

생장 온도 범위별 최적의 유류분해 미생물을 이용한 토양경작 정화기술의 효율성 제고에 관한 현장 적용성 연구

유재봉¹ · 김정호¹ · 김국진² · 오승택² · 이철효² · 박이경³ · 장윤영^{3*}

¹SK건설, ²(주)오이코스, ³광운대학교 환경공학과

A Field Study on the Enhancement of Landfarming Performance Using Oil-degradable Microbes Adapted to Various Temperature Range

Jae-Bong Yu¹ · Jeong-Ho Kim¹ · Guk-Jin Kim² · Seung-Taek Oh² · Cheol-Hyo Lee²
I-Kyong Park³ · Yoon-Young Chang^{3*}

¹SK Engineering and Construction

²OIKOS Co. Ltd.

³Department of Environmental Engineering, Kwangwoon University

ABSTRACT

Bioremediation has been applied as a proven technology in remediation of TPH contaminated soil. However, the efficiency of biodegradation is dependent on temperature as microbial activity is depressed at lower temperature ranges (30°C~80°C). The objective of this study was to develop microbes with enhanced activities at the stated temperature conditions and to evaluate the remediation effectiveness of these microbes in TPH contaminated soil. Experiments were conducted to isolate hydrocarbon degradable microbial consortia cultured under different temperature conditions. It was found that there were 5 strains of mesophilic (30°C) and 3 strains of psychrophilic (80°C) microbes. The TPH concentration was reduced from 4,044 mg/kg to 1,084 mg/kg, (73.2%) in 10 days by using mesophilic microbial consortia and from 5,427 mg/kg to 1,756 (67.6%) in 50 days with psychrophilic microbial consortia in laboratory cultures under controlled conditions. This rate determination excluded physical degradation such as venting and dilution. A field study was then performed to examine the feasibility of applying these microbes in the land-farming process. In this case, 87.1% of the 2,560 mg/kg TPH contaminated soil was degraded in 56 days. The biodegradation rate coefficient (k) was 0.0374 day⁻¹. Findings of this study provide viable options for applying microbes for bioremediation of TPH in lower temperature conditions.

Key words : Microbes, Mesophilic, Psychrophilic, Landfarming, Hydrocarbon

요 약 문

생물학적 정화는 TPH로 오염된 지역을 정화하는 효과적인 방법으로 적용되고 있다. 하지만 미생물의 분해 활성이 적정온도 이하, 이상의 온도에서는 감소하기 때문에, 생분해 효율이 온도의 변화에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 이번 연구의 목적은 유류 분해 효율이 우수한 중온성 미생물을 분리하여 TPH로 오염된 지역에 적용할 때의 정화효율을 평가해 보는 것이다. 먼저 탄화수소 분해효율이 뛰어난 중온성(30°C) 미생물 5종과 저온성(80°C) 미생물 3종의 consortia를 분리하였으며, 이들 미생물 consortia를 실험실내에서 유류로 오염된 토양에 적용해 본 결과, 중온성 미생물의 경우 초기 TPH 4,044 mg/kg이 10일 경과 후 1,084 mg/kg으로 73.2%, 저온성 미생물은 TPH 5,427 mg/kg이 50일 경과 후 1,756 mg/kg으로 67.6%의 처리효율을 보였다. 이 분해율은 휘발이나 희석에 의한 물리적 저감을 포함한다. 이후 분리된 미생물들을 토양 경작 현장에 적용해 본 결과, TPH 2,560 mg/kg의 오염이 56일

*Corresponding author : yychang@kw.ac.kr

원고접수일 : 2009. 5. 14 심사일 : 2009. 7. 6 게재승인일 : 2009. 8. 26

질의 및 토의 : 2009. 12. 31 까지

경과 후 87.1%의 제거율을 보였으며, 이때의 생분해 반응 속도상수는 0.0374 day^{-1} 이었다. 본 연구 결과는 저온, 중온 상태에서 미생물을 이용한 생물학적 정화가 더 다양하게 이용될 수 있는 가능성을 보여준 것으로 판단된다.

주제어 : 미생물, 중온성미생물, 저온성미생물, 토양경작, 탄화수소 분해

1. 서 론

국·내의 유류분해 미생물을 이용한 생물학적 정화를 위한 연구 개발은 정화운영 환경적인 조건, 경제성을 이유로 주로 중온성 박테리아속 미생물이 주종을 이루고 있다. 최근 동절기 토양정화 효율을 증대시키기 위해 저온성 미생물의 개발과 관련된 특허가 출원되고 있으나 아직은 저조하고, 고온성 미생물과 관련된 국내 개발은 거의 수행되지 않고 있다(이상환, 2007).

