

혐기성 PCE 탈염소화 미생물 농화 배양 및 미생물 군집 해석

문부영, 이태호*, 박태주

부산대학교 환경공학과, *부산대학교 환경기술개발연구센터 (e-mail: moonby86@pusan.ac.kr)

<요약문>

An anaerobic PCE(tetrachloroethylene) dechlorinating bacterial culture from a landfill soil was enriched and characterized. The enrichment culture could dechlorinate 60 μ mol/ml of PCE during a month of incubation and cis-DCE(cis- dichloroethylene) was observed as a main product of PCE dechlorination. Microbial analysis of the dechlorinating enrichment culture by using PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis) method showed that at least three microorganisms were related to the anaerobic PCE dechlorination.

key word : PCE(tetrachloroethylene), cis-DCE, dechlorination, PCR-DGGE

1. 서론

용해, 휘발 그리고 확산 등의 이동경로를 거쳐 토양 및 지하수의 다중매체를 오염시키는 물질들 중 물에 잘 용해되지 않는 비수용성 액체(NAPL: Nonaqueous phase liquid)는 비중에 따라 DNAPL(Dense nonaqueous phase liquid)와 LNAPL(Light nonaqueous phase liquid)로 분류된다. 비중이 물 보다 큰 염화 에틸렌 화합물인 PCE(tetrachloroethylene)와 TCE (trichloroethylene)는 대표적인 DNAPL 물질들이다. 토양으로 유출 된 염화에틸렌화합물은 유출량, 토양의 성질 등에 따라 다른 이동경로를 가지게 되며, 비중이 크고 물에 대한 용해도가 낮은 특성으로 인하여 빠르게 대수층(aquifer)으로 이동하여 수년 동안 지하수 전반에 느린 속도로 용해하게 된다.

염화에틸렌화합물(chlorinated ethylene compounds)은 에틸렌에 치환된 염소의 수에 따라 PCE (tetrachloroethylene), TCE(trichloroethylene), DCEs(dichloroethylene isomers) 그리고 VC(vinylchloride or monochloroethylene)와 같은 화합물들로 분류된다. 이들 염화에틸렌화합물들은 발암성이 있는 것으로 밝혀졌으며, 이 중에서 치환된 염소의 수가 많은 PCE와 TCE는 가격이 저렴하며, 탈지, 용해, 세정력 등이 우수하여 섬유산업 및 화학합성산업 등에서 널리 이용되어왔다. 하지만 취급부주의로 인해 장기간 주변 환경으로 누출되어왔으며, 2003년 환경부에서 실시한 토양 및 지하수 측정망 운영 결과에서 PCE와 TCE가 빈번하게 검출되는 것으로 나타났다(환경부, 2002).

염화에틸렌화합물 중 할로겐 원소인 염소로 포화된 PCE는 호기성 조건에서는 생물학적 분해가 어려운 반면, 혐기성 조건에서는 염소가 수소로 치환되는 환원 반응에 의해 단계적으로 PCE, TCE, DCEs, VC를 거쳐 ethylene으로 전환되어진다(Fig. 1). *Dehalococcoides ethenogenes strain 195*은 PCE의 완전

한 탈염소화에 관여하는 유일한 미생물 종으로 밝혀졌으며(Damborsky et al., 1999 and Melanie Duhamel et al., 2002), *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfitobacterium sp. strain PCE1*, *Dehalococcoides ethenogenes* 등은 PCE를 탈염소화하여 중간생성물인 DCEs로 축적하는데 관여하는 미생물 종들로 알려져 있다.

본 연구에서는 혐기성 상태에서 PCE 환원적 탈염소화(reductive dechlorination)에 관여하는 미생물들을 확보하기 위해 다양한 토양 및 슬러지 그리고 침출수 등의 microcosm을 이용하여, 회분식 반응기 실험을 통해 확보된 미생물들을 연속적으로 농화 배양하였다. 또한 분자생물학적 방법인 PCR-DGGE(Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis)를 이용하여 농화 배양한 회분식 반응기 내의 미생물 군집을 해석하였다.

