

## 상업용 훈증제인 Cis-와 Trans-1,3-Dichloropropene(1,3-D)을 차별적으로 분해하는 Bacterial Consortium에 영향을 주는 다양한 이차 탄소원들의 효과

정 근 욱

충북대학교 건설기술연구소

(1999년 12월 2일 접수, 2000년 4월 17일 채택)

### Influence of a Variety of Second Carbon Substrates on the Bacterial Consortium Differentially Degrading Cis- and Trans-1,3-Dichloropropene(1,3-D)

Keun-Yook Chung

*Institute of Construction Technology, Chungbuk National University*

#### ABSTRACT

The differential enhanced degradation of cis- and trans-1,3-D was observed in the previous two studies performed by several researchers.<sup>1,2)</sup> This study was initiated to investigate the involvement of microorganisms in the differential enhanced degradation of the chemicals. As expected, microorganisms were responsible for the enhanced degradation. A mixed bacterial culture capable of degrading 1,3-D was isolated from an enhanced soil sample collected from a site treated with 1,3-D. Similar to the enhanced soil, the mixed culture degraded trans-1,3-D faster than cis-1,3-D. This mixed culture could not utilize cis- and trans-1,3-D as a sole source of carbon for growth. Rather, a variety of second substrates were evaluated to stimulate the differential enhanced degradation of the two isomers. As a result, the mixed culture degraded cis- and trans-1,3-D only in the presence of a suitable second substrate. Therefore, it appeared that the degradation of cis- and trans-1,3-D was a cometabolic process. Second substrates that had the capacity to stimulate the degradation included soil leachate, tryptone, tryptophan, and alanine. Other substrates tested, including soil extract, glucose, yeast extract and indole, failed to stimulate the degradation of the two isomers. The mixed culture was composed of four morphologically distinctive colonies on L-agar plates.

---

Key Words : Cis- and Trans-1,3-D, Cometabolism, Bacterial Consortium, Second Carbon Substrate (Source)

## 요 약 문

휘발성 혼증제인 cis-와 trans-1,3-D의 각각에 대한 분해력 향상은 몇몇 연구자들<sup>1,2)</sup>에 의해 이루어져왔다. 본 연구는 cis-와 trans-1,3-D에 대해 서로 다른 속도에서 각각의 분해력 증진과 미생물과의 관련성을 조사한 것으로, 미생물이 휘발성을 갖는 독성 유기화합물의 분해를 향상시키는 데 관여하고 있음이 관찰되었다. 1,3-D로 야외(field)처리되어 적용되어 왔던 토양으로부터, 1,3-D의 분해가 확인된 토양시료를 채취하여 1,3-D를 분해할 수 있는 혼합 배양세균을 분리하였다. 이렇게 분리된 혼합 배양세균은 cis-1,3-D보다는 trans-1,3-D를 더 빨리 분해시켰으나, 미생물 성장을 위한 탄소원으로 cis-와 trans-1,3-D만이 제공되었을 때는 분해가 일어나지 않는 반면, 적절한 2차 탄소원들이 존재할 때에는 cis-와 trans-1,3-D를 분해시켰다. 따라서, cis-와 trans-1,3-D의 분해는 공동대사과정(cometabolism)인 것으로 판단된다. 두 이성질체는, 토양여과액(soil leachate), tryptone, tryptophan, alanine이 포함된 시료가 2차 탄소원으로 제공되었을 때에는 분해가 이루어졌으나, 고온고압하에서 멸균시킨 토양추출액(soil extract), glucose, yeast extract 및 indole이 포함된 시료가 2차 탄소원으로 제공되었을 때에는 두 이성질체 모두를 분해시키지 못했다. 상업용 혼증제로 이용되는 cis-와 trans-1,3-D를 다른 속도로 개별적으로 분해하는 혼합 미생물군은 형태학적인 구별방법에 의해 4개의 독립된 순수 colony로 구성되어 있는 것으로 관찰되었다.

주제어 : cis- 와 trans-1,3-D, 공동대사작용, 혼합미생물군, 2차 탄소원

## 1. 서 론

가스 상태의 혼증제, methyl bromide는 일반적으로 작물 재배시 병충해 제거에 이용되는 독성화합물 물질이며 오존을 파괴시키기 때문에 USEPA(United States Environmental Protection Agency, 미국 환경청)에서는 2001년부터 사용 금지를 입법 예고하고 있으며,<sup>3)</sup> 액체 상태 혼증제인 1,3-dichloropropene(1,3-D)가 methyl bromide의 대체물질로 고려되고 있다.<sup>4)</sup> 1,3-D는 일반적으로 똑같은 비율의 cis-와 trans-1,3-D로 구성되어 Telone II라는 상표로 판매되고 있다. 이는 straw 색깔의 달콤한 냄새를 가진 휘발성을 지닌 독성 유기화합물로,<sup>5,6)</sup> cis-와 trans-1,3-D의 물리화학적 성질은 Table 1에 나타내었다. Cis-와 trans-1,3-D의 분해과정과 중간 대사물질들은 영국의 토양에서 광범위하게 연구되었고(Fig. 1),<sup>7)</sup> 그들의 연구결과에 의하면 cis-와 trans-1,3-D는 화학적으로 가수분해되어 핵심적인 역할을 하는 중간 대사물질인 cis-와 trans-3-chloroallyl alcohol(CAA)을 형성하며, 이것은

생물학적으로 서로 다른 대사물질인 cis-와 trans-3-chloroacrylic acid(CCA)로 산화되었다.

