

## Isolation and Characteristics of a Phenol-degrading Bacterium, *Rhodococcus pyridinovorans* P21

Kwang-Sik Cho, Sang-Mee Lee, Myung-Jae Shin, Soo-Yun Park, Ye-Ram Lee, Eun-Young Jang and Hong-Joo Son\*

College of Natural Resources & Life Science, Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received June 11, 2014 / Revised July 7, 2014 / Accepted July 14, 2014

The effluents of chemical and petroleum industries often contain non-biodegradable aromatic compounds, with phenol being one of the major organic pollutants present among a wide variety of highly toxic organic chemicals. Phenol is toxic upon ingestion, contact, or inhalation, and it is lethal to fish even at concentrations as low as 0.005 ppm. Phenol biodegradation has been studied in detail using bacterial strains. However, these microorganisms suffer from substrate inhibition at high concentrations of phenol, whereby growth is inhibited. A phenol-degrading bacterium, P21, was isolated from oil-contaminated soil. The phenotypic characteristics and a phylogenetic analysis indicated the close relationship of strain P21 to *Rhodococcus pyridinovorans*. Phenol biodegradation by strain P21 was studied under shaking condition. The optimal conditions for phenol biodegradation by strain P21 were 0.09% KNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.015% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, initial pH 9, and 20-30°C, respectively. When 1,000 ppm of phenol was added to the optimal medium, the strain P21 completely degraded it within two days. *Rhodococcus pyridinovorans* P21 could grow in up to 1,500 ppm of phenol as the sole carbon source in a batch culture, but it could not grow in a medium containing above 2,000 ppm. Moreover, strain P21 could utilize toxic compounds, such as toluene, xylene, and hexane, as a sole carbon source. However, no growth was detected on chloroform.

**Key words** : Degradation, phenol, *Rhodococcus pyridinovorans*, waste

### 서 론

오늘날 급속한 인구증가와 고도의 산업 발달 이면에는 인간의 활동으로 인한 대량의 폐기물 방출 및 그에 따른 환경오염이라는 부작용이 초래되고 있으며, 방출되는 폐기물의 종류 역시 해가 거듭될수록 더욱 다양해지고 있는 실정이다. 따라서 우리의 환경은 날이 갈수록 더욱 심각하게 오염되고 있으며, 결과적으로 오염된 환경을 정화하는 문제는 우리 스스로가 해결하지 않으면 안 되는 매우 중대한 당면과제가 되고 있다. 현재 토양과 지하수를 포함한 물 오염물질 관리에 대한 전 세계적인 관심이 증대되고 있으며, 독성을 가진 난분해성 유기화합물을 분해하는 미생물의 분리와 생물학적 처리에의 적용에 대한 관심 또한 증가되고 있다.

페놀은 석탄과 유류 정제, 합성수지 생산, 의약품 제조 등 다양한 산업체에서 대량으로 배출되고 있는데 구토, 두통, 호

흡곤란뿐만 아니라 돌연변이, 기형, 발암 등 인체에 심각한 문제를 야기하는 독성의 난분해성 물질이다[13]. 따라서 미국 EPA (Environmental Protection Agency) 및 유럽연합(EU)에서는 페놀을 유해물질로 분류하고 있고, 우리나라 역시 페놀 및 그 유도체들을 특정유해물질로 지정하고 있다[20].

페놀이 하천수에 유입될 경우, 0.005 ppm의 저농도에서도 특유의 불쾌취를 발생시키며, 특히 상수원수의 정수에 사용되는 염소와 결합하여 독성이 강한 클로로페놀을 형성함으로써 음용 시 인체에 나쁜 영향을 주게 된다[1].

