

## Cometabolism of MTBE by pure culture isolated from gasoline contaminated aquifer

장순용 · 이시진

경기대학교 토목환경공학부 환경공학과

e-mail : swchang@kyonggi.ac.kr

### 요 약 문

In this paper, we have examined the mtbe cometabolic degradation by pure culture, which is isolated gasoline contaminated aquifer. Propane was more effectively utilized as a growth substrate to oxidize MTBE. Specific substrate degradation rate was increased with increasing initial propane amount. Respirography was enhanced and continued MTBE degradation and TBA observation was supported MTBE degradation. The mass balance of MTBE and TBA indicated that MTBE was oxidized to TBA as well as further oxidation of TBA.

key word : MTBE, Propane, Cometabolism, Pure culture

### 1. 서론

MTBE(Methyl Tertiary-Butyl Ether)는 생물학적으로 난분해성 물질로 분류되는데, MTBE의 구조 속에 포함되어있는 ether(C-O-C) 결합이 화학적으로 안정하기 때문이다<sup>1)</sup>. 1979년부터 MTBE는 무연휘발유의 옥탄가 향상제로 사용되었으나, 1990년 휘발유내의 산소의 함량을 중량 비로 최소 2.7%로 유지하게 한 미국의 Clean Air Act Amendments에 의해 일산화탄소 등의 대기 독성물질로 오염이 심각한 지역에 대해 휘발유의 완전산화를 보조하는 산소첨가제(Oxygenates)로 사용되기 시작하였다.

우리나라에서도 1984년부터 쓰이기 시작했으며, 생산량은 계속 증가해서 현재까지 계속 사용되고 있다. 1993년에는 환경보전법에 의하여 MTBE의 휘발유 배합이 의무화되었으며, 상당량이 휘발유에 첨가되었다. 국내에서 소비되는 휘발유내 MTBE 함량은 6~8% 정도이며, 우리 나라의 유류 및 유기 물질 저장탱크는 주로 지하에 설치되어 있다. 특히, 최근 국내에서도 유류오염에 의한 토양 및 지하수 오염의 심각성이 대두되고 있어 MTBE에 의한 오염을 간접적으로 예상할 수 있다.

이렇듯 MTBE로 오염된 토양 및 지하수의 처리방법으로 물리·화학적 방법들이 많이 이용되고 있으나, 최근 경제적인 측면에서 이점이 많은 생물학적 처리방법을 효율적으로 극대화하는 연구가 이루어지고 있으며, 이 방법을 적용할 경우 많은 비용이 절감된다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다. 그러나, 가솔린 성분과 달리 MTBE는 생물학적으로 분해가 쉽지 않아, 적절한 외부탄소원의 공급에 의해 MTBE의 분해를 유도하는 방법이 호기성 생물학적 처리방법에서도 효율적인 방안으로 고려되고 있다.

생물학적인 MTBE 분해는 MTBE 자체를 탄소원으로 이용하여 직접 분해하거나, 기타 성장기질(growth substrate)을 이용하는 여러 종류의 박테리아와 곰팡이류에 의해 난분해성 오염원인 MTBE 분해를 유도하기도 하는데, 이를 공대사(cometabolism)라고 하는데 대부분의 난분해성 유기물질들은 물질 자체의 독성 등으로 인해 미생물에 의해 직접 탄소원으로 이용되지 못하므로 오염된 토양 및 지하수 복원에 공대사의 원리가 많이 적용되고 있다.

국내에서도 MTBE에 의한 문제제기가 이루어지고 있으나 아직까지 본격적인 연구는 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 국내오염토양에서 분리된 pure culture를 이용한 MTBE 분해특성 및 기질에 대해 비교■분석하고자 한다.

## 2.본문

Serum bottle(120 ml)에 유류오염토양 10 g과 배양액(BSM, Basal Salts Medium) 50 ml를 첨가하고 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉하고 butane 30 ml, O<sub>2</sub> 10 ml, 그리고 air 30 ml로 나머지 headspace를 채웠다. 그리고 7일간 shaking incubator에서 25℃, 150 rpm의 조건으로 배양시켜 butane 분해가 관찰된 후 1 ml를 빼내 같은 조건의 serum bottle(120 ml)에 접종시켜 1주 간격으로 1개월간의 계대배양을 반복하여, propane을 탄소원으로 이용하는 pure culture를 분리하였다.

