

담수토양내 미생물에 의한 Diazinon 의 분해

김중호 · 이영하 · 최종우* · 이규승*

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

*충남대학교 농과대학 농화학과

Microbial Degradation of Diazinon in Submerged Soil

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

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

* Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,

Chungnam National University

ABSTRACT: The mechanisms and metabolic products involved in the degradation of an organophosphate insecticide, diazinon, were studied in submerged paddy soil under the laboratory condition at 30°C. Diazinon abatement in non-sterilized soil was more rapid than indicating microbial participation in diazinon in soil. One-half of the original applications was lost in 2 days and less than 5% remained after 7 days. During the same period, dizon applications increased the microbial populations in accordance with the monooxygenase and esterase activities in soil. These results suggest that the microbiological factors develop in soil following diazinon application. The esterase and monooxygenase-catalyzing degradation products of diazinon were isolated and tentatively identified by mass spectrometry as 2-isopropyle-6-methyl-4-hydroxy pyrimidine, diazoxon, hydroxydiazinon, and sulfotep.

KEY WORDS □ diazinon, microbial degradation, soil esterase, soil monooxygenase

날로 증가되는 농약 사용량에 따라 농산물 또는 작물재배 환경의 농약잔류로 인한 환경오염은 점차 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 각종 농약에 의하여 야기되는 이러한 환경오염 문제의 해결을 위해서는 무엇보다도 토양 내로 투입되는 이들 농약의 잔류도 양상과 아울러 토양 내 여러가지 환경요인의 작용에 의한 농약의 분해기작 및 분해산물에 대한 규명이 이루어져야 한다(Ashton, 1982).

Diazinon (*O,O*-diethyl *O*-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl)phosphorothioate) 입제는 세계적으로 광범위하게 이용되고 있는 수도용 유기인계 살충제로서, 구조적으로 ester 결합을 형성하므로 물리화학적 또는 생물학적 반응에 의해 쉽게 가수분해될 수 있음으로써 유기염소계 농약 등의 타

농약에 비하여 토양 내 잔류기간이 매우 짧은 특성을 갖고 있다(Matsumura, 1982). 반면에 이들 유기인계 농약은 중심 P 원자에 다른 작용기가 붙어 화학적 성질이나 생물학적 활성 및 독성이 전혀 다른 화합물로 전환될 수 있는 구조적 특성을 갖고 있음으로써 여러가지의 대사산물 혹은 분해산물이 형성될 수도 있다(Kunstman and Lichtenstein, 1979).

동·식물체 내에서의 diazinon 의 분해에는 일차적으로 monooxygenase (mixed function oxygenase)가 관여하고 있음이 잘 알려져 있다. 즉, 동·식물체 내에서는 monooxygenase 의 desulfuration 작용에 의하여 diazoxon 이 형성되거나 (Dorough and Ballard, 1982; Cairns *et al.*, 1985), hydroxylation 작용에 의하여 hydroxydiazinon 이

형성된 후(Pardue *et al.*, 1970; Shimabukuro *et al.*, 1982) esterase 등의 가수분해효소의 작용을 받아 분해되는 것으로 보고되고 있다. 그러나 토양 혹은 담수토양내에서의 diazinon 분해는 토양미생물의 작용에 주로 의존함으로써(Sethunathan and Pathak, 1971, 1972) 동·식물체 내에서와는 다른 분해산물이 만들어진다. 일찌기 Getzin(1967)과 Sethunathan and Yoshida(1969)는 토양 내의 diazinon은 먼저 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxy-pyrimidine(IMHP)로 가수분해된 후 미생물에 의하여 CO₂로 무기화됨을 밝혔으며, 또한 토양으로부터 순수분리된 *Arthrobacter* sp.(Sethunathan and Pathak, 1972)와 *Flavobacterium* sp.(Sethunathan and Yoshida, 1973)을 이용한 diazinon의 일차분해산물 역시 IMHP임이 보고된 바 있다.

