

Characterization of Biological Degradation Cypermethrin by *Bacillus amyloliquefaciens* AP01

Yong-Suk Lee · Je-Hoon Lee · Eun-Jung Hwang · Hyo-Jung Lee · Jae-Hoon Kim ·
Jae Bok Heo · Yong-Lark Choi* 

Bacillus amyloliquefaciens AP01 균주에 의한 사이퍼메트린의 생물학적 분해 특성

이용석 · 이계훈 · 황은정 · 이효정 · 김재훈 · 허재복 · 최용락*

Received: 5 October 2015 / Accepted: 26 October 2015 / Published Online: 31 March 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract Strain AP01 was isolated for the biological cypermethrin degradation from soil and sediment in Busan. This strain was identified on the basis of phylogenetic analysis of the 16s rDNA sequence and assigned as *Bacillus amyloliquefaciens* AP01. AP01 could degrade about 45% of cypermethrin in the mineral medium at 30°C and 180 rpm for 5 days. Furthermore when 2% glucose was added in the medium, the degradation rate of cypermethrin by strain AP01 was increased upto about 60%. Therefore, AP01 may serve as a promising strain in the bioremediation of soil polluted with cypermethrin.

Keywords biodegradation · cypermethrin · pyrethroid

Y.-S. Lee and J.-H. Lee contributed equally.

Y.-S. Lee · J.-H. Lee · E.-J. Hwang · H.-J. Lee · Y.-L. Choi
Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714,
Republic of Korea

J.-H. Kim
Aminopia Co., Ltd, Industry-Academy Cooperation Building, Dong-A
University, Busan 604-714, Republic of Korea

J. B. Heo
Department of Genetic Engineering, Dong-A University, Busan 604-714,
Republic of Korea

*Corresponding author (Y.-L. Choi: ylchoi@dau.ac.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

농약(pesticide)은 병해충과 잡초 등을 제거하여 식량 생산량을 증대시키기 위해 필수 불가결한 농자재이다. 다양한 농약들 중에서 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제는 농업과 가정에서 해충들을 박멸하기 위해 사용되는 대표적인 살충제 성분 중의 하나로써 높은 잔류성을 나타내던 유기염소(organochlorine) 계열 살충제들을 대체하기 위해서 유기인(organophosphorus) 계열 살충제 및 카바메이트(carbamate) 계열 살충제와 더불어 1970년대 이후부터 매년 사용량이 증가하고 있다(Wang 등, 2009; Park 등, 2015). 비록 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제들이 일반적으로 유기인(organophosphorus) 계열 살충제들에 비해서 인간에 대한 치명적인 독성이 낮다고 하더라도, 고농도의 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제에 노출되거나 저농도에 지속적으로 노출된다면 내분비 교란, 림프절과 비장의 손상 그리고 발암과 같은 다양한 증상을 나타내는 것으로 알려져 있다(Laskowski 2002).

최근 소득 증가로 인하여 삶이 여유로워짐에 따라 많은 소비자들의 잔류 농약으로부터 안전한 먹거리에 대한 관심이 높아지고 있다(Kang 등, 2015). 국내 공공기관들이 조사한 결과에 따르면 2012년 부산지역에서 출하/유통되는 농산물 3,996건을 조사한 결과, 잔류 농약이 검출된 경우는 57품목 499건으로 출하/유통 농산물의 12.5%에 달하며, 그 중 잔류허용기준을 초과한 경우는 32건으로 0.8%에 이르는 것으로 조사되었다. 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제의 농산물 검출 현황을 보면 비펜트린(bifenthrin)의 경우 총 15회 검출 중 2건이 기준치를 초과한 것으로, 사이퍼메트린(cypermethrin)의 경우 총 5회 검출, 펜프로파트린(fenproprathrin)의 경우 총 3회 검출, 싸이할로트린(cyhalothrin)의 경우 총 1회 검출된 것으로 보고되었다(BMCIHE, 2012). 2012년 경기도에서 유통된 총 11,008건의 농산물의 잔류

농약을 분석한 결과, 잔류 농약이 검출된 경우는 665건으로 전체 유통 농산물의 6.0%를 차지하며 이들 중 잔류허용기준을 초과한 경우는 160건으로 1.5%를 차지 하였다. 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제의 검출 현황을 보면 비펜트린(bifenthrin)의 경우 총 28회 검출 중 3건이 기준치를 초과, 싸이퍼메트린(cypermethrin)의 경우 총 10회 검출 중 2건이 기준치를 초과, 펜프로파트린(fenprothrin)의 경우 총 3회 검출, 싸이할로트린(cyhalothrin)의 경우 총 2회 검출, 퍼메트린(permethrin)의 경우 총 1회 검출된 것으로 보고되었다(GIHE, 2012).

