

호기성 미생물 컨소시엄에 의한 BTX의 분해

문종혜·김종우·박진수·'오광중·†김동욱
†인제대학교 화학공학과, '부산대학교 환경공학과
(접수 : 2000. 12. 13., 게재승인 : 2001. 2. 12.)

Degradation of BTX by Aerobic Microbial Consortium

Jong Hye Moon, Chong Woo Kim, Jin Soo Park, Kwang Joong Oh', and Donguk Kim†
†Department of Chemical Engineering, Inje University, Kimhae, Kyongnam 621-749, Korea
'Department of Environmental Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Received : 2000. 12. 13., Accepted : 2001. 2. 12.)

In this study, a BTX degrading microbial consortium was obtained from the activated sludges of a BTX releasing sewage water and city sewage water treatment plant. The MY microbial consortium was developed for benzene and toluene degradation, whereas the MA microbial consortium was developed for xylene isomers. The major microorganism of the MA consortium was identified as *Rhodococcus ruber* DSM 43338T, whereas that of the MY consortium was *Rhodococcus* sp. In terms of the degradation of a single component, the removal rate of benzene was fastest and decreased in order; toluene, *o*-xylene, *p*-xylene and *m*-xylene. For degradation of mixed BTX, most BTX were degraded within 108 hours and the degradation rate showed either stimulatory or inhibitory effects depending on the composition. MA and MY microbial consortium obtained in this study may be used effectively to remove BTX biologically.

Key Words : BTX, activated sludge, microbial consortium, removal rate, stimulatory or inhibition effect

서론

원유에 다량 포함되어있는 BTX(benzene, toluene, xylene)는 특히 중질유내에 그 함량이 높으며, 또한 구조적으로 안정하여 유기용매로 널리 사용되고 있다(1). 그러나 BTX는 독성을 지니고 있을 뿐만 아니라 다른 탄화수소류보다 물에 대한 용해도가 높아서 처리되지 않은 BTX가 다량 방출되면 토양, 하천 및 지하수를 쉽게 오염시킬 수 있다. 따라서 미국의 EPA에서는 이 들을 top priority pollutant로 지정하였다(2).

BTX의 처리법 중 생물학적 처리는 BTX 분해미생물을 이용하는 방법으로 이차오염을 최소화하며, 운전경비가 물리적, 화학적 방법에 비해 최소 30% 정도 저렴하여 최근에 가장 각광을 받는 처리법이다(3). BTX 분해미생물은 크게 호기성균과 혐기성균으로 나눌 수 있다. 호기성균은 1950년대 이래 Gibson(4), Bartha(5) 등 많은 연구자들에 의해 연구되어 왔으며, 배양이 쉽고 BTX를 빠르게 분해하는 장점이 있다. 대표적인 호기성균으로는 *Pseudomonas putida*, *P. cepacia*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Mycobacterium vaccae* 등이 알려져

있다(6,7). 혐기성균은 비교적 최근에 연구가 이루어지고 있으나 배양조건이 까다롭고, 호기성균에 비해 균성장과 BTX의 분해율이 느린 단점이 있다(8,9). 호기성미생물에 의한 BTX의 분해경로는 Assinder(10), Lee(11) 등에 의해 자세히 연구되었으며, 대체로 monooxygenase나 dioxygenase에 의해 benzene 고리가 파괴되어 pyruvate로 전환되며 이어서 TCA 경로를 통해서 완전히 분해되는 것으로 알려져 있다. 현재까지의 연구결과 BTX 각각의 단일성분을 분해하는 균주는 알려져 있지만 5종의 BTX 전부를 동시에 분해하는 미생물은 알려져 있지 않다. 따라서 BTX의 완전한 분해를 위해서는 단일균주를 배양하기보다 다양한 미생물이 공존하는 활성슬러지를 이용, 개량하는 것이 보다 유리하다고 할 수 있다. 복합균주를 사용하여 BTX의 동시분해를 연구한 결과에 따르면 모든 성분의 분해는 이루어 졌으나, 그 처리속도가 단일균주의 배양에 비해 느렸으며, 그 중에서도 특히 가장 난분해성인 *o*-xylene의 분해가 아주 어려웠던 단점이 있었다(12).

