

Phosphamidon 분해세균의 분리동정 및 생분해능

강양미 · 허성남¹ · 안태석² · 송홍규*

강원대학교 생명과학부, ¹국립환경연구원 한강수질검사소, ²강원대학교 환경학과

토양으로부터 유기인계 살충제인 phosphamidon을 분해하는 세균들을 분리하고 Biolog system을 이용하여 동정하였다. 그람양성 세균들은 모두 *Bacillus* 속에 속하는 종들이었으며 그람음성 세균들은 토양에서 우점하지 않는 세균들이 많았다. 이들중 phosphamidon 함유배지에서 생장률이 높은 균주들을 선택하여 phosphamidon 분해능을 조사한 결과 *Campylobacter jejuni*로 동정된 YD-17 균주가 가장 높은 생분해능을 나타내어 1000 ppm의 phosphamidon이 배양 21일 후 9.4%의 잔류량을 보였으며 이는 대조구에 비해 제거율이 52% 증가된 결과였다. 이때 균주의 생장을 단백질량으로 측정하였는데 분해균주들이 고농도의 phosphamidon에 의해 저해되지 않고 지속적인 생장을 하여 phosphamidon을 탄소원으로 이용하는 생분해가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

KEY WORDS □ biodegradation, identification, organophosphorus insecticide, phosphamidon

농약(pesticide)은 각종 병해충으로부터 농작물을 보호하여 궁극적으로 식량, 유용산물과 생물량 등의 생산증가를 위하여 사용하는 물질이다. 근래들어 인구증가에 따른 식량 및 농산물 수요를 충족시키기 위하여 농약의 사용량이 지속적으로 증가하고 있다. 그러나 농약은 해충인 표적 생물체(target organism)에만 영향을 미치는 것이 아니라 비표적 생물체(nontarget organism)에도 영향을 미치기 때문에 자연환경에서 큰 악영향을 미치게 된다(10). 특히 잔류성이 높은 농약은 자연환경에서 먹이연쇄를 통해 농축되는 생물학적 증폭이 일어나 영양단계의 정점에 있는 생물체에서 최고 백만배 이상 그 농도가 증가될 수도 있다. 이러한 문제 때문에 잔류성이 높은 농약의 생산 및 사용이 점차 금지되고 있는 실정이다.

농약은 표적해충의 종류에 따라 살충제, 제초제, 살진균제 등으로 나뉘어지며 이는 다시 그 화학적 구조에 따라 종류가 달라질 수 있으며, 또한 생물체내로의 침입경로 또는 작용기작에 따라서도 분류된다(8). 유기인계 농약중 phosphamidon은 스위스의 Ciba-Geigy사에서 개발한 침투이행성 살충제로 Dimecron이란 이름으로 판매되고 있는데 매우 넓은 범위의 작용기작을 나타내며 유효성분은 2-chloro-N,N'-diethyl-3-hydroxycrotonamide dimethylphosphate이다(8). 이 살충제는 식물의 잎 등을 통해 즉시 침투이행하여 곤충에 소화중독효과 및 접촉효과를 나타내는데 우리나라에서도 솔잎혹파리 등의 방제에 널리 이용되고 있다. 살충제로 많이 이용되는 유기인계(organophosphate)는 대체로 유기염소계(organochlorine) 농약보다 분해도가 높아 잔류성이 낮은 것으로 알려져 있으나(11), 경우에 따라서는 매우 오랫동안 토양에 잔류하는 경우도 있다(4). Phosphamidon은 비교적 신속하게 분해되지만 매질환경에 따라 차이를 보이기도 하

여 저농도로 살포하였을 때 3-4주 후 50% 이상이 검출되기도 하였다(12). 농약은 국지적으로 고농도가 투여되기도 하며 특히 phosphamidon은 강한 독성, 돌연변이성 및 유전독성을 갖고있기 때문에(6,9) 잔류성분의 신속한 제거는 매우 중요하다. 토양에는 이런 농약성분을 분해할 수 있는 세균이 많이 존재하므로 이들을 이용하여 농약으로 오염된 환경을 정화할 수 있는 가능성이 있다. 이에 본 연구에서는 농약 분해능이 우수한 균주를 선발하기 위해 여러 가지 유기인계 농약내성 토양세균들중 phosphamidon 분해세균을 선별하고 동정하였으며, 이들의 phosphamidon 분해능을 측정하였다.

