

Sphingomonas sp. HS362에 의한 Phenanthrene 분해특성

김수화 · 홍승복 · 강희정 · 안진철 · 정재훈 · 손승렬^{1,*}

단국대학교 첨단과학부 미생물학전공, ¹단국대학교 기초과학연구소

유류에 의해 오염된 토양으로부터 난분해성 물질인 phenanthrene을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용하여 성장하는 균주들을 분리한 후, 그 중에서 분해능이 가장 우수한 균주를 선별하여 HS362라고 명명하였다. HS362는 생화학적 검사로는 *Sphingomonas paucimobilis*와, 16S rDNA 염기서열 분석으로는 *Sphingomonas* CF06과 가장 유사한 것으로 나타났고, 지방산분석 결과도 그람음성 간균인 *Sphingomonas* 속으로 판명되었으므로 *Sphingomonas* sp. HS362라고 명명하였다. 이 균은 500 ppm의 phenanthrene을 단일 탄소원으로 첨가한 경우, 10일 만에 98% 이상을 분해하였고, 3000 ppm의 phenanthrene이 첨가된 경우에도 10일 만에 약 30% 이상을 분해하는 우수한 균임이 확인되었다. 또한 이 균은 PAH들(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 중에서 phenanthrene 이외에도 분자량이 적은 indole, naphthalene은 분해할 수 있는 반면에, 분자량이 큰 pyrene, fluoranthene은 분해하지 못하였다. *Sphingomonas* sp. HS362에 의한 phenanthrene 분해는 30°C, pH 4-8, NaCl이 1%이하의 농도인 조건하에서 배양했을 때 가장 우수했으며, 특히 전분과 SDS, Tween 85, Triton X-100와 같은 계면활성제를 첨가해 주었을 때 분해가 증진되었다. 또한, 전배양을 통해서 phenanthrene의 분해가 증진되는 것을 볼 때에 분해효소가 유도되는 것으로 추측할 수 있었다. *Sphingomonas* sp. HS362는 5개의 plasmid를 가지고 있는데, 그 중에서 plasmid p4를 잃었을 때에는 phenanthrene을 분해하지 못하는 것으로 보아 plasmid p4가 phenanthrene 분해와 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

Key words □ PAH, phenanthrene, plasmid, *Sphingomonas*

다중고리 방향족 탄화수소들(Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)은 천연 화석연료의 주성분으로서 유기 물질의 불완전한 연소과정 중에도 형성되므로, 정제된 화석연료에는 PAHs가 상대적으로 고농도로 존재한다고 알려져 있다. 또한 석유의 정제 과정에서 발생하는 산업적 폐수·폐기물의 배출과 운송 사고로 인한 유출은 PAHs를 환경으로 유출시키는 주요 원인이 되고 있으며, 그 밖에 산불(20), 담배연기(12)등에 의해서도 PAHs가 환경으로 유입된다. 따라서 PAHs는 다양한 인간 활동에 의해서 생성되는 오염물질 중 하나로서 거의 모든 곳에 존재하며, 인간의 건강과 환경에 유해한 물질로 알려져 있다. 이러한 이유로 PAHs의 생분해 기작과 환경과외에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

PAHs는 2개 혹은 그 이상의 방향족 고리가 선형, 각형, 혹은 집단 배열로 융합된 형태의 탄화수소를 말한다(11). PAHs는 크게 naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluorene처럼 방향족 고리가 3개 이하로 구성된 low-molecular weight (LMW) PAH와 pyrene, chrysene, fluoranthene처럼 방향족 고리가 4개 이상으로 구성된 high-molecular weight (HMW) PAH로 나누어질 수 있다(5). PAHs 분자의 화학적 특성에 따른 환경 파괴는 분자의 크기, 방향족 고리의 수, 고리의 연결 방식에 따라 다르지만, 일반적으로

로 방향족 고리의 수가 증가할수록 용해도와 휘발성은 감소하고 소수성과 화학적 안정성은 증가된다. 이러한 PAHs 분자들의 높은 소수성과 안정성, 낮은 용해도는 자연환경에서 PAHs의 지속성을 증가시키고, 또한 이러한 소수성 화합물들은 친지질의 특성을 지니고 있어 유기화합물이 풍부한 해양 저질토와 토양에 축적되고 있다(3). 이런 이유로 먹이 사슬을 통한 생물 농축의 가능성도 매우 높으며(21), 급성 독성효과나 돌연변이, 암, 기형을 유발하기도 하기 때문에 유해물질로 규정되어 있다.

PAHs 중에서 phenanthrene은 3개의 벤젠고리가 융합된 형태로써, 다른 PAHs에 비해 독성은 덜 띠고 있지만, PAHs에 의해 오염된 환경시료에 고농도로 존재하며, 그들의 화학적 구조가 benzo[α]anthracene과 같이 암을 유발하는 PAH에서 발견되므로 PAHs의 분해에 대한 연구에 있어 model compound로 이용된다. 또한 환경에서 PAHs의 생물적 이용능력, 생물정화, 미생물 분해율에 영향을 주는 요소를 결정하기 위한 PAH 모델로서도 이용된다(17).

현재 밝혀진 phenanthrene을 분해하는 세균의 속으로는 *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Comamonas*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Norcardioides*, *Pseudomonas*가 보고 되었고(10), 최근에는 *Pseudomonas* 속이나 *Flavobacterium* 속으로 알려진 PAHs 분해세균들이 *Sphingomonas*로 재분류되고 있다(14).

