

토양에서 분리한 수종 세균의 농약분해력 검정 및 동정

박경훈* · 이영기¹ · 이수현¹ · 박병준 · 김찬섭 · 최주현 · 임재열²

농업과학기술원 농산물안전성부, ¹농업과학기술원 농업생물부, ²경북대학교 농생물학과

요약 : 농약분해에 관여하는 세균을 분리하기 위하여 연작지 시설하우스 토양 및 밭토양시료에서 procymidone, parathion, alachlor에 대해 생육저해를 받지 않는 12개의 균주를 분리한 후, 이들을 표준사용농도 및 그 1/10의 농도가 함유된 배지 상에서 가장 생육이 왕성한 2균주, B52 및 B71을 선발하여 농약 분해능을 조사하였다. 선발된 분리균을 6종의 농약(procymidone, chlorothalonil, ethoprophos parathion, alachlor, pendimethalin)이 40 mg a.i. L⁻¹의 농도로 함유된 TSB배지에서 분해율을 조사한 바, 대조구에 비해 분리균 B52는 최고 53.2%, 분리균 B71은 25.0%의 차이를 보여 분리균이 농약을 분해하는 것으로 나타났고 특히 procymidone, parathion, alachlor에 대한 분해율이 높았다. 이들 3종 농약의 농도에 따른 분해율의 변화를 조사한 결과 5~40 mg a.i. L⁻¹까지는 균의 생육이 왕성하였고 농약의 분해율도 높았으나 그 이상에서는 농약의 종류에 따라 차이가 있었으나 대체로 균의 생육과 분해율이 낮아지는 경향이 있었다. 배양일수별 분해율의 변화는 농약의 종류 및 균주에 따라 다양한 양상을 나타내었는데, B59는 parathion을 6일간의 배양으로 거의 분해하였고 procymidone과 alachlor는 배양 21일까지 거의 비슷한 속도로 분해되었다. 배양액의 pH는 농약의 분해와는 거의 상관없이 pH 5 이상에서는 거의 차이가 없었고 pH 4에서는 균이 거의 생육하지 못했으므로 분해율 또한 매우 낮았다. 선발균은 형태적, 생리생화학적 특성 및 미생물 동정장치를 이용하여, B59는 *Acinetobacter* sp. B71은 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. (2006년 3월20일 접수, 2006년 6월 20일 수리)

색인어 : 농약분해, 세균, alachlor, parathion, procymidone.

서 론

농약은 농업에 있어서 필수 영농자재로서 우리나라에서는 1990년부터 해마다 24,000~25,000톤씩 농경지에 살포되어 농산물의 품질향상과 수량증대에 많은 공헌을 하였다. 그러나 농약은 안전한 농산물의 생산에 크게 기여해 온 것과는 반대로 그 고유의 독성으로 인하여 사용된 농약이 목표로 하는 특정 병해충이나 잡초를 방제한 후에는 신속히 분해되어야만 인축과 환경에의 부작용을 최소화할 수 있다.

작물에 살포된 농약은 10~20%만이 작물에 부착되며, 나머지는 토양에 떨어져 다시 작물에 흡수되거나 토양 중에 잔류되며, 일부는 토양수에 의하여 수계로 운반되거나 바람 등의 환경요인에 의하여 공중 전파되거나 다시 토양이나 수계로 운반되는 순환과정을 거친다(박 등, 1993). 이처럼 농약은 자연계를 순환하면서 분해 소실되는데, 토양 중에서는 분해, 휘발, 흡착, 용탈이 이루어진다. 이러한 토양 중의 농약의 동

태는 화학구조, 농도, 제형, 토양형, 유기물함량, 토양 pH, 무기이온, 통기성, 기후조건, 표층의 식생, 미생물 상 등에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(정과 박, 1990). 따라서 살포되는 많은 부분의 농약은 토양에 집적하게 되며 집적된 농약의 토양 중에서의 행동양상을 파악하는 것은 토양환경의 보전뿐만 아니라 잔류농약의 위해정도를 평가하는데 귀중한 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

Procymidone은 dicarboximide계 살균제로서 *Botrytis* sp., *Sclerotinia* sp.와 *Monilia* sp. 등의 식물병원균에 작용하여 triglyceride의 합성을 저해하거나 균사의 신장을 억제시키는 약제이다(Tomlin, 1994). 또한 이 약제는 저독성으로서 우리나라에서는 잣빛곰팡이병약으로(농약공업협회, 2005) 딸기 등 여러 작물에 등록되어 광범위하게 사용되고 있으나 최근 무분별한 사용으로 수확한 농산물에서 잔류기준을 초과하여 식품안전에 문제시되고 있는 농약이지만 연용한 토양에서는 산화 및 가수분해에 의하여 분해가 잘 되는 것으로 알려져 있다.

*연락저자

Parathion은 해충의 cholinesterase를 저해하는 유기인계 살충제로서 원제의 급성경구독성(LD₅₀)이 2 mg kg⁻¹(rat)의 맹독성으로(Tomlin, 1994) 제품에서는 성분량을 17%이하로 낮추어 사과 잎말이나방 등의 방제용으로 사용되고 있다(농약공업협회, 2005). 건조한 토양조건에서는 분해가 매우 느리지만 담수상태에서 잘 분해되며, 유기물이 많은 조건이면 더 신속히 분해되는 것으로 알려져 있다. 환원상태의 논에서는 amino-parathion과 *p*-aminophenol로 분해되고 더 나아가 nitrate와 CO₂로까지 분해된다(Munnecke와 Asih, 1974). 또 산화상태의 발상태에서는 *p*-nitrophenol과 diethylthiophosphoric acid로 가수분해된다(Ou, 1984). *Pseudomonas*속(Rosenberg와 Alexander, 1979), *Bacillus*속(Ou와 Sharma, 1989), *Flavobacterium*속(Lewis 등, 1985)의 미생물이 parathion에 대한 분해력이 있는 것으로 보고되어 있고, 국내에서도 김 등(1991)에 의해 토양시료에서 parathion을 분해하는 *Bacillus*속 세균을 선발한 바 있다.

