

Ochrobactrum anthropi JW-2의 paraquat 내성에 관한 특성

원성혜 · 이병현 · 조진기*

경북대학교 동물공학과

Characterization of a paraquat resistance of *Ochrobactrum anthropi* JW-2. Won, Sung-Hye, Byung-Hyun Lee, and Jinki Jo*. College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea – The bacterial strain JW-2 which conferred resistance against paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) was isolated from soil. The strain was identified as an *Ochrobactrum anthropi* based on its morphological, physiological, biological and fatty acid composition, and was designated as *Ochrobactrum anthropi* JW-2. We compared paraquat resistance of *O. anthropi* JW-2 with *Escherichia coli* JM105. In the presence of 100 mM paraquat, *E. coli* JM105 was not grown whereas the growth rate of *O. anthropi* was about 70% of control. We compared the sensitivity of *O. anthropi* JW-2 and *E. coli* JM105 to redox-cycling compounds such as paraquat, plumbagin or menadione, which are known to exacerbate superoxide generation. *O. anthropi* JW-2 did not show cross-resistance to plumbagin or menadione. Superoxide dismutase activity was increased in paraquat-treated *E. coli* JM105 while it was not increased in *O. anthropi* JW-2. These results suggest that the mechanism of paraquat resistance in *O. anthropi* JW-2 is probably due to selectively decreased permeability toward paraquat by membrane protein.

Key words: *Ochrobactrum anthropi*, paraquat, resistance, superoxide

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride)은 상품명인 Gramoxone의 유효성분으로 수생 및 지상잡초의 방제용으로 널리 사용되고 있는 비선택성 제초제이다. 화학적으로는 bipyridinium염계의 화합물로서 제초제로 이용되기 전에는 methyl viologen이라는 이름의 산화환원 지시약으로 널리 사용되어 왔다[26]. 우리나라에는 1970년에 도입되었으며 1994년 전체 제초제 생산량 중에서 paraquat 가 차지하는 비율은 총 제초제 생산량의 약 12.0%, 유효성분 생산량으로는 약 31.0%, 매출액 면에서는 약 22.5%를 차지함으로서 농약사용량이 다른 농약류 보다 빠른 속도로 증가되어 왔으며 앞으로도 지속적으로 증가될 전망이다[1]. Paraquat은 분자구조 내에 2개의 양전하를 가지고 있고 수용액 중에서 양이온 상태로 존재하기 때문에 토양에 살포된 즉시 토양의 음전하 부분에 흡착되어 불활성화 된다[6, 8]. 특히 토양환경 중에서 점토광물에 강하게 흡착된 paraquat은 상당기간 잔류되어 토양을 오염시킬뿐만 아니라 유기물이 적은 사질토양에서는 빗물 또는 관개수에 의하여 용탈되어 수질을 오염시키고 나아가 작물 중으로 이행된다[10]. 그러나 Hance 등[12]은 수년간 paraquat을 연용 살포한 경작지에서 일정기간 이상 지났을 때 토양내 paraquat의 축적 농도가 증가하지 않았음을

발견하였는데, 이는 paraquat에 대한 광분해 작용과 토양 미생물의 작용과 관련이 있다고 보고하였다[9, 13, 21]. 이후 미생물의 paraquat 분해에 의한 대사작용 및 paraquat에 대한 내성에 관한 많은 연구가 보고되었는데, Baldwin 등[3]은 *Corynebacterium fascians*, *Clostridium pasteurianum*, *Lipomyces starkeyi*, *Pseudomonas aeruginosa*가 paraquat을 분해하여 분해산물을 탄소원 또는 질소원으로 이용하는 것으로 보고하였다. 또한 최근에는 *Acetobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescence*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Cephalosporium* sp., *Fusarium* sp. F-14 및 *Penicillium* sp. F-16등의 paraquat 분해가 보고되었다[20, 31, 33].

Paraquat 독성에 관한 연구는 포유류계 (mammalian system)에서 많이 되었고[19, 24, 30] 원핵생물계에서는 *Escherichia coli*에 관한 보고가 대부분이다[11, 15, 16]. 미생물들은 호흡과정 중 여러 종류의 활성산소를 생산하게 되며 생산된 활성산소는 superoxide dismutase (SOD), catalases, peroxidases와 같은 항산화 효소들에 의해 해독된다. 그러나 paraquat 처리시 세포내에는 superoxide (O_2^-)와 같은 활성산소가 과량으로 생산되고 적절한 항산화 효소들에 의해 완전히 해독되지 않을 경우 활성산소는 DNA, 단백질 및 lipids peroxidation에 의한 membrane transport 계를 파괴함으로서 미생물에 해를 주게 된다. 미생물들은 그 종류마다 paraquat에 대한 내성 농도의 범위가 다른데 이는 paraquat의 분해 또는 항산화 효소들의 작용 및 세포막 단백질의 작용 등 다양한 방어기전을 가지고

