

## 갯벌에서 분리한 3,4-Dichloroaniline 분해 미생물의 특성

김 영 목

부경대학교 식품생명공학부

Isolation and Characterization of 3,4-Dichloroaniline Degrading Bacteria from a Sandbank. Young-Mog Kim. *Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

**Abstract** The compound 3,4-dichloroaniline (DCA) is an aromatic amine used as an intermediate product in the synthesis of herbicides, azo-dyes and pharmaceuticals. It is also a degradation product of some herbicides (diuron, propanil, and linuron) and of trichlorocarbanilide, a chemical used as active agent in the cosmetic industry. 3,4-DCA, however, is considered potential pollutants due to their toxic and recalcitrant properties to humans and other species. A bacterium capable of growth on 3,4-DCA was isolated by dilution method from 3,4-DCA-containing enrichment culture. Finally, a strain, YM-14, capable of degrading efficiently 3,4-DCA was isolated from a sandbank. The isolated strain, YM-14 was identified to be *Arthrobacter* sp.. Fifty ppm 3,4-DCA in 1/10 LB media was completely degraded by the growth of *Arthrobacter* sp. YM-14 for 12 h at 30°C. The isolated strain is capable of growth on 3,4-DCA as sole carbon source and also able to degrade other chloroaniline compounds. Also, the isolated strain showed high level of catechol 1,2-dioxygenase activity by 3,4-DCA exposure. The catechol 1,2-dioxygenase was supposed to be ones of the important factors for 3,4-DCA degradation.

**Key words :** *Arthrobacter* sp., bioremediation, 3,4-dichloroaniline, sandbank

### 서 론

염화아닐린계(chloroanilines) 화합물들은 오랜 기간 동안 페인트, 농약, 플라스틱, 제약회사 등의 중요한 intermediates로 사용되어 왔으며 [5], 주로 phenyl-urea계, dicarboximide계 그리고 phenylcarbamate계 제초제와 같은 chloroaniline-based pesticides의 미생물 분해 산물로서 환경 중에 방출 추적되고 있다 [9]. 이들의 미생물 분해에 대한 저항성 및 독성 정도는 aromatic ring에 결합된 염소원자의 위치와 갯수에 의해 크게 좌우되어진다 [5,9]. 또한 chloroaniline계 화합물은 생물체에 독성을 나타내거나 발암성이 있는 것으로 알려져 있기 때문에 이들의 환경 중 동태와 부식물질과의 화학적 반응 특성을 파악하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. 토양 환경 중에서의

이들 화합물의 동태는 단지 부분적으로 연구되어져 있으며 토양에서 다양한 작용에 의해 제거되는 것으로 예측되어지고 있다. 특히 diuron, linuron, neburon, propanil과 같은 phenylurea계 농약으로부터 방출되는 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA)은 각각 이들 농약들의 잔류 marker로서 사용되고 있다. 이 화합물 또한 분자 내에 염소원자를 가지고 있기 때문에 미생물의 분해에 대한 저항성을 가지며, 토양 부식물질과의 화학적인 결합으로 토양 내에 장시간 잔류하므로 심각한 환경 오염물질로 문제시 되고 있다 [19].

한편, 유기독성 물질로 오염된 지역의 환경친화적인 복원 방법으로 미생물 또는 산화제 등을 이용하여 유기독성물질을 분해하여 최종적으로 물과 CO<sub>2</sub>로 광물화시키는 분해적 방법 (degradative process)과 산화환원효소 및 catalytic agents를 이용하여 유기독

\* Corresponding author

Phone: +82-51-620-6415, Fax: +82-51-622-9248

E-mail: ymkim@pknu.ac.kr

성물질을 oxidative coupling을 통해 polymer를 형성 시키거나 humic 물질에 binding시켜 거의 영구히 고정화시켜 무독화 시키는 비분해적 방법(non-degradative process)이 제시되고 있다. 이중 미생물 또는 미생물이 생산하는 효소를 이용한 생물학적 분해 방법(bioremediation)이 보다 환경친화적인 방법으로 여겨지고 있다 [3,10,11,14].

