

## 토양으로부터 Chlorothalonil 전환 미생물의 분리 및 특성

이수현 · 신재호 · 최준호 · 박종우 · 김장억 · 이인구\*  
경북대학교 농화학과

**Isolation and Characterization of Chlorothalonil-dissipating Bacteria from Soil. Lee, Soo-Hyun, Jae-Ho Shin, Jun-Ho Choi, Jong-Woo Park, Jang-Eok Kim, and In-Koo Rhee\***. Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – Chlorothalonil is a wide-spectrum fungicide that is widely used in the world. Chlorothalonil is known as a potential toxic pollutant due to its high application rate, persistence, and toxicity to humans and other species. With the increase of necessity of bioremediation, this study was conducted to isolate the chlorothalonil dissipation bacteria from soil. Soil samples were collected from 184 sites of farmland and wastewater disposal soil. 661 strains resistant to chlorothalonil were isolated by dilution method from chlorothalonil-containing enrichment culture. After incubating at 30°C in 1/10 LB media containing 10 ppm of chlorothalonil for a week, dissipation ability of chlorothalonil was investigated by HPLC. Finally, a strain SH35B, capable of dissipating chlorothalonil efficiently, was selected. The strain SH35B was identified as *Ochrobactrum* sp. Ten ppm of chlorothalonil in 1/10 LB media were completely dissipated by the growth of *Ochrobactrum* sp. SH35B for 30 h at 30°C. In the isolated strain, the content of glutathione and the activity of glutathione S-transferase were supposed to be ones of the important factors for chlorothalonil dissipation and were higher than those of control strains, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

**Key words:** Chlorothalonil, *Ochrobactrum* sp., dissipation

유기염소계 농약은 높은 사용빈도와 잔류성 및 인축에 대한 독성으로 인해 심각한 오염물질로 간주되고 있다. 유기염소계 살균제 중의 하나인 chlorothalonil(2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile)은 전 세계적으로 폭넓게 사용되고 있으며 미국에서 연간 500만 kg이 소비되는 두 번째로 많이 사용되는 살균제이다[4]. 특히, 농업용 chlorothalonil은 제조과정상 발암물질인 hexachlorobenzene이 혼입되어 있을 뿐 아니라 미국 환경보호국(EPA)에 의해 추정발암성 물질로 분류되어 있다[4].

Chlorothalonil 분해의 첫 번째 대사산물로 추정되고 있는 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile(TPN-OH)은 토양과 식물 및 동물 등에서 자주 발견된다[16]. TPN-OH는 chlorothalonil 보다 항균력이 훨씬 떨어지지만 물고기나 흰쥐에서 높은 급성독성을 가지고 있으며[3, 5], 모화합물 보다 극성이 높고 용해도가 증가되어 하층토양이나 지하수로 쉽게 이행하게 된다[4]. TPN-OH는 높은 잔류독성으로 인해 연속 사용할 경우 토양 내에서 chlorothalonil의 분해가 억제된다[13]. Chlorothalonil이  $^{14}\text{C-CO}_2$ 로 전환되는 비율은 사용 90일 후 사용한 chlorothalonil의 2.8-13.8% 정도이다

[15]. Katayama 등[11]은 37 종의 세균을 이용한 순수배양에서 chlorothalonil이 완전히 미네랄화가 되지 않고, 이들 세균에 의해 chlorothalonil의 염소 원자가 hydroxyl기나 methylthio기로 치환된다는 사실을 보고하였다. 한편, Motonaga 등[13]은 1 mol의 chlorothalonil이 완전히 분해되면 이론적으로 4 mol의 염소가 방출되어야 하지만 실제로 0.75-1 mol의 염소만 방출된다고 보고하였다. 또한, 토양 미생물들은 chlorothalonil이나 이들 분해산물들을 유일 탄소원 및 에너지원으로 이용하지 못하여서 다른 탄소원을 가해주지 않으면 미생물에 의한 chlorothalonil의 분해가 일어나지 않고[10, 12], 공대사(cometabolism)에 의해 chlorothalonil의 분해가 일어나는 것으로 추정된다.

