

# 계면활성제 미생물반응기의(혼합 VOCs) 생분해 II: 미생물의 군집해석

## Biodegradation of VOC Mixtures using a Bioactive Foam Reactor II: Analysis of Microbial Community

장현섭\* · 신승규\*\* · 송지현\*\*\* · 황선진\*\*\*\*

Jang, Hyun Sup · Shin, Shoung Kyu · Song, Ji Hyeon · Hwang, Sun Jin

### Abstract

A toluene-degrading bacterial strain was isolated from a mixed culture that was maintained using toluene as a sole carbon and energy source. The isolated bacterium was classified as *Pseudomonas* sp. TBD4 based on the close relationship to bacteria belonging to this genus. A bottle study to determine biodegradation rates of individual aromatic compounds showed that the biodegradation was faster in the order of toluene, benzene, styrene, and p-xylene. However, when various mixtures were subjected to TBD4, styrene was degraded at the highest rate, indicating that both toluene and p-xylene could stimulate the degradation of other substrates whereas styrene played as an inhibitor. In addition, the mixed culture and TBD4 were inoculated to the bioactive foam reactor (BFR), and the reactor performance and the corresponding change of microbial community were monitored using the fluorescent in situ hybridization (FISH) method. When an inlet concentration of the VOC mixture increased to greater than 250 ppm, the overall removal efficiency dropped significantly. The FISH measurement demonstrated that the ratio of TBD4 to the total bacteria also decreased to less than 20% along with the decline in removal efficiency in the BFR. As a result, the periodic addition of the pre-grown TBD4 might have been beneficial to achieve a stable performance in the BFR operated over an extended period.

**Keywords :** VOC, bioactive foam reactor, FISH, microbial community, biodegradation

### 요 지

Toluene을 유일 탄소원으로 배양한 혼합미생물 군으로부터 순수미생물을 분리배양한 후, 염기서열을 분석하여 *Pseudomonas* sp. TBD4 균주를 얻었다. 이 균주의 VOC 분해능을 평가하기 위해 toluene, benzene, p-xylene, styrene을 대상물질로 하여 회분식 생분해실험을 진행하였으며, 단일 기질인 경우 toluene, benzene, styrene, p-xylene의 순으로 분해 능이 좋은 것으로 나타났다. 또한 VOCs 혼합물을 주입하였을 경우에는 모든 조합조건에서 styrene, toluene, benzene, p-xylene의 순서로 쉽게 분해하였다. 이러한 결과로부터 VOC가 공존할 경우 toluene과 p-xylene은 다른 VOC의 분해를 촉진 시키지만 styrene은 저해물질로 작용함을 알 수 있었다. 한편 연속식 계면활성제 미생물 반응기(Bioactive Foam Reactor, BFR)에 혼합미생물 배양액과 TBD4 배양액을 접종하고 장기 운전하면서 운전특성과 미생물 동적변화를 확인하였다. VOCs 혼합물질 유입농도가 250 ppm 이상에서는 처리효율이 급격히 저하되었는데, FISH 분석 결과에 따르면 동일한 시점에서 TBD4가 차지하는 비율이 전체 미생물의 20% 미만으로 감소하여 BFR의 처리효율과 미생물상은 매우 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 본 연구 결과 FISH 분석법을 계면활성제 미생물 반응기의 미생물 군집변화 해석에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였으며, 미생물 반응조를 장기간 운전할 때에는 안정적인 처리효율을 유지하기 위하여 주기적인 식종을 해주는 것이 적절하다고 판단된다.

**핵심용어 :** 휘발성유기화합물, 계면활성제 미생물반응기, FISH, 미생물군집, 생분해

### 1. 서 론

2005년 국내에 악취방지법이 시행되면서 악취문제에 관해 효과적으로 대처할 수 있는 다양한 악취 저감기술에 대한

관심이 더욱 고조되고 있다. 대표적인 악취 유발물질로는 황 화합물, 질소화합물, 유기산, 휘발성유기화합물(Volatile Organic Compounds, VOCs) 등이 있으며, 이들은 대부분 화학공장이나 유류로 오염된 지역에서 많이 발생하는 것으

\*경희대학교 환경응용화학대학 박사과정(E-mail : jhyunsup@hotmail.com)

\*\*세종대학교 토목환경공학과 석사과정(E-mail : ssklio9@naver.com)

\*\*\*정희원 · 세종대학교 토목환경공학과 조교수(E-mail : songjih@sejong.ac.kr)

\*\*\*\*교신저자 · 경희대학교 환경응용화학대학 환경공학전공, 환경연구센터 부교수(E-mail : sjhwang@khu.ac.kr)

로 알려져 있다. 악취물질을 효과적으로 처리하기 위해서는 주요악취성분과 악취강도에 따라 적용 가능한 최적기술(Best Available Control Technology, BACT)을 선정하는 것이 매우 중요하다(송지현, 2006). 최근에는 생물학적 탈취방법인 바이오필터 시스템에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 바이오필터법은 우수한 처리효율과 경제성 그리고 유지관리의 용이성에 힘입어 하폐수처리에서 발생하는 악취저감에 적용되고 있다. 또한 신소재 담체의 개발 및 보급이 계속적으로 이루어지고 있고 VOCs와 같은 악취물질에 높은 분해능을 갖고 있는 미생물의 분리, 배양이 동시에 이루어지고 있어 바이오필터의 적용분야는 향후 더욱 확대되리라 예상된다.

