

## 폭약 2,4,6-Trinitrotoluene에 노출된 분해세균 *Stenotrophomonas* sp. OK-5의 세포반응

장효원 · 송승열 · 김승일<sup>1</sup> · 강형일<sup>2</sup> · 오계현\*

순천향대학교 생명과학부, <sup>1</sup>기초과학연구원 프로테오믹스팀, <sup>2</sup>순천대학교 환경교육과

환경오염원으로서 폭약 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)에 대한 TNT 분해세균 *Stenotrophomonas* sp. OK-5의 세포반응에 대하여 조사하였다. 아치사 조건의 TNT 농도와 노출시간에 따른 균주 OK-5의 생존율을 분석한 결과, 이 세균의 생존율은 스트레스 충격 단백질의 생성과 비례하였다. 총세포 지방산 조성분석에서 균주 OK-5는 trypticase soy agar에서 자랄 때보다 TNT 배지에서 자랄 때 여러 가지 종류의 지방산이 생성되거나 사라지는 것이 밝혀졌다. 주사전자현미경하에서 TNT에 노출된 세포는 주글주글하고 불규칙적인 간상형으로 나타났다. Anti-DnaK와 anti-GroEL을 이용하여 SDS-PAGE와 Western blot을 통한 분석으로 균주 OK-5는 70 kDa DnaK와 60 kDa GroEL을 포함하는 몇가지 스트레스 충격단백질을 생성하는 것으로 밝혀졌다. TNT에 노출된 OK-5 배양에서 수용성 단백질 분획에 대하여 2-D PAGE를 실시하였으며, pH 3에서 pH 10의 범위에서 약 300여개 spot들이 silver로 염색된 gel상에서 관찰되었다. 이들 가운데 TNT의 반응으로 현저하게 유도되고 발현된 10 개의 spot들을 확인하였으며, 2개의 단백질, spot #1과 spot #10에 대한 내부아미노산 서열을 ESI-Q TOF로 분석한 결과, *Xylella fastidiosa*의 DnaK protein XF2340와 *Mesorhizobium loti*의 스트레스 유도단백질로 각각 밝혀졌다.

**Key words** □ morphological change, *Stenotrophomonas* sp. OK-5, stress-shock proteins, TNT stress

자연에서 생물체들은 끊임없이 변화하는 주변 환경에서 그들의 생명을 유지해 나간다. 그러한 가운데 좋은 환경 조건에서는 생물체의 생명 조절기작은 잘 유지되지만, 부적절한 환경하에서 이러한 다양한 환경요인들은 생물체에게 스트레스로 작용하여, 그 결과 생물체 내에서는 스트레스에 대한 생존 반응기작으로 독특한 유전자 집단인 스트레스 충격단백질을 생성하는 것으로 보고되었다(1,11). 이렇게 스트레스로 작용하는 요인으로는 온도(13,24), pH (8), 삼투압(1) 등과 같은 물리적 요인, 바이러스와 같은 감염성 생물체에 의한 생물적 요인(24), 그리고 다양한 화학물질이나 중금속에 의한 화학적 요인들이 알려져 있다. 최근들어 미생물에서 산업활동에 널리 사용되고 있는 benzene (2), phenol (7,15), 2,4-dinitrophenol (6), 4-chlorobenzoate와 biphenyl (19), 폐녹시계 제초제인 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid와 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (4) 등을 포함하는 난분해성 유기화합물에 의한 스트레스 단백질의 유도 및 생성과 관련한 연구가 보고되고 있다.

2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)은 질소방향족 화합물로서 군사적 목적뿐만 아니라 건설현장이나 다른 산업적 목적으로도 널리 사용되는 폭발성의 화학물질이다. 그러나 이들 화합물들은 구조적으로 분해가 어려워 자연 환경에 노출시 토양에 잔류하거나 지표수와 지하수를 포함하는 수계를 오염시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(9,21). 특히 군사 시설과 관련하여 TNT는 심각한 환

경오염원으로서 그 독성과 환경에 미치는 문제점들이 최근 일부 선진국에서 보고되었으며, 자연생태계에 축적되어 생물체에 대하여 독성으로 작용하거나(23), 내분비 교란물질로서 작용하는 것으로 알려져 왔다(5,10).

