

## 항진균능을 가진 불용성 인산 가용화 세균의 분리 및 특성

박기현<sup>1</sup> · 손홍주<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>밀양대학교 생물공학과, <sup>2</sup>부산대학교 생명응용과학부 및 PNU-IGB JRC

다기능성 농업용 미생물 제제를 개발하기 위하여 항진균능을 가진 불용성 인산 가용화 세균을 식물의 근권 토양으로부터 분리하였다. 분리균주의 분류학적 위치를 검토한 결과, *Pseudomonas fluorescens* RAF15로 동정되었다. *P. fluorescens* RAF15는 농작물의 잿빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*와 줄기썩음병균 *Rhizoctonia solani*의 생육을 억제할 수 있었다. 불용성 인산인  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 로부터 가용성 인산을 생성하기 위한 최적 배지 및 배양조건은 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 0.05%, 배양온도 30°C 및 초기 pH 7.0이었으며, 최적조건에서 배양 5일 후, 863 mg/L의 가용성 인산이 생성되었다. 불용성 인산 가용화는 유기산 생성에 의한 배양액의 pH 감소와 밀접한 관계가 있었다. *P. fluorescens* RAF15는 10-35°C, 1-4% 염 농도 및 pH 2.0-11.0의 범위에서도 가용성 인산을 생성할 수 있었다. 본 균주는  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  및 hydroxyapatite에서 각각 971-1121 mg/L, 791-908 mg/L 및 844 mg/L의 가용성 인산을 생성하였다. 그러나  $\text{FePO}_4$  및  $\text{AlPO}_4$ 의 경우, 생성된 가용성 인산의 농도는 각각 18 mg/L, 5 mg/L이었다.

**Key words** □ antifungal activity, biofertilizer, phosphate-solubilizing bacteria, *Pseudomonas fluorescens* RAF15

오늘날 농업은 화학비료나 화학농약의 과다사용으로 인하여 토양의 염류 집적 및 산성화, 수환경의 부영양화 등을 초래하여 작물의 품질 저하로 인한 농가 소득 감소와 환경오염 등 심각한 문제들을 발생시키고 있다. 따라서 화학비료나 화학농약의 사용을 줄이거나 대체할 수 있는 생물학적 처리가 대두되고 있는데, 특히 토양 생태계의 변화로 인한 작물 생산성의 향상이나 생물학적 방제가 다양한 미생물에 의하여 가능하다는 것이 국내외 여러 연구자들에 의하여 입증되어지고 있다(1-3).

식물의 인 요구량은 질소의 약 10%에 해당하며, 그 대부분은 유묘기 때 흡수되지만, 충분한 양의 인산을 식물체에 공급하기란 매우 어렵다. 즉, 토양에 공급되는 유효인산의 시용량이 적을 뿐만 아니라 공급된 인산비료도 soil solution 내의 양이온과 급속히 결합하여 용해도가 낮은 물질로 고정되거나 흡착되어 식물이 효율적으로 이용할 수 없기 때문이다(4). 즉, 인산염은 산성 및 알칼리 토양에서 철, 알루미늄 그리고 칼슘이온 등과 결합하여 침전 및 흡착 등의 과정을 거쳐 불용성 인산염이 된다(5). 따라서 토양의 지력저하 즉, 토양 중에서 식물이 흡수하여 이용 가능한 유효인산의 양은 대부분 소실되고, 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양만 증가되는 결과를 초래한다. 동시에 유실되는 비료 성분을 증가시켜 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져온다. 최근의 근해 적조현상 등은 부영양화된 지표수의 유입이 한 원인으로 생각되고 있다. 그러므로 합성비료에 의한 환경오염문제를 해결함과 동시에 인 자원의

재활용이란 측면에서 토양 속에 다량 축적되어 있는 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 토양 미생물의 탐색과 그 특성에 관한 연구는 미생물비료의 실용화를 위해서 반드시 선행되어야 할 중요한 과제라고 할 수 있다.

