

Research Article

Open Access

## 광양만에서 TBTCI (Tributyltin Chloride) 내성세균의 분리 및 분해활성

정성윤,<sup>1\*</sup> 손흥주,<sup>2</sup> 정남호<sup>3</sup>

<sup>1</sup>대구가톨릭대학교 의생명과학과, <sup>2</sup>부산대학교 생명자원과학대학, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교 CU 인재학부

### Isolation and Degradation Activity of a TBTCI (Tributyltin Chloride) Resistant Bacterium in Gwangyang Bay

Seong-Yun Jeong,<sup>1\*</sup> Hong-Joo Son<sup>2</sup> and Nam Ho Jeong<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Biomedical Science, Catholic University of Daegu, Gyengsan 712-702, Korea, <sup>2</sup>College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea, <sup>3</sup>Catholic University of Daegu CU Leaders' College, Gyeongsan, 712-702, Korea)

Received: 9 December 2011 / Accepted: 26 December 2011  
© 2011 The Korean Society of Environmental Agriculture

#### Abstract

**BACKGROUND:** Tributyltin chloride is among the most toxic compounds known for aquatic ecosystems. Microorganisms are responsible for removal of TBTCI. Nevertheless, only a limited number of marine bacteria were investigated for biodegradation of TBTCI in Korea.

**METHODS AND RESULTS:** The number of TBTCI resistant bacteria ranged from  $2.5 \times 10^3$  to  $3.8 \times 10^3$  cfu/mL in the seawater, and ranged from  $3.2 \times 10^5$  to  $9.1 \times 10^5$  cfu/g in the surface sediment, respectively. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of TBTCI resistant bacteria were investigated by API 20NE and other tests. The most abundant species of TBTCI resistant bacteria were *Vibrio* spp. (19.2%), *Bacillus* spp. (16.2%), *Aeromonas* spp. (15.2%), and *Pseudomonas* spp. (13.1%), etc. Eleven TBTCI resistant isolates also had a resistance to heavy metals (Cd, Cu, Hg, and Zn). Among them, isolate T7 showing the strong TBTCI-resistance was selected. This isolate was identified as the genus *Pantoea* by 16S rRNA gene sequencing and designated as *Pantoea* sp. T7. In addition, this bacterium was cultivated up to the growth of 50.7% after 60 hrs at TBTCI concentration of 500  $\mu$ M. TBTCI-degrading activity of *Pantoea* sp. T7 was measured

by GC-FPD analysis. As a result of biological TBTCI-degradation at TBTCI concentration of 100  $\mu$ M, TBTCI-removal efficiency of *Pantoea* sp. T7 was 62.7% after 40 hrs. **CONCLUSION(S):** These results suggest that *Pantoea* sp. T7 is potentially useful for the bioremediation of TBT contamination.

**Key Words:** Gwangyang Bay, *Pantoea* sp. T7, TBTCI-degrading activity, Tributyltin Chloride

#### 서론

유기주석 화합물(organotin compounds)은 1960년대부터 선박 및 해양 구조물의 생물오손(biofouling) 방지제로 널리 사용되었다(Marszalek *et al.*, 1979). 특히 오도료(antifouling paint)에 첨가되는 tributyltin (TBT)은 따개비류(barnacles)와 강장동물(tube worms)과 같은 부착생물의 부착방지에 매우 효과적이며, 효능도 5년 이상 지속되므로 전 세계적으로 방오도료로서 널리 사용되었다(Hashimoto *et al.*, 1988). 이는 유기주석 화합물의 자체 독성으로 인해 선체 하단에 해양 동식물의 부착을 방지하여 항해를 가속시켜 연로절감 효과가 있기 때문이다. 그 외에도 유기주석 화합물은 가공 시 분자구조 변화를 방지하기 위해 polyvinylchloride (PVC) 안정제로 쓰였으며 살충제(insecticides), 살균제(bactericides), 목재 보존제(wood preservative) 등으로 많이 사용되었다(Clark *et al.*, 1988).

그러나 유기주석 화합물 중 대표적인 오염물질인 TBT는 비표적 생물(non-target organisms)에 대한 독성이 강해 해

\*교신저자(Corresponding author),  
Phone: +82-53-850-3772; Fax: +82-53-850-3727;  
E-mail: jsmicro@cu.ac.kr

양의 거의 모든 생물에 강한 독성을 나타내며, 해양 미생물의 사멸(han and Cooney, 1995)과 면역독성(Anderson et al., 1997)을 유도하고, 내분비계 장애물질로서 고등류의 임포섹스(imposex)를 일으키기도 한다(Shim et al., 2000). 이러한 독성은 생물학적으로 무해한 주석이 유기작용기와 결합함으로써 유기주석 화합물이 특정 단백질과 결합하는 성질에 기인하는 것으로 보고 있다. 또한 TBT는 친지방성(lipophilic)으로 인해 생물 체내에 흡수가 되면 배출이 잘 이루어지지 않기 때문에 생물농축인자(BCF: bioconcentration factor)로 작용해 환경에 극미량으로 존재해도 생물체에 미치는 영향이 크다(MacDonald and Trevors, 1988).

