

# 유류오염토양에서 분리된 MTBE(Methyl Tertiary Butyl Ether) 이용 균주의 MTBE 분해특성

## Characterization of MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) Utilizing Bacteria from the Gasoline Contaminated Soils

안 상 우<sup>1)</sup> · 이 시 진<sup>2)</sup> · 박 재 우<sup>3)</sup> · 장 순 웅<sup>†</sup>

An, Sangwoo · Lee, Sijin · Park, Jaewoo · Chang, Soonwoong

**ABSTRACT :** In this study, we have isolated MTBE utilizing bacteria at the gasoline contaminated soil and also MTBE degradation patterns were characterized. The 18 bacterial mono-cultures isolated from enrichment cultures were screened for MTBE degradation. Of the 18 strains, the 3 strains (*Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Achromobacter*) have shown effective MTBE degradation. Experimental parameters affecting the growth conditions (such as temperature, pH, initial cell mass) were optimized. Experimental parameters such as temperature 30°C, pH 7, and initial cell mass 0.6 g/mL in optimal growth conditions for MTBE degradation. The optimal growth conditions of the isolated stains were temperature 30°C, pH 7, and initial cell mass 0.6 g/mL in our experiment, respectively. The first order degradation coefficients of *Achromobacter*, Mixed culture, *Pseudomonas*, and *Flavobacterium* were 0.072, 0.066, 0.047, and 0.032 hr<sup>-1</sup>, respectively. and also, it could be expressed as a degradation rate considering cell mass (1.302, 1.019, 0.523, and 0.352 mg/TSS g/hr for each microorganism). Although *Achromobacter* has shown highest MTBE degradation rate, degradation rate for BTEX was relatively lower than other strains. and Mixed culture and *Flavobacterium* have shown similar degradation pattern for MTBE and BTEX biodegradation.

**Keywords :** Biodegradation, BTEX, MTBE, MTBE utilizing bacteria

**요 지 :** 본 연구에서는 가솔린으로 오염된 토양에서 MTBE이용 분해균주를 분리하였으며, 분리한 각 균주의 MTBE 생분해특성을 파악하고자 하였다. 오염된 토양 내에서 MTBE 이용 혼합균주 중 총 18균주를 분리한 후, 18균주 중 3개의 균주(*Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*)에서 MTBE의 생분해가 나타났다. MTBE 이용 균주의 최적 생장인자는 배양온도 30°C, pH 7, 균접중 농도는 0.6g/mL로 조사되었다. *Achromobacter*, 혼합균주, *Pseudomonas*, 그리고 *Flavobacterium*의 MTBE 일차 분해계수는 0.072, 0.066, 0.047, 0.032hr<sup>-1</sup>로 조사되었다. 그리고 균접중농도를 고려한 MTBE 생분해속도는 1.302, 1.019, 0.523, 0.352mg/TSS g/hr로 관측되었다. MTBE 단독기질로 존재할때 MTBE분해속도가 가장 높은 *Achromobacter*는 BTEX와 동시에 존재하였을 경우 다른 균주들에 비하여 낮은 MTBE 분해능을 나타내었다. 또한, MTBE 이용 혼합균주와 *Flavobacterium*은 MTBE와 BTEX 생분해 특성이 비슷한 것으로 나타났다.

**주요어 :** 생분해, BTEX, MTBE, MTBE 이용 균주

## 1. 서 론

가솔린은 대표적인 원유생산물로서 다양한 탄화수소로 구성되어, 연료로서 요구되는 성능과 환경 규제기준에 따라 원유를 정제 시 가솔린의 성분함량이 결정된다. 가솔린의 성분함량 중 18%(Wet.) 이상을 구성하는 BTEX(Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene)는 주로 가솔린 저장탱크와 다양한 산업공정으로부터 환경에 배출되어 주변 토양 및 지하수를 오염시키는 것으로 알려져 있다. BTEX는 다른 가솔린 성분 중에서 상대적으로 물에 대한 용해성이 크고, 인체에

유독하며, 특히 Benzene은 대표적인 발암성 물질로 분류된다. 가솔린의 연료첨가제로써 MTBE(Methyl Tertiary Butyl Ether)는 우리나라에서 1984년부터 사용되기 시작하였으며, 1993년 환경보전법에 의하여 MTBE의 가솔린 배합이 의무화되어 현재까지도 계속 사용되고 있다. 하지만 MTBE가 미국 EPA(Environmental Protection Agency)에 의하여 2급 발암물질로 규정됨에 따라 캘리포니아주를 비롯한 17개 주에서 MTBE의 생산 및 사용을 금지시켰고, 유럽에서도 규제강화 등 대비책을 강구하고 있다. 우리나라도 정부 조사 결과 MTBE의 위해성이 검증되어 2006년부터 대체방안이

1) 정희원, 한양대학교 건설환경공학과 박사과정

2) 비희원, 경기대학교 환경에너지시스템공학과 교수

3) 정희원, 한양대학교 건설환경공학과 교수

† 정희원, 경기대학교 환경에너지시스템공학과 교수(E-mail : swchang@kyonggi.ac.kr)

추진되고 있다. 또한, 우리나라의 경우에는 전국적으로 유류저장탱크와 수송관이 주로 지하에 설치되어 있으며, 주유소 설치 자유화에 따른 유류저장탱크의 증가로 인하여 유류저장탱크 주변의 토양과 지하수가 BTEX와 MTBE로 오염될 가능성이 크고, 현재 상당량의 오염이 진행되었다고 예상할 수 있다(Arp와 Schmidt 2004; 정경미 등, 2006; 김미경 등, 2004).

