

토양에 축적된 염소화 페놀화합물의
bioremediation기술 개발

Development of the bioremediation technology for soil
contaminated by chlorinated phenols

1995. 2.

한국과학기술연구원
부설 생명공학연구소

제 출 문

한국과학기술연구원 부설
생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “토양에 축적된 염소화 페놀화합물의
bioremediation기술 개발”사업의 최종보고서로 제출합니다.

1995년 2월 일

주관연구기관명: 한국과학기술연구원 부설

생명공학연구소

연구 책임 자: 오희목(생명공학연구소 선임연구원)

연 구 원: 윤병대(생명공학연구소 책임연구원)

성문희(")

권기석(생명공학연구소 선임연구원)

이정기(")

이성기(")

구영환(생명공학연구소 연구원)

이창호(")

김성빈(")

요 약 문

I. 제 목

토양에 축적된 염소화 페놀화합물의 bioremediation기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

PCP (pentachlorophenol)로 대표되는 염소화 페놀화합물 (chlorinated phenols)은 생물체에 대한 광범위한 영향력으로 인하여 농약제조, 섬유산업, 페인트산업, 목재보존 등에 폭넓게 사용된 살충제의 주성분이다. 염소화 페놀화합물은 이러한 광범위한 독성 및 잔류성으로 인하여 환경오염물질로 주목되고 있다. 환경오염물질의 분해 및 무독화 처리 방법중 미생물의 탁월한 분해능을 이용한 bioremediation (생물학적 오염현장처리)기술은 신규 환경처리기술로 지하수나 토양과 같은 오염지의 환경정화에 효과적으로 적용될 수 있는 유용한 기술로 주목되고 있다.

따라서, 본 연구는 자연계로 부터 염소화 페놀화합물 분해 미생물을 탐색하고, 토양중의 농도에 대한 정성·정량분석기술을 확립하며, 오염지로 부터 효과적으로 무독화 또는 분해처리할 수 있는 경제적이고 환경학적으로 안전한 bioremediation기술 개발을 목적으로 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 분해 미생물 탐색

자연계의 토양으로 부터 염소화 페놀화합물을 분해하는 미생물을 탐색한다. 분리 균주의 분해특성을 조사하며, 분해능이 우수한 분리 균주는 계대 또는 동결건조하여 ampoule에 보존한다.

2. 염소화 페놀화합물의 분석

오염토양에서 염소화 페놀화합물의 추출법을 확립하고, UV Spectrophotometry, Gas chromatography, GC/Mass spectrometry에 의한 정성·정량분석법을 확립한다.

3. 오염지 조사

전국 각지의 염소화 페놀화합물 오염예상지역을 대상으로 토양시료를 채취하여 오염도를 조사하고, 오염현장의 물리·화학적 제반 특성에 대한 기초조사를 수행한다.

4. Bioremediation기술 개발

오염지의 토양을 대상으로 bench-scale의 slurry bioreactor에 의한 처리를 수행하면서 접종 미생물의 영향, 무기 및 유기 영양염류의 효과, 환경요인의 영향에 대하여 조사한다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 분해 미생물 탐색

염소화 페놀화합물 분해균주의 탐색법을 확립하고, 전국각지의 오염예상 토양시료로부터 60여 균주를 분리하였다. 100 - 3,000 µg/ml의 PCP 분해능이 있는 우수균주(부1, 부34 등)를 2차로 선별하여 동정 및 특성조사를 수행중에 있다. 분리균주는 glycerol에 액침 장기보존과 고체배지에 계대보존하였다.

2. 염소화 페놀화합물의 분석

오염지 토양에 포함된 염소화 페놀화합물을 hexane을 용매로 추출하였다. UV Spectrophotometry, Gas chromatography, GC/Mass spectrometry에 의한 정성·정량분석법을 확립하였다.

3. 오염지 조사

전국의 오염예상지로 부터 토양시료를 채취하여 분석하여 오염지를 확

인하였다. 오염된 토양은 50 - 100 $\mu\text{g/g}$ wet soil의 농도로 PCP가 존재함을 알 수 있었다. 인천 공단부근의 오염지로 부터 오염토양을 운반하여 slurry- phase reactor에 의한 오염물 처리에 시료로 이용하였다. 미확인된 전국의 각 토양 및 지하수를 조사한다면 PCP의 더 높은 오염농도를 발견할 수 있을 것이다.

4. Bioremediation기술 개발

가. 우량균주에 의한 PCP분해능

12종의 실험세균을 500 또는 1000 ppm의 PCP를 포함한 액체 또는 고체 최소배지에서 배양하면서 PCP의 생분해를 측정하였을 때 80 - 90%의 분해 효율을 나타내었다.

나. Slurry reactor에 의한 오염토양 처리

실험세균의 혼합배양 및 토착미생물과 실험세균의 혼합배양 그리고 토착미생물만의 배양에 의한 slurry-phase bioremediation에서 오염토양의 처리는 8일 내지 16일경에 PCP가 완전분해됨을 확인하였다. Slurry-phase bioremediation의 최적화 및 실험세균의 특성을 더 연구한다면, 오염물질의 효율적인 처리와 *in situ* bioremediation의 성공적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

Summary

Title: Development of the bioremediation technology for soil contaminated by chlorinated phenols

The chlorinated phenols represented as pentachlorophenol (PCP) have been known to be one of the major environmental pollutants because of their extensive use and toxicity against the organisms. Also, there has been a growing demand for more effective treatment of those compounds in the environment in the viewpoints of human health and clean environment. Many concerns have recently been focused on the natural removal of chlorinated phenols from the contaminated sites by biodegradation.

The bioremediation using the microbial activity to degrade and/or to detoxicate toxic compounds is believed to be more effective and environmentally sound technology for the treatment of contaminated soil, sediment, aquifer and ground water. For the purpose of development of the bioremediation technology for soil contaminated by chlorinated phenols, this study focused on the isolation and detection of bacteria capable of degrading chlorinated phenols, the establishment of analytical methods for chlorinated phenols, the investigation of the contaminated sites, and the development of the effective treatment devices or processes such as a slurry-phase technique.

Through this study, 60 bacterial strains capable of growing on a minimal medium containing PCP were isolated from the soil samples

collected throughout the land, and among them, 12 active isolates were finally selected for the further studies on the biodegradability and for the use in the slurry-phase treatment of contaminated soil. The chlorinated phenols in soil and water samples were extracted by the method of methanol-hexane extraction and analyzed by a spectrophotometry, gas chromatography, or GC/Mass spectrometry. One site near the Incheon industrial complex was identified as a PCP-contaminated place. The soil brought from the PCP-contaminated site contained 50 - 100 µg/g wet soil of PCP and was treated with the active bacterial isolates in a bench-scale slurry reactor. PCP in the contaminated soil was decreased up to 90% at 8 days after inoculation of the isolates and completely disappeared within 16 days.

Consequently, it is believed that PCP-contaminated sites may be more in many other regions and can be effectively and economically restored to the clean environment by using the proper bioremediation technologies.

Contents

Chapter 1. Introduction	11
1. Biodegradation of chlorinated phenols	11
A. Aerobic degradation	11
B. Dehalogenation under anaerobic conditions	14
2. Bioremediation of chlorinated phenols	15
Chapter 2. Materials and Methods	18
1. Materials	18
A. Strains	18
B. Media	18
2. Methods	19
A. Isolation of PCP-degrading bacteria	19
B. Contaminated sites	19
C. PCP extraction from soil	19
D. Flask microcosm	19
E. Bench-scale bioreactor	22
Chapter 3. Results and Discussion	23
1. Quantitative analysis of chlorinated phenols	23
2. Contaminated sites	25
3. Characteristics of the isolates	25
4. Analysis of PCP-contaminated soil	28
5. Flask microcosm	28
6. Bioremediation by a slurry-phase technique	35
Chapter 4. Conclusion	39
References	40

목 차

제 1 장 서 론	11
1. 염소화 페놀화합물의 생분해	11
가. 호기적 분해	11
나. 혐기적 분해	14
2. 염소화 방향족화합물의 bioremediation	15
제 2 장 재료 및 방법	18
1. 실험재료	18
가. 실험균주	18
나. 배지	18
2. 실험방법	19
가. PCP 분해세균의 탐색 및 균주보존	19
나. 오염지 조사	19
다. 오염토양에서의 PCP 추출	19
라. Flask microcosm에서의 실험 및 균주선택	19
마. Bench-scale의 slurry bioreactor에 의한 처리	22
제 3 장 결과 및 고찰	23
1. 염소화 페놀화합물의 정량	23
2. 오염지 조사	25
3. 분리균주의 특성	25
4. PCP 오염토양의 분석	28

5. Flask microcosm에서 PCP분해	28
6. Slurry reactor에 의한 bioremediation	35
제 4 장 결 론	39
참 고 문 헌	40

제 1 장 서 론

PCP (pentachlorophenol)로 대표되는 염소화 페놀화합물 (chlorinated phenols)은 생물체에 대한 광범위한 영향력으로 인하여 농약제조, 섬유산업, 페인트산업, 목재보존 등에 폭넓게 사용된 살충제의 주성분이다. PCP는 0.6 mg/l로 대부분의 어류에 치명적인 급성 독성물질로서 phenol에 비해 약 40배의 독성을 보이고, 페놀화합물은 염소화 정도가 클수록 상대적 독성도 커지는 경향을 나타낸다 (Liu and Kwasniewska, 1981). 또한 미국 환경청의 특정 유해화학물질 (priority pollutant)목록에 수록되어 환경으로 부터 우선적 처리를 요하는 물질로 분류되고 있다. 염소화 페놀화합물은 이러한 광범위한 독성 및 지하수, 토양 등에 잔류성으로 인하여 환경오염물질로 주목되고 있다.

환경오염물질의 분해 및 무독화 처리방법 중에서 미생물의 탁월한 분해능을 이용한 bioremediation (생물학적 오염현장처리)기술은 물리·화학적 처리방법에 비하여 2차오염의 염려가 없어 환경학적으로 안전하며, 경제적이고, 광역적으로 적용될 수 있다는 장점으로 인하여 신규 환경처리기술로 앞으로 지하수나 토양과 같은 오염지의 환경정화에 효과적으로 적용될 수 있는 유용한 기술로 주목되고 있다.

