

## **Bacillus sp. MS202에 의한 Dinitroaniline계 제초제인 Pendimethalin의 부분환원**

이영근\* · 장화형 · 장유신 · 형석원 · 정혜영

한국원자력연구소, 방사선이용연구부  
(2004년 10월 15일 접수, 2004년 11월 23일 수리)

### **Partial Reduction of Dinitroaniline Herbicide Pendimethalin by *Bacillus sp. MS202***

Young-Keun Lee\*, Hwa-Hyoung Chang, Yu-Sin Jang, Seok-Won Hyung, and Hye-Young Chung (Radiation Application Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute)

**ABSTRACT :** The persistence of pendimethalin in soil and ground water has an injurious effect on ecosystem. Pendimethalin-degrading bacterium was isolated from Masan, Gyeongnam province and temporarily identified as *Bacillus sp. MS202* by the analysis of API CHB50, kit, FAME, and 16S rDNA sequence. From the analysis of pendimethalin metabolite using TLC, GC, and GC-MS, we found that the degradation of pendimethalin by *Bacillus sp. MS202* did not result in the dealkylated form, but the formation of the reduced compound, 6-amino-2-nitro-*N*(1-ethylpropyl)-3,4-xylylidine or 2-amino-6-nitro-*N*(1-ethylpropyl)-3,4-xylylidine.

**Key words:** Pendimethalin, *Bacillus*, reduction, mass spectrometry.

## 서 론

Dinitroaniline 계열의 선택성 제초제인 pendimethalin [*N*(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylylidine]은 식물의 뿌리와 잎에 의해 흡수되며 발아 후에 식물의 미소관을 분열시킴으로써 잡초의 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. Pendimethalin은 상대적으로 낮은 휘발성 (vapour pressure,  $3.0 \times 10^{-5}$  mmHg at 25°C)을 가지기 때문에 토양표면에서 휘발에 의한 유실율이 낮으며<sup>2)</sup> 특히 토양에 시비되는 유기비료중 요소를 토양에 처리하였을 경우 요소에 의해 방출되는 유기물질이 pendimethalin과 상호작용하여 증발율을 감소시킨다고 하였다<sup>3)</sup>. 또한 반감기가 60일 이상으로 토양 중에 머무는 기간이 길며 다른 dinitroaniline 계열의 농약들보다 광분해가 적은 것으로 보고되었다<sup>4)</sup>. 이러한 토양중에 잔류하는 pendimethalin은 독성적인 측면에서 일반적으로 보통독성을 나타내지만 생체 내에서 축적 된다는 보고가 있기 때문에<sup>5)</sup> 미국의 EPA (Environmental Protection Agency)에서는 이를 환경 잔류성 농약으로 분류하고 있어<sup>6)</sup> 환경적 측면에서 잔류성 문제를 해결하기 위한 연구가 요구되고 있다.

Iesce 등<sup>7)</sup>은 많은 종류의 농약들이 자외선에 의해 분해될 수 있다고 보고하였고, Polonca 등<sup>8)</sup>은 X-ray에 의해서 유기인계 농약이 분해되는 것으로 보고하였다. 또한, 토양에 살포된 농약들 중 일부는 미생물에 의해 분해되어 무독성화 된다고 알려져 있다<sup>9)</sup>. 이러한 농약분해 미생물을 이용하는 방법은 환경친화적이고 광범위한 지역들을 효율적으로 정화할 수 있는 특성을 가지고 있다. 농약분해는 bacteria<sup>10)</sup>, actinomycetes<sup>11)</sup>, fungi<sup>12)</sup> 등에 속하는 다양한 미생물들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 미생물의 농약분해는 성장을 위한 기질로 이용하는 경우<sup>13)</sup>와, 에너지원으로 이용하지 않고 단순히 농약의 분자구조를 변화시키는 경우<sup>14)</sup> 그리고 미생물의 활동에 의하여 주변환경이 바뀌어 비효소적으로 농약의 구조가 변형되는 경우<sup>15)</sup> 등을 들 수 있다.

