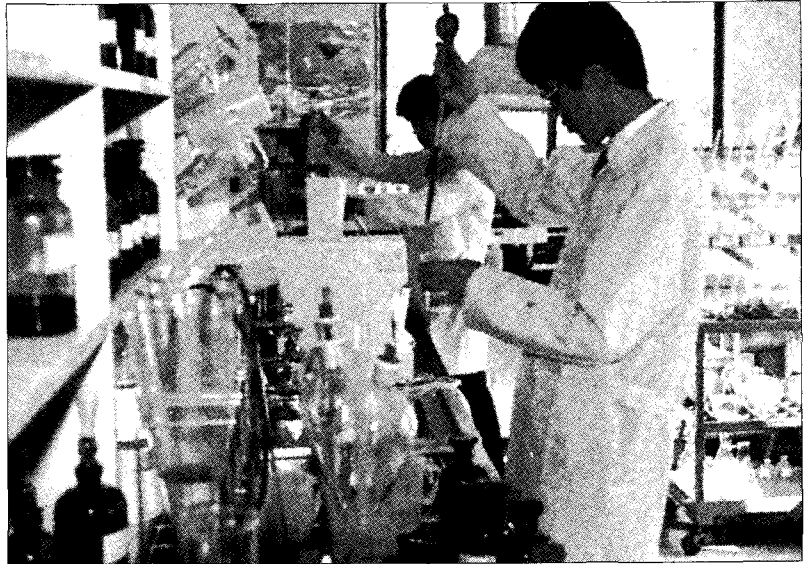


# PVA 등 조염제 분해균주의 분리 및 생물학적 활성증진 기술 개발 <2>

임연택  
국립환경연구원 수질공학과장



## 목차

### I. 서론

#### II. 재료 및 방법

1. 균주분리용 시료와 사용시약
2. 사용배지 및 배양조건
3. 균주분리
4. 균주 동정
5. Cell Growth 측정
6. PVA 분석
7. 화학적 산소 요구량(COD<sub>Mn</sub>) 측정
8. 고온 분해 균주의 선발
9. 혼합 배양시 PVA 분해균의 선별 실험

#### III. 결과 및 고찰

1. 시료채취 및 PVA 분해균의 분리

#### 2. 균주 동정

#### 3. PVA 분해를 위한 최적 배양조건

4. 혼합배양시 KMG1과 KMG5 균주의 세포증식
5. KMG1과 KMG5 공생균주 중 PVA 분해균의 확인
6. 혼합배양의 Kinetics 조사
7. 고온성 PVA 분해 변이주의 개발

#### IV. 결론

## 2. 균주 동정

공생에 의해 PVA를 분해 이용하는 것으로 확인된 두 균주 KMG1과 KMG5의 전자 현미경 관찰에 의한 세포 모양은

표 4-6. Characteristics of the Isolated Strains

Strains	KMG1	KMG5
<b>Characteristics</b>		
<b>Morphological characteristics</b>		
<b>1.Type and size</b>	Rod, 1.0 $\mu$ m	Rod, 1.5 ~ 2.0 $\mu$ m
<b>2.Gram staining</b>	Negative	Negative
<b>3.Colonies on agar plate</b>	circular, cream on nutrient agar; white on PVA agar; brown pigment production on nutrient but not on PVA agar	circular, yellow elevated rigid on nutrient and PVA agar
<b>4.Flagellar</b>	Not detected	Not detected
<b>5.Spore</b>	No	No

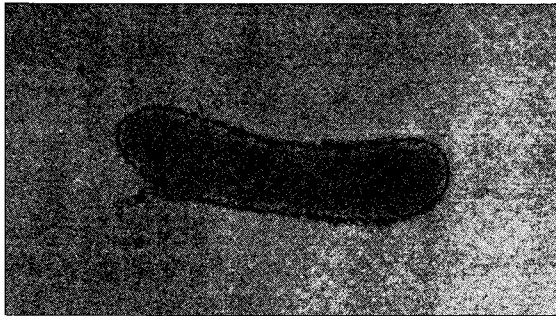
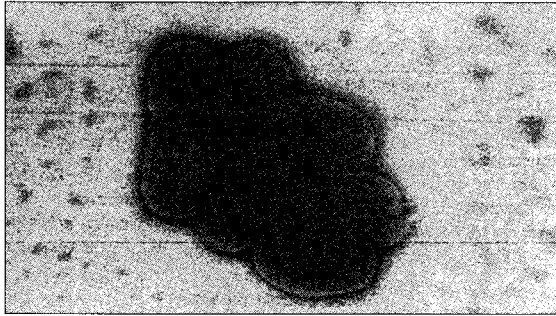


