

Benzene 분해 *Burkholderia* sp. SKK381 분리 및 최적 특성

¹강 동 일 · ²김 철 경 · ³고 창 웅 · ⁴진 환 준 · ⁵김 장 규 · †김 남 기
¹주식회사 코리아나 화장품, ²신흥대학 환경관리과, ³삼척대학교 화학공학과
⁴한국생산기술연구원, ⁵현대중공업, †성균관대학교 화학공학과
(접수 : 2000. 9. 8., 게재승인 : 2000. 11. 14.)

Identification and Optimal Characteristics of *Burkholderia* sp. SKK381 Degrading Benzene

Dong Il Kang, Chul Kyung Kim, Chang Woong Kho, Hwan Jun Jin, Jang Koo Kim, and Nam Ki Kim†
¹R&D Center, Coreana, Cheonan, Chungcheongnam-Do 330-830, Korea
²Dept. of Environ. Man., Shin Heung College, Euijungbu, Kyunggi-Do 480-701, Korea
³Dept. of Chemical Engineering, Samchok University, Samchok, Kangwon-Do 245-711, Korea
⁴R&D Dept., Korea Institute of Industrial Technology, Chongchungnam-Do 330-820, Korea
5R&D Dept. Hyundai Heavy Industries, Ulsan City 682-792, Korea
†Dept. of Chemical Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Kyonggi-Do 440-746, Korea
(Received : 2000. 9. 8., Accepted : 2000. 11. 14.)

Several bacterial strains growing on benzene minimal medium were isolated from soil by enrichment culture, *Burkholderia* sp. SKK381 was identified and selected. In order to determine the ability of *Burkholderia* sp. SKK381 to degrade benzene. Changes in substrate concentration, cell growth, and pH were monitored from start-up in batch culture. At 30°C, 1000 ppm of benzene was degraded 100% within 28 hours. Cell growth conditions were best at an initial pH of 7.0 and a benzene concentration of 1000 ppm at 30°C.

Key Words : benzene, *Burkholderia* sp., batch culture, cell growth

서 론

수많은 독성의 유기, 무기 화합물의 부적절하게 매립, 처리, 투기되므로써 토양과 지하수 등이 심각하게 오염되고 있다. 최근 이러한 물질이 자연환경과 인간에게 미치는 악영향에 대한 관심이 고조되면서 환경오염정화에 혁신적이며, 능률적인 기술들이 계속 개발되고 있다. 생물학적 분해 방법을 응용한 bioremediation은 최근 개발된 이들 기술 중 가장 효율적인 기술이다. 오염물질의 양, 조성, 독성 등과 미생물의 특성, 균집의 조성 및 pH, 온도, 습도, 미량원소 등이 Bioremediation 큰 영향을 주는 주요한 인자라고 할 수 있다 (1). 미생물들은 환경오염물질을 영양분으로 사용 가능한 효소를 가지고 있으며, 미생물 자체가 작은 크기여서 오염물질과의 접촉이 용이하다는 점에서 이상적인 조건이라 할 수 있을 것이다. 산업화 및 환경오염의 가속화로 본래 존재하지

않았던 수많은 환경오염물질들이 자연으로 내보내지고 있으며, 이들 중 어떤 것들은 기존의 미생물에 의해서는 거의 분해되지 못함으로써 자연 생태계 내에 잔류되어 큰 문제를 일으키는 물질이 있다. 오염물질을 잘 분해할 수 있는 미생물을 개발함으로써 환경조성에서의 효율의 한계를 극복하는 방법도 계속 연구되어지고 있다.

