

토양에서 분리한 Phenol 분해세균의 수치분류

이 건 · 이상준* · 이종근
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Numerical Taxonomic Studies of Phenol-degrading Bacteria Isolated from Soil

Lee, Geon, Sang-Joon Lee* and Jong-Kun Lee

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — Sixty five phenol degrading bacteria were isolated from soil and identified. Similarity values calculated on the basis of total 46 morphological, biochemical and physiological characteristics of the isolated strains. 65 isolates were divided into 6 clusters at the 70% similarity level. The dominant organisms were belonged to *Azotobacter*, *Pseudomonas* and *Flavobacterium*.

1763년 바퀴벌레를 방제하기 위해 니코틴 추출물이 사용된 이후(1), 대량의 농약이 사용됨으로서 농업의 생산성이 급격히 향상되었으나 그 대상생물이 농약에 저항성을 가지게 되어 농약 사용량이 증가되고 또한 독성이 더욱 강한 농약이 개발, 살포되었다(2).

특히 방향족 화합물은 대개 자연계에서 난분해성 이어서(3) 생물농축 또는 그 자체나 그 대사산물의 독성으로 자연환경 및 생활환경을 위협하고 있다(4). 이 중 phenol은 분해되기 어려운 독성화합물로서 coal-tar 증류, polymeric resin 생산, oil 정제, 의약품 제조공업 등에서 배출되며(5), 대부분 방향족 화합물의 중간대사산물로 phenol이 생성된다(6). 또한 산업장에서 고농도로 배출되기 때문에 미생물에 강한 독성을 야기하여 생물학적 폐수처리시 생분해에 큰 지장을 초래하고, 상수원에 유입된 phenol은 수 ppb 농도에서도 이 원수의 염소소독시 chlorophenol이 생성되어 심한 악취, 구토 및 독성을 가진다. 더욱이 halogen족으로 치환된 phenol은 강한 독성과 난분해성을 띠게 되어 공중보건상에 많은 문제점을 야기한다

(7, 8).

Yun 등(1986)은 활성오니법에 의한 phenol 폐수 처리 효율을 검토할 목적으로 phenol 2000 mg/l까지 분해하는 균주를 분리·검토하였다(9). 자연생태계에 많은 문제점을 발생시키는 halogen-substituted organic compounds 생분해에 관한 많은 보고들이 있으며(10), 치환체 phenol의 분해특성을 조사하는 많은 실험들은 대개 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(2,4,5-T) 분해균주를 사용하여 그 분해특성과 분해대사산물의 특성을 검토하였다(11).

본 실험에서는 토양에서 phenol 분해균주를 분리하여 분해균주의 phenol 및 그 치환체에 대한 분해 정도를 조사하고, 수치분류(numerical taxonomy)를 통해 phenol 분해균주간의 similarity를 조사하여 cluster별 형질 특성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취 및 균주분리

경남 김해시 및 부산시 강서구 지역의 농약시비량이 많은 화훼, 채소 단지의 토양을 플라스틱제의 원통 용기를 사용하여 지표토 부분 5~10 cm 정도 깊이의

Key words: Phenol degrading bacteria

*Corresponding author

토양층을 대각선상등간격채토법(12)에 의해 8개 단지의 토양을 약 500g씩 채취하여 증균배양(enrichment culture)을 2회 반복하여 phenol 분해균주를 증식시켜 순수분리하였다. 분해균주의 증균 및 분리용 기초배지(basal salts medium : BSM)는 K_2HPO_4 , 1.6 g ; KH_2PO_4 , 0.4g ; NH_4NO_3 , 0.5g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.025g ; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.0023g ; 증류수 1000 ml의 성분으로 하는 Alexander의 분리용 배지(13)를 사용하였다. 증균 및 분리용 배지의 유일한 탄소원 및 에너지원으로 200 mg/l의 phenol을 사용하였다.

Phenol 분해능의 측정은 BSM 액체배지 10 ml가 든 시험관에 여과멸균된 phenol stock($\times 100 : 1\%$)을 100 μ l 첨가하여 30°C, 48 hrs 동안 진탕배양(180 rev/min)한 후, 배양액을 원심분리(15,000 rpm, 10 mins)하여 얻은 상정액을 spectrophotometer(Simadzu UV-240)를 사용하여 268 nm에서 흡광도를 보정용 공시험액과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

치환체별 분해능 실험도 상기와 동일한 방법으로 실시하였으며 흡광도는 p-bromophenol, 278 nm ; p-chlorophenol, 278 nm ; p-iodophenol ; 278 nm ; p-methylphenol, 276 nm ; p-nitrophenol, 317 nm에서 각각 측정하였다. 단, 치환체 phenol의 첨가농도는 이들 화합물의 생물독성을 고려하여 각각 50 mg/l씩 첨가하였다.