따라서 본 연구에서는 5종류의 모든 BTX를 제거하면서 비교적 빠른 분해속도를 가진 혼합균주를 획득하고자 하였다. 이를 위해 인근의 BTX를 배출하는 사업장 및 하수처리장에서 활성슬러지를 채취하여 BTX가 함유된 적절한 배지에서 장기간 적응시킨 후 적절한 혼합균주를 선별하였고, 각 혼합균주에 대해 단일 및 복합성분의 BTX의 제거효율을 측정하였으며, 각 성분간의 촉진 및 방해효과를 관찰하였다.

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Inje University, Obang-dong, Kimhae, Kyongnam 621-749, Korea.
Tel : +82-55-320-3396, Fax : +82-55-327-4955
E-mail : chedukim@ijnc.inje.ac.kr

Table 1. Constant parameters for the temperature regression equation.

BTX	A	B
Benzene	5.534	3194
Toluene	5.133	3024
<i>p</i> -Xylene	6.931	3520
<i>m</i> -Xylene	6.280	3337
<i>o</i> -Xylene	5.541	3220

Table 2. Absorbance(OD₆₀₀) of each microbial consortium cultured at 48 hour for single component of BTX.

Strain	Benzene	Toluene	<i>p</i> -Xylene	<i>m</i> -Xylene	<i>o</i> -Xylene
MA	0.205	0.127	0.348	0.286	0.487
MD	0.101	0.089	0.255	0.283	0.138
MH	0.143	0.117	0.084	0.078	0.116
MY	0.409	0.573	0.124	0.272	0.232

재료 및 방법

미생물 컨소시엄의 배양

BTX를 배출한다고 알려진 김해시 A공단(MA 슬러지), 양산시 D기업(MD 슬러지), 울산시 H기업(MH 슬러지) 및 부산시 Y하수처리장(MY 슬러지)에서 슬러지를 채취하여 기본배지 50 mL와 함께 500 mg/L의 액상 BTX를 silicon rubber septum이 부착된 500 mL medium bottle에 주입하였다. 기본배지의 조성은 다음과 같다(13): (mg/L) MgSO₄ · 7H₂O 500, K₂HPO₄ 500, (NH₄)₂SO₄ 500, CaCl₂ 10, FeCl₃ · 6H₂O 1, MnCl₂ 1, ZnSO₄ 0.1. 각각의 슬러지에 대해 액상농도 500 mg/L의 benzene, toluene, *p*-, *m*-, *o*-xylene을 개별적으로 주입하여 30°C, pH 7.0의 조건에서 2주 간격으로 BTX를 보충하여 3개월 간 계대배양을 실시하였다.

특정 BTX를 빠르게 분해하는 미생물컨소시엄의 선별을 위해 silicon rubber septum이 부착된 medium bottle에 50 mL의 기본배지와 500 mg/L의 각 BTX를 넣고 계대배양된 미생물 컨소시엄 1 mL를 주입한 후 일정시간 동안 용액의 흡광도를 600, 660 nm에서 측정하였다. BTX의 분해속도 측정시 미생물의 초기집중농도는 1 mL였으며, 이때 미생물의 건조균체 중량은 MA 컨소시엄의 경우 0.01-0.026 mg/mL였고, MY 컨소시엄에서는 0.013-0.04 mg/mL였다.

BTX의 농도분석

각 균주의 BTX 분해를 측정하기 위해 아래의 물질수지와 Henry법칙을 사용하여 기상농도로 측정된 값을 액상의 농도로 환산하였으며, 각 BTX에 대한 상수(A,B)가 Table 1에 나타나 있다(14):

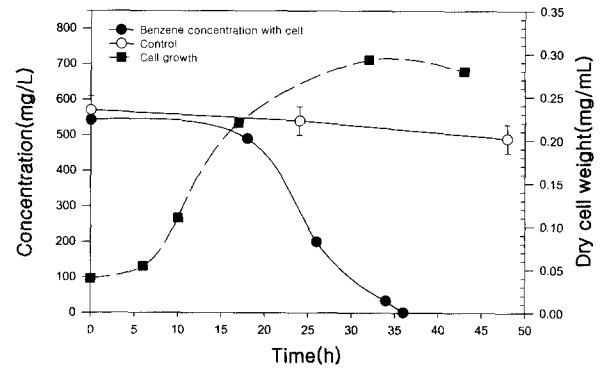
$$M = S_L \cdot V_L + S_G \cdot V_G \quad (1)$$

