

Biodegradation of the Organic Solvents by an Isolated *Pseudomonas* sp.
BCNU 154

김미림, 정미연, 성은미¹, 이호원¹, 이영근², 김용근³, 박정욱⁴, 주우홍@
창원대학교 생물학과, 경남대학교 생명과학부¹, 밀양대학교 식품과학과², 생물공학과³,
창원대학교 유전공학연구소⁴
전화 (0551) 279-7443, 팩스 (0551) 279-8212

A strain of *Pseudomonas* sp. BCNU 154 was isolated from contaminated soil with organic solvents as the sole source of carbon and energy. It utilized an exceptionally wide aromatic substrates. The strain BCNU 154 was able to utilize toluene, *p*-xylene, ethylbenzene, cumene, as the only carbon and energy source. When toluene or *p*-xylene was used as the sole carbon and energy source, the compound was rapidly degraded with significant increase in biomass concentration. The biodegradation of this compound was observed when ethylbenzene or cumene was supplied on the carbon source and energy source, which may be a candidate extremophilic bacterium for the bioremediation technology.

서론

극한적인 환경에서 생존가능한 다양한 미생물 군종이 발견 보고되고 있으며 이들 극한 미생물은 온도, pH, 삼투압의 조건에서 고온성 미생물, 호산성 미생물, 호알카리성 미생물, 호염성 미생물등으로 구분되어 분리 보고되고 있다. 특히 극한 미생물 중 일부는 독립된 그룹을 형성하고 있는 측면에서 학문적으로나 산업적으로 주목을 받고 있다¹. 최근 고농도의 유기용매 내성 유기용매내에서는 이들을 새로운 극한 미생물(extremophiles)의 발견으로서, 저농도의 유기용매내에서는 이들을 분해 또는 자화하여 생존가능하나 고농도에서는 생존이 불가능하다고 하는 상식을 초월한 새로운 유전자원으로 유기용매계를 포함하는 미수계 내에서의 생물변환에 새로운 가능성으로 받아들여지고 있으며 미수계를 본격적으로 이용한 미생물 반응의 새로운 지평을 열어 줄 것으로 기대되고 있다².

재료 및 방법

본 실험에서 사용된 균주는 창원대학교에서 분리 보관된 Gram 음성세균인 *Pseudomonas* sp. BCNU 154 균주를 사용하였고, 유기용매 내성균주의 탐색과 배양에 사용한 배지로서 Luria-Bertani(LB)배지에 Glucose와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 첨가된

modified Luria-Bertani(LBM) 배지를 사용하였고, 분해능과 자화능 조사는 Mineral salt broth(MSB) 배지에 trace element slution을 첨가하여 사용하였다. 균주의 유기용매에 대한 내성을 알아보기 위해 10ml의 LBM 배지에 여러 가지 organic solvent를 10%되게 첨가하였고, 180rpm, 30℃에서 하루 배양한 후 탁도를 측정하였다. 또한, 성장률을 조사하기 위하여 660nm에서 탁도를 측정하여 최적온도, 최적 pH, 최적배지를 결정하였다. 본 배양은 1% benzene, toluene, ethylbenzene, xylene 그리고 cumene이 포함된 배지에 초기 탁도가 0.04~0.05가 되도록 접종한 후 180rpm, 30℃에서 진탕배양하면서 경시적으로 탁도를 측정하여 균주의 성장을 조사하였다.

