

사염화에틸렌(PCE)으로 오염된 국내 4개 지역 지하수 내 생물학적 PCE 탈염소화 활성 및 미생물 군집의 비교

김 영^{1*} · 김진욱¹ · 하철윤¹ · 권수열² · 김정관² · 이한웅³
하준수⁴ · 박후원⁴ · 안영호⁵ · 이진우⁶

¹고려대학교 환경시스템공학과, ²한국방송통신대학교 환경보건학과,
³고려대학교 생명과학대학, ⁴(주)그린텍환경건설링
⁵영남대학교 건설환경공학부, ⁶(주)도화종합기술공사

Evaluation of Microbial PCE Reductive Dechlorination Activity and Microbial Community Structure using PCE-Contaminated Groundwater in Korea

Young Kim^{1*} · Jin-Wook Kim¹ · Chul-Yoon Ha¹ · Soo-Yeol Kwon² · Jung-Kwan Kim²
Han-Woong Lee³ · Joon-Soo Ha⁴ · Hoo-Won Park⁴ · Young-Ho Ahn⁵ · Jin-Woo Lee⁶

¹Dept. of Environmental Engineering, Korea University, Choongnam, Korea

²Dept. of Environmental Health, Korea National Open University, Seoul, Korea

³School of Life Sciences, Korea University, Seoul, Korea

⁴Greentech Environmental Consulting Co., Seoul, Korea

⁵School of Civil and Environmental Engineering, Yeongnam University, Gyungsan, Korea

⁶Dohwa Consulting Engineers Co., Ltd., Seoul, Korea

ABSTRACT

In Korea, little attention has been paid to microbial perchloroethylene (PCE) and/or trichloroethylene (TCE) dechlorination activity and identification of microorganisms involved in PCE reductive dechlorination at a PCE-contaminated aquifer. We performed microcosm tests using the groundwater samples from 4 different contaminated sites (i.e. Changwon A, Changwon B, Bucheon and Yangsan) to assess PCE reductive dechlorination activity. We also adapted molecular techniques to screen what types of known reductive dechlorinators are present at the PCE-contaminated aquifers. In the Changwon A and Changwon B active microcosms where potential electron donors such as sodium propionate, sodium lactate, sodium butyrate, and sodium fumarate, were added, ethylene, an end-product of complete reductive dechlorination of PCE, was detected after a period of 90 days of incubation. In the Bucheon and Yangsan active microcosms, cis-1,2-dichloroethylene (c-DCE) was accumulated without the production of vinyl chloride (VC) and ethylene. Molecular techniques were used to evaluate the microbial community structures in the Changwon B and Yangsan aquifer. We found two sequence types that were closely related to a known PCE to ethylene dechlorinator, named uncultured bacterium clone DCE47, in the Changwon B site clone library. However, in the Yangsan site clone library, no sequence type was closely related to known PCE dechlorinators reported. It is plausible that microorganisms being capable of completely dechlorinating PCE to ethylene may be present in the Changwon B site aquifer. In this study we find that complete PCE reductive dechlorinators are present at some PCE-contaminated sites in Korea. In an engineering point of view this information makes it feasible to apply a biological reductive dechlorination process for remediating PCE- and/or TCE-contaminated aquifers in Korea.

Key words : Microbial PCE reductive dechlorination, Microcosm test, PCR, Microbial community analysis

