

유류 오염 토양에서 분리된 *Rhodococcus fascians*를 이용한 토양 column에서의 JP-8의 분해

박 봉 제 · 노 용 호 · † 윤 현 식
인하대학교 생물공학과

(접수 : 2008. 12. 1., 게재승인 : 2008. 12. 22.)

Biodegradation of JP-8 in soil column by *Rhodococcus fascians* isolated from petroleum contaminated soil

Bong Je Park, Yong Ho Noh, and Hyun Shik Yun†
Department of Biological Engineering, Inha University
(Received : 2008. 12. 1., Accepted : 2008. 12. 22.)

The environmental contamination by organic pollutants is a widespread problem. The most widely distributed pollution can be attributed to oil contamination. Bioremediation, the use of microorganism or microbial processes to degrade environmental contaminant, is one of the new technologies. The objective of the present study is to study the degradation of JP-8 in soil by microorganism. The degradation of JP-8 was analysed by TPH using gas chromatography. *Rhodococcus fascians* isolated from the petroleum contaminated site was applied for the degradation of JP-8 in the soil column system. Air flow rate of 30 ml/min was sufficient to degrade JP-8 in the soil column as much as 70% of JP-8 in the soil column. The addition of nitrogen source resulted in the increase in JP-8 degradability to 75% of JP-8 and the C:N ratio for JP-8 degradation was 100:10.

Key Words : Bioremediation, Biodegradation, JP-8, Soil column, *Rhodococcus fascians*

서 론

토양은 인간이 살고 있는 생활환경의 필수 불가결한 요소로서 인간 거주와 활동영역의 기반을 이루며 생태계의 존립을 위한 터전을 이루고 있다. 토양은 대자연의 일부로서 인간 생활의 모든 부분에서 밀접한 관계를 맺고 있으며 토양의 오염은 인간에 대한 반작용으로 나타나 주변 생태계 파괴와 궁극적으로는 인간 삶의 파괴로 나타나게 된다(1).

1990년대 이후 미군의 유류 유출사고는 매년 3~4건 이상 발생하였으며, 일반 주유소 유출 사고에 비해 피해 규모나 복구기간, 복구비용에서 심각한 문제를 유발하고 있다(2). 1991년 경기도 하남 산곡천 기름오염, 1996년 미군 송유관 파열로 한강 기름 오염, 1998년 백운산 메디슨기지 기름유출, 2000년 평택 송탄 K-55 미군기지 항공유 유출, 2000년 대구 미군 기름 수송용 송유관 파열 기름유출, 2000년 파주 미군부대 연료탱크 송유관

파손, 2001년 서울 녹사평역 기름유출, 2004년 평택 캠프 험브리 영내 송유관 파손, 2006년 용산구 한강로 기름유출 등 그 지역이 광범위 할뿐 아니라 오염 유류의 종류 또한 다양하다(2).

국방부가 진행한 주한 미군기지에 기름을 공급하는 한국 중남 송유관 (TKP)이 매설된 지역의 토양 오염도 조사 결과 23곳에서 기름 유출로 기준치를 웃도는 심각한 토양오염이 발생한 것으로 나타났으며, 이러한 오염을 복구하기 위해서는 최소 1천억 원 이상의 복구비용이 소요 될 것으로 예상된다(3). 전국 미군기지 및 시설과 경기도내 미군훈련장 등을 단계적으로 반환하는 연합 토지 관리 계획 (LPP, Land Partnership Plan)이 시행되면서 주한 미군 기지들이 반환되고 있지만 이들의 유류에 의한 토양 오염정도가 심하게는 TPH 농도 기준치의 70배에 달하는 등 심각한 오염수준을 보이고 이를 복구하기 위해서는 2조원 이상의 복구비용이 예상되는 것으로 나타났다(4).

