

## *Burkholderia cepacia* G4에 의한 트리클로로에틸렌의 공동대사적 분해에 미치는 성장기질의 영향

예 병 대·박 성 훈·\*이 은 열  
부산대학교 공과대학 화학공학과, <sup>1</sup>경성대학교 공과대학 식품공학과  
(접수 : 2000. 8. 23., 게재승인 : 2000. 10. 5.)

## Effects of Growth Substrates on Cometary Biodegradation of Trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4

Byoung Dae Ye, Sunghoon Park, and Eun Yeol Lee\*<sup>1</sup>

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

(Received : 2000. 8. 23., Accepted : 2000. 10. 5.)

The effects of growth substrates such as toluene and phenol on cometabolic biodegradation of trichloroethylene (TCE) by *Burkholderia cepacia* G4 were investigated. The dual effects of primary substrate on TCE biodegradation, stimulatory effects of toluene and phenol at low concentrations (0.5~2 ppm & 0.1~0.5 ppm, respectively) and a competitive inhibition at high concentration, were observed in batch experiments. These stimulatory effects of toluene and phenol were found to be due to the increments in the amount of reducing power like NADH which could be generated during the assimilation of toluene and phenol as the carbon and energy source. The efficiency of TCE biodegradation in trickling biofilm reactor (TBR) could be also enhanced up to the TCE removal efficiency of 58.1% by the supply of appropriate amounts of phenol (0.94~4.7 ppm).

**Key Words** : trichloroethylene, cometabolism, biodegradation, *Burkholderia cepacia*

### 서 론

Trichloroethylene (TCE), chloroform, vinyl chloride, dichloroethane 등의 염화 탄화수소 화합물은 대표적인 휘발성 유기화합물 (volatile organic compound, VOC)이다. 이들은 인화성이 없는 공업용 유기용매로 드라이클리닝제, 그리스제거제 등의 용도로 산업현장에서 널리 사용되고 있다(1,2). 그러나, 사용된 많은 양의 염화 탄화수소 화합물들에 대한 적절한 처리 기술이 개발되지 못하여 대기, 토양 및 지하수 등으로 직접 유출되어 광범위한 범위의 환경오염을 유발시키고 있다(3,4). 특히, 이들 중에서도 TCE는 chloroform과 함께 가장 난분해성 물질이고, 유전자변이 및 암을 유발하는 등 인체에 강한 독성을 주는 것으로도 알려져 있어 효과적인 처리 기술의 개발

이 시급히 요구되고 있다(5). 미국환경보호국 (Environmental Protection Agency, EPA)에서도 TCE 등을 특정유해물질 (Priority Pollutants)로 규정하여 기존의 오염물질 (Conventional Pollutants)들과는 구분하여 취급하고 있으며, SDWA (Safe Drinking Water Act)에 의해 규제되는 음용수 관련 유해물질 중에서도 'Volatile Organic Chemicals' 항목으로 지정되어 관리되고 있다(6). 국내에서도 그 위험성이 인식되어 1993년부터 이들에 대한 규제를 강화하고 있다.

기상으로 배출되는 TCE에 대한 처리 기술로는 과립상의 활성탄을 이용하여 흡착·제거시키는 방법이 있다. 그러나, 이 방법은 TCE를 활성탄으로 흡착시킴으로써 단순히 물리적으로 오염물질을 이동시키는 것에 불과하므로 사후처리가 다시 요구된다는 문제점이 있으며, 초기설비비와 운전비가 과도하다는 단점도 있다. 따라서 물리화학적 방법에 비해 경제성이 있으면서 보다 환경친화적 기술인 생물학적 처리법의 개발이 요구되고 있으며, 이 방법은 분해 최종산물이 무해한 물질이 되는 완전무기화가 일어나기 때문에 2차 오염문제를 해결할 수 있다는 장점도 있다(7).

미생물을 이용하여 TCE를 생분해시키는 경우 TCE 자체가

\*Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

미생물에 대한 독성이 높으므로 성장 기질로는 사용되지 못하고 다른 성장 기질의 존재 하에서 oxygenase 계열의 산화 효소에 의해서 공동대사 (cometabolism) 과정을 거쳐 분해된다(8-14). *Methylosinus trichosporium* OB3b와 더불어 TCE 생분해 연구에 많이 사용되는 미생물인 pseudomonads는 toluene이나 phenol 등을 성장 기질로 제공하면 toluene dioxygenase 또는 toluene monooxygenase가 발현되면서 TCE가 공동산화 (cooxidation) 과정을 거쳐 생분해된다. 그러나, 공동대사 과정에서 성장 기질이 다량으로 존재하는 경우에는 TCE와의 경쟁적 저해 (competitive inhibition) 관계 유발로 인한 TCE 분해속도 감소 현상이 일어날 수 있는데, Saylor(15)등은 *Pseudomonas putida*을 이용한 실험에서 효소에 대한 toluene의 친화력이 TCE보다 높기 때문에 이런 경쟁적 저해 관계가 생긴다고 하였다. Jean(16)등은 toluene-oxidizing bacteria를 이용한 생물막 시스템에서 초기 toluene 유입 농도에 따라서 TCE 생분해 속도가 저해됨을 보여주었고, 이러한 경쟁적 저해관계는 반응기 운전 효율에 악영향을 줄 수 있다고 하였다. 하지만, 다른 측면에서 보면 TCE 분해 과정에서 TCE 및 분해산물의 독성 등으로 인하여 미생물의 분해능이 감소되므로 효소의 재활성화 및 분해과정에서 cofactor로 사용되는 NADH의 원활한 공급 등을 위해서는 알맞은 양의 성장기질을 계속적으로 제공해 주어야 한다. 따라서 경쟁적 저해 현상을 유발하지 않으면서 TCE 분해능의 재활성화 및 NADH 공급원으로서의 역할을 수행할 수 있도록 알맞은 양의 성장기질을 공급해 주는 것이 중요하다. 이를 위해서는 회분식 및 연속식 분해반응기에서의 성장기질 공급이 TCE 생분해에 미치는 영향에 대한 분석이 필요하며, 이러한 과정을 통해 높은 TCE 생분해 속도 및 안정된 반응기 운전을 도모하기 위해 공급해야 하는 최적 성장기질 농도를 결정할 수 있다.