Alachlor는 amide계 제초제로 일년생 잡초의 발아를 억제하는 제초제이며(농약공업협회, 2005) 잡초의 유아, 유근으로부터 흡수되어 체내 단백질의 생합성을 저해함으로 세포분열을 억제하여 살초효과를 나타낸다(Tomlin, 1994). 토양 중 분해는 주로 미생물에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있다. Smith와 Phillips(1974)는 배지에 sucrose를 첨가했을 때 *Rhizoctonia solani*에 의해서 alachlor 분해가 촉진되었으나 탄소원이나 질소원으로 이용하지는 못하는 것으로 보고하였다. 또한 Tjedje와 Hagedorn(1975)은 *Chaetomium*속에서, 이(1984)는 *Streptomyces*속, *Bacillus* 속 및 *Pseudomonas*속에서 alachlor 분해미생물을 분리하고 이들에 의한 분해산물을 밝혀내어 분해경로를 추정한 바 있다. 특히 국내에서 사용되고 있는 이 약제는 내분비계 장애물질(EDs ; Endocrine Disrupter substances)로 알려져 관심이 고조되고 있는 약제이다(국립환경연구원, 1998).

이 연구에서는 우리나라에서 많이 사용되는 살균제 procymidone과 살충제 parathion 및 제초제 alachlor에 대해 분해력이 있는 토양세균을 선발하여 각종 농약의 분해효과, 분해에 미치는 환경요인을 조사하였으며, 특히 농약의 분해능이 높은 미생물을 동정하였다.

재료 및 방법

세균 분리

농약 분해균주를 선발하기 위하여 경기도 지역 10개소의 시설하우스와 밭에서 각각 30점씩의 토양시료를 채취하였다. 토양시료 1 g씩을 멸균증류수 9 mL에 넣고 진탕한 후 10⁻⁵, 10⁻⁷배로 순차적으로 희석하였다. 멸균한 TSA(Tryptic soy agar, Difco, 3 g tryptic soy broth, 15 g agar)배지에 3종의 시험농약(procymidone, parathion, alachlor)을 각각 40 mg a.i. L⁻¹가 되도록 첨가, Petri dish에 20 mL씩 분주하여, 상기의 토양 희석액 0.1 mL 씩을 도말, 28°C에서 2~3일간 배양하여 형태적으로 상이한 278개(procymidone, 153; parathion, 50; alachlor, 75)의 colony를 분리하였다. 분리된 세균은 1/10 TSA에서 순수분리 과정을 거쳐 10% glycerol을 첨가하여 -80°C에서 동결보존하면서 실험에 사용하였다.

균주 선발

균주선발은 2차에 걸쳐서 수행하였는데, 1차 선발은 표준사용농도의 procymidone, parathion, alachlor가 함유된 1/10 TSA 배지에 세균현탁액을 10 µL씩 점적, 28°C에서 2일간 배양 후 생장력이 왕성한 12균주를 선발하였다. 접종원으로 사용한 278개의 세균은 1/10 TSA배지에서 48시간 배양하였으며, 농도는 멸균증류수에 현탁하여 10⁸ CFU mL⁻¹의 농도로 조절하였다. 2차 선발에서는 1차에서 선발된 12균주를 3종의 농약을 포함하여 12종의 약제(살균제, chlorothalonil, edifenphos, procymidone, IBP; 살충제, ethoprophos, parathion, phenthoate; 제초제, alachlor, butachlor, molinate, pendimethalin, thiobencarb)에 대하여 표준사용농도와 이의 1/10 농도에서 전술한 방법으로 접종하여 생장력이 왕성한 2균주를 선발하였다.

선발균주의 농약분해력 조사

시험에 사용된 농약은 살균제 2종, 살충제 2종, 제초제 2종을 포함하여 6종으로 제품은 시중에서 구입하였고, 원제는 농업과학기술원에서 분양받았다. 제품으로 사용한 약제는 procymidone 수화제(a.i. 50%), parathion 유제(a.i. 17%), pendimethalin 유제(a.i. 31.7%)이며 원제로 사용한 약제는 chlorothalonil(a.i. 85%), ethoprophos(a.i. 90%), alachlor(a.i. 93%)이었다. 삼각플라스크(250 mL)에 TSB(Tryptic soy broth, tryptone 17 g, soytone 3 g, dextrose 2.5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, distilled water 1000 mL, pH 7.0)배지를 100 mL씩 분주, 멸균한 후, 이들 농약의 최종농도가 40 mg a.i. L⁻¹가 되도록 무균적으로 첨가하고 전술한 방법으로

Table 1. GLC conditions used for analysis of pesticide

Instrument	HP 5890 series II gas chromatograph
Autosampler	Model 7673 (Hewlett Packard, USA)
Detector	ECD (Electron Capture Detector, ^{63}Ni)
Column	1.5% OV-17 and 1.95% OV-210 (2 mm i.d.×2 m), Chrom W HP (80-100 mesh)
Temperature	Injection port 230°C Column 200°C (180°C in case of ethoprophos) Detector 270°C
Gas flow rate(N ₂)	40 mL min ⁻¹
Sample volume	1 µL

조제한 접종원을 1 mL씩 접종, 다시 12일간 진탕배양(28°C, 150 rpm)하면서 농약 분해율을 조사하였다.

농약농도별 선발균주의 농약분해

농약농도를 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 mg a.i. L⁻¹로 조정하여 TSB배지에 공시한 2균주를 접종, 앞서의 방법과 동일하게 21일간 배양하면서 농약분해율을 조사하였다.

