

환경친화적 미생물비료 자원 *Pseudomonas fluorescens* RAF15에 의한 가용성 인산 생산에 영향을 미치는 조건

박기현 · 박근태* · 김성만** · 이충열** · 손홍주

부산대학교 생명응용과학부, *부산대학교 산학협력단, **부산대학교 생명자원과학부
(2008년 7월 2일 접수; 2008년 7월 28일 수정; 2008년 7월 28일 채택)

Conditions for Soluble Phosphate Production by Environment-Friendly Biofertilizer Resources, *Pseudomonas fluorescens*

Ki-Hyun Park, Geun-Tae Park*, Sung-Man Kim**,
Chung-Yeol Lee** and Hong-Joo Son

School of Applied Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

*Research & University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

**School of Bioresource Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

(Manuscript received 2 July, 2008; revised 28 July, 2008; accepted 28 July, 2008)

Abstract

The effects of inorganic salts, inoculum concentration, aeration rate and shaking speed on insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 were investigated. Soluble phosphate production was dependent on the presence of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in the medium. Supplementation of medium with 0.01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and 0.01% NaCl slightly increased soluble phosphate production. The optimal medium compositions for the solubilization of insoluble phosphate by *P. fluorescens* RAF15 were 1.5% glucose, 0.005% urea, 0.3% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and 0.01% NaCl, respectively. Optimal inoculum concentration was 2.0%(v/v). Maximum soluble phosphate production was obtained with 20-50 ml/250-ml flask and 200 rpm of shaking speed, respectively. The addition of EDTA decreased cell growth and soluble phosphate production.

Key Words : Biofertilizer, Phosphate-solubilizing bacteria, *Pseudomonas fluorescens*

1. 서 론

토양에 존재하는 인산은 식물체의 주요 영양원으로서 대단히 중요한 기능을 수행하고 있으나 토양 속 인산 농도는 0.05 mg/l 정도로서, 식물체가 필요로 하는 양에는 부족한 형편이다¹⁾. 따라서 합성인산

비료의 형태로 인산을 토양에 공급하기도 하지만 인산은 토양 속 양이온과 빠른 속도로 결합하여 난용성 물질로 전환되며, 또한 강우 등에 의한 세척작용으로 인하여 소실되기 때문에 식물체에게 충분한 양의 인산을 공급하기란 대단히 어렵다^{2,3)}.

대부분의 합성인산 비료는 불용성 무기염 형태의 인광석을 화학적으로 처리하여 생산하고 있다. 그러나 이 방법은 불순물이나 가스 등을 수증기나 대기로 방출시킴으로서 환경을 오염시키는 것으로 알

려져 있다⁴⁾. 따라서 토양에 고정되어 있는 난용성 인산을 실제 비료성분으로 이용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다⁵⁾. 토양 속 난용성 인산을 가용화시키기 위한 실질적인 접근 방법 중의 하나는 유기산을 생산하는 미생물을 이용하는 것이다^{6,7)}. 즉, 난용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물 (phosphate-solubilizing microorganism, PSM)은 인산에 결합된 양이온을 chelating할 수 있는 유기산을 생산함으로써 가용성 인산을 방출하게 되고, 이에 따라 농작물의 생산성을 높일 수 있다⁶⁾.

