

Bacteria 토양주입을 통한 투수계수 감소

Reduction of Hydraulic Conductivity by Soil Injection of Bacteria

송영우¹⁾, Song, Young-Woo, 김건하²⁾, Kim, Geon-Ha, 구동영³⁾, Ku, Dong-Young,

¹⁾ 한남대학교 공과대학 토목환경공학과 교수

²⁾ 한남대학교 공과대학 토목환경공학과 조교수

³⁾ 한남대학교 대학원 토목환경공학과 석사

개요(SYNOPSIS) : When microorganism is injected into porous medium such as soils, biomass retained in the pore. Bacteria within these microcolonies produced large amounts of exopolysaccharides and formed a plugging biofilm. Soil pore size and shape are varied from the initial condition as a result of biofilm formation, which make hydraulic conductivity reduced and friction rate between soil aggregates increased. In this research, hydraulic conductivity reduction was measured after microorganism are inoculated and cultured with synthetic substrate and nutrient. Also, pore sand of before and after biofilm formation compared with scanning electron microscopy.

Hydraulic conductivity of Sand and Poorly Graded Sand was decreased approximately 1/10 ~1/100 after biomass inoculation and cultivation. Biofilm attached on soil aggregates is resistant to acidic or basic condition.

주요어(Keywords) : hydraulic conductivity, biofilm, landfill, biomass

1. 서론

바이오플름이란 박테리아가 다공성 매질에 흡착되어 생장하는 동안 주요 성분이 다당류로 구성된 점착성 물질(slime)인 Extracellular Polymeric Substances (EPS)를 생성해 다른 무기 미립자들과 함께 퇴적되어 형성된 집합체를 말하며, 낮은 투수성, 큰 비표면적, 강한 친수성을 나타낸다. 다공성 매질 내에 바이오플름이 형성되면 유체가 흐르는 통로인 간극의 크기 감소와 형태가 변화하여 투수계수가 감소되고 마찰계수의 증가를 가져온다(Taylor 외, 1990). 본 연구는 투수계수가 비교적 큰 모래와 화강풍화토에 박테리아를 접종하여 투수계수를 감소시킬 수 있는지 조사하였고, 아울러 전자주사현미경 (Scanning Electron Microscopy)을 이용하여 바이오플름이 형성된 시료의 단면을 관찰하였다.

2. 바이오플름 (Biofilm)

미생물은 수중 환경에서 대부분 기층 표면에 견고하게 부착하여 생장과 증식을 반복한다. 바이오플름이란 표면에 부착된 박테리아와 EPS 그리고 또 다른 무기 미립자들의 퇴적에 의해 형성된 Fig. 1과 같은 집합체를 말한다. 바이오플름의 물리·화학적·생물학적 특성은 주요 성분인 미생물과 EPS 그리고 바이오플름이 완성되었을 때의 환경에 의존하는데, 특히 바이오플름의 물질적 특성은 바이오플름 유기탄소(organic carbon)의 50~90%를 차지하는 EPS에 의해 크게 좌우된다.

2.1 바이오플름의 형성 과정

미생물들은 액체 상에서 토양 표면까지 이동하는 과정 동안 토양 표면에 흡착과 이탈을 반복하며 필름을 형성한다. 흡착된 세포들은 기질을 이용하여 생장하며 세포 개체 수를 증가시키고, 신진대사 분비물인 EPS를 생성하여 퇴적을 증가시켜 바이오플름을 형성한다. 바이오플름의 퇴적과정은 다음 식으로 설명할 수 있으며 Fig. 2에 나타나 있다. 이런 바이오플름의 퇴적은 흔히 S자 곡선 형태를 가지며 유도기, 지수기, 정체기(안정기)로 구분할 수 있다.

$$\text{biofilm accumulation} = \text{adsorption} + \text{attachment} + \text{growth} - \text{detachment} - \text{desorption} \quad \dots \dots \dots \quad (1)$$

