

순천만 갈대근권 토양으로부터 얻은 PAH 분해세균의 특성 분석

김성현 · 강성미 · 오계현¹ · 김승일² · 윤병준³ · 강형일*

순천대학교 환경교육과, ¹순천향대학교 생명과학과, ²한국기초과학지원연구원 프로테오믹스,
³제주대학교 생명과학과

본 연구는 농업과 어업, 그리고 생태체험과 같은 인간들의 활동으로 인하여 상당히 영향을 받는 갯벌환경 중의 하나인 순천만을 모델장소로 갈대의 환경정화 기능에 있어 근권에 분포하는 미생물의 역할에 대한 기초 자료를 얻고자 수행하였다. 우선, 순천만의 갈대근권 토양을 시료로 하고 anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyrene 등이 첨가된 다환성 방향족 화합물(polycyclic aromatic hydrocarbons; PAH)을 탄소원 및 에너지원으로 하는 농화 배양을 통하여 두 개의 consortium 을 획득하였다. 두 consortium 으로부터 순수 분리된 우수한 PAH 분해능을 갖는 4개의 균주(SCB1, SCB2, SCB6, 그리고 SCB7)를 형태 및 생리학적 특성과 16S rRNA 유전자 서열을 기초로 분석한 결과 각 균주는 99% 이상의 신뢰도로 *Burkholderia* sp., *Alcaligenes* sp., *Achromobacter* sp., and *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. 주목할 만한 점은 *Burkholderia* sp. SCB1과 *Alcaligenes* sp. SCB2는 naphthalene이나 phenanthrene 보다 훨씬 안정되어 있는 구조의 anthracene이나 pyrene에서 더 빠른 성장률과 기질 분해율을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 반면, *Achromobacter* sp. SCB6와 *Pseudomonas* sp. SCB7은 pyrene을 제외한 다른 시험기질에 대하여 유사한 성장 및 분해패턴을 나타내었다. 이러한 결과는 주요한 염습지 식물중의 하나인 갈대의 근권에서 살아가는 이들 PAH 분해 균주들이 PAH와 같은 물질로 오염된 근권 환경의 정화작용에 중요한 역할을 할 수 있음을 제시해 주었다.

Key words □ PAH, *Phragmites communis*, reed rhizosphere, Suncheon bay

순천만은 한반도 가장 남쪽의 여천반도와 고흥반도를 양 옆에 끼고 있으며, 순천시내를 통과하는 이사천과 동천이 합류되는 지점에서 시작된다(Fig. 1). 따라서 순천만은 하천으로 유입된 많은 물질들이 바다로 흘러들어가지 전 거치게 되어 사람들의 활발한 활동으로 인한 영향이 매우 큰 곳이라 할 수 있다. 특히, 두 하천의 합류 지점으로부터 순천만의 갯벌 앞부분까지 전개되는 약 5.4 km²의 갈대군락은 전국에서 가장 넓은 면적으로 해마다 그 면적이 확대되고 있다(7). 갈대(*Phragmites communis*)는 군락을 이루어 자라기 때문에 큰 군락으로 이루어진 갈대밭은 육상생태계와 해양생태계를 연결하는 첫 번째 완충지대로서 두 생태계의 건전성 유지에 매우 중요한 역할을 한다. 갈대뿌리는 옆에 있는 식물 뿌리와 엮이면서도 깊고 넓게 퍼져가는 능력 때문에 어떤 식물보다도 유기물이나 중금속의 흡착능력이 매우 뛰어난 것으로 알려져 있다(4, 8, 11, 13, 14, 18, 21). 또한 갈대뿌리에서 방출되는 산소발생으로 수막이 형성되어 갈대근권의 환경을 호기성 및 혐기성 상태로 만들게 된다(4, 12). 이러한 사실은 갈대근권에서의 유기물 분해가 호기성 및 혐기성의 두 조건에서 살아가는 많은 미생물들에 의해 활발히 일어날 수 있음을 제시해 준다. 갈대의 환경정화기능은 갈대밭을 통과한 폐수 속의 오염물질이 뚜렷한 감소를 보인다는 사실에서 잘 드러나고 있다(11). 이

러한 갈대밭의 특성 때문에 중금속의 제거뿐 만 아니라 분뇨나 생활폐수를 처리하기 위한 생물학적 시스템을 개발하는데 있어 갈대밭을 응용하는 연구가 활발히 진행되어 왔다(18, 21). Daane 등(12)은 갈대근권의 토양에서 다환의 방향족화합물(polycyclic aromatic hydrocarbons)을 분해하는 세균을 분리하여 갈대식물과의 상호관계를 제시한 바 있다. 순천만 갯벌미생물에 대한 연구로는 미생물 군집에 관한 연구(6)와 셀룰로오스 분해에 관여하는 미생물에 관한 연구(3)가 있으나 오염물질 분해미생물에 관한 연구는 보고된 바가 없다.

