

Perchloroethylene과 Trichloroethylene의 혐기적 탈염소화 및 미생물 군집 분석

이재원 · 김병혁 · 안치용 · 김희식 · 윤병대 · 오희목*

한국생명공학연구원 환경생명공학연구소

울산, 여수 등 공단지역의 토양, 하천의 저니, 해양의 준설토 등을 이용하여 난분해성 염소화합물인 PCE (perchloroethylene) 및 TCE (trichloroethylene)의 혐기성 탈염소화에 관련하는 미생물을 탐색하고 이들의 탈염소화 효율을 조사하였다. 혐기성 상호대사에 의한 탈염소화 효율을 조사하기 위해 전자공여체로 acetate를 사용하여 혐기성 회분식 실험을 실시하였으며, 이와 병행하여 분자생물학적인 기법인 16S rDNA의 PCR-Double Gradient DGGE (DG-DGGE)를 이용하여 미생물의 군집을 분석하였다. 그 결과 울산 태화강 및 여수 하남천의 저니를 점종한 경우 PCE는 70%, 65%, TCE는 50%, 45%의 높은 탈염소화 효율을 나타내었다. 또한 16S rDNA의 PCR을 이용한 DG-DGGE로 미생물 군집을 분석한 결과, 탈염소화 효율이 높은 지역의 저니에는 *Desulfovibrio* spp.의 미생물이 주로 존재함을 확인하였다.

Key words □ DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), PCE, reductive dehalogenation, TCE

산업의 고도화와 근대화에 따라 수많은 유기성 유해폐기물이 대량으로 생산되어 토양 및 지하수를 오염시키고 있다. 이들 중 특히, PCE, TCE와 같은 염소계 유기화합물은 우수한 탈지능력으로 드라이클리닝, 금속산업의 세정용매 등으로 널리 사용되어 왔다. 그러나 염소계 유기화합물은 휘발성이 매우 강하고, 발암성을 가지고 있으며, 분자학적 구조가 매우 안정한 난분해성 물질로 일단 오염되면 그 처리에 있어서 상당한 시간과 비용이 요구된다. 따라서 염소계 유기화합물의 취급부주의로 인한 토양 및 지하수로의 이행에 따른 광범위한 수질오염과 이들이 인체에 미치는 영향에 대한 심각성이 제기되어 국내에서도 1993년부터 PCE 및 TCE를 폐수배출기준에 포함시켰으며, 현재 먹는물 수질 기준의 경우 PCE, TCE의 규제농도가 각각 0.01 mg/l와 0.03 mg/l로 일본과 같은 수준으로 규제되고 있다.

이러한 염소계 유기화합물의 처리는 유지관리 비용이 많이 드는 물리·화학적 방법보다 생물학적 처리법이 상대적으로 경제적이고 친환경적인 것으로 보고되고 있다(14). 생물학적 처리에 있어서 PCE나 TCE는 호기성 조건에서는 생분해되기 어려우나 혐기성 조건에서 hydrogenolysis에 의해 PCE의 염소이온이 수소이온과 치환되는 환원반응에 의해 단계적으로 PCE, TCE, cis-DCE (cis-1,2-dichloroethene), VC (vinyl chloride), chloroethane 으로 완전히 탈염소화 되는 것으로 알려져 있으며, 치환된 염소수가 많을수록 환원전위가 증가하여 환원적 탈염소화반응이 더 잘 일어난다고 알려져 있다(6). 이러한 혐기성 미생물 상호대사(cometabolism)는 혐기성 미생물이 생분해 가능한 1차 기질(growth