본 연구에서는 TNT에 노출된 지역의 토양에서 분리된 TNT 분해세균인 OK-5를 이용하여, TNT가 환경스트레스로 작용하였을 때 TNT 노출농도가 증가함에 따른 세균의 세포학적 변화상을 조사하였다. TNT 농도가 증가함에 따라 생성되는 스트레스 유도단백질을 SDS-PAGE, Western blot, 그리고 2-D PAGE를 통하여 분석하였으며, ESI-Q TOF mass spectrometry에 의한 MS/MS 분석을 통하여 스트레스 충격유도단백질을 확인하였다. TNT의 노출에 따른 OK-5에서 세포막의 총 지방산의 변화를 조사하였으며, 치사농도의 TNT에 노출된 OK-5의 형태학적 변화를 주사전자현미경을 이용하여 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 분해세균의 분리 및 동정

TNT에 노출된 지역에서 채취한 토양표본으로부터 TNT의 분해능이 탁월한 세균이 농화배양과 순수배양 기법을 통하여 분리되었다. 이 분리세균은 현미경을 통한 형태학적 특성조사를 실시하였으며, BIOLOG Analysis System에 의한 다양한 기질 이용여부와 Hewlett Packard 6890 series II gas chromatograph를 이용하여 Microbial Identification System에 의한 지방산 성분 분석을 통하여 동정하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel. 041-530-1353, Fax: 041-530-1350  
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

### TNT에 대한 분리세균의 생존율 측정

LB 액체배지(1% tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract)에서 자란 분리세균이 대수생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 O.D. 값이 0.8일 때, 원심분리용 튜브에 넣고, 2000×g에서 10 분간 원심 분리하였다. 얻어진 균체를 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3 회 세척하여 준비된 0.1, 0.3, 0.5 mM의 TNT를 포함하는 액체배지에 동일한 양의 세척한 분리세균을 각각 접종하였다. 2 시간 간격으로 LB 고체배지에서 100  $\mu$ l 씩 평판도말한 후, 30°C에서 배양하여 형성되는 집락을 계수하여, TNT의 농도와 노출시간에 따른 세균의 생존율을 각각 분석하였다.

### TNT의 충격에 의한 분리세균의 지방산 조성변화 분석

TNT에 의한 분리세균의 지방산 조성 분석을 위하여 TSA (trypticase soy agar, Difco, Detroit, USA) 배지와 TNT (0.5 mM)에 24 시간동안 노출시킨 후 얻어진 균체에 NaOH-methanol을 첨가하여 반응시켰다. 균체는 가수분해되어 세포막 또는 세포벽의 지질로부터 지방산이 분리되었다. 분리한 지방산이 담긴 튜브에 HCl-methanol을 첨가하여 80°C에서 반응시켜 냉각시키고 *n*-hexane을 가하여 fatty acid methyl esters를 추출하여 분석에 사용하였다. 이때 튜브에 산성화된 하층용액은 버리고 유기성 추출물만을 sample vial에 옮겨 flame ionization detection (GC-FID)과 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)가 부착된 GC로 지방산을 분석한 후, MIDI의 표준 데이터베이스를 이용하여 확인하였다.

### 주사전자현미경을 이용한 세포형태 관찰

OK-5를 대수성장기까지 성장시킨 후, 균체를 회수하여 100 mM의 phosphate buffer (pH 7.0)로 2 회 세척하였다. 이 균체를 TNT가 0.5 mM에 포함된 무기영양배지에  $10^6$ - $10^7$  cells/ml이 되도록 현탁하여 30°C, 150 rpm에서 1 시간동안 진탕배양하였다. 이 스트레스 충격실험을 마친 후, pore size가 0.2  $\mu$ m인 membrane filter로 여과된 균체를 1.5% agarose gel로 옮겼다. 균체가 옮겨진 gel을 0.5×0.5 cm의 크기로 자른 후, Ng 등(17)의 방법에 따라, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)로 녹여 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 4 시간 동안 고정하고, 동일 buffer (pH 7.2)로 15 분씩 3 회 세척한 후, 30%에서 100% ethanol (30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%)로 각각 15 분간씩 탈수 시켰다. 계속하여 100% ethanol과 isoamyl acetate를 1:1로 혼합한 시약에 15 분간 처리하였으며, isoamyl acetate로 4 시간동안 처리한 후, 공기중에서 건조시켰다. Sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co., Japan)를 사용하여 두께가 300 Å이 되도록 gold coating하여 주사전자현미경(S-2500C, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### Western blot

균주 OK-5는 TNT에 의한 스트레스 충격처리 후, SSPs의 분석을 위하여 Sambrook 등의 방법(22)에 따라 Western blot을 실시하였다. Bollag 등의 방법(3)으로 SDS-PAGE로 단백질을 분자

량 크기에 의해 분리한 후, gel에 있는 단백질을 semi-dry electroblotter (Owl separation systems, Portsmouth, USA)를 사용하여 Hybond™-PVDF membrane (Amersham International plc., Buckinghamshire, England)으로 옮겼으며(40 mA, 60 min), 단백질이 옮겨진 membrane을 phosphate buffer saline (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)로 15 분씩 2 회 세척한 후, 1% bovine serum albumin으로 50 분 동안 처리하고 다시 PBS buffer로 15 분씩 2 회 세척하였다. 1 차 항체는 각각 anti-DnaK monoclonal antibody와 anti-GroEL monoclonal antibody (Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada)로 PBS-Tween 20에 희석(1:10,000)하여 1 시간 30 분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.08% Tween 20이 포함된 PBS buffer로 12 분 2회, 15 분 1 회 세척하였다. 2 차 항체는 anti-mouse IgG HRP conjugate (Promega, Madison, USA)역시 PBS-0.08% Tween 20에 희석하여 1 시간 30 분동안 반응시킨 후, PBS-0.08%로 12 분 2 회, 15 분 1 회 세척 후 Western 용 ECL kit (Amersham International plc.)를 사용하여 X-ray film (AGFA, Belgium)으로 현상하여 분석하였다.

