

Pseudomonas putida KT-3의 Methyl Ethyl Ketone 및 Methyl Isobutyl Ketone 분해 특성

김민주¹ · 이태호¹ · 이경미¹ · 류희욱^{1,2} · 조경숙^{3*}

¹바이오세인트(주) 환경생명공학연구소, ²숭실대학교 환경·화학공학과, ³이화여자대학교 환경학과

Degradation Characteristics of Methyl Ethyl Ketone and Methyl Isobutyl Ketone by *Pseudomonas putida* KT-3. Kim, Min-Joo¹, Tae Ho Lee¹, Kyung Mi Lee¹, Hee Wook Ryu^{1,2} and Kyung-Suk Cho^{3*}.

¹Research Institute of Biological and Environmental Technology, Biosaint Co., Seoul 156-833, Korea,

²Department of Chemical and Environmental Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea,

³Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea –

Methyl ethyl ketone (MEK) and methyl isobutyl ketone (MIBK) have been widely used as solvents in various industries. Biodegradation of MEK and MIBK by *Pseudomonas putida* KT-3, which could utilize MEK or MIBK as a sole carbon source, was characterized, and the cosubstrate interaction in MEK/MIBK mixture was also studied. Within the range of initial MEK concentration (from 0.5 to 5.5 mM), an increased substrate concentration increased the specific degradation rate of MEK by *P. putida* KT-3 (from 3.15 to 10.58 mmol/g DCW · h), but the rate slightly increased at 11.0 mM of initial MEK concentration (11.28 mmol/g DCW · h). The similar degradation rates of MIBK (4.69~4.92 mmol/g DCW · h) were obtained at more than 3.0 mM of initial MIBK concentration. Kinetic analysis on the degradation of MEK/MIBK mixture by *P. putida* KT-3 showed that MEK or MIBK acted as a competitive inhibitor. Maximum degradation rate (V_{max}), saturation constant (K_m) and inhibition constant (K_i) were as follows: $V_{max,MEK}$ =12.94 mmol/g DCW · h; $K_{m,MEK}$ =1.72 mmol/L; $K_{i,MIBK}$ =1.30 mmol/L; $V_{max,MIBK}$ =5.00 mmol/g-DCW · h; $K_{m,MIBK}$ =0.42 mmol/L; $K_{i,MEK}$ =0.77 mmol/L.

Key words: Methyl ethyl ketone, methyl isobutyl ketone, *Pseudomonas putida*, biodegradation, mixture gas, inhibition

대표적인 케톤류 휘발성 유기화합물인 methyl ethyl ketone(MEK)과 methyl isobutyl ketone(MIBK)은 합성수지 페인트, 락커, 바니쉬 및 접착제 등의 용제로 많은 산업시설에서 사용되고 있다[10]. MEK는 무색의 인화성 액체로 acetone과 유사한 냄새가 나는 물질로 냄새 감지 한계는 5.4 ppmv이고[1], MIBK는 불쾌감을 주는 냄새를 지니며 냄새 감지 한계는 0.3~0.7 ppmv이다[1,14]. 이들 물질은 눈, 코, 목의 점막을 자극하는 물질로, 높은 농도의 경우에는 중추신경계 장애 및 마취효과에 의한 사망까지 야기할 수 있다[2, 4, 11, 16]. 눈과 코를 자극하는 MEK의 농도는 약 200 ppmv이고, 300~600 ppmv의 MEK에 노출되는 경우 독성작용이 나타나는 것으로 보고되고 있다[4]. 150~450 ppmv의 MEK가 혼합된 가스에 노출되면 중추신경계와 말초신경계 장애가 발생할 수 있는데, MEK 이외의 다른 유기용제들이 함유되어 있으면 MEK에 의한 독성 작용이 증가된다[4, 11].

눈, 코 및 목의 점막을 자극하는 MIBK 농도는 80~500 ppmv이고, MIBK에 장기간 노출되는 경우에는 무기력, 식욕 부진, 위장 장애 및 중추신경 장애 현상이 나타날 수 있다[5].

MEK와 MIBK와 같은 ketone류 용제를 많이 사용하는 대부분의 사업장은 이들 물질의 배출 저감 대책 및 근로자들의 노출 방지 대책이 매우 미비하여, MEK와 MIBK가 함유된 폐가스로 산업체 내부는 물론 외부 공기가 오염되고 있다. 특히, 비닐 바닥재 제조 공장에서는 고농도의 MEK와 MIBK 혼합가스에 의한 대기 오염 문제 및 악취 민원이 발생하고 있다.

