

Biodegradation Kinetics of Benzene by *Pseudomonas aeruginosa*

박춘화 · 김동주
고려대학교 지구환경과학과
djkim@korea.ac.kr

Abstract

Monod kinetics에 관련된 주요 생분해 파라미터를 도출하기 위하여 microcosm 규모의 배치실험에서 BTEX 화합물에 대해 분해능이 우수한 *Pseudomonas aeruginosa*을 이용해 다양한 농도의 벤젠에 대한 분해기작을 고찰하였다. 벤젠의 생분해율(D)과 Maximum specific growth rate (μ_{max})는 기질의 농도가 증가할수록 높아지다가 최고점에 도달 후에 점차적으로 감소하였으며 이것은 어느 한계점 이상의 벤젠 농도가 미생물의 생분해에 방해 요소로 작용한다는 것을 나타낸다. 그러나 미생물에 의한 벤젠 분해의 상관관계를 나타내는 yield coefficient(Y)는 벤젠의 초기 농도가 낮을수록 높은 값을 나타내었다. Microbial decay constant(b)와 half-saturation constant(K_c)는 각각 $0.21 \sim 0.48 \text{ day}^{-1}$ 와 218 mg/l 로서 문헌값 보다 높은 수치를 나타내었다. 실험으로부터 결정된 생분해 파라미터들은 초기 벤젠 농도에 따라 큰 차이를 보이므로 생분해 모델링에 사용할 파라미터는 기질농도에 따라 적절하게 선택되어야 한다고 사료된다.

key word : benzene, *Pseudomonas aeruginosa*, biodegradation, Monod kinetics, dissolved oxygen.

1. Introduction

유류 오염지역을 정화하는 방안으로 미생물을 이용한 생물학적 복원(Bioremediation)이 대두되고 있는데, 이 기법은 다소 시간이 걸리지만 고가의 비용을 들이지 않고 오염물질을 완전히 분해하여 무해한 물질로 분해시키므로 최근에 실험실 연구와 더불어 현장 적용 연구가 한창 진행중에 있다 (Yeom, 1999; Goux, 2000). 한편, 이러한 생분해 기작에 관한 연구는 현장 및 실내실험과 병행하여 모델링 연구도 활발히 진행되어 왔다. 그러나 지금까지의 모델링 연구는 대부분 수리지질학적 파라미터의 정량화에 초점을 두었을 뿐, 미생물학적 파라미터에 대해서는 자료가 부족하여 기존 참고문헌을 인용하여 생분해 모델링을 수행하고 있는 실정이다 (Jose, 1988; Wolfgang, 1995). 따라서 본 연구의 목적은 벤젠으로 오염된 사질토양에서 성장하는 미생물 중에서 적응시간이 비교적 빠른 미생물인 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 수용액상태의 다양한 초기 벤젠 농도에 따른 시간별 분해능 및 분해 특성을 파악하고 모델링에 사용되는 생분해 파라미터를 도출하는데 있다.

2. Materials and Methods

방향족 탄화수소계 화합물 중 수용성이 강한 벤젠과 BTEX로 오염된 사질토양에서

가장 성장속도가 빠른 균주인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여 수용액 상태의 배지 실험이 수행되었다. 벤젠의 흡착을 배제하기 위해 실험기기는 glass 재질을 사용하였으며 다른 미생물의 영향을 완전히 배제하기 위하여 용기 및 시료는 멸균하였다. 실험에 사용된 벤젠 용액의 초기 농도는 총 5가지(200, 300, 500, 700, 1300 mg/l)였으며 미생물의 초기 농도($10^6 \sim 10^7$ CFU/ml)에 대하여 시간에 따른 벤젠의 농도 변화와 미생물 세포수의 변화를 분석하였다. 각각의 serum bottle에 미생물의 성장에 필요한 영양분이 있는 최소배지(M9)를 넣고 밀봉한 다음 수용액 상태의 균질한 벤젠 용액을 만들었다. 미리 배양된 고농도(10^9 CFU/ml)의 미생물은 사질토양내 자생미생물 농도($10^6 \sim 10^7$ CFU/ml)가 되도록 glass-syringe를 이용하여 벤젠 용액에 혼합되었다. 이렇게 만들어진 수용액을 30°C, 150 rpm으로 진탕기에서 배양하여 반응이 끝날 때까지 일정 시간마다 glass-syringe로 채취하였으며 벤젠과 미생물은 각각 HPLC, plate counting(LB-AP) 방법으로 측정하였다. M9배지의 조성은(g/l) Na₂HPO₄(6.0), KH₂PO₄(3.0), NaCl(0.5), NH₄Cl(1.0), MgSO₄(0.5), CaCl₂(0.015)이며 초기 pH는 7±0.3였다.

