

## 부유상태에서 *Pseudomonas putida* F1에 의한 Trichloroethylene 분해

정인경, 박옥현, 우혜진, 박창호

경희대학교 산학협력기술연구원, 부산대학교 환경공학과, 경희대학교 화학공학과  
전화 (031) 201-2975, FAX (031) 202-1946

### 1. 서론

염소화지방족탄화수소화합물(chlorinated aliphatic hydrocarbons, CAHs)은 미생물에 의해 쉽게 분해되지 않는 물질이다. Trichloroethylene(TCE)은 하나의 대표적인 휘발성의 CHAs로서 낮은 농도에서도 유전자 변이, 중추신경억제, 간손상을 일으키고 동시에 생체내에 축적되어 암을 유발시키는 등 보건에 큰 악영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이러한 유기성 염소화 화합물에 대한 생물학적 제거기술은 특정 미생물의 공동대사를 이용하는 것으로서 염소계 유기화합물과 에너지원인 1차 기질간의 경쟁적 억제 작용, 분해효소의 활성도, 대사 산물이 세포에 미치는 독성 등 다양한 영향인들이 서로 연관되어 있다.<sup>1)</sup> *Pseudomonas putida* F1 박테리아는 성장속도가 빠르고 Methanotroph인 *Methylosinus trichosporium* OB3b 보다 높은 초기분해속도로 TCE를 분해시킨다. 이 박테리아는 호기조건에서 톨루엔을 탄소원과 에너지원으로 사용하며 이때 TCE를 공동대사할 수 있는 toluene dioxygenase 효소를 생성한다.<sup>2)</sup> 본 연구는 TCE를 공동대사 처리하는 *Pseudomonas putida* F1의 성장 및 감쇠 특성을 살펴보고 이 미생물의 TCE 전환능력을 구하였다.

### 2. 재료 및 방법

· **미생물 배양** : 냉동상태의 *Pseudomonas putida* F1을 50 ml 배양액을 넣은 300 ml 플라스크에 넣고 진탕배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 25°C 조건에서 미생물이 마지막 지수성장단계에 도달(OD<sub>600</sub>=0.8~1.0) 할 때까지 배양하였다. 박옥현 등<sup>3)</sup>에서 사용된 것과 동일한 조성의 배양액을 사용하였으며, 배양기간 중 톨루엔은 기상으로 공급하였다.

· **미생물의 성장 및 감쇠** : 300 ml 플라스크에 OD가 0.1인 미생물 배양액 50 ml을 넣어 미생물의 성장을 OD의 증가로 측정하였다. 톨루엔은 플라스크 headspace에 장착된 유리튜브로부터 확산에 의해 기상으로 공급하여 기질과 무기영양염이 부족하지

않은 상태에서 미생물의 성장을 시간에 따라 OD로 측정하였다. 미생물의 감쇠는 배양된 미생물을 원심분리(1000 rpm)하여 농축시키고 톨루엔 없는 새로운 배양액에서 OD가 0.6(미생물농도: 230 mg/L)이 되도록 조정하여 시간에 따라 OD로 측정하였다.

· 미생물의 TCE 전환능력 : 배양조로부터 회수한 미생물농도가 380 mg/L인 *Pseudomonas putida* F1 10 ml를 특수한 뚜껑(minert cap)이 장착된 40 ml 밀폐용기에 넣어 TCE 포화용액을 용기에 주입하여 원하는 기상농도를 맞추었으며 기상과 액상농도는 헨리법칙을 적용하였다.<sup>4)</sup> 초기 TCE 농도가 80, 130, 210  $\mu\text{g/L}$ 일 때 시간에 따른 TCE 농도의 변화 및 미생물농도를 측정하였다.

· 분석방법 : 미생물농도는 분광광도계(SHIMADZU UV-1601, JAPAN)를 이용(파장 600nm)하여 시료의 Optical Density(OD)를 측정하고 미리 구한 OD와 미생물 농도사이의 검량선으로 부터 미생물 농도값을 구하였다. 톨루엔과 TCE 가스의 농도분석은 400  $\mu\text{l}$  시료가스를 샘플링 채취구로부터 채취하여 FID(Flame Ionization Detector)가 장착된 가스크로마토그래프(Perkin-Elmer Autosystem XL)를 사용하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 *Pseudomonas putida* F1의 성장 및 감쇠

Fig. 1은 기질과 무기물 영양염이 부족하지 않은 상태에서 시간경과에 따른 *Pseudomonas putida* F1의 질량성장 과정을 나타내고 있다. 미생물은 약 6시간 이내에 OD값이 0.1~0.8 범위에서 시간경과에 따라 지수함수적으로 성장하였다. 새로운 세포를 합성하는 탄소 및 에너지원인 톨루엔을 공급하지 않은 내생(endogenous)상태에서 미생물 질량농도를 OD항으로 시간에 따라 측정한 결과를 Fig. 12에 나타내었다. 처음 7시간동안 미생물 농도는  $\text{OD}_{600} = 0.4$ (미생물농도:150 mg/L)까지 급속히 감소하였으며 이후에는 거의 일정한 OD수준을 유지하였다. 이는 미생물이 성장을 멈추었다는 것을 시사하며, 또한 OD가 지속적으로 일정하게 측정되는 것은 미생물의 사체가 남아서 생기는 결과이다.

