

## DGGE를 이용한 PCE 및 TCE의 혐기적 탈염소화 군집의 미생물 군집분석

김병혁<sup>1,4</sup> · 조대현<sup>1</sup> · 성열봉<sup>3</sup> · 안치용<sup>1</sup> · 윤병대<sup>2</sup> · 고성철<sup>4</sup> · 오희목<sup>1</sup> · 김희식<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>한국생명공학연구원 환경바이오연구센터, <sup>2</sup>한국생명공학연구원 전북분원 생물산업공정센터  
<sup>3</sup>포항산업과학연구원 광양환경연구실, <sup>4</sup>한국해양대학교 환경공학과

**Analysis of Microbial Community during the Anaerobic Dechlorination of PCE/TCE by DGGE. Kim, Byung-Hyuk<sup>1,4</sup>, Dae-Hyun Cho<sup>1</sup>, Youlboong Sung<sup>3</sup>, Chi-Young Ahn<sup>1</sup>, Byung-Dae Yoon<sup>2</sup>, Sung-Cheol Koh<sup>4</sup>, Hee-Mock Oh<sup>1</sup>, and Hee-Sik Kim<sup>1\*</sup>.** <sup>1</sup>Environmental Biotechnology Research Center, KRIBB Daejeon 305-806, Korea, <sup>2</sup>Bioindustrial Process Center, Jeonbuk Branch Institute, KRIBB, Jeongeup 580-185, Korea, <sup>3</sup>Env. & Energy Research Center, RIST, Gwangyang 545-090, Korea, <sup>4</sup>Department of Environmental Engineering, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea – This study investigated the effect of PCE and TCE as electron acceptors on the bacterial composition of dechlorinating communities. The enrichment cultures reductively dechlorinating PCE and TCE were developed from three environment samples using acetate as electron donor. The cultures were prepared by sequential enrichment, which was seeded with sediment and dredged soil. Denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA gene fragment was used to compare the microbial communities of these three enrichment cultures. After incubation for 4 weeks, the removal efficiencies of PCE and TCE were highest from Yecheon site (87.37% and 84.46%, respectively). PCE and TCE as electron acceptors affected the bacterial diversity and community profiles in the enrichment cultures. DGGE analysis showed that the dominant bacteria in PCE and TCE enrichment were belonged to *Clostridium* sp., *Desulfotomaculum* sp., and uncultured bacteria.

**Key words:** Bioremediation, DGGE, microbial community, TCE, PCE

### 서 론

산업화에 따라 수많은 유기성 물질이 대량으로 생산되어 토양 및 지하수를 오염시키고 있다. 이들 중 perchloroethylene (PCE)와 trichloroethylene (TCE)는 염소계 유기화합물로 우수한 탈지능력과 세정력을 가지고 있어, 드라이클리닝, 금속 산업의 세정용매 등으로 널리 사용되어 왔다. 그러나 사용 후 부실한 관리로 인해 자연계에 방출되어 지하수와 지표수를 오염시키고 있다. 염소계 유기화합물은 휘발성이 매우 강하고, 발암성을 가지고 있으며, 분자구조가 매우 안정한 난분해성 물질로, 처리에 있어서 많은 시간과 비용이 요구된다. 따라서 염소계 유기화합물의 오염에 따른 광범위한 수질오염과 이들이 인체에 미치는 영향에 대한 심각성이 제기되어 국내에서도 1993년부터 PCE 및 TCE를 폐수 배출기준에 포함시켰으며, 현재 먹는 물 수질기준의 경우 PCE와 TCE는 각각 0.01 mg/L와 0.03 mg/L로 규제되고 있다[1].

이러한 염소계 유기화합물의 처리는 유지관리 비용이 많이 드는 물리·화학적 방법보다 생물학적 처리법이 경제적

이고 친환경적인 방법으로 알려지고 있다[17]. 생물학적 처리에 있어서 PCE나 TCE는 호기성 조건에서는 분해되기 어려우나 혐기성 조건에서 hydrogenolysis에 의해 PCE의 염소이온이 수소이온과 치환되는 환원반응에 의해 단계적으로 PCE, TCE, *cis*-1,2-dichloroethene (*cis*-DCE), vinyl chloride (VC), ethene으로 탈염소화 된다[14]. 또한, 치환된 염소수가 많을수록 환원전위가 증가하여 환원적 탈염소화 반응이 더 잘 일어난다고 알려져 있다[7]. 자연계에는 다양한 미생물이 존재하지만 미생물 탐색 및 분리의 어려움으로 지금까지 밝혀진 혐기성 탈염소화 미생물종은 매우 적으며, 혐기성 상호대사에 의한 탈염소화가 미생물이 염소화합물을 분해하는 주된 기작으로 여겨지고 있다[5]. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195와 *Dehalococcoides* sp. strain FL2는 각각 PCE와 TCE를 ethene으로 완벽하게 탈염소화시키는 능력을 가지고 있다[6, 14]. 그러나, *Dehalococcoides* sp. 195와 FL2는 무해한 ethene으로의 전환이 항상 나타나는 것이 아니며, *cis*-DCE, VC에서 탈염소화반응이 종결되는 경우도 자주 관찰되고 있다[11]. 하지만, PCE와 TCE에서 ethene으로 전환시 영향을 미치는 요인(전자 수용체, 전자 공여체, 온도 등)에 의해서 저해되거나 촉진되는지에 대한 명확한 규명이 현재까지 밝혀지지 않았다. 이러한, 알려지지 않은 성장요인에 의하여 일반적인 분리 및 배양이 매우 어렵기 때문에, 미