*Corresponding author : kimyo@korea.ac.kr

원고접수일 : 2004. 1. 06 게재승인일 : 2005. 2. 22

질의 및 토의 : 2005. 6. 30 까지

요 약 문

본 연구는 사염화에틸렌(Perchloroethylene) 또는 트리클로로에틸렌(Trichloroethylene)으로 오염된 국내 지하수 내에 국외에서 보고된 환원성 탈염소화 미생물의 존재 유무와 사염화에틸렌의 생물학적 탈염소화 활성도를 평가하였다. 마이크로코즘 테스트(microcosm tests)는 4개의 오염지역(창원 A, 창원 B, 부천 및 양산) 지하수와 다양한 전자 공여체(sodium lactate, sodium propionate, sodium butyrate, sodium fumarate)를 이용하여 수행하였다. 단일 전자공여체와 창원 A 혹은 창원 B 지하수를 주입한 전 마이크로코즘에서 사염화에틸렌 완전 탈염소화 분해 시 발생하는 최종 산물인 에틸렌이 배양 90일 후에 검출되었고, 부천 혹은 양산 지역의 지하수를 주입한 마이크로코즘에서는 배양 90일 후 시스-1,2-디클로로에틸렌(cis-1,2-Dichloroethylene)만이 검출되었고, 염화비닐(Vinyl chloride) 과 에틸렌은 검출되지 않았다. 완전 탈염소화 생분해가 확인된 창원 B 지역 지하수와 불완전 탈염소화 생분해가 확인된 양산 지역 지하수 내 미생물 군집을 비교하기 위해 분자생물학적 방법을 이용한 실험을 수행하였다. 창원 B 지역 지하수의 클론 라이브러리(Clone library)에서 사염화에틸렌 완전 탈염소화 미생물, uncultured bacterium clone DCE47과 매우 유사한 염기서열 클론이 확인되었다. 그러나 양산 지역의 클론 라이브러리에서는 기존의 염화에틸렌 탈염소화 미생물과 유사한 염기서열 클론이 확인되지 않았다. 본 연구 결과를 통하여 국내 일부 지역의 지하수 내에 사염화에틸렌을 완전 탈염소화하여 무해한 에틸렌으로 분해하는 미생물이 존재함을 확인하였고, 적절한 전자공여체를 공급하는 경우 그 분해 활성도가 증가함을 확인하였다. 이 결과는 사염화에틸렌 혹은 트리클로로에틸렌으로 오염된 국내 지하수를 경제적인 공법인 환원성 탈염소화 생물학적 공정으로 복원할 수 있는 가능성을 보여주는 중요한 지표라고 사료된다.

주제어 : PCE 환원성 탈염소화 생분해, 마이크로코즘 실험, PCR, 미생물 군집 분석

1. 서 론

염화 지방족 탄화수소(CAHs, Chlorinated Aliphatic-Hydrocarbons) 중 사염화에틸렌(PCE, perchloroethylene)과 트리클로로에틸렌(TCE, trichloroethylene)은 국내에서 가장 흔히 발견되는 지하수 오염물질이다. 이들은 대수층 내에서 종종 환원성 탈염소화 반응으로 생분해되는데, 이는 염소이온이 수소이온으로 치환되어 사염화에틸렌이 트리클로로에틸렌, 시스-1,2-디클로로에틸렌(c-DCE, cis-1,2-dichloroethylene), 염화비닐(VC, vinyl chloride), 에틸렌(ethylene)으로 순차적으로 환원되는 생물학적 반응이다. 궁극적으로는 인체에 무해한 에틸렌으로 환원되는 공정이다. Table 1은 사염화에틸렌을 트리클로로에틸렌, 시스-1,2-디클로로에틸렌, 혹은 에틸렌으로 분해하는 균들을 나타내고 있다. *Dehalococcoides ethenogenes* (Maymo-Gatell et al., 1997)과 *Dehalococcoides* sp. strain FL2 (Löffler et al., 2000)는 사염화에틸렌을 에틸렌으로 완전 탈염소화하고, *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1 (Gerritse et al., 1996)과 *Desulfitobacterium* sp. strain Viet1 (Löffler et al., 1997)은 사염화에틸렌을 트리클로로에틸렌 혹은 시스-1,2-디클로로에틸렌으로 부분 탈염소화하는 것으로 보고되고 있다. 아직 국내에는 사염화에틸렌과 트리클로로에틸렌의 탈염소화 분해에 관여하는 토착 미생물에 대한 정보가 전무하다. 따라서 본 연구에서는 국외에서 보고된 환원성 탈염소화 미생물의 국내 사염화에틸렌 오염 지하수

내 존재 유무와 전자공여체 주입 시 사염화에틸렌 탈염소화 분해 활성도를 평가하였다.

