

Sodium dodecylbenzenesulfonate(soft type)를 분해하는 미생물의 분리 및 특성

전홍기 · 안영희 · 백형석
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and characterization of sodium dodecylbenzenesulfonate(soft type)-degrading bacteria

Jun, Hong-Ki, Yeong-Hee Ahn and Hyung Suk Baik

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University,
Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT : Microorganisms capable of utilizing sodium dodecylbenzenesulfonate(SDBS, soft type) as a sole carbon source were isolated from nature by using SDBS agar plate technique. Isolated bacteria were examined primarily for biodegradation ability of SDBS, and followed by testing for resistance to several kinds of metal compounds and antibiotics. Among them(152 strains), one strain showed a excellent SDBS-degrading ability with a resistance to ampicillin and rifampicin was selected. This bacterium was identified as *Klebsiella* sp. and harbored two plasmids of about 4 and 5 kilobases. SDBS-degrading ability was lost when the plasmids were cured by mitomycin C. It was revealed that the degradation of SDBS was controlled by the plasmid DNA encoding genes. The two plasmids were stably maintained in *Escherichia coli* C600.

KEY WORDS □ Sodium dodecylbenzenesulfonate(SDBS), Biodegradation, *Klebsiella* sp., plasmid.

합성세제는 1930년 독일에서 합성된 이래 여러 가지 장점때문에 오늘날까지 많이 사용되고 있다(Swisher, 1970). 그러나 합성세제는 거품을 형성하여 폐수처리를 방해하고(Cain, 1977), 피부손상을 일으키는 등의 단점도 가지고 있다. 세척용으로 사용되는 합성세제는 음이온계 세제이며 초기에는 주로 alkylbenzenesulfonates(ABS)가 사용되었으나 1965년 이후에는 linear alkybenzenesulfonates(LAS)가 사용되고 있는데 그 이유는 LAS가 생물학적으로 soft type으로서 직쇄의 alkyl기가 미생물에 의해서 ABS보다 용이하게 분해되기 때문이다. 그러나 분해가 용이한 연성세제인 LAS는 미생물에 의해 분해되면 phenol계의 분해산물이 생성되는데, 이것의 생물독성은 ABS보다 어류에 대해 2~3배 강하며, 식물성 plankton에 대한 독성도 강한 단점을 가지고 있다(강영호, 1983; 김학성, 1986). 그러므로 본 연구에서는 하수처리상의 문제를 야기하고 인체에 손상을 가져오는 LAS의 일종인 sodium dodecylbenzenesulfonate(SDBS) 분해에

관련된 plasmid의 특성을 조사함으로써, LAS분해과정상의 중간단계를 빨리하여 LAS분해율을 향상시키고자 하는 목적으로, SDBS를 분해하는 미생물을 부산시내 폐수와 토양 등에서 분리하여 SDBS 분해율을 측정하였고, 각종 금속이온과 항생물질에 대한 내성조사를 행하였다. 또한 이 미생물의 분류학적인 위치를 검토하였으며, 분리균으로부터 plasmid를 분리하여 분해유전자가 plasmid에 존재하는지의 여부도 조사하였다.

재료 및 방법

시료 및 SDBS분해균의 분리

SDBS분해균을 분리하기 위해 부산시내 주택단지의 하수, 토양 및 하천에서 100여점의 시료를 채취하였다. SDBS를 유일한 탄소원으로 이용하는 균주의 분리에 사용된 배지의 조성은 Table 1과 같았다(Ohwade, 1975). 본 연구에 사용한 합성세제는 Tokyo Kasei Co.(日本, 東京郡 北歐 豊島 6-

15-9) 제품인 sodium dodecylbenzenesulfonate(soft type)이었다. 이 제품은 C₁₂ LAS homolog로서 가장 전형적인 LAS이다. LAS분해균주로서 선정된 균주는 0.1% SDBS가 첨가된 LB한천 사면배지(Maniatis등, 1982)에서 3일간 배양한 후 냉암소에서 보존하여 본 실험에 사용하였다.

