

유류 분해 근권세균 *Rhodococcus* sp. 412와 옥수수를 활용한 유류 오염 토양의 정화

홍선화 · 박혜림 · 고우리¹ · 유재준¹ · 조경숙
이화여자대학교 환경공학과, ¹경기과학고등학교

Bioremediation of Oil-Contaminated Soil Using an Oil-Degrading Rhizobacterium *Rhodococcus* sp. 412 and *Zea mays*. Hong, Sun Hwa, Hae Lim Park, U-Ri Ko¹, Jae Jun Yoo¹, and Kyung-Suk Cho*. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea, ¹Gyeonggi Science High School, Gyeonggi 440-210, Korea – The advanced bioremediation of diesel-contaminated soil through the exploration of bacterial interaction with plants was studied. A diesel-degrading rhizobacterium, *Rhodococcus* sp. 412, and a plant species, *Zea mays*, having tolerant against diesel was selected. *Zea mays* was seeded in uncontaminated soil or diesel-contaminated soil with or without *Rhodococcus* sp. 412. After cultivating for 30 days, the growth of *Zea mays* in the contaminated soil inoculated with *Rhodococcus* sp. 412 was better than that in the contaminated soil without the bacterium. The residual diesel concentrations were lowered by seeding *Zea mays* or inoculating *Rhodococcus* sp. 412. These results indicate that the simultaneous use of *Zea mays* and *Rhodococcus* sp. 412 can give beneficial effect to the remediation of oil-contaminated soil. Bacterial community was characterized using a 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting method. The similarities of DGGE fingerprints were 20.8~39.9% between the uncontaminated soil and diesel contaminated soil. The similarities of DGGE fingerprints were 21.9%~53.6% between the uncontaminated soil samples, and 31.6%~50.0% between the diesel-contaminated soil samples. This results indicated that the structure of bacterial community was significantly influence by diesel contamination.

Key words: Oil-contaminated soil, phytoremediation, *Rhodococcus* sp, *Zea mays*, rhizobacterium

서 론

산업화에 따른 유류 소비의 증가로 다양한 종류의 유기합성물질들이 개발 및 사용, 화석연료의 사용은 지속적으로 증가 되고 있다. 이들 물질을 생산하거나 운반, 저장 등의 과정에서 토양으로 유류가 유입 되면 심각한 환경오염을 유발하게 된다. 토양이 유류와 같은 오염 물질에 노출이 되면, 자연 상태에서 스스로 정화하는데 수 십년이 걸린다. 가정용 연료, 차량연료, 의약품 등으로 널리 사용 되는 유류는 혈액, 간, 신장, 폐 등 각종 장기에 심각한 영향을 주며, 분자량이 작은 물질은 중추신경계에 영향을 주어 심할 경우 사망에 이르게 한다[4]. 이러한 이유로 여러 나라에서는 토양의 유해성을 파악하고 토양을 복원하기 위한 노력을 기울이고 있다.

오염토양을 복원하는 방법에는 크게 물리화학적 처리기술과 생물학적 처리기술의 2가지로 구분할 수 있다. 우선 물

리화학적 처리 기술에는 토양 증기 추출법, 토양 세척법, 열적처리기술, 소각, 열분해, 휘발, 열탈착법, 고형화 안정화법이 있고, 생물학적 처리 기술에는 landfarming, biofile, bioreactor, phytoremediation 등이 있다[3, 6, 15]. 물리화학적 처리 기술은 많은 비용이 소요되고 2차 오염 야기 등의 문제가 있으므로 최근에는 자연친화적인 방법인 생물학적 처리기술에 대한 선호도가 높아지고 있다. 생물학적 처리 기술 중에서 현재는 식물과 토양 미생물의 상호 작용으로 오염물질을 제거하는 식물상 복원기술이 각광 받고 있다.

식물상 복원기술이란 오염 되어진 토양이나 지하수, 퇴적물 등을 식물과 뿌리 미생물의 상호 기작을 이용하여 정화하는 복원기술로서[7, 20], 근권여과(rhizofiltration), 식물추출(phytoextraction), 식물전환(phytotransformation), 식물촉진(phytostimulation), 식물안정화(phytostabilization), 식물휘발(Phytovolatilization) 등이 있다[15].

최근 들어 식물상 복원의 효율을 증대시키기 위한 방법 중 하나로 식물과 근권 미생물 간의 상리공생적 상호관계에 대한 연구가 주목을 받고 있다[15]. 유류에 내성을 가지면서 식물의 성장을 촉진 시킬 수 있는 능력을 가지는 근권 미생물이 유류의 독성으로부터 식물을 보호하고, 식물들은 미생

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

물이 생존하는데 필요한 영양소를 뿌리를 통해 제공함으로써 근권 주변에는 이러한 미생물의 활성이 활발해진다. 이러한 공생관계는 식물상 복원에 있어 매우 중요한 기작으로 작용하여 유류 오염 토양의 복원효율을 증대시킨다. 유류 오염 토양이 정화되는 과정에서 유류를 분해하는 토착 미생물의 역할에 대한 연구가 많이 수행되어 왔으며, 미생물의 오염물질 생분해 활성이 생물복원 과정에서 매우 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[8].