중온성 미생물의 경우 97년 이후부터 토양경작, 바이오파일, 지중 생물학적 정화 등의 생물학적 정화 공법이 적용되면서 개발이 진행되어 왔으며, 국내 특허 출원된 미생물 종류는 *Pseudomonas* sp. 이외 9종 이상의 속명을 가진 미생물 16종 이상이 출원되었다. 저온성 미생물의 경우 *Pseudomonas* sp. 외 소수의 특허 출원만 확인되었다. 이는 그동안 동절기 생물학적 정화를 수행하는 경우가 많지 않아, 그 필요성이 부각되지 못한 것으로 보인다. 하지만 국내 부지 이용도가 높고, 급속한 개발 방식으로 동절기 생물학적 정화도 그 수요가 높아지고 있다(김국진, 2008).

지중 또는 굴착 후 토양을 정화하는 경우, 동결심도 이내에서는 온도에 의한 미생물 생장이 거의 정지되어 생물학적 정화는 기대하기 어려우며, 동결심도 이하에서도 중온성 미생물의 성장 제약 온도인 10°C 이하로 온도가 저하되면 생물학적 정화 효율을 기대하기 어렵다. 하절기 경우에도 토양 내 온도는 지중의 경우 $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ 범위에서 유지되기 때문에 일반적인 중온성 미생물의 경우 분해 활성을 최대로 발휘하기 어렵다. 토양경작이나 바이오파일의 경우, 동절기 동안 시설 내부에 별도의 열 공급 장치를 설치하더라도 하절기에 비해 분해 효율은 크게 저하된다. 하절기 비닐하우스 경작의 경우, 하우스 내부의 토양 온도는 25°C 이상 유지되기 어려워 중온성 미생물의 최적 온도 조건인 30°C 에는 미치지 못하는 조건이다.

토양경작을 위한 주요 영향인자로는 미생물 농도, 토양 pH, 수분함량, 온도, 영양분 농도, 토성, 오염물질 특성 등이 있다. 토착미생물의 존재여부와 농도를 평가하기 위해 토양시료 채취 후 평판계수법 등의 실험을 통하여 미생물의 농도를 측정한다. 일반적으로 토양 내에는 $10^4\sim 10^7$ CFU/g 정도 관찰되지만, 이 중 유류분해 미생물 농도는

토양의 환경이나 오염원의 종류에 따라 크게 달라진다. 유류분해 미생물의 농도가 10^3 이상 일 경우 토양경작법이 가능한 것으로 알려져 있고(환경부, 2007), 10^6 이상일 경우는 더 이상 유류분해 미생물을 첨가 하더라도 정화효율에는 큰 영향이 없는 것으로 알려져 있다(EPA, 1996). 토양의 pH는 7부근에서 미생물이 성장하기에 가장 좋은 조건이며, 토양경작법을 적용하기에는 pH 6~8 범위가 가장 적당하다. 토양의 온도는 미생물의 성장에 가장 큰 영향을 미친다. 토양미생물의 활성은 10°C 이하에서는 활동이 둔화되고 5°C 이하에서는 활동을 거의 멈추게 된다. 또한 45°C 이상에서도 중온성 미생물의 경우 활성이 감소한다. 따라서 적용 온도가 낮거나 높을 경우, 해당 온도에서 유류분해활성이 상대적으로 뛰어난 미생물의 주입이 필요하게 된다. 미생물은 세포성장과 생분해과정을 수행하기 위하여 암모니아와 인등의 영양염류를 필요로 한다. 이러한 영양염류는 토양으로부터 공급 받을 수도 있지만, 오랫동안 오염이 지속되고 자연적으로 정화가 진행된 토양의 경우는 미생물이 유류성분을 분해하는데 필요한 영양분이 부족한 경우가 많다. 이러한 경우는 토양 내 영양분 함량의 측정을 통하여 추가로 공급할 필요가 있다. 대표적인 미생물의 세포구조식은 $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ 과 $\text{C}_{60}\text{H}_{87}\text{O}_{32}\text{N}_{12}\text{P}$ 이며, 주요 구성 물질은 탄소(C), 질소(N), 인(P) 등으로 이루어져 있다. 이들 미생물을 이용하여 생분해를 촉진하기 위한 가장 이상적인 탄소 : 질소 : 인의 비율은 100 : 10 : 1 ~ 100 : 10 : 0.5의 범위가 일반적이다(이상환, 2007, EPA, 1996). 토성은 토양의 투수계수, 수분함량, 겔보기 밀도 등에 영향을 미친다. 특히 토양 내 영양염류 및 수분함량 등을 적절히 유지하기 위해서 토성을 고려해야 한다. 토양경작의 환경인자로 오염물질의 특징이 큰 영향을 미친다. 오염물질의 화학구조를 살펴보면 어떤 물질이 가장 난분해성 물질인지 확인이 가능하다. 따라서 이러한 정보를 이용하여 정화기간 산정, 생물학적 정화 가능성 평가, 현장 파일럿 실험, 토양경작 운전 및 모니터링 계획 등은 생분해가 가장 느린 오염물질을 기준으로 이루어져야 한다. 휘발유, 경유, 등유 등은 상대적으로 생물학적으로 분해가 쉬운 유종이고 기계유, 윤활유 등은 C_{30} 이상의 난분해성 물질의 함유량이 높아 생물학적으로 정화하기 어려운 유종에 속한다. 또한 오염물질의 농도에 따라 제약을 받기도 하는데 석유계 화합물의 농도가 25,000

