

담수토양중 Diazinon과 Dursban의 분해에 미치는 Monooxygenase와 Esterase의 활성¹⁾

최종우 · 이영하* · 이규승

Effect of activities of monooxygenase, α , β -esterase on the degradation of diazinon and dursban in submerged soil

Jong-Woo Choi, Young-Ha Rhee* and Kyu-Seung Lee

Abstract

In order to determine the major biochemical degradation factors of the two organophosphorus insecticides, diazinon and dursban, the activities of monooxygenase(m. o.) and α , β -esterase were studied in submerged soil under laboratory conditions at $30 \pm 1^\circ\text{C}$. The degradation rate of diazinon by microorganism showed 1.5 times higher than dursban. The m. o. activity increased from 12hrs and 3days after application of diazinon and dursban, respectively. But the β -esterase activity showed maximum at one day after application of dursban and 5~8days after diazinon application. Also, the β -esterase activity was about 10 times higher than α -esterase. Hence, it was concluded that the biological degradation of diazinon was mainly attributed to m. o. activity and the degradation of dursban to β -esterase activity.

1. 序 論

미생물이 분비한 효소가 농약을 분해시키는 대사과정은, 미생물이 분비하는 효소에 의하여 농약이 분해는 되지만 에너지원과 영양원으로 이용될 수 없는 incidental metabolism, 농약과 유사한 구조를 가진 화합물에 의하여 미생물의 활성이 유도되는 cometabolism 그리고 미생물이 농약을 기질로 이용하여 에너지원을 얻을 수 있는 catabolism이 있다.¹⁾ 또한 미생물이 농약을 분해할 때 일어나는 반응은 유기인제, cabamate계, pyrethroid계등의 ester 결합에 작용하는 hydrolysis, 유기염소계에서 주로 일어나는 dechlorination의 reductive reaction 그리고

ring opening, decarboxylation등의 oxidative reaction으로 크게 나눌 수 있다¹⁾. 이와같이 미생물이 분비하는 효소에 의한 대사과정과 여러 반응중 유기인제 농약의 분해에는 가수분해에 관하여는 esterase²⁾와 산화반응에 관하여는 m. o.³⁾를 대표적으로 꼽을 수 있다.

일반적으로 곤충⁴⁾이나 동물의 간장⁵⁾에서 m. o.는 농약과 같은 xenobiotics의 oxidative metabolism에서 주된 작용을 하는 효소로서 많이 연구되어 왔다. 즉, ring opening, dealkylation, hydroxylation, epoxidation등의 산화반응에 다각적으로 관여하는 효소로서 일명 MFO(mixed function oxidase)로 알려져 있으며³⁾, α , β -esterase는 본 실험에 사용한 유기인제의

1) 본 논문은 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

충남대학교 농과대학 농화학과

(Dept. of Agricultural Chemistry, Chungnam Natl. Univ.)

* 충남대학교 자연과학대학 미생물학과

(Dept. of Microbiology, Chungnam Natl. Univ.)

P-O ester결합에 작용하여 가수분해에 관여하는 효소로 알려져 있다.⁶⁾⁷⁾

이와같이 곤충과 동물에서는 두 효소의 기능이 잘 밝혀져 있으나 토양내에서는 농약의 분해에 토양미생물이 분비한 효소의 기능에 대한 연구는 그리 많지 않은 실정이다⁸⁾.

따라서 본 실험에서는 유기인계 농약인 두 약제를 담수 토양에 처리하여 각 약제의 분해에 미생물이 관여하는 정도를 알아봄과 동시에 m. o. 활성과 α , β -esterase 활성을 측정하여 두 약제의 분해에 관여하는 두 효소의 특성을 관련지어 실험하므로써 Diazinon과 Dursban의 합리적인 사용방법을 알아보고자 본 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

(1) 공시토양

대전시 중구 궁동(어은부락) 토양으로 모내기 이전인 4월 중순에 채취하여 풍건 후 2mm체에 통과한 시료를 사용하였으며, 공시토양의 특성은 Table 1과 같다.

(2) Diazinon (97.4%)과 Dursban(97.0%)은 표준품을 사용하였으며, 실험에 사용된 유기용매는 농약잔류분석용, 시약은 GR급을 이용하였다.

