

토양 내 TPH(Total Petroleum Hydrocarbons)의 생물학적 분해 연구

김지영 · 이상섭*

경기대학교 자연과학대학 생명과학과 미생물학 연구실

Received: May 11, 2011 / Revised: June 10, 2011 / Accepted: June 13, 2011

In-situ* Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons-Contaminated Soil by *Pseudomonas* Species. Kim, Jee-young and Sang Seob Lee. Department of Life Science, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – We previously showed that five strains belonging to *Pseudomonas* could remove TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) efficiently when they are applied to TPH-contaminated soil. We optimized the bioremediation condition using different hydrocarbons and nutrients conditions to improve the efficiency. We setup lab-scale column bioreactor to monitor TPH and diesel removal efficiency. When we applied five *Pseudomonas* sp. mixtures to 25,000 mg·kg⁻¹ TPH-contaminated soil (diesel 10,000 mg·kg⁻¹, kerosene 10,000 mg·kg⁻¹, gasoline 5,000 mg·kg⁻¹) with the optimum condition, 76.3% of TPH removal efficiency was shown for 25 days. Meanwhile, in the application of five *Pseudomonas* sp. mixtures to 20,000 mg·kg⁻¹ diesel-contaminated soil with the optimum condition, 99.2% of diesel removal efficiency was shown for 40 days. In the application to lab-scale bioreactor with five high efficiency bacteria, 88.5% of TPH removal efficiency was shown for 45 days. Based on the results from this study, we confirmed that this mixed *Pseudomonas* sp. consortium might improve the bioremediation of TPH in contaminated soil, the efficacy can be controlled by improving the nutrients. We also confirmed that the nutrients and oxygen for biodegradation of TPH could contribute on the management and control of applications of these strains for the study of bioremediation of TPH-contaminated soil.

Key words: Bioremediation, *Pseudomonas* sp., total petroleum hydrocarbons (TPH), bioventing

서 론

총 석유 계 탄화 수소 류(total petroleum hydrocarbons)는 원유의 주요 성분으로 84% 이상이 각기 용도에 따라 분류되어 1차적인 에너지원으로 널리 쓰임에 따라 공단지역이나 가정난방 및 주유소 지하 유류저장창고(underground storage tank; UST)의 배관시설의 누출에 의한 토양과 지하수의 유류오염이 심각한 환경 및 사회문제로 대두되었다[5]. 미국의 경우, RCRA(Resource Conservation and Recovery Act)에 의해 165,000곳 이상의 UST 인근 유류 오염 지역이 보고되었으며, 앞으로도 100,000 곳 이상이 복구가 요구되고 있다[14]. 국내의 경우 2008년 환경통계연감에 따르면, 오염우려지역으로 지정된 2,383곳 중 공장지역으로 지정된 611 곳 및 원광석 고철 야적지 101 곳에서 최대 9,620.75 mg/kg의 TPH가 오염된 사례에 대한 보고가 있었으며, 그 외 특정오염 유발시설로 지정된 주유소 부근의 토양에도 상당한

오염 사례가 보고되고 있다.

토양 유류오염의 정화방법으로 다양한 방법이 적용되고 있는 가운데 생물학적 처리 방법은 물리화학적 방법보다 더 효율적이며, 경제적이다. 왜냐하면 유류오염은 복합적이며 생물학적 처리방법이 다양하게 적용방법을 변형시킬 수 있는 장점이 있다고 알려져 있기 때문이다[1, 2].

생물학적 처리 방법에는 land farming, composting, bioreactor, biopile, vacuum heap biostimulation 등의 ex-situ 방법과 bioaugmentation, bioventing, bioslurping, biosparge, biopolymer shields 등의 *in-situ* 방법이 적용되고 있다. 이 중 bioventing 방법에 의한 유류 오염 처리 방법은 토양에 존재하는 토착 호기성 미생물에 산소를 공급 함으로써 그 분해효과를 증진시키는 방법으로 현재 *in-situ* bioremediation 분야에서 각광받고 있는 기술 중 하나이다 [9]. 특히, bioventing은 최소한의 공기를 공급하고 미생물의 분해 활성을 위하여 영양 물질 및 수분을 같이 공급한다. 그래서, 선택적으로 오염물질을 고효율로 분해 하는 균주를 선정과 적용, 그에 따른 미생물 성장에 영향을 미치는 환경조건, 즉 접촉 초기 농도 및 온도, 수분, 전자 수용체, pH 및 영양염류의 농도 등의 환경 인자 도출이 필수적이다[12]. 또

