

페놀분해세균의 분리 및 생물학적 처리 특성

송형익 · 김진옥*

대구공업대학 식품공학과, *영남대학교 교육대학원 생물교육전공

Characterization of Biological Treatment by an Isolated Phenol-Degrading Bacterium

Hyung Ik Song and Jin Ok Kim*

Department of Food Technology, Taegu Technical College

*Department of Biology Education, Graduate School of Education, Yeungnam University

ABSTRACT

20 bacterial strains capable of growing on phenol minimal medium were isolated from soil and wastewater by the enrichment culture technique, and among them, one isolate which was the best in the cell growth was selected and identified as *Bacillus* sp. SH3 by its characteristics. Strain SH3 could grow with phenol as the sole carbon source up to 15 mM, but did not grow in minimal medium containing above 20 mM of phenol. The optimal conditions of temperature and initial pH for growth and phenol degradation were 30°C and 7.5, respectively. This strain could grow on various aromatic compounds such as catechol, protocatechuic acid, gentisic acid, *o*-, *m*-, *p*-cresol, benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, anthranilic acid, phenyl acetate and pentachlorophenol, and the growth-limiting log P value of strain SH3 on organic solvents was 3.1. In batch culture, strain SH3 degraded 97% of 10 mM phenol in 48 hours. In continuous culture under the conditions of 20 mM of influent phenol concentration and 0.050 hr⁻¹ of dilution rate, the treatment rate of phenol was 94%.

Keywords : Phenol, *Bacillus* sp. SH3, Biological treatment

I. 서 론

페놀은 원유정제, 코우크스제조, 페인트도료 공정, 석탄액화 및 가스화 공정, 석유화학, 석탄전환공정, 의약품 및 화학용제, 염료제조, 농약, 고분자수지, 화약제조, 반도체산업 등의 산업폐수로부터 유출되어 하천수나 상수원수를 오염시키는 대표적인 난분해성 물질의 하나이다.¹⁾ 페놀은 하천수에 유입될 경우 0.005 mg/l의 극히 낮은 농도에서도 특유의 불쾌취를 발생하며, 특히 상수원수의 정수시 사용되는 염소와 결합하여 독성과 악취가 더욱 강력한 클로로페놀을 형성하므로 음용시 인체에 나쁜 영향을 주게 된다.²⁾ 따라서 페놀은 우리나라 먹는물 수질기준에서 냄새를 감안하여 0.005 mg/l 이하로 규제하고 있고 세계보건기구(WHO)의 가이드라인은 0.001~0.3 mg/l로 설정하고 있으며³⁾ 미국환경보호청(EPA)에서는 페놀을 주요 오염물질로 지정하여 지표수의 정

화기준을 0.001 mg/l 이하로 정하고 있다.⁴⁾

한편 환경정책기본법 시행규칙에서 규정하고 있는 페놀류의 배출허용기준은 청정지역이 1 mg/l, 그 외 지역이 3 mg/l 이하로 되어 있으며, 91년 발생한 낙동강 상수원수 페놀오염 사건 이후 규제치가 크게 강화되었다.

수계에서의 페놀의 제거에는 화학적 산화, 용매 추출, 활성탄 흡착 등이 주로 쓰이고 있지만,⁵⁾ 오늘날은 미생물을 이용하는 생물학적 처리법이 널리 채택되고 있으며 이 방법은 특히 유출수의 페놀농도가 극히 낮거나 저농도일 때 유리하다.⁶⁾ 페놀의 생물학적 처리에는 *Pseudomonas* sp.^{1,6-9)} *Acinetobacter* sp.,¹⁰⁾ *Rhodococcus* sp.,^{11,12)} *Bacillus* sp.¹³⁻¹⁶⁾ 등을 대상으로 많이 연구되어 왔다. 그러나 페놀은 200 mg/l 정도의 비교적 낮은농도에서도 미생물의 생육을 저해하므로 생물학적 처리에는 한계농도에 따르는 문제점을 극복해야한다.⁷⁾ 따라서 고농도의

페놀처리를 위해서는 페놀분해능이 강력해야 하고 공존하는 다양한 화합물을 분해할 수 있는 다기능의 균주라야 한다.

본 연구에서는 난분해성의 가장 기본적 환상구조를 가지는 방향족화합물이고 보편적으로 가장 광범위한 배출분포를 보여, 하천수 특히 상수원수의 대표적 오염물질로 알려져 있는 페놀을 대상으로 이를 효과적으로 처리할 수 있는 강력하고 다기능의 분해균주를 확보하고자 하였다. 공단지역의 하천도양과 폐수로부터 페놀을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 균주를 분리한 후 우수균주를 선별, 동정하였으며 최중선별균주의 분해특성, 방향족화합물의 이용성, 유기용매에 대한 내성 등을 조사하는 한편 생물학적 처리특성을 조사하여 공업적인 이용가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용배지 및 시약