2. 실험방법

(1) 항온실험

1m×2m×1m(W×L×H) 항온조를 30±1℃로 유지시키면서 100ml의 비이커에 토양을 20g씩 취하고 증류수 30ml를 가하여 담수상태로 유지하였다.

Diazinon제 상용농도(18ppm), 3배량(54ppm)과 Dursban제 상용농도(12ppm), 3배량(36ppm)을 각각 1ml씩 가하였다. 시료채취는 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10일에 실시하였으며, 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

(2) 농약의 추출 및 분석

농약의 추출과 분석은 MacRae의 방법에 준하여 전보(최, 이; 1987)⁹⁾와 동일하다.

3. 효소활성 측정

토양내 esterase활성도는 Walker(1985)¹⁰⁾의 방법에 준하여 수행하였다. 즉 sample soil 5g에 α -esterase 기질로는 α -naphthyl acetate를, β -esterase기질로는 β -naphthyl acetate를 5ml(1mM)를 가하여 40℃에서 20시간 배양한 뒤 96% EtOH 5ml로 반응을 중지시키고, 3600G에서 30분동안 원심분리 후 상정액 1ml를 취하여 0.25% 4-aminoantypyrin 1ml, 0.35% potassium ferric cyanide 1ml, 증류수 7ml를 가하여 생성된 naphthol을 UV/Vis Spectrophotometer 480nm에서 O. D.를 측정하여 효소활성으로 하였다.

m. o.활성도는 Shang과 Soderlund(1984)¹¹⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 공시토양 5g에 기질로 1mM의 *p*-nitro anisole 10ml를 가하고 40℃에서 20시간 배양한 뒤 1M Na₂CO₃ 8 ml로 반응을 중지시키고 3,600G에서 30분간 원심분리후 상정액 2ml를 취하여 증류수 8ml를 혼합한 후 생성된 *p*-nitrophenol을 420nm에서 O. D.를 측정하여 효소활성으로 하였다.

III. 결과 및 고찰

농약이 담수토양 중에서 분해될 때는 물리화학적 요인 이외에 토양미생물이 분비하는 효소에 의하여 대사가 이루어져 분해속도가 빨라지는 것이 주된 분해기작이라고 밝혀졌다¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾. 따라서 Gunner(1968)¹⁵⁾와 Sethunathan 등 (1972)¹⁶⁾은 미생물순수배양후 농약의 분해양상을 실험하여, 미생물 상호간의 상승작용이 있음을 확인하였고, 또 분해산물로 P-O ester결합이 깨어진 HOP가 CO₂로 무기화 한다는 것을 밝혀냈으나 효소수준에서의 분해양상을 실험한 결과는 찾아보기 어려운 실정이다⁸⁾.

Table 1. Physical and chemical characteristics of soil used.

Soil Texture	soil separate (%)			pH	T-N (%)	O.M (%)	C.E.C. (me/100g)
	sand	silt	clay				
SIL	18	62	20	6.5	0.17	1.70	8.5

따라서 본 실험은 담수토양중 Diazinon이 거의 분해되는 10일동안의 분해와 더불어 m. o.와 α , β -esterase 활성을 동시에 측정하여 보았다.

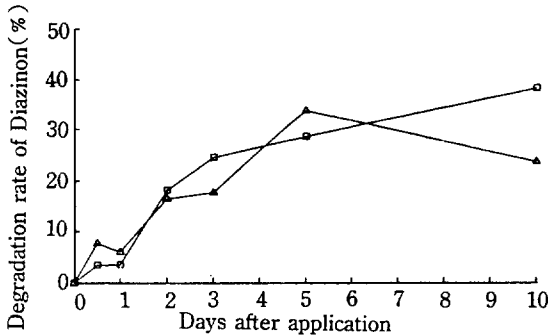


Fig. 1. Microbial degradation of Diazinon in submerged soil.

—□— : Diazinon (1X) —△— : Diazinon (3X)

Fig. 1은 전보(최, 이, 1987)⁹⁾에 발표한 담수토양 중에서의 Diazinon 분해에 관한 실험 결과 중 비살균 토양의 분해율에서 살균 토양의 분해율을 뺀 결과를 나타낸 것이다. 즉, Diazinon이 담수토양에서 분해되는데 물리화학적 영향을 배제한 비교적 미생물에 의하여 분해되었다고 볼 수 있는 실험 결과이다.

