

## Hexane 분해 혼합군의 특성

이은희 · 김재수 · 조경숙\*  
이화여자대학교 환경학과

**Properties of a Hexane-Degrading Consortium.** Lee, Eun-Hee, Jaisoo Kim, and Kyung-Suk Cho\*. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea – It was characterized the hexane biodegradation and mineralization using a hexane-degrading consortium, and analyzed its bacterial community structure by 16S rDNA PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). The specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of the hexane-degrading consortium was  $0.2 \text{ h}^{-1}$  in mineral salt medium supplemented with hexane as a sole carbon source. The maximum degradation rate ( $V_{max}$ ) and saturation constant ( $K_s$ ) of hexane of the consortium are  $460 \mu\text{mol}\cdot\text{g}\cdot\text{DCW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $25.87 \text{ mM}$ , respectively. In addition, this consortium could mineralize 49.1% of  $^{14}\text{C}$ -hexane to  $^{14}\text{CO}_2$ , and 43.6% of  $^{14}\text{C}$ -hexane) was used for the growth of biomass. The clones isolated from the DGGE bands were closely related to the bacteria which were capable of degrading pollutants such as oil, biphenyl, PCE, and waste gases. The hexane-degrading consortium obtained in this study can be applied for the biological treatment of hexane.

**Key words:** Hexane, biodegradation, bacterial consortium, mineralization, denaturing gradient gel electrophoresis

휘발성 유기화합물(VOC)은 각종 산업시설이나 환경기초 시설 등에서 많이 배출되는 오염물질로 스모그를 유발시키고 인체에 악영향을 미친다[15]. VOC의 대표적인 물질로는 alkanes, aromatics, cyclic alkanes, branched alkanes, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) 등이 있다. 이 중 alkane은 다른 VOC 계열의 물질에 비해 생분해되기 쉽다고 알려져 있으나, 짧은 사슬의 alkane은 휘발성이 크고 용해도가 낮기 때문에 생분해가 곤란하다[6, 8]. 특히, octane보다 짧은 alkane은 대부분의 탄화수소 분해 미생물에 산화될 수 있지만 이화되지는 않는다[6, 8].

대표적인 VOCs 물질 중 하나인 Hexane은 각종 유기용제 추출공정, 세정제, 접착제, 잉크 등 다양한 산업공정과 제품에서 범용적으로 사용되는 용제로 여러 산업체 및 시설에서 대량으로 배출되고 있어 많은 환경오염 문제를 유발하고 있으며[15], 많은 대기오염물질 배출시설과 산업용 폐수 및 산업 생산시설의 공정수 뿐 만 아니라, 오염된 토양/지하수 등에서도 흔히 관찰되는 오염물질이다.

Hexane은 인체 내 유입 시 폐를 통해 빠르게 흡수되고 몸 전체로 퍼지며 hexane과 산화 분해 산물인 2,5-hexanedione은 신경 독성물질로 인체에 치명적인 영향을 미친다[4, 11].

따라서, hexane을 함유한 오염물질의 정화기술의 개발이 매우 시급한 실정이다. 많은 환경오염물질 정화기술들이 환

경친화적이고 경제적인 생물공정을 도입하고 있으나, hexane은 대표적인 난분해성 물질 중 하나로 생분해에 대한 연구는 극히 드물다[5, 8, 15]. Hexane 분해 미생물의 배양기술이 아직 개발되지 못하였고, 이로 인해 hexane의 분해 생물자원이거나 특성에 대한 지식기반이 거의 구축되어 있지 않다.

본 연구진은 hexane 분해용 미생물 consortium을 개발하기 위해 유류오염 토양을 접종원으로 하고 hexane을 유일 탄소원으로 공급하여 농화배양을 수행한 결과, hexane을 효율적으로 생분해하는 consortium 개발에 성공하였다. 본 연구에서는 hexane 분해 consortium에 의한 hexane 생분해 특성을 조사하기 위해 hexane-BH 배지에서의 hexane 생분해 속도를 측정하고, 방사선 동위원소를 이용하여 무기화(mineralization) 정도를 측정하였다. 또한 16S rDNA PCR-DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)를 수행하여 hexane 생분해용 consortium의 미생물 군집특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### Hexane 분해 미생물 consortium 개발

Hexane 분해용 미생물 consortium 개발을 위해 이화여대 근처 철도 선로 주변에서 채취한 유류 오염 토양을 미생물 접종원으로 이용하여 다음과 같이 농화배양을 수행하였다. 우선 토양 10 g에 멸균수 10 ml을 넣고 200 rpm에서 30분간 교반한 후, 상등액 약 10 ml을 1 l 혈청병에 넣었다. 여기에 Bushnell-Hass(BH) 배지 50 ml, trace element 용액 50

