

工學碩士 學位論文

토양 조건에서의 천연유기물 첨가에 의한 Endosulfan
생분해 촉진효과 규명 및 PCNB 분해균의 분리 · 동정

Effect of Natural Organic Substrates on Facilitation of Endosulfan
Biodegradation in a Soil and Isolation of PCNB degraders

指導教授 高 星 澈

2003年 2月

韓國海洋大學校 大學院

土木環境工學科

愼 晟 揆

본 論文을 愼晟揆의 工學碩士 學位論文으로 認准함.

위원장 : 김 인 수 (인)

위 원 : 송 영 채 (인)

위 원 : 고 성 철 (인)

2002년 12월 14일

韓國海洋大學校 大學院

土木環境工學科 愼 晟 揆

목 차

Table of Contents	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
ABSTRACT	vi
I. 서론	1
II. 문헌연구	3
2.1 Endosulfan 및 PCNB의 물리·화학적 성질 및 생물독성	3
2.2 Endosulfan 및 PCNB 오염현황	6
2.3 Endosulfan 및 PCNB의 생분해경로	7
2.4 천연유기물 첨가에 따른 난분해성 유기화합물의 분해 촉진 · 11	
2.5 PCR-DGGE기법에 의한 미생물의 군집분석	11
III. 실험재료 및 방법	15
3.1 시험토양의 채취	15
3.2 시약	15
3.3 Endosulfan 및 PCNB의 생분해균의 분리	15
3.4 Endosulfan 및 PCNB의 생분해균주의 성장실험	17
3.5 Endosulfan 및 PCNB의 분해균주의 동정	17
3.6 Endosulfan 분해경로 규명을 위한 돌연변이균 제조	18
3.7 Endosulfan첨가 순수배양조건에서의 천연유기물 첨가에 의한 성장 영 향	18
3.8 토양에서 천연유기물첨가에 의한 Endosulfan 분해촉진 시험 · 19	
3.9 PCR-DGGE 기법에 의한 분해미생물의 추적	20

IV. 결과 및 고찰	23
4.1 Endosulfan 및 PCNB 분해균의 분해력	23
4.2 Endosulfan 및 PCNB 분해균의 동정	27
4.3 Tn5 mutagenesis	33
4.4 천연유기물 첨가 순수배양 조건에서의 Endosulfan 분해균의 성장 및 분해효과	33
4.5 천연유기물 첨가 토양에서의 Endosulfan 분해균의 성장 및 Endosulfan 분해효과	35
V. 결론	45
VI. 참고문헌	46

List of Tables

Table 2.1 Physical and chemical properties of endosulfan	5
Table 3.1 Physical and chemical properties of soil sample	15
Table 3.2 Design of soil microcosm experiments	20
Table 4.1 16S rDNA sequence (712 bp) similarity of the strain PCNB-2 to those of various type of cultures	29
Table 4.2 Physiological characteristics of the strain PCNB-2 based upon API NE 20 test	30
Table 4.3 Profile of cellular fatty acids of the strain PCNB-2 based upon MIDI method	31

List of Figures

Figure. 2.1 Chemical structure of Endosulfan	4
Figure. 2.2 Chemical structure of PCNB	4
Figure. 2.3 Proposed metabolic pathway of Endosulfan	7
Figure. 2.4 Proposed metabolic pathway of PCNB	9
Figure. 2.5 Proposed metabolic pathway of PCP (Minesota university)	10
Figure. 2.6 Flow diagram of PCR-DGGE analysis of microbial communities	14
Figure. 4.1 Temporal change of pH and cell growth during the endosulfan degradation by <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8	24
Figure. 4.2 Time course of endosulfan and endosulfan isomers degradation by <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8	25
Figure. 4.3 Growth curves of PCNB degraders which were grown on MSM containing PCNB (100ppm) as a sole carbons source	26
Figure. 4.4 16S rDNA partial sequencing of <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8	28
Figure. 4.5 SEM micrographs of the PCNB degrader PCNB-2	32
Figure. 4.6 Effect of Plant extract A on the growth of <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8	34
Figure. 4.7 Viable count of <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8 population in the soil microcos 5m undergoing endosulfan degradation	36
Figure. 4.8 Endosulfan degradation by <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8 in the soil microcosm	37
Figure. 4.9 Endosulfan degradation rate (%) by <i>Klebsiella oxytoca</i> KE-8 in the soil microcosm	38

ABSTRACT

Endosulfan and pentachloronitrobenzene (PCNB) are toxic pesticides that were used to control soil-borne plant diseases but are still detected in soils and edible crops despite its terminated use. In this study we report a new Endosulfan and PCNB-degrading strains able to grow under ambient aerobic conditions. These strains could readily utilize Endosulfan and PCNB (100ppm) as a sole carbon source respectively and showed a distinctive growth in a week or so. Endosulfan degrader was identified as *Klebsiella oxytoca* KE-8 and PCNB degrader as *Alcaligenes denitrificans* based upon 16S rDNA sequence analysis. In this study a PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) system was developed to specifically monitor endosulfan or PCNB degrader population (*Klebsiella oxytoca* KE-8 and *Alcaligenes denitrificans*). The isolation and characterization of the new degraders will be useful in facilitating accelerated bioremediation of Endosulfan and PCNB in the environment and in monitoring the bioremediation processes.

Key words : Endosulfan, PCNB, microcosm, PCR-DGGE, natural organic substrate

I. 서론

일반적으로 유기염소계 농약은 지용성이 크며 화학적으로 안정되어 있어 환경 중에서 잘 분해되지 않는 특성이 있다. 이러한 특성으로 인해 생물농축과 먹이사슬농축으로 생태계에 악영향을 끼쳐 전세계적으로 주목을 받고 있으며, 일부 국가를 제외하고는 유기염소계 농약의 생산과 사용을 금하거나 제한하고 있다 [1, 5]. 그러나 이들 유기염소계 농약은 일부 국가에서 아직도 사용되고 있고, 합성 유기농약 초창기에 농약의 효과를 과신하여, 무분별하게 사용한 결과 유기염소계 농약과 그 분해산물이 이러한 농약을 전혀 사용한 적이 없는 지역에서도 검출되고 있는 실정에 놓여 있다 [27]. 이러한 유기염소계 농약은 구조에 따라 크게 세 가지로 나누어진다. DDT 계열, HCH 계열, 그리고 염소화 Cyclodiene 계열이 있다. Endosulfan과 PCNB는 이 염소화 Cyclodiene 계열에 속하는 살충제이며 비교적 넓은 적용범위를 가지고 사용되었다. 유기염소계 농약은 먹이연쇄 관계를 통해서 여러 생물체로 전이되면서 농축되는 경향을 나타낼 수 있는데 이런 경향으로 인해 Endosulfan 및 PCNB의 환경내 동태규명이 필요하고, 2001년 5월 새로이 ‘잔류성 유기오염물질에 관한 스톡홀름 조약(POPs조약)’이 체결된 후라 과거에 처리된 것에 대해서도 처리기술을 확립하여 적절한 처리를 해야할 필요성이 높아지고 있다 [6, 8, 11]. 또한 현재의 Endosulfan과 PCNB에 대한 환경친화적 처리기술은 미국의 Working Group on Pesticides의 제안에 의한 몇 가지 방법들이 있는데 대수층 밑의 깊이로 땅을 파고 묻거나, 매립, 라군을 이용하여 오염물들을 모아서 산화, 생물학적 처리, 증발 등을 시키는 정도에 그치고 있다 [26, 27].

본 연구에서는 유기염소계 농약을 분해할 수 있는 미생물과 주요대사경로를 확인하고, 토양환경 중에서의 분해미생물의 개체군 동태를 규명하여 유기염소계 농약(Endosulfan 및 PCNB)으로 오염된 토양환경을 환경친화적, 경제적으로 복원하기 위한 방법으로 오염 자연환경에 존재하는 Endosulfan 및 PCNB분해균을 농화배양법으로 분리한 후 그들의 분해활성을 검토한 후 분리, 선발된 분해균에 대해서는 동정을 실시하고 분리된 균주를 천연유기물이 첨가된 토양에 처리하여 Endosulfan 또는 PCNB의 분해가 어떻게 영향을 받는지 검토하였

다 [3, 5, 7, 12, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23]. 아울러 분해미생물의 군집변화를 PCR-DGGE기법으로 추적하며 이들이 어떻게 이들 화합물의 분해에 기여하는지 검토하였다 [4, 6, 8, 11, 18, 19]. 이러한 실험결과들은 장기적으로 Endosulfan 또는 PCNB의 궁극적 환경친화적 처리기술의 개발에 기여할 것으로 사료된다.

II. 문헌연구

2.1. Endosulfan 및 PCNB의 물리·화학적 성질 및 생물독성

Endosulfan은 크림-브라운색의 고체이며, 결정 또는 얇은 조각의 형태를 띤다. 테르빈유 같은 냄새가 나고 타지 않으며 환경에서 자연적으로 발생하지 않는다. Technical-grade Endosulfan은 적어도 94%정도의 α -endosulfan과 β -endosulfan으로 구성되어 있고, 존재 비율은 7:3정도이다. 그리고, 2%이상의 Endosulfan alcohol과 1%이상의 Endosulfan ether로 구성된다. Endosulfan sulfate는 Technical-grade Endosulfan의 반응산물로 발견되는데, 환경에서는 광분해와 생물변환에 의한 산화의 결과로서 유기체에서 발견된다 [26]. Endosulfan, α -endosulfan, β -endosulfan, Endosulfan sulfate의 물리, 화학적 특징은 Endosulfan의 연구에서 중요하다. Endosulfan은 6, 7, 8, 9, 10, 10-Hexachloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahydro-6, 9-methano-2, 4, 3-benzo(e)-dioxathiepin-3-oxide으로도 지칭되며 화학식으로는 $C_9H_6Cl_6O_3S$ 표현하고 있다 [26]. Technical-grade Endosulfan의 대부분을 이루고 있는 두 가지 이성질체인 α -endosulfan과 β -endosulfan의 경우 공기중에서 느린 속도로 Endosulfan sulfate로 산화되고 높은 온도에서의 β -endosulfan의 경우 천천히 좀 더 안정한 α -endosulfan의 형태로 전환되게 된다 [23, 26].