그러나 기존의 담체 충전형 바이오필터법에서는 장기간 운전시 비활성 미생물이 축적되는 현상이 문제점으로 나타나고 있으며, 최근에는 이러한 단점을 개선하기 위하여 새로운 반응기 형태들이 제안되고 있다. 김용식 등(2005)은 계면활성제의 거품을 이용해 VOCs의 물질전달율과 생분해효율을 향상시킨 미생물 반응기(Bioactive Foam Reactor, BFR)에 기체상 toluene을 공급하여 막힘현상이 없이 안정적으로 처리할 수 있음을 제시하였다. 그러나 바이오필터 기술의 핵심이라고 할 수 있는 미생물의 처리기작에 관한 연구는 아직 미진하여 바이오필터 내부에 실제 어떠한 미생물들이 공간적으로 분포하며, 미생물 종별 기여도가 어느 정도인가는 잘 알려져 있지 않다. 또한 산업현장에서 배출되는 VOCs는 대부분 여러 복합화합물로 구성되어 있어 생물학적으로 처리할 경우 저해(inhibition), 경쟁(competition), 촉진(stimulation)과 같은 기질간의 상호작용이 발생한다(Oh 등, 1994). 이승우 등(1998)은 *Pseudomonas putida F1*과 *Burkholderia cepacia G4*에 의한 BTEX 및 TCE의 분해실험에서 toluene에 의해 benzene의 분해속도가 저하되고 TCE와 *p-xylene*이 공대사에 의해 제거됨을 보고하였다. 또한 순수배양균주와 혼합균주를 대상으로 BTEX의 분해능을 평가한 결과 ethylbenzene이 두 조건 모두에서 저해작용을 일으킨다는 연구결과도 있다(Deeb 등, 1998; Yadav 등, 1993).

미생물과 대상 기질 간에는 복잡한 상호작용이 존재하므로 처리방식과 대상기질에 따라 바이오필터 내의 미생물 군집은 달라질 수 있고, 따라서 미생물상의 변동을 파악하는 것은 바이오필터의 효율을 최적화하는데 매우 유용하다고 할 수 있다. Tresse 등(2002)은 분자생물학적 기법인 DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)법을 이용하여 styrene을 분해하는 생물반응기의 부유미생물과 부착미생물의 미생물상 변화를 시간별로 파악하여 부착미생물의 생물상이 더 높은 복잡성(complexity)을 가지고 상호작용을 하는 것을 밝혀냈다. Rogers 등(2000)은 FISH(Fluorescent *In Situ* Hybridization)법을 적용하여 미생물을 정량화 하였으며 기질과 미생물의 상호작용에 대해 동력학적으로 해석하는데 사용하였다.

본 연구는 새로운 형태의 생물반응기인 BFR의 장기운전 과정에서 반응기의 VOCs 분해능 변화와 미생물 군집변동을 상호 비교평가하기 위하여 수행되었다. 미생물 군집변동을 해석하기 위해서, 본 연구에서 선정된 4종류의 방향족화합물(benzene, toluene, *p-xylene*, styrene)을 분해하는 미생물을

혼합미생물 배양액으로부터 분리 동정하고 미생물의 DNA 정보를 바탕으로 FISH probe를 제작하였다. 또한 분리 동정된 미생물의 방향족 화합물 기질 분해속도 및 기질간의 상호작용을 실험적으로 조사하였다. 최종적으로 실험실규모 BFR 운전 결과와 미생물 군집 변동 결과를 함께 비교하여, 미생물 군집변동이 BFR의 운전효율에 미치는 영향을 고찰하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 균주의 배양 및 분리

Toluene을 유일 탄소원으로 주입한 미생물 배양기에서 미생물을 채취하여 PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.2)로 적당히 희석한 후, 탄소원이 포함되지 않은 최소한천배지에 도말하였다. 최소한천배지의 조성은  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4900 mg/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2000 mg/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2000 mg/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 340 mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.7 mg/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.4 mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 mg/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2.4 mg/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.4 mg/L;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mg/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.25 mg/L; yeast extract, 1 mg/L; 한천, 15 g/L이었다. 도말한 접시에 유일탄소원 및 에너지원으로 toluene을 가스상으로 공급하였으며, 25°C에서 5일간 배양한 후 균주를 채취하여 순수 분리하였다. 분리된 세균은 최소액체 배지에서 3일간 배양한 후 원심분리하여 미생물을 분리하고 PBS(pH 7.2)로 세척한 후 냉동/해동 방법에 의해 DNA를 추출하였다.

