

## *Stenotrophomons maltophilia*에 의한 방향족 화합물의 생분해

최창석, 박진희\*, 김영식\*, 이태진

서울산업대학교 환경공학과

\*삼성에버랜드

seock10@hanmail.net

leetj@snut.ac.kr

### 요 약 문

다고리방향족 탄화수소를 폐놀에 적용된 미생물을 이용하여 분해하고자 하였다. 분리된 *Stenotrophomons maltophilia*는 나프탈렌과 페난스렌을 탄소원 및 에너지원으로 이용하였으며 10 mg/l의 나프탈렌과 0.9mg/l의 페난스렌이 완전히 분해되는데 지체기후 약 2일과 3일이 소요되었다. 나프탈렌, 페난스렌의 분해시 중간생성물로 chromatography 상에 새로운 피크들이 생성되었으며, 이러한 중간생성물을 파악하여 다고리 방향족 탄화수소의 분해경로를 모색하고자 하였다.

주제어: 다고리방향족 탄화수소, 폐놀, 나프탈렌, 페난스렌, 생분해

### 1. 서론

나프탈렌, 페난스렌등의 다고리방향족 탄화수소는(Polyaromatic hydrocarbons : PHAs) 석유정제업, 유류보관소, 원목저장소 주변 토양에서 주로 검출되고 있는 유해 유독성 오염물질이다. 나프탈렌을 포함한 PAH는 비극성이고 소수성이며 일반적인 환경 내에서 오랜 시간 존재할 만큼 화학적으로 매우 안정적이고, 미량으로도 발암이나 돌연변이를 유발함으로 관심이 고조되고 있다. 또한 PAH의 노출은 그들의 독성 발암 물질의 성격으로 인해 생태계의 파괴 뿐 아니라 인류의 건강을 위협한다. 이러한 이유로 미국 환경청(EPA)에서는 PAH를 우선적으로 처리해야 할 주요 오염물질로 지정·관리하고 있다.<sup>1) 2)</sup>

PAH로 오염된 지역을 복원하는 방법은 물리·화학적방법 등 여러 가지가 있으나 미생물에 의한 생물학적 처리 방법이 경제적인 장점으로 인해 널리 부각되고 있다. 생물학적 처리방법에 있어서 미생물은 난분해성물질을 공동대사(Cometabolism) 또는 탄소원으로 이용하는데, 공동대사에서는 성장기질(Growth Substrate)이 필수적으로 요구되며 성장기질에 의해 유도된 효소가 다른 기질(Non-growth Substrate)을 변형시키는 것이고, 탄소원으로 이용될 때는 난분해성물질 자체가 성장기질로 이용된다.

본 연구에서는 폐놀을 탄소원으로 이용가능한 미생물을 순수 분리하여 PAH의 분해 가능성을 파악하고자 하였으며 또한 분해시 나타나는 생성물을 규명해 그 경로를 살펴보고자 하였다.

### 2. 실험방법

#### 2.1 시약 및 배양

본 실험에는 Aldrich Chemical co.(U.S.A)에서 구입한 phenol, naphthalene, phenanthrene이 사용되었으며 미생물의 배양을 위해 사용된 배양액 구성은 Table 1에 나타낸 바와 같다. 미생물의 배

양을 위해서 125ml serum bottle이 사용되었으며 serum bottle 및 초자류와 배양액은 Autoclave한 후 사용되었다. 먼저 serum bottle에 100ml의 배양액을 넣고 0.1%(0.1ml)의 미생물을 접종하였다. 마개를 밀봉하기 전 head space를 순수산소로 충전하였으며, 밀봉후에도 serum bottle의 head space에 산소의 고갈을 막기 위해 간헐적으로 순수산소를 공급하였다. 실험은 30°C, 200rpm으로 조정된 Mechanical Shaker에서 수행하였다.

## 2.2 분석방법

페놀을 비롯한 PAH는 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 이용하여 분석하였다. 분석을 위해 C-18(150mm×4.6mm; Phenomex) 컬럼을 사용하였고, 이동상으로 페놀과 나프탈렌의 경우는 methanol : water (70 : 30), 페난스렌의 경우는 methanol : water (85 : 15) 사용하였으며, 유량속도는 1.0ml/min, detector파장은 254nm를 사용하였다. 추출된 시료는 HPLC에 주입되기 전에 원심분리기를 이용하거나 또는 microsyringe(0.45µm)를 이용하여 flocc을 제거하였다.

Table 1. The Composition of media to *Stenotrophomons maltophilia*

Compounds	Concentration (mg/L)	Compounds	Concentration (mg/L)
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	600	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.5
NH <sub>4</sub> Cl	130	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2550	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	975	NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1
Yeast extract	100	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	30	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	24
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	8.5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5	Na <sub>2</sub> EDTA	21.5

## 2.3 미생물의 분리

활성슬러지조에서 채취한 시료를 1.2ℓ의 연속 반응기에 채운 후 Table 1에 열거한 시약으로 만든 배양액을 정량펌프를 이용하여 3일의 체류시간을 갖는 반응기로 유입되게 하였다. 20일 후 완전히 탁한 우유빛으로 변했을 때 한천배지에 도말 후 계대배양 하여 하나의 colony를 분리하였다. BIOLOG Test 결과 미생물은 *Stenotrophomons maltophilia* (SI=0.716)로 판명되었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 페놀의 분해

먼저 미생물의 페놀분해능을 살펴보기 위해 600mg/l의 페놀이 함유된 배지에 미생물을 0.1%를 접종하였다.