\*Corresponding author  
Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275  
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

$\mu$ l를 넣었다. BH 배지의 조성은  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.409 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0265 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6 g/l,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0833 g/l 이다. 또한 trace element 조성은  $\text{FeCl}_3$  17 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0.6 g/l,  $\text{ZnSO}_4$  0.2 g/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l,  $\text{MnSO}_4$  0.2 g/l,  $\text{CoCl}_2$  0.8 g/l,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1 g/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 g/l 이다. Hexane의 용해도를 증가시키기 위해 계면활성제인 Pluronic F68 (PF68, Sigma, USA)를 최종 농도가 2.5% (w/v)가 되도록 BH 배지에 첨가하였다[8]. 혈청병을 부틸마개와 알루미늄 캡을 이용하여 밀폐시킨 후, 실린지를 이용하여 hexane (99.5%, Duksan Pure Chemical Co., Korea)을 주입한 후, 30°C, 180 rpm에서 26일 동안 배양 하였다. 이렇게 해서 얻은 배양액은 상기와 동일한 새 배지에 5% (v/v) 접종하여 상기와 동일한 조건에서 계대배양하였다. 이와 같은 방법으로 4회 계대배양하여 얻은 농화배양액을 hexane 생분해용 consortium CH로 명명하였고, 이 consortium의 미생물 군집과 hexane 생분해 특성을 아래와 같은 방법으로 조사하였다.

#### Hexane 분해용 consortium의 미생물 군집 분석

농화배양하여 얻은 hexane 분해용 consortium 배양액을 원심분리하여 얻은 균체 0.5 g (습중량) 으로부터 BIO101 FastDNA SPIN Kit (Q-Biogene, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 template로 하고 16S rDNA gene primer인 341fGC[11]와 518r primer [12]를 이용해 PCR을 수행하였다(PCR system 2700, Applied Biosystem, USA)[2, 13]. 증폭된 genomic DNA 단편은 DGGE로 분석하였다. DGGE는 Dcode™ System (Bio-Rad, USA)을 사용하여 8% polyacrylamide gel을 이용하여 urea 농도를 40~60% (100% denaturant; 7 M urea, 40% (v/v) formamide) 범위로 하여 50 V 에서 12시간 동안 전기영동 하였다[2]. DGGE gel 상에 나타난 band 14개를 잘라내어 다시 DNA를 추출 한 후 341f 와 518r primer 를 사용해 PCR을 수행하였다[2]. 증폭된 DNA시료는 pGEM-T Vector System (Promega, USA)를 이용해 cloning 한 후 *E.coli* DH5 $\alpha$ 에 형질 전환하였다[2]. 형질전환된 14개의 clone 으로부터 plasmid를 추출하여 염기서열을 결정하였다[2]. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (Blast) algorithm을 사용하여 GenBank database와 비교하였다[1, 2]. Hexane 생분해용 consortium 으로부터 얻은 14개 clone (CH1-CH9, CH11-CH15)을 Genbank에 등록하였다 (AY903885-AY903898).

#### Hexane 분해 활성 분석

Hexane 생분해용 consortium을 유일 탄소원으로 hexane 을 10 ml/l 첨가한 BH 배지 (hexane-BH 배지)를 이용하여 30°C, 180 rpm에서 7일 동안 전배양 하였다. 배양액 10 ml

을 원심분리 (9000 rpm, 10 min)하여 회수한 균체를 BH 배지 10 ml에 현탁시켰다. 이 균체 현탁액을 500 ml 혈청병에 넣고 부틸마개와 알루미늄 뚜껑으로 병 입구를 밀봉하였다. 실린지를 이용하여 hexane을 각각 1, 2, 5, 7, 10  $\mu$ l (1.6-7.7 mM) 주입한 후 30, 180 rpm에서 배양하였다. 배양시간 별로 혈청병 headspace 가스를 채취하여 가스 중의 hexane 농도를 가스크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 또한, 균체 농도를 측정하기 위해 배양 시간별로 배양액을 400  $\mu$ l 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양시간에 따라 hexane 농도가 감소하는 그래프의 기울기로부터 hexane분해 속도를 계산하였다. 각 hexane 농도별로 얻은 hexane 분해 속도를 Michaelis-Menten 식에 기초한 Lineweaver-Burk plot 하여 얻은 직선의 기울기와 y절편 값으로부터 최대 hexane 분해속도 ( $V_{\max}$ )와 포화상수 ( $K_s$ )를 구하였다.

