

工學碩士 學位論文

유류오염토양의 화학적·생물학적 통합처리
공정에서 처리효율에 미치는 미생물군집의 역할

Roles of Microbial Communities in the Sequential
Chemical and Biological Treatment Process for
Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils

指導教授 高 星 澈

2008年 2月

韓國海洋大學校 大學院

土木環境工學科

裴 在 祥

本 論 文 을 裴 在 祥 의 工 學 碩 士 學 位 論 文 으 로 認 准 함 .

委 員 長 工 學 博 士 金 仁 洙 (印)

委 員 理 學 博 士 高 星 澈 (印)

委 員 工 學 博 士 宋 永 彩 (印)

2008年 2月

韓 國 海 洋 大 學 校 大 學 院

土 木 環 境 工 學 科

裴 在 祥

<List of Contents>

<List of Contents>	i
<List of Figures>	v
<List of Table>	viii
Abstract	ix
1. 서론	1
2. 연구배경	3
2.1 총석유계탄화수소 (total petroleum hydrocarbons; TPH) 오염현황	3
2.2 TPH의 물리·화학적 특성 및 환경독성	5
2.2.1 TPH의 물리적 특성	5
2.2.2 디젤유의 화학적 특성	9
2.2.3 TPH의 환경독성	10
2.3 TPH의 일반적 처리기법	11
2.3.1 <i>in situ</i> 처리기법의 작용원리 및 특성	11
2.3.1.1 토양증기추출법	11
2.3.1.2 바이오벤팅	12
2.3.2 <i>ex situ</i> 처리기법의 작용원리 및 특성	13
2.3.2.1 열탈착법	13
2.3.2.2 토양경작법	14
2.4 TPH의 화학적 처리기법의 현황	15
2.4.1 토양세척의 작용원리 및 특성	15

2.4.2 펜톤 유사반응 처리기법의 작용원리 및 특성	16
2.5 TPH 오염토양의 slurry-phase 생물학적 처리기법의 현황	17
2.6 TPH의 화학적 및 생물학적 처리기법의 전망	18
3. 실험재료 및 방법	20
3.1 시료채취지역 및 채취방법	20
3.2 적정 화학적 처리조건 탐색	20
3.2.1 계면활성제 종류에 따른 처리효과 비교	20
3.2.2 고효율 TPH분해를 위한 화학적 처리조건 스크리닝	22
3.2.3 우수계면활성제 및 적정 화학적 처리조건 선정	23
3.3 TPH 분해율 측정	24
3.4 우수 TPH분해 미생물 선발	25
3.4.1 농화배양을 통한 유류오염 토양으로 부터의 분해 미생물 분리.	25
3.4.2 분리된 분해 미생물의 성장 속도를 통한 선발	25
3.4.3 총중속영양세균 밀도측정	26
3.4.4 TPH 분해세균 밀도	26
3.4.5 Bioaugmentation용 미생물 균집의 선정	28
3.5 화학적 · 생물학적 통합처리를 거치는 TPH오염토양 내에서의 선 발미생물 균집의 작용 규명	28
3.5.1 토양 microcosm 을 이용한 TPH의 화학적 처리	28
3.5.2 Bioaugmentation용 미생물 균집을 이용한 생물학적 처리	30
3.5.3 Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) 기법을 이용한 TPH분해균 및 토 착미생물 균집분석	32

3.6 현장조건에서의 TPH (디젤유)오염토양의 Bioaugmentation에 의한 처리	34
3.6.1 시료채취	34
3.6.2 오염부지에 대한 정화작업 조건	36
3.6.2.1 최초 오염원 누출지역	36
3.6.2.2 외부로 유출된 오염지역	36
3.6.3 유류오염토양의 미생물 밀도 측정	37
3.6.3.1 미생물제재 밀도	37
3.6.3.2 총중속영양세균 밀도	37
3.6.3.3 TPH 분해세균 밀도	37
4. 결과 및 고찰	38
4.1 TPH오염토양의 화학적 처리조건 탐색	38
4.1.1 계면활성제 종류에 따른 처리효과 비교	38
4.1.2 펜톤 산화처리 농도에 따른 TPH분해효율	40
4.2 화학적 및 생물학적 처리를 거친 토양의 pH	41
4.3 화학적 및 생물학적 통합처리 시 총중속영양세균 밀도변화	41
4.4 화학적 및 생물학적 통합처리 시 TPH 분해 세균 밀도의 변화	44
4.5 화학적 및 생물학적 통합처리 시 TPH 농도변화	47
4.6 PCR-DGGE 기법에 의한 TPH 오염토양의 화학적·생물학적 처리 중의 분해 및 토착 미생물 군집변화 추적	51
4.7 현장조건에서의 TPH 오염토양의 화학적 및 생물학적 통합처리	56
4.7.1 화학적 처리 결과	56
4.7.2 함수율 변화	56

4.7.3 온도변화	58
4.7.4 오염부지에 대한 미생물 처리 후의 TPH 농도분석	60
4.7.5 미생물 밀도 측정결과	61
4.7.5.1 미생물제재 밀도측정	61
4.7.5.2 총중속영양세균 밀도	61
4.7.5.3 TPH 분해 세균 밀도	62
5. 결론	66
사사	67
참고문헌	68

<List of Figures>

Fig 2.1 Chemical structures of petroleum hydrocarbons	6
Fig 2.2 Distribution of boiling points of various petroleum products	8
Fig 2.3 Components of diesel fuel and their contents	9
Fig 3.1 Procedures for the isolation of efficient TPH degraders and their identification	27
Fig 3.2 Procedure for microbial community analysis for soil bioslurry by PCR-DGGE technique	33
Fig 3.3 Soil map for in situ TPH bioremediation	35
Fig 4.1 Efficiency of soil TPH removal by the chemical oxidation depending on surfactants	39
Fig 4.2 Efficiency of soil TPH removal by the chemical oxidation under different chemical oxidation conditions	40
Fig 4.3 Population dynamics of total heterotrophic bacteria from soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil	42
Fig 4.4 Plating out of total heterotrophic bacteria onto TSA from soil slurries undergoing bioremediation of TPH-contaminated soil after 28 days	43
Fig 4.5 Population dynamics of diesel fuel bacteria from soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil	45

Fig 4.6	Plating out of total diesel fuel bacteria onto BH agar from soil slurries undergoing bioremediation of TPH-contaminated soil after 28 days	46
Fig 4.7	Residual concentration of TPH in the soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil	48
Fig 4.8	Removal efficiency of TPH for the soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil	49
Fig 4.9	Profiles of gas chromatography of TPH-contaminated soils	50
Fig 4.10	Microbial community analysis using PCR-DGGE technique of TPH-contaminated soils undergoing sequential chemical and biological treatment (Day 0)	52
Fig 4.11	Continued	53
Fig 4.12	Microbial community analysis using PCR-DGGE technique of TPH-contaminated soils undergoing sequential chemical and biological treatment (Day 28)	54
Fig 4.13	Continued	55
Fig 4.14	Moisture content of TPH-contaminated soil during the sequential chemical and biological treatment	57
Fig 4.15	Temperature monitoring at TPH-contaminated soil undergoing the in situ sequential chemical and biological treatment	59

Fig 4.16 Residual concentration of TPH in soils undergoing the sequential chemical and biological treatment	60
Fig 4.17 Plating out of diesel fuel degraders onto BH plates from the TPH-contaminated soils and the microbial agents used in the soil treatment	63
Fig 4.18 Determination of population density of diesel fuel degraders in the sites C and D, and from the microbial agents 1, 2 and 3 using microplate MPN technique	64
Fig 4.19 Population density of the diesel fuel degraders from the remediation sites C and D determined by viable cell counting and microplate MPN techniques	65

<List of Table>

Table 2.1	Pollution levels of some representative chemicals in the polluted areas and level of pollution concern	4
Table 2.2	Physicochemical properties of petroleum chemicals	7
Table 3.1	Treatment concentrations of various surfactants used for Fenton-like reactions	21
Table 3.2	Conditions for Fenton-like reactions for optimal chemical oxidation of TPH	22
Table 3.3	Experimental condition for optimal chemical oxidation of TPH	23
Table 3.4	Operation condition for gas chromatograph (GC6890-FID) for the analysis of TPH	24
Table 3.5	Conditions for Fenton-like reactions for the sequential chemical and biological treatment	29
Table 3.6	Bioaugmentation plan for TPH-contaminated soil slurry that has undergone Fenton-like reactions	31

Abstract

Total petroleum hydrocarbons (TPH) have been used as fuels as their spills have occurred in various routes such as leaks and spills on the surface soils, leaks through under storage tanks, and spills through the aged oil pipes, etc. These accidental releases of TPH frequently ended up with soil and ground water pollution. In most cases, TPH have toxicity against numerous biota as animals and plants in the environment as well as humans. TPH may be degraded through physicochemical and biological processes in the environment but with relatively slow rates. Currently, chemical and biological treatment technologies are used independently for TPH decontamination in soil. In this study an integrated chemical and biological treatment technology has been developed to eventually establish an efficient and environment-friendly restoration technology for TPH contaminated soils.

Fenton-like reactions were employed as a chemical treatment process and subsequently a bioaugmentation process utilizing diesel fuel degraders was applied as a biological treatment process. TPH concentrations were monitored for samples taken weekly for at least one month. Heterotrophic and TPH degradative bacterial communities were monitored and analyzed based upon viable cell counting, MPN and PCR-DGGE techniques.

Most efficient chemical removal of TPH from soils occurred where

the surfactant OP-10S (0.05%) and oxidants (FeSO_4 4%, and H_2O_2 5%) were used. The inoculation of diesel fuel degraders into the soil slurry led to an increase in their population density at least two orders of magnitude, indicating a good survival of the degradative populations in the contaminated soils. However, an adverse effect in the TPH removal has been observed in the chemically treated soils, potentially due to the presence of free radicals and other oxidative products generated in the process where a lower treatment efficiency (65%) was observed. A similar treatment made in the diesel fuel contaminated field showed a successful removal of TPH under the conditions (soil temperature 20°C , moisture 45% and pH 7.0). The TPH degraders in the field have been successfully monitored by viable counting method and Microplate MPN technique. The PCR-DGGE technique was successfully applied to monitor the degraders and their associated indigenous bacterial populations in the soil bioslurry treatment conditions for treatability study at lab scale. The findings in this study will contribute to development of bioslurry treatment technologies for TPH-contaminated soils and sediments in the environment.

1. 서론

오늘날 석유는 운송수단, 난방, 발전 등으로 가정용 및 산업용으로 많은 양이 필수적으로 요구되고 있다. 석유는 지상유출과 지하저장탱크의 누출, 운송수단에 의한 유출, 배관시설 증가에 따른 오래된 시설의 관 노후, 관리 소홀로 인한 배관의 파손에 의해 유류가 토양에 누출되어 토양 및 지하수를 오염시키고 있다. 석유류는 benzen, toluene, ethylbenzene, xylenes, naphthalene 등과 같은 유해 화학 물질을 포함하고 있어 토양 및 지하수에 오염이 되었을 때 식물 및 동물, 그리고 인간에게 건강상해를 입힌다(Zhou and Crawford, 1995; Liebeg and Cutright, 1999; Ting et al., 1999). 외국의 사례를 볼 때 유류저장시설 중 20%정도에서 상당한 양의 기름이 유출되어 토양 및 지하수를 오염시키고 있는 것으로 보고되고 있다(Mareca, et al., 1990). 현재 우리나라에서는 토양환경을 보존하기 위하여 1995년 토양환경보전법을 제정하여 토양보전을 위한 정책반영, 토양오염현황 등과 함께 오염토양의 정화 및 복원에 관한 사항이 포함된 토양보전기본계획을 수립·시행하도록 하는 책무와 오염토양의 정화기준 및 정화방법 등을 규정하고 있다(토양환경보전법, 2005). 토양에 오염된 유류들은 자연 상태에서 물리·화학·생물학적 기작에 의해 일부 오염물질들이 자연정화에 의해 정화되고 있지만, 처리량이 미약하고 많은 시간이 요구된다. 또한 토양은 물이나 공기와 달리 불균일하여 복원에 많은 제한이 따른다.

현재 토양 및 지하수에 오염되어 있는 유류를 정화하기 위하여 여러 가지 물리·화학·생물학적 기법들이 개발되고, 유류로 오염된 토양 및 지하수 정화작업이 수행되고 있다. 최근에는 정화효율의 향상 및 친환경

적 복원을 위하여 화학적 및 생물학적 처리공법의 연계를 통해 오염토양을 복원하고 있는 추세이다. 생물학적 처리는 물리·화학적 처리보다 경제적이고, 처리 시 발생하는 부산물에 의한 2차 오염이 없다는 것이 공정의 장점이라 할 수 있다. 최근 많은 연구를 통해 생물학적 처리의 효율이 검증되고 있는데, 혼합미생물을 이용하여 86~90%의 제거율을 보였다(Richard, 1990; Marja, 2005). 그리고 경유로 오염된 토양에 단일균주를 이용하여 26%의 제거율을 보였고, 이 균주를 혼합하여 처리하였을 경우 제거율을 40%까지 증가시켰다(Baryshnikova, 2000).

본 연구에서는 유류오염 토양에 대한 친환경 복원기술의 발판을 마련하기 위해 화학적 처리를 거친 토양에 bioaugmentation기법을 적용하여 오염토양내의 잔여유류물질의 정화 및 토양의 회복방안에 대해서 연구를 수행 하고자 하였다. 또한 유류 (총석유계탄화수소; TPH)오염토양에서 우수분해미생물을 선발하여 선발된 미생물 군집이 화학적, 생물학적 통합처리를 거치는 유류오염토양 내에서 어떤 작용을 하는지에 대한 생태적 측면에서 규명함으로써 궁극적으로 유기용제와 유류물질 등의 혼합물질로 오염된 토양의 화학 및 생물학적 통합 공정기술로 친환경 복원기술의 개발에 기여하고자 한다.

본 연구를 통하여 화학적 처리를 거친 유류오염토양을 연속적으로 생물학적 처리를 실시 할 경우 TPH 분해균 및 토착미생물 군집회복이 이루어짐으로서 신속한 토양회복 효과가 가능할 것이라 기대된다.

2. 연구배경

2.1 총석유계탄화수소 (total petroleum hydrocarbons; TPH) 오염 현황

많은 산업분야와 에너지 부분, 그리고 군사업무에 있어서 유류는 빠질 수 없는 자원이라 할 수 있을 만큼 사용범위가 방대하다. 이에 유류의 운송수단이나 저장소, 생산지 등의 요구가 많아짐에 따라 관의 노후 및 관리소홀로 인하여 유류오염사고가 발생되고 있다. 특히 주유소나 군사시설의 경우 관의 부식에 의한 누출로 인하여 토양에 직접적으로 유류가 유출되어 심각한 오염문제를 발생시키고 있다. 또한 선박의 경우 저장탱크 및 관에 의해 유류가 유출되면서 바다에 흘러들어 해양오염, 해양생물의 독성작용 등 다양한 환경오염 문제를 발생시키고 있다.

현재 국내에서는 국가 및 지방 산업단지 223개 (업체수 32,086개)중 화학, 기계, 금속, 조선, 석유화학 및 석유정제 등의 제조업 관련 산업단지 92개 (업체수 : 22,781개), 특정토양오염관리시설인 주유소, 석유류 산업시설, 유독물산업시설 업소 수는 18,837개에 달한다(환경부 "2005 환경통계연감", 2005).

토양오염실태조사를 실시한 결과 (2004년) 총3,683개 지점 중 1.7% (61지점)가 토양오염우려기준 (2000mg/kg)을 초과하는 것으로 나타났다. 특히 공장 및 공업지역, 금속광산지역에서 각 항목별 최고치의 오염도를 나타내었다(환경부 "환경부 보도자료: 전국 토양오염조사결과", 2005).

Table 2.1은 오염우려 지역별 특정항목 오염도 조사를 나타낸 것이다. 각 항목들의 오염도를 보면 각각에 대해 3~10배 정도의 수치로 우려기

준을 초과하고 있다.

Table 2.1 Pollution levels of some representative chemicals in the polluted areas and level of pollution concern

	<i>TPH</i>	<i>Pb</i>	<i>Cu</i>
Manufacturing plants and industrial area	5,138 (mg/kg)	1,182 (mg/kg)	1,953 (mg/kg)
Level of concern	2,000 (mg/kg)	400 (mg/kg)	200 (mg/kg)

(Ministry of Environment, 2005)

국외의 경우 미국은 최소 235,000~355,000곳의 부지를 정화대상부지로 정하였으며, 지하저장 탱크시설은 125,000곳에 달하는 부지를 정화대상부지로 선정하였다(EPA, 2004). 유럽의 경우 소속 국가 내 300,000 오염사이트를 발견 보고하였으며, EEA는 1,500,000 오염사이트를 정화대상부지로 예상하였다. 현재 5개국 유럽 국가만이 복원대상 사이트 중 15%를 복원 완료하여 유럽 대다수 국가가 급속한 토양오염지역 복원 비용지출을 예상하고 있는 추세이다. 최근 이러한 오염실태를 인지하여 많은 유류정화공법이 개발되어 정화가 시행되고 있다. 그러나 단편적 처리로는 오염원의 제거가 어렵기 때문에 현재는 2가지 이상의 공법들을 적용하여 오염정화를 시행하고 있는 추세이다.

2.2 TPH의 물리·화학적 특성 및 환경독성

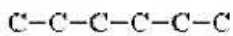
2.2.1 TPH의 물리적 특성

TPH는 원유로부터 생산되는 많은 화학 화합물을 지칭하는 것으로, 원유는 석유제품을 만드는데 사용된다. TPH는 화학물질이 혼합되어 있지만, 수소와 탄소로 만들어져 있어 탄화수소라 호칭하며, 이들 탄소 고리들은 그 길이에 따라서 각 종류마다 각기 다른 물리·화학적 성질을 가지게 되며, 탄소원자가 다른 원자들과 공유되어 있는 상태에 따라서 포화 탄화수소 (saturated hydrocarbon) 또는 불포화 탄화수소 (unsaturated hydrocarbon)상태로 나눌 수 있다(Fig 2.1). 불포화 탄화수소의 경우 특유의 냄새와 독성을 가지고 있어 오염물질로 규정이 되어 있다. 불포화 탄화수소 (unsaturated hydrocarbon)의 주요 화합물로서는 PCBs (polychlorinatedbiphenyls), BTEX(benzene, toluene, ethylbenzene, xylene), PAHs(polyaromatic hydrocarbons)등이 있다.

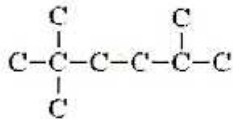
Saturated Hydrocarbons

Alkanes

Normal, Continuous chain (C_nH_{2n+2})



Iso, branched chain (C_nH_{2n+2})



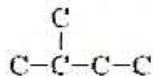
Cyclic, circle of carbons; naphthenes



Unsaturated Hydrocarbons

Alkenes

Olefins (C_nH_{2n})



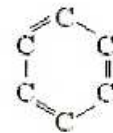
Alkynes

Acetylene (C_2H_2)



Arenes

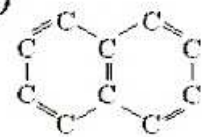
Benzene (C_6H_6)



Toluene (C_7H_8)

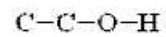
Polynuclear Aromatics

Naphthalene ($C_{10}H_8$)



Oxygenates

Ethanol (C_2H_5OH)



MTBE ($C_4H_9OCH_3$)

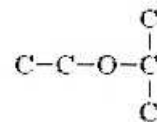


Fig 2.1 Chemical structures of petroleum hydrocarbons (Korea Institute of Construction Technology, 1998)

Table 2.2와 Fig 2.2 는 대표물질에 대한 석유제품별 비등점의 범위와 석유 제품의 종류에 따른 휘발도, 인화점 (flash point), 용해도 그리고 점도를 비교하였다. 디젤의 경우 가솔린에 비해 10^{-3} 배 정도의 휘발성을 갖고 있으며, 물에 대한 용해도 또한 훨씬 낮음을 알 수 있다.

