

유류 오염지역으로부터 분리된 균주를 이용한 디젤유의 분해

박 천 보 · 허 병 기 · 윤 현 식
인하대학교 생물공학과
(접수 : 2001. 12. 14., 게재승인 : 2001. 12. 19.)

Biodegradation of Diesel Oil by Microorganisms Isolated from Petroleum Contaminated Site

Chun Bo Park, Byung-Ki Hur, and Hyun Shik Yunt†
Department of Biological Engineering, Inha University, 253 Yonghyundong Namku, Incheon 402-751, KOREA
(Received : 2001. 12. 14., Accepted : 2001. 12. 19.)

The cells obtained from diesel contaminated site were tested for diesel degradation by culturing them on the culture medium that contained diesel as the only carbon source. Two strains that grew well in the culture media were separated: one formed white colony and another strain formed yellow colony. When they were cultured together, much higher diesel degradation was obtained compared to that of individual cell culture. Mixed culture of white and yellow colony forming strains grew well with 1%(v/v) diesel and the addition of growth nutrients increased the diesel degradation. Additional nitrogen source was efficient for higher diesel degradation (over 90%) when it was compared with that without nitrogen source. When mixed culture of white and yellow colony forming cells were applied to the soil column system contaminated by diesel, 30 mL/min of air flow rate was found to be sufficient to degrade diesel oil. The diesel degradation did not increase noticeably at higher flow rate. The addition of nitrogen source resulted in the increase in diesel degradability.

Key Words : bioremediation, biodegradation, soil columns, diesel oil

서 론

최근 산업의 급속한 발전에 따른 중화학 공업의 발달과 함께 석유관련 제품의 수요가 늘어나, 국내의 석유 소비량도 크게 증가하였다. 특히 석유 및 가스류의 지하 저장시설 및 주유소의 누출로 인한 오염, 군부대에서 토양의 부적절한 관리로 인한 오염 및 공업단지 지역에서 배출되는 오염 등은 단순히 토양의 오염에서 그치지 않고 지하수, 하천수 및 대기의 오염으로 이어지는 심각한 문제를 야기한다.

토양을 오염시키는 유류는 여러 가지가 있으며 그 처리방법 또한 다양하다 할 수 있다. 일반적으로 휘발성이 높은 가솔린으로 오염된 토양에 대해서는 Soil vapor extraction과 같은 공기 주입/추출방식 기술이 효과적으로 적용될 수 있는 반면, 국내에서 소비량이 가장 많은 연료이면서 토양오염 유발물질로서 상당한 부분을 차지(1)하고 있는 디젤유의 경우

대부분의 구성물질이 비휘발성이므로 위와 같은 방법으로는 적절한 효과를 기대할 수 없다(2). 디젤유는 비점이 190℃~350℃로 200여종의 유기화합물로 구성되어 있으며, 약 70% 이상이 파라핀계 물질들로서(3) 이들 물질들은 토양 미생물에 의해 분해가 용이한 성분들로 비교적 처리기간이 길어 잔류 오염이 발생할 수 있으며 처리과정을 조절하기가 힘들다는 단점이 있기는 하지만 생물학적 복원 방법에 적합하다고 할 수 있다.

유류물질로 오염된 토양을 처리하기 위해서 많은 방법들이 개발 적용되어왔으며 크게 물리학적, 화학적, 생물학적 방법으로 나눌 수가 있다. 이중 생물학적 방법은 낮은 비용과 환경에 대한 영향으로 인해서 널리 쓰이는 방법이다. 일반적으로 모든 생물학적 복원 기술은 다양한 매체를 오염시키는 유기화합물을 분해하기 위하여 미생물의 이용을 포함하고 있는데 이는 토양환경이 보유하고 있는 자체적인 복원 능력을 바탕으로, 오염물질 분해 미생물의 생육환경을 최적화하여 처리 대상물질 즉 유류의 분해속도를 증진시킬 목적으로 필요시 추가적인 물리적 처리 및 각종 첨가제 등을 주입하여 처리효율을 제고시키는 기술이다(4). 현재까지 오염된 토양, 수질, 대기 등은 모두 생물학적 처리기술을 이용하여 성공적으로 수행되어져 왔다. 그러나 토양 생태계는 매우 복잡하며 유기화합물의 거동은 토양화학, 토양물리학 및 토양미생물의

†Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University 253 Yonghyundong Namku, Incheon 402-751,
Korea
Tel : +82-32-860-7517, Fax : +82-32-875-0827
E-mail : hyunshik@inha.ac.kr

