

Rhodococcus sp. CP01에 의한 페놀과 6가 크롬이온의 동시 제거

최광현 · 오영숙¹ · 김병동² · 최성찬*

한림대학교 생명과학부, ¹명지대학교 세라믹화학공학부, ²서울대학교 식물생산과학부

페놀을 유일한 탄소 및 에너지원으로 이용할 수 있는 *Rhodococcus* sp. CP01을 침출수로부터 분리하고 회분식 및 연속배양 체제에서 크롬(VI)을 동시에 환원시키는 능력을 측정하였다. 크롬(VI) 환원의 최적 pH 7.0과 페놀 농도 1,000 mg/L에서 최소배지에 주어진 0.25 mM의 크롬(VI)은 CP01 균주에 의해 60시간만에 완전히 환원되었으며, 이때 크롬의 환원속도는 4.17 $\mu\text{M/hr}$, 페놀의 분해속도는 38.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 측정되었다. 수리학적 체류시간을 100 hr으로 유지한 호기성 연속배양 체제에서 크롬(VI)의 농도를 0.0625, 0.125, 그리고 0.25 mM로, 페놀 농도를 1,000~4,000 mg/L까지 변화시키면서 46일간 운전한 결과, 크롬(VI) 0.125 mM과 페놀 3,000 mg/L일 때 유사 steady state에 이르렀으며 이때 크롬의 환원율은 거의 100%로 일정하게 유지되었다. 이 구간에서 계산된 specific reduction rate는 0.34 $\text{mg Cr(VI)} \cdot \text{g protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로서 glucose를 생장기질로 이용한 기존의 연구 결과와 유사한 수준으로 나타났다. 이상의 결과로부터 본 연구는 중금속 크롬(VI)과 방향족 화합물인 페놀을 동시에 효과적으로 제거할 수 있는 생물학적 처리 가능성을 보여 주었다.

Key words □ chromium, degradation, phenol, reduction, *Rhodococcus*

유해 중금속류의 하나인 크롬은 전기도금, 스테인레스 제조, 피혁처리, 염색, 자동차 제조 등 여러 산업에서 널리 사용되어지고 있다. 크롬은 Cr(III)의 경우 인체의 glucose, cholesterol, 그리고 fat의 정상적인 대사를 유지하기 위한 필수적인 미량원소로 고려되지만, chromate(CrO_4^{2-}) 또는 dichromate($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)가 대표적인 화합물 형태인 Cr(VI)은 다양한 크롬처리공정에서 주로 방출되며 물에 대한 용해도가 크롬이온 중 가장 크고, 세포 내로의 유입이 용이하며, 생물체에 암 또는 돌연변이를 유발할 수 있는 치명적인 독성을 나타내므로 적절한 처리 없이 방출될 경우 주변환경에 심각한 영향을 초래하게 된다(8,14). 반면에 Cr(III)은 중성 pH에서 침전물[Cr(OH)₃]을 형성하므로 세포막을 투과할 수 없고 따라서 독성 또한 상당히 낮아진다(6,7).

다른 중금속들과 달리 Cr(VI)은 수중에서 oxyanion의 상태로 용해되어 있기 때문에 일반적인 화학적 침전처리에 의한 제거가 대단히 어렵다. 따라서 크롬이 함유된 폐수들의 생물학적 처리는 기존의 물리화학적 처리에 의한 크롬의 제거시 소요되는 높은 비용을 줄일 수 있고, 또한 높은 제거 효율도 가지고 있다(4). 생물학적 처리시 Cr(VI)을 최종 전자수용체로 이용하는 혐기성 세균에 의한 크롬폐수의 처리보다 효율이 높아 주로 사용되고 있는 호기성 처리법에서는 크롬의 환원에 필요한 전자공여체로서 glucose, 천연 지방족 화합물, 아미노산, 지방산, 수소 등이 사용된다(20). 그러나 최근에는 phenol, 2-chlorophenol, *p*-cresol, 2,6-dimethylphenol, 3,5-dimethylphenol, benzene 또는 toluene과 같은 난분해성 오염물질로 영역을 넓히고 있는 실정이다(20). 이와 같

이 분해되기 어려운 독성화합물을 Cr(VI) 환원 세균에 필요한 탄소 및 에너지원으로 사용하는 것은 생물학적 처리를 이용해서 두 가지의 환경오염물질을 동시에 제거할 수 있으므로 대단히 유용한 공정이다.

