

2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid 분해균주의 분리 및 특성

박영순 · 이 건 · 이상준 · 이종근

부산대학교 미생물학과
(1994년 5월 24일 접수)

Isolation and Characterization of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid Degrading Bacteria

Yeong-Soon Park, Geon Lee, Sang-Joon Lee and Jong-Kun Lee

Dept. of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan,
609-735, Korea

(Manuscript received 24 May 1994)

Abstract

Microorganisms capable of utilizing 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(2,4,5-T) as sole carbon source were isolated from soil by enrichment culture. Among these strains, EL-071P had the highest biodegradability of 2,4,5-T, and according to its morphological and physiological characteristics, it was identified as *Pseudomonas* sp. This strain was resistant to rifampicin, streptomycin, ampicillin, kanamycin and such metal ions as Zn^{2+} , Cu^{2+} . Various compounds of chlorinated phenol and substrate analogs were more easily utilized than 2,4,5-T, but biodegradation rate for each compound was different. The strain easily utilized the compounds of chlorinated substituents on phenol in the order of *ortho*-, *para*-, and *meta*- position. The biodegradability of this strain was very stable.

Key words : 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, *Pseudomonas* sp.

1. 서론

자연 생태계의 미생물은 매우 다양한 천연 또는 합성 유기물을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 성장할 수 있는 능력이 있으므로 자연계에서 물질의 재순환에 매우 중요한 역할을 담당한다.

따라서 자연과 환경의 보존적인 차원에서 토양 미생물의 이러한 생분해능을 최대한 확장시켜, 환경오염물질을 제거하기 위한 연구가 관심의 초점이 되고 있다(Franklin *et al.*, 1981).

우리나라에서도 해마다 그 사용량이 증가 일로에 있는 방향족 탄화수소, 특히 농약 등으로 이용

되는 염소계 방향족 탄화수소는 구조적으로 매우 안정하여 난분해성일 뿐만 아니라 대상 생물 이외의 생물에게 돌연변이 유발원 및 발암원으로 작용할 수 있으며 근권(rhizosphere) 미생물의 활동에 직간접적으로 영향을 주므로서 농작물의 성장을 지연시키는 경우도 있다(Hilary *et al.*, 1985). 그러므로 이들 염소계 방향족 탄화수소를 미생물로 생분해시키는 분야가 점차 주목받게 되었다.

그 중의 하나인 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(이하 2,4,5-T라 약칭)는 관목류에 대한 제조 효과가 2,4-D보다 크다는 것이 보고된 2,4-D 관련 화합물로서 도로, 철도, 목장 등의 잡초 또는 관목

구체에 이용되고 있다. 제초제 외의 식물호르몬제로서 과수의 낙과 방지, 감자의 발아 방지, 밀감류의 크기 증가 및 lemon의 착색을 지연시키는 데 유효하다(장판섭, 1978). 2,4,5-T는 genotoxic effects로 인해 사람에게 대해 기형아 출산을 유발하는 것으로 간주되고 있다(Grant, 1979; Hanify *et al.*, 1981).

Natural microflora는 cooxidative metabolism에 의해 2,4,5-T를 아주 느리게 분해한다(McCall *et al.*, 1981). 2,4,5-T 등 난분해성 물질 이용능을 가진 세균은 세포 수의 증가가 없고 이들 물질의 cooxidative metabolism에서 생긴 탄소가 세포 구성성분으로 되는 경우가 드물다. 따라서 이들 물질의 잔류성은 natural microflora가 이들 물질을 탄소원 및 에너지원으로 이용하지 못하기 때문이다. Cometabolism에 의한 2,4,5-T의 대사적 변환은 대개 다른 목적으로 이용되는 adventitious enzyme에 의해 이루어진다. Cometabolism에 의한 2,4,5-T의 분해속도는 1~100ppm의 2,4,5-T를 90% 분해하는데 42일에서 120일까지 걸린다. 이수치는 분해율을 2,4,5-T의 무기화가 아닌 2,4,5-T의 변환으로 보았을 때의 경우이다(Rosenberg와 Alexander, 1980; Horvath, 1970; Chakrabarty *et al.*, 1985; Kilbane *et al.*, 1983; Karns *et al.*, 1983; Karns *et al.*, 1983; Alexander, 1981; Kellogg *et al.*, 1981; Chatterjee *et al.*, 1981; Bailey *et al.*, 1978; Edwards와 McMinn, 1985; Corbelt *et al.*, 1984).

