

최 종 보 고 서

EBDC계 살균제 잔류농약 검색용  
미생물 선발 및 Kit 개발

전남대학교 농업생명과학대학  
생물환경화학과 천연물연구실

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 2000년도 “농림기술개발연구과제”에 의하여 완료된 “EBDC계 잔류농약 검색용 미생물 선발 및 Kit 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2003.7.24

주관연구기관: 전남대학교  
총괄연구책임자: 심 재 한  
세부연구책임자: 지 연 태  
연구원: 이 창 주  
연구원: 신 경 우  
연구원: 노 상 명  
연구원: 최 대 석  
연구원: 배 형 우  
협동연구기관명:  
협동연구책임자:

# 요 약 문

## I. 제 목

### EBDC계 살균제 잔류농약 검색용

### 미생물 선발 및 Kit 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

환경친화적인 농업경영이 날로 주목받고 미래 농업의 발전 방향으로 점차 자리잡고 있는 오늘날도 농약은 병해충 및 잡초 등의 방제를 통하여 농업생산성을 증가시키고 농산물의 품질향상과 유지보존 등 목적으로 현대농업에서 사용이 불가피한 현실이다. 이에 따라 농약의 오, 남용에 의한 환경오염과 농산물 중에 함유된 잔류농약에 대한 소비자의 우려가 커지면서 유통농산물에 대한 잔류농약검사가 강화되고 있고 실제로 부적합 농산물로 판정되는 사례가 크게 늘고 있는 실정이다(98년 기준 2.9 % 이상 증가). 이러한 여러 가지 이유로 잔류농약을 측정하고 그 정도가 허용기준에 적합한지를 검증하고 있다. 그러나 현재 농산물 중 잔류농약을 측정하는 방법은 정밀분석법으로서 고가의 장비를 필수로 하는 외 장시간이 소요되고 전문적 지식과 기술을 보유한 전문인력 및 막대한 분석비용이 요구될 뿐만 아니라 많은 시료를 대상으로 할 경우에는 한계가 있어 농민과 소비자 모두에게 만족하지 못하는 결과를 초래하고 있는 현 시점에서 잔류농약 속성 측정법의 개발이 절실한 실정이다.

이러한 맥락에서 본 연구는 EBDC계 살균제의 감수성 미생물을 선발하여 간편하고 신속하며 경제적인 잔류농약 검색용 Kit를 개발하여 농산물의 출하 전 및 판매 전 그리고 농산품 수출입 등 유통체계에서 소비자 보호를 위한 경제적이고도 실용적이며 간편한 잔류농약 측정방법으로 안전한 농산물의 유통을 확보하고 소비자에게 안전한 농산물을 공급할 수 있는 최종 목적에 도달하기 위하여 진행하게 되었으며 그 내용을 아래와 같은 몇 가지 측면으로 요약하였다.

## 1. 기술적 측면

현재 국내에서 사용되는 잔류농약 측정법은 고가의 장비들(GC, HPLC, GC/MS)을 사용하고 있는데, 시료 1점을 분석하는데 많은 비용과 노력이 소요되고 숙련된 기술 인력을 요구하고 있으며 특히 출하 전, 또는 판매 전 간단히 검사할 수 있는 정도의 시간이 허용치 않는다. 반면에 미생물을 이용한 잔류농약 측정법은 신속, 간편하고 누구나 쉽게 측정할 수 있으며 많은 시료를 동시에 분석할 수 있어 허용기준을 초과하는 시료에 대해서만 정밀 분석하여 비용절감효과를 거둘 수 있다. 따라서 농산물의 출하 전, 또는 판매 전 등 현장에서 신속하게 잔류농약의 허용기준 초과여부를 직접 판정할 수 있어 안전농산물의 생산과 소비를 보장할 수 있으며 우리농산물에 대한 대외신뢰도와 경쟁력을 높이고 수입농산물에 대한 확실한 규제를 할 수 있게 될 것이다.

## 2. 경제적 측면

현재 국내에서 사용되는 잔류농약 측정법은 고가의 장비들(GC, HPLC, GC/MS)을 사용하고 있는데, 시료 1점을 분석하는데 많은 비용과 노력이 소요되고 숙련된 기술 인력을 요구하고 있으며 특히 출하 전, 또는 판매 전 간단히 검사할 수 있는 정도의 시간이 허용치 않는다. 반면에 미생물을 이용한 잔류농약 측정법은 신속, 간편하고 누구나 쉽게 측정할 수 있으며 많은 시료를 동시에 분석할 수 있어 허용기준을 초과하는 시료에 대해서만 정밀 분석하여 비용절감효과를 거둘 수 있다. 따라서 농산물의 출하 전, 또는 판매 전 등 현장에서 신속하게 잔류농약의 허용기준 초과여부를 직접 판정할 수 있어 안전농산물의 생산과 소비를 보장할 수 있으며 우리농산물에 대한 대외신뢰도와 경쟁력을 높이고 수입농산물에 대한 확실한 규제를 할 수 있게 될 것이다.

## 3. 사회적 측면

EBDC계 살균제는 사과, 포도, 감귤, 배, 감, 수박, 토마토 등 과일과 고추, 양파, 오이, 감자, 참깨, 땅콩 등 채소에 널리 사용되는 농약으로서 만코지수화제를 비롯한 만프로수화제메타실엠수화제, 부탄엠수화제, 싸이몯사닐·만코지수화제, 옥사실엠수화제, 타로만수화제, 펜부코나졸·만코지수화제, 포스만수화제, 웨나리·만코지수화제, 만코지과립수화제 등 11가지 제품이 시판되고 있다. 만코지의 주요대사물질인 ETU(ethylenethiourea)는 발암물질로 지목되고 있어 이들 농약의 잔류문제는 인축에 큰 위해 요인으로 작용한다. 따라서 신속한 잔류농약측정기술

을 보급함으로써 농약을 안전하게 사용하도록 하는 계기를 마련하여야 할 것이다.

우리나라 농약사용량은 원제 기준 1976년 1만여 톤에서 1998년에 2만여 톤으로 약 2배 증가하였으며 단위 면적 당 농약 사용량도 1976년 4.6kg에서 1998년 13.0kg으로 계속 증가하는 추세이며 농약의 오·남용에 의한 부작용의 발생이 빈번하여 안전농산물 생산이 위협받고 있다. 유통농산물 중에 잔류농약에 대한 소비자의 우려가 커지면서 유통농산물에 대한 잔류농약 검사가 강화되고 있고 실제로 부적합 농산물로 판정되는 사례가 급증하고 있다. 지금까지의 잔류농약검사는 정밀 검사법으로 판정의 결과가 부적합한 것으로 나오더라도 해당 농산물은 이미 소비자의 위 속에 들어가 있는 상태이므로 소비자의 불안감이 증폭되어 국산농산물에 대한 불신을 초래하고 있다. 따라서 간편하고 경제적인 잔류농약 간이검사 Kit를 개발하여 생산 및 판매현장에서 간단하고 신속하게 잔류농약을 검사하여 출하 및 판매 전에 부적합 품목을 선별하여 안전한 농산물의 생산 및 유통을 보장하는 계기를 마련할 수 있을 것이며 수출입 농산물의 잔류농약 검사에도 이용할 수 있으며 소비자에게 안전한 농산물만을 공급할 수 있을 것으로 생각된다.

### III 연구개발 내용 및 범위

이상의 연구 목적을 달성하기 위하여 아래와 같은 연구를 실시하였다.

1. EBDC계 잔류농약 간이검사 kit에 사용할 미생물을 선별하기 위하여 세균, 효모, 곰팡이 그리고 방선균 등 100여 종의 미생물에서 균주를 분리하고 EBDC계 살균제에 대한 감수성 스크리닝을 실시하여 그 중 높은 감수성을 갖는 미생물을 선별하여 증식곡선, 최소저해농도, 잔류측정 가능성 및 작물별 잔류측정 가능성 그리고 감수성 미생물의 활성 및 특성조사를 실시하였다. 아울러 B.T(*Bacillus thuringiensis*)와 *E. coli* 등과의 성장곡선을 비교 검토하여 최종 잔류농약 간이검사 Kit에 사용할 미생물 1종을 선별하여 16s rRNA 염기서열 분석을 비롯한 동정을 실시하였다.

2. 감수성 미생물의 최적배양 조건을 확립하기 위하여 최적배양 온도, 최적배양 pH, 최적배양 배지 및 최적배양방법의 조사를 실시하였다.

3. 감수성 미생물의 EBDC계 살균제와의 반응성을 확인하고 과채류 중 잔류농약 추출법을 개발하기 위하여 우선 여러 가지 추출용매의 미생물에 대한 저해 정도와 과채류 중 미생물 저해물질 존재 여부를 조사하였다. 아울러 잔류농약에 대한 최소검출한계, 검출환경 그리고 과채류 종류별 EBDC계 살균제와의 최적반응성 및 회수율을 조사하였으며 잔류농약 간이검사 Kit 의 제작과 실용성을 고려하여 잔류농약 추출용매, 발색제 및 반응정지제의 보관 및 안정성 조사를 실시하였다.

4. 감수성 효소를 탐색하고 확인하기 위하여 미생물의 TCA cycle내에 관여하는 D-lactate dehydrogenase 와 L-malate hydrogenase의 EBDC계 살균제에 대한 감수성과 CMB03의 dehydrogenase의 기질 종류에 따르는 반응성을 TTC teste 법으로 조사하여 감수성 효소를 탐색하고 확인하는 연구를 실시하였으며 아울러 CMB03 조효소 추출액을 이용하여 감수성 최적반응 조건을 조사하는 연구와 EBDC 살균제와 NAD<sup>+</sup> 및 NADH의 관계를 조사하는 연구를 실시하였다.

5. EBDC계 살균제 잔류농약 측정체계와 생산체계를 수립하기 위하여 CMB03의 액체배양액을 이용한 잔류농약 간이 측정법과 미생물의 보존성과 안정성을 보완하기 위하여 alginate를 이용하여 bead capsule를 제조하여 균주를 고정화한 간이 측정법 및 미생물을 고체상태로 동결건조하여 보관하면서 수시로 배양하여 잔류농약 측정에 사용할 수 있는 등 3 가지 방안에 대하여 연구를 실시하였다.

6. 잔류농약 측정의 정확성, 안정성, 분석시간 등 경제적 타당성 평가는 정형화된 측정법(CS<sub>2</sub>법)과 새로 개발한 Kit 측정법을 비교하여 현장 시료에서 잔류농약을 측정하여 잔류량 측정의 현실적 타당성에 대한 평가를 실행하였다. 이러한 일련의 연구로 미생물을 이용한 잔류농약 측정 Kit의 개발로 각 유통, 생산, 소비 등 단계에 보급이 가능하여 EBDC계 살균제의 잔류량의 신속, 간편하고 저렴하게 측정이 가능하고 잔류 측정 대상농약과 민감하게 반응하는 미생물 선발과 Kit의 대량생산으로 다량의 시료를 단시간에 측정가능 하게 되어 농약의 안전한 사용과 안전한 농산물의 생산, 유통 및 소비를 뒷받침하여 국제적 경쟁력이 있는 우리 농산물 생산에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

## IV 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

가. EBDC계 살균제의 감수성 미생물의 선발

#### 1) EBDC계 감수성 미생물 균주의 분리 및 선발

대만(대만농업연구소,1990)에서 사용되고 있는 TTC(Triphenyltetrazolium chloride)를 발색제로, B,T를 이용하여 잔류농약을 측정하는 원리를 참고하여 국내 토양에서 세균, 효모, 곰팡이, 방선균 등 총 100여 종의 미생물에서 균주를 분리하고 EBDC계 대표적 살균제인 mancozeb에 대한 미생물들의 감수성과 성장속도를 조사한 결과 CMB03과 CMB61 두 균주가 B,T균주에 비해 뛰어난 감수성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

#### 2) 감수성 미생물의 활성 및 특성조사

감수성이 우수하다고 추정되는 CMB03 과 CMB61 두 균주를 B,T 및 *E.coli*와 비교하여 성장속도를 조사해본 결과 CMB03과 CMB61은 배양 2시간부터 상당히 빠른 성장속도를 보여준 반면 B,T 및 *E. coli*는 4시간까지 거의 성장을 하지 않는 것으로 나타내었으며 CMB03과 CMB61의 성장속도를 비교하여 볼 때 CMB03이 CMB61보다 더 빠른 성장속도를 보여주었다. 아울러 CMB03과 CMB61 두 균주와 B,T를 비교하여 mancozeb를 농도별로 처리한 배지에서 그들의 증식정도를 증식곡선을 작성하여 조사한 결과 CMB03은 무처리에서 상당히 빠른 증식을 보이거나 mancozeb 0.06 ppm에서 매우 낮은 증식을 보여주며 0.08 ppm부터 는 CMB61보다 더 낮은 증식을 보여주었다.

#### 3) EBDC계 살균제에 대한 최소생육 저해농도 산정

CMB03균주의 EBDC계 살균제에 대한 최소생육 저해농도를 산정하기 위하여 B,T와 비교하여 mancozeb을 농도별로 처리한 top agar plating 실험과 성장저해를 조사를 실행한 결과 CMB03균주는 0.04 ppm 의 mancozeb에서 약 50 %의 성장저해율을 나타냈고 0.02 ppm에서도 약 20 % 에 가까운 저해율을 보여주어

0.02 ppm을 최소생육 저해농도로 산정하였다.

#### 4) 감수성 미생물의 선정

CMB03 균주에 대한 16s rRNA 염기서열의 분석 결과 CMB03은 *Bacillus sp.*로 확인되어 CMB03을 *Bacillus sp.* CMB03으로 명명하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)로부터 AF406633의 accession number를 부여받았다.

#### 나. 감수성 미생물의 최적배양조건 확립

감수성 미생물의 최적 배양조건을 조사하여 최종 아래와 같이 확립하였다. 최적배양 배지는 L.B(Luria bertani) 배지(Tryptone 10g, Yeast extrat 5g, NaCl 10g), 최적 배양 온도는 37℃, 최적 pH는 7.0±0.2 ℃, shaking velocity는 150 rpm 으로 하였다.

#### 다. 미생물과 EBDC계 살균제와의 반응성과 과채류 중 잔류농약 추출법 조사

##### 1) 추출용매의 미생물에 대한 저해여부

잔류농약 추출용매의 미생물에 대한 저해여부와 그 정도를 확인하고자 하는 목적으로 잔류농약 분석방법에 일반적으로 가장 많이 사용하고있는 methanol, ethanol, n-buthanol, acetone 그리고 EDTA(1000 ppm)/DMSO(2 %)수용액 등 5 가지 용매의 미생물에 대한 저해여부와 정도를 농도별로 감수성 미생물 배양배지에 처리하고 미생물을 배양하여 미생물에 대한 저해여부와 정도를 조사한 결과 EDTA(1000 ppm)/DMSO(2 %)수용액이 미생물에 대한 저해가 가장 적은 것으로 나타났다.

##### 2) 과채류성분 중 미생물의 저해물질 존재여부 확인

과채류 성분중 미생물의 저해물질 존재 여부를 확인하기 위해 우선 녹차, 생강, 마늘, 딸기 등 10가지에 대하여 조사하였는데 이들 10가지 과채류 중 생강, 마늘은 식물체 자체의 자극성 물질들이 감수성 미생물의 생장에 현저한 저해를 나타내며, 녹차와 딸기의 경우는 색소의 짙은 색이 TTC 실험결과의 관찰에 상당한 영향을 미치는 것으로 조사되었다.



### 3) EBDC계 살균제의 검출환경 결정

CMB03을 이용한 EBDC계 잔류농약 측정법의 최적 검출환경을 확립하기 위하여 우선 TTC test법을 이용하여 미생물 배양배지의 pH, 발색제 첨가량, 미생물 suspension 양, 반응정지제의 종류에 따르는 TTC 반응성 및 추출용매 DMSO의 농도에 의한 미생물에 대한 영향 및 잔류농약의 추출효과 등을 조사하여 최적검출환경을 확립하였다.

### 4) EBDC계 살균제의 최소검출한계 결정

여러 가지 농도의 mancozeb을 미생물 배양배지에 처리하고 CMB03을 이용한 TTC test를 행하여 spectrophotometer측정법과 육안 검사법을 이용하여 최소검출한계를 조사하였다. CMB03을 이용한 TTC test 결과를 spectrophotometer에서는 최소 0.004 ppm (0.04 $\mu$ g) 수준까지 검출가능하며 육안으로는 최소0.04 ppm 까지 검출가능 하였다.

### 4) 잔류농약 추출용매, 발색제 및 반응정지제의 보관방법 및 안정성 조사

CMB03을 이용한 잔류농약 측정에 이용할 추출용매, 발색제 및 반응정지제를 갈색병에 밀봉하여 실온과 냉장4 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 1, 3, 7, 14, 21, 30일과 45에 각기 이들의 pH 값을 측정하고 외관변화를 관찰함과 아울러 TTC test를 실행한 결과 3가지 용매 모두 pH나 외관상 어떤 변화가 없었으며 정상적인 TTC 반응성을 나타내었다. 또 한 본 연구에서는 선발된 감수성 미생물 *Bacillus sp.* CMB03을 편리하고 안전한 고체상태로 반영구적으로 보관하면서 수시로 사용할 수 있는 방법을 개발하여 앞으로 미생물을 이용한 잔류농약 측정 Kit 개발에 실용적으로 이용할 수 있었다.

### 5) 미생물과의 반응성을 고려한 작물별 추출방법의 고안

과채류 종류별 EBDC계 농약과의 최적 반응성 및 추출방법을 조사하기 위하여 감자, 사과, 배, 오이, 토마토, 깻잎 그리고 상추 등 7가지 과채류에서 CMB03을 이용한 미생물측정법의 mancozeb에 대한 회수율 및 추출방법에 대하여 조사하였으며 아울러 상추와 깻잎에서 B.T와 비교하여 회수율을 조사하였다. Mancozeb을 1  $\mu$ g 처리한 저농도에서는 사과와 배를 제외하고는 모두 45 %이상의 회수율을 보여주고 5 $\mu$ g 처리한 고농도에서는 토마토에서 34 %의 낮은 회수율을 보이는 외 기타 6가지 과채류에서는 모두 57 % 이상의 높은 회수율을 보여주었다. 상추와 깻잎에서 B.T와 비교하여 회수율을 측정한 결과 CMB03은 1  $\mu$ g과 5  $\mu$ g의

mancozeb에서 모두 70 %이상의 비교적 높은 회수율을 보이는 반면 B.t는 저 농도에서는 낮은 회수율을 나타내고 고 농도를 처리한 상추에서만 보다 높은 회수율을 보여주었다.

#### 라. 감수성 효소의 탐색 및 검증

1) CMB03을 비롯한 CMB61, CMB52등 감수성 미생물들의 L-malate dehydrogenase와 D-lactate dehydrogenase의 EBDC계 살균제에 대한 감수성을 조사해본 결과 두 가지 효소 모두 저해를 받는 것으로 나타났으며 CMB03의 D-lactate dehydrogenase는 최고 76.9 %로 저해를 받는 것으로 나타났다. CMB03의 dehydrogenase의 기질 종류에 따르는 반응성을 조사한 결과 Fumarate를 substrate로 이용한 반응에서 formazan formation이 L-malate와 비슷하게 나타나 fumarate의 구조적인 특성으로 인하여 fumarate를 이용한 enzyme과 L-malate를 이용한 enzyme의 특성을 모두 갖는 dual enzyme system이 동시에 작용하는 것으로 추정되었다.

2) EBDC 살균제와 NAD<sup>+</sup> 및 NADH의 관계를 조사한 결과 mancozeb은 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 변화시키지 않는 것으로 나타났다.

3) CMB03 조효소 추출액의 최적반응 조건을 알아보기 위하여 동일한 기질을 사용하면서 기질과 발색제 첨가시간을 달리하면서 효소의 활성정도를 조사한 결과 기질과 발색제를 동시에 첨가한 후 반응을 진행한 경우 농약을 첨가 한 것과 아닌 것이 효소 억제율에서 충분한 상관관계를 갖는 것으로 나타났다.

#### 마. 잔류농약 측정체계와 Kit 생산체계의 수립 및 검토

EBDC계 살균제 잔류농약 측정체계와 생산체계를 수립하기 위하여 CMB03의 액체배양액을 이용한 잔류농약 간이 측정법과 미생물의 보존성과 안정성을 보완하기 위하여 alginate를 이용하여 bead capsule를 제조하여 균주를 고정화한 간이 측정법 및 미생물을 고체상태로 동결건조하여 보관하면서 수시로 배양하여 잔류농약 측정에 사용할 수 있는 등 3 가지 방법을 개발하여 현재 중소기업과 협의 중에 있다.

바. 정형화된 잔류농약 측정법과 개발한 Kit와의 비교 및 현장 시료중 잔류농약 측정

1) 기존의 정형화된 CS2측정법과 CMB03을 이용한 TTC test법을 이용하여 감귤, 사과 및 배등 과채류의 잔류농약 함량을 측정한 결과 새로 개발한 Kit 측정법은 재현성이 우수하고 실험오차가 작고 단위시간 내에 다량의 시료를 분석할 수 있는 등 보다 우월한 방법임을 다시한 번 확인 할 수 있었다.

2) 잔류농약 측정의 정확성, 및 경제적 타당성 평가

기존의 정형화된 측정법 보다 간편하고도 신속하며 훨씬 경제적이며 더 적은 초자기구 및 용매의 사용과 소량의 유기용매와 시약의 사용에 의한 환경오염과 실험자의 안정성 위해가 거의 없는 것으로 판단된다.

## 2. 활용에 대한 건의

가. EBDC계 살균제 잔류량 검출환경과 최소검출 한계

*Bacillus sp.* CMB03 균주배양액을 이용한 잔류농약 측정법은 EBDC계 살균제의 대표적인 농약 mancozeb 잔류량 측정시(TTC 발색법) spectrophotometer(O.D 484nm)에서 최소 0.004 ppm, 육안으로 최소 0.04~0.2 ppm 까지 검출 가능하고 기존의 대만에서 사용한 미생물 B.T 보다 약 3배 정도 성장속도가 빠른 결과를 나타내어 본 연구에서 선발한 미생물은 EBDC계 살균제에 민감한 미생물임이 증명되었으며 잔류농약 검색용 Kit개발에 적합한 것으로 판단된다.

나. 미생물을 이용한 EBDC계 살균제 잔류농약 측정체계와 Kit 생산체계의 수립 및 활용

잔류농약 측정 Kit용 미생물의 활성을 유지하면서 안전하게 장기간 종균을 보존하기 위하여 본 연구에서는 미생물 배양액을 동결건조하여 냉장보관 하는 방안과 alginate를 이용하여 bead capsule를 제조하여 균주를 고정화하는 방안을 고안하여 기존의 대만에서 사용되고있는 미생물 균종을 보관하는(사면배지 보관) 방법 보다 유통, 보급에 편리하고 미생물의 활성을 더 안정하게 유지할 수 있음을 확인하였다.

농산물의 출하 전과 출하 후 유통단계에서 잔류농약을 간단하고 신속하게 검색하여 부적합한 농산물을 판정하고 분리하여 소비자에게 안전한 농산물을 공급할 수 있는 새로운 측정방법이 수립되어 이를 통하여 농약의 과다사용과 수확 전 살포를 견제하여 저공해 농산물의 생산 및 유통을 원활하게 유도함으로써 농산물의 품질인증 및 가격 차별화의 계기를 부여하고 품질인증 및 가격차별화에 의한 농가소득의 증대와 안정적인 농업기반을 조성하는데 기여할 수 있을 것이다. 아울러 각 지역 검역기관에서 저렴하고 신속한 방법으로 농축산물의 검역 및 출하 전 검사를 실행할 수 있으며 단 시간내에 더 많은 수의 시료를 충분히 검사하여 정밀검사 방법을 실행하기 전의 검색단계로 활용하여 효과적이고 경제적인 잔류 검사를 수행할 수 있을 것이다.

## SUMMARY

**Title: Development of a diagnosis kit for detecting fungicide mancozeb using *Bacillus sp.* CMB03.**

Ethylene bisdithiocarbamates (EBDCs) are globally one of the most widely used organic fungicides, and include mancozeb, maneb, metiram, nabam, and zineb. In Korea, EBDCs were first introduced during the 1960s and widely used for the control of fungal diseases in agricultural products including fruit, vegetables, and crops. EBDCs are of both environmental and toxicological concerns, because a number of studies have reported that the degradation product, ethylenethiourea (ETU), is carcinogenic. Toxicological concern on EBDCs has prompted the study on the development of analytical method for these fungicides to better monitor and trace them in agricultural and environmental samples. One method used for the determination of EBDC's is to determine quantitatively CS<sub>2</sub> liberated from EBDC's by spectrophotometrically measuring the absorbance of cupric complexes of *N,N*-bis(2-hydroxyethyl) dithiocarbamic acid of CS<sub>2</sub> formed by decomposition of hot mineral acid of EBDCs in the presence of SnCl<sub>2</sub>. Gas liquid chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods with variable modifications have been also reported for the determination of EBDCs and their degradation products(14, 19, 5, 25, 37). Enzyme-immunoassay method for the detection of thiram has recently been presented. Most of these methods, however, are still time-consuming with extensive sample preparation required.

For the isolation of EBDC fungicides sensitive microorganisms, we were searching one hundred strains bacteria, fungi, yeasts and actinomycetes. And then, we selected most rapid growth rate and sensitive strain to EBDC's fungicide mancozeb by several test(growth inhibition test, growth rate measurement test and etc). Through these screening of residues sensitive strain, we could use these strains to develop fungicide residue rapid and simple assay kit which could be more sensitive and simple assay method than Taiwan agricultural research's one. In this research, we used TTC(Triphenyl

tetrazolium chloride) reagent that changes color from white/yellow to red in visible light range results from reduction reaction by dehydrogenases of cells. By previously stated method, we could assay and detect of mancozeb quantitatively. We isolated most rapid growth rate and sensitive strain to EBDC's fungicide mancozeb what is named *Bacillus sp.* CMB03 by 16sr RNA sequencing method and given AF406633 accession number fo NCBI(National Center for Biotechnology Information).

We defined maximum nedium, growth temperature, pH, aeration condition of CMB03. From the results of test which checked up relation of CMB03 and vegetables and mancozeb, we could validate that fungicides were collect over 70 % in perilla leave and lettuces of mancozeb treatment test. In addition, we searched target inhibition enzyme to mancozeb of CMB03 through the dehydrogenases enzyme assay using TTC redox reaction in addition of several TCA cycle intermediate substrates (citrate, oxaloacetate, fumarate, malate, succinate). By enzyme assay of CMB03 crude extracts using substrate-enzyme reaction, malate dehydrogenase of CMB03 have showed sensitive inhibition to mancozeb. Also, for the development of more stable and simple EBDC fungicide residue assay kit, we constructed microencapsulation method of CMB03 to alginate polymer and tested fungicide mancozeb residue assay.

A simple method for the determination of ethylene bisdithiocarbamate fungicide mancozeb was studied using a bioassay based on the inhibition of triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction by mancozeb-sensitive bacterial isolates. An isolate CMB03 showed the most sensitive response to mancozeb, giving IC<sub>50</sub> value of about 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , and based on 16S rRNA sequence analysis was named *Bacillus sp.* CMB03. Dose-dependent growth inhibition of CMB03 by mancozeb suggested that a biochemical system of CMB03 can be used as a bioassay method for the determination of mancozeb. TTC reduction to formazan, a red color product, by CMB03 was examined as biological reaction indicator responsive to mancozeb.

The bioassay method showed approximately 70 % recovery of mancozeb spiked in lettuce and perilla leaf samples. Our method is suggested to be

useful method for the determination of mancozeb in agricultural samples.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	16
Section 1. Purpose and Range of the Research-----	16
Section 2. Goal and Contents of the Research -----	18
Chapter 2. Development of a Diagnosis Kit for Detecting-----	20
Residual Fungicide Mancozeb Using <i>Bacillus sp.</i> CMB03	
Section 1. Introduction -----	20
Section 2. Selection of Mancozeb Susceptible Microorganism- -	21
Section 3. Optimization Incubate Condition of Microorganism-----	45
Section 4. Fungicide Residue Analysis Method for Vegetable and	
Fruits -----	49
Section 5. Screening and Characteiszating of Mancozeb Susceptible	
Enzyme-----	62
Section 6. Establishment system for Residue Analysis and	
Development of Diagnosis Kit-----	80
References-----	93
Chapter 3. General conclusion -----	97



# 목 차

제 1 장. 서 론 -----	17
제 1 절. 연구개발의 목적과 필요성-----	17
제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용 -----	19
제 2 장. 연구개발수행 내용 및 결과-----	21
제 1 절 서 설-----	21
제 2 절. EBDC계 살균제의 감수성 미생물 선발 -----	22
제 3 절. 감수성 미생물의 최적배양조건 확립 -----	46
제 4 절. EBDC계 살균제와 미생물의 반응성과 과채류 중 잔류농약 추출법 조사 -----	50
제 5 절. 감수성 효소 탐색 및 특성 조사-----	63
제 6 절. 잔류농약 측정체계와 Kit의 생산체계 수립-----	81
참고문헌-----	93
제 3 장 최종결론 -----	97

# 제 1 장 서 론

## 제 1절 연구개발의 목적 과 필요성

우리나라는 농지가 좁고 인구밀도가 높아 단위 농지 당 부양인구가 많은 것이 특징이며 최근 들어 년 중 공급해야 하는 채소류의 경우 비닐하우스 재배로 인한 병충해 방제를 위해서 농약의 과다 사용, 수확 전 살포 등에 의한 잔류 농약 허용기준치를 초과하는 농산물이 시중에 유통되어 소비자의 불안감을 증대하고 있다. 따라서 98년 말 현재 우리나라의 농가 중 유기재배를 하고 있는 농가는 9,000호로서 전체 농가의 0.6 % 정도이며, 재배면적은 8,500 ha로서 전체 농산물의 0.4 % 정도로 그 외 99.6 % 이상은 많은 농약을 과다 사용하고 있는 것으로 알려지고 있다.

