

Biphenyl 분해 미생물 *Pseudomonas* sp. DS-94의 분리 및 동정

이대성 · 정성윤^{1)*}

포항공과대학교 해양대학원, ¹⁾대구가톨릭대학교 의생명과학과
(2010년 9월 4일 접수; 2010년 9월 29일 수정; 2010년 10월 12일 채택)

Isolation and Identification of a Biphenyl-degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. DS-94

Dae-Sung Lee, Seong-Yun Jeong^{1)*}

POSTECH Ocean Science & Technology Institute, POSTECH, Gyeongbuk 790-784, Korea

¹⁾Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

(Manuscript received 4 September, 2010; revised 29 September, 2010; accepted 12 October, 2010)

Abstract

Three biphenyl-degrading microorganisms were isolated from polluted soil samples in Sasang-gu, Busan. Among them, isolate DS-94 showing the strong degrading activity was selected. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of DS-94 were investigated by API 20NE and other tests. This bacterium was identified as the genus *Pseudomonas* by 16S rDNA sequencing and designated as *Pseudomonas* sp. DS-94. The optimum temperature and pH for the growth of *Pseudomonas* sp. DS-94 were 25 °C and pH 7.0, respectively. This isolate could utilize biphenyl as sole source of carbon and energy. Biphenyl-degrading efficiency of this isolate was measured by HPLC analysis. As a result of biological biphenyl-degradation at high biphenyl concentration (500 mg/L), biphenyl-removal efficiency by this isolate was 73.5% for 7 days.

Key Words : Biphenyl-degrading activity, Contaminated soil, *Pseudomonas* sp. DS-94

1. 서론

산업화에 의해 토양이 환경오염에 노출되면 자연 상태에서 스스로 정화하는데 수십 년이 걸린다. 특히 biphenyl은 콜타르(coal tar)와 원유 및 천연가스의 구성성분으로서 polychlorinated biphenyl (PCB)의 유기합성에 널리 사용되어져 왔으며(Moody 등, 2002), 환경 오염물질로서 전 세계에 널리 퍼져있는 실정이다. 최근에 biphenyl의 사용량이 감소되었다고 하지

만, biphenyl은 여전히 우리들의 주위 환경에 많이 남아있어 심각한 환경오염을 야기시키고 있다. 또한 동물사료에 들어있는 biphenyl은 신장장애를 일으켜 방광암을 일으키고(Boehncke 등, 1999), 간독성 및 중추신경계에 악영향을 미치며(Sandmeyer, 1981), 심지어 수명을 단축시키기도 한다(Ambrose 등, 1960).

Biphenyl/PCB에 오염된 지하수 및 토양을 복원하는 방법에는 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있다. 물리화학적 방법에는 토양 증기추출법, 토양 세척법, 소각, 열분해법 등이 있고, 생물학적 방법에는 bioaugmentation (외부미생물의 공급), biofertilizer, bioreactor, bioremediation (생물적 환경정화), biostimulation (영양분 및 전자수용체의 공급),

*Corresponding author : Seong-Yun Jeong, Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea
Phone: +82-53-850-3772
E-mail: jsymicro@cu.ac.kr

landfarming, phytoremediation 등이 있다(최 등, 2001). 물리적 처리방법의 경우 많은 비용이 소요되고, 화학적 방법의 경우 대부분이 화학합성제로 인한 독성과 2차오염을 유발시키며, 생분해능이 떨어지는 단점이 있다(Georgiou 등, 1990). 생물학적 방법은 오염 토양 환경으로부터 분리한 균주를 이용하기 때문에 생태계 보호는 물론 무독성 등의 친환경적 장점이 있어 1970년대부터 연구가 활발히 진행되고 있다. 미생물은 실제로 토양생태계에서 유기물의 분해, 영양소 순환 및 토양의 입단화 등에 기여하고 있으므로, 이러한 오염된 환경의 bioremediation에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

