

## 온도에 따른 원유분해미생물의 생물학적 정화효율 평가

김종성 · 이 인 · 정태양 · 오승택 · 김국진\*

(주) 오이코스

### Evaluation of Bioremediation Efficiency of Crude Oil Degrading Microorganisms Depending on Temperature

Jong-Sung Kim · In Lee · Tae-Yang Jeong · Seung-Taek Oh · Guk-Jin Kim\*

OIKOS Co., Ltd.

#### ABSTRACT

Bioremediation is one of the most effective ways to remediate TPH-contaminated sites. However, under actual field conditions that are not at the optimum temperature, degradation of microorganisms is generally reduced, which is why the efficiency of biodegradation is known to be significantly affected by the soil temperature. Therefore, in this study, the lab-scale experiment was conducted using indigenous crude oil degrading microorganisms isolated from crude oil contaminated site to evaluate the remediation efficiency. Crude oil degrading microorganisms were isolated from crude oil contaminated soil and temperature, which is a significant factor affecting the remediation efficiency of land farming, was adjusted to evaluate the microbial crude oil degrading ability, degradation time, and remediation efficiency. In order to assess the field applicability, the remediation efficiency was evaluated using crude oil contaminated soil (average TPH concentration of 10,000 mg/kg or more) from the OO premises. Followed by the application of microorganisms at 30°C, the bioremediation process reduced its initial TPH concentration of 10,812 mg/kg down to 1,890 mg/kg in 56 days, which was about an 83% remediation efficiency. By analyzing the correlation among the total number of cells, the number of effective cells, and TPH concentration, it was found that the number of effective microorganisms drastically increased during the period from 10 to 20 days while there was a sharp decrease in TPH concentration. Therefore, we confirmed the applicability of land farming with isolated microorganisms consortium to crude oil contaminated site, which is also expected to be applicable to bioremediation of other recalcitrant materials.

**Key words :** Crude oil contamination, TPH, Bioremediation, Land farming, Crude oil degrading microorganisms

#### 1. 서 론

생물학적 복원 기술은 토양환경이 보유하고 있는 자체 복원 능력을 바탕으로 오염물질 분해 미생물의 생육환경을 활성화시켜 처리 대상물질의 분해속도를 증진시킬 목적으로 필요시 추가적인 물리적 처리 및 각종 첨가제 등을 주입하여 처리효율을 제고시키는 기술이다(Yu et al., 2009). Ex-situ 생물학적 복원기술 중 대표적인 기술로써 토양경작과 퇴비화(composting) 기술을 들 수 있으며 오염 현장에서의 처리뿐만 아니라 오염토양을 지속적으로 처리하기 위하여 별도의 처리장을 운영하기도 한다. 토양

경작 기술은 미생물의 성장을 촉진시키기 위해 영양원(N, P source), 수분, pH를 조절하며 산소를 원활히 공급하기 위해 주기적으로 tilling시켜 처리하는 방식으로서, 토양 내에 존재하는 미생물을 이용하는 biostimulation 방식과 특정 오염물질에 대해 분해능이 우수한 미생물을 첨가하여 처리하는 bioaugmentation 방식으로 나눌 수 있다(Chun et al., 2007). 이러한 미생물의 증식에 의한 오염원의 분해에 있어서 C, N, P의 적절한 조합이 매우 중요하다. 토양경작 기술은 처리 비용이 비교적 저렴한 반면, 처리 시간이 길고 분해 속도가 느리며 주변 온도에 민감하기 때문에 사계절의 온도 변화가 현저한 우리나라의 경우 등

\*Corresponding author : gjkim@oikos.co.kr

Received : 2015. 11. 27 Reviewed : 2015. 12. 13 Accepted : 2015. 12. 23

Discussion until : 2016. 4. 30

절기 운전 한계의 단점을 가진다. 따라서 실험실 조건과는 다소 다른 현장의 실제 주변 온도의 영향을 최소화하여 미생물의 활성을 유지시킬 수 있는 기술의 개발이 오염토양의 지속적인 생물학적 처리 시스템 운영을 위하여 절실하다(Ma et al., 1999).