이와 같이 미생물배양에 의하거나 또는 토양내에서의 diazinon 분해의 일차산물은 지금까지 diazinon의 P-O ester 결합이 끊어지는, 즉, esterase 작용에 의한 가수분해 산물만이 알려지고 있으나 복잡한 토양생태계내 미생물 군집의 구성이나 기능으로 미루어 보아 보다 많은 종류의 분해산물 생성이 가능할 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 토양에서의 미생물에 의한 diazinon의 분해과정을 밝힘으로써 diazinon의 합리적인 운용방법을 확립할 수 있다는 관점에서 diazinon입체를 처리한 담수토양 내에서의 diazinon의 잔류도, 분해산물의 종류와 분해산물의 생성과 관련된 미생물개체수 및 토양효소(soil enzyme) 활성의 변화에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

토 양

모내기 이전인 4월 중순에 채취한 논토양을 풍건한 후 2mm 체로 걸러 시료로 사용하였으며, 본 토양시료의 토성은 미사질양토(sand 18%, silt 62%, clay 20%)로써 pH 6.5, 총 질소함량 0.17%, 유기함량 1.70%, 양이온치환용량 8.5 me/100g의 이화학적 성질을 나타냈다.

항온실험

고압살균법에 의해 준비된 살균토양과 비살균토

양 20g을 각각 100 ml의 비이커에 취하고 멸균수 30 ml을 가하여 담수상태로 한 후, diazinon 용액(18 ppm)을 1 ml씩 가하여 균일하게 혼합하고 30±1°C의 항온조에서 10일간 반응시켰다. 반응기간 중 시료채취를 통한 모든실험은 3회 반복으로 수행하였다.

Diazinon의 추출 및 분석

Diazinon의 추출과 분석은 MacRae 등(1967)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 시료를 300 ml 공전삼각 flask에 취하여 acetone 50 ml을 가하고 2시간 동안 진탕 추출하였다. 이 추출액을 감압여과하고, 잔사와 용기를 20 ml씩의 acetone으로 2회 반복 세척하여 모두 합한 다음, fume hood 안에서 진조공기를 불어주면서 증발시켰다. 여기에 hexane 50 ml을 가하고 가볍게 흔들어 500 ml의 분액여두에 옮긴 후, 증류수 100 ml와 포화식염수 30 ml를 가하여 3분간 격렬하게 진탕한 다음 hexane 층을 분리하고 같은 조작을 반복하여 세척한 후 hexane 층을 합하였다. 이를 감압농축기에서 증발농축시키고 원심분리관에서 용량을 1 ml로 맞춘 다음 GLC용 시료로 하였다.

Diazinon 제의 회수율은 91.3% 이었고 retention time(Rt)은 2.96분이었다. Gas chromatography의 조작 조건은 Table 1에서와 같다.

대사산물 확인

토양 500g을 1000 ml의 비이커에 취하고 3cm 정도 깊이의 담수상태로 한 다음, diazinon 1000 ppm 용액을 2 ml씩 가하여 골고루 섞는다. 약제 처리 후 1, 3, 7 및 14일에 시료를 취하여 Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC 판상에서 hexane:ethyl acetate(4:1)의 전개용매로 대사산물을 확인하였으며, 또한 농축시료를 florasil:alumina(1:1 w/w) 컬럼크로마토그래피에 의해 정제한 후 GC/MS로 대사산물의 구조를 확인하였다. GC/MS의 분석조건은 Table 2와 같다.

토양미생물수 측정

토양시료 내의 일반세균 및 균류 개체수의 측정에는 연속희석평판법에 의하였다.

일반세균은 nutrient agar medium을 이용하여 26±1°C에서 2일간 배양하여 계수하였으며 균류는 malt extract 2%, peptone 0.1%, dextrose 1%, oxgall 0.02%, chloramphenicol 0.15%, agar

Table 1. Conditions of gas-liquid chromatography for residue analysis of diazinon.

GC Model	: Instrumental Analysis Model 92 GC
Detector	: Flame Photometric Detector (P-mode 528nm)
Column	: 3% OV 17 + 3% 210(1:1) on Chromosorb W-HP (100/120) 2mm (i.d.) × 1.2m stainless steel
Temperature	: Injector 200 °C Detector 220 °C Column 165 °C(0.5 min) 3 °C/min 174 °C(3 min) 3 °C/min 181 °C(1 min) 19 °C/min 200 °C(8 min)
Gas flow rate	: Carrier, N ₂ : 30 ml/min Fuel, H ₂ : 120 ml/min Top Air : 160 ml/min Bottom Air: 20 ml/min
Attenuation	: 16 × 10 ⁻¹² a.f.c.
Chart speed	: 0.5 cm/min
Injection volume	: 2 µl

Table 2. GC/MS operation parameters for the degradation products of diazinon.

