

LAS(Linear Alkylbenzene Sulfonate)의 Plasmid에 의한 분해

차전옥 · 유진삼 · 백형석*
부산대학교 미생물학과

Degradation of LAS(Linear Alkylbenzene Sulfonate) by Plasmid

Cha, Jun-Ok, Jin-Sam You and Hyung-Suk Baik*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — Microorganisms capable of utilizing linear alkylbenzene sulfonates(LAS) as sole carbon source were isolated from industrial effluent by using LAS agar plates. The isolated strains were identified as *Salmonella* sp.(BC-2) and *Escherichia* sp.(BC-3) from the results of morphological, cultural and biochemical tests. The optimal condition for the growth and biodegradation of LAS was the initial pH 7.0 and LAS concentration 0.1%. The isolated BC-2 and BC-3 strains harbored plasmid and LAS-degrading activity was lost when the plasmids were cured by mitomycin C. The plasmids were transformed into *E. coli* and transformants have the LAS-degrading activity. Isolated strains were examined for primary biodegradation rate of LAS in the medium by methylene blue-active substance(MBAS) method. Of these isolates, BC-2 and BC-3 strains degraded LAS upto 60% and high resistant to CdCl₂ and HgCl₂. Isolated strains were sensitive to chloramphenicol, kanamycin, rifampicin, streptomycin and tetracycline but resistant to ampicillin and lincomycin. Its minimal inhibitory concentration(MIC) for ampicillin was more than 1500 µg/ml.

합성세제는 1930년대에 독일에서 합성된 이래 생산비용이 저렴하고 경수(hard water)에 잘 녹고, scum (Ca, Mg염)을 만들지 않는다는 장점 때문에 오늘날 까지 많이 사용되고 있다(1). 또한 합성세제는 난분해성 비 천연화합물로서 0.5 ppm의 농도에서도 기품을 형성하여 산소의 유입을 방해하므로 폐수처리 과정에 있어서 많은 문제를 일으킬 뿐 아니라 인체와의 친화력도 높아 피부의 손상을 일으키며 다량 섭취시는 위장장애까지 초래한다(2-4). 상수도원 중의 합성세제는 매년 그 수요가 급증하여 완전분해가 이루어지지 않은 합성세제의 잔유분이 심각한 수질오염 문제를 야기한다(5).

세척용으로 옛부터 쓰던 유일한 합성세제는 음이온계 세제인데 음이온계 세제는 초기에 주로 사용되었던 ABS(alkyl benzene sulfonates)와 1965년 이후 만들어져 현재까지 사용하고 있는 LAS(linear alkyl benzene sulfonates)로 크게 구분한다. ABS는 생물학적으로 hard type으로서 alkyl기에 side chain이

있기 때문에 미생물에 의한 분해에 내성을 나타내는 반면 LAS는 생물학적으로 soft type으로서 직쇄의 alkyl기를 가져 미생물에 의한 분해가 ABS보다 용이하여 초기에 주로 사용되던 ABS는 LAS로 대체되어 이용되고 있다.

합성세제의 분해에 관해서는 국내·외에서 많이 연구되고 있는데 미생물에 의한 aromatic hydrocarbon 분해과정에 대해서는 toluene, naphthalene, xylene, camphor 및 salicylate 등이 연구되어 이들 분해세균에 대한 유전학적 연구가 시도되었고, 이들 분해유전자가 plasmid에 존재하고 있는 것들이 알려져 있다(6, 7).

우리나라의 현실에서도 이러한 aromatic hydrocarbon이 다량 방출되고 또한 합성세제의 사용량이 점점 증가하는 추세를 보이고 있기 때문에 이들 오염물질의 처리가 심각한 실정이다.

본 연구는, 하수처리상의 문제를 야기하고 인체에 손상을 가져오는 LAS 합성세제에 관련하여 국내의 폐수와 토양에서 LAS 분해성 미생물을 분리하였으며 이 미생물의 LAS 분해성 plasmid에 대해 조사하였다. 이 분해균주의 분해능에 영향을 끼치는 제반 생육특성과 최적조건에 대한 기초적인 연구를 하였다.

