

유류오염대수층 공기분사공정상의 미생물 제한효소다형성법 적용 평가

이준호[†] · 이상훈 · 조재창 · 박갑성

한국외국어대학교 자연과학대학 환경학과

Analysis of Microbial Community in the TPH-Contaminated Groundwater for Air Sparging using Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism

Jun-Ho Lee[†] · Sang-Hoon Lee · Jae-Chang Cho · Kap-Song Park

Department of Environmental Science and Engineering, Hankuk University of Foreign Studies

(Received 1 November 2005, Accepted 12 May 2006)

Abstract

In-situ Air sparging (IAS) is a groundwater remediation technique, in which organic contaminants volatilize into air form the saturated to vadose zone. This study was carried out to evaluate the effect of sludge and soil microbial community structure on air sparging of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) contaminated groundwater soils. In the laboratory, diesel (10,000 mg TPH/kg) contaminated saturated soil. The Air was injected in intermittent (Q=1500 mL/min, 10 minute injection and 10 minute idle) modes. For Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis of eubacterial communities in sludge of wastewater treatment plants and soil of experiment site, the 16S rDNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) from the sludge and the soil. The obtained 16S rDNA fragments were digested with *Msp I* and separated by electrophoresis gel. We found various sequence types for experiment with sludge soil samples that were closely related to *Agrococcus*, *Flavobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Flexibacter* and *Shewanella*, etc, in the clone library. The results of the present study suggests that T-RFLP method may be applied as a useful tool for the monitoring in the TPH contaminated soil the fate of microorganisms in natural microbial community.

keywords : In-situ air sparging (IAS), Microbial community analysis, Polymerase chain reaction (PCR), Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), Total petroleum hydrocarbons (TPH)

1. 서 론

지하저장탱크(Underground Storage Tank: UST)의 누유로 인한 토양 및 지하수 오염은 매우 심각하다. 오염원들은 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compounds: VOCs)을 다량 포함하고 있는데, 이러한 화합물의 약 95%가 석유에서 생산된 물질들이다. 특히 산업활동, 자동차 보급으로 인한 유류 사용량이 증대되면서 지하 저장탱크에서 Non Aqueous Phase Liquids(NAPLs) 형태의 유류 및 유해화학물질의 누유로 인한 토양·지하수의 오염 문제가 대두되고 있는 현실이다.

유류 저장시설로부터 유류의 누유 정도는 국내·외의 자료로 볼 때 10~29%에 이르는 것으로 알려져 있으며, 석유류 제조·저장시설은 차량의 증가나 석유수요의 증가로 인해 지속적으로 증가될 것으로 예상된다. 또한 이들 물질을 저장하는 시설의 재질이 대부분 강철로 되어 있고, 내구연한이 10년에서 20년인 강철 탱크가 부식으로 인해 누유에 의한 토양오염은 이들 시설의 수나 면적을 감안할 때 막대

할 것으로 추정된다.

이러한 점들을 극복하고, 지하수층에 오염된 물질을 복원하기 위해 사용되는 기술로 현장공기분사공정법(In-situ Air Sparging: IAS)이 있는데 이는 오염된 지하 포화대수층, 불포화층의 오염물질을 처리하는 방법이다. 지하 포화대수층에 있는 휘발성 유기화합물, 석유계 탄화수소류(Total Petroleum Hydrocarbon: TPH)와 NAPLs층에 포함하고 있는 물질을 효과적으로 처리하며 이는 지하 포화대수층(토양층)으로 직접 압을 가해 강제적으로 공기 주입하는 방법이다(US EPA, 1992; Hinchey, 2000; Peterson et al., 2000). 또한 고농도의 유류에 의한 토양오염에 적용하여 복원할 경우 시간이 경과되면서 휘발성이 낮은 유류 성분비율이 증가함에 따라 저농도까지도 처리가 쉽고 지하 포화 대수층에도 적용하기 좋다. 그러나 대기 중으로 방출되는 배기가스의 2차처리가 필요하며, 이런 문제점에 대한 대처방안으로 토양의 복원을 여러 측면에서 도모하게 되는데(송 등, 2002; Cline, 1993; Peterson et al., 1999), 이중 생물학적 복원법은 높은 비용이 소요되는 소각법과 넓은 대지를 필요로 하는 매립처리법에 비해 비용면에서 경제적이며, 해로운 오염물질의 제거에 있어 효과적이다.

Fig. 1과 같이 디젤과 같은 오염원 제거의 주된 메커니즘

[†] To whom correspondence should be addressed.

leejh@kordi.re.kr

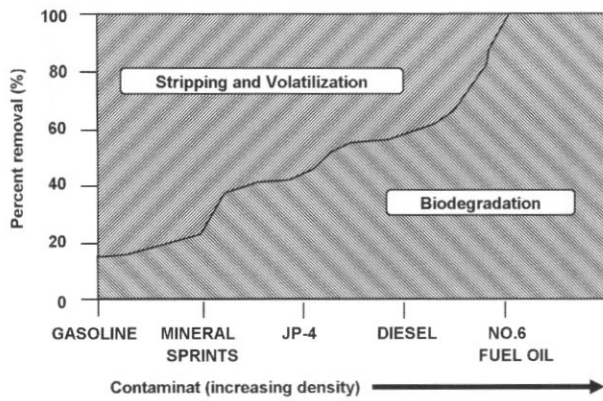


Fig. 1. Qualitative presentation of potential Air sparging mass removal for petroleum compounds.

이 생분해일 경우 공기 주입량은 탈기와 휘발을 위한 주입량보다 상대적으로 더 적은 공기주입량을 필요로 할 것이다. 이외에도 토착미생물의 활성도를 증가시키는 생물학적 정화기술(Bioremediation technology), 자연정화기술(Natural attenuation)이 개발되고 있는데, 이 기술은 오염된 지반 또는 지하수층의 정화 효율을 높이기 위하여 다른 정화기술과 복합적으로 사용되고 있다(Freeman et al., 1995). 그러나 미생물 등을 사용 과정 중에 토양 내 영양소의 부족과 토양 내 환경변화 그리고 많은 정화 시간을 요구하는 단점을 지니고 있다.

대부분의 토양에는 석유계탄화수소를 분해할 수 있는 토양미생물(박테리아, 진균류 등)이 풍부하게 존재하며 이 중 약 200여종의 미생물이 석유계탄화수소의 생물학적 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다. Cookson(1995)은 토양 미생물 중 약 20% 정도가 석유계탄화수소를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있다고 보고(송 등, 1997; Autry et al., 1992)하고 있으며 이들 토양미생물을 이용한 생물학적 복원이 석유계탄화수소로 오염된 토양을 정화하는데 있어서 가장 비용경제적인 기술로 인정되고 있다.