본 연구는 유기독성 물질로 환경 중에 잔류하여 토양 및 수질 오염을 유발하는 3,4-DCA를 효과적으로 분해 할 수 있는 미생물을 이용한 친환경적인 분해방법을 이용하여 3,4-DCA 및 염화아닐린계 화합물에 오염된 환경의 가능성 있는 환경복원 기술을 제시하기 위하여 실시하였다. 이를 위하여 먼저, 3,4-DCA에 대한 내성이 높고 3,4-DCA 분해력(degradation)이 높은 미생물의 선발 분리를 시도하였고, 그 후 분리된 균을 사용하여 3,4-DCA 및 각종 염화아닐린계 화합물들의 분해 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 재료

본 연구에서는 3,4-DCA 제거능이 우수한 균주를 여천석유공단 인근의 갯벌에서 분리하여 사용하였고, 대조균으로는 본 연구실에 보유하고 있는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [6]와 *Bacillus subtilis* RM125 [21]를 사용하였다. 본 연구에 사용된 chloroaniline 화합물은 Sigma사(미국)에서 구입하여 사용하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 stock solution을 조제하여 -20°C에서 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 균의 분리 및 배양

균의 집식배양은  $\ell$ 당 2.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5 g  $\text{NaCl}$ , 0.1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 ml 미량원소용액[조성,  $\ell$ 당 20 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 30 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 3 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$  및 20 mg  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ]을 함유한 최소배지를 Sutherland 등 [18]의 방법을 참고하여 500 ppm의 3,4-DCA를 첨가하여 실시하였다. 500 ml 삼각플라스크에 이 배지 100 ml 당 시료 2 g(또는 2 ml)을 가하여 30°C에서 200 rpm으로 1 주일간 배양한 후, 이 배양액 1 ml를 동일한 배지에 접종하여

같은 조건으로 1 주일간 더 배양하였다. 이 배양액을 0.85% NaCl 용액에 희석한 후 200 ppm의 3,4-DCA를 첨가한 최소 한천배지(상기 최소배지에 1.5% 한천을 가한 배지)에 도말하여 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 균들의 3,4-DCA 제거 능력 판별을 위해서 3,4-DCA가 최종적으로 50 ppm이 첨가된 1/10 LB 배지 [13]에서 진탕 배양하였다.

분리균의 3,4-DCA에 대한 내성은 0, 50, 100 및 200 ppm의 3,4-DCA이 함유된 1/10 LB 배지에 분리균을 접종하고 진탕 배양하면서 균의 증식도를 흡광도의 변화로 조사하였고 균 생육에 미치는 pH의 영향도 흡광도의 변화로 조사하였다.

### 분리균의 동정

분리균은 형태학적 및 생화학적 분류와 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. Chromosomal DNA의 추출은 Berns 과 Thomas [2]가 기술한 일반적인 방법에 따라 행하였다. DNA의 분리 및 조작에 사용한 시약 및 PCR kit들은 주로 Takara 사(일본)의 것을 사용하였다. PCR 반응에 사용된 DNA oligonucleotide는 Bioneer 사(한국)에 의뢰하여 합성하였다. PCR 반응에 사용한 정방향(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') 및 역방향(5'-GCCAGCAGCCGCGTA-3') primer는 Dunbar 등 [4]의 문헌에 따라 제작하였다. PCR 반응은 다음의 조건으로 행하였다. 0.5  $\mu\text{l}$  (2.5 U) Taq polymerase, 5  $\mu\text{l}$  Taq polymerase buffer (X10), 1  $\mu\text{l}$  의 10 mM dNTP, 39  $\mu\text{l}$  dH $_2$ O에 20 pmol의 각 primer 2  $\mu\text{l}$  와, 25 ng의 주형 DNA를 첨가하여 잘 혼합한 후 반응액을 94°C에서 2 분간 변성시켰다. 이를 52°C에서 2 분간 annealing 한 후 72°C에서 2분간 polymerization 시키고 PCR 산물의 염기서열의 결정은 솔젠트(한국)사에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열의 상동성 검색은 Ribosomal database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 통하여 실시하였다.