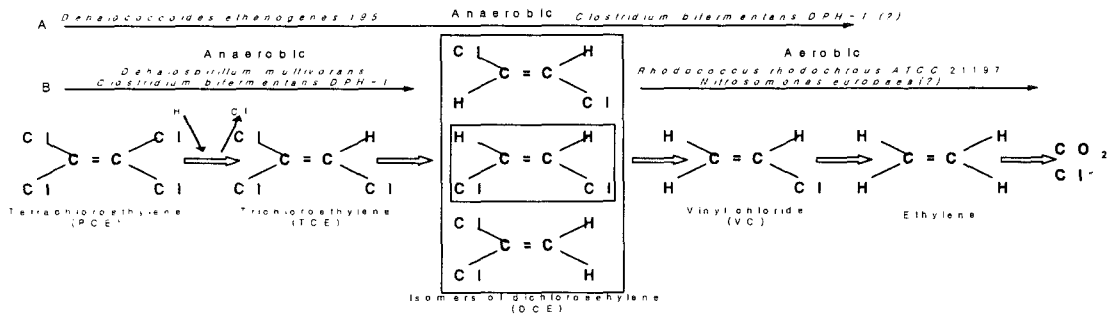


Fig. 1 Biodegradation pathway of PCE(tetrachloroethylene) by reductive dechlorination ; A:Single-stage process(anaerobic), B:Two-stage process(anaerobic and aerobic) (Benedict C. Okeke et al., 2000).

2. 본 론

2.1 실험재료 및 방법

50ml vial의 회분식 반응기를 이용하여 개별의 토양 및 혐기성 소화조 슬러지 그리고 매립장 침출수 내의 microcosm에 의한 PCE 탈염소화를 관찰하였다. 회분식 반응기는 여러 지역에서 수집한 각각의 토양 1g, 슬러지 1ml 그리고 침출수 1ml와 가압/가열 조건(121°C, 15min)에서 멸균한 혐기성 액상 배지 20ml를 함께 vial에 주입하여 구성하였다. vial 내부의 혐기성 상태는 99.9%의 N₂ 가스를 대략 3분 간 주입하여 치환하였으며, 35°C의 배양기(incubator)에서 정치배양하였다. PCE 농도는 60µmoles/l(대략 10ppm)가 되도록 액상 실린지를 이용하여 주입하였으며, 일정한 시간 간격으로 염화에틸렌화합물 농도를 측정하였다.

혐기성 액상배지의 조성은 액상배지 1l 당 KH₂PO₄ 7g, K₂HPO₄ 2g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, yeast extract 1g, 0.1% Na resazurin 100µl, Na₃-citrate 0.5g 그리고 pyruvate 0.5g으로 구성되었으며, 2.5N NaOH를 주입하여 pH를 7로 조절하였다. PCE 탈염소화가 확인된 회분식 반응기 내 미생물들은 반복적으로 농화 배양하였으며, 배양한 미생물 군집들은 open tube로 옮겨 원심 분리한 후, 고형물만 수집하여 냉동 보관하였다. 수집한 샘플들은 분자생물학적 방법인 PCR-DGGE를 이용하여 환원적 탈염소화에 관여하는 미생물 군집을 해석하였다.

2.2 분석방법

회분식 반응기(50ml vial)내의 PCE와 PCE 분해 부산물(TCE, DCEs, VC, ethylene)들의 분석은 gastight syringe로 가스상 샘플 200µl를 취하여 FID(flame ionization detector) 검출기가 설치된

Hewlett-Packard 5890A GC를 이용하여 수행하였다. injector, detector의 온도는 각각 120℃, 220℃로 설정하였으며, oven온도는 80℃에서 10℃/min으로 승온시켰다.