한편, 유일 탄소원으로 hexane을 제공한 배지에서 consortium의 비성장속도를 얻기 위해, 1 l 혈청병에 BH 배지 50 ml, hexane 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ml (1.6 - 77.4 mM) 및 접종원으로 전 배양액을 5% (v/v)를 접종한 후 30, 180 rpm에서 배양 시키면서 배양액의 농도를 600 nm에서 측정하였다. 균주가 지수적으로 증가하는 시기의 비성장속도를 기질 농도별로 구하여 Monod 식을 이용해 최대 비성장속도 ( $\mu_{\max}$ )값과 포화상수 ( $K_s$ )값을 구했다.

#### $^{14}\text{C}$ -Hexane 이용한 생분해 실험

Hexane 생분해용 consortium을 hexane-BH 배지에서 전 배양한 다음 배양액 10 ml을 원심분리 (9000 rpm, 10 min)하여 회수한 균체에 BH 배지 10 ml을 넣어 현탁시켰다. 이 균체 현탁액을 500 ml 혈청병에 넣고 부틸마개와 알루미늄 뚜껑으로 병 입구를 밀봉하였다. 이 때 혈청병 부틸마개에 3 ml 병을 연결한 구리선을 부착시켜 병이 움직이지 않고 headspace에 존재하도록 고정하였다. 이 병에는 1 N KOH 1 ml이 들어있어 hexane 분해 시 발생하는  $\text{CO}_2$ 를 바로 흡수할 수 있도록 하였다. 그 후  $^{14}\text{C}$ 로 labeled된 hexane ( $^{14}\text{C}$ , 1.5 mCi/mmol, American radiolabelled chemicals Inc, USA)을 5 ml hexane으로 희석한 다음 혈청병에 각각 10  $\mu$ l 씩 주입하여 (0.1  $\mu\text{Ci}$ /혈청병) 30, 180 rpm에 배양시켰다. 주입한 hexane이 완전 분해된 직후  $^{14}\text{C}$ 를 분석 하였다. 분해가 끝난 후 headspace에 남아있는 가스를 1 ml 주사기로 채취하여 9 ml cocktail 용액 (\*Ultima gold XR, Sigma-aldrich, USA)이 들어있는 scintillation vial에 넣고 liquid scintillation counter (LSC6500 Beckman, USA)로 측정 하였다. KOH로 흡수된  $\text{CO}_2$ 는 scintillation vial에 넣고 cocktail 용액 9 ml 주입 후 LSC 로 측정 하였다. Biomass 으로의 증가량과 분해산물 (metabolite) 및 용해된  $^{14}\text{C}$ -hexane의 양을 측정하기 위해 배지 1 ml을 원심분리 한 후 상등액은 분해산물 및 용해된 hexane의 양, 남아있는 침전물은 biomass로 보고 LSC로 측정하였다. 미생물 biomass에

단순히 부착된 <sup>14</sup>C-hexane을 제거하기 위해 원심분리한 biomass는 증류수로 세척액에서 방사능 activity가 측정되지 않을 때까지 세척하였다. 대조군은 <sup>14</sup>C-hexane의 물리화학적 감소여부를 측정하기 위해 미생물 접종 없이 동일한 실험을 수행하였다. 모든 실험은 이 반복으로 수행되었다.

**분석 방법**

Hexane 분석은 가스 크로마토그래피 (M600D, Younglin, Korea)를 이용해 측정하였고, SUPELCOWAX 10™ (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm film thickness) column과 불꽃 이온화 검출기 (FID)를 사용하였다. Oven 온도는 100°C, injector 온도 230°C, detector 온도는 230°C로 설정하였다.

**결 과**

**Hexane 분해 미생물 consortium 개발**

유류오염토양을 접종원으로 이용하고 유일 탄소원으로 hexane을 첨가한 BH 배지를 이용하여 농화 배양하여 얻은 consortium CH의 hexane 분해 특성을 Fig. 1에 도시하였다. Consortium CH는 약 60시간 경과 후에 약 750 ppmv의 hexane의 대부분을 분해 할 수 있었다. Consortium CH의 hexane 분해속도는 약 100 μmol·g-DCW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 이었다.