### 3,4-DCA 정량 분석법

분리균을 배양한 후 배양액에 잔존하는 3,4-DCA를 분석하기 위하여 배양액에 동량의 hexane을 가하여 vortex mixer로 3 분간 진탕하고 초음파 세척기(Branson Ultrasonics Corporation, Branson 8210; 미국)에서 1 분간 초음파 처리하여 기포를 제거한 후 hex-

ane층 1 ml를 분취하여 진공농축 원심분리기(주, 한일)에서 건조한 후 acetonitrile에 재용해하여 HPLC(주, 영린)로 분석하였다. 분석용 칼럼은  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>(3.9 × 150 mm; Waters 사)을 사용하였으며 이동상은 acetonitrile : water(60 : 40, v/v)로 하여 분당 1 ml의 이동 속도로 분석하였다. 이때 3,4-DCA는 UV 검출기(주, 영린)로 245 nm에서 검출하였다.

### 염화아닐린계 화합물(chloroanilines) 이용성 조사

분리균에 의한 다양한 염화아닐린계 화합물의 이용성을 조사하기 위하여 50 ppm의 염화아닐린계 화합물(2, 3, 4-chloroaniline 및 2, 4-, 2, 5-, 3, 4-, 3, 5-dichloroaniline)이 첨가된 1/10 LB 배지에 LB배지에서 배양된 종배양액을 1%가 되도록 접종하고, 30°C에서 200 rpm으로 12 시간 배양한 다음 3,4-DCA 정량 분석법에서와 같이 시료를 처리하고 분석하여 잔존하는 염화아닐린계 화합물을 HPLC로 분석하였다.

### Catechol 1,2-dioxygenase 활성 측정

Catechol 1,2-dioxygenase 활성은 Aoki 등 [1]의 방법에 따라 측정하였다. 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 1.5 ml과 증류수 1.3 ml과 10 mM의 기질 100  $\mu$ l를 차례로 혼합한 시료에 무세포 추출액 100  $\mu$ l를 첨가하여 *cis, cis*-muconic acid의 생성량을 260 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 실온에서 무세포 추출액을 첨가하기 않은 대조군과의 차이로부터 환산하였다. 무세포 추출액은 1/10 LB 배지에 12 시간 배양한 균체를 원심집균하고 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 세척하여 동일 buffer에 재현탁한 다음 초음파 세포 파쇄기(Ultrasonics Ltd.; 영국)로 6 분간 파쇄한 후 12,000 x g에서 원심분리하여 얻은 무세포 추출액을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 3,4-DCA 분해균의 분리 및 동정

전국 각지의 하수오니, 토양, 갯벌 등에서 채집된 100 여개의 각종 시료를 3,4-DCA가 함유된 최소배지에서 2주간 2 차례의 계대를 거치며 집식배양하였고, 최종적으로 200 ppm의 3,4-DCA를 함유한 고

체 평판배지에서 증식이 가능한 38종의 단일균을 1차 선발하였다. 1차 선발된 균주들은 그 후 50 ppm 3,4-DCA를 가한 1/10 LB배지에서 배양한 후 잔존하는 3,4-DCA의 양을 측정하여 HPLC로 분석하여 3,4-DCA 분해력을 조사하였다(Table 1). 조사 결과, 38개의 분리균 중 YM-14 균주가 가장 우수한 3,4-DCA 분해 능력을 가지고 있는 것으로 조사되었으며, 또한, 단일 탄소원으로 3,4-DCA를 이용하여 생육이 가능한 것으로 나타났다. 이후, 분리균 YM-14를 가지고 연구를 진행하였다.