순수분리된 균주들은 육즙한천사면배지에 배양하여 4°C 및 실온에서 보존하면서 다음 실험에 사용하였다.

형질분석

세포형태와 집락 특징은 "Microbiology, a laboratory manual"(14)과 "Manual of methods for general bacteriology"(15)에 준해 육즙한천평판배지상에서 30°C로 1~7일 동안 배양하면서 세포의 크기, 형태 및 분열양상을 조사하면서 콜로니의 형태, 표면의 특징 및 색소생성여부를 관찰하였다.

생화학적 제특성의 실험방법은 "Biochemical tests for identification of medical bacteria"(16)에 준해 실시하였으며, 탄수화물과 유기산 이용시험에는 polystyrene multi-well plates를 사용하였으며, 항생물질의 내성시험은 항생제구배(antibiotic gradient) 평판배지(항생제 농도 : 0~100 μ g/ml)를 사용하여 내성의 유무와 개략적 내성농도를 측정하였다. 각 분리

균주의 특징에 따라 "Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1"(17)에 준해 분류·동정하였다. 또한 Api 20E 동정 kit(한국시약주식회사 제품)를 사용한 실험결과도 참고하였다.

통계분석

분리된 phenol 분해균주에 대한 47가지 실험형질 중 2진수특성에 부적합한 O/F test를 제외한 46가지에 대해 2진수형태(binary form : positive results, 1 ; negative results, 0)로 처리하고 유사도 지수는 simple matching(S_{SM}) coefficient와 Jaccard(S_J) coefficient의 지수 산출방법(18)에 의해 산출하고, 이 지수에 따라 비가중 평균결합법(unweighted pair group method with arithmetic average : UPGMA)으로 균주간의 similarity(19, 20)를 산출하여 dendrogram을 작성하였다.

또한 각 cluster별로 여러 형질들에 대해서 양성 특성(positive characteristics)을 나타내는 균주의 백분율(%)을 구해 동일 cluster내에서의 동질성과 타 cluster와의 상관성을 비교하였다.

결과 및 고찰

Phenol 분해균주를 65주 분리하였으며, 각 치환체 phenol의 분해능을 검토해 보면, phenol의 분해능은 48 hrs만에 균주 전체 평균 분해력이 63.3%이고 그 중 No. 13(*Pseudomonas* sp.), No. 19(*Azotobacter* sp.), No. 24(*Azotobacter* sp.), No. 27(*Pseudomonas* sp.), No. 31(*Chromobacter* sp.) 및 No. 53(UN) 균주에서는 약 12~13% 정도의 낮은 분해력을 보였다(Table 1). 또 para 위치에 halogen족 원소 및 alkyl기가 치환된 것은 약 20~30% 정도의 분해력을 보였으나, nitro기가 치환된 것은 약 5% 정도의 낮은 분해력을 보였다. 이것은 Paris 등(1982)의 보고에 따르면 phenol의 halogen기, nitro기 및 alkyl기 치환체중 p-nitrophenol의 microbial transformation rate constant (K_b)에서 타 치환기에 비해 1/10 정도의 낮은 substrate 제거율을 나타냈다고 하였다. 본 실험의 모든 phenol 분해균주에서도 p-nitrophenol이 분해능이 낮아 nitro기(NO_2^-)가 난분해성을 야기하는 기질특이성이 있음을 알 수 있었다.