Lunt와 Evans (1970) 및 Catelani 등(1970)은 유일한 탄소원과 에너지원으로서 biphenyl을 분해해서 증식할 수 있는 미생물을 처음으로 분리하여 보고하였다. 그 후 지금까지 몇몇 biphenyl 분해 미생물이 분리, 보고되었고, 최근에 이러한 미생물들에 의한 생물학적 biphenyl 생분해에 대한 연구가 전 세계적으로 각광받고 있다(Pieper, 2005). 토양은 biphenyl의 가장 큰 저장고로 간주되고 있으며(Valle 등, 2005), 지금까지 다양한 종류의 토양미생물들이 biphenyl의 유도체인 PCBs를 분해할 수 있다고 보고되었다(Lars 등, 2007). 그러므로 biphenyl도 이러한 토양미생물들에 의해서 호기적으로 분해될 수 있을 것이다(Lars 등, 2007). 대표적인 biphenyl 분해미생물로는 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa와 Miyazaki, 1986)과 *Burkholderia* sp. LB400 (Mondello, 1989)이 있다. 최근에도 biphenyl 분해능이 매우 우수한 *Dyella ginsengisoli* LA-4 (Li 등, 2009)가 분리, 보고되어 biphenyl에 오염된 토양의 정화에 많은 기대가 예상된다.

본 연구는 오염 토양에서 분리한 biphenyl 분해 미생물 중 분해능이 뛰어난 *Pseudomonas* sp. DS-94 균주를 분리, 동정하고 생리적 특성 및 분해능에 대해 조사한 결과로서, 오염 토양의 bioremediation을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 표준시약 및 배지

Biphenyl (>99.5% purity) 표준시약은 Sigma-Aldrich

에서 구입하였으며, mineral salts medium (MM 배지)의 조성은 다음과 같다.: NaCl 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ 1.0 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, pH 7.0. Biphenyl은 autoclaving 후에 유일한 탄소원으로 첨가하였다. 미생물 증식용 배지인 Luria-Bertani (LB) 배지의 조성은 다음과 같다.: tryptone 10.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, yeast extracts 5.0 g/L, pH 7.0. 또한 평판 고체배지로 사용할 때에는 Bacto agar (Difco)를 1.5% 농도로 첨가하였다.

2.2. Biphenyl 분해 미생물의 분리

부산 사상구 공장밀집지대의 오염 토양을 채취하여, 2 g의 토양 시료를 biphenyl 100 mg/L의 BMM (biphenyl mineral salts medium)을 포함하는 삼각 플라스크(2 L)에 접종하여 30 °C에서 180 rpm으로 5일간 진탕배양하면서 biphenyl에 대한 적응기간을 거쳤다. 이러한 농화배양액 10 ml를 5일 간격으로 새로운 BMM 배지(1 L)에 옮겨 배양하는 것을 3회 반복한 후, 멸균한 0.85% 생리식염수에 십진법으로 희석하여 BMM 고체배지(biphenyl 최종농도 100 mg/L)에 도말하여 집락을 형성한 콜로니를 선별하여 순수분리하였다. 순수분리된 균주들은 유일한 탄소원으로 biphenyl을 10, 100, 200 mg/L로 함유한 BMM 배지에서 25 °C, 180 rpm에서 7일간 진탕 배양하여 균주별 증식 정도를 분광광도계(Shimadzu, UV-160)로 흡광도(660 nm)를 조사하여 분해능이 우수한 균주들을 선별하였다.

2.3. 고농도 biphenyl의 분해능 비교

Biphenyl 분해능이 우수한 DS-94, 95, 96 균주들의 고농도의 biphenyl에 대한 분해능을 비교, 측정하기 위한 방법은 다음과 같다. Biphenyl이 300과 500 mg/L의 고농도로 포함된 BMM 배지 100 ml가 들어 있는 300 ml 삼각 플라스크에 seed 배양액을 최종농도가 1% (v/v)가 되도록 접종하고, 25 °C, 180 rpm에서 7일간 진탕배양하였다. 배양용액을 원심분리(4,000 g, 20 min, 4 °C)하여 균체를 제거한 상등액을 분액할때기에 옮긴 후, 동량의 EtOAc (ethyl acetate)로 3회 반복하여 추출하였고, 유기용매 추출액은 anhydrous sodium acetate로 수분을 제거한 후, evaporator를 이용하여 농축하였다. 농축된 시료에 EtOAc 10 ml를 첨가하여 PTFE filter (Whatman, 0.2 μm)로 여과한 다음,