Table 1. MSM(minimal salt media)의 조성

	조성	사용량 (g/L)
• 1%(v/v) diesel oil • pH 7.0 or 5.6 • 25°C	NaNO ₃	0.85
	KH ₂ PO ₄	0.56
	Na ₂ HPO ₄	0.86
	K ₂ SO ₄	0.17
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.37
	CaCl ₂ · H ₂ O	0.007
	Fe(III) EDTA	0.004
	Trace element solution (0.25 mL)	
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.32
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	1.78
	H ₃ BO ₃	0.56
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.0
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
	KI	0.66
	EDTA	1.0
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.004

함수이다(5). 따라서 토양 시스템에서의 유류의 거동 및 제거는 많은 요소들에 의해 의존할 것이며, 이런 주요한 요소의 상호효과에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 실험에서는 실제 유류 오염지역으로부터 직접 유류분해 균주를 분리하여 그 균주를 이용한 유류분해 효율을 높이는 데 초점을 두고 진행되었다. 대상 유류로는 디젤유를 선정하였고, 액체배지에서의 디젤유 분해능을 기초로 토양컬럼을 제작하여 실제 토양에서의 분해능을 알아보았다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

유류로 오염되어있는 지역의 토양 시료를 채취한 후, 디젤을 분해할 수 있는 균주를 분리하였다. 분리방법은 우선 토양 시료를 증류수에 풀어 nutrient 배지(beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L)에 도달하여 가능한 모든 콜로니를 분리하여 각각 배양하였다. 위에서 얻은 각각의 콜로니를 디젤을 포함하는 minimal salt media (MSM) (6)에서 1주일간 배양한 후 다시 nutrient 배지에 도달하여 활성이 좋은 균을 분리하였다. MSM의 구성은 Table 1과 같으며 디젤유는 0.2 μm filter로 여과한 후 사용하였다. 위에서 얻은 균주들을 3차례 계대배양한 후 디젤 분해능이 좋은 2종류의 균주를 분리하였다. 이들은 평판 배양시 각각 백색의 콜로니와 황색의 콜로니를 형성하였으며 이에 따라 백색 콜로니를 형성하는 균주, 황색 콜로니를 형성하는 균주, 그리고 두 균주를 혼합하여 배양하여 얻은 균주를 각각 W균주(white colony strain), Y균주(yellow colony strain), WY균주(white and yellow colony strain)로 명명하였고 KCCM(Korean culture collection of microorganisms)에 균주의 동정을 위한 지방산 분석을 의뢰하였다.

MSM에서의 디젤유 분해

균주의 성장속도

앞서 분리된 균주들의 성장속도를 측정하기 위해 Nutrient

media에서는 25°C, 200 rpm에서 3일간 배양하였으며, MSM에서는 25°C, 200 rpm에서 7일간 배양하였다. 이때 각각의 접종량은 배지의 1%와 2%이었다.

분해능 측정

분리된 균의 분해능을 측정하기 위해 nutrient media에서 배양된 W균주, Y균주, WY균주를 각각 디젤유를 포함하는 MSM에 2%를 접종하여 20°C, 200 rpm에서 20일간 배양하였다. 균주를 접종하지 않은 control배지도 같은 조건에서 20일간 함께 두었다.

접종량의 크기에 따른 분해능 변화

균주의 양이 분해능에 미치는 영향을 고찰하기 위해 각각의 균주의 접종량을 달리하여 그 분해능을 측정하였다. 접종량을 각각 0.5%, 1%, 2%, 4%로 하여 1%의 디젤유를 포함하는 MSM에서 10일간 배양하였다.

디젤유의 농도에 따른 분해능 변화

디젤유의 양이 분해능에 미치는 영향을 고찰하기 위해 MSM에 포함되는 디젤유의 양을 달리하여 그 분해능을 측정하였다. 각각 0.5%, 1%, 2%, 4%의 디젤유를 MSM에 첨가한 후 각각의 균주를 2% 접종하여 10일간 배양하였다.

영양소의 첨가에 따른 분해능 변화

영양소의 첨가가 분해능에 미치는 영향을 고찰하기 위해 배양액에 각각 질소원과 인원을 첨가하여 그 분해능을 첨가하였다. 사용된 질소원은 MSM의 질소원인 NaNO₃였으며 그 첨가량은 1~20 mM이었다. 사용된 인원 역시 MSM의 인원인 KH₂PO₄였으며 그 첨가량은 0.0062~0.124 mM이었다. 1%의 디젤유를 포함하는 MSM에 2%의 균주를 접종하여 10일간 그 분해능을 측정하였다.

