Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19 No. 1, 82-87 (1991)

OCT 플라스미드를 갖는 원유 분해세균에 의한 Octane 분해능

최순영 · 김창숙 · 이명혜 · 황문옥 · 민경희*
숙명여자대학교 생물학과

Octane Biodegradability by Crude Oil-Utilizing Bacteria Carrying OCT Plasmid

Choi, Soon-Young, Chang-Sook Kim, Myung-Hye Lee Moon-Ok Hwang and Kyung-Hee Min*
Department of Biology, College of Sciences, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742

Abstract — *Xanthomonas campestris* M12, *Xanthomonas* sp. M28, *Acinetobacter lwoffi* G1, and *Klebsiella pneumoniae* L25, *Pseudomonas maltophilia* N246 were screened to increase the ability for crude oil utilization. All of these could utilize hexadecane and octane with the exception of N246 strain for only octane biodegradation. Thus N246, M12, and M28, strains were specially examined for octane oxidation. Octane biodegradation by three strains showed the optimal conditions at 30℃, pH 7.0~9.0, and 0.2~0.3% octane concentration as a substrate. It was found that *P. maltophila* N246 and *X. campestris* M12 had plasmid and the cured plasmid from N246 strain lost octane uitilization. Therefore, it was confirmed that certain genes for octane utilization were located on OCT plasmid in N246 strain. The size of OCT plasmid in N246 strain was 118 kb. The N246 strain was resistant to ampicillin.

산업화의 가속과 함께 원유의 사용량이 증가함에 따라 원유에 의한 해양오염이 심각하게 대두되고 있다. 우리나라의 원유에 의한 해양오염은 원유 자체의 손실은 물론 주변의 어패류 양식장에 큰 피해를 주고 있다.

해양의 원유오염은 미생물의 자정작용에 의해서 분해될 수 있지만 그 분해속도가 매우 느리기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위한 연구가 시도되었으며(1, 2), 특히 자연환경하에서 생분해에 관한 연구도 수행된 바 있다(3-7). 아울러 미생물에 의한 원유 분해는 OCT 플라스미드에 의해 이루어짐도 보고된 바 있다(7, 8). 수계환경에서의 유기물 분해는 종속영양 세균에 의해서 이루어지므로 이러한 점을 고려하여 우리나라에서도 해양환경에서의 생태학적 연구(9-11)와 탄화수소 세균을 분리하여 보고한 바 있다(12, 13).

본 연구실에서는 원유 분해세균의 생리학적 및 유전학적 특성을 규명하여 오염된 해양원유의 생분해능을 증진시키기 위한 기초연구로서 해양으로부터 원유 분해 호염성 세균을 분리, 동정한 바 있다(14). 본 연구에서는 원유 분해균의 octane 분해에 대한 특성을 조사하고 원유 분해에 관련된 OCT 플라스미드의 특성을 고찰하고자 한다.

Key words: Octane dissimilation, OCT plasmid, *Pseudomonas maltophilia*
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주와 OCT 플라스미드는 Table 1과 같다.

배지

원유 분해세균을 분리하기 위한 최소배지의 조성은 Kim 등(14)이 보고하였다.

원유 분해균의 배양

각 균주의 원유 분해능을 측정하기 위하여 최소배

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this experiment

Strain	Plasmid	Phenotype	Source and Reference
Pseudomonas maltophilia			
N246	OCT	wild type (oct)	Kim *et al.*(14)
N246-O		wild type (cured)	from N246
Pseudomonas putida			
mt-2	pWWO(TOL)	Ben , Mtol , Ptol	ATCC 23973
pPG1	CAM	Ben , Cam	ATCC 17453
Acinetobacter lwoffi			
G1	OCT	wild type	Kim *et al.* (14)
Klebsiella pneumoniae			
L25		wild type	Kim *et al.* (14)
Xanthomonas campestris			
M12	OCT		Kim *et al.* (14)
Xanthomonas sp.			
M28	OCT		Kim *et al.* (14)
Pseudomonas aeruginosa	Rms148	Sm	KCTC 11248
Lactobacillus casei	pPLac		Mooml *et al.* (15)

지에 원유 0.1%, NaCl 3.5%가 포함된 배지에 균주를 접종하여 30℃에서 180 rpm의 조건으로 진탕배양하였다.

OCT 플라스미드의 분리

플라스미드의 분리는 Nakazawa 등(16)의 방법에 따라 실시하였다. LB broth 10 ml에 균주를 접종하여 30℃에서 16시간 동안 진탕배양한 후 4℃에서 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 수확하였다. 수확한 균체를 25% sucrose-50 mM Tris-hydrochloride(pH 8.0), 400 μl에 현탁시킨 후 lysozyme 용액(5 mg/ml in 0.25 mM Tris-hydrochloride, pH 8.0)을 100 μl 첨가하여 섞은 후 0℃에서 5분간 방치하였다. 이 용액에 6.25 mM EDTA 용액(pH 8.0) 50 μl을 넣어준 후 0℃에서 다시 5분간 방치한 다음, 0.5% Brij-0.2% sodium deoxychlorate-62.5 mM EDTA in 50 mM Tris-hydrochloride(pH 8.0)을 30 μl를 넣고 조심스럽게 전위한 후 0℃에서 10분간 방치하였다. 이 혼합액을 4℃에서 15,000 rpm으로 원심분리하여 얻은 상등액을 새로운 시험관에 옮겨 0.5 M NaCl 250 μl을 넣어 조심스럽게 전위한 다음, 최종 농도가 10%가 되도록 polyethylene glycol(PEG, M.W. 6,000)를 넣고 하룻밤 정치시킨 후 원심분리하여 얻은 침전물에 TES(50 mM Tris-hydrochloride-5 mM EDTA-50 mM NaCl, pH 8.0) buffer를 넣어 용해시킨 후 전기영동하였다.