미생물을 동정하기 위하여 먼저 세균의 16S rRNA 유전자의 특정 부위를 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통하여 증폭하였다. Primer는 519F(5'-CAG CA/CG CCG CGG TAA TA/TC-3')와 1406R(5'-ACG GGC GGT GTG TA/GC-3')를 사용하였다(Pulliam Holoman 등, 1998). DNA 증폭은 DNA 증폭기(T1 Thermocycler, Biometra)를 사용하여, 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 30회의 PCR(변성, 94°C에서 1분 결합, 57°C에서 1분 중합, 72°C에서 40초)을 수행하였다. PCR 산물을 PCR 정제 kit(Takara Korea Biomedical Inc.)를 사용하여 정제한 후, 중합반응(DICE TP650, Takara Inc.)을 시키고, DNA 염기서열분석기(Megabase 1000, GE Healthcare)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 16S rRNA 유전자의 염기서열을 RDP(Ribosomal Database Project; Maidak 등, 2001)에 입력하여 기존에 알려진 염기서열과 비교 분석하여 분리된 toluene 분해세균의 분류학적 위치를 추정하였다.

### 2.2 VOC 분해능 평가

탄소원으로 포도당을 첨가한 최소액체배지에 분리된 분해세균을 접종하고, 30°C, 180 rpm에서 교반 배양하였다. 배양액을 원심분리(7,700g, 3분)한 후, 회수된 균체를 PBS로 2회 세척하였으며, 얻어진 세균을 이용하여 VOCs(benzene, toluene, *p-xylene*, styrene)의 분해능을 평가하였다. 이때 균주의 농도는 분광광도계(X-ma 2000, Human co. Korea)를 이용하여 1.0 OD<sub>600</sub>(optical density @600 nm)으로 조절하였다. 이렇게 준비된 균주를 50 mL serum vial에 각각 10ml씩 접종하고 산소를 주입한 후 부틸 고무마개와 알루미늄

Table 1. Oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Sequence (5'-3')	Target group	Fluorescent label	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	FITC <sup>a</sup>	Amann(1990)
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	$\gamma$ subclass of Proteobacteria	FITC	Amann(1995)
TDB1055r	CCCTCTGCTGCACTCTA	<i>Pseudomonas</i> sp. TDB4	TRITC <sup>b</sup>	This study

a : Fluorescein-iodoacetamide (green), b : Tetramethylrhodamine isothiocyanate (red)

늄 캡으로 밀봉하였다. 이때 분광광도계에 의하여 600 nm에서 측정된 OD값과 균체량과의 상관관계를 실험을 통하여 비교한 결과 1.0 OD는 628 mg/L( $R^2=0.981$ )에 해당하였다.

한편, 단일 기질과 혼합기질의 분해능을 평가하기 위하여 조합가능한 모든 조건(B, T, X, S, BT, BX, BS, TX, TS, XS, BTX, BTS, BXS, TXS, BTXS)을 설정한 후 주사기를 사용하여 총탄소의 농도가 1 mM이 되도록 각각 주입하였다. 이렇게 제조된 시료들을 교반배양기(30°C, 180 rpm)에 넣고 배양하면서 기상 VOCs의 농도를 불꽃이온화 검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피(M600D, Younglin, Korea)를 이용하여 측정하였다.

기질로 주입된 VOC는 액상의 미생물에 의해 분해되지만 실제로 측정된 것은 기상 농도이므로 식(1)을 이용하여 액상 농도로 환산하고 생분해에 의해 제거된 기질의 총량을 총탄소 기준으로 나타내었다.

$$M = S_L V_L + S_G V_G = S_L V_L \left[ 1 + \left( \frac{H}{RT} \right) \left( \frac{V_G}{V_L} \right) \right] \quad (1)$$

여기서, M : 기질 총량(mg),  $V_G$  : 기상부피(mL),  $V_L$  : 액상부피(mL),  $S_G$  : 기질의 기상농도(mg/mL),  $S_L$  : 기질의 액상 농도(mg/mL), H : 기질의 Henry 상수(atm/M), R : 이상기체 상수(atm/mol K), T : 온도(K).

### 2.3 BFR의 운전과 미생물 군집해석

본 연구에 사용된 계면활성제 반응조(BFR)의 형태와 운전 조건은 신승규 등(2006)의 연구와 동일하며 주입기질 변동에 의한 반응조 내 미생물 군집의 변화를 살펴보기 위하여 Amann(1995)이 제시한 FISH(Fluorescent *in situ* Hybridization) 분석법을 적용하여 미생물상을 파악하였다. BFR에서 채취한 시료는 4% paraformaldehyde 용액(in PBS, pH=7.2)과 1 : 3의 비율로 충분히 혼합한 후 4°C에서 2~4시간 동안 정치시켜 고정을 실시하였다. 고정된 시료는 PBS로 2~3회 정도 세정을 실시하고 에탄올과 PBS를 1 : 1로 섞은 용액으로 적당히 희석하여 냉동 보관하였다.

고정을 완료한 시료는 탈수를 위해 유리판에 3  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 공기건조를 실시하고 50%, 80%, 98%의 에탄올에 3분간 차례로 침적시켰다. 탈수된 시료에 Table 1에 제시한 oligonucleotide probe를 hybridization buffer(0.9M NaCl, 20 mM Tris hydrochloride, 0.01% sodium dodecyl sulfate, x% Formamide)와 1 : 8로 섞어 10  $\mu$ l씩 떨어뜨린 후 배양기에 넣고 46°C에서 2~3시간 정도 hybridization을 진행하였다.