$$S_L = S_G / H_c \quad (2)$$

$$H_c = H / RT \quad (3)$$

$$H = \exp(A - B/T) \quad (4)$$

기상의 BTX농도측정은 silicon rubber septum이 부착된

**Figure 1.** Degradation of benzene and cell growth of MY consortium.

500 mL medium bottle의 headspace gas를 gas-tight syringe (Hamilton)로 100 μ L 채취한 후, gas chromatograph (도남인스트루먼트)에 주입하여 이루어 졌다. GC는 Quadrex 007-cw column(0.25 mm)과 pulse discharge detector(Valco Instrument)가 장착되었으며, 이동상으로 8 mL/min의 99.999% He가스를 사용하였고, split ratio는 1:20, oven의 초기 온도는 60°C에서 2.5분간 유지하고 20°C/min으로 150°C까지 상승시켜 측정하였으며, 검출기의 온도는 250°C, injector는 60°C를 유지하였다.

본 연구에서 BTX의 분해속도는 미생물컨소시엄의 단위 건조균체 중량 당 분해속도로 계산되었으며, BTX의 기상취발(control)을 고려하여 다음과 같이 정의되었다.

$$\text{BTX의 분해속도} (\mu\text{g BTX/h} \cdot \text{mg dry cell}) = \frac{([0\text{시간의 액상 BTX농도}(\text{mg/L}) - t\text{시간의 액상 BTX농도}(\text{mg/L})] - t\text{시간동안 control의 BTX감소}(\text{mg/L})) \times 1000}{t\text{ 시간(h)} \times \text{mg} \cdot \text{dry cell}} \quad (5)$$

t 시간: BTX의 농도가 정상상태에 도달한 시간

결과 및 고찰

단일성분의 분해

BTX를 배출하는 사업장의 슬러지에서 획득한 미생물컨소시엄을 각각의 BTX에 3개월 간 적응시킨 후 1 mL의 혼합균주를 취하여 플라스크 배양을 실시하였을 때 시간에 따른 흡광도의 변화가 Table 2에 나타나 있다. 위의 실험결과 4종류의 미생물 컨소시엄 중 benzene과 toluene의 분해에 우수한 MY컨소시엄과 *p*-, *m*-, *o*-xylene의 분해에 뛰어난 MA컨소시엄을 선별하였다. MA와 MY컨소시엄의 주된 미생물은 16S rDNA의 염기서열분석을 통하여 ((주)MicroID) *Rhodococcus ruber* DSM 43338T와 *Rhodococcus sp.*로 밝혀졌다.

MY컨소시엄에 의한 benzene과 toluene의 단일성분의 분해가 Figure 1과 Figure 2에 나타나 있다. Benzene의 경우 36시간동안 완전히 분해되었으며, 그 분해속도는 50 μ g/h · mg dry cell로 나타났다. Toluene은 48시간 동안 완전히 분해되었으며, 그 분해속도는 29 μ g/h · mg dry cell로 나타났다. MA 컨소시엄에 의한 *p*-, *m*-, *o*-xylene의 단일성분의 분해가 Figure 3 (a)-(c)에 나타나 있다. *p*-xylene은 96시간 동안 완전히 분해되었으며, 분해속도는 8 μ g/h · mg dry cell이었고, *m*-xylene은 120시간동안 94% 분해되었으며, 분해속도는

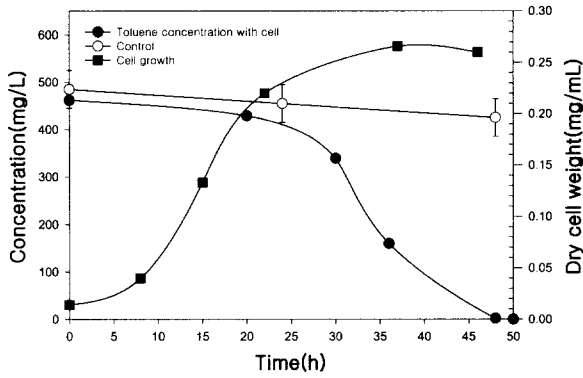


Figure 2. Degradation of toluene and cell growth of MY consortium.

