

활성오니에서 분리한 pentachlorophenol 내성균주의 pentachlorophenol 제거에 관한 연구

박연희 · 조성은 · 이우상 · 조도현

아주대학교 공과대학 생물공학과

초록 : 서울시 중랑천 하수처리장의 활성오니로부터 총 20주의 pentachlorophenol(PCP) 내성균주들을 분리하여 *B. sphaericus* B-2와 *B. schlegelii* B-13를 포함한 *Bacillus* spp. 9주, *Corynebacterium* spp. 4주, *Staphylococcus aureus* S-1 1주, *Aeromonas* spp. A-19 1주, *Arthrobacter* LN-3 1주로 동정하였다. 이 균주들은 200~300 ppm PCP와 0.1% glucose가 포함된 mineral salt 배지에서 생육하였으며 PCP를 분해하는 종류 13주와 분해하지 못하고 흡착 혹은 흡수하는 종류 7주로 구분되었다. PCP 분해균주들은 대부분 배양 24시간후 생육이 최고에 도달하여 PCP를 약 75~90% 분해하였으며 PCP 흡착 혹은 흡수하는 균주들은 흡착한 PCP를 배양 24시간 이후 또는 72시간 이후에 방출하였다. PCP 분해균주 *B. sphaericus* B-2, *B. schlegelii* B-13의 분해 산물을 TLC를 이용하여 검출한 결과 *B. sphaericus* B-2의 배양액에서 2-chlorophenol, *B. schlegelii* B-13에서는 2,4-dichlorophenol로 추정되는 물질과 4종의 분해산물로 보이는 물질들을 검출하였다(1992년 1월 24일 접수, 1992년 6월 29일 수리).

각종 산업이 고도로 발달함에 따라 우리의 환경은 날이 갈수록 심각하게 오염되어 환경정화는 매우 중요한 과제가 되었으며 또한 화학공업에서 다량으로 이용하여 방출하는 여러 유기화합물들은 중요한 환경오염의 요인이 되고 있다.

그중에서도 pentachlorophenol(PCP)와 이의 sodium salt(Na-PCP)는 미국, 일본을 비롯한 여러나라에서 사용되고 있으며 생산량의 80%가 목재보존용으로 이용되고 있다. 또한 insecticide, fungicide, herbicide, algicide, disinfectant 등으로도 널리 이용되고 있다.¹⁾ 이와같이 PCP의 광범위한 사용 결과 환경으로 PCP의 유출은 먹이사슬을 통하여 사람에게서도 PCP가 검출이 되어 생태계에 심각한 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다.^{2,10)}

그러므로 이런 난분해성 독성 유기화합물들을 보다 효과적으로 분해·제거할 수 있고, 물리·화학적 처리법에 비해 2차 오염의 가능성이 적고, 경제적인 수 있는 미생물에 의한 분해에 대한 연구가 환경정화 차원에서 매우 활발히 진행되고 있다.⁷⁾

PCP를 분해하는 미생물은 크게 세균과 곰팡이로 나눌 수 있는데 세균으로는 주로 *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Bacillus*

등이 보고되었다.⁷⁾

본 연구에서는 서울시 중랑천의 하수처리장으로부터 PCP를 제거할 수 있는 미생물들을 분리 동정하고, 분해능력 및 분해산물을 검출하여 PCP 제거 연구에 대한 기초자료로 이용하고자 한다.

재료 및 방법

사용 배지

본 실험에서는 mineral salt 배지⁹⁾와 균주계대용 배지로는 luria 배지⁵⁾와 trypticase soy(TS) 배지⁵⁾를 사용하였다. mineral salt 배지는 50배 농축시킨 stock solution을 만들어 사용하였다. PCP 자체는 물에 녹지 않으므로 0.1N NaOH solution에 PCP의 최종 농도가 10 g/l (10,000 ppm) 되도록 sodium salt 형태로 녹여 PCP stock solution으로 하였고 갈색병에 넣어 냉장소에 보관하면서 배지에 일정량을 첨가, 사용하였다.

