

미생물비료 생물자원인 불용성인산 가용화 세균의 분리, 동정 및 생리적 특성

손홍주* · 김용균 · 이상준¹

밀양대학교 생물공학과, ¹부산대학교 미생물학과

환경친화적인 미생물인산비료를 개발하기 위하여 불용성인산을 가용화시킬 수 있는 세균을 콩의 근권 토양으로부터 분리하였다. 분리균주의 분류학적 위치를 검토한 결과, *Pantoea agglomerans*로 동정되었다. 불용성인산인 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 로부터 가용성인산을 생성하기 위한 최적 배지 및 배양조건은 glucose 3%, NH_4NO_3 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06%, 초기 pH 7.5, 배양온도 30°C이었으며, 최적조건에서 배양 5일 후, 898 mg/L의 인산이 생성되었다. 불용성인산 가용화 기작은 유기산 생성에 의한 배양액의 pH 감소와 밀접한 관계가 있었다. 분리균주는 CaHPO_4 , hydroxyapatite로부터 각각 698, 912 mg/L의 가용성인산을 생성하였으나 $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AlPO_4 로부터는 각각 28, 19 mg/L의 가용성인산을 생성하였다.

Key words □ biofertilizer, insoluble phosphate, *Pantoea agglomerans*, phosphate-solubilizing bacteria

인산은 식물체가 필요로 하는 영양원으로서 대단히 중요한 역할을 수행하고 있으나 soil solution에서 인산의 농도는 약 0.05 mg/L에 불과하다(18). 합성비료의 형태로 인산을 토양에 공급하기도 하지만 식물체가 필요로 하는 충분량을 공급하기는 어렵다. 왜냐하면 공급된 인산은 soil solution내의 양이온과 빠른 속도로 결합하여 용해도가 낮은 물질로 고정되기 때문이다(13). 즉, 인산은 산성 및 알칼리 토양에서 철, 알루미늄 그리고 칼슘이온 등과 결합하여 식물체가 이용할 수 없는 불용성 인산의 형태로 전환된다(19). 이에 따라 농작물 생산성을 향상시키기 위하여 대량의 합성인산비료를 그만큼 더 사용하게 되었고, 결과적으로 환경오염을 비롯한 여러 가지 문제가 발생하게 되었다. 이러한 문제는 농촌진흥청이 설정한 우리 나라 토양에 적합한 표준 비료 시비량에 비해 인산은 138%를 더 시비하며, 그 결과 토양 평균 잔류인산이 231 mg/L이고, 적정량보다 많은 인산을 포함한 토양의 비율이 50%에 달하는 것을 보아도 알 수 있다(2). 또한, 농업기술연구소가 10년간 하우스 재배 토양을 조사한 결과, 인산(적정량 150 mg/L)이 최고 1,951 mg/L이나 존재하는 것으로 조사되었고 특히, 대량의 인산이 식물체가 이용할 수 없는 불용성 인산염의 형태로 토양에 축적되어 있음이 확인되었다(1).

위에서 언급한 바와 같이 토양에 대량공급된 합성인산비료는 일부분만 작물에 흡수되며, 나머지 성분들은 수분과 함께 토양 표층으로 이동하면서 수분은 증발되고, 염류만 쌓여 염류집적 장애를 발생시킨다. 동시에 유실되는 비료 성분을 증가시켜 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져온다. 염류가 과도하게 집적된 토양은 작물의 영양분 흡수와 생육을 방해함으로써 각종 질병 감염 위험을 높이며(17), 최근의

근해 적조현상 등은 부영양화된 지표수의 유입이 한 원인으로 생각되고 있다.

