

## 1,2-Dichlorobenzene을 분해하는 *Pseudomonas* sp. DCB3의 분리 및 특성

서승교 · 우철주\* · 이창호\*

대구산업전문대학 환경관리과, \*경북대학교 식품공학과

### Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp. DCB3 Degrading 1,2-Dichlorobenzene

Seung-Kyo Suh, Cheol-Joo Woo\* and Chang-Ho Rhee\*

Dept. of Environment Management, Taegu Polytechnic College, Taegu 706-023, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### ABSTRACT

Four bacterial strains able to degrade dichlorobenzene as the sole source of carbon and energy were isolated from soil by selective enrichment culture, and among them, one isolation was the best in the cell growth and identified as *Pseudomonas* sp. DCB3 by its morphology and physiological properties. Cell growth dramatically increased in a minimal medium containing 500 ppm of dichlorobenzene was not detected any more at 72 hours after cultivation. The optimal temperature and initial pH for the growth of the isolated strain were 30°C and 7.0, respectively. Cell growth was increased by supplementing (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO and 50 ppm yeast extract as additional nutrients. Therefore, it was suggested that *Pseudomonas* sp. DCB3 could be effectively used for the biological treatment of wastewater containing dichlorobenzene.

**Keywords** : *Pseudomonas* sp., Dichlorobenzene.

## I. 서 론

석유화학, 염색공업, 피혁, 그리고 제지산업 등으로 대표되는 금세기의 눈부신 화학산업의 발전은 지금까지 존재하지 않았던 여러가지 새로운 화합물질을 탄생시켰으며, 이러한 화합물의 대부분은 수백년이 경과하여도 분해되기 어려운 난분해성 물질을 함유하고 있는 것이 많다. 특히, 최근들어 반도체, 신소재 등의 첨단산업이 급성장하면서 여기에 쓰이는 각종 염소계 유기화합물은 환경오염 문제를 가중시키고 있다. 즉 인체에 carcinogen 및 mutagen으로 작용하는 염소계 유기화합물이 다양한 공정에서 배출되어 인간과 생태계에 중대한 위협을 주고 있다. 염소계 유기화합물은 대부분이 미량으로도 인체에 독성과 발암성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 하수, 토양, 저니 및 화학공장등에서 많이 검출되고 있어 환경오염의 주요 원인물질로 알려져 있다. 이러한 난

분해성 화합물의 위협이 증가함에 따라 1970년대 후반에 미국의 EPA는 114개의 화합물을 priority pollutants로 지정하여 법적인 규제를 강화하고 있다.

현재 난분해성 유기염소계화합물의 분해에 관하여 많은 연구가 되어 있으며<sup>1-11</sup> 그중 유기염소계화합물의 미생물에 의한 분해에 관한 연구는 Reineke 등<sup>12</sup>은 chlorobenzene을 분해하는 세균을 토양으로부터 분리하여 분리된 세균의 일반적 특성등을 조사하였으며, Janssen 등<sup>13</sup>은 *Xanthobacter autotrophicus*을 이용하여 방향족 화합물의 분해에 관하여 보고하였고, Vandenberg 등<sup>14</sup>은 *Pseudomonas fluorescens*에 의하여 염소화된 방향족 탄화수소의 대사경로에 관하여 보고 하였다. 또한, Haigler 등<sup>15</sup>은 *Pseudomonas* 속에 의하여 1,2-dichlorobenzene의 분해에 관하여 보고 하였으며 Fathepure 등<sup>16</sup>은 혐기적인 하수슬러지에서 hexachlorobenzene의 분해에 관하여 보고하였다. Spain 등<sup>17</sup>은 *Pseudomonas* 속에 의하여 1,4-di-

chlorobenzene의 분해에 관하여, Schraa 등<sup>18)</sup>은 *Alcaligenes* 속의 의하여 1,4-dichlorobenzene의 분해, Oltmanns은<sup>19)</sup> *Pseudomonas* 속의 의하여 1,4-dichlorobenzene의 분해, De Bont 등<sup>20)</sup>은 1,3-dichlorobenzene의 분해에 관하여 보고 하였다.

최근에는 독성 유기화합물의 처리를 위하여 경제적이고 효율적인 처리방법으로서 미생물을 이용한 생물학적인 처리방법이 많이 연구 되고 있으며 실제로 생물학적 처리에서 중요한 역할을 담당하는 유용한 미생물을 자연계로부터 분리하는 것은 매우 중요하다고 하겠다.

