

## Benzene 분해 세균의 분리와 특성연구

김정현<sup>1</sup>·유재근<sup>2</sup>·이형환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 생물학과 <sup>2</sup>국립환경연구소 수질공학과

### Isolation and Characterization of Benzene-degrading Bacteria.

Kim, Jung-Hyon<sup>1</sup>, Jae-Keun Ryu<sup>2</sup>, and Hyung-Hoan Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea

<sup>2</sup>Division of Wastewater Engineering, National Institute of Environmental Research, Seoul 122-040, Korea

To evaluate the treatability of activated sludge induced by benzene with microorganisms, isolation and characterization of benzene-degrading microorganisms were carried out. Six bacterial isolates from the activated sludge were identified; *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae*. *P. fluorescens* degraded 55% of benzene contained in the medium as a sole carbon source, *E. cloacae* 24%, *E. agglomerans* 41%, and *K. oxytoca* 32%. Optimal temperature, pH and benzene concentration for growth of *P. fluorescens* appeared to be 31°C, pH 7.0, and 300mg benzene per liter. When the *P. fluorescens* was dominant in the activated sludge induced by benzene, the indicator protozoa was *Aspidisca* sp. When concentration of benzene was about 387 mg per liter, the growths of *Aspidisca* sp. and *Litonotus* sp. were high. Protozoa, *Litonotus* sp. and *Vorticella* sp. did not grow over 1600 mg of benzene per liter.

벤젠은 유기화학공업분야에서 많이 사용하기 때문에 환경오염의 주원인 물질로서 폐수에 많이 축적되고 이것을 제거하기 위한 연구는 환경오염을 줄이기 위해서 매우 중요한 일이다(1). *Pseudomonas putida*가 벤젠을 분해시키는 것을 Gibson 등(2)이 보고한바 있으나 아직도 분해능이 좋은 균의 분리는 중요성을 가지고 있다.

본 연구에서는 활성슬러지에 의한 벤젠처리에 따른 미생물의 변화 및 특성조사를 위하여 분해능이 우수한 세균을 분리하여 동정하고 분리된 세균의 생물학적 성상을 연구하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용한 미생물군(Sludge)

중랑천 하수처리장에 있는 반송슬러지에 함유되어 있는 미생물을 이용했다.

##### 배지 및 시약

균의 분리와 보관을 위한 기초배지는 활성슬러지의 미생물에 적합한 Casitone-Glycerol-Yeast Extract(CGY)를 사용하였으며 조성과 제조법은 다음과 같다(3). 즉 Casitone(Difco) 5g, glycerol 10g, yeast extract 1.0g을 증류수 1l에 녹여 pH7.2로 조정 후 121°C에서 15분간 가압숙운 멸균하여 사용하였다.

전배양 배지와 성장곡선 측정에는 Basal Salt Medium(BSM)을 사용하였으며 조성은 다음과 같다. 즉 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.8g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, MgCl<sub>2</sub> 0.16g, CaCl<sub>2</sub> 0.02g, NaMoO<sub>4</sub> 0.002g, FeSO<sub>4</sub> 0.001g, MnCl<sub>2</sub> 0.001g이고, 이를 증류수 1l에 용해한 후 pH 7.2로 조정하여 사용하였다(4).

원생동물의 관찰하기 위해 사용한 메틸셀룰로오스 용액은 메틸셀룰로오스(15 centipoise viscosity) 10g을 증류수 90ml에 용해한 것이고, 염색용액은 메틸

Key words: Benzene-degrading bacteria, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter agglomerans*.

\*Corresponding author

렌블로우 10 mg을 95% 에틸알콜에 첨가한 것이었다 (5).

슬러지의 배양은 Kim 등(6, 7)의 방법에 의하여 실시하였다.

**연속반응조내 균의 분리 및 동정**

연속흐름식 반응조에서 벤젠의 최대 허용농도일 때 슬러지를 10 ml 채취했고, 벤젠이 첨가되지 않은 반응조에서도 10 ml 채취했다. 슬러지 시료를 20 KHz에서 10분 동안 1회 초음파 진동(Fisher model-300)을 시켰다. 이 용액을 CGY 한천배지에 0.1 ml씩 떨어 뜨리고 유리봉으로 시료를 고루펴서 25°C에서 48시간 동안 배양했다. CGY 위에 생육한 독립 콜로니를 따서 CGY 사면배지에 배양하고 냉장하면서 계대배양하여 균주를 보관했다. 균의 동정은 Buchanan 등을 참고로 했다(8).

