미생물을 이용한 토양불용인산 이용 및 인광석 직접시비기술 개발

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물을 이용한 토양불용인산 이용 및 인광석 직접시비기술 개발” 의 최종보고서로 제출합니다.

2004. 8. .

주관연구기관명 : 충북대학교
총괄연구책임자 : 사 동 민
세부연구책임자 : 정 종 배
연 구 원 : Sundaram Seshadri
Munusamy Madhaiyan
김 충 우
정 희 경
김 은 희
이 형 석
김 복 진
최 희 열
조 현 종
진 선 재

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미생물을 이용한 토양불용인산 이용 및 인광석 직접시비기술 개발

Ⅱ. 연구 개발의 목적 및 필요성

인산은 작물 생산에 필수적인 요소 중의 하나이며, 높은 작물 생산량과 토양 생물군 본연의 작용을 위해 충분한 량을 필요로 하는 중요한 식물 영양소이다. 평균 토양에서 P 함량은 0.05%(w/w)이며, 전체 인산의 0.1%만 식물에게 유용하다. 또한 화학비료의 형태로 토양에 공급되는 인산의 이용효율은 매우 낮다. 왜냐하면, 시비된 인산의 대부분이 산성 토양에서는 Al^{3+}나 Fe^{3+}와 결합하고 알칼리성 토양에서는 Ca^{2+}와 결합하여 불용화되기 때문이다.

또한 인광석분말은 외국에서는 인산비료로 사용 되고 있으나 용해도가 매우 낮기 때문에 식물이 쉽게 이용할 수 없다. 그러나 인광석분말을 인산가용화균과 함께 사용하여 가용화 되는 양을 늘릴 수 있다면 인광석을 가공하지 않은 인산 비료로 국내에서도 사용이 가능하리라 판단된다.

이러한 인산가용화 미생물 연구와 더불어 토양의 시비관행에 따른 인산의 축척양상, 미생물분포, 밀도 및 토양효소의 변화 등은 인산가용화균의 사용방법 및 토양인산관리에 매우 중요한 정보를 제공한다. 즉, 작물계의 토양에 퇴비 및 화학비료와 같은 외부 인산 시비량은 종종 작물에게 있어 인산 uptake양을 넘어선다. 이런 잔여물은 화학적으로 안정화되고 불용성 상태로 토양에 축적되어 오랜 시간이 지난 후 식물이 이용할 수 있는 형태로 될 수 있다.

한국 토양의 불용성 인산 화합물은 주로 Ca뿐만 아니라 무기물, 특히, Al과 Fe에 고정되어 있으며 이들을 효과적으로 가용화하여 농업적으로 이용하기 위해서는

불용성 인산을 용해시키는 인산 가용화균의 선발부터 이용까지 새로운 방법이 요망된다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

· 급속한 경제 성장과 인구의 도시집중 그리고 농산물의 수입개방 등으로 우리의 농업여건이 크게 변화되고 있고 이와 같은 현상은 금후 더욱 심화되리라고 생각된다. 종전의 우리 농업시책이 식량 자급을 위해 다비에 의한 최대 수확을 추구하였으나, 오늘의 농정 기본방향은 저비용에 의한 적정 생산과 소비자가 선호하는 고품질의 농산물 생산으로 대폭 전환되고 있다. 다수확을 추구하는 과정에서 비료의 장기간 과다 사용은 토양 생산성의 감퇴, 작물 수량의 감소 및 품질의 저하 등의 부작용을 초래하기도 했다. 토양에 처리된 비료 성분은 여러 가지 생물학적 및 화학적 반응을 거치게 되며, 이러한 과정에서 비료 성분의 불용화나 유실 현상이 일어나게 된다. 비료에 들어 있는 가용성 인산의 일부는 식물이 흡수하고 나머지 많은 부분은 고정 또는 흡착되어 새로운 인 함유물질이 되고 이는 다시, 그러나 완만하게 일부가 식물에게 인산을 공급하게 된다. 1970년까지의 우리나라 논토양 유효인산은 60ppm에 불과하였으나 지속적인 인산비료의 투입으로 인하여 1995년에 이르러서는 128ppm으로 증가되었다. 특히 2모작 논에 신선채소, 과채류 및 기호작물 등 소득 작물의 도입으로 다양한 작부체계가 형성되고 있어서 연간 2~3회 이상의 인산, 칼리를 함유한 복합비료와 유기질 비료의 시용이 이들 성분의 축적요인이 되고 있다.

즉, 작물에 대한 인산 시비는 흔히 작물이 요구하는 인산의 농도를 초과하게 된다. 그리고 그것은 토양에 인산이 축적되는 결과도 가져온다. 토양 인산과 다른 pools의 수준은 토양의 특성과 기후 조건뿐 만 아니라 시비된 인산의 비율과 형태에도 영향을 받는다. 시비처리에 따른 토양인산의 축척 상태를 먼저 조사하기 위하여 경남 밀양 영남 농업 기술원에서 단일 벼 품종을 34년 동안 지속적으로 퇴비와 화학비료를 매년 동일하게 시비한 논 토양을 대상으로 연구하였다. 비료

의 장기처리는 무처리, 퇴비 단용 처리, 화학비료 단용처리, 퇴비 + NPK화학비료 복합처리 등 4가지였다. 지속적으로 시비된 퇴비와 화학비료에 의해서 토양 인산 형태에 변화가 있었고 퇴비 + NPK화학비료 복합처리는 토양 전 인산을 상당히 증가시켰다. 토양의 유효인산은 NPK화학비료 처리구에서 증가되었다. 또한 퇴비와 NPK화학비료 복합처리는 유기 인산농도의 증가를 보였다. 그러나 유기 인산과 전 인산의 비율은 퇴비 또는 NPK화학비료 단용 장기처리에 의해 감소하였다. 토양 내 고정화된 인산은 퇴비와 NPK화학비료가 지속적으로 투여되는 동안에 상당히 증가되었다. 논토양에서의 인산 고정은 aluminum (Al)과 calcium (Ca) 보다도 iron(Fe)에 고정된 양이 높았다. 최고치의 Fe-P의 양은 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서 나타났다.

· 토양 효소와 미생물의 활동은 비료와 퇴비의 시비에 의해 영향을 받으며 생태학적 안정성의 척도로 사용될 수 있다. 앞서 동일비료 장기연용구(밀양 영남농업시험장) 4개의 처리(무비구, 퇴비, NPK화학비료, 퇴비와 NPK화학비료)를 대상으로 토양의 효소활성을 측정하였다. 장기간 NPK화학비료와 퇴비를 시비한 것에서는 다른 처리보다 urease, dehydrogenase 그리고 acid phosphatease의 활성이 크게 증가했다. 또한 퇴비를 시비한 것에서는 NPK화학비료를 시비한 것보다 urease, dehydrogenase, acid phosphatase의 활성이 높게 나타났다. 그러나 arylsulfatase의 활성은 퇴비를 시비한 것과 화학비료를 시비한 것 사이에 큰 차이를 보이지 않았다. 가장 높은 미생물 수를 보인 것은 NPK화학비료와 퇴비를 모두 장기 시비한 처리구에서 나타났고, 퇴비의 시비는 NPK화학비료의 시비보다 높은 미생물 수를 나타내었다. 위의 결과로 생태학적 안정성은 퇴비만 시비하거나 혹은 NPK화학비료와 함께 퇴비를 시비함에 의해 유지됨을 볼 수 있었다.

· Iron phosphates와 aluminum phosphates의 용해도가 pH의 감소와 관련된다는 사실을 바탕으로 bromo cresol green(BCG)과 bromo phenol blue(BPB)를 이용하여 iron phosphates와 aluminum phosphates를 용해시키는 미생물의 선별을 위한 새로운 방법으로 개발하고자 사용하였다. BCG는 투명도와 가시도에서 BPB

보다 우수함을 알 수 있었으며, 지시약을 첨가한 Reyes's basal medium의 사용은 투명대의 형성이 지시약을 첨가한 Picovaskaya's medium보다 오히려 좋음을 확인하였다. 이러한 결과는 BCG를 첨가한 Reyes's basal medium이 iron phosphates와 aluminum phosphates를 가용화하는 미생물의 분리를 위한 가장 좋은 배지임을 나타내었다. 이러한 방법을 이용하여 성능이 우수한 4개의 iron phosphates 가용화균과 5개의 aluminum phosphates 가용화균을 신속, 용이하게 선발하였다.

· 논토양의 근권에서 상기의 방법으로 분리한 *Penicillium Oxalicum* CBPS-Tsa를 이용하여 인산가용화에 미치는 질소 및 탄소원의 효과를 검정하였다. Glucose, sucrose, mannitol, sorbitol와 같은 다양한 carbon sources와 arginine, sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulphate를 이용하여 인산가용화능을 비교하였다. Mannitol, sorbitol, ariginine는 인산 가용화에 효과적이지 못하였고, sucrose는 Ca-p와 Al-P의 가용화에서 보다 나은 carbon source 였으며, glucose는 Fe-P의 가용화에 효과가 좋았다. 모든 nitrogen sources는 인산가용화를 증가시켰지만, nitrates 첨가는 ammonium 첨가보다 인산가용화에 효과적이었다. 인산 가용화는 배지의 산성화를 나타내었으며 최대 pH의 감소는 glucose 처리에서 나타났고, nitrogen sources 중에서는 ammonium chloride 처리에서 큰 pH 감소를 나타내었다.

· 옥수수 생장에서 MPS Bacteria의 접종 효과를 보기위하여 온실 조건하에서 2번의 연속적인 옥수수 pot 재배를 시행하였다. 3가지 가용화균 (*Pseudomonas striata, Burkholderia cepacia* and *serratia marcescens*)을 접종하여 옥수수를 재배한 후 건물량, 인산 및 질소흡수량 등을 측정하였다. 인산가용화균을 접종한 식물은 접종하지 않은 식물과 비교하여 식물 신장, 건물량, N, P의 농도가 모두 높게 나타났다. 두 번의 연속적인 실험에서 *P. striata* 와 *B. cepasia*를 접종한 식물은 *S. marcescens*를 접종한 식물과 접종하지 않은 식물에 비하여 유의성 있는 식물 신장, 건물량, N, P의 농도의 증가를 나타내었다. *P. striata* 와 *B.*

*cepasia*를 접종한 식물은 접종하지 않은 control 식물보다 14%의 건물량과 25%의 P 농도가 증가하였다.

· 인광석을 처리한 토양에서 담배작물의 인산 흡수와 생육에 인산가용화균(PSM)이 미치는 영향을 온실 조건하에서 실험하였다. 무비 토양에 인산비료로써 인광석을 처리한 토양과 처리하지 않은 토양에 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa을 각각 접종한 다음 담배 작물을 재배하였다. 담배작물의 인산 농도는 인광석 처리에 의해 증가하였으며, 인산가용화균을 접종한 처리가 인산가용화균을 접종하지 않은 처리에 비해 현저히 높은 인산 농도를 나타내었다. 담배작물에 의한 인산 흡수는 인광석과 인산가용화균 처리에 의해 증가되었으며, 특히 single rock phosphate처리에서 큰 차이를 나타내었다. 담배 작물의 생육은 인광석 처리, 특히, 인광석과 가용화균의 혼합 처리에 의해 현저히 증가하였다. 작물 생육에 인산가용화균이 미치는 긍정적인 영향은 식물체내의 인산 농도와 인산흡수에 밀접한 관계를 가지며, 이러한 결과는 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa가 토양 불용성 인산과 인광석을 가용화시켜 담배작물의 생육과 인산 흡수를 증진시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

· 최근에는 농업적 환경에 쉽게 적용하고 미생물의 생존, 안정성, 효능, 저장, 운송과 관련된 문제들을 극복하기 위해서 미생물을 담체에 고정화하여 이용하고 있다. 이러한 인산가용화균의 고정화 기술을 개발하기 위하여 토양에서 분리한 인산가용화 미생물인 *P. agglomerans*를 alginate, agar, gelatin에 고정화시킨 후 tricalcium phosphate가 첨가된 액체 배지에서 배양 후 인산가용화능을 비교하였으며 또한 alginate에 고정화된 균의 인산가용화능을 경시적으로 조사하였다. 고정화 담체로 alginate나 agar를 사용하였을 때 고정화된 *P. agglomerans*의 가용화 능이 gelatin을 담체로 사용하였을 때보다 우수하였다. alginate에 고정화된 *P. agglomerans*가 접종된 처리구에는 배양 일에 따라서 유효인산의 농도가 급격히 증가하였고 모든 처리 구에서 배지 안의 pH가 감소하였다.

· *In vitro* 상태에서 상기 기술로 고정화시킨 인산가용화균의 안전성 및 이용성을 측정하였다. 고정화된 *Pantoea agglomerans*는 원산지가 다른 인광석을 모두 효과적으로 가용화시켰으나, 가용화 양상은 인광석 원료의 원산지에 따라 약간 다른 경향을 나타내었다. 접종 후 6일에서 모로코 인광석(215.6 mg L^{-1})과 튀니지 인광석(186.1 mg L^{-1}), 10일에서 이스라엘 인광석(60.98 mg L^{-1})과 TCP(132.3 mg L^{-1}), 12일에서 중국의 인광석(48.8 mg L^{-1})의 최대 가용화능이 관찰되어졌다.

고정화된 박테리아 bead의 저장기간을 조사하기 위하여 6개월 동안 두 개의 다른 온도(4℃, room temp.)에서 저장하면서 주기적으로 활성을 측정하였다. 4℃와 실내온도에서 저장된 beads는 인산가용화능 뿐만 아니라 미생물의 개체수의 유지에 있어 큰 차이를 나타내지 않았다.

· 인광석 및 PSM의 복합처리효과를 규명하기 위하여 충북지역에서 분리한 *P. agglomerans*을 벼(*Oryza sativa L.*)에 접종하여 인산흡수 및 생육효과를 규명하기 위하여 온실 실험을 수행하였다. 처리방법은 무처리구와 6개의 처리구로 1) 종자에 세균을 접종시킨 것, 2) free cell 접종과 3) bateria가 고정된 beads의 접종방법 등 3가지 방법과 pot에 따라 인광석 처리량을 1g과 2.5g을 넣어 재배하였다. 식물 성장과 인산흡수는 인산가용화균이 접종된 처리구에서 유의성있게 증대하였다. 인광석 1g을 넣은 것과 고정된 beads를 접종한 방법이 벼 식물의 성장과 인산의 흡수에 다른 처리구보다 효과가 큰 것을 알 수 있었다. *P. agglomerans* 접종결과 pot에 존재하는 유효인산의 농도가 증가됨을 알 수 있었다.

Ⅳ. 연구개발 결과 활용 및 활용에 대한 건의

본 연구를 수행한 결과로 국제학술지 (2편), 국내학술지 (7편)의 논문이 발간되었고, 국제학술회의 (3편), 국내학술회의 발표 (20편)의 논문을 발표하였다. 또한 2편의 논문이 국제학술지에 투고중이며 2편의 특허를 출원하였다. 이러한

논문, 학술 발표 및 특허 출원한 기술을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 친환경농업재재로 이용이 가능 할 것이다.

SUMMARY

· External phosphorus (P) fertilization in intensive cropping systems often exceeds P demand by crops, which leads to P accumulation in soils. Levels of different pools of soil P have been affected not only by soil properties and climatic condition but also by rate and type of P applied. This experiment was conducted to investigate the long-term applications of compost and chemical fertilizer on soil phosphorus status in paddy cropping system after addition of compost and chemical fertilizers for 34 years in rice monoculture production at National Youngnam Agricultural Experiment Station, Miryang, Korea. Four different treatments of soil amendments were selected in this study: control, compost application, NPK (nitrogen - phosphorus - potassium) fertilizer application, and compost plus NPK fertilizer application. Phosphorus status varied with the long-term applications of compost and fertilizers, and the compost plus NPK fertilizer treatment significantly increased total P in soil. Available P was increased in the treatments that received chemical fertilizers. Applications of compost and chemical fertilizers increased organic P fraction but the ratio of organic P to total P declined with application of compost or chemical fertilizers. Phosphorus-fixation was significantly increased due to the long-term application of compost and chemical fertilizers. The P fixation was highest with iron (Fe) than with aluminum (Al) and calcium (Ca) in the paddy soil. The highest Fe-P content occurred in the compost plus NPK fertilizer treatment. These results represented that the higher level of P remaining in the soil is accumulated by long-term annual application of compost and chemical fertilizers than by that of chemical fertilizer, and P accumulation might be a gradual saturation of the P-sorption capacity.

· Soil enzymes and microbial activities are affected by fertilizer and compost applications and can be used as sensitive indicators of ecological stability. Microbial population and soil enzymes *viz*., dehydrogenase, urease, acid phosphatase and sulfatase were determined in the long-term fertilizer and compost applied paddy soil. Soil samples were collected from the four treatments (control, compost, NPK and compost+NPK). Long-term NPK+compost application significantly increased activities of urease, dehydrogenase, acid phosphatase and arylsulfatase than all other treatments. The compost application enhanced activities of urease, dehydrogenase and acid phosphatase than the NPK application. However, arylsulfatase activity was not significantly different between compost and fertilizer application. The highest microbial population was recorded in the NPK+compost treatment. The compost application also resulted in higher microbial population than the NPK application. The above results indicate that ecological stability could be maintained by application of compost alone or with NPK.

· Two pH indicator dyes, bromo cresol green (BCG) and bromo phenol blue (BPB) were used to develop a new method for the isolation of microorganisms that solubilize iron and aluminum phosphates based on the fact that the solubilization of iron and aluminum phosphates was associated with the decrease of the pH. Bromo cresol green was found to be superior to bromo phenol blue in terms of clarity and visibility. The use of Reyes's basal medium plus dye was found to be preferable to that of Pikovaskaya's medium plus dye in terms of halo zone formation. These results indicated that Reyes's basal medium plus bromo cresol green is the best medium for the isolation of iron and aluminum phosphates-solubilizing microorganisms. Four efficient iron phosphate solubilizers and five efficient aluminum phosphate solubilizers were isolated on Reyes's basal medium containing

$FePO_4$ and $AlPO_4$, respectively, plus bromo cresol green.

· Phosphorus is one of the major plant growth limiting nutrients, despite being abundant in soils in both inorganic and organic forms. Phosphobioinoculants in the form of microorganisms can help in increasing the availability of accumulated phosphates for plant growth by solubilization. *Penicillium oxalicum* CBPS-Tsa, isolated from paddy rhizosphere, was studied for its phosphate solubilization in the present study. The influence of various carbon sources like glucose, sucrose, mannitol and sorbitol and nitrogen sources like arginine, sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium chloride and ammonium sulphate were evaluated using liquid media with tricalcium phosphate (Ca-P), ferric phosphate (Fe-P) and aluminium phosphate (Al-P) respectively. The sucrose-sodium nitrate amendment influenced the production 824 mg L^{-1} of maximum soluble phosphate from 5 g L^{-1} of calcium phosphate source. Mannitol and sorbitol among the carbon sources and ariginine among nitrogen source were poor in influencing phosphate solubilization. While sucrose was good in influencing solubilization of tricalcium phosphate and aluminum phosphate, glucose fared better in solubilizing ferric phosphates. In general, mannitol and sorbitol were poor in influencing P solubilization from all the three phosphates sources. Though all the nitrogen sources influenced better P solubilization, nitrates were better than ammonium amendment. Ammonium chloride and ammonium sulfate amendments witnessed higher uptake of available phosphates by the fungus, indicating depletion of the source in Fe-P amendment. In all experiments, phosphate solubilization was accompanied by acidification of the media. Higher pH reduction was observed in glucose amendment, which was followed by other carbon source amendments. In the nitrogen sources, ammonium chloride amendment favoured greater pH reduction than other sources.

· Two successive in vitro experiments were carried out to examine the effect of MPS bacterial inoculation on growth, nitrogen and phosphorus accumulation of maize plants under green house condition in the same soil. There were four treatments, uninoculated control and three phosphate solubilizing bacterial inoculations, *viz., Pseudomonas striata, Burkholderia cepacia* and *Serratia marcescens*. The inoculated plants showed the higher plant height, total dry mass, nitrogen and phosphorus accumulation when compared to uninoculated control plants in both experiments. In the combined data analysis from two experiments, the plants inoculated with *P. striata* and *B. cepacia* were recorded significantly higher plant height, total dry mass and P accumulation when compared to *S. marcescens* inoculated plant and uninoculated control plants. The *P. striata* and *B. cepacia* inoculation enhanced the total dry matter accumulation by 14 % and phosphorus accumulation by 25% over the uninoculated control plants. The nitrogen and phosphorus concentration of maize plants were also increased due to MPS bacterial inoculation, however, the effect was not significant.

· The effect of phosphate solubilizing microbes (PSM) on plant P uptake and growth in rock phosphate applied soil was tested under a greenhouse condition. Tobacco plants were grown in nonsterilized soil inoculated with *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa with or without rock phosphate application as P fertilizer. Phosphorus concentration in tobacco plants was increased by the application of rock phosphate, and inoculation of soil with PSM further significantly increased P concentration in tobacco plants compared with treatments noninoculated. Phosphorus uptake by tobacco plants were also increased by application of rock phosphate and PSM inoculation, and the increase was significant compared with rock phosphate treatment (P

≤0.05). Growth of tobacco plant was significantly increased in the treatments receiving rock phosphate, and combined application of rock phosphate and PSM further increased plant growth. The positive effect of PSM inoculation on plant growth was closely related to the enhancement in plant P concentration and uptake. These results suggest that *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa can solubilize insoluble soil phosphates and rock phosphate, and promote growth and P uptake of tobacco plants.

· It is now widely accepted that immobilized microbial cells can overcome some of the problems associated with microbial survival, stability, efficacy, storage, transportation and ease of application in agricultural environments. *Pantoea agglomerans,* a phosphate solubilizing bacterium, was immobilized in alginate, agar and gelatin carriers. All the three immobilized carriers with bacterial cells of *P. agglomerans* were compared for solubilization of tricalcium phosphate in pure liquid cultures. While alginate beads were tested for phosphate solubilization on alternate days up to five days, agar beads and gelatin cubes were subjected for one time phosphate solubilization analysis after seven days. Both alginate and agar immobilized cells of *P. agglomerans* exhibited higher efficiency in increasing the solubilization of tricalcium phosphate than gelatin-immobilized cells. The culture filtrate of alginate beadinoculation treatment registered a rapid increase in soluble phosphate concentration upon incubation. A corresponding decrease in the pH of the medium was also observed in all the treatments.

· *Pantoea agglomerans*immobilized in alginate solubilized four different rock phosphates efficiently under *in vitro* conditions. The solubilization pattern differed according to the rock phosphate source, where maximum solubilization of Morocco and Tunisia rock phosphates (215.6 and 186.1 mg

L^{-1}) on 6 days, Israel rock phosphate (60.98 mg L^{-1}) and tricalcium phosphate (132.3 mg L^{-1}) on 10 days and China rock phosphate (48.8 mg L^{-1}) on 12 days after inoculation was observed. The shelf life of the immobilized bacteria immobilized beads stored in two different temperatures was studied for six months. Beads stored at both room temperature as well as cold storage (4℃) were found equally good in supporting the bacterial population as well as phosphate solubilizing activity. *P. agglomerans* immobilized in alginate might be exploited for large-scale biosolubilization of rock phosphates intended for fertilizer use.

· A phosphate-solubilizing bacterium, *Pantoea agglomerans*, was isolated from rhizosphere soils collected from Chungbuk area. A greenhouse experiment was conducted to study the effect of combined application of rock phosphate and *P. agglomerans* inoculation on plant growth and phosphate accumulation of rice (*Oryza sativa* L.). Apart from control that received no inputs, six treatments were planned as follows; 1) seed bacterization, 2) free cell inoculation and 3) bacteria immobilized beads inoculation, individually and in combination with 1 and 2.5 g of rock phosphate per pot. The results showed that plant growth and phosphate uptake were significantly enhanced as a result of bacterial inoculation. Bacterial inoculation in the form of immobilized beads and 1 g of rock phosphate was found to affect positively the rice plant growth and phosphorus accumulation than other treatments. The available phosphate concentration of the pot mixture also found improved as a result of *P. agglomerans* inoculation. A positive correlation was observed between the phosphate concentration in the pot mixture and phosphate accumulation in plant.