독성 유기화합물에 노출되었거나 오염되어 있던 토양은 그 화합물을 빨리 분해하는 특징을 가지고 있다. 이는 미생물들이 점차적으로 토양속의 유기화합물질에 적용되어 왔기 때문에 토양속에 존재하는 미생물들이 독성 유기화합물인 농약을 보다 빨리 분해하는 것으로 판단된다.<sup>8,9)</sup> 그러나 미생물의 성장과 에너지를 목적으로 사용되는 탄소원으로, 연결고리가 짧은 할로젠 탄화수소를 사용하는 미생물은 분리된 반면, 1,3-D를 일차 탄소원으로 사용할 수 있는 미생물은 본 연구의 대상 지역인 플로리다 모래 토양에서는 분리하지 못했다.

두 가지 연구사례에서 네덜란드 토양으로부터 1,3-D를 분해할 수 있는 순수 세균을 성공적으로 분리했다는 보고를 보여주고 있다. 첫 번째 연구<sup>10)</sup>는 12년간 1,3-D로 계속해서 처리된 토양에서 한 종류의 *Pseudomonas sp.*를 분리한 것으로, 분리된 세균의 에너지원과 성장을 위한 유일한 탄소원으로서는 1,3-D를 사용할 수 있었다고 보고하였으나, 분

Table 1. Physical and chemical properties of cis- and trans-1,3-D<sup>5,6)</sup>

Property	Cis-1,3-D	Trans-1,3-D
Chemical formula	CHCl=CHCH <sub>2</sub> Cl	
Molecular weight	110.97	
Physical state	Liquid	
Vapour pressure(mm Hg at 25°C)	43	34
Color	Colorless or straw-colored	
Odor	Sweet, penetrating	
Density(at 20°C)	1.205	1.219
Boiling point(°C)	104.1°C	112.6°C
Melting point(°C)	< -50°C	< -50°C
Water solubility(µg/mL)	2180	2320
Partition coefficient(Log Kow)	2.09	2.04
Henry's law constant (atm/gmol)	1.8 × 10 <sup>-3</sup>	1.05 × 10 <sup>-3</sup>

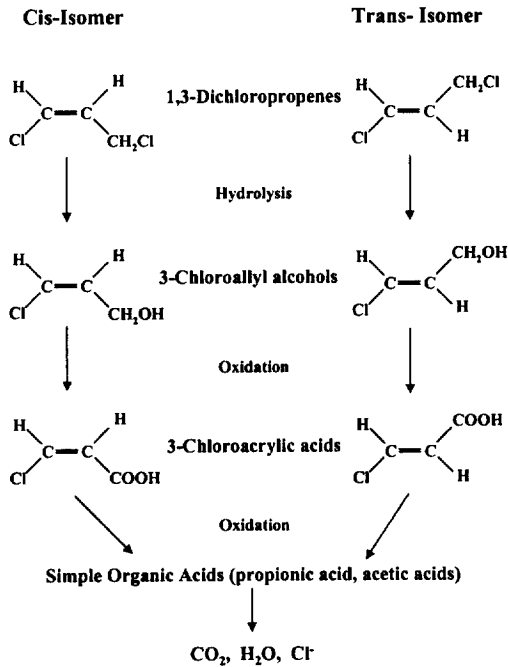


Fig. 1. Proposed degradation pathways of cis- and trans-1,3-D in soils.<sup>7)</sup>

리된 세균이 몇몇 생분해 될 수 있는 유기화합물을 포함하는 enriched 액체 배지에서 배양되었으므로 1,3-D가 유일한 탄소원은 아닌 것으로 판단된다. *Pseudomonas sp.*는 trans-1,3-D를 cis-1,3-D보

다 더 빨리 분해하였고, 이러한 사실은 분해가 증진 증진된 토양에서 trans-1,3-D가 cis-1,3-D보다 더 빨리 분해된다는 몇몇 연구자들<sup>1)</sup>의 결과와 일치한다. 두 번째 연구<sup>11)</sup>에서는 1년 동안 cis-1,3-D로 집 증적으로 처리한 소규모 지역에서 수집된 토양 sample로부터 cis-1,3-D를 유일한 탄소 및 에너지 원으로서 사용할 수 있는 6가지 순수 세균들을 분리 하였다. 이들 연구에서도 순수 분리된 세균들은 cis-1,3-D와 yeast extract가 첨가되어 배양되었기 때문에 cis-1,3-D가 유일한 탄소원으로의 역할은 하지 않은 것으로 판단된다. 이렇게 분리된 세균들은 plasmids를 가지고 있었고 몇몇 연구자들<sup>11)</sup>은 그 plasmids가 cis-1,3-D를 분해하는데 유용하다는 것을 제안했다. 분리된 세균들이 또한 trans-1,3-D를 분해시킬 수 있는 능력이 있는지의 여부는 확인되지 않았다. 토양중의 3-chloroallyl alcohol(3-CAA)은 또한 급속하게 분해된다는 것으로 밝혀졌다.<sup>12,13)</sup> 캘리포니아 토양으로부터 분리된 *Pseudomonas sp.*의 한 종류는 3-CAA를 성장에 필요한 유일한 탄소원으로 사용될 수 있음을 확인하였다.<sup>14)</sup> 몇몇 연구자들<sup>15)</sup>은 네덜란드 토양에서 세 가지 종류의 *Pseudomonas sp.*를 분리시켰으며 그 분리된 미생물들은 3-CAA와 유사 화합물인 2-chloroallyl alcohol을 성장에 필요한 유일한 탄소원으로 사용할

