

Phenanthrene-오염토양의 동전기 생물학적복원에서 제거효율에 대한 황산염원의 영향

김 상 준 · ¹박 지 연 · ²이 유 진 · † ²양 지 원
특허청, ¹한국에너지기술연구원, ²한국과학기술원 생명화학공학과
(접수 : 2006. 6. 7., 게재승인 : 2006. 10. 23.)

Effect of Sulfate Source on Removal Efficiency in Electrokinetic Bioremediation of Phenanthrene-Contaminated Soil

Sang-Joon Kim, Ji-Yeon Park¹, You-Jin Lee², and Ji-Won Yang^{2†}
The Korean Intellectual Property Office
¹Korea Institute of Energy Research
²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST
(Received : 2006. 6. 7., Accepted : 2006. 10. 23.)

This study investigated the effect of sulfate source on removal efficiency in electrokinetic bioremediation which needs sulfate to degrade contaminants by an applied microorganism. The representative contaminant and the applied microorganism were phenanthrene and *Sphingomonas* sp. 3Y, respectively. When magnesium sulfate was used, the magnesium ion combined with hydroxyl ion electrically-generated at cathode to cause the decrease of electrolyte pH, and then the microbial activity was inhibited by that. When ammonium sulfate and disodium sulfate were used to solve the pH control problem, the pH values of electrolyte and soil solution were maintained neutrally, and also the high microbial activity was observed. With the former sulfate source, however, ammonium retarded the phenanthrene degradation, and so the removal efficiency decreased to 12.0% rather than 21.8% with magnesium sulfate. On the other hand, the latter improved the removal efficiency to 27.2%. This difference of removal efficiency would be outstanding for an elongated treatment period.

Key Words : Sulfate source, electrokinetic bioremediation, phenanthrene, *Sphingomonas* sp. 3Y, microbial activity

서 론

동전기 생물학적복원은 동전기 현상에 의해 미생물과 영양원 및 오염물을 지중에서 강제적으로 이동시켜 접촉 빈도를 증가시킴으로서 기존의 지중 생물학적복원보다 효과적으로 오염물을 처리하고 처리기간을 단축하기 위해 고안된 방법이다(1-6).

오염물 제거에 관계하는 동전기 현상은 크게 세 가지로 분류된다(7-10). 먼저 전기이동은 토양용액 중에 존재하는 이온이 그것의 전하와 반대되는 전극으로 이동하는 현상을 말한다. 따라서 전하를 가지는 중금속 및 질산염, 황산염과 같은 이온성 오염물은 이와 같은 현상에 의해 쉽게

전극으로 이동시켜 제거할 수 있다. 전기삼투는 토양공극수의 전기적 이동을 말하는데, 그 원리는 토양입자표면의 확산이중층에 포함되어 있는 양이온이 전기이동에 의해 음극으로 이동하면서 형성된 운동량에 의해 공극수가 딸려가는 것이다. 따라서 추출제를 이용하여 비극성의 오염물을 이러한 현상으로 추출할 수 있다. 마지막으로 전기영동은 표면에 전하를 띠는 입자가 그 전하의 반대되는 전극으로 이동하는 현상을 의미하며, 예를 들어 미생물, 단백질, 점토와 같은 입자는 표면에 음전하를 띠므로 양극으로 이동하게 된다.

동전기 생물학적복원은 오염물의 분해를 위해 미생물활성을 이용하므로 지층의 구조 및 환경, 수분, 전기적 이동과 같은 물리화학적 조건을 제외하면 영양원, 전자수용체 등의 공급과 관련하여 토양내 미생물활성을 증가시키는 여부에 따라 복원효율이 좌우된다(1). 즉 미생물이 오염물을 잘 분해할 수 있도록 에너지를 잘 형성하게 하는 것이 중요하다. 예를 들어 유류물질의 분해에 자주 나타나는

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST

Tel : +82-42-869-3964, Fax : +82-42-869-3910

E-mail : jwyang@kaist.ac.kr

Pseudomonas sp.는 오염물을 효과적으로 분해하는데 질산염을 종종 필요로 하는 것으로 알려져 있다. 보통 지하 환경은 산소가 부족하므로 미생물은 혐기적 호흡 (anaerobic respiration)을 하게 되며 이때 질산염 및 황산염과 같은 이온물질이 전자수용체로 작용하게 된다. 한편 토양내부를 호기적 상태로 만들기 위해 공기를 직접 토양내로 공급하여 오염물 분해를 촉진하는 생물학적통풍법 (bioventing)과 같은 방법도 있다. 황산염환원균 (sulfate reducing bacteria) 또한 황산염을 황 및 황화수소염 (HS⁻)으로 환원하여 에너지를 공급받는 미생물인데 오염물은 전자공여체와 탄소원의 역할을 하게 된다.

