

토양미생물 복원제를 이용한 유류로 오염된 토양의 복원

홍선화 · 이상민 · 이은영*
수원대학교 환경에너지공학과

Received : August 19, 2011 / Revised : September 10, 2011 / Accepted : September 15, 2011

Bioremediation Efficiency of Oil-Contaminated Soil using Microbial Agents. Hong, Sunhwa, Sang Min Lee, and Eun Young Lee*. *Department of Environmental and Energy Engineering, Suwon University, Gyeonggi 445-743, Korea* – Oil pollution was world-wide prevalent treat to the environment, and the physic-chemical remediation technology of the TPH (total petroleum hydrocarbon) contaminated soil had the weakness that its rate was very slow and not economical. Bioremediation of the contaminated soil is a useful method if the concentrations are moderate and non-biological techniques are not economical. The aim of this research is to investigate the influence of additives on TPH degradation in a diesel contaminated soil environment. Six experimental conditions were conducted; (i) diesel contaminated soil, (ii) diesel contaminated soil treated with microbial additives, (iii) diesel contaminated soil treated with microbial additives and the mixture was titrated to the end point of pH 7 with NaOH, (iv) diesel contaminated soil treated with microbial additives and accelerating agents and (v) diesel contaminated soil treated with microbial additives and accelerating agents, and the mixture was titrated to the end point of pH 7 with NaOH. After 10 days, significant TPH degradation (67%) was observed in the DSP-1 soil sample. The removal of TPH in the soil sample where microbial additives were supplemented was 38% higher than the control soil sample during the first ten days. The microbial additives were effective in both the initial removal rate and relative removal efficiency of TPH compared with the control group. However, various environmental factors, such as pH and temperature, also affected the activities of microbes lived in the additives, so the pH calibration of the oil-contaminated soil would help the initial reduction efficiency in the early periods.

Key words: Bioremediation, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), microbial agents, oil-contaminated soil

서 론

석유화학산업의 발달에 따라 다양한 유기 및 무기오염물질들이 환경에 유출되었고, 토양과 지하수 등의 자연환경을 오염시키고 있다[18]. 그 중에서 산업활동에 중요한 에너지원으로 이용되는 석유계 탄화수소 화합물(Total petroleum hydrocarbon, TPH)은 수송, 저장 및 이용 과정을 통해 환경으로 유입된다[10, 19]. 환경에 유입된 TPH는 물리, 화학적 방법에 의해 제거 가능하나[11], 처리비용이 비싸고 오염물질의 분해가 불완전하며, 처리시간이 오래 걸리며, 2차적인 환경문제를 야기할 수 있는 단점을 가지고 있다[6, 9, 17]. 특히 석유 지하 저장시설, 주유소의 누출로 인한 오염, 그리고 군부대에서의 부적절한 관리로 인한 유류오염은 토양 및 지하수를 오염시켜 그 피해범위가 계속적으로 확산되어 나

가고 있다. 이러한 토양 및 지하수의 오염문제는 주변 생태계와 인근 주민들에 대한 잠재적인 위험성을 가짐으로써 새로운 환경문제가 되고 있다[15].

유류로 오염된 토양을 복원하는 기술은 크게 물리화학적 기술과 생물학적 기술로 나눌 수 있다. 두 종류의 기술 중 생물학적 처리 기술은 처리비용이 적게 소요될 뿐 아니라, 2차적인 오염물질을 발생하지 않는 친환경적이라는 장점을 가지고 있다. 특히, 미생물을 이용한 오염 토양의 정화는 최근 주목 받고 있는 기술 중 하나로서, TPH와 같은 환경에 잔존하고 있는 오염물질을 제거하는데 많이 이용되고 있다[5, 8, 12, 16]. 미생물을 이용한 기술 중에서도 미생물 제제를 이용한 기술은 토양내의 오염물질을 분해하는 살아 있는 미생물을 직접적으로 이용하는 것으로써, 소비되는 순간까지 그 생명력이 유지되어 살아있는 기능이 발휘되어야 한다. 미생물 제제는 현재 매우 다양한 분야에서 그 수요가 증가하고 있으며, 특히 토양오염물질의 생분해에 대한 연구가 진행되고 있다[4].

오염된 토양의 미생물수, 효소 활성 및 군집구조의 변화는 유류 등이 토양 환경에 미치는 영향을 평가하기 위한 생

*Corresponding author

Tel: +82-31-220-2614, Fax: +82-31-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

물 지표(biological indicator)로 활용될 수 있다[14, 20]. 환경내의 미생물 군집구조의 분석(community level assay)은 종속영양성 미생물의 군집 특성을 평가하기 위한 방법으로 community level physiological profile(CLPP)로 알려져 있다[3, 4]. CLPP는 31종의 다양한 기질이 microplate에 건조된 상태로 채워져 있으며, 환경 시료가 기질 이용도에 따라 변화하는 색상 및 탁도를 측정하여 미생물 군집 특성을 비교하는 방법이다.