본 연구에서 기질로 사용된 다환의 방향족화합물(polycyclic aromatic hydrocarbons; PAH)인 anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyrene 등은 BTEX와 같은 휘발성 유기물질과 더불어 환경 내에서 가장 많이 발견되는 오염물질 중 하나이다(Fig. 2). 이들은 2 개 이상의 환으로 구성된 물질로 물에 잘 녹지 않는 성질 때문에 쉽게 분해가 되지 않는다. 특히 이 물질들은 생산자에서부터 고차소비자에 이르는 먹이연쇄 과정을 통해 생물농축 현상을 나타내는 특성이 있는데 최종소비자인 사람에게 이르게 되면 인체에 치명적인 결과를 초래할 수가 있다(9, 10, 17, 22, 23). 위와 같은 PAH의 특성 때문에 많은 환경미생물학자들은 미생물에 의한 PAH의 분해와 환경에서의 동태에 관하여 상당한 관심을 갖고 연구해왔다. 본 연구에서는 최근 활발한 환경교육 장소로서 뿐만 아니라 생태 체험장으로 많은 사람들이 활용하고 있는 순천만 갯벌의 갈대근권으로부터 채취한 토양에서 환경오

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 061-750-3385, Fax: 061-750-3308
E-mail: kahng@sunchon.ac.kr

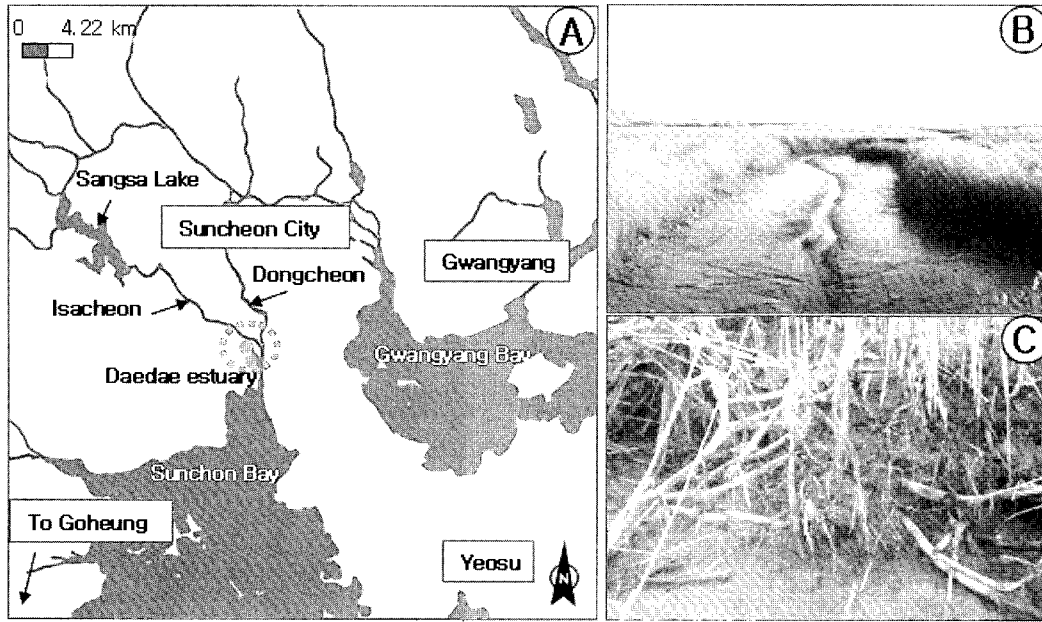


Fig. 1. The local map to Suncheon by (A), view of reeds in Suncheon bay divided by the stream way(B), the and unique structure of their roots (C). The two filled circles in the dotted diamond line of Panel A indicate the sampling spots (S-4, S-5) located immediately downstream of the meeting point of two streams Isacheon and Dongcheon.

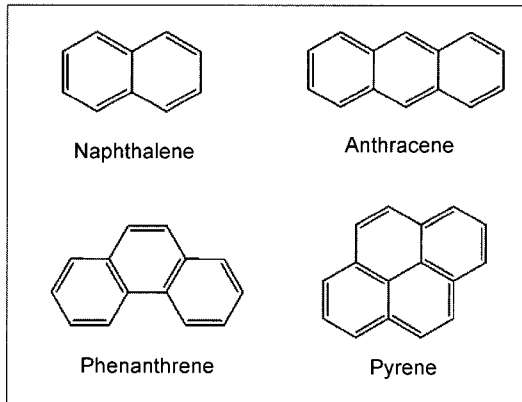


Fig. 2. Chemical structures of PAHs used in this study.

염의 주된 물질 중의 하나인 PAH를 분해할 수 있는 미생물의 존재와 분해능 정도를 파악하고 그 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

시료채집 및 토양분석

본 실험에서 장기간 농업과 어업 등 인간의 활동에 많은 영향을 받은 순천만 갈대밭 근권의 토양을 토양 표층으로부터 30~50 cm 퍼낸 후에 갈대 뿌리와 토양시료를 함께 채집하였다. 갈대 뿌리 근처의 토양시료 1kg을 멸균된 갈색 병에 담아 실험실로 옮겨 4°C에 보관하면서 본 연구를 위하여 사용하였다. 채집된 토양시료의 pH는 McLean의 방법(20)에 따라 수행하였고, 기타 토질분석은 이미 널리 사용되고 있는 방법에 따라 수행하였다

(2). 순천만 갈대밭 2개 지점(S-4, S-5)의 약 20~30 cm 정도의 깊이에서 시료를 채취하여 갈색 병에 옮겨 담았다. 채취한 시료는 사용할 때 까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

DAPI에 의한 총 세균수 측정

DAPI에 의한 세균 수의 측정은 Hobbie 등의 방법(15)에 기초하여 이루어졌다. 먼저 채취된 시료를 2% formalin으로 고정시킨 후에 편평한 곳에 1시간 동안 정치시켜 두었다. 10 ml 시험관에 formalin으로 고정된 시료 5 mL와 1 mL의 DAPI (1 µg/mL)를 첨가하여 가볍게 vortexing한 후 염색을 위해 10분 동안 배양하였다. 여과기구 위에 Nuclepore filters (0.2 µm pore size, 25 mm diameter)를 위치시킨 후에 시료를 2 mL 첨가하고 진공(< 10 mmHg)을 가하여 여과하였다. 현미경 관찰을 위해 immersion oil을 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린 후 그 위에 여과지를 위치시키고 다시 filter 위에 immersion oil을 떨어뜨리고 나서 커버글라스로 덮었다. 세균계수는 광학 현미경(Carl Zeiss vision GmbH Axioskop 40)을 사용하여 1000 배 배율로 20 fields를 관찰하였다. 세균계수를 위해 다음과 같은 식을 사용하였다. 총 세균수 (cells/mL) = A*B*(1/필터링한 시료의 양) (A, 각 field당 평균 세균 수; B, Nuclepore filters 넓이/격자 내 넓이).