Hybridization이 완료된 시료는 washing buffer(x mM NaCl, 20 mM Tris hydrochloride, 0.01%SDS)로 48°C에서 20분간 세척한 후 CLSM(Confocal Laser Scanning Microscopy,

MRC-1024, Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였다. 두 종류의 oligonucleotide probes로 hybridization된 결과는 중첩촬영하여 디지털 영상화하였으며 LSM 분석프로그램을 이용하여 영상파일로 전환한 후, 각 발광체 면적을 산출하여 미생물의 상대적인 비율로 정량화하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 Toluene 분해균주의 분리 및 동정

혼합미생물 배양액을 대상으로 toluene을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 공급한 최소한천배지에서 25개의 세균 집락을 분리하였고, 이들 중 11종류의 세균이 toluene 분해능을 나타내었다. 이들의 염기서열 분석결과 모두 같은 종으로 나타나 이들 중 하나를 임의로 선택하여 TDB4로 명명하였다. 이는 BFR에서 오랫동안 toluene을 기질로 공급하여 toluene 분해세균을 농화시켰기 때문에 종 다양성이 감소되어 나타난 결과로 여겨진다.

분리된 미생물의 DNA 정보를 RDP에 입력하고 유사성을 분석한 결과, *Pseudomonas* 속에 속하는 것으로 나타났으며 *Pseudomonas putida* DSM 291T(GeneBank Accession No. Z76667)와는 유사성이 93.8%이었다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 분리한 toluene 분리세균이 기존에 보고된 종류와 다른 종인 것으로 판단된다. 또한 FISH 분석을 위하여 표적 세균과 결합할 수 있는 DNA probe(5'-TGC AGC ACC TGT GTC AGA GT-3')를 제작하였으며, TDB1055R로 명명하였다.

### 3.2 Toluene 분해균주의 생분해특성

#### 3.2.1 기질의 상호작용

분리 동정된 미생물의 VOCs 분해특성과 기질과의 상호작용을 확인하기 위해 회분 생분해실험을 수행하였다. TDB4 순수배양액을 serum vial에 1.0 OD<sub>600</sub>의 농도로 주입하고 benzene, toluene, *p*-xylene, styrene을 각각 두 가지씩 조합하여 총탄소량 기준으로 1 mM씩 동일하게 공급한 후 기상 농도 변화를 측정하였다(Fig. 1). 기존 문헌에 따르면 두 가지 이상의 기질이 공존할 경우 물질간의 방해(inhibitory)나 촉진(stimulation) 작용이 주요 반응으로 이루어진다고 보고되었다(Alvarez 등, 1991). 본 연구에서는 toluene과 *p*-xylene이 다른 기질의 분해를 증진시키는 것으로 나타났는데 이는 toluene과 *p*-xylene을 분해하는 과정에서 발생된 toluene dioxygenase와 같은 효소의 영향으로 판단된다.

한편 styrene은 다른 물질에 의해 그 분해속도가 크게 영향을 받지 않으나 오히려 다른 물질의 분해를 저해하는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 대부분의 연구가 BTEX를 초

