

除草劑의 處理가 콩 根瘤菌의 生存率에 미치는 影響

辛永順* · 吳正行*

Effect of Herbicides on the Survival of Soybean Nodule Bacteria(*Rhizobium japonicum*) in vitro.

Young Soon Shin* and Jeung Haing Oh*

ABSTRACT

Since most chemicals effect to the non-target organisms, present study was conducted to determine the effects of some herbicides to soybean nodule bacteria(*Rhizobium japonicum*) in vitro. Selective upland herbicides Alachlor, Linuron, Simazine and nonselective Paraquat were medicated to the YEMA media and survival rate of the bacteria in the medium was measured a week after incubation. Survival of soybean nodule bacteria in the media medicated with recommended concentration 400 ppm of Alachlor and Linuron were decreased significantly by 27.4 % and 57.8 %, respectively. While little effect was observed in Simazine, a marked reduction of survival was observed in 200 ppm of Paraquat. Effects of Alachlor was different with isolates of the nodule bacteria. Isolate I-122 was relatively resistant and I-145 was more sensitive than other isolates tested. Intermediate K-5 was the most resistant at the recommended dose and the survival dose was drastically reduced with increment of concentration. Nodule formation of the soybean plants was different with the varieties and isolates. The most nodulation was observed in the resistant isolates I-122 and K-5, for which the nodulation might be related with the resistance to the environmental stress factors.

緒 言

全世界 作物生産量の 病蟲害 및 雜草에 의한 損失은 平均可能收穫量の 33.8%에 이른다.¹⁾ 따라서 作物栽培가 集約化되는 現代農業에서는 농약에 의한 化學的 防除 없이는 農産物生産의 量的 質的 向上은 기대하기 어렵다. 더우기 노동력 부족에 따른 인건비 상승은 생산비 절감을 위한 省力栽培의 필요성을 더욱 절실하게 만들었고 이에 따른 除草劑의 사용량은 급속한 증가현상을 보이고 있다. 이처럼 농약의 사용은 作物의 生産性 向上을 위해 불가결의 要素이나 이들의 非標的 生物에 對한 影響(Nontar-

get effect)은 하나의 害惡的 부작용으로 문제가 되고 있다.

콩은 통상적으로 질소시비의 중요성이 크지 않은 作物로 인식되고 있는데 이는 콩 생육기간중에 소요되는 질소량의 40~60%가 根瘤菌의 공중질소 고정에 의해 공급되기 때문이다. 그런데 除草劑는 종류에 따라 근류균 자체에 직접적으로 영향을 미치 거나 또는 간접적으로 寄主植物에 작용하여 根瘤菌의 侵入, 根瘤形成力 및 질소고정능력 등의 근류균 活性에 영향을 미치게 된다. Johnen & Drew¹⁰⁾는 Linuron이 루핀의 근류균생장을 억제하는데 그 정도는 菌株에 따라 차이가 있다고 하였으며, Kaszubiak¹¹⁾는 Dalapon이 in vitro에서는 근류균의 생

* 檀國大學校 農科大學 (Coll. of Agri., Dankook Univ., Cheonan 330-180, Korea) <'89. 2. 18. 接受>

장을 억제시키나 *in vivo*에서는 알팔파의 근류형성에 영향이 없었다고 하였다. Grossbard⁸⁾는 Atrazin, Dinoseb, Asulam 및 Linuron 등이 콩의 根瘤形成과 질소고정능력을 감소시켰다고 하였으며, Symon-sylvestre *et al.*¹²⁾도 2, 4-DB와 Dalapon을 混用하는 경우 根瘤形成과 질소고정능력은 현저히 감소하는데 이는 根部의 非正常生育에 기인한 것이라고 하였다. 또 Anderson²⁾은 Simazin을 培地上에서 使用 권장농도보다 높은 농도로 처리했을 때 根瘤菌의 증식억제효과를 나타냈으며 DNOC, Dinoseb, Pyrozon 및 Linuron 등은 抑制作用이 크다고 하였다. Greaves *et al.*³⁾도 除草劑를 비롯한 각종 農藥의 使用이 根瘤菌의 活性과 共生育에 害惡의으로 作用할 수 있음을 강조하였다.

따라서 本 實驗에서는 콩발 제조용으로 우리나라에서 많이 사용되고 있는 Simazin, Linuron, Alachlor와 Paraquat의 根瘤菌에 對한 影響을 *in vitro*에서 調查하였다.

