

Research Article



CrossMark

Open Access

카벤다짐 분해 미생물인 *Rhodococcus* sp. 3-2의 대량 배양 및 미생물 제제 개발

박준경¹, 임성훈¹, 김정원¹, 지정환¹, 김공민¹, 박해성¹, 윤영석^{1,2}, 원항연³, 한귀환^{1*}

¹(제)농축산용미생물산업육성지원센터, ²국립수산물과학원 기후환경연구부 식품안전가공과, ³국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

Mass Cultivation of *Rhodococcus* sp. 3-2, a Carbendazim-Degrading Microorganism, and Development of Microbial Agents

Jun-Kyung Park¹, Seonghun Im¹, Jeong Won Kim¹, Jung-Hwan Ji¹, Kong-Min Kim¹, Haeseong Park¹, Yeong-Seok Yoon^{1,2}, Hang-Yeon Weon³ and Gui Hwan Han^{1*} (¹Center for Industrialization of Agricultural and Livestock Microorganisms, Jeongeup 56212, Korea, ²Food Safety and Processing Research Division, Department of Climate and Environment, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea, ³Agricultural Microbiology Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea)

Received: 29 August 2023/ Revised: 01 November 2023/ Accepted: 07 November 2023

Copyright © 2023 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

Jun-Kyung Park
<https://orcid.org/0000-0003-2190-9224>

Seonghun Im
<https://orcid.org/0000-0003-2745-5227>

Jeong Won Kim
<https://orcid.org/0009-0000-6247-9107>

Jung-Hwan Ji
<https://orcid.org/0009-0000-4999-7970>

Kong-Min Kim
<https://orcid.org/0009-0004-6240-9853>

Haeseong Park
<https://orcid.org/0000-0003-1487-0042>

Yeong-Seok Yoon
<https://orcid.org/0000-0002-7103-6460>

Hang-Yeon Weon
<https://orcid.org/0000-0002-9084-4316>

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

Abstract

Rhodococcus sp. 3-2 strain has been reported to degrade benzimidazole-based pesticides, such as benomyl and carbendazim. Therefore, this study aimed to optimize culture medium composition and culture conditions to achieve cost-effective and efficient large-scale production of the *Rhodococcus* sp. 3-2 strain. The study identified that the optimal media composition for mass culture comprised 0.5% glucose, 0.5% yeast extract, 0.15%

NaCl, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% sodium succinate, and 0.1% MgSO₄. Additionally, a microbial agent was developed using a 1.5-ton fermenter, with skim milk (20%), monosodium glutamate (15%), and vitamin C (2%) as key components. The storage stability of the microbial agent has been confirmed, with advantages of low temperature conservation, which helps to sustain efficacy for at least six months. We also assessed the benomyl degradation activity of the microbial agent within field soil. The results revealed an over 90% degradation rate when the concentration of viable cells exceeded 2.65×10^6 CFU/g after a minimum of five weeks had elapsed.

*Corresponding author: Gui Hwan Han
Phone: +82-63-536-6001; Fax: +82-63-536-6003;
E-mail: ghhan@cials.or.kr

Based on these findings, *Rhodococcus* sp. 3-2 strain can be considered a cost-effective microbial agent with diverse agricultural applications.

Key words: Benomyl, Biodegradation, Mass production, Microbe, Residual pesticide

서론

최근 안전한 먹거리에 대한 관심이 증가하고, 지속 가능한 농산업에 대한 필요성이 대두되면서 유해한 화학 잔류물이 없는 농산품에 대한 수요가 증가하고 있다[1]. 한편 지속가능한 산업에 대한 요구가 가속화됨으로서 농축산업분야에서 비료와 농약 사용량의 제한을 받을 전망이다[2]. 이러한 배경으로 인해 농산물의 질병 통제를 위해 사용되는 합성 화학 물질의 사용량을 줄이거나 대체하기 위한 전략을 개발하는 것이 매우 중요해졌다[3,4]. 농약의 경우 정부에서는 이미 2019년부터 농약허용기준강화제도를 도입하여 식품 및 농경지의 농약 잔류를 줄이기 위한 노력을 기울이고 있다[5]. 하지만 이러한 거시적 환경변화와 노력에도 불구하고 여전히 농업현장에서는 사용기준을 넘어서는 양의 농약이 살포되고 있으며, 농업토양과 작물에서는 잔류허용기준치를 초과하는 농약의 검출이 빈번히 일어나고 있다[6]. 특히 베노밀의 분해산물인 카벤다짐은 일부 국산 농산품과 수입농산물 등에서 검출이 빈번하여 사회적 문제가 되고 있다.

베노밀은 벤지미다졸계 침투성 살균제로 사과 및 포도에 발생하는 탄저병뿐만 아니라 고추와 수박 등 과채류의 탄저병 및 잿빛곰팡이병 방제에 널리 사용되는 살균제이다[7,8]. 베노밀은 자연상태에는 빠르게 카벤다짐으로 분해되며 대부분의 살균성은 카벤다짐의 작용으로 알려져 있다[9]. 카벤다짐은 화학적으로 안정하고 비교적 환경에 오래 지속되며 간과 내분비계에 해를 끼칠 수 있고 동물에게 낮은 농도에서도 돌연변이 유발 및 기형 유발 효과가 있다[10,11]. 또한 카벤다짐은 베노밀 살포 후 4년이 지나도 토양 내 잔류가 감지되는 등 긴 환경 지속성을 가지고 있어 토양 내 잔류문제가 커지고 있다. 이러한 베노밀의 분해산물을 무독화하기 위해 광촉매공정[12]과 초음파법[13] 등 다양한 물리적 및 화학적 처리 방법이 연구 및 개발되어 있으나, 2차 환경오염 가능성이 있으며 처리 비용이 증가하는 단점이 있다. 반면 최근 각광을 받고 있는 미생물을 이용한 생물학적 처리 방법은 이들이 가진 분해 활성을 통해 토양 내에 잔류된 오염 물질이 자연적으로 분해되어 인간과 자연 환경에 안전하며 경제적인 효과도 높은 장점을 가진다[14]. 이러한 이유로 인하여 미생물 제제를 활용하여 베노밀이나 카벤다짐을 분해하고자 많은 연구들이 수행되어 왔다. 수행되었던 선행연구로는 *Spingomonas paucimobilis* [15], *Alternaria alternata*, *Bipolaris tetramera* [16,17], *Pseudomonas luteola* [18]를 활용한 카벤다짐의 생물학적 분해 연구가 있으며, 이 외에도 오염된 토양에서 분리한 *Nocardioideis* sp. strain SG-4G 균주를 활용한 카벤다짐 분해 연