mg/kg을 초과하거나, 중금속의 농도가 2,500 mg/kg을 넘어서게 되면 미생물의 활동은 제약을 받게 되어 생물학적 정화가 어렵게 된다(환경부, 2007). 이 같은 경우에는 토양세척법, 열탈착법 등의 물리·화학적 공법으로 정화하게 된다. 기존 생물학적 오염토양정화의 실제 사례(덕적도 유류누출지역 토양복원사례, 2002)를 조사해 보면, 토양정착법으로 57일 정도 정화하여 TPH 초기 농도가 5,566 mg/kg에서 1,289 mg/kg으로 정화되는 수준으로 동 기간 내 TPH 500 mg/kg 이내의 정화는 매우 어려운 것으로 사료된다.

본 연구는 최근 강화된 법적기준에 의한 가지역 정화기준인 TPH 500 mg/kg 미만으로 정화하기 위해 기존의 정화 효율을 더욱 높게 보완하는데 중점을 두었다. 이에 따라 생물학적 정화에서 큰 제약 인자인 온도에 대한 단점을 보완하고자 저온과 중온에서 유류분해 활성이 특히 뛰어난 미생물을 분리하고, 실제 토양정착 현장에 사용하여 정화효율을 확인하는데 그 목적이 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. TPH 및 이화학적 분석

실험대상 오염토양 채취지역은 인천시 남구 소재 OO물류센터 현장으로 주로 JP-8로 오염된 부지에서 채취하였다. 채취 방법은 주 오염 부지를 굴착하여 GL -3.0 ~ -4.0 m 사이에서 회색빛으로 변색된 오염토양을 채취하여 시료로 사용하였다. 채취된 시료는 갈색 광구병에 담은 등 토양오염공정시험방법에 따라 보관하고 분석실로 옮겨 TPH 분석을 실시하였다.

수분함량 분석은 토양시료 10 g을 105°C 건조기에서 항량이 되도록 건조하여 건조전과 후의 무게 차이를 계산하여 수분함량을 분석하였다.

2.2. 현장 및 토양특성 분석

본 연구에서 분리된 혼합미생물의 현장 적용 부지는 1950년대부터 유류를 저장하던 시설로 오랜 기간에 걸쳐 다양한 유류를 취급해오던 지역으로 오랜 기간 동안 다양한 성상의 유류성분으로 오염되어 오염특성이 다양하고 난분해성 물질의 축적이 진행된 지역이다. 또한 기계유, 윤활유 성분의 Heavy oil 오염이 국지적으로 분포되어 있다. 오염토양 특성 분석을 위하여 입도 및 소성한계시험을 실시하였다. 입도분석은 KSF2302법으로, 소성한계시험은 Atterberg 한계시험 방법으로 분석기관에 의뢰하여 분석하였다.

Table 1. The composition of culture medium for isolation of petroleum degrading bacteria

Medium	
(NH ₂)SO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	3.32 g
KH ₂ PO ₄	0.83 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
MnCl ₂ ·2H ₂ O	0.002 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.002 g
Tween 80	0.01 g
Oil	10 g/l D.W.
Agar powder	8 g

2.3. 미생물 분리 동정 및 분석

미생물 분리 동정을 위해 사용된 배지는 먼저 Table 1로 구성된 성분들의 농도가 증류수 1 L 내 용해되도록 조제한 최소배지에 탄소원으로 유류를 함유시킨 고체상 평판배지이다. 여기에 저온(8°C), 중온(30°C)의 온도조건에서 활발하게 성장하는 미생물을 분리하였다. 미생물 동정은 16S rDNA의 부분의 Ribosomal RNA의 이차구조를 참고하여 염기서열을 결정(Stackebrandt et al., 1994)하고, 기존 미생물의 유전자 데이터베이스(NCBI)를 이용하여 유사도를 분석(Goodfellow et al., 1997) 하였다.

먼저 탄소원을 제외한 최소 배지 1 L에 유류로 오염된 토양을 100 g 투입한 후 탄소원으로서 경유가 10,000 ppm이 되도록 추가로 첨가하고, 온도 조건별로 배양하여 유류분해 미생물들이 성장할 수 있도록 하였다. 24~48시간 배양 후 배양액의 상등액을 Table 1의 고체상 평판배지에 도말하여 목표 온도 범위에서 성장하는 미생물을 Single Colony Isolation하고, 분리된 미생물 중에서 성장력이 우수한 미생물을 재 분리하여 최종 선별하였다. 이때 성장력의 분석은 600 nm에서 탁도를 측정하여 상대적으로 탁도가 높은 미생물 순으로 선별하였다. 최종 선별된 미생물 균주들을 16S rDNA의 부분 염기서열 결정 및 유사도 분석으로 동정하여 병원성 미생물의 유무를 확인한 다음 최종 선별하는 과정을 거쳤다(Fig. 1).

