

Micrococcus sp. BCNU 121균주의 toluene과 열에 대한 교차내성

주우홍* · 한수지¹ · 최용락² · 정영기³

창원대학교 생물학과, ¹피츠버그대학교 약학과, ²동아대학교 생명자연과학부, ³동의대학교 생명응용과학과

Received January 5, 2004 / Accepted January 15, 2004

Cross-Resistance to Toluene and Heat in *Micrococcus* sp. BCNU 121. Woo Hong Joo*, Su-Ji Han¹, Young-Lak Choi² and Yong Kee Jeong³. Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, ¹Department of Pharmacy, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, 15260 USA, ²Faculty of Natural Resource and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ³Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – Toluene tolerance and thermotolerance in Gram-positive organic solvent resistant bacterium *Micrococcus* sp. BCNU 121 has been studied. Exposure to a sub-lethal temperature or a sub-lethal concentration of toluene conferred protection to subsequent challenges with a killing temperature or a lethal concentration of toluene, respectively. Pretreatment of *Micrococcus* sp. BCNU 121 with sub-lethal concentrations of toluene induced adaptative protection against heat shock. Moreover, temperature-adaptative cells also showed cross-resistance to lethal doses of toluene. These data suggested a cross-regulation between toluene tolerance and heat shock response.

Key words – *Micrococcus* sp., cross-resistance, cross-protection, solvent-resistance

일반적인 스트레스 반응 중 원핵세균에서 가장 많이 연구된 것은 heat shock 반응이다[5,6]. 대부분의 생물은 적정 온도보다 높은 온도에 노출되면 정상 단백질의 합성은 억제되고 heat shock 단백질의 합성을 급격히 유도, 합성하여 손상된 기능단백질의 구조를 정상적인 구조로 회복시킨다[8,14]. 이러한 heat shock 단백질은 중금속, 에탄올, 산화적인 스트레스[7] 등의 다양한 스트레스 요인에 의해서도 유도되며, chemical pollutant에 의해서도 몇 가지 종류의 heat shock 단백질의 합성이 유도된다는 것이 보고되어 있다[2]. 미생물들은 생육에 적합한 환경이 아닌 경우 환경에 대한 적응이 필요하다. 미생물들은 부적합한 환경에 대해 저항할 수 있는 기작과 stress 조건들에 의해 일어나는 손상을 복구하는 기작을 진화과정을 통하여 획득하고 있다.

한편 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 유기용매 내성세균은 대부분이 그람 음성세균으로서 주로 *Pseudomonas*속 속하고 있으며[1,11], 유기용매 내성세균의 유기용매에 대한 내성기작으로는 대개 세포와 외부환경 사이의 1차적인 barrier로서 중요한 기능을 하는 세포막의 물리·화학적 특성(Physico-chemical)의 변화가 거론되고 있다[13,19,20]. 세포의 막 구조 및 막 성분의 생리적 변화는 세포내 미소환경의 변화와 밀접하게 연관되어져 있으므로 유기용매에 의한 이들의 변화는 필수적인 것으로 생각되어진다.

유기용매 내성세균의 유기용매에서의 내성기작의 해명은 유기용매 내성세균의 산업적인 이용에 앞서 선결되어야 할

과제이며, 동시에 유기용매 내성과 스트레스 반응과의 연관성의 해명도 필수적으로 요구되고 있다.

본 연구에서는 stress 반응과 유기용매 내성기작의 연관성을 규명하기 위하여 그람 양성세균인 *Micrococcus* sp. BCNU 121 균주에 있어서 유기용매와 heat shock stress에서의 치사 조건과 적응조건을 평판계수법으로 조사하였고, 유기용매와 heat stress를 상호 교차시켜 생존율을 비교하여 이들의 연관성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배지 및 시약

Toluene stress에 대한 내성 test, 균주의 보존과 세포계수는 Brain Heart Infusion broth (BHI ; Difco Lab., Detroit USA)배지를 사용하였다.

