

## Bisphenol A 분해세균의 분리 및 특성

김희식 · 이영기 · 이완석 · 박찬선 · 윤병대 · 오희목\*

한국생명공학연구원 생물공정연구실

내분비계 장애물질로 잘 알려진 bisphenol A (BPA)를 단일탄소원으로 이용하여 균체성장을 나타내는 미생물 87주를 공단주변의 토양, 폐수 혹은 활성슬러지로부터 분리하였다. 분리된 균주 중 균체성장이 우수한 균주 8종을 2차 분리하였으며, 이 중 BPA 분해효율이 뛰어난 3종의 균주를 BPA 분해미생물로 최종 선별하였다. 최종 선별된 3종의 균주를 16s rDNA의 부분적 염기서열 및 형태학적, 생리학적 특성조사를 통해 *Serratia marcescens* 1901, *S. marcescens* 1902 그리고 *Pseudomonas putida* 1401로 동정되었다. BPA 분해능은 HPLC분석을 통해 배양액중의 잔존 BPA 농도로 측정하였으며, 최종 선별된 3종의 균주를 대상으로 BPA가 100 mg/l 혹은 500 mg/l의 농도로 포함된 최소 무기염 배지(PAS) 및 비타민을 포함하는 PAS인 PAV 배지에서 배양하여 BPA 분해능을 조사한 결과 20-40%의 분해효율을 나타내었다. 이들 균주의 균체성장은 PAS 배지에서 보다 PAV 배지에서 우수하였다. *S. marcescens* 1901은 저농도(100 mg/l)의 BPA에서 분해효율이 다른 2종의 균주보다 우수하였고, *S. marcescens* 1902와 *P. putida* 1401은 고농도(500 mg/l)에서 BPA 분해효율이 높았다. 선별된 3균주의 순수배양과 혼합배양에 의한 BPA 분해효율을 비교한 결과, 유의한 차이는 나타나지 않았다.

**Key words** □ biodegradation, bisphenol A, endocrine disruptor, *Pseudomonas*, *Serratia*

Bisphenol A (BPA)는 polycarbonate, epoxy 수지, 방염제(flame retardant) 등의 생산과정에 사용되며, 그 외에 코팅제, 페인트, 렌즈, compact disk 등의 제조에도 널리 사용되어 생활주변에 광범위하게 분포되어 있다(7,21). 일반적으로 BPA는 낮은 pH와 높은 압력조건에서 phenol과 acetone으로부터 제조되는 물질로, estrogenic toxicity를 가지는 대표적인 내분비계 장애물질(환경호르몬)이다(6). BPA는 미국에서 420,000 ton (1998년 기준), 일본에서 200,000 ton (1994년 기준)의 생산량을 가지는 화합물로서 주로 플라스틱의 형태로 산업 및 가정에서 많이 사용되고 있다(1). 이처럼 BPA의 사용량이 많은 만큼 상당량이 환경내에 투입될 수 밖에 없으며, 특히 식품의 포장재로 많이 사용되고 있는 epoxy 수지 등에서 BPA가 용출되어 인체에 영향을 미친다고 보고된 바 있다(4). 피부를 통해 BPA에 과다 노출되면 신장, 비장, 췌장 그리고 허파에 악영향을 미치며, BPA는 17 $\beta$ -estradiol과 유사하게 estrogen 수용체와 작용하여 호르몬과 유사한 기능을 나타낸다고 보고되었고(11,15), 고농도의 BPA는 수컷의 mouse 혹은 rat의 생식기관 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(17,19). 또한, 이들의 독성은 Atkinson & Roy (2)에 의하여 DNA와 BPA가 결합하여 발생한다는 것이 밝혀진 바 있다.

Fürhacker 등(10)은 BPA를 처리하기 위하여 새로운 시설이 요구되는 폐수처리공정의 새로운 모델을 제시한 바 있다. 다른 물리화학적 방법 또한 비용이 많이 소요되며, 별도의 시설이 필

요한 것으로서 환경친화적이고 경제적인 처리방법에 대한 보고는 이루어지지 않고 있는 실정이다(7,16,20). 미국 EPA에서는 1% 농도의 BPA를 분해하는데 28일 이상이 소요될 정도로 생분해에 어려움이 있는 물질로 보고하였다(25). 또한, 산화적 촉매를 이용하여 BPA를 무독화시키는 방법이 보고된 바 있다(22). 그러나, 이것은 oxidoreductase에 의한 free radical 반응이며, BPA로 polycarbohydrate나 epoxy 등을 제조할 때 응용되기도 하는 polymerization 반응의 일종이다(8,26). 따라서, 폐수처리 현장에 직접 적용하기에는 polymerization되어 침전되는 대사산물의 처리와 안전성, 경제적인 문제가 수반된다.