최근 토양중 불용성인산의 실제 비료성분으로서의 이용 가능성이 큰 관심을 끌고 있다. 불용성 인산을 가용화시키기 위한 실질적인 접근방법중의 하나는 유기산을 생산하는 미생물을 이용하는 것이다(9,10). 즉, 불용성인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphate-solubilizing microorganism, PSM)을 토양에 접종함으로써 고정된 토양 인산의 가용화를 촉진시킬 수 있고, 이에 따라 농작물의 생산성을 높일 수 있다(9). 따라서 본 연구에서는 합성비료 잔류로 인한 염류집적 피해 경감, 인산자원의 재활용 및 환경보전을 최종목적으로, 먼저 고농도 염이 존재하는 환경에서도 불용성인산을 가용화시킬 수 있는 토양 미생물을 탐색한 후, 선정된 균주의 기초적인 생리적 특성을 파악함으로써 미생물 인산비료의 실용화를 위한 기초자료를 구축코자 하였다.

재료 및 방법

불용성인산 가용화 세균의 분리 및 동정

불용성인산 가용화 세균은 전통적으로 불용성인산 가용화 미생물을 분리하는데 사용되고 있는 Pikovskaya (PVK)배지를 이용한 plate assay method로 분리하였다(6). 이때 사용한 PVK 배지의 조성은 glucose 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%, NaCl 0.02%, KCl 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% 및 yeast extract 0.05% (pH 7.0)이었으며, 불용성인산원으로 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5%를 첨가하였다. 경남 밀양의 각종 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 1 차적으로 불용성인산

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-350-5484, Fax: 055-350-5484
E-mail: shjoo@mmu.ac.kr

가용화미생물로 선정하였다. 선정균주들을 각각 2%의 NaCl이 함유된 PVK broth에 접종하여 30°C, 200 rpm, 5 일간 회전진탕 배양하였다. 원심분리에 의하여 균체를 제거한 배양 상등액의 가용성인산의 농도를 측정하여 인산 생성능이 가장 우수한 균주를 고농도 염존재하에서도 불용성인산을 가용화시킬 수 있는 균주로 최종 선정하였다.

분리균주를 동정하기 위하여 형태학적, 배양적 특성 및 생리학적 특성을 Manual of Methods for General Bacteriology (6) 및 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (12)에 준하여 검토하였으며, 도출된 결과를 Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (3) 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7)를 참조하여 동정하였다. 동시에 자동세균동정장치인 Vitek system (bioMerieux, France)을 통하여 동정결과를 검증하였다.

가용성인산 생산을 위한 생리적 특성 검토

분리균주의 불용성인산 가용능에 영향을 미치는 조건을 알아보기 위하여 배양온도, 초기 pH, 각종 탄소원, 질소원 및 무기이온의 종류 및 농도 등에 따른 균체 생육도, 가용성인산 농도 및 배지의 최종 pH를 200 rpm에서 5 일간 회전진탕배양 후, 측정하였다.

불용성인산 종류별 가용성인산 생성능 검토

가용성 인산을 생성할 수 있는 기질범위를 조사하기 위하여 각종 불용성인산(CaHPO_4 , $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AlPO_4 , hydroxyapatite)이 각각 0.5%씩 함유된 최적배지에 분리균주를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 5 일간 배양한 후, 가용성인산의 농도 및 배양액의 최종 pH를 측정하였다.

분석방법

배양액의 subsample과 1 N HCl을 1 : 1의 비율로 혼합함으로써 배양액 속의 잔존 불용성인산을 가용화시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 균체 생육도를 조사하였다(16). 배양액속의 가용성인산의 농도는 $17,418 \times \text{g}$, 20 분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상등액을 대상으로 vanadomolybdophosphoric acid colorimetric method (4)로 조사하였으며, 균주를 접종하지 않은 배지를 대조구로 사용하였다. 모든 실험은 삼반복으로 실시하였으며, 나타난 각 결과들은 이들의 평균값이었다.