온도는 15-45°C에서 생물학적 분해가 일어난다고 알려져 있다. 문헌에서 제시되고 있는 수분함량이나 온도의 적정범위는 모든 유기화합물질에 적용될 수 있는 수치는 아니고 토성이나 대상오염물질에 따라 달라질 수 있는 광범위한 조건뿐이다(안 등, 2002).

본 연구는 Laboratory simulation 규모의 실험으로 지하 10-15 m에서 채취한 현장토양을 가지고, 디젤로 오염된 대수층·불포화층의 TPH로 오염된 오염물질을 처리하기 위한 Lab-scale 규모의 Air sparging(공기분사공정법) 모델을 바탕으로 진행하였다.

물리·화학적 특성과 미생물의 동정 사이의 상관관계를 확인하여 오염물질 이동 및 분해 특성을 파악하고자 하였다. 더 나아가 오염된 지하수나 지표수 환경에 대한 수리지·화학적 정량적 평가와 미생물 군집(community) 사이의 관계를 파악 할 수 있기 때문에 향후 토착 미생물을 이용한 자연정화 기법과 생물학적 복원을 위한 중요한 정보로 이용될 수 있을 것이다.

이를 위해 디젤의 생분해 유도를 위한 공기주입방법(연속

식, 간헐식), 공기 주입량 결정 실험과, 생물학적 복원 요소인 미생물 군집을 상대적으로 파악하고 평가하기 위한 제한효소 다형성법(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism: T-RFLP)을 적용하였다. 또한 DO 농도 변화, 오염 물질 휘발양상 및 미생물학적 관계를 도출하는데 있다(안 등, 2002; Cookson, 1995; Jackson et al., 1994). 미생물 동정을 위해서는 분자생물학 기법인 16S rDNA gene의 T-RFLP 분석 방법을 이용하여 연구를 수행하였다. 이 방법은 최근 환경내의 미생물 군집을 분석하기 위해 사용되는 분자생물학적 방법으로 분석 시간이 짧고 적용이 간편한 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 T-RFLP 분석 방법을 이용하여 유류를 제거하는데 관여하는 토양 및 슬러지의 미생물 군집을 분석하였다.

2. 실험 방법

2.1. 토양시료의 채취

실험 시료 채취는 Fig. 2와 같이 198△년 개장한 규모 ■■만평의 경기도 하남시 ○○동 ◆◆장이다. 토양채취는 2004년 1월 2일부터 1월 8일까지 실시되었다. 토양채취 작업 과정은 관정을 뚫는 Large-케이싱 작업(지표면 지하 5 m 이내) 후에 Small-케이싱 작업(지름 2.54 cm, 지표면 지하 5~15 m 까지)이 끝날 무렵에 지하 포화대수층 토사를 채취하였다. 약 180 Kg 토양을 채취하였으며, 채취 후 50°C의 건조기 안에서 충분히 건조 시킨 후 2 mm의 Sieve로 걸러주어 퇴적물 입자의 크기를 비교적 고르게 분포 시킨 후 사용하였다(Carter, 1993).

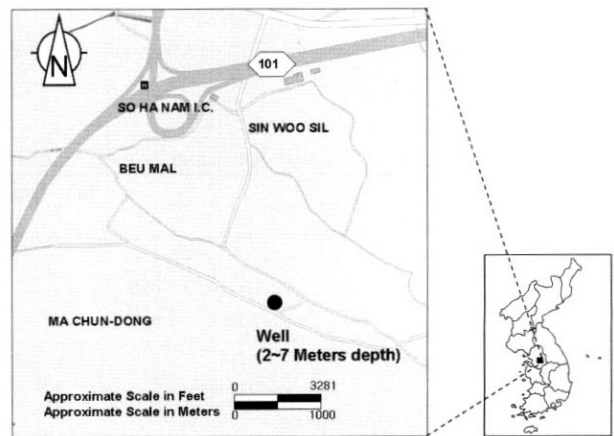
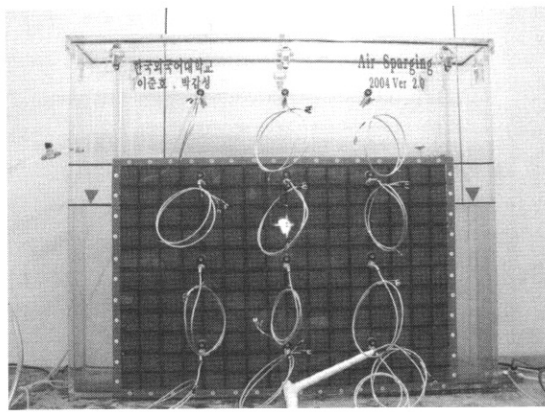


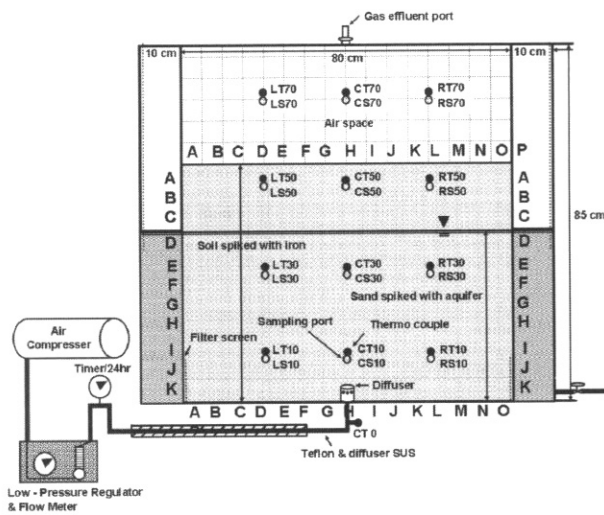
Fig. 2. Location of the test site and well configuration.

2.2. 투명 아크릴 실험탱크 실험조

Fig. 3과 같은 가로 100 cm, 세로 85 cm, 폭 15 cm 크기의 2D Plexiglas box(투명 아크릴 두께: 20 mm)를 제작하여 실험조로 사용하였다. 2D Plexiglas box에 건조시킨 토양을 바닥에서부터 60 cm 높이까지 채운 후 N₂ gas로 Deoxidization(탈산소)하여 DO가 제거된 물을 바닥으로부터 40 cm정도 채워 포화층을 만들었고, 윗부분 20 cm는 불포화층을 만들었다. 실험조 아래 중심에 Sparging diffuser를



(a) photo diagram



(b) Schematics diagram

< 100 cm × 85 cm × 15 cm >

Fig. 3. Schematics diagram of 2 dimension air sparging experiment setup.

설치한 후 Compressor(Italy, Balma)를 사용하여 대기중 공기를 주입하였다.