토양경작을 위한 주요 영향인자로는 미생물 농도, pH, 수분함량, 토양온도, 영양분 농도, 토성, 오염물질의 특성 등이 있다(Yu et al., 2009). 특별히 토양의 온도는 미생물의 성장에 가장 큰 영향을 미친다. 토양미생물의 활성은 10°C 이하에서는 활동이 둔화되고 5°C 이하에서는 활동을 멈추게 된다. 또한 45°C 이상에서도 석유계 화합물의 분해에 관여하는 미생물의 경우 활성이 감소한다. 일반적으로 10-45°C의 온도 범위에서 미생물의 활성과 증식 속도는 온도가 10°C 높아짐에 따라 2배 정도 빨라지는 것으로 알려져 있다(EPA, 1994). 따라서 적용 온도가 낮거나 높을 경우는 해당 온도에서 유류분해활성이 상대적으로 뛰어난 미생물의 투입이 필요하게 된다. 지중 또는 굴착 후 토양 정화하는 경우 토양의 온도는 동절기의 경우 동결심도 이내에서는 온도에 의한 미생물의 생장이 저하되어 생물학적 정화는 거의 이루어지지 않으며, 동결심도 이하에서도 중온성 미생물의 성장 제약 온도인 10°C 이하까지 온도가 저하되어 생물학적인 정화의 효율을 기대하기 어렵다. 하절기의 경우라 하더라도 토양의 온도는 지중의 경우 10~15°C 범위에서 온도가 유지되기 때문에 일반적인 중온성 미생물의 경우 분해 활성을 발휘하기가 어렵다. 굴착 후 정화하는 토양경작이나 바이오파일의 경우 동절기 동안에는 별도의 열을 공급하는 장치를 설치하거나 비닐하우스 설비를 설치한다 하더라도 하절기에 비하여 분해 효율은 크게 저하되는 환경이다. 비닐하우스 경작장 내에서 토양경작하는 경우 하절기 동안 하우스 내부의 공기 온도는 40°C 이상을 상회하나 토양의 온도는 25°C 이상 유지되지 않아 중온성 미생물의 최적 온도 조건인 30°C에는 미치지 못하는 조건이다(Kim et al., 2008).

최근 쿠웨이트 정화사업 등에 의해 원유오염토양 처리에 대한 관심이 높아지고 있지만(Gao et al., 2014; Roy et al., 2014) 아직 원유분해미생물을 이용한 토양 정화에 관한 국내 연구는 미진한 상황이다(Choi et al., 2014). 따라서 본 연구에서는 국내 원유로 오염된 실제 현장부지에서 효과적인 정화효율을 확보하기 위하여 bioaugmentation을 통한 미생물의 주입이 생물학적 분해에 미치는 영향을 살펴보고, 이를 바탕으로 토양경작 기술을 적용하여 미생물 활성에 영향을 미치는 주요 인자인 온도에 따른 정화효율을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

본 실험은 온도 조건에 따른 미생물의 분해 특성을 파악하여 미생물 활성에 영향을 미치는 토양온도 차이로 인한 생물학적 복원 기술의 적용 한계를 극복할 수 있는 해결책을 제시하고자 하였다. 원유로 오염된 ○○ 부지 내 오염토양을 이용하였으며, 대상 부지는 토양환경보전법에 따라 “3”지역으로 구분되었다. 구역별로 2,312 mg/kg~43,236 mg/kg의 오염최고농도를 보였으며, 오염심도는 0-4 m로 나타났다. 주 오염 부지를 굴착하여 회색빛으로 변색된 오염토양을 채취하여 시료로 사용하였으며 채취된 시료는 갈색 광구병에 담는 등 토양오염공정시험방법에 따라 보관하여 분석실로 옮겨졌다. 현장 오염토 내의 토착 원유분해미생물을 분리하고, 이를 적용하여 원유분해 미생물의 원유 분해 특성을 살펴보기 위해 2가지 온도 조건(30°C, 15°C)으로 lab-scale의 토양경작 실험을 진행하여 각각의 온도 조건에서 미생물의 원유분해능, 분해시간, 정화효율 등을 분석하였다.

### 2.1. 석유계총탄화수소(TPH) 및 이화학적 분석

오염토양의 석유계총탄화수소 분석은 토양오염공정시험법에 준하여 수행되었으며 토양시료 10 g을 beaker에 넣고 시료가 분말형태로 유지되도록 무수황산나트륨을 적당량 넣어 잘 흔들어 섞어 디클로로메탄 100 mL를 넣은 뒤 초음파추출법을 통하여 추출하였다. 추출 과정을 거친 추출여과용액은 회전증발농축기를 이용하여 2 mL로 농축 후 기체크로마토그래프(7890A Gas Chromatograph, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 농도를 계산하였다.

채취한 습윤토양은 바로 2 M KCl로 침출하여 질소자동분석기(Kjeltec Auto 1035/1038 System, Tecator AB, Sweden)로 암모늄태 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)를 분석하였으며, 유효인산은 Lancaster 법으로, 풍건토 5 g을 Lancaster 추출액 20 mL를 가하여 10분 간 진탕 후, 현탁액을 Whatman No. 2로 여과한 후, 인산 정량을 위하여 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid에 의한 몰리브덴 청법을 이용하여, 30분 간 발색 후 자외-가시광선분광광도계(GENESYS 5, Spectronic, USA)를 이용하여 720 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 토양의 수분함량은 토양시료 10 g을 105°C 건조기에서 4시간 이상 건조하고 데시케이터에서 식힌 후 항량으로 하여 건조 전과 후의 무게 차이를 계산하여 구하였으며, pH는 풍건토와 증류수를 1:5 비율로 희석하여 pH meter(Orion 3 star, Thermo Scientific, USA)로 측정하였다.

