

저온성 원유분해 세균의 분리동정 및 OCT 플라스미드 특성

김상진^{1*} · 윤희정

¹한국해양연구소 해양미생물연구실, 숙명여자대학교 생물학과

Isolation and Identification of the Crude Oil-degrading Psychrotrophic Bacterium and the Characteristics of OCT Plasmid

Kim, Sang-Jin^{1*} and Hee-Jeong Yun

Marine Microbiology Lab., Korea Ocean Research &

Development Institute, An San P.O. Box. 29, 425-600, Korea

Dept. of Biology, Sookmyung Women's Univ., Seoul 140-742, Korea

Abstract — Psychrotrophic bacterial strains utilizing crude oil as their sole carbon and energy sources were isolated from Antarctic soil and sea sediments. One of the strains named A1-1 showed the highest activity for emulsification of crude oil and the best growth. This strain was identified as *Acinetobacter calcoaceticus*. *A. calcoaceticus* A1-1 strain contains a plasmid (OCT plasmid) which was related to the utilization of alkane compounds. The molecular weight of this plasmid was estimated to be about 110 Md by agarose gel electrophoresis. The cured strain of *A. calcoaceticus* A1-1 strain (OCT⁻) was not able to utilize normal hydrocarbon compounds (C₆-C₁₇) as carbon and energy sources. *A. calcoaceticus* A1-1 was resistant to ampicillin and sensitive to streptomycin, kanamycin, chloramphenicol, tetracycline. The results suggested that this strain carries a plasmid (OCT) responsible for oil utilization which is quite stable and might be concerned with antibiotics resistancy.

원유는 대단히 복잡한 탄화수소 화합물을 포함하고 있는데 주로 포화 탄화수소, 방향족계 탄화수소, asphaltic hydrocarbon, 질소, 황, 산소성분으로 혼합된 화합물과 같은 4가지 성분으로 구성되어 있다(18, 31). 탄화수소 이용 미생물의 유전학적 연구는 원유를 구성하고 있는 성분중 대표적인 모델 기질을 분해하는 미생물을 대상으로 이루어져 왔다. 이 모델 기질로는 우선 alkane계열의 물질중 비교적 탄소길이가 짧은 hexane부터 octadecane 물질과 벤젠고리가 하나인 phenol, toluene, xylene 등이 있고 벤젠고리가 둘인 naphthalene과 세개인 anthracene, phenanthrene과 같은 물질이 있다.

이들 분해대사에 관여하는 plasmid로는 NAH, SAL, TOL/XYL, CAM와 OCT plasmid가 밝혀졌다(11, 6,

23, 7). Alkane계열 화합물의 산화에 대한 생화학, 효소학, 유전학적 연구는 *Pseudomonas putida* biotype A266(28)에서 이루어졌고 Chakrabarty *et al.*(7)는 이 세균의 octane에서 성장능력은 plasmid에 기인한 것으로 밝혔다. 또한 OCT plasmid에 ethylbenzene 자화능도 있음을 확인하였다. *P. putida*의 경우와는 달리 염색체에 의해 alkane 화합물을 산화하는 시스템을 갖고 있는 미생물의 유전학적 연구는 *Acinetobacter calcoaceticus* BD413과 *Acinetobacter* sp. H01-N에서 이루어졌다(10). 한편 plasmid에 원유 이용능력 유전자가 수록된 *Acinetobacter calcoaceticus* RA57도 연구보고된 바 있다(26).

그러나 현재까지 저온성 유류분해 세균의 유전학적 연구는 전혀 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 오랜 세월 동안 저온환경으로 유지된 남극 생태계에서 원유 분해능을 나타내는 저온성 세균을 분리하여 그 중 분해능이 우수한 균주를 선발하여 동정하였고, 이 세균의 n-alkane 분해계에 관여하는 pla-

Key words: Antarctic ecosystem, Degradation of crude oil, Psychrotrophic bacteria, *Acinetobacter calcoaceticus*, OCT plasmid

*Corresponding author

smid을 분리하여 그 특성에 관해 연구하였다.

재료 및 방법

원유분해 균주 분리 및 우수 균주 선발

저온성 유류 분해 세균을 분리하기 위해 1989년 2월 남극 King George섬의 한국 세종기지와 아르헨티나 Teniente Jubany 기지 주변의 토양, 유류에 오염된 모양과 Bransfield Strait의 해저도를 무균적으로 채취하여 시료로 사용하였다.

유류분해 세균을 분리하기 위해서는 채취한 시료를 멸균된 증류수 또는 숙성해수에 적당량 희석하여 원유 첨가 한천배지(Table 1)에 도말하여 8°C에서 10일간 배양한 후 배지상에서 직접 분리하거나, Horowitz *et al.*(17)의 연속 배양 방법을 변형하여 분리하였다. 본 실험에서 사용한 원유첨가 한천배지는 Reisfield *et al.*(24) 등이 사용한 배지 조성을 이용하였으며 제조 방법은 Baruah *et al.*(5)의 방법에 따랐다.

분리한 균주는 원유첨가 액체배지(Table 1)에서 배양하여 그 배양액을 Reisfield *et al.*(24)의 방법에 따라 540 nm에서의 흡광도 값으로 유류 분산도를 측정하였고 이 값을 이용하여 우수 분해 균주를 선발하였다. 한편 세균성장은 ZoBell 2216-E 한천배지를 이용하여 생균수를 측정하였다.

분리 균주의 동정

원유가 첨가된 최소 배지에서 순수 분리된 균주중 성장이 가장 우수한 균주 A1-1을 선발하여 그 형태학적, 생리학적 특성을 분석하였으며 Bergey's manual of systematic bacteriology(21)의 분류 체계를 이용하여 동정하였다. 각 실험에 사용한 배지 조성은 Biochemical tests for identification of medical bacteria(22)와 Manual of methods for general bacteriology(27)를 참조하였다.