Bioremediation기술은 오염지의 특성상 case by case로 적합한 기술을 개발하여야 하고, 미생물학, 환경공학, 지학, 수문학, 토양학 등 다방면의 지식이 종합적으로 적용되어야 하는 등의 어려움이 따른다. 따라서 염소화 페놀화합물을 surrogate로 하여 개발된 경제적이고, 생태학적으로 안전하며, 환경학적으로 바람직한 bioremediation기술은 각종 오염물질 및 오염환경에 적합한 환경정화기술의 순차적 개발을 위한 기초자료로 이용될 수 있다.

1. 염소화 페놀화합물의 생분해

가. 호기적 분해

염소화 페놀화합물을 호기적으로 분해하는 세균은 두 부류로 구분된다 (Häggbloom, 1992). 첫째, 단염소화, 이염소화 페놀 분해균주는 염소화 정도가 높은 페놀화합물을 분해하지 못한다. 일반적으로 단염소화, 이염소화 페놀은 *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia* 속 (genus)의 세균에 의한 분해가 대표적이며, phenol monooxygenase에 의하여 chlorocatechol로 산화되고, 고리분열이 일어난다. Chlorocatechol을 분해하는 대부분의 미생물은 *ortho*-분해경로를 통하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 1).

둘째로, 오염소화 페놀과 같이 염소화 정도가 높은 페놀의 분해균주는 단염소화, 이염소화 페놀을 분해하지 못한다. 이들 세균은 *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* 등의 속에 포함된다. 대부분의 PCP분해균주는 사염소화, 삼염소화 페놀을 분해할 수 있으나, 단염소화, 이염소화 페놀에 대해서는 활성이 극히 낮은 것이 보통이다. PCP의 분해경로 중에서 *Rhodococcus chlorophenolicus*와 *Mycobacterium fortuitum*은 membrane-bound된 *para*-hydroxylase에 의하여 PCP를 tetrachloroquinone으로 분해하고, 이어서 dechlorinating hydroxylation과 세차례의 환원적 dechlorination에 의하여 1,2,4-trihydroxybenzene을 생산하고 최종적으로 CO₂로 무기질화한다 (Fig. 2). 또 다른 분해경로로서 *Flavobacterium* sp.은 PCP를 수산화에 의하여 tetrachlorohydroquinone으로 분해하고 환원적 탈염소화에 의하여 2,6-dichlorohydroquinone으로 전환시키고 결국에는 CO₂로 무기질화한다.

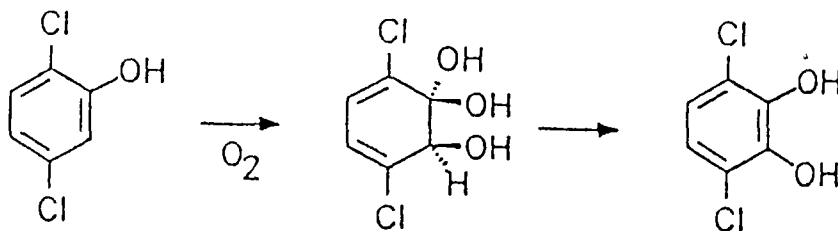


Fig. 1. Proposed oxidation of 2,5-dichlorophenol by *Pseudomonas putida* F1.

결론적으로 단염소화, 이염소화 페놀의 경우 고리분열 후 염소치환기가 제거된다. 이와는 달리 폴리할로겐화 페놀의 생분해에서 할로겐 치환기는 hydroxylation 또는 환원적 탈염소화에 의하여 차례로 제거되어, 모든 또는 대부분의 할로겐 치환기가 제거된 후에 고리분열이 일어난다.

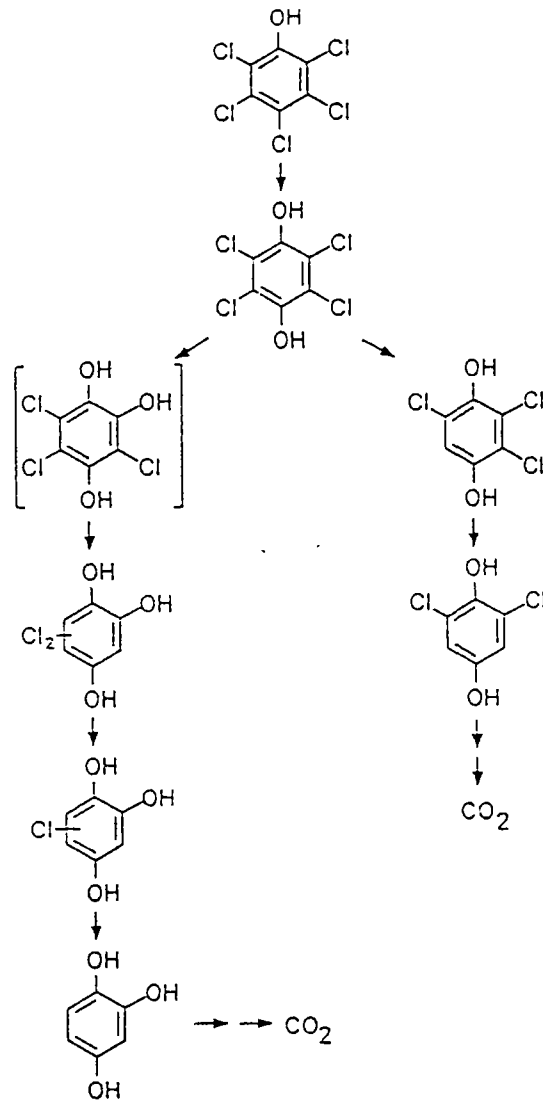


Fig. 2. Pathways for aerobic degradation of pentachlorophenol.

나. 혐기적 분해

Reductive dehalogenation은 한개의 염소원자 (Cl)가 수소원자 (H)로 치환되는 것이다. 특히, hydrolytic dehalogenation은 한개의 할로겐이 수산기 (hydroxyl)로 치환되는 것이다. 세균에 의한 탈염소화는 chlorobenzenes, chlorinated biphenyls, chlorobenzoates, chlorophenols, chlorocatechols 그리고 chloroanilines 등의 방향족 탄화수소에서 보고되고 있다. 아직까지 반응의 기작에 대해서는 상세히 알려져 있지 않으며, 균주분리의 어려움으로 인하여 순수배양 보다는 다양한 세균의 공간적 집합체로서 생리적으로 서로 연계되어 화학적 전환을 일으키는 consortium에 의존하여 연구하고 있다 (Neilson, 1990). 이러한 반응의 특성으로는 첫째, 반응의 특이성 (specificity)으로 PCP로부터 접종한 inoculum에 따라 특정 congener만이 생산되며 (Fig. 3), 둘째, 염소화의 정도가 높은 congener가 일반적으로 좀더 용이하게 탈염소화 된다. 이것은 탈염소화가 기질의 대사작용과 짝을(연계된) 이루는 에너지-생산 반응이라는 가설과 일치한다 (Mohn and Tiedje, 1990).

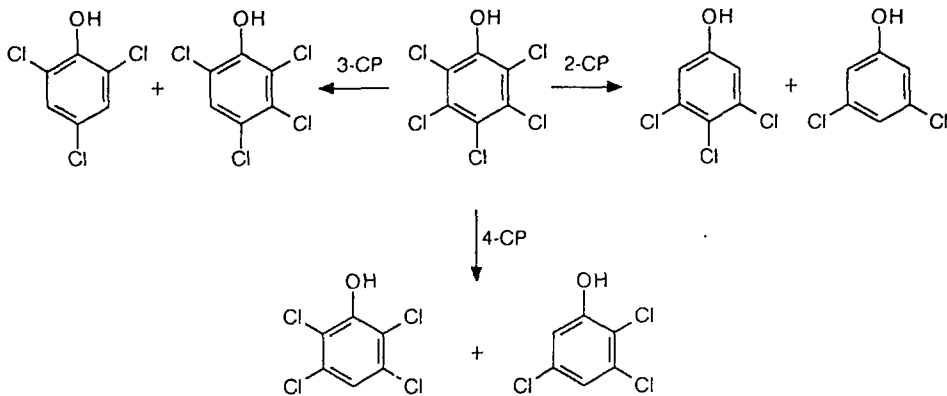


Fig. 3. Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol by cultures enriched with 2-chloro-, 3-chloro, and 4-chlorophenol.

2. 염소화 방향족화합물의 bioremediation

미생물의 탄소순환 능력을 이용하여 오염환경으로 부터 유해화합물을 무독화하거나 분해할 수 있는 bioremediation기술은 1940년대에 원유산업시설로 오염된 지역의 정화에 이용되기도 하였으나, 본격적 이용은 1972년 미국 텍사스의 셸정유회사에서 원유폐기물의 처리를 위한 bioremediation기술의 대규모적인 현장적용 사례가 있었다. 1989년 알래스카 해안가에서 유조선 사고에 의해 유출된 원유를 처리하기 위하여 미국 환경청에서는 대규모의 생물학적 처리를 수행하여 효능을 입증하였으며, 이후 bioremediation기술의 상업적 이용과 기술개발에 대한 본격적인 연구가 수행되고 있는 실정이다.