만일 오염부지의 미생물식생이 좋지 않아 오염물 분해하기 어려운 경우 미생물을 외부에서 주입하는 방법 (bioaugmentation)을 고려할 수 있다(3, 4). 이때 외래 미생물의 특성은 공정 적용 전에 면밀히 조사되어야 하며 때에 따라 특별한 배양 성분을 공급할 수 있다. 본 연구의 경우 phenanthrene으로 오염된 토양을 동전기 생물학적복원을 실시하였는데 이 오염물에 높은 분해 활성을 가지는 외래 미생물을 분리하여 이용하였다. 이때 플라스크 배양에서 적절한 오염물 분해를 나타내는 배지 성분을 선택하였는데 황산염이 오염물 분해에 에너지원으로 작용하는 것으로 판단되었다. 하지만 황산염원으로 사용한 magnesium sulfate는 전기장하에서 특별한 화학적 반응을 일으켜 미생물의 활성이 크게 감소하였으므로 다른 황산염을 고려하지 않을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 magnesium sulfate를 황산염원으로 사용했을 때 어떠한 문제가 일어나는지를 관찰한 다음, 다른 황산염원을 적용할 때 미생물활성, 매질의 환경 변화, 제거효율을 관찰하여 동전기 생물학적복원을 적용할 때의 필요조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

토양시료 및 동전기장치

Phenanthrene은 디젤에 포함되어 있는 다환 방향족 탄화수소 (poly-cyclic aromatic hydrocarbon)의 하나이며 엔진배기가스의 주요 구성성분이다(11). 동전기 생물학적복원에 적합한 낮은 휘발도와 낮은 이동성을 가지고 있으므로 대표 오염물로 선택하였다. 모델 토양은 카울린 (산청, 한국)이며 체로 걸러서 입경 300 μ 이하의 것을 사용하였다. 토양의 종류는 양토 (loam)이며 유기물을 적게 포함하고 있었다. 카울린은 비교적 낮은 양이온 교환능을 가지므로 각종 물질과 토양표면 사이의 상호작용을 최소화하고 전기장하에서 전압경사, 미생물이동, 토양 pH를 비교적 정확하게 평가할 수 있다. 카울린 450 g과 phenanthrene을 용해시킨 아세톤과 혼합한 후 완전히 휘발시켜 초기농도를 200 mg/kg-dry soil로 만들었다. 토양시료의 초기습수율을 25%로 조절하였으며 제조된 토양시료를 동전기 반응기의 가운데 구역 (4 cm 가로 \times 4 cm 세로 \times 10 cm 길이)에 충전하였다(Fig. 1). 전극재질은 양극의 경우 백금도금 스텐리스강, 음극은 스텐리스강으로 제작하여 전극조 (4 cm 가로 \times 4 cm 세로 \times 7.5 cm 길이)의 바깥쪽에 위치하게 하였다. 생물반응기 (bioreactor)는 1 L의

전해액을 포함하고 있으며 토양에 전해질을 공급하고 전기분해로 발생한 수소이온과 수산화이온을 중화시키는 역할을 한다. 토양과 생물반응기 내의 이온농도를 유지하고 갑작스런 pH 변화를 조절하기 위해 전해액을 생물반응기에서 양극전해조로 이동시키고 중간에 연결된 관을 통하여 음극전해조로 유입한 다음 생물반응기로 돌아오게 하였으며 이때 순환속도는 6.7 ml/min이었다. 생물반응기는 동전기 반응기 아래에 위치하여 수두차에 의한 토양내 흐름을 제한하였다.

