

## Aromatic hydrocarbon 분해세균의 검출과 그 plasmid 유전자의 특성

김치경 · 김종우 · 김영창 · 민태익\*

충북대 자연대 미생물학과 · \*한국과학기술원

## Isolation of Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria and Genetic Characterization of Their Plasmid Genes.

Kim, Chi-Kyung, Jong-Woo Kim, Young-Chang Kim, and Tae-Ick Mheen\*

Department of microbiology, College of Natural Science, Chungbuk National University, and Korea Advanced Institute of Science and Technology\*

Aromatic hydrocarbon degrading bacteria were isolated from industrial waste by using an agar plate method. The isolate DY-1 was identified as *Acinetobacter* sp. and found to utilize phenanthrene as its sole carbon source. The bacteria were proved to produce salicylic acid as an intermediate from phenanthrene through naphthalene pathway, when the products in the culture were examined by thin-layer chromatography. The  $Phn^+$  genes were found to be involved in two plasmids of about 4 and 40 kb which were lost and not detected in the DNA samples prepared from the mitomycin C-cured cells by a gel electrophoretic analysis.

현대사회가 고도로 공업화 되어감에 따라 산업공해 화학물질에 의한 자연계의 오염은 극도로 심각해지고 있다(1). 유기합성 공업과정에서 생산되는 여러가지 오염화학 물질로 aromatic hydrocarbon 들과 chlorinated hydrocarbon 들은 물리화학적으로 난분해성 물질일 뿐만 아니라 암유발원 및 mutagen으로도 작용할 수 있는 특성 때문에 그 동안 많은 환경학적 관심을 끌어들였다. 우리나라 현실에서도 이러한 물질들은 공장폐수에 다량 내포되어 있고 농약으로 이용되어 자연계에 축적되는 양이 점차 증가될 것으로 사료되어 이들 오염물질의 효율적인 처리방법이 절실히 요구된다. 그중 대표적인 것들로는 mono-또는 polycyclic aromatic hydrocarbon과 chlorinated hydrocarbon들로

서 이러한 물질들은 물리화학적인 분해도 가능하지만 그것은 부분적인 분해일 뿐 완전한 분해가 불가능하다. 그러나 이러한 난분해성 물질들을 탄소 및 에너지원으로 이용하는 미생물에 의해서는 완전히 분해되어 mineralization 시킬 수 있다는 점에서 중요성이 있다.

미생물에 의한 aromatic hydrocarbon의 분해과정에 대해서는 toluene, xylene, anthracene, phenanthrene 등이 연구되어 salicylate와 catechol을 거쳐 ortho-또는 meta-fission pathway에 의하여 분해되는 과정이 Doelle (1981)에 의하여 밝혀졌다. 근래에 와서는 aromatic hydrocarbon 분해세균을 고체배지 상에서 분리해내는 방법이 Kiyohara 등(1975)과 Sylvestre (1980) 등에 의해 개발되어 hydrocar-

\*이 논문은 한국학술진흥재단의 1984년도 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

bon 분해세균에 대한 유전학적 연구가 시도됨으로서 toluene, xylene, naphthalene, 2, 4, 5-T (Kellog 등 1981, Kilbane 등 1982) 등의 분해 유전자가 plasmid에 존재하고 있음이 밝혀졌다.

본 연구에서는 상기의 필요성에 따라 phenanthrene, naphthalene, anthracene 및 chlorobiphenyl 등의 hydrocarbon을 분해하는 세균을 공장폐수로부터 분리 검정하였으며 그중 phenanthrene 분해균주의 분해특징과 함께 그 분해 유전자가 plasmid에 존재하고 있음을 연구하였다.

