Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 36, No. 4, 336–342(2008)

갯벌 미생물 활성 및 다양성에 미치는 Methyl *tert*-Butyl Ether(MTBE)와 MTBE 대사산물의 영향

조원실 · 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Effect of Methyl *tert*-Butyl Ether and Its Metabolites on Microbial Activity and Diversity in Tidal Mud Flat. Cho, Won-Sil and Kyung-Suk Cho*. *Department of Environmental Science & Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea* – The effect of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and its metabolites like *tert*-butyl alcohol (TBA), and formaldehyde (FA) on microbial activity and diversity in tidal mud flat was studied. MTBE, TBA, and FA with different concentrations were added into microcosms containing tidal mud samples, and placed at room temperature for 30 days. Then the physico-chemical properties such as pH, moisture contents and organic matter contents in the microcosms were measured. In addition, the total viable cell number and dehydrogenase activity were measured. Bacterial communities in the microcosms were monitored using a 16S rRNA-PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) fingerprinting method. As a result, the exposure concentrations of MTBE and its metabolites showed no correlation with the physico-chemical factors ($P>0.05$). Dehydrogenase activity and total viable cell number were decreased with increasing MTBE, TBA and FA concentrations ($P<0.05$). The toxic effect was higher the following order: FA > MTBE > TBA. Dominant species in the microcosms contaminated with MTBE and its metabolites were *Sphingobacteria*, *Flavobacteria*, delta-proteobacteria, gamma-proteobacteria. The diversity of bacterial community was not significantly influenced by MTBE and its metabolites.

Key words: Methyl *tert*-butyl ether(MTBE), *tert*-butyl alcohol(TBA), formaldehyde(FA), tidal mud flat, microbial activity, microbial diversity

서 론

갯벌은 조석운동을 통해 대기, 해양, 육상 환경이 교체되는 지역이다[7]. 또한, 갯벌에는 자체가 공급하는 유기물과 주변에서 유입되는 유기물을 이용하는 다양한 동식물이 서식하고 있으며 생물 생산성이 높을 뿐만 아니라 외부로부터 유입되는 각종 오염에 대한 정화기능이 매우 높아 환경생태학적으로 매우 중요하다[8]. 그러나 갯벌은 오랜 시간 쓸모없는 땅이라는 인식으로 인해 공단, 농경지, 항만, 도시 등의 용도 변경으로 인해 갯벌의 기능이 저하되고, 선박 사고, 수상스포츠 증가 등으로 연안의 환경오염이 심각한 상황에 이르렀다[8, 10, 17].

많은 국가들이 원유를 정제한 휘발유의 옥탄가를 향상하기 위해 MTBE(methyl *tert*-butyl ether, CAS No. 1634-04-4)를 첨가해 왔다[17]. 그러나, MTBE는 benzene, toluene, ethylbenzene, xylene(BTEX) 등의 다른 유류 화합물과는 달리 물에 대한 용해도와 휘발성이 매우 높고 생분해가 쉽지 않으며 발암가능 물질로 분류되면서 2002년 이후부터 MTBE의 사용이 금지되었다[9]. MTBE에 대하여 오염지역의 특징에 따라 분해의 특성과 분해 경로, 분해 정도가 어느 정도 알려 있기는 하지만[3, 17], 갑작스런 해안 연안 오염 시 혹은 MTBE에 노출 된 후 시간 경과에 따라 생성된 중간산물들에 의한 갯벌 미생물에 미치는 위해성에 대해서는 알려지지 않고 있는 실정이다[3, 14, 17].

따라서, 본 연구에서는 갯벌 토양의 미생물 활성과 군집 다양성에 미치는 MTBE 및 중간대사산물인 TBA(*tert*-butyl alcohol)와 FA(Formaldehyde)에 대한 독성 영향을 조사하였다. 갯벌 토양시료에 MTBE와 그 대사산물을 첨가하여 30일 방치 한 후 토양 시료의 물리 · 화학적 특성과 탈수소효소 활성 및 생균수 변화를 모니터링 하였다. 또한 각각의 토양 시료를 분자생물학적 기법인 16S rRNA-PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)를 이용하여 토양 세균 군집 구조에 미치는 MTBE의 영향을 평가하였고, 미생물 군집의 종 다양성을 분석하였다. 본 연구 결과는 MTBE와 그의 대사산물들 노출 시 향후 생태독성 및 위해성을 평가 하는데 기초 자료로 활용 될 수 있을 것으로 기대한다.

*Corresponding author
Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

실험 재료 및 방법

시료 채취, Microcosm 준비 및 실험 조건

경기 시흥에 위치한 오이도에서 5월 중순 간조 시 표층으로부터 10 cm 떨어진 곳에서 갯벌 토양 시료를 채취하여 실험에 이용하였다. 채취 토양 시료의 특징은 Table 1에 정리하였는데, pH는 7.7, 수분 함량과 유기물 함량은 각각 65.0%, 8.7%이었다. 멸균한 200 mL 혈청병에 시료 35 g과 멸균수 25 mL를 넣고 MTBE, TBA와 FA를 주입 한 후 알루미늄 마개로 막고 para film으로 단단히 밀봉하였다. 각 물질의 주입 농도는 MTBE 0, 50, 100, 250, 500, 750 mg/L, TBA 0, 10,000, 20,000, 30,000, 40,000, 50,000 mg/L, FA 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mg/L로 하였다. 모든 실험은 3 반복으로 준비하였다. 이 혈청병을 명조건 하에서 16시간, 암조건 하에서 8시간으로 하여 실온(25±2°C)에서 30일간 방치하였다.

