

나프탈렌 분해균주의 분리 및 특성

류병호 · 오윤근* · 배기철** · 빈재훈**

경성대학교 식품공학과, *제주대학교 해양환경공학과, **부산시 환경보전연구소

Biodegradation of Naphthalene by *Acinetobacter calcoaceticus* R-88

Beung-Ho Ryu, Yun-Kun Oh*, Ki-Chul Bae** and Jae-Hoon Bin**

Department of Food Science and Microbiology, Kyungsoong University, Pusan 608-020, Korea

* Department of Marine Environmental Engineering, Cheju National University,

Cheju 690-121, Korea, **The Pusan Institute of Health and Environment, Pusan, Korea

Abstract

Bacteria utilizing naphthalene as a sole carbon source for growth were isolated and identified and code named as *Acinetobacter calcoaceticus* R-88, *Pseudomonas testosteroni* R-87 and *Pseudomonas putida* R-89. Among these isolates, *A. calcoaceticus* R-88 found most effective in utilizing naphthalene. The optimal pH, temperature and concentration of naphthalene was 7.0, 30°C and 10mM, respectively. The strain degraded naphthalene to salicylic acid as an intermediate. And the strain showed to be resistant to ampicillin, tetracyclin, chloramphenicol and kanamycin. *A. calcoaceticus* R-88 harbored plasmid DNA which was believed to be involved in naphthalene degradation.

서 론

방향족 탄화수소는 화학공업의 발달로 인하여 그 사용량이 늘어남에 따라 새로운 공해물질로 대두되고 있다. 방향족 탄화수소중 특히 다핵(多核) 방향족 탄화수소는 물리·화학적으로 난분해성 물질일 뿐만 아니라 사람에게서는 강력한 돌연변이원성 또는 발암성 물질로 알려져 이러한 공해물질의 효율적인 처리방법이 요구되고 있다. 방향족 탄화수소는 처리방법 중 자연에 분포되어 있는 미생물에 의한 생분해가 자연과 환경의 보존적 차원에서 바람직스럽다¹⁾.

미생물에 의한 다핵방향족 탄화수소의 생물학적 분해는 naphthalene²⁻⁴⁾, phenanthrene^{5,6-7)}, 및 anthracene^{8,9)} 등에 대한 연구가 보고되고 있다.

방향족 탄화수소인 anthracene, naphthalene 및 biphenyl 분해세균을 고체배지 상에서 간단하게 분리해 내는 방법이 보고된 후^{8,9)} 방향족 탄화수소의 분해균에 대한 유전학적 연구가 진행되어 naphthalene의 분해에 관여하는 plasmid DNA^{8,9)}, naphthalene과 salicylic acid의 분해에 관여하는 plasmid DNA¹⁰⁾와 naphthalene의 효소학적 분해¹¹⁾ 및 plasmid DNA에 의한 유전자 재조합에 관한 연구^{12,13)}를 시도하고 있어 연구결과가 기대된다.

본 실험에서는 환경오염물질의 하나인 naphthalene을 분해하는 세균을 분리 선별하고 이들 균주들의 naphthalene 분해 특성과 plasmid에 관하여 실험하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

균주의 배양에 사용된 배지류의 시약은 Difco제

1989년 4월 19일 수리

Corresponding author: B.H. Ryu

품, naphthalene은 Sigma Co.의 제품을 사용하였으며 그 외 시약은 모두 특급 또는 일급을 사용하였다.

2. 배 지

균주의 분리 및 증식을 위한 최소배지는 MM₂ 최소배지¹⁷⁾(Minimal medium; (NH₄)₂SO₄ 18mM, FeSO₄·7H₂O 1μM, CaCl₂·2H₂O 100μM, MgSO₄·7H₂O 1mM, NaCl 8.5mM/L)와 완전배지로는 Luria broth(Bacto peptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 5g, glucose 2.0g/L pH 7.0)를 사용하였다.