플라스미드의 제거실험

Octane 분해균주의 octane 분해능이 플라스미드에 기인하는지를 확인하기 위해 Chakrabarty(17)의 방법을 변형하여 플라스미드의 제거(curing) 실험을 실시하였다. N246 균주를 LB broth에 접종하여 하룻밤 동안 진탕배양한 후, 배양액을 적절히 희석(10^4~10^5 cell/ml)하여 mitomycin C(Sigma)가 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μg/ml이 함유된 LB broth에 배양액을 접종하여 탁도가 증가할 때까지 배양하였다. 이 중 탁도가 약간 증가된 배양액을 선택하여 다시 mitomycin C가 각각 다른 농도로 들어있는 LB에 몇번 반복하여 탁도가 나타날 때까지 배양한 다음, 적절히 희석하여 고체 완전배지에 평판 도말한 후, 배양하였다. 이 때 생겨난 colony를 최소배지와 고체 완전배지에 replica plating하여 배양한 다음 octane 분해능이 상실된 균주를 선별하였다.

결과 및 고찰

원유 분해세균의 원유 분해능 조사

원유 분해세균의 분리방법, 항구나 연안 등지의 sa-

Table 2. Crude oil utilization by several microorganisms

Strains	Time (hr)			
	24	48	72	102
Acinetobacter lwoffi G1	0.17	0.23	0.25	0.36
Klebsiella pneumoniae L25	0.20	0.24	0.24	0.38
Pseudomonas maltophilia N246	0.13	0.20	0.24	0.28
Xanthomonas sp. M28	0.28	0.33	0.38	0.46
Xanthomonas campestris M12	0.24	0.34	0.42	0.57

*Microbial growth was measured by O.D. at 410 nm.

mpling site, salinity, gas-chromatography에 의한 *X. campestris* M12의 원유 분해능 측정, 그리고 분리된 원유 분해세균 5균주들의 hexadecane과 octane 분해능 차이를 이미 보고한 바 있다(14). Hexadecane ($C_{16}H_{34}$)을 분해할 수 있는 세균은 *A. lwoffi* G1, *X. campestris* M12, *Xanthomonas* sp. M28이었고 octane(C_8H_{18})을 분해하는 세균은 *A. lwoffi* G1, *P. maltophilia* N246, 그리고 *Xanathomonas*의 두 균주였다. 균주의 hexadecane과 octane의 분해 최적농도는 0.2~0.3%로 이미 보고한 바 있다(14).

원유 분해능을 조사하기 위하여는 탄소원으로서 우수 균주들을 0.15% 원유와 3.5% NaCl이 포함된 최소배지에 30℃에서 진탕배양하였다. 그 결과는 Table 2에서 보여주는 바와 같이 *Xanthomonas* sp. M28과 *X. campestris* M12가 가장 우수하게 원유를 이용함을 알 수 있었다.

온도, pH, NaCl의 농도가 octane 분해에 미치는 영향

Octane 분해세균들에 의한 octane 분해시의 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 최소배지에 0.3%의 octane을 첨가한 배지에서, 각기 다른 온도에서 48시간 진탕배양(180 rpm)을 실시한 결과 세 균주 모두 37℃에서 거의 최고의 생장을 보여주었으며, 30℃에서도 비교적 높은 생장을 보여주었다. 그러나 octane 분해능의 최적온도는 30℃이었으므로(18) octane 분해실험은 30℃에서 실시하였다.

Octane 분해균이 octane 이용시의 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. Octane 분해 우수균인 *Xanthomonas campestris* M12는 pH 7.5, *Xanthomonas* sp. M28는 pH 7.0, 그리고 *P. maltophilia* N246은