PCP 내성균주의 분리

서울시 중랑천 하수처리장의 활성오니로부터 시료를 채취하여 10배수로 연속 희석한 후 50 ppm PCP가 포

Key words : PCP, PCP-degradation, PCP-adsorption/absorption, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus schlegelii*, *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp., 2-chlorophenol

Corresponding author : Y. H. Park

합된 luria 고체배지에 접종, 30 °C 배양기에서 24시간 배양시켜 생성된 colony를 분리하였다.

PCP 내성균주의 동정

분리한 PCP 내성균주는 “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” 등^{3,5,6,8)}에 의하여 동정하였다.

생육측정

PCP 100 ppm과 0.1% glucose가 포함된 mineral salt 배지 100 ml에 각 내성균주 1%(v/v)를 접종하고 30 °C에서 10일간 진탕배양하였다. 균주의 생육 정도는 spectrophotometer(Spectronic 20, Baush & Lomb)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

배양액중 PCP 농도 측정

PCP 100 ppm과 0.1% glucose를 포함한 mineral salt 배지 조건에서 각 균주들을 배양하였다. PCP 농도 측정은 배양액 5 ml를 채취하여 원심분리(2,500 g, 20분)하여 얻은 상정액을 4배 희석하여 pH 7.0±0.1로 조절한 후 spectrophotometer(HITACHI model 200~20)를 이용하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였고,⁴⁾ mineral salt 배지와 증류수에 PCP의 농도를 변화시켜 첨가한 뒤 같은 방법으로 320 nm에서 흡광도를 측정하여 PCP 분석시 배지에 의한 간섭 여부를 확인하였다. 표준곡선은 PCP를 포함한 mineral salt 배지에 농도를 변화시켜서 동일한 방법으로 측정하여 사용하였다.

균체중 PCP 농도 측정

PCP 함유 배지에서 균체에 의한 흡착 또는 흡수를 측정하기 위하여 원심분리후 얻은 침전물에 증류수 5 ml를 첨가하고 5~6 KHz로 15분간 sonication(CIT Alcatel Pons., GENERATEUR 20~200) 하여 세포를 깬 다음 다시 원심분리하여 얻은 상정액을 위와 동일한 방법으로 PCP 농도를 측정하였다.

PCP 분해 산물 조사

내성균주들에 의한 PCP 분해 중간 산물들은 thin-layer chromatography(TLC)를 이용하여 조사하였다. 균주들의 배양액을 5 ml 채취하여 2,500 g에서 20분간 원심분리하고 상정액 5 ml를 10 ml의 ethyl acetate로 추출한 후 완전 농축시켜 건조시켰다.

Ethyl acetate 100 μ l를 첨가해 추출된 물질들을 다시 녹인 후 TLC판(silica gel 60 F 254 pre-coated, 두께 : 0.2 mm)에 1.5 cm 간격으로 1 cm되도록 band application 하였고, 표준물질로는 PCP, 2,4,6-trichlorophenol, 2,4-di-

chlorophenol, 2-chlorophenol, tetrachlorocatechol, tetrachloro-1,4-benzoquinone을 최종 농도가 100 ppm되도록 ethyl acetate에 녹여 100 μ l를 점적하였다. 전개용매로 benzene : ethyl acetate을 4 : 1(v/v)의 비율로 하여 상방 15 cm 정도 전개시킨 후 자외선(short wavelength)을 조사하여 분해 산물들을 확인하였다. 각 수치는 2회 반복의 평균으로 하였다.