수계에서 페놀을 제거하기 위해 전기화학적 분해, 열분해, 활성탄 흡착 등이 주로 이용되고 있지만 미생물을 이용하는 생물학적 처리법이 생태학적으로 유리하며, 특히 물 속에 존재하는 페놀이 저농도일 때 매우 효과적인 것으로 알려져 있다[14]. 페놀의 생물학적 처리에 대한 대부분의 연구는 *Pseudomonas* sp. [9, 13, 18], *Acinetobacter* sp. [2] 등의 그람음성 세균을 중심으로 수행되었으며, 그람양성 세균에 대한 연구는 소수에 불과하다.

대부분의 독성 유기화합물 분해균주는 극히 제한된 종류의 화합물만을 분해하는 낮은 기질특이성을 가지고 있으며, 또한 기질의 농도가 일정수준 이상이 되면 분해활성의 현저한 저하와 더불어 균체증식이 중단되는 것이 일반적인 현상이다[16]. 실제로 페놀은 저농도(200 ppm)에서도 미생물의 생

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5544, Fax : +82-55-350-5549

E-mail : shjoo@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

육을 저해하므로 생물학적 처리를 위해서는 분해 한계농도에 따르는 문제점을 극복해야한다[12]. 따라서 효율적인 폐놀 처리를 위해서 기본적으로 수행되어야 할 일은 고농도의 폐놀을 분해할 수 있으며, 공존하고 있는 다양한 화합물을 분해할 수 있는 다기능 균주를 분리하고, 그 특성을 조사하는 것이다 [13].

본 연구에서는 유류오염 토양에서 고농도의 폐놀을 분해할 수 있는 그람양성 세균인 *Rhodococcus pyridinovorans*를 분리한 후, 환경요인 변화에 따른 폐놀 분해조건을 조사하였으며, 폐놀 외의 난분해성 기질을 분해할 수 있는지에 대한 기질 특이성 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 배양조건

본 연구실에서 분리되어 보존 중인 P21 균주를 실험에 사용하였다. 이 균주는 자동차 정비소 주변의 유류오염 토양으로부터 분리되었으며, 폐놀을 분해할 수 있는 것으로 확인되었다. 전배양은 nutrient broth 10 ml에 균주 한 백금이를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 다른 언급이 없는 한, 폐놀 500 ppm이 첨가된 배지에 전배양액 2% (v/v)를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 3일 동안 배양하였다.

### 실험균주의 동정

실험균주의 표현형적 특성을 Manual of methods for general bacteriology [7]에 준하여 조사한 후, Bergey's manual of determinative bacteriology [8]에 따라 동정하였다. 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 실시하였다. 16S rRNA gene을 증폭하는데 사용된 primer는 *E. coli* 16S rRNA gene의 보존염기순서에 근거하여 합성된 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3') primer였다. 분석된 염기서열을 NCBI GenBank에 있는 데이터베이스를 이용하여 유사균주와의 상동성을 비교하였다[10]. 또한 염기서열을 Clustal X program을 이용하여 정렬한 후, MEGA 4 프로그램을 이용하여 실험균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

### 폐놀 분해특성 검토

본 실험에 사용된 배지는 폐놀 분해능 실험에 널리 사용하고 있는 기본배지 1(NH<sub>4</sub>Cl 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.08%, MgSO<sub>4</sub> 0.02%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.4%) [4] 및 기본배지 2(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.015%) [21]이었다. 각 배지에 탄소원으로 폐놀 500 ppm을 첨가하였으며, 전배양액 2% (v/v)를 접종하였다.

폐놀 분해에 영향을 미치는 배지조성을 조사하기 위하여 선정된 기본배지에 탄소원(fructose, galactose, glucose, glyc-

erol, lactose, maltose, mannitol, sorbitol, starch, sucrose), 질소원(KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, beef extract, malt extract, polypeptone, tryptone, urea, yeast extract), 무기염(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl, KCl, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 초기 pH (3-10) 및 배양온도(25-35°C)에 따른 폐놀 분해능을 측정하였다. 또한 최적화된 조건에서 폐놀의 농도(500 ppm-3,000 ppm)에 따른 폐놀 분해능을 측정하였다.

