大韓環境工學會誌 · 論文 - Original Paper - 678~683. 2007.

미생물반응기에서 분리한 *Pseudomonas* 속 세균의 BTXS Compounds 분해 특성

조영철 · 장현섭* · 황선진†*

충북대학교 공과대학 환경공학과 · *경희대학교 환경응용화학대학 및 환경연구센터

(2007년 2월 15일 접수, 2007년 6월 7일 채택)

BTXS Compounds Biodegradability by *Pseudomonas* sp. Isolated from a Bioreactor

Young-Cheol Cho · Hyun-Sup Jang* · Sun-Jin Hwang†*

Department of Environmental Engineering, Chungbuk National University

**College of Environment and Applied Chemistry and Center for Environmental Studies, Kyung Hee University*

ABSTRACT : We isolated a toluene-degrading bacterium, TDB-4, from a bioreactor which designed to remove volatile organic compounds (VOCs) from the contaminated air. Based on the results of 16S rRNA gene analysis, it was classified as *Pseudomonas* sp. The toluene degradability was estimated in the variable toluene and bacterial concentrations. The bacterial growth and degradation rate was higher in the samples supplied with 50 μmole/vial of toluene than with 10 μmole/vial. It was decreased, however, in the samples with 100 μmole/vial, indicating that toluene inhibit the growth or degradation activity of TDB-4 at high concentration. When the degradation ability of other compounds was examined, TDB-4 can degrade other VOCs such as styrene, benzene, and xylene. These results will be helpful to optimize the operating conditions to improve the efficiency of a bioreactor in detoxification of VOCs.

Key Words : *Toluene, Volatile Organic Compounds, Biodegradability*

요약 : 휘발성 유기화합물(VOCs)을 제거하기 위해 고안된 미생물 반응기에서 TDB-4로 명명된 톨루엔 분해 세균을 분리하였다. 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 TDB-4는 *Pseudomonas* 속에 속하는 것으로 판명되었다. 이 세균에 의한 톨루엔 분해 특성을 관찰하기 위하여 세균의 농도와 기질인 톨루엔 농도를 변화시키면서 톨루엔의 분해도를 측정하였다. 낮은 농도인 10 μmole의 톨루엔을 기질로 공급하였을 때 보다 50 μmole의 톨루엔을 주었을 때 세균 성장과 톨루엔 분해 속도가 높았다. 하지만, 100 μmole의 톨루엔을 공급한 시료에서는 낮은 농도의 시료보다 세균 성장과 분해속도가 낮은 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 높은 톨루엔 농도에서 TDB-4의 성장 및 톨루엔 분해도가 저해받는 것을 의미한다. 다른 VOC에 대한 TDB-4의 분해능을 관찰한 결과, styrene, benzene 및 xylene의 분해능이 뛰어난 것으로 나타났다. 이러한 실험결과는 VOC를 제거하기 위해 고안된 미생물 반응기의 성능을 향상시키기 위한 운전 조건의 최적화에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 톨루엔, 휘발성 유기화합물, 생분해

1. 서 론

최근 각종 유기용제의 사용량이 급증함에 따라 이들 물질로부터 발생하는 휘발성유기화합물(volatile organic compounds; VOCs)에 의한 오염이 심각한 문제로 대두되고 있다. 우리나라에서는 아황산가스, 질소화합물 등의 일반적인 대기오염물질이외에 톨루엔(toluene), 자일렌(xylene), 스타일렌(styrene) 등의 VOCs를 포함한 22종의 악취유발물질을 규제 · 관리하기 위한 악취방지법이 제정되어 2005년 2월10일부터 시행되었다.[1)]

악취 또는 VOCs를 생물학적으로 제거하는 기술은 크게 고정화된 부착미생물을 이용하는 방법과 부유성장 미생물을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. 담체에 고정화된 부착미생물을 사용하는 방법은 운전이 간편하고 다양한 오염물질의 제거에 적용이 가능하지만, 장기 운전시 비활성물질의 축적, 시스템 압력증가, 막힘 현상이 발생하는 문제점을 가지고 있다.[2,3)] 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 최근에 부유성장 미생물을 이용하는 방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.[4,5)] 특히 계면활성제 거품을 이용한 미생물반응기(bioactive foam reactor; BFR)는 계면활성제를 이용해 만든 거품으로 VOC의 용해도를 높이고 분해미생물과 접촉 시간을 증대시켜 VOC를 제거하는 방법이다.[5)] 이 방법은 VOC의 제거효율 및 속도가 높을 뿐 아니라 고정상을 이용할 때 발생하는 문제점을 제거할 수 있어 효용성이 매우 클 것으로 기대되고 있다.

