

Sphingomonas sp. 224 균주에 의한 살균제 tolclofos-methyl의 분해

곽윤영 · 신갑식 · 이상만 · 김장역 · 이인구 · 신재호*

경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Biodegradation of Fungicide Tolclofos-methyl by *Sphingomonas* sp. 224

Yunyoung Kwak, Kab-Sik Shin, Sang-Man Lee, Jang-Eok Kim, In-Koo Rhee and Jae-Ho Shin*(School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea)

Received: 10 December 2010 / Accepted: 20 December 2010
© The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract: In order to decrease level of an organophosphorus fungicide, tolclofos-methyl, from *in situ* ginseng cultivating soil, we isolated a tolclofos-methyl degrading bacteria from ginseng cultivating soil samples. The bacterial strain removed tolclofos-methyl around 95% after 3 days incubation with complete liquid media. The strain was identified as *Sphingomonas* sp. by 16S rDNA sequence comparison, and designated as *Sphingomonas* sp. 224. Through the GC-MS analysis, *Sphingomonas* sp. 224 was proposed to have an initiative degradation pathway generating the metabolite such as 2,6-dichloro-4-methyl phenol compound from tolclofos-methyl. In addition, *Sphingomonas* sp. 224 was confirmed representing the effective degrading capability to tolclofos-methyl *in situ* soil.

Key Words: Biodegradation, Bioremediation, Organophosphorus fungicide, *Sphingomonas* sp. Tolclofos-methyl

서 론

농약이란 수목 및 농림산물을 포함하는 모든 농작물의 생산에 있어서 이들을 해하는 해충 및 균류, 잡초, 설치류 등으로 인한 피해 방지를 목적으로 사용되는 천연 물질을 포함하는 화학물질 및 합성물질로 정의될 수 있다(Jiménez and

Navas, 1997; Park *et al.*, 2009). 현대 농업에 있어서 이러한 농약은 농산물의 양적·질적 향상 및 농산물 생산에 필요한 노동력 절감효과 등의 장점으로 인하여 필수 농자재의 하나로 자리잡았다(Shin *et al.*, 2009). 그러나 화학 합성 농약의 과도한 사용은 환경 내 잔류 및 축적을 통한 오염뿐만 아니라 방제대상 생물 외의 생태계 군집에 대한 독성 및 인체 독성 등의 문제를 발생시킴에 따라, 농업현장으로부터 농약을 효과적으로 제거하는 기술에 대한 필요성이 높아지고 있다.

환경오염물질의 제거를 위해 사용되는 여러 방법들 중에서, 환경 생태계를 구성하는 요소인 생물 유기체(organisms), 미생물(microorganisms), 또는 이들 유래의 생체 촉매제(biocatalyst)인 효소 등을 이용하여 특정 오염원을 제거하는 생분해법(biodegradation)은 기술의 적용시에 낮은 비용과 비교적 높은 제거효율 및 환경 친화적 방법이라는 다양한 장점이 있으므로 생물복원(bioremediation)의 주된 기술로 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Singh and Walker, 2006; Yair *et al.*, 2008).

우리나라의 대표적 고소득 작물인 인삼은 다년생으로서, 차광 조건을 갖춘 동일 토양에서 평균 4년에서 6년간의 긴 생육기간이 요구됨에 따라, 타 작물에 비해 병해충 발생의 가능성이 더 높은 실정이다(Kim *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2008b). 따라서 인삼경작을 위해서는 농약을 이용한 병해충의 방제가 필수적이다. 유기인계 진균제 tolclofos-methyl (*O*-2,6-dichloro-*p*-tolyl-*O,O*-dimethyl phosphorothioate, *O*-(2,6-dichloro-4-methylphenyl)*O,O*-dimethyl phosphorothioate)(BCPC, 2006)은 인삼 재배 시 토양 진균인 *Rhizoctonia* sp.의 감염에 의하여 발생하는 인삼 모잘록병(Damping-off disease) 방제를 목적으로 인삼 경작지 토양에 흔히 사용되는 있는 토양 살균제이다. 현재까지 tolclofos-methyl의 진균제로서의 작용 기작은 명확히 알려져 있지 않

*교신저자(Corresponding author): J. H. Shin
Tel: +82-53-950-5716 Fax: +82-53-953-7233
E-mail: jhshin@knu.ac.kr

으나, FRAC(Fungicide Resistance Action Committee)의 분류 기준에 의하면 병해 방제 목적으로 처리 시 진균 내 lipid peroxidation 유도 효과에 의한 lipid 및 membrane 합성이 저해되어 진균들에 대한 방제효과가 나타나는 것으로 추정되고 있다(FRAC, 2010). 토양 내에서의 긴 잔효성을 특징으로하는 tolclofos-methyl은 유기인계 살충제가 나타내는 독성 효과인 acetylcholinesterase에 대한 저해 작용은 상대적으로 약한 것으로 알려져 있으나, 생태를 구성하는 여러 구성 군집들 중 어류에는 강한 독성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(REACH, 2007).

