

2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid 분해균의 유전적 특성에 관한 연구

윤소영 · 손홍주 · 이 건 · 이상준 · 이종근*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

2,4,5-T 분해균주인 *Pseudomonas* sp. EL-071P는 rifampicin, ampicillin, kanamycin 등의 항생제와 $ZnCl_2$, $CuSO_4$ 등의 중금속에 대하여 내성을 가지고 있었다. 이 균주로부터 2,4,5-T 분해능과 rifampicin의 내성에 관련된 하나의 plasmid를 분리, 정제하였으며 그 크기는 약 40 kb이었다. *E. coli*에 2,4,5-T 분해능에 관련된 plasmid를 transformation한 결과 2,4,5-T 분해에는 plasmid가 관여함을 확인할 수 있었다. 이 균주는 다양한 염소계방향족 동족체화합물을 유일한 탄소원으로 하여 생육할 수 있었으며, chlorophenol compound의 경우 Cl의 치환위치가 ortho-, para-, meta- 위치순으로 분해가 잘 되었다. 2,4,5-T의 기질유사체인 4-chlorophenol에 의해 2,4,5-T 대사가 저해되었다. 비염소계 방향족화합물중 benzoate, salicylate, toluene은 *Pseudomonas* sp. EL-071P와 *Pseudomonas putida* KCTC 1643에 의해 탄소원으로 이용되었으나 naphthalene의 경우 *Pseudomonas* sp. EL-071P에 의해서만 탄소원으로 이용되어 표준균주인 *Pseudomonas putida* KCTC 1643과 상이한 결과를 나타내었다.

KEY WORDS □ 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid(2,4,5-T)

농약제로 흔히 사용되는 염소계 방향족탄화수소는 구조적으로 안정하고 잔류성이 강한 난분해성물질로서, 구제의 대상이 아닌 생물권에 유입되어 돌연변이 유발원 및 발암원으로 작용 될 수도 있으며, 근권(rhizosphere)의 미생물에도 직,간접적 영향을주고 있다(8). 염소계 방향족탄화수소 화합물가운데 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(이하 2,4,5-T라 약칭)는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(이하 2,4-D라 약칭) 동족체화합물로서 관목류에 대한 제초효과가 우수하여 도로, 철도, 복장등의 잡초 또는 관목구제 목적으로 이용되며, 식물호르몬제로도 널리 이용되고 있다.

각종의 난분해성 방향족 탄화수소화합물을 이용할 수 있는 대표적 균종은 *Pseudomonas*속이며, 그 밖에 *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Bacillus*속 등도 분해능이 있는 것으로 보고된 바 있다. 이들 보고에 의하면 분해능은 chromosome에 기인하고 있으며 plasmid기원으로는 camphor, octane, toluene, salicylate, naphthalene 등에 대한 분해능이 있다(6). 이들 독성유기화합물 분해균주는 기질특이성이 지극히 제한적인 경향이 있어 실제 오염환경의 정화를 위해서는 다양한 오염원에 대한 균주 혼합적용의 난점이 있으나 분해 유전자의 종내 혹은 종간 전달특성을 효과적으로 이용하여 다양한 분해능을 갖는 균주 개발이 기대된다(1-13).

본 연구에서는 토양잔류성의 다양한 화합물에 대해 광범위한 분해능을 가지는 균주를 개발하기 위하여 본 실험실에서 분리한 2,4,5-T 분해균주인 *Pseudo-*

monas sp.의 염소계 방향족탄화수소 화합물의 분해에 관한 유전적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

2,4,5-T 분해균주는 본 실험실에서 분리(11)한 *Pseudomonas* sp. EL-071P를, 유전적 특성 조사에서는 *Escherichia coli* MC 1061를 유전자 도입균주로 이용하였다. 또한 *Pseudomonas* sp. EL-071P의 plasmid DNA 특성 조사과정의 비교균주로 *Pseudomonas putida* KCTC 1643을 이용하였다.

