



원유오염 토양으로부터 분리한 *Pseudomonas fluorescence* KNU417의 톨루엔 분해에서 환경 인자의 영향

권혁만, 염승호<sup>†</sup>

강릉대학교 환경응용화학공학과

(2006년 9월 1일 접수, 2006년 9월 18일 채택)

**Environmental Effect on the Biodegradation of Toluene by  
*Pseudomonas fluorescence* KNU417**

Hyeok-Man Kwon, Sung-Ho Yeom<sup>†</sup>

Department of Applied Environmental and Chemical Engineering, Kangnung National University

ABSTRACT

A microorganism capable of degrading toluene was isolated from crude oil contaminated soil and identified as *Pseudomonas fluorescence*. The effects of environmental factors on the degradation of toluene were investigated. The optimum temperature for toluene degradation was 30°C and the maximum specific cell growth and toluene degradation rates were 0.76hr<sup>-1</sup> and 0.36 hr<sup>-1</sup>, respectively. Although the wild cells were not able to degrade toluene at 10°C and 40°C, the cells adapted to toluene at 30°C degraded 100mg/L of toluene completely at 10°C and 80% of the toluene at 40°C. The wild cells were not able to degrade more than 200mg/L of toluene but the toluene-adapted cells degraded up to 300mg/L of toluene. Although the optimum pH was 7.0, the degradation rates were not much different in the range of 5.5 to 9.0. When nitrate was used as a nitrogen source instead of ammonium, the adaptation period became longer by 2~10 hours and the cell growth yield became lower by 45%. The toluene degradation rates after adaptation period, however, were almost same in both cases. The observations in this study will be used in the future biofilter design and operation.

Keywords : *Pseudomonas*, toluene, biodegradation, environmental effect, microbial adaptation

초 록

원유에 오염된 토양으로부터 톨루엔을 분해할 수 있는 미생물을 분리하였으며 동정결과 *Pseudomonas*

<sup>†</sup>Corresponding author (shyeom@kangnung.ac.kr)

*fluorescence*였다. 이 미생물을 생물학적 톨루엔 처리공정에 사용하기 위해 온도, 톨루엔 농도, pH, 질소원 등의 환경영향이 분해에 미치는 영향에 대해서 연구를 하였다. 이 미생물의 최적 분해 온도는 30°C였으며 이 때 최대 비성장속도와 최대 비소모속도는 각각  $0.76 \text{ hr}^{-1}$ 와  $0.36 \text{ hr}^{-1}$ 이었다. 10°C와 40°C에서는 톨루엔을 분해하지 못하였으나 30°C에 적용한 미생물은 10°C에서 17시간 만에 100mg/L의 톨루엔을 완전히 분해하였고 40°C에서는 30시간 동안 80% 정도 분해할 수 있었다. 본 미생물은 200mg/L 이상의 톨루엔은 분해할 수 없었으나 20mg/L의 낮은 농도의 톨루엔에 적용을 시킴으로써 300mg/L의 톨루엔까지 분해할 수 있었다. pH는 5.5~9.0 범위에서 분해 속도에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 암모늄( $\text{NH}_4^+$ ) 대신 질산염( $\text{NO}_3^-$ )을 사용했을 때 적용기가 2~10시간 정도 길어졌고 미생물 수율이 45% 정도 감소하였다. 그러나 적용기가 지난 후의 톨루엔 분해속도에서는 별 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서 얻은 결과들은 향후 바이오필터 등의 생물학적 톨루엔 처리공정 개발에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