본 연구에서는 유류로 오염된 토양의 정화를 위한 토양미생물 복원제의 이용 가능성을 알아보았다. 특별한 처리 없이 유류로만 오염된 대조군 토양과 토양미생물 복원제를 첨가한 실험군의 복원 효능을 비교평가 하였다. 또한 토양미생물 복원제의 활성을 촉진할 수 있게 해주는 촉진제를 사용과 미생물이 성장하기 위한 중요한 조건인 pH를 보정해 줌으로써 보정하지 않은 조건과 저감율을 비교 평가하였고 CLPP 패턴을 분석함으로써 유류로 오염된 토양에서의 미생물의 특성을 비교 조사하고자 하였다.

실험재료 및 방법

토양 및 실험조건

토양은 수원대학교에서 채취한 토양 30 kg을 2 mm 체로 친 후 토양을 인위적으로 오염시키기 위해서 디젤을 15,000 mg/kg이 되도록 첨가한 후 3개의 pot에 각 10 kg씩 나누어 담았다. 10 kg은 디젤만 넣었고 10 kg은 디젤과 토양미생물 복원제로 5-20%(w/w)가 되도록 넣어 주었다. 나머지 10 kg은 토양미생물 복원제 5-20%(w/w)와 촉진제 500 mL로 넣어 주었다. 촉진제를 넣지 않은 pot에는 물 500 mL을 넣어 주어 수분 함량을 맞춰 주었고 평균 온도가 10-20°C 정도인 실내에서 보관하면서 하루에 한번씩 토양을 위 아래로 섞어 주면서 보관하였다.

토양미생물 복원제는 유기물(organic matter) 50-70%(w/w)에 SiO₂ 19-40%(w/w), N 2-4%(w/w), K₂O 1-2%(w/w), MgO 0.3-1.0%(w/w), MnO 0.02-0.04%(w/w)와 B₂O₃ 0.008-0.015(w/w) 및 유용미생물로 이루어진 분말형태의 제제이다. 촉진제는 부식토 등과 같은 biomass에서 추출한 휴믹산을 주 원료로 하는 증류액을 포함한 액상의 제제이다.

실험조건은 유류로만 오염된 토양(DS), 토양미생물 복원제를 20%(w/w)가 되도록 첨가한 유류로 오염된 토양(DSP), 토양미생물 복원제를 넣은 후 pH를 중성으로 보정한 유류로 오염된 토양(DSP-1), 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 유류로 오염된 토양(DSP-2), 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 후 pH를 중성으로 보정한 유류로 오염된 토양(DSP-3)을 조건으로 하여 실험을 진행하였다. 복원제의 제작과정에서 낮은 pH(pH 5.5)로 제조되어 토양 미생물의 활성에 영향을 줄 수 있다는 가정아래 1 N의 NaOH와 HCl용액을 이용하여 중성 pH로 보정하였다.

Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)기법을 이용한 토양미생물 복원제의 동정

미생물 복원제에서 추출한 genomic DNA 시료를 template로 하여 PCR(TaKaRa PCR thermal cycle, JAPAN)을 수행하였다. PCR에 사용한 primer는 Br518f(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')과 341fGC(5'-CGC CCG CCG GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')를 사용하였다. PCR 조건은 pre-denaturation은 95°C에서 10분, denaturation은 96°C에서 30초, Annealing은 56°C에서 30초, extension은 70°C에서 30초로 28 cycle 실행한 후에 72°C에서 5분 동안 final extension을 하였다. PCR amplicon 시료를 Bio-Rad (USA) decode 시스템을 이용하여 DGGE를 수행하였다. Gradient gel의 농도는 각각 35%~70%로 농도 구배가 연속적으로 형성되게 gel을 제작하여 사용하였다. 제작된 gel에 PCR amplicon을 20 µL + 6X loading buffer 20 µL 로딩하여 TAE 1X buffer(Tris-Acetate 2 M, EDTA 50 mM, pH 8.0)에서 60°C에서 200 V로 5 시간 전기영동 하였다. DGGE fingerprint로부터 대표적인 band 9개를 잘라내어 DNA를 추출한 후, 341f, Br518 primer를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 pGEM-T Vector System(Promega, USA)을 이용해 cloning 한 후 *E. coli* DH5α에 형질 전환하였다[1]. 형질전환된 9개의 clone으로부터 plasmid를 추출하여 염기서열을 분석하였다[1]. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(Blast) algorithm을 사용하여 GenBank database와 비교하였다. 계통수(Phylogenetic Tree)를 그리기 위하여 Bioedit 프로그램으로 염기서열들을 편집한 다음, Clustal X 프로그램으로 염기서열을 정렬하였다. 계통수는 MEGA 4 프로그램을 사용하여 구축하였다[1].

