

難分解性 公害物質 TCAB의 微生物에 依한 分解 : (II) 分離 菌株에 依한 TCAB의 分解

李載球 · 任良彬 · 趙容均 · 慶箕性 · 吳慶錫 · 金學南

忠北大學校 農科大學 農化學科

초록 : [U-¹⁴C] TCAB를 MM₂ 無機培地에 唯一한 炭素源으로 添加 後 分離한 菌株들을 純粹 培養하였을 때 若干의 放射性 分解產物이 autoradiography에 依하여 檢出되었다. 또한 有機物을 제거한 土壤에 ¹⁴C-TCAB를 添加한 後 각각의 分離菌株들을 接種하고 MM₂ 無機培地를 加하여 一定한 濕度を 維持하면서 30°C에서 培養하였을 때 ¹⁴CO₂가 發生되지 않았다. 이들 分離菌株의 하나인 *Achromobacter* group VD를 純粹培養 時 m/z 250인 分解產物이 GC/MS에 依하여 確認되었다. 이 分解產物의 可能的 形成經路는 TCAB의 構造로부터 dechlorination, hydroxylation, 2個 benzene環의 ortho 開裂, 그리고 生成된 carboxyl group의 還元 등이 關聯된다고 생각된다(1991년 9월 2일 접수, 1991년 9월 27일 수리).

前報에서 言及한 바와 같이 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene(TCAB)는 oncogen, mutagen, 그리고 cytotoxic으로서의 可能性¹⁾을 보이는 外에 arylhydrocarbon hydroxylase를 誘發하고²⁾ chloracnegenic potential³⁾과 porphyrinogenic action⁴⁾을 보이는 有害 物質이므로 微生物에 依한 分解는 環境汚染源을 輕減시키는 한 要因이 될 것이다. Viswanathan 등⁵⁾은 3,4-dichloroaniline(3,4-DCA)로 處理된 土壤에서 栽培한 보리中에서 TCAB를 檢出하였다고 報告하였고 Worobey⁶⁾에 의하면 TCAB를 處理한 土壤에 콩을 栽培하였을 때 TCAB 및 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene(TCAOB)가 土壤과 植物體에서 檢出되었다고 報告하였다. 著者⁷⁾들은 [U-¹⁴C] TCAB로 處理된 土壤에 벼를 栽培하였을 때 植物體의 地上部에서 微量의 TCAB를 檢出하였다. 그러나 TCAB의 微生物에 依한 分解에 관한 研究는 아직 發表되지 않았다.

本報에서는 淸州工團廢水處理場으로부터 分離同定한 菌株들에 依한 TCAB의 分解를 究明하기 위하여 基質로 非標識된 TCAB는 물론 benzene 環에 均一하게 標識된 [U-¹⁴C] TCAB를 使用하여 얻은 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

3,4-DCA의 精製

李 등⁸⁾의 方法에 依하여 3,4-DCA(東京化成 製品) 10

g을 round bottomed flask에 넣고 50% ethanol 300 ml와 active carbon 2.5g을 添加하여 95°C의 water bath 上에서 1時間 동안 reflux한 다음 Büchner funnel로 濾過하고 그 濾液을 冷却한 後 蒸溜水에 붓고 이때 생긴 白色結晶을 다시 Büchner funnel로 濾過한 後 n-hexane으로 계속 씻고 그 結晶을 室溫에서 乾燥시켰다. 純度 確認을 위하여는 少量을 acetone에 녹여 TLC와 GC를 行하였다.

[U-¹⁴C] 3,4-DCA의 精製

Benzene 環에 均一하게 標識된 [U-¹⁴C] 3,4-DCA (Specific activity : 226.44 MBq/mM)를 110°C에서 3時間 동안 activation한 Al₂O₃ column을 使用하여 n-hexane-benzene(1 : 1, v/v)으로 elution하여 黑色 着色物을 除去한 後 [U-¹⁴C] TCAB의 合成에 使用하였다.