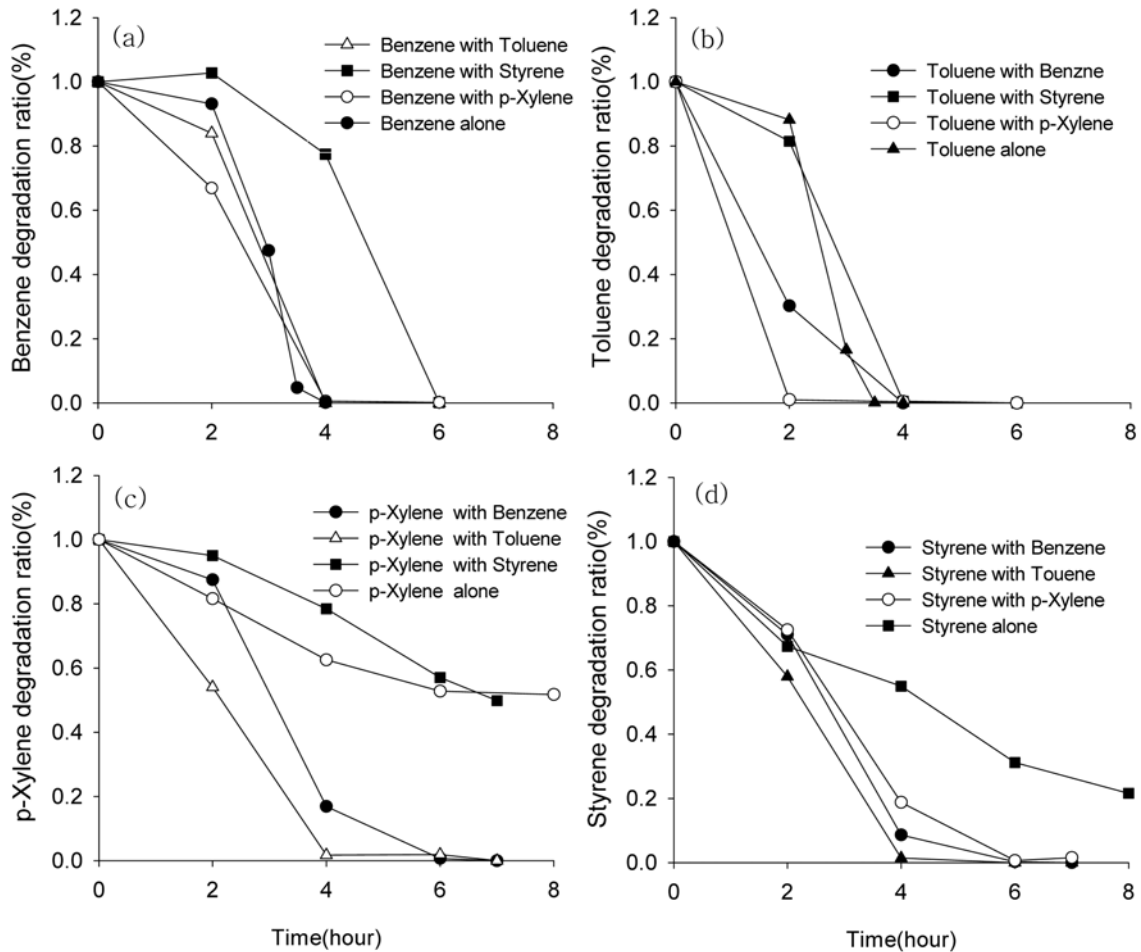


Fig. 1 VOC degradation of binary substrates in combinations of benzene, toluene, *p*-xylene and styrene by *Pseudomonas sp.* TDB4. (a) Benzene, (b) Toluene, (c) *p*-Xylene, (d) Styrene

점으로 진행된 바 있어 본 연구결과와 직접적으로 비교하는 것은 어려우나, styrene과 화학적 성질이 매우 유사한 ethylbenzene이 혼합 기질의 분해과정에서 확실한 저해자로서 작용한다는 Deeb 등(1998)의 연구결과는 시사하는 바가 크다. 즉 실제 산업현장에서는 단일 VOC보다는 여러 가지 VOCs가 혼합되어 발생하고 그 조성도 다양하다. 따라서 바이오필터와 같은 미생물처리시설에 유입되는 VOCs의 각 조성을 파악하고 예상되는 기질 저해작용을 설계 및 운전과정에서 면밀히 고려할 필요가 있다.

### 3.2.2 단일기질 및 VOCs 혼합물의 생분해 비교

Fig. 2는 benzene, toluene, *p*-xylene, styrene을 대상으로 조합 가능한 모든 조건(15가지 조건)을 조성하여 총탄소 기준으로 동일한 양을 생분해실험 장치에 주입한 후 분해특성을 비교한 결과이다. 실험 결과 benzene과 toluene은 단일 기질과 혼합기질의 분해능에 큰 차이가 없었으나 *p*-xylene과 styrene은 혼합기질로 주입한 경우보다 단일기질로 주입한 경우에서 분해속도가 낮게 나타났다. 이것은 TDB4가 직접적으로 *p*-xylene이나 styrene을 분해하는 것보다 benzene이나 toluene을 분해하는 과정에서 생성된 효소에 의해 더 우선적으로 분해되는 것을 의미한다. 결국 *p*-xylene이나 styrene은 공대사(cometabolism)의 특성을 이용하기위해 다른 VOC 물질과 혼합하여 처리하는 것이 유리하다고 하겠다. 공대사를 이용한 처리는 일반적으로 생분해가 어려운 물질을 처리하

는데 이용되고 있으며, toluene이나 phenol을 1차 기질로 하여 TCE(Trichloroethylene)를 처리한 연구사례도 다수 보고 되어 있다(Hopkins 등,1993; 박옥현 등, 2002).

Table 2에는 toluene을 유일탄소원으로 하여 분리 동정한 *Pseudomonas sp.* TDB4가 단일기질 및 혼합기질로서 benzene, toluene, *p*-xylene, styrene을 분해할 때, 분해가 잘되는 순서로 정리하여 나타내었다. 각 VOC 물질을 개별적으로 분해할 경우에는 toluene이 가장 잘 분해되는 것으로 나타났고 styrene은 benzene보다 분해가 어려우며 *p*-xylene은 가장 분해가 어려운 것을 알 수 있다. 그러나 혼합하여 주입한 경우에는 모든 조건에서 styrene, toluene, benzene, *p*-xylene의 순서대로 분해가 잘 이루어지는 것으로 나타났다. 이는 BTEX를 대상으로 한 Deeb 등(1998)의 연구결과와 매우 유사한 결과이다.

