

## 3,4-Dichloroaniline 분해 미생물의 분리 및 특성

김영목 · 박근바위<sup>1</sup> · 김원찬<sup>2</sup> · 한원섭<sup>2</sup> · 유춘발<sup>3</sup> · 이인규<sup>2\*</sup>

부경대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>국립수산과학원 남해연구소,  
<sup>2</sup>경북대학교 농화학과, <sup>3</sup>대구대학교 식품공학과

**Isolation and Characterization of 3,4-Dichloroaniline Degrading Bacteria.** Kim, Young-Mog, Kunbawui Park<sup>1</sup>, Won-Chan Kim<sup>2</sup>, Won-Sub Han<sup>2</sup>, Choon-Bal Yu<sup>3</sup>, and In-Koo Rhee<sup>2\*</sup>. Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea. <sup>1</sup>South Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Yeosu 556-823, Korea, <sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, <sup>3</sup>Department of Food Engineering, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea - Chloroanilines are widely used in the production of dyes, drugs and herbicides. Chloroanilines, however, are considered potential pollutants due to their toxic and recalcitrant properties to humans and other species. With the increase of necessity of bioremediation, this study was conducted to isolate the chloroanilines-degrading bacteria. A bacterium capable of growth on 3,4-dichloroaniline (DCA) was isolated by the 3,4-DCA-containing enrichment culture. The strain KB35B was identified as *Pseudomonas* sp. and also able to degrade several chloroanilines. The isolated strain showed high level of catechol 2,3-dioxygenase activity in the presence of 3,4-DCA. The activity of catechol 2,3-dioxygenase was supposed to be ones of the important factors for 3,4-DCA degradation. The activity toward 4-methylcatechol was 60.6% of that of catechol, while the activity toward 3-methylcatechol and 4-chlorocatechol were 27.0 and 13.5%, respectively.

**Key words:** 3,4-Dichloroaniline, *Pseudomonas* sp., biodegradation

### 서 론

염화아닐린계(chloroanilines) 화합물들은 오랜 기간동안 페인트, 농약, 플라스틱, 제약회사 등에서 제품제조에 중요한 intermediates로 사용되어 왔으며[3], 주로 phenylurea계, dicarboximide계 그리고 phenylcarbamate계 제초제와 같은 chloroaniline-based pesticides의 미생물적 분해 산물의 형태로 환경 중에 방출 추적되고 있다[7]. 특히 diuron, linuron, neburon, propanil과 같은 phenylurea계 농약으로부터 방출되는 3,4-dichloroaniline (DCA)은 각각 이들 농약들의 잔류량 측정의 marker로서 사용되고 있다. 이들 DCA는 분자 내에 염소원자를 가지고 있기 때문에 토양 미생물에 의한 분해에 저항성을 가지며, 토양 부식물질과의 화학적인 결합으로 토양 내 잔류 기간이 길어서 심각한 토양 오염물질로 문제 제시 되고 있다[17].

본 연구는 3,4-DCA에 대해 내성을 가지며 3,4-DCA 분해력이 높은 미생물을 환경으로부터 분리하여, 이 균을 사용하여 3,4-DCA의 분해를 촉진시켜 3,4-DCA로 오염된 토양

의 생물복원에 이용하기 위하여 실시하였다. 유독성이며 토양 잔류성이 큰 이 화합물을 잘 분해할 수 있는 미생물을 선발하고 그 특성을 잘 이용한다면, 이 화합물이 축적되어 있는 토양 생태계의 복원뿐만 아니라 궁극적으로 이 화합물질이 잔류한 토양에서 생산된 농산물에 대한 안전성의 보장에 기여 할 수 있을 것으로 여겨진다. 아울러 염화아닐린계 화합물의 미생물에 의한 분해가 catechol로 전환되어 분해된다는 보고[9, 14 18]에 주목하여 분리균주로부터 catechol의 분해에 관여하는 여러 효소 활성을 조사함으로써 분리균에 의한 3,4-DCA 분해 기작의 규명을 시도하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 재료

본 연구에서는 하수 슬러지로부터 분리 선발한 3,4-DCA 제거능이 우수한 *Pseudomonas* sp. KB35B를 사용하였고, 대조균으로는 *Escherichia coli* DH5a[4]와 *Bacillus subtilis* RM125[19]를 사용하였다. 본 연구에 사용된 chloroaniline 화합물은 Sigma사(미국)에서 구입하여 사용하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 stock solution (20,000 ppm)을 조제하여 -20°C에서 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5718, Fax: 82-53-953-7233

E-mail: ikrhee@knu.ac.kr

### 균의 분리 및 배양

균의 집식배양은 L당 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 미량원소 용액[조성, L당 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  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 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 [16]의 방법을 참고하여 500 ppm의 3,4-DCA를 첨가하여 실시하였다. 500 ml 삼각플라스크에 이 배지 100 ml당 시료 2 g을 가하여 30에서 200 rpm으로 1주일간 배양한 후, 이 배양액 1 ml를 동일한 배지에 접종하여 같은 조건으로 1주일간 더 배양하였다. 이 배양액을 살균 생리식염수로 희석한 후 100 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[10]에서 진탕 배양하였다.