톨루엔은 무색의 액체로 대표적인 VOC이다. 톨루엔의 독성은 농도에 따라 다른데, 1,500 ppm 이하에서는 중추신경계의 기능을 저하시켜 일시적인 기능마비, 착란, 반응장애 등을 유발하며, 10,000~30,000 ppm의 높은 농도에 노출되면 혼수상태나 심한 경우 사망하는 것으로 보고되어 있다.[6,7)] 이러한 독성 때문에, 미국 EPA는 톨루엔을 포함한 BTEX(ben-

† Corresponding author
E-mail: sjhwang@khu.ac.kr
Tel: 031-201-2497 Fax: 031-203-4589

zene, toluene, ethylbenzene, xylene)를 최우선 감시물질(top priority pollutant list)로 지정하였으며,[8] 우리나라에서는 악취방지법에 의하여 2008년 2월부터 배출량이 규제될 예정이다.[1]

본 연구에서는 톨루엔을 기질로 첨가한 미생물 반응기의 효율적인 운전을 하기 위한 미생물학적 자료를 확보하고자 하였다. 이를 위하여, 반응기 내에서 우점하는 톨루엔 분해세균을 분리 동정하였으며, 세균의 톨루엔 분해 특성을 평가하기 위하여 기질 또는 접종 세균의 농도를 변화시킨 시료에서 톨루엔의 분해도를 측정하였다. 또한 분리된 톨루엔 분해세균에 의한 여러 VOC의 분해 정도를 측정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 톨루엔 분해세균의 분리 및 배양

하수처리장에서 채집한 잉여슬러지를 미생물 반응기에 넣고 지속적으로 톨루엔을 공급하면서 한 달 동안 운전한 후, 농화된 혼합세균 용액을 채취하였다. 세균 용액은 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 적당히 희석한 후, 탄소원이 포함되지 않은 최소한천배지에 도말하였다. 최소한천배지의 조성은 Na_2HPO_4(4.9 g/L), KH_2PO_4(2.0 g/L), $(NH_4)_2SO_4$(2.0 g/L), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$(340 mg/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$(1.7 mg/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$(2.4 mg/L), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(0.3 mg/L), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$(2.4 mg/L), $MnSO_4 \cdot 7H_2O$(2.4 mg/L), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$(0.2 mg/L), Na_2MoO_4(0.25 mg/L), yeast extract(1 mg/L), 한천(15 g/L)이었다.[9] 도말한 배양접시를 밀폐된 알루미늄 용기에 넣고 톨루엔을 적신 솜을 넣어 25℃에서 5일간 배양한 후, 배양접시에 자란 세균 집락에서 세균을 채취하여 순수 분리하였다. 분리된 세균은 최소액체 배지가 들어있는 serum vial (50 mL 부피)에 접종하고 고무마개로 막은 후, 주사기를 사용하여 톨루엔을 탄소원으로 공급하였다. 최소액체배지는 위에서 제시한 최소한천배지에서 한천을 제외한 조성으로 제조하였다. 접종된 serum vial을 25℃에서 3일간 배양한 후, headspace에 있는 톨루엔 잔류량의 분석을 통하여 분리된 세균의 톨루엔 분해능을 평가하였다.

2.2. 분리된 톨루엔 분해세균의 동정

세균 16S rDNA의 염기서열을 분석하여 세균을 동정하였다. 세균으로부터 염색체 DNA를 추출한 후, phenol-chloroform 법으로 정제하였다.[10] 세균의 16S rRNA 유전자의 특정 부위를 PCR을 통하여 증폭하였다. Primer는 519F와 1406R을 사용하였다.[11] PCR 산물을 PCR 정제kit(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. 여러 세균으로부터 얻은16S rDNA 유전자의 염기서열을 AnnHyb 프로그램(ver 4.933; (http://bioinformatics.org/annhyb/)내의 염기배열 기능으로 배열하여 동일한 종류로 판단되는 세균을 제거하였다. 16S rDNA의 염기서열을 RDP(ribosomal database project)에 입력하여 기존에 알려진 염기서열과 비교 분석하였다.[12] RDP에서 분석된 결과에서 유사성이 높은 것으로 나타난 세균의 16S rDNA의 염기서열을 내려 받아 AnnHyb 프로그램으로 분석한 후 ClustalX 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다. 이러한 결과로부터, 분리된 톨루엔 분해세균의 분류학적 위치를 추정하였다.

