

순천만 갈대의 근권으로부터 분리한 BTEX 분해세균 *Microbacterium* sp. EMB-1과 *Rhodococcus* sp. EMB-2의 생리학적 특성 분석

강성미¹ · 오계현² · 강형일^{1,*}

¹순천대학교 환경교육과, ²순천향대학교 생명과학부

Physiological Characterization of BTEX Degrading Bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 Isolated from Reed Rhizosphere of Sunchon Bay. Kang, Sung-Mi¹, Kye-Heon Oh², and Hyung-Yeol Kahng^{1,*}. ¹Department of Environmental Education, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea, ²Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-600, Korea – This study focuses on investigating roles of microorganisms in decontamination of reed rhizosphere in Sunchon Bay, Korea, which is considered one of the marsh and mud environment severely affected by human activities such as agriculture and fisheries. In general, the bay is known to play the role of the buffering zone to reduce the sudden impact or change by environmental stresses. In our initial efforts to elucidate the microbial functions in decontamination process in reed rhizosphere, pure bacteria capable of degrading aromatic hydrocarbons were isolated from reed (*Phragmites communis*) rhizosphere of Sunchon bay by enrichment culture using either benzene, toluene, ethylbenzene, or xylene (BTEX) as a sole source of carbon and energy. Measurement of the rates of BTEX degradation and cell growth during the incubation in BTEX media under several temperature conditions demonstrated maximized degradation of BTEX at 37°C in both strains. Both strains were also resistant to all the heavy metals and antibiotics tested in this study, as well as they grew well at 42°C. Identification of the isolates based on 16S rRNA gene sequences, and a variety of phenotypic and morphologic properties revealed that the two strains capable of BTEX catabolism were among *Microbacterium* sp., and *Rhodococcus* sp. with over 95% confidence, designated *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2, respectively. This result suggested that in the rhizosphere of reed, one of major salt marsh plants they might play an important roles in decontamination process of reed rhizosphere contaminated with petroleum such as BTEX.

Key words: Sunchon bay, reed rhizosphere, BTEX, *Phragmites communis*

순천만은 한반도 가장 남쪽의 여천반도와 고흥반도를 양 옆에 끼고 있으며, 상사호에서 이어지는 이사천과 순천시내를 가로지르는 동천이 합류되는 지점에서 시작된다고 할 수 있다(Fig. 1). 순천시내로부터 가까이에 있는 순천만은 사람들의 활동으로 인한 영향이 매우 큰 곳이라 할 수 있으며 하천으로부터 유입된 많은 물질들이 바다로 흘러들어가기 전 순천만을 거쳐서 가게 된다. 특히, 순천의 동천과 이사천의 합류 지점으로부터 순천만의 갯벌 앞부분까지 전개되는 약 5.4 km²의 갈대군락은 전국에서 가장 넓은 면적으로 해마다 그 면적이 넓어지고 있다. 갈대(*Phragmites communis*)는 그 높이가 1~2미터쯤 되며 일반적으로 만이 시작되는 지점에서 큰 군락을 이루어 자라기 때문에 육상생태계와 해양생태계를 연결하는 첫 번째 완충지대로서 육상 및 해양생태계에 미치는 영향

이 매우 큰 곳이라 할 수 있다. 갈대는 뿌리에서 산소를 방출하여 식물 뿌리로부터 2~3 mm 영역인 근권에 존재하는 미생물의 유기물 분해 활성을 촉진하는 효과가 있다고 알려져 있다[2, 6, 7, 9]. 또한 카드뮴, 납등의 중금속이 뿌리에 흡수된 후 축적되어 토양의 중금속량을 줄여준다고 알려져 있다[21].

일반적으로 널리 알려져 있는 갈대의 환경정화기능은 갈대밭을 통과한 폐수 속의 오염물질이 뚜렷한 감소를 보인다는 사실에서 잘 드러나고 있다[7, 9, 18, 22, 24, 27]. 이러한 갈대밭의 특성 때문에 중금속의 제거뿐만 아니라 분뇨를 처리하거나 병원성 미생물을 제거하기 위한 응용연구가 활발히 진행되어 왔다[3, 6, 9, 11, 16, 17, 23]. 보통 습지식물인 갈대와 부들은 뿌리줄기(rhizome)라는 독특한 뿌리구조를 하고 있어 가느다란 뿌리털 사이에 공기 이동의 통로가 있다. 앞에서 만들어진 산소는 줄기를 타고 뿌리줄기에 내려와 가는 뿌리로부터 방출되어 뿌리털 주위에 산소를 포함한 얇은 수막을 형성하게 된다. 이런 수막형성 부위는 일반 토양보다 호기성 미생물의 좋은 생육장소가 되고, 수막들 사이의

*Corresponding author

Tel: 82-61-750-3385, Fax: 82-61-750-3385

E-mail: kahng@sunchon.ac.kr

산소가 없는 부위는 또한 혐기성 미생물의 생육장소가 되므로 결과적으로 갈대가 자라는 습지대 토양은 여러 가지 미생물이 군집을 이루기에 매우 적합한 곳이라 할 수 있다 [25, 28]. Danne 등[7]은 갈대근권의 토양에서 다환의 방향족화합물을 분해하는 세균을 분리하여 이들 균이 염생식물의 근권환경과 밀접한 관계가 있음을 제시한 바 있다. 순천만 갯벌미생물에 대한 연구로는 미생물 군집에 관한 연구 [17]와 셀룰로오스 분해에 관여하는 미생물에 관한 연구 [2]가 있으나 본 연구팀이 파악하는 한 오염물질 분해 미생물에 관한 연구는 보고된 바가 없다.

본 연구에서 연구대상 기질로 사용된 단환의 방향족화합물인 benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes (BTEX) (Fig. 2)는 가솔린의 주요 성분으로 산업적으로 많이 사용되기 때문에, 환경 내에서 가장 많이 발견되는 오염물질 중 하나이다 [5, 8, 15, 18, 21]. 유류저장탱크의 균열로 인한 유류의 누출은 토양과 지하수 오염의 주원인으로 알려져 있고, 유류의 운반과정 중의 사고로 인한 해양오염은 해양환경을 악화시키는 가장 큰 원인이 되고 있어 토양환경이나 해양환경 학자뿐만 아니라 대기환경 과학자들에게도 상당한 관심이 대상이 되어왔다 [8, 15].