잔류 디젤유의 분석

잔류 디젤유의 분석은 EPA method 8015를 따라 행하였다(7). Gas chromatography(Shimadzu GC-17A)를 사용하였으며 GC 컬럼으로는 HP-5 capillary column(30 m, 0.25 mm diameter, 0.25 μm film thickness)를 사용하였다. Normal hexane으로 추출한 후 GC를 통해 분리된 디젤유의 탄화수소의 총량은 total petroleum hydrocarbon(TPH)방법으로 정량하였다.

토양컬럼에서의 디젤유 분해

토양 및 균주

실험에 사용된 토양은 인하대학교 운동장 흙을 30 cm 깊이에서 채취하였으며, US sieve 12(10 mesh)와 US sieve 30(28 mesh)를 이용하여 고르게 체를 쳐 각기 다른 크기의 입자로 준비하였다. 실험에 사용된 균주는 앞서 선별된 균주 중 복합균주인 WY균주였으며, 대상 유류는 역시 디젤유를 filtering하여 사용하였다.

컬럼 설치

선별된 우수 균주를 이용하여 토양에서의 디젤유 분해능을



Figure 1. 통기와 영양염류 공급이 가능한 토양 컬럼

알아보기 위해 토양컬럼을 제작하였다(Figure 1). 컬럼은 다른 연구(8)를 기초로 총 4개의 컬럼을 제작 사용하였으며, 각 컬럼의 총 부피는 대략 2 L이었다. 본 연구에 사용된 컬럼에는 컬럼과 덮개사이가 고분자 물질로 sealing되어 있어 공기 및 물의 누출이 방지되며, 컬럼의 아래와 위에는 영양염류 용액과 공기의 inlet과 outlet이 설치되어 있으며 컬럼내 토양 시료 채취를 위해 덮개부분에 6개의 sampling port가 설치되어 있다.

실험에 사용된 토양은 US sieve 12로 체를 친 것과 US sieve 30으로 체를 친 것을 같은 질량으로 섞어 사용하였다. 준비된 토양시료 0.9 kg을 3회의 멸균과정을 거쳐 9,000 mg의 디젤유로 골고루 오염시켰고, nutrient broth에서 배양된 W 균주와 Y균주를 원심분리 후 각각 50 mL의 멸균된 증류수에 현탁하여 오염된 토양시료에 골고루 주입 후 혼합하여 컬럼에 충전시켰다.

토양의 sampling에는 내경 1 cm, 길이 20 cm에 중간에 10 cm 가량이 파인 sampler를 사용하였다. 토양시료는 컬럼내 토양의 5 cm 깊이에서 채취되었으며, 6개의 다른 sampling port로부터 채취된 시료는 골고루 섞은 후 분석에 사용하였다.

통기의 양에 따른 분해능의 영향

일반적으로 호기성 미생물에게 공기의 공급은 미생물 성장에 중요한 인자임을 감안하여 공기의 공급속도를 조절하며 디젤유의 분해양상 및 미생물 성장을 관찰하였다. Column 1은 전혀 통기를 시키지 않았고 column 2, 3, 4에는 각각 10 mL/min, 30 mL/min, 50 mL/min의 유속으로 컬럼에 공기를 공급하였다.

질소원의 첨가에 따른 분해능의 영향

공기의 유속을 30 mL/min으로 공급하여 주면서 질소원 NaNO_3 와 오염된 디젤유와의 질량비가 100:5, 100:10, 100:15

Table 2. W균주와 Y균주의 지방산 분석 결과

White colony strain	Yellow colony strain
<i>Kluyvera</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>K. ascorbata</i> : 64%	<i>S. thalophilum</i> : 67%
<i>Salmonella</i>	<i>S. multivorum</i> : 53.1%
<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. spiritivorum</i> : 42.2%
<i>S. c. arizonae</i> : 54.5%	
<i>S. c. houtenae</i> : 40.6%	

가 되도록 하여 4일이 지난 후에 질소원 NaNO_3 를 멸균된 증류수 200 mL에 녹여 60 mL/min으로 토양컬럼에 첨가해주면서 디젤유의 분해양상과 미생물 성장을 관찰하였다.

잔류 디젤유의 분석

토양시료로 부터의 잔류 디젤유의 추출은 EPA method 3550 (9,10)방법을 변형하여 사용하였다. 토양시료 2 g에 부수황산나트륨 2 g과 핵산 5 mL을 첨가한 후 1분간 강력하게 교반한 후 3분간 sonication을 한 후 그 상등액을 GC를 이용하여 TPH분석을 하였다.

