

폭약 Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX)에 노출된 분해세균 *Pseudomonas* sp. HK-6의 세포반응과 형태변화

장호원 · 강형일¹ · 김치경² · 오계현*

순천향대학교 생명과학부, ¹순천대학교 환경교육과, ²충북대학교 미생물학과

Cellular Responses and Morphological Changes of RDX-degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. HK-6 Exposed by Explosive Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). Chang, Hyo-Won, Hyung-Yeel Kahng¹, Chi-Kyung Kim², and Kye-Heon Oh*. Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea, ¹Department of Environmental Education, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea, ²Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea – The cellular responses of RDX-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. HK-6 to explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) were examined. Strain HK-6 grown at different RDX concentrations was found to demonstrate the survival rate in proportional to the rate of the stress shock proteins produced in this bacterium. Analysis of total cellular fatty acid acids showed that lipids 10:0 iso and 14:1 ω5c/ω5t increased approx three times in strain HK-6 grown on RDX media than TSA media. SDS-PAGE and Western blot using anti-DnaK and GroEL revealed that several stress shock proteins including 70 kDa DnaK and 60 kDa GroEL were newly synthesized in strain HK-6 exposed to different RDX concentrations in exponentially growing cultures. 2-D PAGE of soluble protein fractions from the culture of HK-6 exposed to RDX demonstrated that approximately 300 spots were observed on the silver stained gel ranging from pH 3 to pH 10. As a result, 10 spots were significantly induced and expressed in response to RDX. Scanning electron microscopy for the cells treated with 0.135 mM RDX for 12 hrs showed the presence of perforations and irregular rod shapes with wrinkled surfaces.

Key words: *Pseudomonas* sp. HK-6, RDX stress, stress-shock proteins, morphological change

동물이나 식물과 같은 고등생물은 다양한 환경조건에서 살아가기보다는 상당히 제한되고 안정된 환경에서 살고 있는데 비하여 미생물들은 매우 다양한 환경에서 분포하여 살고 있다. 일부 미생물들은 온도, pH, 염분, 영양소의 제한, UV 노출 등의 부적절한 환경오염원에 노출되면 유전자의 발현변화를 수반하는 신속하고 일시적인 능력을 나타내게 된다[23]. 특히 최근 산업의 급속한 발전으로 인한 다양한 중금속이나 유기화합물과 같은 물질에 노출된 미생물은 생존을 위한 특별한 방어기작을 가지는 것으로 보고되고 있다[2].

화학적 환경스트레스원으로서 방향족 탄화수소는 분해가 어렵고 자연계에서 오랜 기간동안 잔류함으로써 생태계에 커다란 문제를 일으킨다. 이들 화합물들은 미생물의 세포막을 구성하는 지질에 친화성을 가져 세포막의 구조와 기능의 변화, 세포막의 전위과파, 막 단백질의 변성시키는 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다[7, 10, 21, 23]. 미생물들은 이러한 화학물질에 대한 치명적인 피해를 극복하기 위하여 유

전자 변화를 조절하고 스트레스 충격단백질을 합성하거나 세포막의 변화를 일으켜 항상성을 유지하려한다. 미생물이 최근들어 산업활동에 널리 사용되고 있는 benzene[2], phenol [11, 16], 2-chlorophenol[15], 4-chlorobenzoate와 biphenyl [19], 폐녹시제 제초제인 2,4-dichlorophenoxyacetic acid와 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid[5] 등을 포함하는 난분해성 유기화합물에 노출되었을 때 여러 종류의 스트레스 충격단백질이 유도되는 것을 2-D PAGE를 통하여 확인되었다.

폭약 hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX)는 질소 방향족 화합물로서 군사적 목적뿐만 아니라 건설현장이나 다른 산업적 목적으로도 널리 사용되는 폭발성의 화학물질이다. 그러나 이들 화합물들은 구조적으로 분해가 어려워 자연 환경에 노출시 토양에 잔류하거나 지표수와 지하수를 포함하는 수계를 오염시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[13, 22]. 특히 군사 시설과 관련하여 RDX는 심각한 환경오염원으로서 그 독성과 환경에 미치는 문제점들이 일부 선진국에서 보고되어져 왔으며, 자연생태계에 축적되어 생물체에 대하여 독성으로 작용하거나, 내분비교란물질로서 작용하는 것으로 알려져 왔다[13]. 최근 미생물에 의한 RDX의 생분해에 대한 연구가 일부 보고되고 있으나[1, 9, 12], 환경 스트

*Corresponding author
Tel. 041-530-1353, Fax. 041-530-1350
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

레스로서 생물체에 미치는 영향과 관련된 연구는 거의 보고된 바 없다.