생물학적 탈염소화에 관여하는 미생물의 군집 변화는 분자 생물학적 방법인 PCR-DGGE를 이용하여 조사하였다. DNA 추출은 BIO101사의 Fast DNA extraction kit를 사용하였으며, 추출된 DNA는 beads bitter를 이용하여 세포를 파괴하여 추출하였다. 16S rDNA의 V3 region을 증폭하는 primer를 사용하여 Touch Down 법으로 PCR 증폭하였다. PCR 산물은 정제과정을 거쳐 DNA 변성제의 농도 gradient가 걸린 gel상에서 전기 영동하여 band profile을 비교하였다. 탈염소화 효율과 비례하여 밝기가 강해지거나 새롭게 생겨난 band를 추출하여 DNA의 염기배열을 해석하였다.

2.3 결과 및 고찰

2.3.1 혐기성 미생물의 탈염소화 반응

다양한 토양 및 슬러지 그리고 침출수 내의 microcosm을 이용하여 회분식 반응기 실험을 수행하였다. microcosm 내 미생물 배양은 35℃에서 정지 배양하였으며, 대조군 실험도 병행 하였다. 초기 PCE농도는 60μmoles/ℓ(대략 10ppm)로 하여 1개월 동안 탈염소화 진행상태를 관찰하였다. 그 결과 매립장에서 수집한 토양을 접종한 회분식·반응기에서 PCE 탈염소화가 가장 잘 진행되는 것으로 나타났다.

Table 1. Investigation of PCE degradation by microorganisms in various soil and sludge.

| Sample | | PCE degradatoin |
|----------|-----------------------------------|-----------------|
| control | | - |
| soil | 1. nearby forest site | * |
| | 2. flower bed site | * |
| | 3. landfill site | *** |
| sludge | 1. anaerobic digestion sludge (a) | * |
| | 2. anaerobic digestion sludge (b) | * |
| leachate | 1. landfill site | ** |

(-:non-degradation, *:a little degradation, **:moderate degradation, ***:good degradation)

2.3.2 농화 배양에 따른 탈염소화

탈염소화가 가장 좋은 매립장 토양을 반복적으로 subculture하여 회분식 반응기 내의 PCE 분해를 관찰하였다(Fig. 2). 그 결과 연속적인 농화 배양으로 인해 10ppm PCE의 분해 시일이 점차적으로 줄어드는 것으로 나타났다.

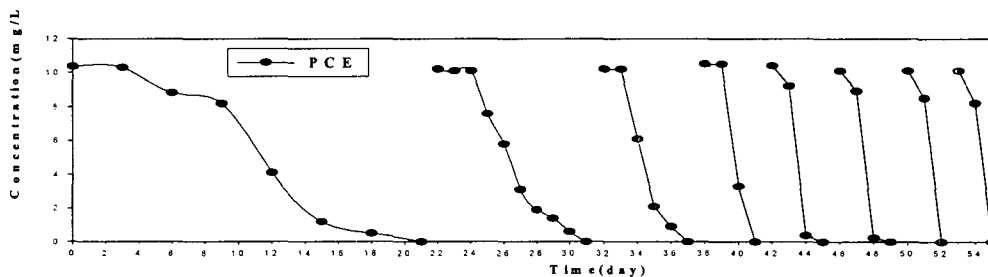


Fig. 2. PCE degradation by the dechlorinating bacterial culture during enrichment procedure.

2.3.3 PCE 탈염소화 및 중간대사산물 생성

매립장 토양의 microcosm을 이용한 회분식 반응기 내의 PCE 환원적 탈염소화를 3개월 동안 관찰하

였다(Fig. 3). 그 결과 혐기성 조건에서 PCE의 환원적 탈염소화는 최종 생성 단계인 ethylene까지 전환되지 않고 중간 생성물인 *cis*-DCE로 축적되는 것으로 나타났다. 즉, 농축 배양에 의해 확보된 환원적 탈염소화에 관여하는 혼합 미생물 중들이 염소로 포화된 PCE를 하위 염소계 지방족 화합물인 VC 혹은 ethylene까지의 전환이 아닌 *cis*-DCE까지의 전환에만 관여하는 것으로 나타났다.