반응조의 온도를 측정하기 위한 Thermo couple (Autonics, T4WM, PT100)을 12개 지점에 설치하였고, 또한 토양 및 지하수 sampling point를 12개 설치(LS: Left Sampling, CS: Center Sampling, RS: Right Sampling, LT: Left Thermocouple, CS: Center Thermocouple, RS: Right Thermocouple)하여 물의 액상 또는 토양의 고체시료를 채취 할 수 있었다.

공기유량 및 폭기방식(연속식, 간헐식)의 변화를 조절(측정)하기 위하여 Sparging diffuser 앞 부분에 Flow meter와 Timer를 설치하였다.

N, P 영양소로서 Nitrogen 100 mg/L, Phosphorus 60 mg/L농도로 제조하여 미량펌프(Peristaltic pump 3, MASTERFLEX, model 7519-05)를 이용하여 날라간 수분만큼 보충 주입하였다. 또한 외부와의 공기 접촉을 막기 위해 밀봉하였고, 외부의 빛도 차단하였다.

실험과정 또는 실험이 끝나고 DO, TPH 분석을 위해 9개의 Sampling port를 이용하였다. 불포화층 및 대기중에 생성되는 VOC는 포테이블 형식의 측정장비(MultiRAE PLUS, Photo-Ionization Detector sensor, Range: 0~200 ppm, Resolution: 0.1 ppm)를 사용하였고 CO₂는 NaOH 흡착법과 칼럼법(GASTEC, No, 2LL, Japan)을 이용하였다. VOC 및 CO₂ 샘플링 포트는 CT50, CT70 지점에 각각 설치하였다.

2.3. 토양 특성 및 디젤, 슬러지 투입 방법

토성측정 방법은 미국농무성의 USDA(U.S. Department of Agriculture)의 토양삼각도(Calgon test)를 이용하여 분별하였다. 각각의 체로 분류한 토양에 대한 Average Modal diameter Grains(AMG)를 계산하였다. 사용 토양에 대한 물리·화학특성 실험결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Characteristic of sample soil samples used in this study

Soil sample		Experiment sample
Classification		
Particle size distribution	Sand (%) 0.05~2.00 mm Silt (%) 0.002~0.05 mm Clay (%) < 0.002 mm	73.50 8.10 19.50
Soil texture (USDA ^{a)})		SANDY LOAM
Cation exchange capacity (meq / 100 g dry soil)		1.40
Density (g/cm ³)		1.43
pH (1:5) ^{b)}		6.74
Moisture retention, Field capacity (%)		27.60
Total organic carbon (%)		0.42
Conductivity (μS)		81.10
Porosity		0.34
d ₅₀ ^{c)} (mm)		0.45
Uniformity coefficient		4.46 ^{d)}
AMG (mm)		0.62 ^{e)}

※ ^{a)} USDA: United States Department of Agriculture; ^{b)} 1:5: a mass soil:a volume of distilled water; ^{c)} d₆₀ sixty drawdown, d₅₀ fifty drawdown, d₁₀ ten drawdown; ^{d)} d₆₀/d₁₀; ^{e)} AMG Average Modal diameter Grains

디젤 오염물질은 처음 실험이 시작될 경우 CS10 (C: 가운데, S: 샘플링 포트, Diffuser로부터 10 cm 떨어진 지점)에만 150 mL를 한번 주입하여, 실험 과정 중 포화층 내의 디젤에 의한 NAPLs을 조성하였으며 다른 port에는 디젤을 주입하지 않았다. 여기에서 CS30 및 CS50은 각각 Diffuser로부터 윗 방향으로 30 cm, 50 cm 떨어진 샘플링 port를 의미한다. 즉, CS10 및 CS30의 토양은 포화층에 접해 있고 CS50의 토양은 불포화층에 접해 있게 된다.

본 실험에 사용된 미생물은 중앙하수처리장에서 채취한 호기성 및 혐기성 슬러지이다. 포화대수층에 접하는 6개의 Port(LS30, CS30, RS30, LS10, CS10, RS10)에는 6일마다 각각 호기성 및 혐기성 슬러지를 혼합(1:1 비율)하여 5 mL씩 주입하였다.

2.4. 토양 및 액상 시료의 TPH 및 DO 측정 방법

토양에 흡착되어 남아있는 TPH(Total Petroleum Hydrocarbons)와 물속에 녹아있는 액상의 TPH를 측정하기 위한 Gas Chromatogram(GC)의 조건은 Table 2와 같다.

토양의 TPH는 실험이 끝나후에 Sampling port에서 직접 토양 10 g을 채취하여 M.C.(MetylenChloride) 50 mL에 추출하여 추출된 용액을 Gas Chromatogram(GC)로 측정(추출 효율 98.5%)하였다. 분석기기는 Hewlett-packard 5890 series II GC/FID를 사용하였다. 액상의 TPH는 실험과정 중에 주사기를 이용하여 채취하였는데, Sampling port에 주사기 바늘 길이가 15 cm인 주사기를 이용하여 10 mL의 TPH가 포함된 water를 채취하여 Methylene Chloride(M.C.) 50 mL에 추출하여 5000 RPM으로 Centrifuge 한 후 추출된 M.C.를 GC를 이용하여 측정(추출효율 99.0%)하였다.

Table 2. The operating condition for Gas Chromatograph (GC-FID)

Gas Chromatograph	Hewlett Packard 5890 Series II	
Detector	Flame Ionization Detector (FID)	
Detector temperature	300°C	
Injector temperature	250°C	
Column	PTETM-5 FUSED SILICA capillary column	
Carrier gas (flow rate)	Nitrogen gas (2 mL/min)	
	Initial time	1 minute
	Initial temperature	37°C
Temperature program	Progress rate	19°C/minute to 280°C
	Final temperature	280°C (5 minute)
	Final time	20°C/minute (to 310°C) and 310°C (30 min)

DO 농도를 측정하기 위해 Sampling port에서 액상시료 50 mL를 채취하여 DO meter를 이용하여 즉시 측정하였다.