농화배양을 통한 PAH consortium 및 단일균주 분리 및 분해능 측정

본 연구에서 사용한 배지는 BM(16), LB(19), TNB 또는 TNA 배지(16)로 실험목적에 따라 달리 사용하였다. 일반적인 영양배지로는 LB 또는 TNB배지를 사용하였고, PAH 분해세균은 순천만 갈대근권의 토양시료에서 농화배양법을 이용하여 분리하였다.

갈대밭 근권의 토양시료 10 g을 100 mL BM (0.10 g CaCl₂ · H₂O, 0.01 g FeCl₃, 0.10 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.10 g NH₄NO₃, 0.20 g KH₂PO₄, 0.80 g K₂HPO₄ in 1 L dH₂O; pH 7.0)배지 안에 PAHs (anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyrene)를 함께 넣고 30°C에서 2주 동안 배양하였다. 농화배양에 단일 기질로서 사용된 PAHs는 acetone에 10 mg/mL의 농도로 녹아있는 것으로 사용하였다. 배양 2주 후에 10 mL의 상층액을 새로운 BM배지에 넣은 후에 위에서 언급한 방법대로 2주 동안 더 배양을 한다. 이와 같은 과정에 의해 다양한 PAH를 분해할 수 있는 consortium을 얻었고 이 consortium으로부터 순수한 단일 PAH 분해세균을 분리하였다. 선별된 균주의 성장률 및 분해능의 측정 은 BM 50 mL에 유일한 탄소원 및 에너지원으로서 anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyrene이 첨가한 후 30°C 180 rpm shaking incubator에서 10일간 배양하면서 측정하였다. 1일 단위로 1 mL의 시료를 채취하여 UV-spectrophotometer (DU 800 UV/Visible, Beckman Coulter)를 이용하여 600 nm에서 OD값을 측정 후 성장률을 결정하였고, 분해능의 측정은 기존의 알려진 방법(23)에 따라 결정하였다.

형태학적 관찰 및 생리, 생화학적 특성 조사

선별된 PAH 분해세균에 대한 형태학적 관찰을 위하여 먼저 MacConkey 고체배지상에서의 성장여부 및 콜로니 색깔을 통해 순수분리를 재확인하였다. 확인된 단일 colony에 대한 Gram 염색을 하여 세균의 형태 및 배열상태를 광학현미경 및 전자현미경을 통해 관찰한다. 그 분해능이 입증된 균주의 기본적인 생리, 생화학적 특성은 BIOLOG System (Biolog, Hayward, Calif.)을 사용하여 밝히고, 보조적으로 NFT-API 20E를 사용하였다. 이외에 본 실험에서 분리한 PAH 분해세균이 다양한 항생제와 중금속 속 저항성을 가지고 있는지를 다양한 농도에서 시험하였다. 항생제 검사에서는 ampicillin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline을 첨가하여 사용하였고 중금속 검사에서는 Hg, Cd, Pb, Co, Fe, Ba를 첨가하여 사용하였다. 이 검사는 LB배지에 각각의 검사하고자 하는 물질을 농도별로 첨가하여 평판배지를 만들어두고 여기에 균을 도말하여 각각의 저항성을 알 수 있도록 하였다. 도말한 배지는 24시간동안 30°C 배양기에서 배양한 후 결과를 알아보았다.

Total Genomic DNA 분리과 정제

PAH 분해 세균으로부터 DNA의 분리는 이미 알려진 방법(17)을 부분적으로 변형하여 사용하였다. 배양한 균을 eppendorf tube에 담고 500 mM EDTA (pH 9.4)를 75 µL 넣어서 1분간 액체 질소에 담근 후 바로 60°C에서 녹이는 과정을 4번 반복하여 실시한 후 phenol/chloroform 용출기법을 이용하여 DNA를 수확하고 1% agarose gel 전기영동법으로 DNA를 확인하였다. Total genomic DNA의 정제를 위해 crude DNA를 10 mL cesium chloride용액에서 녹인 후 ethidium bromide를 첨가하고 102,200 ×g에서 20시간 동안 초원심분리하였다. 초원심분리후 total genomic DNA band를 회수하고 cesium chloride와 ethidium

bromide를 제거하기 위하여 0.02 µm membrane filter를 이용하여 30분간 투석하여 DNA용액을 회수하여 농축한 후 16S rRNA를 증폭하기 위한 표품으로 사용하였다.

PCR 증폭

분리된 균의 total genomic DNA에서 16S rRNA를 증폭시키기 위하여 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3')와 1522r (5'-AAG GAG GTG ATC MRC CGC A-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다양한 농도(10 ng~100 ng) DNA를 주형으로 사용하고 2.5 U Taq polymerase, 0.2 µM primers, 200 µM dNTPs, 10x 반응용액(10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg · mL⁻¹ BSA PH 8.3)을 첨가하여 최종부피를 50 µL로 하여 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 주기로 33번 반복하고 마지막에는 72°C에서 10분간 반응을 수행하였다. 1% agarose gel에서 전기영동을 하여 예상되는 DNA증폭산물을 확인하고, 16S rRNA clone을 만드는데 사용하였다. 기타 언급하지 않은 방법은 이미 알려진 방법에 따라 수행하였다(1).