**Consortium CH의 미생물 군집 구조 분석**

Consortium CH의 bacterial community structure를 DGGE를 통해 분석하였다. Fig. 2(a)는 DGGE결과이고 Fig. 2(b)는 DGGE band와 유사한 종을 phylogenetic tree로 clustering한 결과이다. Hexane을 유일 탄소원으로 농화배양하여 얻은 consortium CH와 농화배양원으로 사용한 오염토

양 자체에 존재하는 미생물 군집의 DGGE band pattern은 크게 달라지는 것으로 보아 군집구조가 바뀌었음을 알 수 있다(Fig. 2). DGGE 각 lane에 나타나는 band들은 consortium에 속한 각 우점종을 나타내는 것으로, 우점 미생물상의 변화, 다양성, 유사도를 비교하는데 유용하다. 즉, 농화배양 전 후에 DGGE band의 위치가 많이 바뀌었다는 것은 우점하는 미생물 종이 많이 변했다는 것을 나타내고, band 수가 많아 졌다는 것은 우점하는 미생물 종이 증가하였다는 것을 나타내므로 다양성이 증가했다고 볼 수 있다. Clone CH1은 유류오염 토양의 근권으로부터 분리된 *Wautersia eutropha*와 99% 유사도를 보였고, clone CH2는 *Pseudomonas* sp. 3 [14]와 96% 일치하였고, clone CH3는 토양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa*와 99% 일치하였다. Clone CH4는 biphenyl을 분해하는 *Wautersia basileensis*와 98% 유사한 것으로 나타났고, clone CH5와 CH11은 *Brevundimonas* sp. GOBB3-110[9]와 유사도가 97% 이었다. DGGE fingerprint에서 진한 band로 보였던 clone CH6은 유류를 분해할 수 있는 uncultured bacterium와 유사도가 97%이었다. 또한, clone CH7은 폐가스 분해에 사용된 uncultured alpha proteobacterium[14]과 99%의 유사도를 보였다. Clone CH8은 인천항에서 분리된 *Brevundimonas vesicularis*와 99% 유사하였고, clone CH9는 alpha proteobacterium AC49[16]와 유사도가 97%로 나타났다. Clone CH12은 PCE로 오염된 지역에서 관찰된 uncultured beta proteobacterium와 유사도가 가장 높았으며, clone CH13의 경우 *Symbiobacterium thermophilum* IAM14863과 92%의 유사도를 보였다. Clone CH15는 uncultured bacterium[10]와 유사도가 가장 높았다.

**Consortium CH의 미생물 성장 속도 측정**

유일 탄소원으로 hexane만을 첨가한 BH 배지에서 consortium의 성장속도를 비교하기 위해 hexane을 1.6 mM에서 77.4 mM 첨가하여 균주 성장을 측정하였다(Fig. 3). Consortium은 약 5시간 정도의 lag phase 후 성장하기 시작하였고 hexane 첨가량이 증가할수록 성장속도도 증가하였으며 고농도 hexane 주입에 의한 성장 저해현상은 관찰되지 않았다. 그러나 hexane 77.4 mM 농도에서는 최대 성장값 (OD<sub>600nm</sub>)이 약 2.8로 38.7 mM에서와 거의 유사한 값을 보여, 기질농도가 38.7 mM 이상에서는 성장속도가 거의 일정해짐을 알 수 있었다. Hexane 농도 변화에 따른 성장속도를 도시한 결과(Fig. 3(b)) 전형적인 Monod model에 일치함을 알 수 있었고, 최대 성장속도(μ<sub>max</sub>)와 포화상수(K<sub>s</sub>)는 각각 0.2 h<sup>-1</sup>와 53.4 mM 이었다(Table 1).

**Consortium CH의 hexane 분해 활성**

Consortium의 hexane 분해속도에 미치는 hexane 농도의 영향을 조사한 결과를 Fig. 4에 도시하였다. Consortium은 lag phase 없이 hexane을 분해할 수 있었는데, 이는 이들을