Diazinon 상용량인 1X에서는 1일까지 완전히 분해된 반면, 1일 이후로 3일까지는 급격히 분해되었다. 즉 Diazinon의 반감기가 2.2일이고⁹⁾, 세균 및 균류수의 증가가 초기에 일어났다는 김등(1989)¹⁷⁾의 결과로 미루어 Diazinon은 미생물에 의하여 초기에 급격히 분해된다는 것을 알 수 있고, 또한 5일 이후로는 30%~40%의 분해율을 유지하였다. Diazinon 3배량 (3X)에서는 미생물에 의한 분해 양상이 계단곡선을 이루었다. 즉 분해율이 증가(0.5일) 후 감소(1일), 증가(2일) 후 일정(3일), 다시 증가(5일) 후 감소(10일)의 경향을 나타내었다. Diazinon농도별 분해율은 1일까지 3X에서 더 왕성하였으며 5일째에도 3X가 33.7%로 1X(28%)보다 분해율이 높았다.

그러나 10일째에는 1X(38.8%), 3X(23.6%)로 반대의 현상을 나타내었다. 이와 같이 농도 차이에 따라 1X에서는 비교적 일정한 경향을 보였으나 3X에서는 증가, 감소로 분해율이 시일별로 변화가 심하였다.

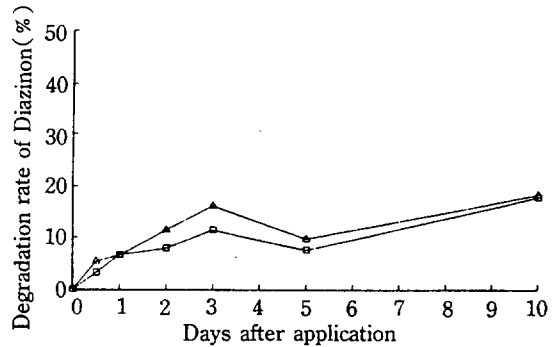


Fig. 2 Microbial degradation of Dursban in submerged soil.

—□— : Dursban (1X) —△— : Dursban (3X)

Fig. 2는 Diazinon과 마찬가지로 전보의 담수토양 중 Dursban의 분해율에서 미생물에 의한 분해율만을 시간별로 나타낸 결과이다.

Dursban의 분해율은 전반적으로 1일부터 10일까지 10-20%를 유지하였으며, Diazinon이 Dursban 분해율보다 2배정도 더 높았다. 또한 농도별로는 Diazinon과 마찬가지로 3X에서는 분해율의 변화가 심하였으나, 1X에서는 완만한 증가를 이루었다. 특히 Diazinon의 경우 5일째에 분해율이 28.6%(1X), 33.7%(3X)로 매우 높아졌으나, Dursban은 3일째에 다소 높아졌다가 5일째에는 1X와 3X 공히 감소하여 7.55%(1X), 9.77%(3X)를 나타내었다.

즉, incubation 5일째에는 두 약제간의 분해양상이 다른 일면을 보여주고 있다. 이는 Dursban을 기질로 이용하는 bacteria의 생육 현상에서 3일에서 5일 사이에 생육이 완만한 결과(미발표)와 일치하였다.

농약이 m. o.에 의하여 분해되면, 극성이 증가되거나 불안정한 화합물로 변형되어 배당체형성 또는 무기화 반응으로 원래 약제가 가지고 있는 약효를 발휘하지 못하게 되는 것이다. 즉 동물에서는 배설이 용이해지고, 곤충체에서는 활성부위까지 도달하는 농약의 양이 감소되어 충분한 약효를 발휘할 수 없게 된다.⁴⁾

이런 관점에서 Fig. 3은 Diazinon과 Dursban을 각각 처리한 토양중의 m. o.활성을 측정된 결과로서 각 약제에 m. o.가 미치는 영향을 검토하였다. 그림에서 y축은 토양 1g중에 들어 있는 효소가 1분 동안에 기질을 이용한 양 즉, n mol/min/g을 1 unit로 나타내었다.