물리 · 화학적 특징, 토양 미생물 효소 활성 및 미생물 수 측정

pH는 pH meter(Model 420A, Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 수분 함량과 유기물 함량은 standard methods (APHA, 1985)를 이용하여 분석하였다.

탈수소효소 활성 분석은 tetrazolium염이 환원에 의하여 전환된 formazan을 메탄올로 추출하여 비색적량하는 방법을 이용하였다[5]. 먼저, test tube에 0.03 g의 $CaCO_3$를 넣고 멸균 한 후 105°C 건조기에서 건조 시킨 후 분석하고자 하는 토양 3 g을 무균적으로 test tube에 넣은 후 3% triphenyltetrazolium chlolide 1 mL와 멸균수 2.5 mL을 첨가한 후 vortex mixer로 충분히 혼합하였다. 빛이 투과 하지 않도록 포장 한 뒤 37°C 배양기에 넣고 24시간 동안 배양시켰다. 배양 후 methanol 100 mL를 가한 후 250 mL 삼각플라스크에 옮겨 담은 후 90분 동안 삼각플라스크를 흔들어 추출하고 깔대기에 여과지(Whitman filter paper)로 여과하였다. Methanol을 blank로 하고 UV/Visible spectrophotometer (Agilent, USA)를 사용하여 485 nm 파장에서 여과액의 흡광도를 측정하였다. 탈수소효소 활성은 24시간 동안 건조토양 g당 생성된 TPF 농도(μg)로 계산하였다(μg · g-soil^{-1} · d^{-1}).

Table 1. Characteristics of soil samples.

pH	7.7 ± 0.3
Moisture Contents (%)	65.0 ± 0.4
Organic matter Contents (%)	8.7 ± 0.6
CFU (CFU · g-dry soil^{-1})	$2\times10^9 \pm 8\times10^8$
DHA (μg/g-soil · day)	1,100 ± 142
Clay (0~2 μm) (%)	92
Silt (2~50 μm) (%)	3.8
Sand (50~2000 μm) (%)	4.2
Soil texture (USDA)	CL

LS: loamy sand, CL: Clay loam

생균수는 단계적 희석법을 이용하여 도말하는 plate counting 방법을 이용하여 측정하였다. Test tube에 9 mL의 멸균수를 준비 한 후 시료 1 g을 잘 섞은 후 1 mL를 취한 후 준비된 9 mL의 멸균수에 넣어 희석하였다. 이러한 과정을 반복하여 10^{-3} 에서 10^{-7}로 희석한 용액을 LB 고체배지 (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 10 g/L, agar 15 g/L)에 0.1 mL을 도말 하여 37°C에서 24시간 배양한 후 콜로니(colony) 숫자를 측정하였다.

모든 분석은 삼반복 수행하여 평균치 값을 계산하였다. 또한, MTBE, TBA 및 FA 주입 농도와 각 microcosm의 토양의 물리 · 화학 · 생물학적 특성간의 상관관계를 조사하기 위하여 이변량상관계수(divariate correlation coefficient) 분석을 수행하였다. SPSS 통계 package(ver 12.0)를 이용해 Pearson's 상관계수를 구하였고, 유의차 분석을 하였다.

미생물 군집분석

각각의 토양시료 1 g을 채취하여 토양 시료용 DNA 추출 kit(Q-Biogene, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 template로 하고 eubacterial 16S rDNA primers인 341fGC(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')와 518r(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')을 이용해 PCR(PCR system 2700, Applied biosystem, USA)을 수행하였다[4]. 모든 PCR반응에는 1 μL template, 2.5 μL 10×Buffer, 12.5 mg/mL BAS(bovine serum albumin), 10 mM dNTP(deoxynucleosid triphosphate, Corebio, Korea) mixture, 25 mM $MgCl_2$ 2 μL, 20 pmol primers, 0.5 U/μL *Taq* polymerase(Promega, WI, USA)로 구성되며 총 volume을 25 μL로 하여 멸균수로 채웠다. PCR 과정을 통해 증폭된 genomic DNA단편을 DGGE(Denaturing gradient gel elecrophoresis)로 분석하였다. DGGE는 Dcode™ System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 8%(w/v) polyacrylamide gel을 이용하여 urea농도를 40~60%(100% denaturant, 7M urea, 40%(v/v) formamaide) 범위로 하여 50 V로 14시간 동안 전기영동 하였다. Urea의 농도를 40~60% 농도의 변성을 주기 위해 총 volume 25 mL에서 40% acroamide/bis 5 mL, 50×TAE buffer(20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM Na_2EDTA, pH 7.8) 0.5 mL, formamide와 urea의 구성은 40% denatureation에 대해 formamide 4 mL, urea 4.2 g, 60% denatureation에 대해 formamide 6 mL, urea 6.3 g 첨가하였으며 10% ammoniumphosphate와 N, N, N', N'-tetra-methyl- ethlenediamine (TEMED)의 최종 농도가 각각 0.2%, 0.15%가 되도록 넣어 준 뒤 16×16 cm^2 gel을 만들어 이용하였다. DGGE gel 상에 나타난 특이적인 band를 골라 잘라내어 20 μL 멸균수를 넣고, 얼림-녹임(-20°C에서 10분간 얼렸다 65°C에서 3분간 해동을 3번 반복)을 반복하여 수행하고, 원심분리 후 상등액