배양액중의 농약분해율 측정

공시균주에 의한 배양액 중 농약의 분해율을 측정하기 위하여 Screw-capped tube에 배양액 1 mL를 취하고 여기에 hexane 10 mL 및 포화식염수 1 mL를 첨가, 3분간 초음파 처리(Branson 8200), 이를 다시 3분간 격렬하게 진탕한 후, hexane층을 분리, 여기에 무수황산나트륨 1 g을 첨가하여 수분을 제거하고 적당량 희석하여 GLC(Gas Liquid Chromatograph)분석을 하였다. 본 실험에서 사용한 각 농약의 기기분석조건은 표 1과 같다.

분석조건에서 GLC column 온도가 200°C일 때 농약의 retention time은 procymidone 6.1분, chlorothalonil 3.0분, parathion 4.4분, alachlor 2.9분, pendimethalin 4.7분이었고, ethoprophos는 column 온도가 180°C에서 약 2.2분이었으며, 배양액 중에서의 농약 회수율은 78~96% 수준이었다.

배양일수별 농약분해와 균증식

선발된 2균주를 procymidone, parathion 및 alachlor가 40 mg a.i. L⁻¹ 함유된 TSB 배지에 접종, 진탕배양(28°C, 150 rpm)하면서 12일까지 3일 간격으로 농약의 분해와 균증식정도를 조사하였다. 균증식 정도는 희석평판법으로 조사하였다.

pH 변화에 따른 농약분해

TSB배지의 pH를 각각 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조정, 멸균한 후 3종의 농약(procymidone, parathion, alachlor)을 각각 40 mg a.i. L⁻¹가 되도록 첨가, 공시 2균주를 전술한 방법으로 21일간 배양하면서 배양액중 잔류하는 농약성분을 GLC로 분석하여 농약분해율을 조사하였다.

선발세균의 동정

선발된 농약 분해균의 형태적, 세균학적, 생리생화학적 특성을 後藤과 龍川(1984a, 1984b, 1984c, 1984d)의 방법으로 조사하여 Bergey's manual의 검색표(Holt 등, 1994)를 기준으로 동정하였으며, 추가로 동정 system인 GC-Fatty acid 분석기(HP 6890, Sherlock)와 Biolog system(Bio LogTM V.3.7)(Jones 등, 1993)을 이용하여 농약분해균을 동정하였다. 세균의 형태조사를 위하여 TSA 배지에서 28°C, 16시간 배양한 colony를 배지와 함께 잘라(0.5×0.5cm) 4°C의 karnovsky 고정액에서 12시간 고정된 후, 0.05M cacodylate buffer(pH 7.0)를 이용하여 20분씩 2회 세척, 1% osmic acid(OSO₄)에 2시간 동안 이중 고정된 후 증류수로 2회 세척하였다. 고정된 시료는 ethanol series와 amyl acetate에서 탈수하고 임계점 건조(Hitachi, HCP-2 Critical Point Dryer)과정을 거쳐 200~300 Å의 gold-palladium으로 coating한 후 주사 전자현미경(Hitachi S570)하에서 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

시설재배지 토양 및 발토양에서 시료를 채취하여 procymidone, parathion, alachlor가 함유된 1/10 TSA배지 상에서 생장이 양호하면서 형태적으로 상이한 총 278개의 균주가 분리되었는데, procymidone을 처리한 배지에서 분리균주의 55%, parathion에서 18%, alachlor

에서 27%의 균주를 분리하였다(표 2).

Table 2. Frequency of bacteria isolated 3 days after incubation on 1/10 TSA medium containing 40 mg a.i. L⁻¹ pesticides

Pesticide	No. of bacteria isolated	Isolation rate(%)
Procymidone	153	56
Parathion	50	18
Alachlor	75	27
Sum	273	100

미생물에 의한 농약의 분해는 미생물이 분비하는 효소에 의하여 분해되거나 복수의 균에 의한 co-metabolism으로 진행되는 경우가 많으며, 대사작용에 의해서는 농약이 미생물의 에너지원으로 이용될 뿐만 아니라 비효소적인 여러 가지 환경요인에 의하여 복합적인 영향을 받게 된다(Hill과 Wright, 1978).

Procymidone에서 많은 세균이 분리된 것은 이 약제가 토양중 미생물에 의해 쉽게 분해된다는 보고(박 등, 1993b)와 일치하는 것으로 생각되었다. 또한 3가지 농약 중에서의 분리율과 이들 농약의 포유동물에 대한 독성을 비교했을 때 독성이 가장 높은 parathion

Table 3. Growth of bacterial isolates on 1/10 TSA medium containing 12 different kinds of pesticides

Pesticide	Dosage	Degree of bacterial growth											
		B5	B27	B31	B36	B38	B52	B59	B62	B63	B71	BP1	BS1
Fungicide													
Procymidone	STD ^{a)}	+++ ^{b)}	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++ ^{c)}	+++	+++	+++	+++
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Chlorothalonil	STD	- ^{d)}	-	-	-	+ ^{e)}	++	+++	-	-	+++	-	-
	1/10	-	-	-	-	++	++	+++	-	-	+++	-	-
Edifenphos	STD	-	-	-	-	+	+	+++	-	-	+++	+	-
	1/10	+++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+	+++
IBP	STD	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	+++	++	-
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
Insecticide													
Ethoprophos	STD	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Parathion	STD	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	++	-
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
Phenthoate	STD	-	++	-	++	++	-	+++	-	-	+++	++	++
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
Herbicide													
Alachlor	STD	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	+++	+	-
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
Butachlor	STD	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-
	1/10	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++
Molinate	STD	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pendimethalin	STD	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	+++	-	-
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Thiobencarb	STD	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^{a)} STD : standard dosage, ^{b)} +++ : good, ^{c)} ++ : moderate, ^{d)} + : bad, ^{e)} - : no growth

에서의 분리율이 18%로 상대적으로 낮은 것파도 일치하는 것으로 생각되었다.

