

악취제거용 균주의 분리 및 특성

¹정귀택 · ^{1,6}이광연 · ¹이경민 · ¹이혜진 · ^{1,2}류화원 · ^{1,2}김도만
²조성호 · ⁷김시욱 · ⁸차진명 · ⁸장영선 · †^{1,2,3,4,5}박돈희
전남대학교 ¹생명과학기술학부, ²응용화학공학부, ³촉매연구소, ⁴생물공학연구소, ⁵생물산업기술연구소
⁶동아인제대학 안광학과, ⁷조선대학교 환경공학과, ⁸비앤이테크(주)
(접수 : 2005. 2. 22., 게재승인 : 2005. 9. 28.)

Isolation and Characterization of Odor Treatment Bacteria

Gwi-Taek Jeong^{1,†}, Gwang-Yeon Lee^{1,6,†}, Kyoung-Min Lee¹, Hye-Jin Lee¹, Hwa-Won Ryu^{1,2}, Doman Kim^{1,2},
Sung-Hyo Chough², Si-Wouk Kim⁷, Jin-Myoung Cha⁸, Young-Seon Jang⁸, and Don-Hee Park^{1,2,3,4,5,†}

¹School of Biological Sciences and Technology, ²Faculty of Applied Chemical Engineering,
³Research Institute for Catalysis, ⁴Biotechnology Research Institute, ⁵Institute of Bioindustrial Technology,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
⁶Department of Ophthalmic Optics, Dong-A College, Jeonnam 526-872, Korea
⁷Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
⁸B & E Tech Co., Ltd., Jeonnam 519-831, Korea
(Received : 2005. 2. 22., Accepted : 2005. 9. 28.)

The microorganism for odor gas removal was isolated from sewage and contaminated soil. This was characterized as *Pseudomonas* sp. TKC by morphological, biochemical/physiological, and cultural characteristics analysis of the isolates. The optimum conditions for isolates growth were as follows; substrate concentration 500 ppm, initial medium pH 7.0, incubation temperature 30°C, agitation speed 150 rpm, and MSM medium containing 3 g/L (NH₄)₂SO₄.

Key Words : *Pseudomonas* sp., biological treatment, odor removal

서 론

미생물을 이용한 악취가스 분해는 호기성 분해와 혐기성 분해로 나뉘는데, 일반적으로 톨루엔을 비롯한 악취가스 이용 균주는 산소를 전자 수용체로 사용하는 호기성 분해가 대부분이며, 이 경우 분해효율도 높다는 장점을 가진다. 이러한 필요에 의해 악취가스를 분해하는 미생물이 분리되어, 현재 30개속 100여종의 균주가 보고되고 있다(1~3). 이들 균주는 주로 *Pseudomonas putida*와 같은 *Pseudomonas* 속이 많으며, 간혹 *Mycobacterium*과 같은 다른 속의 미생물이 보고된 적도 있다. 한편, *Phanerochaete chrysosporium*과 같은 곰팡이들이 악취가스를 포함한 몇몇 방향족 화합물을 분해

한다는 연구가 보고 된 바 있으나, 이는 매우 낮은 기질농도를 대상으로 한 것이었다(4, 5). 이들 대부분의 미생물들은 제한된 종류의 화합물만을 분해할 수 있으며, 일정한 기질 농도이상에서는 분해 활성과 균체 증식의 저하가 일어난다. 그러나 다양한 화합물을 동시에 처리할 수 있는 효율적인 대사 활동을 가지는 미생물은 지금까지 보고된 적이 없어, 톨루엔을 비롯한 악취가스의 생물학적 처리를 위해서는 각각의 악취가스에 활성을 갖는 미생물들에 의한 혼합 배양에 요구되며, 혼합 배양시 조합을 이루는 균주들에 대한 이해를 필요로 한다(6, 7).

따라서 혼합 배양에 투입되는 미생물의 선택이 악취가스의 분해에 중요한 역할을 수행하게 된다. 그 동안 수행되어 온 미생물학적 연구를 살펴보면 1차적으로 단일 균주의 분리 및 특성 조사, 또는 분리한 균주의 플라스미드 분리 및 유전자 조작에 의한 균주 개량, 분해 경로의 규명 및 효소의 정제를 비롯하여 지방산 분석을 통한 내성 기작과 같은 생리적 연구가 주를 이루었다(8, 9).

바이오필터나 생물반응기 분야에서는 토착 미생물균이나 우수 균주 1~2종을 사용하여 악취를 분해한 많은 연구

The first two authors contributed equally to this work.