폐수처리장, 지하수, 지표수 또는 토양에 흔히 존재하는 페놀은 자체의 독성뿐만 아니라 염소소독시 chlorophenol을 생성하여 환경에 큰 부담을 주므로 이를 Cr(VI) 환원의 전자공여체로 사용하려는 연구가 활발히 진행되어 왔다(16,23). 그러나 현재까지 보고된 연구결과로는 페놀 분해균주인 *Pseudomonas putida* DMP-1과 크롬 환원균주인 *Escherichia coli* ATCC 33456의 혼합배양에 의한 크롬과 페놀의 동시제거이므로, 하나의 반응기내에 서로 다른 두 종의 세균을 유지해야하며 이로 인해 시스템의 복잡성이 커지고 유입수 부하량의 급격한 변동에 취약한 단점을 지니고 있다. 따라서 본 연구에서는 난분해성 유기물과 중금속을 함유하고 있는 침출수로부터 크롬을 환원시키면서 동시에 페놀을 분해시킬 수 있는 단일 미생물을 분리해내고, 최적 생장조건을 살펴봄과 더불어 호기성 부유생장식 연속배양 체제에서 페놀 분해와 크롬환원의 정도를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 동정

균주 분리를 위한 접종 시료는 정선군 남면 광덕리에 아적된 생활 폐기물로부터 발생된 침출수 (pH 7.0~7.1)를 사용하였다. 농후배양을 위해 500 ml 삼각 플라스크에 침출수 1 ml와 크롬 0.25 mM을 mineral salt basal (MSB)배지(18) 100 ml에 접종하고 Teflon으로 감싼 고무마개로 밀봉하여 30°C, 200 rpm으로 진

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 033-240-1531, Fax: 033-242-9300
Email: sechoi@sun.hallym.ac.kr

탕배양하였다. 유일한 탄소 및 에너지원으로 페놀을 매일 1,000 mg/L씩 첨가해 주었으며, 플라스크 내에 충분한 산소의 공급을 위해 페놀 주입 전 매일 5분간 마개를 열어 산소를 공급해 주었다. 균주가 자라서 탁도가 증가하면 1 ml씩 새로운 MSB배지에 계대배양 했으며, 수 차례의 계대배양 후 균 현탁액을 적절히 희석하여 크롬 0.25 mM이 첨가된 고체 MSB 배지에 도말하여 30°C 배양기에서 배양하였다. 이때 페놀은 튜브관에 넣어 배지에 증기상태로 공급해 주었다. 나타난 집락 중 크롬에 대한 내성 정도와 생장속도가 가장 탁월한 균주를 단일균주로 분리하고 동정 실험을 수행하였다. 가스크로마토그래프(Model 6890 Plus, Hewlett-Packard, Wilmington, USA)를 이용하여 순수 분리된 균주의 세포막 추출물 fatty acid methyl ester(FAME)의 조성을 Bergen과 Sorheim(1)의 방법에 따라 확인하고 library와 비교하여 동정한 결과, 이 균주를 *Rhodococcus* sp. CP01이라 명명하였다.

크롬(VI) 환원의 분석

균주가 Cr(VI)을 환원시키는 최적 pH를 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 우선 배양된 균주를 멸균한 MSB로 2회 세척하고 현탁액 ($A_{600} \approx 2.0$)을 초기 pH가 각각 pH 5.2, 6, 7, 8, 9로 조절된 MSB 배지에 1 ml씩 접종하였다. 이때 페놀은 세포의 생장에 미치는 독성을 고려하여 초기 농도 1,000 mg/L로 하여 5% 이하만이 남아 있는 것으로 확인될 때마다 1,000 mg/L가 되도록 다시 첨가하였다. 초기 크롬(VI)의 농도는 0.25 mM로 하였으며 접종된 시료는 30°C에서 진탕배양(200 rpm)하였다. 동일한 조건에서 접종을 하지 않은 시료를 준비하여 미생물학적 크롬(VI) 환원을 확인하였다. 채취한 모든 분석 시료는 2회에 걸쳐 분석하였으며 평균값을 결과로 나타내었다.