MEK와 MIBK로 오염된 폐가스를 정화하기 위한 경제적이고 효율적인 방법으로 이들 물질을 생분해 가능한 미생물을 활용하는 생물학적 제어기술이 매우 유용하게 활용될 수 있다. 그런데, MEK와 MIBK는 비교적 생분해도가 높은 물질로 알려져 있으나[7], 이들 물질을 생분해할 수 있는 미생물에 관한 연구는 거의 보고되지 않았다. Deshusses 등은 폐수처리장에서 채취한 슬러지나 토양 미생물을 MEK 및 MIBK를 이용하여 농화배양하여 얻은 농화배양액과 Bioton을 각각 점증원과 담체로 활용한 바이오필터에 의한 MEK

*Corresponding author

Tel. 82-2-3277-2393, Fax. 82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

와 MIBK의 혼합가스 제거 특성에 관하여 보고하였다[6]. 그러나, 이는 혼합미생물에 의한 MEK와 MIBK 분해에 관한 것으로 이들 물질을 분해하는 미생물에 관해서는 연구가 진행되지 않았다.

본 연구팀은 MEK 분해용 바이오필터로부터 MEK, MIBK와 같은 ketone 화합물을 효율적으로 분해할 수 있는 균주 *Pseudomonas putida* KT-3를 순수분리 하였다[8]. 본 연구에서는 *P. putida* KT-3 균주에 의한 MEK와 MIBK 혼합가스 분해 특성을 규명하여, MEK와 MIBK 동시 처리를 위한 생물학적 공정 설계를 위한 기초 정보를 도출하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에서 사용된 ketone 분해 균주는 *P. putida* KT-3이며[8], KT-3 균주 배양은 yeast extract를 1 g/L 첨가한 무기염배지를 이용하여 30°C에서 진탕배양(180 rpm)하였다. 무기염 배지의 조성은 KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, MgSO_4 , 0.5 g/L이고 pH는 6.8이다.

MEK 및 MIBK 분해능 조사

KT-3 균주에 의한 MEK 및 MIBK 단독 및 혼합가스 분해 특성은 다음과 같은 방법에 의해 조사되었다. Yeast extract(1 g/L)를 첨가한 무기염 배지가 200 mL 들어있는 500 mL 삼각플라스크에 KT-3 균주를 접종하여 진탕 배양(30°C, 180 rpm)하였다. 지수 증식기까지 성장한 균주 배양액을 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하여 0.1 N phosphate buffer(pH 7)를 이용하여 2회 세정하였다. 세정한 균체를 무기염배지에 600 nm에서의 흡광도값이 0.3 이 되도록 균체현탁액을 준비하였다. 이 균체현탁액 20 mL를 혈청병(총부피: 1,240 mL)에 주입한 후, 혈청병을 부틸고무마개와 알루미늄캡으로 완전 밀폐하였다. MEK 및 MIBK 용액을 syringe를 이용하여 각각 0, 1, 5, 10 및 20 μL 를 단독 혹은 혼합조건으로 혈청병에 주입하였다(총 실험 조건: 25 조건). 혈청병을 30°C에서 진탕배양하면서(180 rpm) 용기의 headspace에서의 가스 시료를 gas tight syringe로 채취하여 MEK 및 MIBK 농도를 분석하였다. 이때 가스 시료에 대한 시간별 채취는 GC상의 검출 한도 내에서 검출이 되지 않을 때까지 수행되었다. Headspace 가스 중의 MEK와 MIBK 농도값과 아래의 식을 이용하여 액상과 기상에 존재하는 MEK와 MIBK의 total mass(M)를 계산하였다[9, 13].

$$M = S_L \cdot V_L + S_G \cdot V_G = S_G \left(\frac{V_L}{H_C} + V_G \right) \quad (1)$$

M : 기질 첨가량(mmol)

V_L : 반응 액상 부피(L)

V_G : 반응 기상 부피(L)

S_L : 액상에서의 기질 농도(mmol/L)

S_G : 기상에서의 기질 농도(mmol/L)

H_c : MEK 및 MIBK Henry 상수[12]

분석방법

MEK와 MIBK 농도는 수소염이온화검출기가 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 6890, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다. DB-WAX(30 m×0.32 mm×0.25 μm , J&W Scientific, USA) 칼럼을 이용하였고, 시료주입부와 검출부 온도는 230°C로 설정하였으며, 오븐 온도는 100°C로 하였다.

결과 및 고찰

MEK 및 MIBK 분해 특성

MEK 및 MIBK 단독 혹은 혼합한 조건에서의 *P. putida* KT-3 균주에 MEK 및 MIBK 분해 특성을 25가지 조건에서 조사하였는데, 그 중 대표적인 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 도시하였다. Fig. 1은 MEK 0.11 mmol에 MIBK를 각각 0, 0.008, 0.04, 0.08, 0.16 mmol 주입한 조건에서 *P. putida* KT-3에 의한 MEK 및 MIBK 분해를 나타낸 결과이다. MIBK가 혼합되지 않은 MEK 단독조건에서는 배양 6시간 이내에 혈청병의 headspace 중의 MEK는 검출되지 않았으나, MIBK 혼합량이 증가할수록 MEK가 완전히 분해될 때까지 소요되는 시간은 점점 증가하였다(Fig. 1a). 또한, 0.11 mmol의 MEK가 혼합되어 있는 조건에서 MIBK는 *P. putida* KT-3에 의해 분해 가능함을 확인하였다(Fig. 1b).