**세균의 성장곡선**

활성슬러지에서 분리해 낸 각 균의 성장특성을 알아보기 위해 BSM 배지 20 ml에 균을 접종하여 25°C에서 140 rpm으로 진탕배양하여 접종 즉시부터 매 시간마다 분광광도계(Superscan-3)를 사용하여 60 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

**반응조내 지표 원생동물의 관찰**

벤젠의 농도변화에 따른 미생물 활동을 알아보기 위하여 현미경으로 반응조의 슬러지에 있는 원생동물을 분리하여 동정하였다(14). 원생동물의 관찰을 용이하게 하기 위하여 메틸렌블로우염색과 촬영을 위해 세포 파괴없이 운동 저하를 시키는 메틸셀룰로오스 용액을 사용했다. 또한 미생물의 출현 빈도는 다음과 같이 5단계로 구분하여 관찰하면서 표시하였다. 즉 cc는 출현종이 아주 많다, c는 다량출현, (+)는 보통출현, r는 약간출현, r는 아주 약간출현 등으로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**균의 분리 및 동정**

벤젠을 첨가한 슬러지와 글루코스를 첨가한 슬러지에서 시료를 채취하여 각각 19개와 12개의 콜로니를 분리하였으며, 분리된 각각의 균주에 대한 형태학적 생화학적 특성을 실험한 결과는 Table 1에, 그리고 분리된 세균의 콜로니 빈도와 종명은 Table 2와 같다. 벤젠을 첨가한 활성슬러지에서 우점종으로 분리한 균주 JK-1은 완전히 호기성이고, 그람염색에서 음성이며, 균의 형태는 막대형이고 운동성이 있

었다. 또한 카탈라제시험에서 양성, 인돌을 형성치 않았고, ONPG(P-nitrophenyl-BD-galactopyranoside)가 음성이었으며, 기타 여러가지 생화학적 인 특성을 관찰한 결과 이 균주는 *Pseudomonas fluorescens*로 동정되었다. 또한 벤젠이 첨가되지 않은 활성슬러지에서 분리된 균주 JK-2는 호기성으로 그람염색에서 음성이며, 균의 형태는 막대형이고, 운동성이 있으며, 메틸레드 반응에서 음성이었고, ONPG가 양성이었고, 기타 여러가지 생화학적 특성으로부터 *Enterbacter cloacae*로 동정되었다. 벤젠을

**Table 1. Characteristics of microorganisms isolated from the activated sludge**

Characteristics	Strains of microorganisms isolated					
	JK-1	JK-2	JK-3	JK-4	JK-5	JK-6
Isolation	AS	AS	AS	AS	AS	AS
Oxygen	SA	SA	SA	SA	SA	SA & AA
Gram staining	-	-	-	-	-	-
Cell shape	R	R	R	R	SR	R
Lecithinase	±	-	±	-	-	-
Motility	+	+	+	-	+	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	±	+	+
Indol	-	-	+	+	-	-
Methyl red	-	+	+	-	+	-
Voges-Proskauer	+	+	±	+	-	±
ONPG	-	+	+	+	+	+
Simmon's citrate	+	±	-	+	-	+
Gas production	-	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	+	-
Arginine	+	+	-	+	-	-
Urea	-	-	±	+	-	+
Gelatine	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	+	+	±
Inositol	-	+	-	+	+	+
Sorbitol	±	+	-	+	±	+
Rhamnose	-	+	+	+	+	+
Saccharose	-	+	+	+	+	+
Arabinose	±	+	±	±	+	+

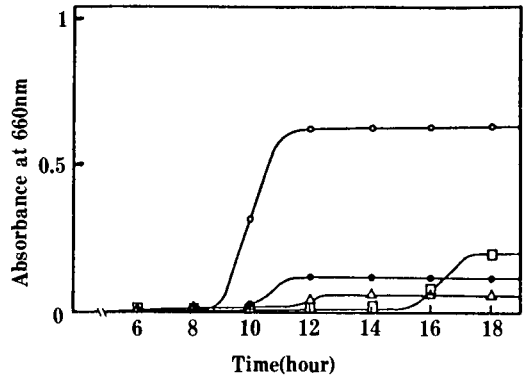
Symbols: As, activated sludge; SA, strict aerobic; AA, anaerobes; SR, short rod; R, round; (-), negative reaction; (+), positive

**Table 2. Microorganisms isolated from sludges**

Sources collected	No. of colonies isolated	Strains identified	No. of colonies identified
BA	19	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JK-1)	18
		<i>Enterobacter agglomerans</i> (JK-3)	1
GA	12	<i>Enterobacter cloacae</i> (JK-2)	2
		<i>Klebsiella oxytoca</i> (JK-4)	3
		<i>Citrobacter freundii</i> (JK-5)	3
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (JK-6)	1
BA & GA		<i>P. fluorescens</i> (JK-6)	3

BA, an activated sludge induced by benzens; GA, an activated sludge induced by glucose.

