

제초제 pendimethalin 분해 박테리아 Bacillus sp. MS202와 방사선을 이용한 분해능 향상 돌연변이체 유도



이 영 군

한국원자력연구소
방사선이용 연구부 책임연구원

1. 서론

Dinitroaniline 계열의 선택성 제초제인 pendimethalin [N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine]은 식물의 뿌리와 잎에 의해 흡수되며 발아 후에 식물의 미소관을 분열시킴으로써 잡초의 성장을 저해한다. Pendimethalin은 상대적으로 낮은 휘발성(vapour pressure, 3.0×10^{-5} mmHg at 25°C)을 가지기 때문에 토양표면에서 휘발에 의한 유실율이 낮으며 특히 토양에 시비되는 유기비료중 요소를 토양에 처리하였을 경우 요소에 의해 방출되는 유기물질이 pendimethalin과 상호작용하여 증발율을 감소시킨다. 또한 반감기가 60일 이상으로 토양 중에 머무는 기간이 길며 다른 dinitroaniline 계열의 농약들보다 광분해가 적다. 토양중에 잔류하는 pendimethalin은 독성적인 측면에서 일반적으로 보통독성을 나타내지만 생체 내에서 축적되므로 미국의 EPA(Environmental Protection Agency)에서는 이를 환경 잔류성 농약으로 분류하고 있어 환경적 측면에서 잔류성 문제를 해결하

기 위한 연구가 요구되고 있다.

많은 종류의 농약들이 자외선에 의해 분해될 수 있으며, 토양에 살포된 농약들 중 일부는 미생물에 의해 분해되어 무독성화 된다. 이러한 농약분해 미생물을 이용하는 방법은 환경친화적이고 광범위한 지역들을 효율적으로 정화할 수 있는 특징을 가지고 있다. 농약분해는 박테리아, 곰팡이 등에 속하는 다양한 미생물들이 관여하며, 이러한 미생물의 농약분해는 성장을 위한 기질로 이용하는 경우와, 에너지원으로는 이용하지 않고 단순히 농약의 분자구조를 변화시키는 경우 그리고 미생물의 활동에 의하여 주변환경이 바뀌므로써 비효소적으로 농약의 구조가 변형되는 경우 등을 들 수 있다.

미생물에 의한 pendimethalin 분해는 곰팡이(*Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces varioti*, *Rhizoctonia bataticola*) 및 세균(*Bacillus megaterium*, *Pseudomonas sp.*, *Pyricularia sp.*, *Rizobium sp.*, *Trichoderma viride*)에서 확인되었으며 분해 대사반응 순서는 혐기조건에서 부분 환원 후 호기조건에서 탈알킬화 되거나 이의 역순일 것으로 가정

되고 있다.

하지만, 현재까지의 보고만으로는 미생물에 의한 pendimethalin의 분해 대사반응의 경로를 총체적으로 이해하기에는 자료가 많이 부족한 실정이다.

본 연구에서는 호기조건에서 pendimethalin의 $-NO_2$ 잔기가 $-NH_2$ 잔기로의 부분환원이 우선되는 분해경로를 지닌 pendimethalin 분해 박테리아 *Bacillus* sp. MS202를 새롭게 분리하였다. 또한, pendimethalin 분해 대사 관련 유전자 연구와 pendimethalin 오염토양복원 미생물제제로 활용하기 위하여 pendimethalin 분해능이 향상된 안정적 돌연변이체들을 방사선 (gamma radiation)을 이용하여 유도하였다.

2. Pendimethalin 분해 박테리아 *Bacillus* sp. MS202

마산지역 토양에서 분리한 박테리아로부터 pendimethalin (1,000mg/l)이 함유된 고체배지에서 투명대를 형성하는 분해미생물을 분리하여 API CHB 50 kit, 16S rDNA 서열 비교, FAME (Fatty acid methyl ester) 분석을 통해 *Bacillus* sp. MS202로 명명하였다. *Bacillus* sp. MS202는 pendimethalin으로부터 단일 분해산물 (M1)을 생성하며, 이동상으로 hexan:diethyl ether (3:1)를 사용하여 TLC를 수행하였을 때 Rf값은 pendimethalin은 0.70이고 M1은 0.37이었다. GC분석 시 배출시간은 pendimethalin은 18.5분이고 M1은 16.5분이었다. GC-MS (Agilent 6890, USA, HP-1 Capillary