최근 국립 농산물 품질관리원 및 식품의약품안전청을 중심으로 행해진 인삼 내 농약 잔류 안전성 조사 결과를 살펴보면, tolclofos-methyl의 경우 인삼 체내에서 가장 높은 검출 빈도 및 검출율을 보임에 따라 생산된 인삼에 대한 안전성 부적합 판정을 야기하는 잔류농약 성분중의 하나로 보고되고 있다(MAF and NACF, 2006; Kim *et al.*, 2008b). 따라서 인삼의 질적 향상 및 안전성 확보와 관련하여 tolclofos-methyl의 잔류 정도를 낮추기 위하여 인삼경작지에 잔류하는 이들 화합물의 효과적 분해 및 제거 방법에 대한 요구가 높다고 할 수 있다.

이러한 필요성을 바탕으로 본 연구에서는 미생물을 이용한 tolclofos-methyl의 효과적 생분해를 목적으로, 분해능이 좋은 미생물을 선발하여 실험실 조건에서 tolclofos-methyl에 대한 분해능을 확인함과 동시에 분리 미생물이 집중된 실제 토양 환경 내에서의 tolclofos-methyl에 대한 분해 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서는 technical grade(순도 96.5% 이상)의 tolclofos-methyl을 표준품으로 사용하여 acetone을 용매로 하는 최종 2×10^4 mg/L 농도의 stock solution을 조제하고, 실험 시 적정 농도로 첨가하여 사용하였다. 미생물 배양액 내 또는 토양 내에 잔류하는 tolclofos-methyl의 추출 및 이들 화합물의 분석에 사용한 ethyl acetate 및 acetonitrile 등의 용매는 Burdick & Jackson사(USA)의 분석용 시약(순도 99.9% 이상)을 사용하여 실험하였다.

미생물의 배양 조건

미생물의 일반적인 배양에는 Tryptic soy broth(Bacto™ Tryptic soy broth, TSB, 30.0 g/L of Soybean-Casein Digest Medium USP; 1.7% pancreatic digest of casein, 0.3% enzymatic digest of soybean meal, 0.25% dextrose, 0.5% sodium chloride, 0.25% dipotassium phosphate)를 사용하였으며, tolclofos-methyl에 대한 분해능 검증을 목적으로 한 미생물의 배양에는 1/10 농도의 Luria-Bertani broth (0.1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% sodium chloride)를 사용하여 30°C에서 160 rpm으로 진탕하여 배양하였다.

Tolclofos-methyl 분해 미생물의 동정

Tolclofos-methyl 분해 미생물의 동정 확인은 다음과 같이 실시하였다. Ausubel의 방법(Ausubel *et al.*, 1992)을 참고로 선발된 미생물로부터 chromosomal DNA를 추출하여 이를 주형(Template) DNA로 사용하였다. PCR 반응의 primer로는 일반적인 원핵 미생물의 분류 기준으로 사용되고 있는 16S rRNA의 V3 영역을 증폭하는 bacterial universal PCR primer set(primer 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTG GCTCAG-3', primer 1492R: 5'ACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3')(Lane, 1991)을 사용하였다. PCR 반응은 10 ng의 주형 DNA, 각각 0.2 μM 농도의 primer set, PCR buffer(10 mM Tris·HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP 및 1 Unit의 Taq DNA polymerase(home-made)가 첨가된 조건의 PCR 반응액을 준비하고 이를 97°C에서 30초간 denaturation, 56°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 조건을 1 cycle로 이를 총 30 cycle을 반복하는 조건으로 실험하였다. 증폭된 PCR 산물은 제노텍사(Zenotech, Korea)에 의뢰하여 염기 서열 분석하였다. 분석 결과는 NCBI의 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 및 Ribosomal Database Project(<http://rdp.cme.msu.edu/>)를 사용하여 기존 보고된 미생물의 16S rDNA sequence들과 비교하여 tolclofos-methyl 분해 미생물의 속을 추정하였다.

미생물 배양액 및 토양 내 잔류 tolclofos-methyl의 추출

미생물 배양액 내 잔류하는 tolclofos-methyl은 다음의 방법으로 추출하였다. 미생물 배양액과 동일한 양(v/v)의 ethyl acetate 용액을 첨가하고 vortex mixer로 1분간 진탕하여 완전히 혼합하였다. 이후 초음파 발생기(Branson Ultrasonics Co., USA)를 사용하여 40 kHz에서 1분간 처리하여 미생물 균체를 파괴하고 미생물 균체 내로 흡수 및 흡착된 tolclofos-methyl을 용출하였다. 용출액 중에서 ethyl acetate 상층액 200 μL만을 취하여 진공 농축 원심분리기에서 농축 건조하고, 이후 200 μL의 acetonitrile 용액에 재용해하였다. 이를 0.45 μm PVDF filter(Millipore, USA)를 사용하여 여과한 다음 HPLC 분석을 실시, 미생물 배양액 내 잔류하는 tolclofos-methyl의 양을 정량 확인하였다. 이들 분석 조건에서의 tolclofos-methyl 회수율은 86.8(±17.7)% 범위로 확인되었다.