## 실험재료 및 방법

### Aromatic hydrocarbon 분해세균의 분리 및 동정

청주 및 대전지역의 공장폐수로부터 Kiyohara 등(1982)과 Sylvestre(1980)의 방법을 병용하여 aromatic hydrocarbon 분해세균을 분리했다. 供試 hydrocarbon이 포함된 minimal broth medium에 시료를 접종하여 30°C에서 72시간 배양하여 이 배양액을 minimal solid medium에 다시 접종한후 시험하려는 hydrocarbon을 ether에 용해시킨 ethereal solution을 살포하면 ether는 증발되고 plate는 백색 불투명한 hydrocarbon film으로 덮인다. 이 plate를 30°C에서 colony가 나타날 때까지 배양한 후 colony 주위에 hydrocarbon이 분해되어 clear zone이 나타나는 것을 분해균주로 분리 선발하였다. 분해검정에 사용한 aromatic hydrocarbon은 phenanthrene, anthracene, naphthalene 등이고 chlorinated compound로는 4-chlorobiphenyl과 2, 4, 5-Trichlorophenoxy acetic acid 등이 사용되었다.

분리선발된 균주는 형태학 및 생화학적 특성을 검사하여 Bergey's Manual에 따라 동정하였다.

### 배지 및 균주의 증식

Phenanthrene 분해균주의 증식에 사용한 배지는 MM2 배지로서(Kiyohara 등(1982)) 그 조성은 1,000 ml의 10 mM phosphate buffer 에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 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 mM과 NaCl, 8.5 mM이었고 고체배지의 경우 agar의 농도는 1.5%였다. 또한 chlorinated biphenyl 분해균주의 증식에 사용한 배지는 Minimal basal medium No. 30 (16)으로 그 조성은 증류수 1,000 ml당  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g;  $\text{NaNO}_3$ , 1 g;  $\text{CaCO}_3$ , 5 g;  $\text{MgSO}_4$ , 0.05 g;  $\text{MnSO}_4$ , 0.05 g;  $\text{FeSO}_4$ , 0.025 g이었다. 배양온도는 30°C였고 증식은 agitation 및 aeration 기능을 갖춘 Multigen fermenter(New Brunswick Scientific Co.)에서 72시간 동안 배양하였다.

### Aromatic hydrocarbon의 분해검정

Kiyohara 등(1982)의 방법에 따라 aromatic hydrocarbon film으로 덮인 MM2 agar plate에 나타나는 colony의 주위에 형성되는 clear zone을 확인함으로써 시험 hydrocarbon을 sole carbon source로 이용하는 균주를 검정하였다. 또 phenanthrene의 분해과정을 검정하기 위하여 phenanthrene이 포함된(2 mg/ml) MM2 broth medium에 균주를 접종하여 30°C에서 배양하는 동안 일정시간별로 spent medium을 채취하여 여과농축후 redistilled methanol로 재추출 농축하여 petroleum ether, benzene, acetone, acetic acid(80:20:10:4 v/v)을 electric solvent로 사용하여 aluminium plate에서 thin-layer chromatography 방법으로 분해산물의 생성을 검사하였다.

### Plasmid DNA의 분리

Aromatic hydrocarbon 분해세균으로부터 plasmid DNA를 분리하기 위하여 Hansen(1978) 등의 lysozyme-SDS 방법에 따라 세균을 lysis 시킨뒤 pH 12.1~12.3에서 alkaline denaturation 하고 2M Tris(pH 7.0)로 neutralize 하였다. SDS를 4% 그리고 NaCl을 1.0M로 첨가하여 membrane-chromosome complex를 제거한후 3M sodium acetate와 ethanol을 첨가 냉장시킨후 원심분리하여 순수분리된 plasmid DNA를 농축하였다.

### Plasmid의 curing

Aromatic hydrocarbon 중 phenanthrene의 분해균주(*Acinetobacter* sp.)에 대하여 그 분해

유전자가 plasmid에 존재하는지를 Reinwald 등 (1973)의 방법을 이용하여 확인하였다. LB broth에 mitomycin C (5~40  $\mu\text{g/ml}$ )를 첨가하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양한 후 생존한 cell들을 phenanthrene이 살포된 MM2 plate에 접종하여 배양했을때 분해능을 상실하여 clear zone이 나타나지 않는 colony를 cured cell로 선발하였다. 선발된 cured cell들은 상기의 "plasmid DNA의 분리"의 방법에 따라 DNA를 추출하여 전기영동법으로 분석함으로써 plasmid의 curing 여부를 재확인하였다.

