

연안 갯벌에서 분리한 Chloroaniline 화합물 분해 미생물의 특징

강민승 · 김영목*
부경대학교 식품공학과

Characterization of Chloroanilines-degrading Bacteria Isolated from Seaside Sediment

Min-Seung KANG and Young-Mog KIM*

Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Chloroanilines are aromatic amines used as intermediate products in the synthesis of herbicides, azo-dyes, and pharmaceuticals. 3,4-dichloroaniline (DCA) is the degradation product of some herbicides (diuron, propanil, and linuron) and of trichlorocarbanilide, a chemical used as an active agent in the cosmetic industry. The compound, however, is considered a potential pollutant due to its toxicity and recalcitrant property to humans and other species. With the increasing necessity for bioremediation, we sought to isolate bacteria that degraded 3,4-DCA. A bacterium capable of growth on 3,4-DCA as the sole carbon source was isolated from seaside sediment using a dilution method with a culture enriched in 3,4-DCA. The isolated strain, YM-7 was identified to be *Pseudomonas* sp. The isolated strain was also able to degrade other chloroaniline compounds. The isolated strain showed a high level of catechol 2,3-dioxygenase activity on exposure to 3,4-DCA, suggesting that this enzyme is an important factor in 3,4-DCA degradation. The activity toward 4-methylcatechol was 53.1% that of catechol, while the activity toward 3-methylcatechol, 4-chlorocatechol and 4,5-chlorocatechol was 18.1, 33.1, and 6.9%, respectively.

Key words: Bioremediation, Chloroanilines, 3,4-Dichloroaniline, Seaside sediment

서 론

염화 아닐린계 (chloroanilines) 화합물들은 오랜 기간 동안 페인트, 농약, 플라스틱, 제약회사 등의 중요한 intermediates로 사용되어 왔으며 (Gheewala and Annachhatre, 1997), 주로 phenylurea계, dicarboximide계 그리고 phenylcarbamate계 제초제와 같은 chloroaniline-based pesticides의 미생물 분해 산물로서 환경 중에 방출 추적되고 있다 (Kearny and Kaufman, 1975). 이들의 미생물 분해에 대한 저항성 및 독성 정도는 aromatic ring에 결합된 염소원자의 위치와 갯수에 의해 크게 좌우 되어 진다 (Kearny and Kaufman, 1975; Gheewala and Annachhatre, 1997). 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 (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 (Tixier et al., 2002).

한편, 유기독성 물질로 오염된 지역의 환경 친화적인 복원 방법으로 미생물 또는 산화제 등을 이용하여 유기독성물질을 분해하여 최종적으로 물과 CO₂로 광물화시키는 분해적 방법 (degradative process)과 산화환원효소 및 catalytic agents를 이용하여 유기독성물질을 oxidative coupling을 통해 polymer를 형성시키거나 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 (Lee et al., 2001; Na et al., 2001; Kim et al., 2004; Choi et al., 2005).

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 시도하였다. 미생물의 분리를 위해 다양한 화합물에 장기간 오염 또는 노출되어 왔던 대규모 화학단지인 울산시 소재 온산화학공단을 중심으로 시료를 채취하였고, 그 후 분리된 균을 사용하여 3,4-DCA 및 각종

*Corresponding author: ymkim@pknu.ac.kr

염화아닐린계 화합물들의 분해 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 재료

3,4-DCA 제거능이 우수한 균주를 온산화학공단 인근의 갯벌에서 분리하여 사용하였고, 대조균으로는 *Escherichia coli* DH5 α 와 *Bacillus subtilis* RM125를 사용하였다. Chloroaniline 화합물은 Sigma사(미국)에서 구입하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 사용하였다.

균의 분리 및 배양

3,4-DCA 분해 능력이 우수한 균을 선별하기 위하여 Kim et al. (2004)이 보고한 최소배지에 500 ppm의 3,4-DCA를 첨가하고 이 배지 100 mL 당 시료 2 g (또는 2 mL)을 가하여 30°C에서 200 rpm으로 1주일간 배양하였다. 이후, 이 배양액 1 mL를 동일한 배지에 접종하여 같은 조건으로 1주일간 더 배양하였다. 이 배양액을 200 ppm의 3,4-DCA를 첨가한 최소 한천배지(상기 최소배지에 1.5% 한천을 가한 배지)에 도말하여 단일 콜로니를 분리하였다.