*Corresponding author

Tel: +82-31-249-9642, Fax: +82-31-251-4721

E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

한 현재까지 bioventing의 연구는 단일 균주를 이용한 연구가 대부분이나[4, 6, 10, 11, 15], 단일 미생물 적용으로는 탄소 화합물 뿐 아니라 알칸 화합물과 방향족 화합물의 복합 오염의 효율적인 제어의 문제점이 야기된다. 왜냐하면 각 기질에 대한 생 분해 경로가 서로 다르기 때문이다. 그러므로 각 기질에 대한 고효율 균주들을 혼합해서 적용할 필요가 있다. 일례로 Facundo 등의 연구진[3]과 Namkoong 연구진[13]은 혼합균주를 이용하여 경유의 생물학적 처리 연구를 보고하였다. 그러나 현재까지 연구된 토양 복원 기술은 유류 복합 오염 지역의 생물학적 복원을 위한 구체적인 조건에 대한 공학적 인자가 제시되지 못한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 유류 오염 토양의 효율적 처리 기술 개발을 위하여 TPH, BTEX 각각의 고효율 혼합 균주를 적용하여 TPH의 bioremediation 연구를 하였으며, TPH 오염 토양 내 유류 분해 및 제어 효율을 분석하여 최적 효율을 위한 운전 인자를 확보하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 연구실에서 스크린를 통해 확보된 고효율 균주 *Pseudomonas putida* KD19(95.6%의 diesel 제거 효율) [16], *Pseudomonas* sp. K14(78.4%의 kerosene 제거 효율) [7], *Pseudomonas putida* BJ10(99.9%의 benzene, toluene, xylene 제거효율), *Pseudomonas putida* E41(97.9%의 ethyl benzene, xylene 제거효율)[8]을 사용하였으며, 본 연구를 통해 확보된 59.6%의 gasoline 제거 효율을 보인 *Pseudomonas putida* G8도 사용하였다. 사용된 배지는 MSM(Minimal salt medium: KH_2PO_4 2.0 g·L⁻¹, K_2HPO_4 2.0 g·L⁻¹, KNO_3 1.0 g·L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g·L⁻¹, NaCl 0.4 g·L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g·L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g·L⁻¹, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g·L⁻¹, trace element solution SL-6 1.0 mL, vitamin solution 1.0 mL, distilled water 1.0 L, pH 7.0)로 조성하였다. 배양 조건은 28±2°C, 150 rpm으로 45 일간 진탕 배양하였다. 고형 배지 제조 시, 유류에 의한 agar 무름 현상을 방지하기 위하여 MSM에 1.8%의 agar powder를 사용하였으며, autoclave 후에 diesel, kerosene, gasoline을 1,000 mg·L⁻¹의 농도로 각 배지에 여과 멸균 후 첨가하여 제작하였다. 분리된 모든 균주는 28±2°C에서 호기 배양하였다.

토양 및 유류 조건

본 실험에 사용된 토양은 일반적인 토양분석법에 의해 분

석하였으며 4.87%의 유기물과 공기의 통기율을 최대로 하면서 토양 내 미생물의 활성에 저해 되지 않을 정도로 맞추기 위하여 15.5%의 수분 함량으로 Cr 34.7 mg·kg⁻¹, Mn 307.4 mg·kg⁻¹ 등으로 구성되어 있는 사질 양토(Sandy loam)를 사용하였다(Table 1). 모든 토양 실험은 28±2°C의 조건에서 수행되었으며, 대량 컬럼 실험의 경우 실온(20±5°C)에서 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 TPH는 시판되는 diesel, kerosene, gasoline를 1:1:0.5(v:v:v)의 비율로 혼합하여 25,000 mg·kg⁻¹으로 토양에 적용하여 실험하였다. Diesel의 단일실험 시 20,000 mg·kg⁻¹의 초기 농도로 실험하였다.

컬럼을 이용한 유류 오염된 토양의 생물학적 분해를 위한 환경인자 도출

환경 인자로서 균주의 초기 농도, 산소 공급 및 영양 조건을 선정하고 각 인자를 조절하여 고효율 균주의 생물학적 분해와의 영향을 연구하였다. 각 조건 선정을 위해 컬럼을 사용하여 연구하였으며, 컬럼 내 공기주입에 따른 토양 내 수분을 보충하기 위하여 펌프 전단에 수분 공급조를 설치하였다. 컬럼 상부는 휘발을 막기 위하여 포트를 제외한 부분은 밀봉하였으며, 휘발성 유기화합물의 휘발 정도를 알기 위해 상부 포트에서 포집백을 사용하여 기상 시료를 포집한 후 GC(HP 6890, USA)로 분석하였다. 공기를 주입하는 컬럼 실험의 경우 연속주입식으로 공기를 주입하여 주었으며, 최소량의 공기(5일 간격으로 3 ml/min) 공급으로 미생물의 유류 제거 속도를 도모하고자 하였다.

우선 고효율 제거 균주의 초기 농도에 따른 영향을 알아보기 위하여 높이 1.0 m의 아크릴 소재 컬럼에 토양을 채우고 TPH 15,000 mg·kg⁻¹로 오염시킨 후 고효율 혼합 균주를 각 기질이 첨가된 MSM배지에서 2일간 호기 배양하여 원심분리 후 증류수로 2회 washing 후 적용하였다. 적용 균주 농도는 각 토양 당 0.1 g·kg⁻¹, 0.5 g·kg⁻¹, 1.0 g·kg⁻¹, 그리고 2.0 g·kg⁻¹(cell wet weight/soil weight)로 다양하게 첨가하여 10일간 TPH제거효율을 측정하였다. 균이 접종된 모든 토양에는 MSM 배지에 0.03% activator I(soybean 및 corn 식품 가공후 폐기물)을 첨가하여 TPH 제거 효율을 분석하였다. 균주 농도 영향 실험에 따른 최적 적용 균주 농도가 선정된 후, 이후의 실험에서 고효율 균주의 접종량은 동일 비율로 혼합하여 최종 1.0 g·kg⁻¹(cell wet weight/soil weight)로 적용하였다.

영양염류 첨가에 따른 제거 패턴 분석은 MSM과 activator I을 각 0.03%(v/w)로 첨가하여 실험하였다. 영양염류의 생물

Table 1. Chemical composition of the soil used in the study.