지금까지 작물의 병해충 방제는 대부분 화학농약의 과다사용에 의존하였으며, 결과적으로 화학농약에 대해 내성이 있는 병원성 미생물의 출현 등 많은 문제점이 제기되고 있다. 따라서 많은 연구자들이 화학농약을 대체할 수 있는 생물학적 방제 기술 개발을 위하여 수많은 길항미생물을 분리하고 그 특성을 규명하고자 하는 노력을 하고 있다(6, 7). 특히, 식물병원성 진균에 대해 항진균 활성을 가지는 미생물의 분리가 많이 이루어지고 있는데, *Bacillus* spp.와 *Pseudomonas* spp. 등이 강한 항진균 활성을 가진다는 결과들이 보고되어 있다(8, 9).

본 연구에서는 다양한 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성을 가지고 있으며, 동시에 경작지 토양에 식물이 흡수하기 어려운 불용성의 형태로 다량 축적되어 있는 각종 인산염을 가용화시킬 수 있는 세균을 분리하여 생물농약 및 생물비료로서의 기능을 모두 가지고 있는 다기능성 미생물 제제 개발을 위한 기초자료를 구축하고자 하였다. 일차적으로 상기 목적에 부합하는 미생물을 분리한 후, 불용성 인산 가용화 최적조건을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 항진균능을 가진 불용성 인산 가용화 세균의 분리 및 동정

불용성 인산 가용화 세균은 전통적으로 불용성 인산 가용화 미생물을 분리하는데 사용되고 있는 Pikovskaya 배지(PVK 배지)를 이용한 plate assay method로 분리하였다(10). 경남 밀양의 각

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 055-350-5540, Fax: 055-350-5544  
E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

중 농경지 토양 및 농작물 근권 토양을 시료로 채취하였으며, 준비된 토양시료 현탁액을 단계적으로 희석한 후, 일정액을 PVK agar plate에 도말하여 30°C에서 7일간 배양하였다. 콜로니 주위에 생성된 투명환의 직경이 큰 콜로니들을 불용성 인산 가용화 세균으로 1차 선정하였다. 선정균주들을 각각 1%의 NaCl이 함유된 PVK broth에 접종하여 30°C, 200 rpm, 5일간 회전진탕배양하였다. 원심분리에 의하여 균체를 제거한 배양 상등액의 가용성 인산의 농도를 측정하여 인산 생성능이 우수한 균주를 고농도 염 존재 하에서도 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 균주로 2차 선정하였다. 항진균능을 가진 불용성 인산 가용화 균주를 선정하기 위하여 대표적인 식물병원성 진균인 *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phythium ultimum*, *Alternaria porri*를 대상으로 PDA plate에서 대치배양을 실시하여 가장 큰 생육지대를 생성하는 균주를 실험균주로 최종 선정하였다.

불용성 인산 가용화 미생물 분리에 사용된 PVK 배지의 조성은 glucose 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.02%, KCl 0.02%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 % 및 yeast extract 0.05% (pH 7.0)이었으며, 불용성 인산원으로 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5%를 첨가하였다(10). 기본 배지 선정에 사용된 배지는 NBRIY 배지[glucose 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.02%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, KCl 0.02%, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, pH 7.0](11), NBRIP 배지[glucose 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.025%, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.5%, pH 7](11) 및 Son 배지[glucose 1%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.06%, pH 7.0](12)이었으며, 불용성 인산원으로 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5%를 각각 첨가하였다.

실험균주를 동정하기 위하여 형태학적, 배양적 특성 및 생리학적 특성을 Biochemical tests for identification of medical bacteria (13)에 준하여 검토하였으며, 도출된 결과를 Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria (14) 및 Bergey's manual of determinative bacteriology (15)를 참조하여 동정하였다. 동시에 API 20NE kit (bioMerieux, France)를 통하여 동정 결과를 검증하였다.

### 가용성 인산 생산을 위한 최적조건 검토

실험균주의 불용성 인산 가용능에 영향을 미치는 조건을 알아보기 위하여 각종 탄소원, 질소원 및 무기이온의 종류와 농도, 배양온도, 초기 pH 등에 따른 균체 생육도, 가용성 인산 농도 및 배지의 최종 pH를 측정하였으며, 특별한 언급이 없는 한 200 rpm에서 5일간 회전진탕배양하였다.

