

제초제 Dicamba의 토양미생물 및 잔디 효소에 의한 분해

오경석* · 이영기 · 오병렬 · 이병무 · 이재구¹

농업과학기술원 작물보호부, ¹충북대학교 농과대학 농화학과

요약 : 토양미생물 및 잔디 추출액에 의한 제초제 dicamba의 분해성을 평가하기 위하여 본 실험을 수행하였다. Dicamba를 분해하는 토양미생물 5종을 enrichment culture에 의해 토양으로부터 분리하였으며, 이들 균주는 *Acidovorax sp.*, *Alcaligenes sp.* 및 *Variovorax sp.*로 동정되었다. Dicamba를 10 ppm 수준으로 처리한 무기배지에서 분리균에 의한 dicamba 분해는 배양 21일 후에 평균 90% 이상이었으며, 분해산물로 5-hydroxydicamba가 검출되었다. 한국잔디 (*Zoysia japonica* S.)를 phosphate buffer로 추출하여 추출액에 의한 dicamba 분해를 조사한 결과 dicamba의 반감기는 2.5~2.7일 이었으며, 대사산물로 소량의 4- 및 5-hydroxydicamba가 검출되었다.(2000년 10월 23일 접수, 2000년 12월 13일 수리)

Key words : Dicamba, degradation, microorganisms, turfgrass, enzyme.

서론

국내에 있는 잔디는 대부분 묘지, 골프장 및 공원녹지 등에 식재되어 있는데, 이러한 잔디를 심고 적절한 관리 없이 방치하면 잔디는 2~3년 내에 완전히 소멸하여 잡초밭이 되어 버린다. 이러한 현상은 도로주변이나 묘지 등에서 쉽게 볼 수 있는데 잔디밭에서의 잡초발생 상황은 잔디 조성 당시 일년생잡초가 발생하고 이어서 초장이 짧은 다년생 잡초에서 대형 다년생잡초로 변천하며, 이 사이에 성장·도태가 행해져 잔디는 초기단계에서 쇠퇴해 버린다. 따라서 잔디는 매년 초 반복하여 중점관리하고 있는 실정이다. 잔디밭의 관리는 잡초방제에 달려 있는데 크게 인력제초와 제초제 사용으로 대별할 수 있다.

그러나 인력 제초는 국내 노동력의 노령화 및 인력확보의 어려움 등 현실적 문제점이 있으며, 과중한 노동과 노령자에 의한 노동의 질적저하 등과 더불어 다년생 잡초방제 문제를 생각하면 몇 배의 경비가 더 들게되고, 잔디에 대한 손상도 크다. 그러나 제초제는 잡초종류에 대응한 방제가 가능하고 인력으로는 방제하기 곤란한 잡초도 쉽게 제초할 수 있다. 이들 제초제는 살포되었을 때 유효성분이 엽면, 줄기, 토양 등에 부착되지만 최종적으로는 토양으로 유입되어 유입량과 활성정도에 따라 부작용을 발생시킬 가능성이 있다. 토양 중에 유입된 농약은 용탈, 토양과의 흡착 및 분해작용 등에 의하여 소실되는데 농약의 분해 및 불활성화는 미생물에 의한 것이 가장 우세하다고 알려져 있다. 그 예로 잔디 중에서 시비와 잔디깎기를 반복하는 곳에서는 미생물군의 밀도가 증가하여 제초제가 분해되고 또한 농약의 잔효 및 잔류기간도 짧아지는 특성도 있다. 농약의 분해에 참여하는 토양미생물은 일반적으로 농약을 생화학적으로 영양원 또는 에너지원으로 이용하는 적응 또는 구성요소 효소체계를 포함하고 있다. 탄소, 질소 또는 다른 영양물의 단독 또는 보조원으로서 농약을 이용하는

수많은 연구들이 보고되었다 (Kaufman, 1974; Kaufman와 Kearney, 1976; Bartha와 Pramer, 1970). Krueger 등 (1989, 1991)은 dicamba (3,6-dichloro-*o*-anisic acid)에 감수성이 있는 완두 및 콩종자의 근권에 dicamba를 분해시킬 수 있는 3종의 토양미생물을 처리하였을 때 dicamba에 의한 피해로부터 보호될 수 있으며, dicamba를 단독 탄소원으로 이용하는 8종의 세균에 dicamba를 3.4 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 처리하였을 때 21일 후에 dicamba가 98% 정도 분해되었다고 하였으며, 그 주 분해산물로 3,6-dichlorosalicylic acid, 그리고 미량의 2,5-hydroxy-3,6-dichlorosalicylic acid가 검출되었다고 하였다. 제초제 amitrole의 유리기 (free radical) 분해는 토양미생물의 영향을 받는다고 하였으며 (Kaufman 등, 1968; Plimmer 등, 1967), 또한 trifluralin의 화학적 분해는 토양미생물이 활성화된 혐기 조건하에서 더욱 빠르게 분해된다고 하였다 (Willis 등, 1974).