따라서 본 연구에서는 유기염소계 화합물이 포함 된 폐수의 생물학적 처리에 이용할 수 있는 미생물을 확보하기 위하여 토양 및 폐수 처리장의 활성슬러지 등의 균원시료로부터 유기염소계 화합물중 유기용제 및 세정제, 살진균제등 농약의 생산원료로서 많이 사용되고 있는 dichlorobenzene을 분해하는 미생물을 분리한 후 우수한 균주를 선별하여 분리균의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성 및 영양요구성, 미생물의 성장에 미치는 환경인자 등을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 배지 및 배양조건

Dichlorobenzene 분해균주의 분리 및 배양에 사용한 배지는 고등<sup>21)</sup>이 사용한 배지로서 그 조성은 증류수 1 l에 NH<sub>4</sub>Cl 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.35g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.9g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.48g, CaCl<sub>2</sub> 0.03g, FeSO<sub>4</sub> 0.01g, MnCl<sub>2</sub> 0.01g, CoCl<sub>2</sub> 0.001g, NaMoO<sub>4</sub> 0.001g을 함유하고 있으며, pH는 6.8로 조절하였다. 유일 탄소원인 dichlorobenzene은 멸균된 최소배지에 가스상태로 첨가하였다. 균배양은 30°C에서 120 rpm으로 진탕 배양하였으며, 균체량은 분광광도계(Spectronic 20D)를 사용하여 흡광도를 660 nm에서 측정하여 나타내었다.

균주의 분리 및 보존을 위한 완전 배지는 Nutrient broth를 사용하였으며, 평판 고체 배지는 상기 배지에 Bacto agar (Difco)를 1.5%(W/V)농도로 첨가하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 일급 또는 특급을 사용하였으며, 배지류는 Difco 제품이고, dichlorobenzene 및 방향족 화합물은 Sigma 제품을 사용하였다.

### 2. 균주의 분리 및 선별

Dichlorobenzene 분해 균주를 분리하기 위하여 대

구, 울산 근교에서 채집한 토양 등의 균원시료를 멸균된 증류수로 희석하여 접종한 후, 유일 탄소원으로 dichlorobenzene을 가스상으로 공급하면서 배양하였다. 이 배양액을 분리원으로 하여 3회에 걸쳐 24시간 간격으로 enrichment culture 를 수행한 후 배양액을 희석하여 고체배지에 도말하고 dichlorobenzene을 증기 상태로 공급하면서 30°C 배양기에서 7일간 배양한 후에 나타나는 colony를 순수 분리하였다.

순수분리된 균주중 dichlorobenzene 분해능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 다시 액체 최소배지에 접종하여 배양후 균주의 생육속도가 빠른 것을 1차로 선별하고, 이들 균주의 배양온도, 초기 pH 등을 검토하여 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다.

### 3. 균주의 동정

분리균주의 동정은 형태적, 생리적 및 생화학적 특성을 조사한 후 Bergey's manual of determinative bacteriology (10th ed.)<sup>22)</sup>와 Manual for the identification of medical bacteria (2nd ed.)<sup>23)</sup>에 준하여 동정하였다.

### 4. Dichlorobenzene 의 분석

배양액내의 용존 dichlorobenzene의 정량을 위하여 배양액을 membrane filter(Millipore : pore size, 0.2 μm)로 여과한 후 분석에 이용하였다. 시료중의 dichlorobenzene의 농도는 불꽃이온화 검출기를 장착한 gas chromatograph (Shimadzu GC-14A)로 분석하였다. Column 충전물은 DC550(Alltech사 제품)을 사용하였으며, 분석시 column의 온도는 180°C였으며, injector, detector의 온도는 각각 210°C, 230°C였고, 운반기체 (N<sub>2</sub>)의 유속은 30 ml/min 이었다. 시료의 injection volume는 1.0 μl를 주입하였다.

## III. 실험결과 및 고찰

### 1. Dichlorobenzene 분해 균주의 분리 및 선별

Dichlorobenzene을 유일 탄소원으로 첨가한 최소 배지를 이용하여 dichlorobenzene 을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 4주의 균을 분리하여 균주의 생육도를 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다.

특히 분리균주중 DCB3은 최소배지에서 72시간 배양시 OD 값이 0.21로 분리균주 중에서 균의 생육도와 dichlorobenzene 자화능이 우수하여 최종 균주로 선별하였다.

