

Cadmium이 土壤微生物에 의한 Butachlor 汚染物質 分解에 미치는 影響

許泰雄 · 鄭文鎬

서울대학교 保健大學院 環境保健學科

Effects of Cadmium on the Degradation of Butachlor Pollutant by Microorganism

Tae Ung Heo and Moon Ho Chung

Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health,
Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

ABSTRACT

The effects of heavy metal, Cd on the degradation of the herbicide butachlor (N-Butoxymethyl-2-chlor-2',6'-diethylacetanilide) in soils were examined the laboratory. The degradation of the herbicide in soil was greatly inhibited by the amendment of the heavy metal, Cd. The inhibited rate of Cd concentration was high in the order of 30 ppm>20 ppm>10 ppm>0 ppm. And the degradation rate of butachlor was high in order of 80 μ M>40 μ M>20 μ M. The effects of Cd on the degradation of the butachlor in soil varied with concentration of heavy metal and butachlor.

Keywords : Cadmium, butachlor, degradation rate, microorganism.

I. 緒 論

農藥은 單位面積當 收穫量의 增加에 많은 寄與를 하였으나 이러한 農藥이 人體 및 環境에 豫想치 못했던 각종 事故를 誘發하였을 뿐만 아니라 農藥 機械化와 並行하여 雜草除去 方法으로 勞動力이 切感되는 有機除草劑 使用이 급속히 增加함에 따라 土壤微生物상이 過去와는 달라졌으며, 土壤環境 中 除草劑의 變化는 複雜多樣하여 農藥 그 自體의 特性과 土壤의 理化學의 特性, 土壤微生物, 氣象學의 因子 등에 따라 크게 差異가 있다고 알려져 있다.¹⁾

除草劑 中 Butachlor(N-butoxymethyl-2-chloro-2', 6'-diethylacetanilide)는 주로 1年生 作物과나 광엽 및 수생 잡초를 防除하기 위하여 프로파닐과 混用 되기도 하며 殘留期間은 아주 짧은 것으로 알려져 있다. 商品名은 Machete이고 水溶性(24C 에서 23 ppm)이 낮은 약간 달콤하고 芳香性이 있는 호박색의 액체이며, 쥐에 대한 유제의 急性경구 중위 致死量(LD₅₀)은 3300 mg/kg이다. 현재 農村에서 使用중인 除草劑 中 Butachlor는 그 使用量이 많아 使用上

問題點이 많고 侯爵物에도 藥害를 입히기도 하며 土壤汚染物質로 使用한다.²⁾ Butachlor는 土壤中에 있어서 주로 微生物에 의하여 分解되는 것으로 알려져 있다.³⁾ 그런데, 일반적으로 微生物의 增殖 및 活性은 重金屬에 의하여 크게 影響을 받는 것으로 알려져 있다.

Butachlor가 속하는 산 amide계 除草劑는 그 構造의 基本形은 R-NH+CO-R'로 요소계 除草劑와 매우 비슷하며 Alachlor(商品名 Lasso), Diphenamide(商品名 Danby), Propanyl(商品名 stem F-34), Metolachlor 등이 있다.

Alachlor의 分解 微生物로는 *Streptomyces lavendulae* Ru3340-8, *Bacillus brevis* IFO 3331, *Bacillus cruciviae*, *Pseudomonas putida* 등으로 알려져 있다.⁴⁾

Metolachlor의 경우 土壤에서 半減期(half-life)가 15~20일 정도로써 *Bacillus megaterium*, *Mucor racemosus*와 *Fusarium* sp.등의 土壤內 微生物에 의해 分解된다.^{6, 10)} 이러한 微生物 除草劑의 種類 및 土壤內 濃도와 微生物 種類에 따라 成長率이 다른데 *Fusarium* sp.는 300 ppm에서도 成長하지만 다른

微生物은 200 ppm 以上이면 成長이 멈춘다.⁷⁾

除草劑 外 殺蟲劑에 대한 研究結果 역시 農藥의 種類 및 濃度와 微生物의 種類, 重金屬의 濃도에 따라 다른 것으로 判明되었다.⁹⁻¹¹⁾

Cd의 濃도에 따른 農藥의 分解程度는 IBP(殺菌劑), Fenitrothion(殺蟲劑)에서는 Cd濃도가 높아짐에 따라 현저히 抑制된다고 한다.^{19, 20, 36, 37)}