Chakrabarty *et al.*(1985)은 *Pseudomonas cepacia*를 포함하는 혼합배양으로부터 2,4,5-T를 분해하는 culture system을 개발하였고 Kilbane *et al.*(1982)은 2,4,5-T를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 *Pseudomonas cepacia*를 plasmid-assisted molecular breeding으로 선별했다. McCall *et al.*(1981)은 방사선 동위원소를 이용하여 2,4,5-T의 대사산물이 2,4,5-trichlorophenol, 2,4,5-trichloroanisole이고, 이 anisole은 미생물학적 메틸화를 통해 phenol로부터 생성됨을 보고한 바 있다. Kim *et al.*(1987)은 2,4,5-T 분해세균을 공장폐수로부터 Kiyohara *et al.*(1982)의 방법으로 분리하였다. 지금까지 2,4,5-T와 관련된 보고는 호

기적 조건을 이용한 것이기 때문에 산화적 대사경로만 연구되었고 potential reductive transformation에 대해서는 거의 보고가 되어 있지 않다. Sufliata *et al.*(1984)은 3-chlorobenzoate를 기질로 하여 최소배지에서 키운 혐기적 메탄생성균총이 2,4,5-T를 *para* 위치에서 탈염소화하여 2,5-D를 생성함을 보여 주었다.

현재까지 염소계 방향족 탄화수소의 분해과정이 연구보고된 세균에서는 대부분 그 분해 유전자가 plasmid상에 존재하고 있음이 밝혀져 그 plasmid 유전자에 대한 연구가 활발해지고 있다(Hansen과 Olsen, 1978). 자연계에 오염, 축적되어 새로운 공해물질로 지목되는 이들 탄화수소를 효율적으로 분해하는 미생물을 분리하고 그들의 분해능과 분해유전자의 특성을 밝히는 문제는 미생물을 이용한 환경보존적 차원에서 수행되어야 할 중요 연구 과제라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 2,4,5-T에 대한 분해균주를 토양에서 분리하여 분해능을 확인하였다. 또, 각종 금속이온과 항생물질에 대한 내성조사와 분류학적인 위치를 검토하였으며, 분해능에 영향을 미치는 제반 생육 특성, 분해 안정성 등을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 분리용 시료 및 배지조성

2.1.1. 분리용 시료

2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid 분해균을 분리하기 위하여 부산과 경남 일대의 과수원, 화훼단지 등에서 토양 시료를 약 200여점 채취하여 분리용 시료로 사용하였다.

2.1.2. 배지조성

탄소원 및 에너지원으로 2,4,5-T를 이용할 수 있는 균을 분리하기 위해 사용된 분리용배지의 조성은 Table 1에서와 같다.

2,4,5-T 분해균주로서 선정된 균주는 100ppm의 2,4,5-T가 첨가된 LB 한천사면배지에서 충분히 생육시킨 다음 냉암소에서 보존하여 본 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of medium for isolation of 2,4,5-T degrader(g/l)

2,4,5-T	0.05	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	2.1	NaCl	0.2
KH ₂ PO ₄	1.6	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.05
KCl	0.2	pH	7.2

2.2. 2,4,5-T 분해균의 분리

각 지역에서 채취한 토양을 1g씩 취하여 분리용 배지 10ml를 넣은 시험관에 잘 현탁한 후 30°C에서 7일간 왕복 진탕배양하였다(120Rev X 6cm, stroke 진탕배양기). 진탕배양이 끝난 각 시험관으로부터 배양액 0.1ml씩 취해서 새로운 분리용 배지에 접종, 30°C에서 7일간 다시 진탕배양한 후 2,4,5-T 분해능 유무를 육안으로 관찰하였다.

이상에서 2,4,5-T 분해능이 있는 것으로 관찰된 시험관의 배양액 0.1ml를 취해 균 분리용 평판배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 평판배지상에 형성된 colony를 1백금이 취하여 다시 균 분리용 배지에 옮겨 배양하면서 균일한 성장을 나타내는 colony를 선별하였고 분리용 최소액체배지에서 배양시켜 분해능 유무를 재확인하였다.

2.3. 분리균의 생육도 측정

분리균들의 2,4,5-T 분해율을 검토하기 위해 500ml shaking flask에 100ml 배지를 넣어 멸균한 후 종배양액 1ml를 접종하여 30°C에서 120rpm으로 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 생육도와 분해율을 측정하였다. 대조구로서는 균을 접종하지 않은 동일한 조성의 배지를 사용하였으며 생육도는 spectrophotometer(Shimadzu UV 120-02 spectrophotometer)를 이용하여 600nm에서의 흡광도로 측정하였고, 분해율은 배양액을 10,000rpm에

서 30분간 원심분리하여 288nm에서 측정하였다.