**Table 1.** Comparison of cell growth on the isolated strains

Strain	Cell growth (O.D. 660 nm)
DCB1	0.05
DCB2	0.09
DCB3	0.21
DCB4	0.03

Strains were growth for 3 days at 30°C in a minimal medium.

Dichlorobenzene as a sole carbon and energy source was supplied through the gas phase by putting 0.5 ml of dichlorobenzene of gas<sup>-1</sup> in the flask.

## 2. 균주의 동정

분리 균주의 SEM(Scanning Electron Microscope) 전자 현미경 사진은 Fig. 1과 같으며, 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2, Table 3에 나타내었다. 분리균주는 gram 음성균으로서 짧은 간균의 호기성 세균이었으며, 운동성을 지니고 있었다.

또한 형태학적, 배양학적 성질을 조사한 결과 Catalase가 양성, Methyl red test 양성, V-P test 양성 및 포도당으로 부터 CO<sub>2</sub>를 생성하지 않고, Citrate 음성, Indol production은 음성, Nitrate 환원력이 있었고 gelatine 액화능과 hydrogen sulfide 생성은 양성, pigment production은 음성이었다. 탄수화물의 이용성은 glucose, fructose, galactose, inositol, sorbitol, raffinose, pectin, dextrin을 이용하였으며 그 외의 당은 이용하지 못하거나 미약하였다.



**Fig. 1.** Scanning electron micrograph( $\times 20,000$ ) of the isolated DCB3. Cultured on NB medium for 36 hours.

**Table 2.** Morphological and physiological characteristics of the isolated strain.

Characteristics	DCB3
Form	Rod
Gram staining	
Catalase	+
Methyl red test	+
V P test	+
Indole production	
Starch hydrolysis	
Gelatin liquefaction	+
Utilization citrate	
Hydrogen sulfide production	+
Gas from glucose	-
Urease test	-
Pigment production	
Optimum growth temperature	25 30°C
pH	4.0 11.0
Growth in NaCl	0 8%

**Table 3.** Carbohydrate utilization of the isolated strain DCB3.

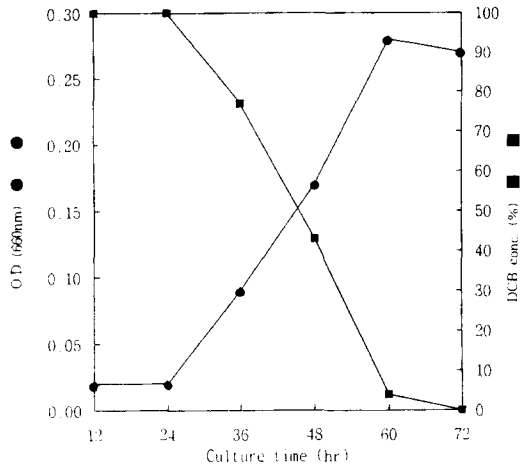
Characteristics	DCB3
Glucose	+
Fructose	+
Xylose	+
Galactose	+
Inositol	+
Sorbose	+
Sorbitol	+
Lactose	
Sucrose	
Maltose	-
Arabinose	-
Dextrin	+
Gluconic acid	w
Pectin	+
Soluble starch	-
Raffinose	+
Mannose	
Glycerin	w

+ : positive, - : negative, w : weak

따라서 분리된 균주는 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성에 의한 결과로서 *Pseudomonas* sp.와 가장 유사한 미생물로 밝혀져 분리균주를 최종적으로 *Pseudomonas* sp. DCB3으로 명명하였다.

## 3. 분리 균주의 생육 곡선

Dichlorobenzene을 유일 탄소원으로 500 ppm 첨



**Fig. 2.** Time course of cell growth by *Pseudomonas* sp. DCB3 in a minimal medium containing dichlorobenzene as a sole carbon source.

가한 최소배지에서 배양시간에 의한 분리 균주인 *Pseudomonas* sp. DCB3의 균체 증식 및 dichlorobenzene농도의 변화를 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

균의 생육도는 배양 24시간 부터 급격히 증가하였으며, 배양 60시간 일때 흡광도가 0.27로 가장 높게 나타났다. 이때 배양액내의 dichlorobenzene는 약 96%가 분해되었으며, 72시간에는 거의 검출되지 않았다.