### 기질특이성 조사

기질특이성 실험은 액체배지와 고체배지를 이용하여 수행하였다. 액체배지의 경우, 탄소원으로 사용했던 폐놀대신 다양한 난분해성 화합물(n-hexane, chloroform, toluene, xylene)을 일정 농도씩 첨가하여 배양한 후, 실험균주의 생육도를 조사함으로써 실험균주의 유기물 분해자로서의 특성을 살펴보았다. 고체배지를 이용할 경우, 상기 화합물을 페트리 접시 뚜껑에 부착시킨 durham tube에 첨가하여 휘발상태로 공급하였다[9].

### 폐놀 분해능 및 균체 생육도 측정

폐놀의 농도는 colorimetric assay [6]를 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 배양액을 원심분리(10,000× g, 10분)하여 균체를 제거한 후, 상등액 1 ml에 50 µl의 2N NH<sub>4</sub>OH, 25 µl의 2% 4-aminoantipyrine, 25 µl의 8% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>를 첨가하여 3분간 정치하였다. 반응 상등액의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다. 폐놀의 정량은 폐놀 표준용액을 사용하여 동일한 방법으로 실험하여 작성한 표준곡선과 비교하여 산출하였다. 생육곡선을 파악하기 위한 실험을 제외하고는 폐놀 분해능을 상대 분해율(%)로 표시하였다. 균체의 생육도는 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 실험균주의 동정

P21 균주는 내성포자를 형성하지 않았으며, 운동성이 없는 그람양성의 단간균이었다. 콜로니의 형태는 원형(circular), 주변부는 사상형(filamentous), 두께는 볼록형(convex), 색깔은 분홍색이었으며, 가지를 친 기질균사는 형성하였으나 기중균사는 형성하지 않았다(Fig. 1). 또한 본 균주는 catalase를 생성하였으나 oxidase는 생성하지 않았으며, glucose 자화능은 없었다. 이러한 결과를 바탕으로 Bergey's manual of determinative bacteriology에 준하여 동정한 결과, P21 균주는 *Rhodococcus* 속에 포함됨을 알 수 있었다. 보다 정확하게 동정하기 위하여 실험균주의 16S rRNA gene의 염기서열을 결정한 후, GenBank에 등록된 유사균주와 비교분석하여 유전자 간의 상관성을 조사한 결과, P21 균주는 *Rhodococcus pyr-*

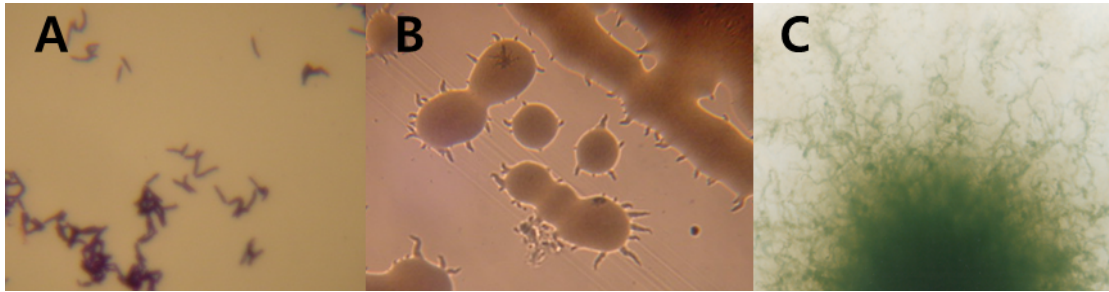


Fig. 1. Gram staining (A), colony morphology (B) and substrate hyphae (C) of isolated strain P21.

*idinovorans* PDB9<sup>T</sup>와 98.9% 상동성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 16S rRNA gene의 구조에 근거하여 유사균주들과의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 계통수를 작성한 결과(Fig. 2)에서도 본 실험균주는 *Rhodococcus* 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하며, 특히 *Rhodococcus pyridinovorans* PDB9<sup>T</sup>와 높은 유연관계를 나타내었다.