환경에 배출된 BTEX는 대수층 내에 용존하거나 Non-Aqueous Phase Liquids(NAPLs) 상태로 지하에 존재하며, 대수층 내에서는 방향족 탄화수소의 소수성 특성에 의하여 토양에 흡착되어 지하수의 오염원으로 오랜 시간 동안 존재하게 된다. 또한, NAPLs의 질량변화는 매우 느린 속도로 변화하여 지하 환경의 오염을 악화시킨다. 하지만 MTBE(water solubility: 5.2~5.4g/L,  $K_{ow}$ : 0.94~1.16)는 BTEX에 비해 수용해도가 높아 지하물질에 거의 흡착이 되지 않아 MTBE의 유동이 흡착에 의해 지연되기 어렵기 때문에 오염지역이 광범위한 것으로 알려져 있다. BTEX와 MTBE의 정화방법으로는 물리·화학적 처리방법과 생물학적 처리방법이 있으나 오염지역이 광범위할 경우에는 토양 및 지하수에 생존하는 토착미생물의 성장과 재생산을 인위적으로 가속화시켜 포화지역에 있는 유기성분의 분해를 촉진시키는 생물학적 처리기술을 적용하여 오염지역을 복원하게 된다. 생물학적 처리방법은 정화비용이 저렴하며 2차 오염을 유발하지 않는 환경 친화적인 장점으로 많은 주목을 받고 있다. 생물학적 처리기술은 추가적인 영양물, 전자수용체, 전자공여체 등을 토양 및 지하수에 주입하여 미생물의 증식을 촉진시켜 유류오염물질을 생분해한다(김미경 등, 2004; Pruden과 Suidan, 2004).

MTBE의 분해연구 초기에는 호기성 상태에서 분해가 이루어지지 않는 것으로 알려져 있었으나(Fujiwara 등, 1984), Salanitro 등(1994)에 의하여 metabolism에 의한 MTBE 생분해가 처음 보고된 이후로 미생물을 이용한 MTBE 분해에 관한 많은 연구들이 진행되었다. 현재 미생물을 이용한 MTBE의 생분해 연구는 MTBE를 단독 탄소원으로 사용하는 metabolism과 MTBE를 직접적으로 미생물이 이용할 수는 없지만 다른 1차 기질을 이용하여 생산되는 효소에 의한 MTBE를 분해하는 co-metabolism의 연구가 진행되고 있다(Steffan 등, 1997; Smith 등, 2003). Salanitro 등(1994)의 MTBE metabolism의 연구에서 MTBE 분해 혼합균주가 120 $\mu$ g/mL의 MTBE를 생분해하였으며, MTBE의 분해속도는 34mg/cell/hr로 발표하였다. 또한, Mo 등(1997)이 슬러지에서 분리한 MTBE 분해균주인 *Methylobacterium*, *Rhodococcus*과 *Arthrobacter*는 60mg/L MTBE를 1주에서 2주안에 생분해하였으며, 혼합균주가 순수균주보다 MTBE생분해능이 높은 것으로 보고하였다. Biofilter에서 분리한 Proteobacteria를 이용한 MTBE 생

분해 실험에서 500 $\mu$ g/mL의 MTBE를 1.17g/mL/hr의 분해속도로 생분해한 것으로 보고되기도 하였다(Hanson 등, 1999). 마지막으로 Steffan 등(1997)이 처음 보고한 co-metabolism에 관한 연구에서는 propane 산화 박테리아(ENV 421과 ENV 425)의 mg cell protein당 9.2nmol/min(0.8 $\mu$ g/min)과 4.6nmol/min(0.4 $\mu$ g/min)의 분해속도로 MTBE를 분해하는 것으로 보고하였으며, 방향족 탄화수소 뿐만 아니라 지방족 탄화수소를 1차 기질로 MTBE를 생분해하는 연구들도 보고되어 MTBE의 생분해에 관한 가능성 및 연구는 활발히 이뤄지고 있는 실정이다.

하지만 우리나라에서는 MTBE의 위해성이 검증되었음에도 불구하고 아직까지 현재 법적 규제치가 존재하지 않아 BTEX를 포함한 유류오염물질들에 비하여 생물학적 분해에 관한 기초연구가 부족한 실정이다. 더불어 국내토양에서 MTBE의 생분해에 관여하는 metabolism과 co-metabolism을 포함한 연구 및 균주특성에 관한 연구도 많이 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유류물질 중 가솔린으로 오염된 국내토양에서 MTBE 이용 분해균주를 배양하고자 하였으며, 균주를 배양한 후에 미생물 성장에 영향을 미치는 환경요인과 더불어 단일 탄소원으로써 MTBE 생분해 특성을 파악하고자 하였다. 또한, MTBE 뿐만 아니라 BTEX와 함께 존재할 경우에 복합기질에 의한 미생물의 촉진 혹은 저해반응을 규명하여 향후 생물학적 복원에 필요한 기초자료를 확보하고자 하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1 MTBE 이용 균주의 분리

본 연구에서는 유류에 오염된 토양 시료를 채취 후, 채취한 시료는 NB(Nutrient and Broth) 배지 100mL에 0.1%에 해당하도록 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 호기조건으로 MTBE 분해균주를 증식배양을 하였다. 균주의 증식 및 회분식 실험을 위해서 BSM(Basal Salts Medium)과 NB배지를 사용하였다. BSM 배지는 증류수 1L당 stock A, stock B의 용액을 각각 50mL를 첨가하였으며 단일 탄소원으로 500mL 배양액에 MTBE 액상 기준 100mg/L을 주입하였다. BSM배지의 조성은 표 1에 나타내었다. 또한 NB 배지의 조성은 증류수 1L당 Peptone 5g, Beef extract 3g이었다.

MTBE 이용 균주를 분리하기 위하여 증식이 확인된 NB 배지에서 1mL의 균주 배양체를 MTBE 100mg/L가 주입된 BSM(250mL)에 접종하였으며, 미생물 생장은 OD(optical density)를 측정하여 살펴보았다. MTBE 분해능 및 성장(OD>0.1)이 확인된 배양 bottle을 대상으로 재차 계대배양을 실시하였

표 1. BSM배지의 조성

Stock A (D.W: 1L)	Stock B (D.W: 1L)
Potassium phosphate : 85g	Nitrilotriacetic acid : 2.46g
Sodium phosphate : 20g	Magnesium sulphate : 0.4g
Amomonium chloride : 40g	Ferrous sulphate : 0.24g
	Manganese sulphate : 0.06g
	Zinc sulphate : 0.06g
	Cobalt chloride : 0.02g
cf.) Adjust pH 6.8~7.1	

으며, 총 3회의 계대배양을 실시한 후에, 0.1mL의 균주 배양체를 증식 고체배지인 NB agar plate에 도말하였다. 30℃ 배양기에서 배양 후, NB agar plate에 생성된 colony 총 18개 균주를 분리하였으며, 분리한 18개의 균주를 대상으로 동정을 실시하였다.