본 연구에서는 토양에서 분리된 RDX 분해세균인 HK-6를 이용하여, RDX가 환경스트레스로 작용하였을 때 RDX 노출농도가 증가함에 따른 세균의 세포학적 변화양상을 조사하였다. RDX 농도가 증가함에 따라 생성되는 스트레스 유도단백질을 SDS-PAGE, Western blot, 그리고 2-D PAGE를 통하여 분석하였다. RDX의 노출에 따른 HK-6에서 세포막의 총 지방산의 변화를 조사하였으며, 치사농도의 RDX에 노출된 HK-6의 형태학적 변화를 주사전자현미경을 이용하여 확인하였다.

재료 및 방법

분해세균의 분리 및 동정

RDX에 노출된 지역에서 채취한 토양표본으로부터 RDX의 분해능을 가지는 세균이 농화배양과 순수배양 기법을 통하여 분리되었다. 사용된 배지는 K_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 5 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.07 mM, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.04 mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0005 mM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.00035 mM을 포함하는 기본배지에 보조탄소원으로 succinate 5 mM과 적당량의 RDX가 첨가된 배지를 사용하였다. 준비된 배지는 pH 7.2로 조절한 후 고압멸균(121°C, 15분) 하였다. 분리세균은 10%의 접종량을 이용하면서 계대하였으며, 진탕혼합배양기에서 배양(30°C, 150 rpm)하였다. 이 분리세균은 현미경을 통한 형태학적 특성조사를 실시하였으며, BIOLOG Analysis System에 의한 다양한 기질이용 여부와 Hewlett Packard 6890 series II gas chromatograph를 이용한 Microbial Identification System에 의한 지방산 성분 분석을 통하여 동정하였다.

RDX에 대한 분리세균의 생존율 측정

LB액체배지(1% tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract)에서 자란 분리세균이 대수생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 O.D.값이 0.8일 때, 원심분리용 튜브에 넣고, 2000×g에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 균체를 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척하여 준비된 0.045 mM, 0.09 mM, 0.135 mM의 RDX를 포함하는 액체배지에 동일한 양의 세척한 분리세균을 각각 접종하였다. 2시간 간격으로 LB 고체배지에서 100 µl 씩 평판도말한 후, 30°C에서 배양하여 형성되는 집락을 계수하여, RDX의 농도와 노출시간에 따른 세균의 생존율을 각각 분석하였다.

RDX의 충격에 의한 분리세균의 지방산 조성변화 분석

RDX에 의한 분리세균의 지방산 조성 분석을 위하여 TSA (trypticase soy agar, Difco, MI, USA) 배지와 RDX(0.135 mM)에 24시간동안 노출시킨 후 얻어진 균체에 NaOH-

methanol을 첨가하여 반응시켰다. 균체는 가수분해되어 세포막 또는 세포벽의 지질로부터 지방산이 분리되었다. 분리한 지방산이 담긴 튜브에 HCl-methanol을 첨가하여 80°C에서 반응시켜 냉각시키고 *n*-hexane을 가하여 fatty acid methyl esters를 추출하여 분석에 사용하였다. 이때 튜브에 산성화된 하층용액은 버리고 유기성 추출물만을 sample vial에 옮겨 flame ionization detection(GC-FID)와 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)가 부착된 GC로 지방산을 분석한 후, MIDI의 표준 데이터베이스를 이용하여 확인하였다.

RDX에 대한 분리세균의 스트레스 충격반응

스트레스 충격실험은 Flattery-O'Brien 등[8]의 방법으로 실시하였다. RDX에 의한 분리세균의 스트레스 충격실험을 위하여 100 ml의 무기배지에 RDX의 경우 0.045 mM, 0.09 mM, 0.135 mM이 되도록 각각을 첨가하였다. LB 액체배지에서 자란 분리세균을 2,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 이때 얻어진 균체는 10 mM의 phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척한 후, 원심분리하여 준비된 농도의 각 배지에 10^7 - 10^8 cells/ml이 되도록 현탁하였다. 30°C에서 분당 150회로 회전하는 회전진탕배양기에서 12시간 동안 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하였다.

단백질의 획득 및 SDS-PAGE

분리세균에 RDX로 스트레스 충격을 준 후 4°C로 유지하면서 5000×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 균체를 증류수로 세척하였다. 세척된 균체는 다시 증류수에 현탁하여 4°C로 유지하면서 50 W의 초음파 분쇄기(Fischer M-300, Pittsburgh, PA, USA)로 30초간 25회 반복하면서 세포를 파쇄하여 단백질을 추출하였다. 이 시료는 3500×g로 4°C에서 30분간 원심분리 한후, Lowry 방법을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다[14]. 추출한 단백질은 Bollag 등[3]의 방법에 따라 SDS-PAGE 하였다. Separating gel은 12%의 acrylamide slab gel을 사용하였으며, stacking gel은 5%로 acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동은 60 V에서 100 V로 약 2시간 30분동안 실시하였으며, 얻어진 gel은 gel-staining solution (0.1% Comassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2시간 염색하였고, gel-destaining solution I(10% methanol, 10% glacial acetic acid)로 1시간 동안 처리한 후 다시 gel-destaining solution II(5% methanol, 7% glacial acetic acid)로 8시간동안 처리하였다.