결과 및 고찰

Pseudomonas sp. BCNU 154를 20℃, 30℃, 37℃, 40℃에서 각각 1% toluene, ethylbenzene, *p*-xylene(TEX) 와 cumene을 첨가하여 배양한 결과 *Pseudomonas* sp. BCNU 154의 최적생육 온도는 30℃로 밝혀졌다. 그리고 37℃에서도 생육이 좋은 것으로 나타났다 (Table 1). 균주의 성장에 있어서 pH의 영향을 관찰하기 위해 pH 2~10의 범위를 설정하여 spectrophotometer 660nm에서 탁도(turbidity)를 측정한 결과, 다양한 pH 영역에서의 *Pseudomonas* sp. BCNU 154는 pH 6~7에서 최적 생육상태를 나타냈다. toluene과 같은 경우에는 pH 2~8까지 생존하여 넓은 pH에 걸쳐 성장하였다. cumene의 경우에는 pH 5~10범위에서 잘 성장하는 것으로 조사되었다. 대체적으로 *Pseudomonas* sp. BCNU 154는 넓은 pH 범위에서 생존하는 것을 알 수 있었다 (Table 2). 1g/l의 toluene이 함유된 최소배지에서 toluene은 배양 2시간 이후부터 급격히 감소하며 9시간 이후에는 거의 97%이상이 분해되었다. 세포의 성장은 toluene의 분해가 급격해짐에 따라 빠른 성장을 보이고 있다. ($P < 0.05$). *p*-xylene은 2시간 이후부터 꾸준히 감소하여 12시간 이후에는 92%정도가 분해되었으며 세포성장은 6시간까지는 미약한 성장을 보이다가 6시간 이후부터 빠르게 성장하였다. ethylbenzene은 배양 6시간까지는 지속적인 분해가 일어났으나 8시간째 접어들면서 성장이 둔화되었고, 다시 10시간 이후에 계속적으로 분해가 이루어져 12시간이후에는 80%정도가 분해되었다. 세포성장은 분해능과 같이 6시간까지 성장이 활발하지만 6시간 이후에 잠시 둔화되다 8시간 이후에 급격히 성장하였다. cumene은 초기 2시간에서 4시간 이후에는 감소의 폭이 크지는 않지만 꾸준히 농도가 감소되면서 12시간 이후에는 90%이상이 분해되었다. 그러므로 이 연구는 생물회복기술 혹은 생물전환기술에 응용될 수 있는 유기용매내성 극한미생물의 연구에 중요한 역할을 할 수 있으리라 사료된다.

요약

본 연구에 사용한 *Pseudomonas* sp. BCNU 154는 Gram 음성 toluene 내성세균으

로 형태적·생리적 특성을 비교하여 보았을 때 *Pseudomonas* 속임이 확인되었다. 폭넓은 유기용매에 대한 내성한계를 가지고 있으며 *Pseudomonas* sp. BCNU 154 toluene 내성균주는 Modified Luria-Bertani(LBM) 배지에서 잘 자랐으며, 30℃에서 최적의 생육상태를 나타내었다. 최적 pH는 6에서 7로 나타났으며, 1%의 toluene을 첨가하였을 경우에는 pH 2에서 8에 이르는 넓은 pH대에서 잘 자랐으며, cumene은 pH 6에서 10까지의 범위에서 좋은 성장을 보였다. *Pseudomonas* sp. BCNU 154 균주의 toluene, ethylbenzene, *p*-xylene, cumene분해는 1g/l의 농도로 첨가시 toluene의 경우 97%이상이 분해되었고, *p*-xylene은 92%, ethylbenzene은 80%이며, cumene은 90% 이상이 분해되는 것으로 나타났다. 따라서 각 유기용매에 대해 대체로 12시간 내에 90%이상의 분해가 이루어졌으며, ethylbenzene의 경우에는 성장곡선과 마찬가지로 일정시간이 지난 후 성장과 분해가 둔화되다가 다시 성장과 분해가 일어나는 현상을 보였다.

참고문헌

1. Abe A., A. Inoue, R. Usami, K. Moriya and K. Hrikoshi. "Degadation of polyaromatic hydrocarbons by organic solvent-tolerant Bacreria from Deep Sea"(1995). *Biotech. Biochem.*, 59(6), 1154-1156.
2. Gibson D. T. and V. Subramanian. "Microbial degradation of aromatic hydrocarbons"(1984), p. 181-252. In D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York. USA.

Table 1. Optimal growth temperature of *Pseudomonas* sp. BCNU 154

Temperature	Growth in LBM broth with TEX(1. v/v), cumene(1%, v/v)			
	toluene	<i>p</i> -xylene	ethylbenzene	cumene
20℃	++	++	++	++
30℃	+++	++++	+++	+++
37℃	+++	+++	+++	+++
40℃	+	+	+	+

(+ : growing very poorly, ++ : growing poorly, +++ : growing well, ++++ : growing very well)

Table 2. Optimal initial pH of *Pseudomonas* sp. BCNU 154

pH	Growth in LBM broth with TEX(1%, v/v), cumene(1%, v/v)					
	benzene	toluene	ethyl- benzene	p-xylene	cumene	hexane
2	+	+++	++	++	++	+
3	+	+++	++	++	++	+
4	+	+++	++	++	++	+
5	+	+++	++	++	+++	++
6	+	++++	++++	++++	++++	++++
7	+	++++	++++	++++	++++	++++
8	+	+++	++++	++++	++++	++
9	+	+	+++	++++	++++	++
10	+	++	+	+	++++	++++

(+ : growing very poorly, ++ : growing poorly, +++ : growing well, +++++ : growing very well)