

# 순수 분리 미생물을 이용한 오염 토양에서의 BTEX 생분해 특성과 미생물 군집 변화

정경미\*\*\* · 최용수†\* · 홍석원\*\*\*\* · 이수진\* · 이상협\*

\*한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터 · \*\*서울시립대학교 환경공학부 · \*\*\*서울대학교 지구환경시스템공학부

(2005년 11월 29일 접수, 2006년 7월 27일 채택)

## BTEX Biodegradation in Contaminated Soil Samples Using Pure Isolates and Changes in the Mixed Microbial Community Structure

Kyungmi Chung\*\*\* · Yongsu Choi†\* · Seokwon Hong\*\*\*\* · Soo-jin Lee\* · Sanghyup Lee\*

\*Water Environment and Remediation Center, Korea Institute of Science and Technology

\*\*Department of Environmental Engineering, The University of Seoul

\*\*\*Department of Civil, Urban & Geosystem Engineering, Seoul National University

**ABSTRACT :** In our previous studies, we have isolated bacteria from BTEX-contaminated sediment, which utilized BTEX as a sole carbon source and NO<sub>3</sub>-N as an electron acceptor. For the possibility of field application, we have applied co-culture of those isolates in the BTEX-contaminated soil and evaluated their biodegradation efficiencies. To investigate the relationship between the isolates and indigenous microorganism in soil, changes of microbial community structure in soil samples with respect to time were monitored. To examine this, soil samples were artificially contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene. BTEX-degrading bacteria such as *Pseudomonas stutzeri* strain 15(DQ 202712), *Klebsiella* sp. strain 20(DQ 202715) and *Citrobacter* sp. strain A(DQ 202713) were injected into the soil samples in the ratio of 2 : 1 : 1. Our results showed that the highest BTEX biodegradation efficiency was achieved when both BTEX and NO<sub>3</sub>-N existed simultaneously. The change in soil microbial community structure was characterized by PCR-DGGE analysis comparing the relative DGGE band intensities. The band intensities of indigenous microorganisms in the soil were reduced by injecting co-culture of the three isolates. On the contrary, the relative band intensities of the isolates were increased. Among the three isolates, *Pseudomonas stutzeri* strain 15 rendered the highest band intensity. This indicates that the *Pseudomonas stutzeri* was the dominant microbial species found in the soil samples.

**Key Words :** Biodegradation, BTEX, DGGE, Microbial Community, *Pseudomonas Stutzeri*

**요약 :** 본 연구에서는 BTEX로 오염된 저질로부터 순수 분리한 BTEX를 탄소원으로 NO<sub>3</sub>-N를 전자수용체로 이용하는 미생물의 오염 토양에 대한 현장 적용 가능성을 평가하였다. 이와 함께 주입한 순수 분리 미생물과 토착 미생물과의 상호 관계를 관찰하기 위하여 시간 경과에 따른 오염된 토양에서의 미생물 군집 변화도 관찰하였다. 이를 위해 BTEX로 오염 가능성이 적은 지역으로부터 채취한 토양 시료 100 g에 benzene, toluene, ethylbenzene, o-xylene을 각각 일정량 주입한 후, 동정 분리한 *Pseudomonas stutzeri* strain 15(DQ 202712) : *Klebsiella* sp. strain 20(DQ 202715) : *Citrobacter* sp. strain A(DQ 202713)를 2 : 1 : 1의 비율로 주입하여 BTEX 분해 효율과 미생물 군집 변화를 관찰하였다. 실험결과, NO<sub>3</sub>-N와 BTEX가 모두 존재하는 조건에서 동정 분리한 미생물에 의한 분해 효율이 가장 높게 관찰되었다. 그리고 PCR-DGGE를 통한 미생물 군집 변화 관찰 결과, 토양 내 존재하는 다양한 미생물들의 peak는 대부분 감소된 반면, 주입한 동정 분리 미생물 peak는 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 주입한 미생물 3종 가운데 *Pseudomonas stutzeri*만이 우점화 된 결과가 관찰되었다.

**주제어 :** 생분해, BTEX, DGGE, 미생물 군집, *Pseudomonas stutzeri*

### 1. 서론

가솔린 구성 성분의 18%를 차지하고 있는 BTEX(Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene)는 대표적인 석유계 화합물로 다른 석유 화합물에 비하여 물에 대한 용해도가 높기 때문에 일단 오염되면 지하수 내에서 오염지역으로부터 수킬로미터 떨어진 지점까지 오염이 확산되는 특징을 가지는 독성

물질이다.<sup>1)</sup> 이에 BTEX를 포함하는 방향족 화합물이 다량 함유된 토양이나 폐수는 물리·화학적인 처리 방법으로 처리가 가능하지만, 이러한 방법은 약품 사용에 따른 처리 비용의 상승과 2차 오염 유발에 따른 추가적인 처리 공정 요구 등으로 경제성 측면이나 환경보전 측면에서 바람직한 처리공정이 되지 못하고 있는 실정이다.<sup>2~4)</sup>

