

제초제 Bentazon의 토양미생물에 의한 분해

이재구 · 조광래* · 오경석 · 경기성

Degradation of the Herbicide Bentazon by Soil Microorganisms

Jae Koo Lee, Kwang Rae Cho*, Kyeong Seok Oh, and Kee Sung Kyung

Abstract

In order to elucidate the degradation of the herbicide bentazon (3-isopropyl-2,1,3-benzothiadiazin-4-one-2,2-dioxide) by soil microorganisms, it was incubated at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ under the submerged and upland soil conditions of the different soils in the Chung Buk area. When bentazon (200 ppm) was incubated in Cheong Won A soil (silty loam; pH, 5.2; organic matter 1.4%) under the submerged condition for 6 months, 6-hydroxy bentazon (1.27%) was formed as the major degradation product and 8-hydroxy bentazon (0.57%) and anthranilic acid (0.13%) were formed as the minor ones. Meanwhile, when 500 ppm of bentazon was incubated in the same soil for 2 months, a trace amount of 6-hydroxy bentazon was formed. Eight strains of microorganisms isolated from the soils did not give any distinct degradation products in the pure culture experiment. The greater dehydrogenase activity in Cheong Won A soil than in Cheong Ju A soil might be related to the greater bentazon-degradability of the former soil than that of the latter. When bentazon (10 ppm) was incubated for 14 days with 14 strains of bacteria and 8 strains of fungi, the identities of which were all known, *Rhizopus stolonifer* produced 4.6~31.6% of anthranilic acid as the major product from batch to batch, with trace amounts of 6-hydroxy bentazon and 8-hydroxy bentazon as minor products. The rest microorganisms did not produce any noticeable products.

충북대학교 농과대학 농화학과

*경기도 농촌진흥원

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung Buk National University 360-763, Cheong Ju, Korea

*Kyong-gi Provincial Rural Development Administration, Hwaseong, Korea

서 론

Bentazon(3-isopropyl-2,1,3-benzothiadiazin-4-one-2,2-dioxide)은 1970년 독일 BASF (Badische Anilin und Soda Fabriken, Limburgerhof, Germany)사에 의하여 개발된 benzothiadiazole계의 선택성 이형형 제초제로서 우리 나라에서는 주로 논·밭의 일년생과 다년생 잡초 방제 및 두류, 맥류의 광엽잡초 방제에 사용되는 경엽처리제이다.¹⁻¹⁰⁾ Otto 등¹⁰⁾은 식물체와 토양중 bentazon의 분해에 관하여 연구하였다. 즉 식물체 실험에서는 3~4엽기의 식물체에 엽면살포하고 뿌리에 의한 흡수시에는 10 ppm 농도로 영양액과 함께 공급하였으며, 토양중 분해실험에서는 4종의 독일토양을 사용하여 22±2°C에서 수분함량을 최대용수량의 40%로 조절하였다. 이들 실험결과에서 bentazon은 식물체뿐만 아니라 호기적인 조건하의 토양중에서 aromatic ring의 6번과 8번 위치에서 hydroxylation을 시작으로 분해되며, 더욱 분해가 진행되면 acetic acid, succinic acid와 간단한 유기화합물을 거쳐 CO₂와 H₂O로 분해된다고 하였으며, 여러 속의 곰팡이들이 이 화합물의 분해에 관여한다고 하였다. 또한 Retzlaff 등¹¹⁾과 Mine 등⁹⁾은 bentazon이 hydroxylation을 시작으로 분해하는 것은 6-과 8-hydroxy bentazon이 모화합물보다 더욱 낮은 독성을 나타내기 때문에 bentazon의 해독작용이 hydroxylation 단계라고 제안하였다. Lee 등⁹⁾ 한국과 독일 토양중 bentazon 잔류물의 형성과 생물에 의한 흡수에 관하여 연구하면서 ¹⁴C-bentazon이 ¹⁴CO₂로 무기화되는 속도는 두 토양 모두에서 처리농도 5.51 mg/kg에서는 주당 0.6%, 25.05 mg/kg에서는 주당 0.2%이었고, 탄소소가 많은 한국 토양에서는 non-extractable bound residue의 함량이 처리량의 57%나 된다고 하였다. 본 연구에서는 우리 나라의 논과 밭토양 중에서 bentazon이 토양미생물의 작용에 의하여 어떤 경로로 분해되어 어떤 분해산물을 형성하는지 구명하기 위하여 물리화학적 성질이 다른 논과 밭토양 각각 2종씩을 선정하여 각 토양에 bentazon을 일정농도로 처리하고 일정기간동안 배양한