*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5756, Fax. 82-53-950-6750
E-mail: jkjo@kyungpook.ac.kr

있기 때문이다[7]. 최근에는 미생물들의 이러한 다양한 방어기전을 이용하여 미생물로부터 제초제 내성 관련 유전자들을 식물체에 도입하고자 하는 시도가 많이 보고되고 있다[14, 32]. 특히 비선택성 제초제에 대한 내성 유전자를 식물체에 도입하게 되면 식물체가 도입된 유전자에 의해 선택적인 살초 효과를 가지게 됨으로서 환경오염의 예방 및 생산비 절감 등의 효과를 가져올 수 있다. 본 연구는 미생물로부터 paraquat 내성 유전자를 분리할 목적으로 우선 토양으로부터 paraquat에 내성을 가지는 미생물을 분리, 동정하였으며 내성균주의 paraquat에 대한 내성 농도의 범위 및 paraquat 처리에 대한 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

Paraquat 내성균주의 선발

Paraquat을 수년간 살포한 과수원의 토양 50 g에 멸균수 50 ml을 넣어 하룻밤 진탕하고 정치한 후 상층액을 paraquat 1 mM이 첨가된 MC 액체배지[17] (D-glucose, 10 g; KH₂PO₄, 310 mg; KCl, 23 mg; NH₄Cl, 10.7 mg; MgSO₄ · 7H₂O, 22 mg; Ferric monosodium EDTA, 560 µg; CuSO₄ · 5H₂O, 9.8 µg; MnSO₄ · 4H₂O, 69 µg; ZnSO₄ · 7H₂O, 436 µg; D-biotin, 0.2 µg; Agar, 10 g in 1 L distilled water, pH 7.0)에 접종하여 30°C, 3일간 배양하였다. 배양액을 paraquat 1 mM이 첨가된 MC 고체배지에 도말하여 살아남은 균주의 colony를 선발하였다. 선발된 colony는 paraquat 5 mM이 첨가된 MC 액체배지에 반복 접종하여 생육 속도가 빠른 균주를 paraquat 내성균주로 선발하였다.

선발균의 동정

분리된 paraquat 내성균주의 동정은 형태학적 검사, 생리 생화학적 분석 및 세포기방산 분석을 실시하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[18]에 준하여 동정하였다.

균주 및 배양

Paraquat 내성균주로 선발되어 동정된 *Ochrobactrum anthropi* JW-2는 30°C에서 배양하였으며, paraquat, 과산화화합물 및 제초제 내성실험을 위한 대조균주로는 *E. coli* JM105를 사용하였고 37°C에서 배양하였다.

농약류의 미생물 독성 검정

농약 약제별 (제초제 6종, 살충제 3종) 미생물에 대한 독성 실험에 사용한 농약류의 상세 내역은 Table 1과 같다. 5 ml의 LB 배지[27] (tryptone (Difco), 5 g; yeast extract (Difco), 5 g; NaCl, 5 g in 1 L distilled water, pH 7.4)에

50 µl의 균을 접종하고 배양 4시간이 경과한 후 약제의 최종농도가 10 mg/l이 되도록 첨가 하였다.

Paraquat 및 과산화화합물의 처리

Paraquat (methyl viologen, Sigma, USA), plumbagin (Sigma, USA) 및 menadione (Sigma, USA)을 농도별로 첨가한 5 ml의 LB 배지에 균을 접종하고 24시간 배양 후 그 성장정도를 O.D. 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

Superoxide dismutase 활성 염색

대수증식 중기의 배양액에 paraquat의 최종농도가 0.1 mM이 되도록 첨가한 후 3시간 더 배양하였다. 원심분리하여 균을 모아 50 mM potassium phosphate buffer (50 mM KH₂PO₄, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 혼탁한 다음, lysozyme (Sigma, USA)을 최종농도 1 mg/ml 첨가하여 4°C에서 1시간 배양 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리하여 상층액을 취하여 native polyacrylamide gel 전기영동을 하였다.