토양 시료 내 잔류하는 tolclofos-methyl은 다음의 방법으로 추출하였다. 먼저 대상 토양 시료를 혼합한 후 5점 이상의 상이한 부위로부터 시료 채취를 하였다. 채취된 토양 시료는 다시 교반하여 잘 섞어준 뒤 이 중 0.5 g만을 취하여 acetonitrile 용액 1 mL을 가하고 vortex mixer로 1분 동안 진탕하여 완전히 혼합하였다. 이후 상층액 부분 200 μL만을 취하여 0.45 μm PVDF filter(Millipore, USA)를 사용하여 여과한 다음 HPLC 분석을 실시, 토양 시료 내 잔류하는 tolclofos-methyl의 양을 정량 확인하였다. 이들 분석 조건에서의 tolclofos-methyl 회수율은 75.7(±7.2)% 범위로 확인되었다.

Table 1. HPLC analysis condition of tolclofos-methyl

Instrument	Waters 510 high performance liquid chromatography
Column	Eclipse XRD-C18, 4.6 × 150 mm column
Detector	UV-8010, TOSOH
Mobile phase	Acetonitrile:Water(70:30, v/v)
Flow rate	2.0 mL/min
Detection(nm)	UV 200 nm
Retention time	1.45 min

Table 2. GC-MS analysis condition of tolcofos-methyl metabolite

Instrument	Shimadzu GC MS - QP 2010 plus gas chromatograph mass spectrometer
Column	DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)
Column temp.	100°C (hold 2 min) → 220°C (5°C/min) → 280°C (10°C/min, hold 10 min)
Column flow	1.0 mL/min
Detector mode	Scan mode(TIC total ion chromatogram) total ion current: 45-550 m/z
Detector voltage	0.75 kV
Purge flow	3 mL/min
Inject temp.	260°C
Ion source temp.	200°C
Interface temp.	300°C
Injection volume	1.0 μL
Sampling time	1.0 min

Tolclofos-methyl 및 분해 산물의 분석

미생물 배양액 또는 토양으로부터 추출한 tolclofos-methyl 시료를 Table 1의 조건에서와 같이 HPLC(High-performance liquid chromatography, Waters 510, USA) 분석하고 tolclofos-methyl 표준품을 사용하여 작성한 검량 곡선식(검량식: $y=4106.7x + 84.846$, $R^2=0.993$)으로부터 추출한 tolclofos-methyl의 양을 환산하여 정량하였다. Tolclofos-methyl 분해 산물 확인을 위한 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry, Shimadzu GC MS-QP 2010 Plus, Japan) 분석은 미생물 배양액으로부터 추출한 tolclofos-methyl 시료를 사용하여 Table 2의 조건으로 실험하였다. 이때 tolclofos-methyl이 첨가되지 않은 1/10 농도의 LB 배지 및 tolclofos-methyl 첨가 시 사용되는 양과 동일한 양의 acetone만이 첨가된 1/10 농도의 LB 배지를 대상으로 상기에 기술된 미생물 배양액 내 tolclofos-methyl 추출 과정과 동일한 방법의 추출 과정을 거침으로서 확보된 시료를 대조구로 사용하였다.

Tolclofos-methyl 분해 미생물의 토양 처리

분해 미생물의 토양 처리 후 실제 토양 환경 내에 존재하는 tolclofos-methyl에 대한 분해 정도는 다음과 같이 실험하였다. TSB 배지를 사용하여 30°C, 160 rpm으로 48시간 동안 배양한 tolclofos-methyl 분해 미생물의 배양액(OD

600 = 10.63) 3 mL를 원심 분리(17,700 × g, 5 min)하여 균체를 집균하였다. 집균된 균체는 살균생리식염수에 재현탁하고, 다시 원심 분리하는 세척과정을 거쳐 균체 내에 잔류하는 배지 성분을 완전히 제거하였다. 이후 집균된 균체는 3 mL의 살균생리식염수에 재현탁하고 실제 경북 풍기 인삼 경작지로부터 채취한 토양 시료 30 g에 살포, 골고루 혼합하였다. 분해 미생물의 최종 접종농도는 1×10^8 cells/g 이상이 었다. 동 실험구에 tolclofos-methyl은 acetone 용매를 사용하여 조제한 stock solution을 사용하여 최종 20 mg/Kg의 농도가 되도록 처리하였다. 동일한 토양 시료 30 g을 121°C에서 1시간 동안 멸균 처리한 토양 실험구는 대조군으로 사용하였다. 멸균 대조군 토양 시료는 TSB-agar 배지상에 도말하여 30°C 조건에서 1주일 동안 배양하여도 미생물 colony가 형성되지 않았다. 모든 실험은 25°C, 상대 습도 50%의 항온 및 항습 조건에서 진행하였다.

결과 및 고찰

Tolclofos-methyl 분해 미생물의 선발 및 동정

Tolclofos-methyl이 사용되는 인삼 재배지를 포함하는 전국의 밭, 논토양 지역에서 채취한 223점의 토양 시료를 사용하여 tolclofos-methyl이 최종 300 mg/L의 농도로 첨가

된 조건의 집식 배양을 실시하고 수 차례의 계대 배양을 거친 후, 액체배양매지에서 tolclofos-methyl을 감소시키는 미생물 colony 248주를 확보하였다(결과 미제시). 이들과 함께 기존에 유기인계 화합물을 분해하는 것으로 보고된 문헌들을 참고로 tolclofos-methyl 분해 가능성이 있는 미생물을 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(KACC), 한국미생물보존센터(KCCM) 및 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC)로부터 분양받고 실험실에 보유 중인 난분해성 물질 분해미생물을 포함하여 screening 실험을 진행하였다.

