

생물학적 처리에 따른 갯벌 복원을 위한 현장 적용성 연구

조대철¹, 배환진², 권성현^{2*}

¹순천향대학교 에너지환경공학과

²경상대학교 해양과학대학 해양환경공학과 해양산업연구소

A Field Research on Mud Flat Remediation by Biological Treatments

Daechul Cho¹, Hwan-Jin Bae² and Sung-Hyun Kwon^{2*}

¹Department of Energy & Environmental Engineering, Soonchunhyang University

²Department of Marine Environmental Engineering, Gyeongsang National University

요 약 현장 갯벌에서의 미생물제제와 CaO₂처리를 통한 효율성을 관찰하고자 유용미생물 및 미생물과 CaO₂를 혼합하여 특수 처리한 제제를 100m² 크기의 각 처리구에 3.6kg씩 살포하여 6주간 모니터링 결과, 두 처리구로부터 pH 및 ORP는 평균 pH 7이하, ORP는 초기 값(-178 mV ~ -188 mV)에 비해 -121.06 mV ~ -142.06 mV로 다소 상승하였다. 강열감량과 COD의 경우, 큰 변화가 없었으며 질소와 인 계열은 다소 효과가 있었는데 암모니아는 시간이 경과함에 따라 대조구와 더불어 낮아지는 경향을 보였으며 질산성질소의 경우, CaO₂와 미생물제제의 혼합처리(11.3%)가 미생물제제 처리(7.3%)보다 질산염농도가 감소한 이유는 산소발생에 의한 어느 정도의 호기화된 조건에서 질산화반응에 의해 퇴적토의 질산염이 수층으로 용출된 결과로 생각되며 이에 따라 총 질소의 농도도 혼합처리에 의한 감소(6.1%)로 이어진 결과라 판단된다. 마찬가지로 인의 경우에도 초기 농도가 다소 높은 수치(T-P는 0.761 mg/g, PO₄-P는 0.529 mg/g)를 보였으나 혼합 처리구에서 T-P는 29%, PO₄-P는 31.8%의 감소율로 미생물제제보다 인의 용출을 억제시킨 결과로 나타났다.

Abstract A field test on mud flat remediation was carried out in order to observe the effects of the treatments such as microbial dose and an oxygen releasing compound like CaO₂. The size of each treatment site was 100 m² and the dosage was 3.6 kg per site. The 6 week monitoring showed that pH on two sites was below 7 and ORP increased from -178~-188 mV to -121~-142 mV. In Ignition loss and COD there were no significant changes. Meanwhile nitrogen and phosphorus concentrations changed: ammonia concentration decreased both on control and treatment sites. Nitrate nitrogen decreased more on combined treatment site than on single microbial treatment (11.3% vs. 7.3%) probably because the extra oxygen supplied by CaO₂ formed more oxic environment so that the facilitated nitrification might produce more nitrate but the nitrate would be much rapidly released into the water layer out of the sediment. That also explains the total nitrogen reduction(6.1%). Similarly, T-P and PO₄-P reduced by 29% and 31.8%, respectively on combined treatment sites, resulting from the phosphorus release effect though the initial concentrations of the two factors were considerably high.

Key Words : Microbial Agent, CaO₂, Organic Compounds, Oxidation Reduction Potential, Nitrogen and Phosphorus Removal

1. 서론

갯벌은 외부에서 유입되는 물질 뿐만 아니라 해역 자체의 물질들이 축적되는 장소로 다양한 생물이 서식하고

있는 곳으로 환경적으로는 침강, 퇴적, 무기화되고 재생되는 등 오염물질이 축적, 정화되고 있으며, 생물·화학적으로는 무기화된 원소들이 생물에 의해 섭취되어 유기화 과정이 활발히 이루어지고 있는 장소이다. 갯벌의 정

*Corresponding Author : Sung-Hyun Kwon

Tel: +82-55-772-9132 email: shkwon@gsnu.ac.kr

접수일 12년 05월 04일

수정일 (1차 12년 06월 26일, 2차 12년 07월 02일)

게재확정일 12년 07월 12일

화능력은 조건대로 유입된 오염물질이 먼저 조석과정을 거치면서 갯벌에 흡착이 일어나고 흡착된 오염물질은 미생물 작용에 의한 분해 및 micro benthos, meio benthos 그리고 macro benthos의 생태계의 순환과정을 거쳐 제거된다[1]. 갯벌의 이러한 역할은 갯벌 생태계의 다양성에 근거하고 있다. 생물은 그 자체로서 뿐만 아니라, 유전자 조작 및 대사 작용을 통해 합성된 물질 등이 산업적으로 유용하게 이용되고 있는 상황이다. 일반적으로 해양은 생물 다양성이 높게 나타나고, 이로 인해 서식 생물은 환경 및 기타 요인에 대한 생리적 작용을 통해 생물학적 활성 물질의 분비율이 높은 것으로 사료된다. 최근 들어 환경 오염과 대규모 간척사업 등으로 갯벌이 오염되고 생물 다양성이 감소되고 있으며, 이로 인하여 막대한 경제, 생태적 손실을 초래하고 있다.

현재 갯벌 및 연안저질의 오염정화를 목적으로 산소발생제(Oxygen Release Compounds: ORC)인 CaO_2 및 MgO_2 가 사용되고 있으나 대부분 지하수 및 하천의 오염정화를 목적으로 사용[2-4]하고 있으며 광범위한 연안 및 해양퇴적물, 양식장 정화에 대하여 적용된 사례가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 갯벌 생태계를 복원 시키고자 생물정화기술(Bioremediation techniques)의 한 방법[5]으로 유용미생물과 함께 산소발생제(CaO_2)를 사용함으로써 호기성 미생물의 생분해(biodegradation)를 촉진하여 오염물질 저감은 물론 그에 따른 효율성과 미생물 군집변화를 동시에 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