Bioremediation은 오염물질을 분해할 수 있는 미생물의 활성을 증진시켜 달성될 수 있으므로 현장에 적응된 미생물을 이용하거나, 특별한 대사기능을 갖는 미생물을 첨가하여 오염물질의 분해를 유발하거나 증진시키게 된다. 이때 특별한 대사기능을 갖는 미생물은 자연계로 부터 탐색하거나 근래에 급속히 발전한 유전공학의 핵심기술인 유전자재조합기술을 이용하여 만들어 지기도 한다. 이와같이 개발된 균주 및 처리기술은 산업폐수의 효율적 처리는 물론이고, 강이나 호수의 저니 (sediment), 지하수, 토양 등의 오염현장에서 독성오염물질의 분해 및 무독화처리기술 개발에도 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

Bioremediation기술의 연구는 반응조의 설계, 영양염류와 산소의 전달 시스템, 미생물 균주의 탐색과 육종, 혐기적 처리시스템 등의 개발 분야에 주안점을 두고 있다. 오염현장에 적용되는 bioremediation기술은 크게 3가지로 분류될 수 있다. 첫째는 현장처리로 지하수 포화대에서 오염된 토양의 물을 펌핑한 후 처리하여 재순환시키거나, 미생물과 영양염류를 오염지로 투과시켜 분해하거나, 오염토양에 공기를 주입하는 등의 처리이고, 둘째로 *ex situ* solid-phase 기술은 오염 토양에 물, 영양염류, 미생물을 첨가하여 처리되도록 하는 것이다. 셋째로 *ex situ* slurry기술은 생물반응기나 못 등에서 영양염류와 미생물 접종을 투여하고 적절히 혼합하며 통기함으로서 미생물 반응을 원활히 해주는 처

리법으로 미생물의 활성을 증가시키기 위한 적절한 환경조건의 유지가 필요하게 된다.

미국, 독일 등의 선진국에서는 이미 1970년대에 사용금지되었지만 호수나 강의 저부에 축적된 대표적인 유기독성오염물질인 PCBs (polychlorinated biphenyls)의 경제적이고 환경학적으로 안전한 bioremediation기술 개발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다 (Rhee *et al.*, 1993a, 1993b). 또한 목재 처리장 부근의 PCP로 오염된 토양 및 지하수의 bioremediation기술 개발에 관한 연구가 이루어지고 있다. 실제로 *Flavobacterium* sp., *Rhodococcus chlorophenolicus*, *Rhodococcus* sp. 등의 미생물은 폐수중에 함유된 PCP에 분해능이 있는 것으로 보고되었으며 (Kiyohara, 1982), Saber and Crawford (1985)는 토양으로 부터 분리된 *Flavobacterium* sp.의 균주는 유일한 탄소 및 에너지원으로 공급된 PCP의 구성 탄소중 73-83%를 CO₂로 변환시키고, 모든 염소가 염소이온으로 유리됨을 보고하였다.

또한, white-rot fungus인 *Phanerochaete* spp.는 PCBs, 염화아닐린, 다중환 방향족 탄화수소와 같은 인공합성물질과 PCP를 무기질화 시킬 수 있음이 보고되었다 (Lamar and Dietrich, 1990; Lamar *et al.*, 1990). Topp and Hanson (1990)은 오염지의 영양염류 분포상태에 따라 *Flavobacterium* sp. 세균의 생존력이나 PCP분해능이 다르게 나타남을 보였다. 영양제한, 세균의 표현형변이, PCP 분해능에는 상호연관이 있고, 황산염, 질소원 또는 PCP가 제한된 상태에서 배양된 세포는 glucose의 첨가에 의해서 PCP의 분해율이 급속히 증가됨을 보였다. 즉, 특정 영양염류의 제한 또는 첨가에 의하여 오염물질 분해의 최적조건을 마련할 수 있음을 보였다.

염소화 페놀화합물의 bioremediation에 의한 정화에 관한 연구로서 방부제로 오염된 토양의 slurry법에 의한 bioremediation은 페놀류와 분자량이 낮은 PAHs (polyaromatic hydrocarbons)등은 잘 분해하지만 PCP와 분자량이 큰 PAHs는 토착 미생물에 의하여 분해가 용이하지 않았으나, pH를 7.1로 조절함에 의하여 비교적 신속히 분해작용이 진행되었다 (Mueller *et al.*, 1991). Slurry

법에 의한 처리는 기계적인 혼합에 의한 미생물의 대상화합물에 대한 접촉을 원활하게 해주고, 최적 환경조건의 유지가 가능하다는 점에서 solid-phase 처리보다 효과적인 것으로 알려져 있다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 실험균주

본 연구에 사용된 균주는 전국 각지에서 채집한 토양으로부터 분리한 60여 균주에서 12 균주를 선택하였다.

나. 배지

실험에 사용한 균주들을 배양하기 위해 mineral salts (MS) 배지를 사용하였으며, 고체 및 액체 최소배지에 탄소원인 PCP 를 각 농도별로 첨가한 후 가압멸균하여 실험세균을 접종하였다. 배지조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of the mineral salts (MS) medium for PCP-degrading bacteria

Components	Enrichment PCP medium (g/L)	Low-buffer PCP medium (g/L)
NaNO ₃	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄	0.65	0.065
KH ₂ PO ₄	0.17	0.017
MgSO ₄	0.1	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.1
PCP	0.1-3.0	0.1-3.0
Bromothymol blue		0.02
Agar		10 - 15
pH	7.3	7.4

2. 실험방법

가. PCP 분해세균의 탐색 및 균주보존

PCP를 분해하는 실험세균은 Stanlake and Finn (1982), Saber and Crawford (1985)의 방법을 참조하여, 오염 예상지역의 토양을 채집한 후 각 토양 1-3 g을 100 - 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 PCP가 포함된 MS액체배지에 접종하여 1주 이상 30°C에서 120 rpm으로 배양하였다. 배양된 토양혼합 배지의 시료는 100 - 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 PCP가 첨가된 MS 고체배지에 도말배양함으로써 분해능이 우수한 균주를 선발하였다. 선발된 균주의 집락은 동일한 고체배지와 액체배지에서 계대배양하면서 안정적인 분해능을 검사하였다. 최종적으로 선택된 균주는 15%의 glycerol로 액침하여 -70°C에 보존하였다 (Sambrook *et al.*, 1989).

나. 오염지 조사

목재 처리장 부근, 농경지, 하천의 저니, 해안가 등의 오염 예상지역으로 부터 시료를 채취하여 염소화 페놀화합물의 종류, 농도 등에 대한 정성·정량분석을 실시하고, 아울러 오염지의 수분함량, pH, 산화환원전위 등의 기초 환경조건도 조사하였다.

다. 오염토양에서의 PCP 추출

오염지 토양에 포함된 염소화 페놀화합물은 Mueller *et al.* (1991)의 방법을 활용하여, 토양으로 부터 hexane을 용매로 추출하였다 (Fig. 4).

라. Flask microcosm에서의 실험 및 균주선택

PCP가 500 - 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가된 MS 고체배지에서 배양된 한 집락을 PCP가 같은 농도로 첨가된 10 ml의 MS 액체배지에 접종하여 예비 배양하였다. 각 실험세균의 배양액 0.1 ml을 500 - 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 PCP가 포함된 각각의 250-ml Erlenmeyer flask의 50 ml MS 액체배지에 접종하여 4주간 30°C에서 120

Place 5 g of soil in a 125-ml flask and add 15 ml methanol and acidify to pH = 2 with 36 N sulfuric acid, shake (150 rpm) for 4 hours at room temperature



Methanol/Soil slurry



Charge slurry with 10 ml of 0.1 M HCl/0.1 M KCl and filter through a Whatman no. 1 filter paper. Wash filter with distilled water and hexane (5.0 ml)



Filtrate



Extract filtrate 3 times with 5 ml volume of hexane



Aqueous phase



Hexane phase



Pass hexane extracts through a 0.2 micron Teflon filter to remove precipitate



PCP fraction

Fig. 4. Flow chart for the extraction of PCP from contaminated soils and sediments.

rpm으로 배양하면서 실험세균의 성장과 PCP의 분해감소, pH의 변화를 측정하였다. 이때 사용한 실험세균은 토양에서 분리된 60여 균주 중에서 PCP의 분해능이 우수한 12 균주를 선택하여 실험하였다.

1) UV-VIS spectrophotometry

Saber and Crawford (1985), Stanlake and Finn (1982)의 방법을 활용하여, 318 nm에서는 PCP의 잔류량을 측정하였으며, 680 nm에서는 cell density의 흡광도를 측정하였다.

2) GC, GC/Mass분석

PCP의 농도를 정성·정량적으로 조사하기 위하여 Standard Methods (1989), Mueller et al. (1991)의 방법을 참조하여 분석을 실시하였다 (Table 2).

Table 2. Operational condition of a gas chromatograph for the analysis of chlorinated phenols

1. Injector temp.	200°C
2. Column	DB-1 capillary 0.32 mm x 30 m
Initial temp.	80°C (3 min)
Increase	8°C/min
Final temp.	150°C
3. Detector	FID
Temp.	250°C
4. Gas	
Hydrogen	40 psi
Carrier gas (N ₂)	70 psi
Air	55 psi

마. Bench-scale의 slurry bioreactor에 의한 처리

1) Slurry reactor의 균주 접종

4주간 PCP (500 ppm, 1000 ppm)배지에서 배양된 12개의 우량균주를 $1.0 \times 10^8 - 1.6 \times 10^5$ /ml의 농도로 접종하였다.

2) Slurry reactor의 조건

Reactor	멸균 tap water	멸균 soil	Tap water	Soil	미생물 접종 (12 strains)	PCP농도
A	5 L	600 g				50 - 100 (µg/g wet soil)
B	5 L	600 g			12 strains	
C			5 L	600 g		
D			5 L	600 g	12 strains	

3) 배양조건

Slurry의 토양함량은 12%이고, 온도는 28 - 30°C, 초기 pH는 6.7 - 7.7로 유지하였다. Stirring mode는 6 min 작동 후 3 min 정지가 반복되도록 조절하였다.

4) PCP 분해도 조사

접종후 2 - 3 일 간격으로 미생물의 밀도, pH, PCP농도 변화를 조사하며, gas chromatography에 의하여 중간대사산물의 발생을 추적하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 염소화 페놀화합물의 정량

PCP를 포함한 페놀계 화합물의 gas chromatogram은 Fig. 5와 같으며, PCP의 RT (retention time)는 22.2 mim로 생분해에 의한 PCP의 감소 및 잔류량 측정에 이용하였다. Fig. 6은 UV scanning에 의한 PCP의 표준곡선으로서 각 농도에 따른 최대흡광도를 나타내고 있다.