3. Naphthalene 분해균주의 분리 및 동정

부산의 동천, 수영천, 동래천 및 분노처리장 부근에서 토양과 물을 채취하여 Kiyohara 등¹⁸⁾과 Sylvestre¹⁹⁾의 방법을 병용하여 분리하였다.

0.05% naphthalene이 들어 있는 최소배지(naphthalene 최소배지)에 시료를 접종하여 30°C에서 3일 동안 1차배양 한 후 2회 되풀이 배양하면서 농화 배양하였다. 최종 농화배양액을 적당히 희석하여 Luria 고체배지에 도말 배양한 후 이 배지에 나타난 colony를 미리 0.05% naphthalene이 살포된 최소배지에 tooth-pick로 옮겨 배양하면서 naphthalene을 분해하여 주위에 clear zone을 형성하는 colony를 분해균주로 선발하였다. 분리된 균주의 동정은 일반적인 동정방법¹⁴⁾과 API-20E, API-20NE kit (Analytical Products Inc., New York)를 사용하였다.

4. Naphthalene의 분해 검정

Naphthalene을 단일 탄소원으로 첨가한 최소배지에 균주를 접종하고 배양하면서 시간별로 분해균주의 성장율과 naphthalene의 양을 측정하였다. 배양시간에 따라 배양액을 채취하여 같은 양의 chloroform으로 naphthalene을 추출하여 UV-Spectrophotometer로 측정하여 분해정도를 측정하였다¹⁶⁾. 그리고 naphthalene의 분해과정을 알기 위하여 배양액을 일정시간별로 배양액을 채취하여 chloroform으로 추출하여 농축하고 다시 methanol로 재추출 농축한 후 aluminum plate상에서 petroleum ether : benzene : acetone : acetic acid 80 : 20 : 10 : 4 (v/v)을 전개용매로 전개한 후 분해산물의 생성을 조사하였다.

5. Plasmid DNA의 분리 및 curing 실험

분해세균의 plasmid DNA 분리는 Kado와 Liu 방법¹⁷⁾을 사용하였으며 plasmid의 curing은 완전배지에서 mitomycin C를 처리하여 naphthalene 분해능을 상실한 균주를 얻은 후 plasmid를 분리하여 curing된 균주를 찾았다¹⁸⁾.

결과 및 고찰

1. 분리균의 동정

부산시내의 하천에서 진흙과 물을 채취하여 naphthalene을 유일한 탄소원으로 이용하여 액체 배양한 후 naphthalene을 살포한 최소배지에 clear zone^{7,19)}을 형성하면서 자라는 미생물 16종을 선발하고 이들 중 분해능이 좋은 균주에 대하여 다시 검토하여 분해능이 우수한 균주 R-87, R-88 및 R-89를 선발하였다(Fig. 1). 이들 균주는 일반적인 동정실험과 API-20NE kit를 사용하여 동정하였다.

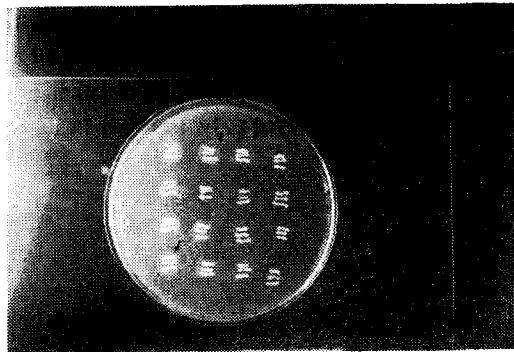


Fig. 1. Screening of naphthalene utilizing bacteria on minimal agar plates. The plates were sprayed with an ethereal solution of naphthalene and then incubated for 3days.

분리된 R-87, R-88 및 R-89 균주 모두 gram 음성의 간균으로 glucose를 산화하였다.

R-87과 R-89는 oxidase의 활성이 있고 형광성 색소형성의 성질을 갖는 *Pseudomonas* 속으로 분류할 수 있으며, R-88은 motility를 갖지 않는 성질과 oxidase의 활성이 없고 lactose를 이용할 수 있는 성질로부터 *Acinetobacter* 속으로 분류되었다(Table 1, 2).

