

파라치온 분해 세균 *Pseudomonas rhodesiae* H5의 특성

윤남경 · 박경량*

한남대학교 이과대학 미생물학과

Received June 14, 2004 / Accepted July 24, 2004

Characteristics of the Parathion Degrading *Pseudomonas rhodesiae* H5. Nam Kyung Yun and Kyeong Ryang Park*. Department of Microbiology, Hannam University, 133 Ojung-Dong, Daeduk-Ku, Daejeon 306-791, Korea – Eighty one bacterial strains of parathion degrading bacteria were isolated from soil samples that were contaminated with pesticide in Daejeon area. Among them, one bacterial strain was finally selected in media containing parathion as the sole source of carbon and energy, and this strain was identified as *Pseudomonas rhodesiae* H5 through physiological and biochemical tests, and analysis of its 16S rRNA sequence. *Pseudomonas rhodesiae* H5 was able to utilize various carbohydrates but did not utilize sorbose as sole carbon source. *Pseudomonas rhodesiae* H5 was resistance to ampicillin, spectinomycin, and mitomycin C but sensitive to kanamycin and chloramphenicol. And this strain showed high resistance up to several milligrams of heavy metals such as BaCl₂, LiCl, and MnSO₄. Optimal growth condition for temperature and pH of *P. rhodesiae* H5 was 30°C and pH 7.0, respectively. It can be presumed that *P. rhodesiae* H5 hydrolyzed an organophosphate bond of parathion, forming *p*-nitrophenol, and then metabolized via *ortho*-ring cleavage mechanism.

Key words – parathion degrading bacteria; organophosphate; *Pseudomonas rhodesiae* H5

유기인제(organophosphates) 살충제로는 파라치온(*O,O*-diethyl-*O-p*-nitrophenyl phosphorothioate), 말라치온(*O,O*-dimethyl-*S*-(1,2-dicarbetoxyethyl)dithiophosphate), 페니트로치온(*O,O*-dimethyl-*O-p*-nitro-*m*-tolyl phosphorothioate) 등이 있으며 이들은 오랫동안 전 세계적으로 널리 이용되었다. 이들 유기인제 살충제는 다른 난분해성 살충제나 제초제에 비해 비교적 분해가 빨리 진행되는 화학물질이지만 생명체에 독성을 나타내고 자연계에 축적되는 환경오염물질이기 때문에 현재는 사용이 금지되고 있으나, 최근 연구에 의하면 지하수가 살충제 오염에 방치되어 있어 아직도 이들 살충제 오염으로부터 안전하지 않다는 것을 확인해 주고 있다[13].

유기인제는 cholinesterase inhibitor (anticholinesterases insecticides)로 작용하기 때문에 자연계에 축적될 경우 생명체에 치명적인 손상을 초래할 수 있다. 이들은 신경세포의 synaptic cleft안으로 침투하여 acetylcholinesterase (AChE)의 활성부위에 있는 serine 잔기와 비가역적으로 결합함으로써 AChE의 acetylcholin 가수분해 기능을 억제시킨다[6,12,24]. 이 결과 중추신경 및 말초신경계의 synaptic cleft에 acetylcholin이 과도하게 축적되어 지속적인 choline effect를 나타낸다. 따라서 이렇게 생명체에 치명적인 유기인산계 살충제를 제거하기 위한 다양한 연구가 시도되고 있고, 최근에는 미생물을 이용한 생물분해 방법이 많이 연구되고 있다.

미생물을 이용하여 유기인제 살충제의 독성을 제거하는 생물분해 방법은 주로 유기인제 살충제를 단일 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 세균을 분리하고 이들의 특성을 밝히는 과정으로 진행되고 있다[20-23]. 지금까지 보고된 바에 의하면 파라치온을 비롯한 유기인제는 세 가지의 다른 경로를 통해 분해되는 것으로 확인되고 있으며(Fig. 1) [19]. 일반적으로 파라치온은 파라치온 hydrolase에 의해 *p*-nitrophenol과 diethylthiophosphoric acid (DETP)로 분해된다고 알려져 있다. 또 유기인산계의 분해연구의 일환으로 세균들에 의한 DETP와 *p*-nitrophenol (PNP)와 같은 주요 대사산물의 가수분해와 산화, 환원에 관한 연구도 보고되고 있다[15,18,19,26].