[U-¹⁴C] TCAB의 合成 및 精製

李 등⁸⁾의 方法에 準하여 合成하였다. 즉 精製된 [U-¹⁴C] 3,4-DCA 13.6 mg을 硬質 試驗管에 넣고 CuCl 20 mg과 pyridine 1 ml를 加한 後, 60°C의 水浴槽內에서 空氣를 불어 넣어 주면서 10時間 동안 反應시킨 後 反應混合物를 加溫하면서 空氣를 弱하게 注入하여 pyridine을 完全히 蒸發시킨다. 乾固된 內容物을 少量의 n-hexane-benzene(8 : 2, v/v) 混合物로 溶解한 後 silicic acid column 上에서 上記 溶媒로 elution하여 精製하였

으며 이때 tailing이 많이 생기므로 silicic acid column 위에서 같은 작업을 반복하여純粹한 [U-¹⁴C] TCAB를 얻었다. 그純도는 autoradiography에 의하여 確認하였고 specific activity는 603.84 KBq/mg이었다. 또한 本實驗에 사용된 TCAB의 構造式과 標識位置는 Fig. 1에서 보는 바와 같으며, TCAB의 立體 異性體는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

有機溶媒

本 研究에 사용된 모든 有機溶媒는 再蒸溜 또는 3次 蒸溜하여 GC 위에서 不純物의 有無를 確認하였다.

Thin-layer Chromatography(TLC)와 Autoradiography [U-¹⁴C] TCAB의 純度 및 代謝產物의 確認에는 autoradiography를 利用하였고 이에 사용한 film은 FUJI X-ray Film, Medical(FUJI Photo Film Co., LTD, Japan, 20.3×25.4 cm)이며 現像液은 X-DOL(X-ray film developer, Poohung Photo-chemical Co., LTD, Korea), 定着劑는 X-FIX(X-ray film用, Poohung Photo-chemical Co., LTD, Korea)를 使用하였다. TLC plate로는 Art. 5554, DC-Alufolien, silica gel 60F₂₅₄(25 Folien, 20×20 cm, 0.2 mm, E. Merck, Germany)를 使用하였다.

分離菌株에 의한 [U-¹⁴C] TCAB의 分解

分離菌株에 의한 [U-¹⁴C] TCAB의 分解產物을 確認하기 위하여 200 ml의 MM₂ 培地에 單一炭素源으로 非

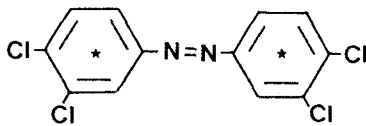


Fig. 1. Structural formula and labeled position(*) of TCAB(3, 3', 4, 4'-tetrachloroazobenzene). Specific activity : 603.84 KBq/mg

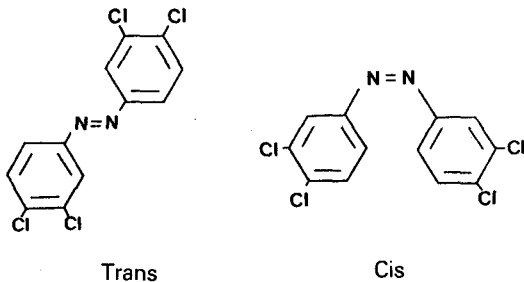


Fig. 2. Spatial configurations of cis- and trans- TCAB.

標識 TCAB를 30 ppm되게 處理하고 加壓殺菌한 後, [U-¹⁴C] TCAB를 833,000 dpm(13.88 KBq) 處理하고 여기에 分離菌株中 繼代培養으로 生長이 旺盛한 5菌株(Isolate I, III, IV, V, VI)를 各各 接種하여 30℃의 培養배양기 내에서 6週間 繼代培養한 後 acetone과 methanol로 抽出하고 濃縮 精製하여 TLC와 autoradiography를 行하였으며, 이때 展開溶媒로는 n-hexane-benzene(7 : 3, v/v)과 acetone-methanol(66 : 34, v/v)을 使用하였다.