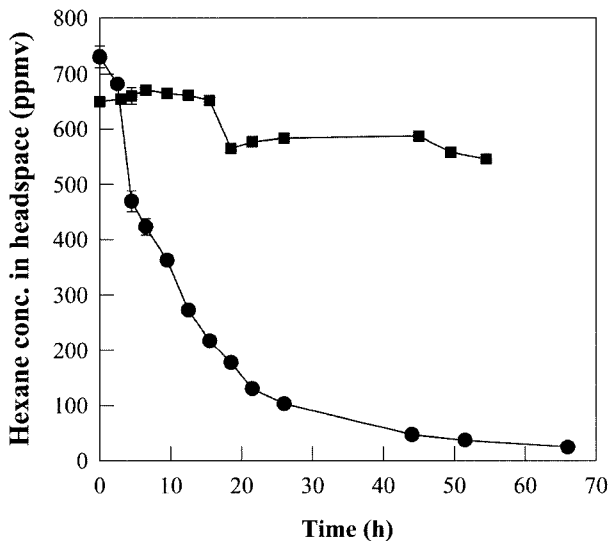
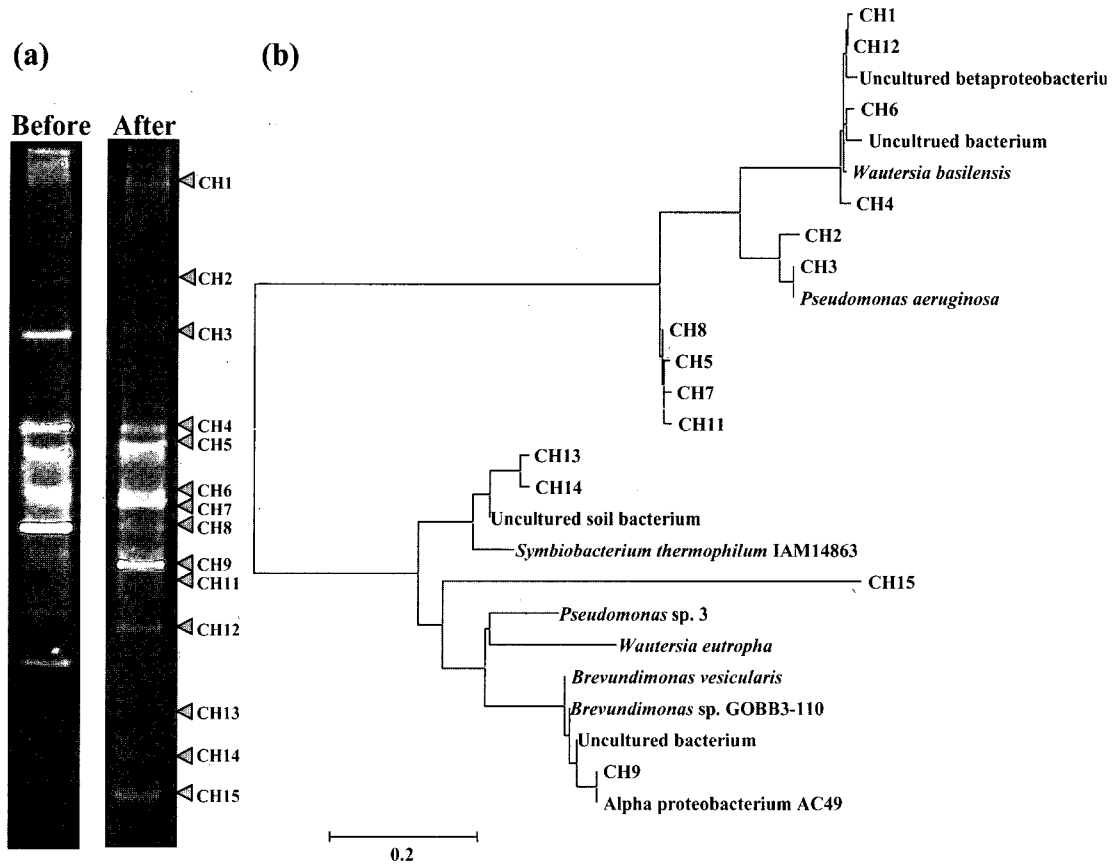
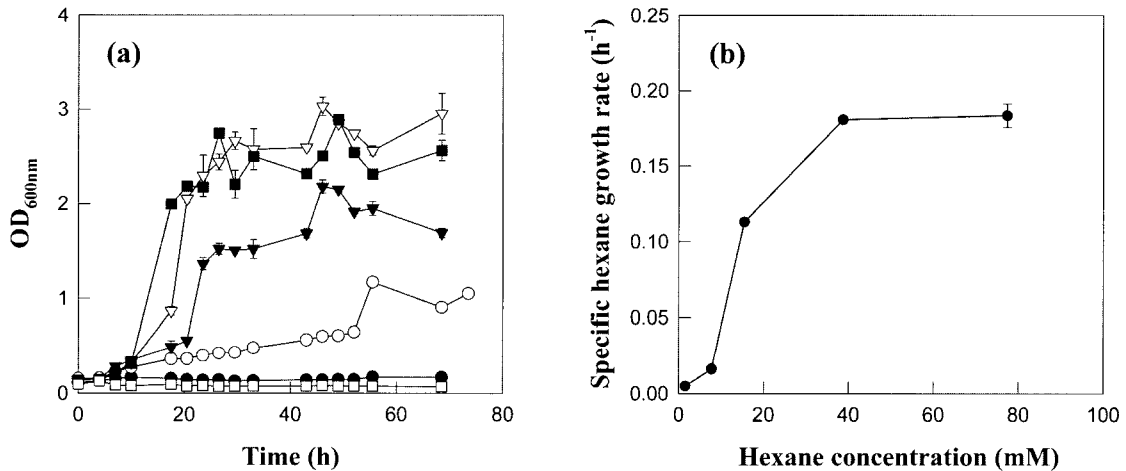


Fig. 1. The biodegradation of hexane by consortium CH. ●, Consortium CH; ■, Control.



