

## ***Micrococcus* sp. M1에 의한 Phenol과 *p*-Cresol의 생분해 Kinetics**

손홍주 · 장웅석 · 이 건 · 이상준

부산대학교 미생물학과

(1996년 12월 10일 접수)

## **Biodegradation Kinetics of Phenol and *p*-Cresol by *Micrococcus* sp. M1**

Hong-Joo Son, Woong-Seok Jang, Geon Lee, and Sang-Joon Lee

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Manuscript received 10 December 1996)

In order to find the most fitted biodegradation model, biodegradation kinetics model to the initial phenol and *p*-cresol concentrations were investigated and had been fitted by the linear regression. Bacteria capable of degrading *p*-cresol were isolated from soil by enrichment culture technique. Among them, strain M1 capable of degrading *p*-cresol also degraded phenol and was identified as the genus *Micrococcus* from the results of taxonomical studies. The optimal conditions for the biodegradation of phenol and *p*-cresol by *Micrococcus* sp. M1 were  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.05%, pH 7.0, 30°C, respectively, and the minimum volume 100ml/250ml shaking flask. *Micrococcus* sp. M1 was able to grow on substrate concentration up to 14mM and *p*-cresol concentration up to 8mM. With increasing substrate concentration, the lag period increased, but the maximum specific growth rate increased. The yield coefficient decreased with increasing substrate concentration. The biodegradation kinetics of phenol and *p*-cresol were best described by Monod with growth model for every experimented concentration. In cultivation of mixed substrate, *p*-cresol was degraded first and phenol was second. This result implies that *p*-cresol and phenol was not degraded simultaneously.

**Key words :** Phenol, *p*-cresol, biodegradation kinetics, *Micrococcus* sp., Monod with growth model.

### 1. 서 론

현대사회는 가속화되는 산업의 발달로 인해 각종 환경오염이 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 환경오염의 중요한 원인중의 하나인 도시 및 공장폐수중의 난분해성 유기화합물은 하천이나 호수의 바닥, 논, 토양에 축적되어 환경을 오염시키고 사람과 가축에도 적지않은 피해를

입히고 있다(Fawell and Hunt, 1987).

미생물에 의한 생분해는 유기화합물 분해하는데 있어서 중요한 메카니즘이다. 그러나 미생물의 분해능을 최대로 하여 자연환경에서 잘 분해되지 않는 난분해성 화합물 분해하고자 하는 많은 연구들이 진행되어 왔다(Alexander, 1965; Dart and Stretton, 1980;

Gehm and Bregman, 1976).

Phenol은 현존하는 유기화합물중 가장 널리 사용될 뿐만 아니라, 다양한 합성 유기화합물의 기본적인 구조단위가 되는 물질이다. 즉, phenol과 치환체 phenol은 화학합성과정중의 부산물로 생성되며, coal-tar 증류, 오일정제, 의약품, 농약제조 등에도 광범위하게 사용되므로 우연히 또는 고의로 자연환경으로 배출된다. 특히 phenol과 p-cresol은 현재 사용되고 있는 phenol류의 대부분을 차지하고 있다(손 외, 1989).

한편, 난분해성 화합물의 양적인 측면에서의 분해특성 즉, kinetics에 대한 연구가 활발해지고 있는데, biodegradation kinetics는 자연 환경에서 난분해성 물질의 농도와 분해율을 정량적으로 예측하게 함으로서 다른 환경에 응용할 수 있도록 공식화시켜준다. 다시말해, 자연환경에서 독성 난분해성 화합물의 농도와 분해에 대한 예측은 kinetic data를 필요로 하며, 이러한 data는 유기화합물의 생태계에서의 농도와 분포를 측정하는데 사용되는 많은 computer-based model의 중요요소가 된다(Sulflita et al., 1983; Paris et al., 1981; Irwin, 1990). 또한 실제 폐수처리공정을 scale up 시킬 경우, 기초자료로서의 중요한 가치를 가진다. 최근에는 세균의 순수배양에 의한 biodegradation kinetics를 특징짓는 공식이 제안되었다(Simkins and Alexander, 1984). 그리고 미생물에 의한 분해과정에서 얻어진 data가 이들 model에 적합한지를 평가하기 위해 통계적 방법이 제안되었다(Ludwig et al., 1988).

본 연구에서는 p-cresol 분해세균인 *Micrococcus* sp. M1을 이용하여 phenol의 생분해능을 확인하고, 이들 두가지 화합물에 대한 제반 생육특성과 분해 최적조건에 대하여 조사하였다. 또한, 각 화합물의 농도에 따른 생육도와 분해율을 측정하여 기존의 kinetic 모델중 가장 적합한 모델을 선정한 후, 농도변화에 따른 비성장속도를 비교하였다. 그리고 이들 두 기질을 혼합한 배지에서의 생육도와 분해율도 조사하였다.

## 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 산소 등의 환경조건이 변동함에 따라 그 반응차수가 달라진다. 따라서 단일 기질농도에 의하여 유일하게 성장을 제한받는 한 개체군의 growth dynamics에 관한 여러가지 수학적 공식이 제안되었으며, 그 중에서 생육도와 기질농도간의 상관관계를 잘 설명할 수 있는 수식으로 Monod 식이 널리 실험에 적용되었다(Simkins and Alexander, 1984).

