

## Phenol을 이용하는 균주에 의한 Trichloroethylene 분해

이숙희 · 홍성용 · 하지홍\*  
경북대학교 유전공학과

### Biodegradation of Trichloroethylene by a Phenol-Utilizing Bacterium

Lee, Suk-Hee, Sung-Yong Hong and Ji-Hong Ha\*

Department of Genetic Engineering Kyungpook National University,  
Taegu 702-701, Korea

**Abstract** — The bacterial strain which utilizes phenol and degrade TCE was isolated from an industrial waste site. The bacterial strain was named as T5-7 and identified as an *Acinetobacter* species. After phenol-induction, the strain T5-7 removed TCE efficiently without cell growth. So, it seems that TCE degradation was not related to cell growth. TCE degradation increased when initial cell concentrations of phenol-grown T5-7 were high. In the presence of phenol, initial degradation of TCE was delayed but total amount of degradation was not affected at final stage. The strain cultured in 0.1% yeast extract did not degrade TCE, which indicates that phenol induction was essential to the TCE degradation.

Trichloroethylene(TCE)는 여러 산업체에서 유기 용제, 연화제, 드라이클리닝 용제 및 탈지제로 폭 넓게 사용되고 있으며 실제로 환경수 중에 널리 유출되는 유기염소 물질로써(1) 최근 우리나라에서도 지하수 오염의 주요인으로 등장하고 있다(2).

TCE는 자연분해가 어려운 발암성 물질로써 국내 사용량이 상당히 많으며 그 사용량이 매년 증가하고 있는 실정이다(3). 특히, 산업화된 지역에서의 검출치가 높고 수계에서의 반감기가 300일 이상이 되는 것으로 알려져 있으며 우리나라에서는 1993년부터 음용수 규제대상물질로 선정하였다(4).

물리, 화학적인 방법에 의한 TCE 처리는 비용이 많이 들며 오염원을 또 다른 곳으로 방출시켜서 환경문제를 제기하므로 미생물을 이용한 생물학적인 처리를 통하여 유독한 부산물없이 TCE를 제거하려는 연구가 진행되고 있다.

1980년대 초반까지만 해도 TCE는 수중환경에서 지속적으로 존재하며 미생물에 의한 분해는 일어나지 않는다고 생각하였으나(5) 1980년대 중반부터 미생물

분해에 관한 보고가 발표되기 시작했다. 혐기상태에서의 TCE 분해는 매우 느리며 돌연변이를 일으키고 자연분해가 어려운 vinyl chloride(VC)를 생성하는 것으로 보고되어 있으며(6, 7) 호기성 분해의 경우 Wilson등(8)이 천연가스가 포함된 공기(77% methane)를 soil column에 공급할 경우 cometabolism 되는 것을 발견한 이후로 methane(9, 10), ammonia(11), propane(12), 방향족 화합물등을 분해하는 균들을 이용하여 TCE를 cometabolism 시키려는 연구가 행하여져 왔다. 방향족화합물을 이용하는 *Pseudomonas cepacia* G4(13-16), *P. putida* F1(17), *P. mendocina*(18) 등은 phenol이나 toluene등의 유도기질이 첨가되었을 때 TCE를 분해할 수 있으며 phenol이나 toluene을 분해하기 위해 유도되어지는 비특이적인 oxygenase들이 성장과는 무관하게 TCE를 부수적으로 산화할 수 있는 것으로 알려져 있다(19).

본 연구에서는 난분해성인 TCE를 생물학적인 방법으로 처리하기 위한 연구의 일환으로써 TCE를 cometabolism 시키고자 하였으며 각종 산업용제로 많이 이용되며 폐수중에 널리 유출되는 phenol을 유도기질로 하였다. Phenol로 유도되었을 때 TCE를 분해할 수 있는 세균을 분리하여 동정하였으며 그 분해특성에 관해 연구하였다.

**Key words:** Phenol-induced, degradation of trichloroethylene, *Acinetobacter* sp.

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 균주 분리

대구, 부산, 울산, 구미의 공단지역 폐수유입지 토양과 하수의 시료로부터 우선 phenol을 분해하는 균을 분리하였다. 시료를 멸균수에 적당히 희석한 후 0.1% yeast extract를 포함한 MM2 최소기본배지(20)에 접종하여 30°C, 180 rpm에서 24시간 진탕배양하였다. 배양액을 MM2 배지로 희석하여 50 ml vial에 10 ml씩 접종한 후 phenol 농도가 2 mM이 되도록 넣어주었다. 30°C, 180 rpm에서 24시간 진탕배양한 후 분해능이 좋은 vial을 선택하여 적당량을 희석한 후 LB 한천배지에 도말하여 균을 순수분리하였다. 순수분리된 각균의 phenol 분해능을 측정하여 우수한 균주를 선발하였고 이들 중 trichloroethylene 분해능이 가장 우수한 균주를 선발하여 본 실험에 사용하였다.

### 균의 동정

분리균주의 형태, 생리, 및 배양학적 특성을 조사하였다. 특성조사는 Manual of Methods for General Bacteriology(21)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(22)의 방법에 따라 행하였다.

### Phenol 분해능 측정

Phenol이 첨가된 MM2 배지에서 배양된 균액을 10,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액을 UV-spectrophotometer(Beckman DU-65)를 이용하여 UV 범위에서 scanning하거나 270 nm에서 흡광도값으로 분해능을 측정하였으며 아울러 균체중식도 관찰하였다.

### TCE 분해능의 측정

2 mM phenol에서 대수증식기까지 자란 균을 원심분리하여 모은 뒤 일정한 균체농도가 되도록 MM2 최소기본배지에 현탁하여 10 ml vial에 2 ml씩 접종하였다. 유일탄소원으로 TCE(12.5 mM stock in water)를 넣고 Teflon-lined rubber septa로 막은 뒤 밀봉하여 30°C, 180 rpm에서 배양하였다. TCE는 휘발성이 높은 물질이므로 남아 있는 TCE양을 측정하기 위해 반응 vial 속에 포함되어 있는 전체 TCE를 추출하였다. 일정 시간동안 배양한 후 5 ml syringe를 이용하여 2 ml의 n-pentane을 septa를 통해 배양액에 주입하고, 이를 30분간 30°C에서 진탕하였으며 0.5 µl n-pentane 층을 microsyringe로 취하여 GC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

Table 1. Operation conditions of gas chromatography for TCE degradation

Contents	operation conditions
Gas chromatography	Pye Unicam series 304
Detector	ECD
Column	3 m×5 mm(i.d.) stainless steel 10% silicon DC-200 chromosorb W (80~100 mesh)
Injector Temp.	150°C
Oven Temp.	85°C
Detector Temp.	200°C
Carrier gas	N <sub>6</sub>
Flow rate	40 ml/min
Injection volume	0.5 µl
Attenuation	1024
Chart speed	0.5 cm/min

### Phenol의 분해와 TCE 분해의 연관성 조사

T5-7에 의해서 TCE가 분해될 때 phenol에 의한 유도가 필수적인 지를 조사하기 위하여 T5-7 균주를 0.1% yeast extract가 첨가된 MM2 배지에 배양한 후 위와 동일한 방법으로 TCE 분해능을 측정하였다.