Constituent	Cr, mg·kg ⁻¹	Cu, mg·kg ⁻¹	Cd, mg·kg ⁻¹	Pb, mg·kg ⁻¹	Zn, mg·kg ⁻¹	Mn, mg·kg ⁻¹	MgO, mg·kg ⁻¹	CaO, %	K ₂ O, %	Fe ₂ O ₃ , %	P ₂ O ₅ , %	Organic matter, %	Moisture %water	pH
Content	34.7	15.6	0.0	8.7	62.7	307.4	0.96	0.24	1.54	5.76	0.12	4.87	15.5	7.5

학적 분해 영향을 위한 실험을 위해 4가지 조건으로 준비하였다. TPH와 diesel의 제거 효율에 대한 실험을 실시하였다. TPH 처리 연구는 TPH 25,000 mg·kg⁻¹(diesel 10,000 mg·kg⁻¹, kerosene 10,000 mg·kg⁻¹, gasoline 5,000 mg·kg⁻¹)으로 오염 시켰으며 5개의 고효율 제거 균주를 혼합하여 최종 농도 1.0 g·kg⁻¹(cell wet weight/soil weight)로 맞추어 토양에 적용하였다. Diesel 처리 연구는 경유 20,000 mg·kg⁻¹로 오염시킨 후, diesel 분해 고효율 균주 *P. putida* KD19을 균주 농도 1.0 g·kg⁻¹(cell wet weight/soil weight)로 토양과 혼합하여 적용하였다. 기질만을 첨가한 대조군(Case 1), 기질과 고효율 미생물을 접종한 경우(Case 2), Case 2에 무기 염류로서 MSM을 첨가한 경우(Case 3), Case 2에 MSM 및 활성제로서 activator I을 첨가한 경우(Case 4)로 나누어 실험하였다.

산소 공급에 따른 유류 오염된 토양의 생물학적 분해 연구를 위해 토양 높이가 다른 컬럼 3종을 사용하였다. 컬럼 1은 내경 0.10 m, 길이 0.60 m로 제작하였으며 0, 0.25, 0.50 m의 높이에 샘플링 포트를 두었으며 컬럼 2, 3은 내경 0.22 m, 높이 1.00 m로 제작하였으며 샘플링 포트는 0, 0.45, 0.90 m에 위치하여 제작하여 사용되었다. 컬럼 2, 3에 공기를 공급하는 air stone을 설치하여 컬럼 2에는 3.0 mL·min⁻¹, 컬럼 3에는 7.4 mL·min⁻¹로 공기를 일정하게 공급시켰다(Fig. 1).

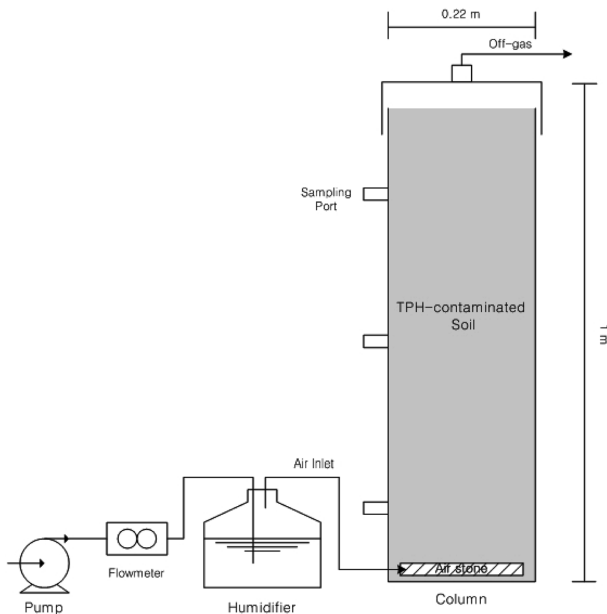


Fig. 1. The Apparatus of Column 3 for TPH biodegradation (50 kg volume). The column 3 was made of acrylic plastic material which was 1.0 m in height, 0.22 m in diameter, 0.10 m in width, and three sampling ports which were located in different depth. Air stone and humidifier were set up for aerobic and moisture conditions.

Lab-scale reactor에서의 유류 고효율 분해 균주를 이용한 유류 오염된 토양의 생물학적 분해

TPH로 오염된 토양의 생물학적 분해의 현장 연구를 위해 lab-scale의 토양 반응기를 제작하여 연구하였다. 토양 반응기는 아크릴 소재의 직사각형(L 0.20 m×W 0.30 m×H 0.15 m)으로 50 kg의 TPH오염 토양(평균 TPH 7,000 mg·kg⁻¹)에 고효율 제거 혼합 균주를 적용한 경우와 적용하지 않은 경우로 나누어 TPH 복합 오염 제거 실험을 실시하였다.

시료의 전처리 및 분석 방법

토양 내 TPH의 분석을 위하여 추출용매 methylene chloride를 1:2 비율로 사용하여 28°C에서 150 rpm로 30 min간 shaking하여 추출하였다. 추출된 용매 5 mL을 얻은 후, 2.0 g의 무수황산나트륨을 이용하여 수분을 제거하고 상등액을 0.2 μm pore size syringe filter로 거른 후 2 mL sample vial에 담아 ACME 6000 Auto sampler를 장착한 gas chromatography(ACME 6000, younglin instrument, Korea)를 이용하여 분석하였으며, flame ionization detector (FID)와 HP-5 column(30 m×0.32 mm×1 μm)을 사용하였다. GC의 주입구와 검출기 온도는 각각 250°C, 290°C를 유지하였으며, 오븐의 온도는 초기 40°C에서 1분간 대기 후 분당 15°C씩 290°C까지 승온시켰으며, 290°C에서 5분간 대기하였다. 분석물질의 standard는 Sigma-Aldrich사의 제품을 희석하여 사용하였다. 고효율 균주를 접종한 토양 내 미생물 생존율은 PBS에 탈착을 시킨 후 10-fold serial dilution 후 생균수를 계수하였다.