을 회수하였다. 이렇게 얻은 DNA 시료를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer에는 341f(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')과 518r(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')을 것을 사용하였으며, PCR을 수행하였다. 증폭된 시료는 pGEM-T vector(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 *E. coli* DH5aaa에 cloning 하였다. NucleoGen Plasmid Purification kit(spin type: Nucleogene, Korea)를 이용하여 추출한 plasmid DNA를 *EcoRI* 제한효소(Mbiotech, Seoul, Korea)로 절단하여 DNA insert를 확인하고, 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 the National Center for Biotechnology Information(NCBI) website의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) algorithm을 통하여 GenBank database와 비교하였다[4].

미생물의 다양성과 군집구조 분석 및 통계분석

각 DGGE band의 intensity를 모든 band의 intensity 총합으로 나눈 값을 이용하여 다음의 공식을 통하여 종의 풍부도와 개체수의 균등한 분포를 나타내는 척도인 Shannon-Weaver 지수(Shannon-Weaver index, H')를 계산하였다[13].

$$H'=-\sum p_i \ln p_i$$

여기서, H'는 Shannon 다양성 지수, p_i는 i band의 intensity를 DGGE 모든 band intensity 총합으로 나눈 것으로 biotype의 빈도와의 관계를 나타낸 것이다.

또한, 군집 내 종 구성의 균일한 정도를 나타내는 지수인 균등도 지수(Evenness index)를 계산하였다[13].

$$E = \frac{H'}{\ln(S)}$$

여기서, H'는 다양성(Shannon-Weaver indices), S는 전체 종수이다.

각 시료의 DGGE fingerprints 간의 유사성을 비용 평가하기 위하여 각각의 DGGE 각 band intensity 값을 모든 band의 intensity 총합으로 나눈 값(어떤 한 종의 개체수÷총개체수)을 이용하여, 주성분분석(Principal component analysis, PCA)을 수행하였다(SPSS ver. 12.0).

결과 및 고찰

토양의 물리 · 화학적 특성 변화

MTBE와 그의 대사산물인 TBA와 FA를 갯벌 토양을 넣은 microcosm에 다양한 농도로 주입하고, 30일 경과 후 각 토양 시료의 pH를 측정하였다. 초기 pH는 7.7이었는데, MTBE를 첨가한 microcosm의 pH는 6.7~7.0으로 pH가 약간 감소하였다(결과 미제시). MTBE와 주입농도와 pH 변화 사이의 상관관계는 없는 것으로 분석되었다(결과 미제시, $p>0.01$). 한편, TBA와 FA를 주입한 microcosm의 pH는 각각 7.8~7.5, 6.9~7.1로 약간 감소하였다. TBA 및 FA 주입농도와 pH 변화와의 상관성을 분석한 결과, 상관관계가 없었다(결과 미제시, $p>0.05$).

미생물 활성 변화

MTBE와 그의 대사산물이 갯벌 미생물의 탈수소효소 활성 및 생균수에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 제시하였다. 갯벌 토양의 초기 탈수소효소 활성은 1,100

