

디젤로 오염된 군부대 토양에 대하여 토착미생물 4종을 이용한 생분해법의 TPH 제거 효율 규명

박민호¹ · 이민희^{2*}

¹한국농어촌공사 경남지역본부

²부경대학교 지구환경과학과

TPH Removal of the Biodegradation Process Using 4 Indigenous Microorganisms for the Diesel Contaminated Soil in a Military Camp

Minho Park¹ · Minhee Lee^{2*}

¹Korea Rural Community Corporation, Kyongnam Provincial Office

²Department of Earth Environmental Sciences, Pukyong National University

ABSTRACT

Batch experiments using indigenous and commercialized adventive microorganisms were performed to investigate the feasibility of the biodegradation process for the diesel contaminated soil, which was taken in US Military Camp 'Hialeah', Korea. TPH concentration of the soil was determined as 3,819 mg/kg. Four indigenous microorganisms having high TPH degradation activity were isolated from the soil and by 16S rRNA gene sequence analysis, they were identified as *Arthrobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp. and *Bacillus* sp.. Two kinds of commercialized solutions cultured with adventive microorganisms were also used for the experiments. Various biodegradation conditions such as the amount of microorganism, water content and the temperature were applied to decide the optimal bioavailability condition in the experiments. In the case of soils without additional microorganisms (on the natural attenuation condition), 35% of initial TPH was removed from the soil by inhabitant microorganisms in soil for 30 days. When the commercialized microorganism cultured solutions were added into the soil, their average TPH removal efficiencies were 64%, and 54%, respectively, which were higher than that without additional microorganisms. When indigenous microorganisms isolated from the contaminated soil were added into the soil, TPH removal efficiency increased up to 95% (for *Bacillus* sp.). According to the calculation of the average biodegradation rates for *Bacillus* sp., the remediation goal (87% of the removal efficiency: 500 mg/kg) for the soil would reach within 24 days. Results suggested that TPH removal efficiency of biodegradation by injecting indigenous microorganisms is better than those by injecting commercialized adventive microorganisms and only by using the natural attenuation.

Key words : Biodegradation, TPH removal, Indigenous microorganisms, Soil remediation

1. 서 론

디젤과 같은 연료유류의 누출에 의한 국내 토양 및 지하수 오염이 심각한 것으로 밝혀져, 2000년 이후부터 군부대, 유류저장소, 주유소를 중심으로 유류 오염토양 복원사업이 진행되어왔다(Lee et al., 2011; Lee et al., 2005). 유류로 오염된 토양을 복원하기위해 다양한 물리/화학/생

물학적 방법들이 적용되었으며, 이 중 미생물의 생분해 기작을 이용하는 생물학적 방법은 다른 방법들에 비하여 가격이 저렴하고, 처리 후 부산물이 적으며, 친환경적이라는 장점을 가지고 있어서 국내외에서 널리 사용되고 있다(한국지하수토양학회, 2003). 생물학적 방법은 크게 분해능이 좋은 미생물을 배양하여 오염토양에 직접 첨가하는 “생물 증진법(bioaugmentation)”과 산소, pH 영양분등 미생물

*Corresponding author : heelee@pknu.ac.kr

원고접수일 : 2012. 3. 9 심사일 : 2012. 4. 26 게재승인일 : 2012. 4. 27

질의 및 토의 : 2012. 8. 31 까지

분해에 필요한 외부 환경을 변화하여 미생물 분해능을 촉진시키는 “생물자극법(biostimulation)”으로 구분하는데, 오염부지 복원 시 이 두 방법이 함께 적용되는 경우가 대부분이므로 통합하여 “생분해법(biodegradation)”이란 용어로 주로 사용되고 있다(Richard and Vogel, 1999; Barathi and Vasudevan, 2001; Seklemova et al., 2001). 국내 유류 오염부지에 적용되고 있는 생분해법의 형태는 대부분 비원위치 토양경작법(Ex-situ soil landfarming)과 바이오파일(bio-pile)법으로, 유류로 오염된 토양을 지상 처리실에 옮긴 후 수분이나 공기량과 같은 외부환경을 조절하거나 필요시 미생물제제(주로 상품화된 외부미생물 배양액)를 첨가하여 미생물의 생분해를 촉진하는 보수적인 방법에 머물러있다(환경부, 2007). 실제 복원 현장에서는 생분해법의 분해효율이 실내 실험에서 얻어진 결과보다 낮고 일정 시간 이후에는 제거효율이 더 이상 향상되지 못하는 “꼬리물림현상(tailing effect)”이 나타나, 토양세척이나 열탈착법과 같은 고비용의 제거방법이 추가로 적용되고 있는 실정이다(Kim, 2011; 한국지하수토양학회, 2003). 국내에서는 오염부지에 적용하는 복원방법 선정 기준이 주로 소요되는 비용에 치우쳐있어서, 생분해법의 추가 기술 개발이 이루어지지 않고 있다. 이 결과 생분해효율이 높은 국내 대표 미생물 종을 발견하거나, 분해 효율을 높일 수 있는 생분해 기작을 규명하는 학술적, 기술적 연구들이 매우 부족하여 국내 생분해 기술 수준은 2000년 초반 수준에 머물러있다. 이미 국외에서는 생분해법과 다른 방법을 연계한 복합 생분해법이 개발되거나 생분해 효율이 높은 토착/외부미생물을 대상으로 제거 기작 규명에 대한 연구가 진행되고 있어서 이 분야에 대한 국내 연구 활성화가 매우 시급하다(Mohamed et al., 2007; Urum et al., 2005).

