

Toluene내성세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 154을 이용한 방향족화합물의 분해

성은미 · 정영기* · 이호원 · 주우홍**†

경남대학교 생명과학부

*동의대학교 미생물학과

**창원대학교 생물학과

Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons by Toluene-tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 154

Eun-Mi Sung, Yong-Kee Jeong*, Ho-Won Lee and Woo-Hong Joo**†

Department of Biology, Kyungnam University, Masan, Korea

**Department of Microbiology, Dong-eui University, Pusan, Korea*

***Department of Biology, Changwon National University, Changwon, Korea*

Abstract

The biodegradative potentialities of a toluene-tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 154, isolated from waste water, were investigated. Among 16 aromatic substrates tested, cumene, cyclohexane, ethylbenzene, *p*-xylene, *m*-xylene, toluene and diphenylether were metabolized. *Pseudomonas* sp. BCNU 154 degraded aerobically toluene, ethylbenzene, *p*-xylene and cumene. With toluene competitive degradation occurred after 12 hours, but with *p*-xylene and cumene, and with ethylbenzene, 90 and 75% degradation occurred after 12 hours of incubation, respectively.

Key words – Biodegradation, *Pseudomonas*, Toluene-tolerant bacterium

서 론

극한적인 온도와 pH, 고농도의 염, oxidative agents, alcohol, 항생제등의 존재 그리고 영양부족과 같은 환경은 미생물에 있어서 극심한 스트레스로서 작용한다. 그러나 이러한 환경변화에도 미생물은 적응하여 생존하며, 특히 최근 고농도의 유기용매에서도 적응하여 사는 유기용매 내성세균도 분리 보고되고 있다[1,2,11-13].

유기용매내성 세균은 새로운 극한미생물로 미수계나 유기용매와 물이 혼재하는 이상계에서의 생물변환반응에 생촉매로서 이용될 수 있어 그 이용에 대한 연구가 활발히 진행될 것으로 예상되고 있다. 물에 불용성인 물질을 이용하여 부가가치가 높은 물질의 생산에는 현재 무기촉매를 사용하거나 미생물이나 동물기원의 효소를 사용하고 있다. 효소를 사용하는 경우 안정적인 효소활성을 유지하기 위해 효소를 고정화하여 사용하는 경우가 많다. 이러한 유기

† Corresponding author

합성반응에 유기용매 내성세균을 이용할 경우 효소 사용 및 고정화에 따른 비용을 절감할 수 있고 균주의 재이용이 가능하므로 유기용매 내성세균은 새로운 생체촉매로서 높은 활용성에 주목을 받고 있다.

한편 일부 *Pseudomonas* 및 *Nocardia*를 포함한 미생물군주들은 benzene, toluene, ethylbenzene, *p*-xylene등을 이용할 수 있다[4,7,8,16]. 이들 미생물들은 저농도의 유기용매 존재하에서 유기용매를 분해하거나 자화하여 생존이 가능하나 0.3% (V/V)이하의 농도에서만 살 수 있다. 따라서 고농도의 다양한 종류의 유기용매에서 생존이 가능하면서 분해력이 있는 균주의 탐색과 이용은 환경미생물학 분야의 한계를 극복할 수 있는 계기로서 크게 기대되고 있다. benzene, toluene, ethylbenzene 그리고 xylene (BTEX)는 휘발유의 구성물질로서 다른 구성성분들에 비해 상대적으로 물에 잘 용해되기 때문에 대부분의 토양과 지하수에서 다량으로 검출되는 오염물질이다. 또한 이 물질들은 인체에 상당히 유독한 것으로 알려져 있으며, 특히 benzene은 강력한 발암물질로 알려져 있음에도 불구하고 아직까지 안전한 형태로 처리되지 못하고 있다. 또한 자연계에서 BTEX 화합물질의 생물학적 분해에 관한 연구는 상당히 많이 이루어지고 있으나[6], 이들 대부분의 연구는 단일 화합물질을 다루고 있다. 그러나 단일 화합물에 의한 환경 오염은 매우 드물고 대부분 자연계에서는 처리가 어려운 혼합 상태로 존재하기 때문에 BTEX 혼합물의 분해에 관한 연구가 요망되고 있다. 현재로서는 BTEX를 동시에 모두 잘 분해하는 단일 균주는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다[17]. 그리고 이들 균주는 매우 낮은 농도의 BTEX에서만 생육 가능하다는 한계를 가지고 있다.