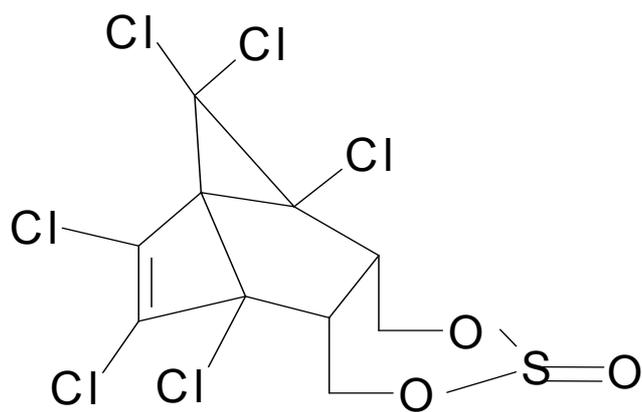


Fig. 2.1. Chemical structure of Endosulfan [1, 26, 27]

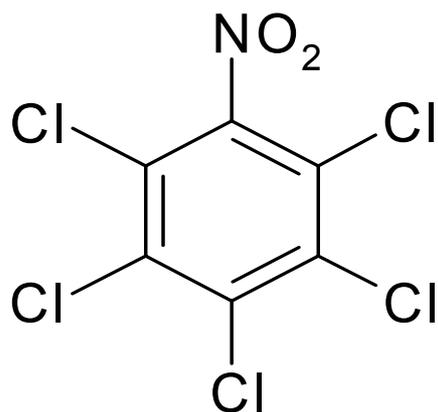


Fig. 2.2. Structure of PCNB [1, 26, 27]

Table 2.1. Physical and Chemical Properties of Endosulfan [27]

Property	Information
Molecular	406.95
Color	Cream to brown; mostly beige
Physical state	Crystalline solid; Waxy solid
Melting point	
Pure	106°C
Technical	70~100°C
Boiling point	No data
Density at 20/4°C	1.735g/ml
Density for vapor	14
Odor	
α -Endosulfan	Terpene-like
Decomposition products	May have a slight odor of sulfur dioxide
Organic solvents at 20°C	
Dichloromethane	65g/l
Ethanol	65g/l
Chloroform	746g/l
Ethanol	40g/l
Kerosene	164g/l
Methanol	89g/l
Xylene	388g/l
Partition coefficients:	
Log K_{ow}	3.55 and 3.62
Log K_{oc}	3.5
Reactivity	Both isomers are slowly hydrolysed by aqueous acids and alkalis, with the formation of the diol and sulfur dioxide α and β isomers are rapidly oxidized by peroxides or pemanganate to endosulfan sulfate The β form is slowly converted to the more stable α form at high temperatures Both isomers slowly oxidize in air to endosulfan sulfate Corrosive to iron

Endosulfan은 고독성 농약으로서 모화합물의 토양중 반감기 (30~70일)는 다른 유기염소계농약들에 비해 짧은 편이다. Endosulfan의 경우 다른 유용한 살충제에 비교하여 익충이나 진드기 그리고 거미들에게는 낮은 독성을 보이나, 물고기나 수중의 무척추동물 그리고 포유류의 생식선에 대해서는 극도의 독성을 보인다 [9, 23, 25]. Endosulfan은 중앙신경계에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 과민성, 구역질, 현기증, 두통, 경련등을 일으키며 노출된 농도가 높을 경우 사망에 이를 수도 있다[5]. LC50 (lethal concentration, 50% kill)값은 암컷쥐의 경우 12.6mg/m³ 수컷쥐의 경우 34.5mg/m³이다 [27].

2.2 Endosulfan 및 PCNB 오염현황

Endosulfan의 경우, 1954년 Farbwerke Hoechst A.G.에 의해 미국에서 처음 소개되었고, "Thiodan"이란 상표로 등록되었다 [1, 23]. Endosulfan은 식용이나 비식용 곡물에 생기는 곤충의 수의 조절이나 나무의 보존제로 주로 사용되기 때문에 그에 대한 노출은 음식에 내포된 상태가 대부분을 차지하나, 피부접촉, 공기중에서의 흡입, 음료수를 마실 때 내포되는 경우도 있다. Endosulfan은 물에 녹지 않기 때문에 지표수에 들어간 경우 토양에 부착되어 물에 떠 있거나 음용시에 동물의 몸에 농축된다 [26]. 유기염소계농약으로 잔류성이 길어 사용이 금지된 PCNB(pentachloronitrobenzen, quintozene)는 1930년에 개발된 약제로 1969년부터 국내에 도입되어 종자처리 또는 토양살균제로서 잘록병 방제 약제로 많이 이용되었다 [1]. 토양중에서 매우 안정하기 때문에 잔류성이 길어져 국내에서는 1989년부터 사용이 금지되어 있는 농약이다. 그러나 현재까지도 일부경작지 토양에서 PCNB나 이의 대사산물들이 상당량 검출되고 있고 수확한 작물에서까지도 검출되고 있는 실정이다. PCNB의 토양중 분해반감기는 5-10개월정도로서 생분해에 대한 연구는 소수의 연구에서 찾아볼 수 있는데 이 살균제는 물리, 화학적으로 안정하여 미생물에 의한 생분해도 비교적 어려운 것으로 알려져 있다 [26].

2.3. Endosulfan 및 PCNB의 생분해경로

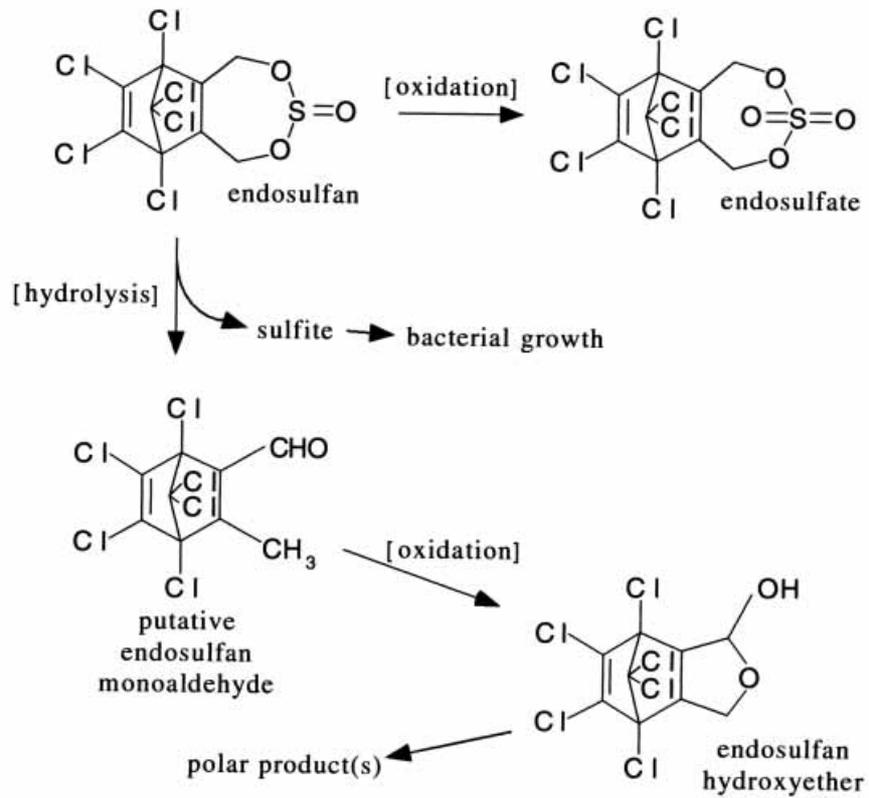


Fig. 2.3. Proposed metabolic pathway of Endosulfan

PCNB의 생분해에 대한 연구는 소수의 연구에서 찾아볼 수 있는데 특히 혐기성 상태에서의 초기분해가 중요한 것으로 보고되고 있고 주요 분해 산물은 Pentachloaniline (PCA), Pentachlophenol (PCP), Pentachlorothioanole (PCTA) 등으로 밝혀지고 있다. 또한 PCNB의 토양중에서의 주대사 경로는 PCA로의 환원으로 보고하고 있다.

