

## 바이오 필터에서 순수분리된 *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1에 의한 방향족 화합물의 분해특성

조대원 · <sup>1</sup>윤인길 · †박창호  
경희대학교 화학공학과, <sup>1</sup>경희대학교 산학협력기술연구원  
(접수 : 2002. 11. 13., 게재승인 : 2003. 2. 11.)

### Biodegradation of Volatile Aromatic Compounds by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 Isolated from a Biofilter

Dae Won Cho, In-Kil Yoon<sup>1</sup>, and Chang-Ho Park†  
Department of Chemical Engineering, <sup>1</sup>Industrial Liaison Research Institute, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea  
(Received : 2002. 11. 13., Accepted : 2003. 2. 11.)

A bacterial strain isolated from a compost-packed biofilter after 100 days of operation was identified as *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1, with a similarity of 99%. This strain removed benzene, toluene and m-xylene (BTX) at 2~30 mg/L within 6~20 hrs in batch cultures. Optimum pH and temperature for BTX removal were pH 7 and 32°C. This strain also removed a mixture of BTX at component concentrations of 2~5 mg/L.

**Key Words** : Biofilter, BTX, *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1

#### 서 론

석유산업의 발달과 인구의 증가는 화학제품 생산원료 및 에너지원이 되는 원유의 사용을 급증시켰다. 이와 같은 산업 공정에서 발생하는 탄화수소로 인해 대기 중에 휘발성 유기 화합물(volatile organic compounds) 오염이 심각한 문제가 되고 있다. 이 중에서도 벤젠, 톨루엔, 자일렌 등의 방향족 탄화수소는 인체 및 자연생태계에 미치는 독성으로 인하여 주요 환경오염물질로 분류되고 있다(1). 국내에서는 1995년 대기환경보전법에 “휘발성 유기화합물 및 악취물질의 규제”에 관한 조항을 설치하였으며 1998년 개정안을 통해 대상물질 선정 및 배출허용기준을 강화하여 휘발성 유기화합물(VOC) 및 악취를 규제하고 있다.

휘발성 유기화합물 중 대표적인 방향족 화합물인 벤젠, 톨루엔 및 자일렌 (BTX)은 벤젠고리를 기본구조로 가지는 휘발성 물질이다. 이 분자들은 이 구조적 특징 때문에 매우 안정하며 자연분해가 힘들기 때문에 분해를 위한 적절한 방법 및 조건을 찾기 위한 연구대상물질로 주목받고 있다(2).

난분해성 화합물을 처리하는 효과적인 기술의 하나로 미생

물을 이용한 분해기술이 있다. 지금까지 벤젠과 톨루엔을 생분해할 수 있는 균주로 *Pseudomonas putida*(3), *Acinetobacter sp.*(4) 등이 보고되었다. 이러한 균주에 의한 생물분해 속도에 오염물질의 양, 미생물의 특성, 균집의 조성, pH 및 온도가 큰 영향을 주는 인자로 보고되었다(5). 이 중에서도 특히 중요한 것은 오염물질을 효율적이고 안정적으로 분해할 수 있는 미생물의 확보 및 확보된 미생물의 활성을 최대로 유지할 수 있는 조건의 최적화라고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 VOC제거에 사용된 바이오필터(6)에서 우수한 VOCs 분해능을 보이는 균주를 순수분리·동정하여 이 균주의 특성 및 BTX 분해특성을 확인하고 pH 및 온도 등의 영향을 확인하여 최적의 분해조건을 파악하고자 하였다.