MIBK 0.08 mmol과 MEK를 0, 0.01, 0.06, 0.11, 0.22 mmol을 각각 혼합한 조건에서 KT-3 균주에 의한 MIBK 및 MEK 분해를 Fig. 2에 도시하였다. MEK가 혼합되지 않은 MIBK만 단독으로 주입한 조건에서 *P. putida* KT-3 균주는 0.08 mmol의 MIBK를 8시간 이내에 완전 분해하는 것이 가능하였다(Fig. 2a). 또한, 0.01 및 0.06 mmol MEK를 MIBK와 혼합해서 주입한 경우에는 배양 9시간 정도에 MIBK의 완전 분해가 관찰되어 MEK의 혼합에 의해 MIBK의 분해속도가 약간 감소하였으나, 0.11 mmol 이상의 MEK가 혼합된 경우에는 MIBK 분해속도가 상당히 지연되었다(Fig. 2a). 이 실험의 모든 조건에서 *P. putida* KT-3는 MIBK 뿐만 아니라 MEK도 분해할 수 있었다(Fig. 2b).

P. putida KT-3에 의한 MEK 분해 속도에 미치는 MIBK의 영향을 Fig. 3a에 도시하였다. MIBK가 혼합되어 있지 않은 MEK 단독 기질 조건에서 MEK 첨가량이 0.01에서 0.11 mmol로 증가함에 따라 KT-3 균주에 의한 MEK 분해속도도 3.15에서 10.58 mmol/g DCW·h로 선형적으로 증가하였다. MEK 첨가량이 0.22 mmol인 조건에서는 MEK 분해속도는 11.28 mmol/g DCW·h로, MEK 첨가량이 0.11 mmol인

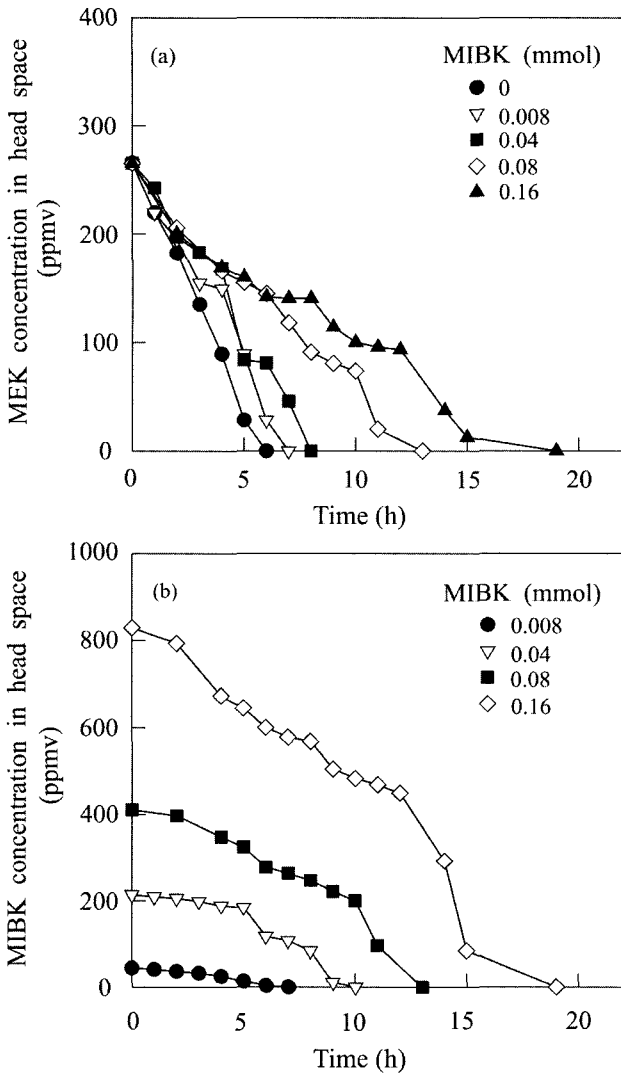


Fig. 1. Time profiles of MEK and MIBK concentrations when different concentrations of MIBK (0~0.16 mmol) were mixed with 0.11 mmol MEK.

경우와 거의 유사한 속도를 얻을 수 있었다.

MEK 첨가량이 0.01~0.22 mmol인 모든 조건에서 MIBK의 첨가량이 증가할수록 MEK 분해속도는 저해를 받았다. 예를들면, 0.11 mmol의 MEK만 첨가된 조건에서의 KT-3 균주에 의한 MEK 분해속도와 비교해보면(10.58 mmol/g DCW·h), MIBK를 0.008, 0.04, 0.08 및 0.16 mmol 혼합한 조건에서 MEK 분해속도는 8.77, 7.56, 4.62, 2.79 mmol/g DCW·h로 감소하였다. 특히, MEK에 MIBK를 0.16 mmol 혼합한 경우 MEK 첨가량별로 MEK 분해속도에 미치는 MIBK의 영향을 비교해 보면, MEK의 첨가량이 적을수록 *P. putida* KT-3 균주의 MEK 분해속도에 미치는 MIBK의 영향이 크게 작용함을 알 수 있었다.

