(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월11일
(11) 등록번호 10-2520249
(24) 등록일자 2023년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *B09C 1/10* (2006.01)
C02F 3/34 (2017.01) *C12R 1/025* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
B09C 1/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0107898
(22) 출원일자 2022년08월26일
심사청구일자 2022년08월29일
(65) 공개번호 10-2023-0031804
(43) 공개일자 2023년03월07일
(30) 우선권주장
1020210113642 2021년08월27일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
CN109402016 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 2 항

(73) 특허권자
재단법인 농축산용미생물산업육성지원센터
전라북도 정읍시 첨단과학로 241(신정동)
(72) 발명자
김평일
광주광역시 서구 화정로 211, 유니버시아드 힐스테이트 2단지 203동 1303호
박해성
전라북도 정읍시 첨단1로 47, 302동 1506호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태평양

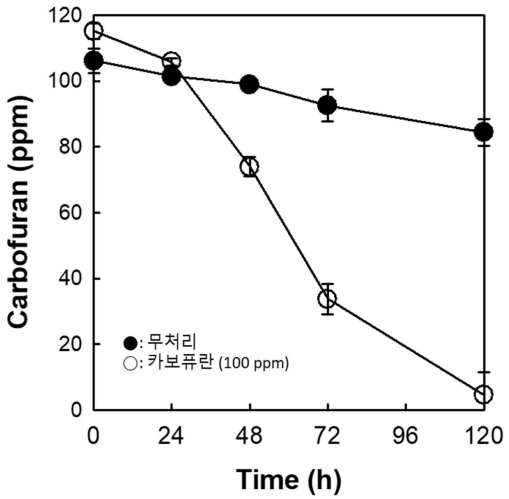
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **농약 분해용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 농약 분해용 조성물에 관한 것으로서, 아크로모박터(*Achromobacter*) 속 미생물, 상기 미생물의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 이용하여, 친환경적으로 농약을 분해할 수 있어 생태계 보호에 효과적이라는 장점이 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C02F 3/34 (2013.01)
C12R 2001/025 (2021.05)

(72) 발명자
서선일
광주광역시 광산구 장신로 306, 신창동 대광로제비앙아파트 105동 1301호
임지환
전라북도 정읍시 상사3길 47, 엘지아파트 101동 1201호

(56) 선행기술조사문헌
CN113234626 A
KR101994072 B1
KR1020200079599 A
KR102079536 B1
SHAMSA AKBAR, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Thesis of The Degree of Doctor, UNIVERSITY OF THE PUNJAB, LAHORE, PAKISTAN(2014.09.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062935
과제번호	PJ014800012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	미생물활용농업환경문제개선기술개발(R&D)
연구과제명	잔류농약 분해 우수 미생물의 최적 조합 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	재단법인 농축산용 미생물산업육성지원센터
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아크로모박터(*Achromobacter*) 속 미생물, 상기 미생물의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 카바메이트계 농약 분해용 조성물로서,

상기 아크로모박터(*Achromobacter*) 속 미생물은 수탁번호 KACC 92347P로 기탁된 아크로모박터 페스티퍼(*Achromobacter pestifer*) GHC2-5 균주이고,

상기 카바메이트계 농약은 카바릴(carbaryl), 카보퓨란(carbofuran), 에티오펜카브(ethiofencarb), 페노뷰카브(fenobucarb), 메티오카브(methiocarb) 및 프로폭서(propoxur)로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인 카바메이트계 농약 분해용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

카바메이트계 농약이 잔류하는 것으로 예상되는 환경에, 청구항 1의 카바메이트계 농약 분해용 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 잔류 카바메이트계 농약의 제거 방법으로서,

상기 카바메이트계 농약은 카바릴(carbaryl), 카보퓨란(carbofuran), 에티오펜카브(ethiofencarb), 페노뷰카브(fenobucarb), 메티오카브(methiocarb) 및 프로폭서(propoxur)로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인 잔류 카바메이트계 농약의 제거 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미생물을 이용한 농약 분해용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화학 농약은 농업 생산성 향상에 크게 기여하였으나, 무분별한 사용으로 인해 토양 및 수질오염, 작물에 잔류되는 등 다양한 환경 문제를 발생시키고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해 국내의 경우 대부분의 농약은 안전성 평가와 농약 사용 지침을 통해 관리가 이루어지고 있다. 그럼에도 불구하고 전작물에 사용되었던 농약이 후작물에 전이되는 문제가 빈번하게 일어나 농가에 막대한 피해가 발생하고 있는 실정이다. 농업현장에서 살포된 농약은 일부가 작물에 부착되거나 공기 중으로 스며들고, 대부분은 토양에 안착하게 된다. 토양 내 농약성분은 자연적으로 분해되기도 하지만 난분해성 농약들의 경우에는 분해 과정이 매우 복잡하고 오랜 시간이 소요된다. 따라

서 다량의 농약이 토양에 축적될 경우 토양오염뿐만 아니라 지하수에 스며들며 하천 및 호수에도 영향을 주어 토양 및 수중 생태계의 파괴에 대한 우려가 높아지고 있는 실정이다. 따라서 수확이 끝난 밭의 토양에 잔류하는 농약을 빠르게 분해할 수 있는 효율적인 체계의 구축이 시급하다고 할 수 있다.

