

Research Article



CrossMark

Open Access

미생물제(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리에 따른 토양 중 카벤다짐의 분해효과

연제형¹, 김현수¹, 안재형¹, 한귀환², 오영곤³, 조일규^{3,4}, 박인철^{1*}

¹국립농업과학원 환경개선미생물연구단, ²(재)농축산용 미생물산업육성지원센터, ³전남바이오산업진흥원 친환경농생명연구센터, ⁴(주)현농

Degradation effect of carbendazim in soil by application with the microbial agent, *Rhodococcus* sp. 3-2

Jehyeong Yeon¹, Hyeon-su Kim¹, Jae-Hyung Ahn¹, Gui Hwan Han², Young Goun Oh³, Il Kyu Cho^{3,4} and In-Cheol Park^{1*}
(¹Bioremediation Team, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea, ²Center for Industrialization of Agricultural and Livestock Microorganisms, Jeongeup 56212, Korea, ³Eco-Friendly Agri-Bio Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation, Gokseong 57510, Korea, ⁴Hyunnong Co. LTD, Gwangju 62286, Korea)

Received: 4 November 2021/ Revised: 29 November 2021/ Accepted: 21 December 2021

Copyright © 2021 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Jehyeong Yeon
<https://orcid.org/0000-0002-3846-7795>

Hyeon-su Kim
<https://orcid.org/000-0003-3697-1821>

Jae-Hyung Ahn
<https://orcid.org/0000-0002-7250-4959>

Gui Hwan Han
<https://orcid.org/0000-0001-9352-9445>

Young Goun Oh
<https://orcid.org/0000-0002-9233-6286>

Il Kyu Cho
<https://orcid.org/0000-0002-4177-5588>

In-Cheol Park
<https://orcid.org/0000-0002-6243-2103>

Abstract

BACKGROUND: The fungicide of benomyl, a benzimidazole group, has been commonly used for pesticides against fungal diseases in the world. However, benomyl is rapidly hydrolyzed in the environment after using to control plant diseases and has adverse effects by generating carbendazim, which is toxic to plants, humans, and the environment.

METHODS AND RESULTS: In this study, the decomposition effect of carbendazim, a degradation product of benomyl was conducted in pot and field after making a pro-

TOTYPE of benomyl-degrading microbial agent (BDMA). We found that the carbendazim-degrading microbial agent (CDMA) (10^5 , 10^6 , and 10^7 cfu/g soil) decomposed carbendazim by 50% or more in all the treatments, compared to the untreated control in the pot tests after four weeks. The effect of 100% decomposition of carbendazim was observed at 7 days after treatment, when the prototype of BDMA was applied at 10-folds dilution in the field. The decomposition effect at more than 60% and plant growth promoting effect were observed after 7 days of the treatment, compared with the untreated group in the second field experiment, treated with commercially available concentrations of 500-folds and 1,000-folds.

CONCLUSION(S): These results might represent that the BDMA would decompose carbendazim effectively, a de-

*Corresponding author: In-Cheol Park
Phone: +82-63-238-3027; Fax: +82-63-850-3835;
E-mail: pinc@korea.kr

composition product of the fungicide benomyl, remaining in agricultural area, and it could be utilized practically by using a low dilution rate.

Key words: Benomyl, Carbendazim, Decomposition effect, *Rhodococcus* sp. 3-2

서 론

현재까지 화학 농약은 해충, 잡초 또는 다양한 식물병으로부터 식물을 보호하기 위해 농업에서 사용되는 가장 효과적인 방법이다[1]. 이러한 화학 농약은 살충제, 살균제 그리고 제초제 등 다양한 제품으로 개발되어 농업 지역뿐만 아니라 비농업 지역의 유지 및 관리와 같은 다양한 용도로 사용되고 있다[2]. 하지만 농약의 과도한 사용 또는 농약 성분의 화학적 특성에 따라 토양 잔류하는 다양한 농약이 특정 조건에서 식물, 동물 그리고 사람에게 전이가 되어 심각한 피해를 미칠 수 있다[3, 4].

벤지미다졸계 살균제인 베노밀(CAS No. 17804-35-2)은 곰팡이에 의해 발생하는 식물병 방제에 높은 방제 효과가 있어 국내, 외 곰팡이에 의한 식물병을 방제하는데 광범위하게 사용되고 있다[3, 5]. 하지만 과도한 베노밀 사용은 토양 지속성으로 인한 농산물 생산량 감소, 인체 독성(내분비계 장애, 발암 가능성, 기형, 간 독성) 그리고 식물 저항성 등의 다양한 문제를 나타내는 것으로 알려져 있다[6-10].