P. putida KT-3에 의한 MIBK 분해 속도에 미치는 MEK의 영향을 Fig. 3b에 도시하였다. MEK가 혼합되어 있지 않

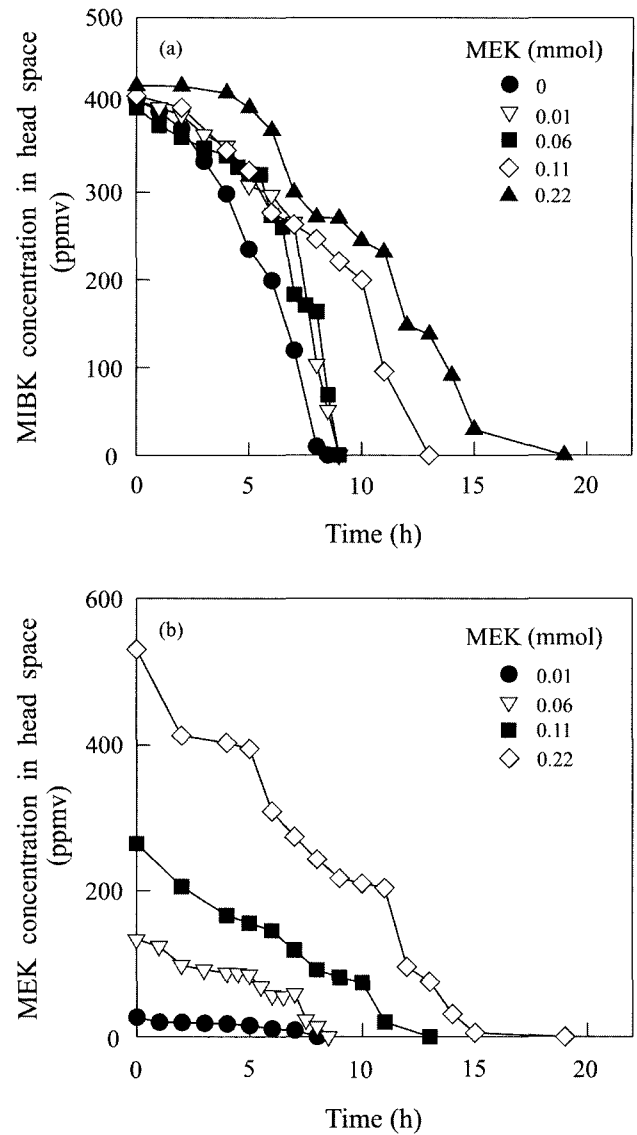


Fig. 2. Time profiles of MIBK and MEK concentration when different concentrations of MEK (0~0.22 mmol) were mixed with 0.08 mmol MIBK.

는 MIBK 단독 기질 조건에서 KT-3 균주에 의한 MIBK 분해속도는 MIBK 첨가량이 0.06 mmol 이하인 조건에서는 MIBK 첨가량이 증가함에 따라 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 MIBK 첨가량에 상관없이 4.69~4.92 mmol/g DCW·h로 거의 일정하였다.

MIBK 첨가량에 상관없이 MEK 혼합 첨가량이 증가할수록 KT-3 균주의 MIBK 분해속도는 감소하였다. 예를들면, MIBK 첨가량이 0.04 mmol인 경우, MIBK 단독 기질 조건에서의 MIBK 분해속도는 4.69 mmol/g DCW·h이었으나, MEK가 0.01, 0.06, 0.11 및 0.22 mmol 혼합 첨가된 조건에서의 MIBK 분해속도는 각각 3.52, 3.06, 1.94, 1.60 mmol/g DCW·h이었다. MEK 첨가량이 0.22 mmol로 높게 혼합되어 있는 경우, MIBK 첨가량별로 MIBK 분해속도를 MIBK