일부 호기성 미생물은 BTEX를 분해할 수 있으며, 이들 호기성 미생물의 BTEX 분해 능력은 오염지역을 복원하는데 매우 중요한 역할을 한다.<sup>5)</sup> 호기적 BTEX 복원을 촉진하기 위해 오염지역에 산소를 주입하는 공법을 생물복원공정에서

† Corresponding author  
E-mail: yschoi@kist.re.kr  
Tel: 02-958-5834

Fax: 02-958-5839

많이 사용하고 있다. 그러나 이러한 호기적 처리 방법은 에너지가 많이 소요되며, 혐기성 미생물이 우점하고 있는 지하 환경에 적용하기에는 적절치 못한 방법으로 알려져 있다.<sup>6)</sup>

BTEX의 혐기성 생분해는 불가능한 것으로 오랫동안 생각 되어 왔으나, 최근 들어 이들 물질의 혐기적인 조건하에서 생분해에 관한 연구 결과들이 보고되고 있다.<sup>7)</sup> 최근 혐기성 상태의 BTEX로 오염된 하천 저질로부터 3종의 BTEX 분해 가능 미생물을 분리 동정한 연구 결과가 보고되고 있으며,<sup>8)</sup> 동정 분리한 3종의 미생물은 혐기성 미생물로 전자 수용체로 질산성 질소를 사용하며 탄소원으로 BTEX를 사용하는 특징의 미생물로 보고되고 있다.<sup>8)</sup>

분리된 3종 미생물 단독의 BTEX 분해 특성에 있어서는 평균 78%의 분해 특성이 관찰되었으며 분해 효율 향상의 한 방법으로 미생물을 일정 비율로 혼합한 결과, 약 15%의 분해 효율 향상이 관찰되었다고 보고하고 있다.<sup>8)</sup>

따라서 본 논문에서는 지금까지 BTEX로 오염된 하천 저질에서 분리한 미생물들에 대한 다양한 분해 특성 및 효율 향상과 관련된 희분식 실험 결과<sup>8)</sup>를 바탕으로 오염된 토양에 실제 적용하여 분해 특성을 관찰하였다. 그리고 시간 경과에 따라 BTEX가 분해 됨과 동시에, BTEX 분해가 토양내 존재하는 기타 미생물에 의한 분해가 아닌, 실제로 동정 분리된 미생물에 의한 분해를 확인하기 위하여 시간 변화에 따른 토양시료내의 미생물 종 변화도 함께 관찰하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 토양 시료 준비 및 전처리

실험에 사용된 토양 시료는 KIST 주변의 BTEX로 오염되지 않은 것으로 추측되는 지역에서 채취하였다. 토양시료를 채취하여 실험실로 옮겨 바로 풍건시켰으며, 토양 시료는 표준 망체(No. 16)를 사용하여 직경 1.18 mm 이하로 균일화하여 사용하였다. 준비된 토양 시료의 pH는 5.1을 나타내었고 수분 함량은 6.7%였다.

### 2.2. 미생물 주입 시료 준비

토양 시료를 대상으로 BTEX 생분해 특성을 알아보기 위하여 250 mL 갈색 메디아 병에 토양시료를 각각 100 g씩 주입하였다. 4종의 시료를 각 샘플 당 15개씩 준비하였으며 시료 각각의 특징은 다음과 같다.

시료 번호	시료 준비 목적
①	BTEX의 토양 흡착정도를 알아보기 위한 멸균된 토양
②	분리된 미생물에 의한 분해 특성을 알아보기 위한 electron acceptor와 미생물을 주입시킨 토양
③	전자 수용체 유·무에 의한 효과 파악을 위하여 electron acceptor없이 미생물만 주입시킨 토양
④	토양 자체 내 존재할 수 있는 미생물에 의한 가능성 관찰을 위하여 채취한 토양 자체

본 실험에서는 같은 조건의 시료를 15개씩 준비하여 시간에 따른 head space 및 토양내의 BTEX 농도 측정 후 폐기처리 하였다. 전자 수용체로 KNO<sub>3</sub>를 23.5 mM 첨가 하였고, 수분함유량은 10%로 일정하게 유지시켰으며 주입된 미생물은 OD<sub>600nm</sub> 0.37 상태의 미생물을 *Pseudomonas stutzeri* strain 15(DQ 202712): *Klebsiella* sp. strain 20(DQ 202715): *Citrobacter* sp. strain A(DQ 202713)=2:1:1의 비율로 주입하였다. 혼합 비율은 Chung<sup>8)</sup> 등의 연구 결과에서 최적 혼합 비율로 2:1:1로 보고하고 있어 그 비율을 그대로 적용하였다. 각 병에 benzene 22.8 μL, toluene 23.2 μL, ethylbenzene 22.8 μL, o-xylene 23.2 μL를 syringe로 주입한 후 30°C에서 배양하였다. 이때 각 병은 테프론으로 코팅된 마개를 사용하여 BTEX의 휘발 손실정도를 최소화 하였다.

