

## 염화 방향족 탄화수소 분해세균의 분리 및 특성

김종우 · 김치경 · 김영창 · 염재홍 · 이재구\*

충북대학교 자연대 미생물학과 \*농대 농화학과

**Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons.****Kim, J.W., C.K. Kim, Y.C. Kim, J.H. Yeoum and J.G. Lee\****Department of microbiology, College of Natural Sciences, and Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture\*, Chungbuk National University*

**ABSTRACT:** Several bacterial isolates capable of degrading 4-chlorobiphenyl or 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid were isolated from industrial wastes by the agar plate method and studied for their biodegradabilities of the hydrocarbons and some biochemical characteristics. The isolates DJ-12, DJ-26 and TP-1 were identified as *Pseudomonas* spp. and they could not degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. The absorption spectra for 4-chlorobiphenyl and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid showed the peaks at 253 and 292 nm, respectively. Biodegradability of the isolates was determined by decrease of the absorbance for the test hydrocarbons with a UV-scanning spectrophotometer. The plasmids of the isolates were studied to examine whether or not the hydrocarbon-degrading genes exist in the plasmids. Antibiotics resistance was also examined to search out a proper marker for the isolates in further experiments, such as curing test and genetic recombination.

**KEY WORDS** □ chlorinated aromatic hydrocarbon-degrading bacteria, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 4-chlorobiphehyl

유기합성화학 공업의 급진적인 발달로 인하여 일상생활에서 유기합성 물질의 사용량이 급증 하고 있다. 이에 따라 자연계에 유입되는 여러가지 hydrocarbon들이 새로운 환경오염원으로 대두되고 있다(Pujar 등, 1985). 그중 농약 등으로 이용되는 chlorinated aromatic hydrocarbon 중에는 구조적으로 매우 안정하여 난분해성 특징을 띠지만 아니라 non-target organism에도 mutagen 및 carcinogen으로 작용할 수 있으며 또한 rhizosphere microorganism의 activity에 직접 간접으로 영향을 줌으로써 농작물의 생장을 지연시키는 물질들도 있다(Hilary 등, 1985). 그러므로 이들 chlorinated aromatic hydrocarbon 오염물질에 대하여 미생물의 생분해에 의한 처리 문제가 점차 주목 받게 되었다.

그동안 국내외적으로 미생물에 의한 hydrocarbon 물질의 분해과정에 대한 연구가 진행되어 aromatic hydrocarbon중 phenanthrene (Kiyohara 등, 1982), toluene (Williams 등, 1985; Yano 등, 1980), xylene (Gibson 등, 1986), naphthalene (Gunsalus 등, 1985) 등은 catechol을 거쳐 meta- 또는 ortho-ring fission 경로를 따라 분해되는 것으로 보고 되었다. Chlorinated aromatic hydrocarbon에 대해서는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Fisher 등, 1978; Seidler 등, 1985), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) (Alexander 등, 1980; Chakrabarty 등, 1982) 및 chlorobiphenyl (Furukawa 등, 1986; Chakrabarty 등, 1982) 등이 연구되어 dechlorination 과정과

aromatic ring의 분해과정이 보고 되었다.

우리나라의 현실에서도 이러한 물질들이 공장폐수를 통해 다량 방출되고 또한 농약 등으로 많이 사용되고 있어 자연계에 축적되는 양이 점점 증가하는 추세를 보이고 있기 때문에 이들 오염물질의 처리 문제가 심각한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 chlorinated aromatic hydrocarbon중 4-chlorobiphenyl (4-CB)과 2, 4, 5-T 등에 대한 분해세균을 공장폐수로 부터 분리하여 그 분해능과 생화학적 특성 등을 검정하였다.

## 재료 및 방법

### 배지 및 균주의 증식

분해 균주의 증식에 사용한 배지는 MM2 최소배지로 (Kiyohara 등, 1982) 그 조성은 1,000 ml의 10 mM phosphate buffer에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 18 mM;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$ 과 NaCl, 8.5 mM 이었다. 완전배지로는 Luria 배지 (Bacto-tryptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl, 5g/l, pH 7.0)를 이용하였다. 각 균주는 agitation 및 aeration 기능을 갖춘 multigen fermentor (New Brunswick Scientific Co. Model F 1,000, F2, 000)에서 배양온도를 30°C로 하여 24-72시간 동안 증식시켰다. 탄소원으로 첨가한 시험 hydrocarbon의 양은 1 mg/ml 이었다.

