

GOVP1199801723

31.46
L2931
V.2

최 중
연구보고서

시설재배지 염류집적도양의 개량을 위한
흡착제-미생물복합제의 개발

Inorganic Salt Uptake by Bacterial Cell Mass and Absorbents
for Soil Improvement in Glass House Condition

연구기관

충남대학교 농과대학

농림부

제 출 문

농 립 부 장관 귀하

본 보고서를 “시설재배지 염류집적 토양의 개량을 위한 흡착제-미생물 복합제의 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 11. .

총괄연구책임자 : 최 우 영
연 구 원 : 윤 민 호
연 구 원 : 남 윤 규
연 구 원 : 현 문 식
연 구 원 : 고 정 연
연 구 원 : 김 연 희
연 구 원 : 신 공 식
연 구 원 : 오 진 환

요 약 문

I. 제 목

시설재배지 염류집적 토양의 개량을 위한 흡착제-미생물 복합제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구는 시설하우스에서 나타나는 염류집적 현상을 물리적으로 제거 또는 회석하기 위한 흡착제와, 여기에 첨가하여 토양내에 분포하면서 염류를 흡착 및 용탈하여 비옥도와 작물생육에 영향을 미치는 미생물을 분리 혼합하여 <흡착제-미생물 복합제>를 개발하는데 목적이 있으며, 물리·화학적방법에 생물학적 경감방법을 병용하여 건전한 토양환경을 유지함으로써 지속적 환경보존형 농업기반을 구축하는데 기여하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 가. 염류장해지역의 토양조사 및 미생물의 분포연구
- 나. 염류내성 유용미생물의 분리, 선발 및 검정
- 다. 염류 흡착제의 비교연구
- 라. 염류흡착제-미생물복합제의 조제 및 제제화 관련연구
- 마. 복합제의 실용성 구명

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 염류장해지역의 토양조사 및 미생물의 분포연구

각도의 농촌진흥원에서 추천하는 염류장해 보고지역으로 부터 192점의 시설하우스 토양시료를 수집하고 화학조성과 토양미생물의 분포를 조사하였다. 유효인산, 치환성 칼륨 및 칼슘의 함량이 정상 수준보다 높은 분포를 보임으로서 NO₃-N과 함께 염류집적의 주요 원인임을 확인하였다. 세균류 (mesophile, thermophile, actinomycetes)와 진균류별 분포와, 주요작물의 근면 (rhizoplane) 미생물, 상호경쟁 및 길항성을 조사하였다. 우점하는 중온성 세균수와 주요 토양성분간에 유의성있는 상관관계는 없었다.

나. 염류내성 유용미생물의 분리, 선발 및 검정

1) 염류내성균의 순수분리 및 고도내염성 균주의 선발

전항의 시료로부터 염류내성균을 순수 분리하였으며 2.5M NaCl 함유 평판배지에서 비교적 생육이 양호한 균주 *Halomonas* sp. HS1-1을 선발하였다.

2) 인산집적 세균의 분리 및 인산흡착율의 비교

같은 내염성균의 시료로 부터 autoradiography방법에 의하여 인산집적균을 분리하고 순수정제한 다음 액체배양을 통하여 cell mass에 비하여 인산의 감소율이 높은 PO8 및 PO14의 2개 균주를 선발하였다. 이들은 각각 *Acinetobacter lwoffii*, *Chromobacterium lividum*으로 분류되었으며, 균주 PO8에 대하여 jar fermentor내에서 인산흡수율을 실험한 결과 PO14에 비하여 생육은 낮은 반면에 인산흡착율이 높아서 배양 1일후 93%의 흡수값을 나타내었다.

다. 염류 흡착제의 비교

농업용소재 7종(수입재료 3종포함), 일반 공업용소재 2종, 세제및 소취제 각 1종씩을 대상으로 양이온및 음이온의 흡착력을 측정하고 이들의 입자 크기, 단위 무게에 대한 표면적과 공극률을 측정하여 비교 평가함으로써 실용가능한 소재로서 zeolite(I)과 인도네시아산 호수퇴적 peat, 스리랑카산 Lignocell, 그리고 탈지미강및 vermiculite을 목적 이온에 따라 이용할수 있음을 구명하였다.

농업용 zeolite(I)는 질산이온을 제외한 다른 모든이온에 대하여 높은 흡착력을 나타내었고, Lignocell과 vermiculite은 양이온 흡착율 (Fe^{2+} 11.2~11.3; K^+ 4~4.6 meq/100 g), 그리고 탈지미강은 질산흡착력(3.7 meq/100 g)이 비교적 높았으며, 인도네시아산 호수퇴적 peat는 zeolite(I)과 비슷한 흡착양상을 나타내었다. 이들은 공급가격면에서도 농업용 재료로서 경쟁력이 있다고 판단된다.

라. 염류흡착제-미생물복합제의 조제 및 제제화

1) 미생물의 대량배양

선발된 우수균주 <*Halomonas* sp. HS1-1, *Acinetobacter lwoffii* PO8, *Chromobacterium lividum* PO14>는 먼저 shake flask에서 최적배지와 배양조건을 검토한 다음 2종의 jar fermentor로 parameter를 구하여 대량배양법을 확립하였다. 또한 인산함량이 높은 토양은 질산염 농도도 아울러 높았으므로 실용적으로는 혼합용 균주로서 탈질균을 포함하는 것이 효율적일 것이므로, 탈질균 *Alcaligenes* sp. DS5을 추가하였다.

2) 복합제의 제제화

흡착제중에서 흡착력이 우수한 zeolite(I) 분말과 타재료를 혼합하고 1.2

~3%의 CaCO₃를 첨가하여 pH를 조정한 다음, 여기에 각 선발균주의 액체배양물을 sieve상에서 배합하여 통과시키면서 트레이에 받아 28℃에서 숙성시켰다. 숙성중 생균수는 10⁸~10⁹ 수준으로 상승하며, 음건하여 그대로 zipper bag에 포장하거나 진공포장하였다.

3) 복합제의 보존성

염류흡착제-미생물 복합제를 수분함량 20%이하에서 포장하여 실온과 4℃에서 보관하면서 생균수의 변화를 조사한 결과, 90일후 실온에서 지수 2, 4℃에서는 지수 1이하의 감소율을 나타내었다. 탈질균의 경우에는 인산집적균에 비하여 실온에서의 감소율이 커서 지수 3을 나타내었다.

마. 복합제의 실용성

1) 식물 안전성

국내에서 일반적으로 재배되는 하우스 원예작물 7가지 22품종에 대하여 발아 및 육묘실험을 통하여 대조구와 비교 관찰한 결과 전 실험구에서 발아및 초기생장의 차이 또는 특징적인 병징이 발견되지 않았으므로 선발균주가 시험작물에 대하여 공존성이 있음을 확인하였다.

2) Incubation test에 의한 토양중 인산 제거효율의 비교

Acinetobacter lwoffi PO8, *Chromobacterium lividum* PO14를 살균한 토양 (Top and sub soil)에 접종하여 실내에서 7주 동안 배양실험을 수행하면서 토양중 유리 인산과 유효태 인산의 변화를 측정하였다.0 유리 인산의 농도는 배양 초기 3일간 5~25 ppm 농도 범위에서 다소 기복을 보였으나 기간이 지나면서 점차 감소하여 10일 이후에는 최저 수준에 이르러 실험기간중 5 ppm 이하로 유지되었다. 유효인산의 변화를 보면 배양 초기 14일간 40~100 cmol.

ㄱ의 진폭으로 실험구에 따라 다양하게 증감하다가 그후에는 큰 변화없이 농도가 유지되었으며, 7 주의 실험기간중 기간이 길어질수록 유효인산이 근소하게 증가하는 경향을 나타내었다.

3) 풋트 및 하우스 재배시험을 통한 효과의 비교

풋트에서 과린산석회를 과다시비하고 상치, 치커리 및 들깨를 재배하면서 복합제의 점종효과를 비교한 결과, 철분및 아연 등의 영양결핍 현상은 관찰되지 않았으며 채취한 잎의 경도 즉 전단용력과 착공력 등이 복합제 시용구에서 낮아져 엽채류 특히 들깨잎의 경화현상을 감소시키는 효과를 나타내었다. 시설 하우스 적용시험에서도 작물 안전성을 확인하고 녹조류 발생의 저감효과를 얻었다.

SUMMARY

These experiments were conducted to develop an efficient absorbent-microbe mixture for application in green house soils as a desalination device. Extreme halophiles, denitrifier, and phosphate accumulating bacteria were isolated from soils, and their culture conditions for production of viable cell mass were optimized. Various root-media and agromaterials were tested and characterized for their abilities of ion absorption, particle sizes and surface areas to select a suitable absorbent. And the methods for preparation and packing of absorbent-microbe mixtures were evaluated, and then storage conditions were also examined to maintain the viable numbers of organisms in the mixture. The pot and field experiments were carried out to elucidate the desalting potentials or phosphate uptake by the mixtures and/or the inoculated organisms. The results obtained were as follows.

1. Samples of 192 green house soils were collected from the sites which reported as high-salt soil by the Provincial Office of Rural Development, and their chemical compositions and microbial flora were investigated. High levels of phosphorus, potassium and calcium contents were observed in most of the samples and appeared to increase the soil salinity in accordance with nitrate-nitrogen. The distribution of microbial flora such as bacteria (mesophile, thermophile, actinomycetes) and fungi, and their halotolerances were studied.

2. An extreme halotolerant organism, *Halomonas* sp. HS1-1, was isolated from soils, and a denitrifying strain of *Alcaligenes* DS5 was selected. Two strains of phosphate accumulating bacteria were isolated by a method of autoradiography and were identified as a strain belong to *Acinetobacter lwoffii* <PO8> and to *Chromobacterium lividum* <PO14>, respectively, according to

Bergey's Manual of Determination of Bacteria..

3. The optimal conditions for phosphate uptake in liquid culture were found to be: 30°C and pH 7.5 for the strain for PO8; and 30°C and pH 7.0 for P14. Glucose or glycerol, and ammonia-nitrogen were adequate as carbon and nitrogen sources. The level of phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 was maximal as 93% 1 day after cultivation and this was slightly higher than that of *Chromobacterium lividum* P14. The polyphosphate kinases were assayed by the radioisotopic method described by Harold, and that from the strain *Acinetobacter lwoffii* PO8 was purified by column chromatographic procedures. Cellular location of polyphosphate and release of inorganic phosphate were estimated.

4. Among various root-media tested for their absorption rates of ions, particle sizes and surface areas: zeolite(I), a lake sediment peat from Indonesia, and a palm fibre Lignocell from Sri Lanka could be employed for practical purposes. Absorption rates of the zeolite(I) and peat were high for most of the ions tested except nitrous ion, and those of the Lignocell and vermiculite were 11.2~11.3 meq/100g for Fe^{2+} and 2.2~4.6 for K^+ , whereas the defatted ricebran revealed high absorption rates for nitrous ion. These materials were considered to be economically competitive as well.

5. The culture parameters of the selected bacterial strains were obtained from 2 types of jar fermentors for large scale production of the cell mass, which was subjected to use as inoculants. Growth of the strain *Acinetobacter lwoffii* PO8 reached to $\sim 10^9$ cells/mL in 24 hours, while those of *Chromobacterium lividum* P14 and *Alcaligenes* DS5 reached to $\sim 10^8$ in 24 and 48 hours, respectively. Dilutions of the culture broths were mixed with the absorbent materials, of which the pH were adjusted above 6 with calcium carbonate, and incubated for aging and then packed in PE film in vacuo. The mixing ratio of the materials were:

- ① Zeolite(I) 100%
- ② Zeolite(I) + 5% Lignocell
- ③ Zeolite(I) +10% Lignocell
- ④ Zeolite(I) + 5% Rice bran
- ⑤ Zeolite(I) +10% Rice bran
- ⑥ Zeolite(I) + 5% Rice bran + 5% Lignocell

6. The pot and field experiments were carried out to elucidate the desalting potentials or phosphate uptake by the mixtures and/or the inoculated organisms. The results of germination tests supported the safety of plants, which tested with variety of green house plants. A seedlings of lettuce, chikory, and green perilla were transplanted to the pot which supplemented with excess amount of calcium superphosphate and amended with the absorbent-microbe mixture. Visible symptoms of deficiency by iron or zinc were not observed during the growth period, and the shear and puncture strengths of the leaves of the plants, especially perilla reduced significantly, suggesting that chewiness of the leaves improved. And the growth and yield of cucumber were also investigated in green house condition, and that resulted in no significant variations among the experimental plots but in reduction of algal growth in top soils.