일반적으로 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제의 경우, 광산화(photooxidation), 화학적 산화(chemical oxidation)와 생물학적 분해(biodegradation)와 같은 방법들에 의해서 분해되는 것으로 알려져 있다. 특히 토양과 퇴적물 등에서는 미생물들이 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제들을 분해하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 2009). 이와 관련하여 *Bacillus subtilis* (Xiao 등, 2015), *Brevibacterium aureum* (Chen 등, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Zhang 등, 2011), *Sphingobium* sp. (Wang 등, 2009), *Streptomyces aureus* (Chen 등, 2011) 등의 미생물들에 의해서 다양한 종류의 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제들의 생물학적 분해에 관한 연구들이 보고 되어 있다.

본 연구에서는 다양한 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충 성분들 중에서 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해를 위한 새로운 미생물을 분리·동정하고 분해 특성에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기. 본 연구에 사용된 사이퍼메트린(cypermethrin) 시약은 중국 Beijing Luckystar사로부터 제공받아 사용하였다. 분석에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC)는 Waters (Micromass UK Ltd., UK)의 제품으로 1525 binary pump, 2489 UV/Visible detector와 2707 autosampler로 구성되어 있다. HPLC용 acetonitrile과 water는 Burdick & Jackson (Honeywell International Inc., USA)으로부터 구매하여 사용하였다. 기타 미생물 배양에 필요한 모든 시약들은 특급시약을 사용하였다.

사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해용 미생물 분리. 부산 인근의 경작지 토양 또는 연안 퇴적물로부터 토양 샘플(0.5 g)을 채취하여 250 삼각 플라스크로 옮긴 다음, 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제인 사이퍼메트린(cypermethrin)을 최종 농도 50 mg/L이 되게 멸균된 mineral salt medium(MSM) 배지(Na_2HPO_4 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NH_4Cl 1 g/L, NaCl 0.5 g/L, MgSO_4 0.24 g/L, CaCl_2 0.011 g/L) 50 mL과 함께 첨가한 후, 30°C, 180 rpm에서 5일 동안 배양 했다. 5일 후 배양액 1 mL을 취하여 다시 사이퍼메트린(cypermethrin)을 최종 농도 100 mg/L이 되게 멸균된 MSM 배지 50 mL과 함께 첨가한 후, 30°C, 180 rpm에서 5일 동안 배양 했다. 순차적으로 사이퍼메트린(cypermethrin)의 농도를 높여 200, 300 mg/L까지 수행한 다음, MSM 고체 배지에 콜로니를 도출했다. 도출된 콜로니들은 각각 사이퍼메트린(cypermethrin)을 최종 농도 50 mg/L이 되게 멸균된 MSM 배지 50 mL과 함께 첨가한 후, 30°C, 180 rpm에서 5일 동안 배양한 다음 배양액에 존재하는 잔류 사이

퍼메트린(cypermethrin)을 추출한 다음 HPLC를 이용하여 분리 미생물에 의한 사이퍼메트린(cypermethrin)의 분해 정도를 측정했다(Xu 등, 2008).

16s rDNA 서열에 의한 분리 균주의 동정. 두 개의 oligonucleotide 프라이머 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (position 9 to 27 *E. coli* 16S rDNA), 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (position 1542 to 1525 *E. coli* 16S rDNA)를 이용하여 분리 균주의 16S rDNA 영역의 증폭을 수행했다. 초기 변성 단계는 95°C 1분을 시작으로 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분을 30 cycle 수행하고 최종 72°C에 10분간 신장 단계를 수행한다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 pGEM T-easy vector (promega Co., Fitchburg, WI, USA)속에 재조합한다. 선별 균주의 16S rDNA 유전자의 염기서열을 결정한 다음 GenBank Database에서 상동성을 비교하며, 유사 종들과의 유전학적인 유연관계를 알아보기 위하여 ClustalX program을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다(Lee 등, 2006).