결과 및 고찰

TPH 생물학적 분해의 최적 균주 접종 농도 선정

전반적으로 균 초기 농도가 높을수록, 제거 효율이 높았으며 반감기 또한 짧게 나타났다. 균 초기 접종 농도 2.0 g·kg⁻¹ 실험군에서는 10일간 깊이 0.0 m에서 81.5%, 0.45 m에서 78.6%, 0.90 m에서 64.1%의 제거율로 평균 74.7%로 가장 높은 효율을 나타내었다. 그러나 1.0 g·kg⁻¹ 실험군에서도 깊이 0.0 m에서 69.5%, 0.45 m에서 51.1%, 0.90 m에서 44.0%의 제거효율을 보였다. 균 접종량에 따라 제거 속도 상승은 비례하여 증가하였으며, 산소가 부족한 하층의 경우 격차가 크게 나타났다(Table 2).

이 결과로 보아 현장 적용 시 접종량을 늘일수록 제거속도가 빨라지며, 특히 산소량이 적은 하부의 경우 그 효과를 더욱 크게 할 수 있으나, 경제적으로 비효율적이며, 2차 오염 가능성이 있기 때문에 최적 접종 농도를 1.0 g·kg⁻¹로 선정하였다. 일반적으로, 오염지역의 미생물 개체 수는 정상적인 지역의 비옥한 토양과 비교하여 약 10³-10⁵ cell·g⁻¹ dry soil 정도 낮다. In-situ bioremediation에서 미생물 주입 시,

Table 2. TPH biodegradation by applying *Pseudomonas* mixture with different concentration for 10 days.

Applied bacteria conc. (cell wet weight/soil weight)	Depth (m)	Rem. (%)	K (day ⁻¹)	R ²	Half-Life (day)
0.1 g · kg ⁻¹	0	46.8	0.063	0.901	11.0
	0.45	46.1	0.062	0.945	11.2
	0.90	35.7	0.044	0.976	15.7
0.5 g · kg ⁻¹	0	67.2	0.112	0.927	6.2
	0.45	66.2	0.109	0.998	6.4
	0.90	43.2	0.057	0.854	12.2
1.0 g · kg ⁻¹	0	69.5	0.119	0.937	5.8
	0.45	51.1	0.071	0.962	9.7
	0.90	44.0	0.058	0.761	11.9
2.0 g · kg ⁻¹	0	81.5	0.169	0.998	4.1
	0.45	78.6	0.154	0.991	4.5
	0.90	64.1	0.103	0.998	6.8

토착 미생물의 농도 및 생장에 영향을 줄 수 있으며 분해 양상과 잔류 물질 등의 2차 적인 오염원이 생길 수 있다[12]. 그러므로, 적절한 미생물의 주입은 bioremediation 적용의 성공에 중요한 인자가 된다.

토양내 영양염류의 따른 TPH 생물학적 처리

영양염류의 첨가가 TPH 분해에 어떠한 영향을 미치는지 알기 위하여 TPH 25,000 mg · kg⁻¹(diesel 10,000 mg · kg⁻¹, kerosene 10,000 mg · kg⁻¹, gasoline 5,000 mg · kg⁻¹)으로 토양을 오염 시켜 25일 동안 실험한 결과, MSM 및 activator I을 주입한 실험군(Case 4)에서 가장 높은 제거 효율(76.3%) 및 제거속도상수(K=0.711)를 나타냈다(Fig. 2, Table 3). MSM을 주입한 실험군(Case 3)에서는 59.2%의 제거효율을 나타내어 diesel 제거 실험 보다 다소 낮은 값을 나타냈다. 균주만 주입해 준 실험군(Case 2)에서 또한 31.1%의 제거효율을 보였으며, MSM을 주입한 군보다 3배 정도 낮은 제거 속도를 나타냈다. 대조군(Case 1)에서는 25일간 24.9%가 제거되었다.

Diesel의 제거 실험의 경우, activator I이 첨가된 토양 1kg에 diesel 20,000 mg · kg⁻¹로 오염시킨 후, diesel 분해 고효율 균주 *P. putida* KD19를 1.0 g · kg⁻¹(cell wet weight/soil weight)으로 혼합하여 기간별 제거능을 확인한 결과, 40일 후 무기염류(MSM) 및 활성제를 첨가한 실험군(Case 4)에서 99.2%의 diesel을 제거 하여 타 군에 비하여 가장 높은 수치를 나타내었다(Fig. 3). 제거 속도 상수(K) 또한 대조군(Case 1)에 비하여 8.4배 높은 값을 보여 가장 빠르게 제거 하는 것을 보였다. 무기염류(MSM)만을 첨가한 실험군(Case 3)에서는 제거율 98.4%, 제거속도 상수 0.104로 비교적 높은 제거율을 보였다(Table 4). 대조군(Case 1)의 경우,