2. 실험방법

2.1. 자연분해에 의한 탈염소화 가능성 검토

사염화에틸렌 혹은 트리클로로에틸렌으로 오염된 창원 A, 창원 B, 부천 및 양산, 4개의 지역에서 지하수 시료를 채취하여, 시료 내 사염화에틸렌, 트리클로로에틸렌, 시스-1,2-디클로로에틸렌, 염화비닐 및 에틸렌의 농도를 측정하여 자연 상태에서의 환원성 탈염소화 분해 여부를 평가하였다.

2.2. 마이크로코즘 테스트(Microcosm Test)

마이크로코즘 테스트는 오염 대수층 토양시료 채취가 난이하여 오염 지하수를 이용하여 수행하였다. 혐기조건을 유지하기 위하여 anaerobic glove box에서 156 mL serum 병을 사용하여 마이크로코즘을 제작하였다. 마이크로코즘 병에 지하수(110 mL)와 미생물 성장을 돕기 위한 ALSM (anaerobic low salt media)을 넣은 후(Löffler et al., 2000), 최종농도가 약 5 ppm이 되게 사염화에틸렌을 주입하였다. 그 후 사염화에틸렌을 에틸렌으로 완전히 변환시키는데 필요한 전자 공여체[sodium lactate (147 mg/L), sodium propionate (104 mg/L), sodium butyrate (87 mg/L) 및 sodium fumarate (188 mg/L)]를 주입하였다.

Table 1. Pure bacteria cultures being capable of reductive dechlorination of PCE

Organisms	Dechlorination end-product	Electron donors	Reference
<i>Desulfotobacterium</i> sp. strain PCE1	TCE	H ₂	Gerritse et al., 1996
<i>Desulfotobacterium</i> sp. strain PCE-S	c-DCE	H ₂	Unpublished
<i>Desulfotobacterium</i> sp. strain Viet1	TCE	H ₂	Löffler et al., 1997
<i>Desulfotobacterium frappieri</i> strain TCE1	c-DCE	H ₂	Gerritse et al., 1999
<i>Dehalobacter restrictus</i> strain PER-K23	c-DCE	H ₂	Holliger et al., 1998
<i>Dehalobacter restrictus</i> strain TEA	c-DCE	H ₂	Wild et al., 1996
<i>Clostridium bifermentans</i> strain DPH-1	c-DCE	H ₂	Chang et al., 2000
<i>Desulfuromonas chloroethenican</i> strain TT4B	c-DCE	acetate	Krumholz et al., 1996
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> strain BB1	c-DCE	acetate	Sung et al., 2003
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> strain BRS1	c-DCE	acetate	Sung et al., 2003
<i>Dehalospillum multivorans</i>	c-DCE	H ₂	Neumann et al., 1996
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	Ethylene	H ₂	Maymo-Gatell et al., 1997
<i>Dehalococcoides</i> sp. strain FL2	Ethylene	H ₂	Löffler et al., 2000
Uncultured bacterium DCE17	Ethylene	H ₂	Gu et al., 2004
Uncultured bacterium TCE16	Ethylene	H ₂	Gu et al., 2004
Uncultured bacterium clone DCE5	Ethylene	H ₂	Gu et al., 2004
Uncultured bacterium clone DCE47	Ethylene	H ₂	Gu et al., 2004

각 전자공여체 당 탄소원을 주입한 active 마이크로코즘 병 3개와 4종류의 control 마이크로코즘 병(poison control, autoclave control, carbon source control, nutrient control)을 제작하였다. Poison control은 미생물에 독성이 있는 sodium azide (50 mg/L)를 주입하였고, autoclave control은 지하수를 24시간 간격으로 3회 autoclave 하였다. Carbon source control은 탄소원을 주입하지 않고 사염화에틸렌만 주입하여 자연변환을 평가하였다. Nutrient control은 탄소원을 주입하지 않고, ALSM에 함유되어 있는 YE (yeast extract, 20 mg/L) 와 Vitamin B12 (0.05 mg/L)를 주입하여 nutrient가 PCE 분해에 미치는 영향을 평가하였다.