### 분해세균의 분리

농약 및 유기합성 생산공장이 다수 산재해 있는 청주 및 대전 공업단지의 공장폐수로 부터 Kiyohara 등 (1982)과 Sylvestre 등 (1980)의 방법을 이용하여 각 공시 chlorinated aromatic hydrocarbon에 대한 분해세균을 분리 하였다. MM2배지에 공시 chlorinated aromatic hydrocarbon을 단일 탄소원으로 첨가하여 30°C에서 72시간 동안 배양한 후 적절히 희석하여 LB agar plate에 도말 배양하였다. 이 plate에 나타난 colony들을 단일 탄소원으로 공시 chlorinated aromatic hydrocarbon이 살포된 MM2 agar plate에 멸균된 tooth-pick로 접종한 후 30°C에서 배양 하면서 공시 hydrocarbon을 분해하여 주위

에 clear zone을 형성하는 colony들을 분해균주로 분리 선별하였다. 분해세균의 분리 및 분해능 검정에 사용한 chlorinated aromatic hydrocarbon은 4-CB, 2, 4-D 및 2, 4, 5-T를 사용하였다.

### Chlorinated aromatic hydrocarbon의 분해 검정

공시 chlorinated aromatic hydrocarbon을 단일 탄소원으로 첨가한 MM2 최소배지에 균주를 접종하여 배양 하면서 일정 시간별로 분해균주의 생장율과 탄소원으로 제공된 hydrocarbon의 양을 측정하였다. 배양 시간에 따라 배양액을 채취하여 동일 volume의 chloroform으로 hydrocarbon을 추출한 후 순수 chloroform을 대조구로 하여 UV-scanning spectrophotometer로 그 흡광도의 변화를 조사함으로써 첨가된 시험 hydrocarbon의 분해 정도를 측정하였다 (Alexander 등, 1980).

### Plasmid DNA의 분리

분해세균의 plasmid DNA는 Hansen 등 (1978)의 방법에 따라 분리하였다. Lysozyme-SDS system을 이용하여 세균을 lysis 시킨 뒤 pH 12.1~12.3에서 alkaline denaturation한 후 2M Tris로 neutralize 하였다. SDS를 4% 그리고 NaCl을 1M로 첨가하여 membrane-chromosome complex를 제거하고 PEG 6,000을 10%로 첨가하여 6시간 동안 냉장시킨 후 저온에서 원심 분리하여 plasmid DNA를 농축 하였다.

### 항생제에 대한 내성 검사

항생제에 대한 분해균주들의 내성 정도를 조사하기 위하여 ampicillin, tetracyclin, chloramphenicol, kanamycin 등을 시험 항생물질로 사용하였다.

각 시험 항생제가 농도별로 첨가된 (10~200  $\mu\text{g/ml}$ ) LB broth에 균주를 접종하여 배양한 후 그 혼탁도를 균주가 접종되지 않은 broth와 비교하여 내성 유무를 판단 하였다.

## 결과 및 고찰

Agar plate를 사용하는 Kiyohara 등 (1982)의 방법을 이용하여 4-CB 및 2, 4, 5-T 등의 chlorinated aromatic hydrocarbon 분해세균을 청주 및 대전 지역의 공장폐수로 부터 분리하였

**Table 1.** Degradation of chlorinated aromatic hydrocarbons by bacterial isolates from industrial waste water.

Isolates	4-CB	2,4-D	2,4,5-T	Source/Reference
DJ-12	+	-	-	This study
DJ-26	+	-	-	This study
FP-6	+	-	-	Kim,1986
TP-1	-	-	+	This study

Symbols: 4-CB, 4-chlorobiphenyl; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4,5-T, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; +, growth and clear zone formation by degradation; -, no growth.

