

디젤오염토양의 생물학적 복원에 있어서 유기질비료의 첨가가 석유계 탄화수소의 분해 및 ATP 변화에 미치는 영향

이주현* · 전관수†

*대구대학교 건설환경공학부 · 영남대학교 건설환경공학부

(2006년 3월 6일 접수, 2006년 7월 6일 채택)

Effects of Compost Amendment on Petroleum Hydrocarbon Removal and ATP Concentration in Bioremediation of Diesel Contaminated Soil

Joo-Heon Lee* · Kwan-Soo Jun†

*Division of Architecture, Civil and Environmental Engineering, Taegu University
School of Civil and Environmental Engineering, Yeungnam University

ABSTRACT : The effects of compost amendment on the removal of petroleum hydrocarbons and the activities of microorganisms in soil ecosystem have been studied in bioremediation of diesel contaminated soil. The relation between biological activities and removal of petroleum hydrocarbon was determined by ATP(Adenosine Triphosphate), n-alkanes and TPH concentration analysis. After 80 days of bioremediation, the removal of TPH in soil amended with compost increased more than 10% compared with control soil which was tilled in the same condition without compost addition. The biodegradations of n-alkanes having 12 to 20 moles of carbon were distinctive. As the soil was contaminated with more diesel, the ATP has decreased rapidly. When the TPH amounted to 80,000 mg diesel/kg, the ATP decreased to 4 ng/g from initial concentration of 65 ng/g. While the ATP in the compost amended soil increased to 112 ng/g after tilling for 6 days, the ATP in the control increased to merely 36 ng/g after tilling for 14 days. Also while the control soil showed a lag time in ATP increase, the compost amended soil did not show that but showed a rapid ATP increase within a short time. The patterns of changes in ATP concentration were similar to those in daily removals of TPH with time difference of about 7 days.

Key Words : Diesel Contaminated Soil, Petroleum Hydrocarbon, Compost, Biological Activities, ATP, Bioremediation

요약 : 디젤로 오염된 토양에서 유기질비료의 투여가 석유계탄화수소의 생분해에 미치는 영향을 연구하는 한편, 토양의 생태활성과 디젤의 분해도의 관계를 규명하기 위하여 토양내 ATP(Adenosine Triphosphate)농도를 측정하였다. 초기의 자연상태에서 65 ng/g이었던 ATP 농도는 디젤의 오염이 가중됨에 따라 급속하게 감소하여 유류오염도가 80,000 mg diesel/kg까지 증가하자 4 ng/g으로 크게 감소하였다. 건토기준 10%의 유기질비료를 투입한 결과 석유계총탄화수소의 80일간 최종분해율은 대조시료에 비하여 10% 이상 증가되었고, 특히 C12~C20에 해당하는 n-alkanes의 분해가 증가되었다. 또한 유기질비료를 혼합한 경우가 대조시료에 비하여 약 3배 정도의 ATP 농도증가를 보여주어 6일후 112 ng/g의 ATP 농도를 보여주었고, ATP 농도증가의 형태에 있어서도 지연시간을 나타내지 않고 빠른 시간 내에 급속한 증가를 보여주었다. 석유계총탄화수소의 일평균 감소와 ATP 농도는 약간의 시간차이를 두고 유사한 형태를 보여주었다.

주제어 : 디젤오염토양, 석유계탄화수소, 퇴비, 미생물활성, ATP, 생물학적 토양복원

1. 서론

미국 환경보호청(USEPA)에 의하면 1990년대 초 미국에서만 약 137,000개의 지하저장시설(UST)에서 다양한 화학물질의 누출이 확인되었으며,¹⁾ 1990년대 말에는 약 200,000개 이상의 지하저장시설에서 누출이 일어나고 있는 것으로 추정하고 있다.²⁾ 지하저장시설로부터 누출되어 토양을 오염시키는 물질 중 최근 문제가 되고 있는 것으로는 인간의 거의

모든 활동에 사용되고 있는 다양한 종류의 유류를 예로 들 수 있다. 석유의 이용이 증가함에 따라 사고와 부주의에 의해 환경으로 유출되는 석유의 양 또한 증가하고 있고 각종 유류의 저장 및 송유시설은 탱크와 관거의 부식으로 인한 유류 유출의 주요 원인이 되고 있으며, 여러 공업지역의 토양 및 지하수에 심각한 오염원이 되고 있는 실정이다. 토양 환경보전법에서 토양오염유발시설로 지정된 시설은 1999년을 기준으로 19,625개소에 달하며, 이들 시설로부터 유류누출에 의한 토양오염은 국내의 자료에 비추어 볼 때 약 10~29%에 이르는 것으로 추산되고 있다.³⁾

미생물을 이용한 생물학적 복원기술(bioremediation)은 1972

† Corresponding author
E-mail: ksjun@yu.ac.kr
Tel: 053-810-2549

Fax: 053-813-3440

년 미국의 펜실베이니아에서 파이프로 누출된 가솔린의 처리에 도입된 이래 해안과 토양의 유류 처리에 이용되었으며 많은 성공 사례가 보고됨에 따라 적용 사례가 점차 확대되어 가고 있다.⁴⁾ 생물학적 처리공법은 탄화수소로 오염된 토양, 특히 원유를 400°F에서 600°F의 증비점 온도에서 증류하여 얻는 대부분의 일반적인 유류, 즉 Jet 연료, 난방유 No. 2, 디젤유 등으로 오염된 토양을 처리하는 공정들 중 가장 비용효과적인 공정으로 부각되고 있다.⁵⁾ 이 기술은 생분해 미생물의 오염물질 분해 능력을 촉진시켜서 오염 토양을 처리하는 방법이므로 오염 부지의 토착 미생물의 존재 여부와 미생물 대사경로에 관련된 다양한 인자들이 큰 영향을 미친다. 석유계 탄화수소의 분해경로는 유류의 생분해를 포함한 자연분해에 영향을 미치는 무생물인자들에 의해 결정되며, 생물의 성장률과 효소의 활성에 영향을 미치는 인자들이 석유계탄화수소의 생분해에 큰 영향을 미친다. 또한 석유계 오염물질의 분해는 탄화수소 혼합물의 성상과 양 및 생태계의 특성에 따라 좌우된다. 어떠한 환경에서는 좀처럼 분해되지 않는 석유계 탄화수소가 다른 환경조건에서는 몇 시간 또는 며칠의 짧은 기간 내에 완전히 분해되기도 한다.⁶⁾ 생물학적 활성도는 석유계탄화수소의 분해에 있어서 매우 중요한 요소이며, 김 등⁷⁾은 미생물의 ETS(Electron Transport System)와 미생물계수법(colony forming units)을 이용하여 석유계탄화수소로 오염된 토양의 생물학적 활성도를 평가하였다. 또한 박 등⁸⁾은 미생물의 활성도를 간접적으로 파악하는 인자로서 CO₂의 배출량을 평가하였다. Hur 등⁹⁾은 CO₂의 배출량과 탄화수소이용 미생물의 수를 평가하기 위하여 MPN기술을 활용하였고, 탈수소효소에 의해 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)가 TPF(triphenylformazan)로 환원되는 특성을 이용한 분광학적 기법을 이용하여 탈수소효소의 활성을 평가하였다. Lee 등¹⁰⁾은 유류오염 토양에서 석유계탄화수소의 분해와 그와 관련된 미생물의 활성을 호기성 미생물의 호흡율을 측정하여 평가하였다.

