

중질유 오염토양의 생물학적 처리에 있어 amendments의 효과

이상환^{1*} · 김을영¹ · 최호진²

¹한국농촌공사 환경지질사업처, ²한국농촌공사 농어촌연구원

Effects of Organic Amendments on Heavy Mineral Oil Biodegradation

Sang-Hwan Lee^{1*} · Eul-Young Kim¹ · Ho-Jin Choi²

¹Office of Environmental Geology, Korea Rural Community and Agricultural Corporation

²Rural Research Institute, Korea Rural Community and Agricultural Corporation

ABSTRACT

To examine the effects of amendments on heavy mineral oil degradation, a pilot scale experiment was conducted for over 105days. During the experiment, soil samples were collected and analyzed periodically for the determination of residual hydrocarbon and microbial activities. At the end of the experiment, the initial level of contamination ($6,205 \pm 173 \text{ mgkg}^{-1}$) was reduced by 33 ~ 45% in the amendment amended soil; whereas only 8% of the hydrocarbon was eliminated in the non-amended soil. Heavy mineral oil degradation was much faster and more complete in compost amended soils. Enhanced dissipation of heavy mineral oil in compost amended soil might be derived from increased microbial activities (respiration, microbial biomass-C) and soil enzyme activity (lipase, dehydrogenase, and FDA hydrolase) were strongly correlated with heavy mineral oil biodegradation ($P < 0.01$).

Key words : Heavy mineral oil, Bioremediation, Soil amendments, Microbial activity

요 약 문

중질유로 오염된 토양의 생물학적 정화에 있어 amendment의 처리효과를 보고자 포장에서 pilot 규모로 105일간 실험을 수행하였다. 실험기간 중 주기적으로 토양시료를 채취하여 유류성분과 생물학적 활성과 관련된 분석을 수행하였는데 퇴비의 처리구들에서 짚겨+무기양분처리구에 비하여 유류성분의 분해활성이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다. 105일 경과 후 amendment 처리구들에서는 초기농도 $6,205 \pm 173 \text{ mgkg}^{-1}$ 의 33~45%가 소실된 반면 무처리구에서는 8%만이 분해된 것으로 나타났다. 퇴비처리구들에서 무처리구 및 짚겨처리구에 비해서 높은 중질유 분해활성을 관찰할 수 있었는데 실험기간 중 모니터링한 생물학적 지표들 중 soil respiration, dehydrogenase, lipase, urease 등의 효소활성이 짚겨처리구에 비해 현저하게 높은 활성이 관찰되었고 이들 미생물학적 지표들과 중질유의 분해정도 사이에는 높은 상관관계가 존재하였다($p < 0.01$).

주제어 : 중질유, 생물학적 정화, 토양amendment, 미생물활성

1. 서 론

유류오염토양의 생물학적 정화방법은 유지관리의 용이성, 광범위한 영역에 적용가능성, 저렴한 비용과 오염물질의 궁극적인 처리가 가능하다는 측면에서 활용도가 높은

정화기술이라 할 수 있다. 생물학적 정화효율에 영향을 미치는 인자들로서는 양분의 유효도, 토양반응(pH), 토양수분, 통기, 분해능이 있는 미생물의 수와 활성 등이 있다 (Huesemann, 1994). 오염된 토양에서 토착미생물들은 오염물질이 존재하는 환경에 적응하여 있기는 하지만, 대부

*Corresponding author : soillsf@ekr.or.kr

원고접수일 : 2007. 5. 29 게재승인일 : 2007. 9. 4

질의 및 토의 : 2007. 12. 31 까지

분의 경우 양분유효도, 산소 등의 결핍으로 인하여 원위 치상태에서의 생물학적분해는 매우 완만하게 진행된다 (Jørgensen et al., 2000). 생물학적 처리기술은 통기, 양분공급, 수분 및 pH조절 등의 조작을 통해 자연적으로 일어나는 생분해과정을 가속화시키는 기술이라 할 수 있다.

유기물의 사용은 토양의 보습력, 통기성, pH, 양분보유 능 등의 물리화학적 특성의 개선을 통해 미생물의 활성을 진작시키는 것으로 알려져 있는데 이러한 토양의 특성의 개량은 궁극적으로 토양내 미생물의 수, 탄화수소 및 탄소함유 오염물질의 분해능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Wellman et al., 2001). Goyal et al.(1993)은 유기물 자체가 다양한 endo- 혹은 exocellular 효소들을 함유하고 있어 유기물의 사용은 토양 내 다양한 효소들의 활성과 미생물의 활성을 증진시킨다고 하였다.

유기물사용이 미생물의 활성을 진작시키고 궁극적으로는 대상 오염물질의 분해를 촉진시킨다는 연구들이 다수 존재하는데 Gallego et al.(2001)은 도시하수 슬러지의 처리가 탄화수소의 분해를 현저하게 촉진하였다고 보고하였고 Wellman et al.(2001)은 퇴비의 처리가 무기질양분 ((NH₄)₂SO₄)에 비하여 엔진유(motor oil)의 분해를 촉진하였다고 보고하였고 Huesemann과 Moore(1993)은 amendment와 무기질양분을 동시에 사용한 처리가 무기질 양분 또는 amendment를 단독으로 처리한 처리구에 비해 원유(crude oil)의 분해를 촉진하는데 효과적이었다고 보고하였다. Bollag(1983)의 경우는 다른 관점에서 유기amendment의 효과, 즉 퇴비나 하수슬러지의 사용이 토양중 부식물질에서 일어나는 결합기작(coupling)을 통하여 오염물질의 용탈가능성(leachability), 생물학적 유효도(bioavailability)를 저감시켜 오염물질을 안정화시키는 효과가 있다고 하였다. 국내에서는 마정재 등(1999)이 부속이 진행중인 퇴비를 디젤오염토양의 정화에 있어 co-composting 기법에 활용가능성이 있다고 보고한 바 있다.

토양 유류오염의 경우 대부분은 주유소, 저유소 등의 유류취급부지 혹은 특정토양오염관리대상시설 부지 등에서 경유, 휘발유 등의 일반 유류로 인한 오염이 대부분을 차지하고 있으나 윤활유 등의 중질유로 인한 토양오염의 사례들도 꾸준히 보고되고 있다.

중질유 오염의 경우 휘발유, 경유 등의 일반유류와는 그 오염유발의 경로와 오염의 특성에 있어 구별되는 특성을 가진다고 할 수 있다. 유발경로에 있어 중질유 오염은 대용량의 저유시설에서 누유 등에 의한 오염이기 보다는 낙유 등으로 인한 표토오염이 주요한 오염형태가 되며 오염

의 발생도 일시적으로 다량의 유류가 토양으로 유출되는 오염이기 보다는 장기간에 걸쳐 오염이 유발되는 경우가 다수라고 할 수 있다. 장기간에 걸쳐 오염이 유발되고 지속되면서 aging과정에서 weathering되고 생분해가 용이하지 않은 성분들이 집중적으로 잔류되거나 생물학적 유효도가 낮은 양태로 존재하는 특성을 가지게 된다고 할 수 있다.

