

## 아닐린 분해 세균인 *Stenotrophomonas maltophilia*의 분리 및 특성

김현주 · 김진철\* · 김흥태 · 최경자 · 최도일<sup>1</sup> · 김흥기<sup>2</sup> · 조광연  
한국화학연구소 농약활성연구팀, <sup>1</sup>생명공학연구소 식물세포공학실,  
<sup>2</sup>충남대학교 농생물학과

**Isolation and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Capable of Degrading Aniline.** Kim, Hyun-Ju, Jin-Cheol Kim\*, Heung Tae Kim, Gyung Ja Choi, Doil Choi<sup>1</sup>, Hong Gi Kim<sup>2</sup>, and Kwang Yun Cho. Screening Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, <sup>1</sup>Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, <sup>2</sup>Department of Agricultural Biology, Laboratory Chungnam National University, Taejeon 705-764, Korea - Four bacteria capable of using aniline as a sole source of carbon and energy were isolated from river waters. Among them, two strains were identified as *Stenotrophomonas maltophilia* based on their physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence and the others as *Delftia acidovorans*. The four strains were able to grow on the mineral salt media containing aniline at concentrations up to 6.000 µg/ml. Since aniline degradation by *S. maltophilia* has not been reported so far, the two strains A-2 and 51-4 were selected for further studies. They completely utilized aniline in a mineral salt medium containing 300 µg/ml of aniline as a sole carbon and energy source within 24 hours. Optimum pH and temperature for aniline degradation and cell growth of both strains were 7.0 and 35°C, respectively. In addition, they effectively degraded aniline in waste, underground and river waters containing 300 µg/ml of aniline. This is the first report of aniline degradation by *S. maltophilia* strains.

**Key words:** aniline, biodegradation, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia acidovorans*

아닐린은 제초제, 염색약, 플라스틱, 의약품 등의 재료로 이용되고 니트로아닐린계 제초제, 니트로피렌 또는 폭약 등의 니트로아로마틱 복합물질이 미생물에 의해 변형(transformation)되는 과정 중에서도 형성된다. 또한, 페닐우레아, 알킬아닐라이드 그리고 페닐카바마이트 제초제 등의 다양한 종류의 농약들도 미생물에 의한 분해(degradation)과정에서 아닐린, 클로로아닐린 및 메틸아닐린 등의 물질들이 형성되어 토양, 하천 및 지하수를 오염시키고 있다. 이러한 물질들이 경구 흡입이 되거나 피부에 접촉되었을 경우, 심한 메세모글로빈에미아(methemoglobinemia)증상과 암중증(carcinomatosis)증 간암, 신장암 및 방광암 등을 일으키며 또한 돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있다[18,21,29,33].

이들 물질들의 독성 및 발암성이 보고된 이후에 많은 연구자들에 의해 폐수, 하천 및 지하수 그리고 토양에서의 아닐린계 물질들의 분해 메커니즘에 대한 연구가 진행되어 왔다[19]. 환경에서의 아닐린 제거 방식에는 evaporation, photooxidation[19,26,34], autooxidation[20,23] 및 화학적 결합[4] 등의 다양한 이화학적 과정도 있지만 아닐린 분해

의 가장 중요한 경로는 각종 미생물들에 의한 생물학적 분해(biodegradation)로 알려져 있다. 궁극적으로 생물학적 분해는 생물에 의해 유기물질이 완전 산화되어 CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 및 기타 무기 물질로 변화하는 것(mineralization)과 acylation[13,27,30], polymerization[12,13] 및 nitro products [12,13] 등으로 변화하는 것들도 모두 포함된다.

미생물에 의한 아닐린 분해와 관련하여 아닐린 뿐만 아니라 메틸아닐린 유도체, 클로로아닐린 유도체 등을 분해할 수 있는 균주들도 분리되었는데, 대부분이 *Alicycobacter* spp., *Rhodococcus* spp. 및 *Pseudomonas* spp. 등에 속하고 있다[6,7,9,11,16,24,25]. 이러한 아닐린과 아닐린 유도체를 분해하는 균주들의 분리와 더불어 분해경로를 규명하고자 하는 연구들도 많이 진행되어 졌는데, 아닐린이 oxidation에 의해 catechol로 되고 *ortho*-cleavage pathway 또는 *meta*-cleavage pathway를 통해 무기화(mineralization)되는 과정들이 증명되었다[1,3,11,14,16]. 지금까지 알려진 아닐린 분해균주들은 분해물질에 따라 두 개의 그룹으로 나눌 수가 있는데, 하나는 아닐린과 클로로아닐린 유도체를 동시에 분해하는 균주들이고[5,9,11,15,16,25,35,36], 다른 하나는 아닐린과 메틸아닐린 유도체를 동시에 분해하는 균주들이다[2,7,24,31]. 하지만, 현재까지 아닐린과 더불어 클로로아닐린 유도체와 메틸아닐린 유도체를 동시에 분해하는 균주는 아직 자연 상태에서 보고된 바가 없다.

