

A Study Bioremediation of Tidal Flat by Microorganism in Pilot Scale Test

Hye Jin Choi^{1,3}, Young Sun Han¹, Doo Hyun Park², Bo Young Oh¹, Myung Je Hur¹, Nam-Gyu Jo¹, Young Hee Kim¹ and Jong-Guk Kim^{3*}

¹Incheon Research Institute of Public Health and Environment, Incheon 400-101, Korea

²Department of Chemical and Biological engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

³Department of Life Sciences and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received July 7, 2014 / Revised August 25, 2014 / Accepted August 25, 2014

Tidal flats are continuously contaminated by human activities. This study assessed the bioremediation efficiency of tidal flat soil using microcosm reactors and microorganisms originating from the tidal area. We screened 135 bacterial strains that produce extracellular enzymes from the tidal area located in the North port of Incheon bay. Two bacterial strains (*Pseudoalteromonas* sp. and IC35 *Halothiobacillus neapolitanus* IC_S22) were selected and used in the microcosm reactors, which were specially designed to functionally mimic the ecological conditions of the tidal flats. *Pseudoalteromonas* sp. IC35 was selected based on its relatively high activity of the enzymes amylase, cellulose, lipase, and protease. *Halothiobacillus neapolitanus* IC_S22 was selected for oxidation of sulfur. The M1 and M2 microcosm reactors were operated by continuous feeding of seawater under the same conditions, but M2 was first inoculated with *Pseudoalteromonas* sp. IC35 before the seawater feeding. The initial COD in both the M1 and M2 microcosm reactors was 320 mg/l. The final COD was 21 mg/l (M1) and 7 mg/l (M2). The M3 and M4 microcosm reactors were operated by continuous feeding of seawater under the same conditions, but M4 was first inoculated with *H. neapolitanus* IC_S22. The initial sulfate concentration in both the M3 and M4 microcosm reactors was 660 mg/l, and the maximum sulfate concentration was 1,360 mg/l (M3) and 1,600 mg/l (M4).

Key words : Bioremediation, *Halothiobacillus neapolitanus* IC_S22, microcosm reactor, *Pseudoalteromonas* sp. IC35, tidal flat soil

서 론

갯벌은 육상과 해안의 중간지점으로 지형이 완만하고 조석 간만의 차이가 큰 곳에 형성된다. 이 지역은 수생생물의 산란 및 성장 장소가 되고 홍수예방, 해안선 침식방지 등 지리적으로 중요한 뿐만 아니라 육상의 하천과 담수로부터 유입되는 각종 유기물과 무기염류 등의 오염물질이 바닷물에 유입되기 전에 정화하기 때문에 생태기반의 물질순환을 위해 유용하다 [4, 14]. 갯벌에서의 조석과정을 거치면서 1차적으로 물리·화학적 흡착과 침강이 일어나고 세균이 생산하는 세포 외 효소에 의해 저분자 물질로 전환되면서 유기물의 수용화가 촉진된다 [10, 24]. 또한 종속영양세균의 호기성과 혐기성 호흡과 함께 발효에 의한 대사산물의 생성과 소멸과정에서 오염물질은 국지적 또는 광범위하게 분해될 수 있다 [11]. 따라서 갯벌 고유의

생태적인 물질순환기능을 유지하기 위해서는 오염원의 부하와 물질순환능력에 따른 자정능력의 균형을 유지하는 것이 중요하다 [3, 4].

인천 연안의 갯벌은 한강, 임진강, 예성강에 의해 육지에서 공급되는 담수와 바다에서 유입되는 해수가 혼합되는 반폐쇄형 지역으로 환경오염에 노출되어 있으며 생태계가 훼손되게 되면 복구되기 어려운 입지조건이다 [14]. 특히 북항은 중국과 근접한 지리적 이점을 이용하여 갯벌 일부를 매립하여 만든 항만으로 원유, 공산품 등 수도권의 물류량의 이동통로이고 석탄 부두, 시멘트 공장 등에서 발생하는 폐기물질에 의한 오염이 가중되어 갯벌 토양의 물질순환을 저해하여 악취가 증가하고 있다 [4, 13].

최근 친환경적으로 환경을 정화하고자 하는 노력으로 미생물을 이용한 생물정화기법(bioremediation)이 선호되고 있다. 이는 미생물의 세포 외 효소로 고분자 물질을 분해하고 세포 내 대사를 통해 저분자 물질로 이화할 수 있는 특정한 세균의 개체군 밀도를 증가시키고 이러한 미생물의 대사활성의 증가를 유도하여 생태계의 자정능력을 높이는 것이다 [19].

본 연구에서는 북항 갯벌에서 세포 외 효소를 생성하여 유기물을 분해하는 세균과 유황계 악취의 원인이 되는 황(S₀)을 산화하는 세균을 분리하여 오염된 갯벌 정화를 위한 생물학적 제재로서의 가능성을 평가하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5379, Fax : +82-53-955-5379

E-mail : kimjg@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

오염환경에 기능적으로 적응한 세균을 분리 배양하고 세균 고유의 생태적인 기능을 이용하여 환경을 정화하고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있지만 준 현장(pilot)규모의 처리시설이나 실제 현장에 적용하여 성공적인 결과를 얻은 예는 많지 않다. 이로 인해 특정 물질을 정화하는 세균을 분리 후 환경에 적용하고자 할 때 실험실의 조건과 현장의 조건이 달라 실제 생물체재 처리시 환경 적응력이나 정화력에 대한 과학적 검증이 부족하다.