Table 2.2 Physicochemical properties of petroleum chemicals (Korea Institute of Construction Technology, 1998)

<i>Product</i>	<i>Volatility</i> (<i>psia @20°C</i>)	<i>Flashpoint</i> (<i>°C</i>)	<i>Solubility</i> (<i>ppm @20°C</i>)	<i>Viscosity</i> (<i>centistokes</i>)
Gasoline	4~8	-42~-30	50~100	0.5~0.6
Benzene	1.6	-11	1,791	0.5
Toluene	1.9	4	515	0.5
Ethylbenzene	2.2	18	75	0.6
Xylenes	2*	27*	150**	0.6**
n-Hexane	1.5	-40	12	0.4
Cyclohexane			210	NA
I-Octane			8ppb	NA
JP-4 Jet Fuel	1.6	-10~35	< 1	0.8~1.2
Diesel	0.009	40~65	< 1	1.5~2
Kerosene	0.011	40~75	< 1	2~4
Light Fuel Oil #1, #2	< 10^{-3}	40~100	< 1	1.4~3.6
Heavy Fuel Oil #4, #5, #6	< 10^{-3}	65~130	< 1	5.8~194
Lubricating Oil	< 10^{-3}	150~225	< 1ppb	400~600
Used Oil	< 10^{-3}	>100	< 1ppb	40~600

* Value is for m-xylene

** Average data for a mixture of all isomers

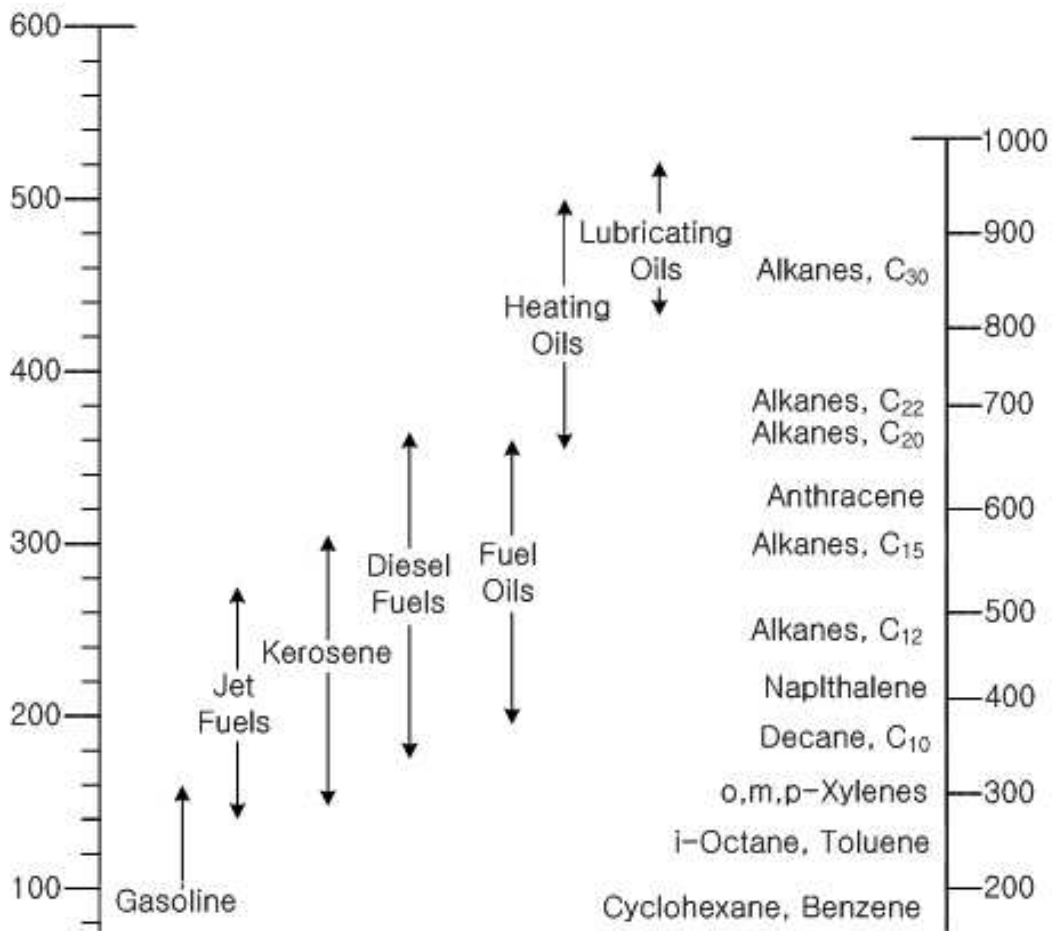


Fig 2.2 Distribution of boiling points of various petroleum products (Korea Institute of Construction Technology, 1998)

2.2.2 디젤유의 화학적 특성

TPH 중에서 디젤유는 200여 화합물로 조성되며, 이러한 조성은 원유의 종류 및 정유회사에 따라 광범위하게 달라진다. Fig 2.3은 디젤구성물질로서 크게 straight chain alkanes, branched chain alkanes, alkyl benzenes, naphtheno-benzenes, alkyl naphthalenes, PAHs로 구분하여 wt-% 함량으로 표기를 하였다. 본 자료에서는 chain alkanes (straight and branched)가 약 76% aromatics (alkyl benzenes, naphtheno-benzenes, alkyle naphthalenes, PAHs)가 약 24%를 차지하는 것으로 나타났다(U.S. EPA, 1982).

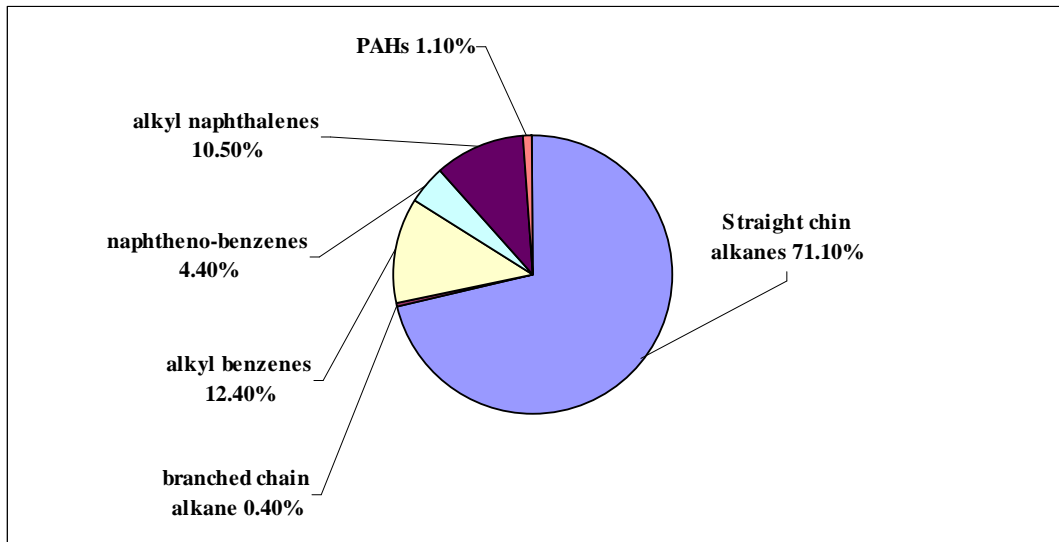


Fig 2.3 Components of diesel fuel and their contents (Korea Institute of Construction Technology, 1998)

2.2.3 TPH의 환경독성

유류저장 시설의 노후화로 인한 파손에 의해 유출이 되어 토양에 유입이 된다. 유출된 원유 및 석유 생산품들 (JP5, JP8, 선박디젤연료)은 강한 독성으로 인해 암을 유발시킨다(Pacheco and Santos, 2001; Easley et al., 2004). 최근 연구결과에 따르면 생쥐를 이용하여 시클로헥산을 사용하여 독성 피해실험을 한 결과 42일 이후 대다수의 생쥐들이 신장장애로 인하여 죽었다(Easley et al., 2004). 또한 원유를 사용하여 금붕어에 실험한 결과 탈수현상이 나타났고, 이후 유류독성으로 인하여 죽었다(Achuba and Osakwe, 2003). 원유 및 석유생산품들은 다양한 화합물로 구성되어 있어 직·간접적으로 인간 및 동·식물에게 영향을 미친다.

원유의 방향족 화합물인 벤젠과 나프탈렌은 농축과 노출로 인한 강한 독성작용으로 생식기장애 및 생명에 직접적인 피해를 준다. 또한 휘발성이 강한 화합물질로서 공기를 통한 호흡으로 인하여 인체에 흡입되어 두통과 현기증을 유발하고 폐, 간, 신장, 중추신경계에 영향을 미치고 암을 유발시킨다(NOAA, 1992). 유류는 계절적 영향으로 인하여 직접적인 독성은 낮아질 수 있지만, 고분자의 PAHs를 함유하고 있어 잔류 화합물이 남게 되는데, 이들은 낮은 휘발, 용해, 생분해로 인하여 농축 및 주입으로 만성적 피해를 주어 암을 유발시키거나 돌연변이를 발생시킨다.

2.3 TPH의 일반적 처리기법

2.3.1 *in situ* 처리기법의 작용원리 및 특성

in situ 처리기법은 오염 또는 축적된 토양을 굴착, 이동하지 않고 현장에서 직접적으로 오염물질을 제거, 분해하는 기술을 말한다. 이 기법은 경제적으로 유리하며, 다양한 토양 정화 공법들과 연계하여 사용할 수 있다.

2.3.1.1 토양증기추출법

토양증기추출법 (soil vapour extraction)은 불포화 대수층에 추출정을 설치하여 토양에 공기를 불어 넣어 진공상태로 만들어 휘발성을 높여 증으로써 토양으로부터 석유류, BTEX 등 휘발성 유기물질 (VOC) 및 준 휘발성 오염물질을 제거하는 기술이다(Johnson et al., 1990). 제거효율은 토양에 대한 오염물질 흡수량, 오염물질 초기분포, 공기흐름, 토양의 유압속성, 수분함량 등 오염물질의 변동에 따라 달라진다. 토양증기추출법은 시설 및 운전이 용이하며 유지비가 저렴하고 기계 및 장치가 간단하다(Pedersen and Curtis, 1991; Rathfelder et al., 1995). 그러나 공기를 이용하는 공정으로 증기압이 낮은 오염물질에는 제거효율이 낮고, 토질에 대한 영향을 많이 받는 공법중의 하나이다(Bedient and Johnson, 1992). 또한 오염물을 포함한 포집된 휘발기체는 대기오염방지를 위하여 후처리 시설 (집진장치)이 필요하다는 단점을 내포하고 있다.

2.3.1.2 바이오벤팅

바이오벤팅 (bioventing)정화기술은 토양증기추출법 (soil vapour extraction) 및 생물학적 처리공법을 결합한 형태로 오염부지에 공기를 주입함으로써 휘발성 유기물질을 추출해 내는 동시에 기존 토착미생물에 산소 및 영양분을 공급하고, 토양 내 증기 흐름속도를 조절함으로써 토착미생물의 생분해능을 극대화한 공법이다(EPA Manual, 1995). 바이오벤팅은 토양 증기 추출법과 달리 비교적 낮은 공기율을 이용하여 오랜 시간동안 가스를 공급하여 휘발보다 생물분해에 의해 오염물질이 제거된다. 그러나 산소 대신 혐기성 가스를 사용할 경우 혐기성 상태가 되어 생분해가 이루어질 수 없어 추가적인 영양분 및 전자 공여체의 공급이 필요하다.(Ballapragada et al., 1997; Fennel et al.,1997; Smatlak et al., 1996). 이 공법은 넓은 범위의 오염물질에 적용할 수 있고, 석유탄화수소와 BTEX 화합물은 효과적으로 처리할 수 있다. 그리고 토양증기추출법과 같이 유지비 및 설치비가 저렴하고 배출가스 처리의 추가비용이 없다(Dupont, 1993; Van Eyk, 1997; Hicks et al., 1993). 그러나 오염도가 높은 부지에서는 토착미생물의 활동에 독성을 나타낼 수 있으며, 높은 제거율을 획득하기가 어렵다. 또한 토착미생물의 활성을 위하여 추가적 영양염류의 공급이 필요하다.

2.3.2 *ex situ* 처리기법의 작용원리 및 특성

ex situ 기법은 오염된 토양을 굴착하여 차단시설 및 처리시설이 설치된 처리지역에 오염토양을 옮겨서 처리한 후 원래 굴착지로 환원하는 처리기법을 말한다. 이 공법은 물리·화학 및 생물학적인 처리방법이 적용될 수 있으며, 오염물질의 확산을 방지하고 분해능을 증진시킬 수 있으나 경비가 많이 든다는 것이 단점으로 작용하고 있다.

2.3.2.1 열탈착법

열탈착법은 (high temperature thermal desorption) 오염토양을 굴착하여 열적환경에서 토양을 고온에 노출시켜 소각이나 열분해를 통해 유해물질을 분해시키는 공법이다. 이 공법은 유기물질은 분해하지 않고 보다 처리하기 쉬운 형태로 전환하는 기법이며, 소각은 오염물질의 분해를 목표로 한다(FRTR, 1999). 많은 열처리 정화기술 가운데 저온에서 오염물질을 열적으로 탈착시키는 저온열탈착 방법 (LTDD, Low Temperature Thermal Desorption)은 토양을 굴착하여 처리하는 방법으로서 비교적 오염물질이 복잡하고, 오염농도가 높은 경우 주로 적용될 수 있으며, 처리시간이 짧라 처리 시 필요로 하는 면적이 비교적 적게 소요되는 방법이다(Low Temperature Thermal Desorption, 1996; William, 1993). 이 공법은 토양의 형태나 오염물질의 종류에 관계없이 적용범위가 넓고, 가장 높은 정화효율을 가진 공법이다. 이러한 장점으로 인하여 현장에 처리시설 설치가 가능하며, 이에 따른 처리에 필요한 운송비를 줄일 수 있다. 또한 처리 후 오염지역에 처리된 토양의 재사용이 용이하다. 그러나

높은 에너지를 요구하고 있어 처리비용이 고가이고, 중금속 처리에는 적합하지 않은 공법이다. 또한 오염토양의 양이 많은 경우 처리비의 경제성 문제 및 발생하는 오염가스에 의한 대기오염물질의 발생 등의 2차적 오염문제가 발생된다(William, 1993).

2.3.2.2 토양경작법

토양경작법 (landfarming)은 비교적 단순하고 저렴하며 넓은 지역을 위한 정화방법으로(Harmsen, 1991) 오염토양을 굴착한 후 넓은 부지에 고루 펴서 공기와 접촉할 수 있는 표면적을 크게 한 후, 오염물질이 휘발되거나 미생물에 의한 생분해로 인하여 오염토양을 정화하는 기술이다. 토양경작법은 bioremediation기술을 기본으로 하여 다수의 오염 지역을 정화할 수 있다(Pope and Matthews, 1993). 이는 넓은 부지에 고루 펼쳐서 공기와 접촉면을 크게 하고, 미생물의 생분해능을 촉진하기 위하여 영양분 공급 및 토양을 주기적으로 혼합하여 호기성 조건을 유지하여 처리효율을 증대시킬 수 있다(McCarthy et al., 2004). 이 공법은 에너지 소비율이 낮고 오염물질로부터 탄화수소 및 금속을 고정하여 토양 표면 및 지하수에 대한 오염도가 낮고 경제적으로 오염토를 정화할 수 있으나, 처리량에 대한 넓은 부지 확보가 필요하고 추가적인 2차 처리시설이 없을 경우 대기오염을 유발시킬 수 있다(Huddleston, et al., 1979; CONCAWE).

2.4 TPH의 화학적 처리기법의 현황

현재 국내에서는 유류오염토양 정화를 위한 기술로 화학적 처리를 선택하여 처리를 하고 있다. 화학적 처리는 처리공정에 적합한 다양한 화학제품을 사용하여 신속하고 다량의 오염물질들을 제거할 수 있는 이점을 가지고 있다. 널리 사용하는 화학적 처리로는 토양세척, 펜톤 유사반응 및 계면활성제를 사용하여 유류오염토양을 처리하고 있다.

2.4.1 토양세척의 작용원리 및 특성

토양세척 (Soil Washing)기술은 오염토양에 적합한 세척제 (물 또는 계면활성제)를 사용하여 토양입자에 결합되어 있는 오염물질의 표면 장력을 약화시키거나 중금속을 액상으로 변화시켜 토양입자로부터 유기오염물질 및 중금속을 분리하여 처리하는 기법이다(Griffiths, 1995; Deshpande et al., 1999; Chu and Chan, 2003). 세척제는 오염물질을 토양으로부터 분리·용해시키는 역할을 하는 물질로서 계면의 자유에너지를 낮추고 계면의 성질을 변화시켜 물에 대한 용해성이 적은 물질을 열역학적으로 안정된 상태로 용해시키는 역할을 한다. 이 기법은 금속, 할로겐 용매, 방향족 화합물, 연료오일, PCBs 및 농약 등 광범위한 유기 및 무기오염물질을 제거할 수 있으며 높은 정화효율을 가지고 있다(U.S. EPA, 1993; Kuhlman and Greenfield, 1999). 또한 물리 및 화학적 공정으로 토양으로부터 오염물질을 분리 및 부피를 감소시킬 수 있다. 그러나 미세토양을 처리할 경우 응집제 첨가가 필요하며, 처리비용이 고가이다. 또한 오염물질을 함유한 세척수의 처리를 위하여 화학 및 생물학적

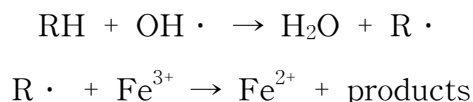
으로 2차적 폐수처리 기법이 요구된다(Mann, 1999).

2.4.2 펜톤 유사반응 처리기법의 작용원리 및 특성

화학적 처리 방법인 펜톤 유사반응을 사용하여 부유 유기물과 오염된 토양을 처리할 수 있다. 이 기법은 과산화수소의 반응메커니즘을 통하여 강력한 산화제인 hydroxyl radical (OH*)을 형성하여 축매반응을 할 수 있다(Kong et, al., 1998).



유기화합물의 경우 위의 반응기작은 아래의 반응을 수행하게 된다.