2.4. 금속이온에 대한 내성조사

중금속이온에 대한 내성조사는 metal compound gradient plate method(Gerhardt *et al.*, 1981)로써 다음과 같이 실시하였다. 10ml의 멸균된 LB 한천배지를 지름이 10cm인 멸균된 petri dish에 넣어 이 plate의 옆면과 바닥의 교점에 배지가 닿도록 plate의 한 쪽 가장자리를 높여서 식혔다. 이 한천배지를 굳힌 후 plate를 편평하게 하여 금속을 포함하는 10ml의 LB 한천배지를 부어 굳혔다. 이 때 금속염은 3차 증류수에 녹여 따로 멸균한 후 이미 멸균된 LB 한천배지에 첨가하여 분주하였다. 한 쪽 가장자리는 0mM 그 반대편은 최고농도가 되는 금속농도 구배 평판에 분리균을 1백금이 취해 금속이온농도가 증가하는 방향으로 도말하였다. 배양 후 적당한 저항성 level을 결정한 뒤 금속농도를 각기 다르게 한, 구배가 없는 금속이온 LB 평판에 분리균들을 멸균된 toothpick로 이식하여 30°C에서 3일 배양한 뒤 colony의 생장유무로서 저항성을 조사하였다.

2.5. 항생물질에 대한 저항성 조사

LB 한천배지를 고압멸균하여 45°C로 식힌 뒤 항생제 stock solutions을 첨가하여 rifampicin, ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracycline 등을 각각 5, 50, 34, 50, 50, 30µg/ml을 함유하는 LB plate를 만들었다(Gerhardt *et al.*, 1981). 이들 평판에 균주를 적당히 희석하여 접종, 1일간 배양 후 생장유무를 확인하고 생장을 나타낸 균종에 대해서는 항생제 농도를 각기 다르게 한 LB 배지에서 배양하여 최소저해농도(MIC)를 결정하였다.

2.6. 공시균의 선정

균 분리용 배지에서의 생장정도, 2,4,5-T 분해능, 금속이온 내성, 항생제 내성 등을 비교, 검토하여 모두 우수한 성질을 나타내는 균주를 공시균

으로 선정하였다.

2.7. 공시균의 분류 및 동정

공시균으로 선정된 2,4,5-T 분해균의 분류학상 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제 특성을 조사하였으며 이에 따른 공시균의 분류와 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8th. ed., 1974)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1(1984)에 준하여 실시하였다.

2.7.1. 형태학적 특성

세포의 형태학적 제반실험은 Manual of Methods for General Bacteriology(Gerhardt *et al.*, 1981)와 L. J. Bradshaw(1982)의 Laboratory Microbiology(3rd. ed.)에 준하여 실시하였다.

2.7.2. 배양적 특성

공시균을 육즙한천 평판배지상에 배양시켜 colony의 형태, 표면, 색, 투명도 등을 관찰하였다. Gelatin 액화실험은 nutrient gelatin stab medium으로 실시하였으며 탄수화물 발효실험은 J.F. MacFaddin(1980)의 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria에 준하여 실시하였다.

2.7.3. 생화학적 특성

공시균의 생화학적인 제 특성은 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (MacFaddin, 1980)와 Laboratory Microbiology (Bradshaw, 1982)에 준하여 실시하였다.

2.8. 분해능에 영향을 미치는 제반 생육 특성조사

공시균에 의한 2,4,5-T 분해율을 높이기 위하여 공시균의 생육특성에 대해 다음과 같이 실험하였

다. 배지의 초발 pH의 변화, 질소원의 변화, 질소 원농도의 변화 및 2,4,5-T 농도 변화에 따른 생육도와 분해율을 조사하였다. 이 외에 기질 유사체와 각종 chlorophenol compounds에 대한 특성을 조사하였다.

2.8.1. pH 변화에 따른 영향

배지의 최적 pH를 결정하기 위하여 pH 4.0에서 pH 10.0까지 각 단계별로 조절된 배지를 사용하여 72시간 배양 후 생육도와 분해율을 측정하였다.

2.8.2. 질소원 변화에 따른 영향

분리용 배지에 질소원으로서 각 종 무기질소원과 유기질소원을 0.05%씩 첨가한 후 72시간 배양하여 생육도와 분해율을 측정하였으며, 실험결과 최적질소원으로 판명된 질소원에 대해서는 농도별에 따른 생육도와 분해율을 측정하였다.

2.8.3. 기질농도 변화에 따른 영향

유일한 탄소 및 에너지원으로 2,4,5-T를 농도별로 첨가하여 72시간 배양 후 생육도를 측정하였다.

2.8.4. 기질 유사체 및 각종 chlorophenol compounds에 대한 분해특성 조사

공시균의 기질 유사체 및 각종 chlorophenol compounds에 대한 분해특성을 조사하기 위하여 Table 2에서 보는 바와 같은 기질 유사체 및 각종 chlorophenol compounds를 0.1 mM로 첨가하여 72시간 배양 후 공시균의 생육도와 분해율을 측정하였다. 생육도 측정은 spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였으며 분해율은 각 chlorophenol compounds와 기질 유사체의 최대흡수파장에서의 흡광도로 측정하였다.

