

논토양미생물의 Diazinon과 부식물질에 대한 기질 친화성

송재영* · 이규승*

Affinity of Diazinon and Humic Substances as a Substrate of Microorganisms in Paddy Soil

Jae-Young Song*, Kyu-Seung Lee**

Abstract

In order to investigate whether soil microorganisms prefer diazinon to humic substances as their substrate, the growth of soil bacteria and the activities of monooxygenase and α -, β -esterase were measured after treatment of diazinon and humic substances in defined medium at $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Also, the degradation rate of diazinon was determined by addition of humic substances to the medium.

The number of soil bacteria was increased from 1 day and 3 days after the treatment with humic substances and diazinon, respectively. And it showed about 1.5 times more with humic substances than diazinon at 10 days. Monooxygenase(MO) activity with the treatment of humic substances was higher than diazinon until 3 days after treatment in the order of HA > FA > humin. Esterase(ES) activity with the treatment of humin and HA was higher than diazinon from 5 days, but FA was much similar to diazinon. The degradation rate of diazinon showed more persistency by addition of humic substances; 51.4% with humin treatment, 58.9% with HA, 62.4% with FA and 71.9% in control at 10 days after treatment.

Therefore, as soil microorganisms prefer humic substances to diazinon, the degradation rate of diazinon might be delayed by addition of humic substances in submerged soil.

I. 서 론

토양으로 유입된 농약의 잔류와 분해에는 토양수분, 토양온도, 무기성분, pH, 흡착과 탈착, 유기

물, 토양미생물등 여러가지 요인이 관여하게 되는데^{1,2)}, 특히 토양유기물은 본질적으로 매우 복잡한 구조로 되어 있으며, 토양내에서 미생물의 영양원과 에너지원으로 이용되기 때문에 농약을 미생물이

* (주)한농 중앙연구소

Central Research Institute, Han-Nong Corporation

** 충남대학교 농과대학 농화학과

Department of Agricultural Chemistry, Chungnam National University

분해한다는 측면에서 농약분해에 미치는 영향은 대단히 크다고 할 수 있다. 그러므로 토양내에서 농약의 거동을 예측하기 위해서는 토양유기물의 화학적 특성, 토양미생물 그리고 농약과의 상호관계를 알아보는 것이 필요하다.

먼저, 토양유기물은 크게 비부식물질과 부식물질로 나뉘어 지는데, 비부식물질이라 함은 탄수화물, 단백질, 아미노산, 지방, 왁스 등과 같은 분자량이 작은 유기물을 말하며, 대부분의 이러한 물질들은 비교적 쉽게 미생물에 의해 분해된다. 이에 반해 부식물질은 산성이고 암색을 띠는 방향성 복합체로서 친수성이고 분자량은 수백에서 수천으로 그 범위가 넓고, 안정한 형태로 존재한다. 부식물질은 용해성에 따라 일반적으로 humin, humic acid, fulvic acid로 나눌수 있는데, humic acid(HA)는 약염기에는 용해되지만 그 추출물을 산성화하면 용해되지 않는 물질이고, fulvic acid(FA)는 알칼리추출물을 산성화할때 용해되는 물질이며, humin은 약염기 또는 약산으로 추출되지 않는 물질이다³⁾.

이와같은 토양유기물이 농약의 잔류에 미치는 영향에 관해서 많은 연구가 이루어져 왔지만^{1,4,5,6,7,8,9)}, 지금까지의 연구는 농약분해속도의 유기물과의 관계를 단지 흡착등과 같은 물리화학적 작용에 관해서만 조사되어 왔다. 그러나, 토양중에서 농약이 분해될때는 미생물에 의한 영향이 매우 크다는 것과 토양유기물이 미생물의 기질로 이용된다는 점을 고려해 볼 때^{1,2,10,11,12)}, 토양중 농약의 분해속도에 미치는 유기물의 영향을 토양미생물과 관련지어 연구한 보고가 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 유기인계 살충제 중에서 토양미생물에 의한 분해가 빠른 diazinon과 부식물질에 대한 토양미생물의 기질 선호성을 알아보고자 diazinon과 humin, humic acid, fulvic acid를 각각 처리한 한정배지에서 토양균수와 그리고 논토양중에서 diazinon을 주로 분해하는 효소인

monooxygenase(MO)와 diazinon과 같은 유기인계농약의 ester 결합을 분해하는 α -, β -esterase(ES) 활성을 측정하였고²⁾, 아울러 부식물질 첨가에 따른 diazinon 분해율을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

(가) 공시토양

대전시 유성구 원신흥동 사양토로서 1991년 4월에 채취하여 풍건후 2mm체로 통과시켜 시료로 사용하였으며, 그 특성은 Table 1과 같다.