생균수 측정

채취한 토양시료를 증류수 10 mL과 충분히 혼합한 후 일정하게 희석하여 nutrient 배지에 도말하였다. 도말후 25°C에서 3일간 incubation한 후 생균수를 측정 하였다.

잔류 질소의 측정

잔류 질소원의 분석은 Lenore 등(11)의 NO_3^- 분석법을 사용하였다. 토양시료를 증류수 10 mL과 충분히 교반 후 1 mL의 HCl을 첨가하였다. 충분히 교반된 시료를 filtering을 한 후 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1601)를 이용하여 270 nm에서의 분석 값으로 보정된 220 nm에서의 분석 값으로 잔류 질소량(NaNO_3)을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 지방산 분석

유류 오염지역으로부터 분리한 미생물 균주들은 KCCM (Korean culture collection of microorganism)에 동정을 위한 지방산 분석을 의뢰하였다. W균주와 Y균주의 Gas chromatography를 이용한 fatty acid component의 분석결과를 Table 2에 나타내었다. W균주의 경우 *K. ascorbata*와 약 64%의 유사성을, Y균주의 경우 *S. thalophilum*와 67%의 유사성을 보였으나 일치하는 정도가 높지 않아 토양에서 분리된 균주는 신규 균주일 가능성이 높다고 사료된다.

MSM에서의 디젤유 분해

균주의 성장속도

각각의 균주를 nutrient 배지에서 36시간 배양한 결과 백색 콜로니를 형성하는 균주와 혼합균주가 황색 콜로니를 형성하는 균주 보다 훨씬 성장속도가 높았다. 각각의 균주가 대수기 말기에 도달하였을 때 디젤유를 1%(v/v) 포함하는 MSM

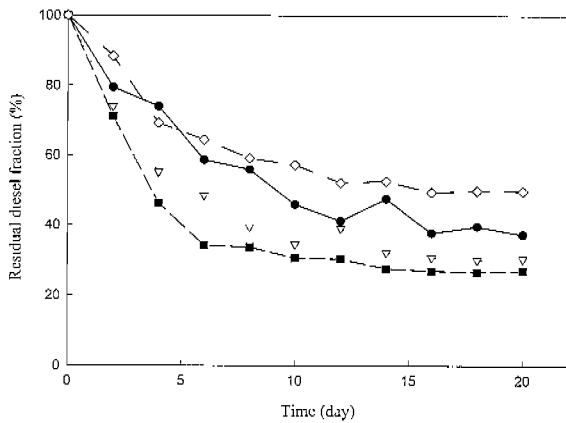


Figure 2. MSM에서의 디젤유 분해능 -●- : W균주, ...▽... : Y 균주, --■-- : WY균주, -◇- : Control (no strain).

에 배지의 2%를 접종하여 25°C, 200 rpm에서 1주일간 배양한 결과, 세 가지 경우 모두 약 5일 이후에는 세포 수에 있어서 큰 변화가 없었고, 최대 세포 수는 nutrient배지에서의 세포수의 약 30% 정도였다.

디젤 분해능 측정

디젤유는 여러 가지 물질로 이루어진 혼합물이기 때문에 어느 한 종의 미생물보다는 복합균주를 사용하였을 때 분해 효율이 높아질 가능성이 높다. 본 실험에서는 W, Y균주를 각각 사용한 경우와 두 균주를 혼합한 WY균주를 사용한 경우의 분해능을 비교하였다. Figure 2에서 알수 있듯이 W균주와 Y균주를 따로 접종하였을 때 보다 복합균주인 WY균주를 사용하였을 경우 4~10%의 디젤유가 더 분해됨을 알수 있었다. 또한 WY균주를 첨가한 경우 20일 후 디젤유가 약 73%가 감소한 반면 미생물을 첨가하지 않은 control 배지의 경우 약 45%의 디젤유가 감소하였는데 이는 미생물이 디젤유를 상당량 분해함을 나타내나 휘발에 의해서도 많은 양의 디젤유가 감소함을 알 수 있다. 실제 잔류 디젤유를 GC를 이용하여 TPH분석을 하면 디젤유를 구성하는 탄화수소 전분(C₈~C₂₄)에 걸쳐 휘발이 일어나는데, 특히 분자량이 작은 탄화수소 (C₈~C₁₁)에서 그 감소량이 두드러진 반면 상대적으로 분자량이 큰 탄화수소(C₁₁~C₂₄)에서는 주로 미생물에 의한 분해가 지배적이었다. 이는 휘발에 의한 디젤유의 감소는 한계가 있음을 의미하며, 휘발에 의한 디젤유의 감소는 휘발성 탄화수소를 상당량 포함하고있는 디젤유의 특성 때문이기도 하지만 200 rpm의 교반에 의한 영향도 큰 것으로 추측된다.

