

# A Batch Study on BTEX and MTBE Biodegradation by Denitrifiers under Aerobic and Anaerobic Conditions

오인석, 이시진, 장순웅

경기대학교 토목환경공학부  
e-mail : inoh2002@hotmail.com

## <요약문>

Leaking underground storage tanks are a major source of groundwater contamination by petroleum hydrocarbons. Aerobic bioremediation has been highly effective in the remediation of many fuel releases. However, Bioremediation of aromatic hydrocarbons in groundwater and sediments is often limited by the inability to provide sufficient oxygen to the contaminated zones due to the low water solubility of oxygen. Nitrate can also serve as an electron acceptor and results in anaerobic biodegradation of organic compounds via the processes of nitrate reduction and denitrification. Because nitrate is less expensive and more soluble than oxygen, it may be more economical to restore fuel-contaminated aquifers using nitrate rather than oxygen. And denitrifying bacteria are commonly found in the subsurface and in association with contaminated aquifer materials. These studies have shown that BTEX and MTBE can be degraded by the nitrate-amended microcosms under aerobic and anaerobic conditions. Biodegradation of the toluene and ethylbenzene compounds occurred very quickly under denitrifying conditions. MTBE, benzene and p-xylene were recalcitrant under denitrifying conditions in this study, But finally Biodegradation was observed for all of the test compounds.

**key word** : BTEX, MTBE, Denitrifying, Electron Acceptor

## 1. 서론

전 세계적으로 유류저장탱크의 부식과 손상으로 인한 누출 또는 자동차 배기가스는 강수에 용해되어 토양 및 지하수의 오염문제가 대두되어 이에 따른 연구가 진행되고 있다. 휘발유의 옥탄가 향상 및 산소함량 촉진제로 사용하는 MTBE(Methyl tert-Butyl Ether)와 석유의 80%이상을 구성하는 BTEX(benzene, toluene, ethylbenzene, o-, m-, p-xylene)는 발암 혹은 잠재적 발암물질로 분류되고 있으며 미국 환경청(EPA)에서는 우선적으로 처리되어야 할 주요 오염물질로 분류하고 있다. 방향족 탄화수소에 의해 오염된 토양의 In-situ 처리방식에 의한 생분해는 전통적인 pump & treatment 처리방식에 비해 경제적이고 더욱 효과적일 수 있다. 얼마 전까지 방향족 화합물의 혐기성 분해는 불가능하다고 생각되었다. 하지만, 최근 연구에서는 산소의 부재로 생분해가 제한될 경우  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$  같

은 전자수용체(EA; Electron Acceptor)가 미생물에 의해 이용되며, Methanogenic Condition에서의 방향족 탄화수소(aromatic compounds) 생분해도 가능성이 보고되고 있다. 특히, 질산염은 토양에 일반적으로 존재하며 산소 다음으로 우세한 전자수용체로써 탈질산화 공정을 통한 유기화합물의 혐기성 생분해 에너지를 공급한다. 그리고 질산염의 높은 용해도(600g/L)와 500mg/L 이하에서 대수층 미생물에 독성을 띄지 않아 미생물에 의한 생분해에 이용이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 하수처리장 반송라인으로부터 얻은 혼합미생물을 사용하여 실험실에서 회분식 실험을 실행하였으며, 산소가 제한되는 유류 오염지역 내에서의 질산염 전자수용체를 이용한 탈질 박테리아의 질산염 이용 평가와 이에 따른, 현장 적용 타당성을 검토하는데 있다.

## 2. 본 문

본 연구에서는 하수종말처리장 폭기조 반송라인에서 슬러지를 취해 톨루엔(toluene)를 탄소원으로 하고 질산염을 에너지원으로 이용하는 균주로 우점화된 혼합미생물(mixed culture)을 배양하였다. 실험에 이용된 모든 초자류는 121 °C, 15분 동안 멸균하였고, 실험 중 광합성 미생물 배양을 방지하기 위해 120mL의 amber serum bottle을 이용하였다. BTEX와 MTBE 분해실험은 120mL amber serum bottle에 배양액 50ml, 그리고 나머지는 공기로 채우고 나서 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 닫았다. 그리고 혐기성 조건을 만족시키기 위해 질소 가스로 headspace를 20분 동안 세정하여 산소를 제거하였다.( $DO \leq 0.5\text{mg/L}$ ) 실험에 접종되는 혼합미생물은 톨루엔 무기화에 기여하는 질산염양을 화학양론적 관계에 따라 계산하여 bottle에 주입한 후, 약 2달간 혐기성 조건에서 25 °C에서 150rpm으로 진탕기에서 배양한 균주를 BTEX와 MTBE 분해율을 측정하기 위한 접종 미생물(microcosms)으로 사용하였다. 또한, 일정기간 마다 톨루엔 분해를 확인하면서 혼합미생물의 OD(optical density)를 측정하여 혼합미생물의 성장을 관찰하여 일정한 세포성장을 보인 미생물을 실험에 사용하였다. 접종미생물의 평균적 OD(550nm)는 0.02 ~ 0.05 범위 이내였다. 배지(media)는 trace element solution 와 vitamin solution을 main reagent에 첨가하여 사용했으며, pH는  $7 \pm 0.2$ 로 조정하였다. 또한  $\text{KNO}_3$ 를 사용하여 질산염의 농도를 조절하였는데, 화학양론에 근거한 이론적 질산염 요구량 보다 과잉으로 농도를 조절하여 실험에 사용하였다. BTEX, MTBE의 분해실험은 배양된 혼합미생물을 접종한 다음 위에서 기술한 배지와 동일 조건에서 실행하였고 각각의 실험조건에 따라 질산염 농도와 용존산소농도를 달리하여 실행하였다. 정확한 분해를 측정하기 위해 동일한 bottle에 미생물의 활동을 방해하는 염화수은( $\text{HgCl}_2$ ) 500mg/L를 넣고 비교실험을 진행하였다.