토양 및 미생물 활성측정

토양의 pH는 토양과 3차 증류수를 1:5(w/v)로 혼합한 후 30분간 교반하고 30분간 정치한 후 pH meter(Thermo Benchtop, USA)로 측정 하였다. 토양 함수량은 토양 5 g을 110°C 건조기에서 항량이 될 때까지 말린 후 건조중량당 백분율로 계산하였다. 토양 중의 잔류 디젤 농도를 측정하기 위해 각 화분에서 채취한 토양 5 g을 시험관에 넣고, hexane-acetone solution(1:1, v/v)을 5 mL 넣은 후 30분간 교반한 후에 30분간 정치하였다. 디젤농도는 상등액(hexane-acetone solution)을 채취하여 gas chromatography(5890 series, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 이때 gas chromatography의 분석 조건은 HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 µm) column과 불꽃 이온화 검출기를 사용하였다. Oven 온도는 320°C, inlet 온도는 280°C, detector 온도는 250°C로 설정하였다.

토양 중의 미생물 활성의 지표인 탈수소 효소 활성(DHA) 측정법을 이용하였다. 첨가된 기질의 일종인 TTC(2,3,5-

triphenyl tetrazolium chloride)는 H₂와 반응하여 TPF (Triphenyl formazan)를 형성한다. 토양 3 g에 3% TTC 1 mL와 멸균수 2.5 mL을 첨가한 후 광분해를 막기 위해 은박지로 덮은 후 37°C 항온기에 넣고 24시간 배양 한다. 배양액에 메탄올을 첨가 한 후 1시간 반 동안 계속 하여(20분마다 한번 정도) 흔들어 액/액 추출한다. 추출한 메탄올 용액 속의 TPF의 양을 485 nm에서 spectrophotometer(Model DR5000, Hach, USA)를 사용하여 측정하였다.

Community-level physiological profiling(CLPP)분석

Community level assay에서 이용하는 Biolog Ecoplate는 31종의 다양한 기질이 3 set씩 microplate 96 well내에 건조된 상태로 채워져 있다(기질이 들어가 있지 않은 3 well 3 sets 포함). 각각의 well에 환경 시료 현탁액을 접종하고 배양한 후, 기질에 대한 색상변화 및 탁도를 측정하여 기질 이용성을 분석함으로써 각 환경 시료내의 미생물 군집 특성을 비교할 수 있다.

실험 시작 20일이 지난 후에 채취한 5종류의(DS, DSP, DSP-1, DSP-2, DSP-3) 시료를 가지고 실험을 수행하였다. 토양 시료와 멸균수를 1:10(w/w)의 비율로 희석한 후 200 rpm으로 10분간 교반한 후 정치시켜 상등액만 Eco plate (Biolog, USA)의 각각의 well에 150 µL씩 접종한 후, 20°C에서 배양하면서, 24시간 간격으로 각 well의 색 변화를 595 nm파장에서 측정하여 분석 하였다. 흡광도는 Multiskan Ascent(Thermo LabSystems, Finland)을 이용하여 측정 한 후, average well color development(AWCD)를 다음의 식으로 계산하였다[4].

$$AWCD = \Sigma(C - R)/n \tag{1}$$

- C: 각 well의 OD_{595nm}값
- R: Control well의 OD_{595nm}값
- n: 기질의 수(31)

생태학에서 종 다양성을 나타내는 지수인 Shannon index 값을 다음과 같은 식으로 계산하였다[7].

$$H = -\Sigma P_i \ln P_i \tag{2}$$

H: Shannon Index

P_i: 전체 OD_{595nm}값에 대한 각각의 기질 OD_{595nm}값

또한, 배양 2일과 8일의 각 well의 OD값은 아래의 식을 이용하여 계산 한 후, SPSS 18.0 ko(SPSS Inc. Korea)을 이용하여 principal components analysis(PCA)를 수행하였다. PCA는 기질이용도에 가장 큰 영향을 미친 요인을 찾아내는 분석기법으로 본 연구에서는 미생물제제, 축진제, 유류오염, 그리고 pH 보정이 요인으로 작용하였다.

$$(C_{id} - R_{id})/AWCD_{id} \tag{3}$$

- C_{id}: 배양 i일째의 각 well의 OD_{595nm}값
- R_{id}: 배양 i일째의 control well의 OD_{595nm}값
- AWCD_{id}: 배양 i일째 AWCD값

결과 및 고찰

토양의 물리·화학적 특성

비오염 토양과 디젤을 첨가하여 오염시킨 토양에 각각 미생물복원제를 첨가하거나 pH를 보정한 후 20일 후 토양을 채취하여 pH, 수분함량 및 잔류 TPH량을 측정하였다(Table 1).

