

갯벌에서 분리한 유기염소계 살충제 Endosulfan 분해 세균의 특성

박미은·김영목¹·정용현*
부경대학교 생태공학과, ¹부경대학교 식품공학과

Characterization of Organochlorine Insecticide Endosulfan-Degrading Bacterium Isolated from Seaside Sediment

Mi-Eun Park, Young-Mog Kim¹ and Yong-Hyun Chung*
Department of Ecological Engineering, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

An endosulfan degrading bacterial strain, K-1321, was isolated by endosulfan-enrichment culture from a seaside sediment collected at Dadaepo Beach, Busan, Korea. The strain was identified as a *Serratia* sp. based on the results of morphological, biochemical and 16S rDNA homology analyses. *Serratia* sp. K-1321 was able to completely degrade 50 ppm endosulfan in culture media and soil within 6 weeks at 25°C. GC/MS analysis revealed that endosulfan diol was an intermediate of the bacterial endosulfan degradation. Considering the above results, we concluded that *Serratia* sp. K-1321 utilized endosulfan as a carbon source and metabolized endosulfan via a less toxic pathway, such as the formation of endosulfan diol as an intermediate.

Key words: Bioremediation, Endosulfan, Organochlorine, Seaside sediment

서 론

현대 농업에서 농약은 병충·해충 및 잡초 등을 방제함으로써 농산물의 질적·양적인 소실을 방지하고, 노동력 부족을 대체하여 안정적인 농산물의 공급을 가능하게 하였다. 농약은 그 특성 상 생물독성과 환경 및 생물체 내 잔류성을 가지며, 일부 농약의 경우 잔류성과 독성이 강하며 자연적으로 잘 분해가 되지 않아 많은 토양오염을 야기하였다 (Shin et al., 2008). 특히 유기염소계 살충제는 강한 독성을 가진 농약으로, 과거에는 널리 사용되었으나, 부작용이 많고 환경 및 체내에 오랫동안 잔류하는 특성이 있어 현재에는 몇몇 약제를 제외하고 사용이 금지되었다 (Shin et al., 2008; Usha and Harikrishnan, 2004).

Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepine-3-oxide)은 비침투성 유기염소계 농약으로서, 일반적으로 입체이성질체인 α -endosulfan과 β -endosulfan이 약 7:3으로 혼합된 약제를 말한다 (Siddique et al., 2003; Lee et al., 2006; Kim et al., 2008). DDT, aldrin 등 기존의 유기염소계 농약을 대체하여 전 세계적으로 사용되어 왔으며 (Usha and Harikrishnan, 2004), 현재 우리나라에서 가장 많이 사용되고 있는 유기염소계 살충제이다. 그러나 endosulfan은 내분비계 교란물질로 보고되어 있으며, 인축 및 어류 독성으로 인해 UNEP (United Nations

Environment Programme)에서 독성물질로 (Guerin, 2001), WHO (World Health Organization)에는 Category II, EU 및 US EPA (US Environmental Protection Agency)에는 Category I B 물질로 분류되어 있다 (Usha and Harikrishnan, 2004). Endosulfan에 중독되면 신경계 과잉 자극, 반복적 경련, 심혈관 허탈, 호흡부전, 두통, 흉통 등의 증상을 나타내며, 사망에까지 이르는 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 2004a; Park et al., 2008; Beauvais et al., 2010; Silva and Beauvais, 2010; Silva and Carr, 2010). 또한, endosulfan은 급성독성 뿐만 아니라 만성독성에 의한 위해성 역시 높으며, 포유류에 대한 생식독성 (gonadal toxicity), 유전독성 (genotoxicity), 신경독성 (neurotoxicity) 등을 유발할 수 있는 것으로 보고되어 있으며, 1 ppb~1 ppm의 농도에서 인간의 적혈구, 혈소판 및 헤모글로빈을 파괴한다는 연구가 있다 (Chaudhuri et al., 1999; Usha and Harikrishnan, 2004; Kim et al., 2004a; Park et al., 2008).

Endosulfan은 효과에 비해 부작용이 많고 환경 및 먹이연쇄에 의한 체내 축적과 이에 따른 인체 부작용 때문에 현재에는 그 사용이 제한적으로 허용되고 있다 (Usha and Harikrishnan, 2004). 그러나 최근까지도 토양, 지하수, 하천, 해수, 대기 등의 환경과 식품에서 자주 검출되고 있어 (Kim et al., 2000; Chung et al., 2001; Laabs et al., 2002; Harner et al., 2005; Lopez-Blanco et al., 2005; Kim et al., 2007; Ha et al., 2009; Park et al., 2009) 인체에 대하여 직·간접적으로 위해성을 가질 수 있어 문제가 되고 있다.

*Corresponding author: chungyh@pknu.ac.kr

따라서 본 연구는 유기독성 물질로서 환경 중에 잔류하여 토양 및 수질 오염을 유발하는 endosulfan을 효과적으로 분해할 수 있는 미생물을 이용한 친환경적인 분해방법을 개발하기 위하여 endosulfan에 대한 내성이 높고 endosulfan 분해력이 높은 미생물의 분리를 시도하였고 그 후 분리된 균을 사용하여 endosulfan의 분해 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용한 endosulfan (순도 99.0%)의 표준품은 Augsburg사 (독일)에서 구입하였으며, 분해균 배양에 사용한 endosulfan은 ㈜경농의 경농 지오릭스 유제 (endosulfan 순도 35%)를 구입하여 사용하였다. 그 외에 시험에 사용된 시약은 분석용의 특급시약을 구매하여 사용하였다.

시료

Endosulfan 분해 균주의 분리를 위해 2010년 5월에 경북 청도군 일대의 endosulfan이 많이 사용되는 과수원과 낙동강 하구 다대포 해수욕장 인근 갯벌에서 토양 및 저질 시료를 채취하였다.

