

PCR을 이용한 토양 중 Terephthalic Acid 분해 *Comamonas testosteroni*의 검출

강동주 · 홍연표¹ · 이종훈*

경기대학교 식품생물공학과, ¹중앙대학교 예방의학교실

PCR Detection of Terephthalic Acid Degrading *Comamonas testosteroni* in Soil. Kang, Dong Zhou, Yeon-Pyo Hong¹, and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea, ¹Department of Preventive Medicine and Community Health, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea – Eleven bacterial strains which are able to utilize terephthalic acid as a carbon and an energy source for growth were isolated from the soil of 7 water quality evaluation points in Kyonggi area of Korea. Phthalic acid isomer degrading activity of the isolates from the 4 contaminated points was higher than those from the 3 clean points. Among 11 isolates, 4 isolates which have high terephthalic acid degrading activity and degrade two phthalic acid isomers were identified by partial 16S rDNA sequence determination. One of them was identified as *Pseudomonas putida*, and the others as *Comamonas testosteroni*. Thus a large number of phthalic acid isomer degrading bacteria in domestic soil were inferred as *C. testosteroni*. On the basis of these results, the PCR detection of *C. testosteroni* in soil was applied to monitor soil contamination by phthalic acid isomers. The DNA of *C. testosteroni* extracted from 4 g soil was directly detected by PCR with *C. testosteroni* specific primer pair. The amount of PCR products was different according to sampling sites and more PCR products were obtained from contaminated sites than those from clean sites (Gulpo-chun > Anyang-chun > Hwangguji-chun > Shin-chun > Huk-chun > Pukhan-river > Kapyeong-chun). This result was coincided with that of the viable cell counts for terephthalic acid degrading bacteria.

Key words: Terephthalic acid, phthalic acid isomer, *Comamonas testosteroni*, PCR detection

급속한 산업발달과 경제성장은 환경오염이라는 부작용을 유발하였으며 이러한 환경오염 문제에 대하여 선진국뿐 아니라 개발도상국에서도 점차 관심이 높아지고 있다. 최근에는 환경오염문제 중에서도 특히 내분비계장애물질이 인간 및 생태계에 미치는 영향에 대한 문제가 커다란 사회적 관심을 불러일으키고 있다. 내분비계장애가 우려되는 물질 중 하나인 phthalic acid ester는 플라스틱과 비닐 제조의 성상 변형제(plasticizer)로 많이 사용되며 화학합성의 발달과 합성 수지 제품의 증가로 그 수요가 날로 증가하고 있다. 이들 화합물들은 성상변형제의 용도 외에도 방충제, 화장품, 살충제의 캐리어 등에 사용되고 있다[1]. 따라서 이러한 유도체 합성을 위한 phthalic acid 이성질체들도 대량 생산되고 있다. Phthalic acid ester와 이성질체들은 인체에는 심각한 독성을 나타내지는 않는 것으로 보고되었으나, 최근 들어 내분비계 장애물질로 알려지면서 관심의 대상이 되고 있다[10, 11, 13]. 한편 이들 화합물은 공업적 사용 후, 극 일부분만이 재활용

되고 나머지는 환경 중에 방출되고 있어 상당량이 토양과 하천에 유입되어 강, 하천, 토양, 대기 등, 우리 주변환경을 오염시켜 농작물 재배 과정에서 농축된 상태로 식품으로 유입될 수 있다. 그러나 우리나라는 잔류실태조사나 관리방안, 제거방안 등에 관한 조사 연구가 선진국에 비해 미흡한 실정이다.

환경 중의 phthalic acid 이성질체 및 유도체들은 주로 미생물에 의해서 제거되는 것으로 알려져 있고, 토양, 하천, 해양으로부터 호기적 또는 혐기적으로 분해 대사하는 미생물들이 분리 동정되었으며 대사과정이 밝혀져 있다[13]. 벤젠에 두개의 carboxyl 기를 가지고 있는 phthalic acid의 기본 구조에 alkyl chain이 결합되어 있는 phthalic acid ester 화합물들은 먼저 alkyl 사슬이 분해되어 phthalic acid 기본구조로 만들어진 후, 분해가 진행되는 것으로 알려져 있으며 [3, 6, 7] protocatechuic acid를 경유하는 개환반응에 의해서 생육에 필요한 탄소원으로 이용되는 것으로 보고되었다[4, 12].

