

Pseudomonas putida BJ10의 Tetrachloroethylene (PCE) 분해 특성

최명훈¹ · 김재수² · 이상섭^{1*}

¹경기대학교 생명공학과, ²경기대학교 생명과학과

BTEX 분해능을 가진 BJ10 세균을 이용하여 호기조건에서 toluene 첨가 시 tetrachloroethylene (PCE) 분해에 관한 연구를 수행하였다. BJ10은 형태학적 특징, 생리 생화학적 특징, 16S rRNA 염기서열 분석 및 지방산 분석 결과에 따라 *Pseudomonas putida*로 동정되었다. BJ10의 PCE 저농도 5 mg/L에서 PCE 분해 실험 결과(toluene 첨가 기질 농도 50 mg/L, 균 초기 접종 농도 1.0 g/L, 온도 30°C, pH 7 그리고 DO 3.0~4.2 mg/L), 10일간 52.8%의 분해 효율을 보였으며, PCE 분해 속도는 5.9 nmol/hr로 나타났다. 또한 BJ10의 PCE 고농도 100 mg/L에서 PCE 분해 실험 결과(toluene 첨가 기질 농도 50 mg/L, 균 초기 접종 농도 1.0 g/L, 온도 30°C, pH 7 그리고 DO 3.0~4.2 mg/L), 10일간 20.3%의 분해 효율을 보였으며, PCE분해 속도는 46.0 nmol/hr로 나타났다. Toluene 첨가 농도에 따른 PCE 분해 효율 증감 효과를 알아보기 위하여, 동일한 배양 조건 하에 10 mg/L의 PCE에 toluene (5~200 mg/L)을 첨가하여 분해 실험을 실시한 결과, toluene 200 mg/L 첨가 시 10일간 57.0%의 PCE가 분해되어 가장 높은 제거 효율을 보였다. 또한 PCE 5.5 mg/L (총 7.6 mg/L)를 추가적으로 주입하여 동일조건하에서 PCE 분해를 확인하였으며 결과적으로 8일 동안 63.0%의 PCE가 분해되었다. 이 때의 PCE분해 속도는 13.5 nmol/hr로 초기의 분해속도(8.1 nmol/hr)보다 증가되었다.

Key words □ aerobic conditions, PCE, *Pseudomonas putida* BJ10, toluene

PCE (Tetrachloroethylene)는 염소계 유기 화합물의 한 종류로 기기 금속 산업의 유기 세정제 및 섬유산업의 용매로서 널리 쓰이고 있으며, 부적절한 폐기물 방류 및 폐기물의 침출수에 의하여 지하수 및 토양오염이 심화되고 있다. 지하수 유출 시, 낮은 용해도 및 높은 밀도로 인해 DNAPLs (Dense non-aqueous phase liquids)을 형성하게 되며 이에 의해 좁은 지역에 높은 농도로 장기간 잔류하며 서서히 주위로 퍼지며 오염을 일으킨다(10). 최근 2007년 환경부 지하수 수질 측정망의 오염 우려 지역에서의 오염물질별 초과 현황 조사 결과, 총 7개의 초과항목 중 특정유해물질로는 TCE (Trichloroethylene)와 PCE가 높게 검출되었다. 또한 최근 5년간 초과항목의 전체비율에서도 PCE가 약 7.2%의 높은 비율을 차지하였다(1). PCE의 주요 인체 흡입 경로는 음용수에 의한 섭취 및 공단지역의 가스 흡입에 의하여 일어난다고 알려져 왔다(22). PCE는 암 유발 물질로도 잘 알려져 있으며 특히 중추신경계를 억제하는 신경독성을 나타내는 것으로도 알려져 있다(24). 이러한 PCE의 인체유해성을 고려, 국내 토양오염물질기준의 대책기준에서는 PCE의 오염농도를 가 지역(전, 담, 대지 등)의 경우 10 mg/L, 나 지역(공장용지, 도로, 철도용지 등)의 경우 60 mg/L로 설정하여 규제하고 있다(2).

