

《原著》

## 연속흐름반응조에서 바이오필름형태의 탈염소화 미생물에 의한 TCE분해 모니터링

박선화<sup>1</sup> · 한경진<sup>2</sup> · 홍의전<sup>2</sup> · 안홍일<sup>3</sup> · 김남희<sup>3</sup> · 김현구<sup>1</sup> · 김태승<sup>1</sup> · 김 영<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>국립환경과학원

<sup>2</sup>고려대학교 대학원 환경공학과

<sup>3</sup>SK에너지(주) 환경사업개발부

## Monitoring Anaerobic Reductive Dechlorination of TCE by Biofilm-Type Culture in Continuous-Flow System

Sunhwa Park<sup>1</sup> · Kyungjin Han<sup>2</sup> · Uijeon Hong<sup>2</sup> · Hongil Ahn<sup>3</sup> · Namhee Kim<sup>3</sup>  
Hyunkoo Kim<sup>1</sup> · Taeseung Kim<sup>1</sup> · Young Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Environmental Research

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Korea University

<sup>3</sup>SK Energy CO., LTD., Seoul, Korea

### ABSTRACT

A 1.28 L-batch reactor and continuous-flow stirred tank reactor (CFSTR) fed with formate and trichloroethene (TCE) were operated for 120 days and 56 days, respectively, to study the effect of formate as electron donor on anaerobic reductive dechlorination (ARD) of TCE to cis-1,2-dichloroethylene (c-DCE), vinyl chloride (VC), and ethylene (ETH). In batch reactor, injected 60 μmol TCE was completely degraded in the presence of 20% hydrogen gas (H<sub>2</sub>) in less than 8 days by anaerobic dechlorination mixed-culture (300 mg-soluble protein), Evanite Culture with ability to completely degrade tetrachloroethene (PCE) and -TCE to ETH under anaerobic conditions. Once the formate was used as electron donor instead of hydrogen gas in batch or chemostat system, the TCE-dechlorination rate decreased and acetate production rate increased. It indicates that the concentration of hydrogen produced in both systems is possibly more close to threshold for homoacetogenesis process. Soluble protein concentration of Evanite culture during the batch test increased from 300 mg to 688 mg for 120 days. Through the protein monitoring, we confirmed an increase of microbial population during the reactor operation. In CFSTR test, TCE was fed continuously at 9.9 ppm (75.38 μmol/L) and the influent formate feed concentration increased stepwise from 1.3 mmol/L to 14.3 mmol/L. Injected TCE was accumulated at 18 days of HRT, but TCE was completely degraded at 36 days of HRT without accumulation of the injected-TCE during the left of experiment period, getting H<sub>2</sub> from fermentative hydrogen production of injected formate. Although c-DCE was also accumulated for 23 days after beginning of CFSTR operation, it reached steady-state in the presence of excessive formate. We also evaluated microbial dynamic of the culture at different chemical state in the reactor by DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis).

**Key words** : Anaerobic Dechlorination Mixed-Culture, Continuous-Flow Stirred Tank Reactor, Trichloroethylene (TCE), Formate, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)

### 1. 서 론

PCE(perchloroethylene) 혹은 TCE(trichloroethylene) 등과 같은 유기염소계 화합물은 1940년부터 다양한 분야에서

기름 세척의 목적으로 사용되었으며, 이는 산업폐수 및 가정하수 등의 형태로 배출되어 일부 산업부지 아래의 침전층에서는 1,000 ppm 이상이 검출되기도 한다(Phelps 외, 1990, Russell 외, 1998). 특히, 이러한 물질들은 토양 및

