

數種 土壤細菌에 의한 殺菌劑 Myclobutanil의 分解力

韓成洙 · 朴必裁 · 鄭載勳 · 林堯燮

Degradation Ability of Fungicide Myclobutanil by Several Soil Bacteria

Seong-Soo Han, Pill-Jae Park, Jae-Hun Jeong and Yo-Sup Rim

Abstract

This study was carried out to isolate some bacterial strains which had potentiality of good degrader of fungicides from herbicide free soil and to clarify degradation of a fungicide myclobutanil[2-p-chlorophenyl-2-(1H-1,2,4-triazole-1-ylmethyl)-hexanenitrile].

Ten strains of the gram-positive and the gram-negative bacteria were isolated and identified. Most of them vigorously proliferated at 55ppm of myclobutanil, but the stains were not grown when more than 70ppm of this fungicide were treated *Staphylococcus* spp. I, *Actinobacillus* spp. III, and another I of the isolated bacteria degraded more than 35% of the treated myclobutanil. These three strains could utilize myclobutanil as nitrogen and carbon sources. Myclobutanil was rapidly decomposed by these strains when applied once or three times. Tested bacteria gradually increased in growth when myclobutanil was applied repeatedly. Degradation of myclobutanil and growth of these bacteria were greater in pH 5.5, and they were high in the order of $28^{\circ}\text{C} > 18^{\circ}\text{C} > 38^{\circ}\text{C}$.

緒 言

撒布되는 農藥의 行方은 處理方法이나 劑型에 따라 多少의 差異는 있으나 大部分의 農藥이 土壤에 流入되며 이들 農藥은 土壤 環境內를 移動하면서

分解되거나 消失되고 一部는 殘留되어 土壤 生態系를 攪亂하는 등의 負의 影響을 誘發할 수 있다.^{1,2)}

그러나 農藥은 土壤中에 들어 가면 微生物學的, 化學的, 光化學的 分解와 같은 여러 가지 變換過程을 거쳐 分解되며, 그 中에서 微生物에 의한 分解가

가장 중요한 것으로 알려져 있고^{3,5)}, 또한 농약에 의한 토양미생물에 따라 다르게 나타나는 것으로 보고하고 있다.⁶⁻¹⁰⁾

토양中 농약의 잔류성과 미생물 분해의制御로 環境汚染을 減少시키며 後作物에 대한 惡影響을 除去할 수 있다면 매우 바람직스러운 일이기 때문에 토양으로부터 농약을 人爲적으로 除할 수 있는 方法의 講究는 農藥 殘留에 의해 擡頭되는 問題 解決을 위한 重要한 課題이며 農藥의 殘留성과 微生物의 作用사이의 關係를 理解하는 것이 必須的이다.

先進 外國에서는 이러한 目的 達成을 위해 農藥을 分解하는 數種 곰팡이, 박테리아, 放線菌을 土壤으로부터 分離하여 이들 微生物의 農藥分解能과 微生物의 生長條件 사이의 關係 그리고 分解機作을 究明하는 研究가 많이 이루어 지고 있으나^{1,21)} 우리나라에서는 거의 이루어 지고 있지 않다. 韓 等⁶⁾은 本 研究의 供試藥劑 myclobutanil이 土壤微生物에 의해 分解가 크게 促進된다고 하였는 바, 本 研究에서는 土壤細菌에 의한 myclobutanil의 分解能과 그들의 分解特性을 究明하고자 農藥 無處理土壤으로부터 數種의 菌株을 分離同定하고, 이들 微生物을 myclobutanil含有 接種하여 生存力과 農藥分離을 調査하였으며, 分解能이 比較的 優秀한 菌株에 대해 myclobutanil을 窒素源 혹은 炭素源으로 利用하는지의 與否, 農藥反覆處理에 細菌의 農藥分解樣相, pH, 溫度, 接種量 等の 差異에 따른 myclobutanil의 分解와 細菌增殖樣相을 調査하였는 바 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

1. 供試藥劑 및 供試土壤

本 實驗에 使用한 殺菌劑 myclobutanil은 6% 水和劑 및 98% 標準品으로 株社會社 慶農으로부터 分讓받아 實驗에 使用하였고, 微生物 分離에 使用한 供試土壤은 pH 5.7, 有機物 含量 1.8%, CEC 6.7me/100g인 微砂質 壤土이었다.

2. 土壤細菌의 分離

土壤試料 50g을 삼각 플라스크에 取하여 最大 圃場用水量의 60%로 調節하고 28°C에서 2週間 pre-incubation하여 微生物을 活性化시킨 土壤을 10 倍로 稀釋하여 0.5ml씩 NB培地에 接種하여 發生한 細菌을 5日間 28°C에서 培養하고 形成된 colony를 顯微鏡的 觀察에 의하여 形態에 따라 分離하여 nutrient broth(NB) agar 培地에서 28°C, 48시간 純粹培養 後 各 細菌을 Cowan과 Steel의 方法에 따라 24種類의 生理生化學的 分類同定 實驗을 行하여 屬까지 分類하였다. 分離된 細菌은 斜面培地에 接種하여 28°C, 48시간 培養 後 各 實驗을 위해 冷藏保管하면서 使用하였다.