Plasmid DNA의 분리

Plasmid는 Kado and Liu(20) 방법을 수정하여 사용하였다. 액체 완전 배지 30 ml에 균주를 접종하여 2×10^8 /ml이 될 때까지 진탕배양한 후 4°C에서 10,000 rpm으로 7분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 EDTA buffer(40 mM Tris, 2 mM Na₂ EDTA, glacial acetic acid, pH 7.8)을 5 ml 넣어 현탁시킨 후 Lysing solution(50 mM Tris, 3% sodium dodecylsulfate, 2 N NaOH pH. 12.6) 10 ml를 첨가

Table 1. The composition of minimum salts medium containing crude oil

Crude oil agar medium		Crude oil liquid medium	
Crude oil*-silica powder	1.0 g	Crude oil*	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.01 g	K ₂ HPO ₄	0.01 g
Agar	15.0 g		
Aged sea water or distilled water	1l	Aged sea water or distilled water	1l

pH adjusted at 7.5

*Kuwait crude oil(sulfur contents: 2.54%)

하였다. 이 혼합액을 65°C water bath에서 60분간 반응시킨 다음 10 ml의 phenol-chloroform(1 : 1)으로 2번 추출한 후 3 M의 sodium acetate 용액을 첨가하여 최종 농도가 0.3 M이 되도록 하였다. 이 용액에 95% ethanol을 2배 첨가하여 DNA를 침윤시켰다. DNA는 -20°C에서 하룻밤 냉동 방치한 후 원심분리하여 DNA 침전물을 수회한 다음, speed vaccum concentrator(Savant SC-100)을 사용하여 ethanol을 완전히 제거하였으며 Tris-EDTA buffer(10 mM Tris-H₂, 1 mM Na₂ EDTA, pH 7.8)로 소량 녹여 agarose gel electrophoresis로 plasmid의 존재여부를 확인하였다.

DNA의 전기영동 분리는 0.7% agarose gel로 100 V에서 1.5~2시간 동안 Tris-Acetate-EDTA buffer 또는 Tris-Boric acid-EDTA buffer를 사용하여 전개시킨 후 gel을 ethidium bromide(50 µg/ml) 용액에 10분간 침지 염색시켰다. 과량의 ethidium bromide는 수도물로 세척 제거한 다음 UV transilluminator로 DNA band를 확인하고 Polaroid 사진기로 촬영하였다.

Plasmid curing 방법

Plasmid curing 실험은 Chakrabarty(6)의 방법을 수정하여 실시하였다(2). 액체 ZoBell 완전 배지에 균주를 접종하여 하룻 동안 진탕배양한 후 배양액을 $10^3 \sim 10^4$ cells/ml 수준으로 희석하여 mitomycin C가 각각 0, 5, 10, 20, 30 µg/ml 함유된 액체 ZoBell 완전 배지에 접종하여 탁도가 나타날 때까지 배양하였다. 각각의 배양액을 동량의 mitomycin C가 함유된 멸균된 ZoBell 액체 배지를 이용하여 적절히 희석하여 다시 한천 완전 배지에 평판 도말하여 균체가 나타날

때까지 배양하였다. 이렇게 해서 나타난 colony중 약 50개를 무작위로 각 실험군에서 선발하여 octane 첨가 한천배지와 완전배지에 replica plating과 picking 방법을 통해 alkane 분해능을 상실한 균주를 계수하여 백분율로 나타내고 curing frequency 실험결과로 하였다. 이와같이 cured된 것으로 추정되는 colony는 agarose gel electrophoresis 방법을 사용하여 plasmid 유무 검증을 하였다.

항생제에 대한 내성 조사

항생제에 대한 내성은 Szybalski(30)의 방법에 따라 항생제 농도가 다양하게 제조된 각각의 한천 완전배지에 대수기(2×10^8 cells/ml)까지 배양한 균체를 평판도말하여, 성장할 수 있는 최고 농도를 결정한 다음, 결정된 농도의 항생제가 함유된 한천 완전배지에 여러번 옮겨 배양하여 항생제의 내성 범위를 조사하는데 사용하였다. 사용한 항생제는 ampicillin, streptomycin, kanamycin, tetracycline, chloramphenicol이다.

결과 및 고찰

우수 원유분해 균주선발

시료로부터 분리된 저온성 원유분해 세균 24균주를 원유첨가 액체배지에서 배양한 후 Reisfield *et al.*(24) 방법에 의해 측정된 결과 이들 중 A1-1 균주가 가장 우수한 유화활성을 나타내었다(Table 2).

균주 동정

본 실험에서 분리한 저온성 원유 분해 세균 A1-1의 형태학적인 특성은 주사현미경으로 관찰한 결과 편모를 갖고 있지 않고, 폭 $0.6 \mu\text{m}$, 길이 $1.5 \sim 3.6 \mu\text{m}$ 의 간균형태이다(Fig. 1). 기타 콜로니의 형태학적인 특성은 Table 3에 표시하였다.

A1-1 균주의 생리, 생화학적인 특성은 Table 4와 같이 그람 음성균이며, catalase, methyl red 반응에 대해 양성인데 반해 oxidase, Voges-Proskauer, indole production, NO_3 reduction의 반응은 음성으로 나타났다. 또한 탄소원의 이용을 살펴보면 glucose, maltose, xylose, mannitol, inositol, galatose, fructose는 이용하나 lactose와 sucrose 등은 이용하지 못했다. 한편 기질을 이용한 가수분해 효소 활성은 casein, starch, gelatine 분해력 등에 모두 음성이며, urea 분해에 대해서만 양성이었다. 이상과 같은 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology(2)의 분류

Table 2. Comparison of crude oil emulsifying activities of the isolated bacterial strains from Antarctica

