

Delftia acidovorans EK2에 의한 고농도 Trichloroethylene (TCE)의 생물학적 분해 특성

박우정 · 이상섭*
경기대학교 생명공학과

The Biological Degradation of High Concentration of Trichloroethylene (TCE) by *Delftia acidovorans* EK2

Woo-Jung Park and Sang-Seob Lee*

Department of Biological Engineering, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea

(Received May 27, 2010/Accepted June 16, 2010)

In this study, we isolated 179 bacterial strains using benzene, phenol, ethylbenzene, aniline, cumene, toluene as growth substrate from TCE contaminated soils and wastewaters. All the 179 strains were screened for TCE (30 mg/L) removal (growth substrate 0.2 g/L, 30°C, pH 7, cell biomass 1.0 g/L (w/v)) under aerobic condition for 21 days. EK2 strain using aniline showed the highest removal efficiency (74.4%) for TCE degradation. This strain was identified as *Delftia acidovorans* as the results of API kit, 16S rDNA sequence and fatty acid assay. In the batch culture, *D. acidovorans* EK2 showed the bio-degradation for TCE in the various TCE concentration (10 mg/L to 200 mg/L). However, *D. acidovorans* EK2 did not show the bio-degradation in the TCE 250 mg/L. *D. acidovorans* EK2 also show the removal efficiency (99.9%) for 12 days in the low concentration (1.0 mg/L). Optimal conditions to degrade TCE 200 mg/L were cell biomass 1.0 g/L (w/v), aniline 0.5 g/L, pH 7 and 30°C. Removal efficiency and removal rate by *D. acidovorans* EK2 strain was 71.0% and 94.7 nmol/h for 21 days under optimal conditions. Conclusion, we expect that *D. acidovorans* EK2 may contribute on the biological treatment in the contaminated soil or industrious wastewater.

Keywords: aniline, biodegradation, *D. acidovorans* EK2, TCE

휘발성 염화 탄화수소 물질중의 하나인 trichloroethylene (TCE)은 섬유세척제, 금속 탈지제, organic solvent 등 여러 용도로 국내 세탁업체 및 화학 산업계에서 생산 및 사용되어지고 있다(31). 그러나 산업적으로 광범위하게 사용된 TCE는 부적절한 처리방법으로 인해 생태계를 오염시키며, 특히 오염된 토양을 통해 지하수를 오염시킨다(38). TCE는 지하로 유출되면 토양 공극을 따라 하부로 이동하여 지하수면에 도달하게 되며 비중이 크기 때문에 지하수면을 통과하여 불투수층을 만날 때까지 DNAPL (Dense Non-Aqueous Phase Liquid) 상태로 이동하게 된다. 이와 같은 DNAPL은 토양층이나 지하수층을 이동할 때 모세관 힘에 의해 공극에 머물며 불연속적인 잔류상을 형성하기도 하며(25, 37, 42) 저투수층 상부에서는 많은 양의 DNAPL이 축적되어 Pool을 형성하기도 하는 등 그 분포가 복잡하며 불균질하다(6, 36). 이처럼 공극이나 투수층에 갇힌

DNAPL은 매우 천천히 용해되기 때문에 장기적인 지하수 오염원으로 작용하게 되며 축적 작용에 의해 특정지역에 고농도로 오염되기 쉽다. 예를 들어 산업폐수, 가정하수, 지하 탱크와 수송 파이프의 누수 등의 형태로 버려진 TCE는 토양 및 지하수를 따라 널리 확산되어 몇몇 산업부지 아래의 침전층은 1,000 mg/L가 넘도록 오염되어진 곳이 발견되기도 한다(34). 국내에서는 강원도 도로 관리 사업소 부지의 토양 시료에서 4,000 mg/kg 이상의 농도가 검출되어(20) 고농도로 오염된 토양을 통해 지하수 또한 고농도로 오염되었을 것으로 예상된다.

고 농도로 오염된 TCE가 사람에게 노출 시 간암을 유발할 수 있으며 다량 흡입할 경우 중추신경계 기능을 저하시켜 현기증, 피로감, 두통, 발한, 조경력 저하 증상을 보이거나 폐부종을 일으킬 수 있고 간과사 증상을 보이거나 허파와 심장, 신장에 영향을 줄 수 있다고 보고되었다(1). 현재 미국환경보호국(U.S. EPA)에서는 TCE를 특유유해물질로 규정하여 SDWA (Safe Drinking Water Act)에 의해 규제되는 음용수 관련 유해

* For correspondence. E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr; Tel: +82-31-249-9642, Fax: +82-31-245-8868

물질중에서 volatile organic chemicals (VOCs) 항목으로 지정되어 엄격히 관리되고 있으며(42), ASTDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)에서는 염소계 용매를 상위 20에 드는 위험 오염물질로 명시하였다. 국내에서는 TCE의 오염을 방지하기 위해 1993년부터 여러 가지 기준과 법안이 제정되었다. TCE는 음용수 수질기준에서 0.03 mg/L로 규정하였으며 토양의 경우는 대책기준으로 '가' 지역(하천, 수도 용지 등)을 20 mg/kg으로 규정하여 관리되어왔다(29). 하지만 2005-2007년 사이에 전국적으로 매년 25,000-140,000개소에서 지하수를 채취하여 실시한 수질검사 결과에 의하면 지하수 수질기준을 초과하는 TCE에 오염된 지하수는 '04년에 15%, '05년도는 16% 및 '06년도는 29%로 점차 증가하고 있는 추세이다(30).

이러한 TCE의 물리적 처리방법 및 화학적 처리방법으로는 각각 소각, 활성탄 흡착 제거법 등이 널리 쓰여지고 있으며 이러한 방법들은 2차적인 오염물질이 발생될 수 있어 사후 처리가 요구되며 높은 설비투자비와 운영비가 요구된다는 단점이 있다. 이 반면에 생물학적 처리 방법은 TCE에 대한 미생물의 생분해능을 이용하여 CO₂ 등의 무해한 최종산물로 분해시킬 수 있어 환경 친화적이며, 운전비 및 설비비도 낮은 것으로 평가되고 있어 대체 기술로서의 중요성을 인정받고 있다(3). 호기적 TCE 분해에 이용되는 미생물들은 TCE 자체를 성장기질로 사용하지 못하기 때문에 산화효소(oxygenase)를 이용하여 성장기질을 산화시킴과 동시에 TCE를 산화시키는 특수한 메카니즘을 통해 TCE를 분해시킨다(43).

