

# Polychlorobiphenyl (PCB) 토양오염복원: PCB 제거 토양미생물들의 군집과 기능을 효과적으로 분석하는 신 genomics 방법개발에 관한 연구

박준홍

연세대학교 사회환경시스템공학부 토목환경공학전공  
parkj@yonsei.ac.kr

## 요 약 문

Because of high population diversity in soil microbial communities, it is difficult to accurately assess the capability of biodegradation of toxicant by microbes in soil and sediment. Identifying biodegradative microorganisms is an important step in designing and analyzing soil bioremediation. To remove non-important noise information, it is necessary to selectively enrich genomes of biodegradative microorganisms from non-biodegradative populations. For this purpose, a stable isotope probing (SIP) technique was applied in selectively harvesting the genomes of biphenyl-utilizing bacteria from soil microbial communities. Since many biphenyl-using microorganisms are responsible for aerobic PCB degradation in soil and sediments, biphenyl-utilizing bacteria were chosen as the target organisms. In soil microcosms,  $^{13}\text{C}$ -biphenyl was added as a selective carbon source for biphenyl users. According to  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  analysis by GC-MS,  $^{13}\text{C}$ -biphenyl mineralization was detected after a 7-day of incubation. The heavy portion of DNA ( $^{13}\text{C}$ -DNA) was separated from the light portion of DNA ( $^{12}\text{C}$ -DNA) using equilibrium density gradient ultracentrifuge. Bacterial community structure in the  $^{13}\text{C}$ -DNA sample was analyzed by t-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. The t-RFLP result demonstrates that the use of SIP efficiently and selectively enriched the genomes of biphenyl degrading bacteria from non-degradative microbes. Furthermore, the bacterial diversity of biphenyl degrading populations was small enough for environmental genomes tools (metagenomics and DNA microarrays) to be used to detect functional (biphenyl degradation) genes from soil microbial communities, which may provide a significant progress in assessing microbial capability of PCB bioremediation in soil and groundwater.

key word: PCBs, soil bioremediation, microbial ecology, microbial genomics, DNA microarrays, stable isotope probing (SIP)

## 1. 서론

토양 및 지하수에서 토양미생물들의 오염복원능 예측은 토양환경오염복원 설계 및 평가에 중요하다. 만약 처리대상 지역에 토양미생물들의 오염복원능이 높은 경우 생물학적 복원방법이(bioremediation) 가

장 경제효과적일 것이다. 유해물질분해 미생물들의 군집과 종다양성과 더불어 유해성유기물질분해기능 유전자를 함께 분석하면, 토양미생물들의 오염복원능을 평가할 수 있다. 하지만 PCB와 같은 난분해성 유기물질 분해하는 토양미생물들은 전체 군집에 비해서 매우 소수이기에, 다양성이 매우 높은 토양미생물군집 중에서 난분해성유기물질분해기능유전자들을 선택적으로 검출하는 것은 현재의 환경분자생물학적 방법으로는 힘들다. 본 연구에서는 최신 환경분자생물학적 기법인 stable isotope probing을 (ref.1) 이용해서 biphenyl 분해기능 지닌 토양미생물들의 유전체들(genomes)을 선택적으로 획득한 결과를 보고하고 있다.

## 2. 본론 및 결론

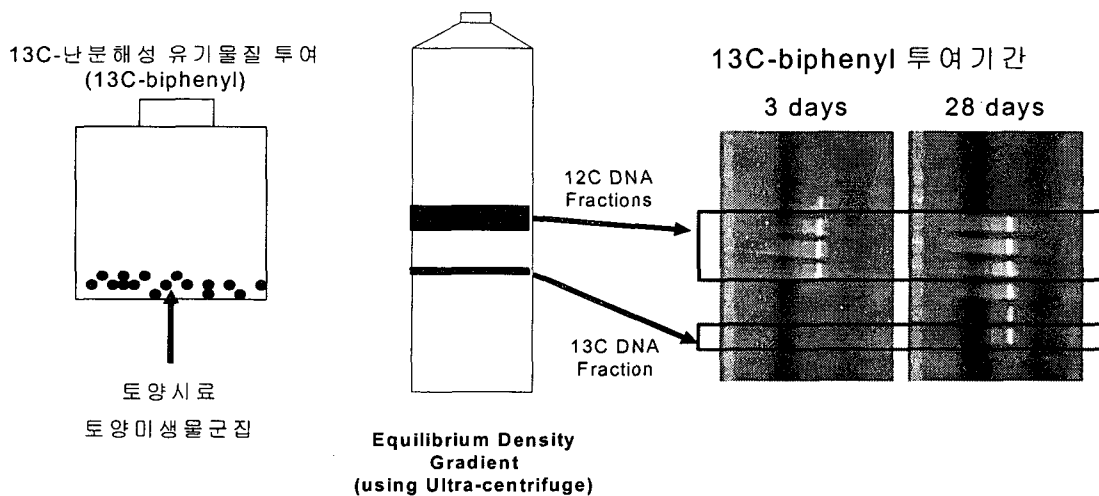


그림 1. 13C-biphenyl 투여를 통한 biphenyl (PCB) 분해 미생물 DNA의 선택적 분리. Ultracentrifuge 이용해서 밀도가 다른 DNA를 경사분리(equilibrium density gradient)한 후 각각의 분리된 DNA 시료들이 있는 박테리아 16S rRNA 유전자들을 PCR (polymerase chain reaction)로 검출한 결과를 보이고 있다 (가장 오른쪽은 PCR 결과의 gel electrophoresis 사진).