분리균 YM-14는 전라남도 여수시에 소재하고 있는 여천석유화학공단 인근의 갯벌에서 채취한 시료에서 분리된 균주로 그람 염색에서 그람 양성균으로 조사되었다. 또한, PCR을 이용한 16S rDNA 염기서열 분석과 염기서열의 상동성 분석 결과, 분리균 YM-14는 *Arthrobacter* sp. FR3의 16S rDNA(accession no. AM113709)와 99%, *Arthrobacter* sp. AD25(accession no. AY628691)등의 *Arthrobacter* 속 에 속하는 균주들과 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 이 결과로부터 분리 선발된 YM-14 균주는 *Arthrobacter* sp.에 속하는 것으로 판단되었다.

**Table 1.** 3,4-dichloroaniline (DCA) remaining ratio in minimal medium by strains isolated from the enrichment culture

Strain No.	Remaining ratio (%)	Strain No.	Remaining ratio (%)
52	88.2	BK10-1	99.8
61	91.3	11	101.9
4B1	78.2	12	80.9
5L2	96.4	14	89.0
44	101.5	16	93.7
34	67.4	17	99.0
4	76.20	18	94.8
3-1	81.30	9	69.3
6	89.2	4J2	88.2
5L1	54.1	5J1	64.8
5	78.2	BK6-1	98.7
10-1	77.6	BK6-2	97.4
4H1	85.0	BK8-1	84.2
4L1	96.1	BK9-1	94.3
5D1	44.1	1	67.1
5D2	64.8	4G1	90.2
KB37	68.5	5A1	103.4
YM-14	ND	4K1	97.2
YM-15	82.6	L662	55.1

Cells were grown in 1/10 LB containing 50 ppm 3,4-DCA. 3,4-DCA was determined by HPLC analysis.

```

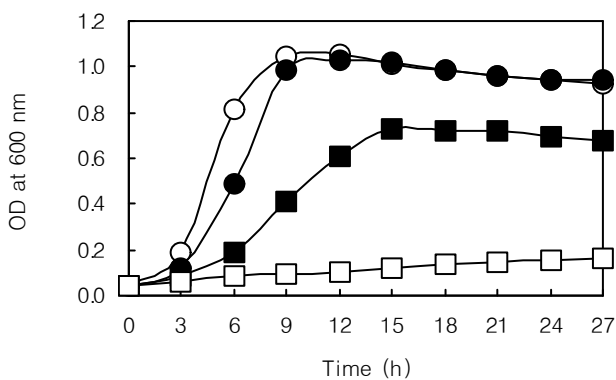
1 GTAGCTAACG CATTAAGTGC CCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTAA AACTCAAAGG 60
61 AATTGACGGG GGCCCCGACA AGCGGCGGAG CATGCGGATT AATTCGATGC AACCGGAAGA 120
121 ACCTTACCAA GGCTTGACAT GGACCGGAAA GACCTGGAAA CAGGTGCCCC GCTTGCGGCC 180
181 GGTTCACAGG TGGTGCATGG TGTCGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG 240
241 CAACGAGCGC AACCCTCGTT CTATGTTGCA AGCGGTTTCGG CCGGGGACTC ATAGGAGACT 300
301 GCCGGGGTCA ACTCGGAGGA AGGTGGGGAC GACGTCAAAT CATCATGCCC CTTATGTCTT 360
361 GGGCTTCACG CATGCTACAA TGGCCGGTAC AAAGGGTTGC GATACTGTGA GGTGGAGCTA 420
421 ATCCCAAAAA GCCGGTCTCA GTTCGGATTG GGGTCTGCAA CTCGACCCCA TGAAGTAGGA 480
481 GTCGCTAGTA ATCGCAGATC AGCAACGTTG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA 540
541 CCGCCCGTCA AGTCACGAAA GTTGTAACA CCCGAAGCCG GTGGTCTTAA CCCTTGTGGG 600
601 GAGGGACGCC GTACGCAAGG TGGGGACCG 629
    
```

Reference (accession no.)	Identity (%)
<i>Arthrobacter</i> sp. FR3 (AM113709)	99
<i>Arthrobacter</i> sp. AD25 (AY628691)	99
<i>Arthrobacter</i> sp. AD12 (AY628690)	99
<i>Arthrobacter</i> sp. AD3 (AY628689)	99

**Fig. 1.** 16S rDNA partial sequence (629 bp) and identification of isolated strain YM-14 by homology search based on 16S rDNA. The PCR was performed as described under Materials and Methods. The sequence data was analyzed via ribosomal database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST).