전체 대상 미생물들을 TSB 배지에 종배양하여 1/10 농도의 LB 배지에 2%(v/v)로 접종하고 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 이후 배양액 내에 최종 20 mg/L의 농도로 tolclofos-methyl을 첨가한 다음 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 5일간 더 배양하고, 이들 배양액 내 잔류하는 tolclofos-methyl의 양을 HPLC로 분석하여 비교하였다. HPLC 분석 결과로부터 배양액 내 낮은 tolclofos-methyl 잔류량을 보임으로서 tolclofos-methyl에 대한 분해능이 있는 미생물 3주를 최종 선발하였다(Figure 1). Fig. 1의 결과와 같이 미생물 No. 118 및 No. 273의 배양액 내에는 배양 초기 첨가해준 tolclofos-methyl이 각각 62% 및 64% 수준으로 잔류되어 있음이 확인되었으며, 미생물 No. 224의 배양액 내에는 배양 초기 첨가해준 tolclofos-methyl이 약 11% 수준으로 잔류되어 있음이 확인되었다. 이들 결과를 바탕으로 No. 224 균주를 tolclofos-methyl 분해 단일 미생물로 선발하였다.

선발 미생물 No. 224의 동정을 위하여 16S rRNA의 V3 영역을 PCR로 증폭하고 염기서열을 분석하여 기존 보고된 여러 미생물 유래의 16S rDNA 염기서열과 상동성 검색을 실시하였다. 그 결과, No. 224 균주가 *Sphingomonas* 속으로

확인됨에 따라, 선발된 tolclofos-methyl 분해 미생물을 *Sphingomonas* sp. 224로 명명하였다.

***Sphingomonas* sp. 224의 tolclofos-methyl 분해능 확인**

Tolclofos-methyl 분해 미생물로 선발된 *Sphingomonas* sp. 224의 배양 시간별 분해 정도를 시험하였다. TSB 배지를 사용하여 종배양한 *Sphingomonas* sp. 224를 1/10 농도의 LB 배지에 2%(v/v)로 접종하고 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 이후 이들 배양액 내에 최종 20 mg/L 농도로 tolclofos-methyl을 첨가하고 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 배양하면서 24시간 간격으로 이들 배양액 내에 잔류하는 tolclofos-methyl을 추출하여 HPLC로 정량분석하였다.

Fig. 2에서와 같이, 배양 24시간 경과 시점의 *Sphingomonas* sp. 224 배양액 내에는 배양 초기 첨가된 tolclofos-methyl의 약 64%가 제거되었으며 배양 72시간 경과 시점에서는 배양 초기 첨가된 tolclofos-methyl의 약 5%만이 잔류되어 95% 이상이 제거된 것으로 확인되었다. 이 결과로부터 *Sphingomonas* sp. 224에 의한 tolclofos-methyl의 제거는 반응 시간에 의존적인 효소학적 분해 기작으로 판단되었다.

일반적으로 pH 11.0 이상의 염기 조건에서 쉽게 분해되는 것으로 알려진 유기인계 화합물의 특징과 관련하여 상기의 tolclofos-methyl 분해 효과가 분리 미생물 *Sphingomonas* sp. 224의 배양액 내 pH 변화에 의한 것인지를 다음 실험으로 확인하였다. 먼저 *Sphingomonas* sp. 224의 배양액 내 pH 변화에 따른 tolclofos-methyl의 분해 가능성을 확인하기 위하여 각 단계별 미생물 배양액의 pH를 측정, 비교하였다. Tolclofos-methyl 첨가 전 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 48시간 동안 배양한 *Sphingomonas* sp. 224 배양액의

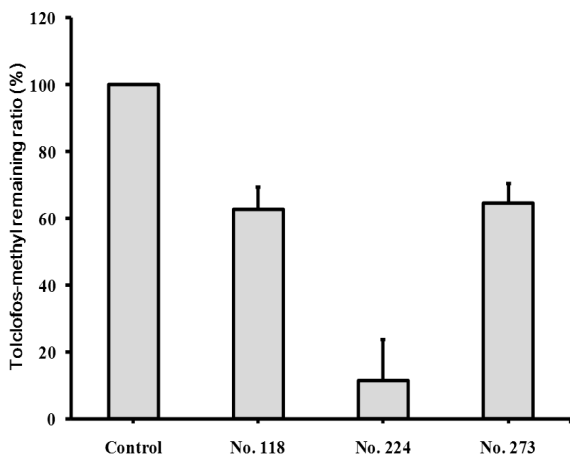


Fig. 1. Remaining ratio of tolclofos-methyl from the culture broth of putative tolclofos-methyl degrading bacterial strain. No. 224, *Sphingomonas* sp. 224; No. 118 or No. 273, putative tolclofos-methyl degrading bacterial strains which were isolated from soil samples. Control means the 1/10 LB medium added with tolclofos-methyl only. Data are the mean of three replicates and error bars represent the standard deviation.