본 연구에서는 디젤로 오염된 국내 군부대 토양을 대상으로 토양에서 활동하고 있는 토착미생물 중 유류분해능이 높은 미생물 4종을 분리/동정한 후, 이들의 생분해 효율을 규명하고, 이 결과를 비토착(외부) 미생물로 제조한 상품화된 미생물 용액의 생분해 효율 결과와 비교함으로써, 유류오염 부지에 생분해법 적용 시 토착미생물을 이용한 생분해법이 훨씬 더 효과적이라는 것을 정량적으로 검증하고자 하였다. 본 연구에서 제시한 미생물 분리/동정 방법과 사용한 토착미생물 4종은 향후 미생물을 이용한 생분해법을 국내 유류 오염 부지에 적용하는 경우 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 실험 방법

2011년부터 현재까지 복원 사업이 진행 중인 “Camp Hialeah” 미군부대에서 채취한 유류오염토양을 대상으로 오염토양의 물리/화학적 특성 규명 및 TPH 농도를 측정하였으며, 토양에서 분리/동정한 4종류의 토착미생물과 상품화된 외부미생물 제제 2종을 이용한 생분해법의 TPH 제거 효율을 배치실험을 통하여 규명하였다.

2.1. 오염토양 특성 규명

채취한 토양시료의 암편과 불순물을 제거한 후 실내(20°C)에서 자연 건조하여 기본적인 물리화학적 특성(pH, 입도분포, 유기물함량, 밀도, 총 인/질소량 등)을 측정하였다. 토양 입도분포 측정은 200 mesh 이상의 경우 20°C에서 24시간 동안 자연 건조 시킨 후 자동체분석기를 사용하였고, 200 mesh 이하의 silt와 clay 입자의 경우 Laser Diffraction Particle Size Analyzer(BECKMAN COULTER, LS 13320)를 이용하여 측정하였다. 분석 결과를 토대로 미국농무성(USDA)의 토성삼각표(soil texture triangle diagram)를 이용하여 토성을 결정하였다. Total Organic Carbon Analyzer(SHIMADZU, TOC-vcph)를 이용해 토양시료의 총유기물(TOC: total organic carbon)함량을 측정하였다. 미생물의 대표적 영양소인 토양의 총 인 및 질소량 및 토양 pH는 국내 토양공정시험법에 따라 UV/VI(ultraviolet-visible spectrometer: JASCO, V-570)와 pH-electrometer(Istek, 815PDC)를 이용하여 측정하였다. 오염토양에 존재하는 TPH 농도를 파악하기 위하여 토양공정시험법(환경부, 2010)에서 제시한 속실험추출법에 의해 전처리한 후 GC/FID(Agilent 6890)를 이용하여 토양 내 TPH 농도를 측정하였다.

2.2. 토착미생물 분리/동정

미군부대에서 채취한 디젤 오염토양 1 g을 9 ml의 멸균 증류수에 혼합한 후, 희석수 0.1 ml를 오일배지평판(주 성분: 디젤 2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.32 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCl_2 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, NH_4NO_3 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ 2 g, 계면활성제 ‘Tween 20’ 0.5 g, agar powder 19 g)에 도말하였다(Schmalenberger et al., 2001; Clarridge, 2004). 평판을 3일 동안 30°C를 유지하는 성장기에서 배양한 후, 활성도가 높아 평판 내 군락(colony)을 형성한 미생물 4종을 분리하였으며 16S rRNA sequencing 유전자감별법을 이용하여 동정하였다(Munson et al., 2004; Petti et al., 2005). SEM

(Scanning Electron Microscope: Carl Zeiss, DSM 940A, Germany) 분석을 통하여 동정한 미생물의 이미지를 획득하였으며(Park, 2012), 미생물 4종은 실험을 위해 멸균실에서 10% 글리세롤로 이루어진 액상에서 배양하여 -70°C 냉동고에 저장하였다. 토양 내 토착미생물 4종의 농도를 최적확수법(MPN: Most Probable Number)으로 측정하여 오염토양에서 생분해를 활발히 일으킬 수 있는 가능성을 평가하였다(Lennette et al., 1974; Mark et al., 1980; Stevens and Holbert, 1995; Haines et al., 1996). 외부 미생물을 배양하여 상품화한 미생물 제제 용액 중 국내 유류오염 부지에 적용했던 A사의 미생물 제제 용액(이하 “O” 미생물로 명명)과 B대학 미생물학과에서 개발한 미생물 제제 용액(이하 “P” 미생물로 명명)을 이용하여 생

분해 배치실험을 반복 실시하였다. 외부미생물 제제 용액의 물리/화학적 특성은 Table 1에 나타나있다.

2.3. 토착미생물과 외부미생물을 이용한 생분해 배치 실험

생분해 배치 실험을 위해 멸균한 플라스틱 페트리디쉬(지름 150 mm × 높이 20 mm)를 반응기(reactor)로 사용하였으며, 반응기에 300 g 오염토양과 토착미생물(또는 외부 미생물) 종류별로 0.3 ml와 0.6 ml 씩 첨가하여 토양과 혼합하였다(토양: 주입 미생물 용액비는 1000 : 1과 500 : 1). 분리/동정하여 저장한 토착미생물을 800 ml의 증류수에 NB 배지 6.4 g을 혼합한 멸균용액에 24시간 배양한 배양액을 사용하였으며, 배양액의 미생물 농도는 Table 4에 나타내었다. 외부 미생물 제제 용액에 대한 미생물 동종

Table 1. Physical and chemical properties of two adventive microorganism cultured solutions

Type of adventive microorganism cultured solution	Chemical components	Physical characteristics and effect	Contents (wt %)
Oilbug 1010 (O)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Nutrients for efficiency increase	22.5
	Na_2HPO_4	Nutrients for efficiency increase	23.3
	KH_2PO_4	Nutrients for efficiency increase	11.3
	S1 (The trade secret)	Oil-degrading microorganism	The trade secret
	S2 (The trade secret)	Oil-degrading microorganism	The trade secret
Penazyme (P)	Sarsapogenin	Removal of NH_3	20.0
	Spirostant	Surface tension decrease	20.0
	Humic acid	Removal of heavy metals	10.0
	Zymogen	Decompositon of organic matter	10.0
	Zyme-Leaven	Yeast fungus	10.0
	Parigenin	Vitalization of microorganism	10.0
	Glycine	Neutralization	5.0
	Laminarin	Vitalization of microorganism	5.0
	Sarsaponin	Removal of NH_3 and H_2S	5.0
	Proenzyme	Decompositon of organic matter	4.0
	Quzyme	Vitalization of microorganism	1.0

