

토양생물반응기내 Toluene의 분해 특성

김철경

목원대학교 화학 및 응용화학부

Biodegradation Characteristics of Toluene in a Soil-Bioreactor

Chul Kyung Kim

School of Chemistry and Applied Chemistry, Mokwon University

요 약

석유탄화수소의 분해능이 확인된 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767을 이용하여 혐기 상태에서 톨루엔 분해의 최적조건을 찾기 위해서 회분식으로 pH, 회전속도, 온도를 변수로 하여 실험하였고, 토양 생물반응기에서는 연속식으로 톨루엔을 분해하는 최적의 순환유속을 찾고자 실험하였다.

온도 15°C, 초기 pH 7의 회분식 실험에서 rpm에 따른 톨루엔 분해는 45시간이 경과한 후에 120rpm의 경우 잔여농도 37.4 ppm으로 62.6%의 분해율, 180 rpm의 경우 잔여농도 13.0 ppm으로 83% 분해율, 60 rpm의 경우는 불검출로 60 rpm에서 가장 좋은 결과를 보였으며, 회전속도 120rpm, 초기 pH 7에서 실시한 회분식 실험에서 톨루엔 분해는 45시간 경과후 15°C에서는 잔여농도 37.4 ppm을 보였으나, 30°C에서는 검출이 되지 않아 대부분의 분해된 것으로 나타났다. 온도 30°C, 초기 pH 7의 조건에서 탱크 내 균체량은 35 mL/min에서 0.19g/L를 보여 최고의 성장을 보였으며, 톨루엔은 9시간이후 검출되지 않았다. 혐기상태에서 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767를 이용하여 톨루엔을 분해하는데 회분식실험과 연속식 토양생물반응기에서의 최적조건은, 회분식의 경우 60 rpm과 온도 30°C인 것으로 나타났으며, 연속식 토양 생물반응기의 경우 55 mL/min, 80 mL/min, 85 mL/min중 가장 낮은 유속인 55 mL/min 에서 결과가 좋았다.

ABSTRACT : To investigate the optimal conditions for biodegradation of toluene by *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 in a batch soil-bioreactor, the effects of rpm change from 60 to 180, and temperature change from 15°C to 30°C in a batch culture and the flow rate change from 55 mL/min to 85 mL/min in soil-bioreactor on the biodegradation of toluene were studied. In a batch culture the optimal operating conditons were 60 rpm, and 30°C at initial pH 7, In a soil-bioreactor the optimal flow rate was 55 mL/min in the flow rate of circulation. The lower flow rate of circulation may help to biodegrade toluene adsorped in soil and dissolved in underground water.

1. 서 론

생물학적 복원 기술에 대상이 되는 오염 물질의 주요한 성분으로는 석유탄화수소성분인 BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene)[1]과 그 밖에 다양한 PAH(polyaromatic hydrocarbon), TCE(trichloroethylene)[2], PCB(polychlorinated biphenyl), PCP(pentachlorophenol)과 같은 성분들이 주종을 이루며, 생체 내에 암, 두통, 시각장애 등을 가져올 수 있는 인체 위해성이 있으며, 생물성장에도 치명적인 악영향을 준다. 이러한 성분들은 유독함과 동시에 난분해성 물질들로서 기존 미생물에 의한 자연분해가 힘들기 때문에 분해 조건을 개선하려는 연구대상이 되고 있다.

토양 내에 존재하는 톨루엔은 토양자체의 오염 뿐만 아니라 유출될 경우 지하수오염, 생활용수 및 농업용수의 오염을 초래하며, 중추신경의 기능저하 [3]를 가져 올 수 있는 것으로 알려져 있고, 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene과 반응하여 피부암을 유발시키는[4] 물질로 알려져 있는 독성물질이다. EPA는 화학물질로 오염된 지역 근처 지표수의 28%, 지하수의 54%가 톨루엔으로 오염된 것을 발표한 바 있다.[5] 톨루엔은 배합비율에 따라 차이가 있으나 5-7% (wt/wt)[6,7] 가량이 휘발유 제품에 포함되어 있으며, 20°C에서 물에 515 mg/L의 용해도를 가지고 있다. 토양 중에 톨루엔이 유출되는 경우 처리하는 방법으로 혐기상태에서의 생물학적인 분해를 연구하였다. 균주는 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767을 사용하였으며 회분식 발효반응기 실험을 통해서 온도, rpm의 변화에 따른 최적 균체 성장조건과 톨루엔 분해능을 확인하였고, 이들 최적조건을 참고하여 토양 생물 반응기 내부를 순환하는 유속변화 조건에서 균의 성장과 톨루엔의 분해능을 연구함으로써 앞으로의 토양 및 지하수의 생물학적 복원공정 개발에 필요한 기초자료를 얻는 것이 연구의 목적이다.

