

Biofilm 생성이 토양흡착 나프탈렌 분해에 미치는 영향

이광춘¹ · 정선용¹ · 박정훈^{1,2*}

¹전남대학교 환경공학과, ²전남대학교 토양기술연구소

Effect of Biofilm Formation on Soil Sorbed Naphthalene Degradation

Guang-Chun Li¹ · Seon-Yong Chung¹ · Jeong-Hun Park^{1,2*}

¹Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University

²Soil Technology Research Institute, Chonnam National University

ABSTRACT

Naphthalene-degrading bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CZ6 isolated from contaminated soil can adhere to crystal naphthalene and produce extracellular polymeric substance. LB, YM and MSM medium were used as culture mediums to investigate the formation of biofilm. Biofilm was developed the most in LB medium by *Pseudomonas aeruginosa* CZ6. In the culture, strain CZ6 growth was rarely affected by naphthalene concentration. Optimal culture condition was 30°C and pH 7 at 0.10% substrate and 150 rpm shaking. The effect of culture medium on naphthalene degradation in the two soil slurry system was evaluated. The initial degradation rate of naphthalene was highest in the MSM medium of soil slurry. However, the sorbed naphthalene was rapidly degraded at the LB medium when naphthalene availability in liquid was limited. The results of this study suggest that biofilm formation and extracellular polymeric substance production increased bioavailability of soil sorbed naphthalene.

Key word : Naphthalene, Biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa* CZ6, Biofilm.

요 약 문

나프탈렌 분해균주인 *Pseudomonas aeruginosa* CZ6을 오염된 토양에서 분리하였으며 분리된 균주는 결정상태의 나프탈렌에 부착하고 그 주변에 extracellular polymeric substance를 분비하는 특성을 가졌다. LB, YM과 MSM 배지를 사용하여 배지의 종류에 따른 biofilm 생성량을 측정된 결과, LB 배지에서 biofilm이 가장 많이 생성되는 것으로 나타났다. 나프탈렌을 기질로 한 배양조건에서 균주는 기질의 농도 영향을 크게 받지 않고 0.10% 기질, 150 rpm 조건에서 최적 배양조건은 30°C, pH 7로 나타났다. 두 가지 토양에서 배지의 종류에 따른 나프탈렌의 분해특성을 관찰한 결과 초기에는 MSM 배지에서 나프탈렌이 가장 많이 분해가 되었다. 그러나 생물이용성이 제한을 받는 조건에서 LB 배지의 나프탈렌이 가장 빨리 제거가 되었다. 이런 결과는 biofilm의 형성과 extracellular polymeric substance 생성이 토양에 흡착된 잔류 나프탈렌의 생물학적 이용성을 향상시키기 때문인 것으로 사료된다.

주제어 : 나프탈렌, 생분해, *Pseudomonas aeruginosa* CZ6, Biofilm

1. 서 론

다환방향족 탄화수소(PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons)는 두 개 혹은 그 이상의 방향족 링으로 구성

되고 여러 가지 기하학적 형태의 연결방식으로 구성된 유기화합물이다(Prabhu and Phale, 2003). PAHs는 주로 인류의 활동 중 유기물의 불완전연소, 예를 들어 산업단지 혹은 가정에서 석유의 연소, 디젤자동차의 배기가스, 유기

*Corresponding author : parkjeol@jnu.ac.kr

원고접수일 : 2009. 9. 4 심사일 : 2009. 9. 17 게재승인일 : 2009. 11. 2

질의 및 토의 : 2010. 2. 28 까지

용매의 제련, 생활폐기물의 소각 등에서 발생할 수 있다.

PAHs는 오염범위가 광범위하고 지속성을 가지며 생물체에 독성을 나타내고 난분해성 물질이다. 미국환경청(EPA)에서 우선고려대상의 오염물질 중에서 PAHs 종류에 속하는 물질이 무려 16가지나 된다. PAHs는 열적으로 비교적 안정된 구조를 가지고 있다. 이러한 화학물질들은 물에 낮은 용해도를 가지며 매우 큰 소수성을 가지고 있다(Cerniglia, 1992). PAHs는 많은 공업지역에서 고농도로 오염되어 있으며 석유로 오염된 지역에도 지방족 탄화수소와 함께 오염되어 있다(Wilson and Jones, 1993). 오염된 PAHs는 토양과 강하게 흡착하고, 흡착은 토양 유기물의 함량과 밀접한 관계를 가지며(Means et al., 1980) 토양에서 물질전환은 물리적, 화학적 그리고 생물학적 프로세스에 의해 이루어지고 있다.

생물학적 복원은 미생물을 사용하여 유해폐기물의 생분해 혹은 독성을 저하 시키거나 최종대사산물로 이산화탄소, 물과 biomass 등으로 전환시키는 것이다. 이러한 복원기술에 있어서 오염토양부지 내에서 처리하는 *in-situ* 방법과 오염토양을 굴착하여 전문적인 처리공장으로 가져가서 처리하는 *off-situ* 방법으로 구분된다. 생물학적 복원을 위하여 많은 종류의 PAHs 분해 미생물들을 분리하고 연구하여 왔다. 예를 들어, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Comamonas testosteroni*, *Janibacter*, *Burkholderia* 와 *Rhodococcus* 종들이 PAHs를 분해할 수 있는 미생물인 것으로 보고되어 있다(Seo et al., 2007; Uyttebroek et al., 2006; Yamazoe et al., 2004; Thakor et al., 2003; Siunova et al., 2007). 나프탈렌은 대표적인 PAHs 오염물질로 물에 대한 높은 용해도를 가지고 있으며 1964년도에 처음으로 *Pseudomonas* sp.에 의한 나프탈렌 생분해 대사경로가 연구되었다(Park and Crowley, 2006).

