

Catechol 처리에 의한 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 생화학 및 세포학적 변화

고연자 · 임재윤 · 이기성¹ · 김치경*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과, 배재대학교 자연과학대학 생물학과¹

방향족 탄화수소 화합물들은 자연계에 오염되면 미생물에 의한 분해가 미미하여 장기 축적됨으로써 생명체에 독성을 나타낸다. 이러한 방향족 탄화수소가 준치사 수준의 농도로 미생물에 노출되면 stress-shock 단백질을 합성하거나 세포 구성물질에 생화학적 변화가 일어나 적응현상이 나타나게 된다. 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. DJ-12를 여러 가지 농도의 catechol로 처리했을 때 나타나는 stress-shock 단백질의 합성양상과 함께 세포의 형태와 생존을 위한 내성의 변화를 연구하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12는 0.5~1 mM의 catechol이 6시간 배양 후 60% 이상이 분해되었으나, 3 mM 또는 그 이상의 농도에서는 전혀 분해되지 않았고 생존 세포수는 30시간 처리 했을 때부터 10^2 cell/ml 또는 그 이상이 사멸되었다. DnaK는 1 mM 이상의 catechol로 10분간 처리할 때 유도 생성되었고, GroEL은 0.5 mM이상에서 생성되었다. 10 mM의 catechol로 처리한 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 세포는 세포벽에 구멍이 생겼으며 간균의 형태가 일그러지는 변화가 관찰되었다. 준치사 농도인 1 mM의 catechol이나 benzoate 또는 4-chlorobenzoate로 전처리한 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 stress-shock 단백질이 합성되었을 뿐 아니라, 치사 농도인 10 mM의 catechol에서 tolerance를 나타내었다.

KEY WORDS □ survival, tolerance, catechol stress, stress-shock proteins, *Pseudomonas* sp. DJ-12

자연생태계에서 수 많은 환경요인들은 생물의 생명작용에 적절한 영향을 주지만, 극한 환경에서는 생물체에 stress로 작용한다. 이와 같은 자연의 환경 stress 외에 인간의 산업활동으로 배출되는 유해 오염물질들도 정상적인 생명 활동을 저해하는 chemical stress로 작용할 수 있다. 환경오염원으로서의 화학물질 중 방향족 탄화수소 화합물들은 자연계에서 미생물에 의하여 잘 분해되지 않고 축적됨으로써 생태환경에서 생명작용에 독성을 나타낼 뿐 아니라 내분비계 교란물질(환경 호르몬)로 작용한다.

이러한 방향족 탄화수소 화합물은 지질에 친화성이 있기 때문에 세포막의 구조와 기능의 변화, 막전위의 파괴, 지질과 단백질의 소실, 막 단백질의 변성 등의 원인으로 작용한다고 보고되었다(5, 9, 27, 28). 특히 Sikkema 등(28)은 toluene이 세포막에 손상을 주고 ATP생산을 억제하여 세포의 성장을 저해한다고 보고하였고, Blasco 등(2)은 4-chlorobenzoate, 4-chlorocatechol 및 4-chlorobiphenyl를 분해시키는 *Pseudomonas*에서도 쉽게 분해되는 않는 높은 농도에서 중간대사산물이 세포내에 축적됨으로써 생장이 급격히 억제된다고 보고하였다.

여러 가지 stress에 대한 생물체의 반응 가운데 원핵 세균에서 가장 많이 연구된 것은 heat-shock에 대한 반응이다. 세균이 급격한 온도 상승에 노출되어 열충격을 받으면, 여러 종류의 heat-shock 단백질이 일시적이지만 신속하게 유도 합성되어 손상된 기능 단백질의 구조를 정상적인 구조로 회복시키는 역할을 한다(10, 16, 17) 또 이와 같은 heat-shock 단백질은 고온에서 생존할 수 있는 내성을 높여주는 동시에 ethanol

(12, 21), sodium dodecyl sulfate(1), hydrogen peroxide 등(7)의 chemical stress에 대한 내성도 함께 나타났다고 보고되었다. 최근에는 benzene(3), phenol(11, 20), 2,4-dinitrophenol 등(9)과 같은 환경 오염원 탄화수소 화합물들에 의해서도 몇 가지 종류의 heat-shock 단백질이 유도 합성된다는 것이 보고되었다.