이와 같이 화학 농약의 토양 지속성 또는 화학물질로부터 발생하는 여러가지 문제를 해결하기 위해 물리적, 화학적, 생물학적 정화기술 등 다양한 방법이 연구되고 있다[11, 12]. 이 중 생물학적 토양정화 기술은 미생물의 대사 활동을 통해 자연적으로 농업 토양의 화학적 농약 오염을 감소시키며, 비교적 저렴한 비용으로 친환경적인 분해가 가능하다는 장점이 있다[13, 14]. 지난 몇 년 동안 화학 농약의 생물학적 정화 기술을 위해 보고된 미생물에는 *Rhodococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp 등이 있으며[3, 15] 이 중 *Pseudomonas aeruginosa* 과 *Bacillus cereus*는 살충제로 널리 사용되는 클로르피리포스(Chlorpyrifos)와 그 대사산물을 분해하는 것으로 관찰되어 이를 이용한 생물학적 정화 가능성을 확인하였다[16]. 현재까지 생물학적 정화 기술을 사용한 토양 잔류 농약 분해 효과 평가는 대부분 미생물을 직접 사용한 *in vitro* 또는 작은 크기의 포트에서 주로 이루어졌을 뿐 미생물을 제형화 후 포트 또는 필드에서 화학 농약의 토양 잔류 농약 분해 효과 및 지속성 평가는 거의 이뤄지지 않았다.

이전 실험에서 우리는 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주가 살균제로 사용되는 베노밀과 그 대사산물인 카벤다짐의 우수한 분해 활성을 나타냄을 보고하였다[3]. 따라서 본 연구에서는 베노밀과 대사산물 카벤다짐을 분해활성하는 미생물로 보고된 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주를 제형화한 미생물제 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 대형 크기의 포트 그리고 시설재배지에 처리 후 베노밀 분해, 지속성 그리고 식물생육촉진 효과를 평가하였다.

를 평가하였다.

본 연구에서 살균제 농약 베노밀 50% 수화제를 처리한 후 *Rhodococcus* sp. 3-2 시제품을 사용하였을 때 토양 중 잔류 카벤다짐 분해 효과를 조사하기 위해서 토양에서 *Rhodococcus* sp. 3-2 시제품을 처리 후 카벤다짐 분해 효과를 조사하였다. 식품공정 잔류농약분석법 실무해설서(page 244~249)에 따르면 베노밀의 경우 살포 후 생체 및 환경 중에서 매우 신속하게 카벤다짐으로 변환되며 실제 살균성분도 카벤다짐으로 알려져 있다. 따라서 베노밀의 잔류량은 카벤다짐을 기준으로 환산되어 표현되며, 베노밀은 유기용매 중에서도 안정성이 취약하고 잔류 분석 과정 중 방법에 따라 일부 또는 전부가 카벤다짐으로 변환되므로 베노밀을 정량적으로 카벤다짐으로 전환, 분석하는 방법이 일반적으로 사용된다. 토양에 살포된 베노밀은 대부분 카벤다짐으로 토양에 대사되어 잔류하기 때문에 토양 중 카벤다짐의 잔류농도에 대해서 *Rhodococcus* sp. 3-2 시제품의 분해력을 조사하였다.

재료 및 방법

Rhodococcus sp. 3-2 균주 대량배양 및 제형화

살균제 농약인 베노밀 50% 수화제의 대형 포트 그리고 시설재배지에서 분해 효과를 확인하기 위해 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주는 아래와 같은 방법으로 베노밀 분해 미생물 시제품으로 분말 제형화한 후 평가하였다.

Rhodococcus sp. 3-2 균주의 대량 배양을 위한 최적 배지는 탄소원으로 0.5%가 첨가된 기본 배지(K₂HPO₄ 0.5%, NaCl 0.15%, MgSO₄ 0.1%, Sodium succinate 0.5%, pH 7.0±0.2)에 Yeast extract을 0.5% 농도로 첨가하여 사용하였다. 최적 배지를 사용한 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주 대량 배양은 1.5 ton 발효기(KoBioTech Co., Ltd)에서 진행하였고, 종균 배양은 1차(50 ml 최적 배지 포함한 250 ml 삼각플라스크) 그리고 2차(2 L 최적 배지 포함한 5 L 삼각플라스크) 총 2회 수행하였다. 5 L 삼각플라스크에서 이루어진 2차 종균 배양물은 1.5 ton 발효기에 최종 접종원으로 사용되었으며 종균 배양과 발효기 배양 조건은 온도 30°C, 에어량 0.5 vvm, 교반속도 150 rpm 그리고 배양시간 48시간으로 동일하게 진행하였다. 배양 후 배양 최종 산물은 희석평판법을 통해 보증균수(cfu/ml)를 확인하였다. 1.5 ton 배양기에서 1 ton으로 대량 생산된 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 제형화를 위해, 배양액을 6,800 rpm에서 1시간 동안 디스크 원심분리기를 이용하여 균체를 농축하였다. 농축된 균체의 보존을 위해 Skim milk 20%를 첨가 120시간 동안 동결건조 한 후 분쇄기를 이용하여 균질화 및 분말 제형화를 하였다.

포트 시험

Rhodococcus sp. 3-2 균주의 분말 제형으로 생산된 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 베노밀 분해 효과를 평가하기 위해 대형 포트 실험을 수행하였다. 대형 포트(NF-2, 상경: Φ256, 하경: Φ234, 높이: 297 mm)에 토양 10 kg을 담고 5엽기 고



Fig. 1. Pot experiment area of the degradation effect of carbendazim.