Key words: LAS(linear alkylbenzene sulfonate), plasmid

*Corresponding author

재료 및 방법

LAS 분해균의 분리

LAS 분해균을 분리하기 위하여 난분해성 방향족 화합물계통을 사용하는 공장이 밀집된 부산의 신평·장림 공단의 폐수 및 인근 토양을 채수 채취하여 분리용 시료로 사용하였다. 분리용 배지로는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, KH_2PO_4 2.4 g, Na_2HPO_4 4.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, Sodium dodecylbenzene sulfonate(soft type) 0.2 g, Agar 15.0 g을 1 L 증류수에 첨가하여 사용하였고, 완전배지로는 LB medium에 0.1% LAS을 첨가하여 사용하였다. 채취한 시료를 균분리용 평판 배지에 도말하여 30°C에서 1주일간 배양하여 형성된 colony를 다시 균분리용 배지에 2번 옮겨 배양하여 균일한 성장을 나타내며, 비교적 colony가 크고 성장속도가 빠른 균주들을 선별하여 0.1% LAS가 첨가된 LB 한천 사면 배지에 1일간 배양한 후 냉암소에서 보존하여 본 실험에 사용하였다(8).

사용시약

합성세제로서 사용한 sodium dodecylbenzene sulfonate는 Tokyo Kasei Co.(日本, 東京都北區豊島 6-15-9) 제품을 사용하였으며, 이것은 C_{12} LAS homolog로서 전형적인 LAS이다. 배지로는 Difco 제품을 사용하였으며, 항생제 및 Mitomycin C는 Sigma Chemical Company 제품을 사용하였다. 제한효소는 IBI Company와 KOSCO Biotech에서 구입하여 사용하였다. Agarose는 BRL 제품을 사용하였으며, 그 외의 시약은 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 확인

Birnboim과 Doly의 alkaline lysis 방법(9)에 의해 plasmid DNA를 분리하였다. 분리한 plasmid는 0.7% agarose를 사용한 gel electrophoresis로 확인하였으며, 이때 running buffer system은 Maniatis등(10)의 Tris-borate buffer를 이용하였고 5 V/cm의 전압을 적용시켜 전개시킨 후 ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색하여 UV-transilluminator 하에서 DNA band를 관찰하였다.

Plasmid DNA에 의한 LAS 분해능 조사

Plasmid DNA의 curing : 분리된 LAS 분해균주에 대해 그 분해유전자가 plasmid에 존재하는지를 검토하기 위해(11, 12) curing 실험을 행하였다. LB broth에서 진탕배양한 균액으로부터 10^4 cell을 취해 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 mitomycin C를 포함하는 5 ml LB broth

(pH 7.5)에 접종하여 하루동안 정지배양한 뒤 LB plate에 도말하여 이를 master plate로 사용하였다. Master plate의 colony를 toothpicks로 selective plate와 LB plate에 각각 이식하였다. Selective plate에서 자라지 않는 master plate의 colony는 LAS 분해능이 상실된 cured cells로서 선별한 뒤 plasmid DNA 분리방법에 따라 DNA를 추출하여 전기영동법으로 plasmid의 curing을 재확인하였다. 이때 selective plate로서는 유일한 탄소원으로 LAS를 포함하는 균 분리용 배지를 사용하였다.

Calcium chloride 방법에 의한 transformation : 분리한 plasmid DNA를 *E. coli* C₆₀₀ 또는 *E. coli* DH5 α 에 Cohen 등(13)의 방법을 사용하여 transformation시켰다.

분리균의 LAS 분해율 측정 및 특징 조사

Methylene blue 법(14)에 의한 분해율 측정 : 100 ml의 LAS 분해율 측정용 배지가 들어 있는 500 ml shaking flask에 배양액 0.1 ml를 접종하여 37°C에서 120 rpm으로 96시간 진탕배양하였다. Control로서는 균을 접종하지 않은 동일한 조성의 배지를 사용하며 일정 시간 간격으로 배양액을 5 ml씩 채취하여 10,000 rpm(Hanila 10H-24)으로 30분간 원심분리한 후 상등액에 잔존하는 LAS의 양을 측정하였다. 즉 희석한 배양액 100 ml에 1 N NaOH를 2-3 방울 가하여 알칼리성으로 만든 후 (지시약은 phenolphthalein 용액을 사용) 다시 1 N H₂SO₄를 가하여 Pink 색이 없어지면 chloroform과 methylene blue 용액을 1 : 2.5의 비율로 가하여 LAS를 추출한 뒤 잔류하고 있는 LAS를 추출하기 위해 다시 chloroform으로 3회 추출한 다음 이 chloroform 추출액 100 ml를 652 nm에서 흡광도를 측정하였다.

LAS 분해균의 금속이온 내성 및 항생물질에 대한 저항성 test : 중금속 이온에 대한 내성조사는 metal compound gradient plate 법(11, 15)에 따라 실시하였다. 항생물질에 대한 내성시험은(15) rifampicin, ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, tetracycline 등을 각각 5, 50, 34, 50, 50, 그리고 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 함유하는 LB plates를 만든 다음 이들 plates에 균주를 10^4 cell/plate로 접종하여 1일간 배양 후 생장유무를 확인하고 생장을 나타낸 균종에 대해서는 항생제 농도를 각기 다르게 한 LB 배지에서 배양하여 최소저해농도(MIC)를 결정하였다.