[0003] 이에, 농업 환경 및 생태계 부담을 줄임과 동시에 안전한 먹거리를 공급하기 위한 일환으로 농업용 유용 미생물을 이용하여 농약을 생분해하는 연구가 꾸준히 이루어져 왔다. 생물학적 농약 분해에 사용되는 주요 미생물로는 바실러스(*Bacillus*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 등의 세균과 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 페니실리움(*Penicillium*) 속 등의 진균이 알려져 있는데, 이러한 미생물들은 농작물 및 인체에 위해가 없을 뿐만 아니라, 토양에 대한 직접적인 오염을 일으키지 않으면서도, 토양에 잔류하는 농약을 분해하여 생태계를 보호하는 한편, 잔류 농약이 토양 및 작물에 전이되는 것을 막아주는 장점이 있다.

[0004] 그러나, 이러한 다양한 농약 생분해성 미생물들의 경우, 실제로 현장 적용이 쉽지 않을 뿐만 아니라, 특히 카바메이트계 농약에 대해서는 그 생분해성에 대해 깊은 연구가 이루어지지 않아, 카바메이트계 농약에 대한 생분해성 미생물에 대한 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

(비특허문헌 0001) SHAMSA AKBAR, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Thesis of The Degree of Doctor, UNIVERSITY OF THE PUNJAB, LAHORE, PAKISTAN(2014.09.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 친환경적으로 농약을 분해할 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 아크로모박터(*Achromobacter*) 속 미생물, 상기 미생물의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 농약 분해용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 농약이 잔류할 것으로 예상되는 환경에, 상기 농약 분해용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 잔류 농약의 제거 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 농약 분해용 조성물의 유효성분으로 이용되는 아크로모박터 속 미생물은 농작물 및 인체에 위해가 없을 뿐만 아니라, 토양에 잔류하는 농약, 특히 카바메이트계 농약을 분해하는 활성을 나타내는바, 친환경적으로 생태계를 보호할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 GHC2-5 균주의 계통분류학적 위치를 분석한 계통분류도이다.

도 2는 본 발명의 GHC2-5 균주의 카보퓨란 분해 활성을 확인한 실험 결과이다.

도 3은 본 발명의 GHC2-5 균주의 다른 카바메이트계 농약에 대한 분해 활성을 확인한 실험 결과이다.

도 4은 본 발명의 GHC2-5 균주의 다른 혼합된 카바메이트계 농약에 대한 분해 활성을 확인한 실험 결과이다.

도 5는 본 발명의 GHC2-5 균주외에, 다른 아크로모박터 속 미생물의 카보퓨란 분해 활성을 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0011] 본 발명의 일 측면은 농약 분해용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 농약 분해용 조성물은 아크로모박터(*Achromobacter*) 속 미생물, 상기 미생물의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함한다.

[0013] 상기 아크로모박터 속 미생물은 아크로모박터 아르세니톡시단스(*Achromobacter arsenitoxydans*), 아크로모박터 콜리노파굼(*Achromobacter cholinophagum*), 아크로모박터 사이클로클라스테스(*Achromobacter cycloclastes*), 아크로모박터 데니트리피칸스(*Achromobacter denitrificans*), 아크로모박터 피스케리(*Achromobacter fischeri*), 아크로모박터 인수아비스(*Achromobacter insuavis*), 아크로모박터 하르틀레비이(*Achromobacter hartlebii*), 아크로모박터 임모빌리스(*Achromobacter immobilis*), 아크로모박터 인솔리터스(*Achromobacter insolitus*), 아크로모박터 락톨리티커스(*Achromobacter lactolyticus*), 아크로모박터 애그리퍼시엔스(*Achromobacter aegrifaciens*), 아크로모박터 리티커스(*Achromobacter lyticus*), 아크로모박터 메타놀로필라(*Achromobacter methanolophila*), 아크로모박터 페스티퍼(*Achromobacter pestifer*), 아크로모박터 피에카우디이(*Achromobacter piechaudii*), 아크로모박터 루흘란디이(*Achromobacter ruhlandii*), 아크로모박터 마르플라텐시스(*Achromobacter marplatensis*), 아크로모박터 스파니우스(*Achromobacter spanius*), 아크로모박터 비스코서스(*Achromobacter viscosus*), 아크로모박터 크세로시스(*Achromobacter xerosis*), 아크로모박터 자일로속시단스(*Achromobacter xylosoxidans*) 등일 수 있고, 아크로모박터 인수아비스, 아크로모박터 애그리퍼시엔스, 아크로모박터 피에카우디이, 아크로모박터 자일로속시단스, 아크로모박터 스파니우스, 아크로모박터 페스티퍼, 아크로모박터 마르플라텐시스 등일 수 있으며, 특히 아크로모박터 페스티퍼, 바람직하게는 수탁번호 KACC 92347P로 기탁된 아크로모박터 페스티퍼 GHC2-5일 수 있다.

[0014] 상기 배양액은 상기 아크로모박터 속 미생물을 배양하여 수득되는 것으로, 상기 미생물의 세포를 포함하는 배양액 자체이거나 이의 농축물 또는 건조물일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 조성물이 처리된 생태계의 환경 내에서 상기 아크로모박터 속 미생물이 생존하여 성장하거나 활성을 가질 수 있도록 포함되는 것이라면 어떠한 형태로 가공된 것이든 포함될 수 있다.