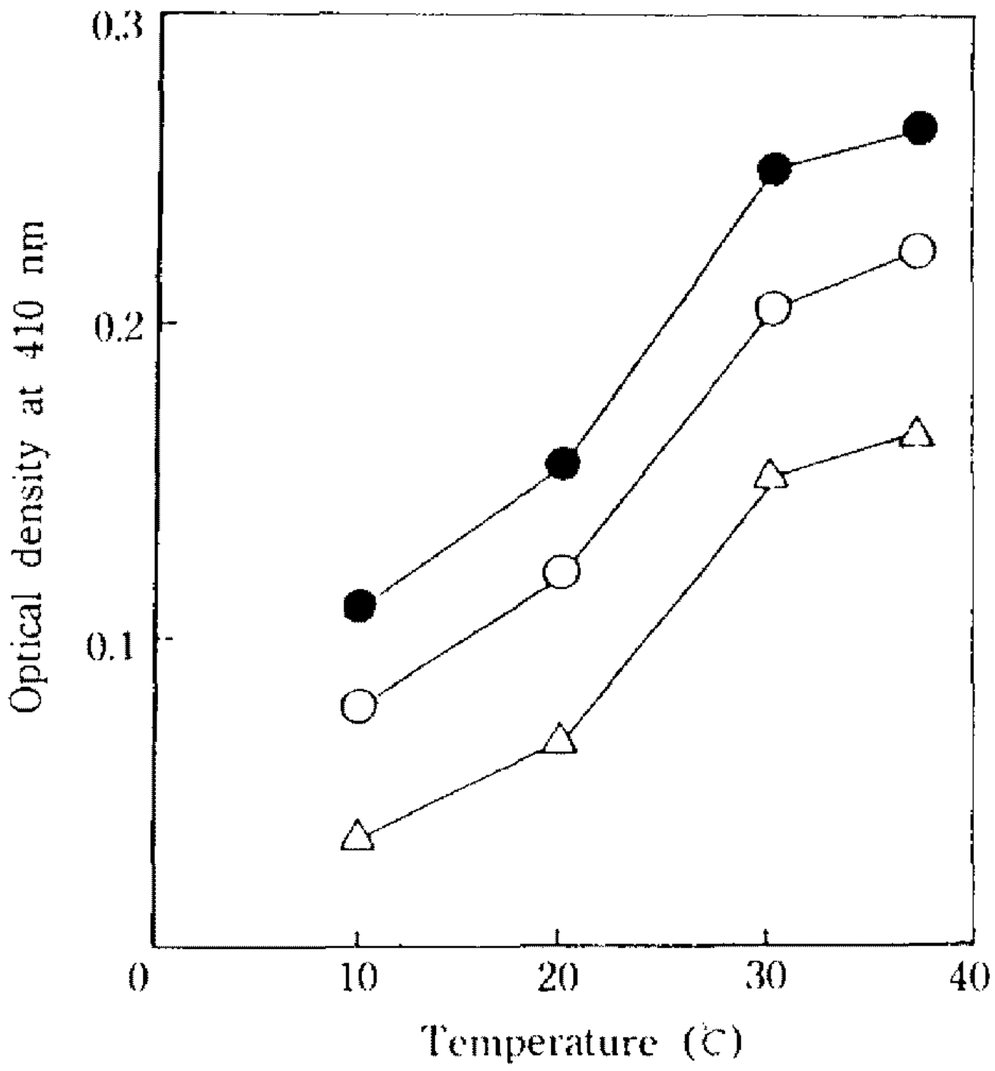

Fig. 1. Temperature effect on octane degradation by stranis.
Xanthomonas campestris M12 (●—●). *Xanthomonas* sp. M28 (○—○) and *Pseudomonas maltophilia* N246 (△—△).

