

토양 미생물 다양성 지표를 이용한 토착 미생물 군집의 호기성 기숀린 오염분해능력 평가 기법 개발 연구

황서윤* · 이나리** · 권혜지*** · 박준홍****

Hwang, Seoyun*, Lee, Nari**, Kwon, Hyeji***, Park, Joonhong****

A Novel Method to Assess the Aerobic Gasoline Degradation by Indigenous Soil Microbial Community using Microbial Diversity Information

ABSTRACT

Since oil leakage is one of the most common nonpoint pollution sources that contaminate soil in Korea, the capacity of soil microbial community for degrading petroleum hydrocarbons should be considered to assess the functional value of soil resource. However, conventional methods (e.g., microcosm experiments) to assess the remediation capacity of soil microbial community are costly and time-consuming to cover large area. The present study suggests a new approach to assess the toluene remediation capacity of soil microbial community using a microbial diversity index, which is a simpler detection method than measuring degradation rate. The results showed that Shannon index of microbial community were correlated with specific degradation rate (V_{max}), a degradation factor. Subsequently, a correlation equation was generated and applied to Michaelis-Menten kinetics. These results will be useful to conveniently assess the remediation capacity of soil microbial community and can be widely applied to diverse engineering fields including environment-friendly construction engineering fields.

Key words : Oil-Contaminated soil, Remediation assessment, Microbial diversity, Correlation analysis

초록

유류오염은 우리나라의 대표적인 토양 비점오염원으로 알려져 있으며, 이를 정화하는 토양의 능력은 토양 자원의 기능적 가치 평가에서 매우 유의하다. 특히 절/성토 설계 등의 친환경 건설기술 측면에서 토양의 유류오염정화능력을 평가하는 것은 중요하다. 그러나 마이크로코즘 실험을 포함한 기존의 토양 유류 오염정화능력 평가기법은 경제적, 시간적인 제약이 많아 광범위한 지역에 적용하기 어렵다. 이에 본 연구에서는 유류 오염물질 중 기숀린의 대표적 오염물질인 톨루엔을 선정하여 쉽고 간편하게 측정할 수 있는 토양의 미생물 다양성 지표를 이용, 토양의 유류오염 정화능력을 평가하는 기법을 제시하였다. 연구를 통해 미생물 군집의 다양성 지표 중 Shannon index가 토양의 정화능력 인자인 Specific Degradation Rate (V_{max})와 상관성 관계가 있음을 보였고, 두 인자 간의 상관식을 도출할 수 있었다. 또한 본 상관식을 Michaelis-Menten kinetics에 적용하여 미생물 다양성 인자만으로 토양의 톨루엔 정화능력을 평가할 수 있는 기법을 제시하였다. 본 기법을 통해 간단히 토양의 톨루엔 정화능력을 평가할 수 있으며, 친환경 건설기술분야와 같은 다양한 공학적 분야에 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

검색어 : 유류오염 토양, 정화능력 평가, 미생물 다양성, 상관관계 분석

* 정회원 · 연세대학교 토목환경공학과 석사과정 (Yonsei University · hsy1015@yonsei.ac.kr)

