

논과 갯벌에서 톨루엔의 혐기성 생분해에 미치는 전자수용체의 영향

조경숙
이화여자대학교 환경학과

Effect of Electron Acceptor on Anaerobic Toluene Biodegradation in Rice Field and Tidal Mud Flat.
Cho Kyung-Suk. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea – In oil-contaminated environments, anaerobic biodegradation of toluene depended on the concentration and distribution of terminal electron acceptor as well as the physicochemical properties such as DO concentration, redox potential and pH. This study showed the anaerobic biodegradation of toluene in two different soils by using nitrate reduction, ferric iron reduction, sulfate reduction and methanogenesis. Toluene degradation rates in the soil samples taken from rice field and tidal mud flat by nitrate reduction were higher than those by other processes. The soil samples from the two fields were enriched for 130 days by providing toluene as a sole carbon source and nitrate or sulfate as a terminal electron acceptor. The toluene degradation rates in the enriched denitrifying consortia obtained from the rice field and tidal mud flat soil were 310.7 and 200.6 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectively. The toluene degradation rates in the enriched sulfate-reducing consortia from the fields ranged from 149.1 to 86.1 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{d}^{-1}$.

Key words: Toluene, anaerobic biodegradation, terminal electron acceptor, denitrification, sulfate reduction

BTEX(Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene)는 대표적인 석유계 화합물로 다른 석유계 화합물에 비해 물에 대한 용해도가 높기 때문에 일단 오염되면 지하수 내에서 오염지역으로부터 수천 미터 떨어진 지점까지 오염이 확산되는 특징을 가지는 독성물질이다. 일부 호기성 미생물은 BTEX를 분해할 수 있으며, 이들 호기성 미생물의 BTEX 분해능력은 오염지역을 복원하는데 매우 중요한 역할을 한다. 따라서 호기적 BTEX 복원을 촉진하기 위해 오염지역에 산소를 주입하는 공법을 생물복원공정에서 많이 사용하고 있다. 그러나 이러한 호기적 처리방법은 에너지가 많이 소요되며, 혐기성 미생물이 우점하고 있는 지하 환경에 적용하기에는 적절치 못한 방법이다. 특히, 혐기적인 분위기에 있는 지하 토양층이나 퇴적물층에서는 혐기성 대사산물인 ferrous ion이나 sulfide와 같은 환원상태 화합물이 대량으로 존재한다. 이러한 환경에 산소를 주입하게 되면 산소는 이들 환원된 화합물과 우선적으로 반응하게 되므로 호기적인 BTEX 분해에 이용되지 않을 수 있다[3].

BTEX의 혐기적 생분해는 불가능한 것으로 오랫동안 생각되어 왔으나, 최근 들어 이들 물질의 혐기적인 조건하에서 생분해에 관한 연구 결과들이 보고되고 있다[3, 8-10]. 산소가 없는 혐기조건에서의 미생물 에너지 전환과정은 전자수용체로 무기화합물이 이용되는 혐기호흡에 의해 수행된다.

혐기적 환경하에서 BTEX가 생분해되기 위해서는 전자수용체를 필요로 하게 되는데, 먼저 탈질세균이 nitrate를 전자수용체로 이용하고, 다음은 망간환원균이 manganese oxides를, 철환원균이 ferric ion을, 황산염환원균이 sulfate를, 마지막으로, 메탄생성균이 이산화탄소를 전자수용체로 이용하여 BTEX가 혐기적으로 생분해하게 된다[1, 3-5, 7-10]. 따라서 혐기환경의 산화환원전위, pH 등과 같은 물리·화학적 특성뿐만 아니라 최종전자수용체로 이용가능한 물질의 농도 및 분포에 따라 BTEX 혐기성 생분해 특성은 달라질 것으로 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 비생물학적 특성이 상이한 논과 갯벌 토양시료를 채취하여 nitrate reduction, ferric iron reduction, sulfate reduction 및 methanogenesis에 의한 toluene 혐기적 생분해 특성을 비교 하였다.