CONTENTS

Abstract ····· 2

Summary ····· 9

Contents (English) ····· 15

Contents ····· 16

Ⅰ. State of art and Research Goal ····· 17

Ⅱ. Research Scopes and Contents ····· 22

Ⅲ. Research Results and Discussion ····· 25

Ⅳ. Contribution to related research area ····· 84

Ⅴ. Application plan ····· 90

Ⅵ. New Research Information ····· 92

Ⅶ. References ····· 94

목 차

요 약 문 ····· 2

Summary ····· 9

Contents (영문) ····· 15

목 차 ····· 16

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 17

제 2 장 국내의 기술 개발 현황 ····· 22

제 3 장 연구개발내용 및 결과 ····· 25

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 84

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 90

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 92

제 7 장 참고문헌 ····· 94

제 1 장 연구개발과제의 개요

급속한 경제 성장과 인구의 도시집중 그리고 농산물의 수입개방 등으로 우리의 농업여건이 크게 변화되고 있고 이와 같은 현상은 금후 더욱 심화되리라고 생각된다. 종전의 우리 농업시책은 식량 자급을 위해 다비에 의한 최대 수확을 추구하였으나, 오늘의 농정 기본방향은 저비용에 의한 적정 생산과 소비자가 선호하는 고품질의 농산물 생산으로 대폭 전환되고 있다. 다수확을 추구하는 과정에서 비료의 장기간 과다 사용은 토양 생산성의 감퇴, 작물 수량의 감소 및 품질의 저하 등의 부작용을 초래하기도 했다. 토양에 처리된 비료 성분은 여러 가지의 생물학적 및 화학적 반응을 거치게 되며, 이러한 과정에서 비료 성분의 불용화나 유실 현상이 일어나게 된다. 비료에 들어 있는 가용성 인산의 일부는 식물이 흡수하며 나머지 많은 부분은 고정 또는 흡착되어 새로운 인 함유물질이 되고 이는 다시, 그러나 완만하게 일부가 식물에게 인산을 공급하게 된다. 1970년까지의 우리나라 논토양의 유효인산양은 60ppm에 불과하였으나 지속적인 인산비료의 투입으로 인하여 1995년에 이르러서는 128ppm으로 증가되었다. 특히 2모작 논에 신선채소, 과채류 및 기호작물 등 소득 작물의 도입으로 다양한 작부체계가 형성되고 있어서 연간 2~3회 이상의 인산, 칼리를 함유한 복합비료와 유기질 비료의 시용이 이들 성분의 축적요인이 되고 있다.

그러나, 이러한 토양 중 비료성분의 증가에도 관계없이 1960년대의 일반벼 표준시비량인 인산 7kg/10a를 현재까지 일괄적용하고 있어 토양 중 유효인산은 배수 또는 지하침투에 의한 수질오염원이 되는 등 토양환경보전에 불리한 영향을 미치고 있다. 인산비료의 작물체 흡수율은 10~20%에 불과하여 토양에 흡착, 축적되어 있는 인산량은 유효인산량의 몇 십배, 몇 백배에 이를 것으로 사료된다.

또한, 인산 비료의 시용은 유실되는 비료 성분량을 증대 시켜 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져오고 있다. 인구 증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용률의 증대에 따라 이러한 부영양화 현상은 매우 심각하며, 최근의 근해 적조 현상 등은 부영화된 지표수의 유입이 그 한 원인으

로 생각되고 있다. 따라서, 비료의 생산비 부담이나 시용에 따른 노동력 절감에 더하여 환경 보전적 영농 시스템을 지향해야 하는 시점에서 이러한 방향에 부합하는 새로운 형태의 비료 및 화학 비료의 효율을 높일 수 있는 토양 미생물의 효과적인 이용 기술의 개발은 매우 절실하다.

토양에 들어 있는 인산의 형태는 크게 무기 인산염, 유기 인산화합물, 흡착된 인산, 용액 중의 인산 등의 네 가지로 구분된다. 무기태의 인산염은 정인산염으로서 대부분 잘 용해되지 않는 염류이다. 인산과 결합하는 금속원소로는 Ca, Fe 및 Al이 중요한 것이나 각각 그 금속과 형성하는 염의 종류는 다양하다. 토양용액에 있는 인산이온이나 비료의 가용성 인산은 토양 안에서 비교적 빠르게 불용성 염이 되거나 흡착된다. 흡착체에 의한 인산이온 $H_2PO_4^-$과 HPO_4^{2-}의 흡착은 편의상 특이적인 것과 비특이적인 것으로 구분한다. 특이적 흡착은 인산이나 규산 이온 등의 음이온이 점토광물과 산화물 흡착체 표면의 Al원자와 Fe원자 사이의 강한 친화성에 의하여 이들 원자의 배위각 안에 침입해 OH^-와 $(OH^+)^{2-}$배위자를 그 각으로부터 내쫓는 배위자 교환(ligand exchange)에 의하여 Al 또는 Fe원자와의 사이에 하나, 또는 그 이상의 산소다리결합을 통하여 인산이온이 결합되는 것이다. 특히 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄 이온 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주원인이 되고 있다. 앞으로 우리가 지향해야할 농업은 환경친화적이고 부가가치가 높은 무공해 농산물을 생산하는 영농 시스템이다. 따라서 인산비료의 시용을 대체할 수 있고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 가장 바람직한 방법은 인산가용화 미생물을 이용하여 토양 속에 다량으로 축적되어 있는 불용성 인산태를 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다. 인산가용화 미생물을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizers)의 개발노력은 부단히 이루어져 왔다. 이미 1950년대에 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며 평균 10%의 수량 증가를 보았다. 1980년대는 특정 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 인산

가용화균을 생물비료로 사용했을 때 곡물류, 콩과식물류, 감자류, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고 되고 있다.

인광석은 인산질 비료원으로 토양에 직접 시용하려는 시도는 오래 전부터 이루어져 왔는데 작물에 대한 효과는 인광석의 가용성 정도에 따라 다르고 가용성 가용율이 높은 인광석은 중과석과 비슷한 효과를 나타냈으며 가용성이 중간정도인 것은 포장이나 온실시험에 적합하고 가용율이 낮은 인광석 원광은 생육기간이 긴 작물이나 연년생작물에 시용하는 것이 보다 효과적이라고 하였다. 그러나 작물체에 인광석 단독처리는 가용화속도가 늦어 충분한 양분공급의 제한요인이 되고 있다.

인산은 작물 생산에 필수적인 요소 중의 하나이며, 높은 작물 생산량과 토양 생물군 본연의 작용을 위해 충분한 양을 필요로 하는 중요한 식물 영양소이다. 평균 토양에서 P 함량은 0.05%(w/w)이며, 전체 인산의 0.1%만 식물에게 유용하다. 또한 화학비료의 형태로 토양에 공급되는 인산이 이용효율은 매우 낮다. 왜냐하면, 시비된 인산의 대부분이 산성 토양에서는 Al^{3+}나 Fe^{3+}와 결합하고 알칼리성 토양에서는 Ca^{2+}와 결합하여 불용화되기 때문이다.

토양의 불용성 인산 가용화균의 역할은 최근 10년 동안 농업과 관련된 생명공학 면에 있어서 매우 중요하게 평가되었다. 생물권에서 인산의 순환은 토양에서 용액상태 혹은, 침전상태로 존재하기 때문에, 대기와 서로 교환되지 않는다. 미생물은 자연적 인산 순환에서 매우 중요한 역할을 한다. 특정한 토양미생물은 불용성 인산화합물을 orthophosphate ions($H_2PO_4^-$, HPO_4^{-2})의 무기 인산으로 용해하는 능력을 가진다. 이러한 인산 가용화의 주요한 미생물적 과정은 작물 근권에서의 유기산 분비, chelation 및 치환 반응에 의하여 일어난다. 많은 미생물이 국내·외에서 tricalcium phosphate, dicalcium phosphate, hydroxyapatite, rock phosphate, iron and aluminium phosphates와 같은 불용성 무기 인산 화합물을 가용화 시키는 것으로 보고 되었다. 한국 토양의 불용성 인산 화합물은 주로 Ca뿐만 아니라 무기물, 특히, Al과 Fe에 고정되어 있으며 이들을 효과적으로 가용화하여 농업적으로 이용하기 위해서는 불용성 인산을 용해시키는 인산 가용화균의 선발부터 이용까지 새로운 방법이 요망된다. 기존의 국내·외의 많은 연

구 결과에 따르면 *Pseudomonas, Bacillus, Burkholderia, Aachromobacter, Agrobacter, Erwinia*와 같은 bacteria 종은 인산 가용화능을 가진다고 보고 되었다. 또한 인산 가용화균의 접종은 작물체의 인산흡수와 생산량 증가를 나타내는 것으로 보고 되었다. 에를 들어 인산가용화능이 있는 *Bacillus* spp. 접종에 의하여 작물의 인산 흡수와 생산량이 동시에 증가하였다는 보고가 있으며 *Pseudomonas putida*의 접종으로 지상부의 성장이 촉진되었고, canola에서는 ^{32}P로 라벨된 P의 흡수가 증가하였다. 인산 가용화능을 나타내는 *Pseudomonas striatam* 처리에 의하여 인산흡수의 증가 및 곡물과 건물 생산량이 현저하게 개선되었다. 이러한 보고에 비추어 인산 가용화균은 식물에 의한 인산 흡수 증가를 통한 식물 생장에 중요한 역할을 하기 때문에, PGPR로써 인산 가용화균의 사용은 농업적인 작물에 중요한 공헌을 할 것이다.

즉, 다른 주요한 영양성분과 비교하여, 인산은 대부분의 토양 조건에서 아주 적은 유동성을 가지고 전체적으로 존재하는 양에 비추어 매우 적은 양이 식물에 이용된다. 무기인산은 다양한 토양광물에 많거나 혹은 적은 비율로 강하게 유지하여 높은 비율을 이루지만 토양 용액에서는 낮은 농도로 존재한다. 그러므로 이러한 불용인산을 토착미생물을 이용하여 식물체가 이용할 수 있는 가용 형태로 전환시키는 방법은 화학비료의 사용을 줄이고 비료의 효율을 높일 수 있는 친환경적 농업기술의 일환이 될 수 있다.

또한 인광석분말은 외국에서는 인산비료로 사용 되고 있으나 용해도가 매우 낮기 때문에 식물이 쉽게 이용할 수 없다. 그러나 인광석분말을 인산가용화균과 함께 사용하여 가용화 되는 양을 늘릴 수 있다면 인광석을 가공하지 않은 인산비료로 국내에서도 사용이 가능하리라 판단된다.

이러한 인산가용화 미생물 연구와 더불어 토양의 시비관행에 따른 인산의 축척 양상, 미생물분포, 밀도 및 토양효소의 변화 등은 인산가용화균의 사용방법 및 토양인산관리에 매우 중요한 정보를 제공한다. 즉, 작물계의 토양에 퇴비 및 화학비료와 같은 외부 인산 시비량은 종종 작물에게 있어 인산 uptake양을 넘어선다. 이런 잔여물은 화학적으로 안정화되고 불용성 상태로 토양에 축적되어 오랜 시간이 지난 후 식물이 이용할 수 있는 형태로 될 수 있다. 식물에 의한 불용

인산의 이용률은 토양의 다양한 생물학적 및 이화학적 성질에 의해 좌우된다. Iron과 Al의 수산화물, 결정체 또는 비결정체의 Al silicate와 calcium carbonate는 인산고정과 불용성 인산을 만드는데 주요한 토양의 mineral이다. Humus는 일반적으로 negatively charge를 갖고 있어 인산을 자체적으로 인산을 고정하지 못한다. 그러나 이것들이 Fe^{3+}, Al^{3+}, Ca^{2+}와 함께 결합됨으로써 결과적으로 인산을 고정하게 된다. 토양속의 무기물과 유기물로 고정된 인산은 토양미생물과 인산효소에 의해 가용화된 다음 식물이 이용할 수 있게 만들어준다. 인산의 형태가 고정되었을지라도 인산이 가용화 되면, 작물에게 이용되어지고, 인산은 또 시간에 흐름에 따라 고정되어 이용력이 낮아진다. 그 결과로 해마다 계속되는 과량의 인산시비는 최적의 인산 공급을 위해 필수적으로 되었고, 경작 하는 토양 속에 인산이 많이 축적 되었다. 토양의 인산 축척물은 다양한 형태로 분포된다. 다양한 인산 형태의 농도를 분석하여 보면 인산과 biosolids의 결합이 누적되어 직선 모양으로 관련되어 있다. 미국의 집약적 농장 지역에 인산 잔여물이 토양에 과다하게 축적됐음을 확인되었고 그 결과로 생기는 runoff의 손실 가능성도 증가되었다.

그러므로 장기간 인산을 관리하는 방법은 농업 생태계에 되풀이되는 퇴비 및 화학비료에 의한 인산비료의 투여로 토양에 남아있는 인산을 확인하는 것이 중요하다. 장기적인 퇴비 및 화학비료의 시비로 인한 토양 인산의 형태 변화는 인산의 이용률 뿐만 아니라 토양에서 일어날 수 있는 인산의 고정 및 이동이 환경에 중요한 필요사항이 된다.

토양 효소와 미생물의 활동은 비료와 퇴비의 시비에 의해 영향을 받으며 생태학적 안정성의 척도로 사용될 수 있다. 미생물과 토양 효소 즉 dehydrogenase, urease, acid phosphatase, arylsulphatase의 활성은 토양에 장기간 사용된 비료와 퇴비에 의해 결정된다. 이러한 미생물 활성의 연구는 미생물 제제를 토양에 사용시 매우 중요한 요인이 된다.

제 2 장 국내의 기술 개발 현황

미생물을 이용한 비효 증진 방법을 개발하려는 시도는 부단히 이루어져 왔다. 1950년대 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화 시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며, 평균 10%의 수량 증가를 보았다. 또한 미생물을 이용한 생물비료의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 근균과 리조비움이 주로 연구되어 세계 약 30개 업체에서 생산하고 있으며, 미국 미주리대학에서는 균근과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다. 미생물을 이용한 인산비효 증진연구는 세계적으로 다양한 균이 분리되어 연구되고 있으며 특히 인도에서는 “Biophos” 라는 이름으로 상용화되어 농가에서 사용하고 있다.

국내에서도 인산축적의 문제점 대두와 환경 친화적 시비기술의 필요성이 요구됨에 따라 인산가용화균 연구가 시작단계에 있다. 일부업체에서 외국에서 수입한 미생물을 그대로 증식하여 유통하고 있으나 미생물이 제제화 되지 않았기 때문에 생존력이 매우 저하되어 실효를 거두지 못하고 있으며 작물 시비효과도 검정되지 않고 있다. 본 실험실에서도 균주 분리를 시작하여 현재 5종의 균주(*Bacillus polymixa*, *pseudomonas strata*, BRPS-116, 207, 419)를 보관하고 있다. 그러나 국내 대부분의 연구가 토양특성을 무시하고 Ca-P 가용화균에 연구가 치우쳐 국내토양에 많은 Al-P 및 Fe-P 가용화균에 대한 연구는 전무한 실정이다. 또한 대량배양기술, 다양한 토양을 대상으로 한 재배실험이 미흡하여 실용화에는 미치지 못하고 있다

대부분의 인산가용화균(bacteria와 fungi)은 토양으로부터 분리되며 그것들의 인산 가용화능은 $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$등의 P-source를 이용하여 측정된다. 이전의 연구에서는 Picovskaya's medium을 사용하였으나, 최근에 와서는 basal medium을 이용하여 균주를 선발한다. 이러한 균은 불용성 인산염이 들어 있는 고체 배지에서 colony의 주변에 투명대를 형성하는 능력을 가지며, 불용성 인산가용화균으로써 동정되어진다. 투명대는 pH감소와 유기산의 생성으로 인한 산성

화에 의하여 불용성 인산을 용해시킴으로써 형성되는 것이다. 그러나 투명대는 $Ca_3(PO_4)_2$를 포함하는 고체배지에서는 형성되지만 $FePO_4$, $AlPO_4$를 포함하는 고체배지에서는 형성되지 않았다. 많은 균주 선발을 연구하는 연구자들은 agar plate에서는 투명대가 형성되지 않았으나 액체 배지에서는 많은 불용성 인산 ($FePO_4$, $AlPO_4$) 을 가용화 시킨다고 보고하였다. 즉, 대부분의 균주는 일차적으로 Picovskaya's medium을 이용하여 투명대가 형성됨을 근거로 분리하였고 이렇게 분리된 균주는 연속적으로 $FePO_4$, $AlPO_4$가 포함된 액체 배지에서 가용화능이 측정된다. 그러나, 결과적으로 이러한 균주는 $FePO_4$, $AlPO_4$의 인산 가용화능이 높게 나타나지 않았다. 지금까지 보고 된 바에 의하면 대부분의 인산가용화균이 $Ca_3(PO_4)_2$의 인산가용화능은 높지만 $FePO_4$, $AlPO_4$의 인산가용화능은 높지 않는 것으로 나타났다. 아마도 $FePO_4$, $AlPO_4$의 인산 가용화 균의 선별 방법이 부족하기 때문일 것으로 추측되며, 최근의 연구에서는 다른 종류의 배지와 pH 지시약을 이용하여 $FePO_4$, $AlPO_4$의 인산 가용화 균을 효과적으로 선별하기 위한 새로운 방법이 시도되고 있으며 또한 개발되어야 한다.

일반적으로 토양에 인산가용화균이 존재하지만, 일반적으로 그것의 비율은 근권토양에 존재하는 다른 미생물과 경쟁하기에 충분하지 못하다. 현재까지 여러 가지 종류의 인산가용화 fungi와 bacteria의 접종이 식물 성장 및 생산량증가에 대한 연구가 보고 되었다(Taha et al., 1969; Azcon et al., 1976; Khan and Bhatnagar, 1977; Banik nad Dey, 1981; Jisha and Algawadi, 1996; Gadagi et al., 2003). 식물 근권토양에 존재하는 미생물의 상당한 수는 식물의 생장과 발달에 유익한 영향을 미칠 수 있다. 이러한 미생물의 분리와 이용은 농업생산성의 향상 및 친환경농업 구현을 위하여 국내, 외적으로 활발히 진행되고 있다.(Rodriguez and Fraga, 1999). 즉 생물비료로써 인산 가용화 미생물을 이용한다(Goldstein, 1993). 생물비료의 효율향상, 유효기간연장, 운송의 용이함 및 경제성을 고려하여 다양한 형태의 담체 (peat, lignite, soil-sand mixtures, vermiculite, perlite , agar, k-carragenan, alginate, gelatin, PAG(polyacrylamide gel)를 이용하는 연구가 진행되고 있으나 국내에서는 미미한 실정이다.

Gel carriers를 cell entrapment에 의해 고정화한 방법은 Rhizobium에 적용되어

field에서 효능이 인정되었다(Van Elsas and Heijnen, 1990) 또한 최근에는 식물 성장에 도움이 되는 미생물 복합체용 담체의 연구가 광범위하게 진행되고 있다 (Bashan, 1998; Deelereck et al., 1996; Vassilev et al., 2001). 일반적인 고정화 과정은 미생물 배양 후 matrix 형태로 고정화하여, 작은 부피에 높은 미생물의 농도를 안전하게 유지하게 만들어내는 것이다(Fedirici, 1993). 미생물의 고정화 기술의 이점은 각각의 담체에 따라 다를 수 있고 또한 장단점이 있으므로 각각의 특성 비교 연구가 진행 중이다.

농업에 사용되는 미생물의 고정화는 보관, 운송 뿐만 아니라 시비 후 토양내에서 환경적인 스트레스로부터 미생물들을 보호하는 것과 서서히 토양으로 미생물을 방출하는 것과 같은 많은 이점을 갖고 있으므로 고정화 기술의 선택과 재료의 뒷받침은 고정화의 단점을 최소화하기 위해 필수적이다. 세포를 고정화시키기 위한 가장 알맞은 방법 중 하나는 calcium alginate을 이용하는 방법이다. 이 기술은 간단하고, 쉽기 때문에 여러 미생물을 대상으로 국내외에서 많은 연구가 보고되었고. 생물분자들과 미생물들의 고정화 모형으로써 적절하다. 최근에는 이 기술이 즉, 인산가용화 미생물 등 농업유용미생물 연구분야에서 사용범위가 확장되어지는 경향이다.

제 3 장 연구개발내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용

장기간에 걸친 시비가 논토양의 인산의 존재 형태 및 축적량을 조사하기 위하여 밀양시 영남 농업 기술원에서 1967년 이래로 운영되고 있는 연영구를 실험지역으로 선정하였다. 이 지역은 6월과 9월 사이에 비가 많이 내리고 강수량은 약 1230mm에 이르며 최고, 최저 대기온도는 각각 30.6℃와 -6℃이었다. 토양은 Deogpyeong series (a fine clayey, mixed, mesic Aquic Hapludults)로 분류되었다.

40여년간에 걸친 동일비료 처리구에서 무비구(control), 퇴비 단용처리구(compost), 화학비료 단용처리구(NPK fertilizer) 및 퇴비 및 화학비료 복합처리구(compost + NPK fertilizer) 등을 실험대상 처리구로 설정하였다. 장기간에 걸친 시비수준은 N, P_2O_5 및 K_2O는 각각 150, 100, 100kg ha^{-1} 이었으며 퇴비처리 수준은 는 10 Mg ha^{-1}이었다. 토양시료 채취는 3반복으로 하였으며, plot의 size는 8m × 6m로 하였다. 포장관리는 보통 벼를 6월에 이식하였고 10월에 수확하였다. 전체 식물에서 뿌리만을 제외하고 모두 수확하였고, 수확 후 다음 벼경작까지 휴경지로 남겨 두었다.

일반적인 토양 화학특성과 인산의 상태 평가를 위해 Ap horizon (0-15 깊이)에서 토양시료를 채취하여 2mm의 체로 쳐서 실내온도에 보관하였다. 토양유기물은 dichromate oxidation법, 토양의 pH는 토양과 물을 1:5로 혼합하여 유리 전극봉을 사용하여 측정했다. Exchangeable cations는 1M ammonium acetate로 추출하여, atomic absorption spectrometry를 사용해서 측정하였다. 인산은 acetic acid와 ammonium fluoride용액으로 추출한 후 전인산은 70% perchloric acid를 이용하여 분해한 후 molybdate-ascorbic acid 방법으로 인산을 정량하였다. 유기인산은 토양 sample을 550℃에서 처리한 후 0.5M H_2SO_4로 인산으로 추출하여 정량하였다. Chang과 Jackson의 방법에 따라 무기 인산(Al-P, Fe-P와 Ca-P)은

각각 0.5M의 NH_4F, 0.1M NaOH, 및 0.5M H_2SO_4로 추출을 하여 분류, 정량하였다.

토양 효소의 활성과 미생물 밀도를 측정하기 위해 채취한 토양시료는 풍건 전에 냉동 보관하였다. 토양효소활성 측정방법은 dehydrogenase의 활성은 formazan release method (Casida et al.)를 이용하였고, acid phosptatase (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase EC 3.1.3.2; pH 6.5; 37℃)와 urease (Urea amidohydrolase EC 3.5.1.5; NH_4-N release method; pH 9; 37℃) 는 Tabatabai and Bremner의 방법을 이용하였다. Arylsulfatase (arylsulfatase sulfohydrolase EC 3.1.6.1; pH 5.8; 37℃)는 Tabatabai의 방법에 의해 측정하였다.
미생물의 밀도는 serial dilution plate count technique의 사용으로 측정하였다. Total bacteria, fungi와 actinomycetess는 각각 agar, rose bengal agar 및 Kuster´s agar 배지를 이용하여 계수하였고, free living N_2 fixers는 Norris N-free agar를 이용하여 계수하였다.