균의 분리 및 배양

Endosulfan 분해 능력이 우수한 균을 선별하기 위해 집식배양을 실시하였다. 접종원은 Shin et al. (2008)의 방법을 참고하여 채취한 시료 10 g을 100 mL의 LB (Luria-Bertani media, Difco., USA) 배지에 넣고 25°C에서 120 rpm으로 24시간 진탕 배양 후 다시 1시간 동안 정치하여 이 상등액 10 mL를 접종액으로 사용하였다. 배양 배지는 Fujii et al. (2000) 및 Kim et al. (2004b)의 방법을 참고하여 탄소원이 없는 YNB (Yeast nitrogen base without amino acid, Difco. USA) 배지 100 mL에 탄소원으로서 100 ppm endosulfan을 첨가한 집식배지에 접종액을 가하여 25°C, 120 rpm으로 1 주 간격으로 3 차례 계대를 거치며 집식배양을 하였으며, 최종적으로 100 ppm의 endosulfan을 첨가한 YNB 한천 배지 (상기 YNB배지에 1.5% 한천을 가한 배지)에 도말하여 단일 균주를 분리하였다.

Table 1. GC/MS operating conditions for endosulfan analysis

GC/MS	Shimadzu (GC 2010 plus/ GC-MS 2010) DB-5 (CBP1-S25-050)	
Column	(Length 30 m × I.D. 0.32 mm, Film thickness 0.25 μm)	
Injector	Splitless	
Injection volume	1 μL	
Carrier gas	He 1.14 mL/min	
Aux temp.	250°C	
Oven temp. program	100°C for 2 min 100-300°C at 5°C/min 300°C for 3 min	
Ion source temp.	200°C	
Quadrupole temp.	220°C	
Detection	Qualitation	Selective ion monitoring (SIM), Ref. ion m/z : 241, 207, 195
	Quantitation	Full scan, m/z : 50-500, scan speed 1,000

Endosulfan 잔류량 측정 및 분해산물 분석

Endosulfan을 첨가한 YNB 한천배지에서 분리된 균들의 endosulfan 분해능 측정 및 분해산물 분석을 위해 100 ppm의 endosulfan이 첨가된 1/10 LB 배지 (Shin et al., 2008)에서 1주 이상 진탕배양 하였다. 배양 후 배양액에 잔류하는 endosulfan을 분석하기 위하여 배양액에 2배량의 n-hexane을 가하여 3분간 vortex mixer로 진탕한 후 n-hexane 층을 0.20 μm Cellulose Acetate filter (Advantec MFS Inc., Dublin, CA)로 걸러 GC/MS (Shimadzu GC 2010 plus/ GC-MS 2010)로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1 과 같다.

정성분석을 위한 endosulfan 표준품 및 분해산물의 GC/MS 분석 결과, α-endosulfan (m/z : 404)은 약 25.97 min, β-endosulfan (m/z : 404)은 약 28.07 min, endosulfan sulfate (m/z : 420) 및 endosulfan diol (m/z : 358)은 각각 약 35.45 min과 약 27.95 min에서 관측되었다. 이를 바탕으로 시간에 따른 peak 면적의 증가를 보인 peak에 대하여 endosulfan 분해 산물의 peak 및 ion spectrum과 대조하여 각 단일 균주에 의한 endosulfan 분해 산물을 검색하였다.

분리균의 동정

분리균은 형태학적 및 생화학적 분류와 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. Endosulfan 분해 분리균의 생화학적 특성 검사 및 동정은 그람 염색 후 그 결과에 따라 BioMerieux Vitek Gram negative identification card (GNI+)를 사용하여 분석하였으며, 그람 음성균 동정 카드 software 버전 R10.01 (BioMerieux, USA)을 사용하여 동정하여 그 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (Krieg and Holt, 1984)에 따라 확인하였다. Chromosomal DNA의 추출은 Berns and Thomas (1965) 가 기술한 일반적인 방법에 따라 행하였으며, DNA의 분리 및 조작에 사용한 시약 및 PCR kit들은 주로 Takara사 (Seoul, Korea)의 것을 사용하였다. PCR 반응에 사용된 DNA oligonucleotide는 Bioneer사 (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였다. PCR 반응에 사용한 primer는 Dunbar et al. (2000)의 문헌에 따라 제작하였으며 (27F, 5'-GTTT GGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R, 5'-AAGGAGGGGA TCCA GCC-3'), PCR 반응 조성은 DNA template에 27F primer, 1492R primer, 10×buffer, 10 mM dNTP mixture, 5X band (5XBD), EF-Taq polymerase를 첨가하여 총 50 μL의 혼합물로 수행하였다. 혼합한 반응액은 94°C에서 2분간 변성시켰다. 이를 52°C에서 2분간 annealing한 후 72°C에서 2분간 polymerization 시켰다. 다시 94°C에서 2분, 60°C에서 2분, 72°C에서 2분의 cycle을 20회 반복하여 시행하였다. 염기서열의 상동성 검색은 Ribosomal database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST)를 통하여 실시하였다.

Endosulfan 농도에 따른 분리균의 endosulfan 분해 특성

분리한 균주의 endosulfan 분해 한계를 알아보기 위해 농도가 각각 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 ppm의 endosulfan을 함유하는 YNB 배지를 조제하였다. 그 후 분리균을 접종하여 25°C에서 120 rpm 조건으로 진탕 배양하며 배지에 잔존하는

endosulfan을 시간별로 관찰하였다.

보조 탄소원 농도에 따른 분리균의 endosulfan 분해 특성

보조 탄소원의 농도에 따른 endosulfan 분해 정도를 알아보기 위해 100 ppm의 endosulfan과 보조 탄소원인 yeast extract의 농도가 각각 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%가 되도록 첨가하여 YNB 배지를 조제하였다. 각각의 배지에 분리균을 접종하여 25°C에서 진탕 배양하면서 시간에 따른 endosulfan의 잔류량을 분석하였다.

