

탈질화성 페놀 분해균 *Pseudomonas* sp. HL100의 분리 및 특성

박수동 · 김연희¹ · 이흥식*

고려대학교 생명공학원, ¹세명대학교 한의학과

Isolation and Characterization of Denitrifying Phenol-Degrading Bacterium *Pseudomonas* sp. HL100. Park, Soo-Dong, Younhee Kim¹, and Heung-Shick Lee*. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ¹Department of Oriental Medicine, Semyung University, Checheon, Chungbuk 390-230, Korea - A bacterial strain which utilizes phenol under denitrifying condition was isolated from the industrial waste water collected from the Chong-ju Industrial Complex. The strain was identified as *Pseudomonas* species from the morphological, physiological, and biochemical characteristics and designated as HL100. The strain can utilize phenol as the sole source of carbon and energy when nitrate is provided as the terminal electron acceptor. The isolated strain completely degraded 3 mM of phenol within 110 hour with concomitant reduction of nitrate to nitrite. The observed maximum doubling time was 20 hours. Under appropriate condition, complete reduction of nitrate to atmospheric N₂ was observed indicating that the isolated strain could perform complete steps of denitrification. The strain showed optimal growth at pH 7.0 and temperature of 37°C under denitrifying phenol-degrading condition. The strain can also utilize toluene as the sole carbon and energy source under the same growth condition. However, no growth was detected on xylene and benzene.

Key words: *Pseudomonas* sp., phenol, denitrification

페놀과 치환체 페놀은 주요 화학, 제약, 석유화학, 섬유 및 전자산업 등의 각종 산업 현장에서 널리 이용되는 대표적인 난분해성 물질이다[6]. 페놀은 단기적인 노출시 구토, 두통, 근육 경련 및 호흡 곤란 등을 일으키며, 장기적인 노출시에는 인체에 심각한 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 독성 외에도 발암과 돌연변이 유발 등의 각종 문제를 일으키고 있어 세계 각국의 음용수 기준 등의 여러 환경 기준에 포함되어 있으며, 그 사용, 배출 및 정화 처리에 엄격한 규제가 가해지고 있다. 페놀의 처리에는 현재까지 화학적인 방법이 주로 이용되어 왔으나 근래에는 미생물이 갖는 빠른 대사와 생육능력, 높은 환경 적응능력 등을 이용한 처리법 개발에도 많은 노력이 기울여지고 있다. 그러나 미생물을 이용한 방법의 경우 처리 농도의 한계점 등이 문제점으로 지적되고 있어 고농도의 페놀 처리를 위한 균의 개발 등이 요구되고 있다[10].

탈질화(denitrification)는 미생물에 의해서만 수행되는 생물학적 과정으로서 혐기적 조건에서 nitrate가 산소 대신 최종 전자 수용체로 작용하여 nitrite, nitric oxide, nitrous oxide 및 N₂로 단계적으로 환원되면서 에너지가 생성되는 과정이다[14]. 탈질화 작용은 다양한 종류의 미생물에 의해 수행될 수 있는데 그 대표적인 예로는 *Alcaligenes*, *Paracoccus* 및 *Pseudomonas* 등을 들 수 있다

[3]. 대부분의 탈질화성 세균은 통성혐기성 균들로서 호기적인 조건에서는 산소를, 혐기적인 조건에서는 nitrate, nitrite 등을 최종전자 수용체로 이용하면서 살 수 있다. 자연계에서 탈질화 작용은 질소순환계의 일부로서 질소비료의 이용 등에 의해 토양에 과량 첨가된 nitrate를 공기중의 질소로 순환시키는데 그 중요성을 갖는다.

현재까지의 페놀 등의 난분해성 물질의 분해에 관한 연구는 호기성균에 의한 과정에만 집중되었는데[7, 9, 13], 근래에는 비용절감 및 효율성 증가를 위해 혐기성균에 의한 처리방법도 모색되는 추세이다[3, 11, 15, 17, 18]. 자연계에서 오염물질의 상당부분이 혐기적인 환경에 놓여있고 산소의 낮은 용해도와 토양 등에 있어서 산소의 토양내로의 침투속도가 일반적으로 미생물 생장의 성장제한 요인으로 작용하는 사실도 이러한 분야의 연구 원인이 되고있다. 이러한 측면에서 탈질작용과 연계된 혐기적인 페놀분해는 최근에 그 가능성이 높게 평가되고 있고[3, 17], 특히 이 경우 최종전자 수용체로서 이용되는 nitrate는 높은 용해도와 낮은 독성 등의 장점으로 인해 산소를 대체할 수 있는 효과적인 물질로서 여겨지고 있다.