2.5. 슬러지 및 토양의 DNA 추출 방법

실험 전, 후의 토양 및 슬러지 시료 미생물의 균집DNA는 Ultra Clean Mega Prep Soil DNA kit (Mo Bio Laboratories, Inc.)를 사용하여 추출하였다. 추출된 균집

DNA 내에 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 pA(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')(Takara), pH(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')(Takara) primer set을 사용하였다. 최종 반응 조건은 1 ng/μL의 각 sampling site로부터 얻어진 주형 DNA, 0.1 M의 27F, 1492R primer set, 1 μL의 BSA(Roche), 25 μL의 MgCl₂가 포함된 RED RaqTM ReadyMixTM PCR REACTION MIX (Sigma), 그리고 21 μL의 증류수가 사용되었다. 각 DNA가 추출된 각각 샘플의 PCR 과정은 30 cycles 씩 반복되어 증폭 진행되었으며 그 온도는 95°C(5분간 예열), 95°C(30초간 denaturation), 42°C(30초간 annealing), 72°C(1분간 extension), 그리고 마지막 과정에서 72°C(20분간 extension)의 반응을 거치게 되었다. 모든 반응은 GeneAmp PCR system 9700(Applied biosystem)에서 수행되었다. PCR product들의 amplification 결과를 확인하기 위해 1% agarose gel 상에 10 μL씩 loading 하여, 100 V, 40분간 전기영동하였다.

2.6. 토양 및 슬러지 내 미생물의 동정(T-RFLP)

16S rRNA gene을 증폭하기 위하여, 사용된 pA primer는 T-RFLP analysis를 위하여 5' 말단 부분을 형광 염료(6-Fam)로 변형하였다. PCR 조건은 16S rRNA gene PCR 조건과 동일하게 실시하였으며, 증폭된 각각의 PCR product들은 amplification 결과를 확인하기 위해 1% agarose gel 상에 10 μL씩 loading 되었으며, 100 V, 45분간 전기영동하였다.

증폭된 총 80 μL 중 전기영동에 사용된 40 μL를 제외한 남은 40 μL의 PCR product는 제한효소(Msp I) 절단과정을 거치게 되었으며, 이 혼합액에 10× buffer 4 μL와 멸균된 증류수 2 μL, Msp I (5'-C-CGG-3') 제한효소 4 μL를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 digestion을 실시하였다. 절단된 단편들 중 10 μL를 취하여 1% agarose gel 상에서 digestion 유무를 확인하였으며, 나머지 30 μL PCR 단편들은 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)에 의해 정제되었다. 추출된 DNA는 ABI-3100 auto capillary electrophoresis system (Perkin-Elmer)을 통하여 형광염료가 포함된 절편의 peak를 탐지하였다. 이 과정을 통해 얻어진 peak data는 이후, genscan 3.7 프로그램을 통해 저장되었으며, 이 data에 포함된 수치를 Excel 프로그램으로 전환하였으며, size를 나타내는 수치 정보를 보정 과정을 통해 peak의 정보와 비교 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

Lab-Scale 규모의 공기분사공정법(IAS)과 T-RFLP방법을 이용하여 호기성 및 혐기성 슬러지 유·무에 따른 TPH농도 변화와 미생물 균집 변화를 분석하였다.

3.1. 최적 반응 조건 예비실험 및 슬러지 유·무에 따른 포화대수층 중 TPH 농도 감소 실험
반응조의 최적 실험조건을 판별하기 위해 연속적인 공기

유입량(500 mL/min, 1,000 mL/min, 1,500 mL/min, 2,000 mL/min)만 변화시켜 실험한 결과 1,500 mL/min의 경우 가장 긴 영향반경을 가져왔다.

500 mL/min으로 주입할 경우에는 Diffuser의 DO 농도가 평균 2.0 mg/L로 측정되었고, 1,000 mL/min에서는 DO 농도가 평균 2.0 mg/L, 1500 mg/min에서는 DO 농도가 평균 3.5 mg/L로 측정되었다. 그러나 2,000 mg/L로 주입할 경우에는 Diffuser의 DO 농도가 평균 2.5 mg/L로 측정되었는데, 이는 주입된 공기가 바로 불포화층으로 빠져나간 것으로 확인되었다. 이를 바탕으로 실험 반응조의 적정 유량은 1,500 mL/min이라고 판단했으며, 공기 주입시간 간격(10분 주입-10분 휴식, 10분 주입-20분 휴식, 20분 주입-10분 휴식, and 20분 주입-20분 휴식)을 변화시킨 결과, 10분 주입-10분 휴식의 간헐적인 공기주입방법은 다른 방법에 비해 최고 40% 이상의 DO 농도 증가 효과가 있었다. 이는 보통 토양입자크기가 1.3 mm 이하인 경우 연속식 주입방법은 Air sparging의 과도한 공기주입으로 인해 공기 channel이 토양층에 고르게 분포하지 못하고, 직경이 큰 규모의 공기 channel이 한 방향으로만 형성되어, 산소전달 효율이 저감된 것으로 보여진다.

간헐적 실험시 공기 Channel이 붕괴·소멸될 때 공기 Channel의 영향이 덜 미치는 지역에서의 오염원과 지하수가 공기 Channel로 이동하는 효과와 공기 Channel을 통과하는 공기입자가 기·액 평형 그리고 수리전도도를 증가시켜 주입된 공기의 충분한 체류시간으로 공기 Channel 내에 정체하여 산소전달효과가 좋게 작용하기 때문이다(조, 2004).

슬러지 유·무에 따른 포화대수층 중 토양의 TPH 농도 감소 실험 결과 슬러지를 첨가하지 않은 토양의 CS10 sampling port (Fig. 3)에 10,000 ppm 양의 디젤을 직접 주입 후 36일후에 포화대수층상의 토양농도를 측정한 결과

Fig. 4와 같이 토양안에 흡착되어 있는 TPH는 최저 211 ppm(mg/kg)에서 최고 988 ppm(mg/kg)의 농도분포(평균 420 ppm)가 측정되었다. 동시에 포화대수층상의 물속에 녹아있던 TPH는 총 77.6% 감소되었다.

슬러지를 첨가한 반응조의 실험에서도 똑같은 방법으로 CS10 sampling port에 10,000 ppm 양의 디젤을 주입 후 같은 방법으로 36일후에 포화대수층상의 토양농도를 측정한 결과 Fig. 5와 같이 최저 254 ppm(mg/kg)에서 최고 895 ppm(mg/kg)의 분포를 보였다. 이때 실험종료 후 토양속에 흡착되어있는 TPH는 평균 401 ppm이었다.

물속에 녹아있던 TPH는 총 78.7%로 슬러지를 첨가하지 않은 실험보다 1.1%의 차이로 거의 큰 차이는 없었으나, 토양에 흡착되어 있는 TPH는 슬러지를 첨가한 실험이 약 19 ppm 정도 더 낮게 측정되었다. 또한 슬러지를 첨가하지 않은 실험에 비해 슬러지를 첨가한 실험의 토양농도감소는 최고 9.4%의 농도 감소 효과를 보였다. 이는 슬러지가 토양과 흡착되어 있으면서 공기흐름에 의해 호기적인 제거효과라고 판단되어지며, 또한 디젤의 용해도는 1 ppm이 안되지만 이는 물속에 녹아있는 샘플채취시 NAPL상으로 존재하는 디젤도 직접 채취되어졌다고 사료된다.