이에 북항 갯벌을 이용하여 pilot scale의 갯벌 모형을 구축하여 북항에서 분리한 세균을 대량 배양 후 다시 microcosm 반응기에서 재현한 갯벌환경에 적용하여 세균의 생리적 생태적 기능이 실제 환경에 적용할 수 있는 수준으로 나타나는지 평가하였다. 또 real time PCR을 이용하여 주입한 세균의 생존력과 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand, COD), sulfate이온을 측정하여 집중한 세균의 생리적인 기능과 생태적인 자정능력의 상관성을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

인천 연안의 항구 근처에 있는 갯벌인 북항 갯벌(latitude: 37°29'28.07", 37°29'29.40", 37°29'44.40", longitude: 126°37'10.58", 126°37'10.10", 126°38'18.30")의 3지점에서 멸균 도구를 이용하여 표면으로부터 10 cm의 갯벌을 채취하고 아이스 팩에 담아 이동 후 실험실에서 균일하게 혼합하여 시료로 사용하였다.

환경 정화 세균 분리

유기물 분해 세균

10 g 갯벌시료를 0.85% 생리 식염수 40 ml에 넣어 1시간 동안 강하게 교반하고 단계 희석하여 희석액 100 µl를 marine (Difco, USA), mR2A (Difco, USA)배지에 도말하고 20°C에서 5일간 배양하면서 형태, 색상, 크기가 다양한 집락을 선택하여 순수 배양 한 후 유기물 분해 세균 분리에 이용하였다. 아밀라아제 생성 세균 선별을 위해 peptone 10 g/l, soluble starch 5 g/l sea salt 40 g/l, bacto agar 15 g/l의 평판배지에 분리한 세균을 도말하고 20°C에서 5일 배양 후 1 M I₂-KI를 점적하여 즉시 투명환을 이루는 세균을 선택하였다[6]. 셀룰라아제 생성 세균은 KH₂PO₄ 0.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/l, sea salt 40 g/l, agar 15 g/l를 멸균 한 뒤 실온에서 5시간 방치한 carboxymethyl cellulose 5 g/l를 첨가하여 만든 평판배지에 분리한 세균을 도말하고 20°C에서 5일 배양하여 0.1% congo red 용액으로 30분 염색한 뒤 1 M NaCl로 30분간 세척 시 투명환을 형성하는 세균을 선택하였다[18, 21]. 리파아제 생성 세균은 peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, sea salt 40 g/l, agar 15 g/l를 멸균한 뒤 여과한 tributylin 5 ml/l를 첨가하여 pH 7.4로 한 배지와 tryptone 1 g/l, yeast extract 0.5 g/l, sea salt

40 g/l, agar 15 g/l를 멸균 후 rhodamin B 0.001 g/l와 olive oil 1 g/l을 멸균하여 첨가한 배지에 분리한 세균을 도말하고 20°C에서 5일 배양 후 집락 주변에 환을 형성하는 세균을 선택하였다[2]. 프로테아제 생성 세균은 peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, sea salt 40 g/l, agar 15 g/l를 멸균 후 여과한 skim milk 20 g/l를 첨가하여 pH 7.0로 한 배지에 분리한 세균을 도말하여 20°C에서 5일 배양하여 투명환을 생성하는 세균을 선택하였다[16].

선별된 세균을 marine broth (Difco, USA)에서 20°C, 5일간 배양 후 원심분리(3,000 rpm, 10분)한 상등액을 조효소액으로 사용하였으며 조효소의 활성도는 매분 기질을 분해하여 1 µg의 생성물을 생성할 때 1 unit으로 하였다. 아밀라아제는 1% soluble starch를 tris-HCl buffer (pH 8.0) 50 ml에 녹인 기질용액 1 ml에 조효소액 0.2 ml를 가한 후 30°C에서 30분간 반응시키고 TCA (Trichloroacetic acid)용액 300 µl를 첨가하여 원심분리(9,000 g, 5분)한 상등액을 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 환원당 정량법을 이용하여 550 nm에서 흡광도 값을 통해 효소 활성을 측정하였다[6]. 셀룰라아제는 carboxymethyl cellulose를 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)에 1%로 녹인 기질용액 400 µl에 조효소액 400 µl를 가한 후 30°C에서 30분간 반응시키고 TCA용액 480 µl를 첨가하여 원심분리(9,000 g, 5분)한 상등액을 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 환원당 정량법을 이용하여 550 nm에서 흡광도값으로 측정하였다. 이때 아밀라아제와 셀룰라아제의 standard는 포도당을 이용하였다[18, 21]. 리파아제는 p-nitrophenyl-butyrate 10 µl, ethanol 40 µl와 50 mM tris-buffer (pH 8.0) 950 µl를 넣은 기질용액에 조효소액 500 µl를 가한 후 30°C에서 30분간 반응시키고 TCA용액 300 µl를 첨가하여 원심분리(9,000 g, 5분)한 상등액을 410 nm에서 흡광도 값으로 효소 활성을 측정하였고 standard는 p-nitrophenol을 이용하였다[2]. 프로테아제는 skim milk 0.6 g을 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 7.5)에 녹여 만든 기질용액 600 µl에 조효소액 120 µl를 가한 후 60°C에서 10분간 반응시키고 TCA용액 600 µl를 첨가하여 원심분리(9,000 g, 10분)한 상등액을 Lowry method로 정량하였다. 이때 standard는 tyrosine을 이용하였다[15, 20]. 효소 활성에 대한 비교 균주로 아밀라아제는 *Bacillus amyloliquefaciens* KACC10110, 셀룰라아제는 *Pseudomonas fluorescens* KACC10093, 리파아제는 *Pseudomonas aeruginosa* KACC10259, 프로테아제는 *Bacillus thuringiensis* KACC10184를 사용하였으며 농촌진흥청의 농업 유전자원센터에서 분양받아 실험하였다.