**Table 1.** Composition of solid and liquid medium used in isolation and cultivation of microorganisms

| Medium                                |              |
|---------------------------------------|--------------|
| (NH <sub>2</sub> )SO <sub>4</sub>     | 3 g          |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 3.32 g       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0.83 g       |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0.4 g        |
| MnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.002 g      |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.002 g      |
| Tween 80                              | 0.01 g       |
| Crude oil                             | 10 g/l D.W.* |
| Agar Powder <sup>x</sup>              | 8 g          |

\*D.W. : Distilled Water

<sup>x</sup>only for solid medium

## 2.2. 원유분해 미생물 분리 및 동정

원유오염토에서 원유성분을 분해하는 미생물을 분리·동정하여 원유오염토를 대상으로 정화가능성을 평가하고자 탄소원을 제외한 영양분이 풍부한 배지에 원유로 오염된 토양으로부터 채취된 시료를 접종한 후 탄소원으로 원유가 10,000 mg/kg이 되도록 배지에 추가로 첨가하여 원유분해미생물 균주들이 성장할 수 있도록 배양하였다(Kavitha et al., 2014; Simons et al., 2013). 10일 후 배양액 내에서 우점을 차지한 미생물 균주들 중 탄소원으로 원유를 함유한 Table 1의 고체상 평판배지에서 미생물 생장의 최적온도(30°C)에서 성장하는 미생물을 분리하고, 분리된 미생물 균주 중 탄소원으로 원유가 10,000 mg/kg의 유류를 함유한 액체 영양배지에서 성장력이 우수한 미생물 균주를 재분리하여 최종 선별하였다. 이때의 성장력의 분석은 600 nm에서 탁도를 측정하여 상대적으로 탁도가 높은 미생물의 순으로 선별하였다. 미생물 동정은 최종 선별된 미생물 균주들을 대상으로 ribosomal RNA의 이차구조를 참고하여 16S rDNA의 부분 염기서열을 결정하였으며(Stackebrandt and Goebel, 1994), 기존 미생물의 유전자 데이터베이스(NCBI)를 이용하여 유사도 분석방법(Goodfellow et al., 1997)을 통해 동정하여 병원성 미생물의 유무를 확인한 다음 최종 선별하여 특허 기탁 및 출원하였다(제 10-2014-0135072호, 석유분해 미생물을 이용한 토양정화방법 및 토양정화제).

## 2.3. Lab-scale 토양경작을 통한 원유분해 효율 분석

원유로 오염된 현장의 오염토양을 대상으로 원유분해미생물을 적용하여 실험실 조건 하에 초기 TPH 오염농도 평균 10,835 mg/kg에서 56일의 정화기간을 통한 정화효율을 평가하였다. 더불어 토양경작에 가장 중요한 정화인자

인 온도를 조절함으로써 2-3일 단위로 원유분해미생물에 의한 원유 오염저감농도 분석을 통한 원유분해능, 분해시간, 정화효율 등을 확인 후 결과를 도출하였다.

토양경작은 분리된 미생물( $1 \times 10^6$  CFU/g-soil 이상)을 오염토양 1-2 kg에 적용하여 30°C와 15°C의 온도조건에서 항온 인큐베이터를 이용하여 실험실 규모로 진행하였다. 원유를 분해하는 미생물은 본 연구에서 분리된 *Arthrobacter* sp. 등 6종의 미생물들의 consortium으로 각각의 분리 미생물 consortia를 동일한 비율로 혼합하여 삼각플라스크에서 Table 1의 액체 영양배지로 24시간 배양하여 오염토양에 수분 조절용 증류수와 희석하여 투입하였다. 이때 투입되는 미생물의 수는  $1 \times 10^6$  CFU/g-soil 이 되도록 하였다. 영양분 농도의 조절은 탄소 : 질소 : 인의 비율이 100 : 10 : 1이 되도록 (NH<sub>2</sub>)SO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 투입하고 주기적으로 각 성분의 분석을 통하여 부족한 영양염류를 추가로 투입하여 적절한 농도가 되도록 조절하였다(Lee et al., 2007). 토양 시료채취는 2-3회/주 뒤집기 및 수분함량 조절(12-14%)과 동시에 100 g을 채취하여 TPH, 미생물 및 이화학적 분석시료로 하였다. 온도의 영향을 확인하기 위하여 시료로 사용되는 토양은 기존에 존재하는 미생물의 영향을 최소화하기 위하여 121°C에서 30분 동안 멸균하여 실험구 토양으로 사용하여 30°C 및 15°C 미생물 처리구로 사용하였으며, 영양분 추가로 인한 기존에 존재하는 미생물의 영향(biostimulation)을 확인하기 위한 실험구인 30°C 및 15°C 미생물 무처리구는 멸균하지 않은 토양을 사용하였다. 대조구로 사용된 멸균구의 경우 멸균된 오염토양을 이용하여 미생물 처리구와 동일한 조건으로 영양분 투입 및 수분조절을 하였으며, 각각의 실험구 및 대조구는 3반복으로 수행되었다.

## 2.4. 통계분석

SAS 9.3 Software(SAS Institute, Cary, USA)를 이용하여 5% 유의수준에서 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였고, Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 평균간의 유의적인 차이를 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 원유분해미생물 분리 및 동정 결과

본 연구에서 미생물 분리 방법은 원유로 오염된 토양에서 분리된 미생물들 중에서 원유가 유일 탄소원으로 존재하는 배지에서의 성장 속도가 빠른 미생물 균주들만을 선별하여 6종의 균주를 특허 기탁 및 출원하였다(Table 2).