\*Corresponding author : kimyo@korea.ac.kr

원고접수일 : 2012. 7. 14 심사일 : 2012. 9. 4 게재승인일 : 2012. 10. 22

질의 및 토의 : 2012. 12. 31 까지

지하수층의 공극에 머물며 불연속적인 잔류상(ganglia)을 형성하기도 하며(Lenhard et al., 1989; Schwillie et al., 1988; USEPA, 1990), 저투수층 상부에서는 많은 양이 축적되어 오염원 pool을 형성하기도 하는 등 그 분포가 복잡하며 불균질하다(Dekker et al., 2000; Saenton et al., 2002). 또한, 공극이나 저투수층에 머물면서 매우 천천히 용해되기 때문에 장기적인 지하수 오염원으로 작용하게 된다. 이를 해결하기 위해, 적용가능한 원위치 정화공정은 세정공정(계면활성제부용매), 열처리공정(스팀/전기), 화학적처리(산화/환원) 및 생물학적 처리 등이 있다(US EPA, 2003). 생물학적 복원분야에서 혐기성 탈염소화에 의한 정화방법은 고농도의 TCE를 효율적으로 제거할 수 있다는 장점 때문에 많은 연구가 진행되었다. 특히, PCE 혹은 TCE를 ETH(ethylene)으로 완전 탈염소화가 가능한 *Dehalococcoides spp.* 동정 이후(He et al., 2003b, 2005; Loffler and Edwards, 2006; Sung et al., 2006), *Dehalococcoides spp.*을 포함한 혼합 균주를 이용한 다양한 연구가 진행 되었다(He et al., 2003a; Hendrickson et al., 2002; Major et al., 2002). 혐기성 미생물에 의한 환원적 탈염소화과정은 Table 1에 나타난 바와 같고, 이때 수소는 중요한 전자공여체로 작용한다.

본 연구에서는, 반응에 필요한 수소를 공급하기 위한 유기화합물로서 포름산나트륨을 선정하였다. 대부분 유기화합물의 유기적 발효에 의해 생성된 수소는 TCE 탈염소화 과정에서 소비되는 동시에 H<sup>+</sup>의 형태로 TCE 분해에서 생성되는 Cl<sup>-</sup>와 반응하여 염산을 생성한다. 이때에 발생된 염산은 pH를 낮추고 미생물의 활성 및 성장을 저해한다(Clare et al., 2009). 그러므로 TCE의 효과적이고 지속적인 생물학적 ARD(Anaerobic Reductive Dechlorination, 혐기성 환원적 탈염소화) 공정을 위해서는 염산의 중화가 필요하다. 즉, 가장 적절한 유기화합물은 충분한 용해도와 염산을 중화시킬 수 있는 역할을 할 수 있어야 하는데, 현재까지 연구된 바에 의하면 formate는 아래와 같이 이 두 가지를 해결할 수 있는 화합물이다(McCarty et al., 2007).

[Neutralization of HCl formed through TCE dechlorination process]

|   |
|---|
| <p><b>Formate Fermentation</b><br/> <math>3\text{HCOONa} + 3\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 3\text{NaHCO}_3 + 3\text{H}_2</math></p>                                 |
| <p><b>TCE anaerobic reductive dechlorination</b><br/> <math>\text{CCl}_2 = \text{CHCl} + 3\text{H}_2 \Rightarrow 3\text{HCl} + \text{CH}_2 = \text{CH}_2</math></p> |
| <p><b>Neutralization</b><br/> <math>3\text{NaHCO}_3 + 3\text{HCl} \Rightarrow 3\text{NaCl} + 3\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}</math></p>                          |
| <p><b>Final Reaction</b><br/> <math>\text{CCl}_2 = \text{CHCl} + 3\text{HCOONa} \Rightarrow \text{CH}_2 = \text{CH}_2 + 3\text{NaCl} + 3\text{CO}_2</math></p>      |

**Table 1.** Pathway of complete anaerobic reductive dechlorination of TCE to ETH (McCarty et al., 2007)

- (1)  $\text{CCl}_2 = \text{CCl}_2 + \text{H}_2 = \text{CHCl} = \text{CCl}_2 + \text{HCl}$
- (2)  $\text{CHCl} = \text{CHCl} + \text{H}_2 = \text{CHCl} = \text{CHCl} + \text{HCl}$
- (3)  $\text{CHCl} = \text{CHCl} + \text{H}_2 = \text{CH}_2 = \text{CHCl} + \text{HCl}$
- (4)  $\text{CH}_2 = \text{CHCl} + \text{H}_2 = \text{CH}_2 = \text{CH}_2 + \text{HCl}$
- (5) Overall reaction:  $\text{CH}_2 = \text{CH}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_2 = \text{CH}_2 + 4\text{HCl}$

혐기성 탈염소화 미생물은 일반적인 다른 혐기성 미생물과 유사하게 성장이 비교적 느리고, 산소노출에 매우 민감하다. 따라서, 고농도의 미생물을 지속적안정적으로 성장시키기 위해서는 적절한 유기산 공급을 통해 전자공여체인 수소를 공급해주고, 미생물 성장을 위한 현장조건을 만들어 주어야 한다. 본 연구에서는, 고농도 혐기성 환원적 탈염소화미생물(*Dehalococcoides spp.* 등) 및 전자공여체를 제공하는 유기산 발효미생물을 포함하는 혼합균주(EV culture)를 보다 안정적으로 성장시키기 위해서 formate 농도 등 연속흐름반응조 조건을 알아보고자 하였다. 동시에, 반응조 운전기간동안 다양한 화학적·생물학적 조건에 따른 EV culture 활성 및 군집변화를 확인하였다.