한편, 미생물에 의한 pendimethalin의 분해 대사반응은 부분 환원, 탈알킬화, 고리화(cyclization) 등일 것으로 가정되고 있다. Singh<sup>16)</sup> 등은 곰팡이 (*Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces varioti*, *Rhizoctonia bataticola*, *Trichoderma viride*) 및 세균 (*Bacillus megaterium*, *Pseudomonas sp.*, *Pyricularia sp.*, *Rizobium sp.*)이 pendimethalin을 분해한다고 보고하였으며, 이 중 *F. oxysporum*과 *P. varioti*는 호기조건에서 탈알킬화와 환원을 일으키며, *R. bataticola*는 탈알킬화 반응만

\*연락처:  
Tel: +82-42-868-8056 Fax: +82-42-862-6980  
E-mail: yklee@kaeri.re.kr

일으키는 것으로 보고하였다. Parr 등<sup>17)</sup>은 dinitroaniline 계열의 제초제인 trifluralin이 토양 미생물 집단에 의해 호기 조건에서 탈알킬화과정을 거친 후 환원이 일어나며, 혐기 조건에서 환원과정을 거친 후 탈알킬화가 일어난다고 보고하였다. 하지만, 현재까지의 보고만으로는 미생물에 의한 pendimethalin의 분해 대사반응 (부분 환원, 탈알킬화, 고리화)의 경로를 총체적으로 이해하기에는 자료가 많이 부족한 실정이다.

본 연구는 dinitroaniline 계열의 제초제인 pendimethalin을 분해하는 미생물의 분해경로를 구명하기 위하여 새로운 균주를 분리하였으며, 이들의 분해산물을 TLC, GC 그리고 GC-MS로 분석하였다.

## 재료 및 방법

### Pendimethalin 분해 균주의 분리 및 동정

마산 교방동에 있는 소나무숲의 부식토로부터 채취한 1 g의 토양을 10 mL의 0.85% 생리식염수에 넣고 교반기 (180 rpm, 30°C, SI-600R, JEIO TECH)를 이용하여 30분간 잘 교반한 후 30분간 실온에 정치하여 토양과 상등액이 분리되도록 하였다. 상등액 50  $\mu$ L를 nutrient agar 배지 (NA, Difco, USA)에 도말하여 30°C에서 18시간 배양한 후 형성된 각각의 colony들을 NA 배지에 순수배양하였고, 이들을 농약분해활성 실험의 후보균주들로 선정하였다. Pendimethalin의 분해활성은 1,000 ppm의 pendimethalin (Bayer, Korea)이 포함된 NA 배지에서 콜로니 주변에 투명대 (clearing zone)를 형성하는 것으로 판별하였다<sup>18)</sup>. Pendimethalin 분해활성을 가진 균주는 API CHB50 kit (bioMerieux, France) 시험, FAME (Fatty acid methyl ester, Agilent GC 6890, Sherlock version 3.10, MIDI system) 분석 및 16S rDNA의 염기서열 분석으로 동정하였으며 이때 primers는 16-F (*E. coli* numbering 42-63: 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3')와 16-R (*E. coli* numbering 1386-1404: 5'-GCG CGG WGT GTA CAA GGC-3')<sup>19)</sup>였다.

### Pendimethalin 분해산물의 TLC, GC 및 GC-MS 분석

선별된 균주를 200 ppm의 pendimethalin이 함유된 영양액체배지 (NB, Difco, USA)에 접종한 후 교반 배양기 (180 rpm, 37°C, SI-600R, JEIO TECH)에서 3일간 배양하였다. 2 mL의 CHCl<sub>3</sub>를 첨가하고 1분간 잘 혼합한 다음 3,500 rpm으로 원심분리하였다. CHCl<sub>3</sub>층을 회수하여 TLC판 (60×100 mm, silica gel 60 F 254, MERCK)에 전개하였다. 이때 TLC의 전개 용매는 hexane 대 diethyl ether를 3 : 1의 비율로 배합하여 사용하였다. TLC 분석에서 사용한 시료에 대해 GC 및 GC-MS (Agilent 6890, USA)분석을 실시하였으며 조건은 Table 1과 같다.

