

반응표면분석법을 이용한 diazinon 분해 미생물 *Paenibacillus tritici* PH55-1의 생산 배지 최적화

김예은^{ID} · 송재경^{ID} · 안재형^{ID} · 안시현^{ID} · 원항연^{ID} · 김정준 · 정준휘^{ID} · 연제형 · 김다연*^{ID}

국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

Optimization of culture condition for diazinon-degrading bacterium *Paenibacillus tritici* strain PH55-1 using response surface methodology

Ye-eun Kim^{ID}, Jaekyeong Song^{ID}, Jae-Hyung Ahn^{ID}, Sihyun An^{ID}, Hang-Yeon Weon^{ID}, Jung-Jun Kim, Joon-Hui Chung^{ID}, Jehyung Yeon, and Dayeon Kim*^{ID}

Agricultural Microbiology Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

(Received August 22, 2022; Revised September 27, 2022; Accepted September 27, 2022)

The main objective of this study was to optimize the culture condition for enhanced growth of *Paenibacillus tritici* strain PH55-1 which was reported as the diazinon biodegradable microorganism having several genes related to degradation of organophosphorus pesticides in the previous study. In this study, the optimized media composition and culture conditions were explored by using the response surface methodology. Through the Plackett-Burman design (PBD), D-mannitol, defatted soy flour, and molybdenum were verified as the best medium components, and the temperature was confirmed as most important environmental factor of the growth of strain PH55-1. The central composite design (CCD) predicted the optimal concentration of D-mannitol, defatted soy flour, and molybdenum were 3.7%, 5.46%, and 2.2 mM, respectively, and the optimal temperature was 33.8°C for optimal growth of strain PH55-1. The predicted maximum bacterial growth of strain PH55-1 was 9.67×10^9 CFU/ml in the optimum condition, and the confirmed cell density by the subsequent validation experiment was 3.21×10^9 CFU/ml, which was 13.3 times higher than that of the commercial medium, Tryptic Soy Broth (TSB; 2.42×10^8 CFU/ml) as the control medium. Improving the culture condition for *P. tritici* strain PH55-1 could benefit

for the industrial application of bio-remediation technology to organophosphate pesticide-contaminated agricultural fields.

Keywords: biodegradation, culture condition, diazinon, optimization, response surface methodology

Diazinon은 유기인계 살충제 중 하나로 acetylcholine esterase의 억제제를 통해 acetylcholine을 축적시켜 신경계의 교란을 야기하는 방식으로 광범위한 살충 효과를 나타낸다(Koh *et al.*, 2009). 토양 환경 중의 diazinon의 반감기는 약 14일 미만이고 유기 염소계 살충제보다 비교적 낮은 환경 독성을 가지고 있기 때문에 과채류와 원예작물의 재배에 널리 사용되며(Kim *et al.*, 1994), diazinon의 사용이 가능한 작물로는 배추, 겨자채, 고추, 마늘, 감자, 오이, 참외 등이 있다. 하지만 토양 중 diazinon이 90%가 분해 되기까지 최대 209일 소요되는 것으로 보고되어(Ferri *et al.*, 2017), 국내 농업 환경에서 diazinon의 지속적인 사용은 생산되는 후작물에 대한 토양 내 잔류 diazinon의 전이 및 흡수를 야기할 가능성이 있다. 농산물 안전성 검사 결과, diazinon은 2005년부터 2019년까지 당귀 잎, 샐러리, 쑥갓, 열무, 취나물 등의 미등록 작물에서 잔류 부적합이 반복적으로 발생하고 있기 때문에(Han *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2022), 농산물 안전성 확보 방안이 필요한 실정이다. 이뿐만 아니라 토양 내

*For correspondence. E-mail: dayeon413@korea.kr;
Tel.: +82-63-238-3050; Fax: +82-63-238-3834

잔류 diazinon은 농업용수에 의한 용탈을 통해 수질 환경에 유입되며, 휘발 및 휘산을 통해 대기중으로 확산되어 대기 환경 오염의 원인이 될 수 있다(Eisler, 1986; Lee and Ryoo, 2012). 오염된 작물 혹은 식수의 섭취는 인간과 동물의 체내에 diazinon이 유입되는 주된 경로이며, 노출된 diazinon은 독성이 강한 diazoxon으로 산화되어 다양한 실험 동물에서 심각한 문제를 초래한다고 보고되었다(Garfitt et al., 2002; Toledo-Ibarra et al., 2016; Karimani et al., 2021).

환경 내 잔류하는 diazinon을 정화하기 위한 비 생물학적 방법으로는 광촉매를 이용한 광분해(Ryu and Oh, 2000) 및 흡착제를 통한 제거 방법 등이 있으나, 이는 불안정한 분해이며 높은 비용과 복잡한 운영과 같은 몇 가지 문제를 가지고 있다(Saleh et al., 2020). 토양 미생물을 이용한 생물학적 정화 방법은 높은 효율과 낮은 비용, 친환경적인 지속가능성 등의 장점을 가지고 있어 이에 대한 대안으로 사료된다. 특히, *Serratia marcescense*, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus serrata*, *Burkholderia* sp., *Streptomyces* sp. 등의 특정 세균(Cycoń et al., 2009; Góngora-Echeverría et al., 2020) 및 *Aspergillus niger*과 같은 곰팡이의 적절한 성장 조건을 제공하였을 때 diazinon을 효과적으로 제거할 수 있다는 연구 결과가 보고되었다(Hamad, 2020). 이러한 미생물들의 효과적인 diazinon 분해는 세포 내에 포함된 다양한 효소의 높은 활성과 가수분해 및 산화 기능을 통해 오염 물질을 독성이 낮은 단쇄 물질로 전환하며 이루어진다(Wu et al., 2021). 그러나 효소의 pH 및 온도에 대한 낮은 안정성은 유용 균주의 산업 응용 분야에서의 이용을 제한하고 있으며(Wu et al., 2021), 이를 해결하기 위해 고효율 미생물의 분리 및 대사과정에 대한 연구는 지속적으로 이루어지고 있다(Cycoń et al., 2009).

Paenibacillus 속에 포함된 종 중 일부는 식물 성장 촉진 박테리아로 이용되며 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid)을 비롯한 옥신(Auxin) 식물 호르몬을 생산하여 식물의 성장에 직접적으로 영향을 미치거나, 대기 중의 질소를 고정하여 암모니아로 환원시킨다(Weselowski et al., 2016). 뿐만 아니라, 유기산을 생산하여 광물 복합체로부터 인의 방출을 촉매하고(Das et al., 2010; Wang et al., 2012), 식물 병원균을 제어하는 독성물질을 생성하여 생물 방제의 효과를 나타낸다(Huang and Yousef, 2014). *Paenibacillus yonginensis*와 같은 일부 종은 siderophore를 생산하거나 식물의 유전자를 활성화시켜 철 결핍 반응에 관여하는 것으로 보고되었다(Wen et al., 2011). *Paenibacillus* 속과 같은 내생포자를 형성하는 유용 균주를 토양에 처리하는 것은 생존에 불리한 환경 조건에서도 균이 장기간 생존할 수 있다는 이점이 있다(Duca et al., 2014).