Monod kinetics는 다음과 같은 식으로 표현된다.

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

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

그리고 단위시간당 미생물 성장율은 식 (2)와 같다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2)$$

여기서  $X$ 는 미생물의 농도(CFU/ml),  $t$ 는 시간(h)이다. 식 (2)를 식 (1)에 대입하면 다음과 같이 정리될 수 있다.

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

한편, 유기물의 제거율은 식 (4)와 같다.

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

여기서  $Y$ 는 증식수율계수이다. 여기서 식 (2)를 식 (4)에 대입하면 다음과 같다.

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

또한, 개체군 밀도가 변할 경우, population size 및 기질농도의 점차적인 변화사이의 관계식 역시 필요하며, 다음과 같이 표현된다.

Mass-balance equation :

$$S_0 + q \cdot B_0 = S + q \cdot B \quad (6)$$

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

$q$ 가 질소, 인산과 같은 기질의 농도에 의하여 뚜렷한 변화를 보인다 하더라도 제한요인인 탄소원의 경우보다는 훨씬 적게 변동한다. 따

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

Model and characteristics	Equation and inequalities
I. Zero order Differential form Integral form Derived parameter Necessary conditions	$-dS/dt = k_1$ $S = S_0 - K_1t$ $K_1 = \mu_{max} X_0$ $X_0 \gg S_0$ and $S_0 \gg K_s$
II. Monod, no growth Differential form Integral form Linear form Derived parameter Necessary condition	$-dS/dt = k_1S/(k_s + S)$ $K_s \ln(S/S_0) + S - S_0 = -K_1t$ $(S_0 - S)/t = \ln(S/S_0)/t K_s + K_1$ $K_1 = \mu_{max} X_0$ $X_0 \gg S_0$
III. First order Differential form Integral form Linear form Derived parameter Necessary condition	$-dS/dt = k_3S$ $S = S_0 \exp(-K_3t)$ $\ln(S/S_0) = -K_3t$ $K_3 = \mu_{max} X_0/K_s$ $X_0 \gg S_0$ and $S_0 \ll K_s$
IV. Logistic Differential form	$-dS/dt = k_4S(S_0 + X_0 - S)$
Integral form	$S = \frac{(S_0 + X_0)}{1 + (X_0/S_0)\exp[k_4(S_0 + X_0)t]}$
Derived parameter Necessary condition	$K_4 = \mu_{max}/K_s$ $S_0 \ll K_s$
V. Monod with growth Differential form Integral form	$-dS/dt = [\mu_{max}S(S_0 + X_0 - S)]/(K_s + S)$ $K_s \ln(S/S_0) = \frac{(S_0 + X_0 + K_s) \ln(X/X_0)}{-(S_0 + X_0) \mu_{max}t}$
Linear form	$\ln(X/X_0)/t = K_s \frac{[\ln(S/S_0) - \ln(X/X_0)]/t}{S_0 + X_0 + \mu_{max}}$
Derived parameter Necessary condition	None None
VI. Logarithmic Differential form Integral form Derived parameter Necessary condition	$-dS/dt = \mu_{max}(S_0 + X_0 - S)$ $S = S_0 + X_0[1 - \exp(-\mu_{max}t)]$ None $S_0 \gg K_s$

라서 영양원을 제한한 성장 modeling에서, q는 시간과 기질농도에 대한 상수로 처리하게 된다. 이때 q는 원하는 B값이 정확할 때만 유용한 값이며, 목적 기질이 소비되는 것만을 측정할 때는 필요치 않다. 위의 사항을 맞추려면 qB는 모든 식에서 X로 대체된다.

$$q \cdot B = X \tag{7}$$

여기서 X는 B와 동일한 개체밀도를 얻는데 필요한 기질의 양이다. 식 (7)을 식(6)에 치환하면 식 (8)을 얻는다.

$$S_0 + X_0 = S + X \tag{8}$$

다시 식 (5)에 식 (7), (8)을 치환하면, 식 (9)

를 얻는다.

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

최종적으로 얻어진 식 (9)는 미생물 농도와 기질농도에 따른 분해 kinetics의 가장 보편적인 식이 된다. 식 (9)에서  $S_0$ 가  $K_s$ 를 무시할 수 있을 만큼 높은 경우, 그리고  $S_0$ 가  $K_s$ 에 비해 무시할 수 있을 정도로 낮은 경우와 그 반대 경우의 3가지 상태에서, Monod 식을 변형하여 Simkins와 Alexander(1984)에 의해 제안된 model은 Table 1과 같다.

### 3. 재료 및 방법

#### 3.1 균주 및 배지

부산과 경남지역의 농약 잔류토양인 화훼단지 및 논으로부터 분리하여 본 연구실에서 보관중인 *p*-cresol 분해균주인 M1을 본 실험에 사용하였다. 이 균주는 *p*-cresol은 물론이고 phenol에 대해서도 높은 분해력을 가지고 있었으며, 또한 영양요구성이 매우 간단하여 본 실험에 가장 적합한 균주라고 판단되었다. 본 균주의 분리시 사용된 분리용 배지의 조성은  $K_2HPO_4$  1.6 g/l,  $KH_2PO_4$  0.4 g/l,  $NH_4NO_3$  0.5 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g/l,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.005 g/l,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.0023 g/l였으며, 탄소원으로 phenol 및 *p*-cresol을 각각 15mM~14mM의 농도로 첨가하여 배양하였다.