균주의 분리, 배양과 특성조사를 위한 최소배지는 무기염의 기본배지¹⁷⁾에 균생육촉진을 위해 yeast extract를 첨가, 사용하였다. 즉, K_2HPO_4 5.8 g, KH_2PO_4 4.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $MgCl_2$ 0.16 g, $CaCl_2$ 0.02 g, Na_2MoO_4 0.002 g, $FeSO_4$ 0.001 g, $MnCl_2$ 0.001 g, yeast extract(Sigma) 0.1 g을 증류수 1 l에 녹이고 pH를 7.5로 조절하였다. 균보존 등에는 완전배지인 Luria-Bertani(LB)배지를 사용하였는데, tryptone(Acumedica) 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g을 증류수 1 l에 녹여 pH 7.0으로 조정하고 121°C에서 15분간 고압증기멸균하여 사용하였다. 페놀(Tedia)은 고체상태나 stock solution을 조제하여 배지의 멸균 후 첨가하였으며 고체배지는 한천(Junsei)을 1.5%(w/v)농도로 첨가하여 조제하였다. 페놀정량용 발색시약 4-aminoantipyrine은 Fluka 제품이었고, 그 외에 실험에 사용한 배지와 시약은 특급 또는 1급품이었다.

2. 페놀분해균의 분리 및 선별

페놀분해균의 분리원으로는 대구 염색공단부근의 폐수와 하천도양에서 채취한 시료를 이용하였다. 페놀분해균의 분리는 집적배양법을 이용하였다. 페놀 250 mg/l가 함유된 100 ml의 최소배지에 시료 약 20 g을 넣어 30°C에서 5일간 진탕배양한 후 페놀농도 350 mg/l가 되도록 페놀을 추가하며 3일간 진탕

배양하였다. 균배양액은 페놀 300 mg/l가 함유된 고체배지에 희석도말하며 30°C에서 집락이 형성될 때까지 배양하였으며 얻어진 집락은 평판배지의 페놀 농도를 500 mg/l, 1,000 mg/l로 점차적으로 높여 가면서 반복 배양하여 생육이 우수한 단일집락을 선택하여 완전배지에 이식, 배양하였다.

순수분리된 균주는 5 mM 농도의 페놀이 함유된 최소배지에 접종하여 30°C, 7일간 진탕배양한 후 흡광도를 측정하여 생육도가 우수한 균주를 선별하였다.

3. 분리균주의 동정

분리균주의 형태관찰은 전자현미경(Hitachi, S-4200)을 이용하였으며 형태 및 생리적 특성은 Gerhardt 등¹⁸⁾과 長谷川¹⁹⁾의 방법에 준하며 실험하였다. 분리균주의 형태 및 생리적 특성에 기초한 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾에 준하여 수행하였다.

4. 배양조건 및 생육도 측정

분리균의 배양은 250 ml 삼각플라스크에 100 ml의 최소배지를 넣고 소정의 페놀을 첨가한 후 균을 접종하여 30°C에서 일정시간 진탕배양(150 strokes/min.)하였으며, 균생육도는 분광광도계(Shimadzu, UV-180)를 사용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하거나 균배양액을 105°C에서 18시간 건조시켜 건조균체량으로 나타내었다.

5. 페놀농도의 측정

페놀농도는 4-aminoantipyrine 발색법^{21,22)}에 준하여 측정하였다. 배양액은 3,500×g에서 10분간 원심분리(Vision, VS-15CFN)하거나 여과지로 여과하여 사용하였다. 시료 1 ml에 증류수 4 ml와 염화암모늄-암모니아 완충액(pH 10.7) 1 ml를 넣어 pH 9.8~10.2로 조절한 후 4-aminoantipyrine-용액(2%, w/v) 0.5 ml를 넣어 섞고 $K_3Fe(CN)_6$ 용액(8%, w/v) 0.5 ml를 넣어 혼합한 후 3분간 방치한다. 발색정도는 분광광도계로 510 nm에서 흡광도를 측정하며, 이와 별도로 증류수 1 ml를 사용하여 대조실험을 행한다. 페놀정량은 페놀표준액(1.0 mg/ml)을 사용하여 동일한 방법으로 실험하여 작성한 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

6. 유기용매에 대한 내성

분리균주의 각종 유기용매에 대한 내성은 hydrophobicity가 다른 유기용매를 25%(w/v)첨가한 완전배지에서 진탕배양하여 분리균의 생육정도를 건조균체량으로 측정하여 나타내었다.²³⁻²⁵⁾

7. 생물학적 처리 실험

폐놀함유 폐수를 생물학적으로 처리하기 위한 개략적인 장치는 Fig. 1과 같다.

회분식배양은 반응조에 폐놀 10 mM이 함유된 최소배지 10 l를 넣고 산기관을 통하여 D.O.농도가 2~3 mg/l를 유지되도록 하고 반응조온도 30°C, pH 7.0으로 유지되는 조건에서 시간경과에 따른 폐놀분해율을 조사하였다. 반응조내의 pH는 2N NaOH 또는 2N HCl을 사용하여 수시로 조절하였으며 D.O.는 D.O. analyzer(New Brunswick)를 사용하여 측정하였다.

연속식배양에는 유입최소배지가 peristaltic pump에 의해 24시간 연속 도입되도록 하였고 유출액은 침전조의 상부에서 배출되어져 분석시료로 사용되었다. 운전은 반응조에 분리균주의 배양액을 접종하여 폐놀이 거의 없어질 시점에서 개시된다. 반응조의 운전조건은 회분식배양과 동일하게 이루어지며, 이 과정에서 도입유량과 도입폐놀농도의 변화에 따른 폐놀처리율과 균체량을 조사하였다. 이때 폐놀처리정도는 도입용액의 폐놀농도에서 배출용액중의 폐놀농도를 뺀 값을 도입용액의 폐놀농도로 나누어준 폐놀분해율로 나타내었다.

