

## ***Pseudomonas* sp.에 의한 Nonylphenol Ethoxylates의 분해 Kinetics**

김수정 · 이종근 · 이상준

부산대학교 자연과학대학 미생물학과  
(1993년 11월 6일 접수)

## **Biodegradation Kinetics of Nonylphenol Ethoxylates by *Pseudomonas* sp.**

Su-Jeong Kim, Jong-Kun Lee and Sang-Joon Lee

*Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University*  
(Manuscript received 6 November 1993)

### Abstract

Optimal biodegradation kinetics models to the initial nonylphenol ethoxylates-30 concentration were investigated and had been fitted by the linear regression. Microorganisms capable of degrading nonylphenol ethoxylates-30 were isolated from sewage near Ulsan plant area by enrichment culture technique. Among them, the strain designated as EL-10K had the highest biodegradability and was identified as *Pseudomonas* from results of taxonomical studies. The optimal conditions for the biodegradation were 1.0 g/l of nonylphenol ethoxylates-30 and 0.02 g/l of ammonium nitrate at pH 7.0 and 30°C. The highest degradation rate of nonylphenol ethoxylates-30 was about 89% for 30 hours incubation on the optimal condition.

Biodegradation data were fit by linear regression to equations for 3 kinetic models. The kinetics of biodegradation of nonylphenol ethoxylates was best described by first order model for 0.1 µg/l nonylphenol ethoxylates-30 ; by Monod no growth model and Monod with growth model for 0.5 µg/ml and 1.0, 5.0 µg/ml, respectively.

Key Words : Nonylphenol ethoxylates-30, *Pseudomonas* sp., Monod and first order kinetic models

### 1. 서 론

오늘날 합성 계면활성제의 거의가 ethylene, propylene, benzene 같은 petroleum-based feed로 만들어져 있으며 대부분이 가정용 세제로 많이 사용되고 있으며 산업 세척용 및 섬유가공, 제지,

펄프산업등에서 유화제로서의 사용이 증가하고 있는 실정이다(Haupt, 1983). 특히 비이온성 계면활성제는 1980년 이후 매년 사용량이 증가하고 있다. 비이온성 계면활성제중 alkylphenol ethoxylate (APEO)는 친수성의 polyethylene glycol chain에 소수성의 측쇄상 nonylphenol이 결합된 구조인데,

이 소수성의 측쇄상 alkylphenol ethoxylate는 미생물에 의해 생분해가 되지 않는 것으로 알려져 있다(Swisher, 1983; Ball *et al.*, 1987). 계면활성제의 생분해력을 일차구조의 변환으로 인한 원물질의 감소 또는 거품감소와 같은 세제성질의 소실등으로 측정해 왔는데, 원물질의 구조변환으로 인해 생성되는 난분해성 중간대사산물의 환경에 대한 영향은 무시되어 왔다(Schoberl *et al.*, 1981). 비이온성 계면활성제의 분해 중간대사산물인 nonylphenol의 새우와 연어에 대한 LD<sub>50</sub> 은 0.13~0.3 mg/l로서 하수처리 과정에서 분해되지 않고 자연계로 유출되어 환경오염을 가중시키고 있다(Gerstl *et al.*, 1989; Folsom *et al.*, 1990; 홍순우 외, 1982).

최근 난분해성 화합물의 양적인 측면에서의 분해특성, 즉 kinetics에 대한 연구가 활발하게 보고되고 있는데, biodegradation kinetics는 자연환경에서 난분해성물질의 농도와 분해율을 정량적으로 예측하게 함으로서 다른 환경에 응용할 수 있도록 공식화시켜준다(Irwin, 1990; Murray *et al.*, 1989; Simkins, 1984).

따라서 본 연구에서는 비이온성 계면활성제의 분해 중간대사산물인 nonylphenol ethoxylate를 분해하는 미생물을 자연계로부터 분리하여 그중 우수한 분해능을 가진 미생물의 분류학적 위치 및 분해 최적조건등을 검토하고, 분리균에 의한 분해 kinetics 특성을 nonylphenol ethoxylate 농도의 양적(量的)인 측면에서 고찰하였다.