3. 分離細菌의 myclobutanil에 대한 生存力

10-100ppm의 myclobutanil이 添加된 NB ager培地에 上記의 分離菌株을 各 各 接種하여 28°C에서 5日間 培養한 後 colony形成能을 農藥 無添加區와 比較하여 6/(生育旺盛, 生育良好, 生育中, 生育微弱, 生育極微弱, 生育不能)로 分離細菌의 myclobutanil에 대한 生存力을 評價하였다.

4. Myclobutanil 分解力 優秀菌株 選拔

供試土壤로부터 分離한 細菌을 NB 培地에 各 各 接種하여 28°C에서 3日間 培養하여 菌을 活性化시켰다. 活性化시킨 各 細菌들의 吸光度를 420nm에서 測定하여 吸光度가 0.7이 되도록 一定하게 調節한 菌液 1ml myclobutanil 10ppm이 되도록 添加한 NB培地 19ml에 接種하고 28°C에서 7日間 培養한 後 試料를 採取하여 菌體增殖量 測定 및 myclobutanil殘留量을 分析한 다음 35% 以上 分解能을 가진 菌株을 選拔하였다.

5. 分解 優秀菌株의 窒素源 또는 炭素源으로서 myclobutanil 利用與否

分解菌이 myclobutanil을 炭素源 또는 窒素源으로 利用하는지의 與否를 調査하기 위하여 nmyclobutanil대신 NaNO_3 또는 glucose 添加 無機鹽培地, NaNO_3 또는 glucose를 除外한 無機鹽+農藥添加培地, NaNO_3 또는 glucose+農藥添加培地에 上記 分解能이 좋았던 細菌을 一定量씩 接種하여 5日間 培養後 試料를 取하여 $\text{NO}_3\text{-N}$ 定量은 Brucine法²³⁾, glucose 定量은 Dinitrosalicylic acid에 의한 比色法²⁴⁾에 의해 分析한 後 無處理區 對比 處理區의 百分率을 求하여 窒素源 혹은 炭素源의 利用率로 나타냈고, 農藥 殘留量을 分析하여 農藥分解率을 算定하였다. 上記 無機鹽培地는 K_2HPO_4 0.5g, NaNO_3 0.5g, MgSO_4 0.5g, glucose 0.1g, 微量無機鹽類 1ml ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.64g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15g+DW 1L)를 1000ml에 넣어 調節하여 pH 7.0으로 調節한 後 使用하였다.

6. Myclobutanil 反覆處理에 의한 分解力과 細菌增殖 樣相

分解菌을 NB 培地 20ml가 함유된 試驗管에 接種하여 30°C에서 3日間 培養하여 菌을 活性化시켰다. 1回 處理는 活性化된 分解菌을 myclobutanil 10 ppm이 되도록 添加한 NB培地에 一定量씩 接種하여 5日間 培養한 後 試料를 採取하였고, 2回 處理는 1回 處理 5日後에 다시 連用處理하여 1回 處理日로부터 10日後에 그리고 3回 處理는 2回 處理後 5日後에 再次 連用處理하여 1回 處理日로부터 15日後에 各各 試料를 採取하여 myclobutanil 分解率과 微生物 增殖量을 調査하였다.

7. pH의 差異에 따른 myclobutanil 分解力과 細菌增殖 樣相

pH를 HCl과 NaOH로 5.5, 7.0, 8.5로 調節한 myclobutanil 含有 NB培地에 分解率이 比較的 높았던 3菌株를 活性化시켜 一定量 接種한 後 28°C에서 5日間 培養하여 試料를 採取한 다음 分解率과 細菌增殖程度를 調査하였다.

8. 溫度 差異에 따른 myclobutanil 分解力과 細菌增殖 樣相

分解菌을 myclobutanil含有 NB 培地 20ml가 담긴 試驗管에 接種하여 18°C, 28°C, 38°C로 調節된 各 恒溫器에서 5日間 培養한 後 試料를 採取하여 分解率과 細菌 增殖程度를 調査하였다.

9. 接種量 差異에 따른 myclobutanil 分解力과 細菌增殖 樣相

Myclobutanil含有 NB 培地 20ml가 담긴 試驗管에 菌株의 O.D 값이 0.5, 1.0, 1.5로 一定하게 調節한 各 菌株의 一定量을 接種한 後 28°C에서 5日間 培養한 後 試料를 採取하여 分解率과 細菌增殖 程度를 調査하였다.

10. 殘留量 分析節次 및 分析器機 條件

各 實驗에서 採取한 液體 培養液 5ml를 200ml 삼각플라스크에 取하고 여기에 methanol : 진한 암모니아수(8 : 2, v/v) 混合溶媒 80ml를 加하여 30分間 加溫 진탕抽出하였고 이를 濾過하여 混合溶媒로 最終 100ml가 되도록 하였다. 上記 抽出液 10ml를 25ml의 蒸溜水와 dichloromethan 20ml, 飽和食鹽水 1ml를 加한 뒤 分液濾過 진탕기로 5分間 激烈하게 진탕한 後 dichloromethan層을 分離하였다.

Table 1. GC condition of residual analysis.