### 불용성 인산 종류별 가용성인산 생성능 검토

가용성 인산을 생성할 수 있는 불용성 인산의 범위를 조사하기 위하여 각종 불용성 인산(CaHPO<sub>4</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub>, hydroxyapatite)이 각각 적정 농도로 첨가된 최적배지에 실험균주를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 5일간 배양한 후, 가용성 인산의 농도 및 배양액의 최종 pH를 측정하였다.

### 분석방법

배양액 시료와 1N HCl을 1 : 1의 비율로 혼합함으로써 배양액 속의 잔존 불용성 인산을 가용화시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 균체 생육도를 조사하였다(16). 배양액 속의 가용성 인산의 농도는 17,418 × g 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상등액을 대상으로 vanadomolybdophosphoric acid colorimetric method (17)로 조사하였으며, 균주를 접종하지 않은 각 배지를 대조군으로 사용하여 실험 결과를 보정하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 실시하였으며, 나타난 각 결과들은 이들의 평균값이다.

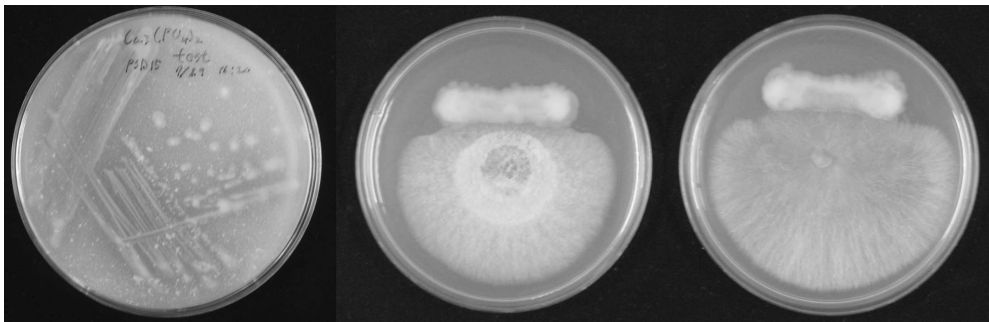
## 결과 및 고찰

### 항진균능을 가진 불용성 인산 가용화 세균의 분리 및 동정

경남 밀양지역의 논, 밭 및 농작물의 근권 토양으로부터 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>가 함유된 PVK plate 상에서 직경 1 cm 이상의 투명환을 생성하는 42 균주를 분리한 후, PVK broth에서 200 mg/L 이상의 가용성 인산을 생성하는 24 균주를 재분리하였다. 이 균주들을 대상으로 30°C에서 7일 동안 대치배양하면서 각종 식물병원성 진균에 대한 항진균 효과를 검토한 결과, 농작물에 잿빛 곰팡이병을 초래하는 *Botrytis cinerea*와 줄기썩음병을 초래하는 *Rhizoctonia solani*의 균사 생장을 억제할 수 있는 RAF15를 최종 실험균주로 선정하였다. RAF15의 불용성 인산 가용능 및 항진균능은 Fig. 1에서 보는 것과 같다. 본 균주는 불용성 인산 가용능과 항진균능을 동시에 가짐으로써 미생물 비료 및 미생물 농약 동시 공급원으로서 잠재적 응용 가능성이 클 것으로 판단된다. 실험균주의 분류학적 위치를 밝힌 결과는 Table 1과 같다. 본 균주는 그람음성의 운동성이 있는 통성형기성 간균으로서, 배양적 및 생리생화학적 제반 특성을 Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria (14) 및 Bergey's manual of determinative bacteriology (15)에 준하여 검토한 결과, *Pseudomonas* 속에 포함될 가능성이 가장 높았다. 또한, API 20NE kit (bioMerieux, France)를 이용하여 4시간 반응시킨 후 동정한 결과, *Pseudomonas fluorescens*와 99.7% 수준에서 유사한 것으로 나타났다. 따라서 실험균주 RAF15를 *Pseudomonas fluorescens* RAF15로 명명하였다.