EBDC계 농약은 현재까지도 국내에서는 사과, 포도, 감귤, 배, 감, 수박, 토마토 등 과일과 고추, 양파, 오이, 감자, 참깨, 땅콩 등 채소에 널리 사용되는 농약으로서 만코지수화제를 비롯한 만프로수화제, 메타실엠수화제, 부탄엠수화제, 싸이못사닐·만코지수화제, 옥사실엠수화제, 타로만수화제, 펜부코나졸·만코지수화제, 포스만수화제, 웨나리·만코지수화제, 만코지과립수화제 등 11가지 제품이 시판되고 있다. 만코지의 주요대사물질인 ETU(ethylenethiourea)는 발암물질로 지목되고 있어 이들 농약의 잔류문제는 인축에 큰 위해 요인으로 작용하는 것으로 많이 제기되고 있으며 따라서 수입 농산물이나 국산 농산물에 잔류농약의 위해성이 대두되고 있음에도 불구하고 현재 국내에서는 신속하고 간편한 EBDC계 잔류농약 측정방법이 개발되어 있지 않은 실정이다.

한편 농산물 중 특히는 과채류는 출하로부터 소비에 이르는 시간이 짧기 때문에 잔류농약 분석이 현재 실행되고있는 정밀검사법으로는 시간적으로나 경제적으로 매우 어려운 실정이다. 따라서 비록 부적합 판정결과가 나오더라도 해당 농산물은 이미 소비된 상태이기에 잔류농약 검사의 의미를 잃게되어 고품질의 우리 농산물의 생산과 안전한 농산물의 공급을 보장할 수 없는 현실이다.

경지가 좁은 우리나라에서는 유기농업도 일정한 한계가 있어 안정적인 국민의 식생활을 보장하기 위하여서는 현재와 같은 재배환경에서 농약의 사용은 불가피

하기에 고부가가치의 안전한 농산물의 생산과 공급을 보장할 수 있는 제도적 장치와 한편, 신속하고 경제적인 잔류농약 측정법 개발이 시기 적절한 것이다.

선진국들에서는 Bio sensor 개념이 일찍이 도입되어 ELISA 검색, 전극, 면역검색 등 방법들이 연구되어 왔으며 대만에서는 EBDC계 살균제와 카바메이트계 살충제들의 잔류량을 측정하는 Bio kit를 개발하여 보급, 시판단계에 이르렀고 정책적으로 출하 전, 출하 후 및 유통단계에 걸쳐 Kit를 이용하여 농산물중 이들 농약의 잔류량을 측정하여 그 결과를 생산자와 보건당국에 알리고 있는 실정이다. 국내에서는 최근에야 시도되는 초보적인 단계로 실용화하기 위해서는 지속적인 장기간의 연구가 실행되어야 한다(이 등, 1998). 그러나 최근 부각되는 잔류농약 문제의 심각성을 고려할 때 조기 실용화가 가능해야 한다는 면에서 미생물을 이용한 잔류측정 Kit의 개발이 시기 적절하다. 현재까지 국내에서 ELISA 기법을 이용한 잔류농약 측정법이 연구되어 왔고( 이 강봉, 1993), 집파리의 AChE를 이용하여 살충제 스크리닝 작업을 하여 살충력을 검증하고자 하는 등 연구가 진행되어 왔으며(이 등, 1991),수입농산물이나 국산 과채류에 잔류농약의 위해성이 인식되고 있어 부분적인 잔류검사기술 개발에 관심을 가져왔으나(이 등, 1992: 조 등, 1994) 실용화고정에 까지 이어진 경우는 거의 없다.

현재 국내에서 사용되는 농약의 잔류량 측정은 정밀검사법을 위주로 고가의 장비(GC, HPLC, GC/MS), 숙련된 기술인력과 복잡한 전처리과정을 거치는 장시간이 소요되며 인체와 환경에 영향을 끼치는 대량의 유기용매를 사용하는 등 단점들을 갖고 있을 뿐만 아니라 기기 1대당 1일 측정가능한 시료의 수가 한정되어 있어 수많은 과채류 중에서 극히 일부분만을 측정할 수 있다. 따라서 국내의 잔류분석작업은 그 자체의 규모가 너무 방대하고 인력이 부족하기에 어느 한 시기의 농산물 내에 있는 농약의 잔류량을 측정할 수 있을 뿐 농약의 반감기나 작물의 상태를 고려하지 않은 결과이다.

미생물을 이용한 EBDC계 잔류농약 측정법은 신속하고 민감한 방법으로 그 유용성이 증명되었다(대만농업연구소, 1990). 이 방법은 Kit화가 가능하여 시간이 절약되고 누구나 간편하게 측정할 수 있으므로 거의 무제한적인 수의 시료에 대하여 측정할 수 있으며 허용기준을 초과한 시료에 대해서만 정밀분석을 실시하여 상당한 비용절감을 가져올 수 있어 잔류농약검사 대상의 시료량을 확대하여 보다 정확한 잔류량을 측정하여 안전한 우리농산물에 대한 대외 신뢰도를 한층 높이고 국제경쟁력을 키워 우리농업의 기반을 지킬 수 있을 뿐만 아니라 수입농산물에 대한 규제를 강화할 수 있게 될 것이다.

그러나 대만의 B.T를 이용한 EBDC계 잔류농약 측정법은 검출한계가 높고 Kit

로 사용하는 미생물활성의 안정성과 실용성에 의문이 가고 또한 집파리의 AChE를 이용한 유기인계와 카바메이트계 잔류농약 측정 Kit는 측정할 때마다 사용되는 효소의 공급문제와 대상농약의 수를 증대시킬 수 있는 효소의 민감성 문제에 봉착하게 된다. ELISA 검색법은 각 농약별로 항체를 제조하여 Kit를 개발하여야 하며(우리나라 사용 농약은 약 200여종) 측정 시 특수한 기자재(ELISA Reader 등)을 필요로 하는 등 단점을 갖고있다. 아울러 대만에서 사용하는 농약과 우리나라에서 사용하는 농약의 차이를 극복해야 하며 실제로 농가나 지도소 수준에서 검사하는데 다양한 기기나 기구가 필요하고 숙련된 기술자가 필요할 뿐만 아니라 현장측정에 실용화하는 데는 불편한 점을 나타내고 있다.

이러한 맥락에서 본 연구는 B.T 보다 EBDC계 살균제에 민감하고 성장속도가 빠른 미생물을 선발하여 간편, 신속하고 저렴한 잔류농약 측정용 Kit를 개발하여 농산물의 생산, 유통 및 소비단계에 보급하여 누구나 손쉽게 잔류농약을 측정할 수 있게 하여 광범위한 농산물 잔류농약을 측정하여 안전한 우리농산물 생산과 농약의 안전한 사용분위기 확산으로 국민의 건강을 지키고 우리농업의 대외경쟁력을 키우고 수입농산물에 대한 규제를 확실히 하는 계기를 만들 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. EBDC계 살균제의 감수성 미생물 선발
  - 가. 균주의 분리와 EBDC계 살균제에 대한 감수성 조사
  - 나. Top agar plate test를 통한 mancozeb에 대한 감수성 조사
  - 다. 액체배지를 이용한 mancozeb에 대한 감수성 조사
  - 라. 효모, 방선균 및 곰팡이의 mancozeb에 대한 감수성 조사
    - 1) 효모의 감수성 실험
    - 2) 방선균의 감수성 실험
    - 3) 곰팡이의 감수성 시험
  - 마. EBDC계 살균제에 대한 최소생육 저해농도 산정
  - 라. EBDC계 살균제에 감수성 균주의 선정 및 동정
2. 감수성 미생물의 최적배양 조건 확립
  - 가. 최적배양 pH 확립

- 나. 최적배양 온도 확립
- 다. 최적배양 배지 확립
- 3. 미생물과 EBDC계 농약과의 반응성과 과채류 중 잔류농약 추출법 조사
  - 가. 감수성 미생물의 EBDC계 살균제에 대한 최소검출한계 결정
    - 나. 잔류농약 검출 환경의 결정
    - 다. 추출용매, 발색제, 미생물 배양배지 및 반응정지제의 보관 및 안정성 측정
    - 라. 과채류 종류별 미생물과 EBDC계 농약과의 반응성 조사
- 4. 감수성 효소 탐색 및 특성조사
  - 가. D-lactate dehydrogenase의 EBDC계 살균제에 대한 감수성 실험
  - 나. L-malate dehydrogenase의 EBDC계 살균제에 대한 감수성 실험
  - 다. CMB03의 dehydrogenase의 기질종류에 따른 EBDC계 살균제에 대한 민감성 조사
    - 라. EBDC계 살균제와  $\text{NAD}^+$  및  $\text{NADH}$ 와의 관계조사
    - 마. CMB03 조효소 추출액의 최적반응 조건 조사
    - 바. 감수성 효소 확인 및 검증
- 5. 잔류농약 측정 체계와 Kit의 생산체계 확립
  - 가. *Bacillus* sp. CMB03 균 배양액을 이용한 잔류농약 측정법
  - 나. *Bacillus* sp. CMB03 균 alginate bead를 이용한 잔류농약 측정법
  - 다. 시범 Kit의 잔류농약 측정민감성, 재현성, 간편성, 신속성 및 사용균주의 안전성과 안정성
- 6. 잔류농약 측정용 시범 Kit 이용결과에 기초한 잔류량 측정법 수립
  - 가. 현장시료에서 정형화된 잔류농약 측정법(CS2 법)과 새로 개발한 Kit와의 비교
    - 나. 잔류농약 측정의 정확성, 분석시간 등 경제적 타당성 평가

## 제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 서 설

EBDC(ethylene bisdithiocarbamates)계 살균제는 세계적으로 널리 사용되고 있는 농약으로 1960년대에 처음 국내에서 생산되어 현재까지도 사과, 포도, 감귤, 배, 감, 수박, 토마토 등 과일과 고추, 양파, 오이, 감자, 참깨, 땅콩 등 채소에 널리 사용되고 있으며 만코지수화제를 비롯한 만프로수화제, 메타실엠수화제, 부탄엠수화제, 싸이몯사닐·만코지수화제, 옥사실엠수화제, 타로만수화제, 펜부코나졸·만코지수화제, 포스만수화제, 휘나리·만코지수화제, 만코지과립수화제 등 11가지 제품이 시판되고 있다. EBDC계 살균제는 환경이나 식물체중에서 분해 또는 대사되어 ETU(ethylene thiourea)를 생성하는데 이물질은 동물에서 기형, 갑상선종양 및 암을 유발하는 독성물질로 밝혀져(Lentza Rizos, C. 1990) 국내외에서 이 물질이 환경에 미치는 영향과 독성에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다.

EBDC계 살균제는 미생물의 TCA cycle내의 dehydrogenase의 활성을 억제하여 살균작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 대만에서 개발한 B.T(*Bacillus thuringiensis*)를 이용한 EBDC계 살균제 색방법은 TTC (triphenyltetrazolium chloride)가 미생물의 TCA cycle내의 dehydrogenase에 의하여 환원되어 Red cola를 나타내는 반응원리를 이용한 측정법으로 그 실용성이 증명되었다.

국내에서는 부분적인 잔류검사기술 개발에 관심을 가지고 있으나 (이 등, 1994; 조 등, 1994) 실용화까지 이어진 경우는 거의 없으며 현재까지도 전통적인 정형화된 기기분석법을 사용하고 있기에 규모가 방대한 국내의 잔류농약 분석작업을 수행하는데는 인력부족 및 시간과 비용이 많이 소모되는 등 원인으로 역부족이다. 비록 유통 농산물 중 잔류농약에 대한 소비자의 우려가 커지면서 유통농산물에 대한 잔류농약검사가 강화되고 있고 실제로 부적합 농산물로 판정되는 사례가 증가하고 있으나 부적합 판정이 나오더라도 해당 농산물은 이미 소비되어 있는 상태이므로 소비자의 불안감이 증폭되어 국산농산물에 대한 불신을 초래하게 되므로 간편하고도 신속하며 경제적인 잔류농약 측정Kit를 개발하여 안전한 농산물의 생산과 공급을 유도하고 소비자의 건강을 보호하여 우리 농산물을 마음놓고 애용할 수 있게 하여 농촌의 실질적인 생활을 보호하는 데 크게 기여할 것이다.

본 연구의 목적은 대만에서 사용한 B.T 보다 우수한 EBDC계 살균제에 민감한 미생물을 선발하여 생육최적조건, 최소생육저해농도, 감수성 효소의 탐색과 검증 및 미생물과 EBDC계 살균제의 반응성과 과채류 중 잔류농약 추출방법에

대한 조사를 실시하고 잔류농약 측정 Kit의 생산체계와 시범 Kit 이용결과에 기초한 잔류량 측정법을 수립하여 농산물의 출하 전 또는 도, 소매시장 그리고 농산물 수출입 등 유통체계에서 소비자 보호를 위한 경제적이고 실용적이며 간편한 측정방법으로 활용될 수 있는 최종목적에 도달할 수 있도록 하는 것이다.

## 제 2 절 EBDC계 살균제의 감수성 미생물 선발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

본 연구에서 사용한 균주는 전라남도 담양, 장성, 고흥 등지의 토양을 대상으로 세균, 효모, 방선균, 곰팡이 등 100여종의 균주를 분리하여 사용하였다.

LB, AIA, YEM, PDA 등 미생물 배지에 사용한 Glucose, Agar, Yeast Extract, Glycerol, Malt Extract, Tryptone, Potato Infusions 등은 BECTON DICKINSON (U.S.A)사 제품을 사용하였으며 기타 시약 NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 등은 First Grade를 사용하였으며 mancozeb은 Sigma(U.S.A)사 제품을 구입하여 사용하였다.

#### 나. 방법

##### 1) EBDC계 감수성 미생물의 분리 및 선발

###### 가) 균주의 분리

적당량(1~5g) 토양을 멸균증류수와 0.85 % NaCl 용액에 첨가한 후 충분히 교반시킨 후 1/1000배로 희석하여 각종 배지(LB, AIA, YEM, PDA)에 적당량(100~150 $\mu$ l)을 도말 하였다. 12시간에서 36시간동안 적절한 온도(25 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C)에서 배양한 후 단일 colony를 분리하였다. 분리된 각 균주들을 액체배지 및 고체배지(PDA slant medium)에서 배양하여 15 % glycerol 용액을 첨가한 후 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 종균으로 사용하였다.

Table 1. Culture mediums of microorganisms

Components	LB (Luria-Bertani)	AIA (Actinomyces Isolation Agar)	YEM (Yeast Extract Malt Extract Glucose Agar)	PDA (Potato Dextrose Agar)
Glucose			10g	20g
Agar	15g	15g	15g	15g
NaCl	10g			
Yeast extract	5g		3g	
Potatoe infusions				1L
Glycerol		5g		
Sodium propionate		4g		
Neopeptone			5g	
Malt extract			3g	
Sodium caseinate		2g		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.5g		
Asparagine		0.1g		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.1g		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.001g		
Tryptone	10g			

나) EBDC계 살균제에 대한 균주의 감수성 및 특성 조사

분리한 균주들을 대상으로 EBDC계 살균제의 대표적인 농약 mancozeb의 존재하에서 균주의 증식상태를 비교 관찰한 후 민감성을 나타내는 균주들을 Top agar plate test 방법과 액체 배지에서 증식곡선 산정을 통해 민감성 균주를 선발하였으며 B.T (*Bacillus thuringiensis*) 와 비교실험도 실시하였다. Top agar plate test는 plate에서의 균주의 colony 형성정도를 육안으로 관찰하고 곰팡이들은 YEM(Yeast extract malt) 고체배지를 이용하였으며 L.B 액체배지를 사용한 경우 대만에서 개발한 잔류농약 측정법(대만농업연구소, 1990)을 참고로 발색제 TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride)를 이용하여 민감성 여부를 육안 및 spectrophotometer 로 측정하였다.

TTC는 Tetrazolium salt의 일종으로 생체내의 효소에 의한 환원반응을 통해



가시광선 영역에서 붉은색을 나타내며 spectrophotometer (484nm)에서 흡광도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이와 같은 TTC의 성질을 이용하여 미생물의 증식을 통한 발색정도의 변화를 통해 균주의 mancozeb 민감성 여부를 확인하였다(Fig. 1).

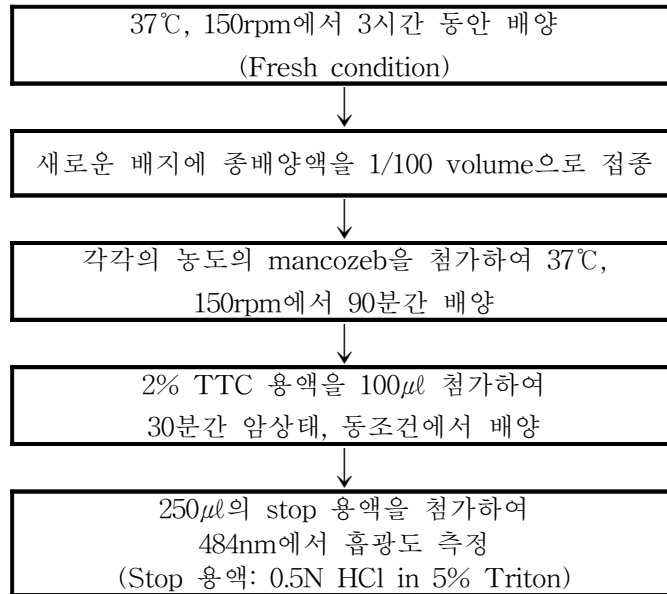


Fig. 1. Diagram of mancozeb sensitivity (TTC) test

다) Top agar plate test를 통한 mancozeb에 대한 감수성 조사

LB 액체배지에서 12시간 동안 배양한 각 균주들을 0.85 % NaCl 용액에 적정 농도(1/1000 ~ 1/10000)로 희석한 후 mancozeb을 농도별로 처리하고 30분간 추가 배양한다. 100µl의 sample에 멸균된 Top agar를 5ml 첨가한 후 LB 고체배지에 부어준 다음 적정 온도에서 16시간 동안 배양한 후 plate에 형성된 colony를 확인하여 대조군과 비교하는 방법을 통해 mancozeb 감수성 여부를 확인하였다. 여러 차례의 균주 분리 실험을 통해 100여 가지의 균주 중에서 mancozeb에 민감한 증식을 나타내는 strain들을 분리하였다.

라) 액체배지를 이용한 mancozeb에 대한 감수성 조사

LB 액체 배지를 이용하여 분리한 균주들을 대상으로 mancozeb에 대한 민감성 여부를 확인하였으며, 균주의 증식 최적상태를 위해 각 균주들은 12시간동안 배양하였으며 이를 종균으로 사용하여 TTC test를 실행하였다.

마) 효모, 방선균 및 곰팡이의 mancozeb에 대한 감수성 조사

효모는 공시 균주인 *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077, *Saccharomyces cerevisiae var diastaticus* ATCC 28338, *Pichia stipitis* CBS7126의 3종을 사용하였고 방선균은 *Streptomyces antimycoticus* KCTC9775를 이용하였으며 곰팡이는 비 병원성 6 strain을 이용하였다.

(1) 효모의 감수성 실험

효모 3개 strain을 full growth 한 상태의 배양액을  $10^{-4}$ 으로 희석한 후 멸균된 YPD 배지에 Bacto-Agar를 0.7 % 농도로 첨가하고 50℃로 냉각한 후 10 ml씩 분주하였다. 각 농도의 mancozeb을 첨가하고 잘 혼합한 다음 희석한 배양액 100 $\mu$ l씩을 첨가한 후 Top Agar Plating을 실시하였으며 *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077 에 대한 증식속도 실험을 행하였다.

(2) 방선균의 감수성 실험

균주는 *Streptomyces antimycoticus* KCTC9775를 사용하였고 배지는 AIA(Atinomyces Isolation Agar)배지를 사용하였다.

배양조건: 28℃, shaking incubator에서 150rpm 으로 18 시간동안 배양하였다.

(3) 곰팡이의 감수성 실험

PDA(Potato Dextrose Agar)배지에 mancozeb을 처리한 다음 곰팡이 strain를 이식하고 증식시켜 곰팡이의 증식 속도 및 사멸 여부를 관찰하였다.

배양조건: 28℃, shaking incubator에서 150rpm 으로 36~48시간 배양하였다.

2) EBDC계 살균제에 대한 최소생육저해농도 (MIC) 산정

Mancozeb에 대한 MIC(Minimum Inhibition concentration)값을 산정하기 위해 mancozeb에 감수성을 갖는 CMB03, CMB04, CMB05, CMB11, CMB26, CMB27, CMB32, CMB52, CMB55, CMB61 등 균주들과 대만에서 사용된 B.T(*Bacillus thuringiensis*)균주와 비교하여 top agar plating을 실시하였다.

각 균주들을 LB(Luria-Bertani)배지에서 37℃, 10시간 진탕 배양한 후 0.85 % NaCl 용액으로 1/100되게 희석하고 37℃에서 30분 동안 방치한다. 다시 1/10000로 희석한 후 3 ml의 top agar에 mancozeb 용액(0.05ppm, 0.1ppm, 0.2ppm)을 첨가하고 100 $\mu$ l의 균주 희석액을 첨가한 다음 top agar plating을 실시하고 각 plate를 37℃에서 12시간동안 배양한 후 Colony의 크기와 수를 관찰하여 증식정도를 조

사하였다. 아울러 mancozeb에 의한 증식억제 정도를 확인하기 위해 선발된 균주들을 대상으로 mancozeb 존재 하에서의 증식곡선을 산정하였으며, B.T와 일반적인 대조균인 *E. coli* DH5a와 비교실험을 실시하였다.

### 3) 균주의 선정 및 동정

이상의 연구 결과에 기초하여 CMB03 균주를 EDBC계 농약 검색용 Kit 제조에 사용하기로 최종 결정하고 균주의 안전성 여부를 확인하기 위해 16s rRNA 염기서열을 조사하여 동정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

Table 1 과 같은 여러 가지 배지를 이용하여 토양 중에서 100여종의 미생물을 분리하여 EBDC계 살균제의 대표적인 농약 mancozeb의 존재하에서 균주의 증식상태를 비교 관찰한 후 민감성을 나타내는 균주들을 Top agar plate test 방법과 액체 배지에서 증식곡선 산정을 통해 민감성 균주를 선발하였으며 B.T (*Bacillus thuringiensis*) 와 비교실험도 실시하여 그 결과를 아래와 같이 정리하였다.

### 가. 균주의 분리와 EBDC계 살균제에 대한 감수성 조사

#### 1) Top agar plate test를 통한 mancozeb에 대한 감수성 조사

분리한 균주들 중 EBDC계 살균제에 민감성 스크리닝을 실시하여 높은 민감성을 나타내는 균주들의 실험 결과를 아래와 같이 보여 주었다.

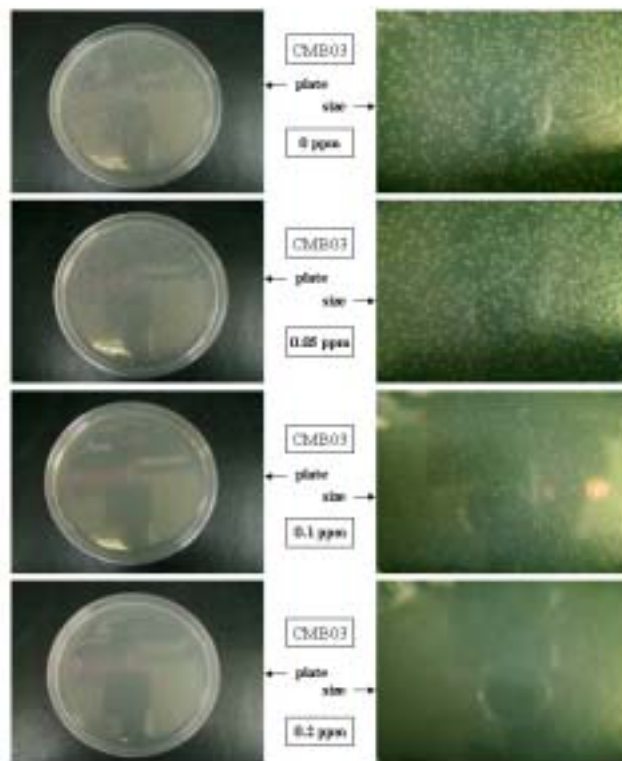


Fig. 2. Top agar plating of CMB03 on LB Plaste with several concentrations mancozeb

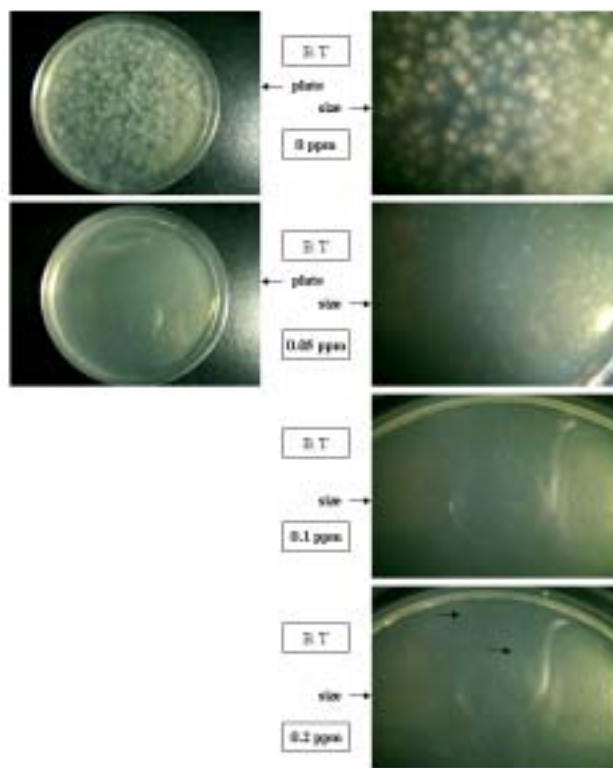


Fig 3. Top agar plating of *Bacillus thuringiensis* on LB Plaste with several concentrations mancozeb

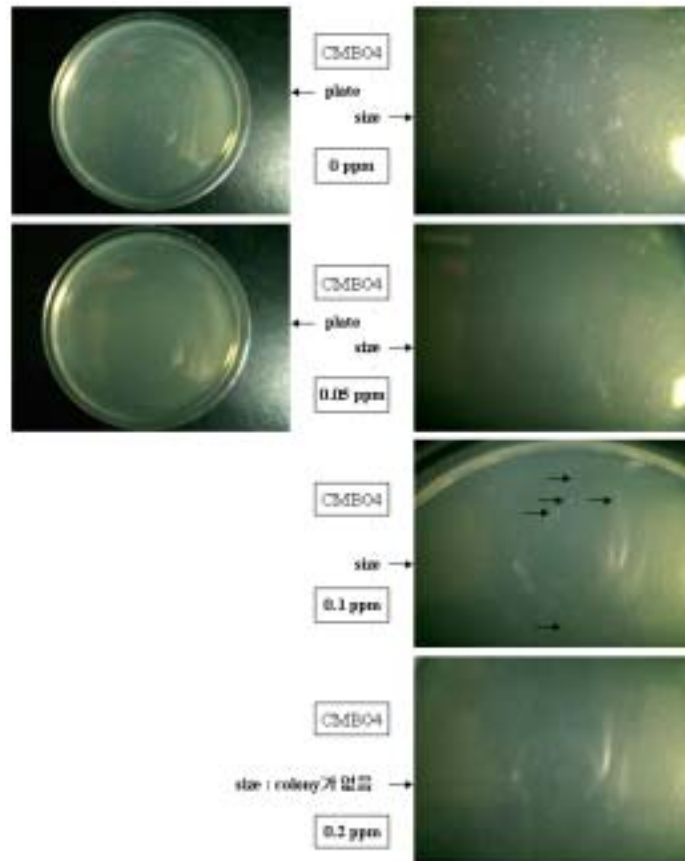


Fig 4. Top agar plating of CMB04 on LB Plaste with several concentrations mancozeb