*Burkholderia cepacia* G4는 기존의 pseudomonads에 비해 높은 TCE 분해속도를 가지고 있으며 *Methylosinus trichosporium* OB3b 등에 비해 빠른 세포 및 효소재활성화를 가지고 있어 one-stage 형태의 TCE 처리용 생물막 반응기의 개발 및 운전 에 사용하기에 적합한 미생물이다. 본 연구 논문에서는 이러한 특성을 가지고 있는 *B. cepacia* G4를 이용한 TCE 분해에서 toluene 및 phenol의 공급유무가 TCE 분해능에 미치는 영향을 분석해 보고 연속적 TCE 분해를 효과적으로 수행할 수 있는 최적 조건을 결정하였다. 이러한 연구 결과들은 *Burkholderia cepacia* G4를 이용한 생물막반응기 시스템의 운전 조건 최적화 및 장기간 운전에서의 안정성 향상에 응용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 *Burkholderia cepacia* G4는 M9 medium(17)을 이용하여 배양하였다. Glucose (0.4%(w/v))를 첨가한 M9 medium이 들어있는 300 mL 용량의 마개 달린 플라스크에서 12~15시간정도 seed culture를 하였다. 이 배양액의 1~2%(v/v) 정도를 100  $\mu$ L의 toluene 또는 5 mM의 phenol이 들어있는 M9 medium에 접종하여 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 30°C에서 배양하였다. 이 때 toluene은 기상으로

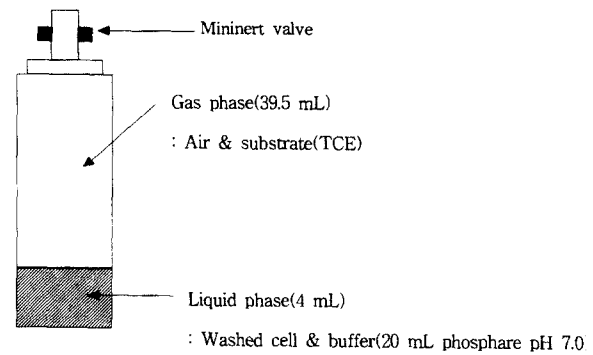


Figure 1. A reaction vial for the measurement of TCE biodegradation.

phenol은 액상으로 공급하였다.

### 세포농도의 측정

세포농도는 spectrophotometer를 이용하여 파장 600 nm에서 Optical density(O.D.)값을 측정하고 검량곡선을 이용하여 결정하였으며, 세포의 단백질 농도에는 BCA (bicinchoninic acid) assay를 사용하였는데, O.D.가 1.0일 때 약  $0.2590 \pm 0.0008$  mg/mL이었다(18).

### TCE 분해속도 측정

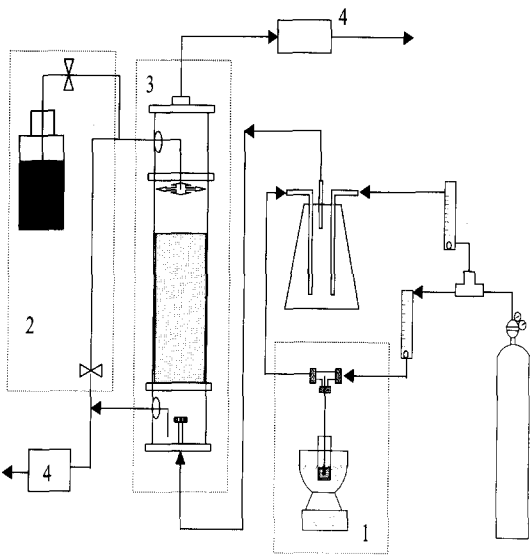
TCE 분해실험에 사용된 40 mL amber vial을 Figure 1에 나타내었다. 실험에 사용한 세포는 플라스크에서 키운 후 실온에서 Eppendorf microcentrifuge를 이용하여 5분간 12000 rpm에서 원심 분리하였다. 상등액은 버리고 20 mM 인산 완충용액 (pH 7.0)에 현탁하여 2 mL을 분석용 vial에 주입하였다. 1 mM TCE stock 용액을 70~300  $\mu$ L 투입한 후 전체용액의 부피가 4 mL가 되게 3차 증류수를 넣고 평형에 도달된 뒤 액상의 농도가 3~20  $\mu$ M이 되도록 하였다(19). 초기 toluene 농도도 TCE와 같은 방법으로 평형에 도달했을 때 0.5~20 ppm이 되도록 하였다. 1 mM TCE stock은 40 mL amber vial (전체 부피는 43.5 mL)에 head space 없이 0.1 mM HCl용액으로 TCE 원액을 희석하여 PTFE-faced rubber septum으로 밀봉한 후 vortex하여 제조하였다. 분석전에 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서는 기질로 사용되는 TCE는 다른 성분들을 넣은 후 마지막에 첨가하였고, 진탕 전에는 분석용 vial을 항상 얼음통에 넣어 0°C로 유지하였다. TCE 분해 반응은 30°C의 진탕향은 수조에서 180 rpm에서 진행하였다.

### TCE 및 toluene 농도분석

TCE 및 toluene은 100  $\mu$ L gas-tight syringe와 500  $\mu$ L gas-tight syringe로 각각 30  $\mu$ L과 200  $\mu$ L의 기상 샘플을 채취하여 전자포집검출기(ECD) 또는 불꽃이온검출기(FID)가 장착된 가스 크로마토그래프를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 HP-5 capillary를 사용하였고, 운반기체로 사용된 질소의 유속은 30 mL/min 였다. ECD에서 오븐, 검출기 그리고 주입부의 온도는 각각 100°C, 200°C, 250°C 였고, FID의 경우는 200°C, 250°C, 300°C 였다.

### Phenol 농도분석

Phenol 농도분석은 modified colorimetric assay법을 이용하



**Figure 2.** A schematic diagram of trickling biofilm reactor (TBR) system for the treatment of TCE (1. TCE supply unit, 2. liquid recycle & M9 medium supply unit, 3. trickling biofilm reactor, 4. effluent liquid & gas)

였다(20). Phenol 농도는 spectrophotometer를 이용해서 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하고난 후, 검량곡선을 이용하여 결정하였다.