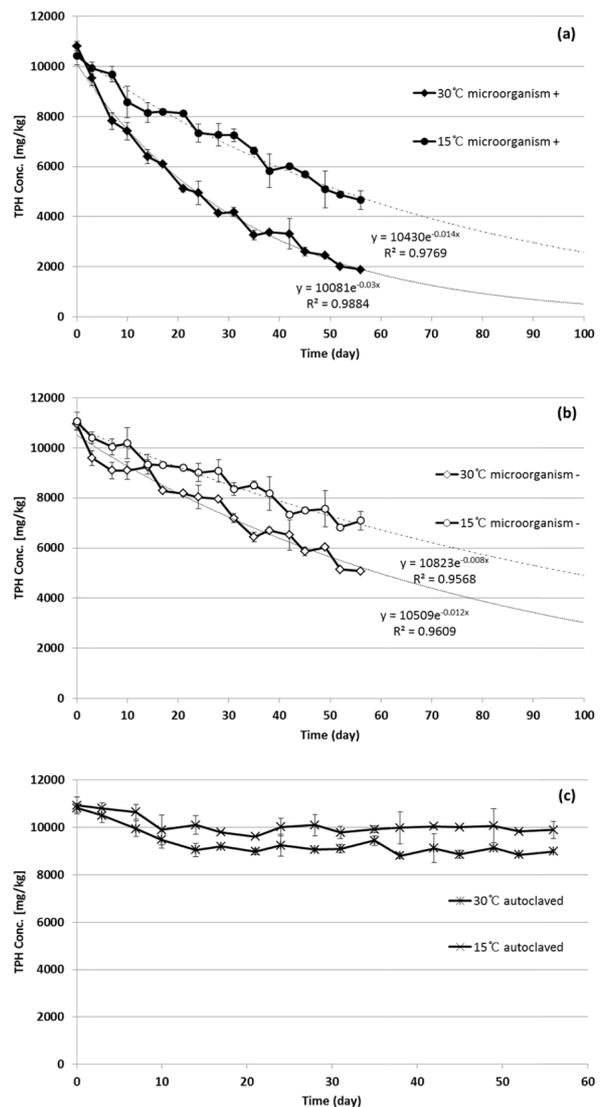
**Table 2.** The list of the international depository microorganisms

| Registration number | Registration date | Name of microorganism                     |
|---------------------|-------------------|---|
| KCTC 12547BP        | 2014.02.10.       | <i>Arthrobacter</i> sp. CO1               |
| KCTC 12548BP        | 2014.02.10.       | <i>Methylobacterium oryzae</i> CO2        |
| KCTC 12549BP        | 2014.04.29.       | <i>Caulobacter henricii</i> CO3           |
| KCTC 12550BP        | 2014.02.10.       | <i>Acinetobacter oleovorans</i> CO4       |
| KCTC 12551BP        | 2014.02.10.       | <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> CO5 |
| KCTC 12552BP        | 2014.02.10.       | <i>Pseudomonas</i> sp. CO6                |

CO1 균주는 현재 81종이 존재하는 *Arthrobacter* 속에 속하는 세균으로 *Arthrobacter oryzae* 표준균주와 99.88%, *Arthrobacter sulfonivorans* 표준균주와 99% 이상의 높은 16S rDNA sequence 유사도를 보였으나 MEGA 6.0 (MEGA Software, Pennsylvania, USA)을 이용한 계통수 심화분석에서 동일 그룹을 형성하는 정도가 38%로 나타났다. CO2 균주는 현재 49종이 존재하는 *Methylobacterium* 속에 속하는 세균으로 *Methylobacterium oryzae* 표준균주와 100%의 높은 16S rDNA sequence 유사도를 보였다. CO3 균주는 현재 15종이 존재하는 *Caulobacter* 속에 속하는 세균으로 *Caulobacter henricii* 표준균주와 97% 이상의 16S rDNA sequence 유사도를 보였다. CO4 균주는 현재 32종이 존재하는 *Acinetobacter* 속에 속하는 세균으로 *Acinetobacter oleivorans* 표준균주와 100%의 높은 16S rDNA sequence 유사도를 보였다. CO5 균주는 현재 211종 18아종이 존재하는 *Pseudomonas* 속에 속하는 세균으로 *Pseudomonas frederiksbergensis* 표준균주와 99.58%의 높은 16S rDNA sequence 유사도를 보였다. CO6 균주는 현재 211종 18아종이 존재하는 *Pseudomonas* 속에 속하는 세균으로 *Pseudomonas koreensis* 표준균주와 99.77%, *Pseudomonas moraviensis* 표준균주와 99% 이상의 높은 16S rDNA sequence 유사도를 보였으나 계통수 심화분석에서 동일 그룹을 형성하는 정도가 5%로 나타났다.

DNA 분석결과 각각의 미생물을 *Arthrobacter* sp. CO1, *Methylobacterium oryzae* CO2, *Caulobacter henricii* CO3, *Acinetobacter oleivorans* CO4, *Pseudomonas frederiksbergensis* CO5, *Pseudomonas* sp. CO6로 명명하고 한국 생명공학연구원 유전자 은행에 각각 KCTC 12547BP, KCTC 12548BP, KCTC 12549BP, KCTC 12550BP, KCTC 12551BP, KCTC 12552BP로 기탁하였다.