분리균의 동정

분리균은 형태학적 및 생화학적 분류와 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. Chromosomal DNA의 추출은 Berns and Thomas (1965)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 primer는 Dunbar et al. (2000)의 문헌에 따라 제작하였고, PCR 반응은 다음의 조건으로 행하였다. 0.5 μ L (2.5 U) Taq polymerase, 5 μ L Taq polymerase buffer (X10), 1 μ L의 10 mM dNTP, 39 μ L dH₂O에 20 pmol의 각 primer 2 μ L와, 25 ng의 주형 DNA를 첨가하여 잘 혼합한 후 반응액을 94°C에서 2 분간 변성시켰다. 이를 52°C에서 2분간 annealing 한 후 72°C에서 2분간 polymerization 시키고 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 염기서열의 상동성 검색은 Basic Local Alignment search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시하였다.

3,4-DCA 분석

3,4-DCA를 첨가한 최소 한천배지에서 분리된 균들의 3,4-DCA 제거 능력 판별을 위해서 3,4-DCA가 최종적으로 50 ppm이 첨가된 1/10 LB 배지(Motonaga et al., 1996)에서 진탕 배양하였다. 배양한 후 배양액에 잔존하는 3,4-DCA를 분석하기 위하여 배양액에 동량의 hexane을 가하여 vortex mixer로 3분간 진탕하고 초음파 세척기(Branson Ultrasonics Corporation, Branson 8210; 미국)에서 1 분간 초음파 처리하여 기포를 제거한 후 hexane층 1 mL를 분취하여 진공농축 원심분리기(주, 한일)에서 건조한 후 acetonitrile에 재용해하여 HPLC(주, 영린)로 분석하였다. 분석용 칼럼은 μ Bondapak

C₁₈ (3.9 \times 150 mm; Waters사)를 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) 분해성 조사

분리균에 의한 다양한 염화아닐린계 화합물의 분해성을 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% 접종하고, 30°C에서 200 rpm으로 3일간 배양한 다음 배양액에 잔존하는 염화아닐린계 화합물을 HPLC로 분석하였다.

Catechol dioxygenase 활성 측정

Catechol 1,2-dioxygenase 활성은 Aoki et al. (1984)의 방법에 따라 측정하였고 catechol 2,3-dioxygenase 활성은 Nakanishi et al. (1991)의 방법에 따라 측정하였다. 효소의 활성은 실온에서 무세포 추출액을 첨가하기 않은 대조균과의 차이로부터 환산하였다. 무세포 추출액은 1/10 LB 배지에 12시간 배양한 균체를 원심집중하고 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하여 동일 buffer에 재현탁한 다음 초음파 세포파쇄기(Ultrasonics Ltd.; 영국)로 6분간 파쇄한 후 12,000 \times g에서 원심분리하여 얻은 무세포 추출액을 사용하였다.

결과 및 고찰

3,4-DCA 분해균의 분리 및 동정

울산 온산화학공단 인근의 갯벌에서 채집된 시료를 3,4-DCA가 함유된 최소배지에서 2주간 2차례의 계대를 거치며 집식배양 하였고, 최종적으로 200 ppm의 3,4-DCA를 함유한 고체 평판배지에서 증식이 가능한 균을 선별하였다. 이후, 고체 평판배지 분리된 단일균을 50 ppm 3,4-DCA를 함유한 1/10 LB배지에 접종하여 30°C에서 3일간 배양 후 배양액에 잔존하는 3,4-DCA의 양을 HPLC로 분석하여 3,4-DCA 분해력이 좋은 균주를 선별하였다.

선발된 분리균주 YM-7은 울산광역시 온산면에 소재하고 있는 온산화학공단 인근의 갯벌에서 채취한 시료에서 분리된 균주로 그람 염색에서 그람 음성의 간균으로 조사되었다. 또한, PCR을 이용한 16S rDNA 염기서열 분석과 염기서열의 상동성 분석 결과, 분리균 YM-7은 *Pseudomonas* sp. CYN01B (accession no. AB175661)의 16S rDNA와 95%, *Pseudomonas* sp. A07 (accession no. AM284989)등의 *Pseudomonas* 속에 속하는 균주들과 95%의 상동성을 나타내었다(Table 1). 이 결과로부터 분리 선발된 YM-7 균주는 *Pseudomonas* sp.에 속하는 것으로 판단되어 *Pseudomonas* sp. YM-7으로 명명하고 본 실험에 제공하였다.