이에 본 연구에서는 BPA의 생물학적 처리를 위해 BPA의 정량분석법 정립과 BPA 분해능이 우수한 미생물의 탐색 및 선별, 선별된 BPA 분해세균의 동정, BPA 분해효율 및 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 배지

BPA는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)의 제품을 사용하였으며, 주요 배지성분들은 Difco (Detroit, MI, USA) 제품들을 사용하였다. BPA 분해실험에 사용한 배지는 최소 무기염 배지인 PA salts (PAS) medium (12) [g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.35, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7, NH<sub>4</sub>Cl 2.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.03, pH 6.8]과 PAS 배지 100 ml에 vitamin mixture (biotin 2  $\mu$ g, calcium pantothenate 400  $\mu$ g, folic acid 2  $\mu$ g, niacin 400  $\mu$ g, p-aminobenzoic acid 200

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-860-4321, Fax: 042-860-4598  
E-mail : heemock@mail.kribb.re.kr

$\mu\text{g}$ , thiamine 400  $\mu\text{g}$  in 10 ml DW) 1 ml를 첨가한 PAV 배지를 사용하였다. PAV 배지의 경우 pH를 7.0으로 보정하였고, 평판 고체배지로 사용할 때 Bacto agar (Difco)를 1.8%의 농도로 첨가하였으며, 액체배양을 이용한 BPA 분해능 조사를 위한 실험에서는 PAS 및 PAV 배지에 BPA stock solution (50,000 mg/l in 90% methanol)을 BPA의 최종농도가 10, 100, 500 mg/l가 되도록 첨가하였다.

### BPA 분해미생물의 분리 및 선별

BPA 분해미생물을 분리하기 위하여 여천공단, 대구·구미공단 등의 폐수, 활성오니, 주변 토양 등을 균원시료로 채취하여 단일 탄소원으로 BPA가 500 mg/l의 농도로 함유된 PAS 배지에 균원시료를 10% (v/v or w/v)가 되도록 접종하여 30°C에서 5일간 왕복진탕(130 rpm)하면서 BPA에 대한 적응과정을 거쳤다. BPA가 10, 100, 500 mg/l로 함유된 PAS agar plate에  $10^1$ ~ $10^4$  까지 희석된 배양액을 도말하여 30°C에서 7일간 배양하여 집락을 형성하는 미생물을 순수분리하였다. 순수분리된 균주는 단일탄소원으로 BPA가 100 mg/l 혹은 500 mg/l의 농도로 포함된 PAS 액체배지에서 130 rpm, 30°C, 5일간 배양한 후, spectrophotometer (UV160A, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 균체탁도를 측정하여 균체성장( $A_{600}$ )이 0.1이상인 균주들을 선별하였다.

### 선별세균의 동정

선별된 BPA 분해세균의 동정은 16S rDNA의 부분적 염기서열 분석을 통해 수행하였다. 선별된 세균은 LB (Luria-Bertani) 배지에서 20시간 배양한 후 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다(3). 추출한 DNA를 주형으로 polymerase chain reaction (PCR)반응을 수행하였다. PCR반응은 PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol, pH 8.0; Takara, Shiga, Japan)에 deoxyribonucleotide triphosphate가 각각 20 mM, primer는 각각 50 pmol을 첨가하고, Taq DNA polymerase (Takara Taq) 2.5 unit와 추출된 genomic DNA를 최종 50 ng이 되도록 하여 최종 100  $\mu\text{l}$ 로 PCR 반응용액을 제조하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위해 사용한 primer로 9F (*E. coli* 9-27; 5'-GAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3')와 536R (*E. coli* 536-519; 5'-GWATTACCGCG-GCKGCTG-3')을 사용하였다. PCR반응은 GENEamp® System 2400 (Perkin Elmer, Foster, CA, USA)을 이용하였고, 반응조건은 우선 95°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 1 min, 60°C에서 1 min, 72°C에서 2 min으로 30 cycle을 시행한 후 72°C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 PCR산물은 ABI automatic DNA sequencer (model 377, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)로 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열은 BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 분석하였으며, Clustal W (23) program package를 이용하여 Genbank에 등록된 다른 균주들과 분자진화학적 거리를 비교 분석하여 진화계통학적 위치를 확인하였다.

또한, BPA 분해세균의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하여 동정결과를 확인하였다. 생리학적 특성은 Cowan (5)의 방법에 따라 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology (14)에 따라 확인하였다.

### BPA 분해능 실험

BPA가 10, 100, 500 mg/l의 농도로 포함된 PAS 혹은 PAV배지 20 ml이 들어있는 100 ml 삼각플라스크에 seed 배양액을 1% (v/v) 접종하고, 130 rpm, 30°C에서 3일간 배양하여 잔존 BPA농도를 측정하였다. Seed는 100 mg/l의 BPA가 포함된 LB 배지에서 40시간 동안 30°C, 130 rpm으로 진탕배양하였다. 잔존 BPA의 농도는 배양액 1 ml을 취하여 16,000×g, 3 min 동안 원심분리하여 균체를 제거한 후, 그 상등액을 methanol로 적당하게 희석하고, PVDF (polyvinylidene fluoride) filter (Whatman, Kent, UK, 0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과한 다음 HPLC (Class-LC10, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다.