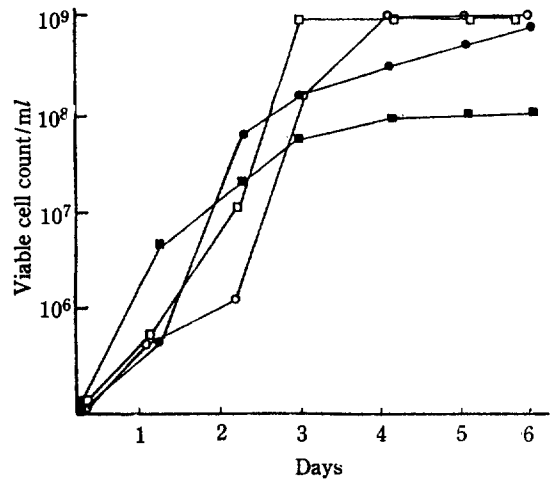
다. 분리된 분해균주들은 MM2 최소배지에 단일 탄소원으로 살포한 시험 chlorinated aromatic hydrocarbon을 분해하여 colony 주위에 clear zone을 형성하였다 (Kim 등, 1986).

또한 분리 균주들은 모두 단일 chlorinated hydrocarbon에 대해서만 분해능을 나타냈다 (Table 1). 특히 2,4,5-T 분해균주인 TP-1은 구조적으로 거의 동일한 2,4-D를 분해하지 못하는 것으로 보아 Chakrabarty 등 (1985)이 지적했던 바와 같이 분해 초기의 효소는 매우 높은 기질 특이성이 있을 것으로 생각된다.

분리된 세균 중 각 chlorinated aromatic hydrocarbon의 분해과정과 그 분해유전자의 특징을 규명하기 위하여 4-CB 분해균주 DJ-12, DJ-26 그리고 2,4,5-T 분해균주 TP-1의 형태 및

생화학적 특징을 조사한 결과는 Table 2와 같았으므로 Bergey's Manual에 따라 이들 균주는 모두 *Pseudomonas* 속으로 추정된다.

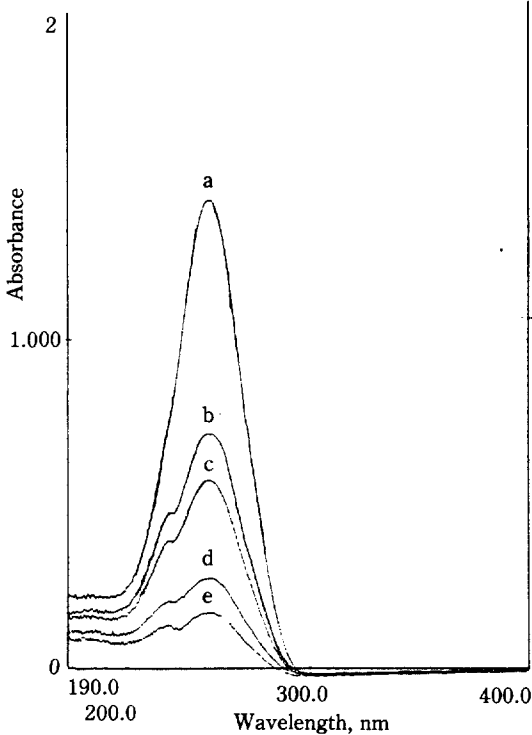
분해세균의 성장율과 액침 배양시의 분해능을 비교하기 위하여 MM2 최소배지에 시험 chlorinated hydrocarbon을 단일 탄소원으로 첨가하여 각 균주를 배양하는 동안 균주의 증식 (Fig.1)을 조사하는 동시에 첨가한 hydrocarbon의 감소를 조사하였다 (Fig.2, 3). 균주의 증식은 viable cell count로 4-CB와 2,4,5-T의 농도 변화는 각각의

**Fig. 1.** Growth of the bacterial isolates on 4-CB or 2,4,5-T as a sole source of carbon in the MM2 liquid medium.

DJ-12, ○; DJ-26, □; FP-6, ●; TP-1, ■.

