

## 염소계페놀의 환원적 탈염소화에서의 전자공여체의 영향

†박 대 원 · \*김 성 주 · \*박 정 극

한국과학기술연구원 환경연구센터 · \*동국대학교 화학공학과

### The Effect of Electron Donor on Reductive Dechlorination of Chlorophenols

Daewon Pak<sup>†</sup>, Sung-Joo Kim<sup>\*</sup>, and Jung-Keuk Park<sup>\*</sup>

Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

<sup>\*</sup>Department of Chemical Engineering, Dongkuk University, Seoul 100-715, Korea

#### ABSTRACT

Batch experiments were conducted to investigate the effect of electron donor on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol by a methanogenic consortium. The methanogenic consortium was obtained from the anaerobic digester of a municipal wastewater treatment plant. The batch reactor containing methanogenic consortium was spiked with 2,4,6-trichlorophenol at 10 mg/ℓ. Acetate, ethanol, glucose or methanol, each was added as an electron donor for methanogenic consortium. During the course of the experiments liquid samples were taken from the batch reactor to measure dechlorination rate and find the dechlorination pathway of 2,4,6-trichlorophenol. After incubation 2,4,6-trichlorophenol was first dechlorinated to 2,4-dichlorophenol and then to 4-chlorophenol. Phenol was not detected in the batch reactor. The highest rate of dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol was observed when ethanol was used as an electron donor.

#### 서 론

염소계 페놀은 제지산업, 석유화학산업 등 다양한 산업체에서 발생하는 폐수에 포함되어 있으며 발암성, 변이성 등을 가지고 있어서 유독화학물질로 분류되어 국내 방류수 기준에서는 페놀 류로서 규제되고 있다. 염소계 페놀은 일반적으로 미생물에 의해 분해가 어려운 난분해성 물질로 알려져 있지만 문헌에 의하면 치환된 염소 수에 따라 호기성 또는 혐기성 미생물에 의한 분해가 보고되고 있다. 치환된 염소 수에 따라 mono- 또는 di-chlorophenol은 비교적 호기성 미생물에 의해 분해가 잘되는 것으로 보고되고 있고 3개 이상의 염소이온으로 치환된 염소

계페놀의 분해는 주로 혐기성 미생물을 이용하는 공정에서 관찰되고 있다(1-5).

혐기성공정에서 관찰되는 염소계페놀의 분해반응은 환원적 탈염소화 반응이다. 환원적 탈염소화 반응은 환원조건하에서 페놀에 치환된 염소가 수소와 치환되는 반응이다. 이러한 탈염소화 반응에서 혐기성미생물들은 성장과 유지에 필요한 에너지는 얻지 못하는 것으로 알려져 있다(6). 따라서 혐기성미생물들의 성장과 유지를 위한 에너지는 전자공여체(electron donor) 또는 성장기질(growth substrate)로부터 얻는다. 이러한 환원적 탈염소화 반응은 cometabolism으로 설명될 수 있다. 지금까지 cometabolism은 주로 cooxidation 반응으로 설명되

† Corresponding Author

어왔다. Cooxidation이란 전자공여체의 존재 하에 유도된 효소가 전자공여체 이외의 물질을 산화시키는 반응이다. 그러나 최근에는 혐기성미생물에 의한 염소계 화합물의 환원적 탈염소화도 미생물들이 성장이나 유지에 필요한 에너지를 이 반응에서 거의 얻지 못하고 다른 에너지원 또는 전자공여체를 필요로 하기 때문에 cometabolism의 범주에 속한다고 생각되고있다(6).

혐기성 미생물의 cometabolism에서 전자공여체의 역할은 미생물의 성장과 유지에 필요한 에너지의 공급원인 동시에 환원적 탈염소화 반응을 일으킬 수 있는 환원력을 제공하는 것이다. 따라서 전자공여체로 부터 얻는 환원력이 염소계 화합물의 탈염소화 속도를 좌우할 것으로 생각된다. 지금까지 문헌에서 발표되는 혐기성 미생물을 이용한 염소계 폐놀의 탈염소화를 위한 전자공여체로는 acetate, glucose, 3-chlorobenzoate 등이다(7-9). 이와 같은 실험은 대개 특정미생물을 사용하였기 때문에 하나의 전자공여체만이 사용되었다. 그러나 cometabolism을 실제 폐수처리에 응용할 경우 현장에서는 미생물 consortium을 이용하기 때문에 하나이상의 전자공여체가 이용될 수 있고 전자수용체에 따라 염소계 화합물들의 탈염소화 속도가 다를 것으로 예상된다.