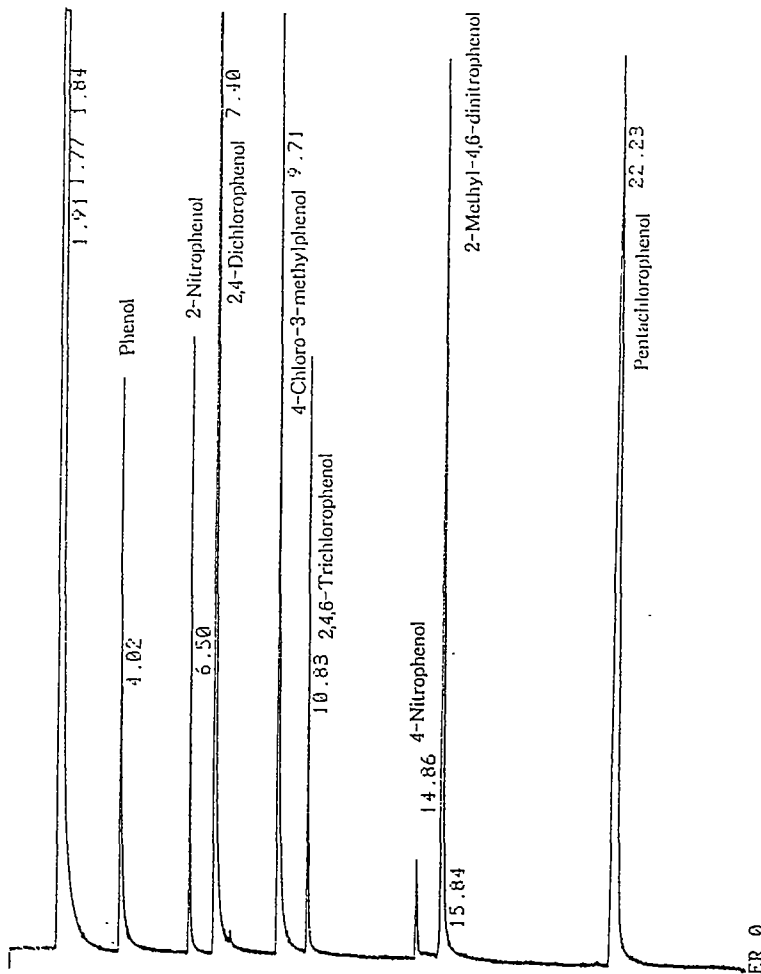


Fig. 5. Gas chromatogram of phenols mixture.

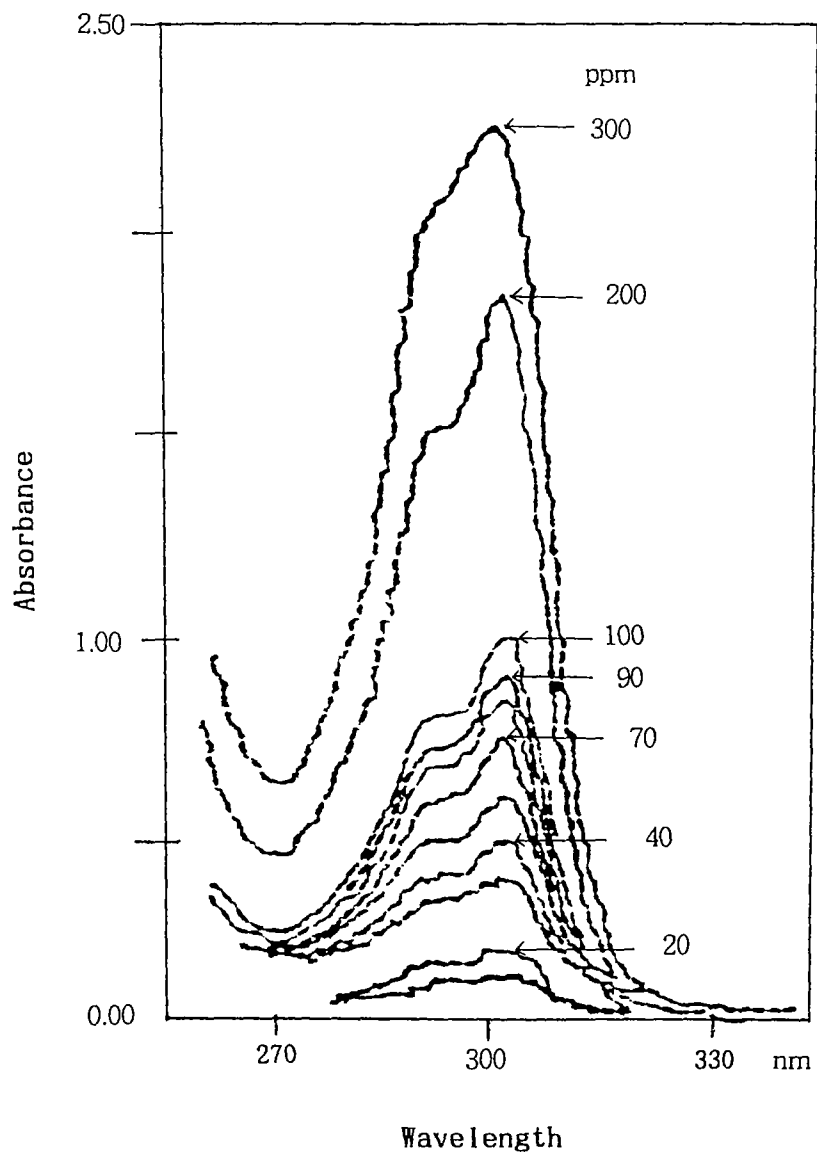


Fig. 6. Absorption spectra of PCP solutions prepared for the standard curve. PCP concentration was indicated on each spectrum.

2. 오염지 조사

전국의 오염예상지로 부터 토양시료를 채취하여 분석하였다. 시료채취 지점으로는 속초 및 아야진 (3 sites), 부산 목재야적장 (2 sites), 여수 (2 sites), 군산 (3 sites), 대전 대화공단 (1 site), 그리고 인천 (4 sites) 등이었다. 채취된 시료를 분석한 결과 인천 공단부근의 염소화 페놀화합물 오염지를 확인하였다.

3. 분리균주의 특성

Table 3의 60여 균주는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 PCP 분해능을 나타냈으며, 이들 중에서 선택한 12종의 실험세균은 모두 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 PCP 분해성능을 가지고 있었다 (Table 4).

고체배지상의 집락의 형태는 Fig. 7와 같이 볼 수 있으며, bromothymol blue (pH indicator)가 포함된 PCP 고체배지에서 부1과 여수2 균주는 yellow color를 나타내면서 집락을 형성하였다. 이는 균주들이 PCP를 잘 분해하고 있음을 뜻한다. 다른 균주들도 MS 고체 및 액체배지에서 대부분 yellow color를 나타내었다. 부3-3 균주는 4주간의 배양 중에 노란색이 나타나지 않았으며, 그외 11 균주는 모두 배지가 노란색으로 변화하였다. 이는 catechol 2,3-dioxygenase에 의해 무색의 catechol이 yellow products (hydroxymuconic semialdehyde)로 변화된다는 Prosser (1994)의 review와도 일치된다. 그러므로 yellow color가 나타나지 않은 균주는 PCP의 이용방법에 새로운 경로가 있는 것으로 추정된다. 12 균주 중에는 분해성능이 아주 우수한 균주 (부34, 부1, 1000-2)도 발견하였다. 이와같이 높은 농도의 PCP를 분해하는 것으로 확인된 균주에 대한 세포학적인 특성이 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

Table 3. Characteristics of PCP-degrading natural isolates

Bacterial strains	Biodegradability of PCP ($\mu\text{g/ml}$)	Color of colonies	Bacterial strains	Biodegradability of PCP ($\mu\text{g/ml}$)	Color of colonies
부3-1	1,000	Y*	부3v	100	Y
#부34	3,000	Y	부472	100	Y
1000-1	1,000	Y	부12	100	Y
#1000-2	2,000	Y	부4-2	100	Y
1000-3	1,000	Y	부47	100	Y
#부3-2	1,000	Y	부3-12	100	Y
#부471	1,000	Y	부27	100	Y
#부2#	1,000	Y	부473	100	Y
#부3-4	1,000	Y	부3-11	100	Y
#부3-3	1,000	NY**	부48	100	Y
#500-1, 2, 3, 4	1,000	Y	0781	100	Y
여11	500	NY	부37	100	Y
부17	500	NY	부3-13	100	Y
여22	500	NY	부3-14	100	Y
군산718	500	Y	부2-a	100	Y
0782	500	Y	#부1	2,000	Y
부31	200	NY	부11	100	Y
부3-0	200	Y	부3-I	100	Y
부1-11	200	NY	부3-II	100	Y
부1-12	200	NY	여1-a	100	Y
부3-b	200	Y	여1-b	100	Y
부4v	200	Y	여2-11	100	Y
부3-c	200	Y	여2-13	100	Y
부4-3	200	Y	여2-14	100	Y
부3-3	200	Y	여22-1	100	Y
부3-1	200	NY	여22-2	100	Y
부3-2	200	NY	여12	100	Y
여2	200	Y	여21	100	Y

* yellow color in PCP media contained bromothymolblue.