토양 중의 미생물군집은 토양의 이화학적 성질과 밀접한 관계를 맺고 있으며 미생물의 에너지를 공급하는 유기물 함량과도 상관 관계가 높은 것으로 알려져 있다[5]. 따라서

*Corresponding author
Tel: 82-31-249-9656, Fax: 82-31-253-1165
E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

본 연구그룹에서는 경기도지역의 하천을 대상으로 생화학적 산소요구량(BOD) 20 ppm 이상으로 오염도가 높은 4개 지역(굴포천, 안양천, 황구지천, 신천)과 2 ppm 이하로 비교적 청정한 3개 지역(북한강, 흑천, 가평천)에서 terephthalic acid를 탄소원으로 생육하는 11개 균주를 분리하여 그들의 phthalic acid 이성질체를 탄소원으로 한 고체배지에서의 생장과 액체배지에서의 이성질체 분해능력을 비교한 결과, 분리균들은 대체로 한개 또는 두개의 phthalic acid 이성질체를 이용하여 성장하는 것으로 나타났고, 오염도가 높은 지역에서 분리된 균들의 phthalic acid 이성질체 분해활성이 오염도가 낮은 지역에서 분리된 균들에 비해 높은 것으로 나타났다[9].

본 연구에서는 분리된 11개 균주 중, 높은 terephthalic acid 분해능을 보유하고 2개의 이성질체의 분해가 가능한 4개 균주를 16S rDNA 부분 염기서열 결정을 통해 동정하였고, 이들 중, 대부분을 차지하는 *Comamonas testosteroni*의 PCR에 의한 토양으로부터의 직접 검출을 통하여 phthalic acid 이성질체에 의한 토양오염의 모니터링 방법으로써의 적용가능성을 타진해 보았다.

재료 및 방법

미생물 배양

분리한 terephthalic acid 분해미생물 배양을 위한 배지(TPA 배지)는 무기염으로 구성된 기초배지에 탄소원으로 terephthalic acid를 5 mM 첨가하고, 1 N NaOH로 pH 7이 되도록 조정하여 사용하였다[9]. 기초배지는 1 L 증류수에 NH₄Cl 1.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeCl₃ · 6H₂O 0.01 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g, EDTA 0.1 g, CuSO₄ · 5H₂O 5 µg, H₃BO₃ 1 µg, MnCl₂ 1 µg을 녹여 제조하였다, 균주들은 26°C 호기적 조건에서 48시간 배양하였다.

Genomic DNA 및 토양 중의 DNA 추출

Terephthalic acid 분해균의 genomic DNA의 추출은 Current Protocols in Molecular Biology[2]에 제시된 방법을 수정하여 사용하였고, 토양으로부터의 DNA 추출은 Xia 등[14]의 방법을 수정하여 사용하였다[8]. 전보[9]에서 보고한 terephthalic acid 분해균을 분리한 곳과 동일한 7개 지역 소하천에서 2002년 10월 6일 채취한 토양시료 4 g에 8 ml lysis solution I(0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0, 10 mg/ml lysozyme)을 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 다음, 8 ml lysis solution II(0.1 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 10% SDS)을 첨가하고 -70°C 냉각과 65°C 녹임을 3회 반복하여 토양 중의 세포를 용해하였다. 용해된 세포액을 12,000×g에서 10분 원심분리한 후, 여과하여 CTAB와 NaCl가 최종농도 0.1%와 0.7% 되게 첨가하고 잘 혼합하여

65°C에서 10분 반응시켰다. 동량의 chloroform-isoamylalcohol (24:1)을 첨가한 후, 원심분리하여 얻은 상등액에 동량의 1.6 M NaCl에 녹인 13% polyethylene glycol(molecular weight, 8,000) 용액을 첨가하여 얼음에서 2시간 방치하고, 12,000×g에서 15분 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물은 70% ethanol로 씻어내고 상온에서 건조한 후 3 ml TE에 용해하였다. 10 M ammonium acetate를 450 µl 첨가하여 최종농도가 1.5 M이 되도록 한 시료를 상온에서 12시간 이상 정치시킨 다음, 혼합물을 micro centrifuge에서 14,000 rpm, 10분 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상등액에 2배의 ethanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 보존한 다음, 원심분리하여 DNA를 회수하고 70% ethanol로 수세하고 건조하였다. 건조한 DNA는 60 µl TE에 용해하여 PCR에 사용하였다.