### Gas chromatography 조건

본 실험의 gas chromatography는 Philips사의 Pye Unicam Series 304 chromatograph를 이용하였으며 integrator는 동사의 PU 4810 model을 이용하였다. 정량분석을 위한 조건은 Table 1과 같다.

### 환경요인에 의한 영향

TCE 분해에 미치는 초기접종량의 영향을 조사하기 위하여 균체량을 O.D. 0.3~1.0으로 조절하여 분해를 조사하였으며 아울러 다양한 초기균체농도에서 phenol과 TCE가 동시에 존재할 때의 TCE 분해양상을 조사하였다. 기질농도에 대한 영향을 조사하기 위해 TCE의 농도를 조절하여 분해능을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균의 선발

Phenol 분해능이 우수하며, phenol에서 자란 후 TCE 분해능이 가장 좋은 T5-7 균주를 선발하여 TCE 분해를 위한 균주로 사용하였다. T5-7이 phenol을 이용할 수 있는 pH와 온도 범위는 각각 pH 5~9, 온도 20~37°C였으며 특히 pH 5에서도 phenol을 잘 이용하는 것으로 나타났다.

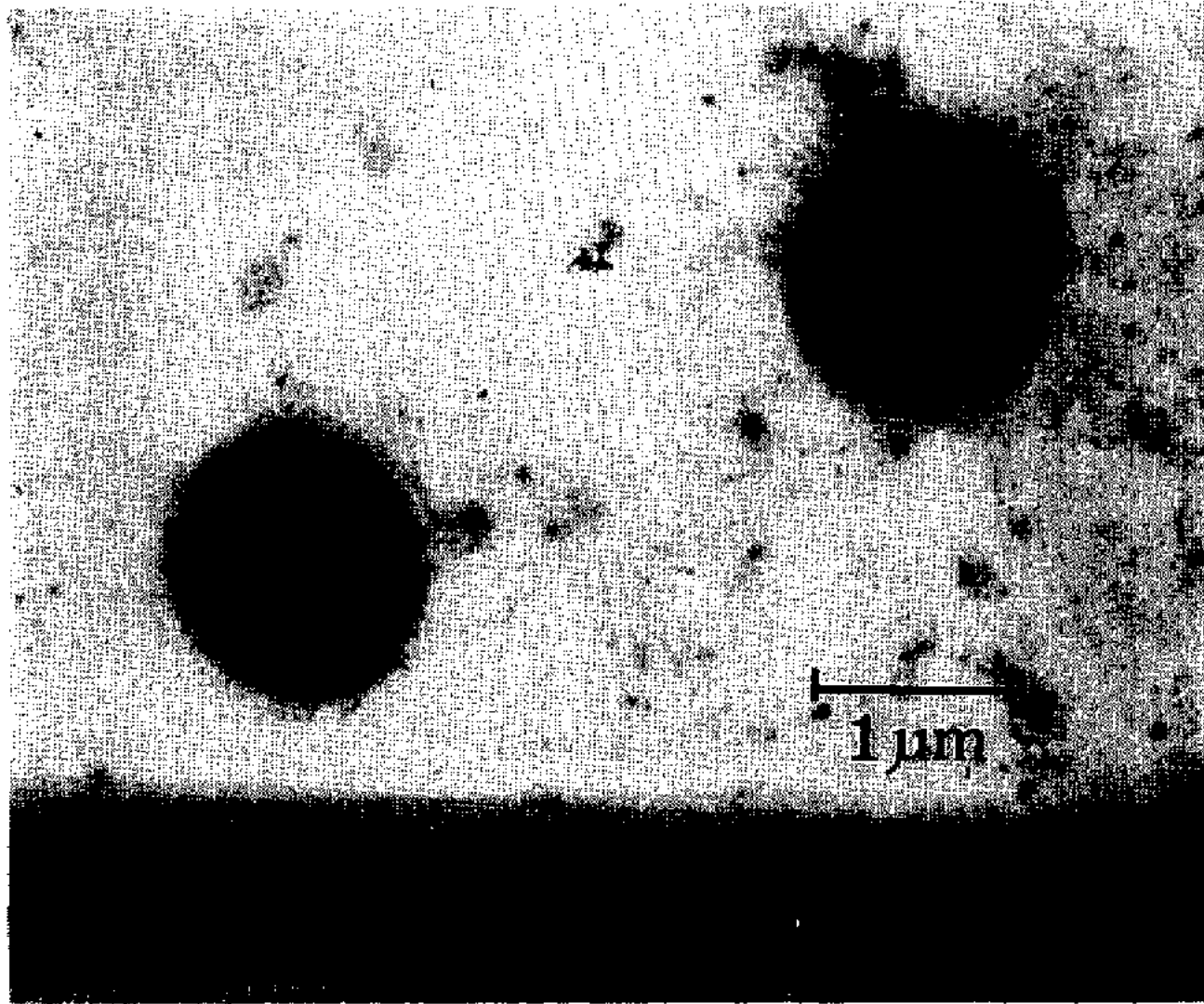


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain T5-7(×12,000).

Table 2. Morphological characteristics of the strain T5-7

Characteristics	T5-7
Cell form	spherical
Motility	twitching
Flagella	-
Cell diameter, μm	0.83~1.08

균의 동정

선발된 T5-7 균주의 전자현미경 사진을 Fig.1에 나타내었다. T5-7의 모양은 구형에 가까웠고 편모를 가지고 있지 않았으며 운동성은 twitching motility를 보여 주었다.

T5-7의 형태학적 특징을 Table 2에, 생리 및 배양학적 특성은 Table 3에 나타내었다. T5-7은 Gram negative 균주로 oxidase 반응에서 negative 결과를 보였다. 탄소원의 이용성에서 T5-7 균주는 hexose를 거의 이용하지 못하는 반면 유기산류를 잘 이용하였다. 이상의 형태적 관찰, 생리, 배양학적 특성과 탄소원 이용성을 종합하여 Bergey's manual을 토대로 검토한 결과 T5-7 균주는 *Acinetobacter* sp.로 동정되었다.