크롬(VI)의 환원 정도는 배양액으로부터 일정량의 시료를 취하고 크롬(VI) 농도의 감소로 측정하였다(17). 채취한 시료는 우선 원심분리(10,000×g, 10 min)하여 부유물질을 제거하고, 상등액 0.1 ml을 1.9 ml의 증류수에 넣은 후, 0.16 ml의 2N 황산을 가하여 산성화시켰다. 발색은 acetone에 녹인 0.5% diphenylcarbazide (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 용액 40 μ l를 첨가하여 10분 간 상온에서 반응을 지속시킨 후, UV/vis-spectrophotometer (Model UV-1601PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하고, 표준직선으로부터 시료 내에 존재하는 Cr(VI)만을 선택적으로 정량하였다. 크롬(VI)은 배양액의 수층에만 존재하고 원심분리에서 얻어진 cell pellet에서는 측정되지 않았으므로 세포에 흡착 또는 흡수되어 제거되는 영향은 거의 없었다.

페놀의 정량

배지에 존재하는 페놀은 크롬(VI) 환원 정도의 측정을 위해 원심 분리한 시료에서 일정량을 4 mm PTFE syringe filter(pore size 0.45 μ m)로 여과한 후, 4.6×150 mm COSMOSIL RP-C18 column이 장착된 HPLC (Model L-7100, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 정량하였다. 분석 조건은 용매로서 methanol:DW (40:60 v/v) 혼합액을 isocratic 조건하에서, 시료 주입량은 10 μ l, 유량은 1.0 ml/min으로 분석하였다. 검출은 254 nm의 파장에서

UV detector로 수행하였으며 머리 얻어진 표준직선으로부터 시료 내에 존재하는 페놀을 정량하였다.

단백질 정량

회분식 배양 중 세포 단백질량의 증가는 밀봉된 플라스크에 spinal needle과 stopcock을 이용하여 배양시료를 채취하는 과정에서 페놀이 휘발되어 손실되는 것을 막으면서 채취한 시료로부터 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford(2)의 dye-binding 방법을 준하여 시료 0.1 ml에 20 μ l의 1N NaOH 첨가 후 vortex mixer를 이용하여 완전히 섞어주고, coomassie blue reagent(Bio-Rad, Hercules, USA) 1 ml을 넣어주고 상온에서 10분간 정치시켜 발색시켰다. 발색 정도는 UV/vis-spectrophotometer를 이용하여 595 nm에서 흡광도로 측정하였으며, bovine serum albumin을 표준물질로 이용한 표준직선으로부터 정량하였다.

연속배양 조건

연속배양은 3 L 반응조(2 L working volume)내에서 수행하였으며, Fig. 1과 같은 호기성 부유공정 체제를 이용하여 수행하였다. 반응조와 모든 tubing 및 사용 배지는 15분간 121°C에서 멸균하였으며 1.95 L의 MSB배지에 페놀에 적응된 균주 현탁액 ($A_{600} \approx 2.0$) 50 ml를 접종하였다. 초기 6일간은 미생물량을 증가시키고 안정화시키기 위해 크롬을 공급하지 않고 탄소원인 페놀만 feed tank로부터 공급하였다. 안정화된 후 feed tank에 크롬(VI) 농축액을 0.0625 mM이 되도록 pore size 0.2 μ m의 초미세여과막(Millipore)으로 여과하여 첨가하고 운전을 시작하였으며, 이후 유입 크롬의 농도를 0.125 및 0.25 mM로 증가시켰다. 또한 feed tank의 페놀 농도도 크롬환원 정도를 고려하여 1,000 mg/L로부터 2,000, 3,000, 그리고 4,000 mg/L로 점차 증가시켰다. 페놀과 크롬(VI)을 함유하고 있는 MSB 배지는 feed tank로부터 peristaltic pump(Speed pump II, VWR Scientific, South Plainfield, USA)를 통해 반응조에 20 ml/hr의 일정한 속도로 공급해 주었으며 이때 수리학적 체류시간은 100 hr이다. 반응조의

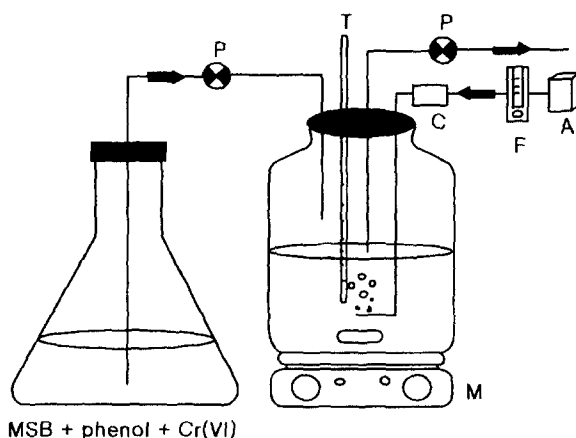


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental set-up for continuous culture of *Rhodococcus* sp. CP01. MSB-mineral salt basal medium, P-peristaltic pump, C-cotton filter, T-thermometer, M-magnetic stirrer/heater, F-flow meter, A-air pump.