substrate)을 공급하여 이들을 분해하기 위한 효소가 최종적으로 2차 기질인 PCE, TCE를 탈염소화하는 것이며, 혐기성 상호대사를 진행하기 위해서는 혐기성 미생물이 쉽게 생분해할 수 있는 1차 기질이 필요하다. 지금까지 알려진 1차 기질은 methanol, acetate, benzonate, glucose 등 여러 가지가 있으나, 이들 중 acetate가 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(1, 15). 그러나 acetate가 모든 혐기성 미생물들에게 가장 효과적인 1차 기질로 적용되는 것은 아니며, *Dehalobacter restrictus* (PER-k23) 처럼 H₂와 formate를 전자공여체로 PCE나 TCE를 전자 수용체로 사용할 수 있는 미생물들도 존재한다(7). 자연계에서 이처럼 다양한 미생물이 존재하지만 미생물 탐색 및 분리의 어려움으로 지금까지 순수하게 밝혀진 혐기성 탈염소화 미생물종은 매우 적으며, 염소화합물을 분해하는 주된 기작 또한 현재까지 혐기성 상호대사에 의한 탈염소화가 혐기성 미생물이 염소화합물을 분해하는 주된 기작이라고 여겨지고 있다.

본 연구에서는 하천의 저니와 해양의 준설토로부터 염소계 유기화합물인 PCE 및 TCE의 혐기성 탈염소화에 관련하는 혐기성 미생물을 탐색하고, 혐기성 상호대사에 의한 탈염소능을 확인하기 위하여 회분식 실험을 수행하였으며, 이와 병행하여 분자생물학적 기법인 PCR-double gradient-DGGE (DG-DGGE) 방법을 이용하여 미생물의 군집변화를 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 채취 및 보관

염소화합물을 분해하는 미생물들은 석유화학공업지역의 저니에서 주로 서식한다고 보고되고 있으며, 특히 혐기성 조건의 하천

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-860-4321, Fax: 042-860-4594
E-mail: heemock@kribb.re.kr

이나 해양의 저질 등에 많이 존재한다고 알려져 있다(6). 또한 PCE 등을 분해하는 균주들은 이전에 PCE 등으로 오염된 지역의 저질에 분포할 가능성이 크므로 이를 근거로 하여 실험에 사용될 시료를 크게 하천, 해양의 저질(준설토)과 오염지역의 저니로 구분하였으며, 울산 태화강, 여수 하남천, 반월공단, 광양 등 총 10 여 곳에서 하천저니 및 준설토 시료 28개를 채취하였다.

염소화합물 분해미생물의 탐색에 이용될 저니 및 준설토는 분할형 라이너 토양채취기(SJD-1600, 50×300 mm)와 시료용기(PVC pipe)를 사용하여 약 30~40 cm 정도의 깊이에서 채취하였다. 채취한 토양은 즉시 기밀용기(Wheaton, USA)에 넣은 다음 N₂ flushing을 약 3분간 실시하여 토양의 산소를 최대한 제거하고 이후에 외부공기와 접촉을 완전 차단시켰다. 이와 같이 기밀 처리된 sampling bottle은 이동시 ice box에 보관하여 온도를 0~4°C로 유지하였다.

혐기성 회분식 실험

여러 지역의 저니 및 준설토에서 채취된 토양에서 염소화합물 분해능이 있는 혐기성 미생물을 탐색하고 탈염소화 특성을 비교하기 위하여 회분식 실험을 실시하였다. 회분식 실험에 사용된 혐기성 배지는 Sung 등(15)이 비오염지역 하천의 저질에서 PCE를 electron acceptor로 하고 acetate를 electron donor로 하는 새로운 종(*Desulfuromonas michiganensis*)을 분리할 때 사용한 배지를 선정하여 사용하였으며, 배지 제조시 미량원소 및 비타민을 각각 1 ml씩 추가하였다(13, 17). 혐기성 배지는 실험준비 중 121°C에서 20분 동안 멸균한 다음 방냉 후 잔존하는 산소를 제거하기 위해 45 ml N₂/min으로 15분간 탈기시켰다.