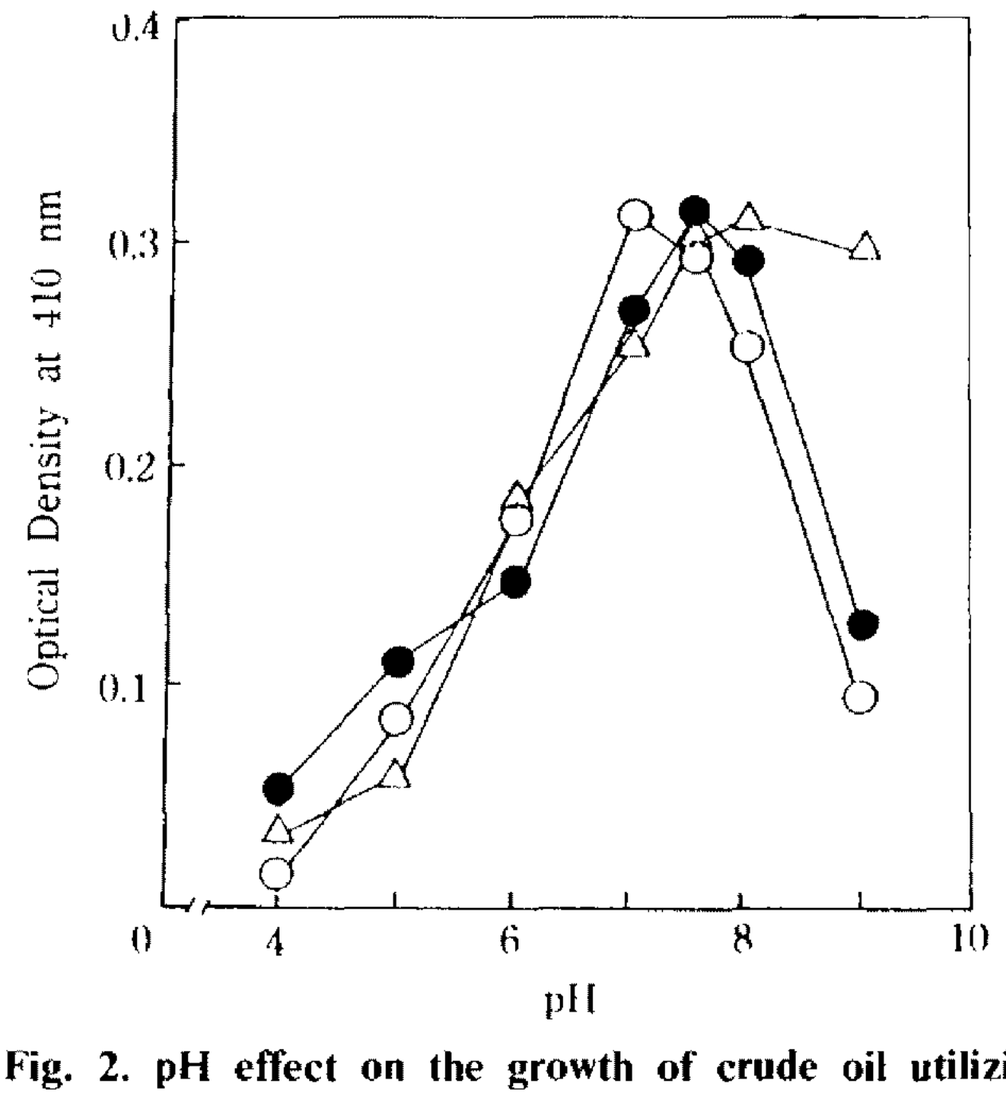

Fig. 2. pH effect on the growth of crude oil utilizing bacteria.
Xanthomonas campestris M12 (●—●), *Xanthomonas* sp. M28 (○--○) and *Pseudomonas maltophilia* N246 (△—△).

pH 7.5~9 사이에서 최대의 생장을 보여주었다. 이와 같은 결과를 토대로 하여 최소배지의 pH를 맞추는 기준으로 하였다.

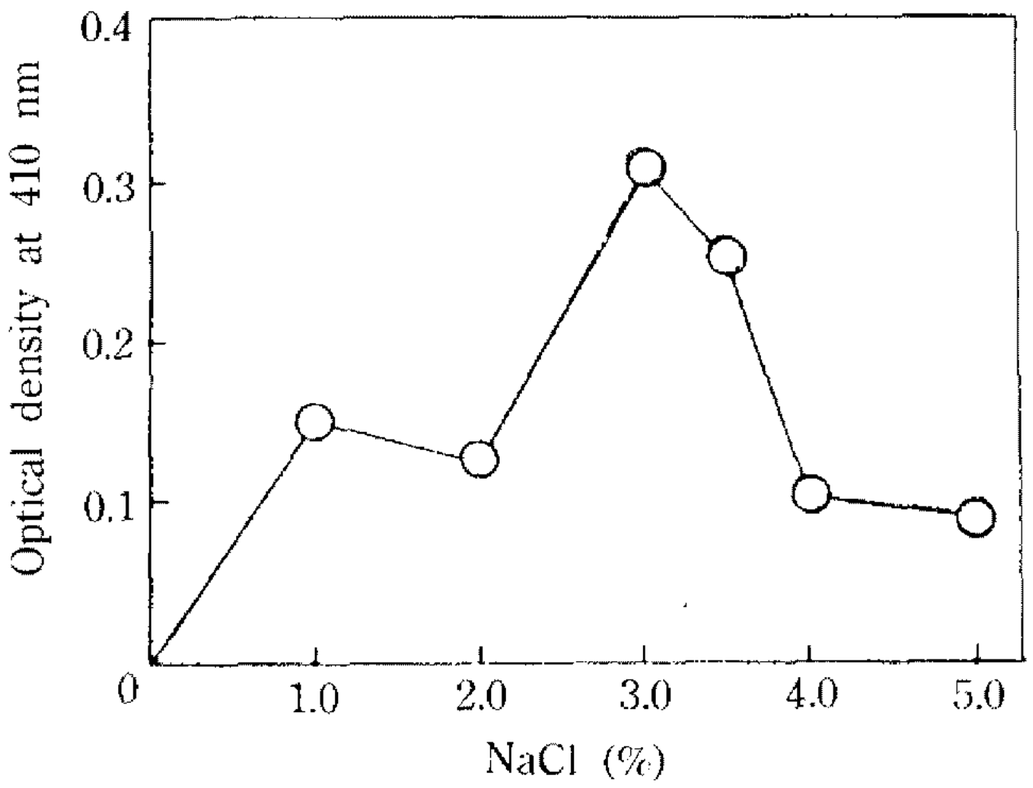

Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the growth of *P. maltophilia* N246.
The culture was incubated for 48 hr at rotary shaking incubator (30℃).