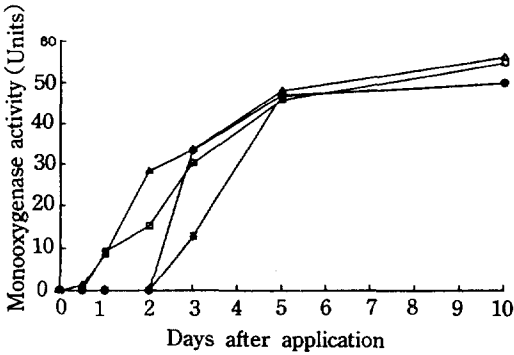


Fig. 3. Change of Monooxygenase activity.

—□— : Diazinon(1X) —*— : Dursban(1X)
 —△— : Diazinon(3X) —○— : Dursban(3X)

Diazinon처리토양에서 m. o.활성은 상용량(1X)에서 1일부터 활성이 나타나기 시작하여 5일까지 급속히 증가한 이후로 10일까지는 완만히 증가하였다. Diazinon(3X)에서도 12시간부터 활성이 나타나기 시작하여 Diazinon(1X)에서와 같은 경향을 나타내었다. Dursban처리토양에서는 상용량(1X)과 3배량(3X) 공히 같은 경향으로 3일째 부터 활성이 나타나기 시작하여 급격히 증가하다가 5일째부터 완만히 증가하였다. 또한 두약제 공히 처리량 증가에 따라 활성이 약간 큰 영향을 보였다. 결과적으로 Diazinon은 약제처리 12시간부터 m. o.가 활성을 나타내어 Diazinon 분해에 관여하고, Dursban은 후기 3일부터 활성이 나타나는 것으로 보아 Diazinon보다 늦게 Dursban에 m. o.가 관여한다고 할 수 있다.

m. o. 효소계와 더불어 xenobiotics의 분해에 관여하는 중요한 효소로서, 농약의 구조 특성상 ester결합을 형성하고 있는 organophosphorus, carbamates, pyrethroids계 농약의 ester결합에 작용하는 esterase가 있다.

Fig.4는 Diazinon과 Dursban 각각의 처리구에서 β -esterase의 활성을 시간에 따라 측정된 결과로서, β -esterase활성은 두 약제간 현저한 차이를 보였다. 즉 Dursban처리구에서는 처음부터 활성이 증가하다가 1일째에 가장 높은 활성을 보이고 그 이후로 점차 감소하였다. 그러나 Diazinon처리구에서는 초기에는 활성이 급격히 감소하다가 2일을 지나면서 다소 활성이 증가하여 5일(1X), 8일(3X)에 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 농도별 차이는 두 약제처리구에서 공히 농도가 높을수록(3X) 활성이 낮았

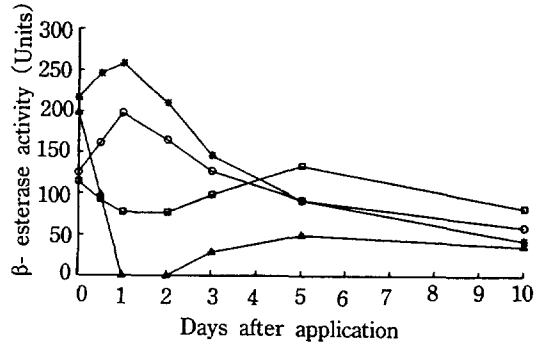


Fig. 4. Change of β -esterase activity.

—□— : Diazinon(1X) —*— : Dursban(1X)
 —△— : Diazinon(3X) —○— : Dursban(3X)

으며, 특히 Diazinon 3X에서는 처리 1일과 2일 사이에 전혀 활성을 나타내지 않았는데 이 결과는 m. o.와 상반되는 경향이였다.

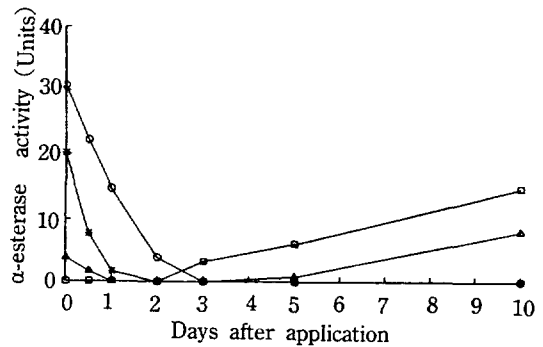


Fig. 5. Change of α -esterase activity.