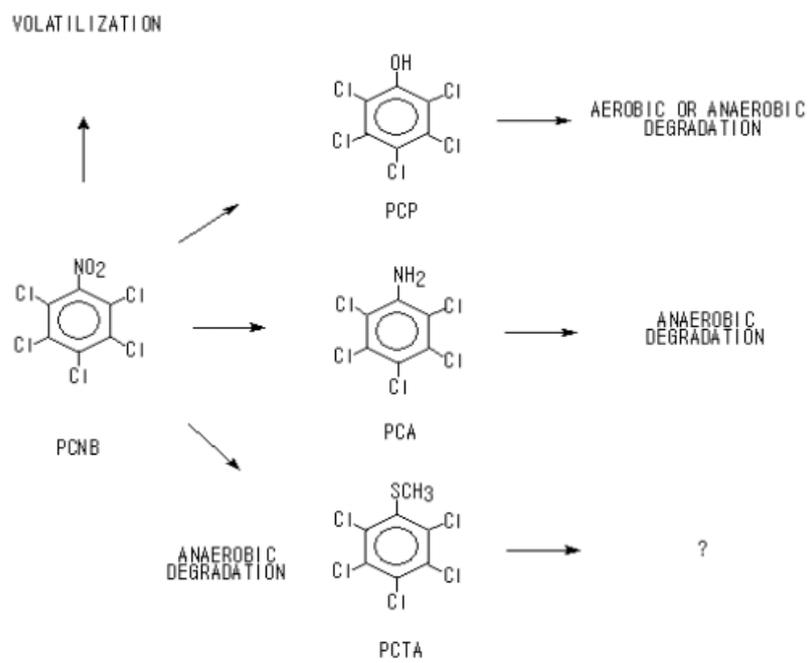


Fig. 2.4. Proposed metabolic pathway of PCNB

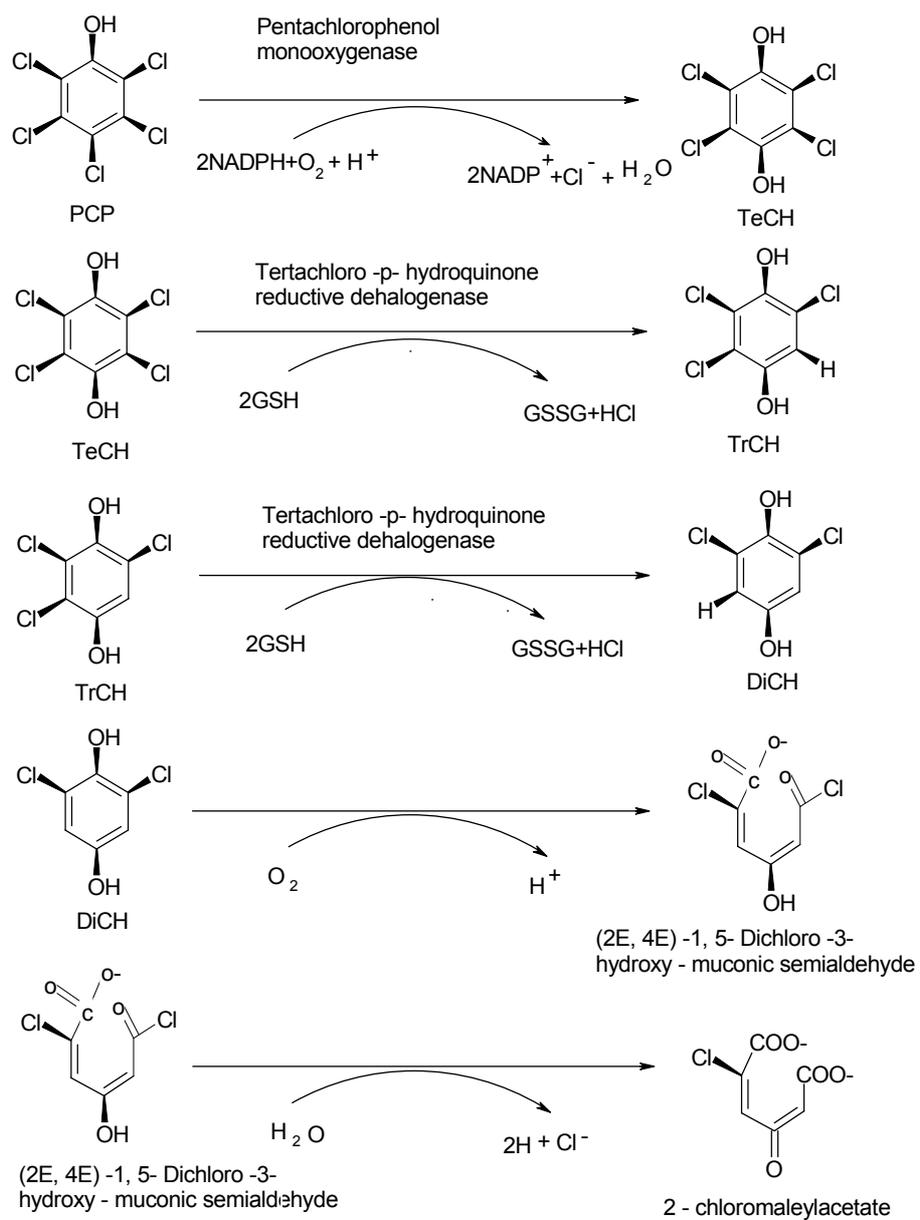


Fig. 2.5. Proposed metabolic pathway of PCP [28]

2.4. 천연유기물 첨가에 따른 난분해성 유기화합물의 분해 촉진

분해미생물을 이용한 난분해성 유기화합물을 분해하려고 할 때, 유기화합물 자체가 분해되면서 생성되는 대사산물의 독성으로 인하여 분해미생물의 분해·생존능력을 감소시키는 경우가 발생하게 되는데, 이런 방해작용들을 줄이거나 상쇄시키기 위해서 천연유기물을 투입하여 효과를 본 연구들이 보고되어 있다 [7, 10, 15]. 난분해성 물질의 하나인 PCBs의 분해촉진효과를 위해서 식물추출물을 첨가함으로써 천연물질을 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 2배 정도의 분해율 상승효과를 보았다 [3].

2.5. PCR-DGGE기법에 의한 미생물의 군집분석

이 방법들은 DNA염기서열 차이에 따라 2차구조의 변화 또는 이중나선의 구조적 변화가 발생하고 전기영동시 이동속도가 달라지게 되어 일정한 전기영동결과를 보이게 되는 원리를 이용한 것이다. Muyzer et al. (1993)가 16S rDNA의 V3부분을 PCR로 증폭한 후 DGGE를 사용하는 방법으로 유전적 다양성을 분석하는 방법을 제안하였다 [2, 4, 6, 8, 17, 19].

DGGE분석의 원리는 전기영동시 겔내에 존재하는 변성제의 농도 구배에 따른 핵산의 이중나선 구조와 변성구조, 염기서열이 가지는 Tm값의 차이에 의해 핵산의 이동속도가 달라지는 점을 이용한 것이다 [2, 17]. 추출한 DNA를 사용하여 생산되어진 동일한 PCR 산물들을 DGGE전기영동을 하면 시료가 이동하면서 각각 다른 농도의 우레아(urea)와 포름아마이드에 노출되어 이중나선의 DNA가 단일가닥으로 전환되어진다. 이렇게 전환되어지는 비율은 염기서열 내에 존재하는 녹는 범위에 따라 달라지게 되며 겔상의 특정 위치에서 특정염기서열을 가진 DNA가 밴드형태로 나타나게 된다. 따라서 낮은 농도의 변성제를 가지는 겔상부에서는 낮은 Tm값을 가진 DNA가 검출되어지며, 높은 농도의 변성제를 가지는 하부의 겔에서는 높은 Tm값을 가진 DNA가 검출되게

된다. 이 때 서로 다른 염기서열을 가진 DNA가 각기 다른 위치에서 밴드를 형성하므로 염기서열의 n값이 증가할수록 밴드의 수는 늘어나게 되고 동일한 염기서열이 많아질수록 나타나는 밴드의 강도도 증가하게 된다. 그러므로 전체적인 DNA에 대한 수적, 양적변화를 하나의 겔상에서 관찰할 수 있고, DGGE 패턴상의 밴드로부터 직접 DNA를 회수한 후 염기서열을 확인할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 클로닝을 통한 염기서열분석에 대한 시간을 절약할 수 있다. 단점으로는 낮은 분포를 보이는 군집의 경우 증폭산물이 적기 때문에 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)에 의해 염색이 안되어 검출되지 않을 수도 있다. 또한 DGGE방법의 경우 경사겔을 만드는 과정이 복잡하고 PCR반응시 GC clamp에 의한 미스매치 그리고 DNA증폭과정 또는 분석과정시 합성될 수 있는 헤테로듀플렉스(heteroduplex)에 의한 오류를 고려해야 한다. Muyzer et al. (1993)가 16S rDNA의 V3 부분을 PCR로 증폭한 후 DGGE방법을 사용하여 유전적 다양성을 분석하는 방법을 제안한 후에 Murray et al. (1998)은 DGGE방법을 박테리아와 고세균군집조성의 계절적, 공간적 다양성에 대한 연구에 적용하였으며, Bernadette M. Duineveld et al. (2001)은 16S rDNA를 증폭하여 DGGE를 연구에 적용하여, Chrysanthemum의 뿌리부분의 박테리아군집 활성분석에 사용하였다. Casamayer et al. (2000)은 16S rRNA분석과 DGGE를 사용하여 호수에서 산소와 황화물농도에 따른 미생물 군집구조에 대해 연구하였다. 특히 국내에서는 한석균 (2000)은 환경시료에서 직접 추출한 DGGE 패턴과 16S rDNA를 이용한 PCR 산물의 DGGE 패턴을 상호비교하여 호수의 깊이별 군집구조분석에 적용하였다.

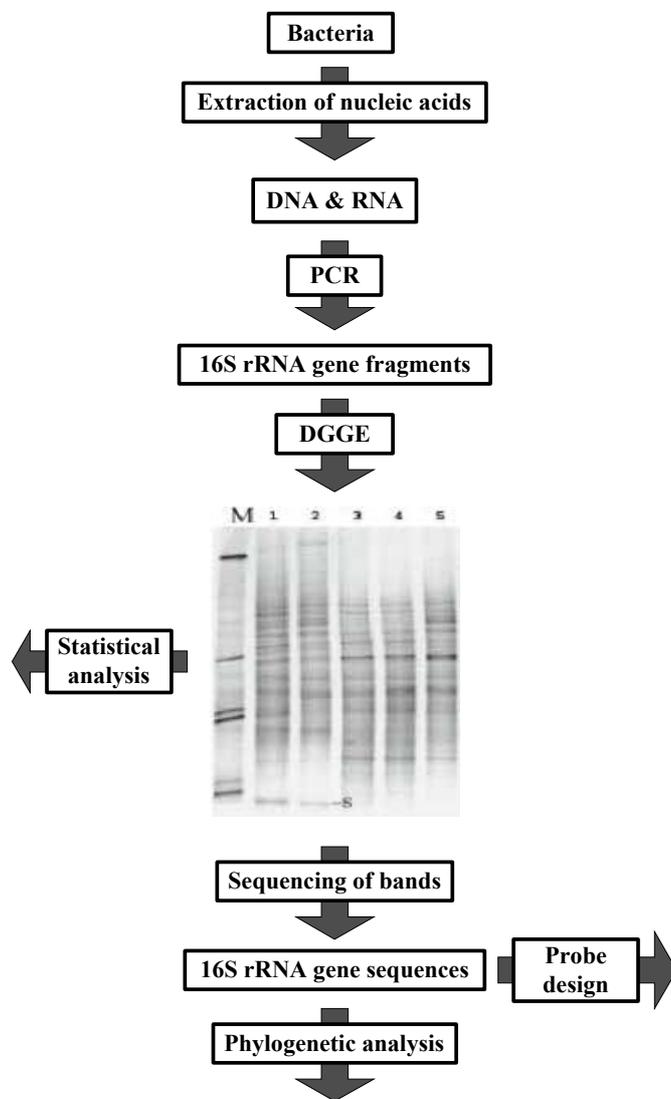


Fig. 2.6. Flow diagram of PCR-DGGE analysis of microbial communities

Ⅲ. 실험

3.1. 시험토양의 채취

경북대학교 농과대학 실습포장의 칠곡지역 토양과 충청북도 증평에 위치한 인삼밭토양을 채취하여 풍건한 다음 2 mm 체를 통과시켜 공시토양으로 실험을 실시하였다.