TCE 분해능 측정과 phenol 분해와의 연관성 조사

Phenol로 유도된 T5-7 균주를 이용하여 TCE 분해능을 측정한 gas chromatography 결과를 Fig.2에 나타내었으며 시간이 지나면서 TCE peak가 급격하게 감소하는 것을 보여주고 있다.

Fig.3은 TCE 분해와 균체증식의 연관성을 조사한

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the strain T5-7

Characteristics	T5-7
Gram stain	d
KOH method for Gram determination	G(-)
Catalase	+
Oxidase	-
Acid production from glucose	-
Oxidation/fermentation(glucose)	oxidation
Gelatin liquefaction	-
Starch hydrolysis	-
Casein hydrolysis(milk)	-
Lipid (Tween 80)	+
Fluorescent pigment	-
Arginine dihydrolase	-
Nitrate reduction	-
Lecithinase	d
Citrate utilization	+
Methyl-red	-
Voges-Proskauer	-
Indole production	-
Growth at 4°C	-
Growth at 41°C	+
H <sub>2</sub> S formation	-
Utilization of carbon sources*	
D-Arabinose, Benzoate, L-Glutamate, Na-acetate, Na-lactate, Na-citrate, Na-propionate	+
L-Arginine, Glycine, Glycerol, M-Hydroxybenzoate, Inositol, Isopropanol, Lactose, Maltose, Glucose, Mannitol, Starch, L-Threonine	-

+ : positive, - : negative, d: doubtful.

\*Each carbon sources were added with concentrations of 1.0% to MM2 medium and the growth was checked after 3 days cultivation at 30°C.

결과로써 TCE가 분해되는 동안 균체의 증식은 이루어지지 않았으며 TCE 분해가 초기에 상당히 빨리 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 121°C 에서 15분간 열처리한 균액을 control로 사용하였을 때 TCE의 농도가 균이 접종되지 않은 배지의 control과 비슷한 농도로 측정되었으므로 TCE가 균체에 흡착하지는 않는 것으로 보여진다.

T5-7 균주가 phenol에 의한 유도 없이도 TCE를 분해할 수 있는 지를 알아보기 위해 yeast extract를 넣은 MM2 배지에서 배양한 균을 모아 TCE 분해능을 조사하였다(Fig.4). Yeast extract에서 자란 균주는 15시간이 지나도록 TCE 분해를 보이지 않았으며 phenol(2 mM)을 넣어 준 배양액은 초기 적응기를 거치다가 TCE 분해를 약간 보이는 바 T5-7에 의한 TCE

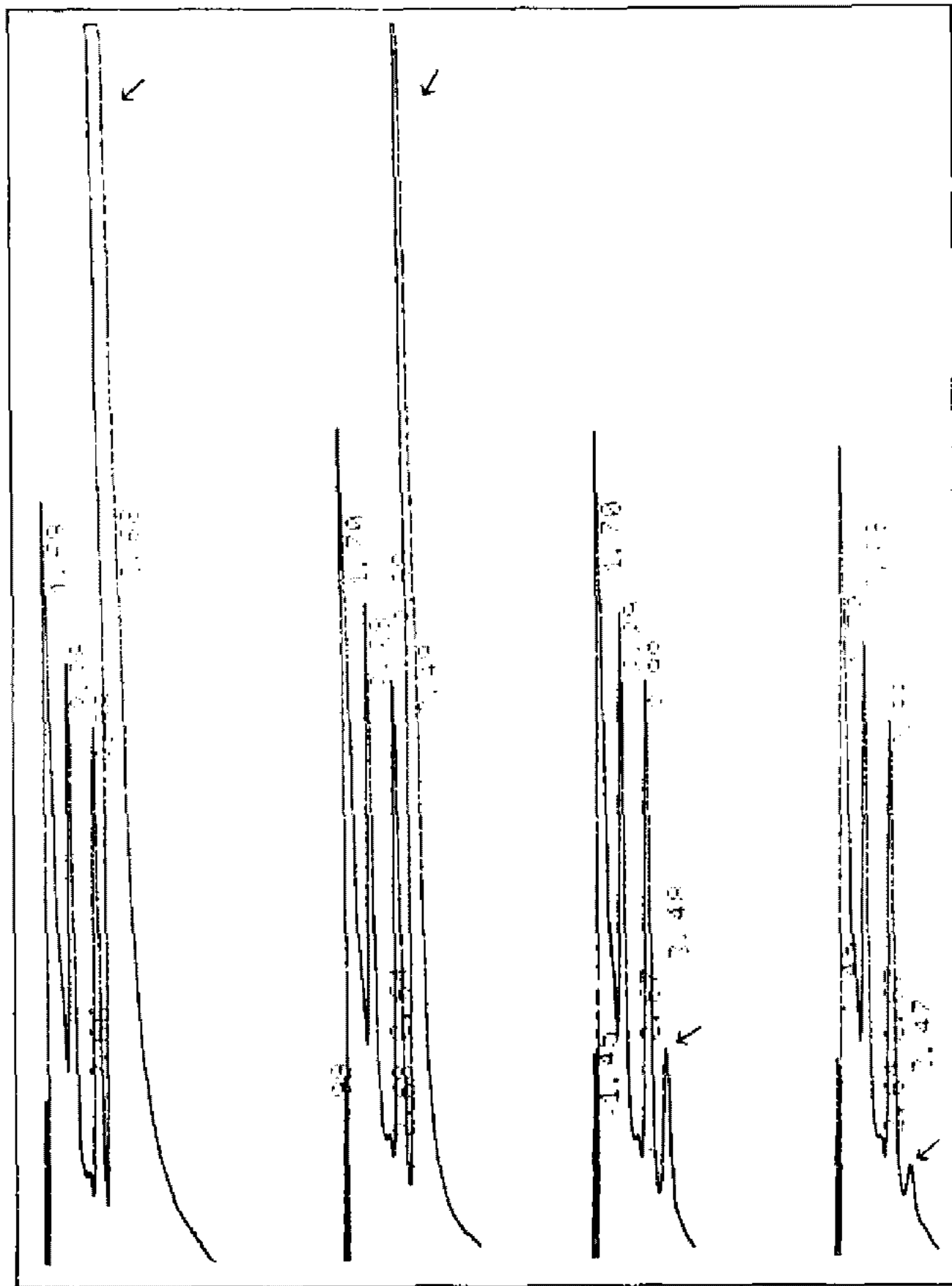


Fig. 2. Gas chromatographic profiles of pentane extracts of T5-7 culture medium.