Bioremediation에서 대상이 되는 오염물질들은 petroleum hydrocarbon 성분인 BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene)(2)과 그밖에 다양한 PAH(polyaromatic hydrocarbon), TCE(trichloroethylene)(3), PCB(polychlorinated biphenyl), PCP (pentachlorophenol)과 중금속 등 인체에 위해한 성분들을 함유한 물질들이 이 주종을 이룬다. 방향족 화합물은 benzene ring을 기본구조로 가지며, 대부분 휘발성이며 난용성 물질로 알려져 있고, 공명구조를 나타내는 매우 안정된 화합물이며 석유화학공업분야에서 널리 사용되고 있으나 구조적 특징으로 인하여 기존 미생물에 의한 자연분해가 힘들기 때문에 적정분해 조건 개선을 위한 연구대상으로서 주목받고 있는 물질이다(4). 이러한 물질들은 gasoline 유출이나, 사용된 용매의 유출 등으로 평상시 아무런 제한 없이 외부에 노출 및 유출되는 경우가 많아 VOC물질에 대한 관리, 유출 및 오염 처

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, SungKyunKwan University, Suwon, Kyonggi 440-746, Korea
Tel : +82-31-290-7253, Fax : +82-31-290-7272
E-mail : nkkimdr@hanmail.net

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain SKK381

Characteristics	SKK381	Characteristics	SKK381
Shape	rod	Gelatine hydrolysis	-
Size	0.8~1.0 × 1.5~3.0 μ m	PNPG(p-nitro-phenyl- β D-galactopyranoside)	+
Gram stain	-	Glucose	+
Motility	+	Arabinose	+
Catalase	+	Monnose	+
Oxidase	+	Mannitol	-
O/F test	Oxidation	N-acetyl-glucosamine	-
Denitrification	-	Maltose	-
Nitrate used as a nitrogen source	+	Gluconate	+
Indole production	-	Caprate	+
Glucose acidification	-	Adipate	+
Arginin dehydrolase	-	Malate	+
Urease	-	Citrate	+
Esculin hydrolysis	+	Phenyl-acetate	+

리에 관한 기술 확보가 시급할 것으로 보인다.

본 연구에서는 난분해성 위해물질이며 석유화학산업폐수 중에 다량으로 혼입되어 있는 방향족 화합물 중 발암물질로 규정되어 인체에 치명적인 영향을 주는 benzene을 대상물질로 선택하였으며 benzen의 분해능이 우수한 균을 토양으로부터 순수 분리하여 개량하고 이들 선별된 균주의 분해능을 조사하였다. 또한 산업현장에서의 처리공정에 대한 최적화 방안도 함께 조사하였으며, 이러한 연구를 통하여 방향족 화합물이 함유된 토양, 산업폐수의 효율적 처리를 위한 기초자료를 확인하려고 하였다.

Benzene은 휘발성이 강하여 대기 중에서 존재할 수 있으며, 대부분의 PAHs가 물에 불용성인 것과는 대조적으로 비교적 높은 용해도를 갖고 있으므로 지하수에도 존재할 수 있고, 토양의 흡착에 의해 지표층에서도 발견된다.

Benzene, toluene을 생육에 이용할 수 있는 미생물로는 *Pseudomonas putida*(5,6), *Pseudomonas aeruginosa*(7), *Pseudomonas*(8), *Achromobacter sp.*(6), *Nocardia sp.*(9), 그리고 *Acinetobacter sp.*(10) 등이 보고되었으며, 미생물에 의한 benzene의 이용은 1913년 Sohngen에 의해 처음 알려졌다. 이후 Gibson(8)이 ethylbenzene을 유일 탄소원으로 사용하는 *Pseudomonas putida*를 분리하면서, 이 균이 toluene 및 benzene을 분해함으로써 분해 경로가 알려졌다. Benzene의 분해경로는 산소에 의해 유도된 두 개의 hydroxylgroup에 의해 benzen이 cis-benzene diglycol로 바뀌고 다음 catechol로 산화되어 분해되어진다.