** nonyellow color in PCP media contained bromothymol blue.

excellent strains used in this experiment

Table 4. Characteristics of selected 12 strains capable of degrading PCP

Bacterial strains	Cell Growth (A_{660})		pH		PCP decrease (%)	
	48 hrs	144 hrs	48 hrs	144 hrs	48 hrs	144 hrs
부1	0.19	0.23	7.05	7.74	68	82
1000-2	0.68	0.57	6.33	7.13	68	75
부34	0.13	0.16	7.02	7.75	68	73
부471	0.09	0.05	6.69	8.81	46	85
부3-2	0.11	0.06	7.22	8.66	46	75
부2*	0.08	0.08	6.92	7.60	61	71
부3-4	0.05	0.10	6.90	8.10	59	63
500-1	0.5	0.52	7.59	8.38	46	78
500-2	0.10	0.13	6.00	8.44	55	78
500-3	0.43	0.47	7.25	8.48	56	80
500-4	0.44	0.39	7.49	8.61	66	80
부3-3	0.12	0.10	6.89	7.62	56	65

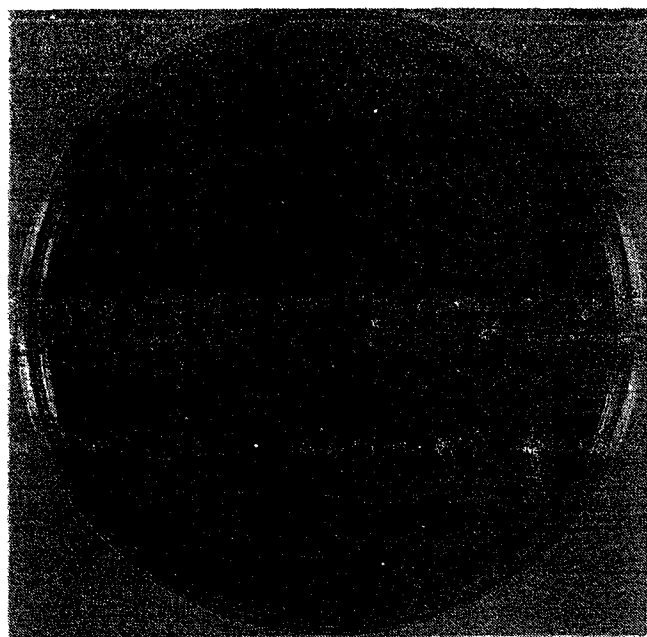


Fig. 7. Colonial morphology of a PCP-degrading bacterium isolated from soil sample.

4. PCP 오염토양의 분석

PCP의 오염이 예상되는 부산, 여수, 군산, 대전, 인천, 속초, 아야진 등의 토양을 수집하여 PCP를 추출하여, GC와 GC/Mass로 분석하였다. 추출물의 Mass spectrum은 Fig. 8에서 보는 바와 같으며, 50 - 100 $\mu\text{g/g}$ wet soil의 PCP로 오염되어 있음을 알 수 있었다. 미국 등의 오염지 경우(10,000 ppm) 보다는 매우 낮은 농도이긴 하지만 이와 같이 PCP 오염지의 확인은 앞으로 bioremediation에 의한 오염지처리의 측면에서 볼 때 의의가 매우 크다고 할 수 있다. 국내의 미조사된 토양, 저니 등의 오염가능지역을 더 조사한다면 이들의 오염농도는 더 높아질 수도 있다.

5. Flask microcosm에서 PCP분해

각 실험세균 중에서 대표적인 균주의 PCP의 분해 및 cell density는 Fig. 9와 같다. PCP 1,000 ppm을 분해하는 1000-2 균주는 500 ppm의 PCP를 분해하는 500-4 균주에 비해 분해율과 세균성장이 높게 나타났으며, 두 균주가 80%의 PCP를 분해할 때에는 cell density가 감소되는 현상을 나타내었다. PCP의 감소율을 비교한 경우 500 ppm에서 부471이 비교적 높게 나타났으며, 1,000 ppm 농도에서는 부1 균주가 가장 높았다 (Fig. 10).

Fig. 11A - 11B는 12균주의 PCP 최대 분해효율과 그 경과시간을 나타낸 것으로, 부1 균주는 144 h에 82%, 216 h에는 90%의 분해효율을 나타내었고 1000-2 균주는 286 h에 80%, 452 h에는 90%의 분해효율을 나타내었다. 부34는 286 h에 82%의 분해효율이 나타난 이후 더 감소되지 않았다. 부3-2와 부3-3은 각각 75%와 65%의 낮은 분해효율을 나타내었고, 그외의 균주는 80 - 85%의 분해효율을 286 h - 452 h에 나타내었다. 선택된 실험세균은 모두 PCP에 대하여 높은 분해효율을 나타내었으며, PCP가 높은 효율로 분해되는 그 시간 전후에는 cell density도 전반적으로 감소되어 PCP의 높은 분해율과 세균성장곡선은 상관성이 있음을 알 수 있다. 특히, 48 h, 144 h 대의 PCP분해율, pH 및 세균의 성장 (Table 4)은 실험균주의 대사작용에 뚜렷한 변화가 있었음을 의미한다. 본 실험의 균주는 Rutgers *et al.* (1993)의 실험결과 보다는 분해효율이 월등히 우수함을 알 수 있었고, 실제 bioremediation에 이용할 수 있음을 입증하였다.

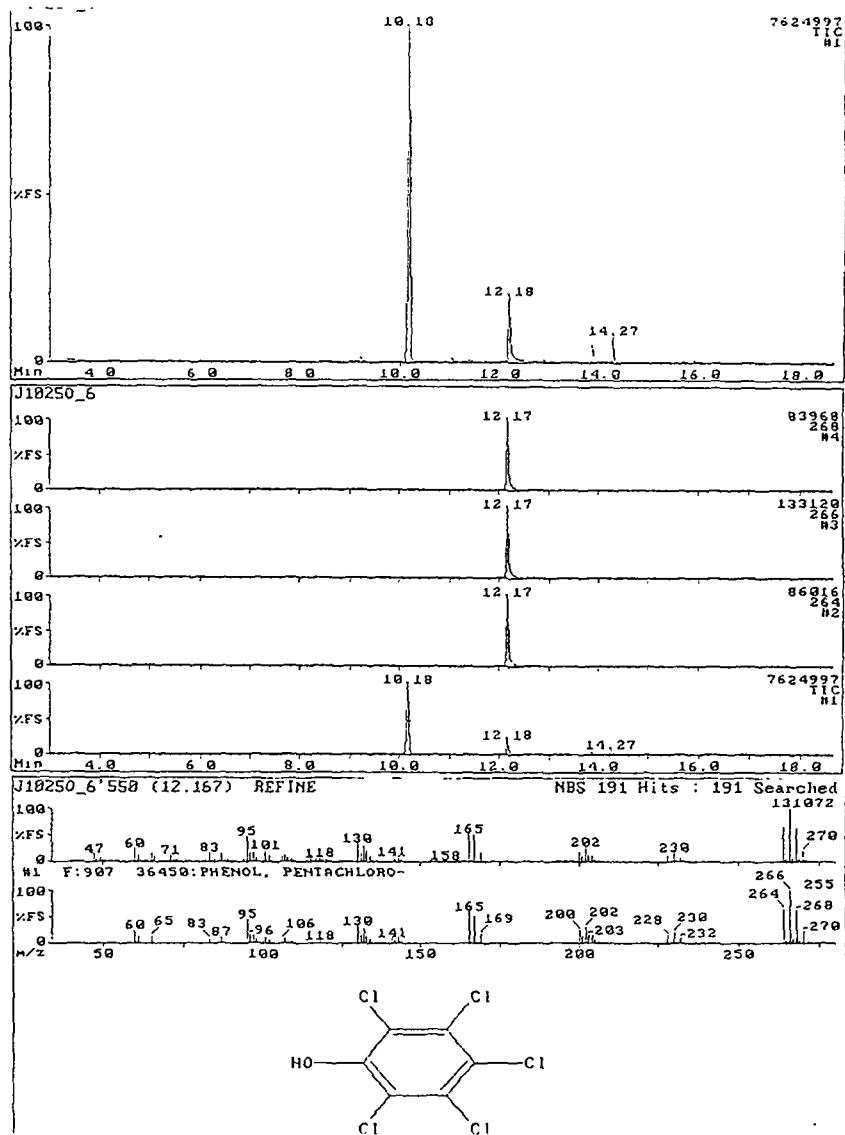


Fig. 8. GC/Mass spectrum of pentachlorophenol extracted from the contaminated soil. GC conditions: capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D.; temperature was programmed from 100 to 250°C at a rate of 10°C/min. Mass conditions: scan time, 0 - 9 sec; type ionization, E.I positive; source temperature, 200°C; trap current, 200 µA; resolution, unit.