2.3. 톨루엔 및 휘발성 유기화합물의 분해능 평가

탄소원으로 포도당을 첨가한 최소액체배지에 분해세균을 접종하고, 24시간 동안 교반 배양(30℃, 180 rpm)하였다. 배양액을 원심분리(7,700 ×g, 3분)한 후, 회수된 균체를 PBS(pH 7.2)로 2회 세척하였다.

세균의 농도에 따른 톨루엔 분해특성을 조사하기 위하여 배양된 세균을 최소액체배지에 접종한 다음, 분광광도계(X-ma 2000, Human Co.,)를 이용하여 세균 농도를 각각 0.6, 2.8, 5.2, 9.8×10^8 CFUs/mL로 조절하였다. 이와 같은 과정으로 준비된 세균 시료를 50 mL serum vial에 각각 10 mL씩 접종하고 산소를 주입한 후 고무마개와 알루미늄 캡으로 밀폐하였다. 톨루엔 농도에 따른 분해 특성을 평가하기 위하여 분해세균을 접종한 serum vial을 준비한 후 밀폐하고, 주사기를 사용하여 vial 당 톨루엔을 각각 10, 50, 100 μmole(1.1, 5.3, 10.6 μL)을 공급하였다. 제조된 시료들을 교반 배양기(30℃, 180 rpm)에 넣고 배양하면서 일정시간 간격으로 headspace에 있는 톨루엔의 농도를 측정하였다.

분리된 세균에 의한 톨루엔 및 다른 휘발성 유기화합물(benzene, xylene, 및 styrene)의 분해속도를 비교하였다. 세균 농도는 5.2×10^8 CFUs/mL을 사용하였으며, 기질은 5 μL를 주입하였다. 18시간 동안 배양(30℃, 180 rpm)하면서, 2시간 간격으로 headspace gas를 취하여 VOC의 농도 변화를 측정하여 분해도를 구하였다.

톨루엔 및 휘발성유기화합물의 분해특성 실험에 사용된 모든 시료는 각 조건 별로 3개씩 준비하였으며, 결과는 각 시료에서 측정된 평균값으로 나타내었다.

2.4. 분석방법

톨루엔을 포함한 VOC는 flame ionization detector(FID)가 장착된 가스크로마토그래피(M600D, Younglin)를 이용하여 분석하였다. HP-5 capillary 칼럼(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)을 사용하였고, carrier gas는 He을 사용하였으며, oven은 200℃ 항온으로 설정하였다.

세균에 의한 VOC의 분해도를 측정하기 위하여 vial 속에 들어있는 VOC 총량의 변화를 알아야 한다. 기질로 주입된 VOC는 액체상에 있는 미생물에 의해 분해되지만 실제로 실험에서 측정된 것은 vial의 기체상(headspace)에 들어 있는 VOC의 양이다. Vial 속에 있는 VOC의 총량은 headspace에 있는 양과 용액에 용존된 양의 합이며, 용액 중의 VOC 양은 물질의 특성과 headspace에 있는 VOC의 농도(측정된 값)로부터 구할 수 있다(식 (1)).[13,14]

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

여기서, M은 기질 총량(mg), V_G는 기체부피(mL), V_L은 액체부피(mL), S_G는 기질의 기체상농도(mg/mL), S_L은 기질의 액체상 농도(mg/mL), H는 기질의 Henry 상수(atm/M), R은 이상기체 상수(atm/M · K)이며, T는 온도(K)를 나타낸다.