이러한 방향족 탄화수소 화합물에 의하여 sublethal 수준의 stress를 받으면 미생물은 유전자 발현기작이 조절되어 stress-shock 단백질을 합성하거나 세포 구성물질에 생화학적 변화가 일어나 생리적인 적응현상이 나타나게 된다. Lupi 등(19)은 *Pseudomonas putida* KT2442에서 1.6 mM의 2-chlorophenol을 stress로 45-95분 동안 처리하였을 때 여러 가지 단백질의 합성이 증가되는 것을 2D-PAGE를 이용하여 확인하였다. Pentachlorophenol과 monochlorophenol에 노출된 *E. coli*에서는 stress-shock 단백질이 노출 시간에 따라 유도 혹은 억제되며(6), 20 mM benzoate에 15분간 노출된 *E. coli*에서는 33개 종류의 stress-shock 단백질이 유도되는 것이 확인되었다(15).

Pseudomonas sp. DJ-12는 호기성 환경에서 4-chlorobiphenyl(4CB) 및 biphenyl를 meta-cleavage과정으로 분해하여 4-chlorobenzoate(4CBA) 및 benzoate를 생성하는 것으로 밝혀졌고(13), 또 4CB나 biphenyl 그리고 4-hydroxybenzoate(4HBA)와 같은 환경 오염물질의 stress에 대한 생존성과 stress-shock 단백질의 합성양상이 Park 등(24)에 의하여 연구보고 된 바 있다. *Pseudomonas* sp. DJ-12는 catechol을 0.5~1.0 mM의 농도 범위에서는 분해하지만 그 이상의 농도에서는 분해하지 못하고 생장이 저해된다. 그러므로 본 연구에서는 4CB 및 biphenyl의 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12에 대하여 여러 가지 농도의 catechol로 처리했을 때, stress-shock 단백질

*To whom correspondence should be addressed

Tel : 0431-261-2300, Fax : 0431-264-9600

E-mail : environ@trut.chungbuk.ac.kr

의 합성 및 지방산의 변화 등 생화학적 변화와 함께 세포의 형태 그리고 생존을 위한 내성등 세포학적 변화를 연구하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 catechol 처리

Pseudomonas sp. DJ-12는 Kim 등(13)의 보고에서의 같이 30°C의 Luria-Bertani(LB) 배지에서 대수기까지 배양시킨 후 세포를 회수하여 실험에 사용하였다. Catechol 처리 후 세균의 성장과 분해능을 측정할 때에는 MM2 최소배지(14)에 catechol을 농도별로 첨가하여 실험하였다. MM2 최소배지는 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 1 µM FeSO₄ · 7H₂O, 100 µM CaCl₂ · H₂O, 1 mM MgSO₄, 8.5 mM NaCl, 18 mM (NH₄)₂SO₄를 포함시켰다.

Catechol 처리 실험은 Flattery-O'Brien 등(7)이 보고한 방법으로 20 ml의 MM2 최소배지에 catechol을 0.5, 1, 3, 5, 7, 10 mM의 농도로 각각 첨가한 후 균체를 10⁶~10⁷ cells/ml이 되도록 접종하여 30°C에서 60분 동안 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 단백질 및 지방산을 분석하였고 세포의 내성 실험을 실시하였다.

Catechol의 분해 및 성장 측정

Pseudomonas sp. DJ-12의 catechol 분해능과 그 성장율을 측정하기 위하여 Park 등(24)의 보고에서의 같이 MM2 최소배지에 catechol을 각 농도별로 첨가한 후, 균체를 10⁷~10⁸ cell/ml이 되도록 접종하여 30°C에서 진탕배양하였다. 30 시간 동안 일정 시간별로 시료를 채취하여 심진 희석한 다음 LB agar plate에 도말하고, 30°C에서 20시간 배양한 후 colony를 계수하여 생존율을 측정하였다. Catechol의 분해는 상기의 방법으로 채취한 배양액을 2,000×g로 5분간 원심분리 후 상등액을 취하여 UV-visible spectrophotometry 방법으로 275 nm에서의 흡광도를 측정하여 잔유 기질의 양을 측정하였다.