Table 2. Endosulfan dissipation ratio by strains isolated from enrichment culture

Strain No.	Remaining rate (%)	Degradation product	Strain No.	Remaining rate (%)	Degradation product
K-1120	46.4	endosulfan sulfate	S-120	104.3	N. D.
K-1131	91.5	N. D.	S-131	107.0	N. D.
K-1132	92.8	N. D.	S-132	129.4	N. D.
K-1220	98.0	N. D.	S-220	120.8	N. D.
K-1321	19.8	endosulfan diol	S-321	113.2	N. D.
K-1322	94.8	N. D.	S-322	85.2	N. D.
K-1331	56.4	endosulfan diol	S-331	101.1	N. D.
K-1332	43.6	endosulfan sulfate	S-332	85.3	N. D.
K-2120	31.2	endosulfan diol	N-1120	75.7	endosulfan sulfate
K-2130	34.7	endosulfan sulfate	N-1131	78.8	endosulfan sulfate
K-2220	89.0	N. D.	N-1132	98.2	N. D.
K-2321	72.3	endosulfan sulfate	N-1220	103.3	N. D.
K-2322	40.2	endosulfan sulfate	N-1321	83.2	N. D.
K-2331	30.1	endosulfan diol	N-1322	84.5	N. D.
K-2332	63.7	endosulfan sulfate	N-1331	107.7	N. D.
K-2333	70.5	endosulfan sulfate	N-1332	90.0	N. D.

Endosulfan 분해균에 의한 토양에서의 endosulfan 분해 특성

토양에서의 분리균의 endosulfan 분해능을 알아보기 위해 토양 실험을 실시하였다. 토양 실험에 사용한 토양은 부산시 기장군에 위치한 밭에서 채취한 토양을 2 mm 체로 통과시킨 후 110°C, 15기압에서 30분 동안 고압증기멸균을 3번 반복하여 멸균시켜 사용하였다. Endosulfan의 토양에의 흡착 및 휘발 등의 요건을 고려하여 100 g의 토양에 endosulfan의 농도가 각각 50, 100, 200, 500 ppm이 되도록 임의 오염시켰다. 그 후 LB 배지에 배양한 endosulfan 분해균 배양액을 20 mL 씩 주입하였으며, 유사한 조건을 조성하기 위해 대조구 (비접종구)에는 같은 양의 멸균된 LB 배지를 가하였다. α-Endosulfan의 경우 증기압이 4.0×10⁻⁴ Pa로 휘발성이 강하여 토양 중에서 빨리 제거되는

경향을 보이므로 (Guerin, 2001), 휘발에 의한 잔류 endosulfan 농도의 오차를 줄이기 위해 각 실험구의 입구를 실리콘스토퍼를 이용하여 막았다. 토양 실험 장치는 25°C에서 관찰하면서 토양 중에 잔류하는 endosulfan 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

Endosulfan 분해균의 분리

Endosulfan을 함유한 고체 평판배지에서 총 32주의 단일 균주를 분리하였으며, 이 중 12주의 균주가 endosulfan 분해능을 보였다. Endosulfan sulfate는 endosulfan의 분해산물 중 하나로, 그 독성이 모화합물인 endosulfan과 비슷하며, 환경 및 체내 잔류성은 endosulfan보다 더 큰 것으로 알려져 있다 (Rao and Murty, 1980; Shin et al., 2008; Cho, 2010) 따라서 분해산물로서 endosulfan sulfate를 생성하지 않는 균주 중 상대적으로 endosulfan의 분해능이 뛰어난 균주를 endosulfan 분해균으로 선정하였다. 그 결과 본 연구에서 분리된 균들 중에서 endosulfan 분해능이 가장 뛰어나고 endosulfan sulfate를 생성하지 않는 K-1321을 endosulfan bioremediation 연구를 위한 균주로 최종 선발하고 이 후 연구를 진행하였다 (Table 2).

Table 3. Biochemical properties of the isolated strain K-132

Medium Abbreviation	Principal component	Result
DP3	2,2,4'-Trichloro-2'-Hydroxydiphenylether	+
OFG	Glucose	+
GC	Tryptophan	+
ACE	Acetamide	-
ESC	Esculin	+
PLI	Indoxyl-β-D-Glucoside	+
URE	Urea	-
CIT	Citrate	+
MAL	Malonate	-
TDA	Tryptophan	-
PXB	Polymyxin B	+
LAC	Lactose	-
MLT	Maltose	+
MAN	Mannitol	+
XYL	Xylose	-
RAF	Raffinos	-
SOR	Sorbitol	-
SUC	Sucrose	+
INO	Inositol	+
ADO	Adonitol	+
COU	p-coumaric	+
H2S	Sodium Thiosulfate, Lactate, Ferrous Sulfate	-
ONP	O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	-
RHA	Rhamanose	-
ARA	L-Arabinose	-
GLU	glucose	+
ARG	Arginine	-
LYS	Lysine	+
ORN	Ornithine	+
OXI	Oxidase	-

Table 4. 16S rDNA sequences (1,420 bp) and identification of the isolation strain K-1321 by homology search based on 16S rDNA