본 연구에서는 유류 오염 토양으로부터 분리한 유류 분해 세균 *Rhodococcus* sp. 412[16], 유류 분해에 탁월한 능력을 가진 옥수수(*Zea mays*)[8, 14]를 함께 식재 하였을 때 유류 분해 효율 향상 여부와 식물의 성장과 토양의 미생물 군집 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

이화여대 약초원에서 식물을 배양하던 자연 토양을 2 mm 체로 쳐 마사와 1 : 1 비율로 섞은 토양을 사용 하였다. 토양에 디젤을 최종농도가 20000 mg-diesel/kg-soil 이 되도록 첨가하여 잘 혼합한 후 일주일간 보관하였다. 이렇게 디젤로 오염시킨 토양과 비오염 토양을 각각 1 kg에 화분으로 동일하게 넣었다. 이때 사용한 pot의 크기는 높이 15 cm, 지름 13.5 cm인 원형 pot를 사용하였고, 각각의 pot에 옥수수(*Zea mays*) 씨앗을 10개씩 심었다. 유류 오염 토양에서 분리한 유류 분해 세균 *Rhodococcus* sp. 412[66]를 디젤을 유일 탄소 원료로 첨가한(20000 mg/L) 무기염 배지(KH₂PO₄, 1.5 g/L; Na₂HPO₄·12H₂O, 9 g/L; (NH₄)₂SO₄, 3 g/L; CaCl₂·12H₂O, 0.04 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.15 g/L; FeSO₄·7H₂O, 0.01 g/L)에서 30°C, 200 rpm에서 4일간 배양한 후, 배양액을 원심분리 하여(10000 rpm, 10 min) 균체를 회수 하였다. 회수한 균체를 멸균수로 세정한 후, 다시 상기와 동일 조건에서 원심분리 하여 균체를 회수 하였다. 이를 다시 멸균수 30 ml에 현탁한 후, 이 균체 현탁액을 토양에 5 ml/pot씩 주입하였다. 토양 주입 후 412 균주 농도는 10⁸ cfu/kg-soil 정도로 하였다.

실험조건은 비오염균과 오염균으로 크게 구분하여, 비오염균은 토양(C), 토양에 옥수수만 식재(C+P), 토양에 412 균주만 접종(C+R), 토양에 옥수수 식재와 412 균주 접종(C+P+R)로 하였다. 또한, 오염균은 토양에 디젤을 첨가한(20,000 mg-diesel/kg-soil) 오염 토양(D), 오염 토양에 옥수수만 식재(D+P), 오염 토양에 412 균주만 접종(D+R), 오염 토양에 옥수수 식재와 412 균주 접종(D+P+R)로 하였다. 각 조건의 화분은 각각 3개씩 준비하였고, 항온습도 배양실에서 실험을 수행 하였다. 배양실 조건은 온도는 25°C 습도 60%로 유지되었으며, 명과 암조건을 각각 16시간과 8시간으로 하였다. 식물재배기간 동안 각각의 화분에 하루에 한

번씩 약 30 ml의 수분을 공급하여 주었다.

토양 및 미생물 활성 분석

토양의 pH는 토양과 3차 증류수를 1:5(w/v)로 혼합한 후 30분간 교반한 후에 30분간 정치하여 pH meter(Orion 420A, Orion research Inc., USA)로 측정 하였다. 토양 함수량은 토양 5 g을 110°C 건조기에서 항량이 될 때까지 말린 후 건조 중량당 백분율로 계산하였다. 유기물 함량은 건조된 토양을 도가니에 담아 700°C 회화소에서 1시간 작열한 후 건조 중량당 백분율로 계산하였다. 토양 중의 잔류 디젤 농도를 측정하기 위해 각 화분에서 채취한 토양 5 g을 시험관에 넣고, hexane을 5 ml 넣은 후 30분간 교반 한 후에 30분간 정치하였다. 상등액을 채취하여 디젤농도를 gas chromatography(5890 series, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 이때 gas chromatography의 분석 조건은 HP-5(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) column과 불꽃 이온화 검출기를 사용하였다. Oven 온도는 320°C, inlet 온도는 280°C, detector 온도는 250°C로 설정 하였다.

토양의 미생물 활성은 탈수소효소 활성(dehydrogenase activity, DHA)를 측정함으로써 조사하였다. DHA 측정을 위해 멸균한 유리관에 토양 3 g과 0.1% INT(2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride)용액 1 ml, 멸균수 1.5 ml를 무균적으로 넣고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 ethanol로 INT-formazan을 추출하였다. 추출한 에탄올 용액의 흡광도를 spectrophotometer(8453 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent Technologies, USA)를 사용하여 485 nm에서 측정하였다.

식물성장 측정

식물을 재배 30일 후 각 처리구별 지상부 길이와 식물체 중량을 측정하였다. 지상부의 길이는 토양 표면으로부터의 길이를 측정하였고, 식물체 중량은 화분에서 채취한 식물의 뿌리 부분을 물로 씻어 토양을 조심스럽게 제거한 후, 식물을 60°C 오븐에서 24시간 건조시킨 후 그 무게를 측정하였다.