\*Corresponding author  
Tel. 042-860-7436, Fax. 042-861-4913  
E-mail: kjinc@pado.kRICT.re.kr

한편, 아닐린은 연못에서 약 1% 정도가 휘발이나 광에 의해 제거되고 약 4% 정도는 부식토 성분들과 결합함으로써 제거되며 나머지는 미생물에 의해 분해되는 것으로 보고되어 있다[17]. 이와 같이, 미생물에 의한 분해가 오염된 하천수, 연못, 지하수 및 폐수 등에서의 아닐린 제거에 가장 중요한 수단으로 알려져 있어, 미생물을 이용한 공장 폐수 및 폭장 폐수의 정화에 이들 미생물을 이용하고 있으며, 최근에는 오염된 지하수 또는 토양에서 아닐린 및 아닐린 유도체들을 제거하고자 하는 연구들이 많이 진행되고 있다.

그러므로, 본 연구에서는 환경의 주요 독성오염물질인 아닐린을 효율적이면서 경제적으로 처리하는 방법인 생물학적 분해(biodegradation)를 위해, 분해능이 우수한 새로운 균주를 선발하고자 하였다. 그 과정 중에 지금까지 아닐린 분해 균주로 보고되지 않은 두 개의 *Stenotrophomonas maltophilia* 균주를 분리하였기에 이들 균주의 특성을 규명하고 또한, 지하수, 하천 및 정화조 등에서 채취한 물시료에서의 아닐린 분해정도를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 배지

아닐린은 순정 1급(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였고, 고효율액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)용 acetonitrile은 덕산화학(Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea)제품을 이용하였으며, 물은 실험실에서 제조한 3차 증류수를 이용하였다. 아닐린 분해균의 분리 및 배양조건을 조사하기 위해 사용한 종배양용 배지는 1 L의 증류수에 0.25 g peptone, 0.25 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g glucose, 0.03 g MgSO<sub>4</sub> 및 0.003 g CaCl<sub>2</sub>을 함유한 PTYG 배지를 사용하였고, 최소 영양원 배지로는 1 L의 증류수에 0.22 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.085 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.45 g NaHPO<sub>4</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 0.23 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.37 g CaSO<sub>4</sub> 및 0.0025 g FeCl<sub>3</sub>을 함유하는 mineral salt 배지를 사용하였다. 아닐린 분해균의 보존은 1.5%의 한천과 300 µg/ml 수준의 아닐린을 첨가하여 만든 사면 아닐린 mineral salt 배지와 nutrient agar(Becton and Dickinson Company, Sparks, Maryland, USA)배지에 배양 후, 4°C에서 보관하였다.

### 분해미생물의 분리

아닐린 분해균주의 분리를 위하여 전국의 강에서 채취한 물 시료 10 ml을 아닐린이 300 µg/ml 수준으로 처리된 40 ml의 mineral salt 배지에 넣고 30°C, 200 rpm으로 진탕배양하였다. 7일간 배양 후, 소량을 취하여 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리한 다음, 상층액을 자외선 흡광계(UV-2401PC Spectrophotometer; Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 아닐린의 분해

여부를 조사하고, 550 nm에서는 균의 증식을 조사하였다. 초기의 아닐린 농도와 비교하여 감소된 것이 확인된 배양액 0.1 ml을 취하여 아닐린이 300 µg/ml이 포함된 PTYG 평판배지에 도말하고 자라는 균주를 순수 분리하였다. 분리한 균주들을 다시 아닐린을 최소영양원으로 포함하고 있는 mineral salt 배지에 배양하면서 아닐린 분해여부를 HPLC 분석으로 확인하였다. 이러한 일련의 과정을 통하여 네 개의 세균을 순수 분리하였다.

### 생리 및 생화학적 특성

순수 분리한 네 개의 아닐린 분해균의 동정을 위하여 *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*[10]의 표준방법에 따라 몇가지 생리 및 생화학적 특성을 조사하였고 또한, Micro Station System(Biolog, Inc., Hayward, Calif., USA)을 이용하여 95가지 탄소원의 이용에 대한 특성을 조사하였다. Biolog 실험을 위해 분해균주를 Tryptic Soy Agar(TSA) 배지에 하루 동안 배양한 다음 미리 멸균된 saline 용액에 현탁하여 균의 밀도를 조정된 후, 탄소원이 들어 있는 Biolog GN Microplate에 준비된 현탁액을 각 well 당 150 µl씩 분주하였다. 4시간, 24시간 그리고 48시간 배양하면서 탄소원 이용 여부를 reader로 측정하고, Microlog release 3.50 software에서 검색하여 분해균주를 분류하였다.