후 유기용매로 추출하여 분해산물을 구명하였다. 또한 수종의 기지 및 미지의 토양미생물을 이용하여 pure culture에 의한 bentazon의 분해경로와 분해산물을 구명하여 이 화합물의 토양중 행적을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시토양

충북 청원군 오창면과 청주시 개신동 소재의 논과 밭토양을 채취하여 옮긴한 다음 2 mm 체를 통과시켜 공시토양으로 사용하였으며, 각 토양의 물리화학적 성질은 표 1과 같다.

2. Bentazon의 정제

성보화학(주)로부터 분양받은 bentazon (3-isopropyl-2,1,3-benzothiadiazin-4-one-2,2-dioxide, technical grade, 44.13%) 액제 50 ml를 round-bottom flask에 넣고 증류수 650 ml를 넣은 다음 활성탄 2.5 g을 첨가하여 95°C에서 1시간동안 환류하고, Büchner funnel로 여과한 후 그 여액에 활성탄 2.5 g을 다시 넣고 재환류하였다. 여과 후 그 여액을 교반하면서 결정이 생성될 때까지 conc. HCl을 첨가하고 방치한 다음 불순물이 섞인 상정액은 검사법으로 제거하고, 그 결정물에 methanol (HPLC grade) 200 ml와 활성탄 2.5 g을 넣고 다시 환류하였다. 여과 후 이 액에 conc. HCl을 넣고 rotary evaporator(R 110, Büchi, Switzerland)로 농축한 후 불순물을 제거하기 위하여 잔류물에 증류수 50 ml를 넣고 이 액을 여과한 후 50°C에서 건조하여 백색의 결정을 얻었고, 그 순도는 HPLC로 확인하였다.

3. 토양중 Bentazon의 분해

토양중 bentazon의 분해산물을 구명하기 위하여 논과 밭토양 300 g씩을 500 ml Erlenmeyer flask에 넣고 bentazon을 각각 200, 500 ppm 수준으로 처리하고 밭토양은 최대용수량의 60%에 해당하는 증류수를 넣었으며, 논토양은 담수로 하여 각각 2, 4,

Table 1. Physico-chemical properties of the sample soils

Soils	Characteristics	pH (1:5)	Organic matter (%)	Total sand (%)	Total silt (%)	Total clay (%)	Texture
Cheong Won A*		5.20	1.41	65	25	5	SL
Cheong Won B**		5.65	0.52	85	12	3	LS
Cheong Ju A*		6.70	1.59	83	10	7	LS
Cheong Ju B**		5.25	1.02	84	12	4	LS

A*: Submerged soil

B**: Upland soil

6개월 동안 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기내에서 배양하였다. 배양기간중 손실된 수분은 매주 보충하였다. 배양이 끝난 후 각 토양은 Lee 등⁶⁾의 방법에 따라 증류수를 추출용매로 사용하였다. 즉 각 시료에 증류수 150 ml를 넣고 2시간 진탕한 후 13,000 rpm에서 원심분리하여 그 상정액을 모으는 방법으로 4회 반복 추출하였다. 합한 추출액은 rotary evaporator로 농축한 후 소량의 methanol로 용해하고 이를 florasil column으로 정제한 다음 그 분해산물을 HPLC로 확인하였다.

4. 토양 현탁액중 bentazon의 분해

Glucose 1g을 함유한 증류수 95 ml와 공시토양 5g을 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 혼합한 다음 bentazon을 100 ppm 수준으로 처리하고 30°C 의 진탕항온기내에서 10일동안 배양하였다. 배양후 각 시료를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음 methanol에 재용해하여 정제 후 HPLC로 분석하였다.

5. 토양의 dehydrogenase activity 측정

토양의 dehydrogenase activity 측정은 Casida의 방법¹²⁾을 변형하여 실시하였다. 즉 두 종류의 논토양 (Cheong Won A와 Cheong Ju A) 각각 20g에 CaCO_3 0.2g을 넣어 완전히 섞은 후 시험관에 6g씩 취하여 3% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 1ml와 증류수 2.5 ml을 넣어 혼합하였다. 이 때 기질을

첨가하지 않은 control과 기질로써 0.05M glucose와 3.7% brain heart infusion broth를 첨가한 시료를 cork로 막은 다음 30°C 의 항온기내에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된 토양중의 triphenylformazan을 methanol로 추출한 다음 485 nm에서 흡광도를 측정하여 dehydrogenase activity를 정량하였다.