Model	: Gas chromatography/mass Spectrometer FINNIGAN MAT 4510
GC parameter	: Column: OV-1, 30 m-capillary Temp. : Injector 250 °C Int. oven 250 °C Column 60 °C(0.5 min) 10 °C/min 250 °C(10 min)
Mass parameter	: Low mass : 50 High mass : 650 Samp Int(ms): 0.075 Inten/ion : 2
Mode	: Centroid positive ion

2.0% 조성의 분리용 배지에서 26±1°C로 5-6일간 배양한 후 균체수를 측정하였다.

토양효소 활성측정

토양 내 esterase 활성도는 Mackness 등(1985)의 방법에 준하여 수행하였다. 즉 토양시료 5g에 α-esterase의 기질로는 1 mM α-naphtyl acetate를, β-esterase의 기질로는 1 mM β-naphtyl acetate를 5ml 가하여 40°C에서 20시간 반응시

킨 뒤 96% ethanol 5ml로 반응을 중지시키고 원심분리 후 (3,600g/30 min) 상등액 1 ml를 취하여 0.25% 4-aminoantypyrine 1 ml, 0.35% potassium ferric cyanide 1 ml, 증류수 7 ml를 가하고 생성된 naphthol을 480 nm의 spectrophotometer로 측정하였다.

토양 내 monooxygenase의 활성도는 Shang과 Soderlund(1984)의 방법에 준하여 토양시료 5g에 기질인 1 mM의 p-nitro anisole 10 ml를 가하고 40°C에서 20시간 반응시킨 뒤 1 M Na₂CO₃ 8 ml로 반응을 중지시키고 원심분리 (3,600g/30 min) 후 상등액 2 ml를 증류수 8 ml로 희석시키고 생성된 p-nitrophenol을 420 nm에서 측정하였다.

결 과

담수상태의 살균 및 비살균토양에 토양살포 추천량(3 cm의 담수조건에서 3 ppm)의 diazinon을 각각 처리한 후 시간에 따른 약제 잔류량을 비교하여 생물학적 분해요인을 조사한 결과는 Fig.1에서와 같다. 비살균토양에서의 경우 30°C의 항온반응 7일 이후 95% 이상의 diazinon이 분해되었으며 반감기는 2.2일로서 살균토양보다 diazinon의 분해가 왕성하였다. 살균토양에서의 diazinon 분해

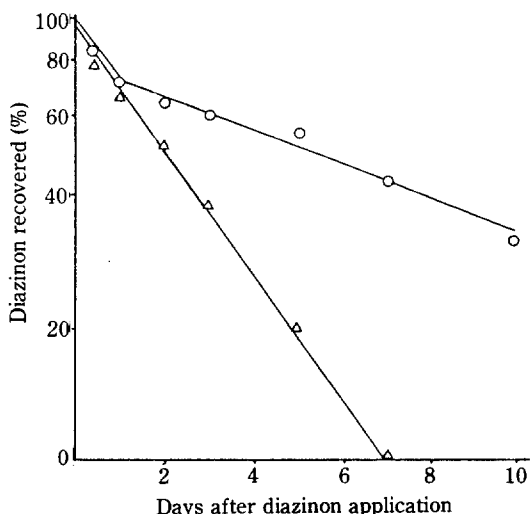


Fig. 1. Persistence of diazinon in submerged paddy soil under the laboratory condition at 30°C.

○ - ○ : sterilized soil, △ - △ : non-sterilized soil

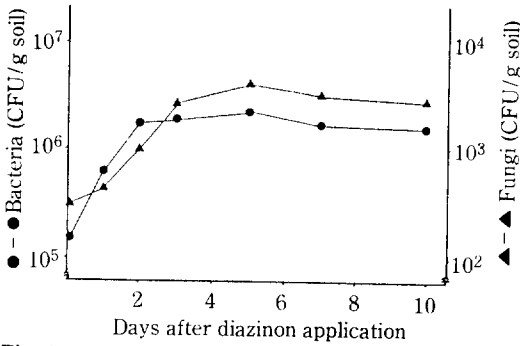


Fig. 2 Changes in numbers of bacteria and fungi in submerged soil.

