

벤젠과 톨루엔 분해에 적합한 미소환경과 토착미생물군의 분포변화

이한웅 · 이상현 · 이정욱 · 김현국 · 이수연 · 방성호¹ · 백두성² · 김동주² · 박용근*

고려대학교 생명공학원, ¹한서대학교 생물학과, ²고려대학교 지구환경학과

생물학적 방법으로 토착 미생물에게 벤젠과 톨루엔을 효과적으로 분해할 수 있는 토양환경인자의 조건을 조사하기 위해 16가지의 서로다른 환경의 미소환경(microcosm)을 제작하여 벤젠과 톨루엔 분해실험을 수행하였고, 아울러 분해과정에서 토착미생물의 분포변화를 조사하였다. 그 결과 실험 조건중 토양의 수분 포화도는 30%와 60%이면서 동시에 생물들이 흡착할 수 있는 미생물 흡착제로 활성탄을 1% 첨가한 미소환경(Case 6, Case 7)에서 벤젠과 톨루엔의 분해속도가 가장 빨랐다. 토착토양미생물의 분포변화를 조사한 결과 벤젠과 톨루엔의 분해가 가장 빨리 일어나는 Case 6 와 Case 7에서는 10일 배양 후 total culturable bacteria는 초기 세균 수에 비해 각각 488배와 308배가 증가하였다. 벤젠과 톨루엔 분해세균의 증가 역시 총 세균수가 증가하는 비율로 증가하여 초기 분포를 계속 유지하였고, 벤젠과 톨루엔을 첨가한 미소환경에서 분해 미생물 종의 변화는, 첨가 전 그람음성 세균이 반응 10일 후에는 그람양성 세균이 많이 분리되었다.

Key words □ benzene, bioremediation, indigenous bacteria, microcosm, toluene

벤젠과 톨루엔은 유류의 주요 구성성분이다(16). 이들 물질은 산업화로 인한 화학 공업이 발달함에 따라 용매나 기계의 원료로 널리 사용되고 있다(19). 이들 물질은 용해도가 높아 토양에 방출이 되면 토양을 통과해서 결국 지하수에 용해되어 환경 오염뿐만 아니라 보건 건강에도 악영향을 끼친다(3). 이러한 유류를 토양과 수계에서 제거하기 위한 방법으로 bioremediation은 여러 해 동안 많은 연구실에서 연구되고있고, 이러한 유류가 오염된 환경에서 미생물의 분포도 많이 연구되고있다(17,19). 이들 연구는 벤젠과 톨루엔을 분해하기 위해 최적조건을 미소환경에 단일 탄소원으로 벤젠과 톨루엔을 첨가한 후 이들 물질의 대사과정과 분해정도 또는 미생물의 분포 변화를 조사한 것이다(18, 19,20). 이런 실험은 자연계의 다양한 환경인자인 수분 포화도, pH, 미생물의 농도와 기후조건 등을 고려하지 않고 벤젠과 톨루엔을 최적조건에서 실험한 결과로 환경인자의 다양성이 결여된 단점이 있다(18,20). 미생물 흡착제(활성탄)를 첨가하여 미생물에게 BTEX(benzene, toluene, ethyl-benzene, xylenes) 분해정도를 실험한 보고도 역시 다양한 환경 인자를 고려하지 않았다(15). 따라서 미생물을 이용해서 오염된 지역을 자연 정화하고자하는 많은 연구가 있었음에도, 이를 환경에 직접 적용하는데는 많은 어려움을 겪고 있다.

