

인광석 가용화 세균의 분리 및 가용화 최적조건

김형종 · 정훈섭* · 김재호 · 이종수
배재대학교 생명과학부 유전공학과
*공주시농업기술센터

Isolation of Insoluble Phosphate-Solubilizing Bacteria and Optimum Condition for Solubilization

Hyoung-Jong Kim, Hun-Seob Jeong*, Jae-Ho Kim and Jong-Soo Lee

Department of Genetic Engineering, Division of Life Science, Paichai University
**Gongju City Agricultural Technology Center*

요 약

PDA-calcium phosphate 평판배지를 이용하여 인산가용화활성을 가진 850종의 세균을 분리한 후 인광석에 대한 인산가용화활성이 가장 강한 HS-2 균주를 선발하였다. 선정 균주의 형태학적, 배양학적 및 생리생화학적 특성 등을 조사한 결과 *Azotobacter* sp. HS-2로 동정되었고, 이 균주를 인광석을 0.1% 함유한 Potato dextrose Broth 배지 (pH 6.0)에 접종하여 30℃에서 5일 배양했을 때 인광석이 가장 많이 분해되었고 0.5M의 수산을 첨가했을 때 분해율이 약 50% 증가되었다.

ABSTRACT

850 strains of phosphate-solubilizing bacteria were isolated from soil of Chung-nam and Daejeon region using 0.5% calcium phosphate containing medium. The HS-2 strain with the highest rock phosphate-solubilizing activity was selected and identified as *Azotobacter* sp. HS-2 based on the microbiological characteristics. The optimum culture temperature and initial pH of medium for

solubilization of rock phosphate were 30°C and pH 6.0~7.0, respectively. Addition of oxalic acid (0.5M) into the PDB-rock phosphate medium increased 50% solubilization of rock phosphate.

key words : Insoluble phosphate, Isolation, *Azotobacter* sp., Solubilization

I. 서론

최근 인구증가에 따른 식량 문제를 해결하기 위하여 기계화, 전문화, 집약화 농업 경영 방식을 도입하여 생산성을 증가시켜 왔다. 그러나 이런 경영방식은 화학비료의 과다 투입을 수반하게 되었고 특히 인산의 축적을 심하게 초래하였다(Korea Society of Soil Science and Fertilizer, 2001).

인산축적은 토양에 시용된 인산비료의 작물 이용율이 10~20%로 낮고 따라서 대부분이 토양에 고정 집적되기 때문이다.

토양 중에서 인을 고정 할 수 있는 조성은 토양 점토 입자, 광물 표면, 칼슘, 철 및 알루미늄의 이온, 산화물과 수소산화물 및 비결정 화합물 등이 포함된다(신영오, 1985 ; 조백현, 1991).

토양이 인을 고정하는 능력의 대소는 토양광물의 종류, 점토입자의 대소, 산도, 칼슘, 철, 알루미늄의 활성 및 함량, 토양 함수량, 유기질 함량 등과 밀접한 관계가 있으며 산성 정도의 활성이 높으면 토양의 인 고정은 높아진다. 토양중의 인산함량이 높게되면 양분간의 상호작용으로 특정양분의 결핍이나 과잉을 유발하여 작물의 수량과 품질을 저하시키며, 토양유실 등에 의해 하천, 바다의 부영양화 같은 환경오염의 원인이 된다(대우학술총서변역, 1996).

토양중의 인산 함량이 높음에도 불구하고 인산질 비료를 사용하는 이유는 발근과 분얼수의 증가 등을 위해 왕성한 에너지 대사를 필요로 하는 생육초기에 토양의 유효 인산으로부터 토양용액으로 방출되어 나오는 가용성 인산량이 초기 생육에 필요한 요구량을 따르지 못하기 때문이다. 이렇게 생육초기에 필요한 양분 공급을 위해 사용하는 시발비로서(유인수, 1987) 인산질 비료가 앞서 밝힌 바대로 흡수 이용율이 낮아 토양의 인산함량을 점차 더 높여 가는 순환을 계속하게되므로 토양의 인산 축적이 심각한 문제로 대두된다.