황산화 세균

KH₂PO₄ 2 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, NH₄Cl 0.4 g/l, MgCl₂ 0.2 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l를 멸균 한 뒤 Na₂S₂O₃·5H₂O 8 g/l, 1M glucose 0.1 ml/l를 필터하여 섞어 준 황첨가 최소배지를 이용하여 황산화 세균을 분리하였다. 분리한 세균은 0.01% 레자루린 지시약(resazurin sodium salt, Sigma Co., USA)이 첨

가된 최소배지를 이용하여 20°C, 7일간 배양하면서 배지색이 무색으로 변화하는 세균으로 선별하고 sulfate ion (Hach, USA) 실험을 통해 황산화 효소생성이 뛰어난 세균을 선택하였다.

세균 동정

16S rRNA를 이용한 분석

Genome DNA를 추출(DNA extraction, Cosmo_geneteck, Korea)하여 16S rRNA 염기서열의 분석으로 세균 동정을 위해 27 (F), 518 (R) 프라이머(10 pmol)를 각각 5 µl, 주형 DNA 5 µl, PCR premix 10 µl을 혼합물로 하여 총 20 µl를 핵산증폭기(2720 thermal cycle, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 증폭하였다(Table 1). 조건은 94°C에서 10분간 반응 후, 94°C에서 1분, 54°C에서 45초, 72°C에서 45초로 35회 반복 반응하고 72°C에서 10분간 추가 반응시켰다. 증폭된 유전자 산물을 pGEM T-vector (Promega, USA)에 ligation시킨 후 one-shot Top chemically competent cell (Invitrogen, USA)에 형질전환시켜 X-gal과 IPTG가 첨가된 Luria-Bertani 배지(Difco, USA)에서 colony를 선택하여 정제(Plasmid purification kit, Cosmo_geneteck, Korea)하고 Cosmo_geneteck (Korea)에 의뢰하여 유전자 분석을 하였다. 염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information) genbank의 유전자 데이터와 비교 분석하였으며 유사한 종(species)들과 염기서열 유사도를 확인하기 위해 Bio-Edit (ver, 7.2.3.)과 Phylogenetic tree version mega (ver, 5.2)를 이용하였다[12].

NCBI accession

Pseudoalteromonas sp. IC35 (KF804087)과 *Halothiobacillus neapolitanus* IC_S22 (KF804088)의 유전자를 분석하여 NCBI에 등록하였다.

Microcosm test

실험장치

실제 갯벌환경에서 세균에 의한 오염물질 제거 능력을 평가하기 위하여 400 mm × 600 mm × 500 mm 크기의 microcosm 반응기를 이용하여 Fig. 1과 같은 갯벌 모형을 구축하였다. 바

닥에 기울기를 이용하여 다양한 깊이의 갯벌 생태계와 비슷하게 구축하고 저질 상태를 복합 갯벌과 같게 하기 위해 갯벌을 직접 현장에서 채취하였다. 싸이폰(siphon)을 이용하여 조석간만의 효과가 나타나게 하고 펌프를 이용하여 유입되는 바닷물의 유량을 0.5 ml/sec의 속도로 일정하게 유입시켜 하루에 2번 조석이 일어나게 하였다. 시중 판매되는 천일염(white-mineral-rich salt)으로 3.5% 소금물을 만들어 주 1회 교환하여 바닷물이 순환하는 효과가 있게 하였으며 최소 배지를 주입하여 유기물이 유입되는 자연 환경과 유사한 조건을 만들었다.

Microcosm 반응기는 총 4대를 운영하였으며 유기물 분해 미생물의 환경정화능력을 측정하기 위해 유기물 최소배지만 접종한 대조군인 M1, 유기물 최소배지와 *Pseudoalteromonas* sp. IC35를 주입한 접종군 M2를 운영하였다. 그리고 황산화 미생물의 환경정화능력을 측정하기 위해 황첨가 최소배지만 접종한 대조군인 M3와 황첨가 최소배지와 *H. neapolitanus* IC_S22를 주입한 접종군 M4를 구축하여 동일한 환경에서 7일 단위로 8주간 측정하였다.

접종 세균의 대량 배양

유기물 분해 세균의 대량 배양을 위해 유기물 최소배지로 glucose 1.8 g/l, sodium acetate 0.6 g/l, K₂HPO₄ 0.1 g/l, NH₄Cl 0.2 g/l, soluble starch 1 g/l, K₂SO₄ 0.1 g/l를 멸균하여 연속 배양하였으며, 황산화 세균의 대량 배양을 위해 황첨가 최소배지를 이용하여 연속 배양하였다. 각각의 배지에서 20°C, 7일 동안 배양하여 원심분리(3,400 rpm, 30분)한 후 0.85% 생리식염수로 세척하고 M2에는 67×10⁶ cfu/l의 *Pseudoalteromonas* sp. IC35를, M4에는 64×10⁶ cfu/l의 *H. neapolitanus* IC_S22를 총 4회에 걸쳐 접종하고 접종 후 1주일 후 환경 변화를 측정하였다.

COD 및 황산화능 분석

바닷물이 순환하는 실제 갯벌과 유사한 환경을 위해 3.5% 소금물을 교환하고(1회/주), 교환 후 7일 동안 반응한 소금물에 대해 정화정도를 측정하였다. 유기물 분해 정도를 측정하기 위한 COD는 해양환경공정시험법의 과망간산알칼리법으로 1시간 동안 유기물을 분해시켜 소모된 KMnO₄의 양으로부터 유기물량을 계산하였고 환원성 황의 산화정도는 소금물 내 sulfate ion (Hach, USA)의 변화를 측정하였다.