[0015] 상기 농축물은 상기 배양액의 고형분 농도를 높인 것으로, 상기 아크로모박터 속 미생물의 세포 농도가 증가된 것일 수 있다. 상기 농축물은 진공농축, 판형농축, 박막농축 등에 의해 농축된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 예컨대 공지의 농축기를 이용하여 40 ℃ 내지 60 ℃의 온도에서 수행할 수 있다. 상기 농축물의 농도에 따라 본 발명의 조성물에 포함되는 배양액의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

[0016] 상기 건조물은 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조, 감압건조, 분무건조, 포말건조, 고주파건조, 적외선건조 등의 방법을 통해 건조된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 아크로모박터 속 미생물의 세포를 포함하는 배양액을 동결건조시킨 동결건조물을 이용할 경우, 이를 포함하는 조성물을 제형화, 포장, 보관하는 등에 있어 유리한 장점이 있으며, 장기간 보존할 수 있으면서도 아크로모박터 속 미생물의 생물 활성을 손상시키지 않는 장점이 있다.

[0017] 상기 농약은 카바메이트(carbamate)계 농약을 포함하는 것일 수 있고, 상기 카바메이트계 농약은 예컨대 알디카브(aldicarb), 알독시카브(aldoxycarb), 알릭시카브(allyxycarb), 벤디오카브(bendiocarb), 벤퓨라카브(benfuracarb), 벤티오카브(benthiocarb), 카바릴(carbaryl), 카보퓨란(carbofuran), 카보설판(carbosulfan), 클로르프로팜(chlorpropham), 디에토펜카브(diethofencarb), 에티에노카브(ethienocarb), 에티오펜카브(ethiofencarb), 페노뷰카브(fenobucarb), 페녹시카브(fenoxycarb), 포메타네이트(formetanate), 퓨라티오카브(furathiocarb), 이소프로카브(isoprocarb), 메티오카브(methiocarb), 메토밀(methomyl), 메토밀-옥심(methomyl-oxime), 메톨카브(metolcarb), 옥사밀(oxamyl), 피리미카브(pirimicarb), 프로파모카브(propamocarb), 프로팜(propham), 프로폭서(propoxur), 터뷰카브(terbucarb), 티오디카브(thiodicarb), XMC(3,5-Xylyl methylcarbamate), 자일릴카브(xylylcarb) 등일 수 있고, 특히 카바릴, 카보퓨란, 에티오펜카브, 페노뷰카브, 메티오카브, 프로폭서 등일 수 있다.

[0018] 상기 농약 분해용 조성물은 상기 아크로모박터 속 미생물이 농약 분해에 직접 사용될 때까지 생존할 수 있도록 적당한 영양공급원을 더 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 적당한 영양공급원은 미생물이 생존하는데 필요한 것으로 통상의 기술자에게 알려진 성분이면 특별한 제한 없이 사용될 수 있고, 구체적으로 탄소원으로서 포도당, 맥아당, 갈락토스, 설탕, 젖당 또는 전분일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0019] 상기 농약 분해용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 예컨대, 직접 분사가능한 용액, 분말 및 현탁액의

형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀젼, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흩뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이때, 필요에 따라 적절한 용매 및/또는 담체가 포함될 수도 있고, 유화제나 분산제 등과 같은 비활성 첨가제나 표면-활성 물질이 포함될 수도 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 다른 측면은 잔류 농약의 제거 방법을 제공한다.

[0021] 상기 잔류 농약의 제거 방법은 농약이 잔류하는 것으로 예상되는 환경에, 상기 농약 분해용 조성물을 처리하는 단계를 포함한다.

[0022] 상기 환경은 농약에 오염되었을 것으로 예상되는 환경이면 무엇이든 해당될 수 있고, 특히 토양이나 수계 등과 같은 생태계일 수 있으나, 이제 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명을 통해 침출수, 유거수, 대수층, 지하수, 지표수, 우물물, 토양, 농업 또는 공업 시료, 및/또는 공업용 연못, 폐수 처리 시설, 모기 웅덩이가 있는 수원(water source) 등의 다양한 환경의 농약, 특히 카바메이트계의 다양한 농약을 해독, 오염 방지, 변화, 제거 또는 감소할 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0025] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

실 시 예 1

[0026] **[1-1] 농약의 준비**

[0027] 시그마-알드리치社(St, Louis, MO, USA)에서 카바릴(carbaryl), 카보퓨란(carbofuran), 에티오펜카브(ethiofencarb) 페노뷰카브 (fenobucarb), 메티오카브(methiocarb) 및 프로폭서(propoxur)를 구입하였고, 이들을 각각 최종 농도 10,000ppm이 되도록 아세톤(Merck, USA)에 혼합하여 냉장 보관하였다.

[0028] **[1-2] 시료 채취 및 농화 배양**

[0029] 다년간 지속적으로 화학 농약을 처리해온 전라남도 고흥군 소재의 배추밭에서, 상토 1~2cm를 걷어낸 뒤 5~10cm 깊이의 토양 시료 50g을 채취하였다. 상기와 같이 채취된 토양 시료는 2mm 체(Daihan Standard Test Sieve; Daihan Co., Korea)로 입자가 큰 돌맹이와 이물질을 제거한 후, 실험에 사용하였다.