이러한 연구들은 과산화수소 분해력인 펜톤 반응의 원리를 기초한 것으로 철분 또는 다른 변화된 요소들이 축매작용을 한다(Fenton, 1984). 강력한 hydroxyl radical의 과산화수소 분해는 유기화합물의 확산속도를 조절하여 비특이성 산화반응을 한다(Dorfman, et. al., 1973; Haag, et. al., 1992). 토양은 침철광, 적철광, 또는 자철광과 같은 광물수산기(oxyhydroxide minerals)를 포함하고 있으므로 오염지역에서 이러한 천연광물들은 과산화수소 주입 시 펜톤과 같은 축매반응을 한다(Watts, 1991). 이러한 반응기작을 통하여 오염된 토양으로부터 유류 및 중금속

오염토양을 정화할 수 있다. 그러나 강력한 산화제인 만큼 생물학적 기법과의 적용면에서 다수의 제한적 요소를 가지고 있다. 산화제에 의해 토착균의 사멸로 인하여 정화효율이 저감되고, 기존 토양환경에 막대한 영향을 준다.

2.5 TPH 오염토양의 slurry-phase 생물학적 처리기법의 현황

토양 slurry 생물반응기는 오염물질의 생분해를 촉진하기 위한 비생물적 조건을 최적화하는 과정이다(Rutherford, et. al., 1998). 이 반응기는 토양을 여러 비율로 물에 혼합하여 미생물, 오염물질 (탄화수소 등), 영양물질 및 산소 등을 서로 최대한 접촉하게 함으로서 처리효율을 높이게 한다(Machin-Ramirez et. al., 2007; Kriipsalu et. al., 2007). 저질토양의 유기성 오염물질은 그들이 생물이용성 (bioavailability)이 낮을 경우 처리효율이 낮다는 사실이 보고되고 있다(Launen et. al., 2002; Yu et. al., 2005). 토양 slurry 생물반응기의 장점은 토양수분이 충분하므로 오염물질의 생물이용성을 증가시킬 수 있는 것이다(Weber and Kim, 2005). 또한 처리가 자동 운전되는 반응기에 의해 진행이 되므로 토양과 같은 고형폐기물 처리에 비해서 처리효율이 일정하다는 장점이 있다(Ferrari et. al., 1996).

2.6 TPH의 화학적 및 생물학적 처리기법의 전망

현재 유류로 오염된 토양은 물리, 화학, 생물학적 방법을 사용하여 정화 및 복원을 하고 있다. 화학적 처리는 오염된 토양이나 지하수에 직접적으로 주입하여 처리하는 방식으로 고농도로 오염된 토양을 정화할 시 높은 효율을 가진다. 그러나 이러한 화학적 처리는 토양에 직접 처리를 하였을 경우 토양에서 많은 화학작용을 일으키기 때문에 본래의 화학적 성질을 변화시켜 다른 문제점들을 유발시킬 수 있으며, 생물학적 공법과 통합하여 처리를 할 경우 토양 pH의 감소로 인한 토착미생물의 생장 억제를 유발시키고, 화학약품에 의한 필요 이상의 영양분 공급으로 인하여 토양환경에 부작용을 일으킬 수 있다. 또한 화학약품과 토양 속에 존재하는 미량의 금속들과 반응이 일어날 수 있어 중금속에 대한 오염을 발생시킬 수 있다(Riser-Roberts, 1998). 생물학적 처리는 오염물질을 호기성 또는 혐기성 조건에서 미생물의 생화학적 대사과정을 통하여 토양, 물, 그리고 가스로부터 환경오염물질을 분해·제거한다(Riser-Roberts, 1998; Collin, 2001). 그러나 고농도의 오염물질에는 독성작용으로 인하여 적용하기가 어렵고, 생분해반응이 비교적 느리게 진행되므로 처리시간에 따른 문제점이 발생하게 된다.

현재 국내 오염토양 정화에 대한 연구는 개별적인 기술들의 단순적용 차원에 머무르고 있어 오염토양 처리에 대한 실질적인 해결방향을 제시하지 못하고 있다. 따라서 기존 개발된 토양정화기술들의 조합을 통해 정화대상을 넓히고, 정화효과는 증대시켜 정화비용을 감소시키고, 현장 적용성 증대 및 개별 기법의 단점을 보완하기 위해 다른 공법과의 조합을 통한 시스템 개발이 요구된다. 이에 본 연구에서는 화학적 산화기법과 생물

정화 (bioremediation)기법 조합을 통해 유류로 오염된 토양의 효율적 정화 시스템을 개발하고자 한다.

3. 실험재료 및 방법

3.1 시료채취지역 및 채취방법

본 연구에 사용된 토양 시료는 휘발유 및 디젤유로 오염된 김해시의 ○○주유소 토양으로 시료 채취는 표층~60cm깊이의 토양을 채취하였다. 큰 입자의 토양 및 자갈, 이물질을 제거하기 위하여 2mm 체질을 하여 사용하였다. 본 연구에서는 이 복합오염물질을 총칭하여 total petroleum hydrocarbon (TPH)로 명칭 하였다.

3.2 적정 화학적 처리조건 탐색

TPH오염토양의 적정 화학적 처리조건을 선정하기 위하여 펜톤 유사 반응 및 계면활성제를 이용하여 적정 화학적 처리실험을 실시하였다. 펜톤 유사반응의 경우 여러 조건의 과산화수소 (H_2O_2)의 처리량을 선정하여 실험을 수행하였다. 그리고 계면활성제 (surfactant)는 여러 종류의 계면활성제를 이용하여 비교분석 실험을 수행하였다.

3.2.1 계면활성제 종류에 따른 처리효과 비교

실험에 사용한 계면활성제 (surfactant)는 (주)한국환경기술에서 제공받아 사용하였다. 계면활성제 선정을 위한 화학적 처리는 $FeSO_4$ 4% + 계면활성제 0.5%, H_2O_2 5% + 계면활성제 0.5%의 조건으로 처리 하였다. 토양 1kg에 대해 처리량은 10%로 하였으며, 실온 (24℃)에서 30분 동안

반응시켰다. 처음 펜톤 산화보조제인 FeSO_4 4% (w/w)와 수용액 상태로 만든 계면활성제 5%를 주입하여 충분히 반응을 시켰다. 그 다음 산화제인 H_2O_2 5%와 수용액 상태로 만든 계면활성제 5%를 주입하여 충분히 반응시켰다. 처리가 끝난 후 실온 (24°C)에서 24시간 방치를 하였다. 각 처리구에 대해서는 3회 반복 실험을 수행하였다(Table 3.1).

Table 3.1 Treatment concentrations of various surfactants used for Fenton-like reactions

<i>Treatment*</i>	<i>Surfactant</i>	<i>Concentration</i> (%, w/w)
1	Control	0
2	Hansol (SRA)	10
3	LX-CONE	10
4	N_TWO 1030	10
5	M-NP1020V	10
6	Hansol (SRA)	20
7	LX-CONE	20
8	N_TWO 1030	20
9	M-NP1020V	20

* 1~5 : treated one time , 6~9 : treated two time

3.2.2 고효율 TPH분해를 위한 화학적 처리조건 스크리닝

적정 화학적 처리조건을 탐색하기 위하여 다양한 조건에서의 펜톤 유사반응과 계면활성제 반응을 통하여 TPH분해 실험을 실시하였다. 실험의 처리 변수는 pH, 계면활성제 및 펜톤제 처리 농도 및 처리량이며 이에 따른 잔류 TPH 농도 측정을 통해 펜톤처리기법 조건을 최적화 하였다. 실험을 위한 처리조건은 Table 3.2와 같다.

Table 3.2 Conditions for Fenton-like reactions for optimal chemical oxidation of TPH

<i>Treatment</i>	<i>Condition**</i>
1*	FeSO ₄ 4% + surfactant 0.05%
	H ₂ O ₂ 5% + surfactant 0.05%
2	FeSO ₄ 4% + surfactant 0.05%
	H ₂ O ₂ 5% + surfactant 0.05%
3	FeSO ₄ 4% + surfactant 0.1%
	H ₂ O ₂ 10% + surfactant 0.1%

* Treated two times

** Used surfactants available in the market

3.2.3 우수계면활성제 및 적정 화학적 처리조건 선정

최고의 TPH분해율 달성을 위한 최적의 화학적 처리조건 및 계면활성제 선정을 위하여 이런 과정에서 확립된 화학적 처리조건과 TPH저감효율이 가장 높은 계면활성제 (surfactant)를 선정하여 실험을 수행하였다. 처리조건 및 계면활성제는 Table 3.3과 같다.

Table 3.3 Experimental condition for optimal chemical oxidation of TPH*

<i>Treatment</i>	<i>Condition</i>	<i>Surfactant</i>
1	Control	-
2	FeSO ₄ 4% + surfactant 0.05%	OP-10S 10%
	H ₂ O ₂ 5% + surfactant 0.05%	
3	FeSO ₄ 4% + surfactant 0.05%	LX-CONE 10%
	H ₂ O ₂ 5% + surfactant 0.05%	

* %, w/w

3.3 TPH 분해율 측정

최소 4주 동안 모니터링한 샘플에 대해 TPH 분석실험을 수행하였다. 채취한 시료를 40ml vials (National Scientific Company)에 5g을 담은 후 실온에서 24시간 건조를 시켰다. 건조시킨 시료의 잔류 수분을 제거하기 위하여 시료에 대한 1.5배의 무수황산나트륨 (Na_2SO_3)을 첨가하여 혼합하였다. 수분이 제거된 시료에 아세톤과 헥산을 1:1 비율로 혼합한 액을 10ml 주입한 후 2min간 혼합하여 12시간 정치를 시켰다. 정치시킨 상등액을 screw cap vial (Agilent)에 1ml씩 분주하여 분석 하였다. GC를 이용한 분석조건은 Table 3.4와 같다.

Table 3.4 Operation condition for gas chromatograph (GC6890-FID) for the analysis of TPH

<i>Gas Chromatograph</i>	Agilent Technologies 6890 Network System
<i>Column</i>	HP-5(Phenyl Methyl Siloxane) 50m(length)×0.2(diameter)×0.33 μm (film thickness)
<i>Temperature program</i>	Initial temperature : 2min at 50 $^{\circ}\text{C}$ Maximum temperature : 1min at 325 $^{\circ}\text{C}$
<i>Instrumental setting</i>	Injection temperature : 300 $^{\circ}\text{C}$ Detector temperature : 320 $^{\circ}\text{C}$ Gas type : Nitrogen Injection volume : 1 μl

3.4 우수 TPH분해 미생물 선발

3.4.1 농화배양을 통한 유류오염 토양으로 부터의 분해 미생물 분리

유류오염토양으로부터 TPH분해미생물을 분리하기 위하여 농화배양(enrichment)기법을 이용하였다. 250ml 삼각 플라스크에 Bushnell-Haas media (BH Broth, $\text{KH}_2\text{PO}_4(1\text{g/L})$, $\text{K}_2\text{HPO}_4(1\text{g/L})$, $\text{NH}_4\text{NO}_3(1\text{g/L})$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(0.2\text{g/L})$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}(0.083\text{g/L})$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(0.02\text{g/L})$, pH 7.0 ± 0.2 at 25°C , 121°C , 15min Autoclave)를 100ml 채운 후 샘플토양 5g을 넣고 단일 탄소원으로 시중판매 경유 $50\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 27°C 진탕항온기 (190rpm)에서 배양하였다 (4week). 4주 동안 배양한 배양액 $100\mu\text{l}$ 를 BH Agar에 도말한 후, 우점화 TPH 분해균주를 순수배양을 통하여 분리하였다.

3.4.2 분리된 분해 미생물의 성장 속도를 통한 선발

필요한 경우 TPH오염토양으로부터 분리된 분해미생물을 BH media에 접종을 하여 pH 6.8 ± 0.02 로 조절을 한 후 단일 탄소원으로 경유 $50\mu\text{l}$ 를 주입한 후 27°C , 190rpm으로 7일 동안 배양을 하였다. 배양액을 채취하여 각 균주에 대한 성장곡선 (흡광도 545nm)을 작성하여 성장속도를 측정하였다.

3.4.3 총중속영양세균 밀도측정

화학적 처리 및 생물학적 처리를 거친 토양시료를 채취하여 총중속영양세균 밀도를 측정하였으며, 생균수측정법을 이용하여 수행하였다. 생균수측정은 복합배지 TSA (tryptic soy agar) 1/5 strength 배지를 이용하여 10^{-3} , 10^{-4} 및 10^{-5} 으로 희석하여 2회 반복 실험을 수행하였다(Atlas, 1995).

3.4.4 TPH 분해세균 밀도

화학적 및 생물학적 처리를 거친 토양시료를 채취하여 TPH 분해세균 밀도를 측정하였으며, 생균수측정법을 이용하여 수행하였다. 생균수측정법은 Bushnell-Haas media를 이용하였으며, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 으로 희석하여 2회 반복 실험을 수행하였다. 그리고 대상오염지역의 오염원인 경유를 유일 탄소원으로 이용하여 실험하였다(Atlas, 1995).

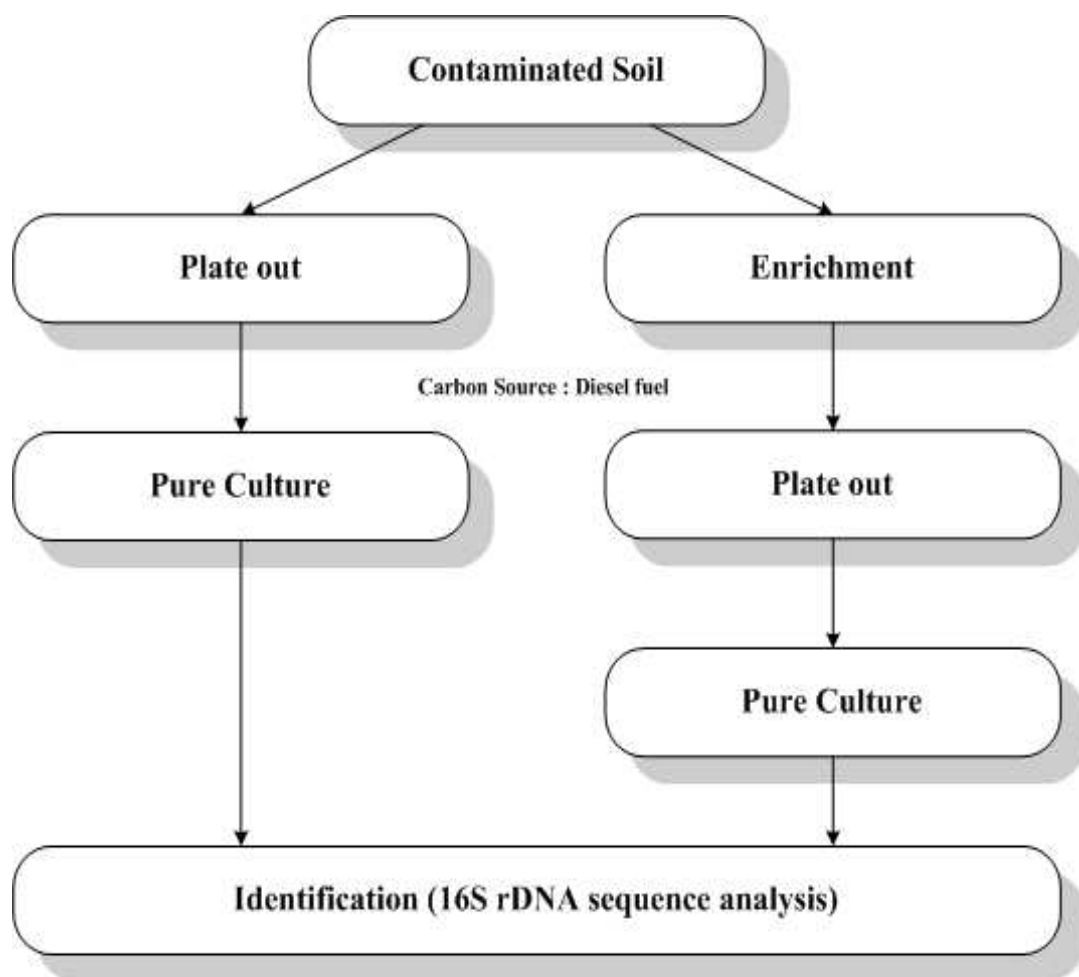


Fig 3.1 Procedures for the isolation of efficient TPH degraders and their identification

3.4.5 Bioaugmentation용 미생물 군집의 선정

경유를 유일 탄소원으로 사용한 농화배양을 한 후 확보된 유류 (경유) 분해균을 포함하는 혼합균을 확보하였다. 이를 $10^6 \sim 10^7$ (c.f.u/ml soil slurry)의 농도로 토양슬러리에 처리하여 bioaugmentation 실험을 실시하였다.

3.5 화학적 · 생물학적 통합처리를 거치는 TPH오염토양 내에서의 선발미생물 군집의 작용 규명

3.5.1 토양 microcosm 을 이용한 TPH의 화학적 처리

본 연구에서 수행한 적정 화학처리조건은 토양 150g에 대한 10%량으로 처리하여 24시간 동안 반응을 시켰다. 각 처리구에 대해 3회반복 실험을 수행하였다. 계면활성제는 처리효과의 적정성으로 판단된 OP-10S와 비교 실험을 위하여 Tween 80을 사용하였다(Table 3.5).

Table 3.5 Conditions for Fenton-like reactions for the sequential chemical and biological treatment

<i>Treatment</i>	<i>Conditions</i> *
Control 1	None
Control 2	Autoclaved (121 °C, 15min)
Treatment 1	FeSO ₄ 4% + OP-10S 0.05% H ₂ O ₂ 5% + OP-10S 0.05%
Treatment 2	FeSO ₄ 4% + Tween 80 0.05% H ₂ O ₂ 5% + Tween 80 0.05%

* %, w/w

3.5.2 Bioaugmentation용 미생물 균집을 이용한 생물학적 처리

화학처리 된 토양을 BH배지로 12.5% 슬러리상태로 만든 다음, 1M NaOH로 pH 7.2 ± 0.05 로 조정 후 미생물을 접종하였다 (10^8 c.f.u/g soil). pH조정은 혼합의 양호성을 위하여 증류수 10% 추가 후 적정하였다. pH적정 후 각 토양에 대해 배양한 미생물을 주입하여 처리한 후 4주 동안 모니터링을 하였다 (단, 대조구의 경우 같은 농도의 조건을 맞추기 위하여 증류수를 첨가). 미생물 성장조건을 맞추기 위하여 매주 슬러리의 10% 농도로 유류분해 미생물을 접종하였으며, C : N : P = 100 : 15 : 1(Riser-Roberts, 1998)의 비율로 영양원을 첨가하였다. 질소원은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 인은 K_2HPO_4 를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 탄소원의 함량은 디젤유에 함유된 TPH농도 (4000mg/L slurry)를 기준으로 계산하였다(Table 3.6).

Table 3.6 Bioaugmentation plan for TPH-contaminated soil slurry that has undergone Fenton-like reactions

<i>Treatment</i> *	<i>Bioaugmentation</i> **
Control 1-1	- +
Control 1-2	- +
Control 1-3	- +
Treatment 1-1	- +
Treatment 1-2	- +
Treatment 1-3	- +
Treatment 2-1	- +
Treatment 2-2	- +
Treatment 2-3	- +
Treatment 3-1	- +
Treatment 3-2	- +
Treatment 3-3	- +

* three replicated

** '+' indicates mixed cultures degrading diesel fuel enriched from TPH-contaminated soils were inoculated at the final density of $10^6 \sim 10^7$ (c.f.u/ml soil slurry)

3.5.3 Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) 기법을 이용한 TPH분해균 및 토착미생물 군집분석

토양의 화학·생물학적 처리 전·후의 미생물 군집변화를 측정하기 위해 PCR-DGGE 기법을 이용하였다. 처리 전·후의 토양으로부터 추출한 총 DNA중 16S rDNA를 PCR을 수행하여 증폭 후 16S rDNA V3 region을 touchdown PCR을 수행하여 재증폭 하였다. Touchdown-PCR을 수행하여 얻은 PCR 산물은 BioRad Dcode System (BioRad Laboratories, USA)으로 DGGE를 수행하였다. Denaturing gradient gel은 40%에서 70%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 하였다. 증폭 산물 40 μ l를 loading하여 1 \times TAE 완충용액에서 60 $^{\circ}$ C, 70V로 14시간 전기영동 후 EtBr을 사용하여 염색 후 Scientific Image System (Kodak, USA)로 관찰·분석하였다.