분리균의 형태학적, 배양적, 생화학적 특성 : 공시 균주로 선정된 LAS 분해균의 분류학적 위치를 검토하기 위해 형태학적, 배양적, 생화학적 성질을 검토

하였으며 이에 따른 공시균의 분류와 동정은 Bergey's manual of Determinative Bacteriology(8th ed.)(16)와 Bergey's manual of Systematic Bacteriology(vol.1)(17)에 준하여 실시하였다. 세포의 형태학적 제반 실험은 L.J., Bradshaw의 Laboratory Microbiology(3th ed.)(18-2)과 微生物の分類と同定 및 Manual of Methods for General Bacteriology(17)에 준하여 실시하였다. 배양적 특성은 공시균을 nutrient broth agar 평판배지상에 배양시켜 colony의 형태, 표면, 색 등을 관찰하여 조사하였으며, 생화학적 제 특징은 Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria(19)와 Gerhardt 등(15)의 Manual of Methods for General Bacteriology에 준하여 실시하였다.

분해능에 영향을 미치는 제반 생육특성 조사

분리균에 의한 LAS 분해 및 생육특성에 대하여 배지의 초발 pH, 질소원, LAS 농도에 따른 생육도와 분해율을 조사하였으며, 이에 따른 최적조건에서의 생육도와 분해율도 조사하였다.

LAS 분해능에 대한 안정성 조사(20)

LAS가 포함된 배지에서 24시간 배양한 후 LAS 대신 육즙 액체배지에 접종하여 48시간 동안 배양하면서 0, 6, 12, 18 세대별로 배양액을 취하여 육즙 한천배지상에 도말한 다음 배양 후 나타난 단일 colony를 LAS가 포함된 최적 평판배지에 tooth-picking 하여 이 평판배지를 37°C 에서 배양하여 생성된 colony의 갯수를 확인하였다.

결과 및 고찰

LAS 분해균의 플라스미드 분리 및 공시균의 선정
부산의 신평 장림 공단지역의 폐수가 유출되는 하천의 물과 인근 토양을 시료로 채취하여 분리용 배지에서 배양을 실시하여 LAS 분해능이 높은 균주를 선별하였다. LAS 분해능이 우수하며 plasmid가 존재하는 균주를 BC-2와 BC-3라고 각각 명명하여 본 실험에 사용하였다.

플라스미드 DNA에 의한 LAS 분해능 조사

Curing : LAS를 분해하는 분리균 BC-2와 BC-3의 wild type cell은 균분리용 배지에서 colony를 형성하나, cured cells은 이 배지에서 colony를 형성하지 못하였다(Fig. 1). LAS 분해유전자가 plasmid에 존재하는 지를 확인하기 위해 LAS⁺ wild type과 LAS cured cell의 DNA를 순수분리하여 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같았다. Lane b의 BC-2와 Lane d의 BC-3 wild type에서 나타난 plasmid DNA가 LAS cured cell(Lane c/Lane e)에서는 나타나지 않았다.

LAS 분해유전자와 플라스미드와의 연관성 : Aromatic hydrocarbon의 분해유전자가 plasmid에 존재하는 것은 *Pseudomonas* sp.에서 알려져 있으며 xylene, toluene 등이 plasmid에 존재하는 유전자에 의해 분해되며(7), 본 연구에서 사용된 분리균주 BC-2와 BC-3도 LAS 분해유전자가 plasmid에 존재하고 있음이 wild type cells 및 transformants의 plasmid DNA를 분리하여 전기영동한 결과를 비교함으로써 확인되었다. 공시균주인 BC-2와 BC-3의 wild type cell에 있는 plasmid를 LAS 분해능이 없는 *E. coli* C₆₀₀과 *E. coli* DH5 α 에 transformation시킨 결과 모든 transformants는 LAS 분해능을 가졌고(Fig. 3) trans-