한편 국내에서는 2000년 12월 현재 총 956종의 등록농약 중 제초제가 25%에 해당하는 239종이고, 잔디밭에 이용되는 제초제는 13종이 등록되어 있다. 이들 농약은 대부분 수화제, 액제 등 희석제 농약 (정과 박, 1992)이며, 희석제 농약 중 시중에서 판매되고 있는 dicamba 액제는 용탈이 쉽고, 농약처리시 비산에 의해 주변작물에 약해발생 및 오용에 의한 피해를 유발시키는 경우가 많다.

따라서 본 연구에서는 토양 중에서 분리한 토양미생물 및 잔디 추출액에 의하여 dicamba의 분해정도 및 분해과정을 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 시험에 사용된 dicamba (순도 96.0%) 및 대사산물은 일본 SDS사로 부터 분양받아 사용하였으며, pentafluorobenzyl bromide는 Sigma사 (미국) 제품을 구입하여 사용하였다. 한편 미생물 분리를 위하여 채취된 토양은 골프장

*연락처

인근 지역에서 1996년 3월부터 5월까지 양토 및 사양토 각각 5점을 채취하여 실시하였으며, 잔디 또한 골프장에서 한국잔디를 채취하였다.

토양미생물의 분리

토양미생물에 의한 dicamba 분해실험은 토양 50 g에 증류수 250 ml를 가하여 조제한 토양현탁액을 실온에서 4시간 방치한 다음 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)와 1:1로 혼합하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상정액 0.2 ml를 10 ppm dicamba 수용액 1 ml로 피복된 MM₂ 무기배지 [Mineral salts medium, 18 mM (NH₄)₂SO₄, 1 μM FeSO₄ · 7H₂O, 100 μM CaCl₂ · 2H₂O, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 8.5 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 15 g Agar, 1 l 증류수] (Kiyohara 등, 1982)에 도말한 다음 30±1°C의 항온기내에서 3일간 배양하였다. 배양 후 분리균을 10 ppm dicamba가 함유된 MM₂ 무기배지에 접종하고 매 2주 간격으로 10 ppm dicamba 1 ml 씩 2회 처리한 다음 각 분리균 배지내의 colony를 nutrient broth (NB) 사면배지 (5 g peptone, 3 g beef extract, 1 l 증류수)에 접종하였다.

분리 미생물의 동정 및 생리적 특성

분리 미생물의 동정은 Microlog system (Biolog, 3.5)를 이용하여 세균의 영양 이용성과 유사도를 조사하였으며, 이들 균의 주요 생리적 특성은 Collins 등 (1995)의 방법에 따라 조사하였다.

분리 미생물의 dicamba 분해력 측정

토양에서 분리한 균의 dicamba 분해성은 분리균을 10 ppm dicamba가 함유된 nutrient broth medium 및 MM₂ salt medium에 접종하고 28±1°C의 진탕배양기내에서 150 rpm의 속도로 2주간 배양하였다. 배양 후 dicamba 및 대사산물의 분석은 Carroll 등 (1993)과 Smith (1973)의 방법에 준하여 수행하였다. 즉 시료 전량을 증류수 100 ml로 1시간동안 초음파 추출한 후 추출액 전량을 250 ml 분액여두에 옮긴 다음 dichloromethane 40 ml를 넣고 분배하였다. 이 때 dichloromethane층은 버렸고, 수상층에 sodium chloride 15 g을 첨가하고 ethyl acetate 50 ml를 부가한 다음 다시 분배하여 추출하였다. 이 때 유기상층은 anhydrous sodium sulfate에 통과시켜 모아두고 상기 조작을 2회 반복하였다. 이 ethyl acetate 추출액을 진공회전농축기를 이용하여 약 1 ml까지 농축한 후 다시 질소가스를 이용하여 건조하였다. 이 농축액을 methanol 5 ml로 재용해한 다음 마개달린 시험관에 옮긴 후 질소가스로 농축하였다.