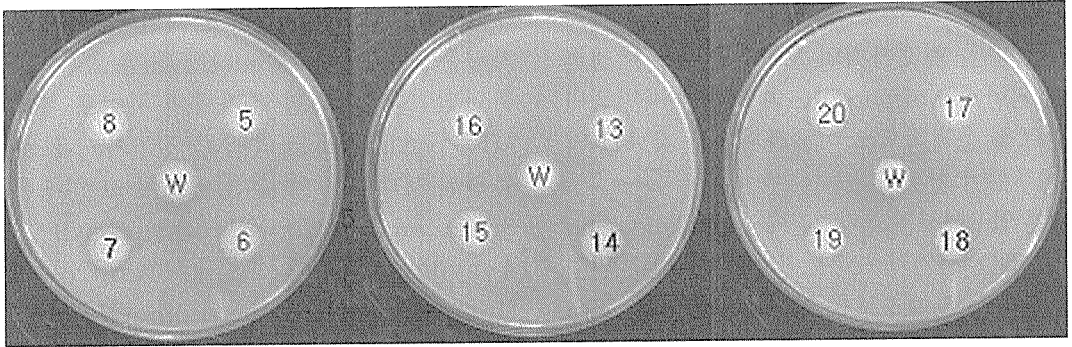
Column, FID Detector) 분석결과 M1의 분자량은 251이며 pendimethalin은 280으로 확인되었다. 이러한 분자량의 차이로 부터 M1은 pendimethalin의 $-NO_2$ 잔기가 $-NH_2$ 로 환원된 형태임을 알 수 있었으며 그 명칭은 6-amino-2-nitro-N(1-ethylpropyl)-3,4-xylylidine 혹은 2-amino-6-nitro-N(1-ethylpropyl)-3,4-xylylidine이다. 이러한 결과는 기존의 미생물에 의한 pendimethalin의 분해경로로 가정되어진 호기조건에서 탈인산화 반응이 먼저 일어난다는 연구결과와 상이하다.

따라서 pendimethalin의 분해대사는 미생물의 종과 배양조건에 따라 매우 상이함을 알 수 있다.

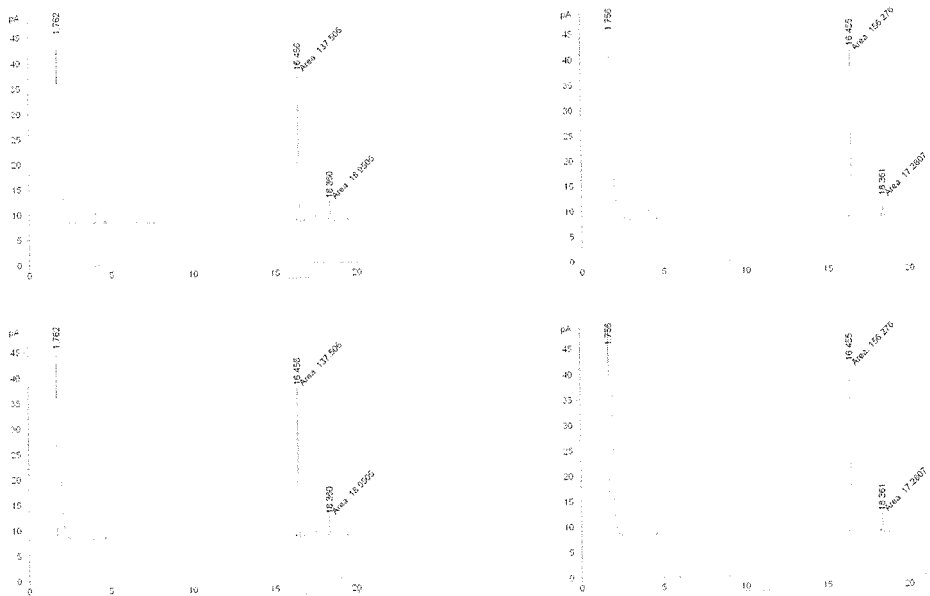
3. 방사선이용 pendimethalin 분해능 향상 돌연변이체 유도

방사선을 이용하여 안정적인 분해능 향상 돌연변이체를 유도하기 위하여 방사선 (gamma radiation, Co-60, capacity: 75,000 Ci, dose rate: 920 Gy/hr, AECL)에 대한 감수성을 조사한 결과, *Bacillus* sp. MS202의 D_{10} 값은 1.7 kGy이었다. LD_{95} (3kGy)의 조사선량을 조사한 후 pendimethalin이 첨가된 고체배지에서 분해능이 향상된 후보 돌연변이체들 (MS202-7, MS202-14 and MS202-18)을 선별하였고<사진 1> M1의 생성능을 GC분석을 통해 확인하였다<사진 2>. 상기한 3종의 후보 돌연변이체들로부터 4세대에 걸쳐 pendimethalin을 함유한 배지에서 배양하면서 각 세대별로 분해투명

특 집



〈사진 1〉 *Bacillus* sp. MS202와 방사선 유도 돌연변이체 후보의 pendimethalin 분해능 W: *Bacillus* sp. MS202, 숫자: 돌연변이체



〈사진 2〉 *Bacillus* sp. MS202와 방사선 유도 돌연변이체들의 GC 분석: pendimethalin (18.5분), 대사산물 M1 (16.5분). 시계방향: *Bacillus* sp. MS202, MS202-7, MS202-14, MS202-18.