이러한 필요성에 비추어 본 연구에서는 nitrate를 최종 전자 수용체로서 페놀을 단일 탄소 및 에너지원으로서 이용할 수 있는 탈질화성 페놀 분해균을 분리 및 동정하였고 분리된 균의 특성과 페놀 분해능력에 대해 분석하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-415-60-1415, Fax. 82-415-864-2665
E-mail: hlee@tiger.korea.ac.kr

재료 및 방법

균주의 분리

혐기적 폐놀 분해균을 분리하기 위하여 충청북도 청주시 공단주변 전자 및 염색공장 폐수 유입지의 토양, 폐수 및 침전물을 밀폐형 원통 용기를 이용하여 100 g씩 채취하였다. 채취한 시료를 멸균된 생리 식염수(0.85% NaCl) 100 ml이 들어있는 250 ml 플라스크에 희석하였고, 37°C에서 30분 진탕 배양한 후, 상온에 1시간 방치하여 현탁액을 얻었다. 현탁액에서 하수와 침전물은 여과한 후, 단일 탄소원 및 에너지원으로 1 mM의 폐놀을 함유한 basal salt medium(BSM; 9 mM K_2HPO_4 , 2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 mM KH_2PO_4 , 200 μM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mM KNO_3 , 8 μM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1 mM 폐놀, pH 7.2)에 접종하여 수일간 37°C에서 정지배양 하였다. 배양용기로는 screw cap tube(15 mm×150 mm)를 이용하였다. 배양액을 5,000 g에서 2분간 원심 분리하여 침전물을 제거 한 후, 상층액을 다시 원심분리하였다. 원심분리에 의해 얻어진 배양액을 폐놀과 nitrate를 함유한 고체 basal salt medium에 도말한 후 혐기 배양조인 anaerobator(FA-6, Hirayama, Japan)에서 37°C로 혐기배양하였다. 이 과정을 2~3회 반복하여 균을 순수분리하였다. 분리한 균주는 LB(0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl, pH 7.2)에 접종하여 -70°C에 보관하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주를 동정하기 위해 형태학, 생리학, 생화학적 특성을 조사하였다. 분리균의 일반적 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[8]에 준해 결정하였다. 편모의 수와 형태 및 세포의 형태는 투과형 전자현미경(Transmission electron microscope, Hitachi 7100)을 이용하여 관찰하였다. 또한 생화학적, 생리학적 특징은 Analytical profile index kit(API-20NE, Biomérieux S. A., France)와 Merck bacterial identification kit(Merck, Germany)를 이용하여 분석하였다.

균의 배양

폐놀을 단일 탄소원과 에너지원으로 함유하는 minimal medium(BSM)을 screw cap tube(15 mm×150 mm)에 넣어 폐놀 분해균의 성장을 분석하였다. 분리한 균을 접종한 후, argon gas를 1500 kPa, 30 psi로 sparging하여 산소의 유입을 차단한 후, 정지 배양하면서 일정 시간 간격으로 배양액을 채취하였다[2]. 균주의 생장은 배양액의 OD_{600} 에서의 흡광도로 측정하였고, 이 배양액을 10,000 g에서 2분 동안 원심 분리하여 균체를 가라앉힌 후, 상등액을 취하여 폐놀 분해능력을 조사하였다. 폐놀 이외에 acetic acid, toluene, benzene, xylene 등의

유기화합물에 대한 분해 및 성장 능력을 확인하기 위해 이들 유기화합물을 단일 탄소원으로 하는 최소배지에 0.01%(w/v)가 되도록 첨가하여 정지 배양한 후 OD_{600} 에서 생장을 측정하였다.

폐놀과 nitrite의 농도 측정

폐놀의 농도는 Martin의 colorimetric assay방법에 의해 OD_{500} 에서 측정하였다[4, 12]. Nitrate reduction에 의해 생성된 nitrite의 농도측정은 Methods for General and Molecular Bacteriology의 방법을 따랐다[5].