결과 및 고찰

PCP 내성균주의 분리 및 동정

서울시 중랑천 하수처리장의 활성오니로부터 얻은 시료를 50 ppm PCP가 포함된 luria 고체배지에서 배양하여 생성된 colony중 총 20주의 균주를 분리하였다. 이 균주들을 “Bergey’ Manual of Systematic Bacteriology” 등^{3,5,6,8)}에 의한 각종 동정 실험을 하여 Gram-positive bacteria로는 *Bacillus sphaericus* B-2, *Bacillus schlegelii* B-13를 포함한 *Bacillus* spp. B-11, B-12, B-13, B-14, B-15, B-16, B-18, B-22 9주, *Corynebacterium* spp. C-3, C-4, C-5, C-7 4주, *Arthrobacter* LN-3 1주, *Staphylococcus aureus* S-1 1주를, Gram-negative bacteria로는 *Aeromonas* spp. A-19 1주를 부분동정하고, Gram-negative bacteria인 US-8, US-9, US-20, US-23은 동정하지 못하였다. 이 PCP 내성균주들은 대부분 Gram-positive bacteria였고, *Bacillus* spp.가 9주로 가장 많았다.

PCP 분해 능력 조사

Spectrophotometer에 의한 PCP 분석에서 PCP 농도를 변화시킨 mineral salt 배지와 증류수에서 각 농도에 따른 PCP의 흡광도 값이 유사한 것으로 간섭이 없음을 확인하였다. 각 내성균주들을 100 ppm PCP와 0.1% glucose가 포함된 mineral salt 배지에서 배양하면서 PCP 농도의 변화를 측정된 결과 이 PCP 내성균주들은 PCP를 분해하는 종류와 배양액중 PCP를 일시적으로 흡착 혹은 흡수하는 종류로 구분되었다.

1) PCP 분해 균주

Staphylococcus aureus S-1 1주, *Corynebacterim* spp. C-3, C-4, C-5 3주, *Arthrobacter* LN-3 1주, *Bacillus* spp. *B. sphaericus* B-2, *B. schlegelii* B-13, B-15, B-22 4주, *Aeromonas* spp. A-19 1주, 그리고 미동정된 US-8, US-a, US-20 3주의 총 13 균주는 100 ppm PCP가 포함된 mineral salt 배지에서 24시간 배양하였을 때 배양액의 PCP 농도가 약 87% 이상 급속히 감소하고, 균주마다 약간의 차이는 있으나 그후 10일까지 PCP 농도의 변화가 거의 없으므로 PCP를 분해하는 것으로 나타났다.

Fig. 1에서와 같이 *B. sphaericus* B-2는 배양 24시간후 75~80%의 PCP를 분해하였으며 그후 PCP 농도는 큰 변화없이 일정하게 유지되었다. *B. schlegelii* B-13은 배양 24시간후 PCP를 66% 정도밖에 분해하지 못하였으나 72시간 후에는 88% 까지 PCP를 분해하여 배양 24시간 이후 더 이상의 PCP 분해가 일어나지 않는 대부분의 균주들과는 달리 느리게 분해하는 경향을 나타내었다. 이 분해균주들의 PCP 분해 정도는 100 ppm PCP를 함유한 배지에서 75~90% 정도이고 주로 배양후 24시간에서 48시간내에 이루어졌으며 그후에는 10일까지도 더 분해되지 않았다.

이러한 결과를 다른 종류의 PCP 분해균과 비교하면 Watanabe¹¹⁾가 40 ppm PCP perfused soil에서 분리한 *Pseudomonas* spp.는 배양 1주동안 73~77%의 PCP를 분해하였고, 배양 2주후에는 완전히 분해한다고 보고하였으며 *Flavobacterium*²⁾은 100 ppm PCP가 처리된 mineral salt 배지에서 PCP를 3~5일후에는 완전히 분해할 수 있다고 보고하였다. 이들 균주들에 비하여 본 실험에서 분리한 PCP 분해균주들은 PCP를 완전히 분해하지는 못하였으나 배양 24시간 동안 70~90%까지 PCP를 분해하여 PCP 제거에 보다 효과적으로 볼 수 있다.