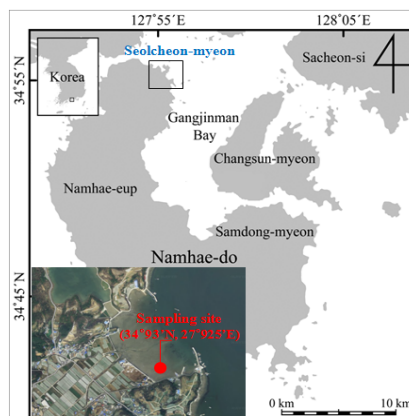
본 연구에 사용된 실험재료는 산소발생제(CaO_2)와 유용 미생물을 이용하였다. 먼저 오염된 지역을 자연적 환경으로의 빠른 복원을 위하여 호기성조건인 환경을 조성할 필요가 있다. 이를 위해 사용되는 산소발생제(Oxygen Release Compounds, ORC)는 불용성이며 물(H_2O)과 반응하여 Calcium Hydroxide($\text{Ca}(\text{OH})_2$)로 바뀌는데 이것은 퇴적층의 표면에 현탁액(Suspension)과 같은 비교적 안정한 상태로 유지하면서 인산염이 Calcium Peroxide 결정으로 스며들어 물의 투과(transmission)를 억제하고, 그 영향으로 결정이 수화(hydration)되는 비율이 제어됨으로써 산소가 장시간에 걸쳐 지속적으로 배출되는 특징이 있다[6].

미생물제제(Microbial Agent)는 M&M Bio사의 M-1001을 구입하여 사용하였으며 그 구성은 경남, 전남, 충남 연안의 저질에서 분리한 450여종의 균주로부터 효

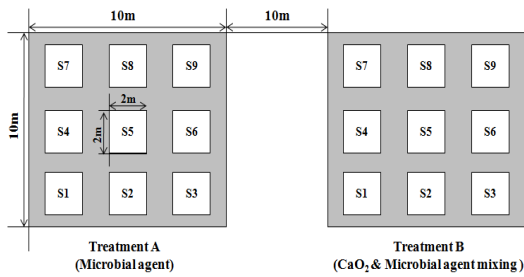
소활성도가 뛰어난 *Bacillus* sp. 5종, *Streptomyces* sp. 4종, *Cellulomonas* sp. 1종, *Saccharomyces* sp. 1종으로 11종을 최종 선별하였으며, 젖산생성능력이 뛰어난 *Lactobacillus* sp. ML-101 1종, 황화수소 및 암모니아 분해력이 뛰어난 *Rhodobacter* sp. 2종을 선별하였다. 그리고 분리한 균주의 내염성을 측정하여 6%의 염농도에서 50%정도의 성장을 보인 균주를 최종적으로 사용하였다. 그리고 미생물제제는 해양 저층까지 쉽게 도달하도록 하게하고, 유기물의 분해 능력이 뛰어나고 미생물의 생육에 필요한 영양성분이 함유된 고체상태의 미세분말 침강제를 보강하여 그레놀의 형태로 제제화 하였다. 침강제는 수심 20 m이하의 저층까지 도달시키고자 점착제 중 효율성이 높은 Maltodextrin을 사용하였고, 미생물의 활력유지를 위한 방법으로 배양된 미생물을 코팅하기 위한 재료로 Gelatine을 이용하였다. 제제화 시, Maltodextrin 40%와 Gelatine 60%의 혼합 비율을 통해 미생물제제를 제조하였으며 대기 중의 수분과 접촉되지 않게 밀봉하여 사용하였다.

2.2 실험방법

Sampling Site는 그림 1과 같이 경남 남해군 설천면 금음리 봉암마을에 위치한 갯벌(Fig. 1)로 $34^{\circ}93'N$, $127^{\circ}92.5'E$ 지점에 가로 x 세로(10m x 10m)크기의 대조구와 처리구를 설정하고, 미생물제제와 CaO_2 와 미생물을 혼합하여 입상화 시킨 제제를 살포하였다(Fig. 2). 제제의 살포량은 $3.6\text{kg}/100\text{m}^2$ 로 투여하였으며 샘플 채취는 각 구역별로 소규모 크기(2m x 2m)의 9곳에서 채취하였고, 총 4회로 2주마다 실시하였으며 실험실로 옮겨 화학적 분석을 진행하였다. 또한 처리 전·후의 미생물 군집을 위한 퇴적토 표층, 중층, 하층별로 3곳에서 채집하여 사용하였다.



[그림 1] 샘플링 지점
[Fig. 1] Sampling Site



[그림 2] 실험구 구성도

[Fig. 2] Schematic diagram of experimental site

화학적 분석방법으로 퇴적물의 pH와 ORP(oxidation Reduction Potential)는 퇴적물로부터 전극을 통해 직접 pH(ORION model 210A, USA) 및 ORP(Thermo 3 Star, USA)를 측정하였다. 강열감량(Ignition Loss)은 습식 퇴적물 10 g을 항량으로 건조시키고 550℃에서 강열한 후 무게 차이에 따른 강열감량으로부터 계산하였다. COD(Chemical Oxygen Demand)는 알칼리성 과망간산칼륨법으로 측정하였으며 AVS(Acid Volatile Sulfide)는 황 검지관법으로 수행하였다. 습식 퇴적물 2 g을 검지관이 결합된 가스발생관에 옮긴 후, 18 N 황산(H_2SO_4) 2mL를 가하여 일정 시간 동안 펌프로 흡입시킨 후 검지관의 변색이 멈출 때 눈금을 읽어 AVS를 계산하였다. 이때 흡입 시간의 준수와 발생가스가 누출되지 않도록 주의하였으며 실험에 이용된 황 검지관은 (Detectop Tube NO. 201H, GASTEC, Japan)을 사용하였다.

질소 및 인계열 화합물 분석은 습식 퇴적물 20 g을 원심분리시켜 상등액을 채취하여 GF/C(47mm)로 여과시키고 희석한 뒤 해수법에 따라 수행하였다. T-N과 NO_3 -N은 알칼리성 과황산칼륨으로 분해하여 질산성 질소로 산화시킨 후 카드뮴-구리 환원칼럼을 통과시켜 질산이온을 아질산 이온으로 환원하여 비색 정량하여 543 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. NO_2 -N는 디아조화법으로 543 nm에서 측정하였고, NH_3 -N는 인도페놀법으로 640 nm에서 측정하였다. T-P와 PO_4 -P는 과황산칼륨으로 산화 분해하여 인산염(PO_4 -P)형태로 변화시킨 다음 아스코르빈산 환원법으로 비색 정량하였으며 885 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 UV-1800(Shimadzu, USA)로 분석하였으며 위의 실험법은 해양환경공정시험법[7]에 준하여 실시하였다.