복원제 첨가 전 후로 토양의 pH가 교란될 우려 때문에 pH를 보정한 것과 보정하지 않은 것을 비교하였다. 실험군의 시료를 주기적으로 채취하여 pH를 측정 한 결과, 토양미생물 복원제를 넣은 토양의 pH 값은 5.24, 토양미생물 복원제를 넣지 않은 유류오염토양은 6.5으로 복원제를 첨가할 경우 토양의 pH가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. pH는 오염된 토양의 식물상 복원에 있어 중요한 제한요소로 작용하게 되는데, Betancur-Galvis(2006)는 phenanthrene, anthracene, benzo(a)pyrene으로 오염된 토양의 정화에 있어 pH가 미치는 영향을 연구하였다[2]. 그 결과, 중성의 토양에서는 112일 동안 오염물질이 완전히 제거되는 반면, 염기성

Table 1. Chemical and physical properties of soil samples after 20 days.

Experimental condition	pH	Moisture Content (%)	Residual TPHs (mg/kg)
DS contaminated soil	7.46 (6.5) ^a	17.6 (21.1) ^a	8707.7±591.7 ^b (13398.5±245.7) ^a
DSP contaminated soil + microbial additives	5.24	23.5	4235.4±83.1
DSP-1 contaminated soil + microbial additives + pH calibration	6.38	23.4	4396.3±11.4
DSP-2 contaminated soil + microbial additives + accelerating agents	4.92	21.5	5903.1±492.4
DSP-3 contaminated soil + microbial additives + accelerating agents + pH calibration	6.28	19.1	4465.1±64.4

^aInitial values pH, moisture content, TPHs were represented in parentheses.

^bValues are means ±SD of triplicate determinations.

토양에서는 112일 동안 탄소고리가 가장 적은 phenanthrene 도 100% 제거하지 못하였다. 한편, pH가 산성일 경우 식물의 성장이 잘 이루어지지 못하기 때문에 산성의 pH는 식물상 복원에 있어 제한요소로 작용한다[2].

수분함량은 DS, DSP, DSP-1, DSP-2, 그리고 DSP-3가 각각 17.6, 23.5, 23.4, 21.5, 그리고 19.1%로 나타났다. 초기 토양의 오염농도를 15,000 mg/kg 되도록 디젤을 첨가하고 미생물 복원제를 20%(w/w), 촉진제 500 mL를 첨가하고 pH를 보정한 토양들의 TPH를 20일 후에 측정하였다(Table 1). 그 결과, 초기 토양의 TPH는 13398.5±245.7 mg/kg였고, DS, DSP, DSP-1, DSP-2, 그리고 DSP-3는 8707.7±591.7, 4235.4±83.1, 4396.3±11.4, 5903.1±492.4, 그리고 4465.1±64.4 mg/kg 였다. 20일 후에는 pH를 보정한 토양미생물 복원제를 넣은 유류로 오염된 토양에서의 TPH 저감효과가 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 10일 경과한 후의 결과를 살펴보면, DSP-1의 저감율은 54.9%로 토양미생물 복원제를 넣은 유류토양 DSP(41.8%), pH 보정한 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 유류토양 DSP-3(37.9%), 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 유류토양 DSP-2(28.7%), 유류로만 오염된 토양 DS(12.7%) 보다 저감율이 높은 것을 확인할 수 있었다.

DGGE를 이용한 미생물복원제의 동정

토양 미생물복원제에 들어있는 미생물의 성상을 알아보기 위해 시료로부터 총 genomic DNA를 추출한 후 DGGE를

수행하였다(Fig. 1). DGGE fingerprints로부터 8개의 band를 선택하여(Fig. 1(a)) 동정한 결과, Clone 들은 대부분은 토양에서 나오는 균으로서 아직 uncultured bacterium이 대부분이었다. 그 중에서도 Clone S2는 *Leptospirillum* sp.와 99%의 높은 유사성을 보였고, S3 Clone은 carbon dioxide-utilizing 미생물과 95%의 유사도를 보였다. S4는 금속광산에 존재하는 *Acidiphilium* sp.와 98%의 유사도를 보였으며, S9는 탄화수소계 유기화합물을 분해하는 미생물로 알려져 있는 *Pseudomonas* sp.와 96%의 높은 유사도가 있는 것으로 나타났다.