공시균주 및 배양조건

본 실험에서는 그람 양성세균으로 유기용매에 내성을 가지는 *Micrococcus* sp. BCNU 121 균주를 공시하였다. 균주를 BHI broth 배지에서 24-48 시간 배양하여 활성화시킨 후 종균으로 사용하였으며, 전배양액 1 ml를 신선한 BHI broth 배지에 접종 후 32℃, 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 회수된 전배양균주를 세정후 신선한 BHI broth 배지에 접종후 중간 증식기(OD_{660nm}=0.6)까지 배양하여, 다양한 농도의 용매와 온도 조건하에서 적응 처리한 후 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그리고 원심분리 회수된 균주를 세정후 각종 농도의 용매와 온도 조건에서 생존을 확인하여 준치사 농도, 온도 그리고 치사조건을 확인하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-279-7443, Fax : +82-55-279-7449

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

Stress tolerance

균주를 신선한 LB 배지에 접종후 중간 증식기 (OD_{660nm}=0.6)까지 배양하였다. 전배양액의 균주를 다양한 농도의 용매와 온도 조건하에서 적응 처리한 후 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 대조구(non-treated cell)와 처리구(treated cell)를 배지에 흡광도 660 nm에서 1.0이 되게 재현탁하였고, 각각의 배양액을 10 ml씩 test tube에 분주하여 toluene 준치사 농도 3%와 준치사 온도 60℃에서 처리한 후 0분, 30분에서 샘플을 취하여 0.9% sodium chloride에 연속 희석한 다음 BHI 환천 배지에 도말하였다. 이를 32℃에서 48시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하여 stress 내성 정도를 비교하였다.

생존율과 내성 assay

대조구와 처리구에서 각각 colony를 계수하여 생존율을 측정하였다. 생존율은 0분에서 colony forming unit (CFU)와 stress 처리 후 주어진 시간에서 CFU의 비율로 나타내었다. Toluene 준치사 농도와 준치사 온도에 대한 내성 효과를 tolerance factor로 표현하였으며, 대조구 세포의 퍼센트 생존율과 처리구 세포의 퍼센트 생존율에 대한 비율로 나타내었다. 모든 실험은 duplicate plating으로 3회 반복 실험하였다.

결과 및 고찰

Toluene에서 적응농도와 생존율

Micrococcus sp. BCNU 121 균주의 toluene에서의 적응농도를 알아보기 위하여 다양한 농도에서 1시간 처리한 결과

0.1% 이하 농도에서는 세포가 큰 손상을 받지 않았으며, 0.1~3% 이하의 농도에서도 세포가 수시간 생존하였다 (data 미기재). 또한 toluene에 대한 준치사 농도를 알아본 결과, 처리전 대조구의 세포수는 6.0~7.0×10⁷ CFU/ml이고, toluene 3% 농도에서 30분 동안 처리시 세포의 생존율은 0.3%임을 알 수 있었다(Fig. 1, A). Toluene의 각종 농도에 전처리한 후의 효과를 비교하기 위하여 각각의 농도(0, 0.05, 0.07, 0.1%)로 1시간 전처리하여 적응시킨 후 준치사 농도(3% toluene)에서 처리한 결과, 0.1% toluene 농도에서 적응 처리시 가장 뚜렷한 효과가 관찰되었다(Fig. 1, B). 이러한 준치사 농도에 있어서의 유기용매 내성의 향상 효과는 tolerance factor로 표현하였으며, 이는 대조구 세포의 퍼센트 생존율과 처리구 세포의 퍼센트 생존율에 대한 비율로 나타내었다. Toluene 적응농도(0.05, 0.07, 0.1%)에서 1시간 전처리시 대조구(toluene 0%)와 비교하여 전반적으로 5 배 이상의 내성이 증가함을 알 수 있었고, 0.1% 농도에서의 전처리시 약 12배 정도 내성이 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, B). 이상의 결과들에서 세포가 손상을 받지 않은 범위의 유기용매에서 적응된 세포가 적응되지 않은 세포에 비해 준치사 농도에서 내성을 가짐을 알 수 있었다.

Heat에서 적응온도와 생존율

Micrococcus sp. BCNU 121 균주의 생육온도를 알아보기 위하여 다양한 온도에서 30 분간 배양한 결과, 32~50℃까지 세포가 손상을 받지 않고 생육함이 관찰되었으며, 65℃ 이상에서는 수초내 세포가 모두 사멸하였다(data 미기재). 또한 준치사 온도를 알아본 결과, 처리전 대조구의 세포수를 1.0~