† Corresponding Author : School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1841, Fax : +82-62-530-1849

E-mail : dhpark@chonnam.ac.kr

가 되어왔으나, 이는 대부분 수학적 모델링이나 반응기 가동에 대한 공학적 접근이 대부분으로, 미생물은 도구적 역할을 수행할 뿐, 투입된 미생물군 내부를 조사한 생물, 생태학적 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다(10, 11).

이렇듯 생물학적 관점으로 접근한 혼합 배양에 있어서도, 균주의 선택에 있어 기질 이용성을 중심으로 하여 우수한 균주 1-2종을 혼합 배양하거나, 혹은 토착 미생물에 우수한 균주를 첨가하는데 실제 미생물군을 이루는 각 균주의 특징이나, 우점의 조건에 대한 연구 및 각 균주간의 상호관계에 대한 규명은 거의 이루어지지 못한 실정이다. 또한 분리나 유전적 개량에 의해 선별된 기질 이용능이 우수한 균들이 실제 혼합 미생물 군에 첨가되었을 때, 기존의 미생물 군과의 경쟁 및 자연환경의 변화에 적응하지 못하여 사라져 가는 경우가 많았으며, 실제 생물반응기에 적용시킬 혼합 미생물군의 특성 및 그러한 조합에서 우점을 차지하는 미생물군의 특성에 대한 규명을 필요로 한다.

본 연구에서는 악취가스를 제거할 수 있는 미생물을 자연계에서 분리하여 균주의 특성을 밝히며, 우수한 균주를 선별하여 여러 생화학적 특성과 균주 성장 특성을 조사하고 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배지조성

악취 분해 균주를 분리하기 위하여 광주시 소재 전자공장 등의 하천 및 주변토양 및 울산, 온산, 여천 공업단지의 오염토양 및 슬러지 등으로부터 분리한 균주들 중 악취의 분해능이 우수한 균주들을 선별하여 각각 단일 배양 후 다시 혼합 배양을 병행하여 각 악취별 3종의 접종 균주를 선별하였다.

균주의 분리와 분해활성 측정에 사용한 배지로는 Minimal Salt Medium (MSM : KH_2PO_4 1.50 g/l, Na_2HPO_4 6.00 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.00 g/l, MgSO_4 0.05 g/l, CaCl_2 0.01 g/l; pH 7.0)을 사용하였으며, 분리한 균주의 보존에는 영양한천배지 (beef extract 3.00 g/l, peptone 5.00 g/l, agar 15.0 g/l)를 사용하였다. 벤젠, 톨루엔 및 자일렌을 비롯한 각종 시약은 시약급을 사용하였다.

악취 분해 균주의 분리는 MSM 액체 배지 50 ml가 들어 있는 300 ml 삼각플라스크에 유일한 탄소원 및 에너지원으로 벤젠, 톨루엔 및 자일렌 성분을 초기 농도를 500 ppm으로 각각 첨가한 후, 혼합 균주 5%를 넣고 잘 혼합하여 30°C, 150 rpm에서 진탕 배양하였다. 이러한 방법으로 3회 계대 배양을 반복한 후, 배양액을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하여 영양한천 평판배지에 0.1 ml를 도말하여 다시 30°C에서 배양하였다. 영양한천 평판배지로부터 서로 다른 콜로니를 순수분리한 후 영양한천 사면 배지에 증식시켜 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

분리균주의 동정

위에서 순수 분리한 균주를 "Manual of Methods for

General Bacteriology"와 "The prokaryotes"에 따라 분리 균주의 형태, 생리 및 생화학적 특성을 검토한 후, "Bergey's Manual"에 의해 동정하였다.

분리 균주의 최적 배양 조건

500 ppm의 3가지 성분이 첨가된 MSM 배지에 분리 균주를 접종하고 아래와 같이 배양 조건을 달리하여 150 rpm에서 배양하였다. 배양조건은 초기 pH (pH 5, 6, 7, 8, 9), 배양온도 (20, 25, 30, 35, 40°C), 초기 기질의 농도 (250, 500, 1,000, 2,000 ppm), 질소원의 종류 (diammonium sulfate, ammonium chloride, urea, potassium nitrate, ammonium acetate; 각각 3 g/l), 질소원의 농도 (1.0, 3.0, 6.0, 9.0 g/l), 그리고 탄소원의 종류 (glucose, sodium acetate; 2.0 g/l)의 조건을 달리하여 최적배양 조건을 조사하였다.

