

Gram 음성세균에 의한 Aroclor 분해에 미치는 환경요소의 영향

김치경 · 김문식

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Effects of Environmental Factors on Degradation of Aroclors by Gram-negative Bacteria

Kim, Chi-Kyung, and Moon-Sik Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

ABSTRACT: The effects of environmental factors on degradation of Aroclor 1242 were investigated with four Gram-negative bacterial isolates. Their biodegradabilities of the Aroclor were well correlated to their growth rates on the Aroclor added as a sole carbon and energy source. The optimum concentration of the Aroclor for biodegradation of the substrate in MM2 medium was 0.5 mg/ml in HK-100, HK-123, and MS-1003 strains, but 1 mg/ml in DJ-26 strain. The optimum temperature and pH were 30°C and 7.0, respectively, for all the strains. On the basis of the results which the strain of DJ-26 showed the highest degradability of the Aroclor as well as the highest growth rate under the optimum environmental conditions, the bacterial isolate identified as *Pseudomonas* sp. was found to be a strain usable for treatment of the toxic and recalcitrant chemical pollutants, such as polychlorinated aromatic hydrocarbons.

KEY WORDS □ Biodegradation of Aroclors, Effects of environmental factors, Gram-negative bacteria.

현대사회가 고도의 산업사회로 발전되어감에 따라 각종 합성 화학물질, 특히 염소계 방향족 화합물의 오염문제가 극도로 심각해지고 있다. 이러한 오염물질들 중 polychlorinated biphenyls (PCBs)는 열에 대한 안정성과 산, 알칼리 및 부식성 화학물질에 대한 저항성이 높고 또 화학적 반응성이 매우 낮은 특성 때문에 Aroclor, Kaneclor 등의 상표로 여러 가지 산업제품으로 이용되고 있다. PCBs는 구조적으로 안정한 benzene ring으로 이루어져 있고 난분해성이므로 토양이나 수질환경에 오랫동안 잔류되어 있으면서 수중생물에게는 생식력의 감퇴 및 생화학적 대사과정에 상당한 영향을 줄 뿐만 아니라 (Haque와 Schmedding, 1974; Blakemore와 Carey, 1978), 고등생물이 이 오염물질을 섭취할 때에는 암과 돌연변이의 유발 원인이 된다고 보고하였다 (Ghosal 등, 1985).

이러한 화학물질들로 오염된 산업폐수에 대해서는 물리, 화학적 처리방법을 계속 사용해 오고 있으나 2

차적인 환경오염이 새로 야기될 가능성이 크며 처리비용면에서도 문제점을 내포하고 있어, 분해활성도가 큰 미생물들을 이용하는 처리방법의 개발이 절실히 요구되고 있다 (Zaugg와 Swarz, 1981).

미생물에 의한 PCBs의 분해에 관한 연구는 Furukawa 등(1983)이 *Acinetobacter* sp.에 의하여 Kaneclor가 분해되는 과정을 보고한 바 있으며, 그 후 Furukawa와 Miyazaki(1986)는 *Pseudomonas* sp.에서 PCBs를 분해하는 유전자와 이에 관여하는 효소의 특성에 대하여 보고하였다. 그리고 Kilpi 등(1988)은 PCBs를 유일한 탄소 및 에너지원으로 이용하는 *Pseudomonas* sp.와 *Nocardia* sp.의 mixed culture를 이용함으로써 Aroclor 1221의 분해율을 증가시켰다. Cometabolism에 의한 Aroclor 1254의 변환에 대하여 Kohler 등(1988)이 보고한 바 있으며, 본 연구실에서도 *Pseudomonas* sp.에 의한 Aroclor 1242와 1254 분해특성 연구 보고한 바 있다 (Kim 등, 1989).

Table 1. Chemical composition of Aroclor 1242 and 1254

Congeners	Mol %	
	1242	1254
C ₁₂ H ₁₀	< 0.1	< 0.1
C ₁₂ H ₉ Cl	1	< 0.1
C ₁₂ H ₈ Cl ₂	16	0.5
C ₁₂ H ₇ Cl ₃	49	1.0
C ₁₂ H ₆ Cl ₄	25	21
C ₁₂ H ₅ Cl ₅	8	48
C ₁₂ H ₄ Cl ₆	-	23
C ₁₂ H ₃ Cl ₇	0.1	6
C ₁₂ H ₂ Cl ₈	-	-
C ₁₂ HCl ₉	-	-
Molecular weight	267	328

그러므로 본 연구에서는 자연계로부터 분리한 Aroclor 분해균주들 중 Gram 음성세균으로 동정된 4균주들에 대하여 Aroclor의 분해에 미치는 기질의 농도, 배양온도 그리고 pH와 같은 환경요소의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

Aroclor 및 배지

본 연구에서는 polychlorinated biphenyls의 혼합물질인 Aroclor 1242와 Aroclor 1254를 미국의 Foxboro Chemical Company (North Haven, CT)로부터 구입하여 사용하였으며, 그들의 구성성분은 Table 1과 같다.