본 연구에서 사용한 토양 시료는 서울 근교 공단지역의 논토양과 공단지역 가까이에 위치한 작은 섬의 갯벌에서 채취하였다. 토양 pH는 토양 시료 1g에 증류수를 9 mL 첨가하여 200 rpm에서 15분간 교반하여 얻은 토양 현탁액의 pH로 측정하였다. 또한, 토양 현탁액 중의 황산염과 질산염의 농도는 IC Pack-™ Anion(4.6 mm ϕ × 50 mm L, Waters, USA) 칼럼을 이용하여 이온 크로마토그래피(Waters 510, USA)로 분석하였다. 토양 시료를 110°C에서 24시간 건조시킨 후 수분함량을 측정하였고, 건조 토양을 다시 650°C에서 30분간 열처리한 후, 열처리 전후의 무게 변화를 측정하여 유기물 함량을 구하였다.

토양 시료를 대상으로 toluene 혐기성 생분해 특성을 조사하기 위해, 100 mL 혈청병에 토양 시료 30g과 무기염 배

*Corresponding author
Tel. 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

Table 1. Properties of soil samples from rice field and tidal mud flat.

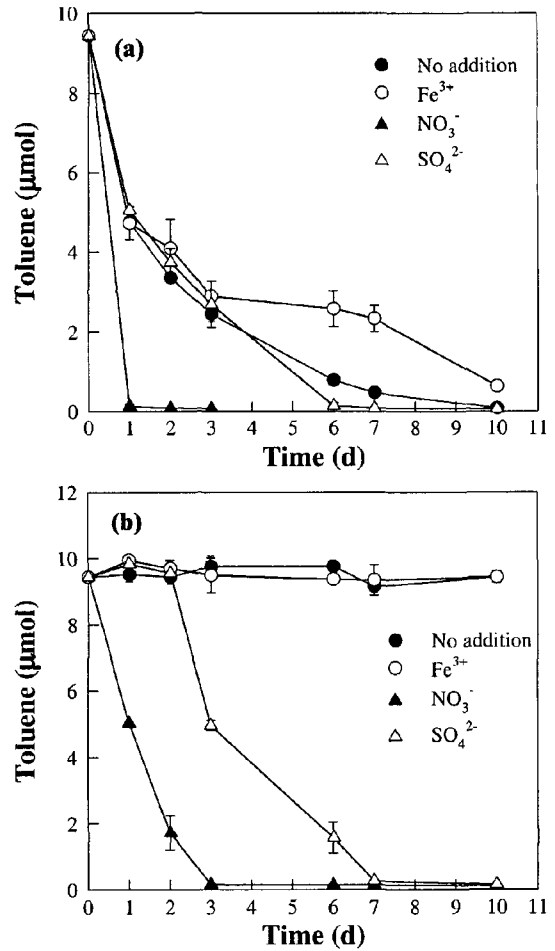
	Rice field	Tidal mud flat
pH	6.3±0.2	7.5±0.3
Moisture content (%)	65.0±4.0	70.9±1.0
Organic matter content (% w/w)	7.1±0.13	3.3±0.08
SO ₄ ²⁻ concentration (mg/g-dry sample)	7.27±0.05	24.75±0.56
NO ₃ ⁻ concentration (mg/g-dry sample)	0.71±0.04	N.D.

N.D., not detected.