본 연구진은 환경친화적 미생물비료를 개발하기 위하여 자연계에 존재하는 미생물 중 토양 속 난용성 인산을 효율적으로 가용화시킬 수 있으면서 동시에 농작물에 질병을 유발하는 진균의 생육의 억제할 수 있는 *Pseudomonas fluorescens* RAF15를 분리한 후, 난용성 인산 가용화에 영향을 미치는 탄소원, 질소원, 배양온도, 배지 pH 및 염 저항성 등을 조사하여 생물비료 및 생물농약으로서의 가능성에 대하여 보고⁸⁾한 바 있다. 각종 미량 원소들이 난용성 인산 가용화를 촉진할 것으로 예상되고 있으나 아직까지 무기염이 난용성 인산 가용화에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 보고는 거의 없는 실정이며⁹⁾, 나아가 평균 접종량 및 통기량 등의 배양조건이 난용성 인산 가용화에 미치는 영향에 연구는 전혀 없다. 따라서 본 연구에서는 이들 조건이 난용성 인산 가용화에 미치는 효과를 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 농작물의 근권 토양으로부터 분리된 *P. fluorescens* RAF15이었다⁸⁾. 사용된 기본배지의 조성 및 배양조건은 glucose 1.5%, urea 0.005%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, 배양온도 30℃ 및 초기 pH 7.0이었으며, 다른 언급이 없는 한, 난용성 인산원으로 $Ca_3(PO_4)_2$ 0.5%를 첨가하여 가용성 인산 생성능을 검토하였다. 이때, 배양온도, 배지의 초기 pH, glucose 및 urea의 농도는 이전에 최적화된 것이었다⁸⁾. 전배양은 50 ml의 nutrient broth가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 nutrient agar plate에서 보존중인 균주 한 백급이를

접종하여 30℃, 200 rpm에서 24시간동안 회전 진탕 배양하였다. 전배양액을 본배지 50 ml가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 2%(v/v) 접종한 후, 200 rpm에서 5일간 회전 진탕 배양하였다.

2.2. 가용성 인산 생산을 위한 조건 검토

실험균주의 난용성 인산 가용능에 영향을 미치는 조건을 알아보기 위하여 각종 무기염의 종류 및 농도, 평균 접종량, 통기량 및 EDTA 첨가 등에 따른 균체 생육도, 가용성 인산 농도 및 배지의 최종 pH를 측정하였다.

2.3. 분석방법

배양액 시료와 1N HCl을 1 : 1(v/v)의 비율로 혼합함으로써 배양액 속의 잔존 난용성 인산을 가용화시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 균체 생육도를 조사하였다⁹⁾. 배양액 속의 가용성 인산의 농도는 12,000 rpm, 20 분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상등액을 대상으로 vanadomolybdophosphoric acid colorimetric method¹⁰⁾로 조사하였으며, 균주를 접종하지 않은 각 배지를 대조구로 사용하여 실험 결과를 보정하였다. 모든 실험은 triplicates로 실시하였으며, 나타난 각 결과들은 이들의 평균값이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 무기염이 난용성 인산 가용화에 미치는 영향

기본배지에 함유된 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 난용성 인산 가용화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 의 경우, 0.1-0.7% 범위에서 대조구보다 가용성 인산 생성능(793-844 mg/l)이 우수하였으며, 그중 0.3%에서 최대 가용성 인산 생성능(844 mg/l)을 나타내었다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 경우, 0.01% (823 mg/l)를 제외한 모든 실험 농도에서 대조구보다 가용성 인산 생성능이 낮았다. 이전 보고⁸⁾에 의하면 *P. fluorescens* RAF15에 의한 가용성 인산 생성은 배지의 pH 감소와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌는데, 본 연구에서도 이러한 결과를 다시 한번 확인할 수 있었다. 일반적으로 불용성 인산이 가용성 인산으로 전환되는 이유는 미생물이 생산한 각종 유기산에 의한 배양액의 pH 감소가 원인인 것

Table 1. Effect of inorganic salt concentrations in basic medium on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15

| Concentration (%) | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | | | Concentration (%) | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | | |
|-------------------|---|----------------------|----------|-------------------|---|----------------------|----------|
| | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) | Final pH | | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) | Final pH |
| None | 766 | 0.732 | 4.2 | None | 775 | 0.759 | 4.1 |
| 0.1 | 819 | 0.869 | 4.1 | 0.01 | 823 | 0.996 | 4.0 |
| 0.2 | 808 | 0.759 | 4.2 | 0.02 | 775 | 0.974 | 3.7 |
| 0.3 | 844 | 0.930 | 4.1 | 0.03 | 772 | 0.990 | 3.8 |
| 0.4 | 824 | 0.820 | 4.1 | 0.04 | 764 | 0.927 | 3.8 |
| 0.5 | 821 | 0.792 | 4.1 | 0.05 | 757 | 0.869 | 3.6 |
| 0.6 | 811 | 0.567 | 4.2 | 0.06 | 750 | 0.880 | 3.6 |
| 0.7 | 793 | 0.792 | 4.2 | 0.07 | 746 | 0.886 | 3.7 |
| 0.8 | 763 | 0.682 | 4.2 | 0.08 | 738 | 0.836 | 3.6 |
| 0.9 | 740 | 0.825 | 4.2 | 0.09 | 702 | 0.847 | 3.6 |
| 1.0 | 722 | 0.754 | 4.3 | 0.1 | 667 | 0.847 | 3.6 |