### 3.3 BFR에서의 미생물 군집변동

미생물 반응조인 BFR에 순수균주(*Pseudomonas sp.* TDB4)와 혼합균주 배양액을 1:1로 섞어 식중환 후, 반응기의 거동과 미생물 군집변화를 살펴보았다. 반응초기 7일 동안에는 적응단계로서 toluene을 기상농도인 80 ppm으로 주입하였으며, 이후에는 혼합물질(BTXS)의 농도를 단계별로 높여 주입하였다. 그 결과 toluene 만을 주입한 초기단계의 BFR 분해효율은 70%에 이르렀으나, 기질을 혼합물질로 전환한 시점에서는 기질의 충격부하로 인해 일시적으로 효율

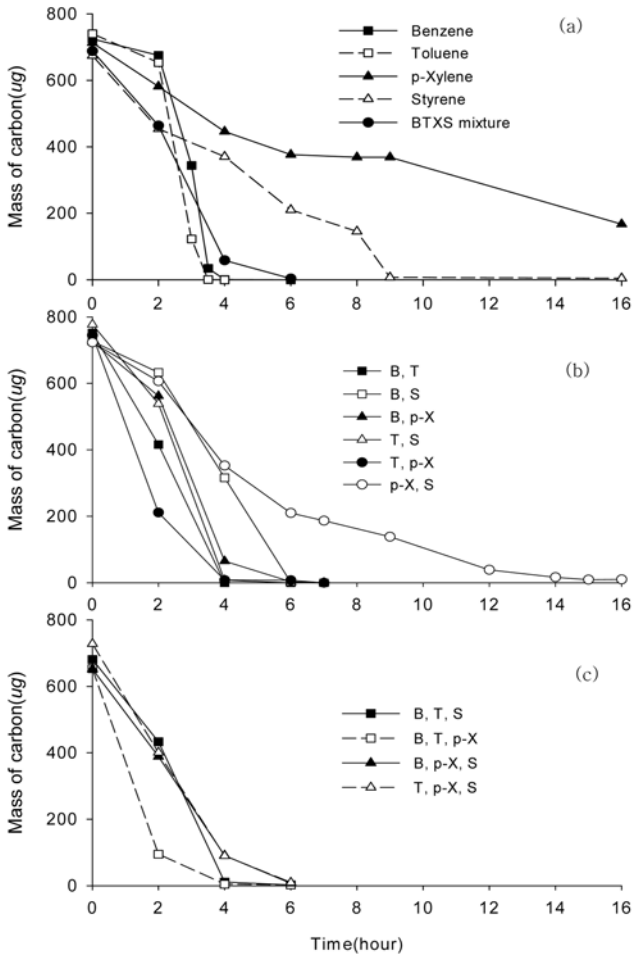


Fig. 2 Biodegradation of single substrates and VOC mixtures by *Pseudomonas sp.* TDB4. (a) Individual substrates and quadruple (BTXS) mixture, (b) dual mixtures, and (c) triple mixtures

Table 2. Order of biodegradation rates for individual VOCs and various mixtures by TDB4

Individual VOC	B, T, pX, S	T > B > S > pX
VOCs in Mixture (dual substrate)	B, T	T > B
	B, pX	B > pX
	B, S	S > B
	T, pX	T > pX
	T, S	S > T
	pX, S	S > pX
VOCs in Mixture (triple substrate)	B, T, pX	T > B > pX
	B, T, S	S > T > B
	B, pX, S	S > B > pX
	T, pX, S	S > T > pX
VOCs in Mixture (quadruple substrate)	B, T, pX, S	S > T > B > pX

B : benzene, T : toluene, pX : p-xylene, S : styrene.

이 감소하였다가 회복되는 현상을 나타내었다. BTXS 혼합물을 100 ppm에서 200 ppm으로 상승하여 주입하여도 배출되는 VOC의 농도는 일정하게 유지되어 처리효율이 80% 정도로 상승하였으나 기질농도를 250 ppm으로 주입한 시점부터는 그 처리효율이 급격히 감소하였다. 이후 최대 400

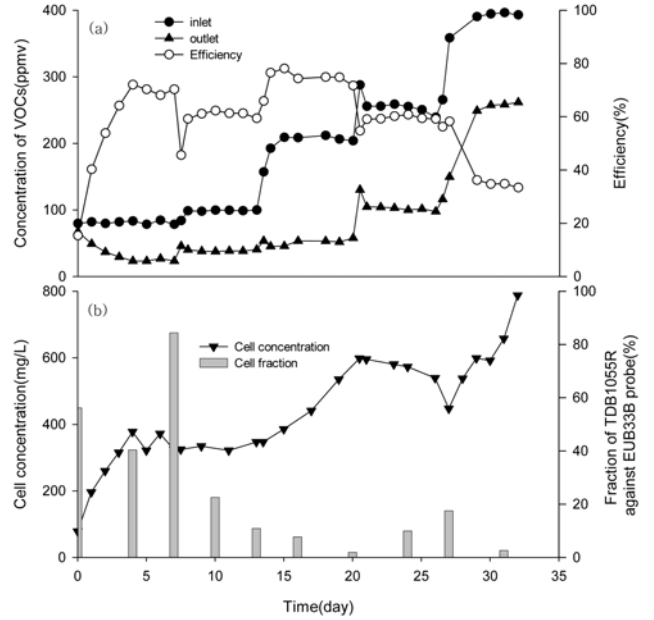


Fig. 3 (a) Changes of the inlet and outlet concentrations and overall removal efficiencies in the bioactive foam reactor (BFR) and (b) changes of microbial community as a function of BFR operation