추(*Capsicum annuum* L. Manitta) 유묘를 이식 한 후 베노밀 50% 수화제를 물에 희석하여 10 mg/L 농도로 토양에 혼합 처리하였다(Fig. 1). 처리 1시간 후 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 농도를 토양 1 g당 생균수 2.65×10^5 , 2.65×10^6 그리고 2.65×10^7 의 3가지 농도가 되도록 1 L의 물에 희석하여 각 처리구에 토양 관주 처리하였다. 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 희석하지 않고 1 L의 물만을 토양 관주 처리 한 샘플은 대조군으로 사용하였다.

처리 후 1주일 간격으로 6회 대형 포트 가장자리 6개 지점의 5~10 cm 깊이에서 약 500 g씩 실험용 약수저를 사용하여 토양을 채취하였으며 채취한 토양 시료는 풍건 후 2 mm 토양 분석용 체에 통과시켜 균질화한 후 카벤다짐 추출을 하였다. 카벤다짐의 추출은 Pinto 등(2010)이 사용한 QuEChERS 방법을 응용하여 다음과 같이 수행하였다[17]. 풍건 후 균질화된 토양 시료 20 g을 취하여 250 mL 삼각플라스크에 칭량하고 acetone 100 mL을 가한 뒤 30분간 진탕 추출하였다. 추출 물을 약 5 g의 celite 545가 깔린 büchner funnel상에서 감압여과하고, 이때 acetone 30 mL로 용기 및 잔사를 씻어 앞의 여액과 합하였다. 이 여액을 separatory funnel 500 mL에 옮겨 증류수 150 mL와 포화 NaCl 50 mL를 가하고 dichloromethane 50 mL로 2회 분배하였다. 이 dichloromethane층을 50 g의 anhydrous sodium sulfate에 통과시켜 탈수하였다. 이를 40°C 수욕상에서 감압농축, 건조한 후 acetonitrile 20 mL에 재용해하여 PSA, MgSO₄를 첨가하여 2분간 흔들고 4,200 rpm에서 원심분리 한 뒤 필터(0.2 µm)하여 LC/MS/MS에 3 µl 주입하여 나타난 크로마토그램상의 피크면적을 측정하여 표준검량선에 의해 함유농도를 산출하였다.

시설재배지 토양에서 미생물 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 카벤다짐 분해 효과

시설재배지 실험은 1차 21년 5~6월 곡성군에 위치한 전남 바이오산업진흥원 친환경농생명연구센터 비닐온실(Fig. 2a), 2차 21년 9~10월 완주군에 위치한 국립농업과학원 비닐온실(Fig. 2b)에서 수행하였다. 온실의 평균 온도와 습도는 1, 2차 21°C와 71%로 동일하였다. 완전임의배치법을 사용하여 실험구를 배치하였으며 각 실험구의 크기는 2 m²(1 m×2 m)로 27개의 상추(*Lactuca sativa* L. cv. Seon Hong Jeok Chuk Myeon) 식물이 있도록 구성하였다. 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 전 실험구 토양에는 베노밀 50% 수화제 희석액(13 g/20 L)을 (사)한국작물보호협회 농약사용지침서를 참고하여 0.2 L/m² 살포하였다. 처리 1시간 후 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 처리는 1차 비닐 온실 실험에서는 (1) 무처리 (2) 10배 희석(2.65×10^8 cfu/g soil) (3) 1,000배 희석(2.65×10^6 cfu/g soil)을 2차 비닐 온실 실험에서는 (1) 무처리 (2) 100배 희석(2.65×10^7 cfu/g soil) (3) 500배 희석(1.325×10^7 cfu/g soil) (4) 1,000배 희석(2.65×10^6 cfu/g soil)을 처리하였다. 희석액 처리 시 작물 생육용 미생물제 관수 시 처리량을 참고하여 1.5 L/m²씩 각각의 실험구에 처리하였다. 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 1일 후 4~5엽기 상추를 파종하였다. 1차 시설재배지 실험은 7일 간격 5회, 2차 시설재배지 실험은 0, 1, 3, 7, 14, 21일 6회 토양 샘플을 나사송곳을 사용하여 각 실험구의 5개 지점의 0~15 cm 깊이에서 약 500 g씩 채취하였다. 최종 시설재배지 실험에서 이식한 상추는 재배 28일 후 수확 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리에 의한 생육촉진효과를 확인하기 위해 실험구별 무게를 국립농업과학원 시설재배지에서 직

