



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

유기염소계 농약 endosulfan의 생물학적 분해에 관한 연구



2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생태공학과

박 미 은

공 학 석 사 학 위 논 문

유기염소계 농약 endosulfan의 생물학적 분해에 관한 연구

지도교수 정 용 현

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생태공학과

박 미 은



박미은의 공학석사 학위논문을 인준함.

2011년 2월 25일



주 심 공학박사 김 동 명 (인)

위 원 공학박사 성 기 준 (인)

위 원 공학박사 정 용 현 (인)

목 차

I. 서론	01
II. 이론적 배경	06
1. 유기염소계 농약	06
2. Endosulfan	09
2.1. Endosulfan의 물리·화학적 특성	09
2.2. 환경 중 endosulfan의 특성	12
2.3. Endosulfan의 생산 및 사용	19
3. 생물학적 정화 방법 (Bioremediation)	18
3.1. 생물학적 정화 방법	21
3.2. Bioaugmentation	23
3.3. Biostimulation	24
III. 실험 재료 및 방법	25
1. 실험재료	25
1.1. 토양 시료	25
1.2. 배양 배지	26
1.3. 사용 시약	26
2. 실험방법	28
2.1. GC/MS에 의한 endosulfan 정량 분석 조건 확립	28
2.2. 토양 시료 내 endosulfan 잔류량 측정	31
2.3. 집식 배양을 통한 endosulfan 분해균의 분리	31
2.4. Endosulfan 분해균의 동정	34
2.5. Endosulfan 분해균의 분해 특성	35
IV. 결과 및 고찰	39
1. GC/MS에 의한 endosulfan 분석 조건 확립	39
1.1 GC/MS에 의한 endosulfan 표준물질 검량선 작성	39
1.2. 회수율 측정	42

2. 시료 내 endosulfan 잔류량	44
3. 균주의 분리 및 선발	46
3.1. 집식 배양으로부터 endosulfan 분해 우량 균주의 선발	46
3.2. Endosulfan 분해균 동정	48
4. Endosulfan 분해균의 분해특성	54
4.1. Endosulfan 농도에 따른 분해능	54
4.2. 보조 탄소원 농도에 따른 endosulfan 분해능	57
4.3. Endosulfan 분해균에 의한 배지 중의 pH 변화	59
4.4. 토양에서의 endosulfan 분해 특성(Lab-scale model analysis)	60
4.5. 분리균 K-1321 strain.에 의한 endosulfan 분해 경로 분석	64
V. 결론	68
참고 문헌	72
Appendix	86



표 목 차

Table 1.1 Classification of pesticides by ingredient and chemical characteristic	02
Table 2.1 The classification organochlorine pesticides according to chemical structure	06
Table 2.2 The substitutes of organochlorine pesticides	08
Table 2.3 Physicochemical properties of endosulfan	11
Table 2.4. Overview of acute toxicity of key endosulfan compounds	18
Table 2.5 Comparison of available technologies for pesticides ...	22
Table 3.1 Composition of media for isolation of endosulfan -utilizing bacteria	27
Table 3.2 GC/MS operating conditions for endosulfan analysis ...	30
Table 4.1 Recoveries of endosulfan and endosulfan sulfate	43
Table 4.2 Background residues of endosulfan in soil samples	45
Table 4.3 Endosulfan dissipation ratio in YNB medium by strains isolated from enrichment culture	47
Table 4.4 Biochemical properties of the isolated bacterium K-1321 strain	50
Table 4.5 16S rDNA partial sequence (1420 bp) and identification of the isolated strain K-1321 by homology search based on 16S rDNA	52
Table 4.6 Peak area and concentration with relative to β -endosulfan standard curve of endosulfan diol by <i>Serratia</i> sp. K-1321 in YNB media with 100 ppm endosulfan ...	66

그림 목 차

Fig. 2.1 The amount of organochlorine pesticides production	09
Fig. 2.2 Metabolic pathways of endosulfan	16
Fig. 3.1 Map of sampling sites	25
Fig. 3.2 Procedures for the isolation of endosulfan-degrading bacteria	33
Fig. 3.3 Laboratory-scale model analysis of bioaugmentation of endosulfan in soil by the isolation bacterium	37
Fig. 4.1 Standard peak of α -and β -endosulfan by GC/MS analysis	40
Fig. 4.2 Standard curve of α -and β -endosulfan by GC/MS analysis	41
Fig. 4.3 Microscopic morphology of K-1321 strain	48
Fig. 4.4 Phylogenetic tree of <i>Serratia</i> sp. K-1321	53
Fig. 4.5 Effect of endosulfan concentration on the degradation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain	55
Fig. 4.6 Effect of an additional source concentration on endosulfan biodegradation by <i>Serratia</i> sp. K-1321	58
Fig. 4.7 Biodegradation of endosulfan and change of pH in culture medium by <i>Serratia</i> sp. K-1321	59
Fig. 4.8 Effect on endosulfan concentration on the bioaugmentation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain	61
Fig. 4.9 Change of pH in the soil by isolated bacterium	63
Fig. 4.10 GC/MS profile and mass spectra of endosulfan and its metabolites	65
Fig. 4.11 Concentration of endosulfan diol with relative to endosulfan standard curve by <i>Serratia</i> sp. K-1321	66
Fig. 4.12 Proposed metabolic pathway of endosulfan by <i>Serratia</i> sp. K-1321	67

Bioremediation of Organochlorine Insecticide Endosulfan by Bioaugmentation with a Bacterium

Mi-Eun, Park

Department of Ecological Engineering, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Endosulfan, a organochlorine compound, is widely used as an insecticide all over the world. However, endosulfan is ubiquitous contamination in agricultural environments and considered potential pollutants due to its toxic and recalcitrant properties. To remove toxic organic compounds, both biological and chemical treatments have been suggested. Bioremediation of the toxic organic compounds, using microorganisms or enzymes produced from the microorganisms (bioaugmentation), is often considered as an environmentally favorable method. Therefore, many efforts have been made to isolate bacteria capable of degrading endosulfan. The objective of this study was to isolate a bacterium to degrade endosulfan and to evaluate the possibility of the bioremediation in soil environment for the degradation of endosulfan. A endosulfan

degrading bacterium, K-1321 strain, was isolated by endosulfan-containing enrichment culture from soil and seaside sediment samples. The strain was identified to by *Serratia* sp. based on the results of morphological, biochemical and 16S rDNA homology analysis. *Serratia* sp. K-1321 was able to degrade 100% on 10ppm endosulfan within 4 weeks and 100% on 50ppm endosulfan within 6 weeks in the culture media at 25°C. The pH value of the culture media was increased to pH 8.5 from pH 5.8 after 6 weeks of incubation. The experiment in soil, lab-scale model analysis, was performed to two group, sterile soil (Group A) and non-sterile soil (Group B). In soil, *Serratia* sp. K-1321 was able to degrade 99% of 50 ppm endosulfan within 6 weeks at 25°C and the pH value of perform was increased to pH 8.2 from pH 5.5 after 6 weeks to began the observation in all group. GC/MS analysis revealed that endosulfan diol was an intermediate of the bacterial endosulfan degradation Considering above results, we concluded that *Serratia* sp. K-1321 utilized endosulfan as a carbon source and metabolized endosulfan via less toxic pathway such as the formation of endosulfan diol as and intermediate.

I. 서론

현대 화학 사업이 발전하면서 다양한 기능을 가진 수많은 화학물질이 지속적으로 개발 및 생산되고 있으며, 특히 현대 농업에서 병충, 해충 및 잡초로 인한 농산물의 질적·양적인 손실을 방지하며, 농업인구의 감소로 인한 노동력 부족을 대체하기 위해 많은 유기합성 농약들이 개발 및 생산되었다. 농약은 화학적 성분에 따라 유기염소계, 유기인계, 카바메이트계 및 무기 농약 등으로 분류되며(Table 1.1), 유기염소계 살충제는 1940년대 DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethane) 사용을 시작으로 다양한 약제들이 개발되었으며, 1970년대까지 농업에 이용되었다.

그러나 1962년 미국의 레이첼 카슨(Rachel L. Carson)이 침묵의 봄(Silent Spring)을 통해 유기염소계 화합물의 잔류성으로 인한 문제점을 지적하고, 1963년에 대통령 과학고문위원회가 ‘농약에 관한 조사 보고서’를 발표하여 그 정당성을 입증하였다. 그로 인해 1972년 미국에서 DDT의 사용을 전면 중단하였으며, 이 후 전 세계적으로 유기염소계 농약의 잔류성과 생물 축적성 등이 문제가 되어 점차 사용이 금지되었다(정영호 외, 2004; 식품의약품안전청, 2009).

Table 1.1 Classification of pesticides by ingredient and chemical characteristic (KFDA, 2008)

Ingredient	Chemical group	Residual	Examples
Bio-pesticides	-	-	Rotenone, Nicotine, etc.
Organosynthetic pesticides	Organochlorines	High	DDT, Endosulfan, etc.
	Organophosphates	Low	Malathion, Methylparathion, etc.
	Cabamates	Low	Carbaryl, Parathion, etc.
Inorganic pesticides	Inclusion of Hg, As, F, or Pb	Permanent	Phenylmercury acetate, Arsenate of lead, etc.



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 1956년 독일에서 개발된 cyclodiene계 농약으로, 현재 우리나라에서 가장 많이 사용되고 있는 유기염소계 농약이다(식품의약품안전청, 2008; 신채호 외, 2008). 유기염소계 농약에 속하는 cyclodiene계 농약은 1945년 하이먼(J. Hyman)에 의해 aldrin, dieldrin, endrin, heptachlor 등이 개발되어 사용되었다(정영호 외, 2004). 그러나 비슷한 시기에 개발된 cyclodiene계 유기염소계 살충제인 aldrin, dieldrin, endrin 등은 환경 및 농산물에의 잔류성과 생물 농축의 특성으로 인해 사용이 금지된 반면, endosulfan은 다른 유기염소계 농약에 비해 반감기가 짧고 광범위한 살충능력을 가지고 있으며 비교적 체 내 잔류성이 낮아 생물 농축 문제가 적기 때문에 현재까지 여러 나라에서 제한적으로 사용되고 있다(NRA, 1998; Guerin et al., 2001; Walter et al., 2001).

Endosulfan은 WWF (World Wildlife Fund for Nature) 지정 내분비계 교란물질(ECDs)이며, 2001년 개최된 스톡홀름 회의에서는 POP 목록에서 제외되었으나 LRTAR (Long-range Transboundary Air Pollution)협정에서는 여전히 POPs로 등록되어 있으며, UNEP (United Nations Environment Programme)에서는 독성 지속 물질(Persistent Toxic Substance; PTS)로 인식되어 있다(Guerin et al., 2001; 유엔환경계획 한국위원회, 2003; Usha and Harikrishnan, 2004). 또한 WHO에 의한 Category II-Moderately Hazardous 분류물질, EU 및 US EPA (미국 환경보호청)에 의한 Category I B-Moderately Hazardous 분류물질로 지정되어 있다(Usha and Harikrishnan, 2004).

우리나라에서는 2004년 이후 식용 작물에의 endosulfan 살포가 금지되었으나, 토양에서 정량한계 이상의 endosulfan 및 초기 분해산물인

endosulfan sulfate가 검출되어 최근까지 사용이 빈번하게 이루어지고 있다고 추측되며, 현재에는 endosulfan을 사용하지 않더라도 토양 중에 그 잔류 농도가 높은 것으로 보고되고 있다(박동식 외, 2004; 김택겸 외, 2008; 조규범, 2010).

토양 중 endosulfan은 뿌리를 통해 식물체로 흡수되어 식물체 내에 잔류하기도 한다(식품의약품안전청, 2008). 서울, 부산, 인천, 광주, 경기 지역 등의 유통 농산물의 잔류농약 실태에 관한 연구에 따르면 매년 기준치 이상의 endosulfan이 검출되고 있으며(김영국 외, 2000; 김성단 외, 2007; 김현진, 2009; 박성규 외, 2009; 하광태 외, 2009), 한약재에서도 검출되는 것으로 보고되고 있다(강인호 외, 2002).

Endosulfan의 인체에 대한 노출은 농약 살포 시 증기의 흡입 및 피부 접촉, 오염수 음용, 오염 토양과의 접촉, 오염수 및 오염 작물의 섭취 등(Usha and Harikrishnan, 2004)에 의해서 일어날 수 있으며, 토양 및 수중에 잔류하는 endosulfan이 인체에 직접적인 위해성을 가질 수 있어 문제가 된다. 또한 endosulfan은 잔류성이 비교적 길어 토양 환경 중에 오랫동안 잔류하여 재배 농작물에도 흡수될 가능성이 있기 때문에 안전 농산물의 생산에 문제가 되고 있다. 따라서 토양 중 잔류하는 endosulfan의 농도를 저감시키는 연구가 필요하다.

Endosulfan 등과 같은 유기오염물질로 오염된 환경의 복원 방법에는 물리·화학적 방법과 생물학적 처리 방법 등이 있으며, 물리·화학적 처리 방법은 단 시간 내에 빠른 처리 효율을 보이나, 2차 오염의 발생 가능성이 높고 처리비용이 비교적 고가이다. 이에 반해 생물학적 처리 방법은 효율적이고, 경제적이며, 물리·화학적 처리 방법의 대안으로서, 최근 10년 동안 오염 토양에의 생물학적 정화 방법이 주목받으면서 많은 연구와 전략이 개발 및 개선되어왔다(Pritchard et al., 1992; Atlas et al.,

1999; Gestel et al., 2003; Lu et al., 2010).

유기독성 물질로 오염된 지역의 생물학적 처리 방법으로는 식물을 이용하여 오염물질을 저감시키는 방법(phytoremediation), 미생물 또는 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 환경 중 오염물질을 분해하는 생물학적 정화 방법(bioremediation) 등이 있다.

Phytoremediation은 식물을 이용한 정화 방법으로, 친환경적이며 in-situ 처리가 가능하다는 장점이 있으나, 시간이 오래 소요되며, 높은 농도 및 독성 물질로 오염된 토양과 뿌리가 닿지 않는 심층의 오염 토양에는 적당하지 않다. 또한 오염물질 정화 후 오염물질을 흡수한 식물체의 후처리가 곤란하다는 단점이 있다(Pritchard et al., 1992; Atlas et al., 1999; Gerhardt et al., 2009).

생물학적 정화 방법은 미생물의 에너지 대사 능력을 이용하여 오염된 환경을 회복시키는 기술이다. 접근이 어렵거나 넓은 범위로 오염된 환경의 정화에도 적응이 가능하며, 2차 오염물질의 발생 가능성이 낮다. 또한 미생물의 생장으로 인한 오염물질 정화가 지속가능하기 때문에 대중들에게 있어 생물학적 정화 방법은 시간은 오래 걸리나, 물리·화학적 처리방법에 비해 비용이 적게 소요되면서 안전한 방법으로 인식되고 있다(Pritchard et al., 1992; Alexander, 1999; Atlas, 1999; Jacques et al., 2008; Gerhardt et al., 2009; Xu and Lu, 2010).

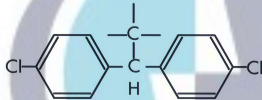
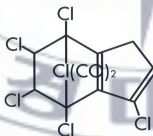
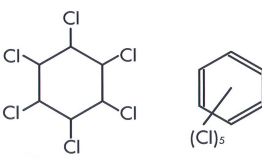
따라서 본 연구에서는 유기독성물질로서 환경 중에 잔류하며 인간에 직·간접적인 위해성이 높은 유기염소계 농약 endosulfan을 분해할 수 있는 미생물을 분리하여 endosulfan 농도별, 보조 탄소원의 농도별 및 토양환경에서의 endosulfan 분해 특성 실험을 통해 bioaugmentation을 주로 하면서 biostimulation을 병행하는 endosulfan의 생물학적 정화 가능성을 연구하였다.

II. 이론적 배경

1. 유기염소계 농약

유기염소계 농약은 탄화수소에 염소가 공유결합하고 있는 구조를 가지는 농약으로, 유기염소계 농약은 구조적 특성에 따라 dichlorodiphenylethanes, cyclodienes, chlorinated benzenes/cyclohexanes 등으로 분류된다(Table 2.1).

Table 2.1. The classification organochlorine pesticides according to chemical structure (KFDA, 2009)

Dichlorodiphenylethanes		DDT, DDD, Dicofol, Perthane, Methoxychlor, Methiochlor, ect.
Cyclodienes		Aldrin, Dieldrin, Heptachlor, Chlordane, Endosulfan, ect.
Chlorinated Benzenes/ cyclohexanes		HCB, Lindane (γ -HCH), ect.

유기염소계 농약은 대기 중에서 매우 안정하고, 환경 중에 오랜 기간 잔류하기 때문에 과거의 노출에 의해 환경 및 체내에 축적된 유기염소계 농약이 계속 문제를 일으킬 수 있다. 유기염소계 약제는 생체 및 체내 잔류성과 함께, 저휘발성, 화학적 안정성, 지용성, 낮은 생체 내 변화 및 분해속도 등의 특성으로 인하여 치명적이지 않더라도 만성노출로 인한 건강장해를 유발한다. 이들 물질은 생식 호르몬 수용체의 기능 방해를 통한 강력한 생식 호르몬 특성과 효소 유도 특성을 보이며, 스테로이드 대사와 연관된 방해 작용을 일으켜 직·간접적으로 번식력과 생식력을 억제한다(식품의약품안전청, 2009).

유기염소계 농약의 중독은 특효약이나 해독제가 현재까지 개발된 것이 없으며(김성국 외, 2004), 중독 시 나타나는 증상은 무증상에서부터 소화기증상, 중추신경계 증상, 호흡부전, 심혈관 허탈과 이로 인한 사망까지 다양하다(박기룡 외, 2008). 이러한 특성으로 인해 1970년대부터 선진국을 중심으로 대부분 사용이 금지되어왔으며, 2001년 스톡홀름 협약에 의해 주요 유기염소계 약제 8종이 POPs 규제대상물질로 선정되었다(유엔환경계획 한국위원회, 2003; 식품의약품안전청, 2009).

따라서 이를 대체하기 위해 기존의 유기염소계 농약보다 잔류성이 짧고 독성이 낮은 물질이 많이 개발되었으나(Table 2.2), 이들 대체 물질 역시 잔류성이 있으며, 여전히 환경과 생물체내에 잔류 및 축적되는 성질이 있어 그 사용이 제한적이다(식품의약품안전청, 2009).

Table 2.2. The substitutes of organochlorine pesticides (KFDA, 2009)

POPs	Substitutes
Aldrin	endosulfan, carbofuran, carbaryl, chlorpyrifos, quinalphos, phorate, etc.
Chlordane	disulfoton, fonofos, chlopyrifos, propoxurm fenitrothion, diazinon, etc.
DDT	diazinon, carbaryl, malathion, trichlorphon, quinalphos, etc.
Dieldrin	pirimiphos, endosulfan, carbofuran, fonofos, chlorpyrifos, fenthion, etc.
Endrin	chlorpyrifos, endosulfan, carbaryl, malathion, nicotine, phosphamidon, etc.
Heptachlor	aldicarb, carbaryl, carbofuran, phorate, fencalerate, deltramethrin, etc.
Mirex	diflubenzuron, carbaryl, avermectin, diazinon, deltamethrin, sulfuramid etc.
Toxaphene	trichlorphon, trifluralin, alachlor, dimethoate, chlorpyrifos, etc.

2. Endosulfan

Endosulfan은 1956년 독일에서 개발된 유기염소계 살충제로서 티오단(thiodan), 시클로단(cyclodan), 말릭스(malix), 벤조핀(benzoepin), 지오릭스(thiolix) 등 여러 상품명으로 알려져 있다(식품의약품안전청, 2008). 국내에서는 『엔도설판』이라는 품목명으로 등록되어 있으며, 작물 뿐 아니라 목재의 보존제로 사용하기도 한다. 초기에는 집파리를 비롯한 가정용 살충제로 쓰이다가 농업용 살충제로 사용이 확대된 물질이다(식품의약품안전청, 2008). 주요 유기염소계 농약을 대체하여 현재 우리나라에서 가장 많이 사용되고 있다(식품의약품안전청, 2009; Fig. 2.2).