Instrument	: Gas Chromatograph, Tracor 570
Detector	: Electron Capture Detector
Column	: 180×4mm i.d. Glass Column packed with 3% OV-17 on Chromosorb W-HP 80/100 mesh
Temperature	: Column Oven; 260°C isothermal
	Injection Port; 270°C
	Detector; 300°C
Gas flow rate	: Carrier(N_2); 40ml/min
	Purge; 10ml/min
Chart speed	: 0.5cm/min

이어 無水黃酸나트륨을 加하여 脫水시킨 後 減壓 濃縮한 다음 乾固된 殘留物을 acetone 5ml로 最終 定容하여 그 中 2 μ 를 GLC-ECD에 注入하여 表 1과 같은 分析器機 條件下에서 分析하였으며 이때의 最小 檢出量은 0.06ng, 檢出/界는 0.03ppm이었으며, 回收率은 90%이었고, retention time은 3.59분이었다.

結果 및 考察

1. 土壤細菌의 分離

Myclobutanil 分解特性 研究에 使用될 土壤細菌을 分離同定하고자 農藥을 處理하지 않은 圓光 大學校 實習地 밭土壤인 微砂質 壤土로 부터 分離된 細菌을 純粹培養하여 Cowan과 Steel의 方法에 의해 24種類의 生理·生化學的 分離同定 實驗을 行하고 屬까지 分類한 結果는 表 2에 나타낸 바와 같다. 그람陽性細菌으로는 *Corynebacterium*屬, *Listeria*屬, *Staphylococcus*屬, *Streptococcus*屬 각 1菌株씩이었으며, 그람陰性細菌로는 *Actinobacillus*屬 3菌株, *Alcaligenes*屬 1菌株, *Enterobacterium*屬 1菌株, 其他 屬 1菌株 等 4屬 6

Table 2. Classification of bacteria isolated from silty loam soil.

Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	
<i>Corynebacterium</i> spp.	I	I
	<i>Actinobacillus</i> spp.	II
	<i>Actinobacillus</i> spp.	III
<i>Listeria</i> spp.	I	III
<i>Staphylococcus</i> spp.	I	I
	<i>Alcaligenes</i> spp.	I
<i>Streptococcus</i> spp.	I	I
	<i>Enterobacterium</i> spp.	I
	Another	I

Classification of bacteria was carried out by Cowan and Steel's method²²⁾

菌株로 總 8屬 10菌株를 分離하였다.

其他 屬에는 *Chromobacterium*, *Benekea*, *Vibrio*, *pleisiomonas*, *Aeromonas*屬 中에 包含되는데 이에 대한 屬의 分類를 위해서는 後/ 分類同定實驗이 要求된다.

2. 分離細菌의 myclobutanil에 대한 生存力

供試土壤으로 부터 分離한 細菌들의 myclobutanil에 대한 生存力 검정을 하기 위하여 myclobutanil이 10ppm에서 100ppm까지 여러 段階의 濃度로 添加된 NB agar培地에 各 菌株를 接種培養한 後 colony形成能을 觀察하여 生育旺盛(◎), 生育良好(○), 生育中(◇), 生育微弱(△), 生育極微弱(*), 生育不能(X)의 6段階로 農藥無處理區와 比較 評價한 結果는 表 3과 같다.

一般的으로 볼 때 供試菌株 모두 myclobutanil 55 ppm까지는 生存力이 旺盛하였고 60ppm 부터는 菌株에 따라 差異가 나고 있었다. 즉, 그람/性細菌 4 菌株는 微弱하지만 70ppm까지 生存하였고, 그람陽性細菌은 *Actinobacillus*屬 I, II를 除外한 모든 菌이 70ppm까지 微弱하지만 生存했으며 供試菌株 모두 90ppm 以上에서는 生育不能이었다. 一般的으로 高濃度의 農藥에서 微生物의 生長이 沮害된다는 事實과 本 實驗缺課를 比較해 볼 때 細菌에 따라 다른 傾向이 나타나고 있었고, 韓²⁵⁾이 napropamide는 100ppm까지는 生育이 旺盛했으며 1500ppm까지도 生存力이 뛰어난 細菌이 存在하였다는 報告로 보아 藥劑의 種類나 菌의 種類에 따라 農藥에 대한 耐性이 다른 것으로 判斷된다.

3. 分離細菌의 myclobutanil 分解力

分離된 細菌들의 myclobutanil分解能을 測定하기 위하여 NB培地에 供試菌株를 接種하여 3日間 培養한 後 菌液의 O.D값이 1.0이 되도록 調節한 다음 myclobutanil 10ppm 含有培地에 一定量씩 接種培養한 後 7일째에 試料를 採取하여 各 細菌의 增殖程

Table 3. Vitality of the isolated bacteria against fungicide myclobutanil.

Strains	Concentration of myclobutanil(ppm)										
	10	20	30	40	50	55	60	65	70	90	100
<i>Corynebacterium</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	△	×	×
<i>Listeria</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◇	△	×	×
<i>Staphylococcus</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◇	*	×	×
<i>Streptococcus</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	△	△	*	×	×
<i>Actinobacillus</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◇	×	×	×
<i>Actinobacillus</i> spp. II	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	*	×	×	×
<i>Actinobacillus</i> spp. III	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	△	×	×
<i>Alcaligenes</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◇	*	×	×
<i>Enterobacterium</i> spp. I	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	◇	*	×	×
Another	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◇	*	×	×

Degree of vitality : ◎ vigorous, ○ good, ◇ moderate, △ weak, * very weak, × not grown.

Table 4. Myclobutanil degradation of bacteria isolated from soil.

