

Rhodococcus sp. EH831에 의한 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 호기성 생분해에 미치는 에탄올의 영향

이승하 · 이은희 · 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Effect of Ethanol on Aerobic Biodegradation of Benzene, Toluene, and Ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. EH831. Lee, Seung-Ha, Eun-Hee Lee, and Kyung-Suk Cho*. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea – The usage of ethanol (EtOH)-blended gasoline (gasohol), has been increasing in recent years. EtOH has influence on the distribution and biodegradation of aromatic compounds such as BTEX (benzene (B), toluene (T), ethylbenzene (B), and xylene (X)) that are gasoline compositions. In this study, the effect of EtOH on the aerobic biodegradation of B, T and E was investigated using a BTEX and EtOH-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. EH831. The degradation rates of B in the conditions of 1:1, 1:4, and 1:0.25 mixtures with EtOH (B:EtOH, mol:mol) were ranged from 3.82 ± 0.20 to $5.00 \pm 0.37 \mu\text{mol} \cdot \text{g-dry cell wight (DCW)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. The degradation rate of T was the fastest in the 1:0.25 mixture ($6.63 \pm 0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), and it was the lowest in the 1:4 mixture ($4.41 \pm 0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). The degradation rates of E were increased with increasing the addition amount of EtOH: The degradation rate of E was the highest in the 1:4 mixture ($1.60 \pm 0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), and the rates were 1.42 ± 0.06 , 1.30 ± 0.01 , and $1.01 \pm 0.30 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in the 1:1, 1:0.25, 1.0 mixtures, respectively. In conclusion, the biodegradation of B, T, E by *Rhodococcus* sp. EH831 was not significantly inhibited by the co-existence of EtOH.

Key words: Gasohol, benzene, toluene, ethylbenzene, ethanol, aerobic biodegradation

에탄올은 연소효율을 높이고 일산화탄소 및 탄화수소가스 와 같은 연소가스 발생량을 저감 시키기 위한 연료산화제로 사용되어 왔다. 최근 들어 고유가의 영향으로 대체에너지로서 에탄올의 중요성이 증대됨에 따라 기존의 가솔린에 에탄올을 혼합하여 연료로 사용하는 gasohol의 사용량이 점점 증가되어 가고 있다[11]. 브라질에서는 절반이상의 가솔린에 22% (v/v)의 에탄올을 첨가하도록 하였고, 미국의 많은 주들도 10%의 에탄올을 가솔린에 첨가하고 있다[15]. 미국에서는 향후 가솔린에 85% (v/v) 이상의 알코올 첨가한 연료를 대체 에너지로 고려하고 있다[8].

향후 고농도로 에탄올이 첨가된 가솔린의 사용량이 증가됨에 따라, 이들의 저장탱크 혹은 운송과정에서의 누출로 인한 토양이나 지하수의 오염문제가 발생할 수 있다. 토양 및 지하수에서의 gasohol의 거동은 기존의 가솔린 거동과 상당히 다른데 에탄올의 공존은 토양 및 지하수에서의 BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene)의 확산과 분포에 영향을 미친다. 예를들면, 에탄올은 물에 대한 용해도가 높고, 가솔린 내에서 BTEX보다 높은 농도로 존재하기 때문에 에탄올이 첨가된 가솔린은 BTEX의 용해성과 이동

성을 증가시킬 수 있다[14]. 실제로 Corseuil 등과 Niven 등의 연구에 따르면 에탄올은 BTEX의 용해도를 30%에서 210% (v/v)로 증가시켰다[2, 10].

한편, 에탄올 공존은 BTEX 생분해에 영향을 미치는데, Schneider 등의 연구에 따르면 24%의 에탄올이 포함된 가솔린으로 오염된 지하수의 미생물계를 조사한 결과, 지하수에 에탄올이 존재함으로써 다른 유기화합물보다 먼저 미생물들이 에탄올을 분해하여 다른 오염물질의 생분해를 저해하는 것 같지만, 에탄올을 이용하여 미생물이 성장하여 미생물 농도가 증가하여 장기적으로는 벤젠과 같은 유기화합물의 생분해를 촉진시킬 수도 있다[12]. 반면, 호기적 조건에서 에탄올은 토양이나 지하수 내에서 BTEX 화합물보다 더 빠르게 분해되는데[3], Lovanh 등은 호기성 조건에서 에탄올이 BTEX의 생분해를 방해한다고 보고하였고[9], Hunt 등의 연구에서도 aquifer microcosm에서 20 mg/L의 낮은 에탄올 농도가 호기적 벤젠 분해를 저해한다고 보고하였다[6]. 혐기적 대수층 미생물계에서는 다른 전자수용조건에서 에탄올을 먼저 분해함으로써 톨루엔의 분해를 방해하였다. Chen 등의 연구에서 BTEX의 혐기성 생분해가 에탄올이 존재하는 조건에서 저해 받는 결과를 얻었지만[1], Da Silva 등은 에탄올이 BTEX의 혐기성 생분해능을 향상시켰다고 보고하였다[5].