이 研究는 除草劑로 使用되는 butachlor(산 아마이드계)가 土壤環境 中 土壤微生物에 미치는 影響을 알아보기 위해 butachlor 濃度を 區分하여 微生物을 培養하여 成長 속도에 어떤 影響을 미치는가를 살펴 보며 카드뮴이 butachlor 分解微生物에 미치는 影響을 檢定하고자 Cd濃도를 4區分하여 微生物을 培養하였다.^{21, 22)}

II. 材料 및 方法

1. 土壤試料

使用 土壤은 京畿道 水原市 所在 서울大學校 農生大 實驗農場의 畚田輪還 土壤으로 전년도는 田土壤으로 94년 2월에 깊이 10 cm에서 3곳을 採取 使用하였으며 理化學的 性質은 Table 1과 같다.²³⁻³¹⁾

2. 試藥

Butachlor(N-Butoxymethyl-2-chlor-2',6'-diethylacetanilide)는 韓國 農藥 株式會社의 實驗分析用(純度 93%) 製品을 使用하였으며 重金屬으로 使用한 카드뮴은 $CdCl_2 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ 를 使用하였다.²⁶⁾

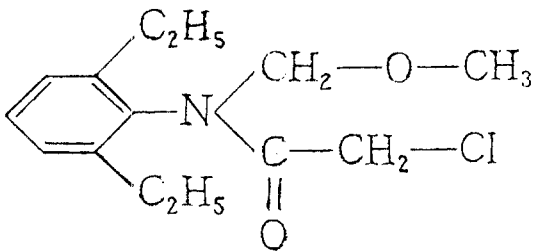


Fig. 1. Chemical structure of butachlor.

3. 實驗方法

1) 菌株의 分離

서울 農生大 畚田輪還 土壤을 作土層에서 500 g 정도 採取하여 그 즉시 유리병에 가득 채운 후 4 °C에서 保管하면서 菌株의 分離源으로 利用하였다.

먼저 土壤에 包含된 모든 微生物을 增殖시키기 위해 Furukawa 등의 方法에 따라 Table 2의 A 培地에 土壤을 1~2 g 넣은 후 20°C 常溫에서 3일간 培養하였다.

300 ml 플라스크에 Table 2의 B 培地를 分株하여 멸균기로 殺菌한 후 適當量의 butachlor를 넣고 플라스크를 솜마개로 막아 好氣狀態로 常溫에서 3일간 200 rpm으로 진탕배양하였다.

그 培養液의 일정량을 B培地에 1.8% agar를 넣고 製造한 固體 評判培地에 接種하여 好氣狀態로 常溫에서 培養後 成長한 集락이 觀察될 때까지 培養하였다.

그 菌株들은 butachlor를 包含하고 殺菌한 B培地가 담긴 500 ml 플라스크에 각각 接種한 후 솜마개를 하고 好氣狀態로 하여 常溫에서 3일간 培養하였다.

다시 그 培養液을 常溫에서 희석법을 利用, 5회 反復 培養하였다.

2) 菌株의 選定

B培地를 500 ml 플라스크에 25 ml씩 분주하여 殺菌한 後 唯一한 炭素源으로 butachlor를 플라스크

Table 2. Composition of media used

A-medium (organic medium)		B-medium (mineral salts medium)	
Glucose	0.5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Peptone	0.5 g	KH ₂ PO ₄	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	K ₂ HPO ₄	1.6 g
D.W.	1000 ml	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
(pH 7.0)		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
		CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g
		D.W.	1000 ml
		(pH 7.5)	

Table 1. Physical and chemical properties of test soil

Moisture (%)	pH (1 : 2.5 H ₂ O)	Particle size distribution (%)			O.M.* (%)	C.E.C.** (me/100 g)
		sand	silt	clay		
8.7	5.3	48.0	21.6	30.4	2.4	11.2

*O.M : organic material, **C.E.C. : cation exchange capacity.