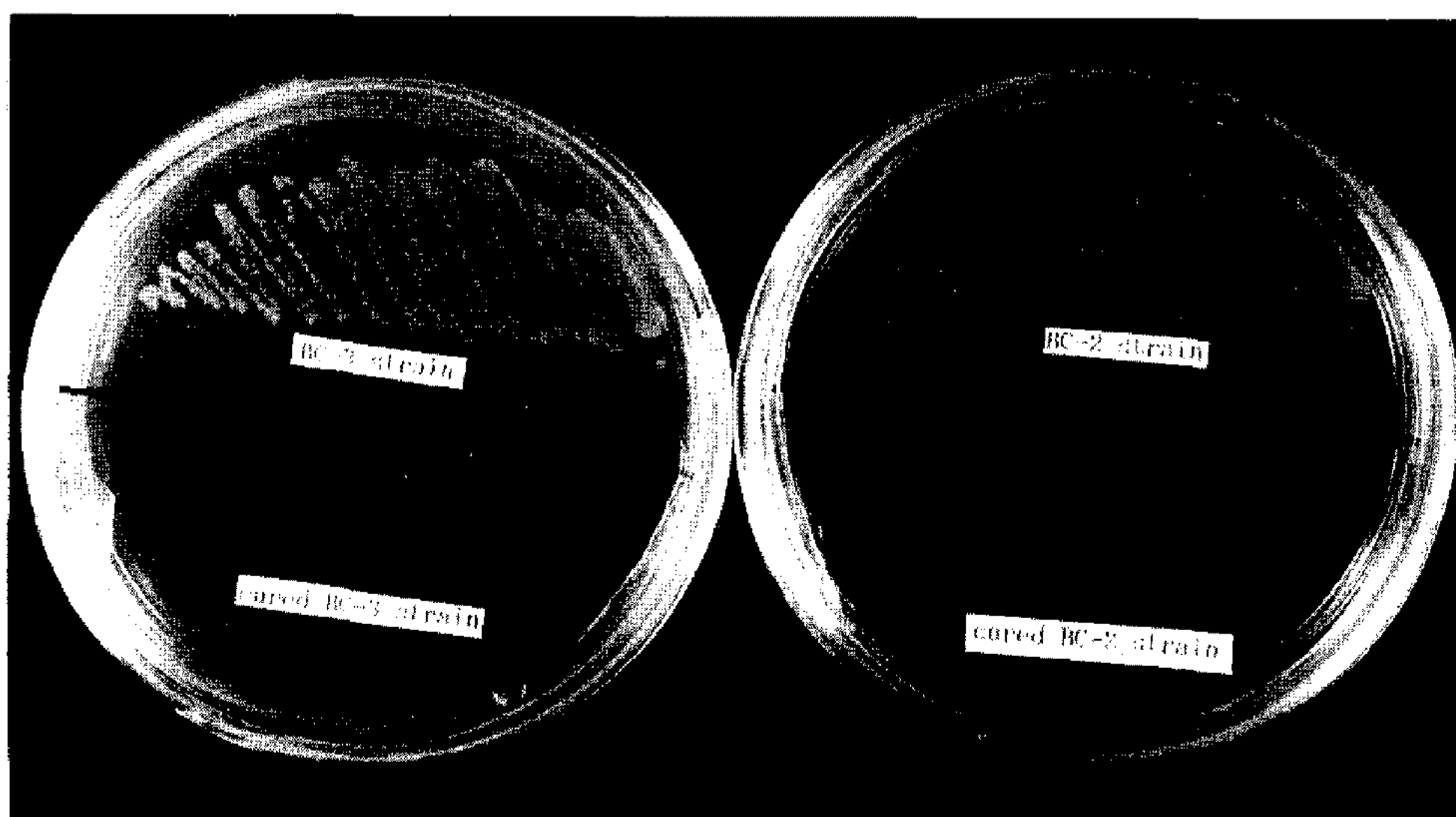


Fig. 1. Detection of LAS degradation of BC-2, BC-3 and cured strains.

formants의 plasmid DNA는 분리하여 전기영동법에 의해 확인하였으며 각각 3 Kb에서 5 Kb 정도의 크기를 가지고 있었다.

LAS 분해균의 합성세제 분해능 : LAS를 0.1% 첨가한 LAS 완전배지 BC-2와 BC-3 균주를 배양시켜 LAS의 분해율을 검토한 결과는 Fig. 4와 같았다. 배양 36시간부터 48시간까지 LAS가 빠른 속도로 분해되다가 그 이후에는 서서히 분해되고, BC-2 균주가 BC-

3 균주보다 분해율이 높은 것으로 나타났다.