균주의 선발

토양시료로부터 분리된 278균주 중에서 농약 분해에 직접 관여하는 균주를 선발하기 위해 2차에 걸쳐 여러 가지 약제가 함유된 배지에서 생육이 양호한 균주를 선발하였다. 1차 선발에서는 procymidone, parathion, alachlor의 표준사용농도의 1/10 농도에서 생육정도가 양호한 12균주를 선발하였고, 선발된 12균주를 상기의 3종 농약을 포함한 12종 농약의 표준사용농도 및 그 1/10 농도로 함유된 배지에서의 생육정도는 표 3과 같다.

살균제 procymidone이 함유된 배지에서는 모든 균주가 잘 생육하였으나 chlorothalonil, edifenphos, IBP가 함유된 배지에서는 균주의 생육정도가 약제간 그리고 처리균주간에 차이가 많았다. 표준사용농도에서는 대부분 균주가 생육하지 못하였으며, chlorothalonil이 함유된 배지에서는 표준사용량의 1/10의 농도에서도 생육하지 못하는 균주가 있었다. 살충제의 경우, 이들 균주에 대한 생육저해정도는 parathion > phenthoate > ethoprophos 순이었다. Ethoprophos는 procymidone과 같이 전 균주의 생육에 영향을 미치지 않았다. 제초제의 경우, 생육저해정도가 butachlor > alachlor > pendimethalin > molinate = thiobencarb 순으로 나타났으며 molinate와 thiobencarb는 전 균주의 생육에 영향을 주지 못하였다. 이상에서 생육에 영향을 준 농약을 함유한 배지에서는 대부분의 균주가 표준사용농도에서 생육이 불가능하였으며, 균주에 따라 1/10 농도에서도 사멸하는 균주도 있었다. 12균주 중에서 B59와 B71이 12가지 농약의 표준사용농도에서도 생육이 양호하였으므로 이들 두 균주를 최종적으로 선발하였다. 이들은 실험에 사용된 농약에 관계없이 다양한 농약이 함유된 배지에서 생장이 양호하였으므로 약제 내성을 가지고 있거나, 농약분해능이 우수한 균주로

판단하고 농약분해정도 및 특성조사에 이용하였다.

선발균의 농약분해력 조사

선발된 2균주를 이용하여 6종의 농약분해율을 조사한 결과는 표 4와 같다. 살균제 procymidone과 chlorothalonil에 대한 B59균주의 분해율은 각각 76.7%와 96.1%로 대조구(무접종구)보다 18.9%, 22.9% 분해율이 높았으며, B71균주에서는 70.9%, 76.2%로 대조구보다 각각 13.1%와 3.0% 분해가 촉진되었다. 살충제 ethoprophos와 parathion의 경우 B59균주에서의 분해율은 대조구보다 각각 26.1%와 53.2% 높았고, B71균주에서는 0.1%와 17.0%가 더 분해되었다. 제초제 alachlor와 pendimethalin에 대한 B59균주에서 분해율이 대조구보다 각각 25.0%와 17.1%, B71균주에서는 24.1%와 5.1% 더 분해되는 것으로 나타났다.

이상에서 볼 때 두 균주 모두가 procymidone, parathion, alachlor의 분해를 촉진한 것으로 나타났는데, 이는 처음 선발할 때 이들 3종 농약을 대상으로 선정하였기 때문이라 판단되었고 B59균주가 B71균주보다 상대적으로 분해능이 높은 것으로 나타났고 특히 parathion에 대한 B59균주의 분해능이 높았다. 또한 균주에 따라 각 약제의 분해 정도에 차이가 있는 것으로 나타났는데, 이는 각 미생물의 생리작용의 차이와 약제의 구조상의 차이에서 유래된 것으로 생각되었다.

농약농도별 선발균주의 농약분해

Procymidone, parathion, alachlor를 각각 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 mg a.i. L⁻¹ 을 함유한 TSB 배지에 선발된 균을 21일간 배양시 농약분해율은 그림 1과 같다. Procymidone의 경우, B59균주는 74~89%, B71균주는 73~97%의 분해율을 보였는데 처리농도가 높아짐에 따라 분해율은 감소하였다. Parathion의 경우 B59 접종구에서 40 mg a.i. L⁻¹까지는 95% 이상이 분해되었으나 80 mg a.i. L⁻¹이상 농도에서는 분해율이

Table 4. Microbial degradation of pesticides 12days after shaking culture in TSB medium containing 40 mg a.i. L⁻¹ of each pesticides

Pesticide	Degradation rate(%)		
	B59	B71	Control
Procymidone	76.7	70.9	57.8
Chlorothalonil	96.1	76.2	73.2
Ethoprophos	38.2	12.2	12.1
Parathion	94.5	58.3	41.3
Alachlor	63.8	62.9	38.8
Pendimethalin	66.7	54.7	49.6

급격히 낮아져 320 mg a.i. L⁻¹ 농도에서는 52%의 분해율을 보였고, B71 접종구에서는 5 mg a.i. L⁻¹에서는 거의 전부 분해되었으나 10, 20, 40 mg a.i. L⁻¹에서는 70% 이상 분해되었고 80 mg a.i. L⁻¹ 이상에서는 분해율이 35%까지 낮아져 균주간 처리농도 간 분해정도가 상이함을 알 수 있다.

Alachlor의 경우 농도의 증가에 따른 두 균주간의 분해율 차이가 없이 80 mg a.i. L⁻¹까지는 분해율이 70% 이상이었으나 그 이상 농도에서는 분해율이 최고 처리농도에서 최저 59%까지 낮아졌다. 이상의 결과 세 가지 약제의 처리농도는 40 mg a.i. L⁻¹까지는 쉽게 분해되는 것으로 나타났다.