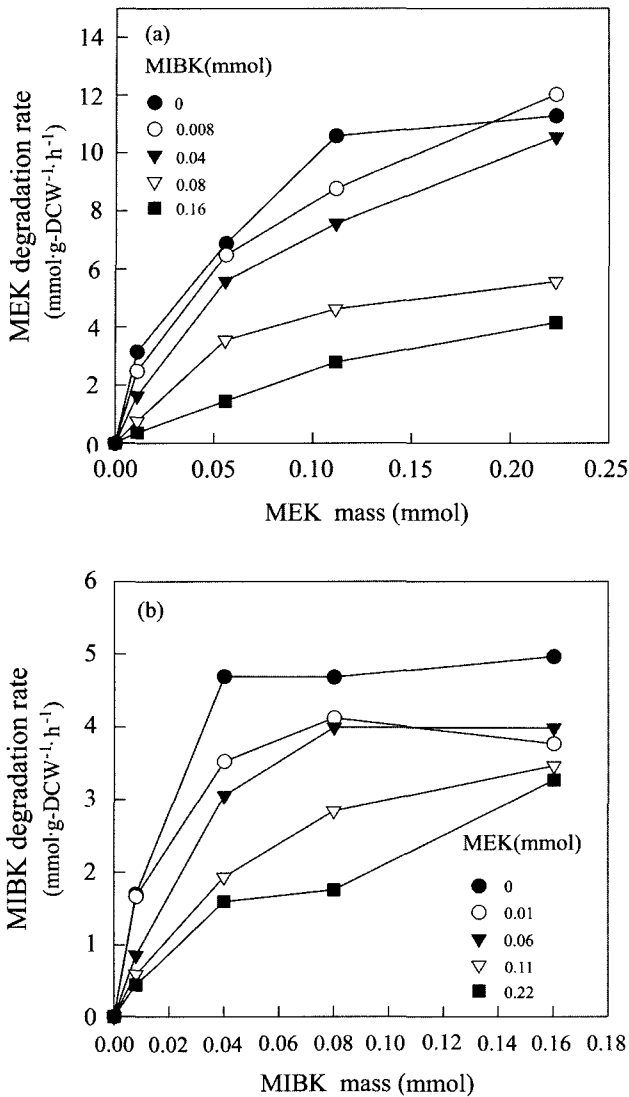


Fig. 3. Effect of MEK/MIBK mixture on the MEK and MIBK degradation rate by *P. putida* KT-3. (a) MIBK effect on MEK degradation rate. (b) MEK effect on MIBK degradation rate.

단독 기질의 분해 속도를 기준으로 비교해보면, MIBK 첨가량이 0.008 mmol로 가장 적은 경우에는 74% 정도 분해속도가 감소하였으나 MIBK 첨가량이 0.16 mmol로 높은 경우에는 분해속도 감소율은 35%에 불과하였다. 즉, MEK에서 조사된 결과와 유사하게, MIBK의 첨가량이 적을수록 *P. putida* KT-3 균주의 MIBK 분해속도는 MEK의 크게 영향을 받음을 알 수 있었다.

MEK 및 MIBK 분해 반응의 속도론적 해석

P. putida KT-3에 의한 MEK 및 MIBK 분해 반응에 있어, 각 물질이 상대 물질의 분해속도에 저해 반응의 특성을 규명하기 위해 속도론적 해석 결과를 Fig. 4에 도시하였다. MEK 분해 속도에 미치는 MIBK의 저해반응(Fig. 4a) 및 MIBK 분해 속도에 미치는 MEK의 저해 반응(Fig. 4b)은 저

해물질의 농도가 높아질수록 겉보기 기질친화도($K_{m,app}$)값이 증가하는 경쟁적 저해 반응을 알 수 있었다. 일반적으로 경쟁적 저해반응은 구조적으로 유사한 기질에서 관찰되며 효소의 활성부위에 기질과 저해물질이 경쟁적으로 결합하기 때문에 발생한다[15]. 따라서, 경쟁적 저해반응에 의한 실제 효과는 $K_{m,app}$ 의 증가와 이로 인한 반응속도의 감소 현상으로 나타나므로, 경쟁적 저해반응은 기질 농도를 높이면 저해현상이 감소하게 된다[15]. Fig. 3에 도시한 바와 같이, MEK 분해 속도에 미치는 MIBK의 저해 영향 혹은 MIBK 분해 속도에 미치는 MEK의 저해 영향이 기질의 첨가량이 적을수록 크게 나타난 결과는 이 두 기질이 상호간에 경쟁적 저해반응을 보임을 입증하는 결과로 사료된다. MEK와 MIBK의 경쟁적 저해반응에서 반응속도식은 다음의 식 (2)로 표시된다[15].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$K_{m,app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \tag{2}$$

여기서, V 는 반응속도(mmol/g DCW·h), V_{max} 는 최대반응속도(mmol/g DCW·h), $[S]$ 는 기질농도(mmol/L), $[I]$ 는 저해물질 농도(mmol/L), K_m 은 포화상수(mmol/L), K_I 는 저해상수(mmol/L)를 의미한다.

MIBK를 첨가하지 않고 MEK만을 첨가한 조건에서 얻은 그래프의 기울기와 y절편의 값으로부터 $V_{max,MEK}$ 및 $K_{m,MEK}$ 를 구한 결과, 각각 12.94 mmol/g DCW·h 및 1.72 mmol/L이었다(Fig. 4a). 또한, 저해물질인 MIBK가 혼합된 조건에서 얻은 그래프의 기울기와 MIBK 농도와의 관계식으로부터 구한 $K_{I,MIBK}$ 는 1.30 mmol/L이었다(Fig. 4a). 동일한 방법으로 MIBK 분해속도에 미치는 MEK의 저해반응을 해석한 결과(Fig. 4b), $V_{max,MIBK}$, $K_{m,MIBK}$, 및 $K_{I,MEK}$ 는 각각 5.00 mmol/g DCW·h 및 0.42 mmol/L, 0.77 mmol/L로 계산되었다.