접종량의 크기에 따른 분해능의 영향

균주의 접종량을 달리하여 각각의 디젤유 분해정도를 측정하였다. 약 10일간 배양하였을 때 Figure 3에서와 같이 접종량을 4%로 하였을 때 WY균주의 경우 약 78%의 디젤유가 감소되어 0.5%의 접종량에서 약 55%의 감소량보다 그 분해정도가 컸다. 그러나 접종량이 1%일 때 디젤유의 감소량이 0.5% 접종량에서의 감소량보다 급격히 증가한 반면 2%, 4%로 증가되면서 그 분해정도는 크게 증가하지는 않았다.

결과를 보면 약 2% 정도의 접종량으로 배지에 포함된 디젤유가 거의 분해될 것으로 생각되는데, 그 이상의 접종량에서

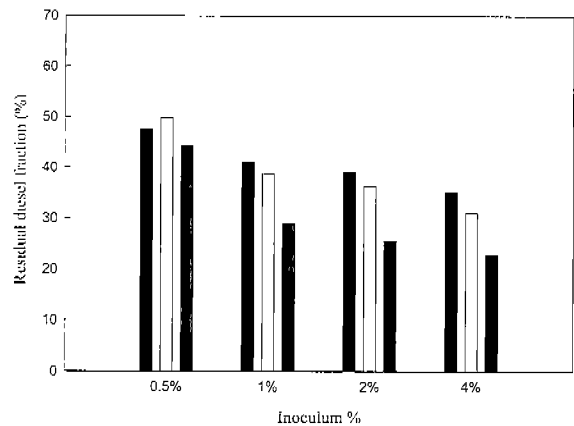


Figure 3. Inoculum size의 변화에 따른 디젤유 분해능의 변화 ■ : W 균주, □ : Y 균주, ▨ : WY 균주.

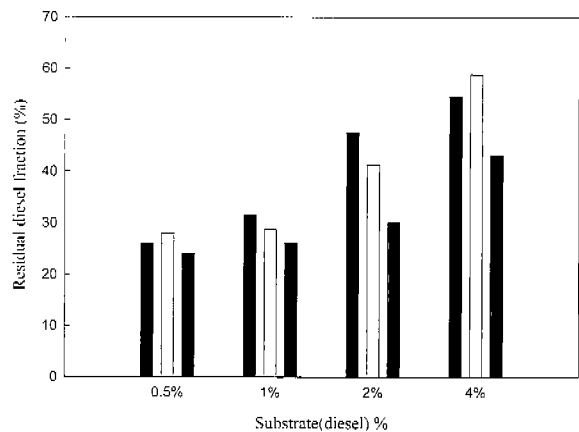


Figure 4. Diesel concentration의 변화에 따른 디젤유 분해능의 변화 ■ : W 균주, □ : Y 균주, ▨ : WY 균주.

그 분해정도가 크게 증가하지 않는 것은 약 75% 정도의 디젤유가 감소한 후의 잔류 디젤유에는 사용된 미생물이 분해하기 어려운 난분해성 물질들이 대부분일 것이기 때문으로 생각된다.

디젤유의 농도에 따른 분해능의 영향

MSM 배지에 포함되는 디젤유의 농도에 변화를 주어 미생물의 성장 및 디젤유 분해능에 미치는 영향을 알아보았다. Figure 4에서 알수 있듯이 0.5%와 1%의 디젤유 농도에서는 그 분해능이 약 70% 이상으로 일정하였으나, 2%와 4%의 디젤유 농도에서는 그 분해능이 감소함을 알 수 있는데 특히 4%의 디젤유 농도에서 WY균주의 디젤유 분해능은 약 56%로 그 분해능이 크게 감소하였다. 휘발로 감소되는 디젤유가 대략 45%임을 감안할 때 미생물에 의한 분해량은 극히 미비함을 말한다. 즉 농도가 높지 않을 때는 큰 영향이 없던 디젤에 포함된 유해물질이 디젤유의 농도가 적정한계를 넘어설 경우 그 독성으로 인해 균주의 생장이 저해받는 것으로 사료된다.