2) PCP 흡착 혹은 균주(이하 PCP 흡착 균주로 함)

Corynebacterium spp. C-7 1주, *Bacillus* spp. B-11, B-12, B-14, B-16, B-18 5주, 미동정된 US-23 1주의 7균주들을 100 ppm PCP가 포함된 mineral salt 배지에서 배양할 때 배양액중의 PCP 함량은 초기에는 급격히 감소되나 일정 시간후 다시 PCP의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 이 균주들은 PCP를 분해하는 것이 아니라 PCP를 세포에 흡착 또는 흡수하는 것으로 추측할 수 있다.

이 균주들에 의한 배양액의 PCP 함량의 변화를 측정해 본 결과 Fig. 2에서와 같이 대부분은 배양 24시간 또는 72시간후부터 증가하였다. 즉 B-12는 배양 24시간후 배양액의 PCP 함량이 88% 정도 감소하였으나 이후 배양 전의 농도로 배양액의 PCP 함량이 다시 증가하였다. B-14는 배양후 24~72시간에 77~88%의 PCP가 감소하였으나 72시간이후 다시 배양액의 PCP 함량이 증가하였다.

또한 이들 PCP 흡착균주들도 배양 24시간에서 72시간 사이에 가장 높은 생육정도를 나타내어 이들 균주의 PCP 제거는 성장과 아주 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 사료된다.

PCP 분해 또는 흡착/흡수 확인

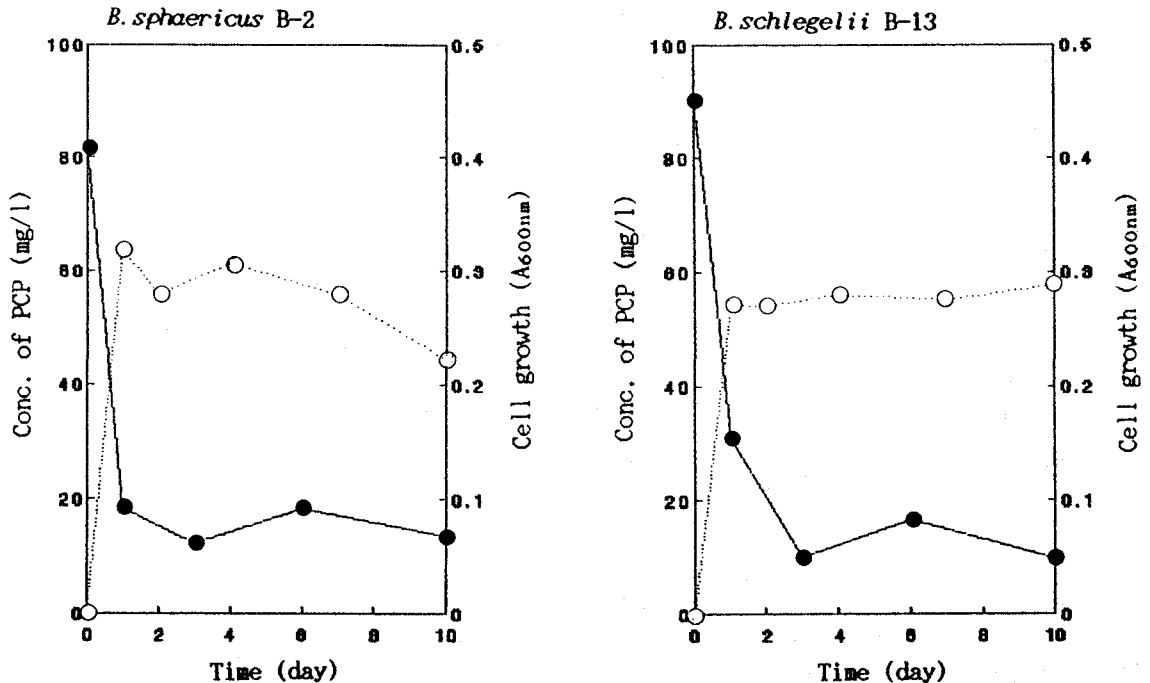


Fig. 1. Changes in PCP concentration in mineral salt medium (0.1% glucose) treated at 100 mg/l PCP during the growth of PCP-degrading strains.
 ○—○: Cell growth, ●—●: Conc. of PCP in the medium