Table 1. Primer sets used in the experiments

Name	Primer sequence (5'-3')	Probe (5'-3')	Target gene	References
27 (F)	GAGTTTGATCMTGGCTCAG		<i>Bacterial 16S rRNA</i>	[9]
518 (R)	WTTACCGCGGCTGCTGG			
Pse (F)	CGCCATCGGTATTCCTTCAG	TCTCTACGCATTTACAC	<i>Pseudomonas</i> sp.	From this study, [7, 8, 22]
Pse (R)	GAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAG			
Hne (F)	TGGCGGACGGGTGAGTAAT	CATGGGAATCTGCC	<i>Halothiobacillus</i>	From this study, [23]
Hne (R)	CCAACGTTATCCCCACCTA			

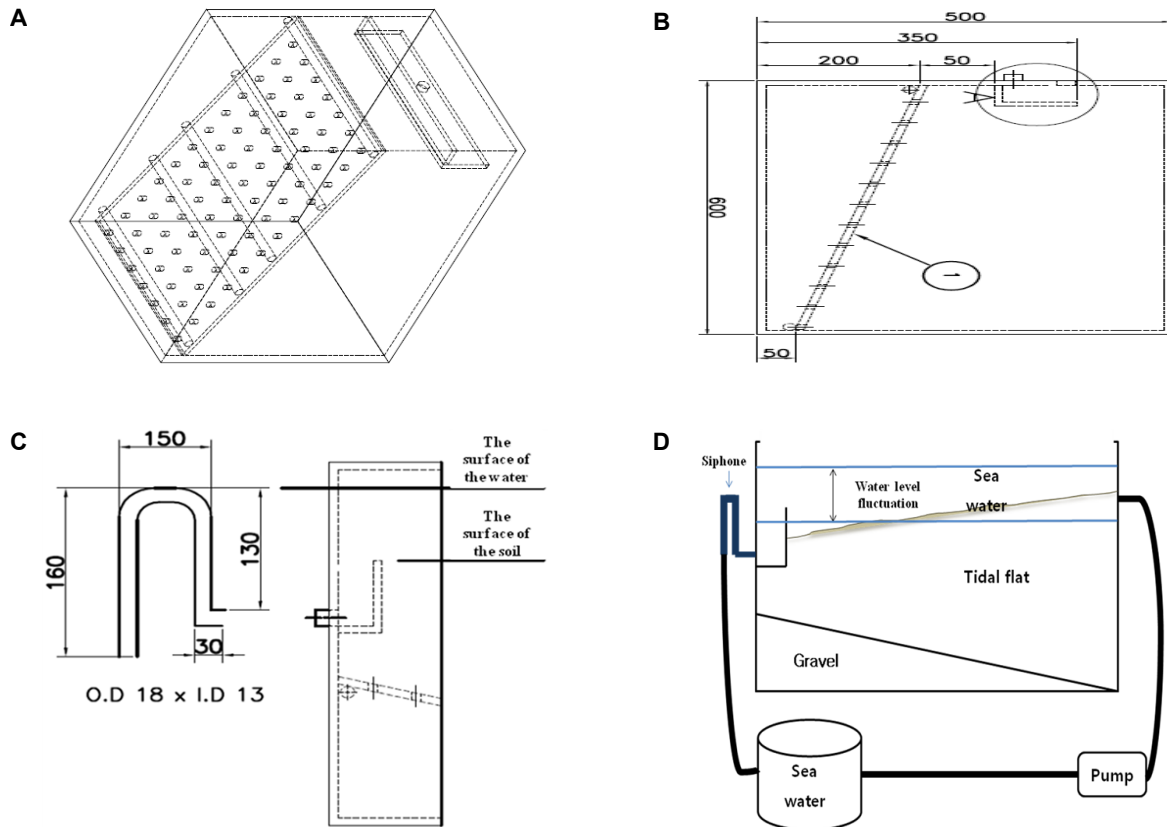


Fig 1. Schematic diagram of experimental system. A) tree dimensional a diagram, B) side view diagram, C) siphone apparatus diagram, D) pilot scale test system.

Real time PCR을 통한 정량 분석

Microcosm 반응기의 갯벌에서 DNA를 추출(Fast DNA Spin Kit for soil, MP, USA)하여 *Pseudoalteromonas* sp. IC35을 분석하기 위해 *pse* (F), *pse* (R)를 제작하여 사용하였으며 *H. neapolitanus* IC_S22 를 분석하기 위해 *hne* (F), *hne* (R)를 사용하였다[7, 8, 22, 23] (Table 1). Real time PCR 반응액은 *taqman* universal master mix with UMG 10 μ l, custom *taqman* gene expression probe 1 μ l, 주형 DNA 1 μ l, 3차 멸균 증류수 8 μ l을 혼합물로 하여 총 20 μ l를 7500 Fast& 7500 real time PCR (Applied biosystems, USA)를 이용하여 반응시켰다. Real time PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분 반응 후, 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분로 40회 반복 반응하였으며 Ct (threshold cycle)값은 형광커브와 역치선이 만나는 cycle값으로 분석하였다.

결과 및 고찰

생물학적 처리를 위한 세균 선택

유기물 분해 세균

북항 갯벌에서 순수 분리한 190균주 중 각각의 기질이 포함된 평판배지를 이용하여 아밀라아제, 셀룰라아제, 리파아제, 프로테아제를 생성하는 135균주를 선별하였으며 이들 중 2가

지 이상 기질에 교차로 활성이 좋은 균주 30균주를 분리하였다. 이들 균주 중 가장 활성이 좋았던 strain IC35는 기질이 포함된 평판 배지에서 기질을 분해하여 아밀라아제 48 mm, 셀룰라아제 36 mm, 리파아제 22 mm, 프로테아제 28 mm의 환을 생성하였다. 이는 아밀라아제 활성이 좋다고 알려진 *B. amyloliquefaciens* KACC10110가 50 mm, 셀룰라아제 활성이 좋다고 알려진 *P. fluorescens* KACC10093가 26 mm, 리파아제 활성이 좋다고 알려진 *P. aeruginosa* KACC10259가 12 mm, 프로테아제 활성이 좋다고 알려진 *B. thuringiensis* KACC10184가 43 mm의 환을 생성한 것과 유사하거나 우수하였다.

