

Salicylate를 생분해하는 *Pseudomonas putida*의 특성

홍순우 · 하영칠 · 이계준 · 배경숙

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of a Salicylate-Degrading Strain of *Pseudomonas putida*

Hong, S.W., Y.C. Hah, K.J. Lee, and K.S. Bae

Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul, 151, Korea

Eight strains of the bacteria capable of growing on salicylate as the sole carbon source were isolated from soil and river water. Three of these isolates were identified as *Acinetobacter calcoaceticus* (AcB1), *Pseudomonas putida* biotype B (PpB2), and *P. putida* biotype A (PpB3). Effects of temperature, pH and C source concentration on biodegradation of salicylate by PpB3 were examined. The optimum conditions were as follows; 30°C for temperature, 7.0 for pH, and 10mM for C source concentration. Ultraviolet scanning spectrum of the salicylate was measured. The spectrum has two peaks at 225nm and 292nm. The spectra of the culture filtrates indicate that ring degradation of salicylate is accomplished.

자연 생태계의 미생물, 특히 토양 미생물은 상당히 다양한 천연 또는 합성 유기물을 변화, 분해시켜 성장할 수 있는 능력이 있어, 자연계에서 물질의 재순환에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서, 자연과 환경의 보존적인 차원에서 토양 미생물의 이러한 생분해능 (biodegradative activity)을 최대로 확장시키기 위한 연구가 관심의 초점이 되고 있다 (Franklin 등, 1981).

산업폐기물의 미생물에 의한 생분해는 보통 공장 등과 같이 폐기물이 다량 유출되는 곳에서 필요하며, 이를 위해서 폐기물 처리공정에 적합하며 필요로 하는 대사능을 충분히 높은 수준으로 가지는 미생물 균주의 개발이 요구된다. 또한, 이러한 미생물은 재래적인 농화배양 (enrichment culture)에 의한 선별기법을 사용하

여 분리할 수 있다.

본 연구는 자연계에서 잘 분해되지 않는 난분해성 물질과 독성을 가진 물질들의 분해를 위한 균주개발의 일환으로, 난분해성 물질의 주된 골격을 이루며 또한 이들 물질의 분해를 어렵게 하는 방향족 화합물의 분해대사에 대하여 조사하고자, 자연계에서 분리한 균주로부터 특성의 방향족 화합물, salicylate의 분해능을 검출하여 그 분해능이 높은 균주를 선별하였으며, 이러한 분해능을 나타내는 생리학적 측면의 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용한 균주와 배지

균주의 동정을 위하여 표준균주로 *Pseudo-*

*본 연구는 1985년도 문교부 유전공학학술연구조성비에 의해 연구된 것임.

monas aeruginosa ATCC 27853과 본 실험실에서 분리동정된 *P. fluorescens* O와 *P. testosteroni* S (Hah 등, 1983)를 비교·확인을 위하여 사용하였다. 이들은 모두 salicylate를 유일한 탄소원으로 하여 자라지 못하였으며, 특정한 영양요구성을 나타내지 않는 야생형이었다.

사용한 최소배지의 조성은 다음과 같다.

NH₄Cl 2.0 g, K₂HPO₄ 4.35 g, NaH₂PO₄ 3.75 g, MgSO₄·7H₂O 0.48 g, CaCl₂·2H₂O 0.03 g, MnCl₂·4H₂O 0.01 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, CoCl₂·6H₂O 0.001 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.001g/L (pH 7.0). 탄소원으로는 Na-salicylate나 glucose를 0.1%로, 필요한 경우는 적정의 농도로, 따로 만들어 0.45 μm 막여과지를 사용하여 여과멸균하여 첨가하였다.

완전배지로는 Luria배지 (Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 5g, Glucose 2g/L, pH 7.0)를 사용하였다. 고체배지는 최소배지 혹은 완전배지에 한천을 1.5%로 첨가하여 사용하였다.

균주의 분리방법

학교주변으로부터 토양과 하천수를 채취하였다. Salicylate 분해균주는 채취된 시료로, 부터 선택적인 농화배양법 (selective enrichment technique)에 의하여 salicylate 최소배지에서 3회 옮겨 길러, 적절히 희석하여 고체최소배지에 도말·배양 후 나타난 colony를 구분하여 순수분리하였다 (Aaronson, 1970).