배양일수별 농약분해와 균증식

Procymidone, parathion, alachlor에 대한 배양일수별 분해율과 균증식을 조사한 결과는 그림 2와 3과 같다. Procymidone의 경우 B59접종구의 분해율은 접종 3일후 50% 이상으로 다소 급격히 상승하다가 그 이후 완만하게 상승되어 배양 21일에는 90%를 보였다. 한편 B71균주에 의해서는 배양일수가 증가됨에 따라 분해가 꾸준히 증가되어 18일에는 95%이상이 분해되었다. 대조구에서의 농약 분해는 주로 가수분해에 의한 것인데 분해율이 배양 9일에 60%까지 상승하였으나 그 이후는 거의 변화가 없었다. 대조구와 균 접종구에 있어서 배양 21일차의 분해율을 비교하면 균 접

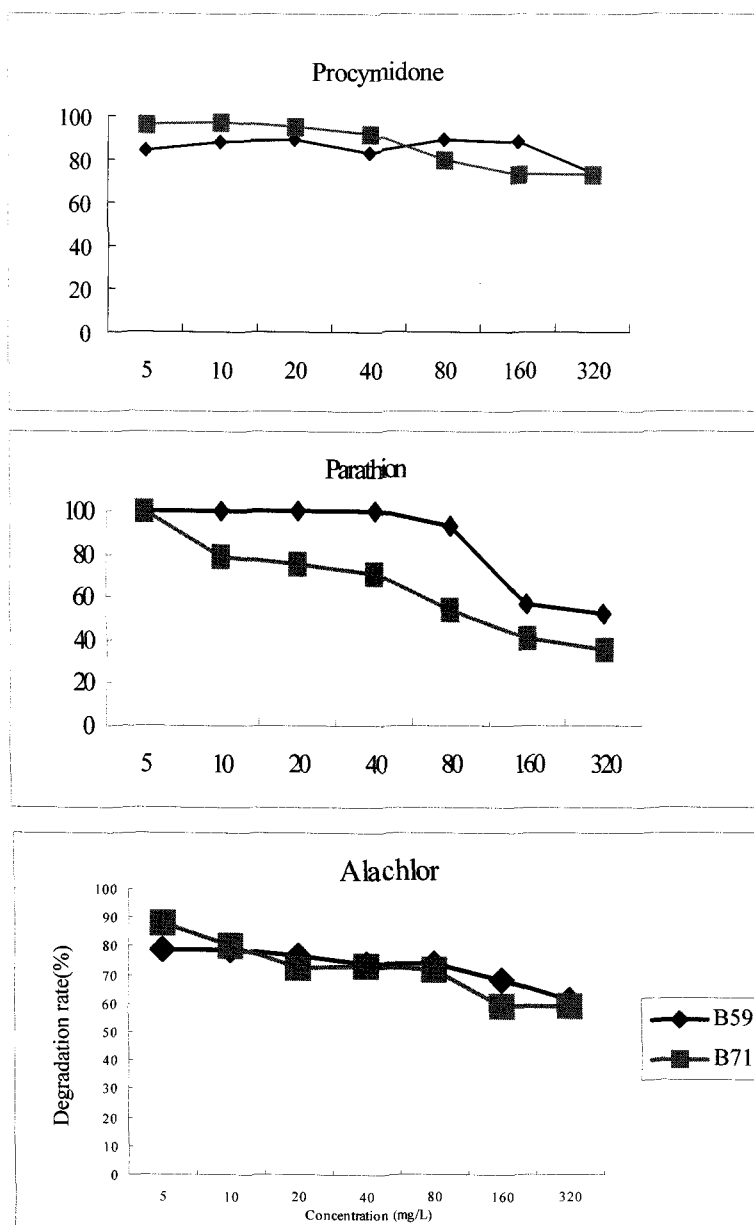


Fig. 1. Degradation rates of the chemicals by the isolates, B59 and B71, determined by culturing them for 21 days in the 1/10 TSB medium containing various concentrations of chemicals.

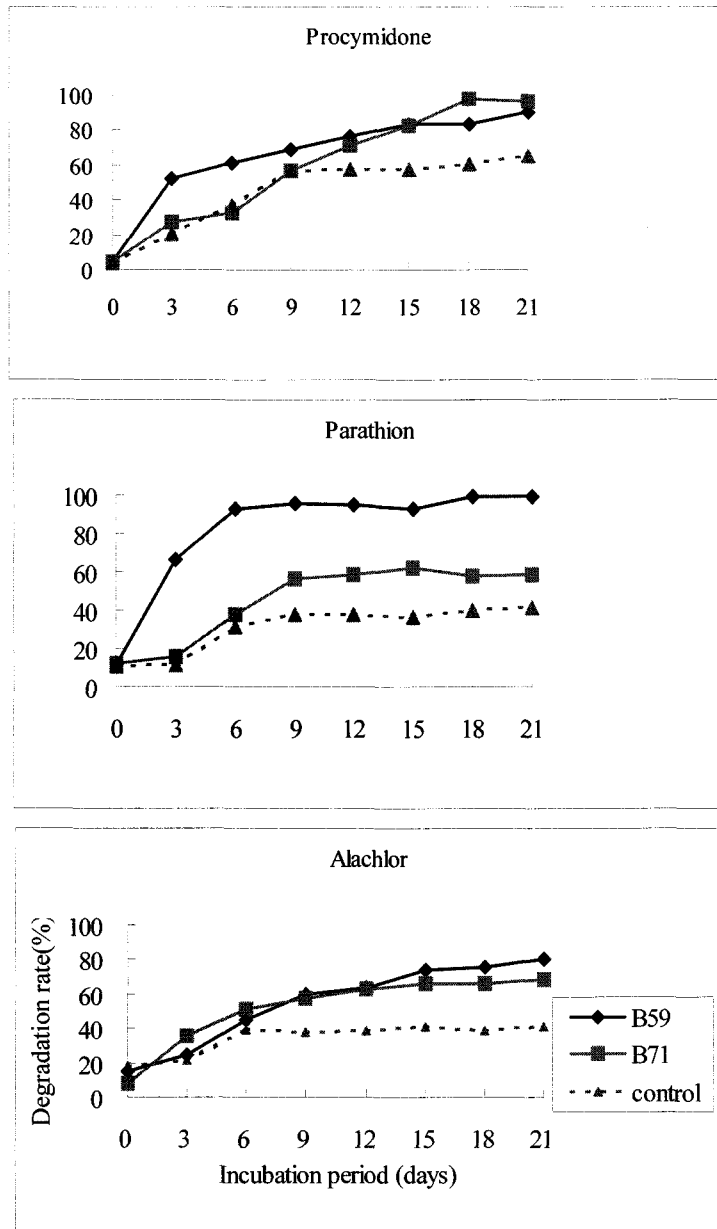


Fig. 2. Transition of degradation rates of procymidone, patathion and alachlor by the cultural period.