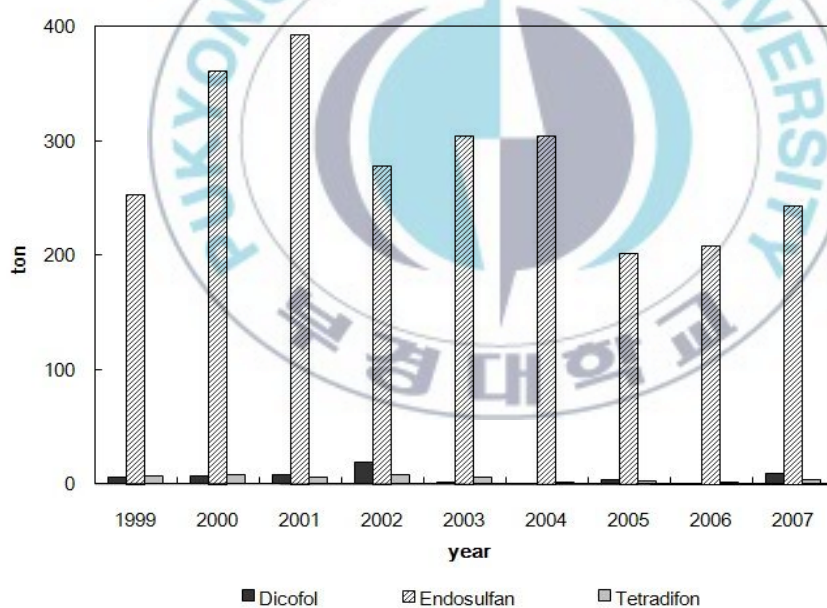


Fig. 2.1. The amount of organochlorine pesticides production (KFDA, 2009).

2.1. Endosulfan의 물리·화학적 특성

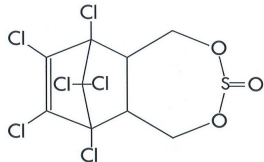
1956년 독일에서 개발된 endosulfan은 1956년에 그 살충효과가 인정되어 비침투 이행성의 소화 중독성 살충제이다(식품의약품안전청, 2008).

Endosulfan 순품(純品)은 무색결정이나 공업용 제품은 황갈색 결정상의 고체로서 이산화황의 냄새를 낸다. 순수한 endosulfan의 녹는점은 106℃(순수한 α -endosulfan의 녹는점은 109.2℃, β -endosulfan의 녹는점은 213.3℃), 공업용 제품은 70~100℃ 정도이며, 물에는 거의 녹지 않으나 대부분의 유기용매에는 소량 용해된다. 실온에서 안정하며, 물, DMSO, 95% 에탄올, 아세톤 용액에서 24시간 안정한 것으로 알려져 있다(NRA, 1998; 식품의약품안전청, 2008). 빛에는 안정한 편이나 자외선에 의해 α -endosulfan이 소량 분해되며, 알칼리조건에서 서서히 가수분해 되어 diol 화합물과 이산화황을 생성한다(유건상 외, 2006; 권성현 외, 2007; 김택겸 외, 2008).

Endosulfan은 입체이성질체인 α -endosulfan과 β -endosulfan의 혼합물로서 일반적으로 각각 64~67%, 29~32%의 비율로 존재하며, 그 비율에 따라 분해 반감기가 달라진다(Siddique et al., 2003; Lee et al., 2006; 김택겸 외, 2008; 식품의약품안전청, 2008).

Endosulfan의 물리·화학적 특성은 Table 2.3과 같다.

Table 2.3. Physicochemical properties of endosulfan

Article	Contents	Reference
Chemical structure		
Chemical name	6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepine-3-oxide	
Other name	Benzoepin, Endocel, Parrysulfan, Phaser, Thiodan, Thionex, ect.	PAN AP (http://www.panap.net)
Base chemical	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Budavari, 1996
Molar mass	406.95	Budavari, 1996
Density (20°C)	1.745 g/cm ³	Lide, 1998-1999
Solubility (20°C)	Water (25°C)	60~100 µg/L
	Dichloromethane	200 g/L
	Ethanol	65 g/L
	Ethyl acetate	200 g/L
	Hexane	24 g/L
	Toluene	200 g/L
	Acetone	262 g/L
	Benzene	333 g/L
	Carbon tetrachloride	460 g/L
	Chloroform	746 g/L
Melting point	Kerosene	164 g/L
	Methanol	89 g/L
	Xylene	388 g/L
Melting point	106°C (pure), 70~100°C (technical)	Budavari, 1996
Boil point	106°C at 760 mmHg	Lide, 1998-1999
Vapor pressure (Pa)	α-endosulfan	4.0×10 ⁻⁴
	β-endosulfan	8.0×10 ⁻⁵
	Endosulfan sulfate	3.7×10 ⁻⁵
	Endosulfan diol	2.3×10 ⁻⁶
log K _{OW}	3.55~4.38	HSDB, 1999; NRA, 1999

2.2. 환경 중 endosulfan의 특성

2.2.1. 잔류성(Persistent)

Endosulfan은 물에 잘 용해되지 않고, 빛에 안정하며, K_{ow} 가 10,000 정도로 토양에 잔류하는 경향이 있다. 그러나 환경상태에서 미생물과 곰팡이류에 의한 분해가 비교적 잘 일어나는 편이며, 알칼리 조건에서 서서히 가수분해 된다(Guerin, 2001; 유건상 외, 2006; 권성현 외, 2007; 김택겸 외, 2008; 식품의약품안전청, 2008).

토양환경 중 분해반감기는 이성질체의 비율 및 환경 조건에 따라 다르며(Kwon et al., 2005), 최소 30일에서 최대 6년까지로 알려져 있다(Tomlin, 1997; Umweltbundesamt, 2004; 식품의약품안전청, 2008). 혐기적 조건에서는 잔류성이 높아져 반감기가 증가하는 경향을 보이며, 증기압은 α -endosulfan이 4.0×10^{-4} Pa, β -endosulfan이 8.0×10^{-5} Pa로 토양 환경에서 α -endosulfan이 대기 중으로 휘발하여 β -endosulfan 및 endosulfan 분해 산물에 비해 더 빨리 제거되는 경향을 보인다(Tomlin, 1997; Guerin, 2001; Siddique et al., 2003; Umweltbundesamt, 2004; 김택겸 외, 2008).

2.2.2. 이동성(Transport)

Endosulfan은 비침투성 농약으로, 주로 토층 10 cm이내에 존재하는 것으로 알려져 있다. 토양에 대한 K_{ow} 값은 약 10,000 정도로 토양 입자에 강하게 흡착되어 토양 환경 중 이동성이 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 주로 토양과 식물체 표면에 잔류한다(NRA, 1998; Guerin,

2001).

그러나 최근 연구에 의하면 대기, 하천, 해수 및 지하수 등에서도 endosulfan이 검출되고 있으며(정예표 외, 2001; Laabs et al., 2002; Harner et al., 2005; Lo'pez-Blanco et al., 2005), 이러한 원인은 endosulfan이 흡착된 토양교질이 강우 유출수 등에 의해 하천 및 지하수로 이동·침투되거나, 살포된 endosulfan이 휘발하여 대기 중에 머무르기 때문인 것으로 알려져 있다(NRA, 1998; Guerin, 2001; Zhang et al., 2003). Lo'pez-Blanco 등(2005)은 토양을 이용한 column 실험을 통해 토양교질에 흡착된 endosulfan이 토양 습도에 따라 토양 공극수로 가역적 이동이 가능하며, 지하수 및 토층 40cm까지 침투가 가능하다고 보고하였다. 또한 endosulfan이 살포된 20일 후 깊은 토층의 지하수로부터 endosulfan이 0.009~0.053 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 검출되었다고 보고된 바 있다(Usha and Harikrishnan, 2004). 또한 국내에서는 과거 endosulfan을 사용했던 고랭지 배추 경작지 근처 하천에서 강우 후 최대 7.83 ng/kg의 endosulfan이 검출되었다는 연구가 있다(박동식 외, 2004). 또한 농약을 전혀 사용하지 않는 농지의 작물에서 미량의 endosulfan이 검출되었으며, 이는 주변 농지에서 사용된 endosulfan이 비산되어 오염된 것으로 보고되고 있어(소비자 안전센터, 2006) 직접적인 살포 없이도 endosulfan의 오염에 노출될 수 있음을 보여준다.

Endosulfan은 휘발성이 강하여 대기 중으로 이동하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 휘발성으로 인해 대기 중에서도 일정량을 endosulfan이 검출되고 있으며(정예표 외, 2001), 대기를 통하여 태평양을 건넌다는 연구 결과도 보고되었다(Harner et al., 2005; Weber et al., 2006).

2.2.3. 분해 특성(degradation)

환경 중 endosulfan의 분해과정은 주로 산화적 분해과정과 가수분해 과정의 두 가지 경로로 이루어지며, 산화적 분해과정에서는 곰팡이류 (fungi)에 의해 주로 endosulfan sulfate가 형성되며, 모 화합물인 endosulfan보다 토양 중 잔류성이 길어 문제가 된다(Kullman and Matsumura, 1996; Umweltbundesamt, 2004). Endosulfan은 알칼리 환경에서 가수분해 되며, endosulfan diol 및 소량의 endosulfan ether, hydroxyether, lactone 등의 여러 중간산물이 형성되는 것으로 알려져 있다(Kullman and Matsumura, 1996; Umweltbundesamt, 2004).

Endosulfan의 생물학적 분해에 대하여 많은 연구가 보고되고 있으며, 다양한 미생물에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다(Sutherland et al., 2000; Hussain et al., 2007). Lee 등(2003)은 *Anabaena* sp.가 endosulfan을 분해하여 endosulfan을 endosulfan sulfate와 알려지지 않은 물질을 생성한다고 보고하였고, Awasthi 등(2003)은 *Bacillus* strain.이 endosulfan을 endosulfan diol과 endosulfan lactone으로 분해한다고 보고하였다. 권기석 등(2003)은 Sutherland 등(2002)은 *Mycobacterium* strain.이, *Klebsiella pneumoniae* KE-1이 endosulfan sulfate를 생성하지 않고 endosulfan을 분해한다고 보고하였으며, 권기석 등(2005)은 *Klebsiella oxytoca* KE-8이 endosulfan sulfate를 분해한다고 보고하였다. Lee 등(2006)은 *Pseudomonas* sp. KS-2P에 의해, Bhalerao 등(2007)은 *Aspergillus niger*에 의해 endosulfan 및 endosulfan sulfate가 분해된다고 보고하였으며, 신재호 등(2008)은 *Bacillus* sp. E64-2가 endosulfan을 endosulfan diol로 분해한다고 보고하였는데, 일반적으로 토양환경 중에서는 endosulfan

sulfate가 주요 대사산물로 생성되기 때문에 문제가 되고 있다(NRA, 1998; Umweltbundesamt, 2004). Endosulfan sulfate는 주로 곰팡이류 (fungi)에 의해서 형성되며 모 화합물인 endosulfan과 비슷한 독성을 가지면서 토양 중 잔류성은 더 높은 것으로 알려져 있어 문제가 된다(Rao et al., 1980; NRA, 1998; Umweltbundesamt, 2004; 신재호 외, 2008; 조규범, 2010). 환경에서 미생물에 의한 endosulfan의 물질대사 경로는 Fig. 2.2와 같다.



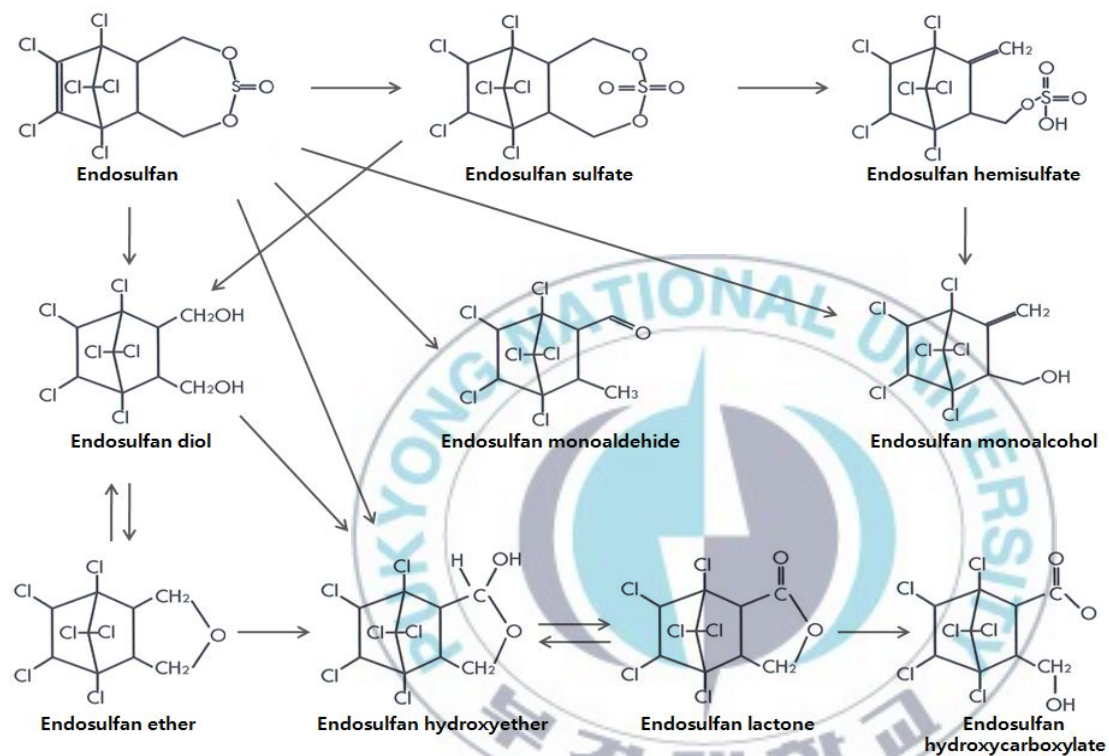


Fig. 2.2. Metabolic pathways of endosulfan (Gorbach and Henke, 1968; Dorough et al., 1978; Sutherland et al., 2002a; Sutherland et al., 2002b; Awasthi et al., 2003; Lee et al., 2003; Siddique et al., 2003; Walse et al., 2003; Kwon et al., 2005; Kumar et al., 2006; Lee et al., 2006; Weir et al., 2006; Hussein et al., 2007).

2.2.4. 독성(Toxicity)

Endosulfan의 사람에 대한 구강 섭취 반수 치사량은 7~121 mg/체중 kg, 피부 접촉에 의한 반수 치사 농도는 13~36 mg/m³로, 높은 독성을 가지고 있다(ATSDR, 1993; PAN AP, <http://www.panap.net>). 주로 섭취, 흡입, 피부 접촉 등의 경로로 체 내에 흡수되며, 쉽게 대사가 일어나고 배출된다. 투약 후 7일 만에 소변으로 90% 정도가 배설되나, 약 10%의 경우는 근육이나 지방 등에 축적된다(김인선 외, 1996). Endosulfan에 중독되면 과다행동, 신경계 과잉 자극, 반복적 경련, 심혈관 허탈, 호흡부전, 호흡곤란, 두통, 흉통 등의 증상을 나타내며, 그로 인한 합병증으로 인해 사망에까지 이르는 것으로 알려져 있다(김성국 외, 2004; 박기룡 외, 2008; 한국작물보호협회, 2010; Beauvais et al., 2010; Silva and Beauvais, 2010; Silva and Carr, 2010). Endosulfan은 급성독성 뿐만 아니라 만성독성에 의한 위해성 역시 높으며, 피부자극, 면역력 저하, 장기 이상, 생식독성(gonadal toxicity), 유전독성(genotoxicity), 신경독성(neurotoxicity) 등을 유발할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Chaudhuri et al., 1999; Usha and Harikrishnan, 2004). 또한 1 ppb~1 ppm의 농도에서 인간의 적혈구, 혈소판 및 헤모글로빈을 파괴한다는 연구가 있다(Usha and Harikrishnan, 2004; 김성국 외, 2004; 박기룡 외, 2008).

Endosulfan은 특히 수(水)환경에서 독성이 높아 수생생물의 기형, 부화율 저하, 폐사 등의 문제를 야기하며(Guerin, 1999; Guerin, 2001; 강한승 외, 2004; Table 2.4.), 참잉어(*Cyprinus carpio* LINNAEUS)에 대한 96시간 반수치사 농도(LC₅₀)는 7.96 ppb, LC₁₀은 4.49 ppb로 아주 강한 어류독성을 보인다는 연구 결과가 있다(이강봉 외 1994). 1969

년 독일에서 30 kg의 endosulfan이 Rhein강에 방출되어 물고기의 폐죽음을 발생시켰으며, 1995년 미국의 endosulfan으로 오염된 목화밭으로부터 강우 유출수가 발행하여 주변 강의 어류가 폐사하였다는 보고가 있다(Usha and Harikrishnan, 2004).

Table 2.4. Overview of acute toxicity of key endosulfan compounds^a (Guerin, 2001)

Compound	Toxicity LD ₅₀ (mg/kg)			
	Insect	Fish	Bird	Mammal
α-Endosulfan	5.5	0.001~0.0 1 ^b	26~100	9.4~40
β-Endosulfan	9.0	0.001~0.0 1	26~100	177
Endosulfan sulfate	9.5	0.001~0.0 1	- ^c	8~76
Endosulfan diol	>500	1~10	-	>1,500

^a Summarized from literature (Guerin, 1993; Anonymous, 1998).

^b The lower lethal dose, i.e. LD₅₀ value, the higher toxicity.

^c -, indicates that there was no data available.

2.3. Endosulfan의 생산 및 사용

Endosulfan은 1956년 개발된 이래로 전 세계적으로 생산 및 사용되어왔다. 현재 endosulfan은 방글라데시, 브루나이, 칠레, 인도, 인도네시아, 파키스탄, 필리핀, 스리랑카, 태국 등의 나라에서 생산되고 있으며(Usha and Harikrishnan, 2004; PAN AP, <http://www.panap.net>), 싱가포르, 벨리즈, 통가, 시리아, 독일, 필리핀, 콜롬비아, 캄보디아, 바레인, 쿠웨이트, 오만, 카타르, 사우디아라비아, 아랍 에미리트, 스리랑카, 파키스탄, 네덜란드, 스웨덴 등의 나라에서 사용이 금지되었으며, 방글라데시, 인도네시아, 한국, 태국, 캐나다, 덴마크, 필란드, 영국, 필리핀, 러시아, 노르웨이, 세르비아, 카자흐스탄, 이란, 일본, 베네수엘라, 도미니카공화국, 온두라스, 파나마, 아이슬란드, 스페인, 이탈리아, 프랑스, 미국, 호주 등 많은 국가에서 제한적으로 사용되고 있다(Hoechst, 1991; IRPTC, 1993; PRC, 1994; Usha and Harikrishnan, 2004; PAN AP, <http://www.panap.net>).

우리나라에서는 지오릭스 및 마릭스의 상표로 바이엘, 한국삼공, 경농, 동부하이텍, 영일케미컬, 동방아그로, 서한화학, 영일케미컬 등의 회사에서 유제(endosulfan 30%) 및 분재(endosulfan 3%) 등의 형태로 생산된다. 주로 땅강아지, 거세미나방, 애바구미, 담배나방의 살충에 주로 이용되며, 유제는 40 mL/물 20 L의 농도로 희석하여 1년에 2회 이내, 분제는 1,000 m³ 당 3~6 kg을 1년 1회 이내로 사용한다. 독성이 강한 농약이므로 시·군 농업기술센터 소장이 실시하는 농약안전사용특별교육 또는 농약 구입 시 농약 판매업관리인이 실시하는 농약안전사용교육을 받은 농업인만이 사용할 수 있으며, 특히 어독성이 높아 저수지나 농수로 등의 수환경으로 유출되기 쉬운 장소에서의 사용은 금지되어있다(한국작물

보호협회, 2010).