토양의 미생물 활성측정

탈수소 효소 활성(DHA)은 미생물의 호흡활동과 밀접한 관련이 있으며, 미생물의 활성 측정 할 수 있는 우수한 방법 중의 하나이다[13]. 본 연구에서도 각 실험 조건 별 미생물 활성을 비교하기 위해 DHA를 측정 하였다(Fig. 2). 실험이 10일 경과된 후 탈수소 효소 활성을 측정한 결과 pH를 보정하고 토양미생물 복원제를 넣은 유류로 오염된 토양(DSP-1, 894.2±174.3 µg/kg)의 활성 값이 다른 조건들에 비해 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 pH를 보정한 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 유류로 오염된 토양(DSP-3, 422.2±54.8 µg/kg)도 DSP-1에 비해 활성 값이 다소 낮지만 다른 조건들에 비해서는 높은 것을 확인 할 수 있었다. pH를 보정한 DSP-1과 DSP-3의 토양은 pH를 보정하지 않은

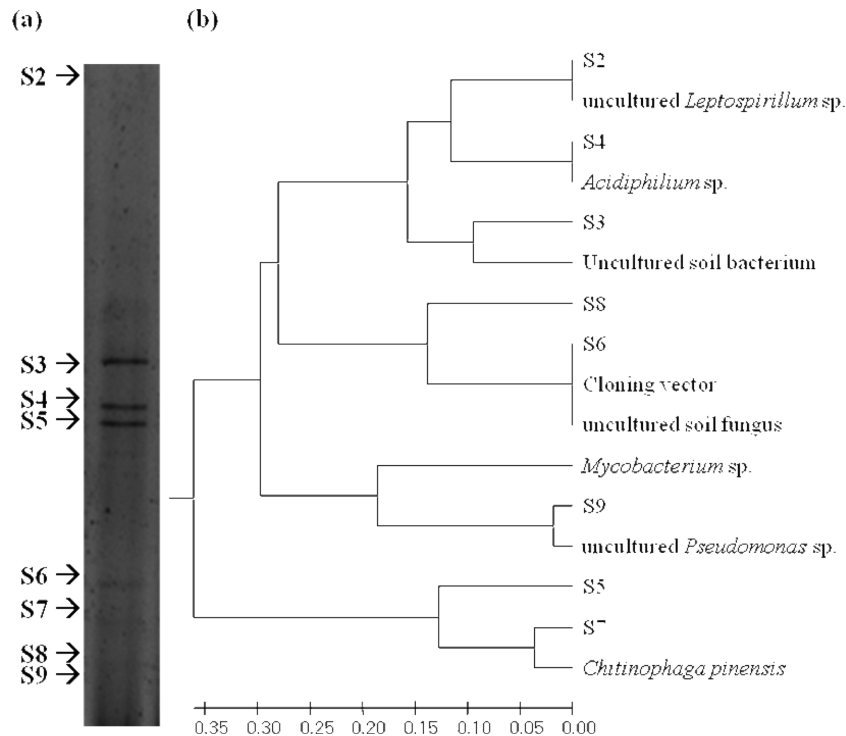


Fig 1. Similarity analysis based on DGGE fingerprints. (a) DGGE band (b) Phylogenetic tree illustrating the relationships among the closest relatives in the GenBank database and the clones.

DSP, DSP-2의 토양에 비해 미생물 활성 값이 매우 높은 것을 확인하였다. 이는 미생물이 성장하는데 있어 산성화된 환

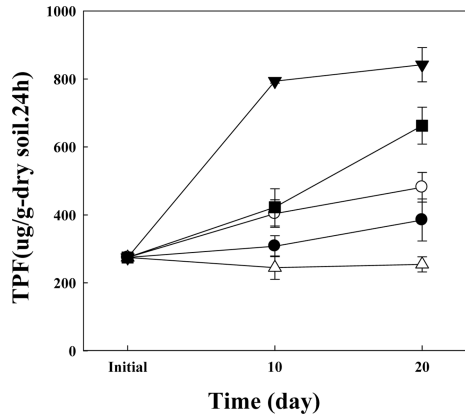


Fig. 2. Comparison of soil dehydrogenase activities according to the additives (●, DS; ○, DSP; ▼, DSP-1; △, DSP-2; ■, DSP-3).

Table 2. substrate utilization after 5 days in soil samples.

