

## LNAPL을 이용한 지중 산소전달 향상: (II) Biotic Condition

### Using LNAPL to Enhance in situ Oxygen Transfer: (II) Biotic Condition

하정협<sup>1</sup> · 강선홍<sup>2,\*</sup>

Ha, Jeong-Hyub<sup>1</sup> · Kang, Seon-Hong<sup>2,\*</sup>

1 Department of Civil, Construction, and Environmental Engineering,  
Iowa State University, Ames, IA, U.S.A

2 광운대학교 환경공학과

(2004년 2월 10일 접수, 2004년 5월 27일 최종수정논문 채택)

#### Abstract

Previous experiment was performed under abiotic condition. Steady-state abiotic experiments in the sand-tank reactor with air flowing through the reactor headspace demonstrated that oxygen supply through the water table interface into the saturated zone was enhanced when an LNAPL (dodecane) pool was present at the water table. Biotic condition was considered in this study. Biotic experiments performed after inoculating the reactor with *Pseudomonas putida* mt-2, which does not grow on dodecane, indicated that the enhanced oxygen supply in the presence of the LNAPL pool also enhanced biodegradation of a solute (glucose) plume passing beneath the LNAPL pool at steady-state.

**Key words:** *in situ*, oxygen transfer, biotic experiment, bioremediation, oxygen solubility

**주제어:** 지중, 산소전달, 미생물 실험, 생물학적 복원, 산소용해도

#### 1. 서론

NAPLs(Nonaqueous phase liquids)로 오염된 지역을 효율적으로 처리하는 기법의 하나로서 최근 생물학적 복원 (Bioremediation)이 크게 각광을 받고 있다. 예를 들면, 석유류 중 LNAPL에 포함되어 있는 탄화수소들은 일반적으로 생화학적 분해가 가능하고 따라서 생물학적 복원 기법을 이용하여 제거할 수 있다 (Rittmann et al., 1994). 그 결과 1970년대 초반부터 생

물학적 지중복원(*in situ* bioremediation)이 오염 토양 및 지하수 복원에 많이 사용되고 있다(Lee et al., 1988). 생물학적 지중복원을 적용함에 있어, 지중에 토착해 있는 미생물들의 활성을 증진시키기 위해 다양한 방법으로, 미생물들에게 제한된 인자(영양염류나 산소 등)가 공급된다. 석유류에 포함된 탄화수소의 경우, 일반적으로 호기성 상태에서 가장 빨리 생화학적 분해가 일어난다. 그러므로 토착 미생물들에게 공급해 주어야 할 가장 중요한 인자의 하나가 산

\*Corresponding author Tel.: +82-2-940-5075, Fax: +82-2-911-2033, E-mail: seonhong@kw.ac.kr (Kang, S.H.)

소이고, 어떻게 산소를 가장 효율적으로 미생물들에게 제공하느냐에 엔지니어적 노력이 기울여지고 있다. 물을 산소원으로 하는 경우에는, 공기로부터 전달되는 산소의 수중 농도가 낮은(8~10mg/L) 것이 단점이고, 이를 보완하기 위해 액체 산소, 과산화수소, 산소 방출 화합물(oxygen release compound) 등을 이용하는 방안들도 연구되었으나 이러한 기법들도 단점을 갖고 있다(Chapelle, 1999). 산소를 수중에 공급하고자 하는 이러한 기법들의 경우, 지하수 내에서의 혼합이 어렵고, 또한 비균일하고 복잡한 지표 밑의 환경 내에서, 원하는 지점에 산소를 정확히 공급해야 하는 어려움이 있다. Air sparging을 통해 산소를 지표 밑의 포화지역에 공급하는 방안도 많이 연구되었으나 이 경우에는 주입된 공기의 이동 방향을 정확히 예측하기가 어렵고 따라서 예기치 않은 지역으로의 오염원의 확산 가능성이 있다(Brown, 1994).

산소를 포화지역으로 제공하기 위한 새로운 대안으로 NAPL내에 포함된 탄화수소의 특성을 이용할 수 있다. 즉, 탄화수소에서의 산소 용해도가 물에서의 산소 용해도보다 훨씬 높다. 예로써, *n*-hexadecane에서의 산소 용해도가 순수한 물에서의 용해도보다 8배 높은 것으로 관측되었다(Ju and Ho, 1989). 따라서, 지표 밑의 LNAPL 오염 지역에 산소가 공급된다면, 더 많은 산소가 물보다는 LNAPL에 용해될 것이고, 그 결과 지하수와 LNAPL의 경계면에서 LNAPL이 고농도의 산소원으로 작용할 것이다.