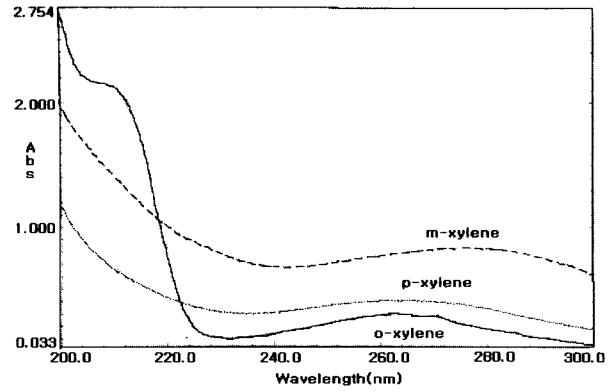
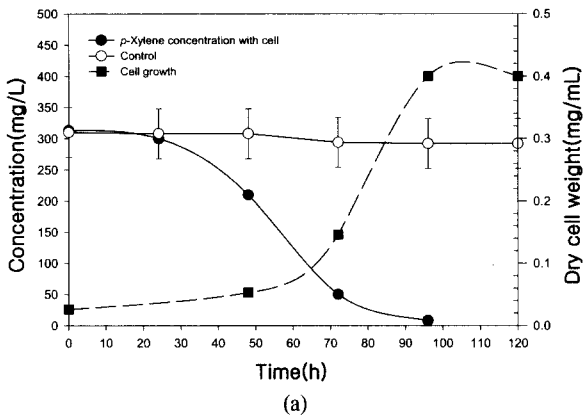
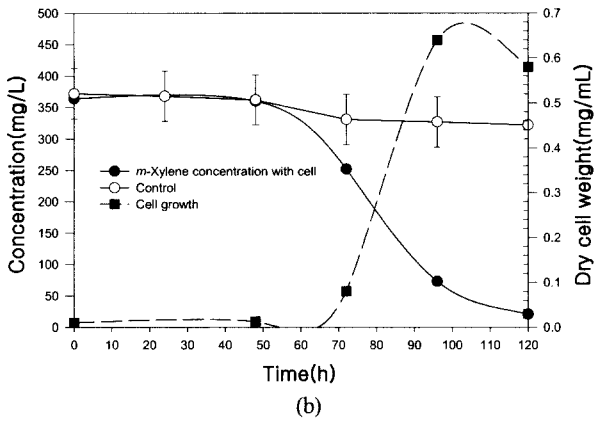


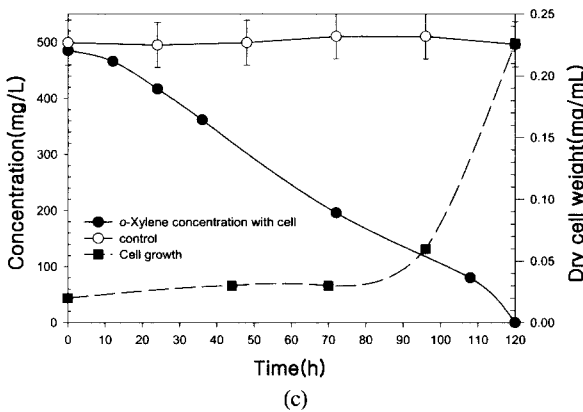
Figure 4. Formation of cresole in xylene degradation



(a)



(b)



(c)

Figure 3. Degradation of *p*-xylene(a), *m*-xylene(b) and *o*-xylene(c) by MA consortium.

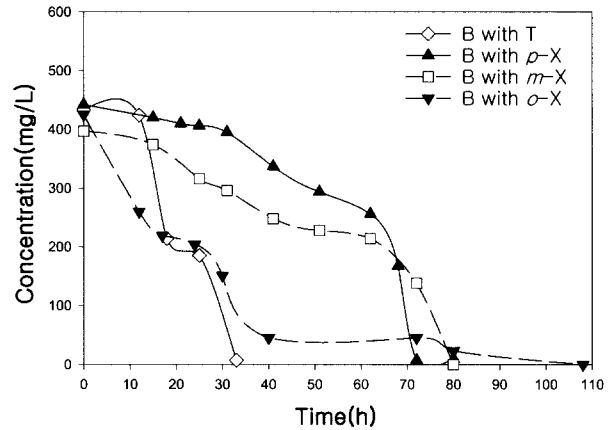


Figure 5. Benzene degradation in binary mixture with toluene, *p*-, *m*-, *o*-xylene by MA and MY consortium.

0.3 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg}$ dry cell로 나타났다. BTX 중 가장 난분해성물질로 알려진 *o*-xylene은 108시간동안 완전히 분해되었으며, 그 분해속도는 13 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg}$ dry cell로 나타났다. 단일성분의 분해속도 측정결과 benzene > toluene > *o*-xylene > *p*-xylene > *m*-xylene의 순으로 분해가 일어났다.