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction	(15)
Chapter 2. Materials and Methods	
1. Materials and Reagents	
1.1. Agromaterials	(19)
1.2. Plant Seeds	(19)
1.3. Reagents	(19)
2. Microbiological Methods	
2.1. Media	(20)
2.2. Isolation and Purification of Organism	(21)
2.3. Bacterial Cultivation	(22)
2.4. Preservation	(22)
2.5. Viable Count	(22)
2.6. Classification	(22)
3. Biochemical Methods	
3.1. Assay of Polyphosphate Kinase	(24)
3.2. Purification of Enzyme	(27)
3.3. SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis	(28)
4. Analytical Method	
4.1. Measurement of pH and EC	(29)
4.2. Analysis of Organic Material and Nitrogen	(29)
4.3. Analysis of Cations	(29)
4.4. Analysis of Phosphate	(30)
4.5. Qualitative Analysis of Phosphate	(31)
4.6. Determination of Chlorophyll	(31)

4.7. Determination of Protein	(33)
4.8. Determination of Reducing Sugar	(33)
4.9. Measurement of Particle Size and Surface Area	(33)
4.10. Measurement of Shear and Puncture Strength	(34)
5. Uptake of Phosphate in Soil and Water	
5.1. Phosphate Uptake by the Organism in Liquid Culture	(34)
5.2. Phosphate Uptake in Soil	(34)
6. Pot and Field Experiments	
6.1. Test of Germination and Seedling	(35)
6.2. Pot and Field Experiments	(36)
Chapter 3. Results and Discussion	
1. Composition and Microbial Flora of Green House Soil	
1.1. Soil Composition	(37)
1.2. Distribution of Microorganism	(38)
2. Isolation and Selection of Salt Tolerant Organisms	
2.1. Halotolerant Bacteria	(42)
2.2. Phosphate Accumulating Bacteria	(43)
3. Phosphate Uptake by the Phosphate Accumulating Bacteria	
3.1. Phosphate Uptake in Liquid Culture	(49)
3.2. Localization of Phosphate in the Cell	(49)
3.3. Culture Conditions for Phosphate Uptake	(51)
3.4. Mechanism of Phosphate Uptake	(56)
4. Characterization of Absorbent Materials	(63)
5. Preparation of the Absorbent-microbe Mixtures	
5.1. Production of the Bacterial Cell Mass	(76)
5.2. Preparation	(77)
5.3. Package and Storage	(79)

6. Field Application	
6.1. Germination Rates	(82)
6.2. Soil Incubation Tests	(82)
6.2. Pot and Field Trials	(83)
Chapter 4. Conclusion	(95)
Chapter 5. References	(98)
Appendix	(101)

목 차

제1장 서론

제1절 연구개발의 목적과 범위	(15)
제2절 국내외 연구동향	(16)

제2장 재료 및 방법

제1절 재료 및 시약

1.1. 흡착제 및 농용재료	(19)
1.2. 식물종자	(19)
1.3. 시약	(19)

제2절 미생물학적 방법

2.1. 배지	(20)
2.2. 균주의 분리	(21)
2.3. 배양방법	(22)
2.4. 균주의 보존	(22)
2.5. 생육 및 생균수의 측정	(22)
2.6. 동정	(22)

제3절 생화학적 방법

3.1. Polyphosphate kinase 활성도 측정	(24)
3.2. 효소의 정제	(27)
3.3. SDS-polyacrylamide 겔 전기이동법	(28)

제4절 분석 방법

4.1. pH 및 EC의 측정	(29)
4.2. 유기물과 질소의 분석	(29)
4.3. 양이온(K, Ca, Mg)의 정량	(29)

4.4. 인산의 정량	(30)
4.5. 인산의 정성	(31)
4.6. Chlorophyll의 정량	(31)
4.7. 단백질의 정량	(33)
4.8. 환원당의 정량	(33)
4.9. 입자의 크기 및 표면적의 측정	(33)
4.10. 전단응력 및 착공력의 측정	(34)
제5절 토양 및 수계에서의 흡착실험	
5.1. 액체배지	(34)
5.2. 토양	(34)
제6절 작물시험	
6.1. 발아 및 육묘시험	(35)
6.2. 포트 및 하우스시험	(36)
제3장 결과 및 고찰	
제1절 염류장해지역의 토성 및 미생물 분포	
1.1. 염류장해지역의 토양성분	(37)
1.2. 염류장해지역의 미생물 분포	(38)
제2절 염류내성 유용미생물의 분리, 선발 및 검정	
2.1. 염류내성균의 순수분리 및 고도내염성 균주의 선발	(42)
2.2. 인산축적 세균의 분리 및 동정	(43)
제3절 인산축적균에 의한 인산흡수 및 균체생산	
3.1. 수계에서의 인산의 흡수	(49)
3.2. 세포내 인산의 분포	(49)
3.3. 배양조건	(51)
3.4. 인산의 흡수 메카니즘	(56)
제4절 염류 흡착제의 특성	(63)

제5절	염류흡착제-미생물복합제의 조제 및 제제화	
5.1.	미생물의 대량배양법	(76)
5.2.	복합제의 제제화	(77)
5.3.	복합제의 보존성	(79)
제6절	흡착제의 작물안전성 및 적용시험	
6.1.	작물안전성	(82)
6.2.	토양에서의 인산의 흡수	(82)
6.3.	포트 및 하우스 재배시험	(83)
제 4 장	결 론	(95)
제 5 장	인 용 문 헌	(98)
부 록	(101)

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

근년 전국의 시설재배 면적은 급격히 증가되어 왔고, 금후에도 이러한 추세는 지속될 것으로 전망된다. 시설재배의 경우 제한된 면적내에서 연작을 반복해야 하므로 토양병해의 증가와 양분의 불균형을 초래하여 무기성분의 농도 불균형과 특정 염류의 과다축적으로 인한 흡수 및 생육장애가 유발되기 쉽다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 농촌진흥청을 중심으로 시설재배토양의 화학성, 장애 발생상황, 작부체계, 유기물 시용량등의 조사분석 및 비배관리, 토양개량, 재배기술의 개선을 위한 다수의 연구보고가 있다. 이들을 요약하여 보면 환류관계에 의한 염류의 용탈과 회석, 새로운 토양의 객토 또는 심토반전, 흡비작물에 의한 양분의 소모, 농업부산물에 의한 흡착제거등으로서 효과를 기대할수 있겠으나 시설재배의 특수성 때문인지 손쉽게 실용화되지 않고 있다. 또한 최근 대형 첨단 유리온실의 비율이 크게 높아지고 있는바 이와같은 고정 시설의 증가는 지금까지 수년간격으로 하우스의 피복 재료를 견고 노지로 전환하여 전답작 순환체계에 의하여 용탈을 촉진시키던 방법의 적용을 더욱 어렵게 하고 있다. 염류집적의 문제를 줄이기 위하여 무엇보다도 영농자 스스로 과잉시비를 하지 않도록 시비관리에 대한 기술교육과 제몽이 뒤따라야 함에도 이런 면의 노력도 미진한 실정이다.

따라서 본연구에서는 시설하우스에서 나타나는 염류집적 현상을 물리적으로 제거 또는 회석하기 위한 흡착제와 여기에 첨가하여 토양내에 분포하면서 염류를 흡착 및 용탈하여 비옥도와 작물생육에 영향을 미치는 미생물을 분리 혼합하여 <흡착제-미생물 복합제>를 개발하고자 본과제를 추진하게 되었다. 물리·화학적방법에 추가하여 생물학적 경감방법을 병용함으로써 건전한 토양환경과 농업기반을 구축하는데 기여하고자 한다.

가. 염류장해지역의 토양조사 및 미생물의 분포연구

- 1) 충청지역 시설원예토양 및 기타 염류장해 보고지역의 토양성분 조사
- 2) 근권 및 비근권 토양의 미생물상 조사

나. 염류내성 유용미생물의 분리, 선발 및 검정

- 1) 염류내성균의 분리 및 농도별 내염성 조사
- 2) 고내염성 미생물의 선발 및 검색
- 3) 선발 미생물의 작물친화성 및 특성검토

다. 염류 흡착제의 비교연구

- 1) 물리적 및 화학적 흡착
- 2) 기존 흡착제와의 비교

라. 염류흡착제-미생물복합제의 조제 및 제제화 관련연구

- 1) 미생물의 대량배양법
- 2) 혼합방법 및 품질규격
- 3) 복합제의 보존성

마. 복합제의 실용성 구명

- 1) 식물 안전성
- 2) 풋트 및 농가적용 시험을 통한 효과의 비교분석

제2절 국내외 연구동향

가. 선진외국의 경우

서구의 조방적인 농업체계에 있어서 본연구와 직접 관련된 연구는 보고되어 있지 않으나, 아래와 같은 기초적 연구를 찾아볼수 있다.

- 근권미생물의 작물 근권에서 역할과 기주식물과의 관계. (Suslow등 1982; Cook등 1987; Liddell등 1989)
- 고염류농도 토양중의 근권미생물에 관한 연구. (Bernstein 1775; Ahmad 1987; Rovira등 1983)
- Phosphorus removal by pure and mixed cultures of microorganisms. (Ye, Ohdake & Toda 1988²²⁾; Ubukata & Takii 1994²⁴⁾)
- 생물학적 인제거 프로세스에 있어서의 세균의 역할과 제어. (Nakamura 1988 일본미생물생태학회편 환경정화와 Biotechnology)¹⁸⁾

나. 국내의 경우

농촌진흥청을 비롯한 관련기관 및 학계에서는 염류집적현상에 많은 관심을 가지고 그 실태조사 및 시설하우스 토양 염류 경감방법 등에 관하여 아래와 같은 기초연구를 진행하여 왔다.

- 시설하우스 토양 집적 염류 경감방법에 관한 기초연구
 - 석고와 생고의 제염효과는 석고 500 kg에서 14%, 생고 300 kg에서 6%의 증수효과. (충남진흥원 1979)²⁵⁾
 - 토양의 염농도는 벧짚 및 오픈을 처리로 29~40% 낮아지고 토마토의 수량은 9~17% 증수되었으며 벧짚+오픈을 복합처리가 좋았음. (경기진흥원 1991~93)
 - 관수에 의한 염류의 용탈특성과 염류집적 토양의 염류제거 연구. (농업기술연구소 1985)²⁶⁾
 - 관수에 의한 토양의 제염율은 담수>객토>벧짚>제염식물>무처리 순으로 염류제거 효과가 컸으며 제거된 염류는 토양깊이 10~20 cm 부근에 집적되었음. (농업기술연구소 1992)
 - 유기물 시용에 의한 염류경감 연구. (농업기술연구소 1989)

- 시설연작지 심토반전 깊이별 염류경감 효과 연구. (경남진흥원 1992)
 - 하우스 딸기에 대한 토성별 염류피해농도 연구. (경남진흥원 1993)³⁰⁾
 - 경제작물재배지 염류집적과 개량대책 (농업환경신포지움 농업과학기술원 허범량,송요성 1995)
- 시설하우스 토양에 있어서 미생물 연구
- 시설원예작물의 안전생산을 위한 미생물 연구. (영남작물시험장 1992 ~93)
 - 미생물에 의한 연작지 염류장해 연구. (경상대학교농대 박창선, 1989)²⁶⁾
 - 시설재배지토양의 조류 생태연구. (농업기술연구원 김영식, 이상규 1993)²³⁾
 - 토양미생물 기능군 분류에 관한연구. (농업기술연구원 서장선,이상규 1993)²⁷⁾
- 시설재배지역에 대한 염류집적 실태조사
- 시설하우스 토양성분조사. (농업기술연구소 1985, 89, 90; 경남진흥원 1984, 85)²⁴⁾
 - 양분축적지 토양의 토심별 무기성분 집적양상 연구. (농업기술연구원 윤정희등 1993)³¹⁾
 - 시설재배지 연작지 시비량과 토양양분 변화연구 (경기진흥원 이상은 등 1993)²⁹⁾

제 2 장 재 료 및 방 법

제1절 재 료 및 시 약

1.1. 흡착제 및 농용재료

농업용소재로서 Lignocell (Coconut palm peat)<Sri Lanka>, 팽윤왕겨 <공주원에협동조합>, 쌀겨 <효성농산(주)>, 이탄 <Indonesia>, perlite <삼용산업>, vermiculite <미성산업>, zeolite(I) <진성화학(주)> 등 7종, 일반 공업용소재로서 활성탄 <(주)영안엔지니어링> 및 tobermolite (경량기포콘크리트 ALC) 등 2종, 세제용 zeolite (4A) 및 소취제용 Greenlite"AK-PQ" <애경소재(주)> 각 1종씩을 구입하거나 분양받아 사용하였다. 작물시험용 재료로서는 원예6호 상토 <부농산업>, 연결포트 <서울농자재>, 1/5000a 와그너포트 등을 사용하였다.

1.2. 식물종자

고추(*Capsicum annum* L.), 토마토(*Lycopersicum esculentum* Mill.), 오이(*Cucumis sativus* L.), 수박(*Citrus vulgaris* Shrad.), 참외(*Cucumis melo* L.), 호박(*Cucurbita moschata* Duch.), 배추(*Brassica pekinensis* Rupr.), 상치(*Lactuca sativa* L.), 들깨(*Perilla frutescens* Brit.)의 홍농, 농우, 서울, 중앙종묘 등의 주요 품종을 구입하여 사용하였다.