중질유의 경우 휘발유, 경유 등의 일반유류에 비해서 그 처리가 용이하지 않다는 일반적인 사실에 대해서만 보고되고 있을 뿐 중질유 오염토양의 처리가능성 및 처리기법 등에 대한 다양한 연구는 부족한 실정이라 할 수 있다.

우리나라에서는 연간 4,500만톤의 유기성 폐기물(축산분뇨 등)이 발생되고 있다고 보고되고 있는데 이는 잠재적인 오염원의 발생이라는 측면과 미생물의 생육과 다양한 오염물질의 분해를 촉진할 수 있는 양분과 에너지원이라는 측면에서 바라볼 수 있다.

본 연구에서는 중질유오염토양의 생물학적 정화가능성과 생물학적 처리에 있어 amendment의 활용가능성과 생물학적 지표(미생물활성과 토양효소)들의 중질유 오염토양 정화과정의 모니터링기법으로의 적용가능성을 검토하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 오염토양 및 amendment

본 실험에서 사용된 토양은 수십년간 차량 정비활동이 이루어졌던 부지에서 채취한 것으로 > C₂₀ 물질들로 조성된 유류성분으로 오염된 토양으로 유기용매 추출성 물질(TEM; Total Extractable Matter)의 함량이 6,205 ± 173 mgkg⁻¹ 인 수준의 오염도를 보이고 있었다(Fig. 1).

실험에는 돈분퇴비와 쌀겨, 두 종류의 amendments가 사용되었는데 amendment 선택에 있어 비용과 확보의 용이성 등을 고려하였다.

2.2. Amendments 처리에 의한 생물학적 분해실험

Amendments의 처리는 무처리(control), 쌀겨(5%, w/w), 퇴비 5%, 10%, 15%(w/w) 수준으로 처리하여 amendment와 토양을 균일하게 혼합 후 처리별로 별도의 플라스틱 박스(100 W × 80 L × 60H cm)에 충전하여 실험을 수행하였다. 양분과 amendment를 처리하지 않은 대조구(양분 및 amendment 무처리)를 두어 중질유 성분의 자연저감정도를 평가하였고 쌀겨의 처리구는 (NH₄)₂SO₄와

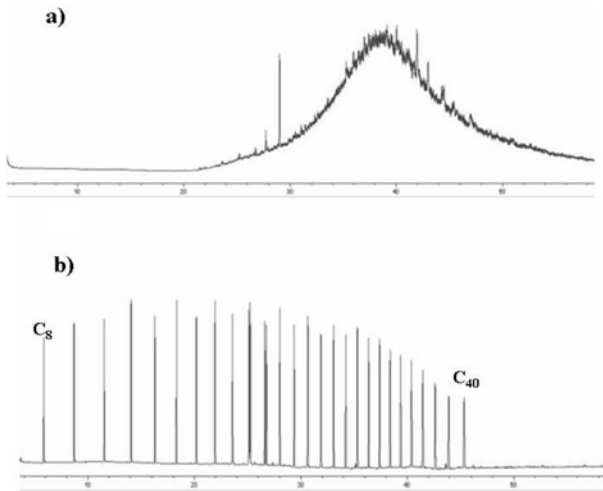


Fig. 1. Gas chromatogram of the soil used in this experiment(a) and n-alkane standard (C₈~C₄₀) (b).

K₂HPO₄를 이용하여 토양의 C/N/P 비율을 100/10/1의 수준으로 조절하였으나 퇴비처리구의 경우 별도의 양분을 공급하지 않았다.

실험은 비가림시설이 되어 있는 노지에서 105일간 진행하였는데 실험기간 중 주 2회 뒤집기를 통하여 원활한 통기가 이루어질 수 있도록 하였고 15일 간격으로 시료를 채취하여 유류성분 및 미생물활성과 관련한 모니터링을 수행하였다.

2.3. 분석법

2.3.1. 유류성분 분석

토양중의 중질유와 각 분획(fraction)은 Oudot et al. (1998)의 방법에 따라 정량하였다(Fig. 2). 습토에 Na₂SO₄를 처리하여 수분을 제거하고 Soxhlet 추출장치를 이용하여 chloroform을 용매로 토양 중 유류성분을 추출한 후 추출액을 건조시키고, 건조된 추출물을 hexane에 재용해시켜 GF/A glass-microfiber filter를 이용하여 asphaltenes를 제거하였다. Hexane 가용성분(maltenes)을 15 cm(L)× 1 cm(φ)에 활성화된 silica gel(100-200 mesh)을 충전시킨 soilid-liquid chromatography column에 hexane 60 ml, hexane-dichloromethane(60 : 40, v/v) 60 ml, 그리고 methanol 60 ml을 연속적으로 흘려주면서 용출액을 회수하고 회수된 용출액을 건조시키고 난 이후의 잔류물의 중량을 측정하는 방법으로 유류성분을 분획정량하였는데 이들 각 분획을 saturates, aromatic, 그리고 polar로 하였고 이들의 총합을 TEM(Total Extractable Matter)로 하였다.

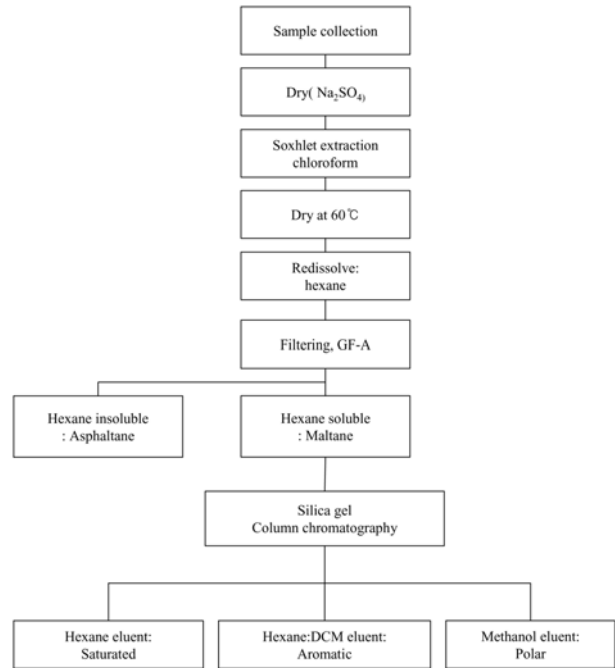


Fig. 2. Sample preparation and analytical scheme for the solid-liquid chromatography.