#### 시약 및 재료

##### BTX 분해균주의 순수분리

100일 동안 VOC에 대해 높은 분해효율을 보인 Biofilter system(6) 내의 매체(compost)로부터 BTX를 분해하는데 적응된 균주를 분산평판법(spread plate method)으로 순수 분리하였다. 0.5 g의 매체를 멸균된 증류수 10 ml에 넣고 교반한 후 다시 1 ml를 취하여 9 ml의 증류수와 섞어 10배로 희석된 시료를 제조하였다. 이와 같은 희석법을 이용하여 10<sup>5</sup>배까지 희석하였다. 각 시료 0.1 ml를 취하여 Nutrient Agar(NA) 배지(trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, Agar 15 g,

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin 449-701, South Korea.  
Tel: +82-31-201-2531, Fax: +82-31-202-1946  
E-mail: chpark@khu.ac.kr

water 1 L)에 도달하였다. 도달한 plate를 배양기를 이용하여 32°C에서 12-24시간 배양하였다. 배양된 plate에서 균락체의 색깔과 형태에 따라 우점종으로 확인되는 균주를 도말평판법(streak plate method)을 이용하여 계대 배양하여 순수 분리하였다. Biofilter system column 내의 우점종 균주의 분포를 알아보기 위하여 평판계수법(viable plate count)을 이용하여 균수를 계수하였다.

**BTX 분해균주의 성장확인**

순수분리된 BTX 분해균주의 성장을 확인하기 위하여 탄소원이 포함되지 않은 Minimal medium(MM배지) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4g, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g, FeNH<sub>4</sub>-citrate 0.005g)를 제조하여 250 ml flask에 100 ml을 넣고 균주를 접종하였다. 균의 배양을 위하여 탄소원으로 톨루엔(20 mg/L)을 넣고 32°C에서 100 rpm으로 진탕배양하였다(VISION CO. LTD.). O.D.는 분광광도계(Spectronic 20D\*)를 이용하여 600nm에서 3시간 간격으로 측정하였다.

**BTX 분해균주의 생태학적 특성확인**

순수 분리된 균주의 생태학적 특성을 확인하기 위하여 형태적, 배양학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 제반 실험은 Manual of Methods for General Bacteriology에 의거하여 실시하였다.

**형태적 특성**

분리균주의 형태적 특성을 확인하기 위하여 Gram staining을 한 후 광학현미경으로 관찰하고 주사현미경(Scanning Electron Microscope)으로 촬영하였다.

**배양학적 특성**

분리균주의 배양학적 특성은 한천평판배지에 배양하여 균락체 형태, 표면, 색 등을 관찰하였다.

**생화학적 특성**

분리균주의 생화학적 특성을 분석하기 위해 catalase, oxidase, nitrate reduction, urease test를 하였다.

**BTX 분해균주의 동정**

순수분리된 균주는 미생물 보존센터(KCCM)에 의뢰하여 16S rDNA 분석에 의하여 동정하였다.

**동정균주를 이용한 회분식 배양에서의 BTX 분해특성 확인**

**배지**

탄소원을 제외시킨 MM 배지를 사용하였다. 배지의 pH는 7로 보정하고 121°C에서 15분간 멸균하였다.

**균주배양**

균주를 250 ml 플라스크에 50 ml의 최소배지(MM)에서 벤젠, 톨루엔, m-자일렌을 유일한 탄소원으로 하여 진탕배양기

에서 온도 32°C에서 배양하였다. 또한 균주활성 유지를 위하여 O.D.가 1.0일 때 새로운 최소배지로 2차 계대 배양하여 활성 있는 균주를 실험에 사용하였다.

분해특성을 확인하는 실험에서는 100 ml serum bottle에 20 ml의 최소배지를 넣고 멸균한 후 VOC를 투여하고 capping하였다. 균주의 접종은 250 ml flask에서 배양한 균주(O.D.-1.0)를 주사기를 이용하여 접종하였다.

**분석시료**

벤젠, 톨루엔, m-자일렌을 실험대상물질로 하였으며 시료는 HPLC grade 시약(Sigma-Aldrich)을 구입하여 사용하였다.