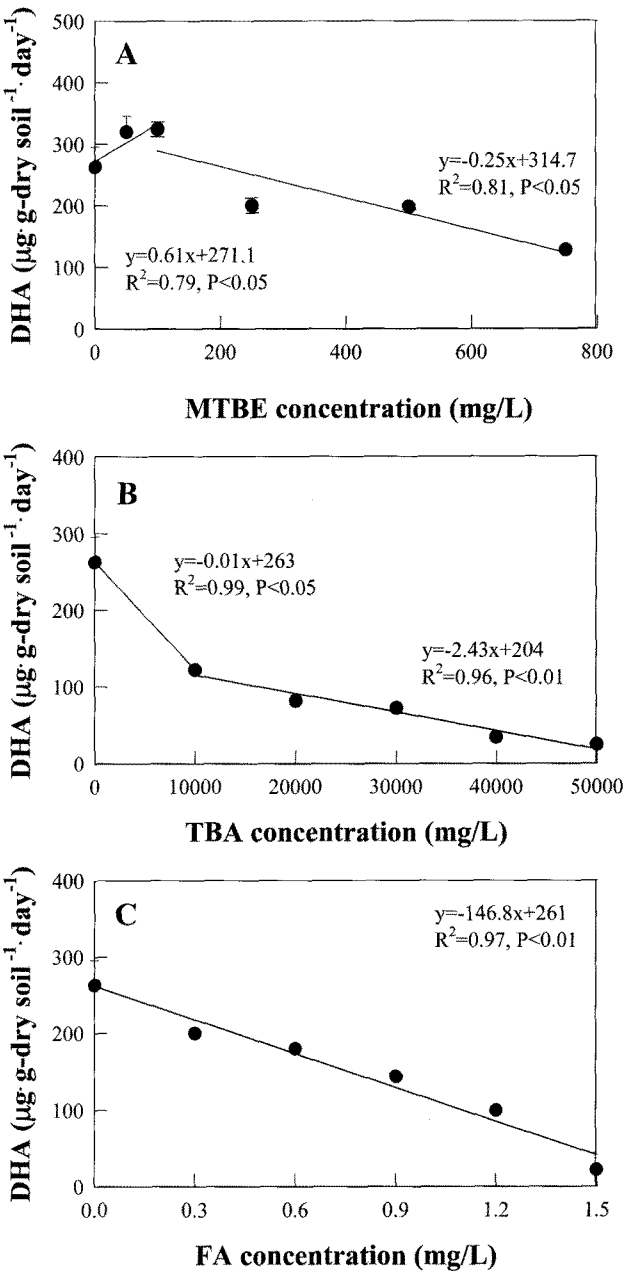

Fig. 1. Effect of MTBE (A), TBA (B), and FA (C) concentrations on dehydrogenases activities in the microcosms after 30 days.

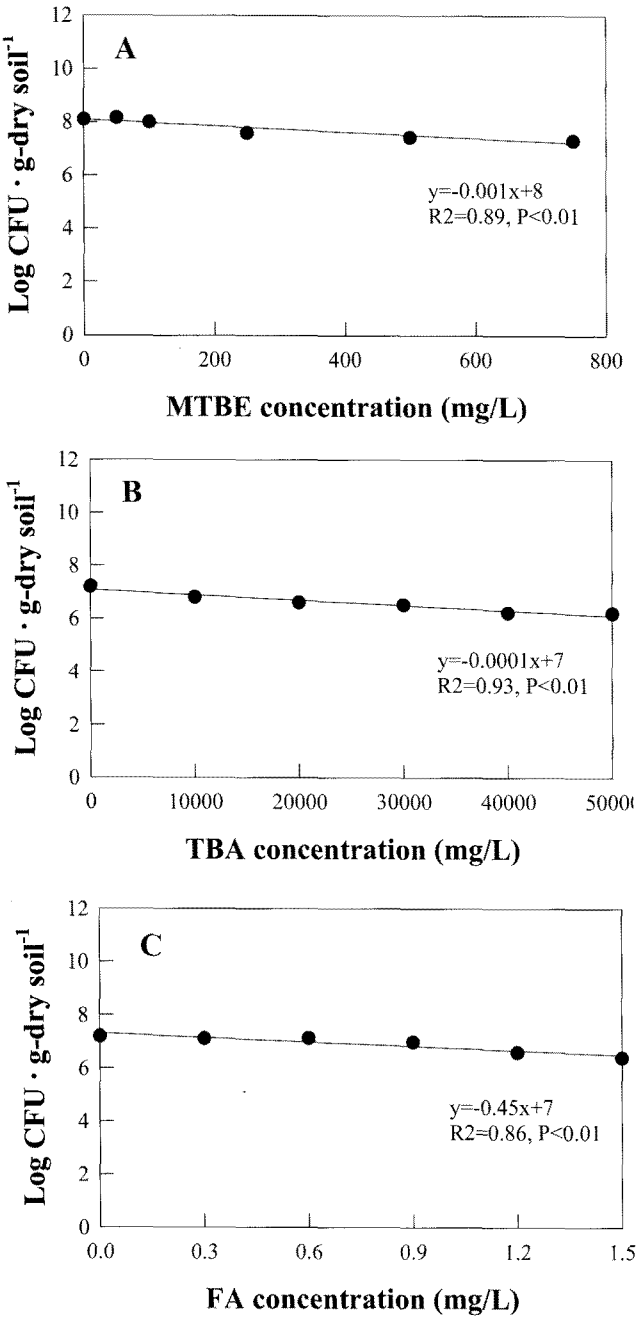

Fig. 2. Effect of MTBE (A), TBA (B), and FA (C) concentrations on viable cell numbers in the microcosms after 30 days.

μg·g-dry soil^{-1}day^{-1}으로 측정되었다. 30일 경과 후 100 mg/L 이하의 범위로 MTBE가 첨가된 경우, 탈수소효소 활성은 증가하는 경향이 관찰되었다($P<0.05$). 그러나, 첨가된 MTBE 농도가 100 mg/L를 초과하는 조건에서는 노출 농도가 증가할수록 탈수소효소 활성이 감소하였다($P<0.05$). 30일 경과 후 TBA와 FA 노출 조건의 경우 주입 농도가 증가 할수록 탈수소효소 활성이 감소하였다($P<0.01$). 독성물질에 대한 노출 30일 경과 후, 각각 독성물질 첨가 농도 증가에 따라 저해 기울기는 FA(146.8) > MTBE(0.23) > TBA(0.004) 순으로, FA 독성에 가장 크고 TBA의 독성이 가장 작았다.