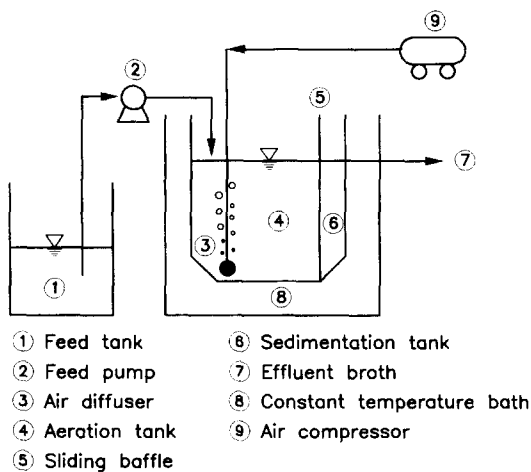


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 선별

폐놀을 유일한 탄소원과 에너지원으로 첨가하여 배양한 최소한천배지에서 20여개의 집락을 순수 분리하였다. 분리된 균주를 폐놀이 첨가된 최소액체 배지에서 진탕배양하여 균체중식이 가장 우수한 SH3 균주를 선별하였다.

2. 분리균주의 동정

분리균주 SH3의 현자현미경 사진은 Fig. 2와 같으며, 형태 및 생리적특성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다.

SH3은 Gram 양성의 포자를 형성하는 간균이며 운동성이 있는 호기성의 세균으로서 catalase 양성, oxidase 양성, urease 양성, glucose에서 산을 생성하였다. H₂S 생성은 음성, Voges-Proskauer 반응은 음성, methyl red 반응은 음성이었으며 질산염환원 반응은 양성, indole 생성반응은 음성이었다. 탄수화물의 이용성은 fructose, maltose는 이용하였으나 arabinose, sucrose, trehalose 등은 이용하지 못하였다.

이러한 형태 및 생리적 특성에 따라 분리균주 SH3을 동정한 결과, *Bacillus* sp.와 가장 유사한 세균으로 확인되어 *Bacillus* sp. SH3으로 명명하였다.

3. 폐놀농도에 따른 생육특성

유일한 탄소원과 에너지원으로서 폐놀을 5~25 mM이 되도록 첨가한 최소배지에 분리균 *Bacillus* sp. SH3의 균배양액 0.1 ml를 접종한 후 30°C에서



Fig. 2. Scanning electron micrograph ($\times 8,000$) of the isolate SH3 cultured on LB medium.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain SH3

Characteristics	SH3
Shape	Rod
Size	0.6-1.2 × 3-6 μm
Gram stain	+
Spore	+
Motility	+
Growth in air	+
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	+
Gas from glucose	-
Citrate utilization	+
Nitrate reduction	+
H ₂ S production	-
Methyl red test	-
Voges-Proskauer test	-
Starch hydrolysis	+
Indole production	-
Pigment production	-
Carbohydrate utilization (acid production)	
Glucose, Fructose, Cellobiose, Maltose	+
Sorbosc, Mannose, Arabinose, Lactose, Raffinose, Inulin, Trehalose, Sucrose, Mannitol, Sorbitol, Ribose, Rhamnose	-

Symbols: +, positive; -, negative.

7일간 진탕배양(150 strokes/min.)하면서 페놀농도와 균중식도를 매일 조사하여 Fig. 3에 나타내었다.

페놀농도별로 보면, 5 mM에서는 급격히 증식하여 배양 1일째에 최고생육을 보이고 그 이후는 점차적으로 감소하였고, 페놀농도 10 mM의 경우는 배양 2일째에 정지기에 도달하면서 이 후 감소되는 경향을 보였으며 15 mM에서는 배양초기부터 균중식이 활발하게 일어나 배양 4일째에 최고치를 나타내어 흡광도가 1.10이었다.

기질인 페놀은 세균의 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용되므로 균생육에 필수적인 기질로 작용하는 반면 세균에 대해 기질 저해작용을 나타내므로²⁶⁾ 양면성을 지닌다고 볼 수 있다.

페놀농도 5~15 mM 범위에서 *Bacillus* sp. SH3의 생육패턴을 비교할 때, 페놀농도가 증가함에 따라 정지기에 도달하는 시간이 연장되는 반면 생육도는 커지는 경향을 나타내었는데, 이는 페놀의 독작용과 에너지원으로서의 작용을 잘 반영한 결과라 생각된다. *Bacillus* sp. SH3에 의한 균생육은 페놀의 생육 저해작용으로 20 mM 이상에서는 완전히 저해를 받

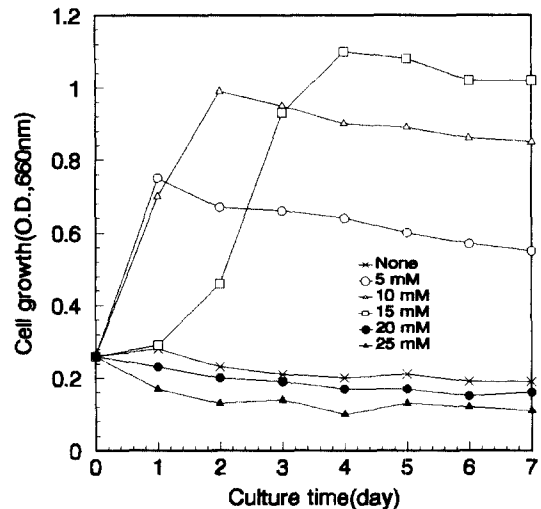


Fig. 3. Effect of phenol concentration on growth of *Bacillus* sp. SH3. Cells were grown at 30°C on a reciprocal shaker (150 strokes/min.) in the minimal media supplemented with phenol as a sole source of carbon and energy.