Western blot

균주 HK-6는 RDX에 의한 스트레스 충격처리 후, SSPs의 분석을 위하여 Bollag 등[4]의 방법에 따라 Western blot을 실시하였다. SDS-PAGE로 단백질을 분자량 크기에 의해 분리한 후, gel에 있는 단백질을 semi-dry electroblotter(Owl separation systems, Portsmouth, NH, USA)를 사용하여

Hybond™-PVDF membrane(Amersham International plc., Buckinghamshire, England)으로 옮겼으며(40 mA, 60 min), 단백질이 옮겨진 membrane을 phosphate buffer saline(0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄)로 15분씩 2회 세척한 후, 1% bovine serum albumin으로 50분 동안 처리하고 다시 PBS buffer로 15분씩 2회 세척하였다. 1차 항체는 각각 anti-DnaK monoclonal antibody와 anti-GroEL monoclonal antibody(Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada)로 PBS-Tween 20에 희석(1:10,000)하여 1시간 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.08% Tween 20이 포함된 PBS buffer로 12분 2회, 15분 1회 세척하였다. 2차 항체는 anti-mouse IgG HRP conjugate(Promega, Madison, WI, USA)역시 PBS-0.08% Tween 20에 희석하여 1시간 30분 동안 반응시킨 후, PBS-0.08%로 12분 2회, 15분 1회 세척 후 Western 용 ECL kit(Amersham International plc., Buckinghamshire, England)를 사용하여 X-ray film(AGFA, Belgium)으로 현상하여 분석하였다.

2-D PAGE

2-D PAGE를 위하여 200 µg의 단백질을 50 µl의 buffer I(0.3% SDS, Tris-HCl 50 mM, 0.2 M DTT)에 넣고 95°C에서 5분간 가열하였다. 열음에 5분간 담가둔 후, 5 µl의 buffer II(50 mM MgCl₂, 10 unit DNase, 3.75 unit RNase, 50 mM Tris-HCl)을 넣고 10분간 열음에 유지하였다. Isoelectrofocusing(IEF)을 수행하기 위하여 buffer III(9.9 M urea, 4% NP-40, carrier ampholyte(pH 3-10), 100 mM DTT)에 시료를 녹였다. IEF와 SDS-PAGE는 PROTEAN II xi electrophoresis kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였으며, silver staining은 Morrissey 방법[17]에 의해 수행하였다. 2-D gel 상에서 분리된 단백질 spots는 semi-dry blotting apparatus(Bio-Rad Trans-Blot SD)를 이용하여 2 mA/cm²에서 50분 동안 처리하여 PDVF membrane으로 옮긴 후, Coomassie brilliant blue R250으로 염색하여 50% 메탄올로 세척하였다. 염색된 2-D gels는 Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)에 의해 분석하였다.

주사전자현미경을 이용한 세포형태관찰

HK-6를 대수성장기까지 성장시킨 후, 균체를 회수하여 100 mM의 phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척하였다. 이 균체를 RDX가 0.135 mM에 포함된 무기영양배지에 10⁶-10⁷ cells/ml이 되도록 현탁하여 30°C, 150 rpm에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 이 스트레스 충격실험을 마친 후, pore size가 0.2 µm인 membrane filter로 여과된 균체를 1.5% agarose gel로 옮겼다. 균체가 옮겨진 gel을 0.5 cm×0.5 cm의 크기로 자른 후, Ng 등[18]의 방법에 따라, 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 녹여 만든 2.5% glutaraldehyde

용액에서 4시간 동안 고정하고, 동일 buffer(pH 7.2)로 15분씩 3회 세척한 후, 30%에서 100% ethanol(30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%)로 각각 15분간씩 탈수시켰다. 계속하여 100% ethanol과 isoamyl acetate를 1:1로 혼합한 시약에 15분간 처리하였으며, isoamyl acetate로 4시간 동안 처리한 후, 공기중에서 건조시켰다. Sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co., Ltd., Japan)를 사용하여 두께가 300 Å이 되도록 gold coating하여 주사전자현미경(S-2500C, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

세균의 동정 및 RDX의 생분해

RDX 오염지역에서 분리한 세균 HK-6는 그람음성의 간균이였으며, RDX에 대한 분해능을 나타내었다. HK-6는 BIOLOG Analysis System에 의한 다양한 기질이용 여부(Table 1)와 Hewlett Packard 6890 series II gas chromatography를 이용한 Microbial Identification System에 의한 지방산 성분 분석을 통하여 *Pseudomonas* sp.으로 동정되었으며, *Pseudomonas* sp. HK-6로 명명되었다. 균주 HK-6에 의한 RDX를 포함하는 액체배지에서 분해 및 생장, 그리고 배양기간중의 pH 변화를 관찰하였다. 배지내의 RDX 농도는 0.045 mM이었으며, 균주 HK-6는 7일 정도의 유도기를 거쳐 배양 26일 만에 완전히 분해되었다. 주어진 기간에서 배양액의 최종 pH는 7.3으로 나타났다(Fig. 1).