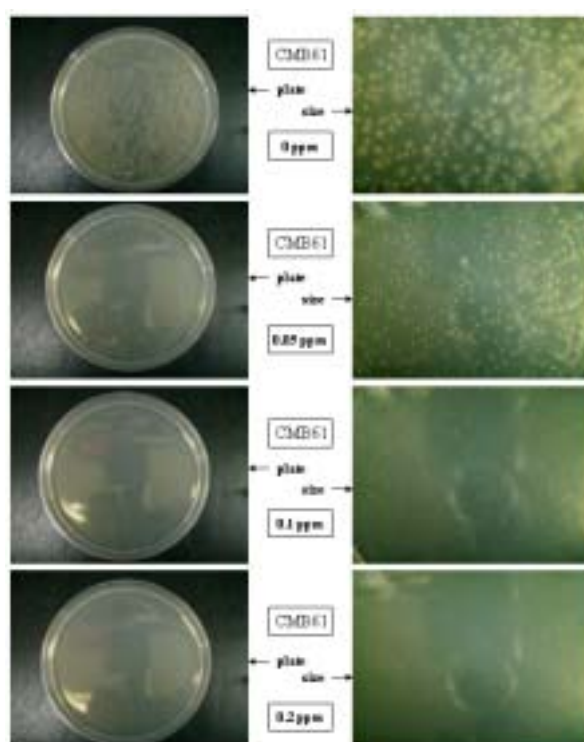


Fig 5. Top agar plating of CMB61 on LB Plaste with several concentrations mancozeb

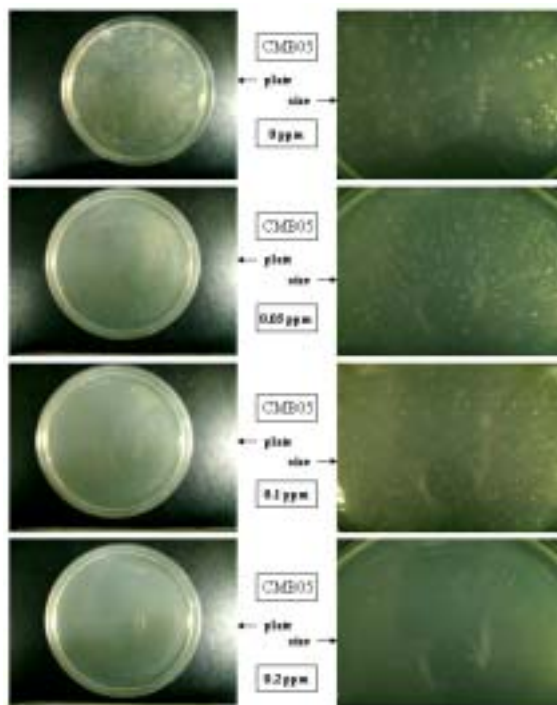


Fig 6. Top agar plating of CMB05 on LB Plaste with several concentrations mancozeb



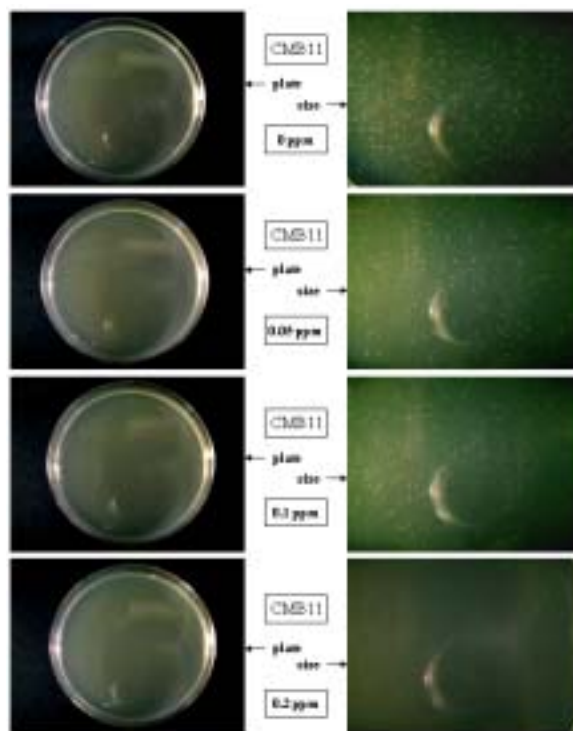


Fig 7. Top agar plating of CMB11 on LB Plaste with several concentrations mancozeb

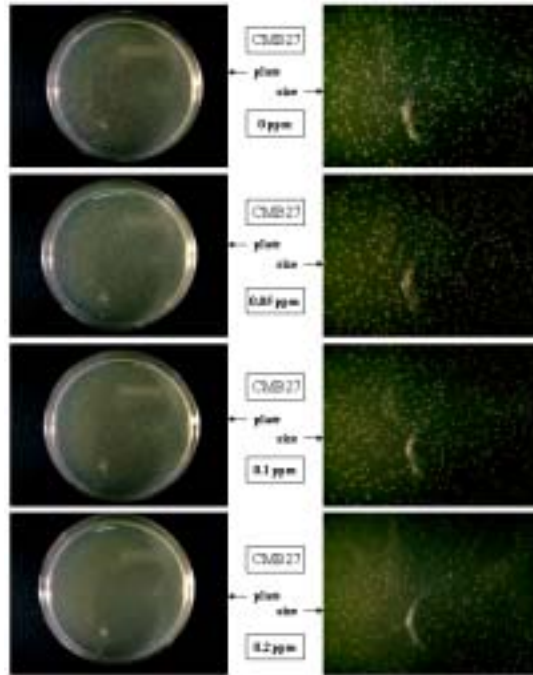


Fig 8. Top agar test of CMB27 on LB Plaste with several concentrations mancozeb

Fig. 2~8까지의 결과에서 알수있는바 CMB03, CMB04, CMB61, CMB05, CMB11, CMB27 등 6가지 균주들은 모두 EBDC계 살균제의 대표적인 농약인 mancozeb에 높은 민감성을 보여주고 있다. CMB03의 경우 0.05 ppm의 농도에서는 control과 비슷한 수의colony가 관찰되었으나 colony size는 약간 감소하였다. 한편, 0.1 ppm의 농도에서는 약 10 %정도의 inhibition을 보여주었으며, 0.2ppm에서는 colony를 거의 관찰할 수 없었다. CMB04의 경우 0.05 ppm에서 colony를 거의 관찰할 수 없으며 CMB61의 경우도 0.1 ppm까지는 colony의 크기만 감소되었으며 0.2 ppm의 농도에서는 99 %정도의 증식 억제를 나타냈으며 CMB05와 CMB11의 경우 0.1ppm 농도에서부터 colony의 수가 감소했으며, 0.2 ppm에서는 약 97 %의 inhibition을 나타냈다.

2) 액체배지를 이용한 mancozeb에 대한 감수성 조사

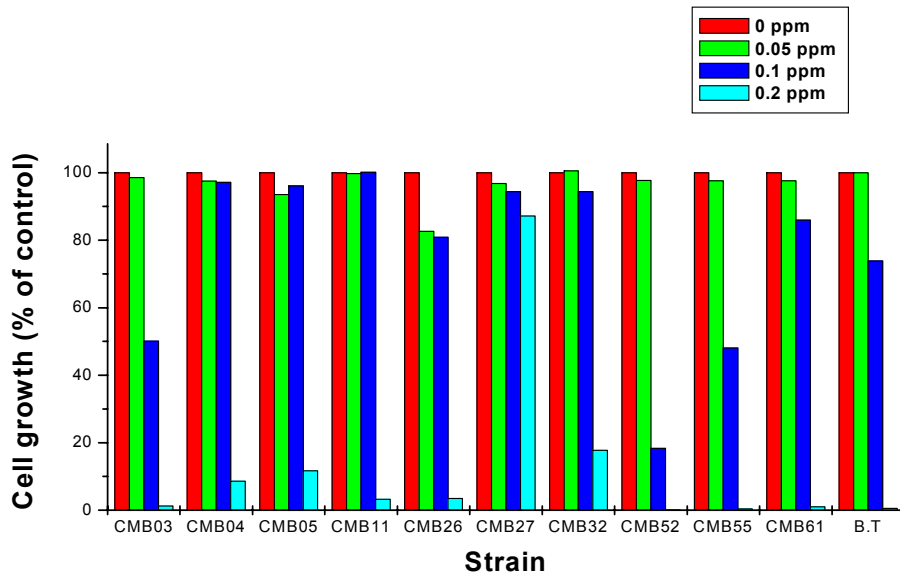


Fig. 9. Growth inhibition rates of several mancozeb sensitive strains

분리된 균주들 중 mancozeb에 높은 민감성을 갖는 균주들에 대한 top agar plate와 액체 배지 배양법을 통하여 확인한 결과는 Fig. 9에 보여준 것과 같이 CMB03, CMB55, CMB52 등 3가지 균주는 0.1 ppm에서 약 50~80 %의 저해율을 보여주고 있어 B.T보다 더 높은 감도를 나타내고 있다.

3) 효모, 방선균 및 곰팡이의 mancozeb에 대한 감수성 조사

가) 효모의 감수성 실험

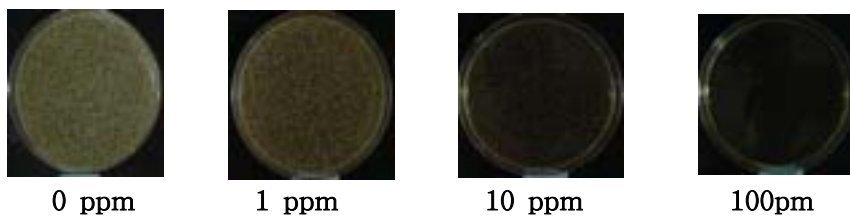


Fig. 10. Top Agar plating of Yeast with Mancozeb on YEM medium

Top Agar Plating 결과는 Fig. 10에서 나타난 것처럼 1 ppm 농도에서는 관찰되는 Colony 수는 비슷하나 Colony size가 감소하여 이러한 결과는 mancozeb 1

ppm 농도에서는 yeast의 증식에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 yeast를 본 연구에 사용할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 증식 곡선을 산정하였다.

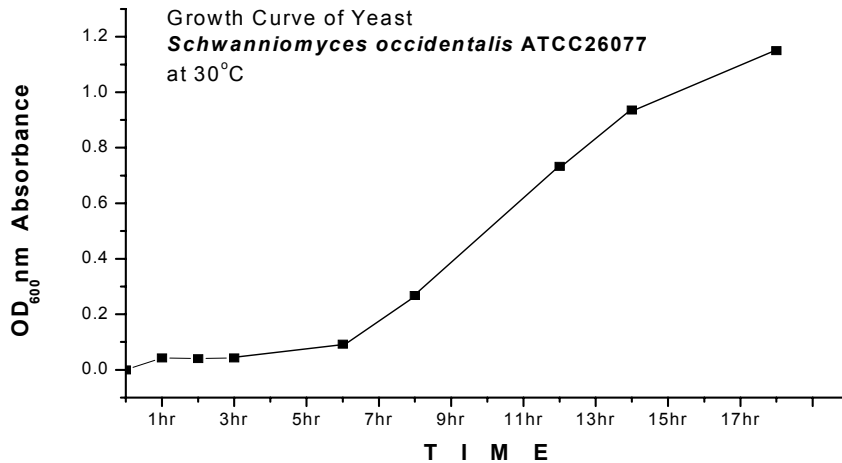


Fig. 11. Growth Curve of yeast *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077

Yeast의 증식곡선은 Fig.11에서 나타낸 바와 같이 *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077의 경우 균주의 증식 속도가 세균 대조군과 비교했을 경우 너무 느리며, mancozeb에 대한 민감성이 너무 낮아(일반세균의 1/100) 본 연구에 사용하기에 부적합한 것으로 나타났다. 한편, 다른 yeast strain들도 모두 너무 느린 증식속도를 나타내었다.

#### 나) 방선균의 mancozeb 대한 감수성 실험



Fig. 12 에서와 같이 방선균은 액체배지에서 배양시에 colony 형태를 가지고 증식하며, 증식속도 또한 매우 느린(full growth time이 7일정도 소요)관계로 본 연구에 부적절한 것으로 확인되었다.

Fig. 12. Growth of *Streptomyces antimycoticus* KCTC9775

다) 곰팡이의 mancozeb에 대한 감수성 실험

PDA 배지에 농도별로 mancozeb을 처리한 후 6개 strain의 곰팡이를 이식하고 증식시켜 곰팡이의 증식 속도 및 사멸 여부를 관찰하여 그 결과를 아래와 같이 정리하여 나타내었다.

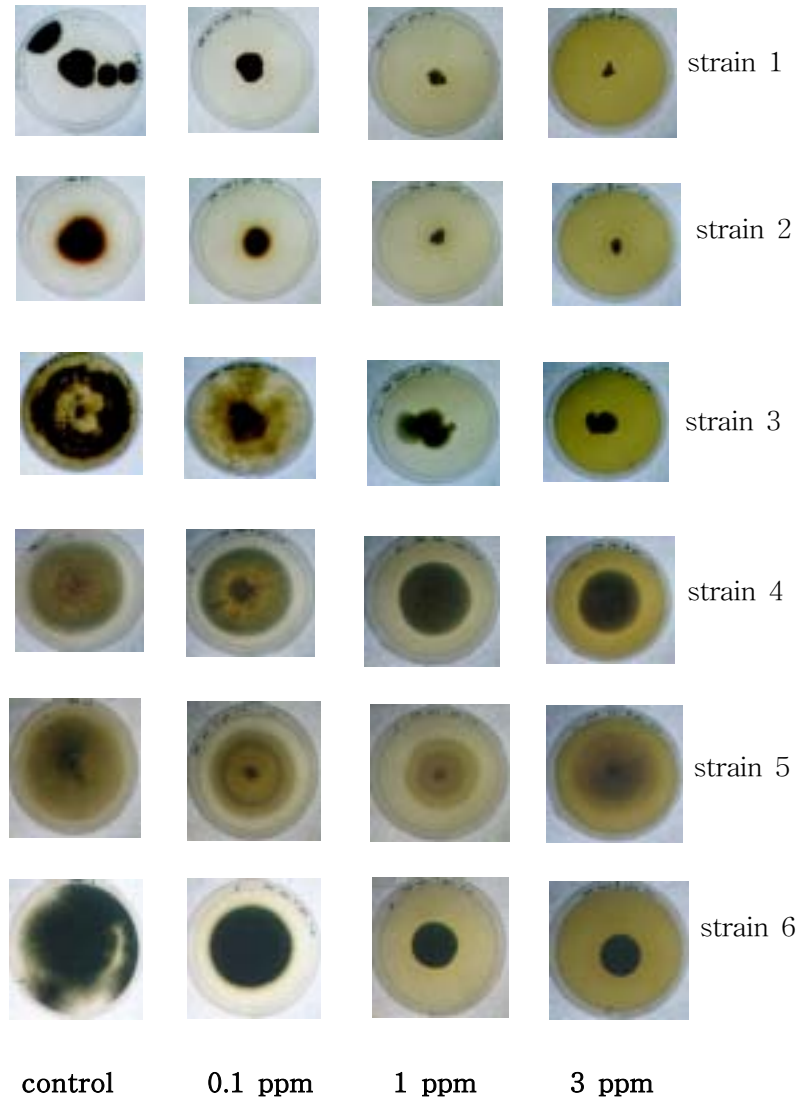


Fig.13. Growth figure of 6 Strains fungi on several concentrations mancozeb

이상의 6개 strain fungi에서 strain 1 과 2, 2개의 strain 이 mancozeb에 미 감성을 나타내는 것으로 나타났으나 증식속도가 너무 느린 관계로 본 연구의 취지에 적합하지 않은 것을 판단이 된다.

나. EDBC계에 대한 최소생육저해농도(MIC)산정

Mancozeb에 대한 MIC(Minimum Inhibition concentration)값을 산정하기 위해 mancozeb에 감수성을 갖는CMB03, CMB04, CMB05, CMB11, CMB26, CMB27, CMB32, CMB52, CMB55, CMB61 등 균주들과 대만에서 사용된 B.T(*Bacillus thuringiensis*)균주와 비교하여top agar plating을 실시하고 각 균주들을 LB(Luria-Bertani)배지에서 배양한 후 Colony의 크기와 수를 관찰하여 증식정도를 조사하였다. 아울러 mancozeb에 의한 증식억제 정도를 확인하기 위해 선발된 균주들을 대상으로 mancozeb 존재 하에서의 증식곡선을 산정하였으며, B.T와 일반적인 대조균인 *E. coli* DH5a와 비교실험을 실시하여 그 결과를 아래와 같이 정리하였다.

1) Top agar plating에 의한 최소생육 저해농도 조사

Table 2. Result of Top Agar Plating with several strains

Strains	Mancozeb (ppm)			
	0	0.05	0.1	0.2
CMB03	100.00	98.55	50.11	1.24
CMB04	100.00	97.52	97.12	8.63
CMB05	100.00	93.53	96.08	11.67
CMB11	100.00	99.69	100.09	3.26
CMB26	100.00	82.63	80.85	3.47
CMB27	100.00	96.79	94.37	87.22
CMB32	100.00	100.52	94.38	17.72
CMB52	100.00	97.66	18.32	0.05
CMB55	100.00	97.58	48.01	0.39
CMB61	100.00	97.59	85.91	1.06
B.T	100.00	100.00	73.53	0.56

Table. 2에서 보여주는 바와 같이 CMB03, CMB55 두 균주는 0.1 ppm의 mancozeb를 처리한 조건하에서 BT보다 더 높은 생장억제를 보여 주고 CMB52는 거의 80 %의 높은 저해율을 나타내었다. 이러한 실험 결과에 근거하여 BT와 *E.coli* DH5a 두 균주와 비교하여 생장곡선 실험을 추가로 실행하여 그 결과를 아래와 같이 보여주었다.

2) 액체배지 생장곡선 산정에 의한 최소생육저해 농도 조사

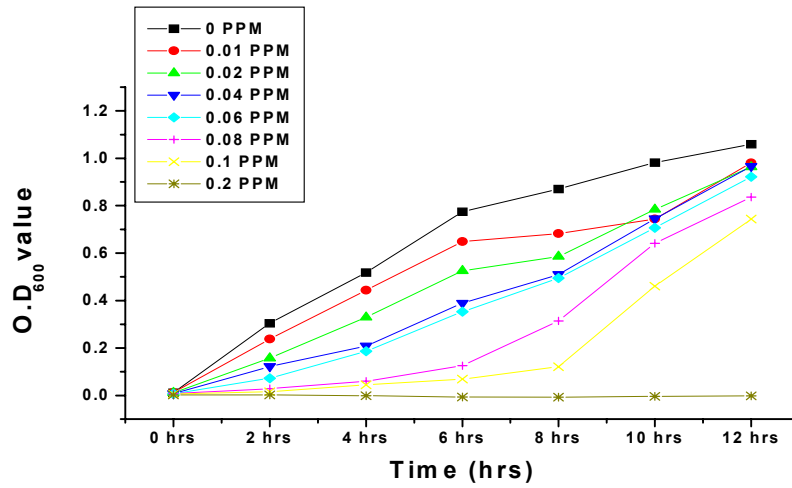


Fig. 14. Growth curve of B.T. containing various concentration of mancozeb

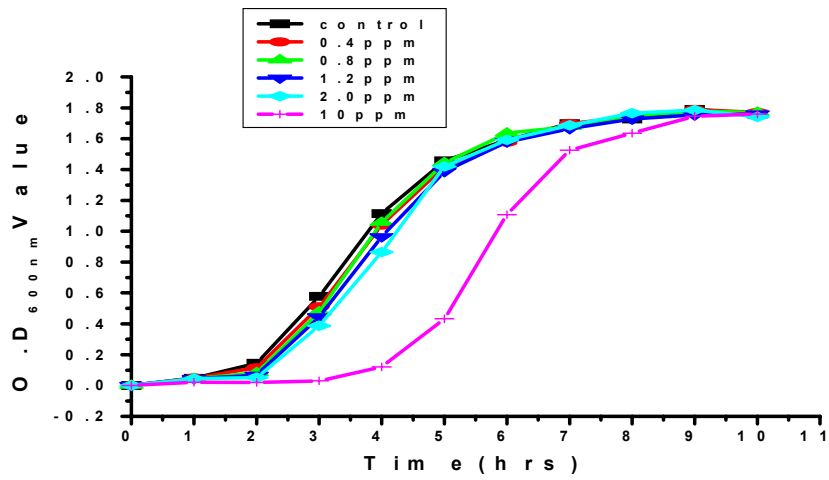


Fig. 15. Growth curve of *E. coli* DH5α on several concentrations mancozeb

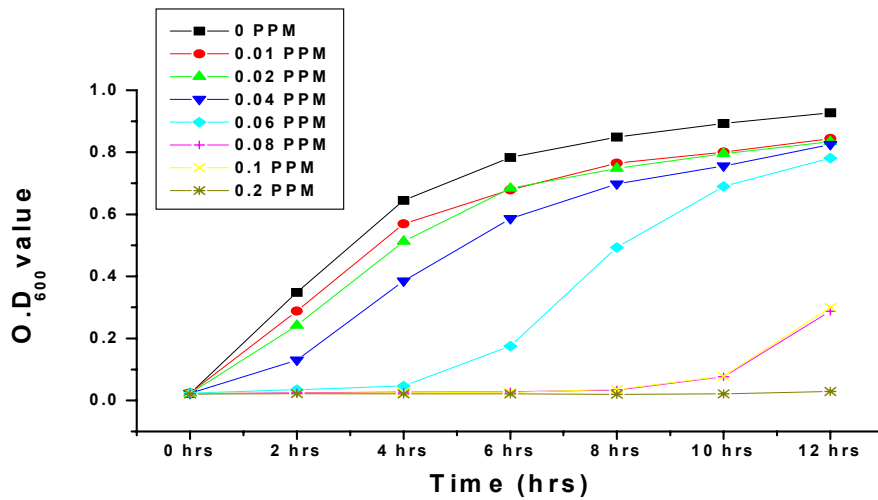


Fig. 16. Growth Curve of CMB03 containing various concentration of mancozeb

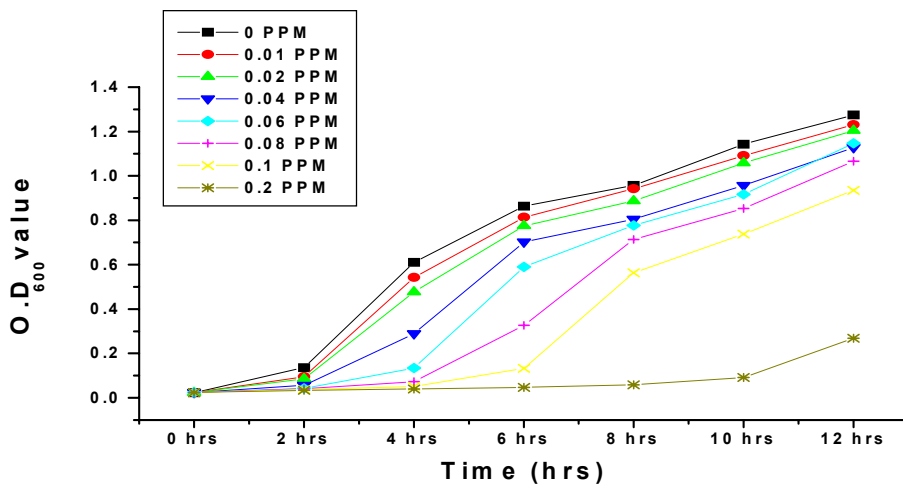


Fig.17. Growth curve of CMB27 containing various concentration of mancozeb



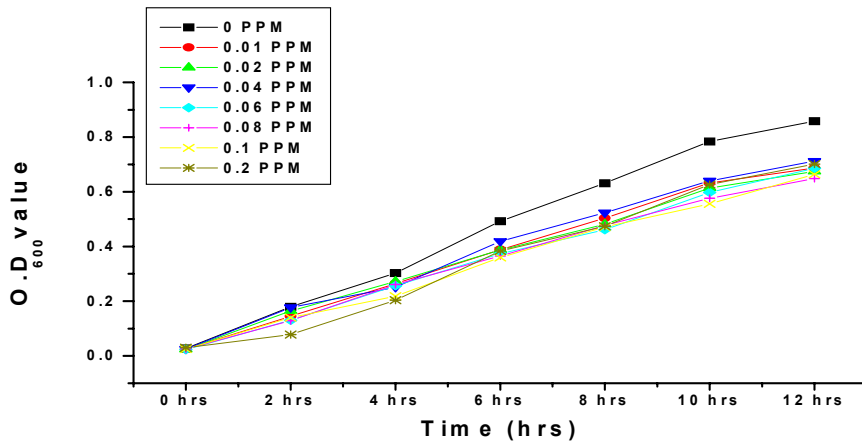


Fig. 18 Growth curve of CMB52 containing various concentration of mancozeb

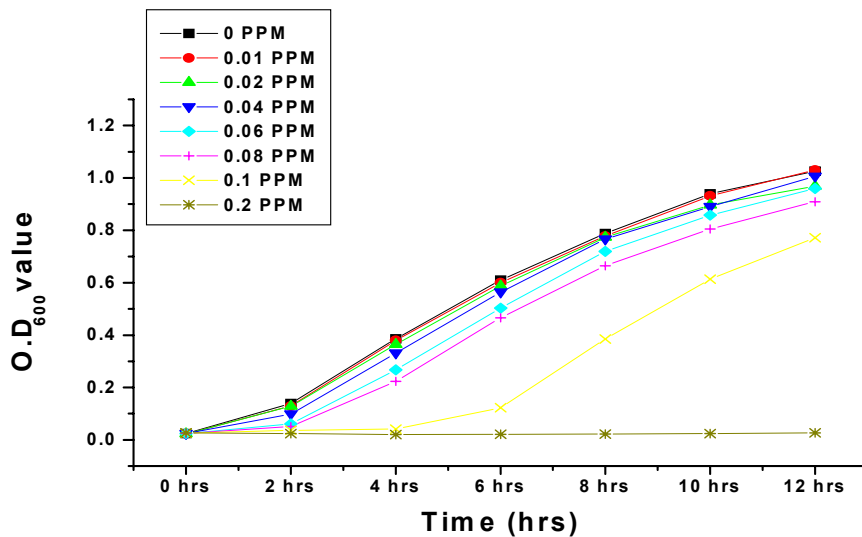


Fig. 19 Growth curve of CMB55 containing various concentration of mancozeb

Fig. 14~19의 결과는 mancozeb에 높은 감수성을 갖는 CMB03, CMB27, CMB52, CMB55 그리고 CMN61 등 5 가지 균주들을 액체배지에서 생장곡선 실험을 수행하여 BT와 *E coli* DH5a 두 가지 균주와 비교하여 보여주고 있다. B.T는 0.1 ppm 의 저 농도 mancozeb를 처리한 배지에서 8시간 동안 거의 성장을 하지않았으며 0.08 ppm에서는 4시간 동안 성장을 하지않는 것으로 나타나 EBDC계 살균제에 상당히 민감한 억제력을 받는다. 반면에 *E coli* DH5a는 이 2 ppm의 높은 농도의 mancozeb 에서도 무처리 배지에서와 비슷한 증식속도를 나타내어 EBDC계 살균제에 대한 민감성이 현저하게 낮음을 확인 할 수 있었다. CMB03은 0.02 ppm까지는 control과 비슷한 성장속도를 나타냈지만, 0.04 ppm부터 growth inhibition이 2시간 경과부터 보이기 시작하며 6시간 경과까지는 control 보다 다소 낮은 O.D600 value를 보여주지만 8시간 경과부터는 control과 비슷해졌다. 한편, 0.06 ppm에서는 4시간까지는 zero time과 비슷한 O.D600 value를 나타내며 4시간 경과 후부터 성장하기 시작하여 12시간 경과 시 control과 비슷한 값을 나타냈다. 그리고, 0.08 ppm 과 0.1 ppm에서는 8시간 경과 후부터 성장하기 시작하였으며, 0.2 ppm에서는 12시간까지 성장하지 못하였으며 CMB03의 generation time은 약 27분으로 산정되었다. 이러한 결과를 기초로 CMB03의 최소생육저해농도를 0.2 ppm으로 산정하는 것이 가장 적합할 것으로 판단된다.

그 외의 3가지 균주 CMB27, CMB52, CMB55 는 mancozeb에 대하여 비교적 낮은 감수성을 보였다. 특히 CMB52 균주는 Top agar plate에서는 80 %에 달하는 성장억제율을 보였지만 성장속도가 너무 느린 원인을 본 연구에 적합한 균주가 아닌 것을 판단하였다.

한편 CMB03, CMB61등 균주와 BT균주와 비교하여 O.D600nm와 O.D484nm에서의 값을 측정하여 이들 균주의 성장억제율과 TTC formazan을 형성하는 관계를 조사하여 그 결과를 아래와 같이 나타내었다.