균주의 동정 방법

균주의 동정은 Gram staining, OF test, oxidase test로 일차 분류한 후, 수정된 Pickett의 scheme (Koneman 등, 1979)과 rapid multi-test system인 API 20E Kit를 이용하여 동정하였다 (Robertson과 MacLowery, 1974). 일단 동정된 균주는 'The Prokaryotes' (Starr 등, 1981), 'Bergey's manual of systematic bacteriology' (Krieg와 Holt, 1984)를 참고로 하여 몇가지 실험을 추가로 시행하여 확인하였다.

균주의 최적 생장조건의 조사

균주의 생장최적조건은 pH (pH 5 - pH 9)와 온도 (20°C - 40°C), 탄소원의 농도 (1, 3, 6, 10 - 60 mM)에 대하여 salicylate 최소배지에서의

생장속도를 측정하여 조사하였다.

생장속도는 적정의 배지에 대수기의 세포를 접종하여 정체기에 들어갈 때까지 매시간 탁도를 측정하여 생장곡선을 구한 뒤, 대수기 동안의 균체량의 증가를 단위시간에 대하여 계산하였다 (Sands 등, 1970).

Salicylate의 분해능의 측정

Salicylate 최소배지에서 균주를 키우면서 적절한 시간 간격으로 시료를 채취하여, 원심분리한 배양여액을 0.45 μm의 막여과지로 여과하여 UV-VIS Scanning spectrophotometer (LKB, Ultrospec 4050)로 흡광도의 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

Salicylate를 유일한 탄소원으로 이용하여 자랄 수 있는 균주를 토양에서 4종, 하천수에서

Table 1. Characterization of the isolates with Pickett scheme.

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Diameter of colonies (mm); 1-2	2	2	2	2	2	2	2	2
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey medium, growth	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation/Fermentation	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxidase	-	-	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
MN medium ;								
Motility	-	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate-reduction	-	-	-	-	-	-	-	-
FLN medium ;								
Fluorescence	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose utilization	+	-	-	-	-	-	-	-
Denitrification	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	-	-	-	-	-	-	-
Acetamide	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	+	-	+	+	+	-
Gluconate	-	+	+	-	+	-	+	-
Maltose	+	-	-	-	-	-	-	-
Tartrate	-	+	-	+	-	+	+	-

Table 2. Identification of the selected strains with API 20E kit.

	B1	B2	B3
β -Galactosidase	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate utilization	-	+	+
H ₂ S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
Indole	-	-	-
VP reaction	-	-	-
Celatinase	-	-	-
Glucose utilization	+	+	+
Mannitol utilization	-	-	-
Inositol utilization	-	-	-
Sorbitol utilization	-	-	-
Rhamnose utilization	-	-	-
Saccharose utilization	-	-	-
Melibiose utilization	+	+	+
Amygdalin utilization	-	-	-
Arabinose utilization	+	-	-
Oxidase utilization	-	+	+

4 종을 분리하여 각각을 B1-B8로 명명하였다. 분리된 균주는 모두 Gram - negative의 짧은 간균 (bacilli) 이었고, glucose를 oxidative 하게 이용하였다. 이들을 수정된 Pickett scheme (Koneman 등, 1979)의 nonfermentative Gram-negative bacilli의 동정체계에 따라 분류한 결과(Table 1), B1을 제외한 7종의 균주의 특성이 거의 유사하였다. 즉, B2-B8의 7종의 균주는 oxidase positive, fluorescent pigment 생성의 성질을 갖는 fluorescent group으로 *Pseudomonas* 속으로 분류되며, B1은 oxidase negative group으로 motility를 갖지 않는 성질과 lactose를 이용할 수 있는 성질로부터 *Acinetobacter* 속으로 분류되었다(Table 1).

이들 8종의 균주중 실험의 편의상 특이한 성질을 갖는 B1과 salicylate 최소배지에서의 생

Table 3. Differentiation of the *Pseudomonas fluorescens* group with standard strains.