실험에 사용된 모든 초자류 및 기기는 가능한 고압증기 멸균기를 이용하여 121℃, 15분간 멸균하여 사용하였다. 1.2l amber serum bottle에서 약 7일 동안 25℃, 150 rpm의 조건에서 성장한 미생물의 OD<sub>550</sub>는 0.5~0.6의 범위였다. TSS(Total Suspended Solid)를 측정하고 원심 분리하여 미생물을 농축시켰다. TSS의 값과 원심분리 후 농축시킨 미생물 농축액의 농도를 계산하여 필요량을 serum bottle에 주입하는 방식을 유지하였다. MTBE 분해실험은 120 ml serum bottle에 50 ml BSM과 MTBE를 주입한 후, teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉하고 균주를 접종한 후에 실험을 시작되었다. 그리고, 비교 실험으로는 위와 동일한 조건에 acetylene(1.0 % (vol/vol); gas phase)을 첨가하여 실험을 진행하였다.

MTBE(Methyl *tert*-Butyl Ether, C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O), 및 기타 부산물은 Hamilton 1710N gas-tight syringe를 이용하여 bottle의 headspace에서 100  $\mu$ l를 채취하여 GC에 직접 주입하여 분석하였다. GC는 HP-5 칼럼(Crosslinked 5% Ph Me Silicone, 25m  $\times$  0.32mm  $\times$  0.52 $\mu$ m film)과 불꽃이온화 검출기(flame ionization detector, FID), 그리고 HP 3394의 integrator가 연결된 Hewlett-Packard 5890 series II를 사용했다. GC의 운전 조건은 주입부, 검출부의 온도가 각각 200℃, 200℃이며, 오븐은 40℃에서 등온으로 운전하였다. Carrier gas는 1 ml/min의 속도로 질소가스를 사용했다.

Protein 농도는 균주를 3 N NaOH 용액에 65℃의 조건에 30분 동안 용해시킨 후 Biuret assay 방법에 의해서 분석하였다.

## 3.결과

본 연구에서는 국내유류오염토양에서 propane과 butane을 이용하여 여러종의 pure culture를 분리하였으며, MTBE 분해능이 우수한 균주를 대상으로 propane과 butane을 기질로 이용하였을때의 기질 이용율, MTBE 분해특성을 관찰하였다.

Fig. 1은 propane과 butane의 초기농도 변화에 따른 기질 이용 특성을 보여주고 있다. Propane을 기질로 공급한 경우가 butane을 공급한 경우보다 다소 기질 이용율이 높으므로 볼 수 있다.

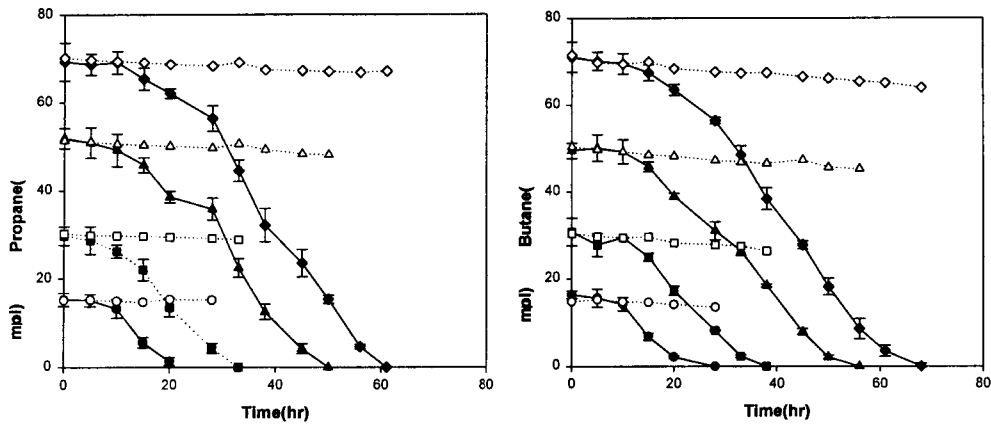


Fig. 1. Propane and butane degradation at different initial propane and butane concentration by pure culture.