본 논문은 농약으로 오염된 토양에서 파라치온을 분해하는 균주를 분리, 선별, 동정하고 파라치온 분해능이 우수한 것으로 선별된 균의 생리, 생화학적 특성, 파라치온 분해능, hydrolase 활성 측정과 최적 성장 조건 등을 조사한 논문으로, 추후 유기인제 농약으로 오염된 토양과 농작물 처리에 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배지

대전 일원의 과수원, 채소밭, 논 등 농약으로 오염된 12 곳의 토양 1 g을 각각 멸균 생리식염수 100 ml이 들어 있는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 진탕한 후, 이 현탁액 100 μ l를 750 μ g/ml의 파라치온이 단일 탄소원으로 첨가된 Bushnell-Hass (2% MgSO₄, 0.2% CaCl₂, 10% KH₂PO₄, 10% (NH₄)₂HPO₄, 10% KNO₃, 0.5% FeCl₃) 최소평판배지에

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-7626, Fax : +82-42-629-8355

E-mail : krpark@hannam.ac.kr

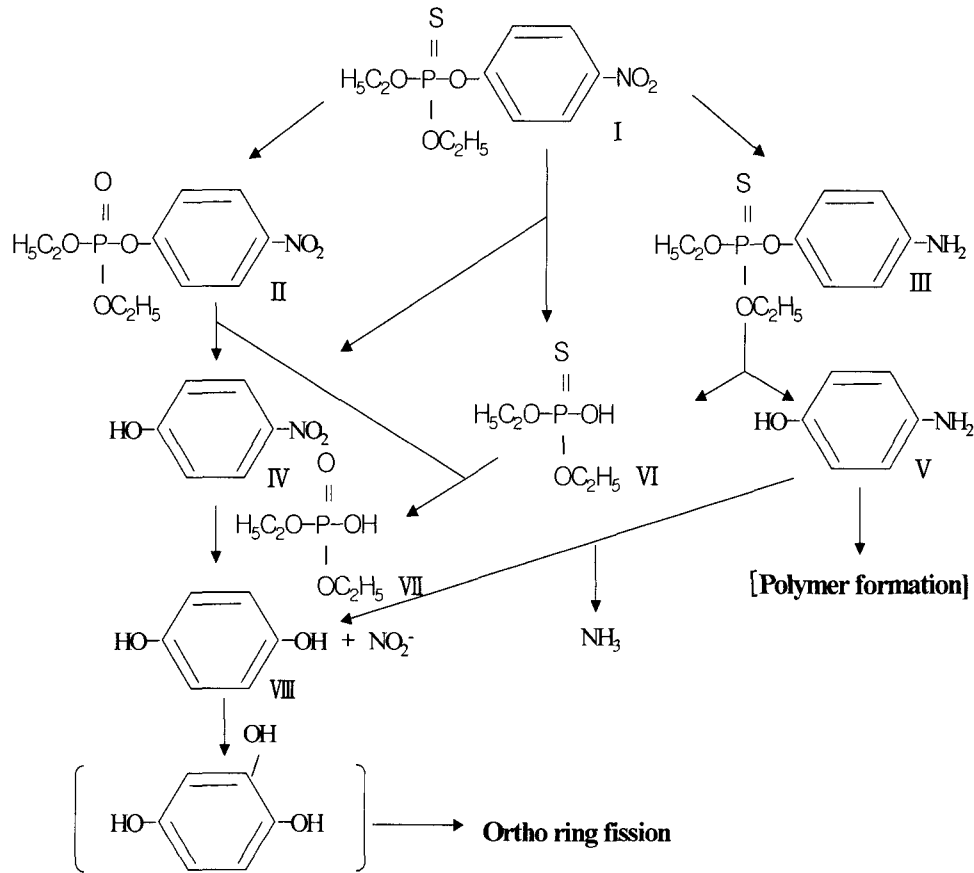


Fig. 1. Pathways of parathion (*O,O*-diethyl-*O*-*p*-nitrophenyl phosphorothioate) metabolism by bacteria [19].
 I, parathion; II, paraoxon; III, aminoparathion; IV, *p*-nitrophenol; V, *p*-aminophenol; VI, diethylthiophosphoric acid; VII, diethylphosphoric acid; VIII, hydroquinone; IX, 1,2,4-benzenetriol

접종하고 30°C에서 2-3일 배양한 다음, 단일 콜로니를 분리 하였다. 분리된 세균은 750 µg/ml 파라치온, 0.48% KH₂PO₄, 0.12% K₂HPO₄, 0.1% NH₄NO₃, 0.02% MgSO₄, 0.004% CaNO₄, 0.0001% FeSO₄의 성분으로 구성된 최소배지에 접종하여 30°C에서 배양하며 파라치온 분자내에 내포된 *p*-nitrophenol이 유리되어 노란색의 집락이 형성되는 균을 1차 선별하였고, 1차 선별 균주중 최소배지에서의 성장능과 파라치온 hydrolase 능력이 가장 우수한 한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다.