그림 4-3. Electron photomicrograph of the isolated bacteria, KMG1 and KMG5. (a)KMG1, (b)KMG5

그림4-3과 같으며 기타 두 균주의 세포와 colony의 중요한 형태학적 성질은 표4-6에 나타내었다. 특히 두 공생 균주중 실제 PVA 분해균으로 예측되는 KMG5 균주는 nutrient agar에서 4일 이상을 배양해야 할 경우 colony를 식별할 수 있을 정도로 생육속도가 매우 늦으며, PVA minimal agar에서도 혼합배양을 해서 약 20일 이상이 지나야 KMG1 colony 주위에 뚜렷한 노란색의 colony를 생산하는 등 매우 특이한 생육 특성을 나타내고 있다

(그림 4-4 참조).

따라서 두균주의 성장속도를 nutrient broth에서 측정해 본 결과 그림.4-5와 같이 KMG1의 doubling time은 다른 일반 세균 보다 다소 늦은 56분을 나타내고 있으나, KMG5는 이보다 훨씬 생육속도가 늦어 약 230분의 doubling time을 보였다.

이와같이 두균주가 대다수의 일반세균들 보다는 현저히 늦은 생육속도를 보이고 있어 생리적 특성조사에 많은 어려움이 있어서, 현재로서는 두 균주의 생리적 특성이 완성되지 못하고 있어 확실한 동정이 다소 지연되고 있는 실정이다.



그림 4-4. Appearance of the two symbiotic stains on the PVA agar plate.

The mixed culture was plated on the medium. After 20 days of cultivation KMG5 colonies(yellow colored) could be recognized by morphological differences from KMG1 colonies(white colored).

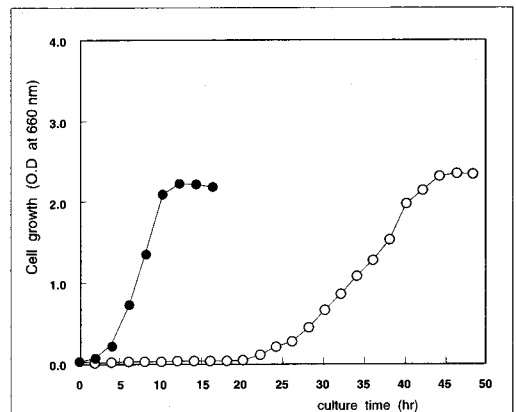


그림 4-5. Difference of growth between KMG1 and KMG5 in nutrient broth. (● KMG1, ○ KMG5)

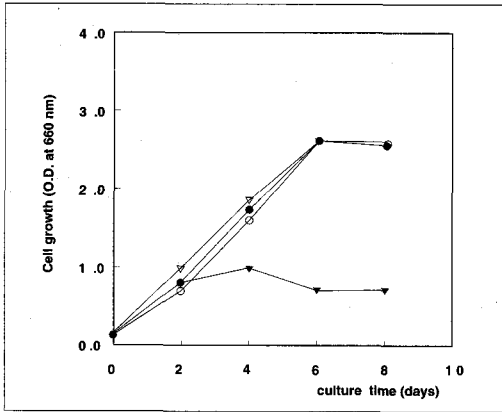


그림 4-6. Effect of temperature on cell growth  
(○ 30°C, ● 35°C, ▽ 37°C, ▼ 40°C)