바이오필름(biofilm)의 형성은 박테리아가 외부의 스트레스 혹은 악영향으로부터 자신을 보호하기 위한 방어기작으로 알려져 있다. Biofilm 형성은 먼저 미생물이 배양용기 등 고체상태의 물질 표면에 부착하고 polymeric matrix속의 미생물 복합체에서 cell이 증식하고 농축되면서 형성된다(Oliveira et al., 2006). 그러나 아직까지 matrix form이나 matrix 성분이 어떻게 미생물을 감싸는지에 대하여 잘 알려지지 않았다(Ma et al., 2009).

본 연구에서는 고농도의 PAHs로 오염된 토양으로부터 나프탈렌 분해 미생물을 분리 및 동정하고 미생물의 성장특성과 나프탈렌으로 오염된 토양슬러리 시스템에서 토양 유기물 함량이 서로 다른 토양을 사용하여 나프탈렌의 분

해특성을 조사하고 배지 종류에 따른 biofilm의 형성특성과 그에 따른 나프탈렌의 분해특성을 관찰하였다.

2. 실험 및 방법

2.1. 미생물의 분리 및 동정

나프탈렌을 분해하는 미생물은 전남지역 산업단지의 오염된 토양에서 분리하였다. 실험에는 무기배지 MSM (mineral salt medium)을 사용하였다(Harwood et al, 1994). 그 조성은 다음과 같다. 1 L 증류수에 KH_2PO_4 3.4 g, Na_2HPO_4 3.55 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, Hutner mineral base 10 ml를 포함하며 Hutner mineral base은(1 L 증류수) nitrilotriacetic acid 10 g, MgSO_4 14.45 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.335 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.00925 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.099 g, stock salts solution 50 mL 포함한다. 500 mL의 삼각플라스크에 MSM 200 mL를 주입하고 1%의 오염토양을 넣고 0.1%의 나프탈렌을 유일한 탄소원으로 하여 30°C, 150 rpm의 조건에서 배양하였다. 며칠 후 현탁액을 접종액으로 사용하고 육안으로 미생물 성장을 확인한 후 같은 조건으로 계대배양을 최소 10회 이상 반복하였다. 미생물의 순수분리는 LB(Luria-bertani) 고체배지에서 도말한 후 우점종으로 성장한 단일 colony를 취하였다. 이 colony를 10 ml의 LB 액체배지(Bacto tryptone 10 gL⁻¹, Yeast extract 5 gL⁻¹, NaCl 10 gL⁻¹)에서 전배양을 한 다음 다시 나프탈렌을 포함하는 MSM 배지에 접종하여 분해여부를 확인하였다.

순수 분리된 미생물을 동정하기 위하여 LB agar plate에 전배양된 미생물을 솔젠트(주)에 의뢰하여 균주의 16S rRNA 염기서열을 해독하였다. Sequencing결과는 NCBI의 Blast검색 프로그램을 통하여 유사성을 판단하였다. 동정결과, 순수분리된 균주는 *Pseudomonas aeruginosa* sp.로 동정되었고 균주명을 CZ6로 명명하였다.

2.2. 현미경 관찰

나프탈렌 분해 시 미생물의 형태와 배양상태를 관찰하기 위하여 광학현미경(Olympus CX40, Japan)으로 검경하여 균주의 운동성, 미생물의 형태학적 특징과 MSM 배지에서 나프탈렌 분해 시 성장상태를 연구하였다. 관찰된 현미경 사진은 Dino Eye-piece 현미경 카메라(AM423X, TaiWan)를 사용하였다.

2.3. 미생물의 성장특성

나프탈렌 분해 균주 CZ6의 성장특성을 조사하기 위해

여 200 ml MSM 배지에 나프탈렌을 0.5%(w/v) 넣고 CZ6를 1%(v/v) 접종하여 배양하였다. 미생물의 성장은 미생물 배양액의 흡광도를 통하여 간접적으로 측정하였다. 자외선 흡광광도기 UV 1800pc(HUMAN, Korea)를 사용하여 Optical Density(O.D.) = 600 nm에서 배양액을 석영 cell에 주입하여 배양액의 흡광도를 측정하였다. 성장상태를 확인하기 위하여 일정시간 간격으로 O.D._{600nm}를 측정하였다. 나프탈렌의 농도에 따른 영향을 파악하기 위하여 0.05%, 0.10%, 0.50%, 1.00% 나프탈렌을 넣고 배양액의 흡광도를 측정하였고 pH 조건에 따른 영향을 파악하기 위해 배양액의 초기 pH를 pH 4, pH 6, pH 7, pH 9, pH 10으로 조절하여 사용하였다. 배양 온도에 대한 영향을 보기 위하여 20°C, 30°C, 40°C의 배양조건에서 성장 곡선을 측정하였다.