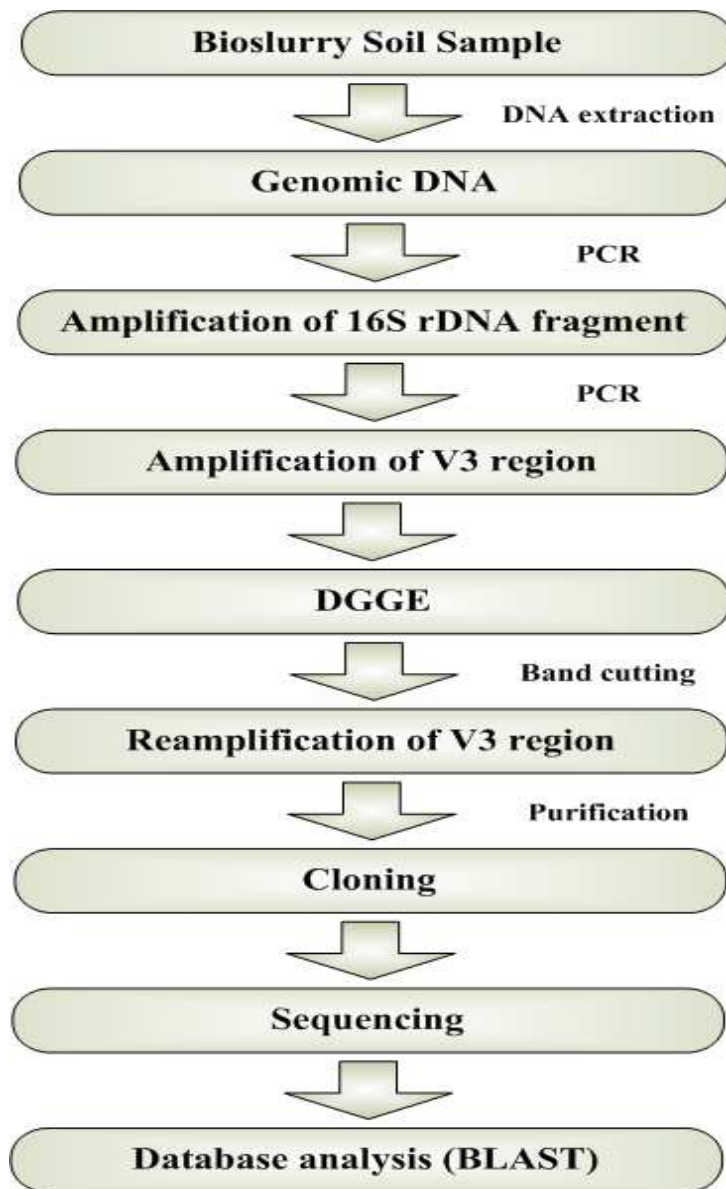


Fig 3.2 Procedure for microbial community analysis for soil bioslurry by PCR-DGGE technique

3.6 현장조건에서의 TPH (디젤유)오염토양의 Bioaugmentation에 의한 처리

본 연구는 화학적 및 생물학적 통합처리 기술을 현장에 적용하여 유류 오염토양에 대한 현장 적용성을 평가하기 위해 실험을 수행하였다. 화학적 및 생물학적 처리는 펜톤 유사반응과 bioaugmentation 기법을 이용하여 생물학적 처리를 수행하였다.

3.6.1 시료채취

본 연구에 사용된 토양 시료는 디젤유로 오염된 경기도 A시의 토양으로 시료 채취는 표층~60cm깊이의 토양을 채취하였다. 큰 입자의 토양 및 자갈, 이물질을 제거하기 위하여 2mm 체질을 하여 사용하였다. 현장의 환경요인은 온도는 15~20℃를 나타내었고, 수분함량은 50~60%정도 함유하고 있었다. 또한 pH는 4.3정도로 나타났고, 초기 오염토양의 TPH 농도는 50,000~70,000 (mg/kg)로 나타났다.

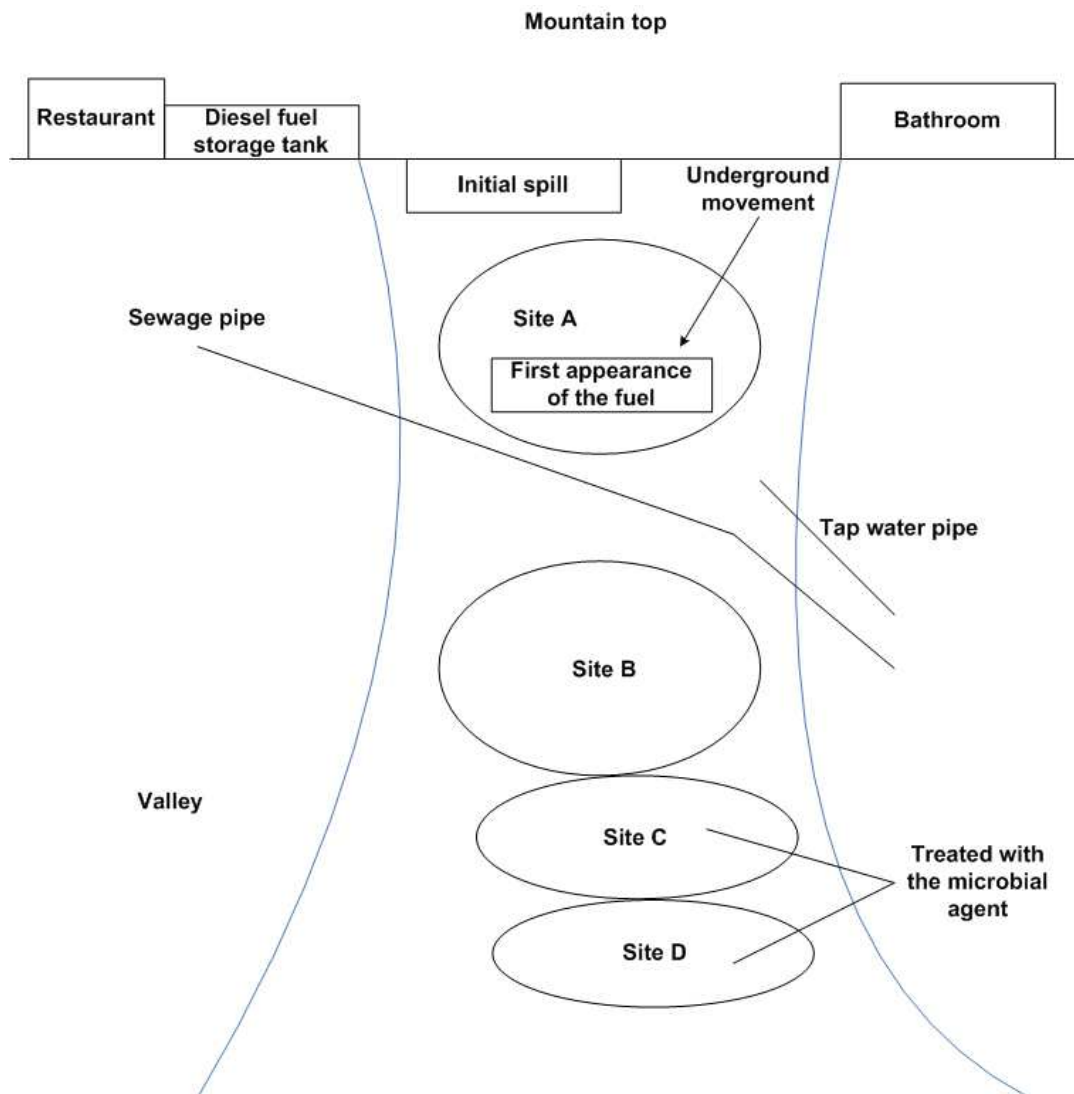


Fig 3.3 Soil map for *in situ* TPH bioremediation

3.6.2 오염부지에 대한 정화작업 조건

정화작업을 위한 화학적 처리는 최초 오염원 누출지역과 외부로 유출된 오염지역에 대해 각각 실시를 하였다.

3.6.2.1 최초 오염원 누출지역

이 지역 (Fig 3.3, Site A)에 대한 산화제 처리는 산화제의 산화율을 높이기 위하여 1~2시간 전에 산화제의 10~20%의 산화보조제 (FeSO_4)를 살포 후, 토양 양에 대한 3%로 산화제 (H_2O_2)를 처리하였다. 그리고 유류분해제 (H-S)는 물에 용해를 시켜 수용액 상태로 약품주입정에 주입하여 200kg ($200\text{m}^3 \times 0.1\%$)을 주입하였다.

3.6.2.2 외부로 유출된 오염지역

외부로 유출된 오염지역의 경우 토양을 굴착하여 오염이 심한 토양은 미생물반응백에 투입하여 처리하고 나머지는 유류분해제 (H-S)를 분무하여 처리하였다. 미생물반응백은 내부에 열선을 설치하여 미생물 활동 온도를 유지하였고, 온도유지를 위하여 보온비닐과 보온제로 감싸두었다. 그리고 오염토양에 미생물, 미생물 영양제 및 수분 등을 주입하였다. 유류분해제 (H-S)처리는 고압분무기를 이용하여 유류분해제 (H-S)를 분무 및 장비나 삽 등을 이용하여 약품과 토양을 혼합하여 96kg ($96\text{m}^3 \times 0.1\%$)양을 주입하였다. 또한 미생물 성장촉진 조건을 맞추기 위하여 질소와 인을 포함한 영양분을 공급하여 주었고, pH조절 (석회사용), 산소공급, 미생물

첨가 및 온도를 유지시켜 주었다.

3.6.3 유류오염토양의 미생물 밀도 측정

3.6.3.1 미생물제재 밀도

미생물 활성을 증대시키기 위해 미생물 제재를 첨가하였다. 미생물 제재의 미생물 밀도를 측정하기 위해 viable cell counting을 수행하였다. 복합배지 TSA (trypticase soy agar) 1/2 strength 배지를 이용하였으며 희석배율은 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 으로 수행하였으며 2회 반복 실험하였다.

3.6.3.2 총종속영양세균 밀도

오염시료에 대해 총종속영양세균 밀도를 측정하였으며 viable cell counting법을 이용하여 수행하였다. viable cell counting은 복합배지 TSA 1/2 strength 배지를 이용하였다.

3.6.3.3 TPH 분해세균 밀도

오염지역의 정화를 위해 사용된 미생물 제재의 TPH 분해세균 밀도를 측정하였다. 오염지역 시료는 각 지점별로 3곳의 시료를 채취하여 반복 실험 하였다. TPH 분해세균 밀도를 측정하기 위해 viable cell counting 법과 MPN법 (탄소원: 경유사용)을 이용하여 수행하였다. TPH 분해세균을 분리 및 밀도를 측정하기 위해 Bushnell-Haas 배지 (Atlas, 1995)를 이용하였으며, 오염원인 경유를 단일 탄소원으로 이용하여 실험하였다.

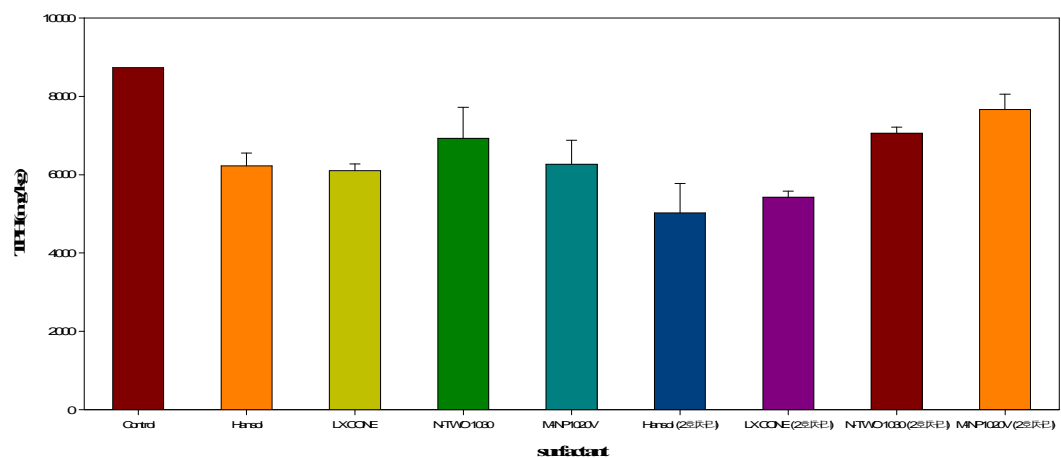
4. 결과 및 고찰

4.1 TPH오염토양의 화학적 처리조건 탐색

4.1.1 계면활성제 종류에 따른 처리효과 비교

Fig 4.1은 계면활성제 종류에 따른 오염토양에서의 TPH 분해제거효율을 나타낸 것이다. 계면활성제에 따른 화학처리의 경우 1회 처리와 2회 처리를 통하여 비교실험을 한 것으로, 2회 처리를 한 경우 효율이 높게 나타났다. 그림에서 보는 바와 같이 가장 높은 효율을 나타낸 LX-CONE의 경우 1회 처리 시 30%, 2회 처리 시 38%를 나타내었다. 이는 1회 처리를 한 경우와 2회 처리를 한 경우 약 8% 차이로 분해율은 높은 차이가 나타나지 않았다. 따라서 경제적 요건을 고려할 때 2회 처리 보다 1회 처리가 더 효과적이라고 판단된다. 또한 1회 처리 시 가장 높은 효율을 나타낸 계면활성제 (LX-CONE)와 또 다른 계면활성제 (OP-10S)를 비교 실험하였다. 이 실험의 경우 LX-Cone은 약 2%의 분해율을 보였으나 OP-10S의 경우 약 15%의 분해효율을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 적정 화학처리조건 선정 시 계면활성제는 OP-10S를 선정하여 실험을 수행하였다.

(A)



(B)

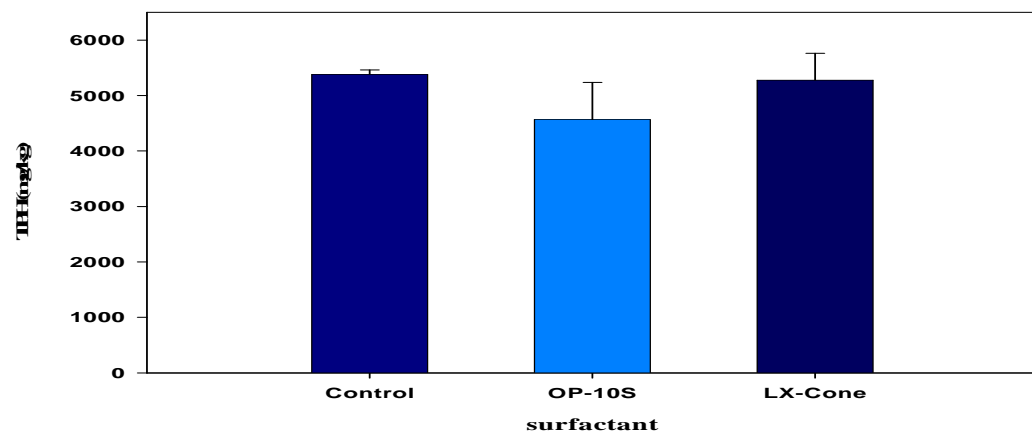


Fig 4.1 Efficiency of soil TPH removal by the chemical oxidation depending on surfactants

chemical oxidation conditions :

(A) FeSO_4 4% + surfactant 0.05% , H_2O_2 5% + surfactant 0.05% (w/v)

(B) FeSO_4 4% + surfactant 0.05% , H_2O_2 5% + surfactant 0.05% (w/v)

4.1.2 펜톤 산화처리 농도에 따른 TPH분해효율

Fig 4.2는 펜톤 산화제의 농도에 따른 TPH분해율을 나타낸 것이다. 처리구 1의 경우 처리구 2와 같은 계면활성제로 2회 처리한 것이다. 펜톤 산화제의 농도가 5%일 때와 10%일 때 분해율의 차이는 거의 나지 않았다. 따라서 적정 산화처리의 농도는 5%로 선정하여 본 연구를 실행하였다.

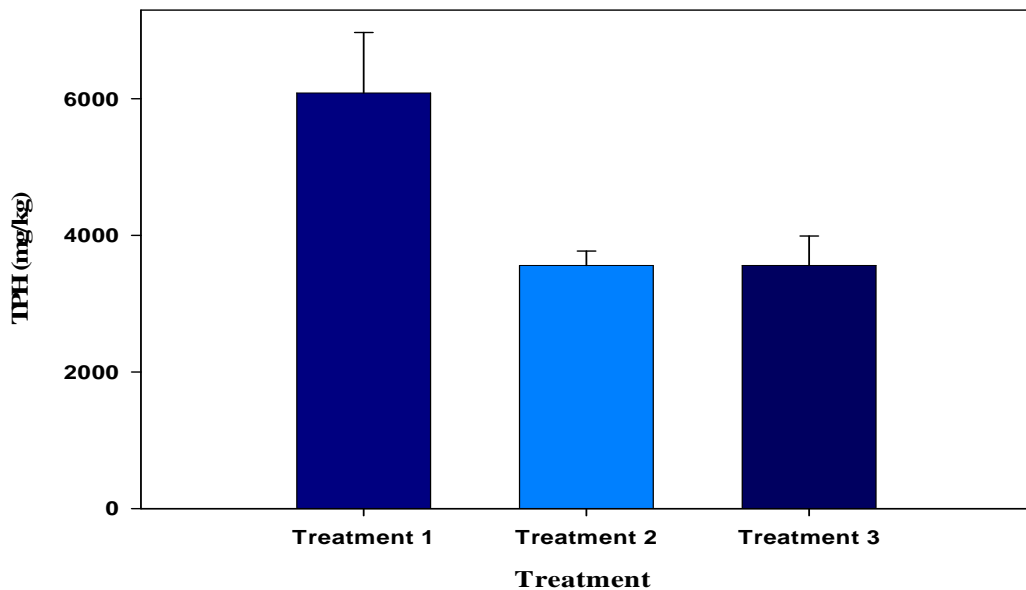


Fig 4.2 Efficiency of soil TPH removal by the chemical oxidation under different chemical oxidation conditions

Treatment 1 : FeSO_4 4% + surfactant (OP-10S) 0.05% (w/v)

H_2O_2 5% + surfactant (OP-10S) 0.05% (w/v, treated two time)

Treatment 2 : FeSO_4 4% + surfactant (OP-10S) 0.05% (w/v)

H_2O_2 5% + surfactant (OP-10S) 0.05% (w/v)

Treatment 3 : FeSO_4 4% + surfactant (OP-10S) 0.1% (w/v)

H_2O_2 10% + surfactant (OP-10S) 0.1% (w/v)

4.2 화학적 및 생물학적 처리를 거친 토양의 pH

유류오염토양을 펜톤 산화처리 후 토양 slurry의 pH는 2~3정도 매우 낮게 나타났다. 따라서 Bioaugmentation기법을 적용하기 위하여 미생물 성장조건에 맞는 pH를 맞추기 위하여 1M NaOH로 pH를 7.2 ± 0.05 의 범위로 조정하였으며, 매주마다 pH변화를 측정하였다. 처리 후 pH를 측정한 결과 6.8~7.0 수준으로 유지되었으며, 펜톤 산화처리의 경우도 pH는 큰 변화를 나타내지 않았다.