BTEX와 MTBE 분석은 불꽃이온화검출기(FID)와 HP-5 컬럼이 장착된 gas chromatography (HP58 90 II)를 이용하였다. 100  $\mu\text{l}$  gas-tight syringe(Hamilton)로 50  $\mu\text{l}$ 의 시료를 채취하여 GC에 주입하였다. GC의 운전조건은 오븐, 주입부, 그리고 검출기의 온도는 80 °C, 250 °C, 250 °C 각각 등온으로 분석하였다. MTBE, benzene, toluene, ethylbenzene, p-xylene, TBA의 머무름시간은 각각 4.00, 4.77, 6.40, 9.30, 9.70, 3.81 min 이었다. 또한 일정한 미생물 접종을 위한 미생물성장측정과 질산염 농도 측정은 HACH DR/4000U Spectrophotometer를 이용하여 optical density(OD)를 550nm에서 측정하였다. 그리고 용존산소는 YSI 58 Portable DO Meter를 사용하였다.

## 3. 결 과

실험에서는 탈질산화 조건에서 배양된 미생물을 이용하여 BTEX 구성물질인 benzene, toluene, ethylbenzene, p-xylene와 MTBE가 혼합된 조건에서 분해능을 살펴보았다.

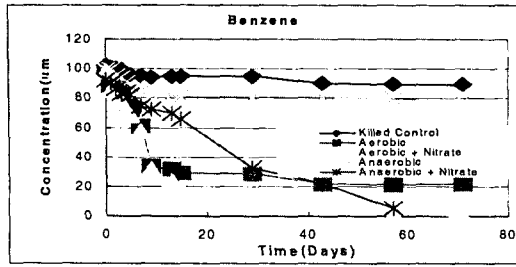


Fig. 1. Biodegradation of benzene by nitrifiers under aerobic, aerobic/nitrate and anaerobic, anaerobic/nitrate conditions.

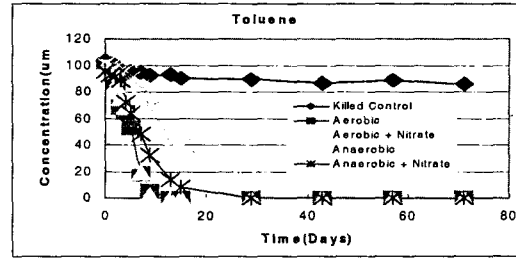


Fig. 2. Biodegradation of toluene by nitrifiers under aerobic, aerobic/nitrate and anaerobic, anaerobic/nitrate conditions.

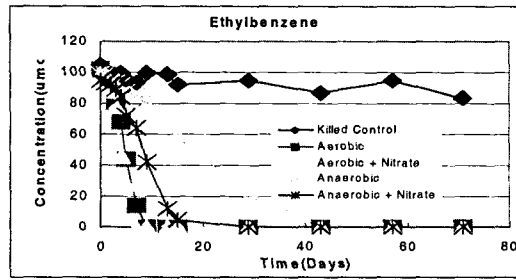


Fig. 3. Biodegradation of ethylbenzene by nitrifiers under aerobic, aerobic/nitrate and anaerobic, anaerobic/nitrate conditions.

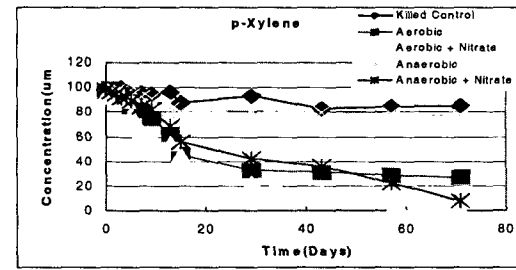


Fig. 4. Biodegradation of p-xylene by nitrifiers under aerobic, aerobic/nitrate and anaerobic, anaerobic/nitrate conditions.