Gasohol 혹은 bio-fuel로서 에탄올 사용은 점점 증가하고

*Corresponding author
Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

있기 때문에 BTEX의 생태계내에서의 이동과 생분해에 미치는 에탄올의 영향에 대해 더 많은 정보 축적이 필요하다. 이러한 정보는 gasohol로 오염된 토양 및 지하수의 생물학적 복원에 있어 매우 유용하게 활용될 수 있기 때문이다. 따라서, 본 연구에서는 호기적 조건에서 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠을 분해할 수 있는 *Rhodococcus* sp. EH831 균주를 대상으로 이들의 생분해에 미치는 에탄올의 영향을 규명하고자 한다.

벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 호기적 생분해에 미치는 에탄올의 영향 규명을 위해 *Rhodococcus* sp. EH831 균주를 접종원으로 사용하였다[7]. 벤젠 생분해에 미치는 에탄올 영향을 조사하는 실험을 위해 EH831 균주는 다음과 같이 벤젠을 유일 탄소원과 에너지원으로 첨가한 무기염배지 (Bushnell-Hass, BH, 배지)에서 배양하였다. 1.2 L-혈청병에 BH 배지를 50 mL 주입하고 EH831 균주를 접종한 후, 부틸마개로 밀폐하였다. 벤젠 10 µL를 실린지를 이용하여 주입 한 후(혈청병 중 벤젠 총량으로 112.5 µmol에 해당) 30°C, 180 rpm에서 7일 동안 배양하였다. 이렇게 해서 얻은 EH831 배양액을 원심분리하여 (8,900×g) 에서 균체만을 회수 하여 멸균수로 2번 세척하였다. 세척된 EH831 균주에 새 BH 배지를 20 mL 첨가하여 현탁한 후, 이 균주 현탁액 20 mL을 600 mL-혈청병에 주입하였다. 혈청병을 부틸마개로 밀폐한 후, 벤젠과 에탄올을 실린지를 이용하여 주입하였는데, 주입농도는 Table 1과 같다. 벤젠과 에탄올 첨가 후 혈청병을 30°C, 180 rpm에서 배양하면서 주기적으로 혈청병 상부의 벤젠 농도를 가스크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

톨루엔 및 에틸벤젠 호기적 생분해에 미치는 영향 규명 실험도 상기의 벤젠과 동일하게 진행하였는데, EH831 균주 전배양에서 톨루엔 혹은 에틸벤젠을 각각 10 µL 주입하였고 (혈청병 중 톨루엔 및 에틸벤젠의 총량은 각각 94.1 및 81.7 µmol 임), 본 실험에서 톨루엔-에탄올 혹은 에틸벤젠-에탄올 주입 농도는 Table 1과 같다. 모든 실험은 2반복으로 수행되었으며, 균주를 접종하지 않는 조건을 대조군으로 하였다.

벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 농도 분석을 위해 headspace 가스를 gas tight syringe를 이용하여 시간별로 0.3 mL씩 채취하였고, 채취된 가스를 불꽃 이온화 검출기가(Flame ionization detector) 장착된 가스크로마토그래피(Gas chromatography,

Agilent 6850N, USA)로 분석하였다. 분석 컬럼은 DB-wax(30 m×0.32 mm×0.25 µm, J&V Scientific column, USA)이었고, 분석 온도는 오븐이 100°C, 주입부와 검출부가 230°C이었다. 모든 측정은 3반복으로 수행하였다.