Time course of TCE degradation by T5-7 with 22.6  $\mu$ M TCE. The peak of TCE is indicated by the arrows.

분해는 phenol에 의해 유도된 것으로 사료된다. Phenol의 존재 하에서 완전분해를 이루지 못하는 것은 yeast extract에서 자란 T5-7 균주가 phenol에 의해 조금은 유도되어 TCE 분해능을 보이거나 완전분해를 이를 정도의 유도는 되지 않은 것으로 보여진다. *P. cepacia* G4의 경우에 glucose, acetate와 같은 기질에서 균을 성장시킬 경우 TCE 분해가 일어나지 않았으나 phenol, toluene, o-cresol, m-cresol로 균을 유도했을 때는 TCE 분해가 일어났으며 TCE 분해에 관계하는 효소는 toluene dioxygenase로 밝혀졌다 (15). 이와같이 방향족 화합물의 분해에 관여하는 oxygenase들이 TCE 분해에 관여하는 것으로 알려져 있으나 Nelson(23)등이 toluene dioxygenase 외에 다른 ring dioxygenase를 가진 미생물을 TCE 분해에 이용했을 때 TCE를 분해하지 못했으므로 TCE의 분해가 aromatic ring dioxygenase의 일반적인 현상은 아니라는 것을 밝힌 바 있다.

TCE의 분해에 미치는 환경인자의 영향

초기접종량 : T5-7에 의한 TCE 분해는 균체의 증

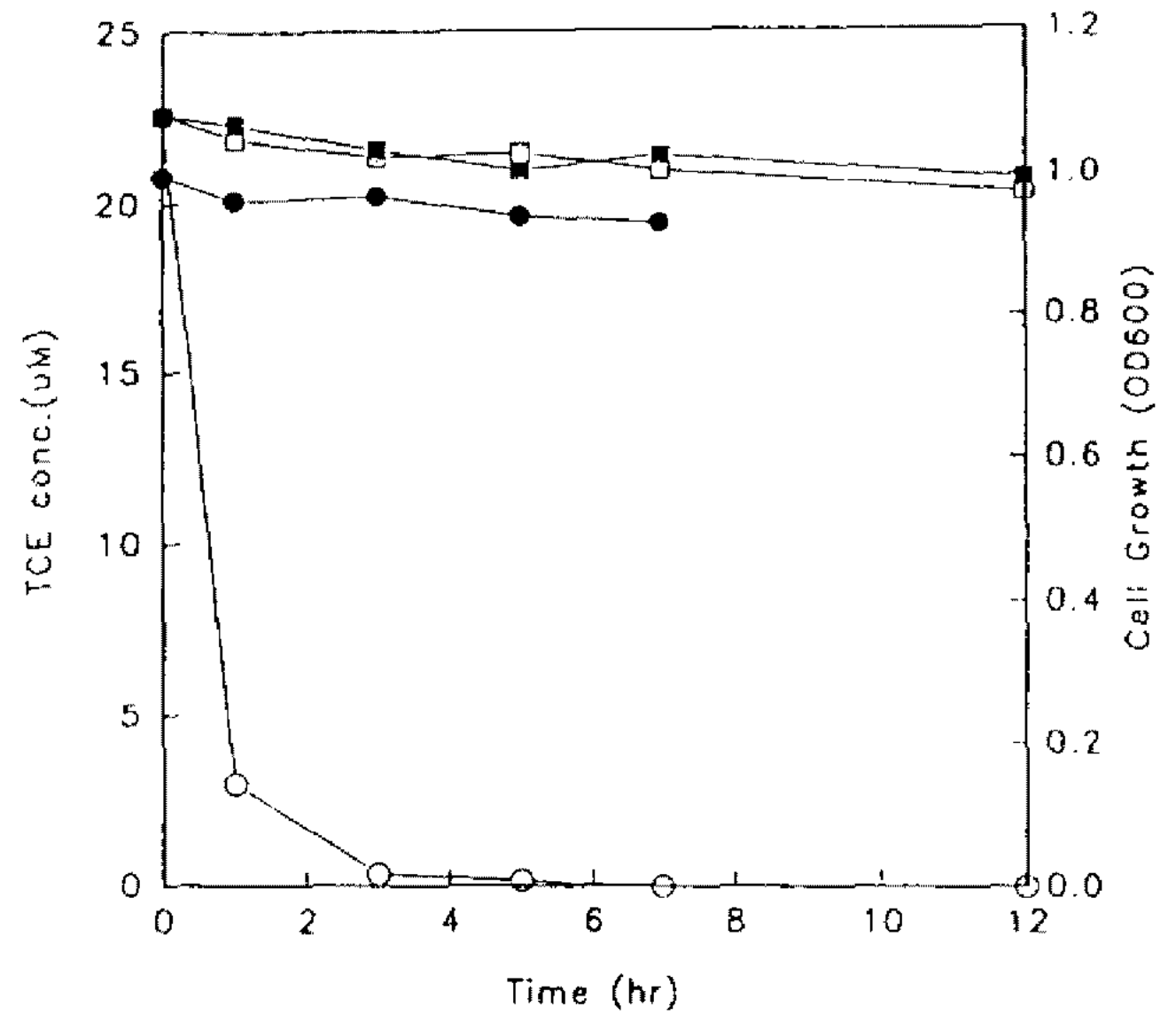


Fig. 3. Time course of TCE degradation and cell growth.

Cells grown on 2 mM phenol were harvested by centrifugation and suspended in MM2 medium to the cell density of 1.0. Appropriate amount of TCE stock was added. At time interval, TCE degradation was measured by gas chromatography. Heat-killed control was prepared by autoclaving cell suspension at 121°C, 15 min prior to inject TCE stock solution.

●: cell density, ○: remaining TCE conc, □: TCE control (uninoculated), ■: heat-killed control.