크당 20 μ M 되도록 調整하여 添加하고 土壤에서 分離된 菌株를 接種시켜 常溫에서 2일간 200 rpm으로 진탕배양하였으며 control로 butachlor없이 培養하였다. 培養後 2-hydroxy-2',6'-diethyl-N-butoxymethyl acetanilide의 發生量을 測定, 比較하여 이것이 가장 많이 發生된 菌主를 分解能이 가장 큰 것으로 選定하였다. 각각의 菌株에 대해서는 3회 反復 實施하였다.

3) Butachlor 分解産物の 測定

Butachlor에서 菌株에 의해 發生된 分解産物(2-hydroxy-2',6'-diethyl-N-butoxymethyl acetanilide)의 測定方法은 다음과 같다.

각각의 플라스크에서 주사기로 2 ml의 培養液을 취하여 遠心分離한 後 1 ml의 上層液을 10 ml 試驗管에 넣었다. 試料의 pH를 1.2 N-HCl로, 2以下로 만든 다음, 0.01 M-(NH₄)SO₄ 0.1 ml를 添加하였다. 常溫에서 마개를 한 후, 플라스틱 주사기로 각각 試驗管에 10 N-NaCl을 1 ml씩 넣어 分解産物이 氣體狀態가 되도록 하였다.

2~3시간 後에 1 cm³ 플라스틱 주사기로 試驗管 上部의 0.5 cm³의 氣體를 취하여 gas chromatography로 分析하였다.

G.C.의 分析條件은 Table 3과 같다.

4) 菌株의 特性

Manual of methods for general bacteriology에 따라 選定 菌株의 諸般 菌學的 特性을 檢討하였다.³⁴⁾

5) Butachlor의 分解 條件

- pH : 7.2(生育 最適 條件)

Table 3. Gas chromatography operating parameters

G.C.Model	: Hewlette Packard 5890A
Detector	: Flame ionization detector
Column	: Capillary column SE54 (12 M×0.3 mm)
Packing material	: Carbo wax 20 M
Oven temperature	: 60°C
Carrier gas	: N ₂ (30 ml/min)
Injection size	: 0.5 ml
Detector temperature	: 200°C

Table 4. Morphological characteristics

Shape	cocci
Motility	-
Flagella	-
Gram staining	-

- 溫度 : 常溫

- 試藥濃度 : Butachlor 濃度를 20, 40, 80 μ M로 分類하고 Cd濃度를 0, 10, 20, 30 ppm으로 하여 菌株 接種 後 常溫에서 현탁배양하여 1일, 3일, 10일, 20일, 30일에 5 ml씩 採取하여 分解率을 檢査하였다.

III. 結果 및 考察

1. 菌의 分離 및 特性

菌 分離用 基本培地를 利用하여 butachlor의 分解能이 있는 菌株를 集락의 形態로 區分하여 4株의 菌株를 分離하였다. 이를 butachlor의 唯一한 탄소 원으로 包含하고 培地에 培養시킨 후 2-hydroxy-2',6'-diethyl-N-butoxymethyl acetanilide의 發生量을 測定하였더니 S-1 菌株에서 發生量이 가장 많았다.

S-1 菌株의 菌學的 特性을 檢討한 結果 Table 4, 5 및 6와 같았다.

2. Butachlor 分解

Butachlor의 分解 半減期는 Cd 無添加 土壤에서

Table 5. Biochemical characteristics

Catalase test	-
Oxidase test	+
Voges Proskauer test	-
Liquefaction of gelatin	+
Nitrate production	+
Galactosidase	-
Urea hydrolysis	-
Indole test	+
Tryptophane disaminase	-
Hydrogen sulfide production	+
Citrate utilization	+
Arginine dehydrolase	+
Gas production from sugars	+
Lysine decarboxylase	+

Table 6. Utilization of carbon compound

Glucose	+
Sucrose	+
Mannitol	-
Melibiose	+
Inositol	+
Amygdaline	-
Sorbitol	+
L(+)-Arabinose	+
Rhamnose	-