Table 3.1. Physical and chemical properties of soil sample

Texture	particle size dist.(%)			pH (1:5)	O.M. (%)	C.E.C (me/100g)
	Clay	Silt	Sand			
SiCL	16.0	56.9	27.1	6.0	2.1	5.7

3.2. 시약

Endosulfan (95.0% - α : β =7:3), Endosulfan alcohol, Endosulfan sulfate, Endosulfan lactone, Endosulfan ether, α -Endosulfan, β -Endosulfan, PCNB (99.0%) 및 계면활성제 (sorbitan trioleate)는 Aldrich Chemical Company Inc.에서 구입하고, 분해능을 살펴보기 위해 사용한 아세톤과 헥산은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

3.3. Endosulfan 및 PCNB생분해균의 분리

Endosulfan의 시험토양으로 경상북도 칠곡지역의 토양샘플을 일정량 취하여 농화배양 (Enrichment culture), 평판배양 (Spread plate culture)을 통하여 Endosulfan분해균주를 선별하였으며, MSM-A배지 (Mineral Salts Medium)에서 액체배양을 통하여 성장실험을 실시하였다. MSM의 기본배지는 NH_4NO_3 1g/l, K_2HPO_4 1g/l, MgSO_4 0.5g/l, CaCO_3 0.2g/l 이고, pH 8.0으로

구성되어 있다. 액체배양은 28℃의 진탕항온기 (200rpm)에서 고체배양은 28℃의 항온기에서 배양하였다. 250ml 삼각플라스크에 100ml의 MSM배지를 채우고 Endosulfan 100, 300ppm을 넣은 다음 7일동안 진탕배양하였다. 상기 과정을 3~5회 반복함으로써 Endosulfan을 유일 탄소원으로 이용하는 Endosulfan분해균주를 분리하였다. 배양액 100 μ l을 고체 MSM배지에 희석배수 (10^4 , 10^5 , 10^6)에 따라 스프레트한 후, 우점화 Endosulfan분해균주를 순수배양을 통하여 분리하였다. PCNB의 실험토양은 충청북도 증평의 인삼밭 토양의 샘플을 일정량 취하여 농화배양(Enrichment culture), 평판배양(Spread plate culture)을 통하여 PCNB분해균주를 선별하였으며, MSM-K배지 (Mineral Salts Medium)에서 액체 배양을 통하여 성장실험을 실시하였다. MSM의 기본배지는 10mM K_2HPO_4 , 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 3mM NaH_2PO_4 , 1mM $MgSO_4$, 10ml의 chloride-free trace element stock solution ($CaSO_4$ 200mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 200mg/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 20mg/l, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 10mg/l, $CuSO_4$ 20mg/l, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg/l, H_3BO_4 5mg/l)이고, pH는 7.2로 구성되어 있다. 액체배양은 28℃의 진탕항온기 (200rpm)에서 고체배양은 28℃의 항온기에서 배양하였다.

250ml 삼각플라스크에 100ml의 MSM배지를 채우고 PCNB 100, 300ppm을 넣은 다음 7일동안 진탕배양하였다. 상기 과정을 3~5회 반복함으로써 PCNB을 유일 탄소원으로 이용하는 PCNB분해균주를 분리하였다. 배양액 100 μ l을 고체 MSM배지에 희석배수 (10^4 , 10^5 , 10^6)에 따라 스프레드한 후, 우점화 PCNB분해균주를 순수배양을 통하여 분리하였다.

3.4. Endosulfan 및 PCNB 생분해균주의 성장시험

250ml 삼각플라스크에 50, 100ml의 MSM배지를 채우고 Endosulfan과 PCNB를 각각 100ppm을 넣은 다음 백금이를 사용하여 순수분리된 균주를 한 루프(loop) 접종하고 28℃의 진탕항온기 (200rpm)에서 실험구와 대조구를 배양하였다. 배양이 시작된 시점부터의 O.D. (525nm)를 측정하여 성장을 확인하면서 실험구와 대조구에서 1ml의 시료를 채취하여 -70℃에 보관하고 더 이상의 성장이 이루어지지 않는 시점을 확인하여 추출을 시작하였다. 배지 중의 Endosulfan 및 PCNB의 추출은 우선 배지에 두 배의 아세톤을 섞어 2시간 정

도 진탕후에 125mm구경의 거름종이를 사용하여 필터링하고 감압농축을 통해 아세톤을 농축시킨후 헥산과 섞어주어 추출성분을 헥산층에 재용해시켜 뽑아 내어 감압농축 후 잔류농약용 아세톤이나 헥산에 재용해하여 GC에서 분석하였다 [16].

3.5. Endosulfan 및 PCNB 분해균주의 동정

Endosulfan균주의 동정은 16S rDNA 시퀀싱결과로 PCNB균주의 동정은 16S rDNA 시퀀싱결과와 API20NE, 지방산조성분석의 결과로 동정하였다. 16S rDNA 시퀀싱은 16S rDNA유전자를 분석하는 것으로서 염기서열의 rRNA 2차 구조를 참고하여 얼라이먼트(alignment) 하고 %유사도값을 구하였다.

3.6. Endosulfan 분해 경로 규명을 위한 돌연변이균 제조

유전자전위능력을 가진 전위 유전자를 사용하여 특히 항생제내성유전자를 가지고 있는 콤플렉스 트랜스포존(transposon)을 이용한 돌연변이체의 제조는 세균의 여러 가지 유전적 특성 규명에 널리 사용되어 왔으며, 이 시스템의 특징은 suicidedelivery 시스템 이용하며, transposase가 트랜스포존외부에 존재하기 때문에 유전체 DNA로 일단 전위된 트랜스포존은 더 이상 이동할 수 없고, 제조한 돌연변이체로부터 트랜스포존의 항생제내성 유전자를 표식으로 사용하여 트랜스포존이 삽입된 인접 DNA를 클로닝할 수 있다 [24]. *Klebsiella oxytoca* KE-8는 MSM-endosulfan 고체배지에, *E.coli* S17-1 pir과 *E.coli* PRK2013은 LB 고체배지(50 μ g/ml kanamycine 포함)에 접종한 후 각각 30 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 고체배지에 있는 세 종류의 세균을 한 루프씩 모아서 멸균된 증류수에 현탁하고 섞어 20 μ l의 현탁액을 LB 고체배지의 중앙에 spotting한 다음 30 $^{\circ}$ C에서 2-8 시간동안 배양하였다. 그후 20mM의 숙신산(succinate)와 50 μ g/ml 카나마이신(kanamycin)을 포함하는 MSM배지에 cell을 풀어 100 μ l씩 평판도말하였다. 이 배지에 성장한 콜로니들을 Endosulfan을 함유하고 있는 배지로 옮기고 이곳에서 성장하지 않은 콜로니를 선발하였다 [18, 24].

3.7. 순수배양조건에서의 천연유기물첨가에 의한 Endosulfan 분해촉진 시험

250ml 삼각플라스크에 50ml의 MSM배지를 채우고 Endosulfan과 PCNB를 각각 100ppm을 넣은 대조구를 준비하고 이와 같은 조건에서 분해균주만을 접종한 실험구, 분해균주를 접종하고 식물추출물 A 300ppm을 성장기질로 넣어준 실험구, 분해균주를 접종하고 퇴비추출물 2500ppm을 성장기질로 넣어준 실험구를 28 $^{\circ}$ C의 진탕항온기 (200rpm)에서 배양하였다. 배양이 시작된 시점부터 O.D. (525nm)를 측정하여 천연기질이 성장에 미친 영향을 확인하고, 시료를 채취하여 추출하여 성장정도에 따른 분해능 변화를 측정하였다.

3.8. 토양에서 천연유기물 첨가에 의한 Endosulfan분해촉진 시험

본 연구에서는 예비 Microcosm실험결과를 바탕으로 테이블 3. 2에 실험조건을 준비하였다 [6, 15, 20, 21, 22]. 우선 250ml의 삼각플라스크에 토양 100g, 소비탄 트리올레이트 300ppm, Endosulfan 100ppm과 처리구별로 식물 추출물 A 300ppm, 퇴비추출물 2500ppm을 넣고 균주를 주입한후 실온의 어두운 곳에서 3회 반복실험하였다. 접종한 날을 시작으로 하여 일주일에 한번씩 샘플을 채취하고 평판도말하여 계수하였다. 균주접종은 Endosulfan을 탄소원으로 하여 고체배양한 후 인산염 완충용액에 희석하여 5ml (O.D. 525nm ; 1.0이상)을 접종하였다. 미생물 계수는 인산염 완충용액을 사용하여 10^4 , 10^5 , 10^6 희석된 것을 사용하였다 [7].

Table 3.2. Design of microcosm experiments

	Soil (g)	Surfactant (sorbitan trioleate ; ppm)	Growth substrate	Endosulfan (ppm)	<i>Klebsciella oxytoca</i> (ml)
TR-1	100	300	-	100	5
TR-2	100	300	Plant extract A 300	100	5
TR-3	100	300	Compost extract 2500	100	5
Control	100	300	-	100	×

3.9. PCR-DGGE기법에 의한 분해미생물의 추적

PCR-DGGE분석을 위해 매주 채취한 샘플 4개와 순수분리 균주에서 DNA추출을 시도하였다. Microcosm의 토양샘플에서의 DNA추출은 FastDNA SPIN Kit (BIO101 systems, USA)를 사용하였고 순수분리된 균주의 경우 직접 DNA추출 방법을 사용하였다. 균주를 액체배지에 접종하고 O.D. (525nm)가 1.0이상의 수치로 측정될 때 배지에서 1ml양을 취하여 13000rpm에서 5분간 원심분리하여 셀을 얻고, 이셀을 인산염 완충용액로 씻은후 다시 13000rpm에서 3분간 농축한 후 농축된 cell에 0.15M NaCl과 0.1M EDTA, 1% lysozyme을 넣고 증류수로 0.6ml의 조정하였다. 37°C에서 3시간동안 배양한 후 10% SDS를 첨가하고 -70°C의 초저온냉장고에서 얼리고 65°C의 수욕조에서 녹이는 과정을 4회 반복하여 처리하였다. 여기에 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 포화된 페놀을 동일부피로 첨가한 후 혼합하였다. 13000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 취하여 새로운 튜브로 옮기는 과정을 2회 반복하였다. 옮긴 상등액과 동량의 클로로폼 : 이소아밀알콜 (24:1)을 2회 처리하여 남아있는 페놀을 제거하였다. 상등액의 2배 부피의 냉각된 알코올(100%)를 첨가하고 -70°C에서 15분동안 넣어두었다가 13000rpm에서 15분간 원심분리한후 다시 냉각된 알코올(70%)에서 씻어주고 원심분리한후 펠릿을 건조시켜 TE 완충용액 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)로 재부유시킨 후 PCR과정에 사용하였다.