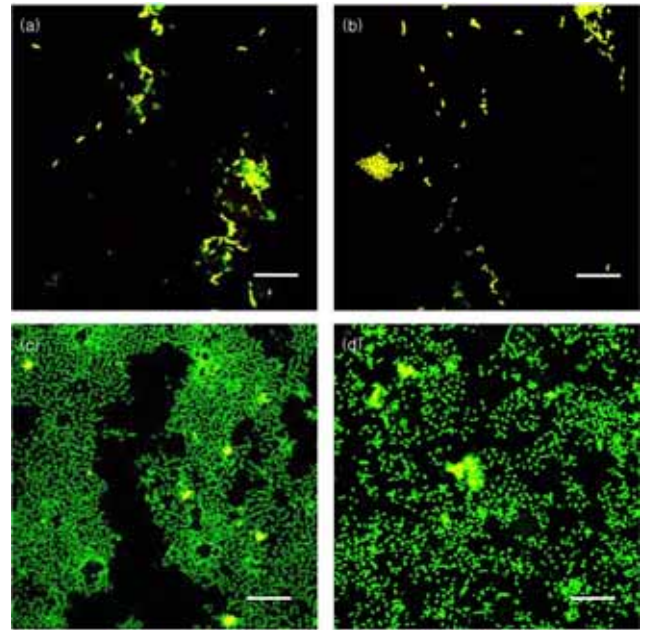


Fig. 4 FISH image of microbial communities in the BFR. The yellow part shows TDB4 detected by both EUB338 (FITC-labeled probe) and TDB1055R (TRITC-labeled probe). The green part shows other bacteria detected only by the EUB338 probe. (A) on day 0 (initial start-up), (B) on day 7, (c) on day 16, and (d) on day 31. Bar = 20 μm

ppm까지 주입농도를 높였을 때는 처리효율이 약 34%로 나타나 미생물에 의한 VOC분해가 한계에 도달했음을 알 수 있다. 이러한 결과가 나타난 원인은 여러 가지가 있겠지만 무엇보다도 기질의 동적부하변동이 미생물상에 많은 영향을 미쳤기 때문으로 판단된다.

BFR 내의 미생물 군집을 FISH법을 적용하여 분석한 결과 toluene만을 주입한 초기단계에서는 EUB338에 대한 TDB1055R의 비율이 85% 정도로서 TDB4가 완전히 우점

하였으나 혼합물질을 주입한 시점부터는 급격히 감소하는 경향을 나타내었고, 전체적으로는 20% 미만의 분율을 나타내었다. 또한 기질의 농도가 증가할수록 미생물의 균체량은 증가하였지만 TDB4의 분율은 낮게 유지되었다. 이 결과는 회분식 생분해실험에서 TDB4가 benzene 및 toluene은 물질대사를 통해 직접적으로 분해하였으나, *p*-xylene과 styrene은 대사물질로서 직접 이용하기 보다는 공대사에 의해 분해하는 현상으로 설명할 수 있다.

TDB4는 주로 benzene과 toluene을 탄소원으로하여 성장하지만 두 기질에 대해서는 다른 미생물들과 경쟁을 해야 하고, *p*-xylene과 styrene은 탄소원이나 에너지원으로 이용하기 어렵기 때문에 전체적으로 기질경쟁에서 불리하여 TDB4의 성장이 상대적으로 저해되었기 때문이라고 할 수 있다. 또한 혼합 미생물에 혼합 기질을 공급할 경우, 어떠한 미생물 종이 다른 미생물을 저해하는 물질을 생산하거나 반대로 제거하는 상호작용이 일어날 수 있는데 고농도의 기질이 공급될 경우 대사과정에서 생산된 대사산물에 의해 TDB4의 성장이 상대적으로 저해되었을 가능성도 있다(Rogers 등, 2000). 이는 VOC 혼합물 유입농도를 400 ppm 정도까지 증가시킨 시점에서 미생물의 양은 증가하였음에도 불구하고 처리효율이 급격히 저하한 이유라고 볼 수 있다.

이러한 현상은 Fig. 4에 제시한 FISH image를 통해서 보다 확실하게 설명된다. 초기 단계에서는 간균형태의 TDB4가 우점하는 모습을 보였으나 반응 중반인 16일의 결과(TDB1055R/EUB338 = 7.7%)와 최종 단계인 31일의 결과(TDB1055R/EUB338 = 2.6%)에서는 TDB4 이외의 다른 미생물들이 우점하는 것으로 나타났다. 즉 toluene을 유일 탄소원 및 에너지원으로 공급하여 분리한 TDB4와 같은 순수균주는 유입기질변동에 매우 민감하게 반응하기 때문에 장기 운전시에는 양호한 처리효율을 유지하기 위하여 주기적인 식종을 해주는 것이 적절하다고 판단된다.

한편 BFR에 의한 각 VOC 물질의 처리효율을 분석한 결과, styrene, toluene, benzene, *p*-xylene 순으로 높은 것으로 나타났으며, 이는 순수균주를 이용한 생분해실험 결과와 일치하였다. 결국 BFR에 식종한 TDB4의 생분해 특성은 전체적인 BFR의 거동과 매우 밀접하게 연관되어 있어 미생물 군집을 파악하는 것은 생물반응기의 효율을 증대시키거나 문제점을 해결하는 단서를 제공할 수 있음을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

Toluene 분해능을 가진 순수균주를 분리하고 그 염기서열을 분석함으로써 유전자 정보를 획득하였으며, benzene, toluene, *p*-xylene, styrene을 대상으로 회분식 생분해실험과 계면활성제 반응조(BFR) 운전을 통해 혼합물질의 분해능을 평가하였다.