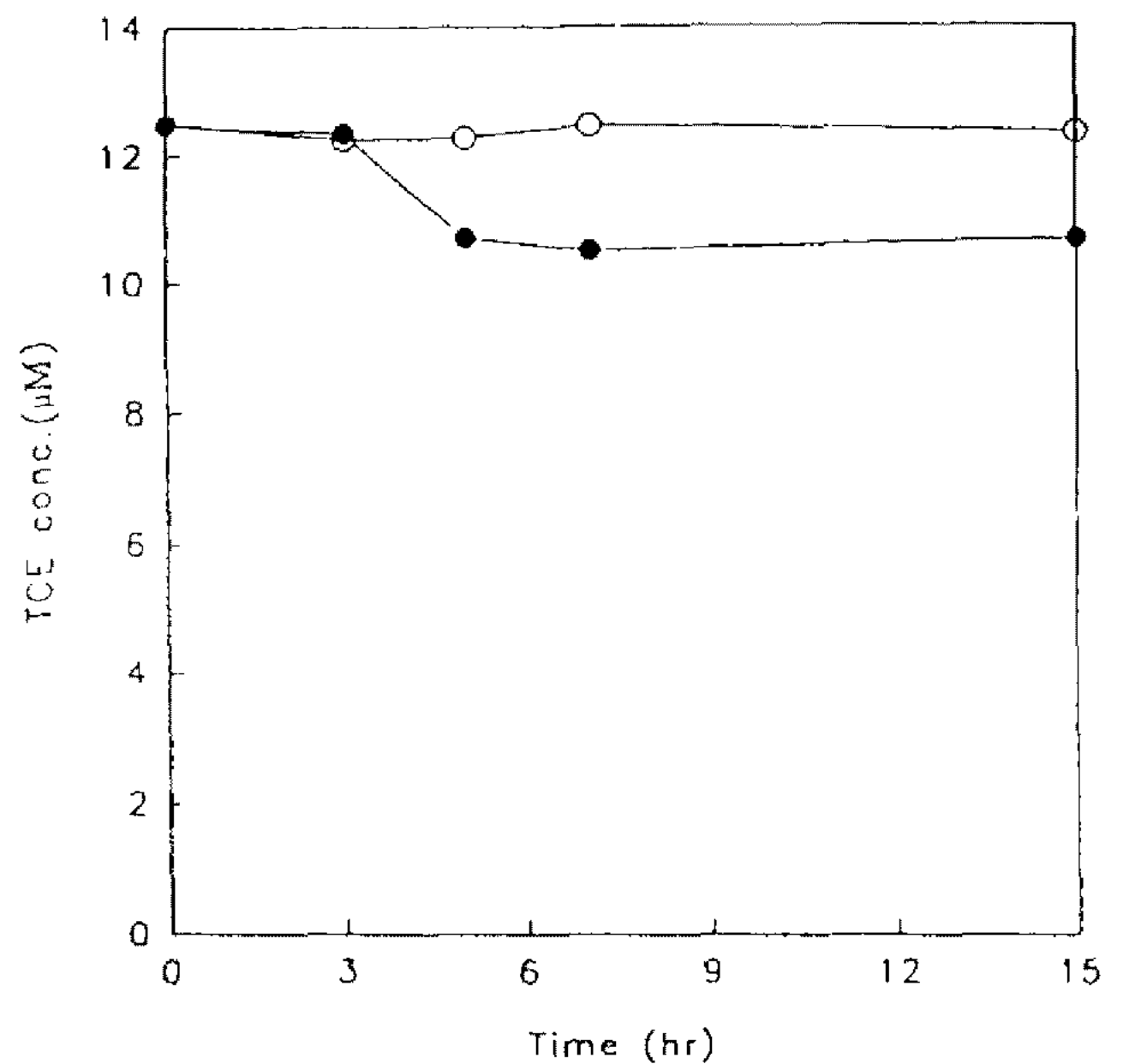
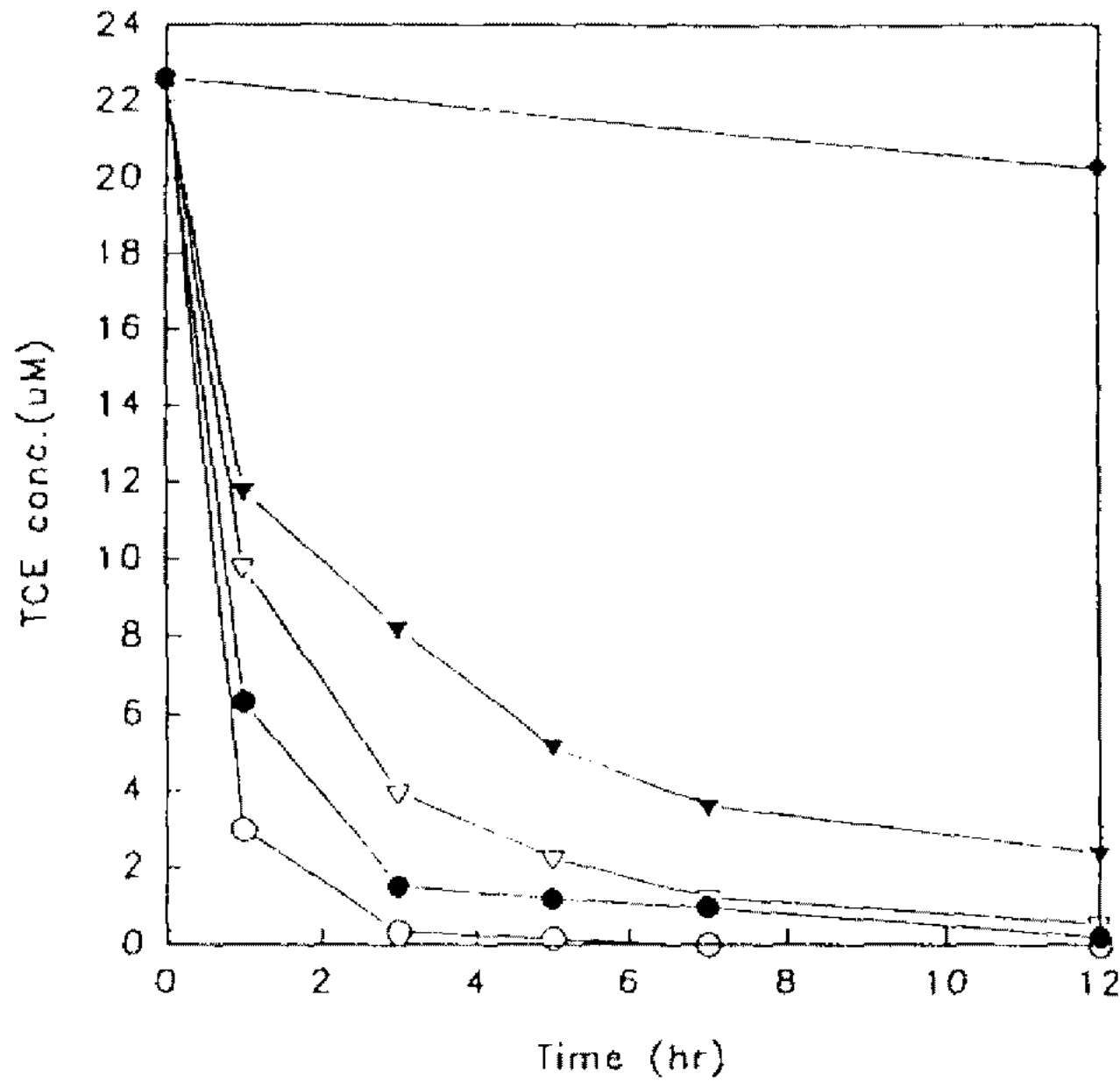


Fig. 4. TCE degradation by T5-7 in MM2 medium with (●) and without (○) phenol after grown with 0.1% yeast extract.