**페놀 분해특성**

P21 균주의 페놀 분해를 위한 기본배지를 선정하기 위해 문헌에서 보고된 두 가지 배지를 이용하여 페놀 분해능을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 기본배지 1에서는 4일

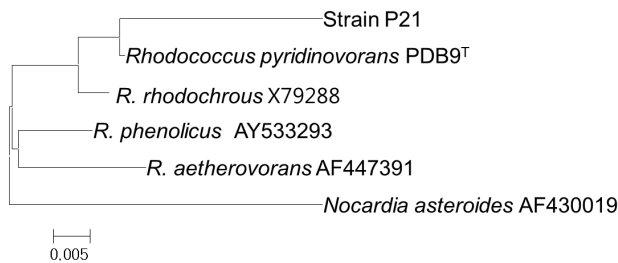


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of isolate P21 and some *Rhodococcus* species. Scale bar represents 0.005 substitution per nucleotide position.

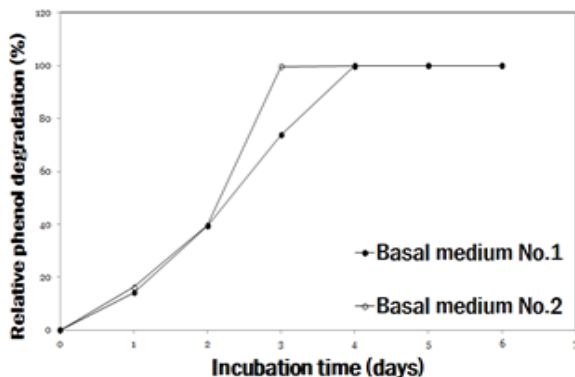


Fig. 3. Phenol degradation and cell growth in different media for the selection of basal medium.

만에, 기본배지 2에서는 3일 만에 페놀의 분해가 완료되었음을 확인하였다. 일반적으로 질소원이 두 종류이상 함유된 배지에서는 nitrogen repression이 발생하여 미생물의 생육이 지연되는 것으로 알려져 있다[3]. 기본배지 1에는 두 종류의 질소원이 함유되어있고, 기본배지 2에 비하여 그 농도가 상대적으로 높으므로 P21 균주의 생육이 다소 지체되고, 이에 따라 페놀의 분해도 지연되어 나타나는 것으로 판단된다. 이후 실험은 기본배지 2를 이용하여 수행하였다.

페놀 외 추가 탄소원의 공급이 페놀 분해능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 0.1%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 3일간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서 페놀 분해능이 가장 높았으며, 탄소원을 첨가한 경우에는 19-35%의 낮은 분해능을 나타내었다. 균체 생육도 역시 페놀 분해능과 비슷한 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Muller 등[14]이 보고한 바와 같이 추가 탄소원의 공급은 catabolite repression을 초래하고, 결과적으로 페놀 분해능이 억제 또는 지연되었음을 의미한다.

질소원이 페놀 분해능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30°C, 200 rpm에서 3일간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 질소원이 첨가되지 않은 경우, 페놀은 전혀 분해되지 않았으므로 질소원은 페놀 분해에 필수적인 인자임을 알 수 있었다. 가장 높은 페놀 분해능과 균체 생육도는 KNO<sub>3</sub>를 첨가한 배지에서 나타났다. 기본배지에 포함되어 있던 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 87%의 분해능을 나타내었으며, NaNO<sub>2</sub>, malt extract 등의 첨가는 페놀 분해를 저해하였다. 특히, 0.09%의 KNO<sub>3</sub>를 첨가한 배지에서 가장 높은 페놀 분해능과 균체 생육도를 보였으며, 그 이상의 농도에서는 페놀 분해능이 억제되는 것으로 확인되었다(미제시).