분석방법

균주의 성장은 배양시간 경과에 따라 일정량의 배지 시료를 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 선별

MSM 액체배지에 유일한 탄소원 및 에너지원으로 벤젠, 톨루엔, 자일렌의 3가지 성분을 초기 농도를 500 ppm으로 하여 각각 첨가한 후, 혼합 균주시료 5%를 접종하여, 30°C, 150rpm으로 진탕 배양하였다. Benzene, toluene, xylene 이 첨가된 배지에서 자란 균주액을 희석하여 nutrient 평판 배지에 도말하여 다시 30°C에서 배양하고, 다시 nutrient agar 평판 배지로부터 서로 다른 콜로니를 순수 분리한 결과, 9개의 집락을 분리하였다. 이들을 각 분리원별로 일련 번호를 붙여 4°C에서 계대 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. Morphological characteristics of the isolates

Microorganisms	Colony size (cm)	Colony color	Colony margin	Gram staining	Shape	
Benzene	BKA	0.30	Yellow	Circular	-	Rod
	BKB	0.25	Yellow	Circular	-	Rod
	BKC	0.20	Yellow	Circular	-	Rod
Toluene	TKA	0.60	Cream	Circular	+	Rod
	TKB	0.45	Yellow	Irregular	-	Rod
	TKC	0.40	Yellow	Irregular	-	Rod
Xylene	XKA	0.50	Yellow	Circular	+	Rod
	XKB	0.30	Yellow	Circular	-	Rod
	XKC	0.20	Yellow	Circular	-	Rod

균주의 동정

분리된 균주는 총 9개 균주 (BKA, BKB, BKC, TKA, TKB, TKC, XKA, XKB, XKC)이었다. TKA는 고체배지에서 크림색의 집락을 형성하고, 나머지 8종 (BKA, BKB, BKC, TKB, TKC, XKA, XKB, XKC)은 노란색의 집락을 형성하는 배양학적 특성을 나타내었다. 형태학적 특성을 보면 모든 균주가 간균이었다. 또한 9종 중에 그람 양성균이 2종

(TKA, XKA), 그랩 음성균이 7종 (BKA, BKB, BKC, TKB, TKC, XKB, XKC)으로 조사되었다(Table 1).

카타라제와 옥시다제 시험에서는 모두 양성반응을 나타냈으며, 운동성 시험에서도 모두 양성반응을 나타내었다. 카제인 분해 시험에서도 모두 양성반응을 보였으며, TKB, TKC를 제외한 7종 (BKA, BKB, BKC, TKA, XKA, XKB, XKC)은 혐기성 상태에서도 성장하였다(Table 2).

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of the isolates

Characteristics	Benzene			Toluene			Xylene		
	BKA	BKB	BKC	TKA	TKB	TKC	XKA	XKB	XKC
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	++	++	++	+++	-	-	+++	++	+
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degradation of tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of casein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of starch	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Lipase test	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Citrate utilization	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Urea hydrolysis	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Denitrification	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tyrosine 가수분해 시험에서는 9종류 모두 음성반응을 나타내었으며, 전분 가수분해 시험에서는 5종류 (BKA, BKB, BKC, TKB, TKC)의 균주가 음성반응을 나타내었고, 또한 9종류 모두 citrate를 이용하지 못하였다. Urea 가수분해 시험에서는 9종류 모두 음성반응을 보였으며, 탈질소화 시험에서는 9종류가 양성반응 나타내었다.

Table 3. Cultural characteristics of the isolates

Culture Conditions	Benzene			Toluene			Xylene		
	BKA	BKB	BKC	TKA	TKB	TKC	XKA	XKB	XKC
2% NaCl	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	++
5% NaCl	++	++	+	+	-	-	++	+	+
7% NaCl	+	+	-	+	-	-	+	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20°C	++	++	++	+++	-	-	+++	+	-
30°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40°C	++	++	++	+++	++	++	+++	++	+
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : no growth, + : poor growth, ++ : moderate growth, +++ : good growth

식염의 영향을 볼 때, 10% NaCl 첨가배지에서는 15종류 모두 성장하지 않았다. 7% NaCl이 첨가된 경우에는 BKA, BKB, TKA, XKA 만이 생육이 가능하였으며, 5% NaCl의 배지에서는 BKA, BKB, BKC, TKA, XKA, XKB, XKC 만이 성장 가능하였다(Table 3).