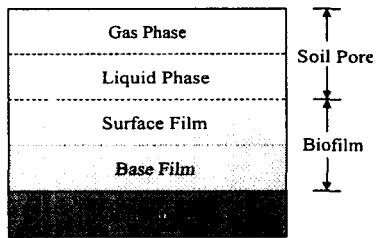


Fig. 1 Biofilm System

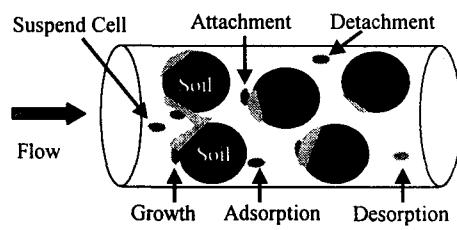


Fig. 2 Various Processes Contributed to Biofilm Accumulation

2.2 EPS (Extracellular Polymeric Substance)

대부분의 박테리아는 바이오플름에서 생장하는 동안 주요 성분이 다당류로 구성된 EPS를 생성한다. 이런 경우 중합체(polymer)는 세포에 부착된 고도로 수화된 막낭(capsule) 또는 점성·용해성의 점착성 물질(slime) 형태로 나타난다. 특히 탄소:질소의 비율이 높은 기질을 공급받았을 때 glucuronic acid 잔류물인 EPS를 많이 생성하고 정상상태(steady-state)의 바이오플름을 보다 빨리 형성한다(Huang, 1994). 이런 EPS는 바이오플름을 구성하는 박테리아와 기층간의 상호작용에 영향을 주며, 또한 바이오플름을 보호하는 역할을 한다(Characklis와 Marshall, 1990).

2.3 바이오플름과 다공성 매체의 투수성

다공성 매질에 박테리아를 주입하면 간극을 완벽하게 메울 수 있는 충분한 두께로 성장한 바이오플름을 형성한다. 바이오플름의 두께는 단일 미생물의 경우 $50\mu\text{m}$ 정도이나, 두 종류 이상의 미생물이 함께 있는 경우 두께는 $120\mu\text{m}$ 이상까지 측정되었다. 또한 바이오플름은 EPS 성분으로 인해 유체 전단력과 같은 힘에 의해 변형되었을 때 빠르게 회복하는 점·탄성체의 표면으로 되어있어 유체의 마찰저항을 증가시키고, 간극의 형태를 협소하게 만들어 시료의 투수계수를 감소시킨다.

Shaw 등(1985)은 직경 $90\mu\text{m}$ 인 유리구슬을 직경 1cm, 길이 5cm인 유리관에 균일하게 채운 후 투수시험을 실시하였다. 활성화된 박테리아를 주입했을 경우 시료의 투수계수는 1/100 정도의 감소를 나타냈고, 바이오플름이 형성된 시료에 살균제를 침투시켜 바이오플름 속에 있는 세포들을 소멸시켰으나, 시료의 투수계수는 변하지 않았다. Stoodley 등(1994)은 직경 $500\mu\text{m}$ 인 유리구슬을 3mm 유리관에 채운 후, 바이오플름을 형성시켰을 때의 유속과 전단강도를 측정하였다. 실험 결과 유속은 유리관 중간에서 가장 빨랐으며 전단강도는 약 5배 정도 증가했음을 관찰하였는데, 이것을 통하여 바이오플름의 퇴적이 유속과 전단강도에 큰 영향을 줄 수 있다는 것을 알 수 있었다.

3. 실험

3.1 시료 준비

본 연구에서는 다공성 매질로 모래와 화강풍화토를 사용하여 시험하였다. 모래는 박테리아 접종 전과 후의 투수계수 변화와 바이오플름의 생성 및 형태 관찰 시험에 이용했으며, 입경이 $250\mu\text{m} \sim 420\mu\text{m}$ 인 것을 사용하였다. 화강풍화토는 D 위생매립장에 반입된 토사로 바이오플름 형성에 따른 투수계수 변화와 바이오플름이 형성된 시료의 화학적 특성을 실험하는데 사용하였다. 시험에 사용된 화강풍화토의 기본 물성값 중 최적함수비는 15.75%, 비중은 2.67 소성지수는 5.8이었다. Fig. 3은 모래와 화강풍화토의 입도분포곡선이다.