금속이온 내성

BC-2와 BC-3 균주에 대해서 금속화합물에 대한 내성을 조사한 결과 이들 균주들의 CdCl₂에 대한 내성은 비교적 높은 것으로 나타났는데 Hiroyuki 등의 토양에서 분리된 *Pseudomonas putida* GAM-1의 plasmid에 의한 Cadmium 내성이 최고 7 mM인데 반해

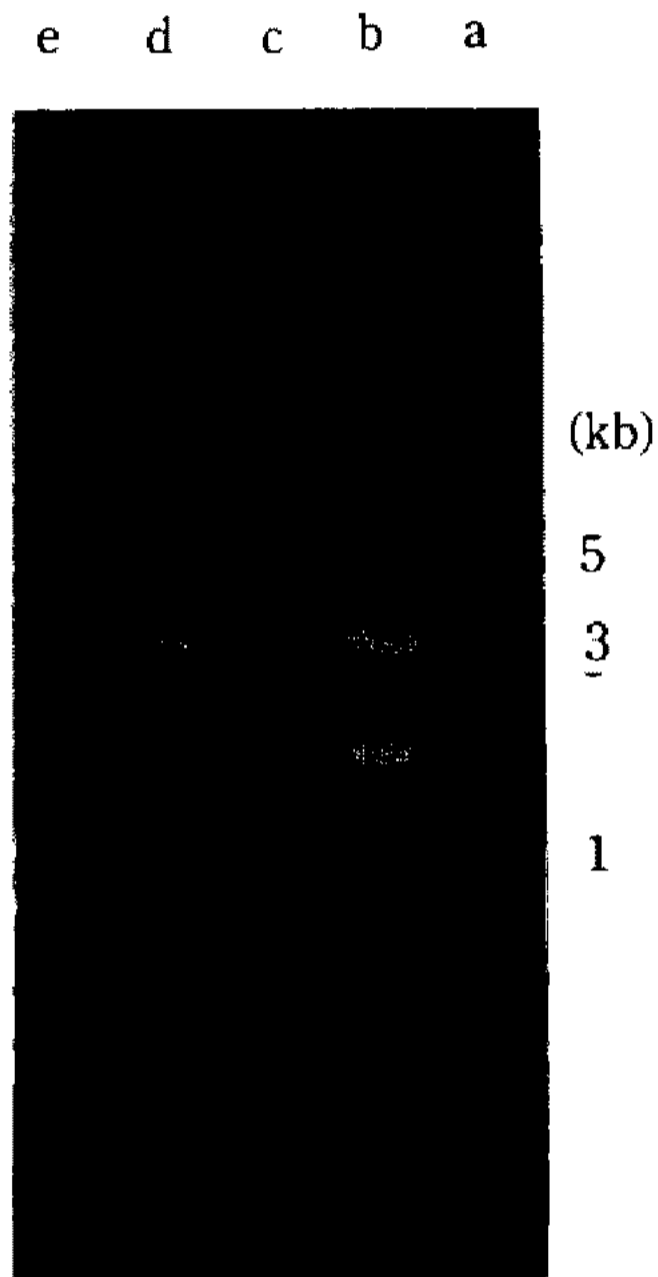


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from the BC-2, BC-3 strains and the cured strains.

Lane a: 1 Kb ladder, Lane b: plasmid DNA of BC-3 strain, Lane c: plasmid DNA of cured BC-3 strain, Lane d: plasmid DNA of BC-2 strain, Lane e: plasmid DNA of cured BC-2 strain.

