

토양 서식 미생물을 이용한 자일렌(xylene) 분해특성 조사 The Investigation of Biodegradation Characteristics of Xylene by Soil Inhabited Microorganisms

최필권*** · 허 평** · 이상섭*[†]
Phil-Kweon Choi*** · Pyeung Heo** · Sang-Seob Lee*[†]

*경기대학교 생명공학과 · **경기도보건환경연구원 토양분석팀
*Soil Analysis Team, Gyeonggi-do Institute of Health & Environment
**Department of Biotechnology Kyonggi University

(2011년 1월 31일 접수, 2013년 5월 20일 채택)

Abstract : The purpose of this study is to investigate the biodegradation characteristics of the xylene by BTEX-degrading bacteria, *Pseudomonas putida* BJ10, isolated from oil-contaminated soil and bio-degradation pathway of the xylene. The removal efficiencies of *o*, *m*, *p*-xylene in mineral salts medium (MSM) by *P. putida* BJ10 were 94, 90 and 98%, respectively for 24 hours. It shows clear difference compared with the control groups which were below 3%. The removal efficiencies of BTEX by *P. putida* BJ10 in gasoline-contaminated soil were 66% for 9 days. They were clearly distinguished from the control groups (control and sterilized soil) which were 32 and 8%. 3-methylcatechol and *o*-toluic acid were detected after 6 and 24 hours during the *o*-xylene biodegradation pathway. Therefore, we confirmed *o*-toluic acid as the final metabolite. And intermediate-products were somewhat different with previously published studies of the transformation pathway from *o*-xylene to 3-methylcatechol.

Key Words : Biodegradation, Soil Texture, xylene, Metabolite, Pathway

요약 : 본 연구의 목적은 유류로 오염된 토양으로부터 분리된 고효율 분해균주에 의한 xylene 분해특성을 조사하고 분해과정을 밝히는 것이다. *P. putida* BJ10에 의해 mineral salts medium (MSM)배지내에서 24시간 배양 후 제거율은 *o*, *m*, *p*-xylene 각각 94, 90, 98%였으며 3% 이하의 대조군과 명확한 차이를 보였다. 또한 유류로 오염된 토양내에서의 9일 경과 후 xylene 제거율은 유류 분해균주 주입구에서 66%였으며 무처리 일반토양에서 32%, 멸균 토양에서 8%로서 *P. putida* BJ10에 의한 유효성을 확인할 수 있었다. 또한 시간경과에 따른 대사산물을 분석한 결과 *o*-xylene의 분해 경로에서는 6시간 경과 후 3-methylcatechol, 24시간 경과 후 *o*-toluic acid 가 분해산물로서 검출되어 최종산물로서의 *o*-toluic acid 가 확인되었으며 중간산물의 변환과정은 기존 발표된 연구들과 다소 다른 결과를 나타내었다.

주제어 : 생분해, 분해경로, BTEX, 대사산물, 분해균주

1. 서론

가솔린은 원유생산물의 대표적인 물질로서 다양한 탄화수소로 구성되며 연료로서 요구되는 성능과 환경 규제기준에 따라 정제시 그 성분함량이 조정된다. 가솔린의 18% (wt.) 이상을 구성하는 BTEX (benzene, toluene, ethylbenzen, *o*, *m*, *p*-xylene)는 주로 유류저장탱크와 다양한 산업공정으로부터 배출된다. BTEX는 다른 가솔린성분 중에서 상대적으로 물에 대한 용해성이 크고 인체에 유독하며 특히 benzene은 대표적인 발암성 물질로 분류된다.

산업공단지역의 유류 취급, 보관, 저장소 그리고 송유관, 20,000여개 주유소 등을 포함한 다양한 잠재오염원들에 의한 유류 오염사고 등으로 토양, 지하수 오염의 심화가 우려되고 있다. 실제 전국 토양측정망 운영 및 토양실태조사 결과¹⁾ 토양오염 우려기준 초과지점의 많은 부분이 BTEX, TPH 등 유류물질에 의한 것이며 반환되는 많은 미군부대 부지에

서 상당한 유류오염이 확인되고 있다.