본 논문에서는 최근 활발한 환경교육 장소로 활용되고 있는 순천만 갯벌의 갈대 근권에서 채취한 토양에서 토양 및 해양오염의 주된 물질 중의 하나인 BTEX를 분해할 수 있는 미생물의 존재와 분해능 정도를 파악하고 기본적인 생리생화학적 특성을 분석함으로써 얻어진 기초 자료를 다음 응용연구를 위해 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

갈대근권 토양 시료의 채취 및 보관

조사 정점은 갈대군락이 갯벌에 연이어져 있는 매우 특이

한 환경조건을 갖춘 지역이다 (Fig. 1). 특히 이 지역의 강 하구에는 대규모의 갈대군락이 발달한 곳으로 근권 효과에 의해 육지에서 방출되어진 환경오염물질을 분해하는 다양한 미생물 군집이 존재할 것으로 생각되어지는 곳이다. 순천만 갈대밭 8개 지점(S-1~S-8)의 약 20~30 cm 정도의 깊이에서 시료를 채취하여 갈색 병에 옮겨 담은 후 사용할 때 까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

갈대근권 토질의 분석

갈대근권 토양시료의 pH는 McLean의 방법 [20]에 따라 수행하였고, 기타 토질분석은 아래에 언급한 방법에 따라 수행하였다. 함수량의 측정은 8개 지점의 채취한 토양시료의 수분함량을 조사하기 위하여 접시의 무게(M_1)를 잰 후, 1g의 토양시료를 취하여 증발접시와 시료를 합한 무게(M_2)를 정확히 잰다. 마지막으로 110°C로 유지되는 건조기 안에서 4시간 동안 완전히 건조시킨 후 무게(M_3)를 정확하게 잰 다음 함수율을 다음 식에 따라 측정 하였다. 함수율 = $(M_2 - M_3) / (M_2 - M_1) \times 100$ (M_1 =접시무게, M_2 =접시와 건조 전 원 시료의 무게, M_3 =접시와 건조 후 시료의 무게). 가급성 인산의 측정은 건조시킨 시료 2g을 삼각플라스크에 취하고 추출액 400 ml를 정확히 가하여 30분간 진동 혼합한 뒤 여과하여 여액을 얻는다(추출액: 황산 3 ml를 증류수 1 l에 주입한다 (0.125N). 이 액 20 ml에 황산암모늄 3 g을 가하고 증류수를 넣어 1 l에 맞춘다(0.0025N).). 추출한 여액을 Standard Methods의 Ascorbic acid법에 따라 발색시켜 880 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 총유기 탄소는 건조시킨 시료 10 g을 삼각플라스크에 취하고 증류수 100 ml를 정확히 가하여 1시간(200 rpm) 진동혼합한 뒤 여과지에 1차 여과하여 여액을 얻는다. 0.45 μ m filter로 2차 여과하여 SHIMADZU YNM TOC 분석기로 정량분석하였다. 질산성 질소의 측정은 건조시킨 시료 2.5 g을 삼각 플라스크에 취하고 증류수

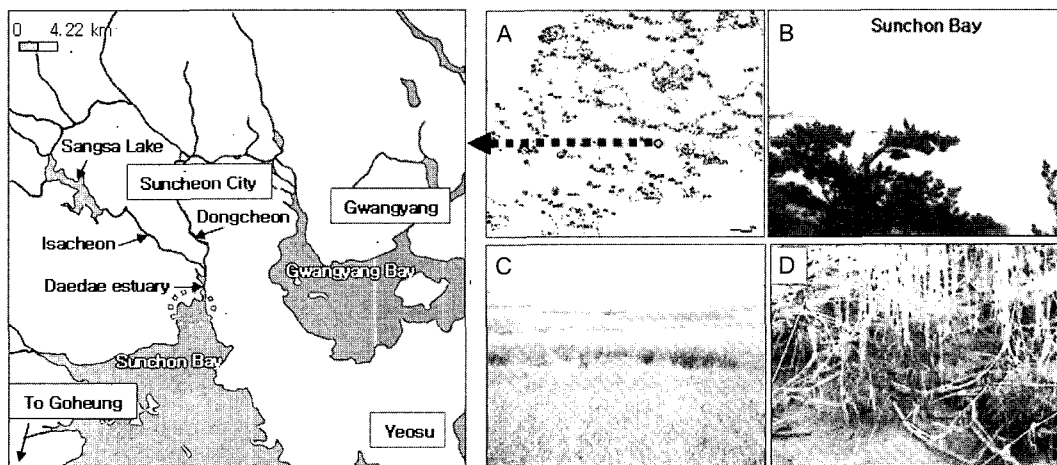


Fig. 1. Geographical location of Suncheon bay and its view with reed bed. The circle in the map indicates Suncheon bay located between Yeosu and Goheung (A). The map in the left panel is the enlarged one of the small filled circle in the right panel A. view of Suncheon Bay (B); reed bed in Suncheon Bay (C); and feature showing unique root structures of reed (D)

25 ml를 정확히 가하여 30분 동안 진동혼합 한 뒤 여과지를 이용하여 1차 여과한 뒤 0.2 µm filter를 이용하여 2차 여과한다. 추출한 여액을 Standard Methods에 따라 분광광도계를 이용하여 파장 220 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다. 암모니아는 건조시킨 시료 2.5 g을 삼각플라스크에 취하고 6% NaCl 25 ml를 정확히 가하여 30분간 진동혼합한 뒤 여과하여 여액을 얻는다. Standard Methods의 indophenol 법에 따라 630 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다. TN측정을 위해 Gerhardt 사의 Vapodeset 50 carousel-MIT Auto sampler를 사용하였고, 2% Boric acid 5 ml를 수기에 넣고, NaOH 6 ml, 증류수 5 ml를 시험관에 넣고, 시험관을 3분 30초간 증기로 끓인다. 0.01N 황산으로 적정하였다. 2 mm채를 통과시킨 시료 1 g을 분해병에 넣고 황산원액 25 ml를 가한 후에 분해 촉진제($K_2SO_4:CuSO_4=9:1$)를 5 g 넣고 켈달분해장치(Gerhardt 사)를 이용하여 분해한다. 분해조건은 200°C에서 30분, 300°C에서 30분, 400°C에서 2시간, 냉각 30분을 한 후 측정하였다.