형질분석에 의한 phenol 분해균주의 형질특성에

Table 1. Phenol and ρ -substituted phenols biodegradation rate* of isolated strains

Strain No.	Phenols						Strain No.	Phenols					
	P	MP	CP	IP	BP	NP		P	MP	CP	IP	BP	NP
1	44	26	22	26	17	4	34	87	32	28	36	29	4
2	64	21	14	10	6	3	35	62	29	27	27	29	2
3	47	23	28	36	12	4	36	84	28	21	35	20	5
4	50	20	26	35	15	2	37	71	16	13	29	26	0
5	47	29	20	30	16	3	38	87	24	26	20	21	4
6	72	28	28	29	21	1	39	87	21	26	26	22	5
7	62	25	23	28	17	2	40	84	31	21	34	22	0
8	56	30	21	30	19	0	41	78	23	20	21	23	2
9	41	24	27	27	16	2	41	62	24	4	31	37	4
10	78	29	2	15	10	0	43	94	20	1	0	17	7
11	75	25	26	38	30	0	44	75	1	20	27	29	5
12	66	27	24	30	31	3	45	69	28	30	29	40	5
13	13	20	13	23	30	0	46	44	26	19	1	25	1
14	59	30	26	36	20	4	47	81	4	36	25	35	5
15	78	20	19	20	12	3	48	66	18	18	26	39	4
16	88	12	30	12	35	1	49	66	27	29	31	17	4
17	84	13	26	29	27	2	50	71	13	21	25	20	0
18	81	23	18	12	20	5	51	75	25	26	27	25	5
19	13	29	27	25	30	7	52	62	28	18	24	29	5
20	56	27	29	29	29	6	53	12	18	20	15	0	4
21	66	27	22	31	25	6	54	81	0	22	16	21	5
22	84	27	22	21	22	3	55	81	12	26	32	22	7
23	47	23	36	24	11	4	56	75	21	21	19	20	5
24	13	17	29	8	11	5	57	44	15	22	25	24	6
25	50	13	22	25	27	5	58	50	17	24	25	22	5
26	78	29	21	29	29	4	59	50	21	28	28	22	3
27	13	26	27	29	28	3	60	78	25	28	25	24	4
28	62	25	27	26	25	4	61	78	16	17	25	24	4
29	81	27	27	33	27	5	62	59	26	30	34	20	5
30	66	26	30	31	11	3	63	72	28	27	28	30	5
31	12	17	20	14	10	2	64	81	27	21	28	31	5
32	62	20	8	6	6	1	65	84	23	30	26	30	5
33	72	28	23	36	26	3							

P: phenol, MP: ρ -methy phenol, CP: ρ -chloro phenol, IP: ρ -iodo phenol, BP: ρ -bromo phenol, NP: ρ -nitro phenol.
*Biodegradation rate unit; percent.

따른 수치분류를 통해 dendrogram을 작성한 결과, S_j coefficient에 의한 dendrogram에서는 유사도 58% 수준에서 4개의 major cluster와 4개의 minor clusters로 분류되었다. 이것은 형질특성에 따른 동정결과와 비교해서 볼 때 cluster 구분 유사도 값이 낮아서 본 실험에서 사용한 parameter로 S_j coefficient를 산출한 결과에 따라 검토하기에는 부적합함을 알 수

있었다(Fig. 1). 또 S_{SM} coefficient를 사용한 dendrogram에서는 유사도 70% 수준에서 3개의 major clusters와 3개의 minor cluster로 분석되었다. 따라서 유의수준이 높게 작성되는 S_{SM} coefficient를 사용한 dendrogram의 cluster들에 대해 major cluster를 중심으로 양성특성의 백분율(%) 출현빈도를 조사하여 검토하였다(Fig. 2, Table 2).