수 있었다. 따라서 chloroallyl alcohol들은 수많은 토양미생물들 중에서 특히 *Pseudomonas sp.*에 대해 유일한 탄소원으로 사용될 수 있는 것으로 판단된다.

본 연구는 토양미생물에 의한 cis-와 trans-1,3-D의 분해 가능성을 평가하고 cis-와 trans-1,3-D의 분해시 2차 탄소원의 영향 검토 및 cis-와 trans-1,3-D를 분해시킬 수 있는 미생물들을 분리하는 것을 목적으로 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

#### 2.1.1. 시약

Telone II(94% 상업용)와 고급 분석용 cis-와 trans-1,3-D(98~99% purity)는 미국 인디애나 주의 인디애나폴리스에 있는 DowElanco회사제품을 사용하였으며, 다른 모든 독성 유기화합물들은 이용 가능한 상업용 농약용등급과 혹은 최고등급인 분석용등급을 사용하였다.

#### 2.1.2. 배지

두 가지의 기본 배지로는 기초 무기영양배지(basal mineral-trace mineral media, BMTMM)와 토양추출액을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 다른 배지들은 두 가지의 기초 배지로부터 이용하였고, 토양추출액은 고온고압하에 멸균된 토양추출액(soil extract)<sup>16)</sup>과 여과에 의해 멸균된 토양여과액(soil leachate)의 두 가지 형태를 사용하였다. 기초 무기영양배지인 BMTMM은 4.8g의  $K_2HPO_4$ , 1.2g의  $KH_2PO_4$ , 1g의  $NH_4NO_3$ , 0.25g의  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.04g의  $CaCl_2$ , 0.001g의  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$  및 1L의 deionized  $H_2O$ 로 구성되어 있다. 이때 배지의 pH는 7.2로 조정되었다. Stock trace mineral은 2mg의  $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ , 1mg의  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 2mg의  $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ , 0.3mg의  $H_3BO_3$ , 0.4mg의  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.4mg의  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ , 그리고 1L의 deionized  $H_2O$ 로 조제하였다.<sup>17)</sup> Stock

trace mineral은 여과 후 멸균시켜, 50mL의 멸균 mineral media A(MMA)에 500 $\mu$ L를 첨가하였다.

#### 2.1.3. 토양추출액(Soil Extract)

토양추출액은 한 연구자<sup>16)</sup>가 제시한 실험절차에 의해 조제하였다. 1kg의 1,3-D로 야외처리된 토양과 1L의 deionized  $H_2O$ 를 2L의 Erlenmyer flask에 첨가하여 1시간동안 121 $^{\circ}C$ 에서 멸균시켰다. 토양입자들을 충분히 침전시킨 후 상등액을 조심스럽게 500mL의 플라스틱 병에 담아 10,000rpm에서 원심분리시켜 그 상등액을 0.22 $\mu$ m 이하의 microfilter로 여과와 멸균을 동시에 행하였다. 여과 및 멸균된 추출액들은 4 $^{\circ}C$  냉장고에 보관하여 사용하였다.

#### 2.1.4. 토양여과액(Soil Leachate)

500g의 1,3-D로 야외처리된 토양과 250mL의 deionized  $H_2O$ (2:1의 비율)를 1L의 Erlenmyer flask에 첨가하여, 10분 동안 진탕교반(shake)시켜 토양입자들을 침전시킨 후 그 상등액을 500mL의 원심분리 병에 담아 5,000rpm에서 20분간 원심분리시켰다. 상등액은 토양영양분들이 고온고압하의 열에 파괴되는 것을 방지하기 위하여 0.22 $\mu$ m 이하의 microfilter로 여과하였다. 여과액은 실내온도(25 $^{\circ}C$ )에서 보관하여 이용하였다.

#### 2.1.5. L-agar Plate와 L-broth

L-agar plate는 혼합 배양세균으로부터 순수 세균의 분리 및 purity를 확인하기 위해 사용하였다. L-agar plate의 조성은 200mL의 deionized  $H_2O$ , 2g의 tryptone, 1g의 yeast extract, 1g의 NaCl 및 4g의 agar 등으로 구성되어 있다. 액체상태의 L-broth는 상기 L-agar plate 조건에서 agar를 제외시킨 상태이다.