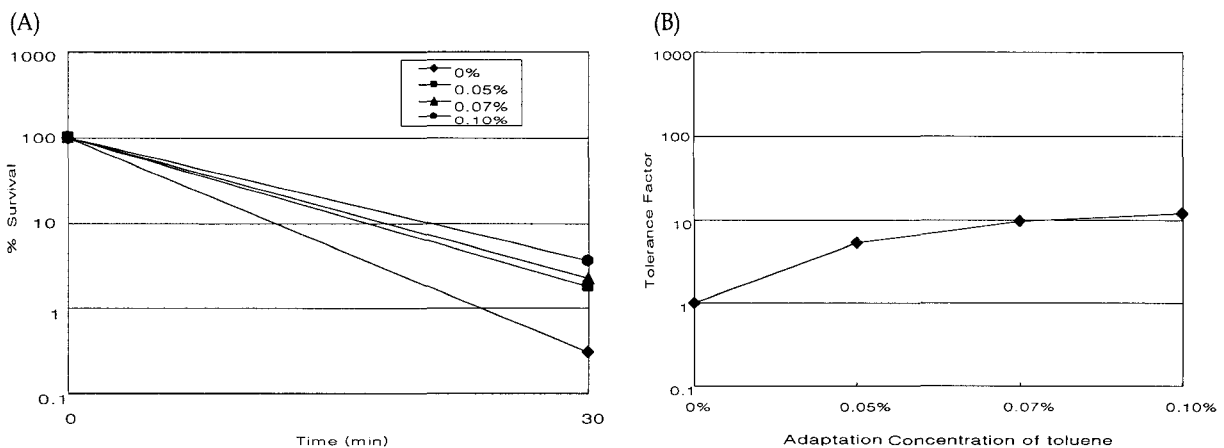


Fig. 1. Toluene tolerance of *Micrococcus* sp. BCNU 121 in the presence of 3% toluene. A) Prior to exposure to lethal challenge concentration of toluene (3%) cultures were either maintained in the absence of toluene (control, ◆) or pre-incubated in the presence of different concentrations of toluene (0.05%, ■; 0.07%, ▲; 0.1%, ●). Increased toluene resistance of *Micrococcus* sp. BCNU 121 was determined in the presence of 3% toluene for 30 min. B) The enhanced toluene resistance was expressed as toluene tolerance factor, i.e. the ratio of percent survival of bacterial cells grown in the presence of different concentrations of toluene (0.05%-0.1%) to percent survival of control cells grown in the absence of toluene ; in the absence of toluene, the toluene tolerance factor is equal to 1.

3.0×10^7 CFU/ml로 시작하여, 60°C 온도에서 30 분 동안 처리시 세포의 생존율은 0.02%로 나타났다(Fig. 2. A). 온도 적응시 효과를 확인하기 위하여 각각의 온도(32, 37, 42, 50°C)로 30분 전처리하여 적응시킨 후 준치사 온도(60°C)에서 처리한 결과, 다소 높은 온도로 적응 처리시 대조구와 비교하여 생존율이 높게 나타났으며, 50°C에서 적응 처리시 생존율이 급격히 증가함이 관찰되었다(Fig. 2, B). 이러한 준치사 온도에 대한 내성 효과를 thermotolerance factor로 표현하면 37~42°C에 전처리한 세포의 경우 tolerance factor 10 전후로 증가하기 시작하여 점진적인 내성을 보여주었고, 50°C에서 30 분 전처리한 세포에서는 tolerance factor가 약 400배 이상으로 내성이 급격히 증가함이 관찰되었다(Fig. 2, B).

적응된 cell에서 cross-tolerance와 cross-protection

일반적으로 스트레스에 적응된 세포는 적응되지 않은 세포보다 준치사 스트레스에 대해 높은 내성효과를 나타내었

다. 준치사 스트레스에 노출시켰을 때 최대 내성효과를 가지는 적응조건을 결정하였다. 본 실험조건에서 준치사 조건인 3% toluene, 온도 60°C에 가장 강하게 내성을 보이는 적응조건은 0.1% toluene, 50°C로 나타났다. 적응한 세포의 다른 스트레스에 대한 적응 또는 내성을 조사하기 위해, 상기의 치사 스트레스에 강한 내성을 가지는 조건(0.1% toluene, 50°C)에서 적응 후 다른 스트레스의 치사조건으로 세포를 처리하였다. 0~0.1%의 toluene에서 1시간 적응 처리 후, 준치사 온도인 60°C에서 30분 처리하였을 때 세포의 생존율을 toluene에서 전처리하지 않은 대조구와 비교한 결과, 0.05%와 0.07% toluene으로 전처리한 경우 약 2배 이상의 내성이 증가함이 관찰되었다. 반면, 0.1% toluene에서 적응 처리시에는 대조구와 차이를 보이지 않았다(Table 1).