Xylene 분해균주 중 일부는 xylene을 완전히 분해하는 대신 그 중간산물인 cresole로 변환한다고 보고되어졌으며, cresole이 생성된 경우 260 nm 부근에서 peak가 나타난다고 알려져 있다(15). Xylene의 분해가 끝난 후, 용액을 원심분리하고 그 상등액의 흡광도를 측정하였을 때 그 결과가 Figure 4에 나타났다. *m*-xylene의 경우 cresole이 형성되지 않았으나, *o*-xylene에서는 명확한 peak가 나타난 것으로 보아 cresole이 생성된 것을 알 수 있다. 본 연구에서 *o*-xylene의 분해속도가 비교적 빠른 것은 *o*-xylene이 완전히 분해되기보다 중간 산물인 cresole로 상당히 전환된 것에 기인한 것으로 사료된다.

BTX의 복합성분 분해

Benzene을 함유한 2성분의 동시분해가 Figure 5에 나타나 있다. Benzene과 toluene의 동시분해에서는 플라스크내 미생물의 초기접종으로 1 mL의 MY컨소시엄이 사용되었으며, benzene과 xylene의 동시분해시에는 0.5 mL의 MA컨소시엄과 0.5 mL의 MY컨소시엄이 사용되었다. Benzene의 분해속도는 benzene-toluene의 동시분해시 50 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg}$ dry cell로 가장 빨랐으며,

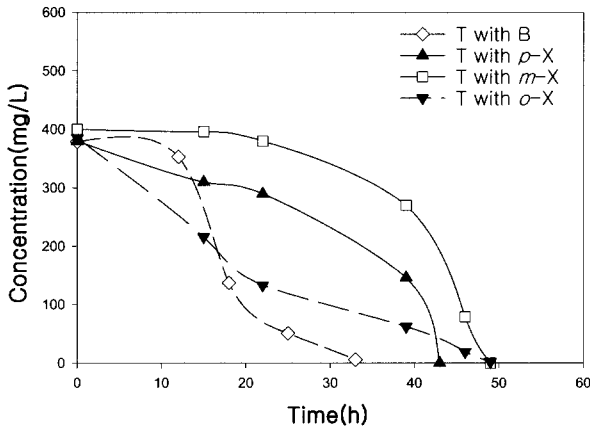


Figure 6. Toluene degradation in binary mixture with benzene *p*-, *m*-, *o*-xylene by MA and MY consortium.

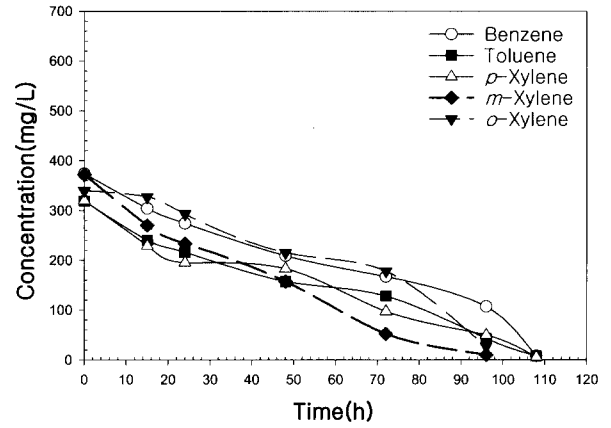


Figure 8. Simultaneous degradation of BTX by MA and MY consortium.

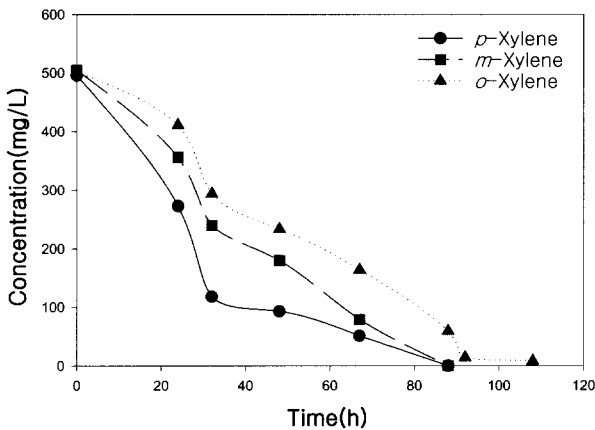


Figure 7. Simultaneous degradation of xylene isomers by MA consortium.