배양액에서 사이퍼메트린(cypermethrin)의 추출 및 분석. 배양 상등액 10 mL에 아세톤/석유에테르 혼합액 (1:1, v/v) 20 mL을 혼합한 다음 ultrasonic bath에서 20분에 한 번씩 섞어 주면서 1시간 동안 추출을 수행하였다. 분리된 2개의 층들 중에서 상층액을 새 tube로 옮긴 다음 40°C water bath에서 중탕하며 질소 가스(N_2 gas)를 이용하여 완전히 휘발시켰다. Acetonitrile 1 mL을 첨가하여 시료를 완전히 녹인 다음 0.22 μm polytetrafluoroethylene 멤브레인 필터를 이용하여 여과한 다음, HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석은 Waters의 HPLC를 이용하였으며 XBridge™ C18 (5 μm , 4.6*150 mm 컬럼, Waters)을 사용하였고, acetonitrile:water (0.85:0.15, v/v) 용매를 분당 1 mL씩 흘리며 UV 235 nm에서 사이퍼메트린(cypermethrin)을 검출하였다(Chen 등, 2011).

결과 및 고찰

사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해를 위한 미생물의 분리. 부산 인근의 경작지 토양 및 연안 퇴적물로부터 샘플을 채취하였다. 샘플을 사이퍼메트린(cypermethrin)이 함유된 MSM 배지에서 순차적으로 배양한 후, 고체 배지에서 콜로니를 도출하였다. 도출된 콜로니들 중 채자 사이퍼메트린(cypermethrin)이 50 mg/L로 포함된 MSM 배지에서 5일간 배양 후 배양액 속에 잔류 사이퍼메트린(cypermethrin)의 농도를 측정하여 초기 첨가한 농도에 비하여 감소된 경향을 나타내는 콜로니들 중에서 강한 활성을 나타내는 콜로니를 선정하여 AP01이라고 명명하였다. **16S rDNA 염기서열을 활용한 분리 균주 동정.** 분리 균주 AP01의 16s rDNA를 알려진 대장균의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 제작한 프라이머를 활용하여 PCR을 통하여 증폭하였다. 얻어진 16S rDNA 염기서열을 GenBank의 기준에 보고된 16S rDNA들과 비교하고, 유전학적 유연관계를 ClustalX program을 활용하여 phylogenetic tree로 나타내었다(Fig. 1). AP01 균주의 16S rDNA 서열은 *Bacillus amyloliquefaciens* (AF489591)와 99% (1514/1526)의 상동성, *B. vallismortis* (AB021198)와 99% (1525/1530)의 상동성, *B. subtilis* (X60646)와 99% (1413/1430), (AB042061)와 99% (1535/1544) 그리고 (AB110598)와 99% (1534/1542)의 상동성, *B. mojavensis* (AB021191)와 99% (1515/1526), *B. atrophaeus*

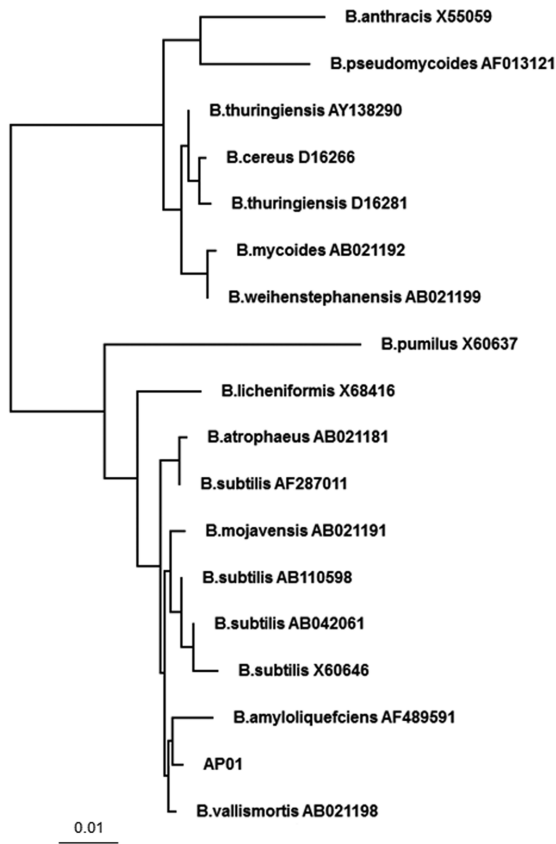


Fig. 1 Phylogenetic location of *Bacillus amyloliquefaciens* AP01 based on partial 16S rDNA sequences.

