

원유분해세균의 분리 및 특성

송영환

부산수산대학교 미생물학과

남해안에 위치한 원유저장기지내의 각 정점으로 부터 원유분해세균을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* 등으로 동정되었다. 원유를 탄소원으로 첨가한 최소배지상에서 원유분해능을 나타내었으며, 0.5%에서 6%까지의 NaCl 농도변화에 대한 원유분해능을 비교한 결과 5종의 원유분해균이 NaCl의 농도가 증가하였을 경우에는 원유분해능이 상실됨을 확인하였다. 또한 원유는 복잡한 유기화합물로 구성되어 있어 분리된 원유분해균이 n-decane, n-hexane, n-octane, n-dodecane 등의 간단한 탄화수소를 자화하는지를 확인하였다. 분리된 원유분해균이 plasmid를 가지는지를 확인한 결과 *Pseudomonas fluorescens* 및 *Pseudomonas aeruginosa* 등에서 분자량이 매우 큰 plasmid가 존재함을 확인하고 ampicillin, tetracycline 및 chloramphenicol 등의 항생제에 대한 내성을 조사한 결과 내성을 나타내어 원유분해에 관련된 유전자와 항생제내성을 나타내는 유전자가 plasmid상에 존재할 가능성이 높음을 알수 있다.

Key Words : Petroleum biodegradation, plasmid, *Pseudomonas*, Hydrocarbon

해양에서의 유류오염은 1988년 Alaska의 Prince Williams Sound 근처에서 200,000 barrel이상의 원유가 유출된 사건이 있는 후 이에 의한 환경오염의 심각성 및 해양생물의 생태에 미치는 악영향으로 인해 세계적인 관심을 가지게 되었고(Harvey *et al.*, 1990), 유류오염을 제거는 방법에서도 현재까지 개발된 유화제의 경우 독성이 높아 비록 유류오염은 제거된다하더라도 독성이 강한 유화제에 의한 환경오염의 심각성도 무시할 수 없는 요인이 되고 있다. 이러한 관점에서 유전공학적 기법을 이용하여 개량된 미생물을 이용한 유류오염을 제거하려는 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다(Leahy and Colwell, 1990). 특히 우리나라와 같은 비산유국의 경우는 항상 유조선의 왕래가 빈번하여 해양에서의 유류오염의 가능성이 상존하고 있으며, 양식산업의 확대로 인해 연안 해역에 유류오염이 생겼을 경우 환경오염은 물론 연안 양식산업에 미치는 피해는 심각할 수 밖에 없다. 이러한 관점에서 미생물에 의한 유류오염을 방지하기 위한 방법으로 우선 우수한 원유분해능을 갖는 미

생물의 검색하고 이들의 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

원유분해세균의 분리

남해안에 위치한 원유저장기지로 부터 시료를 채취하고 원유분해균만을 선택적으로 증폭시키기 위하여 1liter 당 0.5g NH₄Cl, 0.5g K₂HPO₄, 0.1g NaH₂PO₄ 및 100 ml의 원유가 포함된 N₂K 배지에 시료를 첨가하여 30°C의 항온진탕배양기에서 2주간 배양하여 탁도가 증가하는 것을 확인한 다음 이를 충분히 건조된 N₂K 고형배지에 200μl의 원유와 증폭된 배양액을 희석하여 도말한 후 30°C에서 배양하여 형성된 colony 주위에 원유가 분해된 halo를 나타내는 원유분해균을 선별하였다.

원유분해균의 동정

균주의 동정은 Gram staining, Oxidation Fermenta-

tion test, Oxidase test로 일차 분류한 후 rapid multi-test system인 API20 Kit를 이용하여 동정하였다. 일단 동정된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참고하여 몇가지 실험을 추가하여 확인하였다.

NaCl 농도에 따른 원유분해능의 비교

분리된 원유산화균을 최소배지인 N₂K 고형배지에 NaCl을 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4% 비율로 첨가하여 원유분해능을 조사하였다.