**Table 1. GC and GC-MS operating parameters for the analysis of pendimethalin and its degradate**

Model	HP-6890, HP-5890
Column	HP-1 Capillary Column (ID = 0.20 mm, L = 25 m)
Carrier gas	N <sub>2</sub> (0.5 mL/min)
Temperature	Injector: 300°C Detector: 300°C Oven: 150°C - 2 min 10°C/min - 150°C 2°C/min - 230°C 20°C/min - 280°C, 5 min
Ionization energy	70 eV
Detector	FID, MSD (HP-5971)
Split ratio	17 : 1
Injection volume	1 $\mu$ L

## 결과 및 고찰

### 균주의 pendimethalin 분해활성 및 동정

마산 교방동의 소나무 숲에서 분리한 균주가 pendimethalin의 분해활성을 가지는지를 확인하기 위하여 미생물의 분해활성이 육안으로 구분 가능한 1,000 ppm의 pendimethalin이 포함된 NA배지에서 배양한 후 관찰한 결과 24시간부터 colony 주변에 투명대 (clearing zone)가 형성됨을 확인할 수 있었으며, colony를 증류수로 세척하여 제거하였을 때 더욱더 선명하게 관찰되었다 (Fig. 1). API CHB50 kit을 이용한 생화학적 분석방법으로 동정한 결과 *Bacillus subtilis*와 95.3%의 상동성을 나타내었으나, FAME 분석의 경우 *Bacillus mycoides*와 14.4%로 가장 높은 유사성을 가졌다. 또한 16S rDNA의 sequence를 분석한 결과 *Bacillus mycoides*와 98.0%의 상동성을 나타내었다. 위의 결과를 보면 일견 *B. mycoides*와 동일한 종일 것으로 여겨질 수 있으나, Franco 등<sup>20)</sup>이 보고한 *B. mycoides*의 야생형 및 돌연변이체들에 대한 콜로니 형태와 차이가 있었다. Franco 등<sup>20)</sup>에 의하면 *B. mycoides*의 콜로니 형태는 와선형인 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서 새롭게 분리된 균주는 와선형을 나타내지 않았다. 따라서 본 실험에서 분리한 pendimethalin 분해 미생물은 더 이상의 동정분석이 보충되지 않는 한 *Bacillus* sp.로 분류함이 옳다고 생각되어서 이를 *Bacillus* sp. MS202로 잠정적으로 명명하였다. 한편, *Bacillus* sp. 중에는 유일하게 *B. megaterium*이 pendimethalin을 분해한다고 보고되었다<sup>21)</sup>. 본 실험에서의 3종류의 동정결과 *Bacillus* sp. MS202는 *B. mycoides*와 유사하다고 할 수 있으나 *B. megaterium*과는 다른 종으로 여겨지는 바, pendimethalin을 분해하는 또 다른 균주가 발견된 것으로 생각한다.

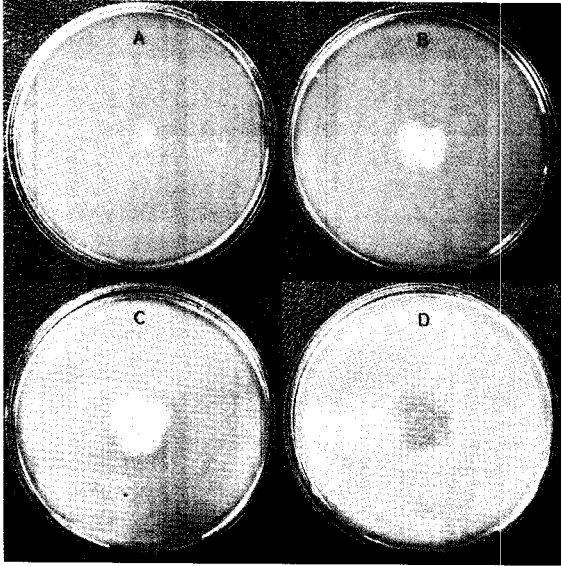


Fig. 1. Morphological observation of pendimethalin degradation by *Bacillus* sp. MS202. Clearing zone around colony represents the pendimethalin degradation activity several days after culture (A, 1 day; B, 2 days; C, 3 days). D shows a clearing zone after the removal of colony with distilled water.