핵심용어 : *Pseudomonas*, 톨루엔, 생분해, 환경 영향, 미생물 적응

## 1. 서론

최근 사회문제로 급부상하고 있는 스모그, 오존층 파괴, 지구 온난화의 주범으로 휘발성 유기화합물(VOCs : Volatile Organic Compounds)이 큰 관심을 끌고 있다. 대표적인 VOCs 중 하나인 톨루엔은 석유화학과 정밀화학 산업의 중요 생산물질인 동시에 가장 널리 사용되는 용매중의 하나이다. 그러나 미국 EPA로부터 주요오염물질(priority pollutant)로 지정된 톨루엔은 공정상의 이유나 작업자의 실수 지하저장탱크에서의 누출 등으로 인해 자연계로 누출되는 경우가 많다<sup>1)</sup>. 특히 한국에서는 전체 대기배출 오염물질의 20.7%인 연간 6,201톤(2000년 기준)의 톨루엔이 대기로 배출되고 있는 실정이다<sup>2)</sup>. 톨루엔이 인체에 흡수될 경우 신경장애, 폐손상, 기억상실, 폐 울혈을 야기시킬 수 있어 자연계로 유출되는 톨루엔을 처리하는 것은 매우 중요하다<sup>3, 4)</sup>. 톨루엔의 처리방법에는 열소각, 촉매소각, 염소처리 등이 있으나 과정이 복잡하고, 부가적으로 에너지를 필요로 하게 되는 단점이 있다. 또한 활성탄흡착, 가스세정 그리고 막시스템 등은 고가의 처리비용과 2차 오염을 유발하며 오염물질을 완벽하게 제거하기 보다는 대상 물질을 단순히 한 상(phase)에서 다른 상으로 이동시키는 것에 불과하다는 단점이 있다<sup>5)</sup>. 이러한 물리/화학적 방법에 비해 생물학적 처리방법은 물

리화학적으로 처리하기에는 부적합한 낮은 농도의 생분해성 배출가스 처리에 효율적이며 2차 오염물질을 발생시키지 않고 운전비 또한 저렴하기 때문에 환경 친화적이고 경제적인 이점을 가지고 있어 미생물을 이용한 휘발성유기 화합물의 제거 방법이 최근 많은 관심을 받고 있다<sup>6, 7)</sup>. 그러나 이러한 생물학적인 방법은 살아있는 미생물을 이용하기 때문에 처리효율이 조업의 환경적 요인에 큰 영향을 받게 되며 가혹한 환경조건에서 공정의 실패로 결론이 나기도 한다. 따라서 다양한 환경 인자들이 미생물 활성과 오염물질 생분해에 미치는 영향을 살펴보는 것은 생물학적 공정 설계에 가장 기본적인면서도 중요한 부분이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 원유에 오염된 토양으로부터 톨루엔을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 *Pseudomonas fluorescence* KNU417을 분리하여 온도, 톨루엔 농도, pH, 질소원의 종류가 톨루엔 분해에 미치는 영향을 조사하였으며 가혹한 조건에서 분해를 크게 향상시킬 수 있는 방법을 제시하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 균주분리

톨루엔을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 미생물을 원유에 오염된 토양으로부터 분리하

였으며 동정결과 *Pseudomonas fluorescence*로 밝혀졌다. *Pseudomonas fluorescence* KNU417로 명명한 본 균주는 [Fig. 1]의 투과전자현미경 (Jem 1010, JEOL, Japan) 사진에서 보듯이 지름 1.5 $\mu$ m 정도의 크기에 여러 개의 편모를 가지고 있다.

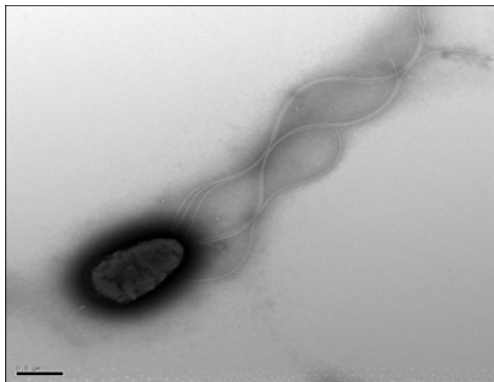
## 2.2 실험방법

### 2.2.1 미생물 전배양

톨루엔 분해 실험에 필요한 미생물을 확보하기 위하여 먼저 전배양을 실시하였다. 전배양배지 250mL를 채운 500mL 삼각플라스크를 멸균한 후 미생물을 접종하고 진탕배양기(Jeio Tech SI-600R, Korea)에서 30 $^{\circ}$ C, 200rpm 조건으로 24시간 배양 하였다. 전배양 배지 조성은 10.0g/L glucose, 5.0g/L yeast extract, 5.0g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.0g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 이다.