이 건조물을 gas-liquid chromatography (GLC)를 이용하여 모화합물인 dicamba 및 분해산물을 분석하기 위하여 pentafluorobenzoylation (PFB benzoylation)을 수행하였다. 즉 농축액에 pentafluorobenzyl bromide 1 μl와 0.2 M sodium carbonate : 0.1 M tetrabutylammonium hydrogen sulfate (1:1, v/v, pH 10) 혼합

용액 1 ml를 부가한 후 60°C의 수욕상에서 20분간 서서히 흔들며 반응시켰다. 반응액을 1 N hydrochloric acid로 중화한 다음 toluene 1 ml로 3회 추출하였다. 이 추출액을 진공회전농축기를 이용하여 농축, 건조한 후 n-hexane 10 ml로 재용해하고 GLC를 이용하여 모화합물인 dicamba 및 분해산물을 분석하였다. 이 때 사용된 기기로는 electron capture detector (⁶³Ni, ECD)가 부착된 GLC (HP 5890 series II Plus, USA)였으며, column으로는 SE-30 (2 mm ID × 2 m L)을 사용하였다. 온도는 injector 250°C, column 200°C, detector 290°C, carrier gas (N₂)의 유속은 40 ml/min이었다.

한국잔디에 의한 dicamba의 분해

Dicamba를 함유하지 않은 잔디시료 10 g과 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 150 ml를 Waring blender에 넣고 10,000 rpm으로 3분간 마쇄한 다음 gauze로 1차 여과하고 Büchner funnel을 이용하여 흡인여과하였다. 이 여액에 dicamba를 10 ppm과 20 ppm 수준으로 처리하고 37°C의 항온기내에서 배양하면서 배양 1, 3, 5, 7, 9일 후의 시료를 채취하여 전량을 500 ml 증류 flask에 넣고 1N hydrochloric acid 150 ml를 첨가한 후 95°C에서 1시간동안 환류시켰다. 환류 후 추출액을 실온까지 냉각시킨 다음 500 ml 분액여두에 옮기고 4 N potassium hydroxide 50 ml를 넣은 후 격렬하게 흔들며 pH가 8이상인지를 확인한 후 20분간 방치하였다. 이 액에 sodium chloride 20 g을 넣고 다시 6 N hydrochloric acid를 사용하여 pH 1이하로 조절한 다음 ethyl ether 50 ml를 넣고 1분간 격렬하게 진탕분배하였다. 이 때 ethyl ether 층은 anhydrous sodium sulfate에 통과시켜 모아 두고 상기 조작을 2회 반복 추출하였다. 추출액 전량을 진공회전농축기를 이용하여 추출액이 5 ml 남을 때까지 감압농축한 다음 diazomethane 용액(ethyl ether) 5 ml를 넣고 methylation 하였다. Methylation 후에 이 액을 10%의 물로 불활성화된 silica gel 5 g이 충전된 column에 옮겨 분해되지 않은 dicamba를 분석하기 위하여 1차로 ethyl ether - hexane (5 : 95, v/v) 혼합용액 50 ml로 용출시켜 받고 다시 dicamba 및 대사산물을 분석하기 위하여 ethyl ether - hexane (20 : 80, v/v) 혼합용액 150 ml로 용출하여 받은 다음 각각 감압농축하여 GLC/ECD로 분석하였다.

결과 및 고찰

분리균의 동정 및 생리적 특성

토양으로부터 enrichment culture를 이용하여 dicamba 분해균을 분리하였으며, dicamba 분해균은 dicamba를 유일한 탄소원으로 첨가한 MM₂ 무기배지에 접종한 다음 증식된 5 균주를 분리하였다. 이들 분리 균주는 Microlog system을 이용하여 동정한 결과 표 1에서 보는 바와 같이 DK 1과 DD 2가 *Acidovorax* sp.와 유사도가 각각 0.85 및 0.90, DK 2 및 DD 3는 *Variovorax* sp.와 유사도가 각각 0.72 및 0.92, DD 1은 *Alcaligenes* sp.와 유사도가 0.88