결과 및 고찰

탈질화성 폐놀 분해균의 분리 및 동정

충북 청주공단의 전자공장과 염색공장의 폐수와 주변 토양에서 채취된 시료를 1 mM 폐놀을 단일 탄소원과 에너지원으로 함유하고 10 mM potassium nitrate를 최종 전자 수용체로서 함유하는 고체 최소배지를 이용한 혐기 배양에 의해 약 25개의 탈질화성 폐놀 분해균들을 분리하였다. 이들 중 1 mM과 3 mM의 폐놀을 함유하는 액체 basal salt medium에서 가장 빠른 성장과 폐놀 분해능을 나타내는 균을 선발하여 HL100으로 명명하였다(자료생략). HL100의 생리적 생화학적 특성을 API 20NE kit와 Merck bacterial identification kit를 이용하여 분석한 결과 모두에서 *Pseudomonas* species로 판정되었다. 관찰된 주요 생리학적, 생화학적 특성을 Table 1에 나타내었다. 형태적으로 HL100은 그람음성의 염색특성을 나타내는 간균으로 판명되었고 전자현미경 분석과 flagella 염색 결과 극성의 flagella를 갖는 것으로 확인되었다(Fig. 1). HL100은 colony 주변에 형광의 색소를 생성하였고 포도당을 단일 탄소원으로 함유하는 배지에서 산성의 발효산물을 생성하는 능력이 관찰되지 않았는데, 이러한 생리적, 형태적 특성도 통성혐기성균인 *Pseudomonas* species의 일반적인 특성과 일치하는 결과이다.

HL100의 성장 조건

최적의 성장온도를 결정하기 위하여 *Pseudomonas* sp. HL100을 30°C, 37°C, 및 45°C의 온도에서 배양한 후 그 성장양식을 비교하였다. 3 mM의 폐놀을 단일 탄소 및 에너지원으로 함유하고 10 mM nitrate를 최종전자 수용체로서 함유하는 basal salt medium에서 배양한 결과 Fig. 2에 나타난 것처럼 37°C에서 최대의 성장속도를 나타내었으며 균의 성장에 따른 폐놀의 감소가 관찰되었다. 45°C의 고온성 조건에서는 온도에 의한 성장 저해로 균체의 성장과 폐놀 분해능을 전혀 나타내지 않은 것으로 여겨진다. 또한 pH에 따른 성장 변화를 관찰하기 위하여 basal salt medium에서 배양한 후 흡광도를 측정된 결과

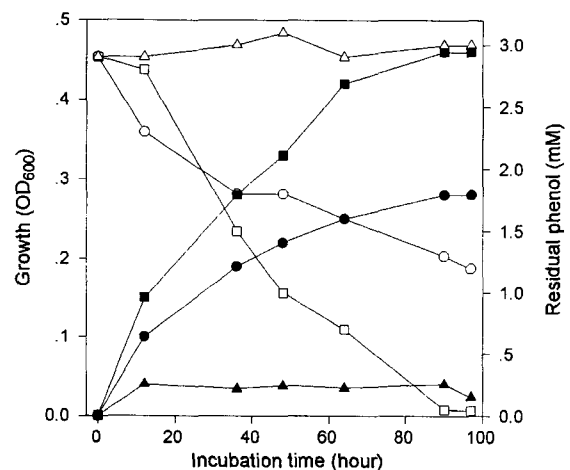
Table 1. Physiological, morphological and biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. HL100¹

Characteristics	<i>Pseudomonas</i> sp. HL100
Gram reaction	-
Cell shape	rod
Motility	+
Catalase	+
Oxidase	+
NO ₃ → NO ₂	+
NO ₂ → N ₂	+
Indole production	-
Glucose acidification	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	-
Esculin hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Fluorescent pigment	+
Phospholipase	+
Maltosidase	-
Chitinase	-
Acid phosphatase	+
Growth on sole carbon sources	
Glucose	+
Arabinose	+
Gluconate	+
Caprate	+
Adipate	+
Malate	+
Citrate	+
Phenylacetate	+
Acetic acid	+
Glycerol	+
Benzoate	+
Mannose	-
Mannitol	-
N-acetyl glucosamine	-
Resistance to antibiotics ²	
Ampicillin (130 ug/ml)	+
Tetracyclin (30 ug/ml)	+
Chloramphenicol (40 ug/ml)	+
Erythromycin	-
Kanamycin	-
Streptomycin	-

¹The tests were done using the Analytical Profile Index kit (API-20NE, Biomerieux S. A., France) and Merck bacterial identification kit (Germany).

²The numbers in parentheses are highest concentrations that permit the growth of HL100.