이중 10 μl 를 취하여 reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC, Waters Co.)에 injection하여 잔류 biphenyl 농도를 측정하였다. 분리용 column은 Cosmosil 5C18 (4.6 mm x 250 mm x 5 μm)을 사용하였으며, 이동상 용매는 acetonitrile/water (70:30, v/v)였으며, flow rate는 1.0 ml/min이었으며, detection은 UV 254 nm에서 수행하였다. 모든 실험은 3회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

2.4. 균주의 생리적 특성 및 동정

분리균주 중 biphenyl 분해 활성이 가장 뛰어난 DS-94 균주의 LB 배지에서의 최적 성장조건을 조사하기 위하여 온도 및 초기 pH에 따른 성장을 측정하였다. 즉, 4°C~40°C, pH를 4~10으로 각각 조정한 후, 25°C에서 180 rpm으로 24시간 진탕 배양하였다. 균주의 증식은 분광광도계(Shimadzu, UV-160)로 흡광도(660 nm)를 측정하였다.

또한 DS-94 균주의 동정을 위하여 MacFaddin (1980)의 방법을 참고하고, API 20NE kit (Biomerieux, France)를 이용하여 생리, 생화학적 특성들을 조사하였다. 그 결과를 apiweb™ database (<http://apiweb.biomerieux.com>)를 참조하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다. 또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 sequencing을 행하였다 (Dunbar 등, 2000). 즉 선별된 DS-94 균주는 LB배지에서 18시간 배양한 후, AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 49F (5'-AGAA TTCTNANACATGCAAGTCGAICG-3')와 1492R (5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다(Moyer 등, 1994). 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 *EcoRI*의 인식부위를, reverse primer의 5'에는 *BamHI*의 인식부위를 첨가하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rDNA의 PCR

반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 μl 의 XL1-blue competent cell에 transformation 시킨 후 alkaline lysis mini-prep 방법(Sambrook 등, 1989)으로 plasmid를 mini-prep 하였다. 이와 같이 16S rDNA 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스에서 가장 상동성이 높은 균주들과 염기서열을 비교하였으며, MEGA 2.1 package (Kumar 등, 2001)를 이용하여 계통도를 그렸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Biphenyl 분해 미생물의 분리

Biphenyl 분해 미생물을 분리하기 위하여 부산 상구 공장밀집지대의 오염 토양을 균원시료로 사용하였다. 먼저 biphenyl에 적응시킨 농화배양액을 희석하여 biphenyl 최종농도 100 mg/L로 함유한 BMM 고체 배지에 도말하여 7일간 배양한 후, 서로 다른 특징의 집락을 형성한 콜로니를 선별하여 3개의 균주를 순수 분리하였다. 이 균주들이 biphenyl을 탄소원으로 이용하여 성장하는지를 재차 확인하고 biphenyl 농도별 증식정도를 비교하기 위하여, biphenyl을 10, 100, 200 mg/L로 함유한 BMM 배지에서 배양하여 균주별 증식 정도를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. DS-94 균주가 DS-95와 96 균주보다 BMM 배지에서 균체성장이 우수하였다. 또한 DS-94 균주는 200 mg/L (biphenyl)

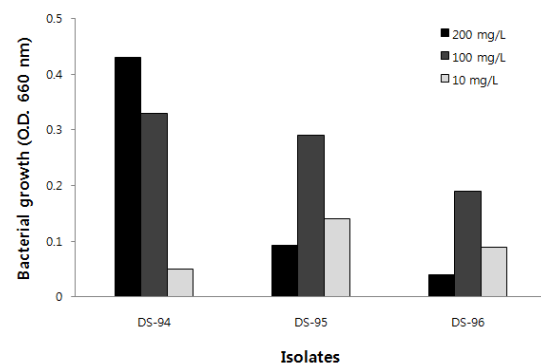


Fig. 1. Cell growth of the isolates in the presence of biphenyl. Isolates were cultured in BMM containing 10, 100, and 200 mg/L of biphenyl for 7 days at 25°C.

