

Naphthalene을 분해하는 *Pseudomonas putida* N3의 분리 및 특성

고영희*·하일호·배경숙

한국과학기술원 유전공학센터

Isolation and Characterization of *Pseudomonas putida* N3 Degrading Naphthalene

Kho, Yung-Hee*, Ilho Ha, and Kyung Sook Bae

Korea Advanced Institute of Science and Technology, Genetic Engineering Center
Seoul 130-650, Korea

A strain capable of growth on naphthalene minimal medium was isolated from soil by selective enrichment culture and identified as *Pseudomonas putida* N3 according to its morphological and physiological characteristics. The optimum pH and temperature for growth of the isolate were 7.0 and 30°C, respectively. This strain was resistant to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and streptomycin but sensitive to tetracycline and rifampicin. Of the naphthalene related compounds, 1,5-dihydroxynaphthalene was more easily utilized than naphthalene due to its solubility. And catechol was degraded through *meta*-cleavage pathway. A 110 Kb plasmid which encodes for a single set of enzymes responsible for the degradation of naphthalene was obtained.

토양 및 폐수내에 존재하는 *Pseudomonas* 속의 많은 종들은 여러가지 천연물질과 인공합성 물질들을 이용하여 성장할 수 있는 것으로 알려져 있다(1, 2). Camphor를 분해하는 CAM plasmid(3), toluene을 분해하는 TOL plasmid(4), naphthalene과 salicylic acid를 분해하는 NAH/SAL plasmid(5), octane을 분해하는 OCT plasmid(6)에 대한 연구가 되어 있으며 근래에는 이러한 plasmid들에 대한 조절기작이 연구되어 지고 있다. Naphthalene과 alkylnaphthalene은 소량이 물에 녹으므로 원유중에서 독특한 성분이라고 볼 수 있다. Naphthalene은 미생물에 의해서 분해되며 그 처음 단계로서 산소분자 1개를 naphthalene에 도입함으로써 (+)-cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene을 형성한 후 1,2-dihydroxynaphthalene을 거쳐서 분해되는 것이 효소학적인 연구에 의해서 밝혀져 있다(7). NAH plasmid에 대해서 많은 연구가 되어 있으며 naphthalene에서

salicylic acid까지의 분해에 관련된 plasmid 절편을 vector에 포함시켜서 cloning 한 연구도 있다(8-9). 본 연구에서는 국내의 폐수와 토양에서 naphthalene을 분해하는 미생물을 분리하여 동정하였으며 그 성장 특성과 항생물질에 대한 저항성을 조사하였다. 또한 그것의 naphthalene 분해 경로를 추적하였으며 plasmid에 관한 조사를 하였다.

실험재료 및 방법

사용 균주

분리한 naphthalene 이용 균주 이외에 plasmid의 크기를 비교하기 위하여 *Pseudomonas putida* mt-2 (KCTC 1643)을 사용하였으며 plasmid의 역할을 알기 위한 접합실험의 수용체로서 *Pseudomonas acidovorans* 4A1을 사용하였다. 사용균주는 최소배지에서 계대 배양하여 4°C에서 보관하였다.

Key words: Naphthalene degrading bacteria, *Pseudomonas putida*, *meta*-cleavage, aromatic compound

* Corresponding author

배 지

균주의 분리 및 배양에 사용한 최소배지는 Table 1과 같았으며 완전배지는 LB 배지(Tryptone 10g, NaCl 10g, Yeast extract 5g, 증류수 1l)를 사용하였다.

Naphthalene 분해 미생물의 분리

서울 근교의 주유소 및 세차장의 토양 및 폐수를 취하여, naphthalene을 증기상태로 공급하는 액체 최소배지에 yeast extract를 0.1% 첨가하여 성장시킨 후 yeast extract 양을 0.05%, 0.03%, 0.01%로 낮춘 배지로 계속 옮겨 배양한 뒤, 최종적으로 naphthalene 만이 유일한 탄소원인 액체 최소배지에서 배양하였다. 이 균체를 연속배양하면서 회석속도를 점차 증가하여 naphthalene 이용능이 우수한 균주를 선별하였다(10).

분리 미생물의 동정

분리된 균주의 동정은 통상적인 방법(11)과 상품화된 API 20NE Kit (Analytical Products Inc., New York)를 사용하였다.

항생물질에 대한 저항성 조사

Ampicillin(10 µg/ml), chloramphenicol(20 µg/ml), kanamycin(100 µg/ml), streptomycin(50 µg/ml), tetracycline(25 µg/ml)을 함유한 LB 배지에 균주를 10⁴ cells/plate로 접종하여 3일후 성장여부를 확인하고 생장을 나타낸 균중에 대해서는

Table 1. Minimal medium for selection and cultivation of the isolated strain.