본 실험에 사용된 50 mL 크기의 vial에 10 mL의 배지를 넣었을 때, 식(1)을 사용하여 용액과 기체 중에 포함된 톨루엔의 비율을 계산하면, 1:1.146(30℃에서 Henry 상수를 6.67 atm/M으로 사용할 때)으로, 첨가한 기질의 47%는 배지에 용해되고, 나머지는 기체에 분포한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 톨루엔 분해세균의 분리 및 동정

도시하수종말처리장에서 발생한 잉여슬러지의 일부를 취하여 미생물 반응기에 접종한 후 톨루엔을 지속적으로 공급하여 톨루엔 분해세균을 농화시켰다.[5] 농화된 혼합 세균 군집을 채취하여 톨루엔을 단일기질로 공급한 최소한천배지에 접종하였다. 1주일 배양 후에 자란 집락 중에서 11개의 세균이 톨루엔 분해능을 나타내었다. 11개의 세균으로부터 염색체 DNA를 추출하여, 16S rDNA의 염기서열을 구하였다. 이들을 비교 분석한 결과 모두 세균이 매우 높은 유사성을 나타내어, 미생물 반응기에서 분리한 11개의 세균이 단일종이거나 분류학상으로 매우 가까운 종류인 것으로 판단되었다. 이는 톨루엔을 단일기질로 공급한 BFR에서 종 다양성이 감소하면서 톨루엔 분해세균 만이 농화되어 나타난 결과로 보여진다. 11개의 세균 중 strain TDB-4의 성장속도가 가장 빠르며 톨루엔 분해능이 뛰어나, 향후 실험에 사용하였다.

TDB-4의 염기서열을 RDP에 등록된 세균 16S rDNA의 염기서열과 비교 · 분석한 결과, TDB-4와 가장 큰 유사성을 나타내는 것은 모두 *Pseudomonas* 속에 속하는 세균인 것으로 나타났다(Table 1). 계통분류학적 연관성을 밝히기 위하여 계통수를 작성한 결과에서도 같은 결과가 도출되었다(Fig. 1). 가장 유사성이 큰 것으로 나타난 것은 *Pseudomonas putida* DSM 291T(GeneBank Accession No. Z76667)이었다. 이러한 결과로부터 TDB-4는 *Pseudomonas* 속에 속하는 세균으로 판단되었다.

Table 1. 16S rRNA gene sequence similarity of toluene-degrading bacterium, TDB-4

Bacterial name	Similarity	GenBank accession number
Pseudomonas putida DSM 291T	0.938	Z76667
Pseudomonas plecoglossicida FPC951	0.932	AB009457
Pseudomonas putida ATCC 12633	0.930	D37923
Pseudomonas monteilii CIP 104883	0.923	AF064458
Pseudomonas oryzihabitans IAM1568	0.922	D84004
Pseudomonas mosselii CIP 105259	0.919	AF072688
Pseudomonas flavescens B62	0.888	U01916
Pseudomonas caricapapayae ATCC33615	0.884	D84010
Pseudomonas fulva IAM1529	0.883	D84015

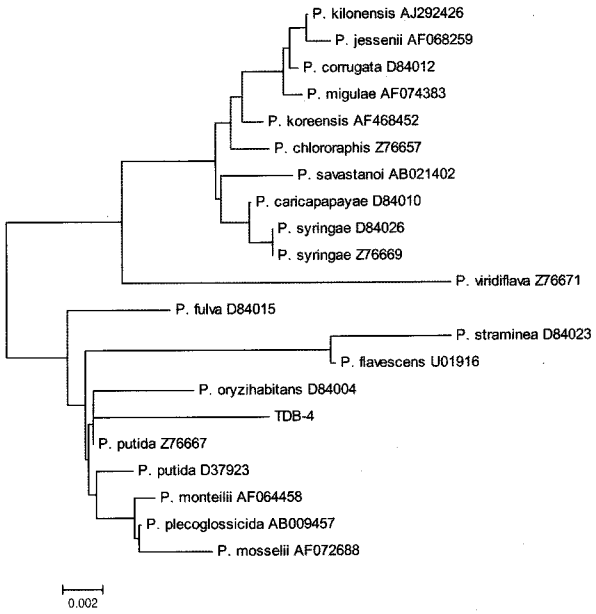

Fig. 1. Phylogenetic tree of toluene-degrading bacterium, TDB-4.

3.2. 톨루엔 분해특성

기질인 톨루엔을 10, 50, 100 μmole/vial로 변화시키고, 각각의 농도에서 톨루엔 분해세균의 농도를 $0.6 \sim 9.8 \times 10^8$ CFUs/ml로 변화시키면서 톨루엔의 분해도를 측정하였다.