材料 및 方法

本 實驗에 供試된 콩품종은 장엽콩, 광고, 방사콩이며, 根瘤菌은 淸안 소재 단국대학교 농과대학 포장에서 분리한 K-4 菌株과 한국에너지연구소 금곡농장에서 分離한 K-5 菌株, 그리고 USDA 분양균주 등이 使用되었으며 除草劑는 우리나라에서 널리 使用되는 殺菌제인 Alachlor, Simazine, Linuron 및 Paraquat를 使用하였다.

콩 根瘤菌의 分離, 培養 : 播種後 4週된 콩을 뽑아 主根에 부착한 活性의 根瘤를 分離하여 殺菌수로 세척하고 95% 에틸알콜에 5분간 침지한 後 0.1% 승홍수에 4~10分間 表面消毒하고 殺菌수로 충분히 세척한 다음 根瘤를 火焰멸균한 슬라이드글라스 사이에 넣고 압착하여 細菌을 누출시켰다. 이것을 백금이에 묻혀 YEMA培地⁷⁾에 無菌의으로 옮겨 塗沫하고 29°C에서 1週日間 培養한 後 형성된 전형적인 根瘤菌落을 재차 도말하여 純粹分離하였다. 分離하는 과정에서 현탁액을 현미경 슬라이드에 옮겨 건조, 고정시키고 Crystal violet로 1분간 染色한 後 流水에 세척하고 현미경으로 檢鏡하여 전형적인 근류균을 관찰하였으며 培地上에서의 檢定은 Congo red 용액을 混合한 선택배지를 사용하였다.

콩 根瘤菌의 生存率 調查 : YEMA 培地에서 1주일간 평판배양된 根瘤菌을 백금으로 殺菌수에 옮겨 연

속희석한 다음 각각 0.5 ml을 멸균된 사테에 분주하고 여기에 각 농도의 除草劑가 混合된 YEMA培地 또는 Congo red + YEMA 선택배지를 분주하여 신속히 혼합시킨 다음 靜置, 응고시켜 29°C 恒溫器에 培養하였다. 除草劑의 濃度는 使用 권장농도를 포함하여 100~1,000 ppm으로 희석하고 모든 과정은 Cleanbench에서 무균적으로 조작하였으며 接種 1주일 後에 나타난 根瘤菌의 菌落數를 計數하여 生存率을 계산하였다. 供試한 除草劑는 처리조건에 따라 차이는 있겠으나 일반적으로 사양토에서는 5 cm 깊이까지 移行하기 때문에 5 cm 깊이의 土壤體積에 대한 藥量으로 환산하여 ppm 농도를 사용하였다.

콩의 根瘤形成力 調查 : 직경 15cm의 盆에 멸균된 토양을 넣고 1% Sodium hypochlorite 용액에 5분간 침지한 각 품종의 콩 종자를 播種하였으며 YEMA 培地에서 1주일간 培養한 根瘤菌을 殺菌수에 희석한 현탁액을 토양속에 注入接種하였고 4주후에 식물체를 뽑아 형성된 전체 根瘤의 數와 重量을 測定하였다.

結果 및 考察

콩발 제조제로 널리 사용되는 선택성 제초제 Alachlor, Linuron, Simazine 및 비선택성 제초제 Paraquat를 YEMA培地에 혼합하여 根瘤菌을 培養한 1週日 後에 조사한 根瘤菌 生存率은 表 1에서 보는 바와 같다. 생존 근류균수는 除草劑의 종류에 따라 정도의 차이는 있으나 처리농도가 증가함에 따라 有意性있게 감소하였다. 播種前 土壤處理 除草劑인 Alachlor는 無處理의 生存菌數 248×10^2 cells/ml에 비해 실제 圃場에서 콩발제조를 위해 撒布하도록 권장하는 농도인 400 ppm 처리에서는 68×10^2 cells/ml로서 72.6%가 감소하였으며 800 ppm 처리에서는 生存菌이 관찰되지 않았다. Linuron은 Alachlor에 비해 감소율이 낮은 하여도 무처리의 782×10^2 cells/ml에 비해 포장사용 권장농도인 400 ppm에서 452×10^2 cells/ml로 42.2%가 감소하였다. 반면에 Simazine은 포장사용 권장농도인 600 ppm에서는 거의 生存菌數의 감소가 나타나지 않았으며, 1,000 ppm에서도 50%가 生存하여 대체로 다른 제초제에 비해 영향이 적은 것으로 나타났고 非選擇性 除草劑로서 강력한 莖葉處理劑인 Paraquat는 毒性이 매우 強하여 200 ppm에서도 77.2%의 생존율 감소가 있었다. 이러

Table 1. Number of cells($\times 10^2$ /ml) of *Rhizobium japonicum* survived in the YEMA media medicated with each concentration of the herbicides after incubation at 27°C for a week.