에탄올이 첨가된 조건하에서 EH831 균주의 건조균체중량당(dry cell weight, DCW) 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 생분해속도를 비교하기 위해, 각각의 실험 종료시 혈청병에서 배양액 1 mL을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Agilent 8453, USA). 배양액의 흡광도값은 다음의 식에 의해 DCW값으로 환산하였다: $g\text{-DCW} \cdot L^{-1} = 0.39 \times OD_{600nm}$ ($r^2=0.98$).

Rhodococcus sp. EH831에 의한 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 호기적 생분해에 미치는 에탄올의 영향을 조사한 결과를 Figs. 1~3에 도시하였다. 에탄올 첨가량의 차이가 있음에도 불구하고 EH831 균주의 벤젠 분해속도($3.82 \pm 0.20 \sim 5.00 \pm 0.37 \mu\text{mol} \cdot g\text{-DCW}^{-1} \cdot h^{-1}$)는 유사하였다(Fig. 1). 이러한 결

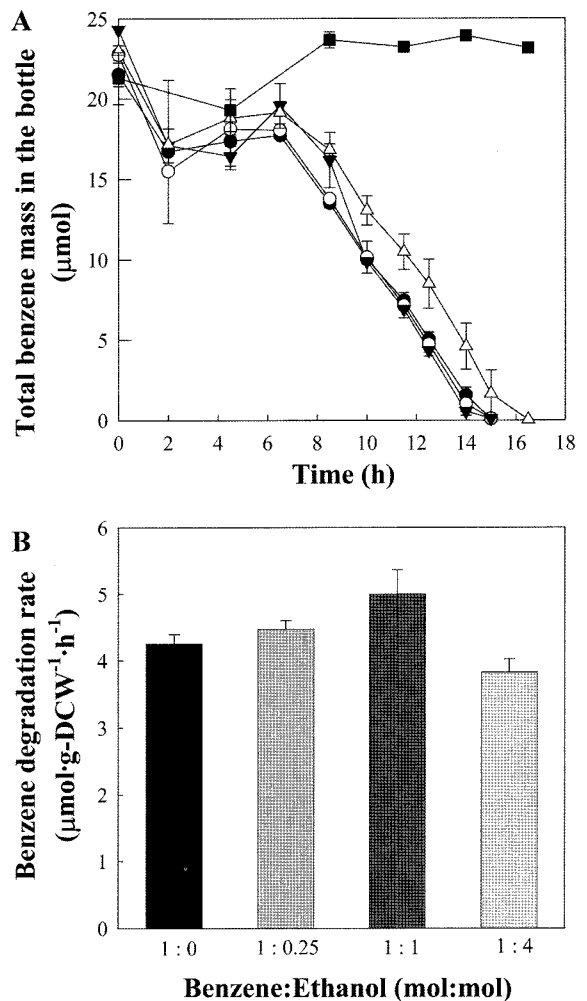


Fig. 1. Ethanol effect on benzene degradation. A. Benzene degradation patterns; B. Benzene degradation rates. Benzene: ethanol ratio (mol:mol): ●, 1:0; ○, 1:0.25; ▼, 1:1; ▽, 1:4; ■, Control (without inoculation of *Rhodococcus* sp. EH831).

과는 벤젠의 호기성 생분해에 미치는 에탄올의 영향은 그리 크지 않음을 알 수 있었다.

톨루엔의 경우, 톨루엔만 주입한 조건에서 EH831 균주는 지연기 없이 톨루엔을 분해하였지만, 에탄올이 존재하는 조건에서는 1시간 정도의 지연기가 관찰되었다(Fig. 2A). 이는 EH831균주가 톨루엔을 분해하기 전에 톨루엔보다 분해가 용이한 에탄올을 먼저 분해하기 때문인 것으로 사료된다. 톨루엔 분해 속도를 비교해보면(Fig. 2B), 톨루엔과 에탄올을 1:0.25 비율로 첨가하였을 때 $6.63 \pm 0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 가장 분해속도가 빠르고, 1:4의 조건이 $4.41 \pm 0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 가장 느렸다(Fig. 2B). 이것으로 보아 1:4 조건과 같은 다량의 에탄올 존재는 톨루엔 분해를 약간 저해하지만, 1:0.25의 조건과 같이 미량의 에탄올은 톨루엔 생분해를 다소 촉진하는 것으로 보인다.