중온성미생물의 경우 30°C, 저온성미생물의 경우 8°C 온도 조건에서 160 rpm으로 유류분해 미생물이 성장할 수 있도록 배양하였다. 배양된 배양액을 다시 고체 평판배지에 도말하여 30°C 및 8°C 항온 인큐베이터에서 배양하여 미생물을 Single Colony Isolation 하였다.

미생물 분석 방법은 멸균수 9 ml에 시료 1 g을 넣어서

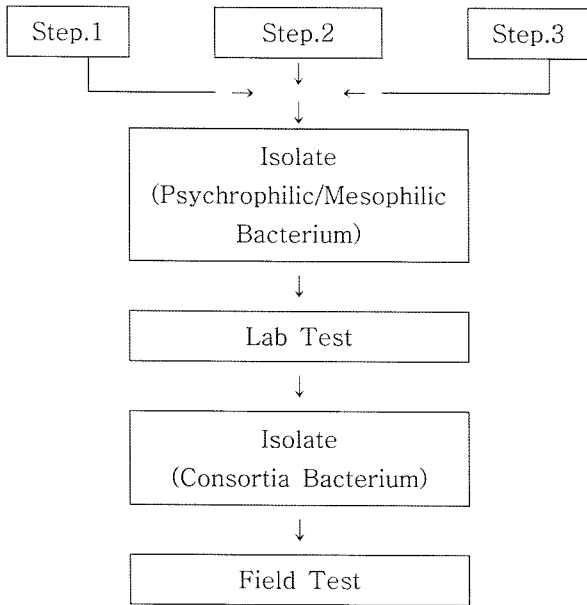


Fig. 1. The flow chart of petroleum degrading bacteria isolation and identification.

진탕배양기에서 30분간 진탕 한 후 멸균수로 10배씩 희석하여 희석 배율별로 Plate에 100 μl씩 도말하여 해당 실험 온도에서 colony수가 증가하지 않을 때 까지 배양하여 colony 수가 50~350 colony 인 것만을 유효 값으로 인정하여 계수하고, 이 때 균수는 Colony Formation Unit(CFU/g)으로 표시하였다.

2.4. 유류분해 효율 분석

온도 조건 별로 분리된 각각의 미생물을 Table 1의 배지로 24시간 액상 배양하여 오염토양 3 kg에 수분 조절용 증류수와 희석하여 투입하였다. 이때 투입되는 미생물의 수는 1×10^6 CFU/g-soil 이 되도록 조절 하였다. 오염토양에 투입되는 영양분은 (NH₄)₂SO₄와 K₂HPO₄를 이용하여 토양의 C : N : P 비율을 100 : 10 : 1 수준으로 조절하였다(이상환 외 2007). 단 질소의 농도는 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 가용성 NH₄⁺ 농도의 양을 적용하였다. 미생물과 영양분이 적정 혼합된 오염토양시료는 온도 조건 별로 팬(Pan)에 깔아 2~3회/주 뒤집기 및 수분함량 조절을 실시하여 현장의 경작공정과 동일한 조건을 모사하였고 50 g을 채취하여 분석시료로 사용 하였다. 시료로 사용되는 토양은 기존에 존재하는 미생물의 영향을 최소화하기 위하여 121°C에서 30분 동안 멸균하여 실험구의 토양으로 사용 하였다. 무처리구의 경우 멸균된 오염토양을 처리구와 동일한 조건으로 영양분 투입 및 수분조절만을 실시하였다.

2.5. 분리 미생물 고농도 대량 배양

분리된 미생물의 고농도 현장 배양 방법은 500 L 발효기(제조원 오이코스, 한국)를 이용하였으며 고농도 생산 방식은 Kim et al., (1996), Lee et al., (1994)의 배지 조성 방식을 이용하였다. 미생물 배양은 먼저 삼각플라스크에서 30°C 24시간 동안 분리 배양한 후, 다시 50 L 발효기에서 12시간 종균 배양하였다. 대량 배양을 위해 배양된 종균을 500 L 발효기에 접종하여 24시간 배양하여 현장실험에 적용 하였다.