온도는 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지하였고, 공기는 air pump를 통해 3.0 L/min의 속도로 공급해 주었으며, 배양액은 자석 교반기를 이용하여 균일하게 혼합해 주었다. 연속배양 중 페놀의 기화에 따른 손실을 3개의 연속된 water trap으로 포집하여 HPLC로 측정된 결과 유의한 수준으로 측정되지 않았다. 총 46일간의 운전 기간 동안 반응조의 유출수를 1~2일 간격으로 채취하여 잔류 크롬(VI)과 페놀의 농도를 각각 측정된 후 % 제거율(유입량에 대한 백분율)로 계산하였으며, 단백질량과 pH의 변화를 측정하였다. Specific Cr(VI) reduction rate는 단위시간당 세포 단백질에 의해 환원된 크롬(VI)의 양으로 계산하였다 ($\text{mg Cr(VI) reduced} \cdot \text{g protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$).

결과 및 고찰

회분식 배양에서 크롬(VI)의 환원

침출수에서 페놀을 유일한 탄소와 에너지원으로 사용하면서 크롬을 환원시키는 능력이 탁월한 *Rhodococcus* sp. CP01 균주를 순수분리 하였으며, 크롬환원에 적절한 pH 범위를 알아 본 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. MSB 배지의 초기 pH를 pH 5.2, 6, 7, 8, 9 등으로 조절하여 배양했을 때 pH 7에서 CP01은 크롬(VI)을 가장 잘 환원시키는 것으로 나타났다. 또한 접종을 하지 않은 시료에서 페놀에 의한 크롬(VI)의 화학적 환원도 관찰되지 않았다. 화학적인 반응에 의해 일어나는 크롬의 환원은 FeSO_4 , Na_2SO_3 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 등과 같은 환원제에 의해 촉매되며 반응의 최적 pH 범위가 산성 pH 2~3임을 고려할 때(3), pH 5.2에서 거의 환원이 일어나지 않은 본 연구의 결과는 CP01에 의한 크롬의 환원이 순수한 생물학적 반응의 결과임을 제시한다. 한편 생물학적 크롬(VI) 환원의 최적 pH는 *Enterobacter cloacae* HO1의 경우 pH 7.0~7.8의 범위였으며(10), *E. coli* ATCC 33456 균주(15)와 *Bacillus* sp.(20)는 본 연구의 CP01 균주와 동일한 pH 7에서 나타났다. 따라서 생물학적 크롬(VI) 환원의 최적 pH는 환원 미생물의 최적 성장 pH와 일치하는 것으로 보이며 중성 pH 범위를 크게 벗어나지 않는 것으로 보인다.

분리된 균주 CP01은 페놀을 유일한 탄소 및 에너지원으로

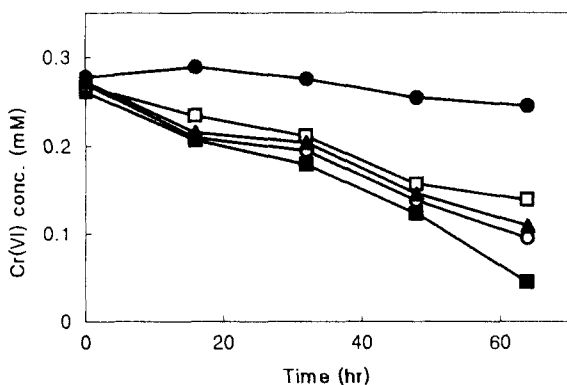


Fig. 2. Effects of pH on the reduction of Cr(VI) by *Rhodococcus* sp. CP01. (●, pH 5.2; ○, pH 6; ■, pH 7; □, pH 8; ▲, pH 9).