### BPA 분석

BPA의 정량은 HPLC를 이용하였으며, column은 Spherisorb C18, 5  $\mu\text{m}$  (Waters, Taunton, MA, USA, 150 mm×4.6 mm I.D.)가 장착된 HPLC를 사용하였다. 이동상 용매는 methanol-water (70:30, v/v) 혼합용액을 사용하였고, flow rate는 1.0 ml/min이었으며, column oven의 온도는 40°C, detection은 UV 275 nm에서 수행하였다. 이 분석조건에서 BPA는 4.6 min의 retention time을 보였다.

## 결과 및 고찰

### BPA 분해미생물의 분리

BPA 분해미생물을 분리하기 위해 BPA를 원료로 플라스틱류를 성형, 제조하는 공장들의 폐수, 활성오니, 주변토양 등의 균원시료 40점을 사용하였다. BPA의 PAS 배지에 대한 용해도는 상온에서 약 350 mg/l로 알려져 있지만(16), methanol에 먼저 50,000 mg/l로 녹여 stock solution을 조제한 후, PAS 배지에 첨가한 경우는 BPA 최종농도 500 mg/l의 농도까지 결정상태 없이 완전히 용해되는 것을 확인하였다. 그러므로, 본 실험에서는 BPA 최고농도를 500 mg/l로 하여 BPA 분해미생물을 분리 및 분해특성을 조사하였다.

먼저, BPA에 적응시킨 균원시료를 BPA농도 10, 100, 500 mg/l로 각각 함유된 PAS 고체배지에 도말하여 7일간 배양한 후, 집락을 형성하는 미생물 87주를 순수분리하였다. 그 중 29주를 500 mg/l의 BPA로부터 분리하였으며, 49주는 100 mg/l의 농도로부터, 나머지 9주만이 10 mg/l의 BPA가 함유된 고체배지상에서 분리되었다. 저농도(10 mg/l)에서는 에너지원으로 사용되는 탄소원의 농도가 낮아 생육이 쉽게 이루어지지 않는 것으로 생각되며, 고농도(500 mg/l)의 BPA는 균체생육을 저해하는 것으로 보이고, BPA를 100 mg/l의 농도로 첨가해준 실험구에서 가장 많은 미생물이 분리되었다.

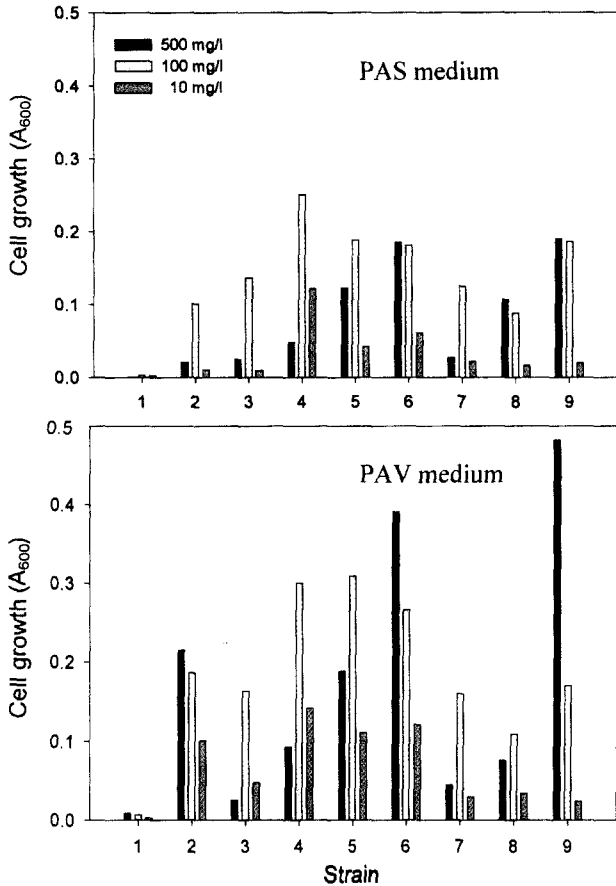


Fig. 1. Cell growth of the isolated microbial strains on BPA. Strains were cultured in PAS and PAV medium containing 10, 100 or 500 mg/l of BPA for 3 days at 30°C. 1, No strain; 2, 1201; 3, 401; 4, 1502; 5, 1901; 6, 1902; 7, 402; 8, 1501; 9, 1401.

순수분리된 미생물을 BPA가 10, 100, 500 mg/l의 농도로 포함된 PAS와 PAV 배지에서 액체배양한 후, 균체탁도를 측정하여 균체성장(A<sub>600</sub>)이 0.1이상인 균주들을 분리하였다. 그 결과, 8종의 균주가 BPA를 단일 탄소원으로 하여 생육하는 미생물로 2차 분리되었고, 대부분의 분리균주는 PAS 배지보다는 PAV 배지에서 균체성장이 우수하였다(Fig. 1). 특히, strain 1502, 1901, 1902, 1401의 4 균주가 다른 균주들에 비해 균체성장이 우수하였으며, strain 1401의 경우 500 mg/l의 BPA를 포함하는 PAV 배지에서 OD<sub>600</sub>가 0.5 정도의 높은 균체성장을 보였다. 그 외의 분리균주들은 주로 BPA농도 100 mg/l에서 가장 양호한 균체성장을 보이고 있으며, 대부분의 균주가 500 mg/l BPA에서 생육저해를 받는 것으로 나타났다. 다만, strain 1401과 1902는 500 mg/l의 BPA에서 높은 균체성장을 보였기 때문에 BPA에 대한 저항성이 비교적 높은 것으로 판단된다.