### 2.3. 미생물 분석

#### 2.3.1. 토양의 DNA 추출 및 16S rDNA 증폭

UltraClean™ soil DNA kit(MO BIO. Laboratories, Inc.)를 사용하여 토양내에 존재하는 미생물의 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA로부터 계통분류학적으로 고유한 특성을 가진 16S rDNA를 증폭하기 위하여 primer 27F와 1492R을 사용<sup>9,10)</sup>하여 PCR을 수행하였다(Table 1). PCR(Polymerase chain reaction) 반응물의 조성은 10×buffer(20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM dNTP Mixture, 20 pmole primer이며, DNA template 와 Ex Taq™ polymerase(TAKARA-Korea Biomedicals Inc.)를 첨가하여 총 50 μL의 혼합물을 준비한 후 수행하였다. PCR 조건은 Fig. 1에 나타내었다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다.

#### 2.3.2. 16S rDNA V3 부위의 증폭 및 DGGE

16S rDNA의 V3 부위를 증폭하기 위하여 앞에서 언급한 PCR 산물(증폭된 16S rDNA)을 주형으로 nested PCR을 수행하였다. primer 341F GC, 534R(Table 1)<sup>9)</sup>은 약 200 bp의 16S rRNA의 V3 부위를 증폭하는 PCR에 이용된다.<sup>10)</sup> PCR 반응물의 조성은 10×buffer(20 mM Tris-HCl, 100 mM

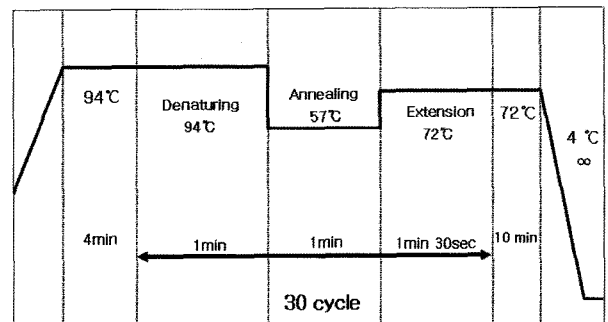


Fig. 1. PCR amplification reactions carried out in an automated thermal cycler.

KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM dNTP Mixture, 20 pmole primer이며, DNA template와 Ex Taq™ polymerase(TAKARA-Korea Biomedicals Inc.)를 첨가하여 총 50 µL의 혼합물을 준비한 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 touch down PCR 방법으로 Fig. 2에 나타내었다. 정제된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다. DGGE는 200-400 base pair를 분리할 수 있는 8% gel을 사용하였다(DCode Electrophoresis Reagent Kit., BIO-RAD). 상부 30%, 하부 60% denaturing gradient를 만들기 위해 Formamide와 Urea의 양을 조절하였다. 30% denaturing 용액은 40% Acrylamide/Bis 25 mL, 50×TAE 완충액(2 M Tris base, 1 M acetic acid, 50 mM EDTA) 2 mL, Formamide(deionized) 12 mL, Urea 12.6 g에 dH<sub>2</sub>O로 100 mL을 채워 사용하였고 60% denaturing 용액은 40% Acrylamide/Bis 25 mL, 50×TAE 완충액(2 M Tris base, 1 M acetic acid, 50 mM EDTA) 2 mL, Formamide(deionized) 24 mL, Urea 25.2 g에 dH<sub>2</sub>O로 100 mL을 채워 사용하였다.<sup>9)</sup> Denaturing 용액을 perpendicular gradient gel sandwich에 변성제 농도를 직선 기울기가 되도록 만든 다음 3시간 정도 굳혔다.

영동장치(DCode™ system, BIO-RAD)에서 미리 60℃로 가열된 1×TAE buffer에 굳은 perpendicular gradient gel을 장치하고, Power supply(Power Pac, BIO-RAD)를 사용해 60 V로 16시간 동안 수직 DGGE를 수행하였다. 영동한 후 겔을 10 mg/mL 농도의 ethidium bromide로 30분간 염색하고, 10분간 초순수에 담그어 destaining 하였다. Gel Documentation System(Gel Doc 2000, BIO-RAD)으로 band를 분석하였다.