특히 이들 방향족 탄화수소들은 난분해성 물질들로서 장시간 자연계에 남아서 유해한 요인으로 작용할 수 있다. 그러나 이러한 난분해성 물질들을 분해할 수 있는 미생물들이 자연계에 존재하고 있으며 이들을 분리하여 효율을 최대화한다면 경제적이고 효과적으로 처리할 수 있다.^{2,3)} 따라서 이러한 오염물질들에 대해 분해능이 우수한 미생물을 분리하여 오염된 현장에 효과적으로 적용될 때 오염물질은 유용한 탄소원으로 이용될 수 있을 것이다.

미생물에 의한 BTEX의 분해경로는 초기에 monooxygenase와 dioxygenase에 의하여catechol이나 protocatecate로 전환되며 dioxygenase에 의해 ring cleavage가 일어난다. 즉 자일렌 등과 같은 방향족화합물들은 생물학적 분해를 통해 catechol, benzoate 등과 같은 단핵고리로 된 중간대사산물로 변환되며 이 물질들은 다시 벤조 고리개환작용으로 생분해되면서 탄소원 또는 에너지원으로 사용되는 것으로 알려져

[†] Corresponding author E-mail: ssllee@kyonggi.ac.kr Tel: 031-249-9642 Fax: 031-251-0746

있다.⁴⁻⁸⁾

*o, m, p-xylene*은 모두 호기성 및 혐기성 상태에서 미생물에 의해 분해될 수 있으나 자연상태에서의 분해는 여타의 물질에 비하여 매우 느리게 나타나는 특징이 있다. 특히 세 가지 물질 중 *o-xylene*의 경우 분해 속도가 가장 느리게 나타나며 가장 적은 종류의 미생물이 분해하는 것으로 알려져 있으며 이는 *o-xylene*의 강한 세포독성에 의한 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 따라서 자연계에 오염되어 있는 방향족탄화수소를 효과적으로 분해할 수 있는 균주를 분리하고 그들의 분해과정을 밝히는 과정은 이러한 독성요인에 대한 대처가 가능하며 효과적인 현장적용을 위한 기본적이며 필수적인 사항이다.

이러한 여러 영향요인들을 고려하여 본 연구에서는 유류로 오염된 토양으로부터 분해균주를 분리하여 그 효과를 알아보고 그 분해특성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

유류 분해미생물을 분리하기 위하여 인천소재 A 주유소의 지하에서 BTEX에 오염된 토양을 채취하였으며 100 mL의 minimal salts medium (MSM)이 포함된 500 mL bottle에 일정한량의 BTEX를 넣은 후 1.0 g (wet weight)의 토양을 넣어 주었다. 28 ± 2°C에서 7일간 배양 후 순수분리를 위해 Nutrient agar와 사전실험을 통해 균의 성장도가 가장 높게 나타났던 농도인 500 mg/L의 기질이 포함된 1.8% agar를 제작하여 멸균된 백금이를 증식배양된 균액에 담근 후 plate에 선을 그리면서 균액을 희석시켜 균들의 분리를 유도하였다. streak, spread plate method를 이용하여 plate에 균을 접종한 후 매일 colony의 형성을 관찰하여 형성된 colony를 액체배지에 접종하여 배양하여 다음과 같이 성장률 시험을 하였다.

균주의 성장률을 측정하기 위하여 밀폐가 가능한 20 mL tube에 MSM을 10 mL 넣은 후 10 µL microsyringe (Hamilton, U.S.A)를 이용하여 배지에 *o, m, p-xylene*을 각각 10 mg/L로 오염시켰다. 각 균주의 배양액 100 µL를 접종 후 초기의 흡광도를 측정하고 1일 마다 흡광도(600 nm)를 측정(Genequant pro, Amersham bioscience, USA)하였다.

o, m, p-xylene 각각의 농도저감 및 탄소원으로서의 이용 여부를 확인하기 위해 추출용매로서 ethylacetate를 10 mL 사용하였으며 농축후 n-hexane 2 mL에 재용해시켜 GC-FID (Agilent 6890) 및 GC-MSD (Agilent 7673N)로 분석하였다.

