

미생물에 의한 난분해성 유기염소계 오염물질의 분해

—PCBs 분해 균주의 분리 및 그 분해 조건—

김찬조 · 오만진 · 이종수 · 손현주* · 성창근

충남대학교 농과대학 식품가공학과, *한국인삼연구소
(1986년 4월 21일 수리)

Degradation of Organochlorinated Pollutants by Microorganism

—Isolation of PCBs-Degrading Strain and Conditions of Degradation—

Chan-Jo Kim, Man-Jin Oh, Jong-Soo Lee, Hyun-Ju Sohn* and Chang-Keun Sung

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungnam National University, Daejeon and *Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon, Korea

Abstract

PCBs was degraded by bacterium, which was classified as a strain of *Alcaligenes aquamarinus*. Its PCB-42 degradation was maximized when grown on mineral salts medium containing 0.1% of PCB-42 as a sole carbon source at 25°C and initial pH 7.0~8.0, and also shaking culture was effective for it. The addition of glucose and peptone were effective for the degradation of PCB-42, but metal ions were not effective.

서 론

종래 가소제, 방수제, 왁스 및 페인트 등으로 많이 사용되었던 Polychlorinated Biphenyls(PCBs)^{1,2)}는 그의 난분해성과 독성으로 인하여 자연 생태계의 파괴와 인축에의 독성등이 큰 관심이 되고 있다. PCBs는 비산화성물질로서 산, 염기 및 열에 강하며 비수용성으로^{3,4)} 1930년부터 공업적으로 생산이 시작되어⁵⁾ 현재 Aroclor, Phenoclor, Clophen 및 Kaneclor 등의 상품명으로 생산되고 있다.

일반적으로 염소함량이 낮은 PCBs는 쥐나 비둘기 등의 체내에서 cytochrome P-450 oxidase의 작

용으로 지방족 혹은 방향족 탄화수소로 분해되어 지고 염소함량이 높은 PCBs는 이러한 작용을 받지 않기 때문에 그대로 체내에 축적되어지는 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 이러한 분해기작은 미생물을 이용한 실험에서 Ahmed⁷⁾ 등도 같은 것으로 보고한 바 있다.

유기염소계 오염물질 중 PCBs에 관한 연구는 Holmes 등⁸⁾, 박등⁹⁾ 및 이등¹⁰⁾을 비롯한 많은 연구자들에 의하여 주로 그 잔류량의 분석이 보고되어 있다.^{11~15)} 또한 분해산물의 추정과 대사기작에 관한 연구는 Kaiser 등¹⁶⁾, Furukawa 등¹⁷⁾, Ahmed 등¹⁸⁾과 Wong 등¹⁹⁾, Wedemeyer 등¹⁹⁾의 보고가 있고 국내에서는 미생물을 이용한 PCBs의 분해에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서

Table 1. Composition of media used.

A-medium (organic medium)	B-medium (mineral salts medium)	C-medium (mineral salts medium)
glucose 0.5g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1g	NaCl 0.5g
peptone 0.5g	KH ₂ PO ₄ 0.2g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2g
KH ₂ PO ₄ 0.5g	K ₂ HPO ₄ 1.6g	ZnSO ₄ 0.01g
D.W. 1000ml	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2g	H ₃ BO ₃ 0.01g
(pH 7.0)	NaCl 0.1g	Al ₂ (SO ₄) ₃ 0.01g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g	MnCl ₂ 0.04g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.02g	FeSO ₄ 0.01g
	Biphenyl 1.0g	CoSO ₄ 0.002g
	D.W. 1000ml	K ₂ HPO ₄ 2.6g
	(pH 7.5)	KH ₂ PO ₄ 1.6g
		D.W. 1000ml
		(pH 7.5)

Table 2. G.C. operating parameters.