¹⁴CO₂ 計測에 의한 [U-¹⁴C] TCAB의 分解確認

土壤 有機物이 적은 밭토양을 300℃의 乾燥器에서 5日間 灰化하고 다시 3 N-H₂SO₄와 6 N-NaOH로 抽出하여 土壤 有機物을 完全히 除去한 後 抽出液의 pH가 5.5~6.0 이 될때까지 蒸溜水로 洗滌한 後 乾燥하였다. 이 土壤 70g씩을 250 ml의 三角 flask에 넣고 綿栓하여 加壓殺菌한 後 最大容水量의 80%에 相當하는 殺菌된 MM₂ 培地를 無菌室에서 添加하였다. TCAB는 全體濃度가 30 ppm이 되도록 處理하였으며, 이중 [U-¹⁴C] TCAB를 2, 559,400 dpm(42.66 KBq) 處理한 後 MM₂ 培地上에서 生長이 좋은 분리 동정된 4菌株(*Achromobacter* group VD, *Pseudomonas alcaligenes*, *Moraxella* spp., *Alcaligenes faecalis*)를 各各 接種하였으며 이를 脫脂하지 않은 숨으로 단단하게 充塡하여 殺菌한 glass column(20 cm L×2 cm ID)과 soda lime을 通過시킨 空氣를 注入하면서 好氣인 暗條件下의 30℃ 水浴槽 내에서 各各 培養하였다. 이때 [U-¹⁴C] TCAB로부터 發生한 ¹⁴CO₂는 1 N-NaOH에 吸收시켜 2週 間隔으로 그 放射能을 liquid scintillation counter(LSC)로 計測하여 分解率을 測定하였다.

TCAB 分解產物의 抽出 및 分析

MM₂ salt medium 200 ml가 들어 있는 培養瓶에 TCAB의 最終濃度가 30 ppm이 되게 添加하고 上記한

Table 1. Conditions of HPLC for the analysis of TCAB degradation products

Model	Waters model 441
Column	μ Bondapak C18(ID 8 mm)
Flow rate	3.0 ml/min
Operating pressure	0.5×1000 psi
UV detector wavelength	254 nm
Chart speed	1.0 cm/min
Mobile phase	Distilled water 65% } -2.5% Acetonitrile 35% } Acetic acid 2.5%

바와 같이 分離한 分解菌株들을 各各 接種한 後 2~8 週間 培養하였다. 一定期間의 培養이 끝난 後 HPLC 分析用 試料의 境遇는 培養液을 濾過하여 菌體를 sonication한 다음 14,000 rpm에서 10分間 遠心分離하여 얻은 上澄液을 濾液과 합한 後 rotary evaporator를 利用하여 培地의 量이 약 50 ml가 될때까지 濃縮하였다. 이 濃縮된 培地에 1:1 比率로 benzene을 添加하고 分液濾斗 内에서 激烈하게 진탕한 後 靜置하여 benzene層과 水層 (aqueous layer)을 各各 分離하였으며 이 抽出過程을 2회 더 反復한 後 分離된 benzene層은 모두 합하여 GC 分析用 試料로 使用하였다. Benzene層에는 未分解된 TCAB가 含有되어 있으며 母化合物인 TCAB보다 極性일 것으로 豫想되는 모든 分解產物은 水層에 分配될 것으로 期待되므로 水層을 round-bottomed flask에 옮긴 後 rotary evaporator에서 乾固될때 까지 濃縮하였다. 濃縮된 殘留物을 少量의 acetone으로 溶解하여 florisil column을 通過시켜 精製한 後 N₂ gas로 濃縮하고 HPLC로 分析하였으며 分析條件은 Table 1에서 보는 바와 같다.

또한 GC 分析用 試料의 境遇는 一定期間 培養한 培養液을 濾過하여 濾液과 菌體를 分離한다. 菌體에 methanol을 添加하여 sonication한 後, 14,000 rpm에서 10 分間 遠心分離하고 그 上澄液을 위의 濾液과 합한 後 rotary evaporator로 完全히 濃縮하고 그 殘渣를 다시 acetone과 methanol로 녹여 florisil column을 通過시켜 精製한다. 精製된 試料를 N₂ gas로 濃縮한 後 diazomethane로 methylation하여 GC로 分析하였으며 分析條件은 Table 2에서 보는 바와 같다.

GC/MS에 의한 分解產物의 究明

抽出한 分解產物은 HPLC로 確認하고 다시 diazomethane으로 methylation시킨 後 GC로 分解產物의 生成 與否와 含量을 確認한 後 GC/MS에 依하여 分子量(m/z)을 測定하였다. 分析에 使用된 GC/MS는 Hewlett Packard 5985 B이고 70 eV에서 electron impact로 ioniza-

tion하였다.