10 μmole의 톨루엔을 공급하였을 때 분해 세균의 농도에 관계없이 5시간 이내에 대부분의 톨루엔이 분해되었다(Fig. 2(a)). 세균의 농도가 커질수록 잠복기(lag phase)가 짧고, 분해속도가 커지며, 안정수준(plateau level)에 도달하는 시간이 짧아지는 것으로 나타났다. 50 μmole의 톨루엔을 공급한 시료에서도 세균의 농도에 따른 차이는 있으나, 최대 9시간 만에 공급한 톨루엔의 99% 이상이 분해되었다(Fig. 2(b)). 모든 시료에서 잠복기가 관찰되지 않았으며, 분해속도는 세균의 농도와 비례하는 것으로 나타났다. 100 μmole의 톨루엔을 공급한 시료에서는 10 또는 50 μmole의 톨루엔을 공급한 시료와 달리 분해속도가 느리고, 안정수준에 도달하는 시간도 매우 길었다(Fig. 2(c)). 분해세균의 농도가 $0.6 \sim 2.8 \times 10^8$ CFUs/mL인 시료에서는 20시간 배양 후 각각 34, 27%의 톨루엔이 분해되지 않았으며, 이후 더 이상의 분해가 진행되지 않았다. 반면 $5.2 \sim 9.8 \times 10^8$ CFUs/mL의 세균을 접종한 시료에서는 20시간 후에 각각 96, 99%의 톨루엔이 분해되었다. 이러한 결과는 세균 당 기질의 양이 높을 때 톨루엔이 이의 분해에 관여하는 효소의 활성도에 영향을 미쳤거나 분해세균에게 독성 효과를 나타내기 때문인 것으로 판단된다.[15]

분해실험이 종료된 후에 세균의 농도 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 세균 당 기질의 양이 가장 적은 조건(9.8×10^8 CFUs/mL, 10 μmole)에서는 초기보다 세균의 농도가 13% 감소하였다. 이것 이외의 모든 조건에서는 세균의 농도가 증가하였다. 세균의 증식 정도는 세균 당 기질의 양과 관계가 있는 것으로 나타났다(Fig. 4). 초기에 주입한 톨루엔의 양과 접종한 세균의 수로부터 세균 당 기질의 양을 구하고, 분해 실험 후 세균의 증식비율을 구하여, 두 요인 사이의 관계를 살펴본 결과, 세균 당

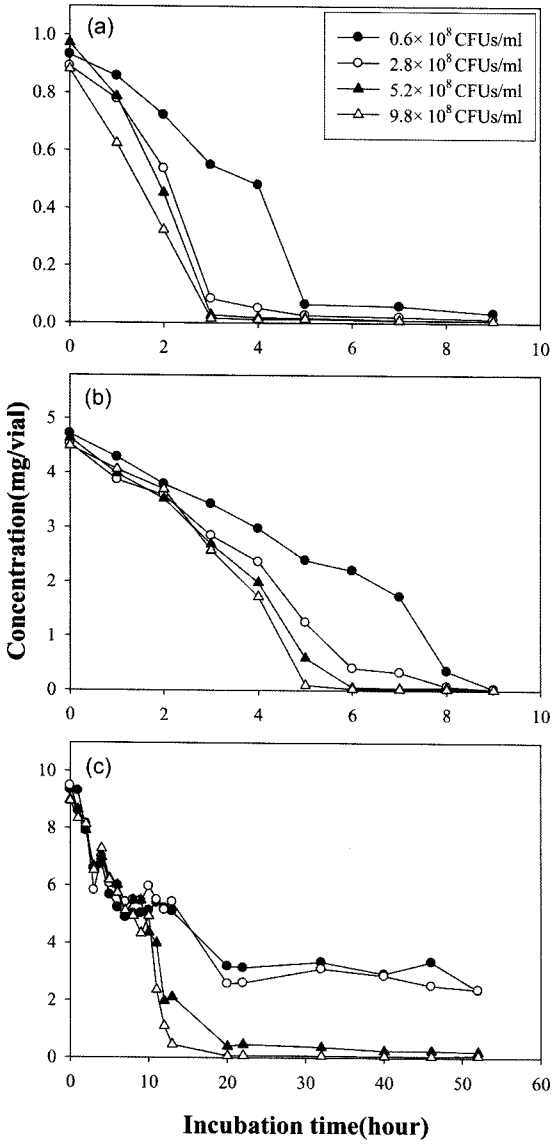

Fig. 2. Time course of toluene degradation at different substrate and bacterial concentrations by a toluene-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. TDB-4. The initial concentration of toluene was 10 μmole(a), 50 μmole(b), or 100 μmole(c) per vial.