우리나라에서는 2004년 식용작물에의 사용이 금지되었으며, 2008년 유해화학물질관리법에 의해 수입, 제조, 판매, 사용(농약으로서의 사용 제외) 금지물질로 지정·관리되고 있다(식품의약품안전청, 2008).



3. 생물학적 정화 방법 (Bioremediation)

3.1. 생물학적 정화 방법

생물학적 정화 방법은 미생물의 물질대사 능력을 활용하여 오염된 환경을 회복시키는 기술로서(Alexander, 1999), (1) 자연적으로 오염물질이 저감되는 지를 모니터링 하는 방법 (natural attenuation), (2) 토착 미생물의 활성을 위해 추가적인 산소, 물 또는 영양소(주로 질소, 인 및 미량 금속의 혼합물)를 투입하는 방법(biostimulation), (3) 특정 오염물질을 정화할 수 있는 미생물(오염 부지, 외부 및 유전공학적 유래 미생물)을 오염 부지에 적용하는 방법(bioaugmentation) 등으로 정의된다(Kapley et al., 1999). 자연환경에 존재하는 오염물질의 화학적 성질과 농도, 환경조건, 토착 미생물 군집의 조성 여부, 특정 오염물질 정화 미생물의 유무에 따라 생분해성의 여부와 정도가 결정된다.

생물학적 정화 방법은 원위치에서 오염물질의 정화가 가능하며, 접근이 어렵거나 넓은 범위의 오염정화에도 적용이 가능하다(EPA, <http://www.epa.gov/>). 2차 오염물질의 발생 가능성이 적은 미생물의 대사 작용을 이용하므로 환경적 스트레스를 적게 발생시키며 다른 처리 방법에 비하여 비용이 적게 소요된다(Pritchard et al., 1992; Atlas, 1999; Jacques et al., 2008; Gerhardt et al., 2009; Xu and Lu, 2010; EPA, clean up information, <http://clu-in.org/>; Table 1.2). 반면, 물리·화학적 처리 방법에 비해 정화 시간이 많이 필요하고, 복합 오염물질의 정화에는 새로운 기술 개발이 요구되며, 독성이 지나치게 높거나 생분해되지 않는 오염원에는 적용하기 어렵다. 또한 분해 산물로서 유해한 물질을 형성할 가능성이 있어 분해 부산물의 위해성 유무 조사가 필

요하다(Swannel et al., 1996).

Table 2.5. Comparison of available technologies for pesticides
(EPA, Clean up information, <http://clu-in.org>)

Technology	Cost range (per yd ³) ^a	Treatment time (months) ^b	Treatable media ^a	Removal efficiency ^a
Low temperature thermal desorption	\$ 100 to \$ 400	0.75	soil, sludge, and sediment	82% to >98%
Incineration	\$ 300 to \$ 1000	1	soil, sludge, and sediment	generally >99.99%
Bioremediation	\$ 8.4 to \$ 192	3.1 (ex situ)	soil, sludge, sediment, and groundwater	up to 99.8%
Phytoremediation	~ \$ 80 or \$ 60 to \$ 100/acre	No date	soil, sludge, sediment, and groundwater	up to >80%

^a Base on the treatment of pesticide contaminated media

^b Based on treatment of 1,000yd³ of contaminated with various
organic compounds

3.2. Bioaugmentation

Bioaugmentation은 특정 오염물질을 분해할 수 있는 미생물을 이용하여 오염된 토양이나 물을 정화하는 방법으로 정의된다. 특정 오염물질 분해 미생물은 토착 미생물 중에서 분리하거나, 외인성 미생물 또는 유전공학을 통해 조작한 미생물 등을 이용한다. 정화 대상 환경이 여러 종류의 혼합물로 오염물질로 오염된 경우에는 biostimulation과 함께 수행되기도 한다(Ellis et al., 2000). Bioaugmentation은 일반적으로 탄화수소 화합물의 정화, 폐기물 및 폐수의 처리, 농약의 해독 등에 이용되며(Kim, 2003), 투입 미생물은 오염된 환경에서 유기체를 조성하여 생물체 내에서 일어나는 화학반응을 체외에서 발생시키는 bioreactors 작용을 한다(Vogel, 1996).

오염된 환경에서 bioremediation은 종종 토착 미생물에 의해 일어나며, 외인성 미생물에 의해 토착 미생물의 증식을 유도하여 대상 화합물의 저하 속도를 높이기도 한다. 독성 오염물질 정화능력을 가진 미생물은 오염물질에 대하여 저항력을 가지고 있으며, 생장 및 번식 등으로 높은 생체량을 유지할 경우 오염물질의 분해를 지속적으로 유지할 수 있다는 장점이 있다(Jacques et al., 2008).

그러나 정화 비용, 투입 미생물의 대상오염물질 분해 효율, 토착 미생물과의 경쟁, 미소식물의 에너지대사에 의한 방해, 대상 오염물질 외 타 오염물질의 혼입, 오염 부지의 물리화학적 조건 등에 의해 환경 중의 오염물질 분해속도가 결정되며(Lewis et al., 1986; van Elsas and Heijnen, 1990; Akkermans, 1994), 토착 미생물과의 경쟁에서 도태되거나 부지 밖으로 이동한 경우에는 오염물질의 분해효율이 저하하거나 정화가 실패할 수 있다(Kim, 2003).

3.3. Biostimulation

Biostimulation은 오염 환경에 추가적인 산소, 물, 전자 수용체 또는 영양소(탄소, 질소, 인, 미량 금속 및 혼합물) 등을 공급하여 토착 미생물의 활성을 증가시킴으로써 오염물질을 정화하는 방법이다(Ellis et al., 2000). 일반적으로 저농도의 탄화수소(유기물질)로 오염된 넓은 범위의 오염의 정화에 이용되며, 토착 미생물을 이용하므로 환경 스트레스를 최소화 할 수 있다. 최근에는 유류 오염 토양 및 유독가스로 오염된 토양의 정화에 주로 이용되고 있으며, bioaugmentation과 병행하여 이용되기도 한다(Kim, 2003; EPA, <http://www.epa.gov/>).

그러나 이를 오염매체에 적용하기 위해서는 토착 미생물의 유무 확인이 필요하며, 높은 농도 및 독성 오염물질의 경우 그 독성이 일반 토착 미생물의 증식 및 활성에 영향을 줄 수 있으며, 생분해되지 않는 오염물질의 정화에는 적당하지 않다(Swannel et al., 1996). 또한 주입한 영양소가 토착 미생물에 의해 이용되지 않고 외부 환경으로 유출될 가능성이 있으며, 그 영양성분에 의해 지하수 또는 근처 하천 등이 오염될 가능성도 배제할 수 없다(Kim, 2003).

Ⅲ. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1.1. 토양 시료

본 연구에서 균원(菌原) 시료로 사용한 토양 시료는 endosulfan의 사용여부를 조사하여 경북 일대 및 낙동강 인근 농경지 토양과 낙동강 하구 인근 갯벌에서 저질을 채취하여 사용하였다(Fig. 3.1). Endosulfan은 주로 토양 표면 10cm 내에 머무르는 것으로 알려져 있으며(NRA, 1998), 토층의 깊이가 깊어질수록 호기성 미생물의 활성이 떨어지므로 토양 표면 아래 5~10cm의 토양을 시료로 채취하였다. 채취한 토양시료는 균의 사멸 및 endosulfan의 유실을 막기 위해 각각 실온과 4℃에서 보관하였다.



Fig. 3.1. Map of sampling sites.

1.2. 배양 배지

균의 분리 및 배양을 위한 배지 및 조성은 Table 3.1 과 같다. 균의 활성을 위한 배지는 LB (Luria-Bertani media, Difco., USA) 배지를 사용하였다(Fujii et al., 2000; 신재호 외, 2008). 분해균 배양 배지는 YNB (Yeast nitrogen base without amino-acid; Difco., USA) 배지를 사용하였다. YNB 배지는 탄소원(carbon source)없이 질소원, 미네랄 및 염분으로 조성된 최소배지이므로, endosulfan을 주 탄소원으로, yeast extract (Difco., USA)를 보조 탄소원으로 첨가하여 사용하였다. Endosulfan과 yeast extract의 농도는 각각 100 ppm과 0.5%가 되도록 첨가하였다. 단일균 분리용 평판배지로는 100 ppm endosulfan과 0.5% yeast extract를 함유하는 YNB 한천 배지(상기 YNB 배지에 1.5%의 한천을 가한 배지)를 조제하여 사용하였으며, 단일균 배양 배지는 endosulfan의 농도가 100 ppm이 되도록 첨가한 YNB배지를 사용하였다(Fujii et al., 2000; 김영목 외, 2007; 김영목 외, 2008; 신재호 외, 2008).

1.3. 사용 시약

본 실험에 사용한 endosulfan (99% purity)과 endosulfan sulfate (99.5% purity) 표준품은 Augsburg 사(독일)에서 구입하였으며, 분해균 배양 및 토양 적용 실험(Laboratory-scale model analysis)에 사용한 endosulfan은 (주)경농의 경농 지오릭스 유제(endosulfan purity 35%)를 구입하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 시약은 분석용의 특급시약을 구매하여 사용하였다.

Table 3.1. Composition of media for isolation of endosulfan-utilizing bacteria

Media	Ingredient	Content (per L)
LB (Luria-Bertani media)	Tryptone peptone	10.0 g
	Bacto-yeast extract	5.0 g
	NaCl	5.0 g
	Glucose	1.0 g
YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids)	Vitamins	
	Biotin	2 mg
	Calcium Pantothenate	400 mg
	Folic Acid	2 mg
	Inositol	2,000 mg
	Niacin	400 mg
	p-Aminobenzoic Acid	200 mg
	Pyridoxine Hydrochloride	400 mg
	Riboflavin	200 mg
	Thiamine Hydrochloride	400 mg
	Compounds Supplying Trace Elements	
	Boric Acid	500 mg
	Copper Sulfate	40 mg
	Potassium Iodide	100 mg
	Ferric Chloride	200 mg
	Managamese Sulfate	400 mg
	Sodium Molybdate	200 mg
	Zinc Sulfate	400 mg
	Salts	
	Potassium Phosphate Monobasic	1.0 g
	Magnesium Sulfate	0.5 g
	Sodium Chloride	0.1 g
	Calcium Chloride	0.1 g

2. 실험방법

2.1. GC/MS에 의한 endosulfan 정량 분석 조건 확립

2.1.1. Endosulfan 분석 조건

Endosulfan 및 endosulfan 분해산물의 분석을 위해 GC/MS (Simazu GC 2010 plus/Simazu GC-MS 2010)를 이용하였다. 분석에는 DB-5 column (CBPI-S25-050, I. D. 0.32 mm, 0.25 μ m, A 30 m)을 사용하였으며, carrier gas는 순도 99.999%의 헬륨을 1.14 mL/min의 속도로 사용하였다. 시료 주입부는 splitless 모드에서 250°C로 측정하였다. 오븐 온도는 100°C에서 2분간 유지하다가 300°C까지 5°C/min으로 승온시켜 300°C에 도달 후 3분간 유지하였다. MSD 측정은 ion source temp. 200°C, quadrupole temp. 220°C 에서 정량 분석 시 Selective ion monitoring (SIM) 모드로, 정성 분석 시 Full scan (SCAN) 모드로 측정하였다. 시료는 1.0 μ L씩 주입하였다(Table 3.2).

2.1.2. 검량선 작성

토양 중 endosulfan 잔류분석을 위해 endosulfan 및 endosulfan sulfate 표준물질을 n-hexane으로 희석하여 검량선 작성에 필요한 다양한 농도의 표준용액을 만들었다. 각 농도의 표준용액을 GC/MS로 측정하여 검량선을 작성하였다.

2.1.3. 회수율 측정

농약잔류성 실험법에 준하여 endosulfan 및 endosulfan sulfate의 회수율 측정을 실시하였다. Endosulfan이 사용되지 않은 장소의 endosulfan이 검출되지 않은 토양에 각 물질의 농도가 검출한계(LOD, Limit of detection : 0.005 mg/kg; 농촌진흥청, 1992)의 10배 및 50배 수준의 농도가 되도록 오염시켜 Table 3.2의 조건으로 각 분석물질의 회수율을 측정하였다(농촌진흥청, 1992; 조규범, 2010).



Table 3.2. GC/MS operating conditions for endosulfan analysis

GC/MS	Simazu GC 2010 plus / Simazu GC-MS 2010	
Column	DB-5 (CBP1-S25-050) (Length 30 m × I. D. 0.32 mm, Film thickness 0.25 µm)	
Injector	Splitless mode, 250°C	
Injection volume	1µL	
Carrier gas	He, 1.14 mL/min	
Oven temp. program	100°C for 2 min 100-300°C at 5°C/min 300°C for 3 min	
Total running time	45 min	
Detection	Ion source temp.	200°C
	Quadrupole temp.	220°C
	Qualitative	Full scan (SCAN) scan ion m/z : 50-500, scan speed : 1000
	Quantitative	Selective ion monitoring (SIM) Ref. ion m/z : 241, 207, 195

2.2. 토양 시료 중 endosulfan 추출

토양 시료 중 endosulfan의 잔류량을 측정하기 위해 n-hexane으로 endosulfan을 용매 추출하였다. 토양시료 5 g에 10 mL의 n-hexane을 가하여 16시간 동안 진탕 추출한 후, 12,000 rpm으로 1분간 원심 분리하여 상등액(n-hexane층)을 0.20 µm Cellulose Acetate filter로 필터링 하여 GC/MS로 측정하였다(서유덕 외, 2003; 김택겸 외, 2008).

2.3. 집식 배양을 통한 endosulfan 분해균의 분리

2.3.1. Endosulfan 분해균의 배양

Endosulfan 분해균 분리를 위해 집식 배양을 실시하였다. 균의 활성을 위해 250 mL 삼각플라스크에서 조제한 LB 배지 100 mL에 토양 시료 10g를 가하여 30℃에서 120 rpm으로 하루 동안 진탕 배양한 후, 한 시간 동안 정지시켜 그 상층액을 균원 시료로 하였다. 균원 시료 10 mL를 100 ppm endosulfan과 0.5% yeast extract를 함유한 YNB 배지에 접종하여 25℃, 120 rpm으로 일주일 간 진탕 배양하였다. 이 배양액을 동일한 조성의 새 배지에 1 mL 씩 접종하여 같은 조건으로 일주일 간 더 배양하였다. 이 배양액을 각각 0.85% NaCl 용액으로 10^{-6} 배 까지 축차 희석(serial dilution)하였다. 이 후 단일 균 분리를 위해 100ppm endosulfan과 0.5% yeast extract를 첨가한 YNB 한천 평판 배지에 0.1 mL 씩 도말한 후 25℃에서 배양하여 단일 콜로니를 분리하였다. 분리균은 100 ppm endosulfan을 첨가한 1/10 LB 배지에 접종하여 25℃, 120 rpm에서 일주일 이상 진탕 배양하고 잔류 endosulfan을 정량하였

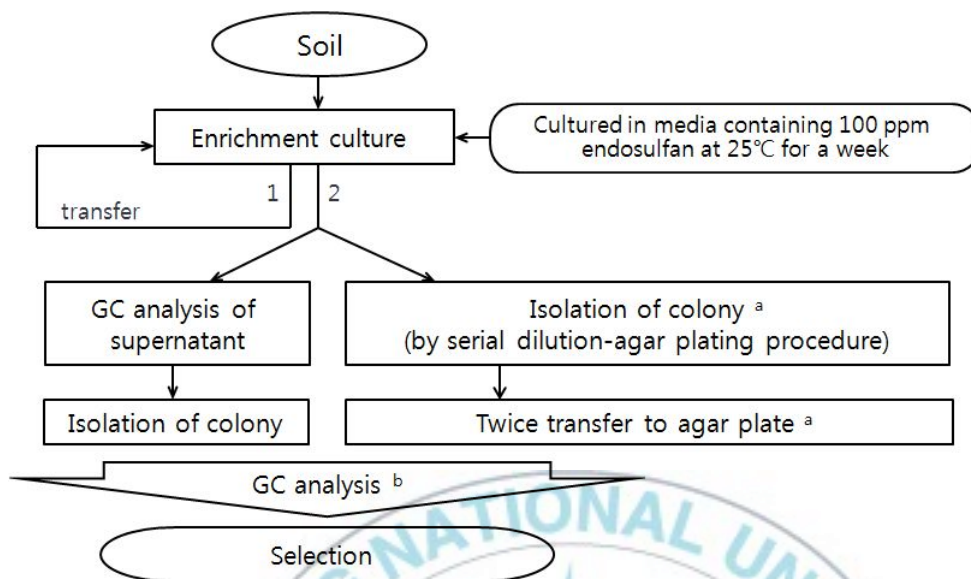
다(Fig. 3.2) (Siddique et al., 2003; Kumar et al., 2007; 김영목 외, 2008; 신재호 외, 2008).

2.3.2. Endosulfan 추출

배양 배지에 잔존하는 endosulfan을 추출하였다. 배양 배지를 1 mL 씩 취한 후 두 배의 n-hexane을 가하여 3분 간 vortex mixer로 진탕하였다. 층이 완전히 분리될 때 까지 잠깐 정치시켜 n-hexane층을 0.20 μ m Cellulose Acetate filter로 필터링 후 GC/MS 시료로 하였다(서유태 외, 2003; 김영목 외, 2007; 김영목 외, 2008).

2.3.3. Endosulfan 분해균의 분리

Endosulfan을 탄소원으로 하는 배지에서의 집식 배양을 통해 다수의 단일 균주를 분리하였다. 이 중 상대적으로 endosulfan의 분해능이 뛰어난 균주에 대하여 GC/MS를 통해 endosulfan 분해산물을 검색하였다. 분해산물로 모 화합물과 독성이 비슷한 endosulfan sulfate를 생성하지 않는 균주 중 endosulfan의 분해능이 가장 뛰어난 균주를 endosulfan 분해균으로 선정하였다(Fig. 3.2).



a, Bacteria was cultured on YNB agar plate containing 100ppm Endosulfan

b, Bacteria was cultured on YNB containing 100ppm Endosulfan was determined by GC

Fig. 3.2 Procedures for the isolation of endosulfan-degrading bacteria (Kim et al., 2007; Kim et al., 2008).

2.4. Endosulfan 분해균의 동정

2.4.1. Endosulfan 분해균의 생화학적 특성 및 동정

Endosulfan 분해 분리균의 생화학적 특성 검사 및 동정을 위해 분리균을 그람 염색 후 그 결과에 따라 Vitek Gram negative identification card (GNI+)를 이용하여 균 동정을 실시하였다(박정운 외, 2006).

2.4.2. 16S rDNA를 통한 endosulfan 분해균의 동정

분리균을 LB 배지에서 하루 동안 배양 후 Chromosomal DNA를 추출 및 정제하였다(Berns and Thomas, 1965). 16S rDNA를 증폭하기 위하여 5'-GTTTGGAT CCTGGCTCAG-3' (27F) primer, 5'-AAGGAGGGGATCCAGCC-3' (1492R) primer (TAKARA, Japan)를 사용하였다(Dunbar et al., 2000). PCR (Polymerase chain reaction) 반응 조성은 DNA template 에 27F primer, 1492R primer, 10×buffer, 10 mM dNTP mixture, 5X band (5XBD), EF-Taq polymerase를 첨가하여 총 50μL의 혼합물로 수행하였다. 혼합한 반응액은 94℃에서 2분간 변성시켰다. 이를 52℃에서 2분간 annealing한 후 72℃에서 2분간 polymerization 시켰다. 다시 94℃에서 2분, 60℃에서 2분, 72℃에서 2분의 cycle을 20회 반복하여 시행하였다. PCR 산물의 염기서열 결정은 (주)Bioneer에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열의 상동성 검색은 Ribosomal database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시하였다.