단백질의 추출 및 전기영동

Catechol로 처리한 균체를 2,000×g로 5분간 원심분리하여 회수한 후, 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하여 냉각 상태를 유지하면서 50 W의 sonicator(Imagic Products International, Inc., USA)로 15초간 15회 반복해서 세포를 파쇄한 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상등액을 취하였다. 추출된 단백질을 Bollag 등(4)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였다. Separating gel은 10%의 acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 4% acrylamide gel을 사용하였다. 단백질은 protein assay kit (Sigma Chemical Co., MD, USA)를 사용하여 같은 농도로 분석하였다. 전기영동은 60 V 또는 90 V에서 2시간 30분 동안 실시하였으며, 전개용매로는 1×의 running buffer(0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 1% SDS)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 Coomassie 염색용액으로 2시간 동안 염색하였으며 탈색용액 I(methanol, 500 ml; glacial acetic acid, 100 ml; H₂O, 400 ml)로 1시간 동안 탈색하였다. 2차 탈색은 탈색용액

II(methanol, 50 ml; glacial acetic acid, 70 ml; H₂O, 880 ml)로 10시간 동안 실시하였다.

Western blot

Western blot은 Sambrook 등(26)의 방법에 따라 실시하였다. SDS-PAGE에서 전기영동이 끝난 후 gel에 있는 단백질을 Semiphor transfer(Hoefer, USA)로 40 mA에서 60분 동안 Hybond™-PVDF membrane(Amersham, England)에 옮겼다. Membrane은 BSA로 2시간 동안 처리한 후 PBS buffer(0.8 % NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, pH 7.4)로 15분씩 2회 세척하였다. 1차 항체는 각각 anti-DnaK monoclonal antibody와 anti-GroEL monoclonal antibody (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada)로 0.08% Tween20이 포함된 PBS buffer에 1:10,000로 희석하여 membrane에 1시간 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.08% Tween20이 포함된 PBS buffer로 15분씩 3회 세척하여 1:10,000으로 희석된 2차 항체(anti-mouse IgG HRP conjugate, Promega Co., Madison, USA)로 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 0.08% Tween20이 포함된 PBS buffer로 15분씩 3회 세척하였으며, ECL kit(Amersham International plc., Buckinghamshire, England)을 이용하여 X-ray film으로 현상하였다.

주사전자현미경 관찰

Pseudomonas sp. DJ-12를 LB 평판배지에 접종하여 12시간 배양한 후 집락을 포함하는 agar block의 표면적이 0.5 cm²가 되도록 떼어내어 10 mM catechol로 6시간 동안 처리하였다. Catechol로 처리한 균체는 Ng 등(22)의 방법에 따라 100 mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 만든 2.5 % glutaraldehyde 용액에서 2시간 동안 전고정 시키고 동일 buffer(pH 7.2)로 15분씩 3번 세척한 후 다시 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 만든 1% osmium tetroxide 용액에서 3시간 동안 후고정하였다. 그리고 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95%의 ethanol에서 각각 15분씩 탈수시킨 후 100% ethanol에서 20분씩 2번 최종 탈수시키고 isoamyl acetate로 치환하여 공기 건조시켰다. 건조된 시료를 Sputter coater(IB-3, Giko Engineering Co., Japan)를 사용하여 두께가 300 Å이 되도록 gold coating하여 주사 전자현미경(S-2500C, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

지방산의 분석

Pseudomonas sp. DJ-12를 LB배지에서 배양한 후 균체를 회수하여 상기의 방법으로 10 mM catechol로 2시간 동안 처리한 후 균체를 회수하였다. 이 균체는 MIDI Microbial Identity System(Newark, USA)의 사용지침서에 따라 지방산을 회수하기 위하여 reagent 1(sodium hydroxide, 45 g; methanol, 150 ml; H₂O, 150 ml)을 1 ml 처리하여 100°C에서 35분간 방치한 후 냉각시켰다. 이 시료에 다시 reagent 2(6 N hydrochloric acid, 325 ml; methanol, 275 ml)을 2 ml 첨가하여 현탁하여 80°C에서 1분간 열 처리를 한 후 빨리 냉각시킨 다음 reagent 3(hexane, 200 ml; methyl-tert butyl ether, 200 ml)을 1.25 ml 첨가하여 10분간 혼합시켜 준 후 두 층으

로 분리되면 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 다시 reagent grade 4(sodium hydroxide, 10.8 g; H₂O, 900 ml)로 세척한 후 gas chromatography(HP6890, Newark, USA)로 분석하였다.