2.3.2. 미생물활성 분석

토양 중 탄화수소분해균 수는 five tube-MPN법에 의해 측정하였는데 습토를 인산염원추액으로 추출하고 순차적으로 희석한 후 희석액 250 μl를 Bushnell-Hass 배지가 담긴 96-well ELISA tray에 접종하였다. 이때 탄소원으로 경유 : 중질유(1 : 1)혼합액을 공급하였고 20일간 배양 후 미생물의 존재유무는 resazurin(0.1 g⁻¹)을 indicator로 이용하여 확인하였다.

토양호흡량(soil respiration)은 0.05 M NaOH가 들어 있는 밀폐용기에 습토를 넣고 25°C에서 24시간 배양후 0.1 M HCl로 CO₂의 포집에 사용되어 소모된 NaOH의 양을 측정함으로써 발생하는 CO₂를 정량하였다.

미생물생체량은 기질 첨가후 호흡량(SIR: Substrated Induced Respiration)을 측정하는 방법에 의해 측정하였는데 기질로는 glucose를 첨가하였고 기질 첨가후 20°C에서 4시간 배양하면서 0.05M HCl로 CO₂의 포집에 사용되어 소모된 NaOH의 양을 측정함으로써 생체량(biomass)을 정량하였다.

2.3.2. 토양효소분석

Catalase 활성은 Rodriquez-Kabana and Truelove (1982)의 방법에 따라 0.5g의 생토에 40 ml의 증류수와 5 ml의 30% H₂O₂를 첨가하여 10분간 진탕하고 5 ml의

3N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종료시키고 이를 여과하여 여액중에 잔류한 H₂O₂를 0.05N KMnO₄로 적정하여 정량하였다.

탈수소효소(dehydrogenase)의 활성은 Casida et al. (1964)의 방법을 이용하여 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)로부터 환원되는 triphenylformazan(TPF)을 메탄올로 추출하여 485 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 정량하였다.

Lipase는 Kuhnert-Finkernagel and Kandler(1995)의 방법에 따라 습토 1g에 tributrin 1.5 ml을 증류수와 같이 첨가한 후 37°C에서 72시간 동안 배양한 후 발생하는 butyric acid를 ethyl acetate로 추출하여 그 양을 5 mM NaOH로 적정함으로써 측정하였다.

FDA가수분해효소는 fluorescein diacetate(3,6-diacetyl-fluorescein; FDA)의 가수분해에 의해 생성되는 fluorescein의 양을 490 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 그 활성을 측정하였다(Bandick and Dick, 1999).

3. 결과 및 고찰

3.1. 토양 및 amendment의 물리화학적 특성

실험에 사용된 공시토양 및 amendment의 물리화학적 특성은 Table 1과 같다. 토양의 pH는 7.6으로 생물학적 정화에 적합한 토양반응을 보이고 있었고 모래 60.3%, 미사 29.8%, 점토 9.9%의 함량으로 미농무성법 분류에 의하면 사양토(sandy loam)로 분류될 수 있는 토양으로 보습력, 통기성 등이 양호한 토양에 해당되었다.

토양 중 중금속은 Cu, Pb, Zn 그리고 Cd이 각각 3.52, 5.95, 3.31, 0.08 mgkg⁻¹으로 자연함유량 수준의 매우 낮은 수준으로 함유되어 있어 생물학적 처리에 있어 중금속의 독성에 의한 미생물 활성의 억제는 우려하지 않아도 될 수준이었다.

토양의 양분보유정도는 유류오염부지에서 일반적으로 관찰되는, 즉 C에 비해 N, P등의 무기양분이 매우 낮은 수준으로 함유되어 있어 미생물 활성의 진작을 위해서는

추가적인 양분공급이 요구되는 수준이었다.

토양 중 유류분해균 수는 8.58 logMPNg⁻¹ 정도로 높은 수준으로 함유되어 있었는데 이는 오염이 장기간(30-40여년) 지속되는 과정에서 오염물질에 대해 토착미생물들이 적응한 결과라 판단된다.

한편 실험에 사용된 쌀겨와 퇴비의 유기물함량은 각각 37%, 34%이고 질소(TKN)의 함량은 0.5%, 1.5%이며 퇴비와 쌀겨의 용적밀도(bulk density; ρ_b)는 각각 1.01, 0.76이었다.

3.1. 중질유성분의 분해

실험기간 중 amendments 처리구들에서 토양 중 중질유성분이 현저하게 저감되었으나 무처리 토양에서의 저감정도는 미미한 것으로 조사되었다. 105일 경과 후 amendments처리구들에서는 3,381~4,173 mgkg⁻¹의 TEM이 잔류하여 초기농도 6,205 mgkg⁻¹대비 33~45%의 TEM이 분해된 것으로 나타났다(Fig. 3(a)).

최대분해활성을 보인 처리구는 15% 퇴비처리구였는데 쌀겨처리구에 비해서 전반적으로 퇴비 처리구들에서 높은 생물학적 분해활성을 보였으나 퇴비의 사용량간에 현저한 차이는 존재하지 않았다.

양분과 amendment를 처리하지 않은 무처리구에서는 초기농도의 8%에 해당하는 519 ± 148 mgkg⁻¹만이 105일 실험기간동안 분해되어 aging된 중질유성분의 생물학적 분해에 있어 무기양분이 제한인자로 되고 있음을 확인할 수 있었고 이로부터 중질유성분의 분해를 촉진하기 위해서는 무기양분의 공급이 반드시 필요하다고 할 수 있다.

사용한 amendment들의 용적밀도를 고려할 때 팽화제(bulking agent)로서의 기능 즉, 토양의 가밀도를 낮추고 공극을 증가시켜 통기성을 개선하는 효과에 있어서는 퇴비 5~10%와 쌀겨처리구가 크게 다르지 않다고 할 수 있는데 퇴비처리구에서의 분해속도가 쌀겨처리구에 비해서 일관되게 높았던 결과로부터 퇴비의 처리가 토양의 물리성의 개량은 물론 미생물활성증진과 관련해서 쌀겨에 비해 보다 효과적이라고 할 수 있다. 분해가 용이한 유기물

Table 1. Chemical and physical properties of the soil and amendments used in this study

	pH	TKN	OM	Sand	Silt	Clay	Av.P	Cu	Pb	Zn	Cd	HUB ^a	
	1 : 5%			mgkg ⁻¹							logMPN
Soil	7.6	0.02	1.69	60.3	29.8	9.9	17.00	3.52	5.95	3.31	0.08	8.58	
Rice Hull	7.2	0.50	34.12	-	-	-	2.34	3.57	2.35	23.52	ND	-	
Compost	6.4	1.51	37.03	-	-	-	572	32.94	7.94	67.94	0.03	-	

^a HUB: Hydrocarbon Utilizing Bacteria

이 투여되고 난 이후 분해저항성이 큰 토양유기물의 분해가 촉진되는 현상을 Shen and Bartha(1996)은 priming effect라고 하였는데 퇴비처리구에서 풍화된 중질유의 분해가 촉진된 것은 퇴비중의 분해가 용이한 저분자량의 물질들이 priming effect를 유발하여 궁극적으로 중질유성분의 분해를 촉진하였다고 할 수 있다.