Concentration (ppm)	Alachlor		Linuron		Simazine		Paraquat	
	Number	%	Number	%	Number	%	Number	%
0	248a ¹⁾	100	782a	100	162a	100	732	100
200	230a	92.7	574b	73.4	160a	98.7	174	23.8
400	68b	27.4	452c	57.8	158a	97.5	0	0
600	4c	1.6	428d	54.7	160a	98.7	0	0
800	2c	0.8	396d	50.6	138ab	85.2	0	0
1000	0	0	0	0	80b	49.4	0	0
F-value	86.14**		79.87**		3.68*		-	

¹⁾ Figures with the same letters are not significantly different at P=0.01 level according to Duncan's multiple range test.

한 연구結果는 Simazine 을 비롯한 Triazin系 除草劑가 一般土壤 細菌과 根瘤菌에 영향을 미치지 않는다고 報告한 Simon-sylvestre²⁾의 研究와 一致하는 것이다. Simazine 을 사과, 딸기, 밀, 옥수수밭에 正常濃度로 8年間 撒布하게 되면 처음 1年間은 一般細菌의 增殖에 抑制作用이 있으나 점차 회복되어 영향이 없어졌다고 하였다.⁶⁾ Linuron은 Atrazin, Dinoseb 등과 같이 根瘤菌을 비롯한 一般土壤細菌을 抑制하였으며⁹⁾ Paraquat 는 사용권장농도에서도 細菌 및 真菌의 生育抑制效果가 현저하였고 그 정도는 土壤의 種類에 따라 差異가 있다고 하였다.⁷⁾ 그러나 Alachlor 의 경우, 本 實驗結果에서는 사용권장농도에서 生存率의 減少를 보이고 있으나 Audus³⁾ 는 사용권장농도에서 一般土壤細菌의 增殖에 영향이 없었다고 하였고 Simazine 처리에 의해서는 根瘤菌의 增殖이 감소하였으며 그 減少하는 濃度에서는 암모니아 生成이 지연된다고 하였다. Grossbard⁸⁾ 도 Simazine 을 사용권장농도보다 높은 농도로 처리하여 培地上에서 檢定하면 細菌의 增殖抑制作用이 나타난다고 하였으며 이와같은 報告는 本 實驗의 結果와 차이를 보이는 것으로 이는 圃場과 菌株의 차이에 의한 것으로 생각된다. 이들 除草劑의 알려진 殺草作用機작을 보면 Linuron과 Simazine

의 경우 光合成의 明反應 阻害作用으로서 殺草機작을 갖게 되며 Alachlor 는 代謝抑制劑로서 핵산 및 단백질의 合成에 關係하는 각종 효소의 作用을 저해하고 Paraquat 는 光合成의 明反應 과정에서 生成되는 電子를 탈취하여 遊離基(Free radical)를 生成, 과산화수소를 生成하므로써 葉綠體膜을 파괴하여 殺草作用을 나타내는 것이다.⁴⁾ 대체로 이와같은 光合成阻害劑는 光線의 존재상태에서 作用이 分명한 것으로 器內檢定을 한 本 實驗의 條件에서 根瘤菌에 作用한 抑制效果를 이같은 作用機작으로서 說明하기에는 부족하며 따라서 아직 밝혀지지 않은 어떤 作用機작이 복합적으로 作用하여 근류균의 生存을 감소를 초래한 것으로 생각된다.

Alachlor 에 대한 根瘤菌의 感受性이 菌株에 따라 차이가 있는가를 조사하기 위하여 國內 分離菌株인 K-4, K-5 그리고 導入菌株인 I-122, I-136, I-138, I-142 및 I-145 를 Alachlor 各 濃度를 混合한 培地에 培養하여 일주일 후에 生存菌數를 調査한 結果는 表 2 와 같다. Alachlor 에 대한 根瘤菌의 感受性에는 菌株間에 큰 차이가 있었는데 K-4, K-5 및 I-122, I-142 는 다른 菌株에 비해 비교적 抵抗性이었으며 I-145 는 가장 높은 感受性을 보였고 특히 I-122 는 다른 菌株가 生存

Table 2. Survival of different isolates of *Rhizobium japonicum* in the YEMA media medicated with each concentration of herbicide alachlor after incubation at 27°C for a week.

