

---

Characteristics of MCPA plasmid isolated from  
*Pseudomonas* sp.

Young-Doo Park and Jin-Seong Eum

Mok Won University

ABSTRACT

In order to find the characteristics of selected powerful *Pseudomonas* sp. KU171(pKU19) degrading MCPA, many physiological and genetic tests were accomplished. By the curing and transformation experiment, it was found that the genes of *Pseudomonas* sp.KU171(pKU19) for MCPA-degrading were located on a plasmid pKU19. Also the plasmid had degradative genes for 2,4-D, 3CB, and DCP. Molecular size of pKU19 was measured to be 31.2Kb.

## 1. 서 론

현대의 농업을 포함하는 각 산업 분야에서 다량의 유기 할로겐 화합물들이 사용되고 있다. 그런데 이러한 화합물질들은 널리 사용되면서 자연환경으로 계속적으로 방출되고 있는 바, 이에 따른 인체에 대한 발암 및 기형유발 영향에 대한 연구가 이미 보고된 바 있다.

유기 할로겐 화합물중 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid(MCPA)등은 제조제로 널리 사용되고 있는 염소계 방향족 탄화수소이다.

자연 생태계중에서 특히 토양에 서식하고 있는 미생물군집은 이런 유기화합들을 biomass로 전환시키거나, 분해시켜서 토양내의 다양한 원소의 균형을 유지시켜주는 소위 광화작용(mineralization process)에 중요한 역할을 하고 있다. 그런데 이러한 세균들이 가지는 대사적 다양성은 거의 전부 또는 부분적으로 내재하고 있는 플라스미드에 의해서 나타나게 된다.

난분해성 화합물중 방향족탄화수소를 분해하는 플라스미드로는 CAM(Rheinwald et al., 1973), TOL(Worsey and Williams, 1975), NAH(Dunn and Gunsalus, 1973), SAL(Chakrabarty, 1972)등의 분해계 플라스미드가 보고되어 있다. 염소계 방향족 탄화수소의 분해에 관여하는 플라스미드로는 pJP1과 pJP4 등이 보고 되어있으며, pJP4에 대해서는 물리적 및 유전적 지도가 작성되었다(Don and Pemberton, 1985). 이외에 3-chlorobenzoic acid에 대한 분해능을 나타내는 플라스미드인 pAC25, pAC27, pB13등이 분리되었으며(Chatterjee et al., 1981; Chatterjee and Chakrabarty, 1983), 또한 *Pseudomonas*에서 분리된 pAC27과 *Alcaligenes*의 pJP4사이에 있어서 분해유전자의 보다 자세한 위치와 상동성을 밝혀 낸 바 있다.

지금까지 밝혀진 분해계 플라스미드 중 거의 대다수가 *Pseudomonas*속에서 나타나고 있다는 사실이 난분해성 물질의 분해에 있어서 이들세균의 중요성을 말해주고 있다.

본 연구에 앞서서 2,4-D, MCPA, 3CB등의 염소계 방향족 탄화수소를 분해할수 있는 *Pseudomonas*속의 세균을 분리 및 동정하였으며, 이들 중 2,4-D(2-6주)보다 토양내 잔존성이 1.5-7배 더 강한 MCPA(8-14주)를 자화하는 4 균주로부터 5개의 플라스미드를 분리하여 여러가지 특성을 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 분해능이 가장 우수한 *Pseudomonas* sp. KU559(pKU19) (Fig.1)의 생리적, 물리적 그리고 유전적 특성을 밝혀 보고는 바 이다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 사용 배지

탄화수소 자화능을 위한 최소 배지로는 MCPA, 2,4-D, 그리고 DCP(2,4-dichlorophenol)을 사용할 시에는 최소배지A(Whiteside and Alexander,1963)와 3CB를 사용한 경우에는 최소배지B(Chatterjee et al., 1981)를 사용하였다.

### 2.2. 플라스미드 DNA 분리.

대량분리는 Hansen과 Olsen의 방법을 변형시켜 사용하였으며, 소량 분리를 위해서는 Birnboim과 Doly을 변형시켜서 사용하였다.

### 2.3. 큐어링

Rheinwald등의 방법에 따랐으며, 큐어링 물질로는 mitomycin C를 사용하였다.

### 2.4. 접합 실험

De Graaf et al.의 방법에 따라 여과막 위에서 접합 실험을 실시하였다.

## 2.5. 형질전환 실험

Nakazawa(1983)의 방법에 의거하여 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 플라스미드의 큐어링

*Pseudomonas* sp. KU559의 염소계 방향족 탄화수소에 대한 생분해능과 플라스미드와의 연관성을 알아보기 위하여 mitomycin C(MC)를 큐어링 물질로 하여 큐어링 실험을 하였으나, 큐어링된 균주를 얻을수 없어서 다른 큐어링 물질인 acridine orange를 사용한결과 MCPA에 대한 분해능을 상실한 균주를 3.7% 얻을수 있었으며, 큐어링된 균주에서는 플라스미드가 나타나지 않으므로, 이 균주의 MCPA에 대한 생분해능 상실은 염색체상의 돌연변이가 아니라 플라스미드의 상실에 기인됨을 확인하였다.

### 3.2. MCPA분해균주의 특성

MCPA분해능이 플라스미드에 기인된다고 밝혀진 이 균주의 여러 특성을 알아보기위하여 기타 염소계 방향족 화합물에 대한 분해능과 여러 종류의 항생제에 대한 내성실험을 하였다. 그 결과 이 균주는 2,4-D, 3CB, 그리고 DCP에서 분해능을 나타내어 MCPA를 포함하여 모두 4가지 염소계 화합물을 분해할수 있음이 밝혀졌는데, 이러한 대사적 다양성을 갖기위한 진화에는 다음과 같은 변화가 필요하다고 보고되어 있다. i)별개의 대사경로의 조합에 의한 새로운 대사경로의 통합 ii)주요 효소의 조절, 활성, 또는 특이성의 변화 iii)비생산적 대사경로의 불활성화등이다.

또한 항생제에 대한 내성 실험결과 KU171 균주는 Ap, Tc, Cm, Km, Gm, 그리고 Sm등 6가지 항생제 모두에 대하여 내성을 나타냈다.

### 3.3 플라스미드의 특성

KU171균주의 플라스미드인 pKU19의 특성을 조사하기 위하여, 이미 밝혀진 MCPA분해능 이외의 다른염소계화합물에 대한 분해능, 항생제에 대한 내성,그리고 증금속에 대한 내성등을 조사하기 위하여 야생균주와 큐어링된 균주를 비교 실험한 결과 pKU19플라스미드는 4가지 염소계 화합물에 대한 분해능을 갖고있음을 확인할 수 있었다.

### 3.4 플라스미드의 분자량 측정

MCPA 플라스미드의 분자량을 측정하기 위하여 RP4, pSY343,그리고 pDC100을 표준 분자량 지표로 사용하여 측정한 결과 31.2Kb로 측정되었다.

### 3.5 형질전환에 의한 플라스미드의 전달

접합에 의한 pKU19플라스미드의 전달이 불가능함에 따라, 형질전환 실험에 의하여 분해능의 전달을 시도하였다. *P. putida* TN1307균주를 수용세포로 사용하여 형질전환 실험을 실시한 결과  $3.6 \times 10^{-7}$ 의 빈도로 분해능이 전달됨을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Alexander, M., 1999. Microbial degradation and biological effects of soil biology. *Rev. Nat. Resources Res.*, UNESCO, 9, 209-226.
- Birnboim, H.C. and J. Doly, 1989. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1512-1522.
- Chatterjee, D. K., S. T. Kellog, S. Hamada, and A. M. Chakrabarty, 1981. Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified ortho pathway. *J. Bacteriol.*, 146, 639-646.

Fisher, P. R., J. Appleton, and J. M. Pemberton. 1998. Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid, pJP1, from *Acaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.*, 135, 798-804.

Higgins, I.J. and R. G. Burns, 1985. *The chemistry and microbiology of pollution*: University of Kent at Kenterbury.

Oh, K. H., S. R. Kim, Y. D. Park, and Y. N. Lee, 1997. Isolation and characterization of chlorinated aromatic hydrocarbons utilizing bacteria. *J. Nat. Sci.* 28. 61-66.

Reineke, W. and H.-J. Knackmuss 1980. Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 derivatives. *J. Bacteriol.*, 142, 467-473.