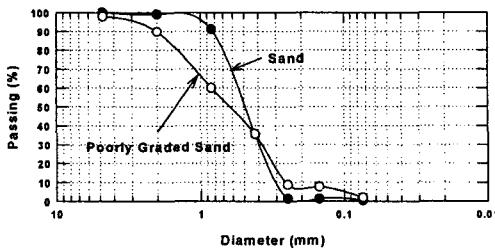


Fig. 3 Grain Size Distribution Curve of Soils

3.2 박테리아 배양

시험에 사용된 박테리아는 *Azotobacter Chroococcum* 호기성 세균으로 *Azotobacter Beijerinck* 속에 속하는 균이다. 이 박테리아는 질소고정 균으로 생장에 필요한 pH 범위는 5.5 ~ 8.5로 최적 pH는 7.6이고 최적온도는 30°C이다(Stainer, 1986). 특히 질소원이 없는 배지(medium)가 높은 농도의 자당(sucrose)을 함유하고 있을 경우 많은 양의 비다당류를 생성할 수 있다(Vega와, 1991).

배지의 성분은 증류수 K_2HPO_4 200mg, K_2HPO_4 800mg, MgSO_4 200mg, CaSO_4 100mg, 미소량의 FeSO_4 와 Na_2MoO_4 , Yeast extract 500mg, Mannitol 20g 등을 증류수 1 l에 혼합하여 제조하였다. 미생물은 그 개체의 크기가 매우 작아 온도, 빛, 산소, 수소이온농도 등의 주변환경에 매우 민감하게 반응한다. 특히 온도는 미생물의 생육속도, 세포의 호소 조성 등에 가장 큰 영향을 미치는 환경요인으로, 본 연구에서는 온도변화에 따른 박테리아의 증식변화를 관찰하였다(Altas와 Bartha, 1992). Fig. 4는 박테리아의 최적 생장온도를 예측하기 위해 배양온도를 각각 10°C, 20°C, 30°C로 유지하여 일정시간마다 측정한 증식곡선이다. 세균세포가 생장하면 탁도를 변화시키므로, 분광광도계를 사용하여 600nm 부근의 투광도를 측정하여 증식곡선을 작성하였다. 실험 결과 박테리아는 30°C에서는 생장이 활발하였으나, 20°C에서는 생장이 느리게 진행되었다. 따라서 이 미생물은 친온성 미생물이므로 시료에 접종한 후의 배양실험은 실험실 온도인 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다.

