

Phenol 분해균주 *Klebsiella pneumoniae*의 분리 및 특성

노 종 수 · 이 현 모
동의공업대학 환경시스템공학과

Isolation and Characterization of a Phenol-degrading Strain, *Klebsiella pneumoniae*

Jong-Su Roh · Heon-Mo Lee

Dept. of Environmental System Engineering, Dongeui Institute of Technology

Abstract

In the screening of phenol-degrading bacteria, a strain showing good growth in media containing phenol was isolated by using enrichment culture from various sample and identified as genus *Klebsiella pneumoniae*. The optimal temperature and pH for cell growth of *Klebsiella pneumoniae* was 35°C and 8.0, respectively. When phenol was added to the minimal media as a sole source of carbon and energy, the concentration of maximum and optimum for cell growth was 1,200ppm and 1,000ppm, respectively.

It was observed that *Klebsiella pneumoniae* was able to degrade 98% of phenol (1,000ppm) after 40hr in culture. The isolated could utilize various kinds of aromatic compounds and showed good growth in presence of phenol, m-cresol and 3-methyl catechol.

I. 서 론

지난 수 십년 동안 인공화합물이라 불리는 일련의 외부 화합물들이 환경에 도입되어 왔으며 이러한 화합물들은 일반적으로 생분해에 저항적이다. 특히 방향족화합물들은 고농도의 난분해성 유기화합물로 산업폐수에 포함되어 있는데, 이들 화합물들은 유해하거나, 돌연변이를 일으키거나, 발암성이며 생태계에 의해서 생물축적 되거나 생물 증대된다(1).

이중 phenol은 석유정제, 수지제조, 사진현상, coal-tar증류, 석유화학공업 등에서 배출되며(2,3) 생체에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 자연분해가 어려워 토양과 하천에 축적 되므로 우선적 처리 대

상이 되고 있다. phenol이 포함된 폐수처리는 지금까지 보고된 방법에 따르면 화학적 산화, 용매추출, 활성탄에 의한 흡착 등의 화학적 방법(4) 그리고 생물학적 방법으로 구분할 수 있다. 이 중에서 생물학적 방법은 처리비용이 저렴하고, phenol의 완전 분해가 가능하다.

phenol의 생물학적 처리에 이용되는 균주로는 *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas putida*, *Flabobacterium*, *Bacillus cereus*, *Nocardia* 등이 보고되었다(1).

대부분의 방향족 탄화수소들은 한 단계나 여러 단계를 거쳐 catechol로 산화된다. Dihydroxylated된 방향족 고리는 ortho, meta-cleavage에 의해 열리고 TCA회로를 거쳐 분해된다 (6,7).

방향족 유기화합물 가운데 phenol은 200mg/l의 낮은 농도에서도 미생물의 생육을 억제하여 폐수 처리를 어렵게 하므로 비교적 높은 농도의 phenol을 분해할 수 있는 기능이 우수한 분해균주의 분리가 필요하다고 본다.

따라서 본 연구자는 토양, 산업폐수 및 하천수로부터 phenol 분해능이 우수한 균주를 선별하여 각종 방향족화합물의 이용성, 분리균주의 형태, 생리 및 생화적 특성에 대한 실험결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 사용배지

분해균주 분리를 위해 사용한 배지는 최소배지 (MgSO₄ · 7H₂O 0.2mg, CaCl₂ 10mg, FeSO₄ · 7H₂O 10mg, Yeast extract 0.2g, KH₂PO₄ 1g, K₂HPO₄ 2g, NaCl 2g, (NH₄)₂SO₄ 5g, per liter)에 Trace element 용액 (CuSO₄ · 5H₂O 0.5mg, MoO₃ 1mg, H₃BO₃ 1mg, MnSO₅ · 5H₂O 1mg, CoCl₂ · 6H₂O 1mg, NiSO₄ · 7H₂O 1mg, ZnSO₄ · 7H₂O per liter) 2ml 와 페놀 농도를 0.05%되게 첨가하여 pH7.0으로 조절 한 후 사용하였다.