2.4. 미생물의 biofilm 생성특성

나프탈렌 분해 미생물 CZ6의 biofilm 생성특성을 연구하기 위하여 영양특성이 다른 LB, YM(Y-medium), MSM 배지에 CZ6를 접종하여 biofilm의 생성량을 측정하였다. Biofilm 측정실험에 추가로 사용된 YM 배지는 0.2% Bacto tryptone, 0.1% NaCl, 0.2% Yeast extract, 0.025% KH₂PO₄, 0.025% K₂HPO₄, 0.01% (CH₃COO)₂Ca, 0.01% (CH₃COO)₂Mg를 1 L 증류수에 녹이고 pH 7.0으로 조절하여 사용하였다(Morikawa, 2009). 구체적인 방법은 전배양 시킨 CZ6(O.D._{600nm} ≈ 0.6)을 1.5 mL e-tube에 미리 주입된 0.5 ml의 각 배지에 2%(v/v) 접종하여 30°C에서 정지배양을 한다. 접종 후 1 h, 24 h, 72 h과 122 h에 꺼내어 증류수로 조심스럽게 세척하여 e-tube 내벽에 부착되지 않은 cell를 제거한다. 다음, 1 mL의 0.1%(w/v)의 crystal violet 수용액으로 40 min 염색한다. 염색이 완료된 e-tube는 증류수로 3번 세척하여 잔류된 염색시약을 제거한다. Cell과 결합된 dye는 1 mL의 95% EtOH를 사용하여 탈색시키고 탈색액을 O.D. = 570 nm에서 흡광도를 측정하여 biofilm의 생성량을 측정하였다(Roongsawang et al., 2003).

2.5. 토양

흡착실험과 토양에 따른 나프탈렌의 분해실험에서 사용

한 토양은 SOM(soil organic matter)이 서로 다른 흑운지(제주도의 검은색 화산재 토양)(이광춘 외, 2007)와 장성 토양(전라남도 장성의 인근 산에서 채취한 유기물이 풍부한 부식토)을 사용하였다. 실험에 사용된 토양은 그늘에서 건조한 후 2 mM의 체로 걸러 낸 후 감마살균을 하여 사용하였다. Table 1에서는 두 가지 토양의 특성을 나타내었다.

2.6. 분석

토양슬러리에서 나프탈렌의 농도를 측정하기 위하여 토양슬러리를 원심분리한 후 상등액 1 mL을 vial에 옮기고 토양에 흡착된 나프탈렌은 MeOH를 유기용매로 초음파 추출기로 3 min간 추출하여 원심분리한 후 상등액을 분석하였다. 토양슬러리 내 나프탈렌의 recovery rate는 98.49%이다. 시료중의 나프탈렌을 분석하기 위하여 HPLC pump 시스템(YongLin 930)과 자외선검출기(YongLin 730D)를 사용하여 UV_{254nm}에서 분석을 하였다. 준비된 샘플은 HPLC 분석용 2 mL vial에 옮겨 HPLC column(LC-PAH 25 cm × 4.6 mm × 5 μm, Supelco)을 사용하여 분석하였으며 acetonitrile와 증류수(80 : 20)를 이동상으로 사용하여 실험을 하였다.

2.7. 오염토양에서 배지의 종류에 따른 나프탈렌 분해특성

흑운지, 장성토양에서의 CZ6의 나프탈렌의 분해특성과 배지의 종류에 따른 나프탈렌 분해특성을 관찰하였다. 토양슬러리 시스템은 4 mL 스크류 vial에 유기물 함량이 다른 위의 두 가지 토양을 각각 0.2 g씩 넣고 2 mL의 멸균된 서로 다른 배지(LB, YM, MSM)를 넣고 초기 토양슬러리 용액의 나프탈렌 농도를 10 ppm이 되도록 각각 오염시켰다. 오염된 토양슬러리는 실온에서 6 rpm으로 48시간 rolling하여 나프탈렌이 흡착평형에 이르게 한 후 균주를 접종하여 나프탈렌 분해특성을 조사하였다. 접종 미생물은 0.1%(w/v)의 나프탈렌을 기질로 MSM 배지에서 전배양한 배양액을 원심분리하여 cell를 회수하고 160 mM의 phosphate buffer saline(PBS) 용액으로 3번 이상 washing하였다. 회수된 미생물은 O.D._{600nm} = 2.0이 되게끔 조절한 후 2%(v/v) 접종하여 분해특성을 4시간 간격으로 관찰하였다.