### 2.2.2 톨루엔 분해 실험 (본실험)

전배양에서 성장시킨 미생물을 원심분리(Hanil combi-514R, Korea)한 다음 상등액을 버리고 본실험 배지로 현탁시킨 후 다시 원심분리하는 과정을 수차례 반복하였다. 이 과정을 통하여 전배양 배지를 미생물로부터 완전히 제거할 수 있었다. 본



[Fig. 1] TEM image of *Pseudomonas fluorescence* KNU417

실험 배지 20mL를 포함한 120mL serum bottle을 멸균한 후 전배양 배지에서 얻은 미생물을 0.1g/L가 되도록 접종하였다. 톨루엔은 25 $\mu$ L micro-syringe (Hamilton, USA)를 이용하여 투입하였으며 톨루엔이 serum bottle을 빠져나가지 못하도록 rubber septa와 aluminum cap으로 밀봉한 후 200rpm 속도로 운전하는 진탕배양기에서 실험을 수행하였다. 본실험 배지의 조성은 Xg/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Yg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 200 $\mu$ L/L trace element로 구성되어 있으며, trace element는 16.2g/L FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10.2g/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.22g/L CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.15g/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.13g/L CrCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.09g/L NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 40.0g/L citric acid로 구성 되어있다<sup>8)</sup>. 이 때 X, Y값은 원하는 pH 값에 따라 결정되었는데, 예를 들면 pH 7.0을 맞추기 위해서 X=0.32, Y=0.64로 하였다.

## 2.3 분석방법

미생물 농도는 spectrophotometer (Jasco V-550, Japan)를 사용하여 660nm에서, 배지의 pH는 pH meter (Mettler-Toledo GmbH8603, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 톨루엔의 농도는 GC(HP 5890 II, USA)를 이용하여 headspace 방법으로 분석하였다. 즉, 2.5mL gas-tight syringe(Hamilton, USA)를 이용하여 serum bottle의 기체부분에서 100 $\mu$ L의 시료를 채취하여 GC로 분석하여 기상으로 존재하는 톨루엔의 농도를 측정하였으며 예비 실험을 통해서 미리 계산한 Henry 상수를 이용하여 액상 톨루엔 농도를 계산하였다. GC의 주입기,오븐, 검출기의 온도는 각각 150 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C, 250 $^{\circ}$ C로 설정하였으며 운반기체로는 헬륨을 사용하였다. 미생물의 분해에 의하지 않은 손실을 보정하기 위해서 미생물만 빠져있는 serum bottle을 대조군으로 사용하였다.