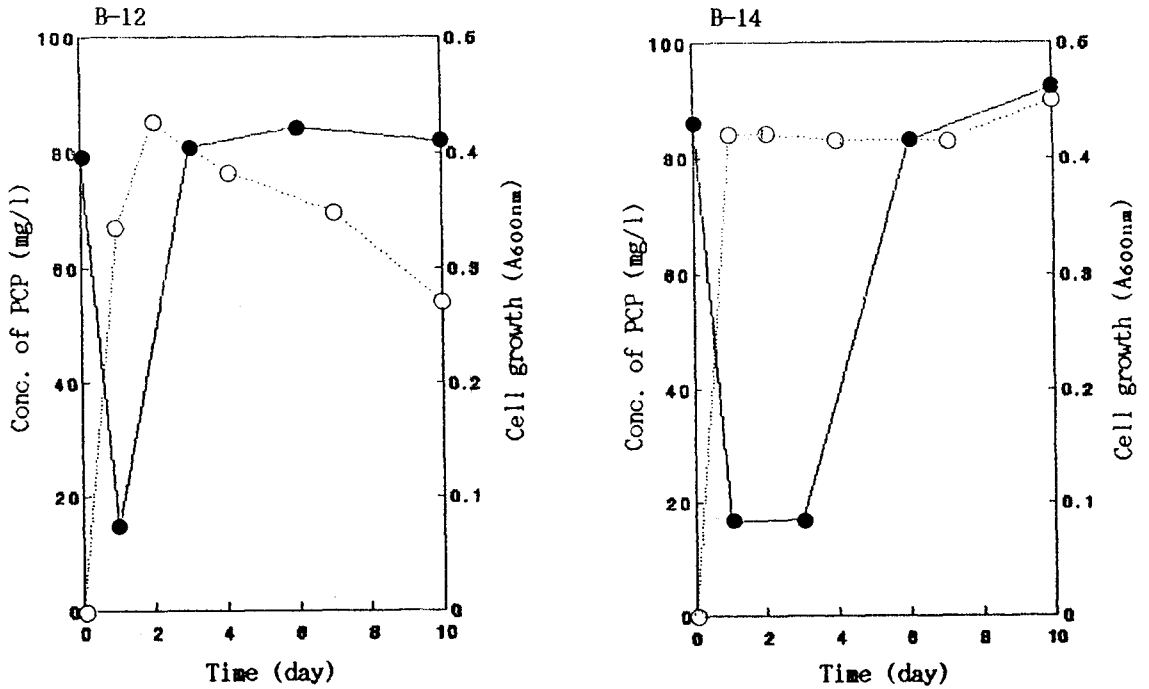


Fig. 2. Changes in PCP concentration in mineral salt medium (0.1% glucose) treated at 100 mg/l PCP during the growth of PCP-adsorbing strains.