2. 균주의 분리 및 선정

토양, 산업폐수 및 하천수 등의 각종시료를 멸균수에 균일하게 현탁한 다음 최소배지에 35°C에서 7일간 연속적으로 3회 이상 반복하여 집적배양 하였다. 이 배양액을 희석하여 최소고체배지 도말하여 35°C 배양기에서 72시간 배양한 후 나타난 콜로니 중 phenol 자화성이 우수한 균주를 선별하였다.

3. 분리 균주의 동정

분리한 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8)의 방법, API 20NE test 및 MIS system(MIDI Inc. USA)을 이용한 형태학적, 생화학적 특성 및 세포내 지방산 분석등은 생명공학연구소에 의뢰하여 분석하였다.

4. 균체증식 및 페놀분석 방법

균체증식은 분광광도계(UV-1240, US)로 660nm

에서 흡광도를 측정하였다. 페놀분석은 Folsom 등(9)의 방법에 따라 1.5ml micro test tube 에 2N-NH₄OH 용액 50μl와 4-aminoantipyrine 용액 25μl를 배양액 1ml와 혼합한 후 K₃Fe(CN)₆ 용액 25μl첨가한 후 2분간 원심분리(15000 X g) 하여 상층액을 취하여 510nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve에 따라 페놀양을 계산하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 선정

각종 균원 시료를 phenol이 첨가된 최소액체배지에서 35°C, 7일간 3회 이상 연속으로 집적배양하여 생육이 우수한 균주의 수를 증가시킨 후 최소 고체배지에 도말하여 25균주를 순수 분리하여 분리된 균주를 phenol이 500ppm 첨가된 최소액체배지에서 균체 증식이 빠르고 자화능이 우수한 A-M균주를 최종 선별하였다.

2. 선정균의 균학적 성상

최종 선별된 A-M균주의 경우 그람 염색에서 음성, 운동성이 없으며 전자 현미경으로 관찰한 결과 간균 형태를 보였다.(Fig.1)

생화적 특성을 조사한 결과 Urease 양성, Arginine dihydrolase 음성, Voges Proskauer test 양성, Methyl red test 음성, Citrate 및 Malonate 이용



Fig. 1. Transmission electron microphotograph of strain A-M

성 양성 등의 특징을 나타내었으며, MIS system (MIDI Inc. USA)을 이용한 세포내 지방산 조성분석을 행한 결과, 주로 C12:0, C14:0 3OH 및 C16:1 iso, C16:1 및 C15 iso 2OH, C16:1, C16:0, C17:0 cyclo, C18:1로 이루어져 있었으며, 포화지방산인 C16:0(26.8%), 불포화지방산인 C18:1 (23.1%), 포화지방산과 불포화지방산의 혼재 상태인 C16 : 1/iso 152OH(16.1)를 많이 함유하고 있었다. (Table 1)

이상의 결과로부터 A-M균주는 *Klebsiella pneumoniae* 으로 동정되었다.

3. 배양온도 및 pH의 영향

최소액체배지에 phenol 500mg/l 첨가하여 *Klebsiella pneumoniae* 균주의 생육에 미치는 배양온도의 영향을 조사한 결과 25 -40℃의 온도범위에서 생육이 관찰되었으나 최적온도는 35℃였으며 (Fig.2), pH는5.0-9.0 범위까지 균생육이 양호하였

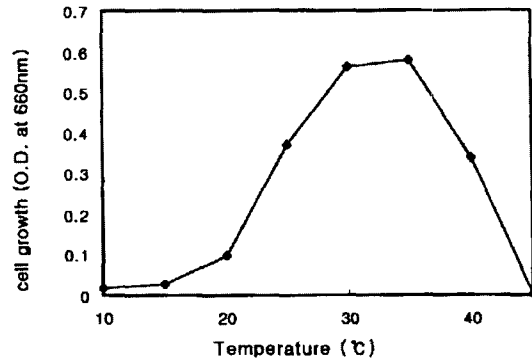


Fig. 2. Effect of temperature on cell growth of *Klebsiella pneumoniae*.