Substrate	DS	DSP	DSP-1	DSP-2	DSP-3
Pyruvic Acid Methyl Ester	+++	+++	+++	+++	++++
Tween 40	+++	+++	+++	++	+++
Tween 80	+++	+++	+++	+++	+++
α-Cyclodextrin	+++	-	+++	-	++++
Glycogen	+++	-	++	-	++++
D-Cellobiose	+++	+++	++++	++	++++
α-D-Lactose	+++	+++	+++	-	++++
β-Methyl-DGlucoside	+++	+	+++	+	++++
D-Xylose	+++	++++	++++	-	++++
i-Erythritol	+++	-	+	+	++
D-Mannitol	++++	++++	++++	+++	++++
N-Acetyl-DGlucosamine	+++	+++	++++	+++	++++
D-Glucosaminic Acid	+++	++	+++	++	+++
Glucose-1-Phosphate	+++	++	++++	+	++++
D,L-α-Glycerol Phosphate	-	-	+	+	+
D-Galactonic Acid γ-Lactone	+++	++	+++	+	+++
D-Galacturonic Acid	+++	++	++++	+++	+++
2-Hydroxy Benzoic Acid	+++	++	++++	+	++++
4-Hydroxy Benzoic Acid	+++	+++	++++	++	++++
γ-Hydroxybutyric Acid	+	-	+	-	+
Itaconic Acid	++++	++	+++	+	++++
α-Ketobutyric Acid	++	+	+	+	++
D-Malic Acid	+++	+++	++++	+	+++
L-Arginine	+++	+++	++++	+++	++++
L-Asparagine	+++	++++	++++	+++	++++
L-Phenylalanine	++++	+++	++++	+++	++++
L-Serine	+++	+++	++++	-	++++
L-Threonine	++++	+	+++	+	++++
Glycyl-L-Glutamic Acid	+++	-	++	-	++
Phenylethyl-amine	++++	++	+++	+	+++
Putrescine	+++	++	++	+	+++

OD<0.5 : -, 0.5< OD <1.0 : +, 1.0<OD<1.5 : ++, 1.5<OD<2.0 : +++, OD>2.0 : ++++.

경에선 미생물의 활성이 저하되는 것을 알 수 있었다. 시간이 지날수록 탈수소 효소 활성 값이 떨어지는 것을 확인하였는데 이는 유류저감과 시간경과에 따른 미생물의 탄소원 부족으로 인한 결과로 판단된다.

Community-level physiological profiling (CLPP) 분석

유류로 오염시킨 토양에 첨가되는 토양미생물 복원제 및 촉진제가 토양 미생물 군집에 미치는 영향을 조사하기 위해 CLPP 분석을 수행하였다. Ecoplate에서 배양 기간 중 5일을 기준으로 31가지의 기질이용도를 Table 2에 나타내었다. DS 토양은 polymer 계통인 D-mannitol 등 5가지의 기질의 이용도가 가장 높았고, DSP 토양은 carbohydrate 계통인 D-xylose 등 3가지의 기질의 이용도가 가장 높았다. DSP-1 토양은 carbohydrate 계통인 D-cellobiose 등 13가지의 기질의 이용도가 매우 높았고, DSP-2 토양은 다른 토양에 비해 기질의 이용도가 낮았다. DSP-3 토양은 carboxylic acid 계통인 pyruvic acid methyl ester 등 18가지의 기질의 이용도가 매우 높았다. 앞선 탈수소효소 활성에서의 결과(Table 1)와 마찬가지로 pH를 보정해준 DSP-1, DSP-3 토양내의 미생물군집의 기질 이용도가 높았고, DSP-3 토양의 미생물군집이 가장 높은 기질 이용도 나타났다. 또한 위의 실험 조건

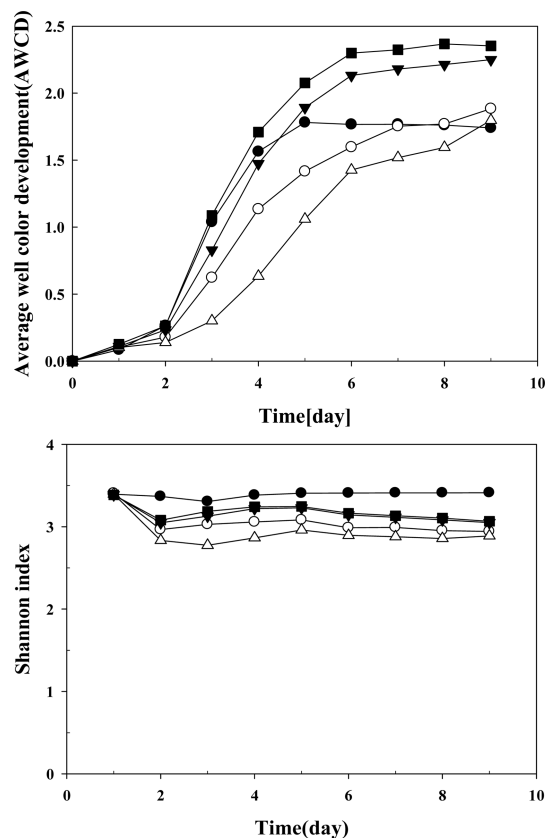


Fig. 3. Development of average and comparison of Shannon index with time (n=3) (●, DS; ○, DSP; ▼, DSP-1; △, DSP-2; ■, DSP-3).