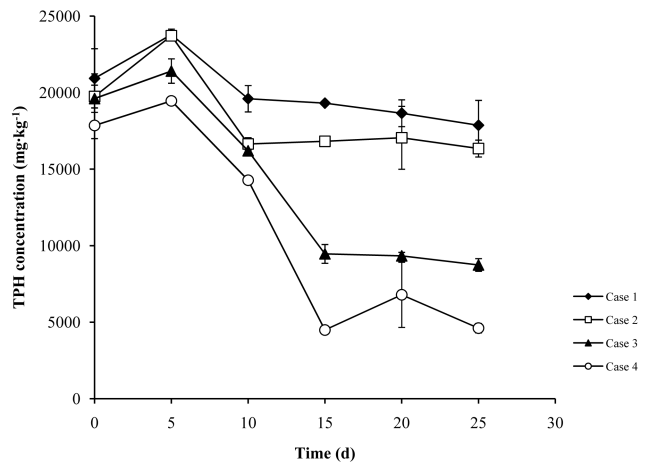


Fig. 2. Effects of nutrients on TPH biodegradation by *Pseudomonas* sp. mixture in the column experiment. 1.0 g (wet weight) of *Pseudomonas* sp. mixture was applied in 1 kg of soil contaminated 25,000 mg · kg⁻¹ of TPH with the following cases. Case 1 (◆), TPH added soil; Case 2 (□), TPH added and seeding microorganism in soil; Case 3 (▲), TPH, MSM, and seeding microorganism in soil; Case 4 (○), TPH, MSM, 0.03% activator I, and seeding microorganism in soil. In the cases of application of nutrients, 59.2% of removal efficiency of TPH in case 3 was shown for 25 days, and 76.3% of removal efficiency of TPH in case 4 was shown for 25 days.

Table 3. Kinetic parameters of TPH biodegradation experiments by *Pseudomonas* mixture for 25 days.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Rem. (%)	24.9	31.1	59.2	76.3
K (day ⁻¹)	0.008	0.010	0.037	0.065
R ²	0.755	0.562	0.871	0.771
Half-life (day)	83.6	71.2	18.6	10.7

K: first order degradation rate constant, R: Coefficient of determination. *Case 1, diesel added only soil; Case 2, diesel added and seeding microorganism in soil; Case 3, diesel, MSM, and seeding microorganism in soil; Case 4, diesel, MSM, 0.03% activator I, and seeding microorganism in soil.

제거되는 양이 42.6%로 나타났는데 이는 휘발된 양과 토양 내 본래 존재하는 미생물에 의해 제거된 것으로 사료된다.

결과적으로, 무기성분(MSM)은 diesel 및 TPH의 생물학적 분해를 및 속도를 효과적으로 높이는 것으로 나타났으며 활성제 activator I이 그 효과를 더욱 증진하는 것으로 나타났다. 이는 활성제에 첨가되어 있는 질소, 인 성분 이외의 무기물질 및 기타 유기산 성분이 미생물의 활성을 높이는 영향을 미치기 때문으로 사료된다. 또한, diesel 및 TPH의 동일한 제거 기간 각기 제거 속도는 diesel의 분해 효율이 TPH 분해 효율보다 다소 높게 나타났으며, 이는 TPH에 존재하는 n-alkane 이외의 방향족 탄화수소류에 의한 영향으로 보인다.

Riser-Roberts[12]에 따르면 토양 내 무기질 및 영양 염류

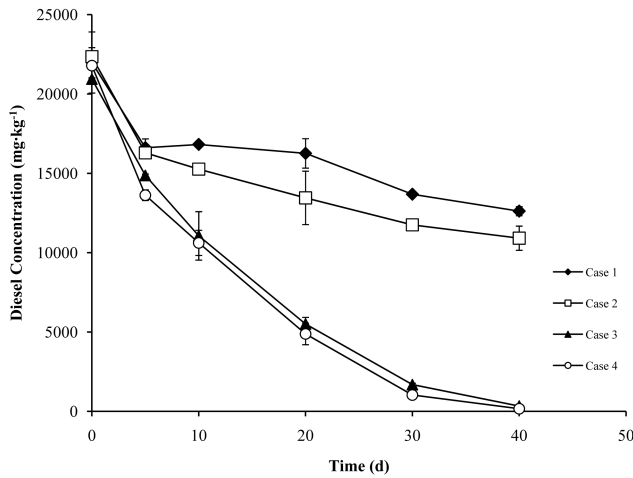


Fig. 3. Effects of nutrients on diesel biodegradation by *Pseudomonas putida* KDi 19 in the column experiment. 1.0 g (wet weight) of *Pseudomonas putida* KDi 19 was applied in 1kg of soil contaminated 20,000 mg·kg⁻¹ of diesel with the following cases. Case 1 (◆), diesel added soil; Case 2 (□), diesel added and seeding microorganism in soil; Case 3 (▲), diesel, MSM, and seeding microorganism in soil; Case 4 (○), diesel, MSM, 0.03% activator I, and seeding microorganism in soil. In the cases of application of nutrients, 98.4% of removal efficiency of diesel in case 3 was shown for 40 days, and 99.2% of removal efficiency of diesel in case 4 was shown for 40 days.

Table 4. Kinetic parameters of diesel biodegradation experiments by *P. putida* KDi19 for 40 days.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Rem. (%)	42.6	51.2	98.4	99.2
K(day ⁻¹)	0.014	0.018	0.104	0.122
R ²	0.846	0.874	0.962	0.958
Half-life (day)	49.9	38.7	6.7	5.7

K: first order degradation rate constant, R: Coefficient of determination. *Case 1, diesel added only soil; Case 2, diesel added and seeding microorganism in soil; Case 3, diesel, MSM, and seeding microorganism in soil; Case 4, diesel, MSM, 0.03% activator I, and seeding microorganism in soil.