본 연구진은 선행 연구 과정에서 충청북도 청주시의 시설 재배지 토양에서 분리한 *P. tritici* strain PH55-1 KACC 92326P 균주를 diazinon 분해 미생물로서 분리 및 선발하였다. PH55-1 균주의 전장 유전체 분석을 통해 diazinon 분해와 관련된 효소인 Metallo- β -hydrolase를 합성하는 유전자 *gloBd*와 *ahlD*를 가지고 있음을 확인하였으며, 유기인계 농약의 분해와 관련된 인산 및 인산 디에스테르 결합을 가수분해하는 효소를 암호화하는 유전자를 가지고 있음을 보고하였다(Kim et al., 2021). 이러한 활용 가치가 높은 미생물의 산업적 응용을 위해서는 미생물 자원의 분리 및 유전적 특성을 분석해야 할 뿐만 아니라 대량 배양을 위한 최적 배양 조건을 확립하는 과정을 필요로 한다. 미생물의 성장 배지에 포함된 배지 성분의 조성 그 농도는 균체의 생산성과 밀접한 관련이 있으며(Jang et al., 2009), 온도, 교반 속도 등의 물리적 요인의 조절은 미생물의 성장에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Hwang et al., 2008).

반응 표면 분석법(response surface methodology; RSM)은 균체량의 증가를 목적으로 고려해야 하는 다양한 독립변수들의 다각적인 상호작용 결과를 통해 최소치와 최대치를 예측하고, 이를 이용하여 각 변수들의 최적값을 확인하는 효과적인 실험설계법으로 실험 경비를 절약할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Choi et al., 2009). 이전의 다양한 생물 공학 연구에서 특정 물질을 생산하기 위한 배지 최적화 수행 시 주로 사용되고 있으며(Chauhan et al., 2006; Ha et al., 2018), 유용 균주의 산업적 이용을 위한 균체량 증가를 위한 최적 배지 조건의 탐색에도 빈번하게 이용되고 있다(Kim et al., 1994; Ha et al., 2018).

본 연구에서는 농업 환경에서 diazinon을 생분해하는 유용 균주로 이용될 수 있는 *P. tritici* strain PH55-1를 농업미생물 제제로 개발하기 위해 성장량 증진에 영향을 미치는 최적 배지 조성 및 배양 조건을 선별하고, 통계학적 기법으로 반응 표면 분석법을 이용하여 최적배지 및 배양조건을 선발하였다. 또한 최적배지 개발 과정 중 PH55-1 균주의 diazinon 분해능을 검정함으로써 농약 분해 활성을 유지 또는 증진할 수 있는 탄소원과 질소원을 선발하면서 고밀도 배양을 위한 최적배지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

대상 균주 정보 및 기본 배양 조건

이전에 연구에서 *Paenibacillus tritici* PH55-1 (기탁번호

KACC 92326P, GenBank 유전체 염기서열 NZ_CP073365) 균주는 시설 재배지 토양으로부터 분리되었으며, 전장 유전체 분석을 통해 diazinon 및 유기인계 농약 분해와 관련된 효소를 암호화 하는 유전자를 가지고 있음이 확인되었다(Kim *et al.*, 2021). 본 연구진은 연구 수행을 위한 대상 균주의 기본 배양을 위해 tryptic soy broth (TSB, BD Difco™) 배지를 사용하였고, 28°C, 150 rpm 조건에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 또한, 대상 균주의 보존을 위해 20% glycerol을 첨가한 stock을 제조하여 -70°C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다.

최적 배지 개발을 위한 기본 배지 조성 탐색 및 diazinon 분해력 평가

Diazinon을 분해하는 유용미생물 *P. tritici* PH55-1의 최적 배양 배지 개발을 위해 상업용 배지인 TSB 배지(tryptone, soytone, glucose, NaCl, KH₂PO₄)와 Weselowski 등(2016)이 *Paenibacillus polymyxa* 균주 배양에 사용한 nitrogen-deficient malate (NFM) 배지의 조성을 참고하여 기본배지를 조성하였다. 질소원으로 yeast extract 1%를 첨가한 기본배지(NaCl 2 g/L, KH₂PO₄ 0.4 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L)에 각각 1% 농도의 탄소원(sucrose, lactose, D-mannitol, glycerol, D-glucose, D-xylose, D-fructose, starch)을 첨가하여 28°C, 150 rpm 조건에서 48시간 동안 진탕 배양한 후 미생물 성장량을 분석하였다. PH55-1 균주의 최적 질소원을 선별하기 위해 1% 농도의 glucose를 첨가한 기본배지에 16개의 질소원[NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, Ca(NO₃)₂, KNO₃, NaNO₃, CO(NH₂)₂, peptone, peptone from casein, polypeptone, malt extract, yeast extract, neutralized soya peptone, tryptone, soybean meal, DSF]을 각각 첨가한 후 상기와 동일한 방법으로 진행하였다. PH55-1 균주의 성장량은 미생물 성장 분석기(BioScreen C, LabSystem)를 이용하여 600 nm에서 측정된 흡광도 값을 확인하여 비교하였다. 또한 PH55-1 균주의 생장이 우수한 탄소원 또는 질소원을 함유하는 배지에서 PH55-1 균주의 diazinon 분해력을 평가하였다. 배지는 상기에서 PH55-1 균주의 성장을 위해 조성한 기본배지를 기반으로 하였으며 diazinon은 성보화학주식회사로부터 원제를 제공받아 사용하였다. Diazinon 100 mg/L를 포함하는 액체 배지에 PH55-1 균주를 접종한 후 배양 시간에 따른 diazinon의 농도 감소 여부를 평가하였다. Diazinon의 농도 변화는 Shimadzu HPLC (SCL-10Avp, Shimadzu) 및 YMC-Triart C18 컬럼(150 × 4.6 mm, YCM)과 PDA (photodiode array detector)를 이용하여 분석하였다. 이동상은 Acetonitrile:water = 7:3, 유량은 0.7 ml/min으로 하였고 192 nm에서 흡광도를 측정하였다. PH55-1 균주의 성장 및 diazinon

분해력이 우수한 최종 선별 탄소원 및 질소원으로 조성한 기본 배지에 대하여 미량원소(FeCl₃, CoCl₂, CuSO₄, MnCl₂, ZnCl₂, NaMoO₄, NiCl₂), 온도, 배지의 초기 pH, 접종원의 농도, diazinon의 농도, 교반 속도를 미생물 성장에 영향을 미치는 추가 요인으로 선정하여 각각의 영양원 및 배양 조건에 따른 PH55-1 성장량을 위와 동일한 방법으로 분석하였다.

Plackett-Burman 실험 설계법을 이용한 최적 배양 배지 성분 및 조건 선별

Paenibacillus tritici PH55-1 균주의 성장에 영향을 미치는 영양 성분 및 배양 조건을 선별하기 위한 통계적 실험 디자인 방법으로 2수준 설계법 중 하나인 Plackett-Burman design (PBD)을 사용하였으며 Design expert 13 (stat-Ease Inc.) 프로그램을 이용하여 수행되었다. PBD는 높은 값(+1)과 낮은 값(-1)의 두개의 수준으로 주 효과를 나타내는 요소를 선별하는 방법이다(Vanaja and Shobha Rani, 2007). 본 연구에서는 미생물 성장 실험 결과, 성장에 영향을 미치는 것으로 나타난 배지 성분으로 2개의 탄소원(D-mannitol, starch), 2개의 질소원(DSF, tryptone), 2개의 미량원소(MnCl₂, Na₂MoO₄)과 배양 배지의 pH, diazinon 농도, 접종원의 양이 독립변수로 선정되었으며, 배양 조건으로 온도와 교반 속도도 독립 변수에 포함되어 탄소원, 질소원, 미량원소, 배지 초기 pH, diazinon 농도, 접종량, 온도, 교반 속도 등 총 11개의 독립변수를 설정하였다. 미생물 성장 실험 결과를 기반으로 각각의 독립변수의 높은 수준(+1)과 낮은 수준(-1)을 설정하여 총 12개의 실험 구를 설정하였으며, 각 실험 구에 대한 종속변수는 28시간 배양 후의 Colony forming unit (CFU/ml)으로 측정하였다(Table 1). 각각의 CFU/ml 값은 밑이 10인 상용 로그 값으로 변환되어 분석되었다.