그러므로 본 연구에서는 벤젠과 톨루엔과 같은 유류가 오염된 토양지역을 미생물을 이용하여 효과적으로 정화시키기 위해서 분해 미생물들이 최대한 활성을 나타낼 수 있는 토양환경에 대한 정보와 분해과정동안 미생물 군이 어떻게 변화해 나가는지를 조사하고자하였다. 이를 위해, 한강 주변의 오염도가 심각한

침전토양에서 토양시료를 채취하여 토양 미생물 활성에 중요한 수분 포화도와 미생물들이 흡착할 수 있도록 활성탄의 농도를 서로 달리하여 16 종류의 미소환경을 설치하였다. 제작된 미소환경으로부터 벤젠과 톨루엔의 분해 정도를 분석하였으며, 벤젠과 톨루엔 분해에 적합한 최적 환경조건에서의 토착미생물군의 분포변화에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

미소환경 설치

미소환경 제작은 아크릴 박스(38.4 cm×38.4 cm×10 cm) 안에 16개의 구획(한 개의 미소환경의 크기: 9.6 cm×9.6 cm×10 cm)이 형성되게 제작하여 미소환경 실험을 수행하였다. 아크릴 박스의 밑 부분은 흙과 기질이 새지 않게 아크릴 판으로 막았으며, 실험 시 수분함량과 기질의 증발을 막기위해 뚜껑을 씌웠다.

연구에 사용된 토양은 입경 2 mm이하의 사질토양으로, 활성탄을 토양 부피에 0%, 1%, 3%, 5%를 첨가하였고, 수분 포화도는 공극 부피의 5%, 30%, 60%, 100%에 해당되는 공급수에 토양 1 g당 벤젠 64 μM과 톨루엔 54 μM을 첨가하여 토양 시료와 균일하게 혼합한 후 미소환경에 각각 1.150 g 씩 넣어 반응시켰다(11). 수분과 미생물 흡착제로 사용된 활성탄은 토양 시료와 혼합하기 전 121°C에서 15분간 멸균을 하여 사용하였다. 각각의 미소환경은 토양을 채취할 당시의 pH 6.8을 유지하였으며, 온도는 상온(25°C~28°C)을 유지하였다. 미소 환경에 첨가된 수분의 포화도와 활성탄의 농도 조건은 Table 1과 같다.

시료채취

시료는 미소환경 설치 당시 시료(0일)와 1일 후, 5일 후, 그리

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 02-3290-3422, Fax: 02-927-9028
E-mail : ykpark@korea.ac.kr

고 10일 경과 후에 채취하였다. 각 시료는 멸균된 집기병에 담아 실험을 한 후 보관 시에는 -70°C 냉장고에 보관하였다.

Table 1. No flow experimental conditions for degradation of benzene and toluene

Microcosm	Moisture Content (%)	PAC (%)
Case 1	5	0
Case 2	5	1
Case 3	5	3
Case 4	5	5
Case 5	30	0
Case 6	30	1
Case 7	30	3
Case 8	30	5
Case 9	60	0
Case 10	60	1
Case 11	60	3
Case 12	60	4
Case 13	100	0
Case 14	100	1
Case 15	100	3
Case 16	100	5

PAC: Powdered-Activated Carbon.

시료분석

사용된 기질은 벤젠과 톨루엔(Junsei Chemical Co., GR grade)을 사용했으며 각각의 미소환경에 벤젠 $64\ \mu\text{M}$ 과 톨루엔 $54\ \mu\text{M}$ 을 첨가하였다. 토양 시료채취 후 토양과 methylene chloride(Junsei Chemical Co., GR grade)을 1 대 1의 비율로 혼합한 후 120 rpm에서 12시간 동안 현탁한 후 상등액을 취하여 methylene chloride로 적당히 희석하였다. 채취한 시료는 15,000 rpm에서 원심 분리한 후 상등액을 $30\ \text{m} \times 0.32\ \text{mm} \times 2.25\ \mu\text{m}$, 5% phenylmethylsiloxane capillary column이 장착된 gas chromatographic system (Hewlett-Packard model 6890 series, USA)을 사용하여 분해 농도를 측정하였다. 운전 조건은 injector 300°C , detector 300°C , 오븐온도: 초기 200°C , 온도증가 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 최종 250°C 10분이다. 이때 각각의 체류 시간은 벤젠 4.71 분과 톨루엔 7.85분 이었다. 모든 시료의 분석은 3번을 반복하여 실험하였다.