#### 3.2 배지의 분류 및 동정

본 실험에 사용된 배지의 분류 및 동정은 Manual of General Bacteriology(1981)에 의거하여 배양적 및 생화학적 제반 특성을 비교하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1984)에 따른 분류를 하였다.

#### 3.3 배양온도와 배양시간에 따른 생육도의 영향

본 실험에 사용한 phenol 및 *p*-cresol의 최적 배양온도와 배양시간을 결정하기 위하여 상기 분리용 배지에 배양된 균주를 취하여 질소원의 변화, 배양온도의 변화, pH의 변화, 통기량의 변화에 따른 생육도의 변화를 등을 조사하였다. 생육도 및 분해율은 spectrophotometer (Shimadzu UV-240)를 사용하였다. 즉, 생육도는 600nm에서 측정하였으며, 분해율은 배양액 100ml를 5000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 침전한 후, 상등액을 취하여 phenol은 268nm에서, *p*-cresol은 276nm에서 각각 측정하였다.

#### 3.4 배양온도에 따른 영향

Phenol 및 *p*-cresol을 각각 4mM씩 유일한 탄소원으로 첨가한 기본배지에 질소원으로 각종 무기질소원과 유기질소원을 각각 0.05%씩 첨가한 후, 12시간 배양하여 생육도와 분해율을 측정하였다.

#### 3.5 배양온도와 초발 pH 변화에 따른 영향

위 실험결과 확인된 최적 질소원을 첨가한 배지에 온도 15℃~40℃ 및 pH 5.0~10.0으로 각각 조정하여 12시간 배양한 후, 생육도를 측정 하였다.

#### 3.6 통기량 변화에 따른 영향

분리균의 분류학상의 특징에 따라 배양시에 가장 적절한 배지량을 찾기위하여 250ml 삼각 flask에 배지를 각각 20ml에서 100ml까지 단계적으로 분주하여 12시간 배양한 후, 생육도를 측정 하였다.

### 3.4 Phenol 및 *p*-cresol 분해 kinetics

상기에서 결정된 최적배지에 phenol 및 *p*-cresol을 각각 4mM씩 첨가한 보존용 한천사면 배지로부터 한 백금을 취하여 전배양하였다. 전배양은 최적배지 100ml에 phenol 및 *p*-cresol을 각각 4mM씩 첨가한 후, 250ml 용량의 삼각 flask에서 30℃, pH 7.0, 180rpm으로 회전진탕배양기(VISION CO. LTD.)를 사용하여 12시간 동안 배양하였다. 본배양은 phenol 및 *p*-cresol을 각각 0.05mM~14mM의 농도로 단계별로 첨가된 배지 100ml에 대수증식기 중기에 도달한 전배양액을 0.1ml(OD<sub>660</sub>=0.5) 접종한 후, 전배양과 같은 조건으로 36시간 배양하였다. 시간에 따른 기질분해 kinetics을 조사하기 위하여 일정시간별로 phenol 및 *p*-cresol의 잔존농도를 gas chromatography (Hewlett Packard 5890A)에 의하여 측정하였다. Phenol 및 *p*-cresol의 정량분석을 위해 5m 길이의 530 $\mu$ m fused silica capillary column 및 flame ionization detector를 사용하였으며, 이때의 조건은 oven temperature 30℃~60℃, injector temperature 200℃, detector temperature 220℃, carrier gas N<sub>2</sub>, flow rate 30 ml/min이었다.

### 3.5. Data 분석

Phenol 및 *p*-cresol의 biodegradation kinetics로부터 얻어진 data를 Table 1의 6가지 model, 즉 zero order, first order, Monod no growth, logarithmic, Monod with growth 및 logistic model에 선형회귀분석으로 적합시킨 후, 결정계수( $r^2$ )값이 가장 큰 model을 선정한 후, 가설검정을 위하여 유의수준 5%

**Table 2. Morphological, cultural and biochemical characteristics of isolated strain M1**

Contents	Characteristics
Shape	coccus
Motility	nonmotile
Gram stain	positive
Colonies on nutrient agar	circular, white, smooth, convex
Catalase test	positive
Voges-Proskauer test	positive
Methyl red test	negative
Indole test	negative
Oxidation-fermentation test	inert
Simmons citrate test	positive
Growth on the KCN broth	positive
Lysine decarboxylase test	negative
Ornithine decarboxylase test	negative
Arginine dehydrolase test	negative
Urease test	positive
H <sub>2</sub> S production	negative
Glucose utilization test	negative
Fructose utilization test	negative
Lactose utilization test	negative
Maltose utilization test	negative
Sucrose utilization test	negative

**Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth and degradation of *Micrococcus* sp. M1**

Nitrogen sources (0.05%.wW/v)	Growth(O.D.660nm)		Biodegradation (%)	
	Phenol	<i>p</i> -Cresol	Phenol	<i>p</i> -Cresol
None	0.08	0.08	17	15
NH <sub>4</sub> Cl	0.25	0.24	60	52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.28	0.24	60	50
KNO <sub>3</sub>	0.18	0.09	24	15
NaNO <sub>3</sub>	0.30	0.35	99	65
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.54	0.58	99	98
Yeast extract	0.95	0.77	98	74
Bactopeptone	0.86	0.80	97	85
Polypeptone	1.12	1.05	99	96
Casein	0.92	0.72	47	33
Beef extract	0.84	0.67	92	74
Casamino acid	0.88	0.72	75	54
Urea	0.18	0.08	10	5

로 하여 F test와 t test를 실시하였다 (Ludwig et al., 1988; 강병서, 1990).