#### Pendimethalin 분해산물의 확인

*Bacillus* sp. MS202에 의한 pendimethalin 분해산물을 확인하기 위하여 균주배양 후  $\text{CHCl}_3$ 로 추출하여 TLC분석하였다. 그 결과, 배지에 pendimethalin만을 처리하여 배양한 대조군은 pendimethalin 원제와 동일한 양상을 보였는데, 이는 배양 중 배지로 인한 원제의 변성이 없었음을 의미한다. 반면, pendimethalin과 *Bacillus* sp. MS202를 함께 처리한 실험군에서는 분해 산물로 보이는 spot 하나를 관찰할 수 있었으며 이를 M1으로 명명하였다 (Fig. 2). Pendimethalin과 M1의 Rf값은 각각 0.70과 0.37로 나타났다. 일반적으로 농약 분석용으로 사용되는 TLC의 전개 용매는 각 농약의 기본적인 화학구조의 성질에 따라 chloroform, hexane, ethyl acetate, acetone, methanol, acetic acid 등<sup>22)</sup> 여러 유기용매의 혼합액이 사용되어진다. TLC를 이용한 pendimethalin 분해산물 분석의 경우 Singh 등<sup>16)</sup>이 benzene : ethyl acetate (3:1)의 혼합액과 chromogenic reagent로 iodine을 사용했다는 보고가 있었으나, 본 실험에서는 hexane과 diethyl ether의 혼합액으로 미생물에 의한 pendimethalin의 분해산물을 분석하였는데 그 결과 좋은 해상력을 가지는 것으로 확인되었으며, 다른 dinitroaniline 제조제 분해산물을 분석하는 데도 응용이 가능할 것으로 사료된다.

TLC 분석 결과 *Bacillus* sp. MS202를 처리한 실험군에서 나타난 새로운 spot (M1)을 재확인하기 위하여 GC분석을 하였다. 그 결과, pendimethalin의 피크 (RT 18.5)가 줄어들고 M1 (RT 16.5)의 피크가 관찰되었다 (Fig. 3). 이 결과는 TLC 결과와 잘 일치되며, 이로써 *Bacillus* sp. MS202 균주는 pendimethalin을 분해해서 M1을 생성하는 것으로 판단된다.

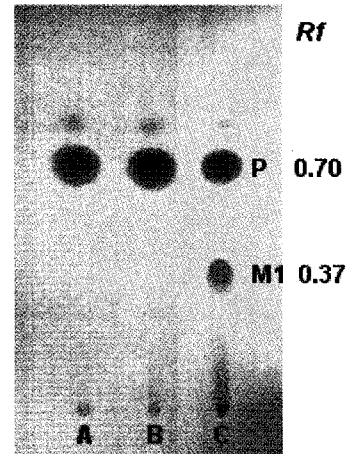


Fig. 2. TLC profile of pendimethalin degradation by *Bacillus* sp. MS202. M1 represents the partially reduced pendimethalin (P). A, pendimethalin; B, nutrient broth + pendimethalin; C, nutrient broth + *Bacillus* sp. MS202 + pendimethalin

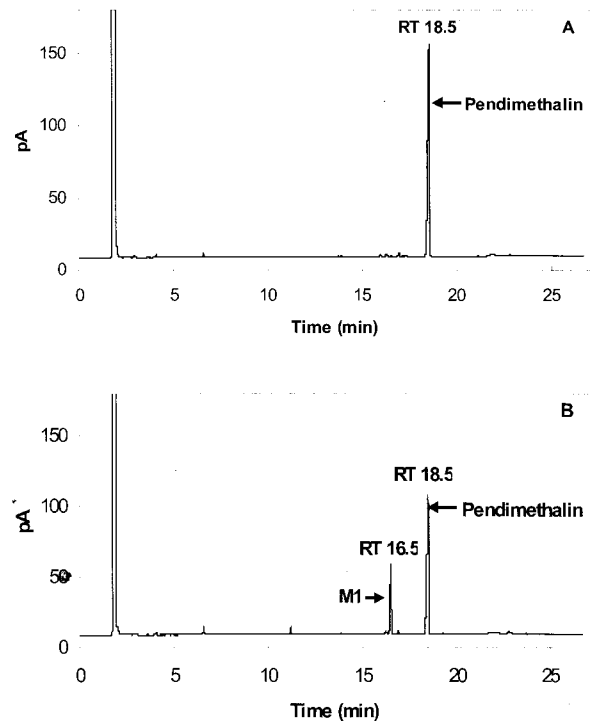


Fig. 3. Gas chromatogram of pendimethalin (A) and its degradation product (M1) by *Bacillus* sp. MS202 (B).