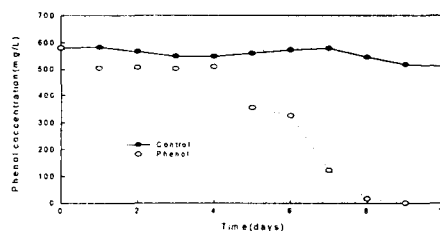


Fig. 1. Time course of phenol degradation by *Stenotrophomons maltophilia*

Fig. 1에서 미생물이 접종되지 않은 control에서는 페놀의 후기 농도는 초기와 변화는 없었으나 미생물이 접종된 경우에는 초기 4일까지는 지체기를 보이다가 4일 이후 급격히 페놀의 농도가 감소하는걸 볼 수 있다. 지체기 후 약 600mg/l의 페놀이 분해되는데 4일이 소요되었다.

### 3.2 나프탈렌의 분해

페놀미생물이 나프탈렌을 탄소원으로 이용할 수 있는지 알아보기 위해 탄소원으로 나프탈렌(10 mg/l)를 가지는 배지를 조성하여 미생물을 배양하였다.

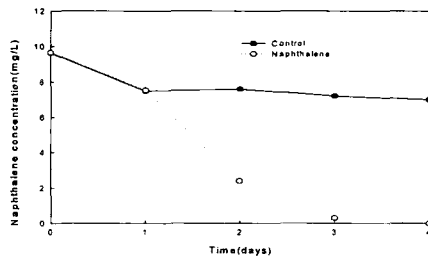


Fig. 2. Time course of naphthalene degradation by *Stenotrophomonas maltophilia*

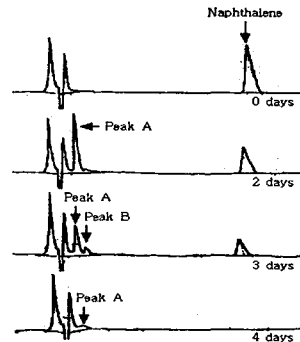


Fig. 3. HPLC chromatograms of naphthalene

Fig. 2에서 나타나듯이 10mg/l의 나프탈렌이 1일의 지체기 후 완전 분해하는데 2일의 소요되었다. 나프탈렌의 분해는 HPLC chromatography 상 peak A와 peak B로 변환 되었으며 시간이 지남에 따라 중간생성물인 peak A, peak B 공히 분해되어짐을 알 수 있었다(Fig. 3). 이는 Hydroxylation에 의한 Naphthalene의 변형물 또는 Salicylate의 형태로 변화된 것으로 사료된다.

### 3.3 페난스렌의 분해

이 미생물이 나프탈렌을 탄소원으로 이용함을 확인 후 페난스렌의 분해 여부를 관찰하였다. 페난스렌의 경우 낮은 수중 용해도로 인하여 탄소원으로 약 0.9mg/l의 페난스렌을 가지는 배지를 조성하여 배양하였다.

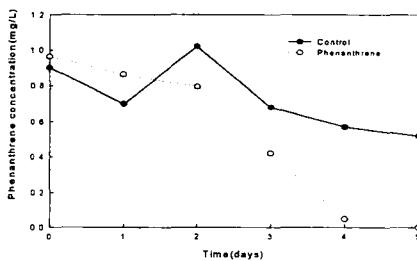


Fig. 4. Time course of phenanthrene degradation by *Stenotrophomonas maltophilia*

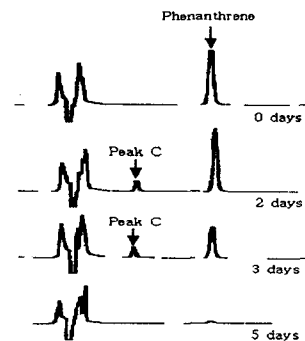


Fig. 5. HPLC chromatograms of phenanthrene

Fig. 4에서 나타나듯이 0.9mg/l의 페난스렌이 완전분해 되는데 2일의 지체기후 3일의 시간이 소요 되었다. 페난스렌의 분해도 나프탈렌 분해 실험과 같이 peak의 크기는 미약하였으나 chromatography 상 새로운 peak C로 변환되었다(Fig. 5). 이는 페난스렌의 생분해경로에 나타나

는 1-Hydroxy-2-naphthoic acid 또는 1,2-Dihydroxynaphthalene 등으로 사료되면 시간이 지남에 따라 분해되었다.

#### 4. 결론

본 실험에서는 *Stenotrophomonas maltophilia*에 의한 페놀, 나프탈렌 그리고 페난스렌의 분해를 확인하였고, 나프탈렌과 페난스렌의 경우에는 chromatography 상 새로운 peak A, B, C의 출현을 관찰하였다. PAH를 탄소원으로 이용하는 페놀미생물의 분리와 PAH의 분해시 나타나는 생성물을 파악함으로써 석유정제업 또는 코크스 공정과 같은 PAH 함유 폐수공정이나 토양복원에 적용함으로써 큰 효과를 기대할 수 있을 것이다.

#### 5. 참고문헌

- 1) Bouchez, M. D. blanchet, and J. P. Vandecasteele. "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strain and by defined strain associations: Inhibition phenomena and cometabolism". *Appl. Microbiol. biotechnol.* 43. 156~164(1995)
- 2) Keith, L. H. and Telliard. W. A., "Priority pollutants I. A perspective view." *Environ. Sci. Technol.*, 139, 416~423(1979)