Strains	Degree of Growth (O.D Value) ^{a)}	Percentage of degradation(%)	
Gram-positive bacteria	<i>Coryndacterium</i> spp. I	1.735	23
	<i>Listeria</i> spp. I	1.707	23
	<i>Staphylococcus</i> spp. I	1.720	39
	<i>Streptococcus</i> spp. I	1.494	31
Gram-negative bacteria	<i>Actinobacillus</i> spp. I	1.835	30
	<i>Actinobacillus</i> spp. II	1.725	32
	<i>Actinobacillus</i> spp. III	1.838	35
	<i>Alcaligenes</i> spp. I	1.585	24
	<i>Enterobacterium</i> spp. I	1.776	27
	Another I	1.876	37

a) Optical density of bacteria growth was measured at 660nm with a reference to non-inoculation control.

도와 myclobutanil 分解率을 調査한 結果 表 4에 나타낸 바와 같다.

Myclobutanil 10ppm 添加培地에서의 供試菌株의 增殖程度는 *Streptococcus*屬 I을 除外한 其他菌株間에 差異가 없었으며, 供試菌株의 分解率은 公히 20% 以上の 比較的 높은 分解率을 나타냈고, 특히 그람陽性細菌에서 *Staphylococcus*屬 I과 그람陰性細菌

에서는 *Actinobacillus*屬 III과 其他 屬 I에서 各各 39%, 35%, 37%로 比較的 높은 分解率을 보였다. 菌株의 增殖程度와 myclobutanil分解率과 서로 比較해 볼 때 增殖量의 增加에 따라서 分解率이 增加하는 것으로는 보이지 않는데, 이는 各 菌株의 活性이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

4. 分解菌株의 窒素源으로서 myclobutanil 利用性

表 4의 myclobutanil 分解力實驗 結果에서 比較의 높은 分解率을 보였던 그람陽性細菌 *Staphylococcus* 屬 I과 그람/性細菌 *Actinobacillus* 屬 III와 其他 屬 I이 myclobutanil를 窒素源으로 利用하는지의 與否를 調査할 目的으로 myclobutanil를 添加하지 않은 無機鹽 培地區를 對照區로 使用하였고, NaNO₃ 대신에 myclobutanil를 添加한 無機鹽培地區 및 NaNO₃ 와 myclobutanil를 모두 添加한 無機鹽 培地區에 供試 3菌株를 各各 接種하여 7日 뒤에 試料를 採取한 다음 NaNO₃添加區에서는 NO₃-N 利用率, myclobutanil處理區에서는 分解率을 各各 調査한 結果를 表 5에 나타내었다.

Staphylococcus 屬 I, *Actinobacillus* 屬 III, 其他 屬 I의 對照區에서의 NO₃-N利用率은 各各 29%, 21%, 35%이었으며 NaNO₃와 myclobutanil을 함께 添加한 實驗區에서의 NO₃-N利用率은 各各 44%, 55%, 45%로 對照區보다 더 많은 NO₃-N를 利用하였으며, NaNO₃대신에 myclobutanil만 添加한 區에서의 myclobutanil의 分解率은 各各 40%, 32%, 38%이었으

며 NaNO₃와 myclobutanil을 함께 添加한 實驗區에서의 myclobutanil分解率은 各各 47%, 37%, 45%로 NaNO₃대신에 myclobutanil만 添加한 實驗區보다 約 干 높은 水準이었다. 結局 供試 3菌株 모두 NO₃-N의 利用率과 비슷한 水準의 myclobutanil 分解率로 보아 myclobutanil를 窒素源으로 利用하는 것으로 判斷된다.

5. 分解菌株의 炭素源으로서 myclobutanil 利用性

前 實驗에서 供試했던 3菌株가 炭素源으로서 myclobutanil을 利用하는지의 與否를 調査할 目的으로 myclobutanil를 含有하지 않은 無機鹽培地區 (對照區), glucose 대신에 myclobutanil를 添加한 無機鹽培地區, glucose와 myclobutanil를 함께 添加한 無機鹽培地區에 3菌株를 各各 接種하여 7日間 培養 後 glucose 添加區에서는 glucose 利用率, myclobutanil 添加區에서는 myclobutanil의 分解率을 各各 調査한 結果는 表 6에 나타낸 바와 같다.

無機鹽만을 使用한 對照區에서의 glucose利用率은 *Staphylococcus* 屬 I이 40%, *Actinobacillus* 屬 III이

Table 5. Utilization of fungicide myclobutanil as a nitrogen source by soil bacteria.

Composition of culture media	<i>Staphylococcus</i> spp. I		<i>Actinobacillus</i> spp. III		Another I	
	Utilization Percentage of NO ₃ -N (%)	degradation (%)	Utilization Percentage of NO ₃ -N (%)	degradation (%)	Utilization Percentage of NO ₃ -N (%)	degradation (%)
Inorganic salt medium with NaNO ₃ and without myclobutanil	29	—	21	—	35	—
Inorganic salt medium with myclobutanil and without NaNO ₃	—	40	—	32	—	38
Inorganic salt medium with both myclobutanil and NaNO ₃	44	47	55	37	45	45

Table 6. Utilization of fungicide myclobutanil as a carbon source by soil bacteria.