첨가한 활성슬러지에서 분리된 균주 JK-3은 그람염색에서 음성이며, 균의 형태는 막대형이고, 운동성이 있으며, 인돌을 형성하였고, VP반응에서 음성이었고, ONPG 반응이 양성이었다고, 기타 여러가지 생화학적 특성으로부터 *Enterobacter agglomerans*로 동정되었다. 벤젠이 첨가되지 않은 활성슬러지에서 분리한 균주 JK-4는 호기성이며, 그람염색에서 음성이며, 균의 형태는 막대형이고, 운동성이 없으며, 산화제 시험에서 음성이었고, 기타 생화학적 특성으로부터 *Klebsiella oxytoca*로 동정되었다. 벤젠이 첨가되지 않은 활성슬러지에서 분리한 균주 JK-5는 호기성이며, 그람염색에서 음성이며, 균의 형태는 짧은 막대형이고, 운동성이 있으며, 인돌을 형성하지 않았으며, 메틸레드반응에서 양성있었고, 기타 생화학적 특성으로부터 *Citrobacter freundii*로 동정되었다. 마지막으로 벤젠이 첨가되지 않은 활성슬러지에서 분리한 균주 JK-6은 그람염색에서 음성이며, 균의 형태는 막대형이고, 운동성이 없으며, 인돌을 형성하지 않으며, 메틸레드 반응이 음성이며, VP시험이 양성이었다고, ONPG가 양성이었다고, 기타 여러가지 생화학적 특성으로 보아 *Klebsiella Pneumonia*로 동정되었다. 분리 및 동정결과는 Table 2와 같다. 벤젠을 첨가한 슬러지에서 분리한 19개의 콜로니중에서 동정결과 *P. fluorescens* 18개 *E. agglomerans* 1개가 확인되었다. 그러므로 벤젠을 첨가한 경우에 있어 우점종이 *P. fluorescens*였음을 알 수 있었다. 또한 벤젠이 첨가되지 않은 슬러지에서 분리한 12개의 콜로니 중에서 *E. cloacae* 2개, *C. freundii* 3개, *K. pneumoniae* 1개, *K. oxytoca* 3개와 *P. fluorescens* 3개를 얻었으며 특별한 우점종



**Fig. 1. Growth curve of *Pseudomonas fluorescens* (○), *Enterobacter agglomerans* (□), *Klebsiella oxytoca* (△) and *Enterobacter cloacae* (●) at the benzene concentration of 300 mg/liter).**

**Table 3. Degradation ratios of benzene by microorganisms.**

Microorganisms	Concentration of Benzene(mg/l)		Ratio degraded (%)
	0 h	18 h	
<i>E. cloacae</i>	300	228	24
<i>E. agglomerans</i>	300	178	41
<i>K. oxytoca</i>	300	204	32
<i>P. fluorescens</i>	300	137	55

은 없었다.

**벤젠배지에서의 증식**

벤젠을 유일한 탄소원으로 넣은 BSM 배지에서 분리한 균주 6종의 분해 성장곡선은 Fig.1과 같다. 6종의 균주중 *C. freundii*와 *K. pneumonia*는 전혀 성장하지 못했으며, *E. cloacae*, *K. oxytoca* 그리고 *E. agglomerans*는 성장을 하였으나, 흡광도 값이 0.2 이하인 매우 낮은 성장을 보였다. 특히 *P. fluorescens*는 높은 성장을 보였으며, 11시간 이후의 최대 흡광도가 0.65로 측정되었다. 구체적으로 이들의 벤젠 분해정도를 알기 위해 배지에 첨가한 초기 벤젠 농도와 18시간 이후의 벤젠 농도를 측정한 결과는 다음과 같다. 초기 벤젠 농도는 300 mg/l로 측정되었고, 18시간 이후의 벤젠 농도는 *E. cloacae*균이 증식한 배지에는 228 mg/l가 잔유하여 약 24%가 분해되었고, *K. oxytoca*가 자란 배지에는 204 mg/l가 측정되었으며, 분해비율은 32% 정도, *E. agglomerans*가 성장한 배지에서는 178 mg/l가 잔존하였으며, 분해비율은 41%였고, *P. fluorescens*가 증

