# Biodegradation of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene isomers) from organic solvent tolerant bacterium, *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106

김종수, 박형철, 조수동*, 김기욱**, 배윤위**, 문자영***, 정영기****, 주우홍**
창원대학교 유전공학연구소, 창원대학교 기초과학연구소*, 창원대학교 생물학과**,
창원대학교 보건생화학과***, 동의대학교 미생물학과****
전화 (055) 279-7443, FAX (055) 279-8212

**Abstract**

Organic solvent tolerance bacteria, *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106 could utilize a high contentration of benzene, toluene, ethylbenzene, xylene isomers (BTEX) as a sole carbon source. It was founded that strain BCNU 106 transformed *o*-xylene to 2-methylbenzyl alcohol, 2-methylbenzoic acid through direct oxygenation of methyl residue on GC-MS analysis.

## 1. 서 론

독성과 발암성을 나타내는 alkylbenzene 화합물들은 석유화학공업단지 주위에 고농도로 오염이 되어 있는 것이 현실이어서 이들 화합물을 분해하는 미생물을 이용한 처리가 시급한 실정이다. 특히 benzene, toluene, ethylbenzene 및 xylene (BTEX)과 같은 유기용매는 호기성 세균에 의해 분해가 된다는 보고가 집중적으로 되고 있는데, xylene 중에서 *m*-xylene과 *p*=xylene의 미생물에 의한 분해에 대해서도 많이 보고되고 있다. 그러나 독성이 강하다고 알려져 있는 *o*-xylene을 분해하는 세균에 대해서는 그리 많이 보고가 되고 있지 않다. 특히 *m*-xylene과 *p*=xylene을 분해하는 세균은 *o*-xylene을 분해하지 못하고, *o*-xylene을 분해하는 세균은 *m*-xylene과 *p*-xylene을 분해하지 못하는 것으로 알려져 있다.

본 연구실에서는 여러 종류의 독성이 강한 유기용매에 대해서 내성을 가지면서 xylene isomer인 *m*-xylene, *p*-xylene 및 *o*-xylene을 모두 분해하는 세균인 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106을 분리하였다. 본 연구에서는 이 분해균의 유기용매 분해의 특성에 대해 보고하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

배지조성

Toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene에 대한 분해능을 관찰하기 위하여 최소배지인 mineral salts (MS) 배지가 사용하였다. MS 배지의 조성은 solution A (136 g/l $KH_2PO_4$, 141.2 g/l $Na_2HPO_4$), solution B (10.0 g/l nitrilotriacetic acid, 14.45 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.33 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 9.25 mg/l $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 99.0 mg/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, metal 44 solution 50.0 ml), metal 44 solution (2.5 g/l EDTA, 1.1 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.55 g/l $MnSO_4 \cdot H_2O$, 5.0 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.39 g/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.25 g/l $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 0.18 g/l $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)이고, solution C (20% ammonium sulfate)로 구성하였다.

BTEX 최적분해조건의 검토

기상과 액상의 비가 9:1이 되도록 유지하기 위하여 밀봉가능한 600 ml serum bottle에 MSB medium 60 ml을 첨가한 후, 각 toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene에 전배양한 균체와 각 화합물을 첨가하여 Teflon-coated rubber stoppers로 밀봉시켜 37℃에서 150 rpm으로 진탕배양하였다. 각 화합물을 배지에 여러가지 농도로 첨가하여 분해되는 정도를 측정하였다.

가스 상에 존재하는 BTEX의 양은 250 $\mu\ell$ gas-tight syringe를 이용하여 headspace에서 150 $\mu\ell$를 취해서 GC에 주입하였다. 시료 중의 양은 CarboWax capillary column으로 흘려 FID 로 검출하였다. 분석조건은 imjector 온도 230℃, detector 온도 250℃이며 oven 온도는 50℃에서 5분간 유지한 후 120℃까지 5℃/min 씩 상승시켰으며 120℃에서 1분간 유지하였다.

중간대사산물의 추정

Toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene의 분해시 생성되는 중간대사산물을 측정하기 위하여 resting cell을 이용하였다. 기상과 액상의 비가 9:1이 되도록 유지하기 위하여 밀봉가능한 600 ml serum bottle에 MSB medium 60 ml을 첨가한 후, 각 toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene에 전배양한 균체(최초 OD 1.0)와 각 화합물(10 mM toluene, 2 mM *o*-, 10 mM *m*-, 10 mM *p*-xylene)을 첨가하여 Teflon-coated rubber stoppers로 밀봉시켜 37℃에서 150 rpm으로 30시간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여 배양여액을 분리한 후, 분액깔대기에서 ethylacetate 추출을 실시하였다. Rotary evaporator로 추출액을 감압농축하여 최종적으로 methanol에 용해시켜 GC-MS를 통해 중간대사산물을 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

BTEX의 분해 최적 조건의 검토

*Pseudomonas savastanoi* BCNU 106은 benzene, toluene, ethylbenzene 뿐만 아니라 , *o*-, *m*-, *p*-xylene 모두를 분해하는 매우 유용한 균주로 확인되었다. 특히 *o*-xylene을 분해하는 균주는 *m*-, *p*-xylene에 대한 분해능을 가지지 못하는 것으로 보고되어 왔으나 본 실험에 사용된 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106은 o-xylene 뿐만 아니라 *m*-, *p*-xylene을 분해할 수 있는 능력을 나타내었다. 또한 Fig. 1 ,2 에서 보는 바와 같이 비교적 높은 농도인 10 mM toluene, 2 mM *o*-xylene, 10 mM *m*-xylene, 10 mM *p*-xylene에서 높은 분해율을 보여주었다. 이러한 결과는 Lee et al (2001) 등이 보고한 분해 농도보다 2-5배 높은 농도의 화합물에서 최적 분해능을 나타내었다. 또한 고농도의 BTEX 폐수에의 적용에서도 내성을 가지면서 분해가 동시에 일어나도록 조작할 수 있는 가능성을 시사해 주었다.