오염 환경에서 미생물에 의한 PAHs 분해는 투여된 미생물이

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-550-3455, Fax: 041-551-9229
E-mail: syson@dankook.ac.kr

성장할 수 있는 기질이나 영양분의 부적당한 농도, 토착 미생물과의 경쟁, 또는 원생동물에 의한 섭식 등이 제한요인으로 작용할 수 있다. 또한 PAHs의 소수성은 자연환경 내에서 불용성의 고체 상태로 존재하려는 성질을 높이기 때문에 PAHs의 분해에 있어 가장 큰 장애로 작용한다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 유기용매의 첨가, 계면활성제의 처리(6)등의 방법이 제시되었고, 그 중에서 계면활성제는 토양이나 다른 유기물에 흡착되어 있는 PAHs를 유리시키고 고체상태의 PAHs가 액체상태로 이동하는 것을 촉진시켜 수중의 PAHs 농도를 증가시키기 때문에 이를 이용하여 PAHs를 정화하려는 연구가 가장 많이 진행되었다.

본 연구에서는 PAHs로 오염된 유류 오염 토양으로부터 단일 탄소원과 에너지원으로서 phenanthrene을 이용하는 균주를 분리, 동정하고, 분리된 균주의 phenanthrene 분해능에 미치는 다양한 조건들의 영향을 관찰하고, phenanthrene 분해를 증진시키기 위한 조건들과 plasmid가 phenanthrene 분해에 있어 어떤 상관관계를 갖는지의 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

Phenanthrene 분해 균주의 분리

유류에 오염된 토양 시료는 표면 아래 5~10 cm로부터 채취하여 멸균된 conical tube (Sarstedt, Germany)에 밀봉하여 실험실로 운반 후 분석하였다. 사용된 최소액체배지는 nitrate minimal medium을 변형한 것으로 그 조성은 증류수 1 L당 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.03 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, KNO_3 0.01 g, trace metal solution 1 ml을 첨가하였다. 고체배지의 경우 1.5%의 Bacto agar (Difco)를 첨가하였다.

채취된 토양 시료 0.5 g을 500 ppm의 phenanthrene (Sigma, USA)이 포함된 5 ml의 최소액체배지에 접종하고 28°C, 180 rpm에서 1주일 동안 집적배양 (enrichment culture)을 하였다. 배양된 시료는 동일한 조건의 새로운 배지로 100 μL 씩 접종하여 1주일 동안 배양하였다. 이러한 계대과정을 3회 반복하였다. 이 집적배양액을 생리 식염수를 이용하여 희석한 후 최소고체배지에 100 μL 씩 접종하였다. 그 위에 100 ml의 아세톤에 녹인 2g의 phenanthrene을 분무하여 28°C에서 배양하는 동안 집락 주위에 투명환(clear zone)이 형성된 집락을 분해세균으로 선별하였다(15). 선별된 집락들을 순수 배양하기 위해 tryptic soy agar (TSA)배지에 접종하여 단일 집락을 분리하였다. 분리된 단일 집락은 다시 최소고체배지에 접종한 후 phenanthrene을 녹인 아세톤(2 g/100 ml)을 분무하여 분해능을 재확인하였다.

Phenanthrene 분해 균주의 특성 및 동정

Phenanthrene 분해 세균의 생화학적 특성은 집락 모양, 색소 형성, 그람 염색, 그리고 API (Analytic Profile Index) 20 NE test strips (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) 실험을 통하여 결정하였다. PAHs를 분해하는 균주들의 지방산 분석을 위해 TSA에서 24~48 시간 배양한 후, 세포의 지방산들을 saponification, methylation, extraction하여 microbial identification system

(MIDI; ChemStation Version 4.02)을 통해 분석하였다.

16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 이용된 primer는 eubacteria에 특이적인 27F (*E. coli* numbering 8~27 : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492~1510 : 5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하였다 (16). PCR 반응은 PE480 (Perkin Elmer, USA)을 이용하였으며 PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1.5분씩 30회 반복하고 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 4°C에서 보관하였다.

증폭된 PCR 산물을 정제한 후 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열간의 유사도를 알아보기 위해 NCBI의 GenBank와 EMBL의 database에서 유사한 16S rDNA 염기서열을 비교·검색하였다.

분리된 균주의 phenanthrene 및 다른 PAHs 분해

분리된 균주가 phenanthrene 이외에 다른 종류의 PAHs를 분해할 수 있는지의 여부를 확인하기 위해 indole과 naphthalene은 최소고체배지에 균체를 접종한 후, 페트리디쉬 뚜껑에 결정체를 첨가해 균체 생성 및 변화를 관찰하였으며, fluoranthene과 pyrene은 각각 2g을 아세톤 100 ml에 녹여 배지 위에 분무한 후 균체 주변에 투명환의 형성 유무 및 균체 주변 배지의 색깔변화를 관찰하였다.

분리된 phenanthrene 분해 균주가 phenanthrene을 유일한 탄소원과 에너지원으로서 이용하여 성장하는지를 알아보기 위해 100 ml의 최소액체배지에 phenanthrene이 500 ppm 되도록 첨가하였다. 분리된 phenanthrene 분해 균주들은 OD660에서 흡광도가 0.04-0.05가 되도록 접종하였으며, 성장물은 배양액 1 ml과 4 ml의 용매혼합물 [acetone : methanol : hydrochloric acid = 10 : 10 : 1 (v/v/v)]을 혼합하여 OD660에서 spectrophotometer (Biomate 5, USA)를 이용해 측정하였다(13).