추출된 DNA를 160배 희석하여 260nm와 280nm에서 측정하여 추출된 DNA의 농도를 확인하였다. 16S rDNA 유전자를 증폭하기 위하여 진정세균에 특이적으로 부착하는 프라이머인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와

1492R(5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다 [2, 16]. PCR 반응 조건은 95℃에서 5분간 초기열처리를 한 후 95℃에서 45초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 25회 반복하고 마지막에는 72℃에서 10분간 처리하였고 증폭된 반응물은 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다. PCR증폭은 Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR System 2400을 사용하였다. Microcosm실험한 실험구와 순수분리균주에서 추출된 DNA의 16S rDNA를 증폭한 샘플로부터 PCR을 실시한 후 DGGE분석을 수행하였다. 대부분의 진정세균에 특이적으로 부착하며 40bp의 GC clamp가 포함된 341F-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG) [2, 16]와 진정세균, 고세균 그리고 진핵세균에 특이적으로 부착하는 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG)을 사용하였다. PCR증폭은 MJ Reserch사의 Minicycler™를 사용하였다. PCR 반응 혼합물의 조성은 *Taq* buffer (10×) 2.5 μ l, MgCl₂ (25mM) 2.5 μ l, dNTPmix (40mM) 1.0 μ l, 20pmole 341F-GC primer, 20pmole 518R primer, 1.25unit *Taq* polymerase, 16S rDNA 증폭을 위한 PCR 산물 2.0 μ l를 첨가하였다. 그리고 비특이적 부착을 최소화하기 위해서 annealing 온도를 최적온도보다 높은 65℃에서 시작하고 매 cycle마다 1℃씩 감소하도록 설정하였다 [2, 16]. PCR 반응 조건은 95℃에서 5분간 초기열처리를 한 후 95℃에서 45초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 25회 반복하고 마지막에는 72℃에서 10분간 처리하였고 증폭된 반응물은 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다. 사용된 폴리아크릴아마이드 겔의 크기는 20cm×16cm, 두께는 1mm였으며 60% (w/v) 폴리아크릴아마이드 겔 (37.0 : 1 = acrylamide : bisacrylamide), 우레아와 포름아마이드 변성제가 30~60%까지 농도구배를 형성시켰다. 20 μ l의 PCR 증폭산물에 2× 겔 로딩다이를 20 μ l 혼합시켜 70V로 9시간동안 전기영동을 실시하였다. 스테이닝시 에티디움 브로마이드의 농도는 1 mg/l 를 사용하였다.

IV. 결과 및 고찰

4.1. Endosulfan 및 PCNB분해균의 분리 및 성장조사

Endosulfan분해균은 공동연구중인 안동대에서 분리·동정된 *Klebsiella oxytoca* KE-8을 사용하였는데, 안동대에서 실험한 자료에 따르면 Endosulfan을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 *Klebsiella oxytoca* KE-8균주를 Endosulfan이 포함되어 있는 MSM배지에 6일동안 배양하면서 분해양상을 조사한 결과 *Klebsiella oxytoca* KE-8은 549.0 μ g/ml의 Endosulfan을 약 64.0% (최종농도: 175.4 μ g/ml)를 분해하였으며, 이때 분해율은 58.5/ml/day였다 [13]. 이 때 그림 4. 1.에 나타낸 것과 같이 *Klebsiella oxytoca* KE-8이 성장하면서 성장배지의 pH가 점점 하강하게 되고 성장이 둔화되면 pH가 다시 상승하는 경향을 나타낸다. 그림 4. 2.의 결과는 유일한 탄소원으로 사용된 Technical-grade Endosulfan에 대한 *Klebsiella oxytoca* KE-8균주의 성장에 따른 이성질체들의 분해와 총 Endosulfan에 대한 분해도를 나타낸 것으로서 β -endosulfan의 경우 천천히 좀 더 안정한 α -endosulfan의 형태로 전환되게 된다. α -endosulfan의 분해가 β -endosulfan에 비하여 총 Endosulfan분해도에 더 많은 영향을 준 것으로 사료된다.

PCNB분해균의 경우 농화배양결과 3균주(PCNB-1, PCNB-2 및 PCNB-3)를 최종적으로 선발하였다. 그 중에서 균주 PCNB-2가 상대적으로 양호한 성장을 보였으므로 본 실험에 사용하였다. 그림4. 3.은 PCNB에 대한 PCNB-2의 분해력을 확인을 위해서 유일한 탄소원으로 PCNB를 주입한 MSM배지에서의 PCNB-2의 성장을 나타낸 결과로서 접종한지 5일에서 6일후에 급격한 성장을 나타내었다.

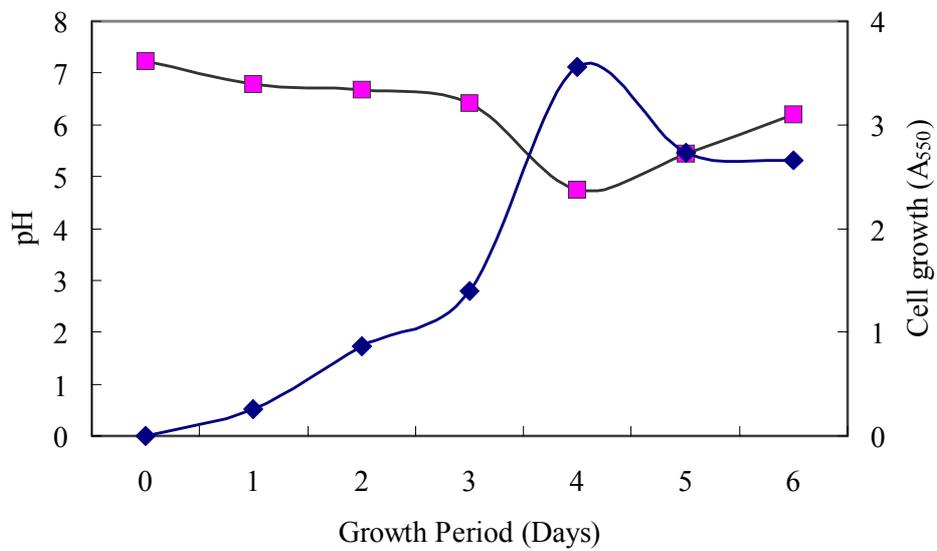


Fig. 4.1. Temporal change of pH and cell growth during the endosulfan degradation by *Klebsiella oxytoca* KE-8. (■) pH, (◆) cell growth

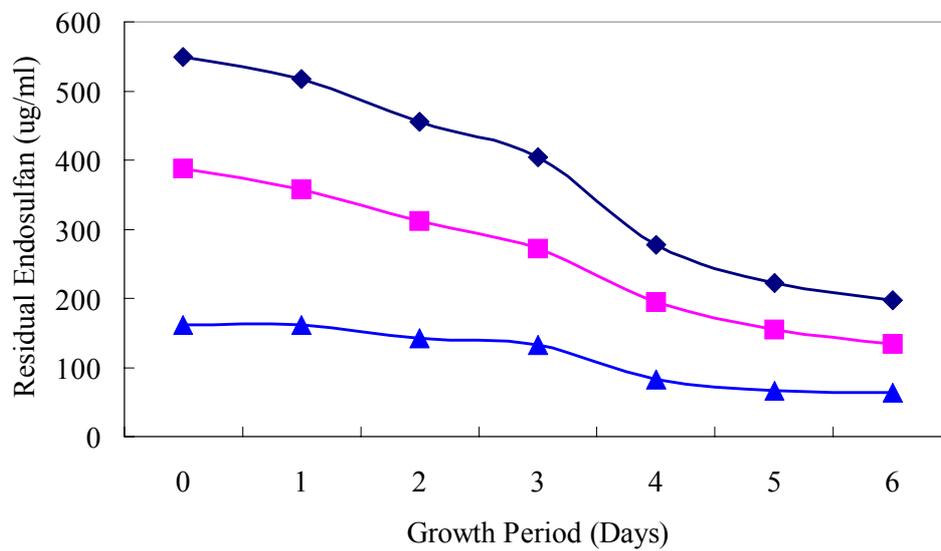


Fig. 4.2. Time course of endosulfan and endosulfan isomer degradation by *Klebsiella oxytoca* KE-8. (◆) total endosulfan, (■) α -endosulfan, (▲) β -endosulfan.

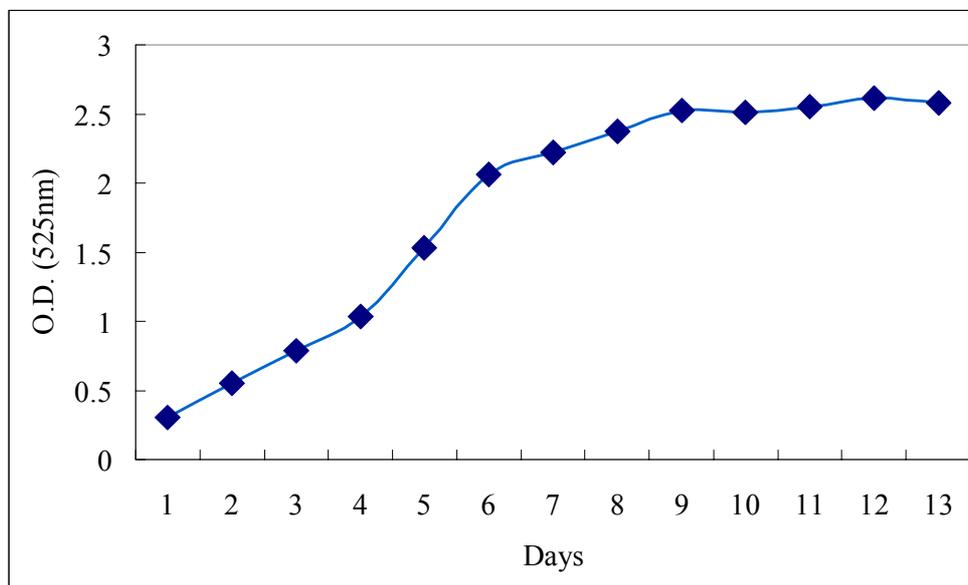


Fig. 4.3. Growth curve of PCNB degrader PCNB-2, which was grown on MSM containing PCNB (100ppm) as a sole carbon source

4.2. Endosulfan 및 PCNB분해균의 동정결과

PCNB분해균의 동정을 위하여 16S rDNA 파셜 시퀀싱을 사용하여 분석한 결과 그림 4. 4에 나타낸 것과 같이 결정된 염기서열의 개수는 712개였고, 시밀러티 분석결과가 98.43% 시밀러티를 나타낸 *Alcaligenes denitrificans* ATCC 15173T로 동정되었다. 이 동정 결과의 뒷받침을 위해서 효소반응을 보기 위한 API NE 20 시험을 하고 각 효소에 대한 반응결과를 테이블 4.2에 지방산 조성분석을 하여 결과를 테이블 4. 3에 나타내었다. 썸을 이용하여 순수배양된 PCNB-2균주의 형태를 조사한 결과 그림 4. 5에 나타낸 것과 같이 막대형의 세포임이 밝혀졌고 그램염색실험의 결과로 그램네가티브(Gram-negative) 균주임을 확인하였다. 공동연구를 진행중인 안동대학교의 자료에 따르면 16S rDNA 부분 염기서열분석Endosulfan분해균을 동정한 결과 *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182^T와 염기서열 유사도가 98.43%가 되는 것으로 나타났다.

CGGGATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGG
TCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGC
CCAGTAGCGGGGATAACTACGCGAAAGCGTAGCTAATACCGCA
TACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCACTAT
TGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTC
ACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCG
CGTGTGCGATGAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCAGGA
AAGAAACGTCATGGGCTAATACCCCGTGAAACTGACGGTACCTGC
AGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG
CAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGAGCTTAACTTT
GGAACTGCATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGG
TGGAATCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAA
CACCGATGGCGAAGGCACCTCCTGGGATAACACTGACGCT

Fig. 4.4. 16S rDNA partial sequencing of *Klebsiella oxytoca* KE-8

Table 4.1. 16S rDNA sequence (712 bp) similarity of the strain PCNB-2 to those of various type of cultures

Strain	Accession No	% Similarity
<i>Alcaligenes denitrificans</i> ATCC 15173 ^T	M22509	98.43
<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501 ^T	AF177667	96.90
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 19395 ^T	U04948	96.88
<i>Bordetella trematum</i> DSM 11334 ^T	AJ277798	96.47
<i>Alcaligenes defragrans</i> 65Phen	AJ005450	93.50
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750 ^T	M22508	92.11
<i>Alcaligenes latus</i> IAM 12599	D88007	86.40

**Table 4.2. Physiological characteristics of the strain PCNB-2 based upon API
NE 20 test**

Characteristics	Reactions of PCNB-2
Reduction of nitrates to nitrites	-
Tryptophan assimilation	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	-
Gelatine Hydrolysis	-
Glucose assimilation	-
Acidification from	
Arabinose	-
Glucose	-
Mannitol	-
N-acetyl-glucosamine	-
Maltose	+
Gluconate	+
Caprate	+
Adipate	+
Malate	-
Citrate	+
Phenyl-acetate	+
Cytochrome	+

Table 4.3. Profile of cellular fatty acids of the strain PCNB-2 based upon MIDI Method¹

Fatty acid profile	Strain PCNB-2
C12:0 2OH	2.00
C14:0	4.89
C16:1 Iso I/14:0 3OH	7.48
C16:1 w7c/15 Iso 2OH	25.55
C16:0	34.12
C17:0 CYCLO	11.82
C18:1 w7c	8.01
C18:0	1.79
Identification	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> (0.714; similarity)

¹ Analyzed by using Hewlet-Packard model 6890A gas chromatograph and MIDI Aerobe method, Chem Station V. 4.02.

Fig. 4.5. SEM micrograph of the PCNB degrader PCNB-2

4.3. Tn 5 mutagenesis결과

Tn 5 변이균을 찾아내기 위해 지금까지 수천 콜로니들을 스크리닝하였으나, 현재까지는 Endosulfan에 자라지 않는 변이균을 분리하지 못하였으며 계속 진행중에 있다.

4.4 천연유기물 첨가 순수배양조건에서의 Endosulfan 및 PCNB분해균의 성장

유일한 탄소원으로 Endosulfan과 PCNB를 사용하여 성장할 수 있는 분리균주의 성장에 도움을 줄 수 있는 천연기질을 첨가하여 균주의 성장을 촉진시킴으로써 실험을 실시하였다. 그림 4. 6은 MSM배지에 Endosulfan 100ppm을 넣은 대조구와 대조구에 균주만 접종한 실험구인 TR-1, 균주를 접종하고 식물추출물을 넣어준 TR-2, 균주 접종하고 퇴비추출물을 넣어준 TR-3 것과 그 대조구에 각각 식물추출물과 퇴비추출액을 넣어준 실험구의 O.D.(525nm)를 측정하여 정리한 결과이다. 실험 결과 각각의 기질을 단독으로 첨가했을 때보다 천연기질을 첨가했을 때 균주의 성장이 높게 나타났다. 짧은 기간의 실험에서는 식물추출물 A를 사용하였을 때의 균주 성장률이 월등하나, 장기간의 실험에서는 식물추출물 A와 퇴비추출물이 균주에 미치는 영향의 차이는 그리 크지 않은 것으로 나타났다.

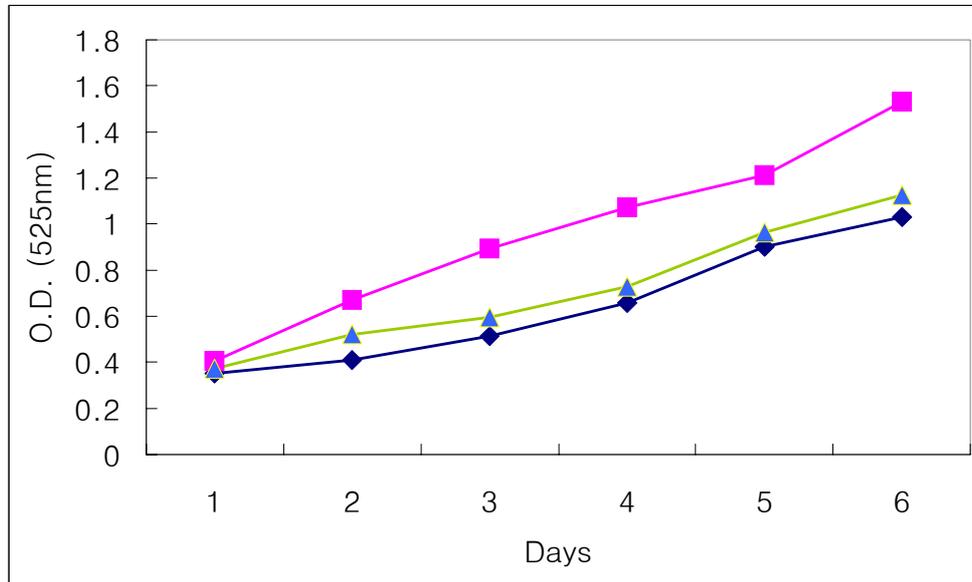


Fig. 4.6. Effect of natural organic substrates on the growth of *Klebsiella oxytoca* KE-8. ■ endosulfan + plant extract A, ▲ endosulfan + compost extract, ◆ endosulfan

4.5. 천연유기물 첨가 토양에서의 Endosulfan분해균의 성장 조사 및 Endosulfan 분해효과

2.0mm의 체를 통과시켜 준비한 토양에 Endosulfan 100ppm과 계면활성제를 넣어 대조구를 만들고 대조구에 균주를 접종한 TR-1, 균주를 접종하고 천연기질인 식물추출물을 넣어준 TR-2 그리고, 균주를 접종하고 퇴비추출물을 넣어준 TR-3를 준비하여 3회 반복처리하고 매주 1회씩 고체배지에 평판도말하여 Endosulfan분해균의 성장을 조사하였다. 그림 4. 7에 나타난 결과를 보면 실험 초기엔 균주의 성장이 감소하고 둔화되는 것은 균주가 새로운 환경에 적응하는 시간이라고 사료되며, 천연기질을 사용한 실험구가 사용하지 않은 실험구에 비해서 성장곡선이 우위를 보인다. 또한, 실험에 사용된 두가지 천연기질에 대해서 비교해 보면 식물추출물 A가 퇴비추출물과 비교했을 때 균주의 성장에 좀 더 효율적인 것을 알 수 있다. 그림 4. 8에 토양 Microcosm을 9주동안 배양한 후 대조구와 실험구에 남아있는 Endosulfan을 추출하여 남은 농도를 비교하였더니 Control의 경우는 50.17ppm, TR-1은 36.65ppm, TR-2는 35.16ppm, TR-3은 25.38ppm의 수치를 나타내었다. 이것을 바탕으로 그림 4. 9에 남은 양을 %로 변환했더니 Endosulfan의 남은 양은 각각 TR-1이 73.1%, TR-2가 70.1%, TR-3가 50.6%의 수치를 나타내었다. 이 수치는 그림 4. 7에 나타난 성장곡선과 비교했을 때 endosulfan의 제거는 분해균주의 성장에 기여한 것으로 판단된다.