**분리 미생물의 BPA 분해효율**

분리균주들을 BPA가 100 mg/l 혹은 500 mg/l의 농도로 포함된 PAV 배지에 접종하여 BPA 분해효율을 조사한 결과(Fig. 2),

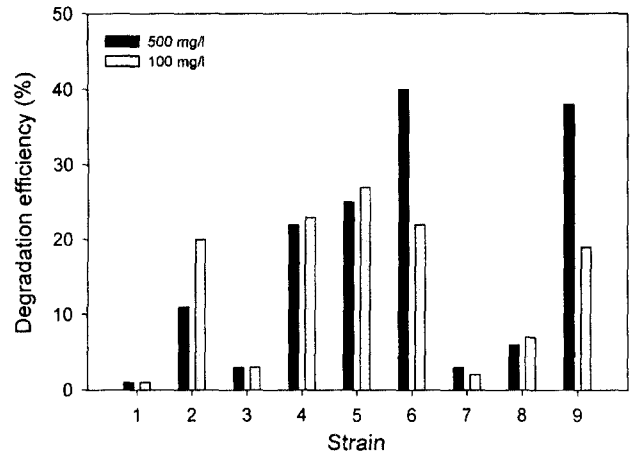


Fig. 2. Degradation efficiency of BPA by the isolated microbial strains. Strains were cultured in PAV medium containing 100 or 500 mg/l BPA at 30°C for 3 days. 1, No strain; 2, 1201; 3, 401; 4, 1502; 5, 1901; 6, 1902; 7, 402; 8, 1501; 9, 1401.

strain 1502, 1901, 1902, 1401의 4 균주는 20-40%의 분해효율을 나타내어 다른 균주들에 비해 BPA 분해효율이 우수한 것으로 관찰되었다. 분리균주 1902와 1401은 BPA 100 mg/l의 농도에서 약 20%의 분해효율을 보인 반면, 500 mg/l의 농도에서는 약 40%로 고농도의 BPA에서 분해효율이 높게 관찰되었다. 분리균주 1901과 진균으로 확인된 1502는 BPA 농도 100 mg/l와 500 mg/l에서 모두 25% 정도의 비슷한 분해효율을 나타내었다. 이상의 결과로부터 고농도 BPA에서 분해능이 우수한 strain 1902와 1401 그리고, 100 mg/l의 BPA에서 분해효율이 가장 높은 strain 1901을 본 연구의 BPA 분해균주로 최종 선별하였다.

**BPA 분해세균의 동정**

선별균주의 동정을 위하여 16S rDNA의 염기서열분석 방법을 이용한 결과, 선별균주 1901과 1902는 염기서열이 결정된 527 bp상에서 *Serratia marcescens*와 99%의 높은 상동성을 보였다 (Table 1). 선별과정에서 strain 1902는 1901과 달리 고체배양상에서 진한 적색의 집락을 형성하였기에 strain 1901과 다른 종의 균주로 생각이 되었으나, 이 결과에서는 같은 종으로 나타났다. 16S rDNA 유전자의 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석에서도 strain 1901과 1902는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Serratia* 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하며, 특히, *S. marcescens*와 높은 유연관계를 보여주었고, strain 1902가 1901보다 더 높은 유연관계를 나타내고 있다.

Strain 1901과 1902의 형태학적 및 생리학적 특성은 Table 2에 나타내었으며, 두 균주 모두 그람 음성균이고 운동성이 있는 통성 혐기성 균주이며, catalase 활성이 강하게 나타났다. 이상의 결과로부터 strain 1901과 1902는 *S. marcescens*로 확인되었다.

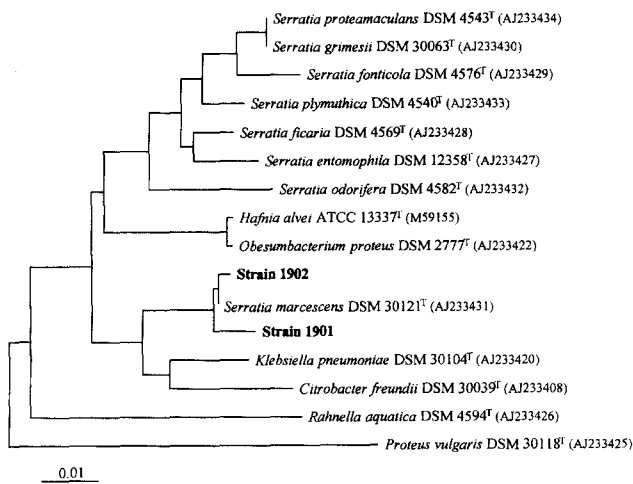
Strain 1401은 염기서열이 결정된 521 bp상에서 *Pseudomonas putida*, *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*와 99%의 상동성을 보였다 (Table 1). Strain 1401은 그람 음성균이고, 호기성 균주이며, 운

**Table 1.** Identification of BPA-degrading bacteria by the partial sequencing of 16S rDNA

Selected strain	Close strain (Accession No.) <sup>1</sup>	Similarity (%) <sup>2</sup>	Length of sequenced 16S rDNA (bp)
1901	<i>Serratia marcescens</i> (AB061685)	99	527
1902	<i>Serratia marcescens</i> (AB061685)	99	527
1401	<i>Pseudomonas putida</i> (AF291048)	99	521
	<i>Pseudomonas monteilii</i> (AF064458)		
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (AB009457)		

<sup>1</sup>Accession numbers are available in GenBank database.