각각의 온도(32~50°C)에서 30분 적응처리 후 준치사 조건인 3% 농도의 toluene에서 30분 치사 후 세포의 생존율을 32°C에서 배양한 대조구와 비교한 결과, 37°C와 42°C에서는 약

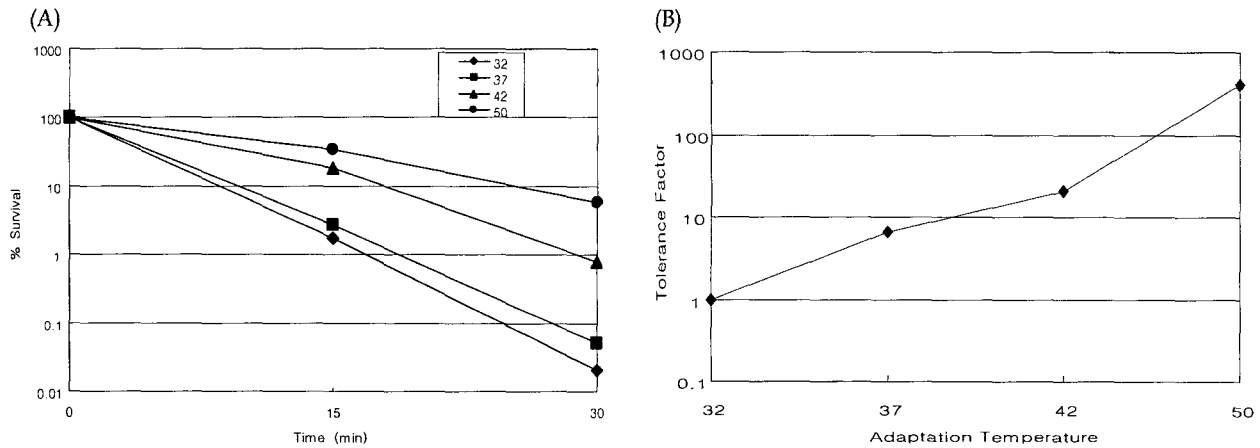


Fig. 2. Effect of exposure to heat on subsequent thermotolerance of *Micrococcus* sp. BCNU 121. A) Cells were incubated at 30°C (control, ◆) or at different temperatures (37°C, ■; 42°C, ▲; 50°C, ●) for 30 min before challenge at 60°C. Increase of heat resistance of *Micrococcus* sp. BCNU 121 was determined at 60°C for 15 or 30min. B) The enhanced thermotolerance was expressed as thermotolerance factor, i.e. the ratio of percent survival of bacterial cells grown at different temperatures (37°C-50°C) to percent survival of control cells grown at 32°C; at this temperature the thermotolerance factor is equal to 1.

Table 1. Development of tolerance and cross-protection in adapted cells of *Micrococcus* sp. BCNU 121

Adaptation	Challenges			
	Heat (60°C, 30 min)		Toluene (3% v/v, 30 min)	
	Surviving cells (%)	Tolerance factor	Surviving cells (%)	Tolerance factor
Toluene (0%)	2.93	1.00		
" (0.05%)	7.03	2.42		
" (0.07%)	6.35	2.15		
" (0.1%)	3.19	1.07		
Heat (32°C)			6.37	1.00
" (37°C)			7.40	1.16
" (42°C)			8.89	1.60
" (50°C)			22.28	5.26

1~2배의 미미한 내성 증가 현상이 관찰된 반면, 50°C 적응 처리시에는 약 5 배 이상의 내성 효과가 관찰되었다(Table 1).