**3.2. Lab-scale 토양경작을 통한 원유분해 효율 분석 결과**  
원유오염토양에서 분리된 원유분해미생물을 적용하여 서로 다른 온도의 실험실 조건에서 초기 평균 TPH 농도



**Fig. 1.** Temporal change of TPH concentrations with microorganism application (a), without microorganism application (b), and after autoclaving (c) at 30°C and 15°C. Error bars indicate standard errors of triplicates.

10,835 mg/kg의 오염토양을 대상으로 56일 간의 정화기간을 통한 정화효율을 평가한 결과 30°C 미생물 처리구에서 가장 정화효율이 높았으며(83%), Fig. 1(a)와 같이 초

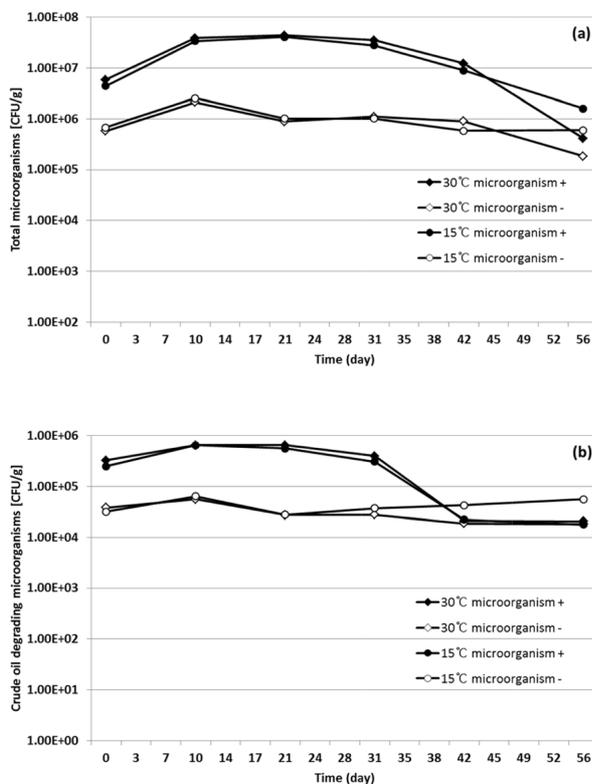
**Table 3.** Result of TPH concentration and remediation efficiency controlled by temperature and microbial addition

| Treatment              | Initial TPH Conc. (mg/kg)     | 28-day TPH Conc. (mg/kg)  | 56-day TPH Conc. (mg/kg) | Remediation efficiency (%) |
|------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 30°C (microorganism +) | 10,812 ± 198* ns <sup>y</sup> | 4,133 ± 75 a <sup>x</sup> | 1,890 ± 51 a             | 83 a                       |
| 30°C (microorganism -) | 10,954 ± 160 ns               | 7,955 ± 266 b             | 5,086 ± 438 b            | 54 b                       |
| 30°C (autoclaved)      | 10,821 ± 637 ns               | 9,055 ± 222 c             | 8,986 ± 335 d            | 17 d                       |
| 15°C (microorganism +) | 10,434 ± 363 ns               | 7,268 ± 448 b             | 4,661 ± 365 b            | 55 b                       |
| 15°C (microorganism -) | 11,061 ± 516 ns               | 9,093 ± 36 c              | 7,092 ± 87 c             | 36 c                       |
| 15°C (autoclaved)      | 10,927 ± 275 ns               | 10,093 ± 53 d             | 9,892 ± 392 d            | 9 d                        |

\*The values are given as mean ± standard deviation (n = 3).

<sup>x</sup>Means in the same column with different letters differ significantly by Duncan's Multiple Range Test (p < 0.05).

<sup>y</sup>None significant.



**Fig. 2.** The number of total microorganisms (a) and crude oil degrading microorganisms (b) through landfarming.

기 TPH 10,812 ± 198 mg/kg에서 미생물 처리 후 56일의 TPH 농도는 1,890 ± 51 mg/kg까지 저감되어 국내 “3”지역 정화목표(TPH 2,000 mg/kg 미만)를 달성하였다(Table 3). 원유분해미생물의 수를 분석한 결과 초기 투입 직후  $3.26 \times 10^5$  CFU/g에서 약 10-20일에  $6.53 \times 10^5$  CFU/g으로 증가하였다가 약 42일 후 서서히  $2.08 \times 10^4$  CFU/g까지 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

15°C 미생물 처리구에서 다음으로 정화효율이 높았고 (55%) 초기 TPH 농도 10,434 ± 363 mg/kg에서 30°C 실

험구와 동일한 정화기간인 56일 후에 4,661 ± 365 mg/kg의 TPH 농도를 보이며, 국내 “3”지역 정화기준인 2,000 mg/kg을 달성하기 위하여 화학적 산화법과 같은 추가적인 정화작업이 병행되거나 장시간의 정화기간이 소요될 것으로 예상된다(Table 3, Fig. 1(a)).