## 2. Biodegradation kinetics theory

반응기내에서의 생물학적 반응은 반응차수(reaction order)에 의한 속도론에 기초를 두고 있다. 이와같은 반응속도론에 의하면 유기물이나 아미노산, 비타민, 질소, 인 및 산소등의 환경조건이 변동함에 따라 그 반응차수가 달라진다(양경수 외, 1988). 따라서 단일 기질농도에 의하여 유일하게 성장을 제한받는 한 개체군의 growth dynamics에

관한 여러가지 수학적 공식이 제안되었으며 그중 생육도와 기질농도간의 상관관계를 잘 설명할 수 있는 수식으로 Monod 식이 잘 알려져 있다(Pirt, 1975; Simkins, 1984).

Monod kinetics는 다음과 같이 표현된다.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (1)$$

여기서  $\mu$ 는 비성장속도,  $\mu_{\max}$ 는 최대 비성장속도, S는 유기물의 농도,  $K_s$ 는 half-saturation constant이다.

그리고 단위시간당 미생물의 성장율은 식 (2)와 같다.

$$\frac{dB}{dt} = \mu \cdot B \quad (2)$$

여기서 B는 미생물의 농도, t는 시간이다. 식 (2)를 식 (1)에 대입하면 식 (3)과 같다.

$$\frac{dB}{dt} \cdot \frac{1}{B} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3)$$

또한 유기물의 제거율은 식 (4)와 같다.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y} \cdot \frac{dB}{dt} \quad (4)$$

여기서 Y는 증식수율계수이다. 여기서 식 (3)을 식 (4)에 대입하면 식 (5)와 같다.

$$- \frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot B}{Y(K_s + S)} \quad (5)$$

또한 개체군 밀도가 변할 경우 집단 크기 및 기질농도의 점차적인 변화사이의 관계식 역시 필요하며 다음과 같이 표현된다.

$$\begin{aligned} \text{Mass-Balance equation : } S_0 + q \cdot B_0 \\ = S + q \cdot B \end{aligned} \quad (6)$$

여기서  $S_0$ 는 초기 기질농도,  $B_0$ 는 초기 개체군 밀도,  $q$ 는 세포 할당량(역산출량 :  $Y^{-1}$ , 상수)이다.

$q$ 가 질소, 인산과 같은 영양원의 농도에 의하여 뚜렷한 변화를 보인다 하더라도 제한요인이 탄소 원일 경우보다는 적게 변동한다. 따라서 영양원을 제한한 성장 modeling에서  $q$ 는 시간과 기질농도에 대한 상수로 처리하게 된다. 이때  $q$ 는 원하는  $B$  값이 정확할 때만 유용한 양이며 목적 기질이 소비되는 것만을 측정할 때는 필요치 않다. 위의 사항을 맞추려면  $q \cdot B$ 는 모든 식에서  $X$ 로 대체된다.

$$\begin{aligned} q \cdot B &= X \\ B &= X/q \end{aligned} \quad (7)$$

여기서  $X$ 는  $B$ 와 동일한 개체밀도를 얻는데 필요한 기질의 양이다.

식 (7)을 식 (6)에 치환하면 식 (8)을 얻는다.

$$S_0 + X_0 = S + X \quad (8)$$

$$X = S_0 + X_0 - S \quad (8)^*$$

식 (5)에서 식 (7), (8)을 치환하면 식 (9)를 얻는다.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot S(S_0 + X_0 - S)}{k_s + S} \quad (9)$$

최종적으로 얻어진 식 (9)가 미생물 농도와 기질농도에 따른 분해 kinetics의 가장 보편적인 식이다. 식 (9)에서  $X_0$ 가  $S_0$ 를 무시할 수 있을만큼 높은 경우와 아닐 경우, 그리고  $S_0$ 가  $K_s$ 에 비해 무시될 정도로 낮은 경우의 3가지 상태에서의 Simkins *et al.*(1984)에 의해 제안된 model은 Table 1과 같다.