** 연세대학교 토목환경공학과 석사과정 (Yonsei University · narilee@yonsei.ac.kr)

*** 정회원 · 연세대학교 토목환경공학과 석사후연구원 (Yonsei University · ghjghj86@hanmail.net)

**** 종신회원 · 교신저자 · 연세대학교 토목환경공학과 정교수 (Corresponding Author · Yonsei University · parkj@yonsei.ac.kr)

Received April 25, 2016/ revised May 10, 2016/ accepted July 19, 2015

1. 서론

급격한 산업화 및 도시화, 국민의 생활수준 향상 등으로 1980년대 이후 우리나라의 주유소, 유류저장 탱크 등의 유류저장 시설 수 및 유류 사용량이 급격히 증가하였다. 주유소의 수가 1990년대 대비 400% 이상 증가 되는 등(Shin et al., 2014), 전국에 유류활용 시설이 널리 퍼져 있으며, 이에 따라 누출 등의 원인으로 인한 유류오염이 도로 및 도시 지역 토양의 대표적인 비점오염으로 인식되었다. 토양의 유류오염은 지하수 오염으로 확산될 수 있고, 매체의 특성상 대기 및 수질오염에 비해 정화하는데 많은 시간 및 막대한 비용이 소요된다(Yun et al., 2003). 이에 따라 미국 등 선진국들은 마이크로코즘 실험을 통해 토양의 유류오염 분해능을 평가하는 위해성평가기법을 사용, 유류 오염된 토양의 위해성 및 토양의 정화능력을 평가하여 유류오염 정화의 기술을 선정하는 등, 효율적인 유류오염처리를 위하여 노력하고 있다(Yun et al., 2003). 또한 토양의 오염정화능력 평가를 통해, 토양의 정화능력을 고려한 절/성토 설계 등 새로운 친환경 건설기술 창출에 기여할 것이므로, 토양의 유류오염분해 능력 평가는 미래 건설 분야에서 필수적이다. 그러나 광범위한 지역에 오염되는 유류오염의 특성상, 마이크로코즘을 이용해 유류오염토양의 분해능 및 분해속도를 추정하여 토양의 정화능력을 평가하는 방법은 시간적, 경제적 제약이 많다. 이를 해결하기 위해 미생물 다양성을 이용하여 토양의 정화능력을 추정하는 방법이 제시된 바 있다. Kim et al. (2014)는 불투수면 감소와 저류를 통해 토양, 지하수 환경을 개선하는 저영향 개발기법(Low Impact Development)이 적용된 토양을 분석하여, 오염정화능력이 좋은 저영향개발기법 토양의 미생물 다양성이 높으며, 이를 토대로 미생물 다양성을 오염정화능력의 지표로 제시한 바 있고, Johnson et al. (2015)은 하수처리장의 활성슬러지 시료를 분석한 결과, 미생물 다양성과 오염물질 제거를 포함한 미생물의 기능간에 상관성이 있음을 밝힌 바 있다. 그러나 토양에서의 미생물 다양성과 오염 정화능력간의 상관성 및 정화능력 추정기법에 대한 연구는 부족하다. 미생물 다양성을 측정하기 위해 다양한 배양 비의존적인 DNA fingerprinting 기술이 개발되었고, 그 중 T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법은 다른 기술들에 비해 장점이 많아 널리 사용된다. T-RFLP은 형광색 소로 라벨링을 한 primer을 이용하여 PCR을 한 후 시료를 제한 효소로 절단하고 DNA 단편들을 분리하여 미생물 군집 및 다양성 분석을 하는 방법으로, 레이저 검출기술의 개발로 다른 fingerprinting 기술에 비해 해상도와 감도가 좋으며 재현성의 측면 및 시료의 처리속도가 빠르다는 장점이 있다(Ranjard et al., 2000; Shim and Lee, 2008). 이와 같이 시간적, 경제효율적인 T-RFLP을 통해 미생물 다양성을 분석하고 이를 통해 토양의 유류오염정화능력을

평가할 수 있다면 기존의 마이크로코즘 방법을 대체하여 현장에서 효율적으로 사용할 수 있다. 이에 따라 본 연구에서는 미생물 다양성 지표를 이용하여 유류오염물질 분해속도 등과 같은 유류오염 정화능력을 추정하는 기법을 개발하는 것을 목적으로 한다. 연구 대상 유류오염물질로는 가솔린의 주 오염원이자 화학적 특성으로 넓은 지역에 오염되기 쉬운 BTEX 중, 국내 유류오염 부지의 대표적인 오염물질인 톨루엔을 대상으로 하며(Chung, 2002), 토양의 호기성 분해속도와 미생물 다양성간의 상관관계를 실험실 규모의 마이크로코즘 실험 및 T-RFLP을 통해 분석하였다.

2. 연구방법

2.1 톨루엔 분해 마이크로코즘 실험

마이크로코즘 실험은 미생물 다양성이 다양한 토양 10가지의 톨루엔 분해 속도를 측정하는 것을 목표로 진행하였다. 실험에 사용된 토양은 충청남도 천안시 신도시개발지역 인근에 pilot 규모로 설치한 저영향개발기법 실험 토양 3종(시료 1-3번), 인근 내대지 토양 2종(시료 4, 5번), 인천시 강화도 길상면 갯벌 토양 2종(시료 6, 7번), 서울시 서대문구 신촌로 공사현장 토양(시료 8번), 서울시 연세대학교의 잔디밭(시료 9번), 서울시 서대문구에 위치한 안산 토양(시료 10번)이다. 각 토양을 이용한 마이크로코즘 실험은 160 ml 세립 바틀에 토양 16 g (10 ml bulk)과 미디어 50 ml를 넣고 공기 100 ml의 headspace로 구성하였다. 톨루엔의 완전 호기성 분해에 필요한 산소의 양은 1 mol 톨루엔(C₇H₈) 당 9 mol 산소로 (C₇H₈+9O₂ → 7CO₂+4H₂O (Yu et al., 2001)) headspace의 공기로 필요 산소를 충당할 수 있음을 알 수 있다. 미디어에는 대략기준 농도(60 mg/L)보다 높은 톨루엔 110±14.1 mg/L를 주입하였으며 trace element solution으로(mg/L) NH₄Cl (100), KH₂PO₄ (700), K₂HPO₄ (1,000), NaCl (10), CaCl₂ (5), MgCl₂ (10), CuCl₂·2H₂O (0.0392), ZnCl₂ (0.1363), NiCl₂ (0.013), FeCl₂·4H₂O (0.7016), AlCl₃ (0.1106), MnCl₂·4H₂O (0.2807), CoCl₂·6H₂O (0.0382), Na₂MoO₄·2H₂O (0.0254), H₃BO₃ (0.0382), Na₂SO₄ (0.1420), biotin (0.02), folic acid (0.02), pyridoxine HCl (0.1), riboflavin (0.05), thiamine (0.05), nicotinic acid (0.05), pantothenic acid (0.05), vitamin B12 (0.001), p-aminobenzoic acid (0.05)를 첨가하였다(Alvarez and Vogel, 1991). 배양 조건은 25°C의 온도에서 150 rpm으로 교반하였으며 각 실험은 모두 duplicate로 진행하였다. 토양의 정화능력으로 인한 톨루엔 농도 변화는 실험 구성 후 12시간의 교반을 통해 headspace 내 톨루엔의 농도를 평형 상태에 도달하게 한 후 headspace의 기체를 gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID)로 주기적으로 분석하여 측정하였다. GC의 Detector 온도는 200°C이며