Phenanthrene 분해능 측정은 시간대별로 배양액을 5 ml씩 취하여 잔존하는 phenanthrene 양을 HPLC (Waters, USA)로 분석하였다. 내부표준물질로서 pyrene을 첨가하고 3배의 ethyl acetate를 가한 후, anhydrous sodium sulfate로 남아있는 수분을 제거하고, 감압증류 장치로 ethyl acetate를 증발시켜 잔류 phenanthrene을 추출하였다. 추출된 phenanthrene은 acetonitrile 2 ml에 녹여 LC-PAH (Supelco, USA)가 장착된 HPLC를 이용하여 분석하였다. 시료들은 717 plus Autosampler를 이용하여 20 μL 씩 주입하였고 column 온도는 30°C를 유지하며, 100% acetonitrile을 분당 0.8 ml씩 흘리면서 UV 검출기를 이용하여 254 nm에서 측정하였다.

극소량의 영양분의 존재가 분해능 향상에 영향을 미칠 수도 있으므로, 500 ppm의 phenanthrene이 포함된 최소액체배지에 전분, 포도당, peptone, yeast extract를 각각 100 ppm이 되도록 첨가한 후 5일과 10일 후에 분해능을 확인하였고, 계면활성제의 효과를 알아보기 위하여 동일한 배지에 SDS (sodium dodecyl sulfate), Tween 85 (polyoxyethylene sorbitan ester), Triton X-100 (alkylphenol ethoxylate ether)를 각각 100 ppm이 되도록 첨가하여 5일과 10일 후에 분해능을 확인하였다.

Plasmid curing 실험

HS362를 tryptic soy broth (TSB) 5 ml에 접종하여, 30°C에서 200 rpm으로 24-48시간 배양하였다. 배양액 100 µl를 새로운 TSB 5 ml에 접종하여, 42°C에서 200 rpm으로 2일 동안 배양하였다. 2일 동안 배양한 배양액을 멸균한 0.85% NaCl buffer를 사용해 단계적으로 희석하여, TSA에 100 µl씩 도말한 다음, 30°C에서 24-48시간 배양하였다. 형성된 각 집락들을 최소고체배지와 TSA에 계대하여 30°C에서 24-48시간 배양하였다(8). 이때, 계대한 최소고체배지에는 아세톤에 녹인 2% phenanthrene을 도포하여 배양하였다. 배양하는 동안 집락주변에 투명환을 형성하는 것과 형성하지 못하는 집락들을 무작위로 선택하여, TSB에 접종하여, 30°C에서 200 rpm으로 24-48시간 배양한 후, 위의 방법과 동일하게 plasmid DNA를 추출하여 확인하였다.

결 과

Phenanthrene 분해균주의 분리 및 동정

Phenanthrene 분해세균을 분리하기 위해 유류오염 토양으로부터 토양 시료를 채취하여 집적배양을 하였다. Kiyohara(15)의 방법에 의해 최소고체배지에 도말하여 아세톤에 녹인 2% phenanthrene을 도포하여 배양한 후, 집락 주변에 뚜렷한 투명환이 형성되는 것을 선택하여 단일 colony를 분리, 순수 배양하였다. 분리된 균주들 중 분해능이 가장 우수한 균주를 HS362로 명명하였다.

분리된 phenanthrene 분해균주 HS362는 그람음성의 간균이였으며, 집락은 점성이 높고, 진한 노란색을 띠었다. 생화학적 검사를 실시한 결과로는 *Sphingomonas paucimobilis*와 가장 유사한 것으로 나타났으며, 지방산 조성 분석에서는 *Sphingomonas* 속에서 대표적으로 나타나는 14:0 2OH, 18:1 w7c, 16:1 w7c/15 iso 2OH가 관찰되었다(결과 미 제시). 또한, 16S rDNA gene을 PCR로 증폭시켜 direct sequencing을 실시하여 얻은 약 1,500 bp의 염기서열을 가지고 NCBI의 GenBank와 EMBL등의 database를 통해 알려진 *Sphingomonas* 속의 16S rDNA 염기서열들과 비교 분석한 결과 HS362는 *Sphingomonas* CF06과 가장 유사하여 99.2% 이상의 유사도를 갖는 것으로 확인되었다(GenBank Accession Number DQ121385). 이상의 생화학적 특성, 지방산 조성 분석, rDNA 염기서열분석 등의 결과를 바탕으로 HS362를 *Sphingomonas* sp. HS362로 명명하였다.

Sphingomonas sp. HS362에 의한 phenanthrene의 분해특성

Sphingomonas sp. HS362가 phenanthrene 이외에 다른 종류의 PAHs를 분해할 수 있는지를 알아보기 위해 앞에서 기술한 방법에 따라, indole, naphthalene, fluoranthene, pyrene에 대해 분해 여부를 확인하였다. *Sphingomonas* sp. HS362는 indole의 경우, 분해산물인 indigo의 형성을 관찰할 수 있었고, LMW PAHs인 naphthalene과 phenanthrene도 분해하였으나, HMW PAHs인 fluoranthene과 pyrene은 분해를 하지 못하는 것으로 확인되었다.