반응표면분석법(RSM)을 이용한 배양 조건 및 배지 성분의 농도 최적화

PBD 실험 설계 방법을 통해 diazinon 분해 미생물 PH55-1의 성장에 주된 영향을 미치는 4개의 독립변수(D-mannitol, DSF, Mo, 온도)의 최적 농도 및 조건을 탐색하기 위해 반응표면분석법(response surface methodology; RSM) 중 실험 횟수의 증가 폭을 최소화할 수 있는 실험설계법인 중심합성계획법(central composite design; CCD)을 이용하여 실험 모형을 설계하였다(Asghar *et al.*, 2014). 실험의 설계는 design expert 13 program을 이용하여 수행되었다. 선별된 4개의 독립변수는 5개의 수준(- α , -1, 0, +1, + α)으로 설정되었으며, 총 29개의 실험 구를 이용하여 28시간 배양한 후 CFU/ml 측정을 통해 종속변

Table 1. Matrix of the Plackett-Burman design (PBD) experiments on 12 variables with response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables	
		-1	+1
Temperature	X ₁ (°C)	28	35
pH	X ₂ (-)	7.5	9
Agitation speed	X ₃ (rpm)	140	160
Starch	X ₄ (%)	1	3
D-mannitol	X ₅ (%)	0.5	2
Tryptone	X ₆ (%)	1	3
DSF	X ₇ (%)	0.5	2
MnCl ₂	X ₈ (mM)	0.5	2
Na ₂ MoO ₄	X ₉ (mM)	1	3
Diazinon	X ₁₀ (ppm)	5	15
Amount of inoculum	X ₁₁ (%)	1	3

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	CFU/ml
1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	6.60E+08
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.54E+08
3	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	3.14E+08
4	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2.47E+08
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	6.10E+08
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	2.32E+09
7	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	5.66E+08
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	6.51E+08
9	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	5.58E+08
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	7.26E+08
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1.00E+09
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	1.91E+08

X₁-X₁₁ represent respective assigned variables and response values.

Table 2. Variable as medium component and culture conditions and the result of ANOVA for the Plackett-Burman design (PBD) experiment

Variable (X _i)	Effect (E _{X_i})	Coefficient Estimate (B _i)	Sum of Squares	Mean Square	F-value	p-value	Confidence level (%)
Model	-	8.7400	0.8929	0.1116	15.28	0.023	91.26
Temperature	-0.3014	-0.1507	0.2725	0.2725	37.30	0.009	99.85
Starch	0.0737	0.0369	0.0163	0.0163	2.23	0.232	99.96
D-mannitol	-0.2340	-0.1170	0.1642	0.1642	22.48	0.018	99.88
Tryptone	0.1418	0.0709	0.0603	0.0603	8.26	0.064	99.93
DSF	0.2496	0.1248	0.1869	0.1869	25.59	0.015	99.88
MnCl ₂	0.0925	0.0462	0.0256	0.0256	3.51	0.158	99.95
Na ₂ MoO ₄	0.2109	0.1054	0.1334	0.1334	18.26	0.024	99.89
Diazinon	0.1058	0.0529	0.0336	0.0336	4.60	0.121	99.95
Amount of inoculum	0.0342	0.0171	0.0035	0.0035	0.10	0.764	99.97
pH	0.0580	0.0290	0.0101	0.0101	0.30	0.615	99.97
agritation speed	-0.0527	-0.0263	0.0083	0.0083	0.25	0.646	99.98
Standard deviation			0.0855	Press			0.3506
Mean			8.7400	R-squared			0.9760
Coefficient of variation			0.9780	Adjusted R-squared			0.9122

수를 산출하였다(Table 2). 각각의 CFU/ml 값은 밑이 10인 상용 로그 값으로 변환되어 분석되었으며, PH55-1 균주의 최적 성장을 위한 4개의 독립변수(DSF 농도; X_1 , D-mannitol 농도; X_2 , Mo 농도; X_3 , 온도; X_4)와 종속변수(CFU/ml; Y)의 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

이때, Y 는 종속변수를 나타내며 본 실험에서는 CFU/ml 값을 의미한다. X_i 와 β_0 는 각각 독립변수와 상수 계수를 나타내며, β_i 와 β_{ii} 그리고 β_{ij} 는 각 독립변수 간의 상호작용 계수를 나타낸다(Seo *et al.*, 2018). 회귀 분석에 의한 모델 식은 design expert13 program으로 예측하였으며, 각각의 CFU/ml 값은 밑이 10인 상용 로그 값으로 변환되어 분석되었다. 실험 모델의 통계적 유의성은 분산분석(analysis of variance; ANOVA)을 통해 검정하였다. 회귀분석 결과를 통해 PH55-1 균주의 성장 최적화를 위해 선별된 4개의 독립변수의 최적조건을 결정하였다.

최적 배양 배지의 성능 검증

각 독립변수의 예상 최적 값은 4개의 독립변수(X_1 , X_2 , X_3 , X_4)를 실험 범위 내로 설정하고 종속변수(Y ; CFU/ml)의 회귀방정식의 값을 목표로 설정하여, 이를 신뢰 구간 95% 수준(p -value < 0.05)에서 최적 점을 통해 확인하였다. 확인된 최적

조건에서 향상된 균체 성장량을 확인하기 위하여 상용화 배지인 TSB에 600 nm 파장에서 흡광도 값이 1인 PH55-1 접종원을 3% (v/v) 접종하고 28시간 동안 배양한 후 CFU/ml을 측정하여 CCD 설계 결과로 얻은 예상 최적 배양 조건 CFU/ml과 비교하였다. 각 측정 값의 통계적인 분석은 독립 표본 t-검정(two independent sample t-test)를 통해 확인되었다.

결 과

선정 최적 탄소원 또는 질소원 함유 액체배지 내 PH55-1 균주의 diazinon 분해력

미생물은 농약 등 오염물질을 분해하고 이를 성장 및 대사 활동을 위한 에너지원으로 사용할 수 있다고 알려져 있으며(Chin-Pampillo *et al.*, 2015), 미생물의 오염물질 분해 활성은 영양원, 물리화학적 조건 등과 같은 다양한 요인들에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다(Park *et al.*, 2006). 본 연구에서는 탄소원 또는 질소원이 *P. tritici* strain PH55-1 균주의 성장 및 diazinon 분해력에 미치는 영향을 평가하였다. PH55-1 균주의 배지 조성별 성장량을 분석한 결과, 탄소원으로 starch 또는 D-mannitol을 함유하는 배지에서 흡광도는 각각 0.26과 0.23으로 다른 탄소원을 첨가했을 때보다 통계학적으로 유의하게 높은 성장량을 나타내었다($p < 0.01$) (Fig. 1). 배지 내 탄소원이 D-glucose, lactose, sucrose, D-fructose, glycerol 및

