 그리고 bioaugmentation시 접종하는 외부 미생물의 종류가 광범위하고 다양하기 때문인 것으로 사료된다.

본 연구에서는 bioaugmentation을 이용한 토양 정화 시 경유 분해능과 균체의 활성에 미치는 영양염류(질소원, 인원)와 통기(aeration rate)의 영향을 조사 분석하기 위하여 토양 컬럼을 제작하였으며, 본 연구결과를 통하여 영양염류와 산소 외에 유류 분해미생물의 탄소원으로 이용되는 hydrocarbon의 토양 흡착으로 인한 유효 탄소원의 부족이 미생물의 개체수와 유류분해에 크게 영향을 미칠 수 있음을 보였다.

**재료 및 방법**

**균주 및 배양배지**

본 연구에서는 명지대학교 생명과학과 정병철 교수를 통하여 한국해양연구소 고성환 박사로부터 입수한 *Yarrowia lipolytica* CL180(11)을 경유(diesel) 분해균주로 사용하였다. 이 균주의 배양시, 단순한 균체 배양을 위해서는 복합배지인 LB를 사용하였고, 액체배지에서의 경유 분해거동을 측정하기 위해서는 탄소원으로 경유가 첨가된 최소배지를 사용하였다. LB의 조성은 Bacto tryptone 10 gm/L, Bacto yeast extract 5 gm/L, NaCl 10 gm/L 이며, 121°C에서 20분간 가압 멸균하여 사용하였다.

경유분해 실험 시 사용한 최소배지는 MPN으로 명명하였으며, 이 배지에는 NH<sub>4</sub>Cl 0.5 gm/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.89 gm/L 와 trace element solution 250 μL가 함유되어 있으며, 121°C에서 20분간 가압 멸균하여 사용하였다. Trace element solution의 조성은 Table 1과 같으며, 이 배지에 경유를 5~20 g/L 첨가하였다.

Table 1. Concentrations of trace element solution for the MPN medium.

CoCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	67.7 mg/L	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.244 g/L
EDTA	3.72 g/L	ZnCl <sub>2</sub>	151 mg/L
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.13 g/L	CuCl <sub>2</sub>	345.9 μg/L

**배양조건**

*Y. lipolytica* CL180의 고체 배양시에는 LB agar(1.5%, w/v)를 사용하여 25°C에서 30시간 동안 배양하였다. 균체확보를 위한 액체배양의 경우, 20~50 mL의 LB가 담긴 100 mL과 250 mL 삼각 플라스크를 사용하여, 진탕배양기(한국종합기기, HK-S125C)에서 25°C, 150 rpm을 유지하였다.

경유분해 거동을 파악하기 위한 액체배양실험에서는 앞서 언급한 바와 같이 경유가 함유된 MPN 최소배지를 사용했으며, 경유의 휘발로 인하여 발생하는 실험 오차를 최소화하기 위하여 테프론 마개를 사용하여 삼각 플라스크의 입구를 막았다. 이때 플라스크 내 액체배지의 부피를 조절하여 headspace를 충분히 확보함으로써 균체 성장에 필요한 산소가 부족하지 않도록 하였다. 한편 배지내 균체농도를 관찰하기 위해서는 UV-Vis spectrophotometer(영우과학, SMART plus 3255)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

**액체배지에서의 *Y. lipolytica* CL180의 경유분해**

*Y. lipolytica* CL180 균주의 성장 특성을 파악하기 위하여 250 mL 삼각 플라스크에 LB 배지 50 mL를 주입한 후, 25°C에서 30시간 동안 고체배양한 *Y. lipolytica* CL180의 단일 콜로니를 접종하였다. 균의 성장은 흡광도(ABS<sub>600</sub>)로 측정하였으며, *Y. lipolytica* CL180의 경유분해도와 아울러 유화도를 측정하였다.

먼저 100 mL의 삼각 플라스크 30개를 준비하여 10개씩 세 그룹으로 나누었다. 첫 번째 그룹은 균주가 주입되지 않은 대조군으로서, 각각의 플라스크에 10 mL의 MPN 배지를 넣은 후, 경유 0.05 mL[0.5%(v/v)]를 첨가하였다. 다른 두 그룹은 동일한 조건으로 9시간 동안 진탕배양한 *Y. lipolytica* CL180 균주(ABS<sub>600</sub> 3.65) 배양액 1%(v/v)를 접종하였다. 이 두 그룹 중 한 그룹은 GC(gas chromatography) 분석용으로 사용하였고, 나머지 한 그룹은 균주의 건조중량 측정을 위해 사용하였다. 이 플라스크를 25°C, 150 rpm으로 진탕배양기에서 배양하였다. 잔류 경유량의 측정은 일정시간 간격으로 배양 중인 각각의 플라스크내의 배양액 전체를 분액여두에 옮긴 후 핵산 25 mL를 첨가하고 15분간 교반하여 경유를 추출하였다. 그 후 핵산층과 수층을 분리한 후, 1 μL의 핵산층을 microsyringe로 취하여 GC(HP 6890 plus, Hewlett Packard)를 이용하여 경유량을 분석하였다. 이때 분석을 위해 사용한 detector는 FID(flame ionization detector)였으며, column은 HP-1(Hewlett Packard)을 사용하였다. Carrier gas는 He(0.8 mL/min)를 사용하였고 FID에 주입된 수소와 공기의 flow rate는 각각 40 mL/min, 400 mL/min 이었다. Injector와 detector의 온도는 각각 250°C, 300°C를 유지하였고, 컬럼의 온도는 40°C에서 15분간 유지시킨 후, 분당 15°C의 속도로 290°C까지 승온시킨 후 15분간 유지시켰다. 얻어진 결과는 HP Chamstation v6.01을 이용하여 분석하였다.