그러나, 현재까지 TCE의 분해에 대한 연구는 대부분 저 농도의 TCE의 처리에 중점을 두어 연구가 진행되었으며(4, 11, 18, 24, 32, 35, 44), 고농도의 TCE로 오염된 지하수 오염 지역(DNAPL)을 처리하기 위한 연구는 매우 미흡하였다. 본 연구에서는 고농도의 TCE로 오염된 DNAPL 지역의 효율적인 생물학적 처리를 위하여 고농도의 TCE 분해가 가능한 균주를 개발하고, 최적의 분해 조건을 확립하여 현장 적용에 있어 기반이 되는 기초자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리

균주 분리를 위하여 100 ml의 무기배지(Mineral salt medium, MSM)에 폐수 1 ml를 접종하고 탄소원으로써 아닐린, 톨루엔, 벤젠, 에틸벤젠, 큐멘, 페놀 0.2 g/L (w/v)와 TCE 10, 50, 100 mg/L를 각각 첨가하여 28°C에서 150 rpm으로 이틀간 진탕 배양하였고 아닐린, 톨루엔, 벤젠, 에틸벤젠, 큐멘, 페놀 0.4 g/L (w/v)와 TCE 200 mg/L가 포함된 무기 한천 배지에 균액을 접종하여 streak plate method와 spread plate method를 이용하여 분리하였다.

스크린 테스트

성장 기질로서 아닐린, 톨루엔, 벤젠, 에틸벤젠, 큐멘, 페놀에서 각각 분리된 균주는 성장기질 0.2 g/L와 TCE 30 mg/L를

첨가한 무기배지에서 24-48시간 배양하여 5,000×g에서 15분간 원심 분리한 후 새 무기배지에 균을 부유시켰으며 2회 반복 후, 120 ml 용량의 amber bottle에 10 ml의 무기배지를 담고 균을 1.0 g/L (w/v)로 접종하고 테플론-실리콘 셉타와 알루미늄 실로 밀봉한 후 TCE 30 mg/L와 각각의 성장기질을 0.2 g/L로 오염시키고 28°C, 150 rpm에서 21일간 배양하여 TCE 분해효율을 측정하였다.

균주의 동정

고효율 균주로 분리된 EK2의 형태학적 특징은 그람 염색 후, 광학현미경(×1,000, BX50, Olympus, Japan) 하에서 형태와 크기, 군집 형태를 관찰하였고 그람 양성/음성 박테리아로 판별하였다.

API 20NE kit (bioMérieux, France)를 사용하여 균주의 생리, 생화학적 특성을 조사하였으며 apiwebTM database (<http://apiweb.biomerieux.com/>)를 이용하여 동정하였다.

16S rDNA 시퀀스 분석은 배양된 균을 분석회사(Solgent Inc., Korea)에 직접 보내어 universal primer 27F, 1492R로 PCR 및 내부 primer 337F, 518R를 이용하여 sequencing을 의뢰하였고 각 4종의 ab1 파일을 받아 Seqman software (Seqman Pro version 7.1.0, DNASTAR Inc.)를 이용하여 단일가닥의 염기서열로 배열하였다. 염기서열의 총 길이는 1,462 bp로 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 BLAST로 검색하여 16S rDNA homology를 비교하였다.

지방산 추출은 GC-FAME 분석 방법을 이용하였으며 분석은 flame ionization detector (FID)를 장착한 HP 6890N gas chromatography (Agilent, USA)를 이용하였으며, Sherlock microbial ID system TSBA50 5.00 library (MIDI; Microbial ID Inc., USA)를 통하여 library 내의 균주들과 비교분석 후, 동정하였다.

최적배양 조건 확립 및 회분식 실험

EK2의 TCE 분해 속도에 배양 조건이 미치는 영향을 알아보기 위하여 TCE 농도, 성장기질의 종류, 아닐린 농도 및 pH, 온도에 변화를 주어 분해능을 측정하였다. TCE 농도는 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 mg/L, 성장기질의 종류를 확인하기 위해 톨루엔, 벤젠, 에틸벤젠, 페놀, 큐멘, *o*, *m*, *p*-자일렌을 0.1 g/L, maltose, fructose, acetate, citrate, formate, malate, oxalate, succinic acid, ethanol을 1.0 g/L을 각각 첨가하여 EK2 균주의 성장을 확인한 후, 아닐린 0.5 g/L와 아닐린 외 성장기질 농도 3.0 g/L, TCE 농도 30 mg/L를 각각 첨가하여 TCE 분해효율을 확인하였다. 그리고 TCE 200 mg/L에 대하여 아닐린 농도(300-600 mg/L), pH(3-9), 온도(10-40°C)로 하였으며 초기 균 접종 농도는 0.01-0.05 g/L (wet weight)로 하여 각기 분해효율 및 분해속도를 측정하였다. 변화조건 이외에는 스크린 테스트와 동일한 조건으로 실험하였다. 최적 배양 조건(TCE 200 mg/L, 아닐린 0.5 g/L, pH 7, 온도 30°C)으로 TCE 분해능을 확인하였다.

Table 1. Total number of the strains isolated from TCE contaminated samples

Growth substrates	Toluene	Phenol	Cumene	Benzene	Ethylbenzene	Aniline	Total
Isolated bacteria	88	55	9	14	5	8	179

균 성장에 TCE 초기 농도가 미치는 영향

아닐린 0.5 g/L와 TCE 100, 200, 300, 400 mg/L의 농도를 첨가하였고 균 농도 1.0 g/L (w/v)로 접종하여 배양하였다. Gene Quent pro (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 600 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다.

TCE 분석 방법 및 농도/성장도 계산

실험에 사용된 amber bottle 내의 TCE 농도의 변화는 HP-5 capillary column (30 m×0.32 mm×0.25 μm)과 FID (Flame Ionization Detector)가 장착된 6890N Gas Chromatography (Agilent, USA)를 이용하여 측정하였다. GC 온도조건은 주입구 270°C, 오븐 80°C, 검출기 270°C였으며 이동상 가스는 고순도 질소를 이용하였다. 주입량은 기상 100 μL, TCE detection limit는 0.1 mg/L이며, retention time은 1.8 min이었다. TCE 농도는 기상을 측정한 후 헨리의 법칙(TCE 헨리상수: 0.01172, 25°C)을 적용하여 액상내의 기질농도로 환산하였다. 균주의 비성장 속도(μ) 및 배가시간(τ_d)은 $\mu = dX / (X \cdot dt)$, $\tau_d = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$ (X: 균체농도(g/L); t: 시간(h); μ : 비성장 속도(h⁻¹))의 식을 사용하여 계산하였다.

결 과

균주 분리

톨루엔, 페놀, 큐멘, 벤젠, 에틸벤젠, 아닐린을 첨가한 증식 배양액에서 각각 88, 55, 9, 14, 5, 8 균주로, 총 179 균주를 순수 분리하였다(Table 1).