### 가용성 인산 생산을 위한 최적조건

불용성 인산 가용화 미생물의 종류에 따라 최적 배지는 다른 것으로 알려져 있다. 따라서 본 균주의 배양을 위한 기본배지를 선정하기 위하여 문헌에 보고된 몇 가지 배지를 이용하여 불용성 인산 가용능을 먼저 조사하였으며, 그 결과는 Table 2에서 보는 것과 같다. NBRIP 배지에서 가장 우수한 불용성 인산 가용능이 나타났으나 균체 생육은 가장 낮았다. NBRIY 배지, Son 배지 및 균주 분리에 사용한 PVK 배지에서는 높은 균체 생육을 보여주었으나 상대적으로 불용성 인산 가용능은 낮았다. 실험에 사용된 네 종류의 배지 모두 가용성 인산 생성량이 가장 많은 시간대에서 배양액의 pH가 가장 낮았다. PVK 및 NBRIY 배지



**Fig. 1.** Biochemical parameters showing biological activities of isolate RAF 15. Clear zone indicates solubilization of insoluble phosphate around colony of isolate RAF 15 on agar plate containing 0.5%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (left). Antifungal activity of isolate RAF 15 against phytopathogenic *Botrytis cinerea* (middle) and *Rhizoctonia solani* (right).

**Table 1.** Taxonomical characteristics of isolated strain RAF 15

Contents	Characteristics
<b>Morphological characteristics</b>	
Cell shape	Rod
Gram stain	-
Spore formation	-
Motility	+
<b>Cultural characteristics</b>	
Colony shape	Circular, undulate, convex
Colony surface	Smooth
Colony color	White
<b>Biochemical characteristics</b>	
Growth in air	+
Growth anaerobically	-
Acid from glucose	-
Oxidase	+
Catalase	+
O/F test	Oxidation
Yellow pigmentation	-
Arginine dihydrolase	-
Nitrate reduction	+
Indole production	-
Urease	-
$\beta$ -Glucosidase	+
$\beta$ -Galactosidase	+
Gelatin hydrolysis	-
Assimilation :	+
glucose, arabinose, mannose, mannitol, gluconate, N-acetyl-glucosamine, malate	
Assimilation :	-
maltose, caprate, adipate, citrate	

의 경우, 각각 배양 2일 후 가용성 인산의 생성량이 감소하기 시작하였으며, 이에 비례하여 균체 생육도는 증가하였다. 이것은 생성된 가용성 인산이 실험균주의 생육에 이용되고, 이에 따라 균체 생육도가 증가한 것으로 추정되나 차후에 좀 더 자세한 실험이 필요한 것으로 판단된다. 본 실험에서는 생성된 균체당 가용성 인산 생성능이 가장 우수한 NBRIP 배지를 기본배지로 선정하여 이후의 실험을 진행하였다.

탄소원이 가용성 인산 생성능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 1%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 5일간 배양한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Glucose, galactose, mannitol로부터 각각 632, 416, 99 mg/L의 가용성 인산이 생성되었으며, lactose, sucrose, maltose, sorbitol 등으로부터는 가용성 인산이 전혀 생산되지 않았다. 또한 가용성 인산 생성에 탄소원은 필수적인 것으로 나타났으며, 가용성 인산 생성은 배지의 pH 감소와 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되었다. 일반적으로 불용성 인산이 가용성 인산으로 전환되는 이유는 미생물이 생산한 각종 유기산에 의한 배양액의 pH 감소가 주원인으로 보고되어 있다(17). 따라서 앞으로 본 균주가 생성하는 유기산의 종류와 농도에 대한 실험이 뒤따라야 할 것으로 판단된다. 가용성 인산 생성에 최적인 glucose의 농도를 조사한 결과, glucose의 농도 증가에 따라 가용성 인산의 생성량도 증가하여 1.5%에서 785 mg/L의 가용성 인산이 생성되었으며, 그 이상의 농도에서는 일정하였다. pH는 4.1-4.2 범위를 유지하였다(Fig. 2). 항진균능이 없는 *Pantoea agglomerans* R-42는 3% glucose로부터 750 mg/L의 가용성 인산을 생성할 수 있는 것으로 보고되어 있다(12). 따라서 본 실험균주가 기질 이용면에서 *P. agglomerans* R-42보다 우수