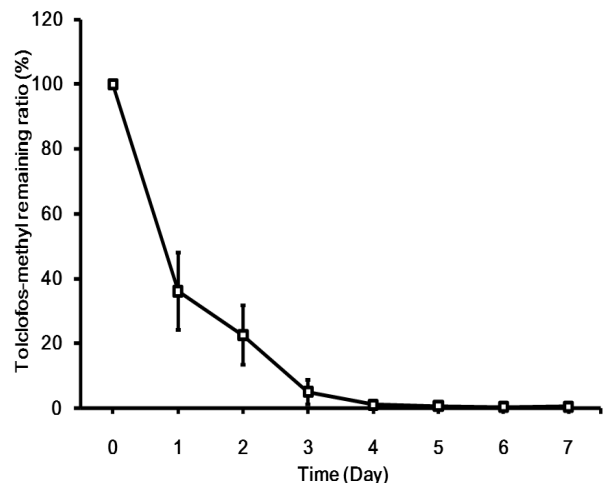


Fig. 2. Tolclofos-methyl degradation by *Sphingomonas* sp. 224. After the incubation of *Sphingomonas* sp. 224 at 30°C, 160 rpm for 48 hrs, tolclofos-methyl(20 mg/L in final concentration) was spiked. Remaining ratio of tolclofos-methyl was measured every 24 h. Data are the mean of three replicates and error bars represent the standard deviation.

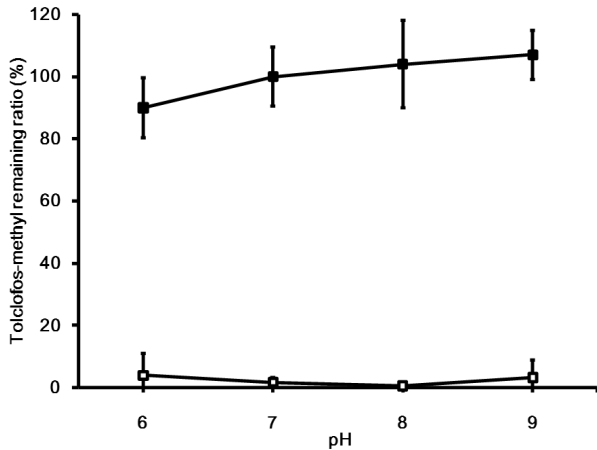


Fig. 3. Effect of pH on the degradation of tolclofos-methyl by *Sphingomonas* sp. 224. *Sphingomonas* sp. 224 was incubated at 30°C, 160 rpm for 48 hrs using the 1/10 LB media with various pH conditions. After spiking of tolclofos-methyl (20 mg/L in final concentration) into the culture broth, these cultures were incubated further for 5 days at 30°C, 160 rpm. The remaining ratio of tolclofos-methyl within the culture broth was compared by HPLC analysis. Closed square (■) represents samples without inoculation and open square (□) represents samples with *Sphingomonas* sp. 224. Data are the mean of three replicates and error bars represent the standard deviation.

pH는 7.3으로 확인되었으며, tolclofos-methyl 첨가 후 배양 5일 경과 시점에서의 *Sphingomonas* sp. 224 배양액의 pH는 8.6으로 확인되었다. 이들 결과는 *Sphingomonas* sp. 224 배양액 내 tolclofos-methyl의 분해는 극심한 pH 변화에 의한 화학적 분해가 아닌 *Sphingomonas* sp. 224 균주 작용에 의한 분해임을 추정하게 하였다(결과 미제시).

또한 pH 6.0 - pH 9.0의 조건을 나타내는 1/10 농도의 LB 배지를 사용하여 분리 미생물 *Sphingomonas* sp. 224의 tolclofos-methyl에 대한 분해능을 확인해 보았다. Fig. 3의 결과와 같이, pH 조건의 변화와 상관없이 *Sphingomonas* sp. 224 첨가 후 배양 5일 경과 후에는 배양 초기 첨가 해 준 tolclofos-methyl이 대부분 제거되는 경향을 확인하였다. 또한 균주의 접종없이 tolclofos-methyl만을 각 pH별 1/10 농도의 LB 배지에 첨가하고 5일 경과 후 이들 화합물의 잔류량을 측정된 결과, 모든 실험구에서 오차 범위 내 동일한 수준의 tolclofos-methyl 잔류량을 보인 대조구의 결과로부터 pH 조건 변화에 따른 tolclofos-methyl의 화학적 분해 영향은 존재하지 않음을 확인하였다.

Sphingomonas sp. 224에 의한 tolclofos-methyl 분해 경로

Tolclofos-methyl에 대한 높은 분해능을 보이는 *Sphingomonas* sp. 224의 배양액 내 tolclofos-methyl 분해 산물의 존재 유무 및 분해 산물의 동정을 통한 이들 화합물의 분해 경로를 추정하였다. 먼저 TSB 배지를 사용하여 중배양한 *Sphingomonas*

sp. 224를 1/10 농도의 LB 배지에 2%(v/v)로 접종하고 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 48시간 동안 배양 한 다음, 이들 배양액 내에 tolclofos-methyl을 최종 20 mg/L 농도로 첨가하고 30°C, 160 rpm의 진탕 조건으로 72시간 더 배양하였다. 이후 이들 미생물 배양액을 사용하여 GC-MS 분석을 실시하였다.