분리균주의 3,4-DCA 분해능을 조사하기 위하여 YM-7의 종배양액을 50 ppm의 3,4-DCA를 함유한 1/10 LB 배지에 1% 되게 접종하였다. 한편, YM-7에 의한 3,4-DCA의 제거 또는

Table 1. 16S rDNA partial sequence (870 bp) and identification of the isolated strain YM-7 by homology search based on 16S rDNA

| | | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 1 | TCAGATTGAA | CGCTGGCGGC | AGGCCTAACA | CATGCTCCTC | GAGCGGATGA | GAGGAGCTTG | 60 |
| 61 | CTCCTCGATT | CAGCCTCGGA | CGGGTGAGTA | ATGCCTAGGA | ATCTGCCTAG | TAGTGGGGGA | 120 |
| 121 | CAACGTTTCT | CAAGGAACGC | TAATACCGCA | TACGTCCTAC | GGGAGAAAGT | GGGGGATCTT | 180 |
| 181 | CGGACCTCAC | GCTATTAGAT | GAGCCTAGGT | CGGATTAGCT | AGTTGGTAGG | GTAAAGGCCT | 240 |
| 241 | TTGTAGGCGA | CGATCCGTAA | CTGGTCTGAG | AGGATGATCA | GTCACACTGG | AACTGAGACA | 300 |
| 301 | CGGTCCCCAC | TCCTACGGGA | TTTAGCAGTG | GGGAATATTG | GACAATGGGC | GAAAGCCTGA | 360 |
| 361 | TCCAGCCATG | CCGCGTGTGT | GAAGAAGGCC | TTCGGGTCGT | AAAGCACTTT | TCGTTGGGAG | 420 |
| 421 | GAAGGGCTCA | TAGCGAATAC | CTGTGAGTTT | TGACGTTACC | AACAGAATAC | CCACCCACTA | 480 |
| 481 | ACTTCGTGCC | AGCAGCCGCG | GTAATACGAA | GGGTGCAAGC | GTTAATCCTT | CTTACTGGGC | 540 |
| 541 | GTAAGCGCG | CGTAGGTGGC | TTGATAAGTT | GGATGTGAAA | TCCCCGGACT | CTTGCTGGGA | 600 |
| 601 | ACTGCATCCA | AAACTGTCTG | GCTAGAGTGC | GGTAGAGGGT | AGTGGAATTT | CCAGTGTAGC | 660 |
| 661 | GGTGAAATGC | GTAGATATTG | GAAGGAACAC | CAGTGGCGAA | GGCGACTACC | TGGACTGACA | 720 |
| 721 | CTGATACTGA | GGTCCGAAAG | CGTGGGGAGC | CCACATGATC | AGATACCCTG | GTAGTCCACG | 780 |
| 781 | CCGTAAACGA | TGTCAACTAC | CCGTTGGGAT | CCTTGAGATC | TTAGTGGCGC | AGCTAACGCA | 840 |
| 841 | TTAAGTTGAC | CGCCTGATGA | GTACCGCCGC | 870 | | | |

| Reference (accession no.) | Identity (%) |
|--|--------------|
| <i>Pseudomonas</i> sp. CYN01B (AB175661) | 95 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A07 (AM284989) | 95 |
| <i>Pseudomonas oleovorans</i> (AY623816) | 95 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. C36 (AJ575816) | 94 |

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>).

분해가 균의 대사작용에 의한 분해인지 아니면 균체 또는 배양액과의 반응에 의한 제거효과 인지를 비교하기 위하여 *E. coli* 및 *B. subtilis*를 각각 그람 음성균과 양성균의 대조군으로 사용하여 3,4-DCA 제거 양상을 균주를 접종하지 않은 대조군과 비교하면서 3,4-DCA의 제거율을 시간별로 관찰하였다.

3,4-DCA를 함유한 선택배지에서 분리한 균주 YM-7은 12 시간만에 3,4-DCA를 100% 제거하였다 (Fig. 1). 하지만 대조군으로 사용한 *E. coli* 및 *B. subtilis*의 경우는 3,4-DCA의 제거능력이 거의 없는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1). 이 결과는 YM-7의 분해작용에 의해 3,4-DCA가 분해된다는 것을 의미한다.