**Table 2.** Soluble phosphate production and cell growth in different media for the selection of a basic medium

Medium	Soluble P (mg/L)					Growth ( $A_{660}$ )					Final pH				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PVK	151	349	343	202	99	0.854	1.454	1.541	1.943	1.953	4.5	4.3	4.7	5.4	5.6
NBRIP	169	309	424	491	598	0.319	0.375	0.467	0.643	0.657	4.6	4.3	4.2	4.1	4.1
NBRIY	123	258	224	16	8	0.426	1.045	1.555	2.243	2.658	4.9	4.3	5.3	6.9	6.3
Son	111	277	316	333	324	0.916	1.165	1.52	1.038	0.835	4.7	4.4	4.3	4.3	4.4

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

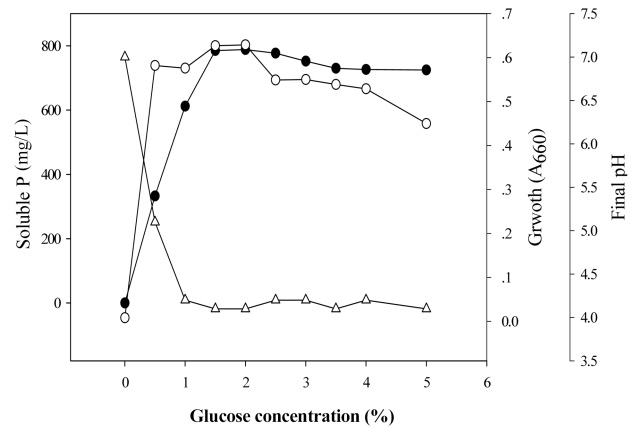
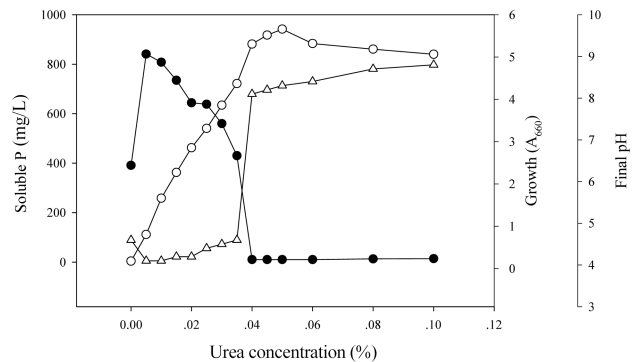
Carbon source (1%)	Soluble P (mg/L)	Growth ( $A_{660}$ )	Final pH
None	0	0.023	7.0
Glucose	632	0.631	4.1
Fructose	5	0.674	6.0
Galactose	416	0.327	4.4
Lactose	0	0.027	6.9
Sucrose	0	0.06	6.8
Maltose	0	0.029	6.8
Sorbitol	0	0.035	6.9
Mannitol	99	0.518	5.4
Glycerol	8	0.917	5.9

**Table 4.** Effect of different nitrogen sources on  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15

Nitrogen source (0.01%)	Soluble P (mg/L)	Growth ( $A_{660}$ )	Final pH
None	381	0.165	4.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	802	0.627	4.2
$\text{NH}_4\text{Cl}$	808	0.771	4.2
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	802	0.935	4.1
$\text{KNO}_3$	794	0.479	4.2
$\text{NaNO}_3$	770	0.572	4.2
Urea	804	1.016	4.1
Beef extract	469	0.259	4.5
Casamino acid	730	0.413	4.2
Corn steep liquor	438	0.229	4.5
Polypeptone	534	0.319	4.5
Tryptone	516	0.308	4.5
Yeast extract	602	0.363	4.4

한 것으로 판단된다.