스크린 테스트

순수 분리된 균주의 TCE 분해효율을 21일 동안 확인하였다. 아닐린을 성장기질로 이용한 균주 중에서 EK2 균주가 초기 TCE 농도 30.4 mg/L를 74.4% (223.2 μg TCE)의 분해효율을 보여주었으며 톨루엔을 성장기질로 이용한 균주 중에서 TX7 균주가 초기 TCE 농도 29.9 mg/L를 68.9% (206.0 μg TCE), 벤젠을 성장기질로 이용한 균주 중에서 EK51 균주가 초기 TCE 농도 30.6 mg/L를 61.9% (189.4 μg TCE), 에틸벤젠을 성장기질로 이용한 균주 중에서 EK66 균주가 초기 TCE 농도 28.8 mg/L를 46.9% (135.0 μg TCE), 큐멘을 성장기질로 이용한 균주 중에서 EK75 균주가 초기 TCE 농도 28.8 mg/L를 56.3% (162.1 μg TCE), 페놀을 성장기질로 이용한 균주 중에서 EK8 균주가 초기 TCE 농도 30.2 mg/L를 62.3% (188.1 μg TCE)의 분해효율을 보여주었다. 따라서 순수 분리한 균주 중 아닐린을 성장기질로 이용하는 EK2 균주가 가장 높은 분해효율을 보여주어 고효율 균주로 선정하였다(Fig. 1).

균주의 동정

EK2를 형태학적 관찰 결과 형태는 rod이며 그람음성으로 확인되었으며 균주의 폭 및 길이는 0.3-0.4×0.5-0.6 μm이었다. 생리·생화학적 특징 검사(Table 2) 결과 *Delftia acidovorans* (99.9%)로 동정되었다. NCBI에서 염기서열 비교결과 *Delftia acidovorans* SPH-1와 99% (1,462 bp/1,473 bp) 일치하였으며 type strain으로서 *Delftia acidovorans* ATCC 15668^T와 99.1% (1,462 bp/1,474 bp) 일치하였다.

지방산 분석(Table 3)을 통하여 EK2는 *D. acidovorans* (Sim Index 0.905)로 동정되었다.

성장기질에 따른 TCE 분해효율

아닐린을 성장기질로 이용했을 때 가장 높은 효율을 보여주었던 *D. acidovorans* EK2를 사용하여 성장 기질에 따른 회분식 실험을 하였다. 회분식 실험에서 TCE 분해효율을 비교한 결과, 다른 성장기질을 사용했을 때 보다 아닐린 첨가 시 15일간 177.7 μg의 TCE를 분해하였고 53.7%의 분해효율을 보여준 반면 다른 성장 기질에서는 TCE가 분해되지 않았다(Fig. 3).

Table 2. Physiological characteristics of the strain EK2

Characteristics	EK2	<i>D. acidovorans</i> ^a
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
NO ₃	+	+
TRP	-	d
GLU	-	-
ADH	-	-
URE	-	-
ESC	+	ND
GEL	-	ND
PNPG	-	-
GLU	-	-
ARA	-	-
MNE	-	-
MAN	+	+
NAG	-	-
MAL	-	-
GNT	+	+
CAP	+	+
ADI	+	+
MLT	+	+
CIT	-	+
PAC	+	+

^a ACM 489^T, data obtained from Bergey's manual of Systematic Bacteriology (4)

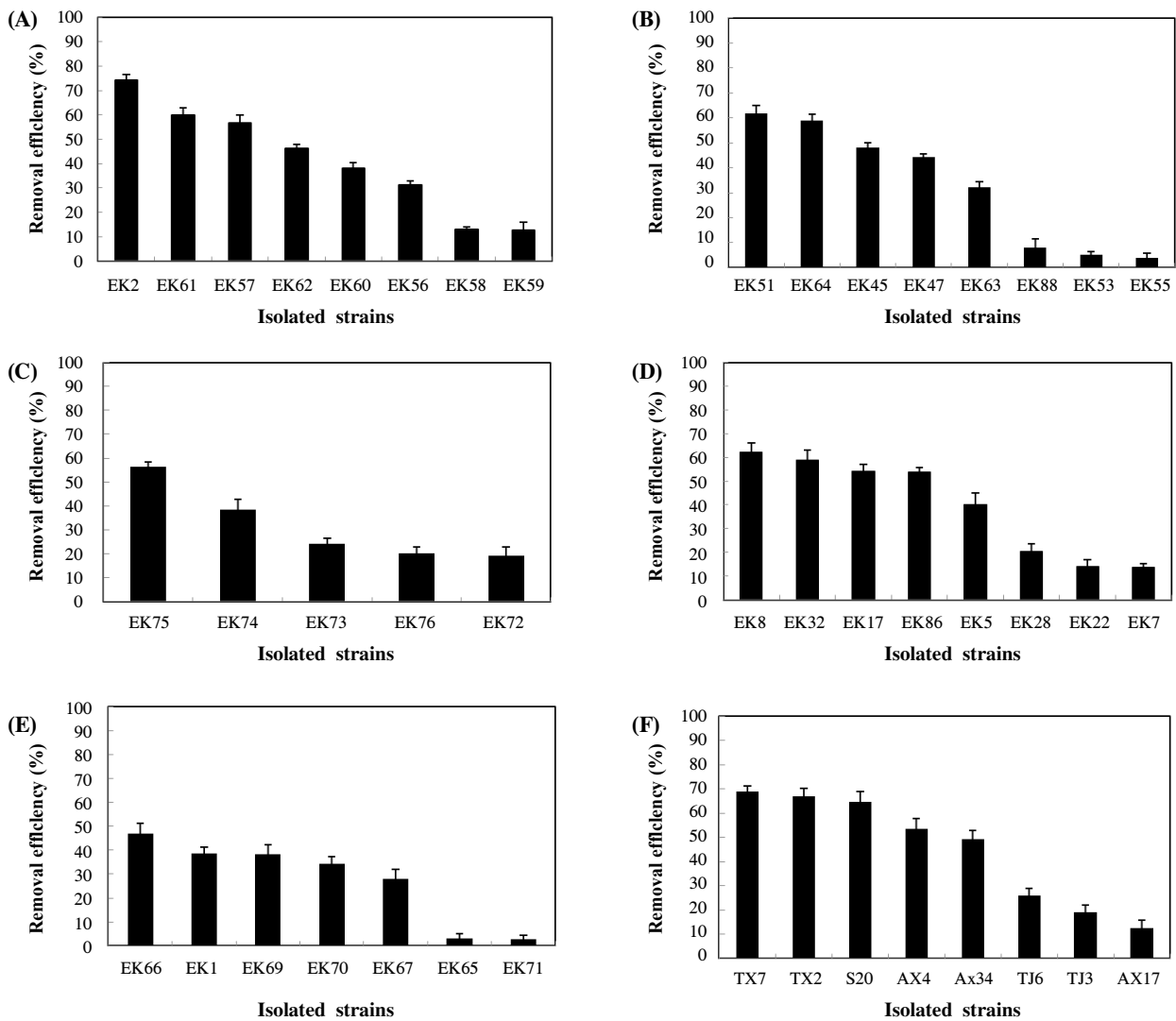


Fig. 1. TCE removal efficiency of isolated bacteria from TCE-contaminated samples for 21 days. Initially 30 mg/L of TCE with 0.2 g/L of each growth substrate was added. Each growth substrate was aniline (A), benzene (B), cumene (C), phenol (D), ethylbenzene (E), and toluene (F). Moreover, the cell biomass in each condition was 1.0 g/L (w/v). All values were the means of triplicates.