Aroclor 분해균주의 분리와 분해능의 검정에 사용한 배지는 MM2 최소배지 (Kiyohara 등, 1982)로서 그 조성은 1,000 ml의 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 1 mM의 (NH₄)₂SO₄, 1 μM의 FeSO₄ · 7H₂O, 100 μM의 CaCl₂ · 2H₂O, 1 mM의 MgSO₄ · H₂O, 그리고 8.5 mM의 NaCl을 혼합하였으며, 단일탄소원 및 에너지원으로 1 mg/ml의 Aroclor를 기본적으로 첨가하였다. 분리된 분해균주의 증식을 위해서는 Luria-Bertani (LB) 배지 (Bacto-tryptone, 10 g; yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; 증류수, 1 l; pH 7.0)를 사용하였다.

Aroclor 분해균주의 분리

Aroclor 분해세균들은 Kiyohara 등(1982)의 agar plate 방법과, Hankin과 Sawhney(1984)의 liquid culture 방법을 병용하여 공단의 폐수로부터 분리하였다. 100 ml의 MM2 액체배지에 단일탄소원으로 Aroclor 1242 또는 Aroclor 1254를 1 mg/ml의 농도로 첨가하고 10 ml의 폐수 시료를 접종하여 aluminum foil로 봉한 후 30°C에서 5-7일 동안 진탕배양하면서 Kim 등(1987)의 방법에 따라 분해균주들을 증식 배양하였다. 분리된

7종의 균주들 중 Kim 등(1989)의 보고에서와 같이 *Pseudomonas* spp.로 동정된 DJ-26과 HK-123, *Achromobacter* sp.인 HK-100 그리고 *Alcaligenes* sp.인 MS-1003 등 4종의 Gram 음성세균을 본 연구에 사용하였다.

Aroclor의 분해 및 세균의 생장

위와 같이 선발된 균주들은 1 mg/ml의 Aroclor 1242를 첨가한 MM2 액체배지에서 30°C로 진탕배양하면서, 일정 시간별로 배양액을 채취하여 Furukawa와 Miyazaki(1986) 그리고 Bedard 등(1986)의 방법에 따라 Aroclor의 분해능을 측정하였다. 각 배양액을 pore size가 0.2 μm인 cellulose nitrate membrane filters로 여과한 후 UV-spectrophotometer (Shimazu Co., UV 240)로 200 nm에서 500 nm까지 scanning 한 후 255 nm에서의 흡광도로 Aroclor의 분해정도를 측정하였다. 이와함께 각 배양액에 대하여 600 nm에서 cell density를 측정하여 각 균주의 생장을 추정하였다.

Aroclor 분해에 미치는 환경요소의 영향

Aroclor 분해에 미치는 환경요소의 영향을 Aroclor의 농도와 배양온도 그리고 pH에 대하여 조사하였다. MM2 액체배지(pH 7.0)에 단일탄소원 및 에너지원으로 Aroclor 1242를 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml씩 첨가한 후 분해균주들을 접종하여 30°C에서 진탕배양하면서 일정시간별로 기질의 분해와 함께 세균의 생장도를 측정하였다. Aroclor 분해에 미치는 온도의 영향은 pH 7.0으로 조정된 MM2 액체배지에 0.5 mg/ml 또는 1.0 mg/ml의 Aroclor 1242를 첨가한 후 균주를 접종하여 25, 30, 35 그리고 42°C에서 배양하면서 상기의 방법으로 측정하였다. Aroclor 1242의 분해에 미치는 pH의 영향은 MM2 액체배지의 pH를 각각 5, 6, 7, 8 그리고 9로 조정한 후 0.5 mg/ml의 Aroclor 1242를 첨가하여 30°C에서 진탕배양하면서 기질의 분해 및 세균의 생장을 측정하였다.

