

## ***Pseudomonas* sp. CL-1 및 *Kluyvera* sp. CL-2 균주의 인산가용화 특성**

권장식\* · 서장선 · 원항연 · 김완규 · 노형준

농촌진흥청 농업과학기술원

### **Phosphate Solubilizing Activity of *Pseudomonas* sp. CL-1 and *Kluyvera* sp. CL-2**

Jang-Sik Kwon,\* Jang-Sun Suh, Hang-Yeon Weon, Wan-Gyu Kim, and Hyung-Jun Noh

National Institute of Agricultural Science and Technology Suin-ro 150, Seodun-dong Kweonseon-gu, Suwon-si 441-707, Korea

From the rhizoplane and rhizosphere of pepper, tomato, lettuce, pasture, and grass, insoluble inorganic phosphate solubilizing bacterial strains were isolated using plate base assay on Pikovskaya's medium. Two strains, CL-1 and CL-2, which produced largest halo on plates (indicative of phosphate solubilization) were selected for further studies. Based on these biochemical and 16S rRNA analysis strains CL-1, CL-2 were found to be as species of *Pseudomonas* sp. and *Kluyvera* sp., respectively. In broth assay *Pseudomonas* sp. CL-1 and *Kluyvera* sp. CL-2 solubilized insoluble phosphate by 193.4 mg and 493.6 P mg L<sup>-1</sup>, respectively after 3<sup>rd</sup> day inoculation. These efficient phosphate solubilizing bacteria have a potential to be developed as microbial based fertilizer in future.

**Key words :** Phosphate solubilizer, Insoluble phosphate, *Pseudomonas* sp., *Kluyvera* sp.

## 서 언

인산은 질소, 칼리와 함께 식물체 세포의 성장에 없어서는 안될 주요 3대 성분이며, 무기 및 유기질 비료의 형태로 경작지에 사용되고 있다. 그러나 인산질비료는 질소질, 칼리질 비료와는 달리 쉽게 유실되지 않기 때문에 식물에 흡수 이용되고 남은 인산성분은 토양에 축적된다. 축적된 무기인산의 결합형태는 주로 Ca-P, Fe-P, Al-P 등의 식물이 이용하기 어려운 여러 가지 결합방식의 화합물로 존재하게 된다. 특히 시설재배지 토양의 총인에 대한 분획 인의 분포는 Ca-P > Fe-P > residual-P > Al-P > saloid-P의 순으로 Ca와 Fe 결합 인산염이 무기태 인산염의 대부분을 차지한다 (Suh, 1994).

이와같이, 식물이 쉽게 이용할 수 있는 형태의 무기질 인산비료를 토양에 사용하여도 토양에 잘 고정되는 특성으로 인하여 작물을 재배할 때 마다 인산질비료를 계속 사용하게 된다. 이 때문에 연중 다기작 재배하는 토양에서는 인산이 적정함량을 훨씬 상회하게 되고, 결과적으로는 토양오염과 작물생육을 저해하는

토양환경을 초래하게 된다. 우리나라의 경우 시설원에 재배지에서의 토양인산 함량은 대부분 적정함량 이상으로 축적되어 있는 곳이 많다(고, 1996).

인산질 비료는 다른 비료에 비하여 고가에 생산, 판매되고 있는 실정을 감안하면 농경지에 다량 축적된 난용성 인산염을 효율적으로 이용하는 방법이 절실히 필요하다. 이를 위하여 토양미생물이 가지고 있는 물질순환기능을 극대화 할 필요가 있다. 현재까지 알려진 인산가용화 세균중에는 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Achromobacter*, *Pantoea*, *Aerobacter*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Escherichia* 속 등이 인산가용화능이 있는 것으로 보고되고 있다(Subba-Rao, 1982).

따라서, 토양에 고정된 난용성 인산염을 효과적으로 가용화시키고 인산시비량 절감 및 시비효율을 높일 수 있는 생물비료를 개발하고자 식물근권에서 분리한 세균에 대하여 인산가용화능이 우수한 균주를 선발하고, 선발한 균주의 분류동정, 생화학특성, 인산가용화능을 평가하였다.