에틸벤젠의 경우, 에탄올이 있는 조건에서 에틸벤젠은 더 빠른 속도로 분해되었으며, 에탄올 첨가 비율이 높을수록 분

해속도도 증가하였다(Fig. 3). 즉, 에틸벤젠과 에탄올이 1:4의 비로 첨가한 경우 에틸벤젠의 분해속도는 $1.60 \pm 0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 가장 높았고 1:1, 1:0.25, 1:0의 조건에서의 에틸벤젠의 분해속도는 각각 1.42 ± 0.06 , 1.30 ± 0.01 및 $1.01 \pm 0.30 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이었다(Fig. 3).

벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 분해속도에 미치는 에탄올 공존의 영향을 상대적으로 비교하기 위해, Strauss 등이 제안한 substrate interaction index을 계산하여 Fig. 4에 나타내었다[13]. 벤젠과 톨루엔의 경우, 에탄올이 동일 mole 비율 이하로 공존하면 이들의 호기적 생분해 활성은 약간 증가(20% 내외)하였고, 에탄올 첨가 비율이 높은 경우에는(4배) 벤젠과 톨루엔 생분해 활성이 약간 감소(20% 이하) 하였다. 이는 에탄올의 공존의 벤젠과 톨루엔 생분해 속도에 크게 영향을 주지 않는 것을 의미한다. 그러나, 에틸벤젠의 생분해 속도는 에탄올 첨가량에 비례하여 증가하였다.

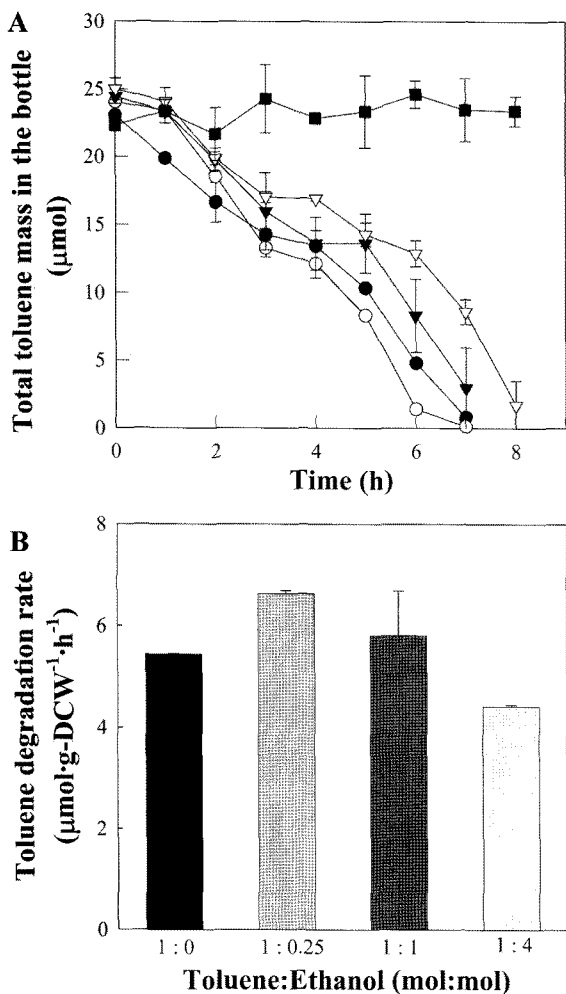


Fig. 2. Ethanol effect on toluene degradation. A. Toluene degradation patterns; B. Toluene degradation rates. Toluene:ethanol ratio (mol:mol): ●, 1:0; ○, 1:0.25; ▼, 1:1; ▽, 1:4; ■, Control (without inoculation of *Rhodococcus* sp. EH831).