\*Corresponding author

Tel: 82-42-860-4326; Fax: 82-42-879-8103

E-mail: hkim@kribb.re.kr

생물 단독에 대한 연구가 힘든 상황이다. 그리고, 각각의 미생물들은 주변 환경에 따라 다른 미생물들과 상호작용을 통해 군집을 형성하기 때문에, 미생물군집의 특성은 개별적으로 존재하는 미생물과는 다른 특성을 가지며, 매우 복잡한 상호작용을 통해 발현적 특성을 가진다. 따라서 미생물 각각을 이해하는 것보다 미생물군집을 이해하는 것이 매우 중요하게 여겨지고 있다. 이러한 미생물 군집 구조와 다양성을 이해하기 위한 조사하는 방법으로 16S rRNA 염기서열 분석을 이용하는 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) 등 여러 분자생물학적 방법들이 개발되어, 생태학적인 관계를 규명하기 위해 사용되고 있다[4, 12, 15].

본 연구에서는 하천의 저니와 해양의 저니로부터 염소계 유기화합물인 PCE 및 TCE의 혐기성 탈염소화에 관련하는 미생물을 농화배양하여 DGGE 방법으로 미생물 군집 분석을 수행하였다. 본 연구를 통한 생태학적인 기초 지식과 미생물간의 탈염소화 과정에서의 상호작용 이해는 성공적인 생물정화에 기여할 것으로 판단된다.

## 실험재료 및 방법

하천의 퇴적물과 해양준설토로부터 염소계 유기화합물인 PCE와 TCE의 탈염소화에 관여하는 미생물군집을 탐색하고 혐기성 상호대사에 의한 탈염소능을 확인하며, 이로부터 안정화된 미생물 혼합균주 확보 및 군집분석을 수행하였다.

### 시료채취 및 보관

탈염소화에 관여하는 미생물들은 주로 저니에서 발견된다고 보고되고 있으며, 혐기성 조건의 하천, 해양의 저질에 존재한다고 보고되었다[7]. 또한, 이전에 PCE 및 TCE로 오염된 지역의 저질에 분포할 가능성 크기 때문에 이를 근거로 하천, 해양의 저니에서 시료를 채취하였으며, 광양(준설토) (34°55'47" 127°40'40"), 하남(퇴적토)(35°14'25" 128°38'47"), 여천(토양)(34°48'54" 127°37'53") 등 전국에서 시료를 채취하였다. 시료 채취는 라이너 토양채취기(SJD-1600, 50×300 mm)(Sinjung, Changwon, Korea)와 PVC pipe를 이용하여 약 30~40 cm 정도의 깊이에서 채취하였다. 채취한 토양은 기밀용기(Wheaton, NJ, USA)에 넣은 다음 질소포기를 약 3분간 실시하여 토양의 산소를 제거하고 외부공기와 접촉을 차단시킨 후, ice box를 이용하여 0~4°C에서 시료를 운반하였다.

### 혐기성 배양 조건

탈염소화능을 가지고 있는 혐기성 미생물을 탐색하기 위해 회분식 실험(batch experiment)을 실시하였다. 실험에 사용된 배지는 Sung 등[19]이 사용한 무기염 배지를 사용하였

으며, PCE와 TCE를 전자 수용체로 하고, 아세테이트를 전자 공여체로 사용하여 배양 하였다. 무기염 배지의 조성은 MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.5 g; NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3 g; CaSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.015 g; resazurin, 0.0025 g; Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, 0.048 g; L-cysteine, 0.035 g; NaHCO<sub>3</sub>, 2.52 g; trace element solution (A) 1 mL, trace element solution (B), 1 mL; yeast extract 0.2 g와 같다[18]. 무기염 배지는 질소 flushing (N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>=80:20)을 통해 산소를 제거하였다.