Catechol 처리에 의한 내성의 유도

Pseudomonas sp. DJ-12 균체를 MM2 배지에 10⁷~10⁸ cells/ml이 되도록 접종한 후 1 mM catechol이나 benzoate 또는 4CBA를 첨가하여 catechol과 benzoate에서는 10분, 4CBA에서는 20분 동안 전처리하여 stress-shock 단백질의 합성을 유도시켰다. 전처리된 각 시료는 10 mM의 catechol에 노출시키면서 15분 간격으로 시료를 채취하여 세균수를 측정하였다. 이때 전처리하지 않은 *Pseudomonas* sp. DJ-12를 세균수를 대조군으로 비교 실험하였다.

결과 및 고찰

Catechol 분해 및 세균의 성장

Pseudomonas sp. DJ-12는 6시간 배양 했을 때 Fig. 1에서와 같이 0.5~1.0 mM의 catechol을 60% 이상 분해했으며 세포수도 증가하기 시작하였다. 그러나 3 mM 또는 그 이상의 농도에서는 30시간 처리 후에도 catechol이 전혀 분해되지 않았으며 생존 세균수는 3 mM 농도에서 10² cells/ml이 감소하였으며 5 mM 이상의 농도에서는 세균수가 10³ cells/ml 이상 급격히 감소하였다

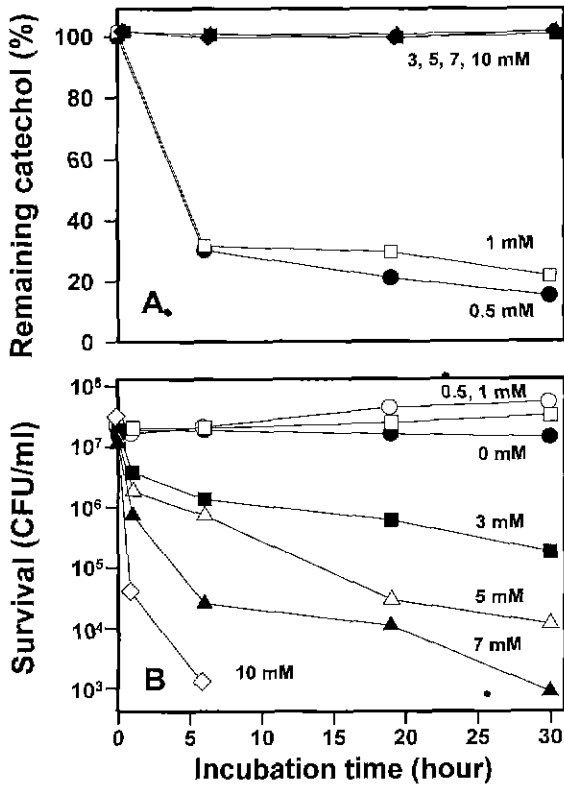


Fig. 1. Degradation of catechol by *Pseudomonas* sp. DJ-12 (A) and survival curves at different concentrations of catechol (B).

이러한 방향족 탄화수소 화합물질의 stress에 의한 미생물의 성장억제 내지 세포의 사멸에 대하여 Gage와 Neidhardt 등 (9)는 2,4-dinitrophenol을 이용한 실험 결과 세포막의 pH gradient가 파괴됨으로써 세포의 생장율이 감소된다고 보고하였다. 그리고 미생물에 의한 방향족 탄화수소 화합물의 분해와 세포 성장과의 연관성에 관하여 Blasco 등(2)은 4-chlorobenzoate, 4-chlorocatechol 및 4-chlorobiphenyl로 *Pseudomonas*에 처리했을 때 분해 가능한 농도의 한계는 2 mM였지만 그 보다 높은 농도에서는 중간대사산물이 세포내에 축적됨으로써 생장이 억제되었다고 보고하였다. 이와 같은 보고는 본 연구 결과와 일치 한다.

Catechol 처리에 의한 stress-shock 단백질의 합성

Pseudomonas sp. DJ-12를 상이한 농도의 catechol로 10분 동안 처리함으로써 유도 합성된 stress-shock 단백질을 anti-DnaK antibody와 anti-GroEL antibody로 Western blot 방법으로 검정한 결과는 Fig. 2와 같다. 여러가지 농도의 catechol로 10분간 처리했을 때 DnaK는 1 mM 이상에서 그리고 GroEL은 0.5 mM 이상에서 생성되었다. 이와 같은 결과는 Table 1에 정리한 바와 같이 5분간 노출시 3 mM 이상의 농도에서 DnaK가 증가하였으나, 10분간 노출 시에는 1 mM 또는 그보다 높은 농도에서 그리고 60분간 노출 시에는 5 mM 이상의 농도에서 DnaK가 생성하였다. GroEL의 합성은 0.5 mM 이상의 농도에서 5분간 처리했을 때 증가하기 시작하였으며, 20