### 3.6 혼합기질을 사용하였을때의 생육도와 생분해능

최적배지에 탄소원으로 phenol 2mM 과 *p*-cresol 2mM을 첨가하여 상기의 방법으로 12시간 회전진탕배양한 전배양액 0.1ml(O.D.<sub>660</sub>=0.5)을 phenol 5mM과 *p*-cresol 5mM을 혼합하여 첨가한 본배양액에 접종하여 배양하였다.

## 4. 결과 및 고찰

### 4.1. 균주의 동정

분리균 M1의 형태적, 배양적 및 생화학적 특성을 검토한 결과는 Table 2에서 보는바와 같다. 즉, 본 균주는 Gram 양성균의 구균으로 운동성이 없었으며, 육즙한천평판배지상에서 원형의 표면이 매끄러운 colony를 형성하였다. 또한 catalase test, Voges-Proskauer test, simmons citrate test, urease test 등에서는 양성을 나타내었으나, methyl red test, lysine decarboxylase test, arginine dehydrolase test,

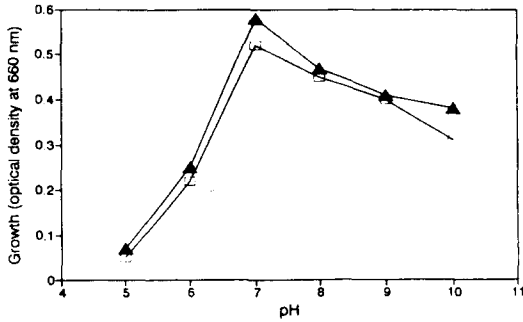


Fig. 1. Effect of initial pH on the growth of *Micrococcus* sp. M1. □, phenol; ▲, *p*-cresol.

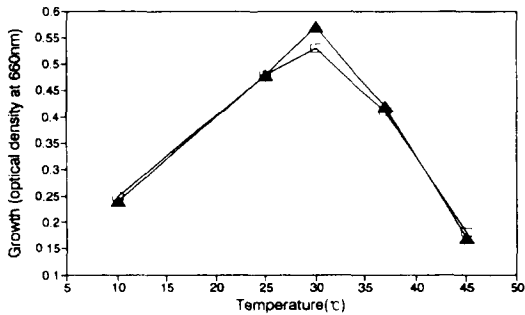


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Micrococcus* sp. M1. □, phenol; ▲, *p*-cresol.

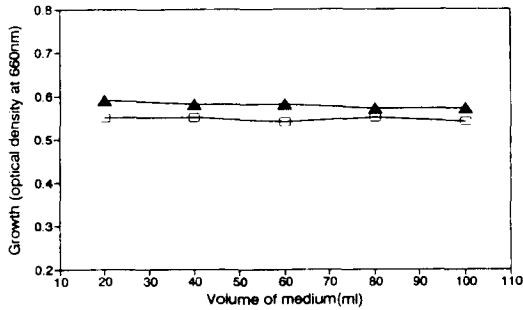


Fig. 3. Effect of aeration on the growth of *Micrococcus* sp. M1. □, phenol; ▲, *p*-cresol.

각종 당의 이용능 시험에서는 음성을 나타내었다. 이상의 실험결과를 검토한 결과 본 균주는 *Micrococcus* 속으로 동정되어, 편의상 *Micrococcus* sp. M12으로 명명하였다.

#### 4.2. 분해능에 영향을 미치는 생육인자 질소원의 변화에 따른 영향

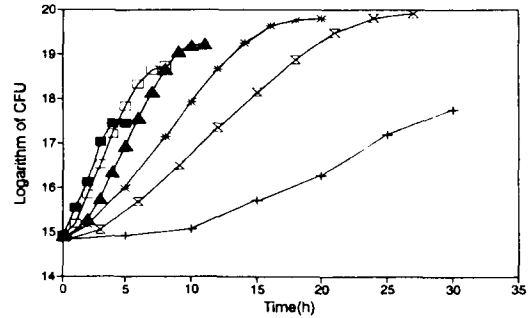


Fig. 4. Growth of *Micrococcus* sp. M1 on various phenol concentrations. ■, 0.5mM; □, 2mM; ▲, 4mM; \*, 8mM; ○, 12mM; +, 14mM. X

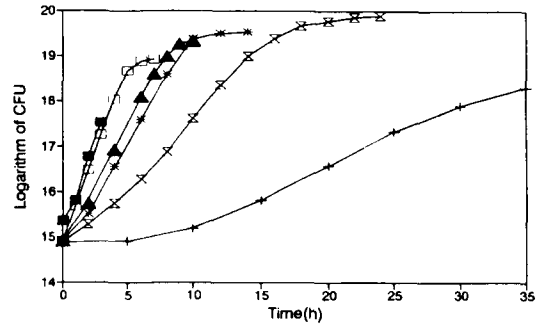


Fig. 5. Growth of *Micrococcus* sp. M1 on various *p*-cresol concentrations. ■, 0.5mM; □, 2mM; ▲, 4mM; \*, 6mM; ○, 8mM; +, 10mM. X