Hydrocarbon분해능의 비교

Kiyohara(1982)등의 방법을 응용하여 분석하였으며, 분리된 원유산화균을 최소배지인 N₂K 고형배지에 5%의 hydrocarbon을 diethylether를 섞어서 분무하여 첨가하고 멸균된 tooth pick로 균을 접종하여 성장을 비교하였다.

항생제 내성 비교

항생제에 대한 내성은 *Pseudomonas* 속의 경우 plasmid의 존재에 기인하는 경우가 많으며(Jacoby, 1979), 항생제에 대한 내성 유전자가 plasmid상에 존재할 경우 plasmid의 분석과 plasmid를 이용한 유전자 재조합 실험에 용이하게 이용할 수 있다. 항생제 내성을 확인하기 위하여 완전배지인 LB(Luria Bertanii: 20g tryptone, 10g yeast extract, 20 g NaCl per liter)에서 분해능을 조사하였다. 사용한 항생제의 종류는 ampicillin(80µg/ml), tetracycline(60µg/ml) 및 chloramphenicol(170µg/ml)이다.

원유분해세균으로 부터 plasmid의 추출

분자량이 큰 plasmid를 분리하기 위하여 Chakrabarty (1979)의 방법을 변형하여 사용하였다. 균체를 10ml의 LB 배지에서 배양한 후 배양액 2ml을 원심분리하여 수확하고 얻어진 균체를 TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에 완전히 현탁한 후, lysing solution(0.02 N NaOH, 4% SDS) 0.6ml을 첨가하고 2 M Tris-HCl(pH 7.0)을 가하여 pH를 8.0으로 조정된 다음 5 M NaCl을 0.24ml 첨가하여 얼음에 방치하였다. 4시간이 지난 후 상층액에 동일한 양의 isopropanol을 가하여 -

20°C에서 30분간 방치한 후 18000g 에서 10분간 원심분리하여 plasmid DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 pellet을 세척한 후 TE buffer에 녹여 전기영동하였다.

Agarose Gel Electrophoresis

Sigma사의 Type II agarose를 이용하였으며 0.5% agarose gel을 준비하여 100V, 60mA에서 3시간 전기영동하였으며 전개가 끝난 gel은 1µg/ml의 Ethidium Bromide 용액에 15분간 염색하고 증류수에서 20분간 담귀 탈색한 다음 UV illuminator 상에서 plasmid 를 관찰하였다.

결과 및 고찰

고형배지상에서 원유분해균의 분리 및 원유분해능의 확인

평판배지에서의 원유분해능을 확인하기 위하여 잘 건조된 배지에서 희석된 배양액을 도말한 후 200µl의 원유를 첨가하여 원유가 고형배지상에 고루 퍼지도록 하였다. Fig 1은 탄소원으로 원유를 이용하도록 최소배지상에서 원유분해능을 확인 한 결과이며, Fig 2는 완전배지인 LB 상에서 원유 분해를 관찰한 결과이다. Fig 1과 Fig 2를 비교하면 최소배지보다는 완전배지상에서 원유분해능이 훨씬 뛰어난 것을 알 수 있고, 완전배지상에서도 활성이 나타남으로써 관련된 유전자들의 발현은 적어도 Catabolite Repression을 받지 않는 것으로 사료된다. Catabolite Repression을 더 확인하기 위하여 Fig 3에서 보는 바와 같이 최소배지에 0.2%의 glucose를 첨가하여 원유분해능을 조사하였을 때도 원유분해능이 나타남을 확인하였다.

원유분해세균의 동정

재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 여러종류의 원유분해균을 분리하여 이들을 각각 PD1, 2, 3, 4, 6 및 KD 1~10으로 명명하였다. Table 1 은 API 20E Kit를 사용하여 동정한 결과를 나타낸 것이다. 분리된 균주는 모두 Gram 음성의 간균이었다.