#### 2.1.6. Yeast Extract, Tryptone, Tryptophan, Indole, Alanine Solution

1%의 yeast extract, tryptone, tryptophan, indole, alanine solution을 deionized된  $H_2O$ 에 혼합하여, 고온고압하에서 멸균시켰다.

## 2.2. 실험 방법

### 2.2.1. Cis-와 Trans-1,3-D를 분해하는 미생물들의 농축 및 분리

기초 무기영양배지(BMTMM)는 작은 양의 분해가 증진된 토양(0.01g/mL)을 접종시 cis-와 trans-1,3-D를 분해시킬 수 있었다. 이때 이러한 현탁액은 L-agar plate위에서 streak되었으며, 각각의 colony들은 토양여과액(0.04mL/mL)이 첨가된 BMTMM에서 배양되었을 때에 cis-와 trans-1,3-D를 분해시킬 수 없었다. 반면 똑같은 배지에서 배양된 colony형태의 혼합 배양세균으로부터 액체배지에 접종된 혼합 배양세균들은 두 이성질체들을 분해시킬 수 있었다. Table 2는 1,3-D를 분해하는 2차 탄소원을 조사하기 위한 다양한 종류의 배지들을 나타내었다.

50mL 각각의 시험배지(Table 2)는 휘발성 물질의 방지 및 누출을 막기 위해 밀봉상태로 하여 250 mL의 glass flask속에 배양하였다. Cis-와 trans-1,3-D(각각 25µg/mL)가 첨가된 이후에 flask는 즉시 밀봉하였다. 광분해를 방지하기 위해 모든 플라스크들은 aluminum foil로 빛을 차단하였으며, 28°C rotary shaker에서 배양하였다. 일정한 시간간격으로 0.5mL의 세균배양액을 시료로 사용하여 glass culture tube에서 hexane용매추출하였다.

### 2.2.2. Culture 추출

10mL의 냉각된 hexane용매를 0.5mL의 세균배양액의 배지 튜브에 첨가하여 10분 동안 500rpm의 속도로 shaking하였다. Shaking후 1mL의 hexane용매추출액은 gas chromatography(GC)를 이용하여 cis-와 trans-1,3-D를 분석하였다.

### 2.2.3. GC 분석

Cis-와 trans-1,3-D 및 cis-와 trans-3-CAA의 정량을 위한 분석절차는 몇몇 연구자들<sup>11)</sup>에 의해 보고된 실험절차와 유사하였다. Cis-와 trans-1,3-D와 가수분해 산물인 cis-와 trans-3-CAA는 Perkin Elmer에서 만든 자동화 시스템의 기체크로마토그

Table 2. Various test media containing various second carbon substrates were used to screen for a second carbon substrate that had the capacity to stimulate the degradation of cis- and trans-1,3-D by the mixed culture

Medium
Basal mineral-trace mineral media(BMTMM) + enhanced soil(0.01g/mL)
BMTMM + autoclaved enhanced soil(0.01g/mL)
Soil extract
BMTMM + soil leachate(0.04mL/mL)
BMTMM + glucose(200µg/mL)
BMTMM + yeast extract(200µg/mL)
L-broth
BMTMM + L-broth(10µL/mL)
BMTMM + tryptone(200µg/mL)
BMTMM + tryptophan(200µg/mL)
BMTMM + indole(200µg/mL)
BMTMM + alanine(200µg/mL)

래피로 정량 분석하였다. 분석기는 자동시료채취기, <sup>63</sup>Ni electron capture detector(ECD), split-splitless injector, turbochrome 4 소프트웨어 및 586 컴퓨터로 구성되었다.

GC 운영인자와 조건들은 다음과 같았다. 즉, 30m × 0.25mm i.d의 컬럼, 3µm의 막 두께로 코팅된 RTX-624, 전달 기체(He)에 대한 유동속도는 분당 5mL, 보충기체인 질소와 메탄 가스(99.5%의 질소와 0.5%의 메탄)의 유동속도는 분당 30mL이었다. Injector의 온도는 150°C, detector의 온도는 375°C, oven의 온도는 1분 동안 50°C, 램프는 분당 40°C, 그리고 16분 동안 120°C에서 유지되었다. Split valve는 1,3-D의 분석을 위해 첫 1분 동안 잠겼으며, 3-CAA의 분석을 위해서는 첫 1.5분 동안 잠겼다. Cis-와 trans-1,3-D 및 cis-와 trans-3-CAA의 분석을 위해 1µL의 injection volume이 사용되었다. 이러한 조건하에서 cis-와 trans-1,3-D 및 cis-와 trans-3-CAA에 대한 체류시간은 각각 4.7, 5.0, 5.4 및 5.6분이었으며, cis-와 trans-1,3-D, cis-와 trans-3-CAA에 대한 탐지한계<sup>18,19)</sup>는

각각 0.26, 0.28, and 0.66, and 0.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