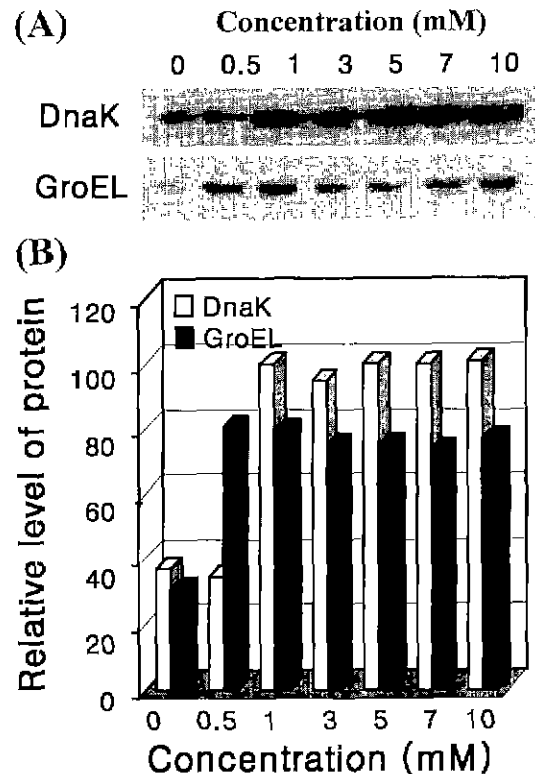


Fig. 2. Production of stress-shock proteins (DnaK and GroEL) by *Pseudomonas* sp. DJ-12 when treated with catechol at different concentrations for 10 min.

Table 1. Production of stress-shock proteins by *Pseudomonas* sp. DJ-12 treated with catechol at different concentration

Treatment time (min)	Stress-shock protein	SSP production at concentrations (mM):					
		0.5	1	3	5	7	10
5	DnaK	-	-	+	+	+	+
	GroEL	±	±	+	+	+	+
10	DnaK	-	+	+	+	+	+
	GroEL	+	+	+	+	+	+
20	DnaK	-	+	+	+	+	+
	GroEL	+	+	+	+	+	+
30	DnaK	-	+	+	+	+	+
	GroEL	-	-	-	-	-	-
60	DnaK	-	-	-	+	+	+
	GroEL	-	-	-	-	-	-

-, no production; ±, weak production; +, heavy production.

분 동안 처리했을 때에도 생산은 지속되었다.

DnaK와 GroEL과 같은 열충격 단백질은 정상적인 온도에서도 합성되는 양이 전체 단백질의 약 1.4% 정도나 되고 열충격을 받을 때에는 약 4~12%까지 합성이 유도된다고 Gomes 등(10)은 보고하였다. 이와 같은 heat-shock 단백질은 열충격 뿐 아니라 phenol(11, 20)이나 benzoate(15), 또는 2,4-dinitrophenol(19) 뿐 아니라 4CB나 biphenyl 그리고 4HBA 등(24)의 방향족 탄화수소의 stress에 의해서도 유도된다는 것이 보고되어 있다. 이와 같이 방향족 탄화수소 화합물에 의하여 세포가 손상을 받으면 세포내의 단백질이 세포외로 수송되는 것이 차단되고, 세포막 단백질이 변성되는데, 이러한 세포내의 변성된 단백질들이 stress-shock 단백질 합성의 유도체로 작용하여 stress-shock 단백질이 생성되고, 이 stress-shock 단백질들이 다시 변성된 단백질을 분해하여 제거하는 역할을 한다고 보고되었다(9, 29). 이와 같은 작용은 catechol의 높은 농도에서 분해작용뿐 아니라 세포의 생존율이 떨어지게 된 본 연구의 결과(Fig. 1)를 뒷받침해 주는 것이다.

