

*Pantoea agglomerans*를 이용한 합성배지내의 인산 가용화 조사

정일, 황은상, 김용웅*, 이종일, 박돈희

전남대학교 화학공학부, 전남대학교 응용생물공학부*

Tel (062) 530-0232, Fax (062) 530-1849

국문초록

*Pantoea agglomerans*의 인산 가용화 정도를 조사하기 위하여 합성배지인 HY와 G broth에서 실험을 수행한 결과 pH와 glucose의 감소 정도에 따른 인산의 가용화 정도는 역상 관계임을 알 수 있었다. aeration조건에서 240시간대에 pH 3.48, glucose양 61245ppm일 때 인산의 가용화 정도가 1675ppm으로 가장 많이 나타났으며, 이때 균은 모두 사멸하였다. 따라서 균이 glucose인 탄소원을 기질로 이용하면서 생성되는 유기산에 의해 시간이 경과함에 따라 pH와 glucose양은 감소하게 되고, 유기산에 의해 불용성 인산인 Hydroxyapatite가 가용성 인산으로 바뀌게 된다.

서론

인산은 미생물 구조와 대사에 중요한 영양원으로 세포내·외의 무기인산 농도에 따른 생리적 변화 및 인산 대사조절에 관여하는 것으로 농업에서 가장 필수적이고도 중요한 영양분 중의 하나이지만, 자연계에서 무기와 유기 형태로 존재하는데 대부분이 불용성 또는 난용성 형태로 존재한다. 즉, 식물의 인산성분 흡수율이 저조하다고 해서 작물에 인산비료를 과다하게 사용하게 되면 토양부식이나 시용되어진 많은 양의 인산이 물에 유출되는 등의 환경적인 문제와 많은 비용의 문제를 야기하게 된다.^{1),2),3),4)}

따라서 본 실험에서는 토양에서 분리되어진 *Pantoea agglomerans*^{5),6)}균을 이용하여 토양속에 중금속과 결합되어져 있는 불용성 인산을 가용성 인산으로 바꾸어 보고자 실험을 수행하였다

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Pantoea agglomerans*로써 30°C, 120rpm으로 30분간 진탕 배양한 후에 동일한 증류수로 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 배 희석한 다음 Agar plate에 도말하였다. 도말한 plate들은 30°C incubator에서 2~3일 동안 배양하면서 투명대를 형성하는 균주들을 선별하여, HY broth(glucose, 10g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.4g; NaCl, 1g; CaCl₂ · 2H₂O, 0.2g; NH₄NO₃, 1.5g; Hydroxyapatite, 4g; Yeast extract, 0.5g; KCl, 0.2g; Peptone, 0.5g; distilled water 1 liter; pH 7.2)에 접종하여 30°C, 120rpm

에서 배양하였다.

2. 균주의 액체배양

토양에 실험하기 전에 균주의 인산 분해력을 조사하기 위해 인산 농도 및 glucose 감소량을 측정하기 위하여 G broth(CaCO₃, 15g; glucose, 108g; peptone, 2g; yeast extract, 2g; distilled water 1 liter; pH 7.0)을 사용하였으며, G broth에 Hydroxyapatite 첨가 유무에 따라 240시간 동안 균수, pH, glucose양, 인농도를 조사하였다.

1) pH 및 가용성 인산 농도 측정

500ml 삼각플라스크안에 250ml의 G broth를 넣어준 후 20 μ l의 *P. agglomerans* 균을 접종하여 주고, 30 $^{\circ}$ C, 120rpm, pH 7.0, 산소 첨가(2.0 v.v.m) 조건으로 배양하면서 0, 1/2, 1, 2, 3, 5, 7, 10일 간격으로 sample을 취하여 배양용액 안에 유리 전극을 침지시켜 직접 pH를 측정하고, 그때의 pH 변화 양상을 알아보았으며, 가용성 인산 농도의 측정은 액체 배양 배지를 Whatman No. 41 paper로 침출액을 받아 삼각플라스크 안에 넣어둔다. 액체 배양한 배양액을 test tube에 5~7ml 넣은 후 주사기를 이용하여 0.2 μ m로 filtering한 다음, 50 μ l를 취하여 침출액 담긴 삼각플라스크에 넣는다. 이 용액에 5ml 증류수, 2ml 암모늄 파라몰리브테이트(12mM)용액과 1ml SnCl₂(5mM)을 더한 후 잘 섞는다. P 농도는 5~6분 후에 Spectrophotometer 660nm에서 측정하였다. 표준 용액은 Phosphate를 사용하였으며, 각각의 농도와 흡광도 사이의 표준 곡선은 Fig. 1에 나타났다.