회분식 실험을 위해 총 용량 160 mL의 혈청병에 채취한 시료 1 g(습중량)과 무기염 배지 50 mL, 전자 공여체로는 2 mM 아세테이트를 주입하였고, 2 mM의 TCE와 PCE를 각각 기질로 함께 주입한 다음, 테프론 재질의 Gray Butyl Septa (Wheaton, NJ, USA)를 사용하여 완전히 밀폐시켰다. 밀폐된 혈청병은 암조건의 28°C에서 정치 배양하였으며, 3 반복으로 진행되었다. 4주에 한번 새로운 배지로 3회에 걸쳐 집적배양 하였다. 새로운 배지로의 접종은 전체 용량에 10%로 하였고, 계대 배양 시 마다 혈청병내에 존재하는 PCE 및 TCE를 측정하여 탈염소화능을 확인하였다(Fig. 1).

### 염소화합물 분석

염소화합물 분석을 위한 표준물질 TCE와 PCE는 Aldrich에서 구입하였다. 염소 화합물의 농도는 Gas Chromatography-flame ionization detector (Varian 3400CX, CA, USA)로 분석하였으며, DB-624 capillary column (30 m×0.32 mm×1.8 μm, J&W, CA, USA)을 이용하여 headspace 부분에 잔존하는 염소 화합물을 분석하였다. TCE와 PCE분석을 위한 오븐 조건은 40°C에서 8분간 머문 후 6°C/분으로 승온시켜 최종온도 100°C에서 2분간 정지하였다. 이때, 주입기와 검출기의 온도는 각각 225°C와 250°C로 설정하였다. 이상의 조건에서 VC, 1,1-DCE, *cis*-DCE, *trans*-DCE, TCE, PCE 각각의 체류시간은 각각 1.5, 2.21, 4.9, 3.2, 8.4, 14.6 분 이었다. 그리고, VC, *cis*-DCE, TCE, PCE의 검출한계는 각각 0.35, 0.48, 0.056, 0.12 μmole/bottle이었다. 염소화합물의 정량은 Sung 등[18]의 방법을 따랐다.

### DNA 추출 및 PCR 조건

4주간 PCE와 TCE를 첨가하여 혐기 배양한 농화배양액에서 3 mL을 취한 후, FastDNA Spin Kit for Soil (Bio101, CA, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 미생물 다양성을 확인하기 위하여 농화배양으로부터 얻은 DNA를 주형으로 16S rRNA gene을 PCR 반응하여 증폭하였다. 1차 PCR은 27f(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541r(5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 이용하여 50 μL 안에 1×PCR buffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μM), template DNA (50 ng), 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다[15, 16]. PCR 반응조건은 94°C에서 5분 동안 DNA를 변

성시킨 후 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1.5분으로 25 cycle을 수행한 후 72°C에서 7분 동안 final extension을 수행하였다. 각각의 PCR 산물들은 ethidium bromide 염색 후 1% agarose gel에서 확인하였다. 1차 PCR의 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행하였으며, 사용된 primer는 40개의 GC clamp가 붙은 341fGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 786r (5'-CGA CCA GGG TAT CTA ATC-3')을 이용하여, PCR을 실시하였다[8, 10]. 이때 사용된 PCR mixture는 1차 PCR에 사용된 것과 동일하며, 사용된 PCR 반응조건은 94°C에서 5분 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 45초, 60°C에서 45초, 그리고 72°C에서 45초로 72°C에서 7분 동안 final extension을 수행하였다. Annealing 온도를 초기에는 60°C에서 시작해서 1 cycle당 0.5°C 감소하게 20 cycle 수행하였고, 그 후 50°C에서 15 cycle을 수행하여 PCR을 완료하였다. 얻어진 2차 PCR 증폭산물은 ethidium bromide 염색 후 1% agarose gel에서 확인 후, DCode System (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 DGGE를 수행하였다[16].

#### DGGE 조건

PCR 증폭산물은 Dcode™ System (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 DGGE를 수행하여 분석하였다[16]. Denaturing gradient gel은 10% polyacrylamide (37.5:1=acrylamide: bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 40~70%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 gradient gel을 제작하였다. 이와 같이 제작된 gel에 PCR증폭산물을 30 µL씩 loading하여 1×TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 75 V로 20시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide에서 염색한 후, UV로 확인하였다[16].

#### 염기서열분석

Denaturing gradient gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 밴드를 선택한 후, 각각 잘라내어 3차 증류수 50 µL를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치한 후 원심분리(6,300×g, 5분)하여 상등액을 취하였다. 각 밴드에서 회수한 DNA를 주형으로 341fGC와 786r primer를 이용하여 위와 같은 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물은 gel extraction kit (Cosmo, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 automatic DNA sequencer (model 377; Applied Biosystems, Foster, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, 결정된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Genbank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다.