이상의 연구결과에서 온도나 toluene에 전적응시 toluene이나 온도에 대하여 교차내성을 보임이 확인되었으며, cross-protection 현상이 관찰되어 heat shock protein과 유기용매 내성 protein과의 상호 연관성이 시사되고 있다. 유기용매 내성 기작에는 다수의 복잡한 기작이 관련되어 있는 것으로 생각되며 특히 heat shock 반응이 관련되어 있을 것으로 생각된다. Blom 등[4]은 *E. coli*에서 benzene 등 다양한 환경오염 물질에 의하여 heat shock protein이 발현됨을 발견하였고, Gage 등[7]도 이러한 현상을 재확인하여 보고하였다. Pich 등[20]도 *Clostridium acetobutylicum*에서 용매 생산시 다양한 heat shock protein이 발현되는 것을 발견하였다. 또한 *P. putida* KT2442에서는 2-chlorophenol에 의하여 다양한 단백질이 발현됨이 밝혀져 있다[15]. 이상의 결과는 일반세균에서의 결과로 유기용매 내성세균을 이용한 실험에서는 유기용매에 대한 적응은 동시에 다른 유기용매에 대한 내성도 증가시키고[9], 증금속에 대하여도 내성을 증가시키며[10], 항생제에 대하여도 내성을 증가시키는 것이 밝혀져 있다[12]. 동시에 *E. coli*에 스트레스 유전자를 대량 발현시키면 다양한 환경요인에 대한 내성이 증가함이 보고되고 있다[3,16,17]. 그러나 직접적으로 heat shock, 산화적 스트레스 등과의 연관성에 대한 보고는 없어 본 연구에서 heat shock 스트레스와는 연관성이 높다는 것을 보고하고자 한다. 현재 전체적인 유기용매 내성을 매개하는 유전자의 구조 기능이 밝혀져 있지 않다. Aono 등[2]이 보고한 유기용매 내성 유전자 *ost A*도 그 기능이 완전히 규명되고 있지 않아 이 분야에서의 보다 집중적인 연구가 절실히 요구되고 있다. 특히 유기용매 내성 세균은 주로 *Pseudomonas*를 중심으로 한 그람 음성세균에서 연구되고 있어 본 연구에서와 같이 유기용매 내성 그람 양성 세균을 사용하여 유기용매 내성기작의 규명함은 학문적으로 의의가 클 것으로 기대된다.

본 연구에 이어 그람 양성세균 *Micrococcus* sp. BCNU 121에서 toluene에 의해 유도되는 단백질과 heat에서 유도된 단백질간의 상호 중복 발현 관계를 확인하기 위한 실험이 보충되어지고, 이들 유전자의 발현조절에 대한 추가 연구가 진행되면 유기용매에서 특이적으로 발현하는 단백질의 기능에 대한 해석과 보다 확실한 유기용매 내성과 heat shock 반응과의 연관성이 유기용매 그람 양성세균에서도 밝혀질 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Aono, R., M. Ito, A. Inoue and K. Horikoshi. 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 145-146.
- Aono, R., T. Negishi and H. Nakajima. 1994. Cloning of organic solvent tolerance gene *ost A* that determines *n*-hexane tolerance level in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4624-4626.
- Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayash, M. Kobayashi and R. Aono. 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *mar A* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1428-1433.
- Blom, A., W. Harder and A. Matin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 331-334.
- Boutibonnes, P., J. C. Giard, A. Hartke, B. Thammavongs and A. Auffray. 1993. Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 47-55.
- Flahaut, S., A. Hartke, J. C. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes and Y. Auffray. 1996. Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 49-54.
- Gage, D. J. and F. C. Neidhardt. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4-dinitrophenol. *J. Bacteriol.* **757**, 7105-7108.
- 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.
- Heipieper, H. J. and J. A. M. de Bont. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of the fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4440-4444.
- Heipieper, H. J., G. Meulenbeld, Q. van Oirschot and J. A. M. de Bont. 1996. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acid in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4292-4297.
- Inoue, A. and K. Horikoshi. 1987. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature.* **338**, 264-266.
- Isken, S., PMAC. Santos and J. A. M. de Bont. 1997. Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 642-647.
- Isken, S. and J. A. M. de Bont. 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* **2**, 229-238.
- 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.
- 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.
- Nakajima, H., K. Kobayashi, H. Asako and R. Aono. 1995. Overexpression of the *rob A* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2302-2307.
- Nakajima, H., M. Kobayashi, T. Negishi and R. Aono. 1995. *Sox RS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**,

- 1323-1325.
18. Pich, A., F. Narberhaus and H. Bahl. 1990. Induction of heat shock proteins during initiation of solvent formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 697-704.
19. Segura, A., E. Duque, G. Mosqueda, J. L. Ramos and F. Junker. 1999. Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1(3)**, 191-198.
20. Weber, F. J. and J. A. M. de Bont. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**, 225-245.