

## 토양매립에 의한 생분해도 측정 및 가속화

김은정 · 박태현\* · 신평균<sup>1</sup>

서울대학교 응용화학부, <sup>1</sup>한국과학기술연구원 수질환경연구센터

**Measurement and Acceleration of Biodegradation in Soil. Kim, Eun Jeong, Tai Hyun Park\*, and Pyong Kyun Shin<sup>1</sup>.** School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, <sup>1</sup>Water Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea - The quantitative and rapid method for measuring the biodegradation of polymer materials in soil was developed. In this study, cellophane film was used as a model biodegradable polymer and the biodegradation was assayed by measuring the amount of glucose which was produced by a hydrolysis reaction using HCl after collecting the film from soil. Cellophane film was degraded 41.2% in 4 months during winter while it was degraded 76.5% in 2 months during summer. It means that biodegradation in soil is affected by environmental conditions. The biodegradation was also measured in an incubator (30°C, humidity 50-55%) to exclude the environmental variations. Cellophane film was degraded 94% in that condition in 40 days. The biodegradation showed the first order kinetics and the rate constant was 0.067 (1/day). Acceleration of the biodegradation in soil was also studied. We added cultured soil microorganisms or nutrients such as N, P, and S into the soil. While the addition of microorganisms showed the temporary increase of rate constant, the addition of nutrients not only showed the increase of rate constant from 0.096 (1/day) to 0.21 (1/day) but also maintained the effect continuously.

**Key words:** biodegradation, soil, cellophane film, first order kinetics, reaction rate constant

현대문명의 발달과 더불어 플라스틱 제품의 사용이 늘어감에 따라 환경문제가 심각하게 대두되고 있으나 플라스틱 제품의 상업성과 이로움 때문에 그 사용이 불가피하다고 볼 수 있다. 이에 대한 해결책으로 생분해성 고분자의 사용을 위한 많은 연구가 주목을 받으며 진행되고 있다. 생분해성 고분자에 대한 연구 및 사용을 위해서는 생분해도 측정 방법과 생분해도 기준 마련이 우선되어야 한다.

고분자 물질의 생분해도 측정 방법에 관한 연구는 표준화된 방법으로서의 정착을 위해 미국, 일본 등에서 활발하게 진행되고 있다. 미국에서는 사용되어진 후 버려진 고분자 물질들의 최종적으로 도달하게 될 환경조건에 따라 생분해 측정 방법들이 ASTM(American Society for Testing Materials) 규정으로 계속 발표되고 있다. 도시 하수오수에 의한 호기적 생분해 방법[1], 특정 미생물에 의한 호기적 생분해 방법[2], 활성오니 폐수처리 시스템에 의한 호기적 생분해 방법[3], 퇴비화 조건에서의 호기적 생분해 방법[4]들이 그 예이며 앞으로 매립조건, 담수조건, 해수조건 등에서의 생분해 측정방법도 연구, 발표될 예정으로 있다[5]. 국내에서도 생분해도 측정을 위

한 호기적 조건[6], 혐기적 조건[7] 등에서의 영향과 효소를 이용한 측정방법에 대한 연구[8]가 보고된 바 있다.

사용되어진 후 버려진 고분자 물질이 최종적으로 도달하게 될 환경조건들 중 가장 많은 부분을 차지하는 것이 매립조건이며, 이 조건에서의 생분해 측정 방법을 확립하는 것이 요청되고 있다. 토양매립에 의한 생분해도 측정시 문제점으로는 매립 장소에 따라 환경조건이 일정하지 않다는 것[9]과 측정 시간이 오래 걸린다는 것이다. 첫째 문제점을 해결하기 위하여는 가장 객관적인 환경조건을 갖는 토양을 선택해야 하며 표준적인 측정을 위하여 실험실적 토양조건을 확립해야 한다. 둘째 문제점에 대해서는 토양매립에서의 생분해도를 가속화 시켜야 한다. 이와 같은 문제점들의 해결을 위해 본 연구에서는 실험실적 토양매립시의 생분해 특성을 관찰하고 토양 미생물의 추가 접종 및 토양내 영양성분 강화를 통한 생분해 가속화에 관해 실험하였다.