Strain No.	Degree of emulsification* after incubation(days)				Emulsifying Activity
	3	7	14	21	
JB1-1	-	-	±	+	0.134
JB1-2	-	-	-	±	0.035
JB1-3	-	-	±	+	0.133
JB2-1	-	-	±	+	0.154
JB2-2	-	-	-	+	0.024
JB2-3	-	-	-	±	0.063
JB2-4	-	-	+	+	0.121
J1-1	-	-	-	±	0.017
J1-2	-	-	-	±	0.093
J1-3	-	-	±	+	0.176
J2-1	-	-	-	±	0.016
J2-2	-	-	-	±	0.024
J3-1	-	-	-	±	0.051
J3-2	-	-	±	+	0.115
J4-1	-	+	+	++	0.574
J4-2	-	-	-	±	0.038
NR1-1	-	-	-	±	0.028
NR1-2	-	-	±	+	0.093
NR2-1	-	-	-	±	0.033
NR2-2	-	-	-	±	0.021
NR3-1	-	-	±	+	0.115
NR3-2	-	-	-	±	0.065
A1-1	+	+	+	++	0.815
A1-2	-	±	+	++	0.697

*Degree of emulsification: -: none, ±: a little, +: well, ++: very well

체계와 비교한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정하였다.

원유 탄화수소를 이용할 수 있는 미생물로 ZoBell (34)에 의해 30개 속에 속하는 100여종 이상이 관여한다고 보고한 이래 Bartha and Atlas(4)는 세균 20속, 조류 1속, 균류 14속의 유류 분해 미생물에 관해 보고하였다. 이와같은 연구 결과와 비교해 볼 때 본 실험에서 분리된 A1-1도 탄화수소를 이용할 수 있는 미생물로서 가장 빈번히 분리되는 속의 범위에 포함되는 세균임을 알 수 있다. 또한 Spino and Geldreich (28)가 fresh water에서 분류동정한 종과도 같은 결과임을 알 수 있다.

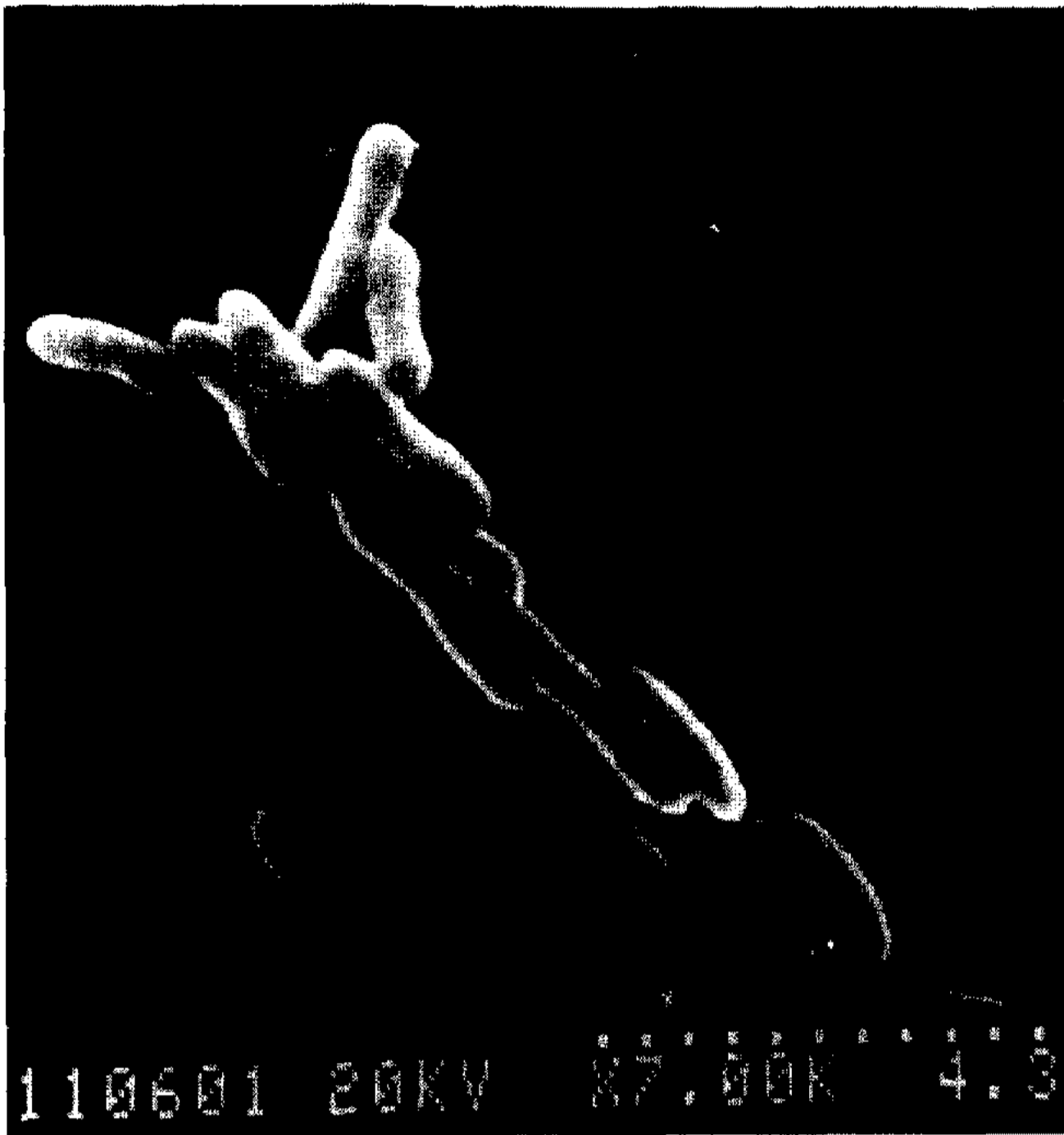


Fig. 1. Scanning electron microscopic photographs of the isolated strain A1-1 ($\times 7,000$).