결과 및 고찰

Aroclor 분해세균의 특성

Aroclor 1242와 1254를 분해하는 세균들을 유기합성 공장들이 밀집되어 있는 청주, 대전 및 안양지역의 산업폐수로부터 분리한 결과, Table 2에서와 같이 DJ-26, HK-100, HK-123, MS-456, MS-724, MS-836 그리고 MS-1003 등 7종의 균주를 선발하였다. 분해세균들 중 DJ-26, HK-100, MS-456, MS-836 그리고 MS-1003 균주들은 Aroclor 1242만을 분해하였고, 그 중 DJ-26, HK-100 그리고 HK-123 균주는 30-35시간 배양 후에 황색물질을 생산하였다. Aroclor 1254는 HK-123과 MS-724 균주에 의해서만 조금 분해되었는데, HK-123 균주는 Aroclor 1242와 1254를 함께 분해하였다. 그러므로 본 연구에서는 분해능이 우수한 DJ-26, HK-

Table 2. Degradation of Aroclors in MM2 liquid medium by the bacterial isolates

Isolates	Aroclors	Degradation	Observed changes during incubation	
			Substrate	Color
DJ-26	1242	++++	dispersed after 25h	yellow after 35h
	1254	-	-	-
HK-100	1242	+++	dispersed after 25h	yellow after 30h
	1254	-	-	-
HK-123	1242	+++	dispersed after 30h	yellow after 35h
	1254	+	dispersed after 48h	cloudy after 48h
MS-456	1242	++	dispersed after 48h	cloudy after 48h
	1254	-	-	-
MS-724	1242	-	-	-
	1254	+	dispersed after 48h	cloudy after 48h
MS-836	1242	+	dispersed after 48h	cloudy after 48h
	1254	-	-	-
MS-1003	1242	+++	dispersed after 30h	cloudy after 48h
	1254	-	-	-

Symbols: + + + +, excellent growth and degradation; + + +, good; + +, fair; +, little; -, no growth and degradation.

100, HK-123 그리고 MS-1003 등 4종의 Gram 음성 세균에 대해서만 Aroclor 1242의 분해와 세균의 성장에 미치는 환경요소의 영향을 조사하였다.

Aroclor 1242의 분해검정

Aroclor 1242 분해세균으로 선발된 상기의 4균주들의 분해능을 UV-spectrophotometer로 측정된 결과는 Fig.1에서와 같다. MM2 액체배지에 Aroclor 1242를 단일탄소원 및 에너지원으로 첨가하여 각 균주들을 3일간 배양했을 때, 255 nm에서 최대흡광도를 나타냈던 Aroclor는 급격히 감소되었으며 220 nm 쪽으로 peak가 이동되었다. 또 DJ-26, HK-100 그리고 HK-123 균주는 400 nm의 광선을 흡수하는 대사산물을 생성하였다. 황색을 띄는 이 대사산물은 Aroclor 1242의 분해물질인 meta-cleavage compound라고 Ahmed와 Focht(1973) 그리고 Sylvestre 등(1985)은 보고하였다. 그러나 MS-1003 균주의 경우, Aroclor 1242는 대부분 분해되어 없어졌지만 400 nm에서 흡광도를 나타내는 meta-cleavage compound는 생성되지 않았다. 이와 같은 결과로부터, meta-cleavage pathway를 통하여 황색을 띄는 meta-cleavage compound인 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid를 생성하는 다른 균주와는 달리, MS-1003 균주는 ortho-cleavage pathway의 대사경로를 거쳐 Aroclor 1242를 분해하는 것으로 판단된다.

Aroclor 1242의 분해정도와 함께 각 균주들의 성장을 측정된 결과는 Fig.2에서와 같다. 배양 1일 이후 255

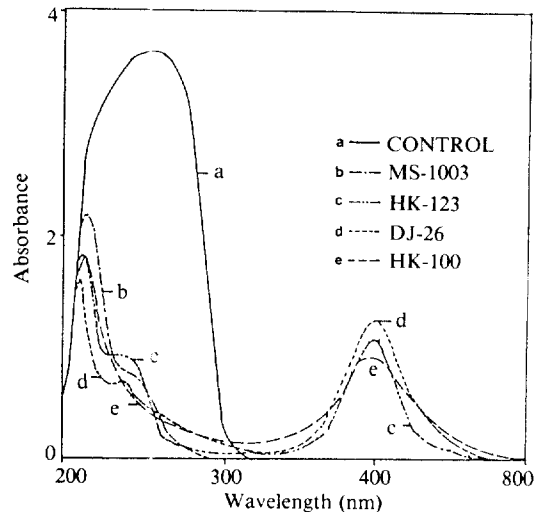


Fig. 1. UV-scanning spectra of Aroclor 1242 and its catabolites in 3-day culture of the bacterial isolates.