### 2-D PAGE

2-D PAGE를 위하여 200  $\mu$ g의 단백질을 50  $\mu$ l의 buffer I (0.3% SDS, Tris-HCl 50 mM, 0.2 M DTT)에 넣고 95°C에서 5 분간 가열하였다. 얼음에 5분간 담가둔 후, 5  $\mu$ l의 buffer II (50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 unit DNase, 3.75 unit RNase, 50 mM Tris-HCl)을 넣고 10 분간 얼음에 유지하였다(18). Isoelectrofocusing (IEF)을 수행하기 위하여 buffer III (9.9 M urea, 4% NP-40, carrier ampholyte (pH 3-10), 100 mM DTT)에 시료를 녹였다. IEF와 SDS-PAGE는 PROTEAN II xi electrophoresis kit (Bio-Rad, Hercules, USA)를 사용하였으며, silver staining은 Morrisey 방법(16)으로 수행하였다. 2-D gel 상에서 분리된 단백질 spots는 semi-dry blotting apparatus (Bio-Rad Trans-Blot SD)를 이용하여 2 mA/cm<sup>2</sup>에서 50 분 동안 처리하여 PDVF membrane으로 옮긴 후, Coomassie brilliant blue R250으로 염색하여 50% 메탄올로 세척하였다. 염색된 2-D gels는 Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)로 분석하였다.

### In-gel digestion

2-D PAGE를 통해서 유도된 스트레스 충격단백질의 gel 부분을 잘라 trypsin으로 in-gel digestion을 실시하였다. 10 mM ammonium bicarbonate와 50% acetonitrile로 세척한 후 gel을 공기중에서 건조시켰다. 건조된 gel은 50 ml ammonium bicarbonate와 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 12.5 ng/ $\mu$ l trypsin으로 37°C에서 12-16 시간 동안 반응시켰다. 그후 반응시킨 gel을 50 mM ammonium bicarbonate와 100% acetonitrile에 의한 2 회에 걸친 추출과정을 통하여 peptide fragments를 확보하였다.

### ESI-Q TOF를 이용한 내부아미노산 서열분석

Nano-ESI (Electrospray Ionization) source와 코팅된 유리 모세관

(Protana, Denmark)을 장착한 Q-TOF (Quadrupole-Time of Flight) 를 이용하여 단백질의 내부아미노산 서열을 분석하였다. Zip-Tip (Millipore Co., Bedford, USA)을 이용하여 염을 제거한 5  $\mu$ l의 시료를 glass capillary nanospray needle에 주입하여 충돌가스로서 10 psi의 압력으로 아르곤과 함께 electrospray (1,500 eV)로 분사하였다. 얻어진 fragment ions의 MS/MS 자료는 MS-Tag program (<http://prospector.ucsf.edu>)을 이용하여 분석하였다.

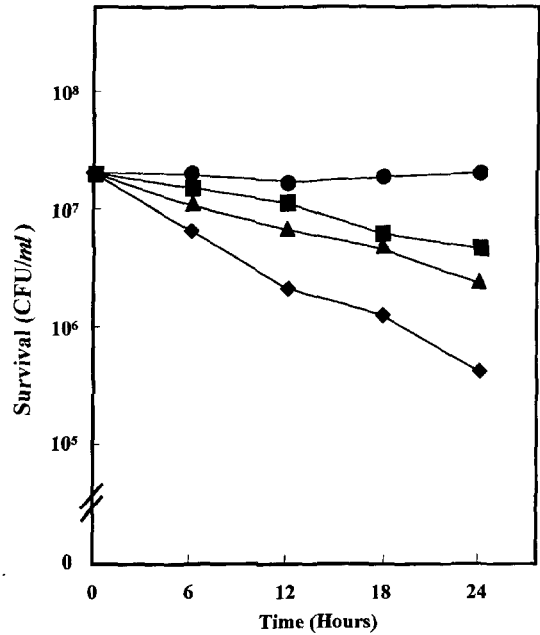
**결과 및 고찰**

**TNT 분해세균의 동정 및 특성**

TNT 오염지역에서 분리한 세균 OK-5는 그람음성의 간균이었으며, TNT에 대한 강력한 분해능을 나타내었다. OK-5는 BIOLOG Analysis System에 의한 다양한 기질이용 여부와 Hewlett Packard 6890 series II gas chromatography를 이용한 Microbial Identification System으로 지방산 성분 분석을 한 결과, *Stenotrophomonas* sp.로 동정되었으며, *Stenotrophomonas* sp. OK-5로 명명되었다. *Stenotrophomonas* sp. OK-5의 생리학적 특성과 반응조건에서 TNT 생분해는 이미 발표된 바 있다(12).