16S rRNA sequencing 및 염기서열분석

회수된 PCR산물을 pGEM-T vector에 ligation 한 후 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 형질전환된 clone을 선별한 후 T7 promotor primer나 SP6 promotor primer를 이용하여 DNA sequencing을 수행하였다. DNA sequencing은 ABI 3100 자동염기서열 분석기를 이용하였다. 기타 언급하지 않은 방법은 Maniatis방법(17)에 따라 수행하였다. 밝혀진 염기서열의 분석은 Lasergene program (DNA STAR, Inc., Madison, WI, USA)과 GenBank의 blast search의 database를 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여, 이미 알려진 방법에 따라 Lasergene의 Megalign program을 이용하였으며, 이때 Clustal method에 기초한 분석한 방법을 따라 수행하였다(17).

결과 및 고찰

순천간 갈대밭 토질의 특성 및 DAPI에 의한 총 세균 수

본 연구에서 분리해낸 균주들은 순천시내를 관통하는 두개의 하천인 이사천과 동천의 합류지점에서 매우 가까이에 위치한 갈대밭에서 얻어진 것으로서 균주 SCB1과 SCB2는 S-4 지점의 토양에서 분리한 것이고, SCB6와 SCB7은 S-5 지점의 토양에서 분리한 것이다(Fig. 1). S-4의 토양은 8.38 µg P₂O₅/g, 0.647 µg PO₄/g, TOC 449.5 µg/g, TN 2486.24 µg/g, 5.151 µg NO₃⁻/g, 9.0 µg NH₄⁺/g로 모든 항목에서 높은 수치를 나타내었고 pH는 6.70으로 나타났다. S-5의 토양에서는 53.93 µg P₂O₅/g, 0.722 µg PO₄/g로 인산이 비교적 많이 함유되어 있는 것으로 보이며 그 외에도 TOC 348.5 µg/g, TN 1317.99 µg/g, 4.429 µg NO₃⁻/g, 7.2 µgNH₄⁺/g, 그리고 pH는 6.70으로 S-4와 마찬가지로 중성의 성질을 나타내었다. 세균계수는 광학현미경(Carl zeiss vision GmbH Axioskop 40)으로 1000×비율로 관찰하여 각 사이트마다 DAPI

staining 한 필터 내의 20 field를 계수하여 최고와 최저를 제외하고 18개의 평균으로 구하였고 100배 희석하여 최종 총 세균수를 구하였다. 갯벌에서 채취한 지역인 S-4와 S-5의 총 세균수는 각각 토양 1g 당 2.2×10^8 cells/mL와 2.4×10^8 cells/mL로 나타났다. 이러한 결과는 8개 지역의 평균값인 2.0×10^8 cells/mL과 유사한 수치의 결과로서 총 세 번의 반복실험에서도 일치되게 나타났다. 토양세균 수에 상당한 영향을 미치는 갯벌환경의 주요 소인 함수량에 있어 S-4와 S-5 지역은 모두 약 50~58%로 상당히 높게 나타났다. 이러한 결과는 안(5)에 의한 토양의 물리적 특성 및 수분조건에 따른 하반식물의 분포에 관한 연구에서 밝혀진 여의도 갈대가 분포한 토양의 함수량인 16.18%와는 상당한 차이가 있음을 보여주는 것으로, 본 연구에서 사용한 순천만 갈대밭의 토양이 이사천과 동천의 합류지점에서 가까운 지역의 갈대 근권에서 채집한 토양일 때문일 것으로 사료된다.

PAH 분해 세균의 분리 및 특성

장기간의 농화배양을 통해 얻어진 PAH consortium으로부터 수 개의 균주를 분리하고, 그 중 분해능이 가장 우수한 4 개의 균주를 선별한 후 각각 SCB1, SCB2, SCB6, 그리고 SCB7이라 명하였다. 이들 선별된 균주들은 모두 그람음성균으로 30°C에서 최적의 성장률을 보였다. 중금속(CdCl₂, HgCl, PbCl₂, 각 80 µg/mL; BaCl₂, FeCl₂, 각 1600 µg/mL)과 항생제(ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracyclin)에 대한 내성 실험을 수행하였다(data not shown). 항생제 내성의 경우, SCB1은 ampicillin에는 감수성을 나타냈으나 다른 시험한 항생제 모두에 대해서는 내성을 나타내었다. SCB6는 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin에는 내성을 나타내었으나 tetracyclin에는 감수성을 보였고, SCB7은 streptomycin에 대해서만 내성을 나타내었다. SCB2는 시험한 모든 농도의 항생제에 대한 내성을 나타내어, 최

근 가장 문제가 되고 있는 다약제 내성(multi-drug resistance; MDR) 균주인지를 파악하기 위하여 보다 다양한 항생제에 대하여 주의 깊게 조사할 필요성이 있는 것으로 사료되었다. 중금속 내성 실험결과, 균주 SCB1과 SCB2는 HgCl와 CdCl₂을 비롯한 시험한 모든 중금속에 대하여 내성을 나타내었다. SCB6와 SCB7은 모두 HgCl에는 감수성을 나타내었으나 다른 중금속에 대해서는 내성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합하면 균주 SCB2는 시험한 모든 항생제와 중금속에 내성을 나타내어 다른 항생제 및 중금속에 대하여 폭 넓게 조사할 필요성이 있는 것으로 보인다. 이외에 이들 균주에 대한 생리생화학 시험을 수행하였는데, 주요한 결과만을 Table 1에 나타내었다. 균주 SCB1은 다른 세 개의 균주에 비해서 보다 다양한 탄소이용능과 함께 nitrate reduction을 할 수 있 것으로 나타나 추후 혐기성 상태에서의 PAH 분해능 연구에 활용될 수 있을 것으로 여겨진다.