토양 내에서의 xylene 분해 능력을 확인하기 위하여 사전 성장률 시험을 통해 가장 높은 효율을 보인 균주로서 호기성이며 rod형의 그람음성균(0.5~1.0 × 1.0~1.5)으로 16 s rDNA

염기서열 분석결과 *Pseudomonas sp.* (99%) ;1486 bp, API 20NE kit 테스트 결과 *Pseudomonas sp.* (95%), 지방산 분석 (Fatty acid analysis) 결과 *Pseudomonas putida* biotype A (38.7%)로 동정된 균주를 이용하여 현장 적용 가능성을 알아보고자 하였다.

시험대상 토양 1 kg에 1 g의 비율로 균주를 혼합하였으며 휘발유는 토양 kg 당 200 mL 첨가 후 고르게 혼합하였으며 대조군으로서 120°C에서 12 hr 열건조된 멸균토양(sterilized soil)과 분해 균주를 주입하지 않은 무처리 일반 토양(control)에 대한 실험을 병행하여 그 결과를 비교하고자 하였으며 실험에 사용된 토양의 이화학적 특성은 Table 1과 같다.

BTEX 분해효과가 높은 것으로 조사된 균주 *Pseudomonas putida* BJ10에 의한 분해경로를 알아보기 위하여 시간경과에 따른 xylene 분해산물을 조사하였다.

0, 6, 24 hr 단위로 ethylacetate 10 mL로 추출 후 GC-MSD, GC-TOFMS (LECO)로 분석하였으며 필요한 경우 N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide 또는 methylboronic acid로 Trimethylsilylation 또는 Methane boronation 후 건조하였고 n-hexane 200 µL에 재용해 후 HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) 컬럼을 이용하여 유속은 1 mL He/min, on-column splitless injection, scan mode, oven temperature 60°C 2 min 머무름 후 250°C까지 5°C/min로 승온조작 후 250°C에서 12 min 머무름 조건으로 분석하였다.

배양액 중 *o, m, p-xylene*의 함량분석은 토양오염공정시험기준¹⁰⁾에 따랐으며 실험에 이용된 토양의 이화학적 특성 중 영양성분에 대한 분석은 EPA method 3015¹¹⁾에 따랐다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유류분해균주(*P. putida* BJ10)에 의한 xylene 분해 특성

유류 오염토양으로부터 분리, 배양된 탄화수소를 먹이로 하는 분해미생물(Hydrocarbon-degrading bacteria)인 *P. putida* BJ10을 이용하여 *o, m, p-xylene* 농도저감 및 탄소원으로서의 이용여부를 확인하기 위해 무기 영양배지 내에서의 *o, m, p-xylene* 함량변화 및 균체질량변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

분해균주에 의한 유효성을 확인하기 위해 분해균주를 주입하지 않은 무처리 일반배지(control)내 xylene 함량과 비교한 결과 *o, m, p-xylene* 모두 분해 미생물 주입실험 결과와 대조군간에 유효한 차이를 확인할 수 있었다. 각각 10 mg/L의 *o, m, p-xylene*은 유류분해균주인 *P. putida* BJ10에 의해 24시간 배양 후 0.6, 0.9, 0.1 mg/L로 저감되어 제거율은 각

Table 1. Physicochemical characteristics of soil used in bioventing

Soil texture	pH	CEC	EC	Organic matter	Moisture contents	MgO	CaO	K ₂ O	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅
		cmol (+) kg ⁻¹	µS cm ⁻¹							
Sandy clay loam	7.2	27.2	297.3	6.6	21.0	0.6	0.4	1.5	3.6	0.2