### 재료 및 방법

#### 매립물질 및 매립조건

실험대상 물질은 생분해가 잘 되는 것으로 알려진 두께 50 µm의 셀로판 필름을 사용하였다. 매립장소는 캠퍼스 인근 숲의 적당한 곳을 택하고 5×5 cm로 자른 셀

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-880-8020, Fax. 82-2-888-7295  
E-mail: thpark@plaza.snu.ac.kr

로판 필름을 10 cm 깊이로 매립한 후 일정한 시간 간격으로 채취하여 생분해도를 측정하였다. 토양매립시 생분해도는 계절에 의한 영향을 많이 받는 것으로 생각되어 겨울기간 동안(11월~2월)과 여름기간 동안(5월~7월)으로 나누어서 각각 측정하였다.

### 실험실적 토양매립

실험실적 조건에서의 생분해도 측정을 위해서는 같은 매립장소에서 채취한 토양을 플라스크에 넣고 10 cm 깊이로 셀로판 필름을 묻은 후 항온배양기 내에서 일정한 조건(30°C, 습도 50~55%)으로 유지시키고 일정한 시간 간격으로 채취하여 생분해도를 측정하였다.

### 생분해도 측정

분해정도 측정을 위하여 무게감소를 재는 것이 가장 손쉬운 방법이지만, 분해가 많이 진행되면 땅속에서 작은 조각들로 존재하므로 흡과 분리하여 회수하기에 어려움이 있고 무게 측정시 많은 오차를 유발하게 된다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 실험에서는 흡 속에서 채취한 셀로판 필름을 HCl로 가수분해시킨 후, 생성된 glucose를 측정하는 방법을 사용하였다. 가수분해시키기 위해 셀로판 필름을 3 ml의 5N HCl을 넣은 후 끓는 물에서 30분간 가열하였다. 가수분해된 용액을 식힌 후, 3 ml의 5N NaOH용액을 첨가하여 중화시켰다. 증류수로 7배 희석한 후, Glucose kit(Sigma, procedure no. 510)을 사용하여 glucose농도를 측정하였다. 실험 결과, 셀로판 필름의 무게와 생성된 glucose의 농도는 Fig. 1과 같이 선형적인 관계( $R^2=1.0$ )를 보였고, 이 방법으로 셀로판 필름의 생분해도를 측정하였다.

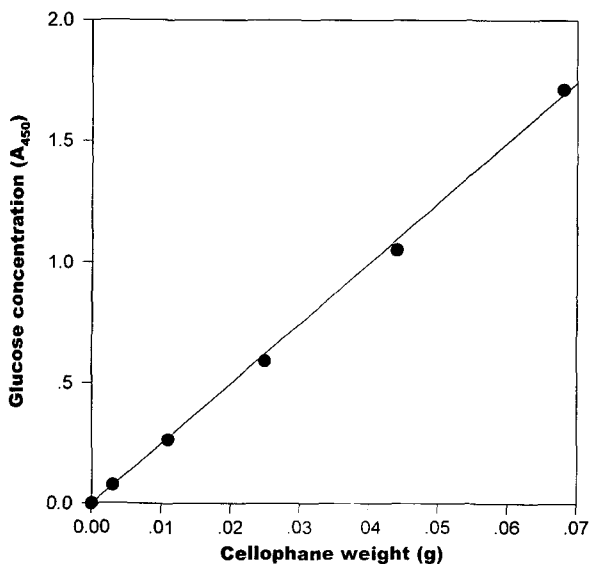


Fig. 1. Standard curve between glucose concentration and cellophane weight.

### 생분해도 가속화

500 ml 플라스크에 100 ml LB배지를 넣고 적당한 양의 토양을 채취하여 첨가한 후 25°C, 180 rpm의 shaking 배양기에서 5시간 정도 배양해서 O.D.값이 2 이상이 될때까지 토양내 미생물을 키운다. 여러 종류의 토양 미생물이 존재하므로 특정한 선택 배지를 사용하기가 어려워 가장 rich한 복합배지중의 하나인 LB 배지를 사용하였다. 흡을 가라앉힌 후, 미생물을 원심분리해서 배지로부터 세포들만 분리하고 이것을 다시 증류수로 씻어 순수한 토양 미생물 용액을 만든다. 이 용액 0.1 ml씩을 5×5 cm 셀로판 필름의 양쪽 표면에 바르고 실험실적 토양매립방법과 마찬가지로 플라스크에 매립하여 항온배양기 내에서 일정한 조건(30°C, 습도 50~55%)으로 유지시키며 일정한 시간 간격으로 생분해도를 측정하여 생분해도 가속화 정도를 관찰하였다.