따라서 본 연구에서는 하수종말처리장의 혐기성 소화조에서 채취한 methanogenic consortium을 이용하여 염소계 폐놀의 환원적 탈염소화 반응을 유도 하면서 전자공여체에 따른 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 대상 염소계 폐놀로는 호기성 미생물에 의해 분해가 어려운 2,4,6-chlorophenol을 선정하였으며 전자공여체로는 Acetate, ethanol, glucose, methanol 등을 사용하여 각각의 전자공여체에 따른 탈염소화 속도를 비교하였다. 또한 탈염소화 경로를 알아보기 위해 Gas chromatogram를 이용하여 반응경로상에 있는 중간생성물과 최종생성물을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용한 환원적 탈염소화 대상물질인 2,4,6-trichlorophenol과 전자공여체 및 분석에 필요한 모든 시약은 99.5% 이상의 순도를 가진 것으로 일본 관동화학주식회사에서 구입하여 사용하였다.

환원적 탈염소화 실험에서 사용된 혐기성 배지의 조성은 1 liter를 기준으로 하여 0.27g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.35g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.53g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.075g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.02g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2g yeast extract, 1.2g of  $\text{NaHCO}_3$  이었다.

### 실험방법

회분식 실험을 위해서 500ml의 serum bottle를 사용하였으며 Teflon으로 코팅된 마개를 이용하여 밀폐하였다. 실험순서는 먼저 혐기성 배지를 만든 후 산소에 의한 저해의 영향을 없애기 위해서 가온, 가압상태(120도, 1기압)에서 15-20분간 멸균한 다음 상온이 될 때까지 냉각하였다. 상온이 되면 잔류 용존산소를 없애기 위해서 질소가스로 10-15분간 flushing 시킨 후 혐기성 반응에 관련된 pH 저하를 막기 위해 1.2g/l  $\text{NaHCO}_3$ 를 주입하였다. 대상물질인 2,4,6-trichlorophenol과 전자공여체를 함께 주입하였다. 전자공여체의 농도는 혐기성 미생물에 대한 탄소의 농도로 계산하여 같은 농도가 되게 아세트산, 에탄올, 글루코스 그리고 메탄올을 주입하였다. 식중슬러지는 중량당 폐수처리장의 1차 소화조에서 2차 소화조로 가는 혐기성 소화 슬러지를 사용하였고 총시료 부피 300ml의 20%를 되게 식중슬러지 후 shaking incubator에서 35°C, 150rpm의 조건에서 배양했다.

### 분석방법

시료채취는 Shaking incubator를 멈추고 층이 분리되기를 기다린 후 상등액 3ml를 취하였다. 채취된 시료는 5M HCl을 이용하여 산성화 한 뒤 시료 대 용매를 3:1의 비로 Diethyl Ether을 주입하였다. 혼합용액을 sonicator(Ellma R.transsonic 470/H)를 이용하여 충분히 교반한 뒤 용매층을 분리하였다. 분리된 용매층을  $\text{MgSO}_4$ 를 사용하여 수분을 제거한 뒤 20 $\mu\text{l}$ 를 취하여 Gas chromatogram (GC)를 사용하여 분석하였다. GC(Hewlett Packard 5890)는 FID(flame ionization detector)를 설치한 것으로 HP-5 column을 사용하였다. 20:1의 split ratio를 사용하였고 온도 프로그램은 초기온도 60°C에서 2분을 머문 후 12°C/분으로 온도를 증가시켜 최종온도 150°C에서 1분 정도 머무르게 하였다. Injector와 detector의 온도는 각각 200, 250°C 이었고 운반기체로는 He를 사용하였다.