PCE에 오염된 지하수 및 토양을 효과적으로 처리하기 위한 기술들이 다양한 분야에서 개발 및 시도 되어왔다. 크게 두 분류, 물리/화학적 처리와 생물학적 처리(13, 18)로 나눌 수 있다. 물리/

화학적 처리의 경우, 열처리 및 화학적 흡착에 의한 처리가 대부분이며, 이에 의한 이차적 대기 오염 및 잔류 물질이 문제시 되고 있다(6). 이에 비해 생물학적 처리 방법은 처리비용이 저렴하며, 환경친화적인 처리 방법으로 주목 받고 있다(3).

현재까지의 연구 결과, 생물학적 PCE 분해는 혐기(4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 25) 및 호기(18, 21) 상태에서의 제거가 연구되어져 왔다. 그러나 혐기적 조건에서의 PCE 분해의 경우 반응속도가 매우 느리고, PCE 분해과정 중 생성되는 DC (Dichloroethylene), 특히 독성이 매우 강한 VC (Vinylchloride) 등은 분해가 되지 않고 축적되어 PCE 분해를 저해하고 2차적 오염을 일으킨다(16). 호기적 조건에서의 PCE의 제거는 *P. stutzeri* OX1에 의한 생분해가 유일하게 보고되었으며, 이때 toluene을 성장 기질로서 주입하여 주었다. 그러나, 위의 연구결과에서는 매우 낮은 처리효율과 느린 분해 속도를 나타내었으며, 저농도 실험만이 수행되었다(18). 그러므로 본 실험에서는 PCE 분해 고효율 균주의 분리 및 배양 최적조건을 확립하여 그 효율 및 분해특성을 연구하였으며, 이 연구를 기반으로 향후 PCE 오염지역의 생물학적 처리 적용시 효율성 및 경제성을 도모하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험실의 선행연구자에 의해 순수분리 된 BJ10을 이용하여 PCE의 호기적 분해에 대하여 연구하였다. BJ10은 고농도의 TPH (Total Petroleum Hydrocarbons), BTEX (Benzene, Toluene,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-249-9642, Fax: 82-31-245-8868
E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

Ethylbenzene, Xylenes) 오염 토양으로부터 분리되었다.

균주의 동정

형태학적 동정

BJ10의 형태학적 특징 관찰을 위하여 단순 염색(simple staining)과 그람 염색(Gram-staining) 후, 광학현미경($\times 1,000$, BX50, Olympus, Japan)하에서 형태와 크기, 군집 형태를 관찰하였으며 그람 양성/음성 박테리아를 판별하였다.

생리·생화학적 동정

API 20NE kit (Biomerieux, France)를 사용하여 균주의 생리·생화학적 특성을 조사하였으며 apiweb™ database (<http://www.apiweb.biomerieux.com>)를 이용하여 동정하였다.

16S rDNA 분석

16S rDNA의 분석을 위하여 Intronbio사의 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit를 사용하여 균주의 Genomic DNA를 추출하였다. PCR 시 Universal primer로 forward primer: 27F; 5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3' 와 reverse primer: 1492R; 5'-ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3' 를 사용하였고, iCycler (BioRad, USA)를 사용하여 수행하였다. 전기영동을 통해서 분리된 각 PCR 산물은 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 GenBank database의 염기서열과 비교 분석하여 동정하였다.

지방산 분석

지방산 분석은 Tryptic Soy Agar (TSA) 배지에 24시간 배양 후 세포벽의 지방산을 추출하여 FAME (Fatty Acid Methyl Ester)를 GC로 분석하였다. 지방산의 추출 및 분석은 KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)에 의뢰하였다.