미생물 군집 분석

각 화분에서 채취한 토양 1 g을 BIO101 kit(FastDAN SPIN Kit for Soil, Q-BIO gene, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 후, 이 genomic DNA 시료를 template로 하여, RCR(GeneAmp PCR system 2700, Applied Biosystem, USA)을 수행하였다[9]. PCR에 사용한 primer는 341fGC(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')과 907r(5'-CCC CGT CAA TTC ATT TGA GTT-3')이었다. PCR 조건은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation, 95°C에서 30초 동안 denaturation,

60°C에서 30초 동안 annealing, 72°C 30초 동안 extension 을 28 cycling한 후에 72°C에서 5분 동안 final extension을 하였다. PCR amplicon 시료를 이용하여 DGGE(Dcode™ System, BIO-RAD, USA)를 수행하였다. 6% acrylamide/bis gel을 이용하였고, urea 농도 구배는 35%~70%로 하였다. 전기영동은 60°C에서 50V로 14시간 하였고, DGGE fingerprints의 유사성은 Gel ComparII(Applied Maths, USA)를 이용해 분석하였다[9]. Gel ComparII로부터 얻은 각 시료의 band intensity를 합하여 백분율로 환산한 후에 SPSS를 이용하여 PCA(Principal component analysis)를 수행하였다. 또한, DGGE gel로부터 우점 band를 절단하여 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣고 멸균수를 20 µL 첨가해 -20°C에서 10분간 얼렸다가 65°C에서 3분간 녹이는 것을 3회 수행한 후, 원심분리(10,000 rpm, 10min)하여 상등액 15 µL을 회수하여 DNA 시료를 준비 하였다. 이 시료를 template로 사용하고 341F와 907r primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR products를 pGEM-T easy vector system 로 cloning한 후, 염기서열 분석을 수행하였다[9]. DGGE band 로부터 얻은 각 clone의 염기서열 분석 결과를 Blast(Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 유사도가 가장 높은 균주를 검색하였고, 각 clone의 염기서열은 GenBank에 등록하였다.

결과 및 고찰

토양의 물리 화학적 특성

비오염 토양과 디젤을 첨가하여 오염시킨 토양에 각각 옥수수과 *Rhodococcus* sp. 412를 접종한 후 30일 동안 옥수수 재배 후 토양을 채취하여 pH, 수분함량 및 유기물 함량을 측정하였다(Table 1). 비오염 토양과 오염 토양의 초기 pH는 4.9였다. 30일 후의 각 실험 조건의 토양 시료 pH는 큰 변화는 없었으나, 비오염 토양과 오염 토양 모두 옥수수와 412 균주를 동시에 첨가한 조건에서는 pH가 5.1~5.2로 다른 조건에 비해 토양 pH가 약간 높았다. 30일 후 토양의

수분 함량은 16.6%~25% 범위 이었고, 유기물 함량은 7.1%~10.8% 범위 이었다. 일반적으로 식물상복원에 사용되는 토양은 pH가 5.6~8.0으로 본 실험에 사용한 토양보다 높았고[23, 25], 유기물 함량은 3.5%~4.8%로 본 실험에 사용한 토양이 약간 높았다[23]. 그 이유는 본 실험을 수행한 계절이 황사가 심한 봄이었는데, 그때 토양의 산성화로 인하여 실험한 토양의 pH가 낮았던 것으로 사료되어진다. 또한, 식물이 존재하는 시료의 pH가 약간 높았던 것은 식물 뿌리에 의한 수분 공급과 중화작용에 의한 것으로 생각되어진다.

디젤을 20000 mg/kg으로 첨가 하여 오염 시킨 토양 시료를 대상으로 30일 후 토양 중의 잔류 디젤 농도를 분석한 결과(Fig. 1), 옥수수 식재 혹은 *Rhodococcus* sp. 412를 접종하지 않은 조건에서도 토양 중 디젤농도는 1909 mg/kg로 감소하였다. 옥수수만 식재한 경우는 24 mg/kg, 옥수수와 *Rhodococcus* sp. 412를 함께 식재한 경우는 510 mg/kg, *Rhodococcus* sp. 412만 접종한 경우는 577 mg/kg였다. 이

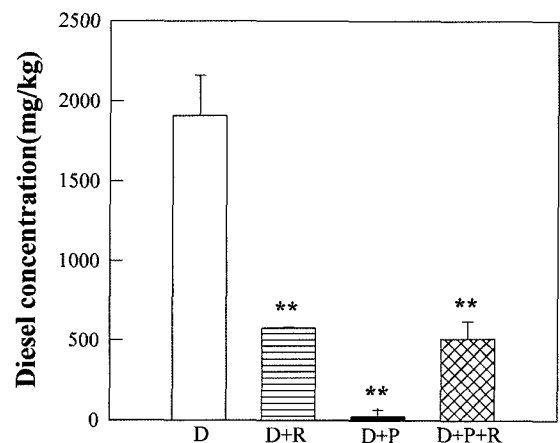


Fig. 1. Comparison of residual diesel concentrations in soil samples after 30 days (initial diesel concentration: 20000 mg/L). D, contaminated soil; D+R, contaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; D+P, contaminated soil+*Zea mays*; D+P+R, contaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412.

Table 1. Chemical and physical properties of soil samples after 30 days.