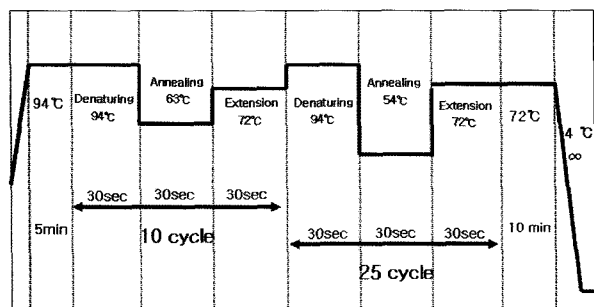


Fig. 2. Touch down PCR amplification reactions carried out in an automated thermal cycler.

Table 1. The sequences of primers for the amplification of bacterial 16S rDNA

Primers	Nucleotide sequence (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	TACCTGTTACGACTT
341F GC	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCA CGGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG
534R	ATTACCGCGCTGCTGG

## 2.4. BTEX 분석

시료내에 존재하는 BTEX의 농도변화를 토양과 기상에서 주기적으로 분석하였다. 배양 시작 후 BTEX가 토양과 head space에서 평형을 이루었다고 판단된 48시간 후 미디어 병의 head space gas를 500 µL gas-tight syringe로 300 µL를 채취하였으며, 토양에 존재하는 BTEX의 농도를 측정하기 위하여 주입한 토양 100 g에 메틸알콜 100 mL과 무수황산나트륨을 적당량 첨가한 후 충분히 흔들어 정치 시켰다. 상등액을 0.45 µm syringe filter로 filtering 한 후 2 mL GC vial에 넣어 준비하였다. 농도 분석은 DB-1(30 m × 0.32 mm × 0.02 mm) 컬럼이 장착된 gas chromatograph(GC-2010, Shimadzu, Japan)을 이용하였고, 검출기는 불꽃이온화 검출기 FID(Flame Ionization Detector)를 사용하였다. 주입구(Injector)와 검출기(Flame Ionization Detector)의 온도는 각각 250℃, 300℃이었고 운반가스(carrier gas)로는 He gas를 사용하여 분해하였다. 시간 경과에 따른 분해 효율 및 미생물 변화를 관찰하기 위하여 시간대별로 각각의 시료를 준비하였고 측정 후, 해당 시료는 폐기하였다. 이를 통하여 시간대별 시료 채취 과정에서 발생할 수 있는 오차를 최소화하였다.

## 3. 결과

### 3.1. BTEX 분해 효율 변화

준비된 4종의 시료에 대한 시간에 따른 총 BTEX 분해 효율 변화를 Fig. 3, 4, 5, 6에 나타내었다. Fig. 3, 4, 5, 6은 BTEX로 오염된 토양에서 시간에 따른 BTEX 제거율을 기상과 토양 내 존재하는 총 농도를 바탕으로 계산된 제거율과 토양 만에서 농도를 바탕으로 계산한 제거율 결과이다.

Fig. 3에 나타난 벤젠의 경우, 멸균된 토양(시료 ①)에서는 최종 약 13%의 제거율이 관찰되었다. 이 결과로부터 BTEX의 토양에 대한 흡착이 발생되기는 하나 그 양은 그다지 크지 않은 것을 추정할 수 있다. 동정 분리된 미생물에 의한 분해 효율 관찰을 위한 시료(시료 ③)와 토양 내 indigenous microorganism에 의한 분해 효율 관찰을 위한 시료(시료 ②)의 경우 모두 20일 경과 후, 최종적으로 65%와 60%의 제거율이 관찰되었다. 이로부터 동정 분리된 미생물과 토양 내 존재하는 indigenous microorganism의 경우 모두 벤젠을 효과적으로 분해하는 미생물 종임을 추정할 수 있었다. 그러나 전자 수용체 유·무 효과를 파악하기 위한 시료(시료 ④) 경우, 최종 분해율이 약 30% 향상된 90%로 관찰되었다. 이로부터 BTEX를 탄소원으로 이용하고 전자 수용체로 nitrate를 이용하는 동정 분리 미생물이 토양 내에서 BTEX를 가장 활발히 분해하는 사실을 추정할 수 있다. Fig. 3의 결과에서 특이한 점은 시료 ③과 ④의 시간 경과에 따른 분해 효율은 비슷한 변화 경향을 보였지만 최종 분해효율에 있어서는 전자 수용체가 존재하는 경우 30% 증가하는 현상이다. 이는 동정 분리된 생물이 토양 내 토착 미생물에 보다 BTEX를 보다 효율적으로 탄소원으로 이용하기 때문인 것으로 판단된다.