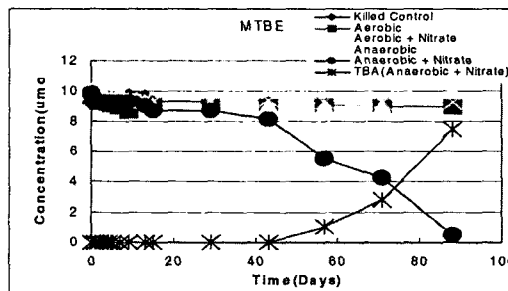


Fig. 5. Biodegradation of MTBE by nitrifiers under aerobic, aerobic/nitrate and anaerobic, anaerobic/nitrate conditions.

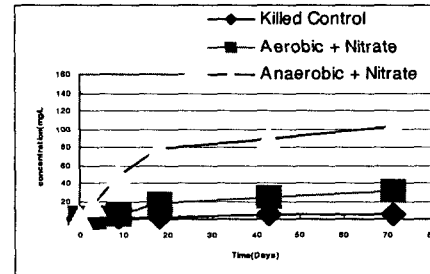
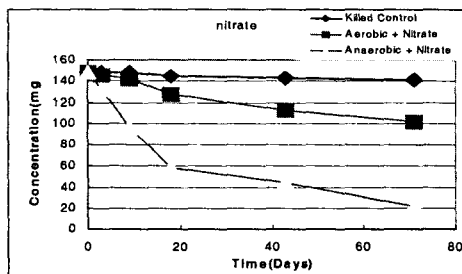


Fig. 6. Effect of nitrate and nitrite on BTEX and MTBE degradation by denitrifiers

각각의 실험은 초기 질산염 농도를 150mg/L로 조정하였고 BTEX의 초기 농도는 bottle내 액상기준으로 100uM, MTBE는 10uM로 조정하였고, 질산염이 첨가되지 않은 호기성(초기 DO 1.6~2.8mg/L),

질산염이 첨가된 호기성(초기 DO 1.6~2.4mg/L), 질산염이 첨가되지 않은 혐기성(초기 DO 0.5mg/L 이하), 질산염이 첨가된 혐기성(초기 DO 0.5mg/L 이하)으로 하여 살펴보았다. 또한 정확한 분해를 측정하기 위한 Control(대조실험)를 두었다. 그 결과는 Fig. 1.~ Fig. 5.과 같은 혼합기질로 분해 특성을 보여준다.

Fig. 1.은 실험기간중의 각 실험조건에 대한 benzene의 농도 변화를 나타낸다. 질산염이 없는 호기성과 혐기성에서의 각각 한정적인 분해와 분해가 이루어지지 못함을 보여준다. Fig. 3.는 실험기간중의 각 실험조건에 대한 ethylbenzene의 농도 변화를 나타낸다. toluene과 ethylbenzene는 모든 조건에서 분해가 일어났다. 특히, 호기성과 질산염을 첨가한 혐기성에서는 지체기 없이 빠르게 분해가 이루어졌다. 또한, 호기성에서는 질산염의 영향을 거의 받지 않지만, 혐기성에서는 질산염의 유무에 따른 분해능 차이가 나타났는데, 이를 통해 질산염에 의해 생분해가 강화됨을 알 수 있었다. Fig. 5.는 실험기간중의 각 실험조건에 대한 MTBE와 부산물인 TBA의 변화를 나타낸다. 질산염이 있는 혐기성 조건을 제외하고는 생변형이 이루어지지 못했다. MTBE의 감소와 TBA의 생성으로 미루어 생변형을 확인하였다. Fig. 6은 질산염이 첨가된 호기성과 혐기성에서의 질산성-질소 농도변화와 질산염이 첨가된 호기성과 혐기성에서의 아질산성-질소 농도변화를 나타낸 것이다. 본 실험에 이용된 미생물의 OD<sub>550</sub>는 초기 0.005에서 0.054로 나타났고, 이때 culture density는 1~3.5mg/bottle 였다. 본 실험을 통해 유류에 의해 오염된 토양의 혐기성 지역에서의 전자수용체로 질산염이 존재한다면, 토착미생물에 의한 분해가 느리지만, 발생될 수 있음을 추정할 수 있었다. 또한 질산염의 유무에 따른 BTEX와 MTBE의 혼합기질의 분해 특성을 살펴볼 수 있었다.

#### 4. 참고문헌

- 1) Joacim Elmen, Wubin Pan, So Yan Leung, Andrew Magyarosy, J. D. Keasling., "Kinetics of Toluene Degradation by a Nitrate-Reducing Bacterium Isolated from a Groundwater Aquifer", *abaiotechnology and Bioengineering*, Vol. 55, No. 1, July 5, 1997
- 2) KEVIN T. FINNERAN AND DEREK R. LOVLEY., "Anaerobic Degradation of Methyl tert-Buthyl Ether(MTBE) and tert-Buthyl Alcohol(TBA), *Environ. Sci. Technol.* 2002, 35, 1785-1790