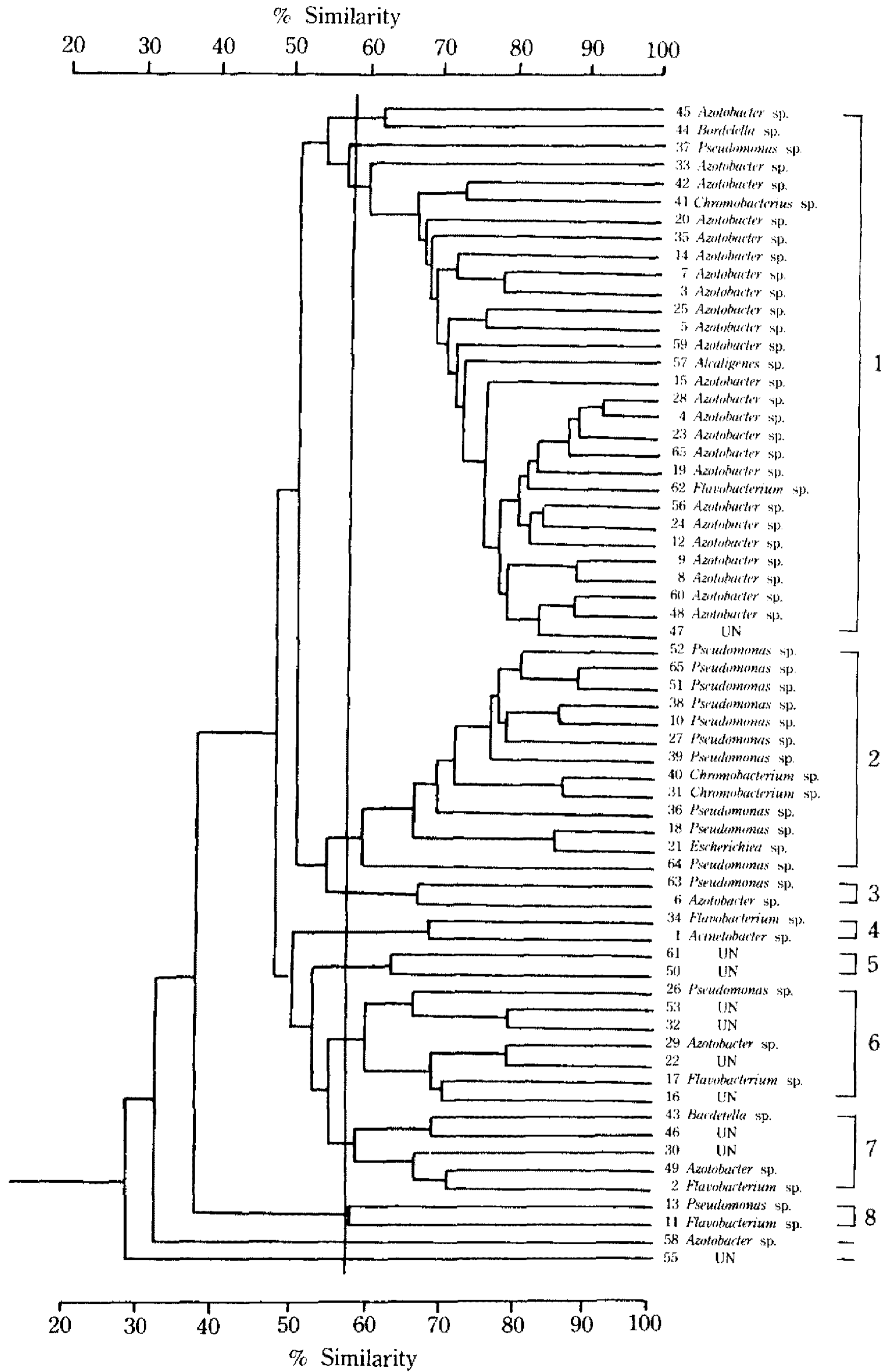


Fig. 1. Dendrogram showing the relationships of isolates based on the S_1 coefficient.

Major cluster

Cluster 1 : 28균주가 속하고 주로 *Azotobacter* spp. 로 구성되어 있다. 이 *Azotobacter* spp.는 세포형태가 큰 난구형으로 세포 배양시간에 따라 그 형태가 변하는 변형세포이었으며, Winogradsky의 질소원 결핍 최소배지상에서 배양하여 관찰한 결과 cyst를 형성

하였다. 또한 액체배지에서 배양 초기에는 섬유상의 형태였고, 4~5일간 배양상태에서는 큰 타원형으로 변형되었으며, sudanophilic granules가 관찰되었다.

당은 glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose, manitol 및 sorbitol에서 산생성을 볼 수 있었다. 유기산 중에서는 oxalic acid에 대한 이용성을 가진 균

