

하수처리장으로부터 PCB분해 미생물의 분리 및 고정화

이진숙, 나경수*, 정선용*, 최윤소**, 이재석
광주과학기술원 신소재공학과, *전남대학교 환경공학과
**동성화학공업주식회사 중앙연구소

Isolation of PCB degrading bacteria from a sewage disposal plant and its immobilization

Jin-Sook Lee, Kyung-Soo Na*, Seon-Yong Chung*
Yoon-So Choi**, Jae-Suk Lee

Department of Materials Science and Engineering
Kwangju Institute of Science and Technology,

*Department of Environmental Engineering, Chonnam National University

**Central Research Institute, Dong Sung Chemical Ind. Co., LTD.

서론

Polychlorinated Biphenyl(PCB)은 벤젠고리 두 개가 결합되어 형성된 biphenyl에 염소가 1-10개 치환된 화합물로서 열매체, 절연유, 기계유등에 대량으로 사용되어 왔다. 그러나, 이들 물질은 생체에 유독한 물질로써 환경과피 및 생태계의 변화를 야기시키는 것으로 밝혀져, 1972년부터 PCB의 생산과 사용이 중지되었다. 그러나, 세계적으로 이더 100만톤의 PCB가 자연계로 방출되었고 폐기처분할 양도 200만톤에 이른다. 우리 나라에도 처리할 PCB가 다량 있는 것으로 알려졌으며, 이들의 효율적 분해 방법이 요구되고 있다. PCB는 2차 유독 성분이 부생되는 물리화학적 분해 방법에 비하여 미생물에 의한 분해 방법이 안전하다는 연구결과가 보고된 후, 이에 대한 연구가 활발히 진행중이다[1]. 그러나, 고농도의 PCB에 견딜 수 있는 우량균주의 결핍, 그리고 분해효소의 생성능 저하때문에 산업적 접근에는 아직 미흡한 수준이다.

또한, 미생물을 연속 공정의 반응기에 이용하기 위하여 다공질의 담체에 흡착시키는 방법이 사용되어 왔다. 그러나, 흡착에 의한 고정방법은 담체의 내부에 짧은 시간동안 대량의 미생물을 고정시킬 수 없기 때문에 담체를 제조함과 동시에 미생물을 고정함으로써, 담체의 내부에 대량의 미생물을 일시에 고정시키려는 연구가 진행되고 있다[2-4]. 동시에 고농도 PCB 처리시 담체의 안정성, 재사용을 위해서 화학적 불활성, 기계적 안정성 등의 성질을 가질 뿐 아니라, 산소운반도 용이한 다공성 담체인 폴리우레탄 폼에의 고정화를 시도하고 있다.

본 연구에서는 하수처리장으로부터 PCB분해능력이 우수한 균주를 광범위하게 분리하여 효소 생성능이 뛰어난 균주를 선별하고, 이들 균의 기질 특이성과 유기용매 내성에 관하여 검토하였다. 분리한 미생물을 폴리우레탄 폼의 생성과 동시에 폼의 내부에 고정하였다. 아울러 폴리우레탄 폼에 미생물을 고정할 때, 화학반응에 따른 반응온도 조절 및 폼의 동공의 크기 조절을 행하고, 고정된 미생물이 PCB분해 활성을 유지하는지 검토하였다.

재료 및 방법

Sampling 및 균분리

광주 하수종말처리장으로부터 시료를 채취하여 무기배지[5] 10 ml가 들어 있는 시험관에 100 μ g 정도 넣은 후 30°C에서 1주일간 진탕 배양을 한다. 이 때 탄소원으로서는 PCB 또는 PCB의 기본골격을 갖는 biphenyl을 사용하였다. 1주일 후 균이 자란 시험관을 선별해서 동일배지가 들어 있는 시험관에 1% 접종한 후 다시 1주일간 배양한다. 이것을 두 번 반복한 후 유기고체 배지에 도달하여 30°C 혹은 37°C에서 3일간 정치 배양하였다. 이후 생성된 콜로니위에 2,3-dihydroxy biphenyl을 포함하는 아세톤용액을 분무하여 PCB분해균을 선정한다.

기질 특이성 조사

PCB분해 능력을 가지고 있는 균의 기질 특이성을 조사하기 위하여 무기배지에 탄소원으로는 각종 방향족 화합물을 0.1% 농도로 하여 3일간 배양해서 균의 자화능력 여부를 조사한다.

프리폴리마 합성

10% NCO-프리폴리마는 liquid MDI 4.52 mole을 50°C에서 30분간 가열한 후, 1 mole의 polyether polyol 3000을 소량씩 첨가하면서 4시간동안 반응시켜 합성한다. 이때, 반응온도는 70~80°C이며, 질소분위기하에서 진행한다. 반응중간에 시료를 채취하여 NCO%(w/w)를 측정한다. 후 benzoyl chloride 50 ppm을 넣어 보관한다.