Sphingomonas sp. HS362가 phenanthrene을 유일한 탄소원과

에너지원으로 이용하여 성장하는지를 알아보기 위하여 500 ppm의 phenanthrene이 첨가된 최소액체배지에서 배양하면서 시간에 따른 phenanthrene 분해능과 성장률을 측정하였다. *Sphingomonas* sp. HS362의 성장은 2일 동안의 유도기를 거쳐 3일 이후, 급격한 증가를 보여 6일까지 꾸준히 증가하였으며 그 후, 성장이 크게 둔화되었다. Phenanthrene의 분해는 균체의 성장과 거의 비례하였다(Fig. 1). 배양 후 2일이 경과할 때까지 첨가된 500 ppm phenanthrene 가운데 약 10%의 phenanthrene을 분해하였으나, 균체의 성장은 관찰되지 않았다. 그러나, 3일을 지나면서 phenanthrene의 양은 급격히 줄어들어 5일째에는 68% 이상, 10일째에는 98% 이상을 분해하였다. 균체의 성장도 3일 이후 급격한 증가 후, 660nm에서 흡광도가 약 0.27까지 성장하는 것을 관찰하였다.

Sphingomonas sp. HS362에 의한 phenanthrene의 최적 분해 조건

Phenanthrene 농도에 따른 *Sphingomonas* sp. HS362의 분해능을 살펴보면 500 ppm에서는 5일 후에는 68% 이상, 10일 후에는 98% 이상을 분해하였고, 1000 ppm의 경우, 5일째 52%, 10일째에는 82% 이상을 분해하였다. 10일 배양 후, 1500 ppm에서는 58%, 2000 ppm에서는 50%, 2500 ppm에서는 41%, 3000 ppm에서는 30% 정도를 분해하였다(Fig. 2). 따라서 500 ppm의 농도에서 분해능이 가장 좋았다.

온도에 따른 *Sphingomonas* sp. HS362의 phenanthrene 분해능을 측정한 결과, 10일 배양 후, 첨가된 500 ppm phenanthrene 중 10°C와 20°C에서는 각각 46%와 58%, 40°C에서는 23% 정도를 분해하였지만, 30°C에서는 98% 이상을 분해하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 따라서, HS362의 phenanthrene 분해를 위한 최적배양온도는 30°C로 추정할 수 있었다.

Sphingomonas sp. HS362의 phenanthrene 분해에 pH가 미치는 영향을 알아보기 위하여, 각각 pH 2, 4, 6, 8, 10, 12에서 배양한 후, 분해능을 측정하였다. 10일 후 pH 4에서는 첨가된 500 ppm phenanthrene 중 약 98%, pH 6과 8에서는 각각 97%, 95% 이상을 분해하였다. 또한 pH 10에서는 80% 이상을 분해하였으

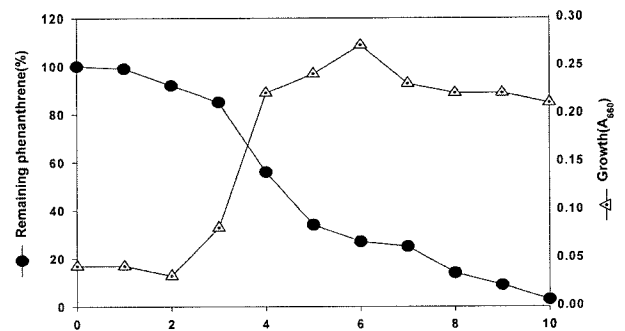


Fig. 1. Relationship between phenanthrene degradation and the growth of *Sphingomonas* sp. HS362. *Sphingomonas* sp. HS362 was grown in a minimal medium containing 500 ppm of phenanthrene.

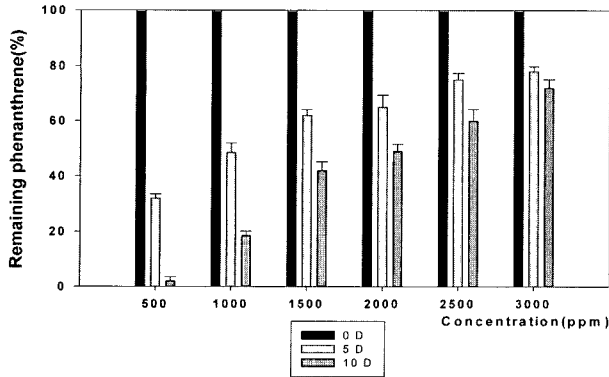


Fig. 2. Degradation of various concentrations of phenanthrene by *Spingomonas* sp. HS362. (D : days) *Spingomonas* sp. HS362 was grown in a minimal medium containing various concentrations of phenanthrene.

나, pH 2와 pH 12에서는 각각 30%, 14% 정도의 분해능을 나타내었다(Fig. 3B). 따라서, *Spingomonas* sp. HS362는 pH 4~8 범위 내에서 phenanthrene 분해능이 우수한 것을 알 수 있었다.

Phenanthrene 분해에 염분의 농도가 미치는 영향을 알아보았다. 대조군으로 사용된 0.2% NaCl 농도와 0% NaCl 농도부터 4% NaCl 농도 범위에 이르기까지 10일 후 500 ppm phenanthrene 가운데, 60% 이상이 분해되는 것을 확인하였으며, 특히 1% 이하의 NaCl 농도일 경우에는 95% 이상을 분해하는 것을 확인하였다(Fig. 3C). 또한 0%에서 1%에 이르는 농도 범위에서는 분해능의 변화가 거의 없는 것으로 관찰되었다. 따라서, phenanthrene 분해에 있어서 NaCl의 농도는 1% 이하가 최적 조건이라는 것을 알 수 있었다.