Experimental condition		pH	Moisture Content (%)	Organic Matter (%)
Uncontaminated soil	Soil (C)	4.6 (4.9) ^a	25.0 (18.7) ^a	7.1 (7.1) ^a
	Soil+ <i>Zea mays</i> (C+P)	4.9	24.8	10.8
	Soil+ <i>Rhodococcus</i> sp. 412 (C+R)	4.7	20.4	7.1
	Soil+ <i>Zea mays</i> + <i>Rhodococcus</i> sp. 412 (C+P+R)	5.1	16.6	8.1
Diesel-contaminated soil with diesel	Soil (D)	5.0 (4.9) ^a	19 (15.6) ^a	7.5 (7.0) ^a
	Soil+ <i>Zea mays</i> (D+P)	5.1	19.8	8.0
	Soil+ <i>Rhodococcus</i> sp. 412 (D+R)	5.0	21	8.0
	Soil+ <i>Zea mays</i> + <i>Rhodococcus</i> sp. 412 (D+P+R)	5.2	21.6	7.4

^a Initial values of pH, moisture content and organic matter were represented in parentheses.

결과에서는 옥수수 식재 혹은 412균주 접종에 의해 유류가 더 많이 제거됨을 알 수 있었다. 한편, 412균주 전배양시 디젤을 20000 mg/L가 되도록 첨가한 무기염 배지를 이용하였다. 412균주를 4일간 전배양한 후 이때 균을 멸균수로 씻은 후 토양에 접종을 해야 하는데, 412균주의 경우 디젤층에 붙어 자라기 때문에 멸균수를 이용하여 세척 할 수가 없었다. 이로 인해 412균주 접종시에 잔류 디젤이 토양에 첨가되어 식물만 단독으로 처리한 화분보다 잔류 TPH의 농도가 더 높은 것으로 사료된다.

식물상 복원의 효과를 증대시키기 위해서 식물과 미생물을 함께 이용하면 오염 물질 분해 효율의 증가 효과를 얻을 수 있다[18, 21]. 그 예로 Escalante-Espinosa(2005)은 *Cypripedium pubescens*만을 이용한 경우에는 120일 동안 디젤(TPH, total petroleum hydrocarbons)을 85% 제거할 수 있었으나, 미생물을 동시에 접종한 경우는 TPH 제거율이 90%로 향상되었다는 연구 결과를 보고하였다[12]. 그 이외에도 Cohen (2002)과 그의 동료 연구자들은 물개구리밥(*Azolla pinnata*)가 디젤을 19일 후 50% 정도까지 제거 시킬 수 있음을 알았다 하지만 이때 이용되어진 미생물은 동정하지 못하였다 [10]. Rahman(1995)는 5가지 미생물을 섞은 consortium (*Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 and *Pseudomonas* sp. DS10-129)와 *Senecus glaucus*를 함께 사용하여 원유를 73%까지 제거할 수 있었다[19].

식물의 생장 비교

옥수수를 식재한 후 배양 30일 지난 후, 옥수수의 줄기와 뿌리의 길이 및 식물체 중량을 측정하여 Fig. 2에 도시 하였다. 비오염 토양에서는 유류분해 세균인 412균주 접종에 의해 옥수수의 지상부 길이는 감소하였으나, 식물체 중량(biomass)는 412균주 접종 유무에 관계없이 거의 유사 하였다. 유류 오염 토양의 경우, 412균주 접종에 의한 식물의 지상부 길이는 증가 하였고 식물체 중량(biomass)도 약간 증가 하였다. 즉, 유류 오염 토양에서는 412균주 접종에 의해 식물 성장이 약간 향상 됨을 알 수 있었다.

식물상 복원 기술 개발 및 활용을 위해서는 토양과 식물의 상호 기작을 이해하고, 식물의 신진대사를 이해하는 것이 매우 중요하다. 식물의 근권은 풍부한 영양물이 존재하기 때문에 다양한 생태적 지위를 가지는 미생물이 존재한다. 이러한 역할을 한다고 알려져 있는 미생물에는 *Rhizobium*과 같은 diazotrophic bacteria, *Azotobacter* 그리고 *Azospirillum* 등이 있는데, 이들은 주로 질소를 고정하여 식물의 성장을 향상 시킨다[1, 2]. 대표적인 식물 성장 촉진 능력은 indole acetic acid 생산능, ACC deaminase 활성, siderophore 생산능 등이 있다[5]. 본 연구에서 이용한 *Rhodococcus* sp. 412는 유류 오염 토양에서 성장한 돌피의 근권에서 얻은 근권 세균이지만[17], indole acetic acid 생산