양분 특히는 질소의 형태 및 수준을 고려할 때 쌀겨처리구와 퇴비처리구들에서 주요 무기태질소의 수준은 크게 다르지 않는 수준이었으나 그 주요 형태는 쌀겨처리구의 경우 NH_4^+ 이었던 반면 퇴비의 경우 N의 형태는 완숙된 퇴비임으로 해서 NO_3^- 가 무기태 N의 주요한 형태라는 점에서 차이가 있다고 할 수 있다. N의 형태가 분해활성에 있어 차이를 보이게 하는 주요한 요인이라고 할 만한 직접적인 근거는 없으나 향후 중질유 오염토양의 정화에 있어 무기양분의 공급을 통한 분해촉진을 모색함에 있어 N의 공급형태에 대한 검토가 필요하다고 할 수 있다.

3.2. 개별 fraction의 분해

유류성분이 분획별 저감양태를 관찰한 결과 105일 경과 후 saturated fraction은 amendment 처리구들에서는 초기농도의 60 ~ 47%인 2,086 ~ 2,706 mgkg⁻¹ 수준으로 저감된 것으로 나타났고 무처리구에서는 18%가 저감된 것으로 나타났다(Fig 3(b)). Saturated fraction의 경우 60일까지 신속한 분해가 이루어지고 이후 완만해지는 양태로 TEM과 유사한 분해 양태를 보인다고 할 수 있는데 엄밀히 말하자면 전체 유류성분(TEM)의 분해는 saturated fraction등의 분해가 용이한 성분들의 저감양태에 의해 결정된다고 할 수 있다.

Aromatic fraction은 실험기간 중 549 ~ 815 mgkg⁻¹가 amendment 처리구들에서 분해가 이루어져 초기농도의 43 ~ 64%가 분해되었고 무처리구에서는 11%인 146 mgkg⁻¹만이 분해된 것으로 나타났다(Fig. 3(c)). Aromatic fraction이 saturates fraction에 비해 완만히 분해된다는 것은 잘 알려진 사실로 본 실험에서도 saturates fraction이 amendment 처리구들에서 1,706 ~ 2,379 mgkg⁻¹이 분해된 것에 비해 절대적으로 적은 양의 aromatic fraction들이 실험기간 분해된 것으로 나타났다. Kirchmann and Ewnetu(1998)의 경우도 비슷한 결과를 보고한 바 있는데, 유류의 분해에 있어 마분퇴비(horse-manure)처리효과를 실험한 결과 saturated fraction의 경우 시간경과에 따라 신속한 분해가 이루어졌던 반면 aromatic fraction의 경우 미미한 양만이 분해되었다고 하였다.

Polar fraction의 경우 전 처리구에서 그 정도의 차이는

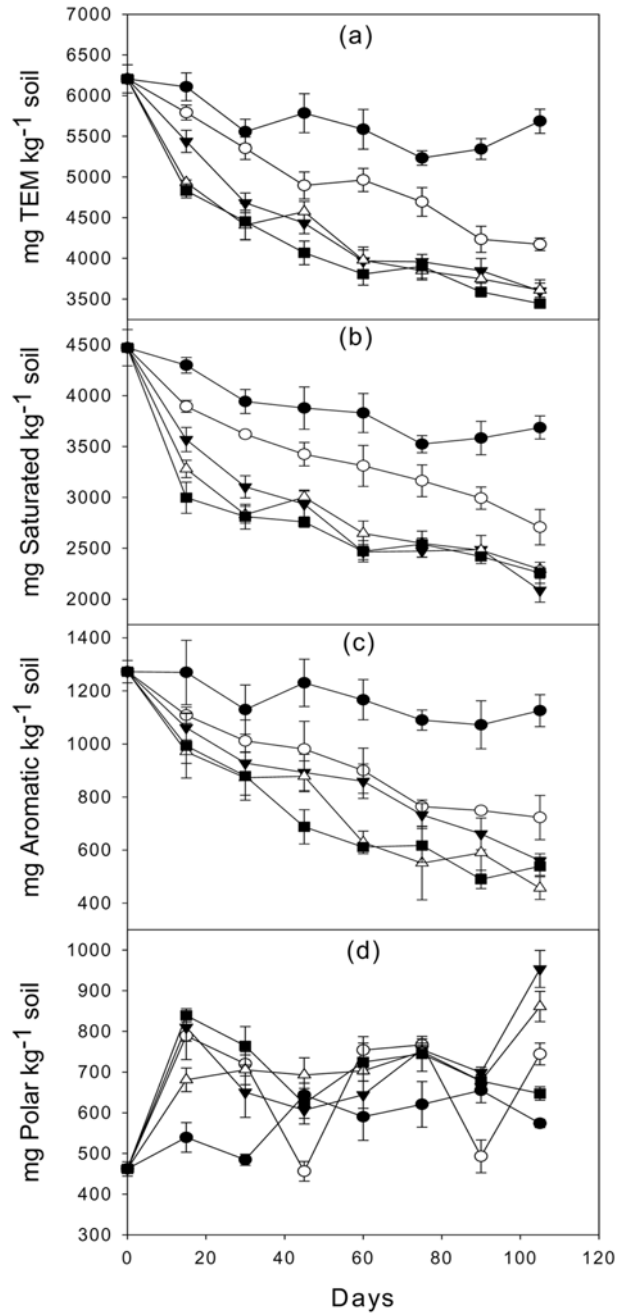


Fig. 3. Effect of amendments on the degradation of heavy mineral oil (TEM) and each fraction. ● Control; ○ Rice hull; ▼ Compost 5%; △ Compost 10%; ■ Compost 15%. Error bar indicate the standard deviation (n = 3).