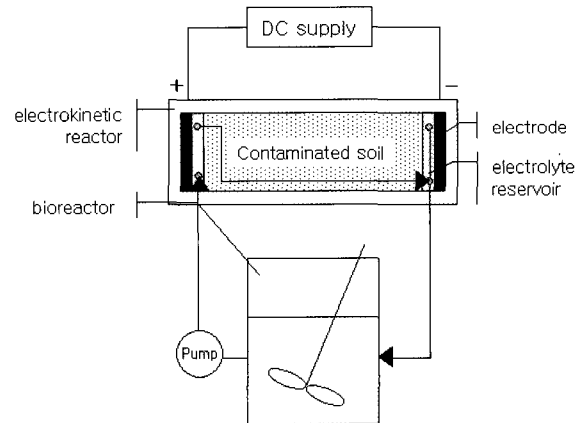


Figure 1. Schematic diagram of the experimental EK process.

미생물과 전해질 조성

동전기 생물학적복원에 사용한 미생물은 *Sphingomonas* sp. 3Y이며 디젤오염지역에서 분리하였다. 이 미생물은 평판배지에서 phenanthrene을 유일 탄소원으로 했을 때 성장하였으므로 분해능을 가지는 것으로 판단하였다. 미생물의 최적 성장 온도와 pH는 각각 30°C와 7이었다.

Phenanthrene을 유일 탄소원으로 플라스크 배양을 했을 때 미생물 성장과 오염물 분해에 적절한 배지조성 (g/l)은 5.0 KNO₃, 0.6 NaH₂PO₄, 1.6 Na₂HPO₄, 0.7 KCl, 0.3 Na₂SO₄, 3.0 MgSO₄·7H₂O, 0.002 CaCl₂이었다. 이러한 배지조성을 전해질로 이용한 동전기 생물학적복원의 예비 실험의 결과, Mg이온이 음극으로 전기이동하여 수산화이온과 결합하여 전해액과 토양 pH가 원래의 중성영역에서 벗어나게 되어 미생물 활성에 감소시키게 되었다(12). 따라서 이러한 문제에 대한 해결하기 위해 magnesium sulfate를 대체하는 다른 황산염원을 이용하여 그 결과를 비교·분석하고자 하였다.

대체 황산염원으로 수산화이온과 결합 가능성이 낮은 ammonium sulfate와 disodium sulfate를 선택하였다. 미생물의 효과적인 활성 유지를 위해 pH 변화에 영향을 미치지 않는 최소량의 Mg을 첨가하였으며 배지 조성을 Table 1에 정리하였다. Exp. 1은 예비 실험에서 사용한 기본 배지이다.

Table 1. Experiment conditions

Exp. no	sulfate source	the remainder (g/l)
1	12.2 mM MgSO ₄ , 2.1 mM Na ₂ SO ₄	0.6 NaH ₂ PO ₄ ,
2	12.2 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.2 mM MgSO ₄	1.6 Na ₂ HPO ₄ ,
3	12.2 mM Na ₂ SO ₄ , 1.2 mM MgSO ₄	5.0 KNO ₃ , 0.002 CaCl ₂

동전기 생물학적복원

동전기 생물학적복원을 시작하기 전에 미생물을 영양배지로 배양하여 농축시키고 배양된 균체를 전해액으로 두 번 세척하였다. 배양된 균체를 생물반응기에 첨가한 후 모두 1.88 mA/cm²의 정전류를 공급하였고 일주일간 운전하였다. 공정을 운전하는 동안 토양에 있는 phenanthrene이 유일한 탄소원으로 공급되었으며 생물반응기는 30℃와 250~300 rpm으로 운전하였다.

분석

토양 중의 phenanthrene의 농도는 C₁₈ symmetry column과 UV검출기로 구성된 HPLC (Waters, 미국)로 분석하였다. 동전기 생물학적복원이 끝나면 토양 시료를 동전기 반응기에서 즉시 분리하여 균일한 두께로 5등분하였다. 각 토양부분을 100℃의 오븐에서 12시간 동안 건조하여 분쇄한 후 일부를 취해 약 1 g의 시료를 10 ml 메탄올과 섞어 밀봉하였다. 추출은 25℃, 180 rpm의 교반기에서 이틀간 실시하였다. 추출이 끝나면 상등액의 부유토양을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 맑은 부분을 HPLC 시스템에

주입하였다. 이 때 이동상은 acetonitrile과 증류수 (85 : 15, v/v)로 구성하였으며 유속은 1.0 ml/min이었다.