Table 1. Medium composition for selection of bacteria utilizing SDBS as a sole carbon source

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0g
KH ₂ PO ₄	2.0g
Na ₂ HPO ₄	3.0g
MgSO ₄ · H ₂ O	0.01g
Sodium dodecylbenzenesulfonate (soft type)	1.0g
Agar	15.0g
Tap water	1000ml

(pH 7.2)

SDBS분해율 측정

합성세제 분해율을 조사하기 위해 500ml shaking flask에 100ml의 SDBS 완전배지(Ha등, 1984)를 넣고 증배액 0.1ml를 접종하여 30°C에서 120rpm으로 30시간 진탕배양하였다. Control로서 균을 접종하지 않은 동일한 조성의 배지를 사용하였으며 일정시간 간격으로 배양액을 5ml씩 채취하여 10,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 상등액에 잔존하는 합성세제의 양을 methylene blue법(American Public Health Association, 1985)으로 측정하였다.

금속이온 내성조사

금속이온에 대한 내성조사는 금속이온 gradient plate법(Gerhardt, 1981; Horitsu등, 1986)으로 행하였다. Gradient plate위에 분리균을 1백금이 취해 금속이온 농도가 증가하는 방향으로 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 후 실험균주의 성장유무로서 저항성을 조사하였다.

항생물질 내성조사

LB agar 배지(Maniatis등, 1982)에 rifampicin(5 µg/ml), ampicillin(50 µg/ml), streptomycin(50 µg/ml), tetracycline(30 µg/ml)을 각각 가하여 plates를 만든 후 plate당 10⁴cell를 도말하여 하룻밤 동안 배양한 후 성장 유무를 확인하여, 성장한 균종에 대해 LB 배지에서 각각의 항생제 농도를 달리하여 생육 최소 저지 농도를 결정하였다.

분리균주의 분류와 동정

균 분리용 배지에서의 성장정도, SDBS분해능, 금속이온 내성, 항생제 내성 등을 비교검토하여 우수한 성질을 나타내는 균주를 분리 및 동정하였다. 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적

조사는 Brandshaw(1979) 및 Gerhardt 등(1981)의 방법을 택하였다. 배양적 특성은 MacFaddin 등(1980)의 방법에 따랐으며 생화학적 특성은 Gerhardt 등(1981)rhk MacFaddin 등(1980)의 방법에 준하였다. 위와같은 결과로 시험균의 분류와 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(1984)에 준하여 행하였다.

분리균의 plasmid 확인 및 E. coli로의 transformation

Birnboim과 Doly(1979)의 alkali lysis방법에 의해 분리균종에 존재하는 plasmid를 확인하였고 이 plasmid들을 agarose gel로부터 Maniatis 등(1982)과 Girvitz(1980)의 방법으로 회수하여 E. coli C600에 Cohen 등(1972)의 방법으로 transformation 시켰다.

Plasmid의 curing

분리된 SDBS분해균주에 대해 그 분해유전자가 plasmid에 존재하는지를 검토하기 위해 Horitsu 등(1986)과 Miller(1972)의 방법을 변형하여 실험하였다. 즉 LB broth에서 하루 동안 진탕배양한 균액으로부터 10⁴cell을 취하여 10 µg/ml의 mitomycin C를 포함하는 5ml LB broth(pH 7.5)에 접종한 뒤, 30°C에서 하루 정치배양하였다. 균액을 적당히 희석하여 LB plate에 도말한 다음 하루 동안 배양하여 master plate로서 사용하였다. Master plate의 colony를 멸균된 toothpick로, 유일한 탄소원으로 SDBS를 포함하는 indicator plate와 LB plate에 각각 이식하였다. Indicator plate에서 성장하지 않는 master plate의 colony는 SDBS분해능이 상실된 cured cell로서 선발하였다. 선발된 cured cell은 상기의 plasmid DNA분리 방법에 따라 DNA를 추출하여 전기영동법으로 plasmid의 존재여부를 확인함으로써 plasmid의 curing을 재확인하였다.

결과 및 고찰

SDBS분해균의 분리

부산 시내 주택단지의 하수구, 토양 및 하천에서 100여점의 시료를 채취하여 SDBS분해균으로서 152균주를 선발하였고, 그 중에서도 분해능이 우수한 것으로 나타난 13균주를 재차 선발하였으며 24시간동안 배양하여 그 분해율을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 그 중에서도 94번과 130번 균주가 가장 SDBS분해능이 우수한 것으로 나타났다.