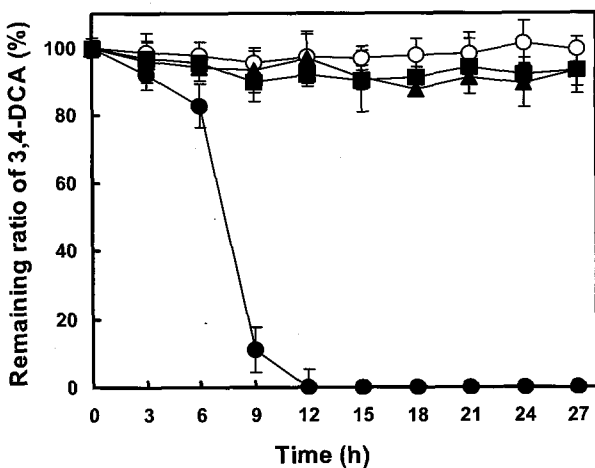


Fig. 1. Biodegradation of 3,4-dichloroaniline (DCA) by *Pseudomonas* sp. YM-7. Cells were grown in 1/10 LB containing 50 ppm 3,4-DCA. 3,4-DCA was determined by HPLC analysis. ○—○, control; ●—●, *Pseudomonas* sp. YM-7; ■—■, *Escherichia coli*; ▲—▲, *Bacillus subtilis*.

분리균주 YM-7의 3,4-DCA에 대한 내성

3,4-DCA를 포함한 1/10 LB배지에서 분리 균주 YM-7의 생육을 조사하였다. 3,4-DCA 무첨가구와 3,4-DCA 첨가구의 결과를 비교해 볼 때 YM-7 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 생육 저해 양상은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

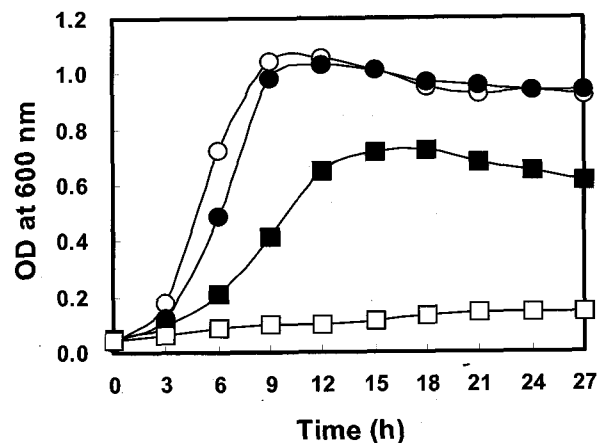


Fig. 2. Growth rate of *Pseudomonas* sp. YM-7 in 1/10 LB media containing 3,4-dichloroaniline. ○—○, control; ●—●, 50 ppm; ■—■, 100 ppm; □—□, 200 ppm.

분리균 YM-7의 동정

분리균 YM-7은 울산광역시 온산면에 소재하고 있는 온산 화학공단 인근의 갯벌에서 채취한 시료에서 분리된 균주로

그람 염색에서 그람 음성의 간균으로 조사되었다. 또한, PCR을 이용한 16S rDNA 염기서열 분석과 염기서열의 상동성 분석 결과, 분리균 YM-7은 *Pseudomonas* sp. CYN01B (accession no. AB175661)의 16S rDNA와 95%, *Pseudomonas* sp. A07 (accession no. AM284989) 등의 *Pseudomonas* 속에 속하는 균주들과 95%의 상동성을 나타내었다 (Table 1). 이 결과로부터 분리 선발된 YM-7 균주는 *Pseudomonas* sp.에 속하는 것으로 판단되었다.

분리균 *Pseudomonas* sp. YM-7에 의한 염화아닐린계 화합물 분해

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 LB배지에 YM-7 균주를 배양한 다음 시료를 취하여 잔존하는 CA 및 DCA 화합물을 앞에서 기술한 대로 추출하고 HPLC로 분석하였다. 그 결과 분리균은 2-CA, 3-CA, 4-CA 및 2,4-DCA의 경우에는 어느 정도의 분해 활성 나타내었으나 2,5-DCA와 3,5-DCA의 경우에는 분해 활성이 상대적으로 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 3).

