

Phenol 분해 균주의 분리 및 특성

¹정경훈 · † 차진명 · ¹오인숙 · ²고한철 · ¹정오진 · ³이용보

전남대학교 생물화학공학과, ¹조선대학교 환경공학부, ²동아전문대학 환경공업과, ³조선대학교 생물교육과
(접수 : 1997. 7. 4., 게재승인 : 1997. 12. 26.)

Isolation and Characterization of a Phenol-Degrading Bacteria

Kyung-Hoon Cheong¹, Jin-Myeong Cha[†], In-Suk Oh¹, Han-Cheol Koh², Oh-Jin Jung¹, and Yong-Bo Lee³

Dept. of Biochemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

¹Dept. of Environmental Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

²Dept. of Environmental Industry, Dong-A Junior College, Chonnam 526-870, Korea

³Dept. of Science Education(Biology Major), Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

(Received : 1997. 7. 4., 1997. 12. 26.)

Twelve bacterial strains capable of growing on phenol minimal medium were isolated from iron foundry activated sludge by enrichment culture, and among them, one isolate which was the best in cell growth and phenol degradation was selected and identified as *Acinetobacter junii* POH. The optimal temperature, initial pH and phenol concentration in the above medium were 30°C, 7.5 and 1000 ppm, respectively. Cell growth of *Acinetobacter junii* POH dramatically increased 20 hrs cultivation-time and reached a almost stationary phase 40 hrs cultivation-time then phenol was degraded about 98%. Cell growth was inhibited by phenol at concentrations over 1500 ppm. The isolate was resistant to several antibiotics as well as various heavy metal ions. The growth-limiting log P value of *Acinetobacter junii* POH on organic solvents was 2.9 in the LB medium. Therefore, it is suggested that *Acinetobacter junii* POH could be effectively used for the biological treatment of wastewater containing the presence of heavy metal ions and organic solvents.

Key Words : phenol degrading bacteria, *Acinetobacter junii* POH, organic solvents

서론

최근 급속한 산업의 발달과 생활수준의 향상으로 화학공장 및 석유관련 산업으로부터 배출되는 폐수에는 각종 난분해성 화합물의 종류와 양이 증가되면서 수질오염에 커다란 영향을 미치고 있다. 이들 폐수 가운데 대다수는 높은 농도의 유기물을 함유하고 있기 때문에 효율적으로 처리하기가 매우 어렵고, 처리수의 수질을 배출 허용기준에 맞추기도 어려운 실정이다(1, 2). 난분해성 화합물 폐수 가운데 phenol은 BTX(benzene, toluene, xylene)와 함께 여러 산업분야에서 이용되어 배출되고 있으며, 또한 빈번하게 발생하는 오염물질로서 휘발성과 물에 대한 불용성으로 인하여 생태계에 미치는 영향이 매우 크기 때문에 미국의 EPA에서도 주요 오염물질로 분류하여 그 배출량에 대해 철저히 감시하고 있다(3, 4). 특히 phenol은 독성이 강하여 200 ppm 이하의 저 농도에서도 미생물 성장을 저해하며 폐수처리도 어렵게 된다(5).

한편, 대부분의 난분해성 화합물 분해 균주는 각각 제한된 종류의 화합물만을 분해하며 일정농도 이상의 기질농도에서는 활성이 현저히 저하되므로 다양한 난분해성 물질이 함유된 폐수의 처리를 위한 연구방향은 기질의 종류에 따라서 여러 가지 분해 균주를 혼합 배양하는 연구들이 필요하다(6, 7). 그러나 본 연구에서는 난분해성 화합물이 혼합되어 있는 폐수의 고정화 처리의 전 단계 연구로서 난분해성 물질인 phenol을 단일기질로써 사용하여 균주를 분리하는 연구를 수행하였다(8).

지금까지 국내·외적으로 Lee 등(9), Hong 등(10) 및 Chang 등(11)에 의하여 난분해성 화합물의 생분해에 관하여 보고한 바 있다. 보고된 phenol 분해 미생물로는 *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas* sp. *Rhodococcus* sp. *Trichosporon cutaneum* 등이 있다(9-14).