본 연구는 chlorothalonil에 대한 내성이 높고 chlorothalonil 전환력(dissipation)이 높은 미생물을 토양으로부터 분리하여, 이 균을 사용하여 chlorothalonil의 초기 독성을 감소시키고 2차로 토양 미생물의 공대사에 의한 chlorothalonil 분해를 촉진시켜 chlorothalonil으로 오염된 토양의 생물복원에 이용하기 위하여 실시하였다. 아울러 chlorothalonil이 비특이적으로 세포내 기능단백질이나 cofactor의 sulfhydryl기와 반응하여 진균류의 살균작용을 나타낸다는 사실[16]에 주목하여 세포내의 해독작용에 관여하는 glutathione(Glu-SH) 함량과 glutathione S-transferase 활성을 조사함으로써 분리균에 의한 chlorothalonil 전환 메커니즘의 규명을 시도였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5718, Fax: 82-53-953-7233

E-mail: ikrhee@knu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 재료

본 연구에서는 토양으로부터 분리 선발한 chlorothalonil 제거능이 우수한 *Ochrobactrum* sp. SH35B를 사용하였고, 대조균으로는 본 연구실에 보유하고 있는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ [9]와 *Bacillus subtilis* RM125[20]를 사용하였다. 환원형  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide(NADPH), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)[DTNB], 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 환원형 glutathione(Glu-SH)과 glutathione reductase 등은 Sigma사(미국)에서 구입하여 사용하였다.

### 균의 분리 및 배양

균의 집식배양은 1당 2.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g NaCl, 0.1 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10 ml 미량원소용액[조성, 1당 20 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 50 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 30 mg ZnCl<sub>2</sub>, 3 mg CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10 mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu · H<sub>2</sub>O 및 20 mg FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O]을 함유한 최소배지를 Sutherland 등[19]의 방법을 참고하여 chlorothalonil[다코닐 수화제, 순도 75%; (주) 경농] 500 ppm을 첨가하여 실시하였다. 500 ml 삼각플라스크에 이 배지 100 ml 당 토양 시료 2 g을 가하여 30°C에서 200 rpm으로 1주일간 배양한 후, 이 배양액 1 ml를 동일한 배지에 접종하여 같은 조건으로 1주일간 더 배양하였다. 이 배양액을 0.85% NaCl 용액에 희석한 후 chlorothalonil 표준품(순도 97%; SDS Biothec. Co.; 일본) 20 ppm을 첨가한 최소 한천배지(상기 최소배지에 1.5% 한천을 가한 배지)에 도달하여 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 균들을 chlorothalonil 제거 능력 판별을 위해서 chlorothalonil 표준품이 최종적으로 10 ppm이 첨가된 1/10 LB 배지[12]에서 3일간 진탕 배양하였다.

### Chlorothalonil 정량 분석법

분리균을 배양한 후 배양액에 잔존하는 chlorothalonil을 분석하기 위하여 배양액에 동량의 hexane을 가하여 vortex mixer로 3분간 진탕하고 초음파 세척기(Branson Ultrasonics Corporation, Branson 8210; 미국)에서 1분간 초음파 처리하여 기포를 제거한 후 hexane층 1 ml를 분취하여 진공농축 원심분리기(주, 한일)에서 건조한 후 acetonitrile에 재용해하여 HPLC(주, 영린)로 분석하였다. Chlorothalonil 분석용 칼럼은  $\mu$ Bondapak C18(3.9 × 150 mm; Waters사)을 사용하였으며 이동상은 acetonitrile : water(60 : 40, v/v)로 하여 분당 1 ml의 이동 속도로 분석하였다. 이때 chlorothalonil은 UV 검출기(주, 영린)로 235 nm에서 검출하였다.