균주의 배양

BJ10은 500 ml glass bottle에 100 ml의 MSM (mineral salt medium)을 넣고 PCE 3.0 μ l, toluene 50.0 μ l를 첨가한 후 접종하였다. 접종 후 배양병의 입구를 butyl rubber를 사용하여 밀봉하였고 pH 7, 0.03 g, 30°C의 조건에서 24시간 배양하였다. 배양된 균주는 433.5 g, 15 min로 원심 분리하여 균체를 얻은 후 새로운 MSM에 균체를 부유시켜 사용하였다. MSM의 조성은 KH₂PO₄, 2 g; K₂HPO₄, 2 g; KNO₃, 1 g; (NH₄)₂SO₄, 2 g; NaCl, 0.4 g; trace element-SL6, 2 ml; MgSO₄·7H₂O, 0.4 g; CaCl₂·2H₂O, 0.04 g; FeCl₂·7H₂O, 0.02 g; VA vitamin solution 2 ml와 같았다. Trace element solution SL-6의 조성은 ZnSO₄·7H₂O, 0.1 g; MnCl₂·4H₂O, 0.03 g; H₃BO₃, 0.3 g; CoCl₂·6H₂O, 0.2 g; CaCl₂·2H₂O, 0.01 g; NiCl₂·6H₂O, 0.02 g; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.03 g; distilled water, 1,000 ml와 같고 VA Vitamin solution의 조성은 biotin, 10 mg; nicotinamide, 35 mg; thiamine dichloride, 30 mg; p-aminobenzoic

acid, 20 mg; pyridoxal chloride, 10 mg; ca-pantothenate, 10 mg; vitaminB 12, 5 mg; distilled water, 1000 ml와 같았다.

회분식 실험

PCE 농도에 따른 BJ10의 PCE 분해특성

BJ10에 의한 PCE의 초기 농도별 분해율을 확인하기 위하여 PCE의 초기농도를 5, 10, 25 그리고 100 mg/L으로 다양하게 주어 제거 실험을 실시하였다. 120 ml amber bottle에 10 ml의 MSM (pH 7)을 넣고 초기 균 접종 농도를 1 g (wet weight)/L으로 하여 teflon-coated silicon septum과 aluminum cap으로 밀봉하였다. 기질은 hamilton syringe (5 μ l)를 사용하여 PCE 0.55 μ l (액상농도기준: 10 mg/L)과 toluene 2.40 μ l (액상농도기준: 50 mg/L)를 주입한 후 30°C에서 0.03 g (150 rpm)으로 진탕배양하였다.

Toluene 농도에 따른 BJ10의 PCE 분해특성

Toluene 첨가 농도에 따른 PCE의 분해 효율 증감 확인을 위하여 PCE 10 mg/L에 toluene 농도를 5, 25, 50, 100 그리고 200 mg/L로 첨가하였다. 배양조건은 PCE 농도에 따른 PCE 분해특성 실험과 동일하게 수행하였다.

PCE 재주입에 따른 BJ10의 PCE 분해

BJ10 균주를 이용하여 PCE 10 mg/L의 분해실험을 실시하였다. 총 26일간 3일 간격으로 PCE의 잔류 농도를 측정하였으며, 18일째 PCE 0.3 μ l (액상농도기준: 5.5 mg/L)를 재주입하여 주었다. 초기 첨가 기질 농도는 toluene 50 mg/L로 하였으며, 배양 조건은 위 실험과 동일하게 수행하였다.

PCE 농도 측정 및 PCE 분해율 산출

PCE 측정은 FID (Flame Ionization Detector)가 장착된 6890N Gas Chromatography (Agilent, USA)를 이용하였다. 샘플 채취시 amber bottle (120 ml)의 headspace (110 ml)에서 gas tight syringe (Hamilton, USA)를 사용하여 100 μ l의 기상을 채취하여 GC에 주입하였다. Headspace의 기질농도를 측정·계산한 후 Henry's coefficients (PCE; 0.72)를 적용하여 액상 내의 기질농도로 환산하였다. 분해효율 및 분해율 계산은 120 ml amber bottle의 주입한 PCE의 총 질량(μ mol)을 기준으로 하여 산출하였다.

결 과

균주의 동정

PCE 분해 고효율 균주인 BJ10은 Rod형의 Gram-negative로 확인되었으며(배양조건: MSM 100 ml, PCE 0.3 μ l, toluene 50.0 μ l, 0.03 g, 30°C) 균주의 폭 및 길이는 0.7~1.0 \times 1.3~1.5 μ m이었다. 생리 생화학적 특징(API 20NE test) 및 분자생물학적(16S rDNA sequence) 분석 결과 각 99.7, 98.0%의 유사도로 *Pseudomonas putida*로 동정되었다. 또한 지방산 분석(FAME)을