***Spingomonas* sp. HS362의 Phenanthrene 분해증진 효과**

Spingomonas sp. HS362의 phenanthrene 분해에 있어서 영양분이 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 500 ppm의 phenanthrene이 포함된 최소액체배지에 각각 100 ppm의 포도당, peptone, yeast extract, 전분 등을 첨가 후, 배양하여 phenanthrene의 분해를 관찰하였다. 대조 실험군에서는 배양 10일 후, 96%의 phenanthrene을 분해하는 것으로 관찰되었고, 포도당을 첨가하여 배양한 경우에는 92%, peptone의 경우에도 92%, yeast extract의 경우에는 95%, 전분을 첨가 배양한 경우에는 98%의 phenanthrene을 분해하는 것으로 확인되었다. 따라서 전분을 첨가하여 배양한 경우에만 분해가 다소간 증진되는 것을 관찰할 수 있었고, 포도당, peptone, yeast extract의 경우에는 오히려 분해능이 저하되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A).

Spingomonas sp. HS362의 phenanthrene 분해에 있어서 계면활성제의 영향을 알아보았다. 대조 실험군에서는 배양 10일 후, 96%의 phenanthrene을 분해하는 것으로 관찰되었고, SDS, Tween 85, Triton X-100 등 계면활성제가 100 ppm 첨가된 경우 모두 10일 후, 99% 이상을 분해하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 첨가된 계면활성제인 SDS, Tween 85, Triton X-100 모두 대조

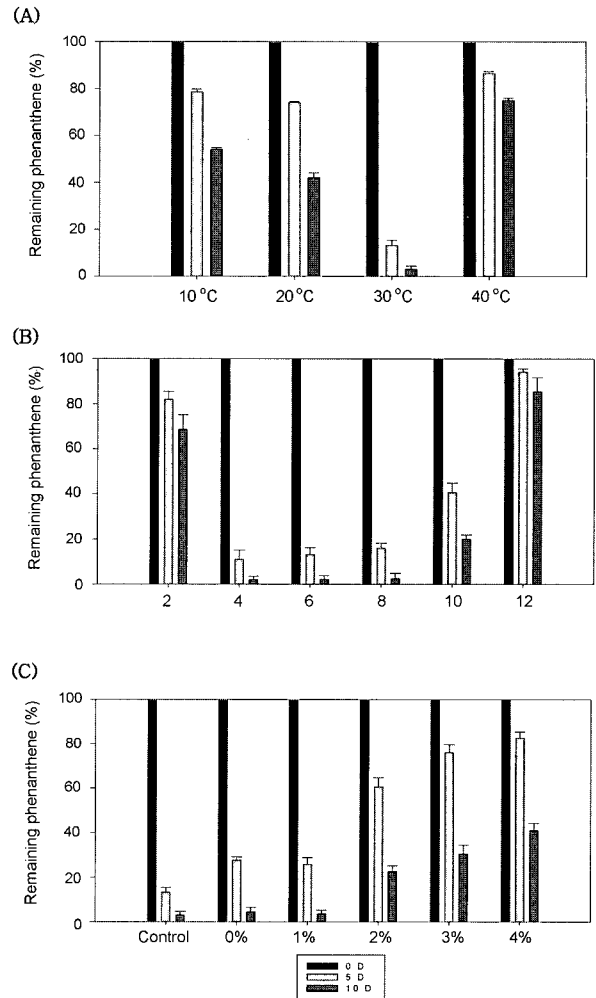


Fig. 3. Effects of temperature(A), pH(B), and NaCl concentration(C) on the degradation of phenanthrene by *Spingomonas* sp. HS362. (D : days) *Spingomonas* sp. HS362 was grown in a minimal medium containing 500 ppm of phenanthrene.

군과 비교해서 분해능의 증진효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

Spingomonas sp. HS362를 500ppm phenanthrene이 첨가된 최소액체배지에서 전배양하여 분해효소의 생산을 유도시킨 후, phenanthrene 분해능 확인 실험을 하였다. 전배양한 실험군은 유도기 없이 바로 phenanthrene 분해를 시작하여 4일 후에 97%, 6일 후에는 거의 완전히 분해하였다. 그러나, TSB에서 배양한 대조군의 경우, 1일 이상의 유도기를 가진 후에 분해가 시작되어 4일 후에 약 42%, 10일 후에야 98% 이상의 phenanthrene을 분해하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과를 통해, *Spingomonas* sp. HS362의 phenanthrene 분해에 있어서는 phenanthrene을 이용한 전배양을 통해 증진효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

***Spingomonas* sp. HS362의 plasmid 분석**

Spingomonas sp. HS362는 5개의 plasmid를 갖고 있는 것으로

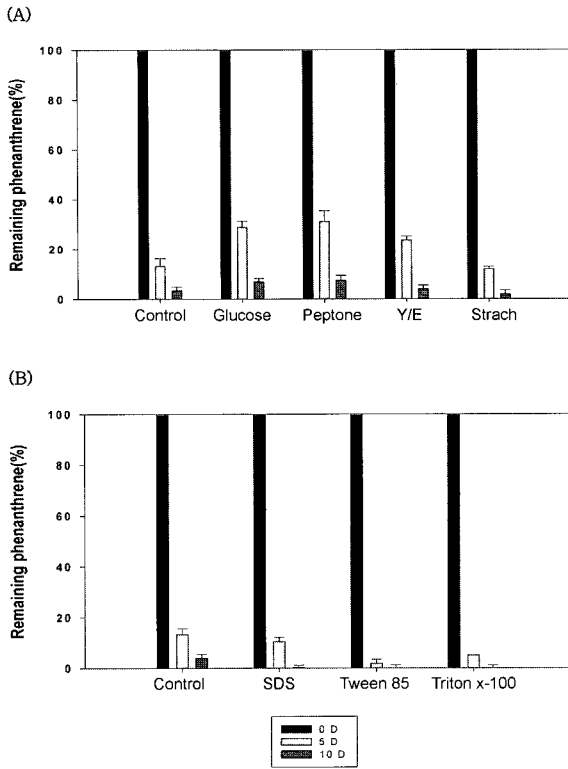


Fig. 4. Effects of nutrients(A) and surfactants (B) on the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. HS362. (Y/E : Yeast Extract, D : days) Each nutrient or surfactant was added at 100 ppm to a minimal medium containing 500 ppm of phenanthrene.