회분식 실험을 위해 총 용량 70 ml의 serum bottle에 여러지역에서 채취된 토양 1 g과 anaerobic medium 30 ml를 함께 주입한 다음, 실험도중 PCE 및 TCE의 유출과 흡착을 막기 위해 테프론 재질의 Gray Butyl Septa(Wheaton, USA)를 사용하여 완전 밀폐시켰다. 이후 밀폐된 용기내부의 혐기화를 위해 N₂ gas로 내부기체를 치환한 다음 혐기성 상태의 serum bottle에 멸균된 주사기를 이용하여 PCE 및 TCE 농도가 1 mM되도록 주입하고, electron donor로써 acetate를 10 mM되도록 주입하여 27±1°C, 150 rpm의 배양조건에서 암배양하였다. 이때 토양을 주입하지 않고 PCE 및 TCE만 첨가한 대조구를 동일한 조건에서 배양하여 PCE 및 TCE의 분해에 영향을 미칠 수 있는 여러 인자를 고려하였다. 각각의 토양시료당 같은 조건으로 serum bottle을 4개씩 준비하여 총 12주간 배양하였으며, 4주에 한번 새로운 배지로 3회에 걸쳐 계대하면서 집적배양(enrichment culture)하였다. 이때, 새로운 배지로의 접종량은 전체 용량의 10%로 하였으며 계대시 serum bottle내에서 잔존하는 PCE 및 TCE를 측정하여 분해능을 확인하였다(Fig. 1).

염소화합물 분석

본 연구에서 PCE 및 TCE의 분석은 capillary column ATTM-5 (30 m×0.32 mm×0.30 μm)와 electron capture detector (ECD)를 설치한 gas chromatograph (Varian model 3400)를 사용하였다.

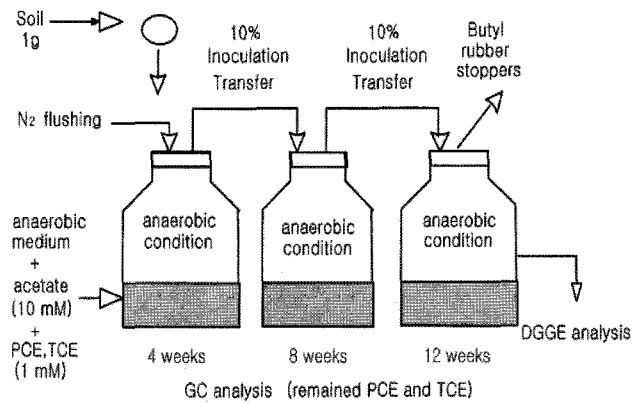


Fig. 1. Anaerobic batch test and experimental process.

액상의 시료는 휘발성이 강하므로 액-액 추출(liquid-liquid)방법을 이용한 용매 추출법을 사용하였다. 이때 추출용매로는 *n*-hexane을 사용하였으며, 시료와 *n*-hexane은 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하였다. 분석조건으로 oven은 초기온도 40°C에서 2분간 머문 후 5°C/min로 온도를 증가시켜 최종온도 100°C에서 5분간 머물렀으며, 주입기와 검출기의 온도를 각각 220°C 및 320°C로 설정하였다(1, 15).

핵산 추출

12주 동안 PCE 및 TCE를 첨가하여 혐기성 배양한 배양액을 원심분리기(MF-550, Hanil Sci. Ind., Seoul, Korea)를 이용하여 원심분리 하였다. 실험에 사용된 시료의 채취장소, 종류, 첨가한 염소화합물 등은 Table 1에 요약하였다. 이렇게 획득한 시료는 Qiagen Soil DNA extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 총 DNA를 추출하였고, 1.2% agarose gel에서 확인한 후, -20°C에서 보관하였다(3).

PCR 증폭

미생물 다양성을 확인하기 위하여 시료로부터 얻은 DNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. 사용된 primer는 universal primer로 알려진 9F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'), 1542R (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')을 이용하였다. PCR 반응은 50 ng의 주형 DNA, dNTP mixture (final conc. 200 μM each), 10 μM primer 그리고 2.5 unit *Taq* polymerase (Rexgene biotech, Cheongwon, Korea)를 첨가하여 최종부피가 100 μl가 되도록 하였다.

PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 94°C에서 1분간 변성시키고, annealing 온도는 50°C에서 하였으며, 72°C에서 1분 30초간 반응시키고, 30 cycle 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 처리하고 반응을 완료하였다. PCR 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다(3).

이렇게 얻어진 증폭산물은 double DG-DGGE를 위하여 341F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')

Table 1. Soil samples used in this study

Number	Site and Soils	Infusion
1	A tideland, Gwangyang (dredged soil)	PCE
2	An underground, Gwangyang (dredged soil)	TCE
3	An underground, Gwangyang (dredged soil)	PCE
4	Masan Port (dredged soil)	PCE
5	Masan Port (dredged soil)	TCE+PCE
6	Masan Port (dredged soil)	TCE
7	Banwol Industrial Complex (dredged soil)	PCE
8	Banwol Industrial Complex (dredged soil)	TCE
9	Seongnam Industrial Complex (soil)	TCE
10	Seongnam Industrial Complex (soil)	PCE
11	Hanam River, Yeosu (sediment)	PCE
12	A reservoir, Yeosu (sediment)	PCE
13	A reservoir, Yeosu (sediment)	TCE
14	Taehwa River, Ulsan (sediment)	PCE

와 536R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3')을 이용하여 nested PCR을 수행하였다(8, 9). PCR 반응은 주형 DNA는 1.0 µl의 PCR 산물, dNTP mixture (final conc. 200 µM each), 10 µM primer 그리고 2.5 unit *Taq* polymerase (Rexgene biotech, Cheongwon, Korea)를 첨가하여 최종부피가 100 µl가 되도록 하였다. PCR반응 조건은 상기 조건과 같았으며, PCR 반응 산물은 1.6% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다(2, 12).

PCR 증폭산물의 Double DGGE

PCR산물은 Dcode™ System (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 DG-DGGE를 수행하여 분석하였다(3). Denaturing gradient gel은 8~12% polyacrylamide (37.5:1=acrylamide:bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 20~50 %까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 double gradient gel을 제작하였다. 이와 같이 제작된 gel에 PCR증폭산물을 30 µl 씩 loading하여 1× TAE buffer 완충용액(40mM Tris, 20mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 70 V로 14시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide에서 염색한 후, UV로 확인하였다.

염기서열 분석

Denaturing gradient gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 band를 잘라내어 TE buffer 50 µl를 첨가하고, deep freezer -70°C에서 얼리고, 50°C water bath 에서 녹이는 과정을 3회 반복한 후 원심분리(6,300×g, 1 min)하여 상등액을 취하였다. 각 band에서 회수한 DNA를 주형으로 341F와 536R primer를 이용하여 위와 같은 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 PCR purification kit (General Biosystem, Seoul, Korea)을 이용하여 정제하였다. 정제된 산물은 automatic DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank를 이용하여 BLAST Search

program을 통해 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물에 의한 PCE의 탈염소화

석유화학공업지역의 저니 및 해양저질을 이용하여 혐기성 회분식 실험을 실시한 후 탈염소화 효율을 조사하였다. 본 연구에서는 PCE나 TCE의 탈염소화 반응 생성물은 측정하지 않았지만 배양기간 중 계대시를 기준으로 대조구와 시료 내에서 PCE 및 TCE의 변화를 관찰함으로써 탈염소화반응의 효율을 평가하였다. Fig. 2는 각 집적배양(enrichment culture) 기간 동안 잔존하는 PCE농도를 대조구와 비교하여 나타낸 것이다. 대조구의 경우 잔존 PCE의 농도는 전체 배양기간 동안 주입한 농도의 약 83% 정도로 거의 비슷하게 나타났으며, *n*-hexane 으로 PCE를 추출하였을 때 추출효율은 양호하였다. 전체 시료에서 PCE의 감소가 일어났으나 토양마다 그 효율에 있어서 차이를 보였다. 이중 울산지역의 저니를 사용한 시료와 하남천의 저니를 사용한 시료는 최종적으로 12주 배양 후, PCE의 탈염소화율이 각각 70% 및 65% 정도로 매우 높았다. 반면 성남이나 반월공단의 시료는 배양기간에 따라 PCE가 약간 감소하였으나, 탈염소화율이 각각 23% 와 20% 정도로 매우 낮게 나타났다. 이와 같은 결과는 각 토양마다 PCE의 탈염소에 관련된 혐기성 미생물들이 존재하기는 하나 울산이나 하남천의 저니에서 보다 많이 존재하며, 우점종을 차지하고 있기 때문인 것으로 판단된다.