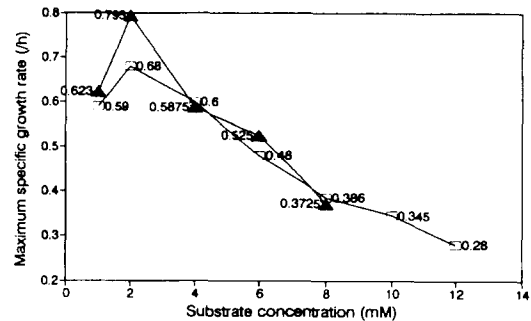


Fig. 6. Dependence of the maximum specific growth rate( $\mu_{max}$ ) on the various substrate concentration. □, phenol; ▲, *p*-cresol.

기본배지에 무기질소원 및 유기질소원을 0.05%의 농도로 첨가하여 본 균주의 생육과 분해율을 측정된 결과는 Table 3에서 보는 바와

*Micrococcus* sp. M1에 의한 Phenol과 *p*-Cresol의 생분해 Kinetics

Table 4. Selected model in experiments with different initial substrate concentrations

Concentration(mM)	Selected model	
	Phenol	<i>p</i> -Cresol
0.05	Not Applicable	Not Applicable
0.1	Not Applicable	Not Applicable
0.5	Not Applicable	Not Applicable
1	Monod with Growth	Monod with Growth
2	Monod with Growth	Monod with Growth
4	Monod with Growth	Monod with Growth
6	Monod with Growth	Monod with Growth
8	Monod with Growth	Monod with Growth
10	Monod with Growth	Monod with Growth
12	Monod with Growth	Monod with Growth

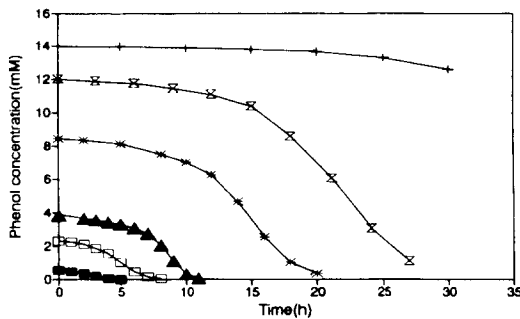


Fig. 7. Degradation of *Micrococcus* sp. M1 on various phenol concentrations. ■, 0.5mM; □, 2mM; ▲, 4mM; \*, 6mM; ○, 8mM; +, 12mM; +, 14mM. X

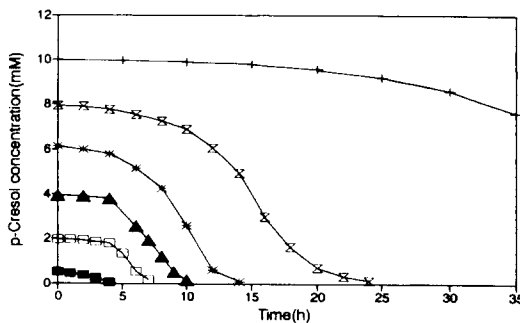


Fig. 8. Degradation of *Micrococcus* sp. M1 on various *p*-cresol concentrations. ■, 0.5mM; □, 2mM; ▲, 4mM; \*, 6mM; ○, 8mM; +, 10mM. X

같다. 전반적으로 유기질소원들이 무기질소원들보다 생육도 및 분해능이 우수한 것으로 나타났다. 특히, 생육도면에서는 유기질소원이 훨씬 높게 나타났으며, 그중 polypeptone이

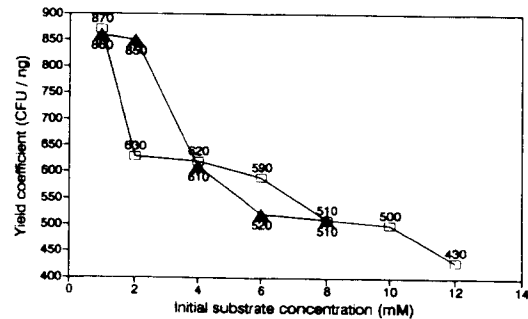


Fig. 9. Yield coefficient in dependence on the initial substrate concentration. □, phenol; ▲, *p*-cresol.

가장 우수하였다. 무기질소원의 경우  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 는 생육도는 낮으나 분해능은 polypeptone을 질소원으로 사용하였을때와 유사하였다. 난분해성 물질의 분해에 관한 실험에서는, 유기질소원을 질소원으로 사용할 경우 잡균오염에 의한 분해능 저하와 탄소원으로서의 이용가능성 때문에 주로 무기질소원을 많이 사용하고 있으므로, 생육도는 약간 낮지만 분해능이 우수한  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 최적 질소원으로 선정하였다.

초발 pH의 변화에 따른 영향

상기의 실험에서 결정된  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 최적 질소원으로 첨가한 배지의 초발 pH를 5.0에서 10.0까지 단계적으로 조절하여 실험한 결과, pH 7.0에서 가장 우수한 생육을 나타내었고, 대체로 중성과 약알카리성의 범위에서 생육이 양호하였다. 그러나 산성범위의 pH에서는 생육이 거의 나타나지 않았다(Fig.1).