Cl⁻ ion의 檢出

MM₂ salt 培地의 成分중 Cl⁻를 含有한 成分을 除去한 培地 30 ml에 TCAB를 30 ppm되게 處理하고 殺菌한 後 isolate I, III, IV, V 그리고 VI를 接種하여 30℃에서 10 日間 培養하고 그 培養液을 14,000 rpm에서 20分間 遠心分離하고 上澄液 10 ml를 取하여 試藥 I[0.3g의 Hg (CNS)₂를 95% ethanol에 녹여 100 ml로 함]을 1 ml, 試藥 II[6.0g의 ferric ammonium sulfate를 6 N-HNO₃에 녹여 100 ml로 함]를 2 ml 加하고 세계 혼든 다음 10分間 靜置 後 UV/Vis. spectrophotometer(SP 8~400, Philips)를 利用하여 460 nm에서 吸光度를 測定하였다.

Carboxyl 基(-COOH)의 檢出

TCAB의 分解產物이 極性을 보이므로 carboxyl 基 檢出 試驗을 行하였다. 즉 溶液 A는 0.075g의 bromocresol green과 0.025g의 bromophenol blue를 100 ml의 無水 ethanol에 녹여서 만든다. 다음 溶液 B는 0.25g의 KMnO₄와 0.5g의 Na₂CO₃ · 10H₂O를 물에 녹여서 100 ml로 하여 만든다. 發色劑로 使用時에는 溶液 A와 B를 9:1(v/v)로 混合하여 바로 TLC plate에 撒布한다. 但

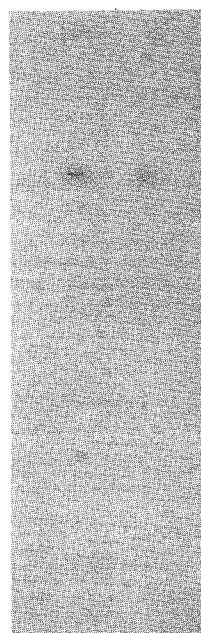


Fig. 3. Autoradiogram of the [U-¹⁴C] TCAB synthesized and purified. Developing solvent : n-Hexane-benzene(7 : 3, v/v)

Table 2. Conditions of GC for the analysis of TCAB degradation products

Model	Hewlett Packard 5890 series II
Column	HP-1, 25 m×0.2 mm×0.33 μm
Detector	Flame ionization detector(FID)
Injector	230℃
Column temp.	230℃
Detector temp.	250℃
Carrier gas	N ₂ (1 ml/min)
Split ratio	50 : 1

注意할 것은 이 혼합액은 5~10분간만 有效하다.⁹⁾

結果 및 考察

[U-¹⁴C] TCAB의 純度 確認

合成된 [U-¹⁴C] TCAB는 TLC 上에서 有機溶媒로 展開한 後 autoradiography에 依하여 그 放射化學의 純度を 確認하였으며 Fig. 3에서 보는 바와 같이 合成된 [U-¹⁴C] TCAB는 不純物이 없음을 알 수 있었다.

分離菌株에 依한 [U-¹⁴C] TCAB의 分解 및 分解産物의 Autoradiography

MM₂ 液體培地에 分離菌株들을 接種하고 [U-¹⁴C]

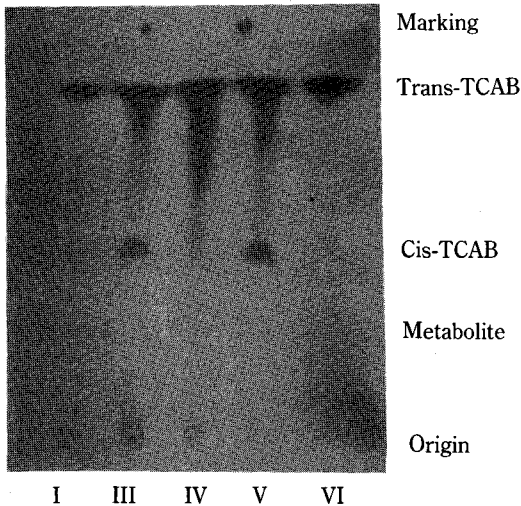


Fig. 4. Autoradiogram of the acetone extract of the MM₂ salt medium treated with 30 ppm [U-¹⁴C] TCAB, incubated, and enriched with the isolates every two weeks.