최종 선별 균주의 생리, 생화학적 특성 조사

최종 선별된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology [14,27] 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria [9]에 의거 형태, 생리 및 생화학적 특성을 조사하고, 당 이용능, 증급속, 항생제 내성 등의 균주 특성도 조사하였다.

16S rRNA 염기 서열 조사

최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별균주의

genomic DNA를 CTAB [30]방법으로 추출하고, 이 DNA를 주형으로 중합연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자 염기 서열을 조사하였다. 이때 선별 균주의 16S rDNA를 증폭하기 위해 forward primer 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'(27F)와 reverse primer 5'-GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT-3'(1492R) [3]를 사용하고(BIONEX), 염기서열은 ABI model 310 (version 3.0)을 사용하여 분석하였다. 이렇게 분석된 rDNA 염기서열은 BLAST search (www.ncbi.nih.gov/BLA-ST/)를 사용하여 비교, 분석하였다.

파라치온 분해능 측정

150 µg/ml 파라치온이 포함된 Bushnell-Hass 최소배지에 최종선별된 균을 접종하여 30°C로 조정된 배양기에서 배양 하면서 시간별로 일정량을 취하여 상온에서 10,000×g로 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 spectrophotometer에서 350 nm에서 450 nm까지 scanning하여 파라치온 분해를 측정하였으며, 이때 균을 접종하지 않은 것을 대조구로 사용하였다. 또, *p*-nitrophenol의 분해능도 같은 방법으로 측정하였다.

효소 활성 측정

파라치온은 파라치온 hydrolase에 의해 p-nitrophenol과 diethylthiophosphoric acid (DETP) 로 분해된다. 이 때 생성 되는 p-nitrophenol은 노란색을 나타내고, 이 색소는 405 nm 에서 검출된다.

파라치온 hydrolase 활성은 Walter [31]의 방법으로 측정 하였다. 파라치온 10 mg을 1 ml의 methanol에 녹이고, 0.1% Triton X-100이 첨가된 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 완충액에 첨가하여 파라치온의 최종 농도를 172 µM이 되도록 조정하여 기질용액으로 사용하였다. 효소의 활성은 시료 0.2 ml에 위의 기질 용액 2.8 ml을 첨가하여 30°C에서 1분간 반응시킨 후, 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였다.

효소활성은 파라치온을 1분동안 1 µmol의 p-nitrophenol (pNP)를 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1 unit으로 환산 하였으며, 405 nm에서 pNP (pH8.5) 의 molar extinction coefficient는 16500 M⁻¹cm⁻¹이다.

선별 균주의 성장 조건

분리균주의 배양 특성을 조사하기 위하여 온도와 pH에 따른 파라치온의 분해능과 성장을 조사하였다.

결과 및 고찰

파라치온 분해균주의 분리, 동정 및 생리·생화학적 특성

대전 근교의 농약으로 오염된 12곳의 토양에서 파라치온 을 단일 탄소원으로 이용할 수 있는 81균주를 순수 분리하였고, 분리된 균주 중 균체생육 및 분해능이 우수한 12균주를 1차 선별하였으며 그 중 파라치온 분해능이 가장 우수한 1균 주를 최종 선별하여 본 실험에 이용하였다.