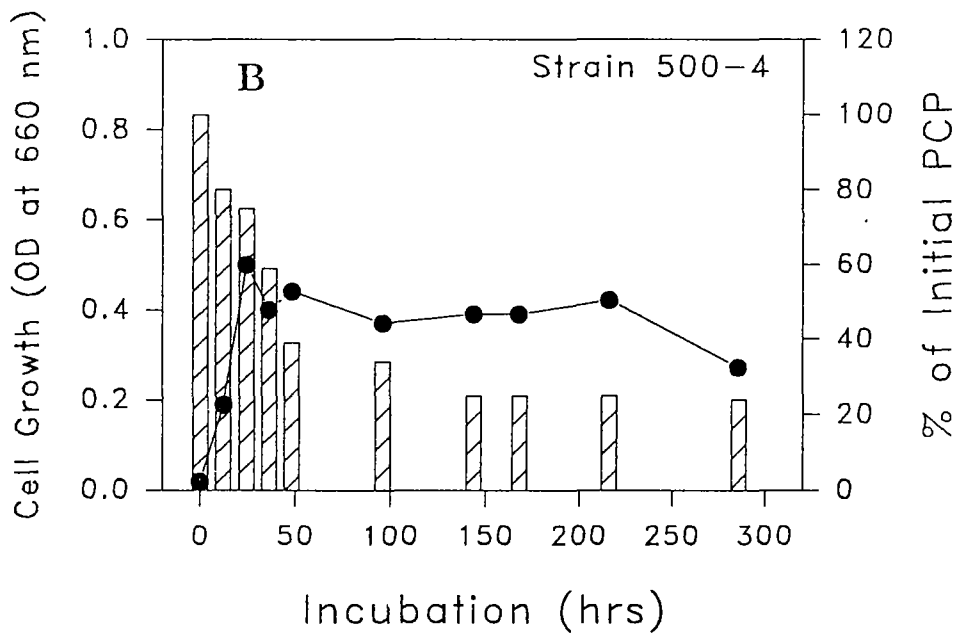
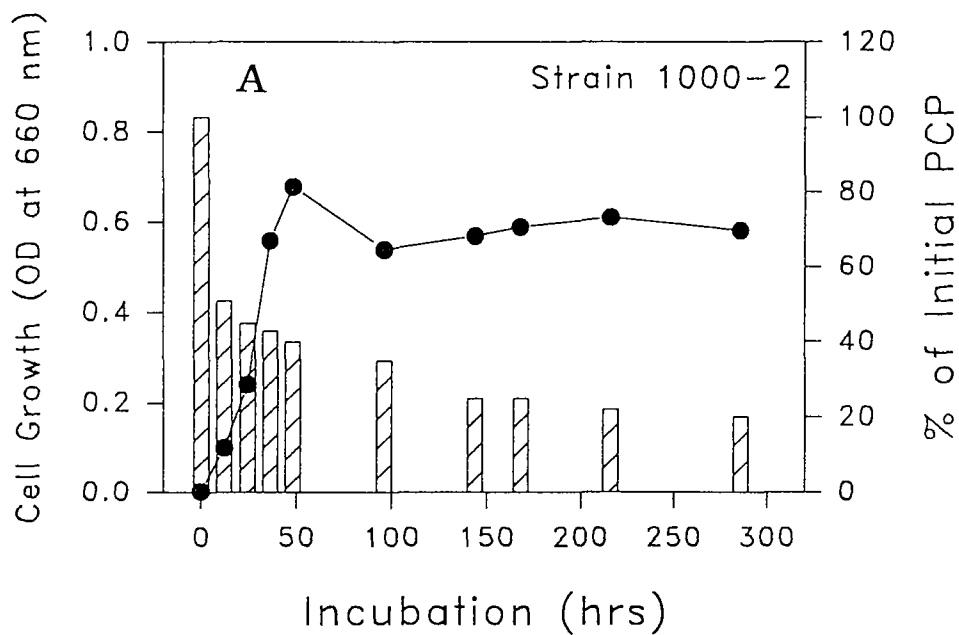


Fig. 9. Time course of cell growth (curve) and PCP remaining (bar) in a flask containing 1000 ppm of PCP and Strain 1000-2 (A) or 500 ppm of PCP and Strain 500-4 (B).

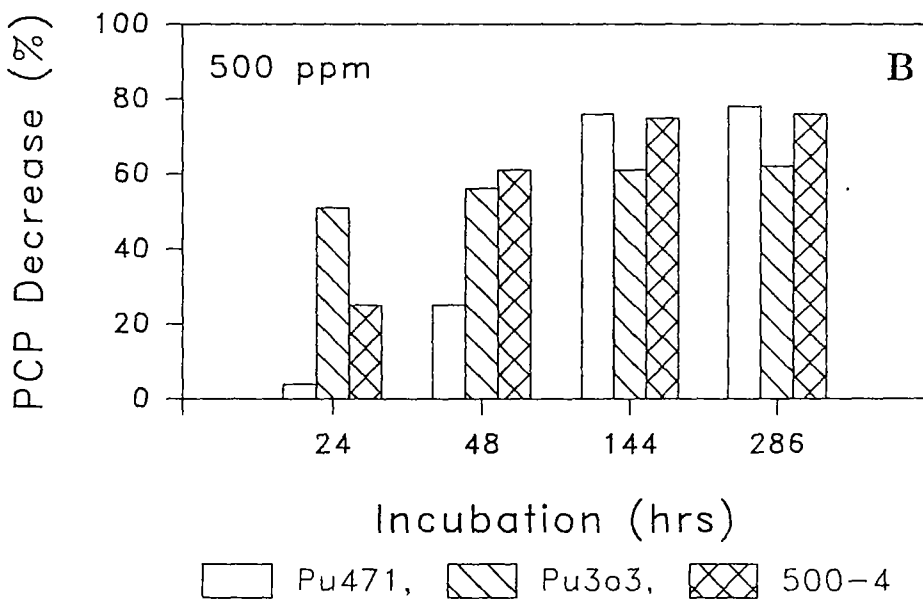
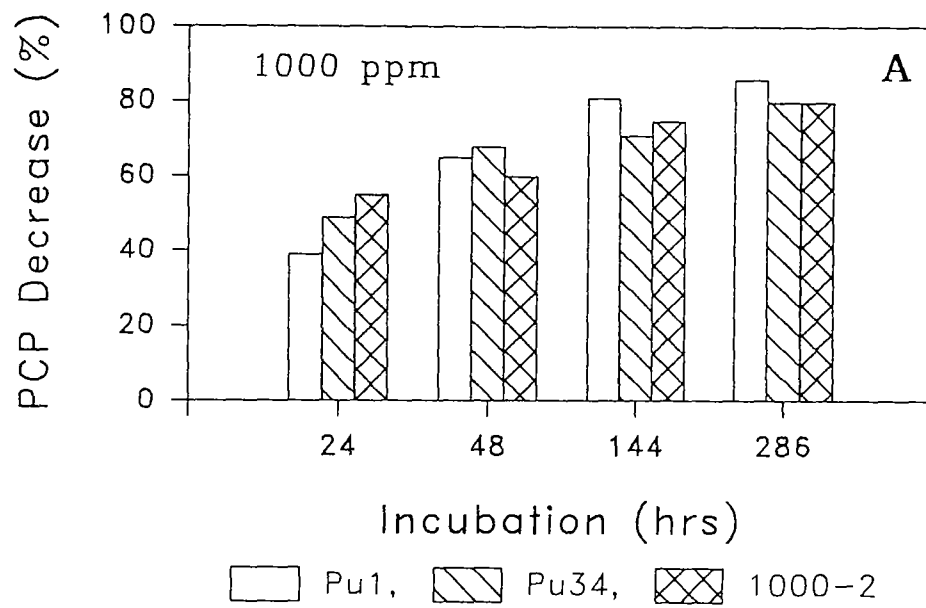


Fig. 10. Comparison of the efficiency of PCP decrease among the treated strains in the flask microcosm containing 1,000 ppm (A) or 500 ppm (B) of PCP.

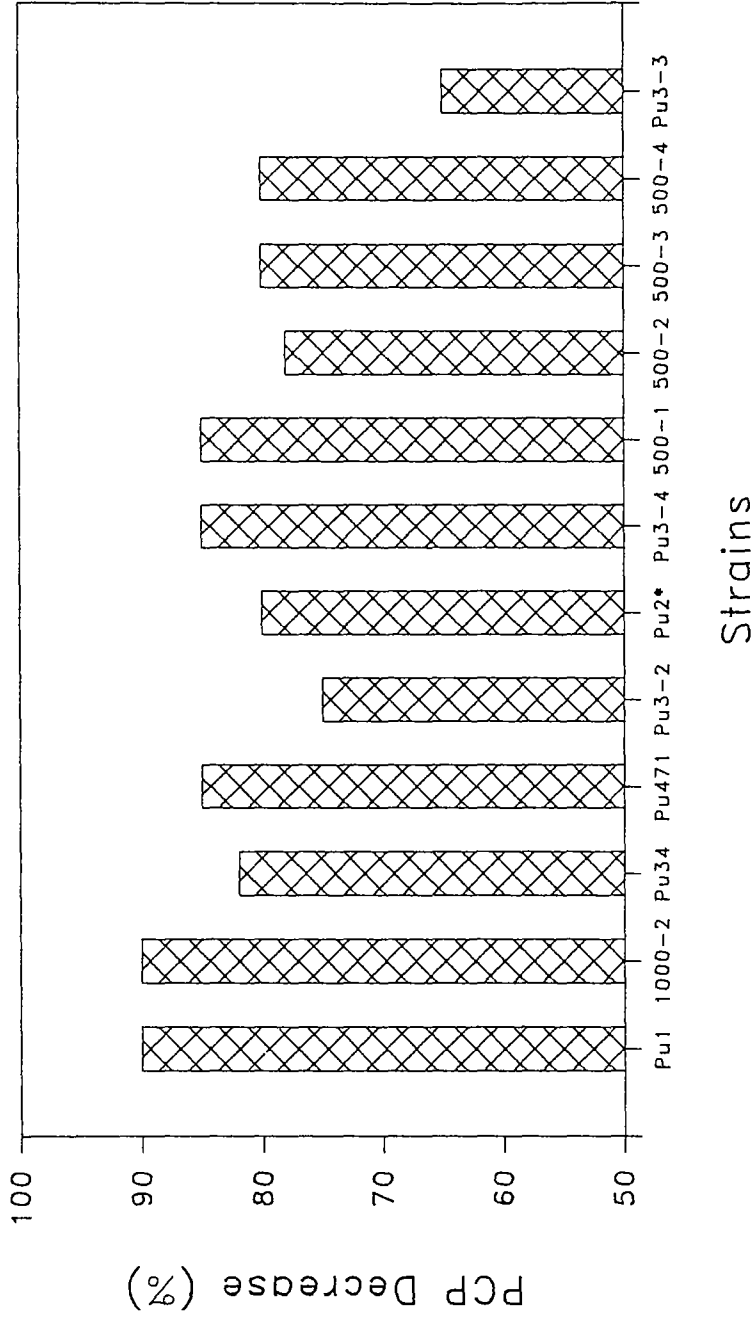


Fig. 11A. Maximal PCP-degrading efficiency in flask microcosms. All cultures were incubated for 696 hours.