Tests	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. fluorescens</i> 0	B2	B3
42°C growth	+	--	-	-
Acetamide	+	--	-	-
Lecithinase	-	+	-	-
6.5% NaCl	-	--	-	-

장이 좋은 B2와 B3를 선택하여, API 20E Kit로 동정하였다(Table 2). 그 결과 3 균주는 모두 API index에서 뚜렷한 성질을 갖는 균으로 판명되었다. B1은 glucose와 lactose 이용능(Table 1)으로부터 *Acinetobacter calcoeticus* (AcB1)로, B2와 B3는 arginine dihydrolase positive, citrate utilization, oxidase positive의 성질로 *Pseudomonas fluorescent* group으로 분류되어, *P. aeruginosa* ATCC

Table 4. Characterization of biotypes within *Pseudomonas putida*.

	B2	B3
Flagella number	1	1
Fluorescent pigment: Pyocyanin	-	-
Pyoverdin	+	+
Chlororaphin	-	-
Levan from sucrose	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Lecithinase (egg yolk)	-	-
Lipase (Tween 80 hydrolysis)	-	-
Growth at 4°C	+	+
Utilization of		
Acetate, Pyruvate, Succinate		
p-Hydroxybenzoate, Nicotinate		
L-Alanine, L-Glutamate, L-Proline	+	+
L-Phenylalanine, L-Tyrosine		
Adonitol, Cellobiose, Trehalose		
Maleate, D-Mandelate, Phthalate	-	-
Naphthalene, Phenol, L-Threonine		
D-Galactose, L-Tryptophan		
Anthranilate	+	-
m-Toluate, Vanillin, Xylene		
p-Aminobenzoate, Furoic acid	-	+

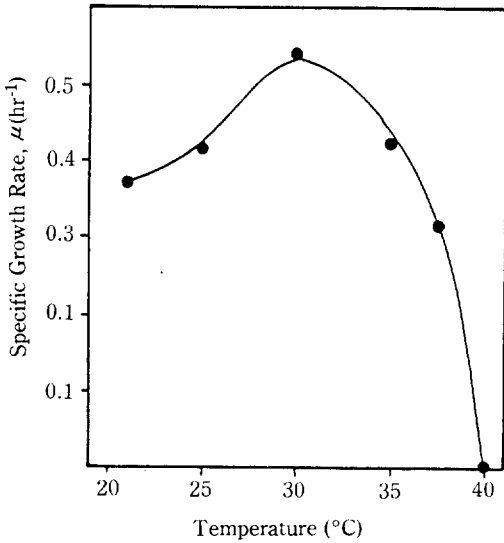


Fig. 1. Specific growth rate of PpB3 according to growth temperature.

27853과 *P. fluorescens* 0와 함께 4 가지의 추가실험을 실시한 결과 두 비교균주와는 뚜렷이 다른 성질을 나타내어 (Table 3) *P. putida* (PpB2, PpB3)로 동정되었다.

동정된 균주 중 B2와 B3를 'Bergey's manual of systematic bacteriology' (Krieg와 Holt, 1984)와 'The Prokaryotes' (Starr 등,

1981)의 *Pseudomonas* 속 부분을 참조하여, 몇 가지 추가실험을 행한 결과 (Table 4), B2는 anthranilate, D-galactose, L-tryptophan을 이용하여 자랄 수 있으므로 biotype B임을, B3는 위의 물질을 이용하여 자라지 못하므로 biotype A임을 확인할 수 있었다.

최적성장 조건

동정된 3 균주는 salicylate 액체최소배지에서 생장이 각기 달랐는데, AcB1은 잠복기가 매우 길어 36시간정도였고, 60시간만에 정체기로 들어갔으며, PpB2와 PpB3는 12-18시간에 정체기로 들어갔다. 이중 PpB3가 그 성장속도와 최종균체량에서 PpB2에 비하여 우수하여 이를 최종선택하였다.

선택된 균주인 PpB3가 salicylate를 유일한 탄소원으로 이용하여 자랄 때의 성장최적온도는 30°C (Fig. 1), 최적 pH는 7.0 (Fig. 2) 이었고, 최적의 탄소원 농도는 10 mM이었다 (Fig. 3). 온도와 pH에 따른 생장의 경우, 최적 조건에서 최종균체량이 최대였으며, 균체의 성장속도도 가장 빨라 12시간만에 정체기로 들어갔다. 탄소원의 농도에 대해서는, 탄소원의 농도가 증가함에 따라 최종균체량도 따라서 증가되었으나 6 mM 이하에서는 이용할 수 있는 탄소원