고농도 TCE 농도별 분해효율

D. acidovorans EK2의 TCE 농도에 따른 TCE 분해효율을 확인하였다. *D. acidovorans* EK2 균주는 21일 동안 TCE 10,

20, 30, 40 mg/L를 각각 66.1, 67.0, 77.4, 76.6%의 분해효율을 보여주었으며, 분해량은 각각 85, 139.4, 253.9, 327.8 µg이었고 이때의 분해속도는 각각 5.6, 11.4, 19.8, 26.1 nmol/h이

Table 3. The composition of fatty acid of *D. acidovorans* EK2

Retention time	Short hand name	Systematic name	%
3.031	8:0 3OH	3-Hydroxyoctanoic acid	0.74
4.475	10:0 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	3.24
5.019	12:0	Dodecanoic acid	2.53
7.594	14:0	Tetradecanoic acid	0.30
9.161	15:0	Pentadecanoic acid	—
10.538	Sum in feature 3 ^a		41.97
10.84	16:0	Hexadecanoic acid	31.75
14.047	Sum in feature 8 ^b		19.18

^a 16:1 ω6c/16:1 ω7c

^b 18:1 ω6c

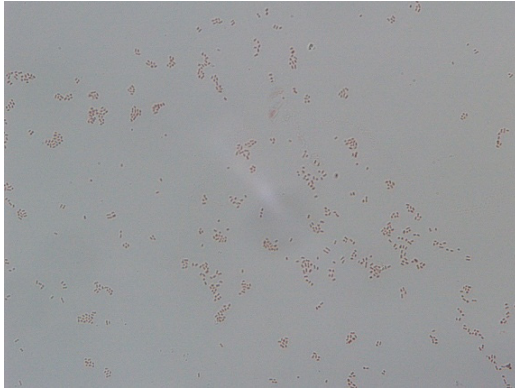


Fig. 2. Morphological characteristics of the strain EK2. EK2 strain is rod shaped Gram-negative bacteria, and its size is 0.3-0.4×0.5-0.6 μm.

었다. 그리고 TCE 50, 100, 150, 그리고 200 mg/L를 각각 70.3, 67.4, 63.2, 65.8%의 분해효율을 보여주었으며 분해량은 각각 366.3, 703.7, 933.5, 1,318.6 μg이었고 이때의 분해속도는 각각 29.8, 57.3, 80.4, 112.0 nmol/h이었다. 그러나 TCE 250 mg/L에서는 분해를 하지 못하였다(Fig. 4).

저농도 TCE 분해 특성

저농도 TCE 분해 특성을 알아보기 위하여 초기 접종 균 농도에 따른 TCE 분해효율을 확인하였다. 초기 TCE 농도 1.0 mg/L에 균 농도 각 0.01, 0.03, 0.05 mg/L를 첨가하였을 때, 초기 균 접종 농도와 상관없이 12일 동안 모두 99.0%의 높은 분해효율을 보여주었고 9 μg의 TCE를 분해하였다(Fig. 5).

아닐린 농도, pH, 온도에 따른 분해효율

최적 배양 조건을 확인하기 위하여 아닐린 농도, pH, 배양 온도 조건을 다양하게 주어 실험을 하였다. 아닐린 농도 0.3,

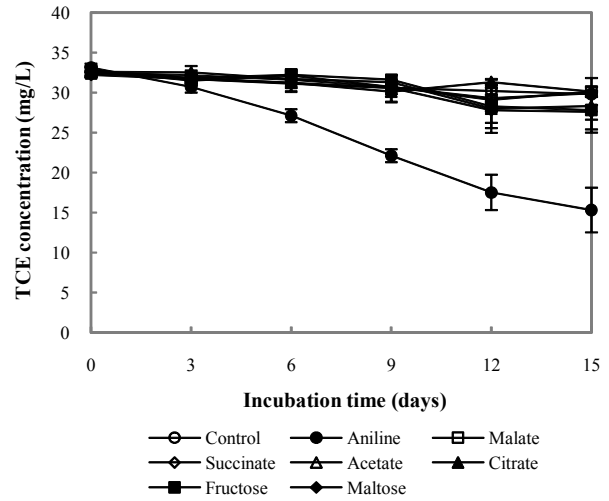


Fig. 3. TCE biodegradation by *D. acidovorans* EK2 with various growth substrates for 15 days. Initially 30 mg/L of TCE concentration and 1.0 g/L (w/v) of cell biomass was added. Incubation temperature and pH were adjusted to 30°C and 7 during each experiment. The initial concentration of each growth substrate: (●) Aniline 0.5 g/L, (◻) Malate 3.0 g/L, (■) Fructose 3.0 g/L, (◇) Succinate 3.0 g/L, (◆) Maltose 3.0 g/L, (▲) Citrate 3.0 g/L, (△) Acetate (3.0 g/L)

0.4, 0.5, 그리고 0.6 g/L를 첨가하였을 때, 21일 동안 각각의 분해효율은 37.4, 62.9, 71.0, 59.3%이었으며 분해량은 각각 760.1, 1281.2, 1439.2, 1,205.6 μg이었고 분해속도는 50.6, 84.4, 94.7, 79.3 nmol/h이었다.

pH 조건에 따라 실험한 결과 pH 3에서는 분해능이 보이지 않았으며 pH 5, 7, 9에서 21일 동안 각각 23.0, 71.0, 42.4%의 분해효율을 보여주었으며 분해량은 각각 473.1, 1439.2, 870.9 μg이었고 분해속도는 각각 31.2, 94.7, 57.2 nmol/h이었다. 온도 조건에서는 10, 20, 30, 40°C에서 각각 3.4, 31.9, 71.0,

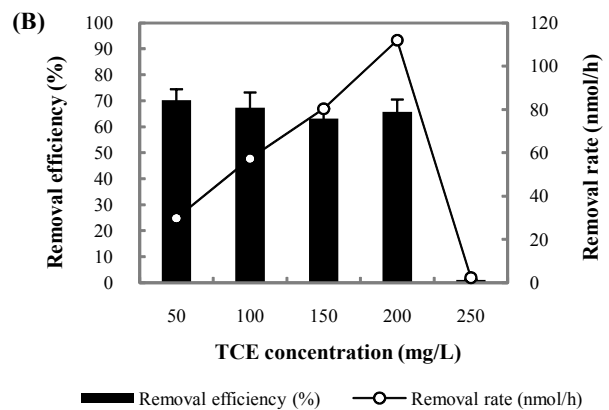
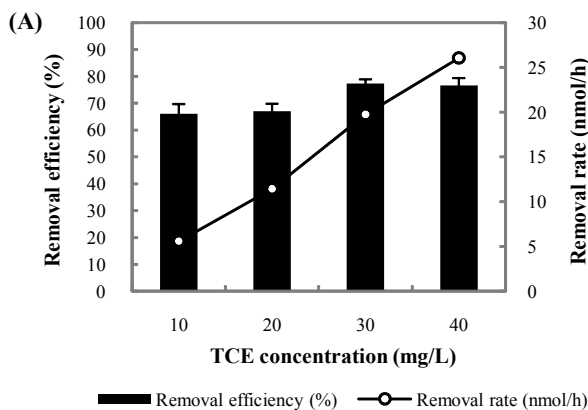