1	ATGCAAGTCG	AGCGGTAGCA	CAGGGGAGCT	TGCTCCCTGG	GTGACGAGCG	GCGGACGGGT	60	
61	GAGTAATGTC	TGGGAAACTG	CCTGATGGAG	GGGGATAACT	ACTGGAAACG	GTAGCTAATA	120	
121	CCGCATAACG	TCGCAAGACC	AAAGAGGGGG	ACCTTCGGGC	CTCTTGCCAT	CAGATGTGCC	180	
181	CAGATGGGAT	TAGCTAGTAG	GTGGGGTAAT	GGCTCACCTA	GGCGACGATC	CCTAGCTGGT	240	
241	CTGAGAGGAT	GACCAGCCAC	ACTGGAAGT	AGACACGGTC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG	300	
301	CAGTGGGGAA	TATTGCACAA	TGGGCGCAAG	CCTGATGCAG	CCATGCCGCG	TGTGTGAAGA	360	
361	AGGCCTTCGG	GTTGTAAGC	ACTTTCAGCG	AGGAGGAAGG	TGGTGAGCTT	AAATACGTTT	420	
421	ATCAATTGAC	GTTACTCGCA	GAAGAAGCAC	CCGGCTAACT	CCGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	480	
481	ATACGGAGGG	TGCAAGCGTT	AATCGGAAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGCACG	CAGGCGGTTT	540	
541	GTTAAGTCAG	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTTGAA	ACTGGCAAGC	600	
601	TAGAGTCTCG	TAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	GGTGTAGCGG	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	660	
661	AGGAATACCG	GTGGCGAAGG	CGGCCCCCTG	GACGAAGACT	GACGCTCAGG	TGCGAAAGCG	720	
721	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCT	GTAACGATG	TCGATTTGGA	780	
781	GGTTGTGCC	TTGAGGCGTG	GCTTCCGGAG	CTAACGCGTT	AAATCGACCG	CCTGGGGAGT	840	
841	ACGGCCGCAA	GGTAAAAC	CAAAATGAAT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGC	GTGGAGCATG	900	
901	TGGTTTAAT	CGATGCAACG	CGAAGAACCT	CACCTACTCT	TGACATCCAG	AGAACCTAGC	960	
961	AGAGATGCTT	TGGTGCCTT	GGGAACCTG	AGCAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAGCTC	1020	
1021	GTGTTGTGAA	ATGTTGGGTT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTATCCT	TTGTTGCCAG	1080	
1081	CGGTTTCGGCC	GGGAACTCAA	AGGAGACTGC	CAGTGATAAA	CTGGAGGAAG	GTGGGGATGA	1140	
1141	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT	TACGAGTAGG	GCTACACACG	TGCTACAATG	GCGTATACAA	1200	
1201	AGAGAAGCGA	CCTCGCGAGA	GCAAGCGGAC	CTCATAAAGT	ACGTCGTAGT	CCGGATTGGA	1260	
1261	GTCTGCAACT	CGACTCCATG	AAGTCGGAAT	CGCTAGTAAT	CGTAGATCAG	AATGCTACGG	1320	
1321	TGAATACGTT	CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGTG	GGTTGCAAAA	1380	
1381	GAAGTAGGTA	GCTTAACCTC	GGGAGGGCGC	TTACCACTTT	1420			
	Reference (accession no.)						Identity (%)	
	<i>Serratia marcescens</i> KRED AB061685						96	
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1 EU036987						96	
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 AJ233431						95	

The sequence data was analyzed via ribosomal database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Endosulfan 분해균의 동정

선발된 분리균주 K-1321은 낙동강 하구 다대포 해수욕장 인근의 갯벌에서 채취한 시료에서 분리된 균주로 그람 염색에서 그람 음성의 단간균으로 조사되었다. 분리 균주의 생화학 적 특성은 Table 3에 나타내었으며, 분리균의 16S rDNA 염기 서열의 상동성 분석 결과, 분리균 K-1321은 *Serratia marcescens* KRED (accession no. AB061685) 및 *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 (accession no. EU036987)의 16S rDNA와 96%, *S. marcescens* DSM 30121 (accession no. AJ233431) 등의 *Serratia* 속에 속하는 균주들과 95%의 상동성을 나타내었다 (Table 4). 이러한 결과로부터 분리 선발된 K-1321 균주는 *Serratia* sp.에 속하는 것으로 판단되어 *Serratia* sp. K-1321로 명명하였다.

Endosulfan 농도에 따른 분리균의 endosulfan 분해 특성

NB 배지에서 endosulfan의 농도에 따른 분리균 K-1321의 분해능을 측정하였다. 그 결과 endosulfan의 초기 농도가 10 ppm로 첨가한 YNB 배지의 경우, 배양 4주 만에 100% 분해되었 으며, 50 ppm의 endosulfan을 함유한 배지의 경우에도 배양 6주에 endosulfan이 100% 분해되었다. 초기 농도 100 ppm 및 200 ppm의 endosulfan을 함유한 배지의 경우, 관찰 기간 동안 각각 약 82%, 65%의 endosulfan 분해율을 보였으며, 500

ppm의 경우 배양 기간 동안 약 30%의 endosulfan 분해율을 보여 endosulfan이 느리게 분해되는 양상을 보였다. 1,000 ppm을 함유한 배지의 경우에는 endosulfan이 거의 분해되지 않고 대부분 잔류하였다. 따라서 본 연구에서 분리한 endosulfan 분해균은 낮은 농도는 물론 500 ppm의 높은 농도에서도 분해 속도가 느리기는 하나, 어느 정도의 분해능을 보였다. 그러나 1,000 ppm 이상의 매우 높은 농도의 endosulfan은 거의 분해하지 못하였다 (Fig. 1).

보조 탄소원 농도에 따른 endosulfan 분해능

보조 탄소원의 농도에 따른 endosulfan 분해능을 측정하였다. 100 ppm의 endosulfan이 함유된 YNB 배지에 보조 탄소원인 yeast extract를 각각 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%가 되도록 첨가하여 조제한 후 분해균을 접종하여 배양하면서 시간에 따른 endosulfan 분해능을 측정 및 비교하였다. 보조 탄소원이 전혀 없는 경우 (0% yeast extract), endosulfan의 분해가 매우 느려 관찰 기간 동안 (6주) 약 20% 정도의 분해율을 보였다. 보조 탄소원을 첨가한 경우에는 초기 분해속도가 보조 탄소원이 없는 경우와 비슷했으나 2주후부터 분해가 촉진되기 시작 하여, 0.5%의 yeast extract를 첨가한 배지에서는 6주후 관찰 기 약 95%의 endosulfan 분해율을 나타내었다 (Fig. 2). 보조 탄소원을 0.01%, 0.05%, 0.1%의 농도로 첨가한 경우에는 배양