Fig. 6과 같이 36일 동안의 시간이 지남에 따라 C10 point 지점에 있던 TPH가 실험이 끝날 무렵에는 C30 point 지점으로 이동되는 경향을 보였다.

Fig. 4, Fig. 5에서 실험결과 후 토양안에 흡착되어있는 TPH의 잔류 디젤 농도가 가장 높은 부분은 실험 반응조 Sparging point부분이 아닌 중앙 부근으로 나타났다. 이러한 결과는 기존의 연구에서 디젤의 농도가 고농도로 존재하는 오염물질이 주입된 공기에 의해 불포화 층으로 이동되는 현상으로 디젤의 Light-Non Aqueous Phase Liquids (L-NAPLs) 특성이 강하게 나타낸 결과라고 사료된다(조, 2004).

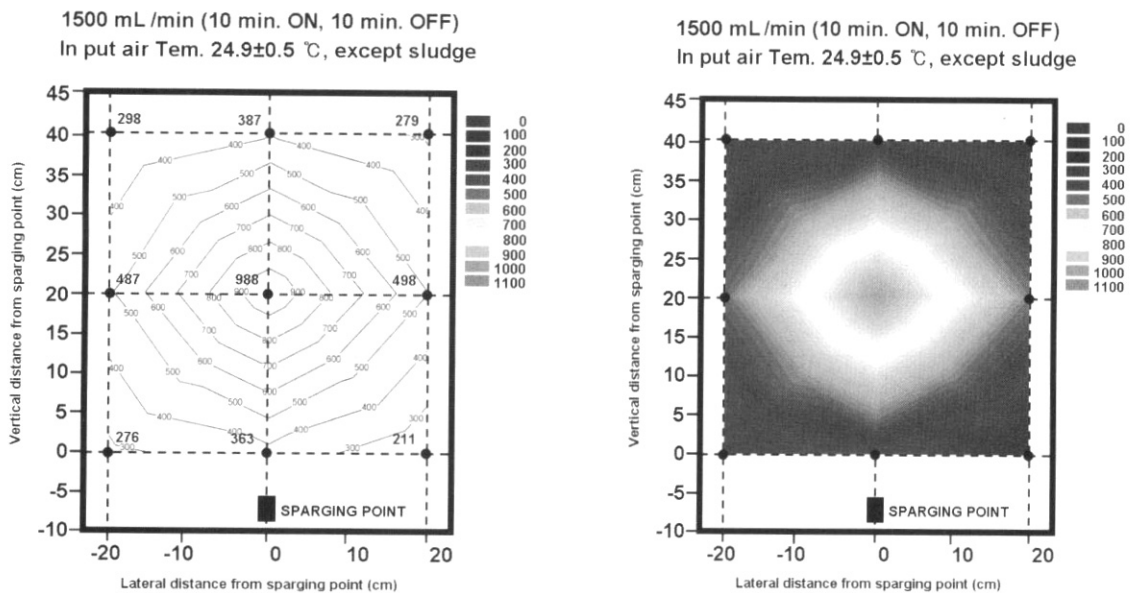


Fig. 4. TPH-soil concentration (ppm) distribution on except sludge after 36 day operation 1,500 mL/min in put air temperature 24.9 ± 0.5°C (10 minute injection, 10 minute idle, intermittent mode).

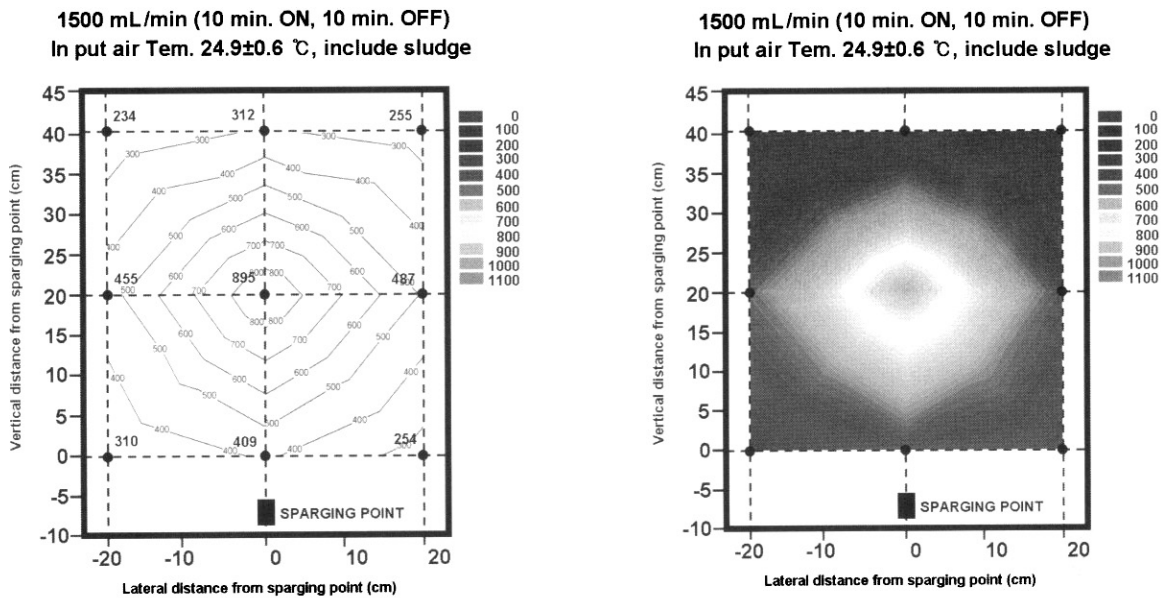


Fig. 5. TPH-soil concentration (ppm) distribution on include sludge after 36 day operation 1,500 mL/min in put air temperature $24.9 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ (10 minute injection, 10 minute idle, intermittent mode).

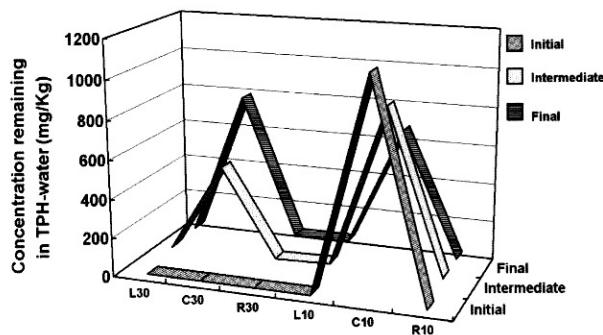


Fig. 6. Each TPH-water concentration (ppm) in remaining water as time include sludge in put air temperature $24.9 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ (10 min. ON, 10 min. OFF, intermittent mode).