nm에서 Aroclor 1242의 흡광도가 급격히 감소하고 세균의 생장이 증가한 것은 Kilpi 등(1988)의 보고에서와 같이 각 균주 모두 단일탄소원 및 에너지원으로 첨가한 Aroclor 1242를 분해하여 세균이 성장하였음을 의미하는 것이다. Aroclor 1242를 분해하면서 DJ-26 균주는 생장이 제일 좋았으나, 그 반면에 MS-1003는 다른 균주들에 비하여 생장은 낮았으나 Aroclor 1242의

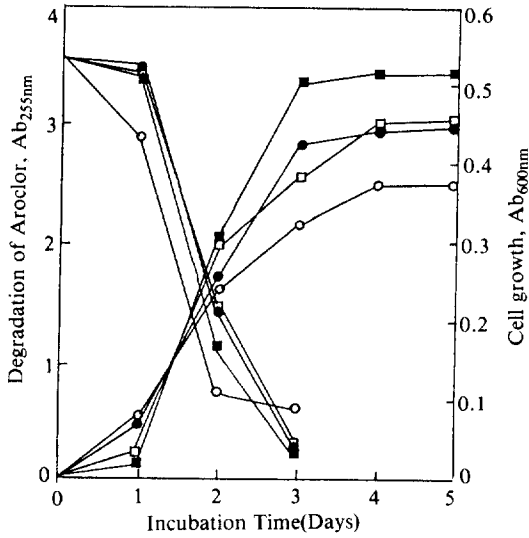


Fig. 2. Degradation and growth of the isolates on Aroclor 1242 as a sole carbon and energy source in MM2 liquid medium.

■—■, DJ-26; ●—●, HK-100; □—□, HK-123; ○—○, MS-1003.

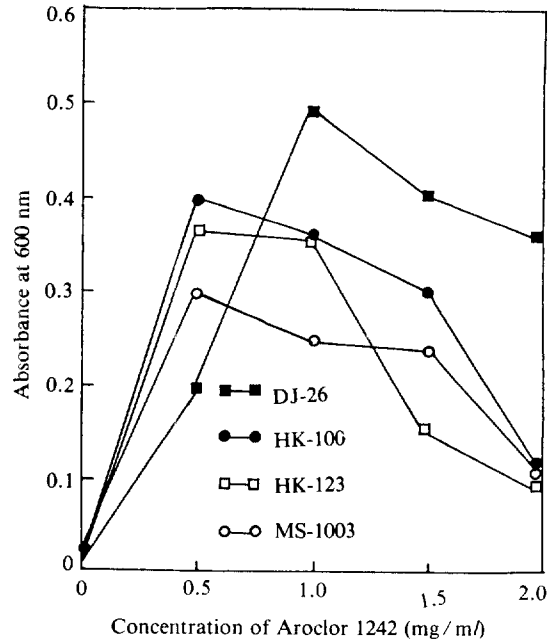


Fig. 3. Effect of substrate concentration on degradation of Aroclor 1242 and cell growth during 3-day cultivation.

분해능은 비교적 높았다. 이와 같이 Aroclor의 분해와 세포의 성장도가 정확하게 일치하지 않는 것은 Furukawa 등(1983)도 지적하였지만 각 균주들은 3일간 배양했을 때 모두 stationary phase에 이르렀고, 이에 비례하여 Aroclor 1242는 거의 분해되었다. 그러므로 Aroclor 1242를 첨가한 MM2 액체배지에서 각 균주들을 3일간 배양한 후 600 nm에서 세균의 성장도를 측정하였고, 이로써 기질의 분해도를 추정하여 Aroclor 1242의 분해에 미치는 환경요소의 영향을 분석하였다.

Aroclor 1242의 분해에 미치는 환경요소의 영향

기질의 농도에 따라 Aroclor 1242의 분해와 각 균주의 성장률을 측정한 결과는 Fig.3에서와 같다. HK-100, HK-123 그리고 MS-1003 균주들은 0.5 mg/ml에서 최대의 성장률을 보였으나 DJ-26 균주는 1.0 mg/ml의 농도에서 최대의 성장률을 나타냈다. 상기의 3균주들은 0.5-1.5 mg/ml의 농도에서 비교적 좋은 성장과 함께 기질의 분해를 보여주었으나, DJ-26 균주는 2 mg/ml까지의 기질농도에서도 성장률이 높았다. 이것으로 보아 Aroclor 1242는 농도가 너무 높으면 균체에 독성을 나타낸다고 보고한 Keil과 Sandifer(1972) 그리고 Novick과 Alexander(1985)의 연구결과와 같이, 본 실험에 사용한 균주들도 약간의 차이는 있지만 기질농도의 영향을 받고 있음을 알 수 있었다.