## 2.2 MTBE 이용 균주의 동정

분리 균주의 형태학적 특징은 단순 염색(Simple staining)과 그람 염색(Gram staining) 후, 광학현미경(BH-2, Olympus Inc., Japan; x1,000)하에서 형태와 크기, 군집 형태, 그람 양성/음성 박테리아로 판별하였으며, 분리 균주의 운동성은 wet mount method로 위상차 현미경(BH-2, Olympus Inc., Japan; x1,000)으로 관찰하였다. 분리 균주의 생리·화학적 특징은 미생물의 효소 작용 등의 검정실험을 하여 판별하였다. 또한, 분리균주의 생리·화학적 특징을 검정하기 위하여 Bergey's Manual과 API kit를 활용하여 분리균주를 동정하였다.

API 20NE kit(bioMerieux, France)는 식품, 의학, 생명, 환경분야에서 16S rRAN의 염기서열분석법과 함께 미생물의 동정에 많이 사용되고 있는 방법으로써(Nsabimana 등, 1999; 이영근 등, 2004; Adnan과 Tan, 2007; Declerck 등, 2007; 김현욱 등, 2008; Tang 등, 2008) biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 이용하여 미생물을 동정하게 된다. API kit에 의해서 도출된 분리균주의 생리·화학적 특징을 API web(www.apweb.biomerieux.com)에 입력하여 미생물의 동정 결과를 살펴보았으며, 더불어 Bergey's Manual을 활용하여 Genus 단계까지 동정하였다.

## 2.3 MTBE 생분해실험 및 분석방법

분리된 MTBE 분해균주를 이용하여 환경 조건별 MTBE 분해 특성과 BTEX와 MTBE가 동시에 존재하였을 때에 MTBE의 분해 특성 실험을 위하여 amber serum bottle(120mL) BSM 배지 50mL를 첨가하고 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 막은 후, 진공 펌프로 bottle 내부의 공기를 제거하고 호기성 조건을 유지해주기 위해 O<sub>2</sub> 20mL를 주입하였

으며, 나머지 headspace는 Air로 채워주었다. MTBE 초기농도, pH, 균 접종 농도 및 BTEX 농도는 실험조건에 조절하였고, 시간 경과에 따라 headspace 분석을 통해 MTBE 및 BTEX 분해 특성을 조사하였다. 모든 실험은 공실험(control)과 더불어 동일한 실험을 총 3회 실시하였다.

MTBE와 BTEX의 분석은 Agilent 6890N Gas Chromatography system과 검출기는 FID(Flame ionization detector)를 사용하였다. 분석에 사용된 column은 Agilent사의 HP-5를 이용하였고, column의 길이는 50m이며 내경은 0.2mm이고 column의 두께는 0.33μm이다. 운반 기체(carrier gas)는 99.999%의 질소를 사용하였다. 미량 농도의 MTBE(1mg/L 이하)와 BTEX(1mg/L 이하)의 수착을 위해 SPME 장치는 Supelco사(U.S.A.)의 SPME manual holder를 사용했으며, fiber 역시 Supelco사의 CAR/PDMS를 사용하였다. 모든 시료는 120mL bottle에 배지 50mL로 하였으며 이 bottle에는 aluminium cap과 silicone/PTFF septum으로 봉한 다음 상온에서 혼합하여 실험 조건을 잡았다(Arp와 Schmidt, 2004). 또한, 실험에 사용된 모든 초사류 및 기기는 고압증기 멸균기를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였으며, 광합성에 의한 미생물 성장을 최소화하기 위해 amber serum bottle(120mL)을 이용하였다(안상우와 장순웅, 2004).

## 3. 실험결과 및 고찰

### 3.1 MTBE 이용 균주의 분리 및 동정

오염된 토양 내에서 MTBE 이용 혼합균주 중 총 18균주를 분리한 후, 형태학적 특징 및 생리·화학적 특징을 조사한 결과 4개의 그룹으로 구분되었으며, 분리된 모든 균주는 그람 음성균으로 판정되었다. 분리균주의 동정 결과 표 2와 같이 Group I 균주는 *Flavobacterium*, Group II 균주는 *Pseudomonas*, Group III 균주는 *Stenotrophomonas*, 그리고 Group IV 균주는 *Achromobacter*로 동정되었다. 이들 균주들은 난분해성으로 알려진 BTEX, MTBE 및 PCBs(poly-chlorinated biphenyls)를 생분해 가능한 균주로 알려져 있다(Ahmed과 Focht, 1973; Lee 등, 2002; Lin 등, 2007).

특히 분리된 균주 중 대부분의 균주들은 MTBE를 단일 탄소원으로 사용할 수 있는 균주들로 BTEX와 함께 존재할 때에 MTBE뿐만 아니라 BTEX도 생분해할 수 있는 것으로 알려져 있다(Deeb 등, 2000; Sedran 등, 2002; Lu 등, 2006; Munoz-Castellanos 등, 2006). 그 중에서 Salanitro 등(1994)은 *Pseudomonas*와 *Achromobacter*를 포함한 5개 균주를 분리하여 MTBE의 생분해능을 조사하여 MTBE를 metabolism에 의하여 분해한 것으로 보고하였다. 또한, Sedran 등(2002)은

표 2. 유류오염토양에서 분리된 균주의 생화학적 특징

Staine	Group I	Group II	Group III	Group IV
Gram stain	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+
Oxi	+	+	-	+
NO <sub>3</sub>	-	+	+	+
TRP	+	-	-	-
GLU	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-
URE	+	-	-	+
ESC	+	-	+	-
GEL	+	-	+	-
PNPG	-	-	+	-
GLU	-	-	+	-
ARA	-	-	-	-
MNE	-	-	+	+
MAN	-	-	-	-
NAG	-	-	+	+
MAL	-	-	+	+
GNT	-	+	-	(+)
CAP	-	+	-	-
ADI	-	-	-	-
MLT	-	+	+	+
CIT	-	(+)	+	-
PAC	-	+	-	-
Genus	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Achromobacter</i>

*Flavobacteria*, *Proteobacteria*, 그리고 Gram positive bacteria 로 구성된 혼합균주를 이용하여 MTBE와 BTEX를 동시에 생분해하였다. 따라서 분리된 MTBE 이용 혼합균주와 혼합균주에서 분리된 순수균주의 MTBE 생분해 가능성과 더불어 최적배양조건을 도출하기 위한 MTBE 생분해 실험을 실시하였다.