**Table 2.** Morphological and biochemical characteristics of the chlorinated aromatic hydrocarbon-degrading isolates.

Parameter	DJ-12	DJ-26	TP-1
Gram reaction	Negative	Negative	Negative
Shape	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Oxygen requirement	Strict aerobic	Strict aerobic	Strict aerobic
Optimum temperature	30°C	30°	30°C
Growth at 42°C	Negative	Negative	Positive
Catalase	Positive	Positive	Positive
Oxidase	Positive	Positive	Positive
Indole	Negative	Negative	Negative
Growth on MacConkey agar	Positive	Positive	Positive
Lactose utilization	Positive	Negative	Positive
Glucose	Positive	Positive	Positive



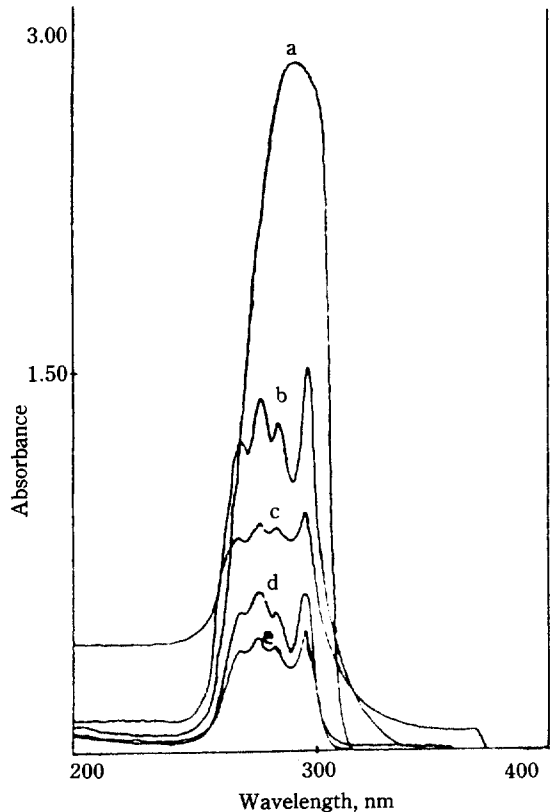
**Fig. 2.** UV-scanning spectra of 4-CB during biodegradation by the isolate DJ-12. a is the culture extracts at zero time and b, c, d and e are those of 6, 12, 18 and 24 hours old cultures, respectively.

중으로써 TP-1은 2, 4, 5-T를 매우 빠르게 분해하는 특성을 보여 주었다.

4-CB 분해균주 DJ-12의 분해능은 4-CB의 최대 흡수파장인 253nm의 peak가 배양 시간에 따라 감소하는 것으로 (Fig.2) 그 분해능을 측정하였다. DJ-26 및 FP-6의 경우는 DJ-12와 매우 유사한 양상을 나타냈다.

한편 본 연구에서 분리된 각 분해균주들의 hydrocarbon 분해유전자와 plasmid와의 연관성을 확인하기 위하여 각 균주들의 plasmid 존재 여부를 확인한 결과는 Fig.4에서와 같이 모두 1 개 이상의 plasmid를 함유하고 있었다. 이는 Furukawa (1986), Chakrabarty (1982) 등이 4-CB 및 2, 4, 5-T의 분해가 *Acinetobacter*, *Pseudomonas* 속 세균들의 plasmid 유전자에 의해서 진행된다는 보고에서와 같이 본 연구에 이용

최대 흡수파장인 253 nm와 290 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 단일 탄소원으로 첨가된 hydrocarbon의 양은 배양 시간에 따라 감소하는데 (Fig. 2, 3) 반비례하여 각 분해균주들의 세포 수는 증가하였다 (Fig.1). 특히 2, 4, 5-T의 분해에 대한 현재까지의 보고에서는 그 분해균주가 exponential phase가 시작되기 전에는 적어도 40시간 이상의 lag phase를 나타내는 것으로 보고되어 있으나 (Chakrabarty 등, 1982), 본 연구에서 분리된 2, 4, 5-T 분해균주인 TP-1의 경우는 lag phase가 매우 짧은 특징을 나타냈다. 이와같은 사실로 TP-1 균주의 2, 4, 5-T 분해효소는 constitutive하게 발현되거나 또는 2, 4, 5-T에 노출되었을 때 그 분해효소가 즉시 induction될 수 있는 균주로 생각된다. 또한 Fig.3에서와 같이 2, 4, 5-T는 처음 1 일 동안에 그 농도가 현저히 감소함을 나타냈다. 이는 Fig.1에서 TP-1 균주가 제 1일에 나타낸 급격한 성장율과도 직접적인 연관성이 있음을 보여