1.3. 시 약

Yeast extract, nutrient agar 등의 미생물 배양용시약은 Difco Lab. 제품을 사용하였으며, 분석용 시약은 Sigma, Junsei, Merck Chem. Co.의 특급시약을 구입하여 사용하였다. 인산분석 및 효소활성도 측정을 위해 사용한 $H_3^{32}PO_4$ 와 $[\gamma -^{32}P]ATP$ 은 Amersham사 (Amersham, UK)의 제품을, 그리고 효소활성도

측정에 사용된 tripolyphosphate, creatine phosphokinase, ATP, ADP 및 phosphocreatine은 Sigma Chem. Co.의 제품을 사용하였다.

크로마토그래피용 여지는 Whatman사 (Whatman International Ltd., UK)의 3MM Chr을, 겔 여과와 이온교환크로마토그래피에는 Pharmacia Biotech사의 Sephadex G-100와 DEAE-Sepharose (Resource™ Q)을 사용하였다.

제2절 미생물학적 방법

2.1. 배지

1) Yeast glucose agar (YGA): yeast extract 3, glucose 1, K_2HPO_4 0.3, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, cycloheximide 0.05, agar 15 gL^{-1}

2) Nutrient agar (NA): beef extract 3, peptone 5, cycloheximide 0.05, agar 15 gL^{-1} , pH 6.8

3) Starch casein agar (SCA): soluble starch 10, vitamin-free casein 0.3, KNO_3 2, NaCl 2, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 0.02, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, cycloheximide 0.025, agar 20 gL^{-1} , pH 7.2

4) Potato dextrose agar (PDA): potato infusion from 200, dextrose 20, chloramphenicol 0.02, agar 15 gL^{-1} , pH 5.6

5) P-1 medium : glucose 2.0, NH_4Cl 1.0, NaCl 2.0, Na_2SO_4 1.0, KCl 0.1, $MgCl_2$ 0.01, $CaCl_2$ 0.01, $FeCl_3$ 0.001, $NaHPO_4$ 0.22, tris(hydroxymethyl) amino-methane 10 gL^{-1} , pH 7.6

6) Pseudomonas isolation agar : peptone 20, $MgCl_2$ 1.4, K_2SO_4 10, Irgasan 0.025, agar 13.6 gL^{-1} , pH 7.0

7) Nitrite agar : Nutrient broth + $NaNO_2$ 125 mg, $(NH_4)_2SO_4$ 250 mg, α -naphthylamine 0.6 g, agar 15 gL^{-1}

2.2. 균주의 분리

1) 인산집적균

충남 및 전북지역의 주요 시설재배지에서 수집한 토양시료와 대전시 하수처리장으로부터 수집한 활성오니 (activated sludge)를 분리원으로 하였다. 생리 식염수로 희석한 후 P-1 한천배지에 도말하여 30℃에서 2일간 배양하면서 생성된 콜로니를 3회 이상 계대하여 순수분리하였다.

Autoradiography법을 적용하였으며, 즉 한천배지에서 선발된 균주를 $10^{-2} \mu\text{Ci}$ 이하의 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ (Amersham PBS13)를 함유하는 P-1 한천평판에서 배양하면서 콜로니가 보일 정도로 자라면 X-ray 필름 (Agfa Curix RP1)으로 덮어서 하루 지난 다음 필름을 현상하여 검은 반점을 나타내는 콜로니를 선발하고 <4.5. 동위원소법 2 참조>, 이를 정제하여 P-1 액체배지에서 인산의 감소율이 높은 균주를 최종선발하였다.

2) 탈질균

탈질균은 NO_3 또는 NO_2 기질의 분해과정에서 생성되는 질소가스 (NO , N_2O , or N_2)의 생성유무로 식별하였다. 즉 5 mM의 KNO_3 를 첨가한 NB 배지에 Durham tube를 거꾸로 놓고 분리균을 접종하여 기포를 생성하는 균을 탈질균으로 1차 선발한 다음, Mycielski와 Gucwa¹⁷⁾의 변법에 따라 기질로 NO_2 가 함유된 nitrite agar plate에서 혐기배양하면서 콜로니 주변의 변색 유무를 확인하여 선발하였다.

3) 내염성균

염류내성 시험에는 Kushner¹³⁾의 호염균 (halophile) 분류법을 적용하여 즉 0.2~0.5 M, 저도내염균 (slight halotolerant); 0.5~2.5 M, 중도내염균 (moderate halotolerant); 2.5 M<, 고도내염균 (extreme halotolerant)를 기준으로 각각 0.5, 1.5 및 2.5 M NaCl 함유배지를 사용하였다.

2.3. 배양방법

250 mL 삼각플라스크에 P-1 액체 배지를 50 mL씩 분주하여 121°C에서 15분간 멸균한 후 전배양액을 0.5% (균수 $3\sim 4 \times 10^6$)되게 접종하여 30°C에서 1에서 2일간 진탕배양 (Rotary shaker, 150 rpm with a stroke diameter of 5 cm) 하였다. 접종액은 보관중인 사면배지로부터 균주를 한 백금이 취해 P-1배지에 접종하고 24시간 진탕배양한 것을 사용하였다.

2.4. 균주의 보존

분리균주는 P-1 한천사면 배지에 접종하고 30°C에서 2일간 배양하여 균체의 증식상태를 확인한 후 4°C에서 보관하였고, 장기보존을 위하여는 액체배양물을 원심분리하고 25% glycerol을 함유한 배지에 현탁시켜 급속냉동 (snap freezing) 한 후 -85°C에서 보관하였다.

2.5. 생육 및 생균수의 측정

배양액을 분광광도계 (Shimadzu UV-120-02)를 이용하여 660 nm에서 탁도를 측정하였다. 또한 생균수의 측정 (viable count)은 회석평판법에 의하였으며 세균은 NA 또는 YGA, 방선균은 SCA, 사상균은 PDA, *Pseudomonas*는 Difco isolation agar를 사용하여 중온성 세균과 방선균의 경우 30°C에서 3~14일간, 고온성 세균은 55°C에서 3일간, 사상균은 25°C에서 3~7일간 배양하여 생육하는 콜로니를 계수하여 평균값을 구하고 viable cells/mL로 환산하였다. 근권미생물에 대하여는 작물의 뿌리를 수중분획법으로 처리하여 주로 근면미생물을 분리 계수하였고 뿌리의 무게 1 g에 대한 콜로니 형성단위로 나타내었다.

2.6. 동정

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹²⁾와 Cowan등의 Manual for the Identification of Medical Bacteria (2nd edition)⁴⁾에 준하여 동정하였다.

1) 형태학적 특성

분리균주의 크기와 형태학적 특성은 Gram염색, nutrient agar에서 배양한 콜로니의 크기, 모양, 색깔 등을 관찰하였고 반 유동 중층배지에 배양하여 운동성을 조사하였다.

2) 전자현미경 검경

Nutrient agar에서 24시간 배양한 균체를 2.5% (v/v) glutaraldehyde에 1시간 전고정한 다음, 증류수로 세척하고 2% osmium tetroxide로 1시간 후고정하였으며 이어서 등차 농도의 ethanol로 탈수시켰다. n-Amylacetate로 40분간 2회 처리하고 건조 (critical point dryer)하여 gold coating한 후 주사형전자현미경 (SEM, Hitachi-S2300)으로 검경하였다.

3) 생리 및 화학적 특성

균주의 생리학적 특성으로는 gelatin 액화력, indole 생성능, nitrate 환원력 및 catalase, oxidase, urease의 생성 유무와 아울러 혐기적 조건에서의 증식여부를 관찰하였다.

화학적 분석방법으로는 Komagata 등¹¹⁾의 방법으로 세포구성 지방산을 분석하여 비교하였다. 동결건조한 세포 20 mg과 5% methanolic HCl 2.5 mL을 시험관에 넣어 100°C에서 3시간 동안 가열하여 지방산을 fatty acid methyl ester (FAME)화 시켰다. 그 후 실온에서 냉각 시킨 후 증류수 1 mL을 가하여 3 mL n-hexane으로 3번 반복 추출하고 n-hexane 추출물에 두배의 증류수를 넣어 혼합한 후 원심분리하여 n-hexane 층만 분리하였으며 질소가스로 농축시킨 FAME를 분석시료로 사용하였다. 지방산 분석은 위의 농축된 FAME를 GC (Hewlett Packard HP6890)로 분석하였다. 이때 컬럼은 capillary column을, detector는 FID (Flame ionization detector)을 사용하였으며, injection 온도는 250°C, 컬럼 온도는 180°C, 운반 가스는 질소 가스 (30 mL/min) 이었다.

제3절 생화학적 방법

3.1. Polyphosphate kinase 활성도 측정

1) 효소액의 조제

500 mL 삼각플라스크에 P-1배지 100 mL를 넣고 전배양액 0.5%를 접종하여 24시간 진탕배양한 후 16,000×g에서 15분간 원심분리 (한일과학산업, Supra 22K)하여 얻은 균체 (건체량 0.1 mg/100 mL)를 25 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)과 4 mM polyphosphate (potassium salt)를 포함하는 extract buffer 3 mL를 첨가하여 초음파처리 (Ultrasonic Ltd., Disintegrator-Rapids Type 4504)하였다. 균체 파쇄액을 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

2) T'Seyen의 방법

T'Seyen²⁰⁾의 방법은 0.77 mM ATP 1 μ L, 20 mM MgCl₂ 1 μ L, 40 mM creatine phosphate 10 μ L, 20 unit/mL creatine phosphokinase 10 μ L 및 0.1 mci/mL [γ -³²P]ATP 4 μ L로 조제한 반응용액에 조효소액을 넣어 100 μ L로 하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후 David 등⁵⁾과 Ebel⁶⁾의 방법에 따라 1 L중에 isopropanol 735 mL, 5% TCA, ammonia water 2.5 mL를 전개용매로 하여 전개한 후 PPK에 의해 얻어진 Poly-P의 크로마토그램을 확인하였다.

3) Harold의 방법

Harold 등⁸⁾의 방법은 20 mM MgCl₂ 1 μ L, 20 unit/mL creatine phosphokinase 3 μ L, 0.2 M ADP 1 μ L, 0.1 mci/mL [γ -³²P]ATP 4 μ L, 조효소액 150 μ L 및 0.1 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)을 넣어 300 μ L로 하여 37°C 수조에서 반응시키고 1 N PCA 0.25 mL와 0.5% BSA 0.5 mL를 넣어 형성된

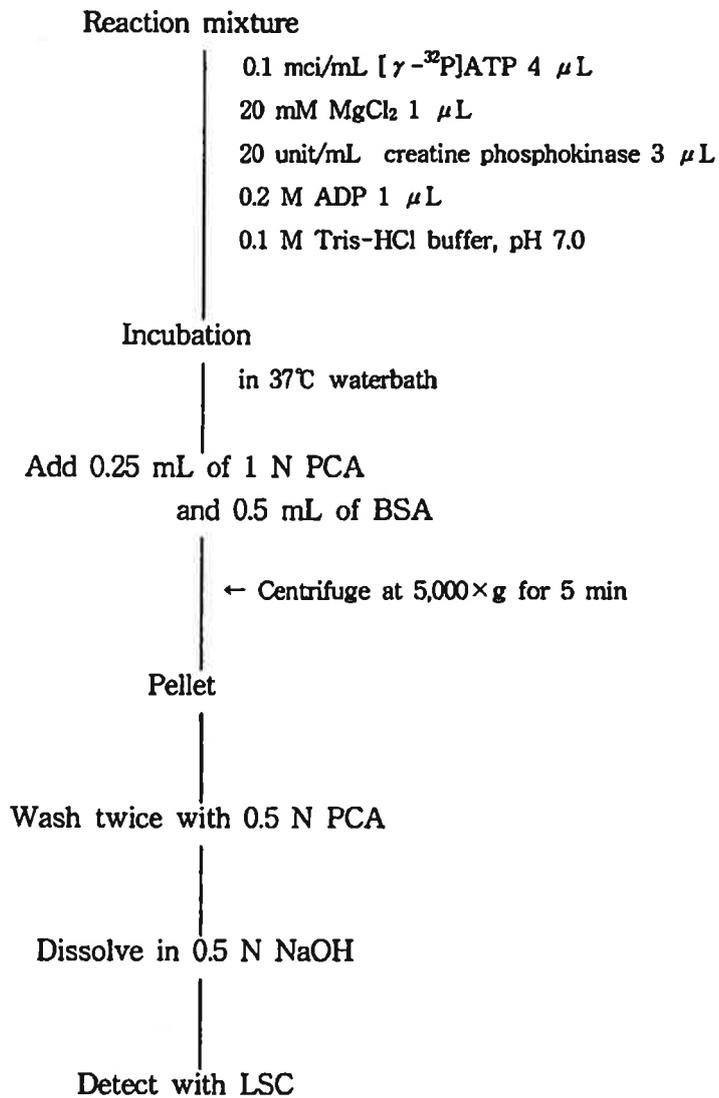


Fig. 1. Schematic diagram for polyphosphate kinase assay according to the method described by Harold.¹⁴⁾