Fig. 4. The removal efficiency and rate of various TCE concentrations by *D. acidovorans* EK2 for 21 days. Initial TCE concentrations were 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, and 250 mg/L in liquid phase, respectively (aniline: 0.4 g/L, cell biomass: 1.0 g/L (w/v), temperature: 30°C, pH 7). (A) TCE removal efficiencies (%) were 66.1, 67.0, 77.4, and 76.6, and TCE removal rates were 5.6, 11.4, 19.8, and 26.1 nmol/h, respectively. (B) TCE removal efficiencies (%) were 70.3, 67.4, 63.2, and 65.8, and TCE removal rates were 29.8, 57.3, 80.4, and 112.0 nmol/h, respectively.

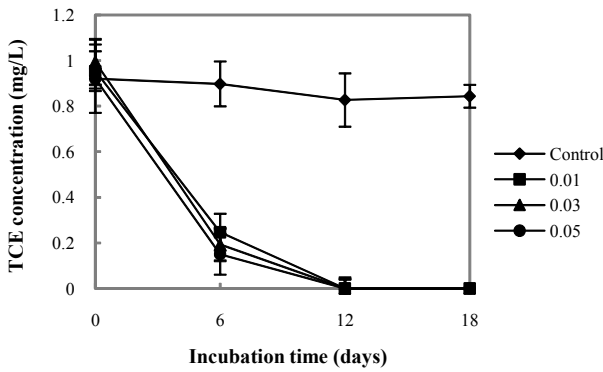


Fig. 5. The effect of cell biomass for TCE biodegradation. The initial TCE concentration was 1.0 mg/L in liquid phase (aniline: 0.5 g/L, cell biomass: 0.01, 0.03, 0.05 g/L (w/v), temperature: 30°C, pH 7).

8.0%의 분해효율을 보여주었으며 분해량은 각각 68.0, 653.6, 1439.2, 162.8 μg 이었고 4.4, 43.1, 94.7, 11.1 nmol/h의 분해 속도를 보여주었다(Fig. 6).

회분식 실험

도출된 최적 배양 조건(TCE 농도 200 mg/L, 아닐린 농도

0.5 g/L, 균농도 1.0 g/L, pH 7, 배양 온도 30°C)으로 회분식 실험을 한 결과 21일 동안 77.4%의 분해효율과 1741.7 μg 의 TCE를 분해하였으며 131.1 nmol/h의 분해 속도를 보여주었다 (Fig. 7).

균 성장에 TCE 농도 영향

D. acidovorans EK2의 TCE 농도에 따른 균 성장을 확인한 결과, 아닐린 0.5 g/L만 첨가한 경우의 비성장 속도(μ)는 0.121 이었고 아닐린 0.5 g/L와 함께 TCE 100, 200 mg/L를 첨가한 경우의 비성장 속도는 각각 0.105, 0.052이었다. 아닐린과 함께 TCE 300, 400 mg/L를 첨가한 경우와 단독으로 TCE 100 mg/L를 첨가한 경우에는 균의 성장이 보이지 않았다(Fig. 8). *D. acidovorans* EK2의 더블링 타임은 단독으로 아닐린 0.5 g/L를 첨가한 경우와 아닐린 0.5 g/L에 TCE 농도 100, 200 mg/L를 첨가한 경우 각각 5.7, 6.6, 13.2 h로 나타났다(Table 4).

고찰

본 연구에서는 고농도 TCE를 분해할 수 있는 호기적 TCE 분해 균주를 개발하기 위해 여러 방향족 화합물들을 첨가하여 균주를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주의 TCE 분해효율을