최종선별된 균주는 그람 음성 간균의 운동성이 없는 호기 성 세균으로 oxidase에만 양성반응을 나타냈을 뿐, catalase를 비롯한 methyl red, Voges-Proskauer, urease, nitrate 환원성 에 음성반응을 나타냈고, starch와 esculine 가수분해, gelatin 액화, H₂S와 indole의 생성, 그리고 citrate의 이용성도 음성을 나타내었다(Table 1). 또 당 이용능을 조사한 결과 선별된 균주는 glucose와 rhamnose, 그리고 maltose를 잘 이용하였 으나, arabinose, fructose, ribose, cellobiose는 약하게 이용하 였고, sorbose는 전혀 이용하지 못하는 것으로 확인되었다 (Table 2). 항생제에 관한 내성은 ampicillin은 80 µg/ml 까 지, spectinomycin은 25 µg/ml, 그리고 mitomycin C는 2 µg/ml 까지 내성을 나타냈으나 chloramphenicol과 kanamycin에 대한 내성은 없는 것으로 확인되었다(Table 2). 중금속에 대 한 내성 시험 결과(Table 3), BaCl₂, LiCl, MnSO₄ 그리고 RbNO₃은 각각 11.83 mg/ml, 6.4 mg/ml, 11 mg/ml, 1.6 mg/ml까지의 높은 농도에서도 선별균주의 생장이 가능하

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the *Pseudomonas rhodesiae* H5

Characteristics	
Gram stain	-
Cell Shape	rod
Spore	-
Motility	-
Catalase	-
Citrate utilization	-
Esculine hydrolysis	-
Gelatin liquefaction	-
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Oxidase	+
Starch hydrolysis	-
Urease	-
Nitrate reduction	-

Table 2. Utilization of various carbohydrate and antibiotics resistance by *Pseudomonas rhodesiae* H5

Carbohydrate	Utilization	Antibiotics	MIC (µg/ml)
Fructose	+ ^w	Ampicillin	80
Arabinose	+ ^w	Chloramphenicol	0
Sorbose	-	Kanamycin	0
Ribose	+ ^w	Spectinomycin	25
Cellobiose	+ ^w	Mitomycin C	2
Maltose	+		
Glucose	+		
Rhamnose	+		

+, Growth; -, No growth; W, Weak growth.

Table 3. Susceptibility of the *Pseudomonas rhodesiae* H5 to various heavy metals

Heavy Metals	MIC (µg/ml)	Heavy Metals	MIC (µg/ml)
Ba	11830	Mn	11000
Cd	10	Ni	200
Co	100	Pb	800
Cu	250	Rb	1600
Hg	3	Zn	60
Li	6400		

였고, Pb(NO₃)₂ 800 µg/ml, CuSO₄ 250 µg/ml, NiCl₂ 200 µg/ml, CoCl₂ 100µg/ml, ZnSO₄ 60 µg/ml, CdCl₂ 10 µg/ml, HgCl₂ 3 µg/ml 까지 내성을 나타내, 조사된 모든 중금속에 대해 내성을 나타내어 토양에서 분리된 재초제 3-chlorobenzoic acid를 분해하는 미생물[11]과 같이 농약으로 오염된 지역에서 분리된 미생물들이 비교적 높은 중금속 내성이 있음을 알 수 있었다.

선별균주의 정확한 동정을 위해 16S rDNA 염기서열 분석 을 실시한 결과 *Pseudomonas rhodesiae*와 98% 일치하고, 생리,

생화학적인 조사결과를 종합한 결과로도 이 종과 일치해, 최종 선별된 균주를 *P. rhodesiae* H5로 명명하였다.

파라치온과 그 관련 화합물의 분해에 여러 종류의 미생물이 관련된다는 것은 이미 여러 논문을 통해서 보고되었다. 그중 *Flavobacterium* sp. strain ATCC 27551 [17]와 *Pseudomonas diminuta* MG [4,16,19,24,25] 등은 파라치온을 단일 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있고, 또 *Bacillus* [10], *Arthrobacter* [2,7,8], *Pseudomonas* [1,23,32], *Burkholderia* [2], *Moraxella* [28,29] 등은 p-nitrophenol을 단일 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 대표적인 미생물로 보고 되었다. 본 실험에서 분리된 균주 *P. rhodesiae* H5도 파라치온과 p-nitrophenol을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있었으며, 이는 Munnecke [19]에서 밝혀진 파라치온 대사 경로와 일치한 결과로, 본 실험에서 최종선별된 *P. rhodesiae* H5도 이 대사 경로를 이용하는 것으로 추정된다.