기질의 양이 적은 조건에서는 이 값이 증가함에 따라 세균의 증식 비율도 증가하였다. 하지만, 세균의 수에 비하여 많은 양의 톨루엔을 첨가하였을 때에는 세균 증식 비율이 감소하였다. 이러한 결과는 TDB-4가 높은 톨루엔 농도에서는 성장이 저해되는 것을 의미하며, 이는 시간에 따른 톨루엔 분해 속도를 측정한 실험(Fig. 2)에서 나타난 결과와 일치한다.

시간당 톨루엔의 농도 변화를 이용하여 톨루엔 분해속도를 계산한 결과, 2.96~85.1 pg/cell/hr 범위로 나타났다(Table 2). 최저 속도는 10 μmole의 톨루엔과 9.8×10^8 CFUs/mL의 세균을 접종한 시료에서 나타났으며, 최고 속도는 50 μmole, 0.6×10^8 CFUs/mL의 세균을 접종한 시료에서 관찰되었다. 50 μmole을 첨가한 시료에서의 분해속도가 10 μmole과 100 μmole을 첨가한 시료보다 높게 나타났다. 이는 50 μmole 첨가시료

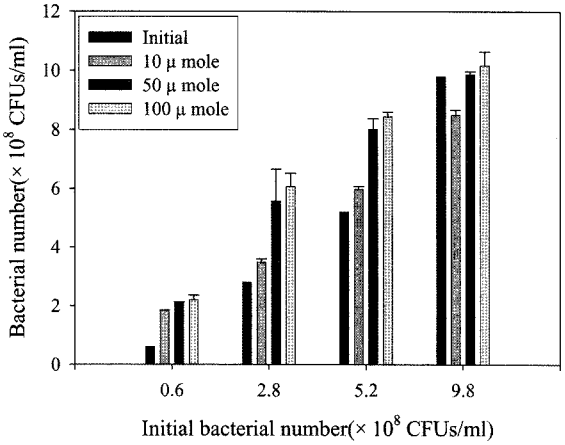

Fig. 3. Change of bacterial number in the samples after degradation experiments.

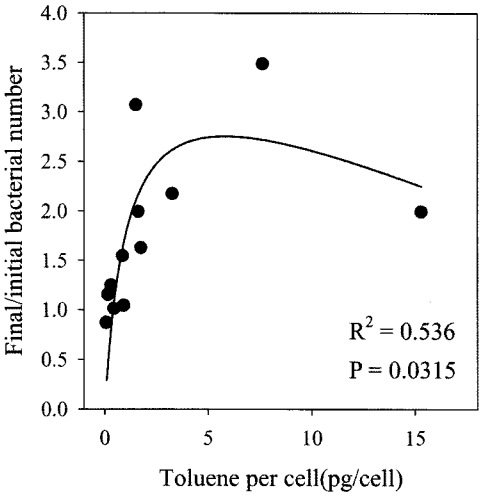

Fig. 4. Relationship between the amount of substrate(toluene) per cell and the ratio of final and initial bacterial concentration in samples.

는 10 μmole 첨가시료에 비해 기질이 풍부하고, 100 μmole과 같이 과량의 톨루엔에 의한 독성효과가 적기 때문에 분해속도가 빠른 것으로 보인다. 이러한 결과는 기질의 농도와 초기 접종량의 차이에 따른 분해세균의 증식 속도를 살펴본 위의 결과와 같은 경향을 보이는 것이다. 이와 같이 높은 농도의 기질 첨가로 인해 물질 분해도가 감소하고, 분해 세균의 성장이 제한되는 것은 톨루엔을 비롯하여 다른 휘발성 화합물의 분해실험에 대한 기존의 연구 결과에서도 알려져 있다.[9,15]

Table 2. Toluene degradation rates in various conditions by TDB-4

Toluene (per vial)	Initial bacterial number(×10^8 CFUs/mL)			
	0.6	2.8	5.2	9.8
10 μmole	26.8*	8.48	5.13	2.96
50 μmole	85.1	21.7	15.2	8.78
100 μmole	45.8	9.84	8.68	6.10