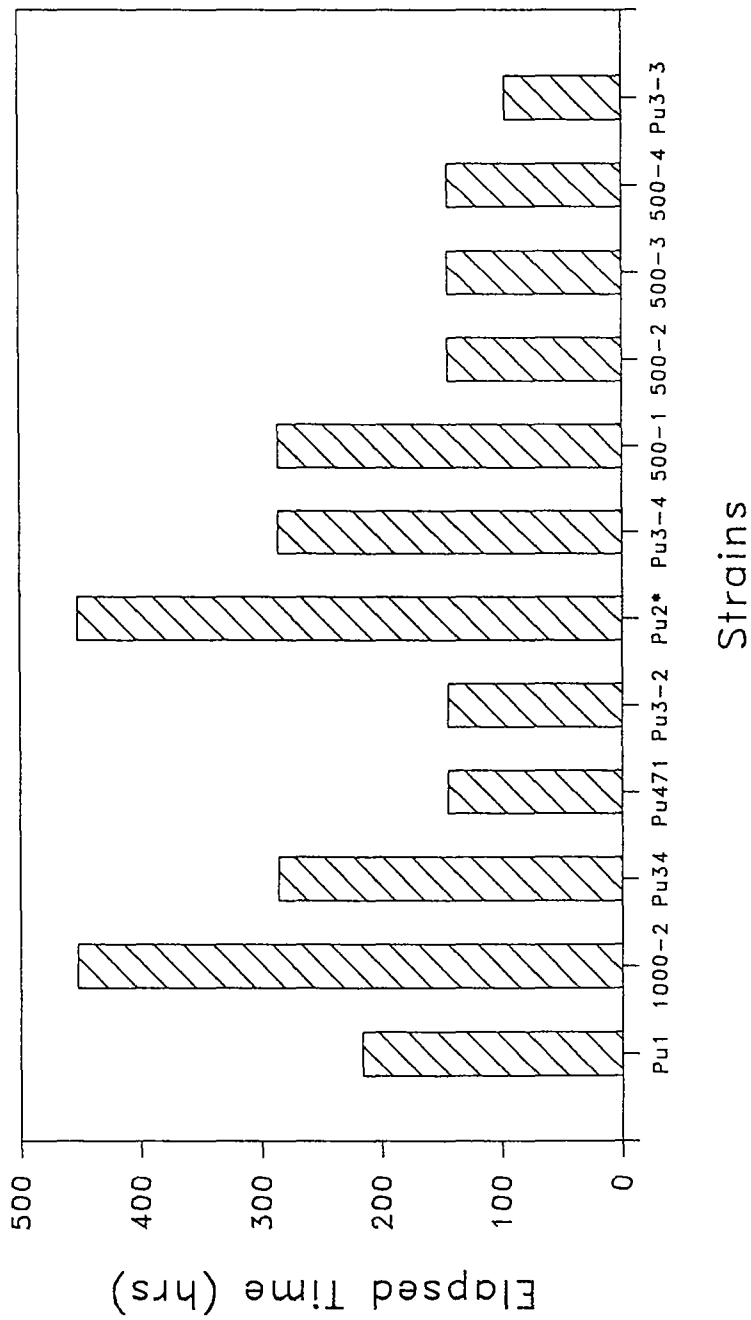
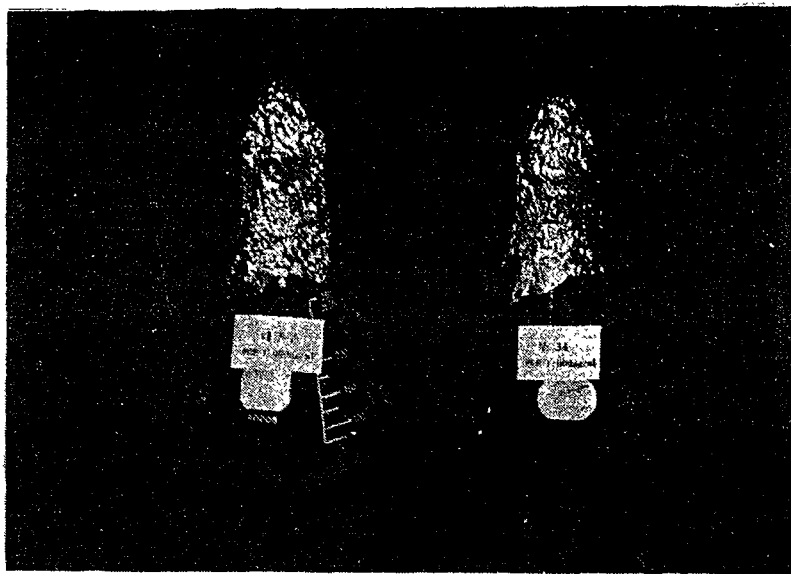


Fig. 11B. Elapsed time to reach the stable PCP-degrading efficiency.

이들 분해균주의 pH 변화는 배양시간이 지날수록 알카리 현상 (pH 6.8 - pH 9.0)을 나타내었다 (Table 4). 이것은 세균의 PCP 유화작용효소나, PCP 분해시에 탈염소화 작용(pH 하강효과) 보다도 알카리성 중간대사물질이 더 많이 생성되는 것이 아닌가 추측케하며 앞으로 더 연구되어야 할 과제이다. Fig. 12는 flask 조건의 실험시에 나타나는 PCP 분해 및 그 분해산물의 현상으로서 분해능을 쉽게 알아볼 수 있도록 대조구에 비해 실험액체배지에는 yellow color가 선명하게 나타났다.



A

B

Fig. 12. Photograph of PCP-degradation in flask microcosms. A, Control (PCP was added into the MS liquid medium at a concentration of 1,000 ppm); B, Pu34 strain was inoculated into the MS liquid medium of flask microcosm containing 1,000 ppm of PCP.

6. Slurry reactor에 의한 bioremediation

PCP 오염토양을 slurry reactor에서 각 실험 균주 및 토착미생물의 혼합 배양에 의해 정화하였다 (Fig. 13). PCP 분해효율은 혼합배양 8일경 (190 hrs)에 자연계에서 분리한 12 종의 실험세균만이 혼합된 B 반응기 → 토착미생물만이 있는 C 반응기 → 이들을 동시에 혼합배양한 D 반응기의 순으로 나타났다. 16일경 (380 hrs)에는 각 반응기에서 PCP가 완전히 분해됨을 확인하였다 (Fig. 14). Cell density는 Fig. 15와 같이 B 반응기는 100배 이상의 높은 성장을 보였으나, C 반응기는 10배 정도, D 반응기는 8배 정도의 증가를 보여 PCP의 분해와 상관성이 있음을 알 수 있다. 각 반응기의 pH는 6.7 - 8.2 범위에서 큰 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 16). 이러한 결과는 Mueller *et al.* (1991)의 solid-phase bioremediation이나 slurry-phase bioremediation의 결과보다 더 높은 분해효율을 나타내었다.

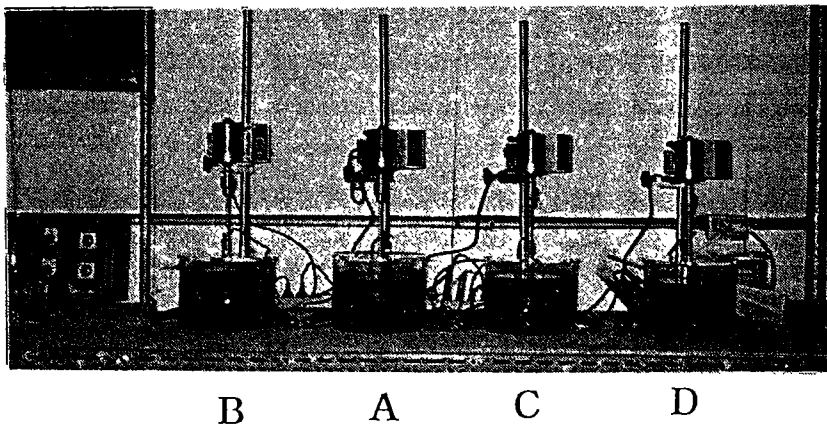


Fig. 13. Bench-scale slurry reactors for the treatment of PCP-contaminated soils.

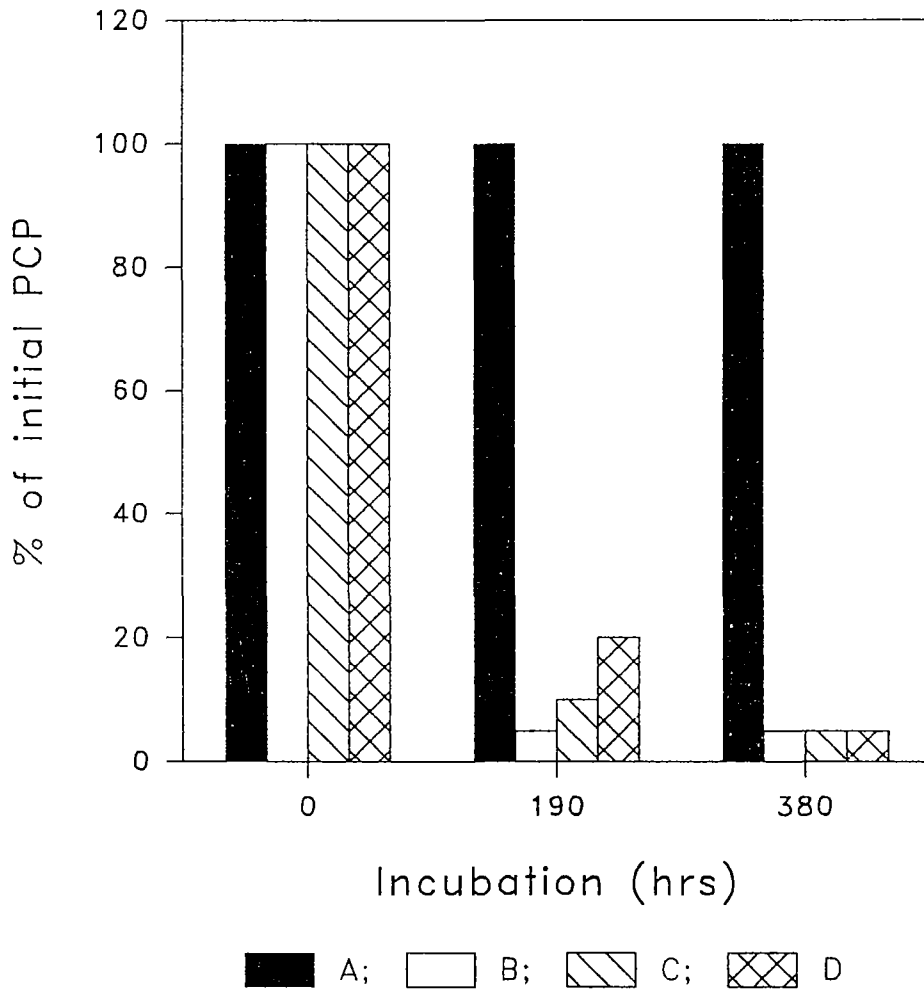


Fig. 14. Comparison of PCP-degradation efficiency among the treatment groups: A treatment, control (sterile soil); B treatment, isolated strains; C treatment, indigenous microorganisms; D treatment, indigenous microorganisms and isolated strains.