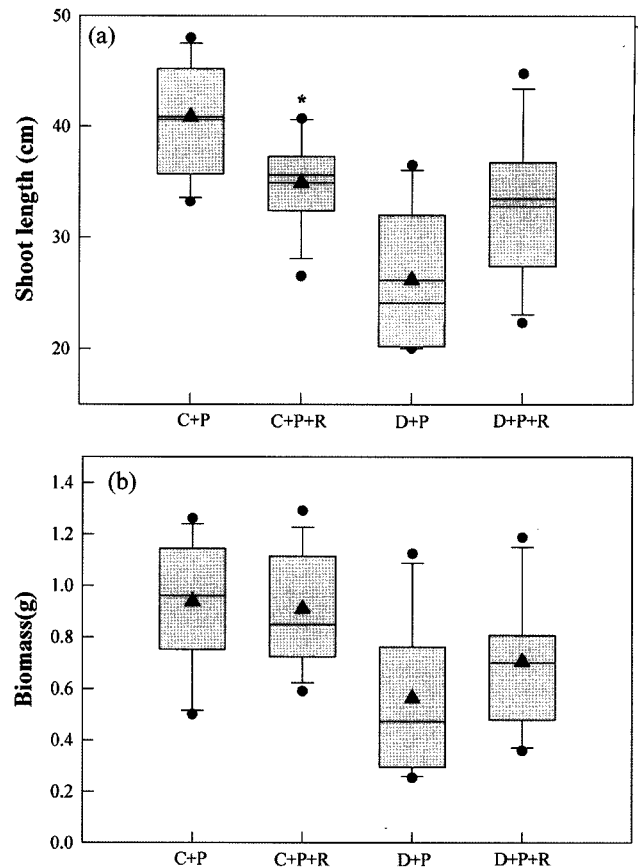


Fig. 2. Effect of the inoculation of *Rhodococcus* sp. 412 on the growth *Zea mays* (n=10). (a) shoot length (b) biomass. C+P, soil+*Zea mays*; C+P+R, soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412; D+P, contaminated soil+*Zea mays*; D+P+R, contaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412.

능, ACC deaminase 활성 및 siderophore 생산능을 가지고 있지는 않았다(결과 미제시). 그런데 디젤로 오염된 토양에 옥수수와 함께 *Rhodococcus* sp. 412를 넣어 준 경우에는 옥수수의 지상부 길이와 biomass가 약간 증가 하였다(Fig. 2). 412균주 접종에 의해 옥수수 성장이 약간 향상된 이유는 indole acetic acid이외에도 식물 성장 호르몬으로 알려져 있는 gibberellic acid 및 cytokinins 등을 412균주가 생산하거나[13], siderophore 이외에 식물에 유리한 작용을 하는 cyanide을 생산하거나[22] 혹은 식물에 필요한 영양 물질을 생산[11] 했기 때문으로 사료되나, 향후 이에 관한 자세한 연구가 필요하다.

토양 미생물 활성 비교

탈수소 효소 활성(DHA)은 미생물의 호흡활동과 밀접한 관련이 있으며, 미생물의 활성 측정 할 수 있는 우수한 방법 중의 하나이다[23]. 본 연구에서도 각 실험 조건별 미생물 활성을 비교하기 위해 DHA를 측정 하였는데(Fig. 3), 비오염 토양의 경우, 식물이 없는 경우는 7.55, 7.42 $\mu\text{g-dry}$

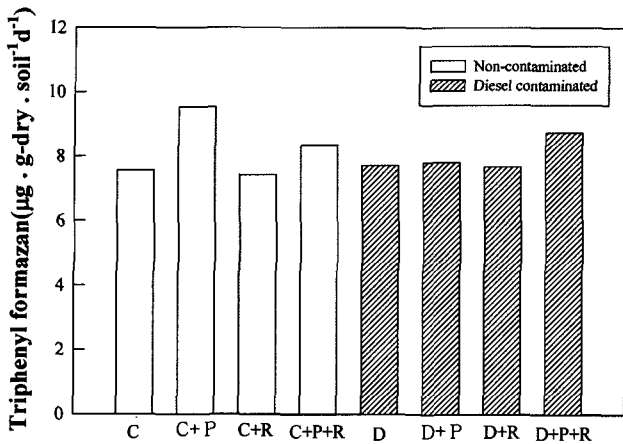


Fig. 3. Comparison of dehydrogenase activity in soil samples after 30 days. C, uncontaminated soil; C+R, uncontaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; C+P, uncontaminated soil+*Zea mays*; C+P+R, uncontaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412; D, contaminated soil; D+R, contaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; D+P, contaminated soil+*Zea mays*; D+P+R, contaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp.

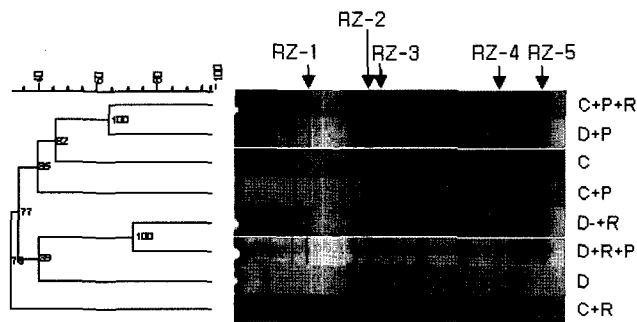
soil⁻¹d⁻¹, 그리고 식물이 있는 경우는 9.53, 8.34 µg-dry soil⁻¹d⁻¹ 이었다. 식물을 식재한 경우의 미생물 활성이 우수하였다. 디젤로 오염 시킨 토양의 경우도 식물과 미생물 모두 접종할 경우 DHA는 8.73 µg-dry soil⁻¹d⁻¹ 이었다. 본 연구에서는 412균주 접종 유무에 상관없이 DHA가 비슷하여 토양 미생물 활성을 잘 대변하지 못하였다. 이는 토양 중에 기질로 이용 할 수 있는 유기물이 부족하여 이러한 결과를 야기 할 수 있으며, 향후 기질로 glucose를 첨가한 조건에서

DHA측정이 필요한 것으로 사료된다.