마이크로코즘 병을 20°C 항온기에서 배양하면서, 전자공여체와 염화에틸렌의 농도를 일주일 간격으로 측정하였다. 마이크로코즘 제작에 사용된 모든 실험기구는 호일로 싸서 120°C에서 60분간 autoclave하여 무균 상태를 유지하였다.

2.3. 현장 지하수에 있는 미생물의 DNA 추출

채취된 시료는 FastDNA SPIN Sample kit (Qbiogene)을 이용하여 추출하였으며 DNA를 증폭하기 위한 PCR 반응에 저해요소로 작용하는 humic acid를 제거하기 위해서 5.5 M Guanidine Thiocyanate (Fluka Chemical Corp., USA) 용액을 이용하였다. DNA SPIN kit에서 추출된 DNA가 포함된 silica matrix가 본래 색(흰색)이 될 때까지 3번 이상 세척하였다. FastDNA SPIN Sample kit는 토양 내에 있는 DNA의 추출을 위해 고안되었는데, 이 범위를 확대시켜 지하수에 적용시키기 위하여 각각의 시료

를 전 처리된 유리섬유여과지(0.45 µm of pore size)가 설치된 멸균된 여과장치를 통하여 여과시켰다. 충분한 DNA를 얻기 위해 한 여과지 당 2 L 이상의 지하수 시료를 여과 시켰으며, 오염에 의한 영향을 최소화하기 위해서 여과 과정은 laminar flow hood에서 수행하였다. 여과를 마친 후, 멸균한 가위와 핀셋을 가지고 유리섬유여과지를 잘게 잘라서 kit에 있는 Matrix Tube에 넣었다. 이 DNA 추출 과정은 DNA가 matrix에 붙게 하는 binding matrix suspension을 사용하는 것이 특징이다.

2.4. 미생물 분석방법

2.4.1. 미생물의 16s rDNA PCR (polymerase chain reaction) 증폭

추출한 DNA를 주형으로 해서 PCR을 실시하였다. PCR 반응물 20 µL 안에는 20 mM Tris-Cl (pH=8.0), 100 mM 염화칼슘, 6 mM 염화마그네슘, 0.02% 젤라틴, 각각 5 mM dNTP (Deoxynucleoside Triphosphate, Pomega, USA), 0.2 pmol 프라이머, 10 ng DNA 주형, 1U Taq 중합효소 (Pomega, USA)를 첨가하였다. 16s rDNA를 증폭하기 위해 사용된 프라이머는 forward 프라이머 (General Biosystem, Korea)로 5'-GATTGGATCCTGGC-TCAG-3 (27F), reverse 프라이머는 5'-AAGGAGGGG-ATCCAGCC-3' (1492R)을 사용하였다. PCR 반응 조건은, 첫 번째 반응은 94°C에서 1분, 다음 각 단계에서는 94°C 1분, 57°C에서 50초, 72°C에서 1분 30초 동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 30번 반복하고, 마지막으로

72°C에서 7분 동안 16s rDNA를 증폭한 후, 반응물을 4°C에서 보관하였다. PCR 증폭 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, German)를 이용하여 정제하였다.

2.4.2. Gene cloning & RFLP (restriction fragment length polymorphism)

PCR 증폭 산물의 라이게이션(ligation)은 pGEM-T Easy vector system II (Pomega, USA) 즉, 발현벡터를 사용하여 Sambrook 등의 방법(Sambrook et al., 1989)에 따라 수행하였으며, 형질전환(transformation)은 Mandel과 Higa의 방법(Mandel and Higa, 1970)으로 수행하였다. 이후에, 형질전환 산물은 선택적 배지(암피실린 60 mg/mL, X-gal 20 mg/mL)에 유도물질 역할을 하는 IPTG (0.1M)를 넣은 배지에 배양되었다. 배양액 내의 흰색의 군체(colony)를 확인한 다음, 반복 복제(replication)에 의해 재확인된 군체를 액체배지에 접종하여 플라스미드(plasmid) 정제에 이용할 수 있도록 12~16 시간 정도 배양하였다. 형질전환에 의해 배양된 군체는 원심 분리를 이용하여 농축하였고, Plasmid Spin Kit (Genenmed, Korea)을 사용하여 군체 미생물 내의 플라스미드를 추출하였다.