배양온도의 변화에 따른 영향

최대의 생육도를 나타내는 질소원을 배지에

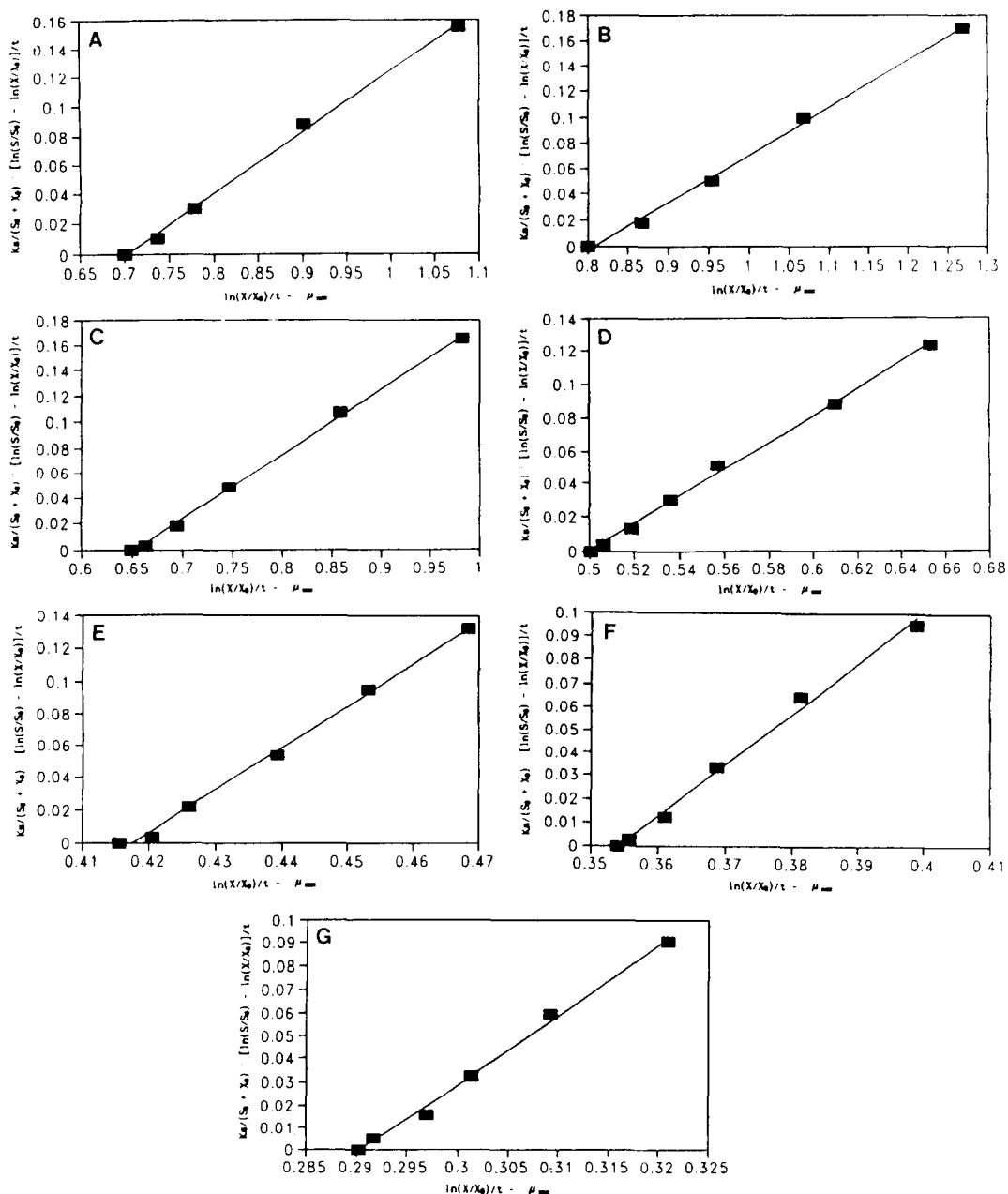


Fig. 10. Linear regression plot of various phenol concentrations. A, 1mM; B, 2mM; C, 4mM; D, 6mM; E, 8mM; F, 10mM; G, 12mM.

첨가하여 12시간동안 배양한 후, 생육도를 측정  
 한 결과, 30℃에서 생육이 가장 우수하였다  
 (Fig. 2).

통기량의 변화에 따른 영향

본 균주의 생육에 가장 적합한 통기량을 조

사하기 위하여 250ml 삼각 flask에 배지를 각  
 각 20ml에서 100ml까지 첨가하여 생육도를  
 측정한 결과, 배지의 양은 생육에 거의 영향  
 을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3).