## 3. 결과 및 토의

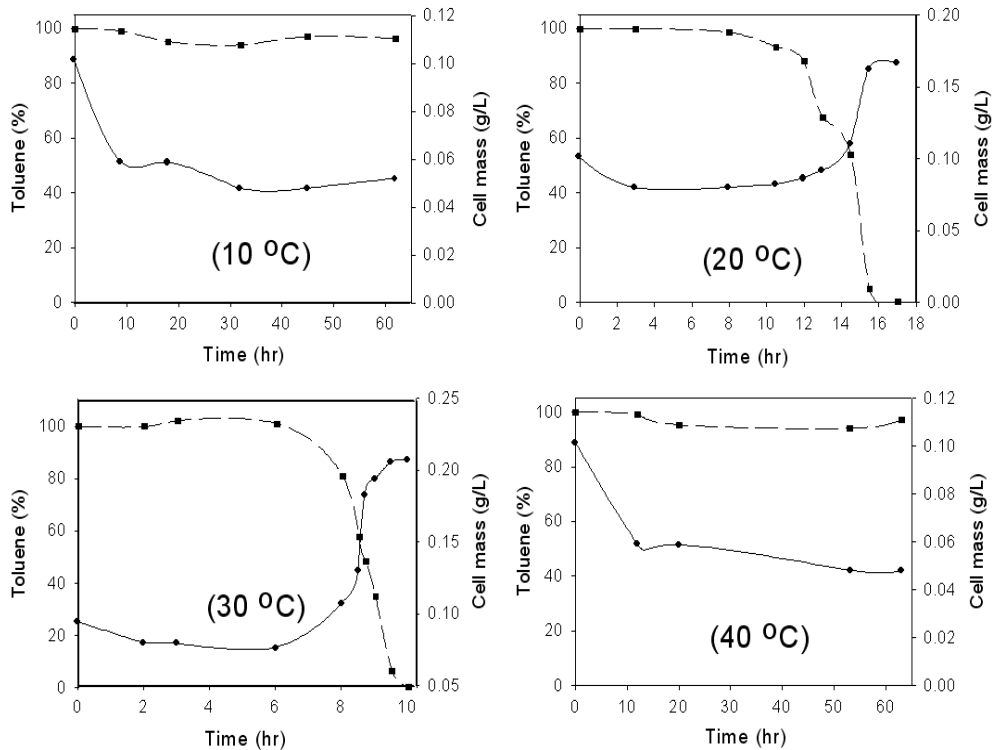
### 3.1 온도에 따른 톨루엔 분해특성

일반적으로 온도는 미생물의 활성에 큰 영향을

주기 때문에 실제 생물학적 처리 공정은 기후나 날씨 조건에 많은 영향을 받는다고 할 수 있다. 특히 사계절이 뚜렷하고 하루 일교차가 큰 날이 많은 한국적 상황에서는 생물공정 설계에서 온도는 중요한 고려사항이 아닐 수 없다. 본 연구에서는 10~40°C의 범위에서 톨루엔의 분해 특성을 살펴 보았다. [Fig. 2]는 온도에 따른 미생물 성장 및 톨루엔 분해 양상을 10°C 간격으로 보여주고 있다. 미생물은 일정한 시간의 적응기(adaption period ; 20°C의 경우 12시간, 30°C의 경우 6시간)를 거치는데 적응기에서 미생물은 새로운 기질을 이용하여 에너지를 얻기 위해 필요한 효소를 만들어내기도 하고<sup>9)</sup> 세포벽의 조성을 변환시켜 가혹한 환경에 견디기도 한다<sup>10)</sup>. 따라서 이 기간 동안엔 미생물은 성장하지 못하고 일부는 사멸하기도 한다. 적응기가 지나면 톨루엔은 분해되기

시작하고 미생물은 성장한다. 그러나 10°C와 40°C의 경우에는 실험 초기에 미생물이 급격하게 사멸되었고 그 이후에도 미생물의 성장이 전혀 이루어지지 못하였고 톨루엔도 전혀 분해되지 않고 있음을 볼 수 있다. [Table 1]은 온도에 따른 미생물 최대비성장속도와 톨루엔 최대비분해속도 (mg-toluene/mg-cell/hr)를 보여주고 있다. 최대비성장속도와 최대비분해속도 모두 30°C에서 각각 0.76 hr<sup>-1</sup>와 0.36 hr<sup>-1</sup>으로 가장 높았다. 따라서 *Pseudomonas fluorescens* KNU417 미생물의 최적 온도는 30°C라고 말할 수 있으며 이 온도보다 높거나 낮을 경우 미생물 성장속도와 톨루엔 분해속도 모두 둔화되었다.

앞서 언급하였듯이 기온은 계절에 따라서도 변하지만 하루 동안의 온도 변화도 적지 않은 경우가 많다. 가혹한 온도에 미생물이 노출되었을 때는 위



[Fig.2] Effect of temperature on the cell growth and toluene degradation

● : cell mass, ■ : toluene

[Table 1] Effect of Temperature on The Specific Cell Growth Rate and the Specific Toluene Degradation Rate

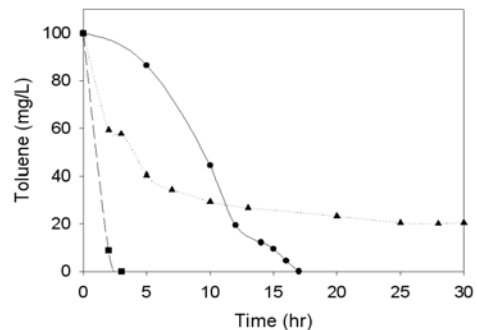
Temp. (°C)	maximum specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	maximum specific degradation rate (hr <sup>-1</sup> )
10	—	—
15	0.04	0.13
20	0.37	0.24
25	0.47	0.27
<b>30</b>	<b>0.76</b>	<b>0.36</b>
35	0.15	0.22
40	—	—

[Table2] Effect Of Nitrogen Sources On The Cell Growth Yield

Concentration (mM)	Nitrogen sources	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
7.5	0.92	0.54
15.0	0.91	0.50
30.0	0.90	0.51
60.0	0.81	0.52
<b>Average</b>	<b>0.89</b>	<b>0.52</b>