2.9. 2,4,5-T 분해능의 안정성 조사

공시균의 2,4,5-T 분해능에 대한 안정성을 Kilbane *et al.*(1982)의 방법에 의해 조사하였다.

즉 2,4,5-T가 포함된 액체배지에서 공시균을 72시간 배양한 후, 배양액 0.1ml를 취하여 2,4,5-T 대신 2%의 glucose가 포함된 액체배지에 접종하였다. 이것을 배양하면서 0, 6, 12, 18 세대별로 배양액을 0.1ml씩 취하여 각각 육즙한천 평판배지상에 spreader로 도말하였다. 도말 후 30°C에서 48시간 배양하여 육즙한천 평판배지상에 나타난 각각의 단일 colony를 2%의 glucose 대신 2,4,5-T가 포함된 평판배지상에 100개의 colony를 임의 선택하여 tooth-picking하였다. 이 평판배지를 30°C에서 4일간 배양하여 형성된 colony 수를 계수하여 2,4,5-T 분해능의 안정성을 조사하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 2,4,5-T 분해균의 분리

부산과 경남지역의 과수원, 화훼단지 등에서 주변토양을 시료로 채취하여 분리용 배지에서 진탕 배양을 실시한 결과 15균주를 선발하였다. 2,4,5-T 분해균으로 분리된 균주는 Gram 양성 및 음성의 세균들이었다. 위 균주들에 대해 분해율을 조사한 결과 Table 2과 같았으며, No. 5, No. 14 균주가 가장 분해능이 우수하였다.

Table 2. 2,4,5-T degradation rate of 2,4,5-T degrading bacteria

Organism No.	Degradation rate(%)	Organism No.	Degradation rate(%)
1	51	13	33
4	51	14	58
5	52	15	20
6	48	17	33
7	48	18	40
10	45	19	15
11	40	20	35
12	45		

3.2. 2,4,5-T 분해균의 생육도 및 분해율 측정

분리균주 중에서 2,4,5-T 분해능이 가장 우수한 균주(No. 14)를 분리용 배지에서 진탕배양하여 그 생육도와 분해율을 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. 이 균주(No.14)가 2,4,5-T를 유일한 탄소원으로 이용하여 생육한 생육곡선에서 살펴보면, 유도기가 거의 나타나지 않았으며, 곧바로 대수증식기로 시작하여 48시간만에 정지기에 도달하였다.

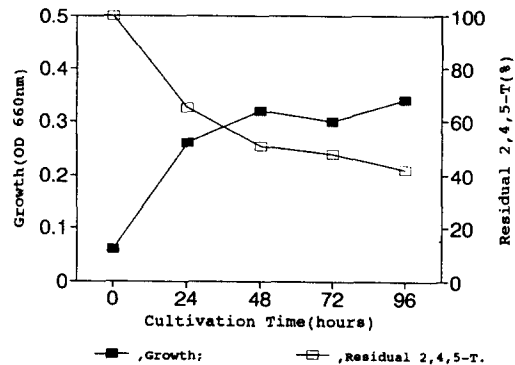


Fig. 1. Growth of isolated strain(No. 14).

Symbols: ■, Growth; □, Residual 2,4,5-T.

3.3. 금속이온 내성

2,4,5-T 분해율이 비교적 높은 균주들에 대해 metal compound gradient plate를 사용하여 금속 화합물에 내성을 조사한 결과 Table 3와 같았다. 이들 균주들의 ZnCl₂와 CuSO₄에 대한 내성은 비교적 높은 것으로 나타났으며 ZnCl₂의 경우 대부분 8mM 이상의 높은 내성도를 보였다. Cadmium의 경우 No. 10, No.14 및 No.20균주가 높은 내성을 나타내었고 HgCl₂의 경우도 거의 비슷하게 나타났다.

3.4. 분리균의 항생제 내성과 최소생육저해농도

분리균 6, 7, 14번의 항생제에 대한 내성은 Table 4와 같았다. 이들 2,4,5-T 분해균은 tetracycline, chloramphenicol에 대해 생장이 저해되었고, rifampicin, streptomycin, ampicillin,

kanamycin에 대해서는 내성을 나타내었다. 내성을 나타낸 경우의 MIC를 보면 rifampicin은 50 μ g/ml, streptomycin, kanamycin, ampicillin의 경우 500 μ g/ml 이상이였다.