으로 보고되어 있다¹¹⁾. 따라서 향후 본 실험군주가 생성하는 유기산의 종류와 농도에 대한 실험이 뒤따라야 할 것으로 판단되었다.

기본배지에 포함되어 있지 않은 다른 무기염을 추가적으로 첨가하여 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 0.01% NaCl의 첨가는 가용성 인산 생성량(766 mg/l, 805 mg/l)을 증가시켰으며, KCl 및 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 의 첨가는 가용성 인산 생성에 긍정적인 영향을 나타내지 않았다.

Table 2. Effect of the other inorganic salt concentrations on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15

| Inorganic salt | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) | Final pH |
|---|------------------|----------------------|----------|
| None | 746 | 0.864 | 3.8 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.01% | 766 | 0.776 |
| | 0.05% | 733 | 0.798 |
| NaCl | 0.01% | 805 | 0.715 |
| | 0.05% | 758 | 0.71 |
| KCl | 0.01% | 750 | 0.745 |
| | 0.05% | 751 | 0.758 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0.01% | 746 | 0.721 |
| | 0.05% | 638 | 0.836 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01% | 571 | 0.358 |
| | 0.05% | 199 | 0.589 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01% | 644 | 0.693 |
| | 0.05% | 249 | 0.748 |

그러나 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 첨가는 오히려 가용성 인산 생성량을 감소시켰다.

이상에서 결정된 난용성 인산 가용을 위한 최적 배지 조성은 glucose 1.5%, urea 0.005%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 0.01%이었다.

3.2. 기타 배양조건이 난용성 인산 가용화에 미치는 영향

중균 접종량은 미생물 대사산물의 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다¹²⁾. 중균 접종량이 난용성 인산 가용화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 2-5%(v/v) 전배양액을 접종했을 경우, 가용성 인산 생성능(827-841 mg/l)이 높게 나타났으며, 그 이상의 접종량에서는

Table 3. Effect of inoculum concentrations on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15

| Inoculum size (% v/v) | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) |
|-----------------------|------------------|----------------------|
| 1 | 794 | 0.861 |
| 2 | 841 | 0.819 |
| 3 | 838 | 0.864 |
| 4 | 829 | 0.893 |
| 5 | 827 | 0.893 |
| 6 | 808 | 0.921 |
| 7 | 802 | 0.945 |
| 8 | 802 | 0.966 |
| 10 | 771 | 1.092 |

Table 4. Effect of medium volume and shaking speed on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15

| Medium volume (ml/250-ml flask) | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) | Shaking speed (rpm) | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) |
|------------------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|
| 25 | 853 | 0.858 | 50 | 183 | 0.489 |
| 50 | 853 | 0.737 | 100 | 569 | 0.656 |
| 75 | 842 | 0.688 | 150 | 832 | 0.825 |
| 100 | 820 | 0.682 | 175 | 847 | 0.754 |
| 150 | 824 | 0.715 | 200 | 852 | 0.847 |
| 175 | 787 | 0.721 | | | |

별다른 영향을 미치지 않았다.

통기량에 따른 난용성 인산 가용성을 측정한 결과, 배지량 25-50 ml/250-ml flask에서 가장 높은 가용성 인산 생성능(853 mg/l)을 나타내었으며, 75-175 ml/250-ml flask에서는 가용성 인산 생성능이 완만하게 감소하였다(Table 4). 따라서 본 실험군주에 의한 난용성 인산의 가용화에는 산소의 공급이 중요한 것으로 추정되었다. 진탕속도에 따른 난용성 인산 가용성을 측정한 결과, 150-200 rpm에서 우수한 가용성 인산 생성능(832-852 mg/l)을 나타내었으며, 그 이하의 진탕속도에서는 가용성 인산 생성능(183-569 mg/l)이 매우 저조하였다(Table 4).