토양에서 탈염소화에 관련된 혐기성 미생물을 보다 우점화시키기 위해 집적배양한 결과, 탈염소화 효율에 큰 변화는 없었으나 전반적으로 탈염소화 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 하남천의 저니 및 마산만의 준설토에서는 초기 접종때와 2번의 집적 배양 이후의 탈염소화 효율이 약 10% 이상 증가하였다.

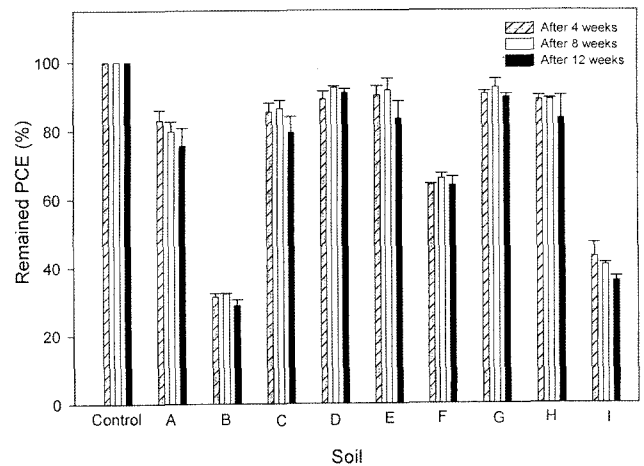


Fig. 2. PCE dechlorination efficiency in anaerobic batch test. Sampling site; A (Masan Port), B (Taehwa River, Ulsan), C (Seongnam Industrial Complex), D (Banwol Industrial Complex), E (Lake Park, Ansan), F (A tideland, Gwangyang), G (Dredged Soil, Gwangyang), H (Sihwa Industrial Complex), I (Hanam River, Yeosu).

이는 각 토양에서 실질적인 탈염소화는 4주내에 이루어졌으나, 이후 집적배양을 통해 보다 우점화된 탈염소화 미생물의 작용으로 같은 농도, 같은 배양기간 동안에 탈염소화 활성이 더 높아졌음을 나타낸다. 따라서 토양으로부터 탈염소화에 관련된 혐기성 미생물을 탐색하는 데 있어서 집적배양은 반드시 필요하며, 이는 탈염소화 효능에 긍정적인 영향을 미친다고 볼 수 있다.

한편 하천의 저니외에 해양의 준설토 및 갯벌의 시료를 사용하여 PCE의 탈염소화율을 확인한 결과 광양의 준설토에서는 PCE의 약 10% 만이 제거되어 탈염소화 효율이 매우 낮은 반면, 광양의 갯벌시료에서는 PCE의 탈염소화 효율이 약 40% 정도로 양호하여 하천의 저질 뿐 아니라 해양의 저질에서도 탈염소화 미생물이 존재함을 알 수 있었다. 혐기성 회분식 실험을 통해 석유화학공단지역의 모든 저질 및 해양준설토에서 PCE를 탈염소화 할 수 있는 혐기성 미생물들의 존재를 간접적으로 확인하였으며, 울산 및 하남천의 저니에서는 이들 미생물이 우점을 이루며, 매우 높은 탈염소화 활성을 나타내었고, 집적배양을 통해 미생물의 탈염소화 효율을 더욱 높일 수 있음을 알 수 있었다.