인산가용화균의 효율적인 분리를 위하여 Picovaskaya's medium, Reyes's medium, 및 Modified basal medium 에 pH지시약 bromo cresol green (BCG)과 bromo phenol blue (BPB)를 첨가하여 새로운 배지를 개발하였다. 각각의 pH지시약을 70% ethanol을 이용하여 0.5% stock solution으로 만들고 pH는 1N KOH를 이용하여 6.5로 맞춘 후Picovaskaya's agar, Reyes's agar 및 Modified basal agar media 100mL에 stock solution 0.5mL씩을 첨가하여 멸균한 뒤 petri plate에 분주하였다. 배지의 효율성을 비교하기위하여 실험에 사용된 미생물은 *Pseudomonas striata* PSB-17과 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa/IMI 387080이었으며 *Pseudomonas striata* PSB-17는 인도의 옥수수 근권 토양에서 분리된 것을 분양 받았고, *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa는 국내 벼의 근권 토양에서 $AlPO_4$가 포함된 Reyes's basal medium을 이용해 분리하였으며, 이들을 PDA에서 3일동안 키운 다음 5 mm agar plug를 이용하여 modified medium이 들어있는 petri dish에 접종하였다. 접종 후 37℃에서 48시간 동안 배

양한 후 투명대와 colony의 크기를 측정하였다.

근권 토양에서 인산가용화균의 분리는 충북지방의 여러 지역으로부터 다양한 작물의 뿌리를 근권 토양과 함께 채취하여 사용하였다. 근권 토양을 연속적으로 희석하여 $AlPO_4$ 와 $FePO_4$ 에 BCG가 포함된 Reyes's basal medium plate에 배양하였다. bacterial colony들은 배지 위에 넓은 투명대를 형성하여 이를 근거로 선별되었고 투명대를 형성하는 하나의 colony를 순수 배양 하여 다음의 인산 가용화 실험에 사용하였다.

1차 분리균주의 인산가용화능, pH의 변화, 유기산생성능 측정을 위하여 각각의 P-source로 $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$가 포함된 100mL flask (Reyes's basal medium 50mL) 에 접종하였다. 접종 후 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배지의 인산농도는 Murphy and Riley(1962)방법에 의해 측정하였고 pH는 배양이 끝난 직후 측정하였다. 유기산은 organic acid column을 이용한 HPLC를 이용하여 측정하였으며 이동상은 이동속도가 H_2SO_4 (0.1%)(이동속도: 0.5ml/min)를 사용하였다.

인산 가용화능에 미치는 탄소 및 질소원의 영향 평가 실험에서는 실험실에서 분리한 균주 중 인산가용화능이 우수한 것으로 확인된 *P. oxalicum* CBPS-Tsa를 사용하였다. 배지에 여러가지 탄소원 (glucose, sucrose, mannitol)을 30g/L 수준으로 처리하여 탄소원의 영향을 비교하였고, 질소원으로는 arginine, ammonium chloride, ammonium sulphate, potassium nitrate 및 sodium nitrate를 10nM 수준으로 사용하였다. PDA에 균주(*P. oxalicum* CBPS-Tsa,)를 접종한 후 30℃에서 7~10일 동안 자라게 하여 4℃로 보관하였다. 이 균주(*P. oxalicum* CBPS-Tsa, (지름 4mm))를 Ca-P, Al-P, Fe-P가 각각 5g/L가 첨가된 Reyes 기초 배지에 접종한 후 120rpm, 30℃에서 7일 동안 배양, 유지하였다. 7일이 지난 후 10분간 원심분리 (4℃에서 10,000 rpm)하고, 상등액을 0.45 M Millipore filter에 통과시킨 후 인산농도와 pH를 측정하였다. 배양액의 pH는 pH meter에 연관된 유리 전극봉을 직접 담가서 측정하였으며 유리인상의 농도는 chlorostannous-molydbophosphoric acid 방법을 이용하여 발색 정량하였다.

인산 가용화균 (*Pseudomonas striata, Burkholderia cepacia* 및 *serratia marcescens*)의 작물체 접종효과는 옥수수를 공시작물로 pot에서 수행되었다. 각 bacteria를 50mL nutrient broth에서 48시간 배양 후, 다시 1L Erlenmeyer flask (500mL nutrient broth)로 옮겨 28℃로 5일간 배양하였다. 각 접종을 위한 세균수는 10^8CFU/mL이었다. 재배용토양은 충북대학교의 농장으로부터 채취하였으며 토양의 실험 전 화학적 특성은 표1과 같다. 토양은 7일 간격으로 2번씩 멸균하였으며, 각 pot(10×10cm)에 멸균된 토양 500g을 채웠다. 첫 실험 완료 후 (1차 수확), 각 처리구에 1차 재배시와 동일한 미생물을 처리하여 2번째 실험에 사용하였다. 옥수수의 종자(*Zea Mays*)를 파종 전 하루 동안 물에 침지 시킨 후 pot당 3개의 종자를 파종하였으며. 파종 15일 후 pot당 하나의 식물체를 남기고 솎아주었다. 첫 실험은 시비처리 없이 수행하였고, 2차 재배시에는 각 pot에 N과 K는 시비하였으나 P는 어떤 처리구에도 시비하지 않았다. 파종 45일후에 식물체의 높이, 건물량, N, P의 농도 및 체내 축적량을 측정하였다. 수확 후 작물시료를 70℃에서 건조 후 Wiley 제분기를 사용해 분말화 한 후, 질소와 인산의 농도는 각각, 표준 Kjeldahl method와 ammonium molybdate-ascorbic acid method를 사용하여 측정하였다. 실험의 결과는 software package DRYSOFT DISIGN를 사용하여 통계분석 하였다.

인산가용화균과 인광석의 복합처리 효과실험은 담배 (*Nicotiana tabacum* L., cv. NC-82) 작물을 공시하여 사용하였으며 4가지 처리(무비구, PSM만 접종한 것, 인광석 시비만 한 것, 인광석과 PSM를 함께 처리한 것)의 5반복 실험으로 수행하였다. 실험에 사용된 토양은 충북대학교의 농장으로부터 채취하였으며 토양의 실험 전 화학적 특성은 표2와 같다. 인광석은 중국산 (<1mm)을 사용하였고 총 인산량은 300g P_2O_5 kg^{-1}이었다. 질소, 인산, 그리고 칼륨 각각의 비율은 9.8, 5.3, 18.8kg $10a^{-1}$로 시비하였으며, urea, rock phosphate, potassium sulfate를 사용하였다. 담배종자를 vermiculite seeding bed에서 6주 동안 발아시킨 후 17kg-pot에 이식하였다. 담배 묘목을 이식한 다음, 준비한 PSM 균주20 mL (log CFU=7.0)을 뿌리조직 주위토양에 접종하였다. 실험은 온실조건하에서 수행하였으며, 처리구

표 1. P status, OM content and pH in soil used in this study before experiment

pH	Organic matter	Ava-P	Al-P	Fe-P	Ca-P	Total-P
	g kg^{-1}	----------	----------	mg-P_2O_5 kg^{-1}	----------	----------
5.51	8.79	433.96	377.44	239.89	102.93	1688.90
(±0.01)	(±0.69)	(±4.64)	(±12.32)	(±13.11)	(±5.78)	(±7.22)

표 2. Selected properties of the soil used in the study.

Texture	pH (1:5 H_2O)	Organic matter	Available P	Total P
		g kg^{-1}	--- mg P_2O_5 kg^{-1} ---	
Clay loam	5.5	17.7	204	909

는 난괴법으로 배열하였다. 담배 잎은 실험하는 동안 4번 (2002년 6월 11일, 18일, 24일, 7월 2일)수확하였다. 잎의 면적과 건물량은 각각 수확 시기마다 측정하였으며, 식물의 높이, 줄기의 건물량과 둘레는 마지막 수확시에 측정하였다. 측정값은 $p \leq 0.05$ 수준에서 Duncan's Multiple Range Test(DMRT)로 비교하였다.

토양 pH는 1:5(soil : water)비율의 현탁액을 유리 전극봉을 사용하여 측정하였고 유기물 농도는 Walkley-Black 방법(Nelson and Sommers, 1982)에 따라 측정하였다. Available P는 Bray No. I 방법(Olsen and Sommers, 1982)에 의해 측정하였다.

잎 면적은 수확 직후 leaf area meter (Model LI 3100, Licor, USA)를 사용하여 측정하였으며, 잎과 줄기의 건조 무게는 72시간동안 70℃에서 건조한 다음 측정하였다. H_2SO_4와 H_2O_2를 사용하여 잎과 줄기의 시료를 분해한 다음 인산의 농도는 spectrophotometer 를 사용하여 vanadomolybdate법으로 측정하였다.

분리한 인산가용화균의 제제화 실험은 실험과정에서 분리, 동정된 박테리아인 *P. agglomerans*를 이용하여 수행하였으며 제제화 물질로는 alginate, agar 및 gelatin을 사용하였다. Alginate를 이용하여 고정하는 방법은 다음과 같다. *P. agglomerans*를 30℃에서 120rpm으로 회전시켜주어 24시간동안 영양배지에서 배양한 후 cell 을 centrifugation (10,000 x g)에 의해 회수하고 무균수로 세척하였다. 최종 세포의 농도는 1 x 10^8cells / ml 로 조절하였고 고정화하여 사용되었다. Alginate를 이용하여 고정하는 방법은 다음과 같다. 배양세포 5ml에 autoclave 한 2.5%, 3.5%와 5% 각각의 sodium alginte 용액 20ml와 혼합하였고, 0.5M calcium chloride 용액에 압출시켰다. bead가 형성된 것은 4℃에서 1시간동안 경화시킨 후 무균수로 세척 후 보관하였다(Woodward, 1998).

Agar를 이용한 제제화 방법은 다음과 같다. 배양세포 5 ml를 2%, 3% 및 4% agar(Bacto Agar, Difco) 용액(40℃)에 혼합하였다. 혼합된 용액은 식물성 기름(corn oil) 200ml에 압출시킨 후 형성된 bead는 4℃에서 1시간동안 경화 시킨 후 무균수로 세척 후 저장하였다(Lopez et al., 1997).

Gelatin을 이용한 제제화 방법은 다음과 같다 Gelatin을 이용하여 고정하는 방법은 Gelatin을 물에 서서히 가열하여 용해시켜 5%, 10% 및 15% 수용액으로 제조한 후 용액의 온도는 35-40℃로 조절하면서 배양세포(1 x 10^8 cells/ml)를 혼합한후 경화 용액(20% formaldehyde, 50% ethanol and 30% water) 2ml를 첨가하했다. 그 혼합물을 부드럽게 vortexing 한 후 cross-linking를 용이하게 하기위하여 18시간동안 4℃에 보관 하면서 gel 형태를 완성한다. 대략 3.5mm의 작은 cubes가 만들어지면 무균수로 씻어주고 냉장고에서 보관하였다. (de Alteriis et al., 1985)

제제화한 인산가용화균의 효능 검정은 다음과 같이 수행하였다. Pikovskaya's medium (100ml)에 0.5g의 Ca3(PO4)2를 추가한후 pH를 7.0으로 조절하고 121℃에서 살균하였다. Flask에 5개의 beads 또는 cubes (1 x 106 cell/bead 또는 cube)를 접종하고, 30℃에서 120rpm으로 회전하여 배양하였다. 접종 후 0일, 1일, 3일, 5일 때 꺼내어 상태를 검정하였으며, alginate, agar, gelatin이 고정화된 cells에 의한 tricalcium phosphate solubilization분석을 배양 7일후에 수행하였다. 원심분리(10,000 x g)를 통해 얻어진 상등액을 0.45㎛ Millipore 를 통과시킨 후 pH 및 인산 농도를 측정하였다.

Alginate를 이용하여 제제화한 *P. agglomerans* 를 이용하여 다양한 종류의 인광석을 대상으로 인산가용화능을 실험한 방법 및 제제화한 균주의 저장수명(Shelf life) 측정은 다음과 같이 행하였다. 박테리아 세포현탁액($1\times10^6 mL^{-1}$)을 20ml의 2.5%의 sodium alginate 용액에 섞어, 교반한후 0.5M $CaCl_2$ 용액에 압출시킨후 bead를 완전히 굳게 하기 위해서 24시간동안 4。C에서 저장하였다. 그 후에 bead를 멸균수로 세척후 실험에 사용하였다.

다양한 지역의 인광석(중국:CRP, 이스라엘:IRP, 튜니지아:TRP, 및 모로코:MRP)을 배지에 0.5%씩 첨가한후 각각의 플라스크에 플라스크당 5개의 bead를 접종하고 16일동안 30。C, 120 rpm의 rotary shaker에서 배양하면서 2일간격으로 sample을 채취하였다.

Shelf life의 측정연구를 위하여 bead를 실온과 4。C의 온도에서 6개월동안 튜

브에 저장하면서 30일 간격으로 인산가용화능을 측정하였다. 또한 임의적으로 선택된 10개 bead를 potassium phosphate buffer에 용해, 배양후, 그 bead를 Vortexer를 이용, 높은 속도에서 5~10분간 섞어 주었고, 일정량을 이용하여 세포수를 Nutrient agar 배지위에 plate count method로 측정하였다.

고정화된 인산가용화균 (*Pantoea agglomerans)*을 이용한 식물재배 시험은 벼(*O. sativa* L.)를 공시하여 수행하였다.. 또한 Free cell inoculum (FCI), Seed bacterization (BI)의 접종방법을 Bacterial Immobilization (BE) 방법과 효율을 비교하였다. Free cell inoculum (FCI)방법은 앞에 준비된 미생물(1m)l을 종자를 뿌린 pot에 접종하여 처리하였고, Seed bacterization방법은 종자를 1시간 동안 미생물에 침지시킨후 건조하여 pot에 파종하였다.

Pot 재배실험을 위하여 표면이 살균한 벼 종자(*O. sativa* L.)를 pot 혼합물(1:1:1 - vermiculite, perlite and peat) 60g을 pot(7 x 7 cm)에 파종하였다. 발아후 5일에 3개의 유묘를 솎아낸후 온실에서 재배하였다. 인광석은 1g/pot (CRP1), 2.5 g/pot (CRP2)의 수준으로 처리하였다. 실험처리구는 1) Uninoculated control, 2) BI + CRP1, 3) BI + CRP2, 4) FCI + CRP1, 5) FCI + CRP2, 6) BE + CRP2, 6) BE + CRP1 and 7) BE + CRP2 이었다. 파종후 30일과 60일에 수확하여 작물체의 높이, 생체량 및 건조후 건물량을 측정하고, 총 인산은 standard 방법 (Jackson, 1958)을 사용하여 측정하였다. 결과값은 ANOVA를 이용하여 통계처리하였다.

제 2 절 연구개발 수행 결과

· 장기간에 걸친 동일 시료의 연용은 토양 인산 축적 형태에 큰 변화를 나타내었다(표 3). 가장 높은 유효 인산의 농도는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서 나타났고 그 다음은 NPK화학비료 단용처리구에서 나타났다. 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서는 높은 인산의 시비수준이 토양의 높은 유효인산의 농도를 나타내는 원인이 될 수 있다. 이러한 결과들은 무기 비료 형태로 처리된 인산이 토양에서 좀더 쉽게 이용되어질 수 있는 형태로 남아있음을 나타내어준다. 토양 pH의 변화로 인하여 Al이나 Fe에 의한 인산염의 고정화는 감소되어질 것이고 표면 P의 탈착은 증가되어 질것이다. 퇴비 단용처리구, NPK화학비료 단용처리구, 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서 무처리구의 토양과 비교하였을 때 전인산의 농도를 증가시키는 결과를 가져왔다. 가장 높은 전인산의 농도는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서 관찰되었다(표 3). 인산의 과도한 투입은 높은 인산 축적의 주요 원인이 될 수 있고 이러한 결과들은 퇴비 + NPK화학비료의 복합처리가 불용성 인산의 양을 증가시키는 것임을 나타내어준다. Hooda et al. 등은 전인산의 증가는 오랜 기간동안 퇴비와 비료를 처리한 지역에서 발생한다고 보고하였다. Damodar Reddy 등은 또한 매년 퇴비나 인산 비료의 처리가 토양의 무기태 나 유기태 인산의 양을 증가시키는 것을 보고하였다. 퇴비나 화학비료 혹은 두 가지의 복합처리에 의해서 토양의 유기태 인산 농도가 증가하였다. 가장 높은 유기인산의 농도는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서 관찰되었다. 그 다음으로 NPK화학비료 단용처리, 퇴비 단용처리순으로 나타났으며(표 3) 무처리에서 가장 낮은 유기태 인산의 농도가 관찰되었다. 만약 인산 비료와 퇴비를 함께 처리한다면 과잉된 인산은 phosphorylase의 활성을 저해하고 연속적으로 무기화 과정을 방해하여 유기태 인산을 증가시킬 것으로 판단된다. 또한 수확 후 벼의 뿌리에서 유래된 토양 유기물의 장기 축적은 식물의 필요량보다 과잉으로 공급된 퇴비 + NPK화학비료가 복합 처리된 곳에서의 유기태 인산의 농도를 높이는 원인으로 생각된다. 토양에서의 전인산 농도가 증가한 것처럼 Al, Fe 그리고 Ca와 고정화된 인산염 농도도 증가하였다. 퇴비의 단용처리, 화학비료의 단용

표 3. Concentration of different P fractions in paddy soils after long-term annual applications of compost and chemical fertilizer

Treatment	Avail-P	Org-P	Al-P	Fe-P	Ca-P	Total-P
	(P mg Kg^{-1})					
Control	24.8	180.2	38.4	163.7	27.1	522.1
Compost	28.7	207.3	48.1	243.9	35.2	713.4
NPK	60.8	244.3	83.9	392.2	57.3	868.4
Compost+NPK	90.0	296.4	94.3	539.9	58.7	1158.5
$LSD_{0.05}$	7.0	34.1	5.6	33.7	15.3	46.7

처리 그리고 퇴비와 화학비료의 복합처리들은 무처리와 비교할 때 Fe-P와 Al-P를 증가시켰지만(표 3) Ca-P의 농도는 Fe-P 및 Al-P에 비하여 많이 증가시키지 않았다. 화학인산비료를 처리한 곳에서 Fe-P와 Al-P의 농도는 무처리나 퇴비를 처리한 곳과 비교하여 볼 때 상당히 증가하는 것으로 나타났다. 식물 요구량보다 과잉으로 투여된 인산비료는 고정된 형태로 축적되어질 수 있고 천천히 유효한 인산형태로 변할 수 있다. Fe-P, Al-P와 Ca-P의 농도는 퇴비 + NPK화학비료가 복합처리된 곳에서 가장 높게 나타나며 이는 아마도 높은 인산의 투입량 때문일 것이다.

전인산에 대한 각각의 토양인산의 형태별 비율은 표4와 같다. 유효인산의 비율은 전인산의 4.0에서 7.8%였고 화학비료를 처리한 곳에서 가장 높게 나타났으며, 무기태 인산비료의 시비는 유효인산의 농도를 크게 증가시켰다. Al-P와 Ca-P의 비율은 각각 전인산의 6.0에서 9.6% 및 5.0에서 6.6%로 나타났으며 모든 처리에서 약간의 차이가 있었다. 실험 토양에서 Fe와 고정된 인산의 비율은 전인산의 31에서 47%였고 전인산에 대한 유기태 인산의 비율도 모든 처리에서 높게 나타났다. 장기간에 걸친 지속적인 퇴비 단용 처리와 NPK화학비료 단용처리는 토양의 화학적 특성을 상당히 변화시켰다.(표 5) 토양의 pH는 무처리에 비해 퇴비 단용처리와 NPK화학비료 단용처리에서 0.1에서 0.3정도 증가하였으며, 가장 높은 토양의 pH는 퇴비 + NPK화학비료의 복합처리에서 나타났다. 퇴비 단용 처리구와 비교할 때 토양의 pH는 NPK화학비료 단용 처리에서 더 높게 나타났으며, 퇴비와 화학비료의 장기간 시비는 토양의 pH를 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Cox et al의 연구에서도 유사하게 나타났다. 토양의 유기물 함량은 무처리 토양의 유기물 함량과 비교해 볼 때 장기간의 퇴비 단용처리와 퇴비 + NPK화학비료 복합처리에 의해서 상당히 증가되었다. 가장 높은 유기물의 함량은 퇴비 + NPK화학비료가 복합 처리된 토양에서 관찰되었고 그 다음으로 퇴비 단용처리로 나타났다. 유기물 함량의 증가는 주로 퇴비의 처리 때문이라 할 수 있다. Albiach et al 과 Ouedraoggo et al 는 또한 퇴비의 지속적인 처리는 토양에서 유기물 함량을 늘린다고 보고하였다. 퇴비 단용처리와 NPK화학비료 단용처리는 토양의 치환성 양이온의 농도도 증가시켜 치환성 양이온 K, Mg, Ca들은 퇴

표 4. Proportion quantity of individual P fraction in total P measured in paddy soil after long-term applications of compost and chemical fertilizer

Treatment	Avail-P	Al-P	Fe-P	Ca-P	Org-P
			(%)		
Control	4.7	7.3	31.3	5.1	34.5
Compost	4.0	6.8	34.2	4.9	28.9
NPK	7.0	9.5	45.2	6.6	28.1
Compost+NPK	7.8	8.1	46.6	5.0	25.5
$LSD_{0.05}$	1.3	0.9	4.79	ns	3.6

표 5. Chemical properties of paddy soils after long-term annual applications of compost and chemical fertilizer

Treatment	pH (H_2O)	OM (%)	Exchangeable cations		
			K	Ca	Mg
			($cmol_c kg^{-1}$)		
Control	5.15	3.31	0.08	2.29	0.91
Compost	5.24	3.83	0.31	4.09	1.10
NPK	5.46	3.00	0.12	4.18	1.46
Compost+NPK	5.48	4.09	0.37	4.84	1.46
$LSD_{0.05}$	0.06	0.29	0.04	ns	0.05

비와 NPK화학비료 장기처리에 의해 증가하였다. 가장 높은 치환성 양이온 농도는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리에서 나타났으며 반면에 가장 낮은 치환성 양이온의 농도는 무처리구에서 관찰되었다.

· 토양 dehydrogenase는 토양의 물질대사 즉, 토양 microflora의 전체 산화 활동에 대한 지표라 할 수 있다. 따라서, 효소는 미생물의 활성에 대한 좋은 척도로 생각된다(Nannipieri et al., 1990). 퇴비 + NPK화학비료 복합처리는 가장 높은 dehydrogenase활성을 나타내었으며, 퇴비 단용처리와 NPK화학비료 단용처리가 뒤를 이었다(그림 1-A). 이 사실은 퇴비를 처리한 토양에 존재하는 많은 수의 bacteria, fungi, actinomycetess에 의해 입증되었다. 장기간 퇴비를 처리한 것이 NPK화학비료 단용처리와 비교해서 dehydrogenase의 활성이 증가하였으며, 이것은 dehydrogenase의 활성이 장기간의 NPK화학비료 시비에 민감하게 반응하며, 효소의 활성이 이러한 토양에서 다소 저해될 수 있다는 것을 암시한다. Kanchikerimath와 Singh는 26년간의 NPK화학비료의 과도한 시비로 인해 토양에서의 dehydrogenase의 활성이 크게 억제되었다는 비슷한 결과를 보고하였다. 그렇지만 퇴비와 함께 NPK화학비료를 시비했을 때에는 dehydrogenase의 활성이 증가되었다. 이것은 퇴비의 처리가 화학 비료에 의한 토양 효소 활성 억제 효과를 줄인다는 것을 암시한다. 퇴비의 처리는 토양에서의 유기물 수준을 개선하였고, 효소의 활성을 증가 시켰다. Beyer et al.역시 유사한 결론을 보고 하였다.
요소는 질소 비료로 널리 사용되고 있으며, 요소의 유효도는 요소가 두 개의 암모니아분자와 한 개의 bicarbonate로 분해되는 정도에 좌우된다. 이 화학적으로 어려운 반응은 많은 토양 박테리아에 존재하는 urease효소에 의해 촉진된다. 가장 높은 토양 urease의 활성 (418.2 mg NH_4-N/kg soil/hr)은 퇴비 + NPK화학비료 복합처리 에서 나타났으며, 그 다음이 퇴비 단용처리, 그 다음이 NPK화학비료 단용처리로 나타났다(그림 1-B). 퇴비 + NPK화학비료 복합처리는 토양 미생물의 수를 증가시키고, urease의 활성을 증가 시켰다. 가장 낮은 urease의 활성은 무처리에서 나타났다. NPK화학비료 단용처리와 퇴비 단용처리는 무처리와 비교해서 urease의 활성이 증가시켰다.