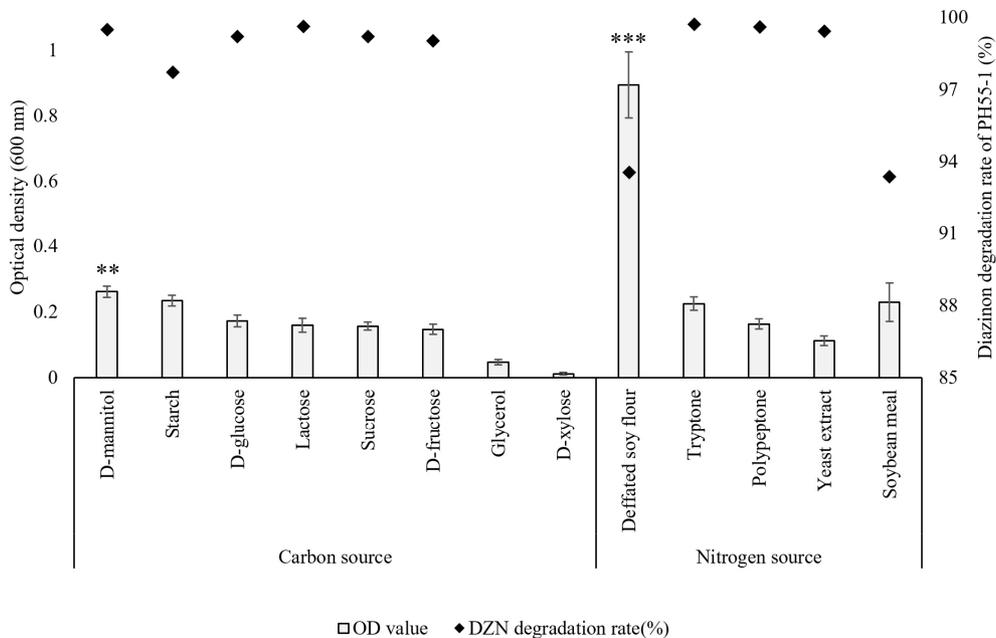


Fig. 1. The growth and diazinon degradation rate of strain PH55-1 regarding each carbon and nitrogen source.

D-xylose일 때 PH55-1 균주의 흡광도는 각각 0.17, 0.16, 0.15, 0.14, 0.04 및 0.01으로 성장량이 비교적 낮았다. 탄소원으로 starch 또는 D-mannitol을 함유하는 배지 내 PH55-1 균주의 diazinon 분해력은 접종 후 7일 째에 starch 함유 배지에서 97.8%, D-mannitol 함유 배지에서 99.5%으로 확인되었다. 따라서 PH55-1 균주의 성장량과 diazinon 분해력이 우수한 starch와 D-mannitol을 최적 탄소원으로 최종 선정하였다.

PH55-1 균주는 배지 내 질소원으로 DSF를 함유할 때 통계학적으로 유의하게 높은 성장량을 나타내었다(흡광도 0.89, $p < 0.001$). 또한 배지 내 질소원으로 tryptone을 함유할 때 흡광도는 0.23으로 다른 질소원과 비교하여 통계학적인 차이는 없었지만 비교적 성장량이 우수하였다. 그러나 질소원이 polypeptone, yeast extract 및 soybean meal일 때 흡광도는 각각 0.16, 0.11 및 0.23으로 DSF 또는 tryptone 첨가 시보다 성장량이 다소 낮았다. 질소원으로 tryptone 또는 soybean meal을 첨가했을 때 PH55-1 균주의 성장량은 통계학적으로는 유사했지만 다이아지논 분해력은 PH55-1 균주를 처리한 7일 후 각각 99.7% 및

93.4%으로 큰 폭으로 차이를 보였다. 질소원 DSF를 함유하는 배지 내 PH55-1 균주의 diazinon 분해력은 93.6%으로 확인되어(Fig. 1), 비교적 분해 활성이 저하되었지만 PH55-1 균주의 성장량을 매우 우수하게 증진하는 영양원으로 확인되었다. 따라서 최적 질소원으로서 tryptone과 DSF를 선정하였다.

Plackett-Burman 실험 설계법을 이용한 최적 배양 배지 성분 및 조건 선별

Paenibacillus tritici PH55-1은 유기인계 살충제 diazinon을 효과적으로 분해하는 균주로서 생물학적 제제로 이용될 수 있는 산업적인 가치가 있는 생물 자원이며, 유용 균주를 산업 분야에 적용 하기 위해 경제성과 효율성을 모두 갖춘 배지 조성으로 높은 균체 생산 수율을 확보하는 과정은 필수적이다(Ha et al., 2018). 본 연구에서는 총 11개의 배지 성분 및 배양 조건이 PH55-1의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 PBD를 이용하여 실험을 설계하였다. 각 영양원 별 예비 성장 실험의 결과를 기반으로 탄소원 D-mannitol과 질소원 DSF는 높은

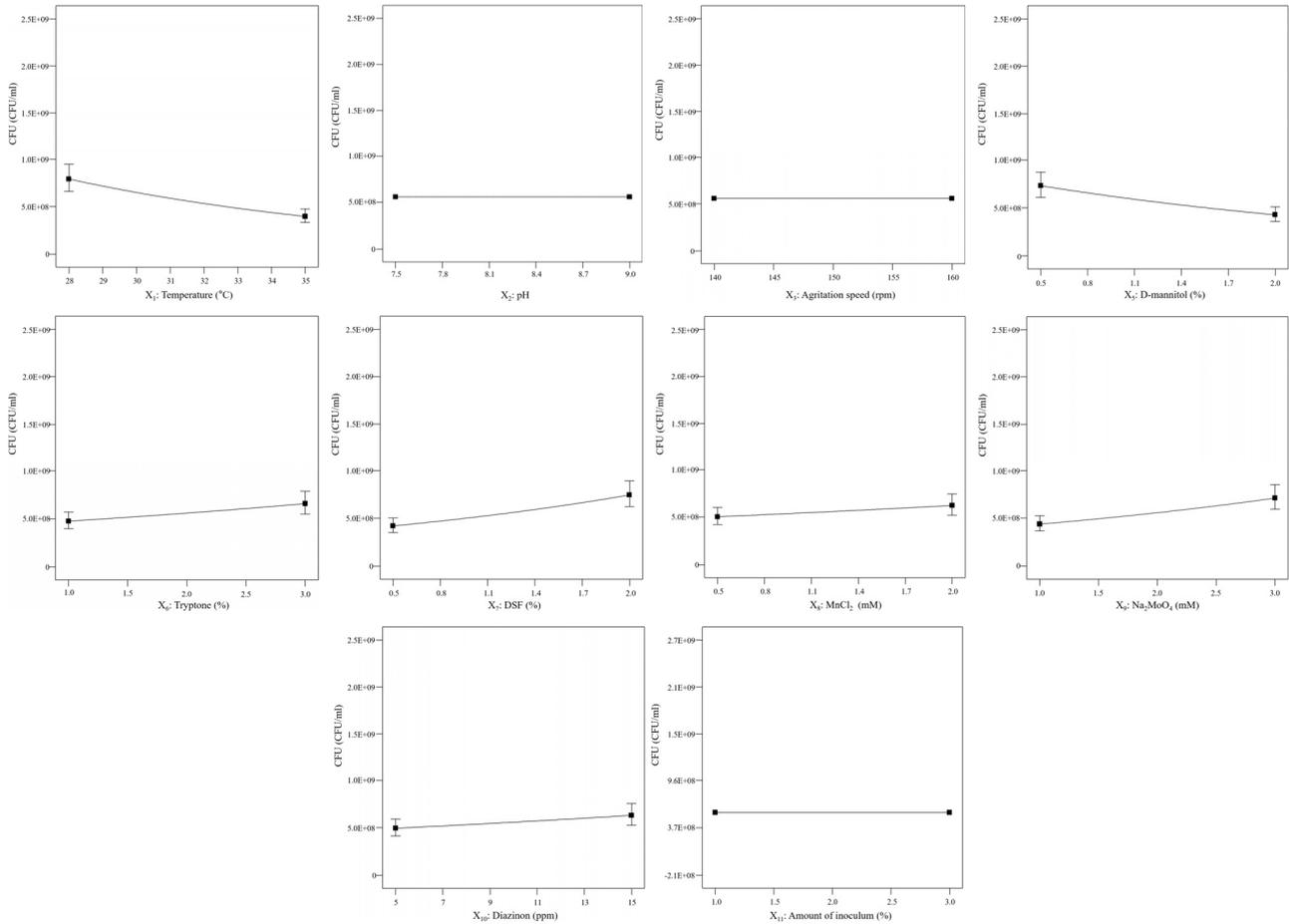


Fig. 2. Main effect graph for each variable on the growth of *P. tritici* PH55-1. The slope of lines shows the magnitude of the main effect.