있었지만 함량에 있어 증감이 반복되는 양상을 보였다 (Fig. 3(d)). 다른 분획들이 지속적으로 분해되어 저감되는 것과는 달리 증감이 이루어진다는 것은 saturated 및 aromatic fraction의 분해중간산물 등이 polar fraction 형태로 검출된다는 것을 의미하는 것이라 할 수 있다. 탄화수소류의 생분해과정에서 polar fractin의 생성된다는 사실

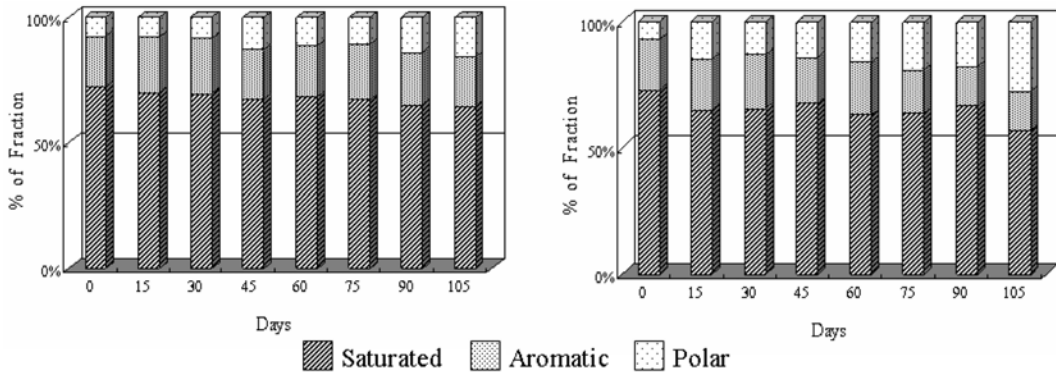


Fig. 4. The change of relative distribution of each fraction during bioremediation in control soil (a) and 5% compost amended soil (b).

은 여러 연구자들에 의해 확인된 바인데 Huesemann and Moore(1993)은 탄화수소의 생분해와 관련된 생체량 (biomass)의 증가에 기인한다고 하였고 Oudot et al.(1998) 등은 polar fraction이 분자량이 큰 물질들이 부분적으로 분해됨에 의해 생성되는 산물로 일시적인 화학종(transient species)들이라고 하였다. Polar fraction이 분해저항성이 큰 물질들의 생물학적 변성(부분적 분해)에 의해 생성된 물질들이라는 것은 본 실험결과에서 분해활성이 왕성했던 퇴비처리구에서의 polar fraction함량이 실험초기 급격히 상승하였던 반면 분해가 거의 이루어지지 않았던 대조구에서는 함량의 변화가 거의 없었던 데서도 확인되는 바이다.

중질유성분의 생물학적 분해과정에서 개별 fraction 즉, saturated, aromatic, polar fraction의 상대분포비의 변화는 Fig. 4와 같다. 당초 본 실험에 사용된 토양 중 유류성분의 개별 fraction의 분포비는 72% saturated, 20% aromatic, 8% polar의 조성을 가지고 있었는데 105일 경과 후 무처리구에서는 saturated fraction의 경우 8% 정도 감소하고, aromatic fraction은 거의 변화가 없었고 polar fraction은 8% 정도 그 함유비에서 증가된 것으로 나타난 반면 분해활성이 상대적으로 높았던 퇴비처리구에서는 saturated fraction은 16%, aromatic fraction은 5% 정도 감소된 것으로 나타났고 polar fraction의 비가 21% 증가된 것으로 나타났다. 잔류물질 중 polar분획의 증가와 실험후기의 분해속도의 감소와는 밀접하게 연관되어 있다고 판단된다.

3.3. 개별 fraction 및 중질유성분의 분해속도

시기적으로 확연히 대비되는 분해속도의 차이가 관찰되었는데 대략 60일을 기준으로 매우 신속한 분해가 이루어지는 초기단계와 이후 분해속도가 현저히 완만해지는 두 단계의 분해양태를 관찰할 수 있었다. 전체적으로 최고 분

해효율을 보인 15% 퇴비처리구에서는 전체 분해량의 81%, 초기농도의 61%가 60일까지 분해된 것으로 나타났는데 이 기간 매우 신속한 분해는 생물학적 유효도가 높은 물질들의(주로 saturated fraction)분해와 밀접히 연관되어 있다고 할 수 있다. 60일 이후 분해속도는 완만해져 이후 45일간은 총분해량의 19% 정도만이 분해되었는데 후반부에서 분해속도의 저하는 잔류한 물질들이 주로 분해저항성 물질 혹은 생물학적으로 유효도가 낮은 물질들로 주로 구성되어 있기 때문이라 할 수 있다(Langbehn and Steinhart, 1995; Allard and Neilson, 1997; Margesin et al., 2000).

First order kinetics는 점근적으로 농도가 zero로 지수적으로 감소된다는 것을 전제로 하는 것인데 농도의 저감 양태를 표현함에 있어 적합하기 때문에 생물학적 분해과정을 묘사함에 있어 보편적으로 사용되어 왔다(Demque et al., 1997; Jørgensen et al., 2000). 그러나 실제 토양 중 유류를 비롯한 유기오염물질들은 처리기간을 장기화하더라도 분해저항성이 큰 물질이 잔류하거나 생물학적 유효도의 저감 등으로 인해서 완전하게 분해되지 않고 잔류되는 부분이 필연적으로 존재함은 주지의 사실이다. 본 실험의 경우에 있어서도 상대적으로 생물학적 분해가 용이하다는 saturated, aromatic fraction의 경우도 분해활성이 높았던 퇴비처리구에서조차 당초의 50% 정도의 부분은 처리기간이 길어지더라도 농도변화가 크지 않을 것임을 확인할 수 있었다. 따라서 first order kinetics 등을 통한 처리기간의 예측이나 정화목표의 도달가능성을 예측하는데 있어 이러한 분해저항성 큰, 잔류성 물질들에 대한 고려가 있어야 한다고 할 수 있다. Nocentini et al. (2000)과 Demque et al.(1997) 등은 이러한 분해저항성이 큰 물질들이 잔류되는 현상을 설명하기 위해 다음과 같이 변형된 양태의 first order kinetics를 제안하였다.

Table 2. Biodegradation rates and estimated refractory fractions

Treatment	Loss rate constant (k^a) (day^{-1})			Residual concentration (mgkg^{-1} soil)		
	Saturated	Aromatic	TEM	Saturated	Aromatic	TEM
Control	0.0085	0.0026	0.0038	3,494	1,025	5,407
Rice Hull	0.0146	0.0115	0.0137	2,407	479	3,792
Compost 5%	0.0473	0.0159	0.0250	2,423	495	3,588
Compost 10%	0.0484	0.0155	0.0338	2,473	457	3,541
Compost 15%	0.0506	0.0156	0.0383	2,461	401	3,553

^a k = degradation rate constant of easily degradable

$$C_t = C_0 e^{-kt} + b$$

여기서 C_0 는 생물학적으로 분해가능한 물질의 농도, C_t 는 시간 t 가 경과되었을 때의 물질의 농도, b 는 분해저항성이 있는 부분을 의미한다.

위의 식에 의해 구해진 TEM과 개별 fraction의 분해속도(k)와 예측 잔류농도는 Table 2에 정리하였다. 변형된 first order kinetics에 의하면 분해활성이 높은 퇴비처리구에서도 상당량의 분해저항성이 있는 부분들이 잔류할 것으로 추정되었는데 compost 15% 처리구에서 saturated fraction은 $2,461 \text{ mgkg}^{-1}$, aromatic fraction은 401 mgkg^{-1} 그리고 TEM은 $3,553 \text{ mgkg}^{-1}$ 정도가 잔류하게 될 것으로 예측되었다.