구[19], 복합 미생물을 활용한 카벤다짐 분해에 대한 연구들이 수행되었다[20]. 최근 연구에서 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주는 액상배지에서 60시간 내에 96% 이상의 베노밀을 분해하였으며, 토양 처리 시 베노밀과 카벤다짐을 10일 이내에 78~82% 분해하는 것이 밝혀졌다[11]. 카보퓨란(carbofuran), 카두사포스(cadusafos) 등의 농약과 동일하게, 카벤다짐 분해에 대한 *Rhodococcus* sp. 3-2의 생물학적 분해 능력과 관련된 메커니즘은 주로 생균수 의존성을 기반으로 한다[10,21,22]. 따라서 *Rhodococcus* sp. 3-2의 대량 배양은 상업적 사용을 위한 필수 단계이다. *Rhodococcus* sp.가 값싼 기질에서도 세포생장이 우수하고 대사산물을 합성할 수 있다는 점을 고려할 때 [23], 저렴한 화합물이나 추출물의 사용은 생산 비용을 절감하는데 매우 적합한 방법이라고 할 수 있다[24]. 이 연구의 목적은 베노밀 및 카벤다짐에 대한 생물학적 분해 효능을 유지하면서 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 최대 성장을 제공하는 상업용 제품 및 화합물을 기반으로 하는 저비용 배지를 탐색하는 것이다. 또한, 균주를 1.5 ton 발효기를 통해 대량 배양하고, 제형화 과정을 통해 미생물 제제를 제작하여 토양에 적용함으로써 농업 현장에서 사용 가능한 잔류농약 분해용 미생물 제제로서의 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험 재료 준비

본 연구에 사용된 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주는 농촌진흥청 국립농업과학원으로부터 분양 받아 사용하였다. 균주의 장기보존을 위해 균주 배양액에 20% glycerol를 첨가한 stock을 제조하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다. *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 보존용 배지로 R2A broth (KisanBio Co., Ltd, Korea; Casamino acid hydrolysate 0.5 g, Yeast extract 0.5 g, Proteose peptone 0.5 g, Dextrose 0.5 g, Soluble Starch 0.5 g, Dipotassium phosphate 0.3 g, Magnesium sulfate 0.05 g, Sodium pyruvate 0.3 g, pH 7.0 ± 0.2, per liter)를 사용하였으며, 균주의 순수 분리배양을 위해 액체배지와 1.5% agar를 첨가한 한천배지를 고압 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균하여 사용하였다. 순수 분리를 위해 R2A 한천배지에 도말하여 30°C 항온배양기에서 48시간 이상 배양 후 형성된 콜로니를 순수 분리하여 본 연구에 사용하였다.

투명 환을 이용한 *Rhodococcus* sp.3-2의 카벤다짐(베노밀) 분해 효능 검증

베노밀의 분해 연구는 분해산물인 카벤다짐(Carbendazim, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하였다. 상업용 배지인 R2A broth 200 ml에 *Rhodococcus* sp. 3-2 종균 배양액 1%를 접종하여 30°C, 진탕배양기에서 48시간 배양하였다. 이후, 카벤다짐이 100 mg/L 농도로 첨가된 R2A agar 배지에 직경 5 mm 크기의 코르크 보러를 이용하여 well을 만든 후, 0.7% agar solution으로 각각의 well을 채워주었다.

약 30분 동안 agar를 굳힌 후 10배 희석한 균주 배양액을 각 well에 10 μ l씩 분주하였다. 30°C로 설정된 항온배양기에서 48시간 이상 배양하여 well 주변에 생긴 투명 환(clear zone) 생성 여부를 확인하였다.

Rhodococcus sp. 3-2의 배지성분 및 배양 조건 최적화

Rhodococcus sp. 3-2의 생균수 기반 저비용 산업용 배지 선발을 위한 실험은 방법 250 ml의 삼각 플라스크에 50 ml의 산업형 기본배지(K_2HPO_4 0.5%, NaCl 0.15%, $MgSO_4$ 0.1%, Na-succinate 0.5%, pH 7.0 \pm 0.2)를 이용하여 수행하였다. 먼저 R2A 한천배지로부터 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 균

집을 R2A 액상배지에 접종하여 30°C, 150 rpm 조건으로 14 시간 동안 전배양을 실시하였다. 이후 최종 배양 볼륨의 1%에 해당하는 전배양액을 산업형 기본배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

배지 최적화 실험을 위해 산업형 기본배지에 최종 배양 볼륨의 0.5%에 해당하는 각기 다른 탄소원 및 질소원을 추가하였다. 탄소원 선발을 위해 yeast extract를 0.5% 농도로 고정 한 후 각각의 탄소원 별 생균수 결과를 확인하였고, 질소원 선발을 위해 Glucose를 0.5% 농도로 고정한 후 각각의 질소원 별 생균수 결과를 확인하였다. 이후, 각 성분마다 생균수 결과를 통해 최적 탄소원, 질소원을 선정하여 산업형 배지 조성을 확립하였다. 또한 선발된 조성을 기반으로 최적배양 조건 설정

Table 1. Cultivation conditions for optimization of the *Rhodococcus* sp. 3-2 strain

Exp.	Exp. No.	Vessel capacity	Carbon source	Nitrogen source	pH	Temp. (°C)	RPM
A ^a	1	500 ml	Fructose	Yeast extract	7.0	30	150
	2	500 ml	Galactose	Yeast extract	7.0	30	150
	3	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	30	150
	4	500 ml	Glycerol	Yeast extract	7.0	30	150
	5	500 ml	Lactose	Yeast extract	6.9	30	150
	6	500 ml	Maltose	Yeast extract	6.9	30	150
	7	500 ml	Soluble starch	Yeast extract	7.0	30	150
	8	500 ml	Sucrose	Yeast extract	7.0	30	150
	9	500 ml	Glucose	Tryptone	7.0	30	150
	10	500 ml	Glucose	Peptone	7.0	30	150
	11	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	30	150
	12	500 ml	Glucose	Soybean flour	7.0	30	150
	13	500 ml	Glucose	Soytone	7.0	30	150
	14	500 ml	Glucose	(NH ₂) ₄ SO ₄	6.7	30	150
B ^b	15	500 ml	Glucose	Yeast extract	4.0	30	150
	16	500 ml	Glucose	Yeast extract	5.0	30	150
	17	500 ml	Glucose	Yeast extract	6.0	30	150
	18	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	30	150
	19	500 ml	Glucose	Yeast extract	8.0	30	150
	20	500 ml	Glucose	Yeast extract	9.0	30	150
C ^c	21	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	27	150
	22	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	30	150
	23	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	32	150
	24	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	35	150
	25	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	37	150
	26	500 ml	Glucose	Yeast extract	7.0	40	150
D ^d	27	5 L	Glucose	Yeast extract	7.0	30	200
	28	5 L	Glucose	Yeast extract	7.0	30	400
	29	1.5 ton	Glucose	Yeast extract	7.0	30	100

The experiment was carried out in the order of A to D. A^a: Carbon and Nitrogen source selection, B^b: Growth conditions by pH, C^c: Growth conditions by culture temperature, D^d: Mass cultivation conditions by lab-scale results.