세포의 형태 변화

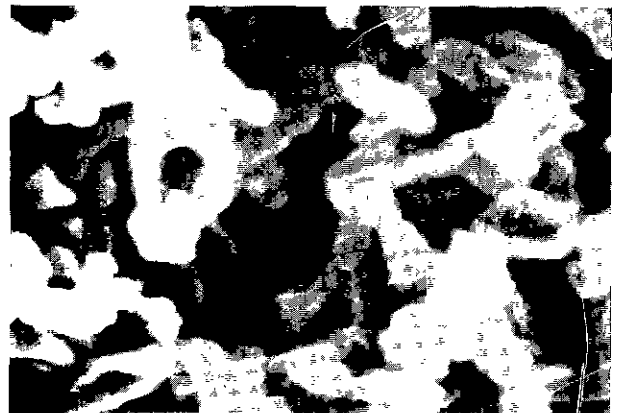
생존율이 급격히 감소했던 10 mM의 catechol를 1시간과 6시간 동안 처리했을 때 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 세포 형태를 주사 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. *Pseudomonas* sp. DJ-12의 정상세포는 전형적인 막대형으로 매끈한 세포표면을 모습을 나타내었다(Fig. 4A). 그러나 10 mM catechol에 1시간 동안 처리한 세포들은 간균의 모양이 일그러지고 세포막에 구멍이 관찰되었다(Fig. 4B) 또한 6시간 동안 처리한 세포들은 그 형태의 변화가 더욱 심각하여 간균의 형태는 거의 관찰할 수 없이 불규칙한 주형으로 변화하였다(Fig. 4C). Gage와 Neidhardt(9)은 2,4-dinitrophenol로 처리한 세포에서 세포막 단백질의 구조와 기능이 저해된다고 보고한 바 있다. Liu와 Fechter(18)는 toluene 혹은 benzene으로 처리한 cochlear 세포에서 형태의 변화뿐 아니라 세포내



(a)



(b)



(c)

Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Pseudomonas* sp. DJ-12 treated with catechol at 10 mM concentration. A. untreated cells; B, cells treated for 1 hr; C, cells treated for 6 hrs Bars represent 3 μm.

칼슘 평형이 파괴 되었다고 보고하였다. 본 연구에서 관찰된 catechol에 의한 세포벽의 파괴 현상은 방향족 탄화수소가 세포막과 함께 세포벽을 파괴한다는 Sikkema 등(27)의 보고와 일치하는 것이다.

지방산의 조성

Pseudomonas sp. DJ-12를 10 mM의 catechol로 2시간 동

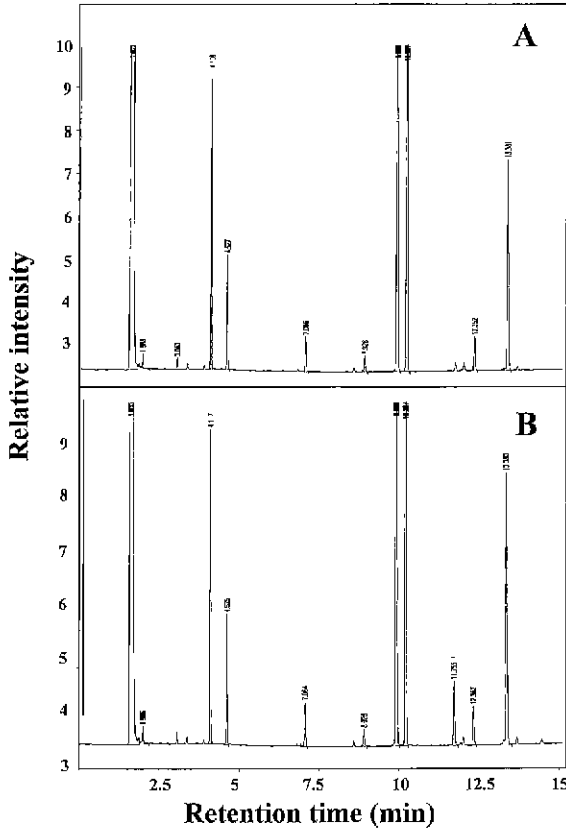


Fig. 4. Gas chromatographs of the fatty acids isolated from *Pseudomonas* sp. DJ-12. (A), untreated control; (B), DJ-12 cells treated with 10 mM catechol for 2 hrs.