### 3. 결 과

우선 cis-와 trans-1,3-D를 분해할 수 있는 미생물을 분리하기 전 cis-와 trans-1,3-D로 처리된 토양속에 그러한 미생물이 존재하고 있는지를 사전에 파악하는 것이 무엇보다 중요하다고 여겨진다. 1,3-D는 1994년부터 1997년까지 4년 연속으로 1년에 한번 1.56kg/ha 및 1.95kg/ha의 속도로 chisel을 사용하여 야외(field)토양에 뿌려졌다.<sup>2)</sup> Fig. 2는 cis-와 trans-1,3-D로 야외 처리된 토양(treated soil), 야외 처리되지 않은 토양(untreated soil) 및 야외 처리 및 멸균된 토양(autoclaved soil)을 실험실에서 각각 99%의 높은 순도(purity)를 가진 분석용 cis-와 trans-1,3-D로 spike한 다음에 시간 경과에 따른 cis-와 trans-1,3-D의 분해속도의 차이를 나타내었다. 1,3-D로 처리된 토양에서는 야외 처리되지 않은 토양과 멸균된 토양에서보다 빠른 분해가 관찰되었다. 21일 이후에 autoclave된 토양에서보다 untreated된 토양에서 cis-와 trans-1,3-D의 분해가 증진된 것은 untreated된 토양속에 1,3-D를 분해하는 미생물이 적은 양이지만 존재했기 때문으로 사료된다. 또한 1,3-D로 처리된 토양에서 cis-와 trans-1,3-D의 분해는 trans-1,3-D가 cis-1,3-D의 경우보다 분해속도가 빠름이 관찰된 반면, 1,3-D로 처리되지 않은 경우 및 멸균된 토양에서는 그 차이가 미미하였다. 이와 같이 1,3-D로 처리된 토양속의 차별적인 분해는 토양속에 존재하는 미생물이 관여했기 때문인 것으로 판단된다.

적은 양의 멸균되지 않은 토양의 접종 배양시

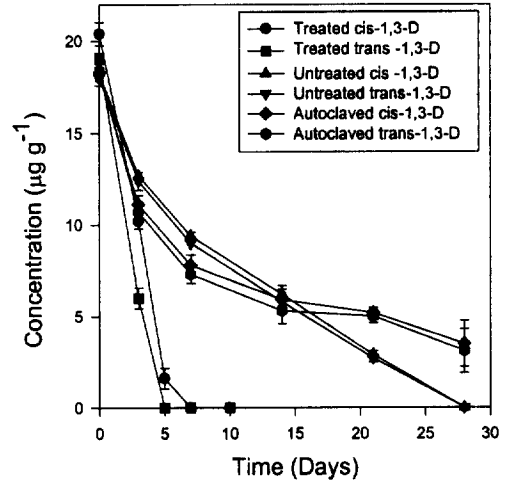


Fig. 2. Degradation of cis- and trans-1,3-D in treated, untreated(control), and autoclaved surface soils.

BMTMM(basal mineral-trace mineral media)에서 cis-와 trans-1,3-D 분해가 관찰되었으나, 고온고압하에서 멸균된 분해가 확인된 토양에서는 분해되지 않았다(Table 3). 비록 1,3-D의 분해가 일어난 멸균되지 않은 토양으로 접종된 BMTMM에서는 분해가 진행되었지만 미생물 성장이 육안으로는 관찰되지 않았다. 또한 고온고압하에서 멸균된 토양과 분해가 확인된 토양을 혼합하여 첨가된 BMTMM에서는 1,3-D가 분해되었다. 분해가 증진된 토양은 1,3-D를 분해하는 세균들 뿐 아니라 1,3-D를 분해시킬 수 있는 필수 2차 탄소원을 포함하고 있기 때문인 것으로 판단된다. 2차 탄소원이 없다면 1,3-D를 분해하는 세균은 1,3-D를 분해할 수 없을 것으로 사료된다. 또한 실험재료와 방법에서 언급했듯이 혼합 배양세균이 분리되었고 그 분리된 혼합 배양세

Table 3. Degradation of cis- and trans-1,3-D in basal mineral-trace mineral medium supplemented with nonsterile enhanced soil(10mg/mL) or autoclaved enhanced soil(10 mg/mL)

Medium	Degradation
Basal mineral-trace mineral medium(BMTMM) + nonsterile enhanced soil	+
BMTMM + autoclaved enhanced soil	-
BMTMM + autoclaved enhanced soil + nonsterile enhanced soil <sup>a</sup>	+

<sup>a</sup> Nonsterile enhanced soil(10mg/mL) was added 7 days after autoclaved soil was added