사용배지

유전학적 실험에는 LB broth를 사용하고 2,4,5-T 및 방향족화합물의 기본배지로 Alexander's minimal medium을 이용하였다. 기본배지의 조성은 2,4,5-T 0.05 g, K_2HPO_4 2.1 g, KH_2PO_4 1.6 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, KCl 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05 g을 증류수 1l에 녹인 후 pH를 7.2로 조절하였으며 30°C에서 배양하였다. Plasmid DNA의 분리 및 정제

Hansen과 Olsen의 방법을 변형시킨 alkaline extraction방법을 사용하였다(10). 분리한 DNA의 순도를 높이기 위하여 polyethylene glycol법으로 정제하였다(10). 분리한 DNA는 0.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 0.5 μ g/ml ethidium bromide 용액에서 염색하여 확인하였다.

항생제 및 금속이온에 대한 내성조사

LB plate에 rifampicin, ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracycline을 각각 첨가하여 만든 구배배지로 최소저해농도(MIC)를 결정하였다. 실제로 *Pseudomonas* sp. EL-071P를 페수처리에 적용시켰을때 페수중에 함유된 중금속에 의한 생육저해 여부를 알아보기 위하여 중금속에 대한 내성을 조사하였다. 중금속에 대한 내성조사는 구배배지에서 얻은 colony를 적당한 농도별로 선별하여 구배가 없는 금속이온이 함유된 배지로 옮긴후 30°C에서 30시간 배양하여 colony의 생장유무로 내성을 조사하였다.

Curing

Pseudomonas sp. EL-071P의 2,4,5-T 분해능의 유전적 기원을 고찰하기 위하여 Chakrabarty 등(7)의 방법에 의하여 curing을 하였다. 배지에 50 µg/ml mitomycin C를 첨가하여 균체를 얻었으며 indicator plate로는 2,4,5-T 기본배지와 ampicillin이 450 µg/ml 첨가된 항생제 배지를 사용하였다. Cured strain에 대하여 ampicillin, kanamycin, rifampicin, streptomycin에 대한 내성잔존 여부를 검토하였다.

Transformation

Pseudomonas sp. EL-071P의 plasmid DNA가 2,4,5-T 분해능에 기여하는 정도를 알아보기 위하여 *Escherichia coli* MC 1061 균주로의 transformation을 행하였으며 Cohen과 Chang의 방법(2)을 변형하여 사용하였다. Competent cell은 무균적으로 냉각된 0.1 N CaCl₂에 *Escherichia coli*를 현탁시켜 준비하였고, 여기에 정제된 DNA를 첨가하여 얼음속에서 30분간 유지시키고, 42°C에서 90초간 열충격을 가하였다. 영양배지로 전체 액량을 1 ml로 조절하여 1시간 배양한 후 2,4,5-T 무기염배지에서의 colony 형성유무를 관찰하였다.

염소계 방향족 동족체화합물에 대한 분해능 검토

Pseudomonas sp. EL-071P의 염소계 방향족 동족체화합물에 대한 분해능을 검토하기 위하여 2,3,4-chlorophenol, 3,4,2,3-2,4-2,5-2,6-dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, catechol, 3,4-chlorobenzoic acid, 3,4-dichlorobenzoic acid, phenoxyacetic acid, *p*-chlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid 등을 각각 유일한 탄소원으로 하는 무기염배지에서 생육도와 기질감소량을 측정하였다. 생육도는 spectrophotometer (Shimadzu UV-24)를 사용하여 660 nm 에서의 흡광도로 측정하였다. 기질감소량에 대한 정량방법은 2,4,5-T 및 각 염소계 방향족 동족체화합물의 최고 흡광도를 나타내는 파장을 구하고, 이 파장에서 각 화합물의 농도에 따른 검량곡선을 작성한 후, 이 곡선을 이용하여 시료의 흡광도를 측정하여 기질량을 환산하였다. 또한 *Pseudomonas* sp. EL-071P의 2,4,5-T 분해능이 기질유사체를 첨가하였을때 어떠한 영향을 받는지를 검토하기 위하여 2,4,5-T 무기염배지에 임의로 100 ppm의 4-chlorophenol

을 첨가하여 그 효과를 검토하였다.