의 고농도에서 높은 성장을 보였지만 10 mg/L의 저농도에서는 낮은 성장을 보였다. 이는 DS-94 균주가 저농도에서는 유일한 탄소원으로 이용하는 biphenyl의 농도가 낮아 생육이 저해된 결과로 판단된다. 한편 DS-95와 96 균주들은 타 농도에 비해 100 mg/L에서 상대적으로 높은 성장을 보였으나, 200 mg/L의 고농도에서는 오히려 성장이 저해되었다. 이들 균주들에게 고농도의 biphenyl 존재는 성장 저해요인으로 작용하는 것으로 판단된다.

3.2. 분리 미생물들의 biphenyl 분해능

분리균주들을 전배양하여 biphenyl이 300과 500 mg/L의 고농도로 포함된 BMM 배지에 1%가 되도록 접종하여 7일간 배양하였을 때, biphenyl의 잔존률을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. DS-94 균주를 첨가했을 때 biphenyl의 잔존 농도는 300과 500 mg/L의 농도에서 각각 36.4%와 26.5%로 분해능이 가장 우수하였다. 특히 biphenyl이 고농도일수록 오히려 높은 분해능을 보여, 이 균주가 고농도일 때 더 잘 성장한다는 Fig. 1의 결과와도 잘 일치하였다. 또한 DS-95 균주는 300과 500 mg/L의 고농도에서 각각 43.7%와 59.1%의 잔존률을 보였다. 한편 DS-96 균주는 둘 다 76.5% 이상의 잔존률을 보여, 역시 고농도에서는 biphenyl 분해능이 떨어짐을 알 수 있었다. 이상의 결과 biphenyl 분해능이 가장 우수한 DS-94 균주를 선별하여 생리적 특성 파악 및 동정 실험을 진행하였다.

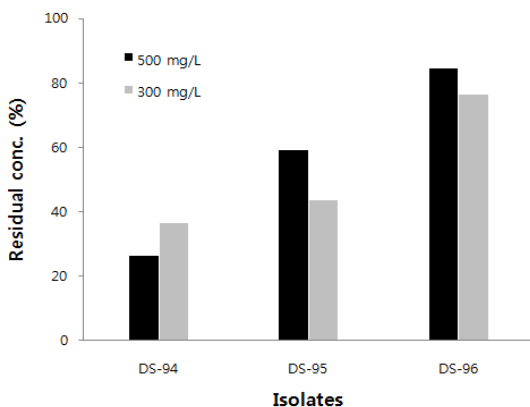


Fig. 2. Residual biphenyl concentration in the culture broth containing 300 and 500 mg/L of biphenyl. Isolates were cultured in BMM for 7 days at 25 °C.

3.3. 우수 균주의 생리적 특성 및 동정

Biphenyl 분해능이 가장 우수한 DS-94 균주를 선별하여, 이 균주의 형태적, 생리, 생화학적 특성들을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. DS-94 균주는 Gram 음성, 간균으로 catalase와 oxidase test에 양성 을 보였으며, API 20NE test에서 인돌을 생성하고, arginine dihydrolase와 urease를 가지고 있지 않았다. 이상의 분석결과 *Pseudomonas* 속으로 1차적으로 분류되었다. 또한 *Pseudomonas* sp. DS-94의 LB 배지에서 성장의 최적 온도와 pH를 조사한 결과, 최적 온도는 25 °C였으며 30 °C에서도 잘 증식하였다. 또한 4 °C와 37 °C에서도 성장을 하였으나, 40 °C에서는 성장하지 못 하였다. 최적 pH는 7.0이었으며, pH 4.0과 10.0에서는 거의 성장하지 못 하였다(Table 1). 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열(1,356 bp)을 분

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of isolate DS-94 selected physiAPI 20NE and other tests