미생물에 의한 TCE의 탈염소화

Fig. 3은 각 집적배양 기간 동안 잔존하는 TCE를 나타낸 것이다. PCE와 마찬가지로 전체 토양에서 TCE의 감소가 일어났다. 이 중 울산의 저니와 하남천 저니의 탈염소화 효율이 각각 50%, 45%로 가장 높은 반면 시화공단 및 반월공단 토양의 TCE의 탈염소화 효율은 각각 약 15%와 13%로 대조구와 비교하여 TCE가 크게 감소되지 않았다. 또한 TCE의 탈염소화 효율은 PCE와 마찬가지로 집적배양에 의해 조금씩 증가되었다. 특히 광양의 해저 준설토는 4주 동안 배양하였을 때와 2번의 집적 배양 후 탈염소화 효율이 30%에서 40%로 약 10%의 증가를 보였다.

TCE와 PCE의 탈염소화 효율을 상대 비교하였을 때, 동일한

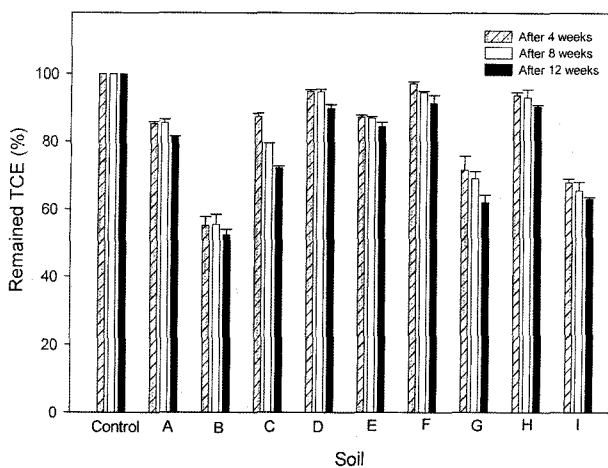


Fig. 3. TCE dechlorination efficiency in anaerobic batch test. Sampling site; A (Masan Port), B (Taehwa River, Ulsan), C (Seongnam Industrial Complex), D (Banwol Industrial Complex), E (Lake Park, Ansan), F (A tideland, Gwangyang), G (Dredged Soil, Gwangyang), H (Sihwa Industrial Complex), I (Hanam River, Yeosu).

토양시료를 사용하였음에도 PCE와 TCE의 탈염소화 효율은 큰 차이를 보였다. 기존의 연구결과에서는 이러한 원인을 탈염소화 반응속도차에 의한 것으로 간주하고 있다. PCE는 혐기성 탈염소화 반응을 거쳐 최종적으로 chloroethane까지 여러 중간 생성물을 형성하는데 탈염소화 반응속도를 비교해보면 치환된 염소의 수가 많은 화합물일수록 탈염소화 반응속도가 증가한다고 보고된 바 있다(16). 따라서 PCE의 첫 번째 혐기성 탈염소화 중간생성물인 TCE를 주입하였을 때와 PCE를 직접 주입하였을 때를 비교하면 같은 토양에 존재하는 미생물의 TCE 탈염소화 반응속도는 상대적으로 PCE의 탈염소화 반응속도보다 낮아서 탈염소화 효율이 낮은 것으로 사료된다. 본 연구결과에서도 광양 해양 준설토를 제외한 나머지 토양에서 상대적으로 PCE의 탈염소화 효율이 TCE의 탈염소화 효율보다 높게 나타났다. 또한 탈염소화 반응속도 외에 PCE와 TCE의 탈염소화 효율은 우점하는 미생물 종에 따라 영향을 받았다. 동일한 시료인 광양의 해양 준설토를 사용하였을 때 PCE의 탈염소화 효율은 매우 낮은 반면 TCE의 탈염소화 효율은 상대적으로 높게 나타났으며, 이를 통해 광양의 해양준설토에는 PCE보다 TCE를 보다 쉽게 탈염소화하는 균주가 더욱 우점을 이루고 있음을 간접적으로 알 수 있었다.