JP-8은 기체, 액화기체 그리고 액체 등의 형태로 인간의 피부와 호흡기를 통해 침투 될 수 있고, 침투된 JP-8은 콩팥, 간장, 폐 등과 신경계에 면역학적 독성으로 작용하여 피로, 심각한 두통 그리고 피부 염증과 같은 증상이 유발된다(5, 6). JP-8은 약 100여 가지 화합물로 조성되며, 이러한 조성은 원유의 종류 및 그 사용 용도에 따라 광범위하게 달라진다(7). JP-8은 일반적으로 18%의

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7517, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : hyunshik@inha.ac.kr

방향족 탄소화합물과 81%의 지방족 탄소화합물로 이루어져 있다. 지방족 탄소화합물은 9% C₈-C₉, 65% C₁₀-C₁₄ 그리고 7% C₁₄-C₁₆으로 구성되어 있다. 이 외에도 JP-8은 그 사용 목적 때문에 부동액, 부식방지제 그리고 정전기 방지제 등과 같은 특수 물질들도 함유하고 있다(5, 8). JP-8은 비 휘발 특성으로 인해 기존의 공기 추출법과 같은 재래식 기술로는 오염지역에서 효과적으로 정화목표를 달성할 수 없으므로 이러한 비 휘발성 유류 물질로 오염된 지반의 복원을 위한 대안기술을 개발하기 위해 다양한 연구가 진행되고 있다(5, 9).

생물 정화란 환경에 적응이 용이하고 2차 환경오염의 발생이 적은 미생물을 이용하여 독성 화합물과 유해 폐기물에서 유래하는 환경적으로 유해한 물질을 제거, 감소, 변형시키는 과정을 말한다(10). 근래에는 오염된 토양, 슬러지, 담수 및 지하수, 해수 등이 생물정화의 주요 대상이 되고 있으며, 생물정화기술의 적용은 다양한 환경에서 성공을 거두고 있다(11, 12). 환경 조건의 최적화를 통한 미생물의 활성 증대로 대상 오염 물질을 효율적으로 제거하는 생물정화기술은 크게 두 가지 방법으로 구분된다. 서식하는 토착미생물의 활성을 촉진시키기 위해 영양 염, 전자 수용체, 과산화수소, 온도, pH 등을 조절하는 방법 (biostimulation) 과 오염물에 분해능이 우수한 자연계에서 분리한 미생물이나 유전공학적으로 변형된 미생물을 첨가하는 방법 (bioaugmentation) 을 이용한 생물정화기술이다(13).

생물학적 토양 복원기술은 국내에서도 연구와 현장처리가 활발히 진행 중이다. Lee 등은 유류로 오염된 토양에서 toluene을 탄소원으로 이용하는 혼합미생물을 분리하여 toluene, benzene, ethylbenzene 및 xylene isomers (BTEX)의 분해특성에 관해 연구하였으며(14), Chung 등은 석유화합물로 오염된 토양에서 분리된 다양한 미생물을 분리 동정한 후, 원유와 기타 기질들을 사용하여 분리된 미생물별 분리 특성을 조사 연구하였다(15). Yoon 등의 연구에서는 토양/지하수에 존재하는 소수성 유기 오염물질을 제거하기 위한 방법의 적용성 검토를 위하여 미생물 계면활성제 (bio-surfactant)인 hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD)에 유기오염이 흡수되는 현상에 대한 실험을 실시하였고(16), Kim 등은 Ozone에 의한 유류오염토양 복원 연구에서, 유류화합물로 오염된 불포화층 토양에 대한 현장오존복원공정의 기초 연구로 토양조건에 따른 오존의 이동과 분해, 유류와의 반응 경향 등을 조사하였다(17).

본 연구에서는 JP-8로 오염된 토양에 활용할 수 있는 생물학적 처리 방법 (bioremediation)을 이용하여 토양에서 분리된 균주의 JP-8 분해능을 고찰하였다. 실제 유류 오염토양에서 직접 JP-8분해에 적합한 균주를 분리하여 각종 환경적 요소가 JP-8 분해에 미치는 영향 분석에 초점을 두고 진행되었던 이전 연구(18)에 기초하여 보다 토양 환경에 유사하도록 조성된 토양 column을 이용한 JP-8 분해의 영향 인자 분석에 중점을 두어 연구를 진행 하였다. 본 연구에서 얻어지는 결과는 항공유에 오염된 토양의 복원을 위한 효율적인 정화 기술 개발에 기초로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

토양 column

선별된 우수 균주를 이용하여 토양에서의 JP-8 분해능을 알아

보기 위해 토양 column을 제작하였다(Fig. 1). Column의 총 부피는 2 L이며 column과 덮개사이에는 sealing 되어 있어 공기 및 수분의 노출이 방지되고, column의 아래와 위에는 공기의 inlet과 outlet이 설치되어 있으며, 실험 도중에 영양 염류 용액의 첨가와 6개의 sampling port를 통하여 시료 채취가 가능하도록 제작되었다(19, 20). 토양 column에서는 통기량, 접종량, 질소원과 항공유와의 비율 등의 조건을 변화시켜 각각의 분해율에 미치는 영향을 조사하였다.