[0030] 멸균된 250ml 유리 플라스크에 pH 7.5의 MSM(minimal salt media)(제2 인산칼륨(potassium phosphate dibasic) 7.5g/L, 제1 인산칼륨(potassium phosphate monobasic) 2g/L, 염화마그네슘(magnesium chloride) 0.5g/L 및 염화나트륨(sodium chloride) 0.5g/L) 49.5mL와, 미량 금속 용액(trace metal solution)(몰리브덴산암모늄(ammonium molybdate) 0.02g/L, 염화코발트6수화물(cobalt chloride hexahydrate) 0.003g/L, 붕산(boric acid) 0.05g/L, 염화아연(zinc chloride) 0.03g/L, 아세트산구리1수화물(copper(II) acetate monohydrate) 0.01g/L 및 염화제1철(iron(II) chloride) 0.02g/L) 500μL를 넣고, 상기와 같이 준비된 토양 시료 5g과 상기 실시예 [1-1]에서 준비한 10,000ppm의 카보퓨란(carbofuran) 용액 1%(v/v)을 첨가하여, 진탕배양기(shaking incubator)(Vision Co., Korea)로 25℃에서 120rpm으로 2주 동안 배양하였다(1차 농화 배양). 그런 다음, 상기 1차 농화 배양의 배양액 5ml을 투입하고, 상기 1차 농화 배양과 동일한 조건 및 방법으로 2회의 계대 배양을 실시하였다.

[0031] **[1-3] 미생물 분리 및 동정**

[0032] 상기 실시예 [1-2]에서 농화 배양한 배양물을 멸균증류수(3M, USA)에 1/10씩 순차적 희석(serial dilution)한 후, 1:1000의 희석 시료 100μL를 R2A 평판 배지 (Lab M, UK)에 도말(spreading)하여 30℃의 배양기에서 12-15시간 동안 정치배양 하였다. 그런 다음, 육안 상 우점균으로 보이는 미생물 군집(colony)을 R2A 평판배지에 획선도말(streaking)하여 GHC2-5 균주를 순수 분리하였다. 상기와 같이 분리한 GHC2-5 균주를 5mL의 R2A 액상 배지에 접종하여 15시간 배양한 후, 80% 글리세롤 용액과 3:1의 비율로 혼합하여 -70℃에서 보관하였다.

[0033] 상기와 같이 분리한 GHC2-5 균주를 ㈜ 천랩에 송부하여 16S rRNA의 서열 분석과유전체 서열의 분석을 의뢰하였고 얻어진 서열을 EzBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/)를 통해 유전체 및 유전자 분석을 실시하는 한편, MEGA X 프로그램을 이용하여 상기 GHC2-5 균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다. 그 결과, 도 1A에 도시된 바와 같이, 상기 GHC2-5 균주는 아크로모박터(*Achromobacter*) 속으로 분류되고, 아크로모박터 페스티퍼(*Achromobacter pestifer*)와 가장 높은 16S rRNA 염기서열 상동성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 염기

서열의 상동성과 계통분류도를 종합하여 볼 때, 상기 GHC2-5 균주는 아크로모박터 페스티퍼에 속하지만 유전적으로는 명확히 구분되는 다른 균주인 것으로 판단된다. 이에, 상기 GHC2-5 균주를 국립농업과학원 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 2021년 5월 6일자로 기탁하고, 수탁번호 KACC 92347P를 부여 받았다.

실 시 예 2

[0034] **농약 분해 활성 확인**

[0035] **[2-1] 카보퓨란 분해 활성 확인**

[0036] 상기 실시예 [1-3]에서 냉동 보관한 GHC2-5 균주를 R2A 평판 배지에 획선도말하여 12~15시간 동안 배양한 다음, 다시 10mL의 R2A 액상 배지에 접종하여 30℃에서 150rpm으로 12-15시간 동안 전배양하였다.

[0037] 상기 실시예 [1-1]에서 준비된 10,000ppm 농도의 카보퓨란 용액 500㎕를 50mL의 R2A 브로스(broth)에 첨가하고, 상기와 같이 전배양된 전배양액을 2%(v/v)의 농도로 접종하여 30℃에서 150rpm으로 4~5일 동안 진탕 배양하였다.

[0038] 상기와 같이 진탕배양하는 과정에서, 매 24시간마다 10mL의 배양액을 분취하였고, 이들을 50mL의 코니칼 튜브(conical tube)에 10mL의 아세토니트릴(acetonitrile)(Duksan, Korea)과 함께 넣어 30초 동안 볼텍싱(vortexing)한 다음, 추가로 QuEChERS powder mix(황산마그네슘(magnesium sulfate) 4g, 염화나트륨(sodium chloride) 1g, 시트르산삼나트륨이수화물(trisodium citrate dihydrate) 4g, 시트르산수소이나트륨세스키수화물(disodium hydrogen citrate sesquihydrate) 0.5g)를 첨가하여 30초 동안 볼텍싱한 후, 4℃에서 10,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 그런 다음, 상층액 5mL를 10mL 주사기(syringe)로 수득한 다음, 주사기 필터(syringe filter)(0.2m)로 여과하고, 상기와 같이 얻어진 여과액을 -70℃에 보관하였다.