column은 19091P-QO4 (30 m × 0.320 mm × 20.0 um)을 사용하였고 carrier gas는 질소 가스를 1.7 ml/min의 flow rate로 사용하였다. Inject의 온도는 200°C로, oven의 온도는 100°C에서 2분 고정 후 10°C/min의 속도로 225°C까지 올린 후 1분 고정 후 측정하였다.

2.2 미생물 다양성 분석

각 토양 시료는 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Bio 101, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출한 후 미생물의 정량적 분석을 위한 quantitative-polymerase chain reaction (qPCR)과 미생물 다양성 분석을 위한 T-RFLP을 진행하였다. qPCR은 SYBR Green 방법을 사용하였으며 primer은 전체 박테리아를 대상으로 한 Bac 1055YF (ATGGYGTGTCGTCAGCT), Bac 1392R (ACGGGC-GGTGTGTAC) (Park et al., 2009)을 첨가하였다. T-RFLP은 16S rRNA 유전자와 다양한 가솔린 분해에 사용되는 aromatic ring hydroxylating dioxygenase (ARHD) 유전자들을 대상으로 PCR을 수행한 후 진행하였다. 16S rRNA 유전자 분석에 사용된 primer은 형광물질이 부착된 27F-FAM (AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG), 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) (Hayashi et al., 2003)를 사용하였으며, ARHD 유전자 분석에 사용한 primer은 forward 5'-TGCASSTWTCACGGSTGG-3', reverse 5'-CTCGACTCCGAGCTTCCAGTT-3'이다(Kim et al., 2004). 증폭된 PCR산물에 HhaI 제한효소를 반응시킨 제한 효소 반응 실험을 진행하였으며, 이후 군집구조 분석은 Microbial Community Analysis (<http://mica.ibest.uidaho.edu>)의 database를 통해 분석하였다.

2.3 상관성 분석

분해 특성과 미생물 다양성간의 상관관계를 알아보기 위해 분해 특성으로는 톨루엔 분해속도(DR, mg-toluene/g-soil/hr), 1 mg cell 당 톨루엔 분해속도를 나타내는 specific degradation rate (V_{max} , mg-toluene/mg-cell/hr)를 분석하였으며 미생물 다양성 인자로는 1 g 토양 당 세균세포 무게(mg cell, mg-cell/g-soil), 16S rRNA 유전자(16S)의 Shannon index, Richness, Evenness, ARHD 유전자(ARHD)의 Shannon index, Richness, Evenness를 분석하였다. 이 후 분해 특성 인자들의 역수 및 로그 값을 포함한 각 인자들 간의 상관성을 SPSS 통계분석 프로그램으로 Pearson 상관계수 및 유의확률(p-value)을 도출하여 분석하였다. 상관성 분석으로 얻은 상관식을 통한 오염정화모형을 제작하기 앞서, 톨루엔 분해속도 중 lag time을 추론하기 위한 추가 실험을 진행하였다. 앞서 실험한 토양들에 유류오염분해 미생물제제를 다양하게 추가하여 얻은 샘플 총 23가지의 lag time을 분석하여 미생물 다양성

인자들과의 상관관계를 이진과 동일하게 SPSS로 추론하고 상관식을 도출하였다. 이렇게 얻은 인자들을 대표적인 반응속도 모델로 알려진 Michaelis-Menten kinetics에 대입해 미생물 다양성으로 토양의 유류오염 정화능을 평가하는 모형을 제작하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 상관식 도출

총 10가지의 다양한 토양들의 톨루엔 분해는 모두 약 48시간 정도의 lag time을 가진 후 96시간 이후에는 모두 95%이상 제거율을 보였다. 톨루엔의 분해속도를 나타내는 DR (mg/L/hr)은 토양의 종류에 상관없이 다양한 결과를 보였으나, DR을 세균세포 무게로 나눈 specific degradation rate (V_{max} , mg-toluene/mg cell/hr)은 저영향개발기법을 적용한 토양(시료 1~3번)이 일반 내대지 토양(시료 4~10번)보다 높은 결과를 보였다(Fig. 1). 각 토양 시료의 미생물 다양성들을 분석한 결과는 Table 1과 같다. V_{max} 가 높은 시료 1~3번의 경우, 16S rRNA 유전자 Shannon index를 비롯한 모든 미생물 다양성 값들이 시료 4~10번 보다 높은 경향을 보인다. 이는 저영향개발기법 토양이 토양, 지하수 환경의 조성이 잘되어 있고 오염저감 및 생태기능에 좋다는 결과를 뒷받침 한다(Ahiablame et al., 2012).