PAHs 배지에서의 세포성장률과 기질 분해능

유일한 탄소원으로 anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyrene을 500 ppm씩 각각 첨가한 네 종류의 BM배지에서 순수 분리된 균주를 30°C, 200 rpm 조건에서 배양시키면서 12시간만

Table 1. Physiological and biochemical characterization of PAH degrading bacteria from Suncheon bay

Characteristic	Reaction			
	SCB1	SCB2	SCB6	SCB7
Morphology	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	-	+
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
O/f	O	O	O	O
Vp	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Nitrate Reduction	+	-	+	-
Nitrite Reduction	+	-	+	-
Arginine Dihydrolase	+	+	-	+
Lysine Decarboxylase	+	-	-	-
β-galactosidase	-	-	+	-
Ornithine Decarboxylase	+	-	-	-
Tryptophane Deaminase	+	-	-	-
Urease	+	-	-	-
Gelatin Hydrolysis	-	-	-	-
H ₂ S Production	ND	-	-	-
L-arabinose	+	-	-	-
Citrate	+	+	+	+
α-D-glucose	+	-	-	+
m-inositol	+	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	-	-
L-rhamnose	+	-	-	-
D-sorbitol	+	-	-	-
sucrose	-	-	-	-

*ND indicates 'Not Determined'.

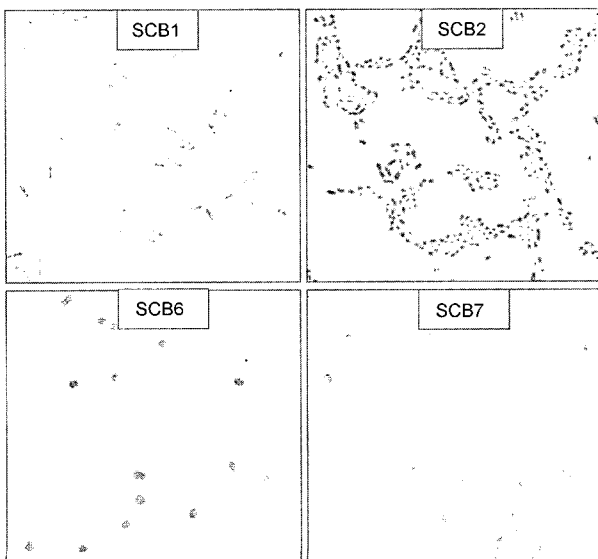


Fig. 3. Morphological features of four PAH-degrading bacteria from the reed rhizosphere of Suncheon bay.

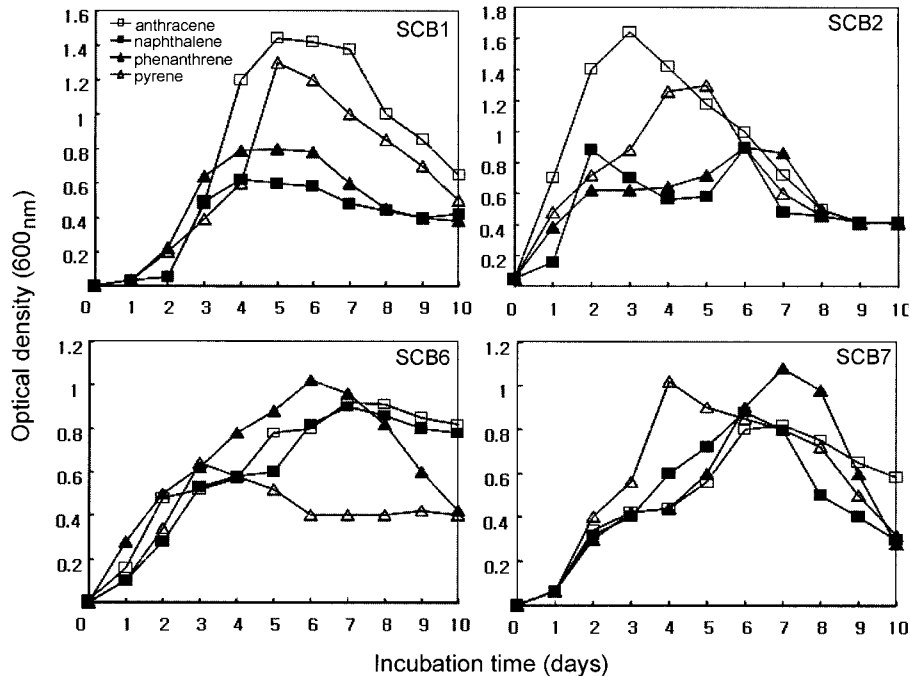


Fig. 4. Cell growth in PAH media by four strains (SCB1, SCB2, SCB6, and SCB7) obtained from PAH consortia using soils of the reed rhizosphere in Suncheon bay.