따라서 세계 각국에서는 이미 TBT 사용을 금지하거나 사용량을 제한하는 법규를 제정하여 해양 환경오염에 적극 대처하고 있다. 선진국을 중심으로 1980년대부터 TBT 사용을 부분적으로 규제하였고, 우리나라는 2,000년부터 부분적 규제를 시작하여 2003년 11월부터 모든 선박에 TBT 방오도료의 사용을 금지하고 있다. 국제해사기구(IMO: International Maritime Organization)는 2003년부터 TBT를 주성분으로 하는 선박용 페인트의 도포를 금지하고 있으며, 2008년부터는 기 도포되어 있는 TBT를 주성분으로 하는 선박용 페인트를 선체로부터 완전 제거하거나 해수로 용출되지 않도록 도막을 도포하도록 하고 있다. 이러한 규제에 의해 해수, 연안 퇴적물 및 생물체에서의 TBT 농도는 현격히 감소하였으나, 수십 년간 해저 퇴적층에 농축된 TBT의 재용출로 인해 해수 중 잔류농도는 계속 관측되고 있는 실정이다(Kam et al., 2011).

해양 환경으로부터 TBT의 제거는 광분해와 같은 무생물학적 분해와 생물학적 분해로 이루어지는데, 이 중 생물학적 분해의 비중이 크다고 보고되고 있다(Maillhot et al., 1999). Barug (1981)는 토양에서 분리한 세균과 곰팡이가 TBT를 분해하는 것을 최초로 보고하였으며, Fukagawa 등(1992)은 해양세균을 이용한 생분해 방법 개발의 일환으로 TBT 내성 세균을 분리하였고, Uchida (1994)는 해수와 퇴적물에서 TBT 내성세균의 분포를 조사하였다. 이와 같은 TBT 화합물의 해양환경오염에 대한 세계적인 관심과 이를 제거하려는 노력에도 불구하고, 아직까지 국내에서는 TBT 내성 또는 분해세균에 대한 연구는 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 연안 해역 중 급속한 산업화와 빈번한 선박의 출입으로 인해 유기주석 화합물 오염이 심화되었을 것으로 예상되는 광양만의 해수와 퇴적물에서 tributyltin chloride (TBTCI) 내성세균의 개체수를 조사하였다. 또한 TBTCI 분해활성이 뛰어난 *Pantoea* sp. T7 균주를 분리, 동정하고 생리적 특성 및 분해능에 대해 조사함으로써, 장차 TBT 오염해양의 bioremediation을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 조사지역 특성

광양만은 남해안 중부 여수해만의 북측에 위치한 내만으로

로서 동서의 길이는 약 17 km, 폭은 약 9 km이며, 여수해만을 통해 남해와 연결되고, 노량수로를 통해 인접한 진주만과 연결되어 있다. 북부의 섬진강과 수어천으로부터 연간 5.8-8.7 × 108톤의 담수가 유입되고 있으며(Park et al., 1984), 연간 약 80만 톤의 부유물질이 섬진강으로부터 유출되어 대부분 하구역에 퇴적되고 일부는 광양만 서측과 여수해만 그리고 남해 해역퇴적층의 주공급원이 된다(kim and Kang, 1991). 또한, 광양만권은 1980년대 후반부터 공업화 및 도시화가 빠르게 진행되고 있는 지역이다. 우리나라의 대표적 화학단지인 석유화학단지(여수시 삼일동, 11.53 km<sup>2</sup>)와 광양제철소(광양시 금호동, 11.92 km<sup>2</sup>)의 가동 등으로 농업 및 수산업 중심의 지역경제에서 공업 및 서비스업 중심의 경제구조로 전환되고 있다(Lee, 2000). 더욱이 광양항은 꾸준한 물동량 증가를 보이고 있으며, 석유화학물질 운반을 비롯하여 LNG 운반선, 컨테이너선 등 다양한 선종의 선박들이 통항하고 있으며, 수질은 총질소를 기준으로 2등급 수질을 보이고 있다.

### 표준시약

본 실험에서 사용된 TBTCI 표준시약(>99.5% purity)은 동경화성 공업주식회사에서 구입하였으며, corn oil (Sigma사)에 녹여 사용하였다. 추출용매인 methylene chloride는 Fisher사(USA)의 HPLC급을 사용하였으며, 실험에 사용한 모든 초자기구는 증류한 아세톤과 헥산으로 3회 이상 세척한 후 완전히 건조시켜 사용하였다.

### 생균수 및 TBT 내성세균의 개체수

시료는 2009년 8월에 광양만의 묘도 북측해안(위도 34° 54.81, 경도 127° 43.08)에서 표층 해수와 표층 퇴적물(수심 19.5 m)을 채취하였다. 표층 해수는 멸균된 MB 채수기로 무균적으로 채수하였고, 표층 퇴적물은 개량형 주상채니기(gravity core sampler)를 이용하여 채취하였다. 채취한 시료는 ice-box에 보관하여 실험실로 옮겨 3시간 이내에 처리하였다. 표층 해수 및 퇴적물의 생균수(VC: viable bacterial cells counting)는 채취한 각각의 시료를 멸균 해수로 십진법으로 희석하여 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 mL, seawater 1 L, 초기 pH 7.6) 평판 배지(Taga, 1968)에 평판도말법(Buck and Cleverdon, 1960)으로 접종하여 25°C에서 7일간 배양 후 나타난 colony의 수를 CFU (colony forming unit)로 계산하였다.