로 확인되었다.

이 plasmid들이 phenanthrene의 분해에 관여하는지 알아보기 위해 42°C에서 배양하면서 plasmid curing 실험을 실행하였다(8). 실험 결과, plasmid 5개 모두가 없는 경우에는 phenanthrene을 분해하지 못하는 것으로 보아 plasmid들이 phenanthrene 분해에 관여한다는 사실을 추정할 수 있었다. 5개의 plasmid 중 어떤 plasmid가 분해에 관여하는지를 확인하기 위하여 curing 실험을 한 결과 각각의 plasmid p1, p2, p3 그리고, p5가 없는 경우에는

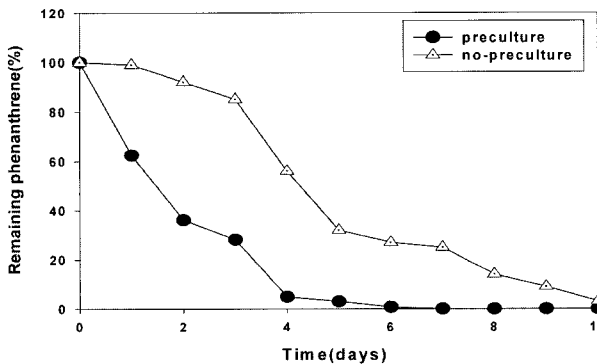
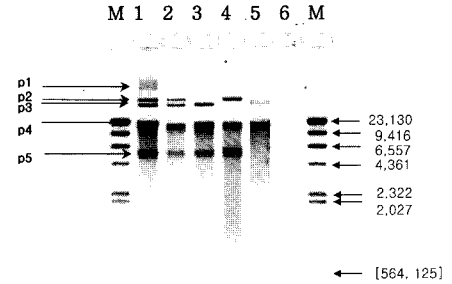


Fig. 5. Effect of preculture on the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. HS362.



Phenanthrene degradation + + + + + -

Fig. 6. Dependence of phenanthrene degradation on each plasmid in *Sphingomonas* sp. HS362. Plasmids were cured by growing at 42°C. M : λ /Hind III marker(Promega), 1 : Plasmids in *Sphingomonas* sp. HS362, 2 : Absence of plasmid p1., 3 : Absence of plasmids p1 and 2., 4 : Absence of plasmids p1 and 3., 5 : Absence of plasmids p1, 2, and 5., 6 : Absence of all plasmids, M : λ /HindIII marker(Promega)

모두 phenanthrene을 분해할 수 있는 것으로 관찰되었다. 따라서 비록 plasmid p4만을 잃어버린 균을 분리하지는 못했으나 plasmid p4가 phenanthrene 분해에 관여할 것이라 추론할 수는 있었다(Fig. 6).

고 찰

오염 지역에서 PAHs은 휘발, 광분해, 여과 등에 의해 제거되기도 하지만 PAHs를 생분해(biodegradation)하는 미생물의 발견은 PAHs에 의해 오염된 곳의 정화과정에 많은 도움이 되고 있다(5). 다양한 미생물들은 세포성장을 위한 탄소원과 에너지원으로 특정 PAHs을 이용하며 CO₂와 중간대사산물로 완전 분해한다(11).

Sphingomonas 속에 속하는 여러 균들은 환경에 널리 분포되어 있으며, 다양한 이화능력을 가지고 있어 환경 내 PAHs의 생물정화를 위한 높은 잠재성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이전의 *Pseudomonas* 속이나 *Flavobacterium*으로 알려진 균들이 *Sphingomonas*로 재분류되는 것으로 미루어 볼 때(14), *Sphingomonas*는 phenanthrene 이외에 더 많은 종류의 오염물질 분해에 기여할 수 있으리라 기대된다.

Sphingomonas sp. HS362는 500 ppm의 phenanthrene을 5일 동안 68%, 10일에는 98% 이상을 분해하였다. 또한, 1000 ppm의 농도에서는 5일과 10일 후에 각각 52%, 82% 이상을 분해하였는데, 이는 1000 ppm의 phenanthrene을 5주 후에 50% 정도 분해하는 것으로 보고된 *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Aeromonas* (1), 1000 ppm의 phenanthrene을 2주 후에 50% 분해하는 것으로 보고된 *Sphingomonas* sp. KH3-2(19), 5일과 10일에 각각 45%와 68%의 분해능을 갖는 *Sphingomonas* sp. 1-21(18)과 10일 배양 후 약 60% 이상을 분해하는 *Pseudomonas* sp. AJ1(13) 보다 phenanthrene의 분해력이 훨씬 우수한 것으로 판단된다.

일반적으로 세균이 phenanthrene과 같은 PAHs를 이용하여 성장할 경우 낮은 성장률을 나타낸다는 보고가 있는데, 이는 PAHs

를 분해할 때, 상당량의 중간 대사산물을 배지내로 분비하기 때문으로 알려져 있다(13). *Sphingomonas* sp. HS362가 phenanthrene을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용하여 성장할 경우 660 nm에서 흡광도 0.27로 기준에 알려진 세균들보다 훨씬 높은 성장률을 보였다.