파라치온 hydrolase 활성 및 파라치온 분해능

P. rhodesiae H5의 파라치온 hydrolase 활성을 영양 복합배지에서 균체 생육과 함께 주기적으로 측정해본 결과(Fig. 2), 파라치온 hydrolase는 intracellular 효소이며, 이 효소는 정지기인 배양 24시간에서 최대 효소 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

Pseudomonas rhodesiae H5를 150 µg/ml 파라치온이 포함되어 있는 최소 배지에서 배양하면서 일정시간 간격으로 배양 상등액을 추출하여 spectrophotometer 상에서 350 nm에

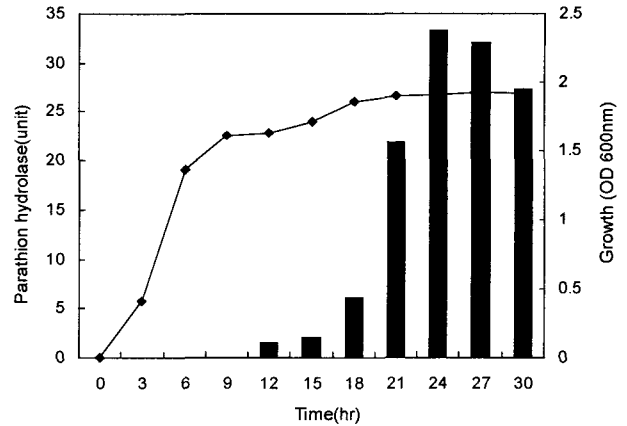


Fig. 2. Production of intracellular parathion hydrolase of *Pseudomonas rhodesiae* H5. Cultures were grown in LB-broth, —◆—, Growth (OD 600nm); ■, intracellular parathion hydrolase activity, measured in culture medium with parathion as the substrate.

서 450 nm까지 scanning하며 파라치온의 분해능을 측정 한 결과, p-nitrophenol 양은 접종후 30분 후에 최대 값을 나타냈다가 다시 감소하여 배양 6시간 이후에는 극히 일부의 p-nitrophenol 만 검출되었다(Fig. 3A). 이는 파라치온이 유일한 탄소원으로 주어졌을 때 *P. rhodesiae* H5에 의해 파라치온이 분해 되어 생성된 p-nitrophenol과 배양액을 2.5N NaOH로 처리해 파라치온이 간접적으로 가수분해 되어 p-nitrophenol가 유리된 것이 합쳐져 배양 30분후에 일시적으로 p-

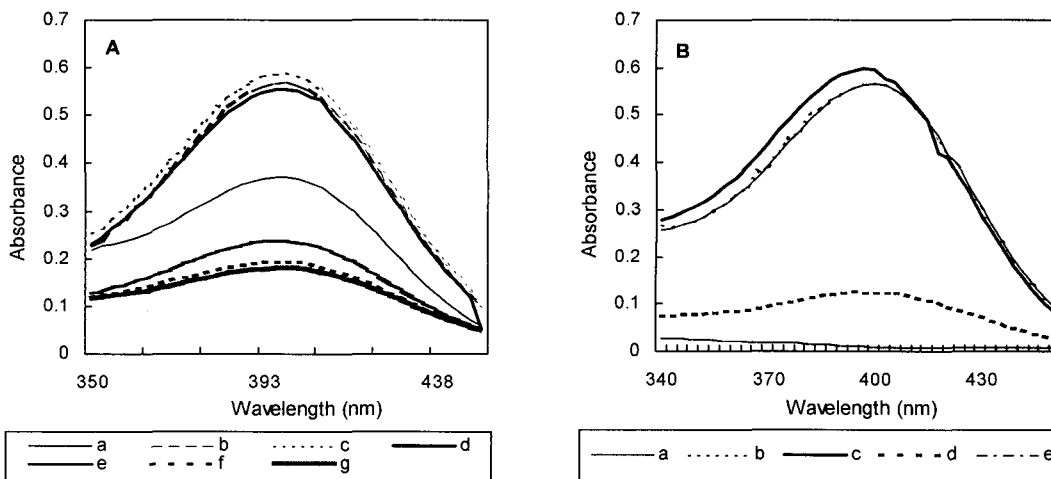


Fig. 3. (A) Disappearance of parathion. Samples were withdrawn from the culture and centrifuged, and the supernatant was treated with 2.5N NaOH. The absorption spectra of p-nitrophenol that resulted from the hydrolysis defined as follows; a, control not treated with NaOH (control spectra taken before and after the incubation were similar); b, control; c to g, samples taken at 0.5 hrs(c), 1 hrs (d), 2 hrs (e), 4 hrs (f), and 6 hrs (g) after the disappearance of the parathion from the growing culture. (B) Disappearance of p-nitrophenol. Samples were withdrawn from the culture and centrifuged, and the absorption spectra of the supernatant were recorded. The curves are defined as follows :a, 12.5 µg of p-nitrophenol per ml in minimal medium; b to d, culture samples taken at 0 hr (b), 1 hrs (c), 2 hrs (d), and 3 hrs (e) after inoculation.