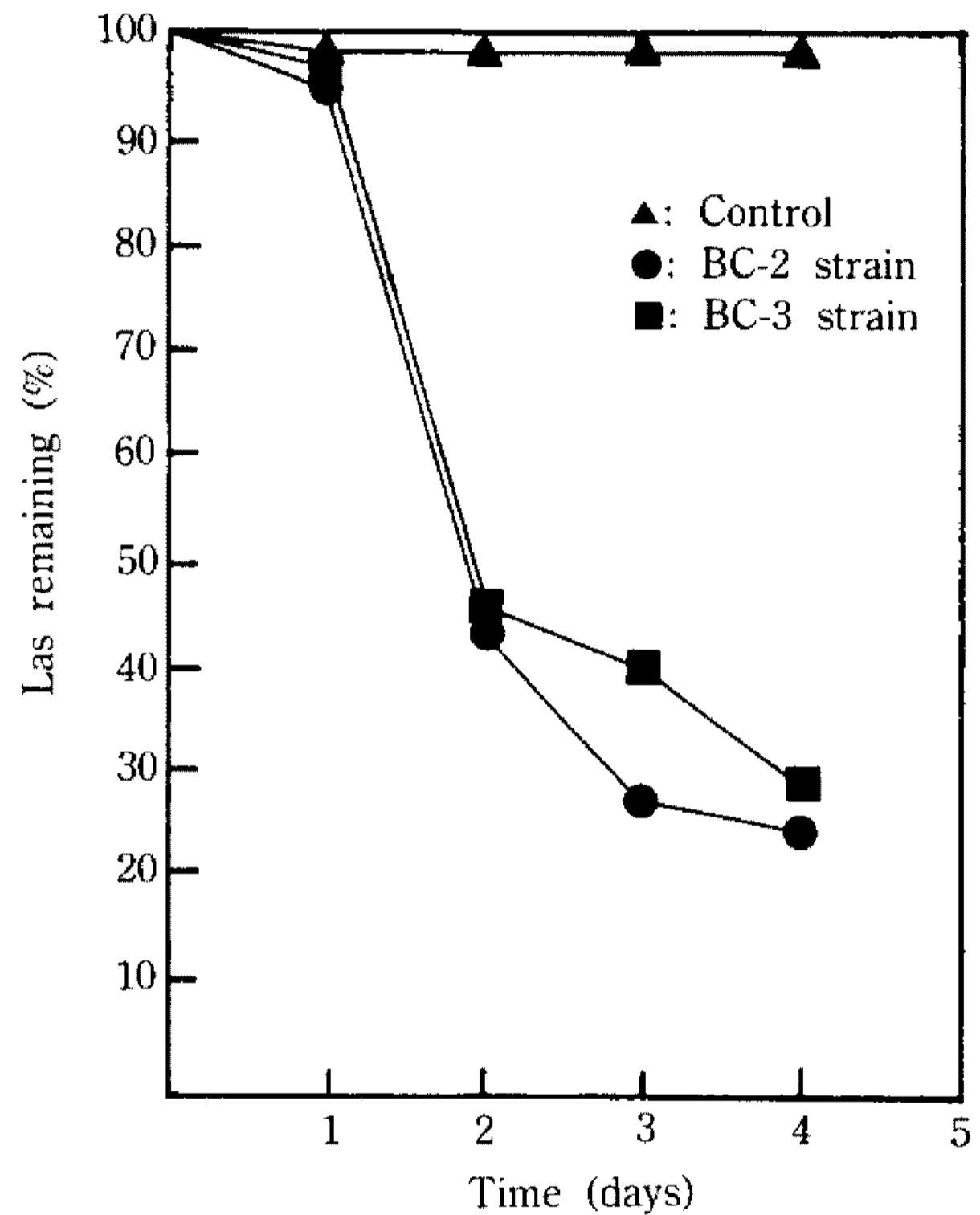


Fig. 4. LAS degradation rate during the culture of the isolated BC-2 and BC-3 strains in 0.1% LAS-containing medium. LAS remaining at various stages during growth was estimated by methylene blue method.