미생물 군집 구조 분석

각 토양시료의 genomic DNA를 추출하여 16S rDNA-PCR 산물의 DGGE fingerprint를 Fig. 4에 도시하였다. 비오염 토양(C)과 디젤 오염 토양(D)은 DGGE fingerprint의 유사도가 20.8%로 디젤에 의해 상당한 미생물 군집변화가 일어났음을 알 수 있었다. 또한, 412 균주를 접종한 경우 비오염토양과 오염 토양 사이의 유사도(C+R vs D+R)는 36%, 식물 식중환 경우 두 토양 사이의 유사도(C+P vs D+P)는 34.6%, 412균주와 식물을 동시에 접종한 두 토양 사이의 유사도(C+P+R vs D+P+R)는 39.3%로, 디젤 오염 여부에 따라 미생물 군집이 상이함을 알 수 있었다. 비오염 토양을 기준으로 각 시료 사이의 군집유사도를 비교해 보면, 412균주를 접종한 토양(C+R)과는 21.9%, 식물 식중 토양(C+P)과는 39.1%, 식물과 412균주를 함께 식중환 토양(C+P+R)과는 53.6%이었다. 디젤 오염 토양(D)을 기준으로 각 시료 사이의 군집유사도를 비교해 보면, 412 균주 접종 토양(D+R)과는 50%, 식물 식중 토양(D+P)과는 39.1%, 식물과 412균주를 함께 식중환 토양(D+P+R)과는 31.6%이 었다.

Fig. 5에서는 DGGE fingerprints의 band intensity를 이용하여 PCA(Principal component analysis)를 수행하여 시료 간의 연관성을 분석하였다. 시료가 PC1과 PC2에 따라 그룹화가 이루어지는 것은 시료들 간의 상관관계가 있음을 의미한다. 여기서 PC1과 PC2는 시료 각각에 작용한 실험 조건 별 요소를 의미한다. 본 실험에서는 디젤과 식물, 유류분해 근권세균의 조건을 달리하였을 때 그 요인들에 의해 시료들



C	100							
C+R	21.9	100						
C+P	39.1	29.2	100					
C+P+R	53.6	40	45.8	100				
D	20.8	40	31.3	33.3	100			
D+R	25	36	28.6	52	50	100		
D+P	38.7	27.3	34.6	64.3	39.1	46.2	100	
D+P+R	24.1	25	31.7	39.3	31.6	72.2	44.4	100
	C	C+R	C+P	C+P+R	D	D+R	D+P	D+P+R

Fig. 4. Similarity analysis based on DGGE fingerprints. C, uncontaminated soil; C+R, uncontaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; C+P, uncontaminated soil+*Zea mays*; C+P+R, uncontaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412; D, contaminated soil; D+R, contaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; D+P, contaminated soil+*Zea mays*; D+P+R, contaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412.

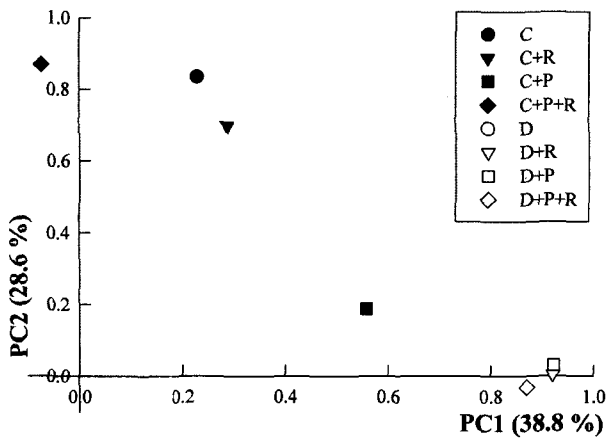


Fig. 5. Principal component analysis of average. C, uncontaminated soil; C+R, uncontaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; C+P, uncontaminated soil+*Zea mays*; C+P+R, uncontaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412; D, contaminated soil; D+R, contaminated soil+*Rhodococcus* sp. 412; D+P, contaminated soil+*Zea mays*; D+P+R, contaminated soil+*Zea mays*+*Rhodococcus* sp. 412.

이 어떤 상관관계를 가지는지 알아보려고 하였다. 비 오염 토양(C)의 경우는 그룹화 되지 않았지만, 디젤 오염 토양의 경우(D)는 디젤 단독 오염 시료를 제외하고 식물을 식재한 경우, 근권세균을 접종한 경우, 근권세균과 식물이 함께 있는 시료가 그룹화되어, 상대적으로 토양 군집이 서로 유사함을 알 수 있었다.