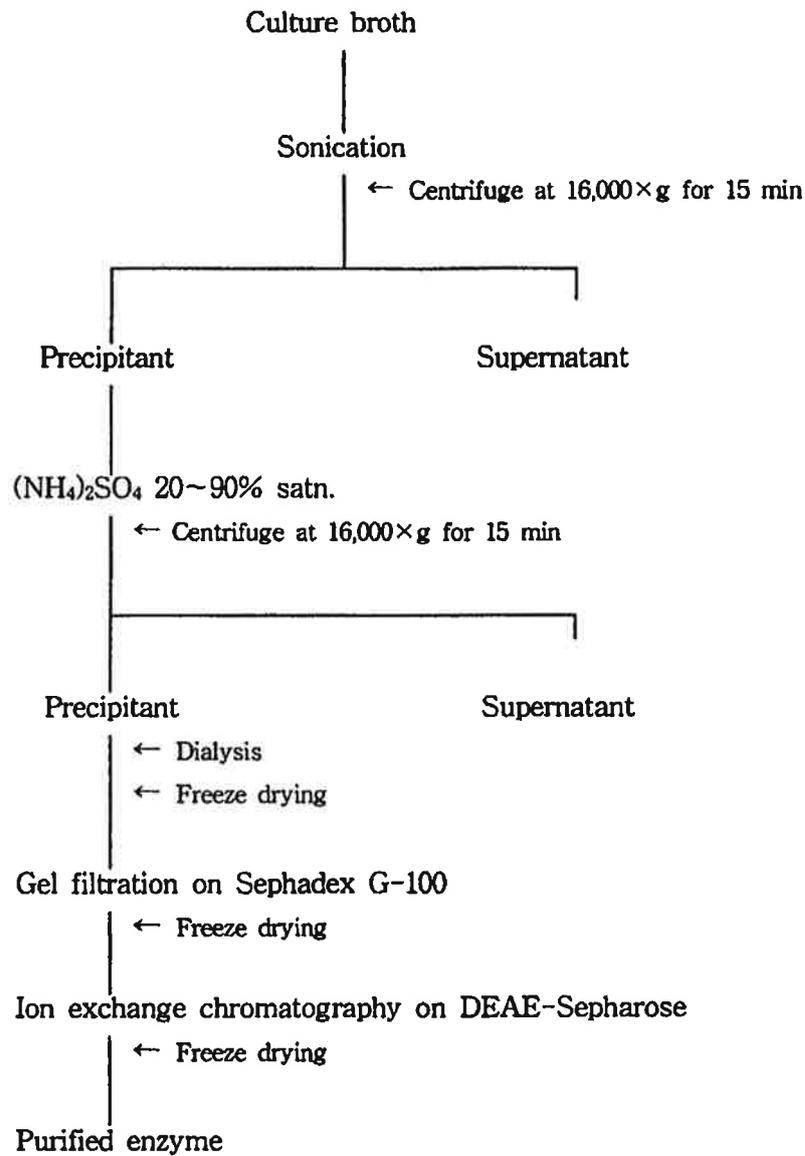


Fig. 2. Schematic diagram for purification of polyphosphate kinase from *Acinetobacter lwoffii* PO8.

All of purification steps were carried out at 4°C.

Poly-P를 침전시킨 다음, 0.5 N NaOH에 용해하여 LSC (Packard Tri Carb 1600CA)로 측정하였다 <Fig. 2>. PPK의 활성도는 위의 조건에서 생성되는 Poly-P가 나타내는 측정값 (CPM단위)을 효소단백질 1 mg에 대한 값으로 환산하여 나타내었다.

3.2. 효소의 정제

인산흡착에 관여하는 효소중의 하나인 PPK의 정제는 단백질 정제장치 (Pharmacia Biotech, GradiFrac™ system)를 이용하여 Fig. 3에 도시한 바와 같이 황산암모늄 침전, 겔 여과, 이온교환 크로마토그래피 등의 방법을 순차적으로 적용하였다. 모든 과정은 4℃에서 실시 하였으며, 정제과정 중 투석은 Viskase 투석막 (Viskase Co., UC 27-32, USA)을 사용하였으며 농축은 동결 건조기 (Heto, Maxi-Dry Lyo/Plus)를 이용하였다.

1) 조효소의 조제

P-1 액체배지에서 24시간 진탕 배양한 후 그 배양액을 16,000×g로 15분간 원심분리하여 얻은 균체를 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)에 현탁시켜 초음파처리하고, 다시 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

2) 황산암모늄 침전

조효소액에 황산암모늄 분말을 20% 포화도에 이를 때까지 서서히 첨가하여 용해시키고, 1일 방치한 후 16,000×g로 15분간 원심분리하여 얻은 상정액에 더욱 황산암모늄 분말을 포화도 90%가 되도록 첨가하여 같은 방법으로 침전시키고 원심분리하여 단백질 침전물을 회수하였다. 이를 10 mL의 20 mM Tris- HCl 완충용액 (pH 7.6)에 용해시키고, Viskase 투석막에 넣어 교반하면서 증류수로 24시간 투석하였다. 투석액은 동결건조하여 Sephadex G-100 겔 여과 및 DEAE-Sepharose 이온교환크로마토그래피의 시료로 사용하였다.

3) Sephadex G-100 겔 여과

황산암모늄 침전과정에서 얻은 농축액을 미리 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)으로 평형화 한 Sephadex G-100 컬럼 (glass column 2×110 cm; bed volume 190 mL)에 주입하고, 단백질 정제장치를 사용하여 16 mL/hr의 유속으로 용출시키면서 분획수집기로 4 mL/tube씩 분취하였다.

4) DEAE-Sepharose 이온교환크로마토그래피

Sephadex G-100 겔 여과에서 얻은 농축액을 동결건조한 후 증류수로 최소량으로 녹이고, 그액을 미리 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)으로 평형화 한 DEAE-Sepharose 컬럼 (Pharmacia Biotech, Resource™ Q)에 흡착시키고, 단백질 정제장치를 이용하여 음이온교환 수지에 결합되지 않은 산성 단백질을 동일 완충용액 10 mL로 용출시킨 다음, 알칼리 단백질을 분리하기 위하여 최종 1 M NaCl의 농도구배를 주어 1 mL/min의 유속으로 용출시키면서 1 mL/tube씩 분취하였다. 이온교환 컬럼으로 부더의 용출액 중에서 PPK의 활성도가 높은 분획을 모아 동결 건조하여 정제시료로 사용하였다.

3.3. SDS-polyacrylamide 겔 전기이동법

효소 단백질 1 mg/mL를 1% SDS 및 1% 2-mercaptoethanol과 함께 100°C에서 2분간 가열하여 변성시키고 그 10 μ L를 색소 10 μ L와 함께 Rapidus Minislab 전기이동장치 (AE-6440, Atto Corp., Japan)의 불연속식 겔 (4.5% stacking gel, 12% resolving gel)에 loading하고, pH 8.8의 Tris완충액 (25 mM Tris; 192 mM glycine; 0.1% SDS)을 사용하여 24 mA로 통전하였다. 분자량 측정용 표준단백질로서는 Promega사의 Protein molecular weight markers (bovine serum albumin, M.W. 66,200; glutamate dehydrogenase, M.W. 55,000; ovalbumin, M.W. 42,700; aldolase, M.W. 40,000; carbonic anhydrase, M.W. 31,000; soybean trypsin inhibitor, M.W. 21,500)를 사용하였다.

제4절 분석 방법

토양시료는 0~20 cm 깊이의 토양을 오가로 채취하여 풍건하고 분쇄한후 0.5 mm 체를 통과한 것 (organic matter, NO₃-N 및 NH₄-N의 경우: <0.15 mm ϕ)을 시료로하여 농촌진흥청 농업기술연구소 토양화학분석법²⁴⁾에 준하여 분석하였다.

4.1. pH 및 EC의 측정

토양 10 g에 증류수 50ml을 가하여 10분간 진탕하고 Whatman No. 2로 여과한 후 pH 미터 (Beckman Φ TM34)와 EC meter (Orion 122)로 측정하였다.

4.2. 유기물과 질소의 분석

막자 사발로 곱게 갈은 건토 0.15~0.2 g을 취하여 원소분석기 (Leco, CHN-1000)로 총탄소와 질소를 측정하였으며 표준시료로서 soil standard (Leco, 502-062)를 사용하였다. 유기물함량은 총탄소 함량에 1.724를 곱하여 환산하였다. 암모니아태 질소 (NH₄-N)는 2 N KCl 용액으로 침출하여 Indophenol blue 법으로, 질산태 질소 (NO₃-N)는 Brucine법으로 각각 측정하여 ppm으로 표시하였다.

4.3. 양이온(K, Ca, Mg)의 정량

치환성 양이온 (K, Ca, Mg) 및 철 (Fe)은 건토 5 g에 1 N ammonium acetate 용액 50 mL을 가해 30분간 침출한 후 Whatman No. 1으로 여과하여 원자흡광광도계 (Analab 9100A, Sunil) 또는 ICP (Lantam-8440)를 이용하여 분석하고, ppm또는 me/100(1) g of sample로 표시하였다.

4.4. 인산의 정량

1) 이온 크로마토그래피

액체 또는 토양추출 시료를 membrane filter (pore size: $0.22 \mu\text{m}$)로 여과한 다음 이온크로마토그래피 시스템 (Dionex IC system with ED40 Detector)을 이용하여 Dionex 컬럼 (Ionpac AS4A-SC 4 mm/10-32)으로 분석하였다. Na_2CO_3 1.8 mM - NaHCO_3 1.7mM 혼액을 용출액으로 하여 2.0 mL/min의 유속으로 용출하였고 운반 가스로는 He (100 psi)을 사용하였다. KH_2PO_4 를 표준시료로 하였으며 분석범위는 인으로서 0.5~5 cmol/L이었다.

2) Ascorbic acid에 의한 Molybdenum 청법

Ascorbic acid에 의한 molybdenum blue method²⁾에 따라 측정하였다. 액체 또는 토양 추출시료를 membrane filter로 여과하여 얻은 1 mL와 ascorbic acid-molybdate 시약 1 mL를 25°C에서 15분간 발색시켜 분광광도계 (Shimadzu UV-120-02)로 880 nm에서 흡광도를 비교하였다. KH_2PO_4 를 표준시료로 하였으며 분석범위는 0~250 ppm이었다.

3) Lancaster 법

토양화학 분석법²⁴⁾에 준하여 Lancaster 법으로 유효인산을 측정하였다. 먼저 토양 5 g에 20 mL의 인산 침출액 (acetic acid 10 mL와 10 N lactic acid 7.5 mL를 증류수 150 mL에 혼합하고 NH_4F 0.56 g, NaOH 4.25 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.33 g을 가하여 용해한 다음 실온에서 냉각시키고 증류수를 가하여 1 L로 만듦, pH 4.25)을 첨가하고 10분 동안 진탕하여 membrane filter로 여과한 다음, 그 3 mL에 ammonium paramolybdate 조작액 6 mL와 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.4 mL를 혼합시켜 30°C에서 30분간 반응시킨 후 700 nm에서 비색정량하였다. KH_2PO_4 를 표준으로 하였으며 분석범위는 0~25 ppm이었다.

4.5. 인산의 정성

1) 동위원소법 <1>

Shoda¹⁹⁾ 등이 적용한 방법에 따라 세포내 PO_4^{3-} 의 분포를 조사하였다. 10^{-4} mci/mL의 $^{32}PO_4^{3-}$ 를 함유하는 P-1액체배지 (이때 P-1배지 본래의 Na_2HPO_4 의 농도는 절반 즉 인으로서 50 ppm으로 조절하였음)에서 24시간 배양한 후 원심 분리하여 균체를 회수하고 그 250 mg (wet weight)에 냉각시킨 5% perchloric acid (PCA)용액 15 mL를 가하여 유리상태의 무기인산, nucleotide, 저분자의 Poly-P를 제거한 다음 Fig. 4의 방법에 따라 분획하였다. 각 분획물을 Whatman 3MM Chr 여지에 점적하여 건조한 다음 X-ray 필름 (Agfa Curix RP1)에 감광시켜 확인하였다.

2) 동위원소법 <2>

Shoda¹⁹⁾ 등의 방법에 따라 인산 흡수능이 높은 균주를 선발하기 위하여 동위원소법을 사용하였다. $10^{-2} \sim 10^{-3}$ μ ci/plate의 $^{32}PO_4^{3-}$ 를 함유하는 P-1 한천배지에 1차 선발된 균주를 접종하고 24시간 배양한 후 그 위에 X-ray 필름을 올려 놓고 감광시켜 색도를 비교하였다.