Table 1. Gas production from batch reactor spiked with 2,4,6-trichlorophenol compared to control. (Vg: Volume of gas produced from the reactor spiked with 2,4,6-TCP, Vgc: Volume of gas from control, Vm: volume of methane produced from the reactor spiked with 2,4,6-TCP, Vmc: volume of methane from control)

TCP Concentration Spiked	10mg/l	20mg/l	40mg/l
Cumulative Gas Production (Vg/Vgc)	154ml (0.99)	150ml (0.96)	124ml (0.8)
Cumulative Methane Production (Vm/Vmc)	52.4ml (0.96)	50.1ml (0.90)	36.8ml (0.65)

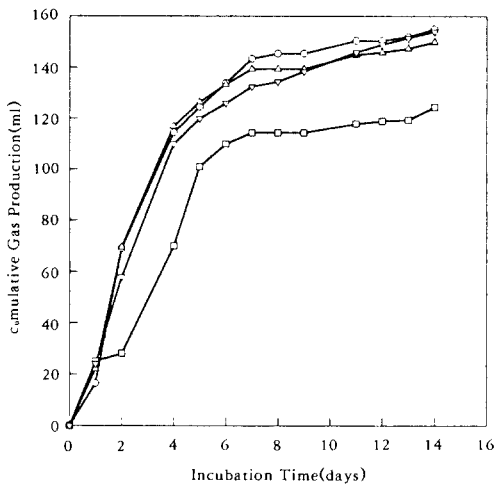


Fig. 1. Time courses of cumulative gas production at different TCP concentrations, ○ : Oppm, △ : 10ppmm, ▽ : 20ppm, □ : 40ppm

결 과

2,4,6-trichlorophenol의 농도 선정

혐기성미생물에 의한 2,4,6-trichlorophenol의 탈염소화 실험을 수행하기 전에 미생물활성에 저해를 주지 않는 농도를 선정하기 위해 회분식 실험을 수행하였다. 1000mg/l의 glucose를 기질로 사용하여 2,4,6-trichlorophenol농도에 따른 메탄가스 발생량을 측정하여 control과 비교하였다. 2,4,6-trichloro-

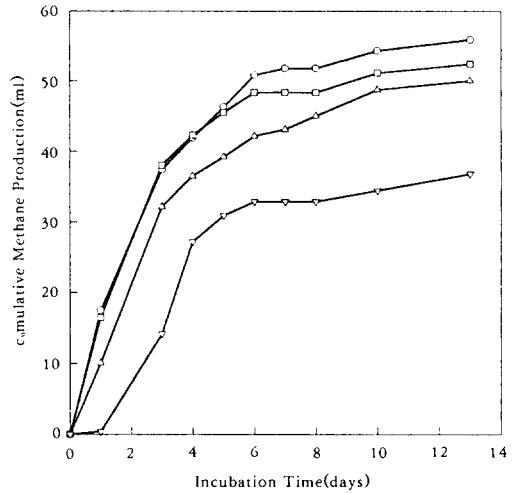


Fig. 2. Time courses of cumulative methane production at different TCP concentrations, ○ :Oppm, □ :10ppmm, △ :20ppm, ▽ : 40ppm

phenol의 농도를 10에서 40mg/l로 변화시켰을 경우 시간에 따른 총가스 발생량이 Fig. 1에 나타나있다. 10과 20mg/l의 경우 총 가스 발생량이 control과 비교하였을 때 차이가 없었다. 그러나 40mg/l의 경우는 반응시작 2일 후부터 가스 발생량이 감소하기 시작하여 14일 후의 가스총 발생량은 124ml로서 155ml의 control과 비교해서 80% 정도로서 차이를 보였다 (Table 1). 또한 발생된 가스의 메탄함량을 측정된 결과가 Fig. 2에 나타나있다. 각각의 2, 4,6-trichlorophenol농도에 따라 발생된 메탄량을 비교해보면 10mg/l의 경우는 control과 비슷하였으나 20 mg/l 부터는 메탄이 control의 90% 정도에 발생하였다(Table 1). 40mg/l에서의 메탄 발생량은 control의 65%로 상당히 저해를 받는 것으로 나타났다. 따라서 탈염소화 실험을 위해서 2,4,6-trichlorophenol의 농도는 10mg/l로 결정하였다.

