

혐기성 PCE 탈염소화 관련 미생물 군집 특성

이태호, 문부영*, 박태주*

부산대학교 환경기술개발연구센터, *부산대학교 환경공학과 (Leeth55@pusan.ac.kr)

<요약문>

Tetrachloroethylene(PCE) dechlorination was investigated in an anaerobic enrichment culture from landfill soil. Anaerobic PCE dechlorinating microorganisms could convert 150mg/L of PCE via trichloroethylene(TCE) to *cis*-1,2-dichloroethylene(cDCE) within 2 days at the optimum temperature of 30 to 35°C. The enrichment culture could dechlorinate TCE but did not degrade other chlorinated aliphatic compounds, such as cDCE, *trans*-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, 1,1-dichloroethane, 1,2-dichloroethane, and 1,1,1-trichloroethane during 5 days incubation. Several isolates from the enrichment culture did not show dechlorinating activity of PCE. Microbial analysis of the dechlorinating enrichment culture by using Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method showed that at least three microorganisms were related to the anaerobic PCE dechlorination in the enrichment.

key word : PCE, TCE, cDCE, dechlorination, enrichment culture, PCR-DGGE

1. 서론

산업 발달과 더불어 산업계의 전반에 널리 이용된 염화에틸렌 화합물인 PCE (tetrachloroethylene), TCE(trichloroethylene) 등은 토양 및 지하수 오염의 주요인 물질로 인식되어져 왔다. 2003년 환경부에서 실시한 토양 및 지하수 측정망 운영 결과에 따르면 PCE와 TCE는 빈번하게 검출된 것으로 나타났다(환경부, 2002).

염소계 지방족 화합물(Chlorinated aliphatic compound)인 PCE는 혐기성 조건하에 분해가 거의 불가능한 것으로 알려져 왔으나, 적절한 혐기성 조건하에서는 몇몇의 미생물들에 의해 환원적 탈염소화가 이루어 질 수 있음이 밝혀져 왔다(Scholz-Muramatsu *et al.*). 선행 연구들의 보고에 의하면 PCE와 같은 염화 에틸렌 화합물의 혐기적 전환에 관여하는 균들로는 *Desulfitobacterium sp.*, *Dehalospirillum multivorans* 그리고 *Dehalobacter restrictus* 등으로 밝혀졌다(Miller, E. *et al.*, 1997; Neumann, A. *et al.*, 1994). Young C. Chang *et al.*(2000)이 보고한 연구에서는 혼합 배양액으로부터 PCE 탈염소화에 관여하는 미생물을 분리하여 *Clostridium bifermentans* DPH-1(strain DPH-1)으로 규명하였으며, Jan Gerritse *et al.*(1999)의 연구에서는 혼합 배양액으로부터 선택적 배양에 의해 *Desulfitobacterium frappieri* TCE1라는 PCE 탈염소화에 관여하는 미생물 종을 분리하였다. 이러한 미생물들은 혐기성 상

태에서 전자 공여체인 수소를 이용하여 단계적인 환원반응에 의해 탈염소화 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 하지만, 염화에틸렌 화합물의 치환된 염소수가 감소할수록 탈염소화 속도는 감소하게 되며, 대부분의 미생물들은 중간 생성물인 *cis*-DCE(*cis*-dichloroethylene) 혹은 VC(vinylchloride or monochloroethylene)까지 탈염소화하는데 관여하는 것으로 보고되고 있다. 또한 Oliver Drzyzga et al.의 보고에 의하면 *desulfitobacterium species*(strain TCE1)는 배양액 내에 단일 종으로 존재 할 경우 할로젠 지방족 화합물의 탈할로겐화를 일으킬 수 없으며, 황 환원 세균(sulfate reducing bacteria)과 공생함으로써 탈할로겐화를 수행할 수 있다고 밝혀내었다. 이는 황 환원 세균의 발효(fermentation)에 의해 생성되는 수소를 *desulfitobacterium species*가 전자 공여체로 사용하기 때문인 것으로 밝혀졌다. 하지만, 현재 국내에서 PCE의 탈염소화에 관여하는 미생물을 분리-특성화한 연구는 전무한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 혐기성 상태에서 지속적으로 농화 배양한 PCE 탈염소화 관련 미생물 군집의 특성을 파악하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. PCE 탈염소화 관련 미생물 농화 배양

혐기성 액상 배지 20ml에 P시 매립장 토양 1g의 microcosm을 회분식 반응기(50ml serum bottle)내에 주입하여 연속적으로 계대배양(subculture)하였다. 반응기 내부는 99.9%의 N₂ 가스를 대략 3분간 주입하여 치환함으로써 혐기성 상태를 유지하였다. PCE 농도는 60µmoles/l 가 되도록 액상 실린지를 이용하여 주입하였으며, 35℃의 배양기에서 정지 배양하였다. 혐기성 액상배지의 조성은 액상배지 1 l 당 KH₂PO₄ 7g, K₂HPO₄ 2g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, yeast extract 1g, 0.1% Na resazurin 100µl, Na₃-citrate 0.5g 그리고 pyruvate 4g으로 구성되었으며, 2.5N NaOH를 주입하여 pH를 7±0.2로 조절하였다.