또 흡광도를 이용한 효소활성 측정에서 strain IC35의 아밀라아제, 셀룰라제, 리파아제, 프로테아제의 활성은 Table 2에서 보는 바와 같이 각각 169.3 unit/ml, 107.3 unit/ml, 13.2 unit/ml, 132.0 unit/ml였다. 이는 *B. amyloliquefaciens* KACC10110의 아밀라아제(159.2 unit/ml)활성, *P. fluorescens* KACC10093의 셀룰라아제(68.5 unit/ml)활성, *P. aeruginosa* KACC10259의 리파아제 (12.2 unit/ml)활성, *B. thuringiensis* KACC10184의 프로테아제(132.7 unit/ml)활성에 비해 상대적으로 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었다(Table 2).

네 종류의 세포 외 효소의 활성이 우수했던 strain IC35의 16S rRNA의 염기서열 분석결과 *Pseudoalteromonas* sp.

Table 2. Measurement activity of extracellular enzymes, amylase, cellulose, lipase, protease.

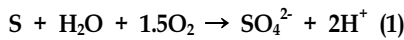
Species	Kind of enzyme	Diameter of clear zone* (mm)	Activity of extracellular enzyme (unit/ml)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. IC35	Amylase	48	169.3
	Cellulase	36	107.3
	Lipase	22	13.2
	Protease	28	132.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> KACC10110	Amylase	50	159.2
<i>P. fluorescens</i> KACC10093	Cellulase	26	68.5
<i>P. aeruginosa</i> KACC10259	Lipase	12	12.2
<i>B. thuringiensis</i> KACC10184	Protease	43	132.7

*The sizes are given as diameter.

(JQ082185)와 유전적 유사도가 가장 높았다(Fig. 2, A).

황산화 세균

에너지원으로 무기 황(S₀)이 첨가된 최소배지에서 황을 산화하는 생리적인 기능을 갖는 31균주를 순수 분리하고 레자주린 지시약(resazurin sodium salt)을 이용하여 산화, 환원 상태를 측정하여 황산화력이 좋은 13균주를 선별하였다. 이들 균주들의 배양액을 이용해 환원성 황을 기질로 sulfate ion을 생성하는 정도로 황산화능력을 측정하였다.



황산화 능력이 좋았던 strain IC_S22 배양액의 sulfate ion의 값은 1,200 mg/ml이었고 황첨가 최소배지의 sulfate ion의 값이 2 mg/l이었다.

이 균주의 16S rRNA의 염기서열은 Fig. 2와 같이 *Halothio-bacillus neapolitanus* strain C2 (NR074679)와 유전적 유사도가 가장 높았다(Fig. 2, B).

Microcosm test

이화학적 분석

분리한 균주를 직접 깻벌 토양에 적용하였을 때 정화능력을 측정하기 위해 실제 복합 깻벌을 이용한 microcosm 반응기 (M1, M2, M3, M4)를 구축하였으며 이 중 유기물 분해 미생물에 의한 환경적 변화를 측정하기 위한 대조군 M1과 접종군 M2를 이용하였다. M1과 M2 반응기의 최초 COD값은 320 mg/l이었으며 접종 직후(initial inoculation)부터 3차 접종(21일째)까지는 COD값이 급감하였으며 최종적으로 대조군인 M1의 COD는 21 mg/l, 접종군인 M2의 COD는 7 mg/l로 모두 감소하여 생태계에 존재하는 기존의 세균 군집에 의해서도 유기물의 분해가 활발하게 이루어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3, A). 그러나 *Pseudoalteromonas* sp. IC35를 주입한 M2 반응기에서 대조군 M1 보다 COD의 감소속도도 빠르고 최종값도 더 낮아 주입해준 균주가 환경 정화 작용을 촉진하는데 기여하였을 것이라 사료된다[5].

무기 황(S₀)을 기질로 성장하는 균주의 환경 적응력을 실험

하기 위해 대조군 M3와 접종군 M4를 이용하였다. M3와 M4 반응기의 초기 sulfate ion 초기농도는 660 mg/l이고 21일째 M3 반응기의 sulfate ion 농도의 최고값은 1,360 mg/l, M4 반응기에서 sulfate ion농도의 최고값은 1,600 mg/l까지 증가한 후 점차 낮아졌다(Fig. 3, B). 대조군과 접종군의 반응기에서 sulfate ion 농도의 변화 양상이 유사한 것은 COD와 같이 황산화력이 있는 균주가 기존 깻벌에도 존재함을 시사하며 이는 미생물 제재 처리에 따라 미생물 군집의 변화가 없으며 처리해준 균주에 의한 활성이 증가한 사전 연구와 유사한 결과였다[11, 17]. M4 반응기에서 최고값이 대조군에 비해 상대적으로 높은 것은 주입해준 *H. neapolitanus* IC_S22가 접종군 환경내 황산화 반응을 촉진하였을 것으로 사료된다. 또 최대값 이후 sulfate ion 농도가 감소하는 것은 microcosm 반응기에 적용한 깻벌의 무기 황의 함량이 Ks값 이하로 감소하여 세균의 대사활성을 제한하는 원인으로 작용하였기 때문으로 판단된다.