미생물 고정화

유기배지 10 mL가 들어있는 시험관에 strain KS5를 접종하고, 37°C에서 하루 동안 배양한다. 그리고, 4000 rpm에서 15분간 원심분리시킨 후 pH 7의 인산완충 용액을 넣고 현탁시킨다. Strain KS5 배양액의 농도는 UV/VIS 분광계를 이용하여 600 nm에서 측정한다. 10% NCO-프리폴리마에 pH 7의 PBS용액으로 현탁시킨 배양액(OD=3.75)을 3%(w/w) 정도 넣고, 실리콘계 계면활성제를 1%(w/w)를 넣는다. 혼합액을 2000 rpm에서 1분간 교반시킨 후 1시간 정도 방치하면 발포되어 폴리우레탄 폼이 생성된다. 제조된 폼을 5 내지 10 mm의 크기로 잘라 10 mL 유기배지에 넣어 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양한다. 배양 후 20 mM 2,3-dihydroxybiphenyl을 포함하는 아세톤용액을 10 μ l 넣어 노란색을 띠는지 확인하는 방법으로 활성을 측정한다.

또한, 미생물이 폴리우레탄 폼에 고정되어 있는지 SEM을 이용해 관찰한다. Strain KS5가 고정된 폴리우레탄 폼을 pH 7.0의 PBS용액으로 표면을 씻어낸다. 3.7%-paraformaldehyde 수용액에 1N NaOH 수용액 5 mL를 넣고 60°C 정도까지 가열하여 완전히 녹인다. 이 용액에 strain KS5가 고정된 폴리우레탄 폼을 4°C에서 12시간 정도 담가 둔다. 그리고, 에탄올의 농도를 높여 가면서 4°C에서 담체에 고정된 미생물을 점차적으로 탈수시킨다. 시료는 대기상태에서 충분히 건조한 후, gold coating하고 SEM관찰을 행한다.

결과 및 고찰

PCB분해균의 특성

Biphenyl과 PCB를 단일 원소원으로 하여 분해균을 분리 검색한 결과 14 종의 분해균이 분리되었다. 이들 분해균을 각종 기질 0.1%의 농도에서 3일 동안 배양하여, 기질 특이성과 유기용매 내성에 관해서 검토한 결과를 Table 1에 표시하였다. 이들의 결과를 보면 분리되어진 균주들은 각종 기질 특이성과 유기용매 내성

에 있어서 서로 상이한 점을 나타냈다. 이것은 토양 및 수생미생물이 혼합되어 있는 하수처리장의 미생물 생태계의 측면에서 고찰해 보면, 천연 및 인공유래의 난분해성 유해물질이 고농도화 되어 있는 하수처리장에는 이들 물질의 분해와 미생물간의 생존유지를 위한 communication을 위해서 기질 특이성이 상이한 미생물종이 다양화를 이루고 있다고 사료된다.

폴리우레탄 폼의 특성

미생물을 폴리우레탄 폼에 고정시켜 연속공정에서의 충전물로서 사용하고자 하는 경우에는 동공이 어느 정도 개방되어 있으면서 경질한 물성도 가지는 반경질 폼이 적합하다고 사료된다. 각종 조성비의 liquid MDI와 각종 분자량의 polyether polyol중에서 이론적으로 NCO%를 고정하고 프리폴리마를 합성할 때 분자량이 클수록 경질한 물성을 나타냈다. 또한 NCO%가 많아질수록 우레탄 결합이 많아지므로 경질한 물성을 보였다.

10% NCO-프리폴리마(polyether polyol 3000)를 이용하여 폼을 제조할 경우, 반응온도는 34~39°C 범위 내에서 반응물의 조성에 따라 변화하였다. 이 때 반응온도는 첨가되는 계면활성제의 양과는 무관하나, 첨가되는 물의 양이 많아지면 증가하였다.

담체에 고정된 미생물의 효율성을 향상시키기 위해서 폼의 동공 크기를 조절하였다. 또한 폴리우레탄 폼에 계면활성제를 사용하면 성분들간의 혼화성이 증가하고 생성되는 기포들의 유동성을 증가시킨다. 따라서 계면활성제의 양을 증가시키면 동공의 크기를 균일하게 조절 가능하고 작은 동공을 만들 수 있다. Fig. 1(a)는 제조한 폴리우레탄 폼의 동공 크기 및 형태를 나타낸다. 본 실험에서 제조한 폼의 동공 크기는 200~400 μm 정도였다.