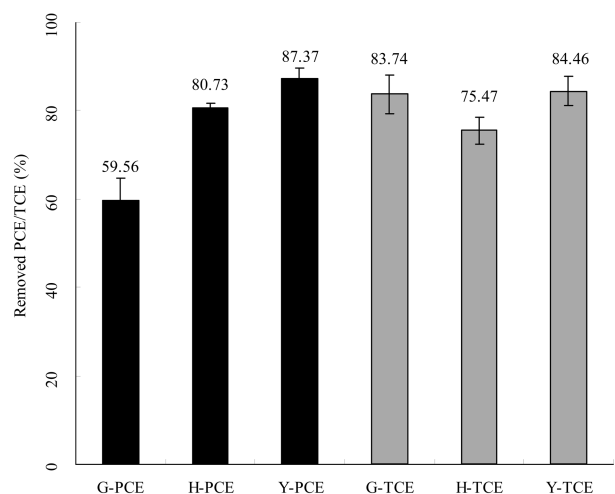
## 결과 및 고찰

### 미생물에 의한 PCE와 TCE의 탈염소화

염소화합물을 분해하는 미생물 혼합균주 확보를 위하여 하천, 해양저질 등에서 채취한 시료를 이용하여, 무기염 배지에서 혐기배양을 실시한 뒤에 탈염소화 효율을 조사하였다. 본 연구에서 PCE나 TCE의 탈염소화 반응생성물은 측정하지 않았으며, headspace 부분에 잔존하는 염소 화합물을 분석하고, 배양시에 대조구와 시료내의 PCE와 TCE의 변화를 관찰함으로써 탈염소화 효율을 평가하였다. 또한, 환경시료에서 탈염소화 관련 혐기성 미생물을 보다 우점화시키기 위해 집적배양하였다. 집적 배양을 수행하면 탈염소화 효율은 큰 변화가 없지만, 탈염소화 활성이 증대되어진다. 이는 환경시료로부터 탈염소화에 관련된 혐기성 미생물을 탐색하는 데 있어서 집적배양은 반드시 필요하며, 이는 탈염소화 활성에 긍정적인 영향을 미친다고 볼 수 있기 때문에 본 연구에서도 집적배양을 수행하였다[11, 13].

4주간 집적배양을 통해 광양, 하남, 여천시료가 PCE와 TCE의 탈염소화율이 우수한 것으로 나타났으며, 그 밖의 다른 시료도 PCE 및 TCE로 농화배양을 수행하였으나, 시료마다 그 효율에 있어 차이를 보이고 있다. 또한, 배양기간에 따라 PCE 및 TCE가 약간 감소하였으나, 탈염소화율은 20~30% 정도로 매우 낮게 나타났다(자료 미제시).

Fig. 1은 4주간의 집적배양 후, 잔존하는 PCE와 TCE농도를 초기농도와 비교하여 탈염소화율을 나타낸 것이다. 광양, 하남, 여천시료의 PCE 탈염소화율은 59.56%, 80.73%, 87.37%를 나타내고 있으며, PCE의 평균 분해능은 75.8%를 나타내고 있다. PCE 탈염소화능은 여천 > 하남 > 광양시료의 순으로 나타났다. 또한, TCE 탈염소화율은 83.74%, 75.47%, 84.46%로 TCE 평균 분해능은 81.2%로 높게 나타



**Fig. 1. PCE/TCE dechlorination efficiency in anaerobic batch test.** Sampling site; G (A tideland, Gwangyang), H (A sediment, Hanam river), Y (Soil, Yecheon).

내고 있으며, TCE 탈염소화능은 여천 > 광양 > 하남시료의 순으로 여천시료가 가장 높은 탈염소화능을 갖는 것으로 분석되었다. PCE와 TCE 탈염소화능은 광양, 하남, 여천시료 중에서 가장 우수한 시료는 여천 시료로 85% 이상의 PCE와 TCE 탈염소화율을 보이고 있다. 이와 같이 다양한 탈염소화율을 보이는 것은 시료마다 탈염소화에 관련된 혐기성 미생물들이 존재하기는 하나 탈염소화율이 우수한 시료에 보다 많이 존재하며, 탈염소화 미생물이 우점종을 차지하고 있기 때문인 것으로 판단된다.