Real time PCR에 의한 생물량 측정

Real time PCR방법은 특정 유전자의 상대적인 정량이 가능하므로 특정 환경에 서식하는 세균의 생물량을 측정하는데 효과적이라 알려져 있다[6, 7]. Table 1의 프라이머를 이용하여 M1, M2 깻벌에서 *Pseudoalteromonas* sp. IC35와 M3, M4에서 *H. neapolitanus* IC_S22의 상대적인 생물량을 측정하였다[7, 8, 22, 23]. Real time PCR에서 형광커브 값과 역치선이 만나는 Ct (cycle threshold)값을 기준으로 깻벌에 존재하는 세균량을 결정할 수 있는데, Table 2에서 보는 바와 같이 최초 Ct값은 모든 microcosm 반응기에서 30 cycle 이상이고 대조군(M1, M3)의 Ct값은 실험이 종료되는 시점까지 지속적으로 30 cycle 이상이다[7, 9]. 접종군(M2, M4)에서는 시간의 흐름에 따라 cycle의 횟수 변화가 있었으나 4회에 걸친 지속적인 균주 주입 후 M2와 M4에서는 cycle 수가 최종적으로 안정화되었다. Ct 값으로 상대 정량 분석한 결과, *Pseudoalteromonas* sp. IC35는 초기에 M1 반응기에서 8.21 log copies, M2 반응기에서 7.98 log copies로 비교적 생물량이 상호 유사한 것으로 나타났으나

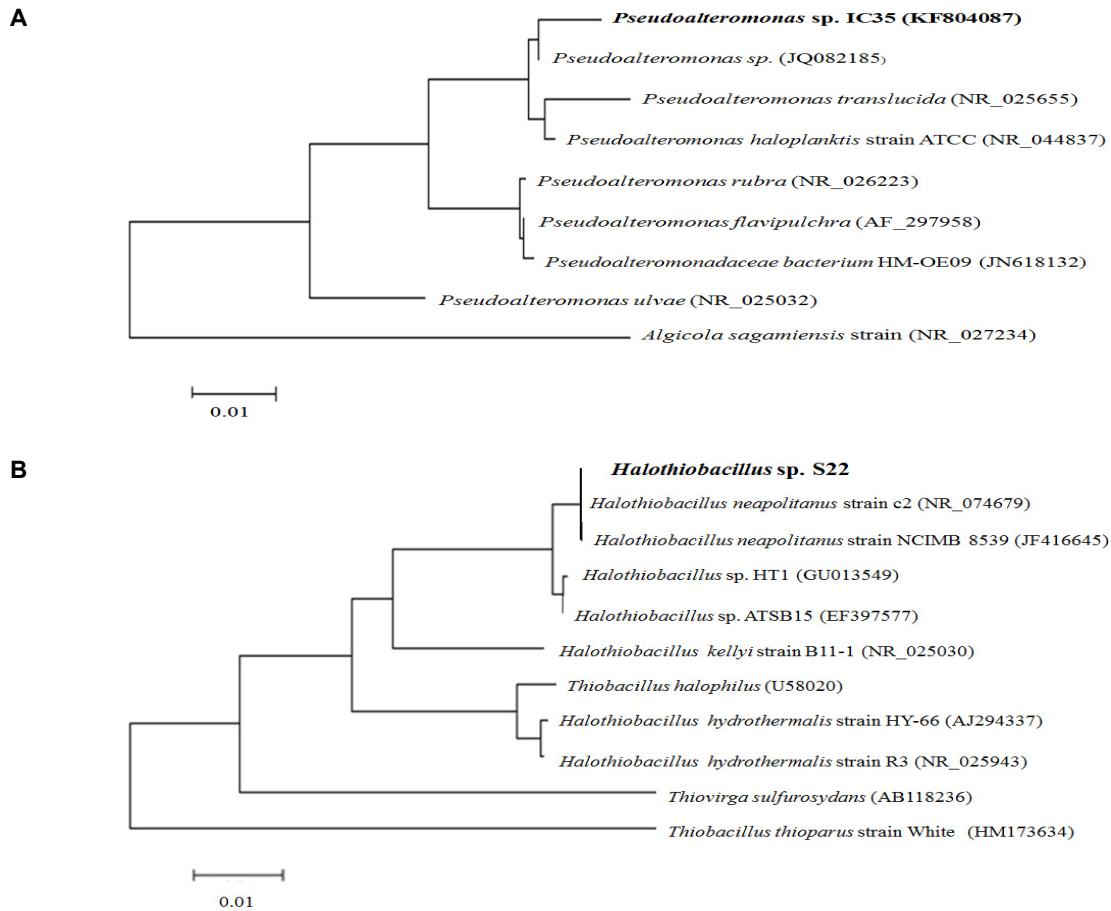


Fig 2. Phylogenetic relationships of the isolate *Pseudoalteromonas* sp. IC35 and *H. neapolitanus* IC_S22 other related bacteria based on the partial 16S rRNA gene sequence. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values (expressed as percentages of 10,000 replications) was shown at major branching points. A) phylogenetic tree of *Pseudoalteromonas* sp. IC35, B) phylogenetic tree of *H. neapolitanus* IC_S22.