토양 용액 중 미생물 농도 (colony forming unit, CFU)는 Profile™ (New Horizons, 미국)으로 측정된 상대광도단위 (relative light unit)로 계산하였다.

결과 및 고찰

전압경사와 전력소비

Fig. 2(a)에서 전해질 이온이 전기이동에 의해 전해조에서 토양으로 이동함에 따라 토양저항이 낮아지므로 전압경사 또한 감소하여 20시간 이내에 정상상태에 도달하였다. 황산염 종류에 따른 전압경사의 변화는 거의 비슷한 경향을 나타냈다. 전압경사가 안정된 다음 전압경사의 크기는 황산염의 짝이온으로 Mg²⁺ > NH₄⁺ > Na⁺의 순서였다. 토양내 전류는 이온 (전하)이동에 의한 것이므로 전압경사(토양저항)가 크다는 것은 이온의 이동속도가 낮다는 것을 의미한다. 따라서 에너지소비측면에서도 전압경사의

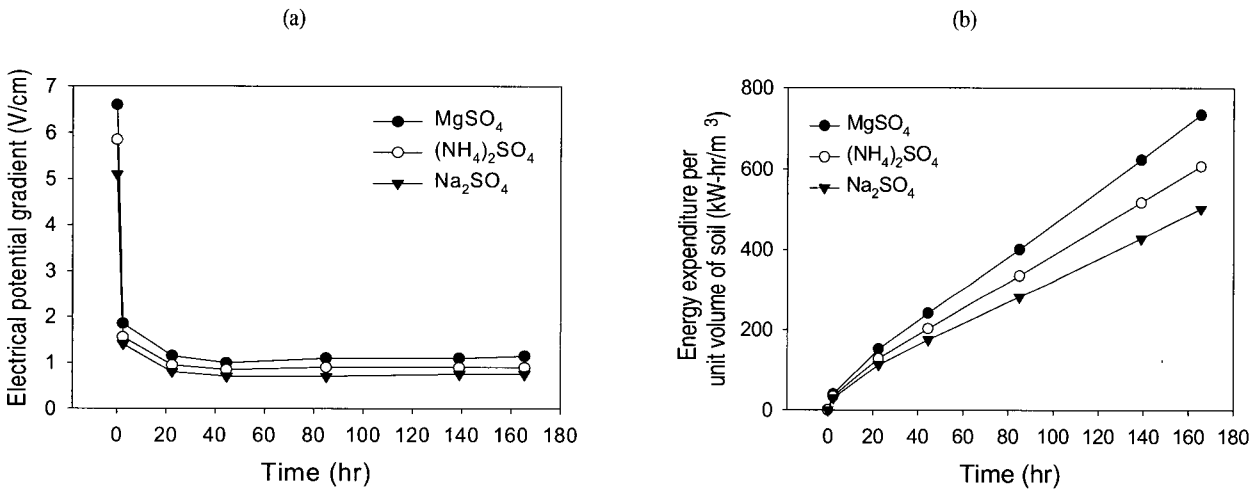


Figure 2. Change in (a) electrical potential gradient and (b) energy expenditure during EK bioremediation.