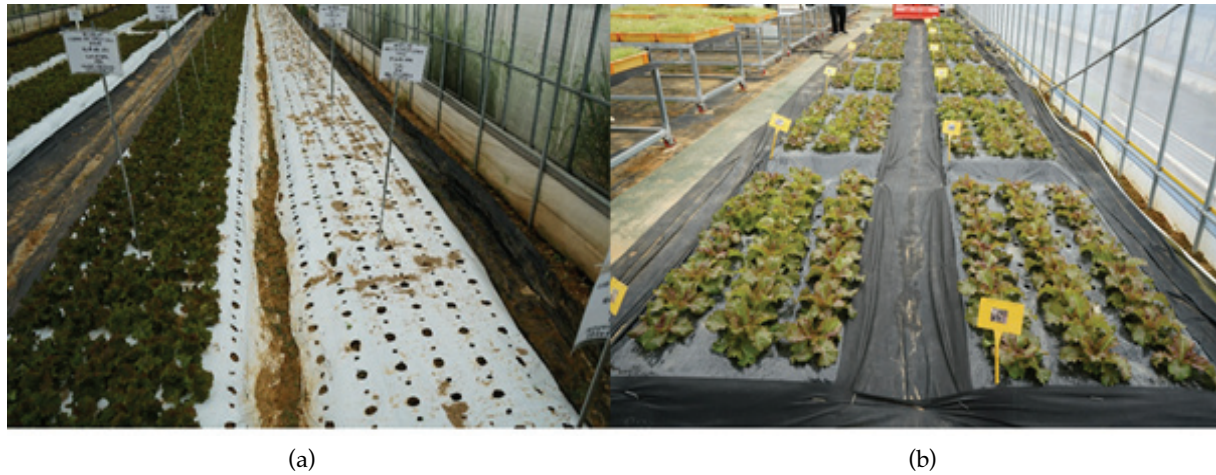


Fig. 2. Study area and sampling locations of the degradation effect of carbendazim. (a) Field experiment, Gokseong (b) Field experiment, Wanju.

접 측정하였다. 모든 시설재배지에서 채취한 토양 시료의 베노밀 분해 효과를 평가 위한 전처리 방법과 LC/MS/MS 분석 방법은 위에서 설명한 포트 시험과 동일하게 수행하였다. 모든 시설재배지 시험은 각 처리 농도별 3 반복으로 1회 수행하였다.

시약 및 기기분석

본 연구에 사용된 카벤다짐(98%, purity)은 Accustandard (Connecticut, USA)에서 구입하였다. 카벤다짐의 토양 잔류 분석을 위한 전처리과정에 사용된 acetonitrile, dichloromethane, acetonitrile, methanol 그리고 water는 Burdick & Jackson(MI, USA), formic acid, sodium chloride, sodium

sulfate anhydrous 그리고 celite 545는 Junsei chemical Co. (Tokyo, Japan), EN method extraction kit(MgSO₄, NaCl, Na Citrate)그리고 PSA(Primary Secondary Amine)-Kit-03는 bekolut(Homburg, Germany), Ammonium formate는 Fluka Co.(New Jersey, USA), Magnesium sulfate anhydrous는 Sigma Co.(St. Louis, USA), PSA(Primary Secondary Amine)는 Varian Co.(Crawley, UK)으로부터 구입하여 사용하였다. 카벤다짐 농도를 대상으로 한 기기분석은 Shiseido nanospace SI2 LC/MS/MS(TSQ Quantum Discovery Max. USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Unison UK-C18(2.0 m×100 mm, 3 μm, Imtakt, Japan)를 사용하였고, 이동상의 유속은 이동상의 유속은 0.3 mL/min이었다. 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Analytical condition of LC/MS/MS to detect carbendazim in soil and lettuce

Analytical condition of LC/MS/MS			
Column	Unison UK-C18 (2.0×100 mm, 3 μm, Imtakt)		
Detector	Thermo TSQ Quantum Discovery Max		
	A: 0.1% formic acid + 5mM ammonium formate in deionized water		
	B: 0.1% formic acid + 5mM ammonium formate in methanol		
	Time(min)	A(%)	B(%)
Mobile phase	0.0	85	15
	0.7	85	15
	1.0	45	55
	2.0	45	60
	3.5	2	98
	4.0	2	98
	4.5	85	15
	6.5	85	15
	Flow rate	0.3 mL/min	
Injection volume	3 μl		
Spray voltage	(+) 3,800 V		
Transfer capillary temperature	275°C		
Sheath gas pressure	35 Arb		
Aux gas pressure	10 Arb		