G.C. Model : AI Model 92(U.K)
Detector : Flame Ionization Detector
Column : 2mm id×6ft glass column
Packing material : 5% SE 30 on chromosorb W HP (80/100)
Oven temp. : 210°C (for biphenyl and PCBs) : 220°C (for organochlorine pesticide)
Carrier gas : N ₂ , 30ml/min.
Injection size : 2μl~5μl
Chart speed : 0.5cm/min.

본 연구에서는 PCBs를 분해하는 균주를 해수와 활성오니등으로 부터 검색, 선별하고 분해 최적조건을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

Biphenyl과 n-hexane 및 acetone 등은 Hayashi 사 제품, PCB-42는 Tokyo Kasei사 제품을 사용하였다. 또한 biphenyl과 PCB-42의 표준액은 이들의 10% acetone 용액을 일정하게 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 균주의 분리

Furukawa 등¹⁷⁾의 방법에 따라 먼저 인천항의 바닷물과 서울시 중랑천 폐수중합 처리장의 활성오니 및 농약공장의 폐수와 부근의 토양 그리고 biphenyl를 경시적으로 살포한 토양 등을 분리원으로 하여 표 1의 A배지에 적당량 접종한 후 26°C에서 3일간 진탕배양하고 그 배양액을 다시 0.1% biphenyl이 함유된 B배지에 접종하여 3일간 배양하였다. 그 배양액 일정량을 미리 준비된 B배지의 평판에 접종하여 26°C에서 배양하면서 황색침착과 그 주위에 황색을 띠는 균주를 분해능이 있는 균주로 분리하였다.

2) 균주의 선정

B배지를 직경 18mm의 L자형 시험관에 10ml 씩 분주하여 살균한 후 biphenyl를 0.1% 첨가하고 분리균주를 접종하여 26°C에서 3일간 진탕배양한 후 그 배양액을 분액여두에 넣고 n-hexane으로 분해물을 추출하였다. 이 추출물을 표 2와 같은 조건으로 gas chromatography를 하여 얻어진 chromatogram의 총 peak 면적과 표준물질 chromatogram의 총 peak 면적을 비교 분석한 후 그의 분해율을 측정하여 강한 균주를 선정하였다.

3) 균주의 동정

"Manual of Methods for General Bacteriology"²⁰⁾에 따라 선정균주의 제반 균학적 특성을 검토한 후 Bergey 편람²¹⁾에 의하여 동정하였다.

4) PCB-42의 분해조건

온도 : 배양온도를 10°C~40°C까지 5°C 간격으로 조절한 후 9일간 배양하여 위의 2)와 같은 방

법으로 분해율을 측정하여 분해 최적온도를 검토하였다.

pH : 배지의 초기 pH를 4.0~10.0까지 각각 일정하게 조절한 후 분리균주를 배양하고 2)와 같이 그 분해율을 측정하여 분해최적 초발pH를 검토하였다.

PCB-42의 농도 : PCB-42를 0.01~1.0%까지 일정농도로 B배지에 첨가한 후 2)와 같이 분해율을 측정하여 PCB-42의 농도가 분해에 미치는 영향을 검토하였다.

진탕효과 : 분리균주를 접종하여 90osci./min., stroke 3cm로 진탕배양한 것과 정지배양한 것과의 분해율을 측정 비교하여 진탕효과를 검토하였다.

배양시간 : 위와 같은 실험으로 얻어진 분해 최적조건으로 분리균주를 배양하면서 3일, 6일, 9일 및 15일의 경시적인 분해율을 측정하여 배양시간에 따르는 분해율을 검토하였다.

배지조성 : B배지에 glucose 1%, peptone 0.1% 및 ZnSO₄와 MnCl₂를 0.001%씩 각각 또는 혼합 첨가하여 이들의 분해에 미치는 영향을 검토하였고 또한 표 1의 C배지¹⁶⁾와 같은 조성의 효과도 검토하였다.