Table 1. The distribution coefficient of naphthalene in soils and the soils properties

Soil	Kd	TOC ¹⁾	pH	Sand	Silt	Clay
Heukyeumji	10.3	13.4%	5.1	3.3%	76.8%	19.9%
Jangseong	10.4	9.1%	4.4	35.3%	53.3%	11.4%

¹⁾TOC : Total Organic Carbon

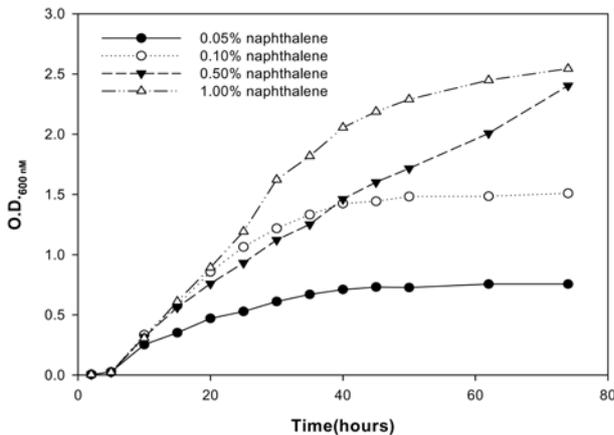


Fig. 1. Growth curve of CZ6 at various substrate concentration.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주 CZ6의 성장특성

3.1.1. 기질의 농도에 따른 성장특성

여러 가지 농도의 나프탈렌의 균주 CZ6의 성장특성을 파악하기 위하여 나프탈렌을 0.05%, 0.10%, 0.50%와 1.00%(w/v)로 결정상태의 나프탈렌을 주입하여 150 rpm, 30°C의 배양기에서 배양을 하였으며, 배양결과를 Fig. 1에 나타냈다. Fig. 1에서 5 h 이후부터 대수증식기가 시작됨을 관찰할 수 있으며, 나프탈렌 0.05%와 0.10%를 사용한 배양에서는 배양 40 h 이후 비슷한 시기에 유지기에 들어서는 것을 관찰할 수 있다. 일반적으로 물에 용해되어 있는 오염물질의 농도가 생분해에 있어서 아주 중요한 인자로 작용하는데 이는 미생물이 물에 용해된 기질을 우선적으로 이용하기 때문이다. 본 실험에서 배양액 중의 용해되어 있는 나프탈렌은 미생물의 성장증식에 의하여 고갈되고 미생물의 성장률은 점차 감소하기 때문에 낮은 농도의 기질 조건에서 먼저 대수증식기가 종료되었다. 반면에 0.50%와 1.00%의 기질을 포함하는 배지에서는 충분한 기질의 공급으로 미생물의 성장속도에 지장을 크게 받지 않는 것으로 사료된다. 초기 10 h 내에는 모든 기질 농도에서 흡광도는 큰 차이를 보이지 않고 낮은 농도에서는 성장속도에 저해를 받아 흡광도 상승속도가 줄어들지만, 20 h 이후 1.00%의 고농도의 기질 조건에서는 성장률이 가속이 되어 흡광도가 높다가 점차 감속이 되는 것으로 나타났다. 균주 CZ6은 저농도와 고농도의 나프탈렌의 조건에서 분해활성은 큰 영향을 받지 않는 것으로 사료된다. 이는 액체상태의 배지에서 나프탈렌 농도가 미생물의 성장에 저해작용을 하지 않는 결과와도 일치한다(Mogil'naya et al., 2005).

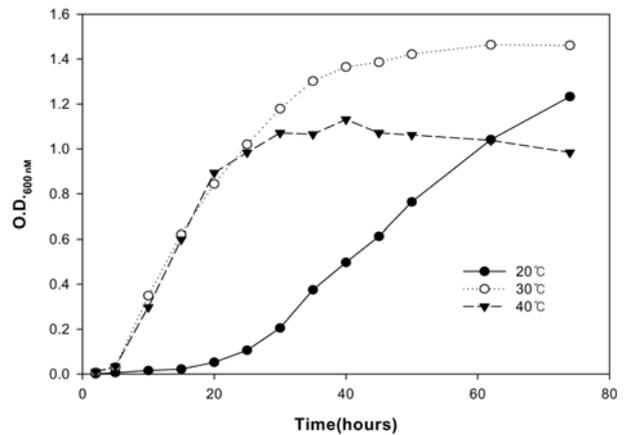


Fig. 2. Growth curve of CZ6 at the different culture temperature conditions.

3.1.2. 온도조건에 따른 성장특성

균주 CZ6의 성장이 배양 온도에 의한 영향을 조사하기 위하여 20°C, 30°C, 40°C로 배양기의 온도를 조절하여 나프탈렌을 0.10%, 150 rpm의 배양 조건으로 배양특성을 조사하였으며 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 배양 온도 30°C와 40°C에서 초기 대수증식기로 들어서 빠른 성장속도로 비슷하게 성장하나 25 h 후부터는 배양 온도의 영향을 받아 유지기로 들어섰고 20°C에서는 기타 배양 조건보다 유도기가 길어서 20 h부터 대수증식기에 들어서서 30°C 조건에서 배양 할 때와 비슷한 성장경향을 보이는 것으로 나타났다. 최적 배양온도 조건은 30°C에서 배양할 때 가장 좋음을 알 수 있었다.

3.1.3. pH조건에 따른 성장특성

여러 가지의 pH 조건에서 균주 CZ6의 성장특성을 관찰하기 위하여 pH 4, pH 6, pH 7, pH 9와 pH 10로 초기 배지의 pH를 조절하여 CZ6의 성장을 측정하였다. Fig. 3에서 관찰하면 균주 CZ6은 pH 7인 중성 조건에서 가장 활성이 좋은 것으로 나타났고 pH 4와 pH 10인 강산 강염기 조건에서는 미생물의 성장이 미비한 것으로 나타났다. 그러나 pH 6부터 pH 9인 넓은 pH 조건에서 모두 높은 성장활성을 보이고 있다. 그러므로 토양오염 복원에서 pH에 대한 완충능력이 우수하여 여러 가지 pH 조건의 오염토양에 적용가능 할 것으로 사료된다.