2. 실험

사용된 균주는 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767이다. 배지는 증류수 1 L에 Beef Extract 3.0 g, Peptone 5.0 g을 용해시켜서 제조하였다. 토양반응기

실험에 앞서 사용 균체의 톨루엔 분해성능을 확인하고, 이로 인한 균체의 성장과 톨루엔의 분해정도를 측정하기 위해서 온도와 rpm의 영향 실험을 하였다. 1 L 플라스크에 500 mL의 배지를 넣고 혐기 상태를 위해서 질소가스를 충분히 내부에 투입하였다. 고온 증기멸균기(121°C, 1.2 atm)에서 20분간 멸균시킨 후 30°C에서 24시간동안 Shaking Incubator에서 성장시킨 균체를 5 mL(0.055 g) 접종하고, 100 ppm 해당하는 톨루엔을 투입하였다.

사용된 토양생물반응기는 높이 500 mm, 외부지름 150 mm의 아크릴로 제작하였으며, 유체의 순환도중 토양의 유실을 방지하기 위해서 바닥에 ASTM 50 mesh의 철망을 설치하였다. 실험에 사용된 토양은 성균관대학교 제 1 공학관 인근 토양 층에서 수집하였고, 실험의 용이함과 일반적인 자료를 얻고자 ASTM 12 mesh(1.680 mm)와 ASTM 50 mesh(0.297 mm)사이의 일정한 크기의 토양을 사용하였다. 온도는 자동조절기가 연결되어 있는 열선을 사용하여 유지하였으며, 실내온도가 저온인 계절에는 이중관을 장치한 반응기를 제작하여 항온조에 연결시켜 펌프로 물을 순환시켜 일정온도를 유지했다. 배지의 조성 과 투입 전의 균체의 배양방법은 회분식 실험과 동일하며, 토양은 반응기에 투입하기 전에 oven에서 30분간 60°C에서 멸균하여 사용하였다. 플라스크에서 일정시간 배양한 균주를 저장탱크에 넣고, 혐기 상태를 만들기 위해서는 질소를 투입하였다. 이후에 100ppm의 톨루엔을 토양에 투입하여 인위적으로 오염시켰다. 저장탱크에서 표본 채취하여 톨루엔의 농도와 균체의 농도 및 pH를 측정하였다.

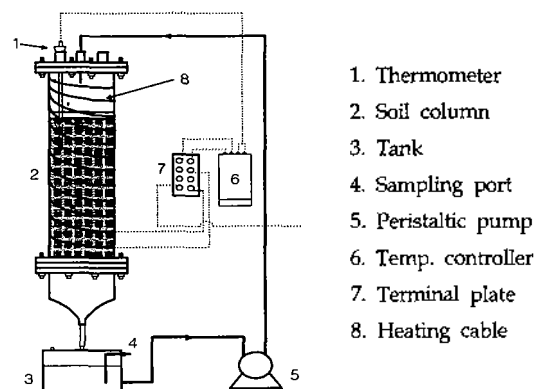


Fig. 1. Schematic diagram of a soil-bioreactor

균주의 농도는 UV spectrophotometer(Duksan OPTIZEN)로 640 nm에서 흡광도값을 측정하여 표준 검량선을 작성한 후 환산하였다. 건조 균체중량은 배양액을 증류수로 희석하여 105℃에서 24시간 후에 측정하였다. 톨루엔의 농도는 GC(HP 6890)를 사용하여 표준 검량선을 작성하여 농도로 환산하였다. 표본으로 채취된 시료의 0.5 mL를 Eppendorf Tube(1.5 ml)에 채취한 후, 여기에 Dichlorobenzene 0.5 mL를 투입하여 Voltex로 1분간 혼합시킨 후에 5분 정도 안정시켜 층분리를 시켰다. 이중 하부의 o-dichlorobenzene (비중 1.31)과 용해된 톨루엔을 0.5 mL를 채취한 뒤에 수분의 제거를 위해 이 용액에 0.5 g의 CaCl₂를 첨가하였다. 1분간 voltex로 혼합한 후 8000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후에 액상의 4 μL를 GC로 분석하였다.