○—○: Cell growth, ●—●: Conc. of PCP in the medium

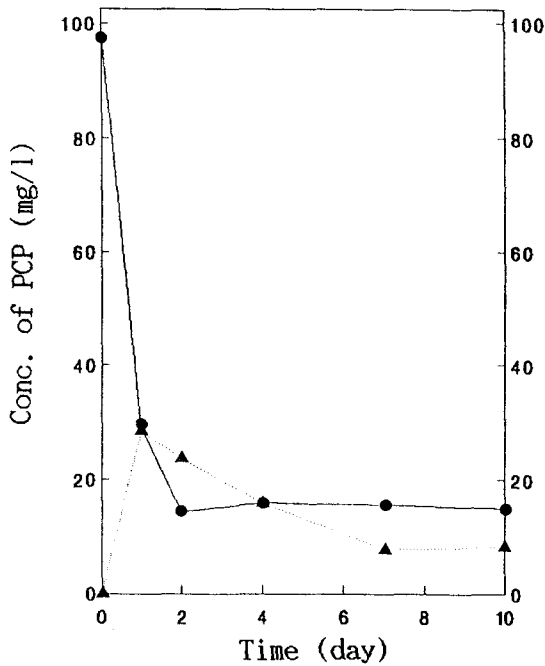


Fig. 3. Changes in PCP concentration on the cell and in the medium during the growth of *B. schlegelii* B-13.

●—●: Conc. of PCP in the medium, ▲—▲: Conc. of PCP on the cell

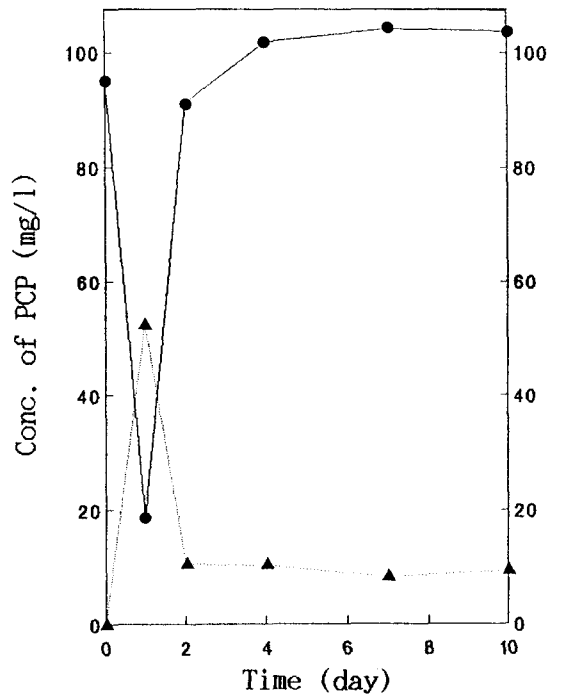


Fig. 4. Changes in PCP concentration on the cell and in the medium during the growth of B-2.

●—●: Conc. of PCP in the medium, ▲—▲: Conc. of PCP on the cell

PCP 분해균주인 *B. schlegelii* B-13과 PCP 흡착균주인 B-12를 선발하여 이들이 PCP를 세포에 흡착 또는 흡수하는 것을 측정하였다. 생육 시간별로 배양액을 취해 원심분리한 후 상정액의 PCP 농도와, 세포 침전물에 증류수를 채워 sonication하여 세포를 깬 후 다시 원심분리한 상정액의 PCP 농도를 측정하였다.

PCP 분해균주인 *B. schlegelii* B-13는 Fig. 3에서와 같이 배양후 48시간까지 88%의 PCP를 분해하였고 그후 배양 10일까지 PCP 함량의 변화가 거의 없었다. 또한 sonication한 후 균체에서 유리된 PCP 함량을 측정 결과 배양 24시간에 약 30 ppm을 나타내었고 시간에 따라 감소하여 *B. schlegelii* B-13가 PCP를 분해한 것을 확인할 수 있었다. 반면 PCP 흡착균주인 B-12는 배양 24시간에 PCP를 80% 정도 제거하였다가 24시간 이후 배양액의 PCP 함량이 증가하였는데 Fig. 4에서와 같이 24시간후 배양액의 PCP 함량이 감소하는 반면, sonication후 균체에서 얻은 PCP 함량이 50 ppm 정도로 나타났고 다시 감소하여 10 ppm정도로 유지되는 것으로 나타나 균체에 흡착 또는 흡수했던 PCP가 거의 모두 배양액에서 방출되어 PCP 함량이 증가하는 것으로 확인되었다. 따라서 B-12는 PCP를 분해하는 것이 아니라 배양초기 세포에

PCP를 흡착 또는 흡수했다가 일정시간 후 다시 배양액으로 PCP를 방출하는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 B-12를 비롯한 PCP 흡착균주들을 흡착 또는 흡수 사실을 확인하였으나 이의 기작은 규명하지 못하였다.