6. 미생물에 의한 bentazon의 분해

(1) 토양분리균에 의한 분해

200 ml Erlenmeyer flask에 각 토양 10g과 증류수 90 ml를 넣은 다음 bentazon을 200 ppm 수준으로 처리하였다. 이것을 30°C 의 진탕수조에서 14일동안 배양한 후 bentazon 분해균을 분리하였다. 200 ml 배양병에 nutrient broth (NB) 배지 (nutrient broth 8 g/L 증류수) 50 ml를 넣고 bentazon을 100 ppm 수준으로 처리한 다음 가압살균한 후 토양분리균을 접종하여 30°C 의 진탕항온기내에서 14일 동안 배양하였다.

(2) 기지미생물에 의한 분해

14종의 세균과 8종의 곰팡이를 각각 선정하여 bentazon의 농도를 10 ppm 수준으로 처리한 배지 [세균: NB medium, 곰팡이: PD medium(감자 20g + dextrose 20g/L 증류수)]에 접종하고 30°C 의 진탕항온기내에서 14일 동안 배양하였다.

(3) 배양액의 추출

14일 동안 배양한 배양액을 glass wool을 이용하여 여과한 다음 이 여액을 rotary evaporator로 농축하고

정제된 다음 HPLC로 bentazon의 분해산물을 분석하였다.

7. High performance liquid chromatography (HPLC)

정제된 bentazon의 순도확인 및 그 분해산물 분석에는 HPLC (Waters, U.S.A.)를 사용하였으며, column은 μ Bondapak C18 (8 mm \times 10 cm), detector는 UV detector (254 nm), 그리고 flow rate는 3 ml/min. 이었다. 이 때 사용된 용매는 acetonitrile:water (35:65, v/v)의 혼합액에 2.5%의 acetic acid를 첨가하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 정제된 bentazon의 순도확인

정제된 bentazon의 순도는 HPLC로 확인한 결과 99.5% 이상이였다.

2. 토양배양에 의한 bentazon의 분해

토양배양시 bentazon의 분해를 확인하기 위하여 각각의 토양에 200 ppm 및 500 ppm의 bentazon을 처리하고 각각 2, 4, 6개월 동안 배양한 후 토양추출액을 분석한 결과는 그림 1에서 보는 바와 같이 bentazon 500 ppm을 처리하고 2개월 동안 배양한 Cheong Won A 토양 (논토양)에서 6-hydroxy bentazon이 형성되었으며, 이 분해산물은 매우 소량에 불과하였다. 또한 그림 2 에서 보는 바와 같이 Cheong Won A 토양에 bentazon 200 ppm을 처리하고 6개월 동안 배양하였을 때는 주 분해산물로 6-hydroxy bentazon (1.27%)외에 소량의 8-hydroxy bentazon (0.57%)과 anthranilic acid (0.13%)가 생성되었다. 토양을 담수상태로 배양하였을 때 bentazon의 분해가 일어나는 것은 어느 정도 혐기성 미생물의 작용도 관여되리라 추측되어지며, 토양중에서 일어나는 bentazon의 주요대사과정은 6-hydroxy bentazon과 anthranilic acid를 형성하는 aromatic ring의 hydroxylation과 다른 부분의 가수분해인 것

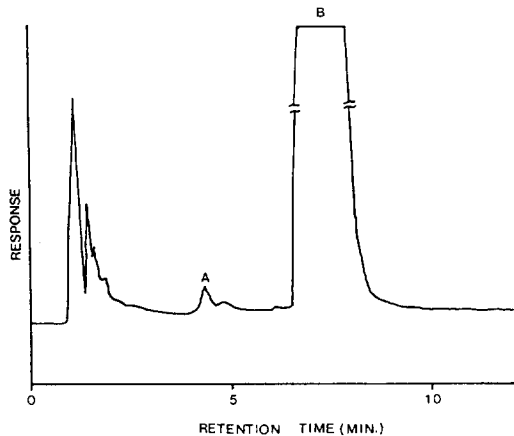


Fig. 1. HPLC of intact bentazon and its metabolites formed during incubation in Cheong Won A soil for 2 months.