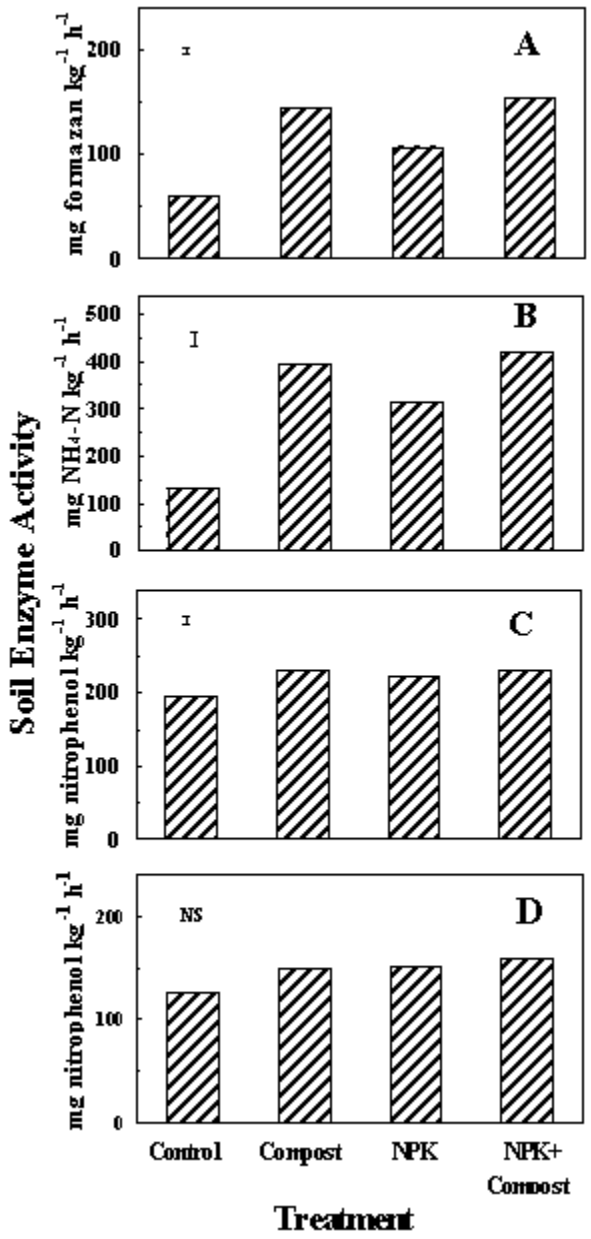

그림 1. Effect of long-term applications of fertilizer and compost on soil dehydrogenase(A), urease(B), acid phosphatase(C) and aryl sulfatase activity(D). (Small bar represents $LSD_{0.05}$)

토양에서의 유기인산은 phosphatase효소에 의해 분해되어 식물에게 유용하게 쓰인다. 많은 식물과 토양미생물은 식물에게 유용한 인산을 생성하는 phosphatase 효소를 만들어 낸다. 조사한 토양 중 가장 높은 phosphatase의 활성은 퇴비 + NPK화학비료 복합처리 (231.6mg nitrophenol/kg soil/hr)에서 나타났고, 퇴비 단용처리와 NPK화학비료 단용처리가 뒤를 이었다(그림 1-C). NPK화학비료와 퇴비에 의해 개간된 토양에서는 무처리와 비교해서 acid phosphatase의 활성이 증가하였다. Kanchijerimath and Singh는 phosphatase의 활성이 무처리와 비교해서 NPK화학비료와 퇴비를 시비함으로써 증가했다고 보고했다. 토양에 함유된 유기물의 증가는 효소의 활성을 증가시켰다. 본 실험에서 우리는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리한 토양에 가장 높은 유기물이 포함되어 있다는 것을 알 수 있었다. Ajwa et al.은 acid phosptatase의 활성이 비료를 주지 않는 토양과 비교해서 비료를 준 토양에서 증가했다고 보고하였다.

Arylsulfatase는 aromatic radical과 함께 유기 sulfate ester의 가수분해를 촉진한다(Tabatabai et al., 1970). 퇴비 + NPK화학비료를 복합처리한 토양에서 가장 높은 arylsulfatase의 활성이 관찰 되었으며, 그 다음이 퇴비 단용처리 그 다음이 NPK화학비료 단용처리 순 이었다(그림 1-D). 퇴비 단용 처리 토양은 높은 arylsulfatase의 활성을 나타내었다. Ajwa et al.은 장기간의 시비로 인해 arylsufatase 효소 활성이 비슷하게 증가되었다고 보고했다. 가장 낮은 arylsulfatase 활성은 무처리구에서 기록되었다.

토양 미생물의 개체수는 벼의 생리적 성장단계에 따라 차이를 보였다(표 6~9). 처음의 식물 생장 단계에서 미생물의 수는 크게 증가하지 않았으나 8월에 미생물수가 급격히 증가했으며 이는 벼의 번식단계와 일치했다. Fungi와 actinomycetess 그리고 N_2 fixers 또한 같은 경향을 보였다(표 6~9). 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구, 퇴비 단용처리구 그리고 NPK화학비료 단용처리구에서는 무처리구와 비교하여 높은 수의 bacteria, fungi와 actinomycetess 그리고 N_2 fixers가 존재함을 알 수 있었다.

가장 높은 미생물의 수는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리구에서 관찰되었고, 퇴비 단용처리구가 뒤를 따랐다. 그러나 퇴비 단용처리구에서는 NPK화학비료 단

표 6. Population dynamics of bacteria during cropping period of the paddy as influenced by the long term fertilizer and compost applications.

Treatments	may	June	July	Aug	Sept	Mean
			(x 10^6/g soil)			
Control	24.21	35.66	36.29	48.13	34.12	35.68
Compost	72.62	53.63	60.06	82.20	56.36	64.97
NPK	67.46	41.78	62.30	73.24	47.25	58.39
NPK + compost	77.78	83.10	78.82	97.01	78.69	83.08
Mean	60.51	53.54	59.36	75.13	54.10	60.53
	Treatment (T)		Month (M)		T x M	
LSD 0.05	6.08		6.80		13.60	

표 7. Population dynamics of fungi during cropping period of the paddy as influenced by the long term fertilizer and compost applications.

Treatments	May	June	July	Aug	Sept	Mean
			(x 10^3/g soil)			
Control	26.49	20.06	41.50	53.84	22.12	32.71
Compost	73.40	46.07	96.96	101.25	47.68	73.07
NPK	67.46	34.12	95.08	98.76	35.29	66.16
NPK + compost	101.59	47.78	119.87	130.48	50.27	89.99
Mean	67.23	37.08	88.35	95.57	38.97	
	Treatment (T)		Month (M)		T x M	
LSD 0.05	0.68		0.76		1.53	

표 8. Population dynamics of actinomycetes during cropping period of the paddy as influenced by the long term fertilizer and compost applications.

Treatments	May	June	July	Aug	Sept	Mean
			(x 10^2 /g soil)			
Control	32.54	17.09	28.55	35.90	25.15	27.84
Compost	54.76	38.52	55.72	67.69	45.21	52.38
NPK	53.17	29.25	49.18	59.06	38.12	45.75
NPK + compost	60.20	40.86	73.00	87.76	48.25	62.01
Mean	50.16	31.43	51.61	62.60	39.18	46.99
	Treatment (T)		Month (M)		T x M	
LSD 0.05	0.53		0.60		1.20	

표 9. Population dynamics of free-living N_2 fixers during cropping period of the paddy as influenced by the long term fertilizer and compost applications.

Treatments	May	June	July	Aug	Sept	Mean
			(x 10^3 /g soil)			
Control	40.48	52.75	63.17	77.31	51.25	55.99
Compost	68.25	114.05	117.22	130.44	98.25	105.64
NPK	57.14	91.92	116.81	122.18	84.24	94.45
NPK + compost	77.38	124.05	164.20	182.75	102.22	130.12
Mean	60.81	95.69	115.35	128.17	83.99	96.80
	Treatment (T)		Month (M)		T x M	
LSD 0.05	0.64		0.71		1.43	

용처리구보다 매우 높은 수의 미생물들이 관찰되었다. 무처리구는 타 처리구에 비해 적은 수의 미생물이 번식함을 알 수 있었다. 미생물의 개체수는 퇴비의 시비에 의해 증가하며, 이것은 토양 유기물 축적 때문이라고 생각한다(Benbi et al., 1998). 결론적으로, 효소와 미생물의 활성은 37년 동안의 NPK화학비료 단용처리 또는 무처리와도 비교했을 때 퇴비의 처리로 인해 크게 증가하였다. 이 결과는 생태계의 안정성은 퇴비 단용처리 또는 퇴비 + NPK화학비료 복합처리에 의해 유지된다는 것을 나타낸다. 작물 생산성에서 토양효소와 미생물의 활성의 이점은 식물이 이용 가능한 토양 영양분의 증가, 유기물에 의한 토양 물리성 개선과 비료 영양소의 효율성 증대에 있다고 할 수 있다.

· 인산가용화 균주인 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa와 *Pseudomonas striata* PSB-17를 이용하여 인산가용화 균을 선발하는 새로운 방법을 탐색하기 위하여 이들의 특징을 확인한 후 지시약을 이용한 분리방법을 고안하였다. 이전의 연구에서 이들 미생물들의 인산가용화능(특히 Al-P, Fe-P 용해는)이 액체 배지상에서 평가되어졌다. *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa는 배양 48시간동안에 tricalcium phosphate를 11%, Aluminum phosphate를 8.5%, 그리고 Iron phosphate를 3.1%가용화 시켰으며(표 10) 각각의 배지 pH가 초기 6.5에서 각각 2.35, 2.74 및 2.54로 감소하였다. *Pseudomonas striata* PSB-17은 tricalcium phosphate를 3.0% 그리고 Aluminum phosphate와 Iron phosphate를 각각 0.7%씩 가용화시켰고 pH 또한 4.27, 4.29 및 4.07로 감소함이 관찰되었다. Reyes's basal 배지에서 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa는 malic acid, oxalic acid 그리고 gluconic acid를 생성하였고, 유기산의 종류와 농도는 P source에 따라 다양하게 나타났다. 그러나 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa에 생성된 malic acid의 농도는 P-source에 관계없이 거의 일정하였다. Reyes's basal 배지에서의 *Pseudomonas striata* PSB-17에 의한 유기산은 오직 gluconic acid만 생성하였다. 배지의 pH의 감소와 관련된 두 균주의 유기산의 생성은 인산가용화에 기인하는 것으로 보였다(표 10).

이들 결과를 바탕으로하여 두 균주가 높은 인산가용화능을 가지고 있음을 확신

표 10. Organic acid production, phosphate solubilization and pH decrease in Reyes's basal liquid medium associated with microbial growth for 48h.

P-Source/Strains	pH[a]	Organic acids (m moles L^{-1})			Pi release[c]
		Malic acid	Gluconic acid	Oxalic acid	
$Ca_3(PO_4)_2$					
P. striata PSB-17	4.27	ND[b]	122	ND	29.70
P. oxalicum CBPS-3F-Tsa	2.35	145	55	160	190.92
$AlPO_4$					
P. striata PSB-17	4.29	ND	122	ND	6.60
P. oxalicum CBPS-3F-Tsa	2.74	144	67	111	85.64
$FePO_4$					
P. striata PSB-17	4.07	ND	52	ND	6.50
P. oxalicum CBPS-3F-Tsa	2.54	148	17	80	31.20

a : Initial pH 6.5

b : Not detected/produced

c : mg g^{-1}insouble P

하였으며, 인산가용화와 배지 pH의 감소 그리고 유기산의 생성사이의 정의 상관관계는 이미 보고 되어졌다(Reyes et al 1999; Whitelaw et al. 1999).

액체 배지에서 aluminum phosphate와 iron phosphate를 가용화시킨 두 균주 모두 tricalcium phosphate를 포함하는 고체배지에서 넓은 투명대를 형성하였지만 aluminum phosphate나 iron phosphate를 포함하는 고체배지에서는 투명대를 형성하지 못하였다. 이러한 결과들은 aluminum phosphate나 iron phosphate를 가용화시키는 균주를 선별하는데 있어 더 나은 방법을 필요로 함을 제시하여주었다. 현재의 연구와 이전의 결과들을 바탕으로하여 유기산의 생성과 pH감소는 aluminum phosphate와 iron phosphate의 주요 가용화 기작이라고 생각되었다(Illmer et al. 1995; Illmer and Schinner 1995; Reyes et al. 1999). 따라서 pH는 iron phosphate와 aluminum phosphate의 가용화와 관련된 중요한 요인이다. pH 지시약은 aluminum phosphate와 iron phosphate solubilizer를 선별하기위한 배지의 변형에 이용되었다.

두 균주는 BPB(bromo phenol blue)를 첨가한 배지에서보다 BCG(bromo cresol green)을 첨가한 배지에서 더 뚜렷한 투명대를 형성하였다(그림 2, 표 11). 이는 아마도 BPB가 실험에 사용된 미생물의 성장에 있어 저해적인 효과를 가지고 있기 때문일 것이다. BPB에 의한 인산가용화 곰팡이 성장의 저해는 다른 연구에서 또한 관찰되었다(Gupta et al. 1994). 따라서 BCG는 aluminum phosphate와 iron phosphate solubilizer의 선별 및 분리에 관한 연구에서 모든 배지에서 이용되어졌다. iron phosphate가 첨가된 배지와 비교하여 aluminum phosphate가 첨가된 배지에서 더 넓은 투명대가 관찰되었다. pH 지시약과 tricalcium phosphate가 포함되어있는 배지에서는 좁은 투명대가 관찰되었고 pH 지시약이 포함되지 않은 이전의 방법과 비교할 때 거의 유사한 결과를 얻었다. 이 유사성은 tricaicium phosphate solubilizer를 선별함에 있어서는 pH 지시약이 필요 없음을 제시해주었다.

pH 지시약은 또한 유용한 미생물들을 선별하는데 이용되어졌다. BPB가 포함된 Pikovskaya's 배지는(Gupta et al. 1994) calcium phosphate solubilizer를 선별하는데 있어 대안적인 방법으로 이용되었다. BTB가 포함되어있는 N-free malate

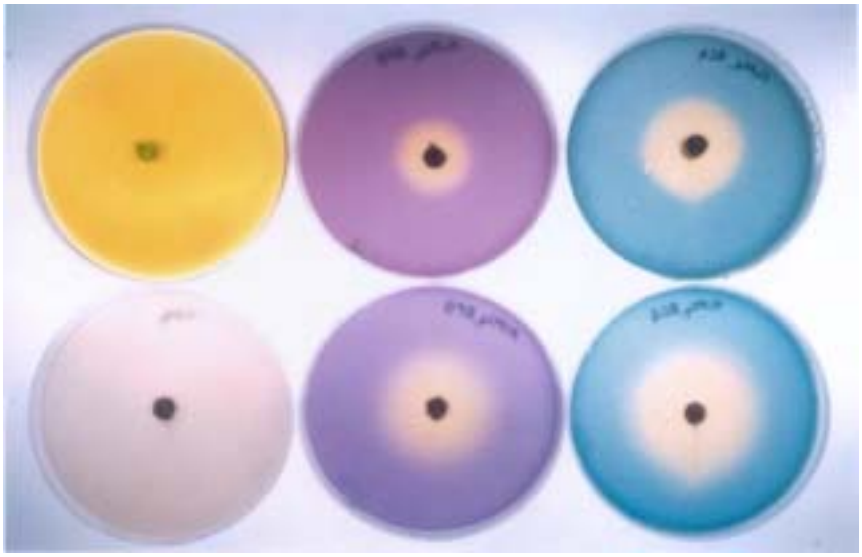

그림 2. Halo zone formation on the Reyes's basal medium with $FePO_4$ (A), $FePO_4$ + BPB (B), $FePO_4$ + BCG (C), $AlPO_4$ (D), $AlPO_4$ + BPB (E), $FePO_4$ + BCG (F) by *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa.

표 11. Colony diameter (mm) on different media with $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$ and $FePO_4$ due to microbial growth for 48 h

Media	P source	*Pseudomonas striata* PSB-17			*Penicillium oxalicum* CBPS-3F-T		
		BCG	BPB	Contrl	BCG	BPB	Contrl
Pikovaskaya	$Ca_3(PO_4)_2$	6.0	4.7	4.5	6.5	9.7	8.0
	$AlPO_4$	8.0	7.2	*ND	22.7	21.0	ND
	$FePO_4$	7.2	6.1	ND	19.0	17.5	ND
Reyes's Basal	$Ca_3(PO_4)_2$	9.1	8.0	7.1	10.0	12.0	10.5
	$AlPO_4$	14.5	10.2	ND	30.7	24.0	ND
	$FePO_4$	12.8	9.2	ND	34.7	26.5	ND
Modified basal	$Ca_3(PO_4)_2$	7.7	7.0	6.5	9.0	11.0	9.5
	$AlPO_4$	12.2	9.2	ND	29.5	19.0	ND
	$FePO_4$	12.2	9.0	ND	33.7	20.5	ND
		$LSD_{0.05}$ for media : 0.40			$LSD_{0.05}$ for media : 0.25		
		$LSD_{0.05}$ for dye : 0.32			$LSD_{0.05}$ for dye : 0.20		

Data: Mean of 3 replications

*ND: No halo zone formation

배지는 또한 색의 변화를 바탕으로한 *Azospirillum*의 선별에 이용되어졌다(Okon et al. 1977).

3가지 형태의 배지중에서 pH 지시약을 포함하는 변형된 basal media와 Pikovskaya's media와 비교할 때 Reyes's basal media에서 가장 넓은 투명대가 형성되었다(표 11). 이것은 Reyse's basal media의 높은 sucrose 농도에 의한 것으로 생각되며, 높은 탄소원의 농도가 유기산의 생성을 증가시키고 따라서 넓은 투명대 형성의 결과를 보였을 것이다. Reyea's basal 액체배지에서의 높은 유기산의 생성률은 이미 Reyes et al.(1999) 연구에서 보고되어졌다. BCG와 aluminum phosphate와 iron phosphate를 각각 포함하는 Reyes's basal 배지에서 넓은 투명대의 형성을 근거로 하여 충북지역의 근권토양으로부터 aluminum phosphate soubilizer 5개와 iron phosphate solubilizer 4개를 선별하였다. (표 12) 배양 48시간동안에 iron phosphate solubilizer에 의한 유효인산의 값은 21.42 $mgPg^{-1}$ (CBPS-64-2)에서 49.49 $mgPg^{-1}$ (CBPS-69)였고, Aluminum phosphate solubilizer에 의하여 가용화된 유효인산의 농도는 8.07 $mgPg^{-1}$ (CBPS-11-1)에서 13.82 $mgPg^{-1}$ (CBPS-14-1)로 평가되었다. 또한 이들 균주들의 인산가용화 능은 이번 연구에 사용된 *P. striata*보다 우수한 것으로 나타났다(표 10, 12).

· 실험에 사용된 P-source 들 중에서 Ca-P가 다른 Al-P나 Fe-P보다 높은 인산가용화능을 나타내었다. 모든 탄소원의 존재하에 곰팡이에 의한 인산가용화는 Fe-P에서 가장 낮게 나타내었다. 다양한 탄소원과 질소원이 첨가된 인산가용화에 있어 기질로 Fe-P가 사용되었을 때 곰팡이는 배양배지의 가용성 P의 50%를 이용하였으며, 이것은 ammonium chloride나 ammonium sulphate가 첨가된 배지에서 더 분명하게 나타냈다. 곰팡이의 생체량은 또한 모든 처리구에서 Ca-P보다 Al-P나 Fe-P에서 상당히 감소하였다. 인산가용화에 있어 sucrose가 가장 우수한 탄소원이었고 그 다음으로 glucose였다. Ca-P가 첨가된 배양액에서의 *P.oxalicum*에 의한 인산가용화에 영향을 미치는 탄소원의 순서는 sucrose > glucose > sorbitol >mannitol 이었고 Al-P가 첨가된 배지에서는 Sucrose >

표 12. Iron and aluminum phosphate-solubilizing bacteria isolated on Reyes's basal medium with BCG plus respective P source and P- solubilization activity

Strain	Plant	Region in Korea	Halo zone (mm)	Pi release (mg P g^{-1} insouble P)
$FePO_4$ solubilizer				
CBPS-69	Rice	Jechon	10.2	49.49
CBPS -68-3	Rice	Jeungpyoung	10.0	49.08
CBPS -34-1	Onion	Hyudodongri	8.2	27.20
CBPS -64-2	Cosmos	Nodong	8.0	21.42
$AlPO_4$ solubilizers				
CBPS -14-1	Pepper	CBNU Farm	15.5	13.82
CBPS -34.2	Onion	Hyudodongri	12.5	10.68
CBPS -23.2	Pepper	Gangsedong	10.3	9.91
CBPS -68-1	Rice	Jeungpyoung	10.0	8.70
CBPS -11-1	Onion	Gaesindong	9.1	8.07

glucose > mannitol > sorbitoltns 이었으며, Fe-P에서는 glucose > sucrose > sorbitol > mannitoltns 으로 나타났다. Mannitol과 sorbitol은 곰팡이에 의한 인산가용화와 성장에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (그림 3). 인산가용화에서 가장 높은 값과 낮은 값은 Ca-P와 sucrose가 첨가된 곳 (562mg-P/L) 그리고 Fe-P와 mannitol이 첨가된 배지 (9.7mg-P/L)에서 관찰되었다. 반면에 nitrate 는 인산가용화 활성을 더욱 촉진시켰으며 ammonium 이나 arginine는 활성을 감소시켰다 (그림 5). 다양한 질소원의 존재하에 Ca-P가 첨가된 배지에서 *P. oxalicum*에 의한 인산가용화는 sodium nitrate > ammonium chloride > ammonium sulphate > potassium nitrate > argininetns 으로 나타났으며, Ca-P와 sodium nitrate가 포함된 배지에서 가장 높은 인산가용화능이 관찰되었고 (824mg-P/L) 그다음으로 ammonium chloride (779mg-P/L), potassium nitrate (762mg-P/L)순으로 나타났다. Al-P가 첨가된 배지에서는 sodium nitrate > potassium nitrate > ammonium sulphate > ammonium chloride > argininetns 으로 나타났다. Fe-P의 경우 sodium nitrate에서 가장 우수하게 나타났고, 그 다음으로 potassium nitrate, arginine, ammonium chhloride, ammonium sulphatetns 으로 나타났다. 배양 배지에서의 pH의 감소는 모든 처리구에서 나타났으며 그 결과들은 그림 4번, 6번과 같다. 초기 pH가 6.5임에 반해 탄소원으로 sucrose와 질소원으로 ammonium chloride가 첨가된 배지에서 pH가 2.0까지 감소하였다. 모든 첨가물들을 고려하였을 때 sucrose-sodium nitrate가 첨가된 배양배지에서 최고의 인산가용화능을 보여주었다. 이번 연구에서 탄소원, 질소원, 인산염과 같은 영양소가 인산가용화에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, Sucrose와 sodium nitrate는 *P. oxalicum*에 의한 인산가용화에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.