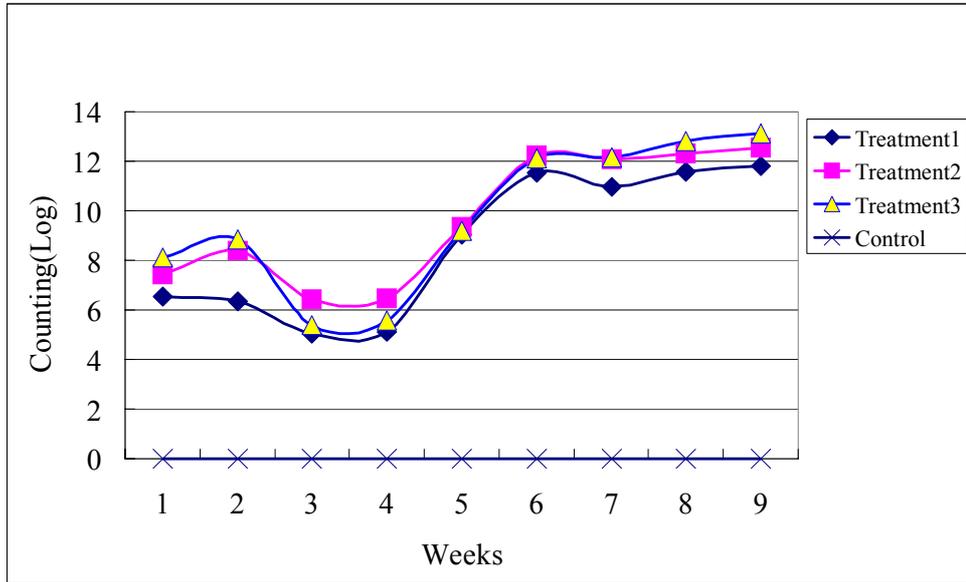


Fig. 4.7. Viable count of *Klebsiella oxytoca* KE-8 population in the soil microcosm undergoing endosulfan degradation. Control (soil 100g+Endosulfan 100ppm), TR-1 (control+*Klebsiella oxytoca* KE-8), TR-2 (TR-1+plant extract A), TR-3 (TR-1+compost extract)

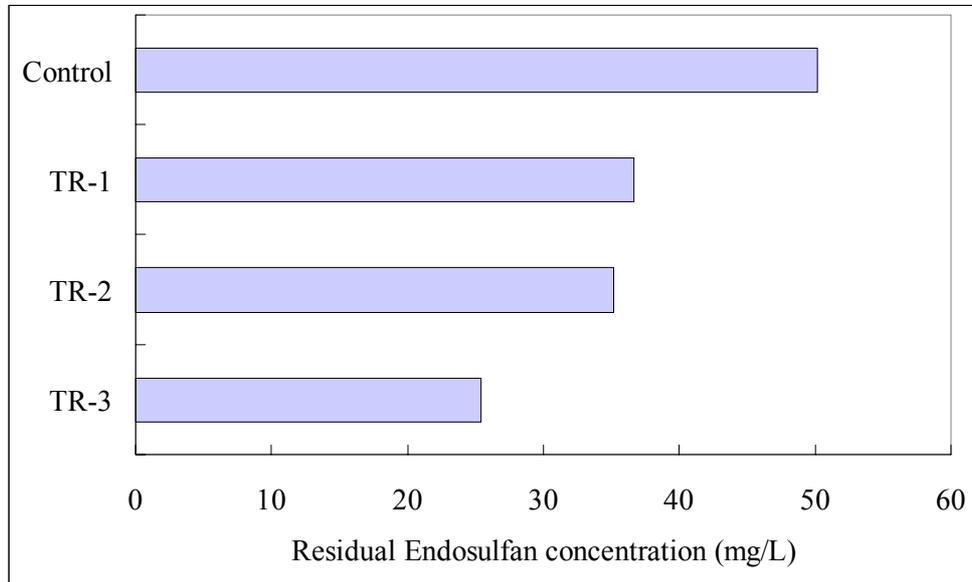


Fig 4.8. Endosulfan degradation by *Klebsiella oxytoca* KE-8 in the soil microcosm treated with natural substrates. Decreased residual Endosulfan concentration may indicate its degradation facilitated by the added substrate. Control(soil 100g+Endosulfan 100ppm), TR-1 (control+*Klebsiella oxytoca* KE-8), TR-2 (TR-1+plant extract A), TR-3 (TR-1+compost extract)

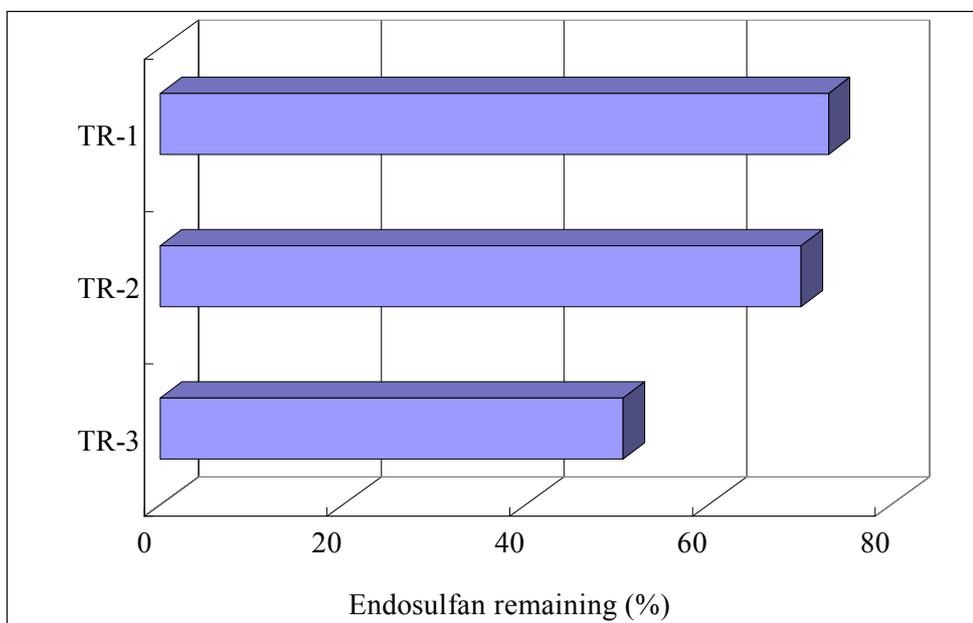


Fig 4.9. Percentage of Endosulfan remaining in the soil microcosm undergoing Endosulfan degradation by *Klebsiella oxytoca* KE-8. Control (Soil 100g+Endosulfan 100ppm), TR-1 (control+*Klebsiella oxytoca* KE-8), TR-2 (TR-1+plant extract A), TR-3 (TR-1+compost extract)

또한 분해균주의 추적을 위해 Endosulfan과 PCNB의 순수균주와 Endosulfan균주를 접종하여 실시한 토양 Microcosm실험구에서 DNA를 추출하여 PCR-DGGE를 수행하였다. 그림 4. 10.은 토양 Microcosm실험구에서 DNA추출 키트를 이용하여 DNA를 추출한 것과 순수배양에서 직접 DNA를 추출한 결과를 나타낸 것으로 Lane 2는 토양 100g에 Endosulfan 100ppm과 계면활성제를 넣고 균주를 접종한 실험구에서의 DNA추출결과이고, Lane 3는 Lane 2와 동일 조건에 천연기질인 식물추출물 A를 첨가한 실험구에서의 DNA추출결과이고, Lane 4는 Lane 2와 동일조건에 퇴비추출물을 첨가한 실험구에서의 DNA추출 결과이고, Lane 5는 순수배양된 균주에서 추출된 DNA추출결과이다. 토양의 경우 배양미생물시료와는 다르게 DNA추출과정에서의 손상이 많은 편이고 PCR증폭과정을 방해하는 물질들의 존재가 많기 때문에 이것들의 제거를 위한 정제과정이 필요하다. 정제가 올바르게 되었는지는 PCR결과의 형성으로 확인하였다. 그림 4. 11.은 이렇게 추출된 DNA를 341F (40GC-clamp) (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG), 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG) 프라이머를 이용하여 증폭한 결과를 나타내었다. 이렇게 증폭된 PCR산물을 샘플로 하여 DGGE분석을 실시하여 전기영동 결과를 그림 4. 12.에 나타내었다. PCR-DGGE를 실시한 결과 순수균주에서 추출한 결과와 실험구에서 추출한 결과가 동일하였으나, DGGE결과에 나타난 밴드의 수가 많았기 때문에 나타난 3개의 밴드를 elution하여 유전자를 분석하고 그 염기서열을 사용하여 BLAST를 통해 분석한 결과 나타났던 밴드는 모두 *Klebsiella oxytoca* KE-8의 서열로 밝혀졌다.

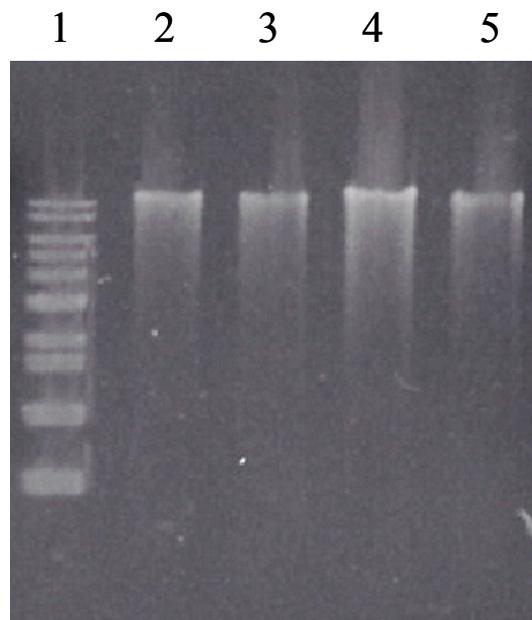


Fig. 4.10. Direct DNA extraction from soil microcosm undergoing endosulfan degradation

Lane 1 ; 1Kb maker

Lane 2 ; DNA extracted from microcosm TR-1 sample

Lane 3 ; DNA extracted from microcosm TR-2 sample

Lane 4 ; DNA extracted from microcosm TR-3 sample

Lane 5 ; DNA extracted from *Klebsiella oxytoca* KE-8 (pure culture)

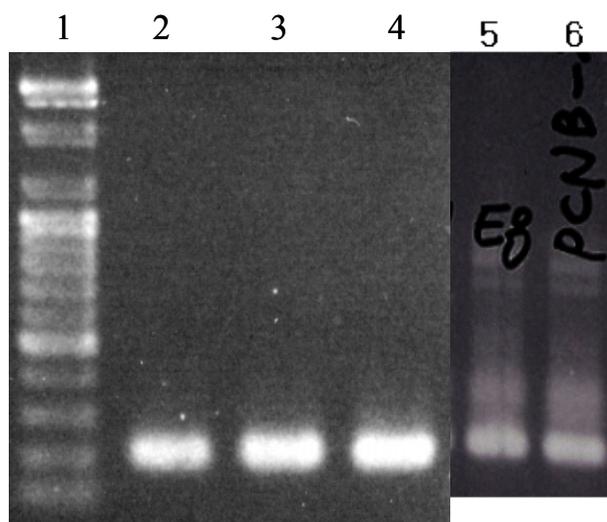


Fig. 4.11. 16S rDNA amplification from V3 region of DNA extracted from soil microcosms and pure cultures using primers 341F (40bp GC-clamp) and 518R.