식과는 무관하게 이루어지므로 초기 균집중량이 TCE 분해에 영향을 미치지라 사료되어 초기 균집중량에 따른 TCE 분해를 조사한 결과 Fig.5와 같이 나타났

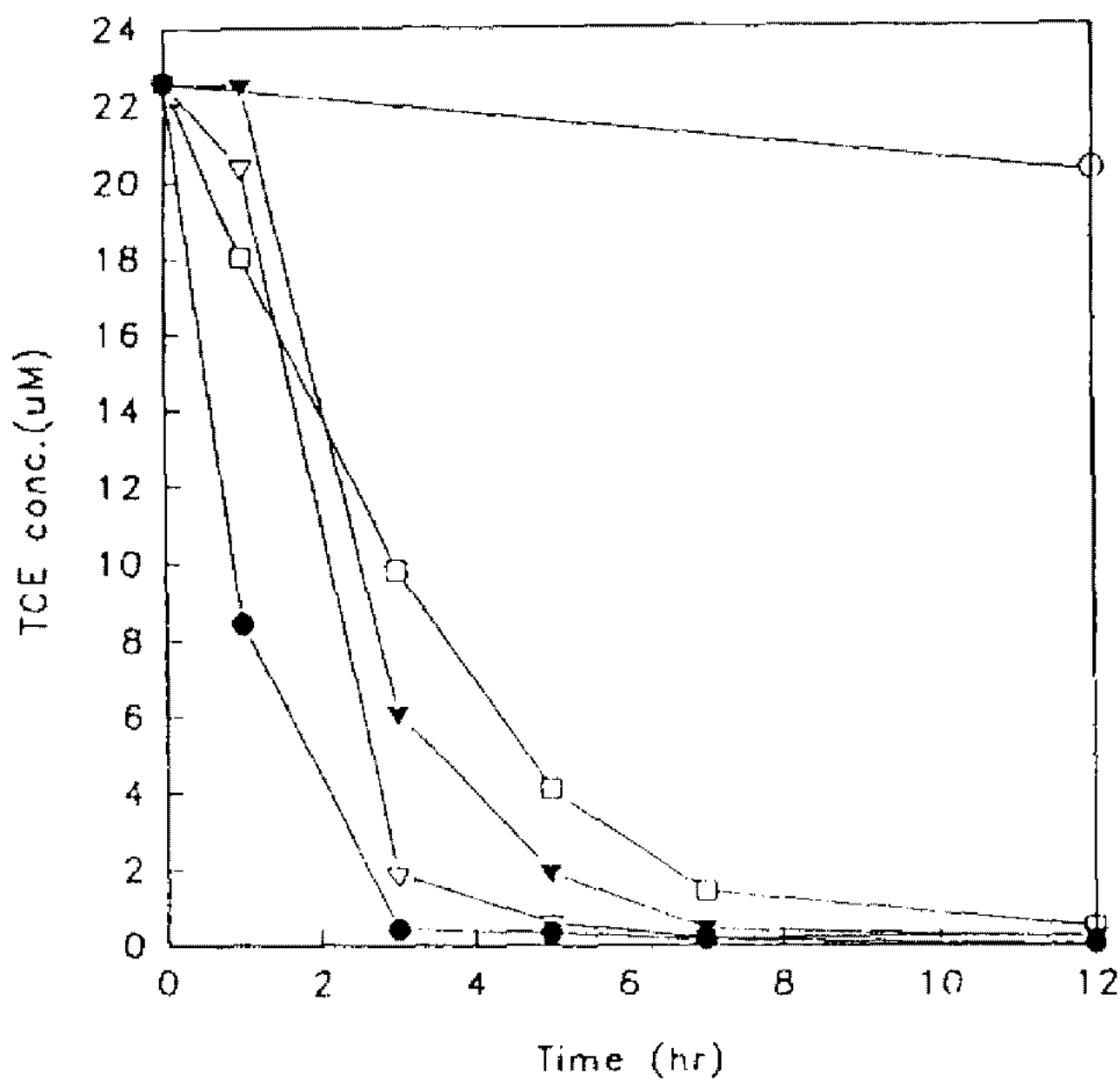




**Fig. 5. Effect of the initial cell concentrations on TCE degradation.**

Experimental conditions were the same as Fig. 3 except initial cell concentrations.

◆: control, ▼: O.D. 0.3, ▽: O.D. 0.5, ●: O.D. 0.7, ○: O.D. 1.0.