분리균 동정 및 토양미생물 검출을 위한 primer 제작 및 PCR

분리된 terephthalic acid 분해균의 동정 및 토양미생물의 검출을 위한 primer(Soil bacteria detectable primer pair, Table 1)는 GenBank database에 등록된 토양 유래 bacteria 중, *Bacillus cereus*(AF290554), *Brevibacterium* sp.(AF229116), *C. testosteroni*(AF336312)와 *Flavobacterium* sp.(AF386740), *Ochrobactrum intermedium*(AJ242582), *Paenibacillus polymyxa* (AJ223989), *Pseudomonas fluorescens*(AJ278813), *Stenotrophomonas maltophilia*(AJ293473)의 16S rDNA 염기서열을 CLUSTAL W multi-alignment program(European molecular biology laboratory, Germany)을 사용하여 정렬한 후, 상동성이 높은 부분을 선정하여 제작하였다. PCR은 template인 genomic DNA를 0.1 µg 이하로, primer 농도는 20 pmol로 하였으며, 0.25 mM dNTP와 2.5 U의 *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan)를 첨가하여 UNOII thermal cycler(Biometra, Germany)를 사용하여 수행하였다. PCR 온도조건은 95°C 5분 동안 예비가열을 한 다음, 94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분의 과정을 30회 반복하여 수행하였다.

염기서열 결정 및 분석

PCR에 의하여 증폭된 단편은 전기영동한 다음, 0.8%

Table 1. Properties of the 16S rDNA-targeted PCR primers used in this study

16S rDNA-targeted primer		Nucleotide (5'-3')	Product size (bps)
Type	Name		
Soil bacteria detectable primer pair			
Forward	Up-F	ACTCCTACGGGAGGCAG	563
Reverse	Up-R	CCGCAATTCCTTTGAGTTT	
<i>Comamonas testosteroni</i> specific primer pair			
Forward	Coma-F	AACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTG	779
Reverse	Coma-R	CTGAGTCAGTTAAGACCCAACAACC	

agarose gel에서 회수하여 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)에 cloning한 후, 수탁업체(Core biosystem, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL W multi-alignment program을 이용하였다. 염기서열과 아미노산서열의 상동성 검사에는 GenBank database에 수록된 정보를 대상으로 Blast program(www.ncbi.nlm.nih.gov)을 이용하였다.

C. testosteroni 특이적 primer 제작 및 PCR

C. testosteroni 특이적 검출을 위한 primer(Comamonas testosteroni specific primer pair, Table 1)는 terephthalic acid 분해균 동정 및 토양미생물 검출을 위한 primer 제작과 동일한 방법으로 B. cereus(AF290554), Brevibacterium sp. (AF229116), C. testosteroni(AF336312), Flavobacterium sp.(AF336740), O. intermedium(AJ242582), Pa. polymyxa (AJ223989), P. fluorescens(AJ278813), St. maltophilia (AJ293473)의 16S rDNA 염기서열을 CLUSTAL W multi-alignme it program을 사용하여 정렬한 후, C. testosteroni에 특이적인 부분을 선정하여 제작하였다. PCR은 토양에서 추출한 DNA 30 μ l를 template로 첨가하고 terephthalic acid 분해균 동정 및 토양미생물 검출에서와 동일한 조건 하에서 annealing 온도만 66°C로 변경하여 수행하였다. PCR 산물은 전기영동한 후, 사진을 Image Master 2D Elite Software (Amersham Pharmacia Biotechnology)를 이용 수치화 하여 비교하였다.

Terephthalic acid 분해미생물 생균수 측정

토양 중의 DNA 추출에 사용한 토양과 동일한 토양시료 1 g을 싱리식염수 10 ml에 넣어 충분히 섞어준 후, 10^3 ~ 10^6 비율로 단계적으로 희석하여 TPA 한천배지에 도말하고 26°C에서 48시간 배양하여 형성된 colony를 계수하였다. 생균수 측정은 3회 반복 실시하였다.