RFLP는 특정부위의 염기서열을 잘라내는 제한효소를 이용하여 같은 패턴을 그룹화 하는 절차(Braker et al., 2000)인데, 본 실험에 이용된 효소는 범용적인 Rsa I을 사용하였다. RFLP에 의해 그룹화 된 플라스미드를 염기서열분석 전문회사인 마크로젠(주)에 의뢰해서, T7과 SP6 프라이머를 가지고 16s rDNA를 증폭하여 염기서열을 분석하게 하였다. 마크로젠(주)으로부터 얻은 16s rDNA의 염기서열을 BLAST와 FASTA 프로그램으로 GenBank에 있는 염기서열정보와 비교하였다.

2.4.3. Phylogenetic tree 작성

염기서열정보는 Clustalx1.81로 정렬되었다. 이렇게 정렬된 염기서열정보는 DNA STAR 프로그램을 사용하여 편집되었고, 최종적으로 MEGA version 2.1 (Sudhir et al., 2001)을 이용하여 계통수를 그렸다. 본 연구에서 연구된 미생물의 염기서열 등록번호(assession number)는 AY625135~AY625151이다. 이 등록번호는 EMBL 뉴클레오타이드 염기서열 정보에서 찾을 수 있다.

2.4. CAHs 분석방법

PCE, TCE, c-DCE, VC 및 ethylene 측정은 Hamilton 1710N gas-tight syringe를 이용하여 마이크로코즘 병의 headspace에서 200 µL를 채취하여 GC에 직접 주입하여

분석하였다. GC는 GSQ-PLOT 컬럼 (J&W Scientific, Folsom, 미국)과 불꽃이온화검출기 (flame ionization detector, FID)가 설치된 Shimadzu 17-A를 사용하였다. GC 주입부와 검출부의 온도는 각각 250°C를 유지하였고, 오븐의 온도는 승온분석을 위하여 40°C에서 2분간 유지 후, 40°C에서 80°C로 5°C/분으로 승온하고, 80°C에서 200°C까지 10°C/분으로 승온하였다.

전자공여체로 사용된 유기산은 다량의 시료분석을 위한 자동시료주입기(autosampler, Waters® 717 plus), 펌프 (Waters™ 600 Controller), 컬럼(BIO-RAD Aminex HPX-87H), 검출기(Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector) 및 크로마토그램 데이터 시스템으로 구성된 HPLC (Waters™)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 현장 지하수 시료 내 염화에틸렌 농도

Table 2에 4개 지역(창원 A, 창원 B, 부천 및 양산)에서 채취한 지하수 시료의 염화에틸렌의 농도를 정리하였다. 이 지역들은 주로 트리클로로에틸렌으로 오염되었고, 미량의 시스-1,2-디클로로에틸렌이 모든 지역에서 검출되었다. 그러나 염화비닐과 에틸렌은 전혀 검출되지 않았다. 이 결과를 통해, 전 지역의 대수층에 트리클로로에틸렌을 시스-1,2-디클로로에틸렌으로 분해하는 미생물 존재 가능성을 확인 하였다. 현장에서 채취한 시료에서의 염화비닐과 에틸렌 불검출은 트리클로로에틸렌을 에틸렌으로 완전 분해하는 미생물이 존재하지 않거나, 존재하더라도 전자공여체 부족 등의 현장조건이 완전 분해에 적합하지 않은 것으로 사료된다. 한 예로 부천 지하수 시료의 DO의 농도가 약 3 ppm으로 트리클로로에틸렌의 완전 분해가 발생하기 부적절한 환경조건이었다.

3.2. 마이크로코즘 테스트

Table 3에 마이크로코즘 테스트 결과를 정리하였다. 4 종류의 control에서는 90일 이후에 사염화에틸렌의 분해

Table 2. Concentrations of chlorinated ethylenes and ethylene in groundwater samples (µg/L)

Site	PCE	TCE	c-DCE	VC	Ethylene
Changwon A	0.04	0.78	0.07	ND	ND
Changwon B	0.06	0.24	0.10	ND	ND
Bucheon	^a ND	0.84	0.04	ND	ND
Yangsan	ND	0.25	0.06	ND	ND

^a: ND indicates not detected.