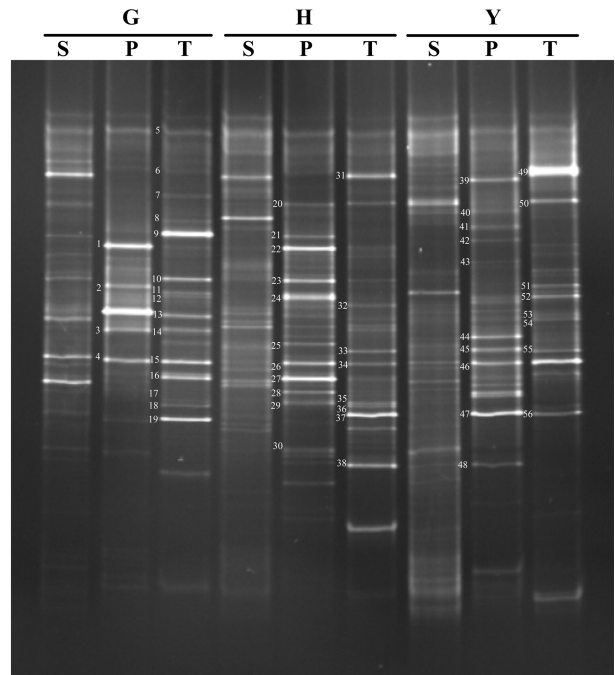
PCE와 TCE의 탈염소화 효율을 상대 비교하였을 때 동일한 환경시료를 이용했음에도 PCE와 TCE의 탈염소화 효율은 차이를 보이고 있다. 하남, 여천시료는 PCE 탈염소화율이 TCE 탈염소화율 보다 우수한 것으로 나타났다. 이러한 원인을 탈염소화 반응속도차에 의한 것이라 기존의 연구에서 보고하고 있다. 혐기성 미생물의 탈염소화 반응을 통해 PCE는 최종산물인 ethene을 생성하며, 중간 생성물인 TCE, DCEs, VC를 생성하는데 탈염소화 반응속도를 비교해보면 치환된 염소의 수가 많은 화합물일수록 탈염소화 반응속도가 증가한다[20]. 따라서 PCE의 첫 번째 혐기성 탈염소화 중간생산물인 TCE를 주입하였을 때와 PCE를 직접 주입하였을 때를 비교하면 같은 시료에 존재하는 미생물의 TCE 탈염소화 반응속도는 상대적으로 PCE의 탈염소화 반응속도 보다 낮아서 탈염소화 효율이 낮은 것으로 판단되어진다.

탈염소화 반응속도 이외에 PCE와 TCE의 탈염소화 효율은 우점하는 미생물 종에 따라 영향을 받으며, 광양시료의 경우 PCE의 탈염소화율은 높은 반면, TCE 탈염소화율은 낮게 나타났는데, 이는 시료내에 PCE보다 TCE를 쉽게 탈염소화하는 미생물이 우점한다는 것을 간접적으로 시사하고 있다.

**미생물 군집분석**

전국의 시료를 각각PCE와 TCE를 넣고 배양한 후, 탈염소화율이 우수한 3개의 시료(광양, 하남, 여천)를 선발 하였으며, 4주간 집적배양한 배양액으로부터 전체 DNA를 획득하여 세균용 universal primer로 알려진 341fGC와 786r primer를 이용하여 PCR 증폭산물을 얻었으며, agarose gel 상에서 예상되는 486 bp의 밴드를 확인하였다(자료 미제시). 미생물 군집다양성을 확인하는데 유용한 기법인 DGGE를 이용하여 미생물 군집의 다양성을 조사했다.

각 배양액의 DGGE profile에서 다양한 밴드들을 확인할 수 있었으며, 각 시료는 기질(PCE와 TCE)에 따라 다른 밴드 pattern을 나타내고 있다(Fig. 2). 각 환경시료의 PCE 및 TCE의 집적배양 전과 집적배양 후의 DGGE profile은 매우 다르며, 집적배양 전 시료에 나타나는 밴드가 집적배양 후에는 대부분 보이지 않고, 새로운 밴드들이 나타남을 확인하였다. 이것은 오염물질에 따른 미생물 군집은 시간에 따라 변화됨을 의미한다.



**Fig. 2. DGGE patterns of 16S rRNA gene fragments of soil and enrichment culture with different electron acceptors. S; soil, P; PCE enrichment, T; TCE enrichment. Sampling site; G (A tideland, Gwangyang), H (A sediment, Hanam river), Y (Soil, Yecheon).**

Table 1과 같이 DGGE gel에서 다른 위치에 존재하는 56 개의 밴드를 분리하였고, 분리된 밴드에서 DNA를 추출하여 염기서열을 분석하였으며, NCBI의 GeneBank를 이용하여 상동성을 비교 검색하였다. 각 군집의 주요 미생물은 DGGE gel에서 강한 intensity를 나타내는 밴드로 9번 밴드는 *Tissierella praeacuta* (X80833)로 분석되었다. 20번과 31번 밴드는 *Sedimentbacter* sp. (AY221992, AY766467)로 Y-TCE 시료와 H-TCE 시료에서 공통적으로 나타났다. 30, 33 번 밴드는 uncultured bacteria로 분석되었으며, 36, 46번, 55번 밴드는 Clostridium-like bacteria (U27711, CR933216)로 분석되었다.