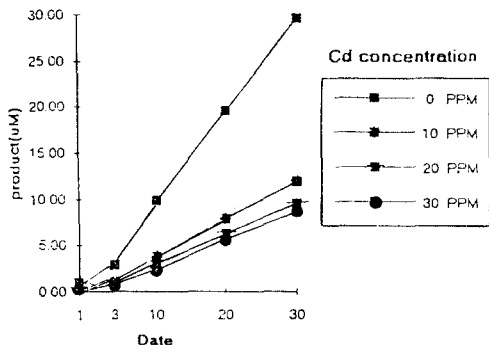


Fig. 2. Effect of cultural time on the degradation of butachlor (20 μM).

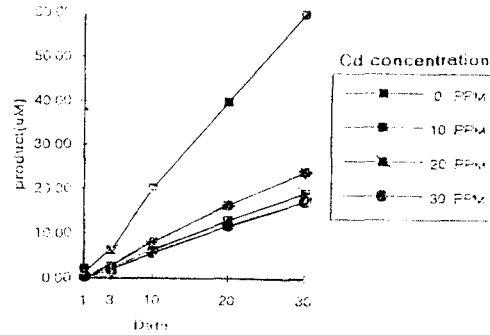


Fig. 3. Effect of cultural time on the degradation of butachlor (40 μM).

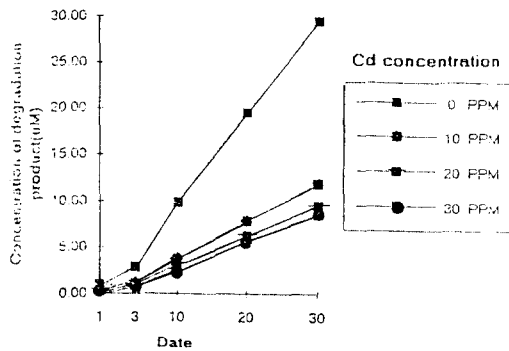


Fig. 4. Effect of cultural time on the degradation of butachlor (80 μM).

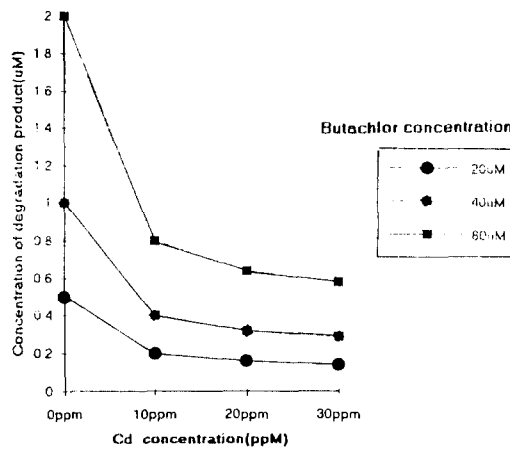


Fig. 5. Effect of Cd on the degradation of butachlor (1 day).

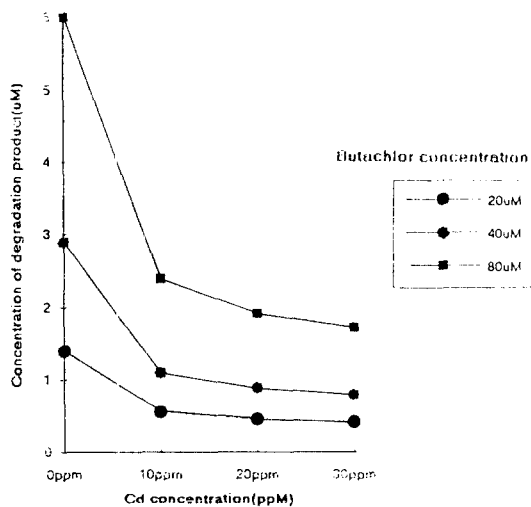


Fig. 6. Effect of Cd on the degradation of butachlor (3 days).