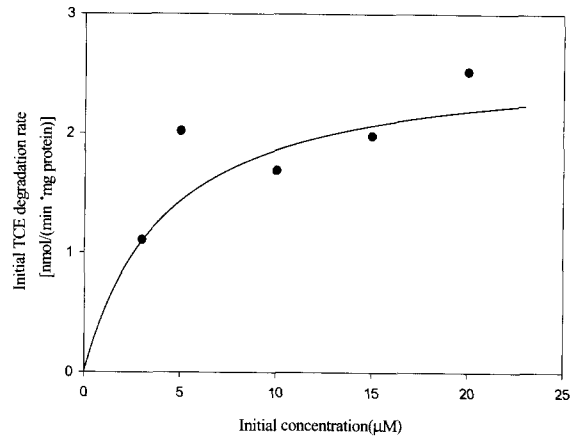
**생물막 반응기 개발 및 운전**

생물막 반응기의 크기는 내경 9 cm, 전체길이 60 cm로서, 충진층에는 다공성 세라믹 담체를 사용하였다(Figure 2). 충진층의 높이는 약 20 cm 정도이며 부피는 약 1.27 L, 사용된 담체의 크기는 0.5 cm<sup>3</sup> 과 1 cm<sup>3</sup> 정도였다. 반응기로 연결되는 모든 재질은 TCE의 흡착 및 소실을 최소화하기 위하여 viton tubing과 telfon 테잎을 사용하였다. TCE는 30°C로 유지되는 oil bath에서 capillary column을 사용하여 휘발시켜 기상으로 공급 되도록 하였다. 유입부의 TCE 농도조절은 sample port내로 공급되는 air의 유량을 변화시켜 조절하였다. 생물막을 형성시키기 위하여 7 L의 발효기에서 세포를 충분히 성장시킨 후 회수하여 반응기에 접종하였다. 3 mM phenol이 들어있는 M9 medium을 공기와 더불어 일정한 속도로 계속적으로 공급하였고, 접종 후 반응기 아래쪽으로 떨어져 나온 세포의 일부는 pump를 이용해서 재순환시키면서 생물막을 형성시켰다.

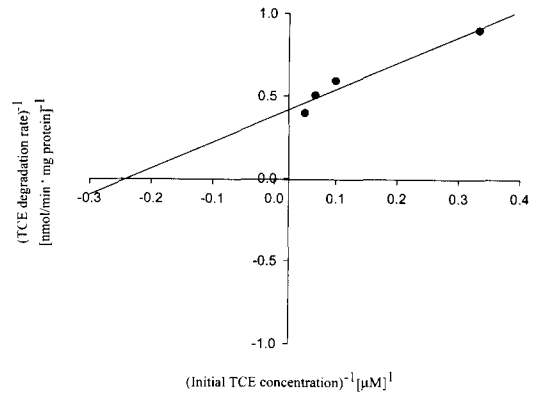
**결과 및 고찰**

**TCE 분해 동력학**

TCE 농도가 TCE 분해속도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 resting cell을 이용하여 다양한 TCE 농도에서의 초기 TCE 분해속도를 측정하였다. 세포현탁액상과 기상사이에서의 평형이 일어나도록 하기 위하여 세포와 TCE가 포함된 vial은 진탕 항온수조에 넣기 전에 약 3분 정도 강하게 흔들여 주었다. TCE 농도는 5, 15, 30, 60, 120분의 시간 간격으로 측정하였고, 초기 TCE 분해속도는 0~5분 사이에서 결정하였다. Table 1에



(a)



(b)

**Figure 3.** Effect of the initial TCE concentration on the initial TCE biodegradation rate (a) and Lineweaver-Burke plot for the determination of kinetic parameters of Michaelis-Menten equation (b).

서 나타난 것처럼 약 5 μM 이상의 TCE 농도부터는 초기 TCE 분해속도가 점차 포화되는 것을 알 수 있는데, 이것은 TCE 분해 과정이 아래에 제시되어 있는 일반적인 효소 분해 동력학식인 Michaelis-Menten식을 따르고 있음을 알 수 있었다(Figure 3 (a)).

**Table 1.** Initial TCE biodegradation rates of *Pseudomonas cepacia* G4 at various initial TCE concentrations

Microorganisms	TCE degradation rates[nmol/(min · mg protein)]				
	for an initial concentration				
	3 μM	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM
<i>P. cepacia</i> G4	1.11	2.02	1.69	1.98	2.52

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \tag{1}$$

여기서 V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>은 각각 최대분해속도 및 포화상수 (saturation constants)이고 S는 TCE 농도이다. 중요 parameter인 V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>를 결정하기 위하여 (1)번 식을 이중 역수 도시 (Lineweaver-Burke plot)한 (2)번 식의 기울기와 y절편으로부터

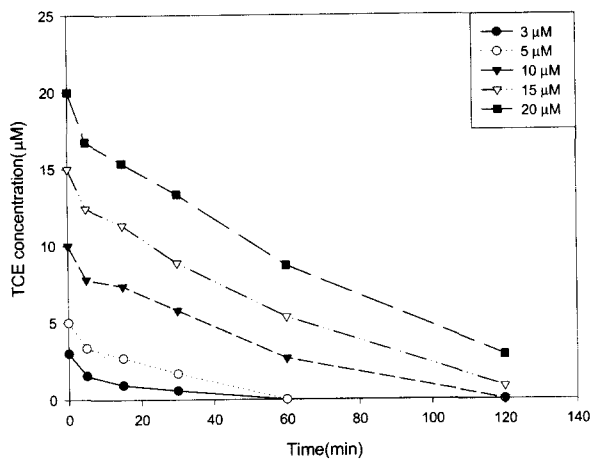


Figure 4 Extent of TCE biodegradation by *B. cepacia* G4 at various initial TCE concentration.