Table 3. Quantitative analysis of *Pseudoalteromonas* sp. IC35 and *H. neapolitanus* IC_S22 using real time PCR

	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. IC35				<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> IC_S22			
	Ct (Cycle)		Log copy (log copies)		Ct (Cycle)		Log copy (log copies)	
	M1	M2	M1	M2	M3	M4	M3	M4
Initial inoculation	34.88	35.72	8.21	7.98	32.02	31.56	6.76	6.99
7 days ^{1)*}	33.84	19.84	7.55	11.84	36.68	16.27	5.87	12.41
14 days ^{2)*}	34.99	29.31	7.20	10.94	33.78	28.29	6.80	9.56
21 days ^{3)*}	32.99	21.20	7.81	11.42	37.97	24.74	5.46	9.69
28 days	35.84	23.23	6.94	10.80	35.32	23.22	6.31	10.18
35 days	35.12	24.53	7.16	10.40	35.68	25.23	6.19	9.54
42 days	35.38	25.12	7.08	10.22	35.94	25.98	6.11	9.30
49 days	35.94	25.32	6.91	10.16	35.21	26.06	6.34	9.28
56 days	35.77	25.3	6.96	10.17	35.37	26.11	6.29	9.26

*1) : 2 nd inoculation, 2) : 3rd inoculation, 3) : 4th inoculation

4회의 지속적인 세균 주입으로 최종적으로 M2 반응기에서 10.17 log copies로 microcosm 반응기에서 접종 세균의 생물량이 늘어났고 배지만 주입한 M1은 6.96 log copies로 감소하였다. *H. neapolitanus* IC_S22는 최초 대조군인 M3 반응기에서

6.76 log copies, 접종군인 M4 반응기에서 6.99 log copies를 가졌으나 최종적으로 황침가 최소배지만 주입한 M3 반응기에서는 6.29 log copies였고 4회 지속적인 세균 주입으로 M4 반응기에서는 9.26 log copies로 증가하였다. *Pseudoalteromonas*

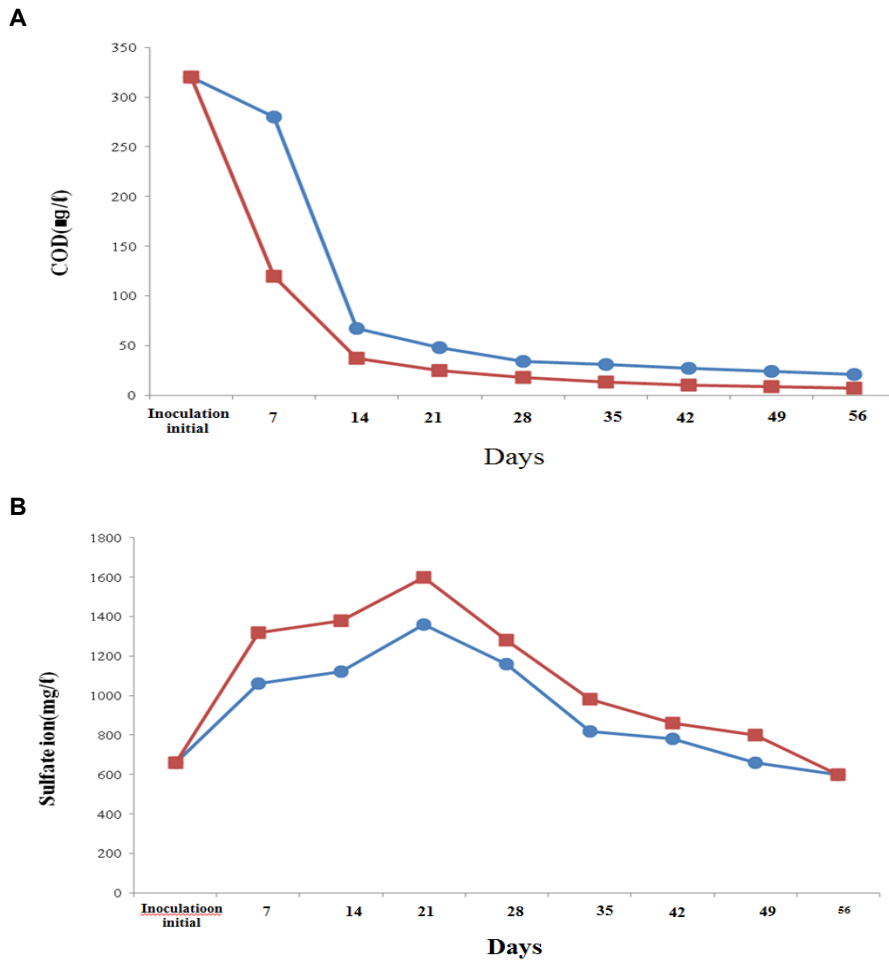


Fig. 3. Time series remove amount of COD and convert to sulfate ion. A) COD degradation by *Pseudoalteromonas* sp. IC35, (□): COD value of control group, M1, (●): COD value of treatment group, M2) B) Sulfate ion variation by *H.neaplitanus* IC_S22 (□: sulfate ion of control group, M3 (●: sulfate ion of treatment group, M4)

sp. IC35와 유사하게 *H. neapolitanus* IC_S22 또한 지속적인 주입으로 환경 내 생물량이 안정화 되었을 것으로 사료된다.

이번 연구는 인천 연안 갯벌에서 아밀라아제, 셀룰라아제, 리파아제, 프로테아제 생성 능력이 우수한 *Pseudoalteromonas* sp. IC35와 황산화능력이 뛰어난 *Halothiobacillus neapolitanus* IC_S22를 분리하고 갯벌과 유사한 모형인 microcosm 반응기를 구축하여 COD와 sulfate ion의 변화를 측정하였다. 그 결과 갯벌에서는 기존의 세균 군집의 생태적인 기능에 의해 유기물이 분해되며 황산화 작용도 일어나고 있지만 대사활성이 우수한 균주를 추가적으로 접종하여 그 활성이 증가한 것으로 사료된다. 그러나 microcosm 반응기에서 실험적으로 얻은 결과를 자연 생태계에서 재현하는 것은 복잡한 생지화학적 parameter를 lab scale과 pilot scale에서 정량적으로 산출, 적용해야 하기 때문에 이와 관련된 정보의 수집, 분석, 응용 및 관련 실험을 통한 지속적인 연구가 필요하겠다.