DAPI염색에 의한 미생물 계수

DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)염색은 Hobbie 등의 방법[13]으로 수행하였다. 포르말린으로 처리한 sample에 formaldehyde를 10 ml 넣고 4°C에서 overnight 동안 방치한 다음 polycarbonate membrane에 관찰할 시료를 증류수 혹은 인산완충액에 1/10로 희석하여 2 ml 여과한다. DAPI (10 µg/ml)용액 1 ml를 여과한 polycarbonate membrane에 점적하여 10분 동안 염색한다. 현미경을 형광모드로 한 후, immersion oil을 처리하여 저배율에서 고배율로 관찰한다. 세균계수는 광학현미경 (Carl zeiss vision GmbH Axioskop 40)을 사용하여 1000X 배율로 관찰하였다. 각 사이트마다 DAPI staining 한 여과지내의 20 field를 계수한 후 최고와 최저를 제외한 18개의 평균값으로 결정하였고, 희석을 100 배하여 최종 총 세균수를 구하였다.

배지 및 농화배양

본 연구에서 사용한 배지는 BM[20], LB[26], TNB 또는 TNA배지[23]로 실험목적에 따라 달리 사용하였다. 일반적인 영양배지로는 LB 또는 TNB배지를 사용하였고, benzene, toluene 등의 기질분해능을 측정할 때는 휘발성인 기질의 특성을 고려하여 혈청병 (serum bottle)안에 준비된 BM배지에 실험기질을 첨가하여 사용하였다. 항생제나 중금속에 대한 내성시험에는 LB배지를 기본으로 시험 중금속 또는 항생제를 첨가하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 완충액으로는 TAE 와 TE buffer를 주로 사용하였다. 오염 토양 내에 존재하는 많은 미생물 중에서 BTEX(그림 2)를 분해할 수 있는 미생물만을 선택적으로 증식시키기 위하여 농화배양을 실시하였다. 채취한 시료 중 10 g을 멸균된 0.9% NaCl 100 ml에 첨가한 후 30°C, 180 rpm 조건으로 shaking

incubator에서 하루정도 진탕한 후 30분 동안 편평한 실험대에 놓아둔다. 농화배양을 하기 위해 무균대 안에서 정치시켜둔 0.9% NaCl 100 ml로부터 상층액 10 ml을 피펫으로 취하여 BM 배지(MSM: minimal salt medium)에 넣고 유일한 탄소원과 에너지원으로 BTEX(benzene, toluene, ethylbenzene, xylene)을 각각 최종 농도가 1 mM이 되도록 넣어 주고 30°C, 180 rpm인 조건인 진탕배양기에서 1주일간 배양하였다.

단일균주의 분리 및 우수 BTEX분해균주의 선별

최종 농화배양액의 100 µl를 noble agar가 첨가된 MSM 배지에 멸균된 삼각병을 이용하여 균일하게 도말하였다. 도말 접종된 MSM 고체배지에 1mM 농도로 만들어진 BTEX 기질을 각각 10 µl씩 주입한 Durham tube를 이용하여 증기 상태로 공급하면서 30°C에서 배양하였다. 또한 다른 MSM 고체배지에는 멸균된 백금이를 농화 배양액에 넣어 균이 묻도록 한 후 도말하여 같은 방법으로 BTEX 기질을 각각 10 µl씩 첨가하여 30°C에서 배양하였다. 배양기간 동안 뚜렷한 성장이 확인되는 균주를 선별하여 순수분리하고 보관균주를 만들어 -70°C의 냉동고에 보관하였다. 단일 탄소원 및 에너지원으로 각각의 BTEX기질 1 mM이 첨가된 50 ml MSM 배지에 순수 분리한 균주를 접종한 후 30°C, 180 rpm 진탕배양기에서 배양하면서 각 기질의 분해능을 6시간 주기로 HPLC를 이용하여 측정하였다. HPLC 분석조건은 이전 연구와 동일하게 수행하였다[15]. 성장률은 30°C 180 rpm shaking incubator에서 1 주일간 배양하면서 6시간 단위로 UV-spectrophotometer(DU 800 UV/Visible, Beckman Coulter)를 이용하여 600_{nm}에서 OD값을 측정하였다.

형태학적 관찰 및 생리, 생화학적 특성 조사

세균의 형태는 그람염색법으로 배양된 세균을 염색한 후 광학현미경하에서 1000배율로 관찰하였다. 선별된 균주에

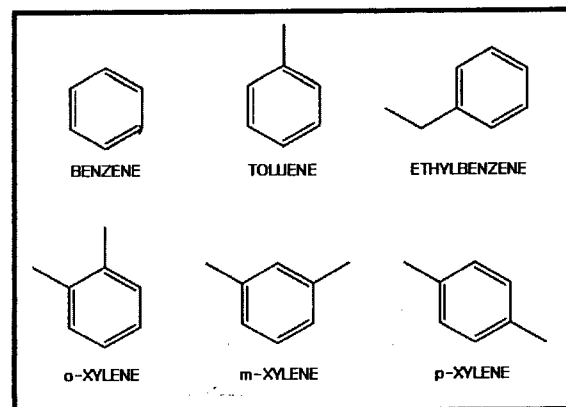


Fig. 2. Chemical structures of BTEX used in this study. The BTEX mixtures were used as substrates for obtaining a consortium and pure bacteria capable of BTEX degradation.

대한 여러 가지 중금속 및 항생제에 대한 내성 실험은 일반적으로 사용하는 LB배지에 목적으로 하는 중금속 또는 항생제를 다양한 농도로 첨가하여 성장량과 유무로 판별하였다. 항생제로는 ampicillin, tetracycline, kanamycin, streptomycin, chloramphenicol을 각각 다른 세 가지 농도로 LB배지에 첨가하여 선별된 균주를 접종하고 30°C에서 배양한다. 중금속은 수은(HgCl₂), 카드뮴(CdCl₂), 납(PbCl₂), 바륨(BaCl₂), 철(FeCl₂)로 항생제와 마찬가지로 같은 조건에서 실시하였으며 실험은 3회 반복하여 측정하였다. 기타 호기성 또는 혐기성 상태에서 성장여부는 AnaeroGen™(Oxoid, Hampshire, U.K.)을 이용하여 회사의 사용 지침에 따라 조사하였다.