Table 2. Various conditions for batch experiments using indigenous and adventive microorganisms

Types of microorganism added into the soil	Amount of indigenous microorganism solution (per 300 g soil)	Water content (%)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Reaction time (day)
<i>Arthrobacter</i> sp.(A1)	0.3 ml	10	20	5
<i>Burkholderia</i> sp. (A2)				
<i>Cupriavidus</i> sp.(A3)				10
<i>Bacillus</i> sp. (A4)				
Mixed 4 indigenous microorganisms (A1 + A2 + A3 + A4 : T)				20
O (adventive microorganism)	0.6 ml	20		
P (adventive microorganism)				
Without the addition of microorganism (natural attenuation)				30

과 농도측정은 제공자의 요구에 따라 실시하지 않았으며 제공자가 제시한 값을 사용하였다(Park, 2012). 총 5종류의 토착미생물 용액(4종류 + 4종을 혼합한 1종)과 2종류의 외부미생물 용액을 사용하였다. 수분을 함유한 오염토양의 반응 전 무게를 기준으로 미생물 주입 후 2일 간격으로 토양무게를 재 측정하여 무게차이만큼 2일에 한 번씩 반응기 내에 멸균 증류수를 추가로 주입하여 토양 내 수분함량을 10%와 20%로 유지하였으며(외부미생물 용액의 경우는 20%로 고정), 온도는 현장에서 적용할 것을 고려하여 20°C로 유지하였다. 각 반응기에 미생물 분해 시 필수 영양소인 인과 질소를 'C : N : P = 100 : 10 : 1'로 가정하여 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 나 KH_2PO_4 를 첨가하였다. 반응 시간(5일, 10일, 20일, 30일)에 따라 반응기로부터 토양을 채취하여 TPH 농도를 분석함으로써 생분해에 의한 반응 시간별 TPH 제거 효율을 계산하였다. 오염토양에 미생물을 첨가하지 않은 반응기를 대상으로 같은 조건의 생분해 실험을 반복하여 자연저감 효율(토양 내 기존 미생물에 의한 생분해 효율 포함)도 계산하였다. 적용 미생물에 대한 생분해 효율을 규명하기 위한 배치실험 조건을 Table 2에 정리하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 오염토양 특성 규명 결과

미군부대 내에서 채취한 유류 오염토양 시료의 물리/화학 특성 분석 결과를 Table 3에 나타내었다. 입도분석 결과 토양 입자의 93% 이상이 0.075 mm보다 큰 입자로 이루어져 토성은 '사토(S: sand)'에 해당되었으며, 실트 및 점토량이 상대적으로 적어서 생분해법 적용 시 토양의 통기성이 양호하여 TPH 분해효율이 높을 것으로 판단되었다. 토양 내 수분함량은 미생물의 생분해 활동을 좌우하는 주요 영향인자로 알려져 있는데, 오염토양의 수분함량을 측정한 결과 2.59%로 낮게 나타나 생분해법 배치실험 시 수분의 추가 공급이 필요한 것으로 나타났다. 토양 pH는 6.7을 나타내어 미생물이 성장하기에 좋은 조건이었으며, 질소와 인은 일정량이 존재하였으나 미생물 활성도를 높이기 위해 추가 공급이 필요한 것으로 밝혀졌다. 토양의 평균 TPH 농도는 3,819 mg/kg로 국내 토양오염우

려기준(2,000 mg/kg)을 초과하였으며, 부산시가 군부대 부지를 복원 후 녹지 및 주거구역으로 개발할 계획을 가지고 있어서 복원 목표는 500 mg/kg로 설정하였고, 이 경우 적용하는 복원방법(본 연구에서는 생분해법)의 TPH 제거 효율이 87% 이상 되어야 복원 목표를 달성함을 알 수 있었다.