의 실험결과에서도 보듯이 톨루엔을 전혀 분해하지 못하고 사멸하므로 공정은 결국 실패하게 된다. 본 연구에서는 이러한 상황을 극복할 수 있는 방안 에 대해서 연구를 하였고 온도 적응(temperature adaptation)을 통하여 상당부분 극복할 수 있음을 알 수 있었다. 이 방법은 최적 온도조건에서 미생 물을 톨루엔에 적응시킨 후 가혹한 온도 조건으로 옮기는 방법이다. [Fig. 3]에서 보듯이 100mg/L 톨루엔을 30°C에서 완전히 분해한 미생물을 이용할 경우 10°C에서도 16시간 만에 같은 양의 톨루엔을 분해할 수 있었으며 40°C에서는 30시간 후에 약 80%의 톨루엔을 분해할 수 있었다. 그리고 100mg/L의 톨루엔 분해속도도 앞의 [Fig. 2] 결과와 비교했을 때, 적응기를 고려하지 않고서도 30% 이상의 향상을 보였으며 적응기를 고려했을 경우는 무려 300% 정도의 속도 향상을 보여주었다. 이러한 결과가 가능했던 것은, 톨루엔 분해와

관련된 미생물 내부 효소가 충분히 발현된 이후에는 나쁜 환경에 옮겨지더라도 톨루엔 저해에 의한



[Fig. 3] Effect of temperature adaptation on the toluene degradation.

● : 10 °C, ■ : 30 °C, ▲ : 40 °C

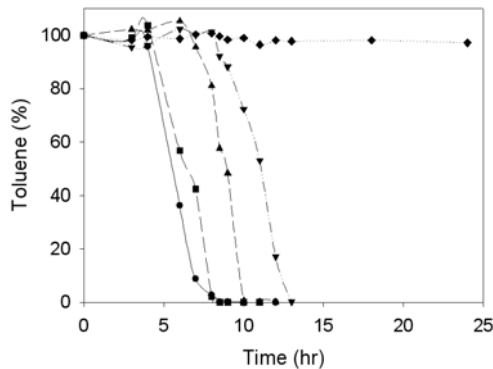
Cells adapted to 100 mg/L of toluene at 30°C were transferred to a shaking incubator operating at 10, 30 or 40°C.

사멸 속도보다 톨루엔 분해에 의한 미생물 성장 속도가 더 크기 때문으로 생각된다. 또한 한번 적응을 거친 후에는 더 이상 적응기가 필요하지 않기 때문에 같은 최적 온도에서의 분해 속도도 크게 향상하는 것으로 생각된다.

본 실험결과는 미생물을 생물공정에 초기 접종할 때 최적 온도조건에서 충분히 적응을 시킨 후에 사용하는 것이 온도 변화에 의한 공정실패를 피할 수 있는 한 방법임을 의미한다.

### 3.2 기질 농도에 따른 분해특성

톨루엔 배출 농도는 배출원의 종류에 의존하며 동일한 배출원이라고 해도 조업 스케줄에 따라서 다양하게 변한다. 생물공정에서 오염물질이 유일 탄소원인 동시에 에너지원으로 작용하는 경우에는 농도의 영향을 살펴보는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 초기 톨루엔 농도에 따른 미생물의 톨루엔 분해특성을 살펴보았다. [Fig. 4]는 톨루엔 초기 농도를 20~250mg/L까지 다양하게 한 후 분해되는 양상을 살펴본 것이다. 초기 농도가 60mg/L까지는 분해가 완료되는 시간이 약 8시간 정도로 비슷했으나 그 이상에서는 농도가 높아질수록 분해가 완료되기까지 많은 시간이 필요했다.

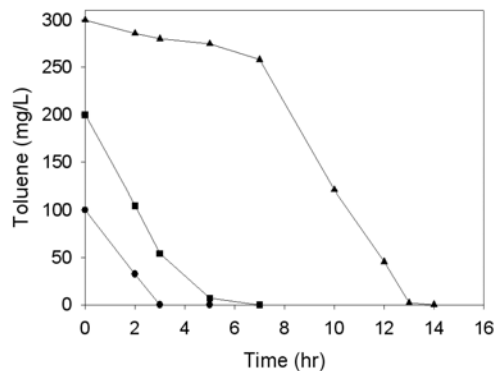


[Fig. 4] Effect of toluene concentration on the toluene degradation.