을 위해 다양한 배양 온도 및 pH 조건을 설정하여 *Rhodococcus* sp. 3-2의 최적 생육조건을 확인하였다. 적용된 모든 배지조성 및 배양조건은 Table 1에 나타내었다.

각 조건별 생육은 생균수 확인을 통해 이루어 졌으며 더불어 탄소원, 질소원, 배양 pH, 배양 온도 조건에서 농약분해효과를 확인해보고자 카벤다짐 100 mg/L이 포함된 배지에 각 조건별 배양액을 10 µl씩 분주하여 투명 환 생성 여부를 확인하였다. 모든 배양은 2회에 걸쳐 반복 수행하였으며 결과값의 평균 및 표준편차를 Prism 8.5 (GraphPad Software Co., USA)를 이용하여 그래프로 도식화하였다.

Rhodococcus sp. 3-2의 대량배양

5.0 L scale jar fermentor (KoBiotec, Korea) 배양조건은 3.0 L의 산업화 배지에 12시간 배양한 전배양액을 2% 접종하여 배양을 시작하였다. 배양온도는 30°C, pH는 7.0 및 통기량 0.5 vvm에서 이루어졌으며 균주의 최적 배양 조건 탐색을 위해 교반속도는 각각 200 rpm 및 400 rpm 조건으로 나누어 수행하였다. 매 12시간마다 배양액을 샘플링하여 생균수, 포도당 소비량, pH 변화를 모니터링하였다. 또한 배양액 샘플을 이용해 카벤다짐 100 ppm이 첨가된 R2A agar 배지에 분주하여 투명 환 생성 여부를 확인하였다. 5 L jar fermentor 배양 결과를 바탕으로 1.5 ton 발효기(KoBioTech Co., Ltd)를 이용한 *Rhodococcus* sp. 3-2의 대량배양을 수행하였다. 종균의 준비는 2번에 걸쳐 준비되었으며, 50 ml의 산업배지가 포함된 250 ml 삼각 플라스크에서 1차 종균배양을 진행 후, 2.0 L의 배지에 1%의 1차 종균 배양액을 접종하여 대량배양을 위한 최종 접종원으로 이용하였다. 1.5 ton 발효기에서 산업배지 1 ton을 제조 후 0.2%의 종균을 투입하여 배양을 시작하였다. 발효기의 배양 온도는 30°C, 통기량 0.5 vvm, 교반 속도는 100 rpm, 배양시간 48시간, 내부압력 0.4 kg/cm²로 설정하여 진행되었으며 40시간에 걸쳐 시간대별 배양액을 샘플링하여 광학밀도 600 nm값 및 생균수를 측정하여 배양 효율을 평가하였다.

Rhodococcus sp. 3-2의 분말 제제의 저장 안정성 조사

Rhodococcus sp. 3-2의 미생물 제제를 제작하기 위해 다음과 같이 분말 제형화를 수행하였다. 개발된 산업배지를 이용하여 1 ton 볼륨으로 대량 배양된 배양액을 6,800 rpm에서 1시간 동안 디스크 원심분리기를 이용하여 균체를 농축하였다. 약 70 L로 농축된 균체를 보존제에 따른 균주의 생존율 비교를 위해 농축된 균체에 성분 조성 및 농도가 다른 각각의 보존제를 첨가하여 120시간 동안 동결건조 후 분쇄기를 이용하여 균질한 상태로 분말화하였다. 보존제 성분 및 농도에 따른 제형화 조건은 Fig. 4에 제시하였다. 세 가지 조건별로 제작된 분말형 미생물 제제를 저온(4°C), 상온(25°C), 고온(40°C)으로 설정된 보관소에 저장하여 온도에 따른 미생물 제제의 저장 안정성이 유지되는지 확인하였다. 2주 간격으로 총 7개월 동안 진행되었다.

Rhodococcus sp. 3-2 미생물 제제를 이용한 토양 내 잔류농약 분해 활성 검증

Rhodococcus sp. 3-2의 미생물 제제를 이용한 베노밀의 분해 활성 검증은 주변 토양으로의 농약 유출 및 오염을 방지하기 위하여 국립농업과학원 내 설치된 비닐하우스에서 수행하였다. 45 cm × 45 cm × 21 cm (L × W × H) 크기의 사각 플라스틱 상자에 15 cm 깊이로 토양 25 kg을 채우고, 대조구 농약으로 베노밀 수화제(HE 베노밀, 한얼싸이언스, Korea)를 사용하였다. 베노밀 수화제를 물에 희석하여 최종농도 100 mg/L가 되도록 제조하여 토양에 혼합하고, 약 4시간 후 *Rhodococcus* sp. 3-2 미생물 제제를 골고루 섞어 비닐하우스에 보관하였다. 미생물 제제의 농도는 토양 1 g당 생균수가 각각 2.65×10^5 , 2.65×10^6 , 2.65×10^7 CFU/g이 되도록 1 L의 물에 희석하여 관주 처리하였고 각각의 처리는 3반복으로 진행하였다. 토양 시료의 채취 및 분석을 위한 전처리 방법은 다음과 같다. 베노밀 농약과 농도별로 미생물 제제가 처리된 토양 상자 중앙부와 가장자리 5지점의 5~10 cm 깊이에서 약 500 g씩 채취하였다. 샘플은 그늘에서 풍건하여 2 mm 체로 체질하여 사용하였다. 토양 시료의 베노밀 추출은 QuEChERS 방법을 이용하였다. 건조된 토양 시료 2 g을 15 ml conical tube에 넣고, 증류수 1.2 ml를 첨가하여 1분간 교반 후 acetonitrile 3 ml과 5분간 vortex mixer로 교반하였다. 혼합시료는 QuEChERS extraction kit (Agilent, 5982-5650) 1.3 g을 첨가하여 강하게 섞은 후 3,000 rpm 조건으로 10분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상층액 1 ml를 0.2 µm 필터로 필터링 후 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 정성 및 정량분석을 실시하였다. 분석에 사용된 HPLC, 컬럼 및 분석조건은 Table 2에 제시하였다.