질소원이 가용성 인산 생성능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 질소원을 0.01%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 5일간 배양한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 무기 질소원이 유기 질소원보다 높은 가용성 인산 생성능과 균체 생육도를 나타내었으며, 질소원의 첨가가 가용성 인산 생성에 필수적인 것은 아니었다. 무기 질소원보다 영양적으로 우수한 유기 질소원에서 균체 생육도가 낮은 것은 특이한 결과였다. 가장 높은 가용성 인산 생성능과 균체 생육도를 나타낸 urea를 최적 질소원으로 선택한 후, 최적농도를 조사한 결과 0.005%까지는 가용성 인산 생성량이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 완만하게 감소하기 시작하여 0.04% 이상의 농도에서 가용성 인산이 거의 생산되지 않았다 (10-14 mg/L). 그러나 균체 생육도는 urea의 농도 증가에 따라 비례적으로 증가하여 0.5%에서 최대 생육을 보여주었다( $A_{660} = 5.7$ ). 또한 0.04% 이상의 농도에서 배양액의 pH는 8.1-8.8 범위를 나타내었고, 이것이 불용성 인산의 가용화를 정지시킨 원인으로 추정된다(Fig. 3). 한편, *P. agglomerans* R-42는 ammonium 염과 nitrate 염에서 가용성 인산 생성능이 우수하며, nitrite 염에서는 가용성 인산을 전혀 생성하지 않는 것으로 알려져 있다(12).

**Fig. 2.** Effect of glucose concentrations on  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15. ○, cell growth; ●, soluble phosphate; △, final pH.**Fig. 3.** Effect of urea concentrations on  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15. ○, cell growth; ●, soluble phosphate; △, final pH.

기본배지 성분인  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  및  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 경우, 각각 0.3% 및 0.01%에서 가용성 인산 생성량이 가장 높았으며, KCl은 가용성 인산 생성에 영향을 미치지 않았다(자료 미제시). 기본 배지에 포함되지 않은 다른 무기염 첨가 효과를 조사한 결과, 0.01%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  및 0.05% NaCl이 가용성 인산 생성량을 증가시켰다(자료 미제시).

*P. fluorescens* RAF15의 최적 배양온도 및 초기 pH를 조사한 결과는 Table 5에서 보는 것과 같다. 배양 5일 후, 30°C에서 가장 높은 가용성 인산 생성능을 나타내었으나 10-25°C의 경우, 배양시간을 12-14일까지 연장시 매우 높은 가용성 인산 생성능 (705-933 mg/L)을 나타내었다. 따라서 본 균주는 연중 기온이 10°C 이하로 유지되는 계절에도 충분히 야외에 적용가능 할 것으로 판단된다. 40°C에서는 가용성 인산 생성 및 균체 생육이 나타나지 않았다. 한편, 본 균주는 초기 pH 2.0-11.0의 영역에서 가용성 인산을 생성(701-863 mg/L)할 수 있었으며, pH 12에서는 가용성 인산을 전혀 생성하지 않았다. 10-35°C 및 pH 3.0-11.0 등 넓은 환경 범위에서 가용성 인산을 생성할 수 있는 세균으로

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

Temperature (°C)	Time (day) <sup>a</sup>	Soluble P (mg/L)	Growth ( $A_{660}$ )	Initial pH	Time (day)*	Soluble P (mg/L)	Growth ( $A_{660}$ )
10	14	705	0.972	2	5	701	0.731
15	14	896	0.977	3	5	813	0.759
20	12	905	0.998	4	5	830	0.825
25	12	933	1.091	5	5	832	0.787
30	5	858	0.982	5.5	5	834	0.787
35	5	321	0.638	6	5	846	0.748
40	5	0	0.011	6.5	5	849	0.776
				7	5	863	0.975
				7.5	5	849	0.743
				8	5	846	0.737
				9	5	843	0.754
				10	5	833	0.737
				11	5	821	0.708
				12	5	0	0.313

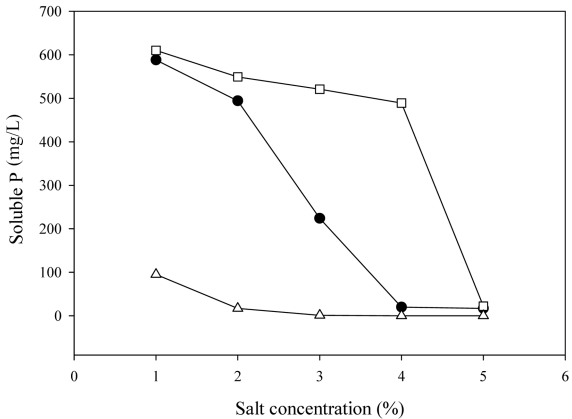
<sup>a</sup>indicates maximal soluble P production and cell growth.