는 TPH의 분해에 관련된 미생물에 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 토양 내 탄소, 질소, 인의 비(C:N:P)에 따라 미생물의 오염물질 제거 속도에 영향을 미친다. 일반적으로 CNP 비가 300:15:1 일 때, 미생물의 활성이 높으므로 알려져 있으나 일반적인 토양 환경에서는 질소, 인의 비율이 매우 낮게 나타나며, 특히 대다수의 경우 인의 농도가 제한인자로 작용한다. 이를 보완하기 위한 무기 영양염류의 주입(질소, 인 및 무기물질)이 다양한 방법으로 이루어지고 있다. 그러나 화학물질을 직접적으로 첨가하는 방법은 적용방법이 어렵고 비용이 고가인 단점이 있기 때문에, 산업적으로 적용 가능한 미생물 활성제의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

산소 공급에 따른 TPH 생물학적 처리

일반적으로 토양 내 산소의 농도가 높을수록, 유류의 생분해 속도는 빨라진다[12]. 또한 자연상태에서 유류가 누출되었을 시, 분해에 관여하는 미생물은 대부분이 호기성 미생물에 의한 것이라 알려졌다. 토양 내 산소의 농도는 산소를 전자 수용체로 사용하는 토양 미생물에 큰 영향을 미치며, 토양의 깊이에 따라 산소의 농도는 급격하게 달라지며 이에 따른 미생물의 활성 역시 급격히 떨어지게 된다. 이러한 방해효과에 대한 구체적 인자를 제시하기 위하여, 높이 0.50 m의 아크릴 소재 컬럼에 TPH 10,000 mg·kg⁻¹으로 인공 오염시킨 후 30일간 제거 효율을 측정 한 결과 깊이 0, 0.25, 0.50 m에서 영양조건을 달리한 4종의 실험군 모두 상부 즉 깊이 0.0 m에서 제거율이 가장 높은 것으로 나타났다. 특히 집중 균 및 영양염류를 첨가해 준 실험군 Case 4에서 깊이 0.0 m에서 99.2%, 0.45 m에서 78.5%, 0.90 m에서 50.3 m의 TPH제거효율을 보여 이러한 차이가 두드러지게 나타났다(Table 5).

그러나 최적 균주 선정 실험시 사용한 깊이 1.0 m의 컬럼 실험의 경우, 평균적으로 0.50 m의 컬럼 실험보다 평균 약 28%정도 낮은 제거속도를 나타내며 반감기 또한 길게 나타났다(Table 2).

그러므로 집중된 미생물의 유류물질 제거 시 토양 깊이 별 산소 공급량이 제거 속도에 매우 큰 영향을 미치는 것을 나타낸다. 이러한 미생물을 이용한 현장적용 시 토양 오염 깊이에 따른 제거 기간을 예측하며, 토양 내 TPH 생물학적 분해에 따른 부족 산소를 적절히 공급하여 줌으로써 그 제거 효율을 높이는 방안을 마련해야 할 것이다.

Table 5. TPH biodegradation by *Pseudomonas* mixture for 30 days in various oxygen conditions of different depth.

	Depth (m)	Removal efficiency (%)	K (day ⁻¹)	R ²	Half-life (days)
Case 1	0	82.5	0.058	0.980	11.9
	0.25	61.8	0.032	0.728	21.6
	0.50	63.4	0.034	0.969	20.7
Case 2	0	88.6	0.072	0.768	9.6
	0.25	69.3	0.039	0.823	17.6
	0.50	52.6	0.025	0.683	27.9
Case 3	0	80.4	0.054	0.920	12.7
	0.25	62.4	0.033	0.840	21.3
	0.50	61.0	0.031	0.835	22.1
Case 4	0	99.2	0.161	0.861	4.3
	0.25	78.5	0.051	0.912	13.5
	0.50	50.3	0.023	0.887	29.7

*Case 1, TPH added only soil; Case 2, TPH added and seeding microorganism in soil; Case 3, TPH, MSM, and seeding microorganism in soil; Case 4, TPH, MSM, 0.03% activator I, and seeding microorganism in soil.

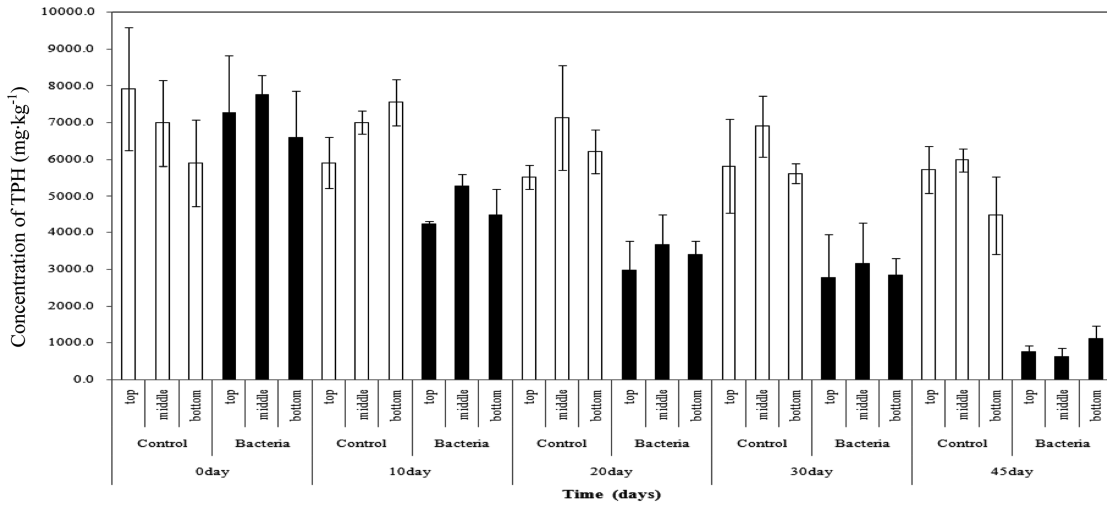


Fig. 4. The results of bioremediation of TPH-contaminated soil with five *Pseudomonas* sp. mixture at the different depths of soil in the lab-scale reactor. The bioremediation of TPH-contaminated soil in lab-scale reactor (L 0.20 m × W 0.30 m × H 0.15 m) by using five *Pseudomonas* sp. mixture showed the 88.5% removal efficiency for 45 days. Regarding to removal efficiency in different depths of soil, higher removal efficiency of TPH was shown in the shallow depth of soil due to oxygen requirement.