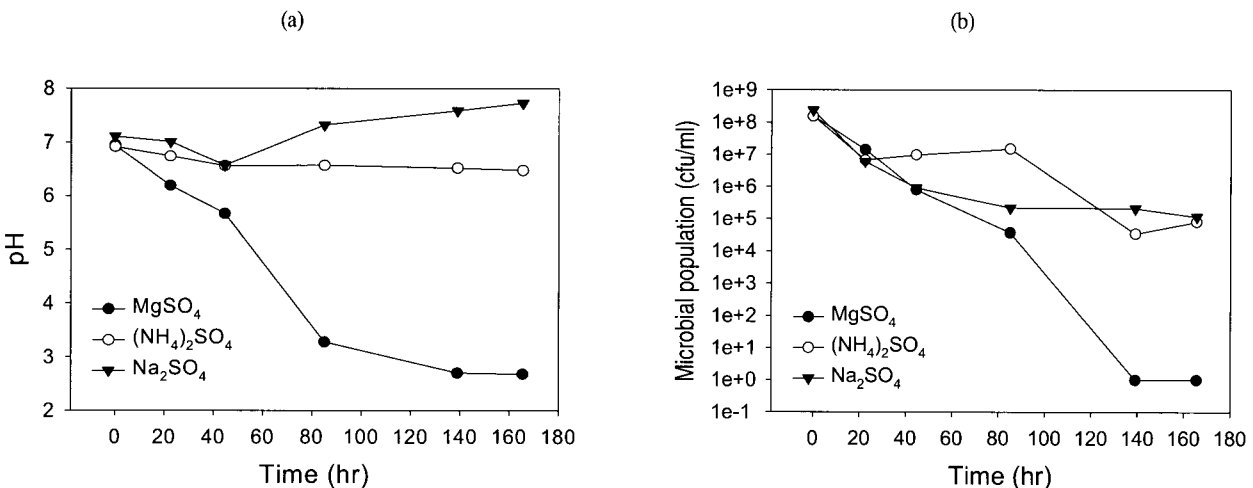


Figure 3. Change in (a) pH and (b) bacterial growth during EK bioremediation.

크기가 가장 작았던 Na^+ 이 가장 좋았으며 그 다음은 NH_4^+ 과 Mg^{2+} 이었다(Fig. 2(b)).

생물반응기에서 미생물의 성장

Fig. 3(a)에서 magnesium sulfate의 경우 음극조에서 흰색 부유물 ($\text{Mg}(\text{OH})_2$)이 다량 생성되었다. 따라서 수산화이온이 소수이온을 중화시키지 못하므로 생물반응기를 포함한 양쪽의 전해조에서 pH가 크게 감소하였다. Ammonium sulfate와 disodium sulfate를 이용한 경우 이러한 침전물이 생성되지 않았으며 전해액 pH가 중성영역으로 유지되는 것을 알 수 있었다. Fig. 3(b)에서 magnesium sulfate의 경우 낮은 pH에 의해 미생물농도가 계속 감소하여 거의 소멸되었지만 ammonium sulfate와 disodium sulfate의 경우 초반에는 탄소원의 부족으로 미생물농도가 감소하는 것으로 보이며 그 이후에는 잘 유지되고 있으므로 이것을 통해 장기간의 동전기 생물학적복원의 운전에서도 지속적인 오염물의 분해능을 유지할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

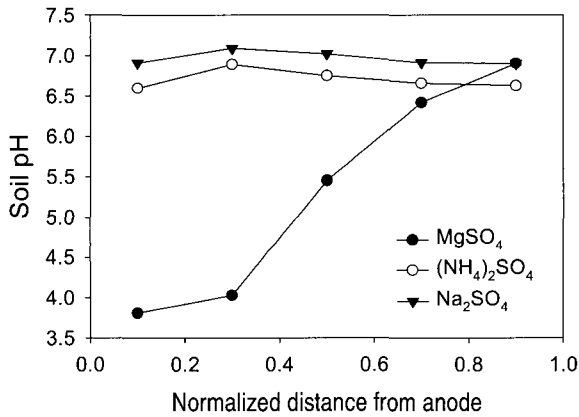


Figure 4. Distribution of soil pH at the end of EK bioremediation.

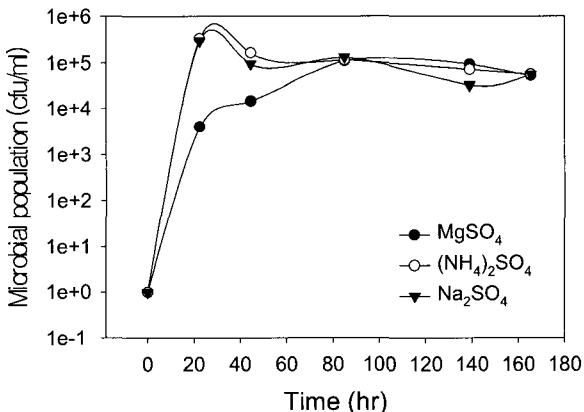


Figure 5. Change of bacterial population in soil solution during EK bioremediation.