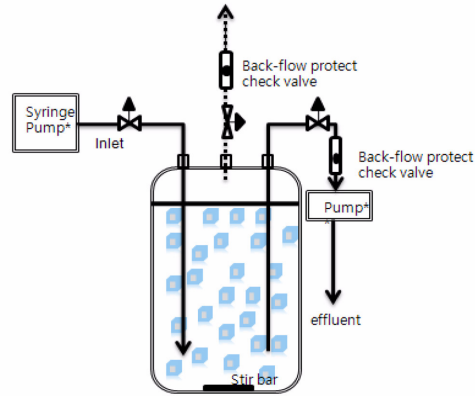
## 2. 실험방법 및 재료

### 2.1. 미생물배양 및 배지제조

본 연구에서는 혐기성 환원적 탈염소화 미생물(i.e. *Dehalococcoides spp.*) 및 유기화합물 발효 미생물을 포함하는 혼합균주인 Evanite Culture(EV culture)를 사용하였다(Hong et al., 2010). 미생물 배양을 위한 배지는 다음과 같이 제조되었다. 탈염소화 미생물 성장을 위한 배지에 0.064 mM의 Na<sub>2</sub>S를 환원제로서 첨가하였고, 배지의 pH를 7~7.5로 유지하기 위해서 300 mg/L의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하였다. 즉, 수소를 전자공여체로 사용할 때 탈염소화 과정에서 생성되는 HCl로부터 pH를 보정하기 위해서 충분한 양의 알칼리성 탄산수소염(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)이 첨가되었다. Modified basal growth배지(Yu et al., 2005)의 필수적인 주요성분들이 혼합된 배지는 150°C에서 15분 동안 고압 멸균된 후 용존산소를 제거하기 위해 혼합가스(20%CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub>)로 1 L당 한 시간 동안 포기하였다. 혐기성조건을 모니터링하기 위해 산화/환원 지표시약인 Resazurin (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA)을 1 L에 0.001 g을 첨가하였다. 주요성분의 혼합과정과 퍼징을 마친 후에 배지가 담긴 시약병은 혐기성 glove box안으로 옮겨졌다. 이때, 남은 미량의 산소를 제거하기 위해 5g의 무수 Na<sub>2</sub>S를 환원제로서 첨가 되었다.



(a)



(b)

**Fig. 1.** Suspended carrier to form biofilm (a) and Schematic diagram of anaerobic continuous-flow stirred reactors containing cell-attached carriers (b).

**2.2. 혐기성 반응조 제작 및 구성**

미생물을 성장시키기 위한 폴리우레탄 재질의 담체(Fig. 1a)는 150°C에서 15분 동안 멸균 시킨 후에 혐기성 glove box안에서 잔류하고 있는 산소를 모두 제거 하였다. 산소가 제거된 담체는 제조된 미생물 배지에 넣은 후 1시간 동안 혼합가스[CO<sub>2</sub> 20%(vol/vol), N<sub>2</sub> 80%(vol/vol)]로 포기하였다. 연속흐름으로 반응조를 작동하기 전에, EV culture는 TCE가 주입되고 유기산 발효에 의해 수소가 공급되는 회분식 반응조에서 2주 동안 Biofilm을 형성하기 위해서 배양되었다. Gas-tight한 chemostat 반응조를 구성하기 위해서 up-church 제품으로 벨브, 튜브, 반응조의 cap부분을 구성하였고(Fig. 1b), syringe pump를 이용하여 TCE 및 유기산 발효에 의한 전자공여체 기질로서 formate를 연속적으로 주입하였다.

**2.3. 유기염소계 용매 (TCE, c-DCE, VC, ETH) 분석**

Chmostat 반응조 및 160 ml 배양병의 head space상에 있는 기체시료를 gas tight 주사기(Hamilton, Reno, Nevada, USA)를 이용하여 가스 시료 100 µL를 채취한 후, FID detector가 장착된 GC-17A(SHIMADZU, Kyoto, Japan)를 이용하여 유기염소계 화합물은 분석되었다. 이때 칼럼은 30 m × 0.53 mm의 GS-Q capillary 칼럼(J&W Scientific, Santa Clara, California, USA)을 사용하였다. 초기 오븐 온도는 160°C이며 220°C까지 30°C/min으로 승온하였다. Split ratio는 1 : 1, inlet 온도는 250°C, detector 온도는 250°C로 설정하였다. Carrier gas는 고순도 질소 가스(99.999%)를 사용하였고, 칼럼 가스 속도는 28.35 mL/min, 선속도 142.4 cm/sec, 압력 108 kPa로 설정하였다. TCE, c-DCE, VC, ETH의 retention time은

3.8, 2.8, 0.9, 0.6분이었다.