Component	Concentration(g)
NH ₄ Cl	1.0
K ₂ HPO ₄	4.35
NaH ₂ PO ₄	3.9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.48
CaCl ₂	0.03
FeSO ₄	0.01
MnCl ₂	0.01
CoCl ₂	0.001
Na ₂ MoO ₄	0.001
Distilled Water	1 l
pH 7.0	

*Sterilized by filtration (pore size; 0.45 µm)

항생제 농도를 각기 다르게한 LB 배지에서 배양하여 최소 저해농도(MIC)를 결정하였다.

Catechol oxygenase의 활성 측정

Nozaki(12)의 방법에 의해서 효소활성을 측정하였다.

Plasmid의 확인

Kado 등(13)의 alkaline lysis 방법에 의해서 행하였다.

결과 및 고찰

Naphthalene 분해균주의 분리

증기상태의 naphthalene을 공급하면서 회분식 배양으로 성장시킨 후, 연속배양 장치로 옮겨 배양하면서 회석속도(dilution rate)를 5.2-5.8 min⁻¹까지 증가시켜 이 보다 작은 성장속도(growth rate)를 지닌 미생물을 배양기내에서 배제하였다(10). 세대시간이 7.2-8.0시간에 해당하는 균을 고체배지에 도말하여 세번 옮겨 배양하면서 균일한 성장을 나타내는 순수 균락을 naphthalene 분해균주로 최종선정 후 N3라 하였다.

균주의 동정

분리 균주 N3를 분류동정하기 위하여 그 형태적, 생리적 및 배양상의 특성을 조사하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다. N3는 Gram 음성균으로서 간상형의 호기성 세균이었으며 강한 운동성을 지니고 있었다. Oxidase test가 양성이며 growth factor를 요구하지 않으므로 Pseudomonadaceae과의 *Pseudomonas*속과 *Frateruria*속 중의 하나로 추정되었고 pH 3.6인 배지에서 생장하지 못하므로 *Pseudomonas*속에 속하는 것으로 밝혀졌다(11). N3는 형광 색소를 분비하므로 (Fig. 1) fluorescens group임을 알 수 있었으며 nitrate를 환원시키지 못하고 41°C에서 생장하지 못하고 lecithinase를 생성하지 않는 성질로 *Pseudomonas putida*임을 최종적으로 확정하였다. 이상의 결과를 확인하기 위하여 상품화 되어 있는 호기성 미생물 동정을 위한 API 20NE kit를 이용하여 비교해 본 결과 Table 3과 같았다. Table 3의 결과로 균종을 추정하면 99.8%의 확률로 *Pseudomonas putida*라는 판정이 얻어지므로 N3 균주를 *Pseudomonas putida* N3로 동정하였다.

Table 2. Characteristics of the isolated strain N3.

Characteristics	N3
Shape	rod
Size	0.4 × 1.1 m
Gram staining	-
Motility	+
Flagella	polar
Oxidase	+
Fluorescence pigment	+
Denitrification	-
Lecithinase	-
Gelatin hydrolysis	-
Growth at 41 °C	-
Utilization of	
Glucose	+
Mannose	-
Arabinose	+
Maltose	-
Rhamnose	-
Mannitol	-
Inositol	-

***P. putida* N3의 생장 특성**

P. putida N3의 생장 최적온도를 알기 위하여 LB 배지에 접종하여 정치 배양한 결과 Fig.2와 같은 결과를 얻었다. 최적온도는 30°C였으며 24시간

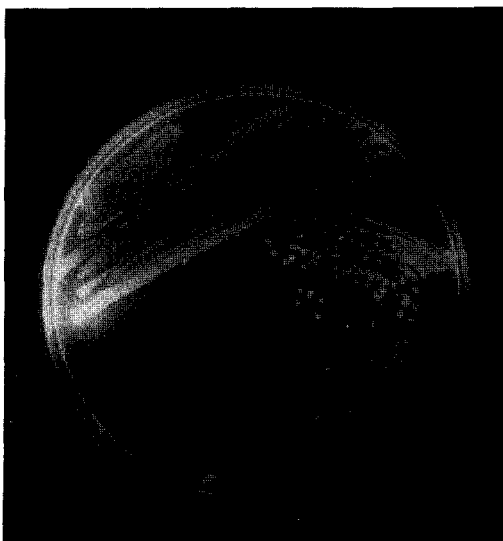


Fig. 1. Fluorescence pigment of *Pseudomonas* sp. N3.