Table 1. Six models for biodegradation kinetics with only the variable of substrate concentration

Model and characteristics	Equation and inequalities
<b>I. Zero order</b>	
Differential form	$-dS/dt = k_1$
Integral form	$S = S_0 - k_1t$
Derived parameter	$k_1 = \mu_{max}X_0$
Necessary conditions	$X_0 \gg S_0$ and $S_0 \gg K_s$
<b>II. Monod, no growth</b>	
Differential form	$-dS/dt = k_1S/(K_s + S)$
Integral form	$K_s \ln(S/S_0) + S - S_0 = -k_1t$
Linear form	$(S_0 - S)/t = \ln(S/S_0)/K_s + k_1$
Derived parameter	$k_1 = \mu_{max}X_0$
Necessary conditions	$X_0 \gg S_0$
<b>III. First order</b>	
Differential form	$-dS/dt = k_3t$
Integral form	$S = S_0 \exp(-k_3t)$
Linear form	$\ln(S/S_0) = -k_3t$
Derived parameter	$k_3 = \mu_{max}X_0/K_s$
Necessary conditions	$X_0 \gg S_0$ and $S_0 \ll K_s$
<b>IV. Logistic</b>	
Differential form	$-dS/dt = k_3S$
Integral form	$S = \frac{(S_0 + X_0)}{1 + (X_0/S_0)\exp(k_3(S_0 + X_0)t)}$
Derived parameter	$k_3 = \mu_{max}/K_s$
Necessary conditions	$S_0 \ll K_s$
<b>V. Monod, with growth</b>	
Differential form	$-dS/dt = [\mu_{max}S(S_0+X_0-S)]/(K_s+S)$
Integral form	$K_s \ln(S/S_0) = (S_0+X_0+K_s)\ln(X/X_0) - (S_0+X_0)\mu_{max}t$
Linear form	$\ln(X/X_0)/t = k_3 \frac{[\ln(S/S_0) - \ln(X/X_0)]}{S_0 + X_0}$
Derived parameter	None $^{\dagger} \mu_{max}$
Necessary conditions	None
<b>VI. Logarithmic</b>	
Differential form	$-dS/dt = \mu_{max}(S_0 + X_0 - S)$
Integral form	$S = S_0 + X_0[1 - \exp(\mu_{max}t)]$
Derived parameter	None
Necessary conditions	$S_0 \gg K_s$

### 3. 재료 및 방법

#### 3.1. Nonylphenol ethoxylates 분해균의 분리

울산공단 지역의 토양 및 하수를 분리원으로 하여 nonylphenol ethoxylates-30을 유일한 탄소원으로

로 첨가한 최소배지에서 농화배양법에 의해 배양 하면서 생육도가 가장 우수한 균주를 공시균으로 선정하였다. 균주분리를 위하여 실험에 사용한 분리용 배지의 조성은 nonylphenol ethoxylates-30 1.0 g/l,  $K_2HPO_4$  1.2 g/l,  $NaH_2PO_4$  0.8 g/l,  $NH_4Cl$  2.0 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/l 이었다. 공시균은 nonylphenol ethoxylates-30 1.0g/l를 첨가한 한천 사면배지에 보존하였다.

### 3.2. 분리균의 분류와 동정

분리균의 형태학적, 배양적, 생화학적 제특성을 Bradshaw의 방법(1979), Philipp등의 방법(1981), Macfaddin의 방법(1980)에 준하여 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1(1984)에 따라 분류·동정하였다.

### 3.3. Nonylphenol ethoxylates의 정량분석

Nonylphenol ethoxylates의 정량분석은 Stevenson의 방법(1954)에 의하여 실시하였다. 즉 시료에 diluted HCl(1+4) 4 drops, BaCl solution(10%) 2 drops, phosphomolybdic acid(10%) 2 drops를 넣어 혼합 후 원심분리하여 침전물을 회수, 건조시킨다. 침전물에 conc.  $H_2SO_4$  1.2ml, 증류수 6ml, ammonium thiocyanate solution(5%) 1ml,  $SnCl_2$  solution 0.5ml를 넣어 혼합 후 최종용량을 10ml로 하였다. 원심분리후 상등액의 흡광도를 470nm에서 측정하였다.