미생물 배양 배지 및 배양 조건

미생물 수는 채취한 토양시료를 0.9% NaCl이 첨가된 phosphate buffer에 첨가 한 후 적당히 희석하여 준비된 배지에 도말하여 28°C 배양기에서 5일 동안 배양한 후 배지에 형성된 colony 수를 측정하였다. Total culturable bacteria 총 세균수 측정은 R2A(Difco, Co.)를 사용하였고, 벤젠과 톨루엔 분해 세균

수는 최소배지인 M9 배지에 기질농도는 각각 $5\ \text{mM}$ 이되게 첨가하여 사용하였다.

분해 미생물 분리 및 동정

벤젠과 톨루엔 분해 미생물의 분리는 최소배지에서 성장한 미생물들을 해부현미경(Kyowa)과 형광현미경(Leica, Germany)을 사용하여 형태학적인 분리 (7,8)를 먼저한 후 우점으로 선별된 미생물을 다시 단일 탄소원으로 벤젠과 톨루엔을 첨가한 M9 액체배지에서 그 성장을 확인 한 후 동정실험을 하였다. 선별된 미생물은 NB (Nutrient broth, Difco Co.)에서 하루 동안 배양한 후 CTAB 방법을 이용하여 미생물의 genomic DNA 를 추출했다(6). 미생물로부터 추출한 genomic DNA를 주형으로 증합연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하였다. PCR반응물 $20\ \mu\text{l}$ 안에는 $20\ \text{mM}$ Tris-Cl (pH 8.0), $100\ \text{mM}$ KCl, $6\ \text{mM}$ MgCl_2 , 0.02% gelatin, 각각 $5\ \text{mM}$ deoxynucleoside triphosphate (Promega, USA), $0.2\ \text{pmol}$ Primer, $10\ \text{ng}$ DNA 주형, $1\ \text{U}$ Taq Polymerase (Promega, USA)를 첨가하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위해 사용된 primer는 forward primer (TAKARA, Japan)로 5'-GATTTGGATCCT-GGCTCAG-3'(27F), reverse primer는 5'-AAGGAGGGATCC-AGCC-3'(1492R)이다. 첫 번째 반응은 94°C 에서 4분, 다음 각 단계에서는 94°C 1분, 57°C 에서 1분, 72°C 에서 1분 30초동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 30번 반복하고, 마지막으로 72°C 에서 10분 동안 16S rDNA를 증폭한 후 4°C 에서 냉각하였다. PCR증폭산물은 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)를 사용하여 정제하였다. 16S rDNA 염기서열을 분석하기 위하여 정제된 PCR산물을 주형으로 다시 DNA Sequencing Kit (ABI prism) 증합효소를 사용하였고, 27F와 1492R을 염기서열 primer로 사용하여 얻은 PCR산물을 ABI model 310 (version 3.0) 염기서열 분석기계를 사용하여 분석하였다. 미생물 동정은 16S rDNA염기서열 분석결과를 BLAST search (www.ncbi.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

미소환경에서의 벤젠과 톨루엔의 분해

다양한 미소환경 조건에서 벤젠과 톨루엔의 분해 양상은 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 벤젠의 분해는 수분포화도가 30%와 60% 에서 분해가 가장 빨리 이루어 졌으며, 특히 활성탄 1%를 첨가해준 조건에서는 반응 5일만에 초기 첨가한 벤젠의 70% 이상이 분해되었고 반응 10일째에는 완전히 분해되었다(Case 6, 10). 그러나 수분포화도가 5% (Case 1, 2, 3, 4)일 때와 100% 일 경우(Case 13, 14, 15, 16)는 반응 10일 이후에도 벤젠의 분해가 완전히 이루어지지 않았고, 이들 중 특히 활성탄이 첨가되지 않은 case 1과 case 13에서 분해가 가장 늦었다. 톨루엔 분해 역시 벤젠 분해와 비슷한 양상으로 분해되었다(Fig. 2). 수분 포화도 30%와 60%에서 분해가 빨리 일어났고, 특히 활성탄이 1% 또는 3%가 첨가된 조건에서 가장 분해 잘 되어 반응 10일에 완전히 분해되었다(Case 6, 7, 10, 11). 그러나 수분 포화도가