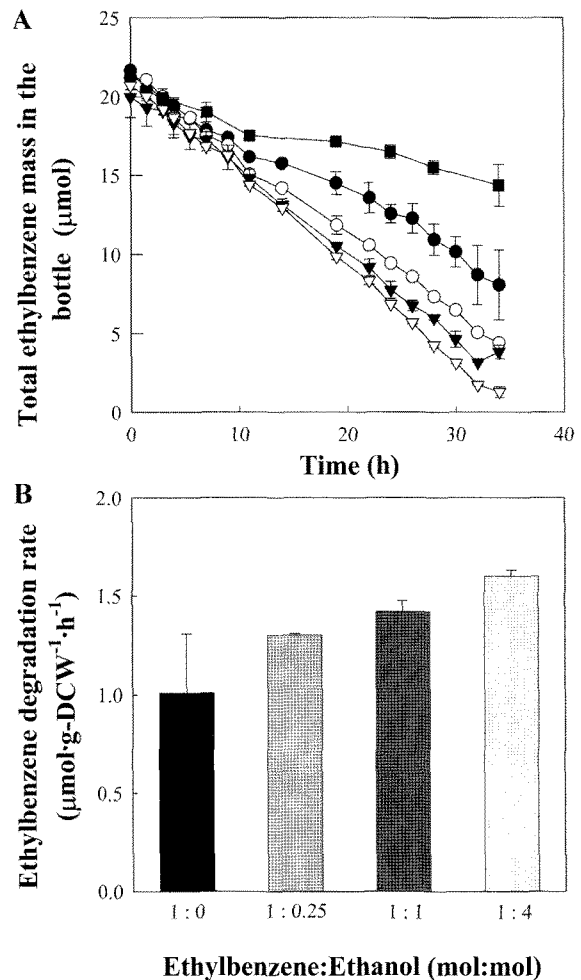


Fig. 3. Ethanol effect on ethylbenzene degradation. A. Ethylbenzene degradation patterns; B. Ethylbenzene degradation rates. Ethylbenzene:ethanol ratio (mol:mol): ●, 1:0; ○, 1:0.25; ▼, 1:1; ▽, 1:4; ■, Control (without inoculation of *Rhodococcus* sp. EH831).

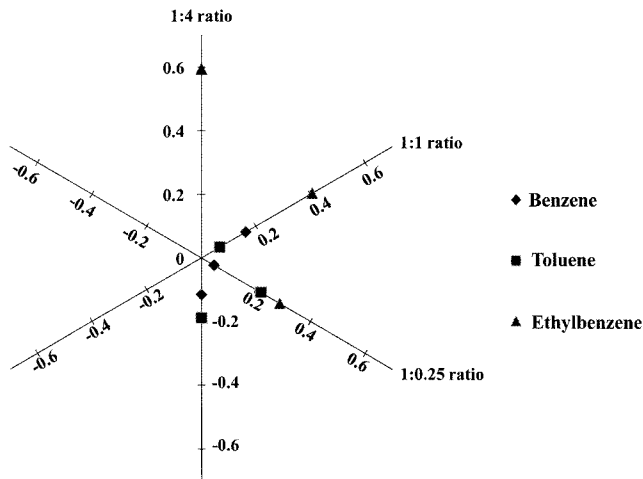


Fig. 4. Substrate interaction indices between benzene (toluene or ethylbenzene) and ethanol.

일반적으로 미생물은 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠 등과 같은 방향족 화합물 보다는 에탄올이 더 쉽게 이용한다고 알려져 있다[2]. Corseuil 등의 연구에서도 미생물이 에탄올을 먼저 이용한다고 하였고[3], Lovanh 등에 따르면 BTEX 분해 효소는 BTEX 보다 분해가 쉬운 물질이 고농도로 공존하게 되면 억제된다고 하였다[9]. Lovanh 등과 Da Silva 등의 연구에 따르면 고농도 에탄올 공존 조건에서는 산소 부족 문제로 벤젠 분해가 저해를 받는다고 하였다[4, 9]. 본 연구에서는 에탄올이 벤젠보다 4배(mole 비율) 이상 공존하더라도 벤젠 생분해 속도는 크게 저해를 받지 않았다. 벤젠과 유사하게 톨루엔의 경우도 고농도로 에탄올이 공존하는 경우(톨루엔보다 4배 이상)에도 톨루엔 생분해 속도는 18.9% 정도밖에 감소되지 않았다. 또한, 에틸벤젠의 경우에는 고농도 에탄올 공존에 의해 에틸벤젠의 생분해 속도가 증가하였다. 본 연구에서 사용한 *Rhodococcus* sp. EH831 균주는 유일 탄소원 및 에너지원으로 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠 뿐만 아니라 에탄올도 이용 가능한 균주이다. 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠은 방향족 화합물이나 에탄올은 알코올계 화합물이므로 이들 생분해에 관여하는 효소가 상이할 것으로 사료된다. 즉, 이들 방향족 화합물과 에탄올이 혼합된 조건 하에서 서로 다른 효소에 의해 이들 물질의 생분해가 일어나므로, *Rhodococcus* sp. EH831에 의한 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠의 호기적 생분해 속도는 에탄올 공존에 의해 크게 저해를 받지 않은 것으로 추측된다. 그런데, 이러한 본 연구 결과는 일반적으로 호기적 및 혐기적 조건에서 에탄올이 BTEX 분해를 저해한다고 알려진 결과와 상이하다[1, 3, 5, 6, 9]. EH831 균주의 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠 생분해 활성이 에탄올 공존에 크게 영향을 받지 않는 기작을 밝히기 위해서는 효소적인 측면의 자세한 연구가 필요하다. 또한, 실제 현장에서는 벤젠, 톨루엔 및 에틸벤젠이 혼합하여 존재하므로 이들 혼합물의 호기적 생분해에 대한 에탄올의 영향을 규명