유화도의 측정은 한국해양연구소(11)의 측정법을 변형하여 사용하였다. 먼저 배양액을 1 mL 취한 후 원심분리(10,000 g, 15 min)하여 기름층과 균층을 분리, 제거하고, 상등액을 0.25 mL를 취한 후 0.2 μm filter(Nalge Nunc International)로 여과하였다. 여과액 0.25 mL에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1.25 mL를 첨가한 후, 이 액에 n-hexadecane 0.05 mL를 첨가한 후 1분간 강하게 교반하였다. 이 용액을 10분간 정치시

킨 후 수층에 유화되어 있는 n-haxadecane을 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

경유의 오염농도가 *Y. lipolytica* CL180의 경유분해능과 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 경유농도를 각각 0.5%(v/v), 1%, 2%가 되게 한 후 각각 액체 배양하였다. 각 농도에 따른 실험을 하기 위하여 250 mL 삼각 플라스크에 MPN 최소배지 20 mL를 분주하고, 세 그룹의 플라스크에 0.5%, 1%, 2%의 경유를 각각 주입하여 인위적으로 오염을 시킨 후, 모든 플라스크에 25시간 동안 배양한 균주 1 mL(ABS<sub>600</sub> 2.06)를 접종하였으며, 이를 25°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 잔류경유량의 측정 및 분석은 이전의 실험과 동일한 조건으로 FID 검출기를 장착한 GC를 이용하여 분석하였다.

**토양시료 채취 및 분석**

본 실험에서 사용한 토양은 경기도 용인시 명지대학교 야산 50 cm 깊이에서 채취하였으며 내경 1.19 mm sieve를 이용하여 고르게 체를 쳤다. 토양의 특성을 알기 위하여 수분함유량, 총유기물 함량, 수분보유능(water holding capacity, WHC), 그리고 pH를 측정하였다. pH와 토양의 수분함유량은 EPA method 3550법을 이용하였으며(12, 13), 총유기물 함량의 측정은 다음과 같이 하였다. 토양시료에 함유된 수분을 제거하기 위하여 건조기에서 105°C로 밤새 건조시킨 후, 30분동안 데시케이터에서 방냉시켰다. 이 토양시료의 무게를 정확히 잰 후 도가니에 넣고 뚜껑과 같이 무게를 측정하였다. 시료가 들어있는 도가니를 로(Pillip, High temp muffle furnaces)에 넣은 후 500°C로 가열하였다. 매 두 시간 간격으로 도가니를 꺼내어 데시케이터에서 방냉시킨 후 무게를 측정하였다. 이 도가니를 다시 로에 넣은 후 위의 과정을 반복하여 무게의 변화가 없을 때까지 실행하였다. 수분보유능(water holding capacity, WHC)은 Kusel의 방법(14)을 이용하여 측정하였다.

**토양컬럼 실험**

토양에서 균주의 경유분해 실험을 하기 위하여 토양 microcosm column을 제작하였다(Figure 1). 이 토양컬럼은 Widrig의 연구를 참고하였으며(15, 16), 주문 제작한 토양컬럼(조일과학)의 크기는 내경 15 cm, 높이 30 cm의 원통형 컬럼으로 총 부피는 5301 cm<sup>3</sup>이었으며, aeration이 경유분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 컬럼 하단 부분에 실리콘 튜브를 부착할 수 있도록 스테인리스 밸브를 장착하였다. 컬럼의 재질은 아크릴이었다.

*Y. lipolytica* CL180의 질소원이 경유분해능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 질소원으로 NH<sub>4</sub>Cl을 주입하였다. 또한 질소원의 농도에 따른 영향을 비교하기 위하여 C : N의 비(w/w)를 각각 100 : 5, 100 : 10, 100 : 15, 그리고 100 : 20으로 변화시켜 실험하였다.

연구에 사용된 모든 토양은 먼저 1.19 mm 체로 친 다음 2000 mL 비커에 넣고 autoclave에서 121°C, 30분간 3번 반복하여 가압멸균하여 토양 내에 존재하는 내부 미생물을 사멸시켰다. 멸균된 토양을 건조기에서 105°C로 밤새 건조한 후, 다음날 데시케이터에서 방냉시켰다. 본 연구에서는 3kg의 멸균건조시킨 토양을 높이 15cm, 부피 2650cm<sup>3</sup>이 되도록 컬럼에 채워 실험하였으며, 경유농도가 0.5%(w/w)가 되도록 15 g의 경유를 주

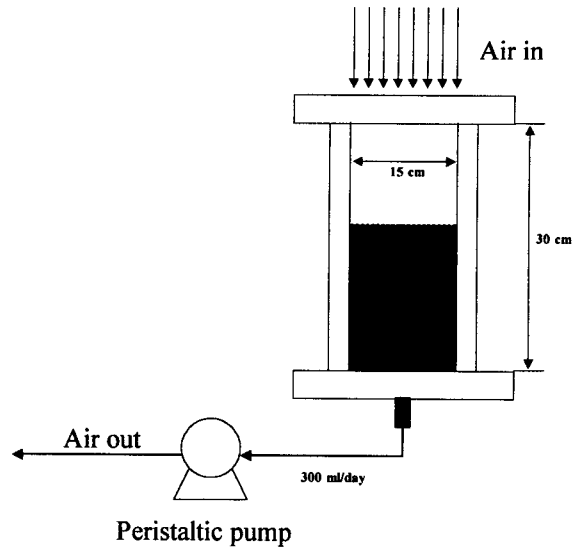


Figure 1. A schematic diagram of the soil column equipped with an aeration pump.