<sup>2</sup>Similarity was obtained from the BLAST search.



**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on partial-16S rDNA sequences. The phylogenetic tree shows the positions of strains 1901, 1902, the type strains of some *Serratia* species, and some other related taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Superscript T means the type strain.

동성이 있는 균으로서 크기는 0.7-1.0×1.8-3.0 μm이었다 (Table 3). KCN이 포함된 배지와 MacConkey agar에서 생육을 보였고, catalase와 oxidase활성을 나타내었으며, citrate를 이용하였으나 urea, gelatin, aesculin 분해능은 없었다. 그 밖의 생리학적 시험 결과로부터 strain 1401은 *P. putida*와 가장 유사한 특성을 가지고 있는 것으로 확인이 되어 *P. putida*로 동정되었다.

지금까지 보고된 BPA 분해미생물은 Lobos 등(16)이 신규주로 분리한 그람 음성의 호기성 세균인 MV1 균주와 Hirano 등(13)의 *Pleurotus ostreatus*인 진균이 있다. 이외에 *Trametes villosa*의 laccase에 의한 BPA 분해도 보고된 바 있다(9).

**선별된 BPA 분해미생물의 분해특성**

BPA 분해미생물로서 최종 선별되어 동정된 3 균주(S.

**Table 2.** Morphological and physiological properties of the strains 1901 and 1902

Characteristics	Strain 1901	Strain 1902	<i>Serratia marcescens</i>
<b>Morphological</b>			
Gram stain	-	-	-
Shape	R	R	R
Width of rod (μm)	0.4-0.6	0.3-0.6	
Length of rod (μm)	0.7-1.1	0.6-1.0	
Motility	+	w	d
<b>Cultural</b>			
Growth in air	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	+
Growth in KCN medium	+	w	+
<b>Physiological</b>			
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Glucose (acid)	+	+	+
OF	F	F	F
<b>Carbohydrates, acid from</b>			
glucose	+	+	+
lactose	-	-	-
maltose	+	-	+
mannitol	+	-	+
raffinose	-	-	-
sucrose	+	-	+
xylose	-	-	d
rhamnose	-	-	-
sorbitol	+	-	+
trehalose	+	-	+
adonitol	+	-	d
arabinose	+	-	-
dulcitol	-	-	-
glycerol	+	-	+
inositol	+	-	d
Utilization of citrate	+	+	+
Aesculin hydrolysis	+	-	d
Indole	-	-	-
Hydrolysis of gelatin	+	+	+
Urease	-	+	w/-
Arginine dihydrolisis	d	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
MR	-	-	d
VP	+	+	+

d: different reaction in different strains

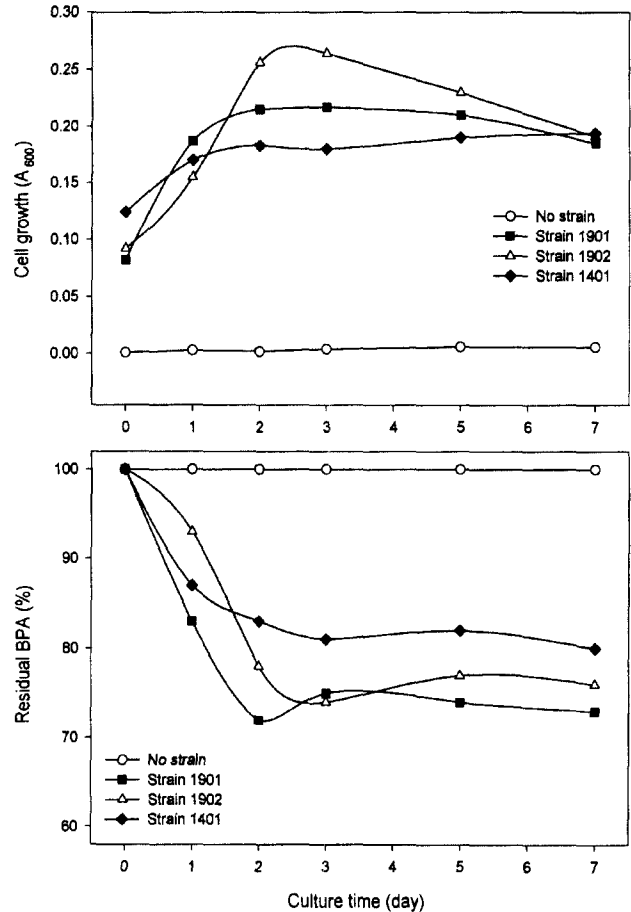
O: oxidation, F: fermentation, w: weak reaction