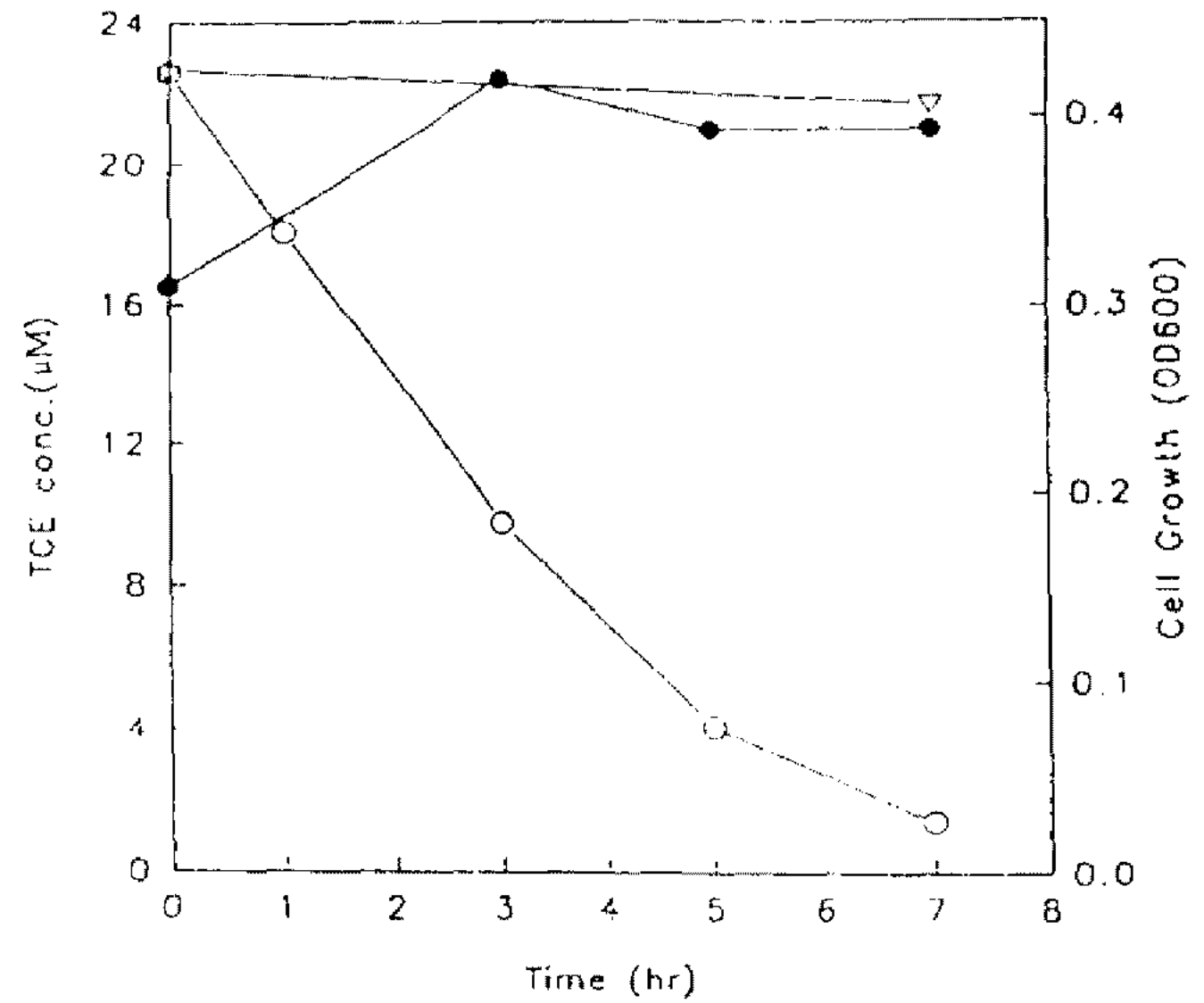


**Fig. 6. Effect of initial cell concentrations on TCE degradation in the presence of 2 mM phenol.**

Experimental conditions were the same as Fig. 5 but 2 mM phenol was added to the culture medium.

○: control, □: O.D. 0.3, ▼: O.D. 0.5, ▽: O.D. 0.7, ●: O.D. 1.0.

다. 균체 농도가 높을수록 TCE 분해가 잘 이루어졌으며 O.D. 0.3에서도 TCE 분해가 비교적 잘 이루어졌다.



**Fig. 7. Time course of TCE degradation and cell growth in the presence of phenol (2 mM).**

Initial cell concentration was O.D. 0.3.

●: cell density, ○: remaining TCE conc., ▽: control TCE conc.

실제로 phenol에서 유도된 *P. cepacia* G4(16)는 지하수를 배지로 하여 TCE를 분해시킬 때 균체수가  $10^8$ /ml 이하이면 TCE 분해가 이루어지지 않으며, phenol에서 자란 균체농도가 높을수록 TCE 분해가 잘 이루어진다고 보고되어 있다.

**Phenol 존재하에서의 TCE 분해:** T5-7 균주가 phenol의 존재하에서 어떤 TCE 분해양상을 보이는지를 조사하기 위하여 phenol에서 자란 T5-7의 균체농도를 다양하게 한 후 2 mM phenol을 첨가하고 TCE를 일정농도로 넣어준 후 시간별로 분해능을 관찰하였다.

Phenol이 존재하지 않을 때보다 TCE 초기분해는 다소 지연되었다. 균체농도가 높을 때는 영향이 적었으나 균체농도가 낮을 때는 초기지연이 많이 되었으며 초기지연 후에 갑작스런 분해가 이루어졌다. 그리고 초기균체농도가 O.D. 0.3일 때 phenol이 존재하지 않을 때는 12시간 내에 완전분해가 이루어지지 않았으나 phenol이 존재했을 때는 완전분해가 이루어졌다.

Phenol(2 mM)과 TCE가 함께 존재할 때 균체성장을 조사하였으며 균체의 O.D.가 0.3일 때 반응초기에는 균이 성장함을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이 결과로써 초기에는 phenol이 TCE 분해의 competitive inhibitor로 작용하여 TCE 분해를 감소시키며 phenol을 이용해서 균이 유도되면 TCE를 잘 분해하는 것으로 보여진다.