본 연구에서는 난분해성 화합물이 포함된 폐수의 생물학적 처리에 이용할 수 있는 미생물을 확보하기 위하여 phenol 분해 균주를 K 제철소 폐수처리장의 활성슬러지로부터 분리하여 phenol 분해능이 가장 우수한 균주를 최종 선발, 분리 균주의 형태적 및 생화학적 특성을 조사하여 동정하였다. 선발된 균주의 세포성장 및 phenol 분해 특성과 각종 항생제, 중금속 이온 및 유기용매에 대한 내성을 조사하고, 최적 phenol 분해농도와

† Corresponding Author : Dept. of Biochemical Engineering,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel. : 062-526-1658 Fax : 520-7382

pH, 온도 등 배양학적 성장특성을 조사하고 phenol이 함유된 폐수의 생물학적 처리를 위한 우수 미생물을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리원과 사용배지

Phenol 분해능이 우수한 균주를 분리하기 위하여 K 제철소 폐수처리장의 활성슬러지를 분리된 시료로 사용하였다. 균주의 분리 및 배양에 사용한 최소 배지는 Lee 등(9)과 Kho 등(15)이 사용한 배지를 이용하였고, 배지의 조성은 증류수 1 L 중에 NH_4Cl 1 g, K_2HPO_4 4.35 g, NaH_2PO_4 3.9 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.48 g, CaCl_2 0.03 g, FeSO_4 0.01 g, MnCl_2 0.01 g, CoCl_2 0.001 g, Na_2MoO_4 0.001 g이며 pH는 7.5로 조절하였다. Phenol은 유일한 탄소원 및 에너지원으로 멸균된 최소배지에 첨가하여 사용하였다. 균주 보관에는 LB 배지를 사용하였으며, 한천배지로는 LB 배지에 bacto agar(Difco)를 1.2%(w/v) 농도로 첨가하여 사용하였다. 사용한 시약과 탄소원인 phenol 등은 Difco사의 특급 및 일급 제품을 사용하였다.

Phenol 분해 균주의 분리 및 선발

먼저 K 제철소 폐수의 활성슬러지를 vortex mixer로 완전히 혼합한 분리된 시료 1 mL를 phenol 100~5000 ppm이 포함된 최소배지에 접종한 후 30°C, 150 rpm에서 7일간 배양하였다. 이후 Kho 등(15)이 사용한 방법을 이용하여 phenol에 적응된 분리된 시료로부터 성장과 phenol 분해능이 우수한 균주를 colony 상으로 순수 분리하였다. 순수 분리한 colony를 한천배지에 toothpicking하여 접종하고 phenol을 증기상태로 공급하면서 30°C에서 3일간 배양한 후 phenol 100~5000 ppm이 함유된 최소배지에 배양한 후에 세포성장과 phenol 분해능이 우수한 균주를 최종 선발하였다. 선발한 균주는 LB 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 전 배양액으로 사용하였고, 이 균주를 본 연구에 사용하였다.

Phenol 분해에 따른 세포성장 특성

세포성장은 660 nm(Shimazu UV-160A)에서 배양액의 흡광도를 측정하여 나타내었다. 즉, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 최소배지를 넣고 1000 ppm의 농도로 phenol을 첨가한 후 전 배양배지를 2%(v/v)되게 접종하여 30°C에서 48시간 120 rpm으로 진탕배양하면서 세포성장과 phenol 분해능, 그리고 phenol 분해의 최적 온도와 pH, phenol 농도 등을 조사하였다. 또, 건조 균체량은 대수성장기에 있는 균을 취해 4°C에서 1,643 xg에서 15분간 원심분리하여 회수된 균체를 80°C에서 항량이 될 때까지 건조한 후의 무게를 측정하여 나타내었다.

분리 균주의 동정

분리 균주의 형태적 특징은 그람 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였고, 배양학적 특징은 LB 한천배지에서, 운동성은 반유동 한천배지에서 천차배양하여 조사하였다. 분리 균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology(16)와 The prokaryotes(17)에 준하여 수행하였고, 분리 균주 동정을 최종 확인하기 위해 시판중인 API 20NE Kit를 병행하여 사용하였다. 또한 생화학적 제반 특성은 Biochemical tests of identification

of medical bacteria(18)에 준하여 실시하였다. Coenzyme Q는 Yamada 등(19)의 방법에 따라서 추출하고 정제하였다. DNA 염기조성(G+C mole 함량)은 Tamaoka 등(20)의 방법에 따라 분리하고 정제하였다.