$V_{max}$ 와  $K_m$ 을 결정하였다 (Figure 3 (b)).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

위 식을 이용하여  $V_{max}$ 와  $K_m$ 을 구한 결과 각각 2.65 nmol/min · mg protein, 4.24 µM 이었다. 이 값들을 이전의 문헌치와 비교를 해본 결과,  $K_m$  값은 기존의 문헌치 값들과 비슷하였으나  $V_{max}$  값에서 어느 정도의 차이를 보였다(18). 이러한 실험 값의 차이는 TCE 분해실험 조건의 차이에서 기인한 것으로 예상되는데, 주로 DO(dissolved oxygen) 값 차이 때문으로 판단된다. TCE는 호기적인 조건에서 분해되기 때문에 반응 중에 존재하는 DO의 level에 따라서 TCE 분해속도가 다소간 변화될 수 있다(21).

Figure 4는 *Burkholderia cepacia* G4에 의해 다양한 초기 TCE 농도에서 TCE의 무기질화가 어느 정도 진행될 수 있는지를 보여주고 있다. TCE 초기 농도가 3~5 µM 범위에서는 60분 이내에 TCE가 100% 완전 무기질화 되었고, 10~15 µM 범위에서는 120분 이내에서 100% 무기질화가 되었다. 그러나, 20 µM 정도의 고농도에서는 TCE 분해가 저해를 받고 있음을 알 수 있었는데, 이것은 TCE 고농도 자체의 독성 뿐만 아니라 TCE 분해 과정에서 생성되는 TCE epoxide 등 분해산물의 독성이 세포의 TCE 분해효소 활성을 저해시켰거나 또는 분해과정에서 cofactor 역할을 수행하는 NADH 등의 reducing power가 제한된 결과로 생각된다(22). 그러므로, 고농도의 TCE를 안정적으로 분해시키고자 하는 경우에는 반응기 운전과정 중에서 일어날 수 있는 TCE 분해효소 및 세포의 재활성 및 reducing power를 제공해 줄 수 있는 방법의 개발이 필요함을 알 수 있다.

**TCE 분해속도에 미치는 toluene과 phenol 농도의 영향**

TCE 및 분해산물의 독성, 그리고 NADH 등의 결핍으로 인한 TCE 생분해능 저하는 생물막반응기 효율의 감소를 초래할 수 있으며, 또한 장기간의 안정적인 반응기 운전을 불가능하게 한다. 따라서 적절한 방법을 이용하여 TCE 분해능을 계속적으

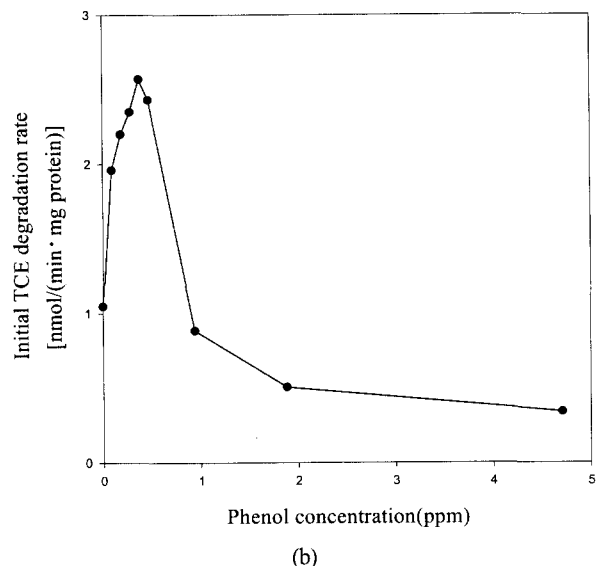
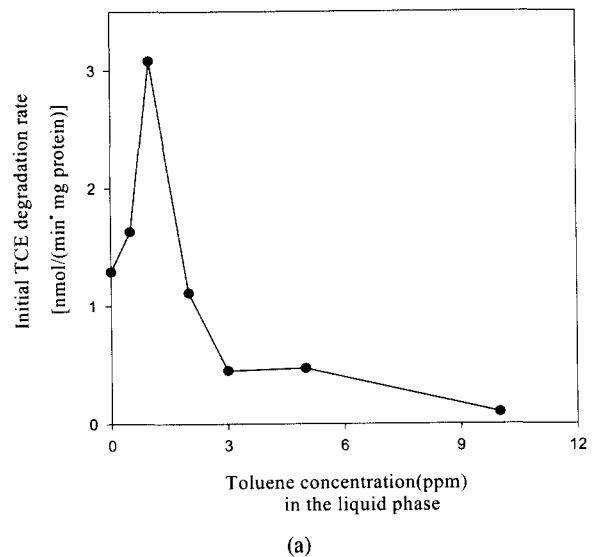
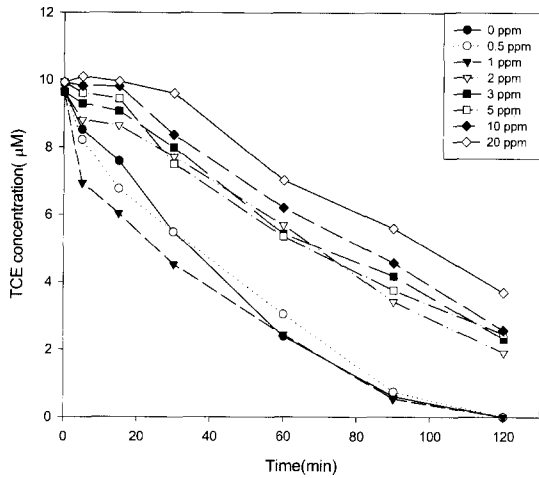


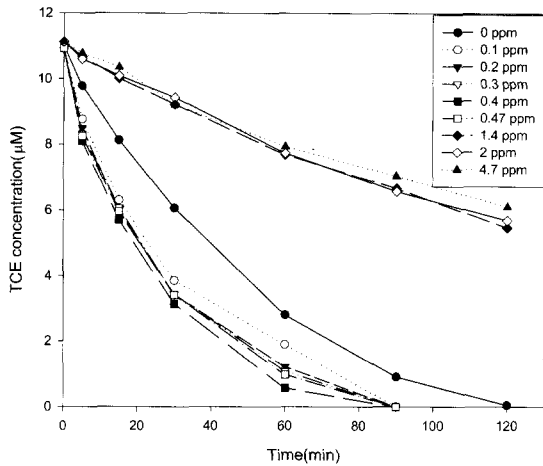
Figure 5. Effects of initial toluene concentrations (a) and initial phenol concentrations (b) on initial TCE biodegradation rates.