Composition of culture media	<i>Staphylococcus</i> spp. I		<i>Actinobacillus</i> spp. III		Another I	
	Utilization of NO ₃ -N (%)	Percentage of degradation (%)	Utilization of NO ₃ -N (%)	Percentage of degradation (%)	Utilization of NO ₃ -N (%)	Percentage of degradation (%)
Inorganic salt medium with glucose and without myclobutanil	40	—	20	—	55	—
Inorganic salt medium with myclobutanil and without glucose	—	39	—	32	—	36
Inorganic salt medium with both myclobutanil and glucose	74	49	34	36	72	46

20%, 其他 屬 I이 55%이었고, myclobutanil과 glucose를 함께 添加한 實驗區에서의 glucose利用率은 各各 *Staphylococcus*屬 I이 74%, *Actinobacillus*屬 III이 34%, 其他 屬 I이 72%로써 對照區보다 높았다. glucose대신 myclobutanil添加 無機鹽培地에서의 myclobutanil의 分解率은 各各 *Staphylococcus*屬 I이 39%, *Actinobacillus*屬 III이 32%, 其他 屬 I이 36%이었으며, glucose와 myclobutanil을 함께 添加한 實驗區에서 myclobutanil의 分解率은 各各 *Staphylococcus*屬이 49%, *Actinobacillus*屬이 36%, 其他 屬 I은 46%로 glucose대신 myclobutanil만 添加한 培地에서 더 많은 分解率을 보였다. 以上の 結果를 綜合해 볼 때, 供試 3菌株 모두 myclobutanil을 炭素源으로 利用하는 것으로 判斷된다. Imai 等¹⁴⁾은 除草劑 molinate 그리고 Oyamada 等¹⁹⁾은 除草劑 chlornitrofen을 分解하는 微生物을 各各 分離하여 이들 微生物이 各 除草劑들을 에너지源으로 利用하는지를 研究한 結果 單一 炭素源으로 利用하지는 못하였으나 그 培地에 補充한 다른 炭素源을 必要로 하였다는 報告와 Katayma 等¹⁷⁾이 行한 殺菌劑 ch-

lorothalonil의 分解菌들 中 *Flavobacterium*屬 2菌株가 이 藥劑를 唯一한 炭素源 및 窒素源으로 利用하였다는 報告를 本 研究結果의 myclobutanil 分解菌이 myclobutanil을 單一 窒素源이나 單一 炭素源으로 利用하였다는 結果과 比較해 볼 때 서로 相異한 結果로써 이는 分解菌의 種類과 藥劑의 種類에 따라서는 差異가 나고 있는 것이라 생각된다.

6. Myclobutanil 反覆處理에 따른 myclobutanil 分解樣相과 細菌增殖量 變化

分解率이 比較的 좋았던 3菌株에 대해 myclobutanil反/處理에 따른 myclobutanil의 分解率과 細菌增殖量 變化를 調査한 結果는 表 7에 나타난 바와 같다.

供試 3菌株가 各各 接種된 NB培地에 myclobutanil을 1回 處理後 5日 뒤 調査한 分解率과 2回 處理後 5日 뒤 調査한 分解率을 보면 23-28% 範圍로 差異를 認定 할 수 없었으나, 3回 處理後 5日 뒤에 調査한 分解率은 59-65%로 急激한 分解가 일어났

Table 7. Effect of repeated application of myclobutanil on degradation of myclobutanil by bacteria and their growth.

Strains of bacteria	Percentage of degradation(%)			Degree of growth(O.D. value) ^{a)}			
	Numbers of application			Days after inoculation			
	once	Twice	Three-time	0	5	10	15
<i>Staphylococcus</i> spp. I	26	28	65	0.786	1.178	1.532	1.984
<i>Actinobacillus</i> spp. III	23	25	65	0.789	1.038	1.396	2.000
Another I	28	23	59	0.787	1.230	1.569	1.967

a) Optical density(O.D.) was measured at 660nm.

다.圃場實驗에서 많은 農藥들은 反覆處理함으로써 分解速度가 빨라졌으며¹⁷⁾, IBP^{®)}, Fenitrothion^{®)}의 分解도 反覆處理에 의해 促進되었다고 報告되고 있으나 本 實驗結果에서 myclobutanil의 境遇 3回 處理시 急激히 分解되었고 1回 處理와 2回 處理사이에 遲延現狀(lag-phase)이 나타나고 있어 既 報告와 多少 差異를 보였다.

7. pH의 差異에 따른 myclobutanil 分解力과 細菌 增殖 樣相

比較的 分解能이 優秀했던 3菌株에 대해 pH 差

異에 따른 分解率과 細菌 增殖程度를 檢討하기 위해 農藥이 添加된 NB培地에 각 菌을 一定量씩 接種한 다음 5日後 調査한 分解率과 細菌增殖量은 그림 1에 나타낸 바와 같다. 供試 3菌株 公히 myclobutanil 分解率은 程度의 差異는 있으나 pH가 낮을 수록 저조하였다. 즉 pH 5.5에서 가장 낮은 分解率을 나타냈으며 pH 8.5에서 가장 높았고, 3菌株 中에서 *Actinobacillus*屬 I이 각 pH에서 가장 높은 分解率을 나타냈다.

pH 가 다른 mylovutanil 添加 NB培地에서 供試 菌株들의 增殖量은 菌株에 따라 그 程度의 差異가 있기는 하나 pH 5.5에서 가장 낮았고, 다음은 pH