* Degradation rate : pg/cell/hr

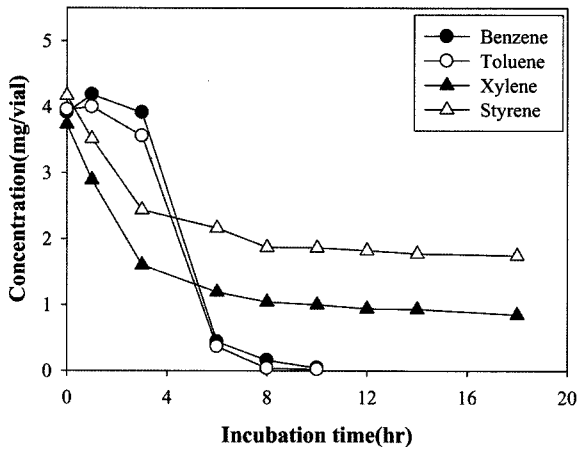

Fig. 5. Time course of degradation of various volatile organic compounds by a toluene-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. TDB-4.

3.3. 다른 휘발성 유기화합물의 분해 특성

다른 종류의 휘발성 유기화합물에 대한 *Pseudomonas* sp. TDB-4의 분해특성을 관찰하기 위하여, 톨루엔 이외에 benzene, xylene, styrene을 첨가하고 시간에 따른 분해도를 측정하였다. Benzene의 경우 톨루엔과 분해 양상 및 분해 속도가 거의 유사하여, 매우 빠른 속도로 분해되었다(Fig. 5). 반면, xylene과 styrene의 경우에는 18시간 동안 각각 초기 주입량의 77%, 58%를 분해하였다. 이러한 결과는 톨루엔 분해 세균인 TDB-4가 다른 휘발성 유기화합물도 활발히 분해할 수 있음을 의미한다. 단일 세균이 비슷한 종류의 오염물질 분해능을 나타내는 것은 널리 알려져 있으며,[14,16] 톨루엔과 다른 휘발성 유기화합물의 구조가 비슷하기 때문에 톨루엔 분해에 관여한 효소가 작용하여 나타난 결과로 판단된다. Styrene과 xylene의 분해도가 톨루엔에 비하여 떨어지는 것은 TDB-4가 톨루엔에 대하여 적응되어 있기 때문인 것으로 보인다. 만일 styrene 또는 xylene을 지속적으로 공급하면 분해능이 향상될 것이다. 실제로 하수종말처리장의 잉여슬러지를 혼합세균으로 접종한 BFR에 스타일렌을 지속적으로 공급한 후 농화된 세균의 종류를 FISH 방법(fluorescence in situ hybridization)으로 확인한 결과, TDB-4가 우점하는 것으로 나타났다.[17] 이러한 결과는 TDB-4가 휘발성 유기화합물에 대한 이용도가 높고 사용 가능한 종류가 다양하며 성장속도가 빠르기 때문에 나타난 것으로 보인다.

이상의 결과로부터, 계면활성제 생물반응기에 TDB-4를 도입하거나 이들이 우점할 수 있는 운전조건을 설정하면, 악취 근원 물질의 일종인 휘발성 유기화합물을 효과적으로 제어하는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

하수슬러지를 식종하고 톨루엔을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 장기간 공급한 계면활성제 미생물 반응기(BFR)에서 분리한, 톨루엔 분해세균의 분류학적 특징 및 톨루엔 분해 특성에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 톨루엔을 유일탄소원 및 에너지원으로 주입한 미생물 반응기에서 톨루엔 분해 세균을 분리하여 TDB-4로 명명하였다. 16S rDNA 염기서열을 사용한 계통분류학적 분석을 통하여 TDB-4는 *Pseudomonas* 속에 속하는 것으로 판단되었다.

2) TDB-4를 사용하여 톨루엔 농도에 따른 분해특성을 파악한 결과, 같은 기질 농도에서 세균의 농도가 높을수록 잠복기(lag phase)가 짧고, 분해속도가 커지며 안정수준(plateau level)에 도달하는 시간이 짧아지는 것으로 나타났다.