본 연구에서는 디젤로 오염된 토양의 생물학적 복원기술에서 유기질비료를 투여할 경우에 대한 석유계총탄화수소(TPH)의 분해와 n-alkanes 및 branched alkanes의 분해를 평가하였다. 또한 유류의 생분해과정에서 미생물활성도를 평가하는 하나의 방법으로서 물질분해 에너지의 보존과 합성 및 합성효소반응 등에 관여하고 생체의 에너지변환 중에서 중심적인 역할을 수행하는 ATP(Adenosine Triphosphate)의 농도를 측정함으로써 석유계 탄화수소의 분해와 그에 따른 ATP의 변화 특성을 연구하였다. ATP의 농도는 생물학적 활성도를 직접적으로 표현하는 지표로 활용할 수 있으며, 토양의 오염도와 분해에 따른 생물학적 활성도, 오염토양의 복원과 생물학적 활성도의 관계 등을 확인할 수 있는 수단으로서 사용될 수 있다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료

Table 1. Soil characteristics(based on dry wt.)

Soil texture	Sandy Loam	
	Gravel(%)	1.4
Sand(%)	79.9	
Silt(%)	9.2	
Clay(%)	9.5	
pH	7.0	
Moisture content(%)	14	
ATP(ng/g)	65.0	
Heavy metals(mg/kg)	Pb	0.68
	As	0.69
	Cu	0.13
	Cr ⁶⁺	ND
	Cd	ND
	Hg	ND

2.1.1. 토양

밭 토양을 5 mm 크기의 체로 친 후 사용하였고, 미국 농무부(U.S Dept. of Agriculture)의 기준으로 양질사토(loamy sand), 국제토양학회의 기준으로는 사양토(sandy loam)의 토성을 나타내었다.¹¹⁾ ATP의 농도는 건조토양을 기준으로 65.0 ng/g인 것으로 분석되었다. 그밖에 토양오염공정시험법에 의해 분석된 토양의 pH와 수분함량 및 중금속 용출농도의 결과는 Table 1과 같다.

2.1.2. 유기질 비료

유기질 비료는 음식물쓰레기를 35일간 호기적으로 발효시켜 만든 것으로 수분 함량이 68%이고 C/N비 24.7, ATP가 16 ng/g dry compost이다. 유기질 비료는 숙성 직후에 바로 채취하여 사용하였으며, 그 밖의 특성은 Table 2와 같다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 토양의 오염

디젤을 스프레이를 이용하여 토양에 고루 분무하면서 토양과 디젤을 혼합함으로써 토양을 인위적으로 오염시켰다. 한편, 채취된 토양의 일부는 순수한 미생물 분해분율과 물리화학적 제거분율을 확인하기 위하여 autoclave를 이용 120℃에서 30분간 멸균처리한 후 인위적으로 오염시켰다. 디젤이 토양에 충분히 흡수 흡착되도록 하기 위하여 인위적 오염조

Table 2. Compost characteristics(based on dry wt.)

Moisture(%)	68	
Salinity(%)	0.17	
Carbon(%)	27.2	
Nitrogen(%)	1.1	
ATP(ng/g)	16	
Heavy Metals (mg/kg)	Cd	3.03
	Cu	7.07
	Cr	1.75
	Hg	0.02
	Pb	7.04

작은 하루간격으로 총 4차례에 걸쳐 실시하였으며, 각각의 오염조작에 앞서 소량의 토양시료를 채취하여 각 오염단계 별로 TPH와 ATP를 측정하였다. 최종단계의 오염조작 후 얻어진 시료토양의 TPH농도는 80,000 mg diesel/kg dry soil 이었고, ATP의 농도는 초기 자연상태의 65.0 ng/g dry soil에서 4 ng/g으로 크게 감소하였다.

2.2.2. 유류 분해실험

디젤을 이용하여 토양을 인위적으로 오염시킨 후 멸균처리된 토양시료균과 대조시료균, 유기질비료 첨가시료균으로 각각 나누었다. 유기질비료 첨가시료균은 오염된 토양 3.0 kg에 유기질비료 0.484 kg(0.06 kg dry compost/kg dry soil)을 첨가하여 충분히 혼합시킨 토양을 2 L 용량의 유리비이커 3개에 각각 담은 후 20℃의 항온과 포화습도가 유지되는 차광된 항온항습기 안에 개방된 상태로 두었다. 멸균처리 시료균과 대조시료균 역시 오염된 토양 3.0 kg을 2 L 용량의 유리비이커 3개에 담은 후 항온항습기 안에 개방된 상태로 두었다. 한편, 호기적인 상태를 유지하기 위해 실험기간 동안 모든 시료에 대하여 첫 주에 2일 1회, 2주와 3주에 3일 1회, 4주에 7일 1회, 그 이후에는 15일 1회로 경운(tilling)을 실시하였다. 일반적으로 생분해에 적합한 토양의 수분함량은 토양의 수분보유능력(field capacity)의 50~90%라고 알려져 있는데,^{12,13)} 본 실험에서는 사용된 토양의 수분 보유능력 31%의 약 70% 수준인 20% 전후가 되도록 유지하였다. 실험은 80일 동안 진행되었으며, 증발된 수분을 보충하기 위하여 경운할 때마다 수분을 검토한 후 부족한 경우에는 물을 분무하여 일정한 수분을 유지하였다.

2.3. 시료채취 및 분석

분석을 위한 토양시료는 여러 지점, 다양한 깊이에서 골고루 채취하였으며 80일간의 실험 기간 동안 1주에는 3회/주, 2주에는 2회/주, 3주부터는 7일 간격, 6주 이후에는 15일 간격으로 시료를 채취하여 석유계총탄화수소(TPH)와 n-alkanes, branched isoprenoid alkanes(pristane, phytane), ATP 등을 분석하였다. 한편, n-alkanes 분석을 위한 표준시료는 Accu-Standard Inc.에서 구입한 'Custom Multi-State Hydrocarbon Window Defining Standard'를 이용하였다.

2.3.1. 석유계총탄화수소와 n-alkanes

채취된 시료는 수분을 제거하기 위해 충분한 무수황산나트륨(Na₂SO₄)을 첨가하였고, 디클로로메탄을 넣은 다음 초음파 추출기를 이용해 추출하였다. 추출액으로부터 다시 한 번 수분을 제거한 후 회전 증발 농축기로 농축하여 검액으로 사용하였다. TPH와 n-alkanes 분석에 사용된 GC는 FID가 장착된 DS 6200을 사용하였고, 분석된 각각의 농도는 건조토양을 기준으로 산출하였다. GC의 분석조건은 Table 3과 같다. 한편, 유기질비료를 투입한 시료의 경우에는 유기질비료에 의한 회석효과를 고려하여 분석된 결과에 회석배수(3.484/3.0)를 곱하였다.