영양소의 첨가에 따른 분해능의 영향

질소와 인이 디젤유의 분해능에 미치는 영향을 검토하기

Table 3. NaNO₃ 및 KH₂PO₄의 농도에 따른 디젤유 분해

NaNO ₃ (mM)	분해능 (%)	KH ₂ PO ₄ (mM)	분해능 (%)
1	95.6	0.0062	73.6
2	97.5	0.031	75.2
5	92.4	0.062	73.4
10	94.7	0.124	73.7
20	94.9		

위하여 MSM에 포함되어있는 질소원인 NaNO₃와 인원인 KH₂PO₄를 각각 농도별로 첨가하여 혼합 균주의 분해능을 측정하였다(Table 3). 질소원인 NaNO₃의 첨가로 분해능이 90% 이상 증가하여 높은 분해 효율을 보인 반면, KH₂PO₄의 첨가는 분해능에 거의 영향을 미치지 못하였다. 일반적으로 디젤유를 구성하는 물질의 미생물에 의한 분해경로는 많은 연구 결과(12,13,14)로 밝혀져 있는데, 본 실험에서는 질소원의 첨가로 미생물 군집의 증가에 따른 분해능의 향상뿐 아니라, 앞서 고찰한 일부 난분해성 물질의 분해에도 어느정도 영향을 미칠것으로 생각된다.

Soil column에서의 디젤유 분해

액체배지에서의 디젤유 분해능 결과를 바탕으로 그 분해능이 타균주에 비해 우수했던 WY균주를 이용하여 토양에 오염된 디젤유의 분해에 사용하였다. 먼저 균주를 포함하지 않은 토양컬럼의 경우 10일간 대략 33%의 디젤유가 분해됨을 알 수 있었다(data not shown). 이러한 수치는 50%에 다다랐던 액상에서 수행된 control 배지의 분해정도에 비하면 상당히 낮은 수준의 분해율이라 할 수 있다. 물론 오염된 디젤유의 양과 통기의 방법이 다르긴 하지만, 이는 실제 토양에서의 디젤유의 분해거동은 액상에서의 분해거동과는 어느 정도 차이가 있음을 나타낸다.

통기의 양에 따른 분해능의 영향

일반적으로 호기성 미생물에게 공기의 공급은 미생물 성장에 중요한 인자임을 감안하여 공기의 공급속도를 조절하며 디젤유의 분해양상 및 미생물 성장을 관찰하였다. Column 1은 전혀 통기를 시키지 않았고 column 2,3,4에는 각각 10 mL/min, 30 mL/min, 50 mL/min의 유속으로 컬럼에 공기를 공급하였다. Figure 5에서 공기의 공급이 전혀 없을 때(column 1) 대략 40%의 디젤유가 분해된 반면 30 mL/min(column 3)과 50 mL/min(column 4)의 공기 공급으로 60%의 디젤유가 분해됨을 볼 수 있다. 처음 3일동안 미생물의 성장이 두드러졌으며 그 이후에는 약간 감소하거나 10⁷ CFU/g soil 정도로 거의 유지가 되었다. 균주의 접종이 없는 경우 10,000 ppm의 디젤유로 오염된 토양은 10일 후 오염량의 약 33%가 감소한 반면 같은 조건하에서 균주를 투입한 경우 약 50%의 디젤유가 분해되었다. 온도가 상온(25°C~29°C)으로 거의 일정하여 디젤유의 분해에 큰 영향을 주지 않았음(15,16)을 감안할 때 토양내에서도 투입된 미생물이 디젤유 분해능을 가진다는 것을 알 수 있었다. 이는 투입된 미생물이 토양 컬럼안에서 디젤유를 효과적으로 분해하는데 적어도 30 mL/min 유속 이상의 통기가 효과적임을 나타내며 일반적인 연구 결

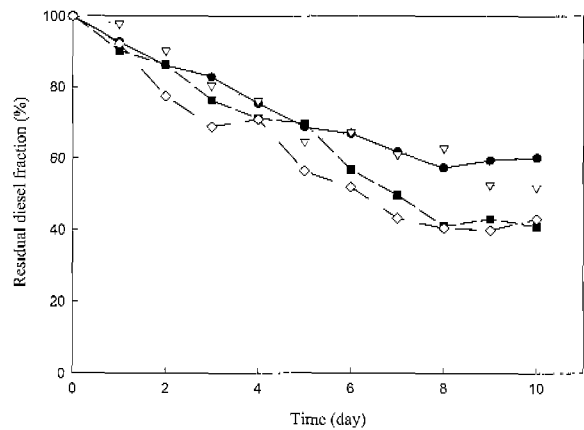


Figure 5. 공기의 flow rate에 따른 디젤유의 분해능 변화
 -●- : No aeration, ...▽... : 10 mL air/min, --■-- : 30 mL air/min, -◇- : 50 mL air/min.