3. Results and Discussion

3.1. Biodegradation kinetics

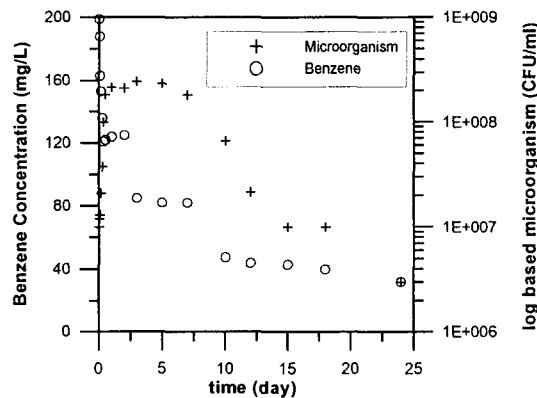


Fig. 1. Kinetic of benzene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*.

그림 1은 수용액상의 serum bottle에서 초기 벤젠 농도 200 mg/l을 단일 탄소원으로 하였을 경우 미생물이 성장하는 것을 보여주고 있다. 벤젠의 초기 농도를 달리하여 실험한 결과 1300 mg/l을 제외한 모든 경우에서 미생물이 성장함에 따라 벤젠이 감소하는 경향을 보여주었으며, 초기 반응시간(12시간)에 미생물의 성장과 벤젠의 감소가 급격하게 일어났다(data not shown). 그러나 벤젠이 완전히 분해되지 않은 상태에서 미생물이 감소한 것은 serum bottle 내의 제한된 용존산소 조건에서 더 이상의 산소공급이 이루어지지 않았기 때문인 것으로 보인다 (Shim, 1999).

3.2. Microbial and Monod kinetic parameters

수용액 상태에서 벤젠의 농도를 달리하였을 경우 생분해율(D)과 미생물에 의한 분해 기작을 표현하는 Monod kinetic equation의 주요 생분해 파라미터인 maximum specific

growth rate(μ_{max}), yield coefficient(Y), microbial decay rate(b), half-saturation constant(K_c)을 구하였다.

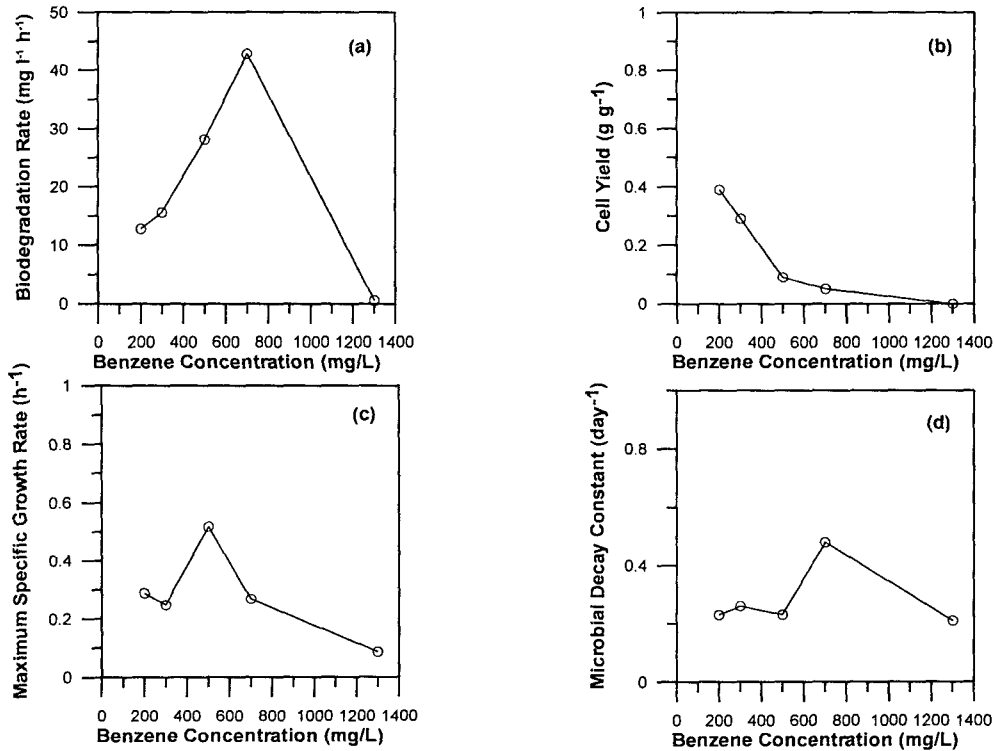


Fig. 2. Effect of substrate concentration on (a) biodegradation rate , (b) yield coefficient, (c) microbial decay coefficient and (d) maximum utilization rate using benzene as sole carbon source.