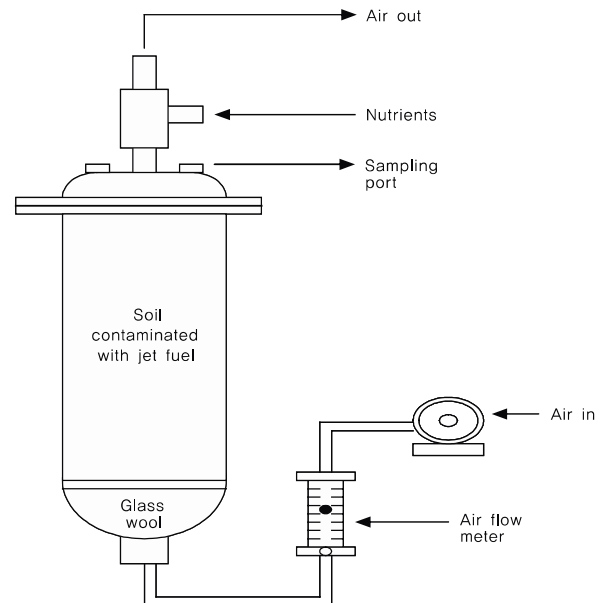


Figure 1. Experimental soil column.

토양과 균주

실험에 사용된 토양은 인하대학교 운동장 흙을 30cm 깊이에서 채취하였으며, US sieve 12 (10 mesh)와 US sieve 30 (28 mesh)을 이용하여 고르게 체를 쳐 각기 다른 크기의 입자로 준비 하였다. 준비된 토양시료는 3회, 30분 동안의 멸균과정을 거쳐 JP-8 (1%, w/w)를 혼합하고, LB 배지에서 24시간 동안 배양된 균주를 원심분리 후 증류수에 희석하여 오염된 토양시료에 골고루 주입한 후 column에 충전하였다.

통기량의 영향

일반적으로 호기성 미생물에게 공기의 공급은 미생물 성장에 중요한 인자임을 감안하여 공기의 공급 속도를 조절하며 JP-8 분해양상 및 미생물 성장을 관찰하였다. 공기의 주입속도는 0 ml/min, 10 ml/min, 30 ml/min, 50 ml/min으로 조절하였으며, 5×10^8 CFU/ml 개수로 접종을 해준 것과 함께 대조군으로서 접종을 하지 않은 것도 함께 10일 동안 JP-8의 잔류량과 미생물의 CFU 수를 측정하였다.

접종량의 영향

접종량을 달리 하여 토양 column 안에서 JP-8의 분해와 균주의 성장에 대하여 관찰하였다. 접종량은 5×10^8 CFU/ml의 균주 현탁액, 0 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml 각각을 총 부피 100 ml로 조절하여 토양과 혼합하였다. 접종량은 5×10^8 CFU/ml, 공기의 주입은 30 ml/min의 속도로 10일 동안 JP-8의 잔류량과 미생물

의 CFU 수를 측정하였다.

C:N 질량비의 영향

질소원인 NaNO₃를 오염원인 JP-8과의 질량비 (C : N ratio) 100 : 0, 100 : 5, 100 : 10, 100 : 20으로 조절하였다. 접종량은 5×10⁸ CFU/ml, 공기 주입속도 30 ml/min에서 10일 동안 JP-8의 잔류량과 미생물의 CFU 수를 측정하였다.

잔류 JP-8의 분석

토양 sample로부터 JP-8의 잔류량 측정은 EPA method 3550 방법을 따랐다. 2 g의 토양시료에 2 g의 무수황산나트륨과 5 ml의 핵산을 첨가한 후 1분간 강력하게 교반하여 3분간 sonication을 한 후 그 상등액을 GC/FID를 이용하여 TPH (total petroleum hydrocarbon) 분석을 하였다. Gas chromatography는 Shimadzu GC-17A를 사용하였으며 GC column으로는 HP-5MS capillary column (30 m, 0.32 mm diameter, 0.25 μm film thickness)을 사용 하였다.