4.3 화학적 및 생물학적 통합처리 시 총중속영양세균 밀도변화

호기성 중속영양세균의 밀도는 5.05~7.46 (log c.f.u./ml), 유류분해균 접종 후 7.86~8.14 (log c.f.u./ml)의 밀도를 나타내었고 생물학적 처리 적용 3주 후 9.67~9.88 (log c.f.u./ml)의 밀도를 나타내었다. 그러나 3주 모니터링 이후 9.06~9.46 (log c.f.u./ml)의 밀도를 나타내었다(Fig 4.3). 초기 미생물 밀도는 대조구보다 화학처리를 거친 토양의 경우 낮은 밀도를 나타내었다. 이것은 화학처리에 사용되는 산화제 (H_2O_2)의 영향으로 토착미생물의 감소로 인한 결과라 사료된다. 생물학적 처리 후 3주 동안 모니터링한 결과 초기 밀도보다 약 100배의 높은 증가를 나타내었다. 이것은 매주 분해균과 영양원소의 주입으로 인하여 유류분해균 증가 및 기존 토착미생물의 성장으로 인한 결과라 사료된다.

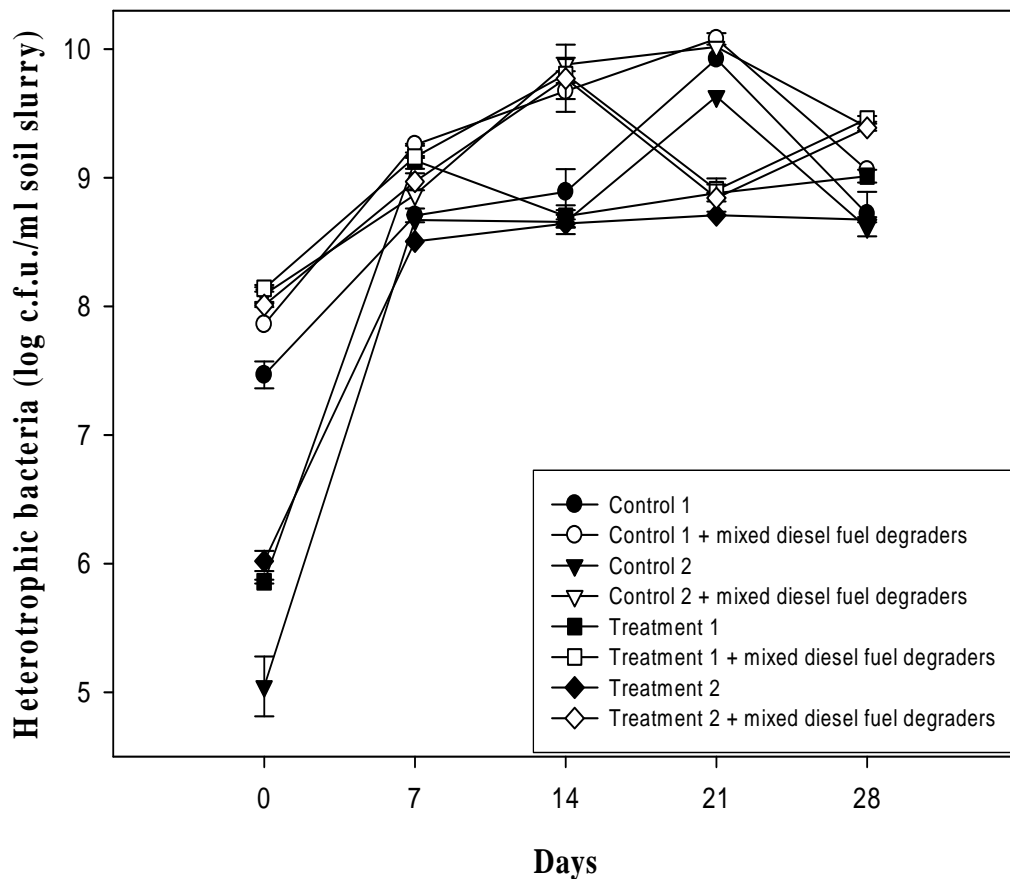


Fig 4.3 Population dynamics of total heterotrophic bacteria from soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil

Control 1 : None

Control 2 : Autoclaved (121°C, 15min)

Treatment 1 : FeSO₄ 4% + OP-10S 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + OP-10S 0.05% (w/v)

Treatment 2 : FeSO₄ 4% + Tween 80 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + Tween 80 0.05% (w/v)

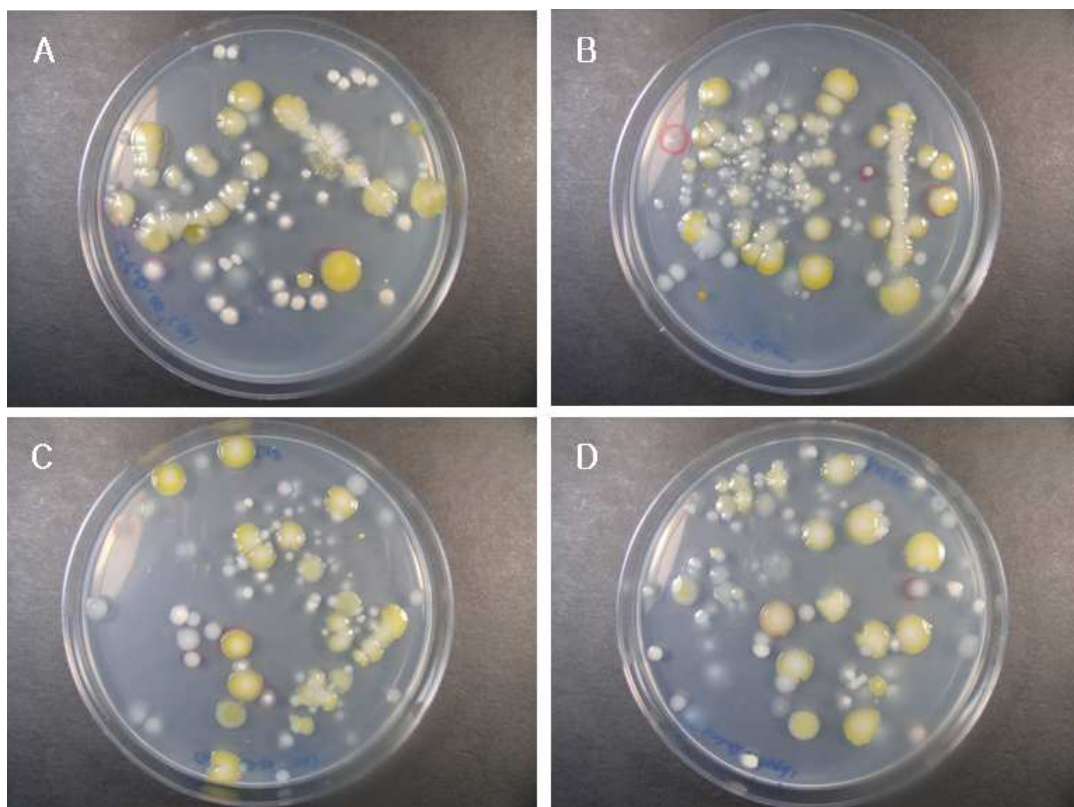


Fig 4.4 Plating out of total heterotrophic bacteria onto TSA from soil slurries undergoing bioremediation of TPH-contaminated soil after 28 days

A. Control 1 (dilution: 10^{-6}), B. Control 2 (dilution: 10^{-6})

C. Treatment 1 (dilution: 10^{-6}), D. Treatment 2 (dilution: 10^{-6})

4.4 화학적 및 생물학적 통합처리 시 TPH 분해 세균 밀도의 변화

유류분해세균의 밀도는 6.26~6.46 (log c.f.u./ml), 유류 분해균 접종 후 7.55~7.89 (log c.f.u./ml)의 밀도를 나타내었고 생물학적 처리 적용 3주 후 9.72~10.6 (log c.f.u./ml)의 밀도를 나타내었다. 그러나 3주 모니터링 이후 8.96~9.19 (log c.f.u./ml)의 밀도를 나타내었다(Fig 4.5). 초기 미생물 밀도에 비해 생물학적 처리 후 약 100배의 증가를 나타내었다. 이는 매주 미생물 성장조건을 유지하기 위하여 영양원소의 주입과 분해균의 주입으로 인한 분해미생물 성장 및 유지에 기인한 것으로 사료된다. 따라서 적절한미생물의 영양원을 공급할 경우 분해세균의 활성유지 및 토양 토착세균의 회복이 가능하며 아울러 잔류 TPH의 처리도 가능할 것으로 판단된다. 그러나 3주 모니터링 후 밀도가 감소하였는데, 이는 TPH제거에 따른 탄소원의 감소로 인한 결과라 사료된다.

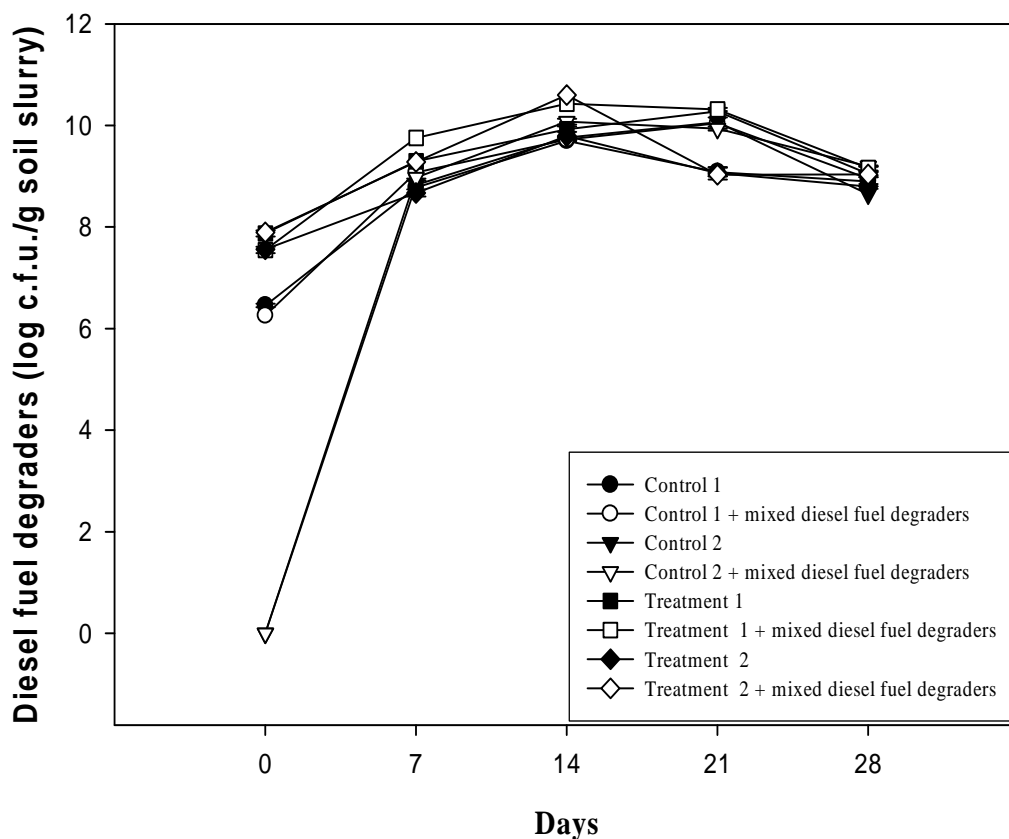


Fig 4.5 Population dynamics of diesel fuel bacteria from soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil

Control 1 : None

Control 2 : Autoclaved (121°C, 15min)

Treatment 1 : FeSO₄ 4% + OP-10S 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + OP-10S 0.05% (w/v)

Treatment 2 : FeSO₄ 4% + Tween 80 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + Tween 80 0.05% (w/v)

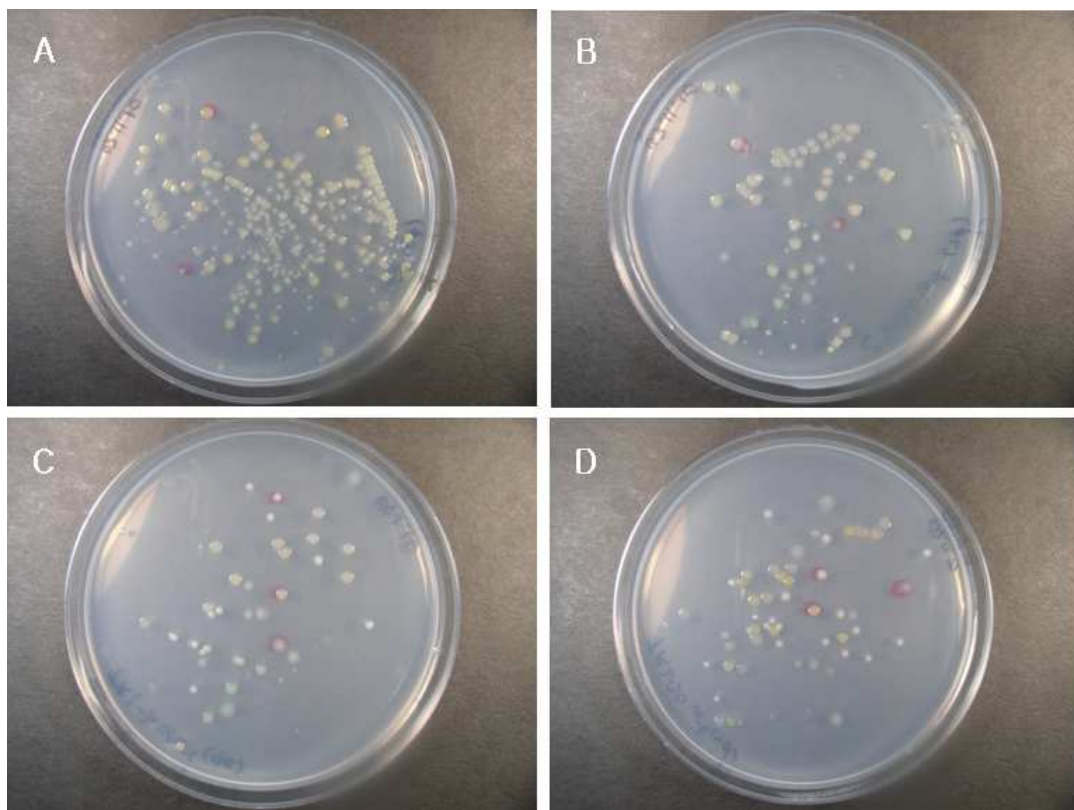


Fig 4.6 Plating out of total diesel fuel bacteria onto BH agar from soil slurries undergoing bioremediation of TPH-contaminated soil after 28 days

A. Control 1 (dilution : 10^{-6}), B. Control 2 (dilution : 10^{-6})

C. Treatment 1 (dilution : 10^{-6}), D. Treatment 2 (dilution : 10^{-6})

4.5 화학적 및 생물학적 통합처리 시 TPH 농도변화

Fig 4.7은 화학 및 생물학적 처리를 거친 토양의 TPH 잔류농도를 나타낸 것이다. 초기 TPH농도는 4200~5100 (mg/kg)정도의 농도를 나타내었으나, 4주 모니터링한 결과 생물학적 처리 전 TPH농도는 약 3700 (mg/kg), 생물학적 처리 후 약 210~980 (mg/kg)정도로 나타났다. 각 처리구에 따른 효율은 대조구의 경우 생물학적 처리 전의 TPH효율은 78.7%, 생물학적 처리 후 91~95%의 TPH처리효율을 나타내었다. 처리구의 경우 생물학적 처리 전의 TPH효율은 20~25%, 생물학적 처리 후 78.6~81%의 TPH처리효율을 나타내었다(Fig 4.7, Fig 4.8). 각 처리구마다 TPH처리효율은 상승하였으나, 화학 및 생물학적 처리를 거친 토양보다 대조구의 경우 TPH처리효율이 더 높게 나타났다. 화학적 처리를 거친 토양은 강한 산화제로 인한 토착균의 사멸이 이루어진다. 그러나 대조구의 경우 토착균의 서식이 가능하고 또한 유류분해균주의 주입으로 인하여 토착균 및 분해균으로 인하여 보다 높은 처리효율을 나타내었다 사료된다. 따라서 생물학적 처리를 시행할 경우 토착균의 작용에 의한 분해가 이루어지기 때문에 화학적 처리가 TPH분해에 역효과를 발생시킬 수 있다고 사료된다.