는 항온반응 1 일까지의 초기와 그 이후 반응기간 중의 분해율이 서로 다르게 나타났다. 분해율이 보다 큰 반응초기의 토양내 diazinon 잔류량은 비 살균토양에서의 잔류량과 큰 차이를 보이지 않았으나 이후 분해율의 급격한 감소가 일어나 항온반응 10 일 후에도 30% 이상의 diazinon 잔류량을 보였다.

Diazinon 을 처리한 담수토양 내에서의 세균 및 균류수의 변화를 조사한 결과 diazinon 처리에 의하여 개체수의 증가가 공통적으로 초기에 일어났다(Fig.2). 세균의 경우 diazinon 처리 후 그 개체수의 증가가 급격히 일어나고 2 일 이후 비교적 안정된 상태를 유지하였는데, diazinon 처리에 의한 최대 세균수는 diazinon 처리 전 세균수의 14 배에 달하였다. 한편, 일반균류 역시 diazinon 처리에 의하여 개체수의 증가가 4-5 일까지 계속 일어났으며 최대 균류수는 diazinon 처리 전의 균류수의 12 배에 달하였다.

Fig.3은 미생물 등의 대사작용의 결과 토양내에 생성되어 있는 토양효소 중 diazinon 분해와 깊은 관련을 맺고있는 monooxygenase 와 α - 및 β -esterase 활성의 diazinon 처리에 따른 변화를 나타낸 것이다. 토양내 monooxygenase 의 활성은 diazinon 처리 12 시간 이후 지속적으로 증가되었으며 α -esterase 역시 diazinon 처리 2 일 이후 전 조사시간 동안 계속 활성증가가 이루어졌다. 반면에 β -esterase 는 약제처리 3 일 이후 활성의 증가가 이루어 졌으나 그 증가량은 극히 미미한 것으로 나타났다.

담수토양내에서 diazinon 분해산물을 확인하고

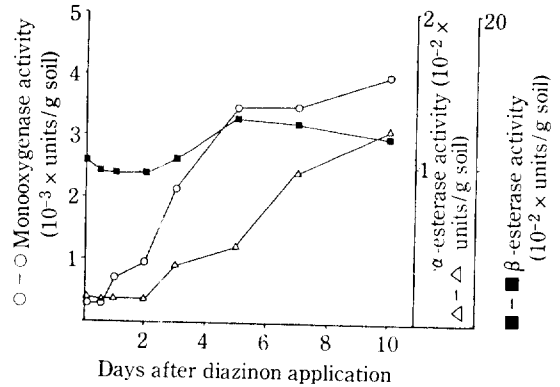


Fig. 3. Changes in monooxygenase and esterase activities in submerged soil.

이를 통하여 토양내 diazinon 의 분해기작을 이해하기 위하여 diazinon 처리 후 경시적으로 분해산물을 조사한 결과 약제처리 7 일 이후 비살균토양으로부터 주요산물이 추출되었으며 추출한 분해산물을 GC/MS 로 분석한 결과는 Fig.4 와 같다. Data system 에 의해 확인된 분해산물은 diazinon 의 ester 결합이 가수분해된 후 pyrimidine 핵에 산소가 도입된 ketone 형의 산화물인 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxy pyrimidine (IMHP)과 P=S 대신 P=O 로 치환된 diazoxon, diazinon 의 isopropyl 기에 -OH 가 도입된 *O,O*-diethyl-*O*-[2-(1-hydroxy-1,1-dimethyl)-6-methyl]-pyrimidyl phosphorothioate (hydroxydiazinon), 그리고 *O,O*-diethyl phosphorothioate 의 이중체인 sulfotep 등이다. 본 실험에서 확인된 분해산물과 diazinon 의 구조식은 Fig.5 에 나타내었다.