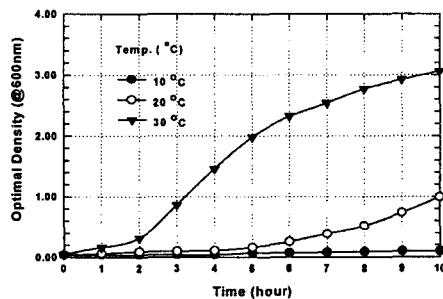


Fig. 4 Temperature Effect on Bacterial Growth versus Time

3.3 실험 방법

배양이 끝난 박테리아 혼합액을 이용한 다짐 시험은 직경 10cm, 높이 12.7cm의 몰드를 이용하여 KS F 2312의 A 방법으로 수행했으며, 이때의 다짐에너지는 5.64 kg/cm²로 표준다짐에너지 5.63 kg/cm²와 비슷하였다. 투수시험은 모래는 정수위 시험, 화강풍화토는 변수위 시험으로 KS F 2322에 따라 수행하였다. 정수위 투수시험에 사용된 몰드는 직경 10cm, 높이 12.4cm의 강성벽 원형몰드로, 실험 방법은 30°C 배양기에서 성장 시킨 *Azotobacter chroococcum*을 6 l의 영양분 용액에 접종한 다음 단위중량이 1.6 kg/cm³인 모래에 침투시켰고, 시료를 통과한 접종액은 펌프를 사용하여 다시 저수조로 흘려 보내 10일 동안 재 순환시켰다. 변수위 투수시험 몰드는 다짐시험 몰드를 그대로 사용하였고, 투수시험 이전에 시료의 양 끝에 다공판과 200번 체 규격의 망을 설치하였다. 그후 영양분 용액과 수돗물을 침투시켜 투수계수를 각각 측정하였다. 또한 바이오플름이 형성된 시료에 화학용액을 침투시켰을 경우 바이오플름의 손상에 따른 투수계수 변화를 알아보기 위해 실험하였다. 일반적으로 매립장 침출수의 pH는 4~8.5이나(Sharma와 Lewis, 1994), *Azotobacter chroococcum*의 적정 pH 농도가 5.5~8.5임을 감안하여 증류수에 HCl을 혼합한 pH 3인 산성용액과 NaOH를 혼합한 pH 11인 염기성용액으로 투수시험을 수행하였다.

4. 결과 및 토론

4.1 다짐 특성

박테리아의 배양액은 EPS를 비롯한 세균 세포들이 존재하고 있기 때문에 다소의 점성을 나타내므로, 같은 부피의 수돗물을 가했을 때보다 배합 함수비가 낮다(Dennis와 Turner, 1998). 따라서 수돗물로 배합했을 때와 박테리아 혼합액으로 배합했을 경우의 다짐특성 변화를 고려해야 한다. Fig. 5는 배합수에 따른 화강풍화토의 다짐곡선으로, 전자의 경우 시료의 최적함수비는 15.75%, 최대건조단위중량은 1.68g/cm³, 후자의 경우 최적함수비는 16.85%, 최대건조단위중량은 1.66g/cm³이었다. 일반적으로 다진 점토차수재나 복토재의 경우 소요 강도와 전단강도 그리고 전조수축에 따른 균열 가능성 등을 고려한 최저투수계수는 최적함수비의 ±2%, 최대건조단위중량의 96~98%의 범위에서 다짐을 해야 얻을 수 있다(Daniel과 Benson, 1990). 실험결과 배합수에 따라 최적함수비가 최대 2%정도 차이가 발생했지만, 함수비-최대건조단위중량과의 상관관계에서 최대건조단위중량의 98%에 해당하는 함수비를 만족하기 때문에 현장 다짐시 수돗물로 측정한 최적함수비로 다짐을 해도 무관할 것으로 생각된다.

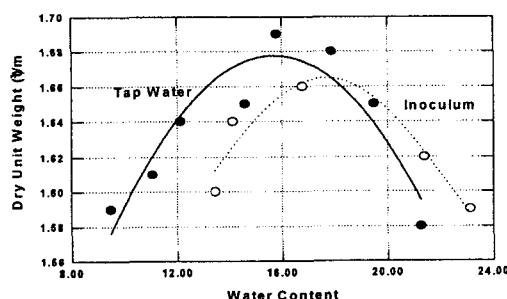


Fig. 5 Compaction Curve of Specimens Molded with Tap water and Inoculum

4.2 정수위 투수시험

모래의 투수계수는 박테리아 접종 전에 그리고 박테리아를 함유한 기질을 10일 동안 공급한 후 수돗물을

침투시켜 측정하였다. Fig. 6은 10일 동안 영양분 용액을 침투시킨 후 수돗물을 통과시켜 측정한 모래의 투수계수 값이다. 투수계수가 $4.3 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ 인 모래 시료에 기질을 공급한 후 침투용액을 수돗물로 바꿔 투수시험을 한 결과 투수계수는 $3 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ 까지 감소하였다. 그러나 투수계수는 잠시 증가한 후 다시 감소해 $2.6 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ 값을 유지하였다. Fig 6의 경우, 투수계수가 증가하는 이유는 박테리아가 접종된 영양분 용액을 시료에 공급하면 박테리아가 성장하면서 발생하는 가스 기포(CO_2)에 의해 바이오필름의 형성에 따른 투수계수 감소와는 무관한 투수계수 감소가 일어날 수 있기 때문이다. 그러나 수돗물과 같은 비영양분을 침투시키면 박테리아 가스생성으로 인해 증가했던 포화도가 다시 감소해 시료의 투수계수는 증가한다(Dennis와 Turner, 1998). 또한 모래 속에 안정된 바이오필름이 형성되어 간극의 크기가 감소해 투수계수는 감소하였다.