### 분리균의 동정

분리균은 그람 염색과 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. Chromosomal DNA의 추출은 Sambrook [15]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 Bioneer사(한국)에 의뢰하여 합성하였다. PCR 반응에 사용한 정방향 (5'-AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG-3') 및 역방향 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') primer는 Dunbar 등[2]의 방법에 따라 제작하였다. PCR 반응은 다음의 조건으로 행하였다. 0.5  $\mu\text{L}$ (2.5 U) Taq polymerase, 5  $\mu\text{L}$  Taq polymerase buffer ( $\times 10$ ), 1  $\mu\text{L}$ 의 10 mM dNTP, 39  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ 에 20 pmol의 각 primer 2  $\mu\text{L}$ 와 25 ng의 주형 DNA를 첨가하여 잘 혼합한 후 반응액을 94°C에서 2분간 변성시켰다. 이를 52°C에서 2분간 annealing한 후 72°C에서 2분간 polymerization 시키고 PCR 산물의 염기서열의 결정은 솔젠트(한국)사에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열의 상동성 검색은 Ribosomal database (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>)를 통하여 실시하였다.

### 3,4-DCA 정량 분석법

분리균을 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 1분간 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  $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (3.9 $\times$ 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) 분해율 조사

분리균에 의한 다양한 염화아닐린계 화합물의 분해율을 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 12시간 배양한 다음 3,4-DCA 정량 분석법에서와 같이 시료를 처리하고 분석하여 잔존하는 염화아닐린계 화합물을 분석하였다.

### Catechol dioxygenases 정량법

Catechol의 분해에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 catechol 1,2-dioxygenase 및 catechol 2,3-dioxygenase 활성을 조사하였다. Catechol 1,2-dioxygenase 활성은 Aoki 등[1]의 방법에 따라 측정하였다. 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 2.5 ml과 10 mM의 기질 100  $\mu\text{L}$ 를 차례로 혼합한 시료에 무세포 추출액 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 일정시간 반응 시킨 후, 2.5 ml의 1 N HCl을 첨가하여 효소반응을 정지시키고 최종적으로 *cis, cis*-muconic acid의 생성량을 260 nm에서 측정하였다.

Catechol 2,3-dioxygenase 활성은 Nakanishi 등[12]의 방법에 따라 측정하였다. 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 1.5 ml에 증류수 1.3 ml과 10 mM의 기질 100  $\mu\text{L}$ 를 차례로 혼합한 시료에 무세포 추출액 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 흡광도의 변화를 375 nm에서 2-hydroxymuconic acid 6-semialdehyde의 생성량을 측정하였다. 효소의 활성은 실온에서 무세포 추출액을 첨가하지 않은 대조군과의 차이로부터 환산하였다. 무세포 추출액은 3,4-DCA 50 ppm 함유 1/10 LB 배지에 12시간 배양한 균체를 원심분리하고 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 세척하여 동일 buffer에 재현탁한 다음 초음파 세포 파쇄기(Ultrasonics Ltd.; 영국)로 6분간 파쇄한 후 12,000 $\times$ g에서 원심분리하여 얻은 상정액을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 3,4-DCA 분해균의 분리 및 동정

대구근교, 경북, 경남의 경작지 및 폐수처리장 등에서 채취한 184점의 토양 및 슬러지를 사용하여 500 ppm의 3,4-DCA를 함유한 최소배지에서 집식 배양하여 3,4-DCA에 내성을 가진 균 38주를 분리하였다. 이들 균주를 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 각각 100 ppm의 3,4-DCA를 함유한 최소배지에서 7일간 배양하거나 50 ppm의 3,4-DCA가 첨가된 1/10 LB 배지에서 3일간 배양한 후 배양액 중에 잔존하는 3,4-DCA를 HPLC로 분석하여 3,4-DCA 제거 효과가 가