세균의 성장은 여러 가지 환경요인에 영향을 받는데, PAHs 분해에 있어서 균체의 성장뿐만 아니라 분해도 이러한 환경적 요인에 영향을 받는다. 온도, pH, NaCl 농도에 따른 phenanthrene 분해능의 변화에 대한 실험을 한 결과, 500 ppm phenanthrene이 첨가된 경우 30°C, pH 4-8, 그리고 1% 이하의 NaCl 농도일 때 분해능이 가장 우수한 것을 확인하였다.

오염 물질에 오염된 환경에 미생물의 분해능을 이용한 정화 방법은 널리 이용되고 있으며, 해당 오염물질의 분해능을 가진 미생물을 오염지역에 투여함으로써 그 환경에서 오염물질을 제거하는 것은 매우 유용한 도구로 생각되고 있다. PAHs 화합물을 제거하는데 있어서도 생물정화의 적용은 매우 효과적인 것으로 받아들여지고 있기 때문에 생물정화시 제한 요인으로 작용할 수 있는 문제점들을 극복하려는 실험들을 중심으로 PAHs 분해의 연구가 다각도로 이루어지고 있다. PAHs 오염 환경의 생물정화시 고려해야 할 또 다른 문제는 PAHs가 소수성의 특징을 갖고 있다는 것이다. 소수성은 분자량이 증가할수록 증가하는데, 이로 인해 PAHs는 자연환경에서 불용성의 고체상태로 존재하려는 성질이 높다. 이 점이 미생물에 의한 PAHs 분해에 있어서 가장 큰 장애요인으로 작용한다. 이런 문제점을 극복하기 위해 유기용매를 첨가하는 방법(7), 계면활성제의 처리(6) 등의 방법이 제시되고 있다. 이러한 방법 중에서 계면활성제를 이용하여 PAHs를 제거할 수 있는 연구가 가장 많이 진행되었다. 계면활성제의 첨가가 PAHs를 제거할 수 있는 이론적 배경은 다음과 같다. 첫째 surfactants micelle은 토양이나 다른 유기물에 흡착되어 있는 PAHs를 유리시키고, 둘째 고체상태의 PAHs의 액체상태로의 이동을 촉진시켜 수중의 PAHs의 농도를 증가시킨다. 계면활성제가 미생물의 PAHs 분해에 미치는 영향은 다양하게 나타날 수 있는데, 앞서 언급한 계면활성제의 작용에 의해 미생물이 PAHs 분해를 촉진시킨다는 보고(2, 9)와 이와는 반대로 첨가된 계면활성제가 기질로 이용되거나 미생물에 독성효과를 나타내어 미생물의 PAHs 분해에 영향이 없거나 혹은 저하시킬 수 있다는 보고(2, 7)가 있다. 본 실험에서는 Tween 85, Triton X-100, SDS를 사용하여 *Sphingomonas* sp. HS362의 phenanthrene 분해에 대한 영향을 알아보았다. 계면활성제가 100 ppm 첨가되었을 때, 각각의 실험군에서 대조실험군 보다 높은 분해능을 관찰할 수 있었다.

또한, 전분이나 포도당 같은 유기물이 첨가되었을 때 PAHs를 cometabolic하게 분해하는 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium* sp. 등이 보고되었다(9). *Sphingomonas* sp. HS362의 phenanthrene 분해에 있어서 포도당, peptone, yeast extract를 첨가한 경우에는 분해능의 증진을 확인할 수 없었고, 단지 전분을 첨가한 경우에만 대조군과 비교해서 분해가 다소 증진된 것을 확인할 수 있었다.

PAHs 분해에 관련된 효소들은 “induced enzyme”으로 알려져

있다. 이러한 전처리의 증진효과는 환경시료에서도 나타나는데 Bauer와 Capone(4)은 naphthalene 또는 phenanthrene이 전처리된 해양저질토의 시료는 phenanthrene과 anthracene의 분해를 촉진시킨다고 보고하기도 하였다. 이에 따라, *Sphingomonas* sp. HS362을 500 ppm phenanthrene이 첨가된 배지에서 전배양하여 전배양하지 않은 대조군과 phenanthrene 분해능을 비교하였다. 그 결과, 전배양한 경우에는 효소의 유도기간 없이 바로 phenanthrene을 분해하기 시작해서 6일에는 첨가된 phenanthrene을 모두 분해하는 것으로 관찰되었다. 이것은 전배양을 통하여 phenanthrene 분해효소가 유도되었기 때문으로 추정된다.

세균의 plasmid가 대사에 필요한 많은 유전자들의 진화와 확산에 중요한 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려져 있는 사실로서, plasmid를 포함하고 있는 *Sphingomonas* 속의 경우에도 plasmid 홀로 또는 chromosome과 협력하여 PAHs를 이화시키는 기능이 있다는 보고가 많아, 분리된 균주 HS362의 plasmid에 대한 연구를 수행하였다. 이에 따라, curing 실험을 한 결과, 각각의 plasmid p1, p2, p3, p5가 없는 경우에는 phenanthrene을 분해하지 못하는 것을 관찰할 수 없었고, plasmid p4가 존재하는 경우에만 phenanthrene을 분해하는 것을 확인할 수 있었다. 이로써, plasmid p4가 phenanthrene을 분해하는데 관여할 것이라 추론할 수 있었으나, chromosome의 관여여부는 확인하지 못했다.