● : 20 mg/L, ■ : 60 mg/L, ▲ : 100 mg/L,  
▼ : 200 mg/L, ◆ : 250 mg/L

그 이유는 톨루엔 농도가 높을수록 미생물 적응시간이 길어지기 때문이다. 그러나 미생물 적응시간을 제외한 분해속도는 초기농도 20, 60, 100, 200mg/L에 대해서 각각 0.22, 0.65, 1.09, 1.74mg/hr로 기질로 작용하는 톨루엔의 농도가 높아질수록 분해속도가 향상되는 것을 알 수가 있었다. 그러나 250mg/L에서는 분해가 전혀 이루어지지 않는 것으로 보아 200mg/L의 농도를 지나면서 기질저해 현상이 급격하게 발생하는 것으로 보이며 본 미생물의 한계 농도는 250mg/L 정도인 것으로 생각된다.

본 연구에서는 분해속도를 더욱 향상시키고 200mg/L 이상의 톨루엔을 분해할 수 있는 방법을 미생물 적응에서 찾고자 하였다. 미생물을 적응시키지 않았을 때는 100mg/L, 200mg/L를 분해하는데 각각 10시간과 13시간이 소요되었으며 300mg/L 농도는 전혀 분해를 하지 못하였다. 그러나 [Fig. 5]에서 보듯이 20mg/L 라는 낮은 농도의 톨루엔에 적응된 후에는 100mg/L 와 200mg/L 는 각각 3시간과 5시간 만에 분해가 완료되었으며 300mg/L 의 톨루엔도 13시간 만에 완전히 분해시킬 수 있었다. 톨루엔에 적응된 미생물이 분해시간을 크게 단축한 것은 앞에서 설명하



[Fig. 5] Effect of microbial adaptation on the degradation of high concentration of toluene.

● : 100 mg/L, ■ : 200 mg/L, ▲ : 300 mg/  
Cells adapted to 20 mg/L of toluene were fed with 100, 200 or 300 mg/L of toluene.

였듯이 적응기를 거치지 않고 곧바로 톨루엔 분해를 시작하기 때문이다. 따라서 이미 적응기가 없어진 이상 적응을 2회 이상 시키더라도 분해 속도가 더 커지는 것은 아니었다(테이타 생략). 그리고 미생물이 견딜 수 있는 한계를 넘긴 농도의 톨루엔을 분해할 수 있었던 것은 미생물이 낮은 농도의 독성물질(톨루엔)에 노출되었을 때 독성물질을 기질로 이용하거나 혹은 독성물질에 견딜 수 있는 자체의 방어기작을 이미 갖추었기 때문에 더 큰 독성에 노출되었을 때에도 사멸되는 것보다 톨루엔을 이용하여 성장하는 속도가 크기 때문으로 생각된다.

본 실험결과는 처리하고자 하는 오염물질에 미생물을 먼저 적응시킨 후에 생물공정에 투입하는 것이 공정의 초기 안정화에 큰 도움이 되며, 일단 공정이 본 케도에 오르게 되면 유입되는 오염물질의 농도에 변동이 있더라도 미생물이 자체의 적응 매커니즘을 통해서 스스로 공정을 안정화시킬 수 있음을 보여준다고 할 수 있다.

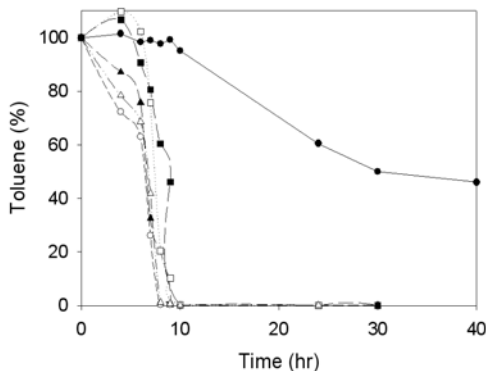
### 3.3 초기 pH에 따른 톨루엔 분해특성

pH는 잘 알려진 대로 미생물 활성화에 큰 영향을 준다. 이러한 pH는 오염원 배출원, 생물공정에 사용되는 담체나 충전물 종류에 따라서 다양한 값을 가진다. 또한 미생물이 성장하면서 산을 배출되는