### 3.2 MTBE 이용 균주의 최적배양인자 도출

MTBE 이용 혼합균주의 최적 성장인자를 도출하기 위하여 온도 및 pH 등의 다양한 조건에서 실험을 실시하였다. MTBE의 분해가 확인된 MTBE 이용 혼합균주를 이용하여 MTBE가 단일 기질로 존재하였을 때에 환경적 요인에 따른 MTBE 분해능을 살펴보았다. 이는 생물학적 복원을 위해서는 오염물질을 분해시킬 수 있는 미생물과 더불어 미생물의 생분해도를 증가시킬 수 있는 환경조건(영양소, 전자수용체, 온도, 함수율, pH, 온도 등)에 대한 적절한 제어가 동시에 이뤄지기 때문에 다양한 환경적 요인에 따른 MTBE 이용 균주의 MTBE 분해율을 살펴보았다. MTBE의 생분해율을 이용하여 MTBE 이용 균주의 최적배양인자를 간접적으로 선정하여 기타 MTBE 생분해 실험의 배양조건으로 동일

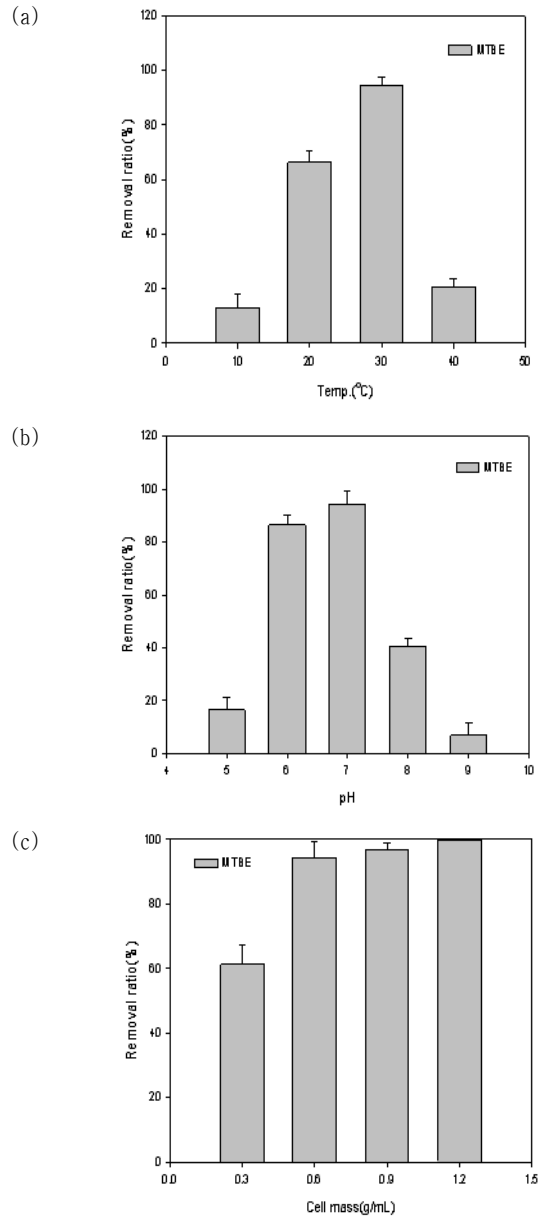


그림 1. MTBE 생분해에서 (a) 온도, (b) pH, 그리고 (c) 균집중농도의 영향

하게 적용하였다.

그림 1에서는 단일 탄소원으로 MTBE 20mg/L(액상기준)을 주입한 후에 배양온도의 변화(10°C ~ 40°C), 생장 pH(5~9)의 변화, 그리고 균집중농도의 변화(0.3g/mL ~ 1.2g/mL)에 따른 MTBE 분해특성 결과를 보여주고 있다. 온도변화에 따른 MTBE 생분해는 30°C에서 94.3%로 분해율이 가장 높았으며, 20°C인 경우 약 67%의 MTBE 제거율을 보였다(pH=7, 균집중농도=0.6g/mL). 최적 pH 7일 때와 비교하였을 때 pH 6인 경우 약 12%정도의 분해율이 떨어짐을 확인할 수 있었으나, pH가 산성과 염기성일 때에 분해율은 급속히 떨어지는 것을 관찰하였다(배양온도=30°C, 균집중농도=0.6g/mL). 또한 균집중농도를 각각 0.3, 0.6, 0.9, 1.2g/mL일 때 51.2,

94.3, 96.7, 99.8%의 MTBE 제거율을 나타내고 있어(배양온도=30°C, pH=7), 현장조건에서 MTBE 분해 특성은 다소 다르겠지만, MTBE 분해균주의 균집중농도 0.6mg/mL는 MTBE 생분해에 있어서 적절한 균집중양인 것으로 확인되었다. 따라서 MTBE 이용 혼합균주의 최적배양 환경인자는 배양온도 30°C, pH 7, 그리고 균집중농도는 0.6g/mL로 조사되었다.