- A : 6-Hydroxy bentazon
- B : Intact bentazon

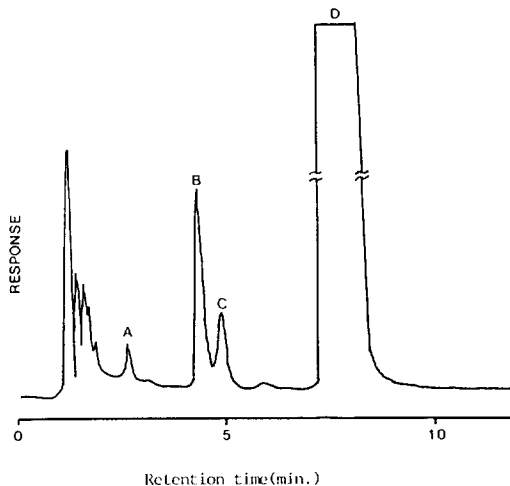


Fig. 2. HPLC of intact bentazon and its metabolites formed during incubation in Cheong Won A soil for 6 months.

- A : Anthranilic acid (0.13%)
- B : 6-Hydroxy bentazon (1.27%)
- C : 8-Hydroxy bentazon (0.57%)
- D : Intact bentazon

으로 생각된다. 한편 Otto 등¹⁰⁾에 의하면 bentazon은 토양중에서도 식물에서와 마찬가지로 aromatic ring의 hydroxylation으로 부터 분해가 시작되고 호기적인 조건에서만 진행된다고 하였으며, 분해산물로는 bentazon을 처리한 토양의 methanol 추출액에서 anthranilic acid isopropylamide를 검출하였으나 hydroxylation된 분해산물이 생성은 되었지만 추출이 되지 않은 것으로 추정하였다. 또한 벼, 귀리, 밀, 옥수수, 그리고 완두에서 bentazon은 8-hydroxy bentazon으로 소량 분해되되, 6-hydroxy bentazon으로 다량 분해된다고 하였다. 이를 본 연구결과와 비교해 볼 때 그들이 지적했듯이 bentazon의 분해는 호기적인 조건에서 초기에 hydroxylation에 의해 분해가 일어날 수도 있으나 본 연구에서와 같이 담수상태의 다소 혐기적인 조건에서도 유사한 분해과정이 일어날 수 있다는 것을 알 수 있다.

3. 토양 현탁액중 bentazon의 분해

미생물이 분비하는 효소에 의한 bentazon의 분해 가능성을 확인하기 위하여 4종의 공시토양 현탁액에 bentazon을 처리하고 배양한 후 그 추출액을 분석한 결과 모든 처리구에서 분해산물을 검출할 수 없었다.

4. 토양의 dehydrogenase activity 측정

효소활성 수준은 토양비옥도의 척도가 되며, 또한 미생물의 토양중 대사적 활성을 평가하는데 이용된다¹³⁾. 따라서 본 실험에서 두 가지 다른 토양조건하에서 미생물의 dehydrogenase activity를 측정한 결과는 표 2에서 보는 바와 같다. 즉 Cheong Won A 토양은 Cheong Ju A 토양보다 control 및 기질을 첨가한 모든 처리구에서 그 활성이 더욱 큰 결과를 나타내었다. 이는 Cheong Won A 토양이 Cheong Ju A 토양보다 미생물의 활성이 더 크므로 Cheong Won A 토양이 Cheong Ju A 토양보다 bentazon의 분해력이 클 것으로 추측된다. 또한 Baruah 등¹³⁾은 dehydrogenase의 활성이 높으면 혐기성 미생물의 활성이 크다고 하였다. 따라서 dehydrogenase의 활성이 높

은 Cheong Won A 토양이 토양배양실험에서 bentazon의 분해산물이 검출되었으므로 그 분해에 관여하는 인자들중 하나가 혐기성 미생물일 가능성을 시사해 준다.

Table 2. Dehydrogenase activity of Cheong Won A and Cheong Ju A soils

Substrate	Absorbance	
	Cheong Won A	Cheong Ju A
Control	0.280	0.180
0.05M Glucose	0.561	0.421
3.7% Brain heart infusion broth	0.460	0.295

5. 미생물에 의한 bentazon의 분해

(1) 토양분리균에 의한 분해

각 토양으로 부터 8종의 세균을 순수분리한 후 이들 미생물에 의한 bentazon의 분해 가능성을 검토하였으나 그 분해산물을 확인할 수 없었다. 한편 상기 토양배양실험시 Cheong Won A 토양에서 bentazon의 분해산물이 검출되었기 때문에 Cheong Won A 토양에서 분리한 미생물이 bentazon을 분해시킬 수 있을 것으로 기대하였으나 그 분해산물을 확인할 수 없었으며, 이것은 토양배양실험중 Cheong Won A 토양에서 그 배양조건이 담수상태이었기 때문에 토양에서 분리한 호기성균에 의한 bentazon의 분해가 어려웠던 것으로 생각되어진다.