유기물 동화유무는 최소배지에 적절한 기질을 첨가하여 조사하였다. 4°C 한천배지에 보관중인 colony 1 백금이를 취해 10 mL 멸균수에 혼합하여 최소배지에 기질이 첨가된 액상배지에 접종하였다. 전 배양액의 최적농도는 1%(v/v)로 하여 균의 유기물 동화 유무를 조사하였다. 또한 최소배지에 평판도말한 colony 크기와 최소배지에 기질이 첨가된 배지의 colony 크기를 비교하여 유기물 동화 유무를 최종 확인하였다.

항생제 및 중금속에 대한 내성

분리 균주의 항생제 및 중금속에 대한 내성 조사는 분리 균주를 LB 배지에서 대수성장기 후기까지 배양한 균체를 kanamycin, tetracyclin, ampicillin, streptomycin, rifampicin, chloramphenicol, speccitinomycin을 10, 20, 50 µg/mL 농도로 LB 한천배지에 첨가하여 접종한 후 30°C에서 48시간 배양하면서 colony의 생성 여부에 따라 항생제 내성 유무를 결정하였다(17, 18). 또, 중금속에 대한 내성도 상기 균체를 HgCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, AgNO_3 등이 5 mM 농도로 첨가된 한천배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하면서 colony의 생성 여부에 따라 분리 균주의 중금속에 대한 내성 유무를 결정하였다(18).

유기용매에 대한 내성

분리 균주의 유기용매에 대한 내성은 hydrophobicity가 서로 다른 유기용매를 25%(v/v)로 첨가한 LB 액체배지에서의 생육 정도로서 나타내었다(21, 22).

Phenol 농도 분석방법

Phenol 분해능은 phenol이 함유된 최소배지에 균주를 배양한 후 배양액을 1,258 xg로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 268 nm에서 측정하거나, gas chromatography (Shimazu GC-14A)로 분석하여 측정하였다(23). GC 분석에 사용한 시료는 배양액을 취하여 membrane filter(Millipore : pore size, 0.45 µm)로 여과한 후 분석에 이용하였다. 시료중의 phenol은 fused-silica capillary column(30×0.32 mm I.D)과 FID를 장착한 GC로 분석하였으며, 분석조건으로 column 온도는 90°C, 주입부와 검출기의 온도는 각각 200°C, 250°C이고, 운반기체(N_2)의 유속은 30 mL/min으로 조절하였다. 시료의 주입량은 1.0 µL이고 이때 phenol의 retention time은 약 3.50분으로 나타났다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선발

Phenol 분해 균주의 분리는 K 제철소 폐수의 활성슬러지를 분리된 시료로 사용하여 성장이 우수한 12개 colony를 1차로 순수 분리하였다. 순수 분리한 균주의 phenol 농도에 따른 성장은 각각의 phenol 농도를 300~5000 ppm이 첨가된 최소배지에서 배양하여 세포성장이 빠르고 phenol 분해능이 가장 우수한 colony 1개를 최종 선발하여 POH로 나타내었다. 분리 균주는

최소배지에 계대배양 하면서 4°C에서 보관하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주의 형태적, 생리·생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다.

분리 균주 POH는 그람 음성 간균의 호기성 세균이며, twitching motility를 지니고 있었다. Catalase가 양성이며 oxidase 음성, glucose에서는 산을 형성하였다. Citrate는 이용하였고 nitrate는 이용하지 못하였으며, methyl red 반응에서는 양성 Voges-Proskauer 반응과 indole test에서는 음성반응을 보였다.