PCP 분해 산물의 검출

PCP 분해균주인 *B. sphaericus* B-2, *B. schlegelii* B-13을 선발하여 PCP 분해확인과 동시에 분해 중간 대사물을 검출하기 위하여 배양여액을 ethyl acetate로 추출하여 TLC로 분석하였다.

B. sphaericus B-2 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 TLC로 분석한 결과 Fig. 5에서와 같이 PCP 함량이 시간에 따라 감소되는 것을 확인하였고 PCP 분해 중간 산물로 R_f 값이 각각 0.81, 0.35, 0.09인 세가지 물질을 검출하였다. 이들중 R_f 값이 0.81인 물질은 2-chlorophenol 표준물질과 R_f 값이 일치하여 이 균주에 의해 PCP가 2-chlorophenol로 분해되는 것으로 추정하였고 이 물질은 배양 1일부터 4일까지 계속 나타났으나 7일째에는 확인할 수 없으므로 4일 이후에는 다른 물질로 분해되는 것을 알 수 있었다. *B. schlegelii* B-13의 경우에는 Fig. 6에서와 같이 R_f 값이 각각 0.89, 0.77, 0.25인 세가지 물

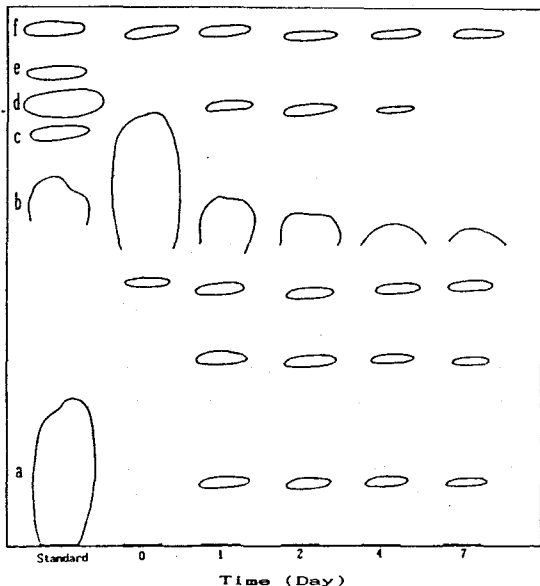


Fig. 5. Thin-layer chromatogram (TLC) of the extract of mineral salt medium containing 100 mg/l PCP inoculated with *B. sphaericus* B-2.
a: Tetrachlorocatechol ($R_f = 0.14$), b: PCP ($R_f = 0.63$), c: 2,4-Dichlorophenol ($R_f = 0.76$), d: 2-Chlorophenol ($R_f = 0.81$), e: 2,4,6-Trichlorophenol ($R_f = 0.87$), f: Tetrachloro-1,4-benzoquinone ($R_f = 0.95$)