- I, III : *Achromobacter* group VD
- IV : *Pseudomonas alcaligenes*
- V : *Moraxella* spp.
- VI : *Alcaligenes faecalis*

Table 3. Detection of Cl⁻ ions in the Cl⁻-free MM₂ salt medium treated with 30 ppm TCAB and incubated for 10 days

Isolate	Absorbance at 460 nm
I(<i>Achromobacter</i> group VD)	0.035
III(<i>Achromobacter</i> group VD)	0.025
IV(<i>Pseudomonas alcaligenes</i>)	0.001
V(<i>Moraxella</i> spp.)	0.014
VI(<i>Alcaligenes faecalis</i>)	0.002

TCAB를 添加하여 一定期間 培養 후 繼代培養하고 acetone으로 抽出하여 濃縮한 다음 autoradiography를 行한 結果는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 이 autoradiogram에서 보면 isolate III과 V에서는 cis-TCAB로 보이는 化合物이 있고 isolate IV에서 放射能을 가진 分解産物이 檢出되었다. 또한 isolate I과 VI에 의한 TCAB 分解 産物を 보면 未分解된 TCAB(trans form)만 나타나 있다. 그 理由는 아마도 分解産物의 抽出過程에서 極性化合物로 推測되는 分解産物들이 充分히 抽出되지 않았거나 또는

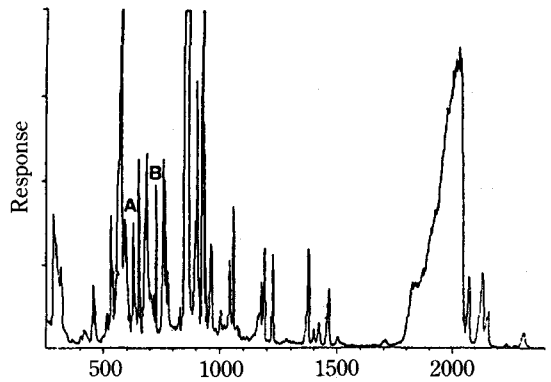


Fig. 5. HPLC chromatogram of the acetone extract of the incubation mixture from which the residual TCAB was removed by extraction with benzene.

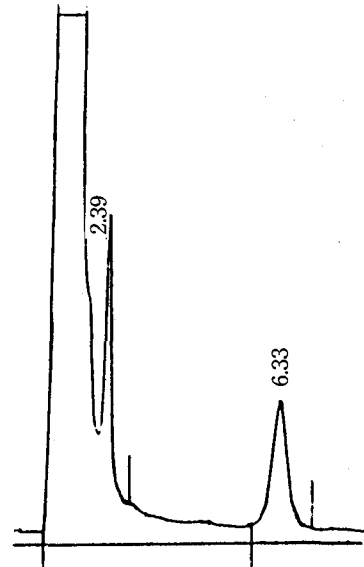


Fig. 6. Gas chromatogram of acetone extract of the MM₂ salt medium treated with 30 ppm TCAB, incubated, and enriched with the isolate(*Achromobacter* group VD) every two weeks.

消失된 것으로 생각된다.

[U-¹⁴C] TCAB로부터 ¹⁴CO₂의 放出 試驗

有機物을 完全히 除去한 土壤에 [U-¹⁴C] TCAB를 處理하고 最大容水量의 80%에 相當하는 MM₂ salt medium을 添加하여 各各의 分離菌株을 接種한 後 30°C에서 培養하면서 放出된 ¹⁴CO₂를 1 N-NaOH에 吸收시켜 LSC로 그 放射能을 計測하였으나 ¹⁴CO₂는 檢出되지 않았다. 따라서 TCAB는 上記 分離菌株들에 依하여 炭素源으로 利用은 되나 ¹⁴CO₂가 生成될 때까지는 分解되지 않는 것으로 생각된다.

分離菌株에 依한 TCAB 分解産物의 特性

分離菌株들에 依한 TCAB의 分解産物을 GC로 分析할 때 column 充填劑로 3% OV-1을 使用하면 分離가 제대로 되지 않는 점으로 미루어 보아 이들 分解産物은 極性物質임을 알 수 있다. 따라서 TCAB의 構造式중에 들어 있는 4個의 鹽素原子中 적어도 1個 以上이 脫鹽素化되고 곧이어 hydroxylation이 일어났을 것으로 判斷하여 培養液中的 鹽化이온을 測定하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 培養液 中에 鹽化이온이 存在함을 알 수 있으며

따라서 TCAB로부터 微生物에 依하여 dechlorination이 일어났음을 確認할 수 있다.

다음에는 TCAB 構造 中에 있는 4個의 鹽素原子가 hydroxyl基로 置換되었을 境遇 benzene 環에 ortho fission이 일어날 것으로 推測하고 이때 生成되는 carboxy基에 敏感한 發色劑를 TLC plate에 展開된 分解産物에 撒布한 結果 靑色으로 發色되는 部分이 觀察되었다.