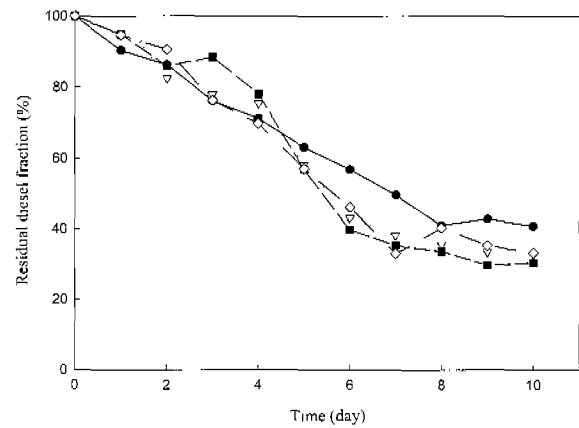


Figure 6. 질소원의 비율별 첨가에 따른 디젤유의 분해능 변화
 -●- : No addition, ...▽... : 100(C):5(N), --■-- : 100(C):10(N), -◇- : 100(C):15(N).

과(15,17)에도 통기가 없을 경우 그 분해능이 급속히 떨어진다고 보고되어 있다.

질소원의 첨가에 따른 분해능의 영향

앞서 언급한 바와 같이 영양염류는 미생물의 디젤분해에 중요한 인자로 작용하는데, 본 실험에서는 공기의 유속을 30 mL/min으로 공급하여 주면서 질소원인 N과 오염된 디젤유의 질량비가 100:5, 100:10, 100:15가 되도록 하여 4일이 지난 후에 질소원 NaNO₃를 멸균된 증류수 200ml에 녹여 60 mL/min으로 토양컬럼에 첨가하면서 디젤유의 분해양상과 미생물 성장을 관찰하였다.

질소원을 전혀 첨가해주지 않았을 경우(column 1) 앞선 통기 조건 실험에서와 같이 60% 정도의 디젤유 분해능을 보였으나, 질소원을 100:10의 질량비(column 3)로 첨가해준 경우 10일 후 70%의 디젤분해능을 나타내었다(Figure 6). 미생물의 수는 질소원을 첨가한 후 2일 정도 후부터 증가하여 질소원이 첨가 안된 경우와 비교 더 많은 수의 생균수가 유지되어 미생물의 성장과 질소원의 공급은 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

많은 연구들을 통해 미생물을 이용하여 유류오염 토양을 복원하는데 있어 영양염류 질소원이 유류의 분해에 영향을

미치는 제한인자로 알려져 있다. 특히 질소원의 첨가 정도에 따라 유류의 분해능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 그 최적 투여량은 어느 정도 차이가 있다. U.S Environmental Protection Agency(18)에서는 C:N의 비를 10:1~100:1로 하여 bioremediation에 적용하길 권고하고 있으나, 몇몇 연구결과에서는 100:10(19) 또는 100:5(20)가 최적이라고 보고되기도 하였다. 이렇게 다양한 결과는 사용된 균주의 특성 및 사용된 토양의 특성 등에 의한 것으로 볼 수 있는데 이러한 연구 결과를 기초로한 본 실험에서는 질소원이 추가로 첨가된 경우 약 70%의 분해율을 보여 질소원이 첨가 안된 경우와 비교하여 효과적임을 알 수 있었으며 질소원의 첨가가 미생물의 성장과 디젤유의 분해능을 촉진함을 알 수 있었다.

요 약

본 실험에 사용된 균주는 유류에 오염된 지역의 토양시료로부터 직접 분리하였는데 본 실험에서는 백색 콜로니를 형성하는 W균주와 황색 콜로니를 형성하는 Y균주 그리고 두 균주의 복합균주인 WY균주를 사용하였다. 단일 균주보다는 복합균주를 사용하였을 때 디젤유의 분해가 더 효과적이었으며 질소원의 첨가가 분해에 제한인자로 작용하였다. 비록 토양시스템에서의 분해효율은 액체상에서의 분해능에 비해 다소 떨어지지만, 통기의 조건 및 질소원의 첨가등으로 그 능력을 어느 정도 향상시킬 수 있었다. 한편 디젤유의 분해에는 생물학적인 측면 뿐 아니라 증발이나 휘발에 의해서도 상당량 감소하였는데 교반에 의해 또 오염토양의 제조과정중에 상당량이 휘발하는 것으로 보이며, 디젤의 용해도가 낮기 때문에 침출되는 양도 적을 것이라고 보여지고 이는 다른 논문에서도 보고된 바 있다(21,22). 앞서 언급한 것처럼 본 실험에서는 통기와 질소원의 첨가를 통해 미생물에 의한 디젤유의 분해능을 향상시켰는데, 이 뿐만 아니라 더욱 효과적인 디젤유의 분해를 위해서는 복잡한 토양시스템에 관계된 여러 요소들을 최적화 하여 분해능을 향상시키기 위한 실험이 수행되어야 한다.