PCB로 오염된 토양 (미국 New Jersey 내 전 공군기지지역)을 채취해서 160ml의 serum bottle내 넣어 soil microcosm 실험을 하였다 (그림 1). 13C-biphenyl 투여한 후 1 달 동안 microcosm 공기 시료의 CO<sub>2</sub> 농도와 13C fraction 을 관찰하였다. 관찰된 13C-fraction 분석결과에 따르면 7일 이후 biphenyl 이용 미생물들이 성장하고 있었다. 13C-biphenyl을 성장기질로 성장한 미생물들은 DNA를 포함한 생체내 13C 함유율이 높아지고, 자연유기물을 기질로 성장한 미생물들은 주로 12C를 생체내에 포함한다. 이러한 원리를 이용해서 토양에서 추출된 전체 DNA 중 13C 함유 DNA를 밀도차이를 이용해서 선택 분리할 수 있었다 (그림1).

이렇게 선택분리된 13C-DNA는 biphenyl을 이용하는 미생물들의 유전체(genomes)들만 포함하고 있다. 표준 t-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)을 이용해서 13C-DNA내 박테리아들의 군집구성과 종 다양성을 관찰하였다. 그 결과 13C-biphenyl을 투여하지 않은 토양DNA (그림 2에서 A)에서는 상대적으로 매우 많은 chromatograph peak들이 있는 반면, 13C-DNA 시료에서는 약 20-30 peak들로 줄어들었다. 따라서 13C-biphenyl SIP를 이용해서 biphenyl 이용미생물들의 유전체정보를 얻을 수 있었고, 기존에 가설과 일치하게

난분해성유기물질 biphenyl 이용 미생물들의 종다양성은 전체 군집 종다양성에 비해 매우 낮음을 보이었다. 소수의 난분해성유기물질분해 미생물들의 선택적 분리를 본 연구에서 SIP기법을 통해서 이루었

고, 불필요한 미생물군집 DNA 제거를 통해서 기존의 환경분자생물학적 방법의 분석정확도를 향상할 수 있게 했다. 예로 SIP 이용해 선택분리된 biphenyl분해 미생물생태 다양도는 고밀도 DNA microarray 으로 정확히 분석할 수 있는 수준으로 낮아졌다 (ref 2). 호기성 biphenyl 대사 미생물들은 대부분의 경우 토양 및 지하수 환경에서 공대사거쳐 PCB 분해한다 (ref.3). 따라서 PCB 분해미생물 genomes들을 본 연구와 같이 선택확득 하면 난분해성유기물질 분해기능 유전자와 미생물들 대한 분석이 가능하고, 이를 통해 토양 및 지하수내 생물학적 PCB 토양오염복원능 평가에 필요한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

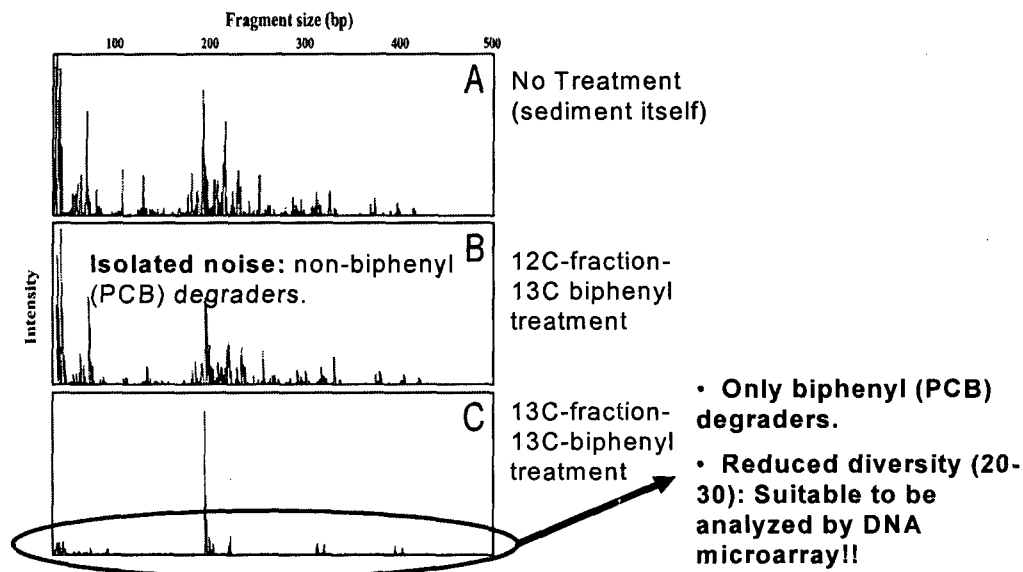


그림 2. 미생물군집내 종 다양성분석 (t-RFLP)

### 3. 참고문헌

- (1) Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, J. C. Murrell. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403(6770): 646-649, 2000.
- (2) Denef, V. J., J. Park, J. L. Rodrigues, T. V. Tsoi, S. A. Hashsham, and J. M. Tiedje. Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environmental Microbiology* 5(10):933-943. 2003.
- (3) Pellizari, V. H., S. Bezborodnikov, J. Quensen 3rd, and J. M. Tiedje. Evaluation of strains isolated by growth on naphthalene and biphenyl for hybridization of genes to dioxygenase probes and polychlorinated biphenyl-degrading ability. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6):2053-2058, 1996.