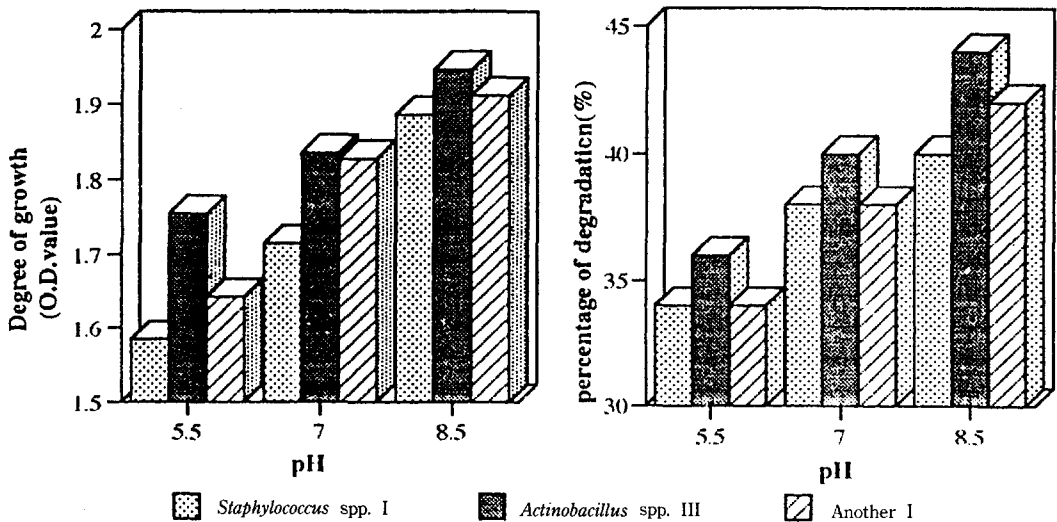


Fig. 1. Effect of pH on growth of soil bacteria(left) and myclobutanil degradation(right).

7.0이었으며, pH 8.5에서 가장 높은 增殖量을 보였고, 3菌株中 各 pH에서 增殖量은 *Actinobacillus*屬 III이 가장 많았고, *Staphylococcus*屬 I은 적었다.

以上の 實驗結果로 볼 때, 結局 pH가 다르면 微生物의 生育程度가 달라짐으로써 myclobutanil의 分解程度의 差異가 나고 있음을 알 수 있었다. 土壤細菌은 中性이나 알칼리條件에서 活動이 旺盛하다고 하였는 바⁴⁾ 本 實驗의 供試菌株 모두 pH 5.5에서보다 pH 7.0과 8.5에서 增殖量이 높아 類似한 結果를 보였으나, Ozaki 等²¹⁾은 土壤 pH를 7로 調節하였을 때 *Pseudomonas putida*에 의한 isiouron의 分解速度가 빨라졌다고 하였고, 本 實驗 結果의 境遇 pH 7보다는 pH 8.5에서 더 많은 分解를 나타내고 있어 多少 差異를 나타내고 있는데 이는 殺菌劑의 種類와 菌의 種類가 서로 다른 데에 原因이 있다고 생각된다.

8. 溫度 差異에 따른 myclobutanil 分解力과 細菌增殖 樣相

農藥이 添加된 NB 培地에 供試菌株를 一定量씩

接種하여 18℃, 28℃ 및 38℃의 恒溫器에서 5日間 培養한 다음 試料를 採取하여 分解率과 細菌增殖程度를 調査한 結果는 그림 2와 같다.

전반적으로 供試 3菌株 公히 28℃에서 가장 높은 myclobutanil 分解率과 細菌 增殖量을 나타냈고, 다음은 18℃에서 分解率과 增殖量이 높았으며, 38℃에서 가장 낮은 分解率과 增殖量을 보였다. 以上の 結果에서 菌의 增殖量이 많으면 myclobutanil의 分解率이 높아지는 것을 알 수 있었다. 一般의으로 높은 溫度에서 農藥의 分解가 빠른 것으로 報告하고 있으나^{8,9)} 本 實驗에서 myclobutanil의 分解率은 28℃ > 18℃ > 38℃의 順을 빠른 것으로 나타나 多少 差異가 있는데, 이는 農藥의 種類와 分解微生物의 種類에 따라서 溫度의 影響이 다르게 나타날 수 있음을 示唆한 結果라 생각된다.