BTEX분해 균주의 total genomic DNA분리 및 16S rRNA 유전자 증폭

BTEX 분해균주로부터 total genomic DNA는 Genomic Purification Kit(Promega, Madison, WI, U.S.A)를 사용하여 분리하였다. 분리한 total genomic DNA에서 eubacterial 16S rRNA를 증폭하기 위하여 27f(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1522r(5'-AAG GAG GTG ATC MRC CGC A-3') prime set을 사용하여 PCR을 수행한다. PCR 조건은 1 µl DNA를 주형으로 사용하고 2.5U Taq Polymerase, 0.2 µM primers, 200 µM dNTPs, 10X buffer(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µgml⁻¹BSA, pH 8.3)를 첨가하여 최종부피가 50 µl 되게 한 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 주기로 33번 순환한 후 최종 72°C에서 10분간 반응을 수행하였다. 증폭반응 후 반응액을 1.2% agarose gel에서 전기 영동하여 예상되는 DNA 증폭산물을 확인하고, 16S rRNA clonal library를 만드는데 사용하였다. 기타 언급하지 않은 방법은 이미 알려진 방법[15,29]에 따라 수행하였다.

PCR product의 회수 및 16S rRNA clone의 제조

Agarose gel로부터 PCR 산물의 회수는 이미 알려진 GeneClean II kit를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 수행하였다. 회수된 증폭산물 중 약 50 ng의 DNA와 pGEM-T vector system을 사용하여 제조회사의 지침에 따라 12시간 ligation 반응을 수행하였다. 형질전환은 ligation 반응액에 얼음에 냉각된 D.W 90 µl와 10 µl의 0.5M MgCl₂-0.1M CaCl₂ solution을 첨가하였다. 이 반응액에 연구실에서 이미 만들어진 수용세포 *E. coli* JM109 100 µl를 첨가하여 잘 섞은 후 30분간 얼음에 방치하였다. 이어서 반응액을 42°C 항온수조에서 열 충격을 정확히 90초 동안 가한 후 1 ml의 LB 배지를 섞고 37°C에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 이 배양액을 ampicillin(50 µg/ml), IPTG, 그리고 X-gal이 첨가된 LB 고체배지에 도말한 후 37°C 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 기타, 위에서 언급하지 않은 방법은 보편적으로 널리 쓰이는 방법[27]에 따라 수행하였다.

Plasmid DNA 분리 및 염기서열분석

형질전환체로부터 plasmid DNA의 분리는 QIAprep-spin Miniprep Kit을 이용하였으며 제조회사의 지침에 따라 수행하였다. 형질전환된 수많은 clone중 일부를 임의적으로 선별한 후 T7 promoter primer나 SP6 promoter primer를 이용하여 DNA sequencing을 수행하였다. DNA sequencing은 ABI 377 자동염기서열 분석기(Applied Biosystem Inc.)를 이용하였다. 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 분석방법에 따라 수행하였다[15].

결과 및 고찰

순천만 갈대밭 토질의 특성

순천만 갈대밭의 토양을 8군데로 나눠서 채취하였는데 S-1은 제방 근처 갯벌, S-2는 갈대밭 전지, S-3은 갯벌 갈대밭, S-4는 갈대밭 사이, S-5는 갯벌, S-8은 강하구 갈대밭에서 채취하였다. 각 항목에 대한 실험은 3번에 걸쳐 이루어졌으며 표에는 세 번 실험한 결과의 평균치를 나타내었다(Table 1). 본 연구에서 조사한 각 갈대 근권 지역의 pH는 6.5~6.9로 비교적 중성인 성질을 나타냈으나 가급성 인산을 비롯한 다른 항목에서는 시료채취지역에 따라 많은 차이점을 나타내었다. 가급성 인산의 경우 S-2지역에서 7.18 µg P₂O₅/g로 가장 적게 나타났으며 S-5 지역에서는 53.93 µg P₂O₅/g으로 S-2 지역의 약 8배 정도 높게 나타났다. 또한 TN과 NH₄의 양도 S-2 지역에서 가장 적었고 반면 갈대밭 사이에 위치한 S-4지역에서 가장 높게 나타나, 강한 유기물의 흡착능력을 보여주는 갈대근권의 특성과 유동성이 적은 환경으로 인한 결과로 여겨진다. BTEX 분해균을 분리한 S-8 지역 토양의 경우, 가급성 인산은 31.15 µg P₂O₅/g, 0.417 µg PO₄/g, TOC 384 µg/g, TN 1552.64 µg/g, 4.108 µg NO₃/g, 7.2 µg NH₄⁺/g로 다른 채취 토양의 중간정도의 값으로 나타났고 pH는 6.45로 가장 낮게 나타났다. 본 연구에서 사용한 8개 지역 갈대 근권의 토질은 90% 이상이 silt나 clay로 조사되었고 이는 Baik등[2]에 의한 순천만 갯벌 토질에 대한 분석결과와 일치함을 보여주었다.

DAPI에 의한 총세균수

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 회석을 100배하여 실시하여 최종 총 세균수를 구하였다(Table 2, Fig. 3). 갯벌에서 채취한 S-5의 총 세균수가 토양 1g 당 총 세균수 2.4×10⁸

Table 1. Characterization of soils collected from eight spots of reed bed in Sunchon bay.