(나) 부식물질

부식물질인 humin, humic acid, fulvic acid는 canadian peat moss에서 분획조제하여 사용하였다(Fig. 1)¹³⁾.

(다) 사용기기 및 시약

Diazinon은 성보화학에서 공여받은 97.4%의 표준품을 사용하였으며, 분석은 최등(1987)²⁾의 방법과 동일하게 Instrumental Analysis Co, Model 92 GC(FPD; P mode, 524 nM)를 이용하여, OV₁₇:OV₁₀₁/1:1 혼합 column으로 정량하였다.

UV/vis spectrophotometer는 Pye Unicam PU 8800을 이용하여 O.D.값을 측정하였으며, 분석 시약으로 유기용매는 Tedia 사의 HPLC용, 그리고 KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄, NH₄NO₃, NDAP, 4-aminoantipyrine, potassiumferricyanide, α -naphthyl acetate, β -naphthyl acetate, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, p-nitroanisole 등은 Sigma 시약을 이용하였다.

Table 1. Some properties of soil used.

Soil texture	Soil separate			pH (1:5)	O.M. (%)	C.E.C. (me/100g)
	Sand(%)	Silt(%)	Clay(%)			
SiC	21	37	42	5.8	4.6	15.18

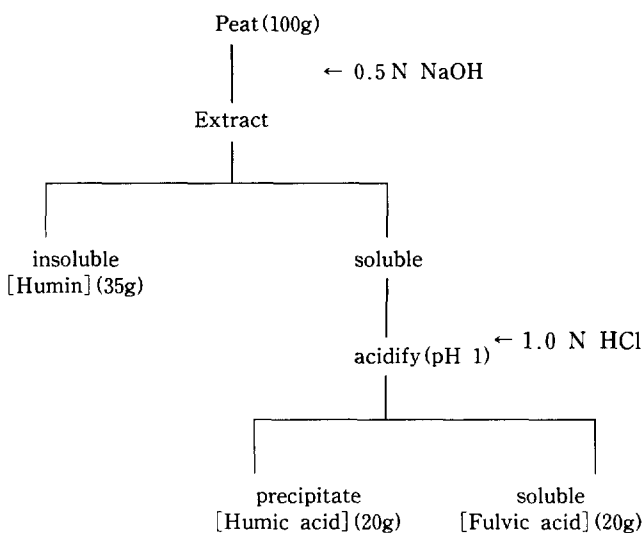


Fig. 1. Fractionation process of humic substances from peat.

2. 실험방법

(가) 시료액

토양 10g에 멸균된 2차 증류수 30ml를 가하고 진탕한 후 현탁액 1ml를 한정배지(defined medium) (NH₄NO₃ 0.4g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g, K₂HPO₄ 1.0g, Yeast ext. 0.2g, D.W. 1l) 8.9ml에 접종하여 하룻밤 pre-incubation한 후 처리구별로 500 ppm diazinon(in acetone) 0.1ml와 humin, humic acid(in H₂O), fulvic acid(in H₂O)를 0.1%로 첨가하고, pH를 6.5~7.0으로 조정한 후 30±1°C에서 3반복으로 진탕배양하였다.

(나) 균수측정

각 시료액 1ml를 취하여 연속희석 평판법으로 nutrient agar medium(Beef ext. 3g, Peptone 5g, Agar 20g, D.W. 1l)에 접종하고, 25°C에서 2일간 배양하여 미생물의 개체수를 계수하였다. 시료액은 시간별로 채취하여 경시적인 조사를 수행하였다.

(다) 효소활성측정

MO 활성도는 Shang과 Soderlund(1984)¹⁴⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 각 시료액 1ml를 시험관에 취하여 0.1M phosphate buffer 용액(pH 7.4) 2.9ml, NADPH generate system(20mM glucose-6-phosphate, 1.8- units glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20mM NADP를 phosphate buffer에 녹여 조제) 0.1ml, 기질로 0.35mM p-nitroanisole 1ml를 가하고, 20분동안 37°C수욕상에서 반응시킨 후 chloroform 용액 5ml를 가하여 반응을 중지시키고, 분액여두에서 chloroform층을 분액한 후 0.5M NaOH 5ml를 가하여 그 수용액층만을 분리하여 생성된 p-bitrophenol을 UV/Vis Spectrophotometer 400nm에서 O.D.를 측정하여 효소활성으로 하였다.