Concentration (ppm)	Number of bacterial cells($\times 10^2$ /ml)						
	K-4	K-5	I-122	I-136	I-138	I-142	I-145
0	248	636	228	544	354	868	622
200	230	588	178	516	318	824	228
400	68	472	146	178	212	639	132
600	4	74	140	12	72	281	6
800	2	14	82	0	0	33	0
1000	0	0	17	0	0	0	0

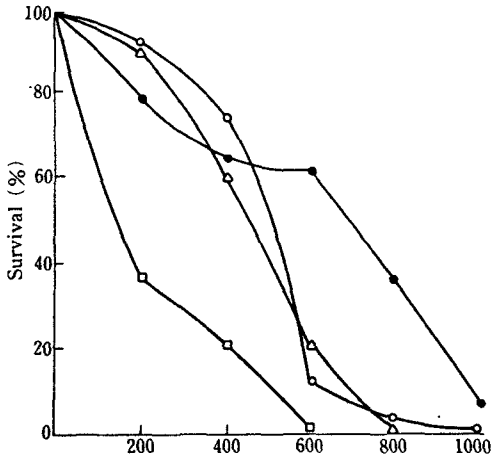


Fig. 1. Survival percent of *Rhizobium japonicum* isolates K-5(○-○), I-122(●-●), I-138(△-△) and I-145(□-□) in the YEMA media treated with each concentration of herbicide Alachlor after incubation at 27°C for a week.

하지 못하는 1,000 ppm에서도 상당한 생존菌數를 보여 가장 높은 抵抗力이 있는 것으로 보였다. 그림 1은 이들 菌株의 생존율을 除草劑 濃도에 對하여 나타낸 것이다. 4 種類의 菌株間에는 비교적 뚜렷한 생존율의 差異를 보였는데 I-145 菌株는 200 ppm에서부터 급격한 감소를 보여 사용권장농도인 400 ppm에서는 생존율이 20%에 불과하였는데 I-122는 800 ppm에서도 40%의 생존율을 나타내어 가장 높은 抵抗力을 보였으며 K-5와 I-138 菌株는 전체적으로 볼 때 중간정도의 感受性を 보였다. 특히 中度抵抗力인 K-5 菌株는 Alachlor의 사용권장농도인 400 ppm에서는 오히려 I-122 菌株보다 높

은 생존율을 나타내고 있어 正常的인 栽培環境에서 는 이 菌株가 가장 活性이 높은 것으로 보였다.

Johnen & Drew¹⁰⁾에 의하면 Linuron은 根瘤菌의 生長을 抑制하며 그 정도는 根瘤菌의 系統에 따라 差異가 있다. 根瘤菌은 중요한 可視의 形質의 하나인 根瘤形成力과 寄主植物의 品種에 대한 特異의 反應 等の 差異에 따라 多數의 系統으로 分類될 수 있으며 이들 系統은 可視의 形質 뿐만 아니라 藥劑에 대한 感受성과 分解力에도 차이를 나타낸다. 除草劑를 비롯한 대개의 農業藥劑는 선택성이 높은 것일 수록 植物의 種類는 물론, 品種에 따라서도 藥害의 차이가 현저하게 나타나며 抵抗力個體의 出現이 용이하여 진다. 따라서 本 實驗에 供試된 菌株들의 分離된 場所, 形質 및 增殖率 등을 고려할 때 藥劑에 대한 抵抗力의 차이는 이들 菌株의 遺傳的 적응형질이라 할 수 있다.