SDBS분해능

SDBS를 0.1% 첨가한 SDBS완전배지에 분리된 120번 균주를 배양시켜 SDBS의 분해율을 검토한

Table 2. SDBS degradation rate of the isolated SDBS-degrading bacteria

Strain NO.	Degradation rate(%)
13	45
16	48
46	40
67	34
81	57
94	59
106	50
120	51
129	51
130	59
130	59
146	50
151	54
157	54

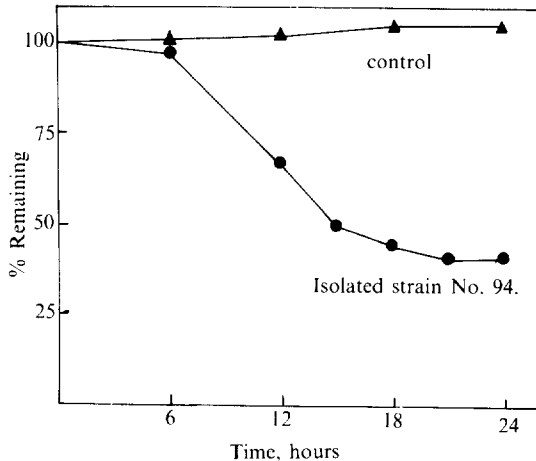


Fig. 1. SDBS degradation rate during the cultivation of the representative isolated strain No. 120 in 0.1% SDBS containing liquid medium. SDBS remained at various stages during growth was estimated by methylene blue method (American Public Health Association, 1985).

결과는 Fig. 1과 같았다. 배양 6시간 이후 18시간까지 SDBS가 급격히 분해되다가 그 이후에는 분해가 서서히 일어났다. 후기에 SDBS의 잔존율이 다소 증가하는 현상은 SDBS분해산물이 methylene blue-substance로 작용(Mckinney 등, 1959)하기 때문이라 사료되었다. SDBS분해산물로서 이 방법의 positive 방해물질로서 유기 sulfon산염, 황산염, carboxyl 산염 등이 알려져 있다(American Public Health Association, 1985). SDBS의 생물학적인 분

해경로는 많은 단계로 구성되어 있으며 표명활성소실은 이 분해경로의 초기에 일어난다(Huddleston 등, 1963)고 알려져 있으며, 표면활성소실이 일어나는 과정에 있는 LAS의 분해정도는 methylene blue에 대한 반응성 소실과 일치함이 알려져 있다.

금속이온 내성

합성세제 분해율이 비교적 높은 것으로서 나타난 균주들은 metal compound gradient method로 금속화합물에 대한 내성을 검토한 결과는 Table 3과 같았다. 이들 균주들은 $CdCl_2$ 와 $ZnCl_2$ 에 대한 내성은 비교적 높은 것으로 나타났으며, Horitsu 등(1986)의 토양에서 분리된 *Pseudomonas putida* GAM-1의 plasmid에 의한 cadmium내성이 최고 7mM인데 비해 본 연구에서 분리한 67번 및 120번 균주는 8.2mM까지 내성을 나타내었다. 106번, 130번 및 151번 균주는 6.2mM의 $ZnCl_2$ 에도 내성을 나타내었다. 분리균주들의 $AgNO_3$ 에 대한 내성은 거의 비슷하였으나 120번 균주가 4.2mM의 $AgNO_3$ 에서도 성장할 만큼 강한 내성을 나타내었다. 그리고 $HgCl_2$ 의 경우 67번 균주가 160 μ g/ml로 가장 높은 내성을 나타내었다.

분리균주의 항생제 내성과 생육 최소 저지 농도(MIC)

분리균 94번, 102번 및 130번 균주의 항생제에 대한 내성은 Table 4와 같았다. 이들 SDBS분해균은 tetracycline, streptomycin, kanamycin과 chloramphenicol에 대해 생장이 저해를 받았으나 ampicillin에 대해서는 내성을 나타내었다. 특히 120번 균주는 ampicillin과 rifampicin에 대해 높은 내성을 나타내었으며 ampicillin에 대한 생육 최소 저지농도는 1,550 μ g/ml 이상으로 나타났다.