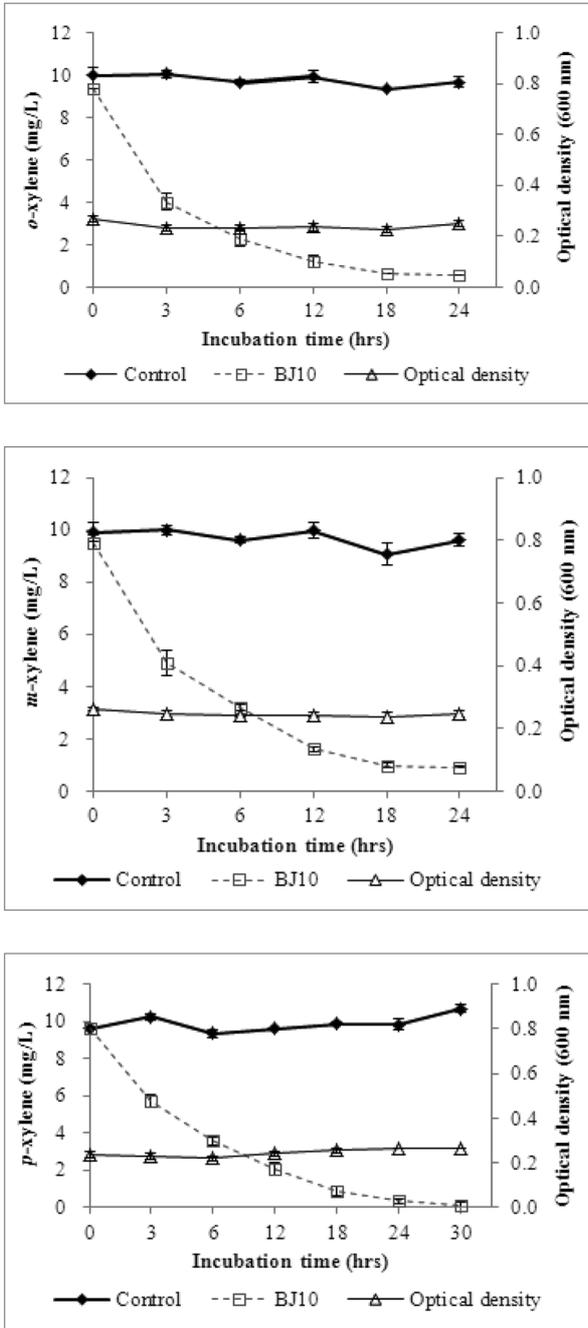


Fig. 1. Comparisons of o, m, p-xylene degradation by *P. putida* BJ10 and variation of biomass.

각 94, 90, 98%로 조사되었으나 분해균주 무처리 구간에서는 24시간 배양 전후 유효한 저감효과가 관찰되지 않았다. 24시간 경과후 균주의 증식여부를 조사하기 위해 600 nm 에서 전후 흡광도를 측정 한 결과 뚜렷한 증식효과를 확인 하지 못하였으며 이와 관련하여 Reineke¹²⁾는 toluene, xylene 대사과정에서 1차 변형된 후 형성되는 benzoic acid, methyl benzoic acid 등에 의한 대사저해작용에 대해 보고하였으며 Bickerdike와 coworkers⁹⁾는 2-methylbenzylalcohol, 2-methylbenzyl-aldehyde 그리고 3, 4-dimethylphenol에 의해 *Rhodococcus* sp. strain B3가 성장이 저해되었음을 보고하였다.

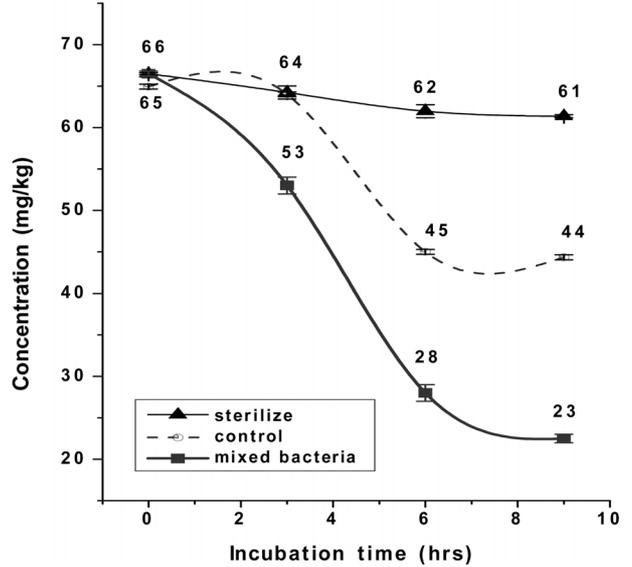


Fig. 2. Variation of residual xylene concentration in soil by gasoline degrading bacteria.

3.2. *P. putida* BJ10에 의한 유류오염 토양내에서의 xylene 분해 특성

유류(xylene)로 오염시킨 토양에 유류오염 토양으로부터 분리, 배양되어 탄화수소를 먹이로 하는 분해미생물(Hydrocarbon-degrading bacteria)을 이용하여 xylene의 분해 특성을 알아보기 위해 시간경과에 따른 토양 내 xylene 함량변화를 조사하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다.