사기로 고르게 주입하였고 경유가 토양 전체에 고르게 퍼지게 하기 위하여 20분간 고르게 혼합하여 주었다. 실험에 사용한 균주는 27시간 동안 LB배지에서 진탕배양한 *Y. lipolytica* CL180 배양액 50 mL를 원심분리(4000 rpm, 20min)한 후 토양 수분보유능의 40%(0.206 mL/g soil)가 되도록 증류수로 현탁하여 각각의 컬럼에 고르게 접종하였다.

이러한 경유분해에 미치는 영향은 토양 컬럼에 C : P의 비가 100 : 1이 되도록 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 첨가하여 실험하였다. 또한 이전 실험에서 얻어진 결과를 기초로 하여, C : N의 비를 100 : 5로 고정된 후, C : P의 비를 각각 100 : 0.5, 100 : 1, 100 : 2, 그리고 100 : 5 로 하여 인원의 농도에 따른 경유분해능을 조사하였다.

또한 균체량이 경유분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 집중 균체량을 변화시키기 위하여, C : N : P를 100 : 5 : 1로 투여한 토양에, 33.25 mg dry cell/kg dry soil, 66.50 mg dry cell/kg dry soil, 99.75 mg dry cell/kg dry soil에 해당하는 균체를 각 토양컬럼에 접종하였다.

통기가 경유분해에 미치는 영향은 하단에 설치된 peristaltic pump를 이용하여 공기가 컬럼 상단을 통하여 공기가 유입되도록 하였다. 먼저 통기 시와 통기를 하지 않았을 때의 경유분해능을 조사하였으며, 각 컬럼의 aeration rate는 각각 900 mL/day, 1800 mL/day, 그리고 3000 mL/day로 변화시켜 aeration rate에 따른 경유분해능과 미생물의 균체수의 변화를 조사하였다.

**토양시료의 경유추출 및 잔류량 측정**

토양시료의 경유추출은 EPA method 3550 Sonication 추출법을 변형하여 사용하였다(12, 13). 일반적으로 토양 내 함유된 유류의 분석은 soxhlet장치로 유류를 추출한 후 GC를 이용하여 분석하거나 sonication법을 이용하여 분석을 한다. Soxhlet을 이용한 방법은(17) sonication을 이용한 방법에 비해 재현성이 우수한 장점이 있으나 추출하는데 장시간을 요구하며 미량의 유류 추출시 과량의 용매 사용으로 농도가 심하게 희석되어 GC 분석

시 분석이 용이치 않은 경우가 발생하는 단점이 있다. 반면에 sonication을 이용한 방법은 재현성은 다소 떨어지나 신속하게 유류를 추출할 수 있으며 소량의 용매 사용으로도 추출이 가능하다는 장점이 있다. 본 실험에서는 위의 사항들을 고려하여 신속하고 비교적 적은 양의 용매로도 추출이 가능한 sonication 추출법을 변형하여 사용하였다.

Sonication 추출법은 시료 중에 함유된 유기물의 예상농도에 따라 두 가지 방법이 있다. 낮은 농도시료의 시험법은 개별 유기 화합물 농도 20 mg/kg 이하일 때 시행하고 높은 농도시료의 시험법은 개별 유기 화합물 농도 20 mg/kg 이상일 때 시행하는데, 본 실험은 5000 mg/kg soil의 경우로 오염되어 있으므로 높은 농도시료 시험법을 사용하였다.

먼저 컬럼 내에 있는 토양을 soil sampler를 이용하여 깊이 7 cm 지점에서 2 g의 토양을 채취하여 20 mL의 바이얼에 옮긴 후, 시료에 함유된 수분을 제거하기 위하여 2 g의 무수 황산나트륨과 추출 용매인 헥산 5 mL를 가한 후 헥산이 휘발되지 않게 하기 위하여 테프론 마개로 밀봉하였다. 그 후 시료가 담긴 바이얼을 교반기로 2분간 잘 혼합하여 주었다. 위의 과정을 거친 바이얼을 Ultrasonic sonicator(IKASONIC, U50)를 이용하여 3분동안 sonication( $460 \text{ W/cm}^2$ ) 시켰다. 이 과정을 세 번 반복한 후 시료 1 mL를 채취하여 원심분리 튜브에 넣고 10분 동안 원심분리(10000 rpm, HANIL micro-12)하였다. 시료분석에 함유된 잔류경유량은 gas chromatography를 이용하여 분석하였으며 10  $\mu\text{L}$  실린지(Hewlett Packard)를 사용하여 헥산층 1  $\mu\text{L}$ 를 주입하였다.