이용하여 크롬(VI)을 효과적으로 환원시켰다 (Fig. 3). 초기 크롬 농도 0.25 mM은 배양 60시간만에 완전히 환원되었으며, 이때 페놀은 균주에 미치는 독성을 고려하여 초기에 과량 투입하지 않고 초기 페놀농도(1,000 mg/L)의 5% 이하만이 남아 있는 것으로 확인된 시간(26 hr, 48 hr)에 첨가하여 1,000 mg/L를 유지토록 하였다. 크롬(VI)의 환원이 대수성장단계보다 생물량이 충분히 생성된 감수성장단계에서 빠르게 일어나는 결과는 기존의 연구 결과(12)와 일치한다. 그러나 *Pseudomonas ambigua* G-1의 경우 초기 세포밀도를 150 mg 건조중량/L로 하였을 때 크롬의 환원은 대수성장단계에서 일어나고 감수성장단계에서는 오히려 크롬의 환원이 멈추는 것이 관찰되었다(5). 본 연구에서 적용한 초기 단백질량은 10.1 mg/L이었으며(Fig. 3) 세포건조 중량을 측정된 결과 15.9 mg/L로서 *P. ambigua*를 이용한 실험에 비해 대단히 적은 양이다. 따라서 크롬 환원의 초기 속도는 접종량에 비례하여 나타난다는 특성을 확인하였으며, 유사한 관찰에 근거하여 휴지기의 미생물을 이용한 크롬의 환원(11) 및 세포생장을 고려하지 않고 효소 동역학을 적용한 크롬환원의 동역학 모델 등이 제시된 바 있다(21).

본 연구에서 크롬(VI) 환원에 필요한 전자(electron)는 페놀로부터 유래하였으며, 이때 크롬의 환원속도는 $4.17 \mu\text{M/hr}$, 페놀의 분해속도는 $38.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 각각 계산되었다 (Fig. 3). 이러한 수치는 *E. coli*와 *P. putida*의 혼합배양에서 얻어진 크롬 환원 속도 $3.3 \mu\text{M/hr}$ 와 페놀 분해속도 $11.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ (16)를 상회하는 수준으로서 단일 균주를 이용한 본 연구의 결과가 궁극적으로 시스템을 단순화시킬 수 있는 장점 외에도 오염물질의 제거 속도 측면에서도 우수함을 알 수 있다. 한편 일반적으로 미생물이 이용하기 용이한 glucose와 같은 기질을 사용할 경우 농도가 높아질수록 균체량 증가에 기여하므로 크롬 환원정도가 증가하지만(9), 페놀과 같은 독성물질을 기질로 이용할 경우 일정량을 초과하면 오히려 크롬의 환원정도가 감소하게 된다. 따라서 독성물질에 의한 세포 생장의 저해 농도는 높을수록 바람직하다. 본 연구에서는 페놀농도가 1,000 mg/L를 초과하면 이러한 저해 현상이 관찰되었으며(결과 미제시), *E. coli*와 *P. putida* 혼합배양의 경우(16) 850 mg/L 이상에서 저해현상이 관찰되었다.

배양 개시 후 60시간만에 0.25 mM의 크롬(VI)은 완전히 환원되었으며 이때 소모된 페놀의 양은 약 2,060 mg/L ($\approx 21.9 \text{ mM}$)이었다 (Fig. 3). 만약 페놀의 산화와 크롬의 환원이 *E. cloacae*에서와 같이 에너지 획득 측면에서 직접 couple되어 일어나는 반응 즉, 크롬(VI)이 최종 전자수용체로 작용한다면(22) 다음의 stoichiometric eq.으로부터 페놀 1 mol당 9.3 mol의 크롬(VI)이 환원된다: $\text{C}_6\text{H}_6\text{O} + 9.3\text{CrO}_4^{2-} + 40.6\text{H}^+ \rightarrow 9.3\text{Cr}^{3+} + 6\text{HCO}_3^- + 20.3\text{H}_2\text{O}$. 본 연구에서 크롬(VI)의 환원에 비해 오히려 현저히 많은 양의 페놀이 분해된 이유는 균주 CP01이 혐기적 상태에서 크롬(VI)을 최종 전자수용체로 이용하는 미생물과 달리 호기적 상태에서 산소를 이용하기 때문이며, 이때의 환원은 에너지 생성과는 관계없이 크롬을 무독화시키거나 우연히 일어나는 NAD(P)H-dependent reductase의 활성(12,13,19)에 의해 나타나는 것으로 보여진다.