고 찰

Diazinon 은 살충효과에 비하여 온혈동물에 대한 독성과 잔류독성이 매우 낮은 유기인계 살충제로서 토양 내에서의 잔류기간도 비교적 짧은 것으로 알려져 있다(Sethunathan and Pathak, 1972). 살충제의 분해와 관련하여 미생물의 활성은 토양의 물리화학적 환경요인의 영향을 크게 받으며 또한, 토양 내 유기물 및 점토광물은 adsorption-desorption 기작에 의해 살충제의 잔류기간에 간접적인 영향을 미치기 때문에 토양의 특성에 따라 살충제의 잔류기간은 달라질 수 있다(Sethunathan

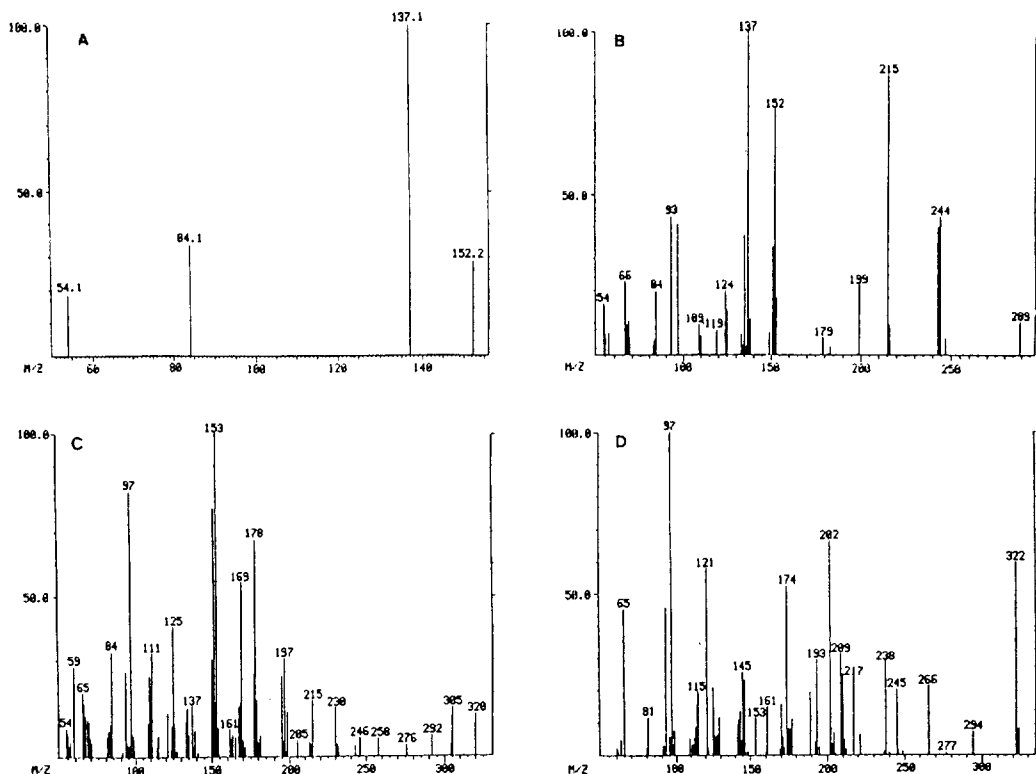


Fig. 4. Mass spectra for degradation products of diazinon.

A : 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxy pyrimidine
 B : diazoxon

C : hydroxydiazinon
 D : sulfotep

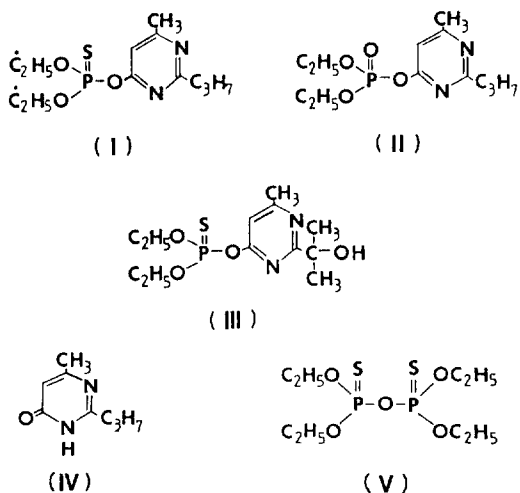


Fig. 5. Structures of diazinon and its degradation products.

I : diazinon IV : 2-isopropyl-6-methyl
 II : diazoxon -4-hydroxy pyrimidine
 III : hydroxydiazinon V : sulfotep

et al., 1982).