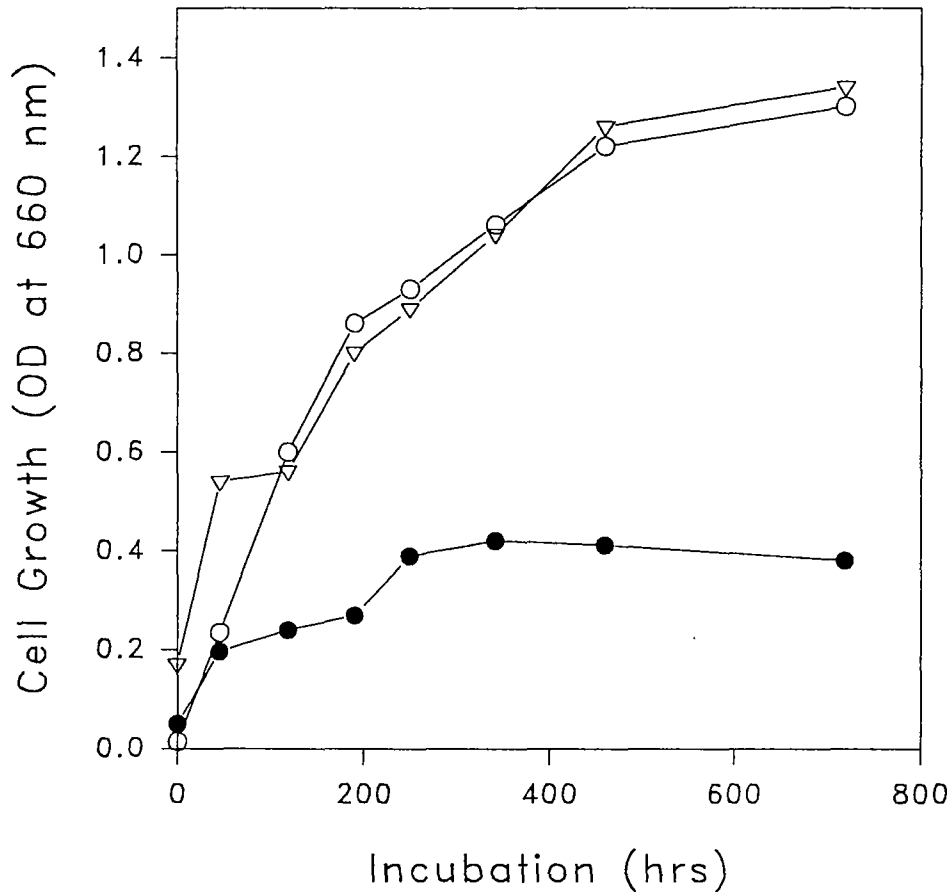


Fig. 15. Growth curves of the mixed microorganisms in the slurry reactors : ○, B reactor (12 isolates); ●, C reactor (indigenous microorganisms); ▽, D reactor (mixed culture of indigenous microorganisms with 12 isolates). The reactors were operated for 34 days.

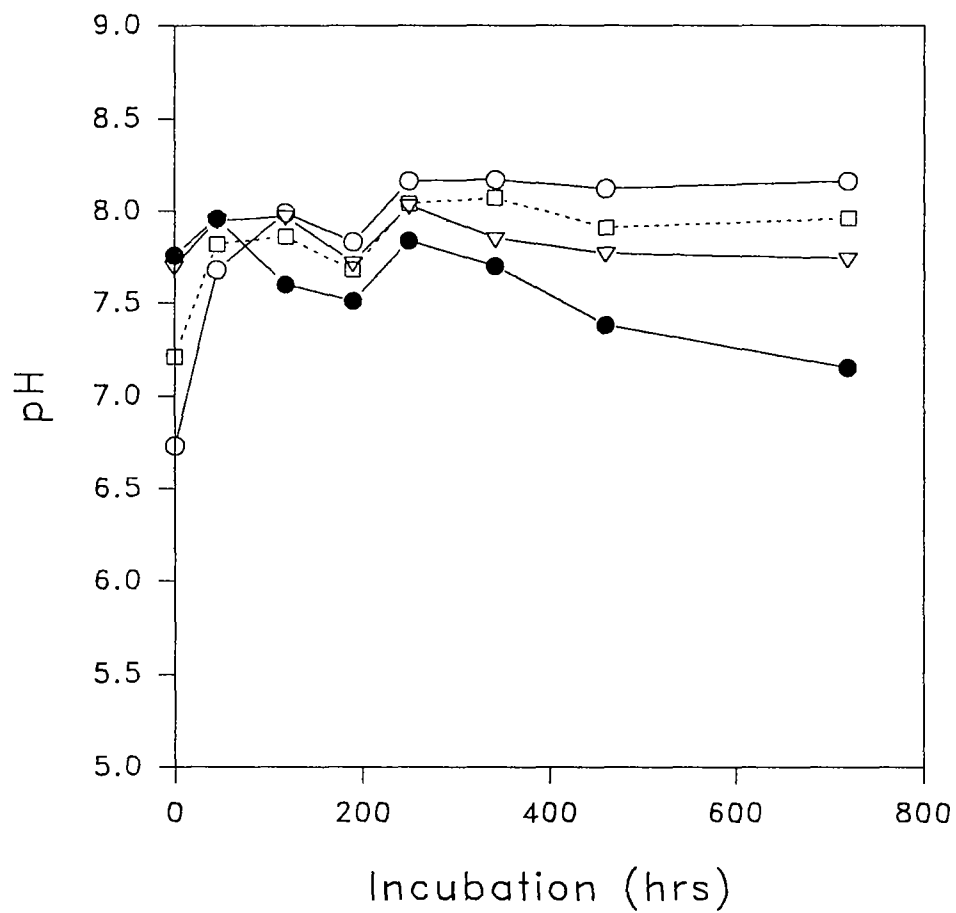


Fig. 16. Comparison of pH change during the biodegradation of PCP in the slurry reactors: □, A reactor; ○, B reactor; ●, C reactor; ▽, D reactor.

제 4 장 결 론

1. 각 지역에서 채집한 오염예상 토양으로 부터 60여 균주의 PCP 분해세균을 분리하였으며, 100 - 3,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 PCP 분해능을 확인하였다.
2. PCP가 오염된 토양은 50 - 100 $\mu\text{g/g wet soil}$ 의 농도로 PCP가 존재함을 알 수 있었다.
3. 미확인된 전국의 각 토양 및 지하수를 조사한다면 PCP의 더 높은 오염농도를 발견할 수 있을 것이다.
4. UV spectrophotometry, gas chromatography, GC/Mass spectrometry에 의한 PCP의 정성·정량분석법을 확립하였다.
5. 12종의 실험세균을 flask microcosm에 각각 배양하면서 PCP의 생분해를 측정 하였을 때 80 - 90%의 분해효율을 나타내었다.
6. 실험세균의 혼합배양 및 토착미생물과 실험세균의 혼합배양 그리고 토착미생물만의 배양에 의한 slurry-phase bioremediation에서 오염토양의 처리는 8 일 내지 16일경에 PCP가 완전분해됨을 확인하였다.
7. Slurry-phase bioremediation의 최적화 및 실험세균의 특성을 더 연구한다면, 오염물질의 더 효율적인 처리와 *in situ* bioremediation의 성공적인 결과를 얻을 수 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

- APHA, AWWA and WEF. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. APHA, Washington.
- Håggblom, M.M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.
- Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 454-457.
- Lamar, R.T. and D.M. Dietrich. 1990. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3093-3100.
- Lamar, R.T., M.J. Larsen, and T.K. Kirk. 1990. Sensitivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3519-3526.
- Liu, D. and K. Kwasniewska. 1981. An improved agar plate method for rapid assessment of chemical inhibition to microbial populations. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 27: 289-294.
- Mohn, W.W. and J.M. Tiedje. 1990. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Archives of Microbiology* 153: 267-271.
- Mueller, J.G., S.E. Lantz, B.O. Blattmann and P.J. Chapman. 1991. Bench-scale evolution of alternative biological treatment processes from the remediation of pentachlorophenol- and creosote-contaminated materials: slurry-phase bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1055-1061.

- Neilson, A.H. 1990. The biodegradation of halogenated organic compounds. *J. Appl. Bacteriology* 69: 445-470.
- Prosser, J.I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiol.* 140: 5-17.
- Rhee, G-Y., B. Bush, C.M. Bethoney, A. DeNucci, H.-M. Oh and R.C. Sokol. 1993a. Reductive dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic sediments: pattern, rate and concentration dependence. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1025-1032.
- Rhee, G-Y., B. Bush, C.M. Bethoney, A. DeNucci, H.-M. Oh and R.C. Sokol. 1993b. Anaerobic dechlorination of Aroclor 1242 as affected by some environmental conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1033-1039.
- Rutgers, M., J.J. Bogte, A.M. Breure, and J.G. van Andel. 1993. Growth and enrichment of pentachlorophenol-degrading microorganisms in the nutristat, a substrate concentration-controlled continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3373-3377.
- Saber, D.L. and R.L. Crawford. 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1512-1518.
- Sambrook, T., E.F. Fritsch and T. Maniatics. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Stanlake, G.J. and R.K. Finn. 1982. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1421-1427.
- Topp, E. and R.S. Hanson. 1990. Degradation of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. grown in continuous culture under various nutrient limitations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 541-544.