3.2. 토착미생물 분리/동정 결과

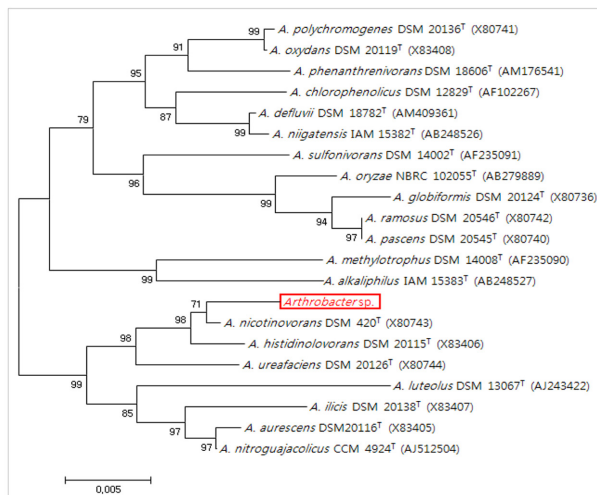
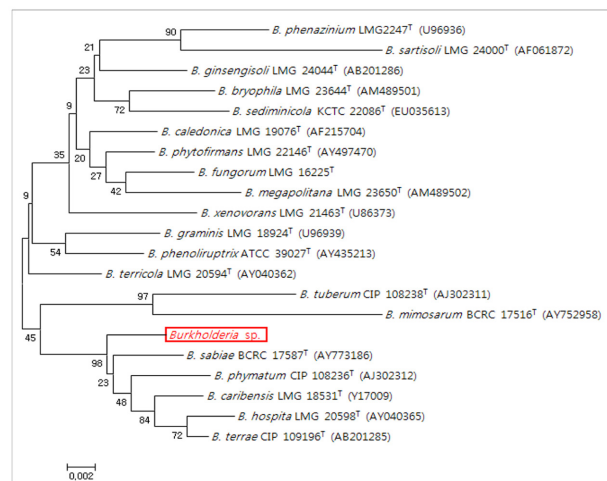
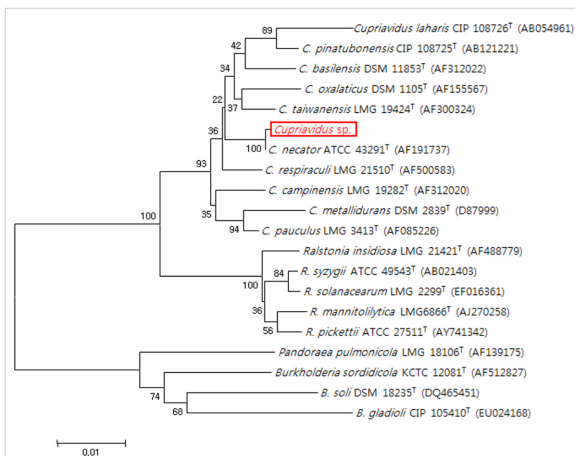
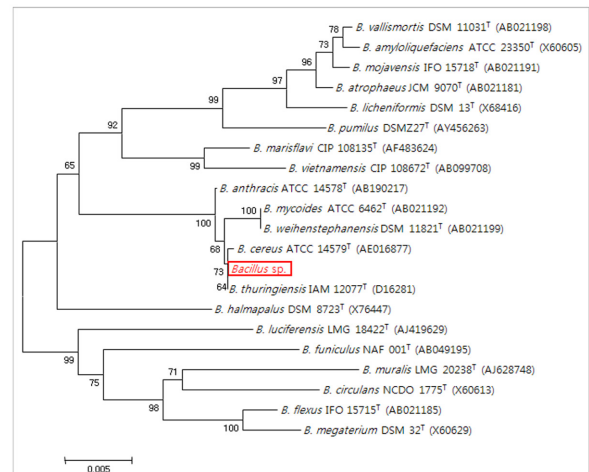
오염토양으로부터 분리한 미생물 균주는 16S rRNA sequencing 방법을 이용하여 동정한 결과 *Arthrobacter* sp.(이후 'A1'으로 명명), *Burkholderia* sp.(이후 'A2'로 명명), *Cupriavidus* sp.(이후 'A3'로 명명), *Bacillus* sp.(이후 'A4'로 명명)로 각각 나타났다. 토착미생물 4종 모두 막대형의 간균으로 밝혀졌으며, 동정결과와 SEM 이미지를 Fig. 1와 Fig. 2에 나타내었다. 미생물 A1 종은 호기성, 비포자, 그람양성균으로 초기에는 다태성(pleomorphic) 간균형태이나 성장하면서 구균형태로 변하는 특징이 있으며, 같은 속에 속한 일부 분리균은 6가 크롬을 환원하는 능력과 일부 농약에 대한 생분해 효과가 있는 것으로 보고되어있다(Julie and James, 1980). 미생물 A2 종은 동물(인간포함)과 식물체 내에 서식하는 자동성(motile)이며 호기성인 간균으로, 같은 속에 속한 일부 분리균은 PCBs를 포함한 유기염소계 살충제를 분해하는 미생물 종으로 알려져 있다(Chen et al., 2008). 미생물 A3 종은 *Wautersia* 미생물 속(genus)을 포함하는 균으로 염화벤젠(chlorinated benzene), 염화톨루엔(chlorinated toluene), 1,2,4,5-사염화벤젠(1,2,4,5-tetrachlorobenzene)을 에너지원으로 이용하여 생분해하는 것으로 보고되었다(Peter and Tom, 2004). 미생물 A4 종은 그람양성 간균으로 BTEX를 포함한 휘발성 유기오염물의 분해능이 뛰어난 것으로 알려져 있다(Gallego et al., 2001). 토착 미생물을 이용한 생분해 배치 실험 후 최적수확법(MPN)을 이용하여 측정한 토양 내 토착미생물 4종의 농도 결과는 Table 4에 나타나있다. 토양 내에서 생분해를 활발히 일으키는 미생물의 경우 토양 내 농도가 최소 1,000 CFU/ml 이상 되어야 되는 것으로 보고되어 있는데(Alexander, 1999), 분석결과 오염토양에서 분리한 토착미생물 4종 모두 최소 농도를 훨씬 초과하는 것으로 나타나 생분해를

Table 3. Results of the analysis for soils properties

	Size distribution (%)			pH	Bulk density (g/cm ³)	Water content (%)	TOC (%)	T-N (mg/kg)	T-P (mg/kg)	TPH (mg/kg)
	Sand	Silt	Clay							
Soil	93.9	5.9	0.2	6.7	1.50	2.59	2.39	4.80	0.06	3,819

Table 4. Concentrations of 4 indigenous microorganisms in cultured solution and soil (measured by most probable number (MPN) method)

Indigenous microorganisms	Concentration of microorganisms in cultured solution (CFU/ml)	Concentrations of microorganisms in soil (CFU/ml)
<i>Arthrobacter</i> sp. (A1)	3.4×10^6	7.6×10^6
<i>Burkholderia</i> sp. (A2)	1.8×10^6	2.1×10^6
<i>Cupriavidus</i> sp. (A3)	2.1×10^5	1.6×10^7
<i>Bacillus</i> sp. (A4)	1.9×10^6	1.1×10^6

(A) *Arthrobacter* sp. (A1)(B) *Burkholderia* sp. (A2)(C) *Cupriavidus* sp. (A3)(D) *Bacillus* sp. (A4)**Fig. 1.** Phylogenetic trees of four indigenous microorganisms isolated from the contaminated soil (modified from Park, 2012).