혼합배양의 효과 : B배지에 선정한 I-5 균주와 이와 속이 다르고 분해력이 비교적 강한 I-2 균주를 혼합 접종하여 분해에 미치는 효과를 검토하였다.

결과 및 고찰

1. 균의 분리 및 동정

균 분리용 기본배지를 이용하여 PCBs의 분해능이 있는 56주의 세균을 분리하였다. 이들 가운데 인천항의 바닷물에서 분리한 I-5 균주가 분해능이 가장 강한 것으로 인정되었다. I-5 균주의 균학적 특성을 검토한 결과는 표 3, 4, 5 및 6과 같다. 이 균주는 gram 음성의 구형에 가까운 간균으로 운동성이 있으며 진탕배양으로 균체량이 현저히 증가되고 그림 5와 같이 분해율이 심히 향상되는 점 등으로 보아 호기성이고 A배지에서 25°C, pH 7.5~9.0에서 잘 생육하였고 oxidase가 양성이며 전분 가수분해능이 있었다. 이상의 결과와 분리원이 바닷물인 점 등으로 미루어 Bergey 편람²¹⁾에 따라 검색한 결과 *Alcaligenes aquamarinus*와 비슷한 균주인 것으로 동정 되었으며 분해능이 다소

Table 3. Morphological characteristics of I-5 strain.

Shape	coccal rod
Size	0.8~1.0×1.2~1.9 μ m
Motility	+
Flagella	+
Gram staining	-

Table 4. Cultural characteristics of I-5 strain.

Glucose nitrate agar	+
Growth in 12% NaCl medium	-
Opt. growth temperature	25°C
Opt. growth pH	7.5~9.0

Table 5. Biochemical characteristics of I-5 strain.

Methyl red test	-
Catalase test	+
Oxidase test	+
Voges Proskauer test	-
Hydrolysis of casein	+
Liquefaction of gelatin	+
Hydrolysis of starch	+

Table 6. Utilization of carbon compound by I-5 strain.

Glucose	+
Galactose	-
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	+
Starch	+
Arabinose	-
Glycerol	+
Sorbitol	-

낮은 여타의 균주는 대부분이 *Pseudomonas* 속으로 추정되었다.

2. PCB-42의 분해

1) 표준 gas chromatogram

Biphenyl과 PCB-42의 표준 gas chromatogram은 그림 1과 같다.

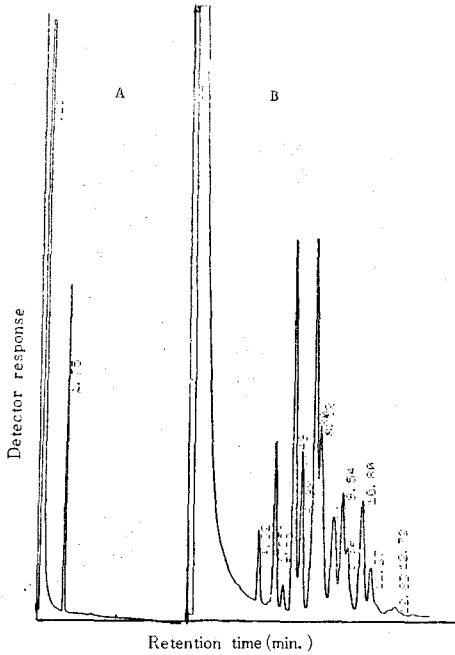


Fig. 1. Standard gas chromatogram of biphenyl and PCB-42.
A: Biphenyl B: PCB-42

2) I-5 균주에 의한 PCB-42의 분해조건

온도: PCB-42의 분해 최적온도를 검토한 결과는 그림 2와 같다. 분해 최적온도는 25°C이었고 30°C보다는 20°C에서 그 분해율이 높았다. 이 PCB-42의 I-5 균주에 의한 분해 최적온도는 이 균의 biphenyl의 분해 최적온도와 생육 최적온도와도 같았다.

pH: PCB-42의 분해에 대한 배양초기 pH의 영향을 검토한 결과는 그림 3과 같이 pH 7.0~8.0이 적당하였으며 배양 3일까지 배지의 pH는 거의 변화하지 않았으나 6일 후에는 약 5.0까지 낮아졌다. 이는 3일후 분해가 왕성해짐에 따라 분해산물이 증가하기 때문인 것으로 추정되고 배양 6일 이후 분해율이 둔화되는 것은 이러한 배지의 pH저하에 의한 것으로도 생각된다.