분해균주에 의한 유효성을 확인하기 위해 멸균 토양(st-erilized soil)과 분해균주를 주입하지 않은 무처리 일반토양(control) 그리고 분해균주를 주입한 토양(mixed bacteria) 세 가지를 비교한 결과 혼합 분해 미생물 주입실험 결과 xy-lene의 제거율은 66%, 대조군 32% 그리고 멸균토양이 8% 로서 분해균주에 의한 xylene의 제거효율이 높게 나타났다. 또한 토양내 주입된 분해균주에 의한 xylene 분해효과가 통계적으로 유의한 여부를 알아보기 위해 통계 패키지(SPSS)에 의한 유효성검정(독립표본 t검정) 결과 Table 2에서와 같이 경과일 6일 이후부터 9일차까지 유의확률 0.000 ($p < 0.05$, Significant, 2-tailed)으로서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

멸균된 토양에서는 xylene 함량의 감소가 일어나지 않았으나 3~6일까지 멸균토양을 제외한 나머지 두 토양에서 xylene 함량이 급속히 감소하였다. 6일이 경과하면서 분해 양상이 달라져 분해균주를 주입한 토양에서는 계속 xylene

Table 2. The result of independent t-test for detecting differential removal efficiencies of xylene by *P. putida* BJ10 in gasoline-contaminated soil

Classification	Incubation time(day)	Control	Sterilize
		Significant (2-tailed)	
Mixed bacteria	6	0,000 ($p < 0,05$)	0,000 ($p < 0,05$)
	9	0,000 ($p < 0,05$)	0,000 ($p < 0,05$)

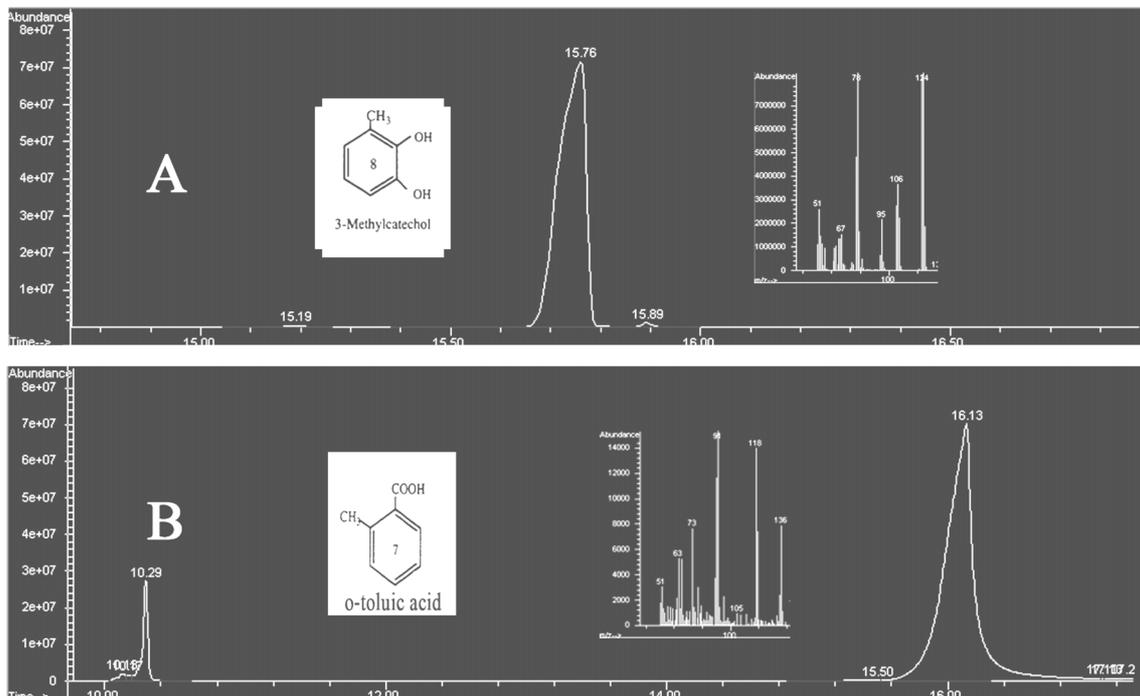


Fig. 3. Total ion chromatogram and spectrum of metabolites (A;3-methylcatechol, B;o-toluic acid) formed during a 24-h incubation of *P. putida* BJ10 with *o*-xylene. The inset shows the electron ionization mass spectrum and the fragmentation pattern of the metabolite at RT 15.76 and 16.13 min.