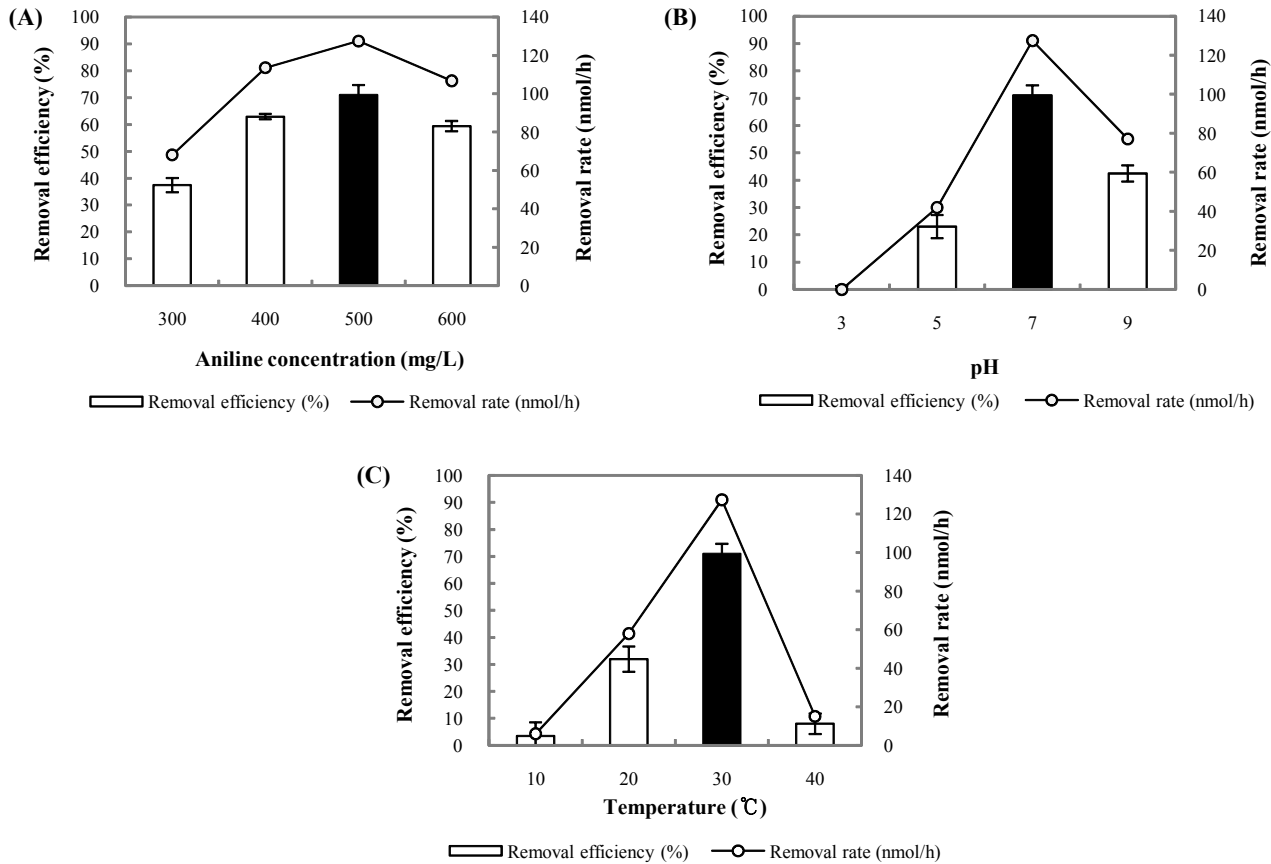


Fig. 6. The effect of aniline concentrations, pH and temperatures for TCE degradation. Aniline concentrations (A); 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 g/L (TCE: 200 mg/L, cell biomass: 1.0 g/L (w/v), temperature: 30°C, pH 7). pH (B); 3, 5, 7, 9 (TCE: 200 mg/L, aniline : 0.4 g/L, cell biomass: 1.0 g/L (w/v), temperature: 30°C). Temperature (C); 10, 20, 30, and 40°C (TCE: 200 mg/L, aniline: 0.4 g/L, cell biomass: 1.0 g/L (w/v), pH 7).

Table 4. The effect of aniline for the growth of *D. acidovorans* EK2 on each TCE concentration (TCE and aniline unit: g/L)

	TCE 0.1 without aniline	Aniline 0.5 without TCE	TCE 0.1 with aniline 0.5	TCE 0.2 with aniline 0.5	TCE 0.3 with aniline 0.5	TCE 0.4 with aniline 0.5
Specific growth rate (μ)	—	0.121	0.105	0.052	-	—
Doubling time (h)	—	5.7	6.6	13.2	-	—

확인한 결과 아닐린을 성장기질로 이용하는 *D. acidovorans* EK2가 다른 기질(벤젠, 에틸벤젠, 톨루엔, 페놀, 큐멘)을 이용하는 균주보다 더 높은 분해효율을 보여주었다.

현재까지 연구에 의하면 TCE를 단일 탄소원으로 분해하는 균주는 보고되지 않았으며, TCE를 분해하기 위해 첨가한 성장기질(1차 기질)은 방향족 화합물로서 톨루엔(44), 페놀(5), 큐멘(44)과 알칸, 알켄 화합물로서 메탄(17, 23), 에탄(15), 부탄(19), 에틸렌(8), 프로필렌(8), 아이소프렌(9) 그리고 식물 여센션 오일(Plant essential oils, 32)등이 이용되었다. 하지만 본 연구에서 아닐린 또한 첨가 성장기질로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

이제까지 밝혀진 호기적으로 TCE를 제거할 수 있는 속(genus)으로는 *Pseudomonas* (5, 14, 22)와 *Burkholderia* (13, 21, 41), *Methylosinus* (10, 12, 23, 40), *Methylocystis* (27), *Methylomonas* (7)가 있으며 그 외에도 *Nitrosomonas* (28), *Rhodococcus* (26), *Xanthobacter* (8), *Alcaligenes* (2), *Mycobacterium* (14), *Ralstonia* (33) 등이 보고 되어왔으나 본 연구에서 분리된 EK2는 *Delftia acidovorans*로 동정되어 위 균주의 TCE 분해능을 처음으로 밝혔다.

다양한 기질을 첨가하여 *D. acidovorans* EK2 균주의 성장을 확인한 결과 톨루엔, 벤젠, 에틸벤젠, 페놀, 큐멘, *o*, *m*, *p*-자일렌, alanine, arginine, formate, oxalate에서는 성장하지 못하였으며 아닐린(Aniline), maltose, fructose, acetate, citrate, malate, succinic acid, ethanol에서 성장할 수 있었다(자료 미제시). 그러나 EK2는 오직 아닐린을 첨가하였을 경우에만

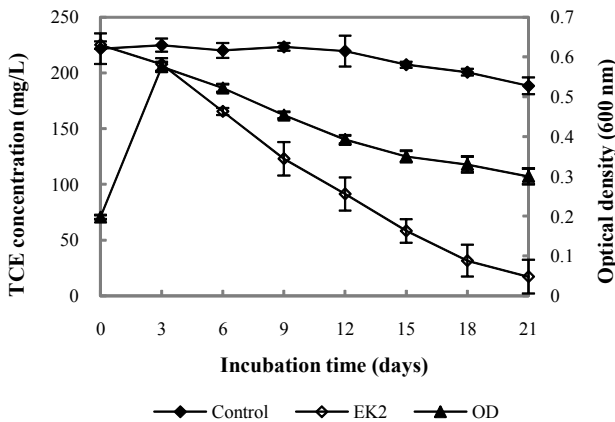


Fig. 7. The biodegradation of TCE under optimal conditions. Initial TCE and aniline concentration was 0.2 and 0.5 g/L. Cell biomass was 1.0 g/L (w/v) (temperature: 30°C, pH 7). TCE removal efficiency and rate was 77.4% and 148.2 nmol/h.

TCE를 분해할 수 있었다.

고 농도의 TCE 농도별 실험에서 EK2는 TCE 농도가 증가할수록 분해속도도 5.6에서 112.0 nmol/h으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고 최대 TCE 200 mg/L까지 분해 및 성장을 할 수 있었다. 그러나 250 mg/L 이상의 농도에서 성장 및 제거를 보이지 않았다. 이제까지 보고된 TCE 분해 균주로 페놀을 이용하는 *B. cepacia* G4 (11)는 TCE 초기 농도가 6.6 mg/L, 암모니아를 이용하는 *N. europaea* (35)은 TCE 초기 농도가 3.3 mg/L, 큐멘을 이용하는 *P. putida* F1 (44)은 TCE 초기 농도가 23 mg/L, 톨루엔을 이용하는 *P. putida* B2 (18)은 TCE 초기 농도가 5 mg/L, *Rhodococcus* sp. L4 (32)는 TCE 초기농도가 21 mg/L로 매우 낮은 농도에서 실험을 진행하였다. 이에 비하여 본 연구에서는 TCE 10-250 mg/L의 고농도 범위에서 *D. acidovorans* EK2의 분해효율을 측정하였으며, 초기 TCE 농도 200 mg/L, 아닐린 0.4 g/L, 균 농도 1.0 g/L를 첨가하여 pH 7, 온도 30°C의 배양조건에서 21일간 65.8% 분해하여 가장 높은 분해효율을 나타내었다. 이로 보아 *D. acidovorans* EK2를 장기간 고농도로 축적된 DNAPL 오염 지역의 생물학적 처리에 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 보인다. 또한, 1 mg/L의 TCE를 12일간 99.9% 이상 제거하여, 분산형 TCE 오염 지역에도 적용 가능하다는 것을 입증하였다.