[0039] 상기 여과액의 용매를 냉각트랩장비(HyperCool, GYROZEN, Korea)가 연결된 원심진공농축기(HyperVac, GYROZEN, Korea)를 사용하여 증발시키고, 튜브에 남은 고형 성분을 아세톤 20㎕로 현탁하고 100배 농축액을 제조한 다음, 아세토니트릴로 1/1000으로 희석하고 TLC(thin layer chromatography)를 수행하여 분석하였다. TLC silica plate(Aluminium HPTLC Silica gel 60 F_{254} plates, Merck, USA)는 실험 목적에 따라 5cm×5cm 혹은 5cm ×10cm 크기로 재단하여 실험에 이용하였고, TLC 전개 용매는 상기 여과액을 단순 전개하는 과정에서는 에틸아세테이트(ethylacetate)와 헥산(hexane)을 50:50의 비율로 혼합한 용매를 이용하였다. 광학 밀도(optical density)(OD600)는 600nm 파장으로 설정된 분광광도계(Libra S50, Biochrom, UK)로 측정하였고, 본 실험에서 사용한 LC-MS/MS는 AB Sciex 5500 triple-quadrupole mass spectrometer(AB Sciex, Toronto Canada)가 장착된 Agilent 1260 series(Agilent Technologies, Wilminton, DE)이고, 컬럼은 Osaka Soda CAPCELL CORE C18(150mm ×2.1mm, 2.7㎛, Shiseido, Japan)을 사용하였으며, 이동상은 A: 0.1%의 포름산(formic acid)과 0.5mM의 포름산암모늄(ammonium formate)을 포함하는 수용액, B: 0.1%의 포름산과 0.5mM의 포름산암모늄을 포함하는 99% 메탄올 용액을, 0.3mL/min의 유속으로 흘려주었고, 컬럼 오븐의 온도는 40℃로 설정하였다. LC-MS/MS는 농약의 잔류된 양을 측정하기 위하여, ESI(electron spray ionization) positive mode로 분석하였다. 또한, 얻어진 LC-MS/MS 기기 분석 조건에서 시험법 검증을 위하여 각각의 농약 표준품을 아세토니트릴로 희석하여 각각 0.02, 0.05, 0.1, 0.2ppm 농도의 시료를 제조하고, 2㎕를 LC-MS/MS에 주입하여 농도에서 직선성을 확인하고 검량선을 작성하였다.

[0040] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 상기 GHC2-5 균주를 배양하는 배양액 내의 카보퓨란의 농도가 시간의 경과에 따라 점차 감소하여, 배양 5일차에는 배양액 내에 카보퓨란이 거의 존재하지 않는 수준으로 분해되는 것으로 확인되었다.

[0041] **[2-2] 다른 카바메이트계 농약에 대한 분해 활성 확인**

[0042] 상기 GHC2-5 균주가 상기 실시예 [2-1]에서와 같은 카보퓨란 외에, 다른 종류의 카바메이트계 농약에 대해서도 분해 활성을 나타내는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 [1-1]에서 준비한 카바릴, 에티오펜카브, 페노뷰카브, 메티오카브 및 프로폭서 각각의 용액을 이용하여, 상기 실시예 [2-1]과 동일한 방법으로 배양 및 분석을 실시하였다.

[0043] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, 본 발명의 GHC2-5 균주는 카보퓨란 뿐만 아니라, 다른 종류의 카바메이트계 농약에 대해서도 동일하게 분해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0044] 또한, 상기 5종의 카바메이트계 농약(카바릴, 에티오펜카브, 페노뷰카브, 메티오카브 및 프로폭서)을 각각 20ppm씩 혼합한 혼합액을 이용하여, 상기 실시예 [2-1]과 동일한 방법으로 배양 및 분석을 실시하였다.

[0045] 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이, 본 발명의 GHC2-5 균주는 카보퓨란 뿐만 아니라, 5종류의 다른 카바메이트계 농약을 혼합한 조성물에 대해서도 동일하게 분해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

실 시 예 3

[0046] **아크로모박터 속의 다른 미생물의 활성 확인**

[0047] 상기 실시예 2에서 확인된 GHC2-5 균주 외에, 아크로모박터 속에 속하는 다른 균주들 역시도 카바메이트계 농약을 분해하는 활성을 가지는지 확인하였다.

[0048] 이를 위해, 국립농업과학원 미생물은행에서 아크로모박터 피에카우디이(*Achromobacter piechaudii*, KACC 12987), 아크로모박터 자일로속시단스(*Achromobacter xylosoxidans*, KACC 14136), 스파니우스(*Achromobacter spanius*, KACC 16377) 및 아크로모박터 마르플라텐시스(*Achromobacter marplatensis*, KACC 16929)를 분양받았고, 이를 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방법으로, 100ppm 농도의 카보퓨란 용액이 포함된 R2A 브로스(broth)에서 접종하여 배양하면서 분석을 실시하였다.