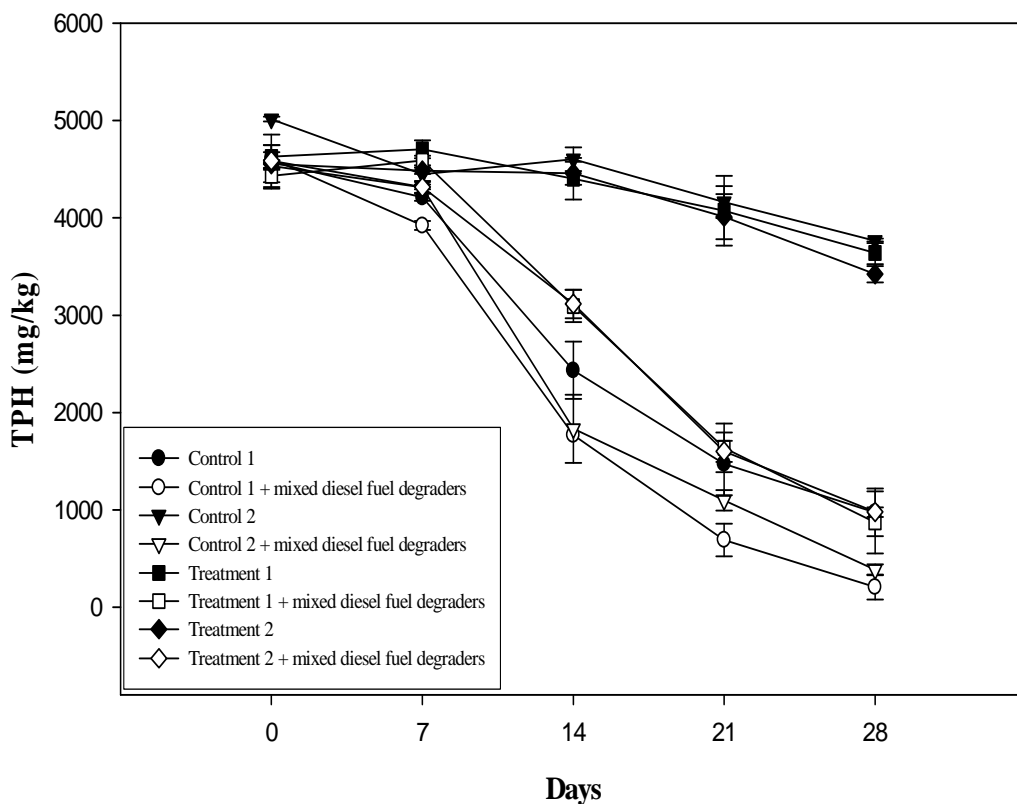


Fig 4.7 Residual concentration of TPH in the soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil

Control 1 : None

Control 2 : Autoclaved (121°C, 15min)

Treatment 1 : FeSO₄ 4% + OP-10S 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + OP-10S 0.05% (w/v)

Treatment 2 : FeSO₄ 4% + Tween 80 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + Tween 80 0.05% (w/v)

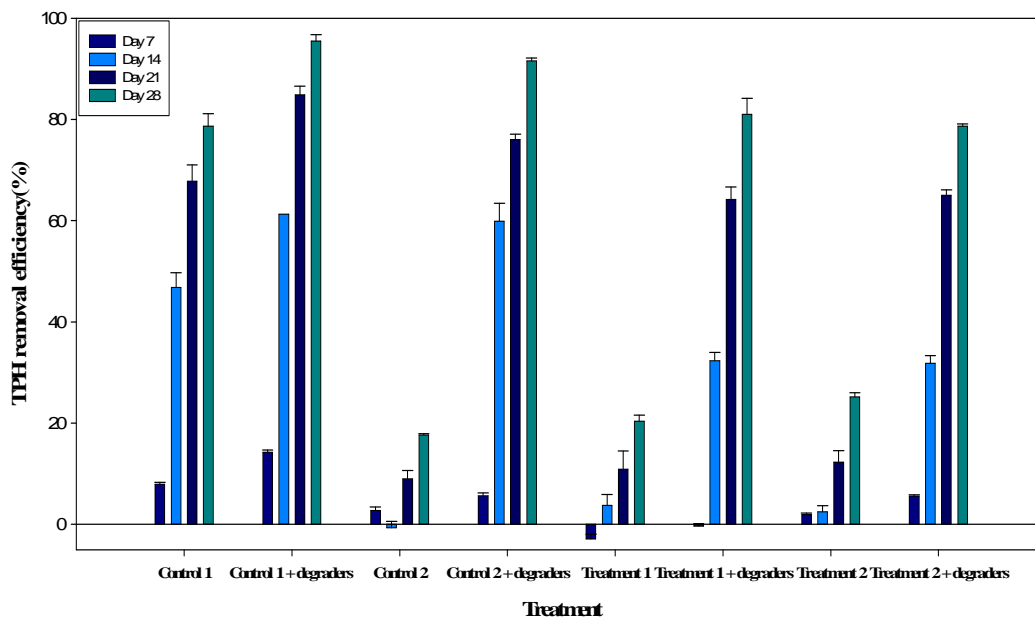


Fig 4.8 Removal efficiency of TPH for the soil slurries undergoing sequential chemical and biological treatment of TPH-contaminated soil

Control 1 : None

Control 2 : Autoclaved (121°C, 15min)

Treatment 1 : FeSO₄ 4% + OP-10S 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + OP-10S 0.05% (w/v)

Treatment 2 : FeSO₄ 4% + Tween 80 0.05% (w/v)

H₂O₂ 5% + Tween 80 0.05% (w/v)

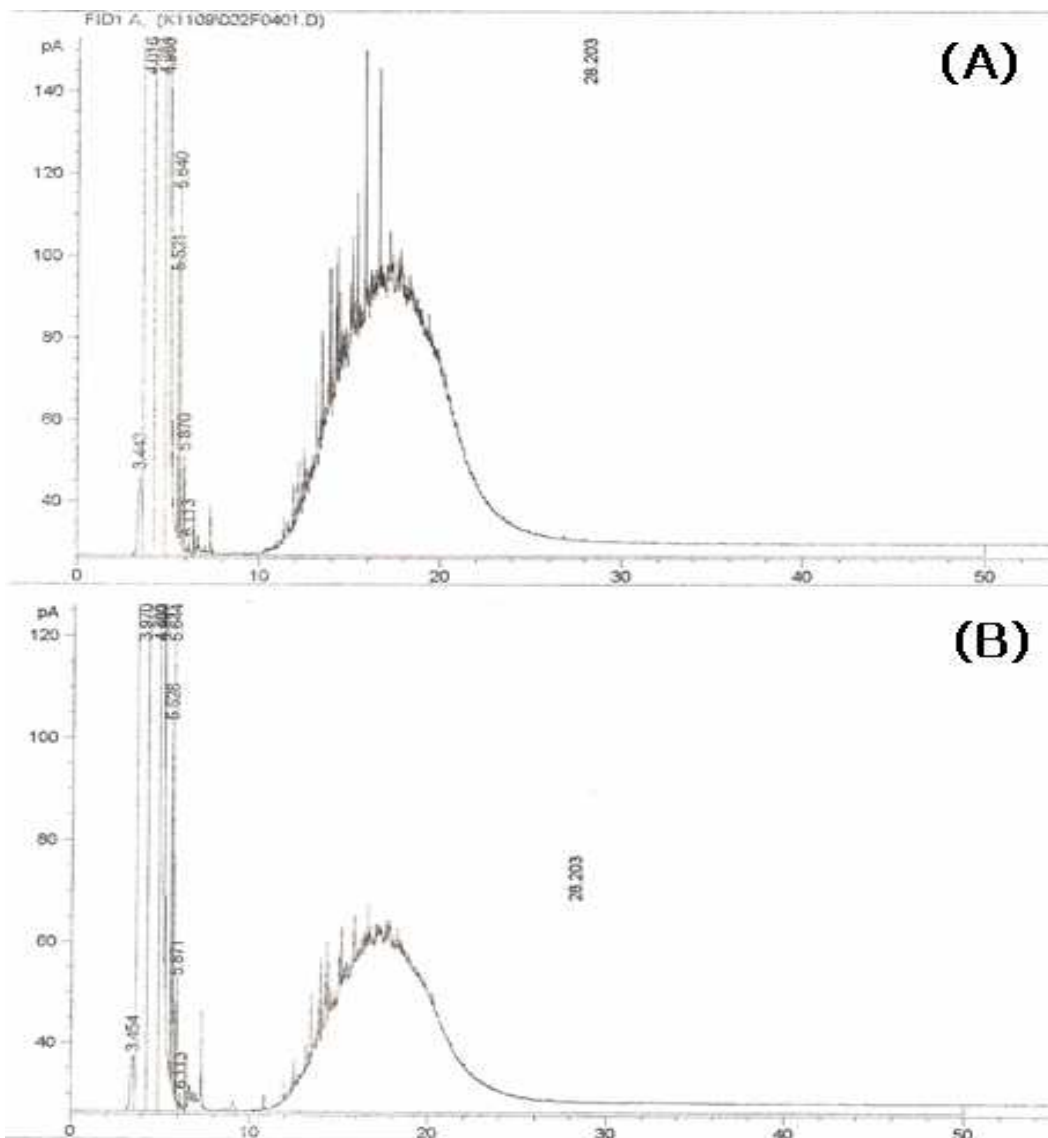


Fig 4.9 Profiles of gas chromatography of TPH-contaminated soils undergoing sequential chemical and biological treatment

Chemical treatment;

FeSO_4 4% + OP-10S 0.05%, H_2O_2 5% + OP-10S 0.05% (w/v)

Biological treatment;

diesel fuel degraders were inoculated at the final density of $10^6 \sim 10^7$ (c.f.u/ml soil slurry)

(A) Day 0, (B) Day 28

4.6 PCR-DGGE 기법에 의한 TPH 오염토양의 화학적·생물학적 처리중의 분해 및 토착 미생물 군집변화 추적

화학 처리 후 미생물 군집의 다양성은 처리 전에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 산화제의 영향으로 토착미생물의 사멸로 인한 결과라 사료된다. 그러나 유류분해균을 접종할 경우 접종균의 존재는 확인할 수 있었다. 분해균 처리 후 28일 경과 시 전반적으로 종다양성은 감소하는 경향을 보였다. 그리고 접종한 유류분해균은 4주 (28일)경과 시 까지도 무접종구와는 차별되게 관찰이 되었다. 약 수십종이 존재하는 것으로 관찰이 되며, 이들을 동정하여 TPH 오염토양의 bioaugmentation 처리 시 그들의 역할을 검토할 필요가 있다. 그리고 화학처리구에 비해서 보다 높은 미생물 군집 다양성을 보이는 것으로 관찰이 되므로 분해균의 처리가 화학처리 토양의 생물적 복원에 기여하는 것으로 사료된다. 이 경우 적절한 유기물 (퇴비 등)의 첨가를 실시하면 오염토양의 화학처리로 부터의 빠른 회복을 기할 수 있을 것으로 본다.

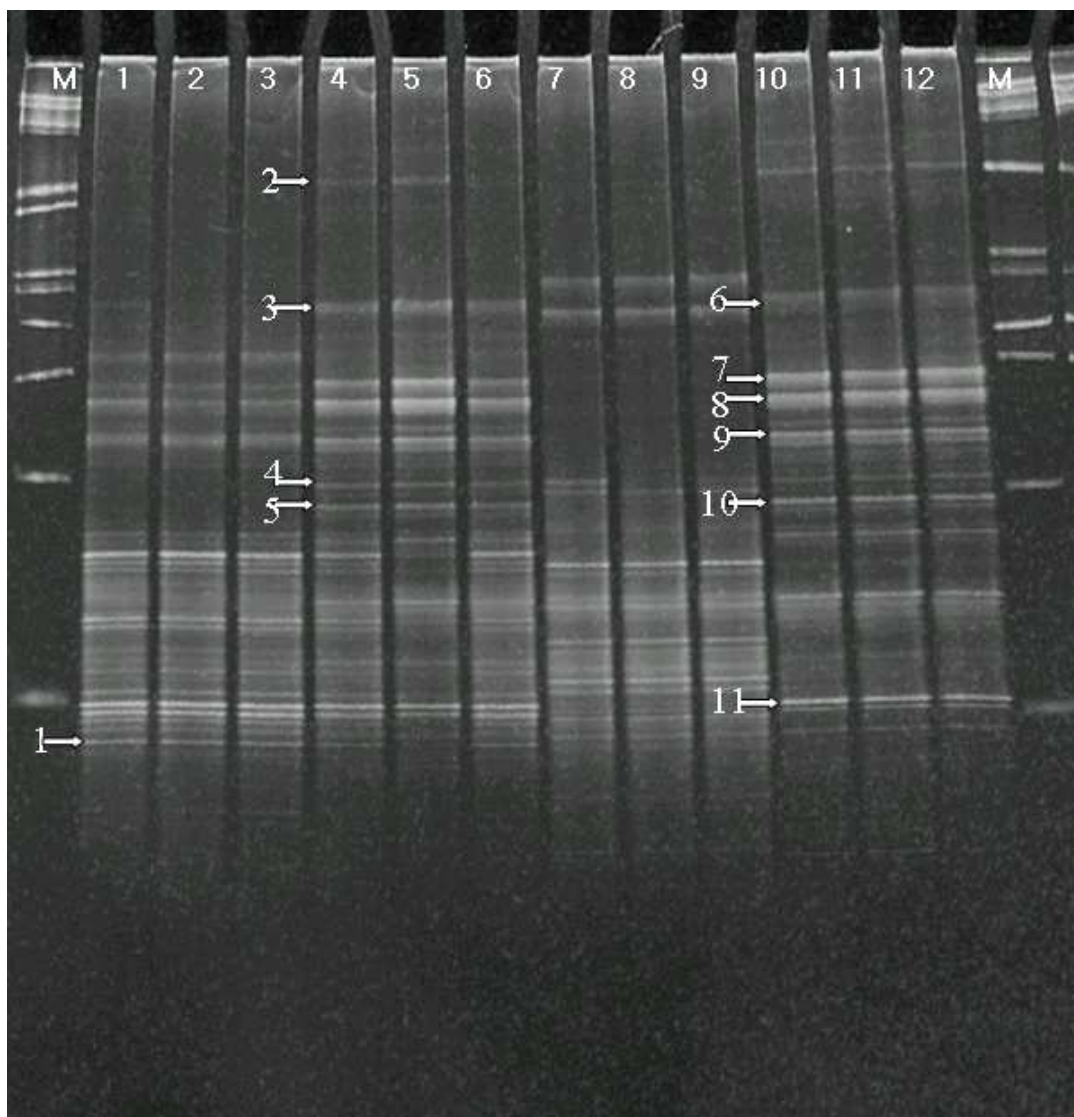


Fig 4.10 Microbial community analysis using PCR-DGGE technique of TPH-contaminated soils undergoing sequential chemical and biological treatment (Day 0)

(M : Marker, Line 1~3 : Control 1, Line 4~6 : Control 1 (degrader inoculation), Line 7~9 : Control 2, Line 10~12 : Control 2 (degrader inoculation))

Arrows indicate the new populations compared with control (without inoculation of the diesel fuel degraders)

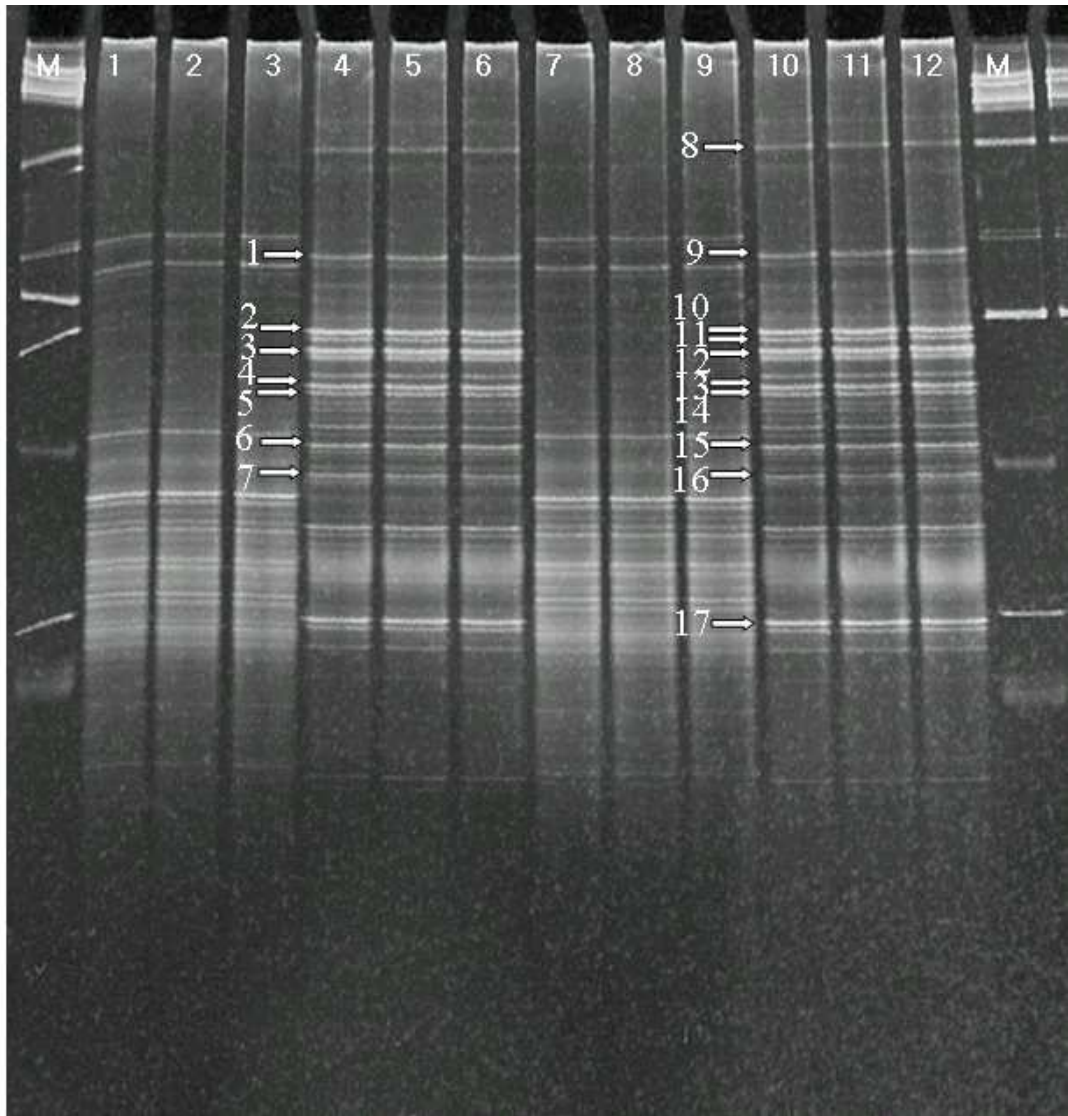


Fig 4.11 Continued

(M : Marker, Line 1~3 : Treatment 1, Line 4~6 : Treatment 1(degrader inoculation), Line 7~9 : Treatment 2, Line 10~12 : Treatment 2(degrader inoculation))

Arrows indicate the new populations compared with control (without inoculation of the diesel fuel degraders)

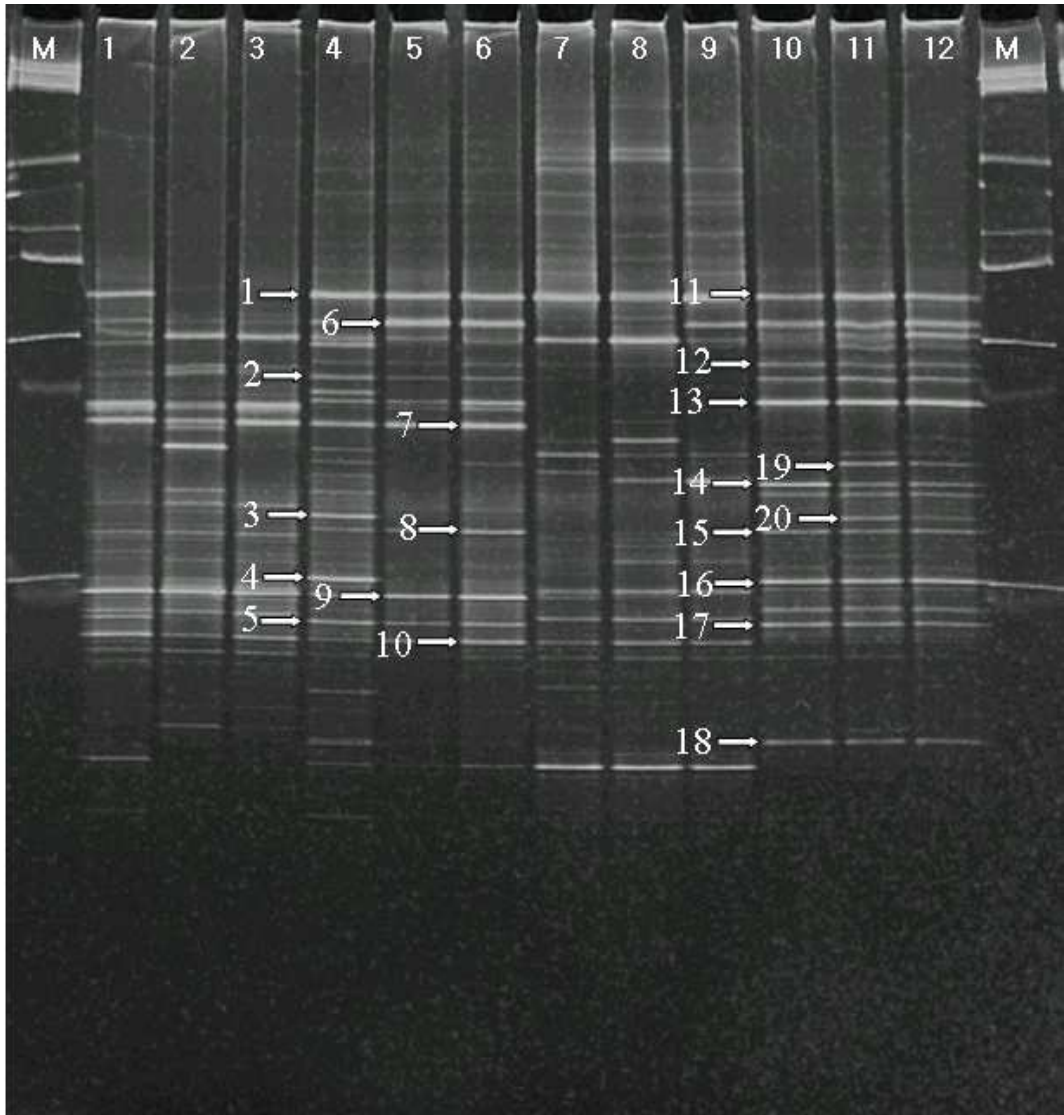


Fig 4.12 Microbial community analysis using PCR-DGGE technique of TPH-contaminated soils undergoing sequential chemical and biological treatment (Day 28)