Viable cell counting

채취한 토양시료를 증류수 10 ml과 충분히 혼합한 후 증류수로 10의 배수로 serial dilution하여 LB 배지에 도말하였다. 도말 후 27°C에서 3일간 incubation한 후 CFU를 측정하였다.

결과 및 고찰

토양 column 에서의 생물학적 복원

Flask culture에서 JP-8의 분해 결과를 바탕으로 토양에 오염된 JP-8의 분해를 토양 column을 통해 알아보았다. 토양 column에서의 자연 분해는 10일이 지난 뒤 약 40% 정도로 측정되었다. 이는 액체배지와 JP-8 혼합물을 이용한 flask 실험에서 보였던 60%의 자연적 분해에 비해 적은 양이다. 토양에서는 분해 미생물이 없을 때에도 액체배지에서보다 JP-8의 분해가 훨씬 더디게 진행됨을 알 수 있었다.

통기량의 영향

호기성과 혐기성 조건에서 성장속도 측정으로 알아본 *Rhodococcus fascians*의 특성은 혐기성 조건에서도 매우 뛰어난 성장 속도를 보인 것을 알 수 있었다. 그러나 토양에서의 공기의 공급은 자연 감소되는 JP-8의 양에 영향을 미치고 미생물 성장에도 영향을 미쳐 JP-8의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. Fig. 2는 공기의 통기 속도와 시간에 따른 JP-8 잔류량을 표현하였다. (a)에서와 같이 *Rhodococcus fascians*를 접종을 하지 않고 통기를 안 시킨 경우 약 49%의 분해가 이루어졌으며, 통기량이 10 ml/min 일 때 52%, 30 ml/min 일 때 55%, 50 ml/min의 통기량에서는 61%의 분해율을 보여 통기량에 비례하여 JP-8의 분해율도 비례하여 증가 하였다. 그러나 *Rhodococcus fascians*를 접종한 (b)의 경우는 통기를 안 시킨 경우에도 분해율이 60% 이상 분해되었으며, 통기량에 따라 JP-8의 분해율이 증가하였으며, 30 ml/min 와 50 ml/min에서 모두 약 70%의 분해율을 보임으로서 같은 통기량에서 미생물이 없을 때보다 분해율이 훨씬 높은 것으로 나타났다. 그러나 통기량 30 ml/min 이상에서는

통기량이 JP-8 분해에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 시간에 따른 생균수 측정에서는 통기량이 없을 때와 비교하여 10 ml/min 통기량에서 생균수가 크게 증가하였다. 10 ml/min 보다 통기량이 증가할 경우에는 생균수가 크게 증가하지는 않았다. 최대 생균수는 대부분 6일째 나타났는데 50 ml/min에서 3.66×10⁹ CFU/soil g 이었으며 이후 조금 감소하는 경향을 보이긴 했지만 10일 후에도 1×10⁹ CFU/soil g 이상으로 유지 되는 것을 볼 수 있었다. 그러나 통기가 전혀 없는 경우 최대 생균수는 4일째 1×10⁹ CFU/soil g였으며 이후 급격히 감소하는 경향을 보여 10일째 3×10⁸ CFU/soil g까지 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3) 따라서 호기성 조건에서 *R. fascians*에 의한 JP-8의 분해가 더 활발하게 이루어짐을 알 수 있었다.