PCB-42의 농도: I-5 균주가 PCB-42를 분해할 때 그 농도의 영향을 검토한 결과 그림 4와 같이 0.1%가 적당하였으며 0.5% 이상에서는 현저히 분해율이 떨어지는 경향이였다. 이 결과는 Wong 등¹⁸⁾의 *Achromobacter* sp.에 의한 PCBs 분해실험에서 Aroclor 1221과 1242를 균 생육의 탄소원과 에너지원으로 이용할 때 0.05%가 적합하였다는 결과보다 다소 높은 농도이였다. 따라서

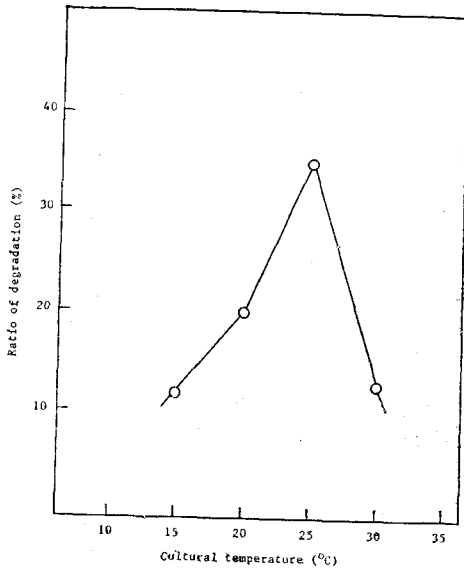


Fig. 2. Effects of cultural temperature on the degradation of PCB-42 by I-5 strain.

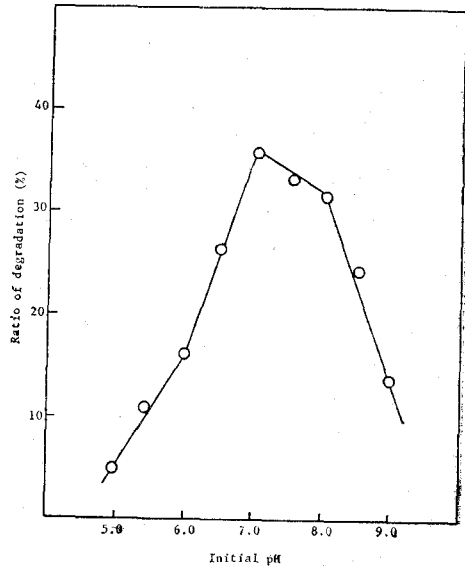


Fig. 3. Effects of initial pH on the degradation of PCB-42 by I-5 strain.

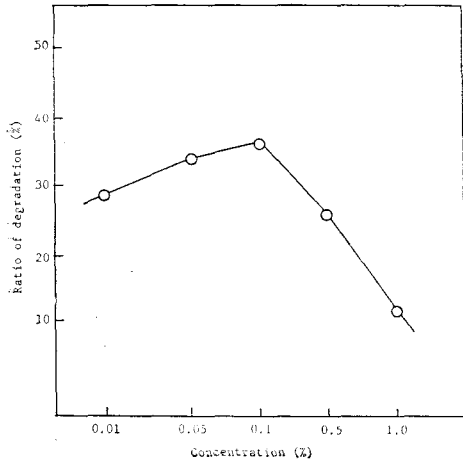


Fig. 4. Effects of PCB concentration on the degradation of PCB-42 by I-5 strain.