(M : Marker, Line 1~3 : Control 1, Line 4~6 : Control 1 (degrader inoculation), Line 7~9 : Control 2, Line 10~12 : Control 2 (degrader inoculation))

Arrows indicate the new populations compared with control (without inoculation of the diesel fuel degraders)

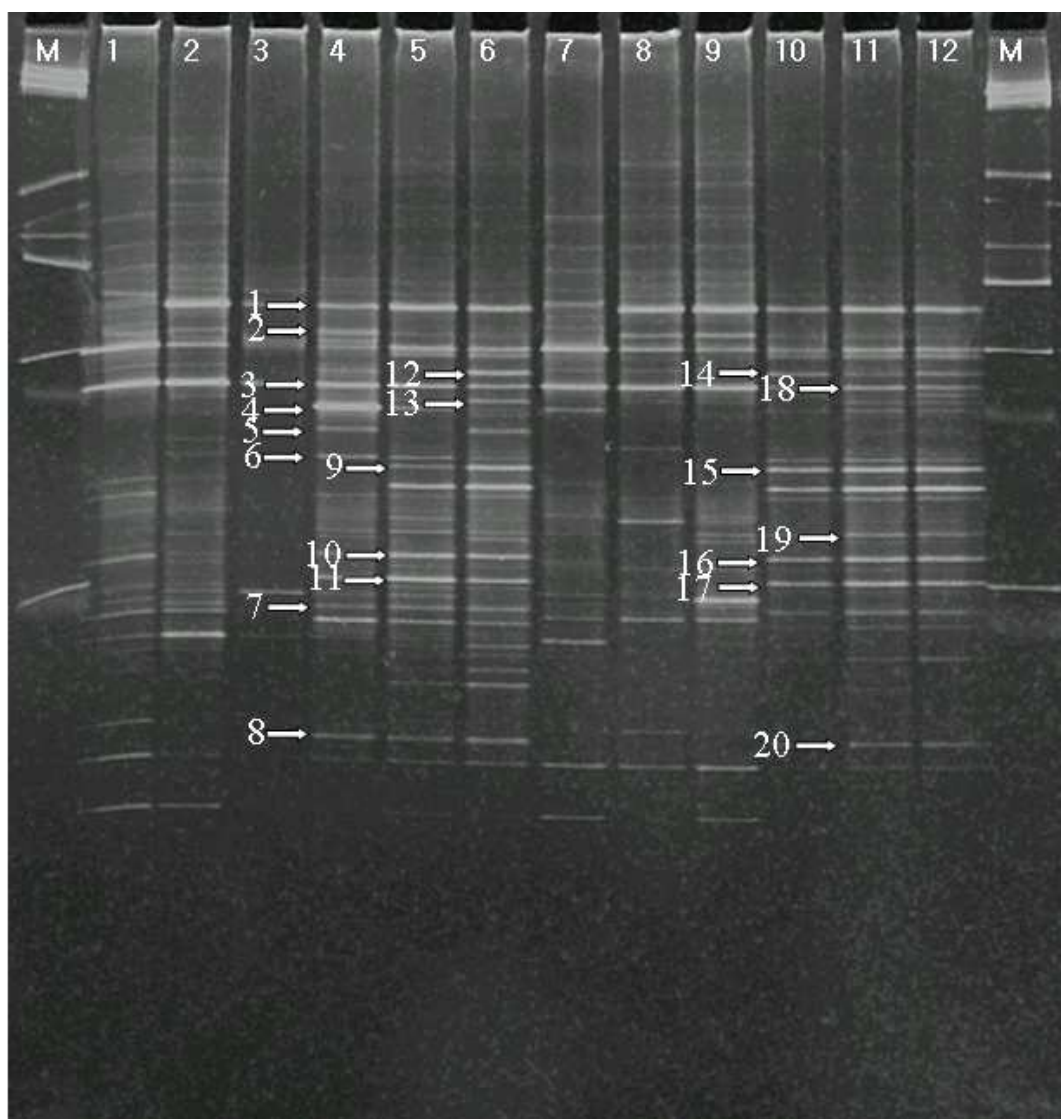


Fig 4.13 Continued

(M : Marker, Line 1~3 : Treatment 1, Line 4~6 : Treatment 1 (degrader inoculation), Line 7~9 : Treatment 2, Line 10~12 : Treatment 2 (degrader inoculation))

Arrows indicate the new populations compared with control (without inoculation of the diesel fuel degraders)

4.7 현장조건에서의 TPH 오염토양의 화학적 및 생물학적 통합처리

4.7.1 화학적 처리 결과

본 지역은 유류저장시설인 지하유류이송 배관 (지름 20mm) 연결부의 파손으로 인하여 2,000 gallon의 경유가 유출되었다. 최초로 유출된 유류가 발견된 지점은 Site A (Fig 3.3)로서 산화보조제 (FeSO_4), 산화제 (H_2O_2) 및 유류분해제를 순차적으로 처리하여 화학적 처리공정을 거쳤다. 처리전의 TPH농도는 직접 측정된 자료는 없으나 처리효율이 50%라 가정할 경우 최소한 100,000 (mg/kg)에 달할 것으로 추정된다. 그리고 처리 후 채취한 토양의 TPH를 분석한 결과 50,000~70,000 (mg/kg)의 농도를 나타내었다.

4.7.2 함수율 변화

TPH (경유)분해를 위한 미생물 활성화에 영향을 주는 인자인 함수율을 주기적으로 확인하였다. 그림에서 보는 바와 같이 50~60%의 함수율을 보여 전반적으로 함수율이 높게 유지되는 것으로 나타났다(Fig 4.14). 높은 함수율은 토양 공극 내 산소의 농도를 감소시켜 TPH 분해 미생물 활성을 저해하는 요인으로 작용할 수 있다. 이에 정기적인 모니터링으로 40~50% 범위의 적절한 수분함량 수준으로 조절하였다.

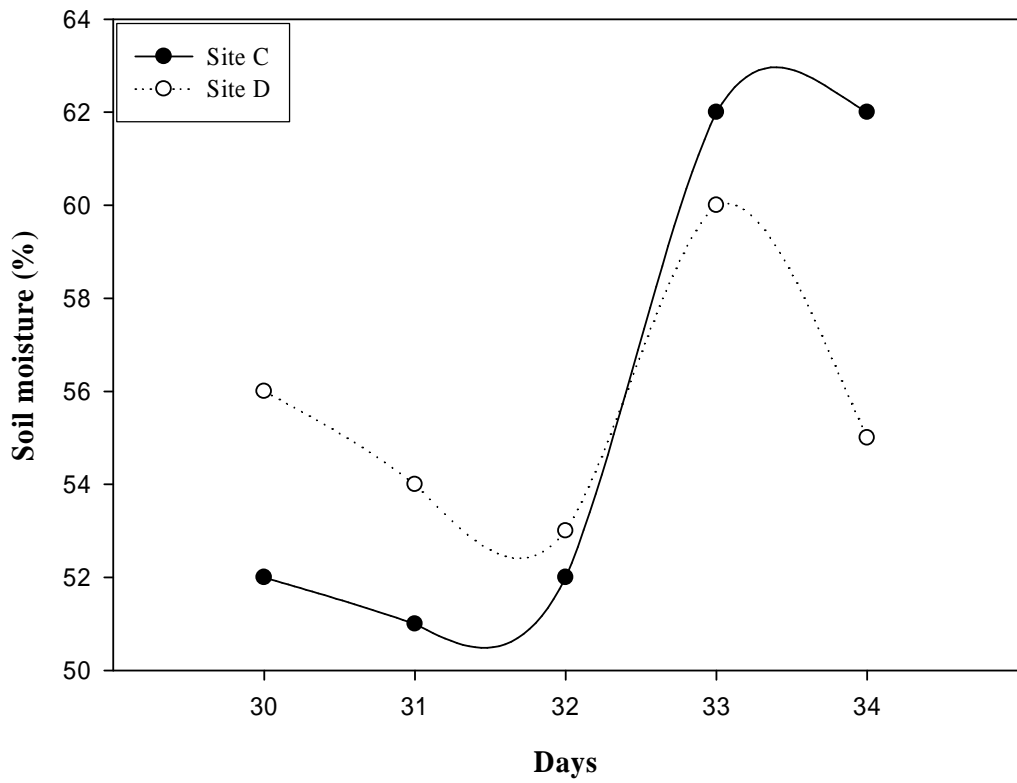


Fig 4. 14 Moisture content of TPH-contaminated soil during the sequential chemical and biological treatment

4.7.3 온도변화

TPH (경유)분해를 위한 미생물 활성화에 영향을 주는 인자인 온도를 주기적으로 확인하였다. 온도 모니터링을 위해 C 지역과 D 지역을 선정하여 측정하였고 Fig 8에 나타낸 바와 같이 표면 (0 cm)과 40cm 깊이에서의 온도를 모니터링 하였다. 토양 온도를 모니터링 한 결과는 12월 24일 전까지는 대체적으로 15~20℃ 정도를 유지하였으나 24일 이후 C 지역의 온도가 전체적으로 4~8℃정도 상승하였다(Fig 4.15).

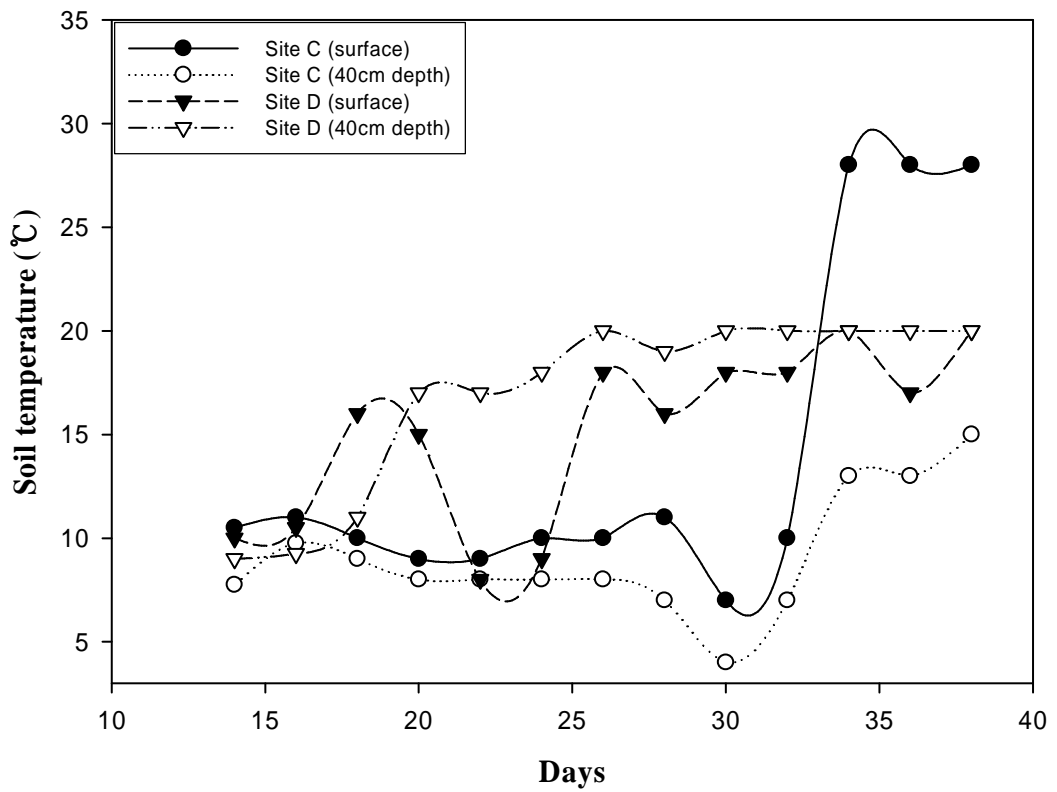


Fig 4.15 Temperature monitoring at TPH-contaminated soil undergoing the *in situ* sequential chemical and biological treatment

4.7.4 오염부지에 대한 미생물 처리 후의 TPH 농도분석

경기도 A시의 디젤유로 오염된 토양 (표층~60cm)을 bioaugmentation 처리 후 TPH를 분석한 결과 50,000~70,000 (mg/kg) 초기 TPH 오염농도가 미생물 처리 25일 후 평균 1,500~2,000 (mg/kg) 정도로 97.1%의 제거효율을 보였다(Fig 4.16).

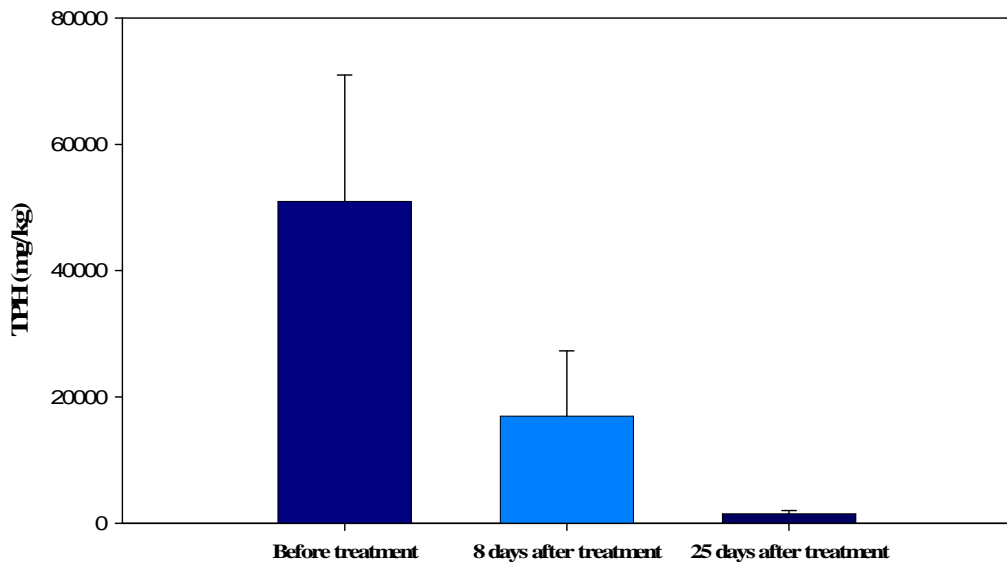


Fig 4.16 Residual concentration of TPH in soils undergoing the sequential chemical and biological treatment

4.7.5 미생물 밀도 측정결과

4.7.5.1 미생물제재 밀도측정

분해미생물에 의한 토양의 TPH 분해를 측정하고자 시판되고 있는 미생물제재를 사용하였다. 미생물 밀도를 측정하기 위해 viable cell counting을 수행하였다. 복합배지 TSA 1/2 strength 배지를 이용하였으며 희석배율은 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 으로 수행하였으며 2회 반복 실험하였다. 미생물제재의 미생물 밀도는 4.5×10^6 c.f.u./g로 측정되었다.

4.7.5.2 총중속영양세균 밀도

총중속영양세균 밀도를 측정하였으며 viable cell counting법을 이용하여 수행하였다. viable cell counting은 복합배지 TSA 1/2 strength 배지를 이용하였으며 미생물밀도는 B 지역 4.7×10^6 c.f.u./g, C 지역 9.1×10^7 c.f.u./g, D 지역 3.7×10^6 c.f.u./g로 측정되었다. C 지역이 높게 나타난 것은 시행 초기 적정한 수분과 온도가 유지된데 그 원인이 있는 것으로 사료된다.

4.7.5.3 TPH 분해 세균 밀도

오염지역의 정화를 위해 사용된 미생제의 TPH 분해 세균 밀도를 측정하였다. 시료는 각 지점별로 3반복으로 채취하여 분석 실험을 실시하였다. TPH 분해세균 밀도를 측정하기 위해 viable cell counting법과 MPN법 (탄소원으로 경유사용)을 이용하여 수행하였다. TPH 분해세균의 분리 및 밀도를 측정하기 위해 Bushnell-Haas 배지를 이용하였으며, 대상오염지역의 오염원인 경유를 유일 탄소원으로 이용하여 실험하였다.

Viable cell counting법과 Micro-plate MPN법을 이용한 TPH 분해 세균 확인 및 정량분석 결과 viable cell counting 방법에 의해 조사된 TPH (경유)분해균의 밀도는 D 지역 (2.97×10^6 c.f.u./g)에 비해 C지역 (3.96×10^7 c.f.u./g)이 10배 가량 높은 밀도를 가지는 것으로 나타났다. MPN의 경우는 D 지역 (7.02×10^4 cells/100g)에 비해 C 지역 (2.42×10^8)이 높은 밀도를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 생균수와 MPN법에 의한 미생물의 밀도는 적정 처리조건이 잘 갖추어진 C 지역에서 좀 더 일치하는 결과를 보이고 있다. 따라서 이 경우는 C 지역의 환경적요인 (수분함량, 온도 등)이 분해미생물의 회복과 회수에 영향을 미친 것으로 판단된다.