기본배지 2에 포함되어있는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 페놀 분해를 위한 최적농도는 각각 0.1%, 0.3% 및 0.015%인 것으로 확인되었다(Fig. 4). 추가적으로 기타 무기염을 0.01% 또는 0.001% 첨가하여 페놀 분해능을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 첨가는 페놀 분해능을 증가시켰으나 다른 무기염은 페놀 분해를 저해하였다.

배지의 초기 pH를 3-10으로 조절하여 30°C에서 3일간 배

Table 1. Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth and phenol degradation by *R. pyridinovorans* P21

Carbon source (0.1%)	Relative phenol degradation (%)	Cell growth ( $A_{660}$ )	Nitrogen source (0.1%)	Relative phenol degradation (%)	Cell growth ( $A_{660}$ )
None	100	1.102	None	0	0.112
Fructose	25	0.359	KNO <sub>3</sub>	100	0.656
Galactose	27	0.430	NaNO <sub>2</sub>	0	0.181
Glucose	35	0.562	NaNO <sub>3</sub>	8	0.126
Glycerol	27	0.422	NH <sub>4</sub> Cl	33	0.473
Lactose	19	0.261	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	59	0.724
Maltose	21	0.292	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	87	0.827
Mannitol	22	0.291	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	0.142
Sorbitol	24	0.331	Beef extract	52	0.662
Starch	21	0.290	Malt extract	0	0.102
Sucrose	20	0.264	Polypeptone	0	0.243
			Tryptone	53	0.533
			Urea	0	0.123
			Yeast extract	25	0.547

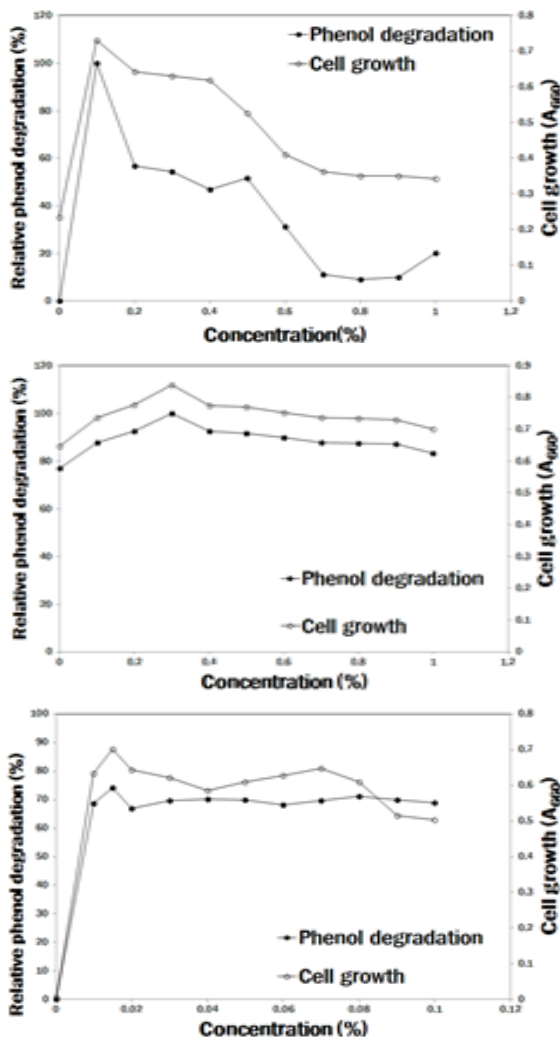


Fig. 4. Effect of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (upper), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (middle) and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (lower) on cell growth and phenol degradation by *R. pyridinovorans* P21.