分離菌株에 依한 TCAB 分解産物의 究明

1) HPLC

未分解된 TCAB를 benzene으로 抽出하여 除去한 後 試料을 HPLC로 分析한 結果 Fig. 5에서 보는 바와 같이 retention time 6.33에서 極性的 分解産物로 推測되는 物質이 檢出되었다.

2) GC/MS

HPLC에서 TCAB의 分解産物로 생각되는 極性化合物이 檢出되었으므로 이 化合物을 究明하기 위하여 GC/MS를 行하였다. 즉 TCAB의 分解産物은 hydroxyl基나 carboxyl基를 가지고 있을 것으로 생각되므로 diazomethane으로 methylation하였다. Fig. 6은 mass spectrum을 얻기 전에 分析한 GC chromatogram이고 여기에서

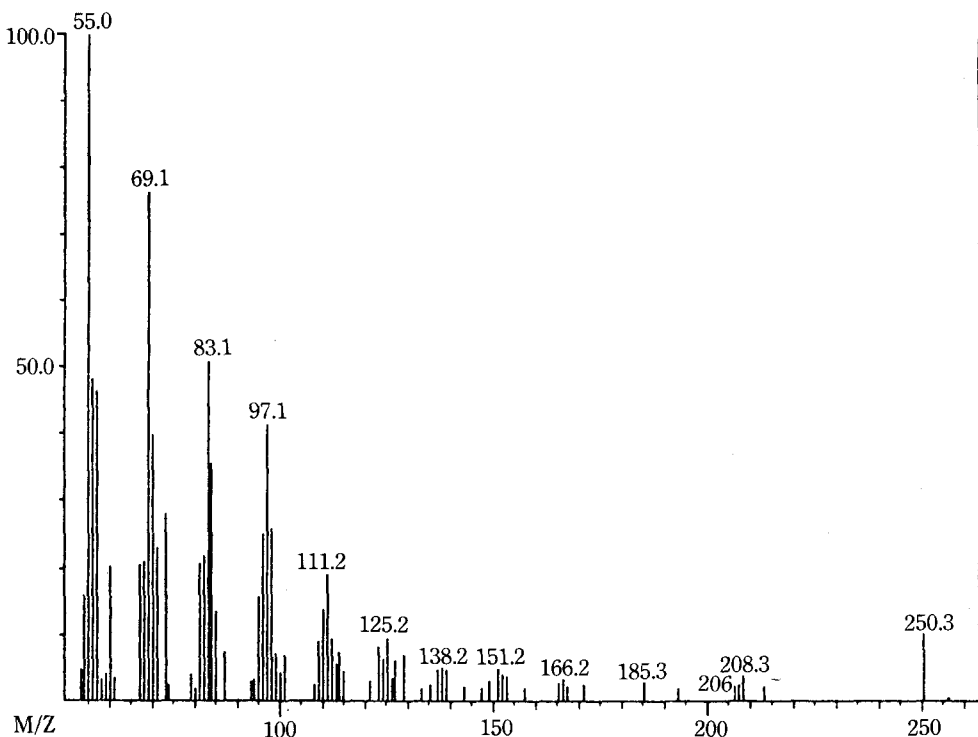


Fig. 7. Mass spectrum of the degradation product(A) of TCAB by the isolate I(*Achromobacter* group VD).