### 16S rDNA의 Sequencing

분리된 균주들의 정확한 동정을 위해 모든 균주들의 16S rRNA gene은 kit(Product A1360; Promega Co., Madison, Wis., USA)를 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)으로 증폭시키고 각각의 PCR product를 DNA purification kit(Product 28706; QIAGEN Inc., Valencia, Calif., USA)로 순수 분리한 후, DNA sequencer(Perkin-Elmer ABI, Foster City, Calif., USA)로 염기서열을 해독하였다[28, 32]. 이때 동정의 key가 되는 1,485 bp를 포함하는 부분을 sequencing하기 위해 forward primer와 reverse primer는 각각 8f(20-mer, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492r(19-mer, 5'-GGTTACCTTGTTACGACGACTT-3')를 사용하였다. 동정한 결과, 51-A와 11-E 균주는 *Delftia acidovorans*로 동정되었고 A-2와 51-4 균주는 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었다. *S. maltophilia*에 의한 아닐린 분해는 지금까지 보고된 바가 없어, *S. maltophilia* A-2 균주와 51-4 균주에 대하여 아닐린 분해 특성을 규명하는 실험을 진행하였다.

### 아닐린 분해 특성 조사

*S. maltophilia* A-2와 51-4 균주의 아닐린 분해능을 확인하기 위해 PTYG 배지에서 종 배양한 균체를 4°C에서 10,000 rpm으로 20분동안 원심분리한 후 0.015 M phosphate

buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 다음, 최소배지인 mineral salt 배지로 현탁하여 550 nm에서의 균체의 혼탁도(OD)가 0.3 (약  $2.0 \times 10^8$  cells/ml)이 되도록 희석하였다. 500 ml의 삼각 플라스크에 현탁액을 200 ml이 되게 한 후 아닐린을 300 µg/ml로 첨가한 다음, 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 매 8시간 간격으로 수확한 시료를 원심분리하여 상층액을 자외선 분광계를 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 분해능을 조사하였고, 균의 생육은 550 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

분리한 네 균주의 최대 분해 농도를 결정하기 위해 농도별(250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 µg/ml)로 아닐린이 포함된 mineral salt 배지 3 ml이 든 시험관에 약  $2.0 \times 10^8$  cells/ml 수준으로 균을 접종하고 7일간 200 rpm에서 진탕배양 한 후, HPLC를 사용하여 분해능을 조사하였다.

또한, 아닐린 분해를 위한 pH와 온도의 영향을 알아보기 위해서, mineral salt 배지 3 ml이 든 시험관에 아닐린을 300 µg/ml 수준으로 처리하고 A-2와 51-4 균주를 각각 약  $2.0 \times 10^8$  cells/ml 수준으로 접종하고, 20시간동안 200 rpm에서 진탕배양 한 후, pH는 5.0-9.0의 범위에서, 온도는 5°C-40°C의 범위에서 HPLC를 이용하여 분해능을 조사하였다.

#### 여러 가지 물시료에서의 아닐린 분해능 조사

대전시 유성구내에 위치한 갑천의 하천수, 원자력 연구소 앞의 지하수(지하수 1), 연구단지 내 아파트 주민의 식수원인 지하수(지하수 2) 그리고 한국화학연구소와 LG 연구소가 연결된 폐수정화조에서, 각각 한 개씩의 물시료를 채취하여 *S. maltophilia* 51-4 균주의 네 가지 물시료에서의 아닐린 분해능을 조사하였다. 이들 물시료를 각각 살균구와 비살균구로 나누고, 이를 다시 아닐린 분해균주의 접종구와 비접종구로 나누어 처리하였다. 살균구의 물시료는 121°C에서 20분간 고압살균하였으며, 모든 물시료는 500 ml 삼각플라스크에 200 ml 씩 물시료를 첨가하였다. 접종구는 *S. maltophilia* 51-4 균주를 약  $2.0 \times 10^8$  cells/ml 수준으로 접종하였다. 모든 시료에는 아닐린을 300 µg/ml이 되도록 첨가한 후, 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 매 12시간마다 60시간까지 수확하여 HPLC를 이용하여 아닐린 잔류량을 조사하였다.

#### 분석 방법

아닐린의 정량적 분석을 위하여 수확한 시료를 10,000 rpm에서 20분간 4°C에서 원심분리한 후, 상층액을 HPLC (Waters; Millipore Co., Millipore, Mass., USA)를 이용하여 분석하였다. Column은 µBondapak C<sub>18</sub>(3.9 × 300 mm; Millipore Co.)을 사용하였고 photodiode array detector (Waters model 996; Millipore Co.)를 이용하여 280 nm에서 분석하였다. 그리고 이동상은 acetonitrile:water (60:40, v/v)였으며, 유속은 1 ml/min였다[23].