Table 3. Morphological characteristics of the isolated strain A1-1

Cell form	Rod
Cell size	
width	0.6 μm
length	1.5~3.6 μm
Colony form	Circular
Surface	Smooth
Elevation	Convex
Margin	Lobate
Color	White

A. calcoaceticus A1-1의 OCT plasmid 분리 및 특성

A. calcoaceticus A1-1에 의한 원유 이용이 plasmid에 의한 것인지를 확인하기 위하여 plasmid 유무를 확인한 결과 Fig. 2와 같았다. 대조구로서 λ DNA와 *Pseudomonas putida* CAM plasmid를 사용하였다. 그 결과 *A. calcoaceticus* A1-1에 plasmid가 존재함을 알 수 있었고, 이 plasmid는 *P. putida*의 CAM plasmid보다 작은 mobility를 나타내었다.

Chakrabarty *et al.*(8)이 octane을 이용하는 세균의 특성이 plasmid에 encode되어 있음을 발견한 후 Fennewald and Shapiro(13)가 OCT plasmid 위에 alk loci의 mating을 시도하였고, Fennewald *et al.*(14)는

Table 4. Biochemical characteristics of the isolated A1-1 bacterial strain

Tests	Results	Tests	Results
Gram reaction	-	Starch hydrolysis	-
Motility	-	Urea hydrolysis	+
Catalase	+	Esculin hydrosis	-
Oxidase	-		
Methyl Red Test	+	Oxidation/Fermentation	
Voges-Proskauer	-	Glucose	+
Indole Production	-	Maltose	+
NO ₃ -reduction	-	Xylose	+
H ₂ S production	-	Mannitol	+
Triple sugar iron agar	-	Lactose	-
Reaction (slant/butt) alkaline/alkaline		Inositol	+
Litmus milk reaction	-	Arabitol	-
Malonate utilization	-	Galactose	+
Penylalanine deaminase	-	Raffinose	-
Gelatine liquefaction	-	Fructose	+
Casein hydrolysis	-	Sucrose	-

+: positive response, -: negative response

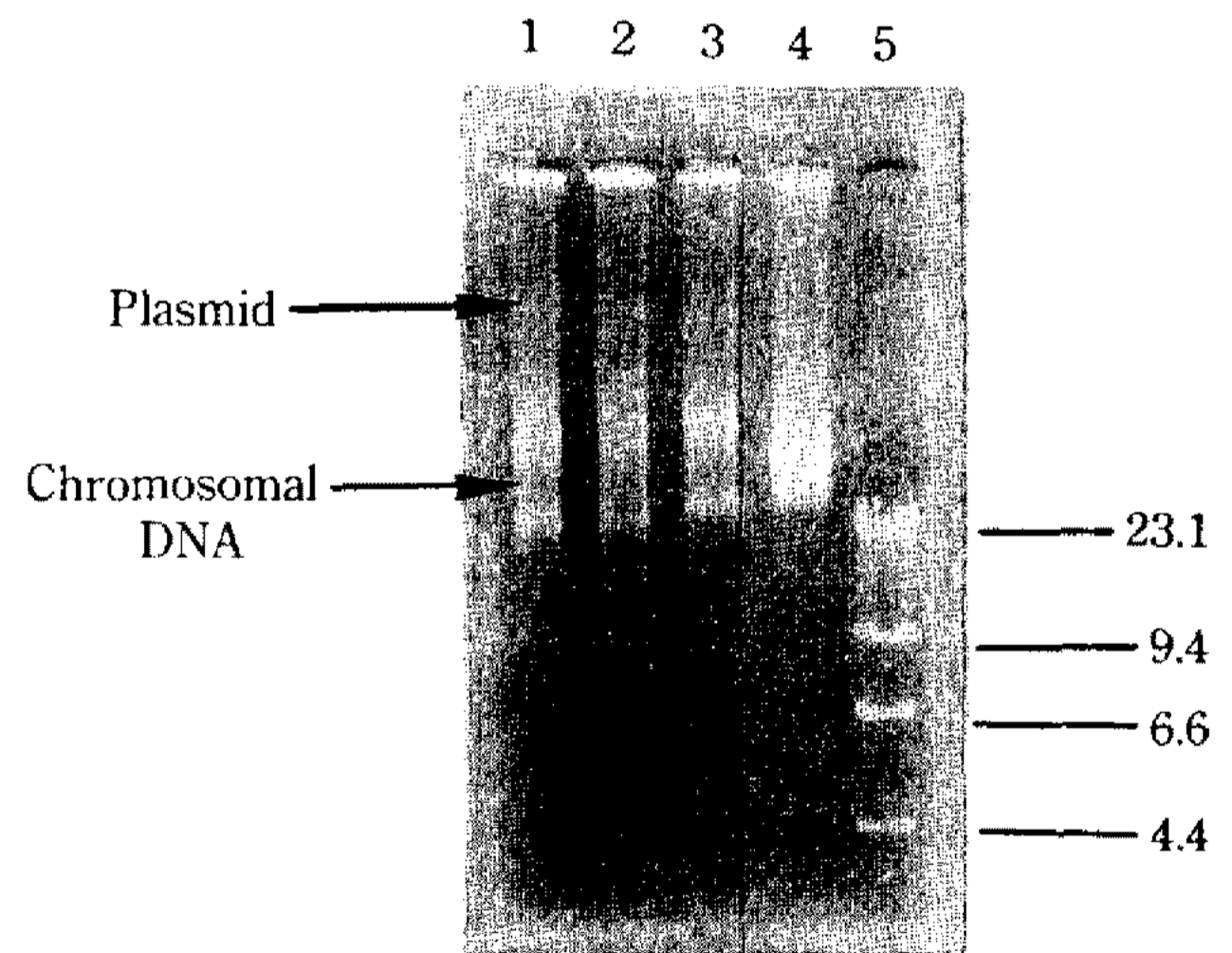


Fig. 2. Isolation of plasmid from *A. calcoaceticus* A1-1 strain.