2,4,6-trichlorophenol의 탈염소화 반응경로

혐기성미생물에 의한 2,4,6-trichlorophenol의 환원적 탈염소화 경로를 알아보기 위하여 전자공여체를 첨가한 후 정기적으로 시료를 채취하였다. Acetate를 전자공여체로 사용한 경우 반응시간에 따른 시료의 2,4,6-trichlorophenol과 중간생성물들의 농도를 측정된 결과가 Fig 3.에 나타나있다. 반응초기

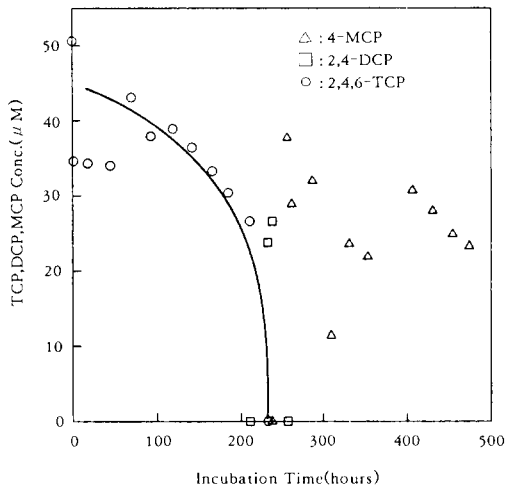


Fig. 3. Anaerobic dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol in a batch reactor added with acetate as an electron donor

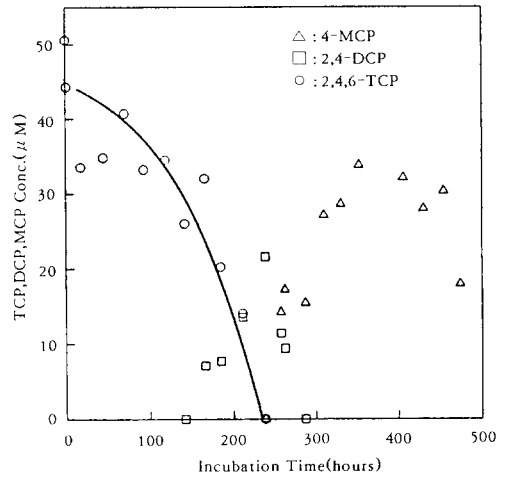


Fig. 5. Anaerobic dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol in a batch reactor containing glucose as an electron donor

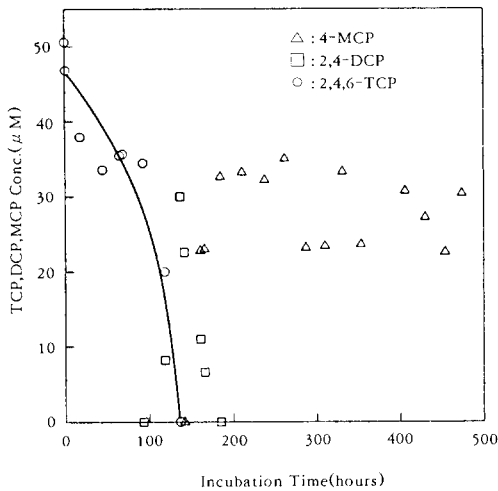


Fig. 4. Anaerobic dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol in a batch reactor containing ethanol as an electron donor

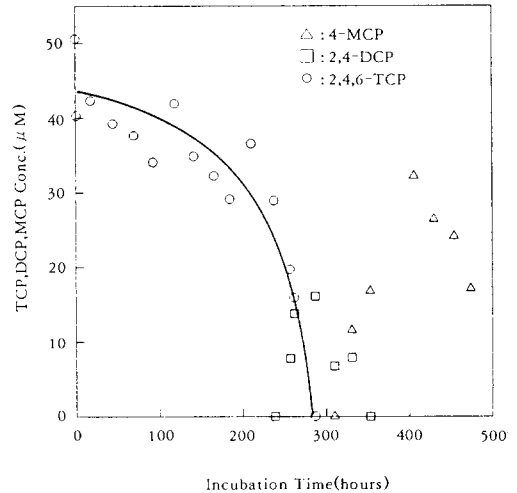


Fig. 6. Anaerobic dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol in a batch reactor containing methanol as an electron donor