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the isolate POH.

| Strains | POH | <i>Acinetobacter junii</i> ^{J6.17} |
|-------------------------------|-----------------|---|
| Morphological characteristics | | |
| shape | short rod | rod |
| cell size(μm) | 0.5~0.7×0.8~1.0 | 0.9~1.6×1.5~2.5 |
| twitching motility | + | + |
| Gram stain | - | - |
| spore stain | - | - |
| Cultural characteristics | | |
| optimum pH | 7.5 | 7.0 |
| optimum temperature (°C) | 30 | 30 |
| growth at 4°C | - | - |
| growth at 42°C | + | + |
| Biochemical characteristics | | |
| glucose (acid) | + | - |
| aerobic growth | + | + |
| anaerobic growth | + | + |
| hydrolysis of gelatin | + | - |
| hydrolysis of starch | - | - |
| catalase test | + | + |
| oxidase test | - | - |
| citrate test | + | + |
| nitrate reduction test | - | - |
| indole test | - | - |
| methyl red test | + | - |
| Voges-Proskauer test | - | - |
| H ₂ S production | K/A | K/A |
| urease | + | + |
| arginine | + | + |
| ornithine | + | - |
| lysine | + | - |
| Glycolysis test | | |
| glucose | + | + |
| maltose | - | - |
| sucrose | - | - |
| lactose | + | + |
| Quinone | Q-7 | Q-8 or Q-7 |
| G + C mol % | 39.12% | 38~47% |

최적 pH와 배양온도는 pH 7.5와 30°C로 나타났으며 4°C에서는 성장하지 못했으며 42°C에서는 약간의 성장을 보였다. Coenzyme Q는 ubiquinone Q-7 이고 DNA의 G + C mol 함량은 39.12%로 나타났다.

분리 균주인 POH의 생리·생화학적 특성과 균주의 Coenzyme와 DNA 함량에 따라 POH를 Bergey's manual of determinative bacteriology(16)와 The prokaryotes(17)에 비교해본 결과 *Acinetobacter junii* 판명되어 POH를 *Acinetobacter junii* POH로 명명하였다. 일반적으로 *Acinetobacter* 속은 oxidase는 음성, catalase는 양성이고 twitching motility를 하는 대표적인 균주이고 coenzyme Q가 ubiquinone Q-8과 Q-7이고, DNA의 G + C mol 함량은 38~47%에 속하므로 본 연구에서 분리한 균주와 대부분 일치하고 있다. 또한 POH를 시판중인 API 20NE Kit에 동정을 확인해 본 결과도 이의 결과와 일치하였다.

항생제 및 중금속에 대한 내성

분리 균주의 여러 가지 항생제에 대한 내성을 조사한 결과 POH는 chloramphenicol과 streptomycin에 대해서는 성장에 감수성을 보여주었으나 kanamycin, tetracyclin, ampicillin, rifampicin, spectinomycin에 대해서 내성을 가지고 있었다 (Table 2). 이렇게 밝혀진 분리 균주의 항생제 내성 특성은 유전자 클로닝에 유전적 지표로서 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

또, 선발한 균주의 여러 중금속 이온에 대한 내성을 조사한

Table 2. Susceptibility of the isolate POH to antibiotics.

| Antibiotics | Concentration (μg/mL) | Resistance(+) or Sensitive(-) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|
| Kanamycin | 10 | + |
| | 20 | + |
| | 50 | + |
| Tetracyclin | 10 | + |
| | 20 | + |
| | 50 | - |
| Ampicillin | 10 | + |
| | 20 | + |
| | 50 | + |
| Streptomycin | 10 | - |
| | 20 | - |
| | 50 | - |
| Rifampicin | 10 | + |
| | 20 | + |
| | 50 | - |
| Chloramphenicol | 10 | + |
| | 20 | - |
| | 50 | - |
| Spectinomycin | 10 | + |
| | 20 | + |
| | 50 | - |

결과 Hg, Co, Zn, Ni, Cd 대해서 내성을 나타내었으나 Ba이나 Ag에 대해서는 감수성을 나타내었다(Table 3). 일반적으로 금속이온에 내성을 나타내는 세균들은 주로 금속이온의 농도가 높은 지역이나 광산층에서 분리되는 균주가 대부분이다. 이들은 중금속이 함유된 환경에서 성장하기 위하여 특이한 유전적, 생리적 특성을 가지고 성장하게 되는데 본 연구의 대상인 K 제철소 폐수의 활성슬러지의 경우 여러 가지 중금속 물질에 대하여 내성을 나타내는 것으로 보아 제철 슬러지가 중금속에도 오염되어 균주들이 내성이 있는 것으로 생각된다. 따라서 이들 중금속에 대한 내성 결과들은 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 3. Susceptibility of the isolate POH to heavy metal ions.

| Heavy metals concentration (5 mM) | Resistance(+) or Sensitive(-) |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| HgCl ₂ | + |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | + |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | + |
| ZnCl ₂ | + |
| BaCl ₂ · 2H ₂ O | - |
| NiCl · 6H ₂ O | + |
| Cd(NO ₃) ₂ | + |
| AgNO ₃ | - |

유기 용매에 대한 내성

최근 유기 용매를 함유하는 이상계(two-phase system)에서 성장이 가능한 미생물들은 유기용매에 의한 환경오염을 제거하는 bioremediation에 유용하게 이용될 수 있기 때문에 이에 대한 관심이 높아지고 있다(21).