TBTCI 내성세균의 개체수는 Fukagawa 등(1992)의 방법을 개량하여 TBTCI을 corn oil (배지 중 최종농도가 1% 이하)에 용해시켜 최종농도가 100 nM과 100 μM이 되도록 PPES-II 배지에 첨가하여 평판배양법으로 25°C에서 2주간 배양한 후 출현한 세균집락을 계수하여 조사하였다. 또한 특징적인 colony를 선별하여 TBTCI 내성균주를 순수분리하였다. 분리한 내성균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 MacFaddin (1980)과 Gerhardt 등(1981)의 방법을 참고하여 형태학적, 배양학적 특성을 파악하고, API 20NE kit

(Biomerieux, France)를 이용하여 생리, 생화학적 특성들을 조사하였다. 그 결과를 apiweb™ database (<http://apiweb.biomerieux.com>)를 참조하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하여 속 level까지 동정하여 종조성을 파악하였다.

### TBTCl 및 중금속에 내성이 강한 균주의 선별 및 동정

분리 동정된 TBTCl 내성세균 중 TBTCl 및 중금속에 대한 내성이 가장 강한 균주를 선별하기 위하여 각각의 농도별에 따른 증식실험을 행하였다. 먼저 TBTCl에 내성이 강한 균주를 선별하기 위해 PPES-II 액체배지에서 전배양한 TBTCl 내성균주 배양액 100  $\mu$ L를 PPES-II 평판배지에 도말하였다. 직경 6 mm의 paper disk에 TBTCl의 농도가 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M 및 750  $\mu$ M이 되도록 loading하여 25°C에서 2주간 배양한 후, 최소저해농도(minimal inhibitory concentrations: MIC)를 조사하여 비교하였다. 또한 TBTCl에 강한 내성을 보이는 11개의 균주를 선택하여 중금속 Hg, Cd, Zn, Cu 및 Sr에 대한 내성 실험을 상기와 같은 방법으로 행하였다. 이 때 각 중금속의 loading 농도는 각각 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM, 25 mM 및 50 mM이 되도록 하여 MIC를 비교하였다.

TBTCl 및 중금속에 가장 강한 내성을 보인 T7 균주를 선택하여 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 염기서열 분석을 행하였다(Dunbar *et al.*, 2000). 선별된 내성균주는 PPES-II 배지에서 18시간 배양한 후, AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer 쌍은 27F (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하였다. 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 EcoRI의 인식부위를, reverse primer의 5'에는 BamHI의 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 rRNA gene의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200  $\mu$ L의 *Escherichia coli* XL1-blue 숙주세포에 형질전환시킨 후 alkaline lysis 순수분리 방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 plasmid를 mini-prep하였다. 이와 같이 16S rRNA gene 분석을 통하여 염기서열을 결정한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스 및 Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>)에서 가장 상동성이 높은 균주들과 염기서열을 비교하였으며, MEGA 5 package (Tamura *et al.*, 2011)를 이용하여 계통도를 그렸다.

### T7 균주의 성장에 TBTCl의 농도별 영향 및 분해활성 측정

선별된 T7 균주의 TBTCl의 각 초기 농도에 따른 성장 정

도를 조사한 방법은 다음과 같다. TBTCl의 농도를 각각 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M 및 1 mM로 첨가한 PPES-II 액체배지 100 mL에 전 배양한 T7 균주 배양액 1 mL를 접종한 후, 25°C에서 180 rpm으로 배양하면서 10시간 간격으로 spectrophotometer (Shimadzu, UV-160)를 이용하여 O.D.값을 측정(600 nm)하였다.

T7 균주의 TBTCl 분해활성을 측정하기 위해서 100  $\mu$ M의 TBTCl을 포함하는 100 mL의 PPES-II 액체배지에 대수 증식기로 전 배양한 T7 균주(approximately  $10^8$  cells/mL) 배양액 1 mL를 접종하였다. 이 때 TBTCl의 광분해를 방지하기 위해서 암조건에서 배양하였으며, 25°C, 180 rpm으로 40시간 동안 배양하였다. 배양 후 세균 배양액은 8,000 X g로 10분간 원심분리하고 배양상등액을 동결건조하여 분석 전까지 -70°C에서 보관하였다. 동결건조 시료로부터 TBTCl을 추출하고 분석하는 방법은 Harino 등(2002)의 방법을 따랐다. 유기물층은 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 통과시켜 수분을 제거하였고, 고속감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 농축시킨 후, Sep-Pak Plus florasil cartridge column (Waters Korea Co., Korea)으로 세정하여 1 mL로 농축한 후, GC 내부표준물질(internal standard)로서 tetrabutyltin (TeBT) 0.01  $\mu$ g (Aldrich, 93%)을 첨가하였다. 이중 2  $\mu$ L를 취하여 microsyringe를 이용하여 gas chromatography에 injection하여 분석하였다. 모든 실험은 같은 조건으로 3회 반복 실험하였다. GC-FPD (HP 5890 II, Hewlett-Packard, USA)의 분석 조건은 다음과 같다. Capillary column은 SPB-1 (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m; length  $\times$  id  $\times$  film thickness)을 사용하였다. 온도 조건은 injector temperature 225°C, detector temperature 250°C, oven temperature 50°C-240°C, 승온 속도 30°C/min으로 하였고, initial time 2 min, final time 10 min으로 프로그램화하였고, carrier gas는 helium (35 mL/min)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 조사해역의 생균수 및 TBT 내성세균의 개체수

조사해역에서 표층해수의 생균수는  $4.7 \times 10^5$  cfu/mL였으며, 표층 퇴적물의 생균수는  $6.9 \times 10^6$  cfu/g으로 조사되었다(Table 1). 광양만의 조사해역은 육지로부터 유기물의 유입이 많고 확산이 적은 내만에 위치하므로, 외양에 비해 비교적 높은 수치의 미생물 밀도를 보였다.