9. 接種量에 따른 myclobutanil 分解率과 細菌增殖 樣相

農藥 10ppm이 添加된 NB培地에 各 菌株의 O.D 값이 0.5, 1.0, 1.5로 調節한 菌夜을 一定量씩 接種한

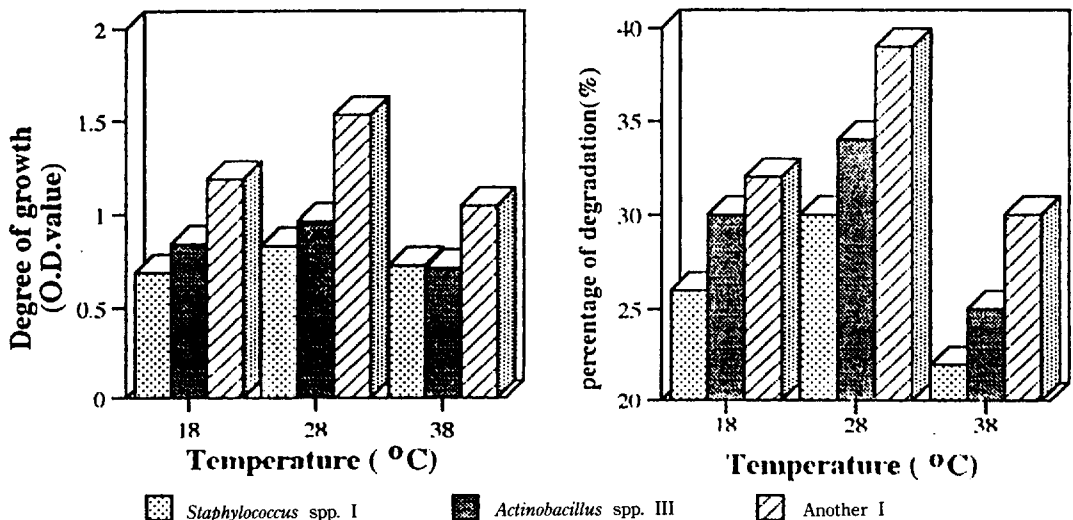


Fig. 2. Effect of temperature on growth of soil bacteria(left) and myclobutanil degradation(right).

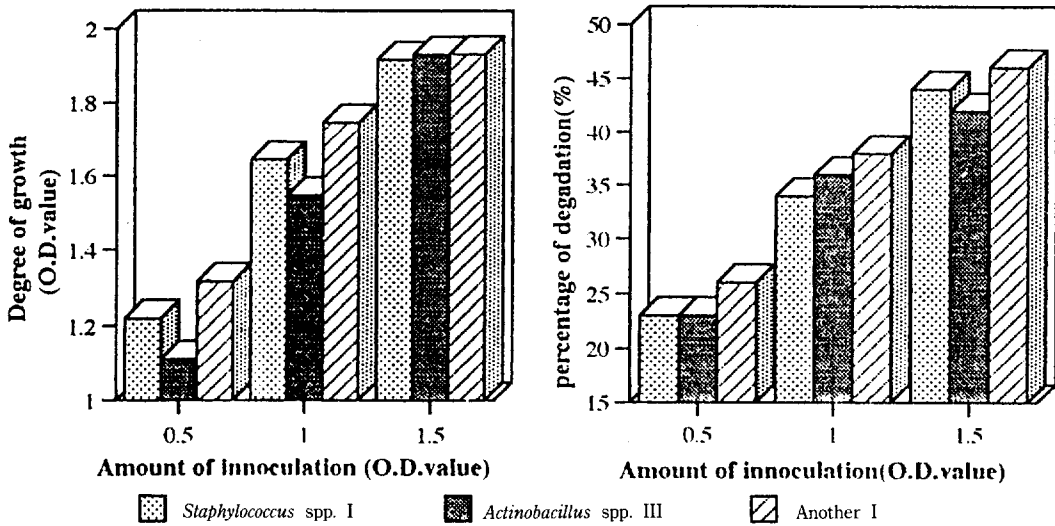


Fig. 3. Effect of inoculation amount on growth of soil bacteria(left) and myclobutanil degradation (right).

後 28℃에서 5日間 培養한 試料를 採取하여 分解率과 세균증식량을 調査한 結果를 그림 3에 나타내었다. 供試 3菌株의 分解率은 接種量이 O.D값으로 0.5에서 23~26% 範圍였으나 接種量 1.0에서는 34~38%이었고, 接種量 1.5에서는 42~46%範圍였다.

한편, 供試 3菌株의 増殖量(O.D 값)도 接種量 0.5에서 1.112~1.316範圍였고, 接種量 1.0과 1.5에서 각각 1.546~1.746 및 1.917~1.932範圍의 増殖量(O.D 값)을 나타냈다. 以上の 結果 본 實驗의 供試 3菌株 公히 接種量이 많으면 많을 수록 myclobutanil의 分解率도 높고 増殖量도 많았다.

要 約

土壤細菌에 의한 myclobutanil의 分解力과 그들의 分解特性을 究明하고자 農藥無處理 土壤으로 부터 數種의 菌株를 分離固定하고 이들 細菌의 myclobutanil 分解力과 myclobutanil에 대한 耐性を 調査하였으며, 分解能이 比較的 좋은 細菌에 대한 myclobutanil의 分解特性, 즉 窒素源 혹은 炭素源으로서의

myclobutanil利用性 그리고 myclobutanil 反覆處理, pH, 溫度 및 接種量의 差異에 따른 myclobutanil의 分解와 細菌増殖 樣相을 調査하였다.

供試土壤으로 부터 分離하여 屬까지 分類한 細菌은 그람陽性細菌이 *Corynebacterium*屬, *Listeria*屬, *Staphylococcus*屬, *Streptococcus*屬 등 各 1菌株씩이었고 그람陰性細菌로는 *Actinobacillus*屬 3菌株와 *Enterobacterium*屬 및 其他 屬 各 1菌株씩이었다. 이들 細菌들의 myclobutanil에 대한 生存力 實驗에서 供試菌株 모두 55ppm까지는 旺盛한 生育을 보였고, 70ppm 以上에서는 生育이 微弱하거나 不能이었다.