결과 및 고찰

Rhodococcus sp. 3-2의 카벤다짐 분해는 확인

미생물 배지에 특정 물질을 섞어 불투명한 배지를 제작 후 투명 환을 관찰하는 방법은 미생물의 인산가용화[25], 폴리머

Table 2. Operating conditions of HPLC for the analysis of Benomyl

Solvent	A: Acetonitrile, B: Distilled water
Isocratic condition	A:B = 7:3
Instrument	Shimadzu HPLC (SCL-10Avp, Shimadzu, Japan)
Column	ZORBAX Eclipse WDB-C18 column (4.6 mm × 150 mm, Agilent, USA)
Detector	Photodiode array detector
Flow rate	0.7 ml/min
Temperature	40°C
Wave length	286 nm
Injection volume	10 µl

분해능[26] 또는 아밀레이스 활성[27] 등을 시험하는데 널리 사용되는 방법으로 특히 농업용 및 환경정화용 미생물 식별에 널리 사용되고 있는 방법이다. 본 연구에서는 카벤다짐 100 ppm을 포함하는 불투명 R2A 배지를 제작하여 투명 환을 관찰하는 방법을 고안하여 카벤다짐 분해 여부 및 그 활성을 관찰하고자 하였다. Fig. 1은 24시간 배양한 *Rhodococcus* sp. 3-2의 배양액을 세포 농도별로 희석 후 카벤다짐을 포함하는 R2A 배지에 분주하여 배양한 결과로, 배양 원액의 투명 환 크기는 평균 11.4 ± 0.5 mm로 가장 크기가 큰 것으로 나타났다. 또한 10배 희석배양액의 투명 환 평균크기는 9.4 ± 0.5 mm였으며 100배 이상 희석한 경우 세포의 성장 및 카벤다짐의 분해 여부를 육안으로 관찰하기는 어려웠다. 본 결과를 통해, 육안으로 24시간 내 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 카벤다짐 분해활성을 관찰하기 위해서는 적어도 생균수 10^8 CFU/ml 이상의 배양액이 필요하다는 것을 알 수 있었다. 또한 *Rhodococcus* sp. 3-2균주에 의한 카벤다짐 분해활성은 배양액 내 세포농도와 밀접한 관련이 있는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 미생물 군체 농도가 높을수록 살충제 fenitrothion의 분해속도와 관련이 크다는 기존 연구내용과 일치한다[28]. 또한 카벤다짐의 생분해는 미생물의 비성장속도와 관련이 있다는 기존 연구와도 동일한 결과이다[29]. 본 연구에서 고안한 방법을 통해 배노밀 뿐만 아니라 다른 농약 분해능을 가지는 유용미생물을 손쉽게 식별할 수 있을 것으로 판단된다.

Rhodococcus sp. 3-2 균주의 최적 탄소원 선발

앞서 밝힌 것과 같이 카벤다짐 분해 미생물의 생균수는 카벤다짐 분해속도 및 효율과 직접적인 연관성이 있기 때문에, 다음으로 카벤다짐 분해 미생물에 대한 생균수 기반 배지 최적화 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 산업화를 염두에 둔 배지를 개발하고자 하기 때문에 높은 생균수를 보장하면서도

최대한 가격경쟁력이 우수한 배지성분을 선발하는 것을 목적으로 하였다. 먼저 8종의 각기 다른 탄소원을 포함하는 배지를 제작하여 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주를 각각의 배지에 배양 후 이들의 생균수 변화를 조사하였다. 48시간의 배양 결과, 탄소원으로 glucose를 함유한 배지에서 가장 높은 생균수($2.8 \times 10^9 \pm 0.2$ CFU/ml)가 관찰이 되었으며, sucrose ($2.2 \times 10^9 \pm 0.8$ CFU/ml), lactose ($1.5 \times 10^9 \pm 0.2$ CFU/ml), galactose ($1.2 \times 10^9 \pm 0.3$ CFU/ml), soluble starch ($9.2 \times 10^8 \pm 0.3$ CFU/ml), maltose ($8.6 \times 10^8 \pm 0.2$ CFU/ml), fructose ($5.9 \times 10^8 \pm 0.2$ CFU/ml), glycerol ($1.0 \times 10^8 \pm 0.1$ CFU/ml)의 차례로 생균수가 높게 측정되었다(Fig. 2A). 또한 100 ppm 농도의 카벤다짐을 포함하는 고체배지에 48시간 배양액을 떨어뜨려 투명 환 생성을 관찰한 결과, glucose를 탄소원으로 배양했을 때 가장 큰 크기의 투명 환이 관찰되었다(11.3 ± 0.2 mm). 투명 환은 sucrose (10.9 ± 0.3 mm), fructose (10.8 ± 0.2 mm), maltose (9.9 ± 0.2 mm), lactose (9.2 ± 0.1 mm), soluble starch (9.1 ± 0.1 mm), galactose (9.2 ± 0.2 mm) 순으로 크기가 크게 관찰되었다(Fig. 2A). 이 실험을 통해 생균수가 높게 측정된 배양액일수록 카벤다짐의 분해능이 우수하다는 것을 알 수 있었다. Glucose는 사용된 탄소원 중 상대적으로 구매비용이 가장 저렴한 탄소원이기도 하므로 경제성 측면에서도 매우 우수하여 미생물 제제 생산에 매우 바람직하다고 할 수 있다.

Rhodococcus sp. 3-2의 최적 질소원 선발 및 배양 조건 확립

다음으로 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 성장에 최적인 질소원을 탐색하기 위해 포도당을 탄소원으로 하고, 총 6종의 각기 다른 질소원을 사용하여 배지를 제조 후 배양을 수행하였다. 배양 결과, *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 생균수는 yeast extract를 질소원으로 이용하였을 때 가장 높았다($2.3 \times 10^9 \pm 0.2$ CFU/ml)(Fig. 2B). 투명 환 형성실험 결과에서도 yeast extract로 배양했을 때 가장 큰 투명 환을 관찰할 수 있었다(11.4 ± 0.1 mm). 이 밖에 뚜렷한 투명 환을 생성한 질소원 중 soybean flour와 soytone은 불용성으로 침전물을 형성하기에 제형화 과정에서 불순물이 섞일 우려가 있다. Peptone과 Tryptone은 수용성인 장점이 있으나 가격경쟁력이 다소 낮기 때문에 yeast extract를 최적의 질소원으로 선발하였다. 결과적으로 0.5%의 glucose와 yeast extract를 포함하는 *Rhodococcus* sp. 3-2의 산업배지 조성이 확립되었다. 다음으로 산업배지를 이용하여 다양한 pH 및 배양온도 조건에서 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주를 배양하였다. pH별 배양결과, pH 7.0 조건에서 $5.9 \times 10^9 \pm 0.3$ CFU/ml로 가장 높은 생균수가 확인되었다. pH 6.0, 8.0 및 9.0 조건에서는 각각 $4.6 \times 10^9 \pm 0.2$, $4.3 \times 10^9 \pm 0.4$, $4.2 \times 10^9 \pm 0.3$ CFU/ml의 생균수가 확인되었다(Fig. 2C). 배양액의 투명 환 크기를 관찰한 결과 pH 6.0, 8.0, 9.0에서 각각 11.3 ± 0.3 , 10.8 ± 0.2 , 10.2 ± 0.2 mm였으며 pH 7.0 조건에서는 11.5 ± 0.4 mm로 측정되었다. 온도별 배양결과, 27, 30, 32°C에서 배양하였을 때, 각각 4.2×10^9