3.3. EDTA 첨가가 난용성 인산 가용화에 미치는 영향

EDTA는 난용성 인산 가용성을 상승시키는 작용이 있는 것으로 보고되어 있다²⁾. 따라서 최적배지에 EDTA를 첨가하여 가용성 인산 생성량을 조사하였으며 그 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. EDTA 자체는 난용성 인산을 가용화 시킬 수 있었으나 EDTA의 첨가는 실험군주의 균체 생육을 감소시켜 결

Table 5. Effect of EDTA addition on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF 15

| Experiment | Final pH | Soluble P (mg/l) | Growth (A_{660}) |
|---|----------|------------------|----------------------|
| Optimum medium + inoculum(2%, v/v) | 4.0 | 845 | 0.815 |
| Optimum medium + 0.05% EDTA + inoculum(2%, v/v) | 4.7 | 669 | 0.656 |
| Optimum medium + 0.05% EDTA | 5.9 | 85 | 0.006 |

과적으로 난용성 인산 가용화를 저해하였다. 이러한 결과는 *Aspergillus aculeatus*에 의한 인광석의 가용화²⁾에서 볼 수 있는 현상과 동일하였다.

4. 결 론

농작물의 근권 토양으로부터 분리된 *Pseudomonas fluorescens* RAF15에 의한 난용성 인산 가용화에 미치는 각종 무기염, 종균 접종량, 통기량 및 진탕속도에 대하여 조사하였다. *P. fluorescens* RAF15에 의한 가용성 인산 생성능은 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 존재 하에서 증가하였으며, 기본배지에 함유되어 있지 않았던 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 NaCl 의 추가공급은 가용성 인산 생성량을 약간 증가시켰다. 가용성 인산 생성을 위한 최적배지 조성은 1.5% glucose, 0.005% urea, 0.3% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 0.01% NaCl 이었다. 최적 종균 접종량은 2.0%(v/v)이었으며, 배지량 20-50 ml/250-ml flask 및 200 rpm에서 최대의 가용성 인산 생성능을 나타내었다. 최적배지에 EDTA의 첨가는 균체 생육과 가용성 인산 생성능을 모두 저해하였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Vassilev N., Baca M. T., Vassileva M., Franco I., Azcon R., 1995, Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium, Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 546-549.

- 2) Narsian V., Patel H. H., 2000, *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer, *Soil Biol. Biochem.*, 32, 559-565.
- 3) Reyes I., Bernier L., Simard R. R., Antoun H., 1999, Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants, *FEMS Microbiol. Ecology* 28, 182-190.
- 4) Vassilev N., Vassileva M., 2003, Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 435-440.
- 5) Rodriguez H., Reynaldo F., 1999, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnol. Adv.*, 17, 319-339.
- 6) Illmer P., Schinner F., 1992, Solubilisation of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils, *Soil Biol. Biochem.*, 24, 389-395.
- 7) Illmer P., Schinner F., 1995, Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms, *Soil Biol. Biochem.*, 27, 257-263.
- 8) Park K. H., Son H. J., 2006, Isolation and characterization of insoluble phosphate-solubilizing bacteria with antifungal activity, *Kor. J. Microbiol.*, 42, 223-229.
- 9) Rodriguez H., Gonzalez T., Selman G., 2000, Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains, *J. Biotechnol.*, 84, 155-161.
- 10) Clescerl L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D., 1998, Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., APHA-AWWA-WEF, Washington, D.C.
- 11) Nautiyal C. S., Bhaduria S., Kumar P., Lal H., Mondal R., Verma D., 2000, Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils, *FEMS Microbiol. Lett.*, 182, 291-296.
- 12) Pirt S. J., 1975, Principles of microbe and cell cultivation, John Wiley & Sons, New York.