Carbendazim

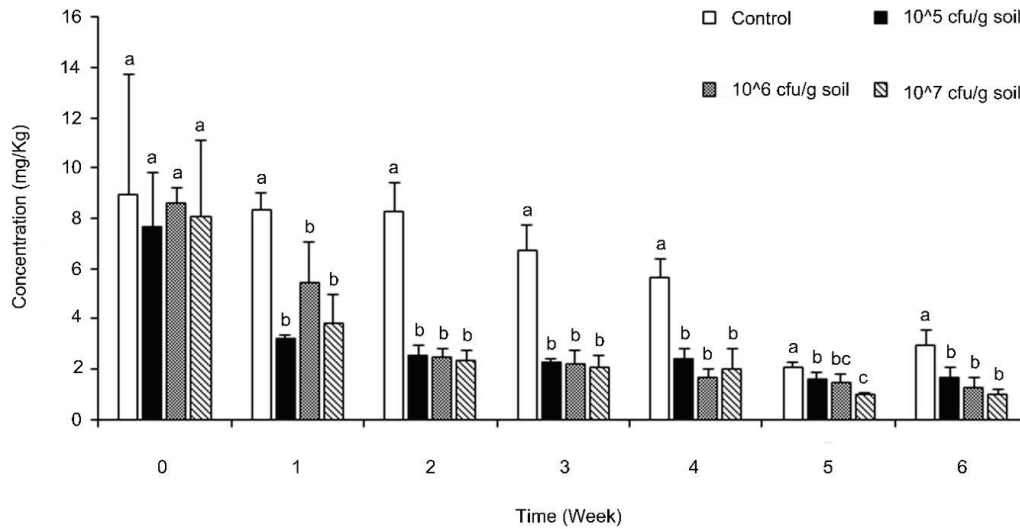


Fig. 3. Degradation effect of carbendazim, soil residual fungicide by treatment of the prototype of benomyl-degrading microbial agent (*Rhodococcus* sp. 3-2) in the pot.

통계 분석

대형 포트 실험은 6반복, 시설재배지 실험은 3반복으로 수행되었으며 실험 결과는 IBM SPSS 통계프로그램(version 23.0 for Windows; SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 평균 \pm 표준 오차로 나타내었다. 평균치 분석은 일원배치 분산분석 검증 방법에 따라 실시하였으며, 평균값 사이 유연성 검증은 Turkey's HSD test($P < 0.05$)를 사용하였다.

결과 및 고찰

대형 포트 실험에서 미생물(*Rhodococcus* sp. 3-2) 시제품의 카벤다짐 분해 효과

살균제 베노밀 50% 수화제 사용에 의해 유발되는 토양 잔류 카벤다짐 분해 효과를 조사하기 위해 베노밀 분해 미생물체 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 준비하였다. 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 처리한 토양의 카벤다짐 초기 토양 잔류량(처리 0일 후)은 $7.680 \pm 2.141 (2.65 \times 10^5 \text{ cfu/g soil})$, $8.628 \pm 0.599 (2.65 \times 10^6 \text{ cfu/g soil})$ 그리고 $8.101 \pm 2.991 (2.65 \times 10^7 \text{ cfu/g soil})$ 이었으며 희석액 처리 1주 후부터 처리하지 않은 대조군에 비해 카벤다짐의 토양 잔류 농도가 4주 차까지 크게 감소하였다(Fig. 3). 4주 후 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 토양 잔류 카벤다짐의 분해력은 무처리 대비 58.1% ($2.65 \times 10^5 \text{ cfu/g soil}$), 70.1% ($2.65 \times 10^6 \text{ cfu/g soil}$), 64.5% ($2.65 \times 10^7 \text{ cfu/g soil}$)로 우수한 분해 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 대형 포트 실험 시 베노밀과 분해산물 카벤다짐에 오염된 토양에 *Rhodococcus qingshengii* strain dj1-6을 직접 처리 후 21일까지 무처리 대조군과 베노밀 그리고 카벤다짐 분해 효과를 보고한 Chuang 등의 연구결과보다 더 오랜 기간 분해 효과를 나타내었다[18]. 하지만 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 5

주 차 이후에는 모든 처리구의 카벤다짐 토양 잔류 농도는 0.976~1.641 mg/kg을 유지하면서 무처리구(2.073~2.951 mg/kg) 대비 베노밀의 토양 잔류 농도가 통계적으로 유의한 차이는 보였지만 토양에서의 큰 감소는 나타내지 않았다. 이는 카벤다짐이 이온, 수소, 리간드 그리고 공유결합 등 토양 입자와 흡착되어 미생물 시제품의 사용성이 감소되었기 때문으로 사료된다[3, 19].

시설재배지에서 미생물 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 카벤다짐의 분해 효과

전남생물산업진흥원 친환경농생명연구센터 시설재배지에서 수행된 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 처리한 토양의 카벤다짐의 초기 잔류량(처리 0일 후)은 무처리 실험구 $0.256 \pm 0.005 \text{ mg/kg}$, 시제품 10배 희석($2.65 \times 10^8 \text{ cfu/g soil}$) 실험구는 $0.183 \pm 0.045 \text{ mg/kg}$, 시제품 1,000배 희석($2.65 \times 10^6 \text{ cfu/g soil}$) 실험구는 $0.070 \pm 0.034 \text{ mg/kg}$ 이었다. 이후 시간이 경과함에 따라 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 7일 후 10배 희석액 처리 실험구는 카벤다짐의 초기 잔류량 대비 100% 분해되는 우수한 효과를 나타냈다(Fig. 4). 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 1,000배 희석 실험구는 처리 7일 후 초기 잔류량 대비 69.1% 카벤다짐 분해 효과를 나타내었으며 무처리구 대비 카벤다짐의 농도가 2주차까지 큰 차이를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 동일 농도 베노밀 50% 수화제로 오염된 토양을 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)으로 처리하였을 때 농도 의존적인 베노밀 분해 효과를 나타낸 것으로 보인다. 즉, 토양에 잔류하는 베노밀과 분해산물 카벤다짐을 분해하는 다양한 미생물(*Rhodococcus* sp. 또는 *Trichoderma* sp.)이 고농도로 사용되었을 때 빠르고 높게 분해된 효과를 감안하면 가능한 경우라고 판단된다[19, 20].