다 UV-spectrophotometer(DU Spectrophotometers, Beckman Coulter)을 이용하여 OD₆₀₀값을 측정하고 세포 성장률을 결정하였다(Fig. 4). 균주 SCB1과 SCB2는 anthracene과 pyrene에서 훨씬 빠른 성장패턴을 보여주었는데 OD₆₀₀값이 최대 1.2에서 1.4에 이를 정도로 기질이용능이 뛰어난 것으로 추측되었다. SCB1은 정상적인 성장을 위한 유도기간이 2일정도 소요되었으나 SCB2는 유도기 없이 빠른 성장양상을 보여주었다. 반면 이들 두 균주는 위의 화합물보다 간단하거나 분해되기 쉬운 구조를 하고 있는 naphthalene 또는 phenanthrene에서는 OD₆₀₀값이 최고 0.8이하로 2배 이상 낮은 성장률을 보였다. 특히 일반적으로 알려져 있는 유도기를 거치지 않고 빠른 성장률을 나타낸 균주 SCB2는 PAH 분해에 관련된 분해효소들을 암호화하는 유전자들의 발현시스템이 빠르고 효율적으로 이루어질 수 있도록 일정 이상의 관련단백질이 체내에 항상 존재해 있을 가능성이 높은 것으로 보인다. 이전 연구에서 naphthalene분해에 관련된 효소들은 유사한 대사 경로를 통하여 phenanthrene과 anthracene을 분해하는데 관여하는 것으로 보고한 바 있다(8, 9, 22). 그렇지만, Cigolini(10)는 pyrene과 phenanthrene을 분해하는 세균 *Mycobacterium* sp. strain PYO1이 naphthalene을 분해할 수 없음을 보고한 바 있다. 이러한 사실은 기본적으로 PAH에 속한 각 기질 들이 균주마다 혹은 그 균주의 서식 환경에 따라 생존할 수 있는 독특한 적응능력을 가지고 있음을 보여준다는 점에서 두 균주의 성장률에서 나타나는 독특한 성장패턴은 이와 관련되어 있을 것으로 여겨진다. 균주 SCB6는 anthracene과 naphthalene에서 성장률에서 약간의 차이가 있었지만 매우 유사한 성장패턴을 보였고, phenanthrene에서 가장 높은 성장률을 나타낸 반면 pyrene에서는 낮은 성장률

을 보였다. SCB7은 두 개의 환으로 된 naphthalene 또는 세 개의 환으로 구성된 phenanthrene보다 네 개의 환을 가진 pyrene에서 가장 빠른 성장률을 나타내었다. 이러한 결과들은 통상적으로 기질구조가 복잡할수록 분해하는데 따른 시간이 느리기 때문에 세포성장도 늦게 일어난다는 견해와 다른 것으로서, 기질의 구조보다는 오히려 그 기질의 분해에 관련된 효소의 발현 등 다른 조건들이 성장률에 상당한 영향을 미칠 수 있음을 제시해주었다. 각 균주에 의한 PAH분해능을 결정하기 위하여 5일 배양시간대에서 채취한 시료분석에서 SCB1과 SCB2는 70% 이상의 높은 anthracene 분해율을 나타낸 반면 naphthalene에 대해서는 분해율의 차이를 보여주었다(Fig. 5). 이러한 결과는 Fig. 4에 나타난 성장률과 상당히 일치함을 보여주는 것이다. 본 결과의 흥미로운 점은 본 연구에서 사용한 가장 복잡한 기질인 pyrene에서 성장률과 분해율이 SCB6을 제외한 모든 균주에서 가장 높게 나타난 것으로서 이들의 분해기작을 밝히기 위한 분자수준에서의 지속 연구가 이루어질 필요가 있는 것으로 사료된다.

PAH 분해 균주의 계통학적 관계

순천만 갈대근권에 분포하는 미생물 군집에는 최소한 *Stenotrophomonas*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* 등 10개 속에 포함되는 세균이 분포되는 것으로 나타났다(Data not shown). PAH를 기질로 사용한 장기간의 농화배양 및 순수배양을 통하여 획득한 균주는 SCB1, SCB2, SCB6, 그리고 SCB7 등 4종류이다. 이들 4 균주에 대한 16S rRNA clone에 대한 염기서열을 분석한 결과, PAH 분해균주인 SCB1, SCB2, SCB6, SCB7은 각각 *Burkholderia* sp., *Alcaligenes* sp., *Achromobacter* sp.,

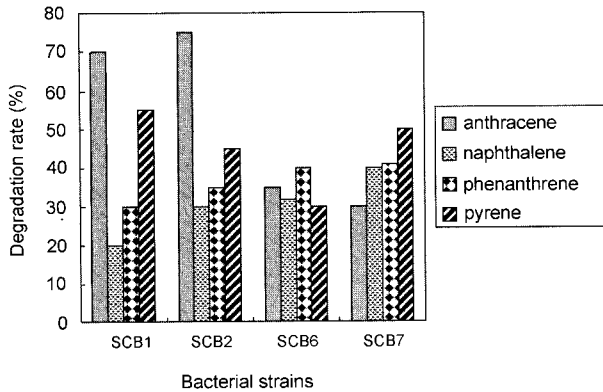


Fig. 5. Comparative analysis of PAH degradation rate by four strains (SCB1, SCB2, SCB6, and SCB7) obtained from PAH consortia using soils of the reed rhizosphere in Suncheon bay. The degradation rates were determined at 5 days' incubation time point by HPLC analysis.