활발히 일으킬 수 있을 것으로 판단되었다.

3.3. 생분해 배치 실험 결과

3.3.1. 외부미생물 배양 용액을 이용한 실험 결과

제품화된 외부미생물 배양 용액을 이용한 생분해 배치 실험 결과는 Fig. 3에 나타나있다. 외부미생물을 첨가하지 않은 토양(Fig. 3에서 ‘Control’ 토양)의 경우 기존 토양 내에 존재하는 미생물 분해 및 기타 자연저감 효과에 의

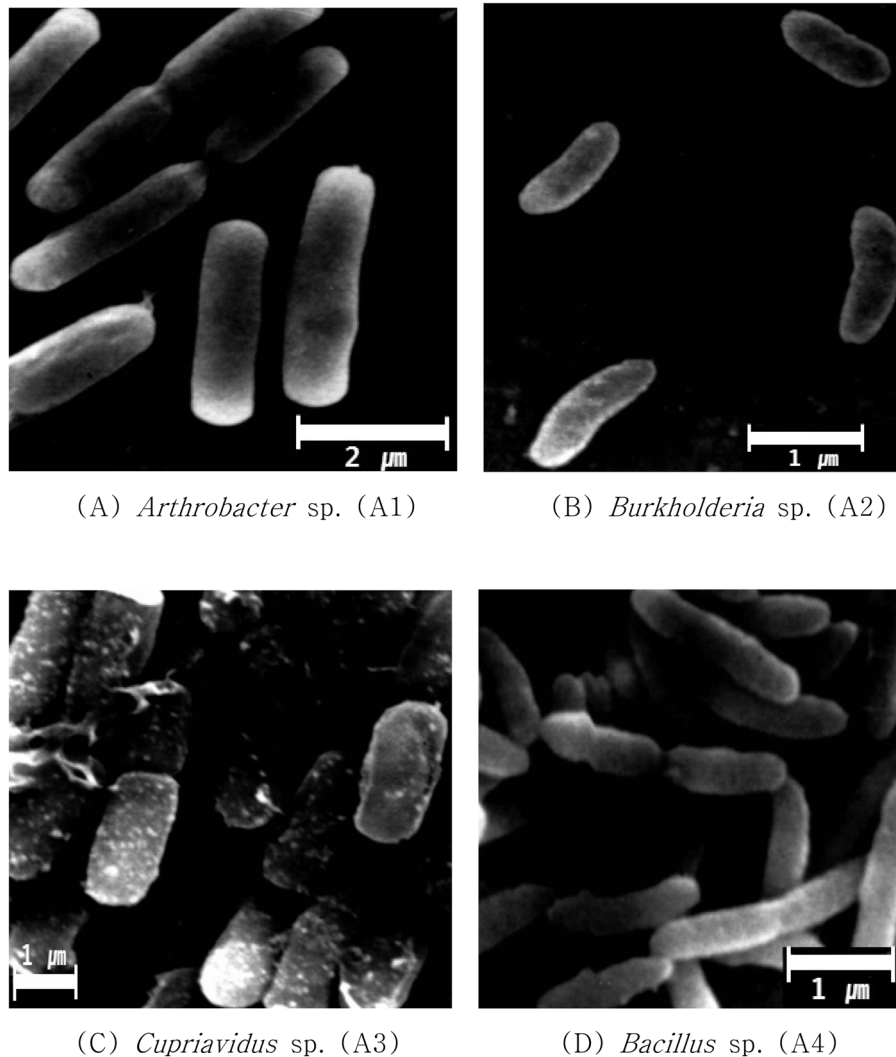


Fig. 2. SEM images of four indigenous microorganisms.

해 5일 후에는 28%, 30일 후에는 35%의 TPH 제거효율을 나타내었다. 실험 10일까지 33%의 TPH 제거효율을 나타내었으나 20일과 30일 이후에는 35%로 유지되어 10일 이후부터 전형적인 생분해 반응의 “꼬리몰림현상 (tailing effect)”이 나타나 본 오염토양의 경우 자연저감에 의한 TPH 제거에는 한계가 있는 것으로 밝혀졌다.

외부 O 미생물 용액의 경우 0.3 ml 주입(토양 300 g 당)에 의해(Fig. 3에서 ‘O-1’) 반응 5일 쯤 36% TPH 제거효율을 나타내었고, 30일 후에는 65% 효율을 나타내어 반응 시간에 따른 제거효율 증가를 나타내었다. 0.6 ml를 주입한 경우(Fig. 3에서 ‘O-2’), TPH 제거효율은 반응 초기에는 0.3 ml를 주입한 경우보다 높았으나 시간이 지남에 따라 거의 비슷한 제거효율을 나타내었다(최대

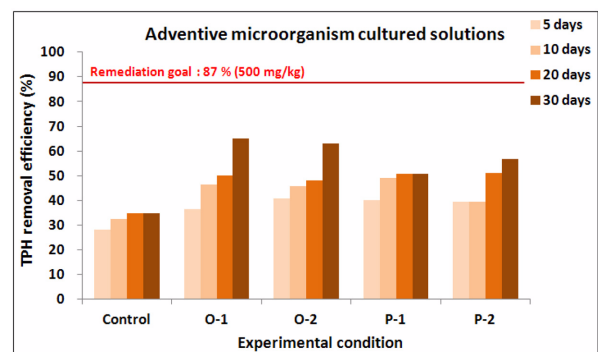


Fig. 3. TPH removal efficiency using adventive microorganism cultured solutions in experiments.