또 다른 생분해 가속화의 방법으로 토양내 탄소이외의 중요한 영양소인 N, P, S 등을 공급하였다. C/N비가 30이 유지되도록 셀로판 1 g당 NH<sub>4</sub>Cl 55.9 mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.34 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g, MgSO<sub>4</sub> 6.85 mg을 토양에 첨가한 후 실험실적 토양매립방법으로 플라스크에 매립하여 항온 배양기내에서 위와 동일한 조건으로 유지시키며 일정한 시간 간격으로 생분해도를 측정하여 생분해도 가속화 정도를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 실외 토양매립조건에서의 생분해도

토양매립에 의한 생분해도 측정시 매립환경에 의해 커다란 영향을 받을 것으로 생각되고 특히 계절적 요인이 크게 작용할 것이 판단되어 겨울기간과 여름기간 동안 각각 생분해도를 측정하여 비교하였다. 토양매립시 분해의 가장 중요한 요인으로 생각되는 미생물의 분포가 이상적으로 균등하기를 기대하기 어렵기 때문에 같은 날짜의 분해도 측정의 결과가 차이를 보이게 되므로 3개씩의 셀로판 필름을 채취하여 그 분해도의 평균값으로 결과를 택했다. 겨울기간 동안(11월~2월 측정)에는 Fig. 2에 보인 바와 같이 4개월 동안 고작해야 41.2%정도의 분해를 보였고 특히 기온이 낮은 12월과 1월에는 분해가 거의 일어나지 않았다. 이에 반해 여름기간 동안(5월~7월 측정)에는 Fig. 3에 보인 바와 같이 2개월 동안 76.5%정도의 분해를 보였다.

### 실험실적 토양매립조건에서의 생분해도

매립환경 조건의 영향을 줄이기 위하여 온도와 습도가 일정하게 유지되는 실험실적 매립조건에서 실험을 수행하였다. 실험실적 토양매립을 위해 토양을 채취하여 플라스크에 넣고, 여기에 셀로판 필름을 묻은 후, 항온배양기

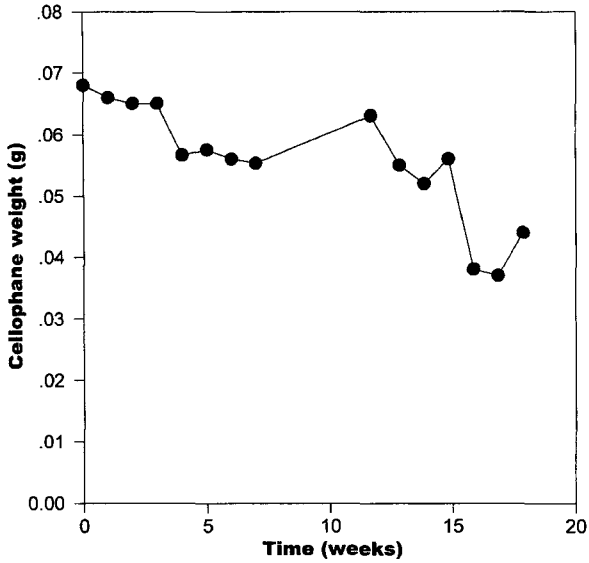


Fig. 2. Biodegradation of cellophane film in winter.

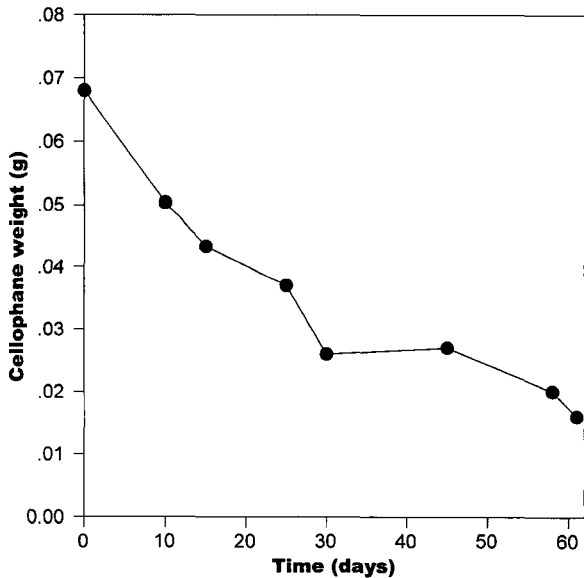


Fig. 3. Biodegradation of cellophane film in summer.