Alachlor에 대한 菌株間의 抵抗力 差異가 실제로 土壤中에서 根瘤形成力과 關係가 있는가를 보기 위하여 광고, 장엽콩, 방사콩에 각 菌株를 接種하여 根瘤形成力을 根瘤數와 根瘤重으로 調査한 結果를 表 3에 나타내었다. 接種 4 週後에 조사한 根瘤形成은 콩 品種間에 차이를 보였으며 방사콩은 다른 두 品種에 비해 낮은 根瘤形成力을 보였고 각 菌株에 대한 품종간의 근류형성 정도는 일치하지 않았으나 전체적으로 볼 때 K-5 菌株와 I-122 菌株가 다른 菌株에 비해 근류형성이 많았으며 統計的 有意性도 인정되었다. K-5에 의해서 형성된 根瘤數는 植物體當 광고 33.3 個, 장엽콩 37 個, 방사콩 20.6 個로 各 葉株中에서 근류형성력이 가장 높았으며 I-122 菌株는 광고 30.6 個, 장엽콩 33 個, 방사콩에서 20.6

Table 3. Nodule formation of isolates of *Rhizobium japonicum* to the soybean varieties Kwangkyo, Jangyeopkong and Bangsakong in four weeks after inoculation.

Isolates	Kwangkyo		Jangyeopkong		Bansakong		Average
	Number of nodules	Nodule weight	Number of nodules	Nodule weight	Number of nodules	Nodule weight	
K-4	27.3	0.68	30.0	0.69	19.3	0.54	25.5b ¹⁾
K-5	33.3	0.67	37.0	0.70	20.6	0.55	30.3a
I-122	30.6	0.76	33.0	0.63	20.6	0.53	28.1a
I-136	30.0	0.70	32.6	0.67	16.0	0.54	26.2b
I-138	24.7	0.77	27.6	0.62	19.0	0.50	23.8b
I-142	24.3	0.70	27.6	0.60	17.6	0.54	23.0b
I-145	26.3	0.74	32.0	0.65	12.3	0.50	23.5b
Average	25.5a		28.5a		16.5b		

¹⁾ Figures with the same letters are not significantly different at P=0.01 level according to Duncan's multiple range test.

個였다. 한편 I-142에 의해서는 광고가 24.3個, 장엽콩이 27.6個, 방사콩이 17.6個였으며 I-145 節株가 그 다음으로 광고, 장엽콩 및 방사콩에서 각각 26.3個, 32個 및 12.3個가 形成되었다. 이러한 結果는 除草劑 抵抗性이 높은 菌株인 K-5와 I-122가 높은 根瘤 形成力을 지녔으며 除草劑 抵抗性이 낮은 I-142와 I-145는 근류형성력도 낮았다는 것을 보여 준다. 即, 土壤中에서의 根瘤 形成能力은 根瘤菌의 各種 障害要因(stress factor)을 극복하는 抵抗性和 밀접한 關係가 있는 것으로 생각되었다. 調査된 根瘤數와 根瘤重間의 相關關係는 그림 2에서 보는 바와 같이 品種에 따라 $r = 0.85 \sim 0.95$ 의 相關係數를 나타냄으로서 高度의 有意性이 인정되었다. 따라서 根瘤數로서 根瘤 形成力을 평가할 때 根瘤의 크기가 다르기 때문에 나타날 수 있는 誤差는 큰 문제가 되지 않는다고 볼 수 있다.

農藥은 植物病과 雜草를 防除하기 위해서 植物體 또는 土壤中에 撒布되지만 그들은 土壤의 性質이나 微生物 및 寄主植物體에 직접 간접으로 영향을 미치게 된다. 정상적으로는 기주식물의 生長에 영향을 주지 않으므로서 유익한 것이지만 경우에 따라서는 식물의 生長을 감소시키기도 하고 病發生을 增大시

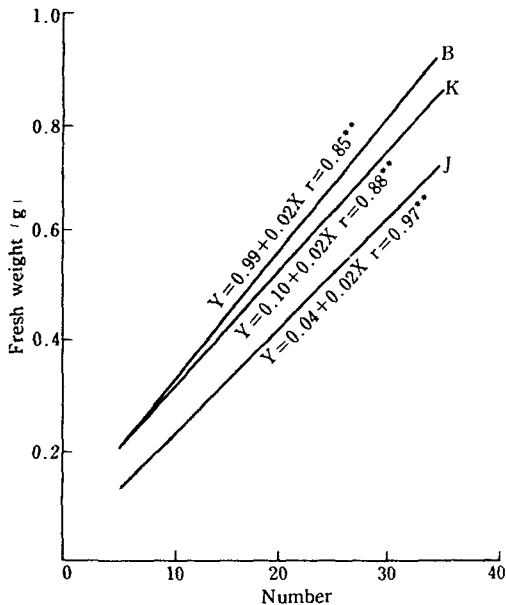


Fig. 2. Correlation between the number and the fresh weight of nodules formed on the root of the different soybean varieties Kwangkyo (K), Jangyeophong(J) and Bangsakong(B).