**2.4. 수소농도 분석**

160 ml 배양병 및 chemostat 반응조의 head space상에 있는 기체시료는 gas tight 주사기(Hamilton, Reno, Nevada, USA)를 이용하여 채취한 후, 수소 농도는 Thermal conductivity detector(TCD)가 장착된 Gas chromatography(GC, DS6200, Korea)를 사용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 HAYESEp Q 80/100 mesh(3 × 203 mm, Altech, USA)이었으며, carrier gas는 He으로 하였다. 분석 오븐온도는 50°C, 주입부와 검출부 온도는 120°C의 조건으로 수행되었다. 액체상 20 µmol/L 이하의 저농도의 수소는 reduction gas detector(RGD)가 장착된 Trace Analytical TA3000R(Menlo Park, CA)에 25 µl를 주입하여 분석하였다.

**2.5. 유기산(formate, acetate) 분석**

Sodium formate와 sodium acetate를 포함하는 액체 시료는 5%의 인산용액과 1 : 1로 혼합하여 전 처리하였다. 전 처리한 10 µl의 액체시료를 photodiode array detector (PAD, Waters 996)가 장착된 Waters HPLC system(510 HPLC pump, 717 automatic sampler)을 사용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 Microsorb-MV C8(4.6 × 250 mm, Rainin Instrument Company, Inc., USA)이었으며, 이동상은 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 사용하였다. HPLC에 사용되는 모든 용액은 사용 전에 여과하여 사용하였다. 이동상의 흐름은 1 ml/min으로 유지하고 formate와 acetate는 각각 230 nm와 205 nm의 파장에서 분석하였다.

## 2.6. DNA추출

5 ml 시료를 멸균된 원심분리기 튜브로 옮긴후에 4°C, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 원심분리후 조심스럽게 상층액이 제거된 cell pellet은 DNeasy Tissue Kit(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출·분리하였다. 사용설명서에 따라 처음에 용해완충용액(20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/mL lysozyme)에 균을 부유한 후 37°C에서 30분간 반응, Proteinase K를 넣고 70°C에서 30분간 반응을 순차적으로 진행하였다. 에탄올 첨가 후 컬럼을 이용하여 DNA를 정제하였다. 정제한 DNA는 Nanodrop ND-1000 분광광도계(Nanodrop Technologies, Rockland, USA)를 이용하여 DNA농도와 순수도(260/280 ratio)를 확인하였다.

## 2.7. PCR 및 DGGE분석

Genomic DNA를 추출한 후 유전자 증폭기기(MyGenie™ 32 Thermal Block, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 이때 사용한 primer는 Eubacterial 16S rDNA gene primers로 341FGC(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')와 518R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')이다. PCR 조건은 94°C에서 3분간 denaturation시킨 후, 94°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 30초 조건으로 총 30 cycle을 수행한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 eubacterial 16S rDNA gene을 DGGE로 분석하였다. Eubacterial 16S rDNA gene primers에 의해서 증폭된 PCR 생성물을 40~60%의 gradient를 가지는 acrylamide gel에서 분석하였다. 이때, Running buffer로서 1×TAE buffer(40 mM Tris, 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA at pH 8.3)를 사용하였고, PCR시료 loading 후에 60 볼트, 60°C에서 7시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동한 후, Ethidium bromide (0.5 g/mL of 1X TBE)로 15분간 염색한 후, UV illuminator(302 nm)로 밴드 양상을 확인하였으며 밴드의 강도를 비교하여 토양층별 미생물의 종류 및 양을 분석하였다.