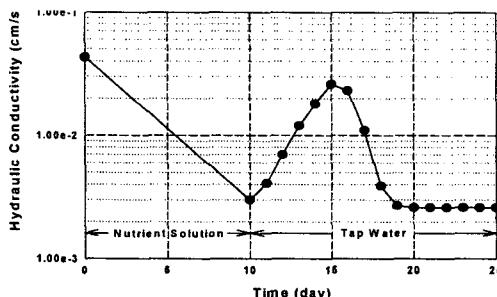


Fig. 6 Hydraulic Conductivity Changes of Sand Treated by Biofilm

4.3 간극의 형태 변화

투수계수가 $4.3 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ 인 모래에 10일동안 기질을 공급한 후 침투용액을 수돗물로 바꿔 15일동안 침투시킨 결과 시료의 투수계수는 Fig. 6과 같이 $2.6 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ 으로 감소하였다. 이런 투수계수의 감소현상을 규명하기 위해 전자주사현미경(SEM)을 이용하여 박테리아 접종 전과 바이오필름이 형성된 후의 단면을 관찰하였다. Fig. 7.a는 박테리아를 함유한 영양분 용액을 침투시키기 전의 시료 단면이고, 그림 7.b~7.d는 투수시험 이 끝난 시료의 상단부분에서 샘플을 채취해 관찰한 단면을 각각 150배 700배, 100배 확대한 것이다. 전자주사현미경 관찰 결과, 바이오필름이 모래 표면과 모래 입자간의 간극사이를 폐색시켰음을 확인할 수 있었다. Taylor 등(1990)은 불투수성의 바이오필름이 입자의 표면에 퇴적되어 입자의 두께가 증가됨에 따라 투수성이 감소한다는 모델을 제시하였다. 그러나 토양공극에 형성된 바이오필름은 Fig. 7.c와 7.d의 경우처럼 모래의 표면에서만 퇴적되어 간극을 막는 것이 아니라 입자와 입자간을 서로 연결하는 mesh 형태의 바이오필름을 형성하여 간극을 보다 협소하게 만들었고, 형성된 mesh는 여러 층으로 이루어져 투수계수를 보다 효율적으로 감소시켰다. 따라서 Taylor 등(1990)이 제시한 기존의 모델은 수정되어야 할 것으로 생각된다.