—□— : Diazinon(1X) —*— : Dursban(1X)
 —△— : Diazinon(3X) —○— : Dursban(3X)

Fig.5는 β -esterase와 마찬가지로 각 약제 처리구에서 α -esterase의 활성을 측정된 결과이다. Dursban처리구는 처음부터 활성을 나타내다 점차 감소하여 Dursban(1X)의 경우 2일, Dursban(3X)는 3일에 이르러 활성을 나타내지 않았다. Diazinon은 (1X)의 경우 3일, (3X)는 5일부터 활성을 나타내기 시작하여 점차 시간에 따라 증가한, 각 약제별로 상반되는 효소활성을 보였다. α -esterase는 β -esterase와 경향은 비슷하였으나, 전반적으로 효소활성이 약

10배정도 낮게 측정되었다.

이상의 결과로 볼 때 담수토양중에서 토양미생물이 분비한 효소에 의하여 분해될 때 Diazinon은 먼저 m. o.에 의해서 epoxidation에 따른 hydroxylation 또는 desulfuration반응이 일어난 다음, esterase에 의하여 P-O ester결합이 끊어지고, Dursban은 먼저 esterase에 의하여 P-O ester 결합이 끊어진 후 m. o.에 의하여 계속 대사가 이루어진다고 예상할 수 있다.

이러한 예상은 Diazinon(1X)의 비살균 토양의 분해율에서 살균 토양을 뺀 즉, 비교적 Diazinon이 토양중에서 분해되는데 물리화화학적 영향을 배제한 생물학적 요인에 의하여 대사가 이루어졌다고 볼 수 있는 분해율과 m. o.활성 및 β -esterase활성과의 관계를 나타낸 Fig. 6에서도 찾아 볼 수 있다.

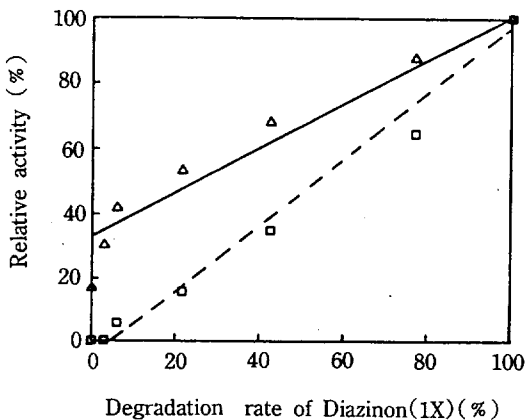


Fig. 6. Correlation between relative activity of two enzymes and degradation rate of Diazinon. Each point is the mean of triplicate.

□ - □ : Monooxygenase, $Y=0.80X-4.89$ ($r=0.98$)
 △ - △ : β -esterase, $Y=0.43X+33.97$ ($r=0.96$)

y축은 두 효소의 활성을 시간에 따라 적분하여 10일 후를 최대활성으로 한 상대적인 활성으로 나타내었고, X축은 Diazinon의 생물학적 분해율을 시간에 따라 적분하여 10일 후의 분해율을 100%로 환산한 생물학적인 분해율로 나타내었다. 두 직선을 보면, m. o.활성과 Diazinon분해율과의 관계식이 $y=0.80X-4.89$ 로 β -esterase활성과의 관계식 $y=0.43X+16.97$ 에 비하여 기울기에서 약 2배정도 m. o.가 높은

것을 보여주고 있다.

즉 담수토양에서 10일 동안의 Diazinon 분해는 m. o.가 β -esterase 보다 2배정도 더 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

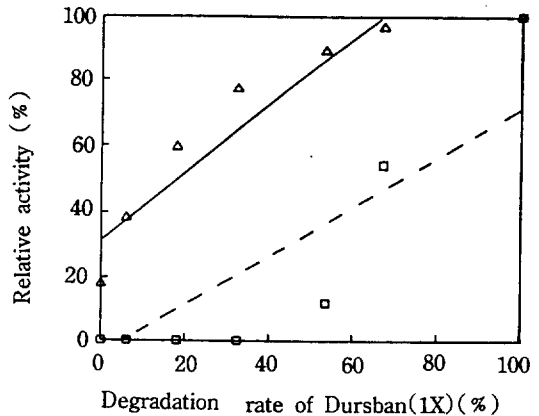


Fig. 7. Correlation between relative activity of two enzymes and degradation rate of Dursban. Each point is the mean of triplicate.