Pseudomonas sp.로 동정되었다(Fig. 6). Fig. 6의 (A)에 나타난 계통학적 그림은 SCB1 16S rRNA의 1340 base pairs를 기초로 만들어졌으며 SCB1은 *Burkholderia anthina*와 99%의 높은 상동성을 갖는 것으로 나타났다. SCB2는 결정된 약 500 base pairs의 16S rRNA를 분석하였을 때 *Alcaligenes faecalis* 97% 이상의 상동관계를 나타내었다(data not shown). Fig. 6의 (B)에 나타난 SCB6의 계통관계는 1321 base pairs를 기준으로 만들어졌으며 *Achromobacter xylosoxidans*와 99%의 높은 상동성을 나타내었다. 1414 base pairs의 16S rRNA sequence를 기초로 분석한 SCB7은 *Pseudomonas putida*와 100%의 일치도를 보여주었다. 이러한 결과에 기초하여 각 균주의 명을 *Burkholderia anthina* SCB1, *Alcaligenes* sp. SCB2, *Achromobacter xylosoxidans* SCB6, *Pseudomonas putida* SCB7이라 명명하였다(Fig. 6). 본 연구를 통하여 분리된 4 종의 세균은 이 등(6)에 의한 순천만 갯벌의 미생물 군집구조 분석에서 밝혀지지 않았던 것으로 갯벌에서 PAH와 같은 방향족탄화수소를 제거하는 환경복원 전략을 마련

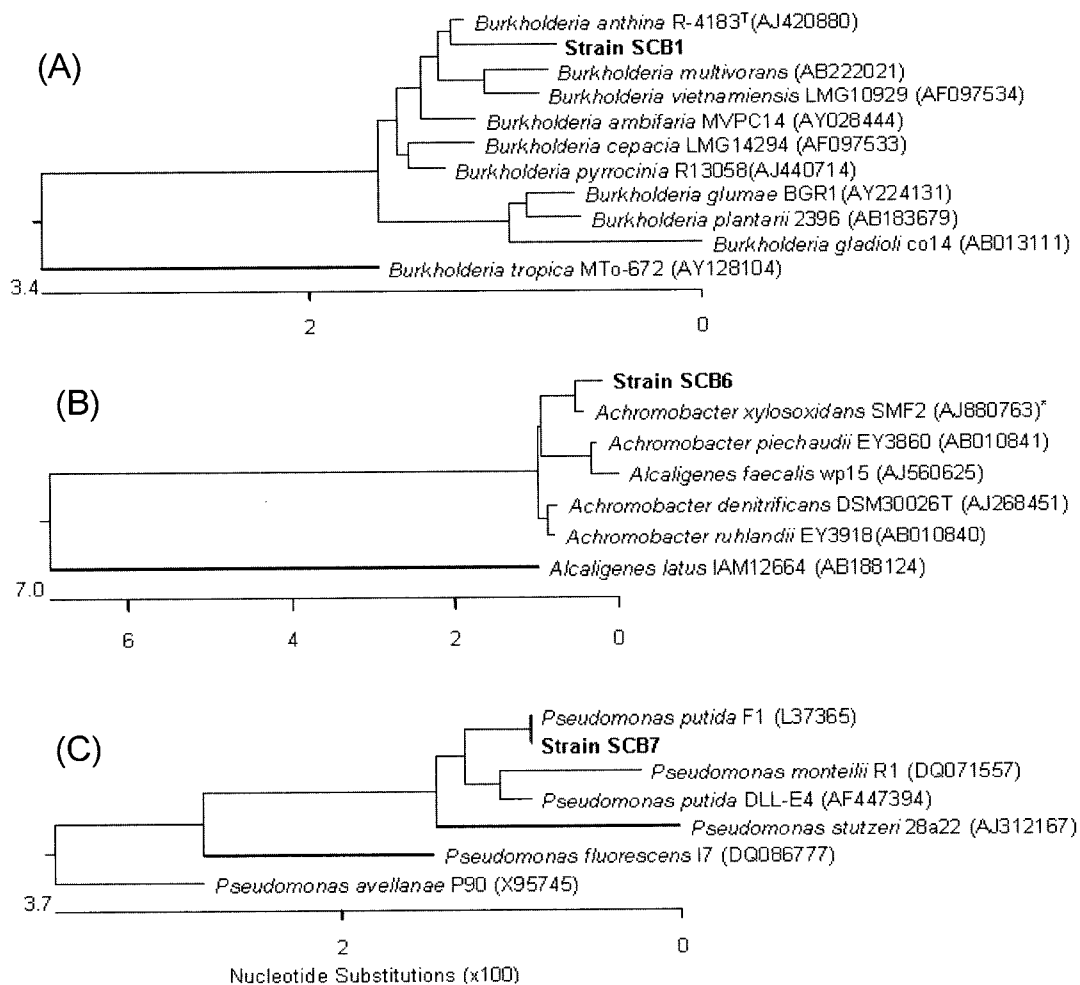


Fig. 6. 16S rRNA sequence-based phylogenetic tree of PAH-degrading bacteria SCB1, SCB2, SCB-6, and SCB7 (A) from reed rhizosphere of Suncheon bay. 1340 base pairs from SCB1, 1321 base pairs from SCB6, and 1414-bp from SCB7 were used to construct this dendrogram. The phylogenetic dendrogram for strain SCB2 was not demonstrated above due to short sequence information less than 500-bp though it was identified as *Alcaligenes* sp. The numbers within brackets indicate accession numbers from the GenBank data library.

하는데 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서 얻어진 PAH를 분해하는 4 개의 그람음성 세균, SCB1, SCB2, SCB6, 그리고 SCB7의 16S rRNA 정보는 GenBank data library에 모두 등록되었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-003-C00128).