TBTCl의 최종농도가 100 nM과 100  $\mu$ M이 되도록 PPES-II 배지에 첨가하여 평판배양법으로 25°C에서 2주간 배양한 후 출현한 세균 집락을 계수하여 TBTCl 내성세균의 개체수를 조사한 결과도 Table 1에 나타내었다. 광양만의 조사해역에서 100 nM의 TBTCl에 대한 내성세균의 생균수는 표층해수와 표층 퇴적물에서 각각  $3.8 \times 10^3$  cfu/ml과  $9.1 \times 10^5$  cfu/g이었으며, 100  $\mu$ M TBTCl에 대한 내성세균의 생균수는 표층해수와 표층 퇴적물에서 각각  $2.5 \times 10^3$  cfu/mL와  $3.2 \times 10^5$  cfu/g이었다. 내성세균의 생균수는 표층해수에



서 보다 표층 퇴적물에서 많이 나타났으며, 높은 농도인 100  $\mu\text{M}$  TBTCI에 대한 내성세균의 생균수가 적게 나타났다. 또한 TBTCI 내성세균의 개체수는 표층해수에서보다 표층 퇴적물에서 약 8.7-16.3배 정도 많게 나타났다. 생균수 대비 TBTCI 내성세균의 비율은 0.53-13.19%로 나타났으며, 표층 퇴적물에서 100 nM의 TBTCI에 대한 내성세균의 비율이 13.19%로 가장 높게 나타났다. 조사해역에서의 표층해수에 분포하는 TBTCI 내성세균의 비율은 0.53-0.81%로, Uchida (1993)가 보고한 해수 중 TBT 농도가 10~600 ng Sn/L로 존재하는 일본의 Kachidoki만에서의 0.9-25% 보다는 현저히 낮은 개체수를 나타내었다. 또한 표층 퇴적물에 존재하는 TBTCI 내성세균의 비율은 4.60~13.19%로 Pain과 Cooney (1998)가 Boston 항구에서 조사한 1%보다 조금 낮은 분포를 나타내었다. 한편 1996년 광양만에서 TBT의 농도를 조사한 Kim과 Park (2001)의 보고에 의하면, 표층해수와 저층에서의 TBT 농도 범위는 각각 ND-15.7 ng/L와 ND~68.5 ng/L였으며 퇴적물에서의 TBT 농도 범위는 ND-8.5 ng/g dry wt였다. 광양만의 TBT 농도는 Uchida (1993)가 보고한 일본의 Kachidoki만에서의 해수 중 TBT 농도 범위인 10-600 ng Sn/L보다 현저히 낮은 농도였으며, 또한 TBTCI 내성세균의 비율도 현저히 낮게 나타났다.

**Table 1. Viable cell count (VC) and distribution of TBTCI resistant bacteria in theseawater and surface sediment of Gwangyang Bay**

(cfu: colony forming unit)

Carbon sources	Viable cell count	Number of TBTCI resistant bacteria	
		TBTCI of 100 nM (%) <sup>1</sup>	TBTCI of 100 $\mu\text{M}$ (%)
Seawater <sup>2</sup>	$4.7 \times 10^5$	$3.8 \times 10^3$ (0.81)	$2.5 \times 10^3$ (0.53)
Surface sediment <sup>3</sup>	$6.9 \times 10^6$	$9.1 \times 10^5$ (13.19)	$3.2 \times 10^5$ (4.60)

<sup>1</sup>: Ratio of cfu at the TBTCI of 100 nM and 100  $\mu\text{M}$  against cfu of corn oil control.

<sup>2</sup>: cfu/mL, <sup>3</sup>: cfu/g.

또한 TBTCI 내성세균의 종조성을 파악하기 위해서, 우선 상기의 평판배지 상에서 특징적인 colony를 선별하여 TBTCI 내성균주를 순수분리하였다. 분리한 내성균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 MacFaddin (1980)과 Gerhardt 등(1981)의 방법을 참고하여 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여 속 level까지 동정하였다. 그 결과, 광양만에서 TBTCI 내성세균의 종조성은 *Vibrio* spp. (19.2%)가 가장 높은 우점종으로 나타났고, *Bacillus* spp. (16.2%), *Aeromonas* spp. (15.2%), *Pseudomonas* spp. (13.1%), *Klebsiella* spp. (11.1%), *Alteromonas* spp. (9.1%), *Pantoea* spp. (6.1%), *Proteus* spp. (3.0%), *Listeria* spp. (2.0%), unidentified (5.0%)의 순으로 우점하였다. 지금까지 보고된 TBT 내성 또는 분해 microorganisms로는 *Coniophoraputeana*, *Pseudomonas diminuta*, *Chlorella vulgaris*, *Cunninghamella elegans*, *Aeromonas veronii*

Av27 등이 있다(Bernat and Dlugonski, 2006; Cruz *et al.*, 2007).