았으며 15 mM이 페놀이용농도의 한계치로 볼 수 있었다.

이같은 생육한계농도는 Buswell과 Twomey¹³⁾가 보고한 *Bacillus stearothermophilus*의 생육한계 0.05%, Yanase 등¹⁴⁾이 보고한 *Bacillus stearothermophilus*의 1,000 mg/l, Anselmo와 Novais¹⁰⁾가 보고한 *Acinetobacter* sp.의 1,000 mg/l, Masque 등⁶⁾이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 1,000 mg/l, Ehrhardt와 Rehm²⁷⁾이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 1,000 mg/l, Park 등²⁸⁾ 및 오와 한¹²⁾이 보고한 *Rhodococcus* sp.의 1,000 mg/l, 이 등²⁵⁾이 보고한 *Acinetobacter* sp.의 1,000 mg/l 보다는 월등히 높았고 Gurujeyalakshmi와 Oriell¹⁵⁾이 보고한 *Bacillus stearothermophilus*의 15 mM과는 유사하였으나 박 등²⁹⁾이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 생육한계농도 2,000 mg/l, 임¹⁶⁾이 보고한 *Bacillus* sp.의 1,900 mg/l에는 미치지 못하였다.

4. 배양온도와 pH 변화에 따른 페놀분해 및 생육 특성

최소배지에 5 mM 농도의 페놀을 첨가하여 24시간 배양한 후 배양온도에 따른 페놀분해와 균생육을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

분리균 *Bacillus* sp. SH3의 페놀분해와 균생육곡

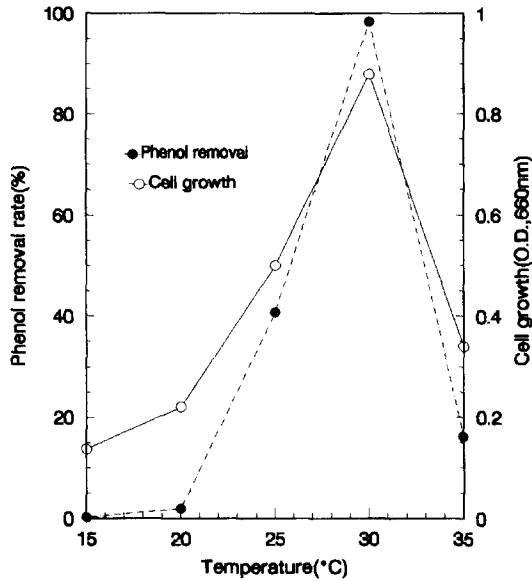


Fig. 4. Effect of temperature on cell growth and phenol degradation of *Bacillus* sp. SH3. Cells were grown for 24 hours with shaking (150 strokes/min.) in the minimal media containing 5 mM of phenol.

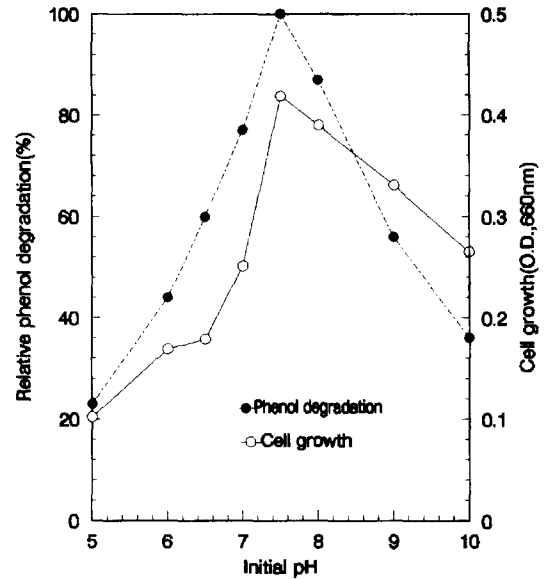


Fig. 5. Effect of initial pH on cell growth and phenol degradation of *Bacillus* sp. SH3. Cells were grown at 30°C for 48 hours with shaking (150 strokes/min.) in the minimal media containing 10 mM of phenol.

선은 거의 동일한 패턴을 유지한 가운데 30°C에서 가장 우수하였으며, 25°C와 비교하여 페놀분해는 약 2.4배, 균생육은 약 1.8배의 값을 보였다. 20°C 이하와 35°C 이상에서는 페놀분해와 균생육이 크게 감소하였다.