생육온도 시험에서는 Table 3에 나타나 있듯이, 저온인 5°C와 10°C, 그리고 고온인 50°C에서는 모든 종류에서 성장하지 않았다. 또한 20°C에서는 TKB, TKC, XKC 만이 성장하지 않았으며, 9종 모두 30°C와 40°C에서 모두 생육이 가능하였다.

분리 균주를 유일한 탄소원으로 500 ppm의 첨가한 MSM 배지에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 72시간 동안 배양한 결과, 증식이 우수한 균주 1종 (TKC)을 선발하였다. 결론적으로 TKC는 *Pseudomonas* sp.로 동정되었으며, 이를 *Pseudomonas* sp. TKC로 명명하였다.

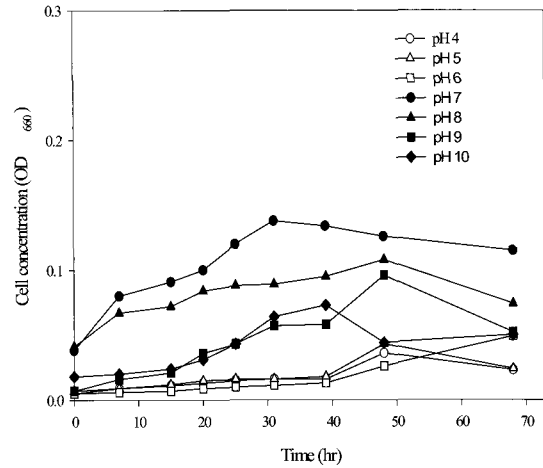


Figure 1. Effect of initial pH on the growth of *Pseudomonas* sp. TKC.

분리 균주의 최적 배양 조건

선별한 *Pseudomonas* sp. TKC의 최적 배양조건을 탐색하기 위하여 초기 pH, 배양온도, 초기 기질의 농도, 질소원의 종류 및 농도, 그리고 탄소원의 종류를 조사하였다. 균주들의 생육에 대한 최적 pH를 구하기 위하여 MSM 배지에 pH 범위를 4~10으로 조절하여 500 ppm의 기질 성분을 첨가한 후 30°C에서 68시간 동안 배양하여 얻은 최적 초기 pH의 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서와 같이 pH가 낮은 4~5에서는 균의 성장률이 낮았으며, pH 7~8의 중성 영역에서 가장 높은 균 성장률을 나타내었다. 또한 최적 pH로는 *Pseudomonas* sp. TKC는 pH 7임을 알 수 있었다.

분리 균주의 배양 온도에 따른 균의 생육도의 영향을 조사하기 위하여 BSM 배지에 최적 pH로 조절한 후, 500 ppm의 기질성분을 첨가하여 배양온도 20, 25, 30, 35, 40°C에서 68시간 동안 배양하여 얻은 결과, 30°C에서 최적의 성장을 나타내었다(data not shown).

초기 기질 농도에 따른 균주의 성장 조건은 pH 7로 조절된 MSM 배지에 균주를 접종하여 기질 성분의 초기 농도를 각각 250, 500, 1,000, 2,000 ppm으로 첨가하여 최적 온도 30°C에서 68시간 동안 배양한 후, 균의 증식을 측정 한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 또한 Fig. 3에 희분배양시의 농도변화에 따른 비성장속도 μ_{max} 을 구하여 나타내었다. Fig. 2와 3에 보이듯이 500 ppm 이상의 농도는 균주의 성장에 저해작용을 하는 것으로 나타났다. *Pseudomonas* sp. TKC의 최대 비성장 속도 μ_{max} 은 0.0181 hr⁻¹로 나타났다. 기질의 농도는 미생물의 성장에 많은 영향을 미치는데, 대사 과정에서 보면 필요 이상의 물질은 요소생산에 저해되고 또한 효소의 되먹임저해 등을 통해 기질이 필요 이상으로 대사되는 것을 막는다고 알려져 있다.