3. 결과 및 토론

회분식 실험은 Incubator내의 온도 15 °C, 초기 pH 7, 초기 톨루엔 농도 100 ppm 에서 균체의 성장과 톨루엔의 분해 및 pH의 변화를 알아보기 위하여 60 rpm, 120 rpm, 180 rpm로 회전속도를 변화시켜 각각 실험하였다. 실험에 사용한 반응조는 1 L 용량이며, 준비한 액체배지에 질소를 투입하여 혐기 상태를 만들었고 고온 멸균 시켰다. 24시간동안 균체를 성장시켜 5 mL 액체배지에 투입하여 실험에 사용하였다. 예비실험에서 균체의 성장이 40시간 이후에는 급격히 감소하는 경향을 보였기 때문에 실험시간은 45시간으로 정하였다.

15°C, 초기 pH가 7인 경우 10시간 경과 후 각각 60 rpm에서 0.09 g/L, 120 rpm에서 0.15 g/L, 180 rpm에서 0.04 g/L로 120 rpm > 60 rpm > 180 rpm 순으로 균체 성장이 좋았으나, 20시간 이후에는 각각 60 rpm에서 0.22 g/L, 120 rpm에서 0.72 g/L, 180 rpm에서 0.32 g/L을 보여 120 rpm > 180 rpm > 60 rpm 순으로 바뀌었다. 이는 15시간 이전에는 180 rpm의 경우에 균체가 적응기를 거치는 중 성장이 뒤졌다가 15시간 이후에 본격적인 성장이 이루어진 것으로 판단한다. 45시간 경과 후 최종적으로 120 rpm의 경우 0.86 g/L로 균체 성장이 가장 좋았으며,

180 rpm의 경우는 0.74 g/L, 60 rpm의 경우 0.38 g/L의 성장을 각각 보였다. 각각의 회전속도 변화에 의한 톨루엔 분해정도는 10시간 경과 후 60 rpm의 경우에 56.5 ppm으로 43.5%의 분해율을 보였으며, 120 rpm의 경우 65.3 ppm으로 34.7%의 분해율을 보였고, 180 rpm일 때 45.7 ppm으로 54.3%를 분해하여 가장 좋은 분해율을 보였다. 20시간 경과후에는 60 rpm일 때 39.2 ppm으로 60.8%의 분해율을 보여 최고를 나타냈으며, 120 rpm의 경우 59.2ppm으로 40.8%의 분해율을 나타냈고, 180 rpm일때는 47.3 ppm으로 43.7%의 분해율을 보였다. 45시간이 경과한 후에는 120 rpm의 경우 37.4 ppm으로 62.6%의 분해율을 나타내서 가장 낮은 분해율을 보였으며, 180 rpm의 경우 13.0 ppm으로 83%이었지만, 60 rpm의 경우는 GC로 검출이 되지 않아 가장 좋은 분해율을 보였다. 저속에서 접촉체류시간의 증가로 일정시간 이후부터는 분해대사과정이 활발히 진행된 것으로 추정된다.

초기 10시간까지 톨루엔은 급속한 분해능을 보였으나, 균체의 성장은 급속히 증가하지 않는 것은 초기 검출되지 않는 톨루엔은 물에 용해되거나 일정량 공기 중에 증발 또는 초기 분해한 탄소원을 균체가 자신의 몸체를 구성하는 성분으로 사용하는 Diauxie Growth를 하는 것으로 추정된다.

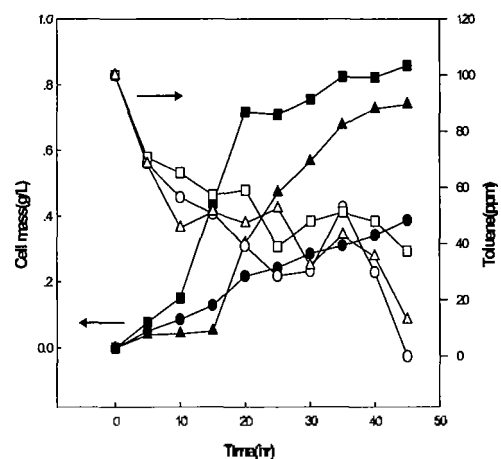


Fig. 2. Variations of cell mass and toluene at 15°C and initial pH 7.