Sampling spots	pH	Phosphorus		TOC	TN	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
		P ₂ O ₅	PO ₄				
S-1	6.90	33.28 ^a	0.444	256.0	1527.44	3.467	6.2
S-2	6.50	7.18	0.095	292.0	957.52	5.072	6.0
S-3	6.80	38.23	0.513	309.2	1536.77	5.712	6.8
S-4	6.70	48.38	0.647	449.5	2486.24	5.151	9.0
S-5	6.70	53.93	0.722	348.5	1317.99	4.429	7.2
S-6	6.70	50.18	0.711	322.0	1280.99	4.012	7.2
S-7	6.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-8	6.45	31.15	0.417	384.0	1552.64	4.108	7.2

^aindicates amount of µg per 1 gram of dried soil

cells/ml로 가장 많이 나타났고, BTEX 분해균을 분리한 S-8의 토양이 1.5×10^8 cells/ml로 가장 적게 나타났다. 그러나 총 세균수는 시료채취지역에 따라 $1.5 \times 10^8 \sim 2.4 \times 10^8$ 으로 큰 편차 없이 나타났다. 토양세균 수에 상당한 영향을 미치는 갯벌환경의 주 요소인 함수량은 갈대밭 건지에서 시료를 채취한 S-2 지역에서 함수량이 가장 낮은 것으로 나타난 반면, 제방 근처 갯벌에서 시료를 채취한 S-1 지역의 함수량이 S-2 지역의 약 2배로 가장 높은 것으로 나타났다. 나머지 S-3, S-4, S-5 지역의 수분 함수량은 약 50~58% 이고, S-8은 함수량이 약 49% 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Ahn[1]에 의한 토양의 물리적 특성 및 수분조건에 따른 하반식물의 분포에 관한 연구에서 여의도 갈대가 분포한 토양의 함수량인 16.18%와는 상당한 차이가 있음을 보여주었다.

BTEX분해 세균의 분리 및 특성

장기간의 농화배양을 통해 얻어진 BTEX consortium으로부터 유일한 탄소원 및 에너지원으로 BTEX를 이용하여 성장할 수 있는 수 개의 균주를 분리하였다. 그 중 분해능이 가장 우수한 두 개의 균주를 선별하고 각각 EMB-C-1과 EMB-C-2라 명하였다(Table 3). TNA배지에서 EMB-C-1은 연두색을 띄었고 EMB-C-2는 살색을 나타내었고, 두 균주

Table 2. Determination of water content and total number of bacteria in soils from the eight sampling spots using DAPI.

Sampling spots	Water content(%)	Bacterial counts	No. of total bacteria (cells/ml)
S-1	64	37	1.8×10^8
S-2	37	47	2.3×10^8
S-3	52	39.5	1.9×10^8
S-4	58	45.5	2.2×10^8
S-5	52	37	1.9×10^8
S-6	50	48.3	2.4×10^8
S-7	ND	ND	ND
S-8	49	30.1	1.5×10^8
Mean	51.7	41.2	2.0×10^8

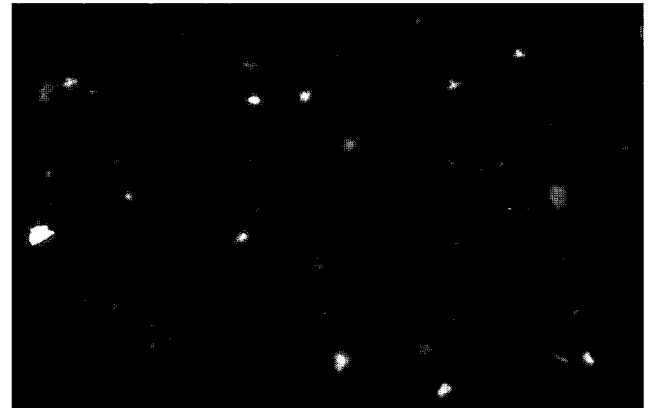


Fig. 3. A representative image of DAPI for bacterial count using Carl zeiss vision GmbH Axioskop 40. The fluorescent color indicates bacteria stained with DAPI.

모두 그람양성이며 간균으로 나타났으나, EMB-C-1은 24 시간 이상 배양 시 불규칙한 모양을 나타내었다. 이는 한 개의 집락을 분리 도말하여 여러 번의 단일균주를 선별하고자 하였으나 항상 같은 결과를 나타내었다. EMB-C-2는 그람양성으로 긴 막대 모양인 간균의 형태를 보였다. TNA에서 EMB-C-1과 EMB-C-2을 도말하여 온도별로 성장량을 측정하였다(Table 3). 4°C, 20°C, 30°C, 37°C 그리고 42°C에서 배양하였다. 그 결과 EMB-C-1의 경우 1일 후 부터 30°C와 37°C, 42°C에서 자라기 시작하였고 3일 후부터 20°C에서도 자라기 시작했다. EMB-C-2는 1일 후 30°C와 37°C에서 자라기 시작하였고 2일 후에는 20°C에서, 3일 후에는 42°C에서도 자라기 시작하였다. 두 균 모두 4°C에서는 전혀 자라지 않았고 20°C와 42°C에서도 일부 성장을 하였지만 30°C와 37°C에서 가장 잘 자라는 것으로 나타났다. 일반적으로 대부분의 호기성 세균들은 중온성 세균들로 42°C에서 잘 자라지 않는 것으로 알려져 있다. 하지만 본 연구에서 분리한 EMB-C-1과 EMB-C-2는 모두 42°C에서 잘 자라고 온성 세균일 가능성이 있는 것으로 나타나, 추후 42°C 이상의 고온에서 BTEX를 기질로 하여 성장할 수 있는 지를 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다. 중금속과 항생제에 대

Table 3. Morphological and physiological properties of two isolates.

Test items	EMB-C-1	EMB-C-2
Gram stain	Gram-positive	Gram-positive
Morphology	Rod	Rod
Resistance to heavy metals / antibiotics($\mu\text{g/ml}$)		
HgCl ₂ (80) / ampicillin(400) ^{a)}	++ / +++ ^{b)}	++ / ++
CdCl ₂ (80) / chloramphenicol(100)	+++ / ++	++ / ++
PbCl ₂ (80) / kanamycin(50)	++ / +++	++ / +++
BaCl ₂ (1600) / streptomycin(100)	+++ / ++	+++ / +
FeCl ₂ (1600) / tetracycline(50)	+++ / +++	+++ / +++
Growth at		
4°C	-	-
20°C	++	++
30°C	+++	+++
37°C	+++	+++
42°C	++	++
Growth aerobically or anaerobically	both	aerobically

^{a)}indicates maximal heavy metal or antibiotic concentrations used in this study.