G-TCE 시료 농화배양의 주요 미생물은 9번 밴드(*Tissierella praeacuta*, X80833)와, 19번 밴드(*Clostridium* sp. EBR, AB186360)이다. 그러나 이 밴드들은 G-PCE 시료 농화배양에는 나타나지 않았다. G-PCE 시료 농화배양의 주요 미생물은 1번 밴드(Unidentified eubacterium, AJ229210)와 3번 밴드(Unidentified eubacterium, AJ229206)로 나타났다. H-TCE 시료 농화배양과 H-PCE 시료 농화배양도 다른 pattern을 보이고 있다. H-TCE 시료 농화배양의 31번(*Sedimentbacter* sp., AY766467), 36번(Clostridium-like species, U27710), 37번(*Desulfotomaculum ruminis*, Y11572)이 주요 미생물이며, 이 밴드는 H-TCE 시료 농화배양에만 나타났다. 한편 Y-TCE 시료 농화배양과 Y-PCE 시료 농화배양은

**Table 1. Sequence similarity between DGGE bands and those of the closest relative in the GenBank database.**

Band No.	Accession No.	Species	Similarity	Band No.	Accession No.	Species	Similarity
1	AJ229210	Unidentified eubacterium from anoxic bulk soil 16S rRNA	98%	33	DQ113713	Uncultured bacterium clone I5-47 16S rRNA	95%
2	AM159271	Uncultured Clostridiaceabacterium 16S rRNA	90%	34	AY330127	Uncultured Clostridium sp. clone AC039 16S rRNA	92%
3	AJ229206	Unidentified eubacterium	94%	35	AB186360	Clostridium sp. EBR-02E-0046 gene for 16S rRNA	93%
4	DQ530152	Achromobactersp. RI55 16S rRNA	99%	36	U27710	Clostridium-like species 16S rRNA	92%
5	AY607123	Uncultured Clostridia bacterium clone X3Ba26	98%	37	Y11572	Desulfotomaculum ruminis 16S rRNA gene	100%
6	AF443595	Clostridium sp. ArC6 16S ribosomal RNA	96%	38	X77848	Clostridium hastiforme 16S rRNA gene	97%
9	X80833	Tissierellapraeacuta 16S rRNA	99%	39	AY221992	Sedimentibactersp. BRS2 16S rRNA	87%
10	DQ326077	Uncultured bacterium clone BA93 16S rRNA	88%	40	L11305	Clostridium hydroxybenzoicum small subunit 16S rRNA	96%
11	DQ141596	Uncultured Alkaliphilus sp. 16S rRNA	95%	41	AY571338	Sedimentibacter hongkongensis strain KI 16S rRNA	98%
12	DQ191815	Uncultured Clostridiaceabacterium clone	90%	42	DQ326077	Uncultured bacterium clone BA93 16S	97%
13	AY540845	Uncultured bacterium clone dr36g	97%	43	AY548788	Oxobactersp. PPF50E4 16S rRNA	95%
14	AY540843	Uncultured bacterium clone dr74g	94%	44	AB218338	Uncultured Clostridiaceabacterium gene for 16S rRNA	95%
15	AB232817	Uncultured bacterium	92%	45	DQ117470	Desulfosporosinus youngii strain JW/YJL-B18 16S rRNA	99%
16	AY745868	Exiguobacterium sp. JL-30 16S rRNA	93%	46	U27711	Clostridium-like species 16S rRNA	100%
17	DQ530152	Achromobactersp. RI55 16S rRNA	94%	47	AY961415	Desulfotomaculum carboxydivorans CO-1-SRB 16S rRNA	96%
19	AB186360	Clostridium sp. EBR-02E-0046 16S rRNA	94%	49	CT574058	Uncultured bacterium partial 16S rRNA	97%
20	AY221992	Sedimentibactersp. BRS2 16S rRNA	93%	50	CT574058	Uncultured bacterium partial 16S rRNA	94%
22	AY607123	Uncultured Clostridia bacterium clone X3Ba26	94%	51	CT574058	Uncultured bacterium partial 16S rRNA	95%
28	X98407	D. aeronauticum 16S rRNA gene	97%	52	AY588963	Uncultured bacterium clone DE2.5 16S rRNA	92%
29	AY742958	Desulfotomaculum nigrificans 16S rRNA	94%	53	X76161	Clostridium aminobutyricum 16S rRNA	96%
30	DQ069229	Uncultured Anaerobrancasp. clone SRB2 16S rRNA	96%	54	AY245479	Uncultured bacterium ML17_DSV3 16S rRNA	95%
31	AY766467	Sedimentibactersp. D7 16S rRNA	100%	55	U27711	Clostridium-like species 16S ribosomal RNA	100%
32	DQ117469	Gracilibacter thermotolerans strain JW/YJLS1	86%				

38번(*Clostridium hastiforme*, X77848), 44번(Uncultured Clostridiaceae bacterium, AB218338), 45번(*Desulfosporosinus youngii*, DQ117470), 46번(Clostridium-like sp., U27711), 47번(*Desulfotomaculum carboxydivorans*, AY961415) 밴드가 같은 위치에서 관찰되었다. 그러나 주요 미생물은 Y-TCE에서는 38번(*Clostridium hastiforme*, X77848), 49번(Uncultured bacterium, CT574058)이고, Y-PCE의 주요 미생물은 44, 45, 46, 47번으로 다르게 나타났다.