#### 잔류 암모니아의 분석

질소원으로 공급하여 준  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 의 감소양상은 Standard Method의 Ammonia-selective electrode법으로 분석하였다(18). 토양시료 5 g을 바이얼에 넣은 후 100mL의 3차 증류수를 첨가하였다. 이 바이얼을 5분간 강하게 교반 시킨 후 20분 동안 sonication하였다. 이것을 GF/C 유리섬유여과지(Whatman)로 여과한 후 상등액 50mL를 추출하여 100mL 비커에 옮기고 Ammonia pH adjusting ISA 용액 1mL를 첨가하였다. 강염기(pH11~13)에서 전환된 암모니아 이온의 양을 Ammonia electrode(ORION, Model 95-12)를 이용하여 분석하였다. 이때 검량선은 매 실험 때마다 암모니아 표준용액(0.1M)을 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 유류분해 균주의 특성

*Yarrowia lipolytica* CL180을 LB 배지에서  $25^\circ\text{C}$ , 150 rpm으로 진탕배양하면서 균주의 특성을 조사하였다. 배양한지 16시간 만에 균주가 성장하기 시작했으며, 최대 비성장속도( $\mu_{\text{max}}$ )는  $0.45 \text{ hr}^{-1}$ 로 비교적 빠른 성장 속도를 나타내었다. 균주의 외적 특징은 LB agar plate에서 콜로니의 크기가 매우 크고 아이보리색을 띄며 콜로니 중심에 돌출된 부분이 있는 것이 특징이며 효모인 관계로 광학현미경 400배 상에서도 매우 크게(지름3~4 mm) 관찰되었다. Desai 등의(19) 연구에 의하면 *lipolytica* 종은 liposan이라는 biosurfactant를 생산하는 것으로 알려져 있으며, liposan은 세포의 수용성 유화제로서 83%의 탄수화물과

Table 2. Growth of *Y. lipolytica* CL180 on various carbon sources added to the MPN minimal medium.

Carbon sources	Growth	ABS <sub>600</sub> at 20 hrs
Glucose (10g/L)	○	0.820
Sucrose ( " )	○	0.041
Glycerol ( " )	○	0.021
Methanol ( " )	×	0.000
Manitol ( " )	○	0.360

17%의 단백질로 구성되어있다고 보고되었다. 그밖에 다양한 탄소원에 대하여 *Y. lipolytica* CL180 균주의 성장을 확인해 본 결과, *Y. lipolytica* CL180은 경유 외에도 다양한 탄소원 하에서 성장할 수 있었다(Table 2).

#### 액체배양을 통한 경유분해실험

*Y. lipolytica* CL180은 액체배양실험에서 매우 높은 경유 분해율을 보였다. Figure 2에서 보는 바와 같이, 배양한지 40시간 경과하였을 때 최초 주입된 경유의 50%가 분해됨을 확인 할 수 있었고 70시간 경과하였을 때 5% 정도의 잔류량을 나타내었다.

또한 *Y. lipolytica* CL180을 이용한 경유분해 실험 시 균주에서 분비되는 유화제의 유화도(emulsifying activity)를 간접적으로 측정된 결과(Figure 3), 유화도는 균주의 대수성장기에서 가장 높은 활성을 나타내었고 사멸기에서 그 활성이 감소함을 나타내었다. 이로 비추어 *Y. lipolytica* CL180 균주의 유화제의 활성과 분비는 균의 성장과 활성에 직접적인 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 또한 대수성장기에서 경유분해가 가장 활발히 일어날 수 있음을 유화도로부터 간접적으로 확인 할 수 있었다.

#### 경유 농도에 따른 *Y. lipolytica* CL180의 경유분해 거동

*Y. lipolytica* CL180 균주의 경유분해 특성을 알아보기 위하여 플라스크 내 경유농도가 0.5%(v/v), 1%, 2%가 되도록 조절하였다. Figure 4에 나타난 바와 같이, 경유 농도가 0.5%일 때 가장 높은 분해율을(95%) 나타내었으며 경유가 1% 함유되었을

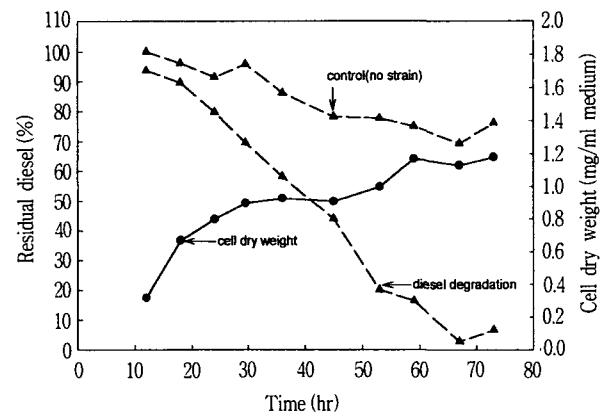


Figure 2. Diesel degradation by *Y. lipolytica* CL180 in the minimal MPN medium in batch flasks.

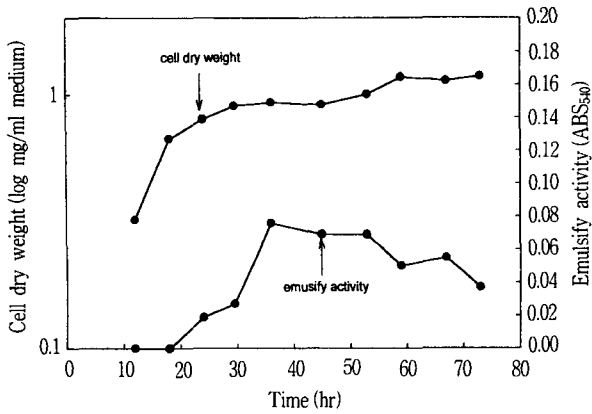


Figure 3. Emulsifying activity observed during *Y. lipolytica* CL180 cultivation.