## 결과 및 고찰

### 아닐린 분해미생물의 분리 및 동정

전국의 강에서 채취한 물 시료로부터 아닐린을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 증식이 가능한 네 개의 균주를 순수 분리하였다. 네 개의 균주들은 모두 그람 음성균이며 oxidase와 catalase reaction에 양성 반응을 보였고, King's B 배지에서 형광색소를 생성하지 않았으며, 4°C와 41°C에서 생장하지 못하였다. Biolog 실험을 수행한 결과, 네 균주 모두 탄소원으로 acetic acid, cis-asconic acid, formic acid, methyl pyruvate, mono-methyl succinate, α-ketoglutaric acid, malonic acid, succinic acid, L-glutamic acid, urocanic acid 및 inosine 등을 이용하였으나, D-melibiose, hydroxy L-proline, γ-hydroxybutyric acid, L-arabinose, glycyl-L-aspartic acid 등은 이용하지 못하였다[15,32]. Biolog 실험 결과, 네 균주 모두 *Comamonas acidovorans* 와 유사성이 높은 것으로 나타났다. 이들 네 개 균주의 정확한 동정을 위해 16S rDNA sequencing을 실시한 결과, A-2와 51-4 균주는 Genbank database에의 *S. maltophilia* Strain VUN 10.012 (AF068009)와 similarity가 100% 일치하여 *S. maltophilia*로 동정되었다. 51-A와 11-E 균주는 *D. acidovorans* (AB020186)의 16S rDNA sequence와 100% 일치하여 *D. acidovorans*로 동정되었다.

*D. acidovorans*는 *Pseudomonas acidovorans*와 *C. acidovorans*로 명명되어 오다가, 1999년에 *D. acidovorans*로 새로이 명명되었다[32]. 이 중에 의한 아닐린 및 아닐린 유도체의 분해는 이미 여러 편의 논문을 통해 보고되었다. Peres 등(1998)은 *C. acidovorans*가 아닐린과 메틸아닐린을 동시에 분해한다고 보고하였고[22], Loidl 등(1990)은 토양에서 분리한 네 개의 *P. acidovorans* 균주가 아닐린과 3-클로로아닐린 및 4-클로로아닐린을 유일 탄소, 질소 및 에너지원으로 이용이 가능하다고 보고하였다[16].

*S. maltophilia*에 의한 아닐린 또는 아닐린 유도체의 분해에 대한 보고는 전무하며, 본 연구에서 처음으로 보고하는 것이다. *S. maltophilia*는 이전에 *P. maltophilia* 또는 *Xanthomonas maltophilia*로도 불리워 졌는데, clinical laboratory에서 자주 분리되었으며[8], 이 종들은 물, 우유 그리고 냉동 식품 등에서도 발견되기도 하였다. 또한, Debette과 Blondeau[6]는 몇몇의 작물 근권에서도 발견된다고 하였다.

### 아닐린 분해미생물들의 최대 분해 농도 조사

분리한 네 개의 아닐린 분해미생물들을 아닐린이 유일한 탄소원으로 포함된 mineral salt 배지에 배양한 후, 서로 다른 아닐린의 농도에서 그 분해능을 비교하였다. 그 결과, 네 개의 균주 모두 250 µg/ml, 500 µg/ml 및 1,000 µg/ml에서 96% 이상의 높은 분해능을 보여 주었으며 2,000 µg/

ml에서는 50% 이상의 분해능을 보였다(Table 1). 균주 간 아닐린 농도에 따른 분해능의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 한편, 아닐린이 첨가된 고체 및 액체 mineral salt 배지에서 *S. maltophilia* A-2와 51-4 두 균주는 서로 색소 생성에 있어서 차이가 있었는데, A-2 균주의 경우에는 균주가 자람에 따라 콜로니 주위가 노란색을 띠었으나, 51-4 균주의 경우는 전혀 색소를 보이지 않아 두 균주가 같은 종일지라도 서로 다른 균주라고 인식되었다. 따라서, *S. maltophilia*는 지금까지 전혀 아닐린 분해 균주로서 보고된 바가 없고 또한, 두 균주 A-2와 51-4가 서로 다른 균주로 인식되어져 두 균주의 아닐린 분해에 대한 여러 가지 특성을 조사하였다.

#### *S. maltophilia* 균주들에 의한 아닐린 분해 특성

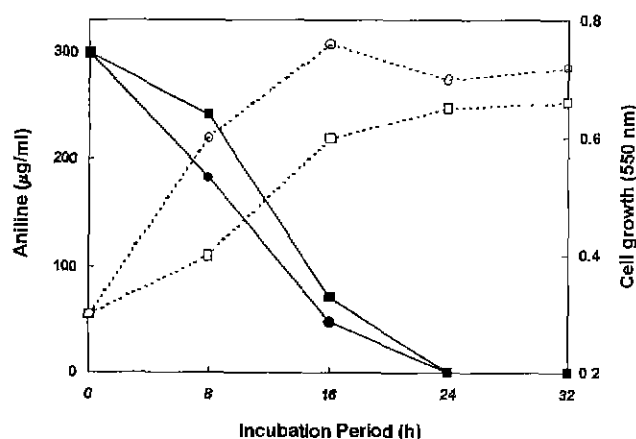
아닐린을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 *S. maltophilia* A-2와 51-4 균주를 아닐린이 포함되어 있는 mineral salt 배지에 배양하면서 8시간 간격으로 분해 양상을 조사하였다.