benzene-*p*-xylene에서는 22 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, benzene-*m*-xylene에서는 10 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 이었고, benzene-*o*-xylene의 경우는 7 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 로 가장 느렸다. 위의 결과를 단일성분의 benzene 분해와 비교해보면 toluene의 첨가는 benzene의 분해속도에 별 영향을 미치지 못하였으나, xylene의 첨가는 benzene의 분해에 심한 방해작용을 하는 것으로 나타났다. 위의 결과는 BTX 상호간의 촉진 및 방해작용에 있어서 La 등(12)의 연구와 일치하였다.

Toluene을 함유한 2성분의 동시분해가 Figure 6에 나타나 있다. Toluene-xylene의 동시분해시에는 플라스크내 미생물의 초기점종으로 0.5 mL의 MA컨소시엄과 0.5 mL의 MY컨소시엄이 사용되었다. Toluene의 분해속도는 toluene-benzene의 동시분해시 60 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 로 가장 빨랐으며, toluene-*p*-xylene에서 33 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, toluene-*m*-xylene에서 35 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 그리고 toluene-*o*-xylene에서는 30 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 이었다. 위의 결과를 단일성분의 toluene 분해속도와 비교시 benzene의 첨가는 toluene의 분해속도를 증가시켰으며(촉진효과), xylene의 첨가는 toluene의 분해에 별 영향을 주지 못하였다. Benzene의 첨가가 toluene의 분해에 촉진작용을 한다는 실험결과는 Lee 등(16)의 연구와 일치하였다. 2성분간의 동시분해속도(Figure 5-6)를 비교할 때 toluene은 benzene에 비해 비교적 빠른 분해속도를 보여주었다.

MA컨소시엄에 의한 *p*-, *m*-, *o*-xylene의 3성분의 동시분해가 Figure 7에 나타나 있다. 복합 xylene은 108시간내에 모두 분해가 일어났으며 *p*-xylene은 6 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, *m*-xylene은 6 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, *o*-xylene은 16 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 의 분해속도를 보여주었다. 복합 xylene의 분해속도를 단일성분의 분해속도와 비교해보면 *p*-, *m*-xylene의 경우 분해속도의 차이가 없었으나 *o*-xylene은 분해속도가 감소하였다.

MA컨소시엄과 MY컨소시엄에 의한 benzene, toluene, *p*-, *m*-, *o*-xylene의 5성분 동시 분해의 결과가 Figure 8에 나타나 있다. Benzene, toluene, *p*-, *m*-xylene은 108시간동안 완전히 분해되었으며, *o*-xylene은 95% 분해되었고, 그 분해속도는 benzene의 경우 11 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, toluene은 5 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, *p*-xylene은 4 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$, *m*-xylene은 5 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 그리고 *o*-xylene은 7 $\mu\text{g/h} \cdot \text{mg dry cell}$ 을 나타내었다. 복합 BTX의 분해속도를 단일성분의 분해속도와 비교해보면 *m*-xylene을 제외한 4성분의 분해속도가 크게 감소한 것을 알 수 있다. 복합 BTX 분해시 상호간의 영향은 연구자간(1,7,12,16,17)의 결과가 서로 상이한 점이 많아서 아직까지 뚜렷한 결론이 나있지 않은 상태이다.

BTX를 배출하는 장소에서 슬러지를 수거하여 일정농도의 BTX에 장기간 적응 후 획득한 MA 및 MY컨소시엄은 주된 균주가 *Rhodococcus*였으며, 단일 및 복합성분의 BTX를 비교적 빠르게 분해할 수 있었다. 본 연구에서 획득한 미생물컨소시엄은 추후 BTX의 생물학적 처리에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

BTX를 배출하는 지역에서 얻어진 슬러지를 적절한 배지에 3개월 간 적응시킨 결과, benzene과 toluene을 빠르게 분해하는 MY컨소시엄과 *p*-, *m*-, *o*-xylene을 빠르게 분해하는 MA컨소시엄을 획득하였다. 균주의 동정결과 MA 및 MY컨소시엄의 주된 균주는 *Rhodococcus ruber* DSM 43338T과 *Rhodococcus sp.*로 밝혀졌다. BTX 단일성분의 분해속도 측정결과 benzene > toluene > *o*-xylene > *p*-xylene > *m*-xylene의 순으로 분해가 일어났다. MA 및 MY컨소시엄의 동시배양을 이용한 2-5종의 복합 BTX의 분해실험결과 대부분의 경우 108시간내에