의 분해가 일어나고 있으나 분해균주가 주입되지 않은 control 토양에서는 xylene 함량의 감소가 멈추었다. 특히 초기의 급속한 xylene 함량 감소 이유는 높은 증기압과 헨리 상수(Henry's constant) 그리고 낮은 boiling point에 의한 것으로서 생물학적 분해보다는 휘발에 의한 영향이 더 지배적으로 작용한 것으로 판단된다.¹³⁾

탄화수소분해미생물(hydrocarbon-degrading bacteria)은 유기물질을 대사하여 이산화탄소와 물을 생산하게 되는 호기성호흡(aerobic respiration)에 산소를 이용하며 석유계 탄화수소(petroleum hydrocarbon)를 효과적으로 분해하기 위해 분해효율이 높은 많은 균이 필요한데 이때 이들의 대사과정(metabolic process)과 균체질량(bacterial mass itself)의 증가를 위해 산소를 필요로 하게 된다.¹³⁾

결과적으로 초기에는 xylene의 휘발을 방지하기 위한 조치가 필요하지만 휘발기능이 줄어드는 일정기간 후 적절한 산소 공급 과정을 부과함으로써 더 높은 xylene 분해효율을 얻을 수 있을 것이다.

3.3. *P. putida* BJ10에 의한 xylene 분해산물 및 대사과정

유류분해균주인 *P. putida* BJ10에 의한 xylene 분해에 대한 대사과정을 알아보고자 시간경과에 따른 대사산물을 분석해 보았다. *o*-xylene의 분해 경로에서는 6시간 경과 후 3-methylcatechol, 24시간 경과 후 *o*-toluic acid가 분해산물로 검출되었다(Fig. 3).

중간대사산물로서 3-methylcatechol이 형성된 후 xylene 고리 개환작용으로 생분해가 일어나 *o*-toluic acid와 같은 화

합물로 변형되며 탄소원 및 에너지원으로서 이용되는 것으로 보여지며 이는 Häggblom¹⁴⁾ 등과 유사한 조사결과를 보여준다. 반면 *Rhodococcus* sp. Strain DK17에 의한 *o*-xylene의 호기성분해 pathway⁶⁾에서 나타난 결과에서는 *o*-xylene이 2-methylbenzylalcohol로 전환된 후 중간산물로서 3-methylcatechol을 형성하였으나 본 연구에서는 3-methylcatechol로 바로 전환된 후 개환작용이 일어나 더 이상 분해가 일어나지 않는 *o*-toluic acid로 변화되었으며 gibson과 subramanian¹⁵⁾에 따르면 몇가지 *Norcardia* strain 들에 의해 직접 *o*-toluic acid로 변환되었다.

p-xylene과 *m*-xylene의 경우는 xylene monooxygenase에 의하여 methyl group의 단계적인 산화를 통해 분해가 이루어진다고 보고되어 있으나(Williams and Worsey)¹⁶⁾ 본 실험에서는 중간산물 및 최종산물로서 기존에 알려진 대사산물은 24시간의 배양기간 동안 검출되지 않았다. 하지만 *p*-xylene과 *m*-xylene의 농도저감(제거율)은 98, 90%로 확인되었으며 GC-MSD로 분석결과 배양기간 중 대사산물의 TIC (Total ion chromatogram)를 분석한 결과 알려져 있지 않은 미지의 물질이 생성되는 것으로 보여지며 수정된 유도체화 방법(Derivatization Method)의 적용과 변형된 검출방법을 적용해야 할 것으로 생각된다.

4. 결론

유류로 오염된 토양으로부터 분리된 고효율 분해균주 *P. putida* BJ10에 의한 유류성분의 분해효과를 확인하고 대사

경로를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) *P. putida* BJ10에 의해 MSM 배지내에서 24시간 배양 후 제거율은 *o*, *m*, *p*-xylene 각각 94, 90, 98%였으며 3% 이하의 대조군과 명확한 차이를 보였다.