### TBTCI 및 중금속에 내성이 강한 균주의 선별 및 동정

분리 동정된 TBTCI 내성세균 중 TBTCI에 대해 보다 높은 농도에서 내성을 나타내는 균주를 선별하기 위하여 MIC를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 그 결과 TBTCI에 강한 내성을 보이는 11개의 균주를 선별하여 중금속 Hg, Cd, Zn, Cu 및 Sr에 대한 내성 실험을 MIC로 조사하였다. 11개 균주 모두 Hg, Cd, Zn 및 Cu에 대해 내성을 보였으나, Sr (스트론튬)에 대한 내성세균은 발견되지 않았다. 또한 대표적인 TBTCI 내성세균 11개 균주는 대체로 Hg에 대해서는 약한 내성을 보였고 Cu에 대해서는 비교적 강한 내성을 보였다. *Pantoea* sp. T7 균주는 750  $\mu\text{M}$ 의 TBTCI 농도에서 MIC를 보여 가장 강한 TBTCI 내성을 나타내었으며, Zn과 Cu에서도 각각 10 mM과 25 mM에서 MIC를 보여 중금속에 대해서도 가장 강한 내성을 나타내었다. 또한 250  $\mu\text{M}$ 의 TBTCI 농도에서 MIC를 나타낸 *Bacillus* sp. T33과 *Pseudomonas* sp. T6 균주도 Cd, Zn 및 Cu에 대해 100  $\mu\text{M}$ -10 mM 농도에서 MIC를 나타내어 비교적 강한 내성을 나타내었다. 이상의 결과는 TBT 내성세균은 여러 중금속에 대해서도 내성이 높다고 보고한 Pain과 Cooney (1998) 및 Fukagawa와 Suzuki (1994)의 연구 결과와도 잘 일치하였다. 이와 같이 본 연구에서 분리한 TBTCI 내성균주들은 TBTCI의 분해뿐만 아니라 중금속 분해에도 그 응용 가치가 있으리라 판단된다.

**Table 2. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of TBTCI and heavy metals against growth of TBTCI resistant bacteria in the PPES-II agar plates**

(unit:  $\mu\text{M}$ )

Strains	TBTCI	Heavy metals			
		Hg	Cd	Zn	Cu
<i>Vibrio</i> sp. T14	100	10	100	1,000	10,000
<i>Vibrio</i> sp. T28	10	10	10	1,000	1,000
<i>Bacillus</i> sp. T33	250	10	100	1,000	1,000
<i>Bacillus</i> sp. T17	100	10	100	1,000	1,000
<i>Aeromonas</i> sp. T9	25	10	100	1,000	10,000
<i>Pseudomonas</i> sp. T6	250	10	1,000	1,000	1,000
<i>Klebsiella</i> sp. T42	100	100	100	1,000	10,000
<i>Alteromonas</i> sp. T18	100	10	100	1,000	10,000
<i>Pantoea</i> sp. T7	750	100	1,000	10,000	25,000
<i>Proteus</i> sp. T37	10	10	100	1,000	1,000
<i>Listeria</i> sp. T25	100	10	10	1,000	10,000

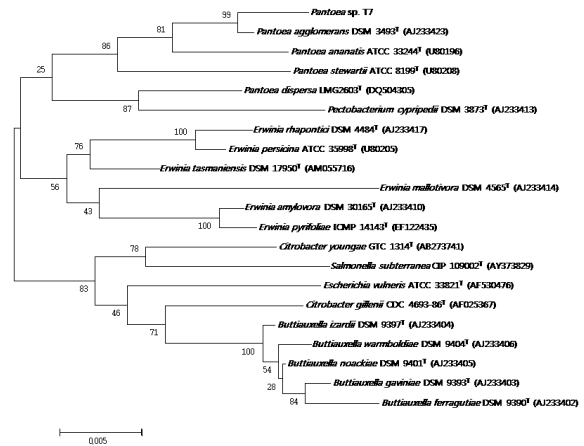
TBTCI 및 중금속에 가장 강한 내성을 보인 T7 균주를 선별하여, 이 균주의 형태적, 생리, 생화학적 특성들을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. T7 균주는 Gram 음성, 간균으로 운동성이 있고, 1.5% NaCl이 포함된 PPES-II 평판배

지에서 convex형의 불투명한 연한 노란색을 나타내었고, 4°C와 37°C에서도 성장을 하였으나, 41°C에서는 성장하지 못 하였다. 또한 인돌과 아세트인을 생성하고 시트르산 이용능은 있었으나, nitrate 환원능은 없었고, Maltose, L-Rhamnose, D-Mannose, D-Arabitol, *meso*-Inositol 및 DL-Lactose로부터 산을 생성하였다. 이상의 결과 *Pantoea* 속으로 1차적으로 분류되었다. 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene 염기서열(1,458 bp)을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 상동성이 높은 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, *Pantoea agglomerans* DSM 3493T (AJ233423)와 99.45%의 가장 높은 상동성을 나타내어(Fig. 1), 본 균주를 *Pantoea* sp. T7로 명명하였다.