3.2. Biofilm의 생성 및 특성

미생물이 세포벽 주위에 협막을 형성하거나 점액성 물질로서 생산하는 EPS(extracellular polymeric substance)는 환경에 대한 미생물 적응의 한 현상으로 세포외 다당

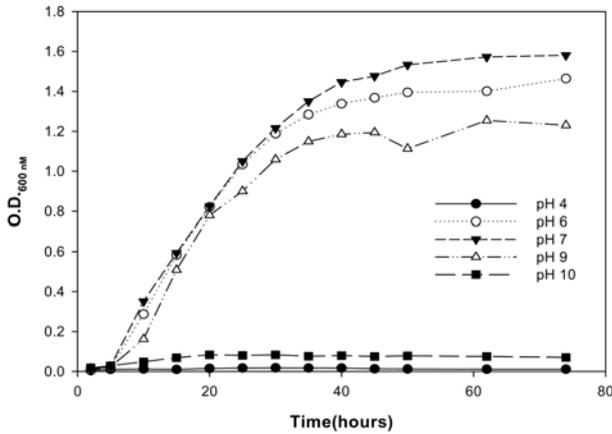


Fig. 3. Growth curve of CZ6 in the different culture pH conditions.

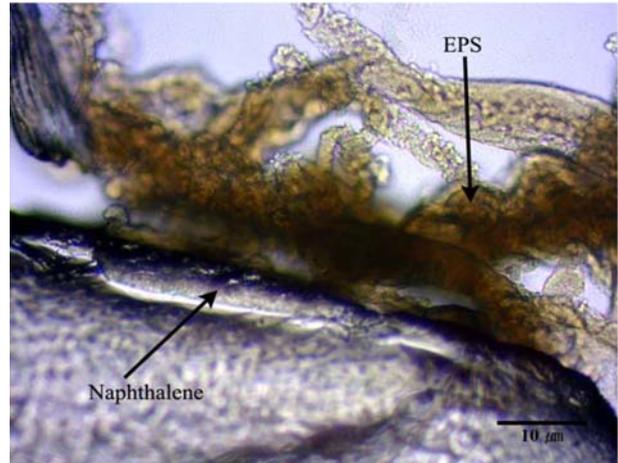


Fig. 4. Extracellular polymeric substance on crystal naphthalene.

류는 미생물이 항체, 독성물질, 중금속, 원생동물 및 박테리오파지로부터 보호막의 역할을 하며 미량원소를 흡수하고 건조지역에서 수분을 유지시키는 등의 역할을 하여 극한 환경에서도 미생물의 환경적응을 가능하게 한다. 나프탈렌 분해 미생물인 CZ6도 MSM 배지에서 고농도의 나프탈렌의 환경에 노출되고 나프탈렌을 분해 할 때 나프탈렌 결정 주변에 EPS를 생성하여 결정상태의 나프탈렌에 부착되는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 또한, CZ6는 서로 뭉쳐서 biofilm cell를 형성하고 결정상태의 나프탈렌 표면에 직접 감싸는 상태로 나프탈렌에 부착되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 5). 이것은 나프탈렌의 생분해에 있어서 액상으로 용해되어 나온 나프탈렌도 분해를 하지만 토양표면에 부착하여 흡착된 나프탈렌을 분해할 수 있을 것으로 사료된다(Guerin and Boyd, 1992; Crocker et al., 1995).

이는 흡착된 나프탈렌 분해 매커니즘의 하나로 미생물에 의하여 분비되는 EPS를 중심으로 planktonic cell 상태의 미생물이 응집되어 biofilm cell를 형성하고 흡착된 나프탈렌에 직접적으로 부착하여 나프탈렌을 에너지원으로 소모한다(Davey and O'Toole, 2000; Calvillo and Alexander, 1996). 균주 CZ6의 biofilm 생성특성을 관찰하기 위하여 영양물질의 함량이 다른 LB, YM, MSM 배지를 사용하여 실험한 결과, 24시간 내에 LB 배지에서 부착된 biofilm이 가장 많이 생성되는 것으로 나타났다(Fig. 6). Davey and O'Toole(2000)은 biofilm이 형성되는 여러 가지 조건에서 배지에 따른 영양물질의 흡수상태에 따라 biofilm의 생성이 달라진다고 보고하였다. 그러나, LB 배지에서는 부착성 biofilm량이 초기 증가 후 시간에 따라 줄어드는 반면에 중간 정도 영양인 YM 배지에서는 시간에 따라 점차 증가하는 것으로 나타났다. 이는 영양

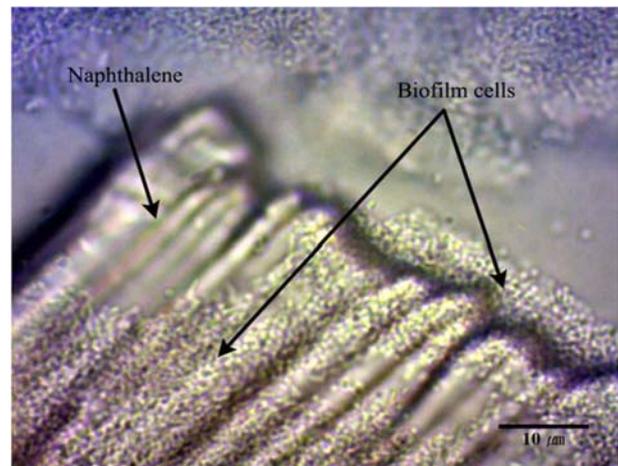


Fig. 5. Biofilm on the surface of the crystal naphthalene.