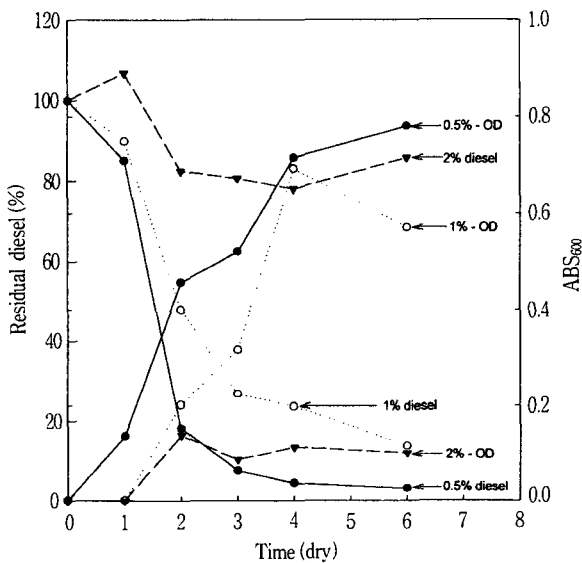


Figure 4. Effects of diesel concentrations on the cell growth and substrate degradation by *Y. lipolytica* CL180 in liquid flask cultures. Solid and broken line represent residual diesel and cell growth( $A_{600}$ ), respectively.

때에는 0.5%의 분해양상과 비슷하나 다소 낮은 분해율을(82%) 나타내었다. 그러나 경유가 2% 함유된 액체배양에서는 전혀 분해가 이루어지지 않았으며 균주 또한 성장하지 않았다. 서 등의 (6) 연구에 의하면 오염토양에 경유를 첨가하였을 때 미생물 군집의 증가가 최고 10 내지 100배 가량 증가한다고 보고하였으나, 오히려 본 연구 결과에서는 경유의 농도가 높을 때 균주가 거의 성장하지 못하였으며 분해 또한 이루어지지 않았다. 이는 비록 경유가 기질로서 *Y. lipolytica* CL180 균주의 탄소원으로 이용되더라도 그 양이 한계 농도를 초과하면 경유가 가지고 있는 독성으로 인하여 균주의 생장에 저해를 일으킬 수 있다고 사료된다.

**토양겔럼에서의 경유 분해**

본 연구에 사용된 토양은 총유기물량 3.39%(w/v), 수분보유능(WHC) 0.514 g H<sub>2</sub>O/g soil, 수분함유량 0.056~0.121 g H<sub>2</sub>O/g soil, pH 6.05를 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용한

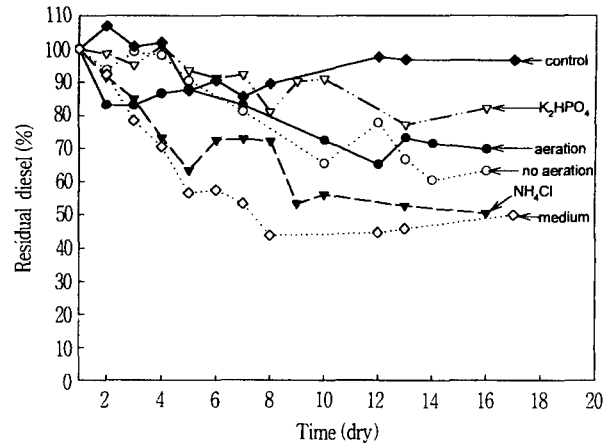


Figure 5. Effects of nitrogen, phosphorus, and aeration on the diesel degradation in soil by *Y. lipolytica* CL180.

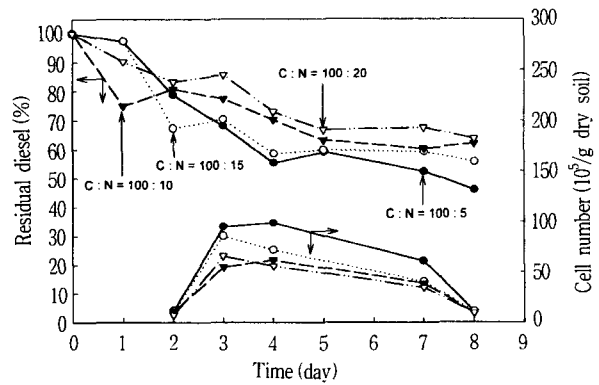


Figure 6. Effect of ammonium chloride concentrations added into soil on proliferation of *Y. lipolytica* CL180.

토양은 SP(Poorly Graded Sand)등급의 토양으로서 국내 야산에서 흔히 발견되는 토양으로 확인되었다.

*Y. lipolytica* CL180 균주의 토양 내 경유 분해 시 작용하는 limiting factor를 조사하기 위하여 질소원만 함유한 겔럼, 인원만 함유한 겔럼, 질소원과 인원 그리고 trace solution을 첨가한 겔럼, 마지막으로 통기를 시킨 겔럼을 제조한 후 실험하였다. Figure 5에 나타난 바와 같이 질소원이 첨가된 겔럼에서는 10일이 경과한 후 약 50%의 경유분해가 이루어진 것에 비해 인원만 첨가한 겔럼과 통기를 시켜준 겔럼에서는 경유분해가 거의 이루어지지 않았다. 이러한 결과로 비추어 본 연구에서 bioremediation에 미치는 limiting factor는 질소원임을 확인할 수 있었다. 그러나 Figure 6에서 나타난 바와 같이 질소원의 농도를 다양하게 접종하여 실험한 결과 질소원이 가장 소량 접종된 경우(C : N = 100 : 5) 경유분해율이 가장 높았다. 이러한 연구 결과는 Braddock 등의(20) 연구결과에서도 동일하게 보고되어 있는데 이는 질소원으로 첨가한 NH<sub>4</sub>Cl이 기질로서 이용되었거나 그 양이 다량으로 유입될 때는 암모니아의 독성으로 인하여 미생물의 활성이 저해되는 것으로 추정된다. Bioremediation시 공급하여 주는 C : N의 비는 각 문헌마다 다양하게 보고되고 있다. 그 예로 U.S. Environmental Protection Agency는(21) petroleum compound의 bioremediation을 위한 C : N의 비를 10 : 1~100 : 1로 요구하고 있으며, Bradford 등의(22) 연