이같은 결과는 *Acinetobacter* sp.²⁵⁾의 최적생육온도 30°C, *Bacillus* sp.¹⁶⁾의 최적생육 및 페놀분해온도 30°C와 유사하였으나 *Rhodococcus* sp.¹²⁾의 최적생육온도 37°C, *Rhodococcus* sp.²⁸⁾의 최적생육 및 페놀분해온도 40°C, 내열 및 호염성세균 *Bacillus stearothermophilus*¹⁴⁾의 최적페놀분해온도 50°C보다는 훨씬 낮았다. 페놀처리의 응용면에서 볼 때 낮은 배양온도가 유리하므로 분리균 *Bacillus* sp. SH3은 배양온도가 높은 다른 세균에 비해 우수하였다.

페놀 10 mM을 첨가한 최소배지의 pH를 5~10 범위로 조절하여 30°C에서 48시간 배양한 다음 초기 pH 변화에 따른 페놀분해 및 균생육을 조사하였다 (Fig. 5).

분리균의 경우 페놀분해는 pH 7~8 범위에서 우수하였고 균생육은 pH 7.5~9.0 범위에서 비교적 우수하였으나, 페놀분해와 균생육의 최적조건은 동일하게 pH 7.5 였다. 이와 같은 결과는 *Rhodococcus*

sp.¹²⁾의 최적생육 pH 7.6과 거의 동일하였다. *Acinetobacter* sp.²⁵⁾의 균생육최적 pH는 7.0으로 보고되고 있으며 *Bacillus stearothermophilus*,¹⁴⁾ *Rhodococcus* sp.²⁸⁾ 및 *Bacillus* sp.¹⁶⁾의 경우는 각각 pH 8, pH 7 및 pH 6에서 균생육과 페놀분해가 가장 우수한 것으로 보고되고 있다.

5. 방향족화합물의 이용성

각종 방향족화합물을 5 mM씩 첨가한 최소배지에서 *Bacillus* sp. SH3의 기질 이용성에 대해 조사한 결과는 Table 2와 같으며, 32종의 화합물 중 16종을 분해하였다.

세균에 의한 단일고리방향족화합물 대사의 주요 중간대사산물³⁰⁾로 알려진 catechol, protocatechuic acid, gentisic acid 등의 자화능이 우수하였다. Catechol로 분해되는 화합물 중 phenol 외에 benzoic acid, anthranilic acid를 분해하였으나 benzene, salicylic acid는 분해하지 못하였다. Protocatechuic acid로 대사되는 것 중 *m*-, *p*-cresol은 잘 이용하였으나 *o*-phthalic acid는 자화하지 못했다. Toluene은 분해하지 못했으나 toluene 대사과정의 중간산물로 알려진 benzyl alcohol에서는 미미한 생육

Table 2. Utilization of aromatic compounds as a sole carbon source by *Bacillus* sp. SH3

Substrates	Growth (O.D., 660 nm)	
	24 hours	48 hours
Phenol	0.620	0.775
Catechol	0.306	0.735
<i>o</i> -Methyl catechol	0.935	1.625
Protocatechuic acid	0.450	0.770
Gentisic acid	0.037	0.756
<i>o</i> -Cresol	0.056	0.075
<i>m</i> -Cresol	0.370	0.335
<i>p</i> -Cresol	0.655	0.853
<i>o</i> , <i>m</i> -, <i>p</i> -Chlorophenol	-	-
<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -Nitrophenol	-	-
<i>DL</i> -Camphor	-	-
<i>o</i> -Phthalic acid	-	-
Pentachlorophenol	0.180	0.150
Benzoic acid	0.810	0.735
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.605	0.600
Anthranilic acid	0.515	0.375
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.029	0.056
Gallic acid	-	-
Salicylic acid	-	-
Phenoxyacetic acid	-	-
Cinnamic aldehyde	-	-
Toluene	-	-
Benzene	-	-
Aniline	-	-
<i>m</i> -Xylene	-	-
<i>p</i> -Xylene	-	0.041
Phenyl acetate	0.660	0.950
Benzyl alcohol	0.045	0.065

Each value represents the absorbance of culture broth at 24 hours and 48 hours after incubation at 30°C. Values were compensated by the absorbance of control. The concentration of substrates was 5 mM.

을 보였다. 또한 *o*-methyl catechol, phenyl acetate에 대하여는 높은 자화능을 보였으나 *o*-, *m*-, *p*-chlorophenol, *o*-, *m*-, *p*-nitrophenol, aniline, *m*-xylene, phenoxyacetic acid는 전혀 이용하지 못하였다.

이와 같은 결과는 *Bacillus stearothermophilus*¹³⁾의 폐놀함유배지 생육균체가 phenol, cresol, catechol 등을 잘 이용한 반면 benzoic acid를 이용하지 못한다는 보고와는 다소 차이가 있었으며, 내열 및 호염성세균 *Bacillus stearothermophilus*¹⁴⁾의 휴지세포가 chlorophenol을 비교적 잘 분해한다는 보고와는 다른 것이다.

이상의 결과로 판단할때 *Bacillus* sp. SH3은 phen-

ol뿐 아니라 benzoic acid, cresol, catechol, pentachlorophenol, phenyl acetate, anthranilic acid, gentisic acid, protocatechuic acid 등의 다양한 방향족화합물을 자화할 수 있는 균주로서 이들 화합물이 함유한 폐수의 생물학적 처리에도 유용할 것으로 사료된다.