결과 및 고찰

16S rDNA 부분 염기서열결정을 통한 균주 동정

굴포천에서 분리한 GP1 균주, 황구지천에서 분리한 균주 HG1, HG2, 신천에서 분리한 DD2 균주의 16S rDNA 부분 염기서열결정을 통한 균주 동정 결과, HG1은 Pseudomonas putida와 HG2, GP1, DD2는 C. testosteroni와 99% 이상의 상동성을 나타내었다(Table 2). P. putida와 C. testosteroni는 분해대사경로가 밝혀진 phthalic acid 분해균으로 보고되어 있다[12].

PCR을 이용한 토양 중의 C. testosteroni 검출

분해활성이 높은 4균주의 16S rDNA 부분 염기서열을 통한 동정결과로부터 국내 토양에서 생육하고있는 terephthalic

Table 2. Identification of strains by partial 16S rDNA sequence determination

Strain	Homologous microorganism	Accession number	Identity
HG1	<i>Pseudomonas putida</i>	AF095892	99
HG2	<i>Comamonas testosteroni</i>	AF519533	100
GP1	<i>Comamonas testosteroni</i>	AF538933	99
DD2	<i>Comamonas testosteroni</i>	AF519533	99

acid 및 그 이성질체를 분해하는 미생물 중, 많은 수가 C. testosteroni인 것으로 추정되었다. 따라서 토양오염의 정도와 토양에 존재하는 C. testosteroni의 분포와의 관계를 알아보기 위하여 토양 중 C. testosteroni의 선택적 검출을 시도해 보았다. 구축한 PCR primer의 검증을 위해 본 실험에서 분리, 동정된 C. testosteroni HG2, P. putida HG1과 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 토양미생물 Flavobacterium sp. KCCM11374, Alcaligenes xylosoxydans KCCM40240, B. cereus KCCM11341, Brevibacterium sp. KCCM11946로부터 분리한 genomic DNA를 대상으로 soil bacteria detectable primer pair와 C. testosteroni specific primer pair를 사용하여 PCR을 수행하였다. Soil bacteria detectable primer pair를 사용한 경우 모든 균주로부터 PCR 산물이 증폭되었으나 C. testosteroni specific primer pair에서는 C. testosteroni를 제외한 나머지 균주들의 genomic DNA로부터는 유전자 산물이 증폭되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

따라서 토양으로부터 직접 추출한 DNA를 template로 C. testosteroni specific primer pair를 이용하여 PCR을 수행한

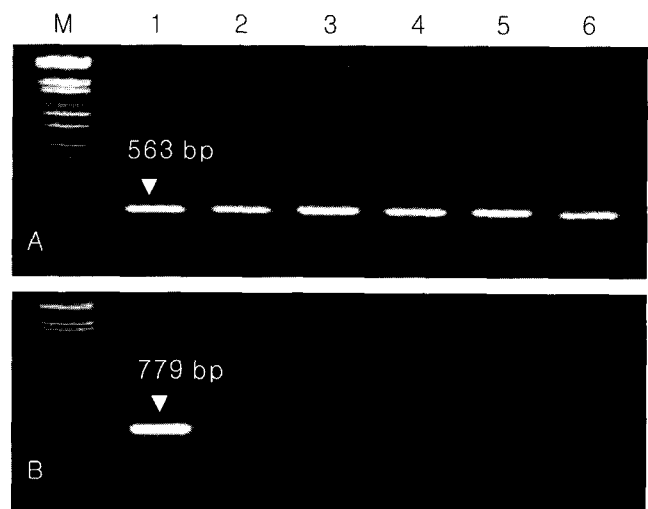


Fig. 1. PCR products obtained by the amplification of genomic DNAs with soil bacteria detectable primer pair (A) and Comamonas testosteroni specific primer pair (B). Lanes: M, DNA size marker (λ DNA digested with EcoT14I); 1, Comamonas testosteroni HG2; 2, Pseudomonas putida HG1; 3, Flavobacterium sp. KCCM11374; 4, Alcaligenes xylosoxydans KCCM40240; 5, Bacillus cereus KCCM11341; 6, Brevibacterium sp. KCCM11946.