재료 및 방법

분해균주 분리 및 동정

살충제를 많이 살포하는 것으로 추정되는 강원도 원주시의 농촌지역 다섯 곳에서 토양을 채취하였다. 토양시료 1 g을 phosphamidon 100 mM 함유 LB 배지에 접종하여 24시간 동안 30°C에서 150 rpm의 속도로 진탕배양한 후 2시간 동안 정지하여 상등액을 취하여 4°C에서 1분간 원심분리(8,000×g)하여 세균을 수확하였다. 균체에 남아있는 LB 성분을 제거하기 위하여 0.85% 생리식염수로 2회 세척하여 얻어진 세균을 단일 탄소원으로 phosphamidon이 혼합된 PAS 배지(K₂HPO₄ 2.96 g, KH₂PO₄ 0.87 g, NH₄Cl 1.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.097 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.0015 g, FeSO₄ 0.005 g, phosphamidon 1 g, agar 15 g, distilled water 1 L)에 접종하여 30°C에서 72시간 배양하여 생장하는 균을 농약분해균주로 분리하였다.

분리된 27개의 phosphamidon 분해균주들의 동정은 Biolog system(Biolog Inc, U.S.A.)을 이용하였다. 멸균된 생리식염수액(0.85%)에 균주를 접종하고 분광분석기로 590 nm에서 O.D. 값 0.08~0.17로 cell 농도를 맞춘 후 미리 예열된

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 0361-250-8545, Fax: 0361-241-4627
E-mail: hgsong@cc.kangwon.ac.kr

(28~35°C) Biolog plate에 150 µl씩 접종하였다. 이를 30°C 배양기에서 24시간 배양한 후에 나타난 색깔 변화를 관찰하여 반응이 왕성한 진한 보라색, 약한 반응을 보인 연보라색, 그리고 반응을 나타내지 않은 것으로 구분하여 기록지에 표시한 후 Biolog's data base에 입력하여 균주를 동정하였다.

우수 분해능 균주의 선별

생장물과 분해능이 우수한 균주를 선별하기 위해서 phosphamidon 1000 ppm을 첨가한 최소한천배지(K₂HPO₄ 4.8 g, KH₂PO₄ 1.2 g, NH₄NO₃ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.4 g, Fe₂(SO₄)₃ 0.001 g, phosphamidon 1 g, agar 15 g, distilled water 1 l, pH 7.0)를 이용하였으며 균체가 형성될 때까지 30°C에서 배양하였고 잘 자라지 않을 경우 yeast extract(0.05 g/l)를 첨가하였다. 평판배지에 도달하여 단일 집락을 얻어 빠르고 크게 성장하는 균주만을 선별하였다.

균주의 phosphamidon 분해능 조사

선별된 균주를 glucose(10 g/l)가 첨가된 최소액체배지에 접종하여 30°C에서 5일간 진탕배양(150 rpm)한 후 원심분리(8,000×g, 20 min)하여 SP buffer(0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.0)로 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 세척한 균주를 hemocytometer를 이용하여 균체수를 측정 후 SP buffer를 이용하여 개체수가 1×10⁷ cells/ml가 되도록 희석하였다.

선별균주의 분해도 측정은 100 ml 삼각 flask에 phosphamidon 1000 ppm과 yeast extract를 첨가한 최소액체배지를 40 ml 넣고 미리 준비해둔 균주를 1×10⁷ cells/ml로 접종하여 30°C의 암소에서 150 rpm으로 15-21일간 진탕배양한 후 잔류 phosphamidon을 추출하여 정량하였으며 균주를 접종하지 않은 대조군과 균주생장 측정을 위해 yeast extract (0.05 g/l)를 첨가한 시료에서의 분해 정도를 비교하였다. 잔류 phosphamidon의 추출은 최소액체배지 40 ml을 취하여 2 g NaCl을 가하고 20 ml dichloromethane과 함께 분액깔대기에 넣어 골고루 잘 섞이도록 여러번 흔들어서 층을 분리한 후 dichloromethane층만을 받아냈다. 이와 같은 방법으로 2회 추출하여 dichloromethane층을 합하고 최종 volume을 40 ml로 맞춘 후 1 ml씩 취한 후 잔류 phosphamidon을 정량하였다(3). 잔류 phosphamidon은 Gas Chromatograph(Hewlett Packard 5890II)로 분석하는데 분석조건은 다음과 같다. Detector, NPD(Nitrogen Phosphorous Detector); Column(PTETM-5), 30 m×0.32 mm×0.25 µm; Temperature, Detector 270°C, Injector 260°C, Oven-initial 200°C, final 250°C; Temperature programming, 5°C/min; Carrier gas, high purity nitrogen; Column flow, 2.2 ml/min. 시료는 2개씩 준비하고 측정하여 그 평균치로 나타내었다.