지 70 mL를 넣고 질소가스를 불어넣어 혈청병 내부를 질소가스로 치환 한 후, 부틸고무마개와 알루미늄 캡으로 혈청병을 밀봉하였다. 무기염 배지 조성은 다음과 같다: NaHCO₃ 2.5 g/L; NH₄Cl 1.5 g/L; KH₂PO₄ 0.6 g/L; KCl 0.1 g/L; MgCl₂ 1 g/L. 각 혈청병에 Fe³⁺(FeC₆H₅O₇), NO₃⁻(NaNO₃), SO₄²⁻(Na₂SO₄)를 전자수용체로 최종 농도가 30 mM이 되도록 syringe로 첨가하였고, 이러한 전자수용체를 전혀 첨가하지 않은 시료(대조군)도 준비하였다. 각 혈청병에 toluene을 1 µL씩 syringe로 주입한 후, 30°C에서 정치배양하면서, 혈청병의 headspace gas를 gas-tight syringe로 채취하여 toluene 농도를 분석하였다. Toluene 농도를 주기적으로 분석하여 toluene이 검출한계 이하까지 분해되면 toluene을 1 µL씩 재주입 하는 방법으로 농화배양을 수행하였다. Toluene 농도 분석은 가스 크로마토그래피(HP 5890 series II plus, Hewlett Packard Co., USA)를 이용하여 분석하였다. 검출기는 FID(Flame Ionization Detector)를 사용하였고, 컬럼은 DB-WAX(30 m×0.32 mm×0.25 µm, J&W Scientific, USA), 시료 주입부와 검출부의 온도는 230°C이고, 오븐은 150°C로 설정하였다. 농화 배양한 시료 중의 생균수를 측정하기 위해 luminometer(Model 3550ib, New Horizons Diagnostics, USA)를 이용하여 ATP 농도를 측정하였다.

논과 갯벌에서 채취한 토양의 pH, 함수량, 유기물 함량 및 이온 농도 분석값을 Table 1에 요약하였다. 논과 갯벌 토양의 pH는 각각 6.3 및 7.5 이었고, 유기물 함량은 갯벌 토양보다는 논토양이 높았다. 논토양에서는 용존성 황산염과 질산염이 검출되었으나, 갯벌 토양에서는 용존성 황산염의 농도가 높았으나, 질산염은 검출되지 않았다.

논과 갯벌 토양시료에 최종전자수용체로 Fe³⁺, NO₃⁻ 및 SO₄²⁻를 첨가한 조건에서의 톨루엔 분해를 측정된 결과를 Fig. 1에 도시하였다. 논토양의 경우, 전자수용체를 인위적으로 첨가하지 않은 대조군 시료에 비해, 최종전자수용체로 질산염을 첨가한 조건에서는 약 10 µmol의 toluene이 1일 만에 완전 분해 되었다. 황산염을 첨가한 조건에서는 대조군 시료와 거의 비슷한 속도로 toluene이 분해 되었고, Fe³⁺를 첨가한 경우에는 톨루엔 속도가 감소하였다. 갯벌 토양시료

**Fig. 1. Toluene degradation under different electron acceptors.** (a) Soil from rice field; (b) Soil from tidal mud flat.

의 경우, 전자수용체를 첨가하지 않은 대조군 시료와 Fe³⁺를 첨가한 경우에는 toluene 분해가 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 NO₃⁻ 및 SO₄²⁻를 첨가한 조건에서는 toluene이 각각 3일과 7일내에 분해되었다.

논토양 시료를 대상으로 Fe³⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻를 전자수용체로 첨가한 조건에서 toluene을 연속적으로 주입하면서 약 130일 동안 농화배양한 결과를 Fig. 2에 도시하였다. 전자수용체를 첨가하지 않은 조건과 Fe³⁺를 첨가한 조건에서는 톨루엔이 거의 유사한 속도로 분해 되었다. NO₃⁻를 첨가한 조건에서는 toluene의 상대적으로 가장 빠르게 분해되었다. 농화배양 동안 toluene 분해속도가 느려졌을 때(배양 38일, 70일, 115일), 30 mM의 NO₃⁻를 첨가해줌으로써 toluene 분해속도를 회복시킬 수 있었다. 이러한 결과는 toluene 분해와 NO₃⁻ 소비(환원반응)가 동시에 진행됨을 의미한다. SO₄²⁻를 첨가한 조건에서는 농화배양이 진행됨에 따라 toluene 분해속도가 증가하는 경향이 관찰되었다. 갯벌 토양 시료에 NO₃⁻, SO₄²⁻를 첨가한 조건에서 toluene을 연속적으로 주입하여 농화배양한 결과를 Fig. 3에 도시하였다. 농화배양이 진행되는