살균토양과 비살균토양에서의 diazinon 잔류량에 대한 본 실험에서는 광분해 등의 제한된 환경요인에 의해 분해속도가 완화되는 살균토양에 반하여 비살균토양에서의 분해속도는 반응시간에 대하여 기하급수적으로 증가되는 양상을 나타냄으로써 담수토양내 diazinon 분해가 미생물학적 요인에 의해 크게 촉진됨을 보여 주었다. 특히, 비살균토양에서의 diazinon 반감기는 2.2일로서 Lee(1981) 및 Song 등(1982)이 각각 보고한 13.1일 및 3.9일에 비하여 짧은 것으로 나타났는데 이는 diazinon 분해를 위한 이들의 실험온도가 각각 $21 \pm 3^\circ\text{C}$ 및 25°C 이었던 것에 비하여 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 본 실험조건이 토양 내 미생물의 성장과 대사활동에 보다 적합하였기 때문인 것으로 보이며(Cho and Ponnampetuma, 1971), 이에 따라 논토양에 살포된 diazinon 약제의 분해는 여름철 고온기에 보

다 더 촉진될 수 있을 것으로 추정된다.

미생물에 의한 diazinon의 분해는 diazinon이 처리된 담수토양 내에서 세균 및 균류의 개체수가 급격히 증가된 본 실험의 결과(Fig.2)에서도 확인할 수 있다. Diazinon 처리에 따른 토양미생물 개체수의 증가는 diazinon이 이들 미생물의 탄소 및 에너지원으로 활용되고 있음을 보여 주는 것으로서 지금까지 *Flavobacterium* sp. 등이 diazinon을 직접 탄소원으로 이용할 수 있으며(Sethunathan and Yoshida, 1973) 이외에 *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas melophthora*, *Streptomyces* sp. 등의 세균과 *Trichoderma viride* 등의 균류 역시 cometabolism에 의해서 diazinon 분해에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(Sethunathan *et al.*, 1982). 최근 Sato(1983)와 Sato 등(1987)은 살충제 pentachlorophenol(PCP) 사용에 따른 토양미생물 군집의 변화 연구에서 PCP 처리에 의해 총 세균수가 급증됨을 발견하고 이와 같은 현상이 살충제에 의해 직접적인 영향을 받아 사멸되거나 생장이 억제된 미생물로부터 영양분의 공급을 받거나 또는 길항작용을 받던 다른 미생물의 생장이 촉진되는 "the partial sterilization effect"에 기인함을 밝힌 바 있다. Diazinon 처리에 의한 본 실험의 경우에도 이와 같은 영향을 완전히 배제할 수는 없지만 미생물의 대사산물로서 diazinon 분해와 직접 관련있는 monooxygenase 및 esterase와 같은 토양효소의 활성이 diazinon 처리에 의해 증가되는 결과(Fig.3)와 결부시켜 볼 때 diazinon에 의해 토양미생물 중 특히 diazinon 분해기능을 갖는 미생물의 성장과 활성이 선택적으로 촉진됨을 알 수 있다.

토양생태계내에서 유기물의 분해와 광물화 반응에 있어서 토양효소의 역할은 매우 지대하며(Lynch, 1983), 유기물 분해와 관련된 토양효소의 대부분이 미생물로부터 생성되었고 또한 점토광물이나 부식산 등의 유기물에 흡착되어 그 안정성이 높기 때문에 토양미생물의 생리적 활성과 생장의 지표로서도 활용된다(Spalding, 1980; Frankenberg *et al.*, 1983; Rhee *et al.*, 1985) 본 실험에서 조사된 α , β -esterase는 유기인계 기질에의 작용양식에 따른 분류법에 의하면 유기인계의 ester 결

합을 가수분해하고 방향족 화합물에 작용하는 "A"-esterase에 해당되며(Walker, 1983) 토양내 이 효소의 활성에 대해서는 많은 보고가 이루어진 바 있다(Nakas *et al.*, 1987; Juma and Tabatabai, 1988). Diazinon 처리에 따른 토양내 esterase 활성의 증가는 diazinon의 분해에 esterase가 관여됨을 보여주는 것으로서 diazinon의 P-O ester 결합이 가수분해되어 생성된 IMHP와 O, O-dithyl phosphorothioate의 이중체 sulfotep 등의 분해산물(Fig.4 and 5)로도 그 사실을 확인할 수 있다.