접수 : 2007. 9. 19 수리 : 2007. 10. 12

\*연락처 : Phone: +82312900371,

E-mail: jskwon@rda.go.kr

## 재료 및 방법

**난용성 인산가용화균의 분리 및 선발** 토양에 집적되어 있는 난용성 인산염을 가용화하는 유용 미생물을 선발하고자 오이, 상추, 토마토, 고추, 목초, 잔디의 뿌리 및 근권토양 시료를 채취하여 희석현탁액을 조제한 다음 인산가용화능을 판별할 수 있는 배지에 도말하여 인산가용화능을 평가하였다.

먼저 희석평판법에 의해 단계별 희석액을 3인산칼슘[Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]이 포함된 Pikovskaya's medium (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g, Glucose 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g, KCl 0.2 g, MnSO<sub>4</sub> 0.01 g, Agar 15 g, Distilled water 1L)에 희석단계별로 도말하였다. 30°C에 5일간 배양하면서 난용성 인산염을 가용화하는 균주를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주를 다시 위에서 사용한 배지에 재 접종후 투명환의 크기에 따라 가장 우수한 균주를 선발하였다.

**선발균주의 동정 및 생화학적 특성** 선발한 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열분석, 형태학 및 생화학적 특성을 통하여 동정하였다. 즉 DNA extraction kit (Toyobo, Japan)로 분리균주의 DNA를 추출한 후 universal primer인 fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 rP2 (5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3')를 이용하여 16S rRNA gene을 PCR을 통해 증폭하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 DNA sequencing kit (BigDye terminator Cycle Sequencing Ready Reactions v3.1; Applied Biosystem)를 사용하여 반응시킨 후, 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI server의 BLAST 프로그램을 통해 속 (genus)까지 동정하였다. 균주간 유연관계를 분석하기 위해서 16S rRNA gene 염기서열은 CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994)을 이용하여 표준균주의 염기서열과 정렬하였다. 데이터셋의 진화계통수 작성은 MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004) 프로그램을 이용하였다. branch의 안정성

(bootstrap value)은 1,000회의 resampling을 통하여 조사하였다.

생리·생화학적 특성 중 catalase, oxidase, 혐기생육, 가수분해능 등은 Claus and Berkeley (1986)와 Smibert and Krieg (1994)의 방법에 따라 수행하였다. 그 외의 탄소원 자화능 및 생리생화학 시험은 API 20NE와 API 20E system (bioMérieux)을 이용하여 제조사의 표준방법에 따라 수행하였다. 형태학적 특징은 TSA 배지에서 2일 배양 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다.

**선발균주의 난용성 인산가용화능** 난용성 인산염의 3인산 칼슘이 포함된 배양액에 선발된 *Pseudomonas* sp. CL-1 균주와 *Kluyvera* sp. CL-2 균주를 접종하여 인산가용화량을 측정하였다. 선발된 균주는 1일간 전배양한 것을 멸균된 Pikovskaya's medium 100 ml 들어있는 삼각플라스크에 1 ml(1×10<sup>7</sup> cfu ml<sup>-1</sup>)씩 접종한 후 28°C에서 130 rpm으로 8일간 배양하였다. 분석용 시료는 24시간 간격으로 시료를 채취하여 10000×g 로 원심분리하여 균체를 분리하고 상등액을 다시 0.45 μm의 필터를 사용하여 여과한 후 인산가용화량을 측정하였다. 가용화인산의 측정에는 바나도 몰리브덴산법으로 하였다(농업기술연구원, 1988). 단위는 P mg L<sup>-1</sup>로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**난용성 인산가용화균의 분리 및 선발** Pikovskaya's medium에서 세균의 콜로니 주위에 투명환을 갖는 균주를 선별하여 그중 난용성 인산염을 가장우수하게 가용화하는 *Pseudomonas* sp. CL-1 및 *Kluyvera* sp. CL-2 균주를 선발하였다(Figure 1). CL-1 균주는 고추근권에서, CL-2 균주는 클로바 근권에서 분리되었다.