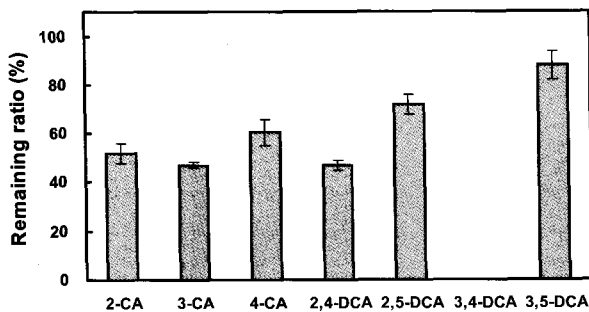


Fig. 3. Degredation of chloroanilines by *Pseudomonas* sp. YM-7. Cells were grown in 1/10 LB containing 50 ppm chloroanilines for 3 days at 30°C. Chloroanilines were determined by HPLC analysis. 2-CA, 2-chloroaniline; 3-CA, 3-chloroaniline; 4-CA, 4-chloroaniline; 2,4-DCA, 2,4-dichloroaniline; 2,5-DCA, 2,5-dichloroaniline; 3,4-DCA, 3,4-dichloroaniline; 3,5-DCA, 3,5-dichloro aniline. Data are the averages of triplicate experiments.

분리균의 catechol dioxygenase 활성

미생물에 의한 방향족 화합물 또는 유기염소계 방향족화합물의 분해 과정 중에 catechol로의 전환이 세포내 대사과정 중의 중요한 기작의 하나로 알려져 있으며 xylene, phenol, toluene 및 naphthalene과 같은 많은 유기화합물이 catechol로 전환된 후에 세포내의 여러 단계를 거쳐 대사 된다는 결과 (Harayama and Rekik, 1990; Na et al., 2001; Park et al., 2003)와 염화아닐린계 화합물이 catechol로 전환된다는 보고도 있다 (Liu et al., 2002; Radianingtyas et al., 2003; Travkin et al., 2003). 이렇게 전환 된 catechol은 그 후 세포내에서 여러 단계의 효소작용에 의해 최종적으로 pyruvate나 acetaldehyde와 같은 Krebs 회로의 중간산물로 분해된다고 보고되고 있다 (Lee et al., 2001). Catechol의 분해에 관여하는 첫 단계의 효소인

catechol 1,2-dioxygenase (ortho-cleavage)와 catechol 2,3-dioxygenase (meta-cleavage)에 대한 연구가 특히 많이 진행되어 왔다 (Harayama and Rekik, 1990; Hofer et al., 1994). 이에 3,4-DCA를 효과적으로 분해하는 *Pseudomonas* sp. YM-7 균주의 분해반응의 기구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 catechol dioxygenase의 활성을 조사하였다. 3,4-DCA의 존재하에서 catechol 1,2-dioxygenase의 활성 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 하지만 catechol 2,3-dioxygenase의 경우 3,4-DCA 무첨가구에서는 6.30 nmol/1 min/mg protein의 활성이 3,4-DCA 존재할 경우에는 27.36 nmol/10 min/mg protein로 그 활성이 약 4배 이상 증가하는 결과가 관찰 되었다 (Fig. 4). 이러한 결과는 catechol 2,3-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 기구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 *Pseudomonas* sp. YM-7 균주로부터 catechol 2,3-dioxygenase 유전자 및 관련 유전자의 cloning을 시도하고 있다.

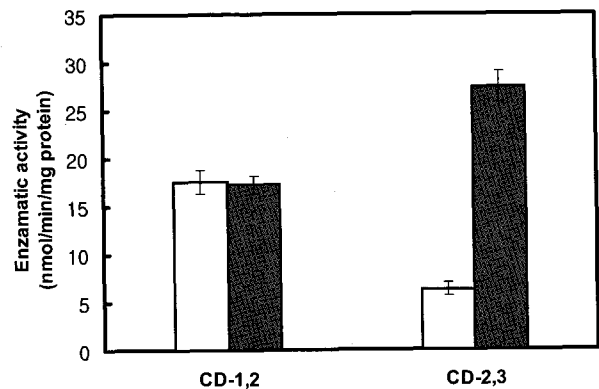


Fig. 4. Change of catechol dioxygenase activities in *Pseudomonas* sp. YM-7. Cells were grown in 1/10 LB for 12 h at 30°C in the absence (open bar) or presence (closed bar) of 50 ppm 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). Catechol dioxygenase activities were measured as described under Materials and Methods. Data are the averages of triplicate experiments.