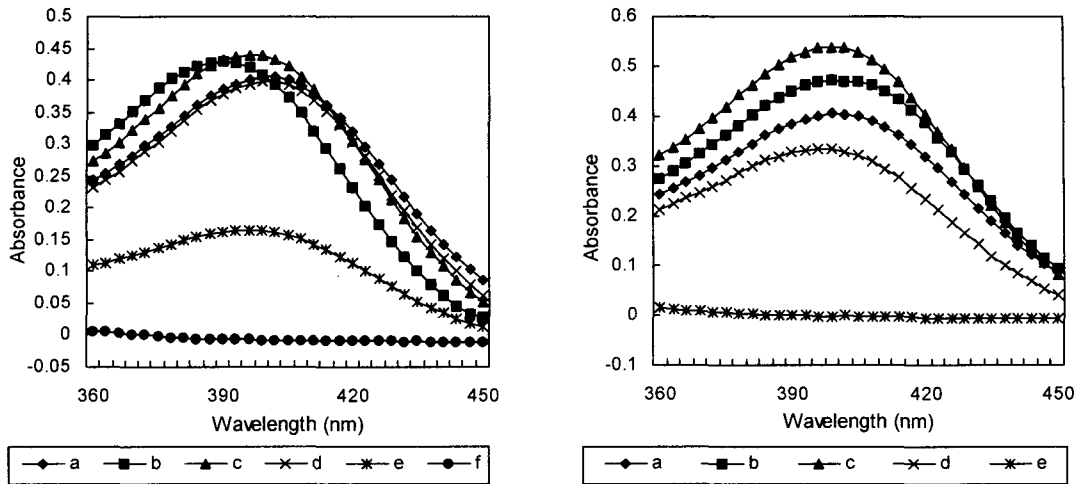


Fig. 4. Effect of temperature on degradation of *Pseudomonas rhodesiae* H5 in 150 µg/ml parathion as a sole carbon source. (A) a, control; b to f, samples taken at 0 hr(b), 2 hrs(c), 4 hrs(d), 6 hrs(e), and 8 hrs(f) after the disappearance of the parathion from the growing culture at 20°C. (B) a, control; b to f, samples taken at 0 hr(b), 2 hrs(c), 4 hrs(d), and 6 hrs (e) after the disappearance of the parathion from the growing culture at 30°C.

nitrophenol 양이 증가 되었다가, Figure 1 의 대사 경로를 이용해 p-nitrophenol은 ortho-ring cleavage를 거쳐 중심대사로 들어가므로, 분리된 균주에서 p-nitrophenol은 생성과 분해가 같이 진행됨을 추측할 수 있었다. 그리고 p-nitrophenol (12.5 µg/ml)를 유일한 단일 탄소원으로 주어진 때는 3시간 후에 완전히 분해되어(Fig. 3B) *Pseudomonas* sp. [5]가 12.5 µg/ml의 p-nitrophenol을 18시간만에 분해하는 것보다 6배나 빠른 분해 속도를 나타내, 본 실험에서 분리, 선별된 *P. rhodesiae* H5의 p-nitrophenol 분해능이 매우 우수한 균주임을 알수 있었다.

선별 균주의 최적 온도와 pH

Pseudomonas rhodesiae H5의 성장과 분해활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해서 단일 탄소원으로 파라치온이 150 µg/ml이 함유된 Bushnell-Hass 최소배지와 영양배지에 일정량의 균을 접종한 후, 20°C, 30°C 및 40°C에서 각각 배양하면서 균체량, 파라치온 분해능과 파라치온 hydrolase 활성을 측정하였다. 그 결과 40°C에서는 성장을 하지 못하였고 20°C와 30°C의 균체 생육은 거의 비슷한 양상으로 나타났으나, 30°C에서의 파라치온 hydrolase 최대활성은 배양 24시간 후였지만 20°C의 경우에는 그보다 늦은 30시간에서 최대활성을 나타냈다(data not shown).

또 파라치온의 분해능을 spectrophotometer로 측정한 결과 30°C에서 배양한 경우 파라치온이 p-nitrophenol까지 분해되는데 걸리는 시간이 6시간이었지만, 20°C의 경우에는 8시간이 소요됨을 확인하였다(Fig. 4).