**Table 1. Degradation of aniline at different concentrations by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Delfia acidovorans* strains isolated from river water**

Strain <sup>1</sup>	Aniline concentration (µg/ml)	Reduction of aniline (%)
<i>S. maltophilia</i> A-2	250	100
	500	100
	1,000	96
	2,000	63
	4,000	33
	6,000	18
<i>S. maltophilia</i> 51-4	250	100
	500	100
	1,000	100
	2,000	82
	4,000	35
	6,000	15
<i>D. acidovorans</i> 51-A	250	100
	500	100
	1,000	100
	2,000	53
	4,000	30
	6,000	21
<i>D. acidovorans</i> 11-E	250	100
	500	100
	1,000	100
	2,000	69
	4,000	31
	6,000	16

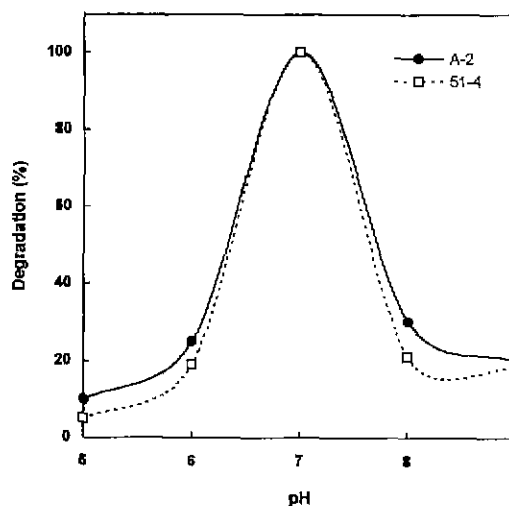
<sup>1</sup>The bacterial strains were inoculated at a level of about  $2.0 \times 10^8$  cells/ml into mineral salt media containing different concentrations of aniline as a sole carbon source and incubated at 30°C and 200 rpm for 7 days.

을 조사한 결과, 아닐린은 배양시간이 지남에 따라 급속하게 줄어들고 24시간이 되면서 완전히 분해되었다(Fig. 2). 균의 생육은 아닐린이 감소함에 따라 증가하였는데 전체적으로 51-4 균주가 A-2 균주보다는 조금 빠른 균의 성장과 아닐린의 감소를 보여주었으나, 두 균주의 아닐린 분해 양상은 매우 유사하였다. 아닐린 분해는 HPLC로 확인되었는데, 두 균주 모두 24시간 이내에 아닐린을 효과적으로 제거하였으며 대사 산물은 관찰되지 않았다. 다만, A-2 균주는 유일한 탄소원으로 아닐린이 포함된 액체배지에서 배양시간이 지남에 따라 밝은 노란색을 띠었으나, 51-4 균주의 배양시에는 색소의 생성을 관찰할 수 없었다. 그리고 아닐린이 포함되어 있지 않은 PTYG배지 또는 nutrient broth



**Fig. 1. Time course of cell growth and aniline degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* strains A-2 and 51-4.**

●, Strain 51-4 (residual aniline); ○, Strain 51-4 (cell growth); ■, Strain A-2 (residual aniline); □, Strain A-2 (cell growth).



**Fig. 2. Effect of pH on aniline degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* strains A-2 and 51-4 in mineral salt media containing 300 µg/ml of aniline as a sole carbon and energy source.**

배지에서는 두 균주 모두 배양액에서 색을 나타내지 않는 것으로 보아, *S. maltophilia* A-2 균주에 의한 노란색 색소는 아닐린 분해 대사과정에서 생성되는 중간물질로 생각되었다.

일반적으로 아닐린 분해는 dioxygenase reaction에 의해 catechol로 전환되고 그 다음 단계로는 catechol-1,2-dioxygenase에 의한 *ortho*-cleavage pathway[11,16]와 catechol-2,3-dioxygenase에 의한 *meta*-cleavage pathway[1,14]의 서로 다른 대사 경로를 가지고 있다. 특히, 아닐린 대사 과정 중에 노란 색소를 보이는 물질은 catechol-2,3-dioxygenase에 의해 생성되는 2-hydroxymuconic semialdehyde로 알려져 있다. 그러므로 *S. maltophilia* A-2 균주는 *meta*-cleavage pathway에 의해 아닐린이 분해되는 반면, 51-4 균주는 catechol-1,2-dioxygenase에 의해 *ortho*-cleavage pathway로 아닐린이 분해되는 것으로 사료된다.