이들 3 균주를 API 20NE kit로 동정한 바 R-87과 R-89는 arginine dihydrolase는 음성이었고

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of strain R-87, R-88 and R-89

Characteristics	R-87 ¹	R-88 ²	R-89 ³
Gram stain	-	-	-
Cell shape	rods	rods	rods
Motility	+	+	+
Fluorescence pigment	-	+	+
Catalase	+	+	+
Growth at 41°C	-	-	-
Growth at 4°C	-	-	-
Casein hydrolysis	-	-	-
Lecithinase	+	-	-
Utilization of glucose	-	+	+
Rhamnose	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Lactate	+	+	+
L-Aspartate	+	+	+
L-Leucine	+	+	-

1: *Pseudomonas testosteroni*.2: *Acinetobacter calcoaceticus*.3: *Pseudomonas putida*.

oxidase는 양성이었으며 citrate를 자화할 수 있는 성질로 보아 R-87은 *Pseudomonas testosteroni*, R-89는 *Pseudomonas putida*로 R-88은 glucose와 lactose를 자화할 수 있는 특성으로 보아 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정되었다(Table 2).

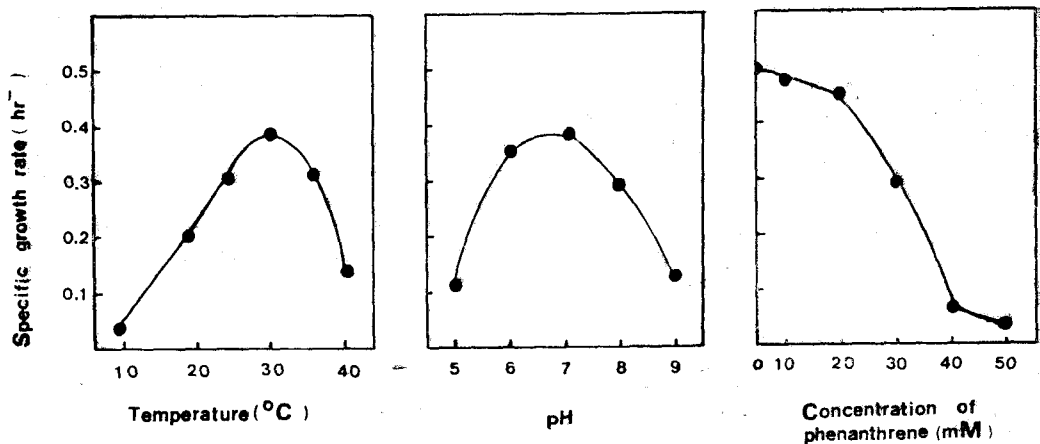
Naphthalene의 농도가 10mM 이하에서는 성장속이 좋았으나 농도가 증가할수록 성장속도가 감

Table 2. Identification of the selected strains with API 20NE kit

Characteristics	R-87 ¹	R-88 ²	R-89 ³
Denitrification	+	-	-
Tryptophane	-	-	-
Glucose, fermentative	-	+	-
Arginine dihydrolase	+	-	+
Urease	-	-	-
Esculine	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-
p-Nitrophenylglucosamine	-	-	-
Glucose, oxidative	-	+	+
Arabinose assimilation	-	+	+
Mannose assimilation	-	-	-
Mannitol assimilation	-	-	-
N-Acetylglucosamine assimilation	-	-	-
Maltose assimilation	-	-	-
Gluconate assimilation	-	-	+
Caproate assimilation	+	+	+
Adipate assimilation	+	+	-
Malate assimilation	+	+	+
Citrate assimilation	+	+	+
Phenyl-acetate assimilation	-	+	+
Oxidase assimilation	+	-	+

1, 2, 3 were determined by API 20NE kit.

소되었으며 40mM에서는 성장이 거의 억제되었다(Fig. 2).