미생물제제 및 산소발생제(CaO_2)와 미생물제제를 혼합 처리한 시료로부터 처리 전·후의 미생물 군집변화를 측정하기 위해 PCR-DGGE 기법을 이용하였다. Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil(MpBio, USA)를 사용하여 DNA를 추출하여 PCR반응을 수행하였다. 1차 PCR은 primer

27F, 1492R을 이용하여 추출한 총 DNA중 16s rDNA를 PCR을 수행하여 확인하였고, 16s rDNA V3 region을 Touchdown-PCR을 수행하여 재 증폭 하였다. 이때 사용된 primer는 40개의 GC-clamp가 붙은 GC-341F를 이용하였으며 Bioneer Inc.(Daejeon, Korea)에서 주문·제작하여 사용하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 5분간 초기 열처리 후, 95℃에서 30초 동안 변성시키고, annealing 온도는 초기에 65℃에서 시작하여 매 2 cycle마다 1℃씩 감소되도록 설정하고, 55℃가 되면 15 cycle을 더 수행하도록 하여 30초간 반응시키고 신장을 위하여 72℃에서 45초 반응 후 최종으로 72℃에서 10분간 처리하고 반응을 마쳤다. PCR 산물은 1% Agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

Touchdown-PCR을 수행하여 얻은 PCR산물은 정제한 뒤, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis systems (C.B.S.SCIENTIFIC, USA)으로 DGGE를 수행하였다. Denaturing gradient gel은 10% polyacrylamide (37.5:1 =acrylamide:bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 40%에서 70%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 하였다. 증폭산물 20 μ l를 loading하여 1×TAE 완충용액에서 60℃, 60V로 16시간 전기영동 후 EtBr(ethidium bromide)을 사용하여 염색 후 CN-1000 Image System (VILBER LOURMAT, France)로 관찰하였다.

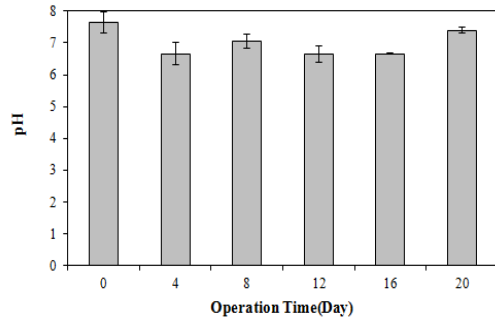
Denaturing gradient gel상에서 위치가 다른 밴드로부터 DNA단편을 회수하고자 각각의 밴드를 자른 뒤 3차 증류수로 세척 후, TE 완충용액 25 μ l를 첨가하여, 원심분리(13,500x1min)하고, -70℃에서 5분, 50℃에서 5분을 3회 반복한 후, 원심분리(13,500x1min)를 하여 상등액을 취하였다. 각 밴드에서 회수한 DNA로부터 primer 341F와 518R로 재 증폭 하였다. 재 증폭 산물은 정제하여 염기서열을 분석 의뢰(Solgent, Korea)하였다. 이로부터 얻어진 염기서열 데이터들을 NCBI(National Center for Biotechnology Information) BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 통하여 가장 유사도가 높은 미생물 종을 밝혀내고 발표된 문헌을 통하여 그 특성들을 파악하였다. 그리고 미생물 군집의 유사성을 관찰하고자 SPSS 18.0(SPSS Inc, Chicago, IL USA)을 이용하여 주성분분석(Principle Components Analysis, PCA)을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

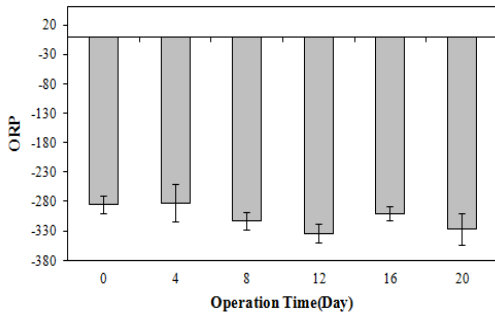
3.1 설천 갯벌의 오염 현황 조사

자연 상태의 설천 갯벌의 오염현황을 파악하고자 pH,

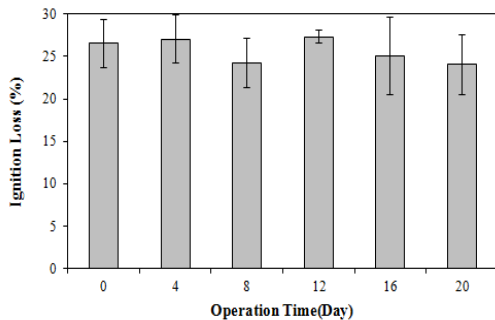
ORP, IL, COD, TN, TP등을 실험실에서 20일간 분석 한 결과, Fig 1과 같이 오염도가 상당히 심화된 것으로 나타났다. 현재 설천갯벌은 평균 -302.2 mV로 환원환경이었으며 특히 COD는 평균 27.93 mg/g.dry로 당항만(23.4 mg/g.dry)에 비해[8] 상당히 높은 것을 알 수 있었다. 반면에 총 질소와 총 인도 평균 2.32 mg/g 과 0.8 mg/g으로 광양만(TN; 2.38, TP;1.73), 고현만(TN; 2.5, TP;1.07)에 비해 다소 낮은 수치를 보였다. 또한 이 자료를 본 연구의 대조구로 하여 처리구와 함께 비교 분석하였다.