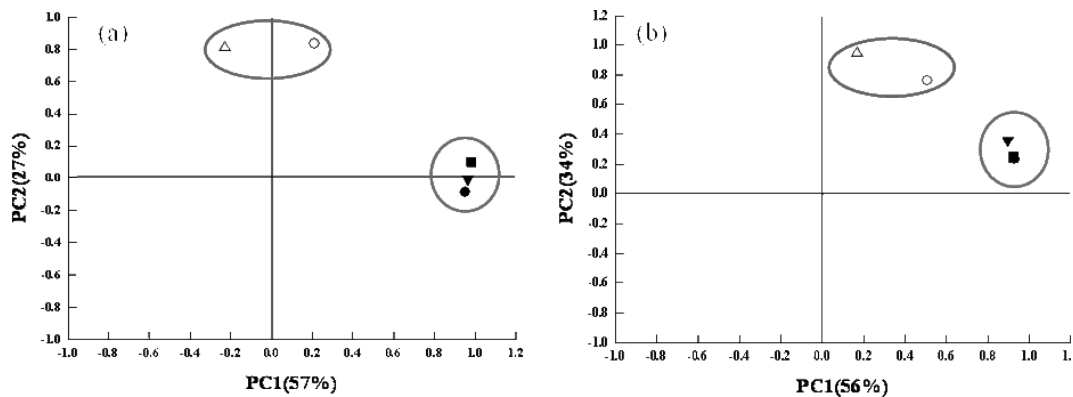


Fig. 4. Principal component analysis of average well color development. (a) 2 day, (b) 6 day, (c) 8 day (●, DS; ○, DSP; ▼, DSP-1; △, DSP-2; ■, DSP-3).

에서는 carbohydrate 계통인 D,L- α -glycerol phosphate와 carboxylic acid 계통인 γ -hydroxybutyric acid의 기질은 이용도가 낮은 것을 확인하였다.

각각의 토양 미생물 군집의 기질 이용도를 각 well의 평균 색 발달 정도(average well color development; AWCD)로 비교 분석하였다(Fig. 3). AWCD 값 또한 pH를 보정한 DSP-3(기질이용도 측정 최종일 9일 기준으로 2.35)와 DSP-1(2.24)가 pH를 보정하지 않은 DSP-2(1.79)와 DSP(1.88)에 비해 기질 이용도가 높은 것을 확인하였고, 초기 토양의 AWCD값은 2.25였으나 유류로 오염시킨 후 복원제를 처리하지 않은 유류오염토양(DS)은 1.7로 유류에 의해 미생물의 기질이용도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 유류의 오염 및 산성화된 토양은 토양내의 미생물 군집의 활동도를 감소시켜주는 부정적인 환경요인임을 다시 한번 확인시켜주는 결과이고, 이를 복원제 첨가로 회복시켜줄 수 있음을 의미한다.

또한 미생물의 종 다양성을 알아보기 위해 ecoplate에서의 배양 마지막 날(9일)을 기준으로 각 시료의 Shannon index를 계산한 결과 DSP, DSP-1, DSP-2, 및 DSP-3가 각각 2.94, 3.05, 2.88, 및 3.06으로 계산되었다.

주성분분석 PCA(Principal component analysis)를 분석하였다(Fig. 4). PCA는 일반적으로 서로 연관이 있는 변수들을 가지고 있는 정보들을 최대한 확보하는 적은 수의 새로운 변수를 생성하여 연관성을 예측하는 통계적 기법이다. PC는 시료들 사이의 관계를 표현한 것으로 각 시료들 사이의 첫 번째 principal component(PC 1)의 변이는 각각 2, 8일째 각각 57%, 56%였고, 두 번째 principal component(PC 2)의 변이는 27%, 34%로 나타났고 모든 변이는 PC 1이 PC 2보다 높게 나타났다. PCA 결과, 2일부터 pH를 보정한 토양(DSP-1, DSP-3)과 보정하지 않은 토양(DSP, DSP-2)의 그룹화가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 4). 이는 미생물이 기질을 이용하는 데 있어 pH가 많은 영향을 미치고 있음을 보여주는 결과이다.