Test	Result
Shape	rod
Gram staining	-
Motility	motile
pH optimum	7.0
Temperature optimum (°C)	25
Growth at 4 °C	+
Growth at 37 °C	+
Growth at 40 °C	-
API 20NE:	
Indole production	-
Acidification during glucose fermentation	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	-
Presence of β-glucosidase	+
Presence of β-galactosidase	+
Protein hydrolysis	-
Assimilation of:	
Arabinose	+
Citrate	-
Gluconate	-
Glucose	+
Maltose	+
Mannitol	-
Mannose	-
N-Acetyl-glucosamine	+

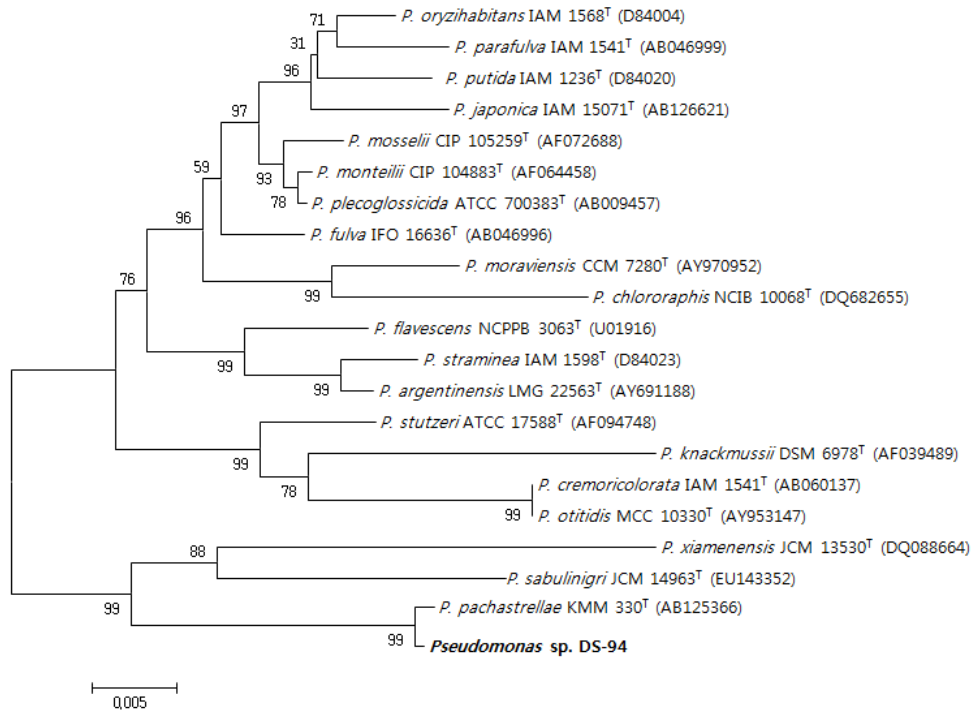


Fig. 3. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA sequence indicating the position of DS-94. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at branching points. Bar shows two nucleotide substitution per 1,000 nucleotides.

석하여 NCBI GenBank에 등록된 상동성이 높은 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, *Pseudomonas pachastrellae* KMM 330^T (AB125366)와 99.1%의 가장 높은 상동성을 나타내어(Fig. 3), 본 균주를 *Pseudomonas* sp. DS-94로 명명하였다.

Biphenyl 오염의 심각성에 비해 지금까지 biphenyl 분해 미생물에 대한 연구는 미진한 실정이다. 최근에 Li 등(2009)이 biphenyl 분해능이 우수한 *Dyella ginsengisoli* LA-4를 분리하여, biphenyl/PCB 분해와 관련된 *bph* 유전자에 대해 보고한 바가 있다. Biphenyl의 유도체인 PCB를 분해하는 미생물에 대한 연구는 상대적으로 많은 연구 성과가 보고되고 있는데, PCB 분해 미생물로는 *Pseudomonas* 속, *Burkholderia* 속, *Rhodococcus* 속이 보고되었다. 이 미생물들은 모두 *bph* 유전자를 가지고 있으며, biphenyl/PCB 분해능이 모두 우수하였다. 그러므로, 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp.