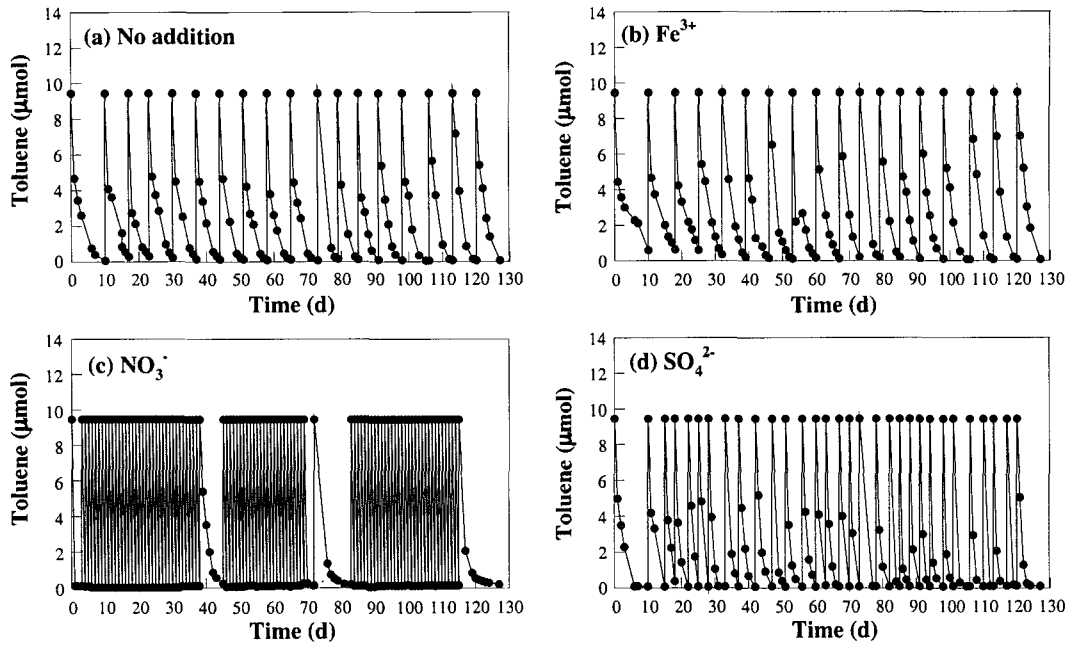


Fig. 2. Time profiles of toluene degradation in the enrichment culture of soil from rice field.

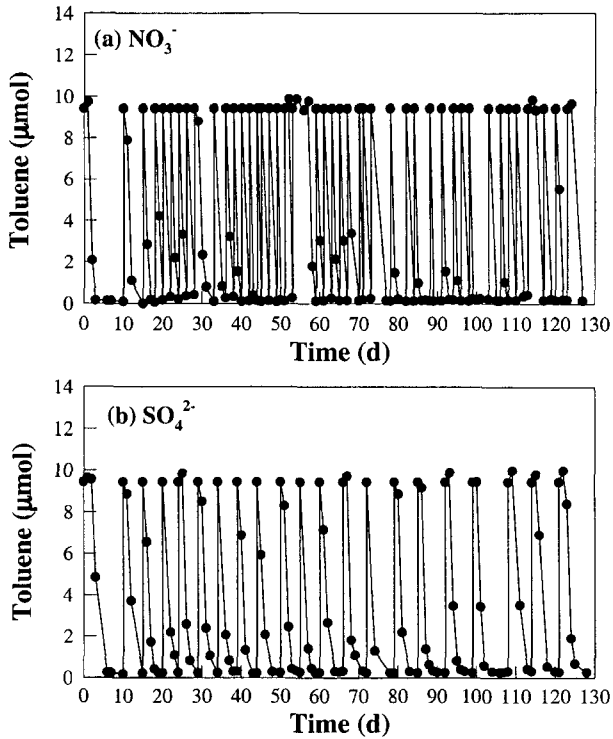


Fig. 3. Time profiles of toluene degradation in the enrichment culture of soil from tidal mud flat.