63%). 외부 P 미생물 용액 0.3 ml를 주입한 경우(Fig. 3에서 ‘P-1’) 5일 제거효율이 40%로 O 미생물 경우보다

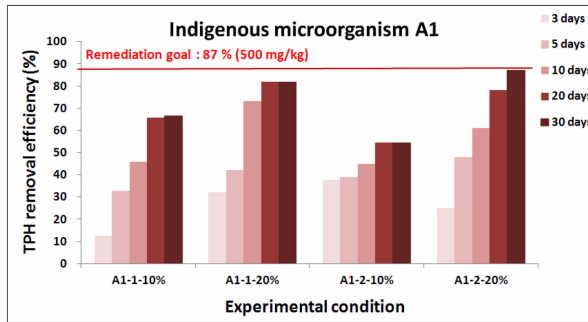


Fig. 4. TPH removal efficiency using indigenous microorganism A1 in experiments.

약간 높았으나, 시간이 지남에 따라 제거율 증가율이 낮아져 반응 30일 후에는 오히려 O 미생물보다 낮은 51% 제거효율을 나타내었다. 0.6 ml를 주입한 경우(Fig. 3에서 'P-2') 반응 30일 후 제거효율이 57%를 나타내어 약간 증가하는 것으로 나타났으나, 두 외부미생물 용액의 경우 전체적인 제거효율은 주입용액의 증가에 따라 큰 변화를 나타내지 않았다. 실험 결과 O 미생물 용액이 P 미생물 용액보다 TPH 제거효율이 높은 것으로 나타났으나, 두 미생물 용액 모두 TPH 제거 효율이 반응 30일 이후에도 토양복원 목표치인 87%(잔류 TPH 농도: 500 mg/kg)보다 매우 낮게 나타나, 오염부지에서 이들을 이용한 생분해법을 적용하는 경우 상당한 분해시간이 요구될 것으로 판단되었다.

3.3.2. 토착미생물을 이용한 실험 결과

토착미생물 A1 배양액 0.3 ml를 주입한 경우, 토양 수분함량 10%인 조건(Fig. 4에서 'A1-1-10%')에서 반응 30일 후 66%의 TPH 제거효율을 나타내었으며, 수분함량이 20%인 조건(Fig. 4에서 'A1-1-20%')에서는 82%를 나타내어 수분함량이 높을수록 제거효율이 증가함을 알 수 있었다. 미생물 배양액 주입량이 0.6 ml로 증가된 경우(Fig. 4에서 'A1-2-10%') 제거효율이 0.3 ml를 주입한 조건(Fig. 4에서 'A1-1-10%')보다 높았으나 시간이 지남에 따라 오히려 약간 낮게 나타나 주입량 증가에 따른 제거 효율 변화는 크지 않았다. 토착미생물 A1의 경우 외부미생물 배양액을 이용한 경우보다 TPH 제거효율이 높게 나타났으며, 수분함량을 20%로 유지한 조건(Fig. 4에서 'A1-2-20%')에서 반응 30일 후 TPH 제거효율이 가장 높은 87%를 나타내었고, 다른 적용 조건에서는 복원 목표치인 87%보다 약간 낮게 나타났다(30일 반응 후 평균 TPH 제거효율은 72%).

토착미생물 A2 배양액을 이용한 생분해 배치 실험 결

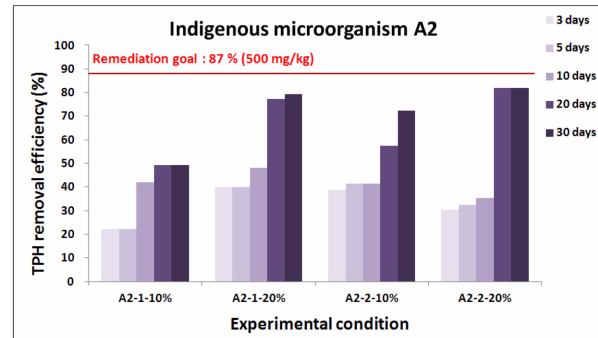


Fig. 5. TPH removal efficiency using indigenous microorganism A2 in experiments.

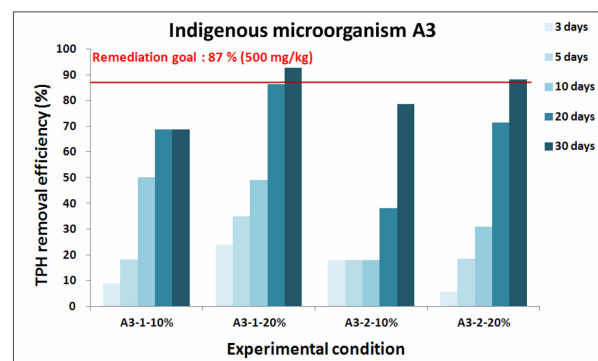


Fig. 6. TPH removal efficiency using indigenous microorganism A3 in experiments.

과는 Fig. 5에 나타나있다. 토착미생물 A2 배양액을 이용한 경우 A1 배양액의 경우와 같이 수분함량이 증가함에 따라 제거효율이 증가하는 경향을 나타내었으며, 수분함량 10% 조건에서 미생물 용액 주입량이 증가함에 따라 제거효율이 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 5에서 'A2-1-10%'와 'A2-2-10%' 비교). 수분함량을 20%로 유지하며 0.6 ml 주입한 경우(Fig. 5에서 'A2-2-20%') 반응 30일 후 최대 82% 제거효율을 나타내었으나, 모든 적용 조건에서 복원 목표치인 87% 이하를 나타내어 토착미생물 4종 중 가장 제거 효율이 낮았다(30일 반응 후 평균 TPH 제거효율은 71%).

토착미생물 A3 배양액을 이용한 경우, 주입량과 관계없이 수분함량 20% 조건에서 반응 30일 후 제거효율이 모두 복원 목표치인 87% 이상을 나타내어(최대 93%) 높은 TPH 제거능이 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 6에서 'A3-1-20%'와 'A3-2-20%'). 실험 결과 토양에 주입하는 미생물 주입량을 1 : 500(미생물용액 : 토양) 이상으로 유지한다면 반응 30일 이내에 복원 목표치에 도달할 수 있을 것으로 판단되었다.