실험재료 및 방법

배지 및 시약

Benzene 분해균주의 분리 및 배양에 사용한 최소배지는 증류수 1 l 중에 NH₄Cl 1 g, K₂HPO₄ 4.35 g, NaH₂PO₄ 3.9 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.38 g, CaCl₂ 0.03 g, H₃BO₃ 2.86 g, MnCl₂ · 4H₂O 1.81 g, ZnSO₄ 0.222 g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.39 g, CuSO₄ · 5H₂O 0.079 g, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 49.4 mg이며 초기 pH는 7.0으로 조절하였다. 유일한 탄소원인 benzene은 멸균된 최소배지에 첨가하였다. 균주의 분리 및 보관을 위한 완전배지는 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 8 g, 증류수 1 l를 사용하였으며, 평판 고체배지는 상기 배지에 agar를

1.5 % (w/v) 농도로 첨가하여 사용하였다.

균주 분리 및 선별

전국에서 채집한 토양의 많은 균원 시료를 증류수로 희석한 후 benzene이 1000 ppm(w/v) 포함된 액체 최소배지에 접종하였으며, 이 최소배지를 분리원으로 하여 3회에 걸쳐 24 시간 간격으로 enrichment culture를 수행한 후 배양액을 0.85% NaCl 생리적 식염수로 10배씩 4회 희석하고 고체배지에 도말하여 균주집락의 형성을 관찰하였으며 colony를 순수 분리하였다. 이 순수 분리된 균주를 액체 최소배지에 유일 탄소원으로 benzene을 1000 ppm(w/v) 농도로 첨가한 후 배양하여 균주증식과 분해능이 높은 균주를 최종 선별하였다.

균주의 동정 및 보존

분리된 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology 와 Biochemical test for identification of medical bacteria에 준하여 수행하였다.

분리된 균주는 분리용 배지에 계대배양하여 보존하였다.

분리균주의 배양

Benzene 분해 미생물은 screening을 통해 분리, 선별된 균주를 대상으로 하였다.

Benzene 균주의 분해능 조사를 위한 종균은 250 ml 용량의 플라스크에 50 ml의 최소배지를 넣고 일정량의 benzene 농도가 1000 ppm(w/v)이 되도록 benzene을 첨가한 후 각 균을 접종하여 25℃에서 2~3일간 진탕배양 (150 rpm)하였다. 배양액은 고속원심분리기를 사용하여 8000 rpm의 속도로 20 분간 원심분리하고, 원심분리관에 침전된 pellet을 KCl buffer 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 이렇게 얻어진 균체를 재접종하여 각각의 온도 및 pH, benzene 투여 농도에 따라 분해능을 조사하였다.

분석방법

균주 성장도는 일정 시간 간격으로 3 ml의 배양액을 취하고 분광광도계를 사용하여 640 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 작성한 검량선을 이용하여 환산하였다.

배양액 내의 용존 benzene의 정량을 위하여 membrane

filter (pore size, 0.45 μm)로 여과하고, 배양액을 일정량의 dichlorobenzene으로 추출하고 이 추출된 용액에 calcium chloride를 넣고 잔여수분을 제거한 후 분석에 이용하였다. 시료 중의 benzene 농도는 fused-silica capillary column과 불꽃이온화 검출기를 장착한 gas chromatography로 분석하였다. 분석시 column의 온도 범위는 80 $^{\circ}\text{C}$ ~220 $^{\circ}\text{C}$ 이고, injector, detector의 온도는 각각 200, 280 $^{\circ}\text{C}$ 였다. 운반기체는 N_2 를 사용하였으며, 이러한 조건하에서 benzene의 retention time은 1.01분 이었다. pH meter(Orion 410A)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Benzene 분해균주의 분리

총 39개의 토양 시료 중에서 benzene을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 균주중생육이 우수한 균주를 분리하였다. 특히 분리된 균주는 유일 탄소원 및 에너지원으로 benzene이 1000 ppm 들어있는 최소배지에서 24시간 배양시 O.D.값이 0.757로 분리균주 중에서 생육이 가장 좋고 분해능력이 가장 우수하여 최종균주로 선정하였다.