RDX에 의한 분해세균의 생존율

RDX의 노출 농도와 노출시간에 따른 균주 HK-6 세포의 생존율을 실험하였다. Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 균주 HK-6는 0.45 mM, 0.09 mM, 0.135 mM의 RDX에 노출되었을 때, RDX의 농도와 노출시간에 비례하여 HK-6의 생존율이 점차적으로 감소되는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 HK-6는 RDX를 기질로하는 세균이라 할지라도, 농도가 증가함에 따라 독성으로 작용하여 생존율에 영향을 미치는 것을 나타낸다. 토양에서 분리한 세균 YK-2는 페녹시계 제초제인 2,4-D를 분해하는 세균이지만 농도가 증가함에 따라 생존율이 크게 감소한다는 보고와 일치하는 결과이다[6].

RDX 노출에 의한 분해세균의 총지방산 조성변화

RDX에 노출됨으로서 나타나는 분해세균 HK-6에서 세포막에서 총 지방산 조성의 변화를 분석하였다. RDX에 의한 지방산 조성변화 시험에서도 10:0 iso의 경우 RDX 노출전의 10.07%에서 노출 후에는 32.15% 증가하였다. 14:1 ω5c/ω5t는 8.9%에서 28.16%로 증가하였으며, 16:1 ω7c/15:0 iso 2OH는 노출 전에는 22.83%였으나, 노출 후 지방산 조성의 변화를 분석한 결과 전혀 나타나지 않는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 페녹시계 제초제인 2,4-D와 2,4,5-T에 노출시

Table 1. Physiological and biological characterization of the strain HK-6 using the BIOLOG analysis system.

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid	-
α -cyclodextrin	-	Itaconic acid	-
Dextrin	-	α -ketobutyric acid	+
Glycogen	+	α -ketoglutaric acid	+
Tween 40	+	α -ketovaleric acid	-
Tween 80	+	D,L-lactic acid	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	+
N-acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid	+
Adonitol	-	Quinic acid	+
L-arabinose	-	D-saccharic acid	+
D-arabitol	+	Sebacic acid	-
Cellobiose	-	Succinic acid	+
<i>i</i> -erythritol	-	Bromo succinic acid	+
D-fructose	-	Succinamic acid	-
L-fucose	-	Glucuronamide	+
D-galactose	-	Alaninamide	+
Genitobiose	-	D-alanine	+
α -D-glucose	+	L-alanine	+
<i>m</i> -Inositol	-	L-alanyl-glycine	+
α -D-lactose	-	L-asparagine	+
Lactulose	-	L-aspartic acid	+
Maltose	-	L-glutamic acid	+
D-mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-mannose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-melibiose	-	L-histidine	+
β -methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline	+
Psicose	-	L-leucine	+
D-raffinose	-	L-ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-proline	+
Sucrose	-	L-pyrogutamic acid	+
D-trehalose	-	D-serine	-
Turanose	-	L-serine	+
Xylitol	-	L-threonine	-
Methylpyruvate	-	D,L-camitine	-
Mono-methylsuccinate	+	γ -aminobutyric acid	+
Acetic acid	+	Urocanic acid	-
<i>Cis</i> -aconitic acid	+	Inosine	-
Citric acid	+	Uridine	-
Formic acid	+	Thymidine	-
D-galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	+
D-galacturonic acid	+	Putrescine	+
D-gluconic acid	+	2-aminoethanol	+
D-glucosaminic acid	-	2,3-buthanediol	-
D-glucuronic acid	+	Glycerol	+
α -hydroxybutyric acid	-	D,L- α -glycerolphosphate	-
β -hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate	-
γ -hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	-

킨 *Burkholderia* sp. YK-2에서 총지방산 조성의 변화를 조사한 실험에서, 지질 14:00, 14:0 3OH/16:1 iso, 17:cyclo, 19:0 cyclo ω 8c 등은 증가한 반면, 노출되지 않은 YK-2 세포에서 지질 16:1 ω 5C, 17:1 ω 7C, 16:1 2OH, 16:0 2OH, 그