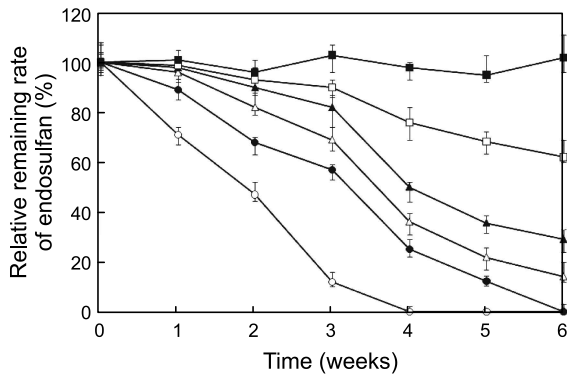


Fig. 1. Biodegradation of endosulfan by *Serratia* sp. K-1321. Cells were grown in YNB containing endosulfan. Endosulfan was determined by GC/MS analysis. ○-○, 10 ppm endosulfan; ●-●, 50 ppm endosulfan; △-△, 100 ppm endosulfan; ▲-▲, 200 ppm endosulfan; □-□, 500 ppm endosulfan; ■-■, 1,000 ppm endosulfan.

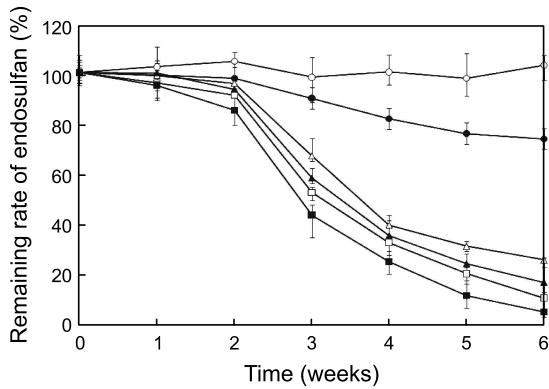


Fig. 2. Effect of an additional carbon source on endosulfan biodegradation by *Serratia* sp. K-1321. After inoculation, cells were cultivated at 25°C in YNB medium containing 100 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, 0% yeast extract; △-△, 0.01% yeast extract; ▲-▲, 0.05% yeast extract; □-□, 0.1% yeast extract; ■-■, 0.5% yeast extract.

6주후 각각 70%, 80%, 85%의 분해율을 보여, 근소한 차이이기는 하나 보조 탄소원의 농도가 높은 배지에서 endosulfan의 분해가 비교적 빠른 속도로 일어났다 (Fig. 2). 이는 보조 탄소원의 농도가 높을수록 분리균의 증식이 촉진되기 때문에 균의 증식과 더불어 endosulfan이 분해 (에너지 대사)가 이루어진 것으로 생각되어진다.

Endosulfan 분해균에 의한 토양에서의 endosulfan 분해 특성

Endosulfan 분해균 K-1321에 의한 토양에서의 endosulfan 분해능을 조사하였다. 그 결과, 50 ppm endosulfan으로 오염시킨 토양의 경우에는 6주에 endosulfan이 완전 분해되었다 (Fig. 3). 100 ppm의 endosulfan으로 오염시킨 토양에서는 6주후 약 85%, 200 ppm으로 오염시킨 토양에서는 75%의 분해율이

나타났다. 그러나 YNB 배지에서와는 달리 500 ppm의 endosulfan으로 오염시킨 토양에서는 endosulfan의 분해가 거의 일어나지 않았는데 이는 500 ppm의 endosulfan에 의한 균 증식 저해에 의한 것으로 생각된다 (Fig. 3).

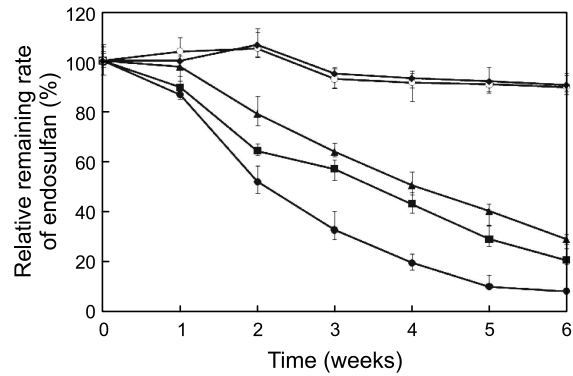


Fig. 3. Endosulfan bioaugmentation of endosulfan by *Serratia* sp. K-1321. Cells were grown in soil containing endosulfan. Endosulfan was determined by GC analysis. ○-○, Control (no inoculation); ●-●, 50 ppm endosulfan; ■-■, 100 ppm endosulfan; ▲-▲, 200 ppm endosulfan; ◆-◆, 500 ppm endosulfan.

Endosulfan 분해균 K-1321의 endosulfan 분해능을 조사한 결과를 종합해 보면, 200 ppm 이하의 농도에서는 배양배지에서 보다 토양에서 더 빠른 속도로 endosulfan이 분해되는 양상을 보였으나 500 ppm의 농도에서는 토양 중의 endosulfan은 분해하지 못하는 것으로 조사되었다. 또한 각 농도의 토양 실험구에서 endosulfan 분해균을 접종시키지 않은 대조구 (control; no inoculation)에서도 10% 미만의 미량이지만 endosulfan이 상당히 느린 속도로 감소하는 경향을 보였는데, 이러한 결과는 Kim et al. (2008)의 보고와 같이 endosulfan이 토양에 흡착되거나 공기 중으로 휘발하였기 때문으로 생각된다.