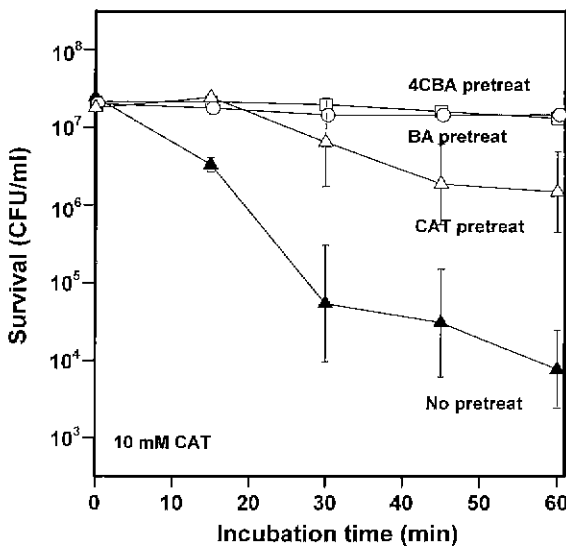


Fig. 5. Survival resistance to 10 mM catechol in the *Pseudomonas* sp. DJ-12 pretreated with catechol, benzoate, or 4-chlorobenzoate. The cells which were pretreated with 1 mM 4-chlorobenzoate (4CBA) for 20 min, 1 mM benzoate (BA) for 10 min, or 1 mM catechol (CAT) for 10 min were shift to 10 mM catechol.

안 처리한 세포에서 지방산의 조성을 gas chromatography로 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. 지방산 조성은 전반적으로 큰

차이가 발견되지 않았지만 retention time이 11.76분에서 검출되는 cyclo fatty acid는 catechol 처리 후 2.89% 증가되었고 9.94분의 cis fatty acid는 3%이상 감소하였다. 또 10.24분의 포화 지방산은 1.67% 증가하였으나 전체적인 양상에는 큰 변화가 없었다. Rosas 등(25)은 준치사 농도인 8.6 μM의 dichlorodiphenyltrichloroethane(DDT)를 *E. coli*에 처리했을 때 포화 지방산이 증가됨으로서 생존 저항성이 높아졌다고 보고하였으나, 본 연구에서는 그 연관성을 확인할 수 없었다.

전처리에 의한 생존율의 내성 증가

1 mM의 catechol이나 benzoate 그리고 4CBA로 전처리한 후, 10 mM catechol에 노출시켰을 때 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 생존내성을 실험한 결과는 Fig. 6과 같다. Stress-shock 단백질이 생성되는 1 mM의 4CBA로 20분간 또는 1 mM의 benzoate 및 catechol로 10분간 전처리한 세균은 전처리하지 않은 세균보다 10 mM의 catechol에 60분 동안 노출시켰을 때 생존 세균수가 약 10²~10³ cells/ml 정도 높게 나타나는 내성을 띠고 있었다.

Stress-shock 단백질의 생성으로 내성이 증가되는 현상에 대하여 Flattery-O'Brien 등(7)은 0.2 mM의 menadione로 *Saccharomyces cerevisiae*에 짧은 시간동안 전처리한 후 4 mM에 노출시켰을 때 생존율이 높아졌다고 보고하였고, O'Sullivan 등(23)과 Foster 등(8)은 acid stress에 적응한 세포는 H₂O₂나 열충격 등의 환경 stress에 tolerance가 유도된다고 보고하였다. 그러므로 본 연구에서 catechol뿐 아니라 benzoate나 4CBA로 전처리한 *Pseudomonas* sp. DJ-12 세포에서 stress-shock 단백질이 유도 합성되어 10 mM의 catechol 농도에서도 생존할 수 있는 내성이 유발된 것은 상이한 방향족 탄화수소에 의하여 발현된 내성이 상호적으로 작용한다는 것을 의미하는 것이다.

사 사

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비(98-015-D00215)에 의하여 지원되었습니다. 지방산 분석을 도와주신 생명공학연구소의 배경숙 박사께 감사드립니다.

참고문헌

- Adamowicz, M., P.M. Kelley, and K.W. Nickerson. 1991. Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 229-233.
- Blasco, R., M. Mallavarapu, and R.M. Wittich. 1997 Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 427-434.
- Blom, A., W. Harder, and A. Matin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 351-334.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelstein. 1996. Protein methods, 3rd ed., Wiley-Liss, New York.
- Cruden, D.L., J.H. Wolfram, R.D. Rogers, and D.T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which