Fig. 2. Specific growth rate of *Acinetobacter* sp. according to the temperature, pH and naphthalene concentration.

2. Naphthalene의 분해와 분해산물의 검정

Acinetobacter calcoaeticus R-88을 이용하여 naphthalene 10mM을 함유하고 있는 최소배지에 접종한 후 48시간까지 배양하고 별도로 증류수를 대조구로 하여 190~350nm 범위에서 흡광도를 조사한 결과 238nm와 276nm에서 2개의 peak를 나타내었고 이 두 peak는 시간이 경과함에 따라 감소하고 있음을 보여주고 있다(Fig. 3). 또 최소배지의 배양액을 사용하여 naphthalene의 분해산물을 thin layer chromatography법으로 조사한 결과 Fig. 4와 같았다. Lane A와 B는 표준물질인 naphthalene과 salicylic acid이며 C와 D는 최소배지를 48시간까지 배양하여 분해한 분해물질로서 salicylic acid임이 확인되었고 78시간 배양 중 이후에 생기는 salicylic acid 이외의 물질은 확인되지 않았다. Doelle²⁰⁾는 aromatic hydrocarbon인 toluene, xylene, anthracene 및 phenanthrene 등

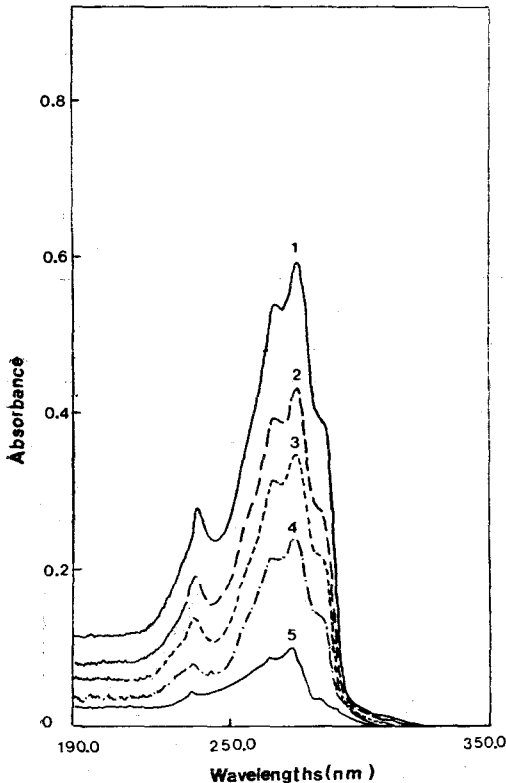


Fig. 3. UV scanning spectrum of naphthalene during biodegradation by *Acinetobacter calcoaeticus* R-88.

1: The culture extracts at start time, 2, 3, 4, 5: The culture extracts after incubation of 1, 2, 3 and 4days.

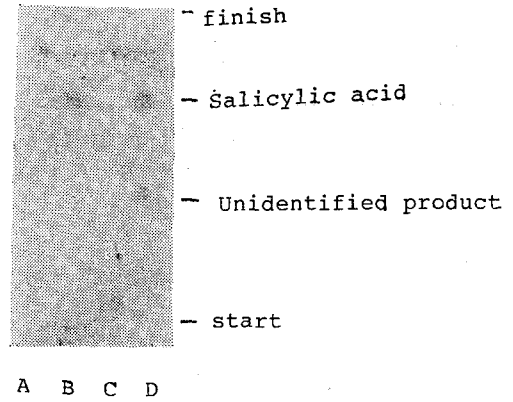


Fig. 4. Thin layer chromatograph of products degraded from naphthalene by the *Acinetobacter calcoaeticus* R-88.

A: Naphthalene, B: Salicylic acid, C: The culture extracts after 2days and D: Culture extracts after 3days.

은 salicylate와 catechol을 거쳐 ortho 또는 meta에서 분해된다고 지적한 결과와 같이 *Acinetobacter calcoaeticus* R-88에 의하여 salicylic acid가 생성되었다.