한편, 두 개의 *S. maltophilia* 균주들의 아닐린 분해에 대한 pH의 영향을 조사한 결과, pH 5.0과 9.0 사이에서는 모두 아닐린의 분해가 일어났으나, pH 5.0과 9.0에서는 매우 느린 속도로 분해가 진행되었다(Fig. 2). 아닐린의 분해가 양호한 범위는 pH 6.0-8.0 사이인 것으로 나타났고 pH 7.0에서 분해 효율이 가장 양호하였다.

또한, 두 개의 *S. maltophilia* 균주의 아닐린 분해 및 세균의 생육에 대한 온도의 영향을 조사한 결과, 두 균주 모두 전반적으로 20°C와 35°C 사이에서 아닐린의 분해 및 균주의 생육이 진행되었고, 35°C에서 최대의 성장과 분해가 일어났다(Fig. 3). 그러나, 15°C와 40°C에서는 균이 거의 성장하지 못하였으며, 그에 따른 아닐린의 분해도 거의 일어나지 않았다.

***S. maltophilia* 51-4 균주에 의한 물시료에서 아닐린의 분해**

*S. maltophilia* 51-4 균주에 의한 폐수 정화조, 지하수 및 하천의 물시료에서의 아닐린 분해능을 조사한 결과, 전반적으로 물시료의 살균여부와 상관없이 *S. maltophilia* 51-4 균주를 접종한 시료의 아닐린 분해가 접종하지 않은 시료에서 보다 훨씬 빨리 진행되었다(Fig. 4). 폐수 정화조 물시료를 제외하고 균주를 접종한 모든 시험구에서는 60시간 이내에 아닐린이 거의 분해되었다. 폐수정화조 시료에서는 분해균주를 접종한 시료들 사이에서도 물 시료의 살균여부가 아닐린의 분해에 상당한 차이를 보여 주었다. 즉, 살균하지 않은 시료보다 살균한 물시료에서 훨씬 빠른 아닐린의 분해가 진행되었는데 이것은 원래 물시료에 있던 다른 미생물들이 *S. maltophilia* 51-4 균주의 생육에 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다. 본 실험의 결과는 *S. maltophilia* 51-4 균주가 다양한 물 시료에서도 아닐린을 효과적으로 제거할 수 있다는 것을 보여준다.

이상의 연구 내용을 종합하면, 강물 시료로 부터 분리한

네 개의 아닐린 분해균주들은 *S. maltophilia*와 *D. acidovorans*로 동정되었다. 그 중에서도 지금까지 전혀 보고되지 않았

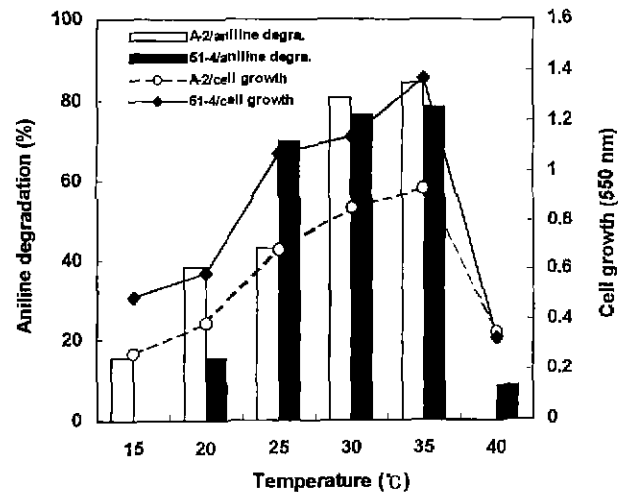


Fig. 3. Effect of temperature on aniline degradation and cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* strains A-2 and 51-4 in mineral salt media containing 300 µg/ml of aniline as a sole carbon and energy source.

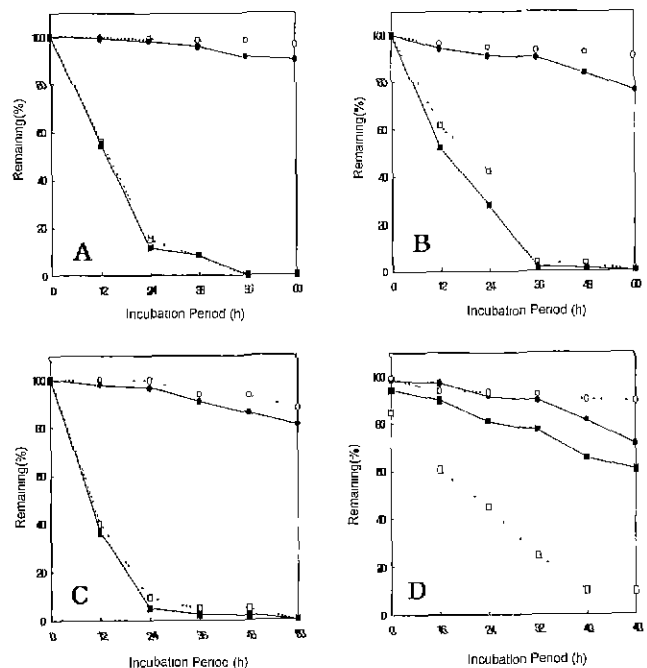


Fig. 4. Aniline degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* strain 51-4 in four water samples incorporated with 300 µg/ml of aniline.