탈수소효소는 검출시간이 빠르고 독성물질에 민감한 반응을 보이며, 분석이 쉽기 때문에 독성 영향을 평가 하는 데 유용하다[16, 18]. 토양 시료를 대상으로 중금속과 PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbons)를 이용한 혼합계 실험에서 탈수소효소가 urease 보다 독성 영향에 민감하게 작용하였다[19]. 이 실험에서 49일 경과 후 혼합 물질의 저농도 노출환경에서 탈수소효소가 증가되었는데 그 이유를 내성균의 존재, 토양 미생물의 적응, PAHs의 분해, 중금속과 PAHs의 흡착으로 인한 오염물질의 생물학적 이용가능성의 변화라고 설명했다[19]. 그러나, PAHs로 오염된 경우 PAHs가 토양 안에서 다양한 경로를 통해 분해되면서 이때 생성된 중간 대사산물이 탈수소효소 활성을 저해할 수 있다고 보고하였다[19, 21]. 유류 오염이 발생되지 않은 갯벌 토양을 대상으로 인위적으로 유류에 노출시켜 저해 영향을 살펴 본 결과 저농도 유류 오염 시 미생물 수가 증가되었으며, 탈수소효소 활성도 증가 하였으며, n-hexadecan과 2-methylnaptalene을 생분해 할 수 있는 *Ruegeria* species가 존재했다[17, 18, 19]. 또한, MTBE, TBA와 FA 중에서 FA의 독성이 가장 크게 관찰되었는데 이는 FA가 효소의 active site(-SH 기)에 곧바로 결합하게 되어 효소를 직접 불활성화 시키기 때문으로 사료된다[6].

MTBE, TBA, FA에 노출 시킨 조건에서 30일 경과 후 (Fig. 2), 미생물 수는 3×10^7~4×10^8의 범위로, 초기값($2\times10^9 \pm 8\times10^8$)에 비해 감소하였다. 탈수소효소 활성과 마찬가지로 독성물질의 주입 농도의 증가에 따라 생균수 저해를 관찰 할 수 있었으며 상관관계 분석 결과 강한 음의 관계가 관찰되었으며, 통계적으로 서로 유의한 것으로 나타났다($p<0.05$). MTBE, TBA, FA 노출 30일 경과 후, 각각의 물질의 저해 정도를 비교해 보았을 때, FA > MTBE > TBA 순으로 FA의 독성이 가장 큰 것을 알 수 있었다.

탈수소효소 활성과 생균수와 같이 미생물 활성은 기질에 의해 저해를 받거나 온도, pH, 영양물질, 전자수용체 등과 같이 다양한 환경적 요인에 의해 영향을 받게 된다[9]. 이러한 요인들은 다양한 환경미생물이 이용 가능한 기질과 빠르게 결합하는 속도에 영향을 주며 토양 환경 내 미생물 수가 많을수록 탈수소효소 활성도 함께 증가한다고 보고하였다[21]. 본 연구 역시 생균수와 탈수소효소 활성은 양의 상관관계를 보였으나, 통계분석 결과 서로 유의하지 않았다(결과 미제시, $P>0.05$).

미생물 군집 특성 분석

MTBE, TBA 및 FA를 첨가하여 인위적으로 30일 동안 오염시킨 갯벌 시료의 DGGE fingerprints를 주성분 분석 (principal component analysis, PCA)한 결과를 Fig. 3에 도시하였다. 시료가 PC1과 PC2에 따라 그룹화가 이루어지는

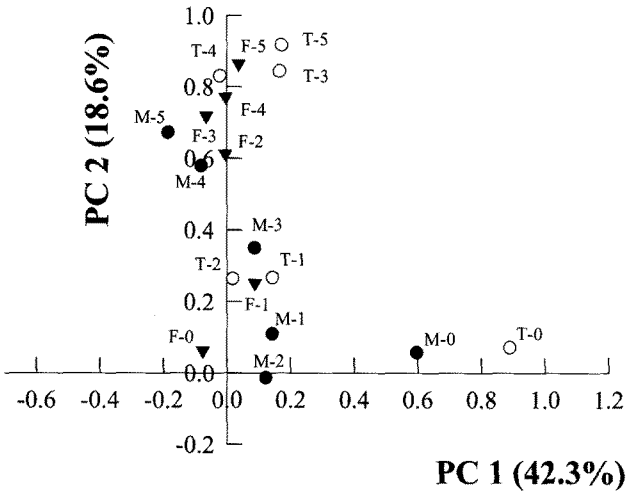

Fig. 3. Principal component analysis of DGGE fingerprints of the tidal mud samples contaminated with MTBE (●), TBA (○), and FA (▼) after 30 days. MTBE addition concentration (mg/L): M-0, 0; M-1, 50; M-2, 100; M-3, 250; M-4, 500; M-5,750. TBA addition concentration (mg/L): T-0, 0; T-1, 10,000; T-2, 20,000; T-3, 30,000; T-4, 40,000; T-5, 50,000. FA addition concentration (mg/L): F-0, 0; F-1, 0.3; F-2, 0.6; F-3, 0.9; F-4, 1.2; F-5, 1.5.