일반적으로 nitrate가 존재하는 배지에서 가용성 P가 증가하고, arginine이 존재하는 배지에서 가용성 P의 저해가 관찰되었다. 이것은 배양일 끝까지 P의 가용화를 증가시키려는 nitrates의 경향때문이라고 할 수 있다(Whitelaw et al., 1999). 이러한 결과로 분석해 보았을 때 *P. oxalicum* CBPS-Tsa를 이용한 더 많은 연구가 필요하다는 것을 알 수 있었으며, nitrate가 ammonium 보다 인산가용화에

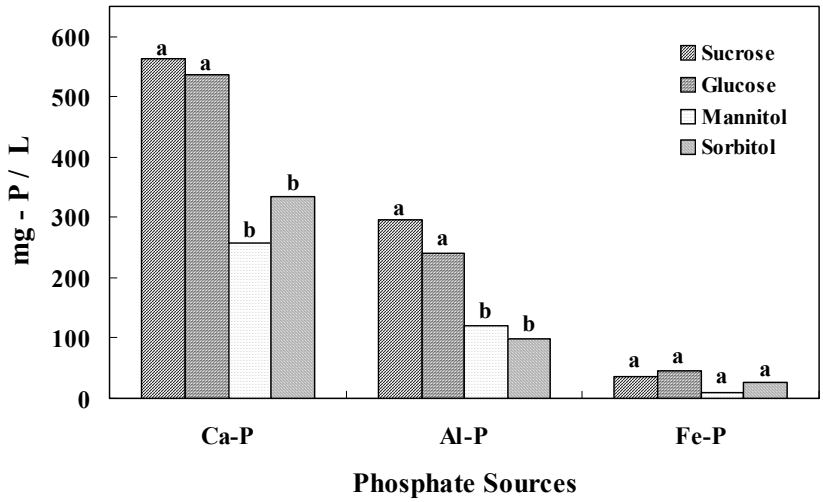

그림 3. Influence of carbon sources on solubilization of various mineral phosphates by *P. oxalicum* CBPS-Tsa after 7 days incubation. All values are means of three replicates. Among phosphate sources, significant differences according to LSD at $P<0.05$ level are indicated by different letters above the bars.

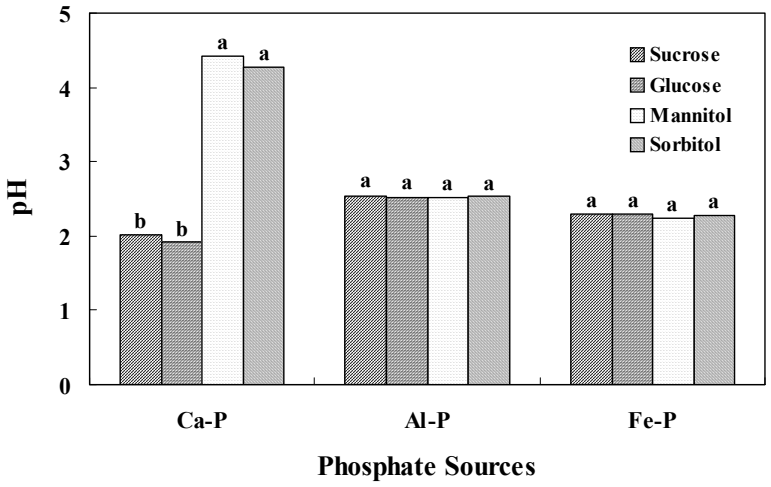

그림 4. The influence of carbon sources on the final pH in the mineral phosphate solubilization media inoculated with *P. oxalicum* CBPS-Tsa after 7 days incubation. All values are means of three replicates. Among posphate sources, significant differences according to LSD at $P<0.05$ level are indicated by different letters above the bars.

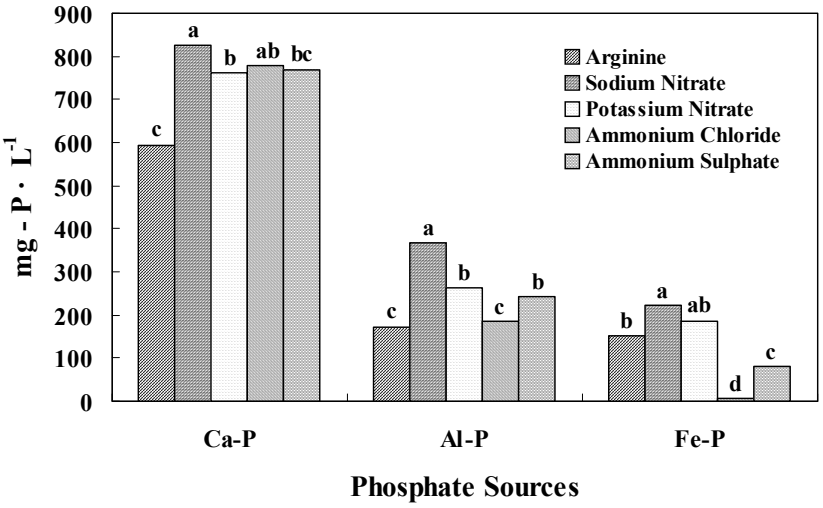

그림 5. The influence of nitrogen sources on solubilization of various mineral phosphates by *P. oxalicum* CBPS-Tsa after 7 days incubation. All values are means of three replicates. Among phosphate sources, significant differences according to LSD at $P<0.05$ level are indicated by different letters above the bars.

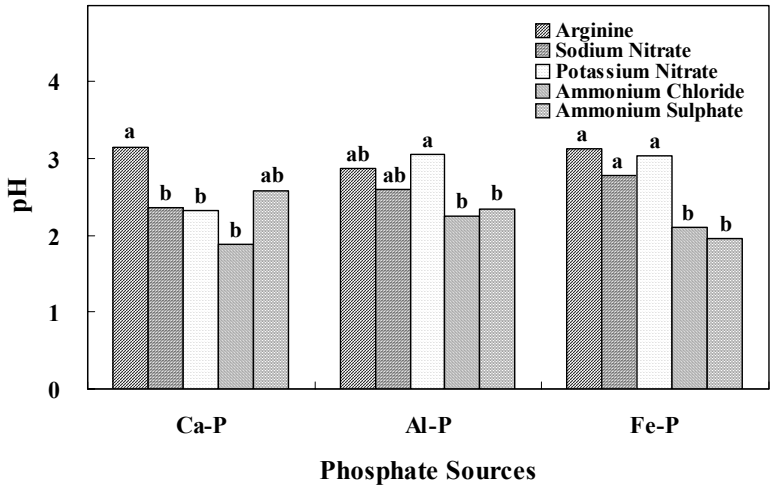

그림 6. The influence of nitrogen sources on solubilization of various mineral phosphates inoculated with *P. oxalicum* CBPS-Tsa after 7 days incubation. All values are means of three replicates. Among phosphate sources, significant differences according to LSD at $P<0.05$ level are indicated by different letters above the bars.

우수한 질소원임을 나타낸다(Reyes et al., 1999).

다른 연구에서 나타나는 것처럼 배지에서의 pH의 감소는 인산염, 탄소원, 질소원 등의 모든 첨가물이 첨가된 처리에서 관찰되었고, 역시 인산가용화가 증가하면 배지 pH는 감소하였다(Cunningham et al., 1992; Illmer et al., 1995; Murphy et al., 1962; Stumm et al., 1995; Whitelaw et al., 1995; Gaur et al., 1990; Gerezim et al., 1988; Seshadri et al., 1995; Nahas et al., 1996; Narsian et al., 2000). 탄소원중에서 가장 낮은 pH값은 glucose가 포함된 배양배지에서 나타났고 가장 높은 pH 값은 mannitol에서 관찰되었으며, 질소원중에서는 ammonium chloride에서 가장 낮은 pH 값이 관찰되었고 가장 높은 pH 값은 arginin에서 관찰되었다.

이러한 결과로부터 *P. oxalicum*을 실제로 토양에 응용할 때 유기물이나 P-source 뿐만 아니라 인산가용화균의 활동을 위해서는 질소 비료의 종류도 고려하여야 할 것이라 판단되었다.

통계학적으로 분석하였을 때 이번 연구에서 pH와 수용성 인산의 농도와의 상관관계가 관찰되었다. 그러나 몇몇의 경우를 제외하고는 (sorbitol과 Fe-P사이에서는 양의 상관관계이고 potassium nitrate와 Ca-P에서는 음의 상관관계)결과값들은 유의성이 없었다(표 13).

· 토양속에 여러 가지의 인산가용화균이 존재하기는 하지만 대개 그 수는 근권토양에 일반적으로 존재하는 토착미생물에 비견할 만큼의 높은 수는 아니다. 그 이유로 인해 높은 비율로 인산가용화균을 식물 근권에 접종하여 작물 생산을 향상시키기 위해선 접종 후 효과를 검정하여야 한다.

MPS를 옥수수에 접종하여 효능을 검정한 바 식물의 신장은 1차 실험에서 MPS 박테리아를 접종한 처리들 사이에서 차이는 두드러지게 나타나지 않았다. 그러나 접종된 모든 식물에서 볼 때 식물의 신장은 균을 접종하지 않은 무처리와 비교하여 높은 값을 나타내었다(표 14). 2차 실험에서는, 식물의 신장이 3개의 MPS bacterial를 접종한 처리에서 상당히 증가되었다. *P. striats*가 접종된 식물은 식물 신장이 최고치로 나타났고 접종된 다른 식물보다 상당히 우세하였다.

표 13. Correlations (r) between final pH and soluble phosphate

	Phosphate sources		
	Ca-P	Al-P	Fe-P
Carbon sources			
Sucrose	-0.085	0.909	0.567
Glucose	0.622	0.809	0.931
Mannitol	-0.976	-0.744	0.899
Sorbitol	-0.982	-0.0434	0.992*
Nitrogen Sources			
Arginine	0.291	-0.746	-0.912
Sodium Nitrate	0.929	0.956	-0.574
Potassium Nitrate	-0.999*	-0.564	-0.968
Ammonium Chloride	-0.909	-0.911	0.713
Ammonium Sulphate	0.938	-0.866	0.635

* - significant at $p<0.05$.

표 14. Effect of MPS bacterial inoculation on plant height and total dry mass of maize plants in two consecutive growth

Inoculation	Plant height			Total dry mass		
	1st Expt	2nd Expt	Mean	1st Expt	2nd Expt	Mean
	cm			g plant^{-1}		
Serratia marcescens	91.0	80.3	85.7	3.21	2.33	2.77
Burkholderia cepacia	91.3	87.2	89.3	3.46	2.84	3.15
Pseudomonas striata	97.25	95.8	96.5	3.37	3.07	3.22
Uninoculated Control	76.2	73.3	74.8	2.71	2.09	2.40
$LSD_{0.05}$	NS	5.97	6.07	0.25	0.22	0.20

*B. cepacia*가 접종된 것 또한 식물신장이 *S. marcescens*가 접종된 것보다 더 높게 나타났다. 두 번에 걸친 생장 실험을 분석해보면 식물 신장의 증가는 MPS bacteria의 접종 때문임을 알 수 있었다. 최고치의 식물 신장은 *P. striata* 가 접종된 식물에서 나타났고 그것은 다른 MPS bacterial 균이 접종된 식물에서 보다 상당히 높은 값을 나타내었다. 가장 낮은 식물 신장의 결과로도 무처리한 식물에 비하여 우세하게 나타났다.

MPS bacterial 균이 접종된 식물은 무처리 식물과 비교하였을 때 건물량이 상당히 높은걸로 나타났다(표 14). *B. cepacia* 와 *P. striate*가 접종된 식물의 건물량은 큰 차이가 없었다. 그러나 두 균 모두 1차실험에서 *S. marcescens*가 접종된 것과 무처리 식물보다는 우세하게 높은 차이가 나는걸 확인할수 있었다. 2차 실험에서는 *P. striata*가 접종한 식물은 다른 MPS가 접종된 식물에서 비교해 볼 때 건물량이 높게 나타났다. 최저치의 건물량은 2번의 걸친 생장 실험에서 무처리에서 나타났다. 2번 실시된 생장 실험을 분석해 보면 *P. striata*와 *B. cepacia* 가 접종된 식물이 *S. marcescens*를 접종한 식물보다 건물량이 매우 높았다. 무처리 식물은 건물량이 매우 낮은 수치였다. 그러나 *P. striata*, *B. Cepacia*가 접종된 식물의 건물량 차이는 크게 나타나지 않았다. MPS bacteria가 접종된 식물의 신장과 건물량의 증가는 다른 작물에서도 보고되었다(Laheurte et al., 1988; Agasimani et al., 1994; Prarhiba et al., 1994).

MPS균이 접종된 식물에서 식물의 신장과 건물량의 증가는 옥수수에서 인산의 흡수가 증가되었음을 보여준다(표 15).

*B. cepacia*와 *P. striata*가 접종된 식물은 *S. marcescens* 보다 인산의 총량이 매우 높게 나타났다. 가장 적게 인산이 축적된 것은 무처리 식물에서 나타났다. *P. striata*가 접종된 식물에서의 인산축적은 *B. cepacia*가 접종된 식물과 비교하여 낮은 수치였다. 그러나 식물신장과 건물량은 *P. striata*가 접종된 식물이 더 높았다. 이것은 *P. striata*에 의해서 식물 생장물질이 생산되었기 때문일 것이다. 이것과 유사하게 *P. striata*가 접종된 해바라기에서도 식물생장이 증가 되었는데 이것은 PGPR의 활성 때문 이었다.

최대의 질소 축적은 무처리와 비교하여 볼 때 MPS bacterial가 접종된 식물에서

표 15. Effect of MPS bacterial inoculation on nitrogen and phosphorus accumulation of maize plants in two consecutive growth

Inoculation	N - Accumulation			P - Accumulation		
	1st Expt	2nd Expt	Mean	1st Expt	2nd Expt	Mean
	㎎ plant^{-1}			㎎ plant^{-1}		
Serratia marcescens	24.0	26.2	25.1	1.2	0.5	0.8
Burkholderia cepacia	26.2	33.5	29.9	1.4	0.8	1.1
Pseudomonas striata	24.4	32.0	28.2	1.2	0.7	1.0
Uninoculated Control	23.0	24.6	23.8	1.0	0.4	0.7
$LSD_{0.05}$	NS	2.13	1.90	NS	0.17	0.06

나타났다(표 15). *P. striata*와 *B. cepacia*가 접종된 식물에서는 질소 축적의 차이가 두드러지게 나타나지 않았다. 그러나 두 균주 모두 *S. marcescens*가 접종된 것과 무처리 식물보다는 상당히 우세하였다. 최저치의 질소축적은 무처리에서 나타났다. 이것과 유사하게 MPS bacteia가 접종된 식물의 높은 질소 축적은 다른 작물에서도 보고되었다. 이 접종에 의한 질소 축적의 증가는 작물의 인산 이용률을 증가시켰다. 인산은 뿌리 생장의 증가와 주로 질소 영양물의 흡수 면적을 넓혀주어 흡수성을 높여주었다.

옥수수의 인산 농도는 MPS bacteria 접종으로 인해 증가 되었다. 그러나 이 증가의 차이는 크지 않았다(표 16). 2차 실험에서 인산 농도에서는 감소되었고 이것은 실험에 인산비료의 시비를 하지 않았기 때문이라 사료된다.

옥수수에 MPS bacteia를 접종하여 두 번에 걸친 실험에서 보면 1차 실험이 2차 실험과 비교하여 식물의 신장, 건물량, 질소와 인산의 축적량이 높은 결과로 나타났다. 그 결과는 주로 박테리아 균주의 인산 가용화율로 인한 것이며 인산비료를 시비하지 않았기 때문이라 판단되며, 이러한 이유로 MPS를 재접종하더라도 적당하게 영양물을 관리해야 됨을 나타낸다. 그러므로 화학비료와 생물비료가 혼합된 과학기술이 실행되어야 한다고 생각되어 진다. Single super phosphorus 75%에 MPS bacteria를 접종한 것과 또는, 100% 인광석에 MPS baceria를 접종한 것은 MPS가 접종되지 않고 100% single super phosphours를 사용한 것과 같은 생산량을 나타낸 보고가 있다 (Gadagi et al., 1999).

· 인광석 및 MPS를 담배식물에 처리한 후 담배식물체의 인산농도와 흡수량은 표 17에 나타내었다. 인광석을 처리한 토양의 담배 잎이 인광석을 처리하지 않은 토양의 담배 잎과 비교하였을 때 인산농도를 크게 높았다. 인광석 처리 후 접종하지 않은 control과 비교하였을 때 토양에 fungi를 접종한 담배식물체 잎에서 인산 농도가 크게 증가하였다. 담배줄기의 인산농도 또한 인광석을 처리한 것과 PSM를 접종한 것에서 인산 농도가 높게 증가 되었다. 그러나 처리 간 줄기인산 농도는 큰 차이를 나타내지 않았다. 담배식물체의 인산흡수 또한 인광석과 PSM의 복합처리에 의해 증가되었는데, 이는인광석 단용처리 보다 크게 증가함을 알

표 16. Effect of MPS bacterial inoculation on nitrogen and phosphorus concentration of maize plants in two consecutive growth

Inoculation	N - Concentration			P - Concentration		
	1st Expt	2nd Expt	Mean	1st Expt	2nd Expt	Mean
	㎎-N/GDW			㎎-P/GDW		
Serratia marcescens	6.11	11.02	8.57	0.33	0.18	0.26
Burkholderia cepacia	6.39	11.79	9.09	0.35	0.20	0.28
Pseudomonas striata	6.94	10.63	8.79	0.34	0.22	0.28
Uninoculated Control	6.04	10.44	8.24	0.32	0.16	0.24
$LSD_{0.05}$	NS	0.2	NS	NS	NS	NS

표 17. Effect of *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa inoculation on phosphorus concentration and uptake of tobacco plant in soil treated with rock phosphate.

Treatment	P concentration		P uptake
	stem	leaf	
	mg g^{-1}	mg g^{-1}	mg $plant^{-1}$
Control	0.26	0.29	13.03
PSM	0.30	0.31	15.08
RP	0.27	0.32	31.15
RP+PSM	0.31	0.34	36.87
$LSD_{0.05}$	ns	0.01	4.71

수 있었다.

인광석은 식물이 작물의 생육에 쉽게 이용할 수 없으나 멸균하지 않은 토양조건에서 인산은 가용화 되어 작물내 인산의 함량을 증가 시킨다. 이러한 가용화는 토착미생물이나 토양내에서 유기산이나 그 밖의 화합물을 생성하여 인산흡수 능력을 증가시키는 작물뿌리의 영향으로 나타났다(Alexander,1977). 인산가용화균 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa (PSM)이 접종된 담배의 인산농도 증가와 흡수는 이 PSM이 토양내 난용성 인과 인광석 가용화에 효과적이라고 판단되었다. Omar (1998)는 field 실험에서 인광석 시비가 밀 작물 내 인산 농도를 PSM 처리가 크게 증가 시킨 것으로 보고하였다.

담배식물체의 생육에 미치는 영향은 잎의 면적, 건조 무게와 식물의 신장 그리고 줄기 둘레, 건조무게로 평가하였고 그 결과는 표 18에 나타내었다.

인광석과 PSM균을 동시에 처리한 경우 최고치의 잎 면적을 나타내었고 인광석 또는 PSM균만을 처리한 토양에서 또한 대조구보다는 잎면적을 증가를 나타냈다. 인광석 단용 처리와, 인광석과 PSM을 복합 처리 시에 잎의 건조무게가 크게 증가되었다.

인광석 또는 PSM의 시비에 의해 작물의 길이신장도 증가되었으나 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 인광석 단용처리 시 줄기의 둘레와 건조무게가 증가되었고 담배작물체의 둘레와 건조무게는 인광석과 PSM균 복합처리가 가장 높게 나타났다. *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa 접종과 함께 인광석을 처리한것과 인광석을 처리하지 않은 것은 control과 비교하여 줄기의 건조 무게가 증가되었다. 인광석을 시비하지 않은 PSM 접종은 control 처리와 비교하여 줄기의 둘레가 큰 차이를 나태내지 않았으나 인광석과 PSM을 복합처리시 PSM의 가용화 능력은 그 효과를 나타내었다.

이번 연구의 결과는 인광석과 PSM균을 동시에 처리한 경우 멸균되지 않은 토양에 인광석과 PSM균의 접종이 밀작물의 인산흡수, 작물의 생장과 총 건조량을 증가시켰다는 Omar(1998)의 결과와 유사하게 나타났다.

인광석이 처리된 토양에 인산가용화 균 *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa 접종시 모든 처리에서 담배작물의 인산흡수와 생산성이 크게 증가 되었다. 이번 연

표 18. Effect of *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa inoculation on growth of tobacco plant in soil treated with rock phosphate.

Treatment	Leaf area	Leaf dry weight	Plant height	Stem girth	Stem dry weight
	cm^2 $plant^{-1}$	g $plant^{-1}$	cm	cm	g $plant^{-1}$
Control	5097.4	26.43	120.8	1.52	19.85
PSM	5929.6	27.35	129.6	1.56	21.80
RP	11972.5	56.85	140.2	2.24	48.04
RP+PSM	12314.8	59.60	143.4	2.36	52.74
$LSD_{0.05}$	315.4	1.18	ns	0.12	1.28

구는 인산 가용화균에 의한 난용성 인광석의 가용화에 따른 작물의 인산흡수량과 생육증대효과를 보여주었다.

PSM을 고정화하기 위하여 *P. agglomerans*을 이용하여 세 종류의 다른 carrier 즉, alginate, agar, gelatin(그림 7)을 세 가지의 다른 농도로 실험하였다. 고정화된 후 물리, 화학적 성질은 3%의 agar는 2% agar와 4% 보다 더 좋은데 반하여 2.5 % alginate는 3.5 %, 5% 보다 더 좋다는 것을 알 수 있었다. 10%의 gelatin은 각각의 5%와 15% 농도보다 더 좋았다 (표 19).

고정된 *P. agglomerans* cells(2.5% alginate, 3% agar, 10% gelatin)를 100ml의 배지가 담긴 250ml conical flasks에 배양한 후 인산가용화능을 측정하였다. 고정된 균주는 shake flask 배양에서 효과적으로 인산염을 가용화시키고, 배지를 산성화시켰다. 플라스크에서 접종된 alginate에 고정된 세포의 인산가용화능은 격일로 측정하였을 때, 그 결과는 배지의 유리인산 농도가 증가되면서 접종 후 5일 후에 유리인산의 농도가 0.22mg P/L에서 64.53mg P/L까지 증가되어진 것으로 나타났다(그림 8a). 배양 후의 배지 pH는 감소하여 pH 1.74 까지 감소하였다(그림 8b).

P. agglomerans 세포를 agar 그리고 alginate에 고정화 한 것이 gelatin 고정화 한 것보다 TCP의 가용화능이 우세하였다. 가용한 P의 농도는 각각 72.0, 71.5 그리고 36.8 mg P/L 로 나타났다(그림 9a). 인산가용화에서 *Aspergillus niger*, *Enterobacter* sp.,(vassilev et al., 1997a,b; Vassileva et al., 1998), *Bacillus megaterium*(Zated, 1997) *Penicillium variabile*(Fenice et al., 2000)를 이용하여 고정화 시킨 것의 이점은 전부터 보고되어져 왔다. 이번 연구에서 세가지 방법(agar, alginate, gelatin)으로 고정화 된 균을 이용하여 배양 후 배지의 pH는 각각 5.8, 5.69, 5.67을 나타내었다.(그림 9b)

Free cell 접종보다 고정화 된 균을 이용하는 것이 인산가용화 균을 이용하는데 우수하다는 보고는 많이 있다. Zayed(1997)에 따르면, alginate 고정화는 뿌리 근권에서 박테리아의 활성에 영향을 주는 박테리오파지로부터 박테리아를 보호하기 위한 능력을 가지고 있다.