(A) Aniline in underground water sample 1; (B) Aniline in underground water sample 2; (C) Aniline in river water sample; (D) Aniline in waste water sample. Symbols, □, with both autoclave and inoculation; ■, without autoclave but with inoculation; ○, with autoclave but without inoculation; ●, without either autoclave or inoculation.

던 *S. maltophilia* A-2와 51-4 균주를 선발하여 여러 가지 특성을 조사한 결과, 이들은 매우 높은 농도에서도 아닐린의 분해가 가능하였으며 또한, 실제 환경에서 채취한 지하수, 하천수 및 폐수정화조의 물시료에서도 효과적으로 아닐린을 제거하였다. 환경내에는 다양한 오염원들이 복잡한 형태로 존재하고 있으므로 앞으로는 메틸아닐린과 클로로아닐린 등의 아닐린 유도체들을 포함하여 다른 주요 환경오염물질에 대한 분해 여부도 조사할 예정이다. 또한, *in-situ* 조건에서 처리된 미생물들이 pH 또는 온도의 변화에 적응하지 못하거나 중간대사산물에 의해 접종된 미생물이 생육에 저해를 받기도 하므로 large-scale bioremediation에서도 적용 가능한 적당한 환경적 조건을 유지할 수 있는 기본적인 연구가 더욱 진행되어야 하겠다.

## 요 약

아닐린을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 증식이 가능한 네 개의 균주를 강에서 채집한 물시료들로부터 분리하였다. 이들의 생리 및 생화학적 특성과 16S rRNA gene sequence를 통해 동정한 결과, 두 개의 균주는 *D. acidovorans*로 그리고, 나머지 두 개의 균주는 *S. maltophilia*로 동정되었다. 분리한 네 개의 균주는 모두 6,000 µg/ml까지 처리된 mineral salt 배지에서 아닐린을 완전히 분해하며 생육이 가능하였다. *S. maltophilia*에 의한 유일 탄소원으로서의 아닐린의 이용은 아직 보고된 바가 없기 때문에 *S. maltophilia* A-2와 51-4 두 균주에 의한 아닐린 분해 특성을 조사하게 되었다. 유일한 탄소원으로 아닐린을 300 µg/ml 수준으로 첨가한 mineral salt 배지에서 두 균주 모두 아닐린을 24시간 이내에 완전히 분해하였다. 또한, 아닐린 분해 및 균 생육에 대한 최적의 pH 및 온도는 각각 7.0과 35°C였고, 하천, 지하수 및 폐수정화조에서 채취한 물 시료에서도 *S. maltophilia* 51-4 균주는 아닐린을 효과적으로 제거하였다. *S. maltophilia* 균주들에 의한 아닐린의 분해는 처음으로 보고하는 바이다.