분해특성 인자인 V_{max} 가 높은 샘플에서 미생물 다양성 값들이 높아짐에 따라 분해 특성과 미생물 다양성 인자간의 상관성이 있다는 가능성이 제시되며, 이에 따라 Pearson 상관계수와 유의확률(p-value)을 사용한 상관성 분석을 Table 2와 같이 분석하였다. 먼저 p-value를 통해 유의성이 있는(p-value<0.05) 인자들은 16S rRNA 유전자의 Shannon index와 V_{max} 의 역수, 그리고 16S rRNA 유전자의 evenness와 V_{max} 의 역수이다. ARHD 유전자의 다양성과는 상관성이 적은 것으로 나타났는데 이는 ARHD가 톨루엔만을 분해하는 유전자가 아닌 벤젠, 나프탈렌 등의 가솔린 성분 및 poly aromatic hydrocarbon (PAH)과 같은 다양한 유류오염물질의 분

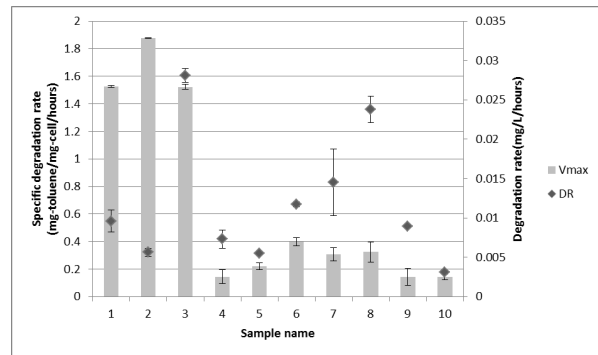


Fig. 1. Degradation Rate (DR) and Specific Degradation Rate (V_{max})

Table 1. Microbial Diversities of Each Samples

Sample name	16S Shannon index	16S Evenness	16S Richness	ARHD Shannon index	ARHD Evenness	ARHD Richness
1	3.80	0.824	100	2.16	0.763	17
2	4.10	0.835	136	2.95	0.806	39
3	3.95	0.850	104	3.08	0.859	36
4	3.74	0.810	101	2.65	0.860	22
5	3.62	0.800	92	0.98	0.900	3
6	3.74	0.806	103	1.95	0.607	25
7	3.40	0.758	89	2.71	0.853	24
8	3.96	0.807	135	3.07	0.833	40
9	1.55	0.572	15	2.53	0.808	23
10	3.31	0.774	72	-	-	-

Table 2. Correlation Analysis of Microbial Diversities and Degradation Factors

Microbial Diversities		DR	Log (DR)	1/DR	V_{max}	Log (V_{max})	1/ V_{max}
16S rRNA Shannon Index	Pearson Correlation Coefficient	0.430	0.373	-0.316	0.228	0.525	-0.742
	Significance Probability (p-Value)	0.142	0.209	0.293	0.454	0.065	0.004
16S rRNA Richness	Pearson Correlation Coefficient	0.510	0.458	-0.413	0.195	0.508	-0.637
	p-Value	0.075	0.116	0.161	0.522	0.076	0.019
16S rRNA evenness	Pearson Correlation Coefficient	0.373	0.327	-0.264	0.242	0.535	-0.728
	p-Value	0.209	0.275	0.384	0.426	0.060	0.005
ARHD Shannon index	Pearson Correlation Coefficient	0.489	0.471	-0.451	0.221	0.349	-0.256
	p-Value	0.107	0.122	0.141	0.491	0.266	0.426
ARHD Richness	Pearson Correlation Coefficient	0.534	0.507	-0.017	0.075	0.285	-0.342
	p-Value	0.074	0.093	0.959	0.817	0.369	0.277
ARHD evenness	Pearson Correlation Coefficient	0.014	0.141	-0.543	0.158	0.079	0.074
	p-Value	0.966	0.662	0.068	0.624	0.808	0.818
mg cell	Pearson Correlation Coefficient	0.929	0.818	-0.676	-0.223	-0.614	0.993
	p-Value	0.003	0.024	0.096	0.631	0.142	0.000

해에도 영향을 미치는 유전자이기 때문인 것으로 보인다. 특히 본 연구에 사용한 primer은 toluene dioxygenase 유전자의 검출이 가능하나 특정적으로 검출할 순 없고, 톨루엔 분해에 기여하는 toluene monooxygenase 유전자의 검출이 불가능한 점도 상관성이 낮게 나온 이유가 된다. 톨루엔 정화능력이 특정 분해 유전자의 다양성과 높은 상관성이 나올 수 있으나, 톨루엔 분해에는 굉장히 다양한 유전자들이 상호작용을 하며(Wackett, 1990; Furkawa et al., 1993; Kukor and Olsen, 1996), 여러 유류오염물질들이 복합적으로 오염되어 있는 실제 현장에 적용하기에는 무리가 있다. 이와 같은 이유로 특정 톨루엔 분해 유전자의 다양성보다는 전체 유전자의 다양성을 대변하는 16S rRNA 유전자 Shannon index나 evenness가 분해 특성을 대변하기 좋을 것으로 보이며, 두 다양성 인자 중 미생물 다양성 대표성이 높고 Pearson 상관계수 및 p-value

에서도 상관관계가 더 높은 것으로 나타난 16S rRNA 유전자 Shannon index를 미생물 다양성인자로 선정하여 V_{max} 와 회귀분석을 진행하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다.