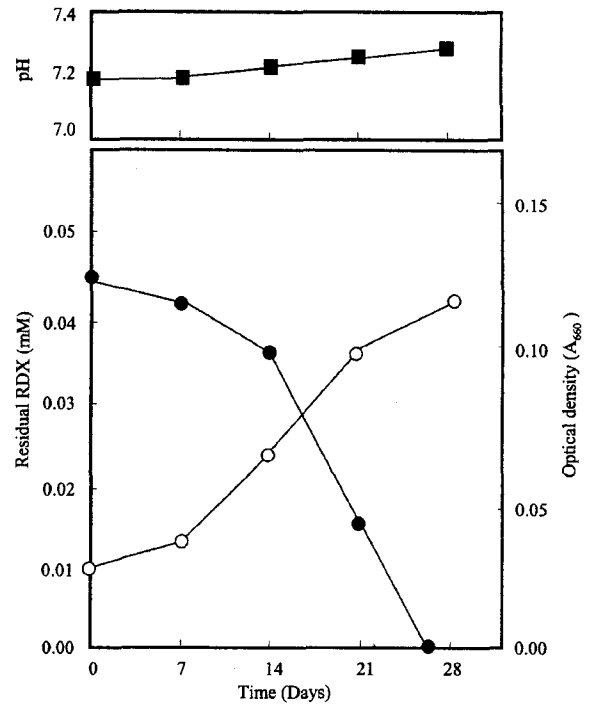


Fig. 1. Growth of test culture, *Pseudomonas* sp. HK-6, measured as optical density at 660 nm (○), and associated with the degradation of 0.045 mM RDX (●) and pH (■).

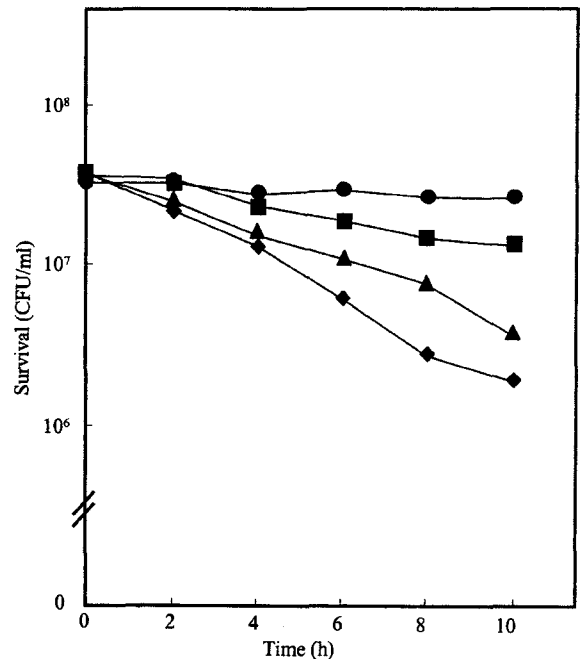


Fig. 2. Survival of *Pseudomonas* sp. HK-6 after RDX shock. HK-6 cells were maintained at the concentrations of 0 mM (●), 0.045 mM (■), 0.09 mM (▲), and 0.135 mM (◆) RDX, respectively. At intervals, the numbers of colonies (CFU/ml) were measured.

리고 18:1 ω 5C가 검출되었으나 이들 화합물에 노출된 후 사라진다는 것이 보고되었다[5]. Pinkart 등[20]은 *Pseudomonas*

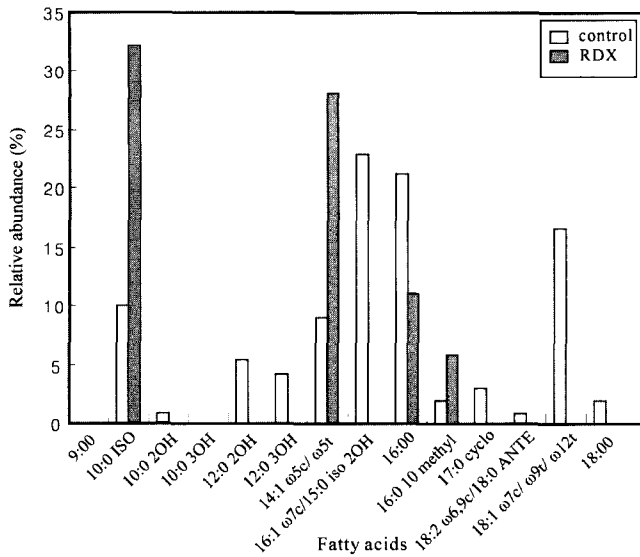


Fig. 3. Fatty acids profiles of *Pseudomonas sp. HK-6* analyzed by GC-FID and GC-MS when grown on TSA or RDX. Cells grown on RDX were used for extraction of total cellular fatty acids, and the lipids were identified based on the retention of authentic references.

putida 균주가 *o*-xylene에 노출된 후 총지방산 분석을 통하여 *trans*-unsaturated fatty acids가 생성됨을 확인하였다.

RDX 노출에 의한 스트레스 충격단백질의 생성

HK-6를 RDX 노출에 의한 세포내에서 스트레스 충격단백질의 생성을 관찰을 확인하기 위하여, 다양한 농도의 RDX에 2시간에서 16시간 노출시킨 후 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 파쇄한 후, 그 상등액을 취해 Lowry 방법에 의해 단백질을 정량하여 60 µg의 표준품을 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 여러 가지 종류의 단백질이 생성되고 소멸되는 것이 관찰되었다(Fig. 4). SDS-PAGE를 시행한 후, gel에 존재하는 단백질을 HybondTM-PVDF membrane으로 blotting

Table 2. Stress shock proteins produced in *Pseudomonas sp. HK-6* treated with RDX at different concentrations.