### 전기영동

순수분리된 plasmid DNA의 전기영동은 0.7% agarose의 horizontal slab gel을 이용하였다. Buffer system은 Maniatis (13)등의 TBE (0.089M Tris-borate; 0.089M boric acid; 0.02M EDTA)를 이용하였고 70 mA, 60V에서 3시간 동안 전개시킨후 UV-transilluminator 하에서 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### Aromatic hydrocarbon 분해균주의 선발 및 동정

Aromatic hydrocarbon을 탄소원으로 이용하는 세균을 청주 및 대전지역의 공장폐수로부터 분리하여 phenanthrene, naphthalene, anthracene, 4-chlorobiphenyl, 그리고 2, 4, 5-Tri-

chlorophenoxy acetic acid 등에 대한 분해성을 시험한 결과는 Table 1과 같다.

Phenanthrene을 분해하는 DY-1과 anthracene을 분해하는 SN-1은 공히 naphthalene을 분해하였으며 4-chlorobiphenyl은 분해하지 못했다. 그 반면 FP-6는 4-chlorobiphenyl 만을 분해했으며 phenanthrene, naphthalene, anthracene에 대한 분해능은 나타나지 않았다. 분리검출된 세균중 phenanthrene의 분해과정과 그 분해유전자의 특징을 규명하기 위하여 phenanthrene을 분해하는 DY-1 isolate의 형태 및 생화학적 특징을 조사한 결과는 Table 2와 같았으며 Bergey's Manual에 따라 DY-1은 *Acinetobacter* sp.로 속명이 동정되었다.

Kiyohara 등 (1982)과 Sylvestre (1980)의 agar plate 방법은 MM2 agar plate에 탄소원으로 첨가한 hydrocarbon의 film이 분해되어 Fig. 1에서와 같이 colony의 주위에 clear zone을 형성토록 하는 것이다. 그러므로 이 방법에 따라 자연계로부터 hydrocarbon 분해균주를 매우 신속하고 간편하게 선발할 수 있었다. 특히 phenanthrene을 분해하는 wild type (phn<sup>+</sup>)으로부터 분해유전자를 상실한 cured cell (phn<sup>-</sup>)의 단일 clone을 분리해낼 수 있으므로 이 방법은 hydrocarbon 분해세균의 유전학적 연구를 효과적으로 수행할 수 있는 매우 유용한 techni-

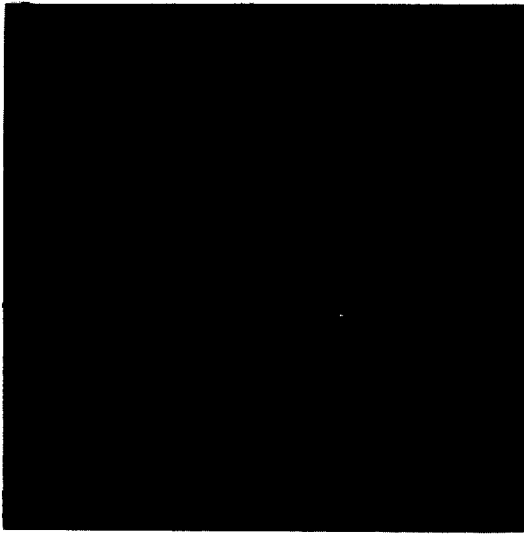
**Table 1.** Degradation of hydrocarbons by bacterial isolates.

Isolates	Sources	Degradation of hydrocarbons tested			
		Phn	Naph	Anth	4-CB
DY-1	Industrial waste water	+	+	-	-
SN-1	Industrial waste water	-	+	+	-
FP-6	Industrial waste water	-	-	-	+

Symbols : Phn, phenanthrene; Naph, naphthalene; Anth, anthracene; 4-CB, 4-chlorobiphenyl; +, growth and degradation with clear zone; -, no growth.