구에서는 최적 C : N비를 100 : 5가 적합하다고 보고하였다. 또한 Margesin 등은 C : N의 비가 100 : 10이 가장 적합하다고 보고하였다(8). 이와 같이 각 문헌마다 다양한 범위의 C : N비를 보고하고 있으며 이러한 다양성은 토양의 특성과 분해 미생물의 종류에 기인한다고 사료된다. 본 연구에서는 다양한 비율로 실험한 결과 C : N의 비가 100 : 5일 때 가장 우수한 분해율과 균체수를 나타내었다(Figure 6). 이와 같은 결과에 따라 C : N의 비를 100 : 5로 고정시킨 후 인의 농도를 다르게 하여 실험하였으나 인원의 농도에 따른 경유분해도는 거의 차이가 없었다. 이때의 경유잔류량은 50% 내외로 4~5일이 경과한 후에는 거의 변화가 발생하지 않았으며 시간에 따라 균체량 또한 급격히 감소하였다. 따라서 산소의 부족으로 인하여 균체수가 감소한 것으로 사료되어 통기에 따른 경유의 분해정도를 실험하였다. 이때 aeration rate는 peristaltic pump를 이용하여 조절하였으며, 공기가 컬럼 상단에서 하단으로 유입되도록 설치하였다(Figure 1). Widrig(15, 16)의 경우 토양 컬럼의 공기 주입을 하단에서 상단으로 하였으나 이와 같이 공기를 공급할 경우 토양 컬럼의 크기가 커질수록 토양 전체로 공기가 고르게 확산되지 않는 단점이 있다. 그러므로 본 실험에서는 peristaltic pump를 컬럼 하단에 설치하여 공기가 상단에서 하단으로 공급되어 토양 전체에 고르게 퍼지도록 하였다. 공기가 공급되는 지 여부를 확인하기 위하여 컬럼 상단에 랩으로 싼 후 랩이 흡입되는지 여부를 확인하였으며 flow meter를 이용하여 aeration rate를 측정하였다. 그러나 실험결과, 통기를 하지 않은 컬럼과 분해양상이 거의 동일하게 나타났으며 aeration rate를 다르게 한 실험에서도(800 mL/day, 1800 mL/day, 3000 mL/day) 유사한 결과가 나타났(Figure 7). 이는 산소가 경유분해의 limiting factor로 작용하고 있지 않음을 설명하며 토양 내에 미생물이 성장하기 위해 필요한 산소가 충분히 공급되고 있음을 추정할 수 있었다.

균체량에 대한 경유분해 양상은 Figure 8과 같은 경향을 나타내었다. 균체량을 다르게 접종하여(33.25, 66.50, 99.75 mg dry cell/kg dry soil) 실험하였으나 8일 경과 후 약 50~60%의 분해율을 보여 이전의 결과와 유사한 경유잔류량을 나타내었다. 또한 균체수의 변화도 5일 경과 후부터 비슷한 개체수로 감소하였다(Figure 8). 최초 접종 균체량을 증가시키면 경유분해도 또

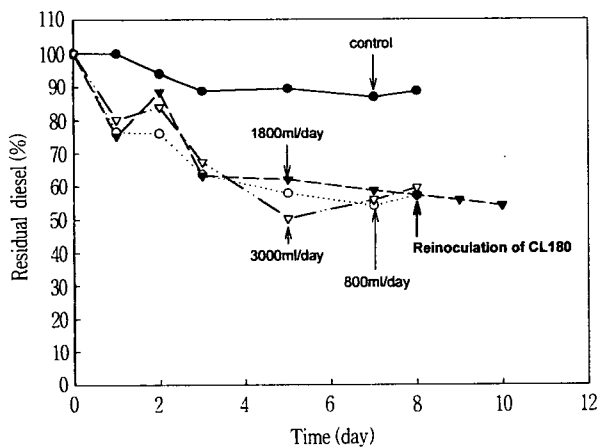


Figure 7. Diesel degradation by *Y. lipolytica* CL180 at various aeration rates.

한 증가할 것으로 사료되었으나 실험 결과 균체량과 무관하게 거의 동일한 경유분해 양상을 나타내었다. 이는 균주가 최초 3일간에는 토양에 흡착되어 있지 않은 분해 가능한 경유를 분해하여 경유잔류량이 감소한 것으로 추정되어지나 그 이후에는 분해 가능한 경유의 감소로 인한 유효 탄소원의 부족으로 균체량이 급속도로 감소되어진 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Figure 9에서도 볼 수 있는데 NH<sub>4</sub>Cl의 감소가 경유분해양상과 동일한 경향으로 나타났다. Loser 등은(7) 이러한 결과에 대해 두 가지 이유를 제시하였다. 첫 번째 이유는 경유 내에 포함된, 미생물이 분해하기 어려운 난분해성의 많은 hydrocarbon이 bioremediation 후에도 잔여하고 있다는 것이며, 두 번째 이유는 경유가 토양에 흡착하여 더 이상 미생물이 탄소원으로 이용할 수 없게 되는 경우이다. 본 연구에서는 첫 번째 이유는 배제하였다. 이는 *Y. lipolytica* CL180를 접종한 액체배양 실험에서(Figure 2) 약 90%이상의 경유가 분해되었기 때문이다. 이러한 결과는 *Y. lipolytica* CL180이 경유 내에 포함된 대부분의 hydrocarbon을 분해할 수 있음을 설명하여준다. 두 번째 이유인 경유의 토양 흡착으로 인하여 bioremediation이 저해되는지 여부를 조사하기 위하여 이미 경유분해가 정지된 컬럼에(C : N : P = 100 : 5 : 1) 최초 접종량과 동일한 양의 균주를 접종하여 경유잔류량을 조사하였다. 접종 후 일정시간이 경과하여도 경유분해는 거의 이루어지지 않았으며 접종전과 비슷한 경유잔류량