16S rRNA 유전자 Shannon index가 클수록 토양의 정화능력을 나타내는 V_{max} 는 커지며, 특히 Shannon index의 값이 3.5 이상인 경우에는 V_{max} 의 값이 급격히 증가하는 양상을 나타낸다. 일반적인 자연 토양의 16S rRNA 유전자 Shannon index는 보통 4를 넘지 않는 것으로 알려져 있어(Ki, 2008), 본 상관식을 사용하여 V_{max} 를 추론할 경우, Shannon index가 4가 넘는 토양에 대해서는 어느 정도 보정이 필요하다. 톨루엔 분해 미생물 순수 균주 및 consortium의 V_{max} 는 2.11~2.44/hr로 알려져 있으며, 일반 자연 조건에서는 0.41~1.45/hr로 알려져 있어(Table 3), 본 상관식의 타당성을 알 수 있다. 본 상관식은 일정 16S rRNA 유전자 Shannon index까지

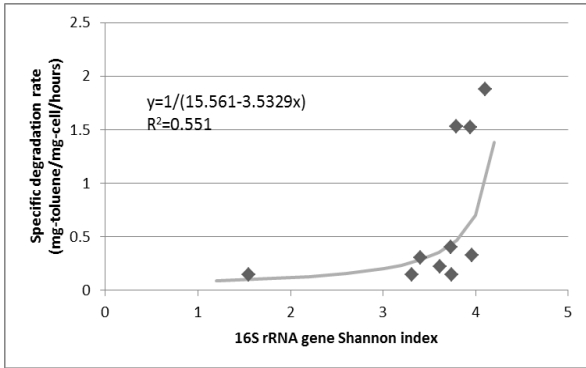


Fig. 2. Correlation Formula of Specific Degradation Rate and 16S rRNA gene Shannon Index

는 기울기가 미미하다 일정 값 이상이 되면 급격히 증가하여, 일반 자연 토양 Shannon index 최대값인 4까지 기울기가 커진 선형 관계를 보이는 양상이다. 이는 Johnson et al. (2015)이 밝힌 하수처리장의 다양성과 기능간 상관관계가 선형이라는 결과와 유사하다. 즉, 토양과 하수처리장에서의 다양성과 분해 특성과 같은 기능간 상관성은, 일정 다양성 값 이상에서는 기능이 일정한 decelerating shape가 아닌 선형에 가까운 Non-decelerating shape이다. 그러나 본 연구 결과 특정 다양성 값을 기준으로 이전과 이후의 Non-decelerating shape의 기울기가 달라지며 저영향평가기법 토양과 같이 의도적으로 다양성을 자연토양보다 높은 환경에서는 그 기울기가 급격히 커짐을 알 수 있다. 이는 미생물 제제 등을 추가한 토양에서의 분해 특성을 미생물 다양성 값으로 추론할 때 오차가 큼을 나타내며 이를 보정하는 추가 연구가 필요함을 시사한다.

3.2 토양의 유류오염정화능력 평가 수치 모형 개발

토양의 유류오염정화능력은 미생물 다양성 지수인 Shannon index를 Fig. 2의 상관식에 대입하고, 도출한 V_{max} 를 대표적인 반응속도 모델인 Michaelis-Menten kinetics에 대입함으로써 평

가할 수 있다. Michaelis-Menten kinetics로 특정 톨루엔 농도를 목표 시간까지 분해하는데 필요한 미생물 양을 구할 수 있으며, 이를 실제 토양의 미생물량과 비교하여 토양의 자연정화 가능 여부를 평가한다. Michaelis-Menten kinetics는 Eq. (1)과 같다.

$$\frac{dt}{ds} = \frac{V_{max} \times S \times X_0}{K_s + S} \quad (1)$$

여기서, $\frac{dt}{ds}$ 는 토양의 오염물질(톨루엔) 분해속도(DR, mg/L/hr)이며, V_{max} 는 specific degradation rate (hr^{-1}), S는 톨루엔의 농도이고, X_0 는 토양의 미생물 농도(mg cell/g soil), K_s 는 토양의 half saturation coefficient (mg/L)이다. 이 식을 적분하여 토양의 미생물 농도 X_0 에 대한 식으로 바꾸면 Eq. (2)와 같다.