내의 일정한 조건에서 분해도를 측정하였다. 그 결과, 40일 경과 후 94%의 높은 분해도를 나타내었고 분해속도는 Fig. 4에 보인 바와 같이 1차 반응 속도식을 따름을 알 수 있으며, 이때 반응속도 상수는 0.067(1/day)이었다.

토양 미생물 추가접종에 의한 생분해도 가속화

생분해도 가속화를 위해 토양내 미생물을 셀로판 필름 표면에 접종하고 플라스크내의 흡속에 매립한 후 항온배양기내에서 생분해도를 측정하였다. 생분해도에 효과를 줄 수 있는 미생물의 농도를 알기 위해 서로 다른 세포수의 미생물 용액 0.1 ml씩을 5×5 cm 셀로판 필름의 양

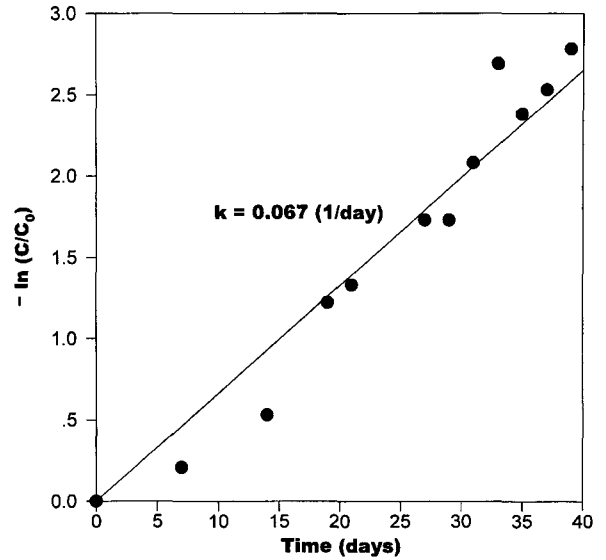


Fig. 4. Biodegradation of cellophane film in incubator.

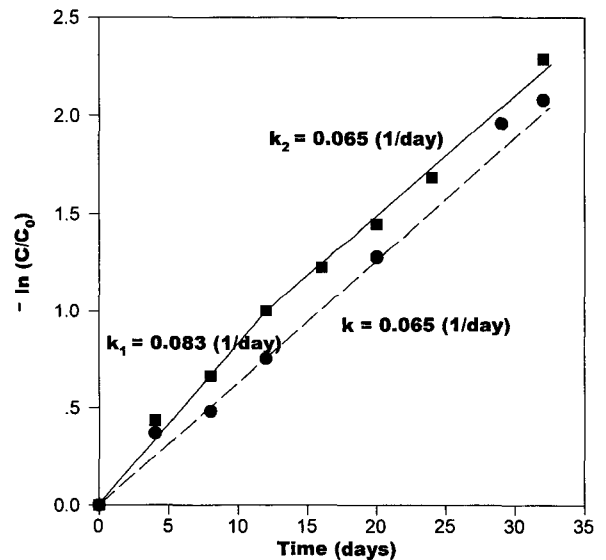


Fig. 5. Acceleration of biodegradation by adding cultured microorganisms.

● : Control, ■ : With the addition of cultured microorganisms.