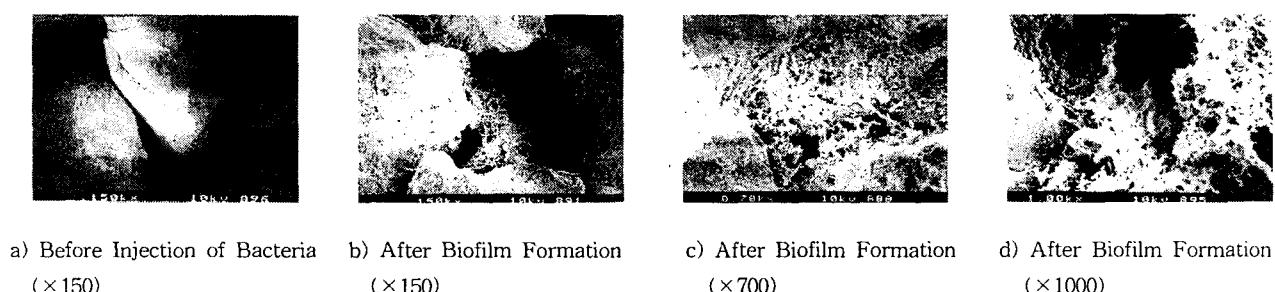


Fig. 7 Comparison of SEM Images of Pore Sand Before and After Biofilm Formation

4.4 변수위 투수시험

Fig. 8은 함수비에 따른 화강풍화토의 투수특성을 파악하기 위해 여러 함수비에서 다져 측정한 투수계수 값이다. 화강풍화토의 투수계수는 함수비가 11.8%일 때 2.85×10^{-4} cm/s부터 함수비가 23.1%일 때 3.6×10^{-7} cm/s까지 감소하였다. Fig. 8의 경우, 높은 함수비에서 시료를 다지면 낮은 투수계수를 얻을 수 있으나, 함수비가 높아 현장에서 다짐작업을 할 수 없기 때문에 투수시험은 배합 함수비가 15~17%인 범위에서 수행하였다.

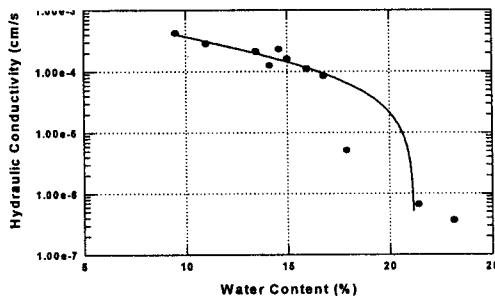


Fig. 8 Hydraulic Conductivity Changes of Poorly Graded Sand versus Water Content

Fig. 9는 영양분 공급 시간에 따른 화강풍화토의 투수계수 변화를 측정한 값이다. 투수계수가 1.6×10^{-4} cm/s인 시료에 기질을 10일 동안 공급한 후 25일 동안 수돗물을 침투시켜 측정한 투수계수는 5.7×10^{-6} cm/s까지 감소한 후 일정 값을 유지하였다. 또한 투수계수가 1.1×10^{-4} cm/s~ 1.05×10^{-4} cm/s인 시료에 각각 15일과 20일 동안 영양분 용액을 공급한 후 침투용액을 수돗물로 바꿔 침투시키면 시료의 투수계수는 2.1×10^{-6} cm/s~ 1.7×10^{-6} cm/s로 감소하였다. 박테리아를 접종한 화강풍화토의 투수시험 결과 시료 모두 1/10~1/100배 크기의 투수계수 감소가 측정되었고, 특히 영양분 공급 15일 이후에 최저 투수계수 값을 보였다. 이것은 Fig. 7.c와 7.d의 경우처럼 시료에 형성된 바이오플름이 간극의 형태를 보다 협소하게 만들었기 때문이다.

Fig. 10은 15일 동안 기질을 공급한 후 화학용액을 침투시켜 투수계수 변화를 측정한 값이다. 투수계수가 각각 9.5×10^{-5} cm/s~ 1.2×10^{-4} cm/s인 시료에 영양분 용액을 공급한 후 침투용액을 산성용액(HCl)과 염기성 용액(NaOH)으로 바꿔 침투시킨 결과 투수계수는 9.5×10^{-7} cm/s~ 2.1×10^{-6} cm/s의 감소를 나타냈다. 실험 결과, 화학용액을 침투시킨 이후에도 투수계수는 수돗물을 침투시켜 측정한 값과 비슷한 값을 유지하였다. 이것은 바이오플름이 화학용액에 잘 저항함을 보여주는 것이다.

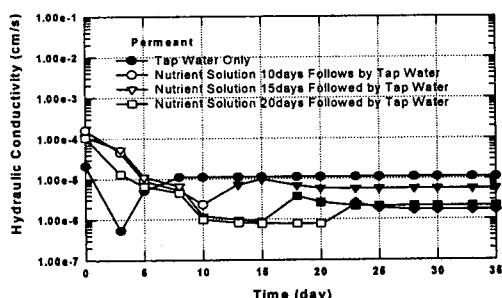


Fig. 9 Hydraulic Conductivity Changes of Specimens Permeated with Nutrient Solution and Tap Water