1. Toluene을 유일탄소원으로 배양한 혼합 미생물군에서 분리된 TDB4 균주는 *Pseudomonas* 속에 해당하며 분석된 염기서열로부터 TDB1055R DNA probe를 제작하였다.
2. BTXS에 대한 TDB4의 분해능을 평가한 결과 단일기질로는 toluene, benzene, styrene, *p*-xylene의 순으로 분해가 이루어졌으며, 혼합물질을 대상으로 하였을 경우에는

모든 조합조건에서 styrene, toluene, benzene, *p*-xylene의 순서로 쉽게 분해하였다.

3. 두 가지 이상의 VOC가 공존할 경우 toluene과 *p*-xylene은 다른 VOC의 분해를 촉진시키지만 styrene은 저해하는 것으로 나타났으며, styrene과 *p*-xylene은 TDB4에 의한 직접적인 분해보다는 toluene이나 benzene의 분해과정에서 생성된 효소에 의한 분해, 즉 공대사에 의해 분해되는 것으로 판단된다.
4. VOC 혼합물질의 동적부하변동이 BFR에 미치는 영향을 살펴본 결과, 250 ppm 이상에서는 처리효율이 급격히 저하되었으며, FISH 분석을 통해 미생물 군집 변화를 살펴본 결과 EUB338에 대한 TDB1055R의 분율이 20% 미만으로써 다른 미생물이 우점하는 것으로 나타나 BFR의 처리효율과 미생물상은 매우 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.
5. 혼합균주를 식종한 BFR에 VOC 혼합물질을 주입하여 운전한 결과 styrene, toluene, benzene, *p*-xylene 순으로 처리가 잘되는 것으로 나타났으며, 이는 순수균주를 이용한 생분해실험의 결과와 일치하였다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2005-000-10675-0)지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

김용식, 손영규, 김지형, 송지현(2005) 계면활성제 거품을 이용한 미생물 반응기에서의 기체상 톨루엔 분해, **대한환경공학회지**, 대한환경공학회, Vol. 27, No. 5, pp. 468-475.

박옥현, 김용찬, 정인경, 우혜진(2002) 미생물을 이용한 휘발성유기화합물(VOC) 가스처리에 관한 실험적 연구(II)-Trichloroethylene의 공동대사 처리, **대한환경공학회지**, 대한환경공학회, Vol. 24, No 2, pp. 261-268.

송지현(2006) 미생물을 이용한 담체충진식 악취저감기술의 현재와 발전방향, **첨단환경기술 4월호** pp. 5-11.

신승규, 장현섭, 황선진, 송지현(2006) 계면활성제 미생물 반응기의 VOCs 혼합물 생분해(I) - 반응기 거동 평가, **대한토목학회논문집**, 대한토목학회, 제26권 제6-B호

이승우, 이준명, 장덕진(1998) *Pseudomonas putida* F1과 *Burkholderia cepacia* G4에 의한 BTEX 및 TCE의 분해, **한국생물공학회지**, 한국생물공학회, Vol. 13, No 5, pp. 561-568.

Alvarez, P.J. and Vogel, T.M. (1991) Substrate interactions of benzene, toluene and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 57, pp. 2981-2985.

Amann, R.I. (1995) In situ identification of micro-organisms by wholecell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, section 3.3.6, pp. 3.3.6/1-3.3.6/15. In A. D. L. Akkermans, and J. D. van Elsas (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer. Academic Publishers, London, England.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56, pp.1919-1925.

Deeb, R.A. and Alvarez-Cohen, L. (1998) Temperature effects and substrate interaction during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus*

- cus rhodochrous*, *Biotechnol Bioeng* 62, pp. 526-536.
- Hopkins, G.D., Munakata, J., Semprini, L., and McCarty, P.L. (1993) Trichloroethylene concentration effect on pilot-scale in-situ groundwater bioremediation by phenol-utilizing microorganisms, *Environ Sci. Technol*, 27, pp. 2542-2547.
- Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J., and Woese, C.R. (1997) The RDP(Ribosomal database project), *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 1 pp.109-110.
- Oh, Y., Shareefdeen, Z., Baltzis, B.C., and Bartha, R. (1994) Interactions between benzene, toluene, and p-xylene during their biodegradation. *Biotechnol Bioeng* 44, pp. 533-538.
- Pulliam Holoman, T.R., Elberson, M.A., Cutter, L.A., May, H.D., and Sowers, K.R. (1998) Characterization of a defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-*ortho*-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, pp. 3359-3367.
- Rogers, J.B., DuTeau, N.M., and Reardon, K.F. (2000), Use of 16S-rRNA to investigate microbial population dynamics during biodegradation of toluene and phenol by a binary culture.
- Tresse, O., Lorrain, M.J., and Rho, D. (2002) Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied Microbiol. Biotechnol* Vol. 59, pp. 585-590.
- Yadav, J.S. and Reddy, A.C. (1993) Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp. 756-762.
- (접수일: 2006.9.28/심사일: 2006.10.24/심사완료일 2006.10.24)