α-, β-ES 활성도는 Riskllah(1979) 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 시험관속에 각 시료액 1ml, 0.1M phosphate buffer 용액(pH 6.5) 5ml를 넣고, 각각 기질로 1mM α-naphthylacetate와 β-naphthylacetate 용액 5ml를 넣어 40°C 수욕상에서 α-ES는 15분, β-ES는 40분 동안 반응시킨 후 96% EtOH 5ml를 가하여 반응을

종지시키고, 그중 1ml를 취하여 0.25% 4-aminoantipyrine 1ml, 0.35% potassium ferricyanide 1ml를 가하여 생성된 naphthol을 480 nm에서 O.D.를 측정하여 효소활성으로 하였다.

(라) Diazinon 분해율 측정

시료액을 0, 1, 3, 5, 7, 10일에 각각 3반복으로 채취하여 Diethyl ether 10ml로 3회 추출한 후 농축하여 건조시키고 n-Hexane 2ml를 정확히 가하여 G.C.로 주성분 감소량을 측정하였다. 각각의 회수율은 5반복 평균으로 부식물질 무첨가시 95.7%, 0.1% humin 첨가시 82.3%, 0.1% humic acid 첨가시 87.3%, 0.1% fulvic acid 첨가시 92.5%이었다.

III. 결과 및 고찰

토양으로 유입된 농약의 거동에는 유기물과의 상호작용이 크게 작용한다고 알려져 있다^{1,5,6,8,9}. 따라서 Khan(1982)¹⁶은 토양내에서 농약의 거동을 실험하여 농약 또는 그 대사산물이 토양유기물의 분획과 화학결합을 한다는 것을 밝혀낸바 있으나, 토양미생물과의 관계에 관한 실험결과는 매우 한정되어 있는 것 같다.

따라서 Fig. 2는 diazinon/과 유기물 분획에 대한 토양미생물의 기질 선호성을 확인하고자 5ppm diazinon, 0.1% humin, 0.1% humic acid, 0.1% fulvic acid를 각각 처리하여 토양미생물의 군수를 측정한 결과이다. Diazinon 처리구에서는 토양미생물의 군수가 3일까지 약간 증가하였으며, 5일에 최고치를 나타낸 후 10일까지는 거의 변화가 없었다. 부식물질인 humin, HA, FA에서는 모두 1일부터 군수가 급격히 증가하였으며, 5일 이후에는 diazinon과 같은 경향을 보였다. 10일후 군수는 부식물질 처리구 모두 diazinon에서 보다 1.5배 정도 많았다. 이런 결과로 볼때 토양미생물은 유기물 분획인 humin, HA, FA를 초기부터 쉽게 분해하여 영양원과 에너지원으로 이용할 수 있지만, diazinon은 일정시간이 지난후야야 분해능력이 생겨 이용할 수 있게 되는 것으로 생각된다.

또한, 유기인계 농약의 분해에 관여하는 효소로

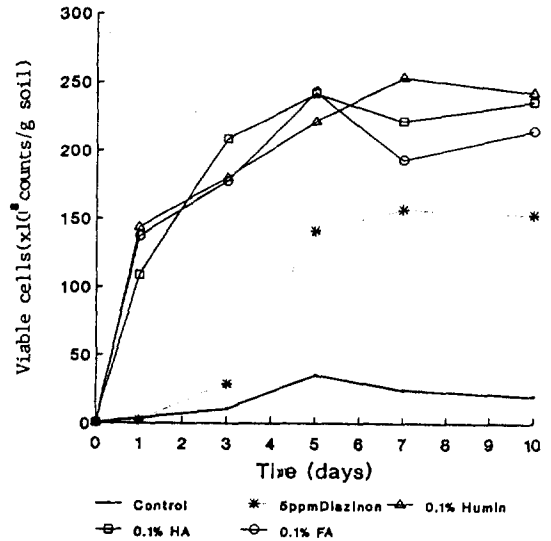


Fig. 2. Changes of bacterial growth with different substances

알려진^{17,18,19} MO와 α, β -ES 활성을 측정하였다 (Fig. 3, 4, 5).