수준과 낮은 수준을 0.5%와 2%로, 탄소원 starch와 질소원 tryptone은 1%와 3%로 설정하였다. 미량원소 MnCl₂와 Na₂MoO₄의 높은 수준과 낮은 수준은 0.5 mM과 2 mM 그리고 1 mM과 3 mM으로 각각 설정하였으며, diazinon의 농도는 10 ± 5 ppm, 접종량은 2 ± 1% (v/v)으로 설정하였다. 배지의 pH조건은 낮은 수준으로 7.5를, 높은 수준으로 9.0을 설정하였다. 배양 조건에 대해서는 28°C와 35°C를 온도 조건으로 설정하였으며, 150 ± 10 rpm을 교반 속도의 높은 수준과 낮은 수준으로 설정하였다. 각각의 실험 조건에서 28시간 동안 배양 후, 반응 값인 PH55-1의 CFU/ml 값을 Table 1에 나타내었으며 각 독립 변수 별 PH55-1의 생장에 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 각 독립변수들의 영향에 대한 ANOVA분석 결과는 Table 2에 나타내었으며, 이를 바탕으로 PH55-1의 생장에 영향을 미치는 탄소원으로 D-mannitol, 질소원으로 DSF, 미량 원소로 Na₂MoO₄ 그리고 배양 조건으로 온도를 선별하였다. 설정한 범위 내에서 D-mannitol의 경우 농도가 낮을수록, DSF와 Na₂MoO₄은 농도가 높을수록 균체량이 증가하였다. 배양 조건인 온도의 경우에도 낮은 값인 28°C에 가까울수록 균의 성장량이 높게 나타났다. 4개의 독립변수를 제외한 나머지 영양 성분 및 배양 조건은 유의한 영향을 미치지 않았다.

중심합성계획법(CCD)을 이용한 배양 조건 및 배지 성분의 농도 최적화

Plackett-Burman design의 통계분석 결과를 통해 총 11개의 배지 조성 및 조건 중 PH55-1의 생장에 영향을 미치는 요인으로 D-mannitol, DSF, Na₂MoO₄, 온도를 선정하였으며, 각 배지 성분들의 농도 및 배양 온도의 최적화를 위한 방법으로 CCD를 이용하여 실험을 설계하였다. 3개의 중심점을 포함한 29개의 실험 구에 대한 각각의 독립 변수의 범위와 실험 조건에서의 반응 값을 Table 3에 나타내었으며, 각 독립변수와 반응 값에 대한 회귀방정식은 아래와 같이 예측되었다.

$$\text{Log}_{10}(\text{CFU}) = 9.59 + 0.10 * X_1 + 0.03 * X_2 + 0.16 * X_3 - 0.56 * X_4 - 0.13 * X_1 * X_2 + 0.07 * X_1 * X_3 + 0.04 * X_1 * X_4 - 0.17 * X_2 * X_3 + 0.03 * X_2 * X_4 + 0.23 * X_3 * X_4 - 0.04 * X_1^2 + 0.25 * X_2^2 + 0.01 * X_3^2 - 0.48 * X_4^2$$

가정된 모델의 F-value 값은 3.37으로 실험 모델이 적합함을 확인하였으며 p-value가 0.0128으로 0.05보다 낮게 나타나 통계적으로 유의한 범위를 나타냈고 결정 계수(R-square)값이 0.7590로 1에 가까운 수치를 나타내기 때문에 가정된 실험 모델이 높은 유의성을 가지고 있음을 확인하였다. 평균에 대

한 표준편차의 백분율을 나타낸 값인 변동 계수(coefficient of variation, CV)는 6.85%로 나타나 각 변수들의 상호작용과 독립적인 영향이 안정적으로 작용함을 확인하였으며, 회귀방정식을 검증하기 위한 적합성 결여(lack of fit)의 p-value 값이

Table 3. Matrix of the central composite design (CCD) experiments on 30 variables with response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables				
		-α	-1	0	+1	+α
DSF	X ₁ (%)	2	4	6	8	10
D-mannitol	X ₂ (%)	1	2	3	4	5
Na ₂ MoO ₄	X ₃ (mM)	0	1	2	3	4
Temperature	X ₄ (°C)	22	27	32	37	42

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	CFU/ml
1	8	2	1	37	3.32E+08
2	8	4	1	37	6.94E+08
3	6	1	2	32	2.59E+10
4	8	2	1	27	1.34E+10
5	8	4	3	37	6.55E+09
6	8	2	3	37	1.07E+10
7	6	3	2	42	6.46E+05
8	4	4	1	27	2.23E+10
9	4	2	1	27	4.83E+09
10	4	2	3	37	1.40E+09
11	4	2	3	27	8.52E+09
12	4	4	1	37	1.51E+09
13	6	3	2	22	2.25E+08
14	8	4	3	27	1.08E+10
15	6	3	2	32	2.50E+09
16	2	3	2	32	7.69E+08
17	6	3	2	32	3.09E+09
18	10	3	2	32	6.50E+08
19	6	3	2	32	9.37E+09
20	6	3	2	32	1.54E+10
21	6	5	2	32	4.27E+09
22	4	4	3	37	1.75E+09
23	8	4	1	27	3.05E+10
24	6	3	4	32	1.33E+09
25	4	4	3	27	1.58E+10
26	8	2	3	27	2.80E+10
27	6	3	2	32	1.06E+09
28	6	3	2	32	3.09E+09
29	6	3	0	32	9.95E+08
30	4	2	1	37	1.09E+08

X₁-X₄ represent respective assigned variables and response values.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) result for the central composite design (CCD) experiment

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	p-value
Model	19.5500	14	1.4000	3.37	0.0128
X ₁	0.2375	1	0.2375	0.57	0.4605
X ₂	0.0179	1	0.0179	0.04	0.8381
X ₃	0.6277	1	0.6277	1.52	0.2371
X ₄	7.6200	1	7.6200	18.40	0.0006
X ₁ X ₂	0.2802	1	0.2802	0.68	0.4235
X ₁ X ₃	0.0737	1	0.0737	0.18	0.6790
X ₁ X ₄	0.0279	1	0.0279	0.07	0.7987
X ₂ X ₃	0.4720	1	0.4720	1.14	0.3025
X ₂ X ₄	0.0137	1	0.0137	0.03	0.8583
X ₃ X ₄	0.8510	1	0.8510	2.06	0.1721
X ₁₂	0.0438	1	0.0438	0.11	0.7494
X ₂₂	1.7600	1	1.7600	4.25	0.0571
X ₃₂	0.0047	1	0.0047	0.01	0.9169
X ₄₂	6.3700	1	6.3700	15.4	0.0014*
Residual	6.21	15	0.4139	-	-
Lack of Fit	5.33	10	0.533	3.03	0.1162
Pure Error	0.8787	5	0.1757	-	-
Cor Total	25.76	29	-	-	-
Standard deviation		0.6434	Press		31.97
Mean		9.39	R-squared		0.759
Coefficient of variation (%)		6.85	Adjusted R-squared		0.534

* Significant value.