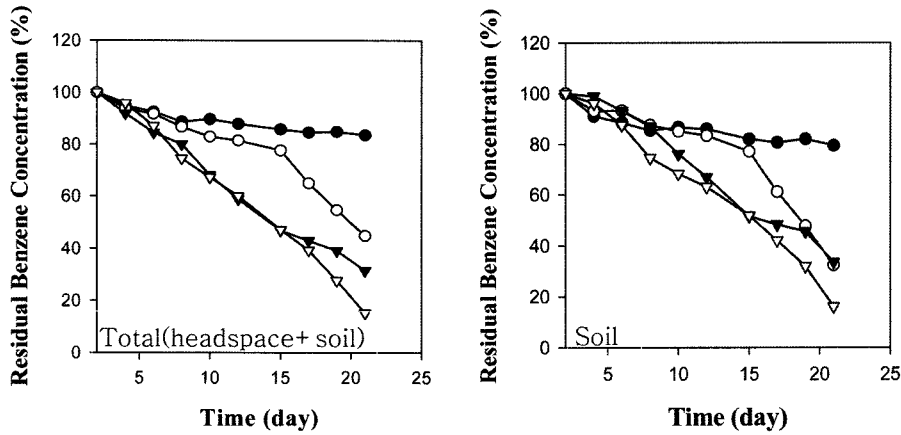


Fig. 3. Benzene degradation by co-culture(*Pseudomonas stutzeri* strain 15 : *Klebsiella* sp. strain 20 : *Citrobacter* sp. strain A = 2 : 1 : 1, ● autoclaved soil+BTEX, ○ soil + BTEX, ▼ soil + co-culture + BTEX, ▽ soil + co-culture + BTEX + nitrate).

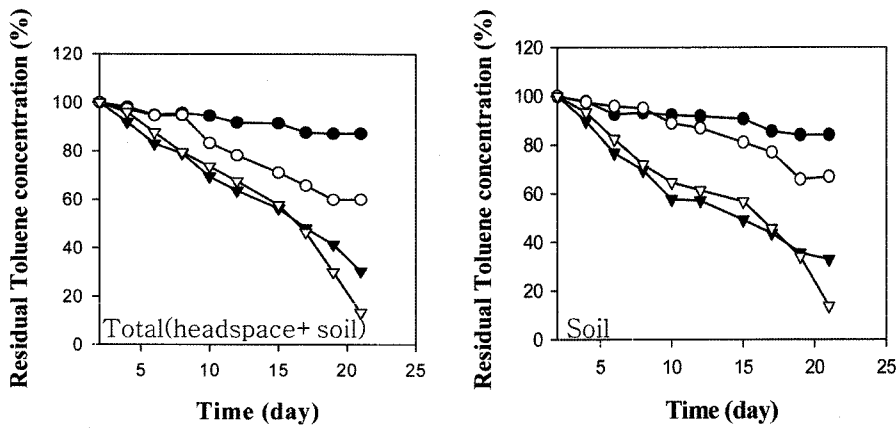


Fig. 4. Toluene degradation by co-culture(*Pseudomonas stutzeri* strain 15 : *Klebsiella* sp. strain 20 : *Citrobacter* sp. strain A = 2 : 1 : 1, ● autoclaved soil + BTEX, ○ soil + BTEX, ▼ soil + co-culture + BTEX, ▽ soil + co-culture + BTEX + nitrate).

Fig. 4의 톨루엔의 경우, Fig. 5의 에틸벤젠의 경우, Fig. 6의 o-xylene의 경우 분해효율이 물질별로 약간의 차이는 발견되었지만 모두 벤젠과 유사한 경향을 관찰할 수 있었다. 즉, 각각 물질의 토양 자체에 대한 흡착은 약 10%로 낮

은 결과가 관찰되었으며, 토착 미생물에 의한 분해, 동정 분리된 미생물에 의한 분해 그리고 전자 수용체가 존재하는 상태에서의 동정 분리된 미생물에 의한 분해 순으로 분해 효율이 관찰되었다.

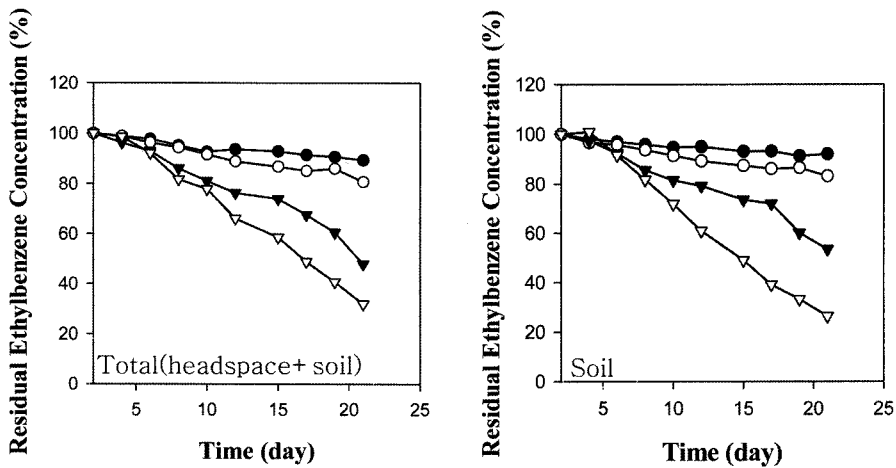


Fig. 5. Ethylbenzene degradation by co-culture(*Pseudomonas stutzeri* strain 15 : *Klebsiella* sp. strain 20 : *Citrobacter* sp. strain A = 2 : 1 : 1, ● autoclaved soil + BTEX, ○ soil + BTEX, ▼ soil + co-culture + BTEX, ▽ soil + co-culture + BTEX + nitrate).