본 연구의 목적은 LNAPL층에 의해 증가된 포화지역의 산소 농도가 포화지역내의 미생물의 활성을 증진시킴으로써, LNAPL 층 밑의 오염 물질의 생물학적 복원이 크게 향상되는 것을 검증해 보는 것이다.

## 2. 실험 방법 및 재료

모래 충전 반응조(Sand-Tank Reactor)와 미생물 모래 충전 반응조의 설계와 실험용 수용액 및 LNAPL의 준비는 전편의 실험 내용과 동일하게 행하였다. 모래 충전 반응조의 모식도는 Fig. 1에 나타 내었다. 본 실험에서는 미생물에 의한 생물학적 복원 정도를 파악하기 위하여 *Pseudomonas putida* mt-2를 이용하였다. *Pseudomonas putida* mt-2는 American Type Culture Collection(ATCC # 23937)에서 구입하였다. *Pseudomonas putida* mt-2는 glucose를 탄소원으로 이용할 수 있으나(Halverson and Firestone, 2000), 본 실험에서 쓰이는 LNAPL인 dodecane은 탄소원으로 이용할 수 없다고 알려져 있다(Seagren, 1994). *Pseudomonas putida* mt-2를 멸균된 nutrient broth에서 24시간 동안 배양한 다음 40°C에서 냉장보관 후, 필요시 사용하였다. Nutrient broth에서 배양한 culture 10mL를, 5g/L glucose가 담긴, 살균된 플라스크에 따라서 4L가 되도록 만들었다. 이 혼합액을 상온에서 3일 동안 배양한 후, 24시간에 걸쳐 3.2mL/min의 유량으로 모래 충전 반응조에 펌핑하였다. 그 후 미생

**Table 1.** Summary of experimental conditions for oxygen-supply studies performed in the sand-tank reactor.

Expt. No. <sup>a</sup>	Feed solution	Air flow	LNAPL	Inoculum
(1)	Deaerated deionized water with HgCl <sub>2</sub>	no	no	no
(2)	Deaerated deionized water with HgCl <sub>2</sub>	yes	no	no
(3)	Deaerated deionized water with HgCl <sub>2</sub>	yes	yes	no
(4)	Deaerated mineral medium with glucose	yes	yes	yes
(5)	Deaerated mineral medium with glucose	yes	no	yes

<sup>a</sup> The experiments are numbered in the same order as they were performed.

물들이 모래에 부착할 수 있도록 24시간 동안 반응조를 정지시켰다. 위의 펌핑 및 정지 과정을 2회 반복하여, 미생물들이 모래 충전조에 보다 많이 부착하도록 하였다.

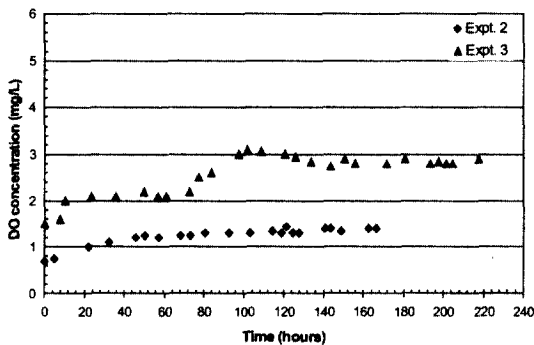
**2. 1. 산소 공급 실험(Oxygen-Supply Experiments)**

본 연구에서 행해진 실험을 Table 1에 요약하였다. Experiment 1, 2, 3 으로 이루어진 abiotic experiment는 앞의 실험에서 다루었고, 본 실험에서는 biotic experiment(Experiment 4, 5)를 수행 하였다. Experiment 1의 목적은 모래 충전조가 견고히 밀폐되어, 수 경계면을 제외한 다른 곳에서의 산소 유입이 없는 지를 확인하는 것이다. Abiotic Experiment 2와 3에서는 LNAPL 층의 유무에 따른 산소의 전달 효율을 비교해 보았다. 마지막으로 본 실험에서 행한 Experiment 4와 5에서는 모래 충전조에 *Pseudomonas*

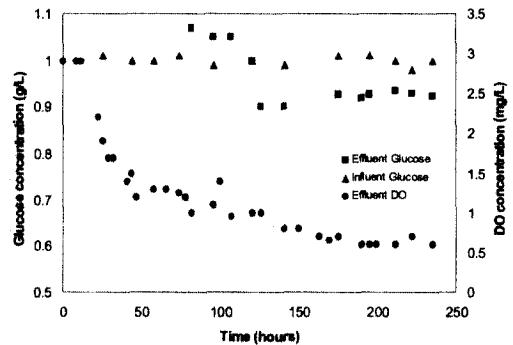
*putida* mt-2 Culture를 주입한 후, LNAPL 층의 유무에 따른 glucose의 생물학적 복원 효율을 비교해 보았다.