3.4. 중질유성분의 생분해 과정에서의 미생물학적 활성의 변화

탄화수소분해균 수는 초기 15일까지 현저한 증가가 이루어지고 난 이후 무처리구와 짚겨처리구에서는 지속적으로 감소하였으나 퇴비처리구들에서는 다른 처리구들에 비해 상대적으로 높은 탄화수소분해균 수의 수준을 유지하다 90일이 경과되면서 감소되는 양상을 보였다(Fig. 5(a)). 중질유성분이 60일까지는 신속하게 분해되었던 양상과는 조금은 차이가 있다고 할 수 있는데 van der Waarde et al.(1995) 등은 탄화수소분해균 수의 변화가 촉진된 생물학적분해 과정을 암시할 수는 있어도 전체적인 생물학적분해 과정을 묘사함에 있어서는 적합하지는 않다고 보고하였는데 이는 다양한 스펙트럼의 미생물 중에서 지극히 제한된 부분만이 실험실 조건에서 배양되고 측정되기 때문이라 하였다.

토양 호흡량(soil respiration)의 측정은 토양미생물의 활성의 지표로서 활용되어왔다(Anderson, 1982). 호흡량은 실험초기에 높은 수준에 도달하였는데 이 기간동안 중질유 혹은 amendment 중의 분해가 용이한 물질들이 토양 미생물에 의해 신속히 분해되었다는 것을 의미한다(Fig. 5(b)). 전처리구에서 실험초기 급속한 증가에 이어 이후에

는 감소되는 양태를 보였는데 무처리구와 짚겨처리구에서는 당초의 수준으로 호흡량이 감소된 반면 퇴비처리구들에서는 상대적으로 높은 수준으로 실험기간내 유지되었다.

Biomass-C(glucose-induced respiration)의 경우 실험 초기 증가하였다가 이후 감소되는 양상은 호흡량의 경우와 유사한 양태를 보였으나 호흡량의 경우 증가 후 감소되어 일정한 수준이 유지되는 반면 biomass-C의 경우 증감이 반복되는 양상을 보였다(Fig. 5(c)). Biomass-C의 연속적인 증감을 Margesin et al.(2000)은 미생물의 천이(microbial succession) 때문이라 하였다.

3.4. 중질유성분의 생분해 과정에서의 효소활성의 변화

중질유의 생물학적분해과정에서의 탄소순환에 관여하는 효소인 lipase, 산화환원효소인 catalase, dehydrogenase, 그리고 가수분해효소활성의 지표로 알려진 FDA hydrolase 활성의 변화를 모니터링한 결과는 다음의 Fig. 6과 같다.

Lipase의 활성은 amendment 처리구들에서는 증감이 반복되는 양태를 보였는데 30일과 75일경 활성이 증가되는 양상이었으나 무처리구에서는 실험기간내 거의 변화가 없었다. Lipase는 오염물질을 포함하여 지질(lipid) 성분의 분해에 관련된 효소로 알려져 있는데 Margesin et al. (2000) 등은 lipase가 탄화수소분해과정의 모니터링에 있어 유용한 지표라고 하였다. 본 실험에서 lipase 활성의 변화가 비단 토양중 탄화수소분해와 연관이 있는 것이 아니라 amendment에 함유된 지질성분의 분해와 연관이 있다고 보여지는데 퇴비처리 토양들에서 탄화수소 즉 중질유성분의 분해속도는 60일을 경과하면서 저하된 반면 lipase의 활성은 45일경 감소되었다가 다시 75일까지 활성이 증가되는 것으로 나타나 탄화수소성분 이외의 퇴비유래 지질성분의 분해와 연관되어 있다고 볼 수 있다.

Catalase활성은 호기성 미생물의 활성의 지표로서 토양 미생물 수 및 토양비옥도와 연관되어 있다고 알려져 있다(Pascual et al., 1996). 본 실험에서 catalase의 활성은 실험기간내에 특징적인 양태를 보이지 않았고 처리간의

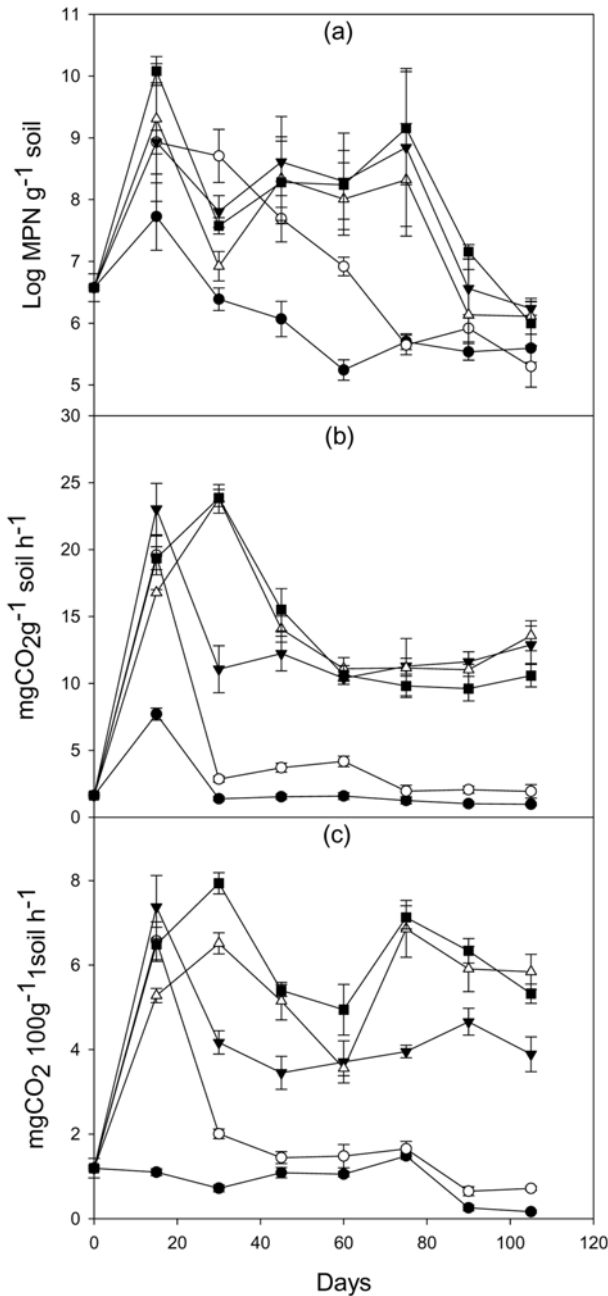


Fig. 5. Change in the number of hydrocarbon using microorganisms (a), soil respiration (b), and microbial biomass-C (c). ● Control; ○ Rice hull; ▼ Compost 5%; △ Compost 10%; ■ Compost 15%. Error bar indicate the standard deviation (n = 3).