### 3.4. 분해최적조건의 검토

공시균에 의한 분해최적조건을 결정하기 위하여 분리용 배지를 기본배지로 사용하였으며, 250ml 용량의 삼각플라스크에 50ml의 배지를 넣어 30°C, pH 7.0에서 180 rpm으로 30시간 회전진탕배양하였다.

**탄소원의 농도에 따른 영향** : 기본배지에 nonylphenol ethoxylates-30의 농도를 각각 200~

2000ppm씩 첨가하여 배양한 후 분해율을 측정하였다.

**질소원의 종류에 따른 영향** : 기본배지에 최적 탄소원 농도로 결정된 nonylphenol ethoxylates-30 1000 ppm을 첨가하였으며, 질소원으로서 각종 무기질소원과 유기질소원을 0.2%씩 첨가하여 배양한 후 분해율을 측정하였다.

**온도와 pH의 변화에 따른 영향** : 상기의 결과 최대의 분해율을 나타내는 탄소원과 질소원을 기본배지에 첨가하여 25°C~40°C, pH 7~9로 각각 조절하여 배양한 후 분해율을 측정하였다.

### 3.5. Nonylphenol ethoxylates-30 분해 kinetics 조사

전배양은 nonylphenol ethoxylates-30 1000 ppm을 함유한 기본배지에 보존용 배지로부터 한 백균이를 취하여 접종하여 30°C, pH 7.0, 180 rpm으로 27시간 회전진탕배양하였다. 본 배양에의 접종은 대수증식기에 도달한 전배양액을 2%(v/v) 접종하여 30°C, pH 7.0, 180 rpm으로 30시간 회전진탕배양하였다. Nonylphenol ethoxylates-30의 농도를 각각 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 5000 ppm으로 조절하여 탄소원 농도에 따른 기질 분해 kinetics를 조사하였으며, 시간에 따른 기질 분해 kinetics 조사를 위하여 18시간동안 1시간 간격으로 nonylphenol ethoxylates-30의 잔존량을 정량분석하였다.

### 3.6. Data 분석

Nonylphenol ethoxylates-30의 biodegradation 실험결과로부터 얻어진 data는 선형회귀로 분석되었다(Irwin, 1990; Simkins *et al*, 1984). 시간에 따른 kinetics 실험 data는 Table 1의 6가지 model에 선형회귀분석으로 적합시킨 후 결정계수( $r^2$ )의 값이 가장 큰 model을 선정하여 가설검정을 위하여 유의수준 5%로 하여 F test와 t test를 실시하였다(강병서,1990).

Table 2. Taxonomical characteristics of EL-10K strain

Contents	Characteristics
Morphological characteristics	
Cell shape	Rod
Gram staining	-
Motility	+
Spore	-
Cultural characteristics	
Colonies on nutrient agar	Irregular, umbonate
Colony surface	Smooth
Colony color	White to cream
Hydrolysis of gelatin	-
Biochemical characteristics	
Catalase test	+
Voges-Proskauer test	-
Indole test	-
Oxidation-fermentation test	Oxidation
Cytochrome oxidase test	+
Simons citrate test	+
$\beta$ -galactosidase test	+
Arginine dehydrolase test	-
Lysine decarboxylase test	+
Ornithine decarboxylase test	-
H <sub>2</sub> S production test	-
Urease test	+
Tryptophane deaminase test	-
Fluorescent pigment test	-
Growth at 4°C	-
Growth at 42°C	-

ptophan deaminase test에서 음성을 나타내었으며, 4°C와 42°C에서 생육하지 못하였다(Table 2). 이상의 실험결과를 검토한 결과 EL-10K는 *Pseudomonas*속으로 동정되었다.

#### 4.2. Nonylphenol ethoxylates-30의 분해 최적조건

탄소원의 농도에 따른 영향 : 기본배지에 nonylphenol ethoxylates-30의 농도를 각각 200~2000 ppm씩 첨가하여 30시간 배양 후 분해율을 측정 한 결과는 기본배지에 사용하였던 농도 1000 ppm에서 가장 분해율이 우수하였고, 2000 ppm에서는 분해율이 50% 정도로 미약하였다(Fig. 1).