Table 1. Morphological and physiological characteristics of bacterium BJ10

Character	BJ10	<i>Pseudomonas putida</i> bio-varA ^a
Gram-stain	-	-
Shape	rod	rod
Size (width×length)	0.7 ~1.0×1.3~1.5 μm	
Potassium nitrate	-	-
Tryptophane	-	-
Glucose	-	+
Arginine	+	+
Gelatine	-	-
D-Glucose	+	+
Arabinose	-	d
Mannose	+	d
Mannitol	-	d
Maltose	-	d
Gluconate	+	+
Caprate	+	+
Adipate	-	-
Malate	+	d
Citrate	+	+
Phenyl-acetate	+	d
Oxidase	+	+

^a ATCC 12633. All its data were obtained from Bergey's manual of Systematic Bacteriology (7).

d, differs among strains

통하여 *P. putida* biotypeA (Sim index 0.387)로 동정되었다.

회분식 실험

PCE 농도에 따른 BJ10의 PCE 분해 특성

BJ10의 PCE 농도에 따른 PCE 분해 특성을 확인하였다. 그 결과 BJ10은 10일 동안 PCE 5, 10, 25, 그리고 100 mg/L를 각각 52.8, 30.4, 27.9, 그리고 20.3% 분해하여 PCE 농도가 증가할수록 PCE 분해효율은 감소함을 확인하였다. 그러나 PCE의 농도가 증가할수록 PCE 분해율은 5.9, 6.8, 15.8 그리고 46.0 nmol/hr로 점점 증가하는 경향을 보였다.

Toluene 농도에 따른 BJ10의 PCE 분해 특성

Toluene 첨가 농도에 따른 BJ10의 PCE (10 mg/L) 분해 특성을 확인한 결과, toluene 5, 25, 50, 100 그리고 200 mg/L를 첨가하였을 때, 10일간 각각 4.0, 21.2, 30.4, 54.1, 그리고 57.0%를 분해하였다. 또한, 각 농도별 PCE 분해 속도는 0.9, 4.8, 6.8, 12.2 그리고 12.8 nmol/hr로 나타났다.

Table 2. Fatty acid profiles of BJ10

Shorthand name	Systematic name ^a	Content (%)
C _{10:0} -3OH	3-Hydroxycapric acid	9.43
C _{12:0}	Lauric acid	1.74
C _{12:0} -2OH	2-Hydroxycapric acid	5.66
C _{12:1} -3OH	3-Hydroxydodecenoic acid	1.60
C _{12:0} -3OH	3-Hydroxylauric acid	4.85
C _{14:0}	Myristic acid	0.39
C _{16:0}	Palmitic acid	21.27
C _{17:0} cyclo	cis-9,10-Methylenehexadecanoic acid	2.36
C _{17:0}	Margaric acid	0.10
C _{18:1} w7o		20.01
C _{18:0}	Stearic acid	0.27
11 methyl C _{18:1} w7o		0.31
19:0 10 methyl		0.18

^aData obtained from reference (20)

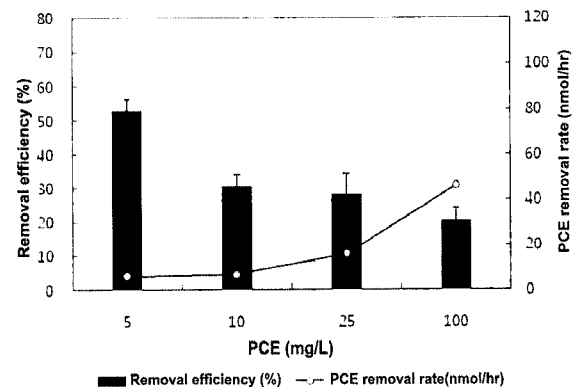


Fig. 1. The characteristics of various PCE concentrations on PCE biodegradation by BJ10 for 10 days. PCE concentrations are 5, 10, 25 and 100 mg/L in liquid phase (toluene, 50 mg/L; initial cell density, 1.0 g/L (w/v); temperature, 30°C and pH 7). PCE removal efficiencies (%) are 52.8, 30.4, 27.9, and 20.3, respectively. PCE removal rates (nmol/hr) are 5.9, 6.8, 15.8, and 46.0, respectively. All values are the means of triplicates

Toluene은 PCE의 공대사적인 분해를 유도하기 위하여 첨가된 것으로, 첨가 농도가 높아질수록, PCE의 분해 효율 및 분해 속도가 증진되는 것을 확인하였다.