균의 생육에 미치는 질소원 종류의 영향을 조사하기 위

하여 MSM배지에 사용된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 대신에 NH_4Cl , urea, KNO_3 , ammonium acetate를 각각 3 g/l씩 첨가하고 pH 7로 조절한 후, 균주를 접종하여 기질 성분을 500 ppm의 농도로 첨가하여 최적 온도 30°C에서 68시간 동안 배양한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

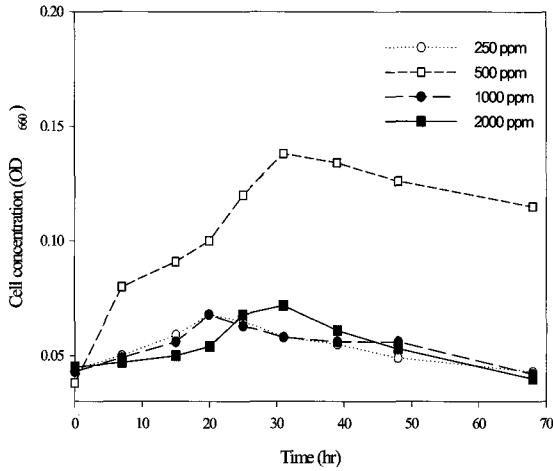


Figure 2. Effect of odor concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. TKC.

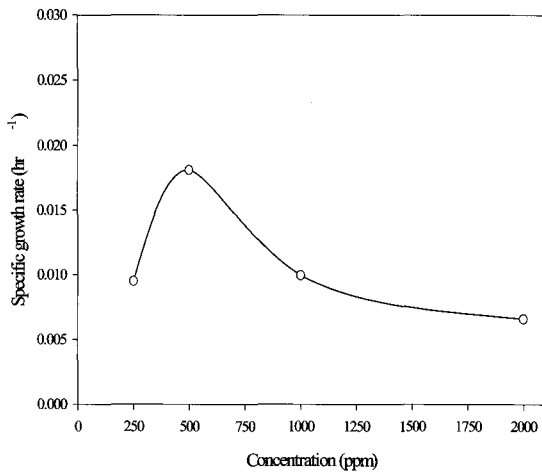


Figure 3. Effect of odor concentration on the specific growth of *Pseudomonas* sp. TKC.

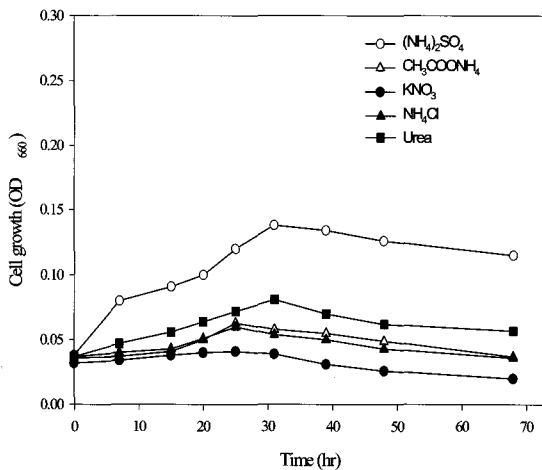


Figure 4. Effect of nitrogen sources on the growth of *Pseudomonas* sp. TKC.

분리 균주는 MSM 배지에 포함된 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea를 공급한 경우 성장률이 좋았으며, KNO_3 를 공급한 경우 성장이 저조하였다. 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가한 경우에서 다른 질소원에 비하여 가장 우수한 결과를 나타내었다.

MSM 배지에 앞의 질소원의 종류 실험에서 얻은 최적 질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도에 따라 각각 1.0, 3.0, 6.0, 9.0 g/l이 되게 첨가하고, pH 7로 조절한 후, 균주를 접종하여 500 ppm의 기질 성분을 첨가하여 최적 온도 30°C에서 68시간 동안 배양한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 나타낸 것처럼 배지에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/l을 첨가하였을 때, 균주의 성장률이 가장 우수하였다.

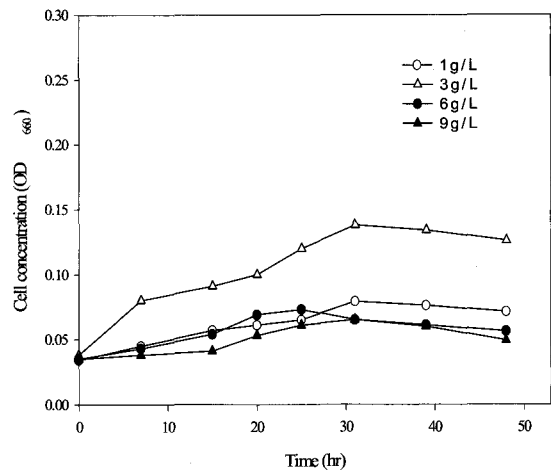


Figure 5. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. TKC.