**Table 3. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of isolate T7 by API 20NE and other tests**

Tests	Isolate T7
Color	creamy-yellow
Cell shape	rod
Gram staining	-
Motility	+
Growth at:	
4°C	+
37°C	+
41°C	-
Indole production	+
Acetoin production	+
Nitrate reduction	-
Hydrolysis of esculin	+
Citrate utilization	+
Hydrolysis of:	
Tween 20	+
Tween 60	+
Tween 80	-
Acid production from	
Maltose	+
L-Rhamnose	+
D-Mannose	+
D-Arabitol	+
<i>meso</i> -Inositol	+
DL-Lactose	+

+, Positive result or growth; -, Negative result or no growth. Values in parentheses were read after 48 h.



**Fig. 1. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rRNA gene sequence indicating the position of T7. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 replications, are given at branching points. Bar shows two nucleotide substitution per 1,000 nucleotides.**

TBT 오염의 심각성에 비해 지금까지 국내에서 TBT 분해 세균에 대한 연구는 미진한 실정이다. 본 연구에서 분리한 TBT 내성 또는 분해세균인 *Pantoea* sp. T7 균주와 상동성이 가장 높은 *Pantoea agglomerans*의 분류학상 synonym은 *Pantoea vagans*와 *Erwinia herbicola*이다(Smits *et al.*, 2010). 최근에 산에 내성을 가지는 biocontrol agent로서 *Pantoea agglomerans* CPA-2가 보고되었으며(Cañamás *et al.*, 2009), 또한 biocontrol agent로 알려진 *Pantoea vagans* C9-1의 유전체 염기서열(GenBank accession number CP002206)이 2010년에 보고되었다(Smits *et al.*, 2010). 이와 같은 선행 연구를 바탕으로 앞으로 TBT 분해에 관여하는 유전자를 찾는다면 biocontrol로서의 *Pantoea* 속 미생물의 유용성과 응용 가능성은 증대되리라 판단된다.

#### *Pantoea* sp. T7의 성장에 TBTCI의 농도별 영향 및 분해활성

선별된 *Pantoea* sp. T7 균주의 배양초기에 TBTCI을 각 농도별로 첨가하여, T7 균주의 TBTCI 농도에 따른 성장 정도를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. *Pantoea* sp. T7 균주는 TBTCI을 첨가하지 않았을 때 PPES-II 액체배지에서 배양 20시간 만에 정지기에 도달하였다. 10 μM의 TBTCI 농도에서는 약한 저해작용을 받아서 대조실험보다 조금 늦은 성장과 균체 밀도를 보였다. 100 μM, 250 μM 및 500 μM의 농도에서는 TBTCI의 영향으로 배양초기 10시간까지는 균 성장이 조금 감소하였으나, 배양 10시간 이후에는 내성을 회복하여 비교적 안정된 성장을 보였다. 그러나 대조실험 및 10 μM의 TBTCI 농도에서의 균 성장 결과에 비해, 비교적 늦은 성장(40시간 만에 정지기 도달)과 균체 밀도를 나타내었다. 특히 500 μM의 고농도에서는 대조실험과 비교 시 60시간 후에 50.7%의 낮은 성장을 보였고, 현미경으로 관찰 시 균의 크기도 작았으며 aggregation 현상이 나타났다. 그러나 1 mM의 고농도에서는 거의 성장이 정지되었다. 하지만 *Pantoea*

sp. T7 균주는 Fukagawa 등(1992)이 일본의 Hakodate만에서 분리한 125  $\mu\text{M}$ 에서 최고 내성농도를 보인 TBT 내성세균 *Vibrio* sp. M-1 균주보다 내성이 4배 이상 뛰어난 결과를 보였다.

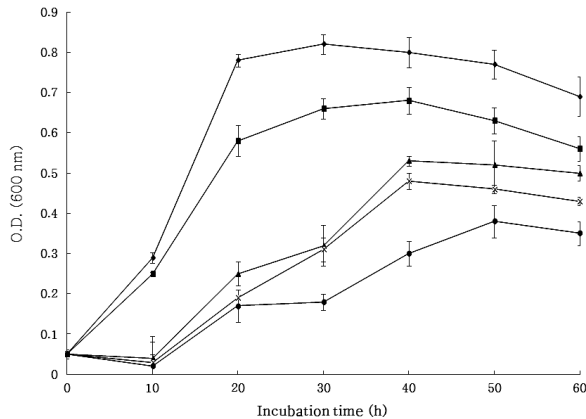


Fig. 2. The growth curve of *Pantoea* sp. T7 at various concentrations of TBTCI (◆, control; ■, 10  $\mu\text{M}$ ; ▲, 100  $\mu\text{M}$ ; X, 250  $\mu\text{M}$ ; ●, 500  $\mu\text{M}$ ). control: same volumes of corn oil were added. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation from triplicate assays.