**선발균주의 동정 및 생화학적 특성** 선발된 *Pseudomonas* sp. CL-1 균주의 16S rRNA 염기서열의 계통분류학적 분석결과는 Fig. 2와 같다. CL-1은 *P.*

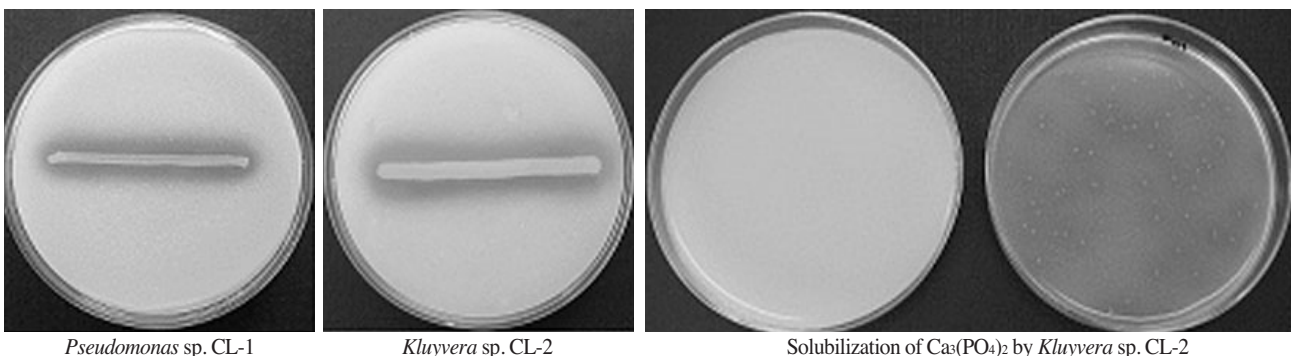
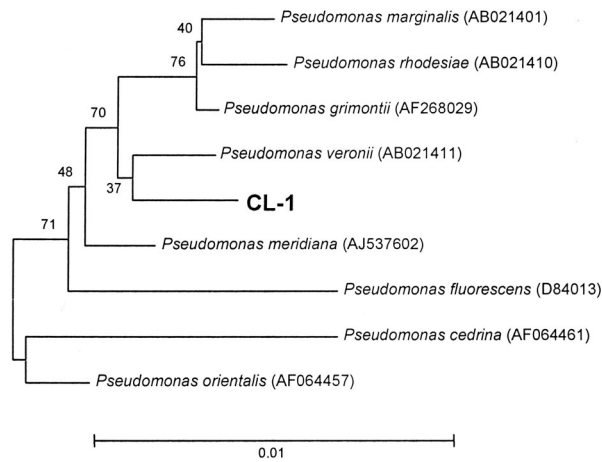


Fig. 1. Solubilization of insoluble phosphate by *Pseudomonas* sp. CL-1 and *Kluyvera* sp. CL-2 strain.