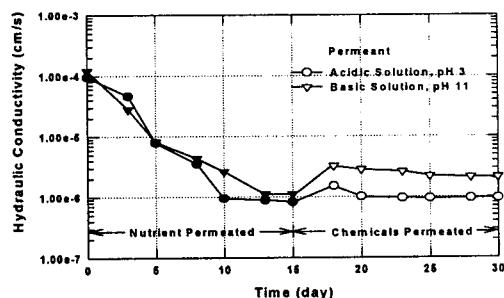


Fig. 10 Hydraulic Conductivity Changes of Specimens Permeated with Nutrient Solution and Chemical Solution

5. 결론

다공성 매질인 모래와 화강풍화토에 *Azotobacter chroococcum* 박테리아를 접종하고, 영양분 용액을 공급

하여 투수시험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수돗물이나 박테리아 혼합액으로 다짐실험을 했을 경우 다짐 특성은 변하지 않았으며, 이것은 현장 다짐시 수돗물로 측정한 최적 함수비로 다짐을 해도 무관함을 보여주는 것이다.
2. 다공성 매질에 박테리아를 주입하면 박테리아의 생장에 의해 형성된 바이오 필름을 관찰할 수 있었고, 입자와 입자 사이에 mesh 형태의 바이오필름이 형성되어 보다 효과적으로 간극을 폐쇄시키고 있었다.
3. 당초 투수계수가 4×10^{-2} cm/s인 모래와 1.6×10^{-4} cm/s~ 1×10^{-4} cm/s인 화강풍화토에 박테리아를 접종한 결과 투수계수는 각각 2.6×10^{-3} cm/s와 5.7×10^{-6} cm/s~ 1.7×10^{-6} cm/s까지 1/10~1/100배 감소한 후 일정 값을 유지하였다.
4. 산성용액(HCl)과 염기성 용액(NaOH)을 침투시켜도 시료의 투수계수는 일정 값을 유지하였다. 이것은 바이오필름 집합체가 화학용액의 침투에 잘 저항함을 보여주는 것이다.

참고문헌

1. Atlas, R.M., and Bartha, R. (1992) *Microbial ecology; Fundamentals and applications*. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, Ca.
2. Characklis, W.G. and Marshall, K.C. (1990) *Biofilm*. John Wiley & Sons. Inc., New York, N.Y.
3. Daniel, D.E. and Benson, C.H. (1990) "Water content-density criteria for compacted soil liner." *J. of Geotech Engrg.*, Vol. 116, No. 12, Dec., pp.1811~1830.
4. De la Vega MG, Chjudo, F.J., and Panque, A. (1991) "Production of exocellular polysaccharide by Azotobacter chroococcum" *Appl Biochem Biotechnol.*, Vol. 30, No. 3, Sep., pp.273~284.
5. Dennis, M.L. and Turner, J.P. (1998) "Hydraulic conductivity of compacted soil treated with Biofilm." *J. of Geotech and Geoenviron Engrg.*, Vol. 124, No. 2, Feb., pp.120~127.
6. Huang, C.T. (1994) "Effect of medium carbon-to-nitrogen ratio on Biofilm formation and plasmid stability." *Biotechnol. and Bioengrg.*, Vol. 44, No. 3, Jul., pp.329~336.
7. Sharma, H.D., and Lewis, S.P. (1994) *Waste containment systems, waste stabilization, and landfill; Design and evaluation*. John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y.
8. Shaw, J.C., Wardlaw, N.C., Bramhill, B., and Costerton, J.W. (1985) "Bacterial fouling in a model core system." *Appl and Environ Microbiol.*, Vol. 49, No. 3, Mar., pp.693~701.
9. Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Painter, P.R., and Wheelis, M.L. (1986) *The microbial World*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
10. Stoodley, P., de Dirk, B., and Lewandowski, Z. (1994) "Liquid flow in biofilm systems." *Appl. and Environ. Microbiol.*, Vol. 60, No. 8, Aug., pp.2711~2716.
11. Taylor, S.W., Milly, P.C.D., and Jaffe, P.R. (1990) "Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium. 2; Permeability." *Water Resour.*, Vol. 26, No.9, Sep., pp.2161~2169.