균주의 동정

분리균주 *Burkholderia sp.* SKK381을 전자현미경으로 scanning 하였으며, 형태적, 생리화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 본 균주는 간균의 호기성 세균으로서 운동성이 있는 Gram 음성균이었다. Oxidase와 catalase는 양성, glucose 이용시 산을 형성하지 않았으며, carbohydrate의 O/F 반응은 양성 반응을 보이는 특징을 나타내었다. Nitrate, esculin hydrolysis 반응은 양성 indole, glucose acidification, urease, gelatine hydrolysis는 음성이었으며, 탄소원의 이용에서는 glucose, arabinose, monnose, gluconate, caprate, adipate, citrate 등을 이용하였다. 이러한 결과로 이 균주는 *Burkholderia cepacia*와 거의 비슷한 것으로 나타났으며, 따라서 상기 형태적, 생리화학적 특성에 의한 균주 동정결과, *Burkholderia sp.* SKK381이라고 명명하였다.

Batch culture의 실험 결과

온도에 따른 *Burkholderia sp.* SKK381 성장

본 실험은 액체최소배지 50 mL에 초기 pH 7.0, 150 rpm, benzene 농도 1000 ppm에서 배양 온도에 따른 균주의 성장과 benzene의 분해율 및 pH 변화를 알아보기 위해 각각 25 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 *Burkholderia sp.* SKK381을 배양한 실험결과를 각각 Figure 2, 3, 4에 나타내었다. 이 결과에 의하면 benzene을 탄소원으로 사용하였을 경우 *Burkholderia sp.* SKK381의 성장 최적 온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 였다.

Figure 1에서 보는 바와 같이 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 *Burkholderia sp.* SKK381은 유일 탄소원으로 benzene 1000 ppm이 첨가된 최소배지에서 유도가 없이 급격한 균주증식을 나타내었고, 배양 후 24시간만에 benzene이 배양액에서 검출되지 않았으며, 20시간에서는 O.D.가 0.723으로 최대의 균주량을 나타내었다. 20시간 이후에서는 오히려 균주량이 줄어든 것은 benzene이 배양액 내에 없음으로 인한 탄소원의 고갈로 인해 균주량이

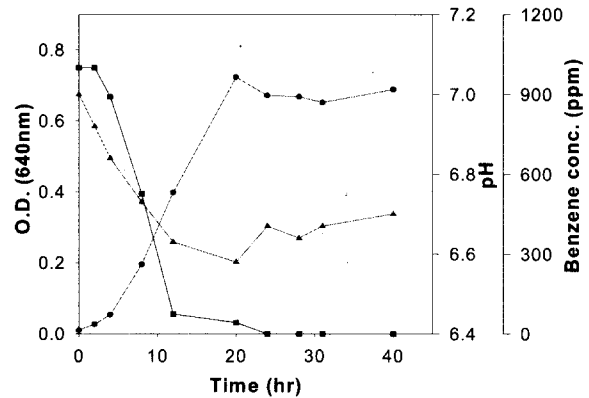


Figure 1. Time course changes of cell growth, benzene concentration, and pH by *Burkholderia sp.* SKK381 in a minimal medium containing benzene as a sole carbon source at 25 $^{\circ}\text{C}$. (● : cell growth, ▲ : pH, ■ : benzene concentration)

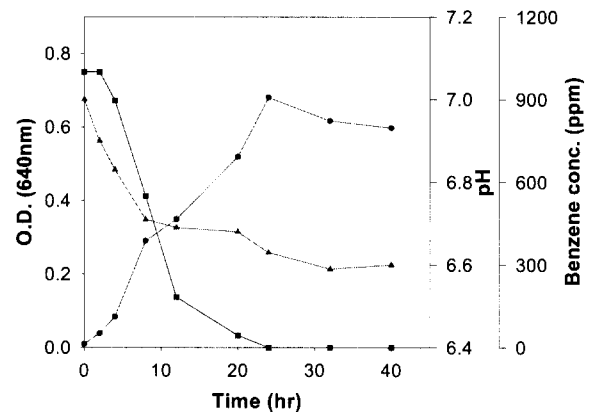


Figure 2. Time course changes of cell growth, benzene concentration, and pH by *Burkholderia sp.* SKK381 in a minimal medium containing benzene as a sole carbon source at 35 $^{\circ}\text{C}$. (● : cell growth, ▲ : pH, ■ : benzene concentration)

더 증가하지 않았고, cell lysis로 인해 O.D.값은 줄어든 것으로 보인다.