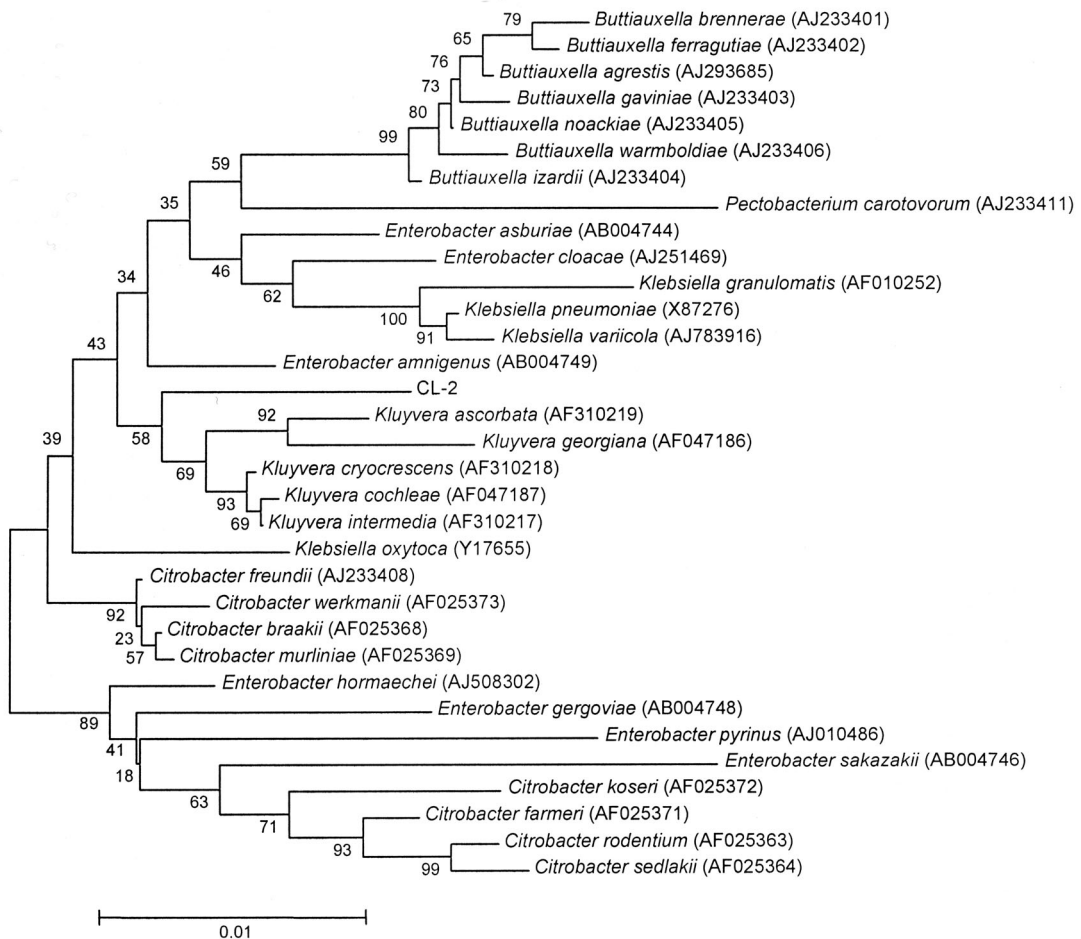
**Fig. 2. Phylogenetic tree of CL-2 based on 16S rRNA sequence similarity. Branching values determined using 1000 bootstraps. Bar, 1 substitution per 100 nucleotides.**

*veronii*, *P. rhodesiae*, *P. marginalis*, *P. grimontii*, *P. orientalis*, *P. meridiana*와 유연관계가 높았으며, 그 중 *P. veronii*가 가장 높았다. 염기서열 유사도는 *Pseudomonas meridiana*(99.4%)와 가장 높았고, 그 외

균주와는 99.0-99.2% 범위였다.

선발된 *Kluyvera* sp. CL-2 균주의 16S rRNA 염기서열의 계통분류학적 분석결과는 Fig. 3과 같이 *Kluyvera intermedia*, *Kluyvera cochleae*, *Kluyvera cryocrescens*와 유연관계가 높았으며, 염기서열 유사도는 각각 97.5%, 97.4%, 97.1%이었으며 그 외 표준균주와는 97.0%이하의 유사도를 보여 *Kluyvera* sp.로 동정하였다.