활성의 차이도 현저하지 않은 것으로 조사되었는데 다분히 과산화수소(H₂O₂) 소모량에 의한 catalase활성 측정이 amendment 유기물에 의한 간섭으로 다분히 왜곡되었을 수 있다고 보인다. H₂O₂의 소모가 토양미생물에 의한 것이 아니라 amendment의 유기물과의 반응에 의해 상당부분 소모될 수 있기 때문이다.

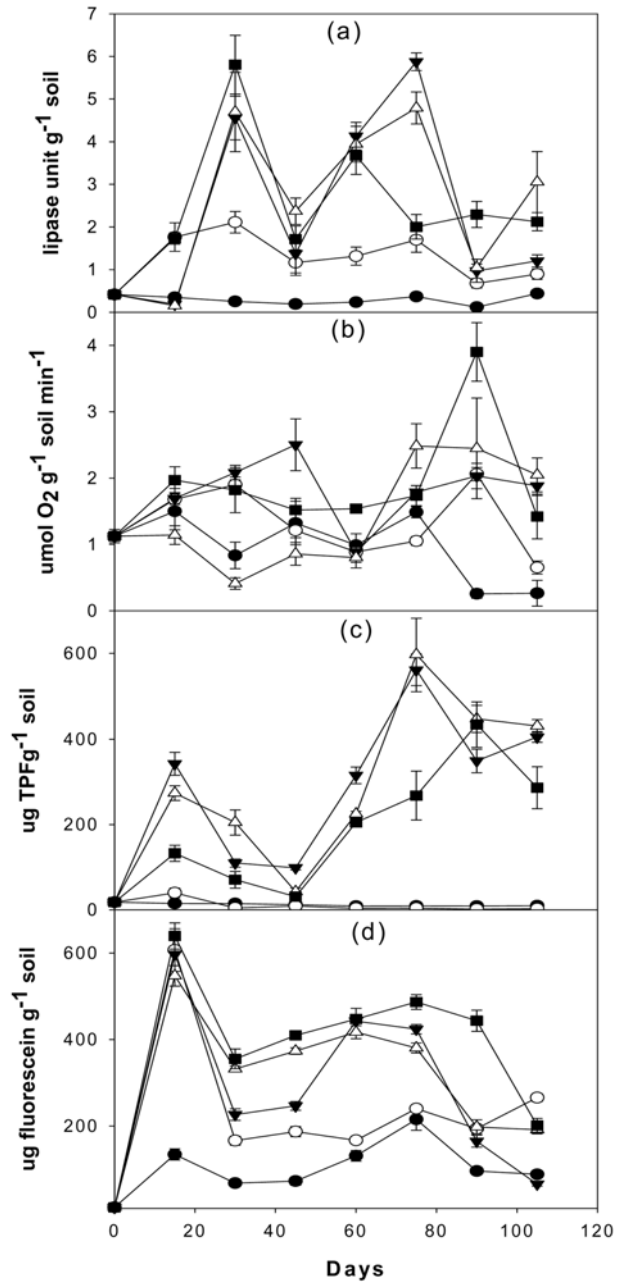


Fig. 6. Effect of amendments on soil lipase (a), catalase (b), dehydrogenase (c), and FDA hydrolase (d) activity. ● Control; ○ Rice hull; ▼ Compost 5%; △ Compost 10%; ■ Compost 15%. Error bar indicate the standard deviation (n = 3).

탈수소효소(dehydrogenase)의 활성은 퇴비처리구들과 무처리 및 싹겨처리구간에 현저한 차이를 보였는데 퇴비처리구들에서 높은 활성이 확인되었고 퇴비처리구내에서 시용량의 증가에 따른 현저한 차이는 존재하지 않았다. 무처리구 및 싹겨처리구에서는 실험초기 15일경 증가하였다가 감소되어 당초의 수준에서 그 활성이 유지된 반면 퇴

Table 3. Correlation matrix of hydrocarbon decontamination and soil biological parameters ^a

Parameter ^b	Correlation coefficient									
	SAT	ARO	POL	HUB	RES	BIOM	LIP	CAT	DHA	FDA
TEM	0.987**	0.954**	-0.452**	-0.106	-0.404**	-0.550**	-0.524**	-0.440**	-0.667**	-0.413**
SAT		0.922**	-0.559**	-0.132	-0.456**	-0.575**	-0.535**	-0.418**	-0.670**	-0.456**
ARO			-0.496**	-0.088	-0.371**	-0.553**	-0.503**	-0.438**	-0.668**	-0.394**
POL				0.187*	0.492**	0.493**	0.345**	0.143	0.440**	0.476**
HUB					0.577**	0.561**	0.364**	0.261**	0.249**	0.713**
RES						0.891**	0.520**	0.286**	0.478**	0.729**
BIOM							0.555**	0.480**	0.641**	0.745**
LIP								0.215*	0.484**	0.442**
CAT									0.514**	0.269**
DHA										0.403**

^a 15 samples for each treatment were used in analysis, i.e., three replicates for each treatment and sampling date

^b SAT, saturated; ARO, aromatics; POL, polars; HUB, hydrocarbon using microbes; RES, soil respiration; BIOM, microbial biomass-C; LIP, lipase; CAT, catalase; DHA, dehydrogenase; FDA, FDA hydrolase

* P < 0.05; ** P < 0.01

비치리구들에서는 45일경 감소되었다가 증가되는 양상을 보였다. 퇴비치리구들에서 45일경의 감소가 외부 환경적 요인(온도, 수분 등)에 의한 것인지 시간경과에 따라 가용한 탄소원의 변화에 따른 미생물 특성의 변화에 의한 것인지는 분명하지 않다. 퇴비치리구들에서 dehydrogenase의 활성이 무처리, 썰겨치리구들에 비해 현저하게 높게 나타나는 것은 호흡량 및 생체량의 결과와 더불어 퇴비의 사용이 토양미생물의 활성증대에 효율적임을 의미하는 것이라 할 수 있다.

FDA는 protease, lipase, esterase 등의 다양한 효소들에 의해 가수분해되는 것으로 알려져 있는데 그 가수분해속도가 토양미생물의 전반적인 활성의 크기로 간주된다. FDA의 가수분해 속도는 초기 15일에 급속히 증가하였다 이후 감소되는 것이 전체 치리구들에서 보여지는 양상이었다. FDA 가수분해 속도 역시 다른 효소들의 활성과 같이 퇴비치리구에서 전반적으로 높은 것으로 나타났다.