### *Arthrobacter* sp. YM-14의 3,4-DCA에 대한 내성

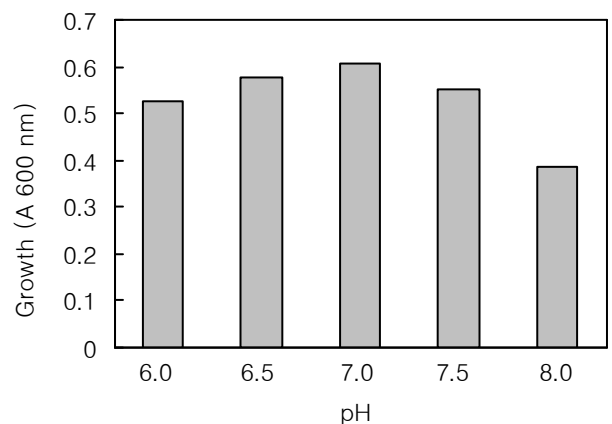
3,4-DCA를 포함한 1/10 LB배지에서 분리 균주 YM-14의 생육을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 3,4-DCA 무첨가구와 3,4-DCA 첨가구의 결과를 비교해 볼 때 YM-14 균주는 3,4-DCA의 농도 증가에 따른 생육저해가 관찰되었으며, 200 ppm 이상의 농도에서는 생육이 불가능한 것으로 나타났다. 50 ppm 3,4-DCA를 첨가한 경우에는 무첨가구에 비해 생육은 조금 느려졌지만 3,4-DCA에 대한 심각한 생육저해 양상은 나타나지 않았다. 이 후 50 ppm의 3,4-DCA 존재 하에서 분리균에 의한 제거 효과를 조사하였다.



**Fig. 2.** Growth rate of *Arthrobacter* sp. YM-14 in 1/10 LB media containing 3,4-dichloroaniline. ○-○, control; ●-●, 50 ppm; ■-■, 100 ppm; □-□, 200 ppm.

### 3,4-DCA 존재 하에서 균 생육에 미치는 pH의 영향

3,4-DCA 존재시의 *Arthrobacter* sp. YM-14의 생육도를 측정된 결과에서 활발한 생육정도를 보이는 3,4-DCA 농도 50 ppm을 기준으로 배지의 pH를 다양화하여 분리균 YM-14의 생육도를 조사하였다. 1/10 LB 배지를 pH 5.0에서 pH 9.0 까지 1.0 단위로 pH를 조정하여 생육도의 변화를 흡광도로 측정하였다 (Fig. 3). 균 생육도는 pH 6.0~7.5의 구간에서 양호한 증식을 나타내었으며 pH 7.0의 조건에서 가장 높은 균 생육도를 나타내었다.



**Fig. 3.** Effect of pH on the growth of *Arthrobacter* sp. YM-14 in the presence of 50 ppm 3,4-dichloroaniline. Cell growth was determined by measuring optical density at 600 nm after 12 h incubation at 30°C.