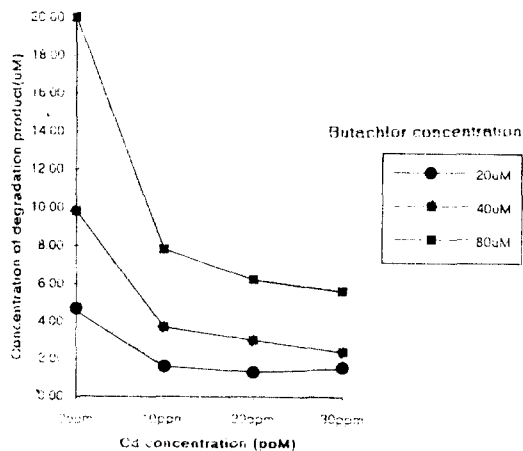


Fig. 7. Effect of Cd on the degradatin of butachlor (10 days).

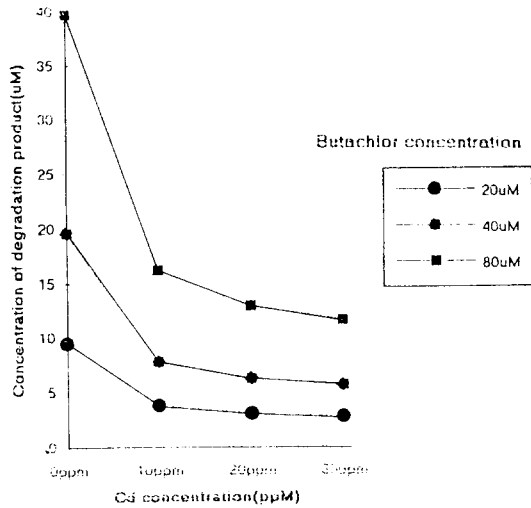


Fig. 8. Effect of Cd on the degradation of butachlor (20 days).

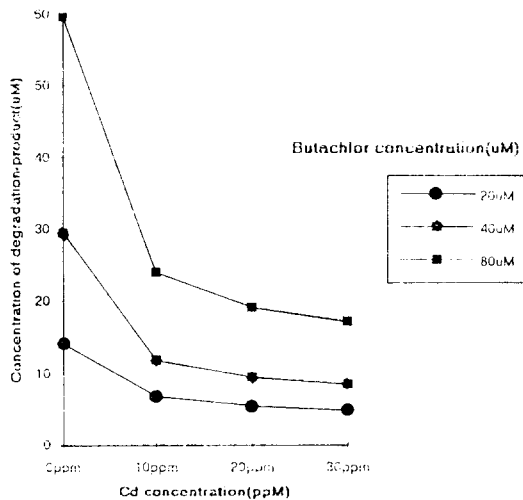


Fig. 9. Effect of Cd on the degradation of butachlor (30 days).

는 각각 17.8일이었으며 Cd 添加 土壤에서는 1/2.5倍, 1/3.1倍, 1/3.5倍로 分解産物濃度가 낮아짐에 따라 分解가 抑制됨을 알 수 있다. Butachlor의 濃度別 分解産物의 濃度와 培養期間과의 關係는 Fig. 2~4와 같다.

土壤中 重金屬은 微生物의 增殖이나 活性에 影響을 주는 것으로 알려져 있고, 또 butachlor는 微生物에 의해 分解되는 것으로 지적되어진 바 重金屬이

Table 7. Percent conversion of butachlor to degradational material (20 days)

Butachlor concentration (µM)	% of conversion to DM* (range)**
20	48 (46~49)
40	49 (47~51)
80	50 (49~50)

*Percent conversion was calculated as (mole excess degradational material above controls/mole butachlor added) 100.

**The range was obtained in triple experiments.

이들 農藥 分解菌에 미치는 影響을 調査하고자 Cd 濃度를 4區分(0, 10, 20, 30 ppm)하였으며, 農藥은 3區分(20, 40, 80 µM)으로 하여 相互組合하여 3回 反復 培養한 後 butachlor 分解率을 觀察하여 相互 比較하였다. 날짜별 Cd의 濃度가 分解産物의 濃도에 미치는 影響은 Fig. 5~9와 같다.