$$X_0 = \frac{K_s \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) + S - S_0}{t \times V_{max}} \quad (2)$$

여기서, S_0 는 토양의 초기 톨루엔 농도(mg/L)이고 S는 t시간 후 톨루엔 농도(mg/L)이며 t는 분해시간(hr)이다. 다만 본 실험결과 토양의 톨루엔 분해에는 lag time이 있어 이를 고려할 필요가 있다. 위에서 실험한 10가지 자연 토양 외 미생물 제제를 추가로 투여한 실험 총 23종의 톨루엔 분해 lag time과 미생물 생태학적 특성 간 상관관계를 분석한 결과 lag time과 $x\left(\frac{ARHD \text{ 유전자수}}{16S \text{ rRNA 유전자수}}\right)$ 의 역수간에 상관성이 있어 회귀분석을 한 결과 Fig. 3과 같은 상관식이 나온다. 이를 보정한 lag time과 x간의 상관식은 Eq. (3)과 같다.

$$L = \alpha \frac{1}{x} \quad (3)$$

Table 3. Kinetic Parameters of Toluene Degradation in Soil

Culture	Half-Saturation Coefficient K_s (mg/L)	Specific Degradation Rate V_{max} (hr^{-1})	Initial Conc. (mg/L)	Reference
Natural soil	-	0.24±0.10	100	This study
LID soil	-	1.64±0.20	100	This study
Natural soil	17.40	0.41	100	Alvarez et al., 1991
Natural soil	17.40	0.83	-	Chen et al., 1992
Natural soil	20.27	-	-	Goldsmith and Balderson, 1988
Pseudomonas strain PPO2	15.07	2.44	-	Oh et al., 1994
Consortium	11.03	2.11	-	Oh et al., 1994
Sludge from WWTP	7.75	1.45	20-100	Tabak et al., 1991

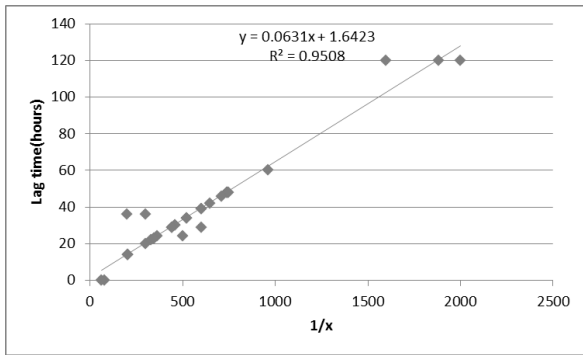


Fig. 3. Correlation Analysis of x and Lag Time

Table 4. Example of Assessment for Necessary Microbial Concentration in Soil under Specific Target Toluene Concentration and Time

x=0.001(L=63.1 h) t=240 hr S=20 mg/L		S ₀ (mg/L)				
		60	100	150	200	400
16S rRNA gene Shannon index	1.6	X=3.3 (mg cell/g soil)	6.1	9.3	12.4	24.3
	1.8	3.1	5.6	8.6	11.5	22.5
	2	2.9	5.2	8.0	10.6	20.8
	2.2	2.6	4.8	7.3	9.7	19.1
	2.4	2.4	4.3	6.6	8.8	17.3
	2.6	2.1	3.9	6.0	8.0	15.6
	2.8	1.9	3.5	5.3	7.1	13.9
	3	1.7	3.0	4.6	6.2	12.1
	3.2	1.4	2.6	4.0	5.3	10.4
	3.4	1.2	2.2	3.3	4.4	8.7
	3.6	1.0	1.7	2.7	3.5	7.0
3.8	0.7	1.3	2.0	2.7	5.2	
4	0.5	0.9	1.3	1.8	3.5	

여기서, L은 lag time(hr), α 는 상관계수이고 그 값은 0.0631 hr이며 x는 $\frac{ARHD \text{ 유전자수}}{16S \text{ rRNA 유전자수}}$ 이다. Lag time을 고려한 최종 식은 Eq. (4)와 같다.

$$X_0 = -\frac{K_s \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) + S - S_0}{(t-L) \times V_{max}} \quad (4)$$

위 식에서 K_s는 토양의 aging effect나 풍화 작용 및 미생물 제제 등에 의해 바뀔 수 있으며 현장토양에 맞는 특정 값을 사용한다. 본 연구에서는 Table 3의 문헌조사로 나온 일반적인 자연토양의 값 17.4 mg/L를 예시로 사용한다. Eq. (4)는 특정 토양의 톨루엔 자연저감능을 평가하는데 사용할 수 있다. 먼저 토양의 16S rRNA