Table 2. Effect of additional inorganic salt on cell growth and phenol degradation by *R. pyridinovorans* P21

Inorganic salt	Relative phenol Degradation (%)	Cell growth ( $A_{660}$ )
None	27	0.530
CaCl <sub>2</sub> 0.01%	36	0.638
NaCl 0.01%	24	0.550
KCl 0.01%	40	0.592
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001%	100	1.940
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001%	38	0.631

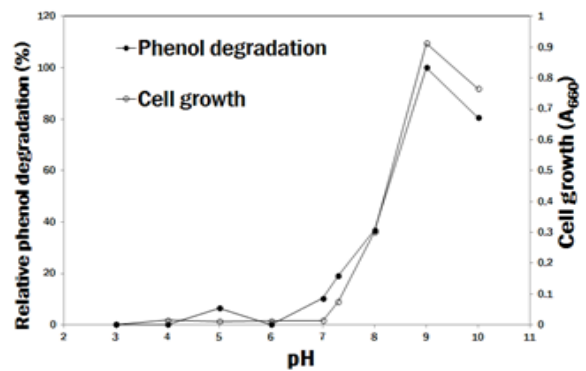


Fig. 5. Effect of pH on cell growth and phenol degradation by *R. pyridinovorans* P21.

양한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 본 실험균주는 산성 및 중성영역에서 생육하지 못하였고, pH 8-11의 알칼리 영역에서 생육할 수 있는 호알칼리성 특성을 나타내었다. 페놀의 분해 역시 균체 생육도와 동일한 경향을 보여주었으며, pH 9에서 가장 높은 페놀 분해능을 나타내었다. 따라서 알칼리성 폐수 속 페놀 분해를 목적으로 할 경우, 중화과정을 거칠 필요 없이 본 균주를 직접 적용할 수 있을 것으로 판단되며, 이러한

특성을 가진 균주로서 *Rhodococcus* sp. EL-GT가 보고되어 있다[17]. 한편, P21 균주는 25-30°C 범위에서 높은 균체 생육도와 페놀 분해능을 나타내었다(미제시).

**최적조건에서 페놀 분해**

상기에서 확립된 페놀 분해 최적조건은 0.09% KNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.015% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 초기 pH 9, 20-30°C이었다. 페놀 500 ppm을 첨가한 최적배지에서 생육곡선을 작성한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 최적화 전 기본배지의 경우, 페놀의 완전분해까지 3일이 소요되었으나 최적배지에서는 2일이 소요되었다. 따라서 본 실험을 통하여 페놀 분해를 위한 배지 및 배양조건 개선이 이루어졌음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

**페놀 농도에 따른 페놀분해능**

페놀의 농도에 따른 페놀 분해능을 조사하기 위하여 0-3,000 ppm의 페놀을 각각 최적배지에 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 본 실험균주는 500-1,500 ppm의 페놀을 유도기의 차이는 있지만 1-3일 내에 완전히 분해할 수 있었으나 2,000 ppm 이상의 페놀은 배양시간을 연장시켜도 분해할 수 없었다. 페놀의 미생물적 분해에 관련된 이전

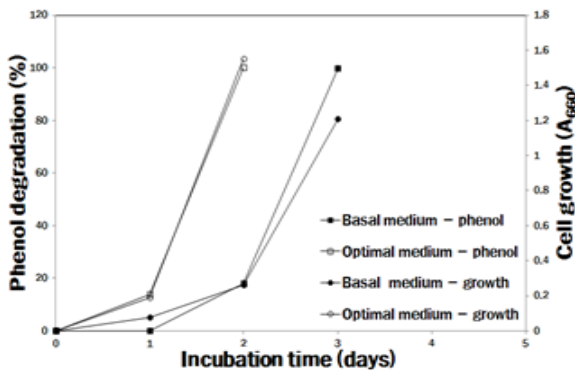


Fig. 6. Time curves of cell growth and phenol degradation by *R. pyridinovorans* P21 with basal and optimal media.