3.2. 오염 복원 완료 예상 시간 유추

슬러지 유·무에 주입 실험의 Regression fitting 회계식은 다음과 같다. 슬러지를 첨가하지 않은 공기 주입의 실험의 경우 식은 $y = 1103e^{-0.0124 \cdot x}$, $R^2 = 0.85$ 이며, 슬러지를 첨가한 실험의 경우 $y = 976.44e^{-0.015 \cdot x}$, $R^2 = 0.98$ 이다.

슬러지를 첨가하지 않은 실험의 경우 토양에 남아있는 TPH를 10 ppm으로 농도를 감소시키기 위해 총 375 day의 시간이 필요했으며, 꼬리효과인 Tail effect 적용시 약 750일의 복원 시간이 필요한 것으로 사료된다. 그러나 슬러지를 첨가한 경우 10 ppm으로 농도를 감소시키기 위해 총 300 day의 시간이 필요했으며, 꼬리효과를 적용시켜도 750 day보다 적은 총 600 day의 예상시간이 평가되었다.

3.3. T-RFLP를 위한 DNA 추출 및 PCR 증폭

T-RFLP 분석에 앞서 Fig. 7과 같이 토양 내의 미생물 군집 DNA를 추출하였다. 슬러지를 첨가하지 않은 실험의 실험

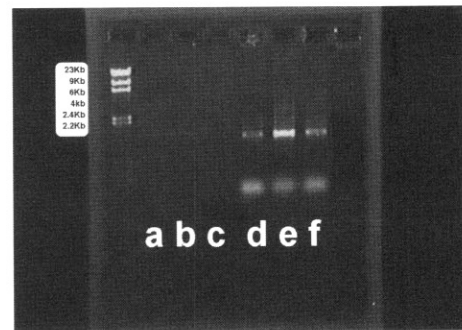


Fig. 7. Genomic DNA extracted from experimental soils and 16s rDNA PCR products. Genomic DNAs from sampling ports CS50(a), CS30(b), and CS10(c) port and PCR-amplified 16s rDNAs from sampling ports CS50(d), CS30(e), and CS10(f) port.

험종료 후 CS50, CS30, CS10 port 토양샘플에 해당되는 실험 전과 후의 전기영동 사진이다. Line a, b, c는 각각 CS50, CS30, CS10에 해당되는 추출된 DNA의 사진이며, 이들 DNA를 주형으로 한 PCR 증폭 후의 사진은 d, e, f line으로 각각 CS50, CS30, CS10 토양 샘플에 해당된다.

Fig. 8은 d, e, f의 DNA 증폭 산물을 *Msp* I 제한효소를 통해 절단한 사진으로 기존 1.5 Kb에서 나타났던 DNA가 제한효소에 의해 절단된 모습을 보이고 있었다. T-RFLP 분석을 거친 data는 Fig. 8과 같은 g, h, k peak 형태의 정보로 저장되어 각각 CS50, CS30, CS10 토양에 해당된다. 이 peak 정보는 기존 sequence database(GenBank)에 존재하는 모든 미생물의 16S rRNA gene sequence와 비교되었는데, database 내의 모든 sequence 정보를 다운로드 하여 이들을 임의의 program(Bioedit)을 통해 program 상에서 제한효소로 절단해 보았다. 여기서 얻어진 정보와 peak에 나타난 정보를 상호 비교 분석하여 각각의 peak가 나타내는

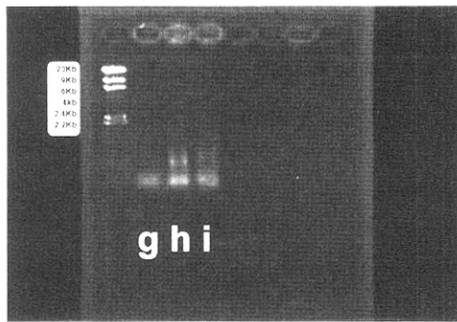


Fig. 8. Schematic diagram of T-RFLP analysis. And electrophoretograms of *Msp* I-digested PCR amplicons from sampling ports CS50(g), CS30(h), and CS10(i) port.

미생물 군집에 대한 정보를 분석하였다. 또한 슬러지를 첨가할 경우 Fig. 8과는 달리 더 진한 DNA 절편사진 밴드를 형성하였으며, 이를 분석 결과 Table 3과 같은 미생물 군집 정보로부터 실험전 미생물 첨가시 그래프 peak가 더 높게 측정되었다. 그러나 미생물의 종에 있어서 슬러지를 첨가하지 않은 슬러지와 거의 구성종이 비슷하여 인위적으로 첨가된 슬러지는 미처 적응 또는 발현이 되지 못한 것으로 판단된다. 이러한 분석방법들은 일반적으로 T-RFLP 방법은 미생물 군집 분석에 많이 이용되고 있으며, 그 유용성이 이미 입증되었다(Zhou et al., 2000). 슬러지를 첨가하지 않은 토양의 T-RFLP의 결과 실험전과 비교하여 82 bp *Pseudomonas*, 145 bp의 *Bacillus*, 149 bp *Thermoanaero-*