Experiment 4와 5에서는 유입수와 유출수의 DO 농도와 glucose의 농도를 측정하였다. 용존 산소의 농도 C<sub>avg, O<sub>2</sub></sub>와 glucose의 농도, C<sub>avg, glu</sub>가 각각 정상 상태(steady state)에 도달할 때까지 주기적으로 유출수의 용존 산소 및 glucose의 농도를 측정하였다. 실험 장치는 앞의 실험에서 사용한 것과 같고 그 모식도는 Fig. 1에 나타 내었다.

분석방법 Glucose의 농도 분석을 위하여 glucose oxidase assay(Sigma Chemical Co., Cat. No. 510-DA)를 사용하였다. 분석을 위해, 유출수를 0.2µm filter (Millipore, Cat. No. GTBP02500)로 여과시킨 후, 증류수로 20배 희석한 sample 0.5를 취한 후 5mL tube에 넣고 나머지는 증류수로 채운 뒤 충분히 혼합시켰다. 대조액으로는 증류수를 사용하였다. 5mL tube에 든



**Fig. 2.** Effluent DO data for abiotic experiments without (Experiment 2) and with (Experiment 3) the LNAPL pool.



**Fig. 3.** Effluent DO and influent and effluent glucose data for biotic experiment with the LNAPL pool (Experiment 4).

**Table 2.** Summary of measured and calculated values determined in abiotic O<sub>2</sub> supply experiments

Expt.	Temp. (Avg. ± Std. dev.) (°C)	Q <sub>air</sub> (Avg.) (ml/min)	Q <sub>x</sub> (Avg.) (ml/min)	v <sub>x</sub> (m/d)	C <sub>avg,O<sub>2</sub></sub> (Avg. ± Std. dev.) (mg/l)	J <sub>avg,O<sub>2</sub></sub> (g O <sub>2</sub> /m <sup>2</sup> /d)
1	21.1 ± 0.6	0	3.2	0.5	0.2 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.02
2	21.0 ± 0.8	11	3.2	0.5	1.4 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.13 <sup>d</sup>
3	21.4 ± 0.5	11	3.2	0.5	2.8 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.33 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> n = 9 data points used to calculate C<sub>avg</sub>.

<sup>b</sup> n = 11 data points used to calculate C<sub>avg</sub>.

<sup>c</sup> n = 13 data points used to calculate C<sub>avg</sub>.

<sup>d</sup> Calculated using L<sub>x</sub> = 0.5m.

<sup>e</sup> Calculated using L<sub>x</sub> = 0.4m, the length of the LNAPL pool.

**Table 3.** Summary of measured and calculated values determined in biotic O<sub>2</sub> supply experiments

Expt.	Temp. (Avg. ± Std. dev.) (°C)	Q <sub>air</sub> (Avg.) (ml/min)	Q <sub>x</sub> (Avg.) (ml/min)	v <sub>x</sub> (m/d)	C <sub>avg,O<sub>2</sub></sub> (Avg. ± Std. dev.) (mg/l)	C <sub>avg,Glu</sub> (mg/l)	J <sub>avg,O<sub>2</sub></sub> (g O <sub>2</sub> /m <sup>2</sup> /d)	
4	21 ± 0.7	11	3.2	0.5	0.66 ± 0.048 <sup>a</sup>	1000 ± 9.5 <sup>c</sup>	927 ± 0.01 <sup>e</sup>	2.58 <sup>g</sup>
5	21 ± 0.5	11	3.2	0.5	0.31 ± 0.073 <sup>b</sup>	1003 ± 8.0 <sup>d</sup>	1010 ± 0.01 <sup>f</sup>	— <sup>h</sup>

<sup>a</sup> n = 9 data points used to calculate C<sub>avg,O<sub>2</sub></sub>.