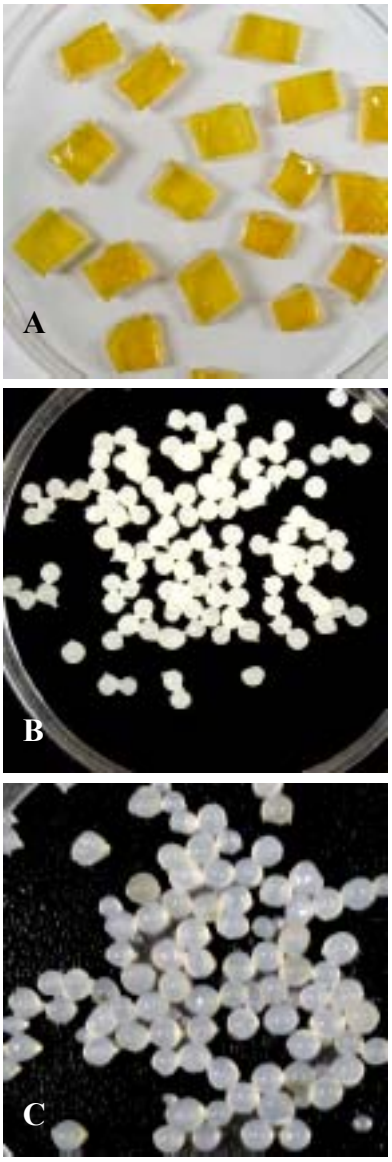

그림 7. Images showing gelatin(A), alginate(B) and agar(C) immobilized cells of *P. agglomerans*. The size of gelatin cubes, alginate beads and agar beads were 3.5, 3 and 3 mm, respectively.

표 19. Physical and aesthetic properties of the beads/cubes

Carrier		Bead dia. (㎜)	Diffusion over prolonged incubation	Microbial cell activity	Appearance and stability
Alginate	2.5 %	3.0	No	Active	Flexible and partially stable
	3.5 %	3.0	No	Active	Hard and stable
	5.0 %	3.0	No	Active	Flexible and partially stable
Agar	2.0 %	3.0	Yes	Active	Flexible and partially stable
	3.0 %	3.0	No	Active	Hard and stable
	4.0 %	3.0	No	Poor	Hard and stable
Gelatin	5.0 %	3.5	Yes	Active	Highly flexible and collapsing nature
	10.0 %	3.5	No	Moderate	Flexible and partially stable
	15.0 %	3.5	No	Poor	Stable; brittle nature

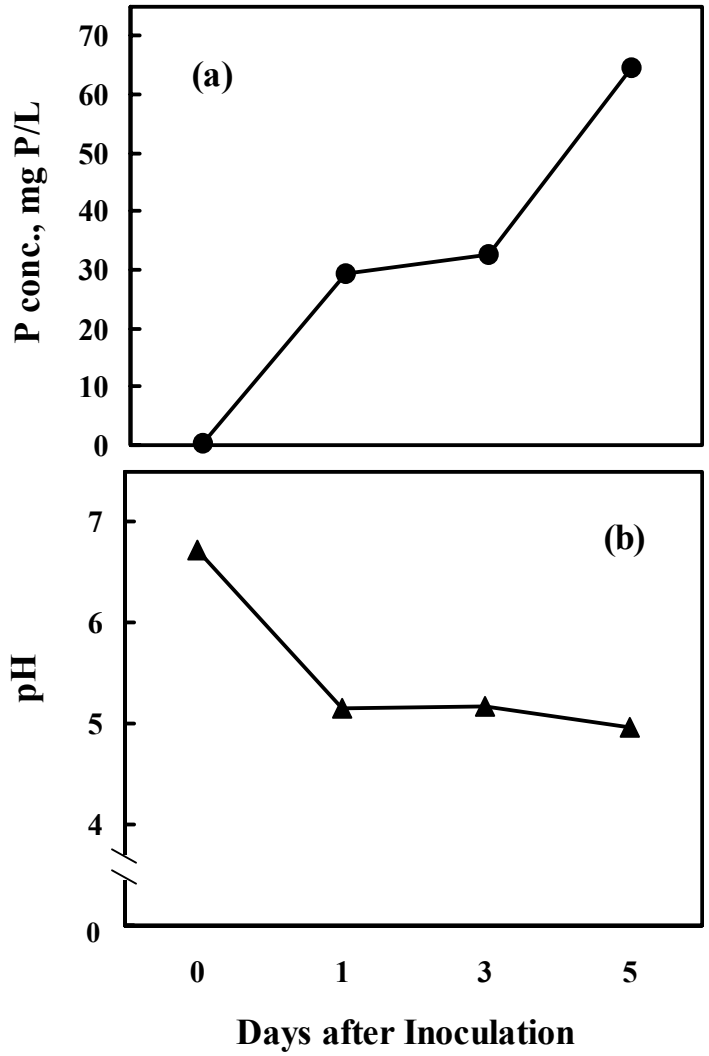

그림 8. Effect of alginate immobilized *P. agglomerans* cells on the soluble phosphate concentration (a) and pH (b) in the calcium phosphate (tribasic) amended media over a period of incubation.

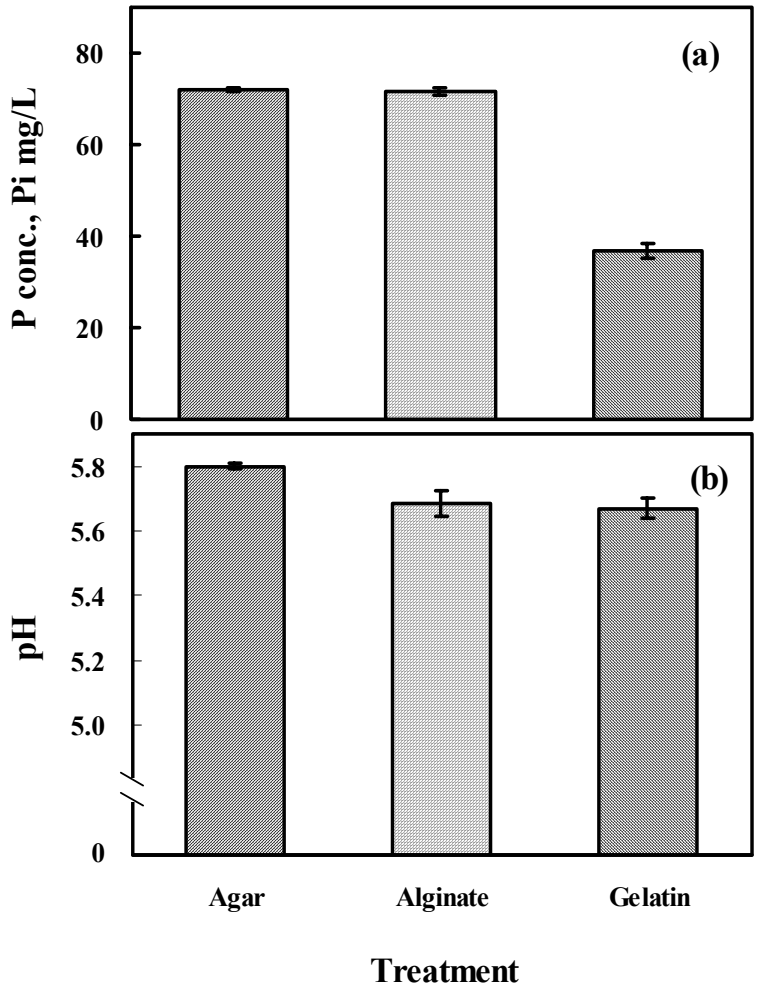

그림 9. Effect of agar, alginate and gelatin immobilized cells of *P. agglomerans* on the soluble phosphate concentration (a) and final pH (b) in the calcium phosphate (tribasic) amended media.

그러므로, 고정화는 농업에서 인산가용화 균을 이용하는데매우 바람직한 것으로 판단된다. 기존에 연구되어졌던 것은 agar, alginate, k-carrageenan 또는 polyurethane 형태를 이용해왔다. 인산가용화를 위한 젤라틴 cube에 고정된 박테리아를 제작한 것은 기존에 보고가 없고 금번 실험이 처음으로 생각된다.
젤라틴을 이용하여 고정화하는 연구에서 관찰된 결과들은 햇빛에 노출된 박테리아 세포에서 영향을 미치는 crosslinkers로써 formaldehyde, ethanol 의 이용과 관계가 있다. 그러나 향후 이방법에 문제가 되는 박테리아 개체수의 감소와 젤라틴 cube에서 연관된 미생물의 수에 관한 formaldehyde, ethanol, glutaraldehyde, gamma ray와 같은 crosslinker의 영향을 평가하기 위해서 또 다른 연구가 요구되어진다. 이러한 연구는 현재 본 실험실에서 진행중이고, 다른 polymer의 이용도 고정화와 인산가용화에 응용하고 있다.

· 2.5% alginate에 고정화된 *P. agglomerans*를 이용하여 4가지의 원산지가 다른 다른 인광석의 가용화능을 비교하였다. 비록 용액안의 P의 농도가 s곡선 형태로 변화하지는 않았지만 결과적으로 초기에는 P의 농도가 증가함을 보였다가 감소함을 나타내었다(그림 10).

Illmer 와 Schinner(1995)는 *Pseudomonas* sp.와 *Penicillium aurantiogriseum*의 free cell 형태로 접종한 인산가용화 실험에서 유사한 결과를 보여주었으며 배양하는 동안 P의 농도가 변화하였다. 본 연구에서도 모든 처리에서 단계적으로 유효인산의 양이 증가하였다. Morocco rock phosphate는 다른 인광석에 비하여 가장 많이 가용화되었고 반면에 China rock phosphate는 그 값이 가장 낮게 나타났다. 최대의 유효인산의 값은 접종 후 각각 6, 10, 12일 후에 Morocco rock phosphate, Tunisia rock phosphate, Tricalcium phosphate, Isreal rock phosphate 그리고 China rock phosphate가 첨가된 flask에서 각각 215.59, 186.14, 132.26, 60.98, 48.87mg L^{-1}으로 나타났다. 그 후에는 China rock phosphate를 제외하고 모든 인광석 처리에서 급격한 유효인산량의 감소가 관찰되었다. 비록 China rock phosphate가 첨가된 처리에서 곡선의 흐름이 거의 유사하게 나타났지만 China rock phosphate처리에서 유효인산의 값은 약간 다른 결과를 보여주

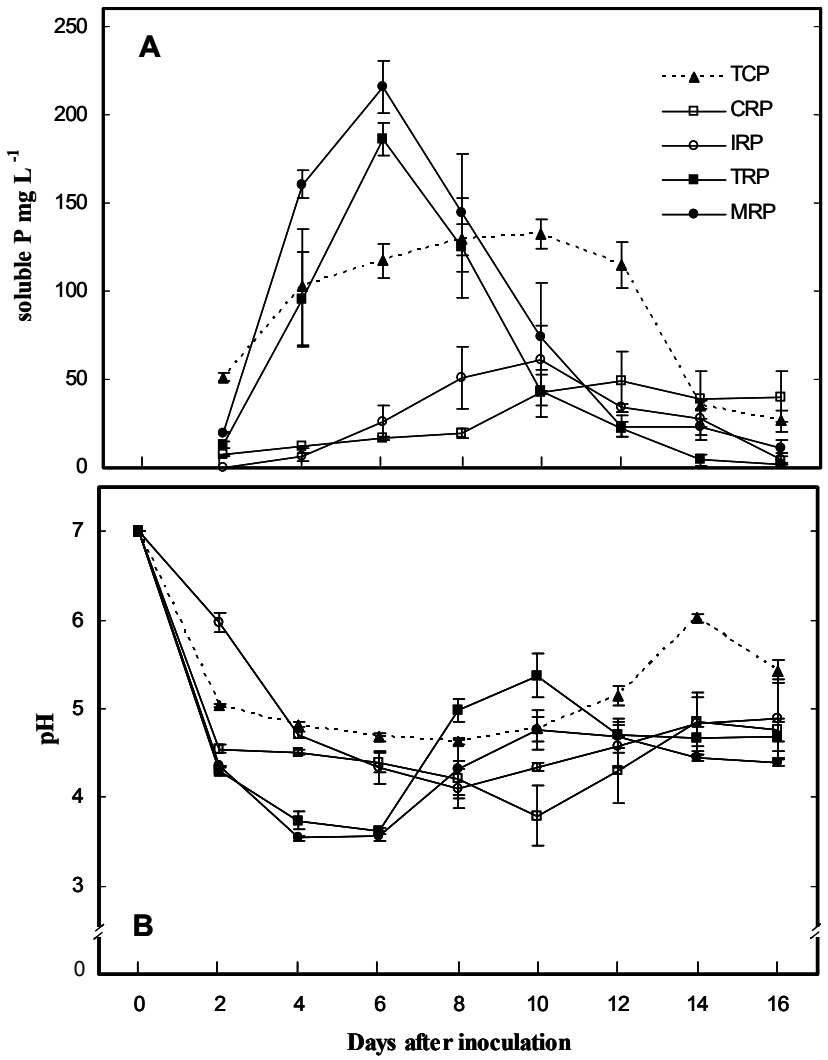

그림 10. Changes in the soluble phosphate concentration (A) and pH (B) during the solubilization of rock phosphates by alginate immobilized *P. agglomerans*

었다. 결과에서 보여주듯이 원료들의 특성은 미생물들이 그것에서 효과적으로 활동하는데 지극히 중요하다는 것을 보여주었다. Vassileva(1998)등도 *Yarowia lipolytica*을 이용한 인광석의 가용화 실험에서 유사한 결과를 보여주었다. 이번 연구에서는 고정화된 bacteria를 접종한 배양액에서의 유효인산의 값이 free cell 형태로 접종한 이전의 실험의 결과보다 더 낮게 관찰되었다.(CHUNG et al. 2004) 이러한 결과는 free cell 형태로의 접종보다 고정화된 *Enterobacter* sp.에 의해 나타난 결과가 더 우수한 Vassilev et al.(1997b)의 결과와 대조적으로 나타났다.

비록 배지에서의 pH의 감소가 모든 인광석 처리구에서 관찰되었지만, 초기의 pH는 감소하다가 그 후 증가하였으며 다시 감소하기도 하였다. 가장 낮은 pH값은 China rock phosphate와 Isreal rock phosphate가 첨가된 배양액에서 각각 배양 10일 후(pH 3.79)와 8일 후 (pH 4.09)에 나타났다. 그 후 배양 마지막 날까지 단계적으로 증가하였다. 반면에 Morocco rock phosphate와 Tunisia rock phosphate 그리고 Tricalcium phosphate가 첨가된 배양액에서는 두개의 최저값이 나타났고 그 값은 접종 후 4, 6, 8 일 후(pH 3.54, 3.61, 4.63)와 그 후 단계적으로 증가하다가 다시 감소하여 접종 12일 후(4.71 : Tunisia rock phosphate, 4.69 : Morocco rock phosphate)와 16일 후(5.42 : Tricalcium phosphate)에 각각 다시 한번 최저값을 보였다. Babenko et al.(1984)의 연구에서는 인산가용화 bacteria의 4가지 생리학적인 그룹에 의한 인산가용화 실험에서 배양하는 동안 P의 농도와 pH의 다른 변화들이 관찰되었고 이것은 인산가용화의 원인이 되어질 수 있는 효소 체계의 유도와 억제에의한 것으로 보여지고 있다. 또한 우리의 이전 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다(Kim et al. 2004).

비록 균주의 특성을 완벽하게 보관되어진 긴 shelf life(carrier에서의 생존기간)는 접종물에 있어 이상적이지만 그렇다고 매우 긴 접종물들의 생존기간은 산업적인 요구에 들어맞지 않는다(Bashan and Gonzalez, 1999). 이번 연구에서는 두 가지 다른 저장온도에서 보관되어진 *P. agglomerans*의 단기간의 생존량과 활성에 대해서 평가하였다.

저장하는 동안에 alginate에서 고정화된 *P. agglomerans*의 생체수와 활성은 모

두 감소하였다. 실온에서 저장된 bead에서의 *P. agglomerans*의 생체 수는 4℃에서 보관된 bead에서의 생체수보다 높았다(그림 11). 비록 고정화된 bacteria의 인산가용화능이 상당히 변화함을 보여주었지만 활성은 급격하게 변화하지 않았으며 평가하는 동안 활성에서의 약간의 변동이 관찰되었다(그림 12). 실온과 냉장에서 보관된 bead에서 각각 4개월 후에 활성이 약간 감소하였다.

· 이전의 많은 연구에서는 인산 가용화균의 접종으로 인한 농작물의 생산량이 현저하게 증가 됐다고 알려졌다(Khan et al., 1997; Vassilev et al., 1997; Vassileva et al., 1999; Vazquez et al., 2000). 식물에서 유효인산을 만드는 부분에서 균들은 또한 식물 생장 조절물질을 생산한다고 보고 되었다(Brown, 1973; Sattar and Gaur, 1987). 이번연구는, 온실에서 키운 벼의 성장과 인의 획득 있어서 *P. agglomerans*의 고정화된 cells의 효과를 보고자하였다. 박테리아는 seed bacterization, free cell 접종과 alginate immobilized cells로 세 개의 다른 형태로 처리하였다.

인광석과 *P. agglomerans*의 복합처리는 식물생장, 건물량과 water stress 조건 아래에서 인의 흡수 능력이 개선 시켰고 control 처리보다 개별적으로 우월하다는 것을 알 수 있다.($P \leq 0.05$) (그림 13, 14). 모든 세 개의 접종처리에서 상당히 비교되는 결과가 나왔는데 bead 처리는 성장에 최적조건의 결과로 나타났다. 식물체의 신장은 control처리시보다 MPS가 처리된 모든 식물체가 더 크게 나타났다. 식물체의 신장은 인광석이 낮은 농도에서 박테리아가 접종된 것이 높은 농도에서 처리한 것 보다 더 컸었고, 수확했을 때 뿌리의 길이는 식물체의 크기와는 반대의 결과를 보였다. 영양분이 부족한 식물이 영양분을 찾기 위해 긴 뿌리를 가지고 이런 특성 때문에 더 적은 영양분을 접하게 되는 식물체는 긴 뿌리를 가지게 되는 현상은 일반적인 것이다. 균의 접종에 의해 뿌리가 길어진 식물체가 만든 큰 뿌리 시tm템에 의해 인산 흡수능력의 증가가 이루어진 것이 가능하였다(Bhadoria et al., 2002)(그림 14B). 샘플링 기간에 식물체의 건물량은 1g의 인광석과 함께 bead가 접종된 것이 가장 높았다.

발아 후 30일에 2.5g 의 인광석으로 씨앗에 처리한 식물체가 다른 처리보다 pot

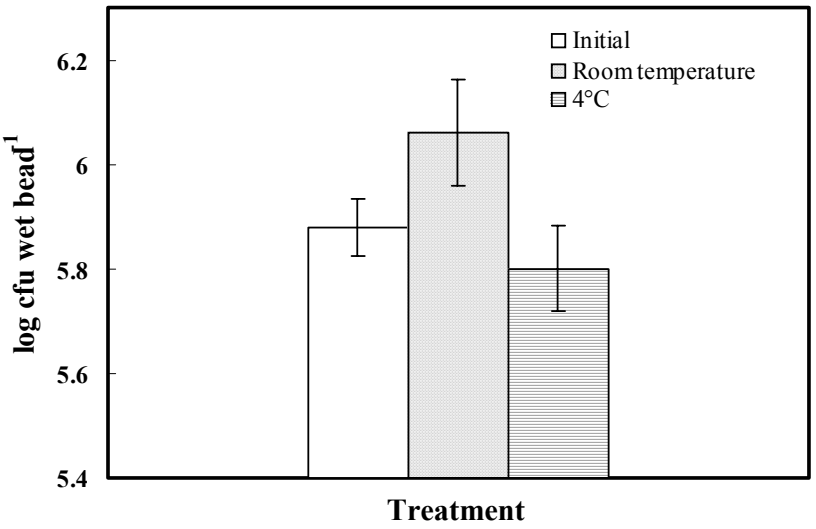

그림 11. Survival of *Pantoea agglomerans* in wet alginate beads as measured by plate count method. The errors bars represent standard error. The Room temperature and cold storage (4℃) figures represent results generated after six months storage.

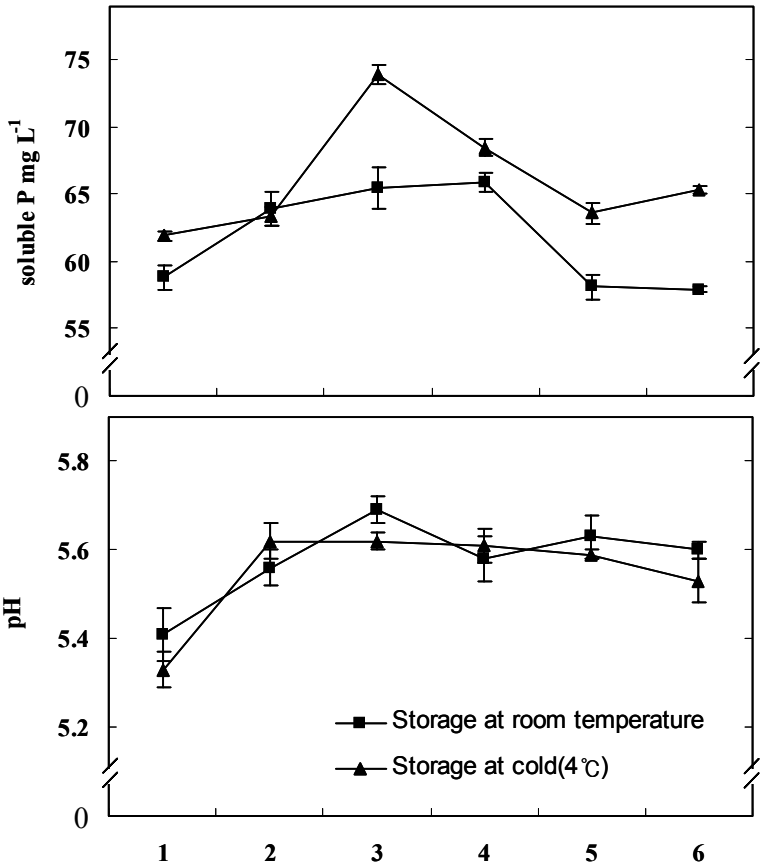

그림 12. Phosphate solubilizing activity of alginate immobilized *P. agglomerans* evaluated for six month

그림 13. Growth of rice plants subjected to different treatments including control. Plants were grown in a sterile pot mixture mixed with rock phosphates and inoculated with *P. agglomerans*. After 60 days the plants were photographed. A) Control, B) BI + CRP1, C) BI + CRP2, D) FCI + CRP1, E) FCI + CRP2, F) BE + CRP1, G) BE + CRP2. BI Seed Bacterization, FCI Free Cell Inoculation, BEBead inoculation, CRP1 1 g of rock phosphate pot-1, CRP2 2.5 g of rock phosphate pot^{-1}.