분리균주 K-1321의 endosulfan 분해 경로

Endosulfan의 생물학적 분해에 대하여 많은 연구가 보고되고 있으며 (Fig. 4), 다양한 미생물에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다 (Sutherland et al., 2002a; Sutherland et al., 2002b; Hussain et al., 2007). Lee et al. (2006)은 *Pseudomonas* sp. KS-2P에 의해 endosulfan 및 endosulfan sulfate가 분해된다고 보고하였으며, Kwon et al. (2003)은 *Klebsiella pneumoniae* KE-1이, Sutherland et al. (2002a)은 *Mycobacterium* strain이 endosulfan sulfate를 생성하지 않고 endosulfan을 분해한다고 보고하였다. 또한 Kwon et al. (2005)은 *Klebsiella oxytoca* KE-8이 endosulfan sulfate를 분해한다고 보고하였고, Lee et al. (2003)은 *Anabaena* sp.가 endosulfan을 분해하여 endosulfan을 endosulfan sulfate와 알려지지 않은 물질을 생성한다고 보고하였다. Shin et al. (2008)은 *Bacillus* sp. E64-2가 endosulfan을 endosulfan diol로, Awasthi et al. (2003)은 *Bacillus* strain이 endosulfan을 endosulfan diol과 endosulfan lactone으로 분해한다고 보고하였

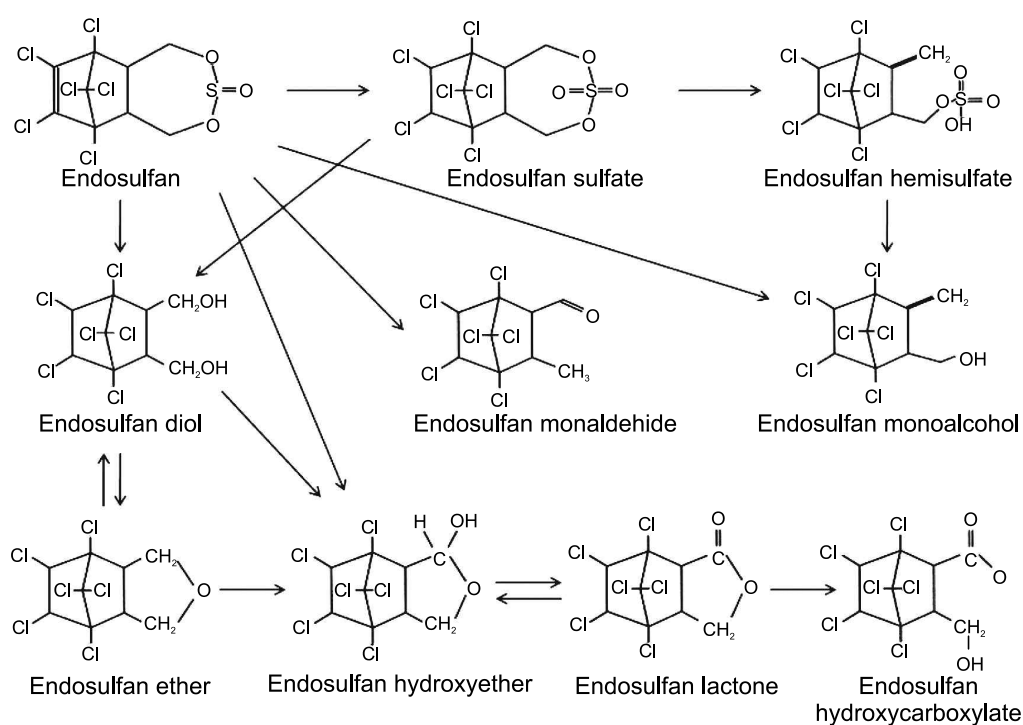


Fig. 4. Proposed metabolic pathways of endosulfan (Awasthi et al., 2003; Hussain et al., 2007; Kwon et al., 2005; Lee et al., 2003; Lee et al., 2006; Siddique et al., 2003; Sutherland et al., 2002a; Sutherland et al., 2002b).