Table 6. Kinetic parameter of TPH biodegradation of *Pseudomonas* mixture in lab-scale reactor which was run for 45 days.

	Rem. (%)	K (day ⁻¹)	R ²	Half-life (days)	T ₅₀₀ (days)
Soil bacteria	22.3	0.005	0.960	123.9	526.0
Soil bacteria + TPH degrading bacteria	88.5	0.044	0.924	14.4	60.7

Lab scale reactor를 이용한 최적 조건에서 TPH 오염 토양의 고효율 균주 적용한 bioremediation test

최적 조건의 산소 및 영양물질을 첨가한 상태에서의 5종의 유류 분해 고효율 혼합 균주(KDi19, K14, G8, BJ10, E41) 제거 효율을 알아보기 위하여 50 kg 용량의 TPH 오염 토양 컬럼을 이용한 lab reactor 실험을 실시한 결과 토착 미생물만이 존재하는 컬럼의 경우 45일 운전 기간 동안 6,937.9 mg·kg⁻¹의 TPH를 5,394.0 mg·kg⁻¹까지 22.3% 제거하였으며, 유류 분해 고효율 균주 적용 토양의 경우 동일한 기간에 7,209.9 mg·kg⁻¹을 825.6 mg·kg⁻¹까지 88.5% 제거하여 식중 균주가 매우 높은 유류 제거 효율을 보였다 (Fig. 4, Table 6). 제거 속도 또한 미생물 식중 시 8배 높게 나타났다. 현재 TPH의 국내 토양 오염 우려 기준(가 지역)은 500 mg·kg⁻¹으로 이 농도까지 예상 복원기간은 균을 접종하지 않았을 경우 526.0일, TPH 제어 균 접종 시 60.7일이 소요되어 균주 적용 시 매우 효율적으로 복원 기간을 단축할 것으로 보인다. 토양 깊이 별 제거율은 평균적으로 상부가 높은 제거율을 보였다. 기간별 제거 속도는 초기 기간 동안 하부보다 상부에서 더 높은 제거 속도를 보이나 제거 단계가 진행될수록 유사한 제거 속도를 나타내었다.

유류 제거 미생물의 식중은 TPH 오염(diesel, kerosene, gasoline 혼합액)과 동시에 진행하였다. 대조군의 및 실험군 초기 토양의 미생물 수는 1.2×10⁹ CFU·kg⁻¹으로 비옥한 토양의 조건을 보여주었으나, TPH의 인공오염 직후 급격히 떨

어져 1.5×10⁸ CFU·kg⁻¹으로 나타났다. 실험군 토양에 영양 염류 및 생균수로 평균 약 1.0×10⁶ CFU·kg⁻¹(1.0 g·kg⁻¹)이 접종되었다(Table 7). 50일 배양 후 미생물 생균수는 다음 표와 같이 나타났으며, 주입한 미생물이 분해 후에도 대조군에 비하여 높은 생존율을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 두 군 모두에서 lab reactor의 토양의 깊이가 깊어질수록 생균수는 낮아졌다. 이는 TPH 인공 오염 시 토양 내 호기성 미생물의 작용에 의하여 공기와 접촉이 원활한 상부의 토양에서는 미생물의 생장이 활발히 일어났으며, 산소농도가 낮아지는 토양 하부에서는 TPH 분해능이 뛰어난 호기성 미생물의 생장이 저해되어 미생물의 사멸과 동시에 제거효율 또한 낮아짐을 볼 수 있다. 유류 분해 미생물을 식중한 실험군에서 또한 마찬가지로의 결과를 볼 수 있었으며, 미생물의 생장 또한 상부에서 활발히 나타남을 볼 수 있었다.

이를 보아 토양 복원 시, 상부 층은 단기간 내 높은 제거 효율을 나타내며, 하부는 그 보다 장기간의 복원 기간이 필요할 것으로 사료된다. 또한 lab reactor 내 호기성 TPH 분해를 촉진하기 위하여 공기를 일정하게 주입하여 주었다. 높은 공기압으로 주입시, 토양 자체의 수분 증발에 의한 미생물의 활성 저해효과가 나타날 수 있으며, 유류 내 휘발성 물질의 휘발에 의한 2차적 대기오염을 일으킬 수 있다. Lab reactor에 적용된 토양 1 kg당 공기 공급은 0.15 mL·min⁻¹을 연속 주입 함으로서 미생물의 활성은 높이면서도 높은 제거율을 보일 수 있도록 계상되었다.

Table 7. Cell density of bacteria of lab-scale reactor in different depth after 50 days.