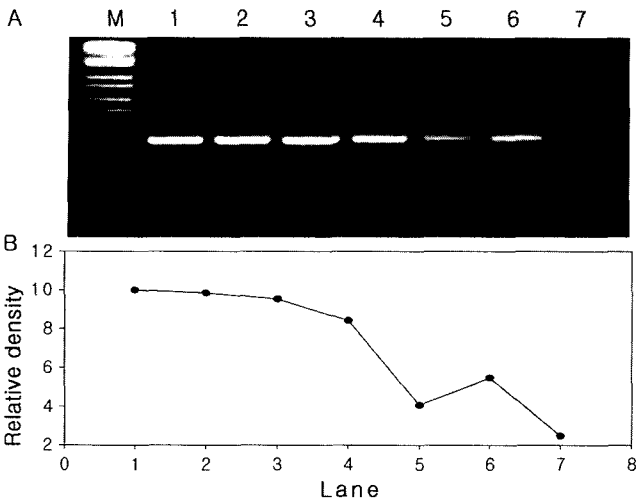


Fig. 2. PCR amplification of the extracted DNA from soil with *Comamonas testosteroni* specific primer pair. A, electrophoretogram; B, intensity of PCR products. Lanes: M, DNA size marker (λ DNA digest with *Eco*T14 I); 1, Gulpo-chun; 2, Anyang-chun; 3, Hwangguji-chun; 4, Shin-chun; 5, Pukhan-river; 6, Huk-chun; 7, Kapyeong-chun.

결과, 각 하천 주변 4 g의 토양으로부터 관찰 가능한 정도의 PCR 산물을 얻을 수 있었고 증폭된 PCR 산물의 양도 지역에 따라 다르게 나타났다. PCR 산물의 양은 굴포천>안양천>황구지천>신천>혹천>북한강>가평천의 순으로 청정지역에서보다 오염지역의 토양에서 *C. testosteroni*가 많이 검출되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

토양 중 terephthalic acid 분해균의 생균수 측정

토양 중의 terephthalic acid 분해균의 존재와 토양에서 검출된 *C. testosteroni* DNA의 상관관계를 검토하기 위해 토양에 존재하는 terephthalic acid 분해균의 수를 TPA 환천배지에서 측정하였다. 토양에서 검출된 terephthalic acid 분해균의 생균수 또한 PCR 검출과 동일하게 굴포천>안양천>황구지천>신천>혹천>북한강>가평천의 순으로 나타났다(Fig. 3).

***C. testosteroni*의 검출과 오염과의 상관 관계**

지금까지의 결과를 종합하면 오염도 수준이 높은 지역에서 phthalic acid 이성질체 분해활성이 높은 분해균이 검출될 뿐만 아니라 분해균의 분포 또한 높은 것으로 나타났고 이들 중, 많은 수가 *C. testosteroni*인 것으로 추정된다. 본 연구에서 제시한 결과는 1 ppm 수준 이하로 존재하는 토양 중의 유기물 검출에 따른 어려움으로 오염물질의 토양 중 농도와 미생물 검출과의 상관 관계를 밝히지 못한 한계를 가지고 있으나, PCR에 의한 토양 중의 특정 유기물 분해 미생물의 검출이 토양오염의 간접적 측정에 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한 토양에서 검출되는 모든 *C. testosteroni*가 phthalic acid 이성질체를 분해한다는 결론을

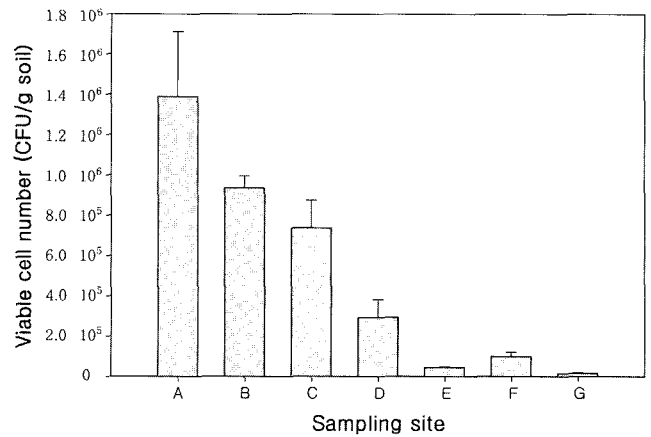


Fig. 3. Viable cell counts of terephthalic acid degrading bacteria in soil. Sampling sites: A, Gulpo-chun; B, Anyang-chun; C, Hwangguju-chun; D, Shin-chun; E, Pukhan-river; F, Huk-chun; G, Kapyeong-chun.