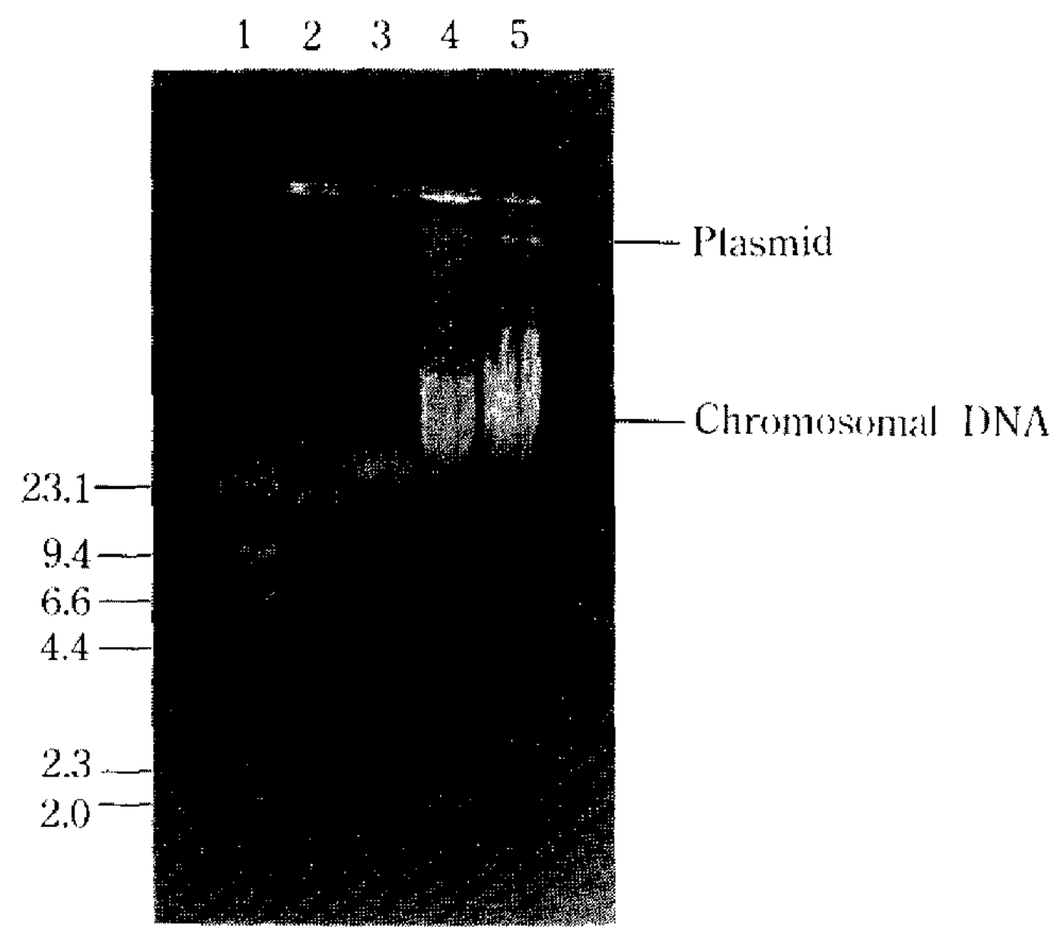

Fig. 4. Plasmid patterns from *P. maltophilia* N246 strain and the cured strain.
Line 1: λ/*Hin*dIII marker
Line 2: *P. maltophilia* N246-O (Cured)
Line 3: *P. maltophilia* N246-O (Cured)
Line 4: *P. maltophilia* N246
Line 5: *P. maltophilia* N246

한편, octane 분해능에 있어서 NaCl의 농도에 의한 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. *X. campestris* M12, *Xanthomonas* sp. M28, *K. pneumoniae* L25 등이 3~3.5% NaCl 농도에서 분해능이 가장 높았던 것으로 보고된 바와 같이(14) *P. maltophilia* N246도 3~3.5% NaCl 농도에서 분해능이 가장 높았으며 오히려 2% 이하에서는 분해능이 저하되었다.

Table 3. Curing frequency of *P. maltophilia* N246 with mitomycin C.

Number of transfer	Curing frequency (%)						
	Concentration of mitomycin C (μg/ml)						
	0	5	10	15	20	25	30
I	0	24.0	30.6	56.2	69.8	80.4	82.3
II	0	43.6	67.2	72.6	77.6	81.4	84.6
III	0	83.6	84.0	84.4	86.4	95.0	97.6

*Transfer I, II, and III were the serial inoculation from the original inoculation.

Table 4. Octane utilization of *P. maltophilia N246* and 2 strains of *Xanthomonas* genus

Strain	Growth on octane
P. maltophilia	
N246 (OCT⁺)	++
N246-O (OCT)	−
Xanthomonas campestris	
M12	+
M28	+

+: Poor growth, ++: heavy growth, and −: no growth

Octane 분해균의 플라스미드 확인 및 제거실험

원유 분해세균 중 octane을 분해하는 세균인 *P. maltophilia* N246 균주를 대상으로 하여 OCT 플라스미드 유무를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. *P. maltophilia* N246(oct⁺)와 다음에 설명한 방법으로 OCT 플라스미드가 제거된 균주(oct)를 사용하여 비교하여 본 결과 *P. maltophilia* N246 균주는 플라스미드를 함유하고 있었다.