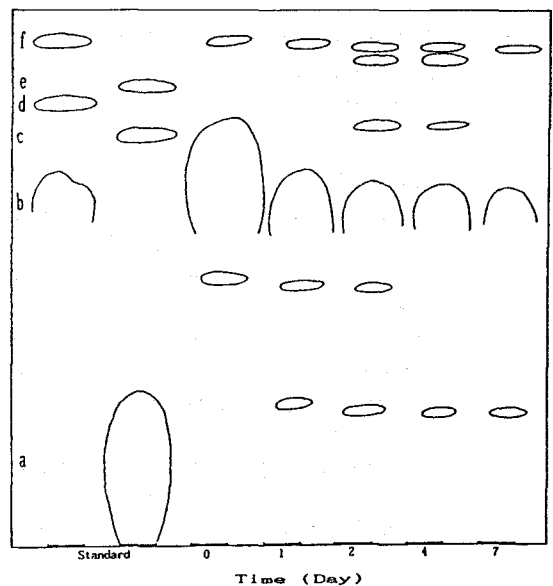


Fig. 6. Thin-layer chromatogram (TLC) of the extract of mineral salt medium containing 100 mg/l PCP inoculated with *B. schlegelii* B-13.
a: Tetrachlorocatechol ($R_f = 0.28$), b: PCP ($R_f = 0.65$), c: 2,4-Dichlorophenol ($R_f = 0.75$), d: 2-Chlorophenol ($R_f = 0.81$), e: 2,4,6-Trichlorophenol ($R_f = 0.85$), f: Tetrachloro-1,4-benzoquinone ($R_f = 0.93$)

질을 검출하였으며 R_f 값이 0.77인 물질은 2,4-dichlorophenol로 추정되며 배양 2일부터 4일까지 나타나 4일 이후에는 다른 물질로 분해되는 것으로 볼 수 있다.

이와같이 일차적으로 TLC를 이용하여 PCP의 분해산물로 추정되는 물질들을 검출하였으나 이 물질들의 동정 및 분해경로에 대하여는 앞으로 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 1989년도 아주대학교 교내연구비에 의하여 이루어졌으며 감사를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Crosby, D. G.: Pure. Appl. Chem., 53 : 1051(1981)
2. Dianel, S. and Crawford, R. L.: Appl. Environ. Microbiol., 56 : 1512(1985)
3. Gerhardt, P., Murry, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B.: Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D. C. 20006(1981)
4. Fountain, J. E., Joshippura, P. B. and Jeliher, P. N.: Analytical Chemistry, 47 : 157(1975)
5. James, G. C. and Natalie, S.: Microbiology a laboratory manual, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York(1980)
6. Jean, F. M.: Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, Williams and Wilkins, London (1980)
7. Jung, Y. C., Kim, K. N., Choi, Y. J., Yang, H. C., Song, J. S. and Seo, Y. S.: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 17 : 100(1989)
8. Krieg, N. R. and Sneath, P. H. A.: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, London(1984)
9. Lee, M. D., Wilson, J. T. and Ward, C. H.: Dev. Ind. Microbiol, 25 : 557(1984)
10. Liu, D., Thomson, K. and Strachan, W. W. J.: Bull. Environ. Contam. Toxicol, 26 : 85(1981)
11. Watanabe, I.: Soil Sci. Plant Nutr., 19 : 109(1973)

Removal of pentachlorophenol by pentachlorophenol resistant strains isolated from activated sludge

Yun-Hee Park, Sung-Eun Cho, Woo-Sang Lee and Do-Hyun Jo(Department of Biotechnology, A Jou University, Suwon 441-749, Korea)

Abstract : Twenty strains of pentachlorophenol (PCP) resistant bacteria were isolated from activated sludge of the sewage treatment plant of Jung Lang Chun, Seoul. The predominant strains were *Bacillus* spp. including *B. sphaericus* and *B. schlegelii*. The other strains were identified as *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Arthrobacter* spp. and *Aeromonas* spp. The resistant strains could be grouped into two categories; PCP-degrading and PCP-adsorbing/absorbing ones. PCP-degrading strains degraded 75~90% of PCP in the medium containing 100 ppm PCP during the first 24 hours of growth. At the initial period the PCP-adsorbing/absorbing strains removed PCP from the medium but started to release PCP after 24 or 72 hours of growth. PCP degradation products from the culture broth of PCP-degrading strains were identified by comparing their R_f values with those of the reference compounds. 2-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol were presumed to be the intermediate products of PCP degradation.