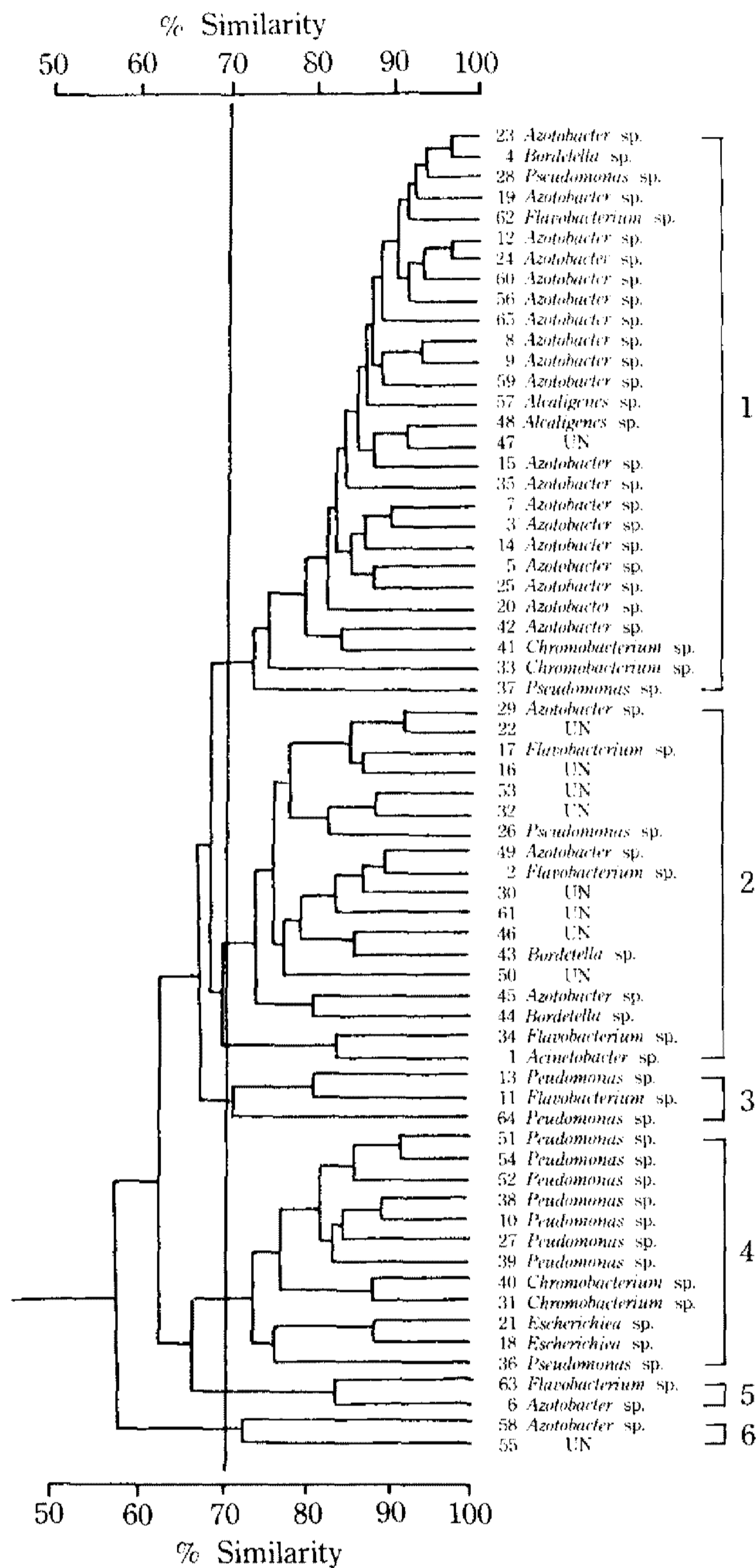


Fig. 2. Dendrogram showing the relationship of isolates based on the S_{SM} coefficient.

주가 많았고, citrate 이용성의 것은 적었다. KCN 내성을 가진 균주는 적었으며, pH 9.5 및 44°C에서는 대부분 균주의 생육이 양호하였다.

Cluster 2 : 본 실험에서 동정이 안된 10균주 중 8균주가 포함된 18개의 균주로 구성되어 있었다. 동정이 안된 균주는 육즙한천평판배지에서 콜로니의 형태는 puntiform으로 관찰되었고, 광학현미경상(×1,000)에서 0.2~0.5 μm 정도의 작은 크기의 세포가 여러 개 모여 원의 형태로 관찰되었다. 이 cluster에