3. 분해균주의 항생제 내성과 생육저해 능도

Naphthalene의 분해 유전자에 plasmid에 있는지를 확인하기 위한 curing test, 또 분리된 plasmid DNA를 recombination시켰을 때 그 recombinant를 분리해 내기 위해서는 antibiotics에 대한 내성을 marker로 이용할 수 있다.

Acinetobacter calcoaeticus R-88의 항생제 내성은 Table 3과 같다. 항생물질 중 streptomycin에 대해서만 생장이 억제 되고 나머지 항생제에 대해서는 강한 저항성을 나타내고 있다. Pemberton

Table 3. Antibiotics resistance and minimal inhibitory concentration (MIC) of *Acinetobacter calcoaeticus* R-88

Antibiotics	<i>Acinetobacter</i> sp.	MIC(μ g/ml)
Ampicillin	R	100
Tetracyclin	R	200
Chloramphenicol	R	200
Kanamycin	R	100
Streptomycin	S	—

R: Resistant and S: Sensitive.

과 Don²¹⁾은 항생제 내성유전자와 방향족화합물의 분해유전자는 transposable genetic element와 host를 갖는 plasmid에 의해서 이루어진다고 보고한 바와 같이 *Acinetobacter calcoaceticus* R-88의 naphthalene 분해유전자가 plasmid에 존재하고 있음을 알 수 있다(Fig. 5).

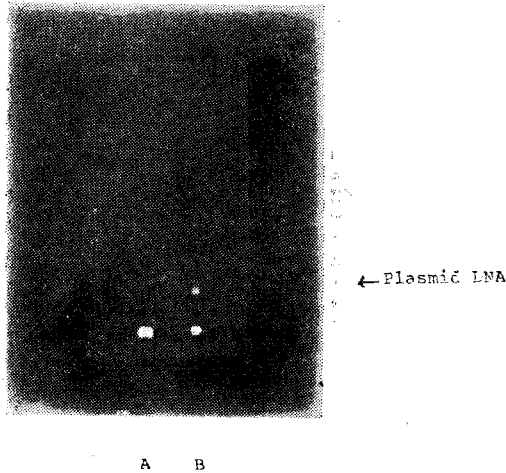


Fig. 5. Detection of plasmid DNA from the *Acinetobacter calcoaceticus* R-88 which lost ability to dissimilate naphthalene.

A : Cured strain (nap^-) and
B : Wild strain (nap^+).

4. *Acinetobacter calcoaceticus* R-88의 plasmid

Acinetobacter calcoaceticus R-88는 Fig. 1에서와 같이 clear zone을 형성하지만 그 cured cell은 clear zone을 형성하지 못하였다.

Acinetobacter calcoaceticus R-88의 plasmid DNA를 Kado와 Liu의 방법¹⁹⁾에 따라 분리하였다. Naphthalene 분해유전자의 plasmid DNA가 *Acinetobacter calcoaceticus* R-88에 naphthalene을 분해하는 유전자의 plasmid DNA의 존재여부를 알기 위하여 wild type(nap^+)와 cured cell(nap^-)의 plasmid DNA를 순수 분리하였다(Fig. 5). Plasmid DNA가 wild type(nap^+)에서는 존재하지만 cured cell(nap^-)에서는 나타나지 않는 것으로 보아 naphthalene을 분해하는 유전자가 plasmid DNA에 존재하고 있다는 것을 알 수 있다.

Aromatic hydrocarbon의 분해 유전자와 plasmid DNA와의 상호 연관성은 naphthalene²²⁾, toluene²³⁾, 및 xylene²⁴⁾의 분해에 관여하는 세균에 plasmid

DNA가 들어 있다고 보고되고 있으며 본 연구에 이용된 *Acinetobacter calcoaceticus* R-88도 naphthalene을 분해하는 유전자가 존재하고 있음이 확인되었다.