중성의 pH 7.0에서 가장 높은 생장을 나타내었다(Fig. 3). 최종전자 수용체로서 sodium nitrite, potassium nitrate, sodium nitrate, ammonium nitrate를 이용한 조건하에서 페놀 분해능의 변화와 성장 곡선의 변화를 조사한 결과 *Pseudomonas* sp. HL100은 최소 배지에서 potassium nitrate를 최종전자 수용체로 이용할 때 가장 우수한 성장

**Fig. 1. Transmission electron micrograph of denitrifying phenol-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HL100 (× 10000).****Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Pseudomonas* sp. HL100.**

Cells were cultivated in the basal salt medium containing 3mM phenol as the sole source of carbon and energy. Open and closed symbols represent phenol degradation and bacterial growth, respectively. Circular, rectangular, and triangular symbols represent the growth temperature of 30°C, 37°C, and 45°C, respectively.

속도와 페놀 분해능을 나타내었다(자료생략). 최종 전자 수용체로서 이용되는 potassium nitrate의 최적농도를 결정한 결과 Fig. 4에 나타낸 것처럼 5 mM과 10 mM의 농도에서 최고의 성장속도를 나타내었고 10 mM의 농도에서 균의 최종 yield가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 20 mM의 nitrate 농도에서는 고농도에 기인하는 성장저해 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 *Pseudomonas* sp. HL100의 최적 배양 조건을 pH 7.0, 37°C 및 10 mM의 potassium nitrate 농도로 결정하였다.

Nitrate의 환원에 의한 페놀 분해

분리된 *Pseudomonas* sp. HL100의 페놀 분해능력과

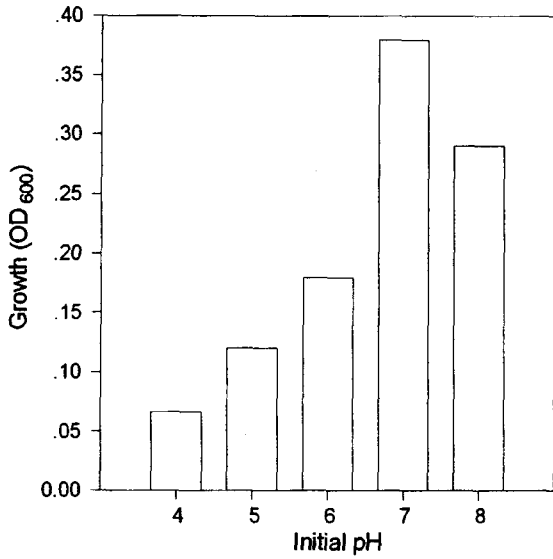


Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Pseudomonas* sp. HL100.
Cells were grown at 37°C for 80 hours in the basal salt medium containing 3 mM phenol as the sole source of carbon and energy.

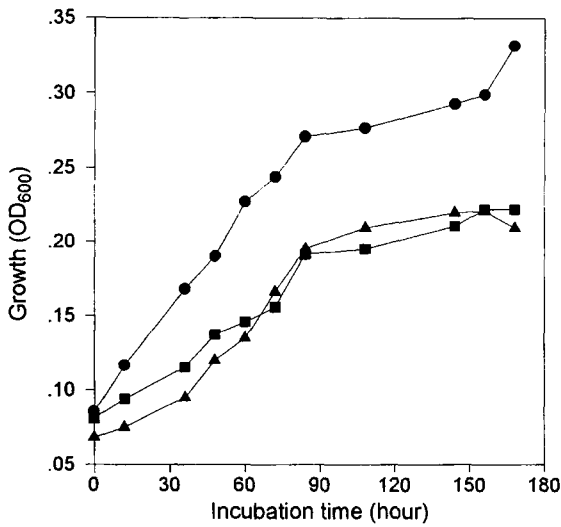


Fig. 4. Growth pattern of *Pseudomonas* sp. HL100 on different amount of potassium nitrate.
Cells were cultivated at 37°C in the basal salt medium containing phenol as the sole source of carbon and energy and potassium nitrate as the terminal electron acceptor. The concentration of potassium nitrate in the growth medium was 5 (▲), 10 (●), and 20 (■) mM.

nitrate 환원과의 상관관계를 분석하였다. 3 mM의 페놀과 10 mM의 potassium nitrate를 함유하는 basal salt medium에서 배양한 결과 Fig. 5에 나타난 것처럼 균체의 성장에 따른 배지내 단일 탄소원인 페놀의 감소가 관찰되었고 동시에 최종전자 수용체인 nitrate의 감소 및 nitrate의 환원에 따른 nitrite의 생성이 관찰되었다. 측