내릴 수는 없지만, 국내 토양에 존재하는 대표적인 phthalic acid 이성질체 분해 미생물로 추정된다. 토양 중 *C. testosteroni*의 PCR 검출은 기기분석에서와 같은 정량성을 제시하지는 못하지만 phthalic acid 이성질체에 의한 오염의 상대적 예측에 사용 가능하다는 점에서 의의를 찾을 수 있다.

요 약

경기도 내의 7개 하천 토양으로부터 terephthalic acid를 분해, 대사하는 미생물 11개 균주를 분리하고, 이들의 phthalic acid 이성질체 분해활성을 비교한 결과, 오염도가 높은 4개 지역에서 분리된 균들의 phthalic acid 이성질체 분해활성이 오염도가 낮은 3개 지역에서 분리된 균들에 비해 높은 것으로 나타났다. 분리된 균주들 중, 높은 terephthalic acid 분해활성을 보유하고 2개의 phthalic acid 이성질체의 분해가 가능한 4균주의 16S rDNA 부분 염기서열결정을 통하여 국내 토양에서 생육하고 있는 phthalic acid 이성질체 분해미생물 중 많은 수가 *C. testosteroni*인 것으로 추정되었다. 이러한 결과에 근거하여 토양 중 *C. testosteroni*의 특이적 검출에 의한 phthalic acid 이성질체에 의한 토양오염의 모니터링 가능성을 검토하였다. *C. testosteroni* 특이적 PCR primer를 구축하고 토양으로부터 직접 추출한 DNA를 template로 PCR을 수행한 결과, 각 하천 주변 4 g의 토양으로부터 관찰 가능한 정도의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 증폭된 PCR 산물의 양은 굴포천>안양천>황구지천>신천>혹천>북한강>가평천의 순으로 청정지역에서 보다 오염지역의 토양에서 *C. testosteroni*가 많이 생육하고 있는 것으로 나타났으며, 각 지역의 토양에 존재하는 terephthalic acid 분해균의 생균수 또한 PCR에 의한 *C. testosteroni*의 검출과 동일한 양상으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(HMP-00-CH-18-0017).

REFERENCES

- Ahn, S.-H., J.-H. Lee, Y.-P. Hong, and M.-K. Kim. 2002. Analysis of soil contamination by phthalate ester around tributaries to the Han River. *J. Korean Soc. Agri. Chem. Biotechnol.* **45**: 97-100.
- Austel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology, Vol. 2. Greene Publishing Associates Wiley-Interscience, U.S.A.
- Cartwright, C. D., S. A. Owen, I. P. Thompson, and R. G. Burns. 2000. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 27-34.
- Chang, H.-K. and G. J. Zylstra. 1998. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DB01. *J. Bacteriol.* **180**: 6529-6537.
- Suh, J. S., B. G. Jung, and J. S. Kwon. 1998. Soil microbial diversity of the plastic film house fields in Korea. *J. Korean Soc. Soil Sci. Fert.* **31**: 197-203.
- Johnson, B. T., M. A. Heitkamp, and J. R. Jones. 1984. Environmental and chemical factors influencing the biodegradation of phthalic acid esters in fresh-water sediments. *Environ. Pollut.* **8**: 101-118.
- Karegoudar, T. B. and B. G. Pujar. 1984. Metabolism of diethyl-phthalate by a soil bacterium. *Curr. Microbiol.* **11**: 321-324.
- Lee, S.-Y., J. Bollinger, D. Bezdicek, and A. Ogram. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3787-3793.
- Lee, Y. and J.-H. Lee. 2001. Degradation of phthalic acid isomers by terephthalic acid degrading bacteria isolated from Kyonggi area. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 122-126.
- Moore, N. P. 2000. The oestrogenic potential of the phthalate esters. *Reproductive Toxicol.* **14**: 183-192.
- Penalver, A., E. Pocurull, F. Borrull, and R. M. Marce. 2000. Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **872**: 191-201.
- Ribbons, D. W., P. Keyser, D. A. Kunz, B. F. Taylor, R. W. Eaton, and B. N. Anderson. 1984. Microbial degradation of phthalate, pp. 371-379. In D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, Marcel Dekker Inc., New York, N. Y.
- Staples, C. A., D. R. Peterson, T. F. Parkerton, and W. J. Adams. 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* **35**: 667-749.
- Xia, X., J. Bollinger, and A.V. Ogram. 1995. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol. Ecol.* **4**: 17-28.

(Received Jan. 19, 2003/Accepted Mar. 16, 2003)