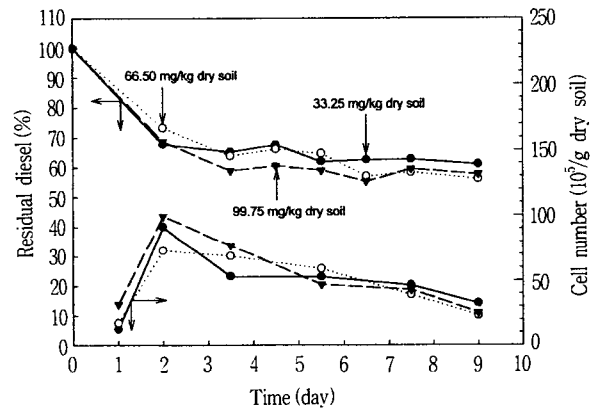


Figure 8. Effect of initial cell concentrations on diesel degradation and proliferation of *Y. lipolytica* CL180 in soil.

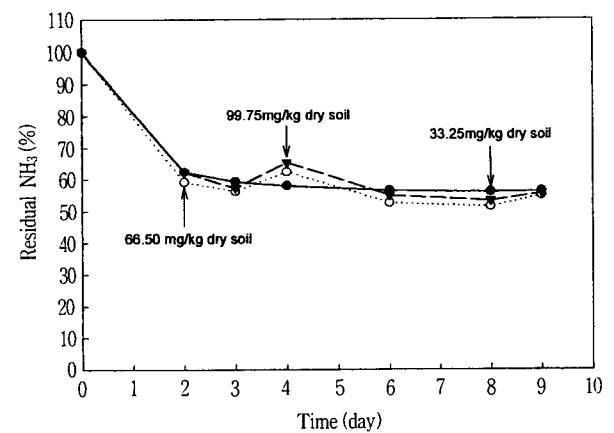


Figure 9. Ammonia consumption by various cell concentration of *Y. lipolytica* CL180.

을 나타내었다(Figure 7). 이러한 결과로 비추어 분해되지 않은 50% 가량의 잔류경유는 토양에 흡착되어 미생물이 분해할 수 없는 상태로 존재하는 것으로 사료된다.

많은 연구자들에 의해 biostimulation이 bioaugmentation에 비하여 유류분해가 우수하다고 보고되고 있다. Margesin 등은(8) 접종시킨 외부 미생물이 오염토양에 적응하지 못하고 토착미생물과의 경쟁에서 도태됨을 보였으며 이는 외부 미생물이 토양입자에 흡착된 오염물질 또는 미세 토양 공극에 의해 여과된 오염물질과 접촉하지 못하여 미생물의 성장이 저해되어 토양정화가 저해 될 수 있음을 보고하였다. 그러나 비교적 단기간 내에 오염물질을 제거할 수 있다는 점과 접종미생물의 성공적인 현장 적용 시 bioremediation의 효과를 극대화시킬 수 있는 장점 등으로 오염물질의 효과적인 토양 탈착, 미생물의 활성화와 현장적용력 향상에 대한 연구와 함께 bioaugmentation이 진행되고 있다.

예를 들면 Stelmack 등은(23) 계면활성제 첨가에 따른 오염물질의 탈착과 분해 경향을 연구하였으며, 최근에는 화학적 계면활성제에 비하여 독성이 적으며 활성이 우수한 미생물이 분비하는 biosurfactant에 대한 연구가 증가되는 추세이다(24).

본 연구결과에서도 이미 제시한 바와 같이 적절한 영양염류와 효과적인 산소의 공급뿐 아니라 토양 내 흡착된 오염물질과 미생물과의 접촉이 bioremediation의 성패를 좌우하므로, 효율성 높은 유류분해를 위해서는 토양 내 흡착된 유류와 미생물과의 접촉에 대한 연구가 선행되어야 하며, 지속적인 분해와 미생물의 현장적용을 위해 고정화 등을(25) 통한 외부미생물의 내성과 활성의 향상이 필요하다고 사료된다.