2.6. 분리 미생물 현장 토양경작 적용

분리 배양한 미생물을 이용하여 현장규모에서 토양경작을 실시하였다. 토양경작장은 20 m^W × 100 m^L × 8 m^H 크기의 비닐하우스로 경작장 내부에는 환기용 덕트를 설치하여 휘발되는 VOCs 가스 및 중기 배기가스를 흡기하여 활성탄 흡착탑으로 처리하였다(환경부, 2007). 실험대상 오염토양량은 경작장 양쪽 입구 쪽의 5 m씩을 제외한 20 m × 90 m에 토양 높이 1 m로 적정한 토양으로 약 1,800 m³를 대상으로 하였다. 경작 기간은 12월에서 1월 까지 동절기를 대상으로 하였고, 경작장 내부의 온도는 주간 20~30°C, 야간 5~10°C 정도로 유지 되었고, 토양의 온도는 주·야간 큰 변화 없이 15°C 내외를 유지하였다. 또한 모든 조건이 동일하나, 기존 외부 사용미생물 주입에 의한 대조구도 동일 규모로 경작 운영하였다. 경작장 내부 오염토양은 1 m 이내가 되도록 적치하고, 수분조절을 위해 경작장 상부에 스프레이 장치를 설치하여 수분량을 조절하도록 하였다. 영양분 농도의 조절은 탄소:질소:인의 비율이 100 : 10 : 1이 되도록 투입하였고(환경부, 2007), 실험실에서와 동일하게 (NH₄)₂SO₄와 K₂HPO₄를 이용하여 주기적으로 각 성분을 측정해가며 부족한 영양분을 추가로 주입 하였다. 중온성 및 저온성의 분리된 혼합 미생물은 현장 내 발효기에서 생산한 직후 경작장으로 이송하여 혼합한 후 주입하였다. 오염토양의 공기 접촉 및 미생물, 영양분의 혼합을 위한 경작은 백호우 장비(0.8 m³)를 이용하여 2~3회/주 경작하였고, 1회/일 트랙터를 이용하여 상부 30 cm 내외의 토양을 잘게 부수어 주는 작업을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 오염현장 토양 특성

토양의 입도를 KSF2302법으로 분석한 결과 0.075 mm이하의 미세토 함량은 30% 이내로 실트질 토사와 점

Table 2. Atterberg limit test result of soil

Specimen	Cu	Cg	U.S.C.S	LL	PL
D-1	5.50	0.73	SP	25.30	N.P
D-3	9.00	0.44	SP	25.47	N.P
D-5	7.31	0.73	SP	24.58	N.P
D-7	6.79	0.82	SP	26.78	N.P
G-3	5.24	0.69	SP	26.22	N.P
G-5	7.14	0.69	SP	24.13	N.P
G-8	7.14	0.64	SP	25.34	N.P
G-21	5.86	0.73	SP	23.22	N.P
D-23	13.46	1.10	SW	26.41	N.P
G-25	6.30	0.57	SP	25.33	N.P
G-28	6.92	0.58	SP	25.61	N.P
G-36	10.00	0.87	SP	25.23	N.P
G-46	7.00	0.89	SP	21.53	N.P
G-50	6.33	0.86	SP	22.34	N.P
G-70	10.00	1.30	SW	25.45	N.P
G-73	5.00	0.56	SP	26.40	N.P
G-74	8.50	0.68	SP	24.55	N.P
G-76	6.79	0.70	SP	24.32	N.P
G-108	9.00	1.00	SW	25.01	N.P
T-8	7.06	1.23	SW	25.32	N.P
T-15	6.15	0.68	SP	25.44	N.P
T-27	6.43	0.97	SP	25.87	N.P
T-28	6.67	0.87	SP	26.24	N.P
T-31	6.00	0.86	SP	24.98	N.P

주) U.S.C.S = Unified Soil Classification System

LL = Liquid Limit, PL = Plastic Limit

N.P = Non Plastic

D, G, T = Sample name

토질 토사가 혼합되었고, 액소성한계시험 결과 균등계수 4-5 이상으로 약간 불량, 곡률계수(Cg) 1-3 이하로 입도 분포 불량, 토질은 입도분포가 불량한 모래 또는 자갈질 모래(SP)로 생물학적 정화 수행이 가능한 토질로 확인되었다(Table 2).

3.2. 중온성 미생물 분리 동정

30°C 온도조건에서 액체 배지에 성장하는 미생물 균주 100종(F1~100)을 1차로 분리하였다. Single Colony Isolation한 이들 분리 미생물 중 colony의 모양, 색상, 표면상태 등을 비교하여 유사성이 있는 미생물을 제외하여 18종(S1~18)을 분리하고, 분리된 미생물 균주 18종 중 10,000 ppm의 유류를 함유한 액체 배지에서 성장력이 빠른 미생물 균주 16종을 MH1~16번으로 명명하여 16S rDNA의 부분 염기서열 결정 및 유사도 분석하였다.

MH 1,2,4,5,6,7,13,15,18번 균주는 현재 11종이 존재하

는 *Acinetobacter* 종의 *Acinetobacter junii*의 표준균주와 100%의 16S rDNA sequence 유사도를 보였다. MH 3번 균주는 *Comamonas testosteroni* ATCC 11996^T와 99.85% 유사도, MH8번 균주는 *Pseudomonas meliae* 및 *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*의 표준 균주와 99.21%의 높은 16S rDNA 유사도를 보였고 MH9번 균주는 *Sphingomonas adhaesiva* IFO 15099^T 균주와 98.44% 유사도를 보였으며, MH16번 균주는 *Pseudomonas jessenii* CIP 105274^T 와 99.22% 유사도를 보였다. DNA 분석결과 각각의 미생물을 *Acinetobacter junii* MH1, *Comamonas tesosteroni* MH3, *Pseudomonas migilae* MH8, *Sphingomonas adhaesiva* MH9, *Pseudomonas jessenii* MH16으로 명명하고 한국생명공학연구원 유전자 은행에 각각 KCTC 10361BP, KCTC 10360BP, KCTC 10359BP, KCTC 10358BP 및 KCTC 10357BP로 기탁하였다. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Sphingomonas*종은 중온성 유류분해 미생물의 주종을 이루는 종들이다.