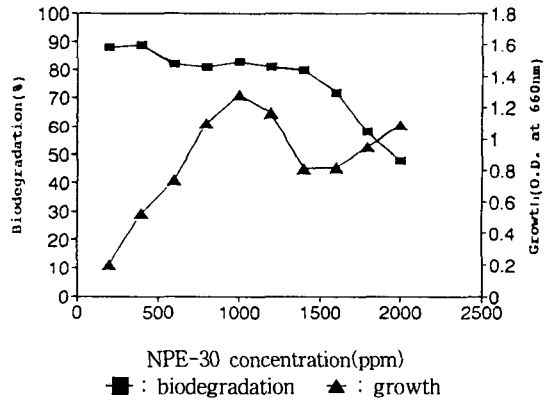


Fig. 1. NPE-30 concentration effect on the growth and biodegradation by *Pseudomonas* sp.

### 4. 결과 및 고찰

#### 4.1. 균주의 분리 및 동정

Nonylphenol ethoxylates-30의 분해능이 확인된 10여 균주를 분리하였으며 이들 중 nonylphenol ethoxylates-30의 분해능이 가장 우수한 균주로 EL-10K이 선정되었다. EL-10K는 그람음성의 간균으로 multi polar flagella에 의한 운동성을 가졌고, catalase test, cytochrome oxidase test, simons citrate test, arginine dehydrolase test, H<sub>2</sub>S test, fluorescent pigment test에서는 양성을 나타내었다. VP test, indole production test, lysine decarboxylase test, ornithine decarboxylase test, urease test,  $\beta$ -galactosidase test, try-

질소원의 종류에 따른 영향 : 최적 탄소원 농도로 결정된 nonylphenol ethoxylates-30 1000 ppm을 첨가한 기본배지에 각종 질소원을 0.2%씩 첨가하여 30시간 배양 후 분해율을 측정 한 결과 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 가장 우수한 분해율을 나타내었다 (Table 3).

온도와 pH변화에 따른 영향 : 최대의 분해율을 나타내는 탄소원과 질소원을 기본배지에 첨가하여 30시간 배양 후 분해율을 측정 한 결과 30°C (Fig. 2), pH 7.5(Fig. 3)에서 분해율이 가장 우수하였다.

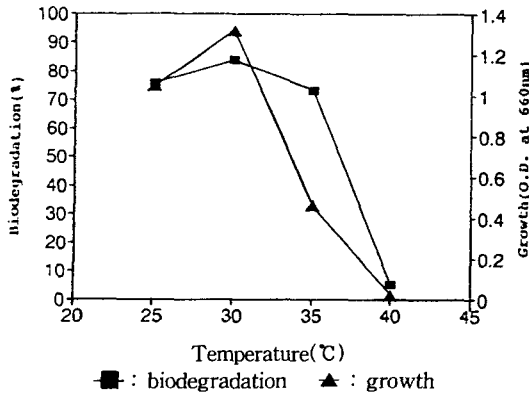


Fig. 2. Temperature effect on the growth and biodegradation by *Pseudomonas* sp.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the biodegradation of nonylphenol ethoxylates-30 by *Pseudomonas* sp.

Nitrogen sources(0.2%)	Biodegradation(%)
NH <sub>4</sub> Cl	82
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	86
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	84
KNO <sub>3</sub>	84
NaNO <sub>3</sub>	4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	66
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	76
Urea	28
Bactopeptone	72
Polypeptone	80
Yeast extract	75

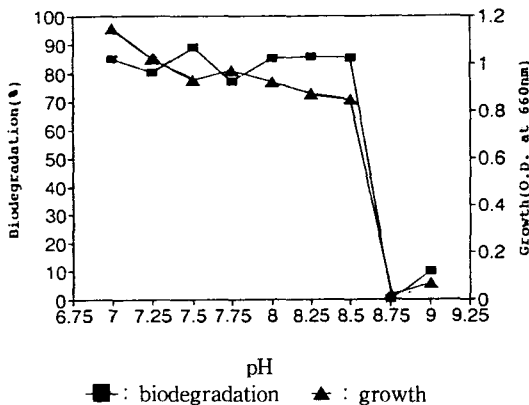


Fig. 3. pH effect on the growth and biodegradation by *Pseudomonas* sp.