본 실험에서는 다양한 유기용매 내성균주들을 탐색하는 과정에서 고농도의 유기용매 존재하에서 생존할 수 있는 유기용매에 대한 안정된 내성 형질을 가지고 있으며, 고농도의 BTEX를 분해할 수 있는 유기용매 내성세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 154를 분리하여 보고하고자 한다. 유기용매내성세균을 환경정화에 이용하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 유기용매 내성세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 154를 공시하여 BTEX에 대한 자화능과 분해능을 조사하였다.

실험재료 및 방법

Toluene 내성 세균의 분리 및 동정

채취한 토양, 하천수를 hexane을 10%(v/v) 첨가한 각

종 액체 배지에 넣어 유기용매내성세균을 집적배양하여, toluene이 overlay된 각종 평판배지에서 toluene내성세균을 분리하였다. 분리된 toluene내성세균의 생리·생화학특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁹⁾에 준하여 조사하였다.

Toluene 내성 세균의 성장 특성 조사

UV-VIS spectrophotometer(UV-2100, Shimadzu)로 660 nm에서 탁도를 측정하여 성장률을 조사하였으며 최적 생육 온도, 최적 초발 pH를 결정하였다.

자화능 조사

KH_2PO_4 170 mg/ℓ, K_2HPO_4 435 mg/ℓ, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 668 mg/ℓ, NH_4Cl 85 mg/ℓ, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 mg/ℓ, CaCl_2 27.5 mg/ℓ, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/ℓ에 trace elements solution (nitritotriacetic acid 1.5g/ℓ, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5g/ℓ, FeSO_4 0.01g/ℓ, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/ℓ, ZnSO_4 0.1g/ℓ, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/ℓ, CoCl_2 0.1g/ℓ, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 0.01g/ℓ, H_3BO_3 0.01g/ℓ, Na_2MoO_4 0.01g/ℓ) 1 ml을 첨가한 Mineral Salts Medium (MSM) 10 ml에 각종 유기용매를 0.1% 첨가한 후 공시균주를 접종하여 각종 유기용매 자화능을 조사하였다. 유기용매를 첨가하지 않고 배양한 것을 control로 하여 비교하였다.

Benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX) 분해 및 생균수 조사

BTEX가 함유된 MSM배지에 초기 OD가 0.1 ± 0.05 가 되도록 공시균주를 접종하여 200 rpm, 30℃에서 배양한 후 gas chromatography(DS 6200, Donam)를 이용하여 BTEX 분해정도를 분석하였다. 이 때 용매만 첨가하고 공시균주는 접종하지 않은 것을 control로 하였다. 배양액중의 BTEX는 diethylether로 추출하였으며, 시료중의 BTEX를 DBTM-1 capillary column (30 m×0.32 mm I.D., 3.0 μm)으로 분리하여 flame ionization detector(FID)로 분석하였다. 분석시 injector 온도를 250℃, detector 온도를 300℃로 설정하였으며 column 온도는 35℃에서 5분간 유지 후, 35-245℃까지는 10℃/min씩 상승시켰으며 245℃에서 5분간 유지하여 최종온도는 250℃에서 3분간 유지하였다. 운반기체(N_2 gas)의 유속은 30 ml/min로 조절하여 분석하였다. 한편

생균수는 시료를 연속희석하여 평판 계수법으로 측정하였다. 이상의 BTEX 분해 및 생균수는 5회 반복 조사하였다.

결과 및 고찰

Toluene 내성 세균의 분리 및 동정

분리된 다양한 유기용매 내성세균중에서 BTEX분해능을 가진 toluene 내성세균 BCNU 154 균주는 그람염색결과 음성으로 나타났으며 간균으로 관찰되었다 (Fig. 1). BCNU 154 균주는 arginine dihydrolase 양성, oxidase 양성, catalase 양성이었으며, O-F test에서 산화적인 특성을 나타내었으며, dinitrification 양성, gelatin 액화능 음성이었다. 환원자화능에 있어서는 glucose, trehalose, geraniol, L-valine, L-arginine, L-rhamnose에 대해서 자화능을 가지고 있었다 (Table 1). 이상과 같은 결과에서 BCNU 154 균주는 *Pseudomonas* 속으로 확인되었다.