Fig. 3은 diazinon과 3가지 부식물질을 한정비재에 각각 처리했을 때 MO활성의 경시적 변화를 측정한 것이다. 그림에서 Y축은 한정배지 1ml 중의 효소가 1분동안 기질을 이용한 양, 즉 nmon/min/ml를 Units로 나타내었다. Diazinon 처리구에서는 5일까지 활성이 증가하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, HA와 FA처리구에서는 1일에 활성이 급격히 증가함을 나타내었으며, 이후 완만히 증가하여 10일에는 diazinon에서 보다 활성이 약 2배 정도 높았다. Humin 처리구는 7일까지 다른 부식물질과 비슷한 경향을 보였으나, 이후 감소하여 10일에는 diazinon 처리구와 거의 비슷하였다. 따라서 MO는 초기에 부식물질 처리구에서 활성이 월등히 높았다는 것으로 미루어 볼때, 전반적으로 농약인 Diazinon 보다는 부식물질을 기질로 선호한다는 것을 보여주는 결과라 하겠다.

Fig. 4는 MO와 마찬가지로 diazinon과 부식물질을 각각 처리한 한정배지에서의 시간경과에 따른 α -ES 활성을 측정한 것이다. Diazinon과 부식물질에서 공히 1일에 약간 감소하였다가 이후 계속 증가하는 경향을 보였다. 특히, humin과 HA 처

리구에서는 5일 이후 급격히 증가하여 10일에는 diazinon에서 보다 1.5~2.5배 정도 높았으며, FA에서는 diazinon과 거의 같은 수준이었다.