사용균주의 선정 및 분류 동정

상기의 SDBS분해율, 금속이온 내성, 항생제 내성시험 등에서 비교적 우수한 성질을 나타낸 분리균 120번 균주를 사용균으로 선정하여 편의상 PK-120이라 명명하였다.

1) 형태학적 특성: PK-120 균주를 nutrient broth agar slant에 접종하여 24시간 동안 배양한 뒤 현미경상에 나타난 형태학적인 특성은 Table 5와 같았다. 본 균주는 운동성이 없고, 혐박을 가지고 있는 Gram(-)의 통성 혐기성 간균으로 나타났다.

2) 배양적 특성: PK-120 균주를 nutrient broth agar plate에 배양하여 형성된 colony의 특성과 각종 배양적 특성은 Table 6과 같았다.

3) 생화학적 특성: PK-120 균주의 생화학적인 특성은 Table 7과 같았다.

4) PK-120 균주의 분류와 동정: 본 실험에서 분

Table 3. Resistance of the isolated SDBS-degrading bacteria to metal compounds by metal compound gradient plate method.

Strain No.	Maximun concentration of indicated compound that allowed bacterial growth				
	CdCl ₂	ZnCl ₂	AgNO ₃	CuSO ₄	HgCl ₂
13	7*	6*	0.1*	6*	140**
16	5	4.8	0.1	6.6	140
46	5	3.4	2.2	7.4	100
67	8.5	7.4	0.1	6.4	160
81	5	4.4	0.1	5.8	.
94	5.5	3.4	0.1	5.4	.
106	6	6.2	0.1	6	100
120	8.5	5	4.2	6.8	.
129	8	4.4	0.1	5.4	.
130	6	6.2	0.1	7.8	120
146	6	4	0.1	5.6	.
151	8	6.2	0.1	7	100
157	5.5	4.4	1.6	6.8	.

* mM

** µg/ml

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

Antibiotics	strain No.		
	94	120	130
Ampicillin	R*(50)**	R(>1550)	R(100)
Chloramphenicol	S***	S	S
Kanamycin	S	S	S
Rifampicin	S	R(S)	S
Streptomycin	S	S	S
Tetracycline	S	S	S

* : Resistance

** : MIC(µg/ml)

*** : Sensitive(> 5µg/ml)

Table 5. Morphological characteristics of the selected strain PK-120

Contents	Characteristics
Shape	rod
Size	0.6~1.3µm by 2.3~3.3µm
Motility	negative
Gram stain	negative
Spore formation	negative
Gapsule production	positive
Type of cell division	simple division

리한 공시균인 PK-120 균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1984)와 Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria(1980)과 비교 검토한 결과 *Klebsiella*속에 속하는 것으로 동정되었으며, 배양적, 생화학적 제반 특징들이 *Klebsiella*

Table 6. Cultural characteristics of the selected strain PK-120

Contents	Characteristics
Colony on nutrient agar	round, wetted, pulvinate
Colony color	white
Colony surface	smooth
Colony edge	entire
Hydrolysis of gelatin	negative
Carbohydrate fermentation*	all positive

* : Tested carbohydrate

arabinose, lactose, maltose, mannose, raffinose, salicine, sorbitol, saccharose, trehalose, xylose, dextrose

Table 7. Biochemical characteristics of the selected strain PK-120

Contents	Characteristics
Oxidase	-
Catalase	+
Indol formation	-
Voges-Proskauer test	+
Methyl red test	-
H ₂ S production	-
Nitrate reduction	+
Nitrite reduction	+
Oxidation and Fermentation	fermentation
Urease	+
Citrate utilization	+
Growth on MacConkey agar	+
Growth on KCN	+
Growth in aerobic condition	+
Growth in anaerobic condition	+
Ornithine decarboxylase	-
Gas from glucose	+

*pneumoniae*와 매우 유사한 것으로 나타나 공시균주를 *Klebsiella* sp. PK-120 균주로 명명하였다.