Acinetobacter junii POH의 서로 다른 유기용매에 대한 내성

Table 4. Solvent tolerance on growth of the isolate POH in the presence of organic solvent at a two-phase(organic-aqueous) system.

| Solvent | Log P | Growth | Solvent | Log P | Growth |
|------------------|-------|--------|-------------------|-------|--------|
| Dodecane | 7.0 | + | <i>p</i> -Xylene | 3.1 | + |
| Decane | 6.0 | + | <i>n</i> -Pentane | 3.0 | + |
| Nonane | 5.5 | + | Styrene | 2.9 | - |
| <i>n</i> -Octane | 4.5 | + | Toluene | 2.8 | - |
| Cyclooctane | 4.5 | + | 1-Heptanol | 2.4 | - |
| Trimethylpentane | 3.9 | + | Benzene | 2.0 | - |
| Hexane | 3.9 | + | Chloroform | 2.0 | - |
| Propylbenzene | 3.8 | + | Phenol | 1.5 | - |
| Cyclohexane | 3.4 | + | 1-Butanol | 0.8 | - |

The isolate POH was inoculated to LB medium containing organic solvent at the concentration of 25%(v/v) and cell growth was measured after 48 hrs cultivation-time.

을 조사하여 Table 4에 나타내었다.

분리 균주는 log P 값이 3.0인 *n*-pentane에서는 성장하고 2.9인 styrene에서는 성장하지 못하였다. 따라서 본 균주의 log P 값은 2.9이며 유기 용매에 대한 내성이 강한 것으로 나타났다. 그러나 Inoue 등(22)은 LB 한천배지에서 유기 용매에 대한 내성을 조사한 결과는 *Acinetobacter calcoaceticus*의 경우 log P 값이 3.9였다. 이와 같이 유기 용매에 내성이 있는 균주는 폐수 처리 뿐 아니라 이들 물질로 오염된 오염지역의 bioremediation에도 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Phenol 분해에 따른 세포성장과 pH의 변화

Acinetobacter junii POH의 phenol 분해에 따른 세포성장과 pH의 변화를 Figure 1에 나타내었다.

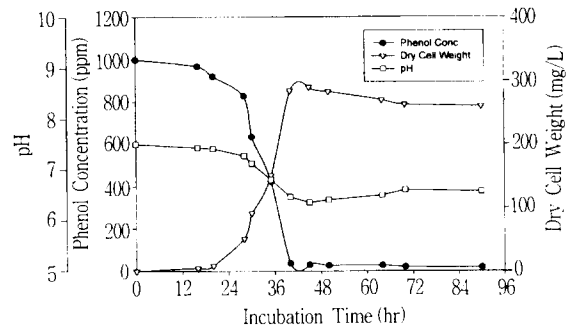


Figure 1. Time course of *Acinetobacter junii* POH in a minimal medium containing phenol.

1000 ppm의 phenol이 함유된 최소배지에서 *Acinetobacter junii* POH의 phenol 분해에 따른 배지내의 pH 변화는 초기 pH 7.5에서 세포성장이 급격히 시작되는 대수성장기 전까지는 에너지원인 phenol에 적응하는 시기이므로 pH 변화가 일정하다가 대수성장기 후기에 접어들면서 pH 변화가 급격히 감소하였고 정상기에 들어가면서 pH가 약간 증가하면서 안정한 경향을 나타내었다. 이는 배양 40 시간 후 배지내의 phenol 농도가 대부분 제거되면서 세포가 정지기에 도달하여 성장이 정지하는 단계에 접어든 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 phenol 분해 균주가 세포 성장에 따른 에너지원으로 phenol을 이용하면서 H⁺ 이온을 생성하므로 배지내의 pH가 감소하고 있다는 것을 의미하고 있다.

pH에 따른 phenol 분해

Phenol 농도 1000 ppm을 함유하고 있는 최소배지의 초기 pH에 따른 *Acinetobacter junii* POH의 phenol 분해와 건조 균체량을 Figure 2에 나타내었다.