로 유지할 수 있도록 해주어야 하는데, 그 대안으로 분해효소 및 NADH의 재생산에 사용될 수 있는 유기물질을 적당량 공급해주는 방법이 있다. TCE 분해효소인 monooxygenase를 유도할 수 있는 성장기질인 toluene 또는 phenol 등을 높은 농도로 제공하는 경우에는 TCE와 경쟁적 저해관계가 일어나서 TCE 분해효율의 저하가 일어날 수 있다. 만약 경쟁적 저해가 일어나지 않는 적절한 농도의 toluene 및 phenol 등의 성장기질을 공급하면 TCE 분해과정에서 필연적으로 수반되는 분해효소 및 세포의 재활성화, 그리고 cofactor의 원활한 공급 등에 도움을 줄 수 있으므로, 이와 관련한 toluene 및 phenol 농도에 따른 TCE 분해속도 변화에 대한 분석이 필요하다. 기존 문헌에서는 이에 대한 연구 결과가 미흡한 편이기 때문에, 본 연구에서는 다양한 toluene 및 phenol 농도가 TCE 초기 분해속도에 미치는 영향에 대한 분석을 실시하였다.

초기 toluene 농도를 각각 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 ppm으로



(a)



(b)

Figure 6. Effect of initial toluene concentration (a) and initial phenol concentration (b) on extent of TCE biodegradation.

변화시키면서 0~5분에서 얻은 TCE 농도 변화 결과로부터 초기 TCE 분해속도를 구하였다 (Figure 5 (a)). 3~20 ppm 사이의 toluene 존재 하에서 TCE 분해속도는 약 0.1~0.45 nmol/min · mg protein 정도를 보였는데, 이 값은 toluene이 첨가되지 않았을 때의 TCE 분해속도에 비해 약 0.5배에서 10배정도 낮은 값이다. 따라서, 3 ppm 이상의 toluene 농도에서는 toluene에 의한 경쟁적 저해로 인하여 TCE 분해속도의 감소가 일어남을 알 수 있었다. 그러나, 저농도의 toluene을 공급해준 경우에는 TCE 분해속도가 증가되는 현상을 관측할 수 있었는데, 즉 0.5~2 ppm 사이의 toluene 존재 시에는 TCE 분해속도가 약 1.11~3.08 nmol/min · mg protein으로 toluene을 공급하지 않은 경우에서의 TCE 분해속도를 기준으로 볼 때 약 1.5배에서 2배정도 높은 결과를 나타내었다. 초기 toluene 농도에 따른 TCE 분해 정도가 Figure 6(a)에 제시되어 있다. 3~20 ppm 사이의 toluene 농도에서는 처음 20여분 동안은 TCE 분해가 거의 일어나지 않아 심한 저해를 받고 있음을 알 수 있었고, 30분 이후부터는 다시 TCE 분해가 일어나기 시작하였다. 이때, toluene 분해 정도도 같이 조사해 보았는데, 초기에 공급된 toluene은 10~30분만에 완전히 분해되었다 (data not shown).

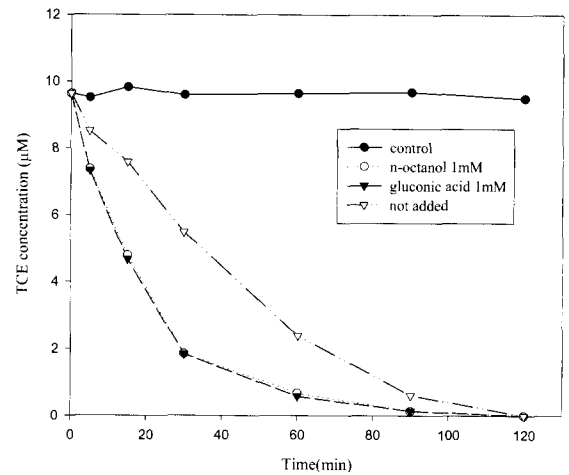


Figure 7. Effects of n-octanol and gluconic acid on TCE biodegradation.

따라서, 30분 정도까지는 toluene 분해가 우선적으로 일어났고, 그에 따른 toluene 농도 감소함에 따라 순차적으로 TCE 분해가 되었음을 알 수 있었다. 고농도의 toluene이 공급된 경우에는 120분이 지나도 분해된 TCE는 초기 농도 대비 약 35~40% 밖에 되지 않아 비효율적임을 알 수 있었다. 이와 반대로 0.5~2 ppm 농도의 toluene을 공급해준 경우에는 TCE 분해속도 뿐만 아니라 무기질화 정도도 촉진됨을 관측할 수 있었다. 공급된 toluene은 5분 이내에, 또한 TCE도 120분 이내에 완전히 분해됨을 알 수 있었다.

Toluene과 같이 monooxygenase에 의해 분해, 동화되는 것을 조사하기 위하여 phenol에 대해서도 위와 같은 실험을 수행하였다. 초기에 투입한 액상의 phenol 농도는 0.1~4.7 ppm이었고, toluene과 마찬가지로 5분 이내에 초기 TCE 분해속도를 구하였다. Figure 5(b)와 6(b)에서와 같이 약 0.5 ppm 이상의 농도에서는 phenol 역시 TCE 무기질화 및 분해속도에 대해 경쟁적 저해를 보였다. 반면에 낮은 농도의 phenol을 넣어준 경우에는 TCE 분해속도가 phenol을 넣지 않은 대조군에 비해 1.5배정도 증가되었고, 또한 무기질화도 더 빨리 일어났다. 따라서, TCE 분해과정 중에 고농도의 toluene 및 phenol의 첨가는 TCE 분해에 대해 경쟁적 저해를 주었지만, 적절한 양을 제공해주면 TCE 분해속도를 촉진시킨 결과를 얻을 수 있었다.