상기의 결과를 종합한 결과, *Micrococcus*



*Micrococcus* sp. M1에 의한 Phenol과 *p*-Cresol의 생분해 Kinetics

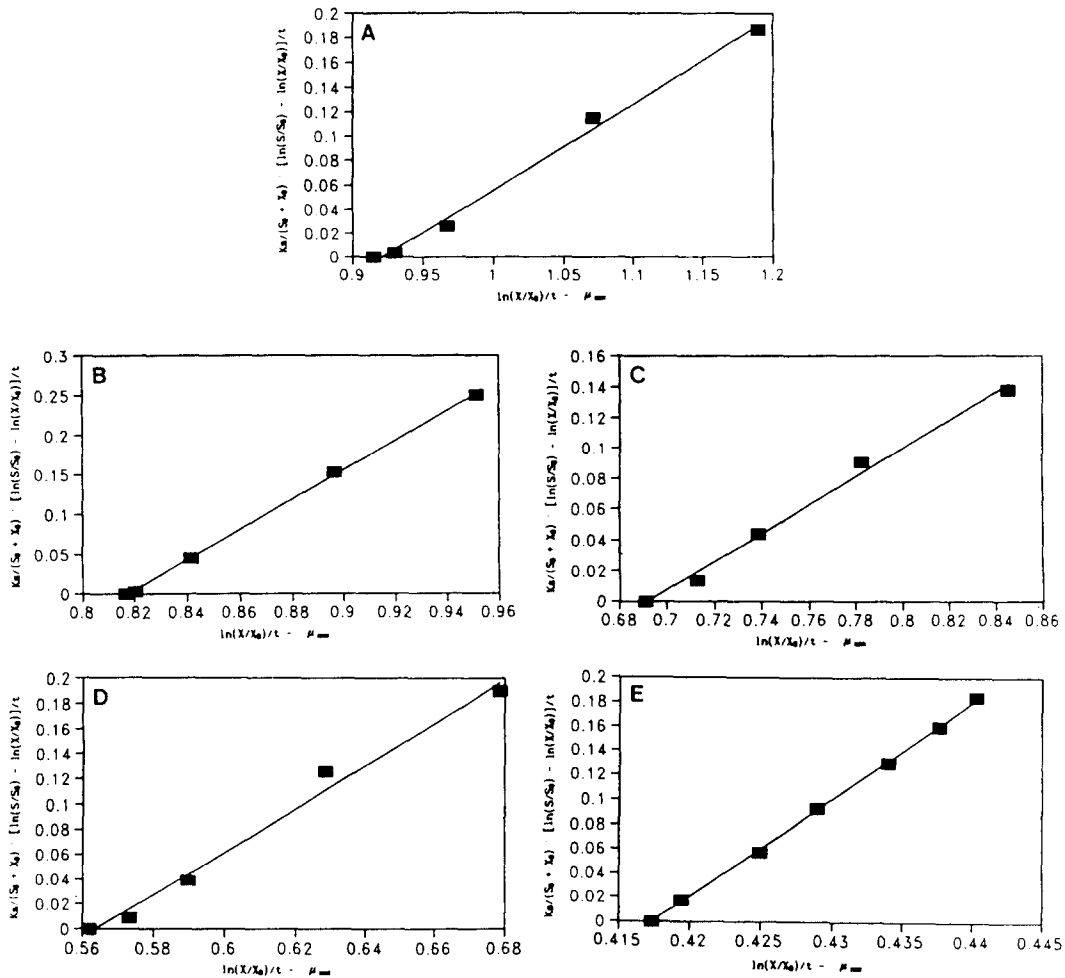


Fig. 11. Linear regression plot of various *p*-cresol concentrations. A, 1mM; B, 2mM; C, 4mM; D, 6mM; E, 8mM.

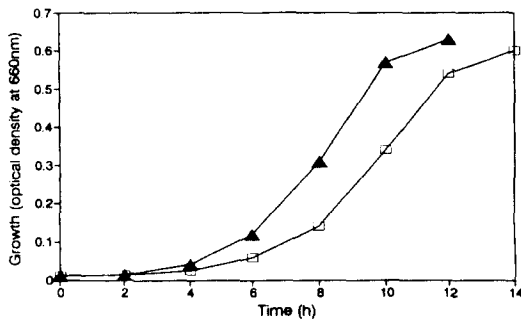


Fig. 12. Growth of *Micrococcus* sp. M1 on phenol 5mM and on *p*-cresol 5mM. □, phenol 5mM; ▲, *p*-cresol 5mM.

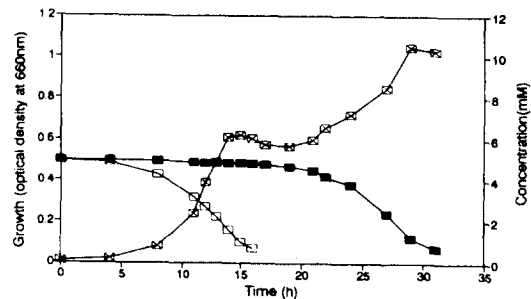


Fig. 13. Growth and biodegradation of *Micrococcus* sp. M1 on mixed substrate (phenol 5mM + *p*-cresol 5mM). □, growth; □, *p*-cresol; ■, phenol.

sp. M1에 의한 phenol 및 *p*-cresol의 분해 최적조건은 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.05% 배지의 초발 pH 7.0, 배양온도 30℃, 그리고 배지량 100ml였다.