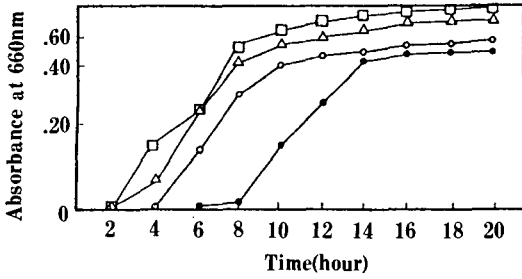


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Pseudomonas fluorescens*.

Symbols; (●): 20°C, (△): 28°C, (□): 31°C, and (○): 34°C.

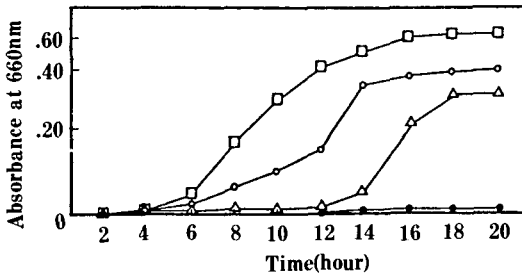


Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Pseudomonas fluorescens*.

Symbols; (●): pH 5, (△): pH 5.5, (□): pH 7, and (○): pH 9.

식한 배지에서는 137 mg/l가 잔유되었고, 분해비율은 55%였다. *P. fluorescens*가 가장 높은 분해능력을 보였다 (Table 3).

연속처리도 실험에서 90% 이상 처리시킨 슬러지 중의 대부분 우점종을 분리하여 동정한 결과는 *P. fluorescens*로 나타났으며, 이 결과는 Leisinger (9)가 벤젠 화합물의 생분해에 관여하는 가장 중요한 세균이 *Pseudomonas*속에 있다는 보고와 유사하다.

*P. fluorescens*는 방향족화합물의 산화과정에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (10, 11). 따라서 *P. fluorescens*가 벤젠 반응조에서 우점종으로 벤젠 분해능이 있다는 것이 증명되었다.

***P. fluorescens*의 온도와 pH의 변화에 따른 증식**

BSM 배지에 300 mg/l의 벤젠을 첨가하여 온도변화를 주어 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 온도 31°C에서 가장 좋은 성장상태를 보였으며, 20°C 이하에서 지연기가 길었고, 최종적인 성장상태도 저조했다. 온도 28°C, 31°C와 34°C까지는 비슷한 성장상태를 보였으며, 대수기는 4시간부터 시작되었고, 정지기는 16시간 후에 도달하였다. 배지의 초기

Table 4. Frequency of protozoa observed in the activated sludge.

Benzene (mg/l)	Protozoa isolated from sludge									
	<i>Litonotus</i>		<i>Aspidisca</i>		<i>Vorticella</i>		<i>Lecane</i>		Worm	
	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G
298	+	+	cc	cc	+	+	r	r	cc	cc
387	cc	c	cc	cc	+	+	r	+	c	c
900	c	cc	c	cc	r	+	r	cc	+	c
1144	+	cc	+	cc	rr	c	r	cc	c	c
1098	+	cc	+	c	r	cc	rr	cc	+	+
1622	rr	cc	+	+	rr	cc	r	cc	r	+
1214	rr	cc	+	+	rr	c	r	cc	+	+
1580	rr	cc	+	+	rr	cc	r	cc	+	+

Symbols: cc, so many; c, many; +, medium; r, a few; rr, few; B, an activated sludge induced by benzene; G, an activate sludge induced by glucose.

pH에 따른 균의 증식곡선은 Fig. 3에 제시되었다. pH 7.0과 9.0에서는 대수기가 접종한 후 4시간부터 시작되었으며, 정지기는 16시간 뒤에 나타났다. 또한 pH 7.0에서 제일 높은 성장을 나타냈고, 특히 5.5에서는 대수기가 접종 12시간 후에 나타났고, 정지기는 18시간 후에 도달하였다. pH 5.0에서는 성장되지 않은 점으로 보아 pH 5.0 이하의 산성에서는 성장이 정지되었다.