한 내성 실험결과 EMB-C-1와 EMB-C-2 본 연구에서 시험한 모든 중금속 (CdCl₂, HgCl, PbCl₂, 각 80 $\mu\text{g/ml}$; BaCl₂, FeCl₂, 각 1600 $\mu\text{g/ml}$)과 항생제(ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracycline)에 대해서 강한 내성을 갖는 것으로 나타났다(Table 3). EMB-C-2는 streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)에서 느리게 자랐지만, 두 균 모두 시험한 항생제 모두에 내성을 갖는 균이라는 점에서 최근 가장 문제가

되고 있는 다약제 내성(multi-drug resistance; MDR) 균주인지를 파악하기 위하여 보다 다양한 항생제에 대하여 주의 깊게 조사할 필요성이 있는 것으로 사료되었다.

BTEX 배지에서서의 성장을 및 분해능

BTEX 분해 균주로 선발된 EMB-C-1과 EMB-C-2를 BM 배지에서 유일한 탄소원으로 BTEX를 첨가한 뒤에 30°C에서 배양하여 UV-spectrophotometer에서 OD_{600nm}값을 측정하였다. 그 결과 benzene, toluene, ethylbenzene, xylene 각각을 기질로 사용하였을 때 보다는 BTEX mixtures를 사용하였을 때 훨씬 빠른 성장을 나타내었다(Fig 4). 두 균 주 모두 toluene과 benzene에서 모두 성장하였으나 600_{nm}에서 최대 O.D.값이 0.40 이상을 넘지 않았으며 ethylbenzene과 xylene을 넣어 준 곳에서는 잘 자라지 않았다. 또한 EMB-C-1이 toluene과 benzene 두 기질에서 유도기간은 2일 정도 걸린 반면, EMB-C-2는 3일 동안의 유도기간을 지나 대수기에 진입하였다. 이와 같은 결과는 EMB-C-1과 EMB-C-2는 각각의 기질이나 BTEX 혼합기질을 분해하는데 있어 필요한 효소가 유도되는데 2~3일 정도의 기간을 필요로 함을 제시해주는 것으로, 일반적으로 알려져 있는 BTEX 분해균주에 비해 비교적 긴 시간의 유도기를 갖는 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서 사용한 1 mM 농도의 BTEX 각 기질을 분해하는데 걸리는 시간도 상당한 시간을 필요로 함을 보여 준다. 본 실험에서 두 균주 EMB-C-1과 EMB-C-2에 의한 BTEX배지에서 성장률의 측정은 오직 pH6.8 및 30°C에서 이루어져 최적의 분해조건을 찾기 위한 다양한 조건에서의 연구가 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서는 BTEX 기질 중 대표 기질로서 toluene과 benzene 두 기질이 최종농도가 1mM가 되게 첨가된 BM배지에서 5일간 배양한 지점 대의 분해율을 측정하였다(Fig. 5). 대조구로서 같은 농도의

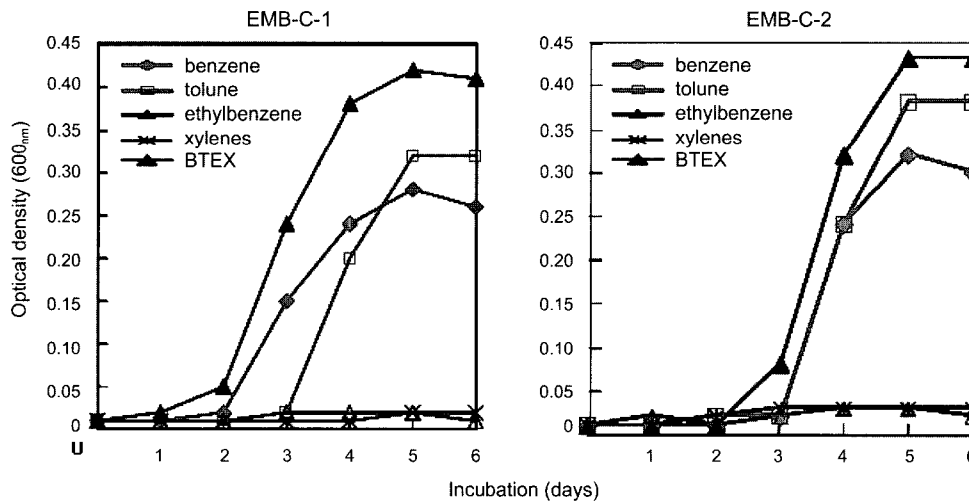


Fig 4. Growth curves of two bacterial strains, EMB-C-1 and EMB-C-2 at individual or BTEX mixtures. Xylenes indicates mixtures of o-, m-, and p-xylene.

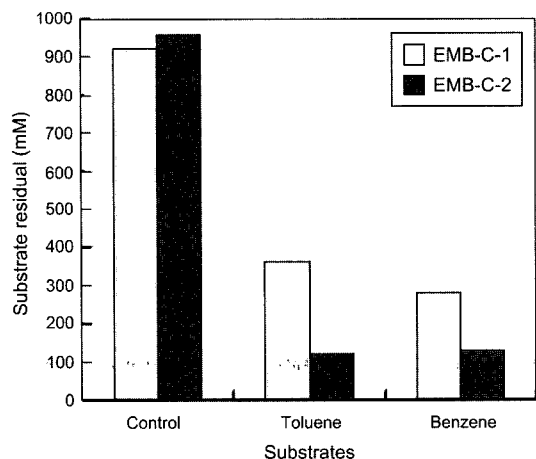


Fig 5. Comparative analysis of toluene and benzene degradation rates by strains EMB-C-1 and EMB-C-2 at 5-day incubation time point. The bottle used as a control was incubated in BTEX mixture-containing medium without EMB-C-1 or EMB-C-2 at the same period.

toluene이나 benzene이 들어간 BM 배지를 균을 접종하지 않고 같은 시간 배양하여 분해율을 분석한 결과 EMB-C-1과

EMB-C-2에 의해서 약 50~60%의 toluene과 85~90%의 벤젠이 분해되었음을 확인하였고, 대조구에서 같은 배양기간 동안 사라진 기질농도가 5~10%임을 감안할 때 실제 분해율의 오차가 이 범위 내에서 나타날 것으로 보인다.