Sphingomonas sp. 224 배양액을 사용한 total ion chromatogram(TIC)은 Fig. 4의 (A)와 같이 확인되었다. 대조구에 의한 total ion chromatogram 결과(결과 미제시)와 비교 분석을 통하여 tolclofos-methyl 유래 분해 산물은 약 7.3분대의 peak임을 확인하였다. Tolclofos-methyl 분해 산물 peak 유래의 ion fragmentation 결과는 Fig. 4의 (B)와 같이 확인되었으며, 이 화합물은 최종적으로 2,6-dichloro-4-methyl phenol 구조의 화합물로 추정되었다.

Tolclofos-methyl이 속하는 유기인계 합성 화학 농약의 경우 phosphoric acid 또는 phosphonic acid를 기본으로 하는 ester 또는 thiol 유도체 구조로 설명될 수 있다(Singh and Walker, 2006). 미생물을 이용한 이들 화합물의 분해 연구와 관련하여, 구조 내 P-O-alkyl 결합 및 P-O-aryl 결합의 가수분해는 유기인계 합성 화합물 자체의 독성을 감소시키는 주된 초기 분해 경로로 보고됨에 따라, 특히 이들 화합물 내 위치하는 P-O, P-F, P-CN 및 P-S 등의 여러 형태의 phosphorus ester 결합을 절단하는 것으로 알려진 유기인계 가수분해 효소(Organophosphorus hydrolase, OPH; EC 3.1.8.1)를 이용한 분해 연구가 활발히 진행되고 있다(Singh and Walker, 2006; Schofield and DiNovo, 2010). Tolclofos-methyl의 구조와 유사한 구조를 가지는 대표적 유기인계 살충제인 methyl parathion(*O,O*-dimethyl-*O-p*-nitrophenyl phosphorothioate)의 분해 경로를 참고로 할 때(Singh and Walker, 2006), 선발 미생물 *Sphingomonas* sp. 224 작용에 의한 tolclofos-methyl 분해 역시 P=S 결합의 P=O 결합으로의 oxidation, P-O 결합의 가수분해 또는 이들 화합물 구조 내에 위치하고 있는 chloride기의 제거 등의 여러 분해 경로를 예상하게 하였다. 상기의 GC-MS 분석 결과로부터 2,6-dichloro-4-methyl phenol 분해 산물이 동정 확인됨에 따라, 선발 미생물 *Sphingomonas* sp. 224의 경우 tolclofos-methyl에 대하여 2,6-dichloro-4-methyl phenol과 dimethylthiophosphate 형태의 분해 산물을 생성하는 Fig. 5와 같은 초기 분해 경로를 가질 것으로 추정되었다. 또한 유기인계 화합물 분해와 관련한 미생물 유래 유기인계 가수분해 효소의 여러 기존 연구 결과 보고를 바탕으로 선발 미생물 *Sphingomonas* sp. 224의 유기인계 가수분해 효소 생산 가능성 역시 추정되었다.

Sphingomonas sp. 224의 토양접종에 의한 tolclofos-methyl의 분해 확인

완전배지를 사용한 실험실 조건에서 tolclofos-methyl에 대한 분해능이 확인된 *Sphingomonas* sp. 224를 tolclofos-methyl이 잔류하는 토양에 처리하여 분해 효과를 확인하였