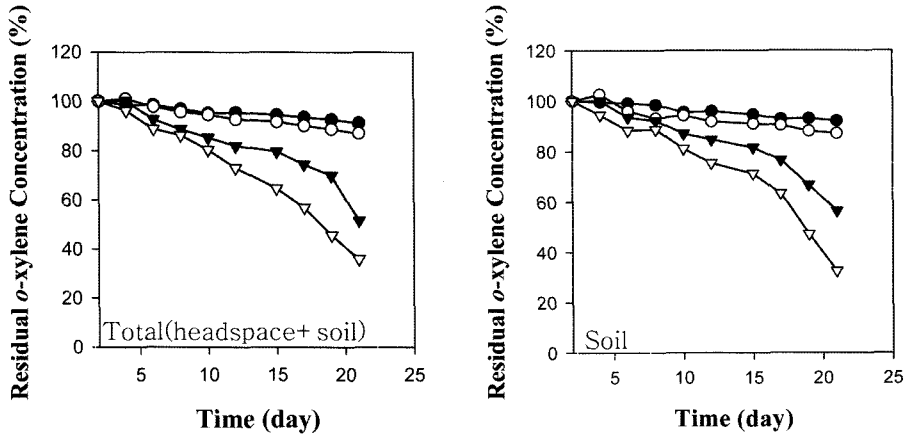


Fig. 6. o-xylene degradation by co-culture(*Pseudomonas stutzeri* strain 15 : *Klebsiella* sp. strain 20 : *Citrobacter* sp. strain A = 2 : 1 : 1, ● autoclaved soil + BTEX, ○ soil + BTEX, ▼ soil + co-culture + BTEX, ▽ soil + co-culture + BTEX + nitrate).

각 물질별 분해 효율을 관찰해 보면 Fig. 6의 Xylene의 경우, BTEX 가운데 가장 낮은 분해율이 관찰되었다. 특히 토양에서는 전자 수용체의 유·무에 따라 약 30%의 차가 관찰되었고 토양 내 토착 미생물과는 약 50%의 차이를 관찰 관찰할 수 있었다. 토착 미생물에 의한 분해는 벤젠의 경우 약 60%, 톨루엔의 경우 약 30%의 분해율이 관찰되었지만, 에틸벤젠, 자이렌의 경우, 토착 미생물에 의한 분해는 거의 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 에틸벤젠과 자이렌과 같이 생물분해가 어려운 물질의 경우, 해당 물질 분해 가능한 미생물을 동정 분리하여 사용하면 기존의 생물학적 처리 방법 보다 고효율의 처리가 가능할 것으로 판단된다.

### 3.2. BTEX 분해에 따른 토양내 미생물 군집 분석 변화

토양에서 BTEX 분해에 따른 토양 시료에 인위적으로 주입한 동정 분리 미생물의 군집 변화 양상을 알아보기 위해 PCR-DGGE 분석을 수행하여 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 토양만의 시료(A), 토양에 동정 분리한 미생물을 주입한 시료(B), 토양에 동정 분리 미생물과 BTEX를 주입한 시료(C,D), 토양에 동정 분리한 미생물과 nitrate를 주입한 시료(E,F)에 대하여, 10일 후, 20일 후 총 2회 시료를 채취하여 추출한 genomic DNA에서 16S rDNA 증폭을 통해 획득한 200 bp의 PCR 산물을 DGGE에 적용한 결과 각 시료에서 서로 다른 다양한 band 특성을 관찰할 수 있었다. 각각의 시료에 대한 DGGE 결과에서 공통적으로 4개의 high intensity band를 관찰할 수 있었다.

DGGE 결과에서 특징적인 현상은 A 시료에서는 토양내 존재하는 다양한 미생물들로부터 유래한 다양한 band가 관찰되었고 시료 B의 경우에는 주입된 3종의 미생물 존재 가능성을 확인할 수 있는 A시료에서는 관찰되지 않은 3개의 밴드가 b, e, f의 위치에서 관찰되었다. 그리고 BTEX가 주입되고 또 BTEX와 전자 수용체인 nitrate가 주입됨에 따라 b와 e 위치의 band에서 높은 intensity를 나타내는 DGGE 결과가 관찰되었다.