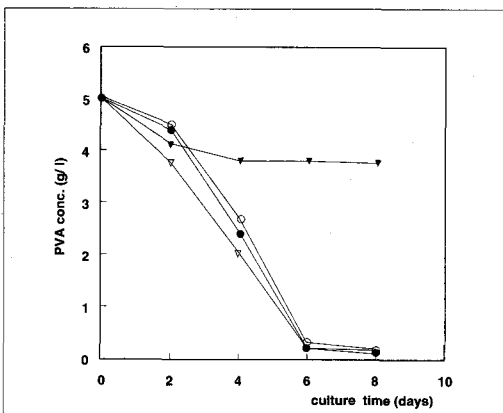


그림 4-7. Effect of temperature on removal of PVA  
(○ 30°C, ● 35°C, ▽ 37°C, ▼ 40°C)

### 3. PVA 분해를 위한 최적 배양 조건

#### 가. 배양 온도의 영향

두 균주 혼합 배양시 배양 온도가 균체 증식과 PVA 분해에 미치는 효과를 구체적으로 조사, 그림 4-6, 그림 4-7과 같은 결과를 얻었다. 균체 증식 정도는 30~37°C 범위의 배양 온도에서 큰 차이를 보이지 않고 배양 6일째에 최대값을 보이고 있으나, 40°C에서는 균체증식이 현저한 감소를 보였다. 또한, 배지중 PVA량 역시 예상대로 균체증식과 비례해서 감소되는 경향을 나타내고 있다.

따라서 배양 온도가 40°C가 되면 PVA 감소율도 뚜렷한 감소를 보이는 것으로 미루어 배지중의 PVA는 균체 생육의 탄소 및 에너지원으로 분해 이용되고 있음을 간접적으로 나타내고 있다.

그러나, 실제 직물 염색 가공 공단의 하절기 원폐수는 수온이 40°C 이상으로 상승, 슬러지 미생물의 처리효율의 심각한 저하를 초래하고 있는 실정이므로 40°C 이상에서도 효과적으로 PVA를 분해 이용할 수 있는 분해균의 개발이 시급한 것으로 분석되고 있다.

그러므로 본 연구에서 분리한 37°C의 최적 온도를 지닌 PVA 분해균은 지금까지 보고 되고 있는 대부분의 PVA 분해균과 마찬가지로 하절기 염색 공단 폐수 처리용으로는 적당치 못한 것으로 판단됨으로 고온에서 높은 활성을 나타내는 변이주 개발이 더욱 중요한 과제로 제기되었다.

배지중 PVA량 역시 예상대로 균체증식과 비례해서 감소되는 경향을 나타내고 있다. 따라서 배양 온도가 40°C가 되면 PVA 감소율도 뚜렷한 감소를 보이는 것으로 미루어 배지중의 PVA는 균체 생육의 탄소 및 에너지원으로 분해 이용되고 있음을 간접적으로 나타내고 있다.

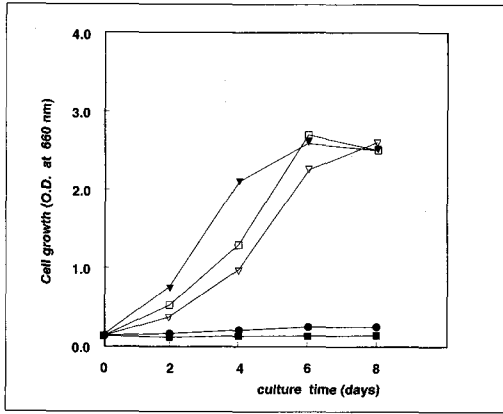


그림 4-8. Effect of pH on cell growth  
(○ pH 5, ● pH 6, ▽ pH 7, ▼ pH 8, □ pH 9, ■ pH 10.)

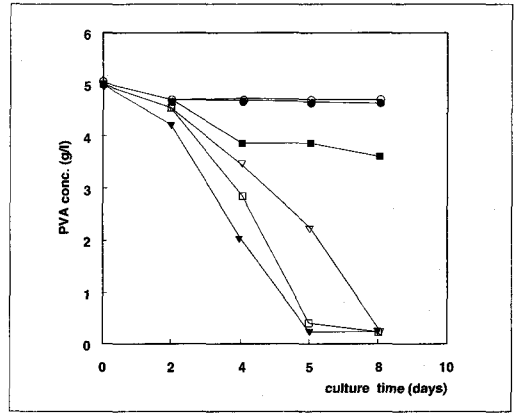


그림 4-9. Effect of pH PVA degradation.  
(○ pH 5, ● pH 6, ▽ pH 7, ▼ pH 8, □ pH 9, ■ pH 10.)