Fig. 2는 Fig. 1의 결과를 재정리 한 그림결과이다. Propane과 butane이 기질로 이용시 초기농도에 따른 비기질분해속도를 나타내고 있다. Propane을 기질로 이용한 경우가 농도에 관계없이 butane을 이용한 경우보다 다소 나은 기질이용속도를 보여주고 있다. 초기 propane양이 20 $\mu$ mol일 때 비기질분해속도는 0.65mmol/DCW/hr이었으나, propane양이 60 $\mu$ mol일때는 0.82mmol/DCW/hr로 관찰되었다.

Fig.3의 결과는 propane을 기질로 이용될 때 MTBE의 분해특성을 보여주고 있다. 초기 주입된 60 $\mu$ mol propane은 약 20시간 이내에 완전히 분해가 이루어졌고, MTBE는 약 30여시간까지 지속적으로 공대사가 일어남을 볼 수 있다. Propane이 완전하게 분해가 일어났어도 propane 분해효소의 활성이 MTBE 분해를 지속적으로 유지하고 있음을 확인 할 수 있는 것이다.

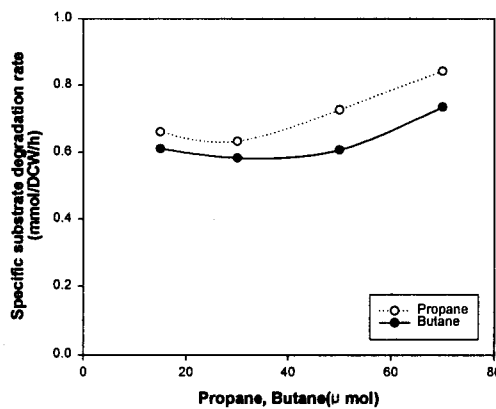


Fig. 2. Specific substrate degradation rate at a different substrate concentration.

이때, MTBE분해와 더불어 MTBE 분해산물로 알려진 TBA의 축적이 관찰되었다. 30여시간이 경과 후에 propanedmf respike 해주었으며, 주입된 propane은 매우 빠르게 분해가 일어났으며, MTBE 역시 약간의 정체기를 거쳐 재분해가 활발하게 일어남을 볼 수 있다. 이때 TBA 일시적인 감소와 재축적이 일어남을 관찰할 수 있다.

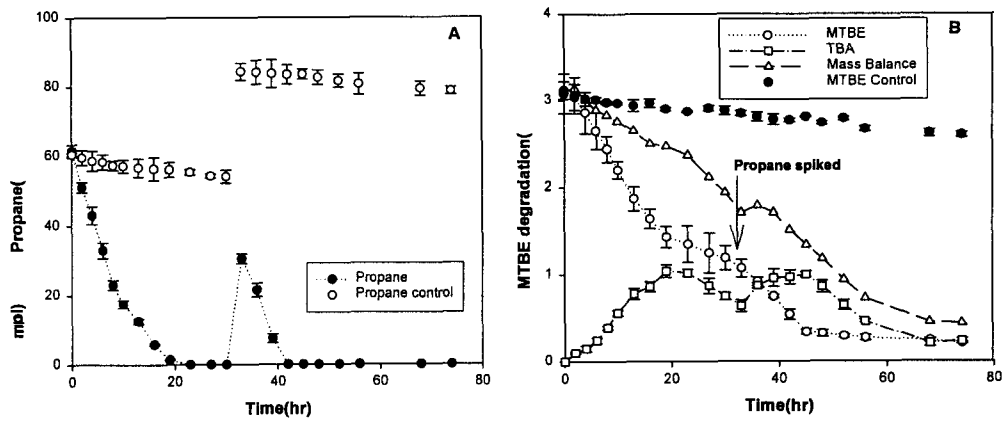


Fig. 3 Cometabolic MTBE degradation by propane respike

#### 4. 참고문헌

- 1) 장순용, 백승식, 이시진 "부탄분해미생물에 의한 가솔린첨가제 MTBE(Methyl tert-Butyl Ether) 분해", 한국지하수환경학회지, 2002
- 2) Hyman, M.R., Kwon, P., Williamson, K. and O'Reilly K., "Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganism". In G.B. Wickramanayake and R.E. Hinche (Eds.), Natural Attenuation: Chlorinated and Recalcitrant Compounds, pp321~326, Battelle Press, Columbus, OH(1998).6(3), pp31~41(2001).