따라서 이런 문제의 해결방법으로 토양 중에 다량으로 존재하는 난용성 인산염을 가용화하여 초기 생육에 필요한 양분을 공급해 줄수있다면 인산비료의 추가 사용없이 작물생육의 건전성을 유지하고, 토양 중에 축적된 인산함량을 낮춰 환경오염 문제를 경감시키는 좋은 대안이 될 것이다.

지금까지 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 미생물로는 *Penicillium bilaji* 등이 작물의 인산 흡수율을 증대와 수량을 10% 이상 증대시켰음이 보고 되었다(김형욱 외 3, 1984 ; 대우학술총

서번역, 1996). 또한 최근에는 *Bacillus megaterium*(Dubey 외 2, 1992) *B. polymyxa*(Tiwari 외 3, 1993), *Pseudomonas striata*(Agasimani 외 2, 1994 ; Varsha 외 2, 1993), *Penicillium simplicissimum*(Sayer 외 2, 1995), *P. bilaji*(양재의 외 4, 2000), *Aspergillus awamori*(Agasimani 외 2, 1994 ; Varsha 외 2, 1993), *A. aculeatus*(Varsha 외 2, 1995), *A. niger*(Sayer 외 2, 1995)등의 각종 미생물들을 시용함으로써 작물의 생산성이 증대되었음이 보고되었다(Dubey 외 2, 1992). 질소 고정균인 VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizae)과 *Rhizobium*을 이용한 생물비료의 개발(kang 외 1, 1999)이 일본, 인도, 미국에서 연구되어 세계 각국에서 생산되고있고 국내에서도 *Penicillium* sp. GL-101과 Cyanobacteria 등을 이용한 과잉 인산염의 가용화 또는 흡수제거에 대한 연구가(Dubey 외 1, 1992 ; Kang 외 1, 1999) 진행되고 있다.

본 연구는 환경친화형 생물비료개발의 일환으로 먼저 토양중 난용성 인산염을 가용화 할 수 있는 미생물을 토양 중에서 분리, 선별하여 동정하였고, 가용화 최적조건을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Potato-dextrose 한천배지와 Nutrient 한천배지는 DIFCO사(미국) 제품을 사용하였고 K_2HPO_4 , $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 등은 동양화학제품, Kanamycin, Penicillin-G, Erythromycin, Chloramphenicol 등은 NALGENE사 제품(덴마크)을 사용하였다. 또한 Streptomycin, Tetracycline, Sulfuric acid, Ammonium molybdate 등은 SIGMA사(미국) 제품을 사용하였다.

인광석은 경기화학에서 수입한 중국산 인광석을 60 mesh의 체로 sieving하여 사용하였다.

2. 인광석 가용화 균주의 분리 및 유리인산의 농도 측정

대전근교와 무주, 공주 등에서 토양을 취하여 실온에서 1시간 방치한 후 멸균수에 희석하여 0.5% calcium phosphate를 함유한 Potato Dextrose Agar와 Nutrient Agar배지에 각각 접종하여 30℃에서 1~3일간 배양한 후 투명한을 형성하는 균을 1차 선별하였다.(배지제조방법 : PDA, NA배지를 121℃에서 15분간 멸균하여 55℃로 식힌 후 $CaCl_2$, K_2HPO_4 를 각각 따로 멸균하여 최종농도가 0.5% 되도록 배지에 첨가하여 PDA, NA-0.5% calcium phosphate 분리용 평판배지를 만든다.)

1차 선별균주들을 0.5%(w/v) 인광석을 함유한 Potato Dextrose Broth배지에 접종한 후 30℃에서 5일간 배양한 다음 아래와 같이 인광석으로부터 생성되는 유리인산함량을 염화제일주석 환원법(Kang 외 1, 1999)으로 측정하여 인산 분해활성이 가장 강한 균주를 최종시험균주로 선정하였다. 유리인산의 농도측정은 균체 배양액 0.5 mL을 취하여 Eppendorf tube에 담은 후 15,000

rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1.0 mL을 취하여 증류수 4 mL을 첨가하여 총 5 mL이 되게 하였다. 여기에 몰리브덴산 암모늄용액 0.2 mL과 염화제일 주석용액 0.025 mL을 가하여 잘 섞은 후 30°C에서 10분간 방치한 후 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험에 사용한 용액은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 몰리브덴산 암모늄 용액 : 몰리브덴산 암모늄(4수화물) 25 g을 증류수 175 mL에 녹인 다음 황산 280 mL을 증류수와 약 400 mL에 천천히 넣고 방냉하면서 혼합한 다음 최종적으로 1,000 mL이 되도록 한다. 염화제일주석용액 : 염화제일주석(2수화물) 2.5 g을 글리세린 100 mL에 넣어 수용액상에서 유리막대로 섞으면서 빨리 녹인다(최명철 외 4, 1997).

3. 균학적 특성 및 동정

선정균주의 형태학적, 생리생화학적 및 배양학적 특성을 Manual of Method for General Bacteriology(Gerhardt 외 6, 1981)와 미생물 실험서(한국미생물학회, 1995 ; 한국생물공학회 편찬위원회, 1999)등을 이용하여 조사하였다.

또한 Potato Dextrose Agar배지에서 3일간 배양한 집락을 OsO₄로 고정하고 아세톤으로 탈수한 후 건조한 다음 금으로 도금하여 전자현미경(SEM은 HITACHI사의 S-2460N, TEM은 Carl Zeiss사의 LEO 912 AD 모델)으로 세포의 표면형태와 크기를 측정하였다.

위와 같은 선정균주의 형태학적, 생리생화학적 및 배양학적 특성 등을 종합하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Sneath 외 4, 1986) 등으로 동정하였다.

4. 인산분해 최적조건

선정된 HS-2 균주의 인광석 가용화 최적조건으로 배양 온도, 배양 시간 및 배지의 초기 pH, 인광석의 농도, 각종 유기산 및 킬레이트의 첨가 효과 등을 조사하였다(양재의 외 4, 2002).

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 선별

대전 근교 및 무주와 공주 등의 토양으로부터 인산염 가용화활성을 가진 850 균주를 1차 분리한 후 이들 가운데 인광석을 가장 많이 분해시키는 HS-2 균주를 시험 균주로 최종 선별하였다.

2. HS-2 균주의 특성 및 동정

HS-2 균은 Gram 음성의 단간균으로 내생포자는 생성하지 않았고 cyst를 형성하였으며 활주 운동을 하였다. 또한 3% NaCl 배지에서 생육하였고 생육 최적 온도와 pH는 각각 30℃, pH 6.0 이었으며 호기성 균이었다(Table 1).

또한 Voges Proskauer test와 암모니아의 생성, 독립질소고정능력, catalase 활성과 gelatin 액화성 등은 양성반응을 보였고 Methyl red test, oxidase 활성은 음성반응을 보였다. Soluble starch, inulin, raffinose, glucose, galactose, xylose, maltose, fructose, inositol, ethanol 등을 소화시켰고, 특히 kanamycin에 대해서 내성이 있었다(Table 1).

한편 주사형 현미경(SEM)과 투시형 전자현미경(TEM)으로 HS-2균의 형태를 관찰한 결과 $0.8 \times 1.2\mu\text{m}$ 의 전형적인 단간균 이었다(Fig. 1, 2).

이상의 균학적 특성을 종합해 볼 때 HS-2균의 그람음성의 간균이고 cyst를 형성하며, 암모니아를 생성하고 독립질소고정능을 갖고 있는 점 등으로 보아 *Azotobacter* sp. HS-2로 동정되었으며 분해율도 이들 미생물보다 훨씬 높았다.

지금까지 인광석을 분해하는 미생물로는 위에서와 같이 *Penicillium*과 *Aspergillus*속의 사상균과 *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *pseudomonas striata* 등의 세균 등이 보고되어 있고 *Azotobacter* 속균으로는 본 연구에서 최초로 인산분해능이 있는 균으로 분리되었다.

3. 인광석 분해 최적조건

1) 배양 온도의 영향

25, 30, 37℃에서 시험균주인 *Azotobacter* sp. HS-2를 일정시간 배양한 후 인광석 가용화 능력을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 30℃에서 5일 배양하였을 때 인광석 kg당 약 14 mg의 유리인산이 생성되어 최대분해능을 보였고, 25℃에서는 인광석을 가용화하지 못하였다.