(2) 기지미생물에 의한 분해

14종의 세균과 8종의 곰팡이를 이용하여 순수배양에 의한 bentazon의 분해를 확인한 결과 표 3과 4에서 보는 바와 같이 14종의 세균과 7종의 곰팡이에서는 bentazon을 분해하지 못하였지만, 곰팡이중 *Rhizopus stolonifer*만이 소량의 6-hydroxy bentazon과 주 분해산물로 anthranilic acid (4.6~31.6%)를 생성하였다(그림 3). Otto 등¹⁰⁾은 *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* 및 *Trichoderma*속 등의 곰팡이가 bentazon의 분해에 관여하며, 식물이나 미생물에 의한 bentazon의 분해는 주로 aromatic ring의 6번과 8번

위치에서 hydroxylation이 되고, 더욱 분해가 진행 되면 acetic acid, succinic acid와 간단한 유기화합 물을 거쳐 CO₂와 H₂O로 분해된다고 하였다. 이를 본 연구결과와 비교해 볼 때 그들이 지적한 bentazon의 분해에 관여하는 곰팡이중에서 *Rhizopus*속인 *Rhizopus stolonifer*가 bentazon을 분해한 것은 일치 하였지만, bentazon 분해에서는 그들의 지적과는 약간 달리 주로 가수분해산물인 anthranilic acid가 형성되었으며, aromatic ring의 hydroxylation에 의한 6-hydroxy bentazon은 소량에 불과하였다.

Table 3. The bacteria tested and their response to the herbicide (10 ppm bentazon)

Strains of bacteria	Response to the herbicide
<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168	-
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1521	-
<i>Bacillus subtilis</i> W-23	-
<i>Bacillus subtilis</i> NA 64	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-
<i>Bacillus brevis</i> IFO 3331	-
<i>Bacillus crueioial</i>	-
<i>Arthrobacter globiformis</i>	-
<i>Arthrobacter suiflex</i>	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
<i>Streptomyces erytheus</i> like 549	-
<i>Streptomyces lavendulae</i> RU 3340-8	-
An isolated strain	-

- : No degradation

Table 4. The fungi tested and their response to the herbicide (10 ppm bentazon)

Strains of fungi	Response to the herbicide
<i>Chaetomium globosum</i>	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+
<i>Valsa cerafospoma</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	-
<i>Trichoderma species</i>	-
<i>Pythium ultimum</i>	-
An isolated strain	-

+ : Degradation - : No degradation

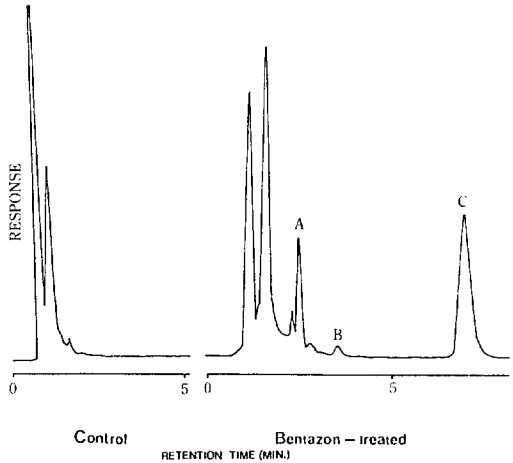


Fig. 3. Degradation products of bentazon by *Rhizopus stolonifer*.
 A : Anthranilic acid
 B : 6-Hydroxy bentazon
 C : Intact bentazon

5. 토양 및 미생물의 배양실험에 의한 bentazon의 가능한 분해경로

토양배양 및 미생물의 순수배양 실험에서 bentazon의 가능한 분해경로는 그림 4에서 보는 바와 같이

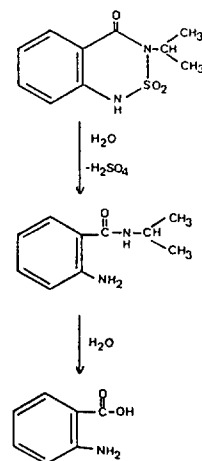


Fig. 4. Possible pathway of the formation of anthranilic acid from bentazon.

bentazon이 최초로 가수분해되어 anthranilic acid isopropylamide 및 H_2SO_4 가 형성되고, 다시 계속해서 가수분해가 진행되어 isopropylamine이 떨어져 anthranilic acid가 형성되는 것으로 추정된다.