#### Pendimethalin 분해산물 (M1)의 특성분석

*Bacillus* sp. MS202에 의한 pendimethalin 분해산물인 M1의 질량분석을 위하여 GC-MS분석을 하였다. 그 결과, M1의 분자량은 251로 관찰되었다 (Fig. 4). 분자량이 281인 pendimethalin과 M1의 분자량을 비교 분석해 본 결과, 분자량의

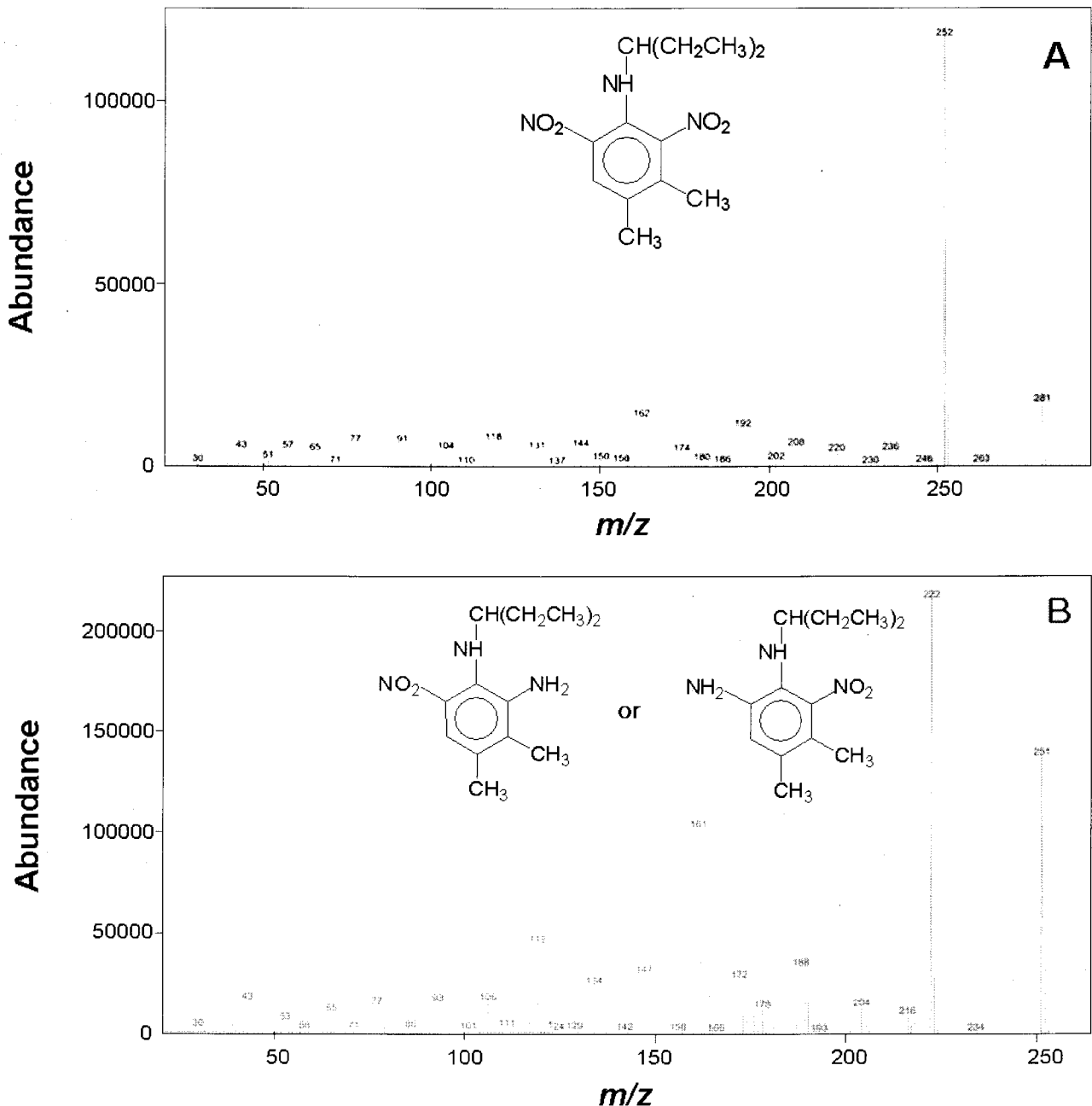


Fig. 4. Gas chromatography-mass spectrometry of pendimethalin (A,  $m/z$  281) and its degradation product M1 (B,  $m/z$  251) by *Bacillus* sp. MS202. Both  $m/z$  252 (in A) and 222 (in B) can split off an ethyl group (loss of 29 Da). The  $m/z$  161 (in B) is the fragment lost an ethyl (loss of 29 Da), a nitro (loss of 46 Da), and a methyl (loss of 15 Da) group from M1.

차이는 30인 것을 알 수 있었다. 이는 M1이 pendimethalin의 benzene 고리에 있는  $-NO_2$ 가  $-NH_2$ 로의 환원된 상태인 6-amino-2-nitro-*N*(1-ethylpropyl)-3,4-xylydine 또는 2-amino-6-nitro-*N*(1-ethylpropyl)-3,4-xylydine 임을 의미한다. 일반적으로, 미생물에 의한 pendimethalin의 분해 대사반응은 부분 환원, 탈알킬화, 고리화 등<sup>16,23)</sup>일 것으로 가정하였다. Pendimethalin을 분해하는 미생물은 여러 가지가 알려져 있는데 그중 박테리아에는 *B. megaterium*, *Pseudomonas* sp., *Pyricularia* sp., *Rizobium*