물질의 농도가 높으면 박테리아에서 catabolite control protein(CcpA)의 발현을 조절하여 biofilm의 탈착을 유도하기 때문인 것으로 사료된다(Stanley et al., 2003; Sauer et al., 2004). Fig. 7에서는 e-tube 내벽에 부착된 biofilm의 염색상태를 나타내었다. 72시간 후에 서로 다른 배지에서 e-tube내에 부착성 biofilm를 형성하였는데 LB 배지를 사용한 실험군에서 염색이 가장 짙게 나타나 e-tube 표면에 균주가 제일 많이 부착되어 있음을 알 수 있으며 이는 Fig. 6의 결과와 일치한다.

3.3. 배지의 종류에 따른 나프탈렌의 분해특성 조사

흑음지와 장성토양을 사용한 토양 슬러리에서 배지의 종류에 따라 24시간 내의 나프탈렌의 분해특성을 관찰하였다. Fig. 8에서는 흑음지 토양에서의 나프탈렌의 분해특성을 나타내었다. 흑음지 토양에 흡착되어 잔류한 나프탈

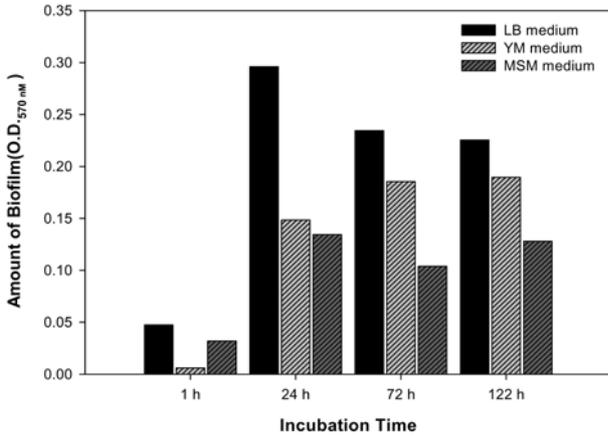


Fig. 6. Biofilm produced by *Pseudomas aeruginosa* CZ6.

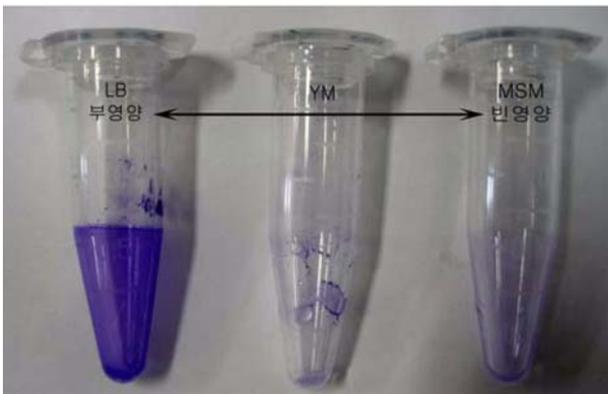


Fig. 7. Staining of CZ6 biofilm after 72 hours.

렌은 초기에 MSM 배지를 사용한 토양슬러리에서 가장 적은 양을 나타내고, YM, LB 배지를 사용한 토양 슬러 리 순으로 나타났다. 이는 일반적으로 알고 있는 현상으 로 영양물질이 풍부한 조건 혹은 분해하기 쉬운 물질과 분해하기 어려운 유기오염물질이 동시에 존재할 경우에는 탄소원과 질소원이 풍부하게 포함되어 있는 LB 배지에서 미생물이 분해하기 쉬운 물질 혹은 영양물질을 직접적으 로 흡수하고 오염물질은 나중에 탄소원으로 사용하고 무 기배지인 MSM 배지에서 나프탈렌은 유일한 탄소원으로 나프탈렌의 분해가 가장 빨리 일어났기 때문이다(안영희 외, 2003). 그러나 시간이 지남에 따라 액상으로 탈착되는 나프탈렌의 속도가 감소되면서 생물이용성이 제한을 받게 된다. 이러한 조건에서 흡착된 나프탈렌은 미생물에 의한 분해에 영향을 주게 된다. Fig. 8에서 8시간부터 LB 배 지에서 제일 적은 잔류 나프탈렌 양을 나타내면서 4시간 대에 비하여 순서가 바뀌는 현상을 나타내고 있다. 20시 간 이후부터 LB 배지에서 잔류 나프탈렌이 검출이 되지