균이, 여과로 멸균된 소량의 토양여과액이 첨가된 BMTMM배지에서 배양시킬 때에는 혼합 배양세균이 1,3-D를 분해할 수 있었다. 비록 혼합 배양세균이 고온고압하에서 멸균 추출된 토양추출액(soil extract)에서 잘 자란다고 할지라도 1,3-D를 분해시키지는 못했다. 따라서 1,3-D를 분해시키는 데 필요한 2차 탄소원은 열에 의해 쉽게 파괴될 수 있는 유기화합물인 것으로 사료된다. 여과에 의해 멸균된 토양여과액(soil leachate)을 충분히 얻는다는 것은 값이 비싸고 어려운 과정이다. 또한 그 혼합 배양세균은 여과에 의해 멸균된 토양여과액이 첨가된 BMTMM배지에서 잘 자라지 못하며 1,3-D의 분해가 비교적 느리다. 우연히 적은 양의 L-broth(10 $\mu$ L/mL)가 첨가된 BMTMM배지에서 혼합 배양세균이 cis-와 trans-1,3-D를 빨리 분해시키는 것이 관찰되었고(Table 4), 혼합 배양세균은 BMTMM배지에서 잘 자라는 것으로 관찰되었다. 그러나, 고농도인 100%의 L-broth(full strength)에서 혼합 배양세균이 잘 자라도, 1,3-D의 분해는 이루어지지 않았는데, 이는 고농도의 L-broth에서는 1,3-D를 분해하는 미생물균이, 영양분이 풍부하고 고농도의 L-broth에서 성장이 빠른 다른 미생물균의 competition에 밀려 죽어가는 것으로 사료된다. 그러므로, 1,3-D를 분해하는 미생물균만을 배양시키기 위해서는 미량의 L-broth(10  $\mu$ L/mL)가 필요함을 알 수 있다. L-broth는 두 가지 유기성분인 yeast extract와 tryptone으로 구성되어 있으므로, 혼합 배양세균이 1,3-D를 분해시킬 수 있는지를 검증하기 위해 BMTMM배지에 yeast extract와 tryptone을 각각 첨가해서 실험하였다(Table 4). 실험결과 tryptone만이 1,3-D를 분해하는 것으로 나타났다. BMTMM배지에 tryptone의 주요 아미노산인 tryptophan<sup>20)</sup>이 혼합된 혼합 배양세균에서 1,3-D를 분해시킬 수 있는 능력을 가진 것으로 밝혀졌는데 tryptone보다도 더욱 더 좋은 효과를 보여 주었다. 게다가 tryptophan은 indole과 alanine으로 구성되어 있기 때문에<sup>22)</sup> 같은 BMTMM배지에 indole과 alanine을 각각 첨가해서 혼합 배양세균에 의한 1,3-D의 분해를 측정할결과 alanine만

Table 4. Screening for second carbon substrates that stimulated degradation of cis- and trans- 1,3-D by the mixed culture grown in basal mineral-trace mineral medium (BMTMM)<sup>a</sup>

Second carbon substrate	Degradation
Soil leachate(40 $\mu$ L/mL)	+
Soil extract	-
Glucose(200 $\mu$ g/mL)	-
L-broth(Full strength)	-
L-broth(10 $\mu$ g/mL)	+
Yeast extract(200 $\mu$ g/mL)	-
Tryptone(200 $\mu$ g/mL)	+
Tryptophan(200 $\mu$ g/mL)	+
Indole(200 $\mu$ g/mL)	-
Alanine(200 $\mu$ g/mL)	+

<sup>a</sup> With the exception of soil extract and full strength L-broth, the mixed culture was directly inoculated into the two media without using BMTMM

이 1,3-D를 분해시켰다(Table 4). 그러나 그 혼합 배양세균이 잘 분해되는 단순한 구조로 되어 있는 당류인 glucose가 첨가된 BMTMM배지에서 배양되었을 때는 1,3-D의 분해가 일어나지 않았다.

1,3-D는 일반적으로 aqueous media에서 화학적으로 급속히 가수분해된다.<sup>21)</sup> 가수분해 속도는 온도에 따라 차이가 있으나 일정 온도에서 pH에는 무관한 것으로 보고되고 있다. 따라서 실험대조군(control)을 28 $^{\circ}$ C로 유지되는 같은 교반기안에서 실험 배양배지와 함께 배양시켰다. 1,3-D를 분해시킬 수 있는 2차 탄소원이 존재할 때는 혼합 배양세균이 1,3-D를 2~4일 동안에 완전히 분해시켰다. 반면 실험대조군에 있는 1,3-D는 4일 후에도 60%가 분해되지 않았다. 적절한 2차 탄소원이 있는 조건에서는 혼합 배양세균이 trans-1,3-D를 cis-1,3-D보다 빨리 분해시켰다. 반면 실험대조군에 있는 두 이성질체는 같은 속도로 분해됨이 관찰되었다. 실험결과 혼합 배양세균은 형태학적인 구별방법에 의해 4개의 다른 순수 colony로 구성되어 있는 것으로 관찰되었다.