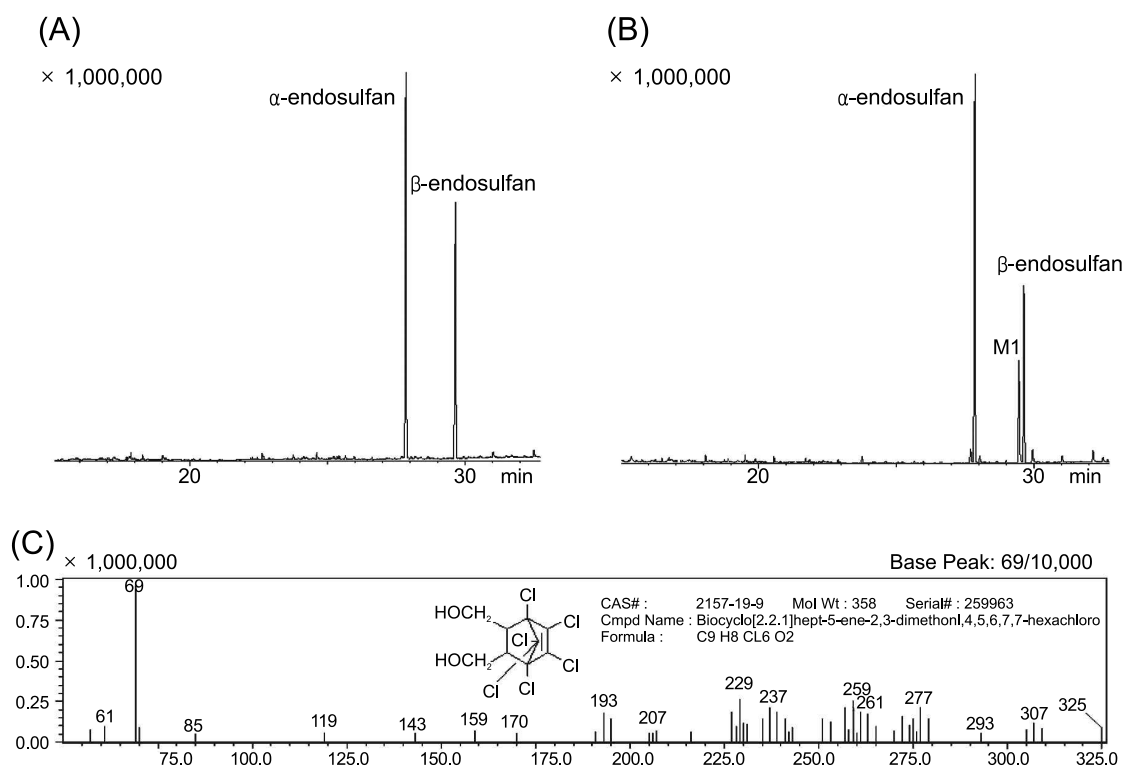


Fig. 5. GC/MS profile and mass spectra of endosulfan and its metabolites. Cells were grown in YNB medium containing 100 ppm endosulfan. After 4 weeks incubation, GC/MS analysis was conducted. A, GC/MS profile of endosulfan; B, GC/MS profile of metabolites; C, Mass spectra of the metabolite I (MI).

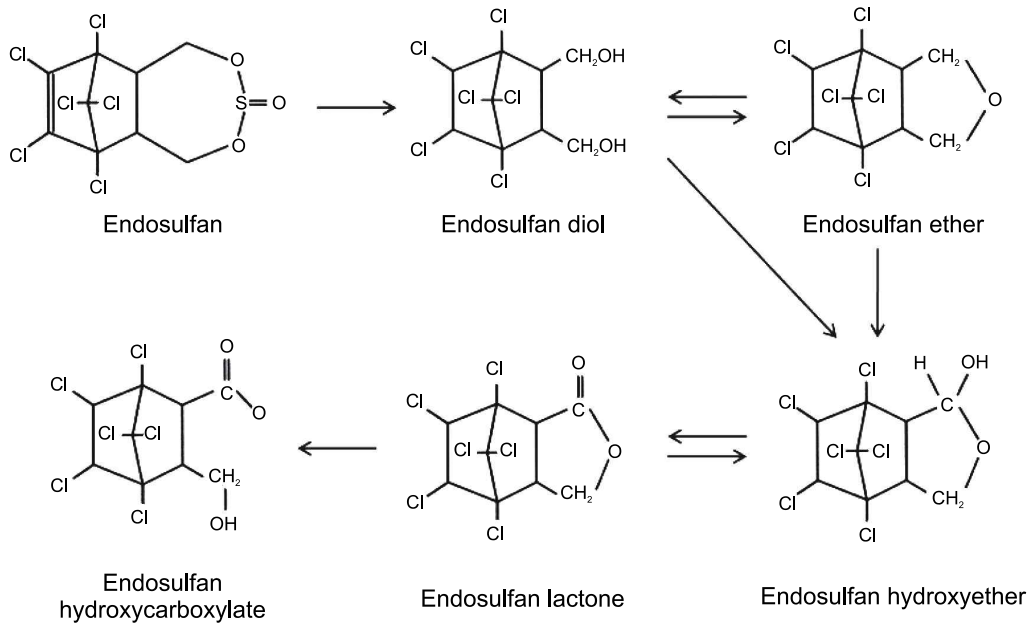


Fig. 6. Proposed pathway of endosulfan biodegradation by *Serratia* sp. K-1321.

는데, 일반적으로 토양환경 중에서는 endosulfan sulfate가 주요 대사산물로 생성되기 때문에 문제가 되고 있다 (Rao and Murty, 1980; Shin et al., 2008; Cho, 2010).

본 연구에서 분리한 endosulfan 분해균주 K-1321에 의한 endosulfan 분해 산물을 GC/MS로 분석한 결과, endosulfan diol이 검출되었으며, 시간에 따라 그 양이 증가함을 확인하였다 (Fig. 5). 따라서 *Serratia* sp. K-1321은 endosulfan을 endosulfan diol로 분해하여 endosulfan diol이 endosulfan ether 및 endosulfan lactone을 거쳐 endosulfan hydroxycarboxylate로 분해하는 경로를 따르는 것으로 추정하였다 (Fig. 6).

본 연구에서 보고한 바와 같이 높은 독성을 가지며 환경에서 잔류성이 큰 난분해성 화합물을 잘 분해할 수 있는 미생물을 선발하고 그 특성을 잘 이용한다면, 이러한 화합물이 축적되어 있는 생태계의 복원뿐만 아니라 궁극적으로 이 화학물질이 잔류한 환경에서 생산된 농·수산물에 대한 안전성의 보장에도 기여할 수 있을 것으로 여겨지며, endosulfan 이외의 난분해성 유기오염물질의 분해 및 제거를 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

“이 논문은 2010학년도 부경대학교 연구년 교수 지원사업에 의하여 연구되었음 (PS-2010-011)”.

참고문헌

Awasthi N, Singh AK, Jain RK, Khangarot BS and Kumar A. 2003. Degradation and detoxification of endosulfan isomers by a defined co-culture of two

Bacillus strain, Appl Microbiol Biotechnol 62, 279-283.

Beauvais SL, Silva MH and Powell S. 2010. Human health risk assessment of endosulfan: III. Occupational handler exposure and risk. Regul Toxicol Pharmacol 56, 28-37.

Berns KI and Thomas CA. 1965. Isolation of the high molecular DNA from *Haemophilus influenzae*. J Mol Biol 11, 476-490.

Cho KB. 2010. Residual Characteristics of endosulfan in Busan and Gimhae Farmland. M.D. Thesis, Dong-A University, Busan, Korea.

Chung RP, Choi MK, Yeo HG and Chun MY. 2001. Seasonal variations in the concentration of persistent organochlorine pesticides in atmosphere. Kor J Environ Agric 20, 79-85

Chaudhuri K, Selvaraj S and Pal AK. 1999. Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. Mutat Res 439, 63-67.