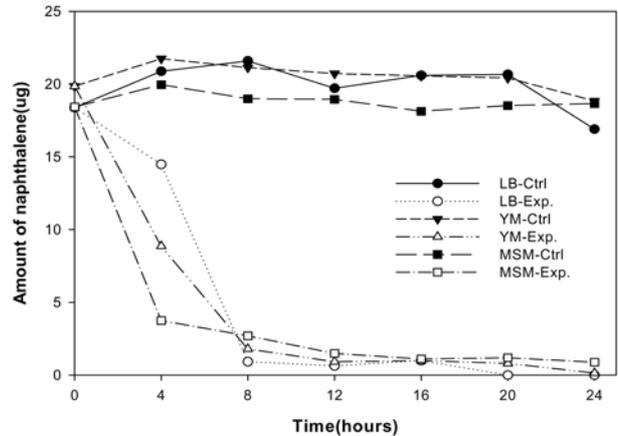


Fig. 8. Residual naphthalene in Heukyeumji soil slurry at different culture medium. Each represented value is the average of the values obtained for duplicate.

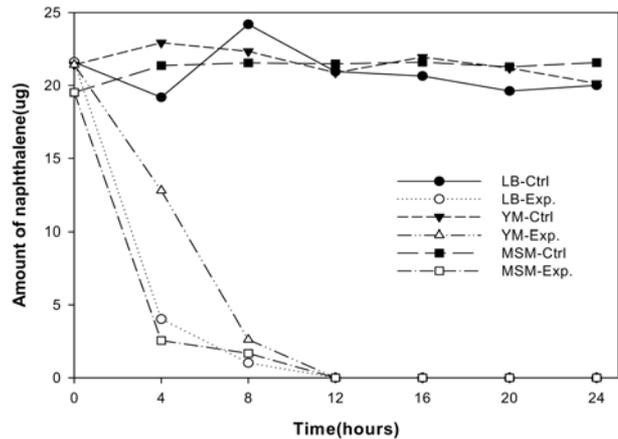


Fig. 9. Residual naphthalene in Jangseong soil slurry at different culture medium. Each represented value is the average of the values obtained for duplicate.

않았다. Fig. 9에서는 유기물 함량이 상대적으로 적은 장 성토양에서의 배지의 종류에 따른 나프탈렌의 분해특성을 나타내었다. 미생물 접종 후 4시간 이내에서는 흑음지 토 양에서와 비슷한 현상을 보이고 있다. 8시간 이후 흑음지 토양에서와 유사하게 LB 배지에서 잔류나프탈렌이 제일 빠르게 감소하였다. 그러나 장성 토양에서는 12시간 이후 세 가지 배지를 사용한 토양슬러리에서 토양에 잔류한 나 프탈렌은 검출이 되지 않았다. 이는 TOC농도가 낮은 장 성 토양에서 오염물질의 탈착이 흑음지 토양에 비하여 빠 르게 진행되었기 때문이다. 세 가지 배지에서 4시간 이내 에 액상의 나프탈렌은 모두 제거가 되고 토양에 잔류한 나프탈렌은 MSM 배지에서 제일 적은 양을 보이고 있어 두 가지 토양에서 모두 초기단계에서 영양물질이 있는 조

건에서는 무기배지 조건에서보다 나프탈렌의 분해가 느려진다는 것을 알 수 있다. 그러나 8시간 이후부터 LB 배지에서 잔류나프탈렌이 가장 빨리 감소하는데 Rice et al.,(2005)에 의하면 LB 배지는 복합성분의 배지로 미생물이 배지의 성분으로 인하여 biofilm의 형성이 유도된다. 또한, 24시간 내에 LB 배지에서 biofilm이 가장 많이 생성되기 때문이다. 토양슬러리 내에 계면활성제가 존재하지 않을 때 biofilm의 생성은 탈착되는 유기오염물질을 이용하기 위한 현상으로 나타난다. 슬러리 내에 계면활성제가 존재 할 때에는 미생물이 biofilm을 형성하지 않지만 계면활성제가 없을 때에는 biofilm을 형성하여 흡착된 유기오염물질을 분해하기 때문이다(Seo and Bishop, 2007). 미생물의 Biofilm 생성은 특별한 물리적인 반응으로 biofilm과 EPS의 생성은 흡착된 잔류 나프탈렌의 분해를 촉진시키는 것으로 사료된다(Wick et al., 2001; Rodrigues et al., 2005).

4. 결 론

나프탈렌 분해균주인 *Pseudomonas aeruginosa* CZ6는 결정상태의 나프탈렌 주변에 EPS를 형성하고 나프탈렌 결정 표면에 biofilm 상태로 부착하면서 나프탈렌의 분해를 촉진시키는 것으로 사료된다. LB, YM, MSM 배지 등 영양물질의 함량이 서로 다른 배지를 사용하여 biofilm 생성량을 측정하였으며 부영양 상태의 LB 배지에서 biofilm이 가장 많이 생성되는 것으로 나타났다. 0.05%, 0.10%, 0.50%와 1.00%(w/v)농도의 나프탈렌을 기질로 한 배양조건에서 기질의 농도 영향을 크게 받지 않고 20°C, 30°C, 40°C의 배양 온도조건과 pH 4, pH 6, pH 7, pH 9와 pH 10의 초기 배지의 pH조건에서 배양결과 0.10%, 150 rpm 조건에서 최적 배양조건은 30°C, pH 7로 나타났다.