요 약

유류로 오염된 토양을 토양미생물 복원제를 첨가한 후 다양한 조건에서 20일 동안의 유류저감효과를 알아보았다. 실험 조건은 유류로만 오염된 토양(DS), 토양미생물 복원제를 20%(w/w)가 되도록 첨가한 유류로 오염된 토양(DSP), 토양미생물 복원제를 넣은 후 pH를 중성으로 보정한 유류로 오염된 토양(DSP-1), 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 유류로 오염된 토양(DSP-2), 토양미생물 복원제와 촉진제를 넣은 후 pH를 중성으로 보정한 유류로 오염된 토양(DSP-3)을 설정하였다. 실험 결과 pH를 보정한 토양미생물 복원제를 첨가한 유류오염토양은 탈수소 효소 활성과 TPH 저감에서의 효능이 우수하였다. 실험이 10일 경과되었을 때 탈수소 효소 활성이 가장 높은 DSP-1 토양이 TPH 역시 가장 활발히 분해했다. 결과적으로 초기 10일의 배양기간 동안 토양미생물 복원제를 첨가한 토양은 대조군에 비해 38% 가량의 TPH 저감상승효과를 볼 수 있다. 토양미생물 복원제의 첨가를 통해 초기 저감속도를 올려줄 수 있으며, 최종적으로도 비 첨가군에 비해 높은 저감효율을 기대할 수 있다. 토양미생물 복원제를 유류오염토양을 복원한다면 초기 오염물질을 빠르게 처리할 수 있지만 미생물 활성은 pH, 온도 등 환경 인자에 많은 영향을 받으므로 토양미생물 복원제의 효율을 최대화하기 위해서는 환경 인자를 분석하여 이를 바탕으로 복원을 진행한다면 오염물질 정화 효율을 향상시킬 수 있을 것이다.

REFERENCES

- An, Y. J., Y. H. Joo, I. Y. Hong, H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2004. Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 611-619.
- Betancur-Galvis, L. A., D. Alvarez-Bernal, A. C. Ramos-Valdivia, and L. Dendooven. 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline

- soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere* **62**: 1749-1760.
3. Garland, J. L. 1997. Analysis and interpretation of community level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 289-300.
 4. Garland, J. L. and A. L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2351-2359.
 5. Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**: 383-393.
 6. Huang, X. D., Y. El-Alawi, J. Gurska, B. R. Glick, and B.M. Greenberg. 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J.* **81**: 139-147.
 7. Ian, F. S. and J. F. Peter. 2003. A tribute to claude shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the shannon-wiener index. *Global Ecol. Biogeogr.* **12**: 177-179.
 8. Imsande, J. 1998. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiol. Plant.* **103**: 139-144.
 9. Macek, T. M. and J. Kas, 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.* **18**: 23-34.
 10. Margesin, R., D. Labbe, F. Schinner, C. W. Greer, and L. G. Whyte. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**: 3085-3092.
 11. Marques, A. V., S. C. Cunha des Santos, R. D. C. Casella, R. L. Vital, C. V. Sebastin, and L. Seldin. 2008. Bioremediation potential of a tropical soil contaminated with a mixture of crude oil and production water. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 1966-1974.
 12. Medina-Bellver, J. I., P. Marn, A. Delgado, A. Rodriguez-Sanches, E. Reyes, J. L. Ramos, and S. Marqus. 2005. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. *Environ. Microbiol.* **7**: 773-779.
 13. Mresi, W. and F. Schinner. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodonitrotetrazilium chloride. *Biol. Fertil. Soils.* **11**: 210-220.
 14. Muhammad, A., J. Xu, Z. Li, H. Wang, and H. Yao. 2005. Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosphere* **60**: 508-514.
 15. Nam, B. H., B. J. Park, and H. S. Yun. 2008. Biodegradation of JP-8 by *Rhodococcus fascians* Isolated from Petroleum Contaminated Soil. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 819-823.
 16. Philp, J. C., S. M. Bamforth, I. Singleton, and R. M. Atlas. 2005. Environmental pollution and restoration: A role for bioremediation, In R. M. Atlas, and J. Philp (eds.). Bioremediation. ASM Press, Washington, DC. U.S.A. 1-48.
 17. Reichenauer, T. G. and J. J. Germida, 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *Green Sust. Chem.* **1**: 708-717.
 18. Valeria, P. A., R. B. Vieira, F. P. Franca, and V. L. Cardoso. 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J. Hazard. Mater.* **140**: 52-59.
 19. Wei, Q. F., R. R. Mather, and A. F. Fotheringham. 2005. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. *Bioresour. Technol.* **96**: 331-334.
 20. Yao, H., Z. He, M. J. Wilson, and C. D. Campell. 2000. Microbial biomass and community structure in a accumulation in soils increasing fertility and changing land use. *Microb. Ecol.* **40**: 223-237.