**Fig. 2. Characterization of microbial community profiles.** (a) DGGE fingerprint of consortium CH. (b) The phylogenetic tree of clones based on 16S rDNA sequences. The clones were obtained from DGGE corresponding bands.



**Fig. 3. Growth of the consortium CH in the liquid media containing different concentrations of hexane.** (a) Time profiles of growth. (b) Relationship between hexane concentration and specific growth rate. Hexane concentration (mM) : ●, 1.6; ○, 7.7; ■, 15.5; ▲, 38.7; □, 77.4.

hexane-BH 배지에서 전 배양하여 hexane 분해효소가 유도되었기 때문으로 사료된다. 또한, 실험에 적용한 농도 7.7 mM까지도 hexane에 의한 저해작용 없이 분해가 가능하였다. 가장 높은 hexane 농도인 7.7 mM를 첨가한 경우에 첨가한 hexane의 대부분이 60시간 이내에 분해되었다.

Consortium의 Hexane의 비분해속도는 hexane의 농도가 증가함에 따라 5.4 mM까지는 거의 선형적으로 증가하였고, 그 이상에서는 완만하게 증가하였다. 각 농도별로 구한 hexane 분해속도로부터 최대 분해속도 ( $V_{max}$ )와 포화상수 ( $K_s$ )를 구한 결과,  $V_{max}$ 는  $460 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 이고  $K_s$

**Table 1. Comparisons of hexane degradation rate and specific growth rate.**

Parameters	Values
Maximum hexane degradation rate (mmol·g-DCW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	460
Saturation constant for hexane degradation (mM)	26
Maximum specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	0.2
Saturation constant for growth (mM)	53.4

는 25.87 mM 이었다(Table 1).

**Hexane 무기화**

Consortium CH의 hexane mineralization 및 분해 pathway 를 조사하기 위해 <sup>14</sup>C hexane을 이용하여 수행하였다. 무집 종의 대조군에서는 hexane의 CO<sub>2</sub>로의 전환 은 관찰되지 않 았다. 반면에 consortium CH가 접종된 headspace에서는 <sup>14</sup>C hexane이 검출 되지 않은 것으로 보아 consortium CH에 의 해 <sup>14</sup>C hexane의 대부분이 분해됨을 알 수 있었고, 약 49.1 %가 CO<sub>2</sub>로 무기화(mineralization)되었고 나머지 약 43.6% 는 biomass에서 검출되었다(Table 2). 즉, 분해된 hexane은 CO<sub>2</sub>로 완전히 생분해 되거나 biomass로 전환되는 것으로 보 아 중간 대사산물의 축적은 거의 없는 것으로 사료된다.

**고 찰**

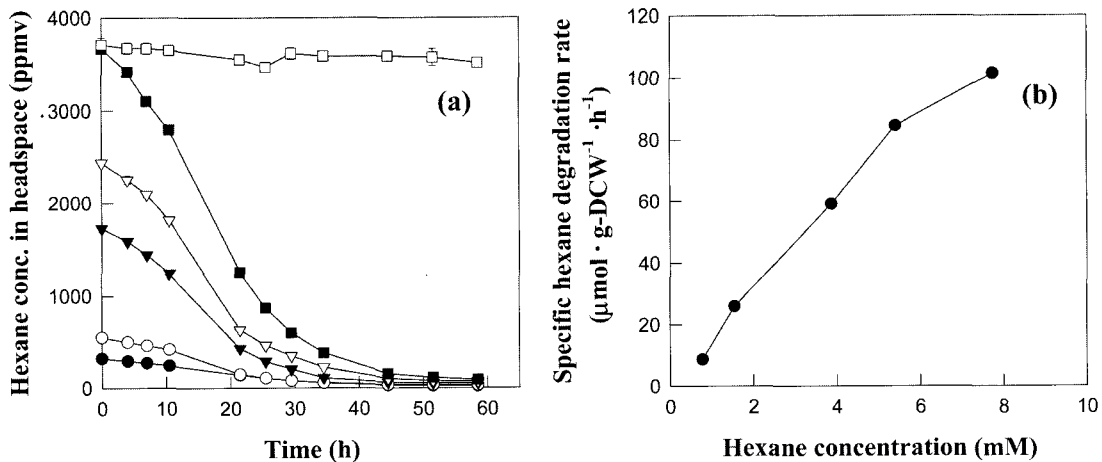
Alkane 계열인 hexane은 구조적으로는 분해가 용이하지 만 용해도가 낮기 때문에 미생물에 의한 생분해가 낮게 나 타나고 있다[3, 15]. 기상의 오염물질을 생분해시키는 미생 물은 액상에 존재하므로 기상의 오염물질의 액상으로의 물 질전달 속도가 전체 반응속도를 좌우하는 율속단계로 작용