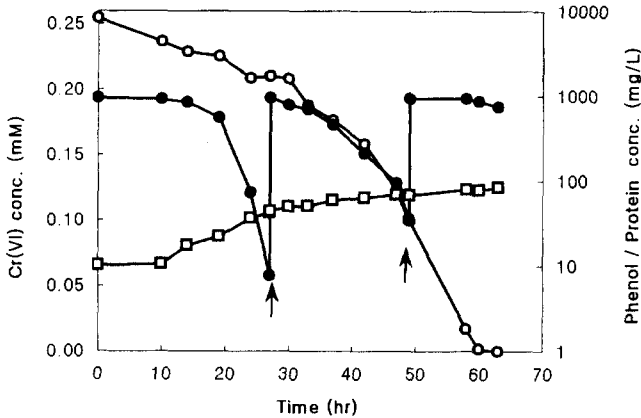


Fig. 3. Reduction of Cr(VI) during the growth of phenol-degrading strain CP01 (●, phenol; ○, Cr(VI); □, protein). Arrows indicate additions of phenol to adjust the concentration to the initial level, 1,000 mg/L.

연속배양에서 크롬(VI)의 환원

회분식 배양실험의 결과를 고려하여 연속배양체제를 구성하고, 반응조에 유입되는 크롬과 페놀의 양은 미생물의 활성과 안정화에 따라 크롬은 0.0625 mM (Phase I; 0~11일), 0.125 mM (Phase II; 11~36일), 그리고 0.25 mM (Phase III; 36~46일)로 점차 증가시키고, 역시 페놀도 1,000 mg/L (0~3일), 2,000 mg/L (3~9일), 3,000 mg/L (9~39일), 그리고 4,000 mg/L (39~46일)로 점차적으로 증가시켰다. Feed tank에서 반응조로 공급되는 유속은 20 ml/hr로 일정하게 유지하여 수리학적 체류시간(HRT)을 100시간으로 하였다. 반응조의 운전기간 동안 일정시간 간격으로 유출수를 채취하여 크롬의 환원효율, 페놀 유입 농도, 단백질량 및 pH를 측정하였다 (Fig. 4). 페놀의 분해율은 Phase III에서는 급격히 떨어지는 것을 제외하면 나머지 구간에서는 100% 분해되었다(결과 미제시). Phase I에서 크롬(VI)의 환원이 점차 감소하는 경향은 페놀의 농도를 1,000에서 3,000 mg/L로 높여주면서 환원율 100%에 이르렀다. 즉 Phase I은 페놀의 부족으로 CP01 균주에 의한 크롬의 환원이 제한을 받는 구간으로 판단된다. 유출수에서 크롬(VI)이 측정되지 않는 시간이 1HRT를 경과한 11일째에 크롬(VI)의 농도를 0.125 mM로 증가시켰으며 페놀의 농도를 3,000 mg/L로 계속 유지시킨 Phase II 구간에서는 유출수에서 크롬(VI)이나 페놀이 거의 측정되지 않았다. 단백질량은 탄소 및 에너지원인 페놀의 유입 농도 변화에 따라 3,000 mg/L의 농도에서 높은 수준(201.3±17.3 mg protein/L)을 보였으며 안정화되는 경향을 보여주었다 (Fig. 4b). 따라서 이 구간(Phase II)을 유사 steady state라 가정하면 specific Cr(VI) reduction rate는 0.34 mg Cr(VI)·g protein⁻¹·hr⁻¹로 계산되었다. Gopalan과 Veeramani (4)는 본 연구와 유사한 연속배양 체제에서 비교적 미생물이 이용하기에 용이한 glucose를 탄소원으로 사용하여 *Pseudomonas* sp. C7에 의한 크롬(VI)의 환원에 관한 연구를 수행하였다. 균주 C7은 HRT가 72시간이면서 유입 크롬의 농도가 0.1 mM과 0.29 mM일 때 각각 0.12와 0.33 mg Cr(VI) g⁻¹·hr⁻¹의 specific reduction rate를 나타내었다. 따라서 탄소원으로 페놀