**TNT에 의한 분해세균의 생존율**

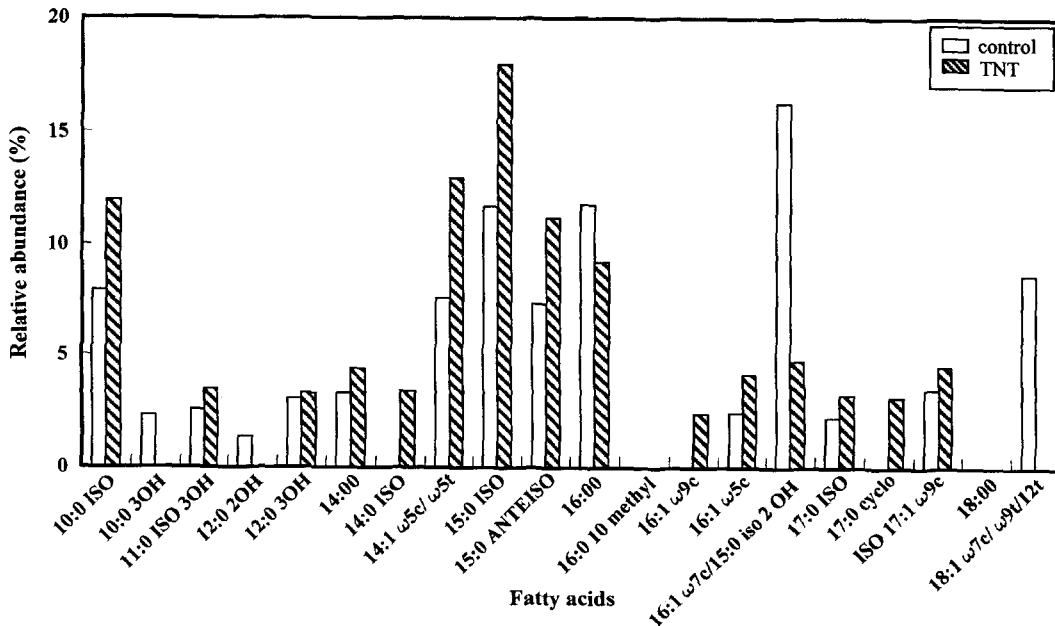
TNT의 노출 농도에 따른 균주 OK-5 세포의 생존율은 TNT에 노출 후 초기 2 시간 동안의 세포의 생존율은 빠른 속도로 감소하였으나 4 시간이 경과하면서 생존율은 완만한 감소율을 보여 주었다(Fig. 1). TNT 농도가 높아짐에 따라 같은 시간대에서의 OK-5 세포의 생존율은 더 감소되는 경향을 나타내었다. 낮은 농도의 TNT (0.1~0.3 mM)에 노출된 세포의 생존율은 처리하지 않은 세포의 생존율과 커다란 차이를 보이지 않았다.



**Fig. 1.** Survival of *Stenotrophomonas* sp. OK-5 after TNT shock. OK-5 cells were maintained at TNT concentrations of 0 mM (●), 0.1 mM (■), 0.3 mM (▲), and 0.5 mM (◆) TNT, respectively. At intervals, the numbers of colonies (CFU/ml) were measured.

**TNT 노출에 의한 분해세균의 총지방산 조성변화**

TNT에 노출됨으로써 나타나는 분해세균 OK-5에서 세포막에서 총 지방산 조성의 변화를 분석하였다. TNT에 노출된 세균 OK-5에서 총지방산 조성은 노출되지 않은 세포와 비교하여, 10:0 ISO, 14:1  $\omega$ 5c/ $\omega$ 5t, 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO, 16:1  $\omega$ 5C



**Fig. 2.** Fatty acids profiles of *Stenotrophomonas* sp. OK-5 analyzed by GC-FID and GC-MS when grown on TSA or TNT. Cells grown on TNT were used for extraction of total cellular fatty acids, and the lipids were identified based on the retention of authentic references.