16S rRNA 염기서열에 의한 BTEX 분해 세균의 동정 및 계통관계

유전자 증폭을 통해 얻어진 16S rRNA clone의 염기서열을 분석한 결과 EMB-C-1은 *Microbacterium laevaniformans* 또는 *M. dextranolyticum*와 98% 이상의 상동성을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 6A). 일반적으로 알려진 *Microbacterium*의 최적성장 온도는 30°C이며 내생포자를 형성하지 않고, 호기성이나 약한 혐기성 상태에서도 생장을 하는 특성을 나타낸다. 하지만 *Microbacterium*의 종에 따라 그 특성이 다양하게 나타내는데 *M. lacticum*은 약 70% 이상의 GC함량과 72°C 고온에도 잘 견딜 수 있는 특성을 갖고 있으며 *M. laevaniformans* [12]는 하수나 활성 슬러지로부터 분리된 것으로 역시 고온에서 잘 견딜 수 있는 균주로 알려져 있다. EMB-C-1은 16S rDNA는 분석된 염기서열 1492-bp를 기준

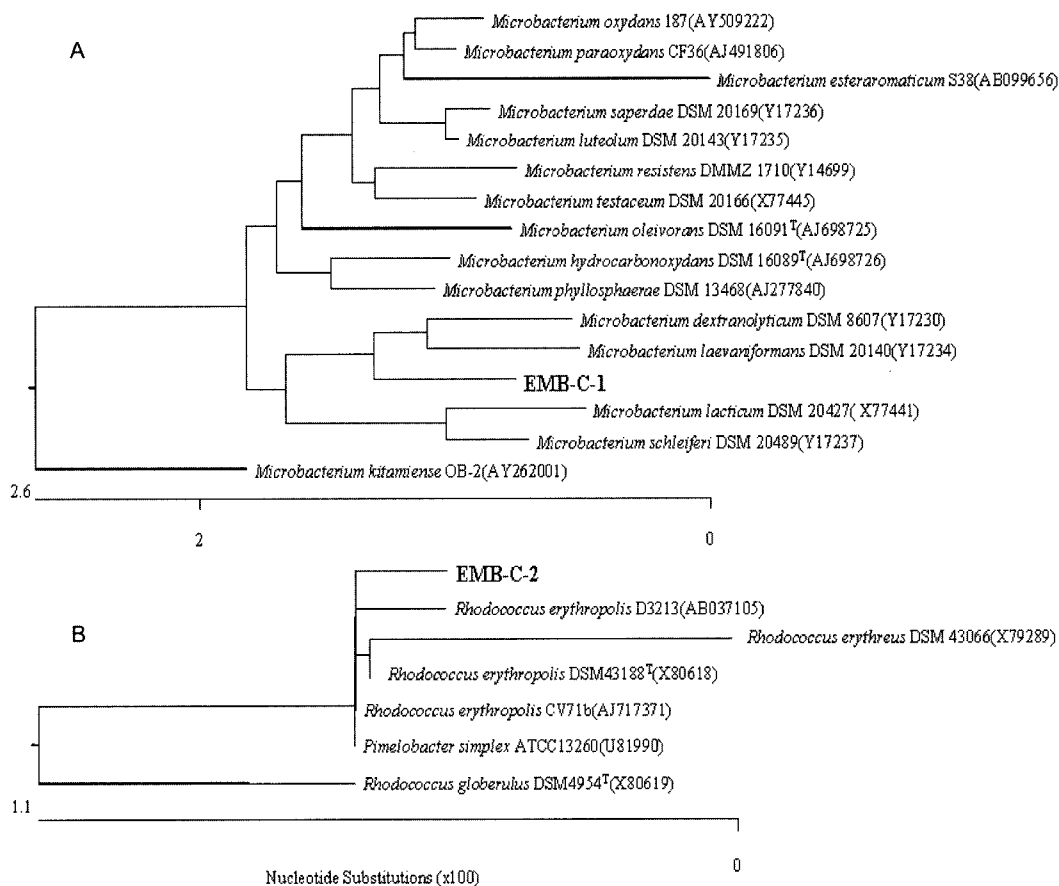


Fig 6. 16S rRNA sequence-based phylogenetic tree of BTEX-degrading bacteria EMB-C-1(A) and EMB-C-2(B) from reed rhizosphere of Sunchon bay. 1482 base pairs from EMB-C-1 and 1458-bp from EMB-C-2 were used to construct this dendrogram. The numbers within brackets indicate accession numbers from the GenBank data library.

으로 *Microbacterium laevaniformans*로 동정되었고, 56.12%의 GC함량을 갖는 것으로 나타났다. 동정된 결과에 의하여 균주 EMB-C-1은 *Microbacterium laevaniformans* EMB-C-1로 명명되었다. *Microbacterium* 균주에 의한 오염물질 분해에 대한 최근의 대표적 연구로는 dibenzofuran 등을 비롯한 유기농약 분해에 관한 연구가 있다[14]. 유기용매로 오염된 토양을 사용하여 방향족탄화수소로 농화배양된 토양미생물 consortium에서도 나타나는 것으로 조사된 바 있다[12].

*Rhodococcus*는 일반적으로 노랑, 오렌지, 빨간색 등 다양한 담황색 색소를 가지고 있는데 본 연구에서 분리된 EMB-C-2는 노란색을 나타내었으며 42°C에서도 잘 자라는 것으로 조사되었다. 이 균은 또한 오염물질이나 BTEX와 같은 난분해성 물질을 분해하는 그람양성균으로 다양한 환경에서 발견되고 있다[12,14]. 본 연구를 통하여 분리된 두 종의 세균은 Lee 등[17]에 의한 순천만 갯벌의 미생물 군집구조 분석에서 밝혀지지 않았던 것으로 42°C에서도 잘 성장하는 특성을 갖고 있어 이와 같은 온도조건에서 효과적으로 BTEX와 같은 방향족탄화수소를 제거하는 등의 환경복원 전략을 마련하는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서 얻어진 BTEX를 분해하는 두 개의 그람양성 세균, *Microbacterium laevaniformans*와 *Rhodococcus erythropolis* 세균의 16S rRNA 정보는 GenBank data library에 각각 DQ152000과 DQ152001의 accession no.로 등록되었다.