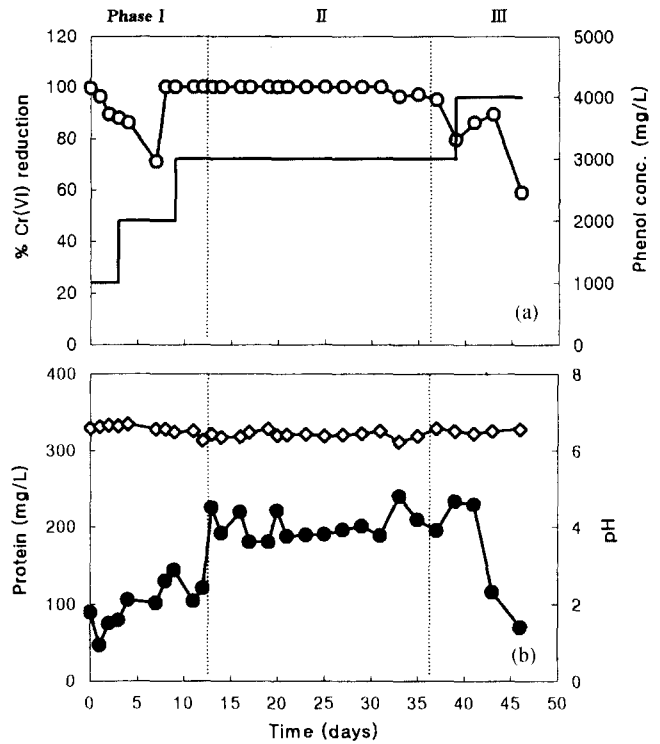


Fig. 4. Performance of reactor during 46 days of continuous culture of *Rhodococcus* sp. CP01. Influent Cr(VI) concentrations were increased from 0.0625 mM (Phase I) to 0.125 mM (Phase II), and then to 0.25 mM (Phase III). (a) Profile of Cr(VI) reduction efficiency (○) and influent phenol concentration (—); (b) Profile of protein concentration (●) and pH (◇) of effluent.

과 같이 독성을 지닌 방향족 화합물을 사용해도 환원력은 크게 뒤떨어지지 않는다는 것을 알 수 있었고, 오염물질을 동시에 제거하는 실제 적용에 있어서도 효과적으로 사용되어질 수 있을 것으로 예측된다.

배양기간동안 반응조의 색깔은 CP01 균주의 핑크색상과 환원된 크롬(III)의 녹색이 혼합된 어두운 갈색을 나타내어 육안으로도 크롬이 활발히 환원되는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 크롬의 환원은 hydroxyl 이온들을 생성하므로 반응조에서 pH를 높이는 효과를 가져올 수 있다. $CrO_4^{2-} + 3e^- + 4H_2O \rightarrow Cr^{3+} + 8OH^-$. 그러나 본 실험에서 유출수의 pH는 전체 배양기간 동안 MSB 배지의 pH인 6.7보다 약간 낮은 pH 6.48±0.11로 측정되었다 (Fig. 4b). 이는 MSB 배지의 완충효과와 더불어 균주의 성장에 의해 페놀의 분해로부터 발생된 탄산이온에 의해 pH가 낮아지는 효과가 위의 식에서 크롬(VI)의 환원과 수반되어 일어나는 pH의 증가효과를 능가했기 때문으로 해석된다.

크롬의 환원은 수용성의 Cr(VI)을 불용성의 Cr(III)수산화물로 변화시키므로 매립지나 토양으로부터 침출되어 수계로 유입될 가능성을 현저하게 낮추어 준다. 그러므로 크롬의 환원은 환경독성을 저감해 주는 유용한 과정이라 할 수 있다. 본 연구에서는 탄소원으로 방향족 화합물인 페놀을 분해하면서 동시에 크롬을 환원시키는 균주를 분리하고 연속배양 체제에서 크롬 환원능을

평가하였다. 얻어진 결과에 근거해 볼 때, 본 연구는 중금속 크롬(VI)과 페놀을 동시에 효과적으로 제거할 수 있는 생물학적 처리의 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 '98 과학기술기초중점연구과제 (No. 1998-024-G00018) 지원에 의해 수행되었습니다. 저자 일동은 최종 논문 작성에 도움을 준 박재우 군에게 감사 드립니다.