이는 *Penicillium* sp. GL-101이 25℃에서 인광석을 가장 잘 가용화시켰다는 최 등(최명철 외 4, 1997)의 보고와는 다른 결과로서 균의 종류와 배지 및 배양조건에 따라 인광석 분해능이 각기 다른 것으로 추정된다.

2) 배지의 초기 pH의 영향

배지의 초기pH가 인광석 가용화에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 4.0~9.0사이에서 인광석을 분해하였으며 pH 6.0, 7.0에서 최대가용화능을 보였다. Fig. 4는 *Penicillium* sp. GL-101의 결과와(최명철 외 4, 1997) 유사하였다.

3) 인광석 첨가 농도의 영향

pH 6.0으로 조정된 배지에 인광석을 0.02 ~ 2.0% 까지 일정농도로 각각 첨가한 후에 5일 배양하여 인광석 가용화율을 조사한 결과 0.1%에서 최대능을 보였으며 그 이상의 농도에서는 분해율이 다소 떨어졌다(Fig. 5).

4) 유기산 첨가의 영향

Oxalic acid, maleic acid, citric acid의 유기산과 EDTA 같은 킬레이트를 0.1M에서 0.5M까지 인광석 배지에 첨가(양재의 외 4, 2000)하여 인광석 분해에 미치는 이들의 영향을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 oxalic acid를 0.5M 첨가하였을 때 약 25mg/kg의 유리인산이 생성되어 인광석 분해율이 무첨가 대조구에 비해 약 50% 증가되었다(Fig. 6).

Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of the HS-2 strain

Classification	Characteristics
Cell form	Rods
Size	0.8 × 1.2 μm
Gram staining	Negative
Cysts are formed	+ (central)
Motility	+
Flagella	-
Temperature for growth	25~35°C (Opt. temp; 30°C)
pH for growth	pH 5.0~9.0 (Opt. pH; 6.0)
Oxidation requirement	aerobic
Growth of 3% NaCl	+
Methyl red test	-
Voges proskauer test	+
Formation of ammonia	+
H ₂ S, indole	-
N ₂ fixed under atmospheric pO ₂	+ (non-symbiotic)
Catalase activity	+
Oxidase activity	-
Assimilation of citrate	-
Liquefaction of gelatin	+
Antibiotic resistance	
Kanamycin	+
Streptomycin, Penicillin, Tetracycline	-
Chloramphenicol, Erythromycin	-
Utilization of soluble starch	+
inulin, raffinose, glucose,	+
galactose, xylose, maltose,	+
fractions, ethanol, inositol	+