결과 및 고찰

불용성인산 가용화 세균의 분리 및 동정

경남 밀양지역의 논, 밭 및 농작물의 근권 토양으로부터 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 가 함유된 평판배지상에서 직경 1 cm 이상의 투명환을 생성하는 42 개 균주를 분리하였다(Fig. 1). 그 중 논 토양시료로부터 분리된 P-8, P-25, 밭 토양시료로부터 분리된 F-27, 근권 토양시료로부터 분리된 R-38, R-41, R-42 균주가 2% NaCl이 함

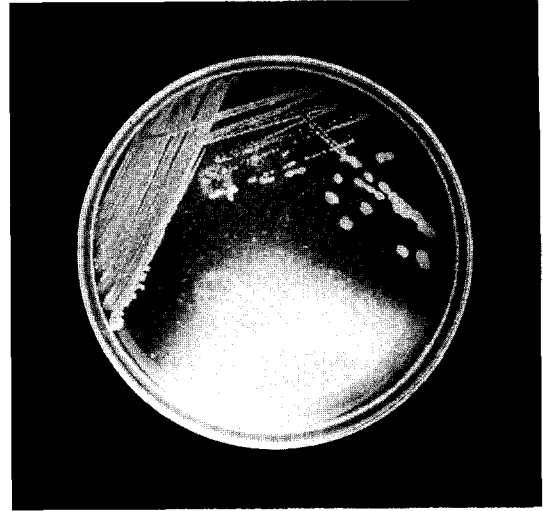


Fig. 1. Clear zone of insoluble phosphate solubilization around colony of isolate R-38 on agar plate containing 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

유된 PVK broth에서 불용성인산 가용능이 우수하였다. 이 중에서 콩의 근권 토양으로부터 분리되었으며, 가용성인산 생성능이 가장 우수한 R-38을 실험균주로 선정하였다. 실험균주의 분류학적 위치를 밝힌 결과는 Table 1과 같다. 본 균주는 그람음성의 운동성이 있는 통성혐기성 간균으로서, 배양적 및 생리생화학적 제반 특성을 Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 검토한 결과, *Enterobacter agglomerans*일 가능성이 가장 높았다. 또한, 자동세균동정장치인 Vitek system과 GNI card를 이용하여 4 시간 반응 후 동정한 결과, *Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans*)와 가장 유사한 것으로 나타났다(98%, Table 2). *Pantoea* 속은 1989년 Gavini 등에 의하여 최초로 제안된 속이며, *Pantoea agglomerans*는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에는 기재되어 있지 않으나 Bergey's Manual Determinative Bacteriology 제 9 판에는 기재되어 있는 세균으로, 현재 *Enterobacter agglomerans*와 구분없이 사용되고 있다(7). 따라서 분리균주 R-38을 *Pantoea agglomerans* R-38로 명명하였다.

가용성인산 생산을 위한 생리적 특성

P. agglomerans R-38을 25, 30, 37°C에서 각각 배양한 결과, 30°C에서 가장 우수한 가용성인산 생성능을 나타내었으며, 25°C 및 37°C에서 배양한 경우, 30°C의 85% 및 90%의 가용성인산 생성능을 가지고 있었다. 한편, 본 균주는 초기 pH 4-9의 영역에서 가용성인산을 생성할 수 있었으며, 그중 pH 7.5에서 최적 생성능을 나타내었다.

탄소원이 가용성인산 생성능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 2%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 5 일간 배양한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Glucose로부터 698 mg/L의 가용성인산이 생성되었으며, 그 외 각종 탄소원으로부터 102~207 mg/L의 가용성인산이 생성되었다. 또한 가용성인산 생

Table 1. Taxonomical characteristics of isolated strain R-38

Contents	Characteristics
<i>Morphological characteristics</i>	
Cell shape	rod
Gram stain	-
Spore formation	-
Motility	-
Cell size	0.8-1.2 μm
<i>Cultural characteristics</i>	
Colony shape	circular, irregular, flat
Colony surface	smooth
Colony color	pale yellow
<i>Biochemical characteristics</i>	
Growth in air	+
Growth anaerobically	+
Acid from glucose	+
Oxidase	-
Catalase	-
O/F test	fermentation
Yellow pigmentation	+
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
Urease	-
H ₂ S production	-
Indole production	-
VP test	+
MR test	-
Nitrate reduction	-
Gelatin hydrolysis	-
Growth in KCN medium	+