**n-Octanol 및 gluconic acid 첨가가 TCE 분해에 미치는 영향**

위의 실험 결과에서 toluene 또는 phenol의 공급에 따른 TCE 분해속도 향상이 분해효소의 유도 및 재활성화 또는 대사과정에서 생성되는 NADH 등의 reducing power 공급이라는 두 가지 상승효과 중 주된 요인을 알아보기 위하여 TCE 분해실험에서 n-octanol 및 gluconic acid를 첨가하여 TCE 분해속도에 미치는 영향을 살펴보았다. n-Octanol의 경우 monooxygenase 유도 효과는 없고 단지 octanal 및 octanic acid로 동화되는 과정에서 두 분자의 NADH가 생성되며 gluconic acid 역시 동화과정에서 단순히 NADH만을 생성하므로, 이들 기질을 공급한 경우에서도 TCE 분해 효율이 증가되면 주로 후자의 이유에 의해 TCE 분해 효율이 증가된 것으로 예상할 수 있을 것이다.

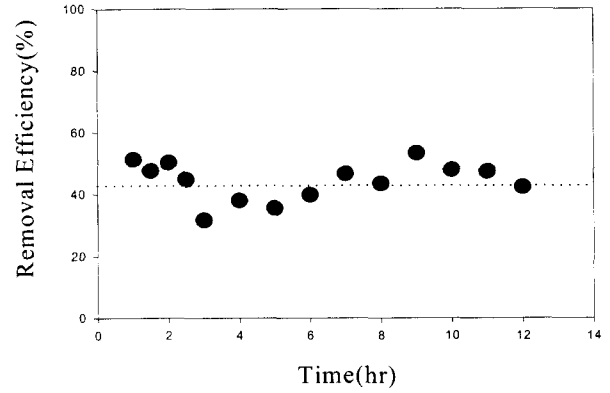
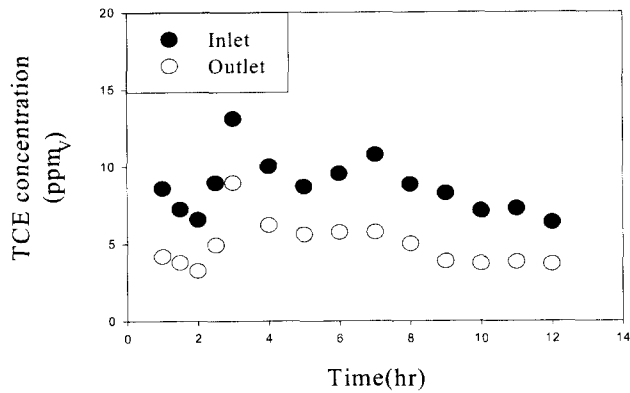
n-Octanol 및 gluconic acid의 첨가가 TCE 분해속도에 미치는 영향이 Figure 7에 제시되어 있다. n-Octanol과 gluconic

acid가 첨가된 경우 초기 TCE 분해속도는 각각 2.43 nmol/min · mg protein, 2.49 nmol/min · mg protein 정도로 성장기질이 제공되지 않은 대조군에서의 분해능인 1.20 nmol/min · mg protein 비해 2배 정도의 TCE 분해능 향상을 보여주었다. 여기서 TCE 분해 실험에 사용된 세포들은 toluene이 있는 배지에서 대수성장기 까지 배양한 후 얻은 resting cell들이므로 monooxygenase는 충분히 발현된 것으로 볼 수 있다. 따라서, 대사과정에서 NADH를 제공해 줄 수 있는 성장기질인 n-octanol 및 gluconic acid를 공급해 준 경우에서도 TCE 분해능 향상 결과를 얻을 수 있었다. 이러한

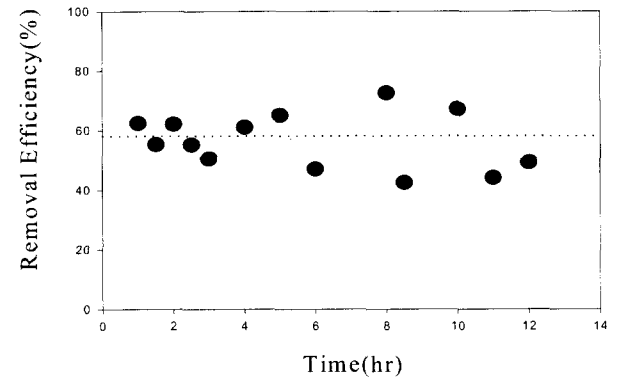
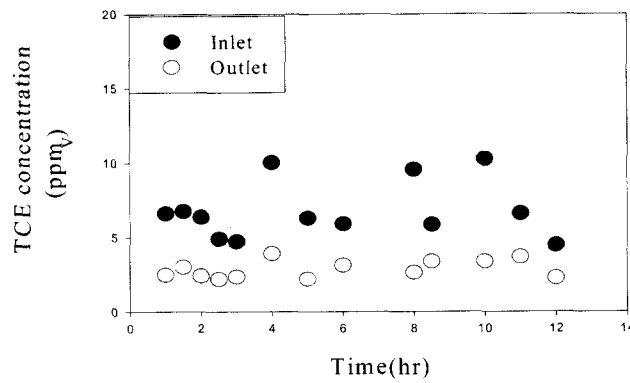
결과들은 TCE 처리를 위한 생물막 반응기의 운전에서 최적 농도의 성장기질 공급을 통한 TCE 분해 반응기의 효율 및 장기간 운전에서의 안정성 증대에 응용될 수 있을 것이다.