MEK와 MIBK를 거의 동일한 비율로 혼합한 조건에서 (MEK/MIBK(mol/mol): 0.01/0.008, 0.06/0.04, 0.11/0.08, 0.22/0.16) 두 기질의 총 첨가량(MEK+MIBK)과 MEK 및 MIBK 분해속도를 합한 총 분해속도와의 관계를 Fig. 5에 도시하였다. Fig. 5에서 점선 그래프는 MEK와 MIBK 분해에 있어서 상대 기질의 저해작용이 전혀 없다고 가정하여 MEK 및 MIBK가 단독기질일 때 각각의 기질농도에서 얻은 분해속도를 합한 총 분해속도를 도시한 것이다. 저해반응이 없다고 가정한 경우와 실제 실험에서 얻은 결과 모두 기질 농도와 반응속도와의 관계는 S자형의 효소반응 그래프로 도시되었다. 저해물질의 첨가량이 적은 경우((MEK/MIBK < 0.06/0.04 이하의 조건)에는 저해반응이 없다고 가정한 속도의 약 75~86%의 분해속도를 얻을 수 있었으나, 저해물질의 첨가량이 많은 경우(MEK/MIBK=0.11/0.08 이상의 조건)에

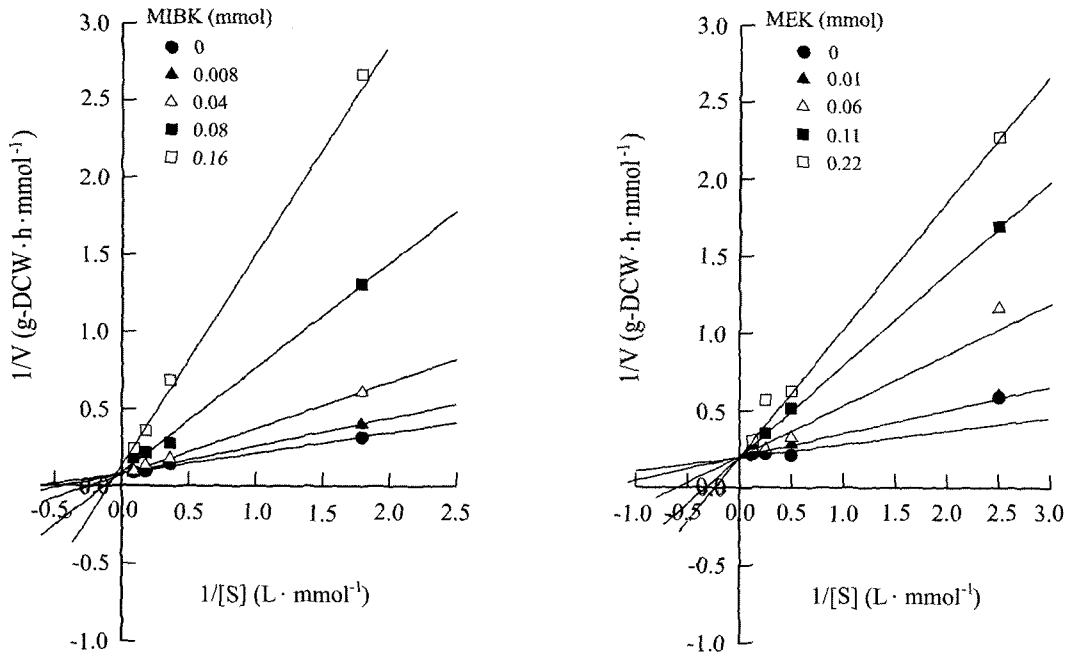


Fig. 4. Kinetic analysis of MEK (a) and MIBK (b) degradation by *P. putida* KT-3.

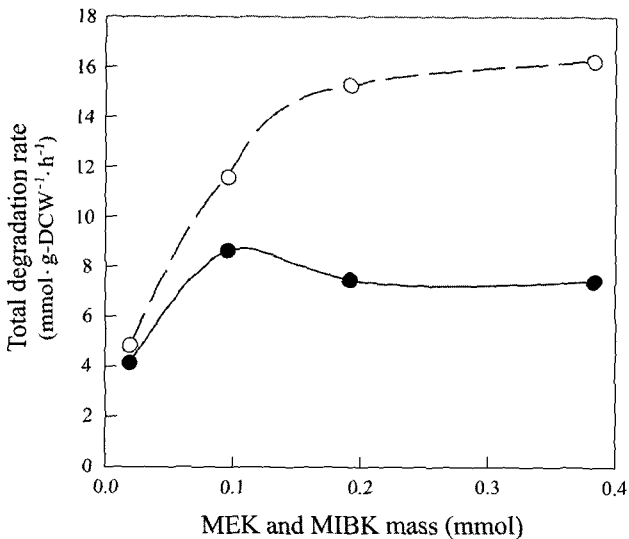


Fig. 5. MEK/MIBK mixture effect on total degradation rate of MEK and MIBK by *P. putida* KT-3. Dot line indicates MEK/MIBK total degradation rate assuming there is no inhibition between these substrates.