3.3. 저온성 미생물 분리 동정

저온성 미생물 분리를 통해 성장 속도가 빠른 3종의 미생물을 분리하여 OL1-3으로 1차 명명하여 16S rDNA의 부분 염기서열 결정 및 유사도 분석의뢰 하였다.

OL1번 균주는 *Arthrobacter nicotianae*와 매우 높은 유사도를 보였다. 16S rDNA 염기서열 약 922 bp가 분석되었는데 보고된 *Arthrobacter nicotianae* DSM 20123 균주와 98.7%의 유사도를 보이며, *A. arilaitensis*, *A. mysorens*, *A. protophormiae*, *A. bergerei*, *A. uratoxydans*, *A. kerguelensis* 등과도 97% 이상의 유사도를 보였다. OL2번 균주의 경우 *Acinetobacter junii* 와 분석된 928 bp가 100% 일치하는 매우 높은 유사도를 보였고, *A. grimontii*, *A. johnsonii*, *A. baumannii*, *A. parvus*, *A. haemolyticus* 등과도 97% 이상의 유사도를 보였다.

OL3번 균주는 분석된 941 bp가 100% 일치하는 종이 4종이나 되었고 97% 이상의 유사도를 보이는 종 또한 72종에 이르는 것으로 분석되었다. *Streptomyces* 속은 분류학적으로 매우 복잡하여 정확한 동정이 매우 어려운 균종의 하나이다. 16S rDNA의 전체 염기서열 1460 bp가 100% 일치하는 균들도 그 특성이 판이하여 서로 다른 종으로 기술되기도 한다. 확정된 표준균주 관련 정보를 제공받아 의뢰균주를 분석한 결과 *S. zaomycticus*, *S. fradiae*, *S. flaveus*, *S. venezuelae*의 표준균주와 941 bp가 100% 일치하였으며, *S. exfoliatus*와는 1개의 염기서

열이 상이하였고, *S. lateritius*, *S. noordhoekensis*, *S. omiyaensis* 외는 2개의 염기서열 만이 상이한 것으로 나타났다. 한편, 941 bp의 염기서열을 사용한 계통수 분석에서는 *S. flavus*, *S. venezuelae*와 같은 cluster를 형성하지만 새로운 종일 가능성을 보여주고 있어 *Streptomyces* 속에 속하는 한 종으로 동정되었다. 본 연구에서 동정된 3종의 우수한 미생물을 *Arthrobacter* sp. OL1, *Acinetobacter junii* OL2, *Streptomyces* sp. OL3로 명명하였고 각각 한국생명공학연구원 유전자은행에 KCTC 11219BP, KCTC 11220BP, KCTC 11221BP로 기탁하였다. 이러한 *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Acinetobacter* 종은 주로 중온성 환경에서 유류분해 능력이 풍부해 정화현장에 사용되어 왔지만, 저온성 환경에서 유류분해 특성은 밝혀진바 없다.

3.4. 분리 미생물의 유류분해 효율 분석

오염된 토양 3 kg에 중온성으로 분리된 5종의 미생물 Consortia와 저온성으로 분리된 3종의 미생물 Consortia를 1:1로 혼합하여 투입하고, 각각의 실험 온도 범위를 30°C, 8°C 항온 인큐베이터에서 유류분해 효율을 분석하였다.

중온성 미생물 Consortia 실험구의 경우 초기 TPH 4,044 mg/kg에서 10일 후 1,084 mg/kg으로 73.2% 감소되었고, 대조구의 경우 39.4% 감량된 2,450 mg/kg으로 분석되었다. 유류분해 미생물의 수를 분석한 결과 초기 투입직후 1.26×10^6 CFU/g에서 6.31×10^6 CFU/g으로 증가하였다가 10일 후 3.16×10^6 CFU/g으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

저온성 미생물 Consortia 실험구의 경우 초기 TPH 5,427 mg/kg에서 50일 경과 후 1,756 mg/kg으로 67.6% 감소하였고, 대조구의 경우 12.9% 감소한 4,725 mg/kg으로 분석되었다. 이때의 저온성 미생물 수는 초기 1.0×10^6 CFU/g에서 5.0×10^5 CFU/g 로 감소된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

각각의 온도 범위에서의 정화 효율을 평가하기 위해 정화 기간 대비 저감 농도를 정량화 한 평균 분해속도상수 (k)를 산정한 결과, 중온성 0.1591 day^{-1} , 저온성 0.0231 day^{-1} 로 나타났다(Table 3). 이는 중온성 미생물의 경우가 저온성에 비해 6.9배 높은 정화 속도를 보인 결과에 비하여 저온의 경우 미생물 성장 조건이 불리한 환경에 의해 유류분해 효율 또한 낮아진다는 것을 확인 할 수 있었다.