**지표미생물의 관찰**

원생동물은 광학현미경의 저배율에서도 관찰하기 용이하므로 선진 외국에서는 폐수처리상태와 원생동물의 종의 변화와의 관련성을 연구하여 지표미생물로 많이 연구하고 있다 (12, 13). 본 실험에서 원생동물을 관찰하여 동정한 결과는 Table 4에 있다. 연속식 활성슬러지에 있어 원생동물은 글루코스를 쓴 대조실험의 경우 *Litonotus* sp., *Aspidisca* sp., *Vorticella* sp. 등이 다량으로 관찰된 결과 벤젠 첨가시의 원생동물에 대한 독성 영향을 추정할 수 있었다. 그 결과 벤젠 농도가 증가할수록 *Litonotus* sp.와 *Vorticella* sp.가 감소하여 벤젠 농도 1,000 mg/l 이상일 때는 거의 관찰할 수 없었고, *Aspidisca* sp.는 벤젠 농도가 1,600 mg/l까지도 어느 정도 관찰할 수 있어서 내성이 있는 것으로 생각된다. 원생동물인 *Uronema parduczi*의 경우 486 mg/l인 벤젠 농도에 영향을 받아 증식이 억제된다는 보고가 있으며 (15), 본 연구의 관찰에서 *Aspidisca* sp.가 벤젠 농도 1,600 mg/l에서도 관찰된 것은 혼합배양 상태임으로 훨씬 고농도인 벤젠에서 증식할

수 있다고 생각된다. 그러므로 *P. fluorescens*가 우점종일 때 나타나는 지표생물은 *Aspidisca* sp.였다.

## 요 약

활성슬러지법에 의한 벤젠폐수 처리실험을 통하여 활성슬러지의 벤젠처리중에 실제 그에 관여하는 세균을 분리 동정하였다.

반응조에서 분리한 세균은 6종으로, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*와 *Klebsiella pneumoniae*로 동정되었다.

벤젠 분해능을 측정한 결과는 *P. fluorescens*가 55%를 18시간만에 처리했고, *E. cloacae*는 24%, *K. oxytoca*는 32%, *E. agglomerans*는 41%의 분해능을 보였다.

*P. fluorescens*의 증식 최적조건은 온도 25-31°C와 pH 7.0으로 확인되었다. *P. fluorescens*가 우점종일 때 나타나는 지표생물은 원생동물인 *Aspidisca* sp.였다.

벤젠 농도가 387 mg/l일 때에는 *Aspidisca* sp.와 *Litonotus* sp.가 증식을 최대로 하였고, 벤젠 농도가 1,600 mg/l에서는 *Litonotus* sp.와 *Vorticella* sp.는 거의 성장하지 않았다. Glucose 배지에서는 모두 성장율이 높았다.

## 참고문헌

1. Environmental Protection Agent: Identification of organic compounds in effluents from industrial Sources. EPA 560, 3-75-002 (1975).
2. Gibson, D.T.: C.R.C. Critical Res. *Microbiol. Rev.*, 1, 199 (1972).
3. Pike, E.B., E.G. Carrington, and P.A. Ashburner: *J. Appl. Bacteriol.*, 35, 309 (1972).
4. Kilbane, J.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 72 (1982).
5. Cooper, R.C., D. Jenkins, and L.Y. Young: *Aquatic microbiology Laboratory manual*, EPA I-A-4, 7 (1981).
6. Kim, J.J., J.K. Yoo, and H.H. Lee: *Kor. J. Microbiol.* (In press). (1988).
7. Kim, J.H., J.K. Yoo, and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16, (1988).
8. Buchanan, R.E.: *Manual of determinative bacteriology*. 8th ed., The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1977).
9. Leisinger, T.: *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*. Academic Press, London (1981).
10. Mandelstam, J., and G.A. Jacoby: *Biochem. J.*, 94, 567 (1965).
11. Palleroni, N.J., and R.Y. Stanier: *Biochem. J.*, 94, 569 (1964).
12. Curds, C.R., and A. Cockburn: *Water Res.*, 4, 237 (1970).
13. Sudo, R., and S. Aiba: *J. Ferm. Tech.*, 48, 342 (1970).
14. John, O.C.: *The Ciliated Protozoa*. Pergamon Press, London (1979).
15. Brigmann G. and R. Kuhn: *Water Res.*, 14, 231 (1980).

(Received August 16, 1988)