는 증가하였으나, 16:0, 16:1  $\omega 7c/15:0$  iso 2OH는 감소하였다. 또한 10:0 3OH, 12:0 2OH, 18:1  $\omega 7c/\omega 9t/12t$ 는 사라지는 것으로 나타났다(Fig. 2). 폐녹시계 제초제인 2,4-D와 2,4,5-T에 노출시킨 *Burkholderia* sp. YK-2에서 총지방산 조성의 변화를 확인한 결과, 지질 14:0, 14:0 3OH/16:1 ISO1, 17:cyclo, 19:0 cyclo  $\omega 8c$  등은 증가한 반면, 노출되지 않은 YK-2 세포에서 지질 16:1  $\omega 5C$ , 17:1  $\omega 7C$ , 16:1 2OH, 16:0 2OH, 그리고 18:1  $\omega 5C$ 가 검출되었으나 이들 화합물에 노출된 후 사라진다는 것이 보고되었다(4). Pinkart 등(20)은 *Pseudomonas putida* 균주가 *o*-xylene에 노출된 후 총지방산 분석을 통하여 *trans*-unsaturated fatty acids가 생성됨을 확인하였다.

**TNT 노출에 의한 분해세균의 형태변화**

생존율이 급격히 감소하는 농도의 TNT에 12 시간동안 노출시킨 OK-5의 외부형태 변화를 정상세포와 비교하여 주사 전자현미경으로 관찰하였다. OK-5의 정상적인 모습은 짧고 둥근 간균의 형태와 매끈한 세포표면을 나타내었다(Fig. 3A). 그러나 0.5 mM의 TNT에 12 시간동안 처리한 세포들은 간균의 모양이 약간 짧고 둥근 형태로 바뀌고, 심하게 쭈그러지는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). Cho 등(4)은 폐녹시계 제초제인 2,4-D와 2,4,5-T에 노출된 토양세균인 *Burkholderia cepacia* YK-2에서 세포의 형태변화와 구멍이 뚫어져 죽게되는 현상을 주사전자현미경을 통하여 관찰하였다. Park 등(19)은 biphenyl, 4-chlorobiphenyl, 4-chlorobenzoate

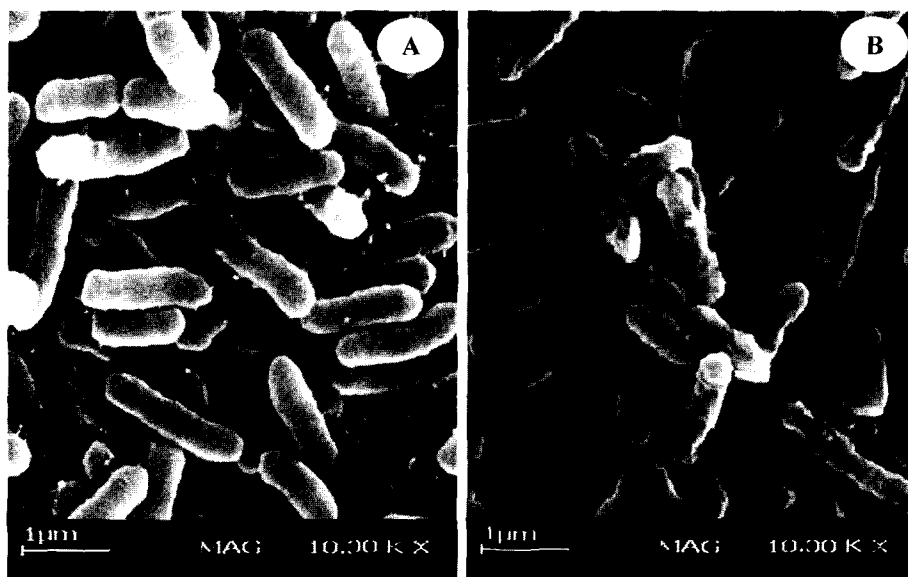


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Stenotrophomonas* sp. OK-5 treated with TNT. A, untreated cells; B, cells treated with 0.5 mM TNT for 12 hrs.