2,4,6-trichlorophenol이 급격히 감소한 것은 미생물에 의한 흡착에 기인한 것으로 생각된다. 미생물에 의한 흡착 후에는 70시간까지 탈염소화 반응이 매우 느리게 진행되다가 그후로 속도가 증가하여 전체적으로 2,4,6-trichlorophenol의 농도가 감소하는데 약 160시간 정도 소요되었다. 여기서 2,4,6-trichloro-

phenol농도의 감소는 미생물들에 의해 ortho위치에 있는 염소가 치환되어 2,4-dichlorophenol이 생성되기 시작했기 때문이다. 생성된 2,4-dichlorophenol은 약 50시간 후에 2,4-chlorophenol의 ortho위치에 있는 염소가 다시 치환되어 4-chlorophenol이 생성되기 시작하였다. 생성된 4-chlorophenol은 더 이

**Table 2. Dechlorination rate of 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic consortium in a batch reactor containing different electron donor**

Electron donor	2,4,6-trichlorophenol Degradation Rate (mole/day)
Methanol	4.2
Glucose	5.1
Acetate	5.2
Ethanol	8.9

상의 탈염소화 반응이 일어나지 않은 것으로 관찰되었다.

다른 전자공여체로 ethanol, glucose, methanol을 사용한 경우 2,4,6-trichlorophenol과 중간생성물의 생성과 감소가 Fig 4,5,6에 나타나있다. acetate를 전자공여체로 사용한 경우와 같이 ortho 위치의 염소가 치환되는 탈염소화 경로를 거쳐 2,4,6-trichlorophenol로부터 4-chlorophenol이 생성되었다. ethanol과 acetate를 전자공여체로 사용한 경우에는 최종생성물인 4-chlorophenol이 생성 후 농도변화가 없었으나 glucose와 methanol을 전자공여체로 사용한 경우에는 최종반응생성물인 4-chlorophenol이 감소하는 것이 관찰되었다. 그러나 4-chlorophenol의 탈염소화 반응생성물로 예상되는 phenol은 측정되지 않았다.

전자공여체에 따른 2,4,6-chlorophenol의 탈염소화 속도비교 전자공여체에 따른 2,4,6-trichlorophenol의 탈염소화 속도를 비교해 보면 차이가 있는 것을 알 수 있다. 동일한 혐기성 슬러지를 사용하였지만 2,4,6-trichlorophenol의 ortho 위치에 있는 염소가 치환되는데 걸린 시간은 전자공여체에 따라 100시간이상의 차이가 관찰되었다. Fig. 3,5,6을 살펴보면 acetate, glucose, methanol은 약 150시간 이상의 순화기간을 거친 다음 탈염소화 반응이 시작되었다. 따라서 반응시작 후 250시간이 지나서야 약 50 M의 2,4,6-trichlorophenol에서 ortho 위치의 염소가 치환되었다. 그러나 ethanol을 전자공여체로 사용한 경우에는 약 100시간 정도로 순화기간도 감소하였고 탈염소화 되는데 걸린 시간은 약 50시간이었다.

전자공여체에 따른 2,4,6-trichlorophenol의 ortho 위치의 염소가 치환되는 속도를 비교하기 위해서 1차 속도식을 적용해서 속도상수를 계산해본 결과가 Table. 2에 나타나있다. 탈염소화 속도가 빠른 순서

대로 전자공여체를 열거하면 ethanol>acetate>glucose>methanol 순이다. Ethanol을 전자공여체로 사용하였을 경우 methanol을 사용하였을 경우보다 2배이상 빠른 탈염소화 속도를 보였다.