동안 SO_4^{2-} 를 첨가한 시료보다는 NO_3^- 를 첨가한 시료에서 toluene 분해가 빨리 진행되었다. 또한, 논토양에서 관찰된 결과와 유사하게 NO_3^- 를 첨가한 시료의 경우 toluene 분해 속도가 저하되었을 때 NO_3^- 을 첨가해줌으로써 toluene 분해

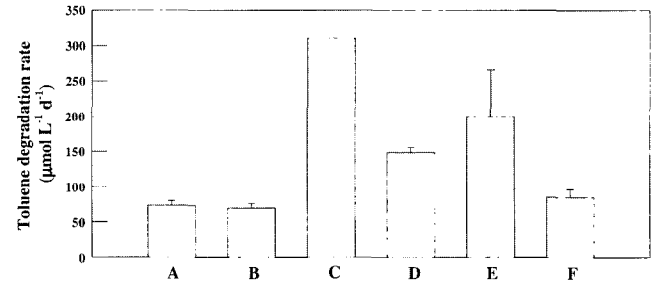


Fig. 4. Comparison of toluene degradation rate in the enriched cultures. A, rice field soil (unamended); B, rice field soil + Fe^{3+} ; C, rice field soil + NO_3^- ; D, rice field soil + SO_4^{2-} ; E, tidal mud flat soil + NO_3^- ; F, tidal mud flat soil + SO_4^{2-} .

속도를 회복시킬 수 있었다.

Fig. 2와 Fig. 3의 각 조건별 농화배양 결과로부터 100일 이후 각 조건에서 toluene 분해속도를 계산하여 Fig. 4에 도시하였다. 논토양시료에 NO_3^- 를 첨가하여 농화배양한 배양액의 toluene 분해속도가 가장 빨랐으며($310.7 \mu mol L^{-1} d^{-1}$), 갯벌 토양시료에 NO_3^- 를 첨가하여 얻은 농화배양액의 toluene 분해속도가 그 다음으로 빨랐다($200.6 \mu mol L^{-1} d^{-1}$). SO_4^{2-} 를 전자수용체로 첨가하여 얻은 농화배양액의 toluene 분해속도는 논 토양시료가 $149.1 \mu mol L^{-1} d^{-1}$, 갯벌 토양시료가 $86.1 \mu mol L^{-1} d^{-1}$ 이었다. 농화배양하여 얻은 농화배양액 중의 ATP 양을 측정하여 생균수로 환산한 결과를 Fig. 5에 도시하였다. Toluene 분해속도가 가장 빨랐던 논과 갯벌 토양시료에 NO_3^- 를 첨가하여 얻은 농화배양액 중의 생균수가 상대적으로 많았다. 이러한 결과는 toluene 분해속도와 생균수가 밀접한 상관관계가 있음을 의미한다.

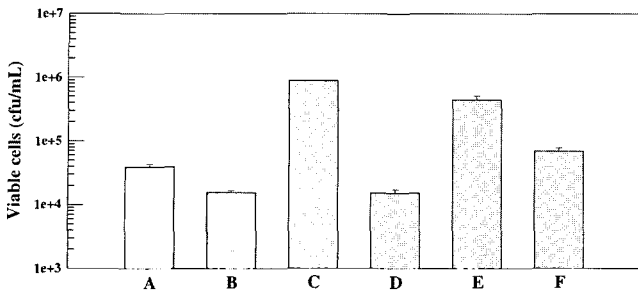


Fig. 5. Comparison of viable cells number in the enriched cultures. A, rice field soil (unamended); B, rice field soil + Fe³⁺; C, rice field soil + NO₃⁻; D, rice field soil + SO₄²⁻; E, tidal mud flat soil + NO₃⁻; F, tidal mud flat soil + SO₄²⁻.