PCE 재주입에 따른 BJ10의 PCE 분해

BJ10에 의한 PCE 분해 기간 동안 기질을 재주입하여 그 분해 경향을 확인하였다. BJ10은 50 mg/L toluene 첨가 하에 10 mg/L의 PCE를 18일 동안 65.1% 분해하였으며, 이때의 PCE 분해 속도는 8.1 nmol/hr이었다. 18일이 경과 후 PCE가 분해된 BJ10의 실험군에 5.5 mg/L의 PCE를 재주입하였고 그 결과, 7.6 mg/L의 PCE는 8일 동안 63.0% 분해되었다. 첨가 후 PCE 분해속도는

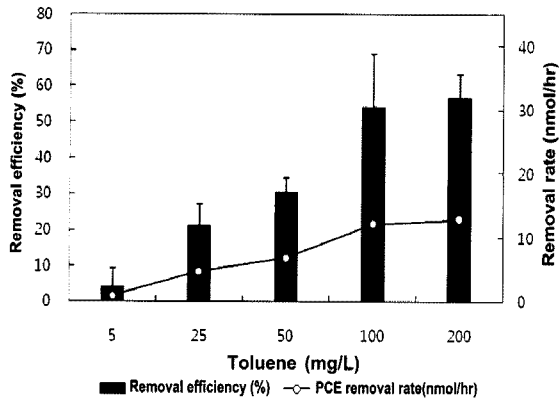


Fig. 2. The characteristics of various toluene concentrations on PCE biodegradation by BJ10 for 10 days. Toluene concentrations are 5, 25, 50, 100 and 200 mg/L in liquid phase (PCE, 10 mg/L; initial cell density, 1.0 g/L(w/v); temperature, 30°C and pH 7). PCE removal efficiencies (%) are 4.0, 21.2, 30.4, 54.1, and 57.0, respectively. PCE removal rates (nmol/hr) are 0.9, 4.8, 6.8, 12.2 and 12.8, respectively. All values are the means of triplicates

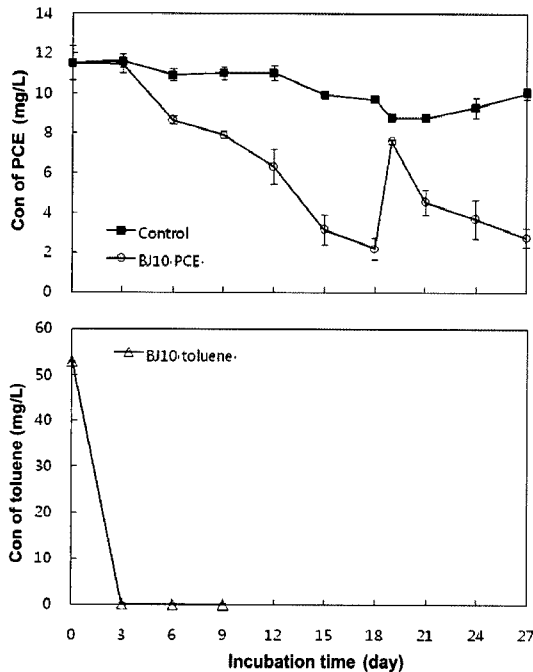


Fig. 3. Time course of PCE degradation by BJ10 including PCE re-injection (toluene, 50 mg/L; initial cell density, 1.0 g/L(w/v); temperature, 30°C, pH 7). The initial PCE removal rate was 8.1 nmol/hr until 18 days. The additional injection of 5.5 mg/L PCE (total 7.6 mg/L) made 63.0% degradation for 8 days in the presence of 50 mg/L toluene under the same conditions. Its removal rate was 13.5 nmol/hr (Symbols: ○, Control; ●, Concentration BJ10 treatment; △, Concentration BJ10 treatment). All values are the means of triplicates