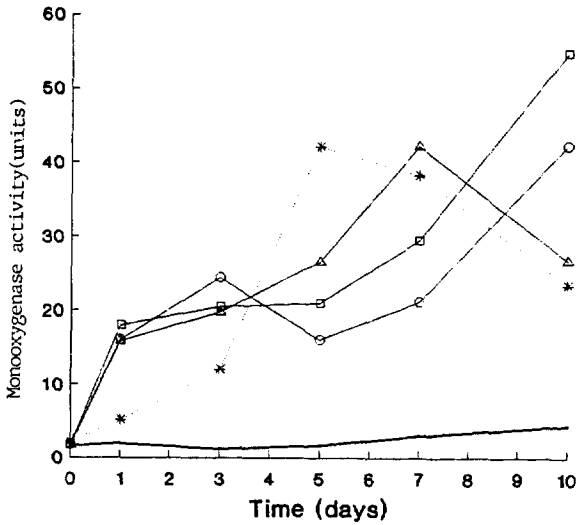


Fig. 3. Changes of monoxygenase activity with different substances

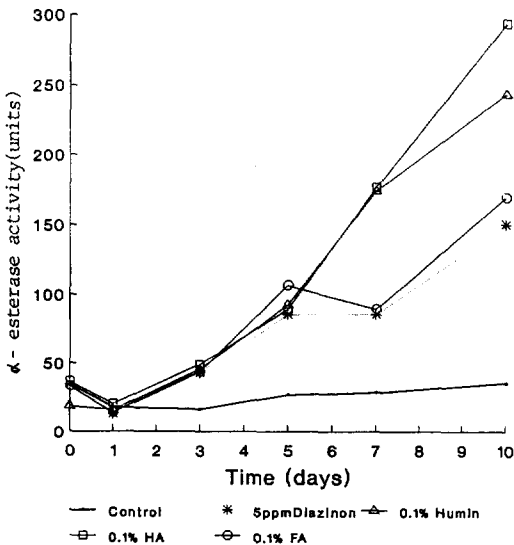


Fig. 4. Changes of alpha-esterase activity with different substances

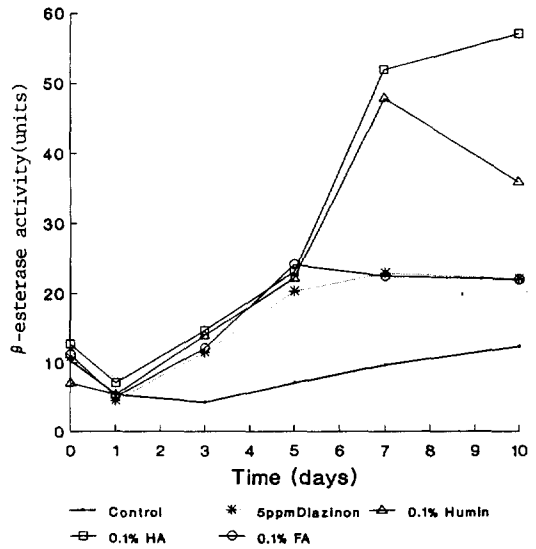


Fig. 5. Changes of beta-esterase activity with different substances

Fig. 5는 β -ES의 활성을 측정된 결과이다. Diazinon과 FA에서는 1일에 감소하였다가 이후 완만히 증가하는 같은 경향을 나타내었고, humin과 HA에서는 5일까지 diazinon과 같은 수준을 보였으며, 7일에 급격히 증가하였다가 10일에 humin은 감소한 반면 HA는 약간 증가하였다. 10일후 활성은 diazinon에서 보다 HA는 약 2.5배, humin은 약 1.5배 높았으며, FA는 거의 같은 수준이었다. 이런 결과로 볼 때 α - β -ES는 비교적 후기인 5일 이후에 diazinon보다는 부식물질을 기질로 더 잘 이용한다는 것을 알 수 있다.

Fig. 6은 diazinon 분해속도에 미치는 부식물질 첨가의 영향을 확인하고자 5ppm diazinon을 처리한 한정배지에 humin, HA, FA를 0.1%로 각각 첨가하여 약 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양하면서 경시적인 diazinon 분해율을 조사한 것이다. 토양부식물질인 humin, HA, FA 첨가구에서 보다 무첨가구에서 diazinon 분해속도가 빨랐으며, 부식물질의 종류에 따라 fulvic acid > humic acid > humin의 순으로 빨랐는데, 이것은 화학적 구조와 원소 조성비등 부식물질의 특성으로 미루어볼때 산소의 함유량이 높은 fulvic acid가 소수성이 큰 humin보다 diazinon 분해에 효과적인 것으로 볼 수 있다. 따라

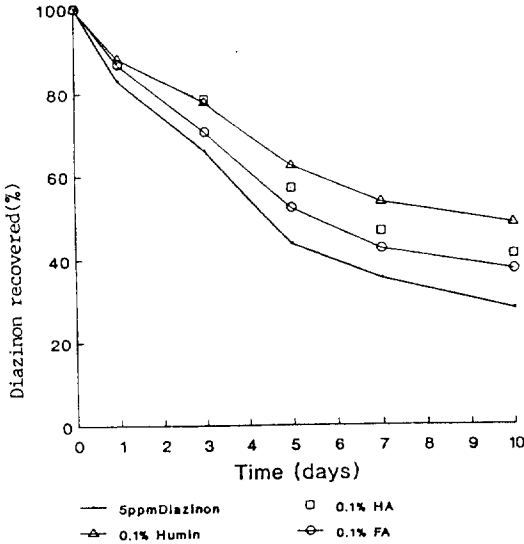


Fig. 6. Degradation rate of diazinon with humic substances

서 이런 결과를 부식물질과의 흡착과정 측면에서 관련지어 생각할 수 있으나 1.8ppm diazinon 처리구에서 부식물질과의 흡착량은 humin > FA > HA의 순이며, 1.0% 부식물질 처리농도에서의 최대흡착량은 humin(12.4%), FA(11.86%), 그리고 HA(10.44%)라는 결과로 미루어 볼때 부식물질에 흡착된 diazinon이 전반적인 diazinon 분해에 큰 영향을 끼치는 것으로는 보기가 어렵다²⁰⁾.

이상의 결과를 종합해 보면, 토양미생물이 부식물질을 첨가해준 처리구에서 초기 1일 부터 토양미생물의 개체수가 증가한 것(Fig. 2)으로 미루어 볼때 diazinon보다는 부식물질을 기질로서 더욱 선호하는 것을 알 수 있다. 따라서 diazinon과 함께 부식물질을 첨가해주면, 우선 부식물질을 분해 이용하여 생육하기 때문에 diazinon의 분해속도가 지연되는 것으로 판단된다(Fig. 6). 또한, 토양중 부식물질의 함량과 조성에 따라서도 분해율에 차이가 있을 것으로 생각되며, 특히 토양에 직접 사용하는 다른 제초제나 살충제등의 약효지속기간에도 영향을 미칠 것으로 판단된다.

IV. 적 요

Diazinon과 부식물질인 humin, HA, FA에 대한 토양미생물의 기질 선호성을 알아보기 위하여 한정비재에 diazinon과 부식물질을 각각 처리하여 항온(30°C±1)으로 유지하면서 토양미생물의 균수와 MO 활성, α-, β-ES 활성을 측정하였으며, 각각의 부식물질 첨가에 따른 diazinon의 분해속도를 조사하였다.