### 4.3. Nonylphenol ethoxylates-30의 분해 kinetics

Nonylphenol ethoxylates-30을 100, 500, 1000, 5000 ppm의 농도별로 18시간동안 1시간 간격으로 분해율을 조사한 결과는 Fig. 4 - Fig. 7에서 보는 바와 같다. Table 1의 3가지 분해 kinetic model들 즉, zero order, Monod, first order model에 시간에 따른 분해율 데이터를 선형회귀분석으로 적합시켜 결정계수( $r^2$ )가 가장 큰 model을 nonylphenol ethoxylates-30의 분해 kinetics의 최적model로 선정하였다. 최적 분해 kinetic model로 선정된 parameters의 값은 Table 4와 같다. F test와 t test 결과 선정된 models이 모두 타당하였다.

Table 4. Linear regression estimates of kinetic parameter and selected model in experiments with different initial substrate concentration

Concets	Nonylphenol ethoxylates-30 concentration			
	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	5000 ppm
Model	First order	Monod, no growth	Monod,growth	Monod,growth
Rate constant	$k_3=0.05$	$k_1=2.33 \times 10^{-4}$	NA*	NA*
$\mu_{max}$	NA*	NA*	$1.6 \times 10^{-2}$	$6.5 \times 10^{-4}$
$K_s$ (ppm)	NA*	0.326	0.701	4.001
Coefficient of determination ( $r^2$ )	0.88	0.95	0.90	0.97

\* Not applicable.

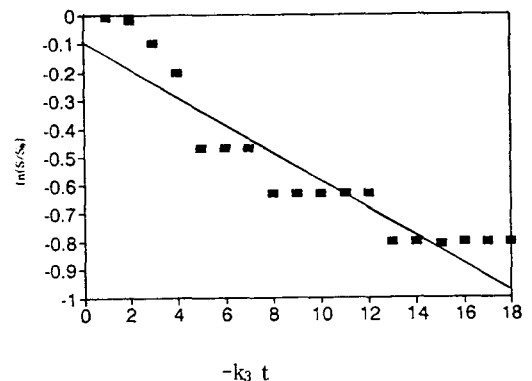


Fig. 4. Linear regression plot of nonylphenol ethoxylate-30 100ppm(First order).

요 약

Nonylphenol ethoxylates-30을 분해할 수 있는 *Pseudomonas* sp.를 분리, 동정하였다. Nonylphenol ethoxylates-30의 최적분해조건은 탄소원으로 nonylphenol ethoxylates-30 1.0 g/l, 질소원으로 ammonium nitrate 0.02 g/l, pH 7.5, 30°C였다. 최적분해 조건에서 nonylphenol ethoxylates-30은 배양 30시간 후 89%가 분해되었다. 최적분해조건에서 nonylphenol ethoxylates-30의 초기농도가 각각 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 5000 ppm일때 시간에 따른 분해율을 수식으로 설명할 수 있는 가장 적합한 분해 kinetics는 각각 first order model, Monod no growth model, Monod with growth model로 나타났다.

참고문헌

姜炳瑞, 1990, 現代統計學, 貿易經營社.  
 裴京淑, 河永七, 洪淳祐, 1982, Isolation and identification of detergents degrading bacteria in the Han river downstream, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 20, 98-104.  
 양경수, 김오식, 1988, 생물학적 폐수처리공정과 설계, 동화기술, 1-11.  
 Ball, H. A., M. Reinhold, and P. L. McCarty, 1989, Biotransformation of halogenated and nonhalogenated octylphenol polyoxyethylates residues under aerobic and anaerobic conditons, ES & T, 23, 951-961.  
 Bradshaw, L. J., 1979, Laboratory Microbiology, 3rd ed., Saunde Company, Philadelphia.  
 Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1984, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, The William and Wilkins Co., Baltimore.