*Pantoea* sp. T7 균주를 대수증식기로 전배양하여 100  $\mu\text{M}$ 의 TBTCI이 포함된 PPES-II 액체배지에 1%가 되도록 접종하여 40시간 배양하였을 때, TBTCI의 분해활성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. GC-FPD 분석에 의해 배양 40시간 후의 TBT 잔존률은 37.3%로 나타나, 본 연구에서 분리한 *Pantoea* sp. T7 균주는 TBT 분해활성이 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 *Pantoea* sp. T7 균주를 첨가하지 않은 negative control에서 40시간 후에 TBT 잔존률은 97.3% (standard deviation: 1.3)로 나타났다. 이러한 결과는 무생물적 광분해에 의한 것으로 판단되나, 본 실험에서는 TBTCI의 광분해를 방지하기 위해서 암조건에서 배양하였으므로 광분해의 영향도 미미한 것으로 판단된다. 또한 배양 초기에는 탐지되지 못했던 dibutyltin dichloride (DBT)와 monobutyltin trichloride (MBT)는 배양 40시간 후에 TBT 분해 부산물로서 측정되었다. 이와 같은 TBT 분해 부산물로서 DBT와 MBT의 생성은 TBT 분해세균 또는 fungi에 의한 TBT의 생물학적 분해과정에서 생성되는 것으로 잘 알려져 있으며 (Bernat and Dlugonski, 2006), 화합물의 구조 및 분해과정은 Fig. 3에 나타내었다.

Table 4. Residual organotin concentrations in the *Pantoea* sp. T7 cultured media under TBTCI of 100  $\mu\text{M}$ . *Pantoea* sp. T7 was cultured in PPES-II for 40 hrs at 25°C and residual organotin concentrations were investigated by GC-FPD analysis

Samples	$\mu\text{M}$ concentrations (and standard deviations)		
	TBT (tributyltin chloride)	DBT (dibutyltin dichloride)	MBT (monobutyltin trichloride)
Before inoculation	100 (2.1)	ND	ND
After cultivation	37.3 (3.8)	0.3 (<0.1)	0.9 (<0.1)

ND: not detected.

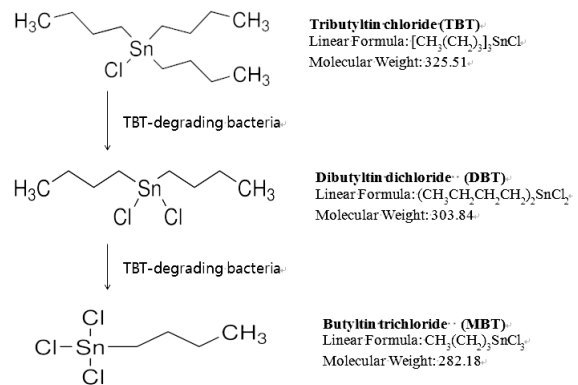


Fig. 3. The structure of TBT and degrading scheme by TBT-degrading bacteria.

이상의 연구 결과 광양만에서 분리한 *Pantoea* sp. T7 균주는 TBT 분해 활성이 뛰어나, 현재 다른 종류의 유기주석 화합물, 유기염소계 화합물 및 중금속 등의 분해에 대한 연구가 진행 중이며, 이를 통하여 난분해성 유기합성 화합물에 오염된 해역이나 토양의 생물학적 복원에 응용할 수 있으리라 기대된다.

## 요약

본 연구에서 우리는 광양만의 해수와 표층 퇴적물에서 TBTCI 내성세균의 개체수를 조사하였다. 광양만에서 TBTCI 내성세균의 개체수는 해수에서  $2.5 \times 10^3$ - $3.8 \times 10^3$  cfu/mL 범위였으며, 표층 퇴적물에서 TBTCI 내성세균의 개체수는  $3.2 \times 10^5$ - $9.1 \times 10^5$  cfu/g 범위였다. 광양만에서 TBTCI 내성세균의 종조성은 *Vibrio* spp. (19.2%)가 가장 높은 우점종으로 나타났고, *Bacillus* spp. (16.2%), *Aeromonas* spp. (15.2%), *Pseudomonas* spp. (13.1%), *Klebsiella* spp. (11.1%), *Alteromonas* spp. (9.1%), *Pantoea* spp. (6.1%), *Proteus* spp. (3.0%), *Listeria* spp. (2.0%), unidentified (5.0%)의 순으로 우점하였다. 또한 11개의 대표적인 TBTCI 내성균주는 여러 중금속들(Cd, Cu, Hg 및 Zn)에도 내성을

나타내었다. 이들 중에서 가장 강한 TBTCI 내성을 보이는 T7 균주를 선별하여, API 20NE등을 이용하여 본 균주의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성들을 조사하였다. T7 균주는 16S rRNA gene 염기서열 분석에 의해 *Pantoea* 속으로 동정되어 *Pantoea* sp. T7으로 명명되었다. 또한 본 균주는 500  $\mu$ M의 TBTCI 농도에서도 60시간 배양 후에 정상 균주 성장의 50.7%까지 증식하였다. *Pantoea* sp. T7의 생물학적 TBTCI 분해활성은 GC-FPD 분석에 의해 측정되었는데, 100  $\mu$ M의 TBTCI 농도에서 배양 40시간 후에 TBTCI 제거 효율은 62.7%로 나타났다.

### 감사의 글

This work was supported by research grants from the Catholic University of Daegu in 2010(20104024).