□ - □ : Monooxygenase, $Y=0.86X-6.84$ ($r=0.88$)
 △ - △ : β -esterase, $Y=1.67X+32.22$ ($r=0.91$)

Fig. 7은 Diazinon과 마찬가지로 비교적 생물학적 요인에 의하여 분해 되었다고 할 수 있는 Dursban분해율과 두 효소의 활성과의 관계를 보여주고 있다. m. o.활성과 Dursban분해율과의 관계식은 $y=0.86X+6.84$ 이고, β -esterase 활성과 Dursban 분해율과의 관계식은 $y=1.67X+37.21$ 이다. 기울기를 보면 Dursban의 분해에 β -esterase가 m. o.보다 약 2배정도 더 크게 작용함을 알 수 있다. 따라서 Dursban은 담수토양 중에서 10일 동안에는 m. o.보다는 β -esterase에 의하여 주로 분해됨을 나타낸 결과라 하겠다.

Diazinon의 대사경로는 곤충과 식물체에서 분자중의 pyrimidine ring에 치환되어 있는 methyl기 또는 isopropyl기에 먼저 m. o.에 의해 hydroxyl기가 형성된 다음에 P-O ester 결합이 끊어지는 것으로 밝혀졌으며¹⁸⁾, 담수토양중에서도 Diazinon은 desulfuration이 일어난 Diazoxon, isopropyl기에 hydroxyl기가 형성된 phosphorothioate(O, O-diethyl-O-[2(1-

hydroxy-1,1]-dimethyl)6-methyl] pyrimidine 등의 m. o.에 의한 대사산물이 확인되었다.⁹⁾¹⁷⁾

본 실험 결과에서도 Diazinon의 분해에는 m. o. 활성이 esterase 활성보다 약 2배 더 큰 영향을 미치고(Fig. 6), m. o.활성이 12시간부터 나타난 결과(Fig. 3)와 esterase활성이 5일째에 최고를 보였다는 것(Fig. 4)을 미루어 볼 때, Diazinon은 m. o.에 의하여 초기에 공격을 받고 일단 hydroxyl기가 치환된 중간체가 형성된 다음에 esterase에 의하여 P-O ester결합이 끊어지는 것이 주 대사경로라고 할 수 있을 것이다.

또한 토양중 Dursban제의 분해경로는 치환성 양이온과 chelate를 형성한 후 가수분해되는 물리화학적 과정¹⁹⁾과 곤충체에서는 Dursban 분자가 desulfuration되어 산소 치환체로 된다는 보고²⁰⁾, 이외에 최등(1987)⁹⁾은 담수토양중에서 Dursban의 분해산물로 P-O ester의 가수분해 산물인 O,O-diethyl phosphorothioate와 2-hydroxy-3,5,6-trichloropyrimidine을 확인하였다. 이와같이 Dursban은 분자구조상 pyridine ring 에 치환되어 있는 염소가 이탈되기는 매우 어려우며 esterase에 의하여 일단 P-O ester 결합이 깨어지고, 그후에 m. o.에 의하여 공격을 받을 것이라는 예상을 할 수 있다. 이런 예상은 본 실험에서 β -esterase의 활성이 1일째에 가장 높았으며(Fig. 4), 3일 이후로 m. o.활성이 높아진 결과(Fig. 3)에서도 뒷받침된다고 볼 수 있으며, 담수토양중에서 10일 동안 Dursban분해에 관여하는 m. o.와 esterase중 esterase가 m. o.에 비하여 영향을 약 2배정도 더 크게 미친다는 것으로도 알수 있었다(Fig. 7).

적 요

담수토양중 Diazinon과 Dursban의 분해에 미치는 Monooxygenase 활성과 α , β -esterase 활성의 영향을 알아보기 위하여, 실험실 조건에서 항온(30±1℃)으로 유지하면서 두 약제의 분해율과 두 효소의 활성변화를 측정하였으며, 주요 결과는 아래와 같다.