[0049] 그 결과, 하기 표 1 및 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명의 GHC2-5 균주 외에도, 아크로모박터 속에 속하는 다른 균주들을 배양하는 배양액 내의 카보퓨란의 농도가 시간의 경과에 따라 점차 감소하여, 배양 5일차에는 배양액 내 카보퓨란의 양이 상당 부분 감소되는 확인되었다.

표 1

[0050]

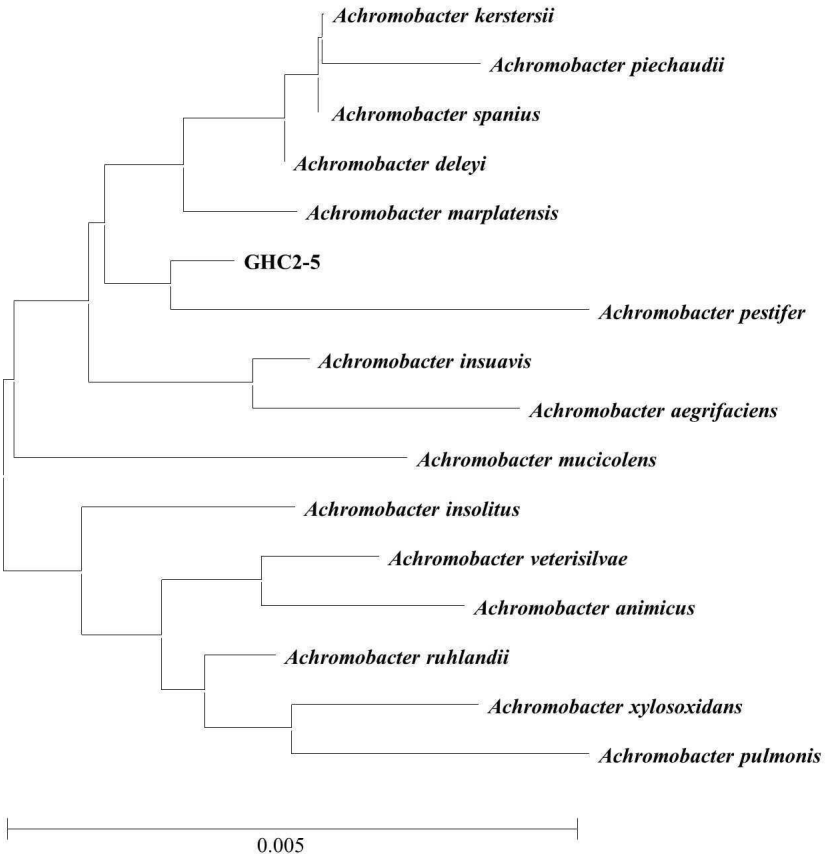
Time	CNT(카보퓨란+R2A)	A. *piechaudii*	A. *xylosoxidans*	A. *spanius*	A. *marplatensis*
0	100%	100%	100%	100%	100%
24	100.1%	99.19%	99.85%	91.89%	95.69%
48	98.87%	76.15%	89.36%	81.07%	51.34%
72	88.39%	55.26%	89.61%	61.18%	72.74%
96	88.54%	20.37%	51.86%	33.49%	42.94%
120	84.11%	12.66%	38.59%	20.26%	28.78%

[0051] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 GHC2-5 균주를 비롯한 아크로모박터 속에 속하는 균주들이 공통적으로 카바메이트계 농약을 분해하는 활성을 가짐을 알 수 있다.

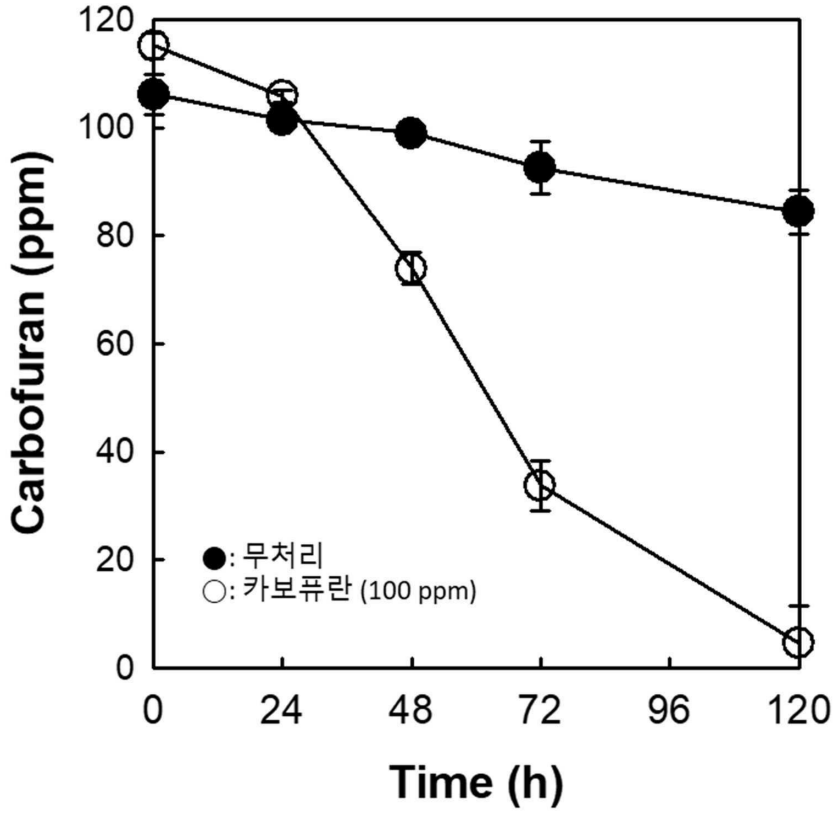
[0052] 상기에서는 본 발명의 대표적인 실험예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실험예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