는 저해반응이 없다고 가정한 속도의 약 46~49%의 분해속도를 얻을 수 있었다.

본 연구에서 얻은 *P. putida* KT-3에 의한 MEK와 MIBK 혼합 기질의 분해 실험으로부터 얻은 결과를 MEK 첨가량, MIBK 첨가량 및 각각의 분해속도 및 총분해속도를 3차원으로 도시하였다(Fig. 6). MEK 분해속도는 MIBK 첨가량이 0.08 mmol 이상으로 많아지면 가파르게 감소하여 MIBK 영향 크게 받았다(Fig. 6a). 그러나, MIBK 분해속도는 MEK

첨가량이 증가함에 따라 다소 완만하게 감소하였다(Fig. 6b). MEK와 MIBK의 각각의 분해속도를 합한 총분해속도는 MEK/MIBK의 혼합비율에 따라 매우 다양한 양상을 보였다. 이는 *P. putida* KT-3 균주에 의한 MEK와 MIBK의 비분해속도가 다르며, 상대 기질에 의한 상호저해작용의 차이로 인해 야기된 것으로 사료된다.

P. putida 균주는 유류, 다환방향족화합물, benzene, toluene, xylene 등과 같은 다양한 종류의 환경오염물질을 분해 가능한 균주로 보고되어 왔으나[3, 5, 12], 아직까지 이 균주에 의한 MEK 및 MIBK에 대한 분해 특성에 대한 정보는 거의 전무한 실정이다. 본 연구에서는 각종 산업시설에서 많이 사용되는 유기용제인 MEK와 MIBK를 유일 기질로 이용할 수 있는 *P. putida* KT-3 균주에 의한 이들 물질의 생분해 특성에 관해 처음으로 보고하였다. 또한, 이 균주에 의한 MEK와 MIBK 단독 혹은 혼합 기질의 생분해를 속도론적 방법으로 해석한 결과를 제공함으로써 MEK와 MIBK 함유 폐가스 처리를 위한 생물학적 공정 설계에 매우 유용한 기반 기술을 구축하였다.

요 약

각종 산업시설에서 유기용제로 사용되는 methyl ethyl ketone(MEK)과 methyl isobutyl ketone(MIBK)을 유일 탄소원으로 이용할 수 있는 *Pseudomonas putida* KT-3 균주에 의한 이들 물질의 생분해 특성을 조사하였고, MEK/MIBK 혼합물 분해에 미치는 이들 기질 상호간의 작용을 규명하였다. MEK 단독 기질 조건에서 MEK 첨가농도가 0.5

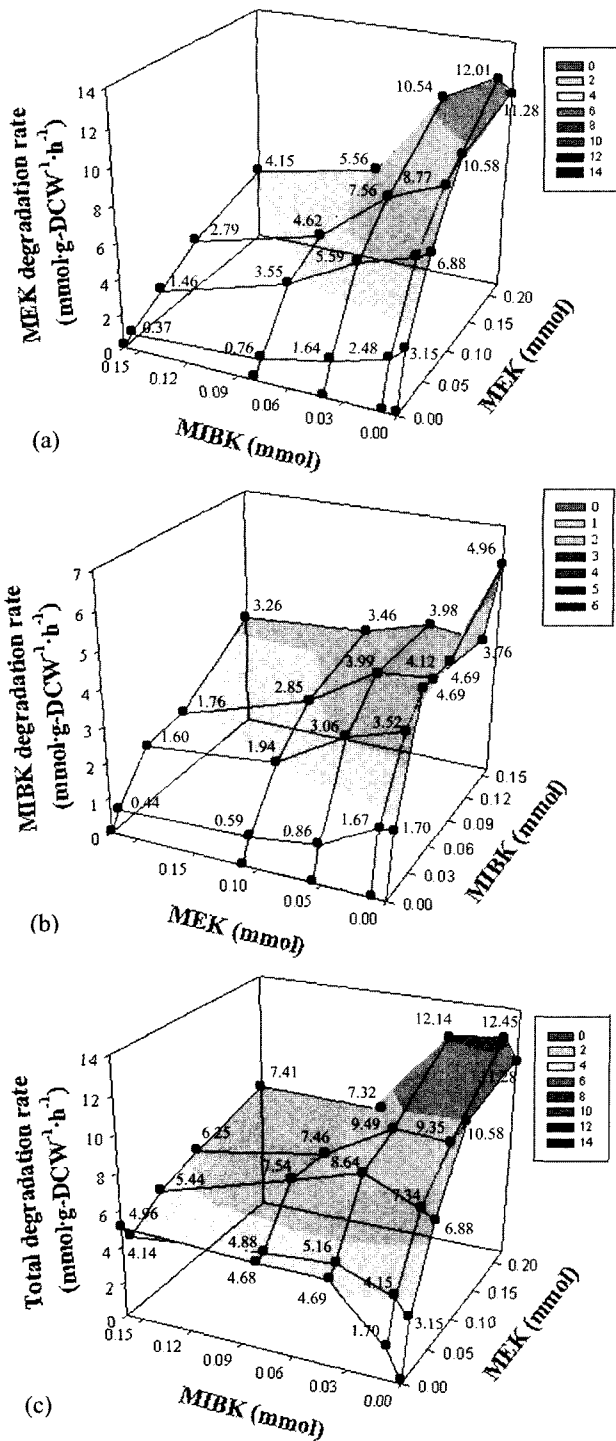


Fig. 6. Comparison of MEK degradation rate (a), MIBK degradation rate (b) and MEK/MIBK total degradation rates (c) under MEK/MIBK mixture conditions.