### 3) O.D600nm 과 O.D484nm 값의 상관관계의 측정

한편, O.D600nm값과 TTC의 환원량을 측정하는 O.D484nm값의 상관관계를 알아보기 위해 O.D600nm 값이 1인 배양액 50  $\mu$ l를 5ml LB broth에 접종한 후 50분 후에 mancozeb을 첨가하였다. 단위 ml당 O.D600 값이 0.01되게 5ml LB broth에 접종한 후 30분 후에 mancozeb을 첨가하였으며, mancozeb 첨가 후 90min을 배양한 후 2 % TTC를 250 $\mu$ l 첨가한 후 30min을 배양한 다음 O.D484nm에서 흡광도를 측정하여 TTC의 환원을 통해 형성된 water insoluble formazan과의 관계를 알아보기 위해 O.D484nm값과 OD600nm값을 비교하였다.

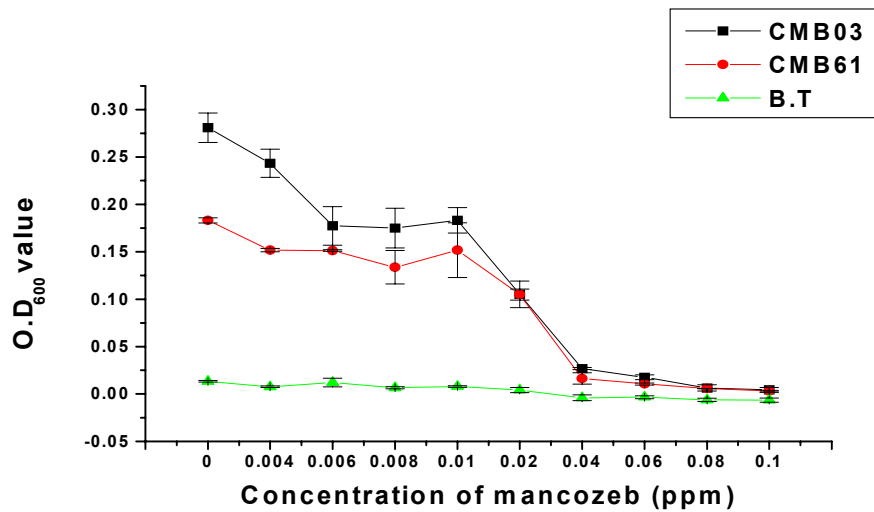


Fig. 20. O.D600 value of CMB03, CMB61 and B.T containing of several concentrations mancozeb

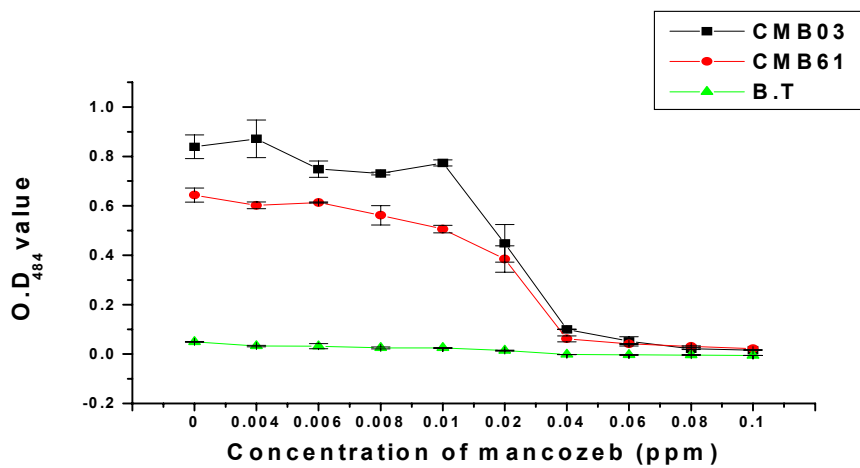


Fig. 21. O.D484nm Value of CMB03, CMB61 and B.T containing several concentration of mancozeb

Table 3. Comparison of OD484nm and OD600nm value

Strain	CMB03		CMB61		B.T	
	OD600nm	OD484nm	OD600nm	OD484nm	OD600nm	OD484nm
0 ppm	0.2809	0.8391	0.1831	0.6434	0.0134	0.0491
0.004 ppm	0.2434	0.8713	0.1517	0.6022	0.0075	0.0324
0.006 ppm	0.1773	0.7483	0.1513	0.6133	0.0121	0.0322
0.008 ppm	0.1751	0.7309	0.1337	0.5617	0.0066	0.02495
0.01 ppm	0.1831	0.7734	0.1516	0.5060	0.0079	0.02495
0.02 ppm	0.1051	0.4482	0.1053	0.3850	0.0041	0.0143
0.04 ppm	0.0268	0.1004	0.0164	0.0617	-0.0041	-0.0015
0.06 ppm	0.0177	0.0517	0.0105	0.0413	-0.0034	-0.0031
0.08 ppm	0.0064	0.0218	0.0058	0.0307	-0.0062	-0.0036
0.1 ppm	0.0043	0.0162	0.0031	0.0222	-0.0064	-0.0056

CMB03, CMB61 등 균주와 BT균주와 비교하여 O.D600nm와 O.D484nm에서의 값을 측정하여 이들 균주의 성장억제율과 TTC formazan을 형성하는 관계를 조사한 결과 실험시의 오차를 감안할 경우 두 값은 서로 상관관계를 갖고있는 것으로 나타났다. CMB03과 CMB61 균주는 저농도 0.04 ppm mancozeb에서 BT 보다 낮은 억제율을 보였으나 성장속도는 오히려 빠르고 0.1 ppm 이상에서는 상당히 민감한 감수성을 나타냈다. CMB03 과 CMB61 두 균주를 B,T 및 *E.coli*와 비교하여 성장속도를 조사해본 결과 CMB03과 CMB61은 배양 2시간부터 상당히 빠른 성장속도를 보여준 반면 B,T 및 *E. coli*는 4시간까지 거의 성장을 하지 않는 것으로 나타내었으며 CMB03과 CMB61의 성장속도를 비교하여 볼 때 CMB03이 CMB61보다 더 빠른 성장속도를 보여주었다. 아울러 CMB03과 CMB61 두 균주와 B,T를 비교하여 mancozeb를 농도별로 처리한 배지에서 그들의 증식정도를 증식곡선을 작성하여 조사한 결과 CMB03은 무처리에서 상당히 빠른 증식을 보이거나 mancozeb 0.06 ppm에서 매우 낮은 증식을 보여주며 0.08 ppm부터는 CMB61보다 더 낮은 증식을 보여주었다.

CMB03균주와 B,T와 비교하여 mancozeb을 농도별로 처리한 top agar plating 실험과 성장저해율 조사를 실행한 결과에서 보여준 바와 같이 CMB03균주는 0.04 ppm 의 mancozeb에서 약 50 %의 성장저해율을 나타냈고 0.02 ppm에서도 약 20 % 에 가까운 저해율을 보여주어 매우 낮은 최소생육 저해농도를 갖는 민감한 균주로서 EBDC계 잔류농약 진단 Kit로 사용하는 목적에 적절할 것으로 판단된다.

다. 감수성 미생물 선정 및 동정

본 연구에 사용할 균주를 선정하기 위해 위와 같은 실험에서 확인된 결과들을 분석한 결과 CMB03 균주를 EDBC계 살균제의 잔류농약 검색용 Kit 제조에 사용하기로 최종 선정하였다. 또한, 균주의 안전성 여부를 확인하기 위해 균주 동정을 실시하였다. 16s rRNA 염기서열을 분석하여 CMB03을 *Bacillus sp.* CMB03으로 명명하기로 하였으며, NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 AF406633의 accession number를 부여받았다.

AF406633. *Bacillus sp.* CMB03...[gi:15217162]

Bacillus sp. CMB03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|15217162|gb|AF406633.1|AF406633[15217162]

LOCUS AF406633 1513 bp DNA linear BCT 21-AUG-2001

DEFINITION Bacillus sp. CMB03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AF406633

VERSION AF406633.1 GI:15217162

KEYWORDS

SOURCE Bacillus sp. CMB03.

ORGANISM Bacillus sp. CMB03

Bacteria; Firmicutes; Bacillus/Clostridium group;

Bacillus/Staphylococcus group; Bacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1513)

AUTHORS No,S.M., Bae,H.W. and Chi,Y.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-AUG-2001) Molecular Genetics Laboratory, Genetic  
Engineering Department, Chonnam National University, 300

Yongbongdong, Bukgu, Gwangju 500-757, South Korea

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1513  
/organism="Bacillus sp. CMB03"  
/strain="CMB03"  
/db\_xref="taxon:168811"

rRNA <1..>1513  
/product="16S ribosomal RNA"

BASE COUNT 391 a 345 c 465 g 312 t

ORIGIN

1 ttggtcaga acgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg aatggattaa  
61 gagcttgctc ttatgaagtt agcggcggac gggtagtaa cacgtgggta acctgccat  
121 aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga taacatttg aactgcatgg  
181 ttcgaaattg aaaggcgctc tcggctgtca cttatggatg gaccgcgctc gcattagcta  
241 gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcgtagc cgacctgaga gggtagcgg  
301 ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttc  
361 gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggctt tcgggtcgt  
421 aaactctgtt gttagggaag aacaagtgtc agttgaataa gctggcacct tgacggtaac  
481 taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgag gtaatacgtg gttggcaagc  
541 gttatccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggtggt ttcttaagtc tgatgtgaaa  
601 gccacggct caaccgtgga gggcattgg aaactgggag acttgagtgc agaagaggaa  
661 agtggaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatat ggaggaacac cacgtggcga  
721 aggcgacttt ctggtctgta actgacactg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat  
781 tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgagtgtca agtgtagag gtttccgcc  
841 ctttagtctc gaagtaacg cattaagcac tccgctggg gagtacggcc gcaaggctga  
901 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggtt aattcgaagc  
961 aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat cctctgaaaa ccctagagat agggcttctc  
1021 cttcgggagc agagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgctg tgagatgtg  
1081 ggtaagtcc cgcaacgagc gcaaccctg atcttagttg ccatcattta gttgggcaact  
1141 ctaaggtgac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgactcaaa tcatcatgcc  
1201 cttatgacc tgggctacac acgtgtaca atggacagaa caaagggcag cgaaccgcg  
1261 aggttaagcc aatcccaca atctgttctc agttcggatc gcagtctgca actcgactgc  
1321 gtgaagctgg aatcgctagt aatcgggat cagcatgccg cggtaatac gttccggg  
1381 cttgtacaca ccgcccgtca caccagaga gtttgaaca cccgaagtcg gtgaggtaac  
1441 ctttaggag ccagccgcc aaggtgggac agatgattgg ggtgaagtcg taacaaggta  
1501 gccgtatcgg aag

### 제 3 절. 감수성 미생물의 최적배양 조건

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 재료

미생물은 본 연구에서 분리 및 동정을 하여 선발한 *Bacillus sp.* CMB03을 이용하였으며 배양배지는 완전배지 L. medium, YT medium 및 LB medium을 사용하였다.

##### 나. 방법

##### 1) 감수성 미생물의 최적배양 온도 확립

EBDC계 감수성 미생물 CMB03의 최적배양온도를 선정하기 위하여 28℃, 37℃, 50℃ 3가지 온도조건하에서 증식곡선을 조사하였다.

##### 2) 감수성 미생물의 최적배양 pH 확립

감수성 미생물의 최적배양배지를 확립하기 위하여 배지의 pH를 5~9 범위에서 달리하면서 미생물의 증식율을 조사하여 최적배양 pH를 확립하였다.

##### 3) 감수성 미생물의 최적배지 확립

CMB03의 최적배지 즉, 가장 빠른 증식을 나타내는 배지를 선택하기 위하여 완전배지를 중심으로 YT medium, L medium, LB medium을 사용하여 최적배지를 조사를 실시하였다.

배지조성은 L medium는 polypeptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L로, YT medium는 Pancreatic digest of casein 8g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L로 LB medium는 Tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L등 으로 조성되었다.

#### 2. 결과 및 고찰

##### 가. 감수성 미생물의 최적배양 온도 확립

본 연구에 사용한 CMB03의 최적배양온도를 선정하기 위해 온도구간을 28℃, 37℃, 50℃로 나누어 각각의 증식 곡선을 조사하여 그 결과를 Fig. 22와 23에 보여주었다.

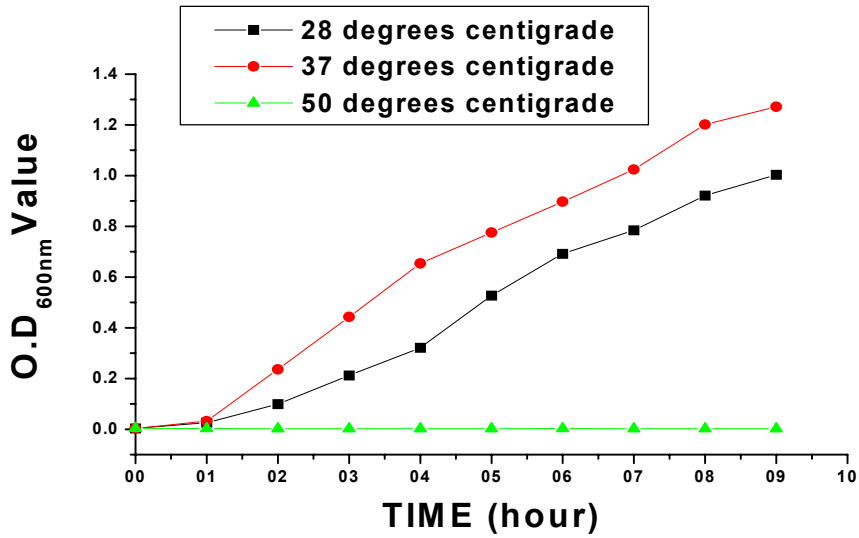


Fig. 22. Growth curve of CMB03 on several temperature condition

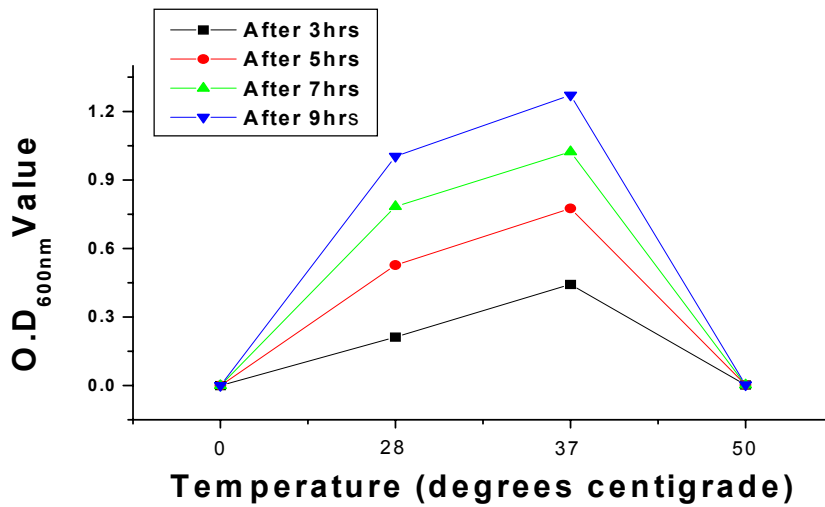


Fig. 23. O.D.600nm value of CMB03 on several temperature after 3hrs, 5hrs, 7hrs, 9hrs culture

Fig. 22는 각기 28℃, 37℃, 50℃ 3가지 온도 조건에서 10시간 동안 미생물을 배양하면서 미생물의 성장상태를 시간별로 O.D600nm 값을 측정하는 것으로 조사한 결과로서 37℃에서는 2시간 때부터 신속한 성장을 보이고 있으며 또 Fig. 23의 결과에서도 37℃에서는 배양 3시간 후 30% 이상의 성장을 보였고 7시간 후에는 충분한 성장을 가져오는 것으로 나타나 최적배양온도를 37℃로 선정하는 것이 가장 적합한 것으로 판단된다.



나. 감수성 미생물의 배양 최적 pH 확립

CMB03의 최적pH를 선정하기 위해 pH5~9까지의 범위에서 균주의 증식곡선을 산정하는 것으로 최적배양 pH를 조사하여 아래와 같이 나타내었다.

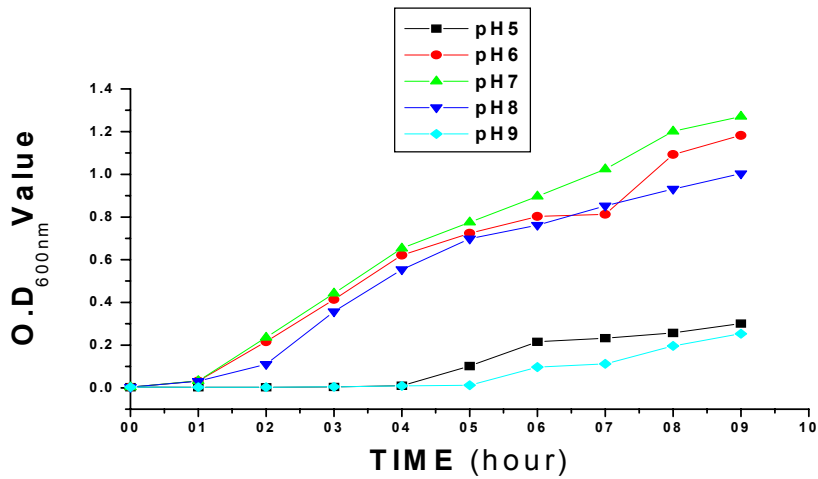


Fig. 24. Growth curve of CMB03 on several pH condition

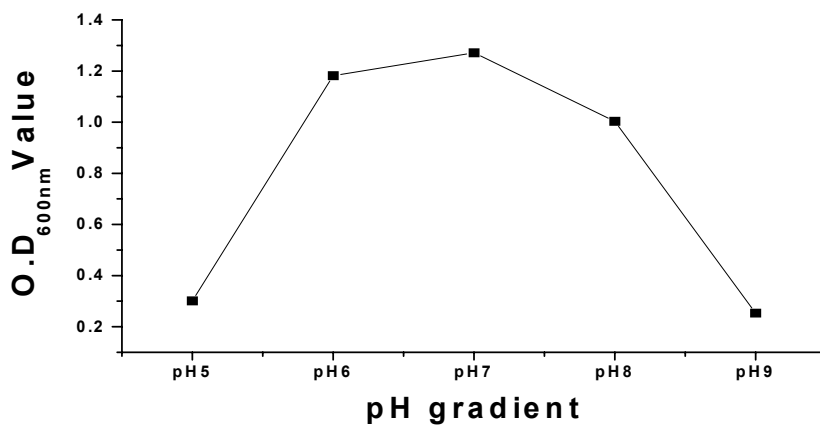


Fig. 25. O.D 600nm value of CMB03 on several pH conditions after 9hrs culture

Fig. 24와 25는 미생물 배지의 pH를 5~9사이에서 달리하여 미생물의 성장속도와 상태를 조사한 결과로서 CMB03 미생물의 배양배지의 pH는 7.0이 가장 적합한 것으로 나타났다.

다. 감수성 미생물의 최적배양배지 확립

*Bacillus*속 균주들의 배양에 사용되는 완전배지, L. medium, YT medium과 LB medium등을 사용하여 CMB03의 증식속도를 조사하여 최적의 배지를 확립하려고 시도하였다.

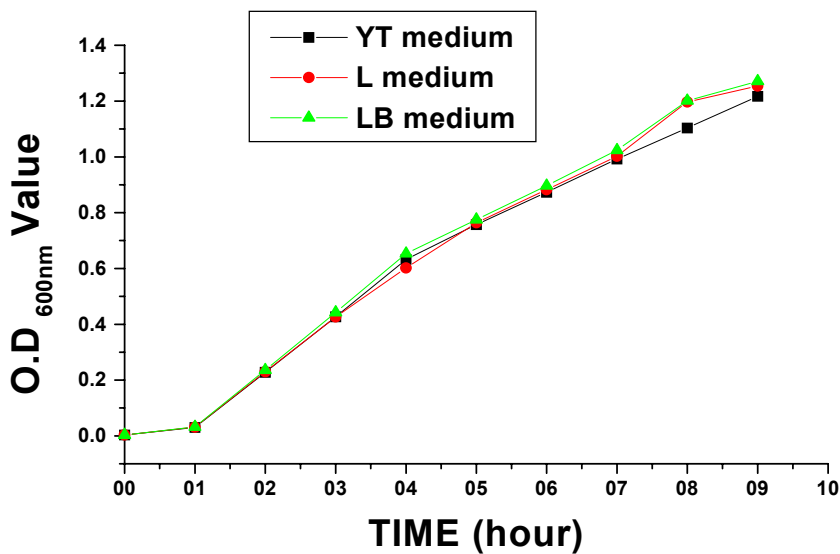


Fig. 26. Growth curve of CMB03 on several medium(YT medium, L medium, LB medium)

일반적으로 *Bacillus*속 균주들의 배양에 사용되는 배지로는 한정배지인 NSMP medium ACS medium와 *Bacillus thuringiensis* medium 등이 사용되며, 완전배지로는 L medium와 YT medium, LB medium 등이 사용된다. 본 연구에서 CMB03을 증식시킬 경우 가장 중요한 부분이 빠른 증식을 가지는 배지를 선택하는 것이므로 완전배지를 중심으로 하여 최적배지를 선정하였다. YT medium, L medium, LB medium을 사용한 결과 LB medium과 L medium에서 배양한 경우 거의 같은 증식속도를 나타내주었지만 LB medium이 더 최적의 성장 조건을 가지고 있는 것으로 관찰되어 본 연구에서는 LB medium을 최적 배지로 선정하였다.

이상의 연구 결과를 토대로 CMB03의 최적 배양조건을 Table. 4 와 같이 확립하였다.

Table. 4. Optimum growth medium and conditions of CMB03 culture

LB medium		temperature	Shaking velocity	pH
Tryptone	10g	37°C	150rpm	7.0±0.2
Yeast extract	5g			
NaCl	10g			

## 제 4 절 미생물과 EBDC계 살균제와의 반응성과 과채류 중 잔류농약의 추출법 조사

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

잔류농약 추출용매로 사용할 유기용매 methanol, ethanol, n-buthanol, acetone은 HPLC용을 사용하였으며 EDTA와 DMSO는 First Grade를 사용하였고 과채류 시료는 전남학사농장 상설매장에서 유기농 과채류(무농약)를 구입하여 사용하였다.

#### 나. 방법

##### 1) 추출용매의 미생물에 대한 저해여부 확인

EBDC계 잔류농약 최적추출방법을 확립하기 위하여 우선 추출용매의 미생물에 대한 저해여부와 정도를 확인하기 위하여 methanol, ethanol, n-buthanol, acetone 그리고 EDTA(100 ppm)/DMSO(2 %) 수용액 등 5가지 용매를 감수성 미생물로 선발된 CMB03 배양배지에 0.5 % ~4.0 %(V/V)의 농도별로 첨가하고 이들 용매의 미생물에 대한 저해여부와 정도를 조사하였다.

##### 2) 과채류중 미생물에 대한 저해물질 존재여부 확인

과채류 성분중 미생물의 저해물질 존재여부를 조사하기 위하여 상추와 깻잎은 4.5cm<sup>2</sup> × 4.5cm<sup>2</sup> 4 leaf, 딸기, 배, 생강, 토마토, 오렌지 과피는 4.5cm<sup>2</sup>×1 disk, 녹차, 마늘, 쌀, 오렌지 과육은 일정한 무게를 취하고 EDTA(1000 ppm)/DMSO(2 %)수용액 2ml를 첨가하여 1분 동안 vortex로 추출한 추출액을 CMB03 배양배지에 첨가하고 Fig. 1에 기술한 TTC test 법으로 실험을 행하여 미생물의 성장

저해정도를 O.D484nm 값을 측정하여 조사하였다.

### 3) EBDC계 살균제의 검출환경 결정

CMB03을 이용한 EBDC계 잔류농약 측정법의 최적 검출환경을 확립하기 위하여 TTC test 법을 이용하여 미생물의 배양배지의 pH, 발색제 첨가량, 미생물의 suspension 양, 배양시간, 반응정지제, 추출용매 DMSO의 농도 등에 따르는 TTC 반응성을 조사하여 최적검출환경을 확립하였다.

### 4) 추출용매, 발색제 및 반응정지제의 보관방법 및 안정성 조사

잔류농약 추출용매, 발색제, 미생물 배양배지 및 반응정지제의 보관 방법과 그 안정성을 조사하기 위하여 이상의 3 가지 용매와 미생물 배양배지를 각각 100 ml 조제하여 50 ml 씩 두 조로 나누어 갈색병에 밀봉하여 한 조는 실온에 보관하고 다른 한조는 4℃냉장보관하면서 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 30일과 45일마다 이들의 pH값을 측정하고 외관변화를 관찰하고 TTC test를 실행하여 조사하였다.

### 5) CMB03을 이용한 EBDC계 잔류농약의 최소검출한계의 결정

CMB03을 이용한 EBDC계 잔류농약의 최소검출한계를 확립하기 위하여 여러 가지 농도의 mancozeb standard solution을 미생물 배양배지에 처리한 다음 TTC test를 실시하여 spectrophotometer와 육안 검사법으로 최소검출한계를 조사하였다.

### 6) 미생물과의 반응성을 고려한 작물별 추출방법

미생물과의 반응성을 고려한 작물별 추출방법을 모색하기 위하여 EBDC계의 대표적인 살균제인 mancozeb을 상추, 배, 쌀, 오렌지, 토마토 등 5가지 무처리 과채류에 일정한 농도로 처리한 다음 EDTA(1000 ppm)/DMSO(2 %) 수용액 2 ml 를 첨가하여 추출한 추출액 100 $\mu$ l를 CMB03 배양배지에 첨가하고 배양한 다음 미생물의 저해정도를 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 추출용매의 미생물에 대한 저해여부 확인

EBDC계 살균제 추출용매의 미생물에 대한 저해여부와 정도를 확인하기 위하

여 methanol, ethanol, n-buthanol, acetone 그리고 EDTA(100 ppm)/DMSO(2 %) 수용액 등 5가지 용매를 감수성 미생물로 선발된 CMB03 배양배지에 0.5 % ~ 4.0 %(V/V)의 농도별로 첨가하고 이들 용매의 미생물에 대한 저해여부와 정도를 조사하여 그 결과를 Fig. 27과 같이 표시하였다.

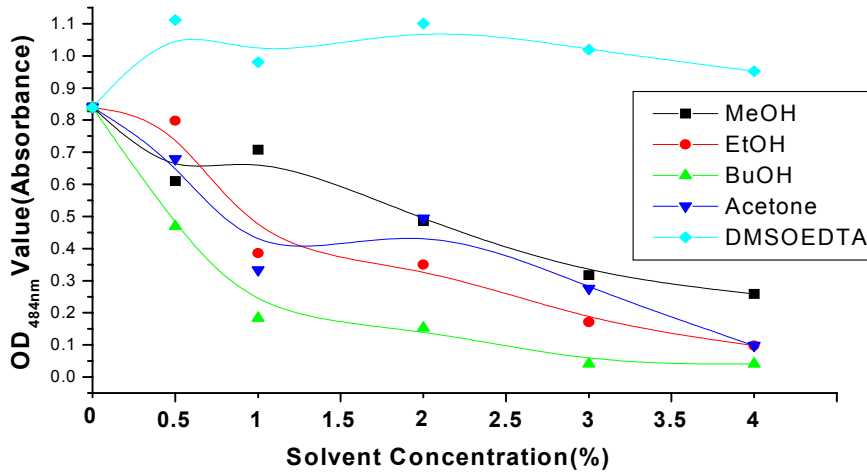


Fig. 27. Inhibition rate of CMB03 to several concentrations solvents

Fig 27.의 결과에서 보면 5가지 추출용매에서 EDTA(1000 ppm)/DMSO(2 %) 수용액은 4 %의 높은 농도에서도 감수성 미생물의 생장에 거의 저해가 없는 반면 methanol은 0.3의 O.D484nm 값을 보여 약 75 % 정도의 저해율을 나타내었고, ethanol과 acetone 0.1의 O.D484nm 값을 보여 약 87.5 % 정도의 저해율을 나타내었으며, buthanol은 0.05의 O.D484nm 값을 보여 약 94 % 정도의 저해율을 나타내어 본 연구의 추출용매로 사용하기에는 이 5가지 용매중 EDTA(1000 ppm)/DMSO(2 %)수용액이 가장 적합한 것으로 판정이 되어 향후의 연구에 사용하였다.

#### 나. 과채류성분 중 미생물의 저해물질 존재여부 확인

과채류 성분중 미생물의 저해물질 존재여부를 조사하기 위하여 상추와 깻잎은  $4.5\text{cm}^2 \times 4.5\text{cm}^2$  4 leaf, 딸기, 배, 생강, 토마토, 오렌지과피  $4.5\text{cm}^2 \times 1$  disk, 녹차, 마늘, 쌀, 오렌지 과육은 일정한 무게를 취하고 EDTA(1000ppm)/DMSO(2 %)수용액 2ml를 첨가하여 1분 동안 vortex로 추출한 추출액을 CMB03 배양배지에 첨가하고 Fig. 1과 같은 방법으로 실험을 행하여 미생물의 성장저해정도를

O.D484nm 값을 측정하여 조사하여 그 결과를 Fig. 28에 나타내었다.