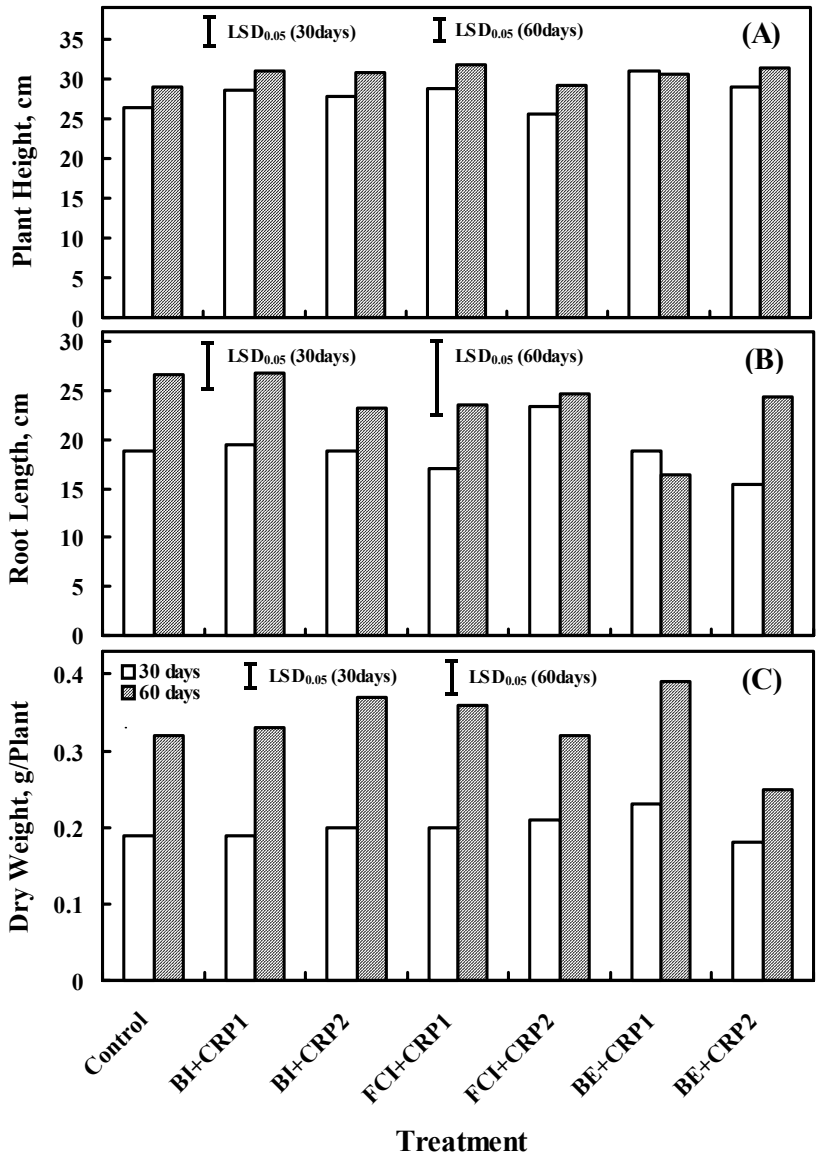

그림 14. Plant height (A), root length (B) and dry weight (C) of rice inoculated with *P. agglomerans* at 30 and 60 d after seeding. BISeed bacterization, FCI Free cell inoculation, BE Bead inoculation. CRP1 1 g of rock phosphate pot-1, CRP2 2.5 g of rock phosphate pot^{-1}.

mixture에서 유효인산이 가장 높았으며 반면에 60일에는 농도가 떨어졌다(그림 15). 모든 처리구에서 식물체에 의한 인산 흡수는 60일 일 때가 30일 일 때보다 더 낮은 효율을 나타내었다. 또한 모든 처리에 있어서 인산의 축척은 30일에서 60일 사이에 바뀐다는 것을 알 수 있다(그림 16). 인산 축적은 처리된 모든 식물체에서 증가되는 동안 control처리 식물체는 변화가 없었다. 인산 축적이 가장 높은 식물체는 beads와 1g의 인광석이 가해진 식물체인 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 고정된 cell의 접종은 Rhizobium - legumes (Dommergues et al., 1979) 관계에서 높은 인산 축적의 증진과 *Enterbacter* sp. 와 양파 및 상추 (Vassilev et al., 1997; Vassilena et al., 1999)의 상호작용이 연구되어 보도된 이전의 연구 결과와 일치하였다. 게다가 토양과 식물의 인산농도 또한 명확하게 상호관계를 나타내었다(r=0.749).

본 연구에서 *P. agglomerans* 의 고정된 cells의 사용은 벼의 신장, 뿌리길이, 건물량과 인산의 축적이 증가함을 알 수 있다. 또한 인광석을 가용화하는 *P. agglomerans*의 작용과 이것이 벼를 통해 흡수된 양분의 이용으로 이루어진 것임을 알 수 있었다.

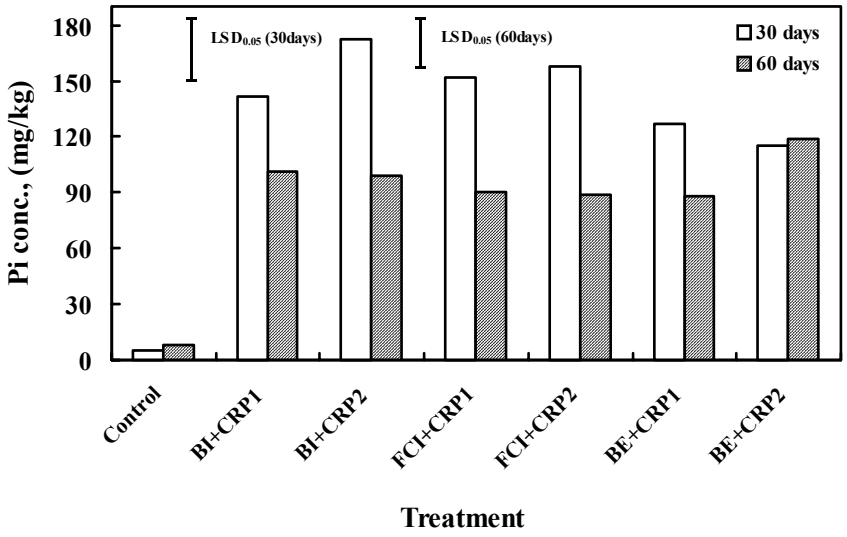

그림 15. Concentration of extractable P in the pot mixture sampled at 30 and 60 d after seeding. BI; Seed bacterization, FCI; Free cell inoculation, BE; Bead inoculation. CRP1; 1 g of rock phosphate pot^{-1}, CRP2; 2.5 g of rock phosphate pot^{-1}.

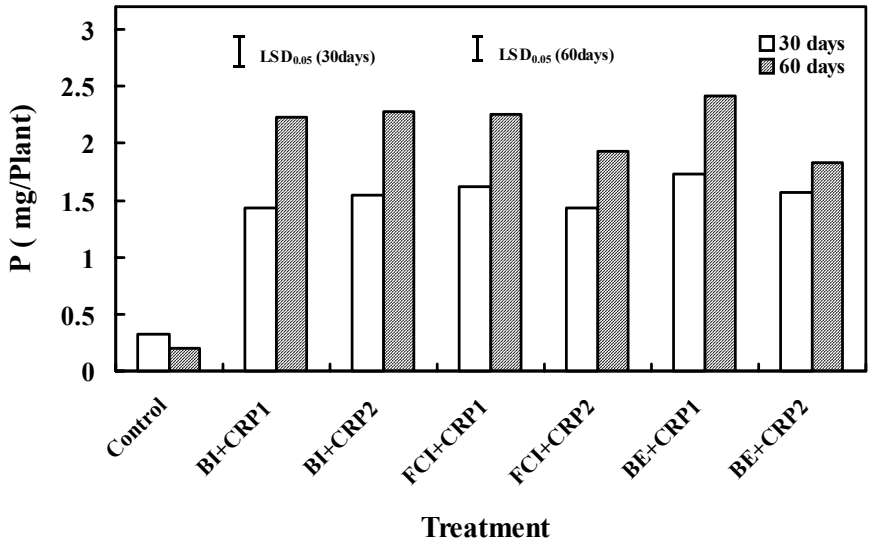

그림 16. Phosphate accumulation in rice at 30 and 60 d after seeding. BI; Seed bacterization, FCI; Free cell inoculation, BE; Bead inoculation. CRP1; 1 g of rock phosphate pot^{-1}, CRP2; 2.5 g of rock phosphate pot^{-1}.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구를 수행함에 있어 우수 P-solubilizer 분리 및 특성 검정, 분리 균주의 Al-P, Fe-P 및 Ca-P 분해능 비교분석, 한국 토양의 흡착인산 특성 조사, 배양 최적 조건 확립, 균주 고정화 방안 확립, 인광석 및 P-solubilizer 처리 방법 개발, 퇴비 및 기타 경제적 탄소원 복합 효과 검정, P-solubilizer의 처리가 인산 흡수량에 미치는 영향, P-solubilizer 처리가 작물 생육에 미치는 영향 등을 성공적으로 조사하여 최종적으로 국내 토양에 적합한 P-solubilizer 선발, P-solubilizer 생산 system 개발, 생물비료의 작물생육에 미치는 영향을 성공적으로 평가하였다.

본 연구를 수행한 결과로 국제학술지 (2편), 국내학술지 (7편)의 논문이 발간되었고, 국제학술회의 (3편), 국내학술회의 발표 (20편)의 논문을 발표하였다. 또한 2편의 논문이 국제학술지에 투고중이며 2편의 특허를 출원하였다. 이러한 논문, 학술 발표 및 특허 출원한 기술을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 친환경농업재재로 이용이 가능 할 것이다.

<국제학술지 발표>

M.S. Park, O. Singvilay, W.S. Shin, E.H. Kim, J.B. Chung, and T.M. Sa (2004. 06) "Effect of Long-Term Compost and Fertilizer Application on Soil Phosphorus Status under Paddy Cropping System" Communications in Soil Science and Plant Analysis, 35(11&12): 1635-1644

Ravi S. Gadagi, and Tongmin Sa (2002. 08) "New Isolation Method for Microorganisms Soubilizing Iron and Aluminum Phosphates Using Dyes." Soil Sci. Plant Nutr., Japanes Society of Soil Science and Plant Nutrition, 48(4): 615-618.

<국내학술지 발표>

H.K. Chung, J.H. Ryu, H.S. Lee, M.S. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, and T.M. Sa (2004. 02) "Effect of Immobilized Cells of *Pantoea agglomerans* on Growth Promotion of Rice (Oryza sativa L.) in the Presence of Rock Phosphates" 한국토양비료학회지, 37(1): 41-45.

E.H. Kim, S.A. Park, M.S. Park, J.C. Yang, M. Madhaiyan, S. Seshadri, and T.M. Sa (2004. 02) "Inorganic Phasphate Solubilization by Immobilized *Pantoea agglomerans* under in vitro Conditions." 한국토양비료학회지, 37(1): 36-40.

Eun-Hee Kim, Seshadri Sundaram, Myoung-Su Park, Wan-Sik Shin and Tong-Min Sa (2003. 08) "Influence of Carbon and Nitrogen Sources in Solubilization of Hardly Soluble Mineral Phosphates by *Penicillium Oxalicum* CBPS-Tsa", 한국환경농학회지, 22(3): 197-202.

Myoung-Su Park, Olayvahn Singvilay, Yeong-Seon Seok, Jong-Bae Chung, Ki-Sup Ahn and Tong-Min Sa (2003. 08) "Effect of Phosphate Solubilizing Fungi on P Uptake and Growth of Tobacco in Rock Phosphate Applied Soil", 한국토양비료학회지, 36(4): 233-238.

Ravi S. Gadagi, Myoung-Su Park, Hee-Kyung Chung, Chung-Woo Kim, Jong-Bae Chung and Tong-Min Sa (2003. 02) "MPS-Bioinoculant Responses to Augment Soil Fertility and Crop Production." 생명과학연구지, 생명과학연구/대구대학교, 1(3): 219-233.

정희경, 사동민(2002. 05) "토양 인산 가용화균의 분리 및 활성비교" 농업과학 연구지, 농업과학연구/충북대학교, 19: 103-110.

Myungsu Park, Ravi Gadagi, Olayvanh Singvilay, Chungwoo Kim, Heekyung Chung, Kisup Ahn and Tongmin Sa (2001. 12) "Performance of MPS Bacterial Inoculation in Two Consecutive Growth of Maize Plants", 한국환경농학회지, 20(5): 335-339.

<국제학술대회 발표>

Sa, T.M., "Isolation, immobilization application of phosphate solubilizing microorganism for eco-friendly agriculture in korea", 제 10차 중국토양학 전국대회, 2004. 7 (중국, 심양)

Chung, H.K., Cuntheepuram Lakshminaras, Sundaram Seshadri, Munusamy Madhaiyan and T.M. Sa, "Phosphate-Solubilizing Microbial Population Dynamics in Different Soil Series of Thanjavur Delta, India", The 6th ESAFS International Conference, Soil Management Technology on Low-productivity and Degraded Soils, 2003.11 (대만)

김은희, 정희경, 신문철, 김충우, Sundaram Seshadri, Munusamy Madhaiyan, 사동민, "Bioconversion of Hardly Soluble Phosphates by Soil Fungal Isolate, Penicillium Oxalicum CBPS-Tsa", The 6th ESAFS International Conference, Soil Management Technology on Low-productivity and Degraded Soils, 2003.11 (대만)

<국내학술대회 발표>

박성애, 김은희, 류정현, 윤상순, S. Seshadri, 사동민, "Assessment of Survival and Activity of Two Phosphate Solubilizing Bacteria *Pantoea agglomerans* and *Klebsiella* sp. in Wet Alginate Inoculant Carrier", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2004. 5.

김은희, 정희경, 박성애, 양진철, S. Seshadri, 사동민, "Influence of Carbon Sources on the Growth and Phosphate Solubilization by Alginate Immobilized Fungal Strain, *Penicillum Oxalicum*-CBPS-3F-Tsa" , 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2004. 5.

김은희, 유정현, 박경모, 사동민, "Phosphate Solubilization by Penicillium oxalicum CBPS-Tsa Influence of Varying Concentrations of Carbon and Nitrogen", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.10

박명수, 정희경, 김은희, 신완식, Munusamy Madhaiyan, Sundaram Seshadri, 사동민, "Effect of MPS+ Bioinoculant, Penicillium oxalicum CBPS-3F-Tsa on the Phosphate Acquisition by Tobacco Plant", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.10

박성애, Sundaram Seshadri, 사동민, "Biosolubilization of Poorly Soluble Phosphates by Immobilized Cells of Pantoea agglomerans", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.10

박명수, 정희경, 신완식, 김은희, Sundaram Seshadri, Munusamy Madhaiyan, 사동민, "Impact of Mineral Phosphate Solubilizing Bioinoculant Penicillium oxalicum CBPS-3F-Tsa on the Phosphate Acquisition by Tobacco", Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum, Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum, 2003.09

김은희, 신문철, 김진권, 사동민, "Comparison of Rock phosphate solubilization activity by Aspergillus niger and Penicillium oxalicum isolated from Korean soil", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.05

정희경, 사동민, "Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Rhizosphere Soils of Chungbuk Province", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.05

이형석, 윤상순, 이규회, 김상현, 사동민, "Rock Phosphate Solubilization and Growth of Corn Plant by Penicillium oxalicum CBPS-3F-Tsa", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.05

김은희, 유정현, 사동민, "pH 지시약을 이용한 인산 가용화 균의 효과적인 선별방법", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2003.05

이형석, Ravi Gadagi, 윤상순, 김충우, 사동민, "New Isolation Method for Microorganisms Solubilizing Iron and Aluminum Phosphates Using Dyes", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2002.10

정희경, Felicidad U. Udarbe, Ravi Gadagi, 사동민, "Identification of phosphate solubilizing bacteria isolated from rhizosphere soils of Chungbuk province based on partial 16S rRNA Sequence Analysis", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2002.10

Ravi Gadagi, 사동민, "Mechanism of Aluminum Phosphate Solubilization by Penicillium oxalicum CBPS-3F-Tsa", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2002.10

김은희, Olayvahn Singvilay, 사동민, "Isolation of phosphate solubilizing fungi using New modified media and their phosphate solubilization activity", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2002.10

Ravi Gadagi, 사동민, "Phospho-bioinoculants to Augment Soil Fertility and Crop Production", 한국환경농학회, 한국환경농학회지, 2002.07

Ravi Gadagi, 정희경, 김충우, A.R. Alagawadi, 사동민, "Inoculation Effect of PSM on Microbial Enzyme Activity in Rhizosphere, and Yield Parameters of Sunflower", 한국환경농학회, 한국환경농학회지, 2002.07

김충우, 김은희, 이철우, 하철규, 윤희준, 사동민, "Penicillium oxalicum의 인산가용화능 비교 및 대량 배양 조건의 최적화", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2002.05

박명수, 김충우, 정희경, Ravi Gadagi, Olayvahn Singvilay, 사동민, "Roles of MPS Bacterial Inoculations in Two Consecutive Growth of Maize Plants", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2002.05

양진철, 김충우, 정희경, Olayvahn Singvilay, Ravi Gadagi, 사동민, "Performance of MPS Bacterial Inoculation on Growth and P Accumulation of Maize Plants", 한국토양비료학회, 한국토양비료학회지, 2001.10

Olayvahn Singvilay, Ravi Gadagi, 김충우, 정희경, 사동민, "Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microorganism", 한국농화학회, 한국농화학회지, 2001.05

<특허 출원>
고정화된 인산 가용화 미생물을 포함하는 비료 조성물
Attapulgite를 이용한 인산가용화 미생물의 고정화

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

국내에서 1996년에 "21세기를 향한 농림수산 환경정책"을 수립하여 중장기적인 대책을 추진하고 있으며 세부내용으로 2004년까지 화학비료 사용을 40% 줄일 계획에 있다. 따라서 화학비료를 대체할 생물비료에 대한 기술개발은 절실히 요구된다. 지금까지 우리 농업에서 다량의 질소와 인산 비료의 시용으로 인하여 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져왔다. 인구증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용율의 증가로 이러한 부영양화 현상은 매우 심각한 사회문제를 낳고 있으며 최근의 근해 적조현상 등은 부영양화 지표수의 유입이 그 한 원인으로 생각되고 있다. 인산질 생물비료는 토양 속에 이미 다량으로 존재하는 불용성 인산염을 미생물을 이용하여 분해함으로써 작물이 필요로 하는 영양분을 공급하기 때문에 환경오염의 문제가 전혀 없으며 오히려 염이 집적된 토양환경을 개선하는 효과를 기대할 수 있다. 화학비료의 장기간 과다 시용은 토양의 산성화, 생산력 감퇴, 작물수량의 감소 및 품질 저하를 초래해 왔다. 반면에 생물비료의 시용은 미생물이 토양에 자리잡음으로써 토양 입단화를 촉진할 수 있고, 미생물이 부가적으로 생산하는 유기산, 식물 영양물질 또는 생장촉진제 등이 식물의 성장과 수확량 증대 및 품질향상 등에 도움을 준다. 특히 화학비료 시용으로 인한 야채와 과일의 고유한 맛을 잃어버리는 현상을 막고 아울러 농산물의 각종 지표도 환경기준에 맞게 제고시킬 수 있다. 비료의 생산비와 시용에 따른 노동력을 절감할 수 있다. '98년 통계자료에 의하면 용성인비 1톤의 가격이 300,000원에 달하며 그 원자재인 인광석은 대부분 중국으로부터 수입하고 있다. 또한 여러 가지 공정을 거치는 등 경제적으로는 상당한 부담이 된다. 또한 미생물이 토양에 자리를 잡게되면 그 다음부터 특별히 인산 비료를 시용할 필요가 없으므로 노동력을 절감할 수 있다. 농업환경문제의 중요성이 점차 증가하는 현실에 비추어 환경 친화적 비료개발 및 시비기술개발은 매우 중요한 기술이 될 것이다. 또한 기름값 폭등, 수입원자재 가격의 인상으로 비료가격이 계속 증가될 것으로 판단된다. 이러한 현실에 비추어 토착미생물을 이용한 비효

효율 증진 및 토양 잔존 양분 이용 기술은 점차 수요가 급증할 것이다. 인광석을 가공하지 않고 효율적으로 인산비료로 이용할 수 있는 기술은 경제적으로 우수할 뿐 아니라 용출속도의 완효화도 기대할 수 있어 환경 친화적 매우 유용할 것이다. 이러한 환경 보존적 차원, 경제적으로 유리한 조건, 변화하는 정책에 부응하는 시비법 연구 등의 중요성에 비추어 미생물 비료의 개발은 향후 중요성이 급증 할 것이다. 그러므로 본 연구를 기초로 하여 향후 지속적인 연구 및 농민에 대한 기술지도 등이 요망된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

과제를 수행하면서 국내외에 논문 발표 및 학회발표를 통하여 많은 전문가와 인산가용화균의 실용화에 대하여 많은 논의를 거쳐 본 실험을 수행하였으며, 인산가용화균의 기초 및 응용연구에 대한 많은 문헌을 접하게 되었다. 참고문헌에 제시한 많은 정보들이 본 연구의 향후발전에 큰 도움이 될 것이다. 특히, 실용화를 위하여서는 아래에 기록한 고정화 기술에 관한 정보가 많은 도움이 될 것이다.

<고정화 관련 문헌>

Nikolay Vassilev, Marcia Toro, Maria Vassileva, Rosario Azcon & Jose Miguel Barea, 1997, Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions, *Bioresource Technology*, 61, 29-32.

M.B. Cassidy, H. Lee, J.T. Trevors, 1997, Survival and activity of *lac-lux* marked *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells encapsulated in κ-carrageenan over four years at 4℃, Journal of Microbiological Methods, 30, 167-170.

A. Lopez, N. Lazaro, Ana M. Marques, 1997, The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads, Journal of Microbiological Methods, 30, 231-234.

Y. Bashan, 1998, Inoculations of plant growth—promoting bacteria for use in agriculture, Biotechnology Advances, 16, 729-770.

Y. Bashan, L.E. Gonzalez, 1999, Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas*

fluorescens in dry alginate inoculant, Appl Microbiol Biotechnology, 51, 262-266.

Maria Vassileva, Rosario Azcon, Jose-Miguel Barea, Nikolay Vassilev, 1999, Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake, Bioresource Technology, 67, 229-232.

Maria Vassileva, Rosario Azcon, Jose-Miguel Barea, Nikolav Vassilev, 2000, Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarowia lipolytica*, Process Biochemistry, 35, 693-697.

Massimiliano Fenice, Laura Selbman, Federico Federici, Nikolay Vassilev, 2000, Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate, Bioresource Technology, 73, 157-162.

Nikolay Vassilev, Maria Vassileva, Massimiliano Fenice, Federico Federici, 2001, Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic(rock) phosphates and P plant acquisition, Bioresource Technology, 79, 263-271.

Elisabetta de Alteriis, Danilo Porro, Vittorio Romano, Palma Parascandola, 2001, Relation between growth dynamics and diffusional limitations in *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as entrapped in an insolubilised gelatin gel, FEMS Microbiology Letters, 195, 245-251.

Yoav Bashan, Juan-Pablo Hernandez, Luis A. Leyva and Macario Bacilio, 2002, Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria, Biology and Fertility of Soils, 35, 359-368.

제 7 장 참고문헌

Agasimani, C. A., Mudagiryappa, M. and Sreenivas, M. N. (1994) Response of ground nut to phosphate solubilizing microorganisms. Ground nut news 6, 5.

Agnihothri, V. P. (1970) Solubilization of insoluble phosphates by some fungi isolated from nursery seedbeds. Can. J. Microbiol. 16, 877-880.

Ajwa, H. A., Dell, C. J. and Rice, C. W. (1999) Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. Soil Biol. Biochem. 31, 769-777.

Alef, K. and Nannipieri, P. (1995) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic press, London, p. 576.

Alexander, M. (1977) Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.

Allen, O. N. (1959) The isolation of Azobacter sp., In Experiment in Soil Microbiology, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, p. 46-47.

Anthoniraj, S., Goopalswamy, G. and Abdul, K. (1994) Effect of graded levels of P and phosphobacterial inoculation on rice yield. Madras Agri. J. 81, 457-458.

Asea, P. E. A., Kucey, R. M. N. and Stewart, J. W. B. (1988) Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and

soil. Soil Biol. Biochem. 20, 459-464.

Azcon, R., Barea, J. M. and Hayman, D. S. (1976) Utilization of rock phosphate in alkaline soil by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. Soil Biol. Biochem. 8, 135-138.

Babenko, Y. S., Tyrugina, G. I., Origoreev, E. F., Dalgikh, L. M. and Borisova, T. I. (1984) Biological activity and physiological biochemical properties of phosphate dissolving bacteria. Microbiologiya. 53, 533-539.

Banik, S. and Dey, B. K. (1983) Phosphate solubilizing potentiality of the microorganisms capable of utilizing aluminium phosphate as a sole phosphate source. Zentralblatt fur Bakteriologie, prasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygeine, II Naturwissenschaftliche Abteilung. 138, 17-23.