## 고 찰

염소계 페놀 중에서도 1 또는 2개의 염소로 치환된 페놀은 비교적 생물학적으로 처리가 가능하고 3개 이상의 염소가 치환된 페놀은 생물학적처리가 어려운 것으로 생각되어져왔다. 그 이유는 일반적으로 치환된 염소의 수가 증가할수록 독성이 증가하기 때문이다. 그러나 최근에 혐기성 공정 중에서 염소계 화합물들이 탈염소화 되는 현상들이 발견되면서 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 이러한 탈염소화 반응은 치환된 염소가 3개이하인 페놀일 경우에는 속도가 현저하게 감소하는 것으로 관찰되고 있다(4). 그리고 1개 또는 2개의 염소로 치환된 페놀은 호기성 미생물에 의한 분해속도가 높은 것으로 관찰되고 있다(5, 6). 이러한 현상을 이용하여 혐기성공정 다음에 호기성공정을 차례로 두어 처리하는 방법이 제시되고 있다(2, 3). 이러한 혐기-호기의 2단계연속 처리 공정에서 전처리에 해당하는 혐기성 공정은 비교적 반응이 느리기 때문에 전체적으로 율속단계이다. 따라서 혐기성 공정의 반응속도를 증가시킬 수 있으면 전체적인 공정의 처리속도가 증가하고 반응기의 부피도 작아질 수 있다.

혐기성공정의 반응속도를 증가시키기 위해서는 반응mechanism을 자세히 살펴볼 필요가 있다. 혐기성공정에서의 염소계 페놀이 제거되는 mechanism은 탈염소화이다. 혐기성미생물에 의한 탈염소화 반응은 주로 methanogen에 의한 cometabolism의 하나로 생각되어지고 있다. Cometabolism은 성장기질인 전자공여체에서 미생물 성장에 필요한 에너지를 얻고 또한 여기서 얻은 환원력을 이용하여 비성장기질인 염소계 화합물들의 환원적 탈염소화 반응을 진행시킨다. 현재까지 실험실에서 수행되어온 혐기성 미생물에 의한 염소계 화합물의 탈염소화 반응에서 사용되어온 성장기질로는 주로 acetate가 주로 사용되어왔다. 그러나 성장기질에 따라 미생물이 얻는 환원력에는 차이가 있을 것으로 가정되어 본 실험에서는 다른 성장기질을 이용하였을 경우에 탈염소화 반응속도를 비교하고자 하였다. 따라서 acetate 이외에 glucose, methanol, ethanol등을 성장기질로 사용한 결과에 의하면 ethanol의 경우가 acetate를 사

용한 경우보다 반응속도가 가장 빠른 것으로 관찰되었다.

위와 같이 혐기성 미생물의 cometabolism을 이용한 염소계 폐놀의 탈염소화 경로를 보면 주로 ortho와 meta 위치에 있는 염소가 우선적으로 치환되는 것으로 관찰되어지고 있다(10). 특히 ortho 위치에 있는 염소가 쉽게 치환되는 것으로 관찰되고 있다. Nicholson 등(10)이 수행한 혐기성 미생물을 이용한 pentachlorophenol의 탈염소화 반응실험의 결과를 살펴보면 주로 ortho 위치의 염소치환이 가장 많이 관찰되었고 다음이 meta 위치였고 para 위치는 가장 적은 것으로 나타난 것으로 알 수 있다. 따라서 최종 반응생성물들로는 3,5-DCP, 3,4-DCP 등이었으며 2,4-DCP는 탈염소화 반응이 계속 진행되어 4-CP이 최종 생성물이었다. 이와 비슷하게 본 실험에서도 주로 ortho 위치의 염소가 탈염소화 되어 2,4,6-TCP에서 2,4-DCP로 되고 계속해서 탈염소화 되어 4-CP이 최종 생성물이었다. 대부분의 문헌에서는 4-CP가 더이상 탈염소화 반응이 일어나지 않는 것으로 보고되고 있다. 그러나 본 실험에서는 전자공여체에 따라 조금 차이를 보이고 있다. acetate나 ethanol 등은 4-CP이 생성 후 더이상 탈염소화가 진행되지 않았으나 glucose나 methanol의 경우에는 4-CP의 농도가 감소하는 경향을 보여 지속적인 탈염소화가 일어나는 것으로 추정되었으나 최종생성물인 phenol은 측정하지 못했다.