비염소계 방향족화합물에 대한 분해능 검토

Pseudomonas sp. EL-071P의 염소계 방향족화합물에 대한 분해능을 검토하여 본 결과 *Pseudomonas putida* KCTC 1643과 유사한 분해능을 가지고 있었으므로 비염소계 방향족화합물에 대한 분해능의 비교실험을 하였다. 비염소계 방향족화합물중 염소계화합물과 오염환경에 공존할 가능성을 가지고 있는 benzoate, salicylate, toluene 등을 각각 유일한 탄소원으로 하는 무기염배지에서의 생육도를 측정하여 분해능 유무를 비교검토하였다.

결과 및 고찰

Plasmid DNA의 분리

분리, 정제하여 얻은 *Pseudomonas* sp. EL-071P의 DNA를 전기영동하여 본 결과, 약 40Kb 정도의 위치에서 단일 band로 나타나, 본 균주는 하나의 plasmid를 가지는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

***Pseudomonas* sp. EL-071P의 항생제 및 금속 이온에 대한 내성**

항생제내성은 tetracycline, chloramphenicol에 대하여는 감수성을 나타내었고 rifampicin, streptomycin, ampicillin, kanamycin에는 내성을 나타내었다(Table 1). 금속이온에 있어서는 metal compounds gradient plate 상에서의 실험결과, CuSO₄, ZnCl₂에 대하여 높은 농도까지 내성을 나타내었다(Table 2).

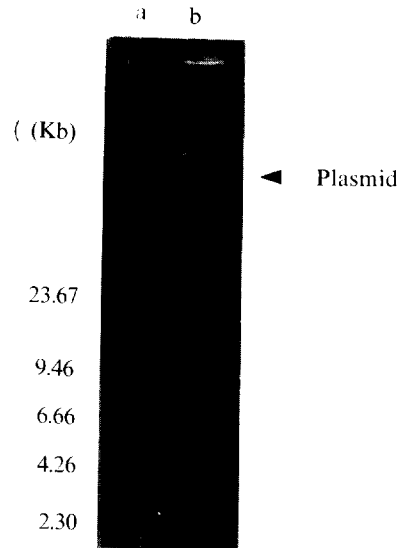


Fig. 1. Electrophoresis of *Pseudomonas* sp. EL-071P plasmid.

Lane a: Lambda/Hind III size marker.
Lane b: EL-071P plasmid.

Table 1. Antibiotic resistance and minimal inhibitory concentration(MIC) of *Pseudomonas* sp. EL-071P

Antibiotics	<i>Pseudomonas</i> sp. EL-071P
Ampicillin	resistance (500 µg/ml)
Chloramphenicol	sensitive (ND*)
Kanamycin	resistance (500 µg/ml)
Streptomycin	resistance (500 µg/ml)
Tetracyclin	sensitive (ND*)
Rifampicin	resistance (50 µg/ml)

*Not Determined.

Table 2. Resistance of *Pseudomonas* sp. EL-071P to metal compounds

*Maximum concentration of metal compound that allowed bacterial growth				
Cd(NO ₃) ₂	ZnCl ₂	AgNO ₃	CuSO ₄	HgCl ₂
7	10	0.4	5	0.1

*Determined by the metal compound gradient plate method(mM).

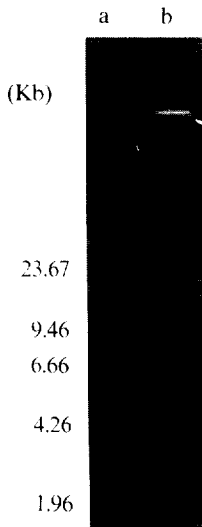


Fig. 2. Electrophoresis of cured strain and *Pseudomonas* sp. EL-071P DNA on agarose gel
Lane a: Lambda/Hind III size marker.
Lane b: cured strain.

Cured strain의 선별

완전평판배지(LB) 및 2,4,5-T 기본배지상에서 생장한 colony중 2,4,5-T 기본평판배지상에서만 생장을 나타내지 않은 위치의 LB 평판배지상의 colony를 cured strain으로 일차선별하였다. 이 일차선별된 균주들에 대하여 한차례 더 2,4,5-T 기본배지상의 생장

Table 3. Difference of antibiotics resistance between *Pseudomonas* sp. EL-071P and cured strain

Antibiotics	<i>Pseudomonas</i> sp. EL-071P (MIC: µg/ml)	Cured Strain
Ampicillin	+(500)	+(500)
Kanamycin	-(500)	+(500)
Rifampicin	-(50)	-(ND*)
Streptomycin	-(500)	+(500)

*Not Determined.