Treatment period (hrs)	Stress shock proteins	Production of stress shock proteins by RDX (mM)		
		0.045	0.09	0.135
2	DnaK	-	+/-	+/-
	GroEL	+/-	+	+
4	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
6	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
8	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
10	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
12	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
14	DnaK	-	+/-	+
	GroEL	-	+/-	+/-
16	DnaK	-	-	+/-
	GroEL	-	-	-

+ : Production, - : No production

시켜, 옮겨진 단백질 가운데 anti-DnaK monoclonal antibody와 anti-GroEL monoclonal antibody에 특이적으로 반응하는 SSPs의 반응 양상을 살펴보는 Western blot을 실시하였다. Table 2는 HK-6에 다양한 농도의 RDX를 2시간 간격으로 노출시켰을 때, DnaK와 GroEL의 유도 여부를 보여주고 있다. HK-6는 0.09 mM RDX에 2시간동안 노출되었을 때 DnaK와 GroEL이 동시에 유도되기 시작하여 노출 14시간 후에는 이들 스트레스 충격 단백질은 감소되기 시작하였다. 분리세균 HK-6는 TNT에 의한 스트레스 충격실험을 통하여 Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 70 kDa DnaK와 60 kDa

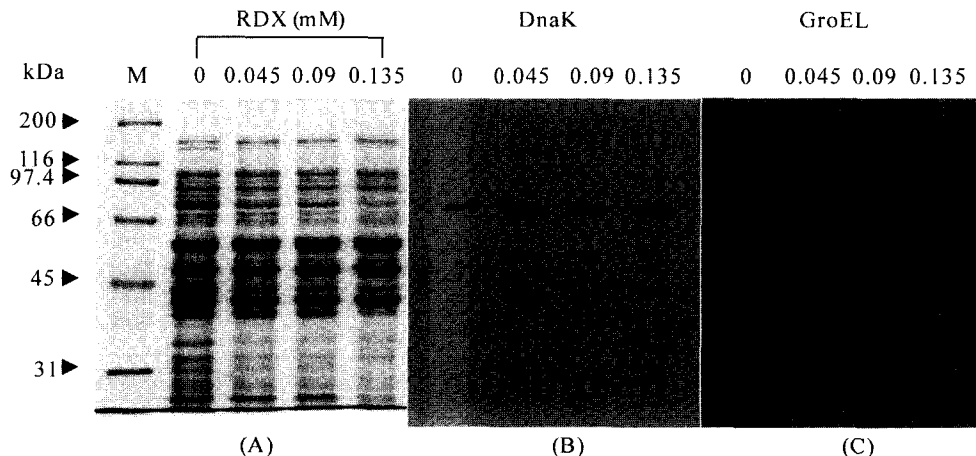


Fig. 4. Induction of stress shock proteins in *Pseudomonas sp. HK-6* treated with different RDX concentrations for 8 hrs. The SSPs were analyzed by SDS-PAGE (A), and Western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies, respectively.

GroEL의 스트레스 충격단백질이 생성되는 것이 확인되었다. Park 등[19]은 4-chlorobenzoate, biphenyl 등의 방향족 화합물에 노출된 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 본 연구에서 밝혀진 균주 HK-6에 RDX에 의해 발현된 것과 동일한 크기의 70 kDa DnaK와 60 kDa GroEL의 스트레스 단백질이 유도되는 것으로 보고하였다.

2-D PAGE 분석

균주 HK-6에 RDX를 노출시킨 후 얻어진 단백질 분획에 대하여 2-D PAGE를 수행하여 HK-6가 RDX에 노출되기 전과 후의 스트레스 충격단백질이 발현되는 양상을 비교하였다(Fig. 5). 2-D PAGE의 gel상에서 약 300개의 spots이 관찰되었으며, RDX에 노출된 세포와 노출되지 않은 세포를 전개한 결과, 10가지 스트레스 충격단백질이 합성되거나 소멸되는 것이 관찰되었다.

RDX 노출에 의한 분해세균의 형태변화

생존율이 급격히 감소하는 농도의 RDX에 12시간동안 노출시킨 HK-6의 외부형태 변화를 정상세포와 비교하여 주사전자현미경으로 관찰하였다. HK-6의 정상적인 모습은 짧고 둥근 간균의 형태와 매끈한 세포표면을 나타내었다(Fig. 6A). 그러나 0.135 mM의 RDX에 12시간 처리한 세포들은 간균의 모양이 약간 짧고 둥근 형태로 바뀌고, 심하게 주그러졌으며, 구멍이 뚫리는 등의 심각한 세포손상을 입는 것이 관찰되었다(Fig. 6B). Cho 등[5]은 폐녹시계 제초제인 2,4-D와 2,4,5-T에 노출된 토양세균인 *Burkholderia cepacia* YK-2에서 세포의 형태변화와 구멍이 뚫어져 죽어가는 현상을 주사