#### 4. Yeast extract의 영향

미생물의 생육에 미치는 yeast extract 농도의 영향을 조사하기 위하여 yeast extract의 농도를 달리하여  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일간 진탕배양한 결과는 Table 4와 같다. 그 결과 yeast extract 농도에 대한 영향은 비슷하였으나, 50 mg/l 일때 균의 생육이 가장 우수하여 yeast extract의 최적 농도를 50 mg/l로 결정하였다.

#### 5. 질소원의 영향

**Table 4.** Effect of yeast extract concentrations on the cell growth.

Concentration (mg/l)	Cell growth (O.D.660 nm)
0.0	0.23
12.5	0.24
25.0	0.25
50.0	0.29
100.0	0.28

**Table 5.** Effect of nitrogen sources on the cell growth.

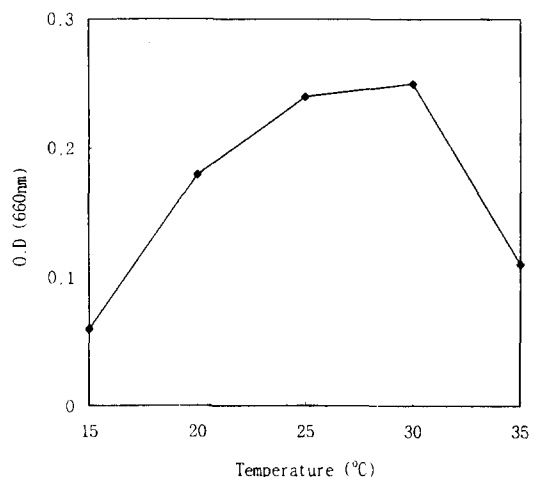
Sources	Cell growth(O.D. 660 nm)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.20
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.22
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.31
$\text{NaNO}_3$	0.24
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.23

미생물의 생육에 미치는 질소원 종류의 영향을 조사하기 위하여 여러 가지 질소원을 각각 1g/l를 첨가하여  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일간 진탕배양한 결과는 Table 5와 같다. 그 결과 질소원 종류에 대한 영향은 비슷하였으나  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 의 첨가시 균의 생육이 0.31로서 우수하였다. 그러므로 분리된 균에 의한 폐수처리시에는  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  첨가가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

#### 6. 최적온도

분리 균주인 *Pseudomonas* sp. DCB3의 배양 온도에 따른 균의 생육도의 영향을 조사하기 위하여 최소배지에서 배양온도 15, 20, 25, 30 및  $35^\circ\text{C}$ 에서 72시간 배양시 균의 생육도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

*Pseudomonas* sp. DCB3는 온도가 증가함에 따라 균의 생육도는 증가하였으며, 배양온도  $30^\circ\text{C}$ 일때 균의 생육도가 0.25로 가장 높게 나타났다. 따라서 분리 균주인 *Pseudomonas* sp. DCB3의 배양 최적온도는  $30^\circ\text{C}$ 로 결정하였다.



**Fig. 3.** Effect of temperature on the growth of *Pseudomonas* sp. DCB3

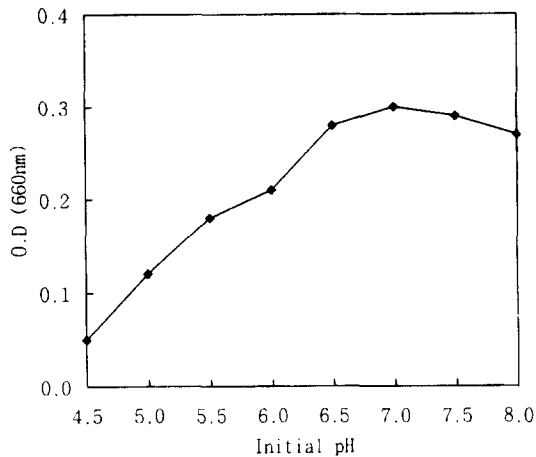


Fig. 4. Effect of initial pH on the growth of *Pseudomonas* sp. DCB3

#### 7. 최적 pH

분리 균주의 생육을 위한 최적 pH를 조사하기 위하여 최소배지의 pH를 4.5에서 8.0까지 0.5간격으로 조정하여 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 분리 균주인 *Pseudomonas* sp. DCE3는 pH 7.0에서 생육이 가장 우수하였다. 산성 조건인 pH에서 균생육은 현저히 낮았으며, 알칼리 조건인 pH 8 이상에서는 균생육이 조금씩 감소하였다.