Banik, S. and Dey, B. K. (1981) Phosphate solubilizing microorganisms of a lateritic soil: III. Effect of inoculation of some tricalcium phosphate solubilizing microorganismson available phosphorus content of rhizosphere soils of rice (*Oryza sativa* L. cv IR 20) plants and their uptake of phosphorus. Zbl. Bakt.-Int. J. Med. M. 136, 493-501.

Bardiyda, M. C. and Gaur, A. C. (1971) Isolation and screening of microorganisms dissolving low-grade rock phosphate. Folia Microbiol. 19, 386-389

Bashan, Y. and Gonzalez, L. E. (1999) Long term survival of the plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 262-266.

Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol. Adv. 16, 729-770.

Bashan, Y. (1986) Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. Appl. Environ Microbiol. 51, 1089-1098.

Begon, M., Jarper, J. L. and Townsend, C. R. (1990) Ecology: Individuals, Populations and Communities, Black well scientific publication, USA, p 71.

Benbi, D. K., Biswas, C. R., Bawa, S. S. and Kumar, K. (1998) Influences of farmyard manure, inorganic fertilizers, weed control practices on some physical properties in a long-term experiment. Soil Use Manage. 14, 52-54.

Beyer, L., Wachendorf, C., Elsner, C. and Knabe, R. (1993) Sustainability of dehydrogenase activity assay as an index of soil biological activity. Biol. Fert. Soil. 16, 52-56.

Bhadoria, P. S., Steingrobe, B., Claassen, N. and Liebersbach, H. (2002) Phosphorus efficiency of wheat and sugar beet seedlings grown in soils with mainly calcium, or iron and aluminum phosphate. Plant Soil. 246, 41-52.

Bojinova, D., Velkova, R., Grancharov, I. and Zhelev, S. (1997) The bioconversion of Tunisian phosporite using *Aspergillus niger*. Nutr. Cyc. Agroecosyst. 47, 227-232.

Brown, M. E. (1973) Soil bacteriostasis limitation in growth of soil and

rhizosphere bacteria. Can. J. Microbiol. 19, 195-199.

Burns, R. G. (1982) Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. Soil Biol. Biochem. 14, 423-427.

Camina, F., Traser-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. and Leiros, C. (1998) Measurement of dehydrogenase activity in acid soil rich in organic matter. Soil Biol. Biochem. 30, 1005-1011.

Casida Jr., L. E., Klein, D. A. and Santoro, T. (1964) Soil dehydrogenase activity. Soil Sci. 93, 371-376.

Cerezine, P. C., Nahas, E. and Banzatto, D. A. (1988) Soluble phosphates accumulation by Aspergillus niger from fluorapatite. App. Microb. Biotech. 29, 501-505.

Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M. P. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarium* biovar *phaseoli*. Plant and Soil. 184, 311-321.

Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M. P., (1993) Stimulation de la croissance du mais et de la laitue romaine par des microorganisms dissolvent de phosphore inorganique. Canadian J. Microbiol. 39, 941-947.

Chhonkar, P. K. and Subba Rao, N. S. (1967) Phosphate solubilization by fungi associated with legume root nodules. Can. J. Microbiol. 13, 749-751.

Choi, M. C., Chung, J. B., Sa, T. M., Lim, S. U. and Kang, S. C. (1997)

Solubilization of insoluble phosphates by *Penicillium* sp. GL-101 isolated from soil. Agric. Chem. Biotechnol. 40, 329-333

Chung, H. K. 2003. Identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from rhizosphere. M.S. Thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Korea.

Chung, H. K., Ryu, J. H., Lee, H. S., Park, M. S., Madhaiyan, M., Seshadri, S. and Sa, T. M. (2004a) Effect of immobilized cells of Pantoea agglomerans on growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) in the presence of rock phosphates. Korean J. Soil. Sci. Fert. 37(1), 41-45.

Chung, H. K., Park, M. S., Seshadri, S., Madhaiyan, M., Song, J. K., Cho, H. S. and Sa, T. M. (2004b) Isolation, Characterization and the Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) on Maize (*Zea mays* L.). Soil Biology Biochemistry (communicated)

Chung, S. C. and Jackson, M. L. (1957) Fractionation of soil phosphorus. Soil Sci. 84, 133-144.

Cunningham, J. E. and Kuiack, C. (1992) Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii.* Appl. Environ. Microbiol. 58, 1451-1458.

Dakora, F. D. and Phillips, D. A. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. Pl. Soil. 245, 35-47.

Darmal, N. S., Singh, R. B. and Rai, R. (1989) Isolation of phosphate

solubilizers from different sources. Curr. Sci. 58, 570-571

Das, A. C. (1963) Utilization of insoluble phosphates by soil fungi. J. Indian Soc. Sci. 11, 203-207

Datta, M., Banish, S. and Gupta, R. K. (1982). Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soil of Nagaland. Plant soil. 69, 365-373.

de Alteriis, E., Parascandola, P., Salvadore, S. and Sardi, V. (1985) Enzyme immobilization within insolubilized gelatin. J. Chem. Technol. Biot. 35(B), 60.

dE Freitas, J. R., Banerjee, N. R. and Germida, J. J. (1997) Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biol. Fert. Soils. 24, 358-364.

Deelereck, S., Strullu, D. G., Plenchette, C. and Guillemette, T. (1996) Entrapment of *in vitro*produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: *in vitro* and *in vivo* inoculum potentials. J. Biotechnol. 48, 51-57.

Dick, R. P. (1992) A review: Long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. Agric. Ecosystem. Environ. 40, 25-36.

Dommergues, Y. R., Diem, H. G. and Davies, C. (1979) Polyacrylamide entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. Appl. Environ. Microbiol. 37, 779-781.

Doran, J. W., Sarrantonio, M. and Liebig, M. A. (1996) Soil health and sustainability, Adv. Agron. 56, 1-54.

Earl, K., Syers, J. and McLaughlin, R. M. (1979) Origin of the effect of citrate, tartarate, and acetate on phosphate sorption by soils and synthetic gels. Soil Sci. Soc. Am. J. 43, 674-678.

Ehrlich, H. L. (1990) Mikrobiologische und biochemische Verfahren stechnik. In Einsele, A., Finn, R. K. and W. Samhaber (ed.) Geomicrobiology, (2nd ed.) VCH Verlagsgesellschafat, Weinheim, Germany.

Fedirici, F. (1993) Potential application of viable, immobilized fungal cell systems. World J. Microb. Biot. 9, 495-502.

Fenice, M., Selbman, L., Federici, F. and Vassilev, N. (2000) Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate. Bioresource Technol. 73, 57-162.

Fisher, P. A. (1958) Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, London, UK.

Gadagi, R. S. and Alagawadi, A. R. (1999) Response of sunflower to the P solubilizing biofertilizers with different sources and levels of phosphorus. Karnataka J. Agric. Sci. 11, 50-55.

Gadagi, R. S. and Sa, T. M. (2002) New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminium phosphates using dyes. Soil Sci. Plant Nutr. 48, 615-618.

Gadagi, R. S., Park, M. S., Chung, H. K., Kim, C. W., Chung, J. B. and Sa, T. M. (2003) MPS-Bioinoculant responses to augment soil fertility and crop production. Life Sciences Research, Daegu University. 1(3), 219-233

Gaur, A. C. and Ostwal, K. P. (1972) Influence of phosphate dissolving bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. Indian J. Exp. Biol. 10, 393-394.

Gaur, A. C. (1990) *Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers,* Omega Scientific Publishers, New Delhi, India.

Gerke, L. (1992) Phosphate, aluminum, and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. Z. Pflanzenernahr. Bodenk. 155, 17-22.

Gerretsen, F. C. (1948) The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. Plant Soil. 1, 51-81

Gleddie, S. C., Hnatowich, G. L. and Polonenko, D. R. (1991) A summary of wheat response to PROVIDE (*Penicillium bilaii*) in Western Canada. In: *Proceedings of the Alberta Soil Science Workshop*. p. 306-313. Lethbridge. Alba.

Goenadi, D. H., Siswanto, and Sugirto, Y. (2000) Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. Soil Sci. Soc. Am. J. 64, 927-932.

Goldstein, A. H., Rogers, R. D. and Mead, G. (1993) Separating phosphate

from ores via bioprocessing. Nat. Biotechnol. 11, 1250-1254.

Goldstein, A. H. (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. The Am. J. Alt. Agric. 1, 51-57.

Gupta, R., Signal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C. and Saxena, K. (1994) A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol., 40, 225-260

Gyaneshwar, P., Nareshkumar, G., Parekh, L. J. and Poole, P. S. (2002) Role of microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil. 245, 83-93.

Haigh, S. D. and Rennie, A. F. K. (1994) Rapid methods to assess the effects of chemical on microbial activity in soil. Environ. Toxicol. Water Qual. 9, 347-354.

Hal, J. A., Pierson, D., Ghosh, S. and Glick, B. R. (1996) Root elongation of various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. Isr. J. Plant Sci. 44, 37-42.

Hayman, D. S. (1975) Phosphorus cycling in soil micro-organisms and plant roots. In *Soil Mircrobiology: Agricultural review,* Walker, N. (ed) London, Butterworths, 67-91.

Hinsinger, P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. Plant Soil. 237, 173-195.

Holt, J. G., Krieg, N. R., A. Sneath, P. H., Staley, J. T. and Williams, S. T.

(1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

Illmer, P. and Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27, 257-263.

Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. (1995) Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. Soil Biol. Biochem. 27, 265-270

Insam, H., Hutchinson, T. C. and Reber, H. H. (1996) Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. Soil Biol. Biochem. 28, 691-694.

Iyamurenye, F. and Dick, R. P. (1996) Organic amendments and phosphorus sorption by soils. Adv. Agron. 56, 139-185.

Jackson, M. L. (1958) Soil chemical analysis. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, USA.

Jisha, M. S., and Algawadi, A. R. (1996) Nutrient uptake and yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) inoculated with phosphate solubilizing bacteria and cellulolytic fungus in a cotton stalk amended vertisol. Microbiol. Res. 151, 213-217.

Johri, J. K., Surange, S. and Nautiyal, C. S. (1999) Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline Soils. Curr. Microbiol. 39, 89-93

Jones, D., Smith, B. F. L., Wilson, M. J. and Goodman, B. A. (1991) Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. Mycol. Res. 95, 1090-1093

Kanchikerimath, M and Singh, D. (2001) Soil organic matter and biological properties after 26 years of maize-wheat-cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a cambisol in semiarid region of India, Agric. Ecosystem Environ. 86, 155-162.

Kang, S. C. and Choi, M. C. (1999) Solid culture of phosphate solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27, 1-7.

Katznelson, H., Peterson, E. A. and Rouatt, J. W. (1962) Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. Can. J. Bot., 40, 1181-1185.

Kennedy, A. C. and Smith, K. L. (1990) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In Cllins, H. P., Robertson, G. P. and Klug, M. J. (ed.) The Significance and Regulation of Soil Biodiversity, Kluwer Academic Publsiher, The Netherlands, p. 75-86.

Khan, J. A., and Bhatnagar, R. M. (1977) Studies on solubilization of insoluble phosphates by microorganisms I. Solubilization of Indian phosphates rock by *Aspergillus niger* and *Penicilium* sp. Fert. Technol. 14, 329-333.

Khan, M. S., Zaidi, A. and Amil, M. (1997) Associative effect of *Bradyrhizobium* sp. (vigna) and phosphate solubilizing bacteria on mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Biojournal. 9, 101-106.

Khasawneh, F. E. and Doll, E. C. (1978) The use of phosphate rock for direct application to soils. Adv. Agron. 30, 159-206.

Kim, E. H., Park, S. A., Yang, J. C., Madhaiyan, M., Seshadri, S. and Sa, T. M. (2004) Inorgaic phosphate solubilization by immobilized *Pantoea agglomerans* under in vitro conditions. Korean J. Soil Sci. Fert. 37(1), 36-40.

Kim, K. Y., Hwang, H. B., Kim, Y. W., Kim, H. J., Park, K. H., Kim, Y. C. and Seong, K. Y. (2002) Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. Korean J. Soil Sci. Fert. 35, 59-67.

Kim, E. H., Seshadri, S., Park, M. S., Shin, W. S. and Sa, T. M. (2003) Influence of carbon and nitrogen sources in solubilization of hardly soluble mineral phosphates by *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa. Korean J. Environ. Agric. 22, 197-202.

Kim, K. Y., Mcdonald, G. A. and Jordan, D. (1997) Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. Biol. Fert. Soils. 24, 347-352.

Kirk, G. J. D., Santos, E. E., and Findenegg, G. R. (1999) Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soils. Pl. Soil. 211, 11-18.

Kloepper, J. W., Lifshitz, K. and Schroth, M. N. (1988) *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISS. Atlas Sci. Amin. Plant Sci. 60-64.

Krishnaraj, P. U. and Goldstein, A. H. (2001) FEMS Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli*in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. FEMS Microbiol Lett. 205(2), 215-220

Kucey, R. M. N., Janzen, H. H. and Leggett, M. E. (1989) Microbiologically mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42, 199-228.

Kumar, V. and Narula, N. (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biol. Fert. Soils. 28, 301-305.

Kuperman, R. G. and Margaret, M. C. (1997) Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. Soil Biol. Biochem. 29, 179-190.

Kuster, E. and Williams, S. T. (1964). Selection of media for isolation of Streptomyces, *Nature.* 202, 926-929.

Ladd, J. M., Foster, R. C., Nannipieri, P. and Oades, J. M. (1996) Soil structure and biological activity, In Stotzky, G. and Bollag, J. M. (Ed.) Soil Biochemistry: 9, Marcel Dekker Inc. New York, p. 23-78.

Laheurte, F. and Berthelin, J. (1988) Effect of phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. Plant soil. 105, 11-17.

Leyval, C. and Berthelin, J. (1985) Comparison between the utilization of phosphorus from insoluble mineral phosphate by ectomycorrhizal fungi and rhizobacteria. Dijon (France), First European symposium on Mycorrhiza.

Lifshitz, R., Kloepper, J. W., Kozlowsaki, M., Simonson, C., Carlson, J., Tipping, E. M. and Zalesca, I. (1987) Growth promotion of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Can. J. Microbial. 33, 390-395.

Lopez, A., Lazaro, N. and Marques, A. M. (1997) The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel beads. J. Microbiol. Meth. 30, 231-234.

Martin, J. P. (1950) Use of acid, rose Bengal and streptomycin in plate method for estimating soil fungi. Soil Sci. 69, 215-232.

Mattiasson, B. (1983) Immobilised viable cells. In Immobilised cells and organelles. VOL. II., Mattiasson B. Boca Raton: CRC Press, Inc.

Matty, M. (1992) The production of organic acids. Rev. Biotechnol. 12, 87-132.

McLaughlin, M. J., Alston, A. M. and Martin, J. K. (1988) Phosphorus cycling in wheat-pasture rotations: the source of phosphorus taken up by wheat. Aus. J. Soil Res., 26, 323-331

Murphy, J. and Riley, J. P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta. 27, 31-36.

Nahas, E. (1996) Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil, World J. Microbiol. & Biotechnol. 12, 567-572.

Nahas, E., Banzatto, D. A. and Assis, L. C. (1990) Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. Soil Biol. Biochem. 22. 1097-1101.

Nannipieri, P., Greco, S. and Ceccanti, B. (1990) Ecological significance of the biological activity in soil, In Stotzky, G. and Bollag, J. M. (Ed.) Soil Biochemistry. 6, 679-685.

Nannipieri, P., Muccini, L. and Ciardi, C. (1983) Microbial biomass and enzyme activities : production and resistance. Soil Biol. Biochem. 15, 679-685.

Narsian, V., and Patel, H. H. (2000) *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. Soil Biol. Biochem. 32, 559-565.

Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D. (2000) Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiol. Lett. 182, 291-296.

Nelson, D. W. and Sommers, L. E. (1973) Determination of total nitrogen in plant material. Agron. J. 65, 109-112.

Nelson, D. W., and Sommers, L. E. (1982) Total carbon, organic carbon, and organic matter. p. 539-579. In Page, A. L. et al. (ed.) Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties (2nd ed.) Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.

Norris, J. R. (1959) The isolation and identification of Azotobacter. Lab. Pract. 8, 239-243.

Okon, Y., Albrecht, S. L. and Burris, R. H. (1977) Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 83-85

Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and Dean, L. A. (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extracting with sodium bicarbonate. USDA Circ. 939. US Gov. Print. Office, Washington, D.C., USA.

Olsen, S. R., and Sommers, L. E. (1982) Phosphorus. p. 403-430. In A.L. Page et al. (ed.) Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties (2nd ed.) Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.

Omar, S. A. (1998) The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 211-218.

PAL, S. S. (1998) Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. Plant Soil. 198, 169-177.

Park, M. S., Gadagi, R. S., Olayvanh, S., Kim, C. W., Chung, H. Y., Ahn, K. S. and Sa, T. M. (2001) Performance of MPS bacterial inoculation in two consecutive growth of maize plants. Korean J. Environ. Agric. 20, 335-339.

Pecina, R., Bonn, G., Burtscher, E. and Bobleter, O. (1984) High performance liquid chromatographic elution behavior of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation exchange stationary phase. J. Chromatography. 278, 245-258.

Pierce, F. J. and Larsan, W. E. (1993) Developing criteria to evaluate sustainable land management. In Kimble, J. M. (ed.) Proceedings of the VIII international soil management workshop. Utilization of soil survey information for sustainable land use, Sacramento, CA. p. 7-14.

Pikovaskaya, R. I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species, Microbiologiya. 17, 362-370.

Prathiba, C. K., Alagawadi, A. R. and Sreenivas, M. N. (1994) Establishment of inoculated organisms in rhizosphere and their influence on nutrient uptake and yield of cotton. Karnataka J. Agri. Sci. 8, 22-27.

Rajan, S. S. S., Watkinson, J. H. and Sinclair, A. G. (1996) Phosphate rock for direct application to soils. Adv. Agron. 57, 77-159.

Reyes, I., Benier, L. and Antoun, H. (2002) Rock Phosphate solubilization and colonization of Maize Rhizosphere by Wild and Genetically modified Strains of *Penicillium rugulosum*. Microb. Ecol. 44, 39-48.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R. and 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. Ecol. 28, 281-290.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R., Tanguay, P. and Antoun, H. (1999) Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of tropical *Penicillium rugulosum* and two UV induced mutants. FEMS Microbiol. Ecol. 28, 291-295.

Richardson, A. E. (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. p. 50-62. In Pankhurst, C. E., Doube, B. M. and Gupta, V. V. S. R. (ed.) Soil biota, management in sustainable farming systems. CSIRO, Victoria, Australia.

Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv. 17, 319-339.

Salih, H. M., Yahya, A. I., Abdul-Rahem and Munam, B. H. (1989) Availability of phosphorous in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate dissolving fungi. *Pl. Soil.* 120, 181-185.

Sample, E. C., Soper, R. J. and Racz, G. J. (1980) Reactions of phosphate fertilizers in soils. In Khasawneh, F. E. (ed.) The role of phosphorus in agriculture, p. 263-310, Am. Soc. Agron., Madison, Wisconsin

Sattar, M. A. and Gaur, A. C. (1987) Production of auxins and gibberellins by phosphate dissolving microorganisms. Zentralbl. Mikrobiol. 142, 393-395.

Seshadri, S. (1995) Phosphate solubilizing fungi from Thanjavur Delta, South India, Ph.D., thesis, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, India.

Singvilay, O., Gadagi, R. S., Lee, D. C., Im, G. J. and Sa, T. M. (2001) Effect

of long term manure and fertilizer application on P status and microbial activity in paddy soil, International symposium on soil and water management, 12-13 October, Suanbo, Korea, p 33.

Smith, F. W. (2002) The phosphate uptake mechanism. Plant Soil. 245, 105-114.

Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. (1989) *Statistical Methods*, Eighth Edition, Iowa State University Press. USA.

Sperber, J. I. (1958) Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Aust. J. Agric. Res. 9, 782-787.

Stumm, W. and Morgan, J. J. (1995) Aquatic chemistry, *Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. (3rd ed.) John Wiley, New York.

Subba Rao, N. S. (1982) *Advances in Agricultural Microbiology*. p. 229-305. Oxford and IBH Publishing Co., India.

Suh, J. S., Lee, S. K., Kim, K. S. and Seong, K. Y. (1995) Solubilization of insoluble phosphate by *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger* isolated from Korean soils. J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert. 28, 278-286.

Tabatabai, M. A. (1977) Effects of trace elements on urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem. 9, 9-13.*

Tabatabai, M. A. (1994) Soil enzymes. In Page, A. L et al. (ed.) Methods of Soil Analysis, SSSA, Madison, WI. p. 775-833.

Tabatabai, M. A. and Bremner, J. M. (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil. Biol. Biochem. 1, 301-307.

Tabatabai, M. A. and Bremner, J. M. (1970) Factors affecting soil arysulfatase activity. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 34, 427-429.

Tabatabai, M. A. and Bremner, J. M. (1972) Assay of urease activity in soils. Soil Biol. Biochem. 4, 479-487.

Taha, S. M., Mahmoud, S. A. Z., Halim-Al-Damaty, A. and Abd-El-Hafez, A. M. (1969) Activity of phosphate dissolving bacteria in Egyptian soils. Plant Soil. 31, 149-160.

Tarafdar, J. and Rao, A. V. (1996) Contribution of *Aspergillus* strains to acquisition of phosphorus by wheat (*Triticum aestivum* L.) and Chickpea (*Cicer arietinum* Linn,) grown in a loamy sand soil. App. Soil Ecol. 3, 109-114.

Thien, S. J. and Myers. R. (1992) determination of bioavailable phosphorus in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 56, 814-818.

Thomas, G. U., Shantaram, M. V. and Saraswathy, N. (1985) Occurrence and activity of phosphate solubilizing fungi from coconut plantation soils. Pl. Soil. 87, 357-364.

Van Elsas, J. D. and Heijnen, C. E. (1990) Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. Biol. Fert. Soils. 10, 127-133.

Vassilev, N., Fenice, M. and Federici, F. (1996) Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variabile* P16. Biotechnol. Tech. 10, 585-588.

Vassilev, N., Toro, M., Vassileva, M., Azcon, R. and Barea, J. M. (1997b) Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. Bioresource Technol. 61, 29-32.

Vassilev, N., Vassileva, M. and Azcon, R. (1997a) Solubilization of rock phosphate by immobilized *Aspergillus niger*. Bioresource Technol. 59, 1-4.

Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R. and Barea, J. M. (2001) Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarowia lipolytica* inoculated into a soil plant system. Biotechnol. Lett. 23, 149-151.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M. and Vassilev, N. (1999) Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp. on plant growth and phosphate uptake. Bioresource Technol. 67, 229-232.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M. and Vassilev, N. (1998) Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. J. Biotechnol. 63, 67-72.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M. and Vassilev, N. (2000) Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarowia lipolytica*. Process Biochem. 35, 693-697.

Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortez, A. and Bashan, Y. (2000) Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol. Fert. Soils. 30, 460-468.

Venkateswarlu, B., Rao, A. V. and Raina, P. (1984) Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from aridsoils. J. Ind. Soc. Soil Sci. 32, 273-277.

Wahid, O. A., and Mehana, T. A. (2000) Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus uptake by wheat and faba bean plants. Microbiol. Res. 155, 221-227.

Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E. and Vivanco, J. M. (2003) Root exudation and Rhizosphere biology. Plant Physiol. 132, 44-51.

Whitelaw, M. A., Harden, T. J. and Helyar, K. R. (1999) Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillum radicum.* Soil Biol. Biochem. 31, 655-665

Woodward, J. (1988) Methods of immobilization of microbial cells. J. Microbiol. Meth. 8, 91-102.

Zaidi, A., Khan, M. S. and Amil, M. D. (2003) Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). European J. Agron. 19, 15-21.

Zak, J. C., Willig, M. R., Moorhead, D. L. and Wildman, H. G. (1994)

Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach, *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101-1108.

Zayed, G. (1997) Can immobilization of *Bacillus megaterium*cells in alginate beads protect them against bacteriophages. Plant Soil. 197, 1-7.