1. 담수토양중 두 약제의 전체 분해율 중 미생물에 의한 분해율은 5일과 10일 사이에 Diazinon은 29-38% (1X), 34-24% (3X), Dursban은 18-28% (1X), 18-27% (3X)이었다.
2. M. O.활성은 Diazinon 처리구에서 12시간부터, Dursban처리구에서 3일부터 활성을 나타내었다.

3. α -보다는 β -esterase활성이 10배정도 높았으며, Dursban처리구는 초기(1일)에 활성이 높았지만, Diazinon 처리구는 후기(5~8일)에 활성이 높았다.
4. Diazinon의 분해율과는 M. O. 활성이, Dursban의 분해율과는 β -esterase활성이 각각 2배정도 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Matsumura, F. and Krishna Murti, C. R. (1982) : *Biodegradation of Pesticides*, Plenum Press, New York and London, 69-78.
2. Walker, C. H.(1983) : Esterase problem of identification and classification, *Biochem. Pharm.* 32, 3265.
3. Hayes, A. W.(1989) : *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press, New York, 29-40.
4. Hassall, K. A.(1982) *The Chemistry of Pesticides*, Macmillan Press, London, 45-85.
5. Hutson, D. H. and Roberts, T. R.(1981) : *Progress in pesticide biochemistry*, Jon Wiley & Sons, 85-115.
6. Nakas, T. P., Gould, W. D. and Klein. D. A.(1987) : Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid gressland soil. *Soil Biol. S Biochem.* 19, 13.
7. Juma, N. G. and Tabatabai, M. A.(1988) : Comparison of Kinetic and thermodynamic parameters of phosphomnoesterases of soils and of corn and soybean roots, *Soil Biol. s Biochem.* 20, 533.
8. Frankenberger, W. T. Jr. and W. A. Dick.(1983) : Relation between enzyme activity and microbial growth and activity indices in soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 7, 945-951.
9. Choi, J. W. and Lee, K. S.(1987) : Degradation of Diazinon and Dursban in submerged soil, *Kor. J. Environ. Agric.* 6, 2, 1.
10. Mackness, M. I., Hallam, S. D. and Walker, C. H.(1985) : A-esterase activity in the lipoprotein fraction of sheep and human serum, *Biochem. Soc. Trans.*, 13, 135.
11. Shang, C. C. and Soderlund, D. M. (1984) : Mo-

- noxygenase activity of tobacco budworm larvae, *Comp. Biochem. Physiol*, 79, 407.
12. Sethunathan, N, (1972) : Diazinon degradation in submerged soil and rice-paddy water, *Adv. Chem. Ser.*, 111, 244.
 13. Sethunathan, N. and Pathak, M. D. (1970) : Development of Diazinon degrading bacterium in paddy water after repeated applications of Diazinon, *Can. J. Microbiol.*, 17, 699.
 14. Lee, H. K.(1981) : Effect of rice straw amendment and repeated application of Diazinon in submerged soils, *J. Kor. Agric. Chem. Soci.*, 24, 1.
 15. Gunner, H. B. and Zukerman, B. M.(1968) : Degradation of Diazinon by synergistic microbial action, *Nature*, 221 7, 1183.
 16. Sethunathan, M. and Yoshid, T.(1973) : A Flavobacterium sp. that degrades Diazinon and Parathion, *Can. J. Microbiol.*, 19, 873.
 17. Kim, J. H., Rhee, Y. H. Choi, J. W. and Lee, L. S.(1989) : Micobial degradation of Diazinon in submerged soil, *Kor. J. Microbiol.*, 27, 139.
 18. Riskallah, M. R., Dauterman, W. C. and Hodgson, E. (1986) : Host plant induction of microsomal monoxygenase activity in relation to Diazinon metabolism and toxicity in larvae of the tobacco budworm *Heliiothis Virescens*(F), *Pestic. Biochem. s Physiol.*, 25, 223.
 19. Khan, S. U. (1980) : *Pesticides in the soil Environment*, Elsevier Press, Amsterdam, 86-87.
 20. Hiroyasu, A. (1982) : *Metabolic Maps of Pesticides*, Academic Press, 168-169.