13.5 nmol/hr으로 PCE를 재 주입하기 전보다 증진되었다

고 찰

현재까지 PCE를 호기적으로 생분해하는 균주에 대한 연구는

Pseudomonas stutzeri OX1에 대해 총 2편이 보고되었다(18, 21). 본 연구에서는 PCE를 호기적 조건에서 고효율로 분해하는 *Pseudomonas putida* BJ10을 분리 동정하였으며, 위 균주를 사용하여 다양한 농도의 PCE 분해 및 첨가 기질 농도의 변화에 따른 PCE 제거의 영향에 대해 연구하였다. 이전 연구에서 PCE의 호기적 분해 실험시 PCE 초기 농도는 매우 낮은 농도 범위 (3.8~11.3 mg/L)에서 수행되었다(18, 21). 그러나 BJ10을 이용하여 다양한 농도(5~100 mg/L)에서의 호기적 PCE 분해실험을 실시한 결과 10일간 PCE 5 mg/L를 52.8%를 제거하였으며, 100 mg/L를 20.3% 제거함으로써, 저농도 및 고농도에서도 PCE를 고효율로 제거할 수 있는 것을 확인하였다[배양 조건: toluene 50 mg/L, 초기 균집중농도 1.0 g/L (w/v), 30°C, pH 7, DO 3.0~4.2 mg/L, 0.03 g]. 또한 PCE 100 mg/L이었을 시의 분해 속도는 46.0 nmol/hr로 나타났다. 류 등(2000)에 의하여 연구된 PCE 제거 균주인 *P. stutzeri* OX1는 M9C1 배지에서 pre-culture하였을 때 분해속도는 7.5 nmol/hr, 분해효율은 9%(초기 PCE 3.8 mg/L, 24시간)이었고 LB에서 pre-culture 하였을 때 분해속도는 26.7 nmol/hr, 분해효율은 28% (초기 PCE 3.8 mg/L, 배양 21시간)이었으며, BJ10에 의한 제거 속도에 비하여 떨어짐을 알 수 있었다(배양 조건: toluene 11.3 mg/L, 초기 균 집중농도 OD₆₀₀ 3.5~5.0, 32°C, 300 rpm). 이 결과로 보아 BJ10을 현장 처리에 적용시, 그 효율 및 경제성에서 뛰어난 효과를 기대할 수 있으며, 또한 영양배지에서 생기는 2차적인 오염에 대한 우려가 없을 것으로 보인다.

지금까지 연구 결과, PCE는 호기적 조건 하에 단독적으로 제거 되지 못하거나 그 효율이 매우 미비하다고 알려졌지만, toluene과 같은 공대사적 분해를 유도하는 기질의 첨가로 제거된다고 보고되었다(18, 21). 예를 들자면 *P. stutzeri* OX1에 의한 PCE 및 TCE의 제거는 대부분 toluene의 첨가에 의해 이루어졌다(18, 19, 21). 또한 *P. putida* F1을 이용한 TCE 분해 실험에서도 toluene을 첨가기질로 주입하여 주었다(15, 27). 본 연구에서는 다양한 농도의 toluene을 첨가하여 PCE 분해에 대한 영향을 확인하였다. BJ10을 이용해 다양한 toluene 첨가 농도(5~200 mg/L)에서의 PCE (10 mg/L) 분해 실험결과 PCE 분해 속도는 toluene첨가 농도에 의존적으로 증가하였다. Toluene 5 mg/L 첨가시 PCE 10 mg/L가 10일 동안 4% 제거되었지만 toluene의 첨가 농도를 200 mg/L 늘렸을 때 동일 기간 동안의 PCE 분해효율은 57.0%로 증진되어 가장 높은 PCE의 분해효율을 확인하였다. 결과적으로 첨가기질인 toluene의 농도가 높아질수록 PCE의 분해율을 증진시킨다는 사실을 밝혔다.