Butachlor의 濃度가 20 µM에서 80 µM으로 높아짐에 따라 發生하는 分解産物의 量도 점차 增加하는 것을 볼 수 있다. Butachlor에서는 이 分解産物로 轉換되는 것은 二分子構造 뿐이라는 假定下에서 이것을 添加한 butachlor의 分解物質로의 轉換率 [(moles of excess degradational material above that of controls/mole of butachlor added) × 100]로 나타내면 Table 7과 같다. Range는 3回 反復하여 얻어진 것이다.

Butachlor의 分解에 미치는 重金屬의 影響은 매우 큰데, Cd의 濃度가 높아짐에 따라 分解率이 顯著하게 떨어지는 것을 볼 수 있다. 이는 土壤中 重金屬은 植物 뿐만 아니라 微生物에서도 影響을 주는 것으로 알 수 있다. 文 등^{36, 37)}의 研究에 의하면 무우와 배추에서 Cd가 生育에 미치는 影響은 Cr과 Ni에 비해서는 낮으나 Cd도 상당한 障礙를 주며 Zn의 경우는 오히려 生育을 促進한다고 한다.

IV. 結論 및 要約

本 研究에서는 土壤속에 包含되어 있는 微生物을 培養하여 butachlor의 分解能이 있는 菌株를 分離하여 그 菌株의 諸般 菌學의 特性을 알아보고 그 菌株를 이용한 butachlor의 分解에 대해 重金屬 濃度別 및 農藥 濃度別 影響과 培養 時間에 따른 經時的 變化를 檢討하였다. 그 實驗結果는 다음과 같다.

① 土壤에서 分離된 butachlor 分解能을 지닌 菌은

4種이며, 그 중 卓越한 菌株가 *Streptomyces*屬 이었다.

- ② 土壤에서 分離된 菌株를 이틀간 butachlor의 分解程度는 butachlor가 많을수록 많았지만 分解率은 濃度와는 無關하였으며, 半減期는 약 20일 이었다.
- ③ 土壤에서 butachlor 分解는 Cd濃度에 의하여 阻害되는 것으로 보아 重金屬 Cd는 分解 微生物 成長을 상당히 阻害하는 것으로 보인다.