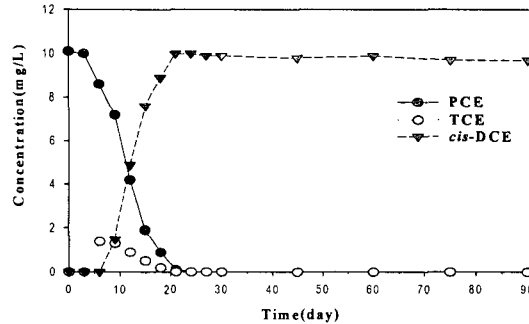


Fig. 3. PCE degradation and metabolic intermediates of the dechlorinating enrichment culture

2.3.4 PCR-DGGE를 이용한 미생물군집조사

순차적으로 농화 배양된 회분식 반응기로부터 수집한 샘플들에서 DNA를 추출하여 분자 생물학적 방법인 PCR-DGGE를 이용하여 탈염소화에 관여하는 미생물 군집을 조사하였다(Fig. 4). 그 결과 배양액 내 PCE 분해에 관여하는 미생물의 존재와 연속적인 농화 배양을 통하여 미생물 군집이 단순화되는 것을 확인하였으며, PCE 분해에 관여하는 미생물은 3가지 이상인 것으로 관찰되었다.

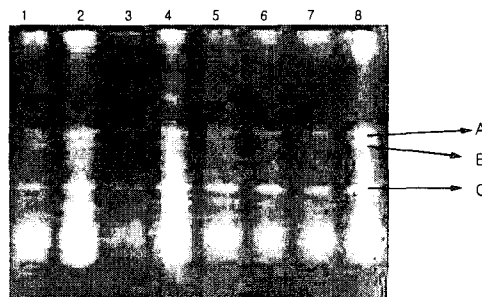


Fig. 4. DGGE profiles of 16S rRNA genes of numerically dominant members of the bacterial community in anaerobic PCE dechlorination enrichment culture

3. 결론

본 연구는 염화에틸렌화합물에 오염된 토양 및 지하수의 생물학적 복원을 위한 자료를 제공하고 탈염소화에 관여하는 미생물 군집을 해석하고자 하였다.

다양한 토양 및 혐기성 슬러지 그리고 침출수의 microcosm을 이용하여 PCE 분해능력을 회분식 실험한 결과 매립장 토양에서 가장 분해가 잘 일어났다. 초기 접종한 회분식 반응기에서 10ppm의 PCE는 25일 경과 후 *cis*-DCE로 전환하였지만, 여러 번의 농화 배양으로 인해 2일만에 전환이 이루어졌다. 본 연구에서 배양된 탈염소화에 관여하는 미생물 군집들을 분자생물학적 방법인 PCR-DGGE로 조사한 결과 적어도 3가지 이상의 미생물들이 관여하는 것으로 나타났다.

참고문헌

- 1) Benedict C. Okeke, Young C. Chang, Masahiro Hatsu and Kazuhiro Takamizawa, "Dechlorination of Tetrachloroethylene by a Membrane-associated Dehalogenase from *Clostridium Bifermentans* DPH-1", Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compound, C2-4 197-201(2000)
- 2) Damborsky J., "Tetrachloroethylene-Dehalogenating bacteria", Folia Microbiol., 44(3),247-262(1999)
- 3) Melanie Duhamel, Stephan D. Wehr, Lawrence Yu, Homa Rizvi, David Seepersad, Sandra Dworatzek, Evan E. Cox and Elizabeth A. Edwards, "Comparison of anaerobic dechlorination enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinylchloride", Water research, 36:4193-4202(2002)
- 4) 환경부, 2001년 지하수 수질측정망 운영결과(2002)