3) Volutin 염색법

세포내 인산의 중합체인 volutin granule을 Laybourn¹⁴⁾ 방법에 따라 Albert's stain의 변형시약으로 염색하여 확인하였다. 배양액을 채취하여 균체를 세척하고 적정균수가 되도록 희석하여 염색한 다음 광학현미경 (Olympus BX50)으로 검경하였다.

4.6. Chlorophyll의 정량

토양중의 조류발생량을 조사하기 위하여 간접적인 방법으로서 chlorophyll a

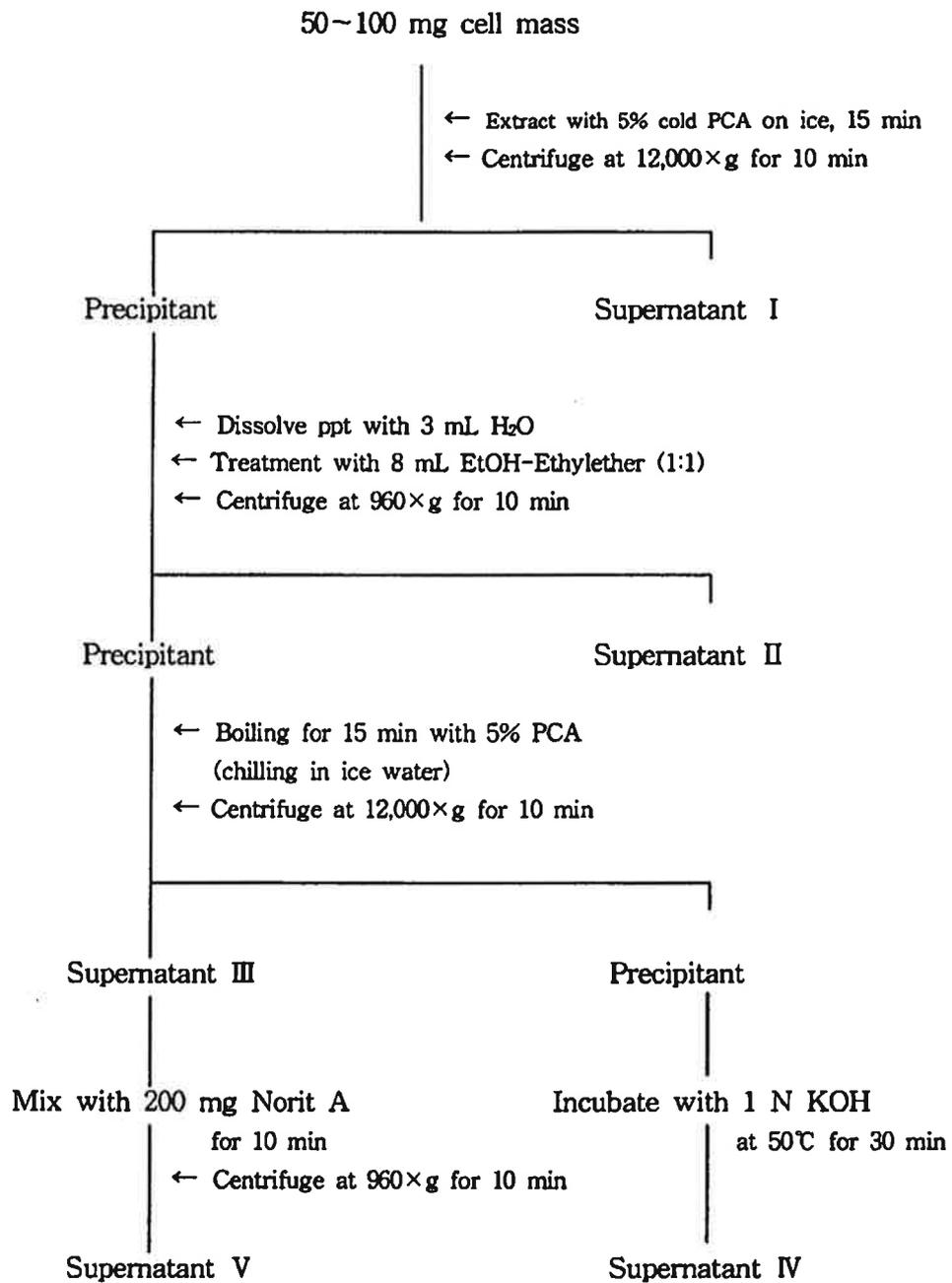


Fig. 3. Schematic diagram for analysis of intracellular PO_4^{3-} .

를 정량하였으며, A층 토양 15 g에 90% acetone 50 mL 및 CaCO₃ 0.5 g을 가하고 질소를 충전하여 10분간 진탕 (Rotary shaker, 240 rpm with a stroke diameter of 5 cm)한 다음 더욱 저온실에서 24시간 정치하여 추출하고 원심분리 (1,000×g, 10 min)하여 얻은 상정액을 시료로 Chlorophyll Meter (SPAD-502, Minolta)을 사용하여 측정하였다. Chlorophyll $\mu\text{g/g soil}$ 로 환산하여 나타내었다.

4.7. 단백질의 정량

Lowry 등¹⁵⁾의 방법으로 측정하였으며, 효소정제 과정중의 단백질 농도를 280 nm에서의 흡광도로 비교하였다. Bovine serum albumin을 표준시료로 하였으며 분석범위는 50~450 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

4.8. 환원당의 정량

Dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 측정하였다. 배양여액 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 넣고 5분간 끓인 다음 냉각시키고 30분후에 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glucose를 표준시료로 사용하였으며 100~1000 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

4.9. 입자의 크기 및 표면적의 측정

1) 입자의 크기

흡착제의 분말 시료를 증류수에 현탁시켜 particle size analyzer (Analysette 22, Fritsch)로 측정하였으며, 50.0% 수준에서의 평균 직경 (median)을 μm 로, 비표면적 (specific surface area)를 m^2/cc 단위로 나타내었다.

2) 표면적

분말 시료를 holder에 넣고 유기재료는 50°C, 무기재료는 250°C에서 탈기한 후 표면적분석기 (ASAP 2400, Micromeritics)로 질소 가스를 사용하여 분석하였으며, 상대압력 (P/P_0 ; 여기에서 P 는 압력, P_0 는 포화압력, 단위는 mmHg임)에 대한 $1/[VA(P_0/P-1)]$ (여기에서 VA 는 cc/g단위의 흡착부피임) 값을 플롯하여 BET 표면적을 구하였다.

4.10. 전단응력 및 찌그러짐 저항의 측정

엽체류의 경도를 비교하기 위하여, 잎자루로부터 기부, 중앙부, 말단부위 3지점의 전단응력 (shear strength)과 찌그러짐 저항 (puncture strength)를 Texture Analyzer (TAXT2i, Stable Micro Systems, England)로 측정하였으며, 전단응력에는 HDP/BS blade를, 엽맥간의 찌그러짐 저항에는 SMSP-5 probe를 각각 사용하였다.

제5절 토양 및 수계에서의 흡착실험

5.1. 액체배지

발효조 (KF-5L, 한국발효기)에 P-1액체배지 2.8 L를 넣고 강압살균한 후 전배양액을 0.5% 접종하여 30°C에서 배양 (agitation, 280 rpm; DO range, ~20 ppm)하면서 배양시간별로 시료를 취하여 균체의 생육, glucose 및 인산의 잔유량, pH 등을 측정하였다.

5.2. 토양

1) 시료토양

충청남도 농촌진흥원 시험포장에서 A층 (표층 15 cm)과 B층 (15 cm 이하)

의 토양을 채취하여 실내에서 풍건한 다음, 2 mm 체를 통과시켜 사용하였다.

인산흡착 평형곡선을 구하기 위하여 50 mL screw-cap 시험관에 시료토양을 5 g씩 넣고 여기에 0~400 cmol/L 농도범위 (인으로 환산)에서 KH_2PO_4 용액을 25 mL (1:5) 첨가하여 8시간 진탕시킨 후 원심분리하고 그 상정액을 여과하여 IC로 인산의 잔유량을 분석하였다. 이로부터 KH_2PO_4 용액별 흡착량을 계산하여 평형곡선을 작성하였다.

3) 배양시험

시료토양의 전처리: 포화흡착 평형에 도달한 250 cmol/L를 100%로 하여 0, 50, 75, 100% 등의 4가지 즉 0, 125, 187, 250 cmol/L 농도의 KH_2PO_4 용액을 조제하고, 여기에 A층 및 B층 토양 2 kg씩 (실험에 필요한 총량을 일시에 처리)을 24시간 침지한 후 흡인여두 또는 glass filter 상에서 3~4배량의 증류수로 씻어 내린 다음 실내에서 풍건시켰다.

배양시험: 500 mL 조직 배양병에 300 g의 건조토양 (A 및 B층 각 16병)을 넣고 살균한 다음 *A. lwoff* PO8과 *C. lividium* PI4의 배양액을 적정균수 ($\sim 10^8\sim 9$ /g 토양)가 되도록 접종하였다. 이때 토양의 수분함량은 mass water content로서 25%와 포화상태의 2 가지 조건으로 조정하였는데, A, B층 시료토양의 공극 (porosity)을 구하고 이로부터 포화상태의 수분첨가량을 계산한 결과 토양 부피에 대해 46% (약 140 mL)에 상당하는 것이었다. 접종후 25°C에서 배양하면서 배양기간별로 무균상에서 시료를 채취하여 분석하였다.

제6절 작물시험

6.1. 발아 및 육묘시험

정선한 종자를 잠시 95% ethanol로 적시고 0.2% 산성승홍수 (HgCl_2 2 g,

HCl 5 mL/L)에 3~8 분간 침지하여 살균한 다음 수세하여 무균실에서 생균배양액을 접종하였으며, 이를 미리 준비한 멸균 샤프 (9 cm diam)의 젖은 여지 위에 100립씩 옮기고 18 또는 22°C, RH 80%의 성장상에 넣어 7일후 발아상태와 길이를 측정하였다. 3반복으로 실험하여 germination index ($G.I. = R_t L_t / R_c L_c \times 100$, 여기서 R은 발아수, L은 길이, c는 대조구 t는 시험구를 의미함)를 구하였다.

육묘시험은 연결포트 (50, 72, 200공, 서울농자재)에 2%의 흡착제제를 혼합한 상토 (원예6호: peat moss 70+perlite 20+zeolite 10, 부농산업)를 채우고 파종한 다음 하우스내에서 관리하면서 초기성장 상태를 대조구와 비교 관찰하였다.

6.2. 포트 및 하우스 재배시험

포트 재배시험은 상치, 치커리, 들깨묘를 1/5000a의 과린산석회를 과량 사용한 와그너포트에 이식하고 지역 들깨작목반의 연동하우스에서 6~8 주간 진행하면서 이들 엽채류의 성장장애 여부 및 잎의 정도 (shear and puncture strength)를 조사하였다. 포트당 약 3 kg의 토양 (전향의 A층토양)에 과린산석회 16 g, 흡착제제 60 g을 사용하였으며, 기타의 시비 및 수분관리는 작목반의 관행에 따랐다.

오이는 하우스 재배시험 (16주간)을 통하여 생육 및 수량을 대조구와 비교하였으며, 기비로서 연동하우스 1동 (6.6a)당 원예용복합비료 20 kg×4포 및 우분퇴비 7.5 ton (wet weight)을 시비하면서 시험구별로 흡착제제 (Zeolite (I) +5% Rice bran+5% Lignocell inoculated with *Acinetobacter lwoffii* PO8) 0 (대조구), 30, 90 kg/a을 혼합 사용하였고, 기타의 비배관리는 관행에 의하였다.

제 3 장 결 과 및 고 찰

제1절 염류장해지역의 토양성분 및 미생물의 분포

1.1. 염류장해지역의 토양성분

각도의 농촌진흥원에서 추천하는 염류장해 보고지역으로 부터 192점의 시설 하우스 토양시료를 수집하고 화학조성과 토양미생물의 분포를 조사하였으며 그 결과를 Table 1과 2에 지역별로 정리하였다.