것은 시료들 간의 상관관계가 있음을 의미하여[5], 여기서 PC1과 PC2는 시료 각각에 작용한 실험 조건 별 요소를 의미로 여기서 농도와 물질 종류의 영향을 뜻한다. 30일 후 각각의 MTBE, TBA 및 FA 물질 종류와 첨가 농도를 달리 했을 때 그 요인들에 의해 시료들이 어떤 상관관계를 가지는지 살펴 본 결과 30일 후 갯벌 토양 환경에서는 독성 물질의 종류와 주입 농도 따라 그룹을 형성하지 않는 것으로 나타났다.

미생물 군집의 다양성 변동을 Shannon-weaver 지수와 균등성 지수를 평가하였다. Shannon 지수는 포괄적 다양성을 의미하는 것으로서 개개의 생물 종의 중요 값과 총 개체수를 가지고 계산되는 지수이며, 이 지수가 증가하면 미생물 군집의 다양성이 증가 한다는 의미이다[9, 11]. 또한 종균등성 지수는 Shannon-weaver 지수를 종수의 로그값으로 나눈 값으로 생물종들 사이의 분포 비율을 판별하는 지수로 1에 가까울수록 미생물 군집이 균등하게 분포하고 있음을 의미한다. 많은 연구에 의해 보고된 바에 의하면, 토착미생물 군집이 갑작스럽게 오염 물질에 노출되면 미생물 다양도를 나타나는 지수인 Shannon-weaver 지수 역시 감소된다[12].

MTBE, TBA, FA에 노출된 시료의 30일 경과 후 미생물 다양도(Shannon index)와 균등도 지수는 각각 2.79~2.59 (0.65~0.60), 3.09~3.10(0.76~0.776), 2.29~2.90(0.70~0.70)으로 독성 물질 첨가량이 증가할수록 모든 토양에서 미생물 다양도와 균등도 지수를 보아 특정물질 농도 증가량에 따른 종다양성 감소는 뚜렷하지 않았다. 이러한 결과를 얻게 된 것은 MTBE, TBA, FA의 물리 화학적 특징과 갯벌 토양 특징 때문인 것으로 판단된다[6, 14, 20]. 일반적으로 토양에서 오염물질의 이동과 전달에 영향을 주는 기본 메커니즘은 이류, 분산, 확산, 수착(흡착과 흡수), 변형에 의해 이뤄지며[6, 14], 이 중 이류, 분산, 확산은 지하 토양에 있는 오염 물질 전체의 농도를 변화하지 않고 액상에서의 오염물질을 지하 토양으로 흡착시켜 농도를 감소시키며 물 속에 있는 오염물질 전달을 지연시킨다. 토양을 이용한 MTBE의 흡착능과 확산능을 실험하여 MTBE 이동 메커니즘을 관찰하였는데 사질 보다 점토에서 흡착능이 뛰어났으며 MTBE 주입 초기 흡착이 빠르게 진행되고 토양 내 확산이 느린 것을 확인 했다[6]. 즉, MTBE와 그 대사산물인 TBA 및 FA 등과 같은 오염물질은 유기물질과 clay에 흡착되어 수층 혹은 가스층 내 농도가 낮은 것으로 보고되었다[6]. 따라서, 갯벌 토양 환경에서는 고농도의 독성물질이 주입되더라도 대부분이 흡착되어 미생물 다양성 지수에 영향을 미칠 정도로는 독성이 크게 나타나지 않은 것으로 사료된다[6, 20].

군집을 구성하는 우점종을 분석한 결과(Fig. 4), *Sphingobacteria*, *Flavobacteria*, delta-proteobacteria, gamma-proteobacteria로 크게 네 그룹을 이뤘다. 특히, MTBE에 노출된 조건에서는 *Sphingobacteria*(AY711630, 97%), *Marinobacteria*(EF190075, 100%), *Bacillus* sp.(EQ881425, 100%), *Flavobacteria*(AM084245, 94%)가 군집의 우점종을 구성하였고, TBA에 노출된 조건에서는 *Photobacterium damselae* sub sp.(AJ749800, 100%), Sediment *bacteria*(AM933661, 98%), Uncultured *Chromatials* bacterium(DQ901585, 100%), FA에 노출된 조건에서는 *Listonella* sp.(AM183772, 100%), Salt march clone LCP-84(AF286038, 96%), *Fusobacteria* (AF286038, 93%)가 우점종 임을 알 수 있었다.

Table 2. Comparison of Shannon diversity index (H').

