

Phenanthrene biodegradation by *Pseudocardia hydrocaroxydans* and *Pseudomonas putida* in presence of metabolic inducers

조화영, 신성호, 우승한, 박종문

포항공과대학교 환경공학부(greatian@postech.ac.kr)
포항공과대학교 화학공학과/환경공학부

ABSTRACT

Soils contaminated by hazardous hydrophobic organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), have become a major environmental issue due to toxic and carcinogenic properties of those compounds. In this work, we investigated effects of various metabolic inducers on phenanthrene biodegradation. Biodegradation tests were performed with two different Pseudomonads: *Pseudocardia hydrocaroxydans* (Gram positive) and *Pseudomonas putida* (Gram negative). Intermediates of phenanthrene metabolism (1-hydroxy-2-naphthoate, salicylate, catechol, phthalate and protocatechuate) were selected as inducers. The tests indicated that 1-hydroxy-2-naphthoate was the most effective inducer and enhanced the phenanthrene degradation rate up to 5.7 times, even though all the others also had induction ability to some extent. The effective induction could be achieved even at a low concentration of 1-hydroxy-2-naphthoate. Addition of metabolic inducers would be an attractive trick for the successful bioremediation of PAH-contaminated soil.

key word : biodegradation, bioremediation, induction, phenanthrene, PAH

1. 서론

유해유기물질로 오염된 토양 및 지하수는 오랜 기간 동안 느린 속도로 노출되어 인간과 환경에 대한 심각한 부작용을 초래한다. 유해유기물질의 한 종류인 PAH(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)는 석탄 건류공정, 화력 발전소, 제철공정, 석유 정제공정 등에서 발생하며 암 또는 돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 PAH는 물에 대한 용해도가 낮고 토양에 대한 흡착력이 높아 자연 상태에서는 장기간 토양에 잔존할 수 있다. 따라서 PAH의 생물복원에 있어 미생물의 분해속도를 증진시킬 수 있는 기술개발이 절실히 요구되고 있다.

Phenanthrene을 분해하는 미생물에 대한 연구는 1928년 Tausson에 의해 처음 시작되었다. 미생물에 의한 phenanthrene 분해에는 크게 두 가지 경로가 있는 것으로 알려져 있는데, 첫째는 phenanthrene이 1-hydroxy-2-naphthoate, salicylate, catechol을 거쳐 분해 되는 것이고, 둘째는 phenanthrene에서 1-hydroxy-2-naphthoate까지의 분해 되는 과정은 첫 번째와 같으나 그 이후로는 2-carboxybenzaldehyde, o-phthalate, protocatechuate 로 분해 되는 것으로 다른 경로

를 가진다. 그리고 이는 미생물마다 다른데, 예를 들면, *Nocardiodes sp.* strain K97(gram (+))은 phenanthrene은 분해하나 naphthalene에서는 자라지 못하는 두 번째 경로를 지나는 종에 속한다. 이와 같이 다양한 경로를 통해 분해 되면서 발생하는 중간체들이 phenanthrene 및 다른 PAH의 분해속도를 향상시키는 inducer 역할을 할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 각 inducer들의 분해 기여도 및 미생물 종간의 차이에 대한 결과는 보고 되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 phenanthrene의 생분해시 대사산물인 1-hydroxy-2-naphthoate, salicylate, catechol, phthalate, protocatechuate을 inducer로 하여 다른 두 종의 미생물의 세포 성장이나 phenanthrene 분해에 대한 연구를 수행하였다.

2. 실험방법

Phenanthrene(PHE)의 분해를 위한 대사과정 중의 inducer로서 1-hydroxy-2-naphthoate (HYD), salicylate(SAL), catechol(CAT), phthalate(PHT), protocatechuate(PRO)의 5종을 사용하였다. 균주는 KCTC(Korean Collection for Type Culture)에서 구입한 *Pseudonocardia hydrocarbonoxydans*와 *Pseudomonas putida*를 사용하였다. 배지로는 Mineral Salt Medium(MSM)을 사용하였고, phenanthrene을 용해시키기 위한 계면활성제로서 Triton X-100를 1% 농도로 첨가하였다. 배지는 121°C에서 20분동안 멸균한 후에 사용하였다. Nutrient broth(NB)에서 48시간 동안 배양한 용액을 3000rpm에서 15분 동안 원심분리 시키고 멸균완충액으로 2회 세척한 후, 초기조건을 분광광도계 600nm에서 OD(optical density) 0.03으로 동일하게 준비하여 접종하였다.

세포 성장은 OD로 측정하였고, phenanthrene은 고성능액체크로마토그래피 Dionex, USA)를 사용하여 UV 254nm에서 측정하였다. 생분해 실험은 50mg/L phenanthrene에 대해 5종의 inducer 각각 0, 20, 50, 100, 200, 500mg/L의 농도로 첨가하여 시간에 따른 변화를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

영양배지인 NB에서 Gram(+)인 *P. hydrocarbonoxydans*는 약 25 시간 후 최대성장에 도달한 반면, Gram(-)인 *P. putida*는 약 8 시간 이후였다. 그리고 *P. hydrocarbonoxydans*와 *P. putida*의 접종크기가 같음에도 불구하고 *P. putida*가 약 1.5배 큰 세포 성장을 보였다. *P. hydrocarbonoxydans*와 *P. putida* 모두 phenanthrene만을 에너지원으로 했을 때보다 inducer의 첨가가 있을 때 더 큰 세포의 성장을 보였다. 1-hydroxy-2-naphthoate의 첨가에서는 *P. hydrocarbonoxydans*, *P. putida* 모두 공통적으로 큰 성장을 보였고, *P. hydrocarbonoxydans*의 경우에는 phthalate에서, *P. putida*는 salicylate에서 상대적으로 큰 성장을 보였다.