염류농도는 EC(1:5) 2.61 dSm⁻¹(충남), 2.44 dSm⁻¹(전북)으로부터 낮은 곳은 0.08~0.13 dSm⁻¹로서 다양한 값을 나타내었다. 표층토양(0~5 cm)에서는 EC(1:5) 5.04 dSm⁻¹(경기), 4.88 dSm⁻¹(경북)의 극히 높은 값을 볼수 있었다. 평균 유기물함량은 3.0±0.9%, NO₃-N 134±74 ppm, 유효인산 1,069.3±713.7 ppm (total phosphorus는 P로서 1,739±894 ppm), 치환성 칼륨 1.69±0.99 me/100g, 칼슘 8.8±1.5 me/100g, 마그네슘 3.4±1.5 me/100g, 철 30.0±10.5 ppm으로 특히 유효인산, 치환성 칼륨및 칼슘의 함량이 정상 수준보다 높은 분포를 보임으로서 NO₃-N과 함께 염류집적의 주요원인이 된다. 최근 농업기술연구원 허범량 등은 우리나라 시설재배지 69,000 ha의 평균 염류농도는 EC (1:5) 2.8±2.3 dSm⁻¹로서 높은 수준에 있음을 지적하였다. 또한 염류장해 보고 지역은 대체로 다년간의 연작으로 인하여 재배토양의 표면은 건조한 경우 백색 또는 적갈색의 침전물을 석출하거나 습한 경우는 조류로 덮여있는 것을 쉽게 관찰할 수 있으며, 이와같은 조류의 번식생태에 관하여는 농업과학기술원 이상규 등이 염류집적과 조류 발생량의 상관성을 구명한바 있다.

1.2. 염류장해지역의 미생물 분포

토양성분 분석과 병행하여, 시료로 부터 세균류 (thermophile, mesophile,

Table 3. Distribution and halotolerance of rhizoplane organisms from melon and tomato.

멜론 및 토마토 근면(rhizoplane)미생물의 분포 및 내염성 수준

작물 (재배지역)	Bacteria			Fungi	Salt Tolerant Bacteria	
	고온균	중온균	방선균		0.5M NaCl	1.5M NaCl
멜론 (전북 완주)	7×10^5	2×10^7	22×10^5	160×10^3	120×10^5	41×10^5
토마토 (충남 논산)	1×10^5	1×10^7	8×10^5	74×10^3	24×10^5	2×10^5

actinomyces)와 진균류별 분포를 조사하고, 주요 작물의 근면 (rhizoplane) 미생물에 대하여도 같은 실험을 하였으며, 특히 분포가 높은 중온성세균에 대하여는 분리원별로 상호경쟁 및 길항성을 분석하였다.

전국 시설재배지 염류장해보고지역의 토양 미생물 분포를 조사한 결과를 표 1과 2에 무기성분 분석자료와 함께 정리하였다. 중온성세균수는 표에서 보는바와 같이 평균 $1 \sim 56 \times 10^7$ cell/g의 범위로, 고온성세균은 $1 \sim 16 \times 10^5$ cell/g, 방선균은 $1 \sim 28 \times 10^5$ cell/g, 사상균은 $5 \sim 81 \times 10^3$ cell/g으로 측정되었다. 근면 미생물의 분포는 Table 3에 작물별로 나타내었으며, 토양미생물의 분포와 비교하면 사상균의 발현빈도가 현저하게 낮았고 일반세균 및 방선균의 경우 콜로니 형태로 보아 미생물상이 단순화되어 있음을 알수 있었다. 토양미생물중 우점균으로서 중온성세균수와 주요 토양성분간의 상관성 여부를 확인하고자 통계분석을 하였으며, 그 결과는 Table 4, 5 및 6에 나타낸바와 같이 유의성있는 상관관계가 성립되지 않음을 보여주고 있다.

Table 4. Correlation between soil components and mesophile counts.

중온성세균수와 주요토양성분간의 상관성 분석

Variable	EC (1:5, dS/m)	O.M. (%)	NO ₃ -N (ppm)	Av.P ₂ O ₅ (ppm)	K (me/100g)
Mesophile Counts ($\times 10^7$ cells/g)	0.145	0.116	0.135	0.192	0.069

Table 5. Number of moderate halophiles and the mean values of soil salt constituents.

중도내염성세균수와 토양염류성분의 평균 및 표준편차

Variable	N	Mean	Std. Dev.
Salt Tolerant Bacterial Counts	44	100.922	136.281
EC	44	0.802	0.911
Av.P ₂ O ₅	44	1022	630.888
K	44	1.443	0.927

Table 6. Correlation between soil components and number of moderate halophiles .

중도내염성세균수와 주요토양성분간의 상관성 분석

Variable	EC (1:5, dS/m)	Av.P ₂ O ₅ (ppm)	K (me/100g)
Salt Tolerant Bacterial Count ($\times 10^5$ cells/g)	0.038	0.105	0.290*

* P < 0.05

Table 1. 전국 시설재배지 토양의 양분 상태 및 미생물 분포

지역	작물	pH (1:5)	O.M. (%)	NO ₃ -N (ppm)	NH ₄ -N (ppm)	T-P (ppm)	Exch.cation(m.e/100g)			Fe (ppm)	EC(1:5) (dS/m)	Bacteria		Fungi		
							K	Ca	Mg			고온균	방선균			
경기	호박, 오이, 취거리, 상지, 케일, 파, 방울토마토	최고	9.5	646	25	7,947	2,712	3.47	16.3	9.7	133	5.04	133×10 ⁵	126×10 ⁷	27×10 ⁵	361×10 ³
		최저	2.2	37	10	1,216	455	0.93	3.7	1.3	12	0.27	-	-	2×10 ⁵	-
		평균	5.1	214	16	3,538	1,423	1.63	8.8	3.2	40	1.13	16×10 ⁵	14×10 ⁷	12×10 ⁵	46×10 ³
경남	오이, 수박, 포도, 화훼	최고	3.8	329	43	2,008	1,421	1.51	14.1	4.6	33	1.94	16×10 ⁵	27×10 ⁷	19×10 ⁵	49×10 ³
		최저	1.9	18	12	1,046	339	0.81	4.7	1.0	16	0.17	-	-	-	-
		평균	2.9	90	18	1,449	703	1.08	8.8	3.2	26	0.52	5×10 ⁵	6×10 ⁷	5×10 ⁵	17×10 ³
경북	참외	최고	3.5	565	18	2,149	818	2.06	47.2	9.8	95	4.88	2×10 ⁵	14×10 ⁷	5×10 ⁵	35×10 ³
		최저	0.6	5	8	650	17	0.13	8.0	3.1	20	0.22	-	-	-	1×10 ³
		평균	2.3	145	12	1,598	482	1.08	17.3	5.0	40	1.56	1×10 ⁵	5×10 ⁷	2×10 ⁵	9×10 ³
전남	메론, 수박, 딸기	최고	5.1	60	10	1,612	820	1.37	9.5	2.6	86	1.45	2×10 ⁵	20×10 ⁷	3×10 ⁵	28×10 ³
		최저	1.7	11	9	1,131	380	0.68	4.6	1.1	34	0.16	-	5×10 ⁷	-	6×10 ³
		평균	3.1	25	10	1,294	530	0.95	6.5	2.1	51	0.26	1×10 ⁵	13×10 ⁷	1×10 ⁵	8×10 ³
전북	멜론, 배추	최고	4.3	481	22	2,200	856	2.10	11.3	3.7	49	2.44	18×10 ⁵	10×10 ⁷	17×10 ⁵	43×10 ³
		최저	2.0	11	8	1,300	652	0.30	4.8	0.2	3	0.08	-	-	-	-
		평균	3.1	120	13	1,669	797	0.95	7.8	1.7	23	0.85	4×10 ⁵	5×10 ⁷	8×10 ⁵	18×10 ³

Table 2. 충청지역 시설재배지 토양의 양분 실태 및 미생물 분포

지역	작물	pH (1:5)	O.M. (%)	NO ₃ -N (ppm)	NH ₄ -N (ppm)	T-P (ppm)	Av.P ₂ O ₅ (ppm)	Exch.cation(m.e./100g)				Fe (ppm)	EC(1:5) (dS/m)	Bacteria		Fungi
								K	Ca	Mg				고온균	중온균	
공주	오이	최고	6.7	2.5	ND	ND	1,901	4.70	12.2	6.6	ND	2.61	10×10 ⁵	125×10 ⁷	50×10 ⁵	9×10 ⁵
		최저	5.8	1.6	ND	ND	1,014	1.70	7.4	3.5	ND	1.11	2×10 ⁵	3×10 ⁷	-	2×10 ⁵
		평균	6.3	2.1	ND	ND	1,458	3.20	9.8	5.1	ND	1.86	5×10 ⁵	50×10 ⁷	27×10 ⁵	5×10 ⁵
논산	토마토, 상차, 오이, 딸기, 고추	최고	7.1	3.9	460	4	1,951	2.26	12.4	6.7	45	2.86	11×10 ⁵	23×10 ⁷	59×10 ⁵	417×10 ⁵
		최저	5.4	2.7	9	1	1,216	0.76	3.9	1.2	10	0.13	-	2×10 ⁷	3×10 ⁵	11×10 ⁵
		평균	5.7	3.3	147	2	1,548	1.37	7.5	3.4	27	1.09	4×10 ⁵	8×10 ⁷	28×10 ⁵	81×10 ⁵
당진	고추, 마늘	최고	6.4	2.8	383	18	1,046	4.00	10.8	4.4	33	0.52	24×10 ⁵	2×10 ⁷	36×10 ⁵	72×10 ⁵
		최저	6.3	2.2	102	14	679	1.94	7.9	3.6	6	0.28	2×10 ⁵	-	15×10 ⁵	38×10 ⁵
		평균	6.4	2.5	260	16	827	2.96	9.4	4.0	16	0.39	10×10 ⁵	1×10 ⁷	24×10 ⁵	59×10 ⁵
연기	참외, 오이	최고	6.8	2.8	ND	ND	4,733	3.87	11.9	6.8	ND	1.87	3×10 ⁵	73×10 ⁷	15×10 ⁵	34×10 ⁵
		최저	6.3	2.1	ND	ND	811	2.34	9.7	5.6	ND	1.48	2×10 ⁵	39×10 ⁷	-	1×10 ⁵
		평균	6.5	2.5	ND	ND	2,772	3.10	10.8	6.2	ND	1.68	3×10 ⁵	56×10 ⁷	15×10 ⁵	18×10 ⁵
청주	상차, 토마토, 시금치, 호박, 배추, 오이	최고	6.0	4.4	438	5	3,026	1.71	12.8	2.4	111	0.90	14×10 ⁵	12×10 ⁷	45×10 ⁵	118×10 ⁵
		최저	4.6	1.6	41	2	1,160	0.48	5.0	1.2	7	0.66	-	1×10 ⁷	1×10 ⁵	19×10 ⁵
		평균	5.4	2.8	174	3	1,857	1.05	8.6	1.9	33	0.53	4×10 ⁵	5×10 ⁷	5×10 ⁵	45×10 ⁵

제2절 염류내성 유용미생물의 분리, 선발 및 검정

2.1. 염류내성균의 순수분리 및 고도내염성 균주의 선발

토양 및 주요 작물의 근면미생물을 대상으로 염농도별 내염성 수준을 측정하였으며, 각 토양 시료의 염류성분과 내염성균간의 상관관계를 분석하고, 상관성이 높은 시료로부터 고도내염균과 중도내염균을 분리하였다.

전국 염류장해 보고지역의 염류내성균의 분포를 일반미생물의 분포와 함께 표 6에 정리하였다. 저도내염균수는 $<1\sim 205\times 10^5$ cell/g의 범위로 측정됨으로서 중온성세균수와 비교하면 titre 10^2 의 차이를 나타내었고, 중도내염균수는 $<1\sim 21\times 10^5$ 수준이며, 2.5 M NaCl 함유배지에서 생육하는 고도내염균은 경북 성주 및 고령의 일부지역에서 2×10^3 cell/g 수준으로 검출되었다. 표 3에서 보는 바와같이 근면미생물의 염류 내성수준은 작물에 따라 큰 차이를 나타내었으며, 멜론 (전북 완주) 및 토마토 (충남 논산)의 근면에서 $2\sim 41\times 10^5$ cell/g의 중도내염균이 분포하였다. 토양시료의 염류성분과 중도내염균수와의 상관관계를 SAS Package 통계분석 프로그램에 따라 분석하였으며 그 결과를 표 7과 8에 나타내었다. EC 및 유효인산 함량과는 상관성을 인정할 수 없었으나, 칼륨 함량과는 $P<0.05$ 수준의 유의성있는 상관관계가 있었다.

Table 7. Distribution of halotolerant organisms in green house soils.

고도염류내성 토양미생물의 분포

지역	Bacteria			Fungi	Salt(NaCl) Tolerant Bacteria			
	고온균	중온균	방선균		0.5M	1.5M	2.5M	
경북 성주	최대	-	1×10^7	-	8×10^3	$>1\times 10^5$	$>1\times 10^5$	3×10^3
	최저	-	-	-	2×10^3	$<1\times 10^5$	-	-
	평균	-	0.5×10^7	-	5×10^3	$<1\times 10^5$	$<1\times 10^5$	2×10^3
고령	최대	2×10^5	1×10^7	7×10^5	44×10^3	6×10^5	3×10^5	4×10^3
	최저	-	-	-	1×10^3	21×10^5	1×10^5	-
	평균	0.8×10^5	5×10^7	3×10^5	13×10^3	3×10^5	21×10^5	2×10^3

전항에 기술한 시료로부터 염류내성균을 순수 분리하였으며 2.5M NaCl 함유 평판배지에서 비교적 생육이 양호한 HS1-1균주를 선발하였다. 선발균주 HS1-1은 Gram 음성균으로서 형태적, 생리적 및 배양적 성질을 검토한 결과 Bergy's Manual of Determinative Bacteriology에 의하여 *Halomonas*속 균주로 동정되었다.