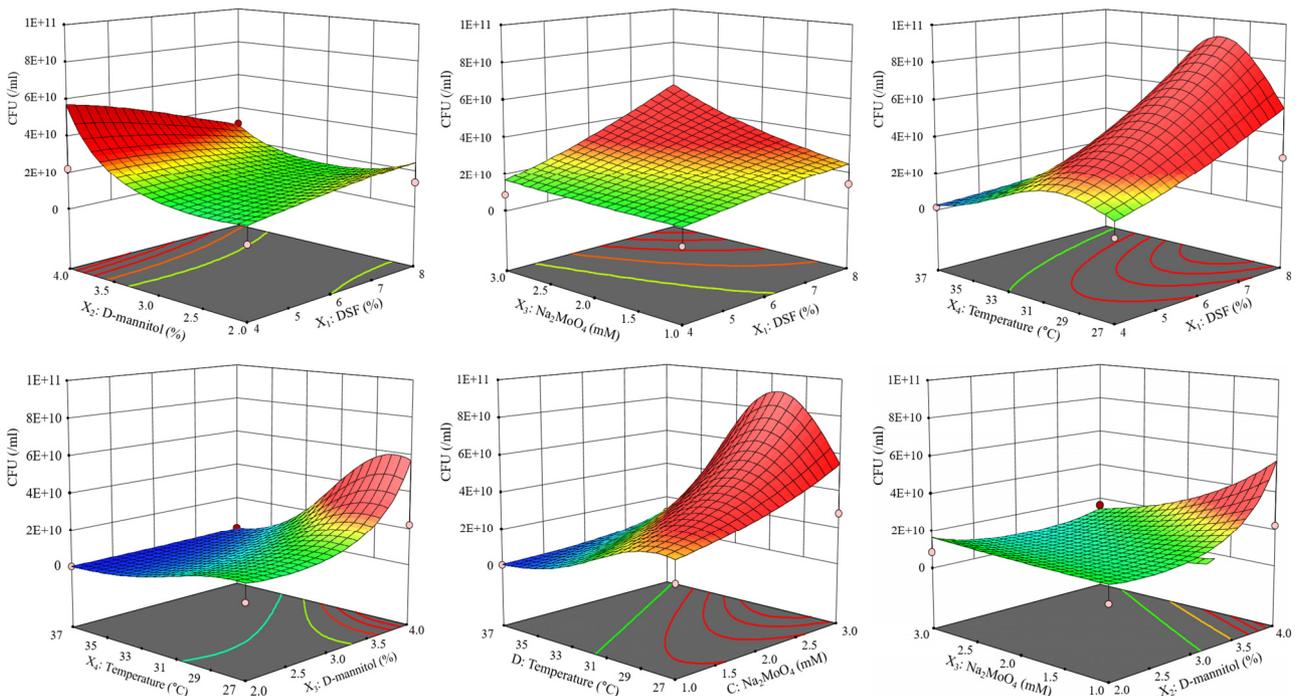


Fig. 3. The 3D graph of response surface analysis for growth of *P. tritici* PH55-1 as predicted by the quadratic model and simultaneously displayed the effect of two independent variables on bacterial growth.

0.05보다 크게 나타났으므로 실험 모델이 회귀모형을 설명하는데 적합하다고 판단하였다(Table 4). *Paenibacillus tritici* strain PH55-1의 성장 증진에 영향을 미치는 요인으로 선별된 4개의 독립변수가 다른 변수에 미치는 교호 효과와 각 독립변수의 상호작용으로 인한 균체량 변화는 반응등고선과 3차원 반응표면도로 나타내어 평가하였으며 이를 Fig. 3에 나타내었다. 설정 범위 내에서 *P. tritici* strain PH55-1의 성장에 영향을 미치는 주 요인은 배양 온도였으며, 온도가 높아질수록 균체량이 증가하다가 약 30°C 이상에서는 다시 감소하는 경향을 보였다. 선별된 배지 성분인 DSF와 Na₂MoO₄은 농도가 높아질수록 성장량이 증가하는 경향을 보이는 반면, D-mannitol은 낮은 농도에서 더 높은 성장량을 보였다. CCD를 통해 예측된 정상점을 안장점(saddle point)으로 *P. tritici* strain PH55-1의 최적 성장 조건은 D-mannitol, DSF, Na₂MoO₄의 농도가 각각 3.7%, 5.5%, 2.2 mM이고 배양 온도는 33.8°C로 예측되었고, 이때의 최대 성장량을 예상한 결과 9.67×10^9 CFU/ml로 확인되었다.

실험 모델의 검증

반응표면분석법(RSM)을 통해 산출된 최적 조건에서의 균체량을 검증하기 위해 실험모델에서 예측된 성장을 위한 최적 배지에 *P. tritici* strain PH55-1를 접종하여 배양한 후 CFU/ml 값을 확인하였다. 예상 최적조건하에서 5반복 실험을 통해 확인한 실제 균체량은 3.21×10^9 CFU/ml로 이론적인 예측값인 9.67×10^9 CFU/ml과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 반면에 이는 대조구로 사용된 상업용 배지 TSB에서의 균체량인 2.42×10^8 CFU/ml과 비교하여 13.3배 증가했으며, LB에서의 균체량인 5.90×10^7 CFU/ml과 비교하여 54.4배 증가한 값을 나타냈다($p < 0.05$).

고 찰

탄소원은 미생물의 성장에 필수적인 요소로 탄소원의 물질대사 속도는 미생물의 균체량 증식뿐만 아니라 1차 또는 2차 대사산물의 생산에 영향을 미친다(Stanbury *et al.*, 2013). D-mannitol은 당알코올의 일종으로 일반적인 포도당이 환원된 형태로, 이전의 연구에서 일부 *Paenibacillus* 및 *Clostridium* 속의 미생물의 경우 D-mannitol을 탄소원으로 이용할 때 효율적인 대사 및 성장을 보이는 것으로 보고되었다(Emtiazi *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2016). *Paenibacillus tritici*의 type strain RTAE36는 D-mannitol을 탄소원으로 사용하여 산을 생성하

는 발효과정을 대사할 수 있다고 보고되었으며(Menéndez *et al.*, 2017), 본 연구에서는 D-mannitol이 *P. tritici* strain PH55-1의 성장에 영향을 미치는 탄소원임을 통계적인 방법으로 확인하였다.

질소원 역시 미생물 성장에 필수적인 요소로서 탄소원이 없는 환경에서는 탄소원으로서 작용할 수 있으며(Hwang *et al.*, 2009), 본 연구에서 확인된 최적 질소원 DSF는 유기 질소원으로서 *Bacillus sp.*의 효소 생산을 위한 최적 질소원으로 보고되었다(Chauhan and Gupta, 2004). 뿐만 아니라 DSF는 *B. subtilis* CPA-8 strain을 이용한 생물학적 방제제의 생산 연구에서 낮은 비용으로 높은 생산성을 보이며 경제성 있는 최적 질소 공급원으로 보고된 바 있으며(Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012), 동일 속의 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 대규모 생산을 위한 배지 개발 과정에서도 대두 분말을 기반으로 한 배지를 사용할 때 높은 경제적 이점이 있다고 보고되었다(Prabakaran and Balaraman, 2006). 본 연구에서 DSF가 배지 내 질소원일 때 PH55-1 균주의 다이아지는 분해력이 다소 감소하는 경향이었지만 성장량을 우수하게 증진하는 영양원으로 확인되어 PH55-1 균주의 고밀도 배양을 위한 질소원으로 선발하였다. 한편, 배지 내 질소원이 tryptone, polypeptone 또는 yeast extract일 때 PH55-1 균주의 diazinon 분해력은 각각 99.7%, 99.6%, 및 99.4%로 나타났다. 따라서 tryptone, polypeptone 또는 yeast extract는 PH55-1 균주를 diazinon 잔류 토양에 처리할 때 분해 효능을 유지 또는 증진하기 위한 후보 보조영양원이 될 수 있다고 사료되며 이를 이용한 추가 연구가 필요하다.