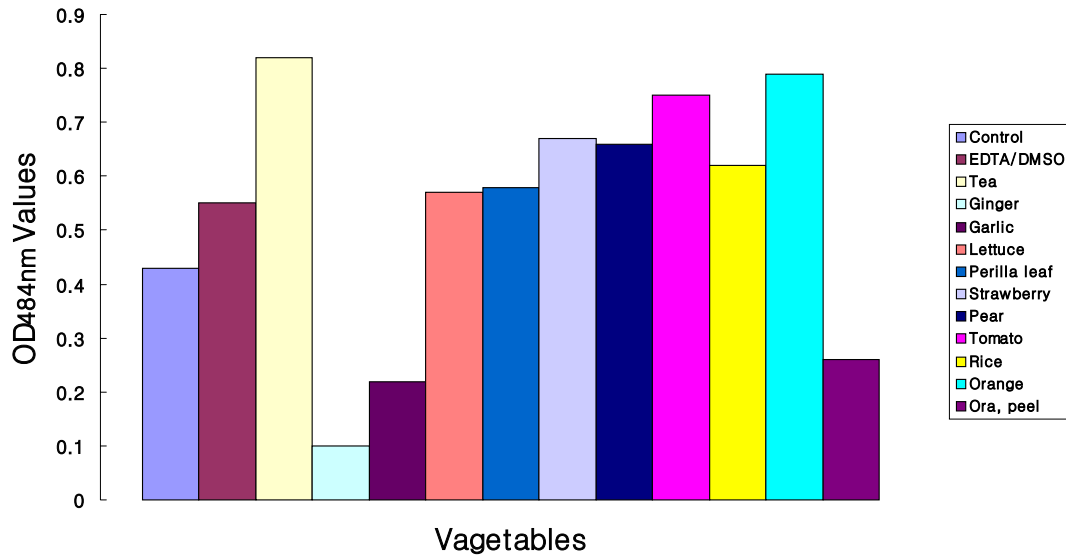


Fig. 28. CMB03 test for vegetable extracts with DMSO/EDTA solution



Fig. 29. Extracts of vegetables with DMSO/EDTA solution

Fig. 28 과 29의 결과에서 보여 준 바와 같이 생강과 마늘은 식물체 자체의 자극성 물질들(유기산 등)이 감수성 미생물의 성장에 현저한 저해를 나타내며, 녹차와 딸기 그리고 오렌지의 경우는 색소의 짙은 색이 TTC 실험결과의 관찰에 상당한 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 생강, 마늘, 녹차, 오렌지 등 작물이나 과채류의 잔류농약을 측정할 때는 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  완충용액을 첨가하여 과채류중 유기산등 물질의 추출로 인한 미생물에 대한 저해를 감소하고 반응정지제로는 0.5N HCl in 5% Triton X-100 대신 methanol을 사용하여 측정하는 방법이 고안되었다.

다. EBDC계 살균제의 검출환경 결정

EBDC계 감수성 미생물을 이용한 잔류농약 측정법의 검출환경의 연구는 미생물 배양배지의 pH, 발색제 TTC의 농도와 양, 미생물 suspensions volume 및 stop solution의 종류 그리고 추출용매 중 DMSO의 농도에 따르는 미생물에 대한 영향 및 추출효과를 TTC 반응성을 조사하여 그 결과를 아래와 같이 정리하였다.

1) 미생물 배양배지의 pH별 TTC 반응성

LB medium을 사용하여 배지의 pH를 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 그리고 8.0등으로 달리 하고 0.04 ppm의 mancozeb을 처리하여 TTC test를 실행하여 O.D484nm 값을 조사하여 그 결과를 Fig. 28에 보여주었다.

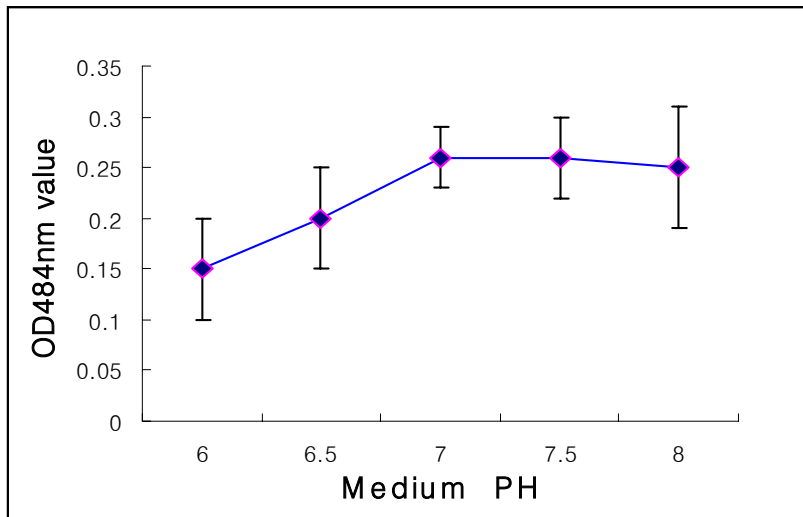


Fig. 30. O.D484nm value of TTC test with various pH of L.B medium in 0.04 ppm of mancozeb

Fig. 30은 0.04 ppm mancozeb을 처리한 조건에서 medium pH를 달리하여 TTC test를 행한 후 OD484nm 값을 측정된 결과로서 pH 6.0과 6.5 에서는 OD484nm 값이 0.2 이하로 현저히 낮게 나타났고 pH 7.0에서 최고 값을 보이다가 pH 7.5 부터는 OD484nm 값이 다시 낮아지는 경향을 보였다. 한편 농도별로 mancozeb을 처리한 이상의 5가지 pH medium에서 TTC test 결과를 육안으로 관찰한 결과 pH 6.0과 6.5에서는 전체적으로 color가 선명하지 못하고 pH 7.5 에

서는 pH 7.0 과 비슷한 양상을 보여주었으나 농도별 차이가 pH 7.0 보다 선명하지 않은 것으로 나타났으며 pH 8.0 에서는 0.2 ppm 과 1.0 ppm 사이에 color 차이를 분별하기 어려울 정도로 감도가 낮게 나타났으나 pH 7.0에서는 mancozeb 에 대한 검출감도가 0.04 ppm 으로 가장 높았을 뿐만 아니라 농도별 순으로 육안으로 쉽게 관찰 가능하였으며 0.2 ppm의 낮은 농도에서도 육안으로 control의 red color와 선명한 대조를 이루는 yellow color를 나타내어 미생물 배양배지의 가장 적합한 pH 조건인 것으로 판단되었다.

## 2) TTC 발색제 첨가량에 따르는 반응성

미생물을 이용한 TTC test 잔류농약 검출에서 TTC의 최적농도와 최적양을 선정함으로써 작물의 잔류농약을 육안으로 쉽게 검출하기 위하여 2 % TTC 용액의 첨가량을 50, 100, 200, 300 과 500  $\mu$ l등으로 달리하고 미생물 배양배지에 mancozeb을 농도별로 처리하여 반응성을 조사하였으며 아울러 새로운 발색제 NBT(nitroblue tetrazolium)와 비교 실험을 행하여 그 결과를 아래와 같이 나타냈다.

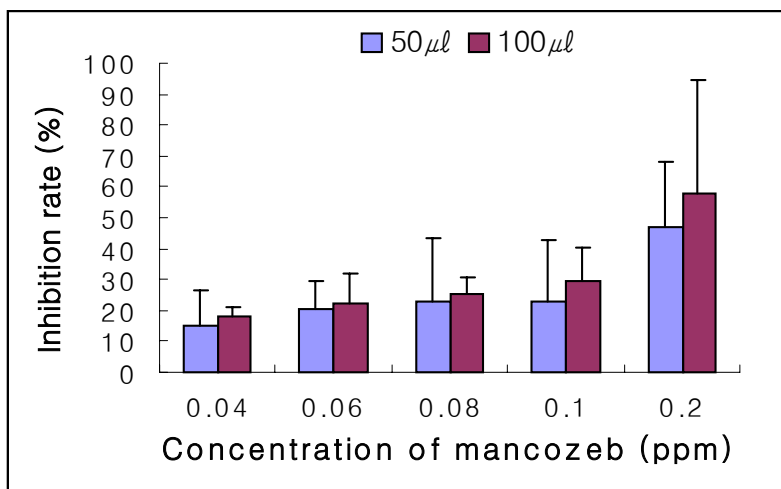


Fig. 31. CMB03 test with various concentration of mancozeb in 50 and 100 $\mu$ l of 2 % TTC

2 % TTC의 여러가지 량에 따르는 반응성 조사결과 100, 200, 300과 500  $\mu$ l 에서는 육안으로 red color 차이를 구별할 수 없었으며 50 $\mu$ l를 첨가한 것은 비교적 낮은 red color를 나타내어 50  $\mu$ l와 100  $\mu$ l첨가한 반응의 inhibition rate를 비교해본 결과 100  $\mu$ l에서는 0.04 ppm부터 육안으로 대조구와 color 차이를 구분할 수 있을 정도로 선명하여 2 % TTC 최적첨가량을 100  $\mu$ l로 확립하였다.

TTC와 NBT의 CMB03과의 반응성을 조사해본 결과 TTC는 선명한 red와



yellow color를 보여주는 반면 NBT는 blue 가 아닌 녹색에서 옅은 황녹색을 나타내는데 color 자체가 선명하지 않고 색감이 TTC보다 현저히 떨어지는 감을 준다. 또한 NBT를 1.0 %, 0.5 %, 0.2 %와 0.1%로 조사해본 결과 0.1 %를 제외한 3가지는 어두운 남색을 나타내는데 전체적으로 농약의 농도별 차이를 육안으로 구분 불가능하였으며 원제의 가격도 TTC에 비해 g당 36배 높아 잔류농약 검색용 진단 kit에 사용하기에는 부적합한 것으로 판단이 되었다.

### 3) 미생물 Suspension volume에 따르는 TTC 반응성

미생물 CMB03의 suspension 양을 100, 300, 400, 500  $\mu\text{l}$ 를 각기 10 ml L.B 배지에 첨가하고 0.04 ppm mancozeb을 처리하여 TTC 반응성을 조사하였다.

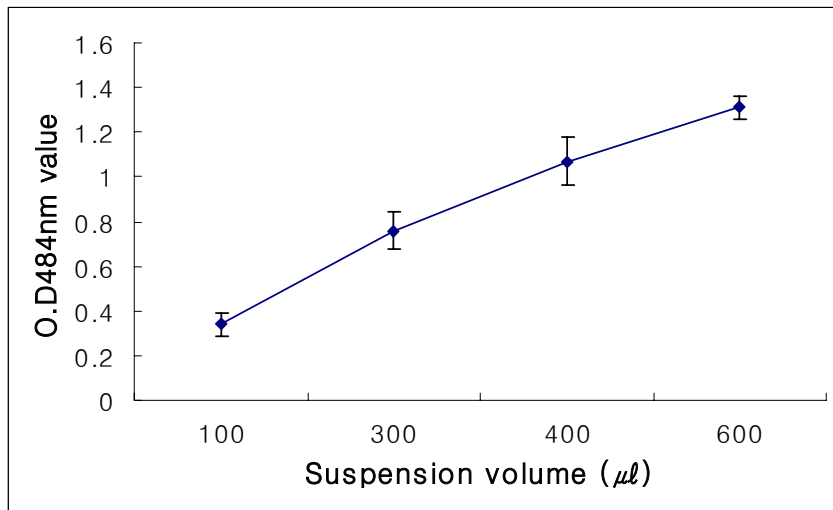


Fig. 32. O.D484nm value of CMB03 with various volume of CMB03 suspension in 0.04 ppm of mancozeb

CMB03 suspension의 volume별 mancozeb 0.04 ppm에서의 O.D484nm 값은 미생물의 첨가 양이 증가할수록 일정한 배양기간에 O.D484nm 값이 전반적으로 증가하고 TTC 반응에 의한 color도 현저하게 짙어지는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 CMB03 suspension의 volume이 100  $\mu\text{l}$  이상으로 증가할 때는 육안으로 농약의 농도별 차이를 구분할 수 없고 감도가 상당히 떨어진다. 200  $\mu\text{l}$ 에서는 육안으로 검출가능한 mancozeb의 농도는 0.08 ppm, 300  $\mu\text{l}$ 에서 검출가능한 농약의 농도는 0.2 ppm 그리고 400  $\mu\text{l}$ 에서 검출가능한 농약의 농도는 0.5 ppm으로 보여주는 반면 100  $\mu\text{l}$ 에서는 mancozeb의 농도 0.04 ppm에서도 육안으로 쉽게 검출가능 하였고 0.2 ppm에서는 선명한 yellow color를 나타내어 CMB03

suspension(O.D600nm 값이 1.0)의 volume은 100  $\mu$ l가 최적volume인 것으로 추정되었다.

4) 두 가지 반응정지제의 TTC 반응성

여러 가지 농도의 mancozeb을 처리하여 TTC test를 행하고 반응 최종단계에 0.5N HCl 와 0.5N HCl in 5 % triton X-100 stop solution으로 각기 반응을 정지시킨 다음 이 두 가지 stop solution이 TTC 반응에 주는 영향을 O.D484nm value를 측정하거나 육안으로 관찰하여 조사하였다.

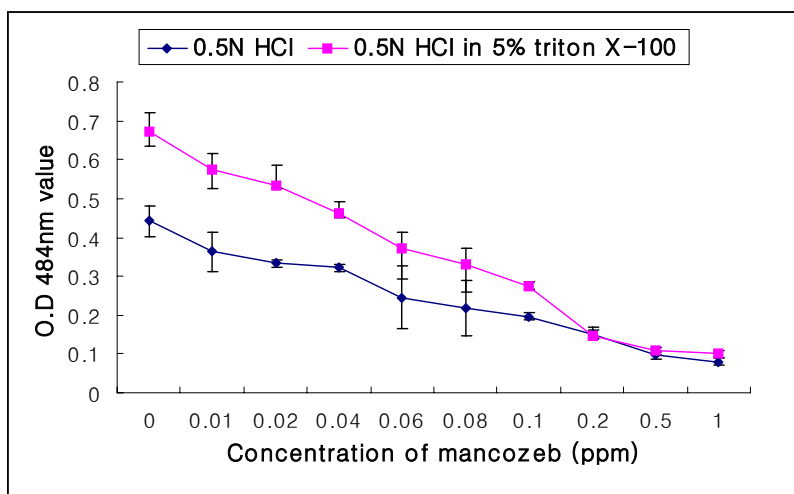


Fig. 33. O.D484nm value of CMB03 with two stop solution in various concentration of mancozeb.



Fig. 34. TTC test with 0.5N HCl in 5 % triton X-100 of stop solution in various concentration of mancozeb.



Fig. 35. TTC test with 0.5N HCl of stop solution in various concentration of mancozeb

Fig. 33에서 보여주는 바 0.5N HCl in 5 % triton X-100을 사용하였을 때 OD484nm 값이 현저히 높게 나타났으며 또 한편 Fig. 34과 35를 비교하여 보았을 때 0.5N HCl in 5 % triton X-100 이 육안으로 더 선명한 color를 보여줄 뿐만 아니라 검출감도도 더 높은 것으로 나타나 0.5N HCl in 5% triton X-100 이 보다 적합한 stop solution으로 생각된다.

##### 5) DMSO의 농도에 의한 미생물에 대한 영향 및 잔류농약의 추출효과

미생물을 이용한 잔류농약 측정법에서 DMSO의 반응에 주는 영향 및 과채류 중 잔류농약의 최적추출효과를 가져올 수 있는 최적농도를 조사하기 위하여 DMSO농도를 1, 1.5, 2, 2.5 그리고 3 %로 달리하여 mancozeb을 5  $\mu$ g 처리한 깻잎에서의 추출효과와 농약을 처리하지 않은 미생물 배양배지, 두 가지 상태에서 실험을 하여 그 결과를 아래와 같이 보여주었다.

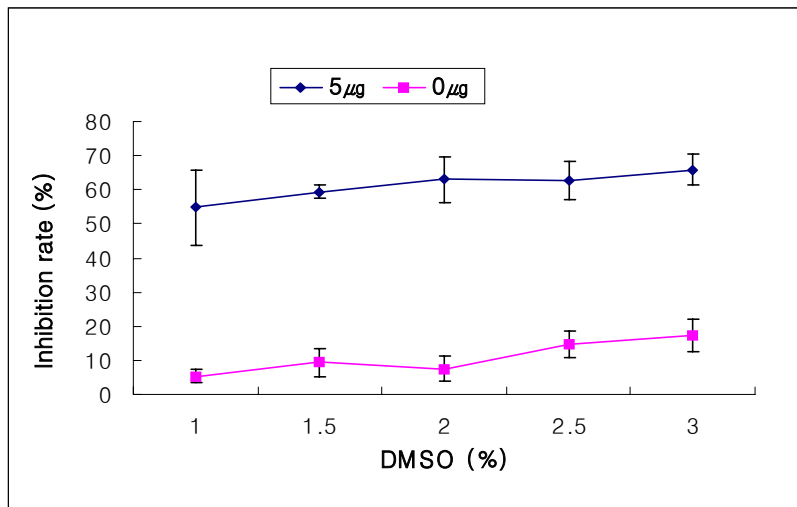


Fig. 36. Effect of DMSO concentration for CMB03 and extracting result with and without mancozeb.

Fig. 36의 결과에서 보면 mancozeb을 처리하지 않은 상태에서 DMSO의 농도가 1.5 %에서는 1 % 보다, 2.5와 3 %에서는 2 % 보다 미생물에 대한 저해율이 증가하였으나 2 %에서는 오히려 1.5, 2.5와 3 % 보다 낮은 저해율을 나타냈다. 반면에 mancozeb을 5 μg처리한 깻잎에서는 2 % 에서 1과 1.5 % 보다 높은 저해율을 보여 비교적 좋은 추출효과를 나타냈다. 또한 DMSO의 농도가 2 % 이상으로 증가하면 오히려 DMSO자체의 영향이 미생물의 생장을 저해함을 나타내었으므로 본 연구에서는 DMSO의 최적농도를 2 %로 선정하였다.

이상의 연구결과로부터 CMB03을 이용한 잔류농약 검출환경의 최적조건을 Table. 5과 같이 확정하였다.

Table. 5. Optimum conditions of TTC test with *Bacillus sp.* CMB03

---

<i>Bacillus cereus</i> CMB03 :	100 μl (OD600nm value=1.0 suspension)
Medium pH :	7.0,
Medium volume :	10 ml
Extrat solution :	1000 ppm EDTA/2% DMSO 2 ml
Indicator solution :	2 % TTC solution 100 μl
Incubate time :	for 90 min at 37 °C, at 150 rpm
TTC reaction time :	for 30 min at 37 °C, at 150 rpm in dark condition
Stop solution :	0.5 N HCl in 5 % Triton X-100 250 μl

---

라. CMB03을 이용한 EBDC계 잔류농약의 최소검출한계 확립

EBDC계 살균제에 민감한 미생물 CMB03의 최소검출한계를 확립하기 위하여 여러 가지 농도의 mancozeb standard solution을 미생물 배양배지에 처리한 다음 TTC test를 실시하여 spectrophotometer와 육안 검사법으로 최소검출한계를 조사하여 그 결과를 아래와 같이 나타내었다.

Table. 6. Low detection limit of CMB03 test by spectrophotometer.

Mancozeb ( $\mu\text{g}$ )	Mancozeb (ppm)	O.D <sub>484nm</sub> value			Average	S.D
		1	2	3		
0	0	0.481	0.494	0.478	0.484	$\pm 0.00$
0.01	0.001	0.487	0.538	0.522	0.516	$\pm 0.03$
0.02	0.002	0.459	0.496	0.540	0.498	$\pm 0.04$
0.04*	0.004	0.446	0.476	0.479	0.467*	$\pm 0.02$
0.06	0.006	0.447	0.433	0.458	0.446	$\pm 0.01$

\* Low detection limit

Table. 7. Detection limit of CMB03 test by maked eyes examine.

Mancozeb ( $\mu\text{g}$ )	Mancozeb (ppm)	Inhibition rate (%)			Average	S.D
		1	2	3		
0	0	0	0	0	0	$\pm 0$
0.2	0.02	18.90	14.14	10.56	14.53	$\pm 4.18$
0.4*	0.04	25.52	28.10	26.78	26.80	$\pm 1.29$
0.6	0.06	37.73	32.94	30.30	33.66	$\pm 3.77$
0.8	0.08	37.24	38.08	32.12	35.81	$\pm 3.23$
1	0.1	46.07	38.26	46.02	43.45	$\pm 4.49$
2*	0.2	61.41	63.90	63.63	62.98	$\pm 1.37$
5	0.5	85.15	88.08	89.13	87.45	$\pm 2.06$
10	1.0	93.74	93.93	93.26	93.64	$\pm 0.35$

\* Detectable range 0.04\* ~ 0.2 ppm

Table. 6과 7에 나타낸 결과에서 보여준바와 같이 CMB03을 이용한 TTC test 결과를 spectrophotometer에서는 최소 0.004 ppm (0.04 $\mu\text{g}$ ) 수준까지 검출가능하며 육안으로는 최소0.04~0.2 ppm 범위에서 검출가능 하였기에 CMB03을 이용한 EBDC계 잔류농약 mancozeb의 최소검출 한계를 0.04 ppm으로 확정하였다.

마. 추출용매, 발색제, 배양배지 및 반응정지제의 보관방법 및 안정성 측정

잔류농약 추출용매, 발색제, 미생물 배양배지 및 반응정지제의 보관 방법과 그 안정성을 조사하기 위하여 이상의 3 가지 용매와 미생물 배양배지를 실온과 냉장 조건에서 보관하면서 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 30일과 45일마다 이들의 pH값을 측정하고 외관변화를 관찰하고 TTC test를 실시한 결과를 Table. 8 에 나타냈다.

Table. 8. Stability of TTC test solution at the storing process

Day	pH value				Face change	TTC reactivity	Room temp °C
	EDTA/DMSO	2 % TTC	Stop solution	L.B. medium			
1	6.90	3.66	0.32	7.05	x	○	18
3	6.90	3.68	0.34	-	x	○	15
7	6.80	3.69	0.35	-	x	○	18.5
14	6.80	3.59	0.35	-	x	○	15.4
21	6.68	3.66	0.36	-	x	○	18
30	6.70	3.68	0.35	-	x	○	13
45	6.80	3.67	0.34	-	x	○	13

X: no changing      ○: normal

Table. 8 에 보여준 것과 같이 추출용매 EDTA/DMSO, 발색제 2 % TTC, stop solution 등은 45일이 지나도 실온에서나 4℃냉장 보관 상태에서 외관상이나 pH의 변화가 전혀 없을 뿐만 아니라 45일 까지 새로 조제한 solution과 차이가 정상적인 반응성을 갖고있음을 실험을 통해 알 수 있었다. 미생물의 배양배지는 일반적으로 새로 조제한 신선한 배지를 사용하기에 실온에서의 안정성은 측정하지 않았으며 4℃에서 냉장 보관하면 20일까지 사용 가능하였다. 또한 본 연구에서는 선발된 감수성 미생물 *Bacillus sp.* CMB03을 편리하고 안전한 고체상태로 반영구적으로 보관하면서 수시로 사용할 수 있는 방법을 개발하여 앞으로 미생물을 이용한 잔류농약 측정 kit 개발에 실용적으로 이용할 수 있을 것으로 추정하고 있다.

바. 미생물과의 반응성을 고려한 작물별 추출방법의 고안

과채류 종류별 EBDC계 농약과의 최적 반응성 및 추출방법을 조사하기 위하여 감자, 사과, 배, 오이, 토마토, 깻잎 그리고 상추 등 7가지 과채류에서 CMB03을 이용한 미생물측정법의 mancozeb에 대한 회수율 및 추출방법에 대하여 조사하였으며 아울러 상추와 깻잎에서 B.T와 비교하여 회수율을 조사하였다.

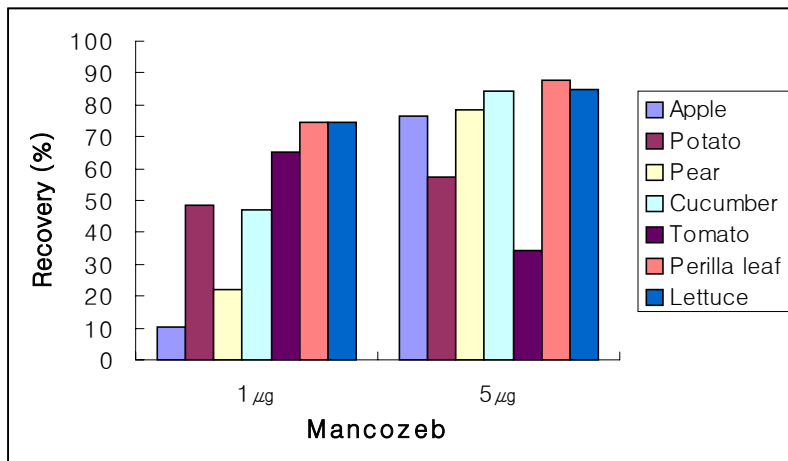


Fig. 37. Recovery of CMB03 test for mancozeb residues from several vegetables and fruits

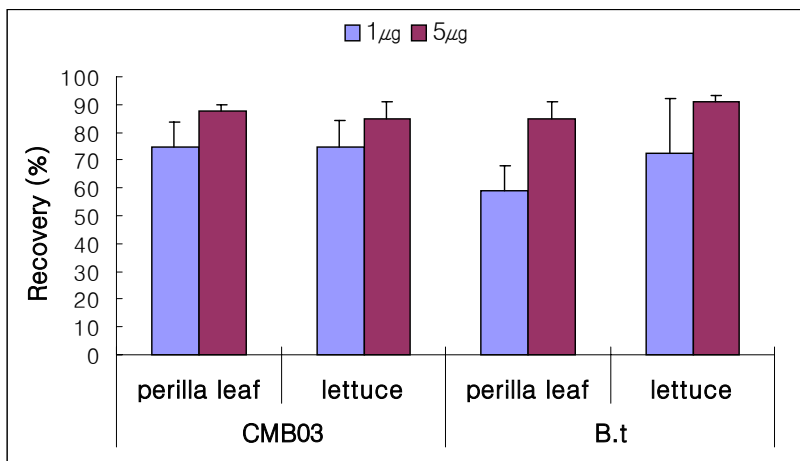


Fig. 38. Recovery of CMB03 and B.T. test for mancozeb residues with lettuce and perilla leaf

Fig. 37의 7가지 과채류에서의 미생물의 반응성을 조사하기 위한 회수율 측정 결과에서 전체적으로 비교적 좋은 반응성을 보여주었다. Mancozeb을 1 µg 처리한 저농도에서는 사과와 배를 제외하고는 모두 45 %이상의 회수율을 보여주고 5 µg 처리한 고농도에서는 토마토에서 34 %의 낮은 회수율을 보이는 반면 기타 6가지 과채류에서는 모두 57 % 이상의 높은 회수율을 보여주어 본 연구의 추출방법은 과채류에서 미생물의 반응성에 적절한 것으로 추정되었다.

한편, 이상의 7가지 과채류에서 토마토를 제외하고는 모두 미생물에 비교적 적

은 저해를 나타내는 것으로 보여주었다.

Fig. 38은 상추와 깻잎에서의 회수율 측정결과를 나타낸 것으로 CMB03을 이용한 잔류농약 측정방법은 1  $\mu$ g과 5  $\mu$ g의 mancozeb 에서 모두 70 %이상의 비교적 높은 회수율을 보이는 반면 B.T는 저 농도에서는 낮은 회수율을 나타내고 고 농도를 처리한 상추에서만 보다 높은 회수율을 보여주어 다시 한번 CMB03의 mancozeb에 대한 높은 감수성을 입증할 수 있었으며 실제 잔류농약 측정용 Kit로 보다 적합한 것으로 생각된다.

아울러 과채류별 농약과의 반응성을 고려한 추출방법을 조사하기 위하여 vortex mixer에서 교반시간을 30초와 1분으로 하고 정치시간을 1~ 5분까지 달리하여 농약의 추출효과와 미생물과의 반응성을 조사한 결과 1분간 교반, 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면 선발된 감수성 미생물 CMB03의 EBDC계 살균제에 대한 최소검출한계는 spectrophotometer에서는 0.004 ppm으로, 육안측정에서는 0.04 ppm으로 매우 우수한 결과를 보여주었다. 본 연구에서 사용한 추출용매 EDTA/DMSO 는 선발된 감수성 미생물의 생장과 이를 이용한 잔류농약 측정에 거의 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 기타 유기용매에 비하여 잔류농약 추출효과가 탁월한 것으로 나타났다. 기타 발색제로 쓰이는 2 % TTC용액 와 반응 정지제 모두 실온에서 45일 지나도 외관상이나 pH의 변화가 전혀 없이 정상적인 반응을 나타냄을 알수있었다. 아울러 대만에서 사용하고있는 *Bacillus thuringiensis* (B.T)와 비교하여 상추와 깻잎에서 TTC test의 반응성과 회수율 실험결과로부터 CMB03이 B.T보다 TTC 반응 성이 우월하고 저 농도와 고농도의 mancozeb에 대하여 전체적으로 70 %이상의 높은 회수율을 보여주어 실제 잔류농약 측정용 Kit로 보다 적합한 것으로 판단된다.