**Table 2. Mass balance results for <sup>14</sup>C portion in the serum bottle after five days' growth (Percent of applied <sup>14</sup>C).**

Condition	Gas phase (%)		Liguid phase (%)	Biomass (%)	Total Recovery (%)
	non-CO <sub>2</sub> (hexane or metabolites)	CO <sub>2</sub>			
Inoculated (Consortium CH)	0.8	49.1	6.5	43.6	100
Uninoculated	99.5	0	0.5	0	100

하는데 용해도가 낮은 hexane은 액상으로의 전이가 어렵기 때문이다[8, 15]. 이러한 문제를 해결하기 위하여 hexane의 용해도를 증가시키고 생분해 되지 않는 미생물에 무독하다 고 알려져 있는 PF68 계면 활성제[8]를 배지에 첨가하여 hexane을 유일 탄소원으로 이용하는 미생물 consortium을 개 발하였다. 본 연구로부터 얻은 consortium CH에 적용한 결 과 계면활성제 첨가한 조건에서는 lag time이 지연되는 결 과가 보였으나 계면활성제 유무에 관계없이 38.7 mM에서 비생장 속도는 모두 0.1 h<sup>-1</sup>로 동일하였다. 즉, 농화배양 초 기에는 계면활성제 첨가에 hexane 생분해 속도가 증진되었 으나, 개발 consortium 배양액에서는 이러한 증진효과는 관 찰되지 않았다. 또한 consortium CH를 hexane을 유일 탄소 원으로 공급한 배지에서 배양하였을 때 계면활성제 주입하 지 않아도 거품이 약간 생성되는 것으로 보아 consortium CH 자체가 biosurfactant를 분비하여 용해도가 낮은 hexane 을 쉽게 분해할 수 있는 것으로 사료되었다.

본 연구는 hexane을 생분해 할 수 있는 미생물 consortium 을 개발하였고, consortium의 hexane 생분해 특성을 조사하 였다. 실험 결과 consortium CH는 hexane 생분해능이 탁월 한 것으로 나타났다(Fig. 1). Hexane 분해용 consortium의



**Fig. 4. Hexane degradation by consortium CH in the liquid media containing different concentrations of hexane. (a) Time profiles of hexane degradation. (b) Relationship between hexane concentration and specific degradation rate. Hexane concentration (mM) : ●, 0.8; ○, 1.6; ▼, 3.9; ▽, 5.4; ■, 7.7; □, control.**

hexane을 유일 탄소원으로 첨가한 배지에서의 최대 hexane 분해 속도는 약  $460 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  이었다 (Table 1). Hexane 생분해에 대한 연구 부족으로 다른 연구 결과와 이번 실험과의 직접적인 비교는 어렵지만, Hohener 등[7]이 연속배양장치를 이용하여 측정된 consortium의 hexane 생분해 속도는 최대  $102 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{-DCW} \cdot \text{h}^{-1}$ 으로 이에 비해 본 연구에서 개발한 consortium CH는 hexane 제거능이 매우 우수하였다.

16S r-DNA PCR-DGGE 방법을 이용하여 Consortium CH의 미생물 군집을 조사한 결과, 토양에서 분리되었거나 혹은 유류, biphenyl 및 PCE 분해와 관련이 있는 세균들과 유사도가 높은 미생물로 구성되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2) 특히, clone CH1은 유류오염 토양의 근권으로부터 분리한 *Wautersia eutropha*와, clone CH6는 유류 분해능을 가진 uncultured bacterium과 유사도가 가장 높았다. 이 외에도 clone CH4, CH7, 및 CH12도 biphenyl, 페가스 및 PCE와 같은 오염물질을 분해능을 가진 세균들과 유사도가 높은 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 이들이 consortium CH에서 hexane 생분해에 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

Consortium CH에 의한 hexane의 분해 최종산물을 규명하기 위하여  $^{14}\text{C}$ -hexane을 이용한 생분해 실험 결과 Consortium CH는 약 49.1%의 hexane을  $\text{CO}_2$ 로 무기화하였고 나머지 약 43.6%는 biomass를 성장시키는데 사용하였다 (Table 2). 이는 Arriaga 등[3]이 bacterial consortium을 이용하여 microcosm 실험한 결과 hexane을 약 59% 무기화한 결과와 매우 유사하다.