**분리균 *Arthrobacter* sp. YM-14에 의한 3,4-DCA의 제거**

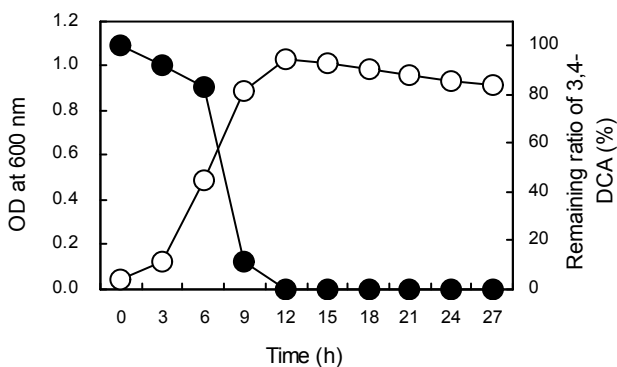
분리균을 LB 배지에서 12시간 종배양하였다. 이 종배양액 0.1 ml를 50 ppm의 3,4-DCA를 함유된 1/10 LB 배지 10 ml에 접종하여 배양시간별로 균생육도와 3,4-DCA 제거율을 HPLC로 측정하였다. 그 결과 *Arthrobacter* sp. YM-14는 균 생육도가 증가함에 따라 급격한 3,4-DCA 제거효과를 나타내었으며 배양 12시간 안에 50 ppm의 3,4-DCA를 완전히 분해하였다 (Fig. 4). 하지만, 대조군으로 사용한 *E. coli* DH5α과 *B. subtilis* SM2의 경우에는 3,4-dichloroaniline 제거효과를 전혀 나타내지 않았다 (결과 미제시).

**염화아날린계 화합물 이용성 조사**

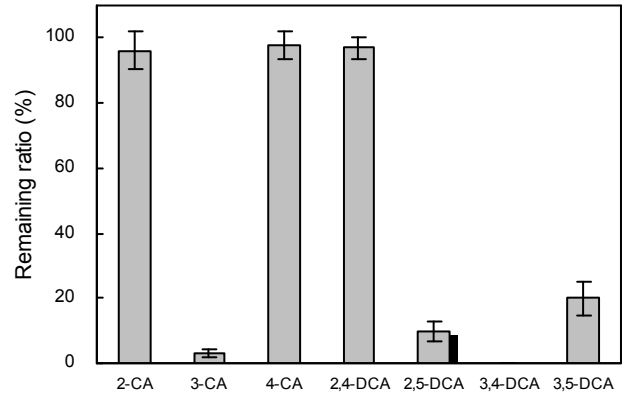
1/10 LB 배지에 2, 3, 4-chloroaniline(CA)과 2,4-, 2,5-, 3,4-, 및 3,5-DCA를 각각 50 ppm 첨가된 1/10 LB 배지에 YM-14 균주를 배양한 다음 시료를 취하여 잔존하는 CA 및 DCA 화합물을 앞에서 기술한 대로 추출하고 HPLC로 분석하였다. 그 결과 분리균은 3-CA, 2,5-DCA 및 3,5-DCA의 분해 활성을 나타내었으나 2-CA, 4-CA와 2,4-DCA의 경우는 거의 분해할 수 없는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

**분리균의 catechol 1,2-dioxygenase 활성**

미생물에 의한 방향족 화합물 또는 유기염소계 방향족화합물의 분해 과정 중에 catechol로의 전환이 세포내 대사과정 중의 중요한 기작의 하나로 알

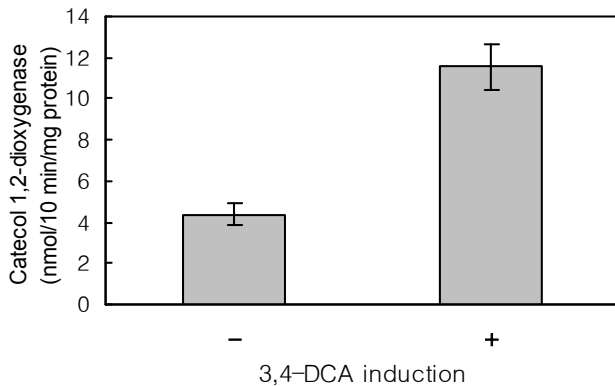


**Fig. 4.** Biodegradation of 3,4-dichloroaniline (DCA) by the growth of *Arthrobacter* sp. YM-14. Cells were grown in 1/10 LB containing 50 ppm 3,4-DCA. 3,4-DCA was determined by HPLC analysis. ○-○, cell growth; ●-●, remaining ratio of 3,4-DCA.