한편, 유기물의 광범위한 산화과정에 촉매역할을 하는 monooxygenase는 aliphatic hydroxylation, aromatic hydroxylation, O-dealkylation, N-dealkylation, desulfuration, epoxidation 등과 같은 반응에 의해서 유기화합물의 극성을 증가시키거나 불안정한 화합물로 전환시키는 효소로서 동물 및 식물체내에서의 diazinon 분해에 관여함이 밝혀지고 있다(Dorough and Ballard, 1982; Shimabukuro *et al.*, 1982; Shang and Soderlund, 1984; Cairns *et al.*, 1985). 반면에 토양내 monooxygenase 활성의 존재에 대해서는 지금까지 거의 연구된 바 없을 뿐 아니라 토양내에서의 diazinon 분해나 미생물에 의한 diazinon 분해에 monooxygenase가 관련되고 있음을 보여주는 보고나 이 효소에 의한 분해산물이 밝혀진 적은 없다. 그러나 diazinon을 처리한 담수토양내에서 monooxygenase 활성의 변화에 대하여 조사한 본 연구 결과는 토양내 monooxygenase 활성의 확인은 물론 diazinon 처리에 의한 효소활성의 지속적인 증가현상을 통하여 diazinon 분해에 monooxygenase가 작용함을 보여 주었다. 또한, 동·식물체내에서 확인된 diazinon 대사산물과 유사한 구조물로서 monooxygenase에 의한 분해산물로 믿어지는 diazoxon과 hydroxydiazinon이 토양으로부터 검출되었는데(Fig.4 and 5), 이와 같은 사실은 담수토양내 미생물에 의한 diazinon 분해에 지금까지 알려진 esterase에 의한 가수분해 이외에도 monooxygenase에 의한 산화작용 역시 중요함을 뒷받침해 준다.

적 요

담수상태의 논토양에 처리한 유기인계 살충제 diazinon의 분해기작과 그 분해산물에 대하여 조사하였다. 항온조건(30°C)하에서 살균토양에 비하여 비살균토양에서의 diazinon 분해가 보다 빠르게 일어남으로써 담수토양내 diazinon 분해에 미생물의 대사활동이 매우 중요한 것으로 나타났는데, 비살균토양내 diazinon의 반감기는 약 2일이었고 항온반응 7일만에 95% 이상의 분해가 이루어졌다. 또한 diazinon 분해기간 중 미생물 개체수와 아울러 토양내 monooxygenase 및 esterase 활성의 증가가 이루어졌으며 이는 토양내 diazinon 처리가 이 약제의 분해와 관련된 미생물학적 요인의 성장 또는 활성을 촉진시키고 있음을 보여준다. 이와 관련하여 담수토양내 diazinon 분해산물로서 esterase 작용에 의한 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxy pyrimidine 이외에 monooxygenase에 의한 diazoxon과 hydroxydiazinon, 그리고 sulfotep 등이 mass spectrometry에 의하여 확인되었다.