### 3.3 MTBE 기질농도에 따른 MTBE 분해특성

MTBE 초기농도 변화에 따른 MTBE 제거율에 미치는 영향을 조사하기 위해, 균주별 실험은 각 균주별 초기 균주 집중 농도는 0.6g/mL를 주입하였으며, pH 7 및 온도 30°C로 7일간 실험을 진행하였다. MTBE의 초기 농도는 10mg/L, 20mg/L, 30mg/L, 40mg/L, 50mg/L로 변화를 주어 MTBE 분해 균주별 분해 특성을 실험 하였다. 예비실험결과, BTEX의 호기성 생분해는 가능하나 MTBE를 단일 기질로써 이용하지 못하는 *Stenotrophomonas*를 실험에서 제외하고 *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*와 혼합균주를 대상으로 MTBE의 분해 특성을 파악하였다.

그림 2는 MTBE 농도변화에 따른 각 균주별 MTBE 이용율을 나타내었다. 기질농도별 혼합균주와 *Achromobacter*는 *Pseudomonas*와 *Flavobacterium* 보다 MTBE 기질 농도의 변화에 둔감한 것을 확인할 수 있었다. MTBE 농도별 기질 이용율을 1차 반응속도 상수식을 이용하여 1차 분해계수를 계산하였을 때, *Achromobacter*, 혼합균주, *Pseudomonas*와 *Flavobacterium* 순으로 각각 0.072hr<sup>-1</sup>, 0.066hr<sup>-1</sup>, 0.047hr<sup>-1</sup>, 0.032hr<sup>-1</sup>로 확인되었다. 이는 Suarez과 Rifai(1999)가 호기성 조건에서의 유류계 탄화수소의 1차 생분해 속도상수는 0.445day<sup>-1</sup>(0.019hr<sup>-1</sup>)이상의 값을 갖는다고 보고한 것과 일치하는 결과로 혼합균주 및 분리균주 모두 생분해능이 모두 우수한 것으로 나타났다. 하지만 *Achromobacter* 순수균주에 비하여 혼합균주의 경우 각 균주별 경쟁적 상호작용에

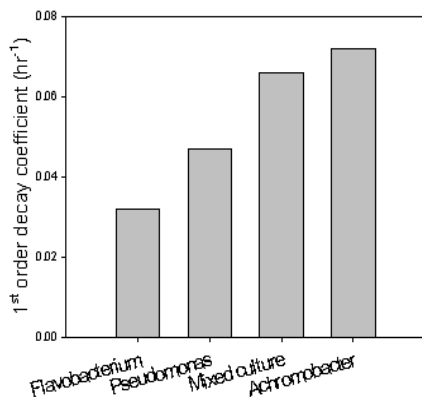


그림 2. MTBE 이용 혼합 및 순수균주의 1차 생분해 속도상수

의하여 다소 1차 생분해 속도상수는 감소하는 것으로 나타났다.

각 균주별 기질 친화성과 최대 MTBE 이용 농도를 살펴보기 위하여 본 연구에서는 SigmaPlot(ver. 9, SPSS Inc., U.S.A.)의 최대 증가량을 산출하는 경험적 모델인 Chapman-Richards 모델(Richard, 1959)인 식 (1)을 이용하여 최대 MTBE 이용 농도를 도출하였다. 식 (1)에서 a는 최대 증가량이며 b는 변화율이다.

$$y = a(1 - e^{-bx}) \quad (1)$$

Chapman-Richards 모델을 이용한 혼합균주 및 순수균주의 최대 MTBE 이용 농도는 그림 3과 표 3에 나타내었다. MTBE 초기 주입량이 증가하면 할수록 모든 균주의 MTBE 생분해는 감소하는 것으로 나타났으며, MTBE 농도가 30mg/L 이상으로 증가하면 기질의 저해반응이 나타나는 것으로 확인되었다. 기질의 최대 이용 농도는 *Archtomobacter* > 혼합균주 > *Pseudomonas* > *Flavobacterium*의 순서로 나타났으며, MTBE의 최대 1차 생분해 속도상수와 일치하였다. MTBE가 단일 기질로 존재하였을 때에 기질 친화성 및 기질이용능이 가장 높은 *Achromobacter*인 경우 *Flavobacterium*에 비하여 최대 MTBE 이용 농도가 약 65% 높은 것으로 나타났으며, 이는 단일 기질로써 MTBE를 이용할 경우 *Achromobacter*가 가장 효율적인 것으로 확인되었다.

MTBE 이용 혼합균주 및 순수균주를 이용한 MTBE 분해

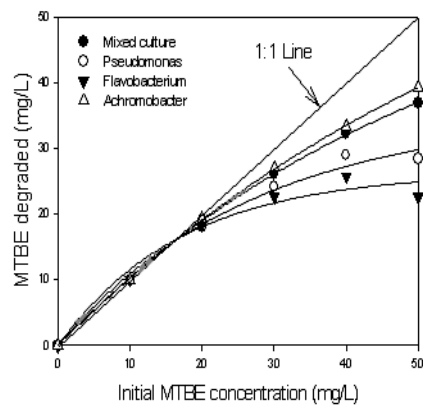


그림 3. MTBE 이용 균주의 초기 MTBE 기질농도와 MTBE 생분해 이용 농도의 관계

표 3. MTBE 이용 혼합 및 순수균주의 최대 MTBE 이용 농도

Stain	Maximum MTBE utilizing concentration (mg/L)	R <sup>2</sup>
Mixed culture	61.536	0.999
<i>Pseudomonas</i>	35.415	0.991
<i>Flavobacterium</i>	26.322	0.974
<i>Achromobacter</i>	76.182	0.999

속도에 대한 kinetics model과 그에 따른 인자값을 산출하기 위한 회분식 실험을 수행하였다. MTBE 분해속도는 저농도에서 선형적으로 증가하지만 농도가 높아짐에 따라 점차 최대치에 도달하는 경향을 보였으며, 이를 정량화하기 위하여 enzyme kinetics에서 잘 알려진 속도식인 Michaelis-Menten의 식 (2)를 적용하였다.