2) 균수 및 glucose양 측정

*P. agglomerans*균을 산소 존재 유무에 따라 0, 1/2, 1, 2, 3, 5, 7, 10일 간격으로 Sample을 취하여 Shan등의 방법에 따라 멸균수를 가하여 희석한 후 G 고체배지에 도말하고, 30 $^{\circ}$ C에서 최소 48시간 이상 배양하여 희석 평판법으로 계수하였으며, 글루코스양의 측정은 균주의 액체 배양 용액 3ml를 0.2 μ m Whatman membrane filter로 여과하여 미생물을 제거시키고, HPLC에 RI detector를 이용하여 glucose양을 측정한다. glucose 함량은 Chromatogram peak area를 Standard와 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 인산 가용화에 따른 Glucose양의 변화

*P. agglomerans*가 glucose을 기질로써 소모하면서 유기산을 생성하며 불용성 인산을 가용성 인산으로 바꾸어 주는지 조사한 결과 Fig: 2, 3.에서와 같다. G broth 내에 glucose양의 감소 정도는 *P. agglomerans*가 anaeration 조건에서 0 day 105184ppm~ 10 day 76492ppm으로 aeration 조건에서 0 day 116334ppm~ 10 day 61245ppm으로 시간이 경과함에 따라 glucose의 양은 감소한다는 것을 알 수 있었

으며, 산소가 유입되었을 때 10 day에서 볼 수 있듯이 61245ppm으로 산소가 유입되지 않은 조건 76492ppm보다 훨씬 많은 glucose 감소량을 보였다. 이를 전제로 하여 Hydroxyapatite를 첨가하였을 때 anaeration 조건에서 glucose 감소 정도는 3일 동안 유사하게 112246ppm 정도로 유지되면서 59612ppm까지 감소하였으며, aeration 조건에서도 3일 동안 유사하게 108731ppm 정도로 유지되면서 3일 이후부터 36904ppm까지 감소함을 나타냈고, 인 농도는 산소가 유입되었을 때 349ppm~1675ppm으로, 산소가 유입되지 않았을 때 242ppm~1164ppm으로 증가됨이 조사되었다. 그리고 glucose 감소 정도가 멈추었을 때 인산의 가용화 또한 증가 정도가 둔화되어 졌다.

2. G broth상에서 시간에 따른 pH 및 균수 측정

*P. agglomerans*를 G 배지 상에서 10일 동안 배양하면서 산소와 0.8% HY 첨가 유무에 따라 비교하여 보았다. Fig. 4을 보면 HY를 첨가하지 않은 G 배지 상에 산소가 첨가되지 않았을 때 10일 동안 액체 배지에서 pH는 7.13에서 5.65로 감소함을 볼 수 있었으며, 반대로 산소를 넣어준 액체 배지에서는 pH가 7.20에서 4.23으로 감소하였고, 이에 따른 균수 확인을 하여 보았는데 산소가 있는 조건이나 산소가 없는 조건 모두 12시간에서 각각 10.42CFU와 10.38CFU로 균 성장이 가장 활발한 것을 볼 수 있었으며, 산소가 첨가되는 배지에서는 240시간 배양되었을 때 균수가 7.72CFU, 산소가 첨가되지 않은 액체 배지에서는 8.18CFU로 산소가 들어있는 액체 배지에서 균의 성장이 활발하기에 유기산 생성이 증가하여 산소가 첨가되는 액체 배지에서 훨씬 빨리 균수가 감소함을 알 수 있었다. G 액체 배지 상에 HY가 첨가되었을 때 Fig. 5를 보는 바와 같이 pH값은 HY가 첨가되지 않은 G 액체 배지와 같이 산소 첨가시 pH 7.33에서 3.62로, 산소가 첨가되지 않은 조건에서는 pH 7.24에서 5.49로 거의 유사한 결과를 볼 수 있었으며, 균수는 12시간 배양하였을 때 산소가 첨가된 조건에서 10.40CFU, 산소가 첨가되지 않은 조건에서 10.13CFU로 나타났고, 산소가 첨가되었을 때에는 240시간 배양하였을 때 HY 첨가 시 균이 사멸하였고, HY가 첨가되지 않았을 때 7.72CFU로 현격한 차이를 볼 수 있었다.