### Glu-SH 정량

Glu-SH함량은 Baker 등[2]의 방법에 따라 ELISA(Bio-Tek Instruments Inc, EL × 808; 미국)를 사용하여 96-well plate에

반응용액과 무세포 추출액을 2 : 1(v/v)의 비율로 넣고 37°C에서 2 분간 반응 후 흡광도의 변화를 405 nm에서 측정하여 정량하였다. 이때 반응용액은 1.0 mM DTNB, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5), glutathione reductase (200 U/ml), 1.0 mM  $\beta$ -NADPH를 1 : 1.15 : 0.02 : 1(v/v/v/v)의 비율로 섞어서 조제하였다. 무세포 추출액은 LB 배지에 12시간 배양한 균체를 원심집균하고 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5)로 세척하여 동일 buffer에 재현탁한 다음 초음파 세포 파쇄기(Ultrasonics Ltd.; 영국)로 6 분간 파쇄한 후 12,000×g에서 원심분리하여 얻은 무세포 추출액을 사용하였다.

### Glutathione S-transferase 정량법

Glutathione S-transferase는 Habig 등[8]의 방법에 따라 측정하였다. 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5) 2.7 ml에 위의 Glu-SH 정량에서와 같이 준비한 무세포 추출액 200  $\mu$ l와 40 mM Glu-SH 75  $\mu$ l을 차례로 첨가하고, 30°C에서 5분간 예열시킨 후 에탄올에 녹인 120 mM DNCB 25  $\mu$ l을 첨가하여 4분간 반응시켰다. 20% trichloroacetic acid(TCA) 500  $\mu$ l을 넣어서 반응을 정지시킨 후 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액의 흡광도를 340 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 30°C에서 5분간 예열하기 전에 미리 20% TCA 500  $\mu$ l을 첨가한 대조균과의 차이로부터 환산하였다. 효소의 활성 단위는 1분간 기질 1 nmol을 전환시킬 수 있는 효소량으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### Chlorothalonil 전환균의 분리 및 동정

팔공산 및 대구근교, 경북, 경남, 제주의 경작지 및 폐수 처리장 등의 184 곳에서 채취한 토양으로부터 500 ppm의 chlorothalonil을 함유한 최소배지에서 집식 배양하여 chlorothalonil에 내성을 가진 균 661주를 분리하였다. 이들 균주를 각각 10 ppm의 chlorothalonil을 함유한 최소배지에서 7일간 배양하거나 1/10 LB 배지에서 3일간 배양한 후 배양액 중에 잔존하는 chlorothalonil을 HPLC로 분석하여 chlorothalonil 제거 효과가 가장 우수한 균주인 SH35B를 분리하였다. SH35B 균주는 경북 고령군의 멜론을 재배한 시설재배 지역의 토양에서 분리되었으며 그람 염색에서 그람 음성이었다고, 간균(1.6 × 0.6  $\mu$ m) 형태를 나타내었으며(Fig. 1), LB 고체배지에 30°C에서 배양시 약 48시간만에 지름 0.1~0.2 mm 가량의 엷은 갈색의 원형 콜로니의 형태를 나타내었다. 1/10 LB 배지 및 chlorothalonil을 20 ppm 포함한 1/10 LB배지에서 분리 균주 SH35B의 생육을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 분리균은 20 ppm의 chlorothalonil에 의해 생육이 억제되었으며, 정지기에 도달하는 시간도 20시간에서 24시간으로 늦어졌다. 분리균 동정을 위한 16S rDNA 염기 서열의 분석은 Frank 등[6]의 방법에 따라 정방향(5'-ACG

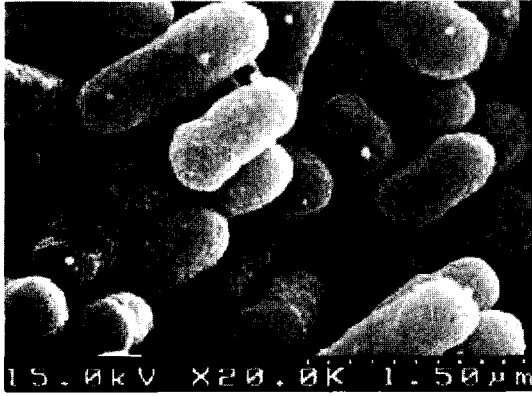


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Ochrobactrum* sp. SH35B.