균주의 생장측정

Phosphamidon 분해시 균주의 생장은 Lowry method(7)를 이용한 단백질 정량으로 측정하였다. Phosphamidon 분해도 측정과 동일한 조건으로 균주를 배양하면서 3~4일 간격으로 최소액체배지 500 µl를 취하여 alkaline copper reagent 500 µl, phenol reagent 2 ml과 함께 차례대로 cuvette에 넣

어 15분(retention time) 후 650 nm에서 O.D.를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

여러 토양에서 유기인계 농약에 대한 저항성 균주를 257개 분리한 후 농약을 탄소원으로 이용하는 분해세균 90균주를 다시 선별하였는데 이중 phosphamidon 분해세균은 27개 균주였다. 이 균주들을 Biolog system을 이용하여 동정한 결과는 Table 1과 같다. Gram 양성세균들은 모두 *Bacillus* 속에 속하는 종들이며 Gram 음성세균들은 다양한 종들이 나타났는데 Biolog's database와 정확히 일치하지 않는 균주들이 많았다. *Capnocytophaga*, *Ochrobactrum* 등 흔치않은 토양세균 속들과 종들이 phosphamidon 분해 분리균주의 대부분을 차지하였는데 이는 유기인계 살충체의 특이한 구조와 그 독성(8) 때문인 것으로 추정된다.

분리한 phosphamidon 분해균주중 분해능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 phosphamidon 1000 ppm을 첨가한 최소한천배지에 접종하여 배양하였다. 3일간 배양하면 집락이 육안으로 보이게 성장하는데 이때 집락이 크고 빠르게 자라는 균주를 phosphamidon 1000 ppm을 첨가한 새로운 최소한천배지에 접종하여 phosphamidon 첨가배지에서 생장물이 우수한 균주 YD-1, 7, 8, 17을 선별하였다. 이중 YD-

Table 1. List of phosphamidon-degrading bacteria isolated from various soils

Strain No.	Gram positive	Gram negative
1		# <i>Enterobacter aerogenes</i>
2		<i>Psychrobater immobilis</i>
3	# <i>Bacillus azotoformans</i>	
4	<i>Bacillus pabuli</i>	# <i>Alcaligenes faecalis ss faecalis</i>
5	# <i>Bacillus larvae</i>	
6		<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
7		<i>Acinetobacter radioresistens/genospcs 12</i>
8		<i>Acinetobacter</i>
9		# <i>Shewanella putrefaciens c</i>
10		# <i>Aeromonas DNA group 11</i>
11	<i>Bacillus brevis</i>	
12		# <i>Pseudomonas fragi</i>
13		<i>Enterobacter gergoviae</i>
15		No ID made
16		<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
17		<i>Acinetobacter</i>
18	# <i>Bacillus larvae</i>	
18		# <i>Ochrobactrum anthropi</i>
21		# <i>Ochrobactrum anthropi</i>
21		# <i>Brucella abortus biovar 2</i>
23		No ID made
24	# <i>Bacillus brevis</i>	
25		# <i>Cdc group EO-2</i>
26		
27		

No ID made: result from insufficient growth

#: the closest organism in the Biolog's database

1은 *Enterobacter aerogenes*, YD-7과 17은 *Capnocytophaga gingivalis*, YD-8은 *Acinetobacter radioresistens*로 동정되었다.