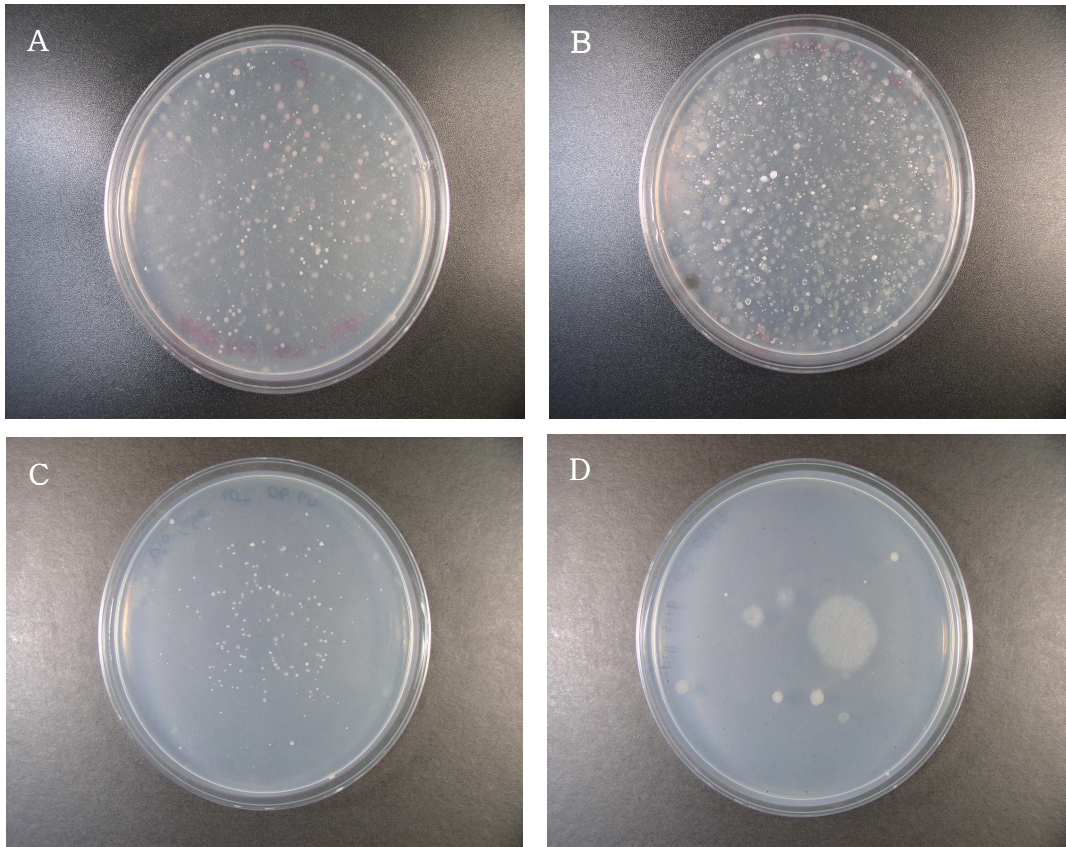


Fig 4.17 Plating out of diesel fuel degraders onto BH plates from the TPH-contaminated soils and the microbial agents used in the soil treatment

(A: Site C, B: Site D (dilution: 10^{-2}), C: microbial agent 1 (dilution: 10^{-2}), D: microbial agent 2 (dilution: 10^{-2}))

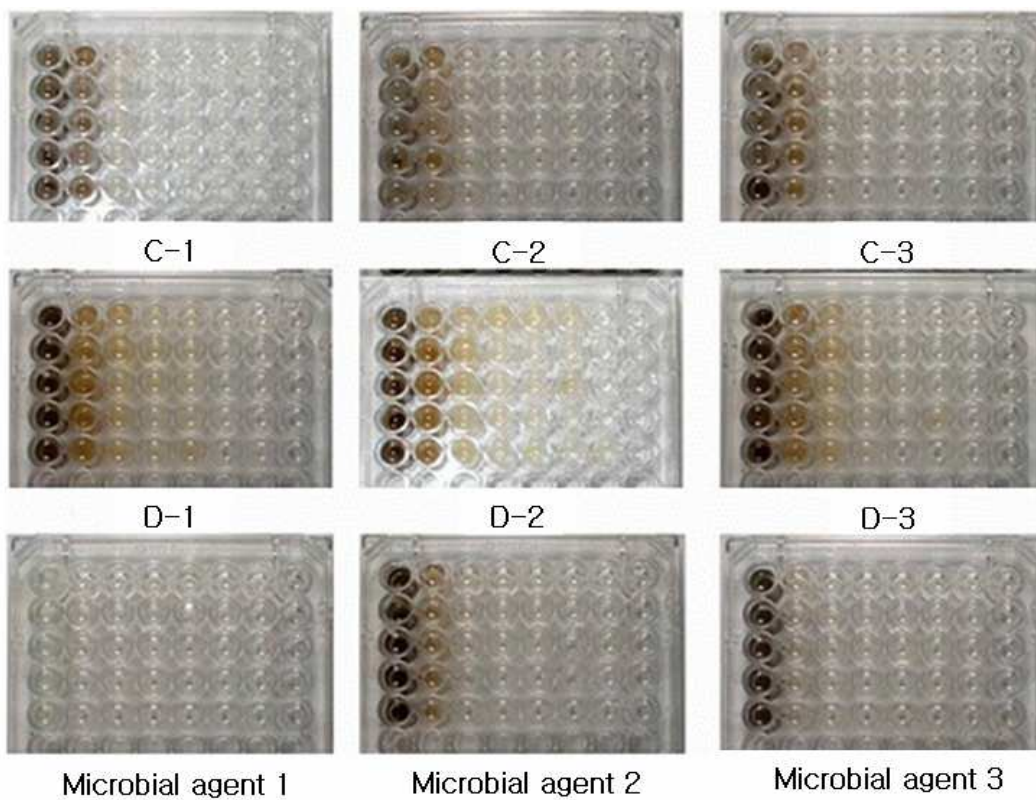


Fig 4.18 Determination of population density of diesel fuel degraders in the sites C and D, and from the microbial agents 1, 2 and 3 using microplate MPN technique

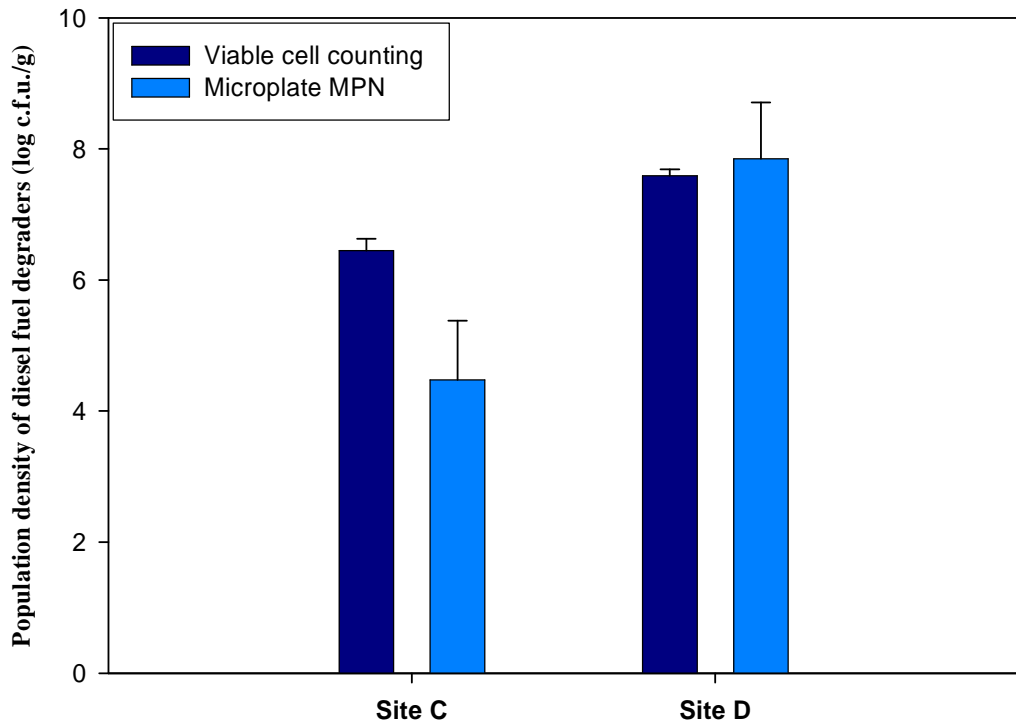


Fig 4.19 Population density of the diesel fuel degraders from the remediation sites C and D determined by viable cell counting and microplate MPN techniques

5. 결론

본 연구에서는 TPH로 오염된 토양에 화학적·생물학적 통합처리 기법을 적용할 경우 어떻게 잔류 TPH가 감소되며, 이때 분해미생물이 오염토양 내에서 어떤 작용을 하는지를 생태학적 측면에서 규명하고자 하였다. 이를 위해 유류오염토양으로부터 우수분해미생물을 선별하여 TPH 처리 (bioaugmentation) 실험을 실시하였다. 또한 이와 유사한 화학적·생물학적 통합처리 기법을 현장에 적용할 경우 TPH분해가 어떻게 진행되는지 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 적정 화학적 처리조건을 탐색하기 위하여 계면활성제 및 산화제 농도에 따라 실험을 수행한 결과 계면활성제의 경우 OP-10S (0.05%)가 15%의 분해율로 가장 우수하였으며, 산화제 (H_2O_2)는 5% 수준이 경제적인 것으로 나타났다.
2. 분리된 우수TPH분해균을 이용하여 화학처리 후 생물학적 처리에 이용할 경우 분해미생물이 $10^9 \sim 10^{10}$ (c.f.u./ml slurry)의 밀도로 유지되었으며, 최소한 100배 이상의 분해균 밀도 증가 효과가 있었다.
3. 화학적·생물학적 통합처리 결과 대조구 및 화학 처리구의 경우 분해미생물 처리효과가 인정이 되었다. 그러나 화학처리구만의 경우는 10% 효율을 보여 분해미생물의 처리가 필수적임을 확인하였다. 그리고 연속하여 미생물을 처리할 경우도 대조구에 비해 20%정도의 차이로 처리효율이 낮게 나타났다. 이는 화학적 처리 토양내의 분해미생물 활성억제물

질 (예 free radical 등의 산화 부산물)의 존재에 기인하는 것으로 판단된다.

4. 유사한 화학적·생물학적 통합처리 공정을 현장에 적용하여 적정조건 (20℃, 함수량 45% 및 pH 7.0 정도)을 유지할 경우 25일 만에 대상 오염 지역의 TPH농도 (50,000~70,000mg/kg)를 우려기준 이하인 1,490 (mg/kg)수준으로 처리가 가능함을 확인하였다.

5. 현장 TPH 처리조건에서 생균수측정 (viable counting)방법과 Micro-plate MPN 방법의 상관성을 확인할 수 있었고 또한 이들 방법에 의한 다양한 유류분해균을 분리, 확인할 수 있는 기법을 확립하였으며, 실험실에서의 처리가능성 시험 (treatability study)을 통해 처리토양시료 내의 미생물군집의 경시 변화를 추적할 수 있는 분자생물학적 기법 (PCR-DGGE)을 확립하였다.

사사

본 연구는 (주)한국환경기술 (현, (주)큐엔솔루션)의 재정적, 기술적 도움으로 진행이 되었기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- [1] 법제처, “토양환경보전법”, 법률 제7459호, 2005.
- [2] 법제처, “토양환경보전법 시행령”, 대통령령 제 18953호, 2005.
- [3] 법제처, “토양환경보전법 시행규칙”, 환경부령 제200호, 2006.
- [4] 한국건설기술원 (Korea Instituted of Construction Technology, 1998) 유류오염토양 현장복원기술 개발
- [5] 환경부(2002) 토양복원 기술 및 사례집
- [6] 환경부 “2005 환경통계연감”, 2005.
- [7] 환경부 “환경부 보도자료: 전국 토양오염조사결과”, 2005.
- [8] Achuba, F. I., Osakwe, S. A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* 29, 97 - 103.
- [9] Atlas, R. M. *Media for environmetal microbiology*. CRC press. 1995.

- [10] Ballapragada B. S., Stensel D. H., Puhakka J. A. and Ferguson J. F. (1997) Effect of hydrogen on reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Environ. Sci-Technol.* 31, 1728-1734
- [11] Bedient, P.B., Johnson, P.C., 1992. Soil vapor extraction systems. In: Charbeneau, R.J., Bedient, P.B., Loehr, R.C. Eds., *Groundwater Remediation*, Vol. 8, Technomic Publishing, Lancaster, PA, pp. 143 - 161.
- [12] Chu, W., Chan, K.H., 2003. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *Sci. Tot. Environ.* 307, 83 - 92.
- [13] Collin, P.H., *Dictionary of Ecology and the Environment*, fourthed. Peter Collin Publishing, London, (2001).
- [14] CONCAWE, *Sludge Farming: A Technique for the Disposal of Oily Refinery Wastes*, Report No. 3/80, 1980.
- [15] Deshpande, S., Shiao, B.J., Wade, D., Sabatini, D.A., Harwell, J.H., 1999. Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Wat.Res.* 33, 351 - 360.

[16] Dupont, R.R., 1993. Fundamentals of bioventing applied to fuel contaminated sites. Environ. Prog. 12 1., 45 - 53.

[17] EPA "Cleaning up the nation's waste sites: Markets and Technology Trends", (2004)

[18] EPA Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends. Office of Solid Waste and Emergency Response(5102G)(2004)

[19] Fennel D. E., Gosset M. J. and Zinder S. H. (1997) Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethylene. Environ. Sci. Technol. 31, 918-926.

[20] Ferrari, M. D., Neirotti, E., Albornoz, C., Mostazo, M. R., Cozzo, M., 1996. Biodegradation of hydrocarbons from oil tank bottom sludges in soil slurry. Biotechnol. Lett. 18 (11), 1241-1246.

[21] FRTR, 1999. Thermal desorption. Federal Remediation Technologies Roundtable.

[22] Griffiths, R.A., 1995. Soil washing technology and practice. J. Haz. Mat. 40, 175 - 189.

[23] Harmsen, J., 1991. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. In: Olfenbuttel, R.F.H. (Ed.), On-site bioremediation process for xenobiotic and hydrocarbons treatment. Butterworth-Hetmann, Stoneham, MA, pp. 255 - 272.

[24] Hicks R. J., Sayles G. D. and Brenner R. (1993) Bioventing: an aerobic process to treat vadose zone contaminated soils. In Proceedings from US EPA Seminar, Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation, EPA/600/K-93/002.

[25] H. J. H. Fenton, Oxidation of tartaric acid in presence of iron, J. Chem. Soc., 65, 899(1984).

[26] Johnson, P.C., Stanley, C.C., Kemblowski, M.W., Byers, D.L., J. Colthart, D., 1990. A Practical Approach to the Design Operation and Monitoring of In-Situ Soil-Venting Systems. GWMR, pp. 159 - 178.

[27] J. R. Easley, J. M. Holland, L. C. Gipson and M. J. Whitaker., 2004. Renal toxicity of middle distillates of shale oil and petroleum in mice Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee 37830, USA

- [28] Kong, Sung-ho, Richard J. Watts, and Jin-Ho Choi (1998) Treatment of petroleum-Contaminated Soils Using Iron Mineral Catalyzed Hydrogen Peroxide, Elsevier Science Giannis,
- [29] Kuhlman, M.I., Greenfield, T.M., 1999. Simplified soil washing processes for a variety of soils. J. Haz. Mat. 66, 31 - 45.
- [30] McCarthy, K., Walker, L., Vigoren, L., Bartel, J., 2004. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an Arctic site. Cold Regions Science and Technology 40, 31 - 39.
- [31] L. M. Dorfman and G. E. Adams, Reactivity of the Hydroxyl Radical in Aqueous Solutions. NSRDSNBS 46, 1(1973).
- [32] Launen, L.A., Buggs, V.H., Eastep, M.E., Enriquez, R.C., Leonard, J.W., Blaylock, M.J., Huang, J.-W., Haeggblom, M.M., 2002.
- [33] L.M. Baryshnikova, V.G. Grishchenkov, M.U. Arinbasarov., A.N. Shkidchenko, and L.M. Boronin, Biodegradation of oil products by individual degrading strains and their associations in liquid media. Applied Biochemistry and Microbiology, 37, 463 ~ 468(2000).
- [34] Low temperature thermal desorption,
www.westov.org/~wea/publicat/ltdweb.com(1996)

[35] Liebeg, E.W., Cutright, T.J., 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micronutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44, 55e64.

[36] Mann, M.J., 1999. Full-scale and pilot-scale soil washing. *J. Haz. Mat.*66, 119 - 136.

[37] Mareca Jr., J.W., Roach, R.D., Sibel, M.,Star, J.W., 1990. Volumetric Leak Detection Methods for Underground Fuel Storage Tanks, *Pollution Technology Review* No. 180. Noyes Data Corp., Park Ridge, New Jersey.

[38] McCarthy, K.,Walker, L., Vigoren, L., Bartel, J., 2004. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an Arctic site. *Cold Regions Science and Technology* 40, 31 - .39.

[39] Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 64-75.

[40] Pedersen, T.A., Curtis, J.T., 1991. Soil Vapor Extraction Technology – Reference Handbook. US EPA, EPAR540r2-91r003.

[41] Pope, D.F., Matthews, J.E., 1993. Bioremediation using the land treatment concept. USEPA/600/R-93/164. Robert S. Kerr, Environmental Research Laboratory. US Environmental Protection Agency, Ada, OK.

[42] Rathfelder, K.M., Lang, J.R., Abriola, L.M., 1995. Soil vapor extraction and bioventing: applications, limitations, and future research directions. In: Reviews of Geophysics IUGG Quadrennial Report. American Geophysical Union, pp. 1067 - 1082.

[43] Riser-Roberts, E., 1998. Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

[44] R.L. Huddleston, J.D. Meyers, Landfarming of industrial solid wastes, Research and Development Department, Continental Oil Company, in: Proceedings of the Presentation at the Annual Meeting of the Pollution Control Association of Oklahoma, Fountainhead State Lodge, 17 - 18 April 1979.

[45] Rutherford, M.P., Banerjee, D.K., Luther, S.M., Gray, M.R., Dudas, M.J., Mc Gill, W.B., Pickard, M.A., Salloum, M.J., 1998. Slurry-phase bioremediation of creosote and petroleum contaminated soils. Environ. Technol. 19, 683-696.

[46] Smatlak C. R., Gosset M. J. and Zinder S. H. (1996) Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethylene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2850-2858.

[47] Ting, Y.P., Hu, H.L., Tan, H.M., 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. *Resource and Environmental Biotechnology* 2, 197e218.

[48] United States Environmental Protection Agency, Assessment of International Technologies for Superfund Applications, Office of Solid Waste and Emergency Response, EPA/540/2-88/003, 1988.

[49] United States Environmental Protection Agency, Innovative Technology: Soil Washing, Directive 9200.5-250FS, Office of Solid Waste and Emergency Response, 1989.

[50] U.S. EPA, Compendium of Reported Physical and Chemical Characterization Data for Petroleum and Synthetic Fuel Products, Petroleum and Shale Oil Products. prepared by TRW Energy Systems Group Redondo Beach, CA, 1982.

[51] Van Eyk J. (1997) Petroleum Bioventing. Balkema, The Netherlands.

[52] W. R. Haag and C. D. D. Yao, Rate constants for reaction of hydroxyl radicals with several drinking water contaminants, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 1005– 1013(1992).

[53] Watts, R. J., et al., Treatment of Contaminated Soils Using Catalyzed Hydrogen Peroxide. *Chemical Oxidations: Technology for the 90's*. W. W. Eckenfelder et al., (Eds.), Technomic Press, Lancaster, Pa. 37(1991).

[54] Weber Jr., W.J., Kim, H.S., 2005. Optimizing contaminant desorption and bioavailability in dense slurry systems. 1. Rheology, mechanical mixing, and PAH desorption. *Environ. Sci. Technol.* 39 (7), 2267–2273.

[55] William, A. : Thermal desorption, American Academy of Environmental Engineers(1993).

[56] Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y.,2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bull.* 51, 1071–1077.

[57] Zhou, E., Crawford, R., 1995. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* 6, 127e140.