**Table 2.** Morphological and biochemical characteristics of the isolate DY-1.

Parameter	Result
Gram reaction	Negative
Shape	Rod to coccobacillus
Oxygen requirement	Strict aerobic
Optimum temperature	30°C
Optimum pH	7.0
Oxidase	Negative
Catalase	Positive
Motility	Negative
Penicillin	Resistant
Indole	Negative
H <sub>2</sub> S	Negative



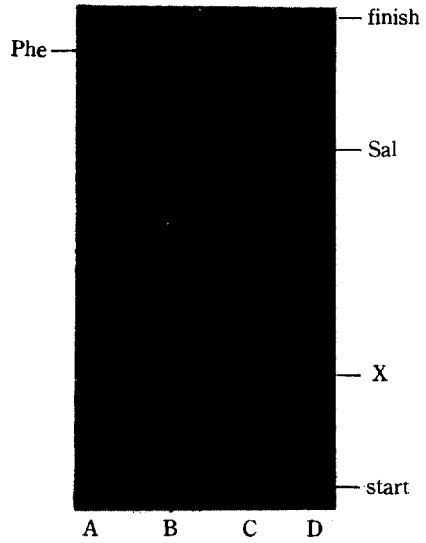
**Fig. 1.** Degradation of phenanthrene by the bacterial isolate DY-1 (*Acinetobacter* sp.) on an MM2 agar plate. Clear zones around the colonies indicate biodegradation of phenanthrene film on the plate. The colonies shown by arrow were cured cells.

que 임이 입증되었다.

**Aromatic hydrocarbon 분해성의 검정**

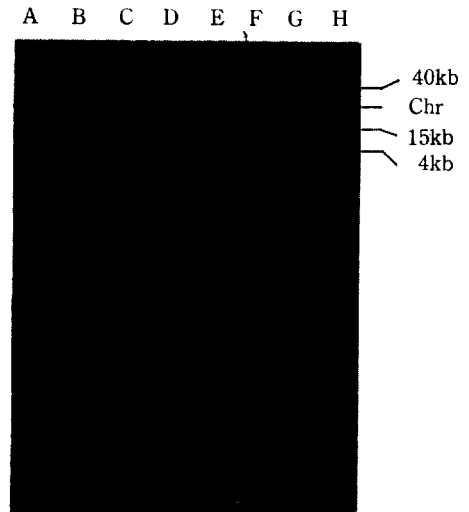
Aromatic hydrocarbon에 대한 각 균주의 분해성은 Fig. 1에서와 같이 agar plate에서 clear zone의 형성방법으로 검정할 수 있었다. Phenanthrene 분해균주로 분리검정된 DY-1은 그 분해능의 안정성을 검사하기 위하여 LB media에서 수세대 계대배양한 후 MM2 agar plate에서 phenanthrene film에 대한 분해능을 검토한 결과 검사세균의 86% 이상이 분해능을 그대로 보유한 것으로 보아 그 분해능이 안정한 것으로 평가하였다.

또 phenanthrene을 함유한 MM2 broth media에서 DY-1 isolate의 분해성을 thin-layer chromatography 방법으로 검정한 결과는 Fig. 2와 같다. Lane A와 B는 대조확인 물질로 사용한 phenanthrene과 salicylic acid이며 lane C와 D는 48시간과 80시간 배양한 후 그 배양액을 검사한 것이다. 48시간 배양결과 phenanthrene이 분해되어 salicylic acid가 생성됨을 확인할 수 있었으며 80시간 후에는 제2의 분해산물(X)이 검출되었다. 이 X 물질에 대해서는

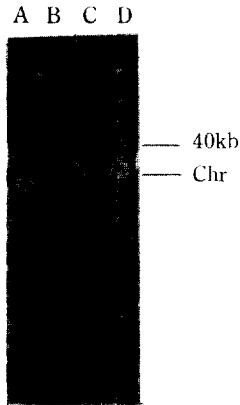


**Fig. 2.** Thin-layer chromatograph of products degraded from phenanthrene by the isolate DY-1 (*Acinetobacter* sp.). Lane A, phenanthrene; B, salicylic acid; C, spent medium incubated for 48h; D, spent medium incubated for 80h. Symbols: Phe, phenanthrene; Sal, salicylic acid; X, unidentified product from phenanthrene.

