

살균제 Tricyclazole에 대한 안전성 평가 (I)

황인영*·최의주*·노정구*

(1984년 11월 14일 접수)

Evaluation for Safety of Tricyclazole (I)

In-Young Hwang*, Eui-Ju Choi* and Jung-Koo Roh*

Abstract

Fate of tricyclazole in rice paddy system was studied. The effect on soil microorganism as well as the mutagenicity of the compound was also examined.

The residues of tricyclazole in crops and soil with two times application before harvest were 0.37 in unpolished rice, 0.29 in polished rice, 0.14 in rice straw, and 0.15 ppm in paddy soil. With three times of application the residues were increased to 0.46, 0.39, and 0.19 ppm, respectively. Until 2~3 weeks after treatment of pesticide the degradation of tricyclazole was progressed comparatively but very slowly afterward and the half life of that was about 140~180 days. There was no effect for viable count of soil microorganisms and for mutagenic test by *Salmonella* and *Saccharomyces* systems.

서 론

Tricyclazole (Beam[®], 5-methyl-1,2,4-triazolo(3,4- β)-benzothiazole)은 도열병 방제에 사용되는 침투성 농약으로 1979년 이후 국내에서 처음 사용되기 시작하여 현재에는 유효성분량으로 연간 10만톤 이상이 사용되고 있다⁽¹⁾.

이 농약의 사용량이 급격히 증가하고 있는 것은 침투이행성이 강하여 방제 효과가 크고 약효의 지속성이 높기 때문이나 대상작물 또는 환경에 잔류되는 양이 많아 그에 따른 안전성이 문제가 된다. 본 실험에서는 tricyclazole의 안전성을 평가하기 위하여 토양중에서 tricyclazole이 분해되는 양상과 포장에 살포하였을때

작물체 및 토양중에 잔류되는 tricyclazole의 양을 측정하였고 토양미생물의 생균수에 대한 영향과 돌연변이성 등을 실험하였다.

실험 방법

1. Tricyclazole의 잔류성 실험

작물 및 토양중에서의 tricyclazole의 잔류성 실험은 농약이 수년간 사용되지 않은 논(사질토, pH 5.34, 유기물 함량 0.51%)을 택하여 37.5g a.i./10a의 농도로 각 실험구에 표 1과 같이 처리하였다. 실험실 내에서의 토양중 농약의 잔류 실험은 acetone으로 희석한 tricyclazole용액을 sea sand 1g에 0.5 ml씩 살포한 후 acetone을 휘발시키고 Primer등⁽²⁾의 방법에 따라 제조

*한국화학연구소 안전성연구센터 (Toxicology Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon)

Table 1. Application schedule of tricyclazole during experiment

Plot	Days before harvest	Application frequency
T ₀	control	0
T ₁	90, 60	2
T ₂	90, 60, 40	3
T ₃	90, 60, 20	3
T ₄	90, 60, 40, 20	4

*harvesting date: Oct. 5, 1983.

한 토양(사양토, pH 4.84, 유기물 함량 2.316%) 50 g (건물 중량)에 잘 섞어 멸균 증류수와 함께 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 수층의 두께를 1 cm 가량 유지한 후 용기 입구를 0.1 mm PVDC film으로 밀봉해서⁽³⁾ 22°C에서 보관하여 일정시간 별로 잔류되는 tricyclazole을 GC로 분석하였다.

2. 농약 잔류 분석

토양 시료 50 g(건물 중량)을 정확히 칭량하여 물 50 g과 methanol 100 ml을 함께 넣고 왕복 진탕기에서 300 rpm의 속도로 60분간 진탕시킨후 감압여과 하였다. 잔사물 methanol 50 ml씩 2회 세척하여 앞의 여액과 함께 rotary evaporator로 40°C에서 감압 건조하였다. 감압 건조물에서 dichloromethane 100 ml씩으로 2회 추출하고 무수망초로 수분을 제거한 다음 다시 40°C에서 감압건조하고 건조물을 acetonitrile 5 ml로 재용해하여 GC로 분석하였다.