Table 1. Utilization of aromatic compounds as a sole carbon and energy source by strains

1. ++++ : best growth, +++ : good growth, ++ : growth, + : a little growth, - : no growth
2. Culture time : 3 days
3. Concentration of substrate : 0.1 %

Substrates	KS1	KS2	KS3	KS4	KS5	KS6	SY1	SY2	SY3	SY4	SY5	SY6	SY7	CN13
Biphenyl	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
p-chlorobiphenyl	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzoate	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
p-hydroxybenzoate	-	++++	++++	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Catechol	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	+	+	-	+	-	+	+
3-chlorobenzoate	-	-	-	+	+	-	++	+	+	++	+	+	+	++
4-chlorobenzoate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2,4-dihydroxybenzoate	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-
Phenol	-	-	++	+	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-
Hexane	++	++	+++	++	+++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Propylbenzene	-	+++	-	++	++++	+++	+	++	+	++	++	-	+	+
Dichlorobenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Cyclohexane	++	+++	+++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Xylene	-	+++	-	+	-	++	++++	+	+	++	++	-	++	++
Styrene	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluene	++++	++++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
Bezene	+++	++	+++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+++	++

고정 strain KS5의 관찰

Fig. 1(b)는 10 mL 유기배지가 들어 있는 시험관에 strain KS5를 고정시킨 폼을 넣어 진탕배양기를 이용하여 37°C, 150 rpm에서 24시간동안 배양한 후, 미생물이 고정된 폴리우레탄 폼을 관찰한 사진이다. 이 사진으로부터 고정직후 소량의 미생물이 분포되어 있는 것과는 달리, 24시간동안 증식하여 대량의 미생물이 존재하는 것을 알 수 있다.

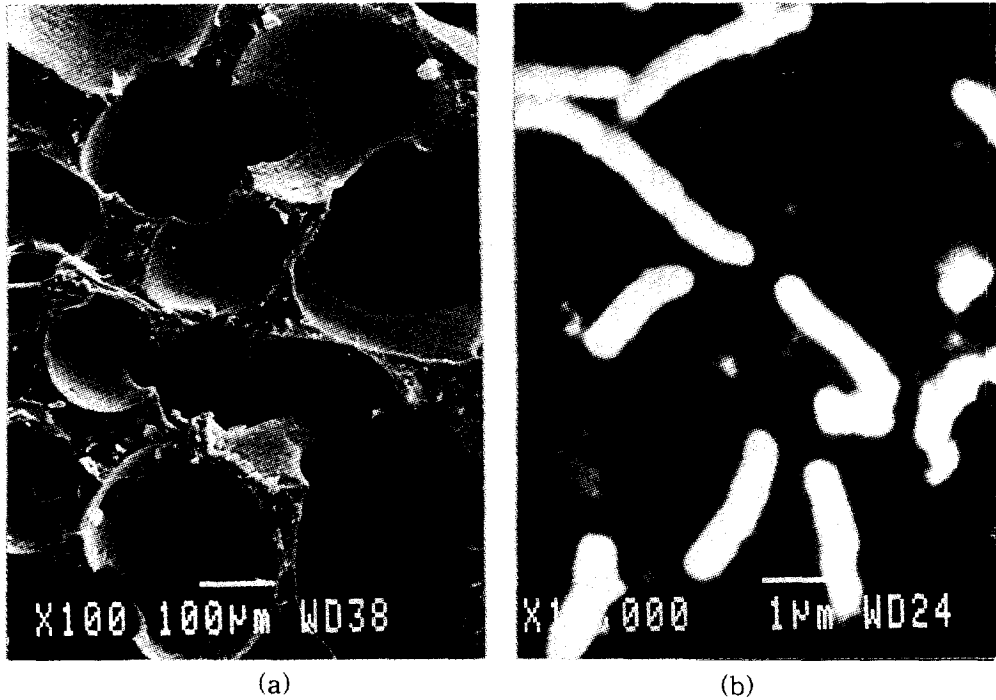


Fig. 1. Scanning electron micrographs of polyurethane foam (a) prepolymer : H₂O : surfactant = 100 : 2.9 : 1.2 (w/w) (b) with immobilized strain KS5, prepolymer : H₂O : surfactant = 100 : 3 : 0.9 (w/w).

참고문헌

1. Higson, F. K.: *Advances in Applied Microbiology*, 37, 135(1992).
2. Pinheiro, H. M. and Cabral, J. M. S.: *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, Vol. 14, August.
3. Pinheiro, H. M. and Cabral, J. M. S.: *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1123(1992).
4. Brookes, I. K., Lillly, M. D. and Drozd, J. W.: *Enzyme Microb. Technol.*, 1987, Vol. 9. April.
5. Chung, S.-Y., Maeda, M., Song, E., Horikoshi, K. and Kudo, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2111(1994).