NaCl의 농도에 따른 원유분해세균의 특성

Table 2 에서 보는 바와 같이 NaCl의 농도를 달리 하였을 때 원유분해능의 차이를 조사하였다. 4종류의 미생물들은 1%의 NaCl을 첨가하였을 때에 모두 원유분해능에는 차이를 보이지 않았으나 2% 이상의 농도에서는 *P. fluorescens*는 원유를 분해하지 못하였음을 알 수 있었고, *P. aeruginosa*의 경우는 5% 농도까지 원유를 분해함을 알 수 있었다. 염도의 변화에 따른 원유분해능의 감소는 Ward와 Brock(1972)등이 조사한 결과와 일치함을 알 수 있었다. Ward와 Brock는 3.3% 에서 28.4%까지 염도를 증가시켰을 때 hydrocarbon의 대사속도가 감소함을 조사하였다. 시료를 채취한 원유저장기지의 경우 해수의 유입이 계속있어 분리된 원유분해균은 염도를 증가시켰을 때 성장속도에는 큰 영향이 없었으나 원유분해능은 감소하거나 소실됨을 알 수 있었다.

Hydrocarbon의 분해조사

석유탄화수소의 화학적 조성을 보면 saturate hydrocarbon, aromatic hydrocarbon, asphaltenes 및 resin (pyridine, quinolines, carbazole, sulfoxide 및 amide) 등으로 구성되어 있다. 원유분해능을 나타내는 미생물들이 원유를 분해하여 clear zone을 형성하므로 간단한

saturate hydrocarbon을 유일탄소원으로 최소배지에 공급하였을 경우, 미생물이 증식할 수 있을 것이다. Table 3을 보면 *P. aeruginosa*의 경우 hydrocarbon을 탄소원으로 공급하였을 경우 가장 빠른 성장을 보임을 알 수 있었다. 원유의 분해에 관여하는 효소들에 대하여는 현재까지 거의 알려져 있지 않으며 부분적으로 방향족 탄화수소의 대사에 관여하는 유전자들이 최근 cloning되고 있는 실정이다(You et al., 1991) 본 실험에서는 가장 간단한 hydrocarbon에 대한 분해능을 조사하였으며 4 종류의 원유분해 미생물이 hydrocarbon을 모두 분해하였으나 특이하게 *P. maltophilia*의 경우 n-hexane을 자화하지는 못하였다.

항생제 내성 조사

원유분해 미생물을 분리하여 이들이 ampicillin, tetracycline, chloramphenicol에 대한 내성을 조사하였다. 여러 종류의 항생제가 있겠으나 유전자 재조합기술을 이용하여 균주개량을 하기 위해서는 현재 bacteria에서 이용 가능한 plasmid vector 에 존재하는 항생제 marker에 상기한 3 종류의 항생제에 대해서만 내성 조사를 행하였다. Table 4 에 나타나 있는 바와 같이 *P. fluorescens*의 경우는 ampicillin(80 μ g/ml)에 대해 내성만을 보였으나,

Fig 1. Detection of bacterial degradability of crude oil on the N₂K medium.

Fig 2. Detection of bacterial degradability of crude oil on the LB medium

Table 1. Identification of the screened strains with API 20E Kit

Test	PD1	PD2	PD3	PD4	PD6	PD7	KD1	KD2	KD3	KD4	KD5	KD6	KD7	KD8	KD9	KD10
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Melibiose utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose utilization	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Oxidase utilization	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
NO ₃	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

PD1, PD2, PD3, PD4 and PD 6 : identified as *Pseudomonas fluorescens*

PD7 : identified as *Acinetobacter baumannii*

KD1, KD2, KD5 and KD8 : identified as *Pseudomonas maltophilia*

KD3, KD4, KD6, KD7 and KD10 : identified as *Pseudomonas fluorescens*

KD9 : identified as *Pseudomonas aeruginosa*

Table 2. Tests of Crude Oil degradability as NaCl concentration.

	0.5%	1%	2%	2.5%	3%	4%	4.5%	5%	5.5%	6%
<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. maltophilia</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Table 3. Tests of hydrocarbon degradability.

	n-decane	n-hexane	n-octane	n-dodecane
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	+
<i>A. Baumannii</i>	+	+	+	+
<i>P. maltophilia</i>	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	++	++	++

*P. aeruginosa*의 경우는 3종류의 항생제에 모두에 대하여 내성을 보였다. 이러한 사실로 미루어 보아 이들 균에는 항생제 내성 유전자가 존재하고 이들 유전자는 plasmid 상에 존재할 가능성이 높아 원유분해세균으로 부터 plasmid의 존재유무를 확인하고자 하였다.