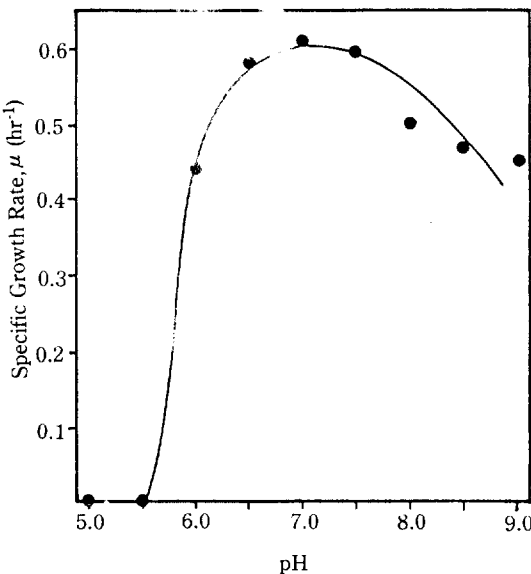


Fig. 2. Specific growth rate of PpB3 according to growth pH.

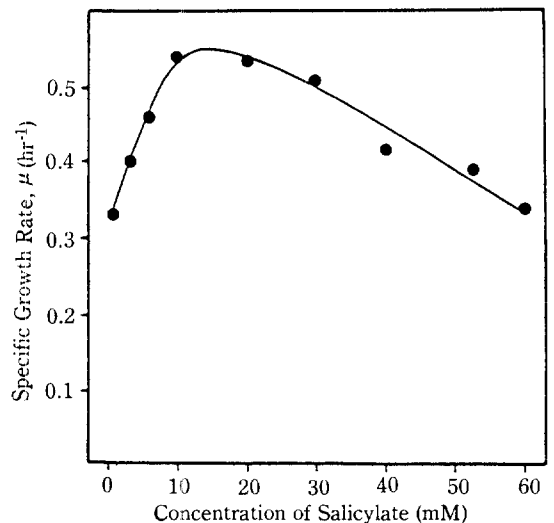


Fig. 3. Specific growth rate of PpB3 according to the concentration of salicylate

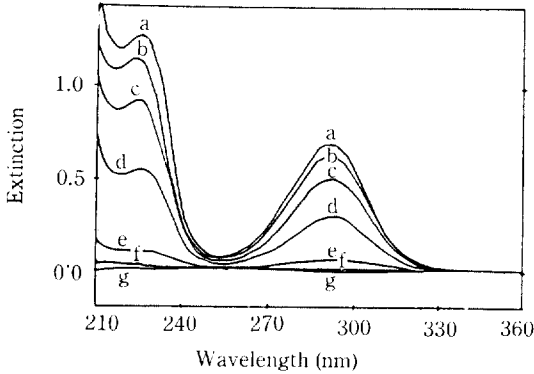


Fig. 4. Ultraviolet scanning spectra of the culture filtrates.

a; 0hr, b; 6hr, c; 9hr, d; 12hr, e; 15hr, f; 18hr, g; 24hr.

의 부족으로 12시간 이내에 정체기로 들어갔으며, 30mM 이상에서는 과다한 탄소원으로 인하여 잠복기가 길어지고 성장속도가 감소되었으며, 50mM 이상에서는 24시간 이후에도 생장이 계속되어 차후의 실험에 불리할 것으로 판단되었다. 따라서, salicylate가 탄소원으로 이용될 때의 최적 농도는 성장속도가 가장 빠른 10mM로 결정하였다.

Salicylate의 분해

Salicylate를 10mM로 함유하고 있는 최소액체배지를, 증류수를 대조구로 하여 210~360nm 범위에서의 extinction을 조사한 결과, 225nm와 292nm에서 2개의 peak를 나타내었다 (Fig. 4). 이들 peak는 benzene ring 구조에 의한 292nm에서의 peak와 carbonyl group에 의한 225nm에서의 peak로 생각되는데, salicylate가 분해된다면 2개의 peak가 모두 감소될 것이며, 이중에서도 carbonyl group에 의한 225nm에서의 peak가 더 빠른 속도로 감소

할 것이다.