Toluene 내성 세균의 성장 특성

Pseudomonas sp. BCNU 154는 그람음성 세균이 생육불가능한 고농도의 유기용매에서도 생존가능하였다. 고농도의 toluene, ethylbenzene, *p*-xylene등이 첨가된 가운데서도 높은 성장률이 관찰되었다. 그러나 benzene에서는 성장이 미약하였다 (unpublished data). *Pseudomonas* sp. BCNU 154의 최적 생육온도는 30°C로 밝혀졌으며 각종 유기용매 존재하에서도 30°C에서 생육이 매우 활발하였고, pH의 영향을 조사한 결과 pH 6~7에서 최적 생육상태를 나타냈으며, 넓은 pH 범위에서 생존하는 것을 알 수 있었다

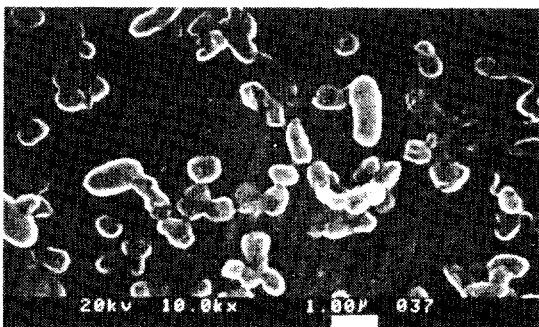


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolate *Pseudomonas* sp. BCNU 154.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of BCNU 154 strain.

Characteristic	Reaction
Aerobiosis	aerobic
Gram reaction	negative
Shape	rods
Cell length(µm)	0.6-0.9 × 1.0-1.7
Motility	-
Fluorescent pigment	-
Grow with 20% or more NaCl	-
Growth at 41°C	-
Arginine dihydrolase	+
Oxidase reaction	+
Catalase reaction	+
O-F test	oxidative
Denitrification	+
Hydrolysis of gelatin	-
Utilization of glucose	+
trehalose	+
geraniol	+
L-valine	+
L-arginine	+
β-alanine	+
L-rhamnose	+

(unpublished data). *Pseudomonas* sp. BCNU 154의 성장 곡선은 Fig. 2에 나타나 있으며, 용매를 첨가한 경우와 용매를 첨가하지 않은 경우를 비교하였을 때에 생육에는 큰 차이가 없었다.

현재 toluene 내성 세균은 Horikoshi, Cruden 그리고 Weber와 de Bont 등에 의해 보고되고 있으나[1,2,11-13], 소

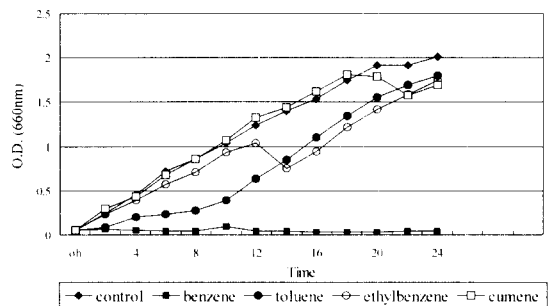


Fig. 2. Growth of *Pseudomonas* sp. BCNU 154. Cells were cultivated in LBM medium with BTEX(1%,v/v) and cumene(1%,v/v).

수의 균주만 실험에 공시되고 있다. 유기용매내성세균의 유기용매에의 적응기구는 많은 것이 배일에 싸여 있다. 현재까지 막단백질이나 인지질과 지방산의 조성 및 변화와 같은 주로 세포막의 변화[3,14,15] 그리고 toluene에 대한 pumping기작[10]만이 유기용매 내성기작으로 밝혀져 있으므로 체계적인 유기용매 내성 기작의 해명은 생물학적으로 주요한 연구과제이다. 본 실험에서 분리된 균주는 새로운 생물소재로서 유기용매내성기구 해명에 공시될 수 있을 것이다.

Toluene 내성세균 BCNU 154의 자화능

Pseudomonas sp. BCNU 154의 유기용매에서의 자화능을 조사하기 위해 0.1%의 각종 유기용매를 유일 탄소원으로 하여 배양한 후 660nm에서 탁도를 측정한 결과, toluene, p-xylene, m-xylene, cumene, diphenylether, 그리고 ethylbenzene에 대한 자화능이 다른 용매보다 좋음이 확인되었으며, toluene의 경우에는 자화능이 특히 높게 나타났다(Fig. 3).

Benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX)의 분해력

Pseudomonas sp. BCNU 154의 BTEX와 cumene에 대한 생물학적 분해력과 세포증식을 조사한 결과는 Fig. 4에서 7에 나타난 바와 같다. *Pseudomonas* sp. BCNU 154의 1g/l benzene에 대한 분해력은 미약하였다(unpublished data). 1g/l toluene이 함유된 최소배지에서 toluene은 배양 2시간 이후부터 급속히 분해되며 9시간 이후에는 거의 97%이

상이 분해되었다. 10g/l toluene을 첨가하였을 때는 9시간 이후에 급격히 분해되어, 12시간 이후에는 80% 정도의 분해가 일어난 것이 관찰되었다. 균생육은 toluene의 분해가 급격해짐에 따라 빠르게 성장을 하였다(Fig. 4). p-xylene은 2시간 이후부터 꾸준히 분해되어 12시간 이후에는 92% 정도가 분해되었다. 균생육은 배양후 6시간까지는 미약한 성장을 보이다가 6시간 이후부터 빠르게 증식하였다(Fig. 5). Ethylbenzene은 배양 6시간까지는 지속적인 분해가 일어났으나 이후 분해가 둔화되어 서서히 분해가 이루어짐이 관찰되었다. 세포성장은 배양후 4시간까지는 성장이 활발하였지만 4시간 이후부터는 생육이 둔화되었다(Fig. 6). Cumene은 초기 2시간에서 4시간에서 활발히 분해되었으며 그 이후 서서히 분해되어 12시간 이후 90% 정도가 분해되었다. Cumene 첨가시 세포성장은 배양후 지속적으로 성장하였다(Fig. 7).

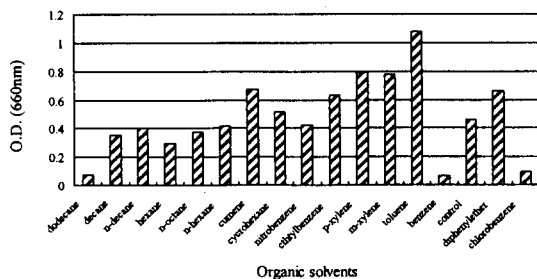


Fig. 3. Assimilation of organic solvents by *Pseudomonas* sp. BCNU 154. Cells were grown in MSB medium with solvent added at 0.1% concentration(v/v).

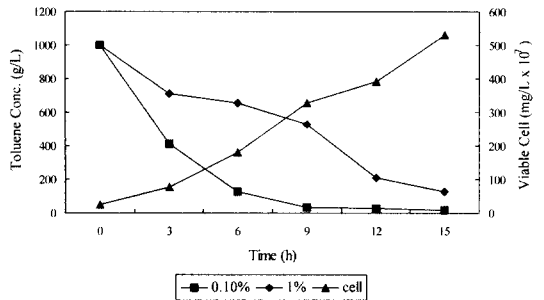


Fig. 4. Profiles of toluene utilization and cell growth. *Pseudomonas* sp. BCNU 154 was cultivated in MSB medium containing 1g/l or 10g/l of toluene.

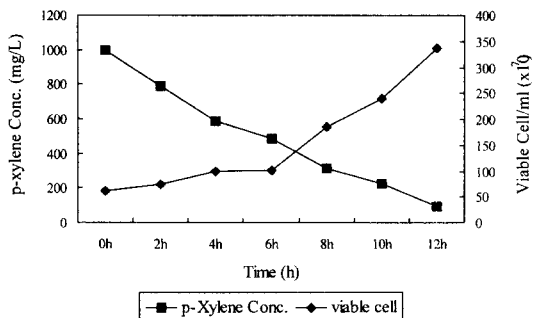


Fig. 5. Profiles of p-xylene utilization and cell growth. *Pseudomonas* sp. BCNU 154 was cultivated in MSB medium containing 1g/l of p-xylene.

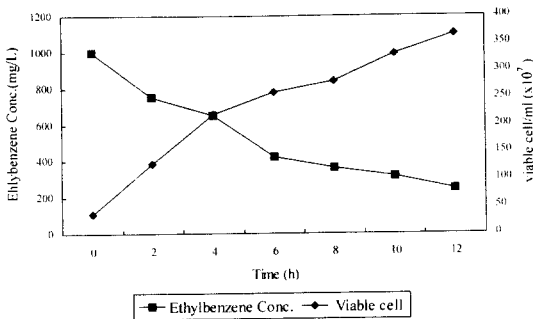


Fig. 6. Profiles of ethylbenzene utilization and cell growth.

Pseudomonas sp. BCNU 154 was cultivated in MSB medium containing 1g/ℓ of ethylbenzene.