2.5. Endosulfan 분해균의 분해 특성

2.5.1. Endosulfan 농도에 따른 분해능

분리한 균주의 endosulfan 분해 한계를 알아보기 위해 농도가 각각 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm의 endosulfan을 함유하는 YNB 배지를 조제하였다. 그 후 분리균을 접종하여 25℃, 120 rpm에서 진탕 배양하며 배지에 잔존하는 endosulfan을 시간별로 관찰하였다.

2.5.2. 보조 탄소원 농도에 따른 endosulfan 분해능

보조 탄소원의 농도에 따른 endosulfan 분해 정도를 알아보기 위해 endosulfan을 주 탄소원으로, yeast extract를 보조 탄소원으로 하는 YNB 배지를 조제하였다. Endosulfan의 농도는 100 ppm, yeast extract의 농도는 각각 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.05%가 되도록 첨가하였다. 각각의 배지에 분리균을 접종하여 25℃, 120 rpm에서 진탕 배양하면서 시간에 따른 endosulfan의 잔류량을 측정 및 비교하였다.

2.5.3. Endosulfan 분해균에 의한 pH 변화

Endosulfan 분해균에 의한 pH 변화를 조사하기 위해 endosulfan 100 ppm을 함유한 YNB배지(pH 5.4 ± 0.05)에 분리균을 접종하여 25℃, 120 rpm에서 진탕 배양하면서 배양 배지의 pH변화를 측정하였다.

2.5.4. 토양에서의 endosulfan 분해 특성(Laboratory-scale model analysis)

토양에서의 분리균의 endosulfan 분해능 및 타 미생물과의 경쟁에서 어떠한 위치를 차지하는지 알아보기 위해 토양 실험을 실시하였다. 토양 실험에 사용한 토양은 같은 지역의 토양을 2 mm 체로 통과시켜 100 g 씩 사용하였다. 실험구는 흡착 및 타 미생물과의 경쟁 등의 요건을 고려하여 각각 멸균 토양 구(Group A)와 비멸균 토양 구(Group B)로 나누었으며, 각각의 토양을 endosulfan의 농도가 각각 50, 100, 200, 500 ppm이 되도록 오염시켰다. 토양은 110℃, 15기압에서 30분 동안 고압 증기멸균(autoclave)하여 하루 동안 방치하는 방법을 3번 반복하여 멸균시켰다. 균 접종은 수분 및 영양분 공급을 겸하여 일반 영양배지에 배양한 endosulfan 분해균 배양액을 20 mL 씩 주입하였으며, 유사한 조건을 조성하기 위해 대조구(비접종구)에는 같은 양의 멸균된 일반 영양 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℃에서 관찰하면서 토양 중에 잔류하는 endosulfan 및 pH 변화를 측정하였다(Fig. 3.3).

토양 실험구에서의 endosulfan 추출은 토양 5 g을 채취하여 n-hexane 10 mL를 가한 후 16시간 동안 진탕하여 30초간 원심분리 후 n-hexane층을 0.20 μ m Cellulose Acetate filter로 필터링하였다(김영목 외, 2007; 김영목 외, 2008). 정량 및 정성 분석은 GC/MS를 이용하여 Table 3.2의 조건으로 행하였으며, pH는 미리 풍건한 시료 5 g에

중류수 25 mL를 가하여 30분간 진탕시켜 1시간 이상 방치한 후 깨끗한 유리전극으로 측정하였다¹⁾.



Fig. 3.3 Laboratory-scale model analysis of bioaugmentation of endosulfan in soil by the isolated bacterium.

1) 국립농업과학원 (<http://www.niast.co.kr/environment/>)

2.5.5. 분리균에 의한 endosulfan 분해경로 분석

분리한 endosulfan 분해균의 endosulfan 분해산물 측정 및 분해 경로를 분석하기 위해 분리균 배양 배지에서 endosulfan 및 endosulfan 분해 산물을 추출하여 GC/MS로 측정하였으며, 분석 후 시간에 따른 peak 면적의 증가를 보인 peak에 대하여 endosulfan 분해 산물의 ion spectrum과 대조하여 검색하였다.



IV. 결과 및 고찰

1. GC/MS에 의한 endosulfan 정량분석 조건 확립

1.1. GC/MS에 의한 endosulfan 표준물질 검량선 작성

GC/MS에 의한 endosulfan의 정량분석 조건을 확립하였다. 모든 시료의 endosulfan 및 endosulfan 분해 산물의 정량분석은 GC/MS (Simazu GC 2010 plus/Simazu GC-MS 2010)를 이용하여 Table 3.2의 조건으로 실시하였으며, endosulfan standard (10 ppm) peak는 Fig. 4.1에, 표준 검량선은 Fig. 4.2에 나타내었다.

검량선은 모두 직선성을 나타내었으며, R^2 의 값은 α -endosulfan이 1.0000, β -endosulfan이 0.9999로 높은 상관관계를 보였다.

모든 시료는 예상 endosulfan 농도에 따라 표준곡선의 범위 내에 들도록 n-hexane으로 1~100배 희석하여 분석하였다.

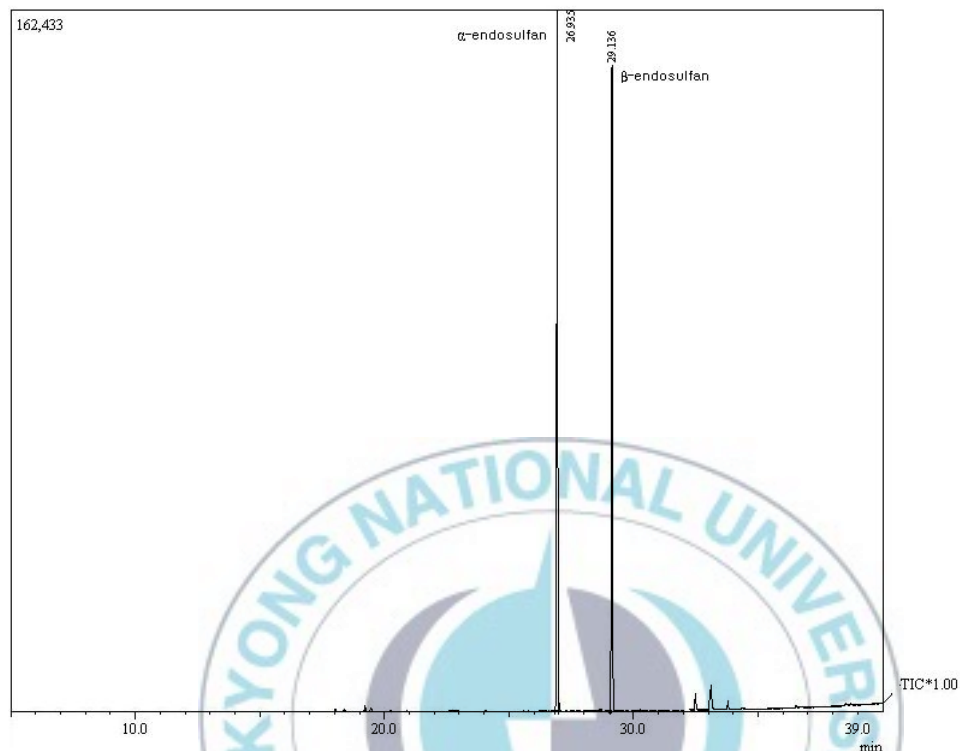
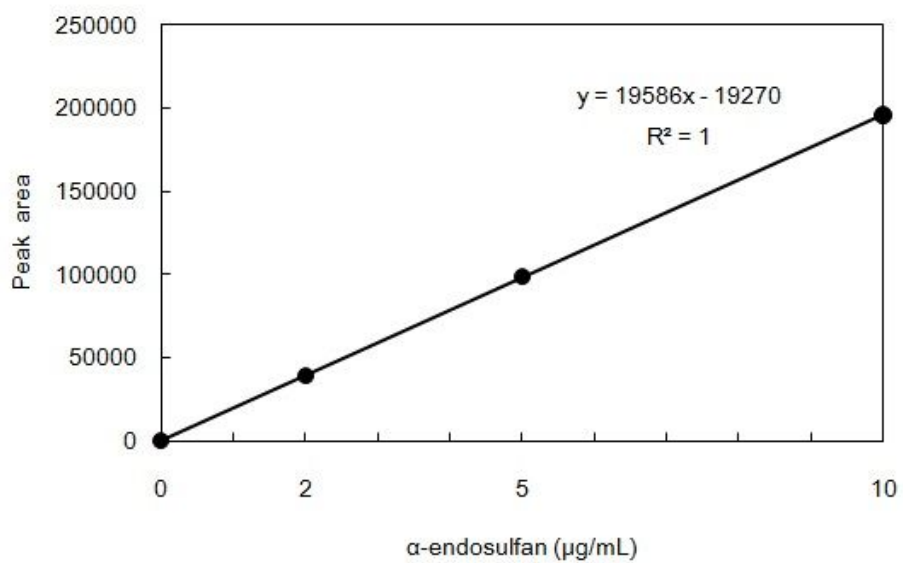
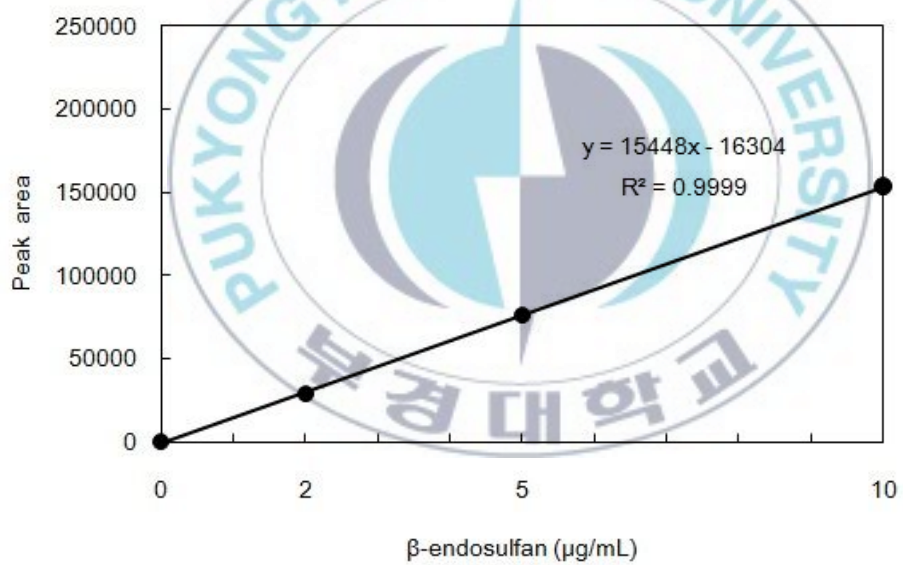


Fig. 4.1. Standard peak of α and β -endosulfan (10 ppm) by GC/MS analysis. x-axis is time (min) and y-axis is TIC of ion.



(a) Standard curve for α-endosulfan.



(b) Standard curve for β-endosulfan.

Fig. 4.2 Standard curve for α-endosulfan (a) and β-endosulfan (b) by GC/MS analysis.

1.2. 회수율 측정

α -endosulfan, β -endosulfan 및 endosulfan sulfate의 회수율 실험 결과는 Table 4.1과 같다.

해당 분석법의 회수율 및 변이계수의 범위는 나라 또는 기관마다 조금씩 다르며, 우리나라의 경우 회수율 70~130%, 변이계수(CV, Coefficient of variation (%), 표준편차(SD)/회수율평균 $\times$ 100) 10%, 검출한계(LOD, Limit of detection) 0.005 mg/kg으로 정하여 운영하고 있다(농촌진흥청, 1992).

본 실험의 성분별 평균 회수율은 최저 87.727%와 최고 108.163%이며 변이계수 값 또한 2.446~14.069%로 회수율 기준 범위 내로 나타나 그 재현성이 우수하였다.



Table 4.1. Recovery of endosulfan and endosulfan sulfate

Chemical	Fortification (ppm)	Recoveries (%)			
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	mean $\pm$ CV ¹⁾
α -endosulfan	0.05	88.763	100.011	74.408	87.727 $\pm$ 10.122
	0.25	99.702	116.367	108.421	108.163 $\pm$ 5.215
β -endosulfan	0.05	97.586	85.729	108.902	97.406 $\pm$ 7.992
	0.25	80.092	99.691	104.162	94.648 $\pm$ 10.523
Endosulfan sulfate	0.05	75.142	108.263	84.785	89.397 $\pm$ 14.069
	0.25	91.838	95.766	89.526	92.377 $\pm$ 2.446

¹⁾ CV (Coefficient of variation, %) = Standard Deviation (SD)/average $\times$ 100



2. 시료 내 endosulfan 잔류량

토양 및 저질 시료에 잔류하는 endosulfan을 정량하였다. 분석은 GC/MS를 이용하여 Table 9의 조건으로 실시하였다. 그 결과, 일부 토양 시료에서 상당히 높은 양의 endosulfan이 검출되었으며(Table 4.2), 이는 최근까지 endosulfan이 사용되었거나, 과거 반복적인 사용으로 인한 잔류량이 상당한 것으로 판단된다.



Table 4.2. Background residues of endosulfan in soil samples

Sample code	Site	Residues of endosulfan (ppm)				Cultivation
		α	β	Sulfate	Total	
K 1	Gyeongbuk	2.498	1.741	1.315	5.554	Orchard (jujube)
K 2	Gyeongbuk	1.663	1.362	1.800	4.825	Orchard (jujube)
K 3	Gyeongbuk	1.690	1.444	1.054	4.188	Orchard (jujube)
K 4	Busan	0.756	0.492	0.062	1.320	Seaside sediment
K 5	Busan	0.452	0.108	0.125	0.685	Seaside sediment
N 1	Gyeongbuk	1.865	0.957	0.546	3.368	Orchard (jujube)
N 2	Gyeongbuk	1.980	2.502	0.052	4.534	Orchard (jujube)
S 1	Busan	2.471	1.245	0.962	4.678	Field
S 2	Busan	3.513	1.794	0.042	5.349	Field
S 3	Busan	0.954	0.517	1.480	2.951	Field

3. 균주의 분리 및 선발

3.1. 집식 배양으로부터 endosulfan 분해 유량 균주의 선발

경남, 경북, 부산 일대의 농경지와 낙동강 및 낙동강 하구 인근 갯벌에서 채취한 토양 및 저질 시료를 100 ppm의 endosulfan을 함유한 YNB 최소배지에서 1주간 씩 3차례 계대를 거치며 배양 하였다. 그 후 100 ppm endosulfan이 함유된 최소한천배지(YNB/endosulfan agar) 상에서 배양하여 32개의 단일 콜로니를 분리하였다. 분리한 단일 콜로니 32주를 다시 100 ppm endosulfan이 첨가된 YNB 배지에 접종하여 25℃에서 7일 이상 배양한 후, 이 배양액에 잔존하는 endosulfan의 양과 endosulfan 분해산물을 GC/MS로 분석하였다. Endosulfan의 분해산물 중 하나인 endosulfan sulfate는 모 화합물인 endosulfan과 독성이 비슷하고 잔류성이 더 강하므로, endosulfan의 제거능이 우수하다고 판단되는 단일 균주 중 분해산물로 endosulfan diol을 형성하는 K-1321 균주를 endosulfan 분해균으로 선발하였다(Table 4.3).

Table 4.3 Endosulfan dissipation ratio in YNB medium 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.

3.2. Endosulfan 분해균의 동정

3.2.1. Endosulfan 분해균의 세균학적 성질

Endosulfan 분해 효과가 가장 우수한 균주인 K-1321은 LB 한천 평판 배지에서 37℃ 배양 시 약 24시간 만에 지름 1 mm 가량의 백색 원형 콜로니의 형태를 나타내었다. 분리균을 그람 염색 결과 그람 음성이었으며, 형태학상 단간균(短桿菌)으로 판별되었다(Fig. 4.3).



Fig 4.3. Microscopic morphology of K-1321 strain.

3.2.2. Endosulfan 분해균의 생화학적 특성

분리 균주 K-1321의 생화학적 특성은 BioMerieux Vitek Gram negative identification card(GNI+)를 사용하였다. 판독은 그람 음성균 동정 카드, software 버전 R 10.01 (BioMerieux, USA)을 사용하여 동정하였으며, 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 (15) 에 따라 확인하였다(Table 4.4).



Table 4.4 Biochemical properties of the isolated bacterium K-1321 strain.

Medium Abbreviation	Principal component	Result
DP3	2,2,4'-Trichloro-2'-Hydroxydiphenylether	+
OFG	glucose	+
GC	Tryptophan	+
ACE	Acetamide	-
ESC	Exculin	+
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	-

3.2.3. 16S rDNA 염기서열 분석결과

PCR을 통해 증폭시킨 16S rDNA 단편의 PCR 산물의 염기서열 결정은 (주)Bioneer에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열 상동성의 검색은 Ribosomal database ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))를 통하여 실시하였다. 분석 결과, 분리균 K 1321은 *Proteobacteria* 문; *Gamma Proteobacteria* 강; *Enterobacteriales* 목; *Enterobacteriaceae* 과; *Serratia* 속에 속하는 것으로 나타났다. 또한 *Serratia marcescens* KRED 및 *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1과 96%, *Serratia marcescens* DSM 30121과 95%의 상동성을 나타내었다(Table 4.5). 이 결과로부터 분리 선발된 K-1321 균주는 *Serratia* sp. 에 속하는 균으로 판단하였다(Fig. 4.4).

이상의 생화학적 및 16S rDNA 염기서열 분석 결과를 종합하여 분리균 K-1321균을 *Serratia* sp. 로 동정하고 후속 연구를 진행하였다.