Table 3. Operating conditions of gas chromatography for TPH and n-alkane analysis

Column	HP - 1(Methyl silicone, 25 m length × 0.32 mm I.D. × 0.52 μm film thickness)	
	Packing material	Fused silica
	Phase	Non polar
Program	Initial time	2 min
	Initial temperature	60℃
	Progress rate	8℃/min to 320℃
	Final temperature	320℃
	Final time	30 min
Temperature	Injection port	300℃
	Detector	320℃
Detector	Flame ionization detector	
Gas flow	Column	2 mL/min
	Hydrogen gas	33 mL/min
	Air	330 mL/min
	Nitrogen(carrier gas)	28 mL/min
	He(carrier gas)	

2.3.2. ATP

유류오염토양의 생물학적 복원에 있어서 유기질비료의 효과와 그에 따른 생물학적 활성도의 변화를 살펴보기 위하여 ATP(Adenosine Triphosphate)의 농도와 석유계총탄화수소의 농도를 측정하였다. ATP의 농도는 미생물의 활성도를 직접적으로 표현할 수 있으며, 따라서 토양의 오염된 정도와 복원에 따른 생물학적 활성도의 관계를 확인할 수 있는 수단으로 사용될 수 있다.

ATP의 분석은 5 g의 토양 시료에 0.1% sodium pyrophosphate를 주입하여 시료내의 미생물을 탈착시킨 다음 상등액을 사용하였다. 1 mL의 상등액에 0.5% TCA를 0.2 mL를 넣고 vortex한 것에 0.8 mL Tris buffer를 주입하고 vortex한 것을 여과하여 검액으로 사용하였다. 검액 100 μL에 50 μL의 ATP-free water를 넣고 vortex한 다음 100 μL ATP Luciferin-Luciferase를 주입하여 이것을 TD-20/20 Lumino-meter로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 초기 n-alkanes 오염농도

하루간격으로 4차례에 걸친 오염조작으로 얻어진 토양의 석유계총탄화수소(TPH)의 농도는 건조토양기준 80,000 mg diesel/kg이었다. 오염된 토양은 Fig. 1과 같이 decane(C10)~docosane(C22)이 995~2,423 mg/kg 범위를 나타내어 전반적으로 1,000 mg/kg이상의 농도를 나타내었으며, 이들의 합은 분석된 전체 n-alkanes 및 branched alkanes의 92.2%에 해당한다. n-alkanes 중에서도 특히 hexadecane(C16)이 2,423 mg/kg으로 가장 높은 농도를 나타내었고, pentadecane(C15)이 1,967 mg/kg으로 그 뒤를 이었다. 한편, branched alkane으로서 비교적 분해되지 않는 것으로 알려지고 있는 pristane과

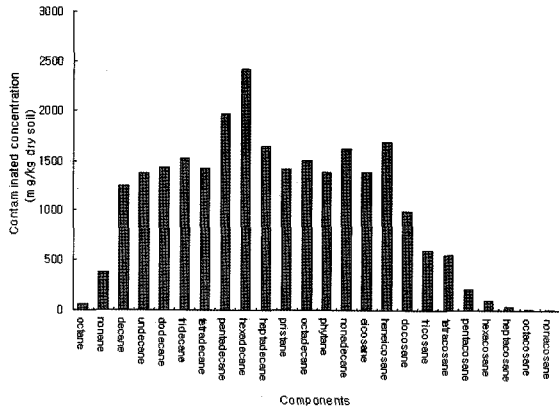


Fig. 1. Initial concentrations of n-alkanes, pristane and phytane in contaminated soil.

phytane은 약 1,400 mg/kg 전후의 농도를 보여주고 있다.

3.2. 유류오염도에 따른 ATP의 변화

하루간격으로 4차례에 걸쳐 이루어진 오염조작 과정동안 각 단계별로 석유계총탄화수소의 농도와 ATP를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 실험결과 디젤에 의한 오염이 가장 될수록 토양에 존재하는 ATP의 농도는 급격하게 감소하여 토양의 석유계총탄화수소 농도가 80,000 mg diesel/kg에 도달하였을 때 ATP는 65 ng/g에서 4 ng/g으로 크게 감소하였다. 이 결과는 디젤의 오염이 토양생태계에 미치는 영향을 보여주는 결과이며, 네 차례에 걸쳐 진행된 오염의 증가가 토양 미생물의 변화를 초래하고 생물학적 활성을 크게 감소시키는 것을 보여준다.

3.3. 석유계총탄화수소의 분해

Fig. 3의 석유계총탄화수소(TPH)의 순수 미생물 분해효율은 평균처리된 시료군으로부터 얻어진 생물학적 제거 이외의 요소를 보정한 결과이다. 평균처리된 시료군으로부터 제거된 석유계총탄화수소의 제거율은 80일간의 실험기간동안 최대 3.8% 미만의 적은 제거율을 나타냈다. 이 결과는 환경에 노출된 석유계탄화수소는 소위 풍화작용이라 불리는 화학적, 물리적, 그리고 생물학적 과정들에 의해 분해되고 그 조성들이 변화되지만 그중에서도 미생분해가 가장 주요한 분해경로로 밝혀진 기존의 연구결과들^{9,14,15}과 유사하다.

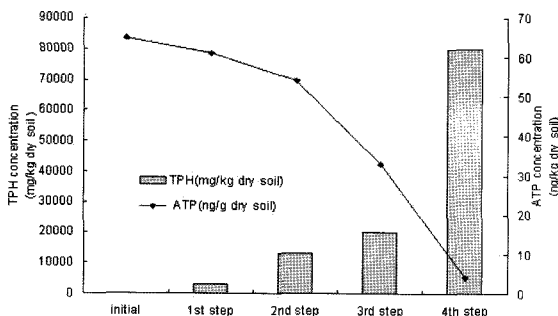


Fig. 2. The correlation between oil contamination and ATP concentration in soil.

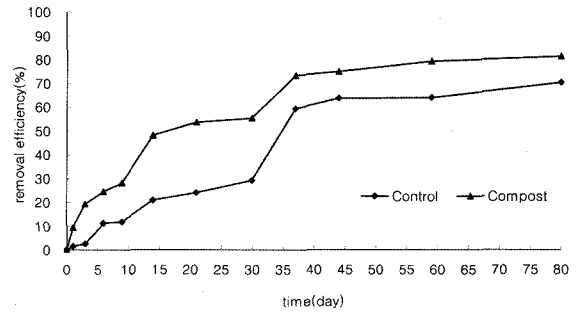


Fig. 3. Volatilization corrected TPH removal in control and compost mixed soil.