- grows with *p*-xylene in a two-phase(organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2723-2729.
6. **Faber, F., T. Egli, and W. Harder.** 1993. Transient repression of the synthesis of *OmpF* and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 189-196.
 7. **Flattery-O'Brien, J., L.P. Collinson, and I.W. Dawes.** 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 501-507.
 8. **Foster, F.W.** 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**, 1981-1987.
 9. **Gage, D.J. and F.C. Neidhardt.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4-dinitrophenol. *J. Bacteriol.* **175**, 7105-7108.
 10. **Gomes, S.L., J.W. Gober, and L. Shapiro.** 1990. Expression of the *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.* **172**, 3051-3059.
 11. **Jeon, T.J. and K.J. Lee.** 1998. Synthesis and requirement of *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and DnaK for survival under phenol stress conditions. *J. Microbiol.* **36**, 26-33.
 12. **Kim, C.K. and I.H. Ga.** 1992. Ethanol tolerance of *Campylobacter jejuni* by ethanol shock. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 377-382.
 13. **Kim, C.K., T.K. Sung, J.H. Nam, Y.C. Kim, and J.K. Lee.** 1994. Cloning and expression of *pcbCD* genes in *Escherichia coli* from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Microbiol.* **32**, 40-46.
 14. **Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yano.** 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-457.
 15. **Lambert, L.A., K. Abshire, D. Blankenhorn, and J.L. Slonszewski.** 1997. Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J. Bacteriol.* **179**, 7595-7599.
 16. **Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer, and F.U. Hatle.** 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-689.
 17. **LaRossa, R.A. and T.K. Van Dyk.** 1991. Physiological roles of the DnaK and GroE stress proteins: catalysts of protein folding or macromolecular sponges. *Mol. Microbiol.* **5**, 529-534.
 18. **Liu, Y. and L.D. Fechter.** 1997. Toluene disrupts outer hair cell morphometry and intracellular calcium homeostasis in cochlear cells of guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 270-277.
 19. **Lupi, C.G., T. Colangelo, and C.A. Mason.** 1995. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2442 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2862-2872.
 20. **Meyer, U., S. Palola, F. Franco, and R. Ludger.** 1995. Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 979-984.
 21. **Michel, G.P.R. and J. Starke.** 1986. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **165**, 1040-1042.
 22. **Ng, L.K., R. Sherburne, D.E. Taylor, and M.E. Stiles.** 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J. Bacteriol.* **164**, 338-343.
 23. **O'Sullivan, E. and S. Condon.** 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4210-4215.
 24. **Park, S.H., Y.J. Ko, and C.K. Kim.** 1998. Cellular responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to the stresses of several aromatic pollutants. *J. Microbiol.* **36**, 93-98.
 25. **Rosas, S.B., M. Del Carmen Secco, and N.E. Ghittoni.** 1980. Effects of pesticides on the fatty acid and phospholipid composition of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 231-234.
 26. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, 2nd ed.. Cold Spring Harbor, New York.
 27. **Sikkema, J., J.A.M. de Bont, and B. Poolman.** 1994. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Bacteriol.* **269**, 8022-8028.
 28. **Sikkema, J., J.A.M. de Bont, and B. Poolman.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**, 201-222.
 29. **Wild, J., E. Altman, T. Yura, and C.A. Gross.** 1992. DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Gene Develop.* **6**, 1165-1172.

(Received February 18, 1999/Accepted May 3, 1999)

ABSTRACT : Biochemical and Cytological Changes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 Cells in Response to Catechol Treatment

Yeon-Ja Ko, Jae-Yun Lim, Ki-Sung Lee¹, and Chi-Kyung Kim* (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, and ¹Department of Biology, Pajon University, Taejeon 302-735, Korea)

Aromatic hydrocarbons which are not easily degraded by microorganisms can be accumulated in the contaminated environment for a long time, producing toxic effects on wild lives and humans. However, the sublethal concentrations of the chemicals induce the synthesis of stress-shock proteins in the cells and increase the adaptability of the organisms to the environmental stresses. In this study, therefore, the cells of *Pseudomonas* sp. DJ-12 treated with catechol at various concentrations were investigated for their survival, biodegradability of catechol, production of stress-shock proteins, and cytological changes. The organisms were capable of degrading catechol at the range of 0.5 to 1.0 mM concentration within 6 hours incubation, but they were killed by $10^2\sim 10^3$ cell/ml at 3 mM or higher concentration without any catechol degradation. These cells treated with catechol began to produce DnaK and GroEL at 1 mM and 0.5 mM, respectively. *Pseudomonas* sp. DJ-12 treated with 10 mM catechol for 1 hour exhibited some punctuated pores on the cell wall and contortion of the rod shape. The cells treated with the sublethal concentration of catechol showed the increased tolerance for survival when exposed to the lethal concentration, and such tolerant effects were functioned crossly among benzoate, 4-chlorobenzoate, and catechol.