Table 3. *in silico* analysis result of T-RFLP digested with *Msp* I

Samples	Time	Without sludge (- sludge)	With Sludge (+ sludge)
Before Experiment		<p>64 bp* <i>Bacillus</i>, <i>Thermoanaerobacter</i>, <i>Thermoanaerobacterium Thiocapsa</i> 138 bp <i>Actinocorallia</i>, <i>Allochroamatium</i>, <i>Amoebobacter</i>, <i>Chromatium</i>, <i>Cryptosporangium</i>, <i>Desulfotobacterium</i>, <i>Desulfosporosinus</i>, <i>Desulfotomaculum</i>, <i>Ectothiorhodospira</i>, <i>Eubacterium</i>, <i>Lamprocystis</i>, <i>Marichromatium</i>, <i>Microsphaera</i>, <i>Paenibacillus</i>, <i>Phabdochromatium</i>, <i>Rubroacter</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Thermochromatium</i>, <i>Thiocapsa</i>, <i>Thiocystis</i>, <i>Thiohalocapsa</i>, <i>Thiorhodococcus</i> 499 bp <i>Shewanella</i>, <i>Xanthomonas</i></p>	<p>64 bp <i>Bacillus</i>, <i>Thermoanaerobacter</i>, <i>Thermoanaerobacterium Thiocapsa</i> 138 bp <i>Actinocorallia</i>, <i>Allochroamatium</i>, <i>Amoebobacter</i>, <i>Chromatium</i>, <i>Cryptosporangium</i>, <i>Desulfotobacterium</i>, <i>Desulfosporosinus</i>, <i>Desulfotomaculum</i>, <i>Ectothiorhodospira</i>, <i>Eubacterium</i>, <i>Lamprocystis</i>, <i>Marichromatium</i>, <i>Microsphaera</i>, <i>Paenibacillus</i>, <i>Phabdochromatium</i>, <i>Rubroacter</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Thermochromatium</i>, <i>Thiocapsa</i>, <i>Thiocystis</i>, <i>Thiohalocapsa</i>, <i>Thiorhodococcus</i> 499 bp <i>Shewanella</i>, <i>Xanthomonas</i></p>
		<p>64 bp K (C10 port) 138 bp 499 bp</p>	<p>82 bp K (C10 port) 490 bp</p>
After Experiment		<p>82 bp <i>Gemella</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Ruminococcus</i>, <i>Thauera</i> 145 bp <i>Bacillus</i>, <i>Kineosporia</i>, <i>Marinobacter</i>, <i>Paenibacillus</i>, <i>Planococcus</i>, <i>Sanguibacter</i>, <i>Sporosarcina</i> 149 bp <i>Thermoanaerobacter</i> 159 bp <i>Rhodococcus</i>, <i>Salibacillus</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Symbiont</i> 490 bp <i>Methylophilus</i>, <i>Oxalobacter</i>, <i>Pseudoaltermonas</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Phodocyclus</i>, <i>Telluria</i>, <i>Thiobacillus</i>, <i>variovorax</i>, <i>Wolbachia</i></p>	<p>58 bp <i>Prevotella</i> 82 bp <i>Gemella</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Ruminococcus</i>, <i>Thauera</i> 83 bp <i>Agrococcus</i>, <i>Capnocytophaga</i>, <i>Pectobacterium</i>, <i>Streptococcus</i> 84 bp <i>Flavobacterium</i>, <i>Kingella</i>, <i>Sporocytophaga</i> 144 bp <i>Dermatophilus</i>, <i>Marinobacter</i>, <i>Microbacterium</i>, <i>Paenibacillus</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Rhodothermus</i>, <i>Thiomonas</i> 145 bp <i>Bacillus</i>, <i>Kineosporia</i>, <i>Marinobacter</i>, <i>Paenibacillus</i>, <i>Planococcus</i>, <i>Sanguibacter</i>, <i>Sporosarcina</i> 149 bp <i>Thermoanaerobacter</i> 490 bp <i>Pseudomonas</i>, <i>Thodocyclus</i>, <i>Telluria</i>, <i>Thiobacillus</i>, <i>Variovorax</i>, <i>Wolbachia</i>, <i>Ruminococcus</i></p>
		<p>64 bp K (C10 port) 138 bp 499 bp</p>	<p>58 bp K (C10 port) 490, 492, 499 bp</p>

* bp: T-RF Size (base pair) Bacteria

bacter, 159 bp의 *Rhodococcus*, 490 bp의 *Pseudoaltermonas* 등의 균주가 새롭게 관측되었지만 Peak 높이는 그리 증가하지 못하였다. 그러나 슬러지를 첨가한 토양의 T-RFLP의 미생물 군집은 64 bp, 138 bp, 449 bp의 미생물 군집이 소멸한 대신에 58 bp *Prevotella*, 82 bp *Gemella*, 83 bp *Agrococcus*, 84 bp *Flavobacterium*, 144 bp *Rhodothermus*, 149 bp *Thermoanaerobacter*, 476 bp *Flexibacter*, 490 bp *Pseudomonas*, 492 bp *Flexibacter*, 499 bp *Shewanella* 등의 새로운 균주가 생성됨을 관측되었다.

기존의 연구에서는 사염화에틸렌(Perchloroethylene) 또는 트리클로로에틸렌(Trichloroethylene)으로 오염된 국내 지하수 내에 국외에서 보고된 환원성 탈염소화 미생물의 존재 유무와 사염화에틸렌의 생물학적 탈염소화 활성화도 평가에서 사염화에틸렌을 완전 탈염소화하여 무해한 에틸렌을 생성하는 미생물이 존재함을 확인하였고, 생물학적 공정 복원 가능성을 제시하였다(김 등, 2005). 본 연구에서도 디젤로 오염된 토양 및 지하수에서 T-RFLP의 미생물 군집 변화를 통하여 물리·화학적 복원 방법과 더불어 생물학적 복원의 검증방법으로 복원할 수 있는 가능성을 보여주는 중요한 지표라고 사료된다. 그리고 또 다른 연구에서는 폐기물로 오염된 토양내 미생물 군집 평가 방법 개발 결과 *Pseudomonas* 선발 특이프라이머를 사용시 오염토양의 평가 지표로서 가능하다고 주장하였으나, *HaeIII* 1개 제한효소로 사용해 더욱 뚜렷한 경향성을 찾을 수 없다고 하였다(장 등, 2004). 본 실험에서도 *Msp I* 1개 제한효소만을 사용해 추후 연구에서는 제한효소의 다양성과 PCR 산물의 시퀀싱을 통한 검증도 필요하다고 사료된다.

4. 결론

본 연구는 유류로 오염된 지하수의 정화방안의 하나로 공기분사공정(In situ Air Sparging: IAS)기술의 슬러지 투입 후 현장적용가능성, 예상 복원가능여부 및 제한효소 가능성을 평가하는 실험이다. 토양 반응조에 공기주입결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 공기 주입방식 및 유량을 결정하기 위한 예비 실험에서 1500 mL/min, 10분 주입, 10분 휴식(간헐식 공기 주입방식, 공기 주입압력; 0.1 Kg/cm²)인경우가 효과적이었다.
- 2) 슬러지를 투입하지 않은 반응에서는 포화대수층 토양에서의 TPH 제거는 초기 10,000 ppm에서 최저 211 ppm에서 최고 988 ppm으로 약 90%의 제거 효과를 가져왔으며, 포화대수층의 물속에 녹아있는 TPH는 77.6% 감소 효과를 가져왔다.
- 3) 슬러지를 투입한 반응에서는 포화대수층 토양에서의 TPH 제거는 초기 10,000 ppm에서 최저 254 ppm에서 최고 895 ppm으로 약 91.0%의 제거 효과를 가져왔으며, 포화대수층 물의 TPH는 78.7% 제거 효과를 가져왔다.
- 4) Regression fitting 회계식결과 슬러지 첨가 유·무에 따라 각각 $y = 1103e^{-0.0124} \cdot x$, $R^2 = 0.8475$, $y = 976.44e^{-0.015}$

$\cdot x$, $R^2 = 0.98$ 계산되었으며, 토양에 흡착되어 있는 TPH를 10 ppm으로 감소시키기 위해 tail effect효과 적용시 감소 예상시간은 750 day(슬러지 無), 600 day(슬러지 有) 이었다.