아직 확인되지 않았으며 phenanthrene 으로부터 salicylate가 생성되었던 것은 Doelle (1981), Evans 등(1965) 등의 보고에서도 지적된 바와



**Fig. 3.** Agarose gel electrophoretogram of *Phn*<sup>+</sup> plasmid DNA purified from DY-1 isolate. Lane A and B, *E. coli* plasmids of v 517 and pBR322, respectively; C and D, DY-1 wild type (*Phn*<sup>+</sup>); E and F, DY-1 cured cell (*Phn*<sup>-</sup>); G and H, FP-6.



**Fig. 4.** The 40 kb plasmid of the isolate DY-1 ( $Phn^+$ ). When the agarose gel of the Fig. 3 was run for an extended period of 30 hours, the 40 kb plasmid of DY-1 was clearly separated from the chromosomal DNA. Lane A, *E. coli* plasmid of v 517; B and D wild type of DY-1 ( $Phn^+$ ); C, cured cell of DY-1 ( $Phn^-$ ).

같은 결과였다.

본 연구에서 사용한 DY-1 isolate는 phenanthrene과 naphthalene을 함께 분해하고 그 결과 salicylate가 생성되는 것으로 보아 1,2-dihydroxy naphthalene을 거치는 naphthalene pathway를 통하여 phenanthrene을 분해하는 것으로 해석되며, X물질의 검정과 함께 분해과정을 밝히기 위한 연구가 현재 진행중에 있다.

#### Phenanthrene 분해유전자와 plasmid와의 연관성

Phenanthrene을 분해하는 DY-1 wild type은 Fig. 1에서와 같이 phenanthrene을 살포한 MM2 plate에서 clear zone을 형성하는데 비하여 그 cured cell( $phn^-$ )은 clear zone을 형성

하지 못했다. Phenanthrene 분해유전자가 plasmid에 존재하는지를 확인하기 위하여  $phn^+$  wild type과  $phn^-$  cured cell의 DNA를 순수 분리하여 전기영동한 결과는 Fig. 3, 4와 같다. Lane C와 D의 wild type에서 나타난 plasmid DNA가  $phn^-$  cured cell (lane E와 F)에서는 나타나지 않는 것으로 보아 phenanthrene 분해유전자가 plasmid에 존재하고 있음을 재확인하였다.

Plasmid의 크기를 비교하기 위하여 size marker로 사용한 *E. coli* V517의 plasmid (lane A)와 pBR322 (lane B)를  $Phn^+$  plasmid와 비교해 볼때 (Fig. 3),  $Phn^-$  plasmid는 각각 4kb와 40kb 이상되는 큰 크기의 plasmid임을 알 수 있었다. 40kb의 plasmid를 확인하기 위하여 전기영동을 낮은 전압에서 30시간 동안 연장하여 전개시킨 결과 Fig. 4에서와 같이 약 40kb의 plasmid가 chromosomal DNA로부터 뚜렷하게 분리되었다. Aromatic hydrocarbon의 분해유전자와 plasmid DNA와의 연관성은 *Pseudomonas putida*에서 naphthalene [Dunn과 Gunsalus(1973)], *Pseudomonas* sp.에서 xylene [Davey 등 (1974), Friello 등 (1976)], toluene [Nakazawa 등 (1978), Williams 등 (1976)] 등이 보고되어 있으며 본 연구에 이용된 DY-1 isolate (*Acinetobacter* sp.)도 phenanthrene 분해유전자가 plasmid에 존재하고 있음이 확인되었다. 또한 DY-1 isolate에 존재하는 두 plasmid가 각각 어떤 양상으로 분해과정에 관계하는지의 문제와 각 plasmid의 restriction enzyme에 대한 fragment들의 특성 등에 관한 연구가 진행중에 있다.