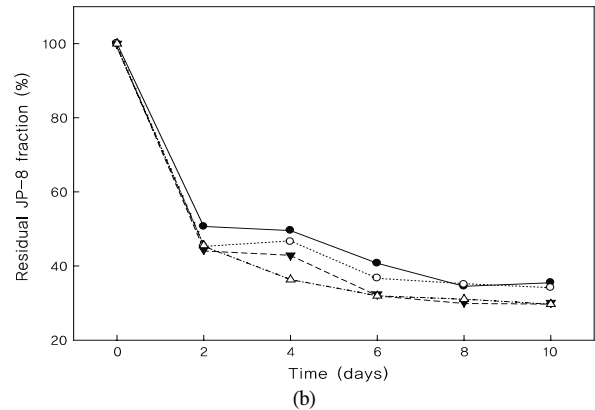
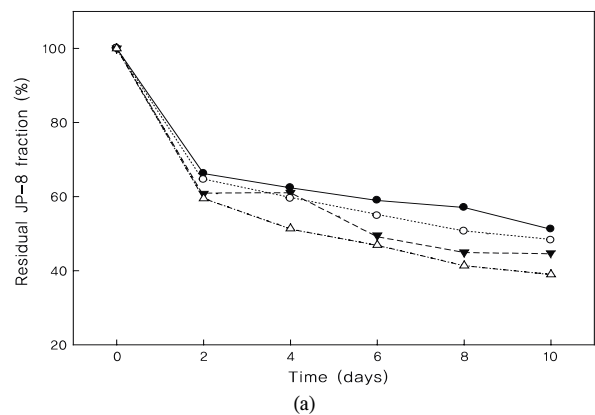


Figure 2. Effect of air flow rates on degradation of JP-8 in soil column. (a) soil treated without cells (b) soil treated with cells (-●-: 0 ml/min, -○-: 10 ml/min, -▼-: 30 ml/min, -△-: 50 ml/min)

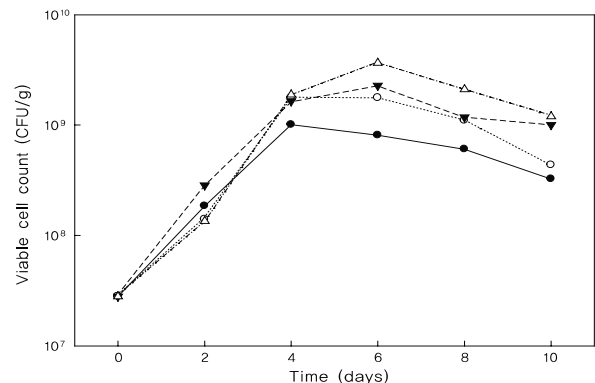


Figure 3. Effect of air flow rate on cell growth. (-●-: 0 ml/min, -○-: 10 ml/min, -▼-: 30 ml/min, -△-: 50 ml/min)

접종량의 영향

Fig. 4는 접종량이 토양 column 안에서 JP-8 분해에 미치는 영향을 분석한 것이다. 30 ml/min의 통기량에서 접종을 하지 않은 것은 10일 뒤에 약 57%의 분해가 이루어져 통기량 및 *R. fascians*의 접종이 없는 대조군과 비교하여 14%의 분해율 증가를 보인 반면, 5.5×10^7 CFU/soil g의 접종량에서는 22%, 1.1×10^8 CFU/soil g에서는 28%, 그리고 2.2×10^8 CFU/soil g에서 34%의 분해율 증가를 보였다. 따라서 *Rhodococcus fascians*의 접종량에 따라 JP-8의 분해율이 증가함을 알 수 있었다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 접종량이 증가할수록 CFU 수도 증가하였다.

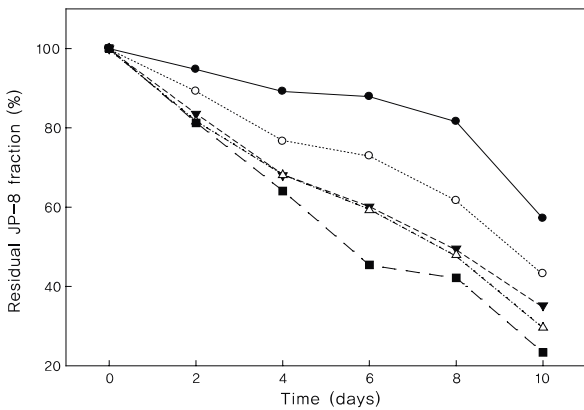


Figure 4. Effect of inoculum size on degradation of JP-8 in soil column. (-●- : control, -○- : 0 CFU/g, -▼- : 5.5×10^7 CFU/g, -△- : 1.1×10^8 CFU/g, -■- : 2.2×10^8 CFU/g)