Table 4. Growth and biodegradation of various chlorinated aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. EL-071P

Compounds	Growth (A ₆₆₀)	Biodegradation (%)
2-Chlorophenol	0.19	31
3-Chlorophenol	0.15	28
4-Chlorophenol	0.15	30
3,4-Dichlorophenol	0.04	ND*
2,3-Dichlorophenol	0.17	28
2,4-Dichlorophenol	0.14	ND*
2,5-Dichlorophenol	0.05	4
2,6-Dichlorophenol	0.22	24
2,4,5-Trichlorophenol	0.03	ND*
3-Chlorobenzoic acid	0.21	32
4-Chlorobenzoic acid	0.26	25
3,4-Dichlorobenzoic acid	0.19	12
Phenoxyacetic acid	0.21	38
p-Chlorophenoxyacetic acid	0.22	26
4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid	0.19	30
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0.25	8
Catechol	0.15	12

*Not Determined.

유무를 확인하여 생장을 보이지 않는 균주를 재선별하였다. 재선별된 균주의 plasmid DNA를 분리한 결과, *Pseudomonas* sp. EL-071P의 단일 plasmid DNA band위치에서 band를 나타내지 않아 2,4,5-T 분해능에 관련된 cured strain임을 확인하였다(Fig. 2). 또한 cured strain의 항생제내성을 *Pseudomonas* sp. EL-071P의 항생제내성과 그 차이를 비교하여 본 결과, ampicillin, kanamycin, streptomycin에 대한 내성은 여전히 보유하고 있었으나 rifampicin에 대한 내성은 상실되어 rifampicin에 대한 내성은 plasmid DNA에 기인하는 것으로 사료된다(Table 3).

Transformation

Pseudomonas sp. EL-071P로 부터 분리된 plasmid를 competent *Escherichia coli* MC 1061로 도입하여 본 결과, 2,4,5-T 무기염 배지에서 *Pseudo-*

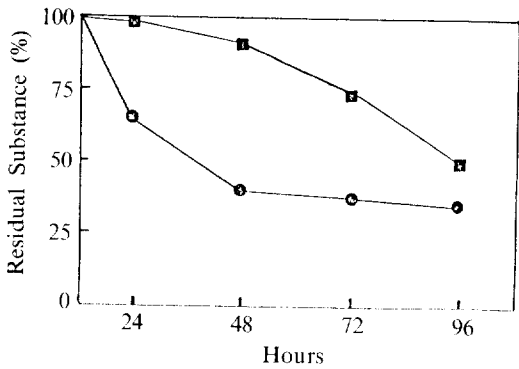


Fig. 3. Effect of 4-chlorophenol on 2,4,5-T metabolism by *Pseudomonas* sp. EL-071P
 —■—: Residual 2,4,5-T with 4-chlorophenol.
 —●—: Residual 2,4,5-T without 4-chlorophenol.

Table 5. Comparison of biodegradability of aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. EL-071P and *Pseudomonas putida* KCTC 1643

Aromatic compounds	Growth	
	<i>Pseudomonas</i> sp. EL-071P	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 1643
Naphthalene	+	--
Salicylate	+	+
Benzoate	+	++
Toluene	+	++

—: No growth, +: Growth, ++: Good growth.

monas sp. EL-071P와 동일한 정도의 생장을 나타 내지는 못하였으나, 미약한 생장의 많은 colony들을 분리할 수 있었으므로 2,4,5-T의 분해는 이 plasmid DNA에 기인하고 있음이 재확인되었다.

염소계 방향족 동족체화합물에 대한 분해능

Pseudomonas sp. EL-071P의 염소계 동족체화합 물에 대한 생육도와 분해능을 검토한 결과, chlorophenol compounds의 경우 Cl의 치환 위치가 ortho, para, meta 위치순으로 분해가 잘 되었으며 동 일한 phenoxyacetic acid 계열의 제초제인 2,4-D의 경우 분해율이 아주 낮아 분해초기의 효소는 매우 높은 기질 특이성이 있을 것으로 사료된다(Table 4). 또한 *Pseudomonas* sp. EL-071P의 2,4,5-T 분해능이 기질유사제를 첨가하였을때 어떤 영향을 받는지를 검토한 결과, 4-chlorophenol에 의해 2,4,5-T의 대사가 저해되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