## 3. 연구결과 및 토의

### 3.1. 회분식반응조

Fig. 2는 회분식 반응조에 60 μmol의 TCE를 공급한 후 Fig. 3에서와 같이 지속적으로 formate 농도를 증가시키며 주입한 후 TCE, c-DCE, VC, ETH의 총 물질 수

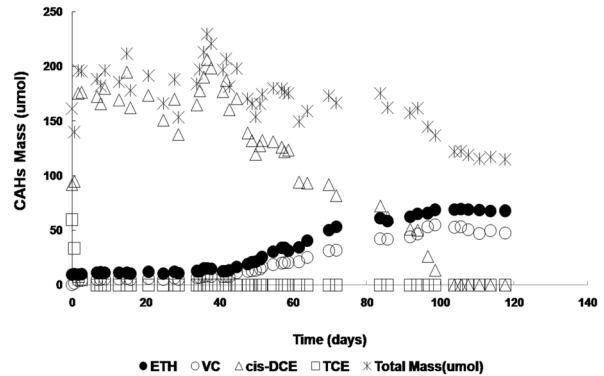


Fig. 2. Transformation of TCE to c-DCE, VC, and ETH in 1.28 L-batch reactor.

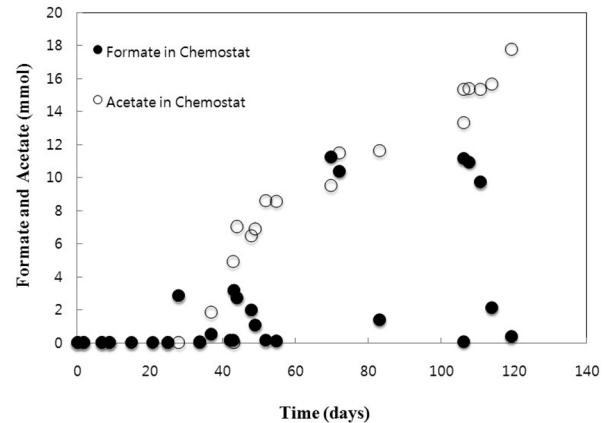


Fig. 3. Monitoring of formate and acetate in 1.28 L-batch reactor.

지(total mass balance)변화를 모니터링한 결과를 보여주고 있다. 실험시작 2일 후 주입된 TCE가 완전 분해되었으나 동시에 c-DCE가 생성되었다. 실험시작 약 28일 후 2 mmol formate를 회분식 반응조에 주입한 결과 c-DCE생성은 급격하게 증가하였지만 여전히 VC와 ETH의 생성은 관찰되지 않았다. 하지만 실험시작 44일 후 10 mmol로 formate농도를 증가시키자 VC 및 ETH이 생성되었으며 c-DCE는 점차 감소하였다. 이후 회분식 반응조 내 formate를 일정한 간격으로 주입함에 따라 VC와 ETH은 지속적으로 생성되었으며 실험시작 100일 후 c-DCE는 완전 분해되었다. 이를 통하여 formate 주입 시 유기산 발효에 의한 전자공여체 공급에 따라 c-DCE가 VC와 ETH으로 완전 분해됨을 확인할 수 있었다. 120일 동안 회분식 반응조의 formate와 acetate 농도는 Fig. 3과 같다. 실험기간동안 지속적 acetate의 농도증가는 homoacetogenesis 균집증가에 따른 영향으로 사료된다.

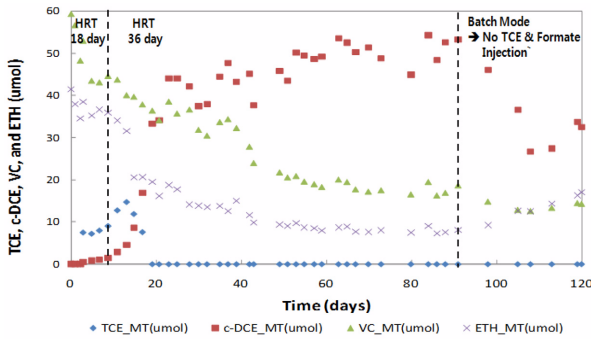


Fig. 4. Transformation of TCE to c-DCE, VC, and ETH in 1.28 L-anaerobic continuous flow stirred reactors containing cell-attached carriers.

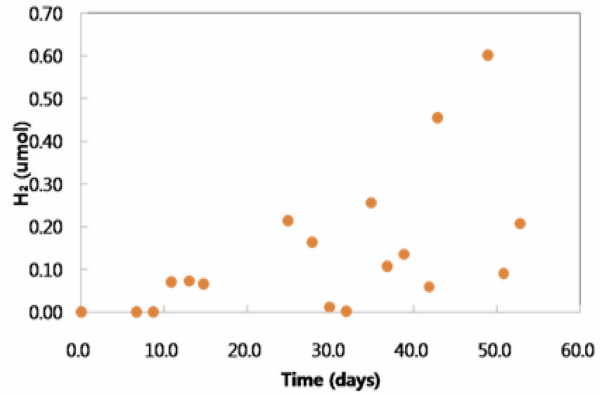


Fig. 6. Monitoring H<sub>2</sub> concentration in 1.28 L-anaerobic continuous flow stirred reactors containing cell-attached carriers.