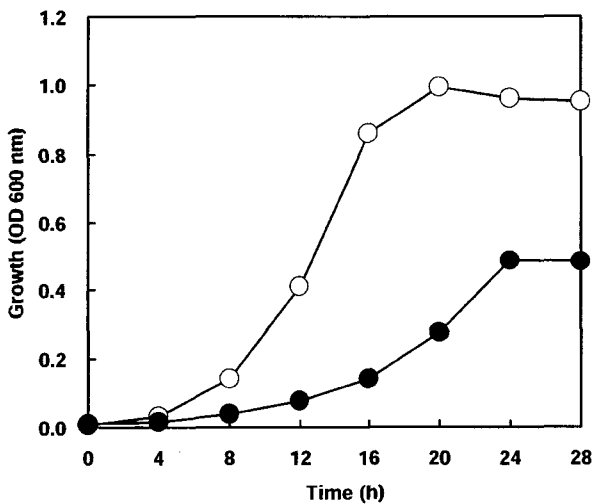


Fig. 2. Growth rate of *Ochrobactrum* sp. SH35B in the presence (●-●) and absence (○-○) of 20 ppm chlorothalonil in 1/10 LB media.

GGC GGT GTG TAC-3') 및 역방향(5'-GCC AGC AGC CGC GGT A-3') primer를 사용하여 PCR[18]에 의해 16S rDNA 단편을 증폭하여 PCR 산물의 염기서열을 결정하였다 (자료 미제시). 염기서열의 상동성 검색을 *Ribosomal database*(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시한 결과, 분리균은 *Ochrobactrum* sp.(Relman)과 100%, *Ochrobactrum anthropi*와 99%의 상동성을 나타내었다. 이 결과로부터 분리 선발된 SH35B 균주는 *Ochrobactrum* sp.에 속하는 것으로 판단되었다.

**분리균에 의한 chlorothalonil의 제거**

분리한 균주 SH35B 및 *E. coli*, *B. subtilis*를 LB 배지에서 12시간 배양하여 그 종배양액 0.1 ml를 10 ppm과 20 ppm의 chlorothalonil을 각각 함유한 1/10 LB 배지 10 ml에 접종하였다. 분리 균주 SH35B 및 *E. coli*, *B. subtilis*의 chlorothalonil 제거 양상을 균주를 접종하지 않은 대조군과

비교하면서 chlorothalonil의 제거율을 시간대별로 관찰하였다. 10 ppm을 함유한 1/10 LB 배지에서는 분리한 균주 SH35B에서 30 시간만에 chlorothalonil의 제거가 100% 이루어지고(Fig. 3), 20 ppm을 함유한 1/10 LB 배지에서 30 시간 동안에 투여한 chlorothalonil의 약 88%를 제거하였다(Fig. 4). 무점종균 및 *B. subtilis*의 경우는 chlorothalonil을 전혀 제거하지 못하였다. *E. coli*의 경우 10 ppm을 함유한 배지에서는 30시간 동안 약 58%의 chlorothalonil이 제거되었으나(Fig. 3), 20 ppm을 함유한 배지에서는 15% 정도가 제거되었으며, 12시간 이후에는 chlorothalonil의 제거능력이 거의 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