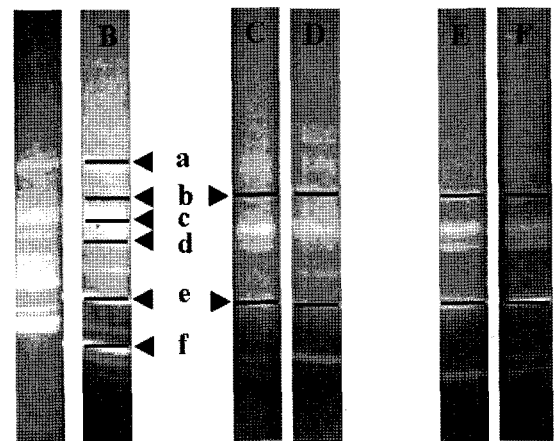


Fig. 7. DGGE profiles of bacterial community.

- A : soil, B : soil + co-culture
- C : soil + co-culture + BTEX(after 10 days),
- D : soil + co-culture + BTEX(after 20days),
- E : soil + co-culture + BTEX + nitrate(after 10 days),
- F : soil + co-culture + BTEX + nitrate(after 20 days)

### 3.3. Sequencing of DGGE fragment

미생물 주입 후, 토양에서의 미생물의 개체군 변화 양상을 알아보기 위한 분자생물학적인 실험인 DGGE 분석 수행 후, Fig. 7에서 관찰된 bands에 대하여 DNA sequencing을 행하였다. 이중 7개의 DNA sequencing 결과를 획득할 수 있었으며, Genbank의 BLAST search database를 이용하여 16S rDNA의 sequence를 alignment한 결과 a, b, c, d, e, f bands에 대한 6 종의 균종을 확인 할 수 있었고 이를 Table 2에 나타내었다.

그러나 관찰된 band에 대한 DNA sequencing 결과, Fig. 7의 B를 보면 주입된 3종의 미생물이 모두 관찰되지는 않았다. 주입된 동정 분리 미생물 중 가운데 *Pseudomonas stutzeri* 만이 band e의 위치에서 관찰되었다. b위치의 band에서 *Citrobacter* 종의 DNA sequencing 결과가 관찰되었으나 본 연구 팀에 동정 분리된 미생물과는 약간의 차이가 있었다. 또한 *Klebsiella* 종의 경우는 band가 전혀 관찰되지 않았다. 이는

**Table 2.** Summary of phylogenetic diversity of soil clones based on 16S rDNA sequences

Clone number	Closest relative	Similarity (%)	Accession number
a	uncultured bacterium	98	DQ068897
b	<i>Citrobacter freundii</i>	99	AY372118
c	Arctic sea ice bacterium ARK1006	98	AF468391
d	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	98	AB076856
e	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	DQ059546
f	<i>Pseudomonas sp.</i> JQR2-5	98	DQ124297

토양 환경과 주입된 미생물이 배양된 배지와는 다른 성상을 나타내기 때문에 이로 인해 동정 분리된 미생물 가운데 활성도와 분해능이 가장 높았던 *Pseudomonas stutzeri*만이 우점화 된 것으로 판단된다.

또한 Fig. 7의 DGGE 결과에서 band f는 *Pseudomonas* 종으로 나타났으며 최종적으로 C, D, E, F에서는 관찰되지 않았다. 이로부터 본 실험에서 사용된 동정 분리한 *Pseudomonas stutzeri* strain 15(DQ 202712)는 BTEX를 탄소원으로 이용하여 BTEX제거에 효과적임을 알 수 있었다.

#### 4. 고찰

본 연구에서는 유류로 오염된 하천저질로부터 benzene, toluene, ethylbenzene, o-xylene을 탄소원으로 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 전자수용체로 이용하는 미생물을 순수 분리하여 BTEX로 오염시킨 토양에 적용 가능성을 검토하였고 토양 내 토착 미생물과의 상호관계에 의한 미생물 군집 변화를 관찰하였다. 미생물 주입 시, 분해 효율 향상을 위하여 동정 분리한 미생물을 혼합하여 주입하였으며 혼합 비율은 *Pseudomonas stutzeri* strain 15(DQ 202712):*Klebsiella sp.* strain 20(DQ 202715):*Citrobacter sp.* strain A(DQ 202713)=2:1:1의 비율로 선정하였다. 그 결과 다음과 같은 결과를 관찰할 수 있었다.

1) 동정 분리한 미생물과 함께 nitrate를 주입시킨 sample에서 기타 시료에 비하여 가장 높은 분해율이 관찰되었으며 토양 내 토착 미생물에 의한 분해율은 이 보다 물질에 따라 benzene에서 최소 40%, ethyl-benzene과 o-xylene에서 최대 60%의 낮은 결과를 관찰할 수 있었다.