2.2. 인산축적 세균의 분리 및 동정

같은 내염성균의 시료로부터 인산축적 세균을 분리하기 위하여 pH 7.6의 P-1 한천배지에 생리식염수로 희석한 시료용액 0.1 mL를 도말하고 30°C에서 2일간 배양하면서 나타난 콜로니를 1차 선발하고, 다시 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유한 P-1 한천배지와 액체배지를 이용하여 인산축적능이 우수한 8개 균주를 2차로 선발하였다. 이들 분리 균주의 인산축적능에 관하여 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유한 P-1 한천배지와 액체 배양에서 얻은 결과를 각각 Fig. 5와 6에 나타내었다. Fig. 5은 선발된 여러 균주들을 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유하는 P-1 한천배지에서 배양 후 표지된 인산 (^{32}P)의 흡수 정도를 X-ray 필름으로 감광시켜 얻은 autoradiography의 결과로서, 생육과 인산축적능이 좋은 균주는 감광도가 높았다. Fig. 6에서는 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유한 P-1 한천배지에서 선발된 8균주에 대해 액체배지에서 배양하여 생육과 흡수된 무기인산과의 관계를 나타내었고, 8균주중 배지중의 cell mass에 비하여 인산의 흡착율이 높은 2개 균주 PO8 및 PI4를 선발하였다.

<그림 1 및 2 참조>

최종 선발된 인산축적 세균 PO8과 PI4 균주의 각종 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹²⁾와 Manual for the Identification of Medical Bacteria⁴⁾에 따라 분류하였다. 분리균주 PO8와 PI4의 형태적, 배양학적 및 생리학적 특성은 Table 2 와 3, Fig. 7에 나타낸 바와 같았으며, 아울러 세포구성 지방산을 methylester화하여 FAME를 GC로 분석하였다. <부록 Fig. 8과 Table 4참조>

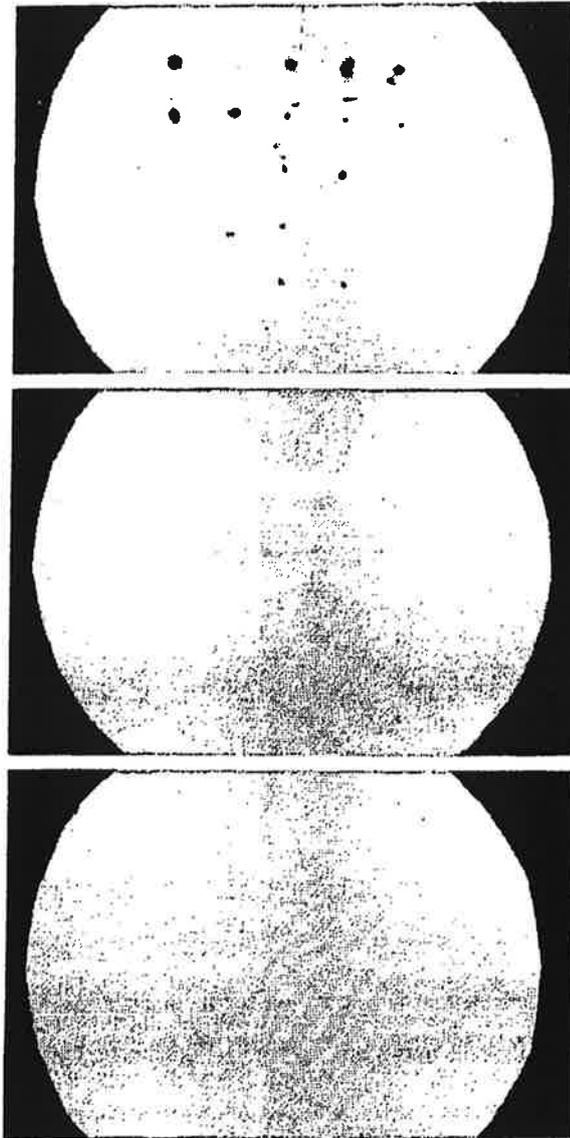


Fig. 4. Selection of phosphate accumulating bacteria by autoradiography. Autoradiograms using P-1 agar plates containing $^{32}\text{PO}_4$ which appropriate dilutions of soil samples were plated by toothpicks.

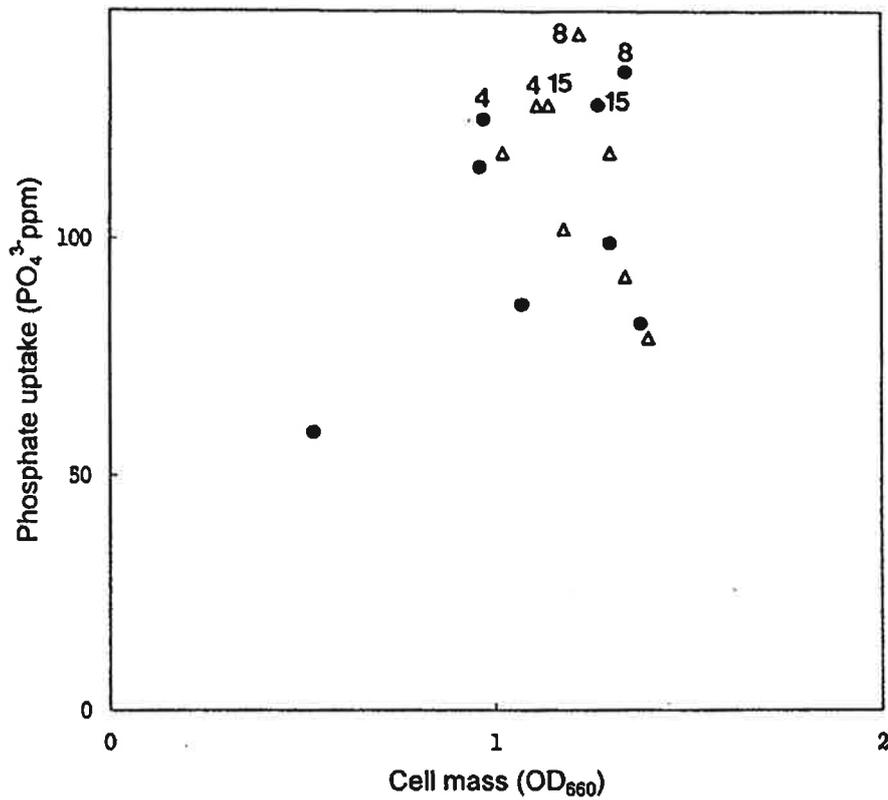


Fig. 5. Efficiency of phosphate uptake by the isolates. Bacteria were grown on P-1 with (●) or without (▲) 0.02% yeast extract in shake flasks, and maximum values of inorganic phosphate consumed were plotted against cell mass concentration.

Table 8. Morphological characteristics of the isolates: PO8 and PI4.

Characteristics	PO8	PI4
Colonies*		
Size (mm) in diameter	1~2	1~2
Color	White	White
Shape	Circular	Circular
Opacity	Opaque	Translucent
Elevation	Raised	Raised
Surface	Glistening	Glistening
Edge	Entire	Entire
Cells*		
Size (μm)	0.4~0.6 $\times 1.0\sim 1.5$	0.4~0.6 $\times 1.5\sim 2.0$
Shape	R/S	R
Gram staining	-	-
Motility	-	+

*The culture was grown on nutrient agar plate (pH 6.8) for 24 hrs at 30°C.
+: Positive, -: Negative, R: Rod, S: spherical.

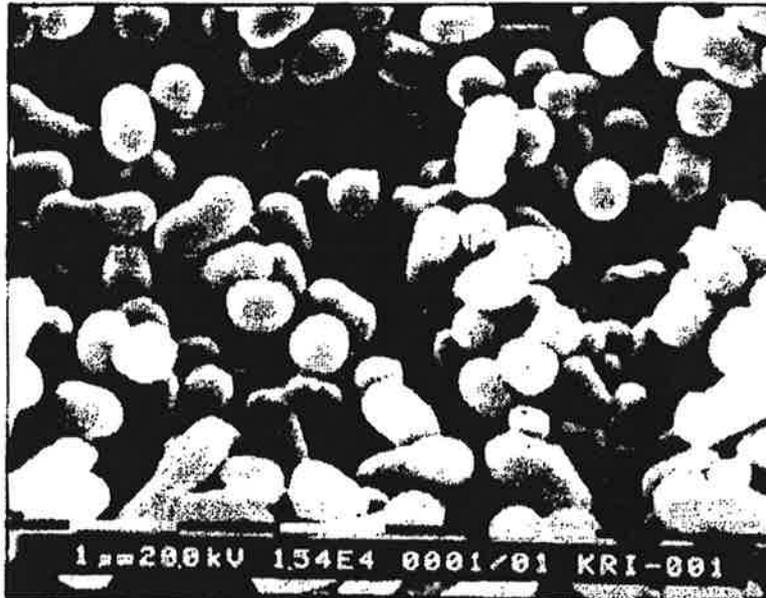
PO8은 전형적인 gram 음성이며 운동성이 없는 간균으로 크기는 0.4~0.6 \times 1.0~1.5 μm 이었다. PI4는 gram 음성의 간균이고 크기는 0.4~0.6 \times 1.5~2.0 μm 이며 flagella를 가지고 있었으며, 자외선하에서 형광을 나타내었다. Nutrient agar에서 PO8은 원형의 콜로니로서 점성이 강하고 흰색이었으며, PI4의 경우는 원형이며 점성이 약하고 묽은 반투명의 흰색을 띠었다. 이상의 결과를 종합하여 Bergey's Manual에 따라 동정한 결과 균주 PO8은 *Acinetobacter lwoffii*, PI4는 *Chromobacterium lividum*의 근연균주로 동정되었다.

Table 9. Physiological and culture characteristics of the isolates.

Chatacteristics	PO8	PI4
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	-	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	+
Carbohydrates[O/F/-]	-	O
Growth at 22°C	+	ND
Growth at 42°C	+	-
Growth on nutrient agar	+	ND
Growth on MacConkey agar	+	d
Growth on KCN	ND	-
Carbohydrates [in peptone media], acid from:		
glucose	-	+
lactose	-	-
maltose	-	ND
sucrose	ND	-
xylose	-	-
Aesculin hydrolysis	ND	+
Nitrate reduced	-	+
Citrate as carbon source	d	+
Indole	ND	-
Gelatin liquefaction	-	+
Urease	-	-
Phenylalanine	-	ND

+: Positive, -: Negative, d: 11~89% of strains are positive, F: Fermentative, O: Oxidative, ND: Not determined.

A



B

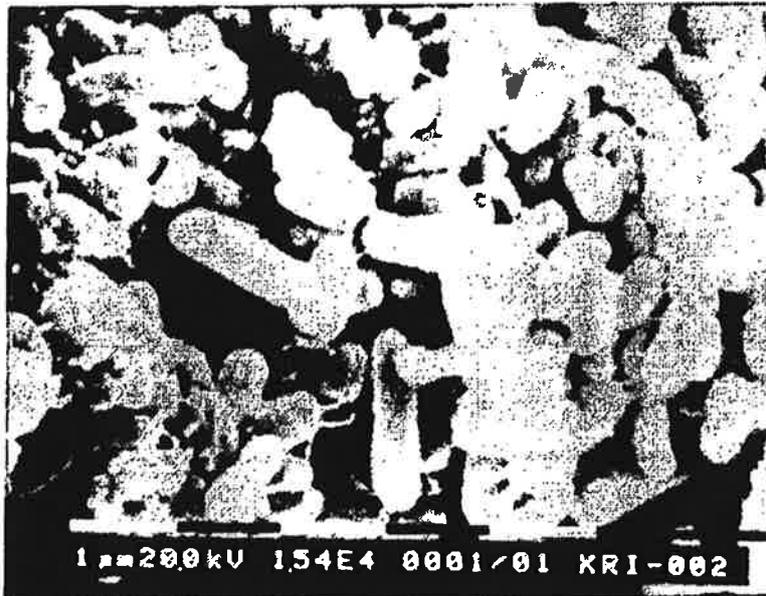


Fig. 6. Scanning electron microscopic photographs of the isolates: PO8 <A> and PI4 which grown on nutrient agar plate for 24 hours.