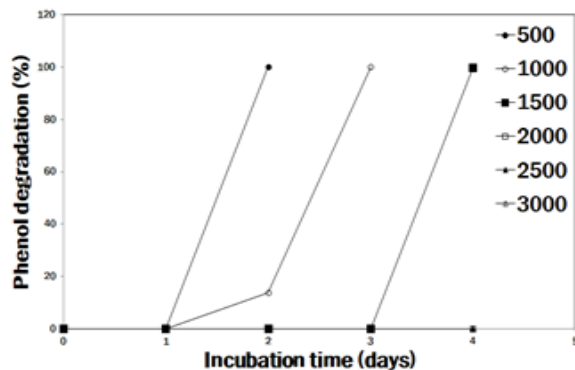


Fig. 7. Effect of phenol concentration on phenol degradation by *R. pyridinovorans* P21.

Table 3. Substrate specificity of *R. pyridinovorans* P21 on solid and in liquid media

Compound	Growth on solid medium	Concentration (%)	Growth in liquid medium (A <sub>660</sub> )
None	-	0.0	0.072
Toluene	++	0.5	0.229
		0.1	0.139
Hexane	+	0.5	1.120
		0.1	0.131
Xylene	+	0.5	0.025
		0.1	0.139
Chloroform	-	0.5	0.024
		0.1	0.042

++ good growth, + growth, - no growth.

보고들에 의하면 *Rhodococcus erythropolis* UPV-1는 800 ppm [19], *Rhodococcus* sp. DGUM2011 [15], *Rhodococcus* sp. [16], *Acinetobacter* sp. [2] 및 *Pseudomonas* sp. [13]는 1,000 ppm의 페놀이 분해한계 농도인 것으로 확인되었다. 또한 *Pseudomonas* sp. HL100은 700 ppm의 페놀이 첨가된 배지에서 전혀 생육할 수 없었으며[18], *Rhodococcus* sp. EL-GT는 1,000 ppm의 페놀은 완전히 분해하였으나 1,500 ppm은 25%의 분해율만 나타내었다[17]. 따라서 실험균주 P21은 이들 균주들보다 페놀 분해능이 우수한 것으로 판단되었다. 그러나 최근의 보고에 따르면 *Neisseria* sp. GN31는 2,000 ppm의 페놀이 첨가된 배지에서 생육할 수 있었다[11].

**기질특이성**

Toluene, hexane, xylene 및 chloroform 등 페놀 이외의 다른 탄화수소의 분해가능 여부를 콜로니의 생성(고체배지)과 660 nm에서의 흡광도(액체배지) 측정을 통하여 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 고체배지에서 toluene, hexane 및 xylene을 휘발상태로 공급했을 때, 육안으로 관찰 가능한 콜로니가 생성되었으나 chloroform의 경우, 콜로니가 생성되지 않았다. 또한 액체배지에서도 비슷한 경향을 나타내었다. Toluene, hexane은 0.1%보다 0.5%에서 균체 생육도가 더 높았으나 xylene은 0.5%에서 균체 생육이 저해되었다. 따라서 P21 균주는 페놀을 제외한 다른 탄화수소들도 분해할 수 있으며, 이들을 함유한 폐수의 정화에도 잠재적 적용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

*Rhodococcus* spp.는 토양 내에 광범위하게 분포하고 있으며, 오염된 환경을 정화하는데 유용한 특성을 가진 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 P21 균주의 보다 상세한 생리학적, 유전학적 연구와 함께 현장적응에 관련된 연구가 수행된다면 페놀함유 폐수의 생물학적 처리의 효율성을 증가시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