키기도 하기 때문에 새로 開發 使用되는 藥劑의 이 같은 영향을 조사하는 것이 매우 중요하다. 藥劑의 非標的 生物效果는 根瘤菌을 비롯한 根瘤土壤의 微生物相에 變化를 초래하여 寄主植物의 生育에 영향을 미치기 때문에 WRO(Weed Research Organization)에서는 培地上에서의 生存菌率을 測定하는 器內檢定方法을 제시하고 있다. 그러나 器內檢定에서의 根瘤菌生存率 減少가 반드시 圃場에서의 根瘤 形成力과 一致하는가 하는 문제는 구명되어야 할 과제이며 특히 補償力이 강한 콩의 경우는 生育초기에 根瘤菌의 密度減少로 初期生育이 抑制되었다 하더라도 後期生育이나 種實收量에서 그 영향이 相殺될 수 있기 때문에 寄主植物體에 미치는 영향 평가가 병행되어야 할 것으로 본다.

摘 要

콩圃場에 使用하는 除草劑가 根瘤菌의 生存率에 미치는 영향을 究明하기 위하여 除草劑 Alachlor, Linuron, Simazine 및 Paraquat를 濃度別로 YE-MA培地에 混合하여 根瘤菌을 接種, 培養하여 生存率을 調査하였다.

1. 콩根瘤菌은 Alachlor와 Linuron의 사용권장 농도인 400 ppm 처리에서도 각각 27.4%와 57.8%의 生存率을 보여 有意한 根瘤菌의 減少를 보였다.

2. Simazine은 供試除草劑中에서 가장 영향이 적었으며 Paraquat는 200 ppm에서도 현저한 生存菌數의 減少를 보였다.

3. Alachlor에 대한 根瘤菌의 感受性은 菌株에 따라 차이가 있었으며 I-122 菌株가 가장 낮은 感受性을, I-145가 가장 높은 感受性을 보였고 中度 抵抗性인 K-5 菌株는 사용권장농도에서는 높은 抵抗性을 보였으나 濃度가 增加함에 따라 급격히 감소하였다.

4. 콩品種의 根瘤 形成力은 菌株, 品種에 따라 차이가 있었으며 Alachlor에 抵抗性인 菌株 I-122, K-5가 높은 根瘤 形成力을 보여 根瘤 形成力은 環境適應力과 밀접한 關係가 있는 것으로 보였다.

引 用 文 獻

- Altman, J. and C.L. Campbell. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 15 : 361-385.

2. Anderson, J.R. 1978. Pesticide effects on nontarget soil microorganisms. In *Pesticide Microbiology*. pp.313-353. Academic Press, London.
3. Audus, L.J. 1970. The action of herbicides and pesticides on the microflora. *Meded. Fac. Landbouw. Genet.* 35 : 465.
4. Bollen, W.B. 1961. Interaction between pesticides and soil microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 15 : 69-92.
5. Greaves, M.P., Davis, H.A., Marsh, J.A. P. and G.I. Wingfield. 1976. Herbicides and microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 5 : 1-38.
6. Greaves, M.P. and H.P. Malkomes. 1981. Effects on soil microflora. In *Interactions Between Herbicides and the Soil*. pp.223-253. Academic Press, London.
7. Greaves, M.P. 1982. Effects of pesticides on soil microorganisms. In *Experimental Microbial Ecology*. pp.613-670. Blackwell Scientific Publication.
8. Grossbard, E. 1975. Techniques for the assay of effects of herbicides on the soil microflora. In *Some Methods for Microbiological Assay*. pp.223-256. Academic Press, NY.
9. Grossbard, E. 1976. Effects on the soil microflora. In *Herbicides*. pp.99-147. Academic Press, London.
10. Johnen, B.G. and E.A. Drew. 1979. Studies on the effect of pesticides on symbiotic nitrogen fixation. In *Soil-Borne Plant Pathogens*. pp.513-523. Academic Press, London.
11. Kaszubiak, H. 1969. The effect of herbicides on rhizobium. *Acta Microbiol. Pol.* 15 : 357.
12. Simon-sylvestre, G. and J.C. Fournier. 1979. Effects of pesticides on the soil microflora. *Advances in Agronomy* 31 : 1-91.