이상에서와 같이 본 실험에서 분리된 *Sphingomonas* sp. HS362는 영양분의 첨가 없이 phenanthrene을 분해할 수 있었으며, 전분을 첨가하여 배양한 경우에만 약간의 분해 증진 효과를 확인할 수 있었다. 여기에 계면활성제를 첨가하였을 때와 전배양을 통해서도 phenanthrene 분해능이 증진됨을 관찰하였다. 이로써 *Sphingomonas* sp. HS362는 phenanthrene 및 유류 오염 환경의 생물학적 처리에 유용할 것으로 판단된다. 또한 앞으로 다양한 환경 시료를 대상으로 한 연구결과가 확보된다면 PAHs 오염 환경의 생물정화에 유용할 것으로 생각된다.

감사의 말

이 연구는 2004학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

1. 서은영, 송홍규. 1995. 해양환경에서의 다핵방향족 탄화수소의 생분해. *미생물과 산업*. 21, 141-146.
2. Aronstein, B.N., Y. M. Calvillo, and M. Alexander. 1991. Effects of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1728-1731.
3. Berardesco, G., S. Dyhrman, E. Gallagher, and M.P. Shiaris. 1998. Spatial and temporal variation of phenanthrene-degrading bacteria in intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2560-2565.
4. Bauer J.E. and D.G. Capone. 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Micro-*

- biol. 54, 1649-1655.
5. Dingyi, YE., A. Siddiqi, A.E. Maccubbin, S. Kumar, and H.C. Sikka. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30, 136-142.
 6. Edward, D.A., R.G. Luthy, and Z. Liu. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 127-133.
 7. Efrogmson, R.A. and M. Alexander. 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1441-1447.
 8. Feng, X., L.T. Ou, and A. Ogram. 1997. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1332-1337.
 9. Guerin, W.F. and G.E. Jones. 1988. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 937-944.
 10. Han, K., S.H. Kim, and S-Y Son. 2003. Isolation and Characterization of PAHs Degrading *Sphingomonas* sp. K-19. *Kor. J. Microbiol.* 39, 288-292
 11. Hedlund, B.P., A.D. Geiselsbrecht, T.J. Bair, and J.T. Staley. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 251-259.
 12. Heudorf, U. and J. Angerer. 2001. Urinary monohydroxylated phenanthrenes and hydroxypyrene - the effects of smoking habits and changes induced by smoking on monooxygenase-mediated metabolism. *Int Arch. Occup. Environ. Health.* 74, 177-183.
 13. Iwabuchi, T., K. Venkateswaran, S. Harayama, and H. Tanaka. 1994. Low growth yield of a marine *Pseudomonas* grown on phenanthrene : a general phenomenon in bacteria grown on polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Mar. Biotechnol.* 2, 11-14.
 14. Khan, A.A., R.F. Wang, W.W. Cao, W. Franklin, and C.E. Cerniglia. 1996. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 466-469.
 15. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yano. 1982. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 458-461.
 16. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
 17. Moody, J.D., J.P. Freeman, D.R. Doerge, and C.E. Cerniglia. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 458-461.
 18. Ryeom, T-K., I-G Lee, S-Y. Son, and T-Y Ahn. 2000. Degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. 1-21 isolated from oil-contaminated soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 724-727.
 19. Shin, S.K., Y.S. Oh, and S.J. Kim. 1999. Biodegradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain KH3-2. *J. Microbiol.* 37, 185-192.
 20. Storelli, M.M. and G.O. Marcotrigigano. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in sediment from the Mar Piccolo, Ionian Sea, Italy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 537-544.
 21. Twiss, M.R., L. Granier, P. Larfrance, and P.G.C. Campbell. 1999. Bioaccumulation of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and pyrene by picoplankton (*Synechococcus leopoliensis*, *Cyanophyceae*) : influence of variable humic acids concentrations and pH. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2063-2069.

(Received July 28, 2005/Accepted August 19, 2005)

ABSTRACT : Characterization of Phenanthrene Degradation by *Sphingomonas* sp. HS362

Su Hwa Kim, Seung-Bok Hong, Hee Jeong Kang, Jin-Chul Ahn, Jae Hoon Jeong, and Seung-Yeol Son^{1,*} (Department of Microbiology, and ¹Institute of Basic Science, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea)

A phenanthrene-degrading bacterium HS362, which is capable of using phenanthrene as a sole carbon and energy source, was isolated from oil contaminated soil. This strain is a gram negative, rod shaped organism that is most closely related to *Sphingomonas paucimobilis* based on biochemical tests, and belongs to the genus *Sphingomonas* based on fatty acids analysis. It exhibited more than 99.2% nucleotide sequence similarity of 16S rDNA to that of *Sphingomonas* CF06. Thus, we named this strain as *Sphingomonas* sp. HS362. It degraded 98% of phenanthrene after 10 days of incubation when phenanthrene was added at 500 ppm and 30% even when phenanthrene was added at 3000 ppm. *Sphingomonas* sp. HS362 could also degrade low molecular weight PAHs(Polycyclic aromatic hydrocarbons) such as indole and naphthalene, but was unable to degrade high molecular weight PAHs such as pyrene and fluoranthene. The optimum temperature and pH for phenanthrene degradation were 30°C and 4~8, respectively. *Sphingomonas* sp. HS362 could degrade phenanthrene effectively in the concentration range of NaCl of up to 1%. Its phenanthrene degrading ability was enhanced by preculture, suggesting the possibility of induction of phenanthrene degrading enzymes. Starch and surfactants such as SDS, Tween 85, and Triton X-100 were also able to enhance phenanthrene degradation by *Sphingomonas* sp. HS362. It carries five plasmids and one of them, plasmid p4, is considered to be involved in the degradation of phenanthrene according to the plasmid curing experiment by growing at 42°C.