쪽 표면에 바르고 생분해도를 측정한 결과 0.1 ml당 10<sup>8</sup> 세포 정도면 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 1.6×10<sup>8</sup>세포/0.1 ml의 미생물 용액을 위와 같은 방법으로 필름에 바르고 실험실적 토양매립조건에서 분해도를 측정 한 결과, Fig. 5에 보인 바와 같이 초반 12일경까지는 미생물 접종이 효과가 뚜렷하게 나타났고, 말기로 갈수록 그 효과는 없어졌다. 분해속도를 1차 반응으로 가정하였을시, 반응속도 상수는 미생물 접종으로 인해 초반 12일까지의 경우에는 0.065(1/day)에서 0.083(1/day)로 증가하여 28% 정도의 증가를 보였으나 그 이후에는 미생물을 접종하지 않은 경우와 같은 반응속도 상수인 0.065

(1/day)로 돌아왔다. 이는 초반에는 추가 접종으로 인해 미생물의 수가 증가하여 분해 속도를 증가 시키지만, 후반으로 갈수록 미생물의 성장 속도가 결국은 영양분에 의해 제한을 받으므로 그 효과가 소멸되는 것을 의미한다. 이 결과는 생분해 가속화를 위해 토양 미생물을 배양하여 추가로 접종하는 것이 초반의 일시적인 효과를 가져 오지만 말기로 갈수록 그 효과는 감소한다는 것을 의미한다.

**영양소 공급에 의한 생분해도 가속화**

대부분의 생분해성 플라스틱은 미생물에 의해 분해될 때 탄소원으로 사용되어지므로 보다 효과적인 가속화 방법으로서 토양내의 탄소이외의 중요한 영양소인 N, P, S 등을 공급하여 미생물의 생산을 촉진시키는 방법을 생각해 되었다. N, P, S의 영양성분들의 양은 셀로판내의 C와 첨가할 N의 비인 C/N을 30으로 하고 박테리아 배양에 널리 사용되는 M9 배지의 N, P, S 비율을 유지하여 첨가하려 하였으나 MgSO<sub>4</sub>는 용해도가 충분히 크지 못하여 최대를 녹을 수 있는 양을 택했다. 우선 N, P, S의 각각의 가속화 효과를 보기 위해서 N만을 첨가하였을 때, P만을 첨가하였을 때, S만을 첨가하였을 때 그리고 N, P, S를 모두 첨가하였을 때로 조건을 달리하여 생분해도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 6에 보인 바와 같이 N보다는 S를, S보다는 P를 첨가하는것이 더 효과적이었고 또한 N, P, S를 모두 첨가 한것이 P를 첨가한것 보다 더 효과적인 것으로 관찰되었다. 분해속도를 1차 반응으로 가정하였을시 N, P, S 영양성분들을 모두 첨가하여 일정한 시간 간격으로 생분해도를 측정한 결과는 Fig. 7에 보인 바와 같다. N, P, S 성분의 첨가로 인해 반응속도 상수는

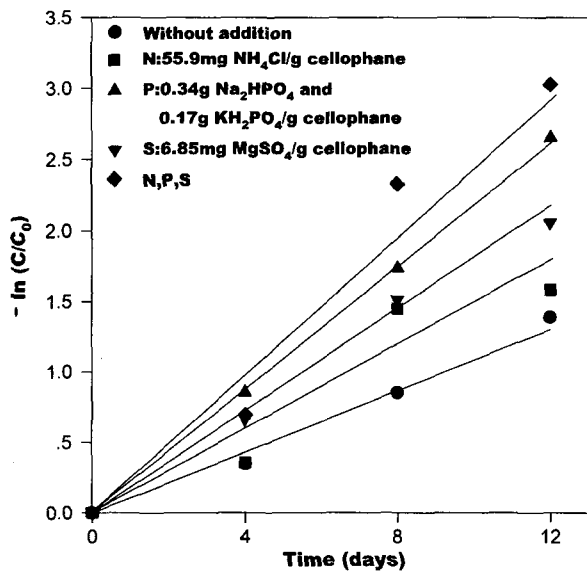


Fig. 6. Effect of nutrient addition on biodegradation.