약 80일 후의 대조시료군과 유기질비료 첨가시료군의 분해율을 보면 유기질비료를 첨가한 것이 81.4%의 높은 제거 효율을 나타낸 것을 알 수 있다. 어떤 물질도 첨가하지 않은 대조시료의 최종 분해효율이 70.3%인 것과 비교할 때 약 10% 정도의 차이를 보이고 있다. 각각의 경우에 대한 초기 분해율을 살펴보면 유기질비료를 첨가해 준 것은 약 14일 이내에 약 50% 정도의 신속한 분해율을 보인 반면 대조시료의 경우는 30~40일 이후에야 비로소 큰 변화를 나타내고 있다. 대조시료의 경우 30일까지는 석유계총탄화수소의 분해를 증가가 비교적 일정하게 나타나지만 30일 이후에 29.3%에서 59.3%로 분해율이 급속히 증가하였다. 그러나 유기질비료를 첨가한 토양의 석유계총탄화수소의 분해율은 10일 이후에 28.2%에서 48.1%로 크게 증가하였고, 다시 30일 이후에는 55.4%에서 73.3%로 크게 증가하였다. 이 같은 결과는 유기질비료의 첨가가 토양내 미생물의 종이나 개체수의 증가 혹은 활성을 증가시켜 분해시기가 앞당겨진 것이라고 판단된다. 이 결과로 볼 때 유류로 오염된 토양에 유기질비료를 혼합하여 주는 것은 유류의 생분해를 증진시키는데 도움이 됨을 알 수 있으며, 따라서 유기질비료는 오염된 토양의 토양개량제로 사용할 수 있다. 그러나 단순히 유기질비료만을 혼합하여서는 석유계총탄화수소의 충분한 분해효율을 얻기가 곤란한 것으로 판단되며, 따라서 유기질비료를 첨가함으로써 초기 분해를 진전시킨 후 후속적인 별도의 물리 화학처리를 고려해 볼 만하다. 37일 이후에는 대조시료와 유기질비료 혼합시료 모두 큰 변화를 나타내지 않고 실험이 종료될 때까지 완만한 분해율의 증가를 유지하였다.

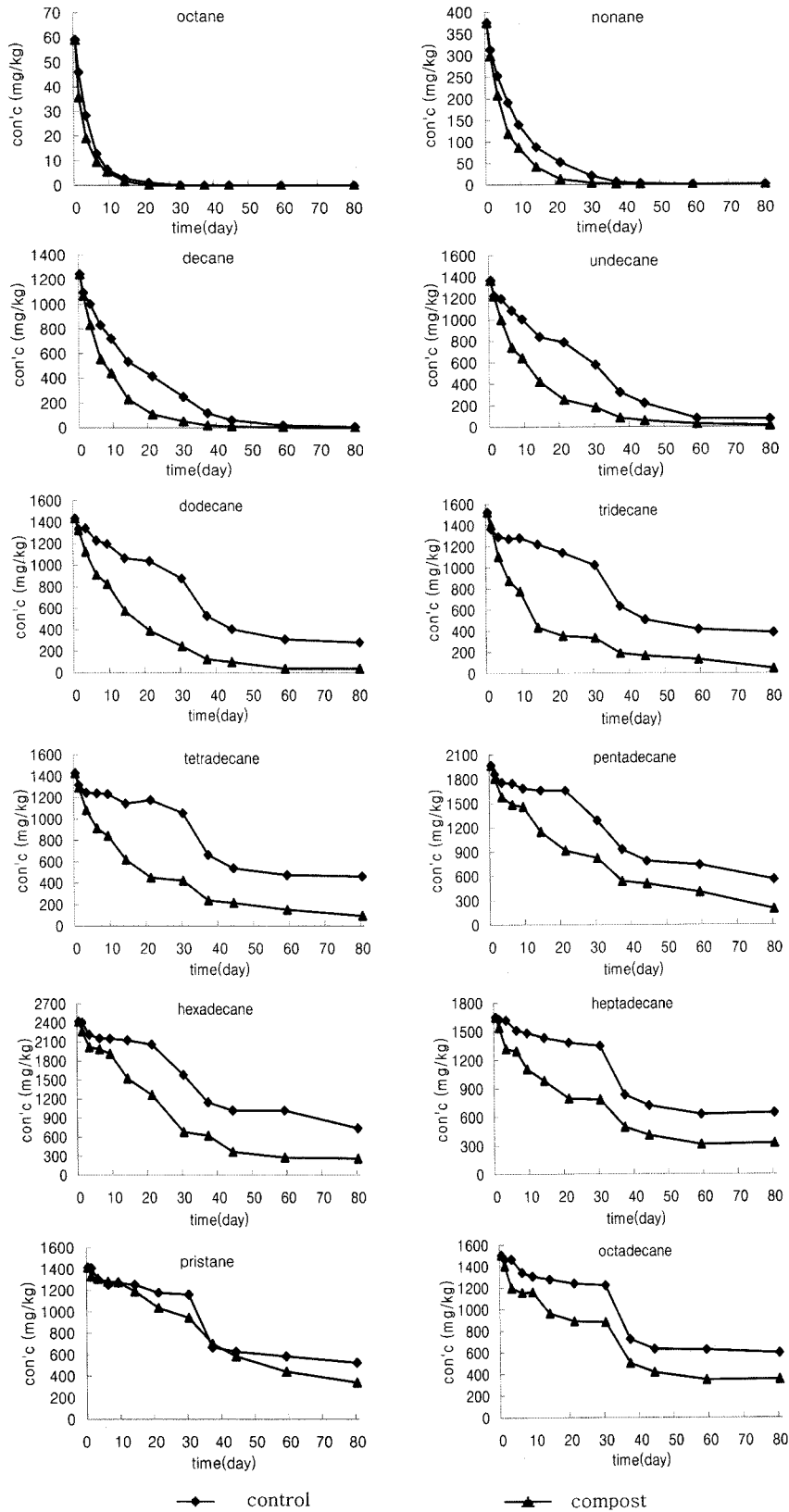
3.4. n-alkanes의 분해

n-alkanes의 생분해는 일반적으로 monoterminial attack에 의해 진행되며, 대개는 1차 알코올로 분해된 후 aldehyde와 monocarboxylic acid로 전환된다.¹² 또한 carboxylic acid의 분해는 후속적으로 2탄소단위(two-carbon-unit)의 더 짧은 지방산과 acetyl coenzyme A의 형성과 함께 β-산화에 의해 이루어지며 종국에는 CO₂로 분해된다. 일부 독성을 갖는 지방산은 탄화수소의 생분해동안 축적이 일어나는 것이 발견되었다.¹⁶ 또한 ω-산화가 보고된 바도 있다.¹⁷ 때로는 n-alkanes의 생분해에서 2차 알코올과 후속적인 ketone을 형성하는 subterminal oxidation이 일어나기도 하지만 이것이 대

부분의 n-alkane을 이용하는 미생물에 의해서 일어나는 기본적인 물질대사 경로로 보이지는 않는다.¹⁸⁾

Fig. 4는 석유계총탄화수소를 구성하는 n-alkanes의 시간에

따른 변화를 보여주는 것으로 분해속도와 최종 잔류농도를 살펴보면 유기질비료의 혼합이 각 성분의 생분해에 어떠한 영향을 미치는지를 알 수 있다.