온도변화에 따라 증식하는 균주에 의한 pH의 변화는 초기 pH 7.00으로부터 감소하였다. 이는 균체증식에 따라 NADH가 전자전달체를 통해 산화될 때 전자전달 과정에서 소비되는 산소에 대하여 세포막 밖으로 방출된 H^+ 로 인해 pH가 저하된다. 따라서 실험결과인 초기 pH의 하락은 많은 산소가 소비되었음을 간접적으로 예측할 수 있다.

Figure 2는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 *Burkholderia sp.* SKK381의 성장을 나타낸 것인데 배양 후 28시간만에 benzene이 배양액에서 검출되지 않았으며, 이 시간에서 O.D.가 0.757로 최대의 균주량을 나타내었다. 균이 성장함에 따라 초기 pH 7.00에서 6.64까지 떨어졌으나 정지기에 도달했을 때는 pH는 6.75로 다시 증가하였으나 전체적으로 pH는 떨어진 것으로 나타났다.

Figure3의 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 배양 후 24시간만에 benzene이 배양액에서 검출되지 않았으며, 24시간에서는 O.D.가 0.680으로 최대의 균주량을 나타내었다. 그리고 초기 pH 7.00에서 pH는 6.60으로 감소하였다. 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 benzene 소진 시간이 24시간으로 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 benzene 소진시간보다 좋게 나타난 것은 35 $^{\circ}\text{C}$

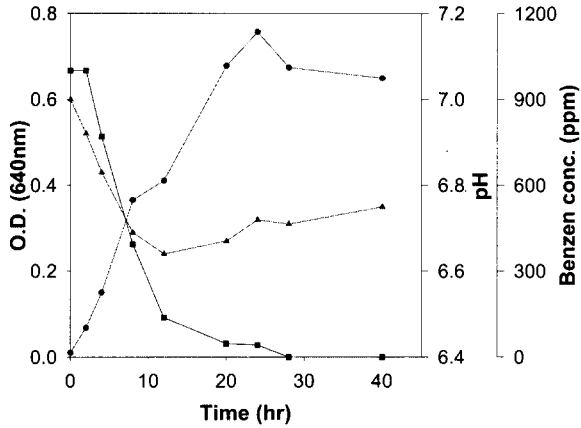


Figure 3. Time course changes of cell growth, benzene concentration, and pH by *Burkholderia sp.* SKK381 in a minimal medium containing benzene as a sole carbon source at 30°C. (● : cell growth, ▲ : pH, ■ : benzene concentration)

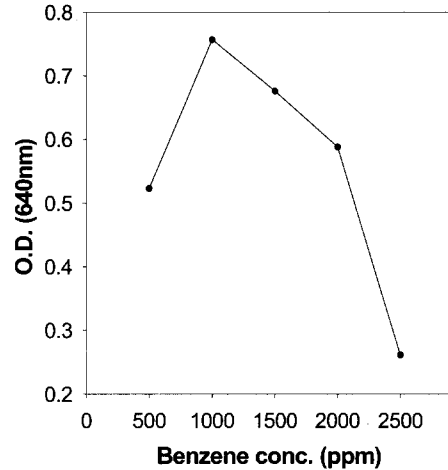


Figure 5. Effect of benzene concentration on growth of *Burkholderia sp.* SKK381.