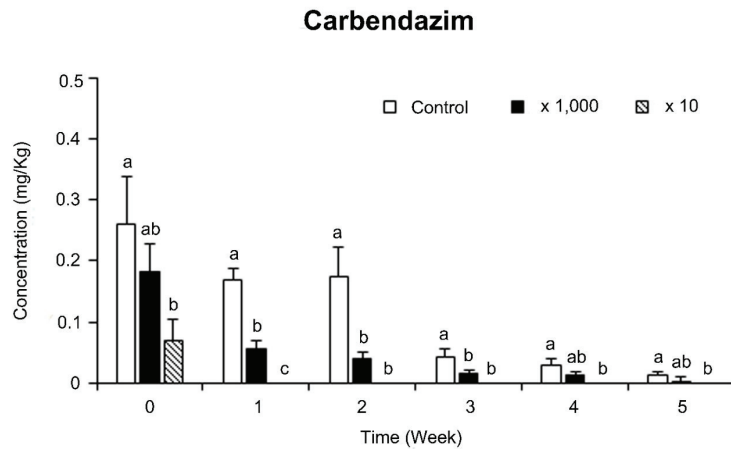


Fig. 4. Degradation effect of carbendazim, soil residual fungicide by treatment of the prototype of benomyl-degrading microbial agent (*Rhodococcus* sp. 3-2) in the Gokseong field.

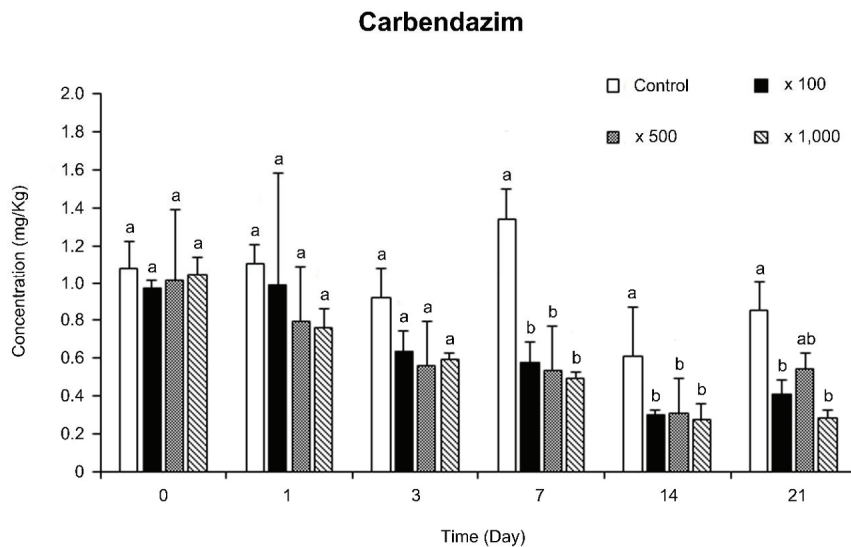


Fig. 5. Degradation effect of carbendazim, soil residual fungicide by treatment of the prototype of benomyl-degrading microbial agent (*Rhodococcus* sp. 3-2) in the Wanju field.

베노밀 분해 미생물 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 경제적이고 효과적인 희석 농도를 확인하기 위해 수행된 국립농업과학원 시설재배지에서의 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 처리한 토양의 카벤다짐 초기 잔류량(처리 0일 후)은 무처리 실험구 0.500 ± 0.164 mg/kg, 시제품 100배 희석(2.65×10^7 cfu/g soil) 실험구 0.293 ± 0.057 mg/kg, 시제품 500배 희석(1.325×10^7 cfu/g soil) 실험구 0.086 ± 0.045 mg/kg, 시제품 1,000배 희석(2.65×10^6 cfu/g soil) 실험구 0.253 ± 0.028 mg/kg으로 나타났다. 처리 1일 후부터 모든 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리농도(100, 500, 그리고 1,000배)에서 무처리구 대비 카벤다짐 토양 분해 효과가 시작되는 것을 나타내었다(Fig. 5). 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 처리 21일 후 모든 농도의(100, 500, 1,000배) 희석 처리구에서 무처리구 대비 우수한 베노밀 토양 분해효과(100배: 91.9%, 500배: 79.8%, 1,000배: 94.3%)

를 보였다(Fig. 5). 이러한 결과는 1차 곡성 시설재배지와 동일하게 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)이 베노밀 50% 수화제를 처리한 2차 완주 시설재배지의 토양 잔류 카벤다짐을 상입화 가능한 농도로 처리하여 분해하는데 우수한 효과를 나타낸다는 결과와 일치하였다. 하지만 2차 시설재배지에서의 처리 농도별 결과는 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 농도가 높을수록 베노밀의 토양 잔류량이 낮아지고 분해 효과가 더 우수한 농도 의존적인 실험결과는 보이지 않았다. 이는 각각의 시설재배지 실험이 서로 다른 위치에서 수행 되었음을 고려하였을 때, 베노밀 분해에 영향을 미치는 토양의 유기 기질물질, pH 그리고 온도 등 다양한 차이점을 감안하면 가능한 경우라고 판단된다[21].