#### 나. pH영향

배양액의 초기 pH를 변화시켜 균체 증식과 PVA 분해에 미치는 배양액중의 수소 이온 농도의 영향을 조사해 본 결과는 그림 4-8과 그림 4-9에 표시되어 있으며, 약알칼리성 pH(pH 7-9)조건에서 가장 높은 세포증식과 PVA 분해율을 나타냄을 알 수 있었다.

#### 다. 산소요구도 조사

현재까지 보고 되고 있는 대부분의 PVA 이용균은 PVA 분해기구의 첫단계로 PVA oxidase가 관계하는 것으로 알려져 있다(Sakai 등, 1986). 따라서 본 연구에서 분리한 KMG1, KMG5 혼합배양 flask 내의 배지량을 적절히 조절, 포기 정도(aeration effect)를 달리 함으로써 PVA 분해 이용률에 미치는 산소의 필요량을 검토하였다.

그림 4-10에서 보는 바와 같이 큰 차이는 없었으나 배지량이 적은 경우 세포생육과 PVA 분해 이용률이 약간 높은 값을 보이고 있어 본 PVA 분해균 역시 PVA oxidase가 PVA 분해에 관여할 것이라 예상된다.

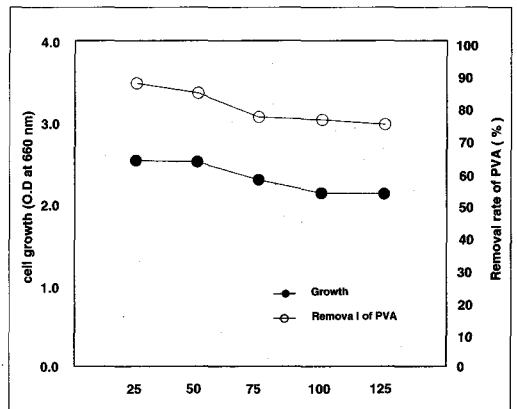


그림 4-10. Effect of aeration on symbiotic utilization of PVA by the mixed culture.

Cultivation was carried out in 250ml flask at 37°C for 5 days.

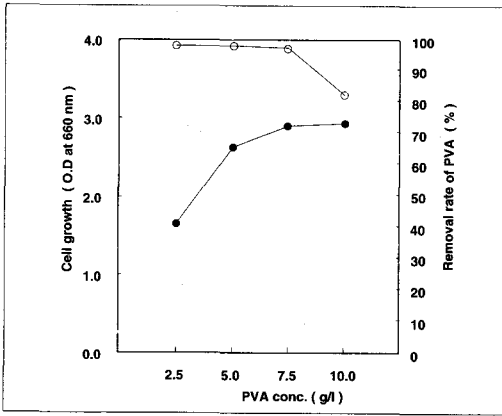


그림 4-11. Effect of PVA concentration on cell growth and removal rate of PVA.  
(● Cell growth, ○ Removal rate of PVA)

#### 라. PVA 농도의 영향

PVA 첨가량을 달리한 배지(0.25~1.0%)에서 KMG1과 KMG5를 혼합배양하여 PVA 농도가 균체증식과 PVA 분해 이용에 미치는 효과를 조사해 본 결과 0.75%까지의 PVA는 완전히 이용했으나, 1.0%의 농도에서는 분해율이 82% 정도로 저하되었으나 균체증식은 오히려 약간 증가됨을 보였다 (그림 4-11 참조). 두 *Pseudomonas* 속 혼합균주에 의한 PVA 분해와 관련된 정 등(1992)의 연구 보고에 의하면 2.0%의 농도에서도 거의 100% 제거율을 나타내었다고 하나 균체량에 대한 PVA 이용량은 거의 같은 값을 나타내므로 정 등이 분리한 PVA 분해균과 본 연구에서 분리한 PVA 분해 균주는 비슷한 분해 활성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