미생물 군집분석

각 지점별로 채취한 시료에 PCE와 TCE를 넣고 12주간 배양한 배양액으로부터 전체 DNA를 획득하여 세균용 universal primer로 알려진 341F-GC와 536R primer를 이용하여 PCR 증폭 산물을 얻었으며, agarose gel 상에서 예상했던 236 bp의 band가 나타남을 확인하였다(data not shown). 군집다양성을 확인하는데 유용한 기법인 DG-DGGE (3, 10, 11)를 이용하여 미생물 군집의 다양성을 조사해본 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 gel 상에서 각 시료에 따라 다양한 bands를 확인할 수 있었다. DG-DGGE profile상의 각 bands로부터 추출한 DNA의 염기서열을 결정하였고, NCBI의 GenBank를 이용하여 상동성을 비교 검색하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 13개의 bands에 대하여 염기서열을 결정하였고, database를 이용하여 분석하였다. 13개의 bands를 분석한 결과, 네 개의 bands (E14, E20, E39, E52)가 *Desulfovibrio* 속으로 분석되었다. *Desulfovibrio* spp.는 PCE 및 TCE로 오염된 지역의 해양저니에 존재함이 보고되었으며, 탈염소화 효율을 증대시키는 것으로 알려져 있다(4). 이들은 황산염 환원박테리아 (sulphate-reducing bacteria)로서 단일균주에 의한 탈염소화는 거의 보고 되지 않았으나, 과거 PCE나 TCE에 오염된 지역의 bioremediation site의 토양에서 종종 발견되었으며, 탈염소화 미생물의 co-culture로서 인식되고 있다(4, 5, 18). DG-DGGE 분석 결과, E37은 *Bacillus* sp.로 분석되었고, 그 외 bands는 uncultured bacteria로 분석되어 다수의 bands에서 *Desulfovibrio* 가 나타나지는 않았지만, 울산 및 여수의 저니와 같이 PCE 및 TCE의 탈염소화 효율이 높은 지역에서는 *Desulfovibrio* 속이 우점하는 양상을 보였다. 이를 통해 석유화학공단의 저니 및 해양의 준설토에서 PCE 및 TCE의 탈염소화에 관여하는 혐기성 미생물의

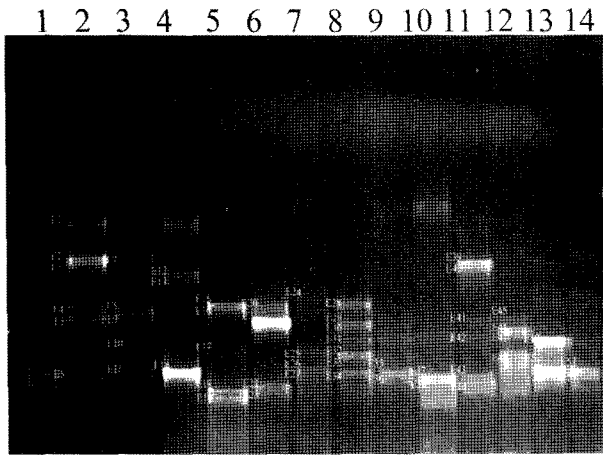


Fig. 4. DG-DGGE profile based on 16S rDNA generated from anaerobic batch test.