반면 30°C 및 15°C 미생물 무처리구는 미생물 처리구에 비하여 정화효율이 떨어졌으나(54%, 36%) 이들 두 무처리구는 56일 후 TPH 농도가 각각 10,954 ± 160 mg/kg, 11,061 ± 516 mg/kg에서 5,086 ± 438 mg/kg, 7,092 ± 87 mg/kg으로 분석되었다(Table 3). 이는 멸균된 토양을 적용한 30°C 및 15°C 미생물 멸균구와 정화효율을 비교해 볼 때(17%, 9%) 오염토양에 존재하던 기존의 토착미생물들이 영양분의 주입으로 인하여 biostimulation 효과를 발생시켰다고 볼 수 있다(Fig. 1(b), 1(c)). 특별히 Fig. 1(c)에서 30°C 및 15°C 미생물 멸균구의 경우 약 10-14일 경과 후까지 농도가 서서히 감소하는 것을 확인할 수 있는데 이는 오염된 토양 내에 존재하는 휘발성 유류성분이 뒤집기, 시료채취 과정에서 휘발되는 등 물리적 작용에서 기인한 것으로 사료된다. 하지만 미생물 처리가 수반되지 않은 토양경작만으로는 국내 “3”지역 정화 목표(TPH 2,000 mg/kg 미만)를 달성하기 어려운 것으로 판단된다.

온도에 따른 토양경작 실험을 통하여 미생물 처리구, 무처리구, 멸균구의 평균 정화효율을 비교한 결과 유의적 차이를 보였으며 15°C보다 30°C에서 약 17%의 높은 정화효율을 확인하였다. 또한 미생물 처리에 따른 영향을 살펴보기 위하여 15°C와 30°C의 미생물 처리구 평균과 멸균구 평균을 비교한 결과 유의적 차이를 보였으며 미생물 처리구가 미생물 멸균구보다 동일한 정화기간 동안 약 56%의 높은 정화효율을 보이며 미생물 처리의 중대한 효과를 확인할 수 있었다(Table 3).

각각의 온도 범위에서 분석한 정화 효율에 대한 정화기

**Table 4.** TPH degradation kinetics with different application of isolated microorganisms

| Temperature | Microorganism + biodegradation rate coefficient (k, day <sup>-1</sup> ) | Microorganism - biodegradation rate coefficient (k, day <sup>-1</sup> ) | Autoclaved removal rate coefficient (k, day <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---|---|---|
| 30°C        | 0.0311(0.0190) <sup>a</sup>   | 0.0137(0.0082) b  | 0.0033 c  |
| 15°C        | 0.0144(0.0108) a  | 0.0079(0.0055) b  | 0.0018 c  |

<sup>a</sup>Means in the same row with different letters differ significantly by Duncan's Multiple Range Test (p < 0.05).

<sup>b</sup>Means the number in the parenthesis indicates TPH degradation rate coefficient considering the effect of volatilization.

간 대비 감소한 농도를 정량화한 평균 분해속도상수(k)를 산정한 결과 각각 처리구의 경우 30°C에서 0.0311 day<sup>-1</sup>, 15°C에서 0.0144 day<sup>-1</sup>로 나타났지만, 실제로 멸균구에서 감소된 휘발에 의한 물리적 저감 농도 차를 감안하여 정량화한 평균 분해속도상수(k)는 각각 처리구의 경우 30°C에서 0.0190 day<sup>-1</sup>, 15°C에서 0.0108 day<sup>-1</sup>로 나타났다 (Table 4). 통계 분석을 통하여 온도 조건에 따른 처리구의 분해속도상수는 유의적인 차이를 보였다(p < 0.05). 하지만 처리 조건에 따른 온도의 영향의 경우 30°C 및 15°C 미생물 처리구와 무처리구에서는 유의적인 차이를 보였지만, 멸균구에서는 온도의 영향에 의한 유의적인 차이가 없었다(p = 0.335). 반면 기존 토착미생물의 영향만을 고려한 무처리구의 경우 평균 분해속도가 각각 0.0137 day<sup>-1</sup>, 0.0079 day<sup>-1</sup>(휘발에 의한 저감 제외 시 0.0082 day<sup>-1</sup>, 0.0055 day<sup>-1</sup>)로 나타났다(Table 4). 30°C 미생물 처리의 경우가 15°C에 비해 약 2.16배 높은 정화 속도를 보였으며 30°C 미생물 무처리구의 경우가 15°C에 비해 약 1.73배 높은 정화 속도를 보인 것으로 볼 수 있는데 이는 미생물의 활성과 증식 속도는 온도가 10°C 높아짐에 따라 2배 정도 빨라진다는 연구와 유사한 결과라고 할 수 있다(EPA, 1994). 이러한 결과를 통하여 30°C 조건에 비하여 15°C에서 미생물 생장 조건은 불리한 환경에 의해 원유분해 효율 또한 낮아지며, 일반미생물에 비하여 원유 분해미생물의 정화 속도가 온도 조건에 더 민감하다고 추측된다.