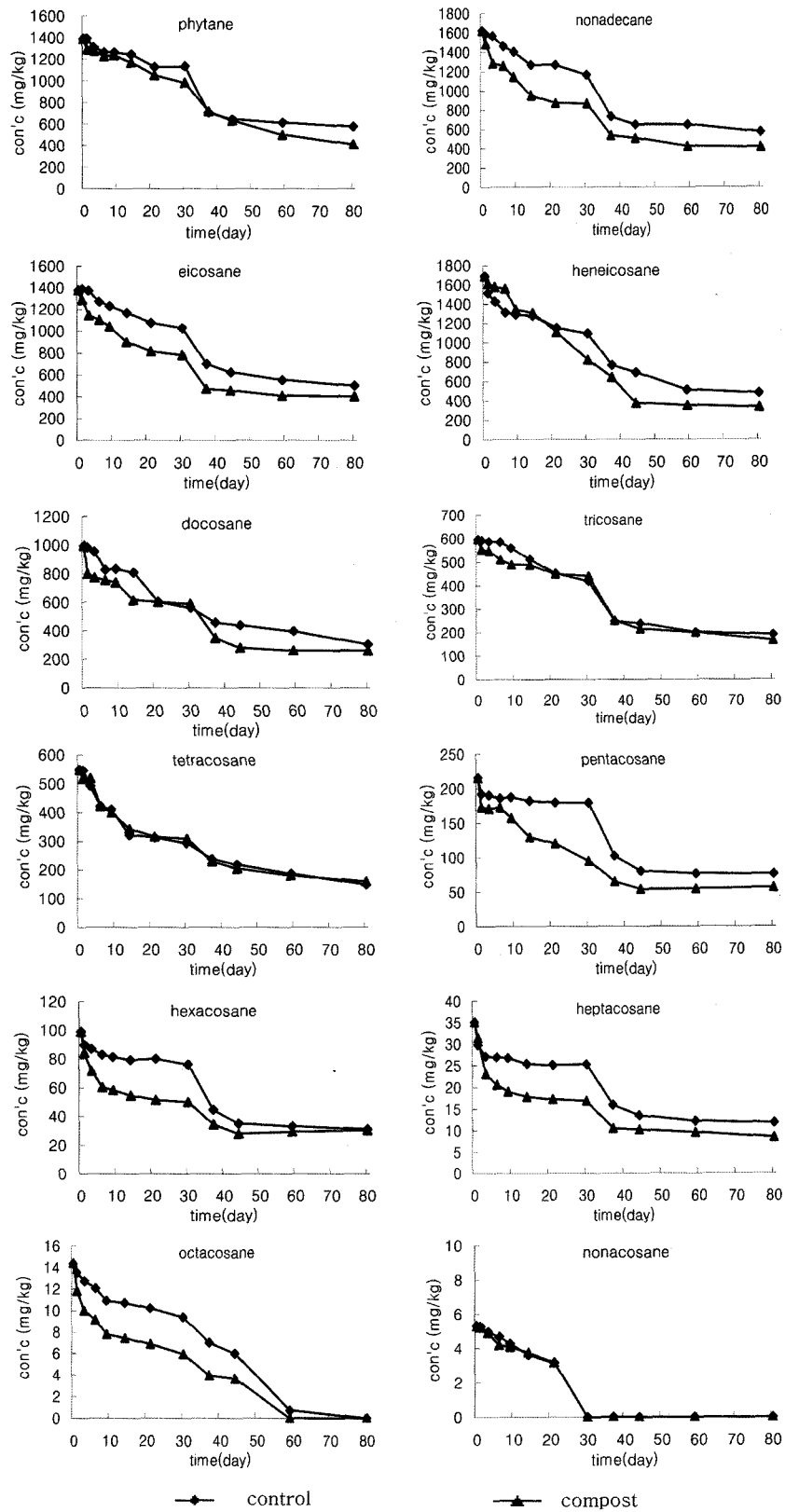


Fig. 4. Volatilization corrected concentrations of n-alkanes and branched alkanes in control and compost mixed soil.

분석결과 분자량이 작은 octane, nonane과 분해가 비교적 어려운 것으로 알려진 pristane, phytane, 탄소함량 C21 이상의 heneicosane, docosane, tricosane, tetracosane, nonacosane

등은 유기질비료의 영향을 적게 받는 것으로 나타났다. 탄소 함량 C9 이하의 분자량이 작은 물질의 경우 분해가 빠르기 때문에 유기질비료를 첨가한 것과 첨가하지 않은 것의 차이

가 크지 않은 것으로 보여 진다. 반면, 생물적인 분해가 어려운 pristane, phytane과 탄소함량 C21 이상의 분자량이 큰 heneicosane, docosane, tricosane, tetracosane, nonacosane 등은 대조시료와 유기질비료를 혼합한 시료의 분해도가 서로 유사하게 나타나 유기질비료의 혼합이 생분해율의 증진에 크게 도움이 되지 않는다는 것을 보여준다. 따라서 유기질비료의 혼합으로 석유계탄화수소의 분해율이 눈에 띄게 증진되는 것은 그 나머지만 dodecane(C12)~eicosane(C20)에 해당하는 n-alkane들의 분해에 의한 것임을 알 수 있다.

Pristane이나 phytane처럼 highly branched isoprenoid alkanes는 주요한 분해경로로서 dicarboxylic acids의 형성과 함께 ω-산화를 받는 것으로 보고되고 있다.¹⁹⁾ 특히 pristane이나 phytane처럼 메틸기로 분지된 탄화수소는 일반적으로 미생물에 대한 저항이 증가한다.¹⁹⁻²²⁾ 예를 들어 Schaeffer 등²²⁾은 탄화수소의 말단부 분지(terminal branching)는 탄화수소의 미생물분해를 방해한다는 것을 발견하였다. 또한 β지점(anteiso-terminus)의 메틸기 분지(methyl branching)는 β-산화를 차단하기 때문에 α-산화,²³⁾ ω-산화¹⁹⁾ 혹은 β-알킬그룹의 제거²⁴⁾ 등과 같은 추가적인 대안을 필요로 한다. 한편, Westlake 등²⁵⁾은 원유의 구성물질 조성이 석유의 미생물 분해에 미치는 영향을 연구하였다. 이 연구로부터 혼합미생물(mixed microbial populations)들이 4가지의 원유를 유일한 탄소원으로 사용하는 조건에서 탄화수소를 활용하는 능력은 불포화탄화수소의 조성뿐만 아니라 아스팔트탄화수소의 조

성에 의해서도 좌우된다는 사실이 밝혀졌다. 또한 보통의 n-alkane 성분이 부족한 오일을 사용한 실험에서는 유류중 방향족성분이 박테리아의 증식을 지속시킬 수 있음을 보여 주었다.