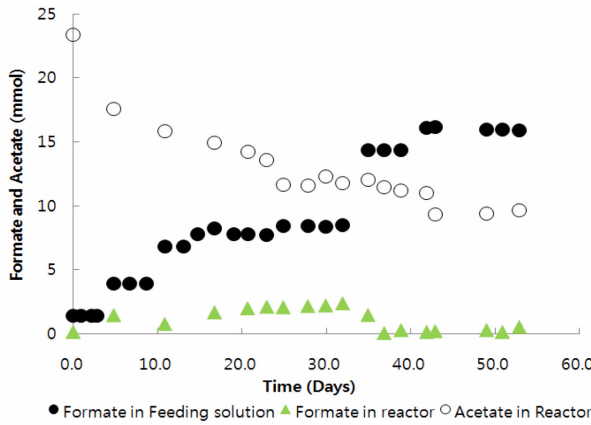


Fig. 5. Monitoring formate and acetate in 1.28 L-anaerobic continuous flow stirred reactors containing cell-attached carriers.

3.2. 연속흐름혼합 반응조 실험

회분식반응조 운전이 완료된 후에, 동일 반응조는 연속 흐름 형태로 운전되었다. 혼합 반응조를 HRT 18 day로 운전하여 총 100 μmol의 염소계 유기화합물(TCE, c-DCE, VC, ETH)을 포함하는 chemostat 반응조에서 formate 주입 농도에 따른 반응조내 유기화합물의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 반응조내 TCE가 ETH로 완전 탈염소화 되지 못하고 c-DCE가 지속적으로 증가하였다. 이는 formate 발효에 의해 공급되는 전지수용체가 부족하기 때문으로 판단하여 실험시작 5일 후 formate 주입량을 3.9 mmol로 증가시켰지만 여전히 TCE 완전 탈염소화가 일어나지 않았다. 이에 따라 10일 후 formate 주입량을 초기 주입량의 5.6배(7.8 mmol)로 증가시켰으며 HRT를 36 day로 증가시켰다. 그 결과 Fig. 4와 같이 반응조 내에 잔류하는 TCE가 완전분해 되었으며 c-DCE의 농도가 급격히 증가하였다. Formate 주입량을 지속적으로 증가시킨 결과 주입되는 TCE는 완전분해 되었으며 연속적으로 주

입되는 formate의 90%가 분해되며 수소 발생량이 증가하기 시작하였다(Fig. 4, 5). 하지만 초기 주입 formate의 6 배를 주입한 30일 이후 c-DCE가 VC 또는 ETH로 분해되는 경향이 느껴지는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 결과는 일정량 이상의 formate를 주입하여도 탈염소화에 사용되는 전지수용체의 양은 한정되어 있으며, 추후 On-Site 공정 운전 시 지하수에 존재하는 TCE 농도에 따른 적절 formate 주입량을 예상할 수 있다. 유기산(formate와 acetate)을 모니터링한 결과, 반응조 운전 초기에는 batch 조건에서 생성된 acetate는 점차 감소하여 약 20일후에는 일정농도를 유지하였다. 즉, 비교적 long-term의 HRT로 셋팅된 연속흐름반응조 조건에서는, acetate의 축적 없이 미생물을 성장시키며 반응조를 운전할 수 있었다. 본 실험결과를 바탕으로 On-Site 반응조 운전인자도출을 위한 기초자료를 확보할 수 있었다.

3.3. 혐기성 미생물농도 및 슬러지 유출량 최적화를 위한 chemostat 반응조 실험

Fig. 4는 완전혼합반응조 형태의 chemostat 반응조에서 HRT를 증가시킨 후 회분식 조건으로 운전형태를 변형시켰을 때 탈염소화율을 관찰한 결과인데, 실험 초기 반응조에 잔류하는 TCE 농도를 고려한다면 지속적으로 주입되는 TCE는 실험시작 8일만에 완전 분해되었으며 HRT를 18일에서 36일로 증가시키기에 따라 c-DCE가 급격히 증가했다. 실험시작 90일 후 TCE와 formate 주입을 중단하고 회분식 형태로 운전형태를 변화시킨 결과 TCE는 완전분해 되었지만 VC가 축적되었다. 즉, 탈염소화 혼합미생물은 반응조의 운전형태에 따라 변화하는 전자공여체인 수소의 농도에 따라 탈염소화반응에 영향을 미칠 수 있는 것을 확인하였다. 그러므로, 탈염소화 미생물을 현장에