생물학적 TCE 분해는 미생물에 의해 발현되는 산화효소에 의해 이루어진다. 그러나 산화효소를 발현하기 위하여 첨가된

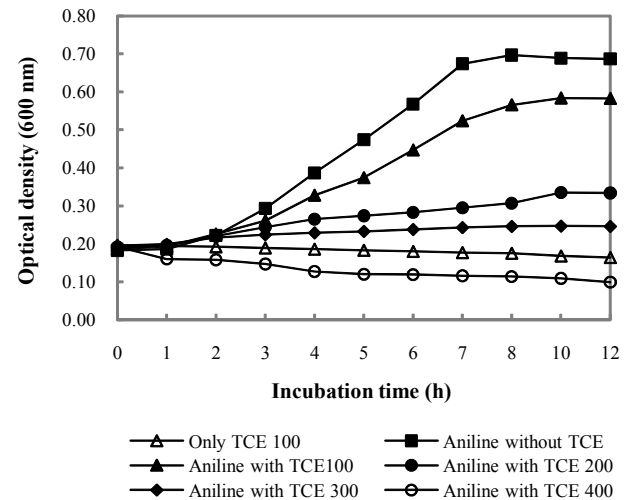


Fig. 8. Growth pattern of *D. acidovorans* EK2 on various TCE concentrations. Aniline concentration was 0.5 g/L and TCE concentrations were 100, 200, 300, and 400 mg/L, respectively.

성장 기질이 적정 수준 이상으로 첨가 될 시 TCE의 분해에 영향을 미친다. Kang (17) 등에 의하면 성장 기질인 메탄 혹은 메탄올은 TCE 분해에 경쟁적 저해제로써 작용하여 고농도(메탄올 0.4 mM) 이상 첨가하였을 경우 TCE 분해가 저해 받았으며 Folsom (11), Strand (39), Hyman (16) 등 역시 TCE를 분해하기 위해 사용된 페놀, 메탄, 암모니아 등은 한정된 농도 이상으로 첨가하였을 경우 TCE 분해가 저해되었다고 보고했다. *D. acidovorans* EK2의 아닐린의 농도에 따른 TCE의 분해 특성을 확인한 결과 아닐린 농도 0.3, 0.4, 0.5 g/L를 첨가하였을 경우 분해속도가 68.2-127.5 nmol/h로 점점 증가하였으나 0.6 g/L를 첨가하였을 경우 분해속도가 106.7 nmol/h로 오히려 감소하였다. 이는 아닐린 농도 0.6 g/L 이상은 TCE와 경쟁적 저해제로써 작용을 하였거나 혹은 아닐린과 TCE의 높은 농도로 인해 EK2에 대해 독성을 나타냈을 것으로 간주된다.

이러한 고농도 TCE 분해에 대한 최적 배양조건으로 회분식 실험을 수행하여 21일간 분해효율이 77.4%, 분해 속도는 131.7 nmol/h로 나타나 뛰어난 분해능을 확인하였다. 그러나 제거 후 TCE 잔류농도가 45.2 mg/L로 나타나 국내 음용수 기준(0.03 mg/L)을 초과하여, 현장적용에 어려운 부분이 있으나 화학적 및 물리적 처리와 연계하거나 제거기간의 연장, 활성제 개발 및 성장기질, 균주 재주입을 통하여 이러한 점을 보완할 수 있을 것이라 보인다.

결과적으로 저농도의 TCE를 고효율로 분해할 수 있었고 TCE 200 mg/L에 대한 최적 배양 조건을 확보함으로써 *D. acidovorans* EK2는 DNAPL로 오염된 지역에서 고농도의 TCE를 생물학적 처리에 있어 효율적으로 사용될 수 있을 것이며 현재 *D. acidovorans*에 의한 TCE 분해에 대한 연구가 매우 미비한 실정이므로 활발한 연구가 필요하다고 사료된다.

적요

본 연구에서는 성장기질로써 다양한 방향족 화합물을 첨가하여 TCE 분해 균주를 분리하고 고효율 TCE 분해 균주에 의한 고농도의 TCE 분해 특징에 대해 연구하였다. TCE에 오염된 토양 및 폐수로부터 시료를 채취하였고 성장기질로써 벤젠(Benzene), 페놀(Phenol), 에틸벤젠(Ethylbenzene), 아닐린(Aniline), 큐멘(Cumene), 톨루엔(Toluene) 등을 사용하여 TCE에 내성을 가지는 179 균주를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주들을 TCE 농도 30 mg/L, 성장기질 농도 0.2 g/L, 30°C, pH 7, 균 농도 1.0 g/L (w/v)의 호기적 조건으로 21일 동안 분해효율을 측정한 결과, 아닐린을 성장기질로 이용한 EK2 균주가 74.4%의 가장 높은 효율을 보여주었다. EK2 균주는 형태학적 특징, 생화학적 특징 및 분자적 특징을 분석한 결과 *Delftia acidovorans*로 동정되었다. *D. acidovorans* EK2의 TCE 분해는 TCE 농도 10에서 200 mg/L까지 성장 및 분해할 수 있었으나 250 mg/L 이상의 농도에서는 성장과 분해가 보이지 않았다. 저농도(1.0 mg/L) 분해 실험을 위하여 *D. acidovorans* EK2를 각 0.01 g/L, 0.03 g/L, 0.05 g/L로 적용한 결과, 모든 조건에서 12일 동안 99.9%의 분해효율을 보였다.

고농도(200 mg/L)를 분해하기 위한 최적 배양조건은 균 농도 1.0 g/L, 아닐린 농도 0.5 g/L, pH 7, 온도 30°C로 확인되었으며, 21일 동안 호기적으로 배양 시 71.0%의 가장 높은 TCE 분해효율을 보여주었고, 분해속도는 94.7 nmol/h이었다. 결과적으로 본 연구에서 개발된 *D. acidovorans* EK2를 이용하여 고농도의 TCE로 오염된 토양 및 지하수의 생물학적 처리에 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 토양·지하수오염방지기술개발사업(173-092-012)과 환경산업 미생물 및 유전자 보존센터(2010-0007473)의 연구비로 수행되었습니다.