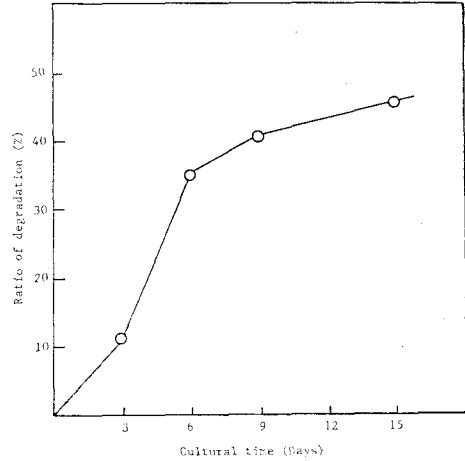


Fig. 6. Effects of cultural time on the degradation of PCB-42 by I-5 strain.

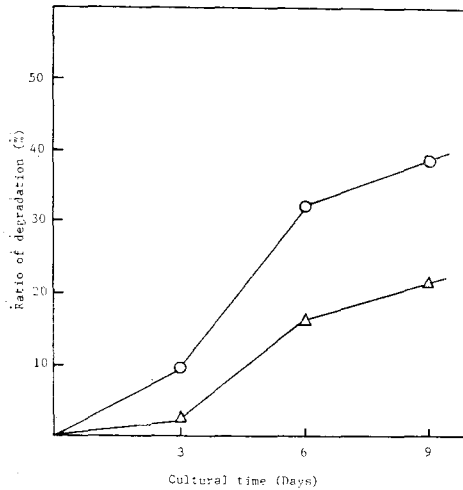


Fig. 5. Effects of shaking culture on the degradation of PCB-42 by I-5 strain.

—○—○— : Shaking culture(90% osi./min., stroke 3cm)
 —△—△— : Stationary culture

이하의 실험에서는 PCB-42의 농도를 0.1%로 하였다.

진탕효과 : PCB-42의 분해에 미치는 진탕효과를 검토한 결과는 그림 5와 같다.

정차배양한 것에 비해 90osci./min., stroke 3cm로 진탕배양한 것이 배양 9일에 그 분해율이 약 15% 더 높아지는 것으로 보아 진탕효과는 인정되었으며 이는 I-5 균주가 호기성인 것에도 부합되는 것이라 생각된다.

배양시간 : 그림 6에서와 같이 배양 9일에 41

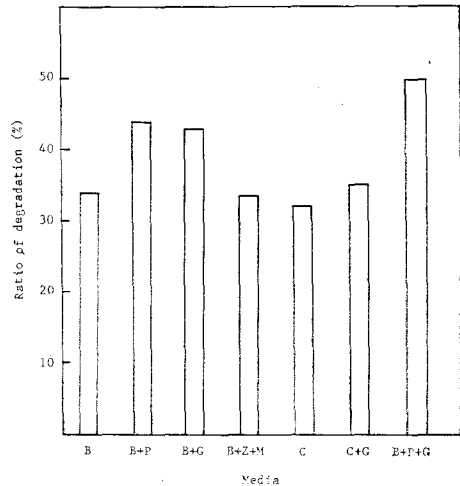


Fig. 7. Effects of medium composition on the degradation of PCB-42 by I-5 strain.

B: Mineral salt medium composed of as Table 1.

B+P: Added peptone in B medium

B+G: Added glucose in B medium

B+Z+M: Added ZnSO₄ and MnCl₂ in B medium

C: Mineral salt medium composed of as Table 1.

C+G: Added glucose in C medium.

B+P+G: Added glucose and peptone in B medium.

% 정도의 분해율을 보이고 그 이후는 분해율의 증가폭이 둔화되었다.