비교적 분자량이 작은 octane(C8), nonane(C9), decane(C10), undecane(C11)은 실험기간 초기에 많은 분해가 이루어졌고, 그에 반해 초기에 높은 농도를 나타내었던 tridecane(C13)~heptadecane(C17)은 실험기간 동안 서로 비슷한 분해 경향을 나타내었다. 대조시료에서 이들의 분해특성을 보면 20~30일 동안의 적응기간(lag phase)을 나타낸 후 약 30일 이후에 급격하게 분해되는 모습을 보여준다. 이러한 경향은 생분해율이 저조한 성분들에 있어서 두드러지는데 탄소의 몰수가 C13인 tridecane부터 C20인 eicosane까지, 그리고 tricosane(C23)과 pentacosane(C25), hexacosane(C26), heptacosane(C27) 등에서도 나타나고 있다. 그러나 유기질비료를 혼합하는 경우에는 이러한 미생물의 적응기간이 상당히 줄어드는 것을 볼 수 있다.

Dodecane(C12)~eicosane(C20)에 해당하는 n-alkane들은 대조시료의 잔류 농도가 초기 농도의 30~40%인 것에 비해 유기질비료를 혼합해 주었을 때는 10~20% 정도만이 잔류하는 것으로 나타나 유기질비료 혼합의 효과를 뚜렷이 보여 주었다. 그러나 석유계탄화수소 중 decane(C10), undecane(C11), hexacosane(C26), octacosane(C28)은 유기질비료를 혼합해준 경우에 초기 분해속도가 다른 경우보다는 높게 나

Table 4. Removal reaction rates and determination coefficients of petroleum hydrocarbons

Components	Case	Rate constant k [day ⁻¹]	Coefficient of determination r^2	Half-life $t_{1/2}$ [day]	Components	Case	Rate constant k [day ⁻¹]	Coefficient of determination r^2	Half-life $t_{1/2}$ [day]
Octane	control	0.1914	0.9834	3.6	Octadecane	control	0.0136	0.8508	51.0
	compost	0.2282	0.9955	3.0		compost	0.0196	0.8989	35.4
Nonane	control	0.1122	0.9831	6.2	Phytane	control	0.0128	0.8771	54.2
	compost	0.1623	0.9946	4.3		compost	0.0159	0.9692	43.6
Decane	control	0.0704	0.9888	9.9	Nonadecane	control	0.0148	0.8960	46.8
	compost	0.0814	0.9542	8.5		compost	0.0176	0.9059	39.4
Undecane	control	0.0475	0.9582	14.6	Eicosane	control	0.0146	0.9348	47.5
	compost	0.0616	0.9885	11.3		compost	0.0165	0.8846	42.0
Dodecane	control	0.0231	0.9376	30.0	Heneicosane	control	0.0159	0.9513	43.6
	compost	0.0508	0.9522	13.6		compost	0.0239	0.9173	29.0
Tridecane	control	0.0188	0.9177	36.9	Docosane	control	0.0152	0.9541	45.6
	compost	0.0405	0.9584	17.1		compost	0.0170	0.8788	40.8
Tetradecane	control	0.0158	0.8864	43.9	Tricosane	control	0.0173	0.9088	40.1
	compost	0.0333	0.9654	20.8		compost	0.0172	0.9074	40.3
Pentadecane	control	0.0165	0.9432	42.0	Tetracosane	control	0.0157	0.9453	44.2
	compost	0.0271	0.9854	25.6		compost	0.0156	0.9277	44.4
Hexadecane	control	0.0158	0.9380	43.9	Pentacosane	control	0.0148	0.8263	46.8
	compost	0.0318	0.9326	21.8		compost	0.0250	0.9436	27.7
Heptadecane	control	0.0142	0.8750	48.8	Hexacosane	control	0.0157	0.8651	44.2
	compost	0.0217	0.9153	31.9		compost	0.0144	0.8521	48.1
Pristane	control	0.0141	0.8747	49.2	Heptacosane	control	0.0133	0.8753	52.1
	compost	0.0187	0.9778	37.1		compost	0.0152	0.8582	45.6

타났지만 최종 분해율은 대조시료와 비슷한 결과를 나타내었다. 한편 대조시료와 유기질비료 혼합시료 모두에서 hexadecane(C16)이 pristane(C19)보다 높은 분해율을 보여주었고, 이 결과는 Roubal과 Atlas에 의한 연구결과²⁶⁾ 자연계에서의 생분해가능성이 hexadecane > naphthalene >> pristane > benzanthracene의 순서로 나타난다는 것과 일치하는 결과라 할 수 있다.

한편, 석유계탄화수소의 생분해를 2차 반응으로 가정하여 얻어진 반응상수와 결정계수는 Table 4 및 Fig. 5와 같다. 석유계탄화수소 각 성분들의 분해반응상수는 대조시료가 0.1914 ~ 0.0133 day⁻¹의 분포를 보이고, 결정계수는 0.99 ~ 0.83으로 나타났다. 유기질비료를 투여한 시료의 경우 분해반응상수는 0.2282 ~ 0.0144 day⁻¹의 분포를 보여주었고, 결정계수는 1.00 ~ 0.85로 나타나 유기질비료를 투여한 경우가 더 빠른 분해속도를 보여주었다. 또한 각 성분들의 분해반응상수는 분자량이 작을수록 크게 나타났다. 탄소몰수가 C19 이상의 성분들은 유기질비료를 투여한 시료와 대조시료의 분해속도가 크게 차이가 나지 않는 것으로 나타났다. 대조시료의 경우 C14 이상의 성분들이 40~50일 이상의 비교적 긴 반감기를 보였다. 그러나 유기질비료를 투여한 시료의 경우에는 C20 이상의 성분들이 40일 이상의 반감기를 나타내고 있으나 50일을 초과하는 성분은 없었다.

3.5. 석유계총탄화수소의 분해와 ATP의 상관성

Fig. 2는 자연상태의 발토양에서 65 ng/g이었던 ATP의 농도가 디젤에 의한 오염이 가중되면서 4 ng/g을 나타내어 미생물의 활성이 거의 없음을 보여주고 있다. 하지만 시간이 지나면서 토양미생물은 유류성분에 적응하고 활성이 증가하게 된다. 특히 Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 유기질비료를 혼합해 준 경우는 대조시료에 비해 훨씬 빠른 시간에 ATP의 농도가 높아지면서 미생물의 활성이 왕성해 짐을 보여준다. 유기질비료를 주입한 경우에 초기 ATP 농도가 높은 것은 유기질비료가 숙성된 직후에 바로 채취되어 혼합되었기 때문인 것으로 보여 진다. 유기질비료를 혼합한 경우 혼합 직후부터 ATP 농도가 급속하게 증가하여 6일에서 9일 사이에 112 ng/g의 높은 ATP를 유지하지만 20일 이후부터는 대조시료와 유사한 값을 갖는다.