6. 유기용매에 대한 내성

환경오염물질인 유기용매의 미생물에 대한 독작용은 미생물의 세포막지질에 흡수되어 세포막의 고유기능을 교란시키고 필수효소의 불활성 또는 변성을 일으키기 때문인 것으로 알려지고 있다.²³⁾ 일반적으로 유기용매는 극성이 커질수록 독성이 증가하므로 극성이 큰 유기용매에서 생육이 가능한 미생물은 유기용매에 의한 환경오염방지에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 유기용매의 log P값과 독성과의 연관성이 밝혀지고 있는데, log P는 *n*-octanol과 물 사이의 용매 분산계수의 상용 log값으로서 대개 log P값이 작아질수록 독성이 증가하며 각 균주는 고유의 성장제한 log P 값을 가지므로 성장제한 log P 값보다 낮은 유기용매에서는 생육이 불가능하다.^{24,25)} *Bacillus* sp. SH3의 유기용매에 대한 내성을 조사하여 Table 3에 나타내었다.

분리균주는 유기용매에 대한 내성이 비교적 커서 성장제한 log P값은 3.1정도였다. Inoue와 Hori-

Table 3. Solvent tolerance of *Bacillus* sp. SH3

Solvents	Log P	Growth*
<i>n</i> -Decane	5.6	+
<i>n</i> -Octane	4.5	+
<i>n</i> -Heptane	4.0	+
<i>n</i> -Hexane	3.9	±
Cyclohexane	3.4	+
<i>n</i> -Pentane	3.3	+
<i>p</i> -Xylene	3.1	-
Toluene	2.5	-
<i>l</i> -Heptanol	2.4	-
Benzene	2.0	-
Chloroform	2.0	-
Phenol	1.5	-
<i>n</i> -Butanol	0.8	-

*Abbreviations used are as follows: +, grow; ±, grow slightly; -, not grow. Cells were grown at 30°C for 48 hours with shaking (150 strokes/min.) in LB broth containing organic solvent at the concentration of 25%(v/v), and the growth was checked as a dry cell weight basis.

koshi²³⁾가 LB고체배지에서 조사한 *Bacillus* sp.에 속하는 9종의 type strain의 log P값은 4.5~7.0으로 나타났다. 따라서 *Bacillus* sp. SH3은 유기용매가 포함된 폐수에서 비교적 잘 생육할 수 있는 균주로 판단되었다.

7. 회분배양에서의 처리특성

단일탄소원으로 10 mM의 페놀을 함유한 최소배지 10 l를 반응조에 넣고 *Bacillus* sp. SH3의 종배양 균체 25 g을 접종한 후 반응조 내 D.O. 2~3 mg/l, 온도 30°C, pH 7.0으로 유지되는 조건에서 시간경과에 따른 페놀처리특성을 조사하였다(Fig. 6).

페놀은 배양초기부터 생육과 함께 서서히 분해되기 시작하여 배양 27시간부터 급격한 감소를 나타내어 배양 41시간과 48시간 경과시에는 각각 73%와 96.6%의 페놀이 분해되었고, 이와 함께 균생육 또한 급격히 증가하여 흡광도가 배양 48시간 경과시 2.02로 최고값을 보였다. 배양 48시간 경과 이후 페놀은 서서히 분해되어 배양 65시간에 99%까지 분해되었으나 균생육은 기질인 페놀의 고갈로 비교적 큰 폭의 흡광도 감소를 가져왔다.

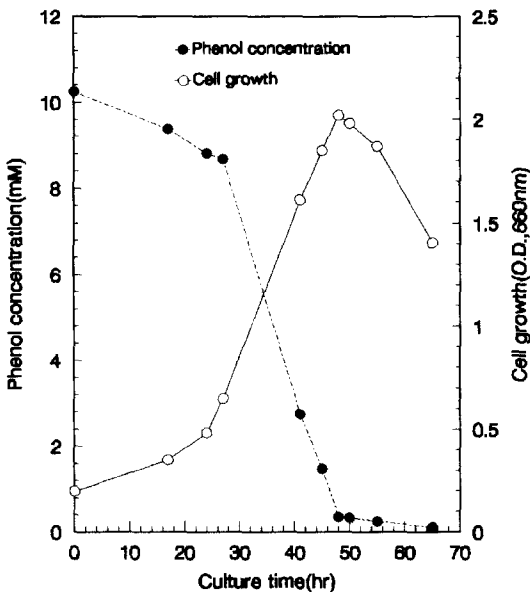


Fig. 6. Time course of cell growth and phenol degradation in batch culture. Cells were grown at 30°C in the minimal media containing 10 mM phenol as a sole source of carbon and energy.

따라서 분해균주 *Bacillus* sp. SH3은 고농도인 10 mM 페놀농도에서도 배양 48시간만에 96.6%의 높은 페놀분해율을 보임으로서 실제 페놀이 함유된 폐수에 적용가능한 우수한 균주로 판단되었다.

8. 연속배양에 의한 처리특성

페놀이 함유된 폐수를 연속적으로 처리하기 위한 기초연구로서 아크릴로 제작된 실험실 규모의 연속 배양장치를 이용하여 분리균주 *Bacillus* sp. SH3의 연속처리 특성을 조사하였다.