MTBE (mg/L)	Shannon - Weaver Index (H')	TBA (mg/L)	Shannon - Weaver Index (H')	FA (mg/L)	Shannon - Weaver Index (H')
0	2.79	0	3.09	0	2.29
50	2.81	10000	3.07	0.3	3.19
100	2.77	20000	2.87	0.6	3.19
250	2.53	30000	2.98	0.9	3.09
500	2.79	40000	3.02	1.2	3.01
750	2.59	50000	3.10	1.5	2.90

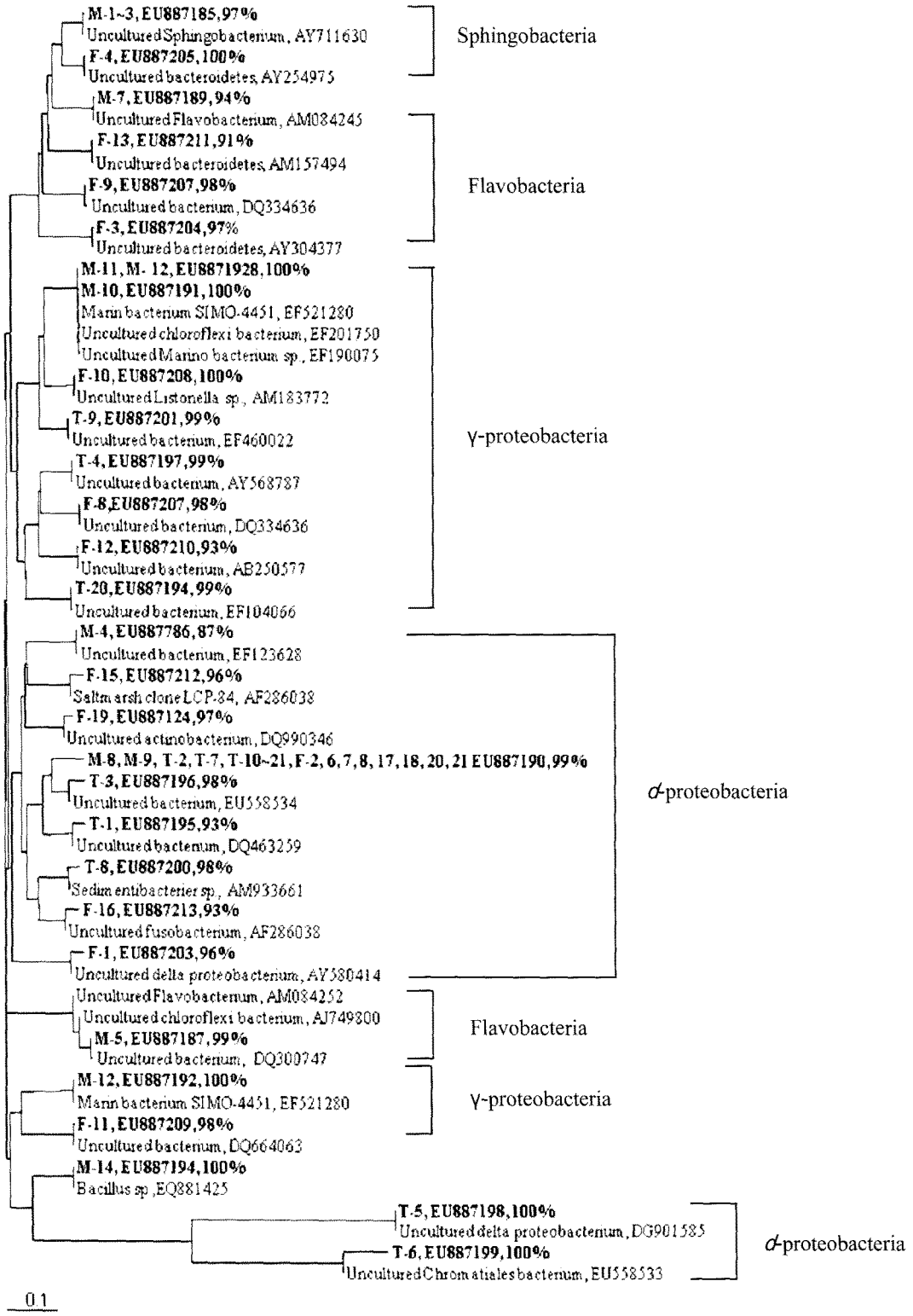

Fig. 4. Phylogenic tree illustrating the relationship of the clons obtained from the tidal mud samples contaminated with MTBE (M-1 ~ M-14), TBA (T-1 ~ T-21), and FA (F-1 ~ F-21).

요 약

갯벌 토양 내 미생물 군집에 미치는 methyl *tert*-butyl ether(MTBE)와 그의 대사산물인 *tert*-butyl alcohol(TBA) and formaldehyde(FA)의 영향을 조사하였다. 서로 다른 농도의 MTBE, TBA 및 FA를 갯벌 토양 microcosm에 첨가