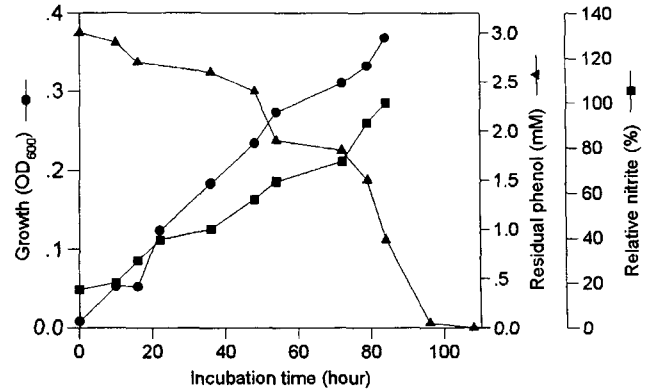


Fig. 5. Growth (●), phenol utilization (▲), and nitrite production (■) by *Pseudomonas* sp. HL100.
Cells were cultivated at 37°C in the basal salt medium containing 3 mM of phenol and 10 mM of potassium nitrate. The amount of phenol and nitrite in the growth medium was measured as described in the Materials and Methods.

정된 doubling time은 약 20시간이었고, 약 110시간 이내에 페놀의 농도가 탐지할 수 있는 수준이하로 감소하였다. 균의 접종이 없는 정상적인 배지를 실험기간 동안 대조군으로 사용하는 경우 페놀의 농도변화가 전혀 일어나지 않았으며 nitrite의 생성도 탐지되지 않았다. 최종 전자 수용체로서 nitrate대신 nitrite를 사용하는 경우에도 거의 정상적인 균의 생장이 일어나는 것에 비추어 볼 때 Fig. 5에 나타나는 nitrite는 궁극적으로 nitrate가 고갈되는 경우에 균에 의해 재사용될 것으로 여겨진다. *Pseudomonas* sp. HL100은 nitrate로부터 최종적으로 N₂ gas를 발생하는 것으로 확인되었지만(Table 1) 본 실험에서는 과량(10 mM)의 nitrate를 사용하였기 때문에 생성된 nitrite는 탄소원과 에너지원인 페놀의 고갈에 의해 재사용되지 못한 것으로 여겨진다. 페놀 외의 다른 탄소원에 대한 이용능력을 분석한 결과 toluene에서는 정상적인 생장이 이루어졌으나 xylene과 benzene이 탄소원으로서 공급되는 경우에는 생장이 관찰되지 않았다.

다양한 페놀 농도에서의 성장 분석

Pseudomonas sp. HL100의 성장을 다양한 페놀 농도에서 측정하였다(Fig. 6). 3 mM의 페놀농도에서 doubling time이 약 20시간으로 가장 빠른 생장이 일어났으며 정체가 진입까지 약 110시간이 소요되었다. 5 mM의 페놀을 공급하는 경우 성장속도가 둔화되는 것이 관찰되었고 7 mM의 농도에서는 독성에 의해 생장이 현격하게 둔화하는 것을 관찰할 수 있었다. 8 mM 이상의 농도에서는 균의 성장을 전혀 관찰할 수 없었다(자료생략). 따라서 *Pseudomonas* sp. HL100의 최적 성장농도는 3 mM의 페놀인 것으로 확인하였다. 3 mM의 페놀하에서 관찰된 최대 doubling time인 20시간은 Bakker[2]가 분

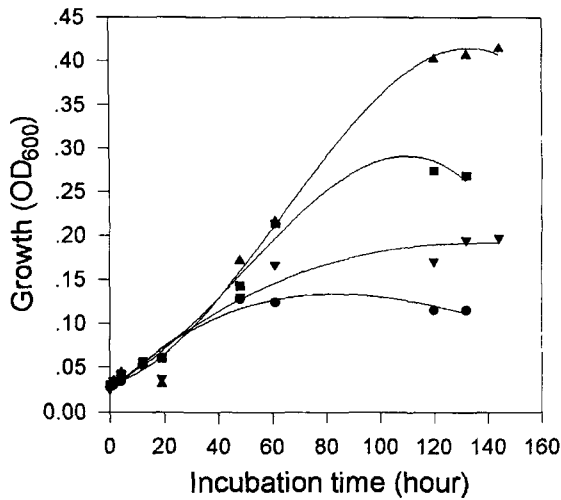


Fig. 6. Growth pattern of *Pseudomonas* sp. HL100 on different amount of phenol.