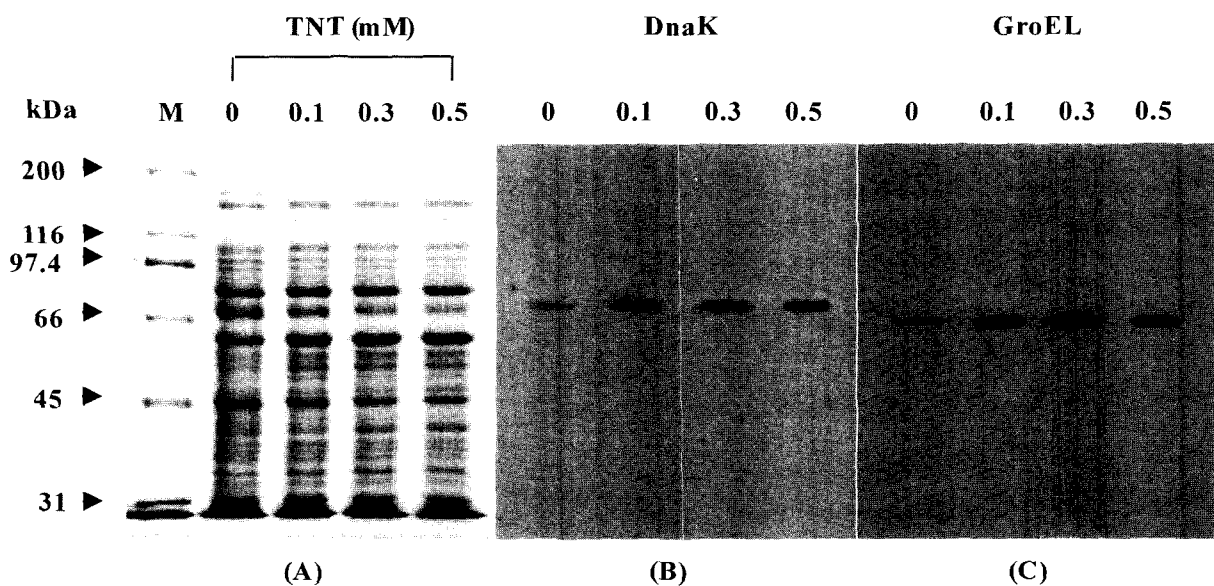


Fig. 4. Induction of stress shock proteins in *Stenotrophomonas* sp. OK-5 treated with different TNT concentrations for 4 hrs. The SSPs were analyzed by SDS-PAGE (A), and Western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies, respectively.

등의 방향족 화합물에 노출된 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서도 OK-5에서와 같은 유사한 현상이 관찰되었다고 보고하였다. 이러한 결과를 토대로 하여 볼 때, 이들 화합물을 기질로 이용하는 세균이라 할지라도 일정 농도 이상에 노출되면 독성물질로 작용하여 세포에 치명적인 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

**TNT 노출에 의한 스트레스 충격단백질의 생성**

OK-5를 TNT 노출에 의한 세포내에서 스트레스 충격단백질의 생성을 관찰을 확인하기 위하여, 다양한 농도의 TNT에 2 시간에서 16 시간 노출시킨 후 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 파쇄한 후, 그 상등액을 취해 Lowry 방법(14)에 의해 단백질을 정량하여 60 µg의 표준품을 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 여러 가지 종류의 단백질이 생성되고 소멸되는 것이 관찰되었다(Fig. 4). SDS-PAGE를 시행한 후, gel에 존재하는 단백질을 Hybond™-PVDF membrane으로 blotting 시켜, 옮겨진 단백질 가운데 anti-DnaK monoclonal antibody와 anti-GroEL monoclonal antibody에 특이적으로 반응하는 SSPs의 반응 양상을 살펴보는 Western blot을 실시하였다. Table 1은 OK-5에 다양한 농도의 TNT를 2 시간 간격으로 노출시켰을 때, 유도되는 DnaK와 GroEL의 패턴을 보여주고 있다. DnaK는 0.3 mM의 TNT에 4 시간 노출시켰을 때부터 발현되기 시작하여 12 시간 노출시켰을 때 발현되지 않았으며, GroEL은 0.3 mM의 TNT에 4 시간 노출시켰을 때부터 발현되어 12 시간이 지나면서 그 유도가 크게 감소되었다. 분리세균 OK-5는 TNT에 의한 스트레스 충격실험을 통하여 Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 70 kDa DnaK와 60 kDa GroEL의 스트레스 충격단백질이 생성되는 것이 확인되었다.

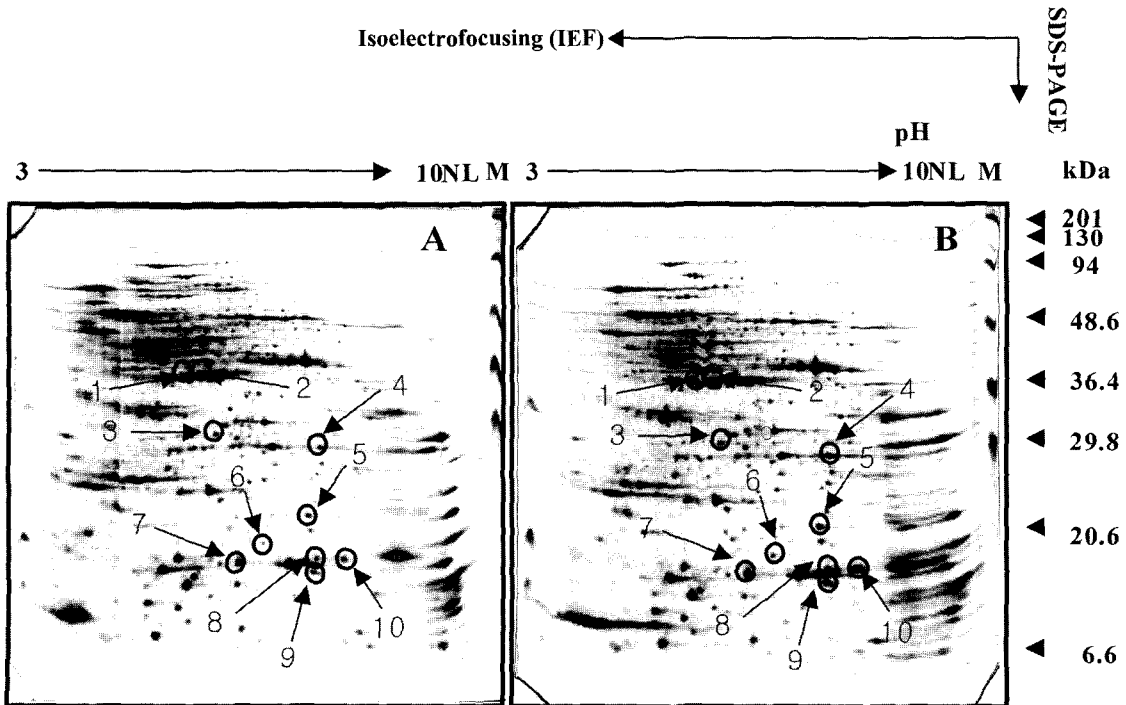
**Table 1.** Production of stress shock proteins in *Stenotrophomonas* sp. OK-5 treated with TNT at different concentrations