**Table 1. 16S rDNA partial sequence (631 bp) of *Pseudomonas* sp. KB35B and homology comparison.**

1	CGTAAACGAT	TTCACTAGCC	GTGGAATCCT	GAGATTTT	TGGCGCAGCT	AACGCATAAG	60
61	TTGACCGCCT	GGGAGIACGG	CCGCAAGGTT	AAAACCTCAA	TGAATTGACG	GGGGCCCGCA	120
121	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTCGAA	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	AGGCCTTGAC	180
181	ATCCAATGAA	CTTCCAGAG	ATGGATGGGT	GCCTTCGGGA	ACATTGAGAC	AGGTGCTGCA	240
241	TGGCTGTCGT	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCGTAACGA	GCGCAACCCT	300
301	TGTCCTTAGT	TACCAGCACG	TTATGGTGGG	CACTCTAAGG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	360
361	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GGCCTGGGCT	ACACACGTGC	420
421	TACAATGGTC	GGTACAGAGG	GTTGCCAAGC	CGCGAGGTGG	AGCTAATCCC	ACAAAACCGA	480
481	TCGTAGTCCG	GATCGCAGTC	TGCAACTCGA	CTGCGTGAAG	TCGGAATCGC	TAGTAATCGC	540
541	GAATCAGAAT	GTCGCGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAT	600
601	GGGAGTGGGT	TGCACCAGAA	GTAGCTAGTC	T 631			

Reference (accession no.)	Identity (%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AJ278813)	99
<i>Pseudomonas graminis</i> (AB109886)	98
<i>Pseudomonas</i> sp. 'FSL R1-057' (AF205137)	98
<i>Pseudomonas marginalis</i> strain JH8 (DQ232737)	98

PCR was performed as described under Materials and Methods. The sequence identity was analyzed using Ribosomal database (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>).

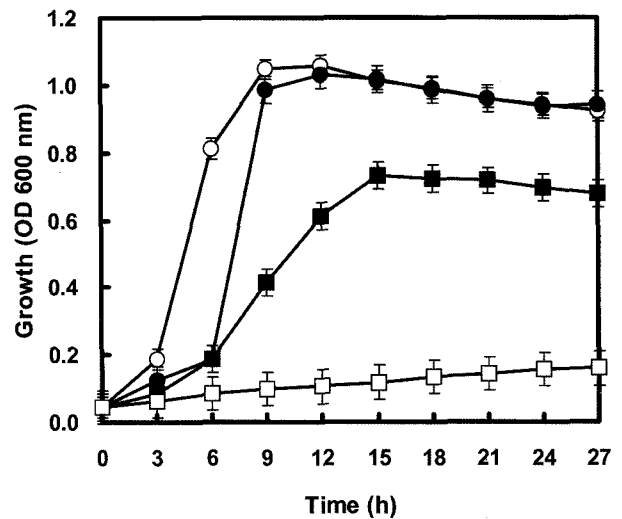
장 우수한 균주인 KB35B를 분리하였다. KB35B 균주는 대구시 서구 이현염색공단 하수처리장의 하수 슬러지에서 분리되었으며 그람 염색에서 그람 음성의 간균 형태를 나타내었다. 분리균 동정을 위한 16S rDNA 염기서열의 분석은 Dunbar 등[2]의 방법에 따라 정방향 및 역방향 primer를 사용하여 PCR에 의해 16S rDNA 단편을 증폭하여 PCR 산물의 염기서열을 결정하였고 염기서열의 상동성 검색을 Ribosomal database(<http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>)를 통하여 실시한 결과, 분리균은 *Pseudomonas fluorescens*의 16S rDNA(accession no. AJ278813)와 99%, *Pseudomonas graminis* (accession no. AB109886) 등의 *Pseudomonas*속에 속하는 균주들과 98%의 상동성을 나타내었다. 이 결과로부터 분리 선발된 KB35B 균주는 *Pseudomonas* sp.에 속하는 것으로 동정하였다(Table 1).

**분리균의 3,4-DCA에 대한 내성**

3,4-DCA를 포함한 1/10 LB배지에서 분리 균주 KB35B의 생육을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 3,4-dichloroaniline 무첨가구와 3,4-dichloroaniline 첨가구의 결과를 비교해 볼 때 KB35B 균주는 100 ppm 농도의 3,4-DCA에서도 생육이 활발하였으나 200 ppm 이상의 농도에서는 생육이 불가능한 것으로 나타났다.