참고 문헌

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1997. Toxicological profile for trichloroethylene, ATSDR, Division of Toxicological, Atlanta, GA, USA.
2. Alan, R.H. and Y. Kim. 1990. Trichloroethylene degradation by two independent aromatic-degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1179-1181.
3. Atlas, R.M. 1995. Bioremediation. *Chem. Eng. News.* 73, 32-42.
4. Bilge, A.K. and C. Ferhan. 2005. Cometabolic degradation of TCE in enriched nitrifying batch systems. *J. Hazard. Mater.* 125, 260-265.
5. Chen, Y.M., T.F. Lin, H. Chih, and J.C. Lin. 2008. Cometabolic degradation kinetics of TCE and phenol by *Pseudomonas putida*. *Chemosphere* 71, 1671-1680.
6. Dekker, T.J. and L.M. Abriola. 2000. The influence of field-scale heterogeneity on the infiltration and entrapment of dense nonaqueous phase liquids in saturated formation. *J. Contam. Hydrol.* 42, 187-218.
7. Eguchi, M., H. Myoga, S. Sasaki, Y. Miyake, and M. Fujita. 2001. The characterization of trichloroethylene degradation by *Methylomonas* sp. KSW III isolated from TCE-contaminated site. *Environ. Conserv. Engineer.* 30, 553-560.
8. Ensign, S.A., M.R. Hyman, and D.J. Arp. 1992. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown *Xanthobacter* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3038-3046.
9. Ewers, J., D. Freier-Schrader, and H.J. Knackmuss. 1990. Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Arch. Microbiol.* 154, 410-413.
10. Fitch, M.W., G.E. Speitel, Jr. and G. Georgior. 1996. Degradation of trichloroethylene by methanol-grown cultures of *Methylosinus trichosporium* OB3b pp358. *Appl. Environ. Microbiol.* 26, 1124-1128.
11. Folsom, B.R., P.J. Chapman, and P.H. Pritchard. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1279-1285.
12. Fox, B.G., J.G. Borneman, L.P. Wackett, and J.D. Lipscomb. 1990. Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: mechanistic and environmental implications. *Biochemistry* 29, 6419-6425.
13. French, W.T., R.B. Lewis, N.D. Donald, L.F. Herbert, and L.T. Cynthia. 2002. Effects of n-hexadecane and PM-100 clay on

- trichloroethylene degradation by *Burkholderia cepacia*. *J. Hazard Mater.* 92, 89-102.
14. Hamamura, N., C. Page, T. Long, L. Semprini, and D.J. Arp. 1997. Chloroform cometabolism by butane-grown CF8, *Pseudomonas butanovora*, *Mycobacterium vaccae* JOB 5, and methane-grown *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3607-3613.
 15. Hashimoto, A., K. Iwasaki, M. Nakajima, and O. Yagi. 2000. Degradation of trichloroethylene and related compounds by *Mycobacterium* spp. isolated from soil. *Clean Prod. Proc.* 2, 167-173.
 16. Hyman, M.R., S.A. Russell, R.L. Ely, K.J. Williamson, and D.J. Arp. 1995. Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1480-1487.
 17. Kang, J.M., E.Y. Lee, and S.H. Park. 2001. Co-metabolic biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* is stimulated by low concentrations methane or methanol. *Biotechnol. Lett.* 23, 1877-1882.
 18. Kelly, C.J., P.R. Bienkowski, and P.S. Saylor. 2000. Kinetic analysis of a tod-lux bacterial reporter for toluene degradation and trichloroethylene cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 256-265.
 19. Kimberly, H.H., A.S. Luis, J.B. Peter, and D.J. Arp. 2005. Trichloroethylene degradation by butane-oxidizing bacteria causes a spectrum of toxic effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 794-801.
 20. Korea Water Resources Corporation. 2005. Scrutiny and design services for restoration of soil and groundwater contamination.
 21. Landa, A.S., E.M. Sipkema, J. Weijma, A.A.C.M. Beenackers, J. Doling, and D.B. Janssen. 1994. Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in a chemostat with toluene as the primary substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3368-3374.
 22. Leahy, J.G., A.M. Byrne, and R.H. Olsen. 1996. Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 825-833.
 23. Lee, S.W., R.K. David, and D.H. Lim. 2006. Mixed pollutant degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing either soluble or particulate methane monooxygenase: can the tortoise beat the hare?. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 7503-7509.
 24. Lee, C.Y. and W.D. Liu. 2006. The effect of salinity conditions on kinetics of trichloroethylene biodegradation by toluene-oxidizing cultures. *J. Hazard Mater.* 137, 541-549.
 25. Lenhard, R.J., J.C. Parker, and J.J. Kaluarachchi. 1989. A model for hysteretic constitutive relations governing multiphase flow, 3. Refinements and numerical simulations. *Water Resour. Res.* 25, 1727-1736.
 26. Malachowsky, K.J., T.J. Phelps, A.B. Teboli, D.E. Minnikin, and D.C. White. 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 542-548.
 27. McDonald, I.R., H. Uchiyama, S. Kambe, O. Yagi, and J.C. Murrell. 1997. The soluble methane monooxygenase gene cluster of the trichloroethylene-degrading methanotroph *Methylocystis* sp. strain M. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1898-1904.
 28. Michael, R.H., A.R. Sterling, L.E. Roger, K.J. Williamson, and D.J. Arp. 1995. Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing Activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1480-1487.
 29. Ministry of Environment. Soil contamination concerning / counterplan level.
 30. Ministry of Environment. 2007. Report of groundwater measurement.
 31. Ministry of Labor. 2000. 99 Research on the actual condition of working environment of manufacturing company.
 32. Oramas, S., M. Rudolf, and L. Ekawan. 2009. Trichloroethylene cometabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 induced with plant essential oils. *Biodegradation* 20, 281-291.
 33. Park, J.H., J.K. Jerome, and M.A. Linda. 2002. Characterization of the adaptive response to trichloroethylene-mediated stresses in *Ralstonia pickettii* PKO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5231-5240.
 34. Phelps, T.J., J.J. Niedzielski, R.M. Schram, S.E. Herbes, and D.C. White. 1990. Biodegradation of trichloroethylene in continuous recycle expanded-bed bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1702-1709.
 35. Roger, L.E., K.J. Williamson, R.H. Michael, and D.J. Arp. 1997. Cometabolism of chlorinated solvents by nitrifying bacteria: kinetics, substrate interactions, toxicity effects, and bacterial response. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 520-534.
 36. Saenton, S., T.H. Illangasekare, K. Soga, and T.A. Saba. 2002. Effects of source zone heterogeneity on surfactant-enhanced NAPL dissolution and resulting remediation end-points. *J. Contam. Hydrol.* 59, 27-44.
 37. Schwillie, F. 1988. Dense chlorinated solvents in porous and fractured media. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
 38. Selvaratnam, C., B.A. Schoedel, B.L. McFarland, and C.F. Kulpa. 1997. Application of the polymerase chain reaction (PCR) and the reverse transcriptase/PCR for determining the fate of phenol degrading *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in a bioaugmented sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 236-240.
 39. Strand, S.E., M.D. Bjelland, and H.D. Stensel. 1990. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by suspended cultures of methane oxidizing bacteria. *Res. J. Wat. Poll. Control Fed.* 62, 124-129.
 40. Sun, A.K. and T.K. Wood. 1996. Trichloroethylene degradation and mineralization by *Pseudomonas* and *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 248-256.
 41. U.S. Environmental Protection Agency. 1984. National Primary Drinking Water Standard. *Proposed Fed. Regist.* 49, 24329.
 42. U.S. Environmental Protection Agency. 1990. Laboratory Investigation of Residual Liquid Organics from Spills, Leaks, and Disposal of Hazardous Wastes in Groundwater. EPA/600/6-90/004. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., USA.
 43. Wilson, J.T. and B.H. Wilson. 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 242-243.
 44. Yuki, M., U. Hajime, T. Yasunori, and H. Katsutoshi. 2004. Addition of aromatic substrates restores trichloroethylene degradation activity in *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2830-2835.