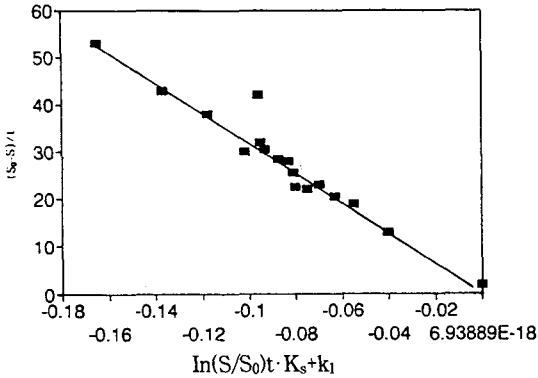


Fig. 5. Linear regression plot of nonylphenol ethoxylate-30 500 ppm(Monod, no growth).

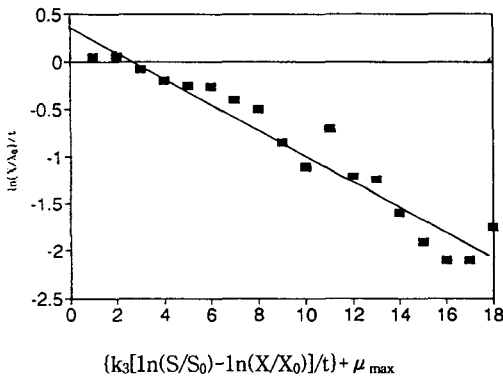


Fig. 6. Linear regression plot of nonylphenol ethoxylate-30 1000 ppm(Monod growth).

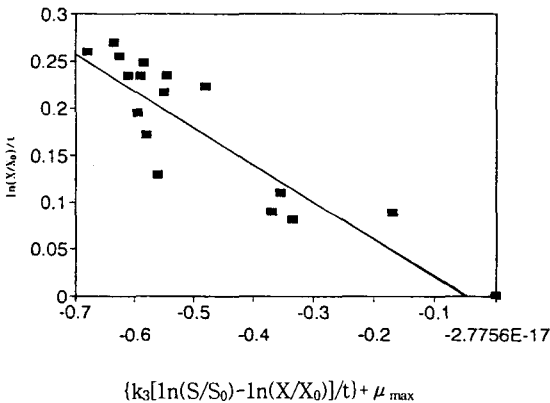


Fig. 7. Linear regression plot of nonylphenol ethoxylate-30 5000 ppm(Monod growth).

- Folsom, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Prichard, 1990, Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 6, 1279-1285.
- Gerstl, Z., Y. Chen., U. Mingelrrin, and B. Yaron, 1989, Toxic organic chemicals in porous media, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Haupt, D. E., 1983, U.S. detergent/surfactant trends-1980's, *Tenside. Detergen.*, 20, 332-337.
- Irwin, W. J., 1990, Kinetics of drug decomposition, Elsevier Science Publisher B. V.
- Macfaddin, J. F., 1980, Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Murray, A. H., L. L. Persons, and M. S. Smith, 1989, Kinetics of nitrate utilization by mixed populations of denitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 717-721.
- Philipp, G., 1981, Manual of Methods for General Bacterology, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Pirt, S. J., 1975, Principles of microbes and cell cultivation, John Willey & Sons.
- Schoberl, V. P., E. Kunkel, and K. Espeter, 1981, Vergleichende untersuchungen uber den mikrobiellen metabolismus eins Nonylphenol und eins Oxoalkohol-ethoxylates, *Tenside. Detergen.*, 18, 64-72.
- Simkins, S. and M. Alexander, 1984, Models for mineralization kinetics with the variable of substrate concentration and population density, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1299-1306.
- Stevenson, D. G., 1954, The absorptiometric determination of a nonionic detergent. *Analyst.*, 79, 504-507.
- Swisher, R. D., 1987, Surfactant biodegradation, Marcel Dekker, Inc.