## 4. 고 찰

몇몇 연구자들<sup>1,2)</sup>의 실험결과와 같이 본 연구에서도 cis-와 trans-1,3-D를 유일한 탄소원으로 사용 하는 미생물을 1,3-D로 아외 처리된 토양에서 분리할 수 없었다. 하지만 본 연구에서는 1,3-D로 처리된 토양으로부터 cis-와 trans-1,3-D를 분해시킬 수 있는 혼합 배양세균을 분리하였고, 분리된 혼합 배양세균은 tryptone 또는 tryptophan 같은 2차 탄소원이 있는 경우에 cis-와 trans-1,3-D를 분해할 수 있었다. 따라서 이러한 분해작용은 공동대사 과정인 것으로 판단된다. Tryptophan은 tryptone의 주요 아미노산이기 때문에 이 두 가지 화합물 중의 어떤 것이라도 cis-와 trans-1,3-D를 분해하는 혼합 배양세균의 2차 탄소원으로서 사용 가능함을 알 수 있었다. 하지만 본 연구결과로부터 tryptophan이 두 가지 이성질체의 분해에 필요한 효소를 생산하기 위한 혼합 배양세균의 분해촉진 여부는 명확히 규명되지 않았다. 이는 1,3-D와 tryptophan이 구조적으로 연관이 없기 때문인데, tryptophan은 indole과 side chain인 alanine으로 구성되어 있는 반면에 1,3-D는 3개의 탄소가 연결된 짧은 연결고리를 가진 염소화된 탄화수소로 구성되어 있다. 그러나 tryptophan은 미생물에 의해 indole과 alanine으로 분해될 수 있기 때문에,<sup>22)</sup> indole과 alanine이 1,3-D를 분해시킬 수 있는지의 여부에 관해 검증할 필요가 있다고 판단되었다. Indole과 alanine을 각각 2차 탄소원으로 사용하여 1,3-D의 분해를 측정 한 결과 indole의 첨가시에는 1,3-D가 분해되지 않았고 alanine의 첨가시에는 1,3-D가 분해되었다 (Table 4). 이는 ring-compound의 구조를 가지고 있는 indole이 3개의 탄소고리를 가지고 있는 1,3-D와는 구조적으로 관련이 적기 때문에 indole이 1,3-D를 분해시켰다고는 사료되지 않으며, 그 보다는 1,3-D와 구조적으로 유사한 3개의 탄소고리를 가진 alanine에 의해 1,3-D가 분해되었다고 사료된다. 따라서 토양여과액을 2차 탄소원으로 이용할 경우 1,3-D가 분해되었기 때문에 토양여과액속에 함유되어 있는 화합물중 alanine이 포함되어 있을 것으로 판단된다. 그러나 고온고압하에서 멸균된 토양추출액(soil extract)이 있을 경우 1,3-D의 분해

가 관찰되지 않았으며, 이는 1,3-D의 분해를 위해 2차 탄소원 역할을 했던 토양여과액속의 화합물들이 열에 쉽게 파괴되는 성분들로 구성되어 있기 때문인 것으로 판단된다. Tryptophan은 열에 쉽게 파괴되거나 산성에서 가수분해되어 indole과 alanine으로 분해되며 특히 고온상태에서 가수분해속도가 빠르다고 보고되고 있다.<sup>20)</sup> 이는 위의 연구 결과를 뒷받침하고 있다. 여과에 의해 멸균된 토양여과액은 일반적으로 수많은 유기화합물로 구성되어 있으므로 다른 화합물들도 마찬가지로 1,3-D를 분해시킬 수 있는 혼합 배양세균의 2차 탄소원으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Trans-1,3-D는 분해가 증진된 토양과 혼합 배양세균에 의해서 모두 cis-1,3-D보다 빠르게 분해되었다. 따라서 혼합 배양세균은 토양에서 두 가지 이성질체의 분해에 관계되었던 것으로 판단된다. 이는 두 가지의 상이한 효소가 하나는 cis-1,3-D에 다른 하나는 trans-1,3-D에 반응하여 가수분해가 진행되었을 경우, 또는 하나의 효소가 cis-1,3-D보다 trans-1,3-D에 더 높은 효소 활성도를 가지고 가수분해 반응에 관여한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 trans-1,3-D가 미생물에 의해서 cis-1,3-D로 이성질체화 되므로 trans-1,3-D가 보다 빨리 분해될 수 있다는 가설을 내세웠지만 이 가설을 실험적으로는 입증하지 못했다. 토양에서 (S)-fluazifop가 enantiomerize되는 것으로 알려져 있다.<sup>23)</sup> 몇몇 토양 세균들은 그들의 성장을 위한 탄소원으로서 racemic 1,3-D 혹은 cis-1,3-D만을 분해시킬 수 있는 능력을 가진 것으로 보고되고 있다.<sup>10,11)</sup> 그러나 이러한 미생물들은 일반적으로 영양분이 풍부한 배지속에서 배양되었으므로, 그들의 성장을 위한 탄소원으로서 1,3-D나 cis-1,3-D만 사용하였는지는 확실치 않다. 이러한 미생물들은 2차 탄소원으로서 배지 중에 들어있는 또 다른 유기화합물들을 이용하여 1,3-D를 공동대사 시켰던 것으로 판단된다.