플라스미드 제거 화합물로는 mitomycin C를 사용하였으며, 이 화합물은 *Pseudomonas*속의 분해계 플라스미드의 제거실험에 효과적으로 작용함이 보고되었다(19). Mitomycin C 처리농도를 증가시킬수록 플라스미드 curing 빈도는 증가하였고 동일한 농도의 mitomycin C가 첨가된 배지에서 연속하여 접종할 경우 octane 플라스미드는 더욱 현저하게 제거되었다 (Table 3). 제거된 플라스미드를 확실하게 확인하기 위해 플라스미드가 제거된 균주와 야생균주인 N246으로부터 플라스미드를 분리해 본 결과 agarose gel 전기영동상에서도 플라스미드가 제거된 균주는 OCT plasmid가 존재하지 않았음을 관찰할 수 있었다. 또한

OCT 플라스미드가 제거된 N246-O(oct) 균주는 N246(oct) 균주와 달리 octane을 이용할 수 없음을 확인할 수 있었다(Table 4).

OCT 플라스미드의 분자량

특이하게도 hexadecane을 분해하지 못하나 octane만을 분해하는 *Pseudomonas maltophilia* N246의 플라스미드의 분자량을 조사하였다. Meyers 등(20)은 플라스미드의 분자량을 측정하기 위하여 agarose gel상에서의 plasmid DNA의 이동 정도와 분자량과의 관계를 비교하였다. Johnston과 Gunsalus(21)는 *P. putida* strains로부터 55 Md의 TOL 플라스미드의 분자량을 측정하였으며, Yano와 Nishi(22)은 *Pseudomonas* sp. TA8로부터 분리한 150 Md의 TOL 플라스미드인 pKJ 1을 보고하였다.

본 실험에서도 위에 기술한 동일한 방법으로 *P. maltophilia* N246에서 분리된 OCT 플라스미드의 분

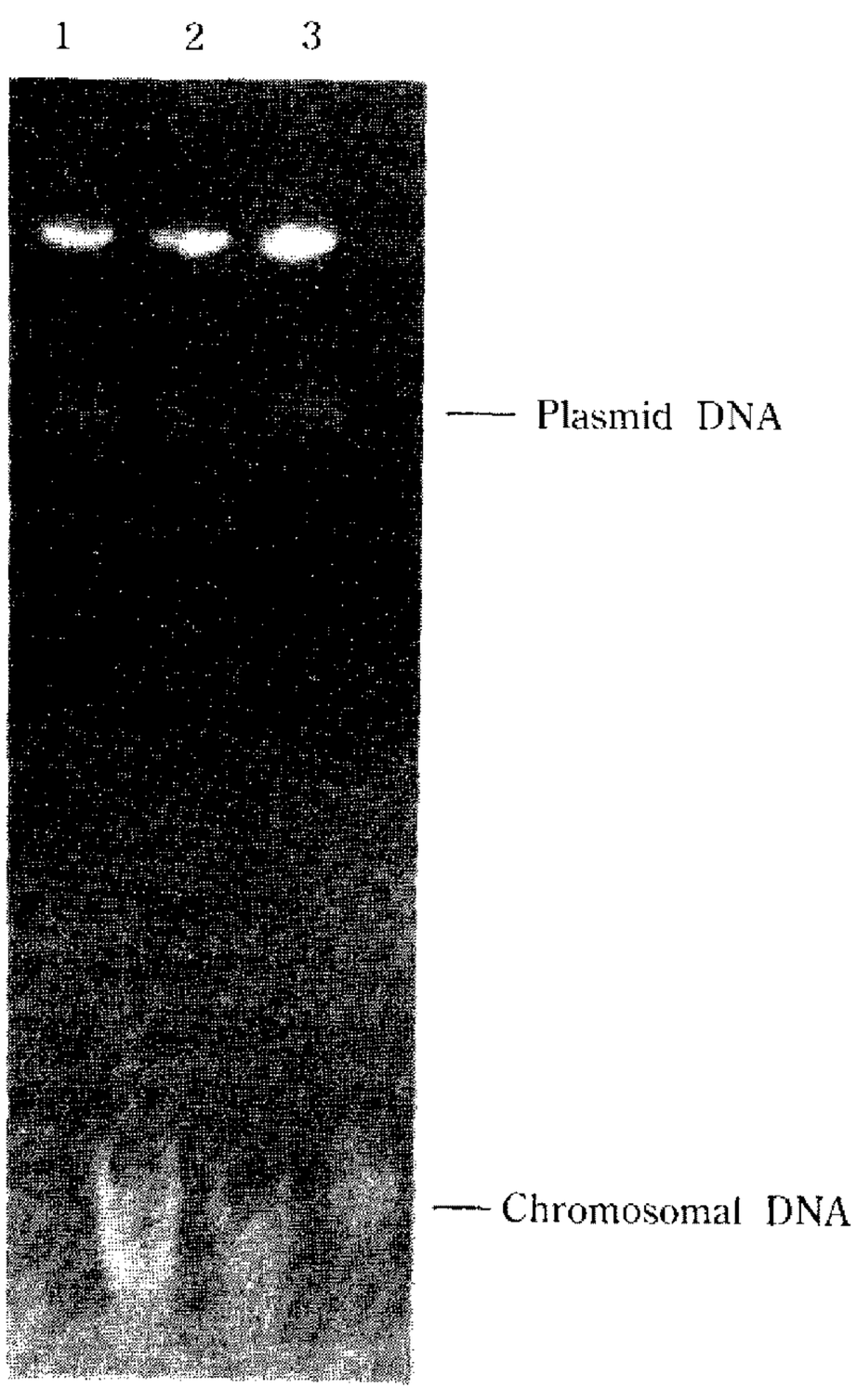

Fig. 5. Plasmid pattern from the bacteria.
Lane 1: *P. putida* mt-2 (TOL)
Lane 2: *P. maltophilia* N246 (OCT)
Lane 3: *X. campestris* M12 (OCT)