최소배지에 phenol 1000 ppm을 첨가하여 배양 후 40 시간에 phenol의 분해와 세포성장은 pH 7.5에서 세포 성장과 phenol 분해율(98%)이 가장 우수하게 나타났다. 그러나 pH 5 이하에서는 세포 성장이 거의 이루어지지 않아 phenol 분해가 나타나지 않았으며 pH 6에서는 40% 이하의 낮은 분해율을 보였고 pH 7.5 이상에서는 세포 성장과 분해가 비교적 우수하게 나타났다. 그러므로 *Acinetobacter junii* POH의 최적 pH는 7.5로 나타나 산성이나 중성보다는 약알칼리에서 성장하는 균주로 생각된다.

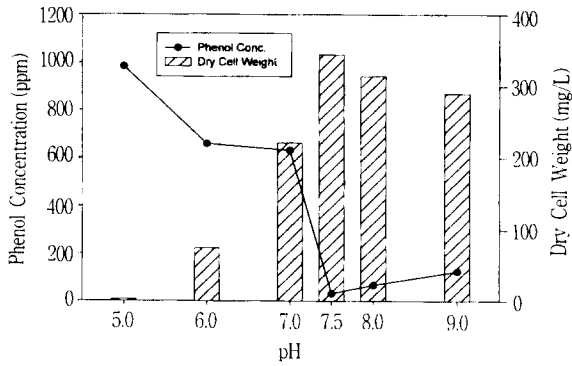


Figure 2. Changes of phenol concentration and dry cell weight on various pH of *Acinetobacter junii* POH. Cell was grown for 40 hrs in a rotary shaking incubator at 30°C.

온도에 따른 phenol 분해

Phenol 1000 ppm이 함유된 최소배지에서 배양온도에 따른 phenol 분해와 건조 균체량은 Figure 3에 나타내었다.

세포성장에 따른 배양 40 시간에 phenol 분해와 건조 균체량은 30°C, 이때 phenol 분해율 역시 98%로 가장 우수하게 나타났다. 그러나 *Acinetobacter junii* POH는 4°C에서는 성장하지 못하였고 25°C에서는 배양 후 60시간에 정상기에 도달하였으며 phenol 분해율은 28%이고, 37°C에서는 배양 후 80시간에 정상기에 도달하여 phenol 분해율도 15% 정도로 온도에 대한 적응성이 민감하게 나타났다.

분리 균주인 *Acinetobacter junii* POH는 25~35°C 사이에서 성장하는 중온 균으로써 온도변화에 따른 세포성장과 phenol 분해율은 30°C에서 최대로 나타났다. 이의 결과는 일반적으로 phenol 분해 균주는 대부분 중온 균에 속한다는 연구결과와 일치하고 있다(2, 12, 15).

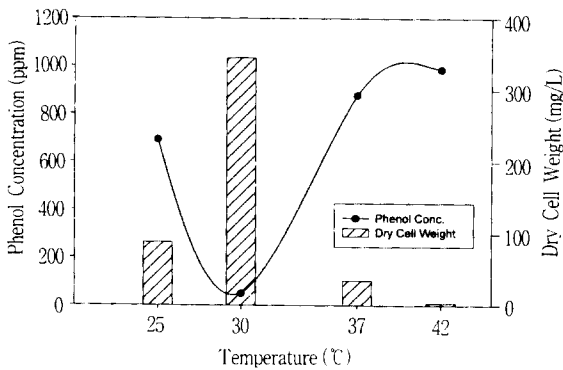


Figure 3. Changes of phenol concentration and dry cell weight on various temperature of *Acinetobacter junii* POH. Cell was grown for 40 hrs in a rotary shaking incubator at pH 7.5.