생분해율(D)는 벤젠의 초기 농도 700 mg/l 까지 증가하다가 그 이후의 농도에서는 점점 감소하여 1300 mg/l 에서는 매우 낮은 수치를 나타내고 있으며 이것은 상대적으로 큰 벤젠의 초기 농도가 미생물의 성장에 방해요소로 작용한다는 것을 의미한다. 벤젠의 초기 농도 200 mg/l 부터 700 mg/l 까지는 지체기를 거치지 않고 분해되었으나 1300 mg/l 의 경우 초기 미생물의 농도는 10^7 CFU/ml 였으나 반응 직후 $1.1 \times 10 \text{ CFU/ml}$ 까지 감소한 후 다시 적응기를 거쳐 점차적으로 성장하였다. 반응 24시간 이후 미생물의 점차적인 성장으로 벤젠의 분해가 이루어 졌으며 이것은 새로운 환경에서 미생물이 성장하기 위해 적응기를 거친다고 제시한 Bull(1974)의 연구결과와 잘 일치한다. Chang (1997)의 *Pseudomonas fluorescens*에 대한 수용액상태의 실험에서 초기 벤젠 농도 100 mg/l 에 대해 $12.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 생분해율을 가진다고 하였으며, 이 값은 초기농도 200 mg/l 의 실험에서 구한 $12.7 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 와 잘 일치하고 있다.

단위 기질당 미생물의 성장을 나타내는 함수인 yield coefficient(Y)는 200 mg/l 에서 0.39로 가장 높고 1300 mg/l 에서는 벤젠의 toxicity 때문에 매우 낮은 값인 0.0001을 나타내었다(그림. 2b). 미생물의 사멸을 나타내는 microbial decay constant(b)는 주위 환경에 매우 민감한 인자이기 때문에 모델링 연구에 중요한 파라미터로 작용한다. Bielefeldt (1999)는 초기

미생물농도 $10^6 - 10^7$ CFU/ml의 batch 실험에서 b 가 $0.1 \sim 0.2 \text{ day}^{-1}$ 을 갖는다고 하였으며, 이 값은 실험에서 구한 b 보다 다소 낮은 수치이다 (그림 2c).

한편, μ_{\max} 는 벤젠의 농도가 500 mg/l 때까지 증가하다가 그 이상의 농도에서는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 벤젠의 초기 농도가 500 mg/l 경우 가장 높은 값인 0.52 h^{-1} 을 나타내었으며, 1300 mg/l 의 경우를 제외한 농도에서는 비슷한 수치인 $0.25 \sim 0.29 \text{ h}^{-1}$ 을 나타내고 있다 (그림 2d). Jose (1998)는 톨루엔을 탄소원으로 한 주상실험에서 μ_{\max} 는 $0.24 \sim 0.30 \text{ h}^{-1}$ 을 가진다고 보고하였다. 각 농도별로 구한 μ_{\max} 값과 그때의 초기 농도로부터 도출한 half-saturation constant (K_c)는 218 mg/l 이었으며, 이는 Tabak (1990)이 구한 22.2 mg/l 보다 높게 나타났으나 bioreactor를 사용해 구한 600 mg/l (shim, 1999)보다 다소 낮게 나타났다.

4. conclusion

유류로 오염된 지역의 토양에서 BTEX를 탄소원으로 이용하는 미생물 중 분해능이 우수한 *Pseudomonas aeruginosa*를 사용하여 벤젠에 대한 분해 특성을 파악함으로써, 생분해 모델링에 필요한 파라미터를 구하였다. 다양한 벤젠의 초기 농도로부터 도출한 생분해 파라미터는 농도에 따라 다른 값을 나타냈는데 생분해율 (D)은 700 mg/l 까지 증가하다가 그 이후의 농도에서는 감소하였다. Maximum specific growth rate (μ_{\max})도 동일한 경향을 나타내었으나, yield coefficient (Y)는 농도가 낮을수록 높은 수치를 나타내었다. Microbial decay constant (b)는 생분해율 (D)이 가장 높은 700 mg/l 에서 가장 큰 값을 나타내었다. 따라서 이러한 생분해 파라미터는 초기 기질 농도 조건에 따라 다르므로 모델링에 사용할 때에는 각 조건에 맞는 값을 선택해야 한다.

5. Reference

- 1) Bielefeldt, A. R., Stensel. H. D., Evaluation of biodegradation kinetic testing methods and longterm variability in biokinetics for BTEX metabolism. Wat. Res., 33, 733-740, 1999.
- 2) Chang, Bea-Ven., Wu, Wen-Bin., Yuan, Shaw-Ying., Biodegradation of benzene, toluene, and other aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. D8. Chemosphere, 35, 2807-2815, 1997.
- 3) Jose F., Munoa, Manuel J., Irarrazaval., A numerical model for simulation of bioremediation of hydrocarbons in Aquifers. Ground Water., 36(2), 215-224, 1998.
- 4) Shim Hojae, Yang Shang-Tian., Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. Journal of Biotechnology. 67, 99-112, 1999.
- 5) Tabak, H. H., Quave, S. A., Biodegradability studies with priority pollutant compounds. J. Water Pollut. Control Fed. 53, 1503-1518, 1981.