Plasmid의 존재 확인

Fig 4에 나타나 있는 바와 같이 alkaline lysis방법에 의하여 total DNA를 추출하여 이를 0.5% agarose gel 에서 전기영동한 결과 *A. baumannii*를 제외한 모든 원유 분해균에서 분자량이 아주 큰 plasmid를 확인할 수 있었다. 특히 *P. aeruginosa*의 경우 다른 원유분해균의 plasmid보다 더 큰 plasmid가 존재함을 알 수 있었다(Fig 4의 화살표).

각각의 plasmid가 원유분해유전자를 포함하고 있는지를 확인하기위하여 현재 Ethidium Bromide를 이용한 curing실험이 진행되고 있으며, electroporation에 의하여 원유분해균의 plasmid를 분리하여 이를 *E. coli* JM 109 균주에 transformation하여 원유분해균의 plasmid가 도입된 *E. coli*의 생화학적 특성을 조사하고 있다. 이

Fig 3. Detection of bacterial degradability of crude oil on the N₂K medium containing 0.2% glucose.

Fig 4. Agarose Gel Electrophoresis of Plasmid isolated from petroleum degrading bacteria
 lane 1 : from *Pseudomonas fluorescens*
 lane 2 : *P. fluorescens*
 lane 3 : *Acinetobacter baumannii*
 lane 4 and 5 : *P. fluorescens*
 lane 6 : *Pseudomonas aeruginosa*

Table 4. Tests of antibiotic susceptibility

	ampicilline(80 μ g/ml)	tetracycline(60 μ g/ml)	chloramphenicol(170 μ g/ml)
<i>P. fluorescens</i>	+	-	-
<i>A. Baumannii</i>	+	-	-
<i>P. maltophila</i>	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+

+ : resistant, - : sensitive

러한 연구가 진행됨에 따라 원유분해에 관련된 유전자의 특성을 조사하고, 유전자 재조합 기술을 이용하여 균주를 개량한다면 유류의 오염방지에 이용할 수 계기가 될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Chakrabarty, A. M. : Plasmid in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.* 10 : 7~30, 1976.
- Harvey, S., Elashvilli, I., Valdes, J. J., Kamoley, D. and Chakrabarty, A. M. : Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology* 8 : 228~230, 1990.
- Jacoby, G. A. : In "*Pseudomonas aeruginosa*, Clinical manifestation of infect and current therapy." ed. by R.G. Dogget, *Academic Press*, New York, 1979.
- Kiyohara, H., Nagao, K. and Yana, K. : Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *App. Environ. Microbiol.* 43(2) : 454~457, 1982.
- Leahy, J. G. and Colvell, R. R. : Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54(3) : 305~315, 1990.
- Ward, D. M. and Brock, T. D. : Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 : 1077~1081, 1972.
- You, I.S., Ghosal, D. and Gunsalus, I. S. : Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene(*nahG*) and its 3'-flanking region. *Biochem.* 30 : 1635~1641, 1991.

Isolation and characterization of petroleum degrading bacteria

Young Hwan Song

Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608-737, Korea

From several sites of petroleum storage basement in South Coasts in Korea, various petroleum degrading bacteria have been isolated and characterized as *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. They show the ability of petroleum degradation on minimal media which contains petroleum as sole carbon source and loose the ability at high concentration of NaCl as increasing the concentration of NaCl from 0.5% to 6%. It has been confirmed that such bacteria have utilized the simple saturate hydrocarbon; n-decane, n-hexane, n-octane and n-decane because petroleum consists of various kinds of organic compounds. It has been also identified that petroleum degrading bacteria harbor the plasmid and show the antibiotic resistance against ampicillin, tetracycline and chloramphenicol. These results strongly suggest that the petroleum degrading gene and antibiotic resistance gene might be located on the high molecular weight plasmid.