참고문헌

1. 강봉조, 김미란, 윤병준, 이동현, 오덕철, 강형일. 2002. 제주연안 갯녹음(백화) 지역의 해수에 분포하는 세균군의 분자생물학적 분석. *미생물학회지* 38, 127-132.
2. 농촌진흥청. 1988. 토양화학분석법.
3. 백근식, 최지혁, 성치남. 2000. 순천만 갯벌 토양의 섬유소 분해능 및 체외효소 활성. *미생물학회지* 36, 130-135.
4. 심우섭, 한인섭. 1998. 울산지역에서 자생하는 갈대, 부들, 갈풀을 이용한 Reed-bed의 생활하수 정화능력 연구. *한국환경과학회지* 7, 117-121.
5. 안홍규. 2000. 토양의 물리적 특성 및 수분조건에 따른 하반식물의 분포 -토양환경과 식생과의 관계를 중심으로-. *한국조경학회지* 28, 39-47.
6. 이명숙, 홍순규, 이동훈, 김치경, 배경숙. 2001. 16S rRNA 유전자 분석에 의한 전남 순천만 갯벌의 세균 다양성. *미생물학회지* 37, 137-144.
7. 환경부. 1998. 서남해안 갯벌생태보고서. pp.108-124.
8. Begg, J.S., R.L. Lavigne, and P.L. Veneman. 2001. Reed beds: constructed wetlands for municipal wastewater treatment plant sludge dewatering. *Water Sci. Technol.* 44, 393-398.
9. Cerniglia, C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol.* 4, 331-338.
10. Cigolini, J.F. 2000. Molecular analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* sp. strain PYO1. Ph.D thesis, Rutgers, The State University of New Jersey.
11. Cooper, P.F., J.A. Hobson, and S. Jowes. 1989. Sewage treatment by reed bed systems. *J. Ins. Wat. Environ. Man.* 3, 60-74.
12. Daane, L.L., I. Harjono, G.J. Zylstra, and M.M. Haggblom. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2683-2691.
13. Farrell, R.E., C.M. Frick, and J.J. Germida. 2000. *PhytoPet*®: A database of plants that play a role in the phytoremediation of petroleum hydrocarbons. *Proceedings of the Second Phytoremediation Technical Seminar*, Environment, Canada, Ottawa, ON. pp. 29-40.
14. Gersberg, R.M., B.V. Elkins, S.R. Lyon, and C.R. Goldman. 1986. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands. *Water Res.* 20, 363-368.
15. Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper. 1997. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
16. Kahng, H.-Y., J.C. Mainverni, M.M. Majko, and J.J. Kukor. 2001. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 127-132.
17. Kahng, H.-Y., K. Nam, J.J. Kukor, B.-J. Yoon, D.-H. Lee, D.-C. Oh, S.-K. Kam, and K.-H. Oh. 2002. PAH utilization by *Pseudomonas rhodesiae* KK1 isolated from a former manufactured-gas plant site. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 475-480.
18. Kern, J. and C. Idler. 1999. Treatment of domestic and agricultural wastewater by reed bed systems. *Ecol. Eng.* 12, 13-25.
19. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1991. Molecular cloning-A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, N.Y.
20. McLean, E.O. 1982. Soil pH and lime requirement. in: methods of soil analysis, part 2: chemical and microbiological properties. 2nd edition. page, A.L., editor. American Society of Agronomy, Inc., Madison.
21. Obarska-Pempkowiak, H. and K. Klimkowska. 1999. Distribution of nutrients and heavy metals in a constructed wetland system. *Chemosphere* 39, 303-312.
22. Nam, K. and J.J. Kukor. 2000. Combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biodegradation* 11, 1-9.
23. van Agteren, M.H., S. Keuning, and D.B. Janssen. 1988. Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds. Kluwer Academic Publishers.

(Received August 9, 2005/Accepted September 9, 2005)

ABSTRACT: Characterization of PAH-Degrading Bacteria from Soils of Reed Rhizosphere in Suncheon Bay Using PAH Consortia

Sung-Hyun Kim, Sung-Mi Kang, Kye-Heon Oh¹, Seung-Il Kim², Byoung-Jun Yoon³, and Hyung-Yeol Kahng* (Department of Environmental Education, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ¹Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. BOX 97, Asan 336-600, Korea, ²Proteom Analysis Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea, ³Department of Life Science, Cheju National University, Jeju 690-752, Korea)

This study was accomplished in order to collect fundamental data on microbial roles in recycling process of reed rhizosphere. Suncheon bay, which is considered as one of the marsh and mud environments severely affected by human activities such agriculture and fisheries, was selected as a model place. In our initial efforts, two bacterial

consortia were obtained by enrichment culture using PAH mixtures containing anthracene, naphthalene, phenanthrene and pyrene as the sources of carbon and energy, and four pure bacteria capable of rapid degradation of PAH were isolated from them. Four strains designated as SCB1, SCB2, SCB6, and SCB7 revealed by morphological, physiological and molecular analyses were identified as *Burkholderia anthina*, *Alcaligenes* sp., *Achromobacter xylosoxidans*., and *Pseudomonas putida*, respectively with over 99% confidence. Notably, *Burkholderia anthina* SCB1 and *Alcaligenes* sp. SCB2 were found to utilize anthracene and pyrene more quickly than naphthalene and phenanthrene, whereas *Achromobacter xylosoxidans* SCB6 and *Pseudomonas putida* SCB7 exhibited similar growth and degradation patterns except for pyrene. These facts suggest that the rhizosphere microorganisms capable of PAH degradation might be used to clean up the contamination sites with polycyclic aromatic hydrocarbons.