분해균주의 phosphamidon 분해능 조사

Phosphamidon 분해능이 우수한 균주를 찾기 위하여 먼저 생장량이 높았던 4가지 균주들을 phosphamidon 1000 ppm이 첨가된 최소액배지에 1×10^7 cells/ml로 접종한 후 30°C에서 15일간 진탕배양하여 잔류 phosphamidon을 분석하였다. 균주 YD-1과 7을 접종한 것은 각각 625 ppm과 642 ppm이 잔류하였으며 YD-8은 414 ppm, YD-17은 319 ppm의 잔류량을 나타내었다(Table 2). 네가지 균주중 phosphamidon 분해능이 가장 높았던 YD-17 균주를 위와 동일한 조건하에 21일간 진탕배양하면서 잔류량의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. Phosphamidon은 균주를 접종하지 않은 대조구에서도 신속한 제거가 일어났는데 일반적으로 유기인계 농약들의 잔류성은 상당히 낮으며 phosphamidon도 유사한 경향을 나타내는 것으로 보고된 바 있는데(12) 본 실험 결과에서는 배양초기 6일간은 비교적 빠르게 제거되다가 그 이후 완만한 감소 경향을 보이고 있다. 광조사가 없는 조건에서 배양하였기 때문에 대부분의 농약에서 나타날 수 있는 광분해는 대조구 시료에서 일어나지 않았으며 화학적 전환의 결과로 감소되었을 것으로 추정된다. 이에 반해 YD-17 균주를 접종한 시료에서는 배양 17일까지 지속적으로 빠른 phosphamidon의 제거가 일어나 1.29 mg phosphamidon/ml/day의 분해율을 나타내었으며 그 이후 감소율이 약간 완만해졌다. 배양 21일 후 잔류 phosphamidon의 양은 94.3 ppm으로 대조구보다 52% 높은 분해도를 나타내었다(Fig. 1). 균주 생장의 증진을 위해 yeast extract를 첨가한 시료에서는 미첨가 시료보다 약간씩 낮은 분해도를 나타내었는데 yeast extract가 기질로 이용되었기 때문에 탄소원으로서 phosphamidon의 생분해가 감소된 것으로 추정된다. 따라서 균주의 분해도를 증가시킬 수 있는 다른 생장요소에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 유기농약의 미생물분해에 대한 보고는 대부분 유기염소계 등의 난분해성 농약을 대상으로 하며(1, 2, 10) 유기인계 농약에 대해서는 연구가 그다지 많지 않아 본 실험에 이용한 균주들의 phosphamidon 분해능을 직접 비교할 수는 없었으나 유기인계 농약도 경우에 따라서는 장기간 잔류할 수 있으므로 이에 대해 높은 분해능을 가진 균주들의 탐색은 의미있는 일이 될 수 있다.

Table 2. Removal of phosphamidon after 15 days of incubation with 4 strains of degrading bacteria

strain	residual percentage
YD-1	62.5
YD-7	64.2
YD-8	41.4
YD-17	31.9

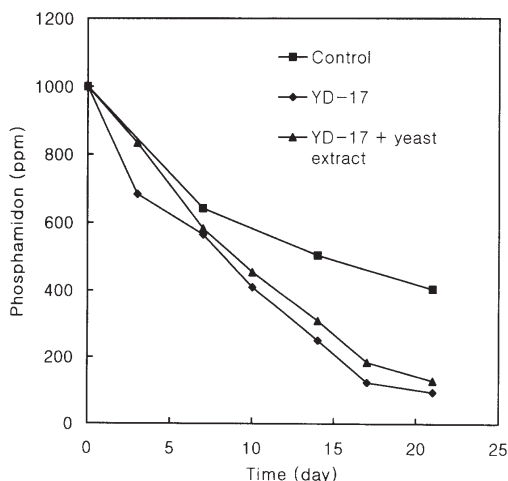


Fig. 1. Removal of phosphamidon by YD-17 strain in minimal medium supplemented with 1000 ppm phosphamidon.

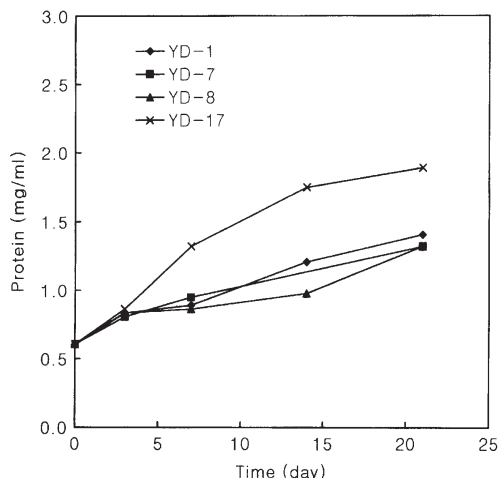


Fig. 2. Change of protein concentration in 4 bacterial strains during phosphamidon degradation.

phamidon의 양은 94.3 ppm으로 대조구보다 52% 높은 분해도를 나타내었다(Fig. 1). 균주 생장의 증진을 위해 yeast extract를 첨가한 시료에서는 미첨가 시료보다 약간씩 낮은 분해도를 나타내었는데 yeast extract가 기질로 이용되었기 때문에 탄소원으로서 phosphamidon의 생분해가 감소된 것으로 추정된다. 따라서 균주의 분해도를 증가시킬 수 있는 다른 생장요소에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 유기농약의 미생물분해에 대한 보고는 대부분 유기염소계 등의 난분해성 농약을 대상으로 하며(1, 2, 10) 유기인계 농약에 대해서는 연구가 그다지 많지 않아 본 실험에 이용한 균주들의 phosphamidon 분해능을 직접 비교할 수는 없었으나 유기인계 농약도 경우에 따라서는 장기간 잔류할 수 있으므로 이에 대해 높은 분해능을 가진 균주들의 탐색은 의미있는 일이 될 수 있다.