Table 4.5 16S rDNA partial sequence (1420 bp) and identification of the isolated 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	ACTGGAACCTG	AGACACGGTC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG	300
301	CAGTGGGGAA	TATTGCACAA	TGGGCCCAAG	CCTGATGCAG	CCATGCCGCG	TGTGTGAAGA	360
361	AGGCCITTCGG	GTGTAAAGC	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	ATACCTGGT	AGTCCACGCT	GTAAACGATG	TCGATTTGGA	780
841	ACGGCCGCAA	GGTTAAACT	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGC	GTGGAGCATG	900
901	TGGTTTAATT	CGATGCAACG	CGAAGAACCT	CACCTACTCT	TGACATCCAG	AGAACTTAGC	960
961	AGAGATGCTT	TGGTGCCCTC	GGGAACCTCT	AGACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTACGCTC	1020
1021	GTGTTGTGAA	ATGTTGGGTT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTATCCT	TTGTTGCCAG	1080
1081	CGGTTCCGGC	GGGAACCTCA	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	GGGAGGGGCG	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

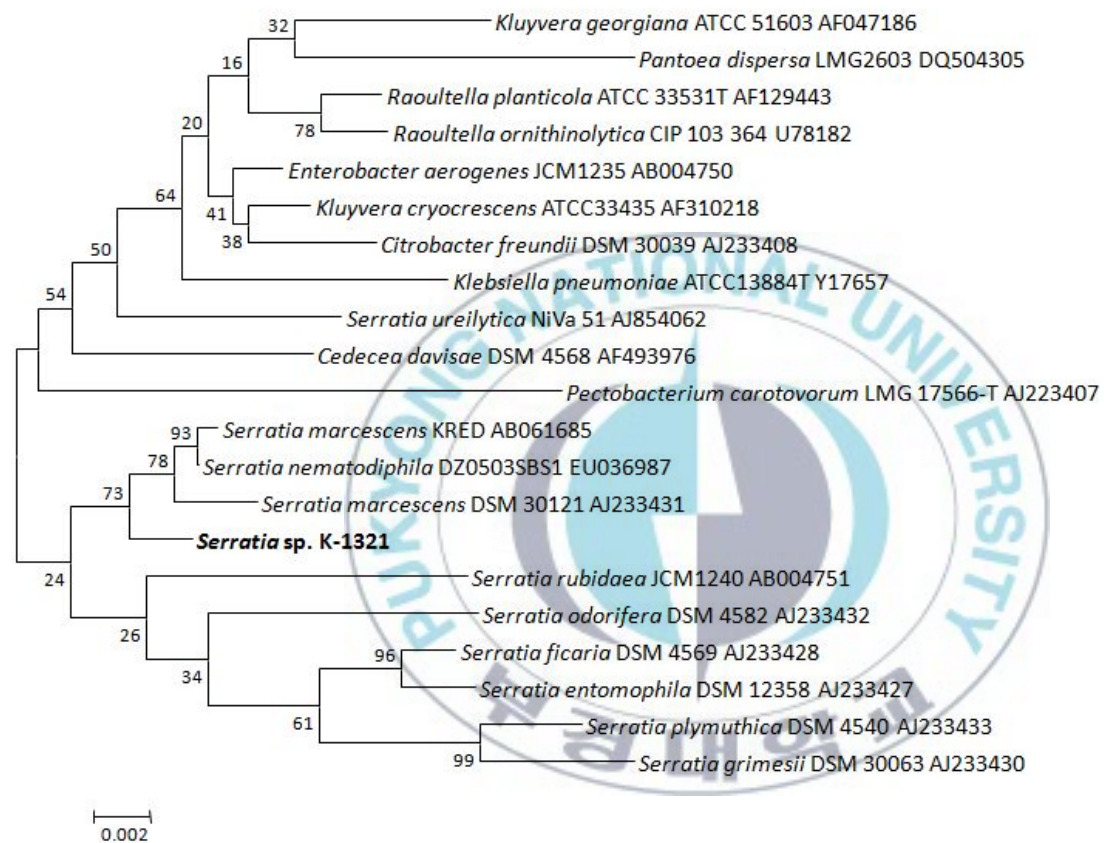
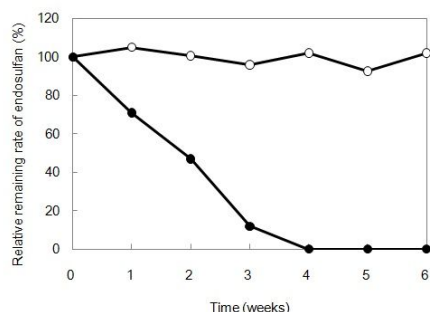


Fig. 4.4. Phylogenetic tree of *Serratia* sp. K-1321.

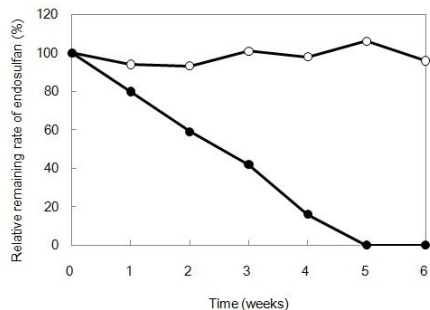
4. Endosulfan 분해균의 분해 특성

4.1. Endosulfan농도에 따른 분해능

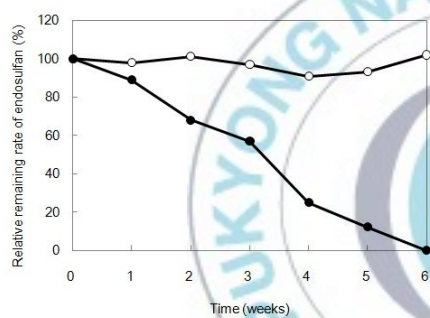
배양 배지에서 endosulfan의 농도에 따른 분리균 K-1321의 분해능을 측정하였다. 그 결과 endosulfan의 초기 농도가 10 ppm의 배지의 경우, 배양 4주 만에 100% 분해되었으며, 20 ppm 및 50 ppm의 endosulfan을 함유한 배지의 경우에도 각각 5주 및 6주 만에 endosulfan이 100% 분해되었다. 초기 농도 100 ppm 및 200 ppm의 endosulfan을 함유한 배지의 경우, 관찰 기간 동안 각각 약 82%, 65%의 endosulfan 분해율을 보였으며, 500 ppm의 경우 관찰 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 분해속도가 느리기는 하나, 어느 정도의 분해능을 보였다. 그러나 1,000 ppm 이상의 매우 높은 농도의 endosulfan은 거의 분해하지 못하였다(Fig. 4.5).



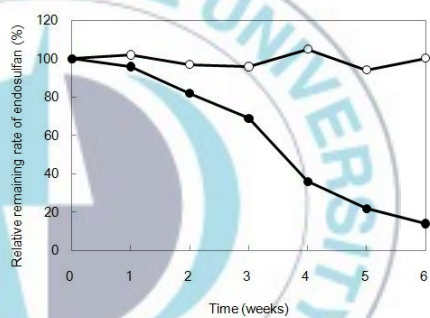
(a) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 10 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.



(b) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 20 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.

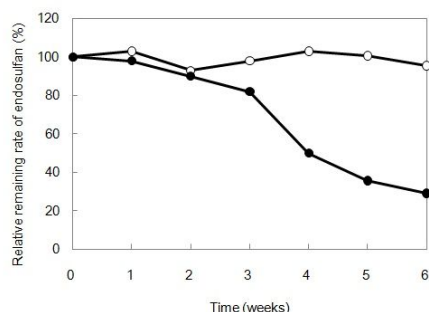


(c) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 50 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.

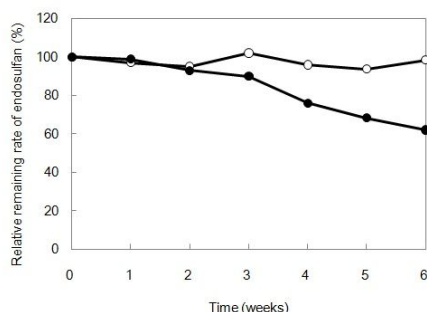


(d) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 100 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.

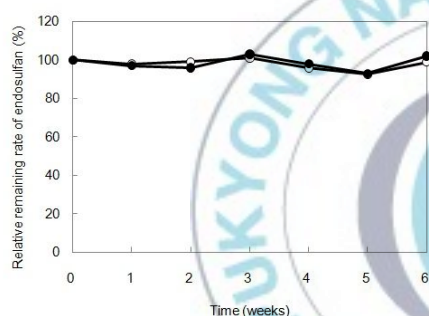
Fig. 4.5. Effect of endosulfan concentration on the degradation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 10 ppm (a), 20 ppm (b), 50 ppm (c), 100 ppm (d), 200 ppm (e), 500 ppm (f), 1,000 ppm (g) endosulfan.



(e) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 200 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.



(f) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 500 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.



(g) Biodegradation of endosulfan in YNB medium containing 1,000 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, K-1321.

Fig. 4.5. Effect of endosulfan concentration on the degradation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 10 ppm (a), 20 ppm (b), 50 ppm (c), 100 ppm (d), 200 ppm (e), 500 ppm (f), 1,000 ppm (g) endosulfan. (Continue)

4.2. 보조 탄소원 농도에 따른 endosulfan 분해능

보조 탄소원의 농도에 따른 endosulfan 분해능을 측정하였다. 100 ppm 의 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(Fig. 4.6).

보조 탄소원이 전혀 없는 경우(0% yeast extract), endosulfan의 분해가 매우 느려 관찰 기간 동안(42일) 20% 정도의 분해율을 보였다. 보조 탄소원을 첨가한 경우에는 초기 분해속도가 보조 탄소원이 없는 경우와 비슷했으나, 0.5%의 yeast extract를 첨가한 배지에서 관찰 기간 동안 약 90%의 endosulfan 분해율을 보였으며, 보조 탄소원을 0.01%, 0.05%, 0.1%의 농도로 첨가한 경우에는 각각 70%, 80%, 85%의 분해율을 보여, 근소한 차이이기는 하나 보조 탄소원의 농도가 높은 배지에서 endosulfan의 분해가 비교적 빠른 속도로 일어났다. 이는 보조 탄소원의 농도가 높을수록 초기에 균주의 증식이 활발히 일어났기 때문에 균의 증식과 더불어 endosulfan이 분해(에너지 대사)가 이루어진 것으로 생각되어진다.

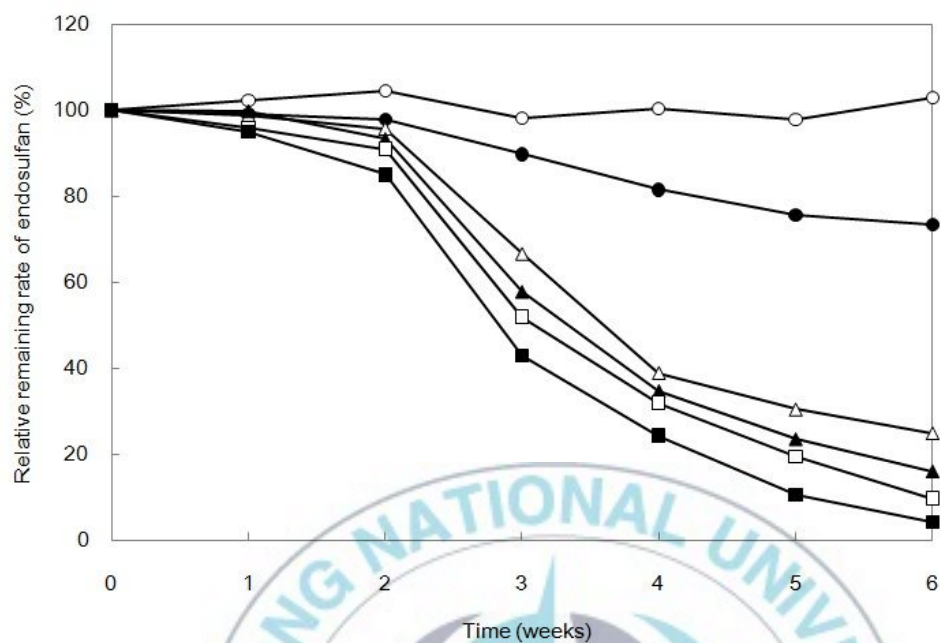


Fig. 4.6. Effect of an additional carbon source concentration on endosulfan biodegradation by *Serratia* sp. K-1321. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 100 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation); ●-●, 0% yeast extract; △-△, 0.01% yeast extract; ▲-▲, 0.05% yeast extract; □-□, 0.1% yeast extract; ■-■, 0.5% yeast extract.

4.3. Endosulfan 분해균에 의한 배지 중의 pH변화

분해균 K-1321에 의한 pH변화를 알아보았다. 분해균을 접종한 배지에서 endosulfan이 감소함에 따라 pH가 증가하는 경향을 보이며, 3주 만에 pH 8 이상으로 도달하였다. 그 이후에도 pH는 8.4~8.5 정도로 유지되었다(Fig. 4.7).

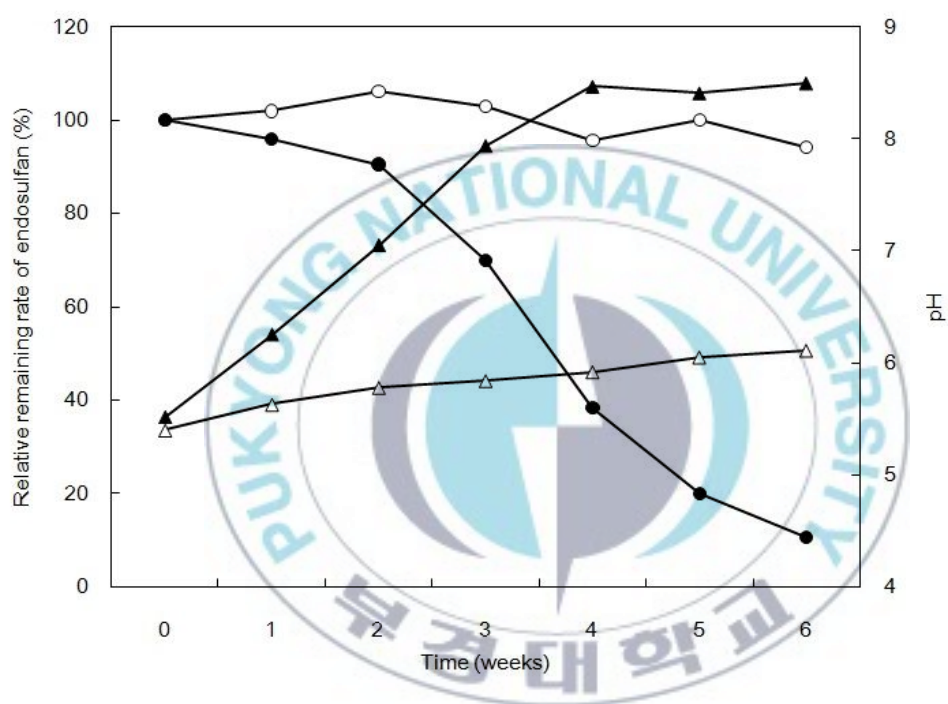


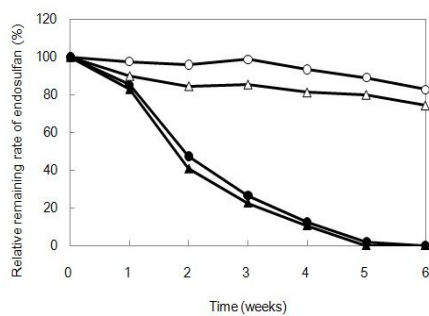
Fig. 4.7. Biodegradation of endosulfan and change of pH in culture medium by *Serratia* sp. K-1321. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 100 ppm endosulfan. ○-○, Remaining endosulfan by control (no inoculation); ●-●, Remaining endosulfan by K-1321; △-△, pH of culture medium by control (no inoculation); ▲-▲, pH of culture medium by K-1321.

4.4. 토양에서의 endosulfan 분해 특성(Lab-scale model analysis)

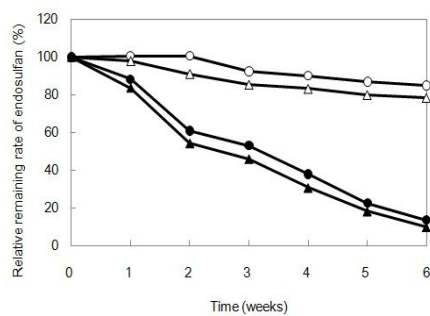
4.4.1. 분리균에 의한 토양 중의 endosulfan 분해

토양에서 분리균 K-1321의 endosulfan 분해능을 관찰하였다. 그 결과, 초기 endosulfan 50 ppm의 endosulfan으로 오염시킨 토양에서 4주 만에 Group A와 Group B 실험구 모두에서 약 90%의 분해율을 보였다. 초기 endosulfan 농도 100 ppm의 토양에서는 Group A에서 약 60%, Group B에서 약 65%의 분해율을 보였으며, 200 ppm으로 오염시킨 토양에서는 Group A에서 약 55%, Group B에서 약 60%의 분해율을 보여, 200 ppm 이하의 농도에서는 배양배지에서 보다 토양에서 더 빠른 속도로 endosulfan이 분해되는 양상을 보였다. 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. 4.8).

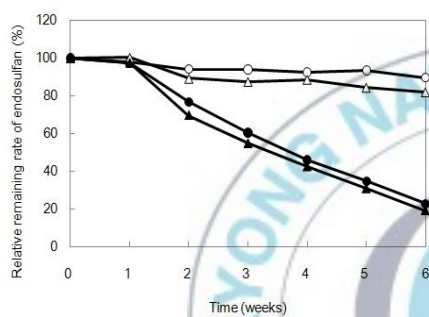
또한 각 실험구와 각 농도의 토양에서 endosulfan 분해균을 접종시키지 않은 대조구(Control; no inoculation)에서도 endosulfan이 상당히 느린 속도로 감소하는 경향을 보였는데, 이러한 결과는 김택겸 등(2008)의 보고와 같이 endosulfan이 토양에 흡착되거나 공기 중으로 휘발하였기 때문으로 생각된다.



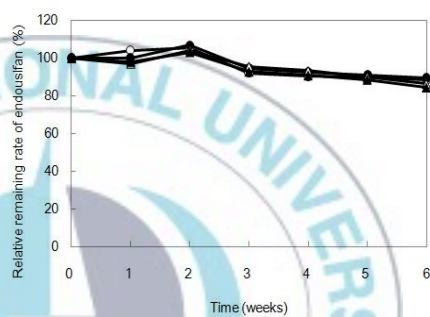
(a) Bioaugmentation of endosulfan in soil containing 50 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.



(b) Bioaugmentation of endosulfan in soil containing 100 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.



(c) Bioaugmentation of endosulfan in soil containing 200 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.



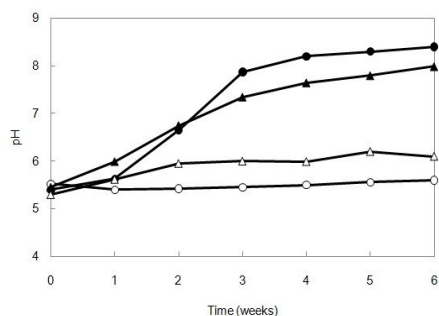
(d) Bioaugmentation of endosulfan in soil containing 500 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.

Fig. 4.8. Effect of endosulfan concentration on the bioaugmentation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in soil containing 50 ppm (a), 100 ppm (b), 200 ppm (c), 500 ppm (d) endosulfan.

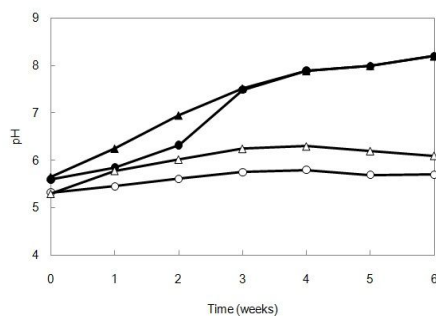
4.4.2. Endosulfan 분리균에 의한 토양의 pH 변화

분리균 K-1321에 의한 토양에서의 pH 변화를 관찰하였다. 그 결과, 실험구와 상관없이 K-1321 strain. 을 접종한 대부분의 실험구의 토양에서 4주 만에 pH 8이상으로 도달하였으며, 그 이후에도 pH 8 이상을 유지하였다. 그러나 500 ppm endosulfan으로 오염시킨 토양에서는 endosulfan의 잔류량 및 pH의 두드러진 변화가 일어나지 않았다(Fig. 4.9).

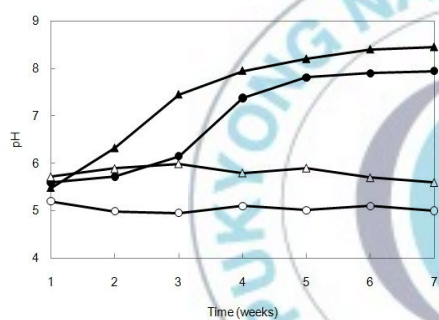




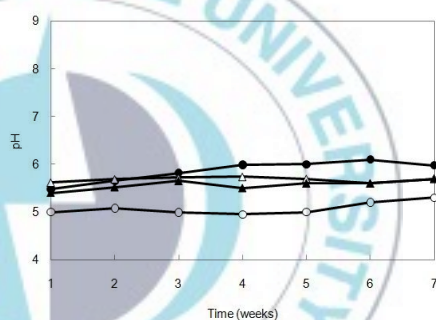
(a) Change of pH in soil containing 50 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.



(b) Change of pH in soil containing 100 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.



(c) Change of pH in soil containing 200 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.