**분석방법**

벤젠, 톨루엔, m-자일렌의 농도측정은 serum bottle의 head space에서 250 µl Gas-tight syringe(Hamilton)로 100 µl의 가스를 취하여 Gas Chromatography(HP 5890 Series II)로 분석하였다. 시료의 정성 및 정량은 벤젠, 톨루엔, m-자일렌을 표준시약으로 calibration한 결과와 비교하여 분석하였다. GC의 column은 Ultra- I capillary column(HP)이고 Carrier gas는 질소(99.999%)를 사용하였다. 분석조건은 injector은 200°C로 유지하고 검출기는 Flame Ionization Detector(FID)를 사용하였다. 검출기의 온도는 250°C로 유지하였고 오븐온도는 초기 35°C에서 3분간 유지하고 3°C/min으로 70°C까지 상승하도록 하였다. 시료의 정성분석은 Retention time으로 정량분석은 peak area로 분석하였다.

**농도변화에 따른 단일 BTX 분해특성**

순수분리·동정된 균주를 이용하여 단일 BTX의 농도별 분해특성을 실험하였다. 벤젠, 톨루엔, m-자일렌을 대상 기질로 하였으며 각 BTX의 최적 농도를 결정하기 위하여 최소 2 mg/L에서 최대 30 mg/L까지의 농도범위에서 실험하였다.

**pH 및 온도변화에 따른 단일 BTX 분해특성**

순수분리·동정된 균주를 이용하여 32°C에서 pH를 6, 7, 및 8로 하여 분해특성을 확인하였다. 또한 온도변화에 따른 실험은 20°C, 25°C, 32°C 및 40°C에서 수행하였고 이 때 초기 pH는 7로 조정하였다.

**혼합 BTX의 분해특성**

순수분리·동정된 균주를 이용하여 단일 BTX 뿐만 아니라 벤젠, 톨루엔, m-자일렌(BTX) 혼합물에 대한 실험을 실시하였다. 농도는 각각 2, 3 및 5 mg/L을 첨가하여 BTX 전체농도가 4, 6 및 10 mg/L의 농도로 실험하였다.

**결과 및 고찰**

**BTX 분해 균주의 순수분리·동정**

Biofilter system의 compost 매체 내에 존재하는 미생물을 분산평판법으로 순수 분리한 결과 5가지 이상의 균주를 순수 분리하였다. 그 중에서 가장 높은 분해 경향을 보이는 붉은 색의 colony 형태를 가지는 균주를 선별하였다. 분리 균주는 평판계수법으로 계수 하였을 때 총 세균수의 80% 이상을 차

지하였다. 순수분리 균주를 미생물보존센터(KCCM)에 의뢰하여 16S rDNA 분석을 통하여 동정한 결과 *Rhodococcus pyridinovorans* 균주와 99%의 높은 일치성을 가지는 것으로 확인하였다.

**BTX 분해균주의 성장 및 생태학적 특성 확인**

순수분리·동정된 균주를 32℃에서 진탕 배양하였을 때 성장과 톨루엔 분해는 Fig. 1과 같다. 톨루엔의 분해율은 3시간에서 15시간 사이에서 가장 높았다. 순수분리·동정된 균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 특징은 Table 1 및 Fig. 2와 같다. 분리된 균주는 광학현미경 관찰 결과 Gram 양성균으로 확인되었으며 균락체의 특징은 습기가 있고 부드러운 표면을 가졌다. Catalase, Oxidase, Nitrate reduction test는 양성을 나타내었으며 Urease test는 음성을 나타내었다.

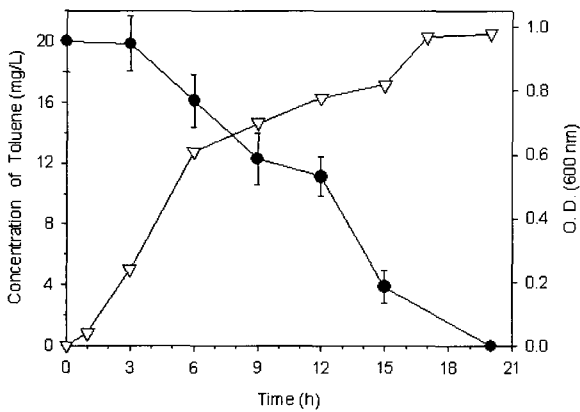


Figure 1. Growth of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 and its Toluene uptake(●, Toluene ; ▽, O.D.(600nm)).