도면

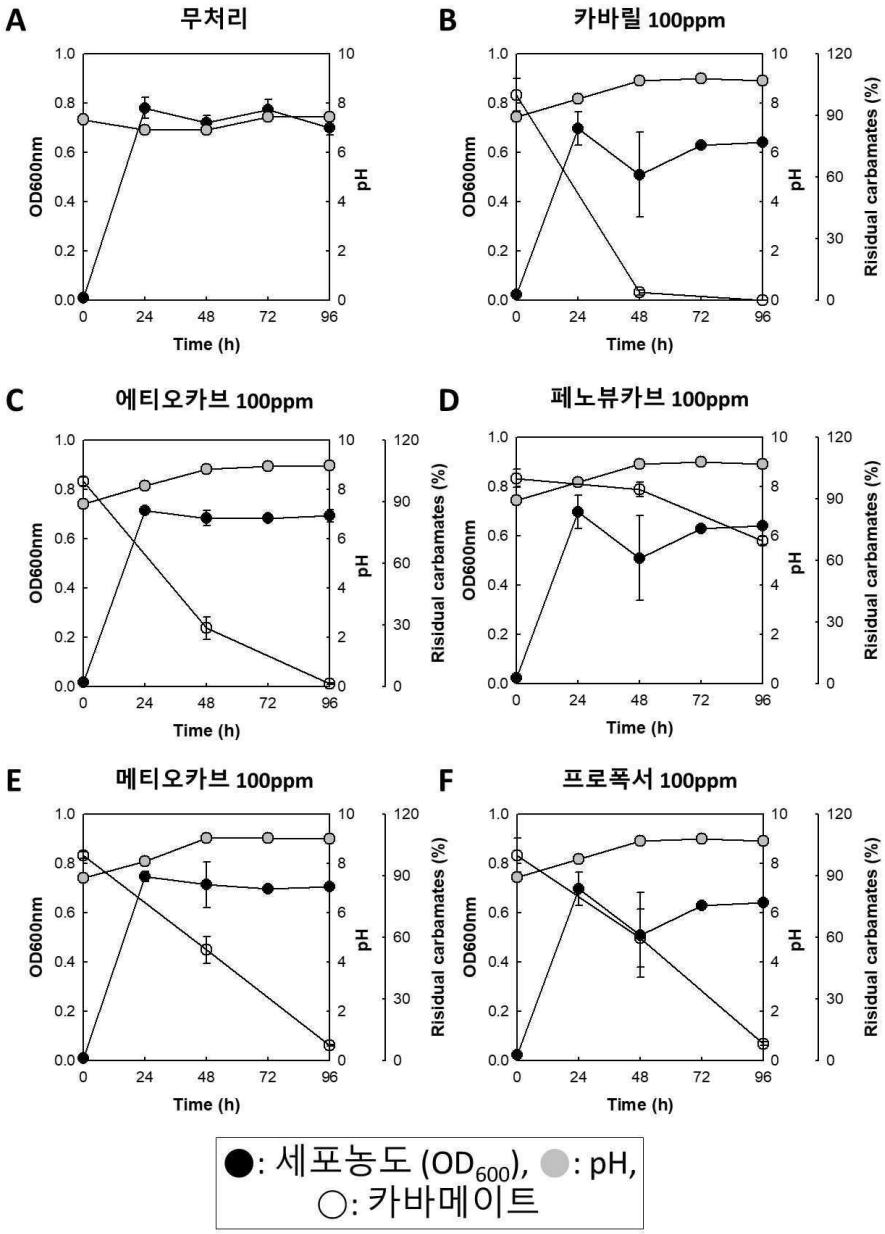
도면1


Achromobacter kerstersii
Achromobacter piechaudii
Achromobacter spanius
Achromobacter deleyi
Achromobacter marplatensis
GHC2-5
Achromobacter pestifer
Achromobacter insuavis
Achromobacter aegrifaciens
Achromobacter mucicolens
Achromobacter insolitus
Achromobacter veterisilvae
Achromobacter animicus
Achromobacter ruhlandii
Achromobacter xylosoxidans
Achromobacter pulmonis
0.005