Lane 1, 2, 3: *A. calcoaceticus* A1-1 (OCT⁺), Lane 4: *P. putida* KCTC 1646 (CAM⁺), Lane 5: λ /HindIII DNA marker

Pseudomonas putida PpG6에서 alkane oxidation에 필요한 유전자의 위치를 표시하였다. *Acinetobacter*속에 속하는 세균 중 유류분해에 관여하는 유전자가 chromosomal DNA에 위치하는 *Acinetobacter calcoaceticus* BD413, *Acinetobacter* sp. H01-N(10)과 plasmid에

Table 5. Curing frequency (%) of *A. calcoaceticus* A1-1 treating with mitomycin C and elevated temperature

Temperature	Number of Transfer	Concentration of mitomycin C ($\mu\text{g/ml}$)			
		5	10	20	30
15°C	I	25	35	43	76
	II	58	69	79	82
	III	74	88	100	100
25°C	I	67	71	89	100
	II	85	100	100	100

존재하는 *Acinetobacter calcoaceticus* RA57(26)에 대한 보고가 있다. *Acinetobacter calcoaceticus* RA57의 경우 4개의 plasmid가 발견되었고 이 중 20 kb 정도 크기의 pSR4는 원유대사 과정에서 탄화수소 기질의 세포와 물리적인 상호작용에 관여하는 유전자가 수록되어 있는 것으로 관찰되었다(26). 그러나 저온성세균인 *Acinetobacter calcoaceticus*의 유류 이용에 관련한 plasmid 분리에 관한 연구 결과는 본 실험에서 최초로 보고한다.

OCT plasmid curing 실험

n-Alkane 화합물 이용에 관여하는 유전자가 plasmid 위에 존재하는지를 확인하고자 OCT plasmid의 curing 실험을 실시하였다. *Pseudomonas*속 세균에 대해 curing 효율이 높고 주로 난분해성 물질 분해에 관련된 plasmid curing에 사용되었던(32) mitomycin C를 curing agent로 사용한 결과 Table 5에 서와 같이 mitomycin C의 농도에 따라 curing frequency가 달라짐을 알 수 있었다.

Chakrabarty *et al.*(8)에 의하면 PpG6 균주 OCT plasmid의 curing frequency는 mitomycin C 농도가 10, 20, 27 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 각각 1, 2, 7%로 나타나 본 실험의 결과는 매우 높은 curing frequency를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 그러나 최(3)가 보고한 *Pseudomonas maltophilia* N246의 curing frequency 실험 결과와 비교할 때 본 실험의 결과는 유사하였다. 또한 배 등(2)의 실험에 따르면 mitomycin C와 온도 증진의 두 방법을 함께 적용한 경우 curing frequency가 mitomycin C만을 적용한 경우보다 1.5배 증진됨을 보고하였는데, 본 실험의 결과도 mitomycin C의 농도와 transfer의 빈도를 늘려 줄수록 curing의 효율이 증가했고, 배양온도를 높여준 결과 curing의