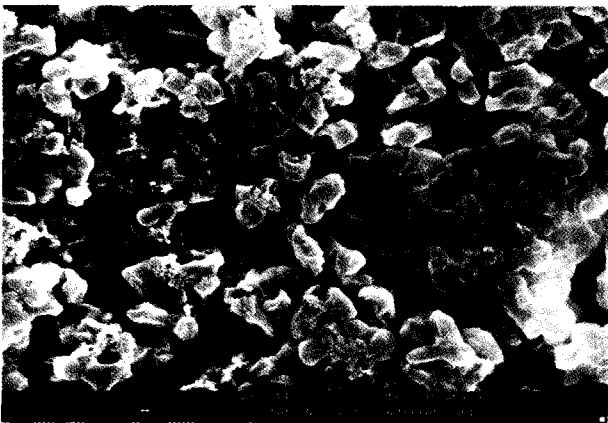


Figure 2. Scanning electron microscopy of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1.

**회분식 배양을 이용한 VOCs 분해능 확인**

순수분리·동정된 *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1균주를 이용한 회분식 실험결과는 다음과 같다.

Table 1. Characteristics of the isolated strain

Contents	Characteristics
Shape	Short rod with round
Cell size(μm)	2.5 ~ 3
Gram stain	Positive
Colony surface	Smooth
Colony color	Red
Catalase test	Positive
Oxidase test	Positive
Nitrate reduction test	Positive
Urease test	Negative

**기질의 농도변화에 따른 단일 VOCs 분해특성**

벤젠, 톨루엔, m-자일렌을 단일 기질로 이용하는 경우의 분해특성은 Fig. 3-5와 같다. 2~30 mg/L의 범위에서 6~20시간 이내에 100%의 제거되었다. 분해능은 톨루엔> 벤젠> m-자일렌의 순서였다. 벤젠, 톨루엔, m-자일렌 모두 가장 우수한 분해효율을 보이는 최적분해농도는 5 mg/L이었다. 또한 초기 기질농도 2 mg/L과 10 mg/L에서 분해율의 차이가 발생하는 것은 10 mg/L에서 분해속도가 2 mg/L일 때보다 크기 때문이다. 고농도(10 mg/L)에서는 기질이 많아 미생물 성장이 가속되고 미생물량이 증가함으로써 분해속도가 커지는 것으로 생각된다.

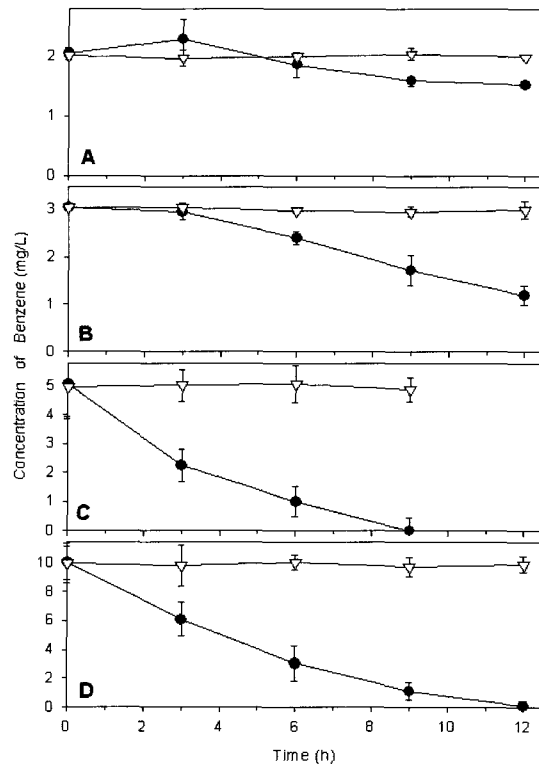


Figure 3. Biodegradation of benzene at different concentration by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1. ●, Benzene ; ▽, Autoclaved Control(A:2mg/L, B:3mg/L, C:5mg/L, D:10mg/L)