살균제 베노밀 50% 수화제 필드 처리 후 상추와 함께 재배하는 기간 동안 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)은 카벤다짐

을 Fig. 4, 5과 같이 75.0~100% 분해하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 베노밀과 분해산물 카벤다짐 분해 미생물을 이용한 포트 실험 시 베노밀과 카벤다짐 분해율이 20일 동안 88.4%라고 보고한 Negi 등의 연구결과 보다 더 큰 지역에서 오랜 기간 우수한 분해 효과가 나타났다[22]. 현재까지 토양 지속성으로 큰 문제를 유발하는 베노밀과 분해산물 카벤다짐을 분해하기 위한 다양한 미생물이 연구되고 있으며 본 연구와 같이 상업적인 이용을 위한 미생물 제형화를 위한 조사가 이루어지고 있다[23, 24].

본 연구 결과는 베노밀 등 벤지미다졸 농약사용으로 토양 중 카벤다짐으로 오염된 토양을 정화하는데 미생물 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)을 효과적인 농도로 시설재배지에 직접 처리하여 토양에 오염된 카벤다짐의 잔류량을 감소시키는 결과를 확인하였다. 향후 살균제 베노밀 50% 수화제가 과도하게 사용된 농업지역에 카벤다짐 분해를 위한 친환경적인 미생물제로 널리 사용하기 위해 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 분해 효과를 더욱 향상시킬 수 있는 추가적인 연구가(최적 온도, 사용 시기 및 간격, 시너지 효과 첨가물 등) 필요할 것으로 판단된다.

미생물 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 식물생육촉진 효과

시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2)의 식물생육촉진 효과를 분석하기 위해 토양에 살균제 베노밀 50% 수화제 희석액(13 g / 20 L)을 0.2 L / m²살포한 2차 시설재배지 실험장소에서 (1) 무처리 실험구, (2) 시제품 100배 희석(2.65×10⁷ cfu/g soil)처리 실험구, (3) 시제품 500배 희석(1.325×10⁷ cfu/g soil)처리 실험구, (4) 시제품 1,000배 희석(2.65×10⁶ cfu/g soil) 처리 실험구에서 재배한 상추를 수확 후 무게(g)를 측정하였다. 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 100배 희석 처리한 상추의 무게는 평균 63.87±7.14 g으로 가장 우수한 식물생육촉진 효과를 나타내었으며 500배 희석 처리는 평균 55.93±8.64 g 그리고 1,000배 희석 처리는 평균 56.53±9.53 g으로 무처리구 평균 37.73± 4.79 g 상추 무게 보다 더 우수한 생육촉진효과를 보였

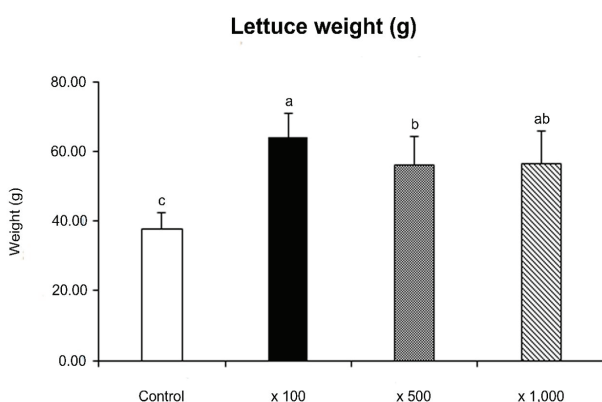


Fig. 6. Effects of the prototype of benomyl-degrading microbial agent (*Rhodococcus* sp. 3-2) on the growth of lettuce plants.

다(Fig. 6). 이러한 결과는 다양한 미생물(*Bacillus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. 등)이 토양 잔류 농약을 분해 및 식물 성장에 필수적인 다양한 미량 원소(질소, 인, 아연 등)의 가용화 작용으로 인해 식물생육촉진을 유발한 결과와 동일하다고 할 수 있다[25, 26].

그러나 본 연구에서는 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 후 토양의 미량원소비의 관측은 이루어지지 않았다. 따라서 향후 베노밀에 오염된 토양에 시제품(*Rhodococcus* sp. 3-2) 처리 후 식물 성장을 촉진하는 토양 미량원소를 가용화 하는 지에 대하여 검토할 필요가 있다고 판단된다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Republic of Korea[project no. PJ01489701].