작물시료의 경우 25 g(건물 중량)을 정확히 칭량하고 200 ml의 4 N H₂SO₄용액과 함께 환류장치에서 60 분간 환류시켰다. 환류된 액을 여과액으로부터 ethyl-acetate 100 ml씩 2회 추출한후 무수 망초로 탈수시켜 40°C에서 감압건조하였다. 건조물을 25 ml의 dichloromethane으로 재용해 하여 column chromatography로 정제하였다. 19×300 mm의 column에 alumina (8% 수분 함유) 14 g을 채우고 그위에 무수망초를 2 cm 두께로 넣은 후 methanol-CH₂Cl₂ (1 : 99 v/v) 용액 30 ml로 씻어낸 다음 dichloromethane으로 재용해시킨 건조물을 통과하여 흡착시키고 methanol-dichloromethane (1 : 99 v/v) 용액 50 ml로 용출하고 column을 통과한 액을 모두 수집하여 45~50°C에서 감압건조한 후 1.0 ml의 acetonitrile로 재용해 하여 토양의 경우와 동일한 조건으로 GC분석하였다.

본 실험에서 tricyclazole의 잔류분석시 사용된 기기는 Hewlett Packard GC-5840A이며, detector로는 FPD, column은 120 cm×1/4 in (id) glass tube에 1%

carbowax 20 M/chromosorb W-HP (80~100 mesh)을 충전하여 사용하였다. Injector, column 그리고 detector의 온도는 각각 230, 250, 230°C였다. Gas의 유속(ml/min)은 N₂가 50, H₂가 50, O₂가 10, 그리고 air가 10이었으며 chart speed는 10 mm/min였다.

Tricyclazole의 정량분석은 chromatogram상의 peak 면적의 제곱근 값으로 하였으며, 표준정량 곡선은 그림 1과 같았다.

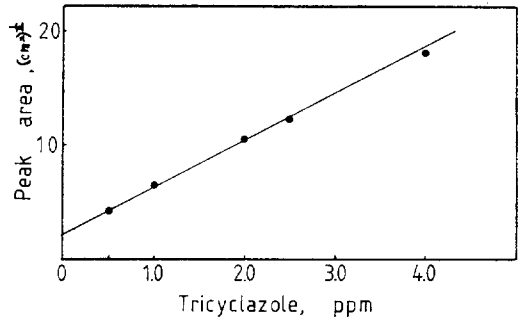


Fig. 1. FID response to a range of tricyclazole concentration

3. 토양중의 생균수 측정

미생물 생균수에 대한 ticyclazole의 영향을 보기 위하여 담수토양에 농약을 처리하고 25°C에서 보관하며 일정시간 별로 채취하여 생리적 식염수로 현탁액을 만들고 차례로 희석한 후 1 ml를 페트리 접시에 넣고 45°C의 한천 배지 15 ml를 붓고 잘 섞어 굳힌 후 30°C에서 7일간 배양하여 colony수를 세었다. 방선균은 chitin agar배지⁽⁴⁾에서 배양하였고, 세균은 modified soil extract agar배지에서 배양하였으며 방선균의 성장을 막기 위하여 pentachloronitrobenzene (PCNB)를 50 µg/ml의 농도로 배지에 첨가하였다⁽⁵⁾. 한편 곰팡이는 Rose-Bengal streptomycin agar⁽⁶⁾에서 배양하였다.

4. 돌연변이 유발성 시험

Ames test: *Salomonella typhimurium*을 이용한 돌연변이 유발성 실험은 Ames등⁽⁷⁾의 방법으로 행하였다. 0.5 mM L-histidine-HCl과 biotin이 포함된 45°C의 top agar에 0.1 ml sample solution과 0.1 ml의 bacterial tester strain culture를 첨가하였다. Vogel-Bonner E medium plate에서 37°C, 48 hr 배양한 후 revertant의 수를 측정하였다.