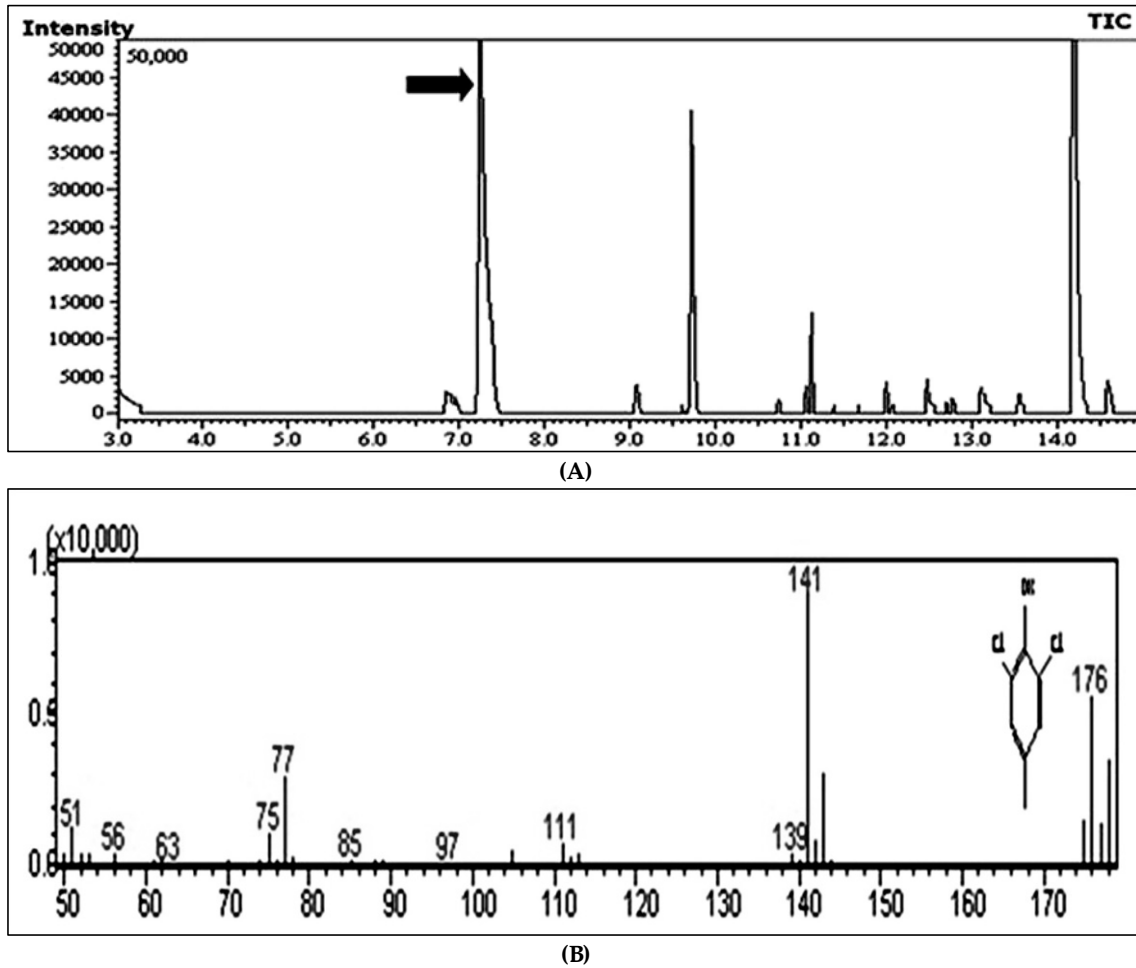


Fig. 4. GC-MS analysis of tolclofos-methyl metabolite by *Sphingomonas* sp. 224. (A) Total ion chromatogram(TIC) of pure culture broth of *Sphingomonas* sp. 224. The peak of tolclofos-methyl metabolite was indicated by arrow. (B) Ion fragmentation of tolclofos-methyl metabolite peak monitoring at retention time of about 7.3 min.

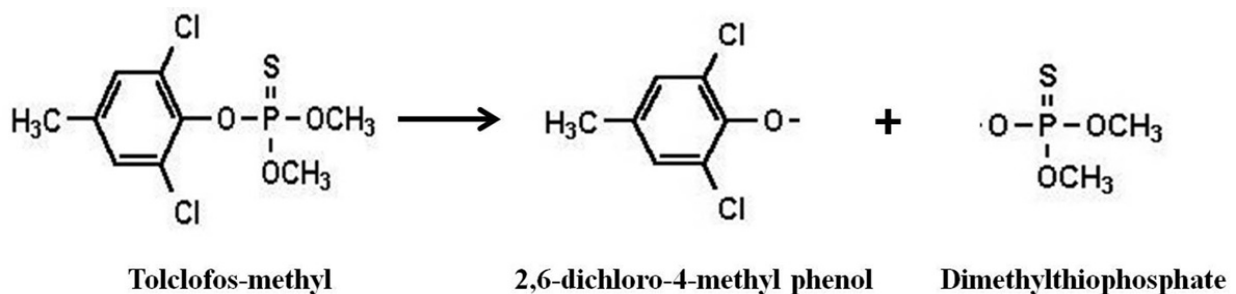


Fig. 5. Proposed degradation pathway of tolclofos-methyl by *Sphingomonas* sp. 224.

다. 경북 풍기 지역의 인삼 경작지로부터 채취한 토양 시료에 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 선발된 *Sphingomonas* sp. 224 및 tolclofos-methyl을 처리하고, 토양 내 tolclofos-methyl의 분해 정도를 2주 동안 관찰하였다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이, 2주의 실험 기간 동안 살균 처리된 토양 실험구 내 tolclofos-methyl의 잔류 정도의 변화는 오차 범위 내에서 동일한 수준으로 확인되었다. 반면 tolclofos-methyl 분해 미생물로 선발된 *Sphingomonas* sp.

224가 처리된 토양에서는 1주 경과 후에 약 30%, 2주 경과 후에 50% 수준의 제거율을 나타내었다. 이 결과로부터 선발된 *Sphingomonas* sp. 224의 실제 토양내에서의 tolclofos-methyl에 대한 분해능을 확인할 수 있었으며, 그 분해 정도는 20 mg/kg 농도의 토양 내 잔류 tolclofos-methyl에 대하여 14일 이내에 약 50% 분해 가능한 것으로 확인되었다. 이들 결과를 바탕으로 선발된 *Sphingomonas* sp. 224 균주는 토양에 잔류하는 tolclofos-methyl을 처리하는 미생물체