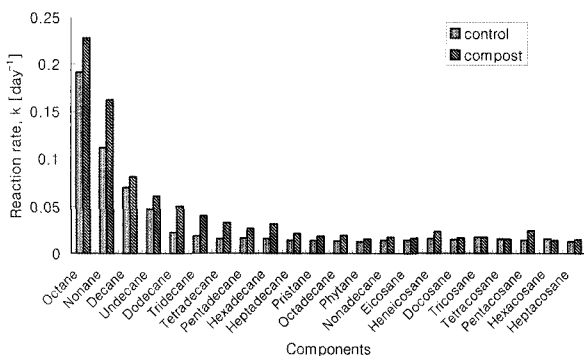


Fig. 5. Removal reaction rates of petroleum hydrocarbons.

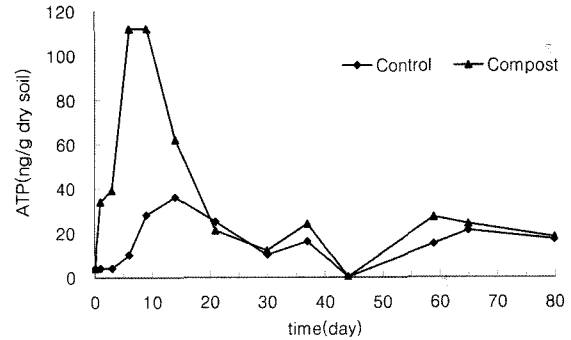


Fig. 6. Changes of ATP concentrations in control and compost mixed soil.

Fig. 6의 유기질비료를 혼합한 시료의 ATP 농도를 TPH 제거효율과 비교해 볼 때 ATP 농도가 높은 상태를 유지하는 시점과 TPH의 급격한 분해가 일어나는 시점인 5~15일 사이가 일치하며, 또 한 차례 급격한 석유계총탄화수소의 분해율을 나타내는 30~37일의 ATP 농도 역시 약간 증가하는 모습을 보여주었다. 한편, 대조시료의 경우 각 alkanes 성분의 분해에서 지연시간(lag phase)이 존재하였고, 초기 약 4일간 석유계총탄화수소(TPH)의 분해율에 지연시간이 존재하는 것과 동일하게 ATP의 농도증가에 있어서도 초기 약 4일 정도의 지연시간이 존재하는 것을 볼 수 있다. 이 결과로 볼 때 유기질비료를 혼합한 시료는 분해초기부터 미생물의 활성이 높기 때문에 왕성한 분해가 일어나는 반면, 대조시료는 유류에 대한 미생물들의 적응기간이 필요하며, 적응기간이 지난 후 왕성한 분해가 일어나는 것이 대조시료와 유기질비료를 혼합한 시료의 차이점으로 보여 진다. 또한 두 가지 시료 모두 왕성한 분해가 일어나는 시기에 유기질비료를 혼합한 시료의 ATP 농도가 대조시료의 ATP 농도보다 높기 때문에 석유계총탄화수소의 분해율 역시 유기질비료 혼합시료가 대조시료보다 높은 것으로 나타났다. 그러나 결국 20일 이후에는 대조시료와 유기질비료를 혼합한 시료 모두 ATP의 농도가 감소하면서 비슷한 농도와 패턴을 보여주며, TPH의 분해패턴도 서로 유사한 것으로 보여 진다. 본 연구에서 나타난 바와 같이 유류로 오염된 토양에서는 초기에 TPH의 급격한 분해와 함께 ATP 농도 역시 크게 증가한 후, 이분해성의 유류성분들 대부분이 많이 분해된 약 14~20일 이후에는 TPH 분해율이 감소하게 되고 이에 따라 석유계탄화수소중 이분해 성분을 탄소원으로 하는 미생물들의 활성이 감소하면서 ATP 농도 역시 감소하는 것으로 보여 진다. 이와 같은 경향은 미생물의 호흡율을 지표로 한 연구결과¹⁰⁾와 ETS(Electron Transport System) 및 미생물계수법(Colony Forming Units)을 이용하여 유류오염토양에서의 미생물활성도를 파악한 연구결과⁷⁾와 매우 흡사하다.

한편, 시간대별 일평균 석유계총탄화수소의 분해율과 ATP 농도와의 관계를 살펴보면 Fig. 7과 같이 분해율과 ATP 농도와의 관계가 정확하게 일치하지는 않지만 TPH의 분해를 패턴과 ATP 농도 패턴이 약간의 시간차를 두고 서로 유사한 경향을 보이고 있다. 이러한 패턴은 대조시료 뿐만 아니라

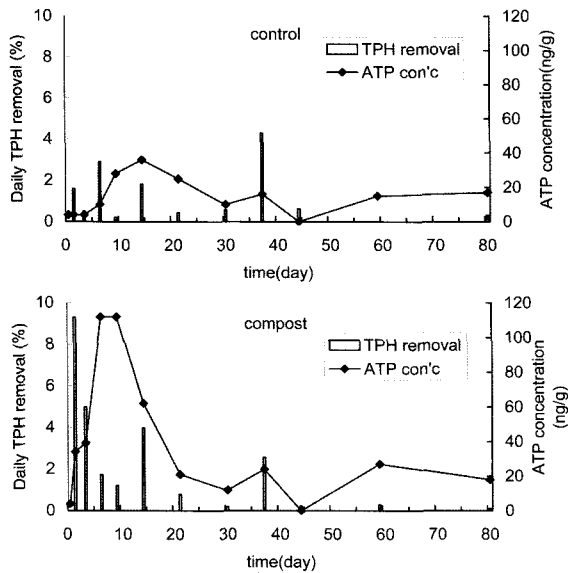


Fig. 7. Daily TPH removal rates and ATP concentrations in control and compost added soils.

유기질비료를 혼합한 시료에서도 나타나고 있다. 유기질비료를 혼합한 시료의 경우 석유계총탄화수소의 하루 평균 분해율은 초기부터 크게 나타나고 있으나 대조시료와 마찬가지로 ATP 농도의 증가는 그보다 약 7일 정도의 시간차이가 있다. 그러나 37일경의 TPH분해율 증가와 ATP 농도의 증가는 대조시료와 유기질비료 혼합시료 모두 다 일치하고 있다. 이렇게 나타나는 이유는 비교적 이분해성 석유계탄화수소가 2차적인 물질, 즉 미생물에 의한 분해가 보다 쉬운 지방산과 알코올 등으로 분해되면서¹²⁾ 약간의 시간차이를 두고 석유계탄화수소를 분해하는 미생물의 활성보다는 2차적인 물질을 분해하는 미생물들의 활성이 크게 증가하기 때문에 ATP 농도의 증가가 석유계총탄화수소의 분해보다 느리게 나타나는 것으로 사료된다.

4. 결론

디젤로 오염된 토양에 유기질비료를 투입하였을 때 유기질비료가 석유계총탄화수소의 분해와 n-alkanes 및 branched alkanes의 분해에 미치는 영향을 연구하였다. 또한 디젤의 오염이 토양의 생태활성에 미치는 영향 및 토양의 생태활성과 디젤의 분해도의 관계를 규명하기 위하여 토양내 ATP (Adenosine Triphosphate) 농도의 변화를 관찰하였다. 연구결과 유기질비료는 디젤오염토양의 생분해를 증진시키는 효과가 있었고, 이는 미생물의 활성이 증가되는데 따른 결과라고 결론지을 수 있었다. 그밖에 본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 디젤에 의한 오염도가 가중될수록 토양에 존재하는 ATP의 농도는 급격하게 감소하여 토양의 석유계총탄화수소의 농도가 80,000 mg diesel/kg에 도달하였을 때 ATP는 65 ng/g에서 4 ng/g으로 감소하여 오염도의 증가가 토양미생물의

변화를 초래하고 생물학적 활성을 크게 감소시키는 것으로 나타났다.