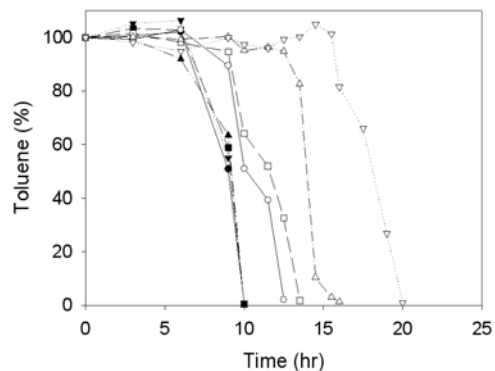
경우가 많아 조업이 진행됨에 따라 pH 값은 대체로 낮아진다. 본 연구에서는 pH 범위를 4.5~9.0으로 하여 pH의 영향을 살펴보았으며 그 결과를 [Fig. 6]에 보였다. 그림에서 보듯이 pH 5.5~9.0 범위에서 톨루엔 분해는 별 영향을 받지 않았으나 4.5에서는 톨루엔을 전혀 분해하지 못하였다. 이러한 저해 현상은 미생물을 최적 pH인 7.0에 적응을 시킨 후에도 극복하지 못하였다. 따라서 본 미생물을 이용한 생물공정 개발에서는 pH 조절이 가장 중요한 고려사항 중의 하나임을 알 수 있다.

### 3.4 질소원에 따른 톨루엔 분해특성

미생물 성장에 가장 중요한 영양소는 탄소원 및 질소원이라고 할 수 있다. 일반적으로 미생물의 성분 조성은  $C_5H_7O_2N$ 이라 알려져 있으며 이를 고려하면 질소 성분은 미생물 중량의 약 12%를 차지한다. 본 미생물은 톨루엔을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하기 때문에 질소원은 외부에서 공급 해주어야 한다. 본 연구에서는 자연계에 가장 널리 존재하는 대표적인 질소원인 암모늄( $NH_4^+$ )과 질산염( $NO_3^-$ )이 미생물 성장과 톨루엔 분해에 어떤 영향을 주는지를 알아보고자 하였다. [Fig. 7]은 암모늄과 질산염의 농도에 따른 톨루엔 분해특성을 보여주고 있다. 암모늄의 경우 60mM



[Fig. 6] Effect of pH on the toluene degradation.  
 ● : 4.5, ■ : 5.5, ▲ : 6.5,  
 ○ : 7.0, □ : 8.0, △ : 9.0



[Fig. 7] Effect of nitrogen sources on the toluene degradation.  
 ( $NH_4^+$ ) ● : 7.5mM, ■ : 15.0mM,  
 ▲ : 30.0mM, ▼ : 60.0mM  
 ( $NO_3^-$ ) ○ : 7.5 mM, □ : 15.0 mM,  
 △ : 30.0 mM, ▽ : 60.0 mM

(4g/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 해당)까지 농도에 상관없이 100mg/L의 톨루엔을 분해하는데 약 10시간이 소요되었으며 질산염의 경우 농도가 높아질수록 분해시간이 점점 길어지는 특징을 보였는데 30mM과 60mM의 경우 각각 15시간과 20시간 정도가 소요되었다. 두 질소원 사이의 분해시간의 차이는 질산염이 더 긴 적응시간을 필요로 하기 때문이며 적응이 끝난 후 분해속도는 두 경우에 있어서 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 암모늄을 질소원으로 사용했을 때 미생물 수율은 0.9 근처였으나 질산염을 사용했을 때 수율은 0.5 근처였다. 일반적으로 암모늄은 미생물 성장을 위한 대사작용에 직접 사용될 수 있지만 질산염의 경우는 여러 번의 환원과정을 거치 후에 사용되는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 이러한 차이가 적응시간의 차이와 수율의 차이로 나타났을 것으로 추정된다.

본 실험결과는 공정 초기에 미생물의 적응시간을 단축시키기 위해서 암모늄을 질소원으로 사용하는 것이 유리함을 말해준다. 또한 바이오필터 공정과 같이 과도한 미생물 성장이 문제가 되는 공정에서는, 일단 공정이 안정화되면 암모늄 대신에 질산염을 투입하여 톨루엔 분해속도는 그대로 유지하면서 미생물 성장을 억제하는 방법을 적용하면 조업 비용을 크게 낮출 수 있을 것으로 생각된다.