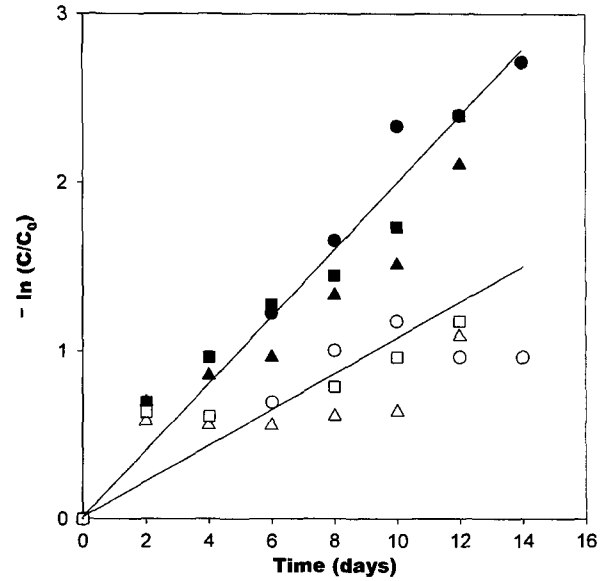


Fig. 7. Acceleration of biodegradation by adding nutrients.  
 ●▲ : 55.9 mg NH<sub>4</sub>Cl, 0.017 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0089 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.72 mg MgSO<sub>4</sub>/g cellophane.  
 ■ : 55.9 mg NH<sub>4</sub>Cl, 0.34 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.17 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 6.85 mg MgSO<sub>4</sub>/g cellophane.  
 ○△□ : Without addition.

0.096(1/day)에서 0.21(1/day)로 증가하여 118% 정도의 높은 증가와 더불어 초반부터 지속적인 생분해 가속화의 효과를 보였다. 또한 P를 1/20정도로 S를 1/10정도로 그 양을 낮추어도 위와 비슷한 결과가 관찰되어, 이 정도의 낮은 양만 공급해도 충분한 효과를 나타내었다.

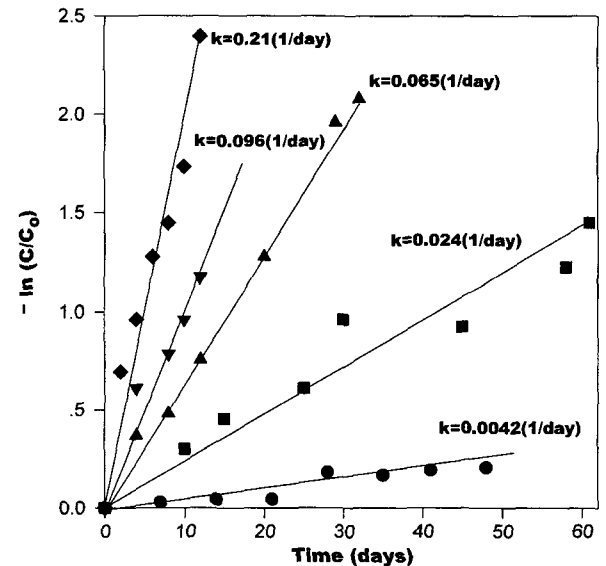


Fig. 8. Biodegradation in various conditions.  
 ● : Outdoor, winter (November-December), ■ : Outdoor, summer (May-July), ▲ : Incubator, spring (April), ▼ : Incubator, summer (Hot and rainy September), ◆ : Incubator, with addition of nutrients (Hot and rainy September)

### 각 조건에서의 생분해도 결과 비교 분석

Fig. 8에 보인 바와 같이 실외에서의 토양매립시 여름 기간이 겨울기간 보다 생분해도가 빠름이 관찰되었고 그때의 반응속도 상수는 겨울기간의 0.0042(1/day)에서 여름기간의 0.024(1/day)로 증가됨을 보였다. 같은 실험실적 토양매립조건이라도 토양을 채취한 시기에 따라서 봄에 채취한 토양으로 실험했을 때와 여름에 채취한 토양으로 실험했을 때와 비교하면 생분해도가 다르게 나타나는 것이 관찰되었는데, 실험실적 토양매립조건에서 각각의 반응속도 상수는 봄에 채취한 토양에서는 0.065(1/day)로, 여름에 채취한 토양에서는 0.096(1/day)로 각각 나타났다. 각각의 조건들 중에서 가장 생분해도가 뛰어난 것은 N, P, S의 영양성분들을 모두 첨가했던 조건에서이며 그때의 반응속도 상수는 0.21(1/day)였다.