**분리균에 의한 3,4-DCA의 제거**

분리한 균주 KB35B, *E. coli* 및 *B. subtilis*를 LB 배지에서 12시간 배양하여 그 종배양액 0.1 ml를 50 ppm의 3,4-DCA를 함유한 1/10 LB 배지 10 ml에 접종하였다. 분리 균주 KB35B 및 *E. coli*, *B. subtilis*의 3,4-DCA 제거 양상을 균주를 접종하지 않은 대조군과 비교하면서 3,4-DCA의 제거율을



**Fig. 1. Growth rate of *Pseudomonas* sp. KB35B in 1/10 LB media containing 3,4-dichloroaniline. ○, control; ●, 50 ppm; ■, 100 ppm; □, 200 ppm.**

시간별로 관찰하였다. 3,4-DCA를 함유한 선택배지에서 분리한 균주 KB35B에서 12시간만에 3,4-DCA가 100% 제거되었다(Fig. 2), 대조구로 사용한 *E. coli* 및 *B. subtilis*의 경우는 3,4-DCA의 제거능력이 거의 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

**염화아닐린계 화합물 분해율 조사**

1/10 LB 배지에 2-, 3-, 4-chloroaniline (CA)과 2,4-, 2,5-, 3,4-, 3,5-DCA를 각각 50 ppm 첨가된 1/10 LB배지에 KB35B 균주를 3일간 배양한 다음 시료를 취하여 잔존하는 CA 및 DCA 화합물을 재료 및 방법에서 기술한 대로 추출하여 HPLC로 분석하였다. 그 결과 분리균은 2-CA, 3-CA,

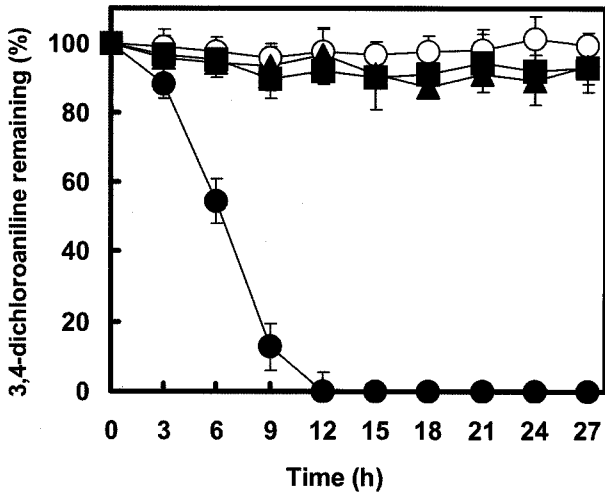


Fig. 2. Degradation of 50 ppm 3,4-dichloroaniline in 1/10 LB media by the growth of bacteria at 30°C. ○, no inoculation; ●, *Pseudomonas* sp. KB35B; ■, *Escherichia coli*; ▲, *Bacillus subtilis*. Data are the averages of three repeat experiments.

4-CA 및 2,4-DCA을 50% 이상의 분해제거 활성을 나타내었으나 2,5-DCA와 3,5-DCA의 경우는 거의 분해할 수 없는 것으로 나타났다(Fig. 3).

**분리균의 catechol 2,3-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 대사된다는 결과[5, 11, 13]와 염화아닐린계 화합물이 catechol로 전환된다는 보고도 있다[9, 14, 18]. 이렇게 전환된 catechol은 그후 세포내에서 여러 단계의 효소작용에 의해 최종적으

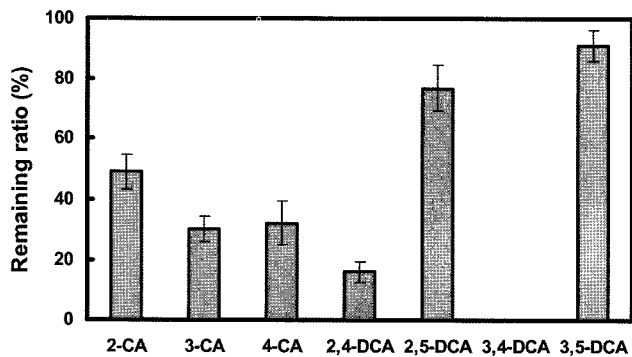


Fig. 3. Degradation of chloroanilines by *Pseudomonas* sp. KB35B. Cells were grown in 1/10 LB containing 50 ppm chloroanilines for 3 days at 30°C. Chloroanilines were determined by HPLC analysis. 2-CA, 2-chloroaniline; 3-CA, 3-chloroaniline; 4-CA, 4-chloroaniline; 2,4-DCA, 2,4-dichloroaniline; 2,5-DCA, 2,5-dichloroaniline; 3,4-DCA, 3,4-dichloroaniline; 3,5-DCA, 3,5-dichloroaniline. Data are the averages of three repeat experiments.