완전히 분해되었으며, 각 혼합물의 조성에 따라 촉진 및 방해작용을 나타내었다. 본 연구에서 획득한 2종의 미생물컨소시엄은 BTX의 생물학적 처리에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 지정 부산대 환경기술 산업개발연구센터(RRC-IETI)의 지원(과제번호: 99-10-03-03-A-3)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

사용기호

M	: BTX의 첨가량 [mg]
H	: Henry상수 [$\text{atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$]
H _c	: 무차원 Henry상수
V _L	: 액상부피 [L]
V _G	: 기상부피 [L]
S _L	: 액상농도 [mg/L]
S _G	: 기상농도 [atm]
A and B	: 상수

REFERENCES

- Oh, Y.-S., Z. Shareefdeen, B. C. Baltzis, and R. Bartha (1994), Interactions between Benzene, Toluene and p-Xylene (BTX) During Their Biodegradation, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 533-538.
- US Environmental Protection Agency, Serial No. 95-12, US Government Printing Office, Washington, D.C., 1977.
- Devanny, J. S., M. A. Deshesses, and T. S. Webster (1999), Biofiltration for Air Pollution Control, p14, Lewis Publisher, Boca Raton.
- Gibson, D. T., J. R. Koch, and R. E. Kallio (1968), Oxidative Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Microorganisms. I. Enzymatic Formation of Catechol from Benzene, *Biochem.*, **7**, 2653-2662.
- Bartha, R. and R. M. Atlas (1977), The Microbiology of Aquatic Oil Spills, *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 225-266.
- Yeom, S. H. (1998), Biodegradation of BTX in a Hybrid Bioreactor, Ph.D Dissertation, Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul.
- Deeb, R. A. and L. Alvarez-Cohen (1999), Temperature Effects and Substrate Interactions During the Aerobic Biotransformation of BTEX Mixtures by Toluene-Enriched Consortia and *Rhodococcus rhodochrous*, *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 526-536.
- Grbic-Galic, D. and T. M. Vogel (1987), Transformation of Toluene and Benzene by Mixed Methanogenic Cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 254-260.
- Chaudhuri, B. K. and U. Wiesmann (1995), Enhanced Anaerobic Degradation of Benzene by Enrichment of Mixed Microbial Culture and Optimization of the Culture Medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 178-187.
- Assinder, S. J. and P. A. Williams (1990), The TOL Plasmid: Determinants of the Catabolism of Toluene and the Xylenes, In *Advances in Microbial Physiology Vol. 31*, A. H. Rose, and D. W. Tempest, Eds., p1-69, Academic Press, London.
- Lee, J.-Y., K.-H. Jung, and H. S. Kim (1995), Amplification of Toluene Dioxygenase Genes in a Hybrid *Pseudomonas* Strain to Enhance the Biodegradation of Benzene, Toluene, and p-Xylene Mixture, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 488-494.
- La, H.-J., S.-W. Chang, and S.-J. Lee (2000), Substrate Interactions on Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene Isomers (BTEX) by Indigenous Soil Microorganisms, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **22**, 375-383.
- Oh, K.-H. and J.-C. Kim (1996), Removal of BTX by Immobilized Microorganisms on Granular Activated Carbon in Fixed-film Column Reactor, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **18**, 489-497.
- Mckay, D. and E. Y. Shiu (1981), Critical Review of Henry's Constants for Chemicals of Environmental Interest, *J. Phys. Chem. Ref. data*, **10**, 1175-1199.
- Yeom, S.-H., J.-H. Lee, and Y. J. Yoo (1998), Cometabolic Removal of Xylene Isomers by *Alcaligenes xylosoxidans*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 222-228.
- Lee, S., J. Lee, and D. Jahng (1998), Degradation of BTEX and Trichloroethylene by *Pseudomonas putida* F1 and *Burkholderia cepacia* G4, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 561-568.
- Chang, M.-K., T. C. Voice, and C. S. Criddle (1993), Kinetics of Competitive Inhibition and Cometabolism in the Biodegradation of Benzene, Toluene, and p-Xylene by Two *Pseudomonas* Isolates, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 1057-1065.