2,4,6-TCP에서 4-CP까지의 탈염소화 과정에서 실험대상물질인 2,4,6-TCP와 중간생성물인 2,4-DCP, 4-CP 각각의 탈염소화 반응속도는 본 실험결과로는 유추하기에 부족하다. 그이유는 2,4,6-TCP의 탈염소화 반응에서 초기의 순화시간을 구분하기가 어렵기 때문이다. 탈염소화 반응속도를 측정하기 위해서는 각각을 대상물질로 하여 실험을 수행하여야 할 것으로 사료된다. 그러나 Vogel 등이 발표한 염소계 지방족 화합물(halogenated aliphatic compounds)의 처리에 대한 총설에 의하면 치환된 염소수가 많을수록 산화반응보다는 환원반응이 일어나기가 쉽다는 것이다(11). 그이유는 치환된 염소수가 증가할수록 산화상태가 높기 때문인 것에 기인한다. 본연구결과에서도 2,4,6-TCP와 2,4-DCP의 반응속도는 비교하기가 어렵지만 4-CP보다는 높은 것으로 나타나고 있다. 따라서 4-CP는 혐기성 미생물을 이용하여 처리하는 것보다 호기성 미생물을 이용하여 처리하는 것이 효율적인 처리시스템을 구성하는 방법으로 사료된다.

## 요 약

난분해성 물질로 알려진 2,4,6-trichlorophenol를 혐기성 미생물의 cometabolism을 이용하여 처리할 경우 높은 탈염소화 속도를 얻기 위하여 전자공여체를 선정하기 위하여 회분식 실험을 수행하였다. 회분식 실험은 Serum bottle에서 중량천 폐수처리장의 1차 소화조에서 채취한 혐기성 소화슬러지를 사용하여 2,4,6-trichlorophenol의 환원적 탈염소화 반응을 유도하였다. 탈염소화 과정에서 중간생성물을 조사하였고 혐기성 미생물의 성장과 유지를 위한 에너지원인 전자공여체에 따른 탈염소화 속도를 비교하였다. 회분식 실험결과 2,4,6-trichlorophenol은 ortho 위치의 염소가 치환되어 2,4-Dichlorophenol로 탈염소화되었다. 2,4-dichlorophenol은 다시 ortho 위치의 염소가 치환되어 4-chlorophenol로 탈염소화되었다. Acetate, ethanol, glucose와 methanol을 전자공여체로 사용한 결과 ethanol을 사용한 경우에서 2,4,6-trichlorophenol의 탈염소화 속도가 가장 빠른 것으로 관찰되었다.

## 참 고 문 헌

1. D. H. Zitomer and R. E. Speece(1993), *Environmental Science Technology*, **27**, 227.
2. P. M. Armanante, D. Kafkewitz, G. Lewandowski, and C. M. Kung(1992), *Environ. Prog.*, **11**(2), 113.
3. D. Kafkewitz, P. M. Armanante, G. Lewandowski, and C. M. Kung(1992), *Biotech. Letters*, **14**(2), 143.
4. J. G. Steiert and R. L. Crawford(1985), *Trends in Biotechnology*, **3**(12), 300.
5. T. M. Vogel *et al*(1987), *Environ. Sci. Technol.*, **21**(8), 722.
6. C. S. Criddle(1993), *Biotechnology and Bioengineering*, **41**, 1048.
7. W. W. Mohn and K. J. Kennedy(1992), *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(7), 2131.
8. W. W. Mohn and K. J. Kennedy(1992), *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(4), 1367.
9. M. L. Krumme and S. A. Boyd(1988), *Water Research*, **22**(2), 171.

10. D. K. Nicholson, S. L. Woods, J. D. Istok, and D. C. Peek(1992), *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(7), 2280 .
11. T. M. Vogel, C. S. Criddle, and P. L. McCarty (1987), *Environ. Sci. Technol.*, **21**(8), 722.