로서 매우 높은 유사도를 보여 주었다. 또한 이들 분리 균주의 각각의 특성을 Bergey's manual (Holt, 1994)의 방법에 따라 확인한 결과 DK 1과 DD 2는 *Acidovorax* 속과 일치하는 gram negative, rod 모양의 세포형태, 반응성도 액체배지내의 운동성, 산화효소 반응성 및 poly- β -hydroxybutyrate 축적성 모두 양성반응을 나타내었다. 또한 DK 2 및 DD 3도 *Variovorax* 속과 특성이 일치하였으며, yellow colony이었다. 한편 DD 1과 *Alcaligenes* 속을 비교한 결과 gram negative, rod 모양, 액체배지내의 운동성 및 β -hydroxybutyrate 이용성이 양성으로써 일치하였다 (표 2).

Table 1. Identification of dicamba-degrading microorganisms isolated from the soil with enrichment culture by Microlog system

Isolate	Identity	Similarity
DK 1	<i>Acidovorax</i> sp.	0.85
DK 2	<i>Variovorax</i> sp.	0.72
DD 1	<i>Alcaligenes</i> sp.	0.88
DD 2	<i>Acidovorax</i> sp.	0.90
DD 3	<i>Variovorax</i> sp.	0.92

토양미생물에 의한 dicamba 분해

토양으로부터 dicamba 분해균을 분리한 후 이들 분리균에 의한 dicamba 분해실험을 수행한 결과는 표 3과 같다. 분리균은 dicamba를 유일한 탄소원으로 첨가한 MM₂ 무기배지에 접종한 다음 21일 후에 분석한 결과 이들 분리균 모두 dicamba를 85.7%~96.6% 분해하였으며, DD1과 DD2를 접종한 배지에서 dicamba의 분해산물인 5-hydroxydicamba (5-OH dicamba, 0.51%~0.6%)를 검출하였다 (그림 1).

따라서 순수배양에서 dicamba를 단독 탄소원으로 처리될 때에는 토양미생물에 의해서 쉽게 이용되고 분해되며, 그 대사작용은 hydroxylation 및 demethylation에 의하여

분해되는 것으로 확인되었다. Krueger 등 (1989)이 단독 탄소원으로 dicamba를 이용할 수 있는 8종의 토양세균을 enrichment culture에 의하여 분리한 후 dicamba의 분해성을 검토한 결과 액체배지내에서 dicamba의 주요 분해균으로 *Pseudomonas* sp. 및 *Moraxella* sp. 등이 분리·선발된 것으로 보고하고 있으나, 본 연구에서 분리동정된 균주는 *Acidovorax* sp.와 *Variovorax* sp.가 각각 2종 및 *Alcaligenes* sp.가 1종으로 분리되었다. 이들 분리균주의 dicamba 분해능은 Krueger 등 (1989, 1991)이 분리한 균주와 대등함을 확인하였다.

한편 이들 분리균이 탄소원이 존재하는 유기배지내에서도 dicamba를 분해시킬 수 있는지를 확인한 결과 DD 1을 접종한 배지에서 dicamba를 89.93% 분해시켰으며, 나머지 균주에서도 21.24~31.6%의 높은 분해력을 보여주었다.

Table 3. Degradation activity of dicamba-degrading isolates in different media treated with 10 ppm of dicamba

Isolate	% Recovered ^{a)}		
	MM ₂ medium		NB medium
	Dicamba	5-OH dicamba	Dicamba
DK 1	3.38	<0.01	78.76
DK 2	9.11	<0.01	68.41
DD 1	5.62	0.51	10.07
DD 2	9.31	0.60	72.91
DD 3	14.35	<0.01	75.51

^{a)}21 days after incubation.

한국잔디중 효소에 의한 dicamba의 분해

Dicamba를 잔디에 처리하였을 때 dicamba가 잔디내로 이행하여 분해되는 과정을 확인하고자 잔디 중에 함유된 효소균을 phosphate buffer를 이용하여 추출한 다음 이 추출액에 dicamba를 처리하고 37°C에서 배양하면서 *in vitro* 실험을 통해 dicamba의 분해를 검토한 결과는 그림 2와

Table 2. Characteristics of dicamba-degrading microorganisms isolated from the soil

Characteristic	<i>Acidovorax</i> sp.		<i>Alcaligenes</i> sp.		<i>Variovorax</i> sp.	
	DK 1, DD 2	Holt ^{b)}	DD 1	Holt	DK 2, DD 3	Holt
Gram reaction	- ^{a)}	-	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Short Rod	Rod	Rod
Mobility in liquid medium	+	+	+	+	+	+
Yellow colony	-	-			+	+
Oxidase	+	+			+	+
Poly- β -hydroxybutyrate accumulated	+	+			+	+
Utilization of β -hydroxybutyrate			+	+		

^{a)}+ : Positive, - : Negative.