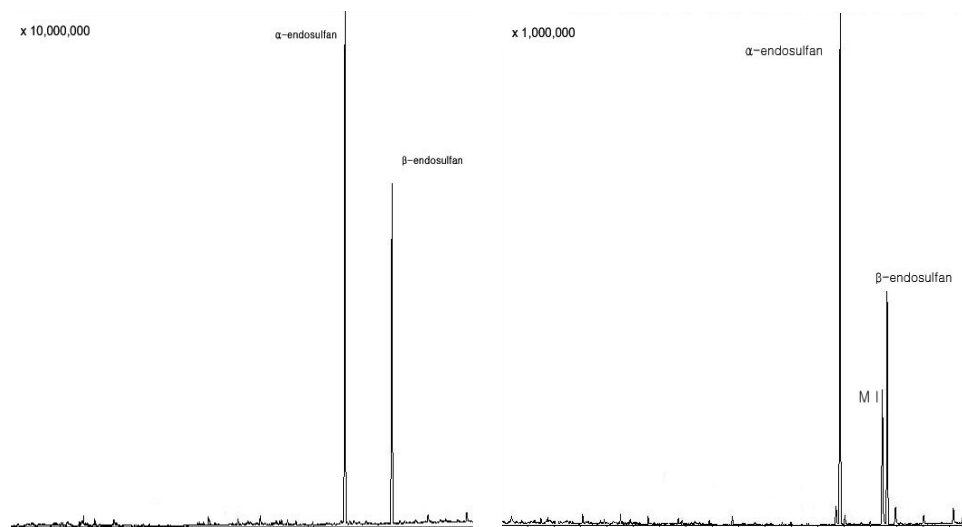
(d) Change of pH in soil containing 500 ppm endosulfan. ○-○, control (no inoculation) of Group A; ●-●, Group A; △-△, control (no inoculation) of Group B; ▲-▲, Group B.

Fig. 4.9. Change of pH in soil by the isolated bacterium. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in soil containing 50 ppm (a), 100 ppm (b), 200 ppm (c), 500 ppm (d) endosulfan.

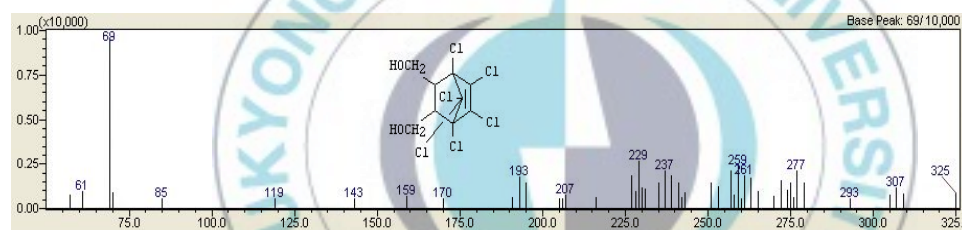
4.5. 분리균 K-1321 strain.에 의한 endosulfan 분해 경로 분석

GC/MS를 통해 endosulfan 정량 및 분해산물 검색을 행하였다. 비접종구(control; no inoculation) 측정결과와 과 각 단일균주의 날짜 별 측정결과 peak를 대조하여 endosulfan 분해산물의 peak를 확인하였다. 그 결과 endosulfan 분해산물의 peak는 β -endosulfan의 peak와 비슷한 27.95 min에서 확인되었으며, 이 peak의 ion spectrum을 참고하여 해당 물질을 검색한 결과 endosulfan diol로 밝혀졌다(Fig. 4.10). 이 물질은 endosulfan이 endosulfan ether 및 endosulfan lactone으로 분해되는 과정의 중간 산물로서(Fig. 2.2 참고), 시간에 따라 그 양이 증가하였다(Table 4.5, Fig. 4.11). 따라서 분리균 *Serratia* sp. K-1321은 endosulfan을 endosulfan diol로 분해하는 분해경로를 따르는 것으로 판단하였다(Fig. 4.12).





(a) GC/MS profile of endosulfan. (b) GC/MS profile of endosulfan and metabolites



(c) Mass spectra of the metabolite I (MI)

Fig. 4.10. 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).

Table 4.6. Peak area and concentration with relative to β -endosulfan standard curve (Fig. 4.2) of endosulfan diol by *Serratia* sp. K-1321 in YNB media with 100 ppm endosulfan

Time (weeks)	Peak area	Concentration
0	0	–
1	22976	1.593
2	104917	6.897
3	229279	14.978
4	285176	18.570
5	380742	24.752
6	534614	34.713

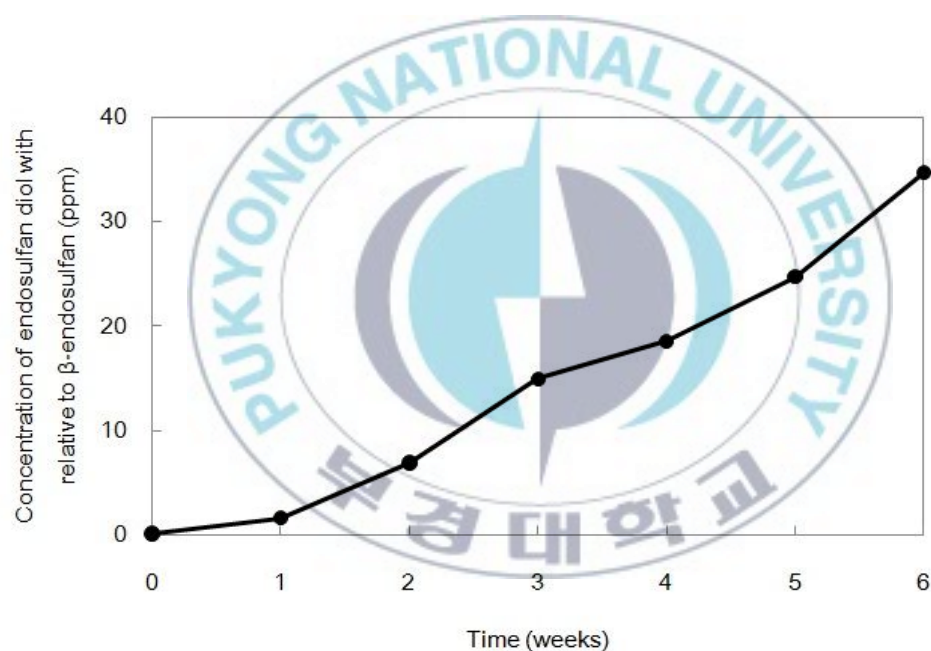


Fig. 4.11. Concentration of endosulfan diol with relative to β -endosulfan standard curve (Fig. 4.2) by *Serratia* sp. K-1321. After inoculation, cells were cultivated at 25°C in YNB with 100 ppm endosulfan.

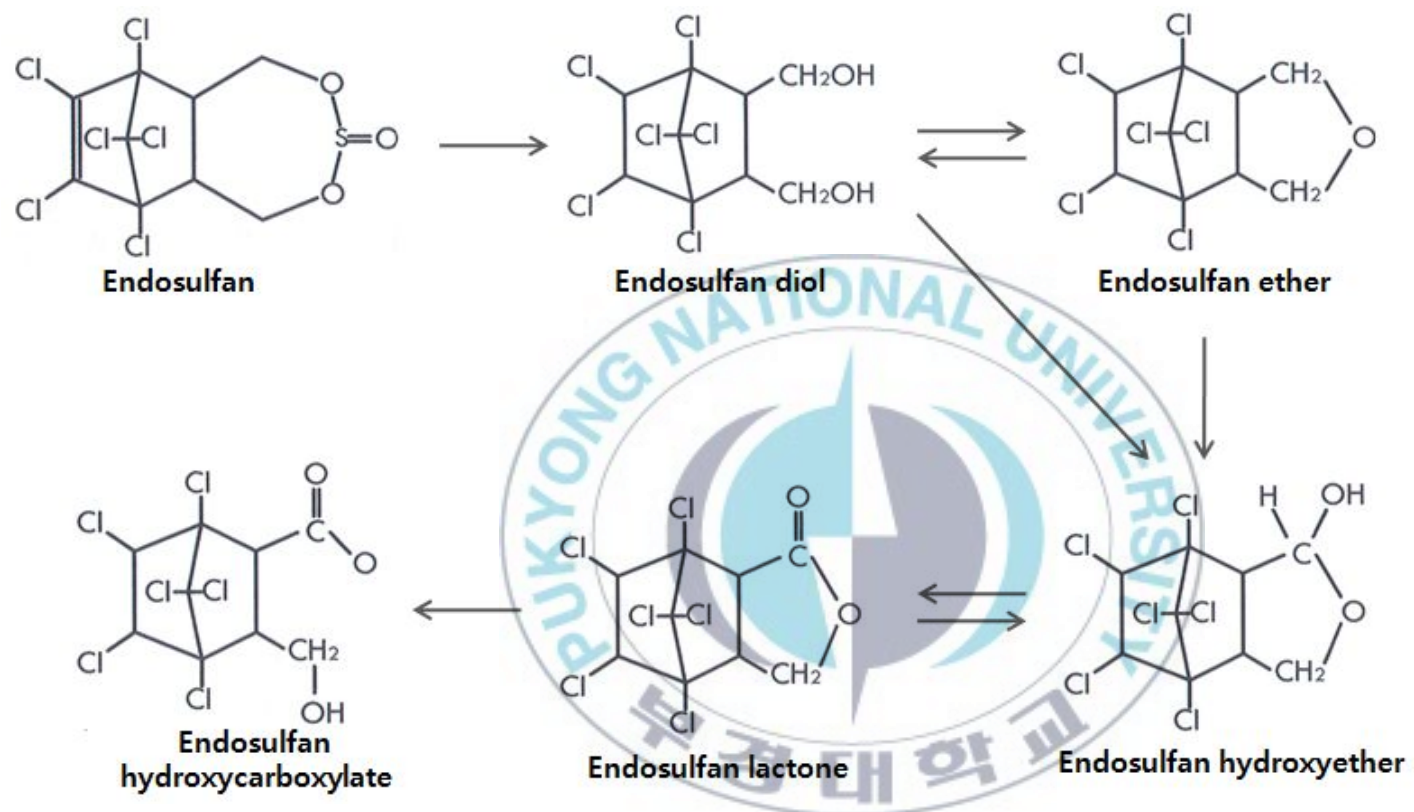


Fig. 4.12. Proposed metabolic pathway of endosulfan by *Serratia* sp. K-1321.

V. 결론

농지는 반복적인 농약의 사용으로 인해 고농도의 특정물질로 오염된 토지이다. 농약은 그 특성상 어느 정도의 잔류성 및 생물 독성을 가지고 있으며, 몇몇의 농약은 잔류성 및 생물 독성이 지나치게 강하여 문제가 되고 있다. 또한 농지 토양에 고농축된 농약 성분은 강우 등의 요인에 의해 주변 환경으로 유출되어 오염시킬 가능성이 높다.

농약 등과 같은 유기독성 물질로 오염된 지역의 생물학적 복원 방법으로 phytoremediation, 생물학적 정화 방법 등이 있으며, 미생물 또는 미생물이 생산하는 효소를 이용하는 생물학적 정화 방법(bioremediation)이 타 복원 방법에 비해 비용이 적게 소요되고, 보다 환경 친화적인 방법으로 여겨지고 있다.

따라서 본 연구에서는 유기독성물질로서 환경 중에 잔류하며 인간에 직·간접적인 위해 가능성이 높은 유기염소계 살충제 endosulfan을 효과적으로 분해 할 수 있는 미생물을 이용하여 endosulfan으로 오염된 환경의 생물학적 정화 가능성을 알아보고자 실험을 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

실험을 위해 endosulfan으로 오염된 곳의 토양 및 저질을 시료로 채취하였다. 시료 내 endosulfan 잔류량은 0.685~5.554 ppm 정도로, 시료 대부분에서 상당히 높은 농도의 endosulfan이 잔류하고 있었다.

토양 시료를 대상으로 endosulfan을 탄소원으로 하는 집식 배양을 통해 endosulfan의 분해 효율이 높으면서 분해 산물로 모화합물보다 높은 독성과 잔류성을 가진 endosulfan sulfate를 형성하지 않는 미생물을 분리하였다. 이 세균을 16S rDNA를 통해 동정한 결과 *Serratia* 속에 속하는 균으로 판별되어 *Serratia* sp. K-1321로 명명하여 향후 실험을 진

행하였다.

Serratia sp. K-1321은 관찰 기간(6주) 동안 50 ppm이하 농도의 endosulfan은 100%, 100 ppm 및 200 ppm의 endosulfan은 각각 85%, 70%까지 분해하였으며, 500 ppm의 endosulfan 또한 약 40% 정도 분해하였다. Endosulfan 외의 보조 탄소원(영양분)의 농도에 따른 분해능 실험에서 농도에 큰 영향 없이 보조 탄소원이 존재할 때 분해효율이 높았는데, 이는 보조 탄소원에 의해 endosulfan 분해균의 증식 및 활성이 활발히 일어났기 때문으로 여겨진다. 또한 분리균에 의한 pH 변화를 관찰한 결과 3주 만에 pH 8 이상으로 도달하였으며, 이에 따라 endosulfan의 급격한 분해가 일어났다.

분리균의 토양에서의 endosulfan 분해 효율 실험 결과, 실험 시작 6주 만에 50 ppm의 endosulfan으로 오염시킨 Group A와 Group B 실험구 모두에서 약 99%의 분해율을 보였으며, 초기 endosulfan 농도 100 ppm의 토양에서는 Group A에서 약 88%, Group B에서 약 90%, 200 ppm으로 오염시킨 토양에서는 Group A에서 약 80%, Group B에서 약 78%의 분해율을 보였다. 또한 분리한 endosulfan 분해균을 접종한 대부분의 실험구의 토양에서 4주 만에 pH 8 이상 도달하였다. 그러나 500 ppm의 endosulfan으로 오염시킨 토양에서는 모든 실험구에서 endosulfan의 분해 및 pH 변화가 미미하였다.

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 김택겸 외(2008)의 보고와 같이 endosulfan이 토양에 흡착되거나 공기 중으로 휘발하였기 때문으로 생각된다. 배지 및 토양의 pH는 endosulfan 분해균의 활성에 따라 증가하였으며, 분해 산물인 endsulfan diol 구조상의 OH⁻기에 의한 것으로 여겨진다. 그러나 pH 증가의 원인이 미생물의 분해 효소에 의한 것인지, 분해 산물에 의한 것인지, 이들이 복합적으로 작용한 결과인지를 정확히 알기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

Endosulfan의 생물학적 정화에 관하여 Lee 등(2003)은 *Anabaena* sp.가 endosulfan을 분해하여 endosulfan을 endosulfan sulfate와 알려지지 않은 물질을 생성한다고 보고하였으며, Awasthi 등(2003)은 *Bacillus* strain.이 endosulfan을 endosulfan diol과 endosulfan lactone으로 분해한다고 보고하였다. 신채호 등(2008)은 *Bacillus* sp. E64-2가 endosulfan diol을 분해산물로 형성한다고 보고하였는데, 본 연구에서 분리한 endosulfan 분해균 *Serratia* sp. K-1321은 endosulfan 분해 산물로 endosulfan diol을 형성하였으며, 그 양이 점점 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 *Serratia* sp. K-1321은 endosulfan을 endosulfan diol로 분해하며, endosulfan diol이 endosulfan ether 및 endosulfan lactone을 거쳐 endosulfan hydroxycarboxylate로 분해되는 경로를 따르는 것으로 판단하였다.

본 연구는 유기독성오염물질 중 하나인 endosulfan으로 오염된 환경의 생물학적 정화가능성을 알아보기 위해 실시되었다. 토양 시료로부터 분리한 endosulfan 분해균 *Serratia* sp. K-1321은 저농도는 물론 고농도의 endosulfan으로 오염된 배지 및 토양에서 뛰어난 endosulfan 분해능을 보였으며, 분해산물로서 독성이 낮은 endosulfan diol을 형성하였

다. 또한 보조 탄소원이 존재할 때 더 뛰어난 분해능을 보여, endosulfan의 생물학적 분해에는 영양분 주입을 병행하는 bioaugmentation이 효율이 높을 것으로 기대된다.

향후 본 연구에서 분리한 endosulfan분해균을 실제 endosulfan으로 오염된 환경에 적용시킬 경우, 높은 농도의 endosulfan을 분해하여 인간에의 직·간접적 위해 가능성을 낮추면서 안전 농산물의 생산에 도움이 될 것으로 여겨지며, 향후 endosulfan을 포함한 수많은 난분해성 오염물질의 분해 및 제거를 위한 기초 자료로 이용될 것으로 판단된다.



참고문헌

- 강인호, 조정희, 김도훈, 심영훈, 김은경, 김종욱, 황완균, 최호영 (2002), 유통 한약재의 내분비계 장애물질 모니터링-유통한약재 중 잔류 농약에 관한 조사., 대한본초학회지, 제 17권, 제 2호, 175-182.
- 강한승, 계명찬, 이재성, 윤용달, 김문규 (2004), 제초제 Alachlor과 살충제 Endosulfan이 무당개구리(*Bombina orientalis*) 배아의 생존 및 기형유발에 미치는 영향., Korean J. Environ. Biol., Vol. 22(2), 300-307.
- 김성국, 조수형, 조남수 (2004), 집단으로 발생한 지오릭스(endosulfan) 중독., 대한응급의학회지, 제 5권, 제 5호, 409-412.
- 김성단, 김복순, 박성규, 김미선, 조태희, 한창호, 조한빈, 최병현 (2007), 서울시 유통 건조농산물 중의 농약잔류 실태 연구., 한국식품과학회지, 제 39권, 제 2호, 114-121.
- 김영국, 임태곤, 박상수, 허남철, 홍석순 (2000), 시중 유통 과채류 중의 잔류농약에 관한 연구., 한국식품과학회지 제 32권, 제 4호, 763-771.
- 김영목, 박큰바위, 김원찬, 한원섭, 유춘발, 이인구 (2007), 3,4-Dichloroaniline 분해 미생물의 분리 및 특성., 한국미생물·생명공학회지, 제 35호, 제 3권, 245-249.
- 김영목, 이은우, 김수정, 이명숙 (2008), 하천 저질에서 분리한 Formaldegyde 분해 미생물의 특징., 한국수산과학회지, 제 41호, 제 2권, 84-88.
- 김인선, 이강봉, 심재한, 서용택 (1999), 생쥐 체내에서 ^{14}C - α -Endosulfan의 대사., 한국환경농학회지, 제 15권, 제 1호,

70-76.

- 김택겸 (2008), 유기염소계 살충제 Endosulfan으로 오염된 토양환경의 화학적 복원., 박사논문, 경북대학교.
- 김택겸, 김장억, 김태화, 권오겸, 김재덕, 임상중 (2008), 유기염소계 살충제 Endosulfan으로 오염된 토양환경의 화학적 복원., 한국환경농학회, 2008학술대회집, 제 2권, 75-89.
- 김현진 (2009), 부산지역 유통농산물의 잔류농약 분석., 석사논문, 경상대학교.
- 농촌진흥청 (1992), 농약연구소 농약잔류성 실험법.
- 박기룡, 정연순, 임학 (2008), 폐색전증을 동반한 Endosulfan 중독 1예., 대한내과학회지 제 74권, 부록 1호, S250-S253.
- 박동식, 김태한, 김성수, 이상민, 김성문, 허장현 (2004), 강원도 고랭지 배추경작지의 토양 및 수질 중 농약 오염 실태., 농약과학회지, 제 8권, 제 3호, 189-197.
- 박성규, 하광태, 김성단, 김시정, 이윤정, 이경아, 장정임, 정삼식, 송부용, 조석주, 조한빈, 최병현, 김민영 (2009), 서울 강북지역 유통농산물 중 농약잔류실태조사., 한국식품위생안전성학회지, 제 24권, 제 1호, 27-37.
- 박정운, 유재수, 노동현 (2006), 새로운 저온 내성세균의 동정과 β -Galactosidase 생산., 한국미생물학회, 제 42권, 제 1호, 40-46.
- 박창규, 마연식 (1982), 농경지 토양의 유기염소계 농약의 잔류평가., 한국식품과학회지 제 1권, 제 1호, 1-13.
- 서유덕, 조정우 (2003), 유기염소계 농약 Endosulfan의 생물학적 분해., 환경관리학회지, 제 9권, 제 1호, 69-76.