Cells were cultivated on minimal medium containing phenol 500mg/l for 2days at pH 7.0

으나 최적의 pH는 8.0이었다. (Fig.3)

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain

Morphological characteristics		
Shape	Rods
Gram stain	Negative
Cell length(μm)	0.9~1.1
Cell diameter(μm)	1.5~1.7
Motility	-
Flagella	-
Biochemical characteristics		
Oxidase	-
Urease	+
Arginine dihydrolase	-
Hydrolysis of:		
Gelatin	-
ONPG	+
Production of indole	-
Voges-Proskauer test	+
Methyl red test	-
Utilization of:		
Citrate	+
Malonate	+
Arabinose	+
Inositol	+
Glucose	+
Mannose	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+

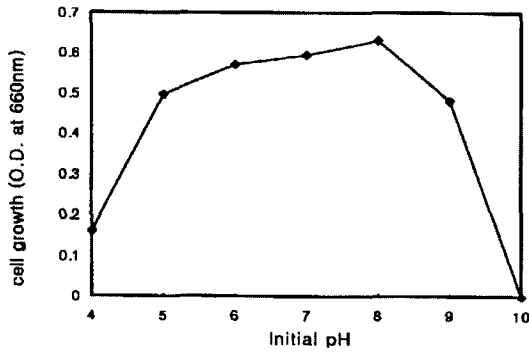


Fig. 3. Effect of initial pH on growth of *Klebsiella pneumoniae*. Cells were cultivated on minimal medium containing phenol 500mg/l for 2days at 35°C

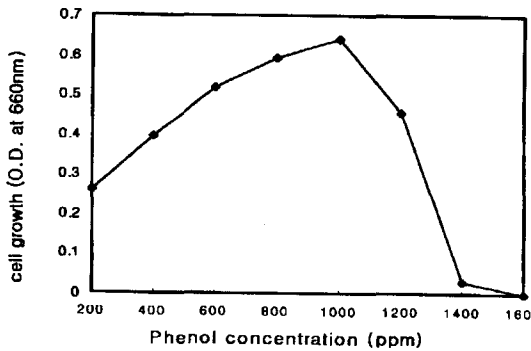


Fig. 4. Effect of phenol concentration on cell growth of *Klebsiella pneumoniae*. Cells were cultivated on minimal medium at 35°C for 2days and pH 7.0

4. 페놀 농도에 따른 균주의 영향

최소액배지에 phenol을 농도별로 첨가하여 *Klebsiella pneumoniae* 균주의 생육에 미치는 phenol 농도를 조사한 결과 1400 mg/l 이상의 농도에서는 균주의 생육이 억제되는 특성을 보였으며 최적의 phenol 농도는 1000mg/l 이었다. (Fig.4)

이러한 결과는 Masque등(4)과 Hiteregger등(10)이 보고한 *Pseudomonas* sp. 의 최적 phenol 농도가 1000mg/l 이라는 보고와 유사하였으나, 이 등(11)이 보고한 *Pseudomonas* sp.에서는 700mg/l 인 것에 비하면 비교적 높은 농도에서 분해력을

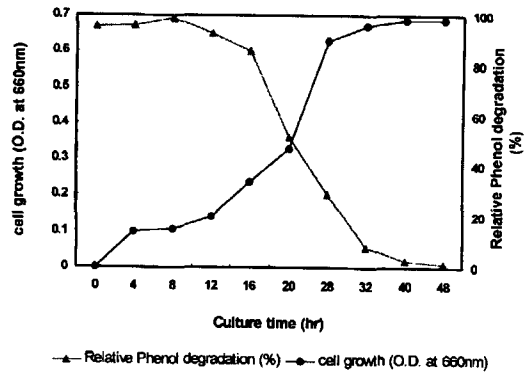


Fig. 5. Time course of cell growth and phenol degradation by *Klebsiella pneumoniae*. Cells were cultivated on minimal medium containing phenol 1,000mg/l at 35°C and pH 7.0

나타내었으며 박 등(12)이 보고한 2000mg/l 이라는 결과와는 상당한 차이를 보였다. 배양시간에 따른 균주의 성장률과 phenol 분해력을 조사한 결과 20시간부터 phenol을 자화하기 시작하여 40시간에 이후에는 98%이상 분해율을 보였다(Fig.5).