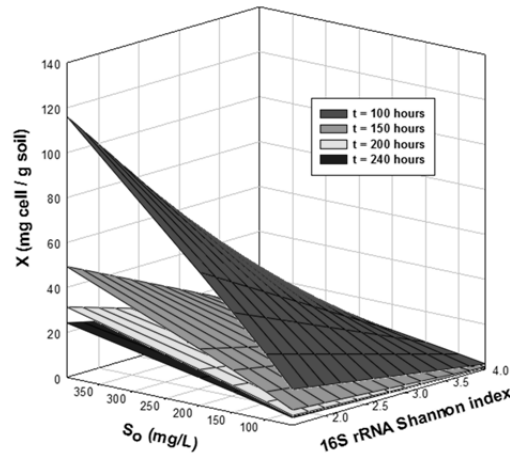


Fig. 4. Assessment Graph for Necessary Microbial Concentration in Soil

유전자 Shannon index를 T-RFLP을 통해 분석한 후 Fig. 2의 상관식을 통해 V_{max}를 구한다. 이후 qPCR을 통해 토양의 ARHD 유전자 수 및 16S rRNA 유전자 수를 구해 x를 산출하고 Eq. (3)를 통해 lag time (L)을 분석한다. 이렇게 구한 L과 V_{max} 및 토양의 특성에 맞는 K_s를 Eq. (4)에 대입하고, 목표 처리 시간(t)과 초기 톨루엔 농도(S₀), 목표 정화 농도(S)를 대입하면, 목표 처리 시간 내 목표 정화 농도 만족을 위한 토착 미생물 농도 X₀를 추정할 수 있다. 이렇게 구한 X₀를 현장 토양 미생물 농도 X와 비교하여 X가 X₀보다 높다면 자연정화가 가능한 토양으로 추정할 수 있다. 다른 활용방안으로는 X₀에 현장 토양 미생물 농도를 대입하고 초기 톨루엔 농도 및 목표 정화 농도를 대입하여, 목표 농도까지 토양이 톨루엔을 정화하는데 소요되는 시간을 산정할 수 있다. Table 4는 활용방안 예시이다. x값이 일반적인 자연 토양의 값인 0.001이고(L=63.1 hr), 목표 처리 시간(t)이 240 hours이며, 목표정화 농도(S)가 20 mg/L일 때 토양의 16S rRNA 유전자 Shannon index와 초기 톨루엔 농도(S₀)별로 정화에 필요한 토착 미생물 농도 X를 나타내었다. 그 값들을 그래프화 시키면 Fig. 4와 같으며, 목표 정화 시간이 짧을수록, 초기 톨루엔 농도가 높을수록, 그리고 토양의 16S rRNA 유전자 Shannon index 값이 낮을수록 정화에 필요한 토착 미생물 농도 X가 커짐을 알 수 있다. 이렇게 구한 X의 값을 평균 산정하는 등 보정하여 실제 토양의 토착 미생물 농도와 비교하여 자연저감 가능 여부를 판단할 수 있다.

4. 결론

본 연구를 통해 얻은 결론은 다음과 같다. 먼저 토양의 미생물 다양성 인자와 톨루엔 분해 특성 인자간의 상관관계가 있음을 규명하였으며, 16S rRNA 유전자 Shannon index와 토양의 specific

degradation rate간의 상관식을 도출하였다. 두 번째로 위 상관식 및 Michaelis-Menten kinetics를 이용하여 16S rRNA 유전자 Shannon index 값 및 $\alpha(\frac{ARHD \text{ 유전자수}}{16S \text{ rRNA 유전자수}})$ 와 같은 분자 생태학적 인자들만으로 토양의 오염정화능력을 평가할 수 있는 모델을 획득하였다. 이를 통해 기존의 오염정화능력 평가 기법보다 시간적, 경제적으로 효율적인 토양의 톨루엔 오염정화능력 평가 기법을 제시하였다. 또한 본 연구진에서 제안한 광범위한 지역의 T-RFLP 다양성 지표 지도화 기법(Kim et al., 2011)을 적용한다면 미생물 다양성 분석을 통해 넓은 지역 토양의 유류오염정화능력을 지도화할 수 있어, 질/성토 설계와 같이 건설 분야에 활용할 수 있는 등, 공학적으로 큰 의미가 있다. 특히, 유류오염 토양의 정화기법 선정 및 오염정화능력을 이용한 건설 산업의 친환경적 설계 등에 활용 되는 등 공학적으로 광범위한 분야에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 환경부 “GAIA” 사업의 재원으로 지원받아 수행되었습니다.