Phenol 농도에 따른 세포성장과 분해

일반적으로 벤젠고리를 가지는 난분해성 화합물은 균체에 독성을 나타내기 때문에 세포성장에 기질저해 효과를 나타낸다(21, 22). *Acinetobacter junii* POH의 phenol에 의한 기질저해 효과를 조사하기 위하여 유일한 탄소원 및 에너지원인 phenol을

300~2000 ppm까지 농도를 변화하면서 전 배양배지를 2%(v/v) 되게 접종한 후 30°C에서 120 rpm으로 진탕배양하면서 phenol의 농도에 따른 분해정도를 조사하여 Figure 4에 나타내었다.

Phenol 500 ppm 이하의 농도에서는 배양 28 시간 이내에 정상기에 들어가 98%의 phenol이 분해되었다. 1000 ppm phenol에서는 30 시간 이후 대수성장기에 들어가 40 시간에는 정상기에 도달하였으며, 이때 phenol은 98% 이상 분해되는 것으로 나타났다. 그러나 1500 ppm과 2000 ppm에서는 배양 후 72 시간에도 세포성장이 거의 이루어지지 않았고 phenol 분해율도 15% 이내로 나타났다.

따라서 phenol을 농도별로 첨가하여 배양한 결과 분리 균주 *Acinetobacter junii* POH의 세포성장의 최적 phenol 농도는 1000 ppm이고, 1500 ppm 이상의 농도에서는 세포성장이 억제된다.

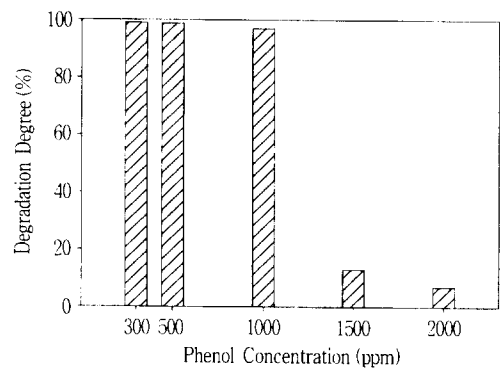


Figure 4. Degradation degree on various phenol concentration of *Acinetobacter junii* POH.

이와 같은 결과는 Masque 등(2)의 *Pseudomonas* sp.와 Hitegger 등(12)의 *Pseudomonas putida*가 phenol 1000 ppm 첨가된 배지에서 세포성장이 가능하다는 보고와 유사하였으나, Hong 등(10)이 분리한 *Pseudomonas* sp.의 성장 한계농도인 2000 ppm에는 미치지 못하였으나 500 ppm의 phenol 농도에서 배양 후 4일에 90% 이상 분해되었다는 보고에 비교해 볼 때 *Acinetobacter junii* POH의 phenol 분해는 매우 신속히 진행되는 것으로 생각되었으며, Lee 등(9)이 분리한 *Acinetobacter* sp.가 phenol 1000 ppm이 배양 후 24시간에 95%에 분해된다는 보고에는 미치지 못하였다.

결론

Phenol 분해 균주를 분리하기 위하여 K 제철소 폐수의 활성 슬러지를 분리된 시료로 이용하여 phenol 분해능이 우수한 POH의 colony를 선별하여 분리 균주의 형태적, 생리·생화학적 특성을 조사한 결과 POH는 *Acinetobacter junii*로 판명되어 *Acinetobacter junii* POH로 명명하였다. *Acinetobacter junii* POH는 세포성장을 위한 최적 pH, 배양온도와 페놀농도는 각각 pH 7.5, 30°C와 1000 ppm으로 나타났다. Phenol 농도에 따른 세포성장에서 *Acinetobacter junii* POH는 1000 ppm에서는 세포성장이 빠르게 나타났으나 1500 ppm 이상에서는 세포성장이 억제되었다. *Acinetobacter junii* POH의 세포성장에 따른 phenol

분해율은 배양 40시간에 정상기에 도달하여 98% 이상의 나타내었다. 또, 항생제와 중금속 이온에 대하여 내성을 지니고 있었다. 유기용매에 대한 내성이 커서 성장제한 log P가 2.9로 나타났다. 따라서 *Acinetobacter junii* POH는 중금속 및 유기용매가 포함된 폐수의 생물학적 처리에 응용 가능성이 있는 것으로 생각된다.