Table 5에는 Fig. 1의 추세선을 통하여 국내 “3”지역 기준인 TPH 2,000 mg/kg을 달성하기 위한 예상 정화기간을 나타냈다. 30°C 미생물 처리구와 무처리구는 각각 54일, 139일의 정화기간이 소요될 것으로 추정되었으며, 15°C 미생물 처리구와 무처리구는 각각 166일과 212일이 소요될 것으로 예상되었다. 결과적으로 미생물 처리구의 경우 15°C가 30°C보다 약 3배, 미생물 무처리구의 경우 15°C가 30°C보다 약 1.5배의 정화기간이 소요되는 것으로 나타나 빠른 시간 내에 정화 목표를 달성하기 위해서는 온도 조건이 매우 중요함을 확인할 수 있었다. 하지만 현장 여건은 실험실과 상이한 특성(온도, 수분 등)을 보이기

**Table 5.** Estimated remediation time to achieve the goal of TPH 2,000 mg/kg

| Temperature | Microorganism + remediation time (day) | Microorganism - remediation time (day) |
|-------------|--|--|
| 30°C        | 54                                     | 139                                    |
| 15°C        | 166                                    | 212                                    |

때문에 실제 원유오염토양에 대한 토양경작 공정은 본 연구를 통하여 산출한 예상 정화기간보다 수 일에서 수 주 이상 소요될 것으로 예상된다. 따라서 실제 현장에서 토양경작을 적용 시 lab-scale 실험을 토대로 pilot-scale 실험을 수행하고 이들 결과의 차이를 감안한 처리 속도를 예상하여 정화기간을 산출해야 할 필요가 있다.

기존의 선행 연구로 Zhao et al.(2011)는 초기 농도 10,000 mg/L의 원유오염토를 *Rhizobiales* sp., *Pseudomonas* sp., *Brucella* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Roseomonas* sp.의 consortium으로 이루어진 혼합미생물을 통하여 30°C에서 생물학적 정화를 수행한 결과, 7일 후 지방족 탄화수소를 약 71%, 방향족 탄화수소를 약 36%까지 제거시키며 원유를 대략 52% 제거하였다. Farahat and El-Gendy(2008)의 연구에서는 이집트 탄화수소 오염토에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* I.1.1.6와 *Brevibacterium casei* I.2.1.7 균주를 이용하여 30°C에서 60일 간 원유오염토의 생물학적 정화를 수행한 결과 약 10,000 mg/kg의 오염토에서 각각 64%, 58%의 TPH 생물학적 분해 효율을 확인하였다. 본 연구를 통하여 분리해낸 미생물 consortium을 통한 생물학적 분해 효율은 초기 TPH 10,812 mg/kg에서 미생물 처리 56일 후 TPH 농도가 1,890 mg/kg까지 저감되며 83%의 정화효율을 보였다. 이는 유사한 실험 조건에서 수행된 선행 연구인 Zhao et al.(2011)와 단일 균주를 이용하여 정화를 수행한 Farahat and El-Gendy(2008)의 결과보다 효율적인 측면에서 우수한 것으로 나타났다.

본 연구에서 30°C 미생물 처리구를 제외하고는 2개월 이내에 국내 “3”지역 기준인 TPH 2,000 mg/kg 미만을 달성하기 어려웠으며, 앞서 추세선을 분석한 결과 정화기

준을 달성하기 위하여 30°C 미생물 무처리구는 139일, 15°C 미생물 처리구 및 무처리구는 각각 166일, 212일이 소요될 것으로 예상되었다. 하지만 실제 정화 현장에서는 고농도 오염토와 저농도 오염토로 구분하여, 고농도 오염토는 토양 세척 또는 열탈착 등의 물리화학적 공법을 적용하고 저농도 오염토의 경우는 생물학적 처리공법과 화학적 산화공법을 연계 적용하여 처리하고 있다. 본 연구를 통하여 도출한 분해속도상수(k)를 적용하여 TPH 4,000-6,000 mg/kg의 상대적으로 저농도의 오염토를 2,000 mg/kg 미만까지 정화하는 데 걸리는 시간을 산출한 결과, 15°C 미생물 처리구는 약 48-76일, 30°C 미생물 무처리구는 약 51-80일, 15°C 미생물 무처리구는 약 87-138일이 소요되는 것으로 나타났다. 따라서 실제 오염토 정화 현장에서 고농도 오염토와 저농도 오염토를 구분하여, 본 연구에서 분리 동정한 원유분해미생물 consortium을 이용하여 저농도 오염토를 대상으로 생물학적 정화를 수행할 경우, 정화목표 달성 및 정화기간 단축을 도모할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통하여 최근 쿠웨이트 정화사업 등에 의해 원유오염토양 처리에 대한 관심이 높아지는 상황에서 국내 원유로 오염된 실제 현장부지에서 효과적인 정화효율을 확보하기 위하여 bioaugmentation을 통한 미생물의 주입이 생물학적 분해에 미치는 영향을 살펴보고자 하였으며, 온도 조건에 따른 미생물의 분해에 미치는 영향을 살펴보고, 이를 바탕으로 토양경작 기술을 적용하여 미생물 활성화에 영향을 미치는 주요 인자인 토양온도 조건에 따른 정화효율의 차이를 확인하고자 하였다.