**Fig. 5.** Degredation of chloroanilines by *Arthrobacter* sp. YM-14. Cells were grown in 1/10 LB containing 50 ppm chloroanilines for 3 days at 30°C. Chloroanilines were determined by HPLC analysis. 2-CA, 2-chloroaniline; 3-CA, 3-chloroaniline; 4-CA, 4-chloroaniline; 2,4-DCA, 2,4-dichloroaniline; 2,5-DCA, 2,5-dichloroaniline; 3,4-DCA, 3,4-dichloroaniline; 3,5-DCA, 3,5-dichloroaniline. Data are the averages of triplicate experiments.

려져 있으며 xylene, phenol, toluene 및 naphthalene과 같은 많은 유기화합물이 catechol로 전환된 후에 세포내의 여러 단계를 거쳐 대사 된다는 결과 [7,14, 15]와 염화아날린계 화합물이 catechol로 전환된다는 보고도 있다 [12,16,20]. 이렇게 전환 된 catechol은 그후 세포내에서 여러 단계의 효소작용에 의해 최종적으로 pyruvate나 acetaldehyde와 같은 Krebs 회로의 중간산물로 분해된다고 보고되고 있다 [11]. Catechol의 분해에 관여하는 첫 단계의 효소인 catechol 1,2-dioxygenase(ortho-cleavage)와 catechol 2,3-dioxygenase (meta-cleavage)에 대한 연구가 특히 많이 진행되어져 왔다 [7,8]. 이에 3,4-DCA를 효과적으로 분해하는 *Arthrobacter* sp. YM-14 균주의 분해반응의 기구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 catechol dioxygenase의 활성을 조사하였다. 3,4-DCA의 존재하에서 catechol 2,3-dioxygenase의 활성 변화는 관찰되지 않았다(결과미제시). 하지만 catechol 1,2-dioxygenase의 경우 3,4-DCA 무첨가구에서는 4.39 nmol/10 min/mg protein의 활성이 3,4-DCA 존재할 경우에는 11.54 nmol/10 min/mg protein로 그 활성이 약 2-3배 이상 증가하는 결과가 관찰 되었다 (Fig. 6). 이러한 결과는 catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 3,4-DCA에 의해 유도된다는 것을 나타내며, 또한 이 효소가 3,4-DCA 분해에 관여하는 중요한 효소군중의 하나라는 것을 의미한다. 현재, 3,4-DCA 분해반응의 기



**Fig. 6.** Catechol 1,2-dioxygenase activity of *Arthrobacter* sp. YM-14. Cells were grown in 1/10 LB for 12 h at 30°C in the absence (-) or presence (+) of 50 ppm 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). Catechol 1,2-dioxygenase activity was measured as described under Materials and Methods. Data are the averages of triplicate experiments.

구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 *Arthrobacter* sp. YM-14 균주로부터 catechol 1,2-dioxygenase 유전자 및 관련 유전자의 cloning을 시도하고 있다.

본 연구에서 보고한 바와 같이 높은 독성을 가지며 환경에서 잔류성이 긴 난분해성 화합물을 잘 분해할 수 있는 미생물을 선발하고 그 특성을 잘 이용한다면, 이러한 화합물이 축적되어 있는 생태계의 복원뿐만 아니라 궁극적으로 이 화학물질이 잔류한 환경에서 생산된 농·수산물에 대한 안전성의 보장에도 기여할 수 것으로 여겨진다.

## 요 약

3,4-dichloroaniline (DCA)를 함유한 최소배지에서 집식배양과 배양 후 HPLC에 의한 잔류분석을 통해 3,4-DCA의 분해 능력이 우수한 균주 *Arthrobacter* sp. YM-14를 여천석유화학공단 인근의 갯벌에서 분리하였다. 분리균 YM-14는 1/10 LB 배지에 함유된 50 ppm의 3,4-DCA를 12 시간 만에 완전히 제거하였다. 이외에도 분리균 YM-14는 3-chloroaniline(CA), 2,5-DCA 및 3,5-DCA의 분해 활성을 나타내었으나 2-CA, 4-CA와 2,4-DCA에 대한 분해활성을 가지고 있지는 않았다. 또한, 분리균 YM-14에서 3,4-DCA의 유도에 의한 catechol 1,2-dioxygenase 활성의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 catechol 1,2-dioxygenase이 3,4-DCA 분해에 관여하는 중요한 효소군중의 하

나로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2006학년도 부경대학교 기성회 학술연구비에 의하여 연구되었음(과제번호 PKS-2006-012).