供試 菌株중 35% 以上 myclobutanil分解能力을 가진 細菌은 *Staphylococcus*屬 I, *Actinobacillus*屬 III 및 其他 屬 I이었고 이들 3菌株는 myclobutanil을 單一 窒素源 또는 單一 炭素源으로 利用하는 것으로 나타났다. 이들 3菌株 모두 myclobutanil을 1回處理와 3回反覆處理時 迅速하게 分解하였고, 菌의 生育은 反覆處理함에 따라 점점 增加되었다. 한편 上記한 3菌株의 myclobutanil分解率과 菌増殖量은 pH 5.5에서 8.5로 높아질수록 그리고 接種量이 많아질수록

를 增加하였고, 이 菌株들의 溫度差異에 따른 myclobutanil 分解率과 菌增殖程度는 $28^{\circ}\text{C} > 18^{\circ}\text{C} > 38^{\circ}\text{C}$ 의 順으로 높았다.

參考文獻

1. Cheng, H. H. (1990). Pesticides in the soil environment ; processes, impacts and modeling. Doil Science Soceiety of America : 429-466.
2. Guenzi, W. D. (1974). Pesticides in soil and water. Soil Science Society of America : 1-562.
3. Guth, J. A. (1980). "Interaxtions between herbicide and the soil," ed. by R. J. Hance. Academic Press, London : 123-158.
4. Hill I. R. and S. J. L Wright. (1978). Pesticide microbiology. Academic Press, London : 79-136.
5. Torstensson, L. (1980). Interactions between herbicides and the soil, ed. by R. J. Hance. Academic Press, London : 159-178.
6. 韓成洙, 崔讚奎, 鄭載勳, 白承和. (1995). 環境差異에 따른 밭土壤中 殺菌劑 myclobutanil의 殘留 및 土壤微生物相 變化. 韓國環境農學會誌. **14**(1) : 28-44.
7. 韓成洙, 鄭載勳, 崔讚奎. (1994). 環境條件 差異에 따른 밭土壤中 除草劑 napropamide의 殘留 및 土壤微生物相 變化, 韓國雜草學會誌. **14**(4) : 298-313.
8. 文永熙. (1990). 湛水土壤중에 있어서 殺蟲劑 fenitrothion의 分解速度에 미치는 各種 環境條件의 影響. 韓國環境農學會誌. **9**(1) : 1-8.
9. 文永熙. (1990). 湛水중에 있어서 殺菌劑 IBP의 分解速度에 미치는 各種 環境條件의 影響, 韓國農化學會誌. **33**(2) : 133-137.
10. Tyunyaeva, G. N. Minenko, A. K. and Penkov, L. A. (1974). The effect of treflan on the biological properties of soil. Agro Khimiya No. 6 : 110-114.
11. Imai, Yasufumi and Shozo Kuwatsuka. (1989). Characteristis of paraquat-degrading microbes. *J. Pesticide Sci.* **14** : 475-480.
12. Imai, Yasufumi, and Shozo Kuwatsuka. (1986). Characteristics of microfora degrading the herbicide molinate in soil. *J. Pesticide Sci.* **11** : 57-63.
13. Imai, Yasufumi and Shozo Kuwatsuka. (1986). The mode of metabolism of the herbicide molinate by four of microorganisms isolated form soil. *J. Pesticide Sci.* **11** : 111-117.
14. Imai, Yasufumi and Shozo Kuwatsuka. (1986). Metabolic pathways of the herbicide molinate in four strains of isolated soil microorganisms. *J. Pesticide Sci.* **11** : 245-251.
15. Itoh, Kazuhito. (1991). Characteristics of microflora degrading insecticide salithon in soil. *J. Pesticide Sci.* **16**(1) : 77-83.
16. Itoh, Kazuhito. (1991). Stereoselective metabolism of insecthion by *Agrobacterium* sp. and *Acinetobacter* sp. isolated from soil. *J. Pesticide Sci.* **16** : 86-91.
17. Katayama, Arata, Hrosh Isemura and Shozo Kuwatsuka. (1991). Population change and characteristics of chlorothalonil-degrading bacteria in soil. *J. Pesticide Sci.* **16**(2) : 239-245.
18. Oyamada, Masami and Shpzo Kuwatsuka. (1990). Degradation of the herbicide naproanilide and its hydrolyzed product in perfused soil and by a bacterium isolated from soil. *J. Pesticide Sci.* **15** : 81-87.
19. Oyamada, Masami and Shozo Kuwatsuka. (1989). Microbiai metabolism of the herbicide chloronitrofen and it's amino derivative. *J. pesticide Sci.* **14** : 329-335.
20. Ozaki, Mamoru, Yoshimi Tanaka, and Shozo Kuwatsnka. (1986). Degradation of isouron in

- Soils. *J. Pesticide Sci.* **11** : 223-229.
21. Ozaki, Mamoru and Shozo Kuwatsuka. (1986). Reproductive degradation of the herbicide isouron and its related compounds by *Pseudomonas putida*. *J. Pesticide Sci.* **11**(3) : 427-432.
22. Cowan, S. T. and K. J. Steel. (1974). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, Cambridge University Press : 1-186.
23. 農村振興廳 農業技術研究所. (1988). 土壤化學分析法. 農業技術研究所 : 62-63.
24. 鄭東孝, 張賢基. (1988). 食品分析, 進路研究所 : 179.
25. Han, S. S. (1995). Isolation and Characteristics of soil bacteria degrading herbicide napropamide. Proceedings I(B) of 15th Asian-Pacific Weed Science Society Conference : 834-839.