생화학적 특성은 Table 1과 같다. *Pseudomonas* sp. CL-1 균주는 oxidase test 및 catalase test에서는 양성 반응을 보였고, esculin과 gelatin, casein을 가수분해하였다. *Kluyvera* sp. CL-2 균주는 oxidase test에서는 음성, catalase test에서는 양성반응을 보였고, esculin과 CM-cellulose를 가수분해하였다. 그리고 acetoin을 생성하였다. 탄소원 이용성은 Table 2와 같다. *Pseudomonas* sp. CL-1균주는 탄소원으로 maltose와 phenyl-acetate를 제외한 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate 등을 이용하였다. *Kluyvera* sp. CL-2 균주는 caprate, adipate, phenyl-



**Fig. 3. Phylogenetic tree of CL-2 based on 16S rRNA sequence similarity. Branching values determined using 1000 bootstraps. Bar, 1 substitution per 100 nucleotides.**

**Table 1. Biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. CL-1 and *Kluyvera* CL-2 strains.**

Characteristics	CL-1	CL-2
Oxidase	+	-
Catalase	+	+
Reduction of nitrates to nitrites	-	+
Indole production	-	-
Arginine dihydrolase	+	-
-galactosidase	-	+
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Tryptophane deaminase	-	+
Acetoin production	-	+
H <sub>2</sub> S production	-	-
Anaerobic growth	w	w
Esculin hydrolysis	+	+
Urease hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	+	-
Starch hydrolysis	-	w
CM-Cellulose hydrolysis	-	+
Casein hydrolysis	+	-

**Table 2. Carbon assimilation by *Pseudomonas* sp. CL-1 and *Kluyvera* CL-2 strains**

Carbon source	CL-1	CL-2
Glucose	+	+
Arabinose	+	+
Mannose	+	+
Mannitol	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	+
Maltose	-	+
Gluconate	+	+
Caprate	+	-
Adipate	+	-
Malate	+	+
Citrate	+	+
Phenyl-Acetate	-	-

acetate를 제외한 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, malate, citrate 등을 이용하였다. 그 외에도 선발된 2 균주는 TSA배지에서 잘 자랐으며, 특히 *Kluyvera* sp. CL-2 균주는 7%의 NaCl 염에서도 생육이 가능하였다.

**선발 균주의 난용성 인산가용화능** 선발된 *Pseudomonas* sp. CL-1 및 *Kluyvera* sp. CL-2 균주의 난용성인산 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>의 가용화량은 Table 3에 나타난 바와 같다. 대조구는 7일 경과까지도 3.5~5.1 (P mg L<sup>-1</sup>)로 거의 변화가 없었으나, CL-1 균주는 1일에 148.0, 3일에 193.4 (P mg L<sup>-1</sup>)의 인을 가용화 하였다. 3일째까지 인 가용화량이 증가를 보이다가 5일째에는 인 함량이 급격히 감소하였다. 그러나 균수는 3일에 5.2×10<sup>11</sup> cfu ml<sup>-1</sup>, 5일에는 약 2배 이상 많은

9.4×10<sup>11</sup> cfu ml<sup>-1</sup>의 균수를 보였다(Table 4). 이것은 가용화된 인이 미생물 개체수 번식에 재이용되었음을 의미하며, 또한 미생물체가 양분 pool의 집적기능이 있음을 의미한다(Jenkinson and Ladd, 1981; Ladd et al., 1995; Van Veen et al., 1987). 결과적으로는 가용화된 인을 미생물체가 보유함으로써 토양에 고정되는 것을 생물적으로 차단하며, 이것은 미생물이 흡수이용한 가용화인이 미생물이 사멸하는 과정에서 다시 토양중에 서서히 방출하기 때문에, 식물양분의 지속적 공급효과를 의미하는것으로 양분 pool의 집적기능이 있음을 판단할 수 있었다. *Kluyvera* sp. CL-2균주의 배양액중 난용성 3인산칼슘의 인가용화량은 CL-1 균주보다 현저히 많은 양을 나타내었다. 즉, CL-2 균주 접종구는 1일, 3일, 5일, 7일 경과시 각각 482.8 mg, 493.6 mg, 502.4 mg, 513.2 mg으로 CL-1 균주보다 2배 이상 인 가용화량을 증가시키는 효과를 나타내었다. 이들 균주를 유기물 등과 혼합하여 적절히 사용하면 토양에 축적된 난용성 인산염을 재활용함으로써 고가의 인산질 화학비료 절감, 시비효율 등을 개선할것으로 기대된다.