## 참 고 문 헌

1. Aoki, K. Konohana, K., Shinke, R., and Nishira, H. 1984. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from aniline-assimilating *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2087-2095.
2. Berns, K. I. and Thomas, C. A. 1965. Isolation of the high molecular DNA from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* **11**, 476-490.
3. Choi, J. H., Kim, T. K., Kim, Y. M., Kim W. C., Joo, G. J., Lee, K. Y. and Rhee, I. K. 2005. Cloning and characterization of a short chain alcohol dehydrogenase gene for cyclohexanol oxidation in *Rhodococcus* sp. TK6. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 1186-1196.
4. Dunbar, J., Ticknor L. O. and Kuske, C. R. 2000. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2943-2950.
5. Gheewala, S. H. and Annachatre, A. P. 1997. Biodegradation of aniline. *Water Sci. Technol.* **36**, 53-63.
6. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
7. Harayama, S. and Rekik, M. 1990. The mata cleavage operon of TOL degradative plasmid pWVO comprised 13 gene. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 113-120.
8. Hofer, B., Backhaus, S. and Timmis, K. N. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB4000 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**, 9-16.
9. Kearny, P. C. and Kaufman, D. D. 1975. In: *Herbicides: Chemistry. Degradation and Mode of action*. Marcel Dekker, New York.
10. Kim, Y. M., Park, K., Joo, G. J., Jeong, E. M., Kim, J. E. and Rhee, I. K. 2004. Glutathione-dependent biotransformation of the fungicide chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4192-4196.
11. Lee, J. S., Kang, E. J., Kim, M. O., Lee, D. H., Bae, K. S. and Kim, C. K. 2001. Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 112-117.
12. Liu, Z., Yang, H., Huang, Z., Zhou, P. and Liu, S. J. 2002. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 679-682.
13. Motonaga, K., Tagagi, K. and Matumoto, S. 1996. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression

- of degradation. *Biol. Fertil. Soils*. **23**, 340-345.
14. Na, K., Kim, S., Kubo, M. and Chung, S. 2001. Cloning and phylogenetic analysis of two different *bphC* genes and *bphD* gene from PCB-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. strain SY5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 668-676.
  15. Park, D. W., Lee, J. H., Lee, D. H., Lee, K. and Kim, C. K. 2003. Sequence characteristics of xyl JQK genes responsible for catechol degradation in benzoate-catabolizing *Pseudomonas* sp. S-47. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 700-705.
  16. Radianingtyas, H., Robinson, G. K. and Bull, A. T. 2003. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology* **149**, 3279-3287.
  17. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
  18. Sutherland, T. D., Horne, I., Lacey, M. J., Harcourt, R. L., Russell, R. J. and Oakeshott, J. G. 2000. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2822-2828.
  19. Tixier, C., Sancelme, M., Ait Aissa, S., Bonnemoy, f., Cuet, a., Truffaut, n. and Veschambre, H. 2002. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* **46**, 519-526.
  20. Travkin, V. M., Solyanikova, I. P., Rietjens, I. M., Vervoort, J., Berkel, W. J. and Golovleva, L. A. 2003. Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. *J. Environ. Sci. Health* **38**, 121-132.
  21. Uozumi, T., Hoshino, T., Miwa, K., Horinouchi, S., Beppu, T. and Arima, K. 1977. Restriction and modification in *Bacillus* species. Genetic transformation of bacteria with DNA from different species. Part I. *Mol. Gen. Genet.* **152**, 525-538.