sp. 등이 있으며, 균류 중에는 *F. oxysporum*, *P. variotii*, *R. bataticola*, *T. viride* 등<sup>16,21,24)</sup>이 알려져 있다. Parr 등<sup>17)</sup>은 dinitroaniline 계열의 제초제인 trifluralin이 토양 미생물 집단에 의해 호기조건에서 탈알킬화과정을 거친 후 환원이 일어나며, 혐기조건에서 환원과정을 거친 후 탈알킬화가 일어난다고 보고하였다. 또한 Singh 등<sup>16)</sup>은 *F. oxysporum*, *P. variotii*와 같은 곰팡이에 의해 호기조건에서 pendimethalin이 탈알킬화와 환원 과정의 산물을 동시에 형성하며, *R. bataticola*와 같은

곰팡이에서는 오직 탈알킬화 산물만 생성한다고 보고하였다. 본 실험에서 분리한 세균인 *Bacillus* sp. MS202는 호기조건에서 pendimethalin을 분해함에 있어 오직 환원 과정만을 수반하는 특이한 경로를 가지는 것으로 보인다. 따라서 미생물에 의한 dinitroaniline 계열의 제초제 분해는 분해환경이 호기적 또는 혐기적 상태에 의해서만 특정한 분해경로가 결정되는 것이 아니라 생물의 종에 따라 서로 달라지는 것으로 사료된다. 그리고 NO<sub>2</sub>의 환원결과 생성된 구조변화물의 제초효과는 사라지는 것으로 보고되었다<sup>24</sup>. 그러므로, 환원된 pendimethalin이 동물 독성 및 광분해 속도에 변화가 발생했는지 고찰하는 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 요 약

토양과 지하수에서 pendimethalin의 지속성은 환경에 해로운 영향을 미친다. 경남 마산에서 분리한 pendimethalin 분해균주는 API CHB50 kit 시험, FAME 분석, 그리고 16S rDNA 염기서열분석 결과로 *Bacillus* sp. MS202로 잠정적으로 동정하였다. TLC, GC, 그리고 GC-MS 분석에 의해 *Bacillus* sp. MS202가 pendimethalin의 -NO<sub>2</sub>를 -NH<sub>2</sub>로 환원시킨다는 것을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 알려진 호기성 미생물에 의한 pendimethalin 분해가 탈알킬화가 우선한다는 보고와 상반되는 새로운 결과이다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