<sup>b</sup> n = 17 data points used to calculate C<sub>avg,O<sub>2</sub></sub>.

<sup>c</sup> n = 12 data points used to calculate C<sub>inf,Glu</sub>.

<sup>d</sup> n = 13 data points used to calculate C<sub>inf,Glu</sub>.

<sup>e</sup> n = 12 data points used to calculate C<sub>avg,Glu</sub>.

<sup>f</sup> n = 11 data points used to calculate C<sub>avg,Glu</sub>.

<sup>g</sup> Estimated based on the measured steady-state glucose removal, the biodegradation stoichiometry, and a steady-state mass balance on oxygen.

<sup>h</sup> J<sub>avg,O<sub>2</sub></sub> could not be estimated due to no measurable removal of glucose.

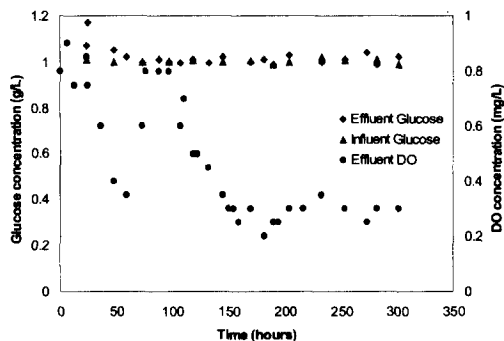
sample과 대조액을 37°C 수조에서 30분간 또는 상온 (18~26°C)에서 45분간 배양한 후 Spectrophotometer (Bausch & Lomb Spectronic 20)를 이용하여 425nm에서 각각의 absorbance를 측정하였다. 검정 곡선을 이

용하여 각각의 absorbance를 glucose의 농도로 환산하였다. 이 때 증류수를 reference로 사용하였다.

### 3. 실험 결과 및 고찰

본 실험의 목적은 앞의 abiotic experiment 실험 결과에서 얻어진, LNAPL 층 존재에 의한 산소 전달 향상, 실제로 LNAPL 층 밑의 오염 물질 (glucose)의 생물학적 복원 효율 증가를 야기하는 가를 고찰해 보는 것이다. Experiment 2와 3에서 얻어진 유출수의 DO 농도를 Fig. 2에 나타내었다. 또한 Experiment 1, 2, 3에서 얻어진 Q<sub>air</sub>, Q<sub>x</sub>, C<sub>avg</sub>, O<sub>2</sub>값들을 Table 2에 요약하였다.

Experiment 4와 5의 유출수 DO 농도와 유입수 및 유출수의 glucose 농도를 각각 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 또한 Experiment 4와 5에서 얻어진 Q<sub>air</sub>, Q<sub>x</sub>



**Fig. 4.** Effluent DO and influent and effluent glucose data for biotic experiment without the NAPL pool (Experiment 5).

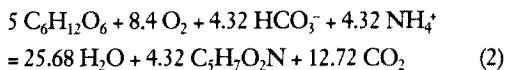
$C_{avg, O_2}$ ,  $C_{avg, glu}$ 와 유입수의 glucose 농도( $C_{inf, glu}$ ) 값들을 Table 3에 요약하였다.

$C_{avg}$  값들을 구하기 위해, LNAPL 층을 갖고 실험한(Fig. 3) Experiment 4에서는 163시간(6.8일~6.8 Pore volume)이후의 자료들을 사용하였고, LNAPL 층을 제거하고 실험한(Fig. 4) Experiment 5에서는 122 시간(5.1 일~5.1 Pore volume)이후의 자료들을 사용하였다. 식 (1)을 이용하여 구한 공극부피속도( $v_x$ )의 값들도 Table 3에 제시하였다.

$$v_x = \frac{Q_x}{nA} \quad (1)$$

Experiment 2와 3에서는 DO 농도가 증가한 반면(Fig. 2), Experiment 4와 5에서는 DO 농도가 감소함(Fig. 3과 Fig. 4)을 알 수 있다. 이는 glucose의 분해 시 포화지역내의 미생물이 산소를 소비하였기 때문으로, 이는 포화지역에서의 산소 감소를 의미하고, 또한 이는 포화지역 상부로부터 포화지역으로의 driving force를 증가시킨다. 따라서 biotic experiment에서는 LNAPL의 영향이 더 큼을 알 수 있다. Fig. 3과 Fig. 4의 데이터를 비교해 보면, LNAPL층이 존재하는 Experiment 4의 glucose 유출수 농도가 LNAPL 층이 없는 Experiment 5의 농도보다 작음을 알 수 있다. 실제로, Experiment 5의 경우, glucose가 거의 제거되지 않았다(Table 3). 또한 Experiment 4에서 상당 부분의 glucose가 분해되었음에도 불구하고 Experiment 4의 유출수 DO 농도가 Experiment 5의 유출수 DO 농도보다 높았다. 이는 abiotic experiment 결과와 마찬가지로, LNAPL 층의 존재가 산소 전달 효율을 증가시켰다는 가설과 일치하였다.