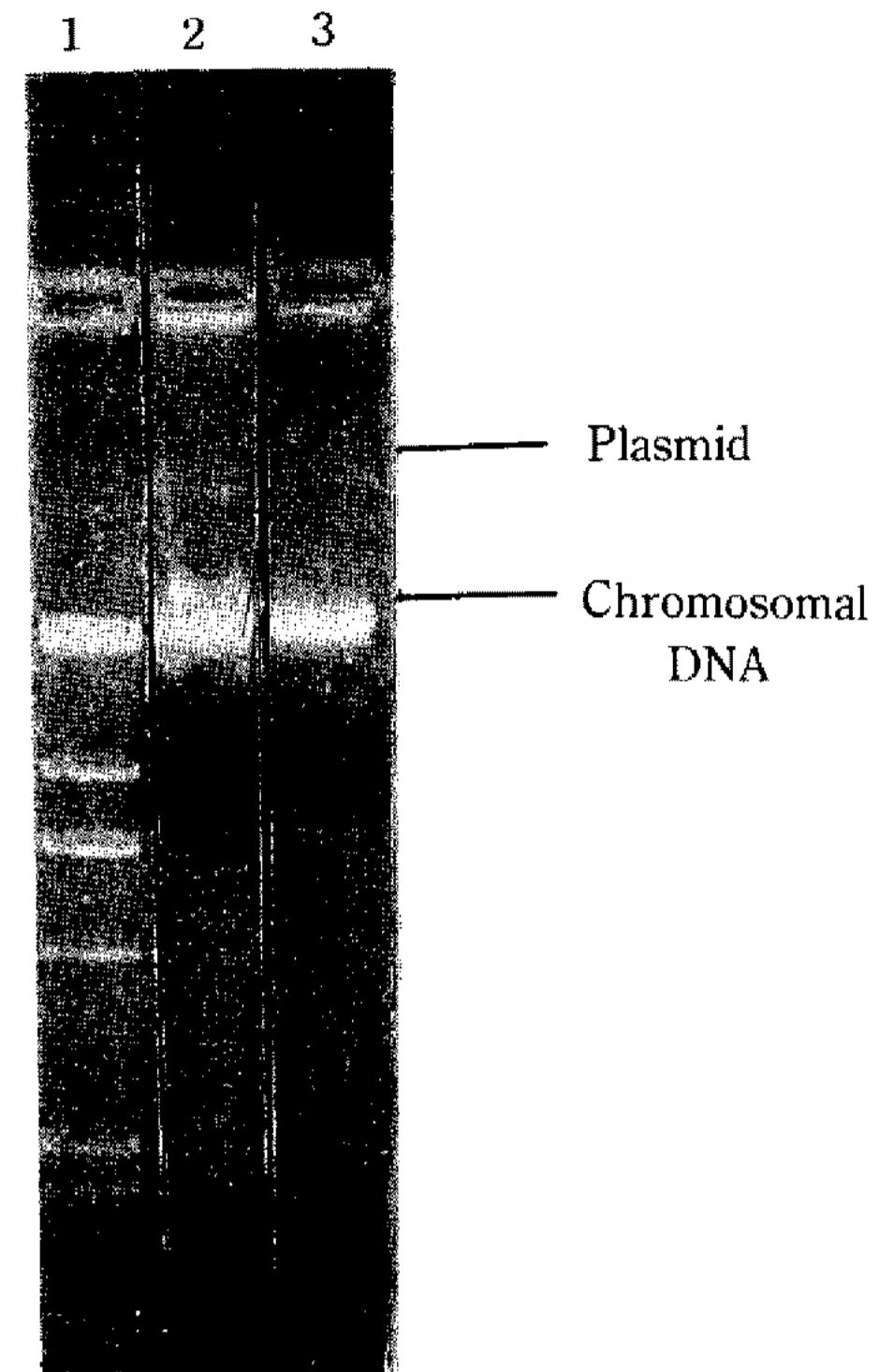


Fig. 3. Plasmid pattern of *A. calcoaceticus* A1-1 strain and the cured strain.

Lane 1: DNA marker, Lane 2: *A. calcoaceticus* A1-1 (OCT⁺), Lane 3: *A. calcoaceticus* A1-1 (OCT⁻)

Table 6. Utilization of alkane compounds by cured and not cured of *A. calcoaceticus* A1-1

Carbon Source	not cured strain (OCT ⁺)	cured strain (OCT ⁻)
Hexane (C ₆)	+	-
Octane (C ₈)	+	-
Decane (C ₁₀)	++	-
Dodecane (C ₁₂)	++	-
Tridecane (C ₁₃)	++	-
Tetradecane (C ₁₄)	++	-
Hexadecane (C ₁₆)	++	-
Heptadecane (C ₁₇)	++	-
Kuwait crude oil	++	-

-: not grow, +: grow, ++: grow actively

효율이 약 2배 증가됨을 알 수 있었다. Mitomycin C를 처리하여 얻은 cured strain은 최소배지에서 생장을 나타내지 못했으며 plasmid의 유무를 관찰한 결과 plasmid DNA를 함유하지 않았다(Fig. 3). 또한 n-alkane 화합물의 탄소원 이용을 살펴본 결과 Table 6과 같이 plasmid가 cured된 OCT⁻는 전혀 탄화수소를 이용하지 못했다. 따라서 본 실험의 결과는 n-alkane 계열 화합물 이용 유전정보가 OCT plasmid에

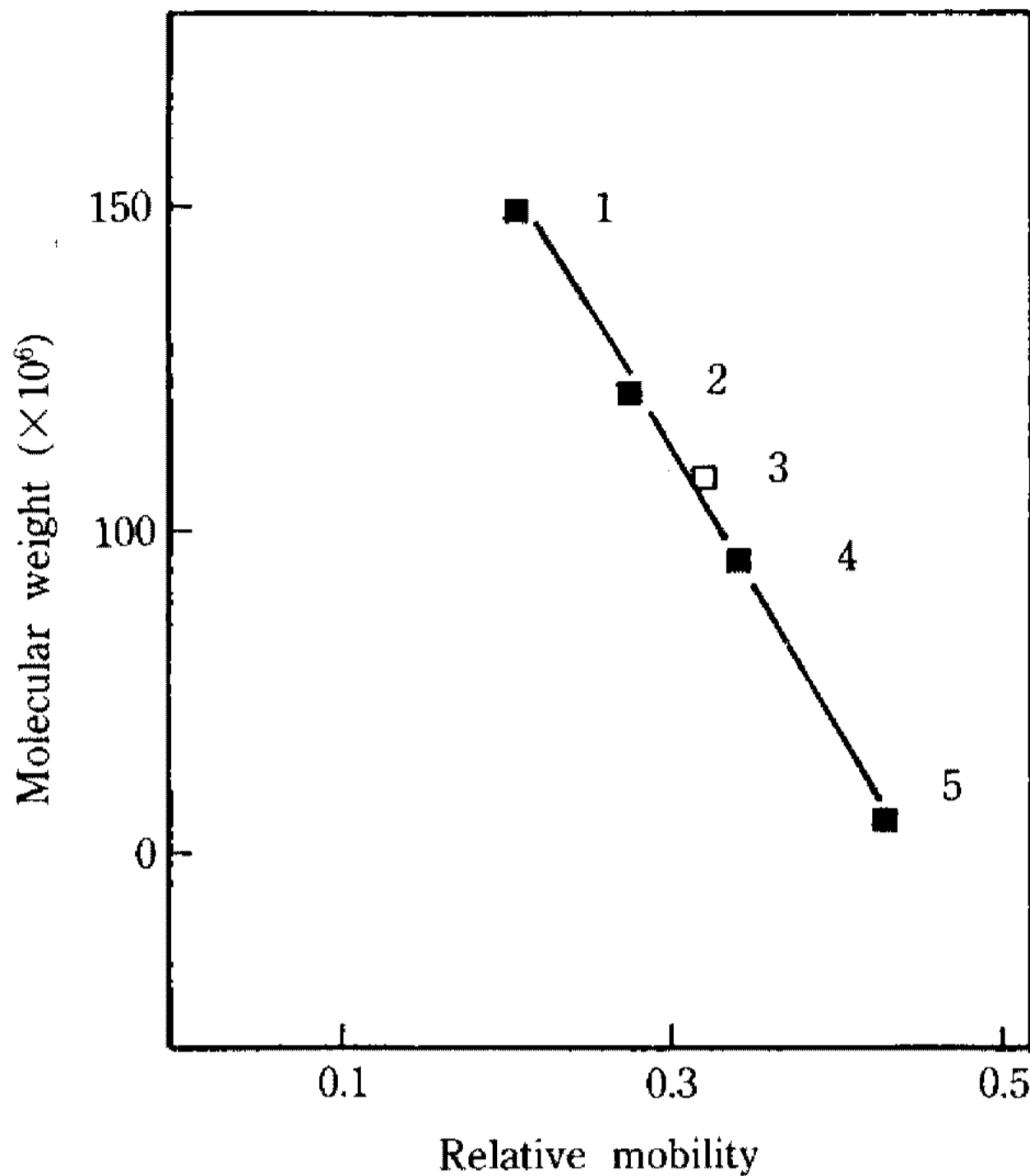


Fig. 4. Molecular weight versus relative mobility of plasmid DNA from various bacteria carrying plasmid of known molecular weight.