2.2. PCE 탈염소화 관련 미생물 군집 특성 조사

연속적으로 계대 배양된 배양액 내의 탈염소화 관련 미생물 군집의 최적 환경 인자를 파악하기 위해 pH, 온도 그리고 PCE 주입농도에 따른 영향을 관찰하였으며, PCE 및 TCE, *cis*-1,2-dichloroethylene, *trans*-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, 1,1-dichloroethane, 1,2-dichloroethane 그리고 1,1,1-trichloroethane와 같은 염소계 지방족 화합물들의 분해 능력을 각각 조사하였다.

PCE 탈염소화 관련 미생물을 확인하기 위해 PCE를 주입한 반응기와 주입하지 않은 반응기를 각각 분리하여 배양하였으며, 주입하지 않은 반응기로부터 지속적으로 PCE 분해 여부를 확인하였다. 그리고 배양액 내에 성장한 미생물 군집을 고상 평판 배지에 배양하여 성장한 colony들을 각각 분리하여 액상 배지에 접종하여 배양시킴으로써 PCE 분해를 확인하였으며, 각각의 배양액 내 배양된 미생물 군집은 분자 생물학적 방법의 Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)를 이용하여 조사하였다. BIO101 사의 Fast DNA extraction kit를 사용하여 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA는 16S rDNA를 증폭 한 후, V3 region을 증폭하여 PCR 산물을 얻어내었다. PCR 산물은 정제하여 DNA 변성제의 농도 gradient가 걸린 gel 상에서 전기 영동하여 band profile을 비교하여 조사하였다.

2.3. 분석 방법

회분식 반응기(50ml serum bottle)내의 염소계 지방족 화합물들의 분석은 gastight syringe를 이용하여

가스 상태의 샘플 200 μ l를 취하여 FID(flame ionization detector) 검출기가 설치된 Hewlet-Packard 5890A GC로 수행되어졌다. injector, detector의 온도는 각각 120 $^{\circ}$ C, 220 $^{\circ}$ C로 설정하였으며, oven 온도는 80 $^{\circ}$ C에서 승온률 10 $^{\circ}$ C/min으로 설정하였다. PCE 탈염소화 농화 배양액 내 세포 성장은 흡광광도계를 이용하여 660 nm의 흡광도를 일정시간 간격으로 두 번씩 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 농화배양 미생물 군집의 PCE 탈염소화

Fig. 1.에 나타난 바와 같이 본 연구에서 연속적으로 계대 배양 된 PCE 탈염소화 미생물 농화 배양액은 PCE를 탈염소화하여 최종 생성물인 cis-DCE를 축적하는 것으로 나타났다. 계대 배양 과정을 통하여 PCE 분해 시간은 점차적으로 단축되었으며, 최종적으로 48시간 이내에 60 μ M의 PCE를 완전 탈염소화하는 것으로 관찰되었다. 농화배양 한 미생물들의 성장을 관찰하기 위해 O.D.(optical density at 660 nm)를 측정한 결과, PCE 분해가 시작되는 시점으로부터 O.D. 값은 증가하였으며, PCE 분해가 완료된 이후 일정하게 유지되는 것으로 조사되었다. 이는 PCE 탈염소화 관련 미생물의 초기 빠른 성장에 따라 PCE 탈염소화가 진행되어 짐을 알 수 있었다.

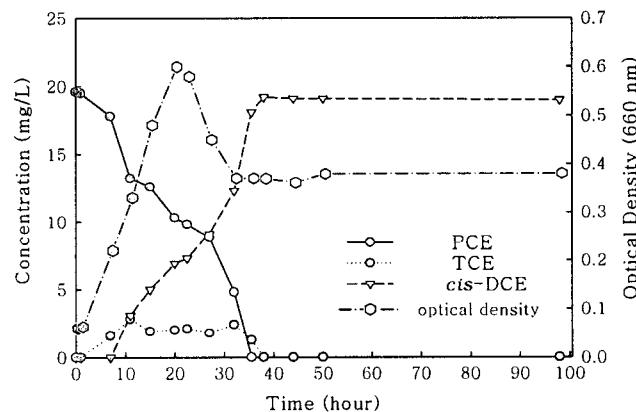


Fig. 1. Time course of PCE degradation and optical density at 660 nm in the enrichment culture.