**Trickling Biofilm Reactor(TBR)**

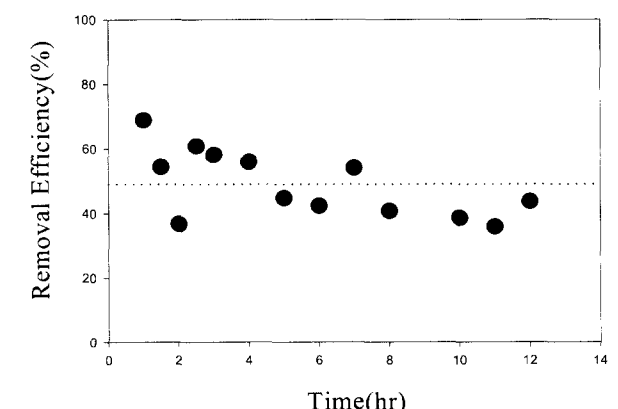
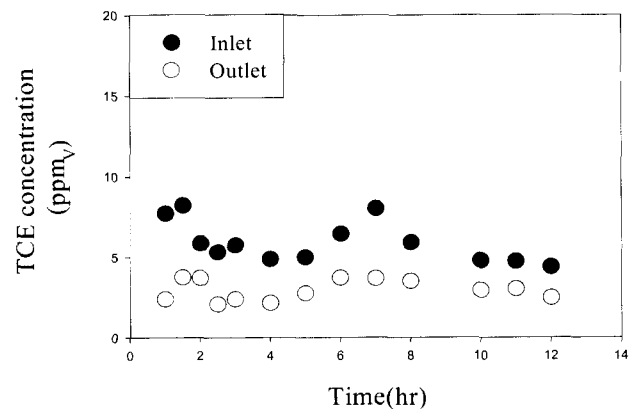
미생물막을 형성시키기 위하여 사용되는 담체인 활성탄은 TCE에 대해 높은 흡착능을 가지고 있기 때문에 실제 미생물막에 의한 TCE 제거효율을 정량적으로 평가하려는 본 시스템에서는 사용하기 어렵다. 따라서 담체 자체의 TCE 흡착능



(a)



(b)



(c)

**Figure 8.** TCE biodegradation in the TBR without phenol (a) and in the presence of 0.94 ppm phenol (b) and 4.71 ppm phenol (c).

력이 적으면서 미생물 부착능이 우수한 다공성 세라믹 담체를 TBR용 충전물로 사용하였다. 미생물막 형성을 위해 사용된 다공성 세라믹 담체 자체의 TCE 흡착능력을 알아보기 위하여, TCE breakthrough curve를 살펴보았다. 미생물막 반응기 유입부에서의 TCE 농도는 평균 300 ppm<sub>v</sub>로 공급하였으며, TCE는 반응기내로 공급된 지 약 40분 이후부터 공급된 양만큼의 TCE가 유출부에서 검출된 것으로 보아 담체 자체의 TCE 흡착 능력은 크지 않음을 알 수 있었다(data not shown).

TBR내에 미생물막을 형성시키기 위해, 0.87 g/L of bed·day의 phenol을 공급하였으며, 이 때 배지의 유량은 4 L/day, 공기 체류시간은 약 8분으로 하였다. 생물막은 배지가 들어가는 반응기의 상단부터 형성되기 시작하였고, 약 7일이 지난 후 반응기 전반부에 걸쳐 형성됨을 확인하였다. 충분한 미생물막 형성 후에는 clogging 현상을 방지하기 위하여 질소원이 결핍된 배지를 공급하였다.

#### TBR에서 TCE 생분해능에 미치는 phenol의 영향

성장기질이 TCE의 공대사적 생분해에 미치는 영향에 대한 회분식 실험결과는 연속적 처리를 위한 생물막 반응기 시스템에서의 결과와는 다를 수 있다. 이것은 일반적으로 현탁 세포를 이용하여 측정된 회분식 실험결과와 같은 실험 조건이지만 담체에 흡착되어 있는 미생물막에서 얻은 실험결과는 다를 수가 있기 때문이다. 예를 들어 단순 수용액상에서 기질이 현탁 세포까지 전달되는 과정과 matrix 형태의 미생물막에서 전달되는 과정은 서로 다르므로 분해 동력학도 상이할 수 있다. 이미 앞선 회분식 실험 결과로부터 공급되는 성장기질의 양에 따라 TCE 분해속도가 많은 영향을 받는다는 것을 살펴보았는데, 연속반응기 형태의 TBR에서도 공급되는 성장기질의 농도에 따라서 TCE 분해속도 및 전환률에 어떠한 영향을 주는지를 살펴보았다.

주요 반응기 운전조건으로는 TCE를 포함한 폐가스의 EBRT (empty bed retention time) 값은 8.3 분, 배지 공급속도는 0.86 mL/min이었다. 우선 phenol 공급이 없는 상태에서 생물막 반응기를 운전하는 경우 TCE 분해 효율이 어떠한 지를 살펴보았는데, phenol이 공급되지 않는 상태에서의 TCE 제거 효율은 평균 42.8% 정도로 유지됨을 알 수 있었다 (Figure 8(a)). Figure 8(b)은 TCE 공급에 대해 counter current로 phenol을 0.94 ppm 정도로 공급해준 경우에서의 TCE 처리 효율을 살펴 본 것이다. 이 경우 TCE 분해효율은 평균 58.1% 정도로 유지되었고, phenol이 전혀 공급되지 않은 경우보다 약 16% 정도 TCE 분해 효율이 증가되었음을 알 수 있었다. 이보다 높은 농도로 phenol을 공급시킨 경우에서의 TCE 분해 효율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 phenol 농도를 4.7 ppm으로 높여 TBR을 운전하였다(Figure 8(c)). TCE 제거효율은 평균 49% 정도로 이 결과 역시 phenol이 존재하지 않을 때보다는 약 7% 정도 향상된 결과로 이 범위까지의 phenol 공급은 TCE 분해 효율을 촉진시키는 효과를 가져올 수 있을 것이다. 그러나, 94.11 ppm 정도로 phenol을 공급하는 경우 TCE 분해효율이 평균 33% 정도로 감소하였는데, 고농도의 phenol 공급은 TCE 분해촉진 효과보다는 경쟁적 저해로 인한 분해 방해 효과가 더 클 수 있었다(Figure 9).