생분해시 균주생장 측정

Phosphamidon을 유일 탄소원으로 생장하는 분해균주에서 생장율을 측정하기 위하여 상기 phosphamidon 분해시 균체의 단백질량을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 1000 ppm의 phosphamidon에 의해 생장이 저해되지 않으며 이를 탄소원으로 이용하여 지속적인 단백질의 증가가 일어났다. Phosphamidon 제거능이 가장 높았던 YD-17 균주가 가장 높은 생장율을 나타내어 전형적인 growth-linked biodegradation(5)이 일어난 것을 볼 수 있었다. 두 번째로 분해능이 높았던 YD-8 균주는 단백질량이 분해능이 낮았던 나머지 두 균주보다도 약간 작았는데 이 균주에서는 생장과 연계되지 않은 다른 분해기작도 존재할 것으로 예상된다.

이상과 같은 생분해와 생장에 대한 실험 결과를 보면 분리된 phosphamidon 분해균주들이 고농도의 phosphamidon에 의해 저해받지 않으면서 지속적으로 생분해를 하면서 생장하는 것으로 나타났다. 따라서 이런 균주를 이용하면 농경지나 임야 등지에 살포된 유기인계 농약의 오염을 제거할

수 있을 것으로 기대된다. 이를 위해서 여러 가지 환경요인의 영향이나 토양 등의 매질환경에서의 생분해 연구 등이 더욱 필요하다.

감사의 말

이 연구는 한국학술진흥재단의 연구비(95 중점대학 부설 연구소 지원)의 지원으로 수행하였습니다. 균주 분리에 도움을 주신 상지대학교 이호용 교수님과 phosphamidon을 제공해주신 강원대학교 허장현 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

1. 이형구, 조홍범, 민병례, 최영길. 1995. Pentachlorophenol 분해세균의 분리 및 특성. *환경생물학회지* **13**, 45-52.
2. 한난숙, 손홍주, 이진, 이상준. 1997. 2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether 분해균의 분리 및 분해특성. *한국환경과학회지* **6**, 173-182.
3. 환경부. 1996. 농약잔류량시험방법. 행정간행물 12000-67634-67-9619. pp. 181-183.
4. Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, p. 445.
5. Alexander, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York, p. 8-15.
6. Datta, C., J. Gupta, and D. Sengupta. 1994. Interaction of organophosphorus insecticides phosphamidon & malathion on lipid profile & acetylcholinesterase activity in human erythrocyte membrane. *Indian J. Med. Res.* **100**, 87-89.
7. Lowry, O., N. Rosebrough, A. Parr, and R. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
8. Matolcsy, G., M. Nadasy, and V. Andriska. 1988. Pesticide Chemistry. Elsevier, New York. p. 142.
9. Saxena, S., B. Ashok, and J. Musarrat. 1997. Mutagenic and genotoxic activities of four pesticides: captan, foltaf, phosphamidon and furadan. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 1125-1136.
10. Schnoor, J. 1992. Fate of Pesticides and Chemicals in the Environment. John Wiley & Sons, New York. pp. 275-294.
11. Varty, I., and W. Yule. 1976. The persistence and fate of phosphamidon in a forest environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15**, 257-264.
12. Voss, G., and H. Geissbühler. 1971. Rate of degradation of phosphamidon and residue values. *Residue Rev.* **37**, 133-152.

(Received December 2, 1998/Accepted December 28, 1998)

ABSTRACT: Isolation, Identification, and Biodegradability of Phosphamidon-Degrading Bacteria

Yang-mi Kang, Seong-Nam Heo¹, Tae-Seok Ahn², and Hong-Gyu Song* (Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, ¹Han-gang Water Quality Research Laboratory, National Institute of Environmental Research, Yangsu-ri 627, Yangpyung-gun, Kyungki-do 476-820, Korea, ²Dept. of Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Organophosphorus insecticide phosphamidon-degrading bacteria were isolated from agricultural soils and identified using Biolog microtiter assay. All Gram-positive degrading bacterial strains belong to genus *Bacillus* and many Gram-negative bacteria were rare soil species. Among them fast growing strains on phosphamidon-containing minimal medium were selected and their biodegrading capability were measured. YD-17 which was identified as *Capnocytophaga gingivalis* showed the highest biodegradation rate. It could increase the removal of phosphamidon up to 52%. During the biodegradation continuous increase of amount of cell protein was observed, which indicated that phosphamidon was utilized as a carbon source for phosphamidon-degrading bacteria.