또한 pH가 파라치온 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 단일 탄소원으로 파라치온 150 µg/ml이 첨가된 Bushnell-

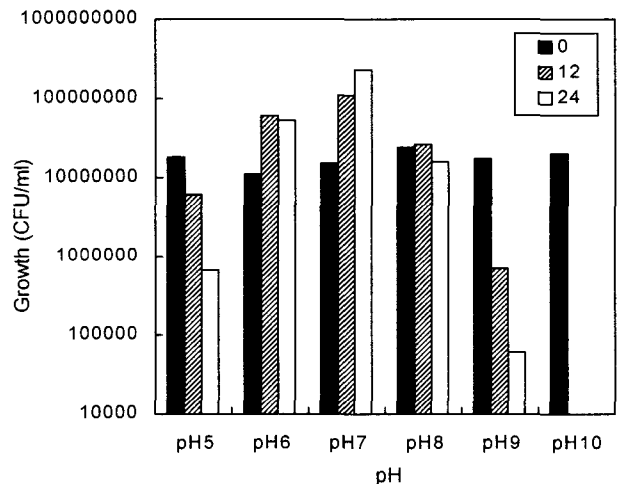


Fig. 5. Effect of pH on the cell growth of *Pseudomonas rhodesiae* H5 in 150 µg/ml parathion as a sole carbon source at 30°C.

Hass 최소배지의 초기 pH를 pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 및 pH 10 으로 각각 조정 한 후 균을 접종하여 균체량을 조사한 결과(Fig. 5), pH 7에서 배양 12시간 이후에 균체량이 10⁸ CFU/ml 까지 나타났고, pH 6과 pH 8은 배양 12시간 이후에 약 10⁷ CFU/ml까지의 균체량을 그리고 pH 5와 pH 9 과 pH 10에서는 초기 접종량 보다 배양 후에 균체량이 적어 성장하지 못함을 확인하였다. 따라서 본 실험에서 분리한 *P. rhodesiae* H5의 최대 성장 온도와 pH는 30°C와 pH 7임을 확인하였다.

본 연구는 농약에 오염되어 있는 토양으로부터 파라치온을 분해하는 균주를 선별하여 특성을 조사한 결과이며 이 균

주에서 파라치온 hydrolase 유전자를 탐색하고 재조합하여 과발현되는 균주개량이 진행되어야 할 것이다.