Table 3. Resistance of screened 2,4,5-T degrading bacteria to metal compounds

Organism No.	Maximum concentration of metal compound that allowed bacterial growth				
	Cd(NO ₃) ₂	ZnCl ₂	AgNO ₃	CuSO ₄	HgCl ₂
1	6	9	0.4	9	0.1
4	2	10	0.3	9	0.1
5	2	9	0.4	8	0.1
6	4	9	0.4	9	0.1
7	4	10	0.9	9	0.1
10	7	10	0.6	7	0.1
11	2	9	0.6	7	0.1
12	7	7	0.6	8	0.1
13	2	10	0.6	9	0.1
14	7	10	0.4	5	0.1
15	2	8	0.7	7	0.1
17	4	10	0.6	6	0.1
18	5	9	0.6	7	0.09
19	2	9	0.6	9	0.1
20	7	7	0.5	9	0.1

* Determined by the metal compound gradient plate method(mM).

Table 4. Antibiotic resistance and minimal inhibitory concentration(MIC) of isolated strains

Antibiotics	MIC (μ g/ml)	Isolated strain No.		
		6	7	14
Ampicillin	500	R	R	R
Chloramphenicol		S	S	S
Kanamycin	500	R	R	R
Streptomycin	500	R	R	R
Tetracycline		S	S	S
Rifampicin	50	R	R	R

Symbols: R, resistant; S, sensitive.

3.5. 공시균주의 선정 및 분류동정

분리균주중 No.14가 2,4,5-T 분해율, 생육도, 급속이온 내성, 항생제 내성시험에서 우수한 성질을 나타내었으므로 편의상 EL-071P라 명명하고, 이

공시균주의 분류, 동정을 위해 형태학적 배양적, 생화학적, 제 특성을 조사하였다.

3.5.1. 형태학적 특성

공시균인 EI-071P를 육즙한천사면배지상에 접종하여 시간별로 배양하면서 광학현미경으로 관찰한 형태적인 특성은 Table 5에서 보는 바와 같았다. 공시균주는 끝이 둥근 단간균으로서 운동성 관찰은 Gray 방법(Gerhardt *et al.*, 1981)에 의한 편모염색에서 polar flagella 형이였고 Gram 염색에서는 음성으로 나타났다.

3.5.2. 배양적 특성

공시균주를 육즙한천평판배지상에서 배양하여 형성된 colony의 특성에 대해서 조사한 결과는 Table 5과 같았다. 형성된 colony는 습기가 많고 중앙부가 볼록한 convex형이었다. Colony의 색깔은 옅은 노란색을 띄었으며 colony는 불투명하였다. Gelatin 액화실험에서는 음성을 나타내었고, 탄수화물 발효능에 대한 실험은 phenol red broth base 배지상에서 실시하였으며 그 결과는 Table 6에 나타난 바와같이 xylose와 arabinose에 대해 발효능을 보였다. 한편 2,4,5-T 분해능 안정성 실험에 사용할 기질인 glucose는 본 균주가 발효적 이용성은 없으나 탄소원으로서 이용성이 있어 이 기질에서 생육됨을 나타내었다.

Table 5. Morphological and cultural characteristics of isolated strain EL-071P

Contents	Characteristics
Shape	Short rod with round end
Cell size(μ m)	0.3~0.5 by 0.8~1.0
Motility	Motile by polar flagellum
Gram stain	Negative
Type of cell division	Simple division
Colonies on nutrient agar	Circular, entire, convex, wetted
Colony surface	Smooth
Colony color	Pale yellow
Colony opacity	Opaque
Hydrolysis of gelatin	Negative

Table 6. Test for carbohydrate fermentation of isolated strain EL-071P

Carbohydrate	Isolated strain EL-071P
Glucose	-(+)*
Sucrose	-
Lactose	-
Mannitol	-
Sorbitol	-
Fructose	-
Xylose	+
Rhamnose	-
Inulin	-
Inositol	-
Ribose	-
Sorbose	-
Arabinose	+
Maltose	-
Galactose	-
Trehalose	-
Salicin	-
Soluble starch	-

Symbols: +, positive; -, negative; (+)*, growth as carbon source.

3.5.3. 생화학적 특성

공시균주의 생화학적 특성을 검토한 결과는 Table 7과 같았다. 본 균주는 catalase, oxidase, citrate utilization, nitrate reduction, MacConkey agar에서의 생장에서는 양성을 나타내었고, H₂S production, indole, decarboxylase test, urease, growth on KCN broth, growth on SS agar, Tween 80 hydrolysis, starch hydrolysis에서는 음성을 나타내었다. Oxidation-Fermentation test에서는 oxidation을 나타내었다.