Na₂MoO₄은 효소의 보조 인자로 사용되어 일부 미생물의 성장 및 대사에 필수적인 미량원소 중 하나로 보고된 바 있다(Schönheit *et al.*, 1979; Hajfarajollah *et al.*, 2014). 본 연구에서 이용한 Plackett-Burman 실험 설계는 교호작용을 배제한 여러 개의 단일 변수가 반응 값에 미치는 영향을 평가하는 통계적 기법으로, 다양한 미생물의 균체량 및 대사 산물의 생산성 증대에 필수적인 영양원을 탐색할 때 주로 사용된다(Kim *et al.*, 2006, 2016; Ha *et al.*, 2018, 2019).

미생물의 성장과 대사 과정에서 배양 온도는 매우 밀접한 관련이 있으며, 적정 수준 보다 과도하게 높거나 낮은 온도는 효소를 불활성 시키고 대사 기능을 떨어뜨려 세포의 성장을 저해한다(Kim, 2012). *Paenibacillus tritici*의 type strain RTAE36의 성장 가능 온도 범위는 15~45°C이고 최적 배양 온도는 30°C로 보고되었으며(Menéndez *et al.*, 2017), 본 연구에서 CCD 실험 설계를 통해 확인한 최적 배양 온도는 33.8°C로 이전의 연구와 유사한 결과를 나타냈다.

본 연구에서는 diazinon을 분해하는 유용 미생물 자원 *P. tritici* strain PH55-1를 상업적으로 응용하여 농업 환경 내 잔류 diazinon을 제거하기 위하여 기존의 상업 배지인 TSB보다 향상된 균체량을 얻을 수 있는 생산 배지의 최적화를 수행하였다. 본 연구 결과를 통해 확립한 최적 배지 조성 및 배양 조건을 기반으로 *Paenibacillus tritici*를 산업적으로 활용한 생물학적 제제의 개발이 가능할 것으로 사료되며, 발효조를 이용한 대량 배양 연구가 추가적으로 수행된다면 환경 친화적이고 지속 가능한 방법으로 농약으로 오염된 토양의 생물학적 정화가 가능할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 반응표면분석법을 이용하여 *Paenibacillus tritici* PH55-1 균주의 성장량 증진을 위한 최적 배지 조성 및 배양 조건을 탐색하기 위해 수행되었다. PH55-1 균주는 diazinon 분해능이 있는 균주로서, diazinon 생분해와 관련된 유전자를 갖는 미생물로 보고된 바 있다. 총 6개의 배지 조성 및 5개의 배양 조건 중 *P. tritici* PH55-1 균주의 성장에 가장 큰 영향을 미치는 주요 인자를 분석하기 위한 방법으로 Plackett-Burman design (PBD)을 설계했다. 실험 결과, 6개의 배지 조성 중 균주의 성장에 영향을 주는 탄소원으로 D-mannitol, 질소원으로 탈지 대두 분말(defatted soy flour, DSF) 그리고 미량 원소로 Na_2MoO_4 을 최종 선정하였으며, 온도를 5개의 배양 조건 중 배양에 영향을 미치는 주요인으로서 최종 선정하였다. *Paenibacillus tritici* PH55-1 균주의 배양 최적화를 위한 각 요인들의 최적조건은 중심합성계획법(central composite design; CCD)에 기반하였으며, 실험 모델에 의한 최적 조건은 D-mannitol 3.7%, 탈지 대두 분말 5.5%, Na_2MoO_4 2.2 mM, 온도는 33.8°C으로 예측되었다. 이 때 *P. tritici* PH55-1 균주의 성장량은 9.67×10^9 CFU/ml로 예측되었으며, ANOVA 분석을 통해 실험 모델의 적합성과 유의성을 확인하였다. 최종적으로 실험 모델의 검증에 위한 실제 배양 결과, 최적 배양 조건에서 균주 성장량이 실험 모델에 의해 예측된 성장량과 통계적으로 차이가 없음을 확인하였다($p > 0.05$). 또한, 최적 배지에서 PH55-1 균주의 성장량이 상용 배지인 TSB, LB와 비교하여 각각 13.3배, 54.4배 향상된 것을 검증하였다. 본 연구는 diazinon을 분해하는 균주인 *P. tritici* PH55-1을 산업적으로 이용하여 농경지 토양과 작물에서의 잔류가 문제 되고 있는 diazinon의 분해에 적용할 수 있는 연구자료로 유용하게 활용 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원에서 진행하는 화학 물질 오염 토양 개선을 위한 미생물 활용 기술 연구(과제 번호: PJ01559102) 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Asghar A, Abdul Raman A A, and Daud WMAW. 2014. A comparison of central composite design and Taguchi method for optimizing Fenton process. *ScientificWorldJournal* **2014**, 869120.
- Chauhan B and Gupta R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochem.* **39**, 2115-2122.
- Chauhan K, Trivedi U, and Patel KC. 2006. Application of response surface methodology for optimization of lactic acid production using date juice. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1410-1415.
- Chin-Pampillo JS, Carazo-Rojas E, Pérez-Rojas G, Castro-Gutiérrez V, and Rodríguez-Rodríguez CE. 2015. Accelerated biodegradation of selected nematicides in tropical crop soils from Costa Rica. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 1240-1249.
- Choi JI, Lee HS, Choi SK, Kim JH, Kim JK, Misawa N, Byun MW, and Lee JW. 2009. Optimization of medium for astaxanthin production by *Paracoccus* sp. using response surface methodology. *KSBB J.* **24**, 321-326.
- Cycoń M, Wójcik M, and Piotrowska-Seget Z. 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere* **76**, 494-501.
- Das SN, Dutta S, Kondreddy A, Chilukoti N, Pullabhotla SV, Vadlamudi S, and Podile AR. 2010. Plant growth-promoting chitinolytic *Paenibacillus elgii* responds positively to tobacco root exudates. *J. Plant Growth Regul.* **29**, 409-418.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, and Glick BR. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* **106**, 85-125.
- Eisler R. 1986. Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Laurel, Maryland, USA.
- Emtiazi G, Pooyan M, and Shamalnasab M. 2007. Cellulase activities in nitrogen fixing *Paenibacillus* isolated from soil in N-free media. *World J. Agric. Sci.* **3**, 602-608.
- Ferri P, Ramil M, Rodríguez I, Bergamasco R, Vieira AMS, and Cela