- 소비자 안전 센터 (2006), 친환경농산물 및 일반농산물 잔류농약 안전실태조사., 소비자안전센터 식의약안전팀.
- 손호용, 금은주, 김종식, 이중복, 권기석 (2006), 미세조류를 이용한 유기염소계 농약 Endosulfan 및 Endosulfan 분해산물의 독성평가., 한국미생물생명공학회, 제 32권, 제 4호, 357-362.
- 식품의약품안전청(KFDA) (2008), 식품 중 엔도설파이란?
- 식품의약품안전청(KFDA) (2009), 유기염소계 농약류의 인체노출평가.
- 식품정보코리아(주) (2006), 효과적인 농식품 위험정보 교류체계 구축방안 연구.
- 신재호, 곽윤영, 김원찬, 소재현, 신현수, 박종우, 김태화, 김장억, 이인구 (2008), 유기염소계 농약 endosulfan을 분해하는 미생물의 분리 및 분해특성., 한국환경농학회지, 제 27권, 제 3호, 292-297.
- 유건상, 김미향, 이화성, 황현직 (2006), 자외선 조사에 의한 수용액 중에 함유되어 있는 엔도설파인 alpha, beta, sulfate의 광분해., 한국환경과학회지 제 15권, 제 11호, 1061-1067.
- 유엔환경계획(UNEP) 한국위원회 (2003), 스톡홀름협약., 유넵프레스 (UNEP press)
- 이강봉, 심재한, 서용택 (1994), In vitro 시험에 의한 잉어체내 ¹⁴C-endosulfan 의 대사., 한국농화학회지, 제 37권, 제 3호, 194-202.
- 정영호, 김장억, 김정한, 이영득, 임치환, 허장현 공저 (2000), 최신농약학, 시그마프레스.
- 정예표, 최민규, 여현구, 천만영 (2001), 대기 중 난분해성 유기염소계 농약의 계절별 농도변화., 한국환경농학회지, 제 20권, 제 2호, 79-85.

- 조규범 (2010), 부산 및 김해지역 농업토양 중 Endosulfan 잔류특성., 석사논문, 동아대학교.
- 하광태, 박성규, 조태희, 한창호, 김성단, 이경아, 김시정, 장정임, 조한빈, 최병현 (2009), 서울 강북지역 유통 농산물의 내분비계장애 추정농약의 잔류실태 (2007)., 한국식품위생안전성학회지, 제 24권, 제 2호, 136-142.
- 한국작물보호협회 (2010), 농약사용지침서.
- Akkermans A. D. L. (1994), Application of bacteria in soils: problems and pitfalls. FEMS Microbiology Reviews, Vol. 15, 185-194.
- Atlas R. M., Brenchley J. (1999), Ecology and industrial microbiology Biotechnology's expanding horizons, Current Opinion in Microbiology., Vol. 2, 233-235.
- ATSDR (1993), Toxicological profile for endosulfan., United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- Awasthi N., Ahuja R., Kumar A. (2000), Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers., Soil Biology and Biochemistry, Vol. 32, 1697-1705.
- Awasthi N., Singh A. K., Jain R. K., Khangarot B. S., Kumar A. (2003), Degradation and detoxification of endosulfan isomers by a defined co-culture of two *Bacillus* strains, Applied Microbiology and Biotechnology., Vol. 62, 279-283.
- Beauvais S. L., Silva M. H., Powell S. (2010), Human health risk assessment of endosulfan : III. Occupational handler

- exposure and risk., Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 56, 28-37.
- Berns K. I., Thomas C. A. (1965), Isolation of the high molecular DNA from *Haemophilus influenzae*., Journal of Molecular Biology, Vol. 11, 476-490.
- Bhalerao T. S., Puranik P. R. (2007), Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*., International Biodeterioration and Biodegradation, Vol. 59, 315-321.
- Budavari S. (1996), An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals., The Merck Index.
- Chaudhuri K., Selvaraj S., Pal A. K. (1999), Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems., Mutation Research, Vol. 439, 63-67.
- Choi J. H., Kim T. K., Kim Y. M., Kim W. C., Joo G. J., Lee K. Y., Rhee I. K. (2005), Cloning and characterization of a short chain alcohol dehydrogenase gene for cyclohexanol oxidation in *Rhodococcus* sp. TK6., Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 15, 1186 -1196.
- Coleman P. F., Dolinger P. M. (1982), Endosulfan monograph number four: Environmental health evaluations of California restricted pesticides., Prepared by Peter M. Dolinger Associates, Menlo Park, CAa. Sacramento, CA: State of California Department of Food and Agriculture.
- Dorough H. W., Huhtanen K., Marshall T. C., Bryant H. E. (1978),

- Fate of endosulfan in rats and toxicological considerations of apolar metabolites., *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 8, 241-252.
- Dunbar, J., Ticknor L. O., Kuske C. R. (2000), Assessment of microbial diversity in four South- western United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, 2943-2950.
- Ellis L. B. M. (2000), *Environmental biotechnology informatics.*, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 11, 232-235.
- Fujii K., Urano N., Kimura S., Nomura Y., Karube I. (2000), Microbial degradation of nonylphenol in some aquatic environments., *Fisheries Science*, Vol. 66, 44-48.
- Gerhardt K. E., Huang X. D., Glick B. R., Greenberg B. M. (2009), Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges., *Plant Science*, Vol. 176, 20-30.
- Gestel K. V., Mergaert J., Swings J., Coosemans J., Pyckeboer J. (2003), Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste., *Environmental Pollution*, Vol. 125, 361-368.
- Gorbach G., Henke J. (1968), Gelchromatographische trennung der nucleinsaurebausteine an sephadex G-25 fine, G-15 und G-10., *Journal of Chromatography A*, Vol. 37, 225-233.

- Goswami S., Vig K., Singh D. K. (2009), Biodegradation of α and β endosulfan by *Aspergillus sydoni*., Chemosphere, Vol. 75, 883-888
- Guerin T. F. (1999), The anaerobic degradation of endosulfan by indigenous microorganism from low-oxygen soils and sediments., Environmental pollution, Vol. 106, 13-21.
- Guerin T. F. (2001), A biological loss of endosulfan and related chlorinated organic compounds from aqueous systems in the presence and absence of oxygen., Environmental pollution, Vol. 115, 219-230.
- Harner T., Shoeib M., Kozma M., Gobas F. A. P. C., Li S. M. (2005), Hexachlorocyclohexanes and endosulfans in urban, rural, and high altitude air samples in the Fraser valley, British Columbia: Evidence for trans-Pacific transport., Environmental Science and Technology, Vol. 39, 724-731.
- Hoechst (1991), Correspondence, 19-02-91. Comments on the nomination of Endosulfan to be included in the Prior Informed Consent Procedure.
- HSDB (1999), Hazardous Substance Data Bank., National Library of Medicine. National Toxicology Program. Bethesda, MD.
- Hussain S., Arshad M., Saleem M., Khalid A. (2007), Biodegradation of α - and β -endosulfan by soil bacteria., Biodegradation, Vol. 18, 731-740.
- IRPTC (1993), Data from IRPTC databases., UNEP, Geneva.

- Jacques R. J. S., Okeke B. C., Bento F. M., Teixeira A. S., Peralba M. C. R., Camargo R. A. O. (2003), Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil., *Bioresource Technology*, Vol. 99, 2637-2643.
- Joseph R., Reed S., Hayachandran K., Clark-Cuadrado C., Dunn C. (2010), Endosulfan has no adverse effect on soil respiration, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 138, 181-188.
- Kapley A., Purohit H. J., Chhatre S., Shanker R., Chakrabarti T., Khanna P. (1999), Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium., *Bioresource Technology*, Vol. 67, 241-245.
- Kim S. J. (2003), Bioaugmentation for the remediation of pesticide-contaminated soil with microorganisms directly enriched in soil or compost., the Degree Doctor, The Ohio State University.
- Kim Y. M., Park K., Joo G. J., Jeong E. M., Kim J. E., Rhee I. K. (2004), Glutathione-dependent biotransformation of the fungicide chlorothalonil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, 4192-4196.
- Kullman S. W., Matsumura F. (1996), Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan., *Environmental*

Microbiology, Vol. 62, 593-600

- Kumar K., Devi S. S., Krishnamurthi K., Kanade G. S., Chakrabarti T. (2007), Enrichment and isolation of endosulfan degrading and detoxifying bacteria., Chemosphere, Vol. 68, 317-322.
- Kumar M., Philip K. (2006), Bioremediation of endosulfan contaminated soil and water-Optimization of operating conditions in laboratory scale reactors., Journal of Hazardous Materials Vol. B136, 354-364.
- Kwon G. S., Sohn H. Y., Shin K. S., Kim E. J., Seo B. I. (2005), Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 67, 845-850.
- Laabs V., Amelung W., Pinto A. A., Wantzen M. da Silva C. j., Zech W. (2002), Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brasil., Journal of Environmental Quality, Vol. 31, 1636-1648.
- Lee J. B., Sohn H. Y., Shin K. S., Jo M. S., Kim J. E., Lee S. W., Shin J. W., Kum E. J., Kwon G. S. (2006), Isolation of a soil bacterium capable of biodegradation and detoxification of endosulfan and endosulfan sulfate., Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, 8824-8828.
- Lee J. S., Kang E. J., Kim M. O., Lee D. H., Bae K. S., and Kim C. K. (2001), Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and

- its degradability of phenol and 4-chlorophenol., *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 11, 112-117.
- Lee S. E., Kim J. S., Kennedy I. R., Park J. W., Kwon G. S., Koh S. C., Kim J. E. (2003), Biotransformation of an organochlorine insecticide, endosulfan, by *Anabaena* species., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, 1336-1340.
- Lewis D. L., Kolig H. P., Hodson R. E. (1986), Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformations., *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, 598-603.
- Lide D. R. (1998-1999), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 79th ed., Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- Lo'pez-Blanco M. C., Cancho-Grande B., Simal-Ga'ndara J., Lo'pez-Periago E., and Arias-Estevez M. (2005), Transport of commercial endosulfan through a column of aggregated vineyard soil by a water flux simulating field conditions., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 6798-6743.
- Lu M., Zhang Z., Qiao W., Wei X., Guan Y., Ma Q., Guan Y. (2010), Remediation of petroleum-contaminated soil after composting by sequential treatment with Fenton-like oxidation and biodegradation., *Bioresource Technology*, Vol. 101, 2106-2113.
- Na K. S., Kim S. J., Kubo M., Chung S. Y. (2001). Cloning and

- phylogenetic analysis of two different bphC genes and bphD gene from PCB-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. strain SY5. Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 11, 668-676.
- NRA(National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals) (1998), NRA ECRP Review of endosulfan., Astralian Government.
- Penuela G. A., and Barcelo D. (1998), Application of C₁₈ disks followed by gas chromatography techniques to degradation kinetics, stability and monitoring of endosulfan in water., Journal of chromatography A, Vol. 795, 93-104.
- PRC (1994), Data sheet on Endosulfan. Unpublished., Philippine Resource Centre, London.
- Pritchard P. H., Mueller J. G., Rogers J. C., Kremer F. V., Glaser J. A. (1992), Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the *Exxon Baldez* oil spill in Alaska., Bioremediation, Vol. 3, 315-335.
- Rao D. M. R. and Murty A. S. (1980), Persistence of endosulfan in soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 28, 1099-1101.
- Siddique T., Okeke B. C., Arshad M., Frankenberger W. T. Jr (2003), Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms., Journal of Environmental Quality, Vol. 32, 47-54.

- Silva M. H., Beauvais S. L. (2010), Human health risk assessment of endosulfan : I. Toxicology and hazard identification., Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 56, 4-17.
- Silva M. H., Carr W. C. Jr (2010), Human health risk assessment of endosulfan : II. Dietary exposure assessment., Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 56, 18-27.
- Sutherland T. D., Horne I., Harcourt R. L., Russell R. J. (2002 a), Oakeshott J. G., Isolation and characterization of a Mycobacterium strain that metabolizes the insecticide endosulfan., Journal of Applied Microbiology, Vol. 93, 380-389.
- Sutherland T. D., Horne I., Russell R. J., Oakeshott J. G. (2002 b), Gene cloning and molecular characterization of a two-enzyme system catalyzing the oxidative detoxification of beta-endosulfan., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, 6237-6245.
- Swannel R. P., Lee K., McDonagh M. (1996), Field evaluations of marine oil spill bioremediation., Microbiological Reviews, Vol. 60, 342-365.
- Tomlin C. D. S. (1997), Inorganic chemistry - an industrial and environmental perspective., Academic press.
- Umweltbundesamt (2004), Endosulfan-Draft dossier prepared in support of a proposal of endosulfan to be considered as a candidate for inclusion in the UN-ECE LRTAP protocol on persistent organic pollutants., German Federal Environment

- Agency-Umweltbundesamt, Berlin
- Usha S. and Harikrishnan V. R. (2004), Endosulfan-Fact sheet and Answers to Common Questions., Thanal.
- van Elsas J. D., Heijnen C. E. (1990), Methods for the introduction of bacteria in soil: a review., *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 10, 127-133.
- Vogel T. M. (1996), Bioaugmentation as a soil bioremediation approach., *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 7, 311-316.
- Walse S. S., Scott G. I., Ferry J. L. (2003), Stereoselective degradation of aqueous endosulfan in modular estuarine mesocosms : formation of endosulfan gamma-hydroxycarboxylate., *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, Vol. 5, 373-379.
- Weber J., Halsall C. J., Muir D., Teixeira C., Small J., Solomon K., Hermanson M., Jung H., Bidleman T. (2010), Endosulfan, a global pesticide : A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic., *Science of the Total Environment*, Vol. 408, 2966-2984.
- Weir K. M., Sutherland T. D., Horne I., Russell R. J., Oakeshott J. G. (2006), A single monooxygenase, ese, is involved in the metabolism of the organochlorides endosulfan and endosulfan sulfate in an *Arthrobacter* sp., *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, 3524-3530.
- Xu Y. and Lu M. (2010), Bioremediation of crude-oil-contaminated

soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation., Journal of Hazardous Materials, Vol. 183, 395-401.

Zhang Z. L., Hong H. S., Zhou J. L., Huang J., Yu G. (2003), Fate and assessment of persistent organic pollutants in water and sediment from Minhiang River Estuary, Southeast China., Chemosphere, Vol. 52, 1423-1430.

국립농업과학원 (<http://www.niast.co.kr/environment/>)

日本 厚生労働省 (<http://www.mhlw.go.jp>)

한국작물보호회 (<http://www.koreacpa.org/>)

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority
(<http://www.apvma.gov.au/>)

CODEX ALIMENTARIUS (<http://www.codexalimentarius.net/>)

EPA (<http://www.epa.gov/>)

EPA, Clean up information (<http://clu-in.org>)

EU Pesticides database
(http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm)

PAN AP (<http://www.panap.net>)

The Japan Food Chemical Research Foundation
(<http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>)

University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database
(<http://umbbd.msi.umn.edu/>)

Appendix

Appendix A- I . Residual characteristic of endosulfan (조규범, 2010)

Compounds	Minimum (mg/kg)	Maximum (mg/kg)	Average± SD, (mg/kg)	Distribution Frequency, (%)
alpha (α)	< LOQ*	1.4	0.096±0.291	34.5
beta (β)	< LOQ	1.9	0.161±0.391	62.5
sulfate	< LOQ	7.2	0.266±0.809	74.5
ether	< LOQ	0.05	0.008±0.010	21.0
lactone	< LOQ	0.6	0.030±0.086	35.5

* LOQ (Limit of Quantitation, 0.01) : LOD (Limit of Detection, 0.005×2)

Appendix A-II. The result of endosulfan residue in Busan, Gimhae Farmland (조규범, 2010)

Sample code	Region	Endosulfan				
		α	β	sulfate	ether	lactone
1	기타	0.063	0.453	0.936	0.013	0.014
2	기타	0.123	0.075	0.018	ND	ND
3	부산	ND*	0.012	0.193	ND	ND
4	부산	0.056	0.115	0.044	ND	ND
5	부산	ND	ND	0.016	ND	ND
6	부산	ND	ND	0.042	ND	ND
7	부산	ND	0.119	0.308	ND	ND
8	부산	0.032	0.159	0.961	ND	0.018
9	부산	ND	0.022	0.087	ND	0.089
10	부산	ND	ND	ND	ND	0.011
11	기타	ND	0.023	0.041	ND	0.016
12	김해	ND	ND	0.010	ND	0.014
13	김해	0.028	0.139	0.278	ND	0.014
14	부산	ND	0.025	0.169	ND	ND
15	김해	ND	0.025	0.113	ND	0.026
16	김해	0.522	0.206	0.135	ND	0.666
17	김해	10467	1.825	0.413	ND	0.023
18	기타	ND	ND	0.016	ND	ND
19	기타	0.056	0.115	0.044	ND	ND
20	기타	0.126	1.050	7.281	0.067	0.048
21	김해	ND	0.090	1.898	0.016	0.012
22	김해	ND	ND	0.016	ND	ND
23	김해	ND	0.024	0.033	ND	ND
24	김해	ND	0.088	0.511	ND	0.018
25	김해	ND	ND	0.019	ND	ND
26	김해	0.320	0.623	0.373	0.1	0.129
27	김해	0.111	0.679	1.234	ND	0.236
28	김해	0.020	0.105	0.180	ND	0.031
29	김해	ND	0.119	0.308	ND	0.009
30	김해	0.028	0.139	0.278	ND	0.014
31	김해	0.237	1.229	1.962	0.013	0.306
32	김해	ND	ND	ND	ND	ND
33	김해	ND	ND	0.017	ND	ND
34	김해	ND	ND	ND	ND	ND
35	김해	0.015	0.108	0.226	ND	0.031
36	김해	ND	ND	ND	ND	ND
37	부산	ND	ND	ND	ND	ND
38	부산	ND	0.015	ND	ND	ND

Appendix A-II. The result of endosulfan residue in Busan, Gimhae Farmland 조규범, 2010) (Continue)

Sample code	Region	Endosulfan				
		α	β	sulfate	ether	lactone
39	부산	0.015	0.017	0.024	ND	ND
40	부산	ND	ND	ND	ND	ND
41	부산	ND	ND	ND	ND	ND
42	부산	ND	ND	0.012	ND	ND
43	부산	0.012	0.014	2.904	0.063	0.019
44	부산	ND	ND	ND	ND	ND
45	부산	0.474	0.914	0.537	0.017	0.193
46	부산	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019
47	부산	0.016	0.018	0.024	ND	ND
48	부산	ND	0.033	0.05	ND	ND
49	부산	1.398	1.759	0.389	0.019	0.023
50	부산	ND	ND	ND	ND	ND
51	부산	0.026	0.164	0.684	ND	0.037
52	부산	ND	0.012	ND	ND	ND
53	부산	0.014	0.012	0.011	ND	ND
54	부산	0.408	0.691	1.353	0.02	0.112
55	김해	ND	0.006	0.016	0.005	ND
56	김해	0.425	0.647	1.263	0.021	0.116
57	김해	ND	ND	0.012	ND	ND
58	김해	ND	ND	ND	ND	0.029
59	김해	ND	0.08	0.445	0.012	ND
60	김해	ND	ND	0.049	ND	ND
61	김해	ND	ND	ND	ND	ND
62	김해	ND	0.021	0.103	ND	ND
63	김해	1.398	1.759	0.389	0.019	0.023
64	김해	0.011	0.011	0.036	0.024	ND
65	김해	0.026	0.164	0.684	ND	0.037
66	김해	ND	0.012	ND	ND	ND
67	김해	0.014	0.012	0.011	ND	ND
68	김해	0.408	0.691	1.353	0.02	0.112
69	김해	ND	ND	0.016	ND	ND
70	김해	0.425	0.647	1.263	0.021	0.116
71	김해	ND	ND	0.012	ND	ND
72	김해	ND	ND	ND	ND	0.029
73	김해	0.320	0.623	0.373	0.01	0.129
74	김해	0.111	0.679	1.234	0.009	0.236
75	부산	0.020	0.105	0.180	ND	0.031
76	부산	ND	0.119	0.308	ND	ND