**pH 및 온도변화에 따른 단일 VOCs 분해특성**

pH와 온도가 벤젠, 톨루엔 및 m-자일렌의 분해에 미치는 영향은 각각 Fig. 6 및 Fig. 7에 나타내었다. pH에 따른 분해율은

pH 7 > 8 > 6의 순서였다. 이 분해 특성은 *Pseudomonas sp.* D8을 이용한 문헌 결과와 유사 하였다(7). 온도에 따른 분해율은 32°C > 25°C > 20°C > 40°C로서 32°C에서 가장 우수한 분해 효율을 보였으며 40°C에서 분해 성능이 급격히 떨어졌다. *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 균주는 pH 7과 32°C가 벤젠, 톨루엔, m-자일렌 분해의 최적조건이었다.

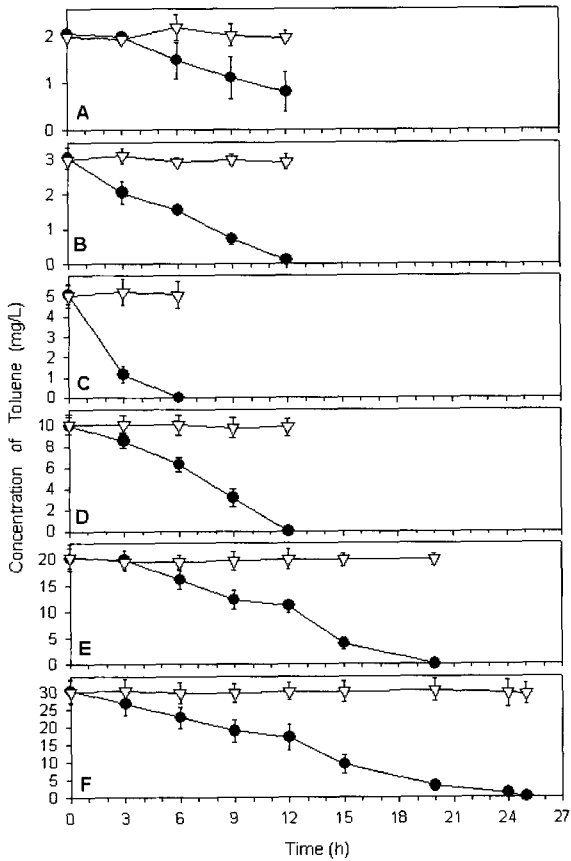


Figure 4. Biodegradation of toluene at different concentration by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1. ●, Toluene ; ▽, Autoclaved Control (A:2mg/L, B:3mg/L, C:5mg/L, D:10mg/L, E:20mg/L, F:30mg/L)

**혼합 BTX의 분해특성**

*Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1균주는 벤젠, 톨루엔 및 m-자일렌을 단일물질로 뿐만 아니라 혼합된 형태로도 분해하였다 (Figure 8). 혼합물질중에서 톨루엔을 우선 기질로 사용하며 그 다음으로 벤젠과 m-자일렌의 순서로 분해하였다. 톨루엔과 벤젠이 90%이상 분해되기 전에는 m-자일렌의 분해율이 저조한 것으로 확인되었다.

BTX를 동시에 분해하는 박테리아에 관한 연구는 문헌에 많이 보고되지 않았으며(8-10) 유전자 조작된 *Pseudomonas putida*에 의한 BTX 동시분해(11)와 *Phanerochaete chrysosporium*이라는 곰팡이를 이용한 보고(12)가 있으나 각각 안전성과 분해시간이 길다는 문제가 있었다. BTX 등의 방향족 화합물은 오염지역에서 대개 단일 물질로 존재하기보다는 혼합물 상태로 존재하기 때문에 본 연구에서 분리 동정한 균주가 유류 오염지역 정화에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