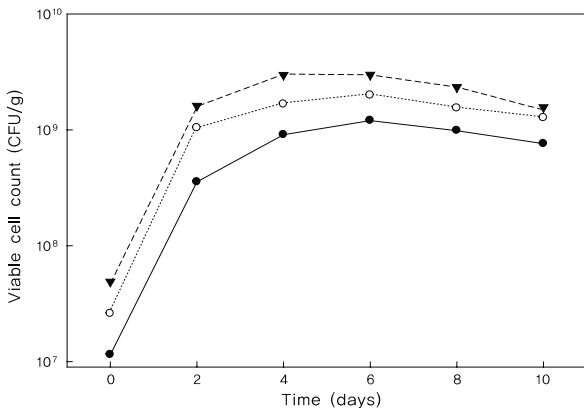


Figure 5. Effect of inoculum size on cell growth. (-●- : 5.5×10^7 CFU/g, -○- : 1.1×10^8 CFU/g, -▼- : 2.2×10^8 CFU/g)

C:N 질량비의 영향

토양 column 안에서 *Rhodococcus fascians*의 생장은 JP-8 분해와 연관되어 매우 중요한 인자로 작용하고 있다. 이러한 *Rhodococcus fascians*의 성장을 통하여 JP-8 분해율을 증가시키기 위하여 질소원을 첨가하였다. 통기량은 30 ml/min이었고 질소원인 NaNO₃를 탄소원인 JP-8과의 질량비 100 : 0, 100 : 5, 100 : 10, 100 : 20으로 첨가하였다. 질량비 100 : 0에서 분해율은 약 70% 이었으며, 100 : 10에서는 JP-8의 분해율이 75%에 도달하였으며 100 : 20으로 증가시켰을 때에는 JP-8의 분해정도에 큰 차이가 없었다(Fig. 6). 생균수에 있어서는 질소원을 증가시킬수록 CFU수는 증가하는 경향을 보였으며 100 : 10 이상에서 높은 값을 나타내어 질소원의 첨가가 세포 성장에 영향

을 주고 이는 JP-8의 분해율을 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 7). 따라서 질소원의 첨가(P)원의 첨가는 JP-8 분해에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(data not shown). 이것은 선택된 균주인 *Rhodococcus fascians*의 성장에 인(P)원이 필요 없는 것이 아니라 토양 자체적으로 인원을 포함하기 때문일 것으로 추측 된다.

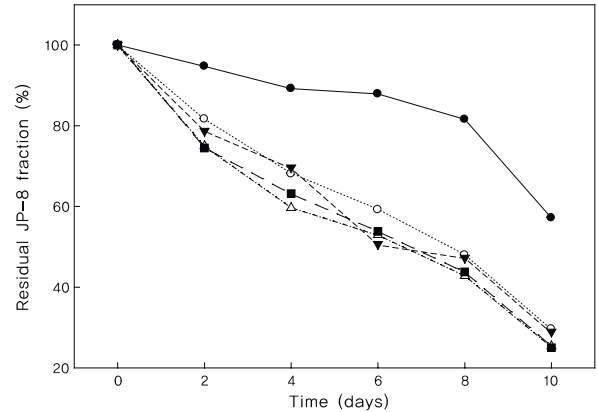


Figure 6. Effect of C:N ratio on degradation of JP-8 in soil column. (-●- : control, -○- : 100:0, -▼- : 100:5, -△- : 100:10, -■- : 100:20)

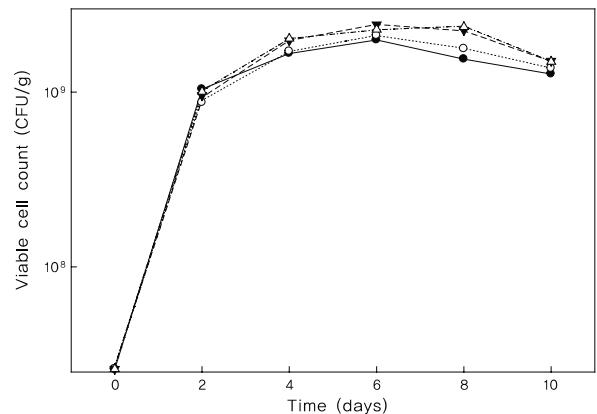


Figure 7. Effect of C:N ratio on cell growth. (-●- : 100:0, -○- : 100:5, -▼- : 100:10, -△- : 100:20)