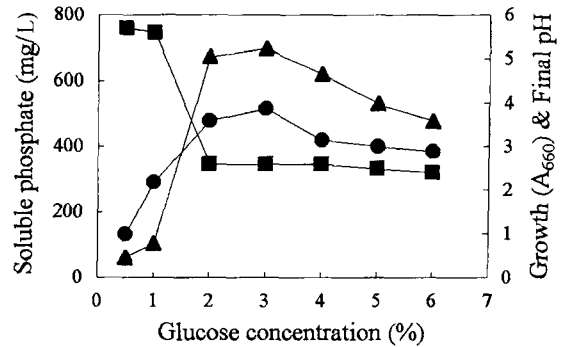


Fig. 2. Effect of glucose concentrations on Ca₃(PO₄)₂ solubilization by *P. agglomerans* R-38. ■, pH; ●, cell growth; ▲, soluble phosphate.

성에 탄소원은 필수적인 것으로 나타났으며, 가용성인산 생성은 배지의 pH 감소와 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되었다. 일반적으로 불용성인산이 가용성인산으로 전환되는 이유는 미생물이 생산한 각종 유기산에 의한 배양액의 pH 감소가 주원인으로 보고되어 있다(14). 따라서 앞으로 본 균주가 생성하는 유기산의 종류와 농도에 대한 실험이 뒤따라야 할 것으로 판단된다. 가용성인산 생성에 최적인 glucose의 농도를 조사한 결과, glucose의 농도증가에 따라 가용성인산의 생성량도 증가하였으나 3% 이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 0.5% 및 1%에서 각각 59 mg/L 및 103 mg/L의 가용성인산이 생성되었는데, 이것은 pH 감소가 그다지 크지 않은데 기인하는 것으로 추정되며, 3% 이상의 농도에서 가용성인산의 생성량이 감소하는 것은 상대적 균체 생육도가 저조함에 기인하는 것으로 추정된다. 따라서 glucose 3%를 최적농도로 결정하였다(Fig. 2).

질소원이 가용성인산 생성능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 yeast extract와 (NH₄)₂SO₄를 제외한 분리용 배지에 각종 질소원을 0.1%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 5 일간 배양한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 유기질소원이 무기질소원보다 균체 생육도 및 가용성인산 생성능이 높았으며, 질소원의 첨가가

Table 2. Identification result determined by Vitek system

Date: 10/03/2001 09 : 11 : 41	bioMerieux Vitek
WSVTK-R06.01	Manual Vitek Lab Report
Vitek ID:	000001-0 (B1-02) Oxidase -
Type:	Gram Negative Identification Card (GNI+)
Elapsed Time:	4 hours
Organism:	<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Enterobacter agglomerans</i>)
Bionumber:	6620601430
DP3	- OFG + GC + ACE - ESC + PLI +
URE	- CIT + MAL - TDA - PXB - LAC -
MLT	- MAN + XYL + RAF - SOR - SUC -
INO	+ ADO - COU - H ₂ S - ONP - RHA +
ARA	+ GLU + ARG - LYS - ORN - OXI -

98% *Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans*)

<1% *Klebsiella rhinoscleromatis*

Wait for nothing

Table 3. Effect of different carbon sources on Ca₃(PO₄)₂ solubilization by *P. agglomerans* R-38

Carbon source (2%)	Growth (A ₆₆₀)	Soluble phosphate (mg/L)	Final pH
Adonitol	0.029	0	6.9
Fructose	1.162	137	4.9
Galactose	0.983	102	5.3
Glucose	2.975	698	2.6
Glycerol	1.137	125	4.9
Inositol	0.921	182	4.4
Lactose	0.296	0	5.7
Maltose	1.021	184	4.3
Mannitol	2.328	207	4.2
Rhamnose	0.894	125	5.1
Sucrose	2.127	136	4.5
None	0.031	0	7.0

Table 4. Effect of different nitrogen sources on Ca₃(PO₄)₂ solubilization by *P. agglomerans* R-38