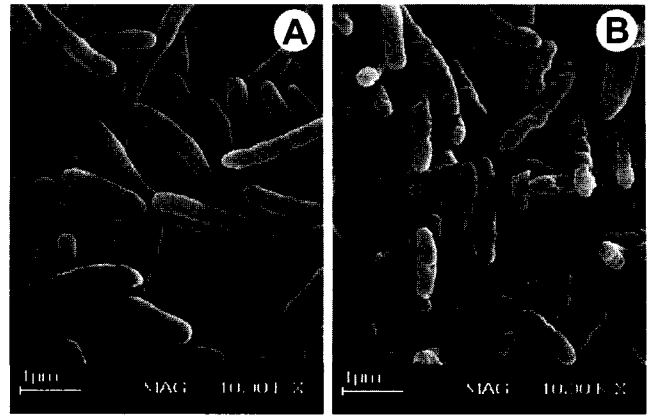


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *Pseudomonas* sp. HK-6 treated with RDX. A, untreated cells; B, cells treated with 0.135 mM RDX for 12 hrs.

전자현미경을 통하여 관찰하였다. Park 등[19]은 biphenyl, 4-chlorobiphenyl, 4-chlorobenzoate 등의 방향족 화합물에 노출된 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서도 HK-6에서의와 같은 유사한 현상이 관찰되었다고 보고하였다. 이러한 결과를 토대로 하여 볼 때, 이들 화합물을 기질로 이용하는 세균이라 할지라도 일정농도 이상에 노출되면 독성물질로 작용하여 세포에 치명적인 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

본 연구를 통하여 RDX 오염지역에서 분리된 RDX 분해 세균은 환경오염원으로서 RDX에 노출되었을 경우에 저농도에서는 기질로 사용하여 성장하지만, 농도가 점차 증가함에 따라 생존율과 세포의 총지방산 조성에 변화를 가져오는 것으로 밝혀졌다. 아치사 조건의 RDX 농도와 노출기간에

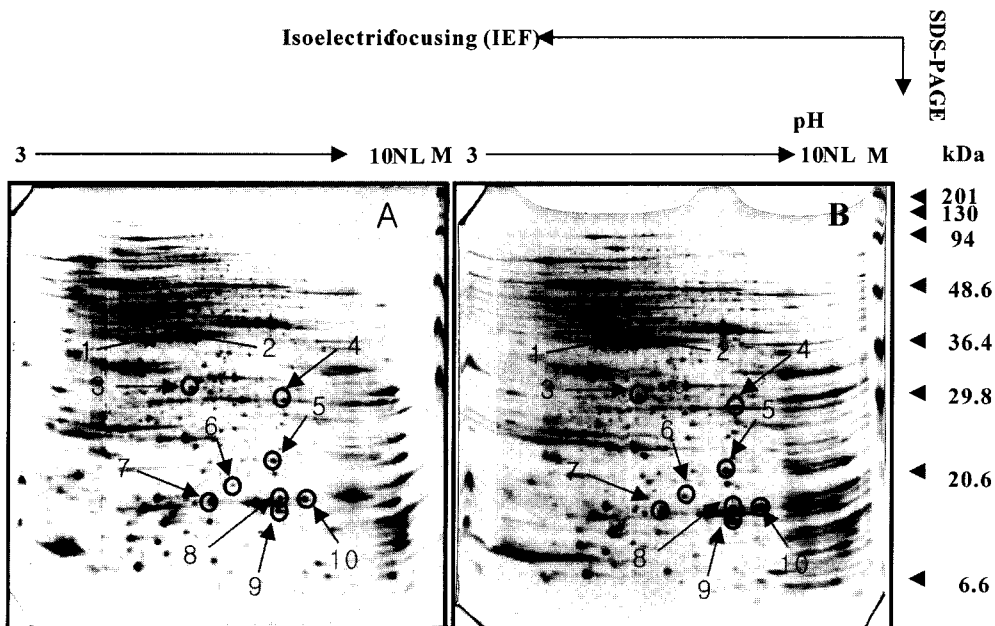


Fig. 5. 2-D PAGE analysis of stress-induced proteins of *Pseudomonas* sp. HK-6: control cells (A), and cells treated with 0.135 mM RDX for 4 hrs (B). Circles indicated RDX-induced proteins.