Saccharomyces cerevisiae test: *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 염색체 이상 실험은 Zimmermann⁽⁸⁾의 방법으로 하였다. Cell을 complete media에서 stationary phase까지 배양한 후 증류수로 세척하고

0.1 M 인산 완충 용액(pH 7.0) 4 ml에 희석시킨 후 1 ml를 원심분리하고 cell을 세척해서 4 mg/l의 adenine을 포함하는 complete media에 plate 시킨후 28°C에서 6~8일간 배양했다. 배양이 끝나고 pink 혹은 red 색의 colony수를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 회수율 및 검출 한계

시료에 따른 tricyclazole의 평균 회수율 및 표준 편차는 표 2와 같다.

Table 2. Recoveries of tricyclazole from various samples

Sample	Fortification (ppm)	No. of Samples	Average recovery (%)	Standard deviation
Soil	0.2	5	82.2	3.1
Rice	0.2	3	86.6	1.5
Rice straw	0.2	3	75.6	8.1

이때 tricyclazole의 최소검출 한계는 각 시료 모두 0.01 ppm이었다.

2. Tricyclazole의 분해 양상 및 잔류성

수확시 논토양에서 토양 및 작물중의 tricyclazole잔류량은 표 3과 같다. 일반적으로 실제 사용되는 농도(37.5 g a.i./10 a)와 처리 횟수(2회)인 관행(T1)의 경우 tricyclazole의 토양중 잔류량은 0.15 ppm, 현미는 0.37 ppm, 백미는 0.29 ppm, 그리고 벧짚은 0.14 ppm이었다. 수확전 40일과 20일에 추가로 tricyclazole을 처리한 실험구(T2-T4)에서는 토양중에 0.19~0.34 ppm, 현미중에 0.46~1.49 ppm, 백미중에 0.39~0.51 ppm, 벧짚중에 0.30~12.54 ppm의 잔류 tricyclazole이 검출되었다. 작물에서의 tricyclazole의 잔류량은 일반적 처리의 경우인 T1 보다 수확전 20~40일에 농약을 처리할 때가 약 2배 가량 되었다.

Tricyclazole 담수상태의 실험실적 실험에서 분해되는 양상은 그림 2와 같다. 농약의 분해 과정은 생물학적⁹⁾, 화학적¹⁰⁾, 물리학적¹¹⁾인 여러 인자들에 의해 이루어지고 있는데 tricyclazole의 경우는 대체로 농약을 처리한 후 15~20일까지는 비교적 빠른 속도로 분해가 이루어지다가 시간이 경과함에 따라 분해속도가 매우 완만하게 될 수 있었다.

이 실험에서 특이한 사항은 그림 2에서 보는 바와 같이 처리농도가 높은 실험구(L1, 처리농도 3.4 ppm)의

Table 3. Residues of tricyclazole in soil, rice and rice straw at harvest (ppm)

Plot	Soil*1	Unpolished rice*2	Polished rice*2	Rice straw*1
T ₀ (Control)	—*3	—	—	—
T ₁	0.15	0.37	0.29	0.14
T ₂	0.19	0.46	0.39	0.30
T ₃	0.24	0.61	0.45	6.40
T ₄	0.34	1.49	0.51	12.52

*1 dry basis

*2 wet basis

*3 not detected

초기 분해속도가 낮은 처리농도의 실험구(L3, 처리농도 0.24 ppm)의 그것 보다 약 2배 가량 빨랐으며, 처리일로부터 약 20일 이상 경과한 후에는 각 처리구 모두 분해속도가 비슷하였다는 점이다. 이때의 반감기는 140~180일로 나타났다. 이상의 결과에서 tricyclazole은 느린 분해가 매우 느린 토양중이나 대상작물 체내에 많은 양이 잔류될 수 있음을 알 수 있었다.