요 약

본 연구는 어업이나 농업 등의 인간활동에 의하여 상당한 영향을 받고 있는 순천만 갈대의 근권에서 이루어지는 정화 작용에 있어 미생물의 역할을 조사하는 것에 중점을 두었다. 일반적으로 만은 환경 스트레스로 인한 갑작스런 충격을 감소시키는 완충지역으로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 갈대근권에서 이루어지는 정화기능에 있어 미생물의 역할을 밝히기 위한 첫 번째 노력의 일환으로 벤젠, 톨루엔, 또는 자일렌이 단일 탄소 및 에너지원으로 첨가된 농화배양법을 사용하여 BTEX를 분해할 수 있는 두 종류의 그람양성 세균을 순수분리하였다. 다양한 온도조건의 BTEX배지에서 이들 세균을 배양하는 동안 BTEX의 분해율 및 성장률을 주기적으로 조사한 결과 35°C에서 가장 빠른 기질 분해율을 보였고 42°C의 고온에서도 두 균 모두 잘 성장하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 시험한 수은, 카드뮴, 납, 비료, 철 대부분의 중금속에 강한 내성뿐만 아니라 ampicillin을 비롯한 시험한 5 종류의 항생제 모두에 강한 내성을 나타냈다. 16S rRNA 유전자 서열과 다양한 표현형 및 형태학적 특성을 기초로 한 동정의 결과 BTEX를 분해할 수 있는 두 균주는 95%이상의 신뢰도로 *Microbacterium* sp.와 *Rhodococcus* sp.로 나타났고, 각 균주는 *Microbacterium* sp. EMB-1과 *Rhodococcus* sp. EMB-2로 명명하였다. 이러한 결과는 주요

한 염습지 식물중의 하나인 갈대의 근권에서 살아가는 이들 균주들이 BTEX와 같은 석유로 오염된 근권 환경의 정화작용에 중요한 역할을 할 수 있음을 제시해주었다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Ahn, H.-K. 2000. An analysis of Riparian vegetation distribution based on physical soil characteristics and soil moisture content - focused on the relationship between soil characteristics and vegetation -. *J. Kor. Ins. Lands. Archi.* **28**: 39-47.
- Baik, K.-S., J.-H. Choi, and C.-N. Seong. 2000. Cellulose degradation and extracellular enzymatic activity of the mud flat in Suncheon bay. *Kor. J. Microbiol.* **36**: 130-135.
- 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.
- Briglia, M., P. J. M. Middeldorp, and M. S. Salkinoja-Salonen. 1994. Mineralization performance of *Rhodococcus chlorophenolicus* strain PCP-1 in contaminated soil stimulating on site conditions. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 377-385.
- Collins, L. D. and A. J. Daugulis. 1999. Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part II. Effect of substrate interactions and feeding strategies in toluene/benzene and toluene/p-xylene fermentations in a partitioning bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 360-365.
- Cooper, P. F., J. A. Hobson, and S. Jowes. 1989. Sewage treatment by reed bed systems. *J. Ins. Wat. Environ. Man.* **3**: 60-74.
- 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.
- Deeb, R. A. and L. Alvarez-Cohen. 1998. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnol. Bioeng.* **61**: 526-536.
- Farrell, R. E., C. M. Frick, and J. J. Germida. 2000. *Phyto-Pet*[®]: A database of plants that play a role in the phytoremediation of petroleum hydrocarbons. pp. 29-40, *Proceedings of the Second Phytoremediation Technical Seminar*, Environment, Canada, Ottawa, ON.
- Ferguson, R. L., E. N. Buckley, and A. V. Palumbo. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 49-55.
- 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.
12. Greene, E. A., J. G. Kay, K. Jaber, L. G. Stehmeier, and G. Voordouw. 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5282-5289.
 13. 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.
 14. Iida, T., Y. Mukouzaka, K. Nakamura, and T. Kudo. 2002. Plasmid-borne genes code for angular dioxygenase involved in dibenzofuran degradation by *Terrabacter* sp. strain YK3. **68**: 3716-3723.
 15. Kahng, H.-Y., J. C. Malinverni, M. M. Majko, and J. J. Kurkor. 2001. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4805-4816.
 16. Kern, J. and C. Idler. 1999. Treatment of domestic and agricultural wastewater by reed bed systems. *Ecol. Eng.* **12**: 13-25.
 17. Lee, M.-S., S.-K. Hong, D.-H. Lee, C.-K. Kim, and K.-S. Bae. 2001. Bacterial diversity in the mud flat of Suncheon bay, Chunnam province, by 16S rRNA gene analysis. *Kor. J. Microbiol.* **37**: 137-144.
 18. Leisinger, T. 1981. Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds. Academic press, London. U.K.
 19. Mantovi, P., M. Marmiroli, E. Maestri, S. Tagliavini, S. Piccinini, and N. Marmiroli. 2003. Application of a horizontal subsurface flow constructed wetland on treatment of dairy parlor wastewater. *Bioresour. Technol.* **88**: 85-94.
 20. McLean, E. O. 1982. Soil pH and lime requirement. In Page, A. L., R. H. Miller and D. R. Keeney (eds.) Methods of soil analysis. Part 2 - chemical and microbiological properties. (2nd Ed.). *Agronomy* **9**: 199-224.
 21. Mikesell, M. D., J. J. Kukor, and R. H. Olsen. 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation* **4**: 249-259.
 22. Muratova, A., T. Hbner, N. Narula, H. Want, O. Turkovskaya, P. Kuschik, R. Jahn, and W. Merbach. 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiol. Res.* **158**: 151-161.
 23. Obarska-Pempkowiak, H. and K. Klimkowska. 1999. Distribution of nutrients and heavy metals in a constructed wetland system. *Chemosphere* **39**: 303-312.
 24. Olsen, R. H. and J. Hansen. 1976. Evolution and utility of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* **150**: 60-69.
 25. Ostendrop, W. 1989. 'Die-back' of reeds in Europe-a critical review of literature. *Aqua. Bot.* **35**: 5-26.
 26. Rhee S. K., G. M. Lee, and S. T. Lee. 1994. Biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 652-657.
 27. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 28. Shim, W.-S. and I.-S. Han. 1998. Effect of reed-bed using Ulsan-habitated *P. australis*, *T. orientalis*, and *P. aundinacea* L. on removing pollutants from sewage. *J. Kor. Env. Sci. Soc.* **7**: 117-121.
 29. Ward, D. M., R. Weller, and M. M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**: 105-115

(Received Aug. 4, 2005/Accepted Sep. 6, 2005)