비염소계 방향족화합물에 대한 분해능

Benzoate, salicylate, toluene 100 ppm농도의 기 액배지에서 *Pseudomonas* sp. EL-071 및 광범위

한 방향족 탄화수소 분해능을 가진 *Pseudomonas putida* KCTC 1643 표준균주를 배양하여 생육을 통한 분해능을 검토한 결과, 두 균주 모두 benzoate, salicylate, toluene 분해능을 가지고 있었으나 naphthalene의 경우 무기염만을 함유하는 agar plate상에서 고체 naphthalene을 첨가하여 승화되는 동안의 균생 육을 판별한 결과 *Pseudomonas* sp. EL-071P만이 생육을 나타내었다(Table 5).

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부 대학부설 유전공학연 구소 학술연구 조성비 (Plasmid-assisted molecular breeding을 이용한 chlorinated aromatic hydrocarbon 분해균주 개발에 관한 연구)에 의해 수행되 었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Chatterjee, D.K., J.J. Kilbane and A.M. Chakrabarty, 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 514-516.
2. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang and L. Hsu, 1973. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **69**, 2100-2114.
3. Curtis, A.C., I.S. Pierson, J.J. Rosen and J.L. Ingraham, 1983. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J. of Bacteriol.*, **153**, 93-99.
4. Desomer, J., P. Dhaese and M.V. Montagu, 1988. Conjugative transfer of cadmium resistance plasmids in *Rhodococcus fascians* strains. *J. of Bacteriol.*, **170**, 2401-2405.
5. Ghosal, D., I.S. You, D.K. Chatterjee and A.M. Chakrabarty, 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science*, **228**, 135-142.
6. Jeong, Y.C., K.N. Kim, Y.J. Choi, H.C. Yang, J.S. Song and Y.S. Seo, 1989. Biodegradation of aromatic compounds by strains of *Pseudomonas*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 100-108.
7. Karns, J.S., J.J. Kilbane, S. Duttgupta and A.M. Chakrabarty, 1983. Metabolism of halophenols by 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1176-1181.
8. Kho, Y.H., H.K. Chun and K.S. Bae, 1989. Conjugal transfer of NAH, TOL, and CAM::TOL Plasmid into n-alken assimilating *Pseudomonas putida*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 51-55.
9. Kilbane, J.J., D.K. Chatterjee and A.M. Chakrabarty, 1983. Detoxification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1697-1700.

10. Maniatis T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
11. Park, Y.S., S.J. Lee and J.K. Lee. 1992. Isolation and characterization of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degrading bacteria. *J. Science. Pusan Natl. Univ.*, **53**, in press.
12. Robert, J.S. and R.M. Atlas, 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2185-2191.
13. Robert, S.B., S.W. Hooper and G.S. Saylor, 1989. The TOL(pWW0) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1323-1328.

(Received May 13, 1992)

(Accepted May 25, 1992)

ABSTRACT: Genetic Characterization of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacterium

Yoon, So-Yeong, Hong-Joo Son, Geon Lee, Sang-Joon Lee and Jong-Kun Lee*

(Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Pseudomonas sp. EL-071P degrading 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) was resistant to antibiotics: rifampicin, ampicillin, kanamycin and metal ions : Zn²⁺ and Cu²⁺. The plasmid related to the degradation of 2,4,5-T and rifampicin resistance was isolated from the strain. Its size was about 40 Kb. As result of transforming the plasmid into *Escherichia coli* MC1061, it was confirmed that the plasmid was related to 2,4,5-T degradation. The strain could grow in the various chlorinated aromatic analogs as the sole carbon source. In the case of chlorophenols, the chlorinated mono-substituted phenols were easily degraded in the order of *ortho*-, *para*-, *meta*-position. The 2,4,5-T metabolism was inhibited by 4-chlorophenol of 2,4,5-T analog. In non-chlorinated aromatics, benzoate, salicylate and toluene were used as the carbon source by the strain and typestrain *Pseudomonas putida* KCTC 1643 having degradability of various aromatics. But naphthalene was used only by the *Pseudomonas* sp. EL-071P.