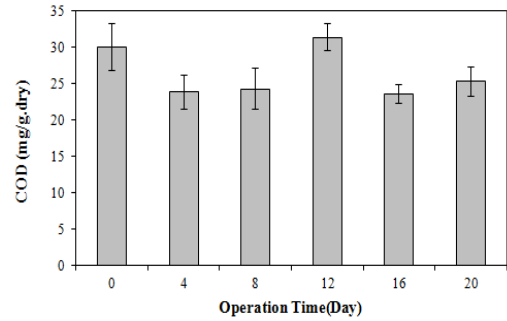
pH



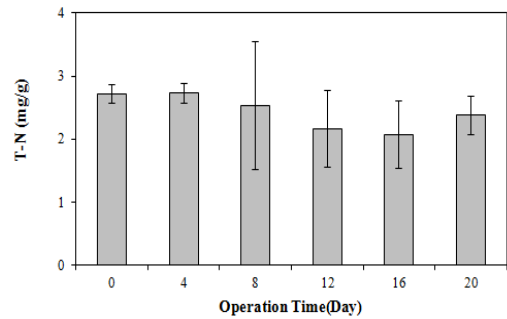
ORP



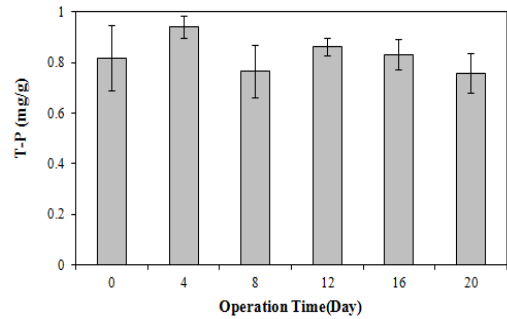
Ignition Loss



COD



T-N



T-P

[그림 3] 설천면 갯벌의 퇴적물 오염 현황조사 결과

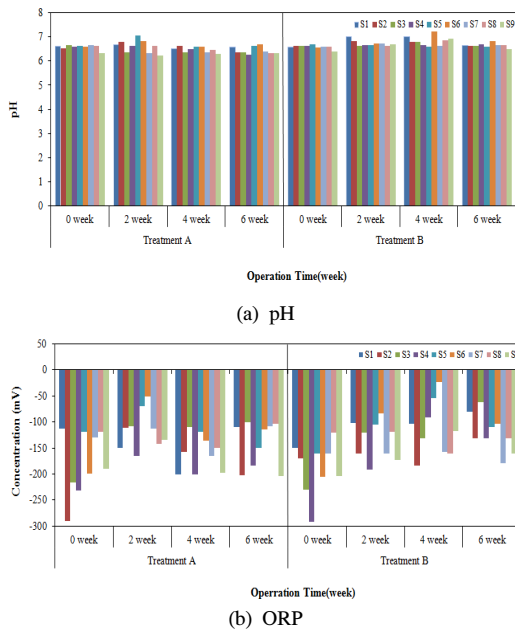
[Fig. 3] Preliminary test results for mud flat contamination in Sulcheon area

3.2 CaO₂ 및 미생물제제의 단일·혼합 처리에 따른 효율성 관찰

단일 처리구(Treatment A)와 혼합 처리구(Treatment B)로부터 퇴적토의 pH 및 ORP의 변화를 관찰한 결과 (Fig 4), 처리지점의 초기 pH는 6.33~6.68로 처리 후의 측정값과 비교 시 S1과 S6지점을 제외하고 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났으며 실험기간동안 특별히 영향을 줄만한 경우나 다른 영향인자는 없었다. ORP(산화·환원

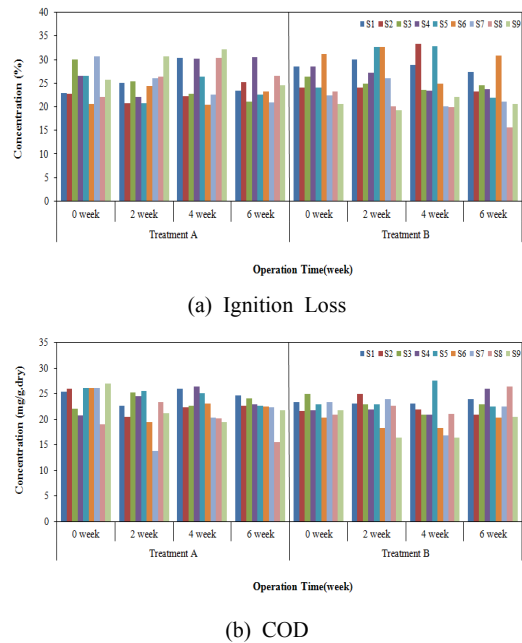
전위)의 경우, 대조구와 처리구의 초기 ORP 수치는 -113.3 mV ~ -291.5 mV의 넓은 범위로 환원환경임을 알 수 있었으며 모니터링한 결과, 대체적으로 CaO_2 를 혼합 처리한 처리구의 산화·환원 전위가 6주 경과 시에 평균 -188.08 mV에서 -121.06 mV로 대조구(-178.73 mV에서 -142.06 mV)에 비해 다소 상승함을 관찰하였다.

CaO_2 및 미생물제제 처리에 의한 강열감량의 변화는 크게 나타나지 않았다. 처리 전의 강열감량은 20.60%~31.10%로 상당히 높게 나타났으며 거제도 남안(10.1%), 광양만(8.9%)에 위치한 양식장[8]보다 무려 3배정도의 높은 수치를 보였다. 퇴적토의 유기물 함량의 지표인 COD를 측정한 결과, 처리 전(19.02~27.04 mg/g.dry) 수치는 해양 퇴적물 관련 기준치인 20 mg/g.dry 보다 높은 COD 농도를 보였다. 이의 주된 원인은 반 폐쇄성 내만의 남해안 특성과 함께 인근 축사의 영향이 큰 것으로 판단된다. 처리 후의 COD 농도는 15.48~26.38 mg/g.dry로 처리 전과 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 분산분석의 통계결과와도 일치하여 통계적으로 COD 감소는 일어나지 않은 것으로 판단된다.