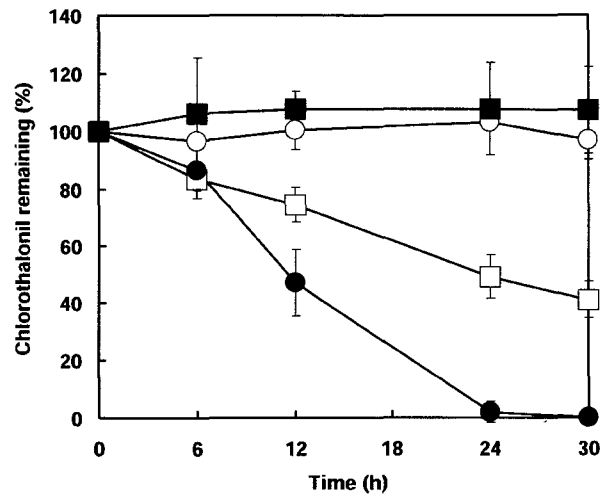


Fig. 3. Dissipation of 10 ppm chlorothalonil in 1/10 LB media by the growth of bacteria at 30°C. ○-○, no inoculation; ●-●, *Ochrobactrum* sp. SH35B; ■-■, *Bacillus subtilis*; □-□, *Escherichia coli*.

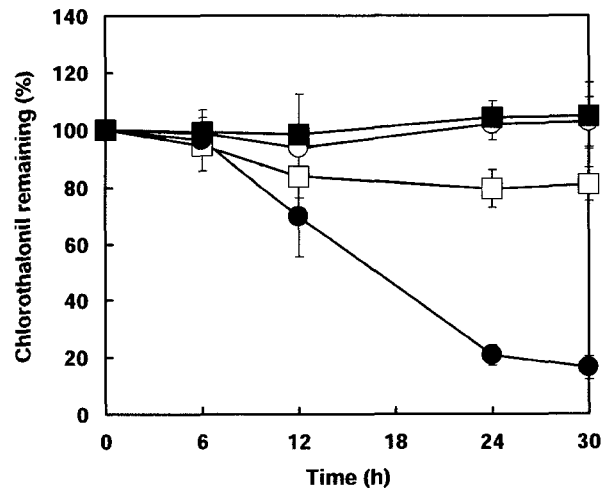


Fig. 4. Dissipation of 20 ppm chlorothalonil in 1/10 LB media by the growth of bacteria at 30°C. ○-○, no inoculation; ●-●, *Ochrobactrum* sp. SH35B; ■-■, *Bacillus subtilis*; □-□, *Escherichia coli*.

### 분리균의 Glu-SH 함량

Glu-SH는 생물계에서 중요한 유리 thiol 화합물의 하나이며 xenobiotics의 무독화, hydroperoxides의 제거, 이온화 방사선의 영향에 대한 보호, 단백질의 sulfhydryl 상태의 유지 및 disulfide 교환에 의한 효소활성의 조절 등과 같은 다양한 생물반응에 관여하고 있다[1]. Chlorothalonil 저항성 종의 미생물이 감수성 종보다 훨씬 더 많은 양의 Glu-SH를 생산하며, Glu-SH이 chlorothalonil 해독작용에 관여하는 것으로 추정하고 있다[7]. Chloroacetanilide계 제초제인 alachlor의 경우 토양미생물의 glutathione S-transferase에 의해 Glu-SH이 conjugation 되어 mercapturic acid의 형태로 체외로 배출된다는 보고도 있다[14]. 그래서 토양 미생물에 의한 chlorothalonil 전환의 초기단계에도 Glu-SH가 관여할 가능성이 높기 때문에 분리균 *Ochrobactrum* sp. SH35B의 균체 내의 Glu-SH 함량을 조사해 보았다. 세포내 Glu-SH 함량을 *E. coli* 및 *B. subtilis*와 비교하여 분석해 본 결과는 Table 1과 같이 분리균인 SH35B의 경우 Glu-SH 함량은 1.33 nmol/mg이었으며, 대조균으로 사용한 *E. coli*는 0.26 nmol/mg이고 *B. subtilis*는 0.61 nmol/mg이었다(Table 1). 세포 추출물의 단백질 단위 중량당 Glu-SH함량은 chlorothalonil 제거 능력이 높은 *Ochrobactrum* sp. SH35B에서 *E. coli* 보다 5배, *B. subtilis* 보다 2배 이상 높았다.