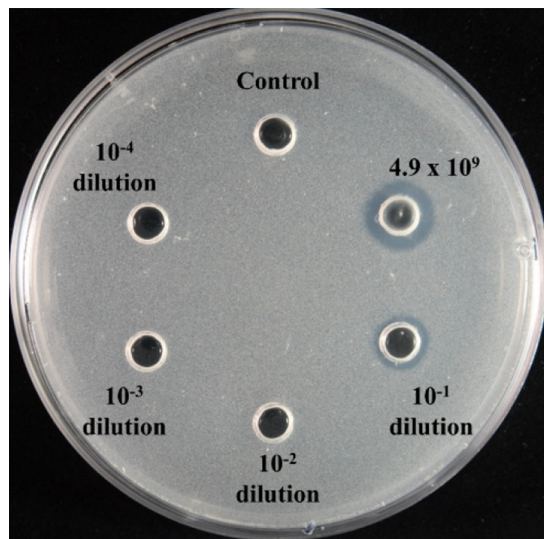


Fig. 1. The investigation of the effect of different cell concentrations of *Rhodococcus* sp. 3-2 on the degradation of carbendazim.

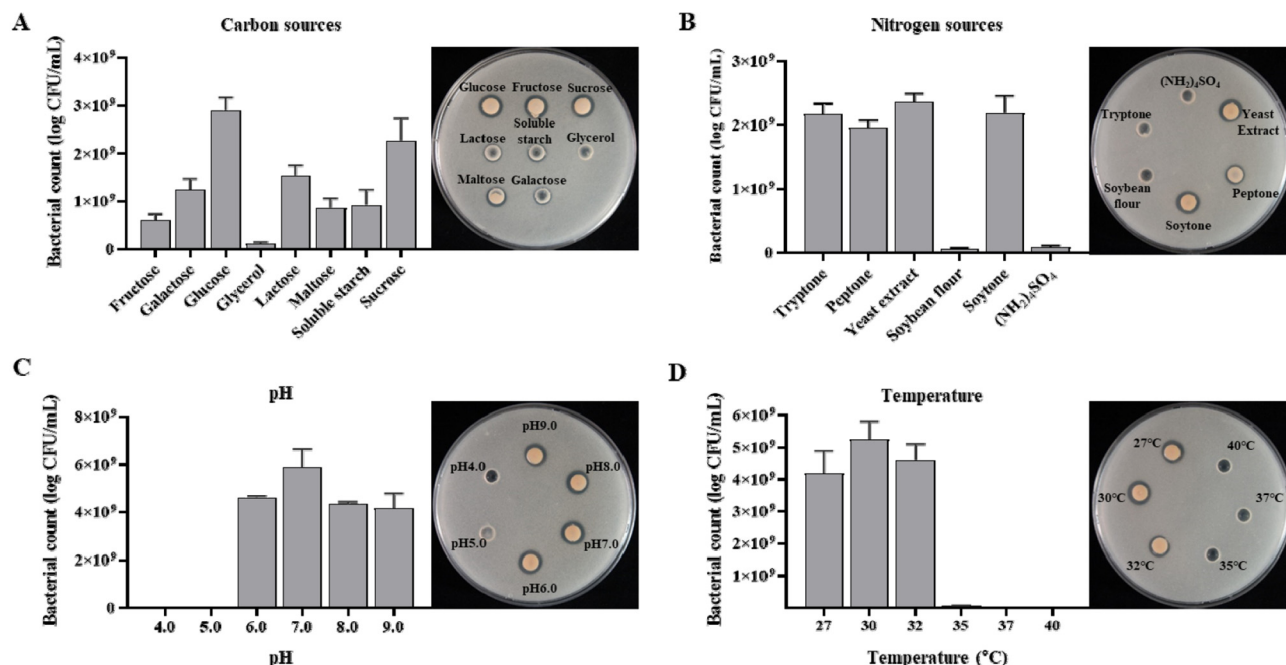


Fig. 2. Optimization of media composition and culture conditions to enhance cellular growth of the *Rhodococcus* sp. 3-2 strain. Viable cell numbers of the *Rhodococcus* sp. 3-2 strain cultured in industrial media with varying carbon sources (A), nitrogen sources (B), pH levels (C), and temperatures (D) during batch cultivation. For measurement of biodegradation activity, each 48-hour culture broth was spotted on R2A solid media supplemented with 100 ppm of benomyl. Left panel indicates Colony Forming Unit by media composition and culture conditions, and right panel indicates colony forming result in plate.

± 0.4 , $5.3 \times 10^9 \pm 0.3$, $4.6 \times 10^9 \pm 0.2$ CFU/ml의 결과를 확인하였다(Fig. 2D). 반면 35, 37, 40°C 조건에서는 $5.7 \times 10^7 \pm 0.3$, $1.3 \times 10^7 \pm 0.3$, $1.7 \times 10^6 \pm 0.3$ CFU/ml로 생균수가 다소 낮게 측정되었다. 투명 환의 크기는 27, 30, 32°C 조건에서만 각각 10.8 ± 0.2 , 11.1 ± 0.4 , 10.9 ± 0.2 mm로 측정되었다. 결과를 종합해보면, 산업배지 이용 시 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 성장에 가장 적합한 배양조건은 pH 7.0과 30°C로 나타났다.