^{b)}Holt *et al.* in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

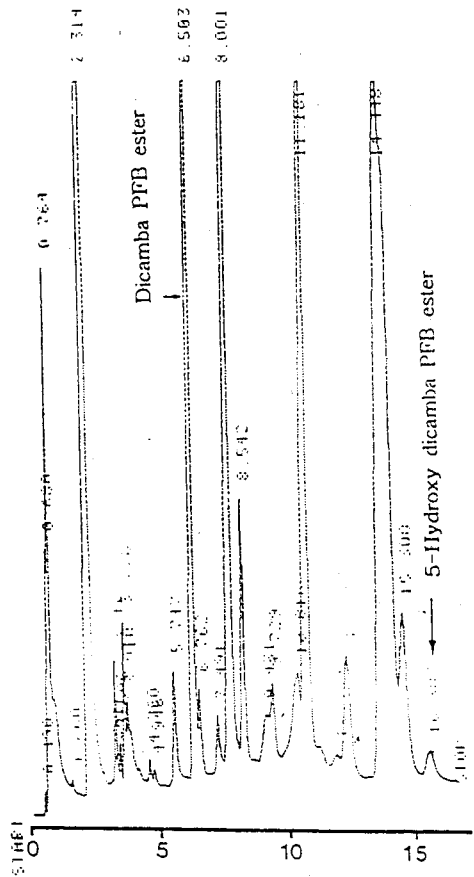


Fig. 1. GLC chromatogram of the degradation products of dicamba by the *Alcaligenes sp.* after 21 days of incubation.

표 4과 같다. 10 ppm 농도로 처리되었을 때에는 dicamba의 반감기가 2.5일이었으며, 20 ppm으로 처리하였을 때에는 2.7일 이었다.

따라서 dicamba는 토양중에서의 반감기가 14~25일인 점을 감안하면 dicamba는 토양미생물에 의해 분해되는 속도보다 식물체내에서 분해되는 속도가 빠른 것으로 보인다.

한편 저자들이 수행 (오 등, 2000)한 광분해 실험에서와 동일하게 phosphate buffer 추출액에서도 dicamba의 분해산물로 소량의 5-OH dicamba가 검출되었으며, gas chromatogram 상에서 나타났듯이 RT 5.9분대에서 dicamba의 분해산물로 추정된 4-OH dicamba가 소량 검출되었다. 이들 대사산물의 RT는 광분해 실험에서 얻은 분해산물의 RT와 동일하였으나, 이들 분해산물의 GC/MS 분석은 추출액 중에 포함된 양이 너무 적기 때문에 확인할 수 없었다.

따라서 본 연구의 결과를 종합하여 보면 dicamba를 잔디에 살포하였을 때 dicamba는 토양 중의 dicamba 분해 미생물에 의해 쉽게 가수분해될 수 있으며, 또한 잔디에 흡수된 후에도 잔디 중에 존재하는 효소군에 의해 가수분해되는 것으로 판단되었다.

Table 4. Half-life of dicamba in the phosphate buffer extract of the turfgrass, *Zoysia japonica S.*

Concentration (mg/ l)	Equation	Half-life (Day)
10	$y = 7.14e^{-0.1376x}$ ($r=0.958^*$)	2.5
20	$y = 14.9e^{-0.0405x}$ ($r=0.951^*$)	2.7

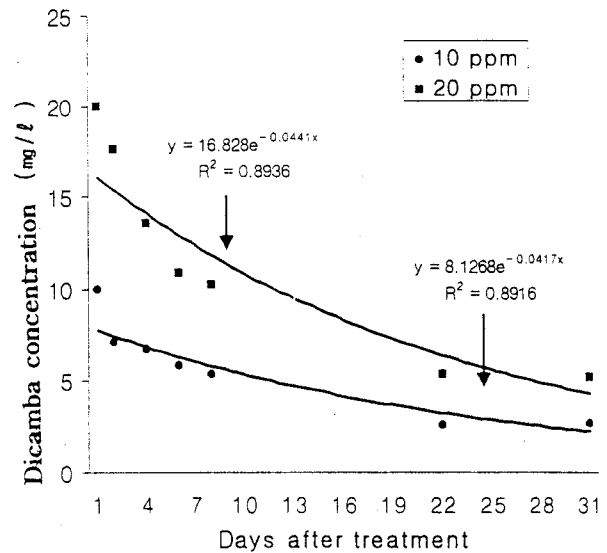


Fig. 2. The degradation of dicamba in the phosphate buffer extract of turfgrass, *Zoysia japonica S.*