3.2. 기초 환경 인자에 따른 PCE 탈염소화

혐기성 상태의 회분식 반응기 내에 배양 된 PCE 탈염소화 관련 미생물 군집의 최적 기초 인자를 파악하기 위해 온도, pH 및 PCE 주입 농도에 따른 PCE 탈염소율을 평가하였다. 그 결과 pH 7.0 \pm 0.2에서 가장 높은 PCE 탈염소율로 나타났으며, pH가 감소 혹은 증가할수록 PCE 탈염소율은 낮아지는 것으로 나타났다(data not shown). 온도에 따른 PCE 탈염소율은 30 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C에서 비교적 높은 것으로 조사되었으며, PCE 주입 농도에 따른 농화 배양액 내 미생물 군집의 PCE 탈염소화는 대략 600 μ moles/l의 PCE 농도까지 탈염소화가 가능한 것으로 나타났다.

3.3. PCE 탈염소화 미생물 군집 특성

본 연구에서 배양한 PCE 탈염소화 관련 미생물 군집의 염소계 지방족 화합물들에 관한 탈염소화를 평가하였다. 그 결과 Table 1.에서 나타난 바와 같이 PCE, TCE를 제외한 나머지 염소계 지방족 화합

물들에서는 탈염소화가 관찰되지 않았다. 이는 본 연구에서 구축한 배양액 내 미생물 군집이 염소계 지방족 화합물 중 특히 PCE 탈염소화에 관여하며, 전자 수용체로서 PCE에 순응되어 있음을 짐작할 수 있었다.

Table 1. Dechlorination of aliphatic compounds by the enrichment culture

Chlorinated aliphatic compounds	Dechlorination
Tetrachloroethylene	+
Trichloroethylene	+
<i>cis</i> -1,2-Dichloroethylene	-
<i>trans</i> -1,2-Dichloroethylene	-
1,1-Dichloroethylene	-
1,1-Dichloroethane	-
1,2-Dichloroethane	-
1,1,1-trichloroethane	-

Cultivation was performed for 5 days. Initial concentration of each compound was 50µM.

+: degraded, -: not degraded.

PCE 탈염소화 관련 미생물을 확인하기 위해 PCE를 주입한 반응기와 주입하지 않은 반응기를 각각 분리하여 배양한 결과, 여러 번의 배양 이후, PCE를 주입하지 않은 반응기 내에서는 PCE 탈염소화가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 그리고 평판 배지에서 성장한 미생물을 분리한 후, 액상 배지에 접종시켜 PCE 분해를 확인한 결과, PCE 분해 활성을 나타내지 않았으며, 순수 분리된 미생물을 상호 혼합하여 배양한 공생 조건에서 또한 PCE 탈염소화가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 농화배양액 내의 PCE 탈염소화 미생물은 본 실험에서 사용한 고상 배지에서는 배양되지 않는 것으로 사료되며, 영양염류의 제공 등 농화배양액 내 미생물 상호간의 작용이 있는 것으로 추측되었다.

농화 배양 된 회분식 반응기 내 미생물 군집은 분자 생물학적 방법인 PCR-DGGE를 이용하여 조사하였다. 그 결과 PCE를 분해하는 미생물의 존재 및 연속적인 농화 배양을 통하여 미생물 군집이 단순화되는 것으로 확인되었으며, PCE 분해에는 적어도 3 가지 이상의 미생물들이 관여하는 것으로 사료되었다.

4. 참고 문헌

- 1) Jan Gerritse, Oliver Drzyzga, Geert Kloetstra, Mischa Keijmel, Luit P. Wiersum, Roger Hutson, Matthew D. Collins, and Jan C. Gottschal, "Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1", Applied and Environmental Microbiology, Dec. p. 5212-5221(1999).
- 2) Miller, E., Gert, W., and Gabriele, D., "Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S", Arch. Microbiol., 168, 513-519(1997).
- 3) Neumann, A., Scholz-Muramatsu, H., and Diekert, G., "Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*", Arch. Microbiol., 162, 295-301(1994).
- 4) Oliver Drzyzga and Jan C. Gottschal, "Tetrachloroethene dehalorespiration and growth of *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 in strict dependence on the activity of *Desulfovibrio fructosivorans*", Applied and Environmental Microbiology, Feb. p. 642-649(2002).

- 5) Scholz-Muramatsu, H., Neumann, A., Messmer, M., Moore, E., and Diekert, G. "Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethylene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. Arch. Microbiol.", 163, 48-56(1996).
- 6) Young C. Chang, Masahiro Hatsu, Kweon Jung, Young S. Yoo, and Kazuhiro Takamizawa, "Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1", Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 89, No 5, 489-491(2000).
- 7) 환경부, 2001년 지하수 수질측정망 운영결과(2002).