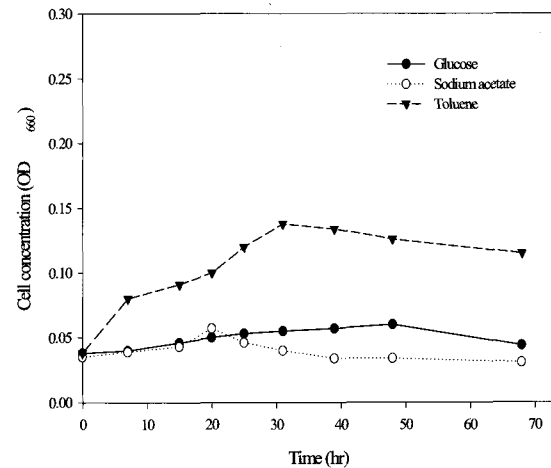


Figure 6. Effect of carbon sources on the growth of *Pseudomonas* sp. TKC.

탄소원의 종류가 균주의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MSM 배지에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 질소원으로 고정시키고, 탄소원으로는 glucose, toluene, sodium citrate를 각각 2.0 g/l를 넣고 pH 7로 조절한 후, 균주를 접종하여 배양온도 30°C에서 68시간 동안 배양한 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

에너지원 성분 외 다른 탄소원을 첨가하였을 경우 균주들이 에너지원 대신 첨가한 탄소원들을 이용하여 일부 성

장하였으나, Fig. 6에서 나타난 것과 같이 탄소원으로 VOCs 성분을 첨가한 경우가 가장 우수한 성장률을 나타내었다

앞의 실험의 결과로부터 *Pseudomonas* sp. TKC의 최적 배양 조건은 초기 기질 농도 500 ppm, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/l인 배지에서 초기 pH 7.0, 배양온도 30°C를 분리균주의 최적 배양 조건으로 설정하였다.

요 약

본 연구에서는 악취 분해 균주를 분리하기 위하여 광주 시 소재 전자공장 등의 하천 및 주변토양 및 울산, 온산, 여천 공업단지의 오염토양 및 슬러지 등으로부터 분리한 균주들 중 악취제거용 균주를 *Pseudomonas* sp. TKC를 분리·동정하였다. 분리 균주의 증식의 최적조건은 초기 기질농도 500 ppm, 배양온도 30°C, 초기 pH 7, 혼합속도 150 rpm, 그리고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/l를 포함하는 MSM 배지로 설정하였다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 지역 석·박사 연구인력 양성 사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Wani, A. H., R. M. R. Branion, and A. K. Lau (1997), Biofiltration: A promising and cost-effective control technology for odors, VOCs, and air toxics **A32**, 2027-2055.
2. Devinny, J. S., M. A. Deshusses, and T. S. Webster (1999), Biofiltration for Air Pollution Control, Lewis Publishers, New York.
3. Jorio, H., K. Kiared, R. Brzezinski, A. Leroux, G. Viel, and M. Heitz (1998), Treatment of air polluted with high concentrations of toluene and xylene in a pilot-scale biofilter, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **73**, 183-196.
4. De Castro, A., D. G. G. Allen, and R. R. Fulthorpe (1996), Characterization of the microbial population during biofiltration and the influence of the inoculum source, In Proceedings of the 1996 Conference on Biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Reynolds, F. E., Ed., The Reynolds Group, Tustin, Ca, pp164.
5. Mallakin, A. And O. P. Ward (1996), Degradation of BTEX compounds in liquid media and in peat biofilter, *J. Indust. Microbiol.* **16**, 309-318.
6. Rombaut, G., G. Suantika, N. Boon, S. Maertens, P. Dhert, E. Top, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2001), Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures, *Aquaculture* **198**, 237-252.
7. Cohen, Y. (2001), Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review, *Biores. Technol.* **77**, 257-274.
8. Effect of composting rate on emitted odor, *J. Jap. Soc. Waste* **10**, 9-15.
9. Wright, W. F., E. D. Schroeder, D. P. Y. Chang, and K. Romstad (1997), Performance of a pilot-scale compost biofilter treating gasoline vapor, *J. Environ. Eng.* **123**, 547-555.
10. Shim, H. and S. T. Yang (1999), Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by an coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor, *J. Biotechnol.* **67**, 99-112.
11. Lu, C., M. R. Lin, and C. Chu (1999), Temperature effects of trickle bed biofilter for treating BTEX vapors, *J. Environ. Eng.* **125**, 775-779.