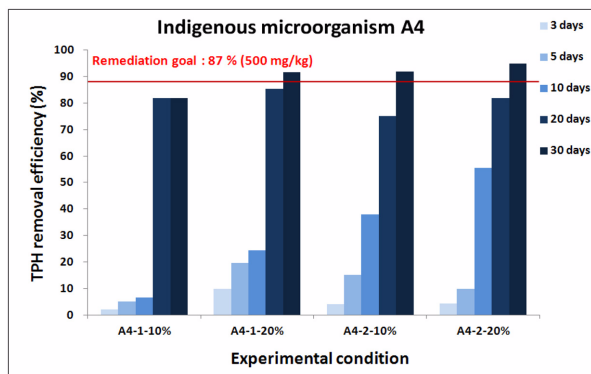


Fig. 7. TPH removal efficiency using indigenous microorganism A4 in experiments.

토착미생물 A4 배양액을 이용한 실험 결과는 Fig. 7에 나타나있다. 모든 적용 조건에서 미생물 4종 중 가장 높은 TPH 제거효율을 나타내었으며, 반응 30일 후 평균 제거효율도 90%로 매우 높았다. 수분함량 20% 조건에서 0.6 ml 주입 시 반응 30일 후 제거효율은 95%로(Fig. 7에서 'A4-2-20%'), 토착미생물 실험 중 가장 높은 TPH 제거효율을 나타내었다.

토착미생물 4종 배양액을 균등하게 혼합한 용액(T)을 이용한 실험 결과는 Fig. 8에 나타나있다. 반응 30일 후 평균 TPH 제거효율이 57%로 나타나 단일 미생물 중을 이용한 경우보다 낮았으며, 최대 제거효율은 수분함량 20%, 주입량 0.6 ml 조건에서 77%이었다(Fig. 8에서 'T-2-20%'). 혼합 미생물의 제거효율이 단일 미생물의 경우보다 낮은 이유는 미생물간의 상호 경쟁에 의한 분해능 저하로 판단된다(Joseph and Rita, 1990).

생분해 반응 30일 후 이용한 미생물에 대한 평균 TPH 제거효율을 정리하여 Fig. 9에 나타내었다. 미생물을 첨가하지 않은 경우 자연저감에 의해 35%가 제거된 것으로 나타났으며, 두 외부미생물 O, P 용액 주입에 의한 생분해에 과정에서 각각 29%와 19%가 추가로 제거되었다. 4종의 토착미생물을 주입한 경우 자연저감에 의한 제거보다 각각 37%, 36%, 47%, 55%가 추가로 제거되었다. A4 미생물의 생분해능이 가장 뛰어나 평균 제거효율이 복원 목표치인 87%보다 높았고, 그 다음은 A3, A1, A2 순으로 나타났으며, 혼합 미생물의 생분해 제거효율이 가장 낮았다. TPH 제거효율이 높았던 A3, A4 미생물 제거효율 결과를 아래의 1차분해반응식에 적용하여 TPH분해상수(k: TPH degradation constant)를 구하였다(Rittmann and McCarty, 1980).

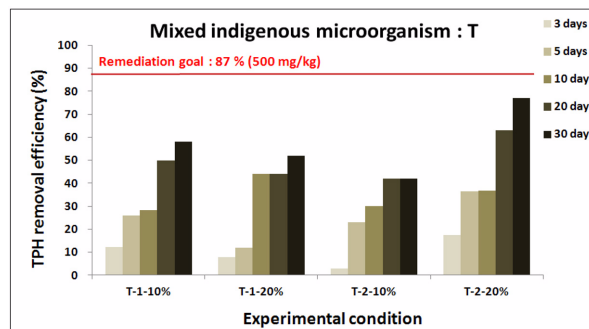


Fig. 8. TPH removal efficiency using the mixed indigenous microorganism (T) in experiments.

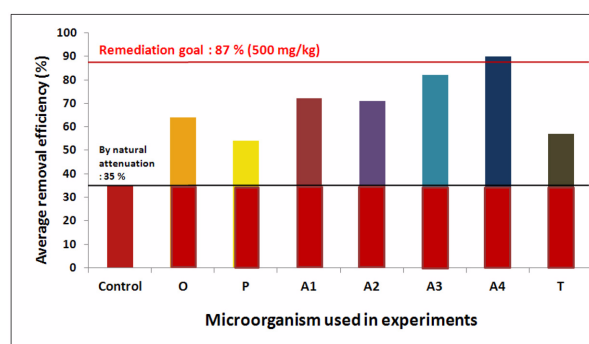


Fig. 9. Average TPH removal efficiency after 30 days in experiments.

$$\frac{dC}{dt} = -k \times C \quad (1)$$

(k: TPH분해상수, C: 토양 내 잔류한 TPH 농도(mg/kg), t: TPH분해반응시간)

계산 결과 A3와 A4 미생물의 TPH분해상수(k)는 각각 0.080(r = 0.961)과 0.089(r = 0.903)이었으며, 복원 목표치(500 mg/kg)에 도달하는데 걸리는 시간은 25.6일과 23.9일로 나타났다. 다만 현장 오염부지 조건에 따라 미생물의 생분해능은 본 배치실험 결과와 다를 수 있어서, 실제 현장에서 적용하기위한 TPH분해상수를 구하기위해서는 파일럿 규모의 현장시험이 추가로 필요할 것으로 판단된다.