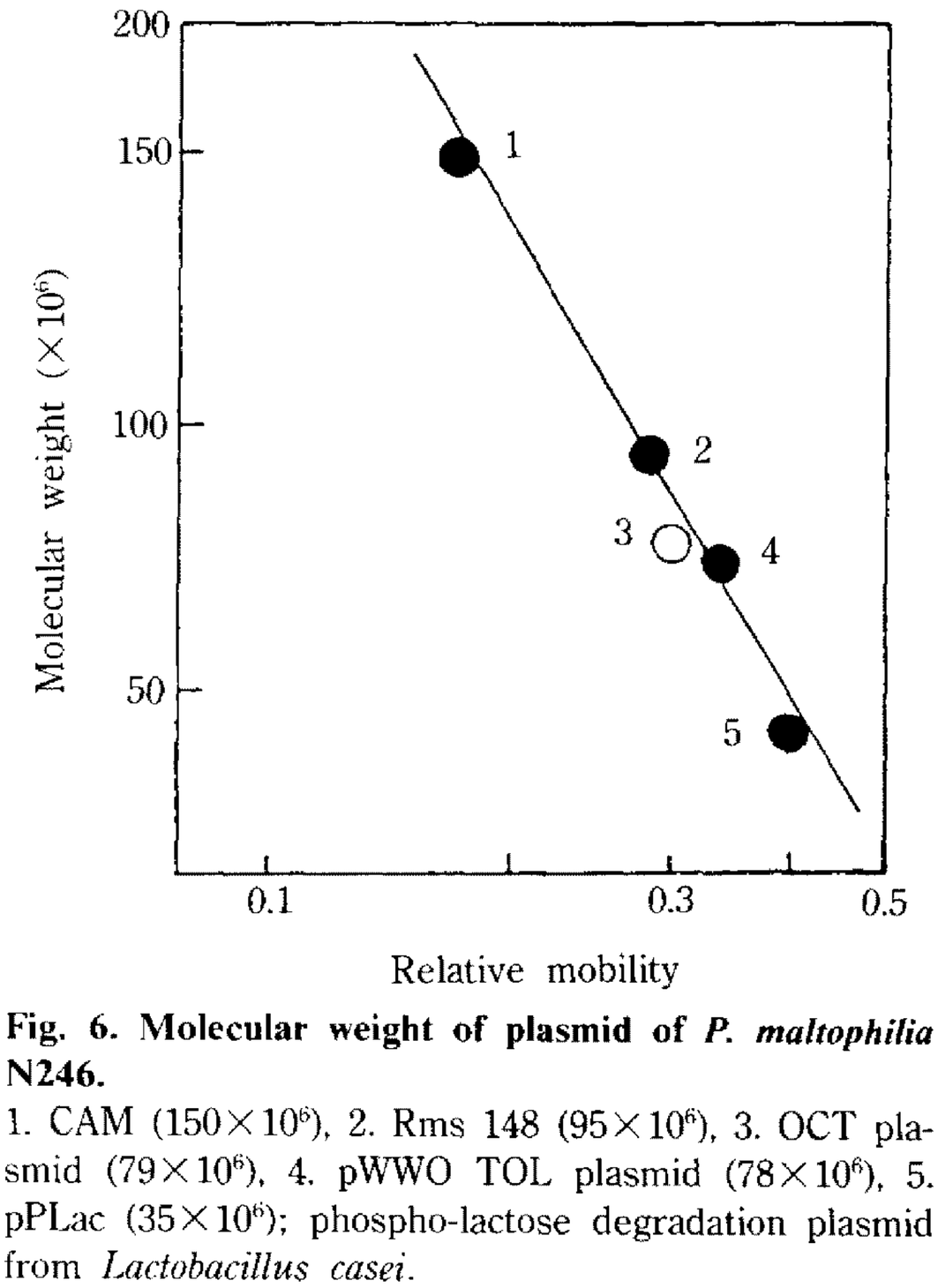

Fig. 6. Molecular weight of plasmid of *P. maltophilia* N246.
1. CAM (150×10⁶), 2. Rms 148 (95×10⁶), 3. OCT plasmid (79×10⁶), 4. pWWO TOL plasmid (78×10⁶), 5. pPLac (35×10⁶); phospho-lactose degradation plasmid from *Lactobacillus casei*.

Table 5. Antibiotics resistance of *P. maltophilia* N246

Antibiotics (μg/ml)		*P. maltophilia* N246
Amp	50	+
	100	+
	150	+
Km	50	+
	100	−
	150	−
Sm	50	−
	100	−
	150	−
Cm	50	+
	100	−
	150	−
Tc	50	−
	100	−
	150	−
Rif	50	−
	100	−
	150	−

Amp: Ampicillin, Rif: Rifampicin, Sm: Streptomycin, Tc: Tetracycline, Chl: Chloramphenicol, Km: Kanamycin; +: growth, −: no grwoth.