Nitrogen source (0.1%)	Growth (A ₆₆₀)	Soluble phosphate (mg/L)	Final pH
NH ₄ Cl	3.421	701	2.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.452	653	2.5
NH ₄ NO ₃	3.431	742	2.5
KNO ₃	3.432	642	2.9
NaNO ₃	3.431	676	2.8
NaNO ₂	0.034	0	6.8
Beef extract	3.634	787	2.4
Casamino acid	4.523	803	2.5
Polypeptone	3.988	769	2.4
Tryptone	4.299	760	2.5
Urea	3.918	518	4.1
Yeast extract	3.486	723	2.5
None	0.299	504	3.2

가용성인산 생성에 필수적인 것은 아니었다. NaNO₂의 첨가는 균체생육을 완전히 저해하였다. 경제성을 고려하여 무기질소원중 가장 높은 가용성인산 생성능을 나타낸 NH₄NO₃를 최적질소원으로 선정 후, 최적농도를 조사한 결과 0.1%로 나타났으며, yeast extract의 부수적인 첨가는 가용성인산 생성능에 아무런 영향을 미치지 않았다. *Penicillium rugulosum*의 경우, nitrate가 ammonium보다 훨씬 우수한 가용성인산 생성능(15)을 보였으나, 본 균주에서는 이러한 경향이 나타나지 않았다.

분리용 배지성분인 MgSO₄ · 7H₂O 및 CaCl₂ · 2H₂O의 경우, 각각 0.02% 및 0.06% 이상의 농도에서 가용성인산 생성능이 더 이상 증가하지 않고 일정하였으므로 0.02% 및 0.06%를 최적농도로 결정하였다. NaCl, KCl, MnSO₄ · 7H₂O 및 FeSO₄ · 7H₂O는

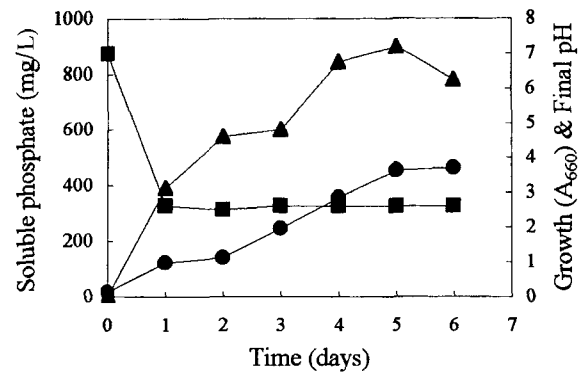


Fig. 3. Changes in soluble phosphate, cell growth and pH mediated by *P. agglomerans* R-38 in culture medium containing 0.5% Ca₃(PO₄)₂. ■, pH; ●, cell growth; ▲, soluble phosphate.

가용성인산 생성에 영향을 미치지 않았다.

이상에서 확립된 불용성인산 가용화를 위한 최적 배지 및 배양조건은 glucose 3%, NH₄NO₃ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.06%, 초기 pH 7.5, 배양온도 30°C이었으며, 최적 배지에서 회분배양을 실시한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉, 배양 1 일만에 배양액의 pH는 2.6으로 감소하였으며, 이에 따라 가용성인산도 생성되기 시작하였다. 이 후, 배양시간 경과에 따라 pH의 변화는 없었으나, 가용성인산 생성량은 증가하여 배양 5 일경, 898 mg/L의 가용성인산이 생성되었다. 이것은 알칼리성 토양에서 분리된 세균들인 NBRI 0603, 2601, 2346 및 4003에서 나타난 경향(14)과 일치하는 결과였다.