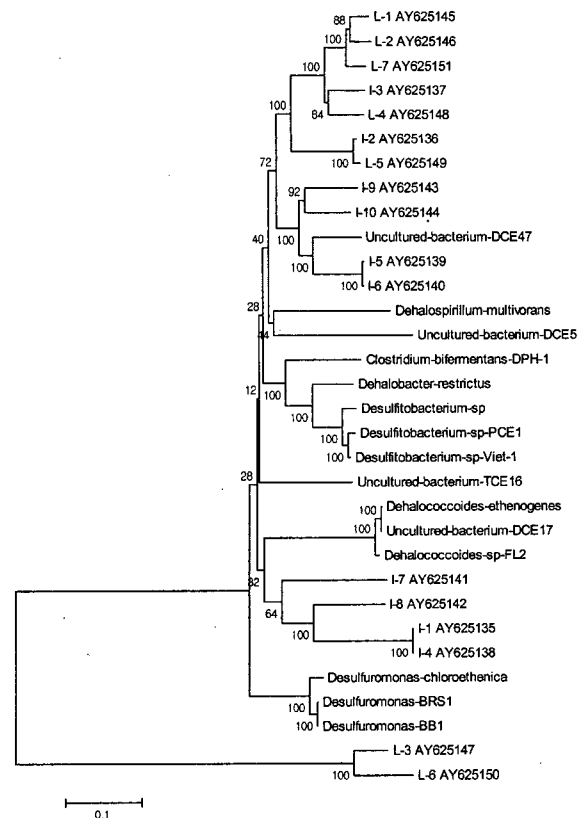
Table 3. PCE reductive dechlorination activities after 90 days of incubation

Site	TCE detection	c-DCE detection	VC detection	Ethylene detection
Changwon A	Yes	No	No	Yes
Changwon B	Yes	No	No	Yes
Bucheon	Yes	Yes	No	No
Yangsan	Yes	Yes	No	No

가 일어나지 않았으나, 전자공여체를 주입한 모든 마이크로코즘 병에서 사염화에틸렌이 탈염소화되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 탈염소화 정도는 지역별로 상이하였다. 창원 A와 창원 B 지역 지하수 시료를 이용한 마이크로코즘 병에서는, 60일 이후에 사염화에틸렌의 탈염소화 최종 산물인 에틸렌이 검출되었다. 그러나 중간생성물질인 시스-1,2-디클로로에틸렌과 염화비닐은 검출되지 않았다. 한편, 부천과 양산 지역 지하수를 이용한 마이크로코즘 병에서는, 90일이 지나도 염화비닐과 에틸렌이 검출되지 않았고 시스-1,2-디클로로에틸렌만 검출되었다. 이 결과로부터 다음의 사항들을 추론 할 수 있다. 첫째, 사염화에틸렌을 트리클로로에틸렌으로 탈염소화시키는 미생물이 전 조사 지역에 존재하고, 둘째로, 창원 A와 창원 B 지역의 지하수 내에 사염화에틸렌을 에틸렌으로 완전 분해하는 미생물이 존재하고, 마지막으로, 부천과 양산 지역의 미생물은 중간생성물질인 시스-1,2-디클로로에틸렌을 염화비닐로 탈염소화하는 효소가 없거나, 시스-1,2-디클로로에틸렌 분해 속도가 느려 실험기간 (90일) 이내에 생분해가 관찰되지 않았다고 추정된다.