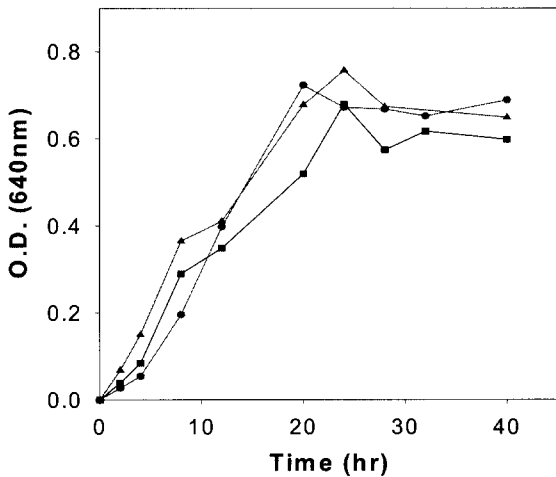


Figure 4. Time course changes of cell growth with temperature by *Burkholderia sp.* SKK381 in a minimal medium containing benzene as a sole carbon source. (● : 25°C, ▲ : 30°C, ■ : 35°C)

에서는 상대적 고온으로 휘발손실이 발생하였기 때문으로 생각된다.

각각의 온도에 따른 균주성장은 Figure 4에 나타내었다. 온도에 따른 *Burkholderia sp.* SKK381의 성장은 실험 온도 중 30°C에서 최대의 증식을 나타내었다. 이는 30°C가 *Burkholderia sp.* SKK381이 성장하는 최적의 온도임을 의미한다. 이외 25°C와 35°C에서도 유도기 없이 잘 성장함을 알 수 있었고, 35°C 이상의 고온보다는 25°C의 저온에서 성장이 나은 것으로 보인다. 이는 이 균주를 토양에서 분리하였으므로 고온보다는 실제 현장온도인 30°C에서 성장을 잘 하는 것으로 보이며 실제 생물학적 복원기술에 적용가능하다고 생각된다.

Benzene 분해율의 경우 온도에 따라 약간씩의 차이는 있었지만 배양 후 24시간에서 28시간이면 1000 ppm benzene은 배양액에서 검출되지 않았다. 이것으로 benzene이 탄소원으로 사용될 수 있음을 보여주었고, *Burkholderia sp.* SKK381이 benzene을 분해하는 plasmid를 보유하고 있는 것으로 보인다.

Benzene 농도에 따른 Burkholderia sp. SKK381 성장

본 실험은 액체최소배지 50 mL에 온도 30°C, 초기 pH 7.0, 150 rpm에서 benzene 농도에 따른 균주의 성장을 알아보기 위해 benzene 농도를 각각 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppm에서 *Burkholderia sp.* SKK381을 배양한 실험결과이다.

Benzene을 농도별로 첨가하여 배양한 결과는 Figure 5에 나타내었다. *Burkholderia sp.* SKK381의 생육 최적 benzene 농도는 1000 ppm이었다. 2000 ppm 정도의 고농도에서도 *Burkholderia sp.* SKK381이 잘 성장하는 것으로 나타났다. 하지만 1000 ppm 이상의 높은 농도에서는 균주성장이 1000 ppm에서의 균주성장과 비교할 때 현저한 감소현상을 보였으며 이는 benzene의 독성으로 인한 기질저해를 받는 것으로 생각된다. 그리고 benzene이 500 ppm의 농도에서 1000 ppm에서의 균주성장과 비교해 균주성장이 떨어지는 것은 탄소원의 고갈로 인하여 균주성장이 억제되어 균체성장이 낮은 것으로 나타났다.