SOD 활성 염색은 Beauchamp와 Fridovich 방법 [4]에 준하였다. 7.5%의 native polyacrylamide gel로 전기영동한 후 gel을 2 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT) 용액에 담구어 암상태로 30분간 배양하고 멸균수로 세정한 다음, 염색액 (50 mM KH₂PO₄, 0.028 mM N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 0.05 mM riboflavin)으로 15분간 암상태에서 처리하고 gel을 fluorescent-illuminator에 수분간 노출하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

Paraquat 내성균주의 선발 및 동정

Table 1. Type and concentration of pesticides used in this study

Chemicals	Type	Contents of active ingredient (%)	Remarks
Herbicides			
Glyphosate	Organophosphorous	100	R
Asulam	Cabamate	100	R
Propanil	Amide	99.0	R
Dicamba	Benzoic acid	87.0	T
2,4-D	Phenoxy	99.0	R
Simazine	Triazine	98.0	T
Insecticides			
Chlorpyrifos	Organophosphorous	96.2	T
Carbofuran	Carbamate	99.0	R
Teflubenzuron	Benzyl urea	99.3	R

T, technical and R, reagent grade.

Paraquat을 수년간 살포한 경상북도 군위군 일대의 과수원 토양에서 추출한 상층액을 1 mM의 paraquat으로 첨가된 MC 배지에 배양하였을 때 생장속도 및 colony 형태가 서로 다른 3종류의 strain이 나타났다. 이 중 5 mM이상의 paraquat 농도에서도 살아남은 1종류의 strain을 선발하였으며 선발된 strain 중 생장속도가 가장 빠른 colony를 반복 선발하여 이를 JW-2로 명명하였다. 선발균의 분류학적 위치를 확인하기 위하여 형태적 및 생리적 특성을 조사하였다. 현미경하에서 그람 염색 결과 형태적으로는 그람 음성 세균이었으며, 생리적 특성은 catalase와 oxidase에 대해 양성이었다 (Table 2). 탄소원 이용능을 조사한 결과

Table 2. Morphological and physiological characteristics of isolated *Ochrobactrum anthropi* JW-2

Gram straining	-
Oxidase	+
Catalase	+
Fluorescence pigment	none
β -Galactosidase	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Urease production	+
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Voges-Proskauer reaction	-
Gelatinase production	-
Nitrate reduction	+
Denitrification	+
β -Glucosidase production	-

+: Positive, -: Negative

Table 3. Assimilation of carbon sources by *Ochrobactrum anthropi* JW-2

Carbon compounds	Assimilation
Adipate	-
Arabinose	+
Caprate	+
Citrate	+
Gluconate	-
Glucose	+
Malate	+
Maltose	+
Mannitol	-
Mannose	+
N-Acetyl-glucosamine	+
Phenyl-acetate	-

+: Positive, -: Negative

glucose, malate, arabinose, maltose 등을 탄소원으로 이용하였다 (Table 3). 그리고 지방산 분석에서는 Table 4와 같이 oleic acid ($C_{18:1}$)가 세포 지방산 조성의 대부분으로 전체 지방산 함량의 80.6%를 차지하였다. 이상의 결과로부터 선발 균주를 *Ochrobactrum anthropi*로 동정하였고, 최종적으로 *Ochrobactrum anthropi* JW-2로 명명하였다. *O. anthropi*는 병원균으로 알려져 있으며[5], Laura 등[25]은 *O. anthropi*가 제초제 atrazine을 분해하여 탄소원으로 이용한다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 *O. anthropi*가 paraquat을 분해하여 탄소원 또는 질소원으로 이용하는지 관한 실험을 수행한 바 있으나 paraquat을 분해하지 못하였다(자료 미제시).

Paraquat에 대한 내성

실험실에서 사용하는 미생물 중 그람 음성균인 *E. coli* strain의 paraquat 내성에 대한 예비 실험 결과 *E. coli* JM105가 paraquat에 대한 내성이 가장 높았다 (자료 미제시). 따라서 선발균인 *O. anthropi* JW-2의 paraquat에 대한 내성을 확인하기 위한 대조균으로 *E. coli* JM105를 사용하였다. *O. anthropi* JW-2와 *E. coli* JM105를 0~100 mM의 다양한 농도의 paraquat으로 첨가된 LB 배지에 접종하여 성장속도를 배양 시간별로 660 nm에서의 흡광도로 비교하였다 (Fig. 1). 대조균인 *E. coli* JM105는 paraquat의 농도가 높아질수록 성장속도가 감소하였다. 즉, paraquat 농도 100 μ M까지는 paraquat 무첨가구와 비슷한 생장곡선을 나타내었으나, 1 mM 이상에서는 성장이 급격히 감소하기 시작하였고 100 mM에서는 전혀 성장하지 못하였다. 반면에 *O. anthropi* JW-2는 paraquat 농도에 따른 성장을 비교에서 농도에 따라 순차적인 성장률의 감소는 있었으나 농도의 증가에 따라 급격한 성장의 감소는 보이지 않았다. 더욱이 고농도의 paraquat (100 mM)으로 처리했을 때 초기 유도기가 2시간 정도 길어지기는 하였으나 24시간 배양 후 paraquat 무첨가구와 비교하였을 때 무첨가구의 약 70%까지 성장하였다. Peterson 등 [29]은 paraquat이 미생물에 미치는 영향에 관한 보고에서