에서 5.5 mM로 증가함에 따라 KT-3 균주에 의한 MEK 분해속도도 3.15에서 10.58 mmol/g DCW·h로 선형적으로 증가하였다. MEK 농도가 11.0 mM인 조건에서는 MEK 분해속도는 11.28 mmol/g DCW·h로, MEK 첨가량이 5.5 mM인

경우와 거의 유사한 속도를 얻을 수 있었다. 또한, MIBK 단독 기질 조건에서 KT-3 균주에 의한 MIBK 분해속도는 3.0 mM 이상의 MIBK 농도에서는 MIBK 농도에 상관없이 4.69~4.92 mmol/g DCW·h로 거의 일정하였다. KT-3 균주의 MEK/MIBK 혼합물에서의 생분해 속도의 감소는 두 기질 상호간의 경쟁적인 저해작용에 의한 것임을 알 수 있었고, 속도론적 해석 결과 얻는 MEK와 MIBK의 최대분해속도 (V_{max}), 포화상수(K_m) 및 저해상수(K_i)는 다음과 같다: $V_{max,MEK}=12.94$ mmol/g DCW·h; $K_{m,MEK}=1.72$ mmol/L; $K_{i,MIBK}=1.30$ mmol/L; $V_{max,MIBK}=5.00$ mmol/g DCW·h; $K_{m,MIBK}=0.42$ mmol/L; $K_{i,MEK}=0.77$ mmol/L.

감사의 글

이 논문은 2001년도 한국대학교육협의회 대학교수 국내 교류 연구비 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Amoore, J. and E. Hautala. 1983. Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *J. Appl. Toxicol.* **3**: 272-290.
2. Armeli, G., F. Linari, and G. Martorano. 1968. Clinical and hematocchemical examinations in workers exposed to the action of a ketone (MIBK) repeated after five years. *Lav. Umamo.* **20**: 418-423.
3. Attaway, H. H. and M. G. Schmidt. 2002. Tandem Biodegradation of BTEX Components by Two *Pseudomonas* sp. *Curr. Microbiol.* **45**: 30-36.
4. Baker, E. L. and R. G. Feldman. 1982. Paraoccupational exposure to mixed solvents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **19**: 27-34.
5. Daane, L. L., I. Harjono, G. J. Zylstra, and M. M. Haggblom. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2683-2691.
6. Deshusses, M. A., H. Geoffrey, and I. J. Dunn. 1996. Transient-state behavior of a biofilter removing mixtures of vapors of MEK and MIBK from air. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 587-598.
7. Devinny, J. S., M. A. Deshusses, and T. S. Webster. 1999. *Biofiltration for air pollution control*. Lewis Publishers. New York.
8. Kim, M. J. and H. D. Park. 2001. A study on the isolation and characterization of a ketone-degrading bacterium, *Pseudomonas putida* KT-3. Biosaint Research Report. BSR-01-001.
9. Lee, E. Y., Y. S. Jun, K. S. Cho, and H. W. Ryu. 2002. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene,

- and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *J. Air Wast. Manage. Assoc.* **52**: 400-406.
10. Lurie, A. P. 1967. Ketones, pp. 101-169. In *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. vol. **12**. John Wiley & Sons, New York.
 11. Murphy, D. C. 1984. Acute illness among workers connected to solvent exposure. *Occup. Health Safety.* **53**: 36-38.
 12. Nwachukwu, S. U. 2001. Bioremediation of sterile agricultural soils polluted with crude petroleum by application of the soil bacterium, *Pseudomonas putida*, with inorganic nutrient supplementations. *Curr. Microbiol.* **42**: 231-236.
 13. Office of pollution prevention and toxics U.S. environmental protection agency, 1994. Chemical summary for methyl ethyl ketone, EPA 749-F-94-015a.
 14. Ruth, J. R. 1986. Odour threshold and irritation levels of several chemical substances: a review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **47**: A142.
 15. Shuler, M. L. and F. Kargi. 1992. *Bioprocess engineering*. Prentice-Hall International. London.
 16. Smith, A. R. and M. R. Mayers. 1944. Study of poisoning and fire hazards of butanone and acetone. *N.Y. State Ind. Bull.* **23**: 174-476.

(Received July 20, 2002/Accepted Nov. 20, 2002)