*P. agglomerans* R-42가 알려져 있다(12). 그러나 *P. agglomerans* R-42는 상기의 환경 범위에서 69-215 mg/L의 가용성 인산을 생성할 수 있었으므로 본 실험균주의 응용 가능성이 더 높은 것으로 판단된다. 이상의 결과는 본 실험균주가 기존에 알려진 불용성 인산 가용화 미생물보다 훨씬 적용환경 범위가 넓고, 효율적인 새로운 균주임을 시사한다.

이상에서 확립된 불용성 인산 가용화를 위한 최적 배지 및 배양조건은 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 0.05%, 배양온도 30°C 및 초기 pH 7.0이었다.

# 염 저항성

염류가 과도하게 집적된 토양은 작물의 영양분 흡수와 생육을 방해함으로써 각종 질병 감염 위험을 높이며, 토양 미생물의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다(19). 따라서 토양 속에 대량으로 축적되어 식물의 염류 장애를 초래하는 각종 염들에 대한 저항성을 최적배지를 이용하여 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 본 균주는 비교적 높은 농도의 KCl (1.4%) 및 NaCl (1.3%)에서도 각각 489-610 mg/L 및 224-588 mg/L의 가용성 인산을 생성할 수 있었으며, 1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도에서도 약



**Fig. 4.** Soluble phosphate production by *Pseudomonas fluorescens* RAF 15 in the medium containing high concentration of salts. ○, KCl; ●, NaCl; △,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

100 mg/L의 가용성 인산을 생성할 수 있었다. 따라서 본 균주는 염류 축적이 보편화된 국내 토양에 충분히 적용 가능할 것이라고 판단된다.

**Table 6.** Changes in soluble phosphate and final pH mediated by *Pseudomonas fluorescens* RAF 15 in optimal culture media containing various insoluble phosphates

Phosphate source	Concentration (%)	Soluble P (mg/L)	Final pH	Phosphate source	Concentration (%)	Soluble P (mg/L)	Final pH
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.5	861	4.2	$\text{CaHPO}_4$	0.5	971	4.0
	1.0	908	4.2		1.0	1038	4.0
	1.5	888	4.2		1.5	1121	4.0
	2.0	880	4.3		2.0	1091	4.1
	3.0	791	4.3		3.0	996	4.1
$\text{AlPO}_4$	0.5	5	3.1	Hydroxyapatite	1.0	844	4.1
$\text{FePO}_4$	0.5	18	3.0				

### 불용성 인산 종류별 가용성 인산 생성능

각종 불용성 인산의 종류에 따른 가용성 인산 생성능을 조사하기 위하여  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  및 hydroxyapatite를 각각 0.5-3.0%씩 첨가한 최적배지에서 배양한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다.  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  및 hydroxyapatite의 경우, 첨가 농도에 따라 971-1121 mg/L, 791-908 mg/L 및 844 mg/L 가용성 인산이 생성되었으며, 배양액의 최종 pH는 4.0-4.3 범위에 있었다. 그러나  $\text{FePO}_4$  및  $\text{AlPO}_4$ 의 경우, 배양액의 최종 pH가 각각 3.0, 3.1이었으나 생성된 가용성 인산의 농도는 각각 18 mg/L, 5 mg/L 였다. *Penicillium radicum*은  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$ 로부터 각각 176, 10, 0 mg/L 가용성 인산을 생성하며(20), *Rahnella aquatilis*는 hydroxyapatite로부터 230 mg/L의 가용성 인산을 생성한다고 보고되어 있다(21). 따라서 본 균주는 이들보다 훨씬 우수한 불용성 인산 가용능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 한편, calcium phosphate에 active하게 작용하는 미생물들은 iron 또는 aluminum phosphate의 가용능이 매우 저조한 것으로 알려져 있으며(22), 본 균주도 유사한 결과를 나타내었다.