Table 4. Cellular fatty acid composition of *Ochrobactrum anthropi* JW-2

Fatty acids	Composition (%)
Straight-chain acids	
$C_{18:1}$	80.6
$C_{18:0}$	8.1
$C_{16:0}$	4.0
$C_{18:1} 2OH$	1.2
Cyclopropane acid	
$C_{19:0}$	2.4
Unknown	3.7

E. coli, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae* 및 *S. faecalis* 등의 장내 세균류가 1 mM 이상의 농도에서 증식이 저해된다고 보고하였는데 이는 본 실험에서 *E. coli* JM105가 1 mM 이상의 농도에서 증식이 급격히 저해되는 것과 일치하였다. Anderson과 Elizabeth[2]은 paraquat을 분해하여 분해산물을 질소원으로 이용함으로써 내성을 가지는 토양 효모인 *Lipomyces starkeyi*는 paraquat 농도 54 mM 이상에서는 증식하지 못한다고 보고하였다. 따라서 *O. anthropi* JW-2는 *Lipomyces starkeyi*에 비해 2배 이상의 내성을 가진 것으로 추정된다. Kim 등[23]은 paraquat에 대한 균주별 증식저해에 관한 연구에서 paraquat에 의한 독성은 산소 의존성이 높다고 보고하였다. 혐기성 세균보다는 호기성 세균이 paraquat에 의한 생장저해 작용이 더 크며, 세균이나 효모에 비해 곰팡이의 paraquat에 대한 증식 저해가 더 급격히 진행된다고 보고하였는데 이는 곰팡이가 증식에 있어서 산소 요구성이 높기 때문이라고 하였다. 또한 세균보다는 효모가 paraquat에 의한 증식저해 정도가 더 완화되는데 이는 세포벽의 구조상의 차이와 관련이 있다고 보고하였다. 본 연구에서 선발된 *O. anthropi* JW-2는 혐기성 세균임에도 불구하고 효모인 *Lipomyces starkeyi* 보다 더 높은 내성을 가졌으며 이는 *O. anthropi* JW-2가 paraquat에 대해 보다 다양한 방어기전을 가지고 있음을 시사한다.

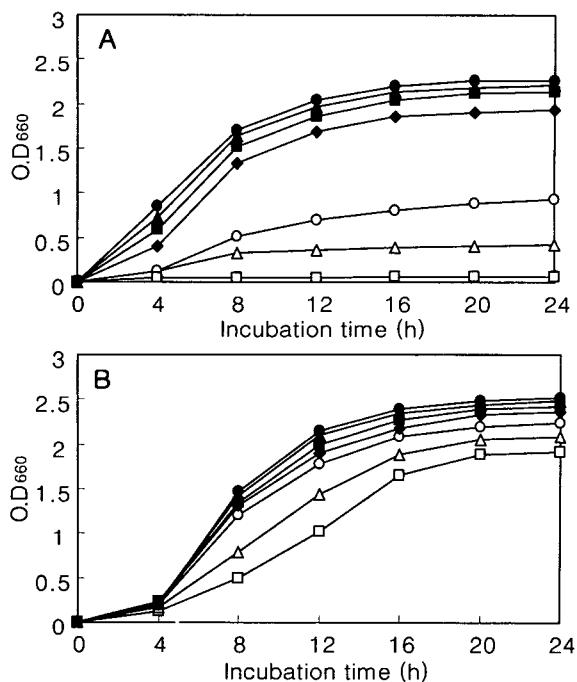


Fig. 1. Effect of paraquat concentration on the growth of *E. coli* JM105 (A) and *O. anthropi* JW-2 (B). (●: control, ▲: 1 μ M, ■: 10 μ M, ◆: 100 μ M, ○: 1 mM, △: 10 mM, □: 100 mM)