Table 3. Identification of *Pseudomonas* sp. N3.

Characteristics	N3	Score	
Denitrification	-	0	
Tryptophan	-	0	
Glucose, fermentative	-	0	0
Arginine dihydrolase	+	1	
Urease	-	0	
Esculine	-	0	1
Gelatin hydrolysis	-	0	
<i>p</i> -Nitrophenylglucosamine	-	0	
Glucose, oxidative	+	4	4
Arabinose	-	0	
Mannose	-	0	
Mannitol	-	0	0
N-Acetylglucosamine	-	0	
Maltose	-	0	
Gluconate	+	4	4
Caprate	+	1	
Adipate	-	0	
Malate	+	4	5
Citrate	+	1	
Phenylacetate assimilation	+	2	
Oxidase	+	4	7

0140457 = *Pseudomonas putida* (99.8%)*

* determined by API 20 NE.

에 모든 생장이 완료됨을 알 수 있었다. 37°C에서는 거의 생장하지 못하였으며 20°C에서는 30°C 일 때의 반 정도 생장하였다. *P. putida* N3의 생장 최적

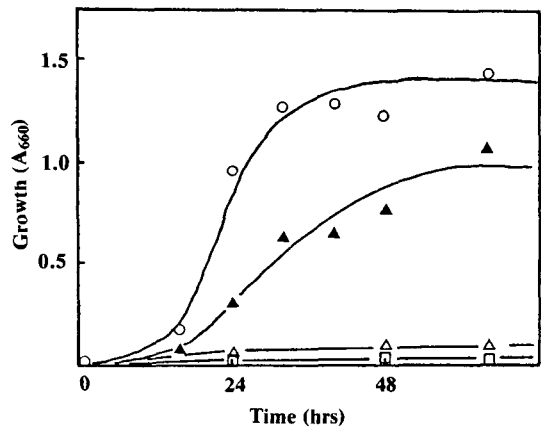


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *P. putida* N3.

□: 10°C, ▲: 20°C, ○: 30°C, △: 37°C

pH를 알기 위하여 naphthalene의 분해중간 산물이며 배지내에 용해시킬 수 있는 salicylic acid를 기질로 하여 30°C에서 pH를 달리하여 배양한 결과 Fig. 3와 같았다. 최적 pH는 7.0이었으며 산성인 조건보다는 염기성인 조건에서 생장이 잘 되었다. 이상의 최적 생장조건에서 증기상태의 naphthalene을 유일한 탄소원으로 공급하는 최소배지에서 생장을 조사해본 결과 Fig. 4와 같았다. 약 하루 동안의 잠복기를 거쳐서 3일동안 생장을 계속하여 4일후 생장이 완료 되었으며 그 기간 동안 pH는 7.0에서 6.7로 변화되었다. Naphthalene을 유일한 탄소원으로 하여 생장하였을 때는 앞서의 최적 생장조건 조사시의 탄소원으로 사용하였던 salicylic acid에 비하여, 그 생장속도가 매우 느렸으며 최종 균체량도 O.D. 660 nm=0.45로서 naphthalene이 분해가 매우 어려운 기질임을 나타내고 있다.

P. putida N3의 유사방향족 화합물 이용성

Naphthalene을 기본골격으로 하고 여러 치환기를 지닌 화합물 8종에 대한 P. putida N3의 분해성은 Table 4와 같았다. 미생물에 유독한 것으로 알려져 있는 1-naphthol, 2-naphthol에서는 전혀 생장하지 못하였으나 hydroxy기를 두개지닌 것들에서는 생장을 나타내었다. 이외에도 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid에서도 생장을 나타내었다. 특히 1,5-dihydroxynaphthalene은 naphthalene 보다 더욱 많은 생장을 나타내었는데 이는 oxygenation에 의한 hydroxy기의 첨가를 용이하게 해주었기 때문으로 사료된다. 고리 구조가 하나인 benzene의 유도체에 대

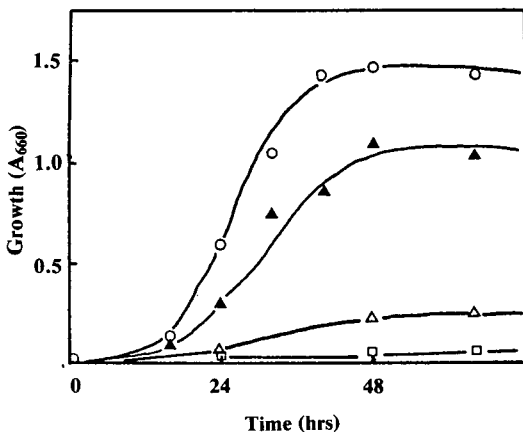


Fig. 3. Effect of pH on the growth of P. putida N3. □: pH 5.0, △: pH 6.0, ○: pH 7.0, ▲: pH 8.0