종구에서의 분해율이 25~31% 높았다(그림 2). Parathion은 B59균주 접종구에서 배양 직후부터 급격히 분해되어 배양 6일차에는 93%의 분해율을 보이다가 그 후 완만하게 진행되어 배양 18일차 이후에는 거의 전부 분해되었는데, 배양 6일까지의 분해속도는 6.7 mg day^{-1} 이었으며 대조구에서 가수분해에 의한 분해속도를 빼면 균에 의한 분해속도는 1.6 mg day^{-1} 이었다. 반면 B71 균주는 배양 9일차에 분해율이 38%에 이르렀고 그 이후로 완만하게 분해되었다(그림 2). 김 등(1991)은 강화배양(Enrichment culture)기술을 사용하여 무기염류 배지에 $50 \text{ mg a.i. L}^{-1}$ 의 parathion을 첨가하여 배양한 결과, $11\sim 23 \text{ mg day}^{-1}$ 로 분해되는

것으로 보고한 바 있다.

Alachlor는 배양 9일차에 B59균주 접종구는 59.6%, B71균주는 57.4%의 분해율을 보였고 배양 21일차에는 각각 80.4%와 68.8%의 분해율을 보여 대조구 41%의 분해율에 비해 28~40%의 분해촉진효과가 있었다(그림 2).

그리고 단위배양기간 중의 균의 증식을 생균수로 조사한 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 약제 간에는 생균수의 차이가 없고, 균증식이 원활한 초기에 농약 분해율이 높은 경향을 보였으며, 배양후기에는 생균수가 점차 감소했는데 균의 증식율과 농약 분해율 간에는 상관이 없는 것으로 나타났다.

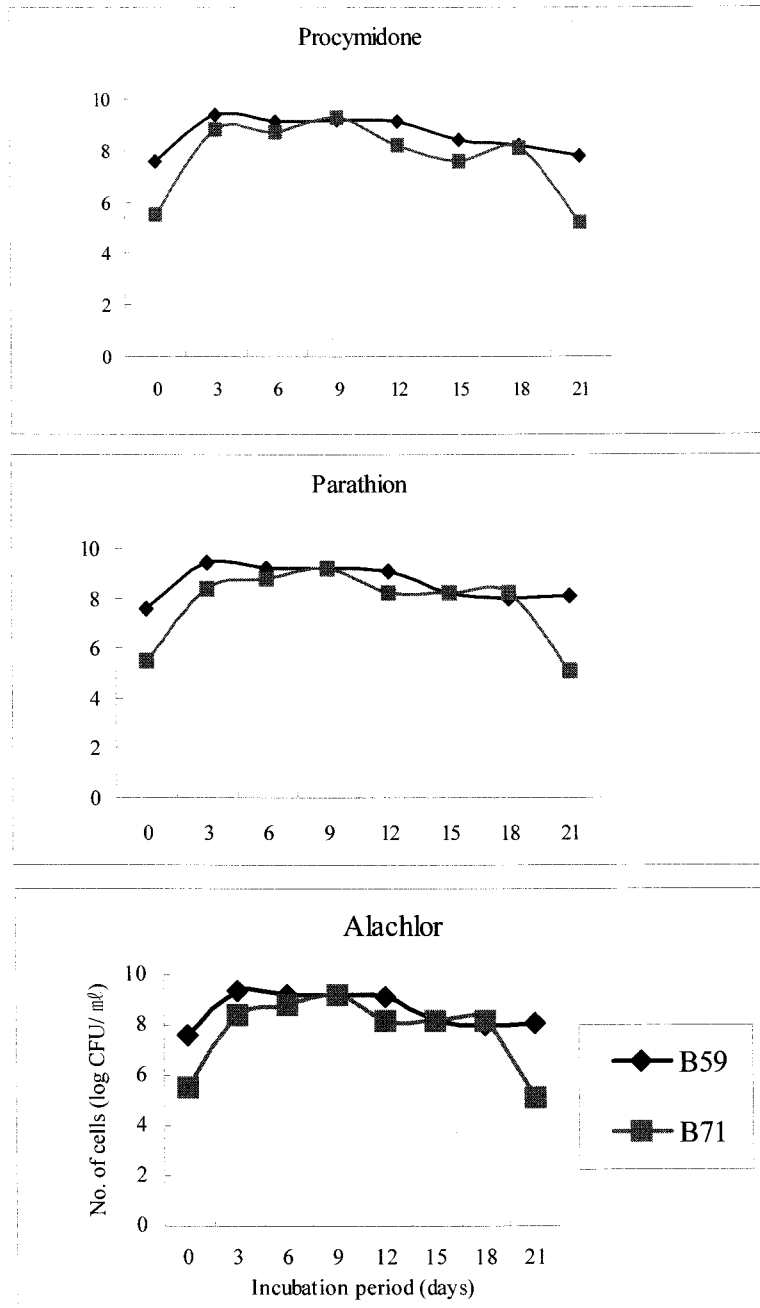


Fig. 3. Growth of bacterial strains, B59 and B71 in TSB medium with 40 mg a.i. L⁻¹ of procymidone, parathion and alachlor.

배지의 pH가 농약분해에 미치는 영향

배지의 pH가 농약의 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 4와 같은데, 농약의 종류 및 균주와 관계없이 pH 5 이상에서는 농약의 분해에 차이가 없었다. 그런데 pH 4에서는 두 균주 공히 모든 약제에서 분해율이 극히 낮았는데, 이는 균이 거의 증식하지 못했기 때문인 것으로 판단되었다.