1. *P. putida* KCTC 1646 (CAM, 150×10^6), 2. *A. tumefaciens* KCTC 1542 (Ti, 120×10^6), 3. *A. calcoaceticus* A1-1 (OCT, 110×10^6), 4. *P. aeruginosa* (Rms, 95×10^6), 5. *P. putida* KCTC 1642 (NAH, 56×10^6)

존재함을 시사한다.

OCT plasmid 분자량 측정

A. calcoaceticus A1-1의 plasmid 분자량을 측정하기 위해 분자량이 이미 알려진 marker plasmids를 표준 시료로 하여 agarose gel electrophoresis를 실시하고 분자량과 상대적인 이동거리 사이의 상관관계를 비교하였다. 본 실험에 사용한 표준 plasmid는 분자량이 150~56 Md 범위에 있는 plasmid를 marker로 하여 분자량과 상대적인 이동거리 사이의 상관관계를 측정하였다. 측정결과 OCT plasmid는 *A. tumefaciens*의 plasmid보다 조금 작은 110 Md 정도의 크기를 갖고 있음을 전기영동상에서 확인할 수 있었다(Fig. 4).

분해 plasmid 중에서 n-alkane계 화합물의 분해능을 가지며 주로 hexane에서 decane 사이의 alkane 화합물을 잘 분해하는 OCT plasmid는 적어도 100 Md 이상의 큰 분자량을 가지나 OCT plasmid가 octane 분해 이용에서 지배하는 단계가 적는데 비해 분자량이 큰 것은 많은 잠재적 생리활성을 가짐을 시사 한다(1). 반면 최(3)에 의하면 *P. maltophilia* N

Table 7. OCT plasmid stability of *A. calcoaceticus* A1-1

Transfer	Stability (%)
Transfer I	89
Transfer II	86
Transfer III	90

246의 OCT plasmid 분자량은 79 Md으로 TOL plasmid와 유사한 크기로 보고하였다. Johnston and Gunsalus(19)는 *P. putida* 균주로부터 55 Md의 TOL plasmid의 분자량을 측정하였고 Yano and Nishi(33)는 *Pseudomonas* sp. TA8로부터 분리한 150 Md의 TOL plasmid pKJ1을 보고하였다. 또한 Rusansky *et al.*(26)는 *A. calcoaceticus* RA57로부터 원유 이용에 관여하는 5.1, 5.4, 10.5, 20 kb 크기의 4개 pSR plasmid를 보고하였다. 이와같은 결과와 비교할 때 본 실험에서 분리한 OCT plasmid는 이미 보고된 OCT, TOL, pSR plasmid에 비해 비교적 큰 분자량을 갖고 있음을 알 수 있다.

OCT plasmid의 안정성

OCT plasmid를 포함하는 *A. calcoaceticus* A1-1의 plasmid 안정성을 최소 배지에서 배양한 후 조사한 결과는 Table 7과 같다. 3회에 걸쳐 transfer하여 배양한 결과 약 90% 이상의 높은 안정성을 나타냄을 알 수 있었다. Plasmid의 안정성은 plasmid상의 유전자가 표현되어 나타나는 생리학적 특성, 증식률과 선택 효과에 영향을 받는다고 보고된 바 있고 Romero *et al.*(25)는 배양온도에 따라 안정성이 나타난다고 하였다. 최(3)에 의하면 *P. maltophilia* N246의 OCT plasmid 안정성을 최소 배지에서 3회에 걸쳐 배양한 후 조사한 결과는 85%이고 고 등(1)에 의하면 CAM : TOL plasmid는 선택 배지에서 70% 안정성이 비 선택 배지에서 0%의 낮은 안정도를 나타낸다고 하였다. 이상의 결과로 보아 A1-1 균주의 OCT plasmid는 최소 배지에서도 안정성이 매우 높은 것으로 판단된다.

항생제에 대한 내성 조사

A1-1 균주의 항생제에 대한 내성은 Table 8에서 보는 바와 같이 ampicillin에 대해서 상당히 높은 농도의 양을 넣어도 균주가 성장하는 강한 내성을 나타냈고, chloramphenicol에 대해서는 20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 양성 반응을 나타냈고, streptomycin, kanamycin, te-

Table 8. Antibiotics resistance to *A. calcoaceticus* A1-1

Antibiotics	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Result
Ampicillin	50	+
	100	+
	300	+
	500	-
Streptomycin	20	-
	50	-
	100	-
	150	-
Kanamycin	20	-
	50	-
	100	-
	200	-
Tetracycline	20	-
	40	-
	80	-
	100	-
Chloramphenicol	5	+
	20	+
	50	-
	100	-

+; positive response, -; negative response

tetracycline에 대해서는 감수성을 나타내었다.

이와같은 특징들은 저온성 유류 분해 세균인 *A. calcoaceticus* A1-1의 저온성 alkane 화합물 분해효소 또는 유화활성과 다른 중온성 균주와의 차이를 규명하고 또한 이를 유전자 수준에서 연구함으로써 유류 오염에 저온성 세균을 적용하는 연구에 도움이 되리라 예상된다.

요 약

오랜 세월 동안 저온환경으로 유지된 남극생태계에서 원유분해능을 나타내는 저온성 세균을 24균주 분리하여 그 중 분해능이 우수한 균주를 선발하였고, 그 중 활성이 가장 높은 A1-1을 선발하여 동정한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus*로 밝혀졌다.