## 제 5 절 감수성 효소 탐색 및 특성조사

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

D-lactate, L-malate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinate, fumarate, oxaloacetate등은 First Grate 시약을 구입하여 사용하였다.



## 나. 방법

TTC를 이용한 미생물의 활성정도를 측정할 수 있는 점에 착안하여 TTC의 발색에 관여하는 dehydrogenase계 효소를 중심으로 EBDC계 살균제에 민감하게 반응하는 효소를 검색하는데 중점을 두고 TCA cycle내에 관여하는 효소들을 대상으로 각 substrate를 첨가하고 반응을 관찰하여 EBDC계 농약에 민감하게 반응하는 효소를 검색하기로 하였다. TTC는 dehydrogenase류와 반응하는 것으로 알려져 있기 때문에 TCA cycle 관련 효소들의 EBDC계 농약에 의한 저해율을 조사함으로써 목표 효소(Target enzyme)를 탐색하고 확인하고자 하였다.

### 1) D-lactate dehydrogenase의 EBDC계 살균제에 대한 감수성 실험

EBDC계에 민감성을 갖는 CMB03, CMB52와 CMB61균주의 조효소액 1mg에 16mM의 D-Lactate 그리고 5mM의  $\text{NAD}^+$  와 0.01ppm의 mancozeb를 첨가한 다음 37°C에서 2시간동안 반응을 실시하여 D-lactate dehydrogenase 효소의 활성을 spectrophotometer를 이용하여 340nm에서의 흡광도 측정을 통해  $\text{NAD}^+$ 가 NADH로의 변환율을 측정하는 것으로 CMB03과 CMB52, CMB61, B.T의 D-lactate dehydrogenase의 활성을 측정하였다.

### 2) L-malate dehydrogenase의 EBDC계 살균제에 대한 감수성 실험

CMB03, CMB52와 CMB61 그리고 BT 균주의 D-malate dehydrogenase 효소의 EBDC계 살균제에 대한 민감성을 여부를 확인하고 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위해  $\text{NAD}^+$ 가 NADH로의 변환율을 측정하는 것으로 이들 균주의 L-malate dehydrogenase의 활성을 조사하였다.

### 3) CMB03 dehydrogenase의 기질종류에 따른 mancozeb에 대한 민감성 조사

TTC가 미생물의 dehydrogenase계열의 효소에 의해서 환원되어 red formazan을 형성하는 원리에 기초하여 미생물의 TCA cycle내에 관여하는 효소들을 대상으로 CMB03의 조효소(crude enzyme)액을 이용하여 citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinate, fumarate, L-malate, oxaloacetate등 6가지 substrate들을 첨가하여 mancozeb에 대한 감수성을 조사하였다.

### 4) EBDC계 살균제와 $\text{NAD}^+$ 및 NADH와의 관계 조사

Mancozeb이 존재하는 효소의 활성측정에서 mancozeb에 의해 NADH formation에 영향을 받는지 확인하기 위해 Tris buffer(pH8.5)에 5mM의  $\text{NAD}^+$ 와

0.1 ppm의 mancozeb을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응을 시킨다음 O.D<sub>340nm</sub> 값을 측정하여 NADH로의 변환되는 값을 측정하였다.

5) CMB03 조효소 추출액의 최적반응 조건 조사

CMB03 조효소의 최적 반응조건을 조사하기 위하여 조효소 추출물들을 대상으로 동일한 substrate (L-malate)를 이용하여 substrate를 넣어준 시간과 TTC를 가해준 시간 등 조건을 달리하면서 효소의 활성정도를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. D-lactate dehydrogenase의 EDBC계 살균제에 대한 감수성 실험

CMB03과 CMB52, CMB61의 D-lactate dehydrogenase의 활성을 측정하기 위하여 spectrophotometer에서 O.D<sub>340nm</sub> 값을 측정하여 NAD<sup>+</sup>에서 NADH로의 변환율을 측정하였다. 1mg 의 조효소액에 16mM 의 D-Lactate와 5mM 의 NAD<sup>+</sup>, 0.01ppm 의 mancozeb를 첨가하고 37°C에서 2시간동안 반응을 시켰다. 효소의 활성을 통한 농약에 대한 민감성 실험에서 짧은 시간에 신속한 민감성을 갖는 최적 반응 조건을 확립할 필요성이 있기에 여러 조건에서 효소반응을 수행하였다.

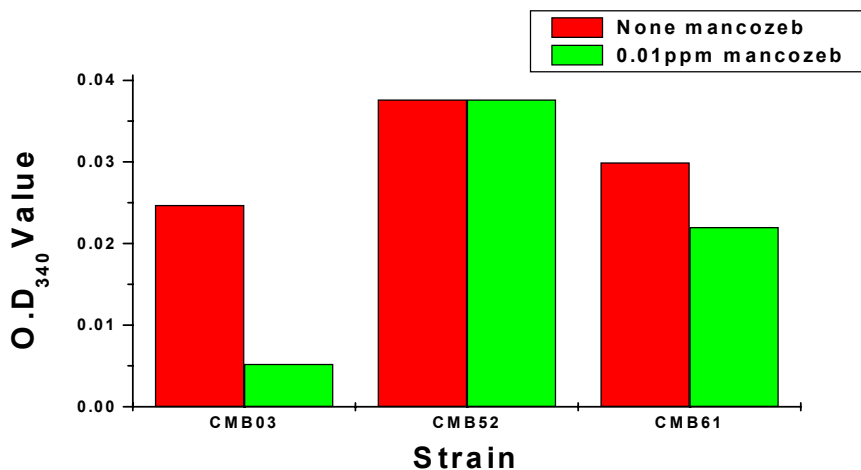


Fig. 39. NADH formation rates of D-lactate dehydrogenase of CMB03, CMB52, CMB61 on with and without mancozeb

Table. 9. Inhibition rates of D-lactate dehydrogenase on formation rate of NADH in reaction of crude extract of CMB03, CMB52, CMB61 with and without mancozeb.

Strain	CMB03		CMB52		CMB61	
Mancozeb						
ppm	0	0.01	0	0.01	0	0.01
Inhibition rates	76.9 %		0 %		24.6 %	

Fig. 39와 Table. 9의 결과에 보여 주다싶이 0 ppm의 mancozeb 처리를 기준으로 CMB03은 O.D340nm 값이 CMB52와 CMB61에 비하여 많이 적은 값을 나타내고 있지만 0.01ppm의 mancozeb을 처리하였을 경우에는 오히려 다른 두 strain에 비해 O.D340nm값이 크게 감소하는 반면 CMB52와 CMB61는 CMB03에 비하여 현저히 적은 변화 (Inhibition rates: 0 % 와 24.6 %)를 보이는데 이러한 결과로 볼 때 CMB03의 D-lactate dehydrogenase가 mancozeb에 감수성이 높음을 설명한다.

나. L-malate dehydrogenase 의 EDBC계 살균제에 대한 감수성 실험

CMB03, CMB52와 CMB61 그리고 BT 균주의 D-malate dehydrogenase 효소의 EDBC계 살균제에 대한 민감성을 여부를 확인하고 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 NAD<sup>+</sup>가 NADH로의 변환율을 측정하는 것으로 이들 균주의 L-malate dehydrogenase의 활성을 조사하여 그 결과를 아래와 같이 보여주었다.

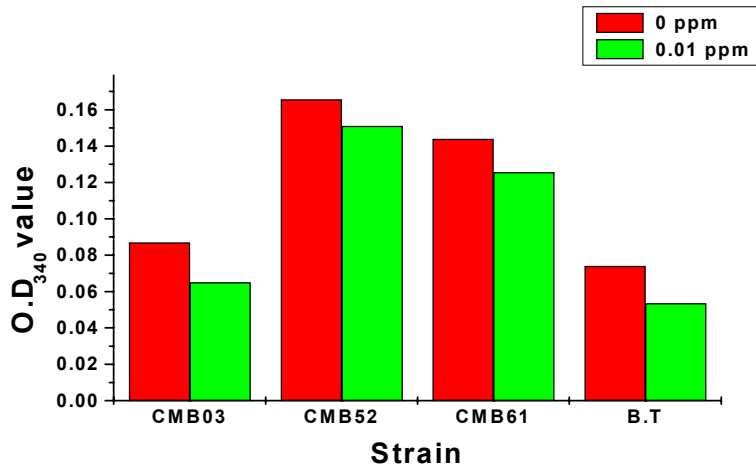


Fig. 40. NADH formation rate of L-malate dehydrogenase of CMB03, CMB52, CMB61, B.T on with and without mancozeb, which reaction were reacted with TTC

Table. 10. Inhibition rates of L-malate dehydrogenase on formation rate of NADH in reaction of crude extract of CMB03, CMB52, CMB61, B.T with and without mancozeb.

Strain	CMB03		CMB52		CMB61		B.T	
Mancozeb								
ppm	0	0.01	0	0.01	0	0.01	0	0.01
Inhibition								
rate	25.2 %		8.8 %		12.7 %		27.5 %	

Fig. 40과 Table. 10의 결과를 보면 CMB03, CMB52, CMB61, B.T등 균주들의 L-malate dehydrogenase는 D-lactate dehydrogenase 에 의해 비교적 낮은 효소 활성의 억제를 받는다.

위의 두 결과를 종합하면 D-lactate dehydrogenase와 L-malate dehydrogenase 를 이용한 EDBC계 살균제 mancozeb에 대한 민감성을 측정한 결과 두 가지 dehydrogenase모두 효소활성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 D-lactate를 기질로 이용한 경우보다도 L-malate를 기질로 이용한 경우가 더욱더 높은 NADH formation rate를 갖는 것으로 판단되었다. 즉, 340nm에서의 흡광도 값이 L-malate를 기질로 사용한 경우가 더욱 더 높은 값을 나타냈다. 따라서 CMB03 균주의 경우 D-lactate dehydrogenase 는 0.01 ppm의 mancozeb처리 농

도에서 76.9 %의 가장 높은 억제율을 보여주었다.

즉, CMB03 균주의 D-lactate dehydrogenase 와 L-malate dehydrogenase 모두 EBDC계 살균제의 저해를 받으나 그중에서도 D-lactate dehydrogenase가 보다 민감하고도 높은 감수성을 갖는다고 판단된다.

다. CMB03 dehydrogenase의 기질종류에 따른 mancozeb에 대한 민감성 조사

TTC가 미생물의 dehydrogenase계열의 효소에 의해서 환원되어 red formazan을 형성하는 원리에 기초하여 미생물의 TCA cycle내에 관여하는 효소들을 대상으로 CMB03의 조효소(crude enzyme)액을 이용하여 citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinate, fumarate, L-malate, oxaloacetate등 6가지 substrate들을 첨가하여 mancozeb에 대한 감수성을 조사하였다.

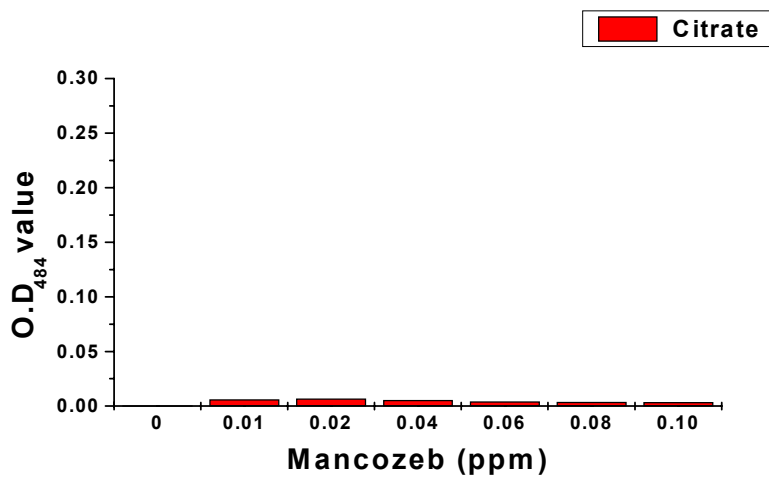


Fig. 41. Measurement of enzyme activity with citrate on several concentration of mancozeb

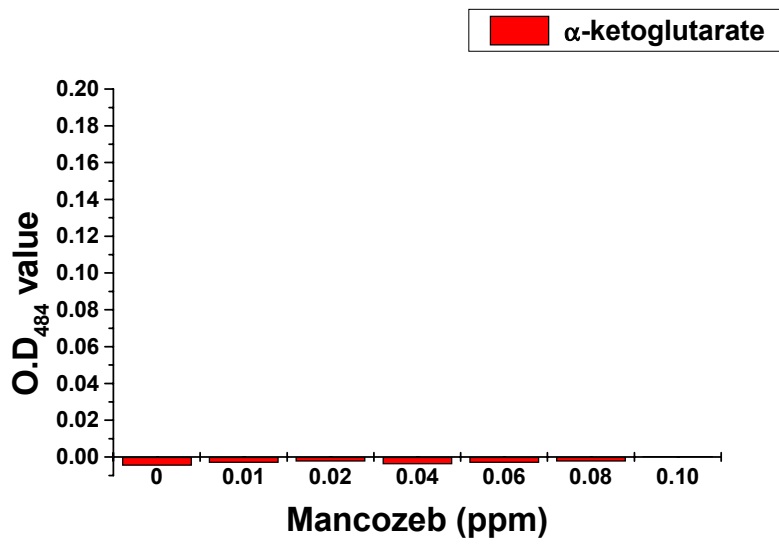


Fig. 42. Measurement of enzyme activity with  $\alpha$ -ketoglutarate on several concentration of mancozeb

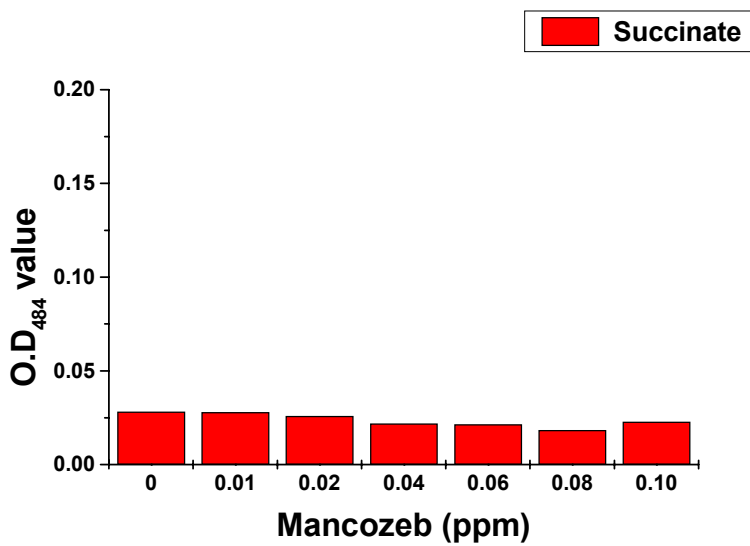


Fig. 43. Measurement of enzyme activity with succinate on several concentration of mancozeb

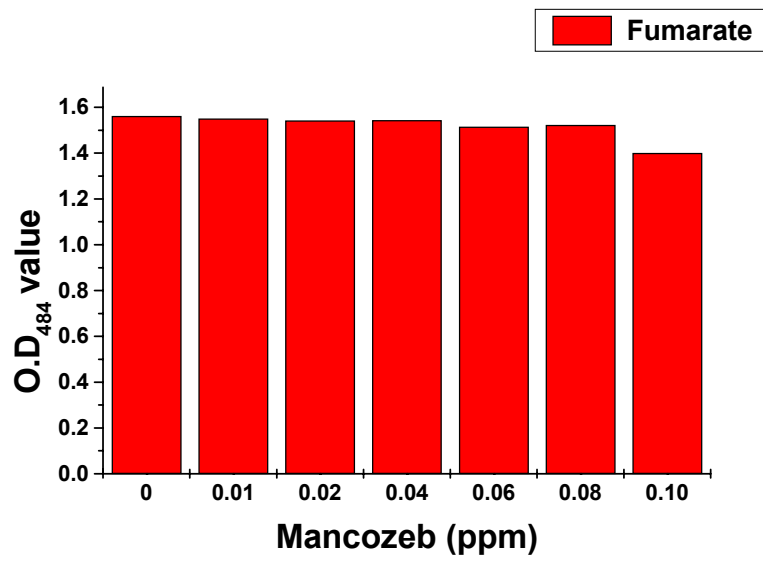


Fig. 44. Measurement of enzyme activity with fumarate on several concentration of mancozeb

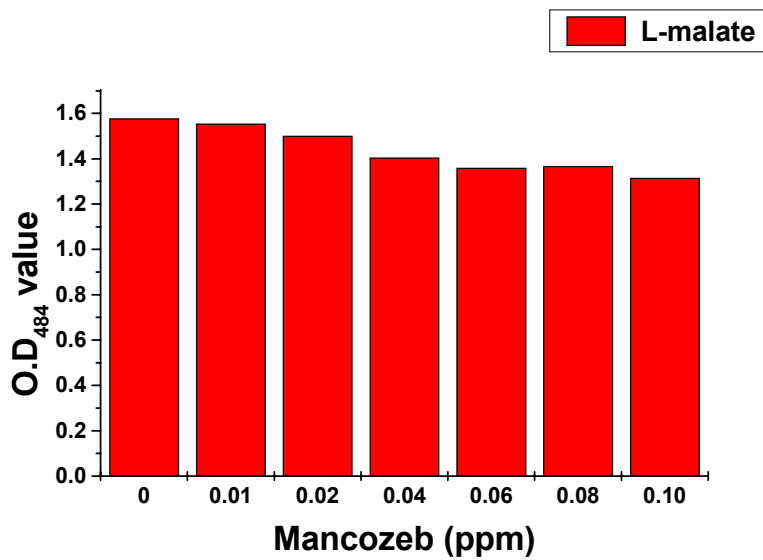


Fig. 45. Measurement of enzyme activity with L-malate on several concentration of mancozeb

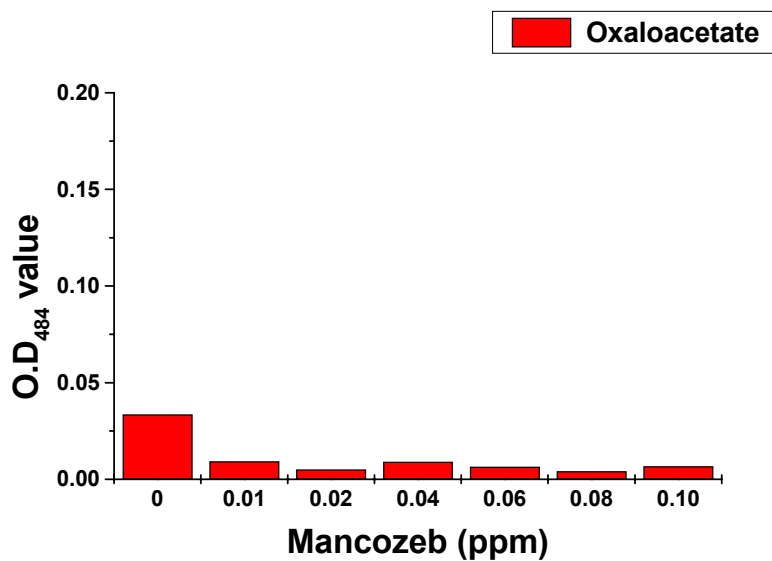


Fig. 46. Measurement of enzyme activity with oxaloacetate on several concentration of mancozeb

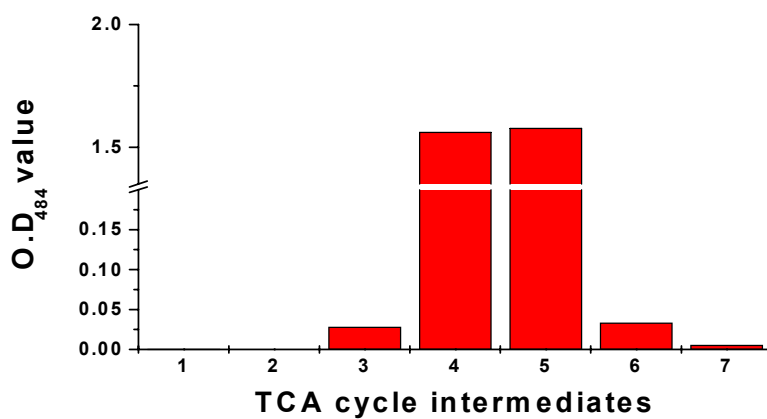


Fig. 47. Formation rate of TTC formazan on reaction with several substrates without mancozeb  
 (1. citrate, 2.  $\alpha$ -ketoglutarate, 3. succinate, 4. fumarate, 5. L-malate, 6. oxaloacetate, 7. D-lactate)



Fig. 41~47 에 나타난 결과들은 CMB03의 조효소(crude enzyme)추출물을 이용하여 TCA cycle의 intermediate들을 substrate로 각각의 효소의 활성과 mancozeb에 의한 억제여부를 측정된 결과로서 citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinate, fumarate, L-malate, oxaloacetate들을 대상으로 하는 효소의 활성과 민감성 측정 실험에서 TTC를 첨가시킨 후 반응을 관찰하였을 때 TTC가 효소반응을 통해 water-insoluble formazan을 형성하게 되면 spectrophotometer를 이용하여 O.D484nm 값을 측정하고 이를 토대로 각 효소의 TTC에 대한 반응성을 확인 할 수 있었다. TCA cycle의 intermediate들을 대상으로 한 효소 활성 중 L-malate와 fumarate를 substrate로 사용한 경우에 TTC의 발색반응이 높게 나타내어 L-malate와 fumarate를 기질로 하는 효소가 TTC의 발색에 영향을 주는 효소인 것으로 추정되었다.

한편, enzyme과 substrate 그리고 TTC가 같이 존재하는 reaction mixture에만 triphenyl-formazan을 형성하였으며 또한 TCA cycle내의 intermediate들 중 fumarate와 L-malate를 substrate로 사용한 반응혼합물에서만 triphenyl-formazan을 형성하여 fumarate나 L-malate를 기질로 하는 효소가 TTC 반응에 영향을 주는 것으로 추정할 수 있다.

#### 라. EBDC계 살균제와 $NAD^+$ 및 $NADH$ 와의 관계 조사

$NADH$ 는 일반적으로 dehydrogenase계 효소의 작용하에 cofactor로 작용하는 것으로 알려져 있다. TTC는 dehydrogenase에 의해 환원되어 red color를 나타내는 formazan을 형성한다. 따라서 mancozeb을 첨가한 dehydrogenase의 반응에서 mancozeb이 직접  $NAD^+$ 나  $NADH$ 에 영향을 미친다면 dehydrogenase 반응에 영향을 주므로 이를 확인하기 위하여 이들의 상호관계를 조사하는 연구를 실행하였다. 한편, Mancozeb이 O.D340nm 값에 영향을 끼쳤을 경우를 고려하여 효소의 반응계에 tris buffer(pH8.5)를 첨가하고 mancozeb을 농도별로 처리하여 O.D340nm 값을 측정 하여  $NAD^+$  와  $NADH$ 의 변화여부를 조사하였다.

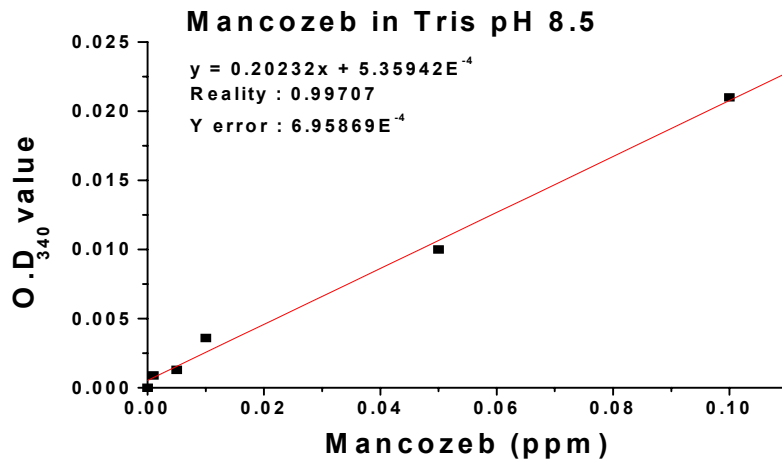


Fig. 48. Effect of mancozeb solved in Tris buffer to O.D340nm value.

Fig. 48에 보여준 바와 같이 buffer에 mancozeb을 농도별로 혼합한 경우 340nm에서의 흡광도에 비례적인 영향을 보여주었다. 이는 mancozeb이 NADH로의 전환된 값을 측정하는 O.D340nm값에 영향을 나타내므로 mancozeb의 농도가 높아지면 NADH로의 conversion양을 정확히 측정하기가 힘들다는 추측을 가능하게 하였다.

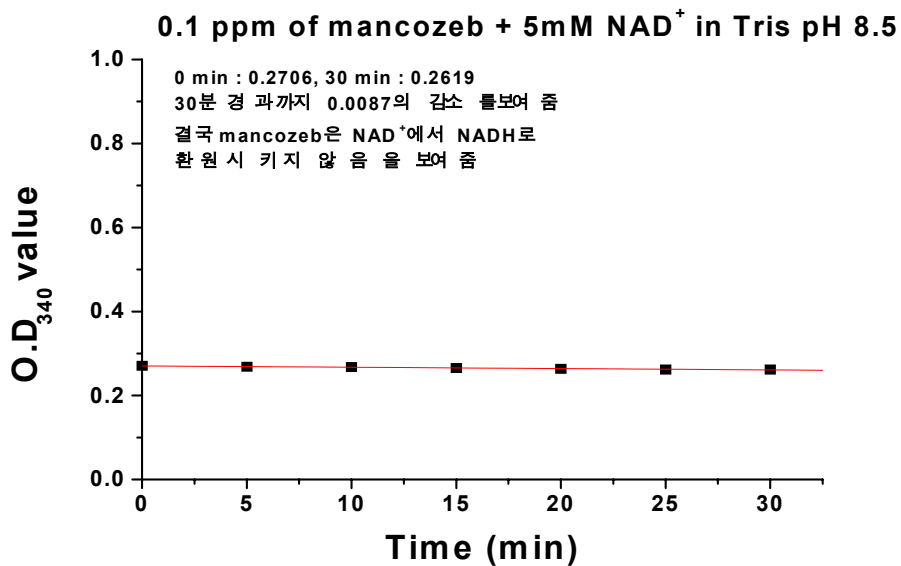


Fig. 49. Measurement of OD340nm value in Tris buffer with NAD<sup>+</sup> and mancozeb

Fig. 49에서는 mancozeb이 0.05 ppm 이상에서 효소활성 억제율이 감소하는 현상을 확인하기 위해 tris buffer (pH8.5)에 5mM의 NAD<sup>+</sup>와 0.1 ppm의 mancozeb을 첨가하여 25℃에서 30분간 반응을 시킨 다음 OD<sub>340nm</sub> 값을 측정하여 NADH로의 전환을 조사해 본 결과 mancozeb은 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 변화시키지 않는 것으로 나타났다.

마. CMB03 조효소 추출액의 최적반응 조건 조사

CMB03 조효소의 최적 반응조건을 조사하기 위하여 Table 11과 같이 조효소 추출물들을 대상으로 동일한 기질 (L-malate)을 이용하여 substrate를 넣어준 시간과 TTC를 가해준 시간 등 조건을 달리하면서 효소의 활성정도를 측정하였다.

Table. 11. Reaction procedure and time of each group(group a, b, c, d).