요 약

본 실험에 사용된 균주는 유류에서 오염된 지역의 토양 시료로부터 직접 분리 하였는데, 이를 액체 배지에서의 성능 시험을 통해 효과를 확인 후 토양 column에 적용하였다. 토양 column에서의 JP-8 분해는 통기에 의한 자연적인 분해와 미생물에 의해 분해되는 것으로 나뉠 수 있다. 토양 내에 접종된 *Rhodococcus fascians*이 통기를 시키지 않을 경우에도 토양중의 JP-8의 농도가 감소하여 *R. fascians*의 JP-8 분해가 통기에 상관없이 이루어지는 것을 알 수 있었다. 통기를 시킬 경우 *R. fascians*를 접종한 경우에 토양중의 JP-8의 70%가 분해되었다. 토양에서 *R. fascians*의 성장에 작용할 수 있는 질소원을 첨가한 경우 JP-8의 분해율이 75%로 증가하였다. *R. fascians*에 의한 JP-8의 분해는 세포의 성장과 밀접하게 관련이 있어서 JP-8의 분해율 향상을 위해서는 *R. fascians*의 증가가 중요함을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Marin, M., A. Pedregosa, S. Rios, L. Ortiz, and F. Laborda (1995), Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5; its possible applications on bioremediation, *Inter. Biodeg. Biodeg.* 269-285.
2. <http://www.pressian.com>.
3. <http://www.hani.co.kr>.
4. <http://www.seoul.co.kr>.
5. Stoica, B. A., A. H. Boulares, D. S. Rosenthal, S. Iyer, I. D. G. Hamilton, and M. E. Smulson (2001), Mechanisms of JP-8 jet fuel toxicity. I. Induction of apoptosis in rat lung epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharm.* 171, 94-106.
6. Liu, S. and J. D. Pleil (2001), Optimized determination of trace jet fuel volatile organic compounds in human blood using in-field liquid-liquid extraction with subsequent laboratory gas chromatographic-mass spectrometric analysis and on-column large-volume injection, *J. Chrom. B.* 752, 159-171.
7. Aheng, A., G. Breedveld, and P. Aagaard (2001), Biodegradation of soluble aromatic compounds of jet fuel under anaerobic conditions: laboratory batch experiments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 572-578.
8. Kanikkannan, N., B. R. Locke, and M. Singh (2002), Effect of jet fuels on the skin morphology and irritation in hairless rats, *Toxicol.* 175, 35-47.
9. McDougal, J. N., D. L. Pollard, W. Weisman, C. M. Garrett, and T. E. Miller (2000), Assessment of skin absorption and penetration and JP-8 jet fuel and its components, *Toxicol. Sci.* 55, 247-255.
10. 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.
11. Boopathy, R. (2000), Factors limiting bioremediation technologies, *Biores. Technol.* 74, 63-67.
12. Loser, C., A. Zehndort, and U. Stottmeister (1998), Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 631-636.
13. 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.
14. La, H. J., S. W. Chang, and S. J. Lee (2000), Substrate interactions on biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) by indigenous soil microorganisms, *J. KSEE.* 22(2), 375-383.
15. Oh, K. T., Y. W. Lee, M. Kubo, S. J. Kim, and S. Y. Chung (2000), Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil, *J. KSEE.* 22(10), 1851-1859.
16. Ko, S. O. and S. P. Yoon (2000), Use of biosurfactant for the removal of organic pollutants in soil or groundwater, *J. KSEE.* 22(2), 193-201.
17. Choi, H. C., D. Y. Yu, H. N. Lim, and K. S. Kim (2000), Ozone-Enhanced Remediation of Diesel-Contaminated Soil : A Column Study, *J. KSEE.* 22(10), 1825-1832.
18. Nam, B. H., B. J. Park, and H. S. Yun (2008), Biodegradation of JP-8 by *Rhodococcus fascians* isolated from petroleum contaminated soil, *K. Chem. Eng. Res.* 46, 819-823.
19. 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.
20. Boopathy, R., D. L. Widrig, and J. F. Manning (1997), In situ bioremediation of explosives contaminated soil: a soil column study, *Biores. Technol.* 59, 169-176.
21. Atlas, R. M. (1995), Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation, *Marine Poll. Bull.* 31, 178-182.
22. 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.
23. U. S. EPA (1984), Interlaboratory comparison study : Methods for volatile and semi-volatile compounds, Environmental monitoring system laboratory, Office of research and development, Las Vegas, NV, EPA 600/4-84-027.