한 후 30일 간 실온에 방치했다. Microcosm 시료의 pH, 수분함량, 유기물 함량 등의 물리 · 화학적 특성을 측정하였다. 총 세균수와 탈수소 효소 활성변화를 측정하였고, 미생물 군집 구조는 16S rRNA-PCR-DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis) fingerprinting 기법을 이용해 모니터링 했다. 그 결과, MTBE, TBA 및 FA 첨가 농도와 물리 · 화학적 요인들 사이에는 상관관계가 없었다($P>0.05$). 탈수소효소 활성과 총 세균수는 MTBE, TBA 및 FA 농도가 증가 될수록 감소하였다($P<0.05$). 각각의 독성 물질들이 미생물 활성에 저해 영향을 주었으며 이들의 저해 정도는 FA > MTBE > TBA 순이었다. MTBE, TBA 및 FA 노출 후 군집의 우점종을 살펴 본 결과 *Sphingobacteria, Flavobacteria,* delta-proteobacteria, gamma-proteobacteria로 크게 네 그룹으로 이뤄졌다. 미생물 군집의 다양성 지수는 MTBE 및 대사산물의 주입농도의 영향을 받지 않았다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 국가지정연구실사업(No. ROA-2008-000-20044-0)과 차세대바이오환경기술연구센터(AEBRC R11-2003-006-06001-0)의 지원을 받아 수행된 연구임.

REFERENCES

1. Barbara, M. K. and S. Bozena. 2003. Habitat functions of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ. Int.* **28**: 719-728.
2. Bark, C. and S. Lee. 2004. Environmental considerations on the function and value of tidal wetland. *Environ. Impact Assess.* **13**: 87-101.
3. Chisala, B. N., N. G. Tait, and D.N. Lerner. 2007. Evaluation the risks of Methyl *tert*-butyl Ether (MTBE) pollution of urban groundwater. *J. Contam. Hydrol.* **91**: 128-145.
4. Cho, W. S., E. H. Lee, E. H. Shim, J. S. Kim. H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2005. Bacterial communities of biofilm sampled from seepage groundwater contaminated with petroleum oil. *J. Microbial. Biotechnol.* **15**: 952-964.
5. Hong, S. H., H. L. Park, W. Ko, J. J. Yoo, and K. S. Cho. 2007. Bioremediation of oil-contaminated soil using an oil-degrading rhizobacterium *Rhodococcus* sp. 412 and *Zea mays. Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **35**: 150-157.
6. Jung, S.S.Y. 2004. Study on adsorption and diffusion transport of MTBE(Methyl tertiary butyl ether) into the soil, Pusan National University, Master thesis.
7. Kang, D., J. Nam, and S. Lee. 2006. Emergy valuation of a tidal flat ecosystem in the southwestern coast of Korea and Its Comparison with valuations using economic methodologies. *Kor. J. Environ. Sci.* **15**: 243-252.
8. Katayama, Y., I. Y. Chung, and K. J. Cho. 2003. Effect of spilled oil on microbial communities in a tidal flat. *Mar. Pollut. Bull.* **47**: 85-90.
9. Kern, E. A, R. H. Veeh, H. W. Langner, R. E. Macur, and A. B. Cunningham. 2003. Characterization of methyl *tert*-butyl ether-degrading bacteria from a gasoline-contaminated aquifer. *J. Bioremed.* **6**: 113-124.
10. Lee, H. Y. 2003. Studies on the distribution of the microalgae in the tidal flats of Gagami beach, Young-Gwang, Korea. *Kor. J. Environ. Sci.* **12**: 715-724.
11. Nahar, M. S., P. S. Grewal, S. A. Miller, D. Stinner, B. R. Stinner, M. D. Kleinhenz, and D. Doohan. 2006. Differential effects of raw and composted manure on nematode community, and its indicative value for soil microbial, physical and chemical properties. *Appl. Soil Ecol.* **34**: 140-151.
12. Natalya, I., S. Jorgen, and P. l. Valter. 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. *Environm. Int.* **28**: 779-782.
13. Ramsech, C. S. and J. S. Rawat. 2008. Monitoring of aquatic macroinvertebrates as bioindicator for assessing the health of wetlands: A case study in the central Himalayas, India, *Ecol. Indicat.* **9**: 118-128.
14. Rossner, A. and D. R. U. Knappe. 2008. MTBE adsorption on alternative adsorbents and packed bed adsorb performance. *Water. Res.* **42**: 2287-2299.
15. Santos, F. S., J. Hermandez-Allica, J. M. Becerril, N. Amaral-Sobrinho, N. Mazur, and C. Garbisu. 2006. Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with Brachiaria decumbens. *Chemosphere* **65**: 43-50.
16. Schinner, F. A., R. Niederbacher, and I. Neuwinger. 1980. Compound fertilizer and cupric sulfate on soil enzymes and CO_2-evaluation. *Plant Soil.* **57**: 85-93.
17. Schmidt, T. C., M. Schirmer, H. Weib, and S. B. Haderlein. 2004. Microbial degradation of methyl tert-butyl ether and *tert*-butyl alcohol in the subsurface. *J. Contam. Hydrol.* **70**: 173-203.
18. Scholz, M., M. Xu, and K. Jing. 2002. Performance comparison of experimental constructed wetlands with different filter media and macrophytes treating industrial wastewater contaminated with lead and copper. *Biore. Technol.* **83**: 71-79.
19. Shen, G., Y. Lu, Q. Zhou, and J. Hong. 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere* **61**: 1175-1182.

(Received Sep. 20, 2008/Accepted Nov. 4, 2008)