Group	Reaction time and adding order of reagents
a	Crude enzyme + L-malate ---> 20min reaction ---> TTC ---> reaction for 2 hrs
b	Crude enzyme + TTC ---> 20min reaction ----> L-malate ----> reaction for 2 hrs
c	TTC + L-malate ---> 20min reaction ---> crude enzyme ---> reaction for 2 hrs
d	Crude enzyme + L-malate + TTC -----> reaction for 2 hrs

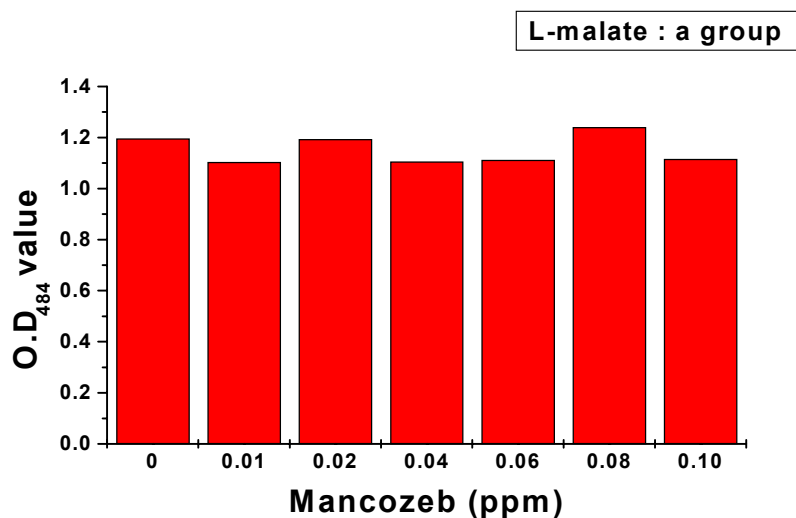


Fig. 50. Measurement of enzyme activity with L-malate on several concentration of mancozeb

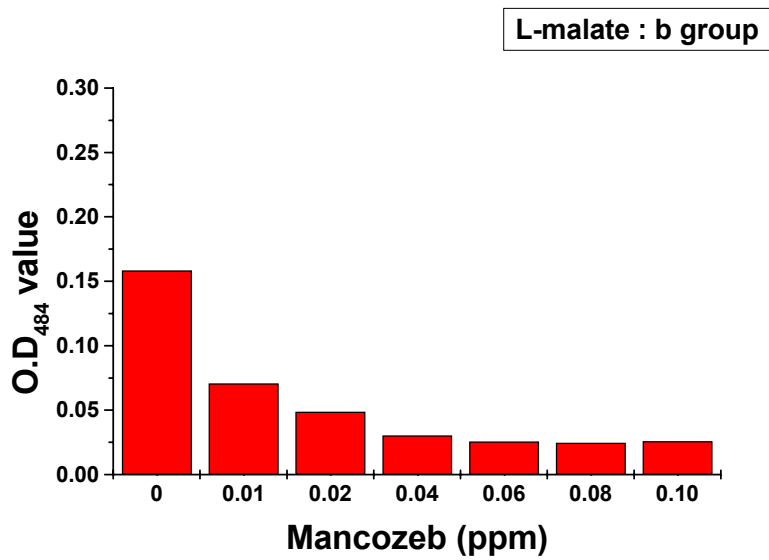


Fig. 51. Measurement of enzyme activity with L-malate on several concentration of mancozeb

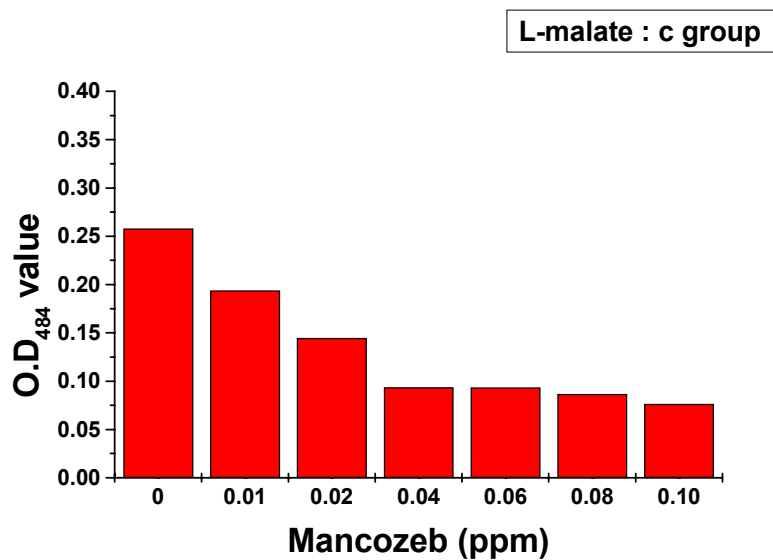


Fig. 52. Measurement of enzyme activity with L-malate on several concentration of mancozeb

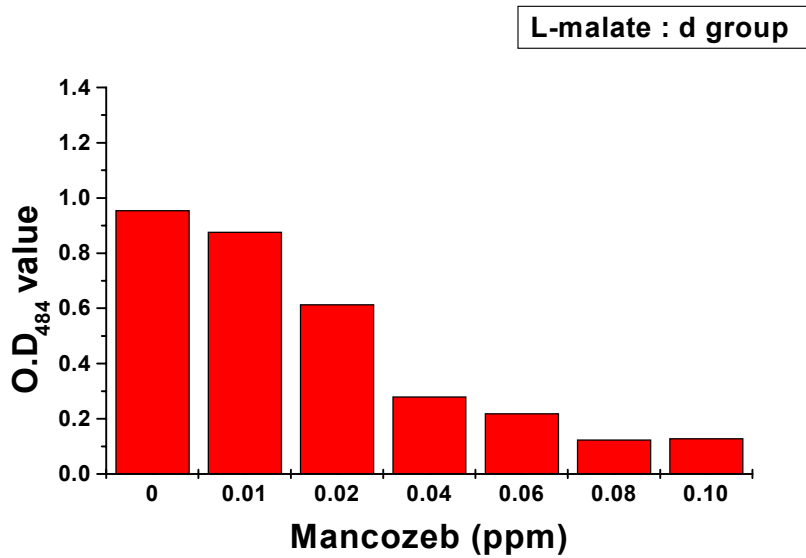


Fig. 53. Measurement of enzyme activity with L-malate on several concentration of mancozeb

Fig. 50 부터 Fig. 53 까지 나타낸 결과들은 모두 CMB03 조효소 추출물과 L-malate의 반응으로 기질과 TTC를 첨가하는 시간을 달리하여 효소의 활성정도를 측정하는 것이다. Fig. 50의 경우 조효소에 L-malate를 첨가한 후 20분간 37°C에서 반응을 시킨 다음 TTC를 첨가하고 다시 동일한 온도에서 2시간동안 추가 반응을 하여 측정하는 값을 나타낸다. 각 농도의 mancozeb에 대해서 불규칙한 값을 나타내고 있는데 이러한 결과 값들은 실험의 오차에 의한 것으로 사료된다. 한편, Fig. 51의 경우에는 조효소에 TTC를 첨가한 후 37°C에서 20분 동안 반응을 시킨 후 L-malate를 첨가하고 다시 2시간동안 추가 반응을 실시한 결과인데 mancozeb을 첨가하지 않은 상태의 반응에서도 TTC의 발색정도가 너무 낮은 값을 나타내었으며, mancozeb의 농도가 높아질수록 TTC의 발색정도가 더 낮아지는 양상을 보였다.

Fig. 52의 경우는 TTC와 L-malate만을 첨가한 상태에서 20분간의 반응 시간을 주고 그 후에 조효소를 첨가하고 2시간의 추가 반응을 시킨 것이다. 이렇게 반응이 일어난 결과 값들은 Fig. 52에 나타낸 측정값들과 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편, 조효소와 L-malate, TTC를 동시에 첨가한 후 반응을 시켰던 Fig. 54의 경우에는 mancozeb이 첨가되지 않은 상태와 농도별로 mancozeb이 존재하는 상태에서의 효소의 억제율과 충분한 상관관계를 갖는 것으로 나타났다.

동일한 방법으로 Fumarate를 기질로 CMB03 조효소와의 반응을 Table 12와 같이 실시하여 그 결과를 아래와 같이 정리하였다.

Table. 12. Reaction procedure and time of each group (group a, b, c, d).

Group	Reaction time and adding order of reagents
a	Crude enzyme + Fumarate ---> 20min reaction ---> TTC ---> reaction for 2 hrs
b	Crude enzyme + TTC ---> 20min reaction ---> Fumarate ---> reaction for 2 hrs
c	TTC + Fumarate ---> 20min reaction ---> crude enzyme ---> reaction for 2 hrs
d	Crude enzyme + Fumarate + TTC ---> reaction for 2 hrs

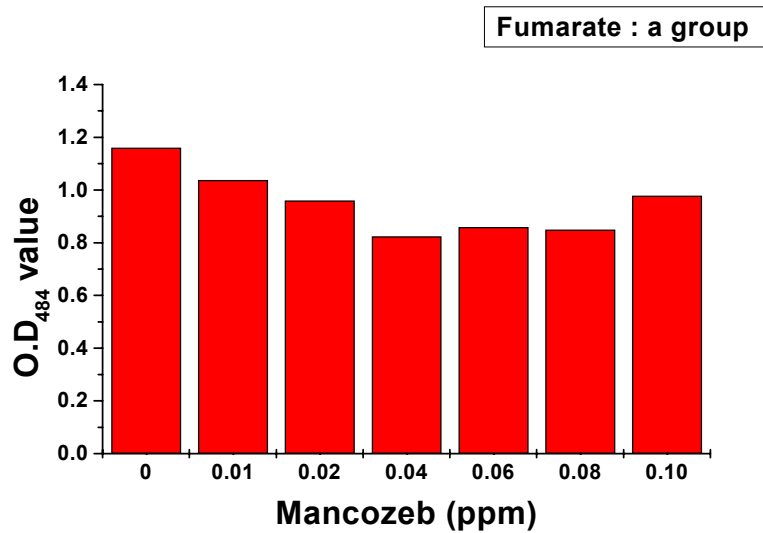


Fig. 54. Measurement of enzyme activity with fumarate on several concentration of mancozeb

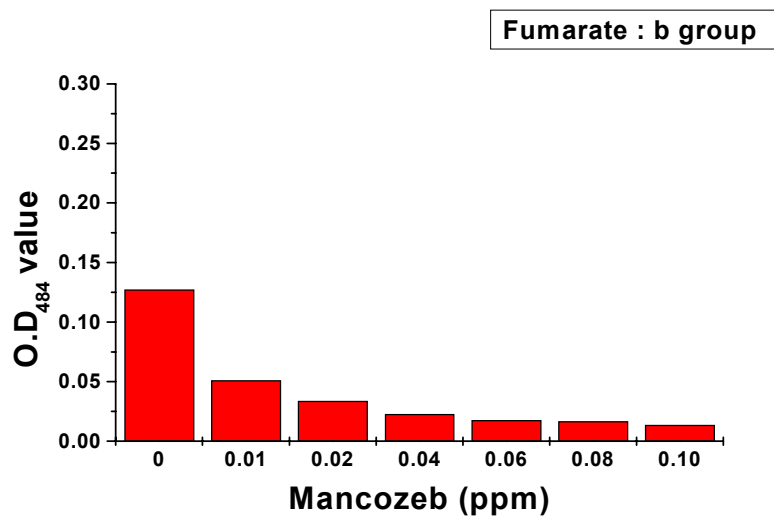


Fig. 55. Measurement of enzyme activity with fumarate on several concentration of mancozeb

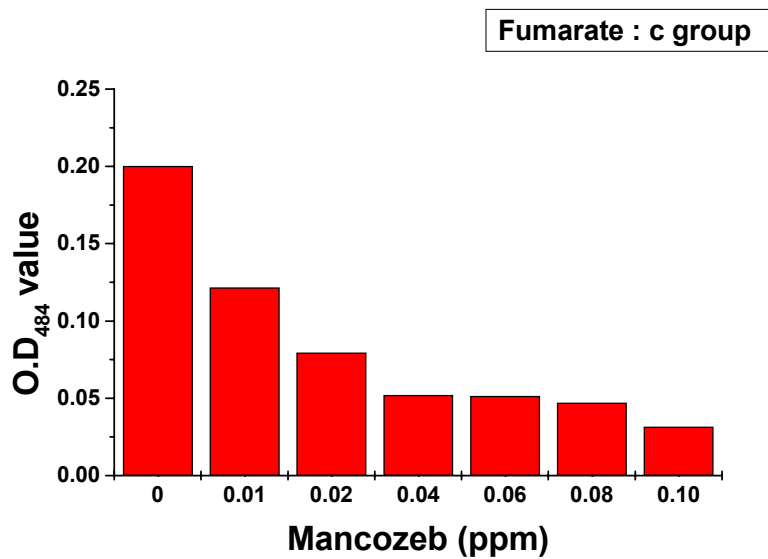


Fig. 56. Measurement of enzyme activity with fumarate on several concentration of mancozeb

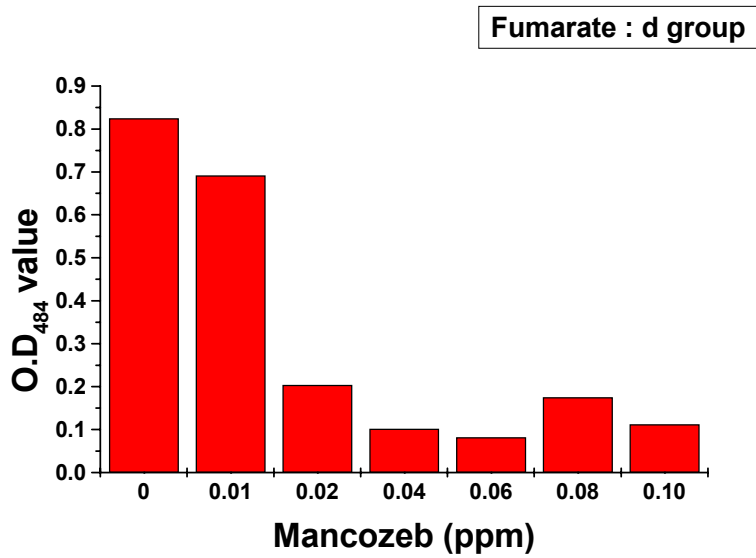


Fig. 57. Measurement of enzyme activity with fumarate on several concentration of mancozeb

Fig. 54부터 57까지의 결과에서 보면 Fumarate를 기질로 실행한 CMB03 조효소의 여러 가지 반응조건 중 D group (Crude enzyme + Fumarate + TTC reaction for 2 hrs)의 반응조건에서 가장 이상적인 결과를 나타냈다. Mancozeb 0 ppm 무처리와 비교하여 0.02 ppm 에서는 약 4배 정도의 효소억제율을 나타냈다.

위의 실험들을 토대로 CMB03 조효소 반응의 d group 반응조건하에서 Fumarate와 Malate를 substrate로 사용한 실험을 실시하였다.



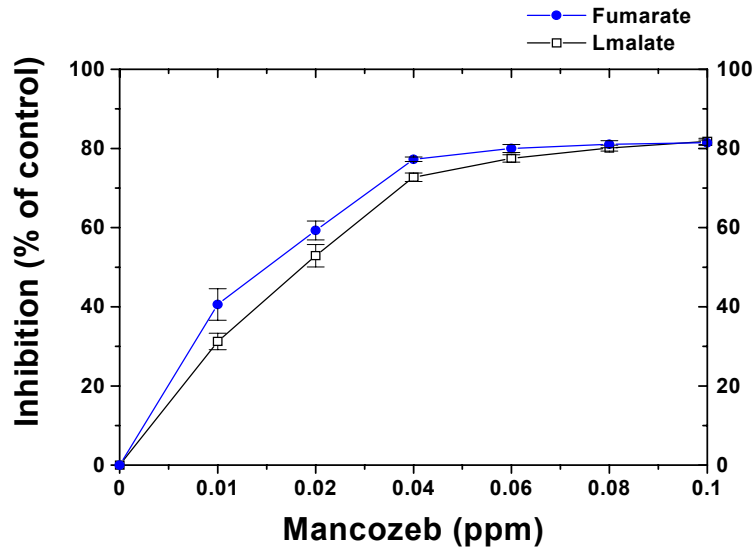


Fig. 58. Measurement of enzyme activity with L-malate and fumarate on several concentration of mancozeb (crude enzyme + L-malate / fumarate + TTC + mancozeb)

Fig. 58.에 나타낸 결과를 분석하면 0.1 ppm의 mancozeb 농도에서의 inhibition ratio는 L-malate와 fumarate가 거의 같았으나 mancozeb의 농도가 높아질수록 fumarate의 inhibition ratio가 L-malate 보다 조금 높게 나타났다. Mancozeb 0.1 ppm 이하의 농도에서 fumarate의 inhibition ratio가 L-malate의 inhibition ratio보다 높게 나타난 이유는 다음과 같이 추정된다.

1, Fumarate구조상 hydrogen donor로서 작용할 작용기가 없기에 직접 fumarate를 이용한 enzyme이 TTC로 hydrogen을 transfer할 수 없기 때문으로 추측된다.

2, Mancozeb 0 ppm에서의 formazan formation이 fumarate와 L-malate에서 거의 비슷하게 나타나는데 이는 fumarate를 이용한 효소반응에서 첫 번째 이유와 비교하여 single step hydrogen transfer를 할 수 없음에도 불구하고 formazan formation이 비슷하게 나오기 위해서는 dual enzyme system이 작용한 것으로 생각된다.

3, Mancozeb을 첨가하지 않고 isocitrate와 succinyl-CoA, 그리고 pyruvate를 제외한 TCA cycle intermediate들을 substrate로 이용한 반응에서 L-malate와 fumarate만이 측정 가능한 formazan을 형성하며 oxalacetate와 succinate를 substrate로 사용한 반응에서는 fumarate와 malate와 비교하여 1.8 %와 2.1 %의

formazan formation이 일어났고 나머지 intermediate들은 측정이 불가능하였다.

Fumarate를 substrate로 이용한 반응에서 formazan formation이 L-malate와 비슷하게 나타나는데 이는 fumarate의 구조적인 특성상 fumarate를 이용한 enzyme과 L-malate를 이용한 enzyme의 특성을 모두 갖는 dual enzyme system이 존재하는 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 알 수 있는 바 enzyme과 substrate 그리고 TTC가 동시에 존재하는 반응혼합물에서만 triphenyl-formazan을 형성하였으며 TCA cycle의 intermediate들 중 fumarate와 L-malate를 substrate로 사용한 반응혼합물에서만 triphenyl-formazan을 형성하는 반면 succinate와 oxaloacetate를 substrate로 사용한 반응혼합물에서는 매우 적은 수준의 triphenyl-formazan을 형성하였으며 citrate와 oxaloacetate, 그리고 D-lactate를 substrate로 사용한 반응혼합물에서는 거의 측정되지 않았다.

본 연구에서 TCA cycle의 intermediate들 중 최종산물로 a-keto form을 형성하는 isocitrate dehydrogenase와 malate dehydrogenase에서 TTC로 detection 가능할 것으로 판단되었는데 실험결과 malate dehydrogenase를 이용해 mancozeb을 첨가하고 기질과 조효소액 그리고 발색제 TTC가 동시에 반응에 참여한 경우 가장 효과적인 효소반응을 나타내는 것으로 나타나 이 반응조건이 CMB03 조효소의 최적반응 조건인 것으로 추정되었다.

## 제 6 절. 잔류농약 측정체계와 Kit의 생산체계의 수립

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 잔류농약 측정체계와 생산체계의 수립 및 검토

EBDC계 살균제 잔류농약 측정체계와 생산체계를 수립하기 위하여 CMB03의 액체 잔류농약 간이 검색방법과 미생물의 보존성과 안정성을 보완하고 유통 및 보급의 편리를 위하여 alginate bead를 제조하여 균주를 고정화한 간이 측정법 및 미생물을 고체상태로 동결건조하여 보관하면서 수시로 배양하여 잔류농약 측정에 사용할 수 있는 등 3 가지 방안에 대하여 연구를 실시하였으며 아울러 CMB03의 안전성 및 안정성을 고려하여 마우에 대한 독성실험도 실행하였다.

1) *Bacillus sp.* CMB03 액체배양액을 이용한 잔류농약 측정법

대만에서 개발한 TTC를 발색제로 BT미생물을 이용한 잔류농약 측정법의 원리를 참고로 하여 BT보다 EBDC계 살균제에 민감하고 성장속도가 빠른 *Bacillus sp.* CMB03 균주를 선발하고 이 균주의 최적배양조건, 최소생육저해농도, 잔류농약의 검출환경 및 작물별 잔류농약의 반응성과 추출방법에 대한 많은 연구를 실행하여 최종적으로 CMB03 액체배양액을 이용한 잔류농약 측정법을 개발하였다.

2) CMB03 alginate bead를 이용한 잔류농약 검색법

*Bacillus sp.* CMB03 균주를 12시간 배양한 후 새로운 배지로 교환하고 3시간의 추가 배양을 실시한 후 3 % sodium alginate solution을 첨가한 다음 glycerol을 15 % 되게 혼합하고 충분히 교반하면서 2 % CaCl<sub>2</sub> 용액에 혼합액을 첨가하면 직경 5mm 정도의 alginate bead가 형성된다. 이렇게 형성된 bead를 Wattman paper를 통해 거른 후 bead를 회수하여 사용한다.

3) *Bacillus sp.* CMB03 의 안전성

농약의 잔류검사에 사용하는 균주에 대한 인체 및 환경에 대한 안전성이 확보되어야 하며, 사용되는 균주의 활성이 최대한 보장되어야 하므로 이러한 사항을 조사하기 위해 마우스를 대상으로 하여 CMB03 배양액을 복강주사와 경구투여하고 마우스의 생사여부 및 생체내 장기 및 조직의 이상유무에 대한 조사를 실시하였다.

4) Kit의 생산체계 수립

본 연구에서 개발한 미생물을 이용한 잔류농약 진단 Kit의 생산체계와 보급을 위하여 현재 중소기업과 협의 중에 있다.

나. 정형화된 잔류농약 측정법과 개발한 Kit와의 비교 및 현장 시료중 잔류농약 측정결과를 기초로 한 정확성 및 경제적 타당성 평가

1) 기존의 정형화된 CS2측정법과 본 연구에서 개발한 Kit를 비교하여 시중에 유통되고있는 감귤, 사과 및 배등 과채류 중의 EBDC계 잔류농약 함량을 측정하기 위하여 아래와 같은 방법으로 실행하였다.

CS<sub>2</sub> 측정에 의한 mancozeb 잔류량 측정방법

시료 20g, 증류수 100 ml, 진한 HCl 20 ml, SnCl<sub>2</sub> 5g을 HCl 20 ml에 녹인 용액을 차례로 three necked flask에 가하고, 즉시 air inlet tube를 연결하여 유속을 50 ml/min.로 공기를 불어넣었다. 가열은 heating mantle을 사용하여 flask내의 시료가 끓은 후 50분 정도 반응시켰다. 이때 mancozeb는 100℃ 이상에서 CS<sub>2</sub> gas로 분해되는데 이 gas를 포집할 수 있는 장치에 10 % NaOH 10 ml와 benzene 5 ml을 넣고 gas를 받을 수 있는 장치에 발색시약(초산동 10mg, diethanol amine 20g을 ethanol을 첨가해 200 ml로 맞추어 조제)15 ml를 가하였다. 반응이 완료되면 소량의 ethanol로 씻어내려 25 ml 용량 flask에 받아 ethanol 로 표준선 까지 채운 후 2시간 이내에 spectrophotometer/UV 435nm에서 흡광도를 측정하였다.

CMB03 Kit를 이용한 잔류농약 측정법

과채류 시료의 껍질을 4cm<sup>2</sup>×4 인 크기로 자른 후 2 ml EDTA/DMSO 로 녹여 1min mixing시키고 10 ml LB broth에 넣는다. mancozeb 농도값을 비교하기 위해 standard를 농도별로 구분하여 10 ml LB broth에 넣는다. 시료와 standard 에 모두에 CMB03균액을 100 μl(OD600nm value=1.0)를 넣고 37 °C, 150 rpm에서 90분 동안 배양한 후 2 % TTC 100 μl를 첨가하고 암조건에서 30분동안 재배양시킨다. 30분 후 250 μl stop solution 을 넣고 spectrophotometer로 O.D484nm value를 측정한다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 잔류농약 측정체계의 수립 및 검토

EBDC계 살균제 잔류농약 측정체계와 생산체계를 수립하기 위하여 CMB03의 액체배양액을 이용한 잔류농약 간이 검색방법과 미생물의 보존성과 안정성을 보완하고 유통 및 보급의 편리를 위하여 alginate를 이용하여 bead capsule를 제조하여 균주를 고정화한 간이 측정법 및 미생물을 고체상태로 동결건조하여 보관하면서 수시로 배양하여 잔류농약 측정에 사용할 수 있는 등 3 가지 방안에 대하여 연구를 실시하였다.

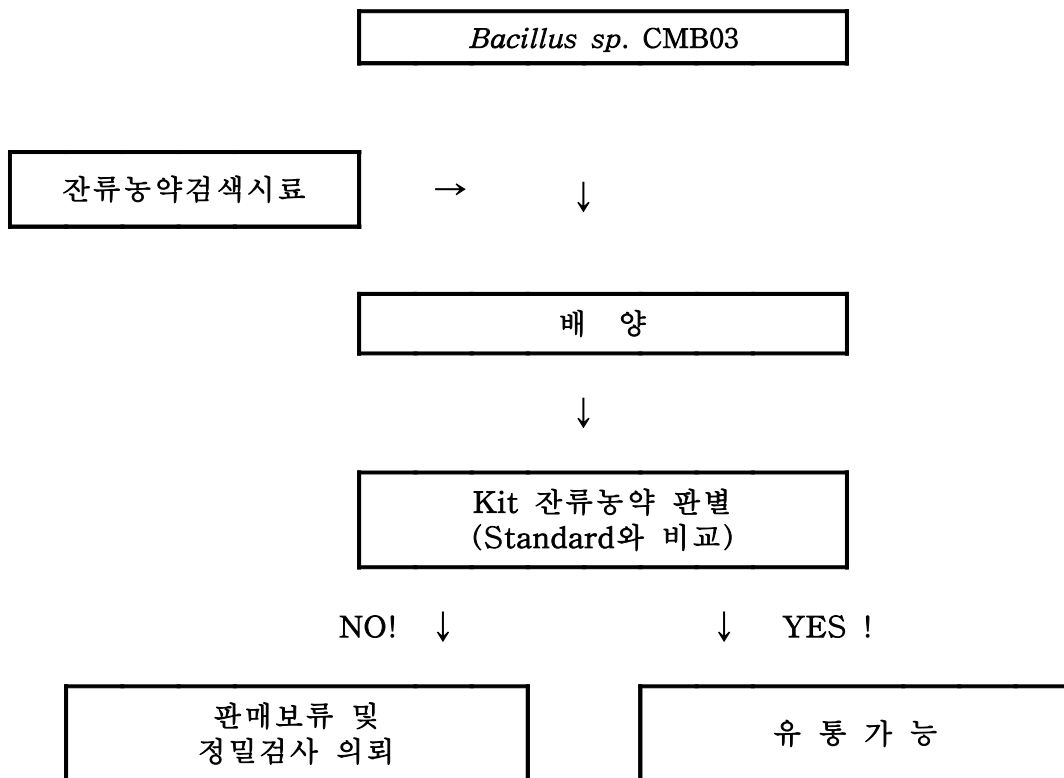


Fig. 59 Flow chart of Rapid Residues Assay method for Fruits and Vegetables

#### 1. *Bacillus sp. CMB03* 액체배양액을 이용한 잔류농약 측정법

CMB03균주의 최적배양 조건, EBDC계 살균제에 대한 최소생육저해농도 및 EBDC계 살균제의 최소검출한계 그리고 미생물과의 반응성을 고려한 작물별 추출방법 등 많은 연구결과를 바탕으로 대만의 BT를 이용한 TTC 발색법에 의한 잔류농약 측정법의 원리를 참고로 하여 Fig. 59와 60과 같은 잔류농약 측정체계를 수립하였다. 또한, 종균의 활성과 안정성을 보장할 수 있고 장시간 안전하게 보관할 수 있고 유통 및 보급 그리고 제품화에 유리하고 편리한 방법으로 미생물을 일정한 정도 배양한 다음 동결건조하여 냉장 또는 냉동 보관하면서 수시로 재배양하여 액체배양액을 이용한 잔류농약 측정에 편리하게 사용할 수 있다.

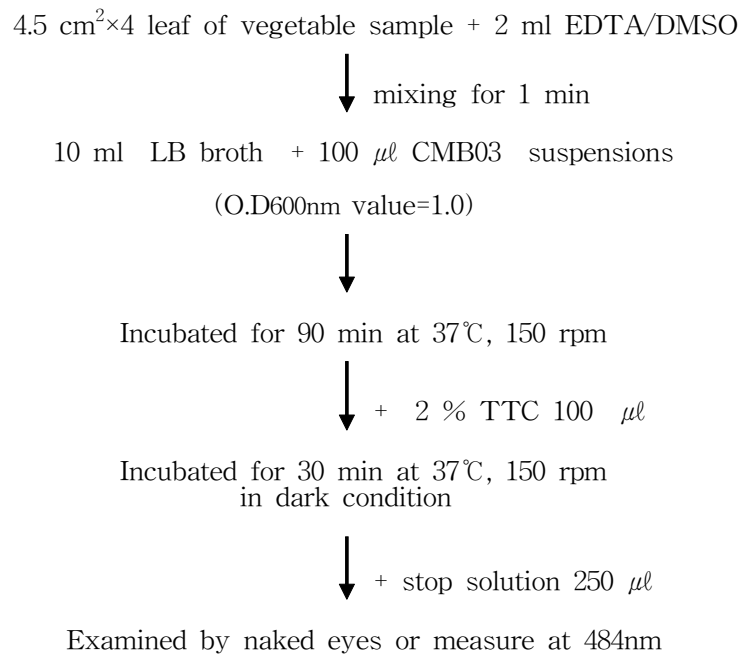


Fig. 60. Procedure of TTC test for EBDC's pesticide residue with *Bacillus sp.* CMB03 in vegetables and fruits

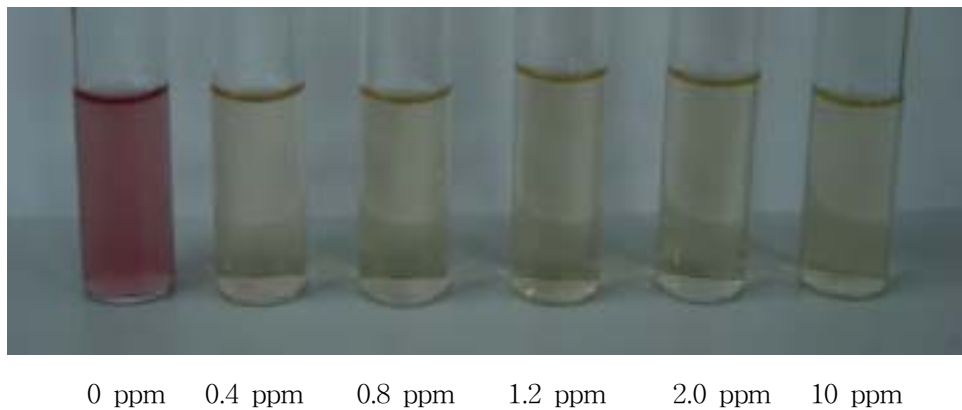


Fig. 61. Results of Rapid Fungicide Residues Assay using color formation with CMB03 culture method

2. CMB03 alginate bead를 이용한 잔류농약 검색법

*Bacillus sp.* CMB03 균주를 12시간 배양한 후 새로운 배지로 교환하고 3시간

의 추가 배양을 실시한 후 3 % sodium alginate solution을 첨가한다. 균체의 보존능력을 높여주기 위해 glycerol를 15 % 되게 혼합한 다음 충분히 교반하고 2 % CaCl<sub>2</sub> 용액에 혼합액을 떨어트려 sodium alginate에 존재하는 sodium ion(Na<sup>+</sup>)을 Ca<sup>2+</sup> ion으로 교환시켜주면 Fig. 62에 보여주는 것과 같이 직경 5mm 정도의 alginate bead가 형성된다. 이렇게 형성된 bead를 Wattman paper를 통해 거른 후 bead를 회수하여 잔류농약 검색에 사용할 수 있다.