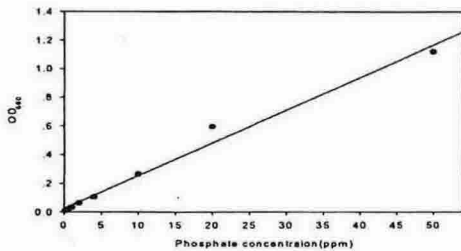


Fig. 1. Correlation between phosphate concentration and OD at 860nm

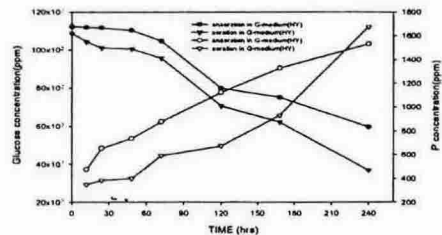


Fig. 2. Change in glucose and phosphorus concentration by *P. agglomerans* during a 10 day incubation in broth G-medium containing 0.8% hydroxyapatite at 30°C.

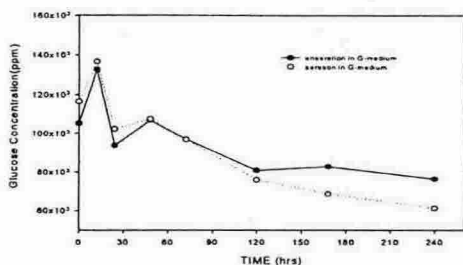


Fig. 3. Change in glucose and phosphorus concentration by *P. agglomerans* during a 10 day incubation in broth G-medium at 30°C.

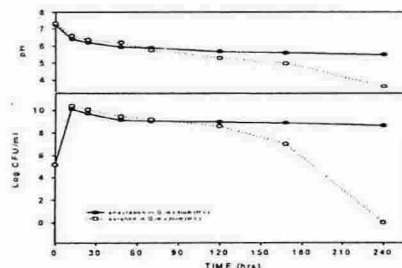


Fig. 4. Change in pH and population of *P. agglomerans* during a 10 day incubation in broth G-medium containing 5% hydroxyapatite at 30°C.

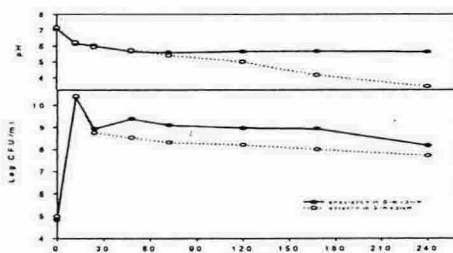


Fig. 5. Change in pH and population of *P. agglomerans* during a 10 day incubation in broth G-medium at 30°C.

참고 문헌

1. Sperber J. I., "Solution of mineral phosphates by soil bacteria."(1957), *Nature*, 180, 994-995.
2. Struthers P. H. and G. H. Seiling, "Effect of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH."(1960), *Soil Science*, 69, 202.
3. Trasar-Cepeda M. C. and T. Carballas, "Liming and the phosphatase activity and mineralization of phosphorus in an andic soil."(1991), *Soil Biol. Biochem*, 23, 209-215.
4. Leyval C. and J. Berthelin, "Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg and Fe mobilization from minerals and plant growth."(1989), *Plant and Soil*, 117, 103-110.
5. Laheurte, F. and Berthelin, J., "Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus."(1998), *Plant and Soil*, 105, 11-17.
6. Kil-Yong Kim, "Hydroxyapatite solubilization and organic acid production by *enterobacter agglomerans*."(1997), *J. Korean Soc. Soil Sci.*, 30(2), 189-195.