- R. 2017. Assessment of quinoxifen phototransformation pathways by liquid chromatography coupled to accurate mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 2981–2991.
- Garfitt SJ, Jones K, Mason HJ, and Cocker J. 2002. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses. *Toxicol. Lett.* **134**, 105–113.
- Góngora-Echeverría VR, García-Escalante R, Rojas-Herrera R, Giacomán-Vallejos G, and Ponce-Caballero C. 2020. Pesticide bioremediation in liquid media using a microbial consortium and bacteria-pure strains isolated from a biomixture used in agricultural areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **200**, 110734.
- Ha G, Shin SJ, Jeong SY, Yang HY, Im S, Heo JH, Yang HJ, and Jeong DY. 2019. Optimization of medium components using response surface methodology for cost-effective mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425. *J. Life Sci.* **29**, 861–870.
- Ha G, Yang HJ, Jeong SJ, Ryu MS, Kim JW, Yang HY, Shin SJ, Im S, Seo JW, Jeong SY, et al. 2018. Medium optimization for enhanced growth of *Bacillus subtilis* SRCM102046 possessing antibacterial activity using response-surface methodology. *Korean J. Food Preserv.* **25**, 613–624.
- Hajfarajollah H, Mokhtarani B, Afaghi A, and Mortaheb H. 2014. Acetic acid production by *Propionibacterium freudenreichii*, Plackett Burman Experimental Design. The 8th International Chemical Engineering Congress & Exhibition (IChEC 2014), Kish, Iran.
- Hamad MTMH. 2020. Biodegradation of diazinon by fungal strain *Aspergillus niger* MK640786 using response surface methodology. *Environ. Technol. Innov.* **18**, 100691.
- Han SH, Park SK, Kim OH, Choi YH, Seoung HJ, Lee YJ, Jung JH, Kim YH, Yu IS, Kim YK, et al. 2012. Monitoring of pesticide residues in commercial agricultural products in the northern area of Seoul, Korea. *Korean J. Pestic. Sci.* **16**, 109–120.
- Huang E and Yousef AE. 2014. The lipopeptide antibiotic paenibacterin binds to the bacterial outer membrane and exerts bactericidal activity through cytoplasmic membrane damage. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2700–2704.
- Hwang JY, Choi SH, Lee SK, and Kim SM. 2009. Optimal conditions for the production of salt-tolerant protease from *Aspergillus* sp. 101 and its characteristics. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1612–1617.
- Hwang SK, Hong JT, Jung KH, Chang BC, Hwang KS, Shin JH, Yim SP, and Yoo SK. 2008. Process optimization of dextran production by *Leuconostoc* sp. strain YSK. isolated from fermented kimchi. *J. Life Sci.* **18**, 1377–1383.
- Jang YM, Shin WS, Lee DH, Kim SY, Park CH, Jeong YS, and Chun GT. 2009. Statistical optimization of production medium for enhanced production of itaconic acid biosynthesized by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *KSBB J.* **24**, 30–40.
- Karimani A, Ramezani N, Afkhami Goli A, Nazem Shirazi MH, Nourani H, and Jafari AM. 2021. Subchronic neurotoxicity of diazinon in albino mice: impact of oxidative stress, AChE activity, and gene expression disturbances in the cerebral cortex and hippocampus on mood, spatial learning, and memory function. *Toxicol. Rep.* **8**, 1280–1288.
- Kim JW. 2012. Response surface optimization of fermentation parameters for citric acid production in solid substrate fermentation. *Korean Chem. Eng. Res.* **50**, 879–884.
- Kim S, An JH, Weon HY, Ju HJ, and Song J. 2021. Complete genome sequence of *Paenibacillus tritici* PH55-1, a diazinon-degrading soil bacterium. *Korean J. Microbiol.* **57**, 283–285.
- Kim H, Im Y, Choi J, and Han SJ. 2016. Optimization of physical factor for amylase production by *Arthrobacter* sp. by response surface methodology. *Korean Chem. Eng. Res.* **54**, 140–144.
- Kim YH, Kang SW, Lee JH, Chang HI, Yun CW, Paik HD, Kang CW, and Kim SW. 2006. Optimization of medium components for cell mass production of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 using response surface methodology. *KSBB J.* **21**, 479–483.
- Kim CK, Oh SA, Choi SS, Kim JG, Lee JK, Kim DK, Jung BK, Yuk DH, and Yun ES. 2022. Monitoring of residual pesticides in fresh-cut produce in Gangseo, Seoul. *Korean J. Food Sci. Technol.* **54**, 218–223.
- Kim SK, Oh SJ, Lee SJ, Baek YJ, and Park YH. 1994. Optimizing conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **22**, 522–530.
- Koh SC, Shin SW, Cho HD, Chon TS, Kim JS, and Lee SK. 2009. Selection of molecular biomarkers relevant to abnormal behaviors of Medaka fish (*Oryzias latipes*) caused by diazinon. *J. Environ. Toxicol.* **24**, 321–332.
- Lee HS and Ryoo KS. 2012. Removal of diazinon and heavy metals in water by benthic macroinvertebrate. *J. Environ. Sci. Int.* **21**, 57–67.
- Menéndez E, Flores-Félix JD, Mulas R, Andrés FG, Fernández-Pascual M, Peix A, and Velázquez E. 2017. *Paenibacillus tritici* sp. nov., isolated from wheat roots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 2312–2316.
- Park MR, Lee SW, Han TH, Oh BT, Shim JH, and Kim IS. 2006. A new intermediate in the degradation of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain SB5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1306–1310.
- Prabakaran G and Balaraman K. 2006. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biol. Control* **36**, 288–292.
- Ryu SP and Oh YK. 2000. The study for photodegradation of diazinon using TiO_2 photocatalyst. *J. Environ. Sci. Int.* **9**, 151–158.
- Saleh IA, Zouari N, and Al-Ghouti MA. 2020. Removal of pesticides from water and wastewater: chemical, physical and biological treatment approaches. *Environ. Technol. Innov.* **19**, 101026.
- Schönheit P, Moll J, and Thauer RK. 1979. Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **123**, 105–107.
- Seo JW, Yang HJ, Jeong SJ, Ryu MS, Ha G, Jeong SY, and Jeong DY. 2018. Characterization of *Lactobacillus brevis* SCML 432 isolated from *Meju* in *Sunchang* and optimization of its culture

- conditions by statistical methods. *Korean J. Food Preserv.* **25**, 397–410.
- Stanbury PF, Whitaker A, and Hall SJ.** 2013. Principles of Fermentation Technology, vol. 2nd, pp. 30. Elsevier, New York, USA.
- Toledo-Ibarra GA, Díaz-Resendiz KJG, Pavón-Romero L, Rojas-García AE, Medina-Díaz IM, and Girón-Pérez MI.** 2016. Effects of diazinon on the lymphocytic cholinergic system of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **176**, 58–63.
- Vanaja K and Shobha Rani R.** 2007. Design of experiments: concept and applications of Plackett Burman design. *Clin. Res. Regul. Aff.* **24**, 1–23.
- Wang Y, Shi Y, Li B, Shan C, Ibrahim M, Jabeen A, Xie G, and Sun G.** 2012. Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber plants. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**, 4567–4573.
- Wen Y, Wu X, Teng Y, Qian C, Zhan Z, Zhao Y, and Li O.** 2011. Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69. *Environ. Microbiol.* **13**, 2726–2737.
- Weselowski B, Nathoo N, Eastman AW, MacDonald J, and Yuan ZC.** 2016. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiol.* **16**, 244.
- Woo JE, Kim M, Noh HJ, Hwang N, Kim JH, Lee SY, and Jang YS.** 2016. Metabolic engineering of the genus *Clostridium* for butanol production. *Korean J. Microbiol.* **52**, 391–397.
- Wu X, Li J, Zhou Z, Lin Z, Pang S, Bhatt P, Mishra S, and Chen S.** 2021. Environmental occurrence, toxicity concerns, and degradation of diazinon using a microbial system. *Front. Microbiol.* **12**, 17286.
- Yáñez-Mendizábal V, Viñas I, Usall J, Torres R, Solsona C, and Teixidó N.** 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* **60**, 280–289.