DS-94도 PCB를 분해할 것으로 예상되어 그 응용범위는 넓을 것으로 생각된다.

4. 결론

본 연구에서는 부산 사상구 공장밀집지대의 오염 토양을 채취하여 biphenyl 분해능이 있는 3개의 균주를 1차로 분리하였으며, 500 mg/L의 고농도의 biphenyl을 분해할 수 있는 DS-94 균주를 선별하였다. 이 균주의 형태적, 생리, 생화학적 특성들을 확인하고 16S rDNA sequencing을 통해 동정한 결과 *Pseudomonas* sp. DS-94로 명명하였다. 이 균주는 25°C, pH 7.0에서 최적 성장을 나타내었고 4°C와 37°C에서도 성장을 하였으나, 40°C에서는 성장하지 못 하였다.

Biphenyl 분해능이 가장 우수한 *Pseudomonas* sp. DS-94는 500 mg/L의 biphenyl을 7일 만에 73.5%까

지 분해할 수 있었다. 본 균주는 biphenyl이 고농도일수록 오히려 높은 분해능을 보이고, 이러한 고농도의 biphenyl을 단일 탄소원으로 이용할 수 있다는 점에서 오염 토양의 bioremediation에 적용 가능성이 높을 것으로 판단된다. 현재 본 균주의 다른 종류의 PCBs에 대한 분해능을 조사하고 있으며, 이를 통하여 오염 토양의 생물학적 복원에 기여할 수 있을 것이라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 일반연구지원사업(2010-0025049)의 일부 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 최병순, 국승욱, 김진한, 이동훈, 박철희, 2001, 토양오염 처리기술, 토양오염 개론, 동화기술, 237-244.
- Ambrose, A. M., Booth, A. N., DeEds, F., Cox, A. J., 1960, A toxicological study of biphenyl, a citrus fungistat, Food Res., 25, 328-336.
- Boehncke, A., Koennecker, G., Mangelsdorf, I., Wibbertmann, A., 1999, Biphenyl, Concise International Chemical Assessment Document, 6, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1-31.
- Catelani, D., Mosselmans, G., Nienhaus, J., Sorlini, C., Treccani, V., 1970, Microbial degradation of aromatic hydrocarbons used as reactor coolants, Experientia, 26, 922-923.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O., Kuske, C. R., 2000, Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis, Appl. Environ. Microbiol., 66, 2943-2950.
- Furukawa, K., Miyazaki, T., 1986, Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, J. Bacteriol., 166, 392-398.
- Georgiou, G., Lin, S. C., Sharma, M. M., 1990, Surface active compounds from microorganisms, Biores. Technol., 10, 60-65.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M., 2001, MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, Bioinformatics, 17, 1244-1245.
- Lars, R., Andrew, J., D., 2007, Biodegradation of biphenyl in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor, Biochem. Eng. J., 36, 195-201.
- Li, A., Qu, Y. Y., Zhou, J. T., Gou, M., 2009, Isolation and characteristics of a novel biphenyl-degrading bacterial strain, *Dyella ginsengisoli* LA-4, J. Environ. Sci., 21, 211-217.
- Lunt, D., Evans, W. C., 1970, The microbial metabolism of biphenyl, Biochem. J., 118, 54-55.
- MacFaddin, J. F., 1980, Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 36-308.
- Mondello, F. J., 1989, Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation, J. Bacteriol., 171, 1725-1732.
- Moody, J. D., Doerge, D. R., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E., 2002, Degradation of biphenyl by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 364-369.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C., Karl, D. M., 1994, Estimation of diversity and community structure through RFLP distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active hydrothermal vent, Loihi Seamount, Hawaii, Appl. Environ. Microbiol., 60, 871-879.
- Pieper, D. H., 2005, Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls, Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, 170-191.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 25-28.
- Sandmeyer, E. E., 1981, Aromatic Hydrocarbons, Wiley, New York, 3325-3330.
- Valle, M., D., Jurado, E., Dachs, J., 2005, The maximum reservoir capacity of soils for persistent organic pollutants: implications for global cycling, Environ. Pollut., 134, 53-164.