Superoxide dismutase (SOD)의 활성 염색

*E. coli*에서 paraquat (PQ^{2+})은 수용성 cytosolic NADPH-dependent diaphorase^[24] 의해 $\text{PQ}^{\cdot+}$ (monocation radical)로 환원되어 세포내로 들어가며 $\text{PQ}^{\cdot+}$ 는 $\text{O}_2^{\cdot+}$ 와 반응하여 활성산소인 $\text{O}_2^{\cdot+}$ 를 생성하고 이를 제거하기 위해 항산화 효소인 SOD의 합성이 유도된다[22]. 본 실험에서는 *O. anthropi* JW-2의 paraquat에 대한 내성이 SOD 활성의 증가에 의한 것인지를 확인하기 위하여 native polyacrylamide gel 전기영동 후 SOD 활성염색을 하였다. Fig. 2는 paraquat 0.1 mM을 3시간 처리 후 native gel로 분석한 결과로서 paraquat 처리에 의하여 *E. coli*는 새로운 isoenzyme^[25] 발현되었다. 그러나 *O. anthropi* JW-2는 paraquat 처리시 새로운 isoenzyme의 생성이 없었을 뿐만 아니라 SOD의 활성의 변화도 없었다. Carr 등[7]은 미생물들의 paraquat에 의한 생화학적 반응에 대해 보고하였는데 미생물의 종류에 따라 paraquat에 대한 생화학적 반응은 다양하게 나타났으며 이들 생화학적 반응에 따라 paraquat에 대한 생물체의 방어 기작을 추정할 수 있다고 하였다. *E. coli*의 경우는 paraquat에 의해서 SOD, catalase, malate dehydrogenase (MDH)와 같은 항산화 효소의 활성이 증가하였다. 이와 같이 항산화 효소의 활성

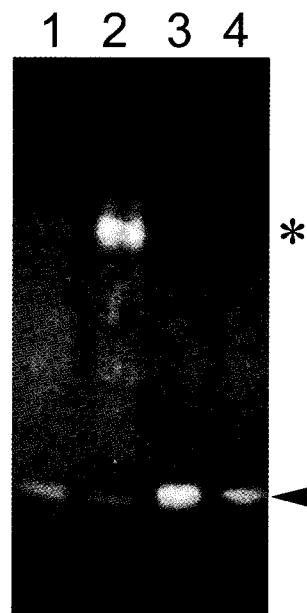


Fig. 2. Superoxide dismutase activity staining of total proteins *O. anthropi* JW-2 and *E. coli* JM105. After native gel (7.5%) electrophoresis, the gel was assayed for SOD activity. Each lane contains 200 μ g of protein. Lanes: 1, *E. coli* JM105 unexposed to paraquat; 2, *E. coli* JM105 exposed to 0.1 mM paraquat; 3, *O. anthropi* JW-2 unexposed to paraquat; 4, *O. anthropi* JW-2 exposed to 0.1 mM paraquat. Arrowhead indicates constitutively expressed SOD proteins, and asterisk represents newly synthesized SOD proteins by paraquat treatment.

이 증가한다는 것은 paraquat이 세포내로 침투되어 세포내에서 과량의 활성산소가 생성되며 이를 해독하기 위해 SOD의 활성이 증가하게 됨을 의미한다[7]. 반면 *Pseudomonas* sp.는 paraquat에 의해 SOD를 비롯한 항산화 효소의 활성의 증가는 전혀 없었다. 그럼에도 불구하고 *Pseudomonas* sp.는 *E. coli*보다 100배 높은 paraquat에 대한 내성을 보였다. 이는 *Pseudomonas* sp.는 paraquat에 대한 생체내 방어가 SOD나 catalase와 같은 항산화 효소에 의해 활성산소를 제거함으로서 내성을 가지는 것이 아니라 세포막의 기능에 의해 paraquat이 세포내로 침투되는 것이 억제됨을 의미한다고 하였다. *O. anthropi* JW-2도 *Pseudomonas* sp.의 경우처럼 SOD 활성의 변화가 없었으며 이는 paraquat에 대한 내성이 세포내 활성산소 생성으로 인한 항산화 효소 활성의 증가에 의한 것이 아닌 다른 방어 기전으로 인한 것임을 추정할 수 있다.

과산화 화합물 및 농약류에 의한 영향

O. anthropi JW-2가 농약류에 대하여 얼마나 광범위하게 내성을 가지는지를 알아보기 위하여 여러 종류의 제초제 및 살충제를 처리하였다 (Fig. 3). *E. coli* JM105를 대조군으로 사용하였으며 내성 효과를 대조구에 대한 상대적인 세포 증식정도로 표시하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 *E. coli* JM105는 chlorpyrifos, carbofuran에 대하여 *O. anthropi* JW-2보다 상대적으로 높은 성장을 나타내었고, paraquat을 제외한 다른 약제류에 대해서도 *O. anthropi* JW-2보다 다소 높은 성장을 나타내었다. 그러나 paraquat에 대해서는 *O. anthropi* JW-2가 *E. coli* 보다 높은 성장을 나타내었다. Kim 등[23]은 미생물의 증식이 농약의 처리농도와 시간 등 실험조건에 따라 영향을 받으나, 동일 처리농도 (10 ppm)에서 paraquat이 다른 농약류에 비해서 미생물에 대한 증식억제 정도가 월등히 높게 나타나며, 제초제임에도 불구하고 전통적인 살균제들에 비하여 강한 살균효과를 보인다고 보고하였다. 본 연구에서는 선발군인 *O. anthropi* JW-2가 다른 농약류에서는 내성을 가지지 못하였지만 paraquat에 대해서는 높은 내성을 나타내었다.