대 형성 정도와 GC 분석을 통한 M1의 생성능을 비교하여 분해능이 향상된 돌연변이체를 선발하는 과정(세대-선별)을 거쳐서 최종적으로 안정적인 돌연변이체들 (MS202m7, MS202m14 and MS202m18)을 확보하였다. GC 분석결

과, 야생형에 비하여 pendimethalin 분해 산물인 M1을 MS202m7은 11.0%, MS202m14는 45.1%, MS202m18은 31.6% 더 많이 생성하였다(표 1). 4세대에 걸친 선발 과정동안 각 세대에서 가장 높은 분해능을 지닌 돌연변

〈표 1〉 Bacillus sp. MS202의 방사선 유도 돌연변이체의 pendimethalin 분해도

Generation		Ratio (%) of degrading activity of mutants to that of control				
		A	B	C	D*	Average±SD
MS202-7	F2	88	97	133	137	114±25
	F3	82	86	118	120	102±21
	F4	65	82	91	111	87±19
MS202-14	F2	51	83	163	178	119±61
	F3	143	192	327	778	360±289
	F4	93	98	114	145	113±24
MS202-18	F2	131	167	186	291	189±74
	F3	71	109	109	110	100±19
	F4	104	117	128	132	120±13

* 다음 세대 콜로니를 선발하기 위해 사용된 콜로니

이체를 선발하였고 이로부터 다음 세대의 콜로니를 확보하여 pendimethalin 분해능을 측정하고, 비록 야생형에 비해 높은 분해능을 지녔으나, 다양한 표준편차를 나타내었다. 그러나 세대가 지날수록 표준편차는 감소하는 경향을 보였으며 4세대에 이르러서는 20% 이내로 안정화되었다. 이처럼 방사선에 의한 돌연변이 표현형이 세대가 지남에 따라 안정화되어가는 정확한 원인은 밝혀내지 못하였으나 이런 현상은 아마도 방사선 유도 돌연변이체에서 회복관련 유전자들이 공통적으로 발현이 증가되는 현상과 관련이 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구를 통해 새로운 pendimethalin 분

해 박테리아 (Bacillus sp. MS202)를 최초로 분리하여 보고하였으며 방사선을 이용한 분해능 향상 돌연변이체를 유도하였다.

Bacillus sp. MS202는 다른 박테리아와는 상이한 pendimethalin 분해경로를 지니고 있음을 알게 되었다.

즉, 호기조건에서 우선적으로 $-NO_2$ 잔기의 $-NH_2$ 로의 환원을 유발하는 분해 대사 과정을 나타내었다. 방사선으로 유도한 pendimethalin 분해 향상 돌연변이체는 방사선 조사로 유발된 군집 내 분해능의 다양성을 4세대에 걸친 선발과정을 통해 다양성이 감소한 안정적인 분해능 향상 표현형을 지녔다. Bacillus sp. MS202와 이의 방사선 유도 돌연변이체들은 pendimethalin 오염토양의 생물학적복원에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. **KRIA**

[참고문헌]

1. Chen W and A Mulchandani, 1998. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. Trends Biotechnol. 16:71-76.
2. Friedberg EC, 2003. DNA damage and repair. Nature 421:436-440.
3. Gita K, BS Shashi, PL Shashi and TY Nanjapur, 2000. Effect of long-term application of pendimethalin: enhanced degradation in soil. Pest Manag. Sci. 56:202-206.
4. Lee Y-K, Jang YS, H-H Chang and H-Y Chung, 2005. Radiation related gene expression in mutants of Bacillus lentimorbus WJ5 induced by gamma radiation (^{60}Co). 5th ICI.
5. Kole RK, J Saha, S Pal, S Chaudhuri and A Chowdhury, 1994. Bacterial degradation of the herbicide pendimethalin and activity evaluation of its metabolites. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52:779-786.
6. Singh SB and G Kulshrestha, 1991. Microbial degradation of pendimethalin. J. Environ. Sci. Health B26:309-321.