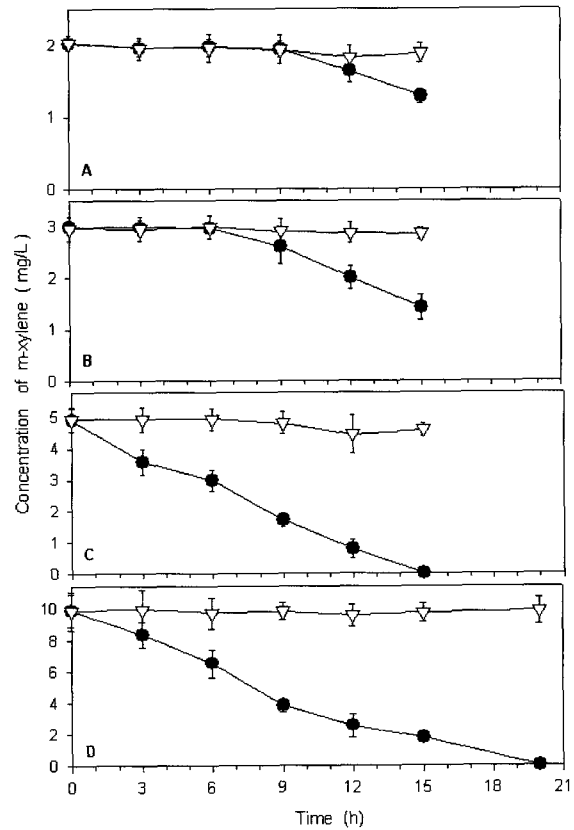


Figure 5. Biodegradation of m-xylene at different concentration by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1. ●, m-xylene ; ▽, Autoclaved Control (A:2mg/L, B:3mg/L, C:5mg/L, D:10mg/L)

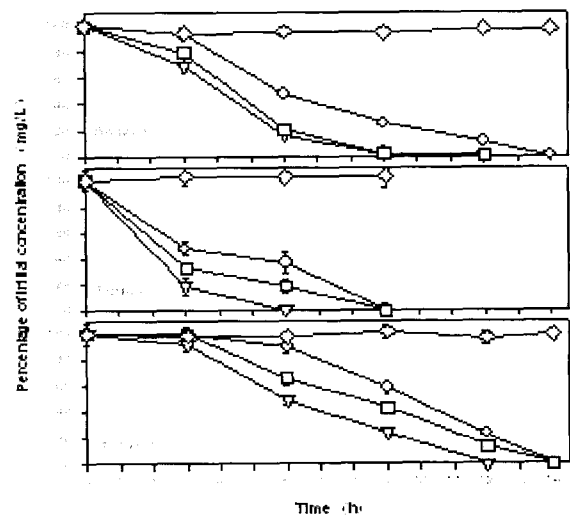


Figure 6. Effect of pH on BTXs biodegradation by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1. ○, pH6 ; ▽, pH7 ; □, pH8 ; ◇, Control (Initial amounts of benzene, toluene, and m-xylene are 5 mg/L each)

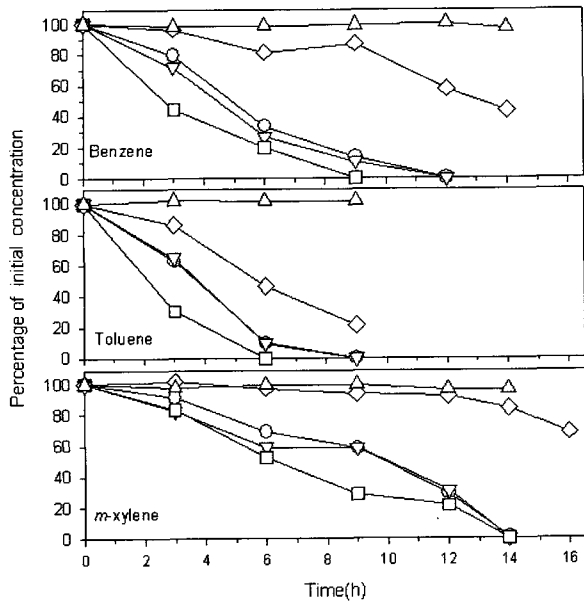


Figure 7. Effect of temperature on BTXs biodegradation by *Rhodococcus pyridinovorance* PYJ-1. ○, 20°C ; ▽, 25°C ; □, 32°C ; ◇, 40°C ; △, Control (Initial amounts of benzene, toluene, and m-xylene are 5 mg/L each)