A. calcoaceticus A1-1에는 분자량 약 110 Md인 plasmid 하나만이 확인됐으며 mitomycin에 의한 plasmid curing은 transfer를 계속할수록 또는 온도를 상승시킬수록 curing의 빈도가 높았다. plasmid가 제거된 균주의 탄화수소 분해능 실험결과 저온성 세균 *A. calcoaceticus* A1-1의 alkane 화합물 이용능력은

plasmid에 유전정보가 있음을 시사했다. 또한 본 균주의 plasmid 안정성은 세번째 transfer 후에도 90% 정도의 안정성을 보여주었고 항생제 중 ampicillin에 대한 내성을 나타내었고 streptomycin, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline에 대해서는 감수성을 나타내었다. 이와같은 결과들은 *A. calcoaceticus* A1-1가 매우 안정적이며 항생제 내성과 관련이 있는 유류이용에 관여하는 프라스미드를 갖고 있음을 시사한다.

참고문헌

1. 고영희, 전효근, 조경연, 배경숙. 1989. 방향족 탄화수소 분해 플라스미드의 n-Alkane 자화성 *Pseudomonas putida* 에로의 전이. 산업미생물학회지 17: 51-55.
2. 배경숙, 나종욱, 강사육, 홍순우, 하영철, 이계준. 1986. *Pseudomonas putida*로부터 salicylate 분해 플라스미드의 분리. 산업미생물학회지 24: 106-112.
3. 최순영. 1990. 해수에서 분리한 원유 분해 세균의 alkane 분해대사와 OCT plasmid의 특성. 숙명여자대학교 박사학위 논문.
4. Bartha, R. and R.M., Atlas. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol.* 22: 225-266.
5. Baruah, J.N., Y. Alroy and R.K. Mateles. 1967. Incorporation of liquid hydrocarbons into agar media. *Appl. Microbiol.* 15: 961.
6. Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112: 815-823.
7. Chakrabarty, A.M. 1973. Genetic fusion of incompatible plasmids in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 1641-1644.
8. Chakrabarty, A.M., G. Chou and I.C. Gunsalus. 1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 1137-1140.
9. Chou, G.I.N., D. Katz and E.C. Gunsalus. 1974. Fusion and compatibility of camphor and octane plasmids in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 71: 2675-2678.
10. Cruze, J.A., J.T. Singer and W.R. Finnerty. 1979. Conditions for quantitative transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr. Microbiol.* 3: 129-132.
11. Dunn, N.W. and I.C. Gunsalus. 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 114: 974-979.

12. Ekelöf, E. 1908. Bakteriologische Studien mit Rand der schwedischen Südpolar Expedition 1901-1903 *W. Erg. der Schwed. Südpolar Expedition*, 1901-1903, Vol. 4. Bonnier, Stockholm.
13. Fennewald, M. and J. Shapiro. 1979. Transposition of Tn7 in *Pseudomonas aeruginosa* and isolation of *alk*: Tn7 mutations. *J. Bacteriol.* **139**: 264-269.
14. Fennewald, M., S. Benson, M. Oppici and J. Shapiro. 1979. Insertion element analysis and mapping of the *Pseudomonas* plasmid *alk* regulon. *J. Bacteriol.* **139**: 940-952.
15. Hansen, J.B. and R.H. Olsen. 1978. IncP-2 group of *Pseudomonas*, a class unique large plasmid. *Nature* **274**: 715-717.
16. Hermann, M., G.K. Garg and I.C. Gunsalus. 1979. Fertility factors in *Pseudomonas putida*: Selection and properties of high frequency transfer and chromosomal donors. *J. Bacteriol.* **137**: 28-34.
17. Horowitz, A., D. Gutnick and E. Rosenberg. 1975. Sequential growth of bacteria on crude oil. *App. Microbiol.* **30**: 10-19.
18. Jobson, A.M., F.D. Cook and D.W.S. Westlake. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.* **23**: 1082-1089.
19. Johnston, J. B. and I. C. Gunsalus. 1977. Isolation of metabolic plasmid DNA from *Pseudomonas putida*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 13-19.
20. Kado, C.I. and S.T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
21. Holt, J.G. et al.(Ed.) 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins Baltimore, London.
22. Macfaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical Bacteria.
23. Nakazawa, T. and T. Yokota. 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.* **115**: 262-267.
24. Reisfield, A., E. Rosenberg and D. Gutnik. 1972. Microbial degradation of oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Appl. Microbiol.* **24**: 363-368.
25. Romero, D.A., P. Slos, C. Robert, I. Castellino and A. Mercenier. 1987. Conjugative mobilization as an alternative vector delivery system for lactic *Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2405-2413.
26. Rusansky, S., R. Avigad, S. Michaeli and D. L. Gutnik. 1987. Involvement of a plasmid in growth on and dispersion of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* RA57. *Appl. and Environ. Microbiol.* **53**: 1918-1923.
27. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. Manual of methods for general bacteriology.
28. Spino, D.F. and E.E. Geldreich. 1981. *Acinetobacter* spp.: Distinct morphology on eosin methylene blue agar as an acid to identification in drinking water. *Appl. and Environ. Microbiol.* **41**: 1063-1064.
29. Stanier, R.Y., N.J. Palleroni and M. Doudoroff. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
30. Szybalski, W. 1952. Microbial selection. I. Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science* **116**: 46-48.
31. Westlake, D.W.S., A. Jobson, R. Phillippe and F.D., Cook. 1974. Biodegradability and crude oil composition. *Can. J. Microbiol.* **20**: 915-928.
32. Williams, P.A. and M.J. Worsey. 1976. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* **125**: 818-828.
33. Yano, K. and T. Nishi. 1980. pKJ1, a naturally occurring conjugative plasmid coding for toluene degradation and resistance to streptomycin and sulfonamides. *J. Bacteriol.* **343**: 552-560.
34. ZoBell, C.E. 1964. The occurrence, effects and fate of oil polluting the sea. *Adv. Water Poll. Res.* **3**: 85-118.

(Received January 7, 1993)