Aroclor 1242의 분해에 미치는 온도의 영향을 측정한 결과는 Fig.4와 같다. Aroclor의 분해에 미치는 최적 온도는 각 균주들 모두 30°C였으나, DJ-26 균주의 경

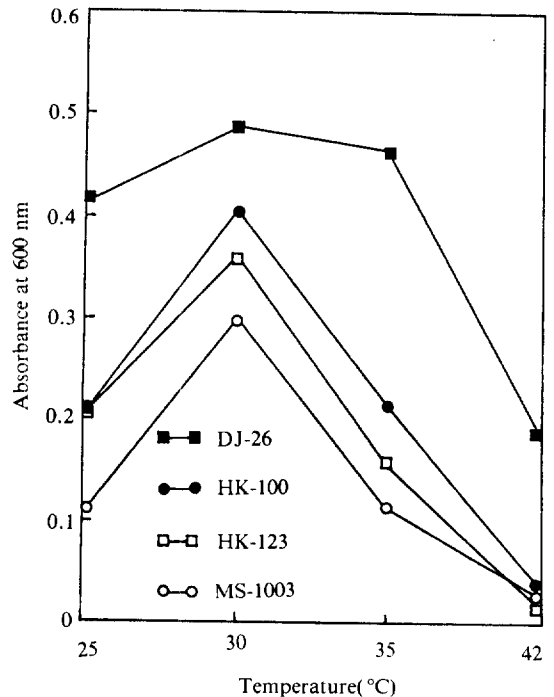


Fig. 4. Effect of temperature on degradation of Aroclor 1242 and cell growth during 3-day cultivation.

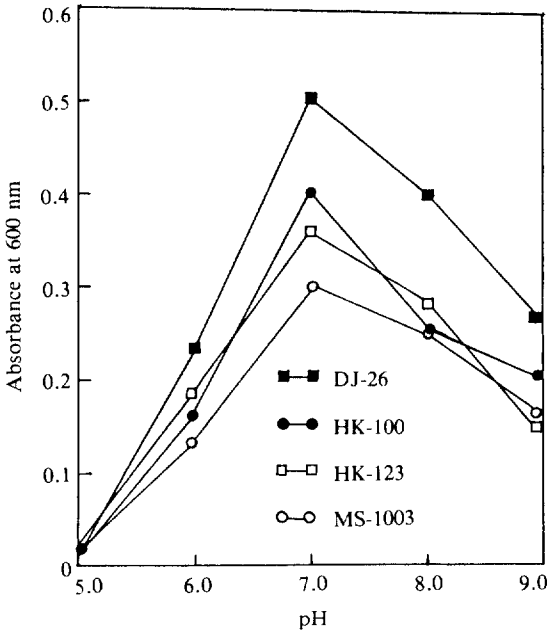


Fig. 5. Effect of pH on degradation of Aroclor 1242 and cell growth during 3-day cultivation.

우에는 25-35°C의 범위에서도 분해율이 매우 높았다. 또한 DJ-26 균주는 42°C에서 배양했을 경우에도 Aroclor 1242를 조금 분해하면서 성장하였다. 그러나 같은 *Pseudomonas* sp.로 동정된 HK-123 균주는 42°C에서 세균의 생장이나 기질의 분해가 거의 없었다. Aroclor의 분해와 분해세균들의 생장에 미치는 pH의 영향을 측정된 결과는 Fig.5와 같다. 각 분해균주들은 모두 pH 7.0에서 가장 높은 성장률을 나타내었으며, Aroclor 1242의 분해에 미치는 pH의 억제작용은 알칼리성에서 보다 산성 환경에서 더욱 컸었다.

이와 같은 결과로부터 ortho-cleavage pathway를 통하여 Aroclor 1242를 분해하는 것으로 나타난 MS-1003 균주는 각각의 최적 조건하에서도 Aroclor의 분해율과 세균의 성장률이 다른 균주들에 비하여 낮았다. 그 반면에 DJ-26 균주는 Aroclor 1242의 분해에 미치는 최적 배양온도와 pH는 같았지만, 그 분해능이 다른 균주에 비하여 훨씬 우수하였고, 또 기질의 농도에 있어서는 다른 균주들 보다 2배 이상인 약 2 mg/ml에서도 높은 분해율과 성장률을 나타냈다. 그러므로 *Pseudomonas* sp.로 동정된 DJ-26 균주는 유독성 오염물질인 PCBs의 분해처리를 위하여 활용할 가치가 매우 높다고 판단된다.