분리균의 plasmid 분리

*Pseudomonas*의 경우 SDBS의 분해능은 plasmid에 의하고 금속이온과 항생제에 대한 내성도 대부분 plasmid와 연관이 있음(Chakrabarty, 1976; Williams, 1978)이 알려져 있다. 사용균주인 *Klebsiella* sp. PK-120 균주의 SDBS분해능과 금속이온 및 항생제 내성을 미루어 볼 때, plasmid가 존재할 가능성이 있어 Birnboim과 Doly(1979)의 방법에 의해 plasmid를 분리하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. λ phage의 DNA를 제한효소 Hind III로 분해하여 생긴 DNA단편(lane 1)을 size marker로 사용하였으며 *Klebsiella* sp. PK-120 균주의 plasmid는 약

5kb와 4kb인 두 개의 plasmid가 확인되었다.

Plasmid의 curing

SDBS를 분해하는 사용균주인 *Klebsilla* sp. PK-120 균주의 wild type cell은 균분리용 배지에서 colony를 형성하나 cured cell은 이 배지에서 colony를 형성하지 못하였다. SDBS분해 유전자가 plasmid에 존재하는지를 확인하기 위해 SDBS⁺wild type과 SDBS cured cell의 DNA를 순수분리하여 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같았다. Lane 2의 wild type과 SDBS cured cell의 DNA가 SDBS cured cell(lane 3)에서는 나타나지 않은 것으로 보아 SDBS분해 유전자가 plasmid에 존재하고 있음이 확인되었다.

Transformation

사용균주인 *Klebsiella* sp. PK-120 균주의 wild type cell에 존재하는 두 개의 plasmid 중에서 어떠한 것이 SDBS분해에 작용하는지를 확인하기 위해 각각 또는 두 plasmid 모두를 SDBS분해능이 없는 *E. coli* C600 균주에 transformation시켰다. 그 결과 2개의 plasmid가 transformation된 transformant들이 SDBS를 분해시켰으며, transformant의 plasmid DNA를 분리하여 전기영동법으로 재확인하였으며 Transformant들의 plasmid들은 숙주 내에서 안정하게 유지되었다.

SDBS분해유전자와 plasmid의 연관성

Aromatic hydrocarbon의 분해유전자가 plasmid에 존재한다는 것이 *Pseudomonas* 속에서 알려져 있으며 xylene, toluene 등이 plasmid에 존재하는 유전자에 의해 분해되며(Chakrabarty, 1976; Williams, 1978), 본 연구에서 사용된 사용균주인 *Klebsiella* sp. PK-120 균주도 SDBS분해유전자가 plasmid에 존재하고 있음이 wild type cell 및 transformant의 plasmid DNA를 분리하여 전기영동한 결과를 비교함으로써 확인되었다. 앞으로, *Klebsiella* sp. PK-120 균주에 존재하는 두 plasmid가 각각 어떤 양식으로 SDBS의 분해과정에 관여하는지의 문제와 각 plasmid의 제한효소에 의한 DNA 단편들의 특성에 관하여 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

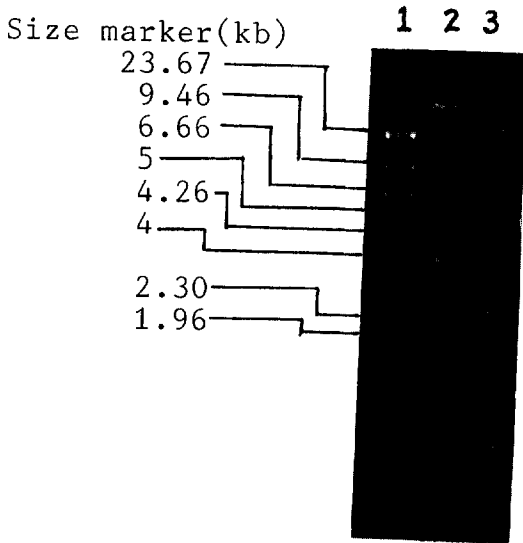


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of *Klebsiella* sp. PK-120 plasmid and its cured cell
 Lane 1: Hind III-digested λ DNA
 Lane 2: *Klebsiella* sp. PK-120 plasmid
 Lane 3: cured cell of *Klebsiella* sp. PK-120.