산소공급효과는 glucose 분해에 대한 물질 수지식과 stoichiometry를 이용하여 정량적으로 계산할 수 있다. 암모늄 이온이 질소원이라고 가정하면 세포 합성을 포함한 glucose의 호기성 분해는 다음의 식 (2)와 같이 표현될 수 있다.



여기서,  $C_3H_7O_2N$  은 새롭게 생성되는 세포를 뜻

한다. 식 (2)를 이용하여 glucose와 DO의 소비율을 구할 수 있다.

Abiotic Experiment 3에서 얻어진  $J_{avg, O_2}$ (Table 2)의 값에 의하면, LNAPL 층이 있는 경우(Experiment 4), LNAPL과 물 경계면(단면적 =  $0.04m^2$ )을 통과하여 전달되는 산소의 단위 시간당 질량은  $(0.33g O_2/m^2/d) \times 0.04m^2) \times (1000mg/g) = 13mg O_2/d$ 이다. Biotic experiment 결과 (Table 3)에 따르면, Experiment 4에서 모래 충전 반응조를 빠져 나가는 산소의 단위 시간당 질량은  $Qx \times C_{avg, O_2} = 3mg O_2/d$ 이다. 이것은 반응조 내에서 glucose 분해에 이용되는 산소량은  $10mg O_2/d$  임을 뜻한다. 식 (2)를 이용하면( $5 \text{ mole glucose} / 8.4 \text{ mole } O_2 = 3.35mg \text{ glucose} / mg O_2$ ), 이 값은  $34mg \text{ glucose}/d$ 의 glucose 제거율에 해당된다. 그러나 glucose의 유입수와 유출수 농도차를 유량으로 곱해서 얻어진 실제 glucose 제거율은  $340mg \text{ glucose}/d$  로서, 이는 앞에서 구한 이론값 보다 10배나 높다.

같은 방식으로 LNAPL 층이 없을 경우(Experiment 5)에 대해서도 계산할 수 있다. 이 경우 미생물이 glucose 분해 시  $5.1mg O_2/d$ 의 산소를 소비하고, 이는 식 (2)를 이용하면  $17mg \text{ glucose}/d$ 의 glucose가 이론적으로 제거됨을 알 수 있다. 그러나 이 실험에서, 실제로는 glucose가 전혀 제거되지 않았다.

LNAPL 층이 있는 경우와 없는 경우 모두 glucose의 이론적 제거율과 실제 제거율이 크게 차이를 알 수 있었다. 이는 위의 단순한 계산으로 설명할 수 없는 다른 인자가 존재함을 의미한다. LNAPL 층이 있는 경우 Experiment 4), glucose 제거율이 예측보다 높았던 것은, LNAPL층 밑의 포화지역으로의  $O_2$  용해율이 그 지역내의 미생물들의 활성으로 인해 크게 증가하였기 때문인 것으로 판단된다(Yang and McCarty, 2000). 즉, LNAPL층 밑의 미생물들의 활성이 커서 그 지역 내의 산소를 많이 소비함으로써, 미생물 분해가 없을 때보다(Experiment 3) DO 농도가 급격히 감소하고, 이는 LNAPL 층에 용해되어 있는 산소들이 그 밑의 포화지역으로 이동되는 concentration gradient driving force를 증가시킨다. 그 결과, 미생물이 없을 때(Experiment 3)보다 더욱 큰 LNAPL층으로부터 밑의 포화지역으로의 산소 플럭스가 발생하고

이는 glucose 제거율 증가를 수반한다. Experiment 4에서 구한 340mg glucose/d의 glucose 제거율과 식(2)를 이용하면, 반응조에서의 산소 제거율은 100mg O<sub>2</sub>/d이다. Experiment 4에서 반응조를 빠져 나가는 산소의 비율은 3mg O<sub>2</sub>/d이었으므로, LNAPL층을 통하여 포화지역 내로 들어 오는 산소의 비율은 103mg O<sub>2</sub>/d이다. LNAPL 층과 물과의 경계 단면적이 0.04m<sup>2</sup>이므로 포화지역으로 들어 오는 산소의 플럭스는 2.58g O<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/d이다. 이 값은 미생물이 없는 경우(Experiment 3, Table 2)와 비교했을 때, 8배나 큰 값이므로 미생물에 의해 산소 플럭스가 8배나 증가하였음을 나타낸다.