#### 마. PVA 중합도의 영향

지금까지 사용해 왔던 중합도 1500의 PVA 이외에 500, 2000, 30000의 중합도를 가진 각종 PVA를 탄소원으로 사용, PVA 중합도 차이에 따른 균체증식과 PVA 분해 이용률을 조사 분석해 보았다. 표 4-7의 결과와 같이 KMG1과 KMG5 혼합 균주는 중합도에 관계없이 모든 종류의 PVA를 효과적으로 분해 이용하고 있음을 알 수 있었다. 중합도 2000의 PVA에서 약간 낮은 분해율을 보이고 있으나, 이것은 본 실험에 사용한 PVA 2000이 공업용이었기 때문이라고 생각된다. 이와 같은 결과는 Suzuki 등(1973b)의 *Pseudomonas* 속 균주와 중합도에 대한 특이성이 없다는 점에선 같은 경향을 보이며, 한편 정 등 (1992)의 *Pseudomonas* 속 분해 균주가 2000 이상의 고 중합도 PVA에 대해서 현저히, 낮은 분해율을 보였던 결과와는 대조적인 것으로 이 점에서 볼 때 본 연구에서 분리한 KMG1과 KMG5 균주가 보다 유리한 분해 균주라고 평가할 수 있겠다.

표 4-7. Effect of Polymerization Degree of PVA on Cell Growth and PVA Degradation.  
(Cultivation was carried out at 37°C for 6 days.)

Polymerization degree	Cell growth (O.D. at 660 nm)	PVA degradation (%)
500	1.996	95
1500	2.420	96
2000	2.481	88
30000	2.455	95

#### 바. 탄소원의 영향

0.5% PVA를 첨가한 최소배지에 별도 살균 처리한 각종 탄

소원을 0.2% 첨가하여 KMG1과 KMG5 혼합균주를 접종, 배양하면서 세포증식과 PVA 분해율에 미치는 효과를 조사하여 표 4-8과 같은 결과를 얻었다. galactose, ethanol, ethlyen glycol, 특히 glycerol의 경우는 최종 PVA 분해율은 대다수 다른 탄소원의 경우와 같았으나 세포생육 및 PVA 분해속도는 현저히 높여주는 효과를 나타내었다. 이에 반해 maltose, sucrose는 오히려 균체증식을 저하시킴과 동시에 PVA 분해율 역시 저하되는 결과를 보였으며 glucose, methanol은 균체증식과 PVA 분해속도의 약간의 촉진효과를 보이는 등 매우 복잡한 탄소원 효과를 보이고 있어 앞으로 탄소원 효과에 대해서는 집중적인 연구가 필요하다고 생각된다.

표 4-8. Effect of CarbonSources on PVA Utilization by Symbiotic Mixed Cultures

CarbonSources	After 3 days Culture		After 3 days Culture		After 3 days Culture	
	Growth (O.D at 660 nm)	Removal of PVA (%)	Growth (O.D at 660 nm)	Removal of PVA (%)	Growth (O.D at 660 nm)	Removal of PVA (%)
None	1.792	44	2.102	62	2.389	97
Glucose	1.983	50	2.523	77	2.501	96
Fructose	2.082	38	2.241	50	2.490	87
Glycerol	2.601	67	2.701	90	2.610	97
Galactose	2.402	55	2.605	85	2.599	97
Maltose	1.960	20	2.101	36	2.289	49
Sucrose	1.982	23	2.105	38	2.301	52
Ethanol	2.079	53	2.673	86	2.601	97
Methanol	1.983	45	2.361	77	2.511	96
Ethlyen Glycol	2.289	51	2.670	85	2.598	96

## 서울시 보건환경연구원

### 폐기물검사 시행

서울시 보건환경연구원 폐기물과에서는 업무과다로 인해 폐기물검사를 유관기관에서 관원으로 의뢰되는 시료에 대해서만 검사 통보하였으나, '97년 하반기부터 장비 등의 보강으로 폐기물매립 등에 필요한 일반 및 지정폐기물에 대하여 관원은 물론 민원 자참시료도 검사하여 성적서를 발급하고 있다.

검사대상 :

1. 폐기물관리법 시행규칙 제2조3항 관련 (오니, 소각재 등에 함유된 유해물 분석)등
2. 수수료 (10개항 : 용출시험, 120,700원)