대조구 실험의 경우 멀균된 토양을 적용하였으나 농도가 감소하는 이유는 주로 경작공정의 뒤집기 과정에서의

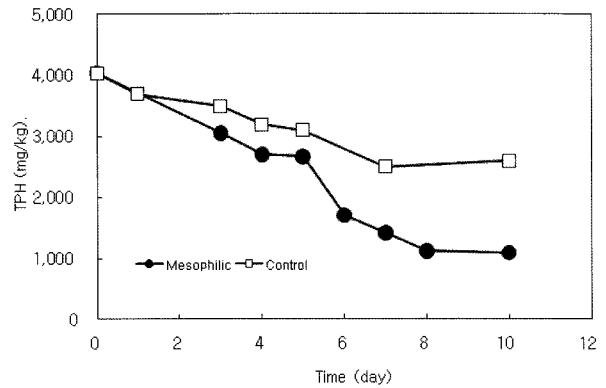


Fig 2. Biodegradability of mesophilic bacterium consortia with elapsed time (Jar Test).

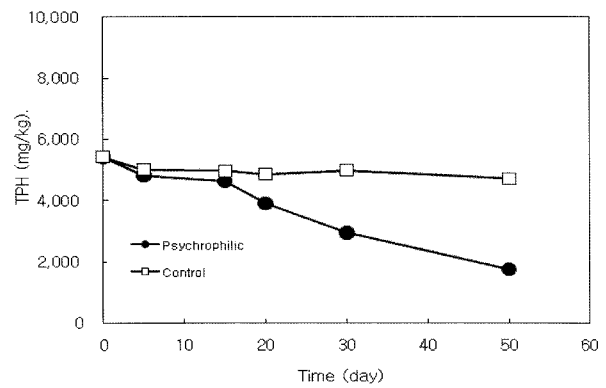


Fig 3. Biodegradability of psychrophilic bacterium consortia with elapsed time (Jar Test).

Table 3. Degradation rates of mesophilic and psychrophilic bacterium consortia inoculated with target contaminant

Microbial	Degradation Rate Coefficient (k, day ⁻¹)	
	Test Cell	Control Cell
Mesophilic	0.1591	0.0589
Psychrophilic	0.0231	0.0043

휘발, 혼합 등 물리적 작용에 의한 영향으로 사료된다. 또한 중온성, 저온성 실험의 오염토양 채취시기와 위치가 서로 달라 오염원의 오염 정도에 따라 물리적인 휘발량의 차이로 두 대조구의 오염농도 감소효율이 차이가 나는 것으로 사료된다.

3.5. 유류분해 미생물의 현장 적용 결과

분리된 혼합미생물을 사용한 경작장의 경우, 초기 오염농도 TPH 2,560 mg/kg의 오염토양을 56일 동안 경작 운영하여 최종 TPH 329 mg/kg으로 정화하였으며, 초기 38

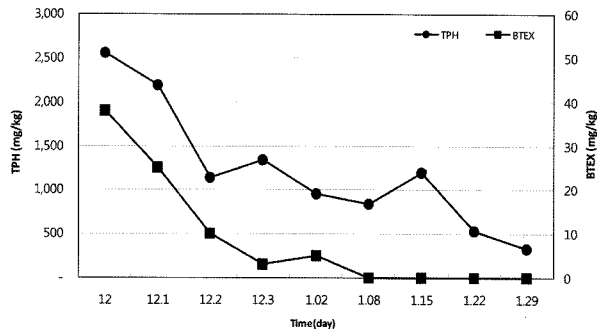


Fig 4. Biodegradability of isolated bacterium consortia in pilot-scale landfarming process.

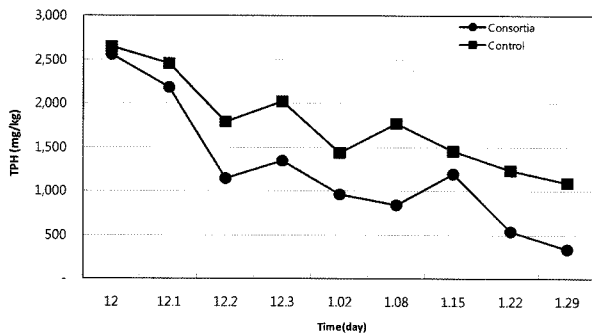


Fig 5. Comparison of biodegradability between psychrophilic + mesophilic bacterium consortia and mesophilic bacterium consortia at winter season.

mg/kg인 BTEX는 35일 후 불검출까지 정화 되었다(Fig. 4). 이때의 분해속도 상수 k 는 0.0374 day^{-1} 로 나타났다. 이는 실험실 수준의 저온성 미생물을 대상으로 실시한 분석 결과에 비하여 높은 결과로 8°C 항온조건에서 운전한 실험실 조건보다 경작장 내부의 토양 온도가 상대적으로 높게 유지된 결과로 보인다. 그러나 본 연구에서 개발된 중온성 미생물을 주종으로 하여 운영한 경작장의 경우, 초기 TPH 2,650 mg/kg을 동일하게 56일 경작 후 1,090 mg/kg으로 59% 저감되어 '가' 지역 정화목표(500 mg/kg 이내)를 달성하지 못하였다(Fig. 5).