배지조성의 영향 : 기본 염류배지에 glucose와 peptone, ZnSO₄와 MnCl₂ 등을 개별 혹은 혼합하

여 첨가한 효과를 검토한 결과는 그림 7과 같다.

glucose와 peptone의 첨가는 배양 6일에 약 10% 정도의 분해율을 향상시켰으며 혼합첨가는 약 12~13% 향상시켰다. 그러나 ZnSO₄와 MnCl₂의 첨가효과는 거의 인정되지 않았으며 B배지와 유사한 C배지 및 C배지에 glucose를 첨가한 것에서도 효과는 인정되지 않았다.

(7) 혼합배양의 효과 : I-5 균주와 이와 속이 다르고 분해능이 비교적 강한 I-2 균주를 혼합배양하여 PCB-42의 분해를 검토한 결과 별다른 효과는 인정되지 않았다.

요 약

海水, 活性汚泥 등으로 부터 난분해성 유기염소계 오염물질인 Polychlorinated Biphenyls(PCBs)를 분해하는 균주를 분리, 선정 한 후 세균학적 특성을 조사한 결과 *Alcaligenes aquamarinus*로 추정되었다. 기본염류배지에 PCB-42를 첨가하여 분해조건을 조사한 바 25°C, pH 7.0~8.0 및 첨가농도 0.1%에서 가장 잘 분해되었으며 또한 진탕배양은 분해를 촉진하고 glucose와 peptone의 첨가는 효과가 인정되었으나 Zn 및 Mn의 첨가효과는 인정되지 않았다.

사 사

본 연구는 특십자 연구소의 연구비 지원으로 수행되었으며 재단 당국에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Peakall, D.B.: Residue Reviews. 44 : 1~21 (1974).
2. Reynolds, L.M.: Residue Reviews. 34 : 27~57(1971).
3. Willett, L.B. and Hess, Jr., J.F.: Residue Reviews. 55 : 135~147(1975).
4. Bevenue, A.: Residue Reviews. 61 : 37~112 (1976).
5. Bailey, R.A. and R.L. Strong: Chemistry of

the Environment. Academic Press : 157~158 (1978).

6. Yoshimura, H. : 化學と生物, 14(2) : 70~77 (1976).
7. Ahmed, M. and D.D. Focht.: Can. J. Microbiol. 19 : 47~52(1973).
8. Holmes, D.C., Inglis, A., and Johnson, W. L.: Pestic. Monit. J. 5 : 1~10(1971).
9. 朴昌奎, 朴魯東 : 한국농화학회지, 23(1) : 58~63(1980).
10. 李允珩 : 水原近郊 灌溉水中의 PCBs 및 有機鹽素系 殺蟲劑의 殘留評價. 서울대학교 대학원 농화학과 석사학위논문(1983).
11. Dudley, D.R., and Karr, J.R.: Pestic. Monit. J. 13 : 155~157(1980).
12. Hans J. Crump-Wiesner, Herman R., Feltz, and Marvin L. Yates.: Pestic. Monit. J. 8 : 157~161(1974).
13. Holden, A.V.: Pestic. Monit. J. 4 : 117(1970).
14. Kpekata, A.K.: Bull Environ. Contam. Toxicol. 26 : 769~774(1981).
15. Timothy, T. Schmidt, Robert, W. Risebrough, and Franklin, Gress.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 6 : 235~243(1971).
15. Kaiser, K.L.E. and P.T.S. Wong: Bull. Environ. Contamin. & Toxicol. 11 : 291~296 (1974).
17. Furukawa, K. and F. Matsumura.: J. Agri. Food Chem. 24(2) : 251~256(1976).
18. Wong, P.T.S. and K.L.E. Kaiser.: Bull. Environ. Contamin. & Toxicol. 13(2) : 249~255(1975).
19. Wedemeyer, G: Applied Microbiology, 15 (3) : 569~574(1967).
20. Philipp, Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Phillips, Krieg.: Manual of Methods for General Bacteriology. ASM : 409~443(1981).
21. Buchanan, R.E. and N.E.Gibbons.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.). Williams & Wilkins Co. : 217~285 (1974).