#### 4. 결론

본 실험에서는 지하수 표면에 LNAPL 층이 존재하고, 그 밑의 포화지역에 호기성 미생물이 존재하는 경우 LNAPL층의 존재에 의해 그 밑의 포화지역 내의 용존 산소 농도가 얼마나 증가하는지, 또한 포화지역 내의 오염 물질이 얼마나 분해되는지를 알아보았다. 이를 위하여 LNAPL(본 실험에서는 dodecane)은 탄소원으로 이용하지 못하고, glucose에서는 자랄 수 있는 *Pseudomonas putida* mt-2를 대상 미생물로 선택하여 사용하였다. LNAPL층 밑의 포화지역으로의 산소 전달 플럭스를 비교한 결과, *Pseudomonas putida* mt-2가 존재하지 않는 경우에는 산소 전달 플럭스가 0.33g O<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/d인 반면, *Pseudomonas putida* mt-2가 존재하는 경우에는 산소 전달 플럭스가 2.58g O<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/d로 미생물이 없는 경우보다 8배나 높았다. 이는 *Pseudomonas putida* mt-2가 포화지역내의 glucose를 분해하면서 산소를 소비함으로써 포화지역 내의 DO를 고갈시켰고, 이는 위의 LNAPL층 내에 용해되어 있는 DO를 포화지역 내로 이동시키는 concentration gradient driving force를 증가시켰기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 LNAPL층이 존재할 경우, LNAPL층 위로 공기를 주입하면 LNAPL층 밑의 포화지역 내에 퍼져 있는 오염 물질의 생물학적 복원 효율이 크게 향상될 것으로 판단된

다.

#### 참고문헌

- APHA, AWWA, and WEF.(1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (19th ed.), American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation, Washington, D.C.
- Brown, R. (1994) Treatment of Petroleum Hydrocarbons in Ground Water by Air Sparging. In R.D. Norris et al. (Eds.), *Handbook of Bioremediation*, pp. 61-85. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Chapelle, F. H. (1999) Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Ground Water: The Perspectives of History and Hydrology, *Ground Water*, 37(1), pp.122-132.
- Halverson, L. J. and Firestone, M. K.(2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66, pp. 2414-2421.
- Hesse, P.J., Battino, R., Scharlin, P., and Wilhelm, E. (1996) Solubility of Gases in Liquids. 20. Solubility of He, Ne, Ar, Kr, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CF<sub>4</sub>, and SF<sub>6</sub> in n-Alkanes n-C<sub>i</sub>H<sub>2i+2</sub> (6 ≤ i ≤ 16) at 298.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, 41(2), pp. 195-201.
- Ju, L-K., and Ho, C.S. (1989) Oxygen Diffusion Coefficient and Solubility in n-Hexadecane, *Biotechnology and Bioengineering*, 34, pp. 1221-1224.
- Kowert, B. A., and Dang, N.C. (1999) Diffusion of Dioxygen in n-Alkanes, *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(7), pp. 779-781.
- Lee, M.D., Thomas, J.M., Borden, R.C., Bedient, P.B., Ward, C.H. and Wilson, J.T. (1988) Bioremediation of Aquifers Contaminated with Organic Compounds, *CRC Crit. Rev. Environ. Control.*, 18, pp. 29-89.
- Rittmann, B.E., Seagren, E., Wrenn, B.A., Valocchi, A.J., Ray, C. and Raskin, L. (1994) *In Situ Bioremediation*, 2<sup>nd</sup> ed. Noyes Publications, Park Ridge, NJ.
- Seagren, E. A. (1994) Ph.D. Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Voudrias, E.A., and Yeh. M.-F. (1994) Dissolution of a Toluene Pool Under Constant and Variable Hydraulic Gradients with Implications for Aquifer Remediation, *Ground Water*, 32, pp. 305-311.
- Yang, Y. and McCarty, P.L. (2000), *Environ. Sci. Technol.* 34, pp. 2979-2984.