Menadione과 plumbagin은 paraquat과 마찬가지로 redox-cycling compounds로서 과산화 화합물의 일종이다. 이들에 대한 *O. anthropi* JW-2의 내성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. Paraquat, menadione 그리고 plumbagin을 각각 0~0.5 mM로 처리한 후 24시간 배양하여 그 성장 정도를 대조구에 대한 상대증식으로 나타내었다. 대조군인 *E. coli* JM105는 menadione과 plumbagin에 대해서 0.3 mM까지는 *O. anthropi* JW-2보다 상대 성장률이 높게 나타났으나 0.5 mM에서는 전혀 생장하지 못하였으며, paraquat에 대해서는 모든 처리구에서 *O. anthropi* JW-2보다 성장률이 낮았다. 그러나 *O. anthropi* JW-2는 menadione과 plumb-

bagin 처리구에서 *E. coli* JM105보다 상대적으로 성장률이 낮았으나 paraquat에 대해서는 상대적으로 성장률이 높게 나타났으며, 0.5 mM에서는 2배 이상 높은 성장률을 나타내어 같은 redox-cycling compounds 중에서도 paraquat에 대해서만 내성을 나타내었다. 이와 유사한 결과가 Kao와 Hassan [22] 그리고 Morimyo 등 [28]에 의해서 보고되었는데 Kao와 Hassan [22]은 paraquat에 내성을 가지는 돌연변이 *E. coli*에 paraquat과 같은 redox-cycling compounds인 plumbagin을 처리하였을 때 plumbagin에 대해서는 전혀 내성을 가지지 않았다고 보고하였다. 또한 세포내로의 paraquat의 흡수율을 조사한 결과 돌연변이체는 정상세포에 비해 세포내 paraquat 흡수율이 감소하였는데 이는 paraquat을 선택적으로 투과하지 못하게 함으로써 paraquat에 대해 내성을 가진다고 하였다. 또한 Morimyo 등[28]은 *E. coli*의 paraquat 내성유전자인 *mvrC*의 이차 구조를 확인한 결과 막 단백질의 구조를 하고 있었으며, *mvrC*를 과발현시켰을 때 paraquat 감수성 세포가 paraquat에 대해서는 내성을 가졌으나 plumbagin에 대해서는 내성을 가지지 못하였는데 이것은 세포막 단백질에 의해

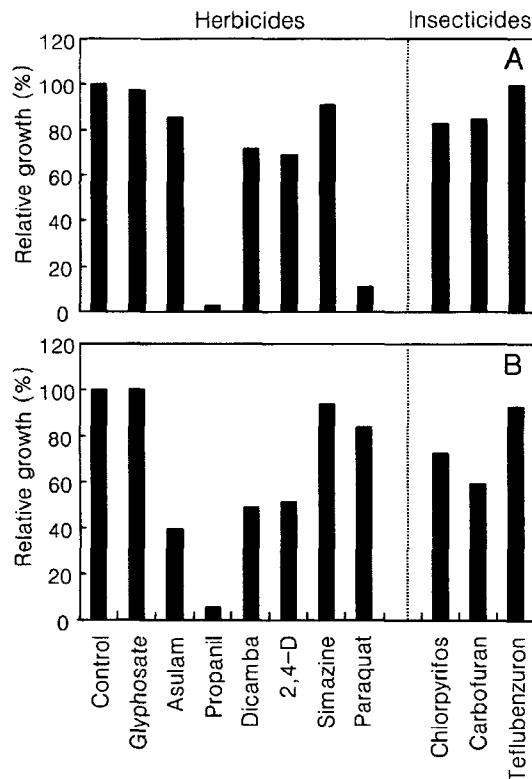


Fig. 3. Effect of pesticide chemicals on the growth of *E. coli* JM105 (A) and *O. anthropi* JW-2 (B).

Organisms were cultured in the presence of 10 mg/l of each chemicals for 24 hours. Optical densities of the cultures were measured by absorbance at 660 nm. The values are represented as the relative growth rate against each control.