[그림 4] Microbial agent 및 Microbial agent와 CaO_2 혼합 처리에 의한 대조구와 처리구 의 pH 및 ORP변화. (a) pH (b) ORP (현장처리기간은 2주 간격으로 3회 측정)

[Fig. 4] Changes of pH and ORP on sampling sites when microbially treated (Treatment A) or microbially plus chemically treated(Treatment B) for 6 weeks: data measured in triplet biweekly



[그림 5] Microbial agent 및 Microbial agent + CaO_2 처리에 의한 대조구와 처리구의 Ignition Loss 및 COD변화. (a) Ignition Loss (b) COD(현장처리기간은 2주 간격으로 3회 측정)

[Fig. 5] Changes of Ignition Loss and COD on sampling sites when microbially treated (Treatment A) or microbially plus chemically treated(Treatment B) for 6 weeks: data measured in triplet biweekly

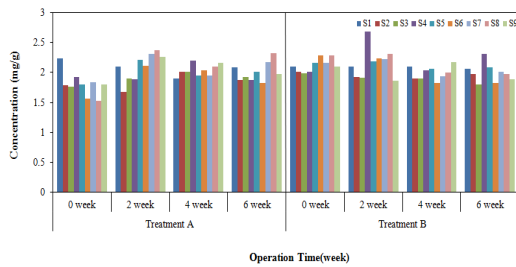
T-N농도 변화를 관찰한 결과(Fig 6(a)), 각 처리구의 T-N농도는 1.525 ~ 2.283 mg/g의 농도분포를 보였다. 처리 후에는 각 처리구에서 다른 양상이 나타났다. 미생물 제제만 처리한 곳에서는 8주 경과 시, T-N농도가 S4지점을 제외하고 급증하였다. 반면 CaO_2 와 혼합처리한 곳에서는 모든 지점에서 T-N농도가 감소하고 있음을 알 수 있었다. 분산분석의 통계처리 결과는 두 방식의 처리가 유효한 처리효과를 보이지 않았고 두 처리 방식간 차이도 없는 것으로 나타났다.

$\text{NH}_3\text{-N}$ 의 경우, 몇몇 지점을 제외하고 CaO_2 와 미생물 제제의 혼합처리에 의한 효율성을 관찰할 수 있었다(Fig 6(b)). 먼저 단일 처리구에서의 초기 암모니아의 농도는 0.665 ~ 0.917 mg/g으로 8주후에는 S8 (0.615 mg/g), S9 (0.518 mg/g) 지점을 제외하고, 0.696 ~ 1.013 mg/g로 큰 변화는 나타나지 않았다. 혼합 처리구에서는 초기 암모니아의 농도는 0.753 ~ 0.952 mg/g으로 단일 처리구에 비해 다소 높게 나타났으나 8주 후에는 S1(0.883 mg/g), S8(0.801 mg/g)을 제외하고 0.436 ~ 0.654 mg/g으로 크게 감소한 것으로 나타났다. 4주 및 6주 후 암모니아 성분의

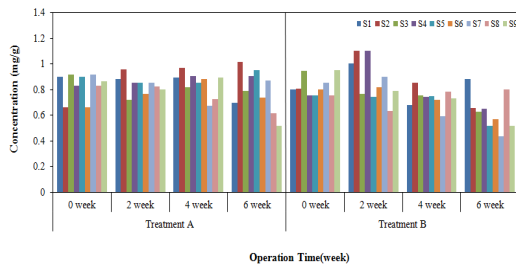
감소효과는 두 가지 처리방법에 대하여 유의한 차이가 있었으며 혼합처리의 경우가 각각 0.73, 0.628 mg/g 으로 단일처리에 비해 13~20% 더 감소하였음을 확인하였다.

NO₂-N의 경우, 단일 및 혼합 처리구에서의 큰 변화는 나타나지 않았다. 단일 처리구의 경우, 초기 NO₂-N 농도는 0.04 ~ 0.06 mg/g으로 8주 후에는 0.046 ~ 0.081 mg/g으로 전체적으로 다소 높아졌다. 혼합 처리구에서의 초기 NO₂-N 농도는 0.035 ~ 0.082 mg/g으로 나타났으며 8주 후에는 0.038 ~ 0.073 mg/g으로 별다른 경향이 나타나지는 않았다.

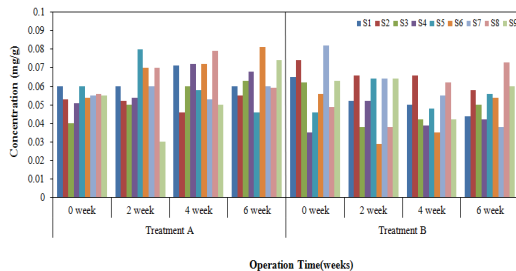
NO₃-N의 경우, 혼합 처리구에서 CaO₂로부터 질산화 반응 촉진에 의한 질산성 질소의 증가함을 보였다(Fig 6(d)). 먼저 단일 처리구에서의 초기 NO₃-N 농도는 0.566 ~ 1.002 mg/g으로 시간이 경과함에 따라 S4, S6, S7지점을 제외하고 대체적으로 증가함을 보였다. 혼합 처리구에서도 S1, S8지점은 NO₃-N 농도가 증가한 반면에 나머지 지점에서는 감소하는 경향을 보였다.



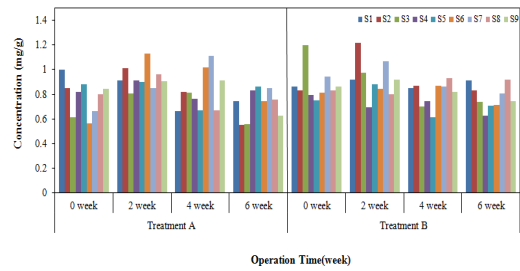
(a) T-N



(b) NH₃-N



(c) NO₂-N

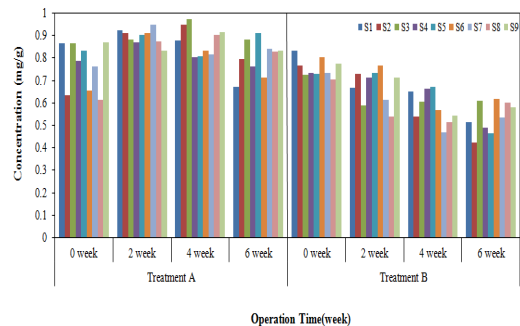


(d) NO₃-N

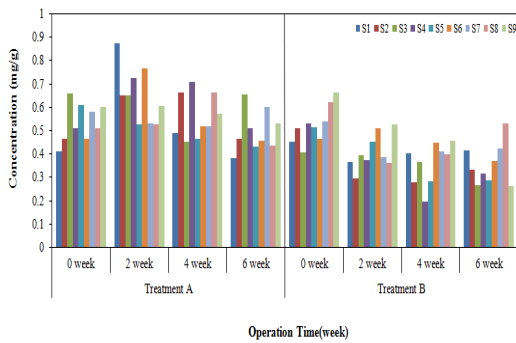
[그림 6] Microbial agent 및 Microbial agent + CaO₂ 처리에 의한 대조구와 처리구의 질소계 화합물 변화. (a) T-N (b) NH₃-N (c) NO₂-N (d) NO₃-N(현장처리기간은 2주 간격으로 3회 측정)