**Fig. 3.** UV-scanning spectra of 2, 4, 5-T during biodegradation by the isolate TP-1. a is the culture extracts at zero time and b, c, d, and e are those of 1, 2, 3, and 4 days old cultures, respectively.

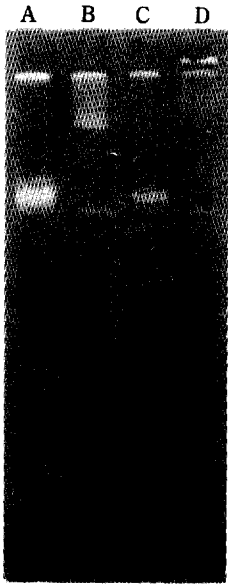


Fig. 4. Agarose gel electrophoretogram of the plasmid DNAs of 4-CB and 2, 4, 5-T-degrading bacterial isolates.

Lane A, DJ-12; B, DJ-26; C, FP-6 and D, TP-1.

된 시험 균주들도 그 분해 유전자가 plasmid에 존재할 수도 있을 것으로 기대된다.

각 균주들로부터 hydrocarbon 분해유전자의 특징을 규명하고 cloning 하는 것이 본 연구의 궁극적 목적이므로 그 분해유전자가 plasmid에 있는지를 확인하기 위한 curing test에서 뿐만 아니라 순수 분리된 plasmid DNA를 recipient cell과 recombination 시켰을 때 그 recombinant를 분리해 내기 위해서는 antibiotics에 대한 내성 특성을 marker로 이용할 수 있다.

이러한 목적으로 몇가지 항생물질에 대한 분해 균주들의 저항성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 4-CB 분해균주 DJ-12는 시험 항생물질중

Table 3. Response of the isolates to antibiotics.

Isolates	Chlorinated hydrocarbons to be degraded	Antibiotics tested			
		Ap	Tc	Cm	Km
DJ-12	4-CB	R	S	S	R
DJ-26	4-CB	R	R	R	R
FP-6	4-CB	S	R	R	R
TP-1	2,4,5-T	R	R	R	R

Symbols; 4-CB, 4-chlorobiphenyl; 2,4,5-T, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; R, resistant; S, sensitive.

Ap ( $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ )과 Km ( $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ )에 대해서 내성을 나타냈으며 DJ-26은 4 가지 시험 항생물질 모두에 대해서 (Ap $\leq 200 \mu\text{g}$ , Tc $\leq 150 \mu\text{g}$ , Cm $\leq 200 \mu\text{g}$ , Km $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ ) FP-6는 Tc ( $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ ), Cm ( $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ ), Km ( $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ ) 등에 대해서 내성을 나타냈다. 또한 2, 4, 5-T 분해균주 TP-1은 Ap ( $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ ), Tc ( $\leq 150 \mu\text{g/ml}$ ), Cm ( $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ ), Km ( $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ ) 모두에 대해서 내성을 나타내고 있었다.

시험 균주들은 모두 다제내성의 특성을 보였으며 특히 Km에 대해서는 공통적으로 내성을 나타냈다. Pemberton 등 (1978, 1981)은 항생제 내성 유전자와 aromatic compound의 분해 유전자는 transposable genetic element 또는 broad-host-range를 갖는 plasmid에 의해서 전파된다고 지적하였다. 따라서 본 연구에 이용된 균주들의 항생물질에 대한 특성은 colned 분해유전자의 선발 marker로서 뿐만 아니라 각 균주들의 hydrocarbon 분해유전자의 위치확인, 유전자의 발현 및 조절 등과 같은 유전학적인 특성을 밝히는 데 유용하게 이용될 수 있다.