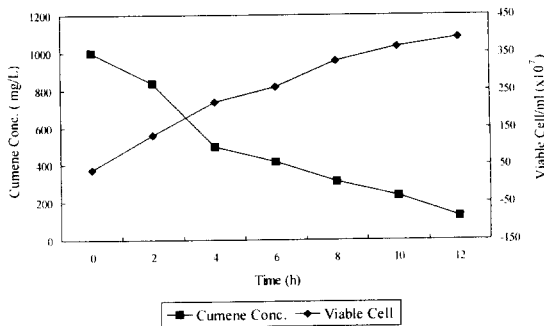


Fig. 7. Profiles of cumene utilization and cell growth.

Pseudomonas sp. BCNU 154 was cultivated in MSB medium containing 1g/ℓ of cumene.

각종 농도의 toluene 과 *p*-xylene에 대한 *Pseudomonas* sp. BCNU 154의 분해능력을 조사하기 위해, 유일한 탄소원 및 에너지원으로 toluene과 *p*-xylene을 10~50g/ℓ의 농도가 되게 첨가하였다. 각종 농도의 toluene과 *p*-xylene이 첨가된 배양매지에 탁도 0.1정도 되게 공시균주를 접종하여 30℃에서 200rpm으로 5일간 배양하여 toluene과 *p*-xylene의 농도에 따른 분해정도를 조사하였다 (Fig. 8, Fig. 9). Toluene이 10g/ℓ 첨가된 배지에서 98%의 toluene이 분해되었고, toluene이 50g/ℓ 첨가된 배지에서 배양 5일 후 89%의 toluene이 공시균주에 의해 분해됨이 확인되었다. *p*-xylene이 10g/ℓ 첨가된 배지에서 배양 5일 후 95%의 *p*-xylene이 분해되었고, *p*-xylene이 30g/ℓ 첨가된 배지에서 배양 5일 후 *p*-xylene이 60%이상 공시균주에 의

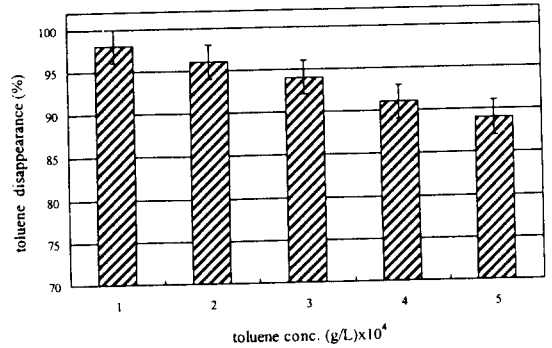


Fig. 8. Degradation of various concentrations of toluene by *Pseudomonas* sp. BCNU154.

Percentage of toluene disappearance was determined at 5 days after cultivation.

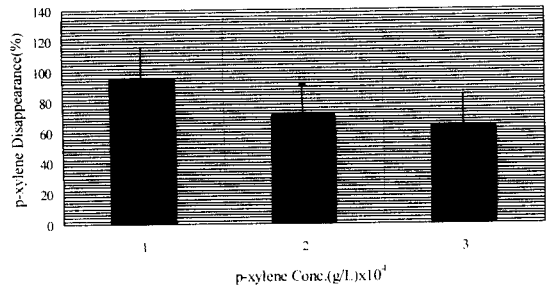


Fig. 9. Degradation of various concentrations of *p*-xylene by *Pseudomonas* sp. BCNU154.

Percentage of *p*-xylene disappearance was determined at 5 days after cultivation.

해 분해되었다.

BTEX를 분해하는 균주로 보고되고 있는 *Pseudomonas fluorescence* BE 103의 경우 benzene이나 toluene이 유일한 탄소원 또는 에너지원일 때 이를 급속히 분해하여 균체농도가 현저하게 증가한다. 그러나 *p*-xylene이 유일한 탄소원으로 공급될 때 분해가 잘 일어나지 않는다고 알려져 있다. 이는 *p*-xylene의 분해산물인 1,4-dimethylcatechol이 미생물의 생육을 억제하기 때문이다[8]. 본 실험에 공시한 균주는 *p*-xylene의 분해산물인 1,4-dimethylcatechol에 대하여도 다소 내성을 가지고 있으므로 *p*-xylene을 분해이용한다고 생각된다. 또한 *Pseudomonas putida* F1에서 *p*-xylene만 첨가하여 배양할 때는 이용이 되지 않지만, toluene이나 benzene과 함께 혼합 배양했을 경우에 분해가