PCE의 재주입에 따른 기질 분해능의 변화를 알아보기 위하여, BJ10을 이용해 10 mg/L PCE 분해 경향을 확인한 결과, 초기 18일간 8.1 nmol/hr의 분해 속도를 나타냈으며 잔류농도는 2.1 mg/L였다. PCE 5.5 mg/L를 재주입한 후 PCE의 분해능이 회복되었으며 제거 속도는 13.5 nmol/hr으로 초기 분해 속도보다 증진된 것을 보여주었다. 이전의 연구 결과에서 *Ralstonia pickettii* PKO1을 이용한 TCE 분해시, 제거 실험 이전에 균주를 TCE에 적응시켜 결과적으로 분해기작 발현이 촉진되어 TCE 분해율이 증가되었다(26). 이는 염소계화합물에 적응한 균주의 분해능의

Table 3. Comparison of biological PCE degradation between *P. stutzeri* OX1 and *P. putida* BJ10. All values are the means of triplicates for BJ10.

Strain	Growth medium	Initial PCE conc. (mol)	Energy source (toluene)	Initial cell density (OD ₆₀₀)	Incubation time (h)	PCE degraded (mol)	PCE removal rate (nmol/hr)
<i>P. stutzeri</i> OX1	M9Cl ⁻	2.0	3.0 mol	3.5~5.0	24	0.18	7.5
	LB	2.0	0 mol	3.5~5.0	24	0.17	7.0
	LB	2.0	3.0 mol	3.5~5.0	21	0.56	26.7
<i>P. putida</i> BJ10	MSM						
	(toluene; 470.4 mol, PCE; 29.3 mol)	54.3	22.6 mol	0.2	240	11	46.0

향상(26), 또는 물질 분해 시 생성되는 대사산물의 독성에 대한 저항력 증진(23), 등의 요인이라 생각되며, 본 실험에서도 유사한 결과를 볼 수 있었다. PCE 분해율의 증진에 대한 정확한 원인을 확인하기 위해서 1차적인 PCE 분해 후 2차 3차의 지속적인 PCE 주입실험이 필요하지만 장기간 동안의 실험은 bottle 내에 PCE 기질의 밀봉상태를 유지하기 어렵다는 단점이 있어 정확한 결과를 얻기 힘들다. 이를 해결하기 위한 실험방법의 개선 및 반복적인 추가연구가 진행되어야 한다.

본 연구에서는 호기적 조건에서 고효율의 PCE 분해균주 *P. putida* BJ10을 분리하였으며, 다양한 농도에서 최적의 제거 효율을 찾아내었다. 또한, 첨가 기질 농도(toluene)별 PCE 분해 실험을 통하여 그 제거 효율을 증가시켰다. 이 균주를 이용한 PCE의 생물학적 처리 시스템을 개발하여 PCE 오염 토양지하수의 현장 적용 시 높은 효율 및 경제성을 보일 것이라 사료된다.

감사의 말

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업(No. 041-071-033), 국가지정 환경산업미생물 및 유전자은행의 연구비(No. R21-2005-000-10045-0)로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 환경부, 2007. 지하수 수질측정망 운영 결과.
2. 환경부, 토양 오염 우려 기준, 대책 기준.
3. Amon, J.P., A. Agrawal, M.L. Shelley, B.C. Opperman, M.P. Enright, N.D. Clemmer, T. Slusser, J. Lach, T. Sobolewski, W. Gruner, and A.C. Entingh. 2007. Development of a wetland constructed for the treatment of groundwater contaminated by chlorinated ethenes. *Ecol. Eng.* 30, 51-66.
4. Anke, N., S.M. Heidrun, and G. Diekert. 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 162, 295-301.
5. Barrio-Lage, G., F.Z. Parson, R.S. Nassar, and P.A. Lorenzo. 1986. Sequential dehalogenation of chlorinated ethenes. *Environ. Sci. Technol.* 20, 96-99.
6. Blankenship, A., D. Chang, A. Jones, P. Kelly, I. Kennedy, F. Matsumura, R. Pasek, and G. Yang. 1994. Toxic combustion by-products from the incineration of chlorinated hydrocarbons and plastics. *Chemosphere* 29, 183-196.
7. Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., p. 354-372. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
8. Cabriol, N., F. Jacob, J. Perrier, B. Fouillet, and P. Chambon. 1998. Complete degradation of high concentration of tetrachloroethylene by a methanogenic consortium in a fixed-bed reactor. *J. Biotechnol.* 62, 133-141.
9. Chang, Y.C., M. Hatsu, and K. Jung. 2000. Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 5, 489-491.
10. Dawson, H.E. and P.V. Roberts. 1997. Influence of viscous gravitational and capillary forces on DNAPL saturation. *Ground Water* 35, 261-269.
11. Distefano, T.D., J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2287-2292.
12. Freedman, D.L. and J.M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2144-2151.
13. Heidrun, R., A. Lorenz, and S. Martin. 2004. Dechlorination of PCE in the presence of Fe⁰ enhanced by a mixed culture containing two *Dehalococcoides* strains. *Chemosphere* 55, 661-669.
14. Holliger, C., G. Schraa, A.J.M. Stams, and A.J.B. Zehnder. 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2991-2997.
15. Lawrence, P.W. and T.G. David. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1703-1708.
16. McCarty, P.L. 1997. Breathing with chlorinated solvents. *Science* 276, 1521-1522.
17. Phelps, T.J., J.J. Niedzielski, R.M. Schram, S.E. Herbes, and D.C. White. 1990. Biodegradation of trichloroethylene in continuous-recycle expanded-bed bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1702-1709.
18. Ryoo, D., H. Shim, K. Canada, P. Barbieri, and T.K. Wood. 2000. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-*o*-xylene

- monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nat. Biotechnol.* 18, 775-778.
19. Ryoo, D., H. Shim, P. Barbieri, and T.K. Wood. 2001. Tetrachloroethylene, trichloroethylene, and chlorinated phenols induce toluene-*o*-xylene monooxygenase activity in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 545-549.
 20. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. 199-204. In Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands (eds.), *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
 21. Shim, H., D. Ryoo, P. Barbieri, and T.K. Wood. 2001. Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes, and vinyl chloride by toluene-*o*-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 265-269.
 22. U. S. EPA. 1998. National primary drinking water regulations, technical factsheet on: Tetrachloroethylene, Environmental Protection Agency.
 23. Wang, L., N. Qiao, F. Sun, and Z. Shao. 2008. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles* 12, 335-342.
 23. World Health Organization. 2006. Concise international chemical assessment document 68.c
 24. Xavier, M., T.A. Gatell, and H.Z. Stephen. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3108-3113.
 25. Yuki, M., U. Hajime, T. Yasunori, and H. Katsutoshi. 2002. Characterization of the adaptive response to trichloroethylene-mediated stresses in *Ralstonia picketti* PKO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5231-5240.

(Received November 26, 2008/Accepted December 19, 2008)

ABSTRACT : The Characteristics of Tetrachloroethylene (PCE) Degradation by *Pseudomonas putida* BJ10

Myung-Hoon Choi¹, Jaisoo Kim², and Sang-Seob Lee^{1*} (¹Department of Biological Engineering, ²Department of Lifescience, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea)

In this study, biological PCE degradation by using a BTEX degrading bacterium, named BJ10, under aerobic conditions in the presence of toluene was examined. According to morphological, physiological characteristics, 16S rDNA sequencing and fatty acid analysis, BJ10 was classified as *Pseudomonas putida*. As a result of biological PCE degradation at low PCE concentrations (5 mg/L), PCE removal efficiency by *P. putida* BJ10 was 52.8% for 10 days, and PCE removal rate was 5.9 nmol/hr (toluene concentration 50 mg/L, initial cell density 1.0 g (wet weight)/L, temperature 30, pH 7 and DO 3.0-4.2 mg/L). At high PCE concentration (100 mg/L), PCE removal efficiency by *P. putida* BJ10 was 20.3% for 10 days, and PCE removal rate was 46.0 nmol/hr under the same conditions. The effects of various toluene concentration (5, 25, 50, 100, 200 mg/L) on PCE degradation were examined under the same incubation conditions. The highest PCE removal efficiency of PCE was 57.0% in the initial PCE concentration of 10 mg/L in the presence of 200 mg/L toluene for 10 days. Furthermore, the additional injection of 5.5 mg/L PCE (total 7.6 mg/L) made 63.0% degradation for 8 days in the presence of 50 mg/L toluene under the same conditions. Its removal rate was 13.5 nmol/hr, which was better than the initial removal rate (8.1 nmol/hr).