5. 각종 방향족 화합물의 영향

분리균 A-M균주의 각종 방향족 화합물의 이용에 따른 성장률은 Table 2와 같다. A-M균주는 여러 가지 방향족 화합물에 생육하였고 phenol, m-cresol, 3-methyl catechol에서 생육이 우수하였다. 이러한 결과는 박 등(12)이 보고한 *Pseudomonas* sp.와 윤등(13)이 보고한 *Acinetobacter* sp. GEM2의 결과와 유사하였다.

IV. 결 론

토양, 산업폐수 및 하천수 등의 각종시료로부터 phenol을 분해하는 미생물을 집적배양에 의해 균주를 분리하였다.

1. 분리된 균주는 *Klebsiella pneumoniae*으로 동정되었다. 균주의 생육을 위한 최적의 온도 및 pH는 각각 35°C 및 pH 8.0 이었으며, 최소배지에 유일한 탄소원인 phenol을 첨가했을 때, 농도가 1200mg/l 까지 성장하였으나 최적

Table 2. Utilization of aromatic compounds by *Klebsiella pneumonia*

Aromatic compounds	Culture time (hrs)		
	12	24	48
Phenol	++	+++	+++
Benzene	+	+	++
Benzoic acid	+	+	++
catechol	+	+	++
3-methyl catechol	+	++	+++
4-methyl catechol	+	+	+
m-cresol	++	+++	+++
Salicylic acid	+	+	+
Toluene	+	+	+
L-Tyrosine	+	+	++
xylene	+	+	++

Abbreviations : +, 0.05 < OD < 0.1 ; ++, 0.1 < OD < 0.3 ; +++ , 0.3 < OD < 0.6

Klebsiella pneumoniae growth was determined by measuring the optical density at 660nm. The strain A-M was incubated for 12hrs, 24hrs and 48hrs at 35°C, respectively. The concentration of aromatic compound was 500mg/ℓ.

의 분해 농도는 1000mg/ℓ 이었다.

- 배양 40시간 이후에는 페놀 농도의 98% 이상이 분해되었다.
- 각종의 방향족 화합물을 자화할 수 있었고 특히 phenol, m-cresol, 3-methyl catechol등에서 성장이 우수하였다.

감사의 말

본 논문은 동의공업대학 학술연구비에 의하여 수행되었으며, 연구비지원에 감사드립니다

참 고 문 헌

- Gabriel Bitton : 1994 Wastewater microbiology. John Wiley & Sons N.Y
- Gehm, H.W. and J.Bregman : 1976 Handbook of water resources and pollution control, Van Nostrand Reinhold CO. N.Y
- J.W. Abson and K.H. Todhunter : 1977 Bio-chemical and biological Engineering Science, Vol.1 Academic Press, London

- Masque, C.,M. Nolla, and A. Bordon : 1987. Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. *Biotechnol. Lett.* 9:55-660.
- Feist, C. F. and G. D. Hegeman : 1969. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida* : regulation of tangential pathway. *J. bacteriol.* 100 : 869-877
- Bayly, R.C. and G.J. Wigmore : 1973. Metabolism of phenol and cresols by mutant of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 113: 1112-1120.
- Johnson, B.F. and R.Y. Stanier : 1971. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*
- Krieg, N. R., and J. G. Holt(ed.) 1984 : *Bergeys manual of systematic bacteriology*, vol.1. The Williams & Co. Baltimore.
- Folsom, B. R. and P. J. Chapman : 1991 Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1602-1608.
- Hinteregger, C., R. Leitner, M. Loidl, A. Fersch, and F. Streichsbir. 1992. Degradation of phenol and phenolic compound by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 : 252-259.
- Bae, Hee-Sung, Young-Gyun Cho, and Sung-Taik Lee*. 1997. Degradation of Chlorophenols and Phenol Mixtures by Cooperative Activities of Chlorophenol-degrading Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnol.* Vol.7(1) : 43-48.
- 박춘호, 김용기, 오평수. 1991. 방향족 화합물이 함유된 폐수의 생물학적 처리. *산업미생물학회지* 19(6) : 631-636.
- 이창호, 오희목, 권태종, 권기석, 이성기, 서현호, 윤병대. 1994. Phenol을 분해하는 *Acinetobacter* sp. GEM 2의 분리 및 특성. *산업미생물학회지* 22(6) : 692-699.