Treatment period (hrs)	Stress shock proteins	Production of stress shock proteins by TNT (mM)		
		0.1	0.3	0.5
2	DnaK	-	-	-
	GroEL	-	-	-
4	DnaK	-	+	+
	GroEL	+	+	+
6	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
8	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
10	DnaK	+	+	+
	GroEL	+	+	+
12	DnaK	-	-	-
	GroEL	-	+/-	+

+: Production, -: No production

**2-D PAGE 분석과 내부 아미노산 서열 분석**

균주 OK-5에 TNT를 노출시킨 후 얻어진 단백질 분획에 대하여 2-D PAGE를 수행하여 OK-5가 TNT에 노출되기 전과 후의 스트레스 충격단백질이 발현되는 양상을 비교하였다(Fig. 5). 2-D PAGE의 gel상에서 약 300 개의 spot들이 관찰되었으며, TNT에 노출된 세포와 노출되지 않은 세포를 전제한 결과, 10 개의 스



**Fig. 5.** 2-D PAGE analysis of stress-induced proteins of *Stenotrophomonas* sp. OK-5. control cells (A), and cells treated with 0.5 mM TNT for 4 hrs (B). Circles indicated TNT-induced proteins.

**Table 2.** Identification of TNT-induced proteins by *Stenotrophomonas* sp. OK-5 based on internal amino acid sequencing

Spot No.	M.W. (kDa)	Amino acid sequence	Homologous proteins	Identification (%)	Accession No.
Spot #1	66	QGEVLLVDLDR	hypothetical protein		AA1000013
		IINEPTAAALAYGLDK	DnaK XF2340	100	G82570
		IALNDAGL	DnaK XF2340	100	G82570
Spot #10	11	VALALL	stress-induced protein	100	NC002678

트레스 충격단백질이 유도되는 것이 관찰되었다. 이 가운데 spot #1와 spot #10 단백질로부터 시료를 채취하여, ESI-Q TOF mass spectrometry에 의한 MS/MS 분석을 통하여 internal amino acid sequencing을 실시하였다. 분석된 내부 아미노산 서열을 MS-Tags 데이터베이스에서 검색한 결과, spot #1는 *Xylella fastidiosa*의 DnaK protein XF2340와 spot #10은 *Mesorhizobium lotii*의 스트레스 유도단백질로 밝혀졌다.

본 연구를 통하여 TNT 오염지역에서 분리된 TNT 분해세균은 환경오염원으로서 TNT에 노출되었을 경우에 저농도에서는 기질로 사용하여 성장하지만, 농도가 점차 증가함에 따라 생존율과 세포의 총지방산 조성에 변화를 가져오는 것으로 밝혀졌다. 아치사 조건의 TNT 농도와 노출기간에 대하여 OK-5 세균은 생존하기 위하여 여러 가지 스트레스 충격단백질을 생성하였다. 또한 고농도의 TNT에 노출시에는 세균의 생존에 치명적인 영향을 미치는 것이 관찰되었다. 2-D PAGE를 통하여 TNT에 노출되기 전과 후의 전개양상을 비교한 결과는 유도된 단백질의 규명에 이용되었으며, 내부 아미노산 서열을 확인하여 DnaK와 관련된 스트레스 충격 단백질임이 입증되었다. 향후 TNT에 의해 OK-5 세포에서 유도되는 스트레스 충격단백질의 명확한 실체와 그 역할에 대한 규명은 전체 길이의 유전자를 클로닝하고 분석함으로써 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단 2001년도 지방대학육성지원(KRF-2001-002-D00226)에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