### 요 약

본 연구의 목적은 토양매립조건에서 생분해성 고분자의 생분해도를 정량적이며 신속하게 측정하는 방법을 개발하는 것으로서, 실험대상 물질은 생분해가 잘되는 것으로 알려져 있는 셀로판 필름을 사용하였다. 분해정도를 측정하기 위하여 흡속에서 채취한 셀로판 필름을 HCl로 가수분해 시킨 후 생성된 glucose를 측정하는 방법을 사용하였다. 토양매립시 생분해도는 겨울에는 4개월간 고작해야 41.2%정도의 분해를 보였으나, 여름에는 2개월 동안 76.5%정도의 분해도를 나타낸 결과로 보아 계절의 영향을 많이 받는것으로 나타났다. 실험실적 토양매립조건의 실험을 위해 토양을 채취하여 플라스크에 넣고, 여기에 셀로판 필름을 묻은 후 항온배양기내에서 일정한 조건(30℃, 습도 50~55%)으로 실험하였다. 이때에는 40일 경과 후 94%정도의 분해도를 나타내었다. 분해속도는 1차 반응 속도식을 따르고 반응속도 상수는 0.67(1/day)이었다. 생분해도의 가속화를 위해 토양내 미생물을 필름 표면에 접종하고 플라스크 내의 흡속에 매립한 후 항온배양기내에서 생분해도를 측정한 결과, 초반 12일경까지는 미생물 접종의 효과가 뚜렷이 나타났으나 말기로 갈수록 그 효과는 없어졌다. 가속화를 위한 또다른 방법으로 토양내 영양성분인 N, P, S 등을 추가로 공급한 결과, 초반부터 말기까지 지속적인 가속화 효과를 보임과 동시에 반응속도 상수도 0.096(1/day)에서 0.21(1/day)로 118%정도의 높은 증가를 보였다. 결과적으로, 실외에서의 토양매립조건에서는 생분해도의 반응속도 상수가 겨울기간의 0.0042(1/day), 여름기간의 0.024(1/day)로 나타났고 같은 실험실적 토양매립조건에서라도 토양을 채취한 시기에 따라 봄에 채취한 토양에서는 0.065(1/day)로 여름에 채취한 토양에서는 0.096(1/day)로 반응

속도 상수가 다르게 나타났다. 각각의 매립조건들 중에서 N, P, S 모두를 첨가한 실험실적 토양매립조건에서의 생분해도가 가장 뛰어난 것으로 나타났다.

### 감사의 말

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업 연구비에 의해 일부 지원 받았으며, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. ASTM. 1991. Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge, pp. 1-4. *In ASTM (ed.), Annual Book of ASTM Standards, D5209-91.* American Society for Testing and Material, Philadelphia.
2. ASTM. 1992. Standard test method for determining the aerobic biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms, pp. 1-4. *In ASTM (ed.), Annual Book of ASTM Standards, D5247-92.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
3. ASTM. 1992. Standard test method for assessing the aerobic biodegradation of plastic materials in a activated-sludge-wastewater-treatment system, pp. 1-6. *In ASTM (ed.), Annual Book of ASTM Standards, D5271-92.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
4. ASTM. 1992. Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions, pp. 1-6. *In ASTM (ed.), Annual Book of ASTM Standards, D5338-92.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
5. Swift, G. 1992. Biodegradability of polymers in the environment: Complexities and significance of definitions and measurements. *FEMS Microbiology Review* **103**: 339-345.
6. Seo, I. S., M. C. Lee, B. H. Kim, and P. K. Shin 1994. Characteristics of municipal sewage sludge affecting the biodegradation of a plastic material under aerobic condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 436-442.
7. Shin, P. K., M. H. Kim, J. M. Kim, and B. H. Kim 1996. Factors of municipal anaerobic digested sludge affecting the biodegradation of plastics under anaerobic condition. *Hwahakgonghak* **34**: 17-22.
8. Choi, S. H., K. N. Kang, T. H. Park, and P. K. Shin 1996. Measurement for determining the biodegradation of starch-filled polyethylene film by  $\alpha$ -amylase. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**: 86-91.
9. Smith, J. L. 1994. Cycling of nitrogen through microbial activity, pp. 91-117. *In J. L. Hatfield and B. A. Stewart (eds.), Soil Biology: Effects on Soil Quality.* Lewis Publishers, Boca Raton.

(Received June 11, 1998)