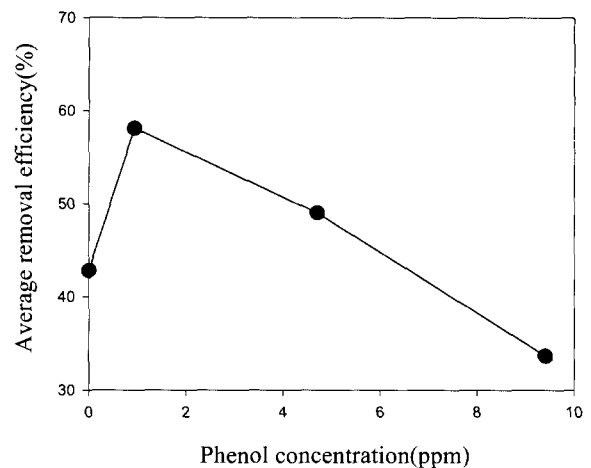


Figure 9. Stimulatory and inhibitory effects of primary substrates on TCE removal efficiency in the TBR

결론적으로, 회분식 TCE 분해 실험 결과와 유사하게 연속처리 시스템인 TBR에서도 phenol 공급이 없는 경우보다는 0.94~4.7 ppm 정도의 적절한 양의 phenol을 공급해 주는 경우에서 보다 높은 TCE 분해 효율을 얻을 수 있었다. 이러한 실험 결과들은 장기간의 TCE 분해 반응기 운전에서 발생할 수 있는 TCE 분해효율 감소 현상을 방지하는데 응용될 수 있을 것이다.

#### 요 약

*Burkholderia cepacia* G4에 의한 TCE의 공대사적 생분해에 미치는 성장기질의 영향을 분석하였다. 회분식 실험에서 toluene의 농도를 0.5~2 ppm, phenol 농도를 0.1~0.5 ppm 정도의 저농도로 공급해준 경우 TCE 분해속도가 1~2.5배 향상됨을 알 수 있었고, 3 ppm toluene 농도, 0.94 ppm phenol 농도 이상에서는 성장기질의 경쟁적 저해로 인하여 TCE 분해속도가 감소됨을 알 수 있었다. Monooxygenase 발현을 유도하는 능력이 없으면서 NADH는 공급할 수 있는 n-octanol 및 gluconic acid를 공급해 준 경우에서도 TCE 분해속도가 증가된 결과로부터 적절한 양의 성장기질 공급을 통한 reducing power의 제공은 TCE 분해 효율 향상에 중요한 역할을 할 수 있음을 알 수 있었다. 연속적인 TCE 처리 시스템인 TBR에서도 phenol을 0.94~4.7 ppm 정도로 공급해준 경우, 58.1% 정도의 보다 향상된 TCE 제거효율을 유지시킬 수 있었다. 따라서, TCE 처리를 위한 생물막 반응기의 효율 향상 및 안정적인 장기간 운전을 위해서는 최적 농도의 성장기질 공급이 필요함을 알 수 있었다.

#### 감 사

본 연구는 한국과학재단의 RRC 연구비 (연구과제: 99-10-03-02-A-3)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. TCE 분석에 도움을 준 윤성준군에게 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Ensley, B. D. (1991), Biochemical diversity of trichloro-

- thylene metabolism, *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 283-299.
- Westrick, J. J., J. W. Mello, and R. F. Thomas (1984), The groundwater supply survey. *J. Am. Water Works Assoc.*, **5**, 52-59.
  - Wackett, L. P., G. A. Brusseau, S. R. Householder, and R. S. Hanson (1989), Survey of microbial oxygenases: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2960-2964.
  - Oldenhuis, R., J. Y. Oedzes, J. J. van der Waarde, and D. B. Janssen (1991), Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichlorosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 7-14.
  - Fan, A. M. (1988), Trichloroethylene: Water contamination and health risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.*, **101**, G.W. Ware, ed., Springer-Verlag, New York, NY.
  - U. S. EPA. (1984), National Primary Drinking Water Standard. *Proposed. Fed. Regist.*, **49**, 24329.
  - Alvarez-Cohen, L, and P. L. McCarty (1991), Effects of toxicity, aeration, and reductant supply on trichloroethylene transformation by a mixed methanotrophic culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228-235.
  - Oldenhuis, R. L. vink, D. B. Janssen, and B. Witholt (1989), Degradation of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2819-2826.
  - Park, S., M. L. Hanna, R. T. Taylor, and M. W. Droege (1991), Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. I: Production of soluble methane monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 423-433.
  - Tsien, H. C., G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett (1989), Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3155-3161.
  - Chang, H. L., and L. Alvarez-Cohen (1995), Model for the cometabolic biodegradation of chlorinated organics, *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 2357-2367.
  - Wackett, L. P., and S. R. Householder (1989), Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2723-2725.
  - Folsom, B. R., and P. J. Chapman (1991), Performance Characterization of a Model Bioreactor for the Biodegradation of Trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1602-1608.
  - Nelson, M. J., S. O. Montgomery, W. R. Mahaffey, and P. H. Pritchard (1987), Trichloroethylene Metabolism by Microorganisms that Degrade Aromatic Compounds, *Appl.-Environ. Microbiol.*, **53**, 604-606.
  - Kelly, C. J., P. R. Bienkowski, and G. S. Sayler (2000), Kinetic Analysis of a tod-lux Bacterial Reporter for Toluene Degradation and Trichloroethylene Cometabolism, *Biotechnol. Bioeng.*, **69**, 256-265.
  - Jean, P. A. and E. Arvin (1997), Modeling of the Cometabolic Biodegradation of Trichloroethylene by Toluene-Oxidizing Bacteria in a Biofilm System, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3044-3052.
  - Maniatis T., Fritsch EF, and J. Sambrook (1982), In: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. NY.
  - Sun, A. K. and T. K. Wood (1996), Evaluation of trichloroethylene degradation and mineralization by pseudomonads and *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 248-256.
  - Kim, K. T. (1998), Degradation of ethylene chlorides by *Methylosinus trichosporium* PP358, M. S. Thesis, Dept. of Chemical Eng., Pusan National University, Pusan.
  - Folsom, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard (1990), Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4; Kinetics and Interactions between substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1279-1285.
  - Junko M. M., V. G. Matheson, L. J. Forney, J. M. Tiedje, and P. L. Mccarty (1997), Long-Term Biodegradation of Trichloroethylene Influenced by Bioaugmentation and Dissolved Oxygen in Aquifer Microcosms, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 786-791.
  - Kim, K. T., J. W. Hwang, J. M. Kang, and S. Park (1999), Degradation Kinetics of Trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* PP358, *HWAHAK KONGHAK*, **57**, 387-392.