Table 2. Similarity of the bands obtained from DG-DGGE profile of anaerobic batch test

Band	Accession No.	Species	Similarity (%)
E2	AY714560	Uncultured delta proteobacterium	100
E14	AF273083	<i>Desulfovibrio oryzae</i>	99
E15	AB186809	Uncultured bacterium	99
E16	AJ704721	Uncultured bacterium	100
E17	AY820716	Uncultured bacterium	100
E20	AY928661	<i>Desulfovibrio</i> sp. A1	84
E21	AY570607	Uncultured bacterium	86
E37	AF500315	<i>Bacillus</i> sp. PC6	100
E38	AF281093	Unidentified bacterium	95
E39	M98496	<i>Desulfovibrio</i> sp. PT-2	85
E40	AJ744885	Uncultured bacterium	85
E42	AF499876	Uncultured bacterium	92
E52	AJ295679	<i>Desulfovibrio</i> sp. JG5	86

존재를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 박대원, 정진영, 정윤철. 1994. 혐기성 미생물의 상호대사기능을 이용한 PCE의 탈염소화. *대한환경공학회지*. 16, 23-29.
2. 박정아, 허건영, 이정숙, 오윤정, 김보연, 민태익, 김치경, 안중석. 2003. 김치의 저온 발효 중 미생물 변화 양상. *미생물학회지*. 39, 45-50.
3. Cremonesi, L., S. Firpo, M. Ferrari, P.G. Righetti and C. Gelfi. 1997. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *BioTechniques*. 22, 326-330.
4. DeWeerd, K.A., W.P. Fianagan, M.J. Brennan, J.M. Principe and

- J.L. Spivack. 1998. Biodegradation of trichloroethylene and dichloromethane in contaminated soil and groundwater. *Bioremed. J.* 2, 29-42.
5. Drzyzga, O., J. Gerritse, J.A. Dijk, H. Elissen and J.C. Gottschal. 2001. Coexistence of a sulphate-reducing *Desulfovibrio* species and the dehalorespiring *Desulfotobacterium frappieri* TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene. *Environ. Microbiol.* 3, 92-99.
6. Holliger, C. 1995. The anaerobic microbiology and biotreatment of chlorinated ethenes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 347-351.
7. Holliger, C., G. Schraa, A.J. stams and A.J. Zehnder. 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2991-2997.
8. Ishii, K. and M. Fukui. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3732-3734.
9. Jaspers, E., K. Nauhaus, H. Cypionka and J. Overmann. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 153-164.
10. Koizumi, Y., Y. Kozima and M. Fukui. 2003. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 147-157.
11. Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317-322.
12. Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
13. Sanford, R., J.R. Cole, F.E. Löffler and J.M. Tiedje. 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3800-3808.
14. Semprini, L. 1997. Strategies for the aerobic co-metabolism of chlorinated solvents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 296-308.
15. Sung, Y., K.M. Ritalahti, R.A. Sanford, J.W. Urbance, S.J. Flynn, J.M. Tiedje and P.E. Löffler. 2003. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2964-2974.
16. Vogel, T.M., C.S. Criddle and P.L. McCarty. 1987. Transformation of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21, 722-736.
17. Wolin, E., M.J. Wolin and R.S. Wolfe. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238, 2882-2886.
18. Yang, Y. and P.L. McCarty. 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3591-3597.

(Received August 26, 2005/Accepted Septembr 12, 2005)

ABSTRACT : Analysis of Microbial Community During the Anaerobic Dechlorination of Perchloroethylene and Trichloroethylene

Jae-Won Lee, Byung-Hyuk Kim, Chi-Yong Ahn, Hee-Sik Kim, Byung-Dae Yoon and Hee-Mock Oh* (Environmental Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea)

In this study, the anaerobic enrichment cultivation was performed with the sediments and the dredged soils from the cities of Ulsan, Masan, Yeosu, Gwangyang, Ansan and Seongnam. Acetate as an electron donor and PCE (perchloroethylene) or TCE (trichloroethylene) as an electron acceptor were injected into the serum bottle with an anaerobic medium. After the incubation of 12 weeks, the removal efficiency of PCE was highest at 70% in the treatment with the sediment of Ulsan. Also, the bacterial community structure was analyzed by D-DGGE (double denatured gradient gel electrophoresis) through PCR-based 16S rDNA approaches. The dominant species in the anaerobic enrichment were found to belong to the genus of *Desulfovibrio*.