Dunbar J, Ticknor LO and Kuske CR. 2000. Assessment of microbial diversity in four South-western United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Appl Environ Microbiol 66, 2943-2950.

Fujii K, Urano N, Kimura S, Nomura Y and Karube I. 2000. Microbial degradation of nonylphenol in some aquatic environments. Fish Sci 66, 44-48.

Guerin TF. 2001. A biological loss of endosulfan and

- related chlorinated organic compounds form aqueous systems in the presence and absence of oxygen. *Environ Pollut* 115, 219-230.
- Ha KT, Park SK, Cho TH, Han CH, Kim SD, Lee KA, Kim SJ, Jang JI, Jo HB and Choi BH. 2009. Monitoring on endocrine disruptors in commercial agricultural products in the northern area of Seoul (2007). *J Food Hyg Safety* 24, 136-142.
- Harner T, Shoeib M, Kozma M, Gobas FAPC and Li SM. 2005. Hexachlorocyclohexanes and endosulfans in urban, rural, and high altitude air samples in the fraser valley, british columbia: Evidence for trans-pacific transport. *Environ Sci Technol* 39, 724-731.
- Hussain S, Arshad M, Saleem M and Khalid A. 2007. Biodegradation of alpha- and beta-endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation* 18, 731-740.
- Kim SD, Kim BS, Park SK, Kim MY, Cho TH, Han CH, Jo HB and Choi BH. 2007. A Study of current status on pesticide residues in commercial dried agricultural products. *Kor J Food Sci Technol* 39, 114-121.
- Kim SK, Cho SH and Cho NS. 2004a. A case of endosulfan intoxication occurring in groups. *Kor Soc Emerg Med* 5, 409-412.
- Kim TK, Kim JE, Kim TH, Shin HS, Kwon OK, Kim JD and Lim SJ. 2008. Chemical remediation of soils contaminated with endosulfan organochlorine insecticide. *Kor J Environ Agric* 2, 75-89.
- Kim YG, Kim TG, Park SS, Heo NC and Hong SS. 2000. A study on residual pesticides in commercial fruits and vegetables. *Kor J Food Sci Technol* 32, 763-771.
- Kim YM, Park K, Joo GJ, Jeong EM, Kim JE and Rhee IK. 2004b. Glutathione-dependent biotransformation of the fungicide chlorothalonil. *J Agric Food Chem* 52, 4192-4196.
- Krieg NR and Holt JG. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 1. In: Genus VIII. Grimont PAD and Grimont F, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 477-484.
- Kwon GS, Kim JE, Kim TK, Sohn HY, Koh SC, Shin KS and Kim DG. 2003. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* 215, 255-259.
- Kwon GS, Sohn HY, Shin KS, Kim EJ and Seo BI. 2005. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8., *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 845-850.
- Laabs V, Amelung W, Pinto AA, Wantzen M, da Silva CJ and Zech W. 2002. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brasil. *J Environ Qual* 31, 1636-1648.
- Lee JB, Sohn HY, Shin KS, Jo MS, Kim JE, Lee SW, Shin JW, Kum EJ and Kwon GS. 2006. Isolation of a soil bacterium capable of biodegradation and detoxification of endosulfan and endosulfan sulfate. *J Agric Food Chem* 54, 8824-8828.
- Lee SE, Kim JS, Kennedy IR, Park JW, Kwon GS, Koh SC and Kim JE. 2003. Biotransformation of an organochlorine insecticide, endosulfan, by *Anabaena* species. *J Agric Food Chem* 51, 1336-1340.
- Lo'pez-Blanco MC, Cancho-Grande B, Simal-Ga'ndara J, Lo'pez-Periago E and Arias-Estevéz M. 2005. Transport of commercial endosulfan through a column of aggregated vineyard soil by a water flux simulating field conditions. *J Agric Food Chem* 53, 6798-6743.
- Park KR, Jung YS and Rim H. 2008. A case of endosulfan intoxication with pulmonary embolism. *Kor Assoc Intern Med* 74, S250-S253.
- Park SK, Ha KT, Kim SD, Kim SJ, Lee YJ, Lee KA, Jang JI, Jeoung SS, Song BY, Jo SJ, Jo HB, Choi BH and Kim MY. 2009. Survey on pesticide residues in commercial agricultural products in the northern area of Seoul. *J Food Hyg Safety* 24, 27-37.
- Rao DMR and Murty AS. 1980. Persistence of endosulfan in soils. *J Agric Food Chem* 28, 1099-1101.
- Shin JH, Kwak YY, Kim WC, So JH, Shin HS, Park JW, Kim TH, Kim JE and Rhee IK. 2008. Isolation of endosulfan degrading bacteria and their degradation characteristics. *Kor J Environ Agric* 27, 292-297.
- Siddique T, Okeke BC, Arshad M and Frankenberger WT. 2003. Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J Environ Qual* 32, 47-54.
- Silva MH and Beauvais SL. 2010. Human health risk assessment of endosulfan: I. Toxicology and hazard identification. *Regul Toxicol Pharmacol* 56, 4-17.
- Silva MH and Carr WC. 2010. Human health risk assessment of endosulfan: II. Dietary exposure assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 56, 18-27.
- Sutherland TD, Horne I, Harcourt RL, Russell RJ and Oakeshott JG. 2002a. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide endosulfan. *J Appl Microbiol* 93,

380-389.

Sutherland TD, Horne I, Russell RJ and Oakeshott JG. 2002b. Gene cloning and molecular characterization of a two-enzyme system catalyzing the oxidative detoxification of beta-endosulfan. *Appl Environ Microbiol* 68, 6237-6245.

Usha S and Harikrishnan VR. 2004. Endosulfan, Thanal,

Kerala, India, 3-4.

2010년 12월 11일 접수

2011년 1월 31일 수정

2011년 6월 8일 수리