토양 pH와 미생물농도

Fig. 4는 복원공정을 종료한 후 토양 pH의 분포를 나타낸 것이다. magnesium sulfate의 경우 양극에서 음극 쪽으

로 3.8에서 6.9의 pH 경사가 관찰되었다. 이와 같이 비록 강산성인 전해질과 달리 토양 pH는 그보다 높은 구간이 존재하는 것은 전해질에 포함된 인산염이 토양에 공급되어 토양의 완충능을 상승시켰기 때문이다. 다만 양극부근의 토양에서는 산전선이 미치는 영향이 강하므로 pH 3.8의 낮은 값을 나타내었다. 반면 ammonium sulfate와 disodium sulfate의 경우는 생물반응기의 전해질이 거의 중성으로 유지되었으므로 토양 pH도 중성으로 유지되었다.

미생물의 토양내 이동은 전기영동과 전기삼투에 의해서 각각 양극과 음극을 향하며 미생물 군체의 크기에 따라 그 영향의 정도가 결정된다. 예비 실험에서 조사한 결과 전기영동이 전기삼투보다 1.7에서 4.3배의 유속으로 미생물을 이동시키며, 특히 전압경사의 변화에 따라 전기삼투가 영향을 받게 된다(13, 14). 따라서 측정된 토양 용액의 미생물농도는 양쪽의 전극에서 이동한 것이며 전극조의 미생물농도와 토양 pH에 직접적인 영향을 받는다. Fig. 5는 토양시료의 중앙 위치 (양극으로부터 5 cm)에서 측정된 미생물농도를 보여주고 있다. Magnesium sulfate의 경우 생물반응기의 미생물활성이 낮은 pH에 의해 저해됐으므로 초반 미생물의 공급이 다른 두 개보다 낮게 나타났다. 하지만 중반이후부터는 이 위치에서 토양 pH가 5.5의 약산성이고 미생물활성의 저해가 미미하므로 세 가지 황산염원간의 농도격차가 줄어드는 것을 관찰하였다.

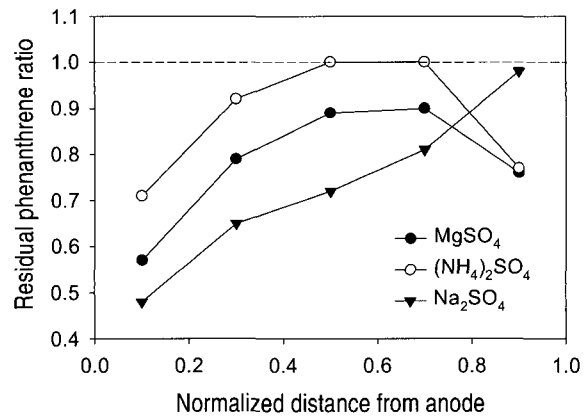


Figure 6. Residual phenanthrene distribution at the end of EK bioremediation.

Phenanthrene의 제거

Fig. 6은 토양위치별 phenanthrene-제거분포를 보여주고 있다. 세 가지 황산염원 모두 양극부근의 오염물이 주로 제거되었으며 음극으로 갈수록 제거율이 감소되었다. 이것은 양극에서 발생하는 산소가 전기삼투흐름을 따라 인접 토양으로 공급되어 미생물활성을 증가시키며 용존산소의 농도가 약산성 환경에서 보다 높게 나타나므로 양극부근에서 오염물이 더욱 분해되었다. 미생물활성이 제거된 기준실험에서 phenanthrene은 전기삼투의 세척효과에 의해 거의 이동 및 제거되지 않았으며 제거율은 4.6%에 불과하였다.

제거율은 magnesium sulfate를 사용했을 때 21.8%였으며

ammonium sulfate의 경우에는 12.0%로 제거율이 낮게 나타났으며 disodium sulfate는 27.2%의 가장 높은 제거율을 나타내었다. 여기에서 비록 ammonium sulfate가 생물반응기와 토양내 pH가 미생물생장에 적합한 환경을 제공하였으나 phenanthrene의 분해속도는 지연시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Yuan의 보고와 일치하여 ammonium (0.2 g/l)을 첨가했을 때 phenanthrene의 생분해가 지연되었다 (15). 결과적으로 disodium sulfate는 위에서 기술한 바와 같이 미생물활성을 성공적으로 유지할 수 있었으며 이에 따라 제거효율의 증가를 나타냈다. 본 공정은 1주일의 단기간 동안의 영향을 비교하였으나 처리기간이 보다 길어지면 이와 같은 제거효율의 차이는 더 커질 것으로 예상된다.