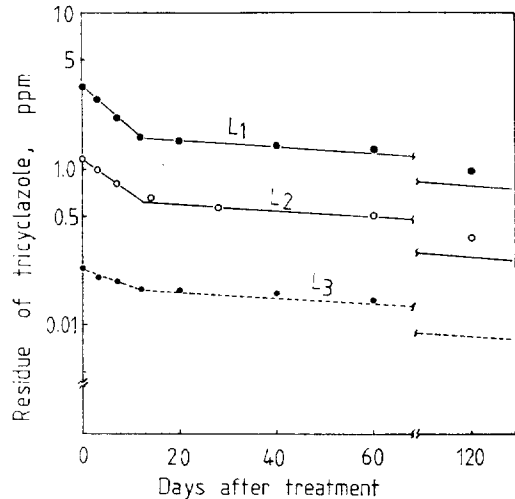


Fig. 2. Degradation of tricyclazole in laboratory model system (treated concentration, L₁=3.4 ppm; L₂=1.2 ppm; L₃=0.24 ppm)

3. 토양중의 생균수 변화

Tricyclazole을 일반적인 사용 농도(0.45 ppm)와 그의 10배, 100배 농도로써 담수토양에 처리하고 시간별로 방선균, 세균, 곰팡이 등에 대한 생균수를 측정한 결과는 표 4와 같다.

각 군들에 대한 tricyclazole의 영향은 농도가 높아짐에 따라 약간의 생균수에 저해 효과가 있었으나 토양중의 non-target microorganism에 대한 실제 사용농

Table 4. Effect of different treatment of tricyclazole on the population of microorganisms in flooded paddy soil

Days	Concentration (ppm)	Actinomycetes ($\times 10^6$)	Bacteria ($\times 10^5$)	Fungi ($\times 10^4$)
1	Control	8.1	42.0	23.7
	0.45	7.8	36.5	23.3
	4.5	9.5	43.5	22.3
	45	5.5	24.0	11.3
3	Control	8.7	45.1	25.4
	0.45	6.8	57.3	26.3
	4.5	10.3	44.5	18.8
	45	6.0	24.8	13.8
7	Control	7.0	37.5	23.9
	0.45	7.0	40.0	19.0
	4.5	7.0	30.0	15.5
	45	7.3	37.5	16.3
14	Control	8.9	30.5	22.1
	0.45	9.3	21.0	21.0
	4.5	10.0	36.5	26.3
	45	8.0	17.3	15.5
28	Control	9.8	45.4	26.6
	0.45	8.8	47.0	25.3
	4.5	10.5	33.3	31.0
	45	8.5	26.8	20.5

도 범위 부근에서의 tricyclazole의 영향은 거의 없었다.

4. 돌연변이 유발성 시험

Tricyclazole에 대한 *Salmonella typhimurium*을

Table 5. Effect of tricyclazole on the reverse mutation in *Salmonella typhimurium*

Treatment	<i>S. typhimurium</i>			
	TA 1535	TA 1538	TA 98	TA 100
Tricyclazole				
1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	—	—	—	—
300 $\mu\text{g}/\text{plate}$	—	—	—	—
100 $\mu\text{g}/\text{plate}$	—	—	—	—
4-NQ				
1 $\mu\text{g}/\text{plate}$	—	—	+	‡

*symbols for the number of revertants/plate (spontaneous subtracted); — < 20; + = 20~100; ‡ > 100

이용한 Ames test 결과 표 5와 같이 TA 1535, TA 1538, TA 98, TA 100의 네 균주에 대한 돌연변이 유발능은 음성이었다. 또한 *Saccharomyces cerevisiae* system으로 tricyclazole에 대한 돌연변이 유발능 시험도 표 6, 표 7과 같이 생존수에 대한 변이수가 0.05% 이하인 음성이었다. 이 결과 tricyclazole은 미생물을 이용한 돌연변이성이 없다고 생각된다.