#### 3.2 *Pseudomonas putida* F1의 TCE 전환능력

Fig. 3에는 Resting cell(톨루엔이 공급되지 않는 상태의 톨루엔 영양미생물)에 의한 초기 TCE 농도에 따른 TCE 전환을 보여주고 있다. 초기 TCE 농도가 80  $\mu\text{g/L}$ , 130  $\mu\text{g/L}$ 인 경우는 각각 6.5시간과 20시간만에 모두 전환되었고, 210  $\mu\text{g/L}$ 의 경우는 22시간까지는 감소하는 경향을 보였으나 그 이후부터는 전환되지 않은 상태로 유지되었다. 이것은 TCE 전환을 수행한 resting cell의 활성저하에 의한 것으로 생각된다. Alvarez-Cohen와 McCarty<sup>5)</sup>는 resting cell에 의한 비성장기질의 전환을 동력학적으로 해

석하기 위하여 중간생성물의 독성과 NADH와 같은 보조효소의 고갈로 인한 전환능력의 손실을 고려한 모형을 제안하면서 전환능력(Transformation capacity :  $T_c$ )을 도입하였다.  $T_c$ 는 비성장기질의 전환으로 인해 활성이 저하된 미생물 변화질량 당 전환되어진 비성장기질의 질량으로 측정된다. 미생물의 감쇠계수  $k_d$ 를 적용하여 미생물의 감쇠율을 고려한 resting cell의 전환능력  $T_c^{k_d}$ 를 결정하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 감쇠계수는 TCE 농도가 80, 130, 210  $\mu\text{g/L}$ 일 때 0.0034, 0.003, 0.0032  $\text{hr}^{-1}$ 로서 TCE 농도에 비례하지는 않았고 전환용량  $T_c^{k_d}$ 는 380  $\text{mg/L}$ 의 미생물 농도에서 TCE 농도가 80에서 210  $\mu\text{g/L}$ 로 증대됨에 따라 9.17에서 5.08  $\mu\text{g}(\text{toluene})/\text{mg}(\text{dried cell})$ 로 감소하였다.

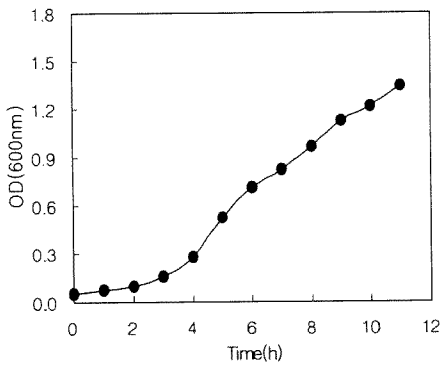


Fig. 1. Growth curve of *P. p.* F1

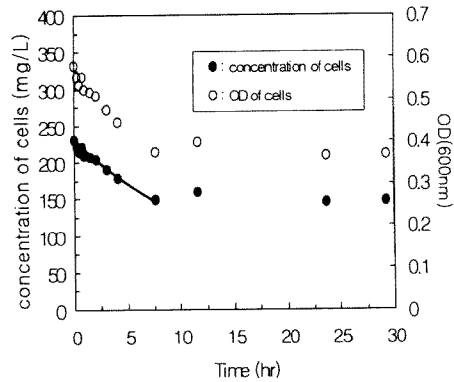


Fig. 2. Endogenous decay of *P. p.* F1

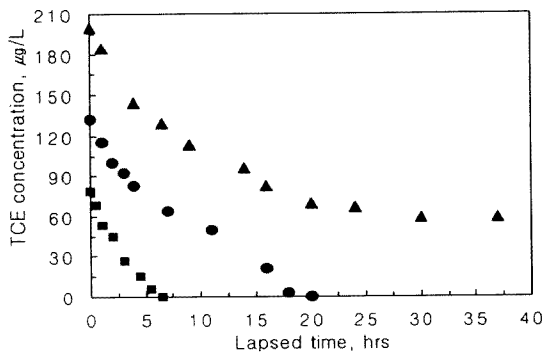


Fig. 3. TCE degradation by resting cells with lapsed time in batch test.

**Table 1.** Transformation capacity  $T_c^{k_d}$  with TCE concentration

TCE conc. ( $\mu\text{g/L}$ )	$k_d$ (1/hr)	$T_c^{k_d}$ ( $\mu\text{g(TCE)}/$ $\text{mg(dried cell)}$ )	$R^2$
80	0.0034	9.17	0.96
130	0.003	5.30	0.96
210	0.0032	5.08	0.94
		3.13	0.83

#### 4. 참고문헌

- 1) Cox, C. D., Woo, H. J., and Robinson, K. G., "Cometabolic biodegradation of trichloroethylene(TCE) in the gas phase", (1998), *Water Sci. Tech.*, **37**, 97-104.
- 2) 우혜진, "Pseudomonas putida F1을 이용한 TCE (Trichloroethylene)의 Cometabolic oxidation", *대한환경공학회지*, (2001), **23**(8), 1413-1423.
- 3) 정인경 · 박옥현 · 우혜진 · 이재현, "부유 · 부착상태에서 Pseudomonas putida F1의 생물학적 동력학", (2001), *대한환경공학회지*, **23**(10), 1733-1740.
- 4) LaGrega, M. D. and Buckingham, P. L., *Hazardous waste management*, (1994) McGrawHill, Inc., New York.
- 5) Alvarez-Cohen, L. and McCart, P.L., "Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transeformation by methanotrophic resting cells", (1991), *Appl. environ., Microbiol.*, **57**, 1031-1037.