+ : Positive, - : Negative

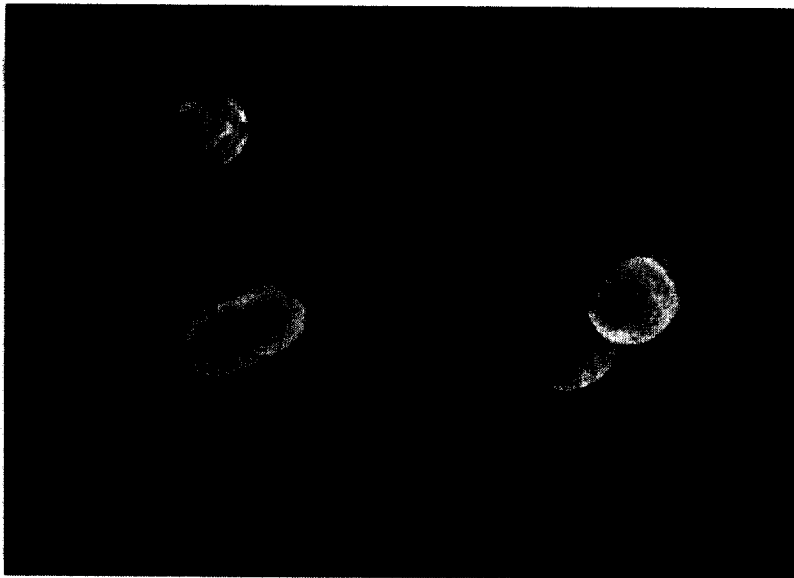


Fig. 1. Scanning electron microscope(SEM) of the selected strain HS-2

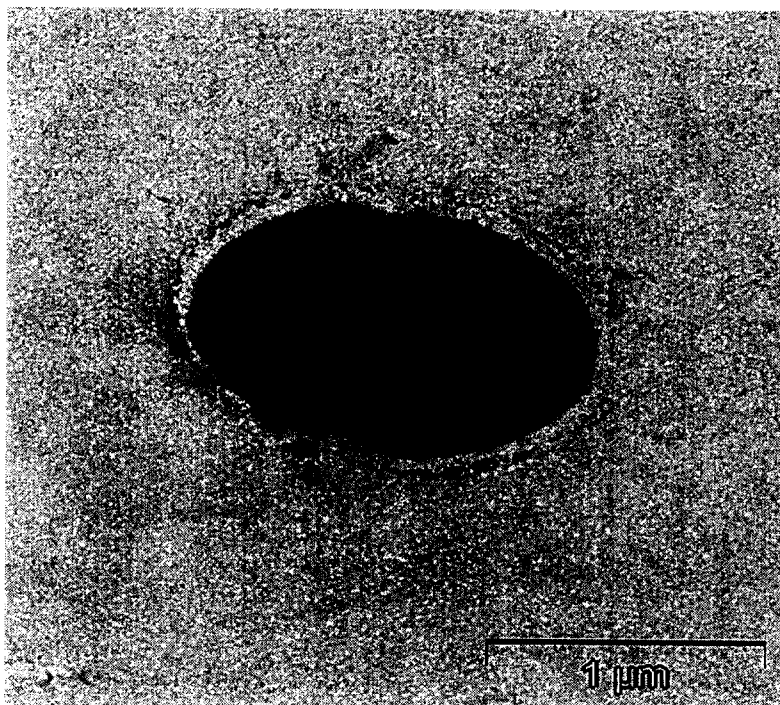


Fig. 2. Transmission electron microscope(TEM) of the selected strain HS-2

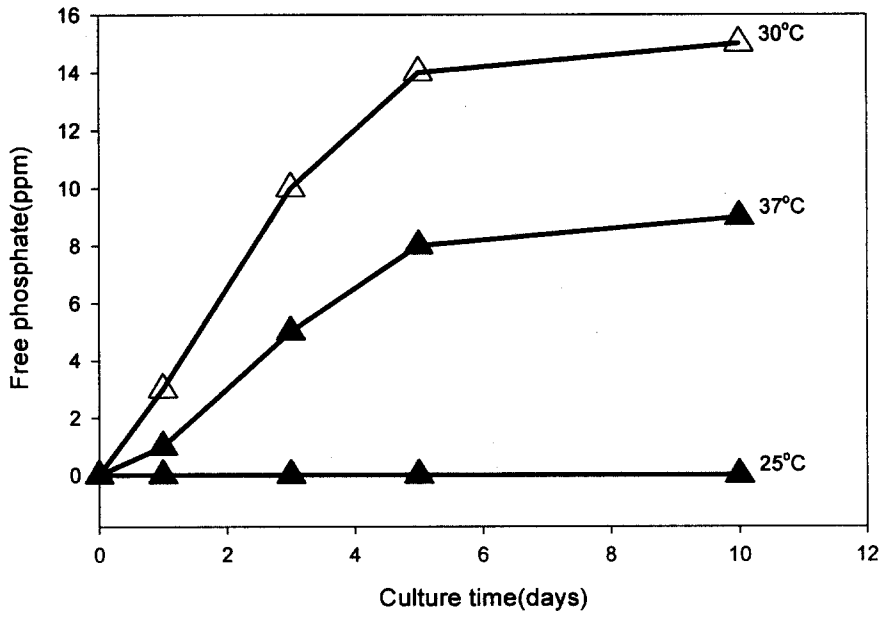


Fig. 3. Effect of culture temperature on the solubilization of insoluble rock phosphate