$$v = \frac{v_{Max} \cdot S}{k_m + S} \quad (2)$$

여기서  $v_{Max}$ 는 MTBE 최대분해속도이고  $k_m$ 은  $v=1/2v_{Max}$  일 때의 MTBE 농도인 기질친화도이며,  $S$ 는 MTBE 농도이다.  $v_{Max}$ 와  $k_m$ 을 구하기 위하여 SigmaPlot을 이용하였으며 결과는 그림 4와 표 4에 나타내었다. *Archtomobacter*, 혼합균주, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*의  $v_{Max}$ 는 각각 1.302mg/TSS g/hr, 1.019mg/TSS g/hr, 0.523mg/TSS g/hr, 0.352mg/TSS g/hr으로 조사되었으며,  $k_m$ 은 117.004mg/L, 88.434mg/L, 19.965 mg/L, 37.651mg/L이었다. SigmaPlot으로 산출된 Michaelis-Menten식의 결정계수는 0.964에서 0.999로 매우 유의한 것으로 조

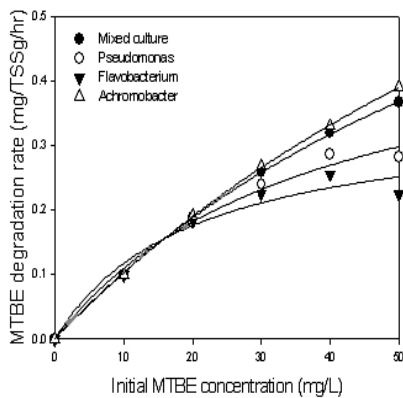


그림 4. MTBE 이용균주의 Michaelis-Menten plot

표 4. 혼합과 순수균주의 MTBE 생분해능의 비교

Stain	Organism	Type of metabolism	MTBE degradation rate	Reference
BC-1	Mixed culture	Aerobic heterotrophic	34mg/cell g/hr	Salanitro et al. (1994)
UCD culture	Mixed culture	Aerobic heterotrophic	0.061mg/L in 2day	Eweis et al. (1998)
Isolate 24	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Aerobic heterotrophic	29% of 200µg/mL in 2weeks	Mo et al. (1997)
Isolate 33	<i>Rhodococcus</i>	Aerobic heterotrophic	28% of 200µg/mL in 2weeks	
Isolate 41	<i>Arthrobacter ilicis</i>	Aerobic heterotrophic	28% of 200µg/mL in 2weeks	
PM1	Member of the β1 subgroup of Proteobacteria	Aerobic heterotrophic	1.17 and 3.56µg/mL/hr for MTBE 50 and 500g/mL	Hanson et al. (1999)
MC	<i>Flavobacterium</i>	Aerobic heterotrophic	12.4mg/protein g/hr	Pimentel-Gonzalez et al. (2008)
KUM	Mixed culture	Aerobic heterotrophic	1.019mg/TSS g/hr	This study
KU3	<i>Archtomobacter</i>	Aerobic heterotrophic	1.302mg/TSS g/hr	
KU18	<i>Pseudomonas</i>	Aerobic heterotrophic	0.523mg/TSS g/hr	
KU5	<i>Flavobacterium</i>	Aerobic heterotrophic	0.352mg/TSS g/hr	

사되었다.

또한, 본 연구에서 분리한 MTBE 이용 균주의 MTBE 분해속도를 기존의 MTBE 생분해 연구들과 비교하기 위해 단위변환 및 분해율을 각각 비교하였다(표 4). Salanitro 등(1994)의 BC-1의 MTBE 분해속도 보다는 본 연구에서 분리한 MTBE 이용균주의 분해속도는 혼합균주의 경우 약 30배 이상 낮은 것으로 조사되었다. 하지만 Mo 등(1997)의 분리균주의 MTBE 분해능(2주 동안 58mg/L 제거)과 Hanson 등(1999)의 PM1의 분해속도(1.95mg/cell g/hr)와 유사한 분해속도를 나타내는 것으로 확인되었다.

### 3.4 MTBE 이용균주의 MTBE와 BTEX 분해특성

가솔린으로 오염된 토양/지하수인 경우 MTBE 이외에 BTEX로 동시에 오염되었을 가능성이 높기 때문에 MTBE 이용 균주의 MTBE와 BTEX의 분해능에 관하여 살펴보았다. 국내·외 연구에서는 BTEX를 동시 분해할 때에는 물질 상호간의 저해영향(inhibitory effects), 촉진영향(stimulation) 등이 주요 기질반응으로 알려져 있다(Church 등, 1999; Deeb 등, 2001; Sedran 등, 2002).

성장기질로는 MTBE와 BTEX를 각각 20mg/L(액상기준)의 농도로 주입하였으며, 초기 균집중농도 0.6mg/mL, pH 7, 그리고 온도 30°C의 조건으로 5일간 생분해경향을 관찰하였다. 본 실험의 기질조건은 MTBE와 BTEX의 기질분포를 1:1로 산정하여 기질이 동시에 존재할 경우 물질상호간 기질반응을 정량화 하고자 하였다. 또한, Deeb 등(2001)의 연구에서 Ethylbenzene과 Xylene의 기질농도가 20mg/L 이상일 경우에 MTBE 분해균주는 저해반응이 나타나는 것으로 보고한 결과를 참조하여, 본 실험에서는 MTBE와 BTEX의 농도를 20mg/L로 선정하였다.