DGGE 분석결과, 탈염소화와 관련된 미생물들은 황산염 환원 세균(sulphate-reducing bacteria, SRB)과 아세테이트 산화세균(acetate-oxidizing bacteria, AOB)가 우점하는 것으로 분석되었다. SRB로 분석되어진 29, 37번 밴드는 각각 *Desulfotomaculum nigrificans* (AB026550)와 100%, *Desulfotomaculum* sp. (Y11572)와 94% 유사하였다. 밴드 37, 45, 47, 28, 29번 밴드는 각각 *Desulfotomaculum* sp. (Y11572)와 100%, *Desulfosporosinus youngii* (DQ117470)와 99%, *Desulfotomaculum carboxydivorans* (AY961415)와 96%, *D. aeronauticum* (X98407)와 97%, *Desulfotomaculum nigrificans* (AY742958)와 94% 유사한 것으로 확인되었다. SRB균주는 탈염소화 효율을 증대시키는 것으로 알려져 있으며, 과거 PCE나 TCE에 오염된 지역의 토양에서 종종 발견되었으며, 탈염소화 미생물의 co-culture로서 인식되고 있다[2, 3, 22]. 최근 몇몇 세균들은 염소계 알칸(chlorinated alkanes)의 탈염소화 과정을 통해 성장에 필요한 에너지를 얻는다고 알려져 있다.

아세테이트는 혐기성 조건에서 메탄을 생성하는 선구물질로 알려져 있으며, AOB에 의하여 H<sub>2</sub>와 CO<sub>2</sub>로 전환된다.

H<sub>2</sub>는 PCE 및 TCE의 염소를 제거하는데 이용되며, 혐기성 배양에서 중요한 역할을 한다. *Clostridium* sp.는 AOB에 속하며, 혐기성 배양 조건에서 아세테이트를 메탄, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>를 생성한다고 보고되어지고 있다[9, 21]. 농화배양된 시료의 균집분석을 통하여 *Clostridium* sp. (6, 19, 35, 36, 38, 40, 46, 53, 55번 밴드)이 모든 시료에 존재하는 것을 확인하였다.

DGGE gel에서 전자 수용체에 따라, 다른 미생물 다양성과 community profiles을 나타냄을 확인하였다. 또한, 농화배양 시료 미생물의 DGGE를 통한 균집분석에서 혼합균주를 구성하고 있는 균주들은 대부분 uncultured 미생물, *Clostridium* sp.와 SRB등으로 조사되었다.

## 결론

본 연구에서는 하천의 저니와 해양의 저니로부터 4주간 집적배양 통해 염소계 유기화합물인 PCE와 TCE의 탈염소화율이 우수한 미생물 혼합균주를 획득하였으며, PCE 및 TCE의 혐기성 탈염소화에 관여하는 미생물 균집을 DGGE 방법으로 조사하였다. 본 연구를 통한 생태학적인 기초 지식과 미생물간의 탈염소화 과정에서의 상호작용의 이해는 성공적인 생물정화에 기여할 것으로 판단된다.

1) 4주간 집적배양을 통해 선발된 광양, 하남, 여천시료가 PCE와 TCE를 PCE 75% 이상, TCE 81% 이상 탈염소화하는 것으로 나타내며, 여천시료가 우수한 PCE/TCE탈염소화율을 보이고 있다(PCE 87.37%, TCE 84.46%). 각 시료별로 PCE와 TCE의 탈염소화율이 차이를 나타내고 있는데, 이러한 PCE와 TCE의 탈염소화 효율은 우점하는 미생물 종에

따라 영향을 받는다는 것을 간접적으로 시사하고 있다.

2) 선발된 세개의 탈염소화율이 우수한 시료에 대해서 미생물 군집분석을 DGGE기법을 통해 16S rRNA gene염기서열을 분석한 결과 탈염소화와 관련된 미생물들로는 SRB와 AOB가 우점하는 것으로 나타났다. 분석된 균주들은 탈염소화 효율을 증대시키는 것으로 알려져 있으며, 과거 PCE나 TCE에 오염된 지역의 토양에서 종종 발견되었고, 탈염소화 미생물의 co-culture로서 인식되는 미생물이다. 이는 선발된 탈염소화 시료에서 PCE 및 TCE의 탈염소화효율에 직·간접적으로 역할을 하는 것으로 사료된다.