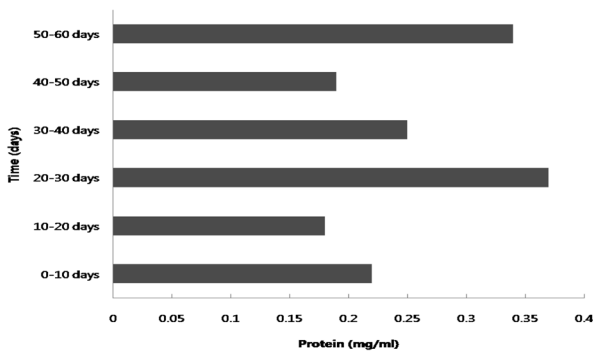


Fig. 7. Protein concentration in 1.28 L-anaerobic continuous flow stirred reactors containing cell-attached carriers.

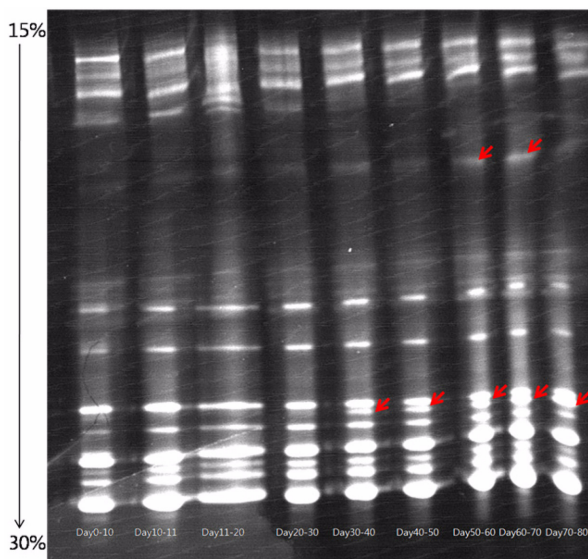


Fig. 8. Microbial community change of mixed-dechlorination culture by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

적용시 효율적인 유기염소계 화합물의 생물학적 정화를 위해 반드시 전자공여체 문턱(threshold) 농도를 고려해야 한다. 본 연구에서는 반응조내 미생물농도 변화를 단백질 농도를 모니터링을 통해 확인하였다. 이를위해, Chemostat 반응조에서 채취한 5 mL 시료를 일정량의 SMART™ Bacterial Protein Extraction Solution과 혼합 후 13,000 rpm에서 5분간 교반시킴으로써 soluble protein을 추출하였다. 추출된 protein을 Nano-drop 흡광계(Nano-drop Technologies, DE, USA)를 이용하여 농도를 측정하였으며, 기간별로 확보된 시료의 protein 농도는 0.2~0.4 mg/mL로 비교적 일정하게 유지됨을 알 수 있다(Fig. 7). 또한 실험기간동안 chemostat 반응조에 존재하는 혐기성 탈염소화 미생물의 양을 protein 농도로 가정하고 TCE 분해율을 계산한 결과 18  $\mu\text{mol}$  TCE/mg protein/day로 나

타났다. 이와 같은 chemostat 반응조 운전 결과를 통해 추후 오염현장에 설치된 on-site biogrowth 반응조에 혐기성 탈염소화 미생물을 식중환 후 일정한 농도 이상의 protein 농도가 유지되며 위에서 언급된 TCE 분해율을 계산함으로써 혐기성 탈염소화의 미생물 농도와 슬러지 유출량을 최적화시킬 수 있을 것으로 판단된다. DGGE 분석 결과, Fig. 8과 같이 반응조 운전기간동안에 미생물 군집변화를 관찰할 수 있었다. 대표적으로 빨간색 점선의 큰 원으로 표시된 DGGE 밴드의 강도가 반응조 운전기간 동안 지속적으로 증가하는 것을 보면 특정 미생물군집의 개체수가 증가했다는 것을 짐작할 수 있다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통하여 확인한 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. Biofilm-type 혐기성 탈염소화혼합미생물을 TCE제거를 위한 연속흐름반응조에 사용할 경우, suspension-type과 비교하여 미생물 유출량이 적고 반응조내에 일정한 농도를 유지하기에 유리하였다.
2. 전자공여체로서 수소대신 formate를 사용할 때, 혼합 미생물에 존재하는 수소발생발효미생물에 의해 유기산인 formate가 발효되어 탈염소화를 위한 수소를 적절히 제공할 수 있었음. 또한, formate는 충분한 용해도와 염산을 중화시킬 수 있는 역할을 하여 pH의 변화가 없었다.
3. 회분식반응조에서는 homoacetogenesis군집증가에 따른 acetate의 축적이 관찰되었으나, 연속흐름반응조에서는 일정한 농도의 acetate를 유지하여 pH변화를 방지할 수 있었다.
4. 혐기성연속흐름반응조를 HRT 36일로 운전하고, TCE 농도의 10배이상의 formate를 지속적으로 주입할때 20 ppm TCE는 완전히 제거되었다.