MTBE 혼합균주는 MTBE와 BTEX가 기질로 동시에 존재할 경우에 Benzene과 Toluene을 분해함으로써 Xylene과

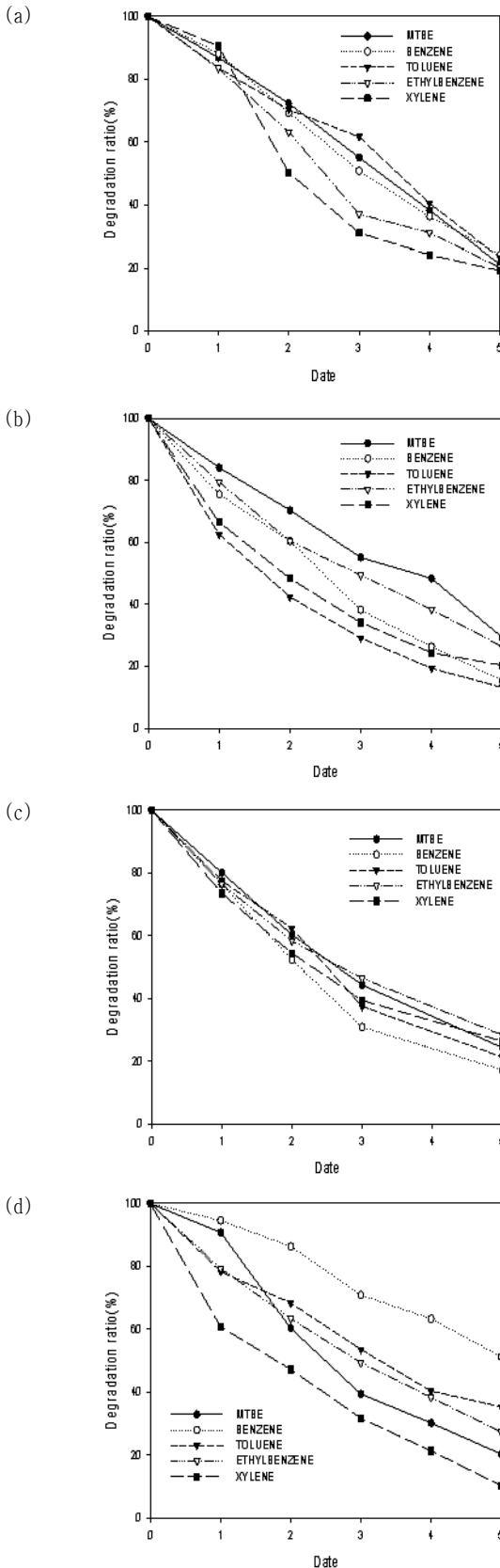
Ethylbenzene의 분해능이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. *Pseudomonas*는 Toluene, Benzene과 Xylene의 기질 친화도가 MTBE와 Ethylbenzene에 비하여 높은 것을 확인 할 수 있었다. 단일 기질로 MTBE의 분해능이 가장 낮은 *Flavobacterium*인 경우 BTEX와 동시에 존재할 경우 MTBE의 분해능이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 다른 균주에 비하여 BTEX의 기질 친화도가 비슷하였으며 그중에서 Benzene과 Toluene의 이용도가 높은 것을 확인 할 수 있었다. 하지만, 단일 기질로 MTBE의 분해능이 가장 높은 *Achromobacter*인 경우 다른 3개 균주에 비하여 기질로서 Xylene과 MTBE의 이용도가 높은 것으로 관찰 되었으며, 그에 반하여 Benzene, Toluene, Ethylbenzene에 분해능은 낮은 것을 확인 할 수 있었다(그림 5).

#### 4. 결 론

본 연구에서는 가솔린으로 오염된 토양에서 MTBE이용 분해균주를 분리 후 회분식실험을 통하여 미생물 증식의 촉진요인과 함께 각 균주의 MTBE 및 BTEX 생분해특성을 파악하고자 하였다. 오염된 토양 내에서 MTBE 이용 혼합균주 중 총 18 균주를 분리한 후, 형태학적 특징 및 생리·화학적 특징을 조사한 결과 *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*로 나타났다. MTBE이용 혼합균주의 최적 생장인자를 도출하기 위하여 온도 및 pH등의 다양한 조건에서 실험을 실시하였으며, 최적의 환경적 요인은 배양온도 30°C, pH 7, 그리고 균 접종농도는 0.6g/mL로 조사되었다. MTBE 농도별 기질 이용율을 일차 분해계수, 최대 MTBE 이용농도, 그리고 MTBE 분해속도를 계산하였을 경우 *Achromobacter*, 혼합균주, *Pseudomonas*, 그리고 *Flavobacterium*순으로 관찰되었다. 또한, 본 연구에서 분리한 MTBE 이용 균주의 MTBE 분해속도를 기존의 MTBE 생분해 연구들과 비교하였을 때 유사한 분해속도를 나타내었다. 마지막으로 MTBE와 BTEX가 복합기질로 존재하였을 때, MTBE 이용균주의 분해특성으로 오염 물질상호간의 저해영향과 촉진영향이 동시에 일어나는 것을 간접적으로 확인할 수 있었으며, 이러한 기질반응을 통하여 혼합균주와 *Flavobacterium*이 다른 균주들에 비하여 안정적으로 오염물질을 제거할 수 있는 것으로 사료된다.

#### 참 고 문 헌

1. 김미경, 정란경, 신정남, 백형환 (2004), 주유소 주변 토양의 BTEX 오염 분석에 관한 연구, *한국환경분석학회지*, Vol. 7,



(a) Mixed culture, (b) *Pseudomonas*, (c) *Flavobacterium* (d) *Achromobacter*  
 그림 5. MTBE 이용 균주의 MTBE와 BTEX 분해특성