3.5.4. 공시균주의 분류, 동정

본 실험에서 분리된 공시균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 제 특징을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8th. ed., 1974)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1(1984)과 비교 검토한 결과, gram 염색에서 음성, 극성 편모에 의한 운동성, 호기성, Catalase 양성, Oxidase 양성, 산화에 의한 당의 이용성 등으로 나타났고, 그 외의 제반 실험에서 *Pseudomonas*

속의 제 특성과 일치하여 *Pseudomonas* 속으로 동정되었다. 이를 편의상 *Pseudomonas* sp. EL-071P라 명명하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

Table 7. Biochemical characteristics of isolated strain EL-071P

Contents	Isolated strain EL-071P
Calase test	+
Cytochrome oxidase test	+
Oxidation/Fermentation test	oxidation
H ₂ S production	-
Simmons citrate agar	+
Nitrate reduction	+
Indole test	-
Decarboxylase test	
lysine	-
ornithine	-
Arginine dehydrolase	-
Urease	-
Growth on KCN broth	-
Growth on SS agar	-
Growth on MacConkey agar	+
Tween 80 hydrolysis	-
Pigment production	-
Starch hydrolysis	-

Symbols: +, positive; -, negative.

3.6. 분해능에 영향을 미치는 제반 생육 특성 조사

3.6.1. pH 변화에 따른 영향

배지의 초발 pH의 변화에 따른 *Pseudomonas* sp. EL-071P와 2,4,5-T 분해능을 조사하기 위하여 각 초발 pH에 있어서의 생육도와 분해율을 비교 검토한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같았다.

배지의 초발 pH를 4.0에서 10.0까지 단계적으로 조절하여 실험한 결과 pH 7.0에서 pH 8.0사이에 대체로 높은 생육과 분해율을 보이고 있으며 pH 7.4에서 분해율이 최고로 나타났다.

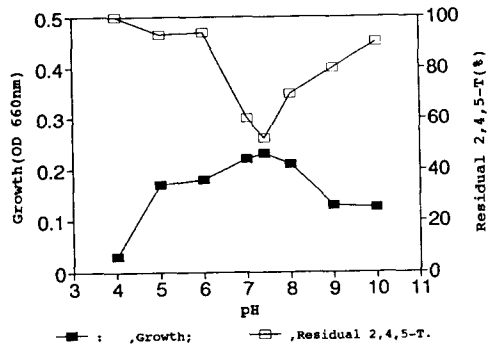


Fig. 2. Effect of pH on the growth and biodegradation of 2,4,5-T of *Pseudomonas* sp. EL-071P.
Symbols: ■, Growth; □, Residual 2,4,5-T.

3.6.2. 질소원 변화에 따른 영향

배지에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 대신 무기질소원과 유기질소원을 0.05% 농도로 첨가하여 공시균의 생육과 분해율을 측정 한 결과는 Table 8에서 보는 바와 같다.

Table 8. Effect of nitrogen sources on the growth and biodegradation of *Pseudomonas* sp. EL-071P.

Contents	Growth (A_{600})	Biodegradation (%)
NH_4Cl	0.15	26
NH_4NO_2	0.17	28
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.18	30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20	48
KNO_3	0.13	23
NaNO_2	0.10	34
Casein	0.13	25
Casamino acid	0.48	18
Yeast extract	0.38	30
Proteose peptone	0.34	33
Bacto peptone	0.28	15
Polypeptone	0.31	5
Asparagine	0.50	10
Arginine	0.39	0
Lysine	0.22	12
Urea	0.16	15
Yeast nitrogen base	0.17	7
None	0.07	0

분리용 배지에서 사용한 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_2 및 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 등이 좋은 생육과 분해율을 나타내었

으며 유기질소원들은 무기질소원에 비해 생육은 좋았으나 분해율이 비교적 저조하였다. 그리고 질소원의 첨가가 공시균의 생육과 분해에 필요한 조건임을 보여주었다. 여러 무기질소원들이 *Pseudomonas* sp. EL-071P의 질소원이 될 수 있으나 그 중 가장 높은 분해율을 나타낸 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 본 실험에서 사용하였다. 최적질소원으로 판정된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도에 따른 공시균의 생육도와 분해율을 측정 한 결과는 Table 9에서 보는 바와 같았다.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도를 0.05%에서 1.0%까지 단계적으로 조절하여 실험한 결과 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 0.2%일 때 가장 좋은 생육과 분해율을 나타내었으며 농도가 0.3% 이상일 때에는 생육은 대체로 양호하나 분해율이 저조하였다. 따라서 본 실험에서는 질소원을 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 하여 실험하였다.

Table 9. Effect of concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the growth and biodegradation of *Pseudomonas* sp. EL-071P.

Concentration (%)	Growth (A_{600})	Biodegradation (%)
0.05	0.15	38
0.1	0.23	38
0.2	0.25	45
0.3	0.21	30
0.4	0.22	10
0.5	0.17	5
1.0	0.13	5

3.6.3. 2,4,5-T의 농도에 따른 영향

배지 내에 첨가되는 2,4,5-T의 농도에 따른 *Pseudomonas* sp. EL-071P주의 생육특성을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 100mg/ℓ까지의 농도에서 본 공시균의 생육이 양호하였으며 150mg/ℓ 이상에서는 2,4,5-T에 의해 생육저해를 받아 생육이 급격히 감소함을 나타내었다.