자량을 측정하기 위하여, 분자량이 이미 알려진 플라스미드를 표준시료로 하여 agarose gel 전기영동을 수행하여 분자량과 상대적인 이동거리 사이의 상관관계를 살펴보았다. Fig. 5, 6에서 보여주는 바와 같이 OCT 플라스미드는 TOL 플라스미드(117 kb)와 거의 유사한 크기인 79 Md(118 kb)의 크기를 갖고 있음을 전기영동상에서 확인할 수 있었다.

항생제에 대한 내성

Octane 분해균주인 *P. maltophilia* N246이 갖는 OCT 플라스미드의 특성을 조사하기 위하여 LB plate에 항생제를 첨가하여 각 균주의 항생제 내성을 조사하였다.

Table 5에서 보여주는 바와 같이 이 균주는 ampicillin에 대하여 내성을 나타내었으며 kanamycin과 streptomycin에 약간의 내성을 나타내었다.

요 약

원유 분해세균에 의한 원유 분해능을 조사한 결과, *Xanthomonas campestris* M12, *Xanthomonas* sp. M 28, *Acintobacter lwoffi* G1, *Klebsiella pneumoniae* L 25, 그리고 *Pseudomonas maltophilia* N246 등의 순서로 나타났다. *Xanthomonas campestris* M12, *Xanthomonas* sp. M28, 그리고 *Pseudomonas maltophilia* N246 균주 모두 octane 분해시의 온도는 30℃에서 최적이었으며, 최적 pH는 *X. campestris* M12와 *Xanthomonas* sp. M28이 7.0~7.5이었고, *P. maltophilia* N246이 7.5~9.0이었다. N246 균주의 최적 NaCl 농도는 3.0~3.5%이었다. *P. maltophilia* N246와 *X. campestris* M12는 모두 플라스미드를 갖고 있음을 확인하였고, N246 균주로부터 플라스미드를 제거하였을 경우 octane 분해능이 소실되었으므로 이 플라스미드 위에 octane 분해 유전자가 있음이 확인되었다. 이 균주의 OCT 플라스미드의 크기는 118 kb이었다. 또한, N246 균주는 ampicillin 항생제에 내성을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1988년도 한국과학재단의 목적기초연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

참고문헌

1. Garret, W.D.: In Proceedings of the joint conference on prevention and control of oil spills. A.P.I.-F.W.P.C.A. New York, American Petroleum Institute, New York, 257 (1969).
2. Wang, L.K., J.Y. Yang and D.B. Dahm: *Chem. Ind.* (London) **13**, 562 (1975).
3. Altas, R.M., and R. Bartha: *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 309 (1972).
4. Byrom, J.A. and S. Beastall: In Symposium on microbiology, 27-28, January, London, Bartholomeu Press, Dorking, 1 (1971).
5. Mulkins-Phillips, G.J. and J.E. Stewart: *Can. J. Microbiol.* **20**, 955 (1974).
6. Soli, G. and E.M. Bens: *Biotechnol.* **14**, 319 (1972).
7. Chakrabarty, A.M., G. Chou and I.C. Gunsalus: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70**, 1137 (1973).
8. George, I.N., G. Chou, D. Katz, and I.C. Gunsalus: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 2675 (1974).
9. 이 윤, 김상종, 하영칠, 홍순우 : 한국수질보전학회지, **1**, 1(1985).
10. 김상종, 정광엽, 이건형, 이 윤 : 한국환경생물학회지, **2**, 21(1985).
11. 김동균, 서윤수, 송준상, 이문호, 양상용, 최재덕, 김상진, 안병호, 김상종 : 국립환경연구원보, **9**, 127 (1987).
12. 정인환, 이영록 : 고려대학교 이공논집, **25**, 261 (1984).
13. 김정국, 이영록 : 한국미생물학회지, **22**, 29(1984).
14. 김성희, 김창숙, 조인선, 최순영, 민경희 : 한국미생물학회지, **28**, 71(1990).
15. 문경희, 박정희, 최순영, 이유미, 김태한, 이연수, 민경희 : 한국미생물학회지, **27**, 188(1989).
16. Nakazawa, T., S. Inouye and A. Nakazawa: *J. Bacteriol.* **144**, 222 (1980).
17. Chakrabarty, A.M.: *J. Bacteriol.* **112**, 815 (1972).
18. 최순영, 김창숙, 이명혜, 황문옥, 이창섭, 민경희 : 한국수질보전학회지, 게재예정(1990).
19. Williams, P.A. and M.J. Worsey : *J. Bacteriol.* **125**, 818 (1976).
20. Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell, and S. Falkow: *J. Bacteriol.*, **127**, 1529 (1976).
21. Johnston, J.B. and I.C. Gunsalus: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **75**, 13 (1977).
22. Yano, K. and T. Nishi: *J. Bacteriol.* **143**, 552 (1980).

(Received November 9, 1990)