참고문헌

- Bergan, T. and K. Sorheim. 1984. Gas-liquid chromatography for the assay of fatty acid composition in gram-negative bacilli as an aid to classification. *Methods Microbiol.* 15, 345-362.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Germain, J. E. and K. E. Patterson. 1974. Plating and cyanide wastes. *J. Water Poll. Contr. Fed.* 46, 1301-1315.
- Gopalan, R. and H. Veeramani. 1994. Studies on microbial chromate reduction by *Pseudomonas* sp. in aerobic continuous suspended growth cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 471-476.
- Horitsu, H., S. Futo, Y. Miyazawa, S. Ogai, and K. Kawai. 1987. Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2417-2420.
- Imai, A. and E. F. Gloyna. 1990. Effects of pH and oxidation state of chromium on the behavior of chromium in the activated sludge process. *Water Res.* 24, 1143-1150.
- Katz, S. A. 1991. The analytical biochemistry of chromium. *Environ. Health Perspect.* 92, 13-16.
- Katz, S. A. and H. Salem. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13, 217-224.
- Kim, H.-Y., Y.-S. Oh, Y.-K. Kim, and S.-C. Choi. 1998. Reduction of hexavalent chromium by leachate microorganisms in a continuous suspended growth culture. *Kor. J. Microbiol.* 34, 126-131.
- Komori, K., P. C. Wang, K. Toda, and H. Ohtake. 1989. Factors affecting chromate reduction in *Enterobacter cloacae* strain HO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 567-570.
- Llovera, S., R. Bonet, M. D. Simon-Pujol, and F. Congregado. 1993. Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3516-3518.
- Oh, Y.-S. and S.-C. Choi. 1997. Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. *J. Microbiol.* 35, 25-29.
- Oh, Y.-S. and S.-C. Choi. 1997. A comparison between bacterial Cr(VI) resistance and Cr(VI) reduction among environmental isolates. *Kor. J. Microbiol.* 33, 125-130.
- Petrilli, F. L. and S. De Flora. 1977. Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 805-809.
- Shen, H. and Y.-T. Wang. 1994. Biological reduction of chromium by *Escherichia coli*. *J. Environ. Eng.* 120, 560-572.
- Shen, H. and Y.-T. Wang. 1995. Simultaneous chromium reduction and phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 and *Pseudomonas putida* DMP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2754-2758.
- Standard Methods. 1995. 19th ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159-171.
- Suzuki, T., N. Miyata, H. Horitsu, K. Kawai, K. Takamizawa, Y. Tai, and M. Okazaki. 1992. NAD(P)H-dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174, 5340-5345.
- Wang, Y.-T. and H. Shen. 1995. Bacterial reduction of hexavalent chromium. *J. Ind. Microbiol.* 14, 159-163.
- Wang, Y.-T. and H. Shen. 1997. Modelling of Cr(VI) reduction by pure bacterial cultures. *Water Res.* 31, 727-732.
- Wang, P.-C., K. Toda, H. Ohtake, I. Kusaka, and I. Yabe. 1991. Membrane-bound respiratory system of *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown anaerobically with chromate. *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 11-16.
- Wang, Y.-T., E. M. Chirwa, and H. Shen. 2000. Cr(VI) reduction in continuous-flow coculture bioreactor. *J. Environ. Eng.* 126, 300-306.

(Received July 31, 2000/Accepted November 30, 2000)

ABSTRACT: Simultaneous Removal of Phenol and Hexavalent Chromium by *Rhodococcus* sp. CP01

Kwang-Hyun Choi, Young-Sook Oh¹, Byung-Dong Kim², and Sung-Chan Choi*(Division of Life Sciences, Hallym University, Chunchon 200-702, ¹Division of Ceramics & Chemical Engineering, Myongji University, Yongin 449-728, ²School of Plant Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Simultaneous reduction of Cr(VI) and degradation of phenol was observed in batch and bench-scale continuous stirred tank reactors using *Rhodococcus* sp. CP01 isolated from leachate. The strain CP01, which was capable of utilizing phenol as a sole source of carbon and energy, completely reduced added hexavalent chromium (0.25 mM) to its trivalent form during 60 hr batch assay under optimal conditions (pH 7.0 and 1,000 mg/L of phenol concentration). The rates of Cr(VI) reduction and phenol degradation were estimated as 4.17 $\mu\text{M Cr(VI)}$ and 38.4 mg phenol $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, respectively. The continuous culture experiment was conducted for 46 days using synthetic feed containing different levels of chromate (0.0625 to 0.25 mM) and phenol (1,000 to 4,000 mg/L). With a hydraulic retention time of 100 hr, Cr(VI) reduction efficiency was mostly 100% for influent Cr(VI) and phenol concentrations of 0.125 mM and 3,000 mg/L, respectively. During quasi-steady-state operation, specific rate of Cr(VI) reduction was calculated as 0.34 mg Cr(VI) $\cdot \text{g protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ which was comparable to reported values obtained by using glucose as growth substrate. The results suggest the potential application of biological treatment for detoxification of wastewater contaminated simultaneously with Cr(VI) and phenol.