초 록

부산의 하천에서 채취한 진흙과 물에서 분리한 나프탈렌 분해균주 중 분해력이 강한 3균주에 대하여 실험한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus*, R-88, *Pseudomonas testosteroni* R-87 및 *Pseudomonas putida* R-89로 동정하였다. 이들 3균주중에서는 *Acinetobacter calcoaceticus* R-88이 나프탈렌 분해력이 가장 우수하였고, 이 균주의 최적 pH는 7.0, 온도는 30°C였고, 나프탈렌의 농도는 10mM이었다. 이 균주는 salicylic acid의 경로를 통하여 분해되고, ampicillin, tetracyclin, chloramphenicol 및 kanamycin에 대하여 강한 저항성을 보여주었다. *Acinetobacter calcoaceticus* R-88는 나프탈렌 분해에 관여하는 plasmid DNA를 1개 가지고 있는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M. and Timmis: Manipulation of degradative genes of soil bacteria, ed. by Leisiger, T., Hüttner, R., Cook, A.M., and Nüesch, J., Academic Press. p.109(1981)
2. Davis, J.I. and Evans, W.C.: Biochem. J., 91 : 251(1964)
3. Jerina, D.M., Selunder, H., Yagi, H., Wells, M.C., Davey, J.F., Mahadevan, V. and Gibson, D.T.: J. Am. Chem. Soc., 98 : 5988 (1976)
4. 고영희, 하일호, 배경숙 : 산업미생물학회지, 16 : 199(1988)
5. Evans, W.C., Fernley, H.N. and Griffiths, E.: Biochem. J., 95 : 819(1965)
6. Kiyohara, H., Nagao, K. and Nomi, R.: Agric. Biol. Chem., 40 : 1075(1976)
7. Kiyohara, H., Nagao, K., Kouno, K. and Yano, K.: Environ. Microbiol., 43 : 101 (1982)
8. Chakrabarty, A.M.: Ann. Rev. Genet., 10 :

- 7(1976)
9. Dunn, N.W. and Gunsalus, I.C.: J. Bacteriol., 114 : 974(1973)
 10. Yen, K.M. and Gunsalus, I.C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79 : 874(1982)
 11. Patal, T.R. and Gibson, D.T.: J. Bacteriol., 119 : 879(1974)
 12. Farrell, R., Gunsalus, I.C., Crawford, I.P., Johnston, J.B. and Ito, J.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 82 : 411(1978)
 13. Sylvestre, M.: Appl. Environ. Microbiol., 39 : 1223(1980)
 14. Gerhardt, P., et al.: "Manual of Methods for General Bacteriology", Am. Soci. Microbiol., Washington(1981)
 15. Krieg, N.R. and Holt, J.G.: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, p.140 (1984)
 16. Alexander, M. and Rosenberg, A.: J. Agric. Food. Chem., 28 : 297(1980)
 17. Kado, G.I. and Liu, S.T.: J. Bacteriol., 145 : 1365(1981)
 18. Pickup, R.W., Lewis, R.J. and Williams, P.A.: J. Gen. Microbiol., 129 : 153(1983)
 19. 김치경, 김종우, 김영창, 민태익 : Aromatic hydrocarbon 분해 세균의 검출과 그 plasmid 유전자의 특성, Kor. Jour. Microbiol., 24 : 67(1986)
 20. Doelle, H.W.: Basic metabolic process, p. 113, ed. by Rhem, H.J. and Reed, G., Biotechnology, Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim (1981)
 21. Pemberton, J.M., and Don, R.H.: Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*, J. Bacteriol., 145 : 681 (1981)
 22. Pun, N.W. and Gunsalus, I.C.: Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*, J. Bacteriol., 114 : 974(1973)
 23. Nakazawa, T., Hayashi, E., Yokota, Y., Ebina, Y. and Nakazawa, A.: Isolation of TOL and RP4 recombinants by interative suppression, J. Bacteriol., 134 : 270(1978)
 24. Pavey, J.F., and Gibson, D.T.: Bacterial metabolism of para- and meta-xylene, Oxidation of a methyl substituent, J. Bacteriol., 119 : 923(1974)