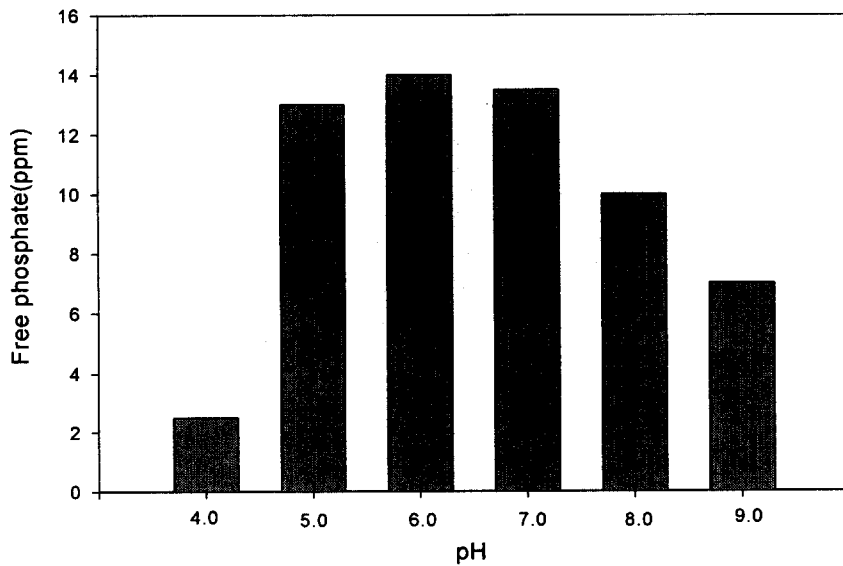


Fig. 4. Effect of initial pH of medium on the solubilization of insoluble rock phosphate

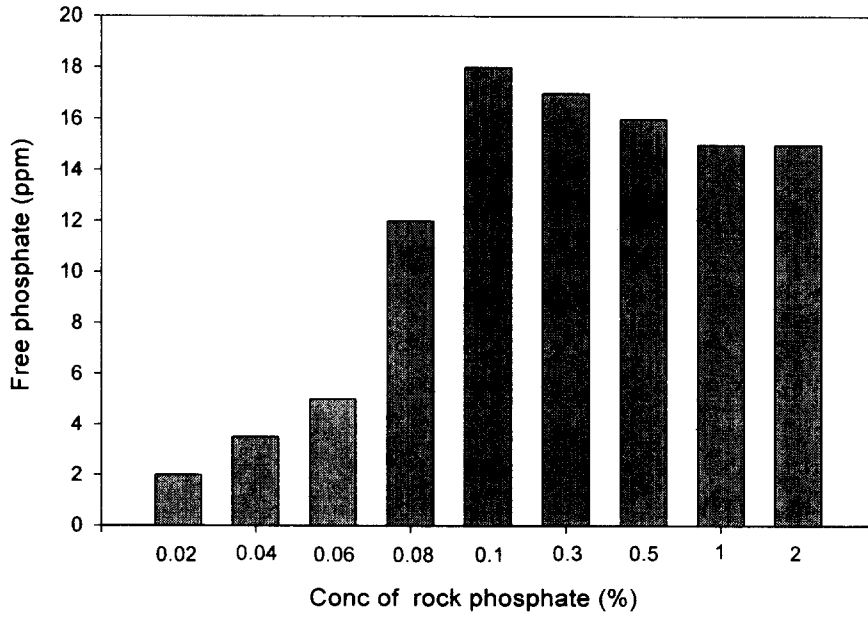


Fig. 5. Effect of concentration on the solubilization of insoluble rock phosphate