#### 4. 결론

1. 원유에 오염된 토양으로부터 톨루엔을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있는 미생물을 분리하였으며 동정결과 *Pseudomonas fluorescens*였다. 이 미생물을 생물학적 톨루엔 분해 공정에 사용하기 위하여 각종 환경요인이 톨루엔 분해에 미치는 영향을 살펴보았다.
2. 이 미생물의 최적 분해 온도는 30°C였으며 10°C와 40°C에서는 톨루엔을 전혀 분해하지 못하였다. 그러나 30°C에 적응한 미생물은 10°C에서 17시간만에 100mg/L의 톨루엔을 완전히 분해하였고 40°C에서는 30시간 동안 80% 정도 분해할 수 있었다. 이러한 실험결과, 미생물을 생물공정에 초기 접종할 때 최적

온도조건에서 충분히 적응을 시킨 후에 사용하는 것이 온도 변화에 의한 공정실패를 피할 수 있는 한 방법이 될 수 있음을 의미한다.

3. 이 미생물을 20mg/L의 낮은 톨루엔에 적응시킨 후 100, 200mg/L 톨루엔에 투입했을 때 분해속도가 크게 향상되었다. 또한, 적응하지 않은 미생물은 200mg/L 이상의 톨루엔은 분해할 수 없었으나 적응된 미생물은 300mg/L의 톨루엔까지 분해할 수 있었다. 이는 미생물 적응이 분해속도와 미생물이 견딜 수 있는 한계 농도를 크게 높여준다는 사실을 보여준다. 그리고 처리하고자 하는 오염물질에 미생물을 먼저 적응시킨 후에 생물공정에 투입하는 것이 공정의 초기 안정화에 큰 도움이 되며, 일단 공정이 본 궤도에 오르게 되면 유입되는 오염물질의 농도에 변동이 있더라도 미생물이 자체의 적응 매커니즘을 통해서 스스로 공정을 안정화시킬 수 있음을 보여준다고 할 수 있다.
4. pH는 5.5~9.0 범위에서 분해 속도에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 pH 4.5에서 톨루엔 분해속도는 확연하게 감소하였다. 이러한 저해 현상은 미생물을 최적 pH인 7.0에 적응을 시킨 후에도 극복하지 못하였다. 따라서 본 미생물을 이용한 생물공정 개발에서는 pH 조절이 가장 중요한 고려사항 중의 하나임을 알 수 있다.
5. 질소원으로 암모늄(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 대신 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)을 사용했을 때 적응기가 2~10시간 정도 길어졌고 미생물 수율이 45% 정도 감소하였다. 그러나 적응기가 지난 후의 톨루엔 분해속도에서는 별 차이를 보이지 않았다. 이러한 실험결과, 미생물의 과도성장이 문제되는 바이오필터 공정 등을 개발할 때 중요한 자료로서 사용될 것으로 기대된다.

#### 사사

본 논문은 2005년도 강릉대학교 학술연구조성비 지원으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.



## 참고문헌

1. Yeom, S. H., and Yoo, Y. J., "Removal of benzene in a hybrid bioreactor", *Process Biochem.* 34, pp. 281~288 (1999).
2. Park, H. S., "Final reports of service research-Development of a Guiding Principle in Estimating Discharges of Volatile Organic Compounds (VOCs)", Ministry of Environment (2003).
3. Yoo, I. N., and Park, C. H., "Degradation of Volatile Organic Compound Mixtures Using a Biofiltration System." *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, pp. 501~506 (2000).
4. Lee, E. S., "Effect of Nitrogen Sources on Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* BZ918 and Application to the Biofilter." Dissertation, Seoul National University, (2004).
5. 염승호, 최석순, "바이오필터 입문과 응용", 도서출판 아진, pp. 1~16 (2002).
6. Deeb, R. A., and Lisa, A. C., "Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multi-component mixtures." *Bioremediation J.*, 4(2), pp. 171~179 (2000).
7. Riyad, J. A., Walter, K., and Edward, H. S., "Biofiltration of BTEX contaminated air stream using compost-activated carbon filter media, *J. Hazardous Materials*, 60, pp. 111~126 (1998).
8. Yeom, S. H., and Andrew, J. D., "Development of a Novel Bioreactor System for Treatment of Gaseous Benzene", *Biotechnol. Bioeng.*, 72(2), pp. 156~165 (2001).
9. Yeom, S. H., and Yoo, Y. J., "Analysis of Microbial Adaptation at Enzyme Level for Enhancing Biodegradation rate of BTX", *Korean J. Chem. Eng.*, 19(5), pp. 780~782 (2002).
10. Heipieper, H. J., and Bont, J. A. M., "Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to Ethanol and Toluene at the Level of Fatty Acid Composition of Membranes", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12), pp. 4440~4444 (1994). 