요 약

본 연구는 미생물이 오염물 분해를 위해 황산염이 필요한 동전기 생물학적복원에서 황산염원의 종류가 제거효율에 미치는 영향을 조사하였다. 대표오염물과 적용 미생물은 각각 phenanthrene과 *Sphingomonas* sp. 3Y였다. Magnesium sulfate를 이용했을 때 Mg이온은 음극에서 전기적으로 생성되는 수산화이온과 결합하여 전해질 pH를 크게 감소시키고 미생물활성을 저해하는 현상이 관찰되었다. 따라서 ammonium sulfate와 disodium sulfate를 이용했을 때 전해질 및 토양 pH가 중성영역으로 유지되었으며 미생물 활성도 높게 유지되었다. 하지만 전자의 경우 ammonium이 미생물의 오염물 분해를 지연시켜 제거효율이 오히려 magnesium sulfate의 21.8%보다 12.0%로 더 낮게 나타났으며, 반면 후자의 경우 27.2%로 제거효율이 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 제거효율의 차이는 장기간의 처리에서는 더욱 두드러질 것으로 예상된다.

감 사

본 연구는 국가지정연구실사업 (M1-0203-00-0001)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cookson, J. T. (1995), *Bioremediation Engineering*, McGraw-Hill Inc., USA.
2. Mohammed, N. (1996), State-of-the-art review of bioremediation studies, *J. Environ. Sci. Hlth.* **A31**(7), 1547-1574.
3. Luo, Q., Zhang, X., Wang, H., and Y. Qian (2005), The use of non-uniform electrokinetics to enhance in situ bioremediation of phenol-contaminated soil, *J. Hazard. Mater.* **B121**, 187-194.
4. Kim, S. J., Park, J. Y., Lee, Y. J., Lee, J. Y., and Yang, J. W. (2005), Application of a new electrolyte circulation method for ex situ electrokinetic bioremediation of a laboratory-prepared pentadecane contaminated kaolinite, *J. Hazard. Mater.* **B118**, 171-176.
5. Clarke, R. L., Lageman, R., Pool, W., and S. R. Clarke (1998), Electrochemically-aided biodigestion of organic materials, US Patent 5,846,393.
6. DeFlaun, M. F. and C. W. Condee (1997), Electrokinetic transport of bacteria, *J. Hazard. Mater.* **55**, 263-277.
7. Shapiro A. P. and R. F. Probst (1993), Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis, *Environ. Sci. Technol.* **27**(2), 283-291.
8. Acar, Y. B. and A. N. Alshwabkeh (1996), Electrokinetic remediation. I. Pilot-scale tests with lead spiked kaolinite, *J. Geotec. Eng.* **122**, 173-185.
9. Pamukcu, S., Weeks, A., and J. K. Wittle (1997), Electrochemical extraction and stabilization of selected inorganic species in porous media, *J. Hazard. Mater.* **55**, 305-318.
10. Acar, Y. B. and A. N. Alshwabkeh (1993), Principles of electrokinetic remediation, *Environ. Sci. Technol.* **27**, 2638-2647.
11. Cooper, D. A., Peterson, K., and D. Simpson (1996), Hydrocarbon, PAH and PCB emissions from ferries: A case study in the Skagerak-Kattegat-Oresund region, *Atmos. Environ.* **30**, 2463-2473.
12. Zhu, W. H., Ke, J. J., Yu, H. M., and D. J. Zhang (1995), A study of the electrochemistry of nickel hydroxide electrodes with various additives, *J. Power Sources* **56**(1), 75-79.
13. Kim, S. J., Park, J. Y., Lee, Y. J., and J. W. Yang (2005), Bacterial behavior in soil under electric field and its effect on electrokinetic bioremediation. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* (submitted).
14. Hamed, J., Acar, Y. B., and R. Gale (1991), Pb(II) removal from kaolinite by electrokinetics, *J. Geotech. Engin.* **117**, 241-271.
15. Yuan, S. Y., Chang, J. S., and J. H. Yen (2001), Biodegradation of phenanthrene in river sediment, *Chemosphere* **43**, 273-278.
16. Huckel, M., H. J. Wirth, and T. W. Hearn (1996), Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **31**, 165-179.
17. Ding, L. and B. Qu (2001), New supports for enzyme immobilization based on the copolymers of poly and α - ω -poly, *React. Funct. Polymers* **49**, 67-76.