Appendix A-II. The result of endosulfan residue in Busan, Gimhae Farmland (조규범, 2010) (Continue)

Sample code	Region	Endosulfan				
		α	β	sulfate	ether	lactone
77	부산	ND	0.021	0.036	ND	ND
78	부산	0.015	0.017	0.024	ND	ND
79	부산	ND	ND	ND	ND	ND
80	김해	ND	ND	ND	ND	ND
81	김해	ND	ND	ND	ND	ND
82	김해	0.189	0.244	0.052	ND	ND
83	김해	ND	ND	ND	ND	ND
84	김해	ND	0.049	0.168	0.010	0.016
85	김해	0.017	0.142	0.538	0.051	0.056
86	김해	ND	ND	ND	ND	ND
87	김해	ND	ND	0.108	ND	ND
88	부산	ND	0.020	0.027	ND	ND
89	부산	ND	0.015	0.020	ND	ND
90	부산	ND	ND	0.020	ND	ND
91	부산	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019
92	부산	0.016	0.018	0.024	ND	ND
93	부산	ND	0.033	0.050	ND	ND
94	부산	1.398	1.759	0.389	0.019	0.023
95	부산	ND	ND	0.048	ND	ND
96	부산	ND	0.013	0.141	0.013	0.014
97	부산	ND	0.093	0.503	0.016	0.011
98	부산	0.060	0.121	0.044	ND	0.021
99	부산	ND	ND	0.023	ND	ND
100	양산	ND	ND	0.014	ND	ND
101	양산	0.137	0.182	0.026	ND	ND
102	양산	ND	ND	0.030	ND	ND
103	양산	0.010	0.016	ND	ND	ND
104	양산	ND	ND	ND	ND	ND
105	김해	ND	ND	ND	ND	ND
106	김해	ND	ND	ND	ND	ND
107	김해	ND	0.021	0.036	ND	ND
108	김해	0.015	0.017	0.024	ND	ND
109	김해	ND	ND	ND	ND	ND
110	김해	ND	ND	ND	ND	ND
111	김해	1.578	1.993	0.336	0.032	0.028
112	김해	ND	ND	ND	ND	ND
113	김해	ND	0.020	ND	ND	ND
114	김해	ND	ND	ND	ND	ND

Appendix A-II. The result of endosulfan residue in Busan, Gimhae Farmland (조규범, 2010) (Continue)

Sample code	Region	Endosulfan				
		α	β	sulfate	ether	lactone
115	김해	ND	ND	ND	ND	ND
116	김해	ND	ND	ND	ND	ND
117	김해	0.189	0.244	0.052	ND	ND
118	김해	ND	ND	ND	ND	ND
119	김해	ND	0.049	0.168	0.010	0.016
120	김해	0.017	0.142	0.538	0.051	0.056
121	김해	ND	ND	0.108	ND	ND
122	김해	ND	0.020	0.027	ND	ND
123	김해	ND	ND	ND	ND	ND
124	김해	ND	ND	0.024	ND	ND
125	김해	ND	ND	ND	ND	ND
126	김해	0.038	0.079	0.033	ND	0.013
127	김해	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019
128	김해	0.016	0.018	0.024	ND	ND
129	김해	ND	0.033	0.050	ND	ND
130	김해	1.254	1.541	0.421	0.018	0.024
131	김해	ND	ND	ND	ND	ND
132	김해	ND	0.013	0.141	0.013	0.014
133	김해	ND	ND	ND	ND	ND
134	김해	0.060	0.121	0.044	ND	0.021
135	김해	ND	ND	0.023	ND	ND
136	김해	ND	ND	0.014	ND	ND
137	김해	ND	0.021	0.036	ND	ND
138	김해	0.015	0.017	0.024	ND	ND
139	김해	ND	ND	ND	ND	ND
140	김해	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019
141	김해	ND	ND	ND	ND	ND
142	김해	ND	ND	ND	ND	ND
143	부산	ND	0.013	0.141	0.013	0.014
144	부산	ND	ND	ND	ND	ND
145	부산	0.060	0.121	0.044	ND	0.021
146	부산	ND	ND	0.023	ND	ND
147	부산	ND	ND	0.014	ND	ND
148	부산	ND	ND	ND	ND	ND
149	부산	0.137	0.182	0.026	ND	ND
150	김해	ND	ND	ND	ND	ND
151	김해	0.017	0.040	0.053	ND	ND
152	김해	ND	ND	ND	ND	ND

Appendix A-II. The result of endosulfan residue in Busan, Gimhae Farmland (조규범, 2010) (Continue)

Sample code	Region	Endosulfan				
		α	β	sulfate	ether	lactone
153	김해	0.008	0.017	0.021	ND	ND
154	김해	0.023	0.041	0.056	ND	ND
155	김해	ND	ND	ND	ND	ND
156	김해	0.035	0.064	0.090	ND	ND
157	김해	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019
158	김해	0.016	0.018	0.024	ND	ND
159	김해	ND	0.033	0.050	ND	ND
160	김해	ND	0.021	0.115	ND	0.011
161	김해	ND	ND	ND	ND	ND
162	김해	ND	ND	0.010	ND	ND
163	김해	ND	ND	0.020	ND	ND
164	김해	0.023	0.139	0.278	ND	0.014
165	김해	ND	0.025	0.169	ND	ND
166	김해	ND	0.025	0.113	ND	0.026
167	김해	0.522	0.206	0.135	ND	0.666
168	김해	1.467	1.825	0.413	ND	0.023
169	김해	ND	ND	0.016	ND	ND
170	김해	0.056	0.115	0.044	ND	ND
171	김해	0.126	1.050	7.281	0.067	0.408
172	김해	ND	ND	ND	ND	ND
173	김해	ND	0.090	1.898	0.016	0.012
174	김해	ND	ND	0.016	ND	ND
175	김해	ND	0.024	0.033	ND	ND
176	김해	ND	0.088	0.511	ND	0.018
177	김해	ND	ND	0.019	ND	ND
178	김해	0.320	0.623	0.373	0.010	0.129
179	김해	ND	0.025	0.169	ND	0.005
180	김해	ND	0.025	0.113	ND	0.026
181	김해	ND	ND	ND	ND	ND
182	김해	0.137	0.182	0.026	ND	ND
183	김해	ND	ND	ND	0.019	ND
184	김해	0.017	0.040	0.053	ND	ND
185	김해	ND	ND	ND	ND	ND
186	김해	ND	0.017	0.021	ND	ND
187	김해	0.023	0.041	0.056	ND	ND
188	김해	ND	ND	ND	ND	ND
189	김해	0.035	0.064	0.090	ND	ND
190	김해	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019

Appendix A-II. The result of endosulfan residue in Busan, Gimhae Farmland (조규범, 2010) (Continue)

Sample code	Region	Endosulfan				
		α	β	sulfate	ether	lactone
191	김해	0.016	0.018	0.024	ND	ND
192	김해	ND	0.033	0.050	ND	ND
193	김해	0.038	0.079	0.033	ND	0.013
194	김해	0.023	0.089	0.487	0.012	0.019
195	김해	0.016	0.018	0.024	ND	ND
196	부산	ND	0.033	0.050	ND	ND
197	부산	1.127	1.321	0.541	0.015	0.020
198	김해	ND	ND	ND	ND	ND
199	김해	ND	0.013	0.141	0.013	0.014
200	김해	0.056	ND	ND	ND	ND

* ND : Not detected (ND < LOQ, 0.01ppm)



Appendix B. Endosulfan residues in the agricultural soils of Gyeonbuk and Daegu (김택겸, 2008)

Sample	Endosulfan concentration (mg/kg)				Cultivation
	α	β	Sulfate	Total	
Gyeonbuk Andong 1	0.38±0.03	0.43±0.09	0.24±0.04	1.05±0.08	Orchard (grape)
Gyeonbuk Andong 2	0.13±0.01	0.21±0.04	1.80±0.21	2.14±0.19	Orchard (grape)
Gyeonbuk Yeongchen	0.09±0.01	0.09±0.01	1.31±0.11	1.49±0.11	Orchard (apple)
Daegu Gatae 1	0.01±0.00	0.05±0.01	0.18±0.03	0.24±0.03	Vegetable
Daegu Gatae 2	0.51±0.07	0.03±0.00	0.09±0.03	0.63±0.04	Vegetable
Daegu Gatae 3	0.28±0.10	0.46±0.06	0.25±0.12	0.99±0.11	Vegetable
Daegu Gatae 4	0.50±0.03	1.05±0.10	1.59±0.34	3.14±0.31	Vegetable
Daegu Mutae	0.42±0.03	4.04±0.25	4.15±0.52	8.61±0.48	Vegetable
Daegu Jimyo	5.31±0.11	3.97±0.07	1.26±0.23	10.54±0.19	Vegetable

Appendix C. Effect of endosulfan concentration on the degradation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 ppm endosulfan

Concentration of fortification in media	Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
		0	1	2	3	4	5	6
10 ppm	Control (no inoculation)	6.96	7.31	7.35	7.06	7.20	6.66	6.80
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	7.51	5.33	2.51	0.30	0.00	0.00	0.00
20 ppm	Control (no inoculation)	14.13	13.28	12.39	12.51	12.26	13.01	12.49
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	15.14	12.11	7.15	3.00	0.48	0.00	0.00
50 ppm	Control (no inoculation)	53.74	52.66	53.36	51.76	47.10	43.94	44.82
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	48.42	43.10	29.31	16.70	4.18	0.51	0.00
100 ppm	Control (no inoculation)	129.02	131.60	127.65	122.54	128.67	121.20	121.69
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	99.70	95.71	78.49	54.16	19.50	4.26	0.60

Appendix C. Effect of endosulfan concentration on the degradation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 ppm endosulfan (Continue)

Concentration of fortification in media	Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
		0	1	2	3	4	5	6
200 ppm	Control (no inoculation)	215.41	221.87	206.10	201.98	208.04	209.42	199.79
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	203.36	199.30	179.37	147.08	73.54	26.20	7.60
500 ppm	Control (no inoculation)	500.06	485.05	461.25	470.47	451.65	423.54	417.18
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	508.40	503.32	468.09	421.28	320.17	218.86	135.69
1,000 ppm	Control (no inoculation)	1041.62	1020.79	1010.75	1020.35	979.54	906.49	897.43
	<i>Serratia</i> sp. K-1321	957.67	928.94	891.78	918.53	900.16	837.15	853.89

Appendix D. Effect of sub-carbon source concentration on endosulfan biodegradation by *Serratia* sp. K-1321. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB medium containing 100 ppm endosulfan

Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
	0	1	2	3	4	5	6
Control (no inoculation)	111.370	114.003	116.384	109.374	111.675	108.928	114.711
0% yeast extract	103.001	101.882	98.605	68.655	40.170	31.415	25.750
0.01% yeast extract	101.988	101.767	95.170	58.905	35.420	23.972	16.318
0.05% yeast extract	116.661	111.995	106.162	60.664	37.332	22.723	11.433
0.1% yeast extract	106.126	100.820	90.207	45.634	25.884	11.324	4.457
0.5% yeast extract	109.634	108.538	107.244	98.413	89.396	82.936	80.526

Appendix E. Biodegradation of endosulfan and change of pH in culture medium by *Serratia* sp. K-1321. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in YNB media containing 100 ppm endosulfan (unit : ppm, pH)

Time (weeks)		0	1	2	3	4	5	6
Concentration of remaining endosulfan	Control	109.702	111.896	116.460	112.993	105.011	109.702	103.387
	K-1321	116.367	111.712	105.347	81.457	44.673	23.273	12.415
pH in media	Control	5.40	5.63	5.78	5.84	5.92	6.05	6.11
	K-1321	5.51	6.25	7.05	7.94	8.47	8.41	8.50

Appendix F . Effect of endosulfan concentration on the bioaugmentation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in soil containing 50, 100, 200, 500 ppm endosulfan

Concentration of fortification in media	Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
		0	1	2	3	4	5	6
50 ppm	Control of Group A	41.01	40.04	38.42	37.95	35.48	31.59	26.15
	Group A	32.50	27.71	13.15	3.49	0.43	0.01	-
	Control of Group B	45.96	41.31	34.91	29.82	24.22	19.37	14.38
	Group B	34.50	28.58	11.63	2.63	0.28	-	-
100 ppm	Control of Group A	70.41	70.82	71.25	65.81	59.31	51.60	43.86
	Group A	50.11	44.24	26.96	14.29	5.41	1.22	0.16
	Control of Group B	91.98	89.99	81.97	70.04	58.31	46.65	36.62
	Group B	79.77	66.71	36.20	16.62	5.09	0.93	0.09

Appendix F . Effect of endosulfan concentration on the bioaugmentation efficacy of endosulfan-degrading K-1321 strain. After inoculation, cells were cultivated at 25 °C in soil containing 50, 100, 200, 500 ppm endosulfan(Continue)

Concentration of fortification in media	Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
		0	1	2	3	4	5	6
200 ppm	Control of Group A	230.66	225.44	212.25	199.47	184.51	172.52	154.71
	Group A	190.72	185.58	142.45	86.01	39.47	13.72	3.10
	Control of Group B	230.66	231.32	206.41	180.79	160.22	135.38	111.03
	Group B	190.72	185.58	129.27	70.74	29.96	9.20	1.75
500 ppm	Control of Group A	520.19	541.20	570.31	525.12	475.24	426.38	377.35
	Group A	487.50	487.00	520.01	490.88	453.57	412.98	369.41
	Control of Group B	510.10	494.70	514.49	491.08	457.69	412.15	356.51
	Group B	490.09	480.20	494.61	458.81	416.60	369.27	312.03

Appendix G. Change of pH in soil by the isolated bacterium (Lab-scale model analysis). After inoculation, cells were cultivated at 25℃ (unit : ppm)

Concentration of fortification in media	Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
		0	1	2	3	4	5	6
50 ppm	Control of Group A	5.52	5.4	5.42	5.45	5.5	5.56	5.6
	Group A	5.4	5.63	6.65	7.87	8.2	8.3	8.4
	Control of Group B	5.32	5.45	5.61	5.75	5.8	5.69	5.7
	Group B	5.6	5.85	6.32	7.49	7.89	7.99	8.2
100 ppm	Control of Group A	5.2	4.99	4.95	5.10	5.01	5.1	5
	Group A	5.6	5.72	6.15	7.38	7.81	7.9	7.95
	Control of Group B	5	5.08	4.99	4.95	5	5.2	5.3
	Group B	5.48	5.65	5.82	5.99	6	6.1	5.98

Appendix G. Change of pH in soil by the isolated bacterium (Lab-scale model analysis). After inoculation, cells were cultivated at 25℃ (unit : ppm) (Continue)

Concentration of fortification in media	Time (weeks)	Remaining value of endosulfan (unit : ppm)						
		0	1	2	3	4	5	6
200 ppm	Control of Group A	5.3	5.62	5.95	6	5.99	6.2	6.1
	Group A	5.45	5.99	6.75	7.35	7.65	7.8	7.99
	Control of Group B	5.29	5.78	6.02	6.25	6.3	6.2	6.1
	Group B	5.65	6.25	6.95	7.52	7.89	8	8.2
500 ppm	Control of Group A	5.72	5.89	5.99	5.8	5.9	5.7	5.6
	Group A	5.48	6.32	7.45	7.95	8.2	8.4	8.45
	Control of Group B	5.62	5.69	5.72	5.74	5.7	5.6	5.7
	Group B	5.4	5.52	5.65	5.5	5.6	5.6	5.7

감사의 글

대학원 입학 후 정신없이 지내다보니 어느덧 2년이 지나갔습니다. 정
도 들고 아쉬움도 남는 시간동안 이 논문을 쓸 수 있도록 도와주신 분들
이 많습니다. 지도교수님이신 정용현 교수님. 학부시절부터 석사 논문을
끝내는 순간까지 언제나 따뜻하게 대해주시고, 하나하나 신경 써주시고,
모자란 제자를 항상 믿어주신 우리 교수님, 너무나도 감사드립니다. 그
리고 입학동기 없이 혼자 논문을 쓰면서 어쩔 줄 몰랐던 저에게 항상 조
언을 해주신 성기준 교수님, 이석모 교수님, 강대석 교수님, 김동명 교수
님, 최창근 교수님께도 감사의 말씀 드리고 싶습니다. 그리고 타과 학생
임에도 불구하고 조언과 수고를 아끼지 않으신 식품공학과 김영목 교수
님, 감사합니다.

2년이란 시간 동안 선배들과 친구들의 도움도 많이 받았습니다. 동생
처럼 대해준 영아 선배(왜 도와주러 안 오셨어요?!). 가끔 맛있는 저녁과
충고 제공해주신 민지 선배, 보라 선배. 사회에 대한 충고를 아끼지 않
은, 지금은 다시 학업에 힘 쏟고 있는 민선 선배. 조언과 응원을 아끼지
않은 혜민 선배, 근주 선배, 민기 선배(아직 이름이 어색하네요...). 이제
부터 논문 쓰느라 힘들 병현 선배, 동주 선배, 선영 언니. 고맙습니다.
선배들 덕분에 저 졸업해요!! 동기 없는 대학원 생활의 티타임과 같은
똥지 지원양. 정말 고마워. 이제 좋은 논문 기대할게, 파이팅!! 각종 서류
와 자료 챙겨주신 김효림 조교선생님, GC를 잘 다룰 수 있도록 도움주
신 다이옥신 센터의 황성민 선배님, GC가 문제를 일으키면 항상 달려와
준 기섭 선배. 감사합니다. 교수님들과의 친분으로 만났지만, 친 후배와
같이 돌봐준 현아 언니, 성환 선배, 원 선배, 대웅 선배, 태영 선배, 재홍

선배, 친 후배 같은 지일이, 모두 모두 고마워요. 우리 방의 막내들, 실험 뒷정리 해주느라 고생한 보연이, 재현이. 그리고 과순이 유리. 너희 덕분에 1년이 즐거웠어. 앞으로 교수님과 우리 방은 너희들에게 맡기마. 부탁한다! 가끔 놀러올게. 나의 소중한 친구들. 자라나는 아이들의 선생님 미숙이, 자랑스러운 대한민국 해군 건희, 예비 대학원생 영득이, 뉴욕 커 란이. 너희들은 내 삶의 피로회복제야!! 앞으로도 영원한 우정을 이어나가자. 1년이 넘도록 연락이 안되는 주연이, 연락 좀 줘!! 항상 격려를 아끼지 않은 오승렬 씨, 지금부터 고생입니다!! 파이팅!!

마지막으로 정말 소중한 우리 가족, 항상 든든하게 뒤에서 받쳐주시고 믿어주신 우리 아빠, 6개월 동안 도시락 싸주시느라 고생하신, 포근하고 따뜻한 우리 엄마. 앞으로 잘할게요. 사랑해요~ 친구 같은 동생 정우. 년 졸업 1번도 안했는데 누님이 2번째 졸업을 하는구나... 실험실 생활이 쉬운 게 아니란다. 앞으로 열심히 하렴. 누님이 돈 벌면 지원 많이 해주마!(연애하는데 쓰지는 말고.) 집에 전화 자주 하고. 앞으로도 우리 가족, 행복하고 건강하게 오래오래 삼시다!! 사랑합니다!!♡♡♡

논문을 끝내고 나니 후련하기도 하고 섭섭하기도 합니다. 사회생활로 나가는 경계에서 조금 불안하기도 합니다. 교수님께 죄송하지만, 솔직히 큰 짐을 내려놓은 듯 속 시원합니다. 다시 대학원에 돌아올 확률은 꽤 크지만, 일단 열심히 일해 보려 합니다. 앞으로 즐겁게, 힘차게 살아가겠습니다!!