선발세균의 동정

형태적 특징, 생리생화학적 특성 및 미생물 동정 system으로 선발된 2종의 세균을 동정하였다. B59는 짧은 간상의 형태로 쌍을 이루고 있었으며, 크기는 0.5×0.92 μm 이었다(그림 5). B71은 굵은 간상이며, 크기는 0.4×1.73 μm이었다(그림 5).

이 실험에 사용한 두 균주는 우선 형태적으로 차이가 있을 뿐만 아니라 생화학적 성질에서도 약간의 차이가 있었다. B59는 그람음성, 비운동성이고 oxidase 음성이었으며, B71은 그람 음성, 운동성 및 oxidase

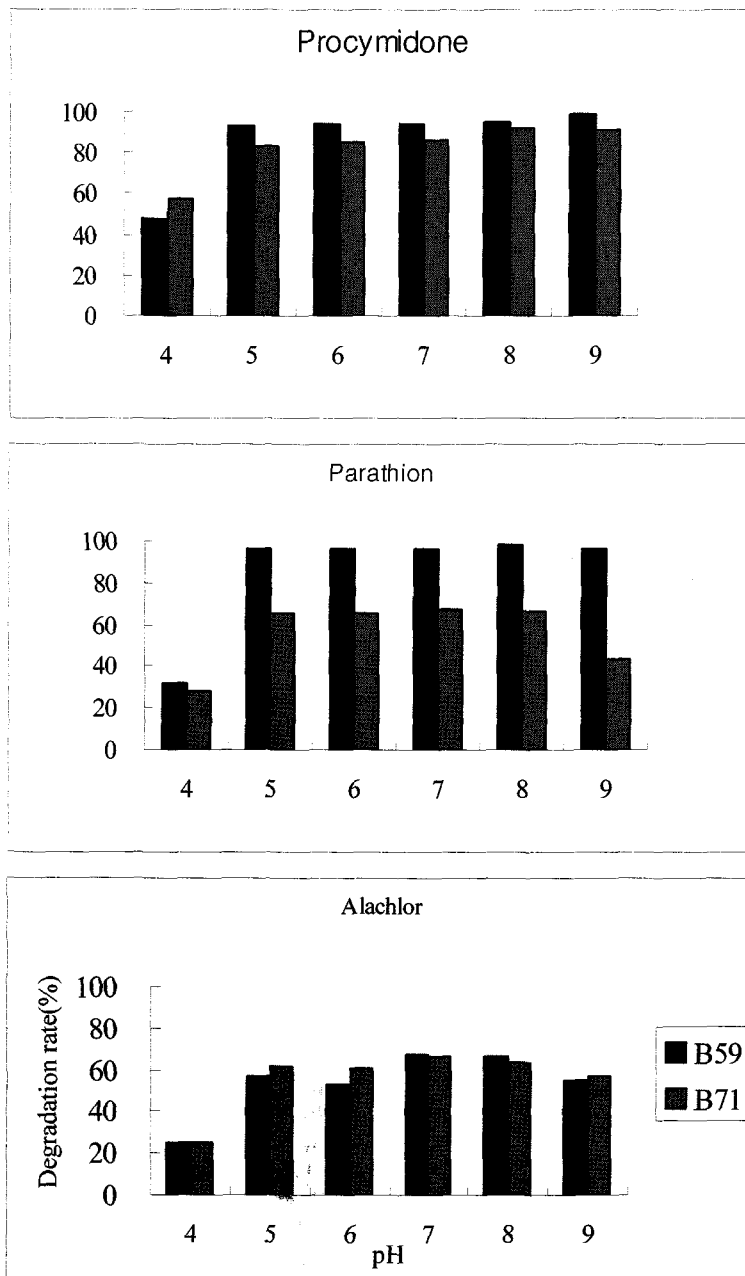


Fig. 4. Effects of pH on pesticide degradation by bacterial strains, B59 and B71.

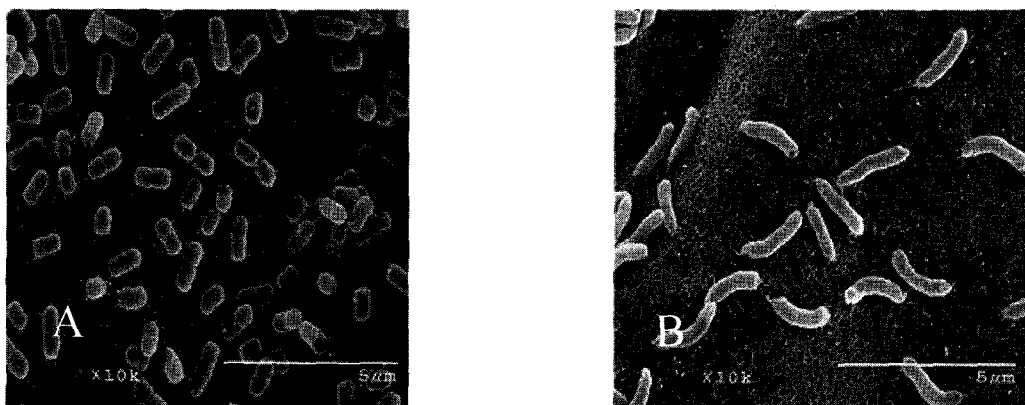


Fig. 5. Scanning electron micrographs of the bacterial strains, B59 (A) and B71 (B).

Table 5. Comparison of biochemical and physiological characteristics between strains B59, B71 and those of Bergey's description

Characteristics	B59	Acinetobacter ^{a)}	B71	Pseudomonas ^{b)}
Gram reaction	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod
Endospore formation	-	-	-	-
Mobility	-	-	+	+/-
Strict aerobes	+	+	+	+
Strict anaerobes	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	-	-	+	+/-
Acid Production from glucose	+	+/-	+	+/-
Growth at 60°C or higher	-	-	-	-
Growth with 20% or more NaCl	-	-	-	-

a), b) : described by Holt *et al.*, 1994.