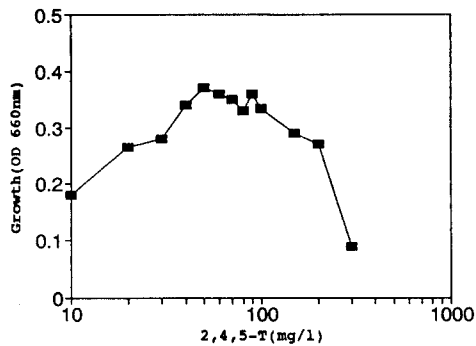


Fig. 3. Effect of 2,4,5-T concentration of the growth of *Pseudomonas* sp. EL-071P.

3.6.4. 기질 유사체 및 각종 chlorophenol compounds에 대한 분해특성 조사

Pseudomonas sp. EL-071P주의 기질 유사체 및 각종 chlorophenol compounds에 대한 생육도와 분해율을 측정된 결과는 Table 10에서 보는 바와 같았다.

Table 10. Growth and biodegradation of various chlorophenol compounds and substrate analogues by *Pseudomonas* sp. EL-071P.

Compounds	Growth (A ₆₀₀)	Biodegradation (O.D.)
2-Chlorophenol	0.19	0.12
3-Chlorophenol	0.15	0.10
4-Chlorophenol	0.15	0.12
3,4-Dichlorophenol	0.04	ND
2,6-Dichlorophenol	0.22	0.10
2,4-Dichlorophenol	0.14	ND
2,5-Dichlorophenol	0.05	0.01
2,3-Dichlorophenol	0.17	0.09
2,4,5-Trichlorophenol	0.03	ND
3-Chlorobenzoic acid	0.21	0.19
4-Chlorobenzoic acid	0.26	0.13
3,4-Chlorobenzoic acid	0.19	0.07
Phenoxyacetic acid	0.21	0.23
p-Chlorophenoxyacetic acid	0.22	0.10
4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid	0.19	0.11
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0.25	0.04
Catechol	0.15	0.09

Karns *et al.*(1983)에 의하면 Cl의 치환 위치가 *ortho*, *para*, *meta* 위치순으로 분해가 잘 안된다고 하였는데 본 공시균에 의한 chlorophenol compounds의 분해율을 보면 이와 일치함을 보여 주고 있다. 또 동일한 phenoxyalkanoic acid 계열의 제초제인 2,4-D의 경우 분해율이 아주 낮아 Chatterjee *et al.*(1982)이 지적했던 바와 같이 분해 초기의 효소는 매우 높은 기질 특이성이 있을 것으로 생각된다.

3.7. 2, 4, 5-T 분해능의 안정성 조사

Pseudomonas sp. EL-071P주의 2,4,5-T 분해능에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 즉, glucose가 포함된 액체배지에 본 공시균을 접종하여 72시간 동안 배양 후, 0, 6, 12, 18세대별로 배양액을 취하여 각각 육즙한천 평판배지상에 도말하여 배양하였다. 이렇게 하여 각 육즙한천 평판배지상에 나타난 단일 colony들을 100개씩 취하여 2,4,5-T가 포함된 평판배지상에 tooth-picking을 실시한 결과 18세대 이후에도 colony 갯수는 100개로 나타났다. 이러한 결과는 Karns *et al.*(1983)이 지적했던 바와는 달리 상당한 분해 안정성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

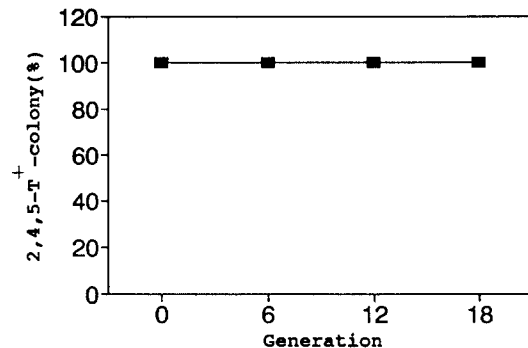


Fig. 4. Stability of 2, 4, 5-T degradability by *Pseudomonas* sp. EL-071P.