References

1. Bae, H. J., Cho, D. C. and Kwon, S. H. 2010. Enviro-chemical changes in shoreline sediment by MgO₂ for enhancement of ladiogenous microbial activity. *J Environ Sci Int* **9**, 617-625.
2. Bulow, L. and Mosbach, K. 1987. The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for and esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *FEBS Lett* **210**, 147-152.
3. Carling, P. A. 1982. Temporal and spatial variation in intertidal sedimentation rates. *Sedimentology* **29**, 17-23.
4. Capone, D. G. and Kiene, R. P. 1988. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol Oceanogr* **33**, 725-749.
5. Choi, D. C., Bae, H. J. and Kwon, S. H. 2012. A field research on mud flat remediation by biological treatment. *JKAIS* **13**, 3285-3294.
6. Choi, S. B. 2010. Isolation and identification of microorganism degradable organic compounds on seaside sediment. Ph. D. Dissertation. Konkuk University, Seoul.

7. Choi, Y. J., Kim, S. H., Gu, M. J., Hoe, H. N., Kim, D. U., Cho, S. B., Kim, S. K., Jeon, C. O., Bae, G. S. and Lee, S. S. 2010. Quantitative real time PCR Using *Lactobacilli* as live-stock probiotics. *J Life Sci* **20**, 1896-1901.
8. Dheilly, A., Soum, S. E., Klein, G. L., Bazire, A., Compere, C., Haras, D. and Dufour, A. 2010. Activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3452-3461.
9. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Waston, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **20**, 1026-1030.
10. Jakob, P., Glockener, F. O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R. and Amann, R. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic and archaea in a high mountain lake. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4299-4306.
11. Kim, Y. J., Kim, S. K., Kwon, E. J., Baik, K. S., Kim, J. H. and Kim, H. 2007. Microbial population diversity of the mud flat in Suncheon bay based on 16S rDNA sequences and extracellular enzyme activities. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **50**, 268-275.
12. Kang, D. O. and Suh, H. H. 2011. Isolation of microorganisms and Development of Microbial Augmentation for treatment. *J Life Sci* **21**, 554-560.
13. Kim, S. Y. 2006. The coastal environment change by the reclamation of tidal flats in Incheon city, west coast of central Korea. M.S, Korea National University of Education, Chung-Buk.
14. Lee, S. W., Je, J. G. and Lee, H. S. 2003. Tidal flat aspects of yellow sea area and conservation for migratory birds. *Korean J Env Eco* **17**, 295-303.
15. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
16. Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 650-663.
17. Martinez, J., Smith, D. C., Steward, G. F. and Azam, F. 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate repressing in the sea. *Aquat Microb Ecol* **10**, 223-230.
18. Miller, G. L., Blum, R., Gennon, N. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal Biochem* **2**, 127-132.
19. Prince, R. C. 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit Rev Microbiol* **19**, 217-242.
20. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Desphande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 597-635.
21. Schinner, F. and Mersi, W. 1990. Xylanase, cm-cellulase and invertase activity in soil an improved method. *Soil Biol Biochem* **22**, 511-515.
22. Skovhus, T. L., Ramsing, N. B., Holmstrom, C., Kjelleberg, S. and Dahllof, I. 2004. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2373-2382.
23. Veith, A., Botelho, H., Kindinger, F., Gomes, C. M. and Kletzin, A. 2012. The sulfur oxygenase reductase from the mesophilic bacterium *Halothiobacillus neapolitanus* is a high active thermozyyme. *J Bacteriol* **194**, 677-685.
24. You, S. J. and Kim, J. G. 1991. Evaluation of the purification capacity of pollutants in tidal flat. *J Korean Fish Soc* **32**, 409-415.

초록 : 환경정화 미생물에 의한 갯벌의 생물학적 정화에 대한 파일럿 규모의 연구

최혜진^{1,3} · 한영선¹ · 박두현² · 오보영¹ · 허명제¹ · 조남규¹ · 김용희¹ · 김종국^{3*}

(¹인천보건환경연구원, ²서경대학교 화학생명공학과, ³경북대학교 생명과학부)

갯벌은 영양염 순환과 오염물질 제거 등 환경적으로 가지는 의미가 크다. 이에 갯벌에서 아밀라아제, 셀룰라아제, 프로테아제, 리파아제를 생성하여 유기물을 분해하는 190균주를 순수분리하고 효소 활성 실험을 통해 그 중 활성이 좋은 균주를 선택하였으며 16S rRNA 유전자 분석을 통해 *Pseudoalteromonas* sp. IC35 (KE804087)로 동정하였다. 또 무기황(S₀)을 에너지원으로 하여 최소배지에서 생존 가능한 황산화 세균을 31균주를 순수 분리하고 sulfate ion을 측정하여 황산화능력이 뛰어난 세균을 16S rRNA 분석하여 *Halothiobacillus neapolitanus* IC_S22 (KE804088)로 동정하였다. 이렇게 분리한 균주들이 환경에서 활성을 가지는 지를 측정하기 위해 유기물 분해에 대해(대조군 M1, 접종군 M2)와 황산화능력에 대해(대조군 M3, 접종군 M4)의 microcosm 반응기를 각각 구축하였다. *Pseudoalteromonas* sp. IC35를 접종한 M1에서 비접종군인 M2에 비해 유기물 분해 효율이 증가되었으며 microcosm 반응기 내의 생물량도 증가됨을 확인하였다. *H. neapolitanus* IC_S22을 접종한 M3에서 비접종군인 M4에 비해 환원성 황(S₀)을 산화하는 능력이 상승되었으며 real time PCR을 이용하여 pilot 내에서 세균의 생물량이 증가함에 따라 초기 sulfate ion의 양도 증가함을 확인하였다. 이번 연구를 통해 대사활성이 우수한 균주를 부가적으로 환경에 접종함으로써 기존 세균 군집에 의한 환경정화 능력을 증가 시키는 것으로 사료된다.