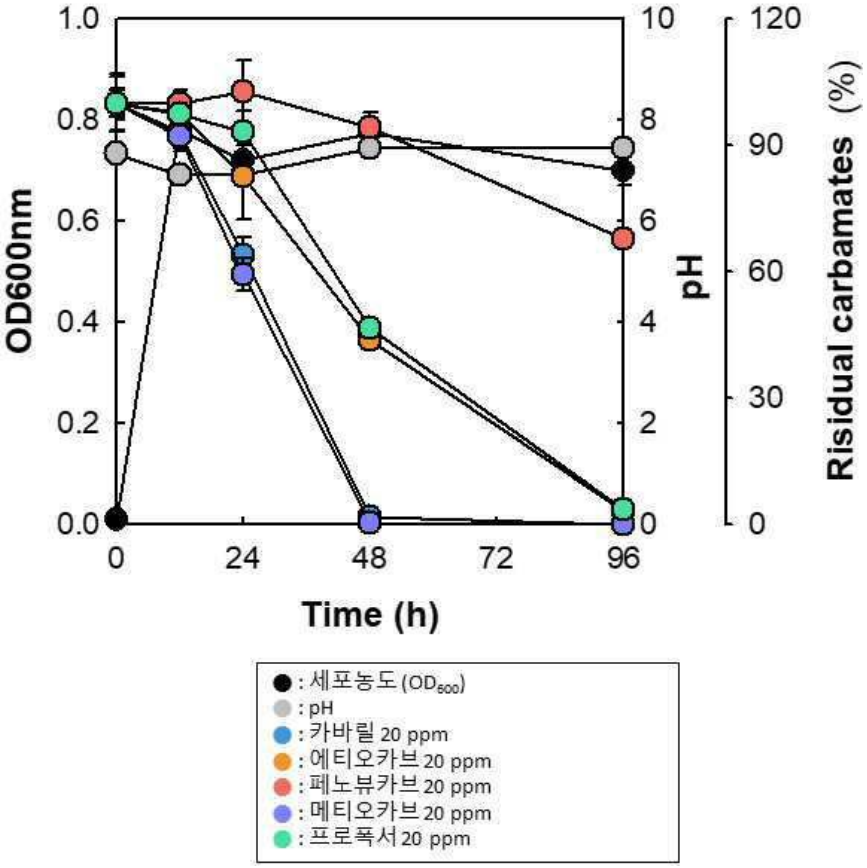
도면2


120
100
80
60
40
20
0
Carbofuran (ppm)
●: 무처리
○: 카보퓨란 (100 ppm)
0
24
48
72
96
120
Time (h)

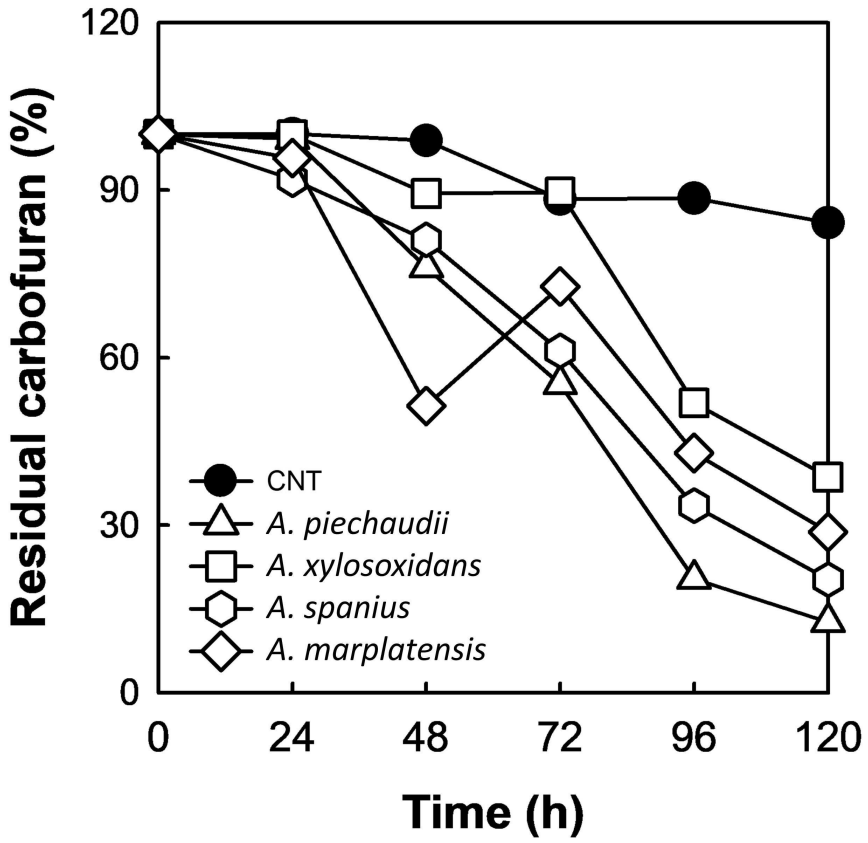
도면3


A
무처리
B
카바릴 100ppm
C
에티오카브 100ppm
D
페노뷰카브 100ppm
E
메티오카브 100ppm
F
프로폭서 100ppm
OD600nm
pH
Risidual carbamates (%)
Time (h)
●: 세포농도 (OD600), ●: pH,
○: 카바메이트

도면4


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD600nm
10
8
6
4
2
0
pH
120
90
60
30
0
Risidual carbamates (%)
0
24
48
72
96
Time (h)
: 세포농도 (OD600)
: pH
: 카바릴 20 ppm
: 에티오카브 20 ppm
: 페노뷰카브 20 ppm
: 메티오카브 20 ppm
: 프로폭서 20 ppm

도면5


120
90
60
30
0
Residual carbofuran (%)
0
24
48
72
96
120
Time (h)
CNT
A. piechaudii
A. xylosoxidans
A. spanius
A. marplatensis