1. 토양미생물의 균수가 부식물질 처리구에서는 초기 1일부터 급격히 증가한 반면 diazinon 처리구에서는 3일후 부터 증가하였으며, 10일후 부식물질 처리구가 diazinon 처리구보다 약 1.5배 많았다.

2. MO 활성은 부식물질 처리구에서 diazinon 처리구보다 3일까지 높았으며, HA > FA > humin의 순이었다.

3. α-ES와 β-ES 활성은 비슷한 경향이었으며, humin과 HA에서는 diazinon보다 5일이후 높았지만, FA는 diazinon과 거의 비슷한 수준이었다.

4. 부식물질을 첨가함으로써 diazinon의 분해속도는 지연되었으며, 10일후의 분해율은 humin, HA, FA 첨가구에서 각각 51.4%, 58.9%, 62.4%이었고, 무첨가구에서는 71.9%이었다.

참고문헌

1. Lee, H.K.(1981) : Effect of rice straw amendment and repeated application of Diazinon in submerged soils, *Kor.J. Agric. Chem. Soc.*, **24**, 1.
2. Choi, J.W. and Lee, K.S.(1987) : Degradation of Diazinon and Durshan in submerged soil, *Kor. J. Environ. Agric.*, **6**, 2.
3. Schnitzer, M. and Khan, S.U.(1972) : *Humic substances in the environment*, Dekker, New York, 327.
4. Siddaramappa, R. and Sethunathan, N.

- (1975) : Persistence of γ -BHC and β -BHC on the indian rice soils under flooded condition, *Pestic. Sci.*, **6**, 375.
5. Castro, T.F. and Yoshida, T. (1974) : Effect of organic matter on the Biodegradation of some organochlorine insecticides in submerged soils, *Soil Sci. Plant Nutr. (Tokyo)*, **20**, 363.
 6. Stephen, D.Y. and Kuwatsuka. S. (1982) : Microbial degradation of Benthocarb, MCPA and 2,4-D herbicides in perfused soils amended with organic matter and chemical fertilizers, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **28**, 19.
 7. Gowda, T.K.S. and Sethunathan, N. (1977) : Endrin decomposition in soils as influenced by aerobic and anaerobic conditions, *Soil Sci.*, **124**, 5.
 8. Moon, Y.H. (1990) : Effects of soil environmental conditions on the decomposition rate of insecticide Fenitrothion in flooded soils, *Kor. J. Environ. Agric.*, **9**, 1.
 9. Leenheer, J.A. and Ahlrichs, J.L. (1971) : A kinetic and equilibrium study of the adsorption of Carbaryl and Parathion upon soil organic matter surfaces, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **35**, 700.
 10. Sethunathan, N. (1973) : Organic matter and parathion degradation in flooded soil, *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 641.
 11. Rajaram, K.P. and Sethunathan, N. (1975) : Effect of organic sources on the degradation of parathion in flooded alluvial soil, *Soil Sci.*, **119**, 296.
 12. Sethunathan, N. and Pathak, M.D. (1970) : Development of a Diazinon degrading bacterium in paddy water after repeated applications of diazinon, *Can. J. Microbiol.*, **17**, 699.
 13. Aharonson, N. and Kafkafi, U. (1975) : Adsorption, mobility and persistence of Thiobendazole and Methyl 2-benzimidazole carbamate in soils, *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 720.
 14. Shang, C.C. and Soderlund, D.M. (1984) : Monooxygenase activity of Tobacco Budworm (*Horiothis virescens* F.) Larvae, *Comp. biochem. Physiol.*, **79B**, 3.
 15. Riskllah, M.R., El-Deeb, W.M. and El-guindy, M.A. (1979) : Esterase activity in relation to insecticides resistance in the egyptian cotton leaf worm, *Center Agricultural pesticides laboratory.*, 70.
 16. Khan, S.U. (1982) : Distribution and characteristics of bound residues of Prometryn in an organic soil, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 175.
 17. Choi, J.W., Rhee, Y.H. and Lee, K.S. (1990) : Effect of activities of monooxygenase, α , β -esterase on the degradation of diazinon and dursban in submerged soil, *Kor. J. Environ. Agric.*, **9**, 96.
 18. Kearney, P.C. and Helling, C.S. (1969) : Reaction of pesticides in soils, *Residue Rev.*, **25**, 25.
 19. Hassal, K.K. (1982) : *The chemistry of pesticides.*, Macmillan press, Basingstoke, 45.