參考文獻

- 1) Guthrie, F. E. and Perry, J. J. : Introduction to environmental toxicology. Elsevier North Holland, New York, 484, 1980.
- 2) 이성환, 홍종구 : 농약학. 향문사, 238, 1993.
- 3) 김찬조, 오만진, 이종수, 손현주, 성창근 : 한국농화학회지, 29(3), 273, 1986.
- 4) 안용준, 신진섭, 이해근 : 농진청심포지움. 19, 78-111, 1993.
- 5) 신천철, 이성규, 노정구 : 제초제 Butachlor의 송사리에 대한 아급성 독성. 한국환경농학회지, 4(2), 118-125, 1985.
- 6) Saxena, A., Zhang, R. and Bollog, J. M. : Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor; Appl-Environ-Microbial, Feb., 390-396, 1986.
- 7) Alexander, M. : Biodegradation of chemicals of environmental concern, science, 132-138, 1981.
- 8) Baucer Capone-DG, J. E. : Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism, 1985.
- 9) Motosugi, K. and Soda, K. : Microbial degradation of synthetic organochloride compounds. *Experientia*, 39(11), 1214-1220, 1983.
- 10) Penner, D. : Herbicide and inorganic phosphate influence on phytase in seedings. *Weed Sci.*, 28, 360, 1970.
- 11) Hamm, P. C. : Discovery, development and current status of the chloracetamide herbicides. *Weed Sci.*, 22, 541, 1974.
- 12) Pillai, C. G. P., Davis, D. E. and Truelove, B. : Site of uptake and mode of action of metolachlor. *Proc. South. Weed. Sci.*, 30, 367, 1977.
- 13) Deal, L. M. and Hess, F. D. : An analysis of the growth inhibitory on germination, growth, leucine uptake, and protein synthesis. *Weed Sci.*, 27, 634, 1980.
- 14) Deal, L. M. and Hess, F. D. : An analysis of the growth inhibitory characteristics of alachlor and metolachlor. *Weed Sci.*, 28, 168, 1980.
- 15) Morelans, D. E., Malhotra, S. S., Gruenhagen, R. D. and Shokrah, E. H. : Effects of herbicides on RNA and protein synthesis. *Weed Sci.*, 17, 556, 1964.
- 16) Mann, J. D., Jordan, L. S. and Day, B. E. : A survey of herbicides for their effect upon protein synthesis. *Plant Physiol.*, 40, 840, 1965.
- 17) Jaworski, E. G. : Analysis of the mode of action of herbicidal α -chroacetamides. *J. Agr. Food Chem.*, 17, 165, 1969.
- 18) Rao, V. S. : Mechanisms of action of acetanilide herbicides, Ph. D. thesis, Cornell University, Ithaca, N.Y., 1974.
- 19) Duke, W. B., Slife, F. W. and Butler, H. S. : An investigation of the mode of action of propachlor. *Weed Sci.*, 22, 142, 1975.
- 20) Devlin, R. M. and Cunningham, R. P. : The inhibition of giberellic acid induction of barley endosperms by certain herbicides. *Weed Res.*, 10, 316, 1970.
- 21) Rao, V. S. and Duke, W. B. : Effect of alachlor, propachlor, and prynachlor an GA-induced production of protease and α -amylase. *Weed Sci.*, 24, 616, 1976.
- 22) Jones, R. L., Horsby, A. G. and Rao, S. C. : Degradation and movement of aldicarb residues in Florida Citrus Soils. *Pestic. Sci.*, 23, 307-325, 1988.
- 23) Kozak, J. and S. J. : Adsorption of five phenylurea herbicides by selected soils of Czechoslovakia. *Weed Sci.*, 31, 368, 1983.
- 24) Hollist, R. L. and Foy, C. L. : Trifluralin interaction with soil constituents. *Weed Sci.*, 19, 11, 1971.
- 25) Harris, C. I. : Movement of herbicides in soils. *Weed Sci.*, 15, 214, 1967.
- 26) Adamson, A. W. : Physical chemistry of surface, 3rd ed., John Wiley and Sons, 385, 1976.
- 27) Upchurch, R. P. Corbin, F. T. and Selmen, E. L. : Persistence pattern for diuron and linuron in Norfolk and Duplin sandy loam soils. *Weed Sci.*, 17, 69, 1969.
- 28) Harvey, R. G. : Soil adsorption and volatility of dinitroaniline herbicides. *Weed Sci.*, 22, 120, 1974.
- 29) Savage, K. E. and Barrentine, W. L. : Trifluralin persistence as affected by depth of soil incorporation. *Weed Sci.*, 17, 349, 1969.
- 30) Parka, S. J. and Tepe, J. B. : The disappearance

- of trifluralin from field soils. *Weed Sci.*, **17**, 119, 1969.
- 31) Jacques, G. L. and Harvey, R. G. : Adsorption and diffusion of dinitroaniline herbicides in soils. *Weed Sci.*, **27**, 450, 1979.
- 32) Webster, G. R. B., Shaykewich, C. F., Kankai, S. and Reimer, G. J. : Availability of the herbicide trifluralin for control of wild oats as influenced by soil characteristics in four Manitoba soil. *Can J. Soil Sci.*, **58**, 397, 1978.
- 33) Osman, M. A. and Bedal, M. A. : Persistence of carbaryl in Canal Water. *J. Environ. Sci. Health*, **B15**, 307-311, 1980.
- 34) Gerhardt, Murray, Costil, Nester, Wood, Krieg and Phillips : Manual of methods for general bacteriology. *ASM*, 127-131, 409-443, 1974.
- 35) Miles, C. J. and Delfino, J. J. : Fate of Aldicarb, Aldicarb Sulfoxide and Aldicarb Alfone in Florida Groundwater. *J. Agr. Food Chem.*, **13**(3), 455-460, 1985.
- 36) 유순호, 현해남 : 토양내 카드뮴, 아연 및 구리의 행동에 관한 연구. *한국농화학회지*, **28**(2), 68-75, 1985.
- 37) 문영희 : 담수 토양 중에 있어서 살균제 IBP의 분해속도에 미치는 각종 토양조건의 영향. *한국농화학회지*, **33**(20), 133-137, 1990.