Lane 1 ; 100bp maker

Lane 2 ; amplified DNA from microcosm TR-1

Lane 3 ; amplified DNA from microcosm TR-2

Lane 4 ; amplified DNA from microcosm TR-3

Lane 5 ; amplified DNA from pure culture

PCR (*Klebsiella oxytoca* KE-8)

Lane 6 ; amplified DNA from pure culture

PCR (*Alcaligenes denitrificans* PCNB-2)

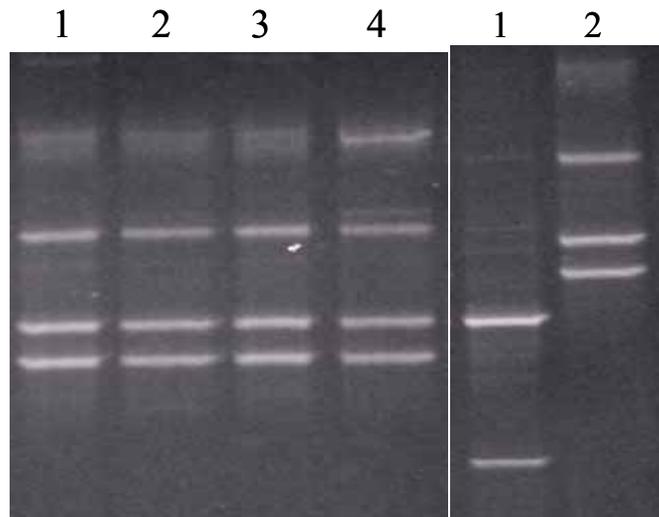


Fig. 4.12. PCR-DGGE analysis of V3 region of the 16S rDNA from soil samples and pure cultures

Lane 1 ; DNA from pure culture (*Klebsiella oxytoca* KE-8)

Lane 2 ; DNA extracted from soil microcosm TR-3
(compost extract added)

Lane 3 ; DNA extracted from soil microcosm TR-2
(plant extract A added)

Lane 4 ; DNA extracted from soil microcosm TR-1
(No addition of natural substrate)

Lane 5 ; DNA from culture (*Alcaligenes denitrificans* PCNB-2)

Lane 6 ; DNA from pure culture (*Klebsiella oxytoca* KE-8)

Band 1

341F

TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAA
GGTTAATAACCTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCAGCCGCGGTAATA

518R

GGCAAGGTTATTAACCTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACC
CGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGT
GCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA

Band 2

341F

CNGNGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGA
AGGGAGTAAGGTTAATAACCTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCAGCCGCGGTAATAA

518R

AGGNAAGGTTATTAACCTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAAC
CCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTG
TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA

Fig. 4.13. Sequence identification of DGGE bands amplified from total DNA in soil microcosms undergoing endosulfan degradation

Band 3

341F

NGCTNGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGG

AAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCAGCCGCGGTAATA

518R

GATNGCAAGGTTATTAACCTTATCGCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACA
ACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCAT
TGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA

**Fig. 4.13. Sequence identification of DGGE bands amplified from total DNA
in soil microcosms undergoing endosulfan degradation (continued)**

V. 결론

본 연구에서는 유기염소계 농약을 분해할 수 있는 미생물의 토양에서의 군집 구조를 분석하고 토양조건에서 천연유기물을 첨가함으로써 Endosulfan과 PCNB의 분해촉진에 어떤 영향을 미칠 수 있는가에 관한 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 본 연구에서는 PCNB분해균으로서 *Alcaligenes denitrificans* PCNB-2를 토양에서 분리·동정하였다.
2. 최종 선발된 Endosulfan분해균주인 *Klebsiella oxytoca* KE-8과 PCNB분해균주인 *Alcaligenes denitrificans* PCNB-2를 이용하여 성장실험을 실시한 결과 Endosulfan과 PCNB성장이 천연기질인 plant extract A 및 퇴비추출물을 사용한 경우 성장의 상승효과가 나타났다.
3. Endosulfan의 분해가 이루어지는 토양 Microcosm실험에 있어서 추출된 총 토양 DNA로부터 PCR-DGGE과정을 거친 후 DGGE 패턴상의 밴드로부터 직접 DNA를 회수한 후 염기서열을 확인함으로써 미생물군집구조 결정을 매우 효과적으로 수행할 수 있었다.

VI. 참고 문헌

1. 윤채혁. 1996. 농약총람.
2. 한석균. 2000. 소양호의 세균 다양성과 군집 구조의 계통유전학적 분석. 이학박사학위논문. 단국대학교.
3. 홍명현. 2002. 연안저질의 PCBs 생분해 촉진에 있어서 천연식물기질 및 계면활성제의 역할. 공학석사학위논문. 한국해양대학교.
4. Allison E. McCaig, L. anne Glover, and James I. Prosser. 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Appl and Environ. Microbiol.* 67(10): 4554-4559.
5. Ana M. Soto, Kerrie L. Chung, and Carlos Sonnenschein 1994. The Pesticides Endosulfan, Toxaphene, and Dieldrin Have Estrogenic Effects on Human Estrogen-Sensitive Cells. *Environmental Health Perspective* 102: 380-383.
6. Bernadette M. Duineveld. George A. Kowalchuk, Anneke Keijzer, Jan Dirk van Elsas and Johannes A. van Veen. 2000. Analysis of Bacterial Communities in the Rhizosphere of Chrysanthemum via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA as Well as DNA Fragments Coding for 16S rRNA. *Appl and Envir. Microbiol.* 67(1) 172-178
7. Butler TA, Sikora LJ, Steinhilber PM, Douglass LW. 2001. Compost age and sample storage effects on maturity indicators of biosolids compost. *J Environ Qual.* 30(6): 2141-2148.
8. C.M.J. van Zeijl, E.H.M. van de Kamp, P.H. Pent, G.C.M. Selten, B.Hauer, R.F.M. van Gorcom, C.A.M.J.J. van den Hondel. 1998. An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *Journal of Biotechnology* 59: 221-224.
9. Daesik Park, Steven C. Hempleman, and Catherine R. Propper 2001. Endosulfan Exposure Disrupts Pheromonal Systems in the Red-Spotted Newt: A

- Mechanism for Subtle Effects of Environmental chemicals. Environmental Health Perspective 109: 669-673.
10. FC Michel Jr, CA Reddy and LJ Forney. 1995. Microbial degradation and humification of the lawn care pesticide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid during the composting of yard trimmings. Appl. Envir. Microbiol. 61: 2566-2571.
 11. George A. Kowalchuk, Zinaida S. Naoumenko, Piet J. L. Derikx. Andreas Felske, John R. Stephen, and Irina A. Arkhipchenko. 1999. Molecular Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the β -Subdivision of the Class Proteobacteria in Compost and Composted Materials. Appl. Envir. Microbiol. 65: 396-403.
 12. Gi-Seok Kwon, Jang-Eok Kim, Taek-Kyum Kim, Ho-yong Sohn, Sung-cheol Koh, Kee-Sun Shin, Dong-Geol Kim. 2002. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. FEMS Microbiology Letters. 215: 255-259.
 13. Heesche-Wagner K, Schwarz T, Kaufmann M. 1999. Phenol degradation by an enterobacterium: a *klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding novel phenol hydroxylase. Can J Microbiol. 45(2):162-171.
 14. Hsu JH, Lo SL. 2001. Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese, and zinc from swine manure. Environ Pollut. 114(1):119-127
 15. Huang GF, Fang M, Wu QT, Zhou LX, Liao XD, Wong JWC. 2001. Co-Composting of Pig manure with leaves. Environ Technol. 22(10): 1203-1212.
 16. Jessica R. Hanson, Corinne E. Ackerman, and Kate M. Scow. 1999. Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether by a Bacterial Pure Culture. Appl. Envir. Microbiol. 65: 4788-4792.
 17. John H. Paul. 2001. MARINE MICROBIOLOGY. METHODS IN MICROBIOLOGY.
 18. KAARE M. NIELSEN, JAN D. VAN ELSAS AND KORNELIA SMALLA. 2000. Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 (pFG4 Δ npt II) with Transgenic Plant DNA in Soil Microcosms and Effect of Kanamycin on

- Selection of Transformants. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 1237-1242.
19. LaMontagne MG, Michel FC, Holden PA, Reddy CA. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtainin PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *49(3): 255-64.*
 20. Ibekwe AM, Papiernik SK, Gan J, Yates SR, Crowley DE, Yang CH. 2001. Microcosm enrichment of 1,3-dichloropropene-degrading so microbial communities in a compost-amended soil. *J Appl Microbiol.* 91(4): 668-676.
 21. MM Laine and KS Jorgensen. 1996 Straw Compost and Bioremediated Soil as Inocula for the Bioremediation of Chlorophenol-Contaminated Soil. *Appl. Envir. Microbiol.* 62: 1607-1513.
 22. Rhee SK, JeonCO, Bae JW, Kim K, Song JJ, Kim JJ, Lee SG, Kim HI, Hong SP, Choi YH, Kim SM,, Sung MH 2002. Characterization of *Symbiobacterium toebii*, an obligate commensal thermophile isolated from compost. *Extremophiles* 6(1): 57-64.
 23. Tara D. Sutherland, Irene Horne, Michael J. Lacey, Rebecca L. Harcourt, Robyn J. Russell, and John G. Oakeshott. 2000. Enrichment of an Endosulfan-Degrading Mixed Bacterial Culture. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 2822-2828.
 24. VICTOR DE LORENZO, MARTA HERRERO, UTE JAKUBZIK, AND KENNETH N. TIMMIS. 1990. mINI-Tn 5 Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria. *Journal of Bacteriology.* 172: 6568-6572.
 25. Yuquan Lu, Kanehisa Morimoto, Tatsuya Takeshita, Toru Takeuchi, and Takeshi Saito 2000. Genotoxic Effects of α -Endosulfan and β -Endosulfan on human HepG2 Cells. *108:559-561.*
 26. <http://www.epa.gov/>. 미국 EPA (U.S. Environmental Protection Agency)
 27. <http://www.hhs.gov/> United States Department of Health Human Servi ces
 28. <http://umbbd.ahc.umn.edu/> The University of Minnesota Biocatalysis/Bio degradation Database