- Baker, C. and S.F. Park. 2001. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1594-1600.
- Blom, A., W. Harder, and A. Matin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 331-334.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Protein methods, 2nd., Wiley-Liss, New York.
- Cho, Y.S., H.Y. Kahng, C.K. Kim, J.J. Kukor, and K.H. Oh. 2002. Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, *Burkholderia cepacia* YK-2, to the phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *Curr. Microbiol.* 45, 415-422.
- Comfort, S.D., P.J. Shea, L.S. Hundal, Z. Li, B.L. Woodbury, J.L. Martin, and W.L. Powers. 1995. TNT transport and fate in contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 24, 1174-1182.
- 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.
- 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.
- Jordan, K.N., L. Oxford, and C. O'Bryne. 1999. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7 correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3048-3055.
- Knackmuss, H.J. 1996. Basic knowledge and perspectives of bioelementation of xenobiotic compounds. *J. Biotechnol.* 51, 287-317.
- Krumholz, L.R., J. Li, W.W. Clarkson, G.G. Wilber, and J.M. Sulita. 1997. Transformation of TNT and related aminotoluenes in ground water aquifer slurries under different electron-accepting conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 161-169.
- LaRoss, R.A. and T.K. van Dyk. 1991. Physiological roles of the DnaK and GroEL stress proteins: catalysts of protein folding of macromolecular sponges. *Mol. Microbiol.* 5, 529-534.
- Lee, M.S., H.W. Chang, H.Y. Kahng, J.S. So, and K.H. Oh. 2002. Biological removal of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *Stenotrophomonas* sp. OK-5 in bench-scale bioreactors. *Biotechnol. Bio-process Eng.* 7, 105-111.
- Lelivelt, M.J. and T.H. Kawula. 1995. Hsc66, an Hsp70 homolog in *Escherichia coli*, is induced by cold shock but not by heat shock. *J. Bacteriol.* 177, 4900-4907.
- Lowry, O.H., N.J. Roseborough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Meyer, U., S. Palola, F. Fransco, 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.
- Morrissey, J.H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307-310.
- Ng, L.K., R. Sherburne, D.E. Taylor, and M.E. Stiles. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studies by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 164, 338-343.
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Park, S.H., K.H. Oh, and C.K. Kim. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr. Microbiol.* 43, 176-181.
- Pinkart, H.C., J.W. Wolfram, R. Rogers, and D.C. White. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* 62, 1129-1132.
21. Reiger, P.G. and H.J. Knackmuss. 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. In: Spain, J.C. (Ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*, Plenum Press, New York, pp. 1-18.
  22. Sambrook, J.K., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, New York.
  23. Smock, L.A., D.L. Syoneburner, and J.R. Clark. 1976. The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and fathered willow. *Water Res.* 10, 537-543.
  24. Teixeira-Gomes, A.P., A. Cloeckert, and M.S. Zygmunt. 2000. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensi*. *Infect. Immun.* 68, 2954-2961.
  25. 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 Dev.* 6, 1165-1172.

(Received October 29, 2002/Accepted November 21, 2002)

**ABSTRACT: Cellular Responses of the TNT-degrading Bacterium, *Stenotrophomonas* sp. OK-5 to Explosive 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)**

**Hyo-Won Chang, Seung-Youl Song, Seung-Il Kim<sup>1</sup>, Hyung-Yeel Kahng<sup>2</sup>, and Kye-Heon Oh\***  
(Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea; <sup>1</sup>Proteome Analysis Team, KBSI, Daejeon 305-333, Korea; <sup>2</sup>Department of Environmental Education, Sunchon, Jeon-Nam 540-742, Korea)

The cellular responses of TNT-degrading bacterium, *Stenotrophomonas* sp. OK-5 to explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as an environmental contaminant were examined. Survival of the strain OK-5 with time in the presence of different concentrations of TNT under sublethal conditions was monitored, and viable counts paralleled the production of the stress shock proteins in this bacterium. Total cellular fatty acids analysis showed that strain OK-5 produced or disappeared several different kinds of lipids when grown on TNT media than when grown on TSA. Under scanning electron microscope, the cells treated with 0.5 mM TNT for 12 hrs showed irregular rod shapes with wrinkled surfaces. Analyses of SDS-PAGE and Western blot using anti-DnaK and anti-GroEL revealed that several stress shock proteins including 70 kDa DnaK and 60 kDa GroEL in strain OK-5 were newly synthesized at different TNT concentrations in exponentially growing cultures. 2-D PAGE of soluble protein fractions from the culture of OK-5 exposed to TNT demonstrated that approximately 300 spots were observed on the silver stained gel ranging from pH 3 to pH 10. Among them, 10 spots significantly induced and expressed in response to TNT were selected and analyzed. As the result of internal amino acid sequencing with ESI-Q TOF, two proteins, spot #1 and spot #10 were assigned the DnaK protein XF2340 of *Xylella fastidiosa* and stress-induced protein of *Mesorhizobium loti*, respectively.