3.3. Cloning 결과

사염화에틸렌 탈염소화 정도가 상이한, 창원 B와 양산 지역 지하수 내 미생물 군집의 구조와 다양성을 비교하기 위해, RFLP를 수행하였다. Table 4는 두 지역 지하수 내 미생물 군집의 종이 계통 발생적으로 다양하다는 것을 보여주고 있다. 창원 B 지역의 클론 라이브러리의 RFLP 결과를 BLAST 데이터베이스로 확인하여 기존에 밝혀진 클론과 비교한 결과 시료 내 미생물의 16s rDNA 유사성이 높은 10개의 상이한 RFLP 형태가 확인되었다. 이들은 5개의 알려진 문(Phyla)인 Low G+C Gram positive, γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria, High G+C Gram positive와 α -Proteobacteria에 속하는 것을 알 수 있었다. 한편, 양산 지역의 클론 라이브러리에서 7개의 상이한 RFLP 형태가 확인되었고, 이들은 3개의 알려진 문인 β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria와 α -Proteobacteria에 속하는 것을 알 수 있

**Fig. 1.** Distance tree showing relationships between bacteria from PCE and/or TCE contaminated sites (Changwon B and Yangsan) and reference microorganisms shown Table 1.

었다. 이 결과를 통해, 양산 지역보다 창원 B 지역의 지하수 내에 더 다양한 미생물이 존재함을 확인 하였다.

우점하는 RFLP 형태를 계통 발생학적으로 분석하여, 두 지역(창원 B, 양산 지역) 미생물 군집에 있는 미생물 종을 동정하였다(Fig. 1). 창원 B 지역 클론 라이브러리로부터는 우점 종은 아니지만 사염화에틸렌을 완전 탈염소화시키는 미생물과 유사한 염기서열을 보이는 두 개의 클론 I-5와 I-6을 확인하였다. I-5와 I-6 클론은 사염화에틸렌을 에틸렌으로 완전 탈염소화시키는 미생물, Uncultured bacterium DCE 47 (Gu et al., 2004)의 염기서열과 상관이 높은 것으로 나타났다. 그러나 양산 지역의 클론 라이브러리에서는 기존의 보고된 탈염소화 미생물과 염기서열이 유사한 클론이 발견되지 않았다. 이 결과로 국내 사염화에틸렌 혹은 트리클로로에틸렌 오염 지하수에 사염화에틸렌 혹은 트리클로로에틸렌을 혐기성조건에서 완전 탈염소화하는 미생물 존재를 확인하였다.

향후 연구로는 창원 A와 B 지역 지하수에서 어떠한 미생물이 사염화에틸렌을 에틸렌으로 변환시키는데 결정적인 역할을 하는지 분리 동정해야 하며, 이를 위해서 마

Table 4. Phylogenetic diversity of the domain clones based on 16S rDNA sequences identified by BLAST database

RFLP type	16S rDNA sequencing			Lineage
	Closest match	No. of Nucleotides compared	% Similarity with closest match	
Changwon B				
I-1 (14) ^a	<i>Staphylococcus caprae</i> gene	1487/1493	99	Low G+C Gram (+)
I-2 (13)	<i>Nevskia ramose</i>	1466/1492	98	γ - Proteobacteria
I-3 (10)	<i>Limnobacter thiooxidans</i> strain CS-K2	1483/1491	99	β - Proteobacteria
I-4 (6)	Uncultured soil bacterium PRR-1B	512/558	91	High G+C Gram (+)
I-5 (6)	<i>Parvularcula bermudensis</i> strain HTCC2517	1135/1244	91	α - Proteobacteria
I-6 (5)	<i>Parvularcula bermudensis</i> strain HTCC2503	1134/1244	91	α - Proteobacteria
I-7 (3)	<i>Alterococcus agarolyticus</i>	693/764	90	α - Proteobacteria
I-8 (2)	Uncultured bacterium #0319-7F4	990/1098	90	High G+C Gram (+)
I-9 (2)	Bacterium Ellin361	1402/1411	99	α - Proteobacteria
I-10 (2)	<i>Stella vacuolata</i> strain DSM5901	1150/1272	90	α- Proteobacteria
Yangsan				
L-1 (17)	Uncultured beta proteobacterium	1439/1489	96	β - Proteobacteria
L-2 (9)	<i>Acidovorax</i> sp.isolate G8B1	1489/1498	99	β - Proteobacteria
L-3 (5)	Uncultured alpha proteobacterium NAC1-6	1156/1290	89	α - Proteobacteria
L-4 (2)	<i>Ultramicrobacterium</i> str. ND5 gene	1455/1455	100	β - Proteobacteria
L-5 (2)	<i>Nevskia ramose</i>	1462/1490	98	β - Proteobacteria
L-6 (2)	<i>Phenylobacterium immobile</i>	1396/1442	96	γ - Proteobacteria
L-7 (2)	Arsenite-oxidizing bacterium NT-5	1463/1493	98	α - Proteobacteria