### 감사의 말

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

### 참고문헌

- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 515-521.
- Sholberg, P.L., A. Marchi, and J. Bechard. 1995. Biocontrol of postharvest diseases of apple using *Bacillus* spp. isolated from stored apples. *Can. J. Microbiol.* 41, 247-252.
- Subhash, C.V., K.L. Jagdish, and K.T. Anil. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91, 127-141.
- Narsian, V. and H.H. Patel. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559-565.
- Vassilev, N., M.T. Baca, M. Vassileva, I. Franco, and R. Azcon. 1995. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 546-549.
- Kobayashi, D.Y. and N.E.H. El-Bararad. 1996. Selection of bacterial antagonists using enrichment cultures for the control of summer patch disease in Kentucky Bluegrass. *Curr. Microbiol.* 32, 106-111.
- Chaurasia, B., A. Pandey, L.M.S. Palni, P. Trivedi, B. Kumar, and N. Colvin. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol. Res.* 160, 75-81.
- Patel, V.J., S.R. Tendulkar, and B.B. Chattoo. 2004. Bioprocess development for the production of an antifungal molecules by *Bacillus licheniformis* BC98. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 231-235.
- Nautiyal, C.S. 1997. Selection of chickpea-rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI1303 antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri, *Rhizoctonia bataticola* and *Phythium* sp. *Curr. Microbiol.* 35, 52-58.
- Gupta, R., R. Singal, A. Shankar, R.C. Kuhad, and R.K. Saxena. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40, 255-260.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265-270.
- Son, H.J., G.T. Park, M.S. Cha, and M.S. Heo. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Biores. Technol.* 97, 204-210.
- Macfaddin, J.F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, New York.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Rodriguez, H., T. Gonzalez, and G. Selman. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol.* 84, 155-161.
- Clescerl, L.S., A.E. Greenberg, and A.D. Eaton. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th ed. APHA-AWWA-WEF. Washington, D.C.
- Nautiyal, C.S., S. Bhaduria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal, and D. Verma. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 291-296.
- Van Elsas, J.D., J.T. Trevors, and E.M.H. Wellington. 1997. *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Whitelaw, M.A., T.J. Harden, and K.R. Helyar. 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 655-665.
- Kim, K.Y., D. Jordan, and H.B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 273-277.
- Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble  $\text{AlPO}_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 265-270.

(Received August 5, 2006/Accepted September 14, 2006)

---

**ABSTRACT: Isolation and Characterization of Insoluble Phosphate-Solubilizing Bacteria with Antifungal Activity**

**Ki-Hyun Park<sup>1</sup> and Hong-Joo Son<sup>1,2,\*</sup>** (<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-706, Korea, <sup>2</sup>School of Applied Life Science and Joint Research Center of Pusan National University-Fraunhofer Institute, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea)

To develop multifunctional microbial inoculant, an insoluble phosphate-solubilizing bacterium with antifungal activity was isolated from plant rhizospheric soil. On the basis of its morphological, cultural and physiological characteristics and Biolog analysis, this bacterium was identified as *Pseudomonas fluorescens* RAF15. *P. fluorescens* RAF15 showed antifungal activities against phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani*. The optimal medium composition and cultural conditions for the solubilization of insoluble phosphate by *P. fluorescens* RAF15 were 1.5% of glucose, 0.005% of urea, 0.3%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.01% of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01% of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and 0.05% of NaCl along with initial pH 7.0 at 30°C. The soluble phosphate production under optimum condition was 863 mg/L after 5 days of cultivation. The solubilization of insoluble phosphates was associated with a drop in the pH of the culture medium. *P. fluorescens* RAF15 showed resistance against different environmental stresses like 10-35°C temperature, 1-4% salt concentration and pH 2-11 range. The strain produced soluble phosphate to the culture broth with the concentrations of 971-1121 mg/L against  $\text{CaHPO}_4$ , 791-908 mg/L against  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , and 844 mg/L against hydroxyapatite, respectively. However, the strain produced soluble phosphate to the culture broth with the concentrations of 15 mg/L against  $\text{FePO}_4$ , and 5 mg/L against  $\text{AlPO}_4$ , respectively.