#### 4.3 Phenol 및 *p*-Cresol의 분해 kinetics

생육최적배지에 탄소원으로 phenol 및 *p*-cresol을 각각 0.05mM~14mM의 농도로 단계별로 첨가한 다음, 최적조건하에서 회전진탕 배양한 결과는 다음과 같다. *Micrococcus* sp. M1은 최대 phenol 농도 14mM, 최대 *p*-cresol 농도 10mM까지 생육이 가능하였으나, 이러한 농도에서는 substrate inhibition이 나타났다. 또한 기질의 농도가 높아질수록 lag phase가 조금씩 길어짐을 보여준다(Fig. 4~5). 또한 2mM까지는 기질농도가 높을수록 maximum specific growth rate( $\mu_{max}$ )가 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 점차 감소하였다(Fig. 6). 이것은 2mM까지는 기질에 의한 생육의 저해가 일어나지 않고, phenol 및 *p*-cresol이 본 균주의 탄소원으로 완전히 이용된다는 것을 의미한다. 기질의 biodegradation은 대수증식기 중기이후 급격히 증가하였다(Fig. 7~8). 그리고 yield coefficient는 초기 기질농도가 증가할수록 점점 감소하였다(Fig. 9).

실험결과 data를 Table 1의 분해 kinetics 모델로 선형회귀분석하여 유의수준 5%의 t test와 F test로 검정하였으며, 가설이 검정된 것중 결정계수가 가장 높은 것을 최적모델로 선정하였다. 그 결과, 실험에 사용한 기질의 전 농도에서 Monod with growth model이 적합하였다(Table 4). Fig. 10~11에 선정된 model인 Monod with growth model의 각 기질의 농도별 linear regression plot을 나타내었다.

#### 4.4. Phenol과 *p*-Cresol을 혼합기질로 사용한 경우의 생육도 및 생분해능

Phenol 및 *p*-cresol을 단일 탄소원으로 하여 각각 5mM씩 첨가하였을때, *p*-cresol을 기질로 사용한 경우가 phenol보다 lag phase가 짧음을 알 수 있었다(Fig. 12). 이러한 결과는 Fig. 13에 나타낸 다소 특이한 성장곡선을 해석하는데 있어 참고가 된다. Fig. 13에서 나타낸 것처럼 *Micrococcus* sp. M1은 혼합기질에

서 *p*-cresol을 먼저 이용하고 난 후에 phenol을 이용하는 것으로 나타났다. 즉, *Micrococcus* sp. M1은 phenol과 *p*-cresol을 동시에 분해하지 않는다는 것을 알 수 있다. 이러한 특이적인 결과를 정확히 해석할 수 있는 계속적인 실험을 현재 수행중에 있다.

#### 요 약

본 연구는 세균에 의한 phenol 및 *p*-cresol의 최적분해 kinetic model을 설정하기 위한 목적으로 수행되었다. Phenol 및 *p*-cresol을 분해할 수 있는 *Micrococcus* sp.를 토양으로부터 분리, 동정하였다. 각 화합물의 분해최적 조건은 모두 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.05%, 초발 pH 7.0, 30 및 통기량 100ml/250ml shaking flask이었다. 본 균주는 phenol 농도 14mM, *p*-cresol 8mM내의 범위에서 생육할 수 있었다. 그리고 phenol 및 *p*-cresol의 조사된 모든 농도에 따른 분해율을 수식으로 가장 잘 설명할 수 있는 분해 kinetic model은 Monod with growth model이었다. 본 균주는 phenol과 *p*-cresol을 동시에 탄소원으로 이용할 수 없었고, 1차적으로 *p*-cresol을 이용하고 난 후, phenol을 이용하는 diauxic growth pattern을 보여주었다.

#### 참 고 문 헌

- 강병서, 1990, 現代統計學, 貿易經營社.  
 손홍주, 이상준, 이종근, 1989, *Aeromonas* sp. El-051S에 의한 pentachlorophenol 분해에 관한 연구, 부산대학교 환경연구보, 7, 95-112.  
 Alexander, M., 1965, Biodegradation : problems of molecular recalcitrant and microbial fallibility, *Advan. Appl. Microbiol.*, 7, 35-42.  
 Dart, R.K., and R.J. Stretton, 1980, *Microbiological aspects of pollution control.*, 2nd ed., Elsevier scientific Publishing Company, New York.  
 Fawell, J.K., and S. Hunt, 1988, *Environmental Toxicology: Organic pollutants*, John Wiley & Sons, 197-201.  
 Gehm, H.W., and J. Bregman, 1976, *Handbook of Water Resources and*

*Micrococcus* sp. M1에 의한 Phenol과 *p*-Cresol의 생분해 Kinetics

- Pollution control, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips, 1981, Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, New York.
- Irwin, W.U., 1990, Kinetics of drug decomposition, Elsevier Science Publisher B.V.
- Krieg, N.R., and J.G. Holt, 1984, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The William and Wilkins Co., Baltimore.
- Ludwig, J.A., and J. F. Reynold, 1988, Statistiscal Ecology, John Wiley and Sons, Toronto.
- Paris, D.F., W.C. Steen, G.L. Baughman, and J.T. Barnett, 1981, Second order model to predict microbial degradation of organic compounds in natural water, Appl. Environ. Microbiol., 41, 603-609.
- Simkins, S., and M. Alexander, 1984, Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density, Appl. Environ. Microbiol., 47, 1299-1306.
- Sulflita, J.M., J.A. Robinson, and J.M. Tiedje, 1983, Kinetics of Microbial dehalogenation of haloaromatic substrate in methanogenic environments, Appl. Environ. Microbiol., 45, 1466-1471.