## 적 요

분해환을 형성시키는 평판 고체배지 방법으로 4-CB 분해세균인 DJ-12, DJ-26, FP-6 균주와 2, 4, 5-T 분해세균인 TP-1 균주를 공장계수로 부터 분리하여 각 균주의 분해능과 생화학적 특성을 연구하였다. 분리균주 중 DJ-12, DJ-26 그리고 TP-1은 *Pseudomonas* 속으로 동정되었다.

Chlorinated aromatic hydrocarbon의 분해는 UV-scanning spectrum을 측정함으로써 조사하였는데 4-CB와 2, 4, 5-T의 peak는 각각 253nm와 292nm에서 나타났다. 각각의 시험 hydrocarbon을 첨가한 배양액에서 각 분해균주를 배양시킴에 따라 253nm와 292nm의 peak가 감소하는 것으로 이들 균주에 의한 시험 hydrocarbon의 분해능이 매우 높다는 것을 확인하

였다.

각 시험균주로부터 plasmid DNA를 조사한 결과 모두 plasmid를 함유하고 있어 hydrocarbon 분해유전자가 plasmid에 존재할 수 있음을 알 수 있으며 이들 분해유전자의 유전적 특징을 규명하기 위한 curing test나 transformation 과정에 필요한 marker를 찾아내기 위하여 몇가지 항생물질에 대한 저항성을 조사하였다.

## 사 사

본 연구는 한국 유전공학 학술협회의 1985년도 특정연구 개발과제의 연구비로 수행 되었음.

## REFERENCES

- Alexander, M. and A. Rosenberg. 1980. Microbial metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil, soil suspensions, and axenic culture. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 297-302.
- Chakrabarty, A.M., J.J. Kilbane, D.K. Chatterjee, J.S. Karns, and S.T. Kellogg. 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 72-78.
- Chakrabarty, A.M., D. Ghosal, I-S. You, and D.K. Chatterjee. 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science*. **288**, 135-142.
- Chakrabarty, A.M., and K. Furukawa. 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 619-626.
- Fisher, P.R., J.M. Pemberton, and J. Appleton. 1978. Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.* **135**, 798-804.
- Furukawa, K., and T. Miyazaki. 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**, 292-298.
- Gibson, D.T., G.M. Whited., W.R. McCombie., and L.D. Kwart. 1986. Identification of cis-Diols as intermediates in the oxidation of aromatic acids by a strain of *Pseudomonas putida* that contains of TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **166**, 1028-1039.
- Gunsalus, I.C. and K-M. Yen. 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* **162**, 1008-1013.
- Hansen, B.J., and R.H. Olsen. 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.* **135**, 227-238.
- Hilary, M.L., P.G. Michael, and J.H. Slater. 1985. Degradation of herbicide mecoprop (2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid) by a synergistic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 429-433.
- Kim, C.K., J.W. Kim., Y.C. Kim, and T.I. Mheen. 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. Jour. Microbiol.* **24**, 67-72.
- Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yano. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-457.
- Pemberton, J.M. and R.H. Don. 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145**, 681-686.
- Pujar, B.G., and D.W. Ribbons. 1985. Phthalate metabolism in *Pseudomonas fluorescens* PHK: Purification and properties of 4,5-dihydroxy phthalate decarboxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 374-376.
- Rheinwald, J.G., A.M. Chakrabarty, and I.C. Gunsalus. 1973. A transmissible plasmid controlling camphor degradation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Nat. Sci. U.S.A.* **70**, 885-889.
- Seidler, P.J., P.S. Amy, J.W. Schulke, and L.M. Frazier. 1985. Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* **49**, 1237-1245.
17. Sylvestre, M. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on p-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1223-1224.
  18. Williams, P.S., H. Keil, and M.R. Lebens. 1985. TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *J. Bacteriol.* **163**, 248-255.
  19. Yano, K and N. Tatsunari. 1980. A naturally occurring conjugative plasmid coding for toluene degradation and resistance to streptomycin and sulfonamides. *J. Bacteriol.* **143**, 552-560.

(Received Mar. 26, 1987)