2) BTEX가 분해됨에 따라 주입한 미생물과 토양 내 토착 미생물과의 상관성 그리고 시간에 따른 미생물 군집의 변화를 관찰하기 위하여 PCR-DGGE를 통하여 미생물 군집구조 분석을 실시하였다. 그 결과 토양에서 토양 내 존재하는 미생물들에 의해 다양한 band가 관찰되었다. BTEX와 nitrate가 주입됨에 따라 토양 내 존재하는 다양한 미생물 종의 band intensity가 감소되며 특정 미생물 종의 밴드 intensity가 증가됨을 관찰할 수 있었다.

3) 순수 분리한 혼합 미생물과 전자 수용체로 nitrate를 첨가시킨 BTEX 제거율이 가장 우수했던 sample의 경우 Fig. 7에 나타난 band e에 대한 DNA sequence alignment한 결

과, *Pseudomonas stutzeri*와 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났으며 이는 동정 분리하여 주입한 미생물과 동일한 종으로 PCR-DGGE 분석 결과에서도 해당 band의 intensity가 가장 높게 나타났음을 알 수 있었다. Band b의 위치에서 *Citrobacter freundii* 종이 관찰되었으나 이는 실험 초기 주입된 동정 분리된 *Citrobacter sp.*와는 약간의 차이를 나타내었다. 이와 같이 주입된 3종의 미생물 가운데 *Pseudomonas stutzeri*만이 우점화 되어 뚜렷한 band가 관찰된 것은 주입된 동정 분리 미생물 배양 배지와 토양과의 환경 차로 인해 발생된 것으로 생각된다. *Pseudomonas stutzeri*가 우점화 된 이유는 배양 배지에서도 가장 높은 활성도와 분해 효율 특성을 나타냈기 때문인 것으로 생각된다. 이로 인해 토양 내에서도 BTEX를 가장 효과적으로 탄소원으로 이용하기 때문인 것으로 판단된다.

이로부터 BTEX 오염 저질로부터 동정 분리한 미생물 3종을 BTEX로 오염된 토양에 전자수용체와 함께 주입함으로써 토양 내 존재하는 토착 미생물보다 효율적으로 BTEX를 분해할 수 있었으며 20일의 실험 기간 동안에는 주입한 미생물 3종 가운데 *Pseudomonas stutzeri*이 우점화되어 BTEX 분해 효율이 향상되는 것으로 판단된다.

#### 사사

본 연구는 2005년도 한국과학기술연구원 기관고유사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Cavalca, L., Gennaro, P. D., and Colombo, M., "Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil," *Res. Microbiol.*, **151**, 877~887(2000).
2. Goudar, C. T. and Strevett, K. A., "Comparison of reactive rates of BTEX bio-degradation using respirometry," *J of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **21**, 11~18(1998).
3. Alagappan, G. and Cowan, R., "Substrate inhibition kinetics for toluene and benzene degrading pure cultures and a method for collection and analysis of respirometric data for strongly inhibited cultures," *Biotechnology and Bioengineering*, **83**, 798~809(2003).
4. Borden, R. C., Daniel, R. A., LeBrun, IV L. E., and Davis, C. W., "Intrinsic biodegradation of MTBE and BTEX in a gasoline-contaminated aquifer," *Water Resour. Res.*, **33**, 1105~1111(1997).
5. Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., and Kato, N., "Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera sp.* strain DNT-1,"

- AEM*, **70**, 1385~1392(2004).
6. Rooney-Varga, J. N., Anderson, R. T., Fraga, J. L., Ringelberg, D., and Lovley, D. R., "Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer," *AEM*, **65**, 3056~3063(1999).
  7. Lee, S. K. and Lee, S. B., "Substrate utilization patterns during BTEX biodegradation by an o-xylene-degrading bacterium *Ralstonia* sp. PHS1," *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 909-915(2002).
  8. 정경미, 이상협, 이한용, 홍석원, 김영오, 최용수, 유명진, BTEX 분해미생물의 순수 분리와 혼합 배양에 따른 기질 분해율 및 미생물 성장률 변화에 관한 연구, 한국물환경학회지, **21**(4), 347~352(2005).
  9. 김옥란, 막결합형-생물반응기에서 생물막 특성 연구, 서울대학교 석사학위 논문(2005).
  10. Vanbroekhoven, K., Ryngaert, A., Wattiau, P., Mot, R. D., Springael, D., "*Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting," *FEMS Microbiology Ecology*, **50**, 37~50(2004).
  11. Prenafeta-Boldu, F. X., Vervoort, J. J., Grotenhuis, T. C., and Van Groenestijin, J. W., "Substrate interaction during the biodegradation of BTEX hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(6), 2660~2665(2002).