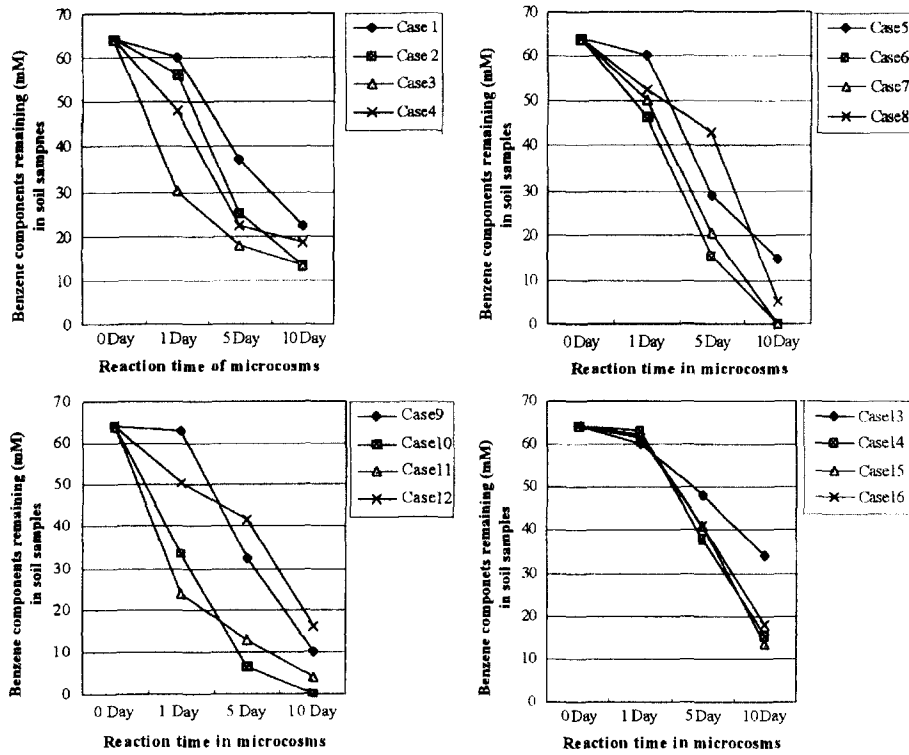


Fig. 1. Degradation of benzene components in various microcosms supplemented with 64 μ M benzene.

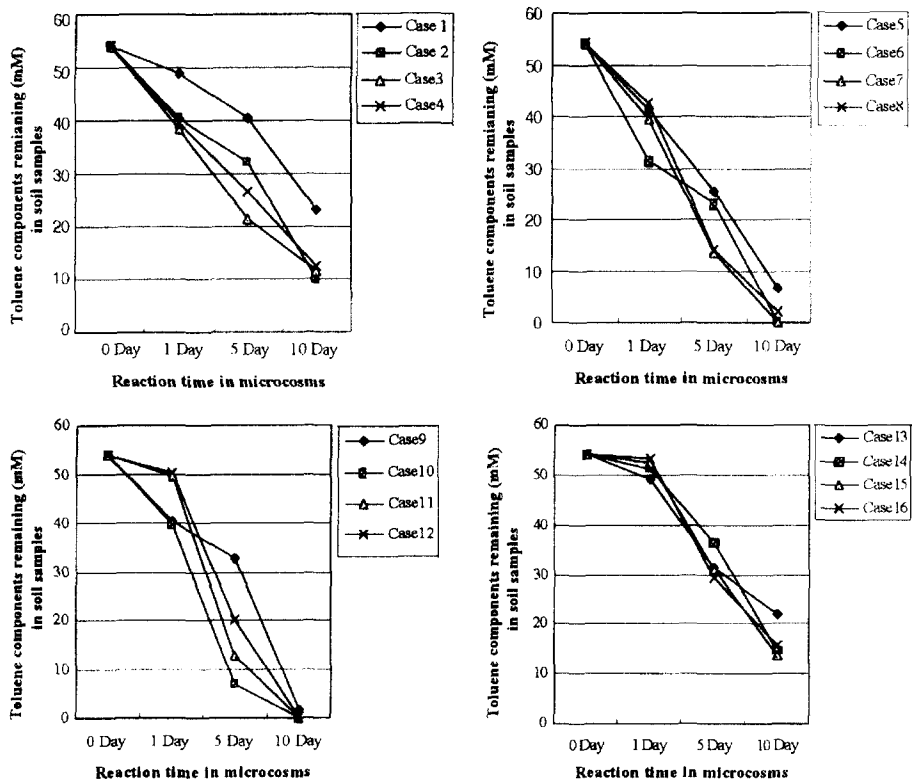


Fig. 2. Degradation of toluene components in various microcosms supplemented with 54 μ M toluene.