감 사

본 연구는 환경부지정 인천지역환경기술개발센터의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. U.S. EPA (1997), Analysis of Selected Enhancement for Soil Vapor Extraction, EPA-542-R-97.
2. Cole, G. M. (1994), Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites, p37-74, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
3. Mackay, D., W. Y. Shiu, A. Chau, J. Southwood, and C. I. Johnson (1985), Environmental Fate of Diesel Fuel Spills on Land, Report for Association of American Railroads, Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, University of Toronto.
4. Hwang, E. Y., W. Namkoong, and J. S. Park (2000), Effect of Environmental Parameters on the Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil, *J. KoSES*, **2**, 85-96.
5. Kim, S. C., W. Namkoong, and D. W. Park (1998), Effects of Initial Concentration and Nutrients in Treatment of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils using a Slurry-phase Bioreactor, *J. KoSES*, **3**, 45-53.
6. Radwan, S. S., N. A. Sorkhoh, F. Fardoun, and R. H. Al-hasan (1995), Soil Management Enhancing Hydrocarbon Biodegradation in the Polluted Kuwait Desert, *Appl. Microbial Biotechnol.*, **44**, 265-270.
7. U.S. EPA (1982), Compendium of Reported Physical and Chemical Characterization Data for Petroleum and Synthetic Fuel Products, Petroleum and Shale Oil Products, TRW Energy Systems Group, Redondo Beach, California.
8. Widrig, D. L. and J. F. Manning Jr. (1995), Biodegradation of No. 2 Diesel Fuel in the Vadose Zone : a Soil Column Study, *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 1813-1822.
9. U. S. EPA (1984), 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.
10. U. S. EPA (1984), Interlaboratory Comparison Study : Methods for Volatile and Semi-volatile Compounds, Environmental Monitoring System Laboratory, Office of Research and Development, Nevada, EPA 600/4-84-027.
11. Lenore, S. C., E. G. Arnold, and D. E. Andrew (1998), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., p4-115, American Public Health Association, New York.
12. Edward, J. C. and T. K. Paul (1991), Hydrocarbon Contaminated Soils, Lewis publishers, New York.
13. Thomas, D. B., T. M. Michael, M. M. John, and P. Jack (1994), Biology of Microorganisms, 7th ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey.
14. Brink, H. B. and S. H. Diane (1994), Bioremediation, McGraw-Hill, Inc., New York.
15. Autry, A. R. and G. M. Ellis (1993), Bioremediation of Petroleum Fuel Contaminated Soils In *Federal Environmental Restoration Conference Proceedings*, pp99-100.
16. Peramaki, M. P. and K. R. Blomker (1997), Practical Design Considerations for Composting Contaminated Soil In *In situ and On-site Bioremediation Vol. 2*, p103-112, Battelle Press, Ohio.
17. Atlas, R. M (1991), Bioremediation of Fossil Fuel Contaminated Soils In *In situ Bioremediation : Applications and Investigations for Hydrocarbons and Contaminated Site Remediation*, p14-32, Battelle Memorial Institute, Ohio.
18. U.S. EPA (1995), How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites : A Guide for Corrective Action Plan Reviewers, U.S. Government Printing Office, New York, EPA 510-B-95-007.
19. 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.
20. Bradford, M. L. and R. Krishnamoorthy (1991), Consider Bioremediation for Waste Site Cleanup, *Chem. Eng. Prog.*, **2**, 80-85.
21. Zhi, C. (1997), Phytoremediation of Petroleum Contaminated Soils, Ph. D. Dissertation, Kansas State University, Kansas State.
22. Simon, J. K. and P. Jayne (1997), Phytoremediation of Diesel-contaminated Soil using Alfafa In *In situ and On-site Bioremediation Vol 3*, p331-335, Battelle Press, Ohio.