Rhodococcus sp. 3-2의 대량배양 조건 확립

다음으로 5 L scale에서 산업배지의 효율을 판단하고자 jar fermentor 배양을 진행하였다. 우선 200 rpm 조건에서는 배양 36시간 후 $1.4 \times 10^9 \pm 0.1$ CFU/ml로 최대의 생균수 결과를 보였다(Fig. 3A). 400 rpm 조건에서도 배양 36시간 후 $3.0 \times 10^9 \pm 0.2$ CFU/ml로 가장 높은 생균수가 측정되었다. pH 변화는 400 rpm 조건에서 두드러졌으며(7.83에서 8.68), 배양 24시간 후 급격히 상승하는 결과를 보였다(Fig. 3A). Glucose의 소비량은 400 rpm으로 배양했을 때 0.06 g/L/h의 속도로 48시간 내 투입한 포도당을 모두 소비한 반면, 200 rpm 조건에서는 0.04 g/L/h의 속도로 투입된 포도당을 전부 소비하지는 못하였다. 시간대 별로 수집한 배양액을 100 ppm 농도의 카펜다짐이 포함된 배지에 떨어뜨려 투명 환 크기를 대조한 결과, 200 rpm 조건은 평균 9.2 ± 0.1 mm 크기의 투명 환이 관찰된 반면 400 rpm에서는 평균 12.1 ± 0.1 mm로

투명 환 크기가 약 32% 큰 결과를 보여 400 rpm 조건으로 배양된 배양액이 농약을 보다 효과적으로 분해하는 것을 확인하였다(Fig. 3A and B). 최종적으로 *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 대량배양 및 제형화를 위해 1.5 ton 대용량 발효기에서 실제 중량 1 ton으로 배양을 진행하였다. 배양결과 배양 15시간 후 OD₆₀₀ 값이 0.240, 33시간일 때 최대 3.887로 측정되었으며 최대 생균수는 3.36×10^8 CFU/ml로 나타났다. pH는 초기 6.98에서 48시간에서 8.89로 측정되었고, 용존산소량은 급격히 균주가 성장하는 배양 18시간 후 9%까지 감소하였다(Fig. 3C). 균주 생장이 느려지는 시점에서부터 증가하여 균주 성장과 반비례 관계가 있음을 알 수 있었다.

Rhodococcus sp. 3-2의 분말 제형과 저장 안정성 조사

비포자형성 그람 양성 세균은 일반적으로 미생물 제제화 과정이나 보관과정에서 생균수가 감소하여 사용 시 활성이 낮아지는 단점이 존재한다[30]. 이에 대한 대안으로 미생물의 배양 후 배지성분의 제거를 통해 저장성을 높이는 방법이 알려져 있다[31]. *Rhodococcus* sp. 3-2 균주의 저장성 증대를 위해 배양액에서 균체만 회수 후 건조하여 분말화를 하였다. 본 실험에 앞서 탈지분유, 유당, 비타민 C, 글루탐산염, 전분 등 5종 이상의 제형 보존제 평가를 수행하였다. 산화화배지를 통해 배양된 *Rhodococcus* sp.3-2 배양액에 보존제 후보물질을 첨가하여 교반 시킨 후, 60일간 보존하며 각각의 생균수

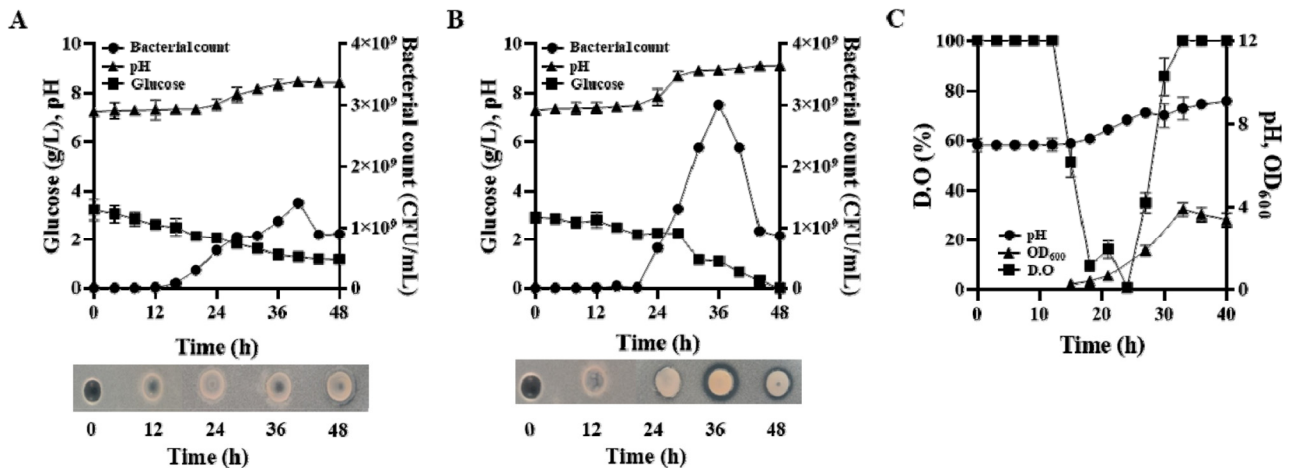


Fig. 3. Culture profile and clear zone test results of *Rhodococcus* sp. 3-2 cultivated in a 5 L jar fermentor under various agitation conditions: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm. The growth dynamics and metabolic activity of *Rhodococcus* sp. 3-2 grown in a 1.5-ton fermentor (C).

변화를 확인하였다. 생균수에 변화에 따른 생존율(%) 확인 결과, 보존제 후보 물질 모두 60일간 보존에도 모두 70% 이상 생균수가 유지됨을 확인하였고, 특히 탈지분유, 글루탐산염, 비타민 C 성분이 2:1.5:0.2 비율로 첨가된 배양액에서 90% 이상 유지됨을 확인하였다. 이를 통해 선별된 3가지의 보존제 혼합물(탈지분유, 글루탐산염, 비타민 C)을 분말형태의 미생물과 혼합하여 각각 저온(4°C), 상온(25°C), 고온(40°C)에서 보관하면서 저장보존성 및 안정성 시험을 수행하였다. 제형화 직후 각 제형의 생균수는 1번, 2번, 3번 제형의 차례로 $1.7 \times 10^9 \pm 0.2$, $1.8 \times 10^9 \pm 0.4$, $4.1 \times 10^8 \pm 0.5$ CFU/g으로 나타났다. 7개월 간의 저장보존성 실험결과 4°C에서는 세 분말 제형 모두 생균수가 10^8 CFU/g 이상으로 유지되어 가장 효과적인 저장보존성을 보였다(Fig. 4). 1번 제형의 경우 25°C에서 생균수가 다른 제형에 비해 다소 낮게 측정되었다(Fig. 4A). 2번 제형은 4°C 결과와 25°C 결과 간 유의미한 차이는

관찰되지 않았으나 40°C 결과의 경우 저장 3개월 이후부터 세포농도가 급격히 감소하여 저장 4개월 이후에는 미생물 제제 내 균주를 관찰할 수 없었다(Fig. 4B). 40°C에서는 오직 3번 제형만 10^7 CFU/g의 생균수가 측정되어(Fig. 4C), 세 가지 온도조건 모두에서 보존성이 가장 우수한 3번 제형(Skim milk 20%, Monosodium glutamate 15%, Vitamin C 2%)을 최적의 분말 제형화 조건으로 결정하였다. 보존성 시험 결과와 농업현장에서의 사용성을 고려했을 때 최종 분말 제제의 보관 온도는 상온이 바람직하며 유통기한은 6개월로 권장해야 할 것으로 판단된다.