5% 또는 100%인 경우는 활성탄 첨가 여부와는 상관없이 모든 조건에서 10일이 되어도 완전히 분해되지 않았다.

미소환경 실험 결과로부터 벤젠과 톨루엔 두 방향족 화합물은 토양 내 수분 포화도가 30%, 60% 이면서 미생물 흡착제로 활성

탄을 1%, 3% 첨가된 미소환경에서 분해가 빨리 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 특히 수분 함량 30%와 활성탄 1%가 첨가된 미소환경(Case 6, 10)에서 가장 빠른 분해 현상을 보여주었다. 일반적으로 토양에서 미생물의 활동은 토양이 물에 잠기거나 반대로 건조해져 토양내 수분이 결핍되면 미생물 활동이 감소된다고 한다(1,15). 물은 영양 물질의 확산과 농도에 영향을 미쳐 미생물에 영향을 준다(14,15). 이러한 현상은 본 실험에서 토양 조건이 같은 상태(영양상태)에서 수분 포화도의 변화에 의해 토착 미생물의 활성이 수분 포화도가 30%와 60% 시 증가하고 이에 따라 벤젠과 톨루엔을 분해하는 미생물의 활성도 증가되었다고 사료된다. 또한 미생물의 흡착제로 사용된 활성탄은 미생물들이 군집을 이루게 하는데 도움을 주는 요인이라고도 사료된다. 따라서 다음 실험은 각각의 환경요인에 따른 미생물 분포변화 실험을 수행하였다.

미소환경 내의 미생물군의 분포변화

Table 2. Total number of the culturable bacteria in various microcosms

Case of microcosm	Reaction time			
	0 h	24 h	120 h	240 h
1	2.19×10^5 ^a	3.16×10^5	1.62×10^6	1.66×10^6
2	2.19×10^5	7.76×10^5	1.45×10^6	2.0×10^6
3	2.19×10^5	2.09×10^5	1.29×10^6	1.74×10^6
4	2.19×10^5	1.79×10^5	1.85×10^5	1.70×10^5
5	2.19×10^5	2.95×10^5	2.0×10^6	3.02×10^6
6	2.19×10^5	6.17×10^5	1.55×10^8	1.07×10^8
7	2.19×10^5	1.0×10^5	4.17×10^7	6.76×10^7
8	2.19×10^5	6.92×10^5	1.70×10^6	2.57×10^6
9	2.19×10^5	8.71×10^5	1.41×10^6	5.5×10^6
10	2.19×10^5	2.75×10^5	3.47×10^6	1.05×10^7
11	2.19×10^5	7.76×10^5	1.51×10^6	2.4×10^6
12	2.19×10^5	2.4×10^5	2.51×10^5	1.26×10^6
13	2.19×10^5	8.71×10^5	1.07×10^6	1.38×10^6
14	2.19×10^5	3.4×10^5	3.94×10^6	6.76×10^6
15	2.19×10^5	6.17×10^5	1.20×10^6	2.19×10^6
16	2.19×10^5	3.47×10^5	2.45×10^5	6.5×10^5

^aThe cell number of the total culturable bacteria (CFU/g).

Table 3. Total number of the culturable bacteria in Case 6 microcosm

Reaction Time	Total number of the viable cells (CFU/g)		
	Total culturable bacteria	Benzene-degrading bacteria	Toluene-degrading bacteria
0 h	2.19×10^5	6.31×10^2 (0.29%) ^a	9.12×10^2 (0.41%) ^b
24 h	6.17×10^6	1.0×10^3 (0.016%)	1.24×10^3 (0.02%)
120 h	1.55×10^8	8.51×10^4 (0.054%)	7.59×10^4 (0.049%)
240 h	1.07×10^8	4.07×10^5 (0.38%)	1.0×10^6 (0.93%)

^aThe percentage of benzene degrading bacteria in total culturable bacteria.