## 요 약

한국해양연구소에서 분양받은 유류분해효모 *Yarrowia lipolytica* CL180를 이용하여 경유로 오염된 토양에 대한 질소원, 인원 aeration rate, 그리고 균체량에 따른 영향을 조사하였다. 실험결과 질소원이 미생물 성장의 limiting factor로 작용하였으며, 다양한 비(C : N = 100 : 5, 100 : 10, 100 : 15, 100 : 20 mg/kg soil)의 질소원을 첨가한 결과 C : N의 비(w/w)가 100 : 5일 때 가장 우수한 분해율과 균체수를 나타내었다. 질소원이 이 비율 이상으로 첨가되었을 때 분해율과 균체수가 낮게 나타났으며 이는 암모니아의 독성으로 인한 영향으로 사료된다. 그러나 인원과 통기에 따른 경유분해율의 변화는 없었으며 질소원이 첨가된 soil column에서는 7일이 경과된 후 약 50%의 경유 잔류량을 나타내었다. 잔류경유를 제거하기 위하여 최초 접종량과 동일한 양의 균주를 접종하였으나 일정시간의 경과 후에도 경유잔류량은 거의 변화가 없었다. 이는 경유의 토양 흡착 때문으로 사료된다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단의 도움(97-0502-0701-3)으로 수행되었기에, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 송태을, 상병인, 김만호, 황종식 (1997), 미생물계면활성제를

- 이용한 오염토양 복원기법과 현장적용성에 관한 연구, *한국토양학회*, 고려대.
2. 석유와 윤활社. 조사연구과 (1994), 경유의 품질특성에 관한 조사연구, *석유와 윤활*, 11, 66-77.
3. Gabriel, P. F (1991), Innovative Technologies for Contaminated Site Remediation: Focus on Bioremediation, *J. Air Waste Manage. Assoc.*, 41, 1657-1660.
4. McAllister, P. M., C. Y. Chiang, J. P. Salanitro, I. J. Dortch, and P. Williams (1995), Enhanced Aerobic Bioremediation of Residual Hydrocarbon Sources, In *Intrinsic Bioremediation* (R. E. Hinchee, J. T. Wilson and D. C. Downey, eds.), pp. 67-75, Battelle Press, Columbus, Ohio, U. S. A.
5. Forsyth, J. V., Y. M. Tsao, and R. D. Bleam (1995), Bioremediation: When is augmentation needed?, In *Bioaugmentation for Site Remediation* (R. E. Hinchee, J. T. Wilson and D. C. Downey eds.), pp.1-14, Battelle Press, Columbus, Ohio, U. S. A.
6. 서은영, 송홍규 (1994), 토양미생물군집의 개체수와 활성도에 미치는 경유의 영향, *한국미생물학회지*, 32, 163-171.
7. Loser, C., H. Seidel, A. Zehndorf, and U. Stottmeister (1998), Microbial Degradation of Hydrocarbons in Soil during Aerobic/anaerobic changed and under purely Aerobic Conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 631-636.
8. Margesin, R. and F. Schinner (1997), Efficiency of Indigenous and Inoculated Cold-Adapted Soil Microorganisms for Biodegradation of Diesel Oil in Alpine Soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2660-2664.
9. Margesin, R. and F. Schinner (1997), Bioremediation of Diesel-oil-contaminated Alpine Soils at Low Temperatures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 462-468.
10. Lestan, D. and R. T. Lamar (1996), Development of Fungal Inoculum for Bioaugmentation of Contaminated Soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2045-2052.
11. 고성환, 이홍금, 김상진 (1998), Hydrocarbon Uptake Modes에 따른 유류분해 미생물 혼합체의 원유분해능, *한국생물공학회지*, 13, 606-614.
12. U. S. EPA, Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants under the Clean Water Act ; Final Rule and Interim Final Rule and Proposed Rule, 40 CFR Part 136, October 26, 1984.
13. U. S. EPA, Interlaboratory Comparison Study; Methods for Volatile and Semi-Volatile Compounds, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Las Vegas, NV, EPA 600/4-84-027, 1984.
14. Kirsten K. and H. L. Drake (1995), Effects of Environmental Parameters on the Formation and Turnover of Acetate by Forest Soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3667-3675.
15. Widrig, David. L. and John F. Manning. Jr. (1995), Biodegradation of No. 2 Diesel Fuel in the Vadose Zone: A Soil Column Study, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1813-

- 1822.
16. Boopathy, R., D. L. Widrig & J. F. Manning (1997), In Situ Bioremediation of Explosives Contaminated Soil: A Soil Column Study, *Biores. Technol.*, **59**, 169-176.
  17. Waton, A. D., L. S. Clesceri, and A. E. Greenberg (1995), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., pp.5/30-5/35, APHA, AWWA, and WEF, Washington, DC.
  18. Waton, A. D., L. S. Clesceri, and A. E. Greenberg (1995), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., pp.4/78-4/80, APHA, AWWA, and WEF, Washington, DC.
  19. Desai, J. D. and I. M. Banat (1997), Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbiol. Mol. Biol.*, **61**, 47-64.
  20. Braddock, Joan F., Marian L. Ruth, and Peter H. Catterall (1997), Enhancement and Inhibitor of Microbial Activity in Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils: Implications for Nutrient-Amended Bioremediation, *Environ. Sci.*, **31**, 2078-2084.
  21. U. S. EPA, How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers; U. S. Government Printing Office: Washington, DC. EPA 510-B-95-007, 1995.
  22. Bradford, M. L. and R. Krishnamoorthy (1991), Consider Bioremediation for Waste Site Cleanup, *Chem. Eng. Prog.*, February, 80-85.
  23. Stelmack, P. L., M. R. Gray, and M. A. Pickard (1999), Bacterial Adhesion to Soil Contaminants in the Presence of Surfactants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 163-168.
  24. Herman, D. C., R. J. Lenhard, and R. M. Miller (1997), Formation and Removal of Hydrocarbon Residual in Porous Media: Effects of Attached Bacteria and Biosurfactants, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1290-1294.
  25. Cassidy, MB., H. Lee, and J. T. Trevor (1996), Environmental Application of Immobilized Microbial Cells: a Review, *J. Industrial Microbiol.*, **16**, 79-101.