### IV. 결 론

토양 등의 균원 시료로 부터 dichlorobenzene을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 4개의 균주를 분리한 후, 분리된 균주중에서 dichlorobenzene 분해능과 생육도가 가장 우수한 균주를 선별하여 균주의 형태학적, 생리학적 및 배양학적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas* sp. 또는 그유연균으로 동정되어 분리 균주를 *Pseudomonas* sp. DCB3로 명명하였다.

*Pseudomonas* sp. DCB3는 유일 탄소원으로 dichlorobenzene 500ppm이 첨가된 최소배지에서 급격한 균체 증식을 나타내었으며, Dichlorobenzene은 배양 후 72시간에 배양액에서 검출되지 않았다. 분리 균주의 생육을 위한 최적온도, 초기 pH는 각각 30°C, 7.0이었다. 균생육을 위한 질소원은 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO가 가장 효과가 있었으며 yeast extract 50 ppm 첨가가 균생육을 촉진하였다.

그러므로 *Pseudomonas* sp. DCB3는 dichlorobenzene 이 함유된 폐수의 생물처리에 효과적으로 이용될 수 있을것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 학술연구 조성비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) Bower, E. J. and P. L. McCarty: Transformations of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1286-1294, 1983.
- 2) Chatterjee, D. K., A. M. Chakrabarty: Plasmids in the biodegradation of PCBs and chlorobenzoates. *FEMS Symp.* 12, 213-219, 1981.
- 3) Chatterjee, D. K. and A. M. Chakrabarty: Genetic rearrangements in plasmids specifying total degradation of chlorinated benzoic acids. *Mol. Gen. Genet.* 188, 279-285, 1982.
- 4) Chatterjee, D. K. and A. M. Chakrabarty: Genetic homology between indepenently isolated chlorobenzoate degradative plasmids. *J. Bacteriol.* 153, 532-534, 1983.
- 5) Craawford, R. L. and W. W. Mohn: Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a Flavobacterium. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 617-620, 1985.
- 6) Fogel, M. M., A. R. Taddeo and S. Fogel: Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 720-724, 1986.
- 7) Hartmann, J., W. Reineke and H. J. Knackmuss: Metabolism of 3-chloro-4-chloro- and 3,5-dichlorobenzoate by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 421-428, 1979.
- 8) Little, C.D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall and P. J. Gilmer: Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 951-956, 1988.
- 9) Reineke, U. and H. J. Knackmuss: Microbial degradation of haloaromatics. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 263-287, 1988.
- 10) Scholtz, R., A. Schmuckle, A. M. Cook and T. Leisinger: Degradation of eighteen 1-monohaloalkanes by *Arthrobacter* sp. strain HA1. *J. Gen. Microbiol.* 133, 267-274, 1987.
- 11) Saxena, A., R. Zhang and J. M. Bollag: Microor-

- ganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 390-396, 1987.
- 12) Reineke, W. and H. J. Knackmuss: Microbial metabolism of haloaromatics: isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 395-402, 1984.
  - 13) Janssen, D. B., A. Scheper, L. Dijkhuizen and B. Witholt: Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 673-677, 1985.
  - 14) Vandenberg, P. A. and B. S. Kunka: Metabolisms of volatile chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 737-739, 1988.
  - 15) Haigler, B. E., S. F. Nishino and J. C. Spain: Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 294-301, 1988.
  - 16) Fathepure, B. Z., J. P. Nengu and S. A. Boyd: Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 327-330, 1988.
  - 17) Spain, J. and S. F. Nishino: Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1010-1019, 1987.
  - 18) Schra, G., M. L. Boone, M. S. M. Jetten, A. R. U. Neerzen, P. J. Colberg and A. Schmidt: Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1374-1381, 1986.
  - 19) Oltmanns, R. H., H. G. Rast and W. Reineke: Degradation of 1,4-dichlorobenzene by enriched and constructed bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 609-616, 1988.
  - 20) De Bont, J. A. M., M. J. A. W. Vorage, S. Hartmans and W. J. J. van den Tweel: Micro degradation of 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 677-680, 1986.
  - 21) 김영희, 하인호, 배경숙: Naphthalene을 분해하는 *Pseudomonas putida* N3의 분리 및 특성. *산업미생물학회지*, 16, 199-204, 1988.
  - 22) Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams: *Bergeys manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
  - 23) Cowan, N. R. and K. J. Steel: *Manual for the identification of medical bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press, London, 1994.