4. 결 론

군부대 디젤로 오염된 토양 내 서식하는 토착미생물 4종을 배양한 용액과 제품화된 2종의 외부미생물 배양액을 이용하여 생분해에 의한 TPH 제거효율을 규명한 결과, 토착미생물 *Bacillus* sp.와 *Cupriavidus* sp. 종의 제거효율이 뛰어난 것으로 밝혀졌다. 외부미생물을 사용하는 경

우 자연저감보다 19~29% 추가로 제거되어 뚜렷한 생분해 효과가 나타났으나, 제거효율이 토착미생물을 이용한 경우보다 현저히 낮아, 오염 부지 복원에 생분해법을 적용하는 경우 부지 내 토착미생물을 이용하는 것이 더 효과적이라는 것을 입증하였다. 토착미생물을 이용한 실험 결과 혼합 미생물보다는 단일 종 미생물을 배양하여 사용한 경우에 TPH 분해효과가 높았으나, 이는 실험실 규모의 배치실험 결과로써 추가 현장 파일럿 실험을 통하여 배치실험 결과를 검증한 후 현장에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 본 실험 결과는 현재까지 국내 유류 오염 부지 복원을 위해 생분해법을 적용하는 경우, 주로 외부미생물 제재를 이용하였던 한계를 벗어나 부지 특성에 맞는 토착미생물을 배양하여 적용함으로써, 유류오염 부지의 생분해 제거효율을 높일 수 있는 정량적 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2010-0085781). 연구를 위해 오염토양을 제공하여준 (주)아름다운환경, 제품화된 미생물 용액을 제공하여준 BioSaint, Inc.와 수원대학교 미생물학과 교수님께 감사드립니다. 끝으로 논문을 세심하게 검토하여 주신 익명의 심사자들에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 한국지하수토양환경학회, 2003, 토양환경공학, 향문사, 서울, 386 p.
- 환경부, 2010, 토양오염정정시험법.
- 환경부, 2007, 오염토양 정화방법 가이드라인, 토양지하수과 행정간행물.
- Alexander, M., 1999, Biodegradation and bioremediation, Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Barathi, S. and Vasudevan, N., 2001, Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum contaminated soil, *Environ Int.*, **26**, 413-416.
- Chen, W.M., Faria, S.M., Chou, J.H., James, E.K., Elliott, G.N., Sprent, J.I., Bontemps, C., Peter, W.Y., and Peter, V., 2008, *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**, 2174-2179.
- Clarridge, J.E. 2004, Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, **17**, 840-862.
- Gallego, J.R., Lored, J., Llamas, J.F., Vazquez, F., and Sanchez, J., 2001, Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation, *Biodegradation*, **12**, 325-335.
- Gu, J.K., Kim, K.S., Dong, J.I., Park, Y.H., Bae, W.K., Yang, J.W., Yum, I.T., Youn, S.P., Lee, J.Y., Lee, J.S., Jang, Y.Y., Jung, J.C., Choi, S.I., Hwang, K.Y., and Hwang, J.S., 2003, Soil and Environmental Engineering, 386 p.
- Haines, J.R., Wrenn, B.A., Holder, E.L., Strohmeier, K.L., Herrington, R.T., and Venosa, A.D., 1996, Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure, *Journal of Industrial Microbiology*, **16**, 36-41.
- Joseph, G.L. and Rita, R.C., 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiol.*, **54**, 305-315.
- Julie, A.S. and James, M.J., 1980, Application of polyacrylamide gel electrophoresis to the characterization and identification of *Arthrobacter* species, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **30**, 460-465.
- Kim, I., 2011, Pilot scale feasibility test for in-situ chemical oxidation coupled with bioremediation to remediate the diesel contaminated military site, Korea; PhD. Thesis, Pukyong National University, Korea.
- Lee, M., Kang, H., and Do, W., 2005, Application of nonionic surfactant-enhanced in situ flushing to a diesel contaminated site, *Water Research*, **39**, 139-146.
- Lee, M., Kim, J. and Kim, I., 2011, In-situ biosurfactant flushing, coupled with a highly pressurized air injection, to remediate the bunker oil contaminated site, *Geoscience Journal*, **15**, 313-321.
- Lennette, E.H., Spaulding, E.H. and Truant, J.P., 1974, Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology Washington, D.C..
- Mark, W.L., Ramon, J.S. and Evans, T.M., 1980, Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies, *Applied and Environmental Microbiology*, **40**, 922-930.
- Mohamed, A.M.I., El-menshaw, N. and Saif, A.M., 2007, Remediation of saturated soil contaminated with petroleum products using air sparging with thermal enhancement, *Journal of Environmental Management*, **83**, 339-350.
- Munson, M.A., Banerjee, T.F., Watson, W.G. Wade., 2004, Molecular analysis of the microflora associated with dental caries, *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 3023-3039.
- Park, M., 2012, TPH removal of the landfarming process using indigenous microorganisms in the diesel contaminated soil; Ms.

Thesis, Pukyong National University, Korea.

Peter, V. and Tom, C., 2004, Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found, *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 2285-2289.

Petti, C.A., Polage, C.R. and Schreckenberger, P., 2005, The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods, *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 6123-6125.

Richard, J.Y. and Vogel, T.M., 1999, Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel, *Int. Biodegradation*, **44**, 93-100.

Rittman, B.E. and McCarty, P.L., 1980, Model of steady-state biofilm kinetics, *Biotech. Bioeng.*, **22**, 23-43.

Schmalenberger, A., Schwieger, F., and Tebbe, C.C., 2001,

Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 3557-3563.

Seklemova, E., Pavlova, A. and Kovacheva, K., 2001, Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration, *Biodegradation*, **12**, 311-316.

Stevens, T.O. and Holbert, B.S., 1995, Variability and density dependence of bacteria in terrestrial subsurface samples: implications for enumeration, *Journal of Microbiological Methods*, **21**, 283-292.

Urum, K., Pekdemir, T., Ross, D., and Grigson, S., 2005, Crude oil contaminated soil washing in air sparging assisted stirred tank reactor using biosurfactants, *Chemosphere*, **60**, 334-343.