4. 요약

난분해성 제초제, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid를 유일한 탄소원으로 이용하는 세균을 토양으로부터 분리하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. 이 분리균은 rifampicin, streptomycin, ampicillin 등의 항생물질과 Zn^{2+} , Cu^{2+} 같은 금속이온에 내성을 나타내었다. 또한 chlorophenol 동족체 화합물들을 잘 이용하였으며 phenol에 치환된 chloro기의 치환위치에 따라 *ortho*, *para* 및 *meta*의 순으로 잘 이용하였다. 이 분리균주의 2,4,5-T 분해안정성은 매우 높은 것으로 관찰되었다

참 고 문 헌

- 장판섭, 1978, 최신 신농약, 286~295, 동명사.
- Alexander, M., 1981, Biodegradation of chemicals of environmental concern, *Science*, 211, 132~138.
- Bailey, R. A., H. M. Clarke, J. P. Ferris, S. Krause, and R. L. Strong, 1978, Pesticides, polychlorinated-biphenyls, and other chloroorganic compounds, Chemistry of the environment. Academic Press, 147~193.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974, The William and Wilkins Co. U.S.A., 8th. ed.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984, The William and Wilkins Co. U.S.A., Vol. 1.
- Bradshaw, L. J., 1982, Laboratory Microbiology, W. H. C. Brown Company Publishers, 3rd. ed.
- Chakrabarty, A. M., D. Ghosal, I. S. You and D. K. Chatterjee, 1985, Microbial degradation of halogenated compounds, *Science*, 288, 135~142.
- Chatterjee, D. K., S. T. Kellogg D. R. Watkins, and A. M. Chakrabarty, 1981, Plasmid in the biodegradation of chlorinated aromatic compounds, P. 519~527. In : S. B. Levy, R. C. Clowes, and E. L. Koenig.(ed.), Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids. Plenum Press. New York.
- Chatterjee, D. K., J. J. Kilbane, and A.M. Chakrabarty, 1982, Biodegradation of 2,4,5-T in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 514~516.
- Corbelt, J. R., K. Wright, and A. C. Baillie, 1984, Compounds interfering with cell growth, division, and development, The biochemical mode of action of pesticides. 2nd. ed., Academic Press, 179~195.
- Edwards, V. T. and A. C. McMinn, 1985, Biotransformation of pesticides and other xenobiotics in plants and soils—recent developments. Progress in pesticide biochemistry and toxicology. (ed.), D. H. Hutson, T. R. Roberts. Vol. 4. John Wiley and sons.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasrain, and K.N. Timmis, 1981, Manipulation of degradative genes of soil bacteria, In T. Leisinger, R. Hutter, A. M. Cook, and J. Nuesch.(ed), Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Academic Press. London, 109~130.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips, 1981, Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology.
- Grant, W. F., 1979, The Genotoxic Effects of 2,4,5-T, *Mutat. Res.* 65, 83~119.
- Hanify, J. A., P. Metcalt, C. L. Nobbs, and K. J. Worsley, 1981, Aerial spraying of 2,4,5-T and human birth malformations : on

- epidemiological investigation, *Science* 212: 349~351.
- Hansen, J. B. 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. C., 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.
- Horvath, R. S., 1970, Microbial cometabolism of 2,4,5-T, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 5, 537~541.
- Karns J. S., S. Duttgupta, and A. M. Chakrabarty, 1983, Regulation of 2,4,5-T and chlorophenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC 1100, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1182~1186.
- Karns, J. S., J. J. Kilbane, S. Duttgupta, and A. M. Chakrabarty, 1983, Metabolism of halophenols by 2,4,5-T degrading *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1176~1181.
- Kellogg, S. T., R. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty, 1981, Plasmid-assisted molecular breeding: new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals, *Science*, 214, 1133-1135.
- Kilbane, J.J., D.K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty, 1983, Detoxification 2,4,5-T from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1697~1700.
- Kilbane, J. J., D. K. Chatterjee, J. S. Karns, S. T. Kellogg, and A. M. Chakrabarty, 1982, Biodegradation of 2,4,5-T by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 72~78.
- Kim, J. W., C. K. Kim, T. H. Yeom, and J. G. Lee, 1987, Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbon, *Kor. Jour. Microbiol.*, 25, 122~128.
- Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana, 1982, Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 454~457.
- MacFaddin, J. F., Biochemical test for identification of medical bacteria, The willam and Wilkins Co. Baltimore. U.S.A.
- McCall, P. J., S. A. Vrona, and S. S. Kelley, 1981, Fate of uniformly carbon-14-ring labelled 2, 4, 5-T and 2, 4-D, *J. Agric. Food. Chem.*, 29, 100~107.
- Rosenberg, A. and M. Alexander, 1980, Microbial metabolism of 2,4,5-T in soil, soil suspensions, and axenic culture, *J. Agric. Food. Chem.*, 28, 297~302.
- Rosenberg, A. and M. Alexander, 1980, 2,4,5-T Decomposition on tropical soil and its cometabolism by bacteria in vitro., *J. Agric. Food. Chem.*, 28, 705~709.
- Suflita, J. M., J. Stout, and J. M. Tiedje, 1984, Dechlorination of 2,4,5-T by an anaerobic microorganism, *J. Agric. Food. Chem.*, 32, 218~221.