^bThe percentage of toluene degrading bacteria in total culturable bacteria.

벤젠과 톨루엔이 분해되는 동안 16종류의 서로 다른 미소환경 내에서의 총 미생물 수와 벤젠과 톨루엔 분해미생물수가 어떻게 변화하는지를 조사하였다(Table 2, 3).

이를 위해 우선 16종류의 서로 다른 조건의 미소환경을 반응시키면서 총 세균수의 변화를 보았다(Table 2). 그 결과 벤젠과 톨루엔의 분해가 가장 빨리 일어났던 Case 6 과 7의 경우는 총 세균의 수가 초기 세균 수에 비해 각각 488배 와 308배씩 증가하였다. 이러한 결과는 적당한 수분 공급에 의해 토양내의 영양 물질 확산에 의해 미생물이 성장하는데 좋은 환경 조건을 만들어주었다고 사료된다. 그리고 미생물 흡착제로 사용된 활성탄의 경우는 토양의 수분포화도가 동일할 경우 토양부피의 1%를 첨가했을 때가 가장 미생물의 수적 증가에 효과적이었다. 활성탄이 첨가되지 않았거나, 높은 농도로 첨가되었을 경우는 오히려 미생물성장이 억제되었다. 따라서 적당한 수분포화도 뿐만 아니라, 토양 내에서는 영양물질과 미생물들이 잘 부착되어 보다 효과적으로 미생물들이 자랄 수 있도록 흡착제의 존재가 중요하며, 그 농도는 토양부피의 1% 정도가 적당하다고 판단된다.

벤젠과 톨루엔이 가장 빨리 분해된 Case 6 경우는 벤젠과 톨루엔분해 미생물수의 변화를 조사하였다(Table 3). 그 결과 총 세균수의 증가비율로 벤젠과 톨루엔 분해세균 수 역시 증가하여, 이들 분해세균이 차지하는 분포 비는 초기에는 감소했지만, 10일 후 벤젠 분해균은 0.29%에서 0.38%로 톨루엔 분해균은 0.41%에서 0.93%로 증가하였다. 이러한 초기 감소 현상은 모든 미소환경에서 일어났다. 벤젠과 톨루엔이 빨리 분해되는 것은 벤젠과 톨루엔 분해세균들이 월등히 그 분포비율이 높아지는 것이 아니라 토착미생물들의 수가 증가하는 비율로 이들 분해세균의 수 또한 점차 증가하기 때문이다. 분해세균이 차지하는 초기 농도가 24시간 이후에는 처음의 농도를 유지하지 못하고 전체 미생물 분포비에 현저히 감소하는 현상을 보여 주었는데 이는 갑작스런 벤젠과 톨루엔의 첨가에 의한 영향이라 사료된다. 그러나 시간이 경과하면서 이들 분해 미생물의 수적 증가현상이 일어났다. 그러므로 오염된 지역을 미생물을 이용하여 효과적으로 자연 정화하기 위해서는 토착미생물들이 잘 자랄 수 있는 토양의 환경을 최적으로 맞추어 주는 것이 중요하다고 판단된다. 따라서 오염된 지역의 수분 포화도를 30%~60%수준으로 맞추어주고 미생물들이 잘 부착할 수 있는 활성탄을 토양부피의 1% 정도 뿌려주는 것이 필요하다고 사료된다.