## References

1. Ahmed, A. M., Nakhla, G. F. and Farooq, S. 1995. Phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Sci Health A* **30**, 99-107.
2. Anselmo, A. M. and Novais, J. M. 1984. Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from an industrial effluent. *Biotechnol Lett* **6**, 601-606.
3. Arst Jr, H. N. 1995. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*: an historical perspective. *Can J Bot* **73**, 148-152.
4. Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Nagarajan, S. and Muralikrishnan, V. 2005. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *J Hazard Mater* **127**, 238-243.
5. Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J. and Christofi, N. 1998. The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol* **85**, 195-210.
6. Folsom, B. R. and Chapman, P. J. 1991. Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1602-1608.
7. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
9. Jeong, Y. C., Kim, K. N., Choi, Y. J., Yang, H. C., Song, J. S. and Seo, Y. S. 1989. Biodegradation of aromatic compounds by strains of *Pseudomonas*. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* **17**, 100-108.
10. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York.
11. Lee, H. D., Lee, M. E., Kim, H. G. and Suh, H. H. 2013. Isolation of a phenol-degrading bacterial strain and biological treatment of wastewater containing phenols. *J Life Sci* **23**, 1273-1279.
12. Marrot, B., Barrios-Martinez, A., Moulin, P. and Roche, N. 2006. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochem Eng J* **30**, 174-183.
13. Masque, C., Nolla, M. and Bordons, A. 1987. Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. *Biotechnol Lett* **9**, 655-660.
14. Muller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G. and Herrmann, H. 1996. Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. *J Bacteriol* **178**, 2030-2036.
15. Oh, J. S. and Han, Y. H. 1997. Isolation and characterization of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. DGUM2011. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* **25**, 459-463.
16. Pai, S. L., Hsu, Y. L., Chong, N. M., Sheu, C. S. and Chen, C. H. 1995. Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresour Technol* **51**, 37-42.
17. Park, G. T., Cha, M. S., Nam, G. S., Cho, S. J., Son, H. J., Lee, G. and Lee, S. J. 2002. Characterization of biodegradation of highly concentrated phenol by *Rhodococcus* sp. EL-GT. *J Environ Sci Int* **11**, 971-972.
18. Park, S. D., Kim, Y. and Lee, H. S. 1998. Isolation and characterization of denitrifying phenol-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HL100. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 303-308.
19. Prieto, M. B., Hidalgo, A., Rodríguez-Fernández, C., Serra, J. L. and Llama, M. J. 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 853-859.
20. Yang, R. D. and Humphrey, A. E. 1975. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol Bioeng* **17**, 1211-1235.
21. Zaitsev, G. M., Uotila, J. S., Tsitko, I. V., Lobanok, A. G. and Salkinoja-Salonen, M. S. 1995. Utilization of halogenated benzene, phenols, and benzoates by *Rhodococcus opacus* GM-14. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4191-4201.

---

**초록 : 페놀분해세균 *Rhodococcus pyridinovorans* P21의 분리 및 페놀분해 특성**

조광식 · 이상미 · 신명재 · 박수연 · 이에람 · 장은영 · 손홍주\*

(부산대학교 생명자원과학대학 및 생명산업융합연구원)

페놀과 각종 난분해성 화합물이 함유된 폐수를 미생물학적으로 처리하기 위하여 폭넓은 연구가 진행되고 있으나 이들 균주들은 200 ppm 이상의 고농도 페놀이 존재할 경우, 기질저해 현상에 따른 생육이 일어나지 않는 단점이 있다. 본 연구에서는 유류로 오염된 토양에서 고농도 페놀을 분해할 수 있는 P21 균주를 분리하였으며, 표현형 및 계통분류에 근거하여 동정한 결과, *Rhodococcus pyridinovorans*로 동정되었다. 본 균주에 의한 페놀분해 최적조건은 0.09% KNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.015% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 초기 pH 9 및 20-30 °C이었으며, 이 조건에서 1000 ppm의 페놀을 2일 만에 완전히 분해하였다. 1,500 ppm의 페놀은 3일 만에 완전히 분해할 수 있었으나 그 이상의 페놀은 분해할 수 없었다. 또한 본 균주는 toluene, xylene 및 hexane과 같은 독성 화합물을 이용하여 생육할 수 있었으며, chloroform에서는 생육할 수 없었다.