된다는 보고도 있다[4]. 공시균주 *Pseudomonas* sp. BCNU 154는 *p*-xylene만을 첨가하여 배양했을 경우에도 이에 대한 높은 분해력을 나타냄이 확인되어 이후의 연구에 기대되는 점이 많다고 사료된다. 또한 본 연구에서 *Pseudomonas* sp. BCNU 154 균주는 넓은 pH 범위에서 생존이 가능하고 미생물이 생존할 수 없는 고농도의 유기용매에서도 생존하면서 동시에 고농도의 유기용매를 대한 분해능을 가지고 있음이 확인되어 미생물학적 분해가 되지 않는 고농도 유기용매를 포함하는 폐수의 생물학적 처리에 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 고농도의 유기용매는 재회수되어 재활용될 수 있으나 중정도 농도의 유기용매 폐액은 재회수 공정이 번거롭고 생물학적 처리도 어려운 실정이다. 또한 유기폐액은 단일 성분 보다 혼합되어 있는 경우가 일반적이다. 그러므로 본 실험의 기초조사 자료는 환경 공학적인 측면에서 다방면에서 많은 활용이 기대된다. 공시균주의 생존력에 다양한 분해능을 대사공학적으로 도입하는 등[11-13] 다각적인 균주육종을 통한 활용방안이 마련되어야 할 것이다.

요 약

분리된 toluene내성세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 154을 생물분해반응에 적용하고자 그 가능성을 조사하였다. 방향족화합물 16개를 대상으로 자화능을 조사한 결과 cumene, cyclohexane, ethylbenzene, *p*-xylene, *m*-xylene, toluene 그리고 diphenylether가 공시균주에 의해 자화됨이 확인되었다. *Pseudomonas* sp. BCNU 154는 toluene, ethylbenzene 그리고 *p*-xylene 그리고 cumene을 호기적으로 분해하였다. Toluene은 12시간 후에 완전히 분해되었으며, *p*-xylene과 cumene은 12시간 배양시 90% 분해되었으며, ethylbenzene은 12시간 배양시 75%가 분해되었다.

감사의 말

본 연구는 교육부 학술연구조성비(생물화학공학 97-F-10)와 학술진흥재단 학술연구조성비(중점 연구소 지원과제)에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Abe, A., A. Inoue, R. Usami, K. Moriya, and K.

Horikoshi, 1995. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by organic solvent-tolerant bacteria from deep sea. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(6), 1154-1156.

2. Aono, R., M. Ito., A. Inoue, and K. Horikoshi, 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(1), 145-146.

3. Aono, R., and H. Kobayashi, 1997. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9), 3637-3642.

4. Arvin, E., B. K. Jensen, and Gunderson, 1989. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3221-3225.

5. Bouchez, M., D. Blanchet., J. P. Vandecasteele, 1996. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 556-561.

6. Gibson, D. T., G. E. Cardini., F. C. Maseles., R. E. Kallio, 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**, 1631-1635.

7. Gibson, D. T., V. Mahadevan., J. F. Pavay, 1974. Bacterial metabolism of para- and meta-xylene : oxidation of the aromatic ring. *J. Bacteriol.* **119**, 930-936.

8. Gibson, D. T. and V. Subramanian, 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, pp.181-252, In Gibson, D. T. (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York.

9. 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. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.

10. Isken, S., and J. A. M. de Bont, 1996. Active Efflux of Toluene in a Solvent-Resistant Bacterium. *J. Bacteriol.* **178**(20), 6056-6058.

11. Lee J. Y., J. R. Roh, and H. S. Kim, 1994. Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene mixture. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1146-1152.

12. Lee J. Y., K. H. Jung, and H. S. Kim, 1995. Amplification of toluene dioxigenase genes in a hybrid *Pseudomonas* strain to enhance the biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene mixture. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 488-494.

13. Lee J. Y., K. H. Jung., S. H. Choi, and H. S. Kim, 1995. Combination of tod and tol in redesigning of metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of benzene, toluene, and *p*-xylene mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2211-2217.

14. Weber, F. J., S. Isken, and J. A. M. de Bont, 1994. *Cis/Trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**, 2013-2017.
15. Weber, F. J., and J. A. M. de Bont, 1996. Adaptation mechanism of microorganisms to the toxic effects of organic solvent on membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **1286**, 225-245.
16. Worsey, M. J., and P. A. Williams, 1973. Metabolism of toluene and xylene by *Pseudomonas putida* mt-2: evidence for a new function of the Tol plasmid. *J. Bacteriol.* **124**, 7-13.
17. Zylstra, G. J., W. R. MacCombie, D. T. Gibson., B. A. Finette, 1988. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1; Genetic organization of the tod operon. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1498-1503.