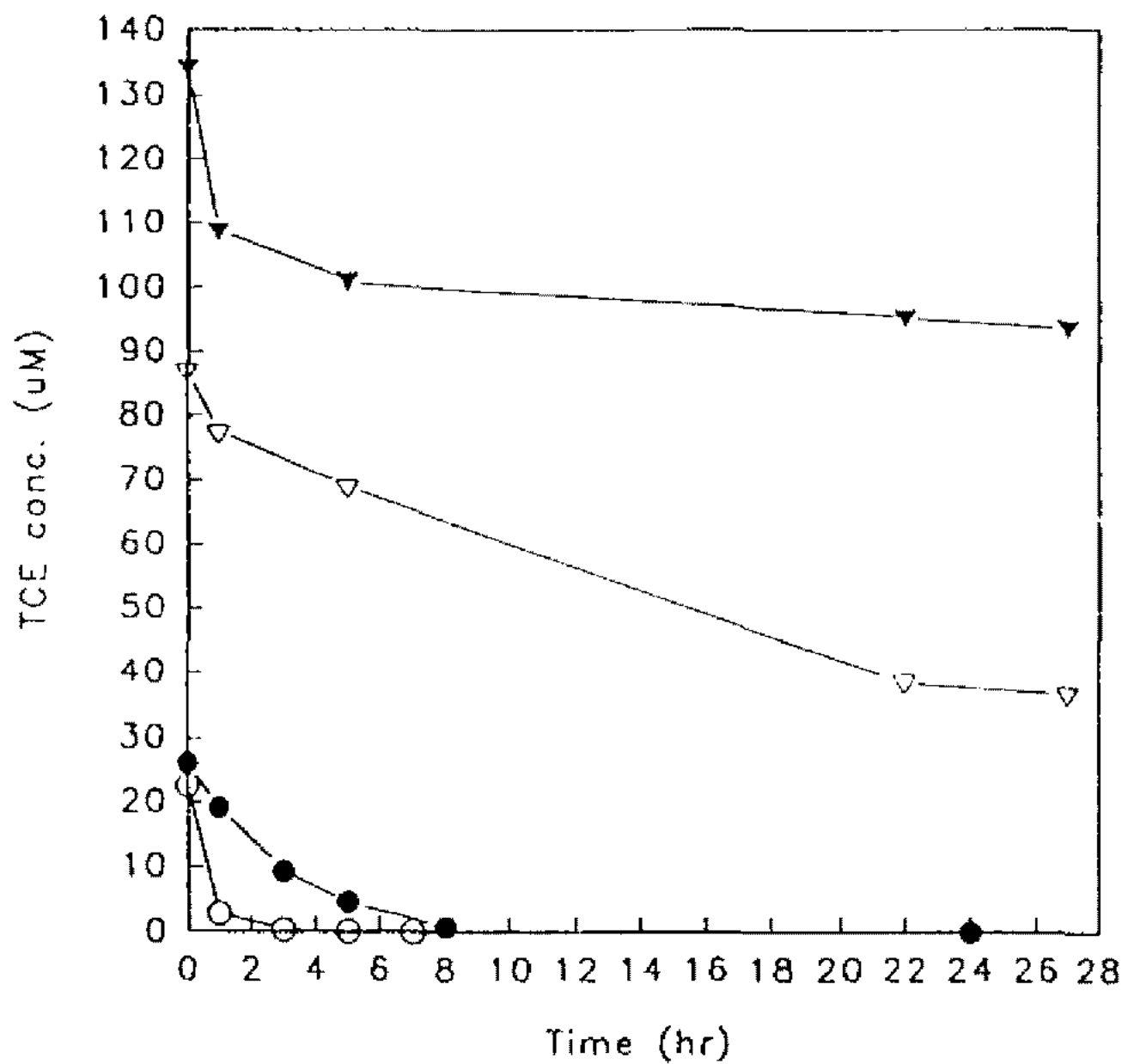


Fig. 8. TCE degradation at higher initial TCE concentrations.

▼: 135  $\mu\text{M}$ , ▽: 87  $\mu\text{M}$ , ●: 26.2  $\mu\text{M}$ , ○: 22.6  $\mu\text{M}$ .

**농도 :** TCE 농도에 따른 T5-7의 분해양상을 조사하기 위하여 다양한 TCE 농도에서 그 분해율을 비교하였다(Fig. 8). TCE 농도가 낮은 경우 짧은 시간 안에 완전분해를 하였으며 87  $\mu\text{M}$ , 135  $\mu\text{M}$ 에서는 완전분해는 아니나 분해능을 보여 주었다. 고농도일 때는 배지내에 phenol을 넣어 균을 계속 유도시키거나 phenol에서 유도된 균체농도를 높게 해주면 TCE 분해가 더 잘 이루어질 것으로 사료된다.

## 요 약

Trichloroethylene(TCE)을 cometabolism시켜 생물학적인 방법으로 처리하기 위한 연구를 행하였다. Phenol로 유도되었을 때 TCE 분해능이 우수한 T5-7 균주를 분리하였으며 동정한 결과 *Acinetobacter* sp.로 동정되었다. Phenol로 유도된 T5-7에 의한 TCE 분해양상을 조사한 결과 초기분해속도가 상당히 빠름을 알 수 있었으며 TCE 분해시 균체농도는 증가하지 않았으므로 TCE 분해는 성장과 무관하게 이루어짐을 알 수 있었다. Phenol로 유도된 T5-7 균주에 의한 TCE 분해는 초기 접종량이 많을수록 분해능이 좋았으며 TCE와 phenol 2 mM이 함께 존재할 때 초기에는 분해가 다소 지연되었으나 시간이 지나면서 낮은 균농도에서도 TCE가 거의 분해됨을 알 수 있었다. 0.1% yeast extract에서 자란 균을 모아 TCE 분해능을 조사한 결과 15시간 이후에도 TCE 분해를 보이지 않는 바 T5-7에 의한 TCE 분해는 phenol에

의해 유도되었음을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 교육부의 유전공학 연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝힙니다.

## 참고문헌

1. Strock, W. 1987. Chlorinated solvent use hurt by federal rules. *Chem. Eng. News* **65**: 11.
2. 환경처. 1993. 지하수 수질 개황조사 결과. *환경소식* **112**: 176.
3. 이덕희. 1991. 음용수중 휘발성 유기오염물질의 규제에 관한 연구. 연세대학교, 환경관리학과.
4. 환경처. 1993. 공해대책. 1.
5. Infante, P.F. and T.A. Tsongas. 1982. Mutagenic and oncogenic effects of chloromethanes, chloroethanes, and halogenated analogues of vinyl chloride. *Environ. Sci. Res.* **25**: 301-327.
6. Freedman, D.L. and J.M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2144-2151.
7. Vogel, T.M. and P.L. McCarty. 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1080-1083.
8. Wilson, J.T. and B.H. Wilson. 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 242-243.
9. Tsien, H.C., G.A. Brusseau, R.S. Hanson, and L. P. Wackett. 1989. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3155-3161.
10. Koh, S.C., J.P. Bowman, and G.S. Saylor. 1993. Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a type 1 methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 960-967.
11. Arciero, D., T. Vannelli, M. Logan, and A.B. Hooper. 1989. Degradation of trichloroethylene by ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 640-643.
12. Wackett, L.P., G.A. Brusseau, S.R. Householder, and R.S. Hanson. 1989. Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2960-2964.
13. Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, W.R. Mahaf-

- fey, and P.H. Pritchard. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 949-954.
14. Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, E.J. O'Neill, and P.H. Pritchard. 1986. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 383-384.
15. Shields, M.S., S.O. Montgomery, S.M. Cuskey, P.J. Chapman, and P.H. Pritchard. 1991. Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1935-1941.
16. Krumme, M.L., K.N. Timmis, and D.F. Dwyer. 1993. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1935-2749.
17. Wackett, L.P. and D.T. Gibson. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1703-1708.
18. Winter, P.B., K.M. Yen, and B.D. Ensley. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. *Bio/Technology.* **7**: 282-285.
19. Fan, S. and K.M. Scow. 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1911-1918.
20. Kiyohara, H., N. Kazutaka, and Y. Keijj. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 454-458.
21. Simbert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization, Pp. 409-443. In Murray, C., K. Nester, K. Wood, and M. Phillips (eds.), *Manual of methods for general bacteriology*. ASM.
22. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Willkins. Baltimore, USA.
23. Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, and P.H. Pritchard. 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganism that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 604-606.

(Received January 21, 1994)