페놀농도 5 mM의 최소배지 10 l를 반응조에 넣고 분리균주의 종배양균체 30 g 정도를 접종한 후 D.O. 2~3 mg/l, 온도 30°C, pH 7.0의 조건으로 배양하여 균체증식을 도모하였다. 배양 36시간만에 반응조의 페놀이 99% 이상 분해되었고 이때의 균체농도는 약 300 mg/l의 건조균체량을 나타내었다.

연속실험은 이처럼 반응조내 대부분의 페놀이 소진되고 충분한 양의 균체가 증식된 상태에서 개시되었다. Feed tank의 도입페놀농도 20 mM에서 수리학적 체류시간(HRT)을 변경시키면서 배양시간에 따른 유출액의 페놀농도와 균체량을 하루간격으로 측정된 결과는 Fig. 7과 같다.

유출액의 페놀농도는 30일간의 처리과정에서 다소 큰 폭으로 변동되었고 특히 체류시간의 영향을 받아 체류시간이 짧아질수록 페놀부하량의 증가로 유출액의 페놀농도가 단계적으로 증가되는 경향을

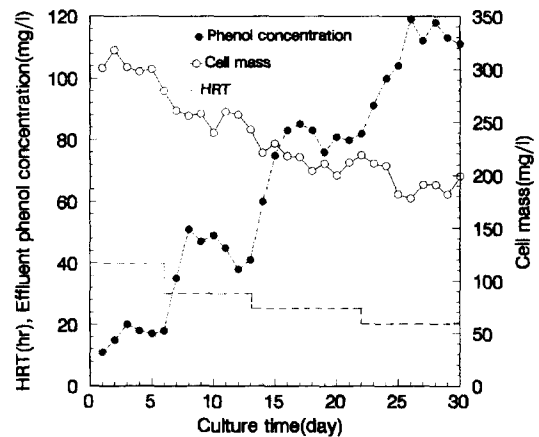


Fig. 7. Time course of phenol concentration and cell mass as a function of hydraulic retention time (HRT) by *Bacillus* sp. SH3 in continuous culture (Influent phenol concentration=20 mM).

보였다. 체류시간에 따른 페놀농도를 보면 체류시간 40, 30, 25 및 20시간에서 평균 페놀농도가 각각 16.5, 43.7, 78.3 및 108.5 mg/l였으며, 이를 처리율로 환산하면 94~99% 범위였다. 유출액의 균체농도는 체류시간의 영향이 페놀농도에 비해 덜 민감하여 배양기간중 주기적으로 서서히 감소하는 경향이었으며 배양초기 약 300 mg/l에서 30일경에는 200 mg/l정도로 감소되었다.

한편 도입배지중의 페놀농도와 도입되는 배지용량 즉 희석률(D)이 유출액의 페놀분해에 미치는 영향을 검토하였다. 이 실험에서는 반응조의 유출액을 1시간 간격으로 채취 분석하여 페놀농도와 균체량이 비교적 일정하게 유지되는 시점, 즉 정상상태에 도달했을 때 부터의 성적을 기준으로 하였다. 희석률 0.042 hr⁻¹에서 도입페놀농도를 10, 20 및 30 mM로 변동시키면서 유출액의 페놀제거효율과 건조균체량을 조사하였다(Table 4).

분리균주 *Bacillus* sp. SH3은 10 mM 페놀농도에서 약 98%, 20 mM에서 약 95%, 30 mM에서도 비교적 높은 약 78%의 처리효율을 보였으며 도입페놀농도가 높을수록 처리효율은 감소하였고 균체량 또한 같은 경향이였다. 처리효율은 슬러지의 첨가로 높일 수 있으므로 세균만으로 처리한 본 실험의 결과는 비교적 양호한 성적으로 판단된다.

도입액의 페놀농도를 20 mM로 고정시킨 상태에서 도입유량 즉 희석률의 변화에 따른 페놀처리율과 균체량의 평균값을 Table 5에 나타내었다.

희석률이 0.022 hr⁻¹에서 0.050 hr⁻¹로 변동됨에 따라 페놀제거효율과 균체량이 전반적으로 감소하였다. 이는 희석률이 높아짐에 따라 페놀부하가 가중되어 페놀의 세균에 대한 기질저해효과도 비례해서 커지기 때문으로 설명할 수 있다. 분리균주는 희석률 0.040 hr⁻¹까지는 95% 이상의 제거율을 보였고 0.050 hr⁻¹에서는 94% 정도의 처리율을 나타내므로

Table 4. The average data of phenol removal as a function of influent phenol concentration at steady state in continuous culture (D=0.042 hr⁻¹)

Influent phenol concentration (mM)	Cell mass (mg/l)	Phenol removal rate (%)
10	263	97.5
20	221	94.9
30	188	78.4

Table 5. The average data of phenol removal as a function of dilution rate at steady state in continuous culture (Influent phenol concentration=20 mM)

Dilution rate (hr ⁻¹)	Cell mass (mg/l)	Phenol removal rate (%)
0.022	296	98.5
0.025	300	99.1
0.028	304	98.0
0.033	254	97.7
0.040	215	95.8
0.050	193	94.2

슬러지 첨가배양시에는 이보다 더 높은 희석률로도 운전이 가능하리라 판단된다.