References

- Ahiablame, L. M., Engel, B. A. and Chaubey, I. (2012). “Effectiveness of low impact development practices: Literature Review and Suggestions for Future Research.” *Water Air Soil Pollut.*, Springer, Vol. 223, No. 7, pp. 4253-4273.
- Alvarez, P. J. J. and Vogel, T. M. (1991). “Substrate interactions of benzene, Toluene, and Para-Xylene during Microbial-Degradation by Pure Cultures and Mixed Culture Aquifer Slurries.” *Appl. Environ. Microbiol.*, Amer Soc Microbiology, Vol. 57, No. 10, pp. 2981-2985.
- Chen, Y. M., Abriola, L. M., Alvarez, P. J. J., Anid, P. J. and Vogel, T. M. (1992). “Modeling transport and biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material - Comparisons with Experimental Measurements.” *Water Resour. Res.*, Amer Geophysical Union, Vol. 28, No. 7, pp. 1833-1847.
- Chung, K. (2002). “Case study of health risk assessment and preliminary remediation goals calculation for the petroleum contaminated site.” *J. Environ. Toxicol.*, KSET, Vol. 17, No. 4, pp. 347-355 (in Korean).
- Furukawa, K., Hirose, J., Suyama, A., Zaiki, T. and Hayashida, S. (1993). “Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (bph operon) and toluene (tod operon).” *J. Bacteriol.*, Amer Soc Microbiology, Vol. 175, No. 16, pp. 5224-5232.
- Goldsmith, C. D. and Balderson, R. K. (1988). “Biodegradation and growth-kinetics of enrichment isolates on benzene, Toluene and Xylene.” *Water Sci. Technol.*, IWA Publishing, Vol. 20, pp. 505-507.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M. and Benno, Y. (2003). “Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA Library and T-RFLP.” *Microbiol. Immunol.*, Wiley-Blackwell, Vol. 47, No. 8, pp. 557-570.
- Johnson, D. R., Helbling, D. E., Lee, T. K., Park, J., Fenner, K., Kohler, H. P. E. and Ackermann, M. (2015). “Association of biodiversity with the rates of micropollutant biotransformations among full-scale wastewater treatment plant communities.” *Appl. Environ. Microbiol.*, Amer Soc Microbiology, Vol. 81, No. 2, pp. 666-675.
- Ki, D. (2008). Development of methods for classifying and mapping soil ecological quality using a decision tree algorithm, M.S. Dissertation, Yonsei University (in Korean).
- Kim, D., Chae, J., Zylstra, G., Kim, Y., Kim, S., Nam, M., Kim, Y. and Kim, E. (2004). “Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of o-Xylene, Toluene, and Ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. Strain DK17.” *Appl. Environ. Microbiol.*, Amer Soc Microbiology, Vol. 70, No. 12, pp. 7086-7092.
- Kim, J., Kim, S., Lee, Y., Choi, H. and Park, J. (2014). “Proposed methodological framework of assessing LID (Low Impact Development) impact on soil-groundwater environmental quality.” *Journal of the Korean Geo-Environmental Society*, KGES, Vol. 15, No. 7, pp. 39-50 (in Korean).
- Kim, K., Yoo, K., Ki, D., Son, I. S., Oh, K. J. and Park, J. (2011). “Decision-Tree-based data mining and rule induction for predicting and mapping soil bacterial diversity.” *Environment. Monit. Assess.*, Springer, Vol. 178, pp. 595-610.
- Kukor, J. J. and Olsen, R. H. (1996). “Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments.” *Appl. Environ. Microbiol.*, Amer Soc Microbiology, Vol. 62, No. 5, pp. 1728-1740.
- Oh, Y. S., Shareefdeen, Z., Baltzis, B. C. and Bartha, R. (1994). “Interactions between Benzene, Toluene and P-Xylene (Btx) during Their Biodegradation.” *Biotechnol. Bioeng.*, Wiley-Blackwell, Vol. 44, No. 4, pp. 533-538.
- Park, E., Chang, H., Kim, K., Nam, Y., Roh, S. and Bae, J. (2009). “Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, Archaeal, and Yeast Populations in Kimchi.” *J. Microbiol.*, Microbiological Society Korea, Vol. 47, No. 6, pp. 682-685.
- Ranjard, L., Poly, F. and Nazaret, S. (2000). “Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to Soil Environment.” *Res. Microbiol.*, Elsevier Science BV, Vol. 151, pp. 167-177.
- Shim, L. and Lee, J. (2008). “Evaluation of lactic acid bacterial community in kimchi using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis.” *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, KMB, Vol. 36, No. 4, pp. 247-259 (in Korean).
- Shin, J., Roh, S., Jung, S., Oh, G., Kim, M. and Yook, W. (2014). “The study on the BTEX concentration of soil in gas station.” *J. Soil Groundw. Environ.*, KoSSGE, Vol. 19, No. 6, pp. 18-23 (in Korean).

- Tabak, H. H., Desai, S. and Govind, R. (1991). On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment, Butterworth-Heinemann: Stoneham, Massachusetts, M.A.
- Yu, H., Kim, B. J. and Rittmann, B. E. (2001). "The roles of intermediates in biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by *Pseudomonas putida* F1." *Biodegradation*, Springer, Vol. 12, No. 6, pp. 455-463.
- Yun, J. K., Lee, M. H., Lee, S. Y., Lee, J. Y. and Lee, K. K. (2003). "A case study of monitored natural attenuation at the petroleum hydrocarbon contaminated site: I. Site Characterization." *Journal of KoSSGE*, KoSSGE, Vol. 8, No. 4, pp. 27-35 (in Korean).
- Zhou, H. W., Guo, C. L., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. (2006). "Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments." *FEMS Microbiol. Lett.*, OXFORD UNIV PRESS, Vol. 262, No. 2, pp. 148-157.