(AB021181)와 99% (1504/1515)의 상동성, *B. licheniformis* (X68416)와 98% (1517/1545)의 상동성과 *B. pumilus* (X60637)와 94% (1352/1432)의 상동성을 각각 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 분석들로 미루어 보아 분리균주 AP01은 *Bacillus amyloliquefaciens*에 속하는 것을 확인 할 수 있었으며, 분리 균주를 *Bacillus amyloliquefaciens* AP01이라고 명명하였다. **탄소원이 분리 균주 AP01이 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해에 미치는 영향.** 다른 모든 실험 조건은 동일하지만 하나의 인자만 변화를 주어서 실험하는 one factor at a time (OFAT)법을 활용하여 분리 균주 AP01이 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해에 영향을 미치는 탄소원에 대한 실험을 수행하였다. 탄소원의 종류로는 maltose, galactose, glucose, sucrose, lactose, carboxy methyl cellulose (CMC), soluble starch와 colloidal chitin을 각각 사용하였으며, 다른 인자들은 상기 실험조건과 동일하며, 선별된 탄소원들만 최종 2%가 되게 배지에 첨가하였다. 30°C, 180 rpm에서 5일 동안 배양한 후, 사이퍼메트린(cypermethrin) 분해율을 조사하였다(Fig. 2). Glucose를 탄소원으로 이용하였을 때 60.25%의 분해율을 나타내었으며, sucrose는 58.73%, maltose는 55.33%의 분해율을 나타내었다. 기타 다른 탄소원을 사용하였을 때는 45% 전후의 사이퍼메트린(cypermethrin) 분해 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 분리 균주 AP01의 경우, 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해를 위하여 사이퍼메트린(cypermethrin)과 더불어 glucose를 추가하였을 때 보다 향상된

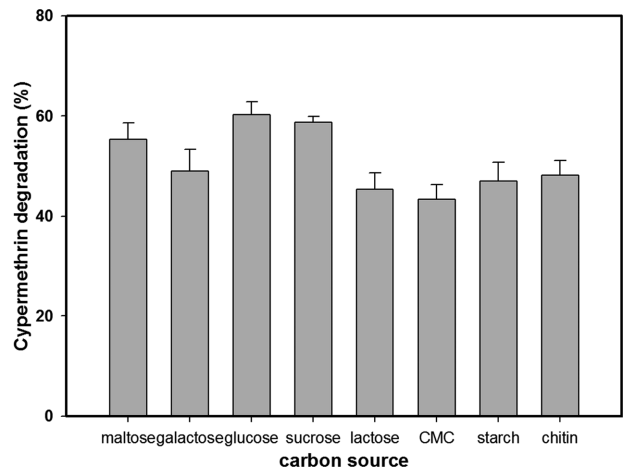


Fig. 2 Effect of carbon sources for biological cypermethrin degradation by *Bacillus amyloliquefaciens* AP01. The experiments were performed in triplicates.

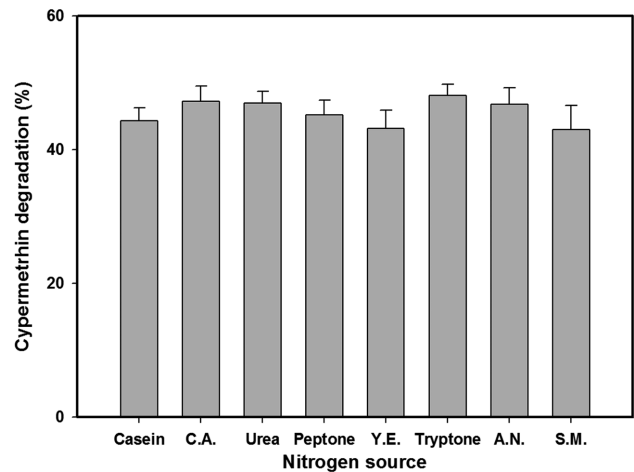


Fig. 3 Effect of nitrogen sources for biological cypermethrin degradation by *Bacillus amyloliquefaciens* AP01. The experiments were performed in triplicates.