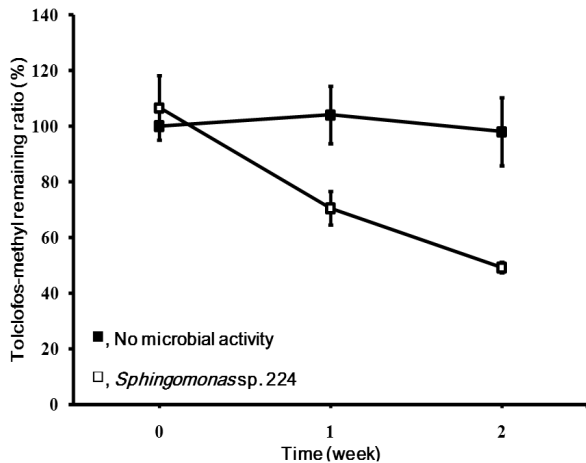


Fig. 6. Tolclofos-methyl degradation by *Sphingomonas* sp. 224 *in situ* ginseng cultivating soil. No microbial activity (■) sample was prepared by sterilizing *in situ* ginseng cultivating soil spiked with tolclofos-methyl; *Sphingomonas* sp. 224 (□) sample was prepared by inoculating *Sphingomonas* sp. 224 to *in situ* ginseng cultivating soil spiked with tolclofos-methyl. Data are the mean of four replicates and error bars represent the standard deviation.

제로 개발될 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

요약

미생물을 이용한 인삼 재배지 내 잔류 tolclofos-methyl의 효과적 분해를 목적으로, tolclofos-methyl에 대한 분해능을 보이는 미생물을 선발하였다. 선발된 미생물은 16S rDNA 염기서열분석을 통하여 *Sphingomonas* 속으로 동정되었다. 선발 미생물 *Sphingomonas* sp. 224는 1/10 농도의 LB 배지에 함유된 20 mg/L 농도의 tolclofos-methyl을 배양 72 시간 이내에 95% 이상 분해하는 것으로 확인되었다. 또한 이 미생물이 tolclofos-methyl을 분해하여 얻어지는 산물로 2,6-dichloro-4-methyl phenol이 확인됨에 따라 미생물이 생산하는 가수분해 효소에 의한 분해 경로를 가지는 것으로 추정되었다. Tolclofos-methyl 분해 미생물 *Sphingomonas* sp. 224를 인삼경작지 토양에 처리하여 이들 토양에 잔류되어 있는 tolclofos-methyl에 대한 분해능을 확인 한 결과, 20 mg/Kg 농도의 토양 잔류 tolclofos-methyl에 대하여 14일 이내에 약 50%의 분해력을 보이는 것으로 확인되었다. 이것은 단일 미생물을 이용한 배지 및 토양 내 tolclofos-methyl의 생분해 효과를 처음으로 확인한 연구 결과이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구개발사업(과제번호: 200802A01033084)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1992. Short protocols in molecular biology, second ed. John Wiley & Sons, New York.
- British Crop Production Council(BCPC), 2006. The e-pesticide manual(version 4.0), fourteenth ed.
- Fungicide Resistance Action Committee(FRAC), 2010. FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action(including FRAC Code numbering), <http://www.frac.info>.
- Jiménez, A.M., Navas, M.J., 1997. Chemiluminescent methods in agro-chemical analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27, 291-305.
- Kim, H.J., Cheong, S.S., Kim, D.W., Park, J.S., Ryu, J., Bea, Y.S., Yoo, S.J., 2008a. Investigation into disease and pest incidence of *Panax ginseng* in Jeonbuk province, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 16(1), 33-38.
- Kim, J.E., Kim, T.H., Kim, Y.H., Lee, J.H., Kim, J.S., Paek, S.K., Choi, S.Y., Youn, Y.N., Yu, Y.M., 2008b. Residues of tolclofos-methyl, azoxystrobin and difenoconazole in ginseng sprayed by safe use guideline, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 16(6), 390-396.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing, in: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, John Wiley & Sons, New York, pp. 115-175.
- MAF., NACF, 2006. Education book of safety ginseng production and distribution technology, pp. 39-64, Ministry of Agriculture and Forestry, and National Agricultural Cooperative Federation, Korea.
- Park, T.J., Yang, M.H., Lee, S.Y., Kim, S.H., 2009. Biosensor System for the detection of agrichemicals and its applications, *KSBB Journal.* 24, 227-238.
- REACH, 2007. Rizolex safety data sheet by the regulation (EC) No 1907/2006, Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), the European Parliament and the Council of the European Union.
- Schofield, D.A., DiNovo, A.A., 2010. Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S, *J. Appl Microbiol.* 109(2), 548-557.
- Shin, J.H., Kwak, Y.Y., Kim, W.C., So, J.H., Shin, H.S., Park, J.W., Kim, T.H., Kim, J.E., Rhee, I.K., 2009. Isolation of endosulfan degrading bacteria and

- their degradation characteristics, *Korean J. Environ.Agric.* 27(3), 292-297.
- Singh, B.K., Walker, A., 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiol Rev.* 30(3), 428-471.
- Yair, S., Ofer, B., Arik, E., Shai, S., Yossi, R., Tzvika, D., Amir, K., 2008. Organophosphate degrading microorganisms and enzymes as biocatalysts in environmental and personal decontamination applications, *Crit Rev Biotechnol.* 28(4), 265-275.
-