### 분리균의 Glutathione S-transferase 활성

Glutathione S-transferase는 xenobiotics의 생물전환에 필수적인 작용을 하는 효소로서 많은 생물에 존재하는 효소군의 하나이며, Glu-SH이 nucleophile로 작용하여 xenobiotics와 conjugation하는 반응의 촉매로서 작용한다[7]. 그래서

glutathione S-transferase가 chlorothalonil의 무독화와 관련이 있을 것이라 생각되어 분리균의 glutathione S-transferase 활성을 조사하였다. 분리균인 SH35B의 glutathione S-transferase 활성은 62.1 nmol/mg이었으며, 대조균인 *E. coli*는 39.8 nmol/mg이고 *B. subtilis*는 16.4 nmol/mg이었다(Table 2). 분리균 *Ochrobactrum* sp. SH35B의 glutathione S-transferase 활성 역시 *E. coli* 보다 1.5배, *B. subtilis* 보다 3.7배 높았다. Katayama 등[11]은 chlorothalonil을 분해하는 세균에서 세포 내에 존재하는 효소가 chlorothalonil의 염소 원자를 methyl기로 치환시킴으로서 chlorothalonil의 초기 탈염소화가 일어나는 것으로 추정하였다. 본 연구에서 분리균 SH35B가 Glu-SH 함량이 높고, glutathione S-transferase 활성이 높은 것으로 보아 Glu-SH의 존재 하에서 glutathione S-transferase에 의한 촉매작용으로 chlorothalonil의 전환이 신속히 일어나서 무독화가 야기되는 것으로 생각된다. 토끼 간의 cytosol 분획에서 chlorothalonil이 Glu-SH 존재 하에서 glutathione S-transferase의 작용에 의해 여러 가지 mercapturic acid 유도체로 전환된다는 사실을 보고한 바 있다[17]. 본 균에 의한 chlorothalonil 전환 산물은 HPLC-MS에 의해 조사 중에 있다. 즉, chlorothalonil을 함유한 배지에서 분리균을 배양한 후 균체를 제거한 상정액에서 chlorothalonil 핵을 가진 mercapturic acid 유도체가 검출되었다(자료 미제시). 이 사실로 볼 때 chlorothalonil이 Glu-SH와 conjugation 된 후 decomposition된 산물의 일부가 체외내로 배출되는 것으로 추정된다. 이와 같이 chlorothalonil 전환반응의 기구를 효소학적 측면에서 조사하기 위하여 본 균의 glutathione S-transferase의 정제를 시도하고 있다.

## 요 약

토양 시료를 대상으로 chlorothalonil을 함유한 최소배지에서의 집식배양과 배양 후 HPLC에 의한 잔류분석을 통해 chlorothalonil의 제거 능력이 우수한 균주 *Ochrobactrum* sp. SH35B를 분리하였다. 분리균 SH35B는 1/10 LB 배지에 함유된 10 ppm의 chlorothalonil을 30시간만에 완전히 제거하였으며, 20 ppm의 chlorothalonil의 경우 30시간 동안 88%를 제거하였다. 분리균의 Glu-SH함량과 glutathione S-transferase 활성은 각각 1.33 및 62.1 nmol/mg이었으며, 대조균인 *E. coli*나 *B. subtilis* 보다 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 chlorothalonil의 전환에 있어서 세포내의 Glu-SH 함량과 glutathione S-transferase 활성이 중요한 인자로 작용하는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2000년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2000-005-G00001).