3.5. 상관관계

실험기간 중 탄화수소(중질유)성분의 변화와 미생물활성 및 효소활성간의 상관관계를 다음의 Table 3에 나타내었다. TEM 및 각 fraction들의 농도와 미생물호흡량, biomass-C 등의 미생물 활성과 lipase, catalase, dehydrogenase, FDA hydrolase 등의 토양효소와 높은 부의 상관($p < 0.01$)에 있었으나 탄화수소분해균 수와는 상관이 없는 것으로 나타났다. 그리고 미생물활성과 토양효소들간에는 높은 정의상관관계가 존재하는 것으로 나타났다($p < 0.01$). 탄화수소분해균 수와 유류성분의 분해되는 대

부분의 경우 높은 상관관계가 존재한다고 보고되는 것이 일반적인 경우(Song and Bartha, 1990; Gnther et al., 1996)라 할 수 있으나 본 실험과 같이 상관관계가 없다고 보고한 사례 또한 존재하는데 van der Waade et al. (1995) 나 Margesin et al.(2000) 등은 탄화수소분해균 수의 변화가 전체적인 생물학적 분해과정을 묘사함에 있어서 적합하지 않다고 보고하였다.

4. 결 론

중질유성분의 생물학적 처리에 있어서 퇴비, 썰겨 + 무기양분 등의 토양 amendment의 처리를 통한 토양미생물의 분해활성을 증대시킬 수 있음이 확인되었는데 특히 퇴비 처리가 무처리, 썰겨치리에 비해 분해활성 증대 효과가 큰 것으로 확인되었다. 퇴비치리에 의한 분해활성의 증대는 퇴비중에 N, P 등의 양분과 미생물의 활성을 증대시키고 co-metabolism의 유도 및 촉진시킬 수 있는 미량원소, 비타민 등의 다양한 물질을 함유하고 있기 때문이라 추정된다. Amendment 처리에 의해서 aging된 중질유에 대한 토양미생물의 분해활성은 크게 증대되기는 하였지만 최고 분해활성을 보였던 퇴비치리구에서도 50% 정도의 중질유 성분은 잔류하는 것으로 조사되었다. 중질유의 분해과정에서 토양호흡 및 biomass-C 등의 미생물활성 과 토양효소(lipase, catalase, dehydrogenase, FDA hydrolysis)의 활성은 중질유의 농도와 높은 상관관계를 보여 이들 인자들을 중질유 성분의 분해과정을 모니터링 지표로서 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 마정재, 고흥석, 황종식, 정민정, 최상일, 김국진, 1999, 동절기 유류 오염토양 복원을 위한 Co-composting 기술의 현장 적용성 연구, *한국토양환경학회지*, **4**, 193-201.
- Allard, A.S. and Neilson, A.H., 1997, Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects, *Int. Bio-deterioration Biodegradation*, **39**, 253-285.
- Anderson, J.P.E., 1982, Soil respiration. In: Page, A.L. (ed), *Methods of soil analysis; part 2: Chemical and microbiological properties*, American society of Agronomy- Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 831-871.
- Bandick, A.K. and Dick, R.P., 1999, Field management effects on soil enzyme activities, *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1471-1479.
- Bollag, J.M., 1983, Cross-coupling of humus constituents and xenobiotic substances, In: Christman, R.F.; Gjessing, E.T. (ed), *Aquatic and terrestrial humic materials*, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan. p. 127-141.
- Casida, L. E., Klein, D.A., and Santoro, T., 1964, Soil dehydrogenase activity, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **47**, 599-603.
- Chaneau, C.H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., and Oudot, J., 1999, Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperatural soil, *Sci. Total Environment*, **227**, 237-247.
- Demque, D.E., Bigger, K.W., and Heroux, J.A., 1997, Land treatment of diesel contaminated sand, *Can. Geotech. J.*, **34**, 421-431.
- Gallego, J.L.R., Lorego, J., Llamas, J.F., Vazquez, F., and Snchez, J., 2001, Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation, *Biodegradation*, **12**, 325-335.
- Goyal, S., Mishra, M.M., Dhankar, S.S., Kapoor, K.K., and Batra, R., 1993, Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term applications, *Biology and Fertility of Soils*, **15**, 60-64.
- Gnther, T., Dornberger, U., and Fritsche, W., 1996, Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil, *Chemosphere*, **33**, 203-215.
- Huesemann, M.H., 1994, Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon contaminated soils, *J. Soil Contam.*, **3**, 299-318.
- Huesemann, M.H. and Moore, K.O., 1993, Compositional changes during landfarming of weathered michigan crude oil-contaminated soil, *J. Soil Contam.*, **2**, 245-264.
- Jørgensen, K.S., Paustinein, J., and Suorrti, A.M., 2000, Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles, *Environmental Pollution* **107**, 245-254.
- Kirchmann, H. and Ewnetu, W., 1998, Biodegradation of petroleum based oil wastes through composting, *Biodegradation*, **9**, 151-156.
- Kuhnert-Finkernagel, R. and Kandeler, E., 1995, Enzymes Involved in Carbon Metabolism. In: Schinner, F.; Ohlinger, R.; Kandeler, E.; Margesin, R. (ed), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Langbehn, A. and Steinhart, H., 1995, Biodegradation studies of hydrocarbons in soil by analyzing metabolites formed, *Chemosphere*, **30**, 855-867.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., and Schinner, F., 2000, Monitoring of bioremediation by biological activities, *Chemosphere*, **40**, 339-346.
- Nocentini, M., Pinelli, D., and Fava, F., 2000, Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: residual concentration problem, *Chemosphere*, **41**, 1115-1123.
- Oudot, J., Merlin, F. X., and Pinvidic, P., 1998, Weathering rates of oil components in a biodegradation experiment in estuarine sediments, *Mar. Environ. Res.*, **45**, 113-125.
- Pascual, J.A., Hernandez, T., Garcia, C., and Ayuso, M., 1998, Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment, *Bioresource Technology*, **64**, 131-138.
- Rodriguez-Kabana, R. and Truelove, B., 1982, Effects of crop rotation and fertilization on the catalase activity in a soil of the south-eastern United States, *Plant and Soil*, **69**, 97-104.
- Shen, J. and Bartha, R., 1996, Priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation tests, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1428-1430.
- Song, H.G. and Bartha, R., 1990, Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 646-651.
- Van der Waarde, J.J., Dijkhuis, E.D., Henssen, M.J.C., and Keuning, S., 1995, Enzyme assays as indicators for bioremediation. In: Hinchee, R. E., Douglas, G. S., Ong, S.K. (ed), *Monitoring and verification of bioremediation*. Battelle Press, p. 59-63.
- Wellman, D.E., Ulery, A.L., Barcello, M.P., and Duerr-Auster, S., 2001, Animal waste-enhanced degradation of hydrocarbon-contaminated soil, *Soil and Sediment Contamination*, **10**, 511-523.