References

1. Wang L, Wang Y, Han L, Wang M, Han X, Feng J (2017) The efficacy and translocation behavior of carabrone in wheat and cucumber. *Crop Protection*, 100, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.06.010>.
2. Laal F, Hormozi M, Madvari RF, Noorizadeh N, Chahak AF (2017) Health risk assessment of occupational exposure to harmful chemical agents in a pesticide manufacturing plant. *Journal of Occupational Health and Epidemiology*, 6(3), 171-177. <https://doi.org/10.29252/johe.6.3.171>.
3. Lee J, Jeon Y, Jung M, Kim Y, Park I, You J, Lee C, Han B, An S, Ahn J (2020) Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains capable of degrading benzimidazole fungicides benomyl and carbendazim. *The Korean Society of Pesticide Science*, 24(2), 163-171. <https://doi.org/10.7585/kjps.2020.24.2.163>.
4. Tao H, Bao Z, Jin C, Miao W, Fu Z, Jin, Y (2020) Toxic effects and mechanisms of three commonly used fungicides on the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Environmental Pollution*, 263, 114660. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114660>.
5. Branford MVP, Cruz EDL, Solano K, Ramirez O (2013) Pesticide exposure on sloths (*Bradypus variegatus* and *Choloepus hoffmanni*) in an agricultural landscape of Northeastern Costa Rica. *Journal of Environmental Biology*, 35, 29-34.

6. Yoon P, Ko S (2019) Studies on toxicological evaluation of pesticides (fungicide, insecticide, herbicide) using tree frog embryos, *Hyla japonica*. Korean Journal of Environment and Ecology, 33(2), 178-186. <https://doi.org/10.13047/KJEE.2019.33.2.178>.
7. Xu X, Chen J, Li B, Tang L (2018) Carbendazim residues in vegetables in China between 2014 and 2016 and a chronic carbendazim exposure risk assessment. Food Control, 91, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.016>.
8. Hwang L, Park S (2019) Monitoring and risk assessment of carbendazim residues in soybean sprout and mungbean sprout from markets in Western Seoul. Journal of Food Hygiene and Safety, 34(4), 348-353. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.4.348>.
9. Adedara I, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur P, Farombi E (2013) Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats. Environmental Toxicology and Pharmacology, 35, 444-453. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.01.010>.
10. Zhu Z, Zhou F, Li J, Zhu F, Ma H (2016) Carbendazim resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* in China and its management. Crop Protection, 81, 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.12.011>.
11. Falciglia PP, De Guidi G, Catalfo A, Vagliasindi FGA (2016) Remediation of soils contaminated with PAHs and nitro-PAHs using microwave irradiation. Chemical Engineering Journal, 296, 162-72. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.099>.
12. Jia JL, Wang BB, Wu Y, Niu Z, Ma XY and Yu Y (2016) Environmental risk controllability and management of VOCs during remediation of contaminated sites. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 25, 13-25. <https://doi.org/10.1080/15320383.2016.1085834>.
13. Reddy GV, Antwi FB (2016) Toxicity of natural insecticides on the larvae of wheat head armyworm, *Dargida diffusa* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Toxicology and Pharmacology, 42, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.014>.
14. Morillo E, Villaverde J (2017) Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. Science of The Total Environment, 586, 576-597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
15. Odukkathil G, Vasudevan N (2013) Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 12, 421-444. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9320-4>.
16. Vidhya Lakshmi C, Mohit K, Sunil K (2009) Biodegradation of Chlorpyrifos in soil by enriched cultures. Curr Microbiol, 58, 35-38. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9262-1>.
17. Pinto CG, Laespada MEF, Martin SH, Ferreira AMC, Pavon JLP, Cordero BM (2010) Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. Talanta, 81, 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.013>.
18. Chuang S, Yang H, Wang X, Xue C, Jiang J, Hong Q (2021) Potential effects of *Rhodococcus qingshengii* strain djl-6 on the bioremediation of carbendazim-contaminated soil and the assembly of its microbiome. Journal of Hazardous Materials, 414, 125496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125496>.
19. Gevao B, Semple KT, Jones KC (2000) Bound pesticide residues in soils: A review. Environmental Pollution, 108(1), 3-14. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00197-9).
20. Sharma P, Sharma M, Raja M, Singh DV, Srivastava M (2016) Use of *Trichoderma* spp. in biodegradation of Carbendazim. Indian Journal of Agricultural Sciences, 86(7), 891-894.
21. Fang H, Wang Y, Gao C, Yan H, Dong B, Yu Y (2010) Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. Biodegradation, 21, 939-946. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9353-0>.
22. Negi G, Pankaj, Srivastava A, Sharma A (2014) *In situ* Biodegradation of endosulfan, imidacloprid, and carbendazim using indigenous bacterial cultures of agriculture fields of Uttarakhand, India. World Academy of Science, Engineering and Technology, 8(9), 898-906.
23. Bai N, Wang S, Abuduaini R, Zhang M, Zhu X, Zhao Y (2017) Rhamnolipid-aided biodegradation of carbendazim by *Rhodococcus* sp. D-1: Characteristics, products, and phytotoxicity. Science of the Total Environment, 590, 343-351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.025>.
24. Silambarasan S, Abraham J (2020) Biodegradation of carbendazim by a potent novel *Chryseobacterium* sp. JAS14 and plant growth promoting *Aeromonas caviae* JAS15 with subsequent toxicity analysis. 3 Biotech, 10, 336. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02319-w>.