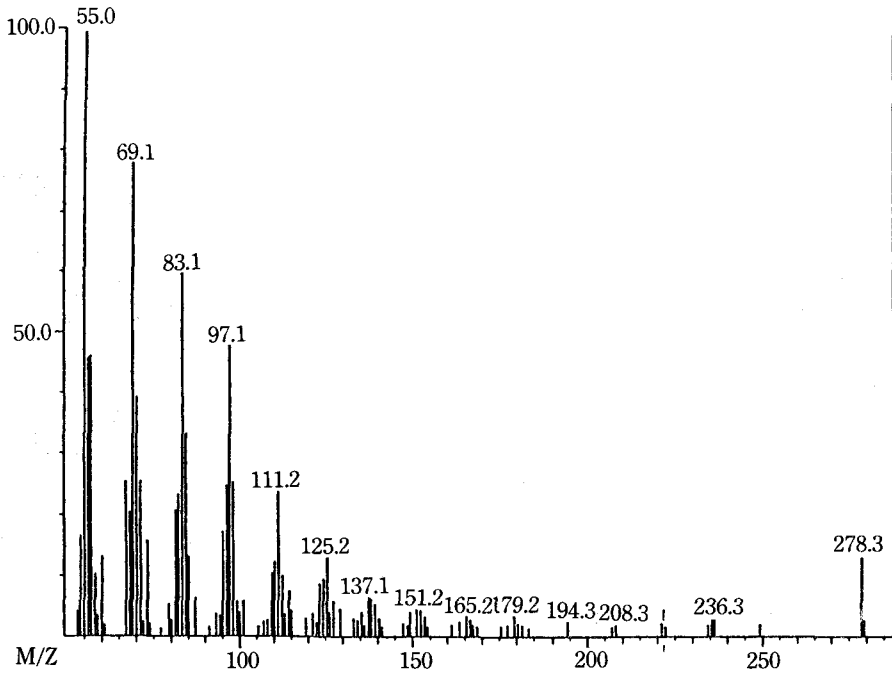


Fig. 8. Mass spectrum of the degradation product(B) of TCAB by the isolate I(*Achromobacter* group VD).

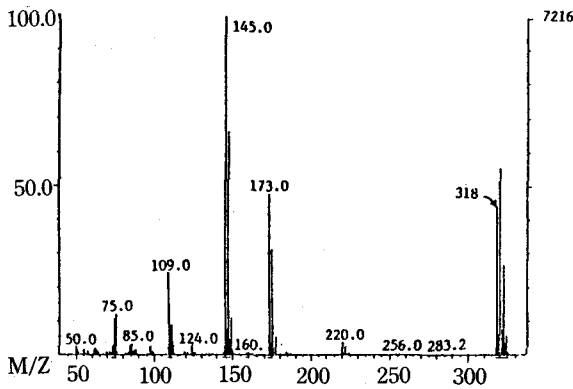


Fig. 9. Mass spectrum of the intact TCAB.

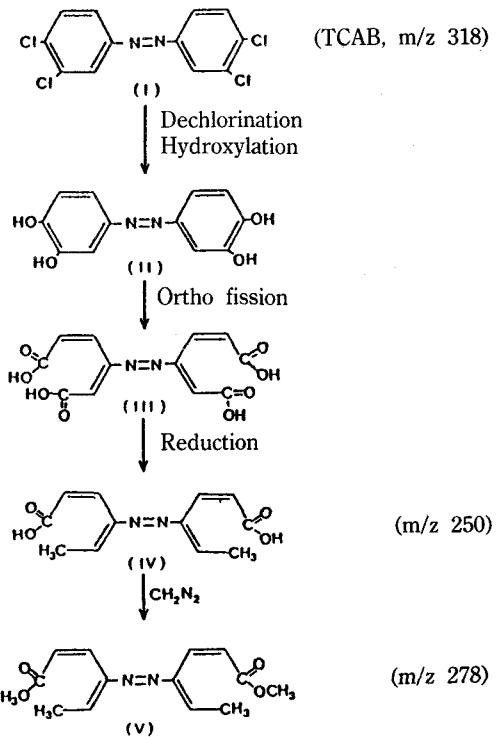
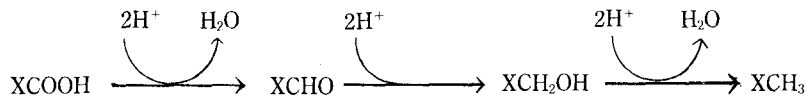


Fig. 10. Proposed pathways for the microbial degradation of TCAB by the isolate I(*Achromobacter* group VD).

TCAB의 分解産物로 생각되는 peak들의 mass spectrum을 얻은 結果는 Fig. 7과 8이다. Fig. 7에서 m/z 250인 것이 本來의 TCAB 分解産物로 생각되며 이는 不完全한 methylation때문에 檢出된 것으로 생각된다. 그리고 Fig. 8에서 m/z 278인 分解産物은 그 構造式 中の carboxyl基나 完全히 methylation되어 ester가 된 것으로 생각된다. 그리고 未分解된 TCAB의 mass spectrum은 Fig. 9에서 보는 바와 같다. 한편 Fig. 10은 TCAB로부터 分解産物이 形成될 수 있는 可能한 分解 經路를 提示한 것이다. 여기에서 보면 앞에서 言及한 바와 같이 TCAB