본 연구를 통해 개발한 hexane 생분해용 consortium은 향후 hexane 처리를 위한 생물학적 공정을 개발하는데 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

## 요 약

Hexane을 유일 탄소원으로 첨가한 무기염 배지에서 hexane 생분해 속도와 비성장속도를 구하였고,  $^{14}\text{C}$ -hexane을 이용하여 무기화(mineralization) 정도를 측정하였다. 또한, 16S rDNA PCR-DGGE 분석기법을 활용하여 consortium의 미생물 군집 특성을 조사하였다. Consortium CH의 최대 비성장속도 ( $\mu_{\text{max}}$ )값은  $0.2 \text{ h}^{-1}$ 이고, 최대 hexane 분해속도 ( $V_{\text{max}}$ )와 포화상수 ( $K_s$ )는 각각  $460 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  및  $25.87 \text{ mM}$  이었다. Consortium CH는  $^{14}\text{C}$ -hexane의 약 49.1%를 무기화하였고, 43.6%의  $^{14}\text{C}$ -hexane은 biomass를 증가시키는데 사용하였다. DGGE band로부터 얻은 clone들은 유류, biphenyl, PCE 및 페가스 등과 같은 오염물질 분해능을 가진 세균들과 유사성이 가장 높았다. 본 연구에서 얻은 hexane 생분해용 consortium은 향후 hexane 제거용 생물학적 시스템을 개발하는데 유용하게 활용될 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-041-D00377).

## 참고문헌

1. Aeson, D. A., M. S. Boguski, O. J. Lipman, J. Ostell, B. F. Ouellet, B. A. Rapp, and D. L. Wheeler. 1999. GenBank. *Nucl. Acids Res.* **27**: 12-17.
2. An, Y. J., Y. H. Joo, I. Y. Hong, H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2004. Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 611-619.
3. Arriaga, S. and S. Revah. 2005. Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol. Bioeng.* **90**: 107-115.
4. American conference of governmental industrial hygienists. 1999. TLVs and BEIs. Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposure indices. Cincinnati, OH.
5. Cesario, M. T., H. H. Beefink, and J. Tramper. 1992. Biological treatment of waste gases containing poorly soluble pollutants. pp. 135-140, *Biotechniques for Air Pollution Abatement Odor Control Policies*. Elsevier.
6. Gibson, D. T. 1984. *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Marcel Dekker, INC.
7. Hohener P., C. Duwig, G. Pasteris, K. Kaufmann, N. Dakhel, and H. Harms. 2003. Biodegradation of petroleum hydrocarbon vapors: laboratory studies on rates and kinetics in unsaturated alluvial sand. *J. Contam. Hydrol.* **66**: 93-115.
8. Kastner, J. R., D. N. Thompson, and R. S. Cherry. 1999. Water-soluble polymer for increasing the biodegradation of sparingly soluble vapors. *Enz. Microb. Technol.* **24**: 104-110.
9. Kisand, V., R. Cuadros, and J. Wikner. 2002. Phylogeny of culturable estuarine bacteria catabolizing riverine organic in the northern Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 379-388.
10. Lu, J., S. Sanchez, C. Hofacre, J. J. Maurer, B. G. Harmon, and M. D. Lee. 2003. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and Functional gene markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 901-908.
11. Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
12. Neefs J. M., Y. Van de peer, L. Hendriks, and R. De Wachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **18**: 2237-2317.
13. Pruden, A., M. Suidan, A. D. Venosa, and G. Wilson. J. 2001. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether under various substrate conditions. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 4235-4241.

14. Showkey, M. D., S. R. Pillai, and G. E. Hill. 2003. Chemical warfare?: Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *J. Avian. Biol.* **34**: 345-349.
15. Spigno, G., C. Pagella, M. D. Fumi, R. Molteni, and D. M. De Faveri. 2003. VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chem. Eng. Sci.* **58**: 739-746.
16. Tiago, I., A. P. Chung, and A. Verissimo. 2004. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7378-7387.

**(Received Aug. 16, 2005/Accepted Sep. 6, 2005)**