**Table 3. Phosphate solubilizing activities of CL-1 and CL-2 strains.**

	Solubilization of insoluble Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (P mg L <sup>-1</sup> )				
	0	1	3	5	7 days
<i>Pseudomonas</i> sp. CL-1	4.0±0.7	148.0±0.0	193.4±1.5	14.9±0.0	18.5±0.7
<i>Kluyvera</i> sp. CL-2	4.0±0.7	482.8±10.9	493.6±4.4	502.4±3.6	513.2±2.9
Control	3.5±0.0	4.5±1.5	3.5±0.0	3.0±0.7	4.0±0.7

**Table 4. Increase of *Pseudomonas* sp. CL-1 strain at Pikovskaya's liquid medium culture.**

	Microbial population(cfu ml <sup>-1</sup> )				
	0	1	3	5	7 days
CL-1	2.1 × 10 <sup>4</sup>	4.7 × 10 <sup>10</sup>	5.2 × 10 <sup>11</sup>	9.4 × 10 <sup>11</sup>	9.2 × 10 <sup>11</sup>
Control	0	0	0	0	0

## 적 요

토양에 고정되어 축적된 난용성 인산염을 가용화하는 유용세균을 선발하여 생물비료로 이용하고자 고추, 토마토, 상추, 오이, 목초, 잔디의 근권토양 및 뿌리표면에서 인산가용화능이 있는 세균을 분리하였다. 선발된 인산가용화균은 16S rRNA 염기서열과 생화학특성 등에 의해 동정되었으며, 난용성인산 가용화능이 우수한 세균 *Pseudomonas* sp. CL-1 및 *Kluyvera* sp. CL-2 균주를 선발하였다. *Pseudomonas* sp. CL-1 균주는 esculin과 gelatin, casein을 가수분해하였고, 그리고 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate 등을 이용하였다. *Kluyvera* sp. CL-2 균주는 esculin과 CM-cellulose를 가수분해 하였고 acetoin을 생성하였다. 그리고 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, malate, citrate 등을 이용하였다. Pikovskaya's medium에서 선발균주의 난용성인산  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 의 인 가용화량을 정량한 결과 *Pseudomonas* sp. CL-1과 *Kluyvera* sp. CL-2 균주는 접종후 1일, 3일에 각각 148.0, 193.4( $\text{P mg L}^{-1}$ )와 482.8 mg, 493.6 mg의 인 가용화량을 나타내었다

## 인 용 문 헌

- Claus, D. & R. C. W. Berkeley. 1986. Genus Bacillus Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105-1140. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Jenkinson, D. S. and J. N. Ladd. 1981. Microbial biomass in soil:

Measurement and turnover; in soil biochemistry, Vol. 5, ed. E. A. PAUL and J. N. LADD, p415~471. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5:150-163.
- Ladd, J. N., M. Amato, P. R. Grace, and J. A. Van Veen. 1995. Simulation of  $^{14}\text{C}$  turnover through the microbial biomass in soils incubated with  $^{14}\text{C}$ -labelled plant residues. *Soil Biology and Biochemistry*. 27(6): 777-783.
- Smibert, R. M. & N. R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Subba-Rao. 1982. *Advances in Agricultural Microbiology : Phosphate Solubilization by Soil Microorganisms*. Butterworth, London. p293-303.
- Suh, J. S. 1994. Biological recycling of the insoluble phosphates accumulated in cultivated soils by the phosphate-solubilizing microorganisms. Ph.D., Chonnam National University, Kwangju, Korea.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Van Veen, J. A., J. N. Ladd, J. K. Martin, and M. Amato. 1987. Turnover of carbon, Nitrogen and phosphorus through the microbial biomass in soils incubated with  $^{14}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - and  $^{32}\text{P}$ -labelled bacterial cells. *Soil Biol. Biochem.* 9(5) : 559-565.
- 고창덕. 1996. 황성지방에서 시설재배지와 일반 밭토양의 화학성 비교. *한국토양비료학회지*. Vol. 29(4) : 385-388.
- 農業技術研究所. 1988. 土壤化學分析法.