3) 톨루엔 농도에 따른 분해특성을 살펴본 결과, 50 μmole을 첨가한 시료에서 분해속도가 가장 빠르며 기질의 양이 100 μmole일 때 분해속도가 감소하였다. 세균의 증식 정도와 세균 당 기질의 양과의 관계를 보면, 세균 당 기질의 양이 적은 조건에서는 이 값이 증가함에 따라 세균의 증식 비율도 증가하지만, 높은 조건에서는 세균 증식 비율이 감소하였다. 이러한 결과는 고농도의 톨루엔을 공급하였을 때 이의 독성에 의해 TDB-4의 톨루엔 분해능 및 증식이 억제되는 것을 의미한다.

4) TDB-4에 의한 다른 종류의 VOC에 대한 분해특성을 관찰한 결과, benzene의 분해 정도 및 분해속도는 톨루엔과 유사하였으며, xylene과 styrene의 경우에는 18시간 동안 각각 초기 주입량의 77%, 58%를 분해하였다. 이러한 결과는 톨루엔 분해 세균인 TDB-4가 다른 휘발성 유기화합물에 대한 이용도가 높고 사용 가능한 종류가 다양한 것을 의미한다.

5) 분리된 세균의 유전학적 정보를 파악한 후 FISH와 같은 분자생물학적 군집구조분석에 적용함으로써, 생물 반응기의 장기 운전에서 발생할 수 있는 미생물 군집의 천이를 통한 급격한 VOC 제거율 감소현상을 미연에 방지할 수 있는 기술적 토대를 마련할 수 있을 것으로 보인다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R012005-000-10675-0) 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 환경부, "악취방지법 시행규칙"(2005).
2. Cox, H. H. J. and Deshusses, M. A., "Biomass control in waste air biotrickling filters by protozoan predation," *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 216~224(1999).
3. Laurenzis, A., Heits, H., Wubker, S. M., Heinze, U., Friedrich, C., and Werner, U., "Continuous biological waste gas treatment in stirred trickle-bed reactor with discontinuous removal of biomass," *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 497~503(1998).
4. Phipps, D. W., "Biodegradation of volatile organic contaminants from air using biologically activated foam,"

US Patent, No. 5,714,379(1998).

5. 김용식, 손영규, 김지형, 송지현, "계면활성제 거품을 이용한 미생물반응기에서의 기체상 톨루엔 분해," 대한환경공학회지, **27**(5), 468～475(2005).
6. NTP(National Toxicology Program), "Toxicology and carcinogenesis studies of toluene(CAS No. 108-88-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice(inhalation studies)," Technical Report Series No. 371. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.(1990).
7. WHO, "Environmental Health Criteria 52, Toluene," World Health Organization, Geneva(1985).
8. Kobayashi, H. and Rittman, B. E., "Microbial removal of hazardous organic compounds", *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 170A～183A(1982).
9. Hori, K., Yamashita, S., Ishii, S., Kitagawa, M., Tanji, Y., and Unno, H., "Isolation, characterization and application to off-gas treatment of toluene-degrading bacteria," *J. Chem. Eng. Japan*, **34**(9), 1120～1126(2001).
10. Lee, D.-H., Zo, Y.-G., and Kim, S.-J., "Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3112～3120(1996).
11. Pulliam Holoman, T. R., Elberson, M. A., Cutter, L. A., May, H. D., and Sowers, K. R., "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**, 3359～3367(1998).
12. Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker Jr., C. T., Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M., and Tiedje, J. M., "The RDP-II (ribosomal database project)," *Nucleic Acids Res.*, **29**, 173～174(2001).
13. 전연신, 이태호, 이은영, 조경숙, 류희옥, "VOC 제거용 바이오필터로부터 분리한 Enterobacter agglomerans X9-c의 toluene 분해 특성," 대한환경공학회지, **23**(5), 889～898(2001).
14. Deeb, R. A. and Alvarez-Cohen, L., "Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and Rhodococcus rhodochrous," *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 526～536(1999).
15. Zahir, Z., Seed, K. D., and Dennis, J. J., "Isolation and characterization of novel organic solvent-tolerant bacteria," *Extremophiles*, **10**(2), 129～38(2006).
16. 이승우, 이준명, 장덕진, "*Pseudomonas putida* F1과 *Burkholderia cepacia* G4에 의한 BTEX, trichloroethylene의 분해," 한국생물공학회지, **13**(5), 561～568(1998).
17. 장현섭, 신승규, 송지현, 황선진, "계면활성제 미생물 반응기의 VOC 혼합물 생분해 II: 미생물의 군집해석," 대한토목학회지, **26**(6B), 695～701(2006).