## 5. 결 론

상업용 훈증제로 이용되고 있는 1,3-D의 분해시



성장을 위한 유일한 탄소원으로 사용될 수 있는 미생물들은 1,3-D로 처리되었거나 처리되지 않은 토양에서 모두 분리할 수 없었으나, 처리된 토양에서 분리된 혼합 배양세균에 의해 1,3-D의 분해가 가능함을 알 수 있었다. 혼합 배양세균은 tryptone, tryptophan, alanine같은 2차 탄소원이 있을때만 1,3-D의 분해가 가능하였고, glucose, yeast extract, indole을 2차 탄소원으로 이용시에는 분해되지 않았다. 혼합 배양세균은 trans-1,3-D를 cis-1,3-D보다 더 빨리 분해시켰으며 혼합 배양세균은 형태학적인 구별 방법에 의해 4개의 다른 순수 colony로 구성되어 있는 것으로 판단된다. 이 연구에서 얻어진 연구결과를 통해서 처리된 토양에 존재하는 세균들은 공동대사(cometabolism)를 통해서 차별적으로 cis-와 trans-1,3-D를 분해시킨 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 미국 플로리다 대학교에서 수행되었던 연구논문의 일부이며 연구를 지원하여 주신 Li-Tse Ou 박사님께 감사함을 표합니다.

## 참 고 문 헌

- Ou, L. T., Chung, K. Y., Thomas, J. E., Obreza, T. A., and Dickson, D. W., "Degradation of 1,3-dichloropropene(1,3-D) in soils with different histories of field applications of 1,3-D," *J. Nematol.*, **27**, 249~257(1995).
- Chung, K. Y., Dickson, D. W., and Ou, L. T., "Differential enhanced degradation of cis- and trans-1,3-D in soils with a history of repeated field applications of 1,3-D," *J. Environ. Sci. and Health*, **B34**(5), 749~768(1999).
- Noling, J. W., and Becker, J. O., "The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide," *J. Nematol.*, **26**, 573~586 (1994).
- Anonymous, "California says, Hello, Telone," *Ag Consultant*(1995).
- DowElanco, 1,3-Dichloropropene: A profile, DowElanco, Indianapolis, IN.(1996).
- Yang, R. S. H., "1,3-Dichloropropene," *Residue Reviews*, **97**, 19~35(1986).
- Roberts, T. R., and Stoydin, G., "The degradation of (Z)- and (E)-1,3-dichloropropenes and 1,2-dichloropropenes and 1,2-dichloropropane in soil," *Pestic. Sci.*, **7**, 325~335(1976).
- Atlas, R. M. and Bartha, R., *Microbial Ecology*, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., New York, NY(1986).
- Racke, K. D., and Coates, J. R., *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*, ACS Symp. Ser. 426, American Chemical Society, Washington, D.C.(1990).
- Lebbink, G., Proper, B., and Nipshagen, A., "Accelerated degradation of 1,3-dichloropropene," *Acta Horticulturae*, **255**, 361~371 (1989).
- Verhagen, C., Smit, E., Janssen, D. B., and Van Elsas, J. D., "Bacterial dichloropropene degradation in soil: Screening of soils and involvement of plasmids carrying the dh1A gene," *Soil Biol. Biochem.*, **27**, 1547~1557(1995).
- Leistra, M., Groen, A. E., Crum, S. J. H., and Van der Pas, L. J. T., "Transformation rate of 1,3-dichloropropene and 3-chloroallyl alcohol in topsoil and subsoil material of flower-bulb fields," *Pestic. Sci.*, **31**, 197~207(1991).
- Van Dijk, H., "Dissipation rates in soil of 1,2-dichloropropane and 1,3- and 2,3-dichloropropenes," *Pestic. Sci.*, **11**, 625~632(1980).
- Belser, N. O., and Castro, C. E., "Biode-

- halogenation-The metabolism of the nematocides cis- and trans-3-chloroallyl alcohol by a bacterium isolated from soil," *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 23~26(1971).
15. Van Waarde, J. J., Kok, R., and Janssen, D. B., "Degradation of 2-chloroallyl alcohol by a *Pseudomonas* sp.," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 528~535(1993).
  16. Ou, L. T., "Interactions of microorganisms and soil during fenamiphos degradation," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **55**, 716~722(1991).
  17. Ou, L. T. and Thomas, J. E., "Influence of organic matter and soil surfaces on a bacterial consortium that mineralizes fenamiphos," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **58**, 1148~1153(1994).
  18. Hubaux, A., and Vos, G., "Decision and detection limits for linear calibration curves," *Anal. Chem.*, **42**, 849~855(1970).
  19. Ott, L., *An introduction to statistical methods and data analysis*, Wadsworth Publishing Co., Belmont, CA(1977).
  20. Difco Laboratories, *Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures*, 9th Ed., Difco Laboratories Inc., Detroit, MI(1953).
  21. McCall, P. J., "Hydrolysis of 1,3-dichloropropene in dilute aqueous solution," *Pestic. Sci.*, **19**, 235~242(1987).
  22. Mallette, M. F., Clagett, C. O., Phillips, A. T., and McCarl, R. L., *Introductory Biochemistry*, Robert E. Krieger Publishing Co., Huntington, NY(1979).
  23. Bewick, D. W., "Stereochemistry of fluazifopbutyl transformations in soil," *Pestic. Sci.*, **17**, 349~356(1986).