IV. 결 론

토양, 폐수 등의 균원으로 부터 페놀을 함유한 최소배지에서 생육이 우수한 20주의 균을 집적배양에 의해 분리하였으며, 분리된 균주 중에서 균생육이 가장 우수한 균주 SH3을 선별하여 *Bacillus* sp. SH 3으로 동정하였다. *Bacillus* sp. SH3은 유일탄소원으로 페놀 15 mM이 첨가된 최소배지에서 생육하였으며 20 mM 페놀농도에서는 생육하지 않았다. 분리균주의 균생육과 페놀분해를 위한 최적온도 및 초발 pH는 각각 30°C와 7.5였다. 방향족화합물 중 catechol, protocatechuic acid, gentisic acid, *o*-, *m*-, *p*-cresol, benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, anthranilic acid, phenyl acetate, pentachlorophenol 등을 생육에 이용하였으며 성장한계 log P값은 3.1정도였다. 분리균주는 희분배양에서 10 mM 농도의 페놀을 48시간만에 97%까지 분해하였고 연속배양에서는 유입액의 페놀농도 20 mM, 희석률 0.050 hr⁻¹의 조건에서 94%의 처리효율을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Hinteregger, C., R. Leitner, M. Loidl, A. Fersch and F. Streichsbier: Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII.

- Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 252-259, 1992.
- 2) Ahmed, A.M., G.F. Nakhla and S. Farooq : Phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Environ. Sci. Health*, **A30**, 99-107, 1995.
 - 3) 박석기, 안승규, 엄석원 : 먹는물의 수질관리. 동화기술, 1996.
 - 4) Yang, R.D. and A.E. Humphrey : Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1211-1235, 1975.
 - 5) Throop, W.M. : Alternative methods of phenol wastewater control. *J. Haz. Materials*, **1**, 319-329, 1997.
 - 6) Masque, C., M. Nolla and A. Bordons : Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. *Biotechnol. Lett.*, **9**, 655-660, 1987.
 - 7) Li, J.K. and A.E. Humphrey : Kinetic and fluorometric behavior of a phenol fermentation. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 177-182, 1989.
 - 8) Bettmann, H. and H.J. Rehm : Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 285-290, 1984.
 - 9) Mörsen, A. and H.J. Rehm : Degradation of phenol by mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 206-212, 1990.
 - 10) Anselmo, A.M. and J.M. Novais : Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from an industrial effluent. *Biotechnol. Lett.*, **6**, 601-606, 1984.
 - 11) Pai, S.L., Y.L. Hsu, N.M. Chong, C.S. Sheu and C.H. Chen : Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technol.*, **51**, 37-42, 1995.
 - 12) 오정석, 한영환 : 폐놀분해 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011의 분리 및 특성. 산업미생물학회지, **25**, 459-463, 1997.
 - 13) Buswell, J.A. and D.G. Twomey : Utilization of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*, strain PH 24. *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 377-379, 1975.
 - 14) Yanase, H., K. Zuzan, K. Kita, S. Sogabe and N. Kato : Degradation of phenols by thermophilic and halophilic bacteria isolated from a marine brine sample. *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 297-300, 1992.
 - 15) Gurujeyalakshmi, G. and P. Oriel : Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 500-502, 1989.
 - 16) 임중기 : *Bacillus* sp.에 의한 phenol의 생분해. 석사학위논문, 경북대학교 대학원, 1995.
 - 17) 서윤수, 김동근, 송준상, 이문호, 양상용, 최재덕, 박경현 : 환경오염물질처리를 위한 유전공학적 연구(I), Phenol 분해균을 중심으로. 국립환경연구소보, **7**, 195-209, 1985.
 - 18) Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E. W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips : Manual of methods for general bacteriology. American society for microbiology, Washington, D. C., 1981.
 - 19) 長谷川武治 : 微生物の分類と同定 (下). 學會出版センター, 東京, 1985.
 - 20) Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed.) : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
 - 21) Martin, R.W. : Rapid colorimetric estimation of phenol. *Anal. Chem.*, **21**, 1419-1420, 1949.
 - 22) Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed., APHA-AWWA-WPCF, Washington, 1985.
 - 23) Inoue, A. and K. Horikoshi : Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter Log P. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 194-196, 1991.
 - 24) Aono, R., K. Aibe, A. Inoue and K. Horikoshi : Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K-12. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1935-1938, 1991.
 - 25) 이창호, 오희목, 권태종, 권기석, 이성기, 서현효, 윤병태 : Phenol을 분해하는 *Acinetobacter* sp. GEM 2의 분리 및 특성. 산업미생물학회지, **22**, 692-699, 1994.
 - 26) Jones, G.L., F. Jansen and A.J. McKay : Substrate inhibition of the growth of bacterium NCIB 8250 by phenol. *J. Gen. Microbiol.*, **74**, 139-148, 1973.
 - 27) Ehrhardt, H.M. and H.J. Rehm : Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 32-36, 1985.
 - 28) Park, G.T., H.J. Son, F.G. Kim and S.J. Lee : Biodegradation of phenol by trichloroethylene-cometabolizing bacterium. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 61-66, 1998.
 - 29) 박춘호, 김용기, 오평수 : 방향족화합물이 함유된 폐수의 생물학적 처리. 산업미생물학회지, **19**, 631-636, 1991.
 - 30) Wallnöfer, P.R. and G. Engelhardt : Aromatic and heterocyclic structures. In K. Kieslich (ed.), *Biotechnology*, Vol. 6a, Verlag Chemie, Weinheim, 277-327, 1984.