Rhodococcus sp. 3-2 미생물 제제 시제품 토양 내 잔류능약 분해 활성 검증

최종적으로 제작된 *Rhodococcus* sp. 3-2의 분말 시제품을 이용하여 토양 내 잔류하는 베노밀의 분해 활성 검정을 실

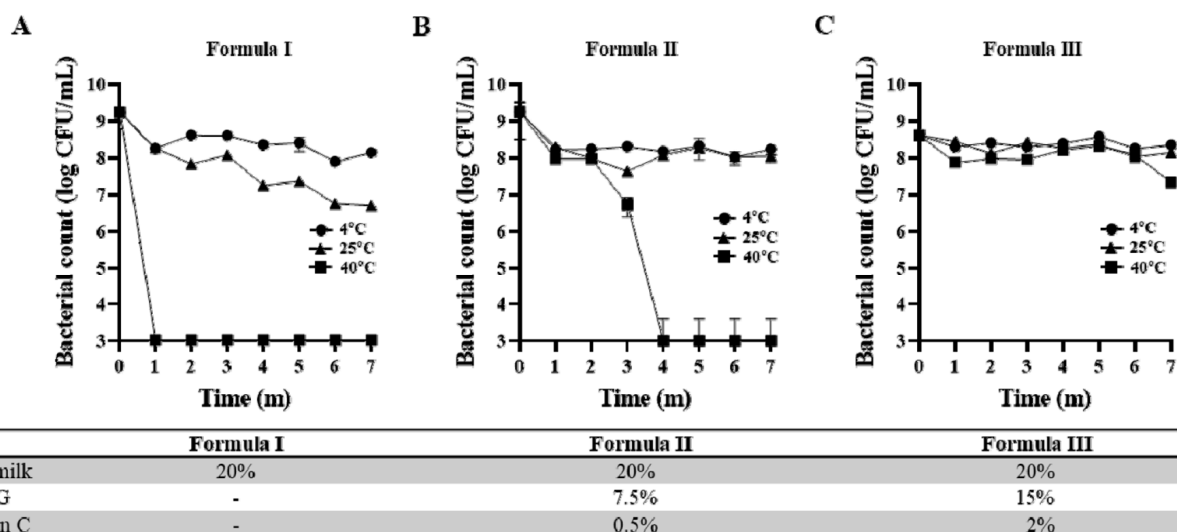


Fig. 4. Evaluation of microbial stability of different formulations: Formula I (A), Formula II (B), and Formula III (C).

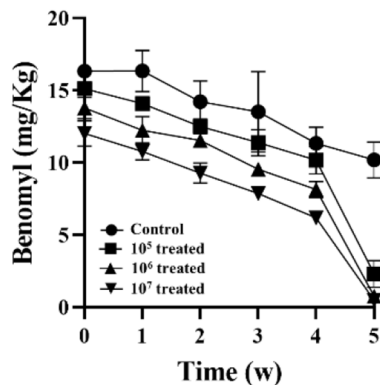


Fig. 5. Evaluation of benomyl degradation in soil by microbial agents. The data presented are the mean \pm standard deviation (SD) of three replicates (n=3).

시하였다. 비닐하우스 내부의 토양에 2.65×10^5 , 2.65×10^6 , 2.65×10^7 CFU/g 농도로 미생물 제제를 각각 토양에 처리하고 5주간 베노밀 분해 양상을 측정 한 결과, 대조군에서는 처리 5주차에 10.2 mg/kg의 베노밀이 측정되어 약 38% 정도의 자연감소가 측정되었다. 반면 미생물 제제를 처리한 실험군에서는 10^5 CFU/g 처리구, 10^6 CFU/g 처리구, 10^7 CFU/g 처리구 각각 4주차에 각각 10.3%, 28.15%, 45.5%의 분해결과를 얻었으며, 5주차에는 77.4%, 92.59%, 95.29%의 결과를 확인하였다(Fig. 5). 액상실험 결과와 유사하게, 토양실험에서도 농도가 높은 미생물 제제를 토양에 처리하였을 때 베노밀의 분해가 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 흥미로운 점은 토양에 2.65×10^6 CFU/g 농도의 미생물 제제만 처리해도 92.59%의 높은 베노밀 분해율을 관찰할 수 있었다는 것이다. 3번째 제제의 제형화 직후 생균수가 4.1×10^8 CFU/g 이었던 것을 감안하면 액상화한 분말 생균제를 155배 희석하여 사용하여도 토양 내 베노밀을 5주 이내 90% 이상 감소시킬 수 있다는 것을 보여주어, 본 연구에서 개발한 미생물 제제가 매우 효과적으로 농업토양에 적용될 수 있음을 보여주었다. 최근 토양, 농산물 및 환경에 잔류하는 농약을 제거하기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있는 가운데 본 연구는 친환경 미생물 자원을 통해 잔류농약성분을 제거 및 중화시킴으로 친환경적이며 경제적인 농약제거 기술의 기반을 닦는 연구가 될 것으로 전망된다. 향후 *Rhodococcus* sp. 3-2 미생물 제제의 사용 적기, 적정 사용량 등 추가 연구를 통해 농약 사용량 감소, 농산물의 안전성 확보 및 농가 소득향상 등 사회, 경제적 효과도 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 *Rhodococcus* 속 균주는 일반적으로 식물의 생육 촉진 인자의 생성이 우수한 균주이므로[32,33] 농업 현장에서 다용도로 활용될 것으로 예상된다.

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. PJ014897, PJ014800).