Table 2. Percentage frequency of positive characters found in major clusters

Cluster No.	1	2	4
No. of isolates	28	18	12
Morphological tests			
Gram stain(negative)	100	100	100
Cell shape(rod)	100	91	91
Motility	14	33	91
Margine entire	85	83	75
Colonies pink, red or orange	50	65	0
Colonies surface			
Wet	93	100	100
Smooth	85	83	58
Decarboxylase and dehydrolase of amino acid tests			
Lysine	0	0	0
Ornithine	7	5	17
Arginine	11	17	92
Biochemical characters			
H ₂ S production	0	0	8
Urease	0	0	0
Indole	0	0	0
Voges-proskauer	100	72	83
Methyl red	0	0	8
Catalase	96	94	100
Oxidase	50	50	75
Acid production from carbohydrates (1% W/V)			
Arabinose	0	28	42
Xylose	4	22	58
Glucose	96	61	92
Fructose	100	28	67
Lactose	93	0	50
Maltose	100	11	83
Sucrose	100	28	100
Trehalose	79	17	33
Salicine	18	6	75
Manitol	100	11	75
Sorbitol	93	0	83
Utilization as sole carbon and energy soure (0.1% W/V)			
Acetic acid	75	50	67
Adipic acid	25	44	100
Oxalic acid	96	67	92
Propionic acid	86	28	25
Toluene	96	100	100
Glycerol	89	100	100
Butanol	100	100	100
Growth on simmon citrate agar	14	33	100
Growth on KCN	18	94	100
Antibiotic resistance on antibiotics gradient plate			
Ampicillin	32	56	83
Tetracycline	46	56	92
Streptomycin	7	11	67
Chloramphenicol	0	11	66
Growth at pH 4.5	4	6	92
Growth at pH 9.5	96	100	100
Growth at temperture 4°C	4	11	17
Growth at temperture 44°C	100	94	96

속한 대부분의 균주는 운동성과 arginine dehydrolase 생성능이 없었으며, 전반적으로 당 이용성이 낮은 균으로, 특히 lactose와 sorbitol을 전혀 발효하지 못하였다. 항생제 내성시험에서는 streptomycin과 chloramphenicol에 대한 내성균이 적었으며, pH 4.5에서는 대부분 생육되지 않았다.

Cluster 4 : 12개 균주로 구성되어 있었고 대부분이 간균, 운동성이 있었고 콜로니의 색소 생성은 전혀 하지 않는 균체자체의 cream색을 가지고 있었으며, 주로 간균이고 운동성을 가진 *Pseudomonas* spp.로 구성되어 있다. 아미노산 시험에서는 arginine dehydrolase 생성이 많았다. 당의 산생성 시험에서는 대체로 발효능이 양호하였으며, 그 중 glucose, sucrose, maltose 및 sorbitol의 발효능은 80% 이상이었다. 탄소원 및 에너지원으로서 유기산의 이용에서는 adipic acid가 100% 이용되었고, propionic acid는 타 cluster에 비해 저조하였다. 항생제 내성시험에서는 streptomycin과 chloramphenicol에 높은 내성을 보였다. 생육환경인자로는 산성인 pH 4.5에서 92%의 생육도를 보였고, 4°C에서는 생육빈도가 저조하였으나 고온인 44°C에서는 생육의 빈도가 대체로 높았다.

Minor clusters

Cluster 3 : *Pseudomonas* sp.와 *Flavobacterium* sp.의 2개의 균주로 구성되어 있다.

Cluster 5 : *Azotobacter* sp.와 *Flavobacterium* sp.의 2개의 균주로 구성되어 있다.

Cluster 6 : *Azotobacter* sp.와 gram 음성의 단간균 형태인 동정이 안된 균주(UN)로 구성되어 있다.

Phenol 분해에 관련된 미생물 균주를 살펴보면, Schmidt 등(22)에 의해 담수에서 *Actinomycetes*, *Nocardia rubra*, *Trichosporon cutaneum*를 분리하여 phenol의 mineralization을 조사한 바 있으며, M. Alexander 등(23)은 *Pseudomonas acidovorans*와 *Pseudomonas* sp. strain ANL이 저농도 phenol을 에너지원으로 한 생육과 분해에 관해 보고하였다. 또 Choi 등(24)은 sewage sludge와 토양에서 *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp., *Acromonas* sp., *Escherichia* sp. 및 *Klebsiella* sp. 등을 분리하였고, Yun 등(9)은 토양에서 *Pseudomonas*속을 분리, 보고하였다. 또한 phenol이 halogen기와 alkyl기

등의 치환체 phenol이 되면, 생분해능이 저하되기 때문에 각 치환체에 따른 분해특성에 관한 보고들이 많이 있다. 그 중 chlorinated phenols의 분해에 관련된 균주는 대개 *Pseudomonas* sp.를 대상으로 연구되었다(10).