^aThe parenthesis is the number of colonies involved in the same group

이크로코즘 테스트를 통하여 사염화에틸렌의 완전 탈염소화가 확인된 미생물배양액을 이용하여 분리 동정 실험이 수행되어야 한다고 사료된다.

4. 결 론

본 연구 결과를 통하여 국내 일부 지역의 지하수 내에 사염화에틸렌을 완전 탈염소화하여 무해한 에틸렌을 생성하는 미생물이 존재함을 확인하였으며, 적절한 전자공여체를 공급하는 경우 그 활성도도 증대되는 것을 확인하였다. 이 결과는 사염화에틸렌 또는 트리클로로에틸렌으로 오염된 국내 지하수를 경제적인 공법으로 보고되고 있는 환원성 탈염소화 생물학적 공정으로 복원할 수 있는 가능성을 보여주는 중요한 지표라고 사료된다. 그러나 사염화에틸렌의 불완전 탈염소화 반응으로 시스-1,2-디클로로에틸렌이 축적되는 경우가 있으므로 공정 적용 시 사전에 충분한 현장 실험을 통하여 사염화에틸렌 또는 트리클로로에틸렌 완전 탈염소화생분해를 입증해야 한다.

사 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-

technopia 21 project)”으로 지원받은 과제입니다.

참 고 문 헌

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H., and Tiedje, J.M., 2004, Nitrate reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2096-2104.

Chang, Y.C., Hatsu, M., Jung, K., Yoo, Y.S., Okeke, B.C., and Takamizawa, K., 2000, Characterization of a tetrachloroethylene degrading bacterium clostridium bifermentans DPH-1, *Bio-sci. and Bioeng.*, **89**(5), 489-491.

Gerritse, J., Renard, V., Pedro Gomes, T.M., Lawson, P.A., Collins, M.D., and Gottschal, J.C., 1996, *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols, *Arch. Microbiol.*, **165**, 132-140.

Gerritse, J., Drzyzga, O., Kloetstra, G., Keijmel, M., Wiersum, L.P., Huston, R., Collins, M.D., and Gottschal, J.C., 1999, Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(12), 5212-5221.

Gu, A.Z., Hedlund, B.P., Staley, J.T., Strand, S.E., and Stensel,

- H.D., 2004, Analysis and comparison of the microbial community structures of two enrichment cultures capable of reductively dechlorinating TCE and *cis*-DCE, *Environmental Microbiology*, **6**(1), 45-54.
- Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N. and Zehnder, A.J., 1998, *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration, *Arch. Microbiol.*, **169**(4), 313-321.
- Krumholz, L.R., Sharp, R., and Fishbain, S.S., 1996, A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(11), 4108-4113.
- Löffler, F.E., Ritalahti, K.M., and Tiedje, J.M., 1997, Dechlorination of chloroethenes is inhibited by 2-bromoethanesulfonate in the absence of methanogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(12), 4982-4985.
- Löffler, F.E., Sun, Q., Li, J., and Tiedje, J.M., 2000, 16S rDNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(4), 1369-1374.
- Mandel, M. and Higa, A., 1970, Transformation by the calcium chloride procedure, *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y., and Gossett, J.M., 1997, Isolation of bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene and ethane, *Science*, **276**(6), 1568-1571.
- Neumann, A., Wohlfarth, G., and Diekert, G., 1996, Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *Biological Chemistry*, **271**(28), 16515-16519.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., and Löffler, F.E., 2003, Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(5), 2964-2974.
- Wild, A., Hermann, R., and Leisinger, T., 1996, Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene, *Biodegradation*, **7**(6), 507-511.