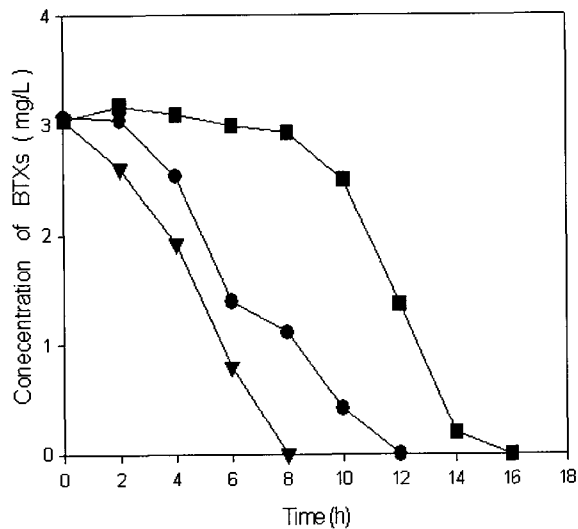


Figure 8. Biodegradation of BTXs mixture by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1. ●, Benzene ; ▼, Toluene ; ■, m-xylene (Initial amounts of benzene, toluene, and m-xylene are 5 mg/L each)

## 감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 중점연구so지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다(KRF-2001-E20007).

## REFERENCES

1. Keith, L. H. and W. A. Telliard (1979), Priority pollutants. I-a perspective view, *Environ. Sci. Technol.* **13**, 416-423.
2. Leisinger T., A. M. Cook, R. Hutter, and J. Nuesch (1981), Microbiol degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds, Academic Press, Zunch.
3. Gilson, D. T., J. R. Koch, and R. E. Kallio (1968), Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms: I. Enzymatic formation of catechol from benzene, *Biochemistry* **7**, 2653-2662.
4. Lee, C. H., H. M. Oh, T. J. Kwan, S. G. Ann, K. S. G. Ann, K. S. Kwan, T. H. Go, and B. D. Yoon (1994), Isolation and characteristics on *Acinetobacter* sp. GEM 63 degrading toluene, *Kor. J. Microbiol.* **32**, 329-335.
5. Baker, K. H. and D. S. Herson, Bioremediation, McGraw-Hill Inc.
6. Yoon, I. K., C. H. Park (2002), Effect of gas flow rate, inlet concentration and temperature on biofiltration of volatile organic compounds in a peat-packed biofilter, *J. Biosci. and Bioeng.* **93**, 165-169.
7. Chang, B. V., W. B. Wu, and S. Y. Yuan (1997), Biodegradation of benzene, toluene, and other aromatic compounds by *pseudomonas* sp. D8, *Chemosphere*, **35**, 2807-2815.
8. Yeon, S. H. and Y. J. Yoo (1997), Substrate interaction analysis in the degradation of benzene and toluene by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234, *Kor. Soc. Environ. Eng.* **2**, 245-250.
9. Yeom, S. H., S. H. Kim, Y. J. Yoo and I. S. Yoo (1997), Microbial adaptation in the degradation of phenol by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234, *Kor. J. Chem. Eng.* **14**, 37-40.
10. Yeom, S. H. and S. S. Choi (1998), Degradation of BTX by *Klebsiella* gr. 47 in the Biological Wastewater Treatment, *J. Kor. Environ. Sci. Soc.* **7**, 393-400.
11. Lee, J. Y., K. H. Jung, S. H. Choi and H. S. Kim (1995), Combination of the tod and tol pathway in Redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for mineralization of a Benzene, Toluene, and p-xylene mixture, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2211-2217.
12. Yadav, J. S. and C. A. Reddy (1993), Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene(BTEX) by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 756-762.