(cell mass : ● 60rpm, ■ 120rpm, ▲ 180rpm, toluene : ○ 60rpm, □ 120rpm, △ 180rpm)

균체의 성장과 톨루엔의 분해 과정중 배지내의 pH의 변화는 변동폭은 크지 않았으며, 45시간이 지난 후에 60 rpm에서 pH 6.90으로, 180 rpm에서는 pH 6.82 그리고, 120 rpm에서는 6.79를 각각 보였다. 초기 pH가 7.0이었음을 고려해 볼 때 전체적으로 실험중 pH가 0.1~0.2 정도만 낮아짐을 알 수 있었고, 균체의 성장 진행시 톨루엔 분해에 의한 수소이온 방출 등의 pH 변화 관련 화학적 진행은 미약하여 기질에 의한 pH 변동을 고려한 제어과정이 큰 의미가 없다고 판단한다.

균체의 성장과 톨루엔의 분해에 온도가 어떠한 영향을 주며, 톨루엔으로 오염된 현장을 처리할 때 온도의 영향과의 관계가 중요한 바, 균체가 가장 잘 성장했던 초기 pH 7과 120 rpm의 조건을 고정하고 국내의 기온을 고려하여 온도를 15°C와 30°C를 실험 조건으로 정하여 비교 실험하였다.

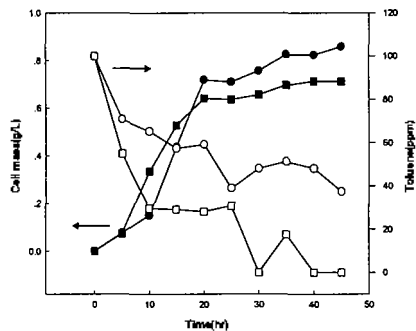


Fig. 3. Variations of cell mass and toluene at 120rpm and initial pH 7.
(cell mass : ● 15°C, ■ 30°C, toluene : ○ 15°C, □ 30°C)

균체의 성장은 10시간 일 때 균체 농도가 15°C에서 0.15 g/L, 30°C일 때 0.34 g/L 이었으며, 15시간까지는 15°C의 경우는 0.43 g/L, 30°C의 경우는 0.53 g/L까지 성장하여 30°C에서 성장이 좋았으나 20시간 이후부터는 15°C의 경우 0.72 g/L, 30°C의 경우 0.64 g/L로 15°C인 경우가 성장이 좋아지는 결과를 얻었다. 초기에 낮은 온도에 적응을 하지 못하던 균체가 시간이 지나면서 온도에 더 잘 적응한 것으로 생각된다. 120 rpm, 초기 pH는 7일 때 10시간 경과후에 15°C에서는 톨루엔의 잔여농도가 65.3 ppm으로 34.7%만이 분해되었는데 30°C에서는 톨루

엔의 잔여농도가 29.7 ppm으로 70.3%가 분해되었다. 45시간이 지난 후에 15°C에서 잔여 톨루엔은 37.4 ppm을 보였으나, 30°C에서는 검출이 되지 않아 대부분의 톨루엔이 분해된 것으로 판단한다.

회분식 실험에서 얻은 성장 최적 조건 30°C와 초기 pH 7로 고정하고 토양생물반응기에서 순환유속을 55 ml/min, 80 ml/min, 85 ml/min로 변화시킬 때 균체의 성장과 톨루엔의 분해를 측정하기 위하여 실험하였다. 안지름 150 mm, 높이 300 mm인 토양 column을 통과할 때, 균체의 대부분은 성장하면서 토양에 흡착하게 되고, 일부는 토양을 통과하여 탱크로 유입되어 탱크 내에서 성장을 하게 되므로 탱크에서 측정된 균체의 농도는 실제 토양 내에서 톨루엔 분해를 수행하는 균체의 농도는 아니라고 할 수 있다. 하지만, 토양에 부착되어있는 균체의 양을 측정할 만한 방법이 없어 토양에 흡착된 균체의 농도가 증가할수록 탱크 내 균체 농도 또한 증가하는 것으로 보고 탱크내의 균체를 측정하여 균체의 일반적 농도로 간주하였다.