#### 사 사

본 연구는 환경부에서 주관하고 한국환경산업기술원에서 시행한 토양지하수오염방지기술개발사업 가이아 프로젝트의 지원으로 수행되었습니다(과제번호 173092011).

#### 참 고 문 헌

Dekker, T.J. and Abriola, L.M., 2000, The influence of field-scale heterogeneity on the infiltration and entrapment of dense nonaqueous phase liquids in saturated formation, *J. Contam*

- Hydrol*, **42**, 187-218.
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K.M., and Löffler, F.E., 2005, Isolation and characterization of Dehalococcoides sp strain FL2, a trichloroethene(TCE)-and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe, *Environmental Microbiology*, **7**, 1442-1450.
- He, J.Z., Ritalahti, K.M., Aiello, M.R., and Löffler, F.E., 2003a, Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a Dehalococcoides species, *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 996-1003.
- He, J.Z., Ritalahti, K.M., Yang, K.L., Koenigsberg, S.S., and Löffler, F.E., 2003b, Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium, *Nature*, **424**, 62-65.
- Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., and Ebersole, R.C., 2002, molecular analysis of Dhalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout north America and Europe, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 485-495.
- Hong, U.J., Park, S.H., Lim, J.H., Ahn, H.I., Kim, N.H. Lee, S.W., and Kim, Y., 2010, Effect of oxygen exposure on dechlorination by anaerobic mixed culture and hydrogen-production fermentation, *J. Soil & Groundwater Env.*, **15**(6), 114-121.
- Lenhard, R.J., Parker, J.C., and Kaluarachchi, J.J., 1989, A Model for hysteretic constitutive relations governing multiphase flow, 3. Refinements and numerical simulations, *Water Resources Res*, **25**, 1727-1736.
- Löffler, F.E., and Edwards, E.A., 2006, Harnessing Microbial activities for environmental cleanup, *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 274-284.
- Major, D.W., MaMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E.A., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., and Buonamici, L.W., 2002, Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene, *Environmental Science & Technology*, **36**, 5106-5116.
- Phelps, T.J., J.J. niedzielski, R.M. Schram., S.E. Herbes., D.C. White., 1990, Biodegradation of trichloroethene in continuous-recycle, expanded-bed bioreactors, *Appl., Enviro. Microbiol*, **56**(6), 1702-1709.
- Robinson, C., Barry, D.A., McCarty, P.L., Gerhard, J.I., and Kouznetsova, I., 2009, pH control for enhanced reductive bioremediation of chlorinated solvent source zones, *Science of the Total Environment*, **407**, 4560-4573.
- Russell, H.H. and Sewell, G.W., 1998, Chlorinated ethenes, Anaerobic Bioremediation, In: Handbook of Bioremediation by Robert D., Norris 7.
- Saenton, S., Illangasekare, T.H., Soga, K., and Saba, T.A., 2002, Effects of source zone heterogeneity on surfactant-enhanced NAPL dissolution and resulting remediation end-points, *J. Contam Hydrol*, **59**, 27-44.
- Schwille, F., 1988, Dense Chlorinated Solvents in Porous and Fractured Media, Boca Raton, FL:Lewis Publishers.
- Sung, Y., Ritalahi, K.M., Apkarian, R.P., and Löffler, F.E., 2006, Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring Dehalococcoides isolate, *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1980-1987.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1990, Laboratory Investigation of Residual Liquid Organics from Spills, Leaks, and Disposal of Hazardous Wastes in Groundwater, EPA, 600/6-90/004, Washington DC:U.S, Environmental Protection Agency.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2003, The DvNAPL Remediation Challenge : Is There a Case for Source Depletion, EPA, 68-C-02-092.
- Yu, S., Dolan, M.E., and Semprini, L., 2005, Kinetics and Inhibition of Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethylenes by Two Different Mixed Cultures, *Environmental Science and Technology*, **39**, 195-205.