DGGE fingerprints로부터 5개의 band를 선택하여(Fig. 4) 동정한 결과를 Fig. 6에 도시하였다. Clone 들은 대부분 산림 토양 시료에서 나오는 균으로서 아직 uncultured bacterium이 대부분이었다. 그 중에서도 Clone RZ-2는 agricultural soil bacterium SC-I-38(AJ252632)과 97%의 높은 유사성을 보였고, RZ-4 Clone은 나프탈렌을 분해하는 균

주인 *Burkholderia glathei*(AY154379)와 99%의 높은 유사도를 보였다. 그 이외에도 비록 uncultured bacterium 이지만 RZ-1, RZ-3는 산림토양에서 많이 검출되는 균주로 각각 DUNssu391(AY913563) 균주와 95%, DUNssu070(AY913293) 균주와 92% 유사도를 나타내었고, RZ-5은 uncultured beta proteobacterium(DQ516443)와 98%의 높은 유사도를 보였다.

식물 뿌리 지역에서의 식물과 미생물의 상호 작용에 의해 형성된 근권은 미생물의 생물량 증가 및 활성, 군집구조에 직간접적인 영향을 미친다[8]. 또한, 토양의 미생물 군집은 오염물질에 의해 노출되어진 미생물이 생존하여 우점 하게 되고, 식물의 뿌리에 의해 수분이 풍부한 조건이 형성되면 미생물 군집은 상당한 변화를 가져오게 된다[21, 24]. 초기 토양 시료에서 얻은(clone RZ-2, RZ-3) uncultured forest soil bacterium, agricultural soil bacterium 과 같은 일반적인 토양 미생물이 존재하였지만, 디젤로 오염시킨 토양에서 30일간 식물을 배양한 후 토양 시료에서 얻은 clone RZ-4는 유류의 산물 중 하나인 나프탈렌을 분해하는 균주인 *Burkholderia glathei*과 유사도가 높았다.

본 연구에서는 옥수수과 유류 분해 세균인 *Rhodococcus* sp. 412를 함께 식종 할 때 디젤의 제거 효율과 토양 미생물 군집의 변화를 알아보았다. 그 결과, *Rhodococcus* sp. 412는 식물의 성장을 증진 시키는 효과가 있는 유류 분해 세균임을 알 수 있었다. 식물과 근권 미생물은 유류오염 물질을 직접 분해하기도 하며 서로의 분해작용을 촉진하는 간접적인 역할을 하기도 한다[15]. 따라서, 본 연구의 결과는 유류 오염 토양을 식물상 복원 기술을 활용하여 정화하는데 있어 유류 정화용 식물과 식물 성장 향상 능력을 가지는 근권 미생물의 동시 활용함으로써 복원 효율을 증진시킬 수 있음을 시사한다.

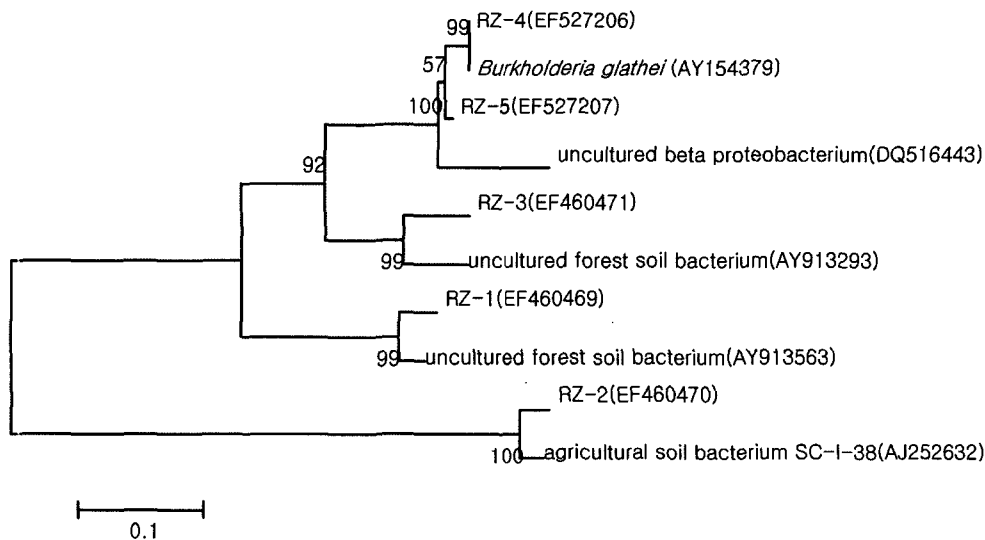


Fig 6. Phylogenetic tree illustrating the relationships among the closest relatives in the GenBank database and the clones.