인용문헌

Bartha, R. and D. Pramer (1970), *Adv. Appl. Microbiol.*, 13, 317.

Carroll, M. J., R. L. Hill, E. Pfeil, and A. E. Herner (1993) Washoff of dicamba and 3,6-dichlorosalicylic acid from turfgrass foliage, *Weed Tech.*, 7:437~442.

Collins, C. H., M. L. Patricia, and J. M. Grange (1995) Collins and Lyné microbiological methods, 7th ed., Butterworth-Heinemann Ltd., Linacre House, Jordan Hill, Oxford.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams (1994) pp.787, *In* Bergey's manual of determinative bacteriology (ed. Williams & Wilkins) Maryland, USA.

Kaufman, D. D. (1974) pp.133~202, *In* : "Pesticides in soil and water" (Guenzi, W. D., Ed.), Soil Sci. Soc. Am.

Kaufman, D. D. and P. C. Kearney (1976) pp.29~64, *In* : "Herbicides : Physiology, Biochemistry, Ecology" Vol. 2, (Audus, L. J., Ed.), Academic Press.

Kaufman, D. D., J. R. Plimmer, P. C. Kearney, J. Blake, and F. S. Guardia (1974) *Weed Sci.*, 16:266.

- Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yano (1982) Rapid screening for bacteria degrading water-insoluble solid hydrocarbons on agar plates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:454~457.
- Krueger, J. P., R. G. Butz, and D. J. Cork (1991) Aerobic and anaerobic soil metabolism of dicamba, *J. Agr. Food Chem.*, 39:995~999.
- Krueger, J. P., R. G. Butz, and D. J. Cork (1991) Use of dicamba-degrading microorganisms to protect dicamba susceptible plant species, *J. Agr. Food Chem.*, 39:1000~1003.
- Krueger, J. P., R. G. Butz, Y. H. Atallah, and D. J. Cork (1989) Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba, *J. Agr. Food Chem.*, 37:534~538.
- Plimmer, J. R., P. C. Kearney, D. D. Kaufman, and F. S. Guardia (1967) *J. Agr. Food Chem.*, 15:996.
- Smith, A. E. (1973) Transformation of dicamba in regina heavy clay, *J. Agr. Food Chem.*, 21:708~710.
- Willis, G. H., R. C. Wander, and L. M. Southwick (1974) *J. Environ. Qual.*, 3:262.
- 오경석, 오병렬, 박승순, 임양빈, 경기성, 이재구 (2000) 제초제 dicamba의 자연광 및 토양 중 분해, *농약과학회지*, 4(3):1~6.
- 정영호, 박영선 (1992) *농약학*, 전국농업기술협회, pp.316~321.

Degradation of the herbicide dicamba by microorganisms isolated from the soil and phosphate extracts of turfgrass, *Zoysia japonica* S.

Kyeong-Seok Oh*, Young-Gi Lee, Byung-Youl Oh, Byung-Moo Lee and Jae-Koo Lee¹(National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, ¹Chung Buk National University)

Abstract : Degradabilities of the dicamba by microorganisms isolated from soil and by enzymes in the turfgrass, *Zoysia japonica* S. were investigated. Five species of dicamba-degrading microorganisms including *Acidovorax* sp., *Alcaligenes* sp., and *Variovorax* sp. were isolated from soils by enrichment culture. All strains in nutrient-free inorganic medium treated with 10 ppm of dicamba degraded average 90% of the dicamba 21 days after incubation. 5-Hydroxydicamba, major metabolite, was detected from the culture broth. The half life of dicamba in the phosphate buffer extracts of *Zoysia japonica* S. was 2.5 to 2.7 days. Trace amounts of 4- and 5-hydroxydicamba were detected in the extracts.

*Corresponding author (Fax : +82-31-290-0521, E-mail : ohks@rda.go.kr)