감 사

이 논문은 "1995년도 조선대학교 학술연구비 지원 및 우수연구센터 기자재 활용에 의해 연구"로 이에 연구비를 지원해 준 대학에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Zilli, M., A. Converti, A. Lodi, M. Del Borghi, and G. Ferraiolo (1993), Phenol Removal from Waste Gases with a Biological Filter by *Pseudomonas putida*, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 693-671.
- Masque, C., M. Nolla, and A. Brodons (1987), Selection and Adaptation of a Phenol-Degrading Strain of *Pseudomonas*, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 655-600.
- Kobayashi, H. and B. E. Rittman (1982), Microbial Removal of Hazardous Organic Compounds, *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 170-173.
- Stensel, H. D. and S. Reiber (1983), Industrial Wastewater Treatment with a New Biological Fixed-Film System, *Environ. Prog.*, **2**, 110-114.
- Li, J. K. and A. E. Humphrey (1989), Kinetics and Fluorometric Behaviour of a Phenol Fermentation, *Biotechnol. Lett.*, **11**, 177-182.
- Bitzi, U., T. Egli, and G. Hammer (1991), The Biodegradation of Mixtures of Organic Solvents by Mixed and Monocultures of Bacteria, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 1037-1042.
- Weisel, I., S. M. Wubker, and H. J. Rehm (1993), Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by an Immobilized Mixed Bacteria Culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 110-116.
- Zaxhe, G. and H. J. Rehm (1989), Degradation of Phenol by a Coimmobilized Entrapped Mixed Culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 426-431.
- Lee, C. H., H. M. Oh, T. J. Kwon, G. S. Kwon, S. G. Lee, H. H. Suh, and B. D. Yoon (1994), Isolation and Characterization of a Phenol-Degrading Strain *Acinetobacter* sp. GEM2, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 692-699.
- Hong, S. Y. S. H. Lee, J. H. Lee, and J. H. Ha (1995), Characterization of Trichloroethylene and Phenol Degradation by *Acinetobacter* sp. T5-7, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 255-261.
- Chang, M. K., T. C. Voice, and C. S. Criddle (1992), Kinetics of Competitive Inhibition and Competabolism in the Biodegradation of Benzene, Toluene and p-Xylene by Two *Pseudomonas* Isolates, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 1057-1065.
- Hinteregger, C. R., M. Leitner, J. Loidl, A. Fersch, and F. Streichsbier (1992), Degradation of Phenol and Phenolic Compounds by *Pseudomonas putida* EKII, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 252-259.
- Morsen, A. and H. J. Rehm (1987), Degradation of Phenol by a Mixed Culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptococcus elinonii* Adsorbed on Activated Carbon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 283-288.
- Ehrhardt, H. M. and H. J. Rehm (1989), Semicontinuous and Continuous Degradation of Phenol by *Pseudomonas putida* P8 Adsorbed on Activated Carbon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 312-317.
- Kho, Y. H., I. H. Ha, and K. S. Bae (1988), Isolation and Characterization of *Pseudomonas putida* N3 Degrading Naphthalene, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 199-204.
- Holt, J. G., N. R. Krich, P. H. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9rd ed., William & Willkins, Baltimore.
- BaLows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (1992), *The Prokaryotes*, 2nd ed., Vol. IV, Springer-Verlag, New York.
- Macfaddin, J. F. (1990), *Biochemical Test of Identification of Medical Bacteria*, The William and Wilkins Co., Baltimore.
- Yamada, Y. I., Ohishi, and K. Kondo (1983), The Coenzyme Q System in Strains of Some Yeasts and Yeast-Like Fungi, *J. Gen Appl. Microbiol.*, **29**, 51-57.
- Tamaoka, J. and K. Komugata (1984), Determination of DNA Base Composition by Reversed-Phase HPLC, *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 125-129.
- Diana, L. C., J. H. Wolfman, R. D. Rogers, and D. T. Gibson (1992), Physical Properties of a *Pseudomonas* Strain Which Grows with p-Xylene in a Two-Phase (Organic-Aqueous) Medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2723-2728.
- Inoue, A. and K. Horikoshi (1991), Estimation of Solvent-Tolerance of Bacteria by the Solvent Parameter Log P, *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 194-196.
- Folsom, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard (1990), Phenol and Trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4 : Kinetics and Interactions between Substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1279-1283.