원유분해미생물 분리 과정을 통하여 *Arthrobacter* sp. CO1 등을 포함한 6종의 원유분해미생물을 분리하였다. 이들 미생물을 각각 일정 온도 조건의 실험실 조건에서 현장 원유오염토양에 적용한 결과, 30°C 항온 조건에서 초기 TPH 10,812 ± 198 mg/kg에서 56일 후 1,890 ± 51 mg/kg으로 83%(휘발에 의한 저감 제외 분해율 66%), 15°C 항온 조건에서 초기 TPH 10,434 ± 363 mg/kg에서 56일 경과 후 4,661 ± 365 mg/kg으로 55%(휘발에 의한 저감 제외 분해율 45.41%) 분해되는 결과를 보였다. 이때 56일 경과 후 처리구의 평균 분해속도상수를 산정한 결과 각각 30°C에서 0.0311 day<sup>-1</sup>(휘발에 의한 저감 제외 분해속도 0.0190 day<sup>-1</sup>), 15°C에서 0.0144 day<sup>-1</sup>(휘발에 의한 저감 제외 분해속도 0.0108 day<sup>-1</sup>)로 나타났다.

본 연구를 통하여 분리된 미생물의 consortium을 이용하여 토양경작 부지에서 원유오염토양을 복원함에 있어서 원유를 분해시킬 수 있는 원유분해미생물을 통한 생물학적 정화 기술의 적용 가능성을 확인하였으며, 이는 기타 난분해성 물질의 생물학적 분해에 대해서도 확대 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

#### 사 사

본 연구는 중소기업청의 “중소기업기술혁신개발사업(과제번호: S2078832)”와 환경부의 “토양지하수오염방지기술개발사업(과제번호: 2014000550004)”의 지원을 받은 과제입니다.

#### References

- Choi, H.J., Oh, B.Y., Han, Y.S., Hur, M.J., and Kim, J.G., 2014, Characterization study of crude oil degrading microbiology isolated from Incheon bay, *J. Life Science*, **24**(6), 694-699.
- Chun, M.H., Son, H.J., and Kim, C., 2007, A study on the isolation of the oil-degradation microbes and treatment efficiency in the oil contaminated soil with peat moss, *Kor. J. Env. Hlth.*, **33**(5), 462-469.
- Environmental protection agency (EPA), 1994, Chapter V. Landfarming - How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: A guide for corrective action plan reviewers, 10-11.
- Farahat, Laila A. and El-Gendy, Nour Sh., 2008, Biodegradation of baleym mix crude oil in soil microcosm by some locally isolated Egyptian bacterial strains, *Soil Sediment Contam.*, **17**, 150-162.
- Gao, Y.C., Guo, S.H., Wang, J.N., Li, D., Wang, H., and Zeng, D.H., 2014, Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil, *Chemosphere*, **117**, 486-493.
- Goodfellow, M., Manfio, G.P., and Chun, J., 1997, Towards a practical species concept for cultivable bacteria, In *The Units of Biodiversity Species in Practice*, 1997, Chapman and Hall, London, 25-59 p.
- Kavitha, V., Mandal, A.B., and Gnanamani, A., 2014, Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: An approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **94**, 24-30.
- Kim, G.J., Oh, S.T., Lee, C.H., Seo, S.K., Kang, C.H., and Chang, Y.Y., 2008, Enhancement of biodegradation rate of petroleum hydrocarbons-contaminated soil with addition of

- organic composite nutrients and a chemical oxidation, *J. Soil Groundw. Environ.*, **13**(3), 59-66.
- Lee, S.H., Kim, E.Y., and Choi, H.J., 2007, Effects of organic amendments on heavy mineral oil biodegradation, *J. Soil Groundw. Environ.*, **12**(5), 54-63.
- Ma, J.J., Ko, H.S., Hwang, J.S., Jung, M.J., Choi, S.I., and Kim, K.J., 1999, The pilot-scale treatability studies of co-composting for the remediation of diesel contaminated soil during the winter, *J. Soil Groundw. Environ.*, **4**(2), 193-201.
- Roy, A.S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A.K., Boruah, H.P.D., Saikia, N., Deka, M., Dutta, N., and Bora, T.C., 2014, Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **94**, 79-89.
- Simons, K.L., Sheppard, P.J., Adetutu, E.M., Kadali, K., Juhasz, A.L., Manefield, M., Sarma, P.M., Lal, B., and Ball, A.S., 2013, Carrier mounted bacterial consortium facilitates oil remediation in the marine environment, *Bioresour. Technol.*, **134**, 107-116.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994, A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 846-849.
- Yu, J.B., Kim, J.H., Kim, G.J., Oh, S.T., Lee, C.H., Park, I.K., and Chang, Y.Y., 2009, A Field study on the enhancement of landfarming performance using oil-degradable microbes adapted to various temperature range, *J. Soil Groundw. Environ.*, **14**(5), 10-17.
- Zhao Dongfeng, Liu Chunshuang, Liu Lihong, Zhang Yunbo, Liu Qiyou, and Wu Wei-Min, 2011, Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **65**, 1244-1248.