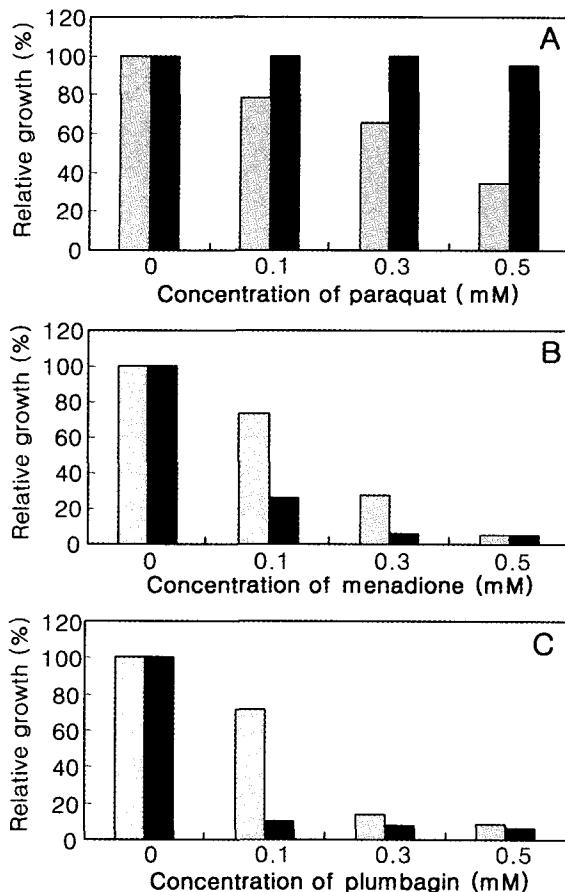


Fig. 4. Effect of redox-cycling compounds on the growth of *E. coli* JM105 (■) and *O. anthropi* JW-2 (■).

Organisms were cultured in the various concentrations of paraquat (A), menadione (B) and plumbagin (C) for 24 hours. Turbidities of the cultures were measured by absorbance at 660 nm. The values are represented as the relative growth rate against each control.

선택적으로 paraquat이 세포내로 유입되는 것을 억제시키기 때문이라고 보고하였다. *O. anthropi* JW-2에 paraquat을 처리했을 때 세포내 SOD 활성의 변화가 없고, 또한 plumbagin에 대해서 내성을 가지지 못하는 등의 결과들을 미루어 보았을 때, *O. anthropi* JW-2가 paraquat에 대해 내성을 가지는 것은 paraquat이 세포내로 유입되는 것을 막는 세포막 단백질의 작용에 의한 것이거나, 또는 세포내로 유입된 paraquat을 능동적으로 세포외로 배출하는 기능 단백질의 존재에 의한 것임을 강하게 시사하고 있다.

요약

토양으로부터 비선택성 제초제인 paraquat에 내성을 가지는 미생물 JW-2를 분리하였고, 형태학적, 생리 생화학적 및 세포기방산 조성 등을 조사한 결과 분리균주 JW-2는 *Ochrobactrum anthropi*로 동정되었으며 최종적으로

Ochrobactrum anthropi JW-2로 명명하였다. Paraquat에 대한 내성을 대조균인 *Escherichia coli* JM105와 비교하였을 때 paraquat 100 mM에서 *E. coli* JM105는 전혀 성장하지 못하였으나, *O. anthropi*는 paraquat 무첨가구와 비교하였을 때 약 70% 까지 성장하였다. Paraquat 처리시 대조균인 *E. coli* JM105는 superoxide dismutase (SOD)의 활성이 증가하였으나 *O. anthropi*는 SOD 활성의 변화가 없었다. *O. anthropi*는 Paraquat과 같은 redox-cycling compound인 plumbagin과 menadione을 처리하였을 때 plumbagin과 menadione에 대해서는 전혀 내성을 가지지 못하였다. Paraquat 이외의 다른 농약류에 대해서도 내성을 가지지 못하였다. 이러한 결과로 보았을 때 *O. anthropi*가 paraquat에 대하여 내성을 가지는 것은 세포막 단백질의 작용에 의해 paraquat이 세포내로 유입되는 것을 선택적으로 막거나, 세포내로 유입된 paraquat을 세포외로 능동적으로 배출하는 작용에 의한 것으로 추정되었다.