Fig. 62. CMB03 beads by microbial organism immobilization system with alginate

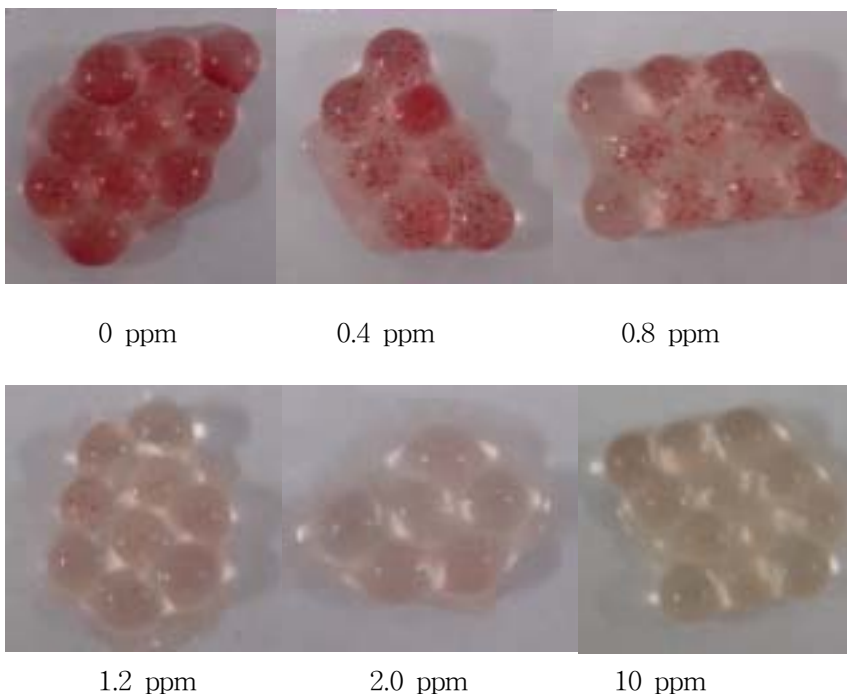


Fig. 63. Results of Rapid Fungicide Residues Assay using color formation with CMB03 Alginate bead method

이러한 방법은 액체배양액을 직접 유통, 보존하는 방법보다 미생물의 활성을 오래동안 안전하고도 안정성이 있게 그리고 보다 간편하게 유통, 보급 및 사용할 수 있어 기존의 균주 액체배양을 통한 검색법과 비교할 때 육안 식별이 더 용이하였다.

### 3. *Bacillus sp.* CMB03 의 안전성

약잔류검사에 사용하는 균주에 대한 인체 및 환경에 대한 안전성이 확보되어야 하며, 사용되는 균주의 활성이 최대한 보장되어야 하므로 이러한 사항을 조사하기 위해 마우스를 대상으로 하여 CMB03 배양액을 복강주사와 경구투여하고 마우스의 생사여부 및 생체내 장기 및 조직의 이상유무에 대한 조사를 실시하여 그 결과를 Tabel. 13에 나타내었다.

Table. 13 Injection test in mice with cultured CMB03 strain

구 분	복강주사		경구투여	
	CMB03 배양액 원액 100 $\mu$ l	CMB03 배양액 1/10희석 100 $\mu$ l	CMB03 배양액 원액 100 $\mu$ l	CMB03 배양액 1/10희석 100 $\mu$ l
개 체 수	5마리	5마리	5마리	5마리
생존여부	생 존	생 존	생 존	생 존
해부결과	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음

Tabel. 13의 결과에서 보여주다 같이 CMB03 균주는 마우스에게 경구 및 복강주사 투여를 한 다음 전체 실험군이 모두 생존하였으며 해부결과에서도 장기나 조직에 어떠한 이상이 발견되지 않은 것으로 보아 동물에게 독성이 없는 것으로 초보적으로 추정하고 있다.

### 나. Kit의 생산체계 수립

EBDC계 잔류농약 검사 Kit 생산 및 원활한 공급이 될 수 있도록 체계적인 생산시스템 및 공급처가 확보되어야 하며 이러한 체계의 구축 및 운영에 있어서 고려되어야 할 사항들을 충분하고 면밀히 연구되어야 할 것이며, 또한 경제성에 대한 사항들도 고려되어야 한다. 이러한 사항들에 대하여 현재 중소기업과 협의 중에 있다.



나. 정형화된 잔류농약 측정법과 개발한 Kit와의 비교 및 현장 시료중 잔류농약 측정을 기초로 한 정확성, 및 경제적 타당성 평가

1) 기존의 정형화된 CS<sub>2</sub> 측정법과 본 연구에서 개발한 Kit를 비교하여 시중에 유통되고있는 감귤, 사과 및 배 등 과채류의 EBDC계 잔류농약 함량을 측정하여 그 결과를 아래와 같이 정리하였다.

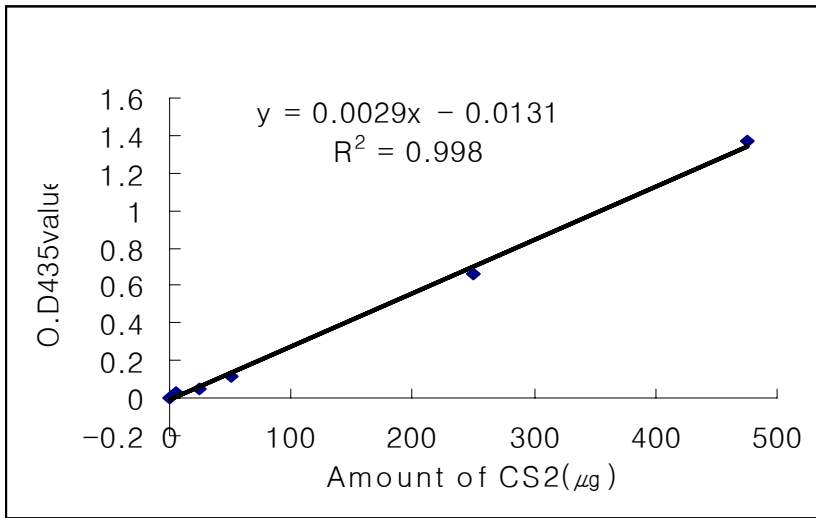


Fig. 64. Standard Calibration Curve of Mancozeb by CS<sub>2</sub> method

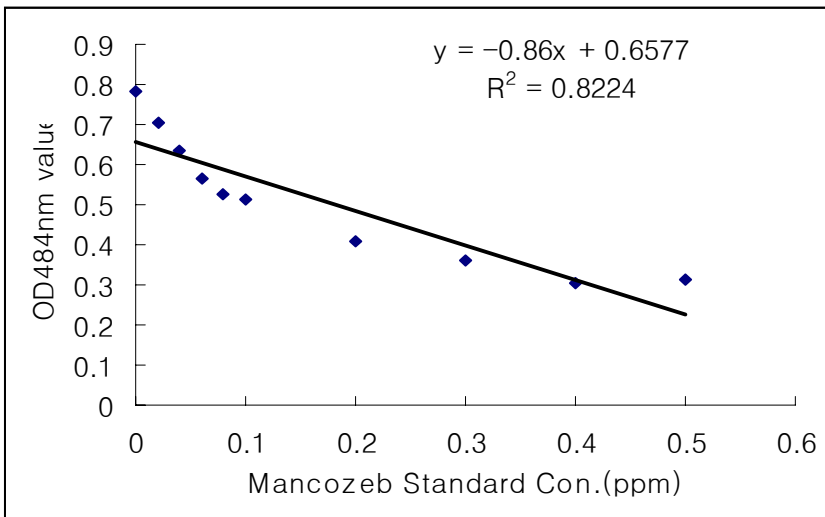


Fig. 65. Standard Calibration Curve of Mancozeb by CMBO3 test

Table 14. Comparison Residue Analysis of Mancozeb between CS<sub>2</sub> method and CMB03 test

Sample ( 20g )		Mancozeb ( ppm )		MRL ( ppm )
		CS <sub>2</sub> 측정법	CMB03 측정법	
감 귤	중문	0.58±0.05	0.58±0.03	-
	천지연	0.67±0.17	0.61±0.05	
	서귀	1.37±1.07	0.60±0.07	
	안덕	1.37±1.03	0.62±0.04	
	성산	1.43±0.24	0.51±0.04	
사 과	함양	0.40±0.08	0.35±0.07	3.0
	곡성	0.87±0.50	0.36±0.05	
	거창	0.91±0.42	0.25±0.06	
배	주	0.65±0.37	0.27±0.10	3.0
	신	0.55±0.39	0.24±0.14	
	박	0.42±0.02	0.24±0.10	

※ Standard calibration equation

$$y=0.0029x-0.0131(R^2=0.998)$$

※ Mancozeb( $\mu$ g)=CS<sub>2</sub>( $\mu$ g)×1.77

정형화된 CS<sub>2</sub>법과 미생물 CMBO3를 이용한 TTC test법 모두가 시료에 대한 잔류농약량이 MRL(최대잔류허용량)에는 크게 미치지 못하였다. CS<sub>2</sub>법은 결과치의 표준편차가 CMBO3 측정결과 보다 매우 큰 것으로 보아 그 방법이 매우 불안정하고 재현성이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 반면에 CMB03을 이용한 TTC test 법은 측정오차가 낮고 재현성이 좋으며 신속하고 간편한 우점을 보여주었다.

## 2) 잔류농약 측정의 정확성, 및 경제적 타당성 평가

기존의 정형화된 CS<sub>2</sub>법과 비교하여 분석의 정확성, 분석시간, 환경에 미치는 영향 및 경제적인 측면과 사회적 효과에 대하여 그 타당성을 평가하였다.

본 연구에서 개발한 CMB03을 이용한 잔류농약 검색법은 최소검출한계가 육안으로 0.04 ppm 까지 분석가능하고 실제 시료에서도 0.1 ppm 이하의 잔류량을 쉽게 검출할 수 있으며 재현성이나 측정오차도 기존의 CS<sub>2</sub>법 보다 우월한 특징을 갖고 있다. 그 결과를 Fig. 66과 67에 보여주었다.



Fig. 66. Results of Rapid Fungicide Residues Assay using color formation with CMB03 test ( mancozeb : 0 - 1.0 ppm )

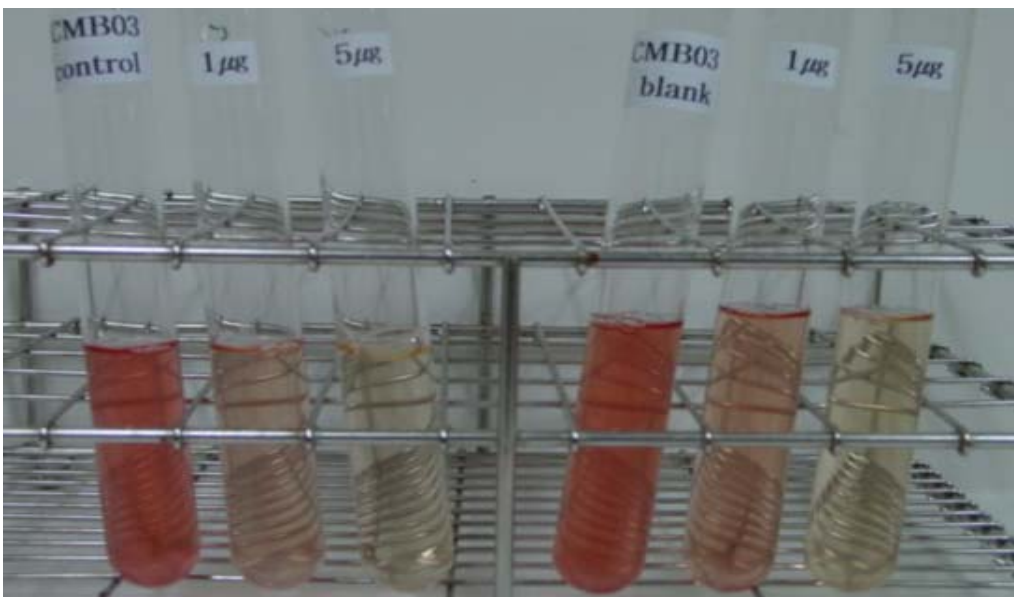


Fig. 67. Results of Rapid Fungicide Residues Assay using color formation with CMB03 test on agricultural sample

Fig. 66의 결과에서 보여준 것과 같이 잔류농약의 농도 0.04 ppm에서 대조구와 색깔 차이를 구분할 수 있을 정도로 민감하다. Fig. 67의 결과는 무처리 시료에 mancozeb을 0.1ppm 과 0.5 ppm 으로 처리한(왼쪽: 배양배지에 농약을 처리, 오

른 쪽: 상추 에 농약을 처리) 후 측정된 결과로서 0.1 ppm 수준에서 control과 blank 와 선명한 색상차이를 나타내어 쉽게 잔류농약의 존재를 측정, 판단할 수 있었다. 한편, 전체 측정과정에 2ml 의 EDTA/EMSO 수용액 과 10 ml의 배양배지와 100  $\mu$ l의 TTC 발색제 수용액 그리고 250  $\mu$ l의 반응정지제, 몇 가지 간단한 유리기구 와 incubator, vortex 와 같은 간단한 기기를 사용하여 빠른 시간내에 더 많은 시료를 신속 정확하고 간편하게 측정할 수 있었다. 반면에 기존의 CS<sub>2</sub>법은 염산, 벤젠 등 독성용매와 SnCl<sub>2</sub> 와 같은 시약을 대량사용하고 실험과정 중 CS<sub>2</sub> 독성기체가 발생하기에 실험자의 건강과 주위환경에 아주 큰 위해를 주고 있으며 시료당 분석시간이 1시간 이상 소요되는 여러 가지 단점들을 갖고 있다. 아울러 휘발성 기체산물을 측정하는 방법이기에 실험오차가 크고 재현성이 떨어지고 정확성이 낮다.

Table. 15. CMB03 Kit 측정법과 CS<sub>2</sub> 측정법의 특징 비교

특 점	EBDC계 살균제 잔류농약 측정방법	
	CS <sub>2</sub> 측정법	CMB03 Kit 측정법
신속성	시료당 1 시간이상 소요	50 점 시료/ 3.5 시간 소요
간편성	특수기구를 사용한 가수분해 반응과 독성기체 채집	간단한 초자기구사용, 비전문가 측정가능
경제성	고급인력, 장시간 소요, 작업량 가중, 시료당 분석료 고가 국산화 Kit 개발로 외화절약	신속, 간편하기에 대량의 시료를 동시에 분석가능하기에 시료당 분석료 저렴 Kit 대량생산과 보급이 가능
정확성	결과오차가 크고 재현성, 회수율이 낮음	오차가 작고 재현성 및 회수율이 높으며 0.1 ppm이하 저농도 검출가능
인체와 환경에 대한 위해성	많은 독성시약을 사용 독성기체 발생	소량의 시약과 용매사용 무독성 균주사용
사회적 효과	안전 농산물공급과 수출입 농산물 규제 불가	안전 농산물 공급과 수출입 농산물 규제 강화

## 제 5 장. 참고문헌

1. Altman, F. P. (1976) Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* 9, 1-7.
2. Bitton, G (1983) Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment: a review, *CRC Crit. Rev. Environ. Control.* 13, 51-83.
3. Bartkowiak A., Hunkeler D.,(1999) Alginate-oligochitosan microcapsules: a mechanistic study relating membrane and capsule properties to reaction conditions. *Chem Mater.*, 11:2486-2492
4. Bederson J.B, Pitts L.H, Germano S.M, Nishimura M.C, Davis R.L, Bartkowski H.M,(1986). Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infraction in rats. *Stroke.* 17 : 1304-8.
5. Berit L. Strand, Yrr A. Morch, T. Espevik, G. S Braek, (2003) Visualization of Alginate Microcapsules by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 82(4) : 386-394.
6. Bhatia R. B., Brinker C. J., Gupta A. K., Singh A. K.,(2000) Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chem Mater.* 12:2434-2441.
7. Cremisini, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R. and Palleschi, G. (1995) Evaluation of the use of free and immobilized acetylcholinesterase for paraoxon detection with amperometric choline oxidase based biosensor. *Anal. Chem. Acta.* 311, 273-280.
8. Chhabra, R. S. Eustis, S. Haseman, J. K. Kurtz, P. J. and Carlton, B. D. (1992) Comparative carcinogenicity of ethylenethiourea with or without perinatal exposure in rats and mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 18, 405-417.
9. C. S. Chiu, C. H. Kao and E. Y. Cheng. 1991. Rapid Bioassay of Pesticide Residues(RBPR) on Fruits and Vegetables. *Journal of Agricultural Research of China* 40(2) : 188-203.

10. Callaway J.K, Knight M.J, Watkins D.J, Beart P.M, Jarrott B, Dwlaney P.M,(2000) A novel, rapid, computerised method for neuronal damage in a rat model of stroke. *J Neuroscience Methods*. 102 : 53-60
11. Cooki D, Richard O.K,(1999) Comparison of the Tetrazolium Salt Assay for Succinate dehydrogenase with the Cytosensor Microphysiometer in the Assessment of Compound Toxicities. *Analatical Biochemistry* 274 : 188-94
12. Denizot.F, Lang R.(1986) Rapid Colorimetric assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium dye Procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89 : 271-7
13. Dearfield, K. L. (1994) Ethylenethiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies. *Mutation Res.* 317, 111-132.
14. Dubey, J. K. Heberer, T. and Stan, H. J. (1997) Determination of ethylenethiourea in food commodities by a two-step derivatization method and gas chromatograohy with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr. A*, 765, 31-38.
15. E. Preston, J. Ewbster. 2000. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. *Journal of Neuroscience Methods* 94 : 187-192.
16. Elia, M. C. Arce, G. Hurt, S. S. ONeil, P. J. and Scribner, H. E. (1995) The genetic toxicology of ethylenethiourea: a case study concerning the evaluation of a chemicals genotoxic potential. *Mutation Res.* 341, 141-149.
17. Filho, O. B. Ahualli, A. P. Trevizan, L. R. P. and de Baptista, G. C. (2002) Book of Abstract 2: Mancozeb on export agricultural commodities: False positive response to CS2 determination by gas chromatography method using head space sampling: In *10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection*. Switzerland.
18. Gueguen, F. Bioisde, F. Queffelec, A. L. Haelters, J. P. Thouvenot, D. Corbel, B. and Nodet, P. (2000) Hapten synthesis for the development of a comparative inhibition enzyme-immunoassay for thiram. *J. Agric. Food*

- Chem.* 48, 4492-4499.
19. Gustafsson, K. H. and Thompson, R. A. (1981) High-performance liquid chromatographic determination of fungal dithiocarbamates. *J. Agric. Food Chem.* 29, 729-732.
  20. Hill, A. R. (1992) Headspace methods for dithiocarbamates. In *Emerging Strategies for Pesticide Analysis*, Cairns, T. and Sherma, J. (eds.) pp213-231, CRC Press.
  21. Keppel, G. E. (1969) Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 52, 162-167.
  22. Lentza-Rizos, C. (1990) Ethylenethiourea (ETU) in relation to use of ethylene bisdithiocarbamate (EBDC) fungicides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 115, 1-39.
  23. Martin H. Rosen and Alfred Perlmutter. (1982) A technique for assaying the activities of  $\alpha$ -GPD, LDH, and MDH in the teleost, the Goldfish, *Carassius auratus*. *comp. Biochem. physiol.* 71B. 113-17
  24. Newsome, W. (1974) A method for determining ethylenebis (dithiocarbamate) residues on food crops as Bis(trifluoroacetamide)ethane. *J. Agric. Food Chem.* 22, 886-889.
  25. Newsome, W. (1976) Residues of four ethylenebis(dithiocarbamate) and their decomposition products on field-sprayed tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 24, 999-1001.
  26. Noel R. Funderburk and A. S. Kester. (1975) Valine, malic, and pyruvic dehydrogenase tests in the differentiation of Bacteroides. *Can. J. Microbiol.* 21. 1369-71
  27. Pastorelli, R. Allevi, R. Romagnano, S. Meil, G. Fanelli, R. and Airoidi, L (1995) *Original investigation*: Gas chromatography-mass spectrometry determination of ethylenethiourea hemoglobin adducts: a possible indicator of exposure to ethylene bis dithiocarbamate pesticides. *Arch. Toxicol.* 69, 306-311.

28. Quan C.S., Fan S.D., Ohta Y.,(2003) Immobilization of *Candida krusei* cells producing gel beads: an application of the preparation of myo-inositol phosphates. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003 Apr 23 [epub ahead of print ]
29. Ryssov-Nielsen, H. (1975) Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of TTC-dehydrogenase activity. *Water Res.* 9, 1179-1184.
30. Rao. M. Uppu. 1995. Novel Kinetics in a Biomimetic Redox Reaction Involving NADH and Tetrazolium Salts in Aqueous Micellar Solutions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 58 : 193-207.
31. Stefanidou, M. and Koutselini, A. (1996) Bee head acetylcholinesterase as an indicator of exposure to organophosphate and carbamate insecticides. *Veterinary and Human Toxicol.* 38, 420-422.
32. Smidsrod O., Skjak-Brađ G.,(1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8:71-78
33. Srivastava D., Bernhard S.,(1985) Mechanism of Transfer of reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide among Dehydrogenases, *Biochem.*, 24, 623
34. T. Coradin, N. Nassif, J. Livage. 2003. Silica-alginate composites for micro - encapsulation. *Appl Microbiol Biotechnol.*
35. Tsernoglou D., Hill E., Banaszak L., (1972) Cytoplasmic Malate Dehydrogenase-heavy Atom Derivatives and Low Resolution Structure, *J. Mol. Biol.*, 69, 75
36. Willaert R. G., Baron G. V.,(1996) Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. *Rev Chem Eng.* 12: 1-205
37. Vryzas, Z. Papadakis, E. N. and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2002) Microwave-assisted extraction (MAE)-acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2220-2226.



38. 이 혜성, 이용태. 1998. 식품의 안전성 평가를 위한 바이오센서의 이용. 식품과학과 산업. 31:93-113.
39. 이 강봉. 1993. ELISA(enzyme-Linked Immunosorbent Assay)기법을 이용한 농약 잔류 분석. 한국농화학회 춘계학술발표회.
40. 이 시혁. 1991. In vitro anticholinesterase 스크리닝을 위한 집파리 외 3 종 곤충으로 부터의 acetylcholinesterase 의 추출. 한국응용곤충학회지. 30: 18-28.
41. 이 시혁, 이 준호, 조 광연. 1992. 전기뱀장어 및 집파리 AChE를 이용한 살충제의 in vitro AChE 저해시험. 한국응용곤충학회지. 31: 122-132.
42. 조영, 차승희. 1994. Acetylcholinesterase 효소진극 제조 및 그 특성. 한국생화학학회지. 27: 170-173.
43. 식품의약품 안전청. 식품공전. 2002.
44. 농약공업협회. 농약사용지침서. 2002.
45. 농약잔류 허용기준. 농업과학기술원. 2003.

## 최 종 결 론

본 연구는 EBDC계 살균제 잔류농약 검색용 미생물 선발 및 Kit 개발을 목적으로 연구개발 목표와 내용에 근거하여 연구를 진행하여 최종적으로 국내에서 처음으로 EBDC계 살균제에 민감하게 반응하는 미생물을 선발하여 잔류농약 측정용 Kit로 개발하여 기존의 정형화된 CS2 측정법과 비교하여 현장시료의 측정을 통해 Kit의 신속, 간편하고 경제적으로 타당함을 알 수 있었으며 국내 대량생산과 보급이 가능하고 사회적으로 기여가 충분할 것으로 판단된다.

본 연구에서 선발한 *Bacillus sp.* CMB03균주는 기존의 대만에서 개발한 BT균주 보다 성장속도가 3배 정도 빠르고 EBDC계 살균제에 대한 감수성도 뛰어난 것으로 나타났다. CMB03은 TTC 발색반응을 통한 감수성 실험에서 mancozeb 0.04 ppm 까지 육안으로 검출가능 하였으며 실제 농산물 시료에서도 0.1 ppm 이상을 쉽게 검출할 수 있었다. 아울러 미생물의 최적배양조건이 확립되었고 EBDC계 살균제에 대한 최소생육저해농도는 0.02 ppm 으로 선정되었으며 최소검출한계는 육안 측정 시 0.04 ppm, spectrophotometer 측정 시 0.004 ppm으로 확립되었다. 따라서 최적검출환경, 농약과의 반응성을 고려한 작물별 잔류농약의 추출방법이 고안되어 시료 50점 분석을 한 사람이 3.5시간에 충분히 정확하게 완수할수 있는 측정방법을 수립하였으며 잔류농약측정에 사용되는 추출용매, 발색제, 반응 정지제 등은 실온에서 45일 이상 안정하게 보관하여 사용할 수 있는 것으로 조사되었다.

미생물과의 반응성을 고려한 작물별 추출방법을 조사한 결과 감자, 사과, 배 등 7가지 과채류에서 살균제 0.1 ppm 과 0.5 ppm의 저 농도에서 모두 45 %이상의 회수율을 나타냈고 상추와 깻잎에서는 70 % 이상의 높은 회수율을 나타내어 BT균주 보다 높은 감수성과 우수한 측정결과를 가져왔다. 또한 감수성 효소의 탐색과 검증을 통해 L-malate 와Fumarate를 기질로 이용하는 dual enzyme system 이 동시에 작용하는 것으로 판단되었고 그 중 L-malate dehydrogenase 의 EBDC계 살균제에 대한 감수성이 현저히 높은 것으로 나타났다. 아울러 BT, CMB61 및 CMB52 등 감수성 균주와 비교하여 살균제에 대한 효소활성 억제율을 검증한 결과 CMB03균주의 L-malate dehydrogenase 의 효소활성 억제율이 76.9 %로 가장 높게 나타나 CMB03 균주가 기존의 BT균주 보다 민감한 우수한 균주임을 다시 한번 증명하였다. 동시에 감수성 효소의 최적반응 조건은 기질과 발색제를 동시에 첨가하여 반응시키는 것이 가장 최적 조건으로 확인되었으며 살

균제는  $\text{NAD}^+$ 를  $\text{NADH}$ 로 변화시키지 않는 것으로 조사되었다.

최종적으로 미생물 액체배양 측정법과 bead capsul 측정법 두 가지 측정체계가 수립되었으며 Kit의 생산체계 수립과 활용 및 보급을 고려하여 미생물을 동결건조하여 보관하면서 수시로 사용할 수 있는 방법을 고안하였다. 이러한 방법은 기존의 미생물을 사면배지에서 보존하는 방법보다 Kit의 제작, 보관, 및 유통이 편리하고 미생물의 활성을 오래동안 유지할 수 있고 경제적인 장점을 가지고 있다.

Bead capsul 측정법은 비록 측정감도는 액체배양 측정법 보다 낮지만 EBDC계 살균제의 MRL 이하까지 충분히 측정할 수 있을 정도로 0.4 ppm이상의 농도를 측정할수 있고 육안으로 측정하는데 편리하고 간편하며 기존의 대만 Kit 보다 한층 기술적으로 발전된 Kit로 제조, 유통 및 보관 그리고 보급이 편리하고 대량생산이 가능하며 저렴한 가격으로 현장에서 잔류농약측정을 실행할 수 있다.