## 요 약

광양, 하남, 여천지역의 토양, 하천 및 해양 퇴적물 등을 이용하여, 난분해성 염소화합물인 PCE (perchloroethylene) 및 TCE(trichloroethylene)의 혐기성 탈염소화에 관련하는 미생물을 탐색하고 이들의 탈염소화 효율을 조사하였다. 혐기성 상호대사에 의한 탈염소화 효율을 조사하기 위해 전자 공여체로 아세테이트를 사용하여 혐기성 회분식 실험을 실시하였으며, 미생물 군집을 분석하기 위해, 분자생물학적인 기법인 16S rDNA의 DGGE 기법을 이용하였다. 그 결과, 4주간 집적배양을 통해 광양, 하남, 여천시료는 PCE와 TCE를 PCE 75% 이상, TCE 81% 이상 탈염소화하는 것으로 나타내며, 여천시료가 우수한 PCE/TCE탈염소화율을 보이고 있다(PCE 87.37%, TCE 84.46%). 또한, 전자 수용체에 따른 탈염소화 배양액의 미생물 다양성은 DGGE로 분석하였으며, 우점하는 미생물은 *Clostridium* sp., *Desulfotomaculum* sp.와 unclutured bacteria로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 환경부의 차세대 핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)에 의해 지원된 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. 환경법 2장, 환경보전 11조. 먹는물 수질 기준 및 검사기준 등에 관한 규칙.
2. DeWeerd, K. A., W. P. Fianagan, M. J. Brennan, J. M. Principe, and J. L. Spivack. 1998. Biodegradation of trichloroethylene and dichloromethane in contaminated soil and groundwater. *Bioremed. J.* **2**: 29-42.
3. Drzyzga, O., J. Gerritse, J. A. Dijk, H. Elissen, and J. C. Gottschal. 2001. Coexistence of a sulphate-reducing *Desulfovibrio* species and the dehalorespiring *Desulfobacterium frappieri* TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene. *Environ. Microbiol.* **3**: 92-99.
4. Gonzalez, J. M., A. Ortiz-Martinez, M. A. Gonzalez-delValle, L. Laiz, and C. Saiz-Jimenez. 2003. An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *J. Microbiol. Methods* **55**: 459-463.
5. Gu, A. Z., B. P. Hedlund, J. T. Staley, S. E. Strand, and H. D. Stensel. 2004. Analysis and comparison of the microbial community structures of two enrichment cultures capable of reductively dechlorinating TCE and *cis*-DCE. *Environ. Microbiol.* **6**: 45-54.
6. He, J., Y. Sung, R. Krajmalnik-Brown, K. M. Ritalahti, and F. E. Löffler. 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* **7**: 1442-1450.
7. Holliger, C. 1995. The anaerobic microbiology and biotreatment of chlorinated ethenes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 347-351.
8. Ishii, K., and M. Fukui. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3753-3755.
9. Jain, M. K., and J. G. Zeikus. 1989. Bioconversion of gelatin to methane by a coculture of *Clostridium collagenovorans* and *Methanosarcina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 366-371.
10. Jaspers, E., K. Nauhaus, H. Cypionka, and J. Overmann. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 153-169.
11. Kim, B.-H., K.-H. Baek, D.-H. Cho, Y. Sung, C.-Y. Ahn, H.-M. Oh, S.-C. Koh, and H.-S. Kim. 2009. Analysis of microbial community during the anaerobic dechlorination of tetrachloroethylene (PCE) in stream of Gimpo and Incheon areas. *Kor. J. Microbiol.* **45**: 140-147.
12. Koizumi, Y., H. Kojima, and M. Fukui. 2003. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 147-157.
13. Lee, J.-W., B.-H. Kim, C.-Y. Ahn, H.-S. Kim, B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 2005. Analysis of microbial community during the anaerobic dechlorination of perchloroethylene and trichloroethylene. *Kor. J. Microbiol.* **41**: 281-286.
14. Maymó-Gatell, X., Y.-t. Chien, J. M. Gossett, and S. H. Zinder. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**: 1568-1571.
15. Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 317-322.
16. 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.
17. Semprini, L. 1997. Strategies for the aerobic co-metabolism of chlorinated solvents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 296-308.
  18. Sung, Y., K. E. Fletcher, K. M. Ritalahti, R. P. Apkarian, N. Ramos-Hernández, R. A. Sanford, N. M. Mesbah, and F. E. Löffler. 2006. *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2775-2782.
  19. Sung, Y., K. Ritalahti, R. Sanford, J. Urbance, S. Flynn, J. M. Tiedje, and F. E. Löffler. 2003. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2964-2974.
  20. Vogel, T. M., C. S. Criddle, and P. L. McCarty. 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **21**: 722-736.
  21. Waber, L. J., and H. G. Wood. 1979. Mechanism of acetate synthesis from CO<sub>2</sub> by *Clostridium acidurici*. *J. Bacteriol.* **140**: 468-478.
  22. Yang, Y., and P. L. McCarty. 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 3591-3597.

**(Received Sep. 17, 2010/Accepted Nov. 18, 2010)**