감사의 글

이 연구는 농림기술개발연구과제 (관리번호 297061-4) 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Agricultural chemical industrial association. 1995. Agrochemical year book. pp. 182-187.
2. Anderson, J. R. and A. D. Elizabeth. 1972. Growth characteristics of species *Lipomyces* and its degradation of paraquat. *J. General Micro.* **70**: 43-58.
3. Baldwin, B. C., M. F. Bray, and M. J. Geoghegan. 1966. The microbial decomposition of paraquat. *Biochem. J.* **101**: 15.
4. Beauchamp, C. and L. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**: 276-287.
5. Berman, A. J., L. V. Del Priore, and C. K. Fischer. 1997. Endogenous *Ochrobactrum anthropi* endophthalmitis. *Am. J. Ophthalmol.* **123**: 560-562.
6. Burns, I. G., M. H. Hayes, and M. Stacey. 1973. Some physico-chemical interactions of paraquat with soil organic materials and model compounds. I. Effects of temperature, time and adsorbate degrading on paraquat adsorption. *Weed Res.* **13**: 67-78.
7. Carr, R. J. G., R. F. Bilton, and T. Atkinson. 1986. Toxicity of paraquat to microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1112-1116.
8. Coats, G. E., Jr. H. H. Funderburk, J. M. Lawrence, and D. E. Davis. 1966. Factors affecting persistance and inactivation of diquat and paraquat. *Weed Res.* **6**: 58-66.
9. Fryer, J. D., R. J. Hance, and J. W. Ludwig. 1975. Long-

- term persistence of paraquat in a sandy loam soil. *Weed Res.* **15**: 189–194.
10. Green, R. E. 1974. Pesticide in soil and water, pp. 3-36. *Pesticide-clay-water interaction*, J. Series No. 1904 of the Hawaii Agr. Exp. Station, Honolulu, Hawaii. Cit.
 11. Gregory, E. M., F. J. Yost, and I. Fridovich. 1973. Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localizations and functions. *J. Bacteriol.* **115**: 987–991.
 12. Hance, R. J. 1987. Decomposition of herbicides in the soil by non-biological chemical processes. *J. Sci. Food Agr.* **18**: 544–547.
 13. Hance, R. J., T. H. Byast, and P. D. Smith. 1980. Apparent decomposition of paraquat in soil. *Soil Bio. Biochem.* **12**: 447–448.
 14. Hartman, C. L., L. Lisa, R. D. Peter, and E. T. Nilgun. 1994. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris Huds.*) by biolistic transformation. *Bio/Technol.* **12**: 919–923.
 15. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1977. Regulation of superoxide synthesis in glucose effect. *J. Bacteriol.* **132**: 505–510.
 16. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1978. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253**: 8143–8148.
 17. Hata, S., K. Shirata, and H. Takagishi. 1986. Degradation of paraquat and diquat by the yeast *Lipomyces starkeyi*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 193–202.
 18. Holt, J. G., N. R. Kreig, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, p. 92. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
 19. Lett, K. F., B. Stripp, R. H. Menard, W. D. Reid, and J. R. Gillette. 1974. Studies on the mechanism of the lung toxicity of paraquat: comparison of tissue distribution and some biochemical parameters in rats and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **28**: 216–226.
 20. Imai, Y. and S. Kuwatsuka. 1989. Characteristics of paraquat-degrading microbes. *J. Pesticide Sci.* **14**: 475–480.
 21. Kanazawa, J. 1990. Behavior of herbicides with long-term application to soils. *Shokuchou*. **24**: 6–20.
 22. Kao, S. M. and H. M. Hassan. 1985. Biochemical characterization of a paraquat-tolerant mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**: 10481–10487.
 23. Kim, M. L., C. S. Park, and K. H. Choi. 1995. Inhibition of microbial growth by paraquat. *Agr. Cult. & Biotech.* **38**: 283–288.
 24. Kornbrust, D. J. and R. D. Mavis. 1980. The effect of paraquat on microsomal lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**: 323–332.
 25. Laura, D., G. Desocio, R. Frassanito, and D. Rotilio. 1996. Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2644–2646.
 26. Michaelis, L. and E. S. Hill. 1933. The viologen indicators. *J. Gen. Physiol.* **34**: 432–435.
 27. Miller, J. H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics*: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
 28. Morimyo, M., H. Etsuko, H. I. Hiriko, and M. Isamu. 1992. Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3159–3165.
 29. Peterson, E., R. Fairsher, J. Morrison, and T. Cesario. 1981. Effect of the herbicide paraquat dichloride on bacteria of human organ. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 327–328.
 30. Rose, M. S., L. L. Smith, and I. Wyatt. 1976. The relevance of pentose phosphate pathway stimulation in rat lung to the mechanism of paraquat toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **25**: 1763–1767.
 31. Smith, S. M., A. J. E. Lyon, and I. B. Sashid. 1978. The breakdown of paraquat by soil fungi. *New Phytol.* **77**: 735–740.
 32. Tones, J. D., P. B. Goldsbrough, and S. C. Weller. 1996. Stability and expression of amplified EPSPS genes in glyphosate resistant tobacco cells and plantlets. *Plant Cell Reports* **13**: 431–436.
 33. Tu, C. M. and W. B. Bollen. 1968. Interaction between paraquat and microbes in soils. *Weed Res.* **8**: 38–45.

(Received October 13, 1999)