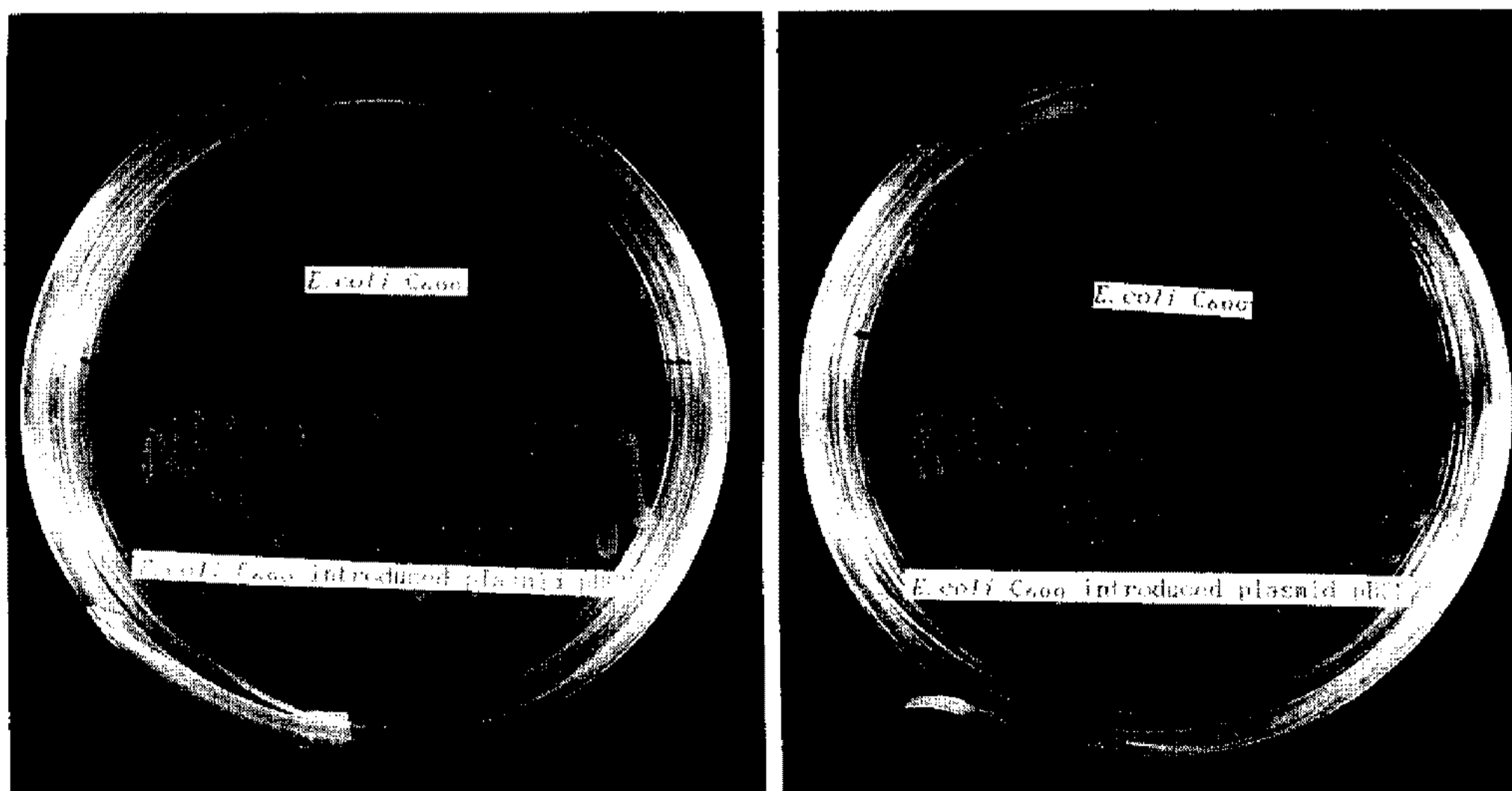


Fig. 3. Detection of LAS degradation of *E. coli* C₆₀₀ and transformed strains.

(12) 본 연구에서 분리한 균주 BC-2와 BC-3 균주는 8 mM 이상까지 성장하였다. AgNO₃에 대한 내성도가 높으며(1 mM) 그리고 HgCl₂의 경우 BC-2 균주에서 200 µg/ml로 높은 내성을 나타내었다.

분리균의 항생제 내성과 최소생육저해온도(MIC)

BC-2와 BC-3 균주의 항생제에 대한 내성을 조사한 결과 이들은 chloramphenicol, kanamycin, rifampicin, streptomycin과 tetracycline에 대해 생장이 저해를 받았고 ampicillin과 lincomycin에 대해서는 내성을 나타냈는데 특히 ampicillin에 대한 MIC는 1500 µg/ml 이상으로 강한 내성을 나타내었다. 그러나 Cured cells의 경우 이러한 성질을 보유하고 있지 않으며, transformants에서는 가지게 되었다. 그러므로 항생제에 대한 내성은 plasmid에 의존하고 있는 것으로 여겨진다.

공시균주의 선정 및 분류동정

본 실험에서 분리한 공시균주 BC-2와 BC-3의 형태학적, 배양적, 생화학적인 여러가지 특성을 조사한 뒤 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8nd ed.), Bergey's Manual Systematic Bacteriology (vol.1), Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(2nd ed.)등을 사용하여 비교 검토한 결과 각각 Salmonella속과 Escherichia속으로 동정되어 편의상 Salmonella sp., BC-2와 Escherichia sp., BC-3이라고 명명하여 실험에 사용하였다.

분해능에 영향을 미치는 제반 생육특성 조사

pH 변화에 따른 영향: pH 7.0에서 최고의 생육과 분해율을 나타내었고, 대체로 알칼리성 범위에서 분해능이 양호하였다. 그러나 산성범위의 pH에서는 생육과 분해능이 거의 없는 특성을 가지고 있었다.

LAS 농도의 변화에 따른 영향: LAS 농도가 0.1%일 때 생육이 가장 양호하였으나 0.3% 이상에서는 생육이 거의 일어나지 않았으며 분해도 되지 않고 고농도의 LAS에 의해서는 생육이 저해되었다.

질소원의 변화에 따른 영향: 배지에 0.4% 농도로 질소원을 첨가하여 생육과 분해율을 측정된 결과 유기질소원들을 첨가했을 때가 무기질소원들을 첨가했을 때보다 생육과 분해능이 좋았으나 질소원이 첨가되지 않은 배지에서의 분해능과 생육은 좋지 못하였으며 Yeast extract의 첨가시 생육이 가장 왕성하였다.

생육 최적 배지조건에서의 생육도 및 분해율 측정: 이상에서 검토한 결과 LAS 분해균의 LAS에 대한 생육과 분해를 위한 최적 배지조건은 Table 1과 같

Table 1. Optimum medium for BC-2 and BC-3 strains

(NH ₄) ₂ SO ₄	4.0 g
KH ₂ PO ₄	4.8 g
Na ₂ HPO ₄	8.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.02 g
Sodium dodecylbenzene sulfonate(soft type)	1.0 g
Distilled water	1000 ml
pH 7.2	

으며 96시간의 배양 이후에 0.1% LAS를 50%~60% 정도로 분해하여 분리용 배지에서 보다 분해능이 향상되었다.