사 사

본 논문은 한국과학재단 지원 연구비의 일부로 수행되었으며, 본 연구의 GC/MS 분석에 도움을 주신 농약연구소 오병렬 박사님께 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ashton, F.A., 1982. Persistence and biodegradation of herbicides. In *Biodegradation of Pesticides* (ed.F. Matsumura and C.R.K. Murti) Plenum press, New York.
2. Cairns, T., E.G. Siegmund, and J.E. Froberg, 1985. Identification of diazinon and its metabolite in spinach by chemical ionization mass spectrometry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 291-295.
3. Cho, D.Y. and F.N. Ponnampuruma, 1971. Influence of soil temperature on the chemical kinetics of flooded soils and the growth of rice. *Soil Sci.* **112**, 184.
4. Dorough, H.W. and S.K. Ballard, 1982. Degradation of pesticides by animals. In *Biodegradation of Pesticides* (ed.F. Matsumura and C.R.K. Murti) Plenum Press, New York.
5. Frankenberger, W.T.Jr. and W.A. Dick, 1983. Relations between enzym activities and microbial growth and activity indices in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**, 945-951.
6. Getzin, L.W., 1967. Metabolism of diazinon and zinophos in soils. *J. Econ. Entomol.* **60**, 505-508.
7. Juma, N.G. and M.A. Tabatabai, 1988. Comparison of kinetic and thermo-dynamic parameters of phosphomonoesterases of soils and of corn and soybean roots. *Soil Biol. & Biochem.* **20**, 533-539.
8. Kunstman, J.L. and E.P. Lichtenstein, 1979. Effects of nutrient deficiencies in corn plants on the *in vivo* and *in vitro* metabolism of [¹⁴C] diazinon. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 770-774.
9. Lee, H.K., 1981. Effect of rice straw amendment and repeated application of diazinon on the persistence of diazinon in submerged soils. *J. Kor. Agr. Chem. Soci.* **24**, 1-6.
10. Lynch, J.M., 1983. Microorganisms and enzymes in the soil. In *Soil Biotechnology* (ed. J.M. Lynch) Blackwell Scientific Publications pp. 25-41.
11. Mackness, M.I., S.D. Hallam, and C.H. Walker, 1985. A-esterase activity in the lipoprotein fraction of sheep and human serum. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 135-136.
12. MacRae, I.C., K. Raghu, and T.F. Castro, 1967. Persistence and biodegradation of four common isomers of benzene hexachloride in submerged soils. *J. Agr. Food Chem.* **15**, 911-914.
13. Matsumura, F., 1982. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In *Biodegradation of Pesticides* (ed. F. Matsumura and C.R.K. Murti) Plenum Press, New York.
14. Nakas, J.P., W.D. Gould, and D.A. Klein, 1987. Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid grassland soil. *Soil Biol. & Biochem.* **19**, 13-18.
15. Pardue, J.R., E.A. Hansen, R.P. Barron, and

- J.Y.T. Chen, 1970. Diazinon residues on field-sprayed kale: hydroxydiazinon-a new alteration product of diazinon. *J. Agr. Food Chem.* **18**, 405-408.
16. Rhee, Y.H., Y.C. Hah and S.W. Hong, 1985. Distribution of abiotic carboxymethylcellulase in relation to microbial growth and activity forest soils. *Kor. Jour. Microbiol.* **23**, 147-156.
17. Sato, K., 1983. Effect of a pesticide, pentachlorophenol (PCP) on soil microflora. *Plant and Soil* **75**, 417-426.
18. Sato, K., H. Kato and C. Furusaka, 1987. Comparative study of soil bacterial flora as influenced by the application of a pesticide, pentachlorophenol (PCP). *Plant and Soil* **100**, 333-347.
19. Sethunathan, N., Adhya and K. Raghu, 1982. Microbial degradation of pesticides in tropical soils. In *Biodegradation of Pesticides* (ed. F. Matsumura and C.R.K. Murti) Plenum Press, New York.
20. Sethunathan, N. and M.D. Pathak, 1971. Development of a diazinon-degrading bacterium in paddy water after repeated applications of diazinon. *Can. J. Microbiol.* **17**, 699-702.
21. Sethunathan, N. and M.D. Pathak, 1972. Increased biological hydrolysis of diazinon after repeated application in rice paddles. *J. Agr. Food Chem.* **20**, 586-589.
22. Sethunathan, N. and T. Yoshida, 1973. A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can. J. Microbiol.* **19**, 873-875.
23. Shang, C.C. and D.M. Soderlund, 1984. Monooxygenase activity of tobacco budworm larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **79**, 407.
24. Shimabukuro, R.H., G.L. Lamoureux and D.S. Frear, 1982. Pesticide metabolism in plants: reactions and mechanisms. In *Biodegradation of Pesticides* (ed. F. Matsumura and C.R.K. Murti) Plenum Press, New York.
25. Song, B.H., Y.S. Jeong and Y.S. Park, 1982. Effect of repeated application of IBP on the degradation of pesticides in flooded soil. *Kor. J. Environ. Agricul.* **1**, 65-72.
26. Spalding, B.P., 1980. Enzymatic activities in coniferous leaf litter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **44**, 760-764.
27. Walker, C.H., 1983. Esterase: Problem of identification. *Biochem. Pharm.* **32**, 3265.

(Received Mar. 6, 1989)