분해율을 나타내는 것으로 판단된다. 유사한 결과는 Cycon 등 (2009)과 Chen 등(2012)에 의해서 보고 되었다. **질소원이 분리 균주 AP01이 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해에 미치는 영향.** 다른 모든 실험 조건은 상기 분석 방법과 동일하지만 질소원의 종류만 변화를 주어서 분리 균주 AP01이 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해에 영향을 미치는 질소원에 대한 실험을 수행하였다. 질소원의 종류로는 ammonium nitrate, casamino acid, casein, peptone, skim milk, tryptone, urea와 yeast extract를 각각 최종 0.5%가 되게 첨가 하였다. 30°C, 180 rpm에서 5일 동안 배양한 후, 사이퍼메트린(cypermethrin) 분해율을 조사하였다(Fig. 3). 분석에 사용되어진 다양한 질소원들의 경우, 대체로 45% 전후의 분해율을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 분리 균주 AP01이 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해 활성에 뚜렷한 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

상기의 실험 결과들을 종합해 보면 분리 균주 *Bacillus*

amyloliquefaciens AP01는 피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제 중의 하나인 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해를 위한 대표 미생물로 그 가능성을 확인 하였으며, 토양 및 농산물에 존재하는 잔류 농약 감소를 비롯하여 안전한 먹거리 확보에 크게 기여 할 것으로 판단된다.

초 록

피레스로이드(pyrethroid) 계열 살충제 중 하나인 사이퍼메트린(cypermethrin)의 생물학적 분해를 위하여 부산 인근의 토양과 연안 퇴적물에서 미생물들을 분리하였다. 이들 중 분해율이 우수한 미생물을 선별하여 AP01이라고 명명하였다. 분리 균주 AP01의 유전학적 유연관계를 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens*와 99%의 상동성을 나타내었다. 다양한 탄소원들 중에서 glucose를 첨가하였을 때, 분리 균주 AP01의 사이퍼메트린(cypermethrin) 분해 활성이 증가하였다.

Keywords biodegradation · cypermethrin · pyrethroid

감사의 글 본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2014년도 산학연협력 기술 개발사업(C0218194)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝히며, 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2011-0008619)이며, 농촌진흥청의 공동연구사업 농업생명공학 원천 기초기술 연구 소과제(과제번호: PJ09759)의 지원을 받았다.

References

- BMCIHE (2012) Pesticide residue survey of agricultural products distributed in Busan. Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment. **22**, 54–74, Korea
- Chen S, Dong YH, Chang C, Deng Y, Zhang XF, Zhong G et al. (2013) Characterization of a novel cyfluthrin-degrading bacterial strain *Brevibacterium aureum* and its biochemical degradation pathway. *Bioresour Technol* **132**, 16–23
- Chen S, Lai K, Li Y, Hu M, Zhang Y, and Zeng Y (2011) Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 1471–83
- Chen S, Luo J, Hu M, Lai K, Geng P, and Huang H (2012) Enhancement of cypermethrin degradation by a coculture of *Bacillus cereus* ZH-3 and *Streptomyces aureus* HP-S-01. *Bioresour Technol* **110**, 97–104
- Cycon M, Wojcik 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
- GIHE (2012) 2012 Annual report of the pesticide residues in agricultural products. Gyeonggi Institute of Health and Environment, Korea
- Kang N, Kim S, Kang Y, Kim D, Jang J, Won S et al. (2015) Monitoring and exposure assessment of pesticide residues in domestic agricultural products. *Korean J Pest Sci* **19**, 32–40
- Laskowski DA (2002) Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev Environ Contam Toxicol* **174**, 49–170
- Lee YS, Yoo JS, Chung SY, Lee YC, Cho YS, and Choi YL (2006) Cloning, purification, and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 113–21
- Park DW, Kim AG, Kim TS, Yang YS, Kim GG, Chang GS et al. (2015) Monitoring and safety assessment of pesticide residues on agricultural products sold via online websites. *Korean J Pest Sci* **19**, 22–31
- Wang BZ, Guo P, Hang BJ, Li L, He J, and Li SP (2009) Cloning of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Sphingobium* sp. Strain JZ-1 and characterization of the gene product. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5496–500
- Xiao Y, Chen S, Gao Y, Hu W, Hu M, and Zhong G (2015) Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 2849–59
- Xu G, Zheng W, Li Y, Wang S, Zhang J, and Yan Y (2008) Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *Inter Biodeterior Biodegrad* **62**, 51–6
- Zhang C, Wang S, and Yan Y (2011) Isomerization and biodegradation of beta-cypermethrin by *Pseudomonas aeruginosa* CH7 with biosurfactant production. *Bioresour Technol* **102**, 7139–46