LAS 분해 안정성 조사

LAS 분해능에 대한 안정성을 조사한 결과 BC-2, BC-3 균주는 0, 2, 4, 6, 8, 10 세대 모두 100%의 분해안정성을 나타내었다.

요 약

부산의 신평·장림 공단지역의 하수나 토양에서 유출된 탄소원으로 LAS를 이용하는 LAS 분해성 미생물을 분리하였다. 플라스미드에 LAS 분해 유전자가 존재하는지를 검토하였으며, 합성세제 분해능, 금속이온 내성 및 항생제 내성 조사, 분해능에 영향을 미치는 제반 생육특성 조사, LAS 분해 안정성 등을 조사하였다.

분리된 균주는 형태학적, 배양적, 생화학적 특징을 분류학적 방법에 의해 동정한 결과, Salmonella sp., BC-2와 Escherichia sp., BC-3으로 명명하였다.

LAS⁺ wild type과 LAS⁻ cured cell의 DNA를 순수분리하여 전기영동한 결과 LAS 분해 유전자가 플라스미드에 존재하고 있음을 확인하였다. LAS 분해능이 없는 E. coli에 분리균의 plasmid DNA를 transformation한 결과 transformants는 LAS 분해능을 가졌다.

BC-2 균주가 BC-3 균주보다 분해율이 높았으며 금속 화합물에 대한 내성 조사 결과, CdCl₂에 비교적 큰 내성을 가진 것으로 나타났다. Ampicillin에 대한 MIC는 1500 µg/ml 이상으로 강한 내성을 나타내었으며 이는 플라스미드에 의존하고 있는 것으로 확인되었다.

분해능에 영향을 미치는 생육특성을 조사하였는데, pH 7.0에서 최고의 생육과 분해율을 나타내었으며

대체로 알칼리성 범위에서 분해능이 양호하였고, LAS 농도가 0.1%일 때 생육이 가장 양호하였다. 질소원 으로서는 yeast extract의 첨가시 생육이 가장 왕성 하였으며, 질소원을 따로 첨가할 필요가 있는 것으로 확인되었다. BC-2, BC-3 균주는 LAS 분해능에 대해 안정성을 가지고 있었다.

감사의 말

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Swisher, R.D. 1970. *Surfactant Biodegradation*. Marcel Dekker, Inc., New York.
2. Cain, R.B. 1977. Surfactant Biodegradation in waste waters, Pp. 283-318. In A.G. Calley, C.F. Forster, and D.A. Stafford(ed.), *Treatment of Industrial Effluents*. John Wiley and Sons, New York.
3. 用水廢水便覽 編輯委員會編. 1973. 用水廢水便覽, Pp. 595, 改訂2版. 丸善株式會社, 東京.
4. 堀口博. 1975. 新界面活性劑, Pp. 443-456. 三共出版株式會社, 東京.
5. United States Public Health Service. 1972. *Drinking Water Standards*, Pp. 22-25. PHS Publication No. 956, US Government Printing Office, Washington.
6. Kellogg, S.T., K.D. Chatterjee, and A.M. Chakrabarty. 1981. Plasmid assisted molecular breeding new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science* **214**: 1133-1135.
7. Chakrabarty, A.M. 1976. Plasmid in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.* **10**: 7-30.
8. Ohwada Kouich. 1975. Agar plate method for detection and enumeration of alkylbenzenesulfate-degrading microorganisms. *Appl. microbiol.* **29**: 40-43.
9. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* **7**: 1513-1523.
10. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
11. Horitsu Hiroyuki, Kazumi Yamamoto, and Akira Fukuchi. 1986. Plasmid-determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GAM-1 isolation from soil. *J. Bacteriol.* **165**: 334-335.
12. Miller, J.M. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
13. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 2110-2114.
14. American Public Health Association. 1985. *Standard methods for the examination of water and waste water*, Pp. 581-585. 16th ed. American Public Health Association Inc., New York.
15. Gerhardt, Murray, Costilow, and Nester. 1974. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, 1981.
16. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The William and Wilkins Co., U.S.A.
17. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. 1984. The William and Wilkins Co., U.S.A.
18. Bradshaw, L.J. 1979. *Laboratory Microbiology*, 3th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto.
19. The GeneClean II kit Bio 101 Inc., 1991.
20. Karns, J.S. and A.M. Chakrabarty. 1983. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1176-1181.

(Received February 21, 1994)