Inducer를 첨가하지 않은 실험에서 두 미생물 *P. putida*와 *P. hydrocarbonoxydans* 각각에 대해 16.5%와 5.2%의 phenanthrene 분해율을 보였다(Figure 1). *P. putida*의 경우, 1-hydroxy-2-naphthoate, salicylate, phthalate를 inducer로 사용했을 때 phenanthrene의 분해율이 최고 2배 이상 증가하였다. 반면, protocatechuate를 첨가할 때는 오히려 phenanthrene 분해가 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. *P. hydrocarbonoxydans*의 경우, 1-hydroxy-2-naphthoate를 첨가할 때 가장 큰 induction 효과를 보였다. 예를 들어, 500 mg/L의 1-hydroxy-2-naphthoate 첨가 시 29.5% 분해율로서 이는 첨가하지 않은 경우에 비해 5.7배 증가한 것이다. Figure 1에서 보는 바와 같이, 각 inducer별로 최적 분해를 나타내는 농도가 다른 결과를 얻었다. Salicylate는 공통적으로 200mg/L에서 최적 phenanthrene 분해율을 나타냈다. 전체적으로 저농도(20-50mg/L)에서도 높은 induction 효과를 보였고, 고농도(500mg/L)에서는 inhibition을 보이는

경우도 있었다.

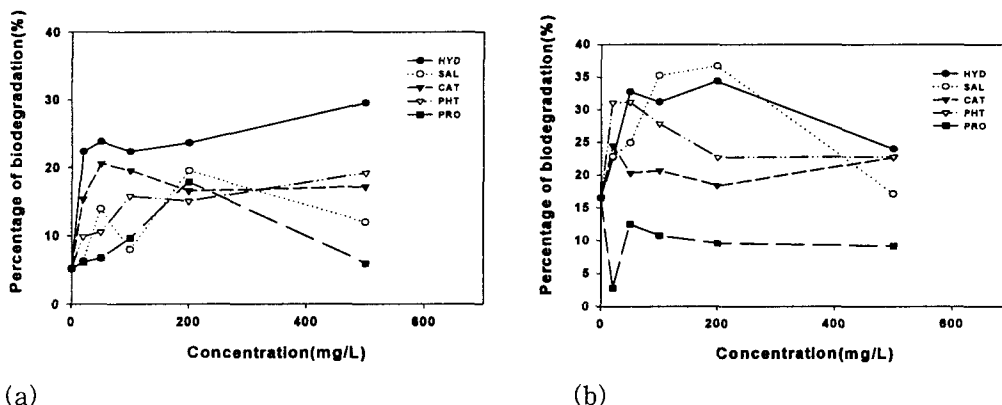


Figure 1. Percentage of phenanthrene biodegradation at various concentrations of inducers with (a) *P. hydrocarbonoxydans*, (b) *P. putida*.

*P. hydrocarbonoxydans*와 *P. putida*는 모두 phenanthrene을 분해하는 종이다. 두 균주는 모두 대사과정중의 inducer인 1-hydroxy-2-naphthoate에서 가장 큰 phenanthrene 분해율을 보이지만 두번째 영향을 받는 induction은 차이를 보였다. *P. hydrocarbonoxydans*는 phthalate에 의해서, *P. putida*는 naphthalene의 분해경로인 salicylate에 의한 induction 효과가 높았다. 그리고 영향을 받는 inducer의 농도 또한 차이를 보였다. 이와 같이 PAH의 분해에 있어 미생물의 종류, 성장속도 및 농도, inducer의 종류와 농도에 따라서 전체 분해속도에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다.

4. 결론

유해 오염물질의 하나로 다환방향족 탄화수소군 중 phenanthrene을 대상으로 2 종의 미생물에 대해 다양한 metabolic inducer를 사용하여 분해효율 증대 실험을 수행하였다. phenanthrene 분해의 결정적 역할을 수행하는 초기 효소반응 단계의 효소 발현을 유도하는 것으로 알려진 1-hydroxy-2-naphthoate, salicylate, phthalate, protocatechuate, catechol 등의 첨가 시 분해효율이 급격하게 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 그 분해기여도는 미생물의 종류, inducer의 종류와 농도에 따라 크게 달라짐을 확인하였다. 이와 같이, 다환방향족 탄화수소로 오염된 토양의 생물복원에 있어서 inducer의 적절한 사용은 in situ 혹은 ex situ에서 복원속도를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

5. 참고문헌

1. Gareth, L.J. and Andrew, D.L., Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 29: 69-79, 1999
2. Lei Tian and Pei Ma, Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*, *Process Biochemistry*, 37: 1431-1437, 2002
3. Tokuro Iwabuvhi and Yukie Inomata-Yamauchi, Isolation and characterization of

marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42 °C, *J Mar. Biotechnol.*, 6: 86-90, 1998

4. William, F.G. and Stephen, A.B., Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and an *Alcaligenes* sp. under different culture conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4061-4068, 1995