Table 2. Induction of catechol 1,2-dioxygenases and catechol 2,3-dioxygenases in *Pseudomonas* sp. KB35B by the addition of 3,4-dichloroaniline (DCA).

	Activity (nmol/min/protein)	
	Without 3,4-DCA	With 3,4-DCA
Catechol 1,2-dioxygenase	11.4 ± 0.5	8.3 ± 1.1
Catechol 2,3-dioxygenase	11.4 ± 3.5	236.0 ± 9.5

Cells were grown in 1/10 LB for 12 h at 30 in the absence or presence of 50 ppm 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). The activity of catechol dioxygenases was measured as described in Materials and Methods. Data are the averages of three repeat experiments.

로 pyruvate나 acetaldehyde와 같은 Krebs 회로의 중간산물로 되어 분해된다고 알려져 있다[8]. Catechol의 분해에 관여하는 첫단계의 효소인 catechol 1,2-dioxygenase(ortho-cleavage)와 catechol 2,3-dioxygenase(meta-cleavage)에 대한 연구가 특히 *Pseudomonas* 속의 미생물을 중심으로 많이 진행되어져 왔다[5, 6]. 이에 3,4-DCA를 효과적으로 분해하는 *Pseudomonas* sp. KB35B균주의 분해반응의 기구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 catechol dioxygenase의 활성을 조사하였다. 3,4-DCA의 존재하에서 catechol 1,2-dioxygenase의 활성의 큰 변화는 관찰되지 않았으나 catechol 2,3-dioxygenase의 경우 그 활성이 20배 이상 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 2). 이러한 결과는 catechol 2,3-dioxygenase이 3,4-DCA 분해에 관여하는 중요한 효소군중의 하나로 추정된다. 현재, 3,4-DCA 분해반응의 기구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 *Pseudomonas* sp. KB35B 균주로부터 catechol 2,3-dioxygenase 유전자 및 관련 유전자의 cloning을 시도하고 있다.

**요 약**

토양 시료를 대상으로 3,4-dichloroaniline (DCA)를 함유한 최소배지에서의 집식배양과 배양 후 HPLC에 의한 잔류 분석을 통해 3,4-DCA의 분해 능력이 우수한 균주 *Pseudomonas* sp. KB35B를 분리하였다. 분리균 KB35B는 1/10 LB 배지에 함유된 50 ppm의 3,4-DCA를 12 시간만에 완전히 제거하였다. 이외에도 분리균 KB35B는 3-chloroaniline (CA), 4-CA 및 2,4-DCA의 분해 활성을 나타내었으나 2,5-DCA와 3,5-DCA에 대한 분해활성을 가지고 있지는 않았다. 또한, 분리균 KB35B에서 3,4-DCA의 유도에 의한 catechol 2,3-dioxygenase 활성의 증가가 관찰되었다. 이상의 결과로부터 catechol 2,3-dioxygenase이 3,4-DCA 분해에 관여하는 중요한 효소군중의 하나로 생각된다.

**감사의 글**

이 논문은 2000년도 학술진흥재단의 지원(KRF-2000-005-

G00001)에 의하여 이루어졌으며 경북대학교 생물건강·농업생명 융합형 인재양성 사업단의 학생이 이 연구에 참여하여 수행한 결과임.

## REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. Gheewala, S. H. and A. P. Annachhatre 1997. Biodegradation of aniline. *Water Sci. Technol.* **36**: 53-63.
4. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
5. Harayama, S. and M. Rekik. 1990. The meta cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprised 13 gene. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 113-120.
6. 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.
7. Kearny, P. C. and D. D. Kaufman. 1975. In: Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of action. Marcel Dekker, New York.
8. 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.
9. 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.
10. Motonaga, K., K. Tagagi, and S. Matumoto. 1996. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. *Biol. Fertil. Soils* **23**: 340-345.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Radianingtyas, H., G. K. Robinson, and A. T. Bull. 2003. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology* **149**: 3279-3287.
15. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
16. Sutherland, T. D., I. Horne, M. J. Lacey, R. L. Harcourt, R. J. Russell, and J. G. Oakshott. 2000. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2822-2828.
17. 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.
18. 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.
19. Uozumi, T., T. Hoshino, K. Miwa, S. Horinouchi, T. Beppu, and K. Arima. 1977. Restriction and modification in *Bacillus* species. Genetic transformation of bacteria with DNA from different species. Part I. *Mol. Gen. Genet.* **152**: 525-538.

(Received June 24, 2007/Accepted Aug. 3, 2007)