대하여 HK-6 세균은 생존하기 위하여 여러 가지 스트레스 충격단백질을 생성하였다. 또한 고농도의 RDX에 노출시에는 세균의 생존에 치명적인 영향을 미치는 것이 관찰되었다. SDS-PAGE, Western blot를 통하여 스트레스 충격단백질로 알려진 DnaK와 GroEL가 발현되는 것으로 밝혀졌다. 2-D PAGE를 통하여 RDX에 노출되기 전과 후의 전개양상을 비교한 결과는 많은 단백질 spots이 유도되는 것으로 나타났다. 특히 Park 등[19]에 의해 발표된 70 kDa DnaK와 60 kDa GroEL의 스트레스 충격단백질의 유도는 본 연구에서 얻어진 HK-6에 의해 유도된 충격단백질과 동일한 것으로 추후 N-말단 아미노산 서열과 내부 아미노산 서열 등의 프로테옴 분석을 통하여 이들 스트레스 충격단백질의 명확한 실체와 그 역할에 대한 규명이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

환경오염원으로서 폭약 hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX)에 대한 RDX 분해세균 *Pseudomonas* sp. HK-6의 세포반응과 형태변화에 대하여 조사하였다. 아치사 조건의 RDX 농도와 노출시간에 따른 균주 HK-6의 생존율을 분석한 결과, 이 세균의 생존율은 스트레스 충격 단백질의 생성과 비례하였다. 총세포 지방산 조성분석에서 균주 HK-6는 trypticase soy agar(TSA)에서 자랄 때보다 RDX 배지에서 자랄 때 여러 가지 종류의 지방산이 생성되거나 사라지는 것이 밝혀졌다. Anti-DnaK와 anti-GroEL을 이용하여 SDS-PAGE와 Western blot을 통한 분석으로 균주 HK-6는 70 kDa DanK와 60 kDa GroEL을 포함하는 몇가지 스트레스 충격단백질을 생성하는 것으로 밝혀졌다. RDX에 노출된 HK-6 배양에서 수용성 단백질 분획에 대하여 2-D PAGE를 실시하였으며, pH 3에서 pH 10의 범위에서 약 300 spots가 silver로 염색된 gel상에서 관찰되었다. 그 결과, RDX에 대한 반응으로 10여개의 spots가 현저히 유도 발현되었다. RDX(0.135 mM, 12시간)에 노출된 세포는 구멍이 나타나고 표면의 불규칙적인 형태 변화가 일어나 죽게되는 것이 주사전자현미경을 통하여 관찰되었다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 2001년도 지방대학육성지원(KRF-2001-002-D00226)에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Binks, P. R., S. Nicklin, and N. C. Bruce. 1995. Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1318-1322.
- Blom, A., W. Harder, and A. Martin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 331-334.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein. 1996. *Protein methods*, pp. 107-154. 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein. 1996. *Protein methods*, pp. 195-227. 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
- Cho, Y. S., H. Y. Kahng, C. K. Kim, J. J. Kukor, and K. H. Oh. 2002. Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, *Burkholderia cepaica* YK-2, to the phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *Curr. Microbiol.* **45**: 415-422.
- Cho, Y. S., S. H. Park, C. K. Kim, and K. H. Oh. 2000. Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia* sp. YK-2 isolated from rice field. *Curr. Microbiol.* **41**: 33-38.
- Feber, F., T. Egli, and W. Harder. 1993. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 189-196.
- Flattery-O'Brien, J., L. P. Collinson, and I. W. Dawes. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 501-507.
- Hawari, J., L. Paquat, E. Zhou, A. Halasz, and B. Zilber. 1996. Enhanced recovery of the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) from soil: cyclodextrin versus anionic surfactants. *Chemosphere* **32**: 1929-1936.
- Heipieper, H. J., R. Diefenbach, and H. Keweloh. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1852.
- Jeon, T. J. and K. J. Lee. 1998. Synthesis and requirement of *Escherichia coli*: heat shock proteins GroEL and DnaK for survival under phenol stress conditions. *J. Microbiol.* **36**: 26-33.
- Kitts, C. L., D. P. Cunningham, and P. J. Unkefer. 1994. Isolation of three hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family *Enterobacteriaceae* from nitramine explosive contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4608-4611.
- Knackmuss, H. -J. 1996. Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *J. Biotechnol.* **51**: 287-317.
- Lowry, O. H., N. J. Roseborough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lupi, C. G., T. Colangelo, and C. A. Mason. 1995. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT-2442 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2862-2872.
- Meyer, U., S. Palola, F. Fransco, and R. Ludger. 1995. Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 979-984.

17. Morrissey, J. H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**: 307-310.
18. Ng, L. K., R. Sherburne, D. E. Taylor, and M. E. Stiles. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studies by electron microscopy. *J. Bacteriol.* **164**: 338-343.
19. Park, S. H., K. H. Oh, and C. K. Kim. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr. Microbiol.* **43**: 176-181.
20. Pinkart, H. C., J. W. Wolfram, R. Rogers, and D. C. White. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1129-1132.
21. Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas, and A. Haidour. 1995. Isolation and expression of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentration of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**: 3911-3916.
22. Reiger, P. G. and H. -J. Knackmuss. 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil, pp. 1-18. In Spain, J. C. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*, Plenum Press, New York.
23. Sikkema, J., B. Poolmen, W. N. Konings, and J. A. M. de Bont. 1994. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**: 2986-2992.

(Received Oct. 30, 2002/Accepted Dec. 27, 2002)