요 약

디젤 오염 토양 정화를 위해 식물과 미생물의 상호관계를 활용하는 생물복원에 관한 연구를 수행하였다. 디젤을 분해하는 근권 세균인 *Rhodococcus* sp. 412와 디젤에 내성을 가지고 있는 식물인 옥수수(*Zea mays*)를 이용하여 디젤로 오염되어진 토양의 디젤 제거능과 미생물 군집변화를 조사하였다. 실험 개시 30일 후, 디젤 오염 토양에서 *Rhodococcus* sp. 412를 접종한 토양의 옥수수의 성장이 412균주를 접종하지 않은 토양에서의 옥수수 성장보다 약간 우수하였다. 또한 식물을 식재하거나 412균주를 접종한 토양에서 존재하는 토양에서 디젤의 잔류농도도 낮게 나타났다. 이러한 결과를 디젤 오염 토양 정화를 위해 옥수수와 *Rhodococcus* sp. 412를 동시에 활용하는 것이 유리함을 의미한다. 토양세균 군집 변화를 16S rDNA-PCR과 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) fingerprinting 방법을 이용하여 분석하였다. 비오염 토양 시료와 디젤 오염토양 시료의 DGGE fingerprint의 유사도는 20.8~39.3% 이었다. 또한, 비오염 토양 시료 사이의 DGGE fingerprint의 유사도는 21.9~53.6%, 그리고 디젤 오염 토양 시료 사이의 유사도는 31.6~50.0% 이었다. 이러한 결과는 디젤 오염으로 인해 토양 세균 군집 구조가 영향을 받았음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2006년 과학고 영재교육 내실화 경기도(교육부) 지원사업 R&E 프로그램과 한국과학재단 차세대바이오환경기술연구센터(AEBRC, R11-2003-006-06001-0)의 지원을 받았으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Adam, G. and H. J. Duncan. 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environ. Geochem. Hlth.* **21**: 353-357.
- Adam, G. and H. J. Duncan. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* **120**: 363-370.
- Anderson, T. A., E. A. Guthrie, and B. T. Walton. 1993. Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 2630-2636.
- ATSDR. 1999. Public health statement for total petroleum hydrocarbon (TPH).
- Barazani, O. and J. Friedman. 2000. Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *J. Chem. Ecol.* **26**: 343-349.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies (review paper). *Bioresource Technol.* **74**: 63-67.
- Burken, J. G. and J. L. Schnoor. 1996. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J. Environ. Eng.* **122**: 958-963.
- Chaudhry, Q., M. B. Zandstra, S. Gupta, and E. J. Joner. 2005. Utilising the synergy between plant and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic in the environment (review articles). *Plant-Microbial Interactions* **12**: 34-48.
- Cho, W. S., E. H. Lee, E. H. Shim, J. S. Kim, H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2005. Bacterial Communities of Biofilm Sampled from Seepage Groundwater Contaminated with Petroleum Oil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 952-964.
- Cohen, M. F., J. Williams, and H. Yamsaki. 2002. Biodegradation of diesel fuel by an *Azolla*-derived bacterial consortium. *J. Environ. Sci. Heal. A.* **37**: 1593-606.
- De Freitas, J. R., M. R. Banerjee, and J. J. Germida. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola. *Biol. Fertil. Soils* **24**: 358-364.
- Escalante-Espinosa, E., M. E. Gallegos-Martinez, E. Favela-Torre, and M. Gutierrez. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* **59**: 405-413.
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-114.
- Issoufi, I., R. L. Rhykerd, and K. D. Smiciklas. 2006. Seeding growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. *J. Agron. Crop. Sci.* **192**: 310-317.
- Kim, J. Y., and K. S. Cho. 2006. Bioremediation of Oil-Contaminated Soil Using Rhizobacteria and Plants. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 185-195.
- Kim, J. Y. and K. S. Cho. 2006. Characterization of diesel degradation of a petroleum-degrading rhizobacterium and monitoring its fate in soil using real time PCR. *Kor. Soc. Environ. Eng.* **158**.
- Maila, M. P., P. Randima, K. Surridge, K. Dronen, and T. E. Cloete. 2005. Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. *Int. Biodeter. Biodegr.* **55**: 39-44.
- Palmroth, M. R. T., U. Munster, J. Pichtel, and J. A. Puhakka. 2005. Metabolic responses of microbia diesel fuel addition in vegetated soil. *Biodegradation* **16**: 91-101.
- Rahman, K. S. M., T. Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy, and I. M. Banat, 1995. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J. Basic Microb.* **42**: 284-291 of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station
- Schnoor, J. L. 1997. Pytoremediation. *Technology evaluation report*.
- Siciliano, S. D. and J. J. Germida. 1999. Enhanced phytoremediation of chlorobenzoates in rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 299-305.
- Siciliano, S. D., N. Fortin, A. Mihoc, G. Wisse, S. Labelle, D. Beaumier, D. Ouellette, R. Roy, L. G. Whyte, M. K. Banks, P. Schwab, K. Lee, and C. W. Greer. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response

- to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2469-2475.
23. Santos, F. S., J. Hernández-Allica, J. M. Becerril, N. Amaral-Sobrinho, N. Mazur, and C. Garbisu. 2006. Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere* **65**: 43-50.
24. von Mresi, W. and F. Schinner. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazilium chloride. *Biol. Fertil. Soils* **11**: 210-220.
25. Wei, C. Y., X. Sun, C. Wang, and W. Y. Wang. 2006. Factors influencing arsenic accumulation by *Pteris vittata*: A comparative field study at two sites. *Environ. Pollut* **141**: 488-493.
26. Wetzal, S., M. K. Banks, and A. P. Schwab. 1997. Rhizosphere effects on the degradation of pyrene and anthracene in soil, pp. 254-263. In E. L. Kruger, T. A. Anderson, and J. R. Coats(eds.), *Phytoremediation of soil and water contaminants*, *American Chemical Society Symposium Series*.

(Received Mar. 3, 2007/Accepted Apr. 28, 2007)