적 요

부산시내 주택단지의 하수내 토양에서 LAS 분해능이 우수한 균주를 유일한 탄소원으로 sodium dodecylbenzenesulfonate(SDBS, soft type)를 포함하는 agar plate를 사용하여 분리하였다. 이들 분리균중 2균주가, SDBS를 0.1% 함유한 완전배지에서 30℃ 24시간 배양했을 때, SDBS분해율이 최고 59% 정도까지 나타내었다. 금속이온에 대한 이들 분리균의 내성조사결과 대부분 CdCl₂와 ZnCl₂에 비교적 내성이 큰 것으로 나타났으며 분리균의 항생제 내성시험에서는

ampicillin 에 대하여 내성을 나타내었다. 특히 분리균중 1개는 ampicillin에 대해 1,550 μ g/ml 이상에서도 내성을 나타내었으며 이 분리균주는 *Klebsiella* 속으로 동정되었다. 이 균주는 5kb와 4kb의 2개의 plasmid를 가지고 있었으며 이들은 *E. coli* C600 plasmid 균주에 형질전환시켰을때 SDBS분해능을 나타내었으므로 SDBS분해능은 plasmid에 존재하는 유전인자에 의한 것임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. **Birnoim, L.J., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acids. Res.*, **7**, 1513-1523.
2. **Brodshow, L.J.,** 1979. Laboratory Microbiology, 3rd ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto.
3. **Cain, R.B.,** 1977. Surfactant Biodegradation in Waste Waters, In A.G. Calley, C.F. Forster, and D.A. Stafford (ed.), Treatment of Industrial Effluents, John Wiley and Sons, New York, 283-318.
4. **Chakrabarty, A.M.,** 1976. Plasmid in *Pseudomonas* *Ann. Rev. Genet.* **10**, 7-30.
5. **Cohen, S.N., A.C. Y. Chang, and L. Hsu,** 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria : Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2110-2114.
6. **Gerhardt, Murray, Costilow, and Nester,** 1981. Manual of method for general bacteriology, American Society for Microbiology.
7. **Girvitz, S.C., S. Bacchetti, A.J. Rainbow, and F.L. Graham,** 1980. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels, *Anal. Biochem.*, 106-492.
8. **Greenberg, A.E., R.R. Trussell, and L.S. Clesceri,** 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed., American Public Health Association Inc., New York, 581-585.
9. **Ha, H.P., S.C. Hah, S.H. Lee, and S.D. Hong,** 1984. Biodegradation of synthetic detergents by *Klebsiella pneumoniae* L-127, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 91-97.
10. **Holt, J.G.(ed),** 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The William and Wilkams Co., U.S.A.
11. **Horitsu, H., Y. Kazumi, and F. Akira,** 1986. Plasmid determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GAM-1 isolated from soil, *J. Bacteriol.*, **165**, 334-335.
12. **Huddleston, R.L., and R.C. Allred,** 1963. Microbial oxidation of sulfonated alkybenzenes, *Dev. Ind. Microbiol.*, **4**, 24-38.
13. **MacFaddin, J.F.,** 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 2nd ed., The Williams and Wilkams Co., Baltimore, U.S.A.
14. **Kring, N. R(ed),** 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkams Co., U.S.A.
15. **Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook,** 1982. Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York.
16. **Mckinney, R.E., and J.M. Symons,** 1959. *Sewage Ind. Wastes*, **31**, 549.
17. **Miller, J.H.,** 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York.
18. **Ohwada, K.,** 1975. Agar plate method for detection and enumeration of alkybenzenesulfonate-degrading microorganisms, *Appl Microbiol.*, **29**, 40-43.
19. **Swisher, R.D.,** 1970. Surfactant biodegradation, Marcel Dekker, Inc., New York.
20. **williams, P.A.,** 1978. The Biology of Plasmids, In A. T. Bull and P.M. Meadow(ed), Compantion to Microbiology. Langman, 77-108.
21. **강영호,** 1983. 환경과학, 합성세제와 부영양화, 형설출판사, 404-405.
22. **김학성,** 1986. 환경화학, 합성세제와 인산염, 동화기술, 238-240.

(Received Jul. 6, 1989)