**Table 1. Glutathione content of *Ochrobactrum* sp. SH35B and other control strains.**

Strains	Glutathione* (nmol/protein)
<i>Ochrobactrum</i> sp. SH35B	1.33
<i>Escherichia coli</i>	0.26
<i>Bacillus subtilis</i>	0.61

\*Glutathione content was measured by the method of Baker *et al.* [2].

**Table 2. Comparison of glutathione S-transferases activity in bacteria.**

Strains	Glutathione S-transferase* (nmol/protein)
<i>Ochrobactrum</i> sp. SH35B	62.1
<i>Escherichia coli</i>	39.8
<i>Bacillus subtilis</i>	16.4

\*Bacteria were grown in LB media for 12 h at 30°C and cells were sonicated for 6 min at 0°C. Glutathione S-transferase activity was measured by the method of Habig *et al.* [8] using 2,4-DCNB.

## REFERENCES

1. Arias, M. and W. B. Jakoby. 1976. Glutathione : Metabolism and function. Raven, New York, U.S.A.
2. Baker, M. A., G. J. Cerniglia, and A. Zaman. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large number of biological samples. *Anal. Biochem.* **190**: 360-365.
3. Clifford, D. P. and F. Edamura. 1988. The synthesis and biological activity of substituted chlorinated benzenedicarbonitriles. *Pestic. Sci.* **4**: 111-121.
4. Cox, C. 1997. *Chlorothalonil*. *J. Pest. Reform* **17**: 14-20.
5. Davies, P. E. and R. W. G. White. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of <sup>14</sup>C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic Toxicol.* **7**: 93-105.
6. Frank, E. L., S. Qing, L. Jieran, and M. T. James. 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene dechlorinating *desulfuromonas* and *dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1369-1374.
7. Habig, W. H. and W. B. Jakoby. 1981. Glutathione S-transferase(rat and human). *Meth. Enzymol.* **77**: 218-231.
8. Habig, W. H., H. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase : the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249** : 7130-7139.
9. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
10. Katayama, A., H. Isemura, and S. Kuwatsuka. 1991. population change and characteristics of chlorothalonil degrading bacteria in soil. *J. Pestic. Sci.* **16**: 239-245.
11. Katayama, A., T. Itou, and T. Ukai. 1997. Ubiquitous capability to substitute chlorine atoms of chlorothalonil in bacteria. *J. Pest. Sci.* **22**: 12-16.
12. Motonaga, K., K. Tagagi, and S. Matumoto. 1996. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. *Biol. Fertil. Soils.* **23**: 340-345.
13. Motonaga, K., K. Tagagi, and S. Matumoto. 1998. Suppression of chlorothalonil degradation in soil after repeated application. *Environ. Tox. Chem.* **17**: 1469-1472.
14. Paul, C. and C. Feng. 1991. Soil transformation of alachlor via glutathione conjugation. *Pestic. Biochem. Physiol.* **40**: 136-142.
15. Regitano, J. B., V. L. Tornisiello, A. Lavorenti, and R. S. Pacovsky. 2001. Transformation pathways of <sup>14</sup>C-chlorothalonil in tropical soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**: 295-302.
16. Robert, T. and D. Huston. 1999. Metabolic pathway of agrochemicals. part 2: Insecticides and fungicides. pp. 1380-1384. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
17. Rosner, E., C. Christa, and W. Dekant. 1996. Biotransformation of the fungicide chlorothalonil by glutathione conjugation. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**: 229-234.
18. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
19. Sutherland, T. D., I. Home, M. J. Lacey, R. L. Harcourt, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott. 2000. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2822-2828.
20. Uozumi, T., T. Hoshino, K. Miwa, S. Horinouchi, T. Beppu, and K. Arima. 1977. Restriction and modification in *Bacillus* species. Genetic transformation of bacteria with DNA from different species. Part I. *Mol. Gen. Genet.* **152**: 525-538.

(Received Sept. 5, 2003/Accepted Mar. 9, 2004)