References

1. Park JK, Seo SI, Han GH, Kim KM, Kim DH, Song J, Kim PI (2018) Development of practical media and fermentative technique for mass cultivation from agricultural and livestock microorganism. Trends in Agriculture & Life Sciences, 56, 23-33. <https://doi.org/10.29335/tals.2018.56.23>.
2. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological Research, 206, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.
3. Ahmad M, Pataczek L, Hilger TH, Zahir ZA, Hussain A, Rasche F, Schafleitner R, Solberg SØ (2018) Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. Frontiers in Microbiology, 9, 2992. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02992>.
4. Besset-Manzoni Y, Rieusset L, Joly P, Comte G, Prigent-Combaret C (2018) Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies. Environmental Science and Pollution Research, 25, 29953-29970. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1152-2>.
5. Park BK, Kwon SH, Yeom MS, Joo KS, Heo MJ (2022) Detection of pesticide residues and risk assessment from the local fruits and vegetables in Incheon, Korea. Scientific Reports, 12, 9613. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13576-5>.
6. Park DW, Yang YS, Lee YU, Han SJ, Kim HJ, Kim SH, Kim JP, Cho SJ, Lee D et al. (2021) Pesticide residues and risk assessment from monitoring programs in the largest production area of leafy vegetables in South Korea: A 15-year study. Foods, 10(2), 425. <https://doi.org/10.3390/foods10020425>.
7. 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>.
8. Tortella GR, Mella-Herrera RA, Sousa DZ, Rubilar O,

- Briceño G, Parra L, Diez MC (2013) Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities. *Chemosphere*, 93, 1084-1093.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.084>.
9. Mazellier P, Leroy É, Legube B (2002) Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 153, 221-227.
[https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(02\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(02)00296-4).
10. Xu JL, He J, Wang ZC, Wang K, Li WJ, Tang SK, Li SP (2007) *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2754-2757. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65095-0>.
11. Yeon J, Kim HS, Ahn JH, Han G, Oh YG, Cho IK, Park IC (2021) Degradation effect of carbendazim in soil by application with the microbial agent, *Rhodococcus* sp. 3-2. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 40, 322-329.
<https://doi.org/10.5338/KJEA.2021.40.4.36>.
12. Panadés R, Ibarz A, Esplugas S (2000) Photodecomposition of carbendazim in aqueous solutions. *Water Research*, 34, 2951-2954.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00058-0).
13. Deshmukh NS, Deosarkar MP (2022) A review on ultrasound and photocatalysis-based combined treatment processes for pesticide degradation. *Materials Today: Proceedings*, 57, 1575-1584.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.170>.
14. Verma JP, Jaiswal DK, Sagar R (2014) Pesticide relevance and their microbial degradation: a state-of-art. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, 429-466.
<https://doi.org/10.1007/s11157-014-9341-7>.
15. Kalwaslińska A, Kesý J, Donderski W (2008) Biodegradation of carbendazim by epiphytic and neustonic bacteria of eutrophic Chełmżyńskie Lake. *Polish Journal of Microbiology*, 57, 221-230.
16. Aharonson N, Katan J (1993) Delayed and enhanced biodegradation of soil-applied diphenamid, carbendazim, and aldicarb. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22, 451-466.
<https://doi.org/10.1002/arch.940220312>.
17. Yarden O, Salomon R, Katan J, Aharonson N (1990) Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, 15-23.
<https://doi.org/10.1139/m90-004>
18. Kalwaslińska A, Kesý J, Donderski W, Lalke-Porczyk E (2008) Biodegradation of carbendazim by planktonic and benthic bacteria of eutrophic Lake Chełmżyńskie. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17, 515-523.
19. Pandey G, Dorrian SJ, Russell RJ, Brearley C, Kotsonis S, Oakeshott JG (2010) Cloning and biochemical characterization of a novel carbendazim (methyl-1H-benzimidazol-2-ylcarbamate)-hydrolyzing esterase from the newly isolated *Nocardioide* sp. strain SG-4G and its potential for use in enzymatic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2940-2945. <https://doi.org/10.1128/aem.02990-09>.
20. Arya R, Sharma AK (2015) Bioremediation of carbendazim, a benzimidazole fungicide using *Brevibacillus borstelensis* and *Streptomyces albogriseolus* together. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17, 185-189.
<https://doi.org/10.2174/1389201016666150930115737>.
21. Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Li H, Ren Y, Li J, Wang J, Yang H (2013) Isolation and characterization of carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11. *PLoS One*, 8(10), e74810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074810>.
22. Wang Z, Wang Y, Gong F, Zhang J, Hong Q, Li S (2010) Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2. *Chemosphere*, 81, 639-644.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.040>.
23. Nor Suhaila Y, Ramanan RN, Rosfarizan M, Abdul Latif I, Ariff AB (2013) Optimization of parameters for improvement of phenol degradation by *Rhodococcus* UKMP-5M using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 63, 513-521.
<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0496-6>.
24. Bong K, Kim J, Yoo JH, Park I, Lee CW, Kim P (2016) Mass cultivation and secondary metabolite analysis of *Rhodobacter capsulatus* PS-2. *KSBB Journal*, 31, 158-164.
<https://doi.org/10.7841/ksbbj.2016.31.3.158>.
25. Yu H, Wu X, Zhang G, Zhou F, Harvey PR, Wang L, Fan S, Xie X, Li F et al. (2022) Identification of the phosphorus-solubilizing bacteria strain JP233 and its effects on soil phosphorus leaching loss and crop growth. *Frontiers in Microbiology*, 13, 892533.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.892533>.
26. Lim BKH, Thian ES (2022) Biodegradation of polymers in managing plastic waste - A review. *Science of The Total Environment*, 813, 151880.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151880>.
27. Ahmed SA, Abdella MAA, El-Sherbiny GM, Ibrahim AM, El-Shamy AR, Atalla SMM (2019) Application of one -factor- at-a-time and statistical designs to enhance α -amylase production by a newly isolate *Bacillus subtilis* strain-MK1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101397. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101397>.
28. Choi H, Lee YD, Kang SC (2009) Identification and cultural optimization of the fenitrothion-degrading microorganism, *Bacillus sphaericus* NFo1. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 13, 21-27.
29. Panda J, Kanjilal T, Das S (2018) Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. *Biotechnology Research and Innovation*, 2, 45-57. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.004>.
30. Segarra G, Puopolo G, Giovannini O, Pertot I (2015) Stepwise flow diagram for the development of formulations of non spore-forming bacteria against foliar pathogens: The case of *Lysobacter capsici* AZ78. *Journal of Biotechnology*, 216, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.004>.
31. Slininger PJ, Schisler DA (2013) High-throughput assay for optimising microbial biological control agent production and delivery. *Biocontrol Science and Technology*, 23, 920-943. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.808739>.
32. Trivedi P, Pandey A, Sa T (2007) Chromate reducing and plant growth promoting activities of psychrotrophic *Rhodococcus erythropolis* MtCC 7905. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 513-517. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700224>.
33. Kundu D, Hazra C, Chaudhari A (2016) Biodegradation of 2,6-dinitrotoluene and plant growth promoting traits by *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: Identification and toxicological analysis of metabolites and proteomic insights. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.004>.