요 약

토양미생물에 의한 제조제 bentazon (3-isopropyl-2,1,3-benzothiadiazin-4-one-2,2-dioxide)의 분해를 구명하기 위하여 성질이 서로 다른 충북지역의 밭토양 2종과 논토양 2종을 담수 및 밭토양 조건하에서 $23 \pm 1^\circ C$ 로 배양하였다. Bentazon 200 ppm을 처리한 Cheong Won A 토양 (Silty loam; pH, 5.2; 유기물 함량 1.4%)을 6개월 동안 담수상태에서 배양하였을 때 주 분해산물로 6-hydroxy bentazon (1.27%) 및 소량의 8-hydroxy bentazon (0.57%)과 anthranilic acid (0.13%)가 형성되었다. 한편 bentazon 500 ppm을 처리한 동일토양을 2개월 동안 배양하였을 때는 소량의 6-hydroxy bentazon이 형성되었다. 8종의 미생물을 토양으로 부터 분리하여 순수배양실험을 하였으나 뚜렷한 분해산물을 검출하지 못하였다. Cheong Won A 토양이 Cheong Ju A 토양보다 더욱 큰 dehydrogenase 활성을 나타낸 것으로 보아 전자가 후자보다 더 큰 bentazon 분해력을 가질 것이라고 추측되었다. 세균 14종과 곰팡이 8종에 대하여 bentazon 10 ppm을 처리하고 14일간 배양하였을 때 *Rhizopus stolonifer*만이 주 분해산물로 anthranilic acid (4.6~31.6%) 그리고 소량의 6-hydroxy bentazon과 8-hydroxy bentazon (1.27%)을 형성하였으며, 나머지 미생물에서는 대사산물을 검출할 수 없었다.

참고문헌

- Anderson, R. N., W. E. Lueschen, D. D. Warnes, and W. W. Nelson(1974) : Controlling broadleaf weeds in soybeans with bentazon in Minnesota, Weed Sci., 22, 136.
- Baltazar, A. M. and T. J. Monaco(1984) : Uptake, translocation, and metabolism of bentazon by two pepper species, Weed Sci., 32, 258.
- Böger, P., B. Beese, and R. Miller(1977) : Long-term effects of herbicides on the photosynthetic apparatus II. Investigations on bentazon inhibition, Weed Research, 17, 61.
- Hayes, R. M. and L. M. Wax(1975) : Differential intraspecific responses of soybean cultivars to bentazon, Weed Sci., 23, 516.
- Irons, S. M. and O. C. Burnside(1982) : Absorption, translocation, and metabolism of bentazon in sunflower, Weed Sci., 30, 255.
- Lee, J. K., F. Führ, and W. Mittelstaedt(1988) : Formation and bioavailability of bentazon residues in a German and Korean agricultural soil, Chemosphere, 17, 2, 441-450.
- Mine, A. and S. Matsunaka(1973) : Mode of action and selective mechanism of bentazon, Proc. Weed Soc. Japan, 12th Meeting, 82.
- Mine, A. and S. Matsunaka(1975) : Mode of action of bentazon. Effect on photosynthesis, Pestic. Biochem. Physiol., 5, 444.
- Mine, A., M. Miyakado, and S. Matsunaka(1975) : The mechanism of bentazon selectivity, Pestic. Biochem. Physiol., 5, 566-574.
- Otto, S., P. Beutel, N. Drescher, and R. Huber (1978) : Investigation into the degradation of bentazon in plant and soil, Adv. in Pestic. Sci., 3, 551.
- Retzlaff, G. and R. Hamm(1976) : The relationship between CO_2 assimilation and the metabolism of bentazon in wheat plants, Weed Research, 16, 263-266.
- Casida, L. E. Jr.(1977) : Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations, Appl. Environ. Microbiol., 34, 6, 630.

13. Baruah, M. and R. R. Mishra(1984) : Dehydrogenase and urease activities in rice-field soils, *Soil Biol. Biochem.*, 16, 4, 423.