2) 디젤오염토양에 유기질비료를 투입하였을 때 80일 후 81.4%의 높은 석유계총탄화수소의 제거효율을 보여주었고, 대조시료에 비하여 10% 이상의 제거효율을 보여주었다. 대조시료가 30~40일 이후에야 급격한 분해를 보여준 것에 반해 유기질비료를 투입할 경우에는 초기 14일 이내에 약 50% 정도의 신속한 분해율을 나타내었다.

3) 유기질비료의 혼합이 생분해가 어려운 pristane, phytane과 탄소함량 C21 이상의 탄화수소들의 생분해율을 크게 증진시키지는 않았으며, 유기질비료의 혼합으로 석유계총탄화수소의 분해율이 증진되는 것은 주로 그 나머진 dodecane (C12)~eicosane(C20)에 해당하는 n-alkane들의 분해에 의한 것임을 알 수 있었다.

4) 대조시료에서 탄소의 물수가 C13 이상인 tridecane부터 C20인 eicosane까지, 그리고 tricosane(C23)과 pentacosane(C25), hexacosane(C26), heptacosane(C27) 등은 20~30일 동안 분해가 잘 되지 않는 지연기간을 보여주었으나 유기질비료를 혼합하는 경우 이러한 미생물의 적응기간이 상당히 줄어드는 것으로 볼 수 있었다.

5) 유기질비료를 혼합해준 경우 대조시료에 비하여 훨씬 빠른 시간 안에 미생물의 활성도가 증가하여 6일후에는 최대 112 ng/g의 ATP 농도를 보여주었으나, 대조시료는 4일 정도의 지연기간을 보여주었으며, 14일 후에야 최대 36 ng/g으로 증가되어 유기질비료의 투입이 미생물활성도에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 2003년도 대구대학교 학술연구비의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Fan, C. Y. and Tafuri, A. N., "Engineering application of bio-oxidation processes for treating petroleum-contaminated soil," in Remediation of hazardous waste contaminated soil, Wise, D. L. and Trantolo, D., J.(Eds.), Marcel Dekker Inc., pp. 373(1994).
2. Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang D. P. Y., and Schroeder, E. D., *Bioremediation principles*, WCB/McGraw-Hill, 8(1998).
3. 이민호, "토양 지하수 오염문제의 현황과 향후 전망," 환경보전, 9/10, 8~16(2000).
4. 권기석, 윤병대, "Bioremediation 기술개발과 미생물의 역할," 생물산업, 9(3), 3017~3024(1996).
5. Wang, X. and Bartha, R., "Effects of bioremediation on toxicity, mutagenesis, and microbiota in hydrocarbon polluted soils," in Remediation of hazardous waste con-

- taminated soils, Wise, D. L. and Trantolo, D., J.(Eds.), Marcel Dekker Inc., pp. 175(1994).
6. Atlas, R. M., "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective," *Microbiol. Rev.*, **45**(1), 180~209(1981).
 7. 김무훈, 강순기, 정우성, 박덕신, "유류오염지역의 미생물분포 및 활성도에 관한 연구," *대한환경공학회지*, **21**(11), 2041~2047(1999).
 8. 박현철, 최선열, 이태호, 박태주, "혐기성슬러지 첨가에 따른 디젤오염토양내 TPH의 변화," *대한환경공학회 춘계학술대회*(2004).
 9. Hur, J. M. and Park, J. A., "Effect of sewage sludge mix ratio on the biodegradation of diesel-oil in a contaminated soil composting," *Korean J. Chem. Eng.*, **20**(2), 307~314(2003).
 10. Lee, J. J., Kim, S. M., Lee, M. J., and Chung, S. Y., "A study on the conditions for aerobic treatment of oil-contaminated soil by crude oil degrading bacteria using respirometer," *한국폐기물학회 춘계학술회의논문집*, pp. 271~276(2002).
 11. 한국지하수도양환경학회, *토양환경공학*, 향문사, 33(2003).
 12. Autry, A. R. and Ellis, G. M., "Bioremediation of petroleum fuel contaminated soils," *Federal Environmental Restoration Conference Proceedings*, pp. 93~100(1993).
 13. Peramaki, M. P. and Blomker, K. R., "Practical design considerations for composting contaminated soil," *In Situ and On-Situ Bioremediation*, Battelle Press, pp. 103~112(1997).
 14. Prince, R. C., "Petroleum spill bioremediation in marine environments," *Crit. Rev. in Microbiol.*, **19**(4), 217~242(1993).
 15. Douglas, G. S., Bence, A. E., Prince, R. C., McMillen, S. J., and Butler, E. L., "Environmental stability of selected petroleum hydrocarbon source and weathering ratios," *Environ. Sci. Technol.*, **30**(7), 2332~2339(1996).
 16. King, D. H. and Perry, J. J., "The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism," *Can. J. of Microbiol.*, **21**, 85~89(1975).
 17. Jurtschuk, P. and Cardini, G. E., "The mechanism of hydrocarbon oxidation by a *Corynebacterium* species," *Crit. Rev. in Microbiol.*, **1**, 239~289(1971).
 18. Markovetz, A. J., "Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms," *Crit. Rev. in Microbiol.*, **1**, 225~237(1971).
 19. Pirmik, M. P., "Microbial oxidation of methyl branched alkanes," *Crit. Rev. in Microbiol.*, **5**, 413~422(1977).
 20. Atlas, R. M., "Petroleum microbiology," *Encyclopedia of Microbiology*, **3**, Academic Press, 363~369(1992).
 21. Baker, K. H. and Herson, D. S., "Microbiology and biodegradation," *Bioremediation*, Baker, K. H. and Herson, D. S.(Eds.), McGraw-Hill, pp. 9~60(1994).
 22. Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S., and Fall, R. R., "Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation," *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 742~746(1979).
 23. Beam, H. W. and Perry, J. J., "Co-metabolism as a factor in microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons," *Archives of Microbiology*, **91**, 87~90(1973).
 24. Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S., and Fall, R. R., "Biodegradation of a cyclic iso-prenoids by *Pseudomonas* species," *J. of Bacteriol.*, **135**, 324~333(1978).
 25. Westlake, D. W. S., Jobson, A. M., and Cook, F. D., "In Situ degradation of oil in a soil of the boreal region of the Northwest Territories," *Can. J. of Microbiol.*, **24**, 254~260(1978).
 26. Roubal, G. and Atlas, R. M., "Hydrocarbon biodegradation in Cook inlet," *Developments in Industrial Microbiology*, **20**, 498~502(1979).