균체의 성장은 15시간을 기점으로 55 ml/min과 85 ml/min의 경우 하강곡선을 보였는데 이는 성장이 줄고 토양에 흡착하는 양이 많아 탱크내 균체농도가 감소하는 것으로 보인다. 15시간까지 55 ml/min, 80 ml/min, 85 ml/min에선 각각 0.15 g/L, 0.06 g/L, 0.10 g/L의 성장을 나타냈다.

톨루엔 분해량은 32시간 지난 시점에서 55 mL/min, 80 mL/min, 85 mL/min은 각각 8.0 ppm, 9.3 ppm, 8.1 ppm의 톨루엔 농도를 보여서 각각 92%, 90.7%, 91.9%의 분해율을 보여 주었다. 55 mL/min, 80 mL/min, 85 mL/min 실험에서는 저속인 55 mL/min에서는 가장 좋은 성능을 보였다. 유속이 느린 경우와 일정한 속도 이상을 유지하는 것이 토양에 흡착된 균체와 유체에 포함된 톨루엔의 접촉을 용이하게 함으로 톨루엔 분해가 우수한 것으로 생각된다. 균체와 오염물의 접촉면적을 늘리는 방법과 기질 저해 농도 산출, 최적의 균체 성장을 위한 초기 세포 농도 등 균주의 성능을 향상시키는 방법 등이 향후 연구되고 또한 생물반응기내의 토양층 내의 균체 흡착성과 분해능과의 관계도 최적화시키면 현재의 성능보다 향상된 분해능을 보일 것으로 기대된다.

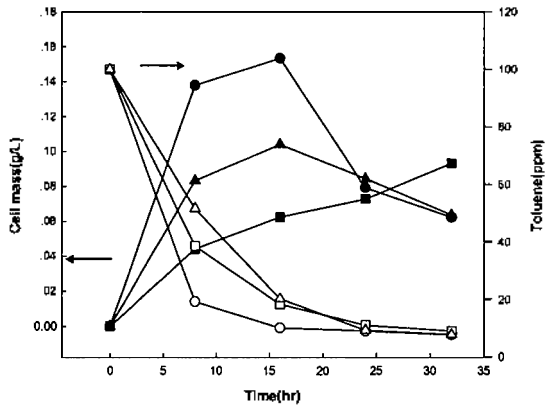


Fig. 4. Variation of cell mass and toluene at 30°C and initial pH 7 (Soil bioreactor).
(cell mass : ● 55 mL/min, ■ 80 mL/min, ▲ 85 mL/min, toluene : ○ 55 mL/min, □ 80 mL/min, △85mL/min)

4. 결 론

혐기상태에서 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767를 이용하여 톨루엔 분해 특성을 실험한 결과 회분식 실험의 경우 60 rpm인 경우와 반응온도가 30°C인 경우가 최적조건으로 확인되었으며 실험중 pH는 0.1~0.2 정도의 변화만 보였는바, *Pseudomonas fluorescens*의 대사 진행시 수소이온농도의 변화가 거의 없는 것으로 판단된다.

연속식 토양 생물반응기의 경우는 55mL/min, 80 mL/min, 85 mL/min중 저속에서 접촉 체류시간이 큰 경우가 분해능을 우수하게 발휘할 수 있는 바, 가장 낮은 유속인 55 mL/min 에서 분해 대사과정이 활발히 진행되어 가장 좋은 분해율을 보였다.

참 고 문 헌

1. Zeyer, J., Kuhn, E. P. and Schwarzenbach, R. P. : Rapid Microbial Mineralization of Toluene and 1, 3-Dimethylbenzene in the Absence of Molecular Oxygen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, pp. 944-947(1986)
2. Wilson, J. T. and Wilson, B. H. : Biotransformation of Trichloroethylene in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, pp.242-243(1985)
3. U.S. Public Health Service : Toxicological profile for toluene. publication ATSDR/TP-89/23, Agency for toxic substances and disease registry, U.S. Public Health Service, Atlanta.(1989)
4. Dean, B. J., Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols, *Mutat. Res.*, 47, pp.75-97 (1978)
5. Hutchins, S. R., Sewell, G. W., Kovacs, D. A. and Smith, G. A. : Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions, *Environ. Sci. Technol.*, 25, pp.68-76(1991)
6. Cookson, J. T. : Bioremediation Engineering, Design and Application, McGraw-Hill, pp.19-20 (1995).
7. Evans, P. J., Mang, D. T., Kim, K. S. and Young, L. Y. : Anaerobic Degradation of Toluene by a Denitrifying Bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, pp.1139-1145(1991)