본 실험에서 분리된 phenol 분해균주로는 *Azotobacter* spp.가 28주, *Pseudomonas* spp.가 12주, *Flavobacterium* spp.가 6주, 그외 *Alcaligenes* sp., *Chromobacterium* spp., *Bordetelia* spp., *Acinetobacter* spp. 및 *Escherichia* spp. 등이었고, 지금까지 보고되지 않은 *Azotobacter* sp.가 분리된 것이 특징적이라 하겠다.

요 약

토양에서 phenol 분해균주를 65주 분리, 동정하였다. 균주의 형태, 생화학 및 생리학적 형질특성 46항목을 parameter로 하여 simple matching(S_{SM})지수 산출방법으로 유사도지수를 구하고, 비가중평균결합법(unweight pair group method with arithmetic average)으로 dendrogram을 작성하였다. 분리균주는 70% 유사도에서 3개의 major cluster와 3개의 minor cluster로 분류되었으며, 우점종으로는 *Azotobacter*, *Pseudomonas* 및 *Flavobacterium*속으로 나타났다.

감사의 말

이 연구는 89년도 한국과학재단 기초연구비 지원(891-0407-031-2)에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 강영호 외 7인: 환경과학, 형설출판사, 181 (1983)
2. 정갑열, 양승립: 부산대학교 연구소보, 4, 33 (1986)
3. Alexander, M.: *Advan. Appl. Microbiol.*, 7, 35 (1965)
4. Dart, R.K. and R.J. Stretton: *Microbiological Aspects of Pollution Control*, Van Nostrand Reinhold Co., New York (1976)
5. Gehm, H.W. and J. Bregman: *Handbook of Water Resources and Pollution Control*, Van Nostrand Reinhold Co., New York (1976)
6. Alexander, M., M.A. Loos and R.N. Roberts: *Canadian Journal of Microbiology*, 13, 679 (1967)
7. Davis, E.M., H.E. Murray and E.L. Powers: *Water*

- Res.*, **15**, 579 (1981)
8. Capestany, G.J., J. Mcdaniels and J.L. Opgrande: *J. Water Poll. Control Fe.*, **5**, 256 (1977)
 9. 윤혜정, 김혜영: 한국생활과학연구원 논총, **38**, 169 (1986)
 10. Chapalamadugu, S. and G. R. Chaudhry: *Microbiological Reviews*, **55**, 59 (1991)
 11. Chakrabarty, A.M., J.S. Karns, J.J. Kilbane and S. Duttagupta: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1176 (1983)
 12. 신정래, 김영환: *Sampling과 평가*, 녹원출판사, 42 (1986)
 13. Alexander, J. and B.K. Lustigman: *J. Agr. Food Chem.*, **14**, 410 (1966)
 14. Cappuccino, J.G. and N. Sherman: *Microbiology, a Laboratory Manual*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, New York, 2nd ed. (1987)
 15. Gerhardt, P., R.G.E. Murray and N.R. Krieg: *Manual of methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, New York (1981)
 16. Macfaddin, J.F.: *Biochemical Test for Indtification of Medical Bacteria*, The William and Wilkins Co., Baltimore (1980)
 17. Breed, R.S., E.G.D. Murray and N.R. Smith: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriolgy*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Vol.1 (1984)
 18. Austin, B. and F. Priest: *Morden Bacterial Taxonomy*, Van Nsorand Reinhold (UK) Co. Ltd, Berkshire (1986)
 19. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal: *Numerical Taxonomy*, W.H. Freeman and Commpany, San Francisco (1973)
 20. Ludwig, J.A. and J.F. Reynolds: *Statistical Ecology*, John Wiely and Sons, Toronto (1988)
 21. Paris, D.F., N.L. Wolfe and W.C. Steen: *Appl. Environ Microbial.*, **44**, 91 (1982)
 22. Schmidt, S. and H.E. Rubin: *Appl. Envirn. Microbiol.*, **49**, 11 (1985)
 23. Alexander, M. and S.K. Schmidt: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 822 (1985)
 24. Choi, W.Y. and S.Y. Kim: *Res. Pep. Env. Sci. Tech.*, **1**, 22 (1983)

(Received September 12, 1991)