## 참고문헌

- Tomlin, C. D. S. (2003) *The pesticide Manual*, 13th (ed), British Crop Protection Council, Bracknell, UK, p.752-753.
- Walker, A. and Bond, W. (1977) Persistence of the herbicide AC 92,553, N-(1-ethypropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylydine in soils, *Pestic. Sci.* 8, 359-369.
- Garcia-Valcarcel, A. I. and Tadeo, J. L. (2003) Influence of organic fertilizer application on pendimethalin volatilization and persistence in soil, *J. Agric. Food Chem.* 51, 999-1004.
- Parochetti, J. V. and Dec, G. W. J. (1978) Photodegradation of eleven dinitroaniline herbicides, *Weed Sci.* 26, 153-156.
- Kimmo, A. M., Arto, J. S. and Jussi, V. K. K. (2003) Bioaccumulation and toxicity of sediment associated herbicides (ioxynil, pendimethalin, and bentazone) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta), *Ecotoxicol. Environm. Safety*, 56, 398-410.
- US EPA (1999) Persistent bioaccumulative toxic (PBT) chemicals, Final Rule, Fed. Regist., 64, 58666-58753.
- Iesce, M. R., Graziano, M. L., Cermola, F., Montella, S., di Gioia, L., and Stasio, C. (2003) Effects of sensitizers on the photodegradation of the systemic fungicide triadimenol, *Chemosphere*, 51, 163-166.
- Polonca, T. and Iztok, A. (2003) Degradation of organophosphorus compounds by X-ray irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 67, 527-530.
- Chen, W. and Mulchandani, A. (1998) The use of live biocatalysts for pesticide detoxification, *Trends biotechnol.* 16, 71-76.
- Engelhardt, G., Wallnofer, P. R., and Plapp, R. (1973) Purification and properties of an aryl acylamidase of *Bacillus sphaericus*, catalyzing the hydrolysis of various phenylamide herbicides and fungicides, *Appl. Microbiol.* 26, 709-710.
- Bachofer, R. and Lingens, M. (1983) Degradation of carboxanilide fungicide by a *Nocardia* species, *Physiol. Chem.* 364, 21-29.
- Blake, J. and Kaufman, D. D. (1975) Characterization of acylamide-hydrolyzing enzymes from *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Pestic. Biochem. Physiol.* 5, 305-313.
- Lee, S. J., Katayama, A., and Kimura, M. (1995) Microbial degradation of paraquat sorbed to plant residues, *J. Agric. Food Chem.* 19, 291-293.
- Alexander, M. (1980) Biodegradation of chemicals of environmental concern, *Science*, 211, 132-138.
- Parr, J. F. and Smith, S. (1976) Degradation of toxaphene in selected anaerobic soil environment, *Soil Sci.* 121, 52-57.
- Singh, S. B. and Kulshrestha, G. (1991) Microbial degradation of pendimethalin, *J. Environ. Sci. Health, B26*, 309-321.
- Parr, J. F. and Smith, S. (1973) Degradation of trifluralin under laboratory conditions and soil anaerobiosis, *Soil Sci.* 115, 55-63.
- Raphi, T. M., Deborah, L. A., and Lawrence, P. W. (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-Triazine herbicide Atrazine, *Appl. Environ. Microb.*, 61, 1451-1457.
- Julian, R. M., Takuichi, S., Andrew J. W., Tracey, A. M., John C. F., Sarah, J. H., and William, G. W. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial

- 16S rRNA, *Appl. Environ. Microb.*, 64, 795-799.
20. Franco, C. D., Beccari, E., Santini, T., Pisaneschi, G., and Tecce, G. (2002) Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*, *BMC Microbiol.* 2, 1471-2180.
21. Gita, K., Shashi, B. S., Shashi, P. L., and Nanjapur, T. Y. (2000) Effect of long-term application of pendimethalin: enhanced degradation in soil, *Pest Manag. Sci.* 56, 202-206.
22. Joseph, S. (2003) Recent advances in the thin-layer chromatography of pesticides: a review, *J. AOAC Int.* 86, 602-611.
23. Kulshrestha, G. and Singh, S. B. (1992) Influence of soil moisture and microbial activity on pendimethalin degradation, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 269-274.
24. Kole, R. K., Saha, J., Pal, S. Chaudhuri, S., and Chowdhury, A. (1994) Bacterial degradation of the herbicide pendimethalin and activity evaluation of its metabolites, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 779-786.