(I)가 dechlorination과 hydroxylation을 받으면 II가 形成되는 것은 可能的 經路이다. 다음에 benzene 環에서 monooxygenase에 依하여 ortho fission이 일어나 III이 形成될 것으로 생각된다. 그런데 이때 4個의 carboxyl基 중에서 2個가 reduction에 依하여 分解產物인 IV를 形成할 것으로 推定하였다. 이 過程은 嫌氣의인 條件에서는 다음과 같이 可能하다.¹⁰⁾

그러나 본 實驗 條件 下에서 이와 같은 經路가 可能한지는 不確實하다. 한가지 確實한 事實은 Fig. 7과 8의 mass spectrum에서 TCAB에 存在하는 4個의 鹽素原子를 發見할 수 없다는 것이다. 따라서 이와 같은 事實은 앞에서의 鹽化이온(Cl⁻) 檢出과 더불어 dechlorination이 일어났음을 強力히 示唆해 준다고 볼 수 있다. 그리고 Fig. 7과 8에 나타낸 mass spectrum의 結果를 뒷받침하

기 위해서는 NMR, IR 등의 結果가 隨伴되어야 하나 試料 中の 分解產物이 極히 微量이고 또한 精製에 어려움이 있어 그 以上の 研究은 다음의 課題로 미루기로 한다. 그리고 分解產物로 提案한 IV(m/z 250)은 比較的 安定한 化合物로 推測되며 그 理由 中の 하나는 그 構造式에서 보는 바와 같이 conjugated system 때문인 것으로 생각된다.

謝 辭

本 研究은 1989年度 文教部 支援 韓國學術振興財團의 自由公募課題 學術研究 助成費에 依하여 遂行되었으며 同 機關에 謝意를 表합니다.

참 고 문 헌

- Hsia, M.T.S., Burant, C.F., Kremer, B.L. and Schrankel, K.R. : Toxicology, 24 : 231(1982)
- Poland, A., Glover, E., Kende, A.S., De Camp, M. and Giandomenico, C.M. : Science, 194 : 627(1976)
- Hill, R.H., Rollen, Z.J., Kimborough, R.D., Groce, D.F. and Needham, L.L. : Arch. Environ. Health, 36(1) : 11(1981)
- Mensink, J.A. and Strik, J.J.T.W.A. : Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28 : 369(1982)
- Viswanathan, R., Scheunert, I., Kohli, J., Klein, W. and Korte, F. : J. Environ. Sci. Health, B13(3) : 243 (1978)
- Worobey, B.L. : Chemosphere, 13 : 1103(1984)
- Lee, J.K. and Kyung, K.S. : Serial No. 572, Subtopic/Poster Code 07B-54 IUPAC, 7th International Congress of Pesticide Chemistry, August 5-10, 1990, Hamburg, Fed. Rep. of Germany
- Lee, J.K., Fournier, J.C. and Catroux, G. : J. Korean Agric. Chemical Society, 20(1) : 109(1977)
- Pásková, J. and Munk, V.J. : J. Chromatog., 4 : 241 (1960)
- Barker, H.A. : Bacterial Fermentation, CIBA Lectures in Microbial Biochemistry, Wiley, New York (1956)

Microbial degradation of the persistent pollutant TCAB : (II)**Degradation of TCAB by isolated microorganisms**

Jae-Koo Lee, Yang-Bin Ihm, Yong-Gyun Cho, Kee-Sung Kyung, Kyeong-Seok Oh and Hak-Nam Kim(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung Buk National University, Cheong Ju 360-763, Korea)

Abstract : When [^{14}C] 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene([^{14}C] TCAB) was added to the MM_2 medium as a sole carbon source for the isolated microorganisms and incubated, some radioactive metabolites were detected by autoradiography. No $^{14}\text{CO}_2$ was evolved from [^{14}C] TCAB which was added as a sole carbon source to an organic matter-free soil inoculated by the isolates, wetted with the MM_2 salt medium, and incubated at 30°C . One of the metabolites in pure culture of *Achromobacter* group VD, which was isolated and identified, was tentatively identified as a compound of m/z 250 by means of GC/MS. The possible pathways for its formation are thought to include dechlorination from the TCAB structure, hydroxylation, ortho fission of the two benzene rings, and reduction of the resulting carboxyl group.