Table 4. Results for isolates from benzene and toluene degrading-bacteria in case 6 microcosm containing original soil sample

Isolates	16S rRNA gene sequencing			Gram stain and cell morphology
	Closest match	No. of nucleotides compared	% Similarity with closest match	
BT1	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	460	97	-, rod
BT2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	540	97	-, rod
BT3	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	346	94	-, rod
BT4	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	542	98	-, rod
BT5	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	436	93	-, cocci and rod
BT6	<i>Flavobacterium capsulatum</i>	431	93	-, rod
BT7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	453	98	-, rod
BT8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	401	95	-, rod
BT9	<i>Pseudomonas putida</i>	602	99	-, rod
BT10	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	485	98	-, rod
BT11	<i>Rahnella aquatilis</i>	562	96	-, rod

Table 5. Results for isolates from benzene and toluene degrading-bacteria after 10 days reaction of the Case 6 microcosm

Isolates	16S rRNA gene sequencing			Gram stain and cell morphology
	Closest match	No. of nucleotides compared	% Similarity with Closest match	
BTEX1	<i>Bacillus</i> sp.	307	94	+, rod
BTEX2	<i>Bacillus</i> sp.	535	97	+, rod
BTEX3	<i>Paenibacillus glucanilyticus</i>	510	96	+, rod
BTEX4	<i>Deinococcus grandis</i>	589	98	+, cocci
BTEX5	<i>Paenibacillus popillae</i>	434	97	+, rod
BTEX6	<i>Microbacterium aurum</i>	104	99	-, rod
BTEX7	Unidentibacterium low G+C G-positive bacterium	430	97	+, cocci
BTEX8	<i>Paenibacillus grandis</i>	334	97	+, rod
BTEX9	Unidentibacterium low G+C G-positive bacterium	348	97	+, cocci
BTEX10	Unidentified eubacterium	620	99	-, rod
BTEX11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	569	98	-, rod
BTEX47	<i>Pseudomonas</i> sp.	407	97	-, rod

미생물군 분포의 변화

벤젠과 톨루엔의 분해가 가장 빨리 일어났고, 미생물 수도 가장 많이 증가한 Case 6의 미소환경을 이용하여 초기토양시료(대조구)에 존재하던 벤젠과 톨루엔 분해세균들과 기질을 첨가해서 미소환경을 반응시키는 과정에서의 미생물 종류들이 어떻게 변화하는지를 조사하였다.

대조구 토양에서 벤젠과 톨루엔을 분해하는 미생물은 Table 4에 나타났다. 실험 결과 일반적으로 벤젠이나 톨루엔 뿐만 아니라 poly-aromatic compound를 분해한다고 널리 보고된(4,5,9,17) *Pseudomonas* sp. (BT1, BT3, BT5, BT9)가 전체 11균주 중 4균주가 분리되었다. 분리된 미생물은 모두 그람음성 미생물들이었고, 현미경 관찰 결과 cocci나 rod 형태의 미생물들이었다(Table 4). 이러한 환경에 벤젠과 톨루엔을 각각 64 μ M과 54 μ M을 첨

가한 후 10일 동안 반응시킨 다음 미생물 종의 변화를 알아본 결과는 Table 5와 같다. 결과 대조구 토양에서 분리된 미생물 속 중 *Pseudomonas*를 제외하고 많은 변화가 발생했다. 특히 그람양성 미생물인 *Bacillus*와 *Paenibacillus*속들이 벤젠과 톨루엔 분해 미생물로 많이 분리되었다. 보고된 논문에 의하면(10) 그람양성 미생물들이 토양 내에서 유류의 구성성분인 탄수화물을 분해하는 중요한 미생물들이라고 발표된 바는 있으나, *Paenibacillus*는 *Bacillus*속에 속하는 미생물로 토양 내에서 질화작용이나 고온성 저항 미생물로 근래에 알려진(2) 미생물이지만, 방향족 화합물을 분해하는 미생물로는 널리 알려지지 않았다(12). 이런 그람양성 미생물들이 반응 후 벤젠과 톨루엔을 분해하는 미생물로 많이 자라게된 원인은 영양상태가 좋지 않은 약 조건의 사질토양(대조구 토양)에서 포자형태 열등한 미생물로 존재하다 환경이

좋아지면서 벤젠과 톨루엔을 기질로 사용하여 급성 장하면서 토양내의 벤젠과 톨루엔을 제거하는데 중요한 역할을 했을 것이라고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 (1998)년 한국학술진흥재단의(과제번호: 98-0703-03-01-3) 학술연구비에 의하여 지원되었음.