**Table 3.** Morphological and physiological properties of the selected strain 1401

Characteristics	Strain 1401	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>Morphological</b>		
Gram stain	-	-
Shape	R	R
Width of rod ( $\mu\text{m}$ )	0.7-1.0	0.8-1.1
Length of rod ( $\mu\text{m}$ )	1.8-3.0	2.0-4.0
Motility	+	+
<b>Cultural</b>		
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	w	+
Growth in KCN medium	+	+
Growth on MacConkey agar	+	+
Growth at 42°C	w	-
<b>Physiological</b>		
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Glucose (acid)	+	+
OF	O	O
Pigmentation	+	+
<b>Carbohydrates, acid from</b>		
glucose	+	+
lactose	-	-
sucrose	-	-
xylose	-	d
Utilization of citrate	+	+
Aesculin hydrolysis	-	-
Indole	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-
Urease	-	-
Nitrate reduction	w	d

d: different reaction in different strains  
 O: oxidation, F: fermentation, w: weak reaction

*marcescens* 1901, *S. marcescens* 1902, *P. putida* 1401)를 BPA가 100 mg/l 혹은 500 mg/l의 농도로 포함된 PAV 배지에서 균체성장과 BPA 분해정도를 시간대별로 측정하여 BPA 분해특성을 조사하였다. BPA 농도 100 mg/l에서 배양했을 경우(Fig. 4), 3종의 균주 중 *S. marcescens* 1902의 균체생장이 우수하였으며, 3균주 모두 배양 3일 이후에는 BPA의 분해가 거의 이루어지지 않는 것으로 관찰되었다. *S. marcescens* 1901의 경우 배양 2일 후 BPA가 약 30% 분해되었고, 이후 7일까지 배양한 결과 분해율이 향상되지 않았으며, 균체성장도 배양 2일 이내에 완료되는 것으로 관찰되었다. *P. putida* 1401과 *S. marcescens* 1901의 경우는



**Fig. 4.** Biodegradation of BPA by the selected strains. Strains were cultured with shaking in the PAV medium containing 100 mg/l of BPA at 30°C and 130 rpm for 7 days.

배양 3일째에 BPA 분해효율이 20-25%로 나타났으며, 그 후 별 다른 BPA의 감소는 관찰되지 않았다. 결론적으로 BPA농도 100 mg/l에서 *S. marcescens* 1901의 BPA 분해능이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

고농도(500 mg/l)의 BPA에서 배양했을 경우(Fig. 5), BPA 농도 100 mg/l의 경우와는 달리 배양 2일까지 균체성장의 lag phase가 확연히 관찰되었으며, 또한 BPA 분해도 배양 2일 후에 급격히 이루어지는 것으로 나타났다. *P. putida* 1401의 균체생장은 OD<sub>600</sub>가 0.6 정도로 다른 2종의 균주보다 상당히 우수하였으며, *S. marcescens* 1901의 경우 OD<sub>600</sub>이 0.2 정도로 BPA 100 mg/l에서 배양했을 때와 큰 차이가 없었다. BPA 분해능의 경우 *S. marcescens* 1901이 약 20%의 낮은 BPA 분해효율을 보이는 반면, *P. putida* 1401과 *S. marcescens* 1902는 배양 3일만에 약 40%의 BPA 분해효율을 나타내었다. 즉, *P. putida* 1401과 *S. marcescens* 1902의 경우, 저농도보다 고농도(500 mg/l)에서 BPA 분해효율이 2배 정도 우수한 것으로 나타났다.

**혼합배양을 이용한 BPA의 분해**

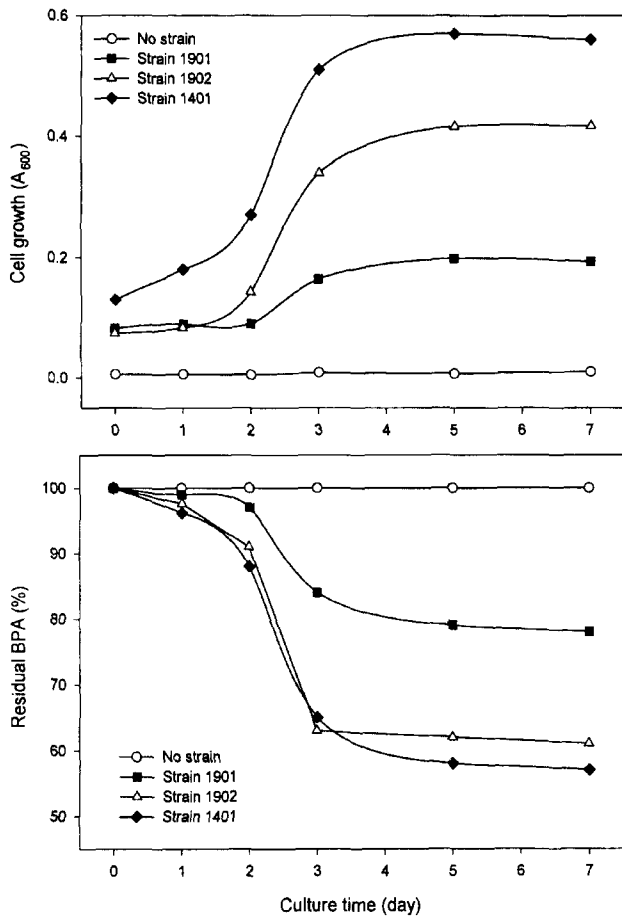


Fig. 5. Biodegradation of BPA by the selected strains. Strains were cultured with shaking in the PAV medium containing 500 mg/l of BPA at 30°C and 130 rpm for 7 days.