### 참고문헌

- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Calvo, L.M., Bureson, E.M., Unger, M.A., 1997. Effects of in *vibrio* exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes, *Environ. Res.* 74(1), 84-90.
- Barug, D., 1981. Microbial degradation of bis (tributyltin) oxide, *Chemosphere.* 10(10), 1145-1154.
- Bernat, P., Dlugonski, J., 2006. Acceleration of tributyltin chloride (TBT) degradation in liquid cultures of the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*, *Chemosphere.* 62, 3-8.
- Buck, J.D., Cleverdon, R.C., 1960. The spread plate as a method for enumeration of marine bacteria, *Limnol. Oceanogr.* 5, 75-80.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., 2009. Acid tolerance response induced in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 and effect on its survival ability in acidic environments, *Microbiol. Res.* 164, 438-450.
- Clark, E.A., Sterritt, R.M., Lester, J.N., 1988. The fate of tributyltin in the aquatic environment, *Environ. Sci. Technol.* 22(6), 600-604.
- Cruz, A., Caetano, T., Suzuki, S., Mendo, S., 2007. *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal, *Mar. Environ. Res.* 64, 639-650.
- 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.
- Fukagawa, T., Suzuki, S., Fukunaga, K., Suzuki, T., Takama, K., 1992. Isolation and characterization of tributyltin chloride-resistant marine *Vibrio*, *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 83-86.
- Fukagawa, T., Suzuki, S., 1994. Cloning of gene responsible for tributyltin chloride (TBTCl) resistance in TBTCl-resistant marine bacterium, *Alteromonas* sp. M-1, *Bioch. Biophys. Res. Com.* 194(2), 733-740.
- Gerhardt, P., Murray, R.G., Costilow, E.R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., Phillips, G.B., 1981. *Manual of method for general bacteriology*, pp. 135-154, 1st ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Han, G., Cooney, J.J., 1995. Effects of butyltins and inorganic tin on chemotaxis of aquatic bacteria, *J. Ind. Microbiol.* 14, 293-299.
- Harino, H., O'Hara, S.C.M., Burt, G.R., Pope, N.D., Chesman, B.S., Langston, W.J., 2002. Butyltin and phenyltin compounds in eels (*Anguilla anguilla*), *J. Marine Biol. Assoc. UK.* 82(5), 893-901.
- Hashimoto, S., Watanabe, M., Noda, Y., Hayashi, T., Kurita, Y., Takasu, Y., Otsuki, A., 1998. Concentration and distribution of butyltin compounds in a heavy tanker route in the Strait of Malacca and in Tokyo bay, *Marine Environ. Res.* 45(2), 169-177.
- Kam, S.K., Kim, H.J., Lee, M.G., 2011. Distribution characteristics of organotin compounds in sediments inside Jeju harbor of Jeju Island, *J. Environ. Sci.* 20, 385-394.
- Kim, D.C., Kang, H.J., 1991. Suspended sediment budget in Gwangyang Bay through the Yeosu Sound, *J. Korean Fish. Soc.* 24(1), 31-38.
- Kim, G.Y., Park, M.O., 2001. Evaluation of butyltin compounds and its distribution among seawater, sediment and biota from the Kwangyang Bay, *J. Korean Fish. Soc.* 34(4), 291-298.
- Lee, J.R., 2000. Change of regional economic structure and industrial development of Kwangyang Bay area: 1987-1996, *Korean Plan. Assoc.* 35(2), 175-189.
- MacFaddin, J.F., 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, pp. 36-308, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Mailhot, G., Astruc, M., Bolte, M., 1999. Degradation of tributyltin chloride in water photoinduced by iron (III), *Appl. Organometal. Chem.* 13, 53-61.
- Marszalek, D.S., Gerchakov, S.M., Udey, L.R., 1979. Influence of substrate composition on marine microfouling, *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 987-995.
- McDonald, L., Trevors, J.T., 1988. Review of tin resistance, accumulation and transformations by



- microorganisms, *Water Air Soil Pollut.* 40. 215-221.
- Pain, A., Cooney, J.J., 1998. Characterization of organotin-resistant bacteria from Boston harbor sediments, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35(3), 412-416.
- Park, Y.A., Lee, C.B., Choi, J.H., 1984. Sedimentary Environments of the Gwangyang Bay, Southern Coast of Korea, *Korean Soc. Oceano.* 19(1), 82-88.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, pp. 25-28, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Shim, W.J., Oh, J.R., Kang, S.H., Shim, J.H., Lee, S.H., 2000. Tributyltin and triphenyltin residues in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and rock shell (*Thais clavigera*) from the Chinhae Bay System, Korea, *J. Korean Soc. Oceanogr.* 33(3), 90-99.
- Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Goesmann, A., Ishimaru, C.A., Stockwell, V.O., Frey, J.E., Duffy, B., 2010. The genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1, *J. Bacteriol.* 192, 6486-6487.
- Taga, N., 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the KuroShio current, *Bull. Misaki. Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.* 12, 65-76.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Uchida, M., 1993. Inhibitory activity of organotin compounds against colony formation of estuarine bacteria, *Nippon suisangakkaish.* 59(12), 2037-2941.
- Uchida, M., 1994. Tolerance of marine bacteria for organotin compounds (OTCs) in areas with or without OTC contamination, *Fisher. Sci.* 60(3), 267-270.