#### 적 요

Agar plate를 사용하는 새로운 방법으로 aromatic hydrocarbon을 분해하는 세균을 공장폐수로부터 분리하였으며 이 방법은 hydrocarbon 분해균주의 분자생물학적, 유전학적 연구에 매우 유용한 방법임이 입증되었다. phenanthrene과 naphthalene을 단일 탄소원으로 이용하는 DY-1 isolate는 *Acinetobacter* sp.로 동정되었으며 이 균주는 phenanthrene을 분해하여 naphthalene pathway를 거쳐 salicylic acid를 생성한다는 것이 분해산물을 thin-layer chromatography 방법으로 확인검정 함으로서 입증되었다. DY-1 wild type의  $Phn^+$  plasmid와 mitomycin C로 처리하여 얻은  $Phn^-$  cured cell의 DNA를 추출하여 agarose gel electrophoresis 방법으로 비교분석한 결과 wild type에서 존재하던 4kb와 40kb의 plasmid가 cured cell에서는 상실되었다. 이는 phenanthrene이 이들 plasmid에 존재하는 유전자에 의하여 분해된다는 것을 의미하는 것이다.

## REFERENCES

1. Aaronson, s; 1970. Experimental microbial ecology, p. 91-92. Academic Press, Inc., New York.
2. Davey, J. F., and D. T. Gibson. 1974. Bacterial metabolism of para- and meta-xylene; oxidation of a methyl substituent. J. Bacteriol. **119**; 923-929.
3. Doelle, H. W. 1981. Basic metabolic process, p. 113-210. In H. J. Rhem and G. Reed (ed.), Biotechnology, vol. 1. Verlag Chemie, Weinheim.
4. Dunn, N. W., and I. C. Gunsalus. 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **114**; 974-979.
5. Friello, D. A., J. R. Myroie, D. T. Gibson, J. E. Rogers and A. M. Chakrabarty. 1976. XYL, a nonconjugative xylene degradative plasmid in *Pseudomonas* sp. J. Bacteriol. **127**; 1217-1224.
6. Furukawa, K., F. Matsumura, and K. Tonomura. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. Agr. Biol. Chem. **42**; 543-548.
7. Furukawa, K., and A. M. Chakrabarty. 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. **44**; 619-626.
8. Hansen, J. B. and R. H. Olsen. 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the p 2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. J. Bacteriol. **135**; 227-238.
9. Kellogg, S. T., D. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty. 1981. Plasmid assisted molecular breeding new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. Science. **214**; 1133-1135.
10. Kilbane, J. J., D. K. Chatterjee, J. S. Karns, S. T. Kellogg, and A. M. Chakrabarty. 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxy-acetic acid by a pur culture of *Pseudomonas cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. **44**; 72-78.
11. Kiyohara, H., K. Nagao, and R. Sakanami. 1975. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. Agr. Biol. Chem. **40**; 1075-1082.
12. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solidhydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. **43**; 454-457.
13. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Agarose gel electrophoresis. P. 156-161. In Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
14. Nakazawa, T., E. Hayashi, T. Yokota, Y. Ebina, and A. Nakazawa. 1978. Isolation of TOL and RP4 recombinants by interactive suppression. J. Bacteriol. **134**; 270-277.
15. Rheinwald, J. G., A. M. Chakrabarty, and I. C. Gunsalus. 1973. A transmissible plasmid controlling camphor degradation in *Pseudomonas Putida*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **70**; 885-889.
16. Sylvestre, M. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on p-chlorobiphenyl. Appl. Environ. Microbiol. **39**; 1223-1224.
17. Williams, P. A., and M. J. Worsey. 1976. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. J. Bacteriol. **125**; 818-828.
18. Evans, W. C., H. N. Fernley, and E. Griffiths. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonas*. J. biochem. **95**; 819-831.

(Received Jan. 31, 1986)