제3절 인산축적균에 의한 인산흡수 및 균체생산

3.1. 수계에서의 인산의 흡수

Acinetobacter lwoffii PO8과 *Chromobacterium lividum* PI4 균주를 jar fermentor에서 P-1배지를 사용하여 48시간 배양하면서 시간경과에 따른 균체의 생육, 당의 소비율 및 인산의 흡수율의 변화를 조사하였으며 그 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

A. lwoffii PO8은 배양 12시간 이후부터 급속도로 생육하여 24시간 후에 정지기에 도달하였으며 인산의 흡수율은 이와 비례적으로 증가하여 24시간 이후 93%로서 최고 수준을 나타낸 다음 배양 48시간까지 큰 변화를 보이지 않았다. 반면에 glucose는 배양초기부터 지속적으로 감소하여 36~48시간에서 완전히 소비되었다. *C. lividum* PI4의 경우는 PO8보다 생육속도가 다소 늦고 균체량도 낮았으며, 이와 비례적으로 인산의 흡수도 지연되어 36시간 이후에 85% 수준의 흡수율을 나타내었다. Glucose는 24시간 후에 거의 소비되어 오히려 PO8보다 소비율이 높은 경향을 보였다. 이러한 *A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4의 인산의 흡수량상을 Shoda 등¹⁹⁾이 보고한 *Arthrobacter globiformis*와 비교하여 보면, 경향은 유사하였으나 *A. globiformis*의 최대흡수율은 약 87%로서 *C. lividum* PI4의 85%와 비견되는 것이었고 *A. lwoffii* PO8의 93%가 훨씬 높은 수준임을 알 수 있었다.

3.2. 세포내 인산의 분포

액체배양중에 세포내로 인산이 흡수되어 Poly-P 중합체 즉 volutin granule 또는 metachromatic granule을 형성하는지 확인하고자, *A. lwoffii* PO8균주를 P-1배지에서 배양하면서 시간별로 시료를 채취하여 Laybourn¹⁴⁾의 염색법으로 실험한 결과, 12시간 배양물 보다 24시간의 경우 진한 색도를 보임으로서 세포내 인산이 중합체로서 존재함을 확인할 수 있었다. <부록 Fig. 9>

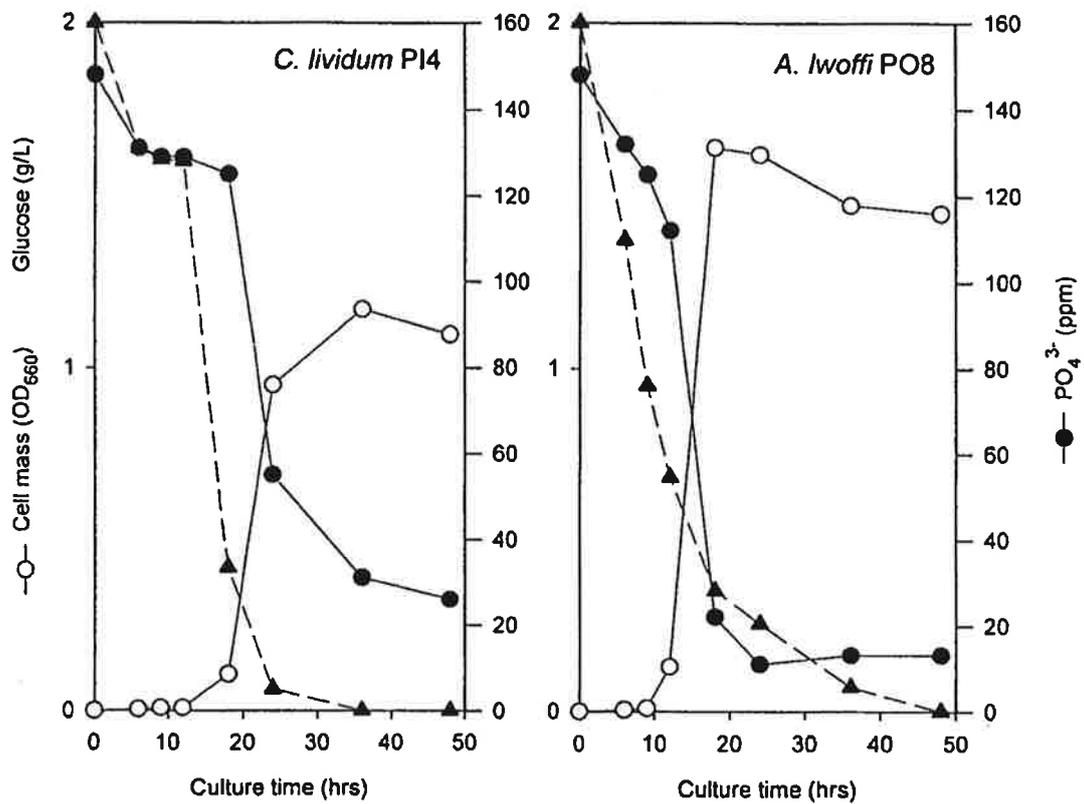


Fig. 8. Time courses of phosphate uptake by the strains *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4. The organisms were grown in P-1 media at 30°C, employing a jar fermentor of KF5L and the residual concentrations of glucose and phosphate were analyzed.

세포를 분획하여 Poly-P을 확인하기 위하여 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유하는 P-1액체배지에서 24시간 배양한 균체를 회수하여 Shoda 등¹⁹⁾의 방법으로 Fig. 3에 따라 세포분획을 실시하였으며, 여기서 얻어진 I (A: 유리태의 인산, nucleotide 및 저분자의 Poly-P), II (B: 인지질), III (C: 고분자의 Poly-P와 핵산), IV (D: 단백질 추출물), V 분획 (E: 활성탄으로 III분획물중의 핵산을 흡착제거하고 순수한 고분자의 Poly-P만을 분획한 것)을 각각 Whatman 3MM Chr 여지에 3 μL 씩 점적하여 X-ray 필름에 시켰다. 그 결과를 Fig. 10 <부록>에 나타내었다. *A. lwoffii* PO8와 *C. lividum* PI4 모두 세포벽의 인지질이나 DNA와 RNA등의 핵산에 이용된 것이외에 원형질내에 다량의 인산을 축적하고 있었다.

3.3. 배양조건

1) 온도 및 pH

인산흡수 효율을 높이기 위한 최적 온도를 검토한 결과는 Fig. 11에서와 같이 *A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4 모두 30~35°C에서 생육 및 인산축적의 효율이 높았으며, 30°C 보다 35°C에서 약간 효율이 낮았다. 이어서 배지의 초기 pH를 6~8의 범위로 조정하여 실험한 결과 Fig. 12에서와 같이 PO8의 경우에는 pH 7.5에서, PI4는 pH 7.0에서 생육 및 인산흡수의 효율이 좋았다. 이와같이 생육 및 인산흡수를 위한 최적온도 및 pH는 PO8의 경우 30°C, pH 7.5, PI4의 경우 30°C, pH 7.0이었다.

2) 탄소원

P-1 기본배지의 성분중에서 glucose를 같은 농도 즉 0.2% (w/v)의 다른 탄소원으로 대체하고 24시간 배양하여 실험한 결과 <부록 Table 11>, *A. lwoffii* PO8은 glycerol과 5탄당, 6탄당등 비교적 넓은 범위에서 생육이 좋았으며 인산흡수 효율도 양호하였다. glucose가 역시 가장 좋은 효율을 보여 주었으며, 반

면에 maltose, lactose, galactose 등에서는 저조하였다. *C. lividum* PI4의 경우에는 glycerol이 glucose 보다 더 좋은 효율을 나타내었으며 그외에 사용된 대부분의 당에서는 효율이 낮았다.

3) 질소원

기본배지 조성중 NH_4Cl 을 여러 종류의 질소원으로 0.1% (w/v) 대체하여 인산흡수에 미치는 효율을 조사한 결과, 두 균주 모두 암모니아태 및 요소태의 것이 생육 및 인산흡수에 좋은 영향을 보여 주었으며, 반면에 질산태의 것은 대사에 이용되지 못함으로서 인산흡수 효율도 저조하였다. <부록 Table 12>

4) 무기이온

P-1 기본배지에 더 이상의 무기이온의 첨가는 필요치 않았다. <부록 Table 13>

5) 아미노산

영양 결핍상태에 있을 때 인산흡수 효율에 미치는 아미노산의 영향을 조사하기 위하여 P-1배지조성중 Na_2HPO_4 을 인산으로써 200 ppm (인으로 133 ppm)으로 조정하고, glucose가 95% 이상 소비되었을 때 즉 배양 36시간후에 여과살균한 각종 아미노산을 무균적으로 100 ppm이 되도록 첨가한 다음, 이를 같은조건으로 계속 진탕배양하면서 시간 경과 (6, 12, 18, 24시간)에 따른 인산흡수 양상을 조사하였다 <부록 Fig. 13>. *A. lwoffii* PO8은 arginine, methionine, lysine 등의 첨가시에 아미노산을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 인산흡수 효율이 향상되었고, asparagine, glutamine, cysteine 등은 효과를 보이지 않았다. 반면에 *C. lividum* PI4의 경우는 phenylalanine을 제외한 asparagine, tyrosine, glutamine, methionine, alanine, arginine 및 lysine 등 첨가한 대부분의 아미노산이 대조구에 비해 인산흡수에 좋은 영향을 보여주었다.

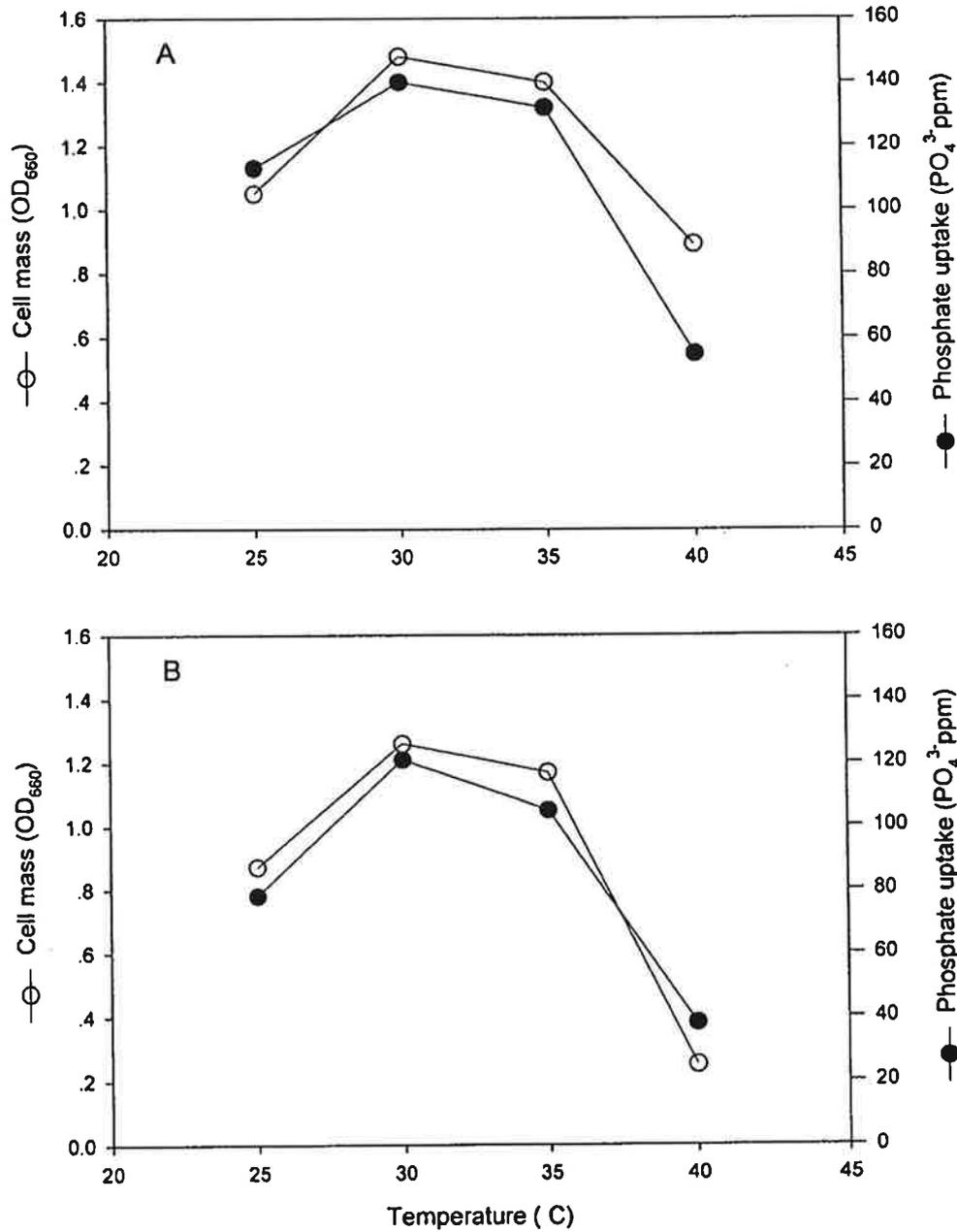


Fig. 11. Effect of temperature on growth and phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 <A> and *Chromobacterium lividum* PI4 .