Table 6. Effect of tricyclazole on the chromosomal aberration in *Saccharomyces cerevisiae*

Treatment*	Survival(%)	Aberrant colonies
		10 ³ survivors
Water		
(negative control)	100	0.69
DMSO		
(negative control)	95	0.72
Tricyclazole		
1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	80	0.62
300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	92	0.78
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	97	0.70
4-NQ		
(positive control)		
0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$	98	13.5

*Chemicals were dissolved in DMSO; DMSO control was 10%(v/v) DMSO; treatment for 60 minutes except for water control (0 min)

Table 7. Effect of tricyclazole on the reverse mutation in *Saccharomyces cerevisiae*

Treatment*	Survival(%)	Ilv ⁺ revertants
		10 ⁷ survivors
Water		
(negative control)	—	0.44
DMSO		
(negative control)	100	0.46
Tricyclazole		
1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	78	0.43
300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	91	0.58
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	95	0.39
4-NQ		
(positive control)		
0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	83	7.2

*Chemicals were dissolved in DMSO; DMSO control was 10%(v/v) DMSO solution

결 론

살균제의 일종인 tricyclazole의 분해속도, 토양 및 작물 중의 잔류성, 방선균, 곰팡이, 세균 등의 토양미생물에 대한 영향 그리고 돌연변이성 등을 조사한 결과 분해속도는 매우 느려 그의 반감기가 약 5개월 이상 되었으며 또한 토양과 작물중에 있어서도 잔류되는 양이 상당량 되었다. 반면 tricyclazole에 의한 토양중의 미생물 생균수에는 영향이 없었고 Ames test, *Saccharomyces* test를 통한 돌연변이성에서도 그 효과는 없었다. 그러나 미생물에 대한 영향이나 돌연변이성이 현재엔 비록 나타나지 않았다고 해도 분해가 잘 안되고 잔류성이 높은 농약들에 대한 계속적이고도 오랜 시간동안의 연구를 통해 각종 농약들에 대한 안전성을 확보하는 것이 앞으로의 연구과제라 생각한다.

요 약

Tricyclazole을 수확전 90~40일에 2~3회 처리한 작물과 토양중에서의 수확시 잔류되는 tricyclazole의 양은 각각 현미가 0.37~0.46 ppm, 백미가 0.29~0.39 ppm, 벧짚이 0.14~0.30 ppm 및 토양이 0.15~0.19 ppm이었다. 담수조건하에서의 tricyclazole의 분해양상은 처리 후 2~3주까지 비교적 빠른 속도로 분해가 진행되다가 그 이후로는 안전한 속도로 분해되었으며 그때의 반감기는 140~180일이었다. 또한 토양 미생물의 생균수에 미치는 영향은 거의 없었으며 *Salmonella*, *Saccharomyces* 등을 이용한 돌연변이성 유무 실험에서는 대조구와 별차이가 없었다.

References

1. 농약공업협회 (1983) : 농약년보, p.24.

2. Pramer, D. and Bartha, R. (1972) : Preparation and processing of soil samples, *Environmental Letter*, 2(4), 217.

3) Miles, J. R. W., Tu, C. M. and Harris, C.R. (1979) : Persistence of eight organophosphorus insecticides, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 312.

4. Lingappa, Y. and Lockwood, J. L. (1972) : Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes, *Phytopathology*, 52, 317.

5. Farley, J. D. and Lockwood, J. S. (1968) : The suppression of *Actinomycetes* by PCNB in culture media used for enumerating soil bacteria, *Phytopathology*, 58, 714.

6. Menzies, J. D. (1965) : *Methods of Soil Analysis*, Part 2. eds. Black, C. A., et al.

7. Ames, B., McCann, N. J. and Yamasaki. E. (1975) : Methods for detecting carcinogen and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Research*, 31, 347.

8. Zimmermann, F. K. (1975) : Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 31, 71.

9. Beestman, G. B. and Deming, J. M. (1974) : Dissipation of acetanilide herbicides from soil, *Agronomy J.*, 66, 308.

10. Howard, P. J., Saxema, J. and Sikka, H. (1978) : Determining the fate of chemicals, *Environ. Sci. Tech.*, 12(4), 398.

11. Chen, Y. S. and Chen, J. S. (1979) : Degradation and dissipation of herbicide butachlor in paddy fields, *J. Pesticide Sci.*, 4, 431.