Depth (m)	Soil bacteria (CFU · kg ⁻¹)	Soil bacteria + TPH degrading bacteria (CFU · kg ⁻¹)
0.05	7.7×10 ⁷	3.2×10 ⁹
0.50	7.5×10 ⁷	1.5×10 ⁹
1.00	7.2×10 ⁷	2.8×10 ⁸

생물학적 처리 기술은 다양한 환경인자에 의하여 그 효율성이 매우 차이가 크게 나타난다. 특히 주요 관여하는 미생물의 호기적 제거에는 산소 농도 및 영양인자, 온도, pH 등이 큰 영향을 미친다. 또한 실험실 환경과 달리 현장에 적용시, 생물학적 분해에 영향을 주는 인자는 기하급수적으로 늘어난다. 이에 따라 영향인자의 종류나 그 효과, 활성제 및 생물 제거가 개발되고 있으나, 구체적인 농도 및 실험적 증명자료가 부족한 실정이다. 그러므로 유류로 오염된 토양의 효율적인 생물학적 복원을 위하여 현장에 필요한, 일률적인 조건의 적용이 아닌 다양한 인자를 적용함으로써 그 효율을 높이고, 다양한 조건을 보완할 수 있는 물리적, 화학적 기법의 지원이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구실에서 확보한 diesel 분해 고효율 균주 *Pseudomonas putida* KDi 19, kerosene 분해 고효율 균주 *P. aeruginosa* K14, gasoline 분해 고효율 균주 *P. putida* G8, BTEX 분해 고효율 균주 *P. putida* BJ10, *P. putida* E41의 5개의 고효율 균주를 컬럼 및 반응기에 적용하여 TPH의 생물학적 분해 실험에 적용하였다. 영양염류 및 산소 농도, 균 농도 등 최적의 환경인자 도출을 통해 최적의 생물학적 처리 효율을 TPH의 경우, MSM 및 activator I을 주입하여 25 일 동안 76.3%의 제거 효율과 제거속도상수 K=0.711를 나타냈으며, diesel의 경우 40일 동안 99.2%의 제거 효율을 보였다. 또한, TPH 오염 토양의 lab-scale bioremediation 실험에서 고효율 균주를 적용한 결과 45일 운전 기간 동안 7,209.9 mg·kg⁻¹을 825.6 mg·kg⁻¹까지 88.5% 제거하였다.

본 연구에서 도출된 TPH로 오염된 토양의 bioremediation을 위한 고효율 균주 확보와 최적의 환경 인자 도출은 현재 부족한 생물학적 처리 연구와 물리적 화학적 처리의 문제를 해소하기 위한 기초적 실험 자료로서 기여할 것으로 사료된다.

Acknowledgment

The authors would like to thank to the Kyonggi University, Financial grants were given by the Kyonggi University (inner project 2009-005).

REFERENCES

1. Atlas, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **52**: 149-156.
2. Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* **12**: 155-172.
3. Facundo, J. M., Vanessa, H. R., and L. M. A. Teresa. 2000. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Poll.* **128**: 313-320.
4. Gallego, J. L. R., J. Loreda, J. F. Lamas, F. Vazquez, and J. Sanchez. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* **12**: 325-35.
5. Greekdrink, M. J., M. C. M. van Loosdrecht, and K. Ch. A. M. Luyben. 1996. Biodegradability of diesel oil. *Biodegradation* **7**: 73-81
6. Kanaly, R. A. and H. G. Hur. 2006. Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH. *Chemosphere* **63**: 202-211.
7. Kim, J.-Y. and S.-S. Lee. 2008. Biodegradation of Kerosene by *Pseudomonas aeruginosa* K14. *Kor. J. Microbiol.* **44**: 159-163.
8. Kim, L.-H. and S.-S. Lee. 2011. Isolation and characterization of ethyl benzene-degrading *Pseudomonas putida* E41. *J. Microbiol.* (Accepted)
9. Lee, J. Y., Lee, C. H., Lee, K. K., and Choi, S. S. 2001. Evaluation of soil vapor extraction and bioventing for a petroleum contaminated shallow aquifer in Korea. *Soil and Sediment Contamination* **10**: 439-458.
10. Li, Y. Q., H. F. Liu, Z. L. Tian, L. H. Zhu, Y. H. Wu, and H. Q. Tang. 2008. Diesel pollution biodegradation: Synergetic Effect of Mycobacterium and filamentous fungi. *Biomed. Environ. Sci.* **21**: 181-187.
11. Liu, P. W. G., L. M. Whang, M. C. Yang, and S. S. Cheng. 2008. Biodegradation of diesel-contaminated soil: A soil column study. *J. Chin. Inst. Env. Eng.* **39**: 419-428.
12. Riser-Roberts, E. 1998. *Remediation of petroleum contaminated soils: Biological, physical, and chemical process.* CRC press LLC, 2000 coporated Blvd., N.W., Boca Raton, Florida 33431, USA.
13. Namkoong, W., Hwang, E. Y., Park, I. S., and J. Y. Choi. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Env. Poll.*, **119**: 23-31.
14. USEPA. 2007. *National Biennial RCRA Hazardous Waste Report: Based on 2007 Data.*
15. Young, C. C., T. C. Lin, M. S. Yeh, F. T. Shen, and J. S. Chang. 2005. Identification and kinetic characteristics of an indigenous diesel-degrading *Gordonia alkanivorans* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 1409-1414.
16. Yun, M.-W., Jung, J.-H., Chang, S.-W., Kong, S.-H., Lee, J.-Y., Kang, D.-H., and S.-S. Lee. 2005. Biodegradation of diesel with *Pseudomonas* sp. KDi19 in liquid medium. *J. of KSEE.* **27**: 1285-1291.