참고문헌

- Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. second ed., p. 128-147. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
- Alexandre S.R., G.F. Duarte, L. Seldin, and J.D.V. Elsas. 1998. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2770-2779.
- Dean, B.J. 1985. Recent findings on the genetic toxicity of benzene, toluene, xylenes, and phenol. *Mutat. Res.* 145, 153-181.
- Finette, B.A. and D.T. Gibson. 1988. Initial studies on the regulation of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Biocatalysis*. 2, 29-37.
- Folsom, B.R. and P.J. Chapman. 1991. Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1602-1608.
- Geoffrey, B., Smith, and J.M. Tiedje. 1992. Isolation and characterization of a nitrite-reduction gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 374-38410.
- Gerhart, P., R.G.E. Murray, R. Cotillow, E. Nester, E.A. Wood, N. R. Krieg, and G.B. Phillips. 1881. *Manual of methods for general bacteriology*. p. 414. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 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, Md.
- Hubert, C., Y. Shen, and G. Voordouw. 1999. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3064-3070.
- Juck, D., T. Charles, L.G. Whyte, and C.W. Greer. 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS microbiology ecology*. 33, 241-249.
- Mason, C.A., G. Ward, K. Abu-Salah, O. Keren, and C.G. Dosoretz. 2000. Biodegradation of BTEX by bacteria on powdered activated carbon. *Bioprocess engineering* 23, 331-336
- Michael Lebuhn, T. Heulin, and A. Hartmann. 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*. 22, 325-334.
- Paul, E.A. and F.F. Clark. 1988. *Soil microbiology and biochemistry*, p. 19-22. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Potter, T.L. 1992. Fingerprinting petroleum products: unleaded gasolines, p. 83-92. In P.T. Kostecki, and E.J. Calabrese (ed.), *Petroleum contaminated soils*, vol. 2. Lewis Publishers, Chelsea, Mich.
- Parales, R.E., J.L. Ditty, and C.S. Harwood. 2000. Toluene-Degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4098-4104.
- Reisch, M.S. 1992. Top 50 chemicals production stagnated last year. *Chem. Eng. News*. 70, 16-22.
- Sarah, J. MacNaughton, J.R. Stephen, A.D. Venosa, Gregory A. Davis, Yun-Juan Chang, and David C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3566-3574.
- Shi, Y., M.D. Zwolinski, M.E. Schreiber, J.M. Bahr, G.W. Sewell, and W.J. Hickey. 1999. Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2143-2150.
- Smith, R.K. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*. 1, 191-206.
- Tsao, C.-W., H.-G. Song, and R. Bartha. 1998. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4924-4929.

(Received January 22, 2001/Accepted March 9, 2001)

ABSTRACT: Microbial Community in Various Conditions of Soil Microcosm

Han-Woong Lee, Sang-Hyon Lee, Jeong-Ok Lee, Hyeon-Guk Kim, Soo-Youn Lee, Seong-Ho Bang¹, Doo-Sung Baek², Dong-Ju Kim², and Yong-Keun Park*(Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, ¹Department of Biology, Hanseo University, Choongnam 356-820, ²Department of Earth and Environment Science, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Biological treatment of benzene and toluene contaminated soil was investigated in laboratory microcosm of 16 different types for degrading benzene and toluene by indigenous bacteria. At the experimental conditions of the microcosms fast degrading benzene and toluene, moisture contents were 30% and 60% in a soil gap and content of powdered-activated carbon(PCA) for adhesion of benzene and toluene-degrading bacteria was 1% in total soil mass. At the conclusion of the shifted bacteria community, Case 6 and Case 7 were operated until 10 days, and then the total cell number and the number of benzene and toluene degrading bacteria were investigated. The total cell number of Case 6 and Case 7 increased 488 fold and 308 fold of total indigenous cell, respectively. The number of benzene and toluene degrading bacteria increased and maintained the percentages occupied in pre-operating microcosm. Species of benzene and toluene degrading bacteria in microcosm changed from species of Gram negative bacteria to Gram positive bacterial species after soil exposed to benzene and toluene.