Catechol 2,3-dioxygenase의 기질 특이성

분리균주 YM-7의 경우 3,4-DCA에 의한 catechol 2,3-dioxygenase의 활성의 증가가 관찰 되었다. 이러한 결과는 catechol 2,3-dioxygenase가 3,4-DCA의 분해에 관여하는 중요한 효소라는 것을 의미한다. YM-7 유래의 catechol 2,3-dioxygenase의 특성을 조사하기 위해서 먼저 여러 기질에 대한 특이성을 조사하였다. Table 2에 나타난 것처럼, YM-7 균 유래의 catechol 2,3-dioxygenase는 catechol과 catechol 유도물질에 대한 분해 활성을 나타내었다. Catechol에 대한 분해 활성이 가장 좋았고 그 이외에는 4-methylcatechol에 대한 분해활성이 53.1%로 가장 높았으며 다른 기질에 대해서도 어느 정도의 분해활성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

Table 2. Substrate specificity of the catechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas* sp. YM-7

| Substrate | Relative activity (%) ^a |
|----------------------|------------------------------------|
| Catechol | 100 |
| 3-Methylcatechol | 18.1 |
| 4-Methylcatechol | 53.1 |
| 4-Chlorocatechol | 33.1 |
| 3,5-Dichlorocatechol | - ^b |
| 4,5-Dichlorocatechol | 6.9 |
| Tetrachlorocatechol | - |

Assay was performed according to the procedure of Nakanishi et al. (1991).

^aThe activity with catechol was defined as 100%.

^bNot determined.

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 화합물질이 잔류한 환경에서 생산된 농·수산물에 대한 안전성의 보장에도 기여 할 수 것으로 여겨진다.

사 사

이 논문은 2007년도 Brain Busan 21사업에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Aoki, K., K. Konohana, R. Shinke and H. Nishira. 1984. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from aniline-assimilating *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2087-2095.
- Berns, K.I. and C.A. Thomas. 1965. Isolation of the high molecular DNA from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.*, 11, 476-490.
- Choi, J.H., T.K. Kim, Y.M. Kim, W.C. Kim, G.J. Joo, K.Y. Lee, and I.K. Rhee. 2005. Cloning and characterization of a short chain alcohol dehydrogenase gene for cyclohexanol oxidation in *Rhodococcus* sp. TK6. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 1186-1196.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor and C.R. Kuske. 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.
- Gheewala, S.H. and A.P. Annachatre. 1997. Biodegradation of aniline. *Water Sci. Technol.*, 36, 53-63.
- Harayama, S. and M. Rekik. 1990. The mata cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprised 13 gene. *Mol. Gen. Genet.*, 221, 113-120.
- Hofer, B., S. Backhaus and K.N. Timmis. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB4000 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene*, 144, 9-16.
- Kearny, P.C. and D.D. Kaufman. 1975. In: *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action*, Marcel Dekker, New York.
- Kim, Y.M., K. Park, G.J. Joo, E.M. Jeong, J.E. Kim and I.K. Rhee. 2004. Glutathione-dependent biotransformation of the fungicide chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4192-4196.
- Lee, J.S., E.J. Kang, M.O. Kim, D.H. Lee, K.S. Bae and C.K. Kim. 2001. Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 112-117.
- Liu, Z., H. Yang, Z. Huang, P. Zhou and S.J. Liu. 2002. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 679-682.
- Motonaga, K., K. Tagagi and S. Matumoto. 1996. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. *Biol. Fertil. Soils.*, 23, 340-345.
- Na, K., S. Kim, M. Kubo and S. Chung. 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.
- Nakanishi, Y., S. Murakami, R. Shinke and K. Aoki. 1991. Induction, purification, and characterization of catechol 2,3-dioxygenase from aniline-assimilating *Pseudomonas* sp. FK-8-2. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1281-1289.
- Park, D.W., J.H. Lee, D.H. Lee, K. Lee and C.K. Kim. 2003. Sequence characteristics of *xyl* JQK genes responsible for catechol degradation in benzoate-catabolizing *Pseudomonas* sp. S-47. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 700-705.
- Radianingtyas, H., G.K. Robinson and A.T. Bull. 2003. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology*, 149, 3279-328.
- Tixier, C., M. Sancelme, S. Ait-Aissa, F. Bonnemoy, A. Cuer, N. Truffaut and H. Veschambre. 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.
- Travkin, V.M., I.P. Solyanikova, I.M. Rietjens, J. Vervoort, W.J. Berkel and L.A. Golovleva. 2003. Degradation

of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. J. Environ. Sci. Health, 38, 121-132.

2007년 8월 6일 접수
2007년 10월 15일 수리