요 약

본 실험에서는 benzene을 유일탄소원으로 사용할 수 있는 균주를 enrichment culture를 통하여 토양에서 분리하였으며 토양에서 분리한 균주 중 benzene에서 생육이 가장 우수한 균을 선별하고 동정한 결과 *Burkholderia sp.* SKK381이라 명명하였다. Benzene에 대한 *Burkholderia sp.* SKK381의 분해력을 알아보기 위해 농도, 온도를 변수로 하여 batch형태로 일정시간에서의 기질의 농도변화, 균주성장, pH변화를 조사하였으며 방향족 화합물의 생물학적 복원기술에 있어서 처리 공정과 최적조건을 결정하기 위한 기초자료로 아래와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 토양으로부터 benzene을 유일 탄소원으로 이용할 수 있는 균주를 분리하고 선별하여 그 형태적, 생화학 특성을 조사한 결과, 이 균체가 *Burkholderia cepacia*와 거의 비슷한 것으로 나타나 *Burkholderia sp.* SKK381이라 명명하였다.
2. 배양온도에 따라 30°C > 25°C > 35°C의 순서로 균체 성장이 우수하였으며 25°C, 35°C에서 유일 탄소원으로 benzene

1000 ppm은 24시간 이내에 100% 분해 되었고, 30℃에서는 28시간 이내에 100% 분해되었다.

3. 초기 pH 7.0, 온도 30℃에서 benzene 농도에 따라서는 1000ppm > 1500ppm > 2000 ppm > 500 ppm > 2500 ppm 의 순서로 균주성장이 우수하였다.

4. Benzene을 유일 탄소원으로 할 때 배양온도 30℃, 초기 pH 7.0 및 1000 ppm에서 O.D. 값이 0.757을 나타내어 최대의 균주성장을 보였고, 28시간 이내에 benzene을 100% 분해 하였다.

Benzene을 유일탄소원으로 사용할 수 있는 균주를 enrichment culture를 통해 분리하였다. 분리한 균주 중에서 benzene의 분해능이 가장 우수한 균주를 선정하기 위하여 농도, 온도를 변수로 하여 batch culture시간에 따른 기질의 농도변화, 균주 성장, pH 변화를 조사하였다. 실험결과 균주성질이 가장 우수한 배양조건은 30℃, pH 7.0, benzene의 농도 1000 ppm이었다. 이 경우 배양 28시간 이내에는 benzene이 100% 분해 되었다.

REFERENCES

1. Baker, K. H. and Herson, D. S. (1994), Bioremediation, McGraw-Hill, Inc
2. Zeyer, J., Kuhn, E. P. and Schwarzenbach, R. P. (1986), Rapid Microbial Mineralization of Toluene and 1,3-Dimethylbenzene in the Absence of Molecular Oxygen, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 944-947
3. Wilson, J. T. and Wilson, B. H. (1985), Biotransformation of Trichloroethylene in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 242-243
4. Leisinger, T., A. M. Cook., R. Hutter, and J. Nuesch (1981), Microbiol degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds, Academic Press, Zunch
5. Gibson, D. T., J. R. Koch, and R. E. Kallio (1968), Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms: I. Enzymatic formation of catechol from benzene, *Biochemistry*, **7**, 2653-2662
6. Worsey, M. J. and P. A. Williams (1975), Metabolism of toluene and xylene by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid, *J. Bacteriol.*, **124**, 7-15
7. Kitagawa, M. (1956), Studies on the oxidation mechanism of methylgroup., *J. Biochem.*, **43**, 553-564
8. Claus, D. and N. Walker (1964), The decomposition of toluene by soil bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **36**, 107-122
9. Raymond, R. L., V. W. Jamison, and J. O. Hudson (1967), Microbial hydrocarbon co-oxidation: I. Oxidation of mono- and dicyclic hydrocarbons by soil isolates of the genus *Nocardia*, *Appl. Microbiol.*, **15**, 857-865
10. C. H. Lee, H. M. Oh, T. J. Kwan, S. G. Ann, K. S. Kwan, Y. H. Go, and B. D. Yoon (1994), Isolation and Characteristics on *Acinetobacter* sp. GEM 63 Degrading Toluene, *Kor. Jour. Microbiol.*, **32**, 329-335