Salicylate를 10mM 함유하고 있는 최소액체배지에서 PpB3를 기르며, 채취한 시료의 여액을 증류수를 대조구로 하여 extinction을 조사한 결과 Fig. 4)는 예상대로 225nm, 292nm의 두 peak가 모두 감소함을 보여주고 있으며, 15시간 이후에는 두 peak가 모두 나타나지 않아 salicylate가 완전 소모되었음을 알 수 있었다. 한편, 이 결과는 PpB3의 성장곡선과도 일치하는 것으로, 12시간 이후는 정체기로 외형상 세포의 증가가 관찰되지 않는 현상이 이용할 수 있는 탄소원의 고갈때문으로, PpB3에 의하여 salicylate가 완전분해됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 선택된 균주인 *P. putida* B3가 salicylate를 유일한 탄소원으로 하여 자랄 수 있으며, 또한 salicylate가 이 균주에 의하여 완전분해됨을 확인하였다.

한편, PpB3는 Table 4에서 모두가 salicylate와 유사한 구조를 갖는 p-hydroxybenzoate, m-toluate, vanillin, xylene 등도 이용할 수 있으며 heterocyclic ring 구조를 갖는 nicotinate, furoic acid 등도 이용할 수 있어 매우 다양한 분해능을 가지고 있음을 알 수 있다. 특히 최근의 Chakrabarty(1972), Williams와 Murray(1974), Thacker 등(1978), Salkinoja-Salonen 등(1979)이 salicylate, m-toluate, nicotinate, vanillin의 분해가 plasmid에 의해서 이루어진다고 한 보고는 본 연구의 선택균주인 PpB3의 salicylate 및 m-toluate, nicotinate, vanillin 등의 분해능이 plasmid 상에 존재할 수도 있음을 시사해 주고 있다.

적 요

Salicylate를 유일한 탄소원으로 이용할 수 있는 균을 토양과 하천수에서 8종 분리하였으며, 이중 3종을 선택하여 *Acinetobacter calcoaceticus* (AcB1), *Pseudomonas putida* biotype B (PpB2), *P. putida* biotype A (PpB3)로 동정하였다. PpB3의 salicylate 최소배지에서의 성장최적조건은 온도 30°C, pH 7.0, 탄소원의 농도 10mM이었다. 한편, salicylate scanning spectrum을 조사하여, 225nm, 292nm의 두 peak가 PpB3의 성장과 함께 감소됨으로써 salicylate가 완전분해됨을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Aaronson, S. 1970. Experimental microbial ecology. pp. 65-227. Academic Press. London.
2. Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **112**: 815-823.
3. Franklin, F.C.H., M. Bagdasarian, and K.N. Timmis. 1981. Manipulation of degradative genes of soil bacteria. In: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. pp. 109-130. ed. by Leisinger T., R. Hütter, A.M. Cook, and J. Nüesch. Academic Press. London.
4. Hah, Y.C., S.W. Hong, and H.E. Han. 1983. The degradation of pigment-producing furfural in aquatic waste. *Kor. J. Microbiol.* **21**: 207-212.
5. Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, Jr., and H.M. Sommers. 1979. Diagnostic microbiology. pp. 111-155. J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
6. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. I. pp. 140-199. Williams and Wilkins. Baltimore.
7. Robertson, E.A. and J.D. MacLowery. 1974. Jr., and H.M. Sommers. 1979. Diagnostic Mathematical analysis of the API Enteric-20 profile register using a computer diagnostic model. *Appl. Microbiol.* **28**: 691-695.
8. Salkinoja-Salonen, M.S., E. Väisänen, and A. Paterson. 1979. Involvement of plasmids in the bacterial degradation of lignin derived compounds. In: Plasmids of medical, environmental and commercial importance. pp. 301-314. ed. by Timmis, K.N. and A. Pühler. Elsevier/North-Holland biomedical Press. Amsterdam.
9. Sands, D.C., M.N. Schroth, and D.C. Hildebrand. 1970. Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. *J. Bacteriol.* **101**: 9-23.
10. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel. 1981. The prokaryotes. vol. I. pp. 655-741. Springer-Verlage, Berlin.
11. Thacker, R., O. Rørvig, P. Kahlon, and I.C. Gunsalus. 1978. NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*. *J. Bacteriol.* **135**: 289-290.
12. Williams, P.A. and K. Murray. 1974. Metabolism of benzoate and methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**: 416-423.

(Received Jan. 15, 1986)