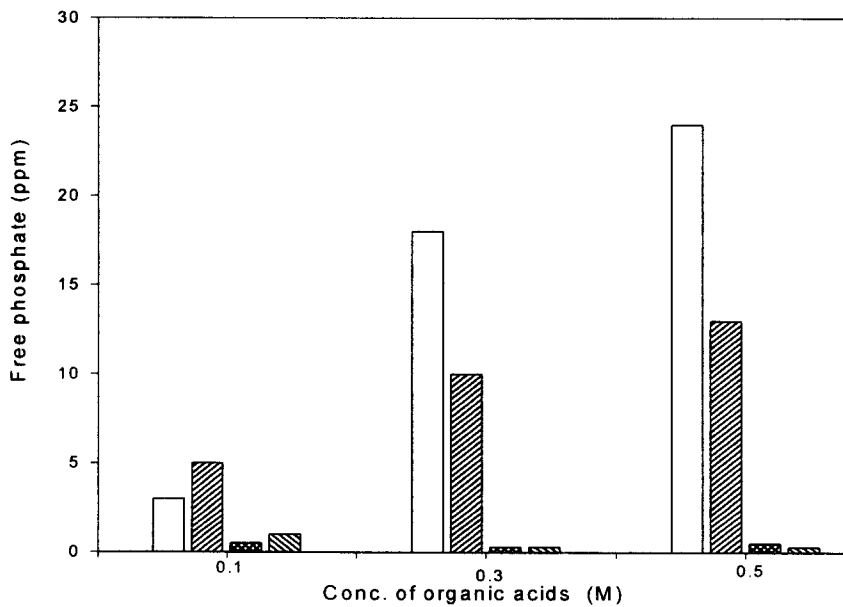


Fig. 6. Effect of organic acids on the solubilization of insoluble rock phosphate

(□; oxalic acid ▨; maleic acid ▩; citric acid ▪; EDTA)

IV. 참고 문헌

- 김형욱, 유장길, 이신찬. R. M. N. Kucy. 1984. 제주도 감귤원 토양의 V.A.-mycorrhizae 분포 및 사상균에 의한 인광석의 용해에 관한 연구, 제주대 논문집17: 45-50
- 대우학술총서번역. 1996. 토양미생물학과 생화학, p.137-335. 민음사. 서울
- 신영오 역. 1985. 토양미생물학 개론, p.114-439. 대광문화사. 서울
- 양재의, 이선형, 박창진, 김정제, 이권복. 2000. 시설재배지 토양에 축적된 인산의 가용화; 강원 대학교 농업과학연구소 논문집. 11: 120-128
- 유인수. 1987. 다수확 재배를 위한 발토양관리와 시비. p. 47 (사)가리연구회
- 조백현. 1991. 토양학, p.128-270. 향문사. 서울
- 최명철, 정종배, 사동민, 임선옥, 강선철. 1997. 토양에서 분리한 *Penicillium* sp. GL-101에 의한 난용성 인산염의 가용화; *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 40: 329-333
- 한국미생물학회. 1995. 미생물학실험서, p.12-25. 아카데미서적
- 한국생물공학회 편찬위원회. 1999. 생물공학 실험서, p. 12-135. 자유아카데미
- Agasimani, C. A., Barbato and M. N. Sreenivasa. 1994. Response of groundnut to phosphate solubilizing micro organisms. *Groundnut News* 6: 5
- Dubey, S. K. and S. D Billore, 1992, Phosphate solubilizing microorganism(PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India-a review. 1988. *Crop Res. Hisar*
- Gerhardt, Murray, Costilow, Nestrt, Wood, Krieg and Phillips 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Soc. for Microbiology
- Kang, Sun Chul and Myoung-Chul Choi. 1999. Solid Culture of phosphate-solubilizing Fungis, *Penicillium* sp. PS-113. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* V27: No. 1: 1-7
- Korean Society of Soil Science and Fertilizer. 2001. *International Symposium on Soil and Water Management*. p102-107.
- Kucy, R. M. N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Can. j. Soil Sci.* 68: 261~271
- Sayer, J. A. S. I. Raggett and G. M. Gadd. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Res.* 99: 987-993
- Sneath, P.H.A, N.S Mair, M.E Sharpe and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins. Co. Baltimore.

- Tiwari, V. N., A. N. Pathak and L. K. Lehri. 1993. Rock phosphate-superphosphate in wheat in relation to inoculation with phosphate solubilizing organism and organic waste. *Ind. J. Agr. Res.* 27: 137-145.
- Varsha, N., T. Jugnu and H. H. Patel. 1993. Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*. *Ind. J. Exp. Biol.* 31: 747-749.
- Varsha, N., T. Jugnu and H. H. Patel. 1995. Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Ind. J. Exp. Biol.* 33: 91-93.