Cells were cultivated at 37°C in the basal salt medium containing phenol as the sole source of carbon and energy and potassium nitrate as the terminal electron acceptor. Symbols: ●, 1 mM phenol; ▲, 3 mM phenol; ■, 5 mM phenol; ▼, 7 mM phenol.

리하였던 균의 150시간에 비해 월등히 우수하고 Tschech 등[17]이 분리하였던 균의 20시간과 같아 상대적으로 짧은 시간내에 많은 양의 페놀을 처리할 수 있는 것으로 확인되었다. 특히 Tschech 등이 분리한 균의 경우 최적 페놀농도로 1.5 mM이 보고된 것에 비추어 볼 때 본 연구에서 분리된 균은 뛰어난 페놀 분해능력과 성장능력을 갖는 것으로 여겨진다. 또한 본 연구에서 분리된 균의 최적농도 3 mM(282 mg/l)은 호기적 조건에서 페놀을 분해하는 균들의 일반적인 분해능력(약 1,000 mg/l)과 최대분해능력(2,000 mg/l)에는 미치지 못하지만[1, 7, 13, 16] 기존의 탈질작용에 의한 혐기적 페놀분해 균들보다는 우수한 것으로 여겨져 페놀계 산업폐수의 생물학적 처리의 효용성을 증가시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

충북 청주시의 공단폐수 유입지로부터 탈질화에 의한 페놀분해 세균이 분리되었다. 분리된 균의 형태적, 생화학적 및 생리학적 특성을 분석한 결과 *Pseudomonas* sp. 로 판명되었고 HL100으로 명명하였다. 분리된 균은 nitrate가 최종전자 수용체로서 공급되는 경우 페놀을 단일 탄소 및 에너지원으로 이용하였다. 배지에 첨가된 nitrate가 nitrite로 환원되면서 3 mM의 페놀을 약 110시간만에 완전히 분해하였으며 관찰된 최대 doubling time은 20시간이었다. 적절한 조건에서 nitrate로부터 N₂를 생성하는 능력을 보여 분리된 균의 경우 탈질작용의 전

과정을 수행할 수 있는 것으로 확인되었다. 최적 생장온도와 pH는 각각 37°C와 7.0으로 판명되었으며 탈질화에 의한 성장시 toluene을 탄소원으로 이용하였지만 xy-lene과 benzene은 이용하지 못하였다.

감사의 말

본 연구는 고려대학교 특별연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Anta, S. P. and D. L. Crawford. 1983. Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 142-143.
2. Bakker, G. 1977. Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. *FEMS Lett.* **1**: 103-108.
3. Casella, S. and W. Payne. 1996. Potential of denitrifiers for soil environment protection. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**: 1-8.
4. Falson, 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**: 1279-1285.
5. Gerhardt, P., R. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington.
6. Keith, L. H. and W. A. Telliard. 1979. Priority pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **13**: 416-423.
7. Kim, S. B., C. K. Kim, H. S. Kim, C. H. Lee, K. S. Shin, G. S. Kwon, B. D. Yoon, and H. M. Oh. 1996. Isolation and characterization of a phenol-degrading *Candida tropicalis* PW-51. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 743-738.
8. Krieg, N. R. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore.
9. 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.
10. Li, J. K. and A. E. Humphrey. 1989. Kinetics and fluorometric behavior of a phenol fermentation. *Biotechnol. Lett.* **11**: 177-182.
11. Lovely, D. R. and D. J. Lonergan. 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1858-1864.
12. Martin, R. W. 1949. Rapid colorimetric estimation of phenol. *Anal. Chem.* **21**: 1419-1420.
13. Oh, J. S. and Y. H. Han. 1997. Isolation and characterization of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. DGUM

2011. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 459–463.
14. Payne, W. J. 1975. Denitrification. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 220–222.
15. Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel. 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1444–1451.
16. Rehm, H. J. 1984. Degradation of phenol by immobilized microorganism. *Eur. Congr. Biotechnol.* **3**: 27–33.
17. Tschech, A. and G. Fuchs, 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* **148**: 213–217.
18. Wilson, B. H., G. B. Smith, and J. F. Rees. 1986. Biotransformation of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material: A microcosm study. *Environ. Sci. Technol.* **20**: 997–1002.

(Received April 18, 1998)