NO₃⁻를 최종전자수용체로 이용하여 BTEX를 분해할 수 있는 탈질세균으로 *Thauera* sp.와 *Azoarcus* sp.가 보고되고 있다[3, 6, 11]. 또한, SO₄²⁻를 최종전자수용체로 이용하는 황산염환원세균인 *Desulfobacteriaceae*에 의한 BTEX 생분해에 관한 연구 결과도 보고된 바 있다[1-3]. 본 연구에서 NO₃⁻ 및 SO₄²⁻를 첨가하여 얻은 농화배양액에서 toluene의 생분해에 *Thauera/Azoarcus* cluster 및 *Desulfobacteriaceae*에 속하는 세균이 주요한 역할을 담당하였을 것으로 사료된다. 현재 분자생물학적 방법을 이용하여 이들 농화배양액의 미생물 군집 분석을 수행하고 있다.

논과 갯벌의 토양시료는 물리·화학적 특성이 상이함에도 불구하고 2가지 환경조건에서 toluene의 혐기성 생분해 활성이 가장 좋은 조건은 질산염 환원 조건이었으며, 그 다음이 황산염 환원 조건이었다. 논에서는 비료로 시비되는 NH₄⁺가 토양미생물의 질산화 활성에 의해 NO₃⁻로 산화되기 때문에 이를 최종전자수용체로 이용하는 탈질세균의 활성이 높을 것으로 사료되며, 이들 탈질세균의 일부가 toluene의 생분해에 관여했을 것으로 예상된다. 갯벌 토양의 경우, SO₄²⁻가 풍부하므로 SO₄²⁻ 환원 조건에 의한 toluene 생분해 활성이 가장 높을 것으로 기대하였으나, NO₃⁻ 환원 조건에 의한 toluene 생분해 속도가 SO₄²⁻ 환원 조건에서의 toluene 생분해 속도보다 높았다. 통성 혐기성 세균의 일부가 산소가 부족한 환경에서 NO₃⁻를 최종전자수용체로 이용하므로, 갯벌에 서식하는 통성 혐기성 세균 중의 일부가 toluene의 혐기성 생분해에 관여했을 것으로 사료된다. 본 연구에서 얻은 결과로부터 유류로 오염된 토양이나 갯벌의 자연복원능을 촉진하기 위해서는 NO₃⁻를 첨가해 주는 것이 가장 효율적임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 2001년도 우수 여성 과학자 도약 지원연구(R04-2001-000-00217-0)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Beller, H. R., D. Grbic-Galic, and M. Reinhard. 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 786-793.
2. Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, and M. Reinhard. 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1188-1196.
3. Bin, L., H. W. Van Verseveld, and W. F. M. Rling. 2002. Microbial aspects of anaerobic TEX degradation. *Biomed. Environ. Sci.* **15**: 130-144.
4. Coates, J. D., D. J. Ellis, C. V. Gaw, and D. R. Lovley. 1999. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Intl. Syst. Bacteriol.* **49**: 1615-1622.
5. Cunningham, J., H. Rahme, G. D. Hopkins, C. Lebron, and M. Reinhard. 2001. Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 1663-1670.
6. Mechichi, T., E. Stackerbrandt, N. Gad'on, and G. Fuchs. 2002. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **178**: 26-35.
7. Mester, K. G. and D. S. Kosson. 1996. Anaerobic biodegradation of toluene under denitrifying conditions in contaminated groundwater and soil. *J. Hazardous Mat.* **45**: 219-232.
8. Rooney-Varga, J. N., R. T. Anderson, J. L. Fraga, D. Ringelberg, and D. R. Lovley. 1999. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3056-3063.
9. Schmitt, R., H. R. Langguth, W. Puttmann, H. P. Rohns, P. Eckert, and J. Schubert. 1996. Biodegradation of aromatic hydrocarbons under anoxic conditions in a shallow sand and gravel aquifer of the Lower Rhine Valley, Germany. *Org. Geochem.* **25**: 41-50.
10. Weiner, J. M. and D. R. Lovley. 1998. Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 775-778.
11. Zhou, J., M. R. Fries, J. C. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje. 1995. Phylogenetic analysis of a new group of denitrifiers capable of an aerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 500-506.

(Received Feb. 9, 2003/Accepted May 16, 2003)