## REFERENCES

1. Aoki, K., Y. Nakanishi, S. Murakami, and R. Shinke. 1990. Microbial metabolism of aniline through a *meta*-cleavage pathway: isolation of strains and production of catechol-2,3-dioxygenase. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 205-206.
2. Appel, M., T. Raabe, and F. Lingens. 1984. Degradation of o-toluidine by *Rhodococcus rhodochrous*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 123-126.
3. Bachofer, R., F. Lingens, and W. Schafer. 1975. Conversion of aniline into pyrocatechol by a *Nocardia* sp.: incorporation of oxygen-18. *FEBS Lett.* **50**(2): 288-290.
4. Bartha, R. 1980. Pesticide residues in humus. *ASM News* **46**(7): 356-360.
5. Bollag, J. M. and S. Russel. 1976. Aerobic versus anaerobic metabolism of halogenated anilines by a *Paracoccus* sp. *Microbiol. Ecol.* **3**: 65-73.
6. Debette, J. and R. Blondeau. 1980. Presence de *Pseudomonas maltophilia* dans la rhizosphere de quelques plantes cultivees. *Can. J. Microbiol.* **26**: 460-463.
7. Fuchs, K., A. Schreiner, and F. Lingens. 1991. Degradation of 2-methylaniline and chlorinated isomers of 2-methylaniline by *Rhodococcus rhodochrous* strain CTM. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2033-2039.
8. Hugh, R. and G. L. Gilardi. 1980. *Pseudomonas*, pp. 289-317. In E. H. Lenette, E. H. Spaulding, and J. P. Truant (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
9. Janke, D., B. P. Baskunov, M. Y. Nevedova, A. M. Ztakun, and L. A. Golovleva. 1984. Incorporation of <sup>18</sup>O<sub>2</sub> during cometabolic degradation of 3-chloroaniline by *Rhodococcus* sp. An 117. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 253-259.
10. John, G. H., N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
11. Kaminski, U., D. Janke, H. Prauser, and W. Fritsche. 1983. Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An 117 and a pseudomonad: a comparative study. *Z. Allg. Mikrobiol.* **23**: 235-246.
12. Kaufman, D. D., J. R. Plimmer, J. Iwan, and U. I. Klingebiel. 1972. 3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzene from 3,4-dichloroaniline in microbial culture. *J. Agric. Food Chem.* **20**: 916-919.
13. Kaufman, D. D., J. R. Plimmer, and U. I. Klingebiel. 1973. Microbial oxidation of 4-chloroaniline. *J. Agric. Food Chem.* **21**: 127-132.
14. Konopka, A. 1993. Isolation and characterization of a subsurface bacterium that degrades aniline and methylanilines. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 93-100.
15. Latorre, J., W. Reineke, and H. -J. Knackmuss. 1984. Microbial metabolism of chloroanilines: enhanced evolution by natural genetic exchange. *Arch. Microbiol.* **140**: 159-165.
16. Loidl, M., C. Hinteregger, G. Ditzelmuller, A. Ferschl, and F. Streichsbier. 1990. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains. *Arch. Microbiol.* **155**: 56-61.
17. Lyons, C. D., S. Katz, and R. Barth. 1984. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 491-496.
18. Mason, T. J., W. P. Walsh, K. Lee, and W. Vogler. 1992. New opportunities for screening and early detection of bladder cancer. *J. Cell Biochem.* **161**: 13-22.
19. Miller, G. C., R. Zisook, and R. Zepp. 1980. Photolysis of 3,4-dichloroaniline in natural waters. *J. Agric. Food Chem.* **28**: 1053-1056.
20. Milnard, R. D, S. Russel, and J. -M. Bollag. 1977. Chemical transformation of 4-chloroaniline to a triazole in a bacterial

- culture medium. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 841–844.
21. Oulmi, Y. and T. Braunbeck. 1996. Toxicity of 4-chloroaniline in early life-stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **30**(3): 390–402.
  22. Peres, C. M., H. Naveau, and S. N. Agathos. 1998. Biodegradation of nitrobenzene by its simultaneous reduction into aniline and mineralization of the aniline formed. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 343–349.
  23. Plimmer, J. R., P. C. Kearney, H. Chisaka, J. B. Yount, and U. K. Klingebiel. 1970. 1,3-Bis-(3,4-dichlorophenyl)-triazene from propanil in soils. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 859–861.
  24. Raabe, T., M. Appel, and F. Lingens. 1984. Degradation of p-toluidine by *Pseudomonas testosteroni*. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 61–64.
  25. Rever, H., V. Helm, and N. G. K. Karanth. 1979. Comparative studies on the metabolism of aniline and chloroaniline by *Pseudomonas multivorans* strain An 1. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 181–189.
  26. Rosen, J. D., M. Siewierski, and G. Winnett. 1970. FMN-sensitized photolysis of chloroanilines. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 494–496.
  27. Russel, S. and J. M. Bollag. 1977. Formylation and acetylation of 4-chloroaniline by a *Streptomyces* sp. *Acta Microbiol. Pol.* **26**: 59–64.
  28. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY, USA.
  29. Swaminathan, S., S. M. Frederickson, J. F. Hatcher, C. A. Reznikoff, M. A. Butler, K. L. Cheever, and R. E. Savage. 1996. Neoplastic transformation and DNA-binding of 2-chloroaniline in SV40-immortalized human uroepithelial cell lines. *Carcinogenesis* **17**(4): 857–864.
  30. Tweedy, B. G., C. Loeppky, and J. A. Ross. 1970. Metabromuron: acetylation of aniline moiety as a detoxification mechanism. *Science* **168**: 482–483.
  31. Voleskow, H. 1987. Germentationsverfahren zum Abbau von Toluidin und Chlorotoluidin. *BTF-Biotech-Forum* **4**: 24–28.
  32. Wen, A., M. Fegan, C. Hayward, S. Chakraborty, and L. I. Sly. 1999. Phylogenetic relationship among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 567–576.
  33. Witte, L., H. Jacobi, and U. Juhl Strauss. 1996. Suitability of different cytotoxicity assay for screening combination effect of environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicol. Lett.* **87**(1): 39–45.
  34. Zepp, R. G., G. L. Baughman, and P. F. Schlotzhauer. 1981. Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water. I. Sunlight induced reaction of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere* **10**: 109–117.
  35. Zeyer, J. and P. C. Kearney. 1982. Microbial degradation of para-chloroaniline as a sole carbon and nitrogen source. *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**: 215–223.
  36. Zeyer, J., A. Wasserfallen, and K. N. Timmis. 1985. Microbial mineralization of ring-substituted aniline through an ortho-cleavage pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 447–453.

(Received June 7, 2000)