[Fig. 6] Changes in nitrogen concentrations when microbially treated (Treatment A) or microbially plus chemically treated (Treatment B) for 6 weeks: (a) T-N (b) NH₃-N (c) NO₂-N (d) NO₃-N

T-P의 경우, 초기 농도는 0.615 ~ 0.870 mg/g으로 고현만(1.07 mg/g), 고성만(1.22 mg/g), 당항만(1.73 mg/g)에 비해 낮은 수치로 나타났으며 혼합 처리구에서 평균 28%의 총인 제거율을 보였다. PO₄-P는 용존성 무기인(DIP)의 형태로 조사지점을 분석한 결과, 대부분이 그림 7(b)와 같이 높은 농도로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 초기 PO₄-P 농도는 0.411 ~ 0.663 mg/g으로 처리 전·후의 결과가 상이하게 나타났다. 총 인과 마찬가지로 단일 처리구에서는 큰 변화가 일어나지 않은 반면, 혼합 처리구에서는 평균 31%의 제거율을 보였으며 특히 S9지점은 0.663 mg/g에서 6주 후, 0.262 mg/g으로 약 60%에 가까운 제거효율을 나타내었다. 분산분석 결과로부터 4주와 6주 공히 혼합처리를 했을 때 약 33% 정도 추가효과가 나타났음을 알 수 있었다.



(a) T-P

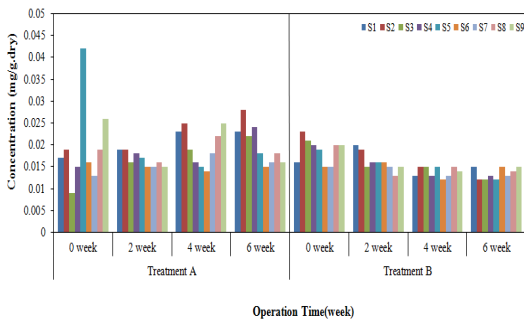


(b) PO₄-P

[그림 7] Microbial agent 및 Microbial agent + CaO₂ 처리에 의한 대조구와 처리구의 인계 화합물 변화. (a) T-P (b) PO₄-P (현장처리기간은 2주 간격으로 3회 측정)

[Fig. 7] Changes in phosphorus concentrations when microbially treated (Treatment A) or microbially plus chemically treated (Treatment B) for 6 weeks: (a) T-P (b) PO₄-P

저층의 생물뿐만 아니라 수계의 생물에게도 영향을 미치는 중요한 인자인 산 휘발성 황화물(AVS)을 측정한 결과(Fig 8), 단일·혼합 처리구로 부터의 초기 황화물 농도는 0.013 ~ 0.042 mg/g.dry로 나타났으며 처리 후의 경향을 관찰한 결과 혼합 처리구에서 S6지점을 제외하고 평균 29%정도의 감소효과가 두드러지게 나타났다. 이원분산분석의 결과를 보면, treatment A가 평균 0.02 mg/g.dry 인데 반해 treatment B는 0.013 mg/g.dry 으로 35% 추가 경감효과가 통계적으로 유의하게 확인되었다.

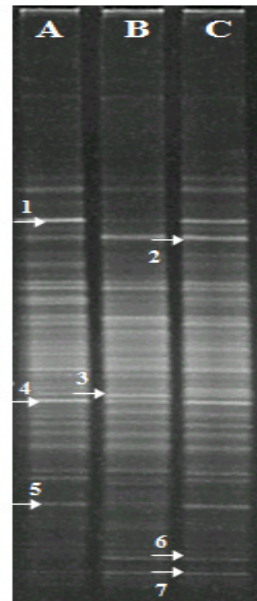


[그림 8] Microbial agent 및 Microbial agent + CaO₂ 처리에 의한 대조구와 처리구의 휘발성 황화물 변화. AVS(현장처리기간 은 2주 간격으로 3회 측정)

[Fig. 8] Changes in AVS concentration when microbially treated (Treatment A) or microbially plus chemically treated (Treatment B) for 6 weeks

3.3 CaO₂ 및 미생물제제의 처리에 따른 미생물 군집변화 및 유사성 관찰

현장에서의 군집변화를 PCR-DGGE기법으로 분석하였다. 그 결과, 산소발생제 및 미생물제제 처리에 따른 군집내 개체수의 변화는 현저하게 나타나지 않았다. 각 군집의 개체수는 DGGE image상에 나타난 bands 수로 각 bands의 density를 통해 화학적·생물학적 처리에 따른 종의 우점 및 변화를 설명할 수 있다. 처리 전 대조구(A)는 bands 수가 35개로 나타났으며 6주 후에 미생물제제(B) 및 미생물 제제와 CaO₂(C)를 혼합 처리한 군집 또한 35~36개로 개체수의 변화는 없었으나 처리에 따른 종의 증감과 감소, 새로운 종의 출현을 관찰 할 수 있었다(그림 9).



[Fig 9] CaO₂ 및 미생물제제와의 단일·혼합처리에 따른 미생물 군집분석 (A: 대조구(초기), B: 5% 미생물제제(6주 경과), C: 5% CaO₂와 미생물제제 혼합(6주 경과))

[Fig. 9] Microbial Flora Analysis of field test samples treated by single dose or by combined doses: (A) Control (no treatment at initial time); (B) Microbial agent (treatment after 6 week); (C) CaO₂ plus Microbial agent (treatment after 6 week)

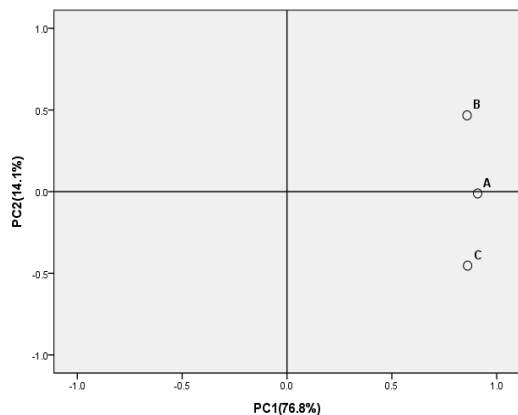
여러 band중 굵기와 밝기면에서 뚜렷한 7개 band의 염기서열 분석결과를 토대로 Genebank의 BLAST serach database를 이용하여 16s rDNA유전자의 염기서열을 alignment한 결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과,