적 요

유독성 오염물질인 polychlorinated biphenyls (PCBs)의 혼합체인 Aroclor 1242를 분해하는 DJ-26, HK-100, HK-123 그리고 MS-1003 등 Gram 음성세균에 대하여, 그 분해작용과 함께 Aroclor를 단일탄소원 및 에너지원으로 이용하는 세균의 성장률을 검토하였다. 그리고 Aroclor 1242의 분해에 미치는 기질의 농도, 배양온도 및 pH의 영향을 분석하였다. 각 균주의 분해작용 뿐 아니라 성장율은 Aroclor의 농도가 0.5 mg/ml일 때 가장 높았으나, DJ-26 균주는 1 mg/ml일 때 제일 좋았다. Aroclor의 분해에 미치는 각 균주의 최적온도와 pH는 모두 30°C와 7.0이었으나, DJ-26 균주는 25-35°C에서도 비교적 높은 분해율을 나타냈다. 또 DJ-26 균주는 각각의 최적조건에서 모두 다른 균주들보다 높은 Aroclor의 분해율과 세균의 성장률을 나타내었다. 그러므로 *Pseudomonas* sp.로 동정된 DJ-26 균주는 Aroclor와 같은 난분해성 오염물질의 분해처리를 위하여 실험한 4균주들 중 제일 우수한 균주라고 평가된다.

사 사

본 논문은 1988-1989년도 한국과학재단의 목적기초 연구비에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

- Ahmed, M., and D.D. Focht, 1973. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* **19**, 47-52.
- Bedard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M.L. Haberl, and C. Johnson, 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 761-768.
- Blakemore, R.P., and A.E. Carey, 1978. Effect of polychlorinated biphenyls on growth and respiration of heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 323-328.
- Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi, 1983. Metabolic breakdown of Kaneclors (polychlorobiphenyls) and their products by *Acinetobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 140-145.
- Furukawa, K., and T. Miyazaki, 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalkaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**, 392-398.
- Ghosal, D., I.S. You, D.K. Chatterjee, and A.M. Chakrabarty, 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* **228**, 135-142.
- Hankin, L., and B. L. Sawhney, 1984. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls in soil. *Soil*

- Sci.* **136**, 401-407.
8. **Haque, R.H., and D. Schmedding**, 1974. Aqueous solubility absorption and vapor behavior of chlorinated biphenyl, Aroclor 1254. *Environ. Sci. Technol.* **8**, 139-140.
 9. **Keil, J.E., and S.H. Sandifer**, 1972. DDT and polychlorinated biphenyl (Aroclor 1242) effects of uptake on *E. coli* growth. *Water Res.* **6**, 837-841.
 10. **Kilpi, S., K. Hinberg, K. Yrjala, and V. Backstrom**, 1988. The degradation of biphenyls by mixed bacterial cultures. *FEMS. Microbial Ecol.* **53**, 19-26.
 11. **Kim, J.W., C.K. Kim, and Y.C. Kim**, 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 122-128.
 12. **Kim, M.S., C.K. Kim, and J.K. Lee**, 1989. Biodegradation of Aroclors by *Pseudomonas* sp. *Genet. Eng. Res.* **3**, 211-220.
 13. **Kiyohara, H., N. Kazutaka, and Y. Keiji**, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-458.
 14. **Kohler, H., D. Kohler, and D.D. Focht**, 1988. Cometabolism of polychlorinated biphenyls: enhanced transformation of Aroclor 1254 by growing bacterial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1940-1945.
 15. **Novick, N., and M. Alexander**, 1985. Cometabolism of low concentrations of Propachlor, Alachlor, and Cycloate in sewage and lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 737-743.
 16. **Sylvestre, M., R. Masse, C. Ayotte, F. Messier, and J. Fauteux**, 1985. Total biodegradation of 4-CB by a two membered bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 192-195.
 17. **Zaugg, R.H., and J.R. Swarz**, 1981. Assessment of future environmental trends and problems: industrial use of applied genetic and biotechnologies. US EPA 600/8-81-020.

(Received April 14, 1990)

(Accepted May 15, 1990)