요 약

대전 근교의 농약으로 오염된 토양으로부터 파라치온을 분해하는 81균주를 분리한 후, 분리균주들중 파라치온 이용 능이 가장 우수한 한 균주를 최종선별하였다. 최종 선별된 균은 생리생화학적 조사와 16S rRNA 염기 서열분석 등을 통하여 *Pseudomonas rhodesiae* H5로 확인되었다. *Pseudomonas rhodesiae* H5는 다양한 당을 이용하였으나 sorbose는 이용하지 못하였다. 또 이 균주는 ampicillin, spectinomycin, mitomycin C에는 일부 저항성을 가지나 kanamycin, chloramphenicol에는 저항성을 나타내지 않았다. 그리고 BaCl₂, LiCl, MnSO₄ 등의 중금속에서는 mg/ml 단위 까지 강한 내성을 나타냈다. *Pseudomonas rhodesiae* H5의 최적 성장 조건은 30℃, pH 7.0 이었고, 이 균주는 파라치온의 organophosphate bond를 가수분해하여 p-nitrophenol를 생성한 후 ortho-ring cleavage를 거쳐 중심대사에 연결되는 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 한남대학교 교비연구비 지원에 의하여 이루어진 연구결과입니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bang, S. W. 1997. Molecular analysis of p-nitrophenol degradation by *Pseudomonas* sp. 159 pages. ENV2030. Ph.D. Thesis. Department of Environmental Sciences, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey.
- Bhushan B., A. Chauhan, S. K. Samanta and R. K. Jain 2000. Kinetics of biodegradation of p-nitrophenol by different bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 626-630.
- Borrell, N., S. G. Acinas, M. J. Figueras and A. Martinez-Murcia. 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1671-1674.
- Brown, K. A. 1980. Phosphotriesterases of *Flavobacterium* sp. *Soil Biol. biochem.* **12**, 105-112
- Chaudhry, G. R., A. N. Ali and W. B. Wheeler. 1988. Isolation of methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 288-293.
- DeFrank, J. J. and T. C. Cheng. 1991. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrolase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* **173**, 1938-1943.
- Hanne, L. F., L. L. Kirk, Appel, M, A. D. Narayan and K. K. Bains 1993. Degradation and induction specificity in Actinomycetes that degrade p-nitrophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3505-3508.
- Jain R. K., J. H. Dreisba and J. C. Spain, 1994. Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by and *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3030-3032.
- Jean F. and M. addin. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
- Kadiyala V, B. F. Smets, K. Chandran and J. C. Spain 1998. High affinity p-nitrophenol oxidation by *Bacillus sphaericus* JS905. *FEMS Microbiol Lett.* **166**, 115-120.
- Kim, G. J., S. K. Koh and K. R. Park. 1994. Characterization of bacteria degrading 3-Chlorobenzoic acid. *Kor. Jour. Microbiol.* **32**(5), 336-344.
- Koelle. G. B. 1975. Anticholinesteraseagents. In "The Pharmacological basic of Therapeutics"(L. S. Goodman and A. Gilman. end), 5th Ed, p. 445. Macmilan, New York.
- Kolpin, D. W., J. E. Barbash and R. J. Gilliom. 1998. Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assensment Program. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 558-566.
- Krieg, H., N. Tone and K. Tonomura. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. I. Williams and Wilkins
- Laveglia, J. and P.A. Dahm. 1977. Degradation of organophosphorous and carbamate insecticides in the soil and by soil microorganism. *Annu. Rev. Entomol.* **22**, 483-513.
- Mulbry, W., J. S. Karns, P. C. Kearney, J. O. Nelson, C. S. McDaniel and J. R. Wild. 1986. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by Southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 926-930.
- Mulbry, W. and Karns, J. S. 1989. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene:relationship between the gene and protein. *J. Bacteriol.* **171**, 6740-6746.
- Munnecke, D. M., L. M. Johnson, H. W. Talbot and S. Barik. 1982. Microbial metabolism and enzymology of selected pesticides, p. 1-32. In A. M. Charkrabarty (de.), Biodegradation and detosification of environmental pollutants. CRC Press. BocaRaton, Fla.
- Munnecke, D. M. and D. P. H. Hsieh. 1976. Pathways of microbial metabolism of parathion. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 63-69.
- Munnecke, D. M. and D. P. H. Hsieh. 1974. Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in aqueous media. *Appl. Microbiol.* **28**, 212-217.
- Nelson. L. M. 1982. Biologically induced hydrolysis of parathion in soil: isolation of hydrolyzing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **44**, 219-222.
- Ou. L. T. and A. Sharma. 1989. Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and a *Bacillus* sp. isolated from different soils. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1514-1518.
- Prakash D, Chauhan A and Jain R. K. 1996. Plasmid-encoded degradation of p-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **224**, 375-381.
- Serdar, C. M., D. T. Murdock and M. F. Rohde. 1989.

- Parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta* MG: subcloning, complete nucleotide sequence, and expression of the mature portion of the enzyme in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*. **7**, 1151-1155.
25. Sethunathan, N. and T. Yoshida. 1973. A *Flavobacterium* that degrades diazinon and parathion. *Can. J. Microbiol.* **19**, 873-875.
 26. Siddaramappa, R., K. P. Rajaram and N. Sethunathan. 1973. Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Appl. Microbiol.* **26**, 846-849.
 27. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. Sharpe and J. G. Holt. 1986. *Bergey's manual of Systematic bacteriology*. Vol. II. Williams and Wilkins.
 28. Spain J. C., O. Wyss and D. T. Gibson 1979. Enzymatic oxidation of p-nitrophenol in a *Moraxella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 812-819.
 29. Spain, J. C. and D. T. Gibson. 1991. Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 812-819.
 30. Wagner, S. M., B. P. Dancik, M. A. Saghai-Marrof, S. M. Williams, B. P. Dancik and R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2097-2100.
 31. Walter W. Mulbry and Jeffrey S. Karns. 1989. Purification and characterization of three parathion hydrolases from Gram-negative bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 289-293.
 32. Zylstra G. J., S. W. Bang, L. M. Newman and L. L. Perry. 2000. Microbial degradation of mononitrophenils and mononitrobenzoates. p. 145-160. In: Spain JC, Hughes JB, Knackmuss JB, editors. Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Boca Raton: Lewis Publishers.