4. 결 론

유류분해 미생물 분리 과정을 통하여 중온성 미생물 *Acinetobacter junii* MH1를 포함한 5종, 저온성 미생물 *Arthrobacter* sp OL1 포함한 3종으로 전체 8종의 유류분해 미생물을 분리하였다. 이들 미생물을 각각 일정 온도 조건의 실험실에서 인공 유류 오염토양에 적용한 결과, 중온성 미생물의 경우 30°C 항온 조건에서 초기 TPH 4,044 mg/kg에서 10일 후 1,084 mg/kg으로 73.2%(물리적

저감 제외 분해율 55.8%), 저온성 미생물의 경우 초기 8°C 항온 조건에서 TPH 5,427 mg/kg에서 50일 경과 후 1,756 mg/kg으로 67.6%(물리적저감 제외 분해율 62.8%) 분해하는 결과를 보였다. 이때 각각 적용구의 평균 분해속도상수를 산정한 결과 각각 중온성 0.1591 day^{-1} , 저온성 0.0231 day^{-1} 로 나타났다. 또한 실험실 조건에서 분해능이 확인된 미생물을 대상으로 실 규모 경작장에서 정화 효율 실험 결과, 초기 오염 농도 TPH 2,560 mg/kg의 오염토양을 56일 동안 동절기의 현장 조건에서 경작 운영하여 최종 TPH 329 mg/kg으로 정화 하였으며, 초기 38 mg/kg인 BTEX는 35일 후 불검출까지 정화 되었다. 이때의 분해속도 상수 k 는 0.0374 day^{-1} 로 나타났다

본 연구를 통하여 정화 효율이 낮아 동절기 동안 정화 운영을 중단하거나 토양 온도 상승을 위하여 효율이 낮은 열풍기를 운전하는 등의 경제적인 손실을 최소화 할 수 있는 가능성을 확인하였고, 분리된 혼합 미생물을 이용하여 연구 대상토양의 오염조건과 유사한 현장 오염토양을 "가지역" TPH 정화기준인 500 mg/kg의 목표달성을 위하여 효율적인 접근이 가능한 것을 확인 할 수 있었다.

사 사

본 연구는 환경부의 "토양지하수복원관리 환경기술교육 혁신지원사업단"의 지원을 받은 과제입니다.

참 고 문 헌

김국진, 오승택, 이철효, 서상기, 강창환, 장운영, 2008, 유기물과 화학산화를 이용한 유류오염 토양의 생물학적 정화효율 향상에 대한 연구, 한국지하수토양환경학회지, 13, 59-66.

이상환, 김을영, 최호진, 2007, 중질유 오염토양의 생물학적 처리에 있어 amendment의 효과, 한국지하수토양환경학회지, 12, 54-63.

환경부, 2007, 오염토양 정화방법 가이드라인.

Caccamo, D., Gugliandolo, C., Stackebrandt, E., and Mageri, T.L., 2000. *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2009-2012.

EPA, 1996, Design conditions for landfarming, ETL-1110-1-176.

Kim, G.J., Lee, I.Y., Choi, D.K., Yoon, C.Y., and Park, Y.H., 1996, High Cell Density Cultivation of *Pseudomonas putida* BM01 Using Glucose, *J. Microbiol. Biotechnol.* 6(3) 221-224.

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*, London: Chapman and Hall, p. 25-59.

Jukes, T.H. and Cantor, C.R., 1969, Evolution of protein molecules, In *Mammalian protein metabolism*, New York: Academic Press, p. 21-132.

Lee, I.Y., Choi, E.S., Kim, G.J., Nam, S.W., Shin, Y.C., Chang, H.N., and Park, Y.H., 1994, Optimization of fed-batch fermentation for production of poly-β-hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 146-150.

Nakamura, L.K., 1993, DNA relatedness of *Bacillus brevis* Migula 1900 strains and proposal of *Bacillus agri* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus centrosporus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 20-25.

Shida, O., Takagi, H., Kakowaki, K., and Komagata, K., 1996, Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and

Aneurinibacillus gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 939-946.

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.

White, D., Sharp, R.J., and Priest, F.G., 1993, A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. *Antonie Leeuwenhoek* **64**, 357-386.

Zarilla, K. and Perry, J.J., 1987, *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **9**, 258-264.

Srienc, F., Arnold, B., and Bailey J.E., 1984, Characterization of intercellular accumulation of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 flow cytometry, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 982-987.