2) 분해균주의 유효성을 확인하기 위해 멸균 토양, 무처리 일반토양 그리고 분해균주 주입 토양을 비교한 결과 xylene 제거율은 분해 미생물 주입 66%, 대조군 32% 그리고 멸균 토양 8%였으며 분해균주에 의한 유효성검정 결과 6일 이후부터 9일차까지 유의확률(Significant, 2-tailed) 0.000 ($p < 0.05$)로서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

3) 시간경과에 따른 대사산물을 분석한 결과 *o*-xylene의 분해 경로에서는 6시간 경과 후 3-methylcatechol, 24시간 경과 후 *o*-toluic acid가 분해산물로 검출되었다.

이상의 결과로 볼 때 토양내에서의 더 나은 제거 효율을 유지하기 위해 토성에 따른 적정 공기공급 외에 대사 과정에서 생성되는 독성 부산물에 대한 제어, 미생물에 필요한 토양 수분함량의 유지, 그리고 유기, 무기 영양성분의 적절한 혼합 등이 고려되어야 하며 xylene 대사과정의 조사를 위한 더 나은 분석방법과 세밀한 조사가 필요한 것으로 나타났다.

KSEE

참고문헌

1. Korea Ministry of Environment, "The investigation results of nationwide and local soil monitoring networks in 2006." pp. 1~35(2007).
2. Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I. and Jedidi, N., "Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions," *Soil Biol Biochem.*, **39**, 1926~35(2007).
3. Bento, F. M., Camargo, F. A. O. and Okeke, B., "Bioremediation of soil contaminated by diesel oil," *Braz. J. Microbiol.*, **34**, 65~68(2003).
4. Dockyu Kim, "Funtional Genomic Studies on Alkylbenzene Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17," Yonsei University., 94~110(2003).
5. Kim, D. Y., Kim, J. W., Jung, G. J., Zylstra, Y. M., Kim, S.-K., and Kim, E., "Regioselective oxidation of xylene isomers by *Rhodococcus* sp. strainDK17," *FEMS Microbiol.*, **223**, 211~214(2003).
6. Kim, D., Y.-S. Kim, S.-K. Kim, S. W. Kim, G. J. Zylstra, Y. M. Kim, and E. Kim., "Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17," *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3270~3278(2002).
7. Hudlicky, T., D. Gonzalez, and D. T.Gibson., "Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: expanding asymmetric methodology," *Aldrichimica Acta.*, **32**, 35~62(1999).
8. Arengi, F. L., M. Pinti, E. Galli, and P. Barbieri., "Identification of the *Pseudomonas stutzeri* OX1 toluene-*o*-xylene monooxy-genase regulatory gene (*touR*) and of its cognate promoter," *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4057~4063(1999).
9. Bickerdike, S. R., R. A. Holt, and G. M. Stephens., "Evidence for metabolism of *o*-xylene by simultaneous ring and methyl group oxidation in a new soil isolate," *Microbiol.*, **143**, 2321~2329(1997).
10. Korea Ministry of Environment, "ES 07601.2 The analysis of benzene, toluene, ethyl benzene and xylene in soil by gas chromatography with purge and trap." The Korea Standard Method for Soil Pollution, pp. 232~238(2009).
11. U. S. EPA., "Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts" Method 3015A, USA, pp.1~25(2007).
12. Reineke, W., "Microbial degradation of haloaromatic," *Ann. Rev. Microbiol.* **42**, 263~287(1988).
13. U. S. EPA., "Bioventing Principles and Practice," U. S. Government Printing Office via GPO Access, USA, **3**, 1~9(1994).
14. Häggblom, M. M., "Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds," *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 29~72(1992).
15. Gibson, D. T. and subramanian, V., "Microbial degradation of aromatic hydrocarbons," In *Microbial Degradation Organic Compounds*, Gibson, D. T. (ed.). Marcel Dekker, New York., pp.361~369(1984).
16. Worsey, M. J. and P. A. Williams. "Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas (putida (arvilla) [sic] mt-2*: evidence for a new function of the TOL plasmid," *J. Bacteriol.* **124**, 7~13(1975).