유기물 함량이 서로 다른 나프탈렌으로 오염된 두 가지 토양의 생분해 실험에서는 액상의 나프탈렌은 균주 CZ6에 의하여 모두 제거가 되었다. 흡음지와 장성토양을 이용 및 배지의 종류에 따른 biofilm 생성과 나프탈렌의 분해특성을 관찰한 결과 초기에는 MSM 배지에서 나프탈렌이 가장 많이 분해가 되었지만 생물이용성이 제한을 받는 조건에서 24시간내 부착성 biofilm 생성이 많은 LB 배지에서 잔류 나프탈렌이 가장 빨리 제거된다. 이는 균주 CZ6를 이용한 나프탈렌 분해 실험에서 biofilm의 형성과 EPS 생성은 토양에 흡착된 잔류 나프탈렌의 분해에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 안영희, 김인수, 김은경, 김무훈, 2003, 토양환경의 오염과 정화, 구미서관, 서울, p. 121.
- 이광춘, 정선용, 박정훈, 2007, BTEX 분해 복합균주의 분리 및 생분해특성, 한국폐기물학회, **24**(8), 689-695.
- Cerniglia, C.E., 1992, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation*, **3**, 351-368.
- Crocker, F.H., Guerin, W.F., and Boyd, S.A., 1995, Bioavailability of naphthalene sorbed to cationic surfactant-modified smectite clay, *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 2953-2958.
- Calvillo, Y.M. and Alexander, M., 1996, Mechanism of microbial utilization of biphenyl sorbed to polyacrylic beads, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 383-390.
- Davey, M.E. and O'Toole, G.A., 2000, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 847-867.
- Guerin, W.F. and Boyd, S.A., 1992, Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1142-1152.
- Harwood, C.S., Nichols, N.N., Kim, M.K., Ditty, J.L., and Parales, R.E., 1994, Identification of the *pcaRKRF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate, *J. Bacteriol.*, **176**, 6479-6488.
- Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., and Banwart, W.L., 1980, Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils, *Environ. Sci. Technol.*, **14**, 1524-1528.
- Ma, L.Y., Conover, M., Lu, H.P., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J., 2009, Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix, *PLoS Pathogens*, **5**, e1000354.
- Morikawa, M., 2009, Sustainable bioremediation technology by utilizing biofilms, *International Symposium for Graduate Studies and Research*, Institute of Biotechnology, Chonnam National University, p. 82.
- Mogil'naya, O.A., Krivomazova, E.S., Kargatva, T.V., 2005, Formation of structured communities by natural and transgenic naphthalene-degrading bacteria, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **41**, 63-68.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., and Cavaco, L.M., 2006, Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates, *Vet Microbiol.*, **118**, 133-140.
- Prabhu, Y. and Phale, P.S., 2003, Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: Novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in

- hydrocarbon assimilation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 342-351.
- Park, J.W. and Crowley, D.E., 2006, Dynamic changes in *nahAc* Gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils, *Appl Microbiol Biotechnol*, **73**, 1322-1329.
- Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., Lam, K.W., and Kjelleberg, S., 2005, Biofilm formation and sloughing in *serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues, *J. Bacteriol.*, **187**, 3477-3485.
- Roongsawang, N., Hase, K.I., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., and Kanaya, S., 2003, Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38, *Chem. Biol.*, **10**, 869-880.
- Rodrigues, A.C., Wuertz, S., Brito, A.G., and Melo, L.F., 2005, Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: kinetics and physiological aspects, *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 281-289.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y.T., Lee, S.E., and Li, Q.X., 2007, Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol, *Biodegradation*, **12**, 123-131.
- Siunova, T.V., Anokhina, T.O., Mashukova, A.V., Kochetkov, V.V., and Boronin, A.M., 2007, Rhizosphere strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of degrading naphthalene in the presence of Cobalt/Nickel, *Microbiology*, **76**(2), 182-188.
- Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D., and Lazazzera, B.A., 2003, Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays, *J. Bacteriol.*, **185**, 1951-1957.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, A.H., Davies, D.G., and Gilbert, P., 2004, Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm, *J. Bacteriol.*, **186**, 7312-7326.
- Seo, Y.W. and Bishop, P.L., 2007, Influence of nonionic surfactant on attached biofilm formation and phenanthrene bioavailability during simulated surfactant enhanced bioremediation, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 7107-7113.
- Thakor, N.S., Patel, M.A., Trivedi, U.B., and Patel, K.C., 2003, Production of poly (β -hydroxybutyrate) by *Comamonas testosteroni* during growth on naphthalene, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 185-189.
- Uyttebroek, M., Ortega-Calvo, J.J., Breugelmans, P., and Springael, D., 2006, Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium* spp. and *Sphingomonas* spp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 829-836.
- Wilson, S.C. and Jones, K.C., 1993, Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *A Review Environ. Pollut.*, **81**, 229-249.
- Wick, L.Y., Colangelo, T., and Harms, H., 2001, Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. *Environ. Sci Technol.*, **35**, 354-361.
- Yamazoe, A., Yagi, O., and Oyaizu, H., 2004, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated dibenzofuran-utilizing *Janibacter* sp. strain YY-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 211-218.