불용성인산 종류별 가용성인산 생성능

각종 불용성인산의 종류에 따른 가용성인산 생성능을 조사하기 위하여 CaHPO₄, FePO₄ · 4H₂O, AlPO₄ 및 hydroxyapatite를 각각 0.5%씩 첨가한 최적배지에서 배양한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. CaHPO₄ 및 hydroxyapatite의 경우, 698 mg/L, 912 mg/L의 가용성인산이 생성되었으며, 배양액의 최종 pH는 2.6, 2.9이었다. 그러나 FePO₄ · 4H₂O 및 AlPO₄의 경우, 배양액의 최종 pH가 각각 2.3, 2.7이었으나 생성된 가용성인산의 농도는

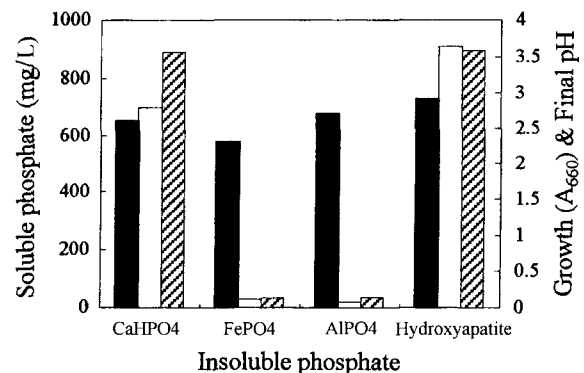


Fig. 4. Changes in soluble phosphate, cell growth and pH mediated by *P. agglomerans* R-38 in culture media containing various insoluble phosphates. ■, pH; ▨, cell growth; □, soluble phosphate.

각각 28, 19 mg/L이었다. *Penicillium radicum*은 CaHPO_4 , $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AlPO_4 로부터 각각 176, 10, 0 mg/L의 가용성인산을 생성(19)하며, *Rahnella aquatilis*는 hydroxyapatite로부터 230 mg/L의 가용성인산을 생성한다고 보고되어 있다(11). 따라서 본 균주는 이들보다 훨씬 우수한 불용성인산 가용능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 한편, calcium phosphate에 활발하게 작용하는 미생물들은 iron 또는 aluminum phosphate 가용화능이 매우 저조한 것으로 알려져 있으며(8), 본 균주도 유사한 결과를 나타내었다.

감사의 말

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2001-002-G00027)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 부산일보. 2000. 8월26일.
2. 조선일보. 2000. 2월29일.
3. 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.
4. Clesceri, 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.
5. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. 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.
7. 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.
8. Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble AlPO_4 with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 265-270.
9. Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilisation of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24, 389-395.
10. Illmer, P. and F. Schinner. 1995. Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.
11. 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.
12. Macfaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
13. Narsian, V. and H.H. Patel. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559-565.
14. Nautiyal, C.S., S. Bhadauria, 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.
15. Reyes, I., L. Bernier, R.R. Simard, and H. Antoun. 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. Ecol.* 28, 182-190.
16. 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.
17. Van Elsas, J.D., J.T. Trevors, and E.M.H. Wellington. 1997. Modern soil microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York.
18. 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.
19. 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.

(Received December 5, 2002/accepted January 13, 2002)

ABSTRACT: Isolation, Identification and Physiological Characteristics of Biofertilizer Resources, Insoluble Phosphate-Solubilizing Bacteria

Hong-Joo Son*, Yong-Gyun Kim, and Sang-Joon Lee¹ (Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea, ¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

To develop environment-friendly biofertilizer solubilizing insoluble phosphates, a bacterium possessing a high ability to solubilize $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ was isolated from the rhizosphere of peas. On the basis of its morphological, cultural, physiological characteristics, and Vitek analysis, this bacterium was identified as *Pantoea agglomerans*. The optimal medium composition and cultural conditions for the solubilization of insoluble phosphate by *P. agglomerans* R-38 were 3% of glucose, 0.1% of NH_4NO_3 , 0.02% of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.06% of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ along with initial pH 7.5 at 30°C. The highest soluble phosphate production under optimum condition was 898 mg/L after 5 days of cultivation. The solubilization of insoluble phosphate was associated with a drop in the pH of the culture medium. The strain produced soluble phosphate to the culture broth with the concentrations of 698 mg/L against CaHPO_4 , 912 mg/L against hydroxyapatite, 28 mg/L against $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and 19 mg/L against AlPO_4 , respectively.