- No. 3, pp. 135~141.
- 김현옥, 김혜정, 김태훈, 김태임, 이주연, 김척제, 백현동 (2008), 한국형 육포제조를 위한 원료 돈육의 미생물 분포 및 병원성 미생물의 확인, *한국축산식품학회지*, Vol. 28, No. 1, pp. 76~81.
  - 안상우, 장순웅 (2004), SPME-GC/FID를 이용한 MTBE 및 TBA 분석에 관한 연구, *한국환경분석학회지*, Vol. 7, No. 2, pp. 83~89.
  - 이영근, 장화형, 장유신, 형석원, 정혜영 (2004), Bacillus sp. MS202에 의한 Dinitroaniline계 제초제인 Pendimethalin의 부분환원, *한국환경농학회지*, Vol. 23, No. 4, pp. 197~202.
  - 정경미, 최용수, 홍석원, 이수진, 이상협 (2006), 순수 분리 미생물을 이용한 오염 토양에서의 BTEX 생분해 특성과 미생물 군집변화, *대한환경공학회지*, Vol. 28, No. 7, pp. 757~763.
  - Adnan, A. F. M. and Tan, I. K. P. (2007), Isolation of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Foods and Assessment of the Isolates for Industrial Potential, *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 1380~1385.
  - Ahmed, M. and Focht, D. D. (1973), Degradation of PCBS by Two Species of Achromobacter, *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 19, No. 1, pp. 47~52.
  - Arp, H. P. H. and Schmidt, T. C. (2004), Air-Water Transfer of MTBE, Its Degradation Products, and Alternative Fuel Oxygenates: The Role of Temperature, *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, No. 20, pp. 5405~5412.
  - Church, C. D., Tratnyek, P. J., Pankow, J. F., Landmeyer, J. E., Baehr, A.L., Thomas, M. A. and Schirmer, M. (1999), Effects of Environmental Conditions on MTBE Degradation in Model Column Aquifers, *Proceedings of the Technical Meeting of USGS Toxic Substances Hydrology Program*, Vol. 3, Charleston, S. C., pp. 93~101.
  - Declercq, P., Behets, J., Hoef, V. van and Ollevier, F. (2007), Detection of Legionella spp. and Some of Their Amoeba Hosts in Floating Biofilms from Anthropogenic and Natural Aquatic Environments, *Water Research*, Vol. 41, pp. 3159~3167.
  - Deeb, R. A., Hu, H. Y., Hanson, J. R., Scow, K. M. and Alvarez-Cohen L. (2001), Substrate Interactions in BTEX and MTBE Mixtures by an MTBE Degrading Isolate, *Environmental Science and Technology*, Vol. 35, pp. 312~317.
  - Eweis, J. B., Schroeder, E. D., Chang, D. P. Y. and Scow, K.M. (1998), *Biodegradation of MTBE In A Pilot-Scale Biofilter*, In G. B. Wickramanayake and R. E. Hinchee, Eds., Natural Attenuation: Chlorinated and Recalcitrant Compounds, Battelle Press, Columbus, Ohio, pp. 341~346.
  - Fujiwara Y., Kinoshita T., Sato H. and Kojima I. (1984), Biodegradation and Bioconcentration of Alkylethers, *Yukagaku*, Vol. 33, pp. 111~114.
  - Hanson, J. R., Ackerman, C. E. and Scow, K. M. (1999), Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether by a Bacterial Pure Culture, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 11, pp. 4788~4792.
  - Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K. S. and Ryu, H. W. (2002), Degradation Characteristics of BTEX by Stenotrophomonas Maltophilia T3-c, *Journal of the Air & Waste Management Association*, Vol. 52, pp. 400~405.
  - Lin, C. W., Cheng, Y. W. and Tsai, S. L. (2007), Multi-Substrate Biodegradation Kinetics of MTBE and BTEX Mixtures by Pseudomonas Aeruginosa, *Process Biochemistry*, Vol. 42, pp. 1211~1217.
  - Lu, S. J., Wang, H. Q. and Yao, Z. H. (2006), Isolation and Characterization of Gasoline-degrading Bacteria from Gas Station Leaking-contaminated Soil, *Journal of Environmental Science*, Vol. 18, No. 5, pp. 969~972.
  - Mo, K., Lora, C. O., A. Wanken, E., Javanmardian, Yang, M. X. and Kulpa, C. F. K. (1997), Biodegradation of Methyl t-Butyl Ether by Pure Bacterial Cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 47, pp. 69~72.
  - Munoz-Castellanos, L. N., Torres-Munoz, J. V., Keer-Rendon, A., Manzanares-Papayanopoulos, L. I. and Nevarez-Moorillon, G. V. (2006), Aerobic Biodegradation of MTBE by Pure Bacterial Cultures Isolated from Contaminated Soil., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 22, pp. 851~855.
  - Nsabimana, E., Belan, A. and Bohatier, J. (1999), Analysis at the Genomespecies Level of Microbial Populations Changes in Activated Sludge : the Case of Aeromonas, *Water research*, Vol. 34, No. 5, pp. 1694~1704.
  - Pruden A. and Suidan M. (2004), Effect of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and p-Xylene Mixture on Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) and tert-Butyl Alcohol (TBA) by Pure Culture UC1, *Biodegradation*, Vol. 15, pp. 213~227.
  - Richard, F. J. (1959), A Flexible Growth Function for Empirical Use, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 10, pp. 290~300.
  - Salanitro, J. P., Diaz, L. A., Williams, M. P. and Wisniewski, H. L. (1994), Isolation of a Bacterial Culture That Degrades Methyl t-Butyl Ether, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60 pp. 2593~2596.
  - Sedran, M. A., Pruden, A., Wilson, G. J., Suidan, M. T. and Vensa, A. D. (2002), Effect of BTEX on the Degradation of MTBE and TBA by a Mixed Bacterial Consortium, *ASCE Journal of Environmental Engineering*, Vol. 128, pp. 830~835.
  - Smith, C. A., O'Reilly, K. T. and Hyman, M. R. (2003), Characterization of the Initial Reactions during the Cometabolic Oxidation of Methyl tert-Butyl Ether by Propane-Grown Mycobacterium vaccae JOB5, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 2, pp. 796~804.
  - Steffan, R. J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C. W. and Zhang, D. (1997), Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyl tert-Butyl Ether, Ethyl tert-Butyl Ether, and tert-Butyl Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, pp. 4216~4222.
  - Surez, M. P. and Rifai, H. S. (1999), Biodegradation Rates for Fuel Hydrocarbons and Chlorinated Solvents in Groundwater, *Bioremediation Journal*, Vol. 3, pp. 337~362.
  - Tang, Y. W., Han, J., McCormac, A., Li, H. and Stratton, C. W. (2008), Straphyococcus Pseudolugnuensis sp. nov., a Pyrrolidonyl Arylamidase/ornithine Decarboxylase-Positive Bacterium Isolated from Blood Cultures, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 60, pp. 351~359.
  - Pimentel-Gonzalez, D., Revah, S., Campos-Montiel, R., Monroy-Hermosillo, O. and Vernon-Carter, E. J. (2008), A Laboratory Study of the Biodegradation of MTBE Solubilised in Water by a Microbial Consortium Entrapped in a Water-in-Oil-in-Water Double Emulsion, *Process Biochemistry*, Vol. 43, pp. 1239~1243.

(접수일: 2009. 12. 30, 심사일: 2010. 1. 19, 심사완료일: 2010. 3. 2)