최종 선별된 3 균주의 BPA에 대한 분해특성을 조사한 결과, 각 균주들마다 저농도 혹은 고농도의 BPA를 보다 효율적으로 분해하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, 이들 3 균주들을 독립적으로 BPA 분해실험에 적용하는 것보다 혼합하여 배양하는 경우가 보다 좋은 BPA 분해효율을 나타낼 것으로 생각되어 혼합 배양에 의한 BPA 분해실험을 수행하였다. 균주의 혼합배양은 선별된 3종의 균주를 1901+1902, 1901+1401, 1902+1401, 1901+1902+1401의 조합으로 혼합 배양하였으며, 3균주를 순수 배양하여 BPA 분해능을 비교·조사하였다(Fig. 6). 혼합배양의 실험구 중에서는 100 mg/l BPA 농도의 경우, *S. marcescens* 1901과 *S. marcescens* 1902를 혼합배양 했을 때가 분해효율이 가장 높았고, 500 mg/l BPA 농도의 경우는 *S. marcescens* 1902와 *P. putida* 1401로 혼합배양한 실험구가 가장 높은 분해효율을 나타냈다. 그러나, 순수배양을 통한 BPA 분해실험에 비해 BPA 분해효율은 크게 향상되지 않았으며, 선별된 3균주의 순수배양과 혼합배양에 의한 BPA 분해효율을 비교한 결과, 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Tsutsumi 등(24)은 BPA 40 mg/l에 산화적 촉매를 이용하여 반

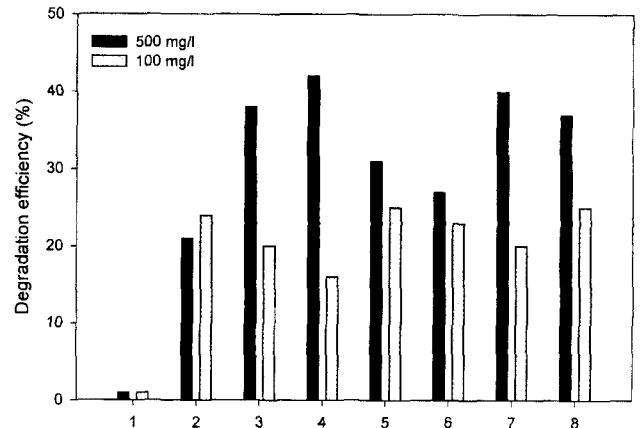


Fig. 6. Biodegradation of BPA by mixed culture of the selected strains. Strains were cultured in the PAV medium containing 100 or 500 mg/l of BPA at 30°C and 130 rpm for 5 days. 1, No strain; 2, strain 1901; 3, strain 1902; 4, strain 1401; 5, strain 1901+1902; 6, strain 1901+1401; 7, strain 1902+1401; 8, strain 1901+1902+1401.

응시킨 결과, 1시간 내에 100% 제거효율을 나타내었다고 보고하였다. Ohko 등(18)은 광촉매를 이용하여 40 mg/l의 BPA를 20시간안에 완전히 분해하였다. 그러나, BPA 40 mg/l라는 저농도에서 실험을 수행하였다는 점과 생물학적 분해가 아닌 화학적 반응에 의한 분해를 의미하는 것으로, 본 연구에서 선별된 미생물에 의해 BPA의 생분해와는 다른 것으로 생각된다. Hirano 등(13)은 *Pleurotus ostreatus*가 0.4 mM (91.3 mg/l)의 BPA를 12일 동안 약 80% 분해한다고 보고하였고, Lobos 등(16)은 분리균주 MV1의 경우 균체농도를 1.0 이상으로 하여 8시간 배양한 결과, 270 mg/l 농도의 BPA를 80-90%까지 분해한다고 보고하였다. 이 결과와 비교하여 볼 때 본 연구에서 선별한 균주의 분해능이 상대적으로 낮다고 볼 수 있으나, 균주 MV1의 경우 탄소원으로 BPA 첨가방법(BPA농도를 270 mg/l로 유지시킴)에서 본 연구의 방법(500 mg/l의 BPA첨가)과 차이를 나타내고 있으며, 초기 접종한 균체의 농도가 본 연구와 비교해서 10배 정도 높기 때문에 BPA 분해능 결과에 차이가 있다고 말할 수 있다.

본 연구에서 선별된 균주는 500 mg/l의 BPA를 3일만에 최대 40%까지 분해할 수 있으며, 500 mg/l라는 고농도의 BPA를 단일 탄소원으로 이용한다는 점에서 의미가 있고, BPA에 적응시킨 균주의 접종량을 증가시키면 보다 향상된 BPA 분해가 이루어질 것이라 생각한다. 이상의 결과로부터 본 연구에서 선별된 BPA 분해세균은 BPA 오염수역 및 토양의 bioremediation에 적용이 가능할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- Alexander, H.C., D.C. Dill, L.W. Smith, P. Guiney, and P. Dorn. 1998. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 19-26.
- Atkins, A. and D. Roy. 1995. *In vitro* conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s).

- Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 424-433.
3. Ausubel, F.A., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman, and K. Struhl. 1988. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
  4. Biles, J.E., T.P. McNeal, T.H. Begley, and H.C. Hollifield. 1997. Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3541-3544.
  5. Cowan, S.T. 1974. Manual for the identification of medical bacteria, 2nd ed. Cambridge Univ. Press, London.
  6. Dehaud, H., C. Ravard, F. Claustrat, and M. Pungent. 1999. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG)<sup>†</sup>. *Steroids* 64, 328-334.
  7. Dorn, P.B., C.S. Chou, and J.J. Gentempo. 1987. Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* 16, 1501-1507.
  8. Fournier, J., G. Williams, and P.A. Holmes. 1997. Dielectric properties during free-radical bulk polymerization: visible lighting-induced polymerization of bisphenol-A bis (2-hydroxyethyl ether) dimethacrylate. *Macromolecules* 30, 2042-2051.
  9. Fukuda, T., H. Uchida, Y. Takashima, T. Uwajima, T. Kawabata, and M. Suzuki. 2001. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 704-706.
  10. Fürhacker, M., S. Scharf, and H. Weber. 2000. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* 41, 751-756.
  11. Gaido, K.W., L.S. Leonard, S. Lovell, J.C. Gould, D. Babai, C.J. Portier, and D.P. McDonnell. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharm.* 143, 205-212.
  12. Gilardi, G.L., S. Hirschi, and M. Mandel. 1975. Characteristics of yellow-pigmented nonfermentative bacilli (groups VE-1 and VE-2) encountered in clinical bacteriology. *J. Clin. Microbiol.* 1, 384-389.
  13. Hirano, T., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1958-1962.
  14. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology (vol 1), Williams and Wilkins, Baltimore.
  15. Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, and D. Feldman. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279-2286.
  16. Lobos, J.H., T.K. Leib, and T.M. Su. 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1823-1831.
  17. Morrissey, R.E., J.D. George, C.J. Price, R.W. Tyl, M.C. Marr, and C.A. Kimmel. 1987. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 8, 571-582.
  18. Ohko, Y., I. Ando, C. Niwa, T. Tatsuma, T. Yamamura, T. Nakashima, Y. Kubota, and A. Fujishima. 2001. Degradation of bisphenol A in water by TiO<sub>2</sub> photocatalyst. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2365-2368.
  19. Reel, J., J. George, A. Lawton, and C. Meyeers. 1997. Bisphenol A. *Environ. Health Persp.* 105, 273-374.
  20. Ronen, Z. and A. Abeliovich. 2000. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2372-2377.
  21. Schmalz, G., A. Preiss, and D. Arenholt-Bindslev. 1999. Bisphenol A content of resin monomers and related degradation products. *Clin. Oral. Invest.* 3, 114-119.
  22. Spivack, J., T.K. Leib, and J.H. Lobos. 1994. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. *J. Biol. Chem.* 269, 7323-7329.
  23. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
  24. Tsutsumi, Y., T. Haneda, and T. Nishida. 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42, 271-276.
  25. US EPA (U. S. Environmental Protection Agency). 1985. Bisphenol A: Proposed test rule. *Federal Register* 50, 20691-20730.
  26. Xu, Y.P., G.L. Huang, and Y.T. Yu. 1995. Kinetics of phenolic polymerization catalyzed by peroxidase in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 117-119.

(Received July 23, 2001/Accepted September 3, 2001)

---

**ABSTRACT: Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Degrading Bisphenol A**

**Hee-Sik Kim, Young-Ki Lee, Wan-Seok Lee, Chan-Sun Park, Byung-Dae Yoon, and Hee-Mock Oh\*** (Biomolecular Process Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong, Taejeon 305-333, Korea)

Eighty-seven microbial strains capable of growing on bisphenol A (BPA) as a sole carbon source were isolated from soils, waste waters and sludges. Among them, three bacterial strains were finally selected as potential decomposers through measuring BPA-degradation efficiency by HPLC analysis. Two of these bacterial strains were identified as *Serratia marcescens* 1901 and *S. marcescens* 1902, and another was *Pseudomonas putida* 1401 by 16S rDNA partial sequences and based on morphological and physiological properties. They showed higher cell growth and BPA degradation in PAV (PAS medium containing vitamin mixtures) than in PAS medium. The degradation efficiencies of these bacterial strains were within a range of 20-40% in the PAV containing 500 mg/l or 100 mg/l of BPA for 3 days. *S. marcescens* 1901 showed higher degradation efficiency at 100 mg/l of BPA than those of other selected strains, while *S. marcescens* 1902 and *P. putida* 1401 degraded a high concentration of BPA (500 mg/l) with a degradation efficiency of 40% for 3 days. The BPA degradation using a mixed culture of three selected strains showed the similar level of degradation efficiency with that using a pure culture.