중간대사산물의 검토

*Pseudomonas savastanoi* BCNU 106의 resting cell을 이용하여 *o*-xylene의 중간대사산물을 GC-MS를 통하여 조사하였다. 주로 2-methylbenzyl alcohol, 2-methylbenzoic acid 등이 발견되었다. 이러한 결과는 Lee et al (2001) 등이 보고한 *o*-xylene이 aromatic ring의 direct oxygenation에 의해 2,3-dimethylphenol로 전환되는 경로와는 다른 경로를 거쳐서 분해되어 간다는 것을 보여주었다.

## 4. 요약

*Pseudomonas savastanoi* BCNU 106은 *o*-xylene 뿐만 아니라 *m*-, *p*-xylene을 분해할 수 있는 능력을 나타내었고, 비교적 높은 농도인 10 mM toluene, 2 mM *o*-xylene, 10 mM *m*-xylene, 10 mM *p*-xylene에서 높은 분해율을 보여주었다.

*Pseudomonas savastanoi* BCNU 106의 resting cell을 이용하여 *o*-xylene의 중간대사산물을 GC-MS를 통하여 조사하였다. 주로 2-methylbenzyl alcohol, 2-methylbenzoic acid 등이 발견되었다.

## 5. 참고문헌

1. Lee, S.K., and S.B. Lee." Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium Ralstonia sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene and *o*-xylene" (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. **56**, 270-275.
2. Chen C.I, and R.T. Taylor. "Thermophilic biodegradation of BTEX by two thermus

species." (1995) *Biotechnol. Bioeng.* vol. **48**, 614-624.

3. Chen C.I, and R.T. Taylor. "Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria." (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. **48**, 121-128.

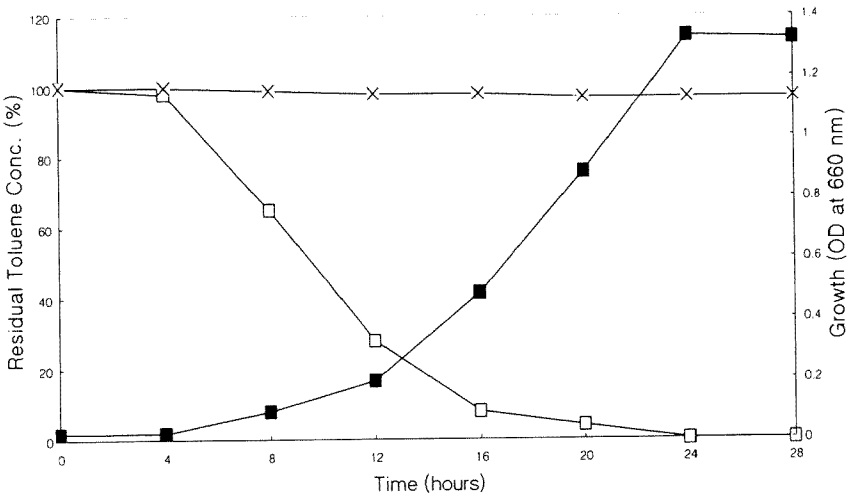


**Fig. 1.** Biodegradation of toluene by *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106. -■-; Growth, -□-; Biodegradation, -×-; culture with no cell.

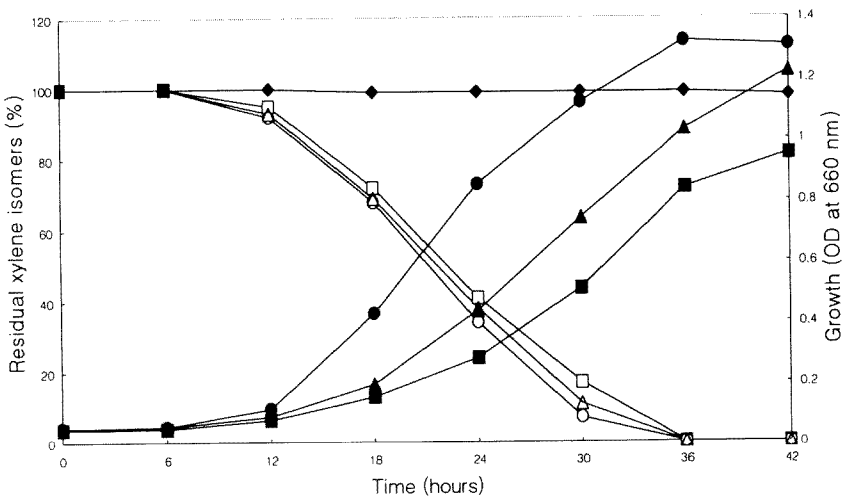


**Fig. 2.** Biodegradation of xylene isomer by *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106. Growth : -■-, *o*-xylene; -●-, *m*-xylene; -▲-, *p*-xylene. Biodegradation : -□-, *o*-xylene; -○-, *m*-xylene; -△-, *p*-xylene. -◆-; culture with no cell.