하는 것도 필요하다.

앞으로 gasohol의 사용량 증가로 인해 gasohol로 오염된 토양 및 지하수의 정화기술이 필요한 것을 고려하면, 본 연구에서 사용한 *Rhodococcus* sp. EH831은 에탄올의 영향 없이 BTEX와 같은 방향족 오염물질을 효율적으로 분해하므로 오염된 토양 및 지하수 정화기술에 활용 가능한 매우 유용한 균주로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단 지정 국가지정연구실사업(No. R0A-2008-000-20044-0)과 차세대 바이오환경기술 연구센터(AEBRCR11-2003-006-06001-0) 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Chen, Y. D., J. F. Barker, and L. Gui. 2008. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: A microcosm study. *J. Contam. Hydrol.* **96**: 17-31.
- Corseuil, H. X. and P. J. J. Alvarez. 1996. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated ground water in Brazil: effect of ethanol. *Water Sci. Technol.* **34**: 311-318.
- Corseuil, H. X., C. S. Hunt, R. dos Santos Ferreira, and P. J. J. Alvarez. 1998. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Res.* **32**: 2065-2072.
- Da Silva, M. L. B. and P. J. J. Alvarez. 2002. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. *J. Environ. Eng.* **128**: 862-867.
- Da Silva, M. L. B., G. M. L. Ruiz-Auilar, and P. J. J. Alvarez. 2005. Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric or nitrate. *Biodegradation* **16**: 105-114.
- Hunt, C., P. J. J. Alvarez, R. dos Santos Ferreira, and H. Z. Corseuil. 1997. pp. 49-54. Proc., 4th Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, Battelle, Columbus, Ohio.
- Lee, E. H. and K. S. Cho. 2009. Effect of substrate interaction on the degradation of methyl *tert*-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by *Rhodococcus* sp. *J. Hazard. Mater.* **167**: 669-674.
- Lee, K. Y. 2008. Viscosity of high-alcohol content fuel blends with water: Subsurface contaminant transport implications. *J. Hazard. Mater.* **160**: 94-99.
- Lovanh, N., C. S. Hunt, and P. J. J. Alvarez. 2002. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. *Water Res.* **36**: 3739-3746.
- Niven, R. K. 2005. Ethanol in gasoline: environmental

- impacts and sustainability review article. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **9**: 535-555.
11. Scharlemann, J. P. W. and W. F. Laurance. 2008. How green are biofuels? *Science* **319**: 43-44.
 12. Schneider, M. R., H. X. Corseuil, and M. Rosrio. 2005. Weathering of ethanol-blended gasoline in aquifers-a field experiment. pp. 100-106. *In* The International Conference on Environmental Science and Technology, vol 1, National Academy of Science, New Orleans.
 13. Strauss, J. M., K. J. Riedel, and C. A. Du Plessis. 2004. Mesophilic and thermophilic BTEX substrate interactions for a toluene-acclimated biofilter. *App. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 855-861.
 14. Williams, P. R. D., C. A. Cushing, and P. J. Sheehan. 2003. Data available for evaluating the risks and benefits of MTBE and ethanol as alternative fuel oxygenates. *Risk Anal.* **23**: 1085-1115.
 15. Yu, S., J. G. Freitas, A. J. A. Unger, J. F. Barker, and J. Chatzis. 2009. Simulating the evolution of an ethanol and gasoline source zone within the capillary fringe. *J. Contam. Hydrol.* **105**: 1-17.

(Received June 24, 2009/Accepted Aug. 25, 2009)