- 5) 슬러지를 첨가하지 않은 T-RFLP의 결과 실험전과 비교하여 82 bp *Pseudomonas*, 145 bp의 *Bacillus*, 149 bp *Thermoanaerobacter*, 159 bp의 *Rhodococcus*, 490 bp의 *Pseudoaltermonas* 등의 균주가 새롭게 관측되었으며, 실험 전 존재하던 64 bp, 138 bp, 449 bp의 미생물 군집의 소멸을 관찰하였다. 이런 사실을 통해 토양 생태계 내에 존재하는 미생물의 군집의 변화됨을 알 수 있었다.
- 6) 슬러지를 첨가한 T-RFLP의 미생물 군집은 실험전과 비교하여 64 bp, 138 bp, 449 bp의 미생물 군집이 소멸한 대신에 58 bp *Prevotella*, 82 bp *Gemella*, 83 bp *Agrococcus*, 84 bp *Flavobacterium*, 144 bp *Rhodothermus*, 149 bp *Thermoanaerobacter*, 476 bp *Flexibacter*, 490 bp *Pseudomonas*, 492 bp *Flexibacter*, 499 bp *Shewanella* 등의 새로운 균주가 생성됨을 관측되었다. 실험전 및 실험후의 미생물 종의 이름은 같지만 제한 효소의 특성상으로 다른 부분이 잘려짐에 의해 관찰되는 가능성도 배제 할 수 없다. 그러나 이들은 서로 다른 미생물 종으로 분류하는 것이 보편타당하다.

실험 과정 중 사용한 sludge의 영향에 의해 같은 실험 공정을 진행하였음에도 불구하고, 실험 전, 후의 미생물 군집이 다른 양상을 보이고 있었다. 이는 첨가된 sludge 내부에 존재하는 미생물 군집은 일반적인 토양에 존재하는 미생물 군집에 비해 좀 더 복잡한 구조를 가지고 있음을 암시하는 것이며, 첨가된 유기물질을 이용하여 번식할 수 있는 미생물 군집들이 토양 미생물 군집에 비해 다량으로 존재함을 암시한다.

Lab-scale의 공기분사공정 실험 결과 위 실험 결과 이외에 정확한 복원 효율을 도출해 내기 위해서는 실내실험, 오염물질의 특성, 공기확산기의 모양변화에 따른 실험, 컴퓨터 모델링 그리고 현지 미생물 군집실험사이의 분석이 필요하다. 또한 토양 깊이에 따른 복원 효율이 다르므로 정확한 토양평가가 이루어 질 수 있을 때, 오염된 지하수·토양에 대한 가장 현명한 복원 방법 디자인 설계를 할 수 있음은 자명한 사실이다.

사 사

본 연구는 2006년도 한국외국어대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- 공성호, 이승희, 조옥상, 광무영, 고숙도로 주변과 주유소의 토양오염에 관한 연구, 한양대학교 환경기술연구소, pp. 20-30 (1998).
- 김 영, 김진욱, 하철윤, 권수열, 김정관, 이한용, 하준수, 박

- 후원, 안영호, 이진우, 사업화에틸린(PCE)으로 오염된 국내 4개 지역 지하수 내 생물학적 PCE 탈염소화 활성 및 미생물 군집의 비교, *한국지하수토양환경학회지*, **10**(2), pp. 52-58 (2005).
- 송정훈, 장순웅, 이시진, 오염지하수 정화를 위한 공기주입 정화법, *산업기술종합연구소 논문집*, **23**, pp. 129-143 (2002).
- 송태을, 상병인, 김만호, 황종식, 미생물 계면활성제를 이용한 오염토양 복원기법과 현장적용성에 관한 연구, *한국토양환경학회 춘계학술발표회 논문집*, pp. 120-123 (1997).
- 안경수, *생물을 이용한 오염 토양과 해양의 환경 복원*, 인천지역환경기술개발센터, pp. 203-240 (2002).
- 안난희, 장덕진, 생물공학의 동향 X I -A: 활성슬러지 내에 서식하는 세균군집의 RFLP 분석, *한국생물공학회지*, pp. 320-323 (2002).
- 장갑열, 원항연, 박정식, 정종천, 공원식, 이강효, 권순익, *오염농경지의 지표미생물 개발*, 농업과학기술원 연구보고서, pp. 998-1013 (2004).
- 조수형, *Lal-scale Biosparging Study to Remediate Diesel-contaminated Soil and Groundwater: the Effect of Air Injection Rate and Pattern*, 경기대 대학원 석사학위 논문, pp. 70-79 (2004).
- Autry, A. R. and Ellis, G. M., Bioremediation: an Effective Remedial Alternative for Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil, *Environmental progress*, **11**, pp. 318-323 (1992).
- Carter, M. R., Soil Sampling and Methods of Methods of Analysis, *Lewis*, pp. 190-193 (1993).
- Cline, S. R., Efficiencies of Soil Washing/Flushing Solutions for the Remediation of Lead Contaminated Soil, Thesis, *West Virginia University*, pp. 89-98 (1993).
- Cookson, J. T., *Bioremediation Engineering Design and Application*, *McGraw-Hill, Inc.*, pp. 140-149 (1995).
- Freeman, H. M. and Harris, E. F., In Situ Soil Flushing, Hazardous Waster Remediation : Innovative Treatment Technologies Edited by Freeman, H. M. and E. F. Harris, *Technomic Publishing Company, Inc.* pp. 131-138 (1995).
- Hinchee, R. E., *Air Sparging for Site Remediation*, *Lewis Publishers*, pp. 120-140 (2000).
- US EPA, A Technology Assessment of Soil Vapor Extraction and Air Sparging, EPA/600/R-92/173, p. 214 (1992).
- Jackson, J. D. and Zenobia, K., Using Microbial Kinetics in the Bioremediation of Contaminated Soil, *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil* Edited by Wise, D. L., and Trantolo, D. J., *Marcel Dekker, Inc.*, pp. 681-689 (1994).
- Peterson, J. W., Deboer, M. D. and Lake, K. L., A Simulation of Toluene Cleanup by Air Sparging of Water Saturated Sands, *Journal of Hazardous Materials*, **72**, pp. 167-178 (2000).
- Peterson, J. W., Lepczyk, P. A. and Lake, K. L., Effect of Sediment Size on Area of Influence During Groundwater Remediation by Air Sparging : A Laboratory Approach, *Environmental Geology*, **38**, pp. 1-6 (1999).
- Zhou, G. W., Ong, W. Z. and Chen, T., Development of a Fungus-specific PCR Assay for Detecting Low-level Fungi in an Indoor Environment, *Molecular and Cellular Probes*, **14**(6), pp. 339-348 (2000).