Table 6. Identification of bacterial strains, B59 and B71 by automated identification system

Identification system	B59		B71	
	Identity	Similarity	Identity	Similarity
Biolog	<i>Acinetobacter</i>	0.596	<i>Pseudomonas</i>	0.512
	<i>A. calcoacet/baumanii/gen 2</i>	0.596	<i>P. corrugata</i>	0.512
MIDI	<i>Acinetobacter</i>	0.240	<i>Pseudomonas</i>	0.302
	<i>A. johnsonii</i>	0.240	<i>P. putida</i>	0.302
			<i>P. viridiflava</i>	0.218

양성이었다(표 5). 이러한 결과 B59와 B71은 각각 *Acinetobacter*속과 *Pseudomonas*속으로 추정되었다.

또한 기기분석에 의한 동정방법으로서 MIDI (microbial identification system, HP6890 & Sherlock)와 Biolog system(Bio Log™ v.3.7)의 분석결과(표 6)에서 두 기 종간 유사도가 상이하였으나 B59균은 *Acinetobacter* sp., B71균은 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. 금 후 2종의 세균에 대한 추가적인 다양한 조사가 이루어진다면 균의 종명이 결정될 것으로 판단되었다.

인용문헌

- Hill, I. R. and S. J. L. Wright (1978) Pesticide microbiology. Academic Press. pp.626~637.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD 21202. p.787.
- Jones, J. B., A. R. Chales and G. K. Harris (1993) Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. Plant Dis. 77:553~558.
- Lewis, D. L., R. E. Modson and L. F. Freeman (1985) Multiphasic kinetics for transformation of methyl parathion by *lavobacterium* species. Appl. Environ. Microbiol. 50:553~557.
- Munnecke, D. M. and D. P. H. Asih (1974) Microbial decontamination of parathion and *p*-nitrophenol in aqueous media. Appl. Microbiol. 28:212~217.
- Ou, L.-T. (1984) Methyl parathion degradation and metabolism in soil : influence of high soil-water contents. Soil Biol. Biochem. 17(2):241~243.
- Ou, L.-T. and A. Sharma (1989) Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and a *Bacillus* sp. isolated from different soils. J. Agric. Food Chem. 37:1514~1518.
- Rosenberg, A. and N. Alexander (1979) Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. Appl.

- Environ. Microbiol. 37(5):886~891.
- Smith, A. E and D. V. Phillips (1974) Degradation of Alachlor by *Rhizoctonia solani*. Agronomy Journal 67:347~349.
- Sethunathan, N. (1973) Degradation of parathion in flooded acid soils. J. Agric. Food Chem. 21(4):602~604.
- Sneath, P. H. A., N. S. Nair, M. E. Shape and J. G. Holt (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD 21202. p.1599.
- Tiedje, J. M. and M. L. Hagedorn (1975) Degradation of alachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*. J. Agr. Food Chem. 23:77~81.
- Tomlin, C. D. S. (1994) The Pesticide Manual (10th). British Crop Protection Council. UK p.1606.
- 後藤正夫, 龍川雄一 (1984a) 植物病原細菌同定을 위한 細菌學的 性質의 조사방법. 植物防疫 38(7):339~344.
- 後藤正夫, 龍川雄一 (1984b) 植物病原細菌同定을 위한 細菌學的 性質의 조사방법. 植物防疫 38(8):385~389.
- 後藤正夫, 龍川雄一 (1984c) 植物病原細菌同定을 위한 細菌學的 性質의 조사방법. 植物防疫 38(9):432~437.
- 後藤正夫, 龍川雄一 (1984d) 植物病原細菌同定을 위한 細菌學的 性質의 조사방법. 植物防疫 38(10):479~484.
- 국립환경연구원 (1998) 내분비장애물질이란? pp.35~37.
- 김찬섭, 최주현, 최용철, 정영호 (1991) 농촌진흥청 농약연구소 시험연구보고서 pp.192~196.
- 농약공업협회 (2005) 농약사용지침서. 삼정인쇄공사 p.1015.
- 박창규 (1993) 농약의 생화학과 사용법. 신일상사 p.697.
- 이재구 (1984) 제초제 Alachlor의 토양미생물에 의한 분해. 한국농화학회지 17:64~72.
- 정영호, 박영선 (1990) 농약학. 문선사. pp.58~93.

Pesticide Degradation Activity of Several Isolates of Soil Bacteria and Their Identification

Kyung Hun Park^{*}, Young Kee Lee¹, Su Heon Lee¹, Byung Jun Park, Chan Sub Kim, Ju Hyeon Choi and Jae Youl Uhm² (Department of Crop Life Safety, National Institute of Agricultural Science and Technology (NIAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea, ¹Department of Agricultural Biology, NIAS, RDA, Suwon 441-707, Korea, ²College of Agricultural Biology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

Abstract : Two bacteria were isolated from the continuously pesticide-used soil under plastic film house and upland condition. The degradation test of several pesticides by the selected bacteria, B59 and B71, were conducted. The degradation rates for 6 pesticides, procymidone, chlorothalonil, ethoprophos, parathion, alachlor and pendimethalin, in medium by the isolates were 21.1% to 53.2% higher than non-inoculated medium. Under shaking culture condition, 90% to 95% of procymidone was degraded after 21 days treatment. Parathion was degraded in the range of 60% to 100% by B71 and B59, respectively. Otherwise 70% of alachlor was degraded by the two isolated bacteria during same period. The pH was not significantly affected for degradation of pesticides. The bacterial strains, B59 and B71 was identified as *Acinetobacter* sp. and as *Pseudomonas* sp. based on morphological, biochemical and physiological characteristics, and identity and similarity of automatic identification system, Biolog and MIDI.

Key words : alachlor, bacteria, parathion, pesticide degradation, procymidone

*Corresponding author (Fax : +82-31-290-0538, E-mail : sikyale@rda.go.kr)