Marine bacterium(band no.1)과 *Bacillus aeolius*(band no. 4), *Pseudomonas* sp.(band no. 5)은 대조구(A)와 혼합 처리구(C)에서는 선명한 band로 발견되나 단일처리구(B)에서는 종의 개체수가 상대적으로 줄어들었다. *Bacillus aeolius*는 메탄산화박테리아로 유기물을 분해하는 특징을 지니고 있다[9-10]. *Staphylococcus* sp.(band no. 2)를 비롯한 band 3, 6, 7의 경우에는 대조구에 비해 처리구에서 다소 굵고 선명한 band로 관찰되었는데, *Oceanisphaera* sp.(band no. 3)은 황산염 환원균[11]으로 미생물제제 처리시, 다른 군집에 비해 증식율이 증가하는 현상을 관찰하였으며 band 6과 7은 각각 *Pseudomonas marginalis*, *Bacillus subtilis*가 가장 근접한 종으로 Blast 되었다.

[표 1] DGGE 밴드로부터 회수한 16s rDNA의 염기서열을 분석결과

[Table 1] Base sequences of 16s rDNA read from DGGE bands

DGGE band	NCBI accession no.	Closest strains	Similarity (%)
1	AY149624_1	marine bacterium sp.	97%
2	Z26905_1	<i>Staphylococcus hominis</i>	96%
3	GU371691_1	<i>Oceanisphaera</i> sp.	93%
4	AB362281_1	<i>Bacillus aeolius</i>	93%
5	JF766689_1	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
6	Z76663_1	<i>Pseudomonas marginalis</i>	97%
7	DQ071265_1	<i>Bacillus subtilis</i>	95%



[그림 10] CaO₂ 및 미생물제제 단일 및 혼합처리에 따른 군집별 유사도 관찰 A: 대조구(초기) B: 미생물제제(6주 경과) C: CaO₂와 미생물제제 혼합(6주 경과)

[Fig. 10] Similarity test for microbial flora after microbial or microbial plus chemical treatment: (A) Control(0 weeks); (B) Microbila agent(6 weeks); (C) Microbial agent+CaO₂(6 weeks)

PCA분석은 DGGE band profile(그림 9)로부터 각각의 band 위치와 명도를 수치화하여 SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 통하여 분석하였다(그림 10). 결과에 의하면, 3군집이 서로 다른 위치에 있기는 하나 Y축 변수요인(종의 다양성)의 변이가 X축(종의 개체수)에 비해 상당히 작다는 것을 감안한다면 3군집은 서로 비슷한 개체군으로 이루어졌을 것이라는 것을 예상할 수 있다. 이것은 그림 9의 결과에서도 알 수 있듯이 유사한 개체군에서 그 band의 굵기 정도 외에는 뚜렷한 차이가 없었던 점을 미루어 보아서도 알 수 있을 것으로 판단된다.

3.4 화학적·생물학적 통합처리에 따른 미생물 군집 해석

본 현장실험에서 가장 효율성이 높게 관찰된 인자는 인(phosphorus)류와 휘발성 황화물(AVS), 암모니아성 질소(NH₃-N)이다. 인의 경우, CaO₂와 미생물제제를 혼합처리 시에 실질적으로 생물화학적 요소의 영향이 보다 부가적으로 첨가된 산소발생제(CaO₂)의 효과로 보여진다. 즉 CaO₂의 가수분해 시 생성되는 Ca²⁺이온과 Ca(OH)₂이 PO₄³⁻과 H₃PO₄와 각각 결합하여 불용성 인을 만들어 인의 용출 억제 및 제거시킴에 따른 인 제거 효과로 판단된다[12-13]. 또한 무기성 인(PO₄-P)과 T-P(총 인)의 감소율(28%, 30%) 패턴이 유사하게 나타났는데 이는 퇴적토의 인 제거 및 용출이 무기인에 의해 좌우됨을 보여주는 예가 될 것이다. 이와 같이 오염된 갯벌에서의 인 제거는 호기적 조건(산소발생제 처리)에서 이루어져야 될 것으로 사료된다.

AVS의 경우, T-P와 비슷한 감소패턴을 보였다. 일반적으로 혐기화된 갯벌(환원환경)에서는 낮은 pH와 황산염 환원균에 의한 황화수소가스(H₂S)를 많이 발생시키며, 이것은 저층에서 서식하는 생물뿐만 아니라 수질생물에 게도 독성을 나타낸다. 따라서 산소발생제(CaO₂)와 미생물제제 혼합처리 시 제거효과가 우수하게 나타났으며 미생물 군집변화에서도 황산염 환원균의 일종인 *Oceanisphaera* sp.(band no. 3)가 관찰(Fig 9)되었는데 미생물제제 처리 시에 개체수(density)가 증가하였으나 CaO₂와의 혼합처리 시에 pH 및 ORP상승에 따른 개체수가 감소함을 알 수 있었으며 여기엔 산소발생제(CaO₂)의 영향이 가장 크다고 사료된다.

Bacillus aeolius(band no. 4), *Pseudomonas* sp.(band no. 5)가 관찰되었는데 이들은 모두 종속 영양균에 속하므로 성장을 위해 외부로부터 영양분(탄소)을 공급 받아야 하는데, 외부 탄소원으로 사용 가능한 물질들로 메탄올, 아세트산, 메탄등 유기물을 이용한다. *Bacillus aeolius*

는 호염 및 내염성을 가진 종으로 메탄을 주 영양원으로 사용하며 surfactant activity를 가지고 있다. *Bacillus aeolius* 및 *Pseudomonas* sp.는 호기성 미생물로서 미생물 제제 처리 시, 개체수(density)가 감소하는 것으로 나타난 것은 혼합 처리구에 비해 혐기도가 큰 결과로 보여 지며 따라서 Heggie 등[14]과 Eyre와 Ferguson의 연구[15]에서 제시되었듯이 퇴적물에서 미생물이 질산염을 사용하게 되면 수층의 질산염이 감소하여 탈질효과가 나타나 결과적으로 $\text{NH}_3\text{-N}$ 이 상대적으로 크게 감소되는 변화가 나타난 것으로 판단된다.

Pseudomonas marginalis, *Bacillus subtilis*는 미생물제제 및 혼합 처리구에서만 나타난 종으로 유기물 분해 및 질소제거 능력이 있으나 실질적으로 Ignition Loss 및 COD 결과(그림 5)와 비교 시, 4~8%내로 비교적 감소효율이 크지 않았다.

4. 결 론

본 연구를 통해 오염된 갯벌 복원을 위하여 사용된 미생물제제는 유기물 분해효과가 뛰어난 종들을 선별하여 만들어 진 것이나 일반적으로 무산소 또는 극 혐기화된 퇴적토에서는 이러한 호기성미생물의 생분해가 가능한 조건이 충족되지 못해서 제거효과가 미비한 것으로 판단된다. 따라서 이러한 호기성미생물의 생육조건을 충족시키기 위해서는 산소발생제가 필수적인 요소로 유용미생물과의 혼합처리에 의한 실험결과에서도 AVS , $\text{NH}_3\text{-N}$, T-P , $\text{PO}_4\text{-P}$ 의 감소가 높은 효율을 보인 것에 기인한다. 이와 함께 미생물의 군집의 변화에서는 미생물제제 및 CaO_2 와 미생물제제 혼합처리에 따른 군집의 변화는 크게 나타나지 않았으나 H_2S 가스를 유발하는 *Oceanisphaera* sp.와 같은 황산염 환원균의 개체수 감소로 인한 AVS 발생 억제효과 및 *Bacillus subtilis* 및 *Pseudomonas* sp.등의 유기물을 분해시키는 능력이 뛰어난 종들의 증가를 간접적으로 확인 할 수 있었다. 또한 PCA 분석 결과에서도 알 수 있었듯이 이러한 생·화학적 처리를 통해 기존 갯벌내의 미생물의 군집의 변화를 크게 변화시키지 않으면서 토착미생물의 활성을 유도함으로써 산소발생제와 미생물제제 사용에 따른 안정성 여부를 확인할 수 있었다.

References

[1] S. J. You, and J. G. Kim, "Evaluation on the purification capacity of pollutants in the tidal flat", J,

Korean Fish, Soc, No. 32(4), pp. 409-415. 2001.
 [2] G. Wobeser, J. Wildl, "Avian botulism-anther perspective", No. 33, pp. 181 - 186, 1997.
 [3] D. W. Acton, and J. F. Barker, "In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic ground waters", Journal of Contaminant Hydrology, No. 9, pp. 325 - 352, 1992.
 [4] C. M. Aelion, and P. M. Bradley, "Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer", Applied and Environmental Microbiology, 57(1), pp. 57 - 63, 1991.
 [5] D. G. Bohan, and W. S. Schlett, "Enhanced natural bioremediation using a time release oxygen compound", In Situ and On-Site Bioremediation, 5, Battelle Press, Columbus Ohio, pp. 475 - 480, 1997.
 [6] S. H. Kong, J. W. Richard, and J. H. Choi, "Treatment of petroleum-contaminated soils using iron mineral catalyzed hydrogen peroxide", Elsevier Science Giannis, 1998.
 [7] S. J. Kim, "Eutrophication in the Namhae Coastal Sea 1. : The Aspects of Eutrophication of Bottom Mud and Surface Seawater in the Namhae Coastal Seas", Korean Wetlands Society, No. 3(2), pp. 107-118, 2001.
 [8] C. Gugliandolo, et al., "*Bacillus aeolius* sp. nov. A novel thermophilic, halophilic marine Bacillus species from Eolian Islands(Italy)", Syst Appl Microbiol, No. 26, pp. 172-176, 2003a.
 [9] C. Gugliandolo, et al., "*Bacillus aeolius* sp. nov. In Validation of Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSEM", List no. 94. Int J Syst Evol Microbiol, No. 53, pp. 1701-1702, 2003b.
 [10] Natarajan Velmurugan, Duraisamy Kalpana, J. Y. Cho, G. H. Lee, S. H. Park, Y. S. Lee, "Phylogenetic analysis of culturable marine bacteria in sediments from South Korean Yellow Sea". Microbiology, No. 80(2), pp. 261 - 272, 2011.
 [11] T. P. Murphy, and E. E. Prepas, "Lime treatment of hardwater lakes to reduce eutrophication", Veth. Internat, Verein Limnol, No. 24, pp. 327 - 334, 1990.
 [12] T. P. Murphy, K. G. Hall, and T. G. Northcote, "Lime treatment of a hardwater lake to reduce eutrophication", Lake and Reservoir Mgmt, No. 42, pp. 51 - 62, 1998.
 [13] D. T. Heggie, G. W. Skyring, J. Orchardo, A. R. Longmore, G. J. Nicholson, and W. M. Berelson, "Denitrification and denitrifying efficiencies in sediments of Port Phillip Bay: direct determinations of biogenic N_2 and N-metabolite fluxes with implications for water

quality”, Marine Freshwater Research. No. 50, pp. 589 - 596, 1999.

- [14] B. Eyre, and J. P. Ferguson, “In Sediment biogeochemical indicators for defining sustainable nutrient loads to coastal ecosystems”, Coastal Biogeochemistry Southern Cross University, pp. 101 - 104, 2002.

조 대 철(Daechul Cho)

[정회원]



- 1985년 2월 : 서울대학교 화학공학(공학사)
- 1996년 2월 : Purdue Univ.(공학박사)
- 2003년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 에너지환경공학과 교수

<관심분야>

바이오계면현상, 생물학적 수질대기환경처리

권 성 현(Sung-Hyun Kwon)

[정회원]



- 1992년 5월 : University of Southern California (석사)
- 1997년 12월: University of Southern California (박사)
- 2000년 9월 ~ 현재 : 경상대학교 교수로 재직

<관심분야>

생물학적 폐수처리, 폐기물처리

배 환 진(Hwan-Jin Bae)

[정회원]



- 2011년 8월 : 경상대학교 (석사)

<관심분야>

폐기물처리, 연안저질복원