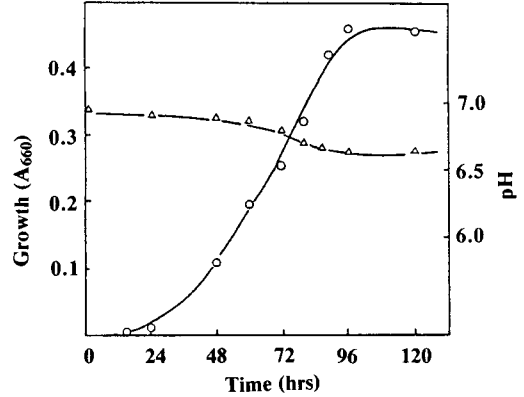


Fig. 4. Growth of P. putida N3 on naphthalene. ○: cell growth, △: pH of the medium

한 P. putida N3의 이용성은 Table 5와 같았다. Benzoic acid와 salicylic acid만을 이용하였으며 o-, m-, p-tolitic acid와 toluene, xylene에서 생장하지 않는 것으로 미루어 P. putida N3는 TOL/XYL plasmid와 연관이 없는 것으로 사료된다. 또한 gentisic acid를 기질로 이용 못하는 사실로 미루어 보아 gentisic acid 분해 경로를 이용하지 않는 것으로 사료된다(14).

P. putida N3에서의 catechol 분해 경로

Catechol의 분해는 catechol 1,2-oxygenase에 의한 ortho-분해경로, 또는 catechol 2,3-oxygenase에 의한 meta-분해경로를 통해서 이루어진다. 또한 Pseudomonas 속의 경우 meta-분해경로에 관여하는

Table 4. Utilization of compounds related to naphthalene by Pseudomonas putida N3.

Compound	Growth (%)
Naphthalene	100
1-Naphthol	—
2-Naphthol	—
1,5-Dihydroxynaphthalene	170
2,3-Dihydroxynaphthalene	48
2,7-Dihydroxynaphthalene	44
5-Amino-2-naphthalene sulfonic acid	—
8-Amino-2-naphthalene sulfonic acid	—
1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic acid	78

Table 5. Utilization of aromatic compounds by *Pseudomonas putida* N3.

Compound	Growth
Benzoic acid	+
Gentisic acid	-
Salicylic acid	+
<i>o</i> -Toluic acid	-
<i>m</i> -Toluic acid	-
<i>p</i> -Toluic acid	-
Benzene	-
Toluene	-
Xylene	-
Benzyl alcohol	-
Phenol	-
<i>o</i> -Cresol	-
<i>m</i> -Cresol	-
<i>p</i> -Cresol	-

효소체계는 모두 plasmid상에 존재하며 *ortho*-분해경로에 관여하는 효소체계는 chromosome상에 있다고 알려져있다(5, 15). *P. putida* N3의 catechol 분해경로를 알기 위하여 benzoic acid를 기질로 하여 생장시킨 후 catechol 분해효소를 조사하여 본 결과 catechol 2,3-oxygenase의 활성만이 있는 것으로 밝혀졌다(Table 6). 따라서 *P. putida* N3는 catechol을 *meta*-분해경로를 통해서 분해하여 2-hydroxymuconic semialdehyde를 생성한 후 pyruvate와 acetaldehyde로 최종 분해함을 알 수 있다.

***P. putida* N3의 항생제 저항성과 최소 생육 저해 농도(MIC)**

일반적으로 *Pseudomonas* 속은 항생제에 대하여 넓은 저항성을 지니고 있으며, 이러한 저항성은 대부분 plasmid와 연관이 있음이 알려져 있다(11). *P. putida* N3의 항생제 저항성은 Table 7과 같았다. Tetracycline과 rifampicin에 대해서만 생장이

Table 6. Specific activity of enzymes of *ortho*-and *meta*-pathways in cell free extracts of *Pseudomonas putida* N3 grown on benzoate.

Enzyme	Specific activity*
Catechol 1,2-oxygenase	—
Catechol 2,3-oxygenase	0.024

* micromole of HMSD formed/mg of protein/min.

Table 7. Antibiotic resistance and minimal inhibitory concentration (MIC) of *Pseudomonas putida* N3.

Antibiotic	<i>P. putida</i> N3*	MIC (μ g/ml)
Ampicillin	R	300
Chloramphenicol	R	100
Kanamycin	R	100
Streptomycin	R	200
Tetracycline	S	—
Rifampicin	S	—

* R: resistant S: sensitive

저해를 받았고 나머지 항생제에 대하여는 강한 저항성을 나타내었다. 또한 이는 plasmid의 존재를 암시한다.

***P. putida* N3의 plasmid**

앞의 실험결과, catechol 2,3-oxygenase의 활성과 항생제에 대한 높은 저항성등의 성질로 미루어 *P. putida* N3에 plasmid가 존재할 가능성이 있어서 Kado 등(13)의 방법에 의해서 plasmid를 검출한 결과 Fig.5와 같았다. 크기는 약 110 kb 정도였으며 이 plasmid를 접합(3)에 의해서 *P. acidovorans* 4

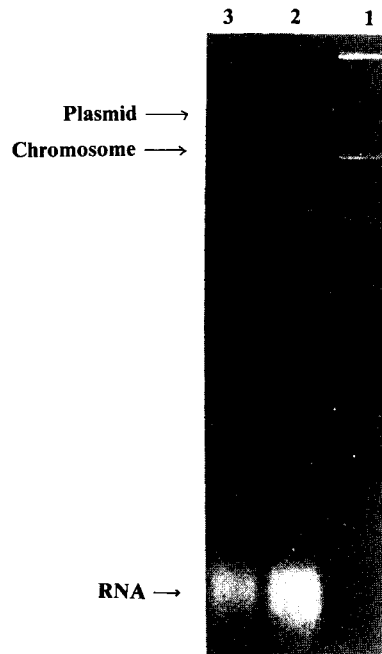


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of the plasmid isolated from *P. putida* N3.

1; TOL(117 kb), *P. putida* mt-2 2,3; plasmid from *P. putida* N3

AI으로 이동시킨 결과 naphthalene을 이용하여 생장할 수 있었으므로 naphthalene의 분해에 관여하는 plasmid임을 확인하였다.

요 약

Naphthalene을 유일한 탄소원으로 이용하는 균을 회분식 배양과 연속식 배양에 의해서 토양과 폐수로부터 분리하였다. 이 균은 *Pseudomonas putida*로 동정되었으며, 최적 pH와 온도는 각각 7.0과 30°C이었다. 분리된 균은 1,5-dihydroxynaphthalene을 naphthalene보다 더욱 잘 이용하였으며 benzoate와 salicylate도 이용하였다. 또한 catechol이 *meta*-분해 경로를 통해서 분해되었으며, ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin에 대해서 강한 저항성을 지니고 있었으며, naphthalene의 분해에 관여하는 약 110 kb 크기의 plasmid를 1개 지니고 있었다.

참고문헌

1. Chakrabarty, A.M. Plasmid in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.* **10**, 7-30 (1976).
2. Dunn, N.W. and I.C. Gunsalus. A transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **114**, 974-979 (1973).
3. Shaham, M., A.M. Chakrabarty, and I.C. Gunsalus. Camphor-mediated chromosomal transfer in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **116**, 944-949 (1973).
4. Jeenes, J.D. and P.A. Williams. Excision and integration of degradative pathway genes from TOL plasmid pWWO. *J. Bacteriol.* **150**, 188-194 (1982).
5. Yen, K.M. and I.C. Gunsalus. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 874-878 (1982).
6. Chakrabarty, A.M., G. Chou, and I.C. Gunsalus. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 1137-1140 (1973).
7. Patal, T.R. and D.T. Gibson. Purification and properties of (+)-cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **119**, 879-888 (1974).
8. Farrell, R., I.C. Gunsalus, I.P. Crawford, J.B. Johnston, and J. Ito. Restriction endonuclease sites and aromatic metabolic plasmid structure. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **82**, 411-416 (1978).
9. Ground, A.D. and I.C. Gunsalus. Cloning of genes for naphthalene metabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **156**, 89-94 (1983).
10. Kubitschek, H.E. Continuous Cultures. Prentice-Hall, USA (1970).
11. Holt, J.G. ed., *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 1, pp. 140-219, Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. (1984).
12. Tabor, H. ed., *Methods in enzymology*. vol. 17A, pp. 522-525. Academic Press. New York (1970).
13. Kado, C.I. and S.T. Liu. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**, 1365-1373 (1981).
14. Monticello, D.J., D. Bakker, M. Schell, and W.R. Finnery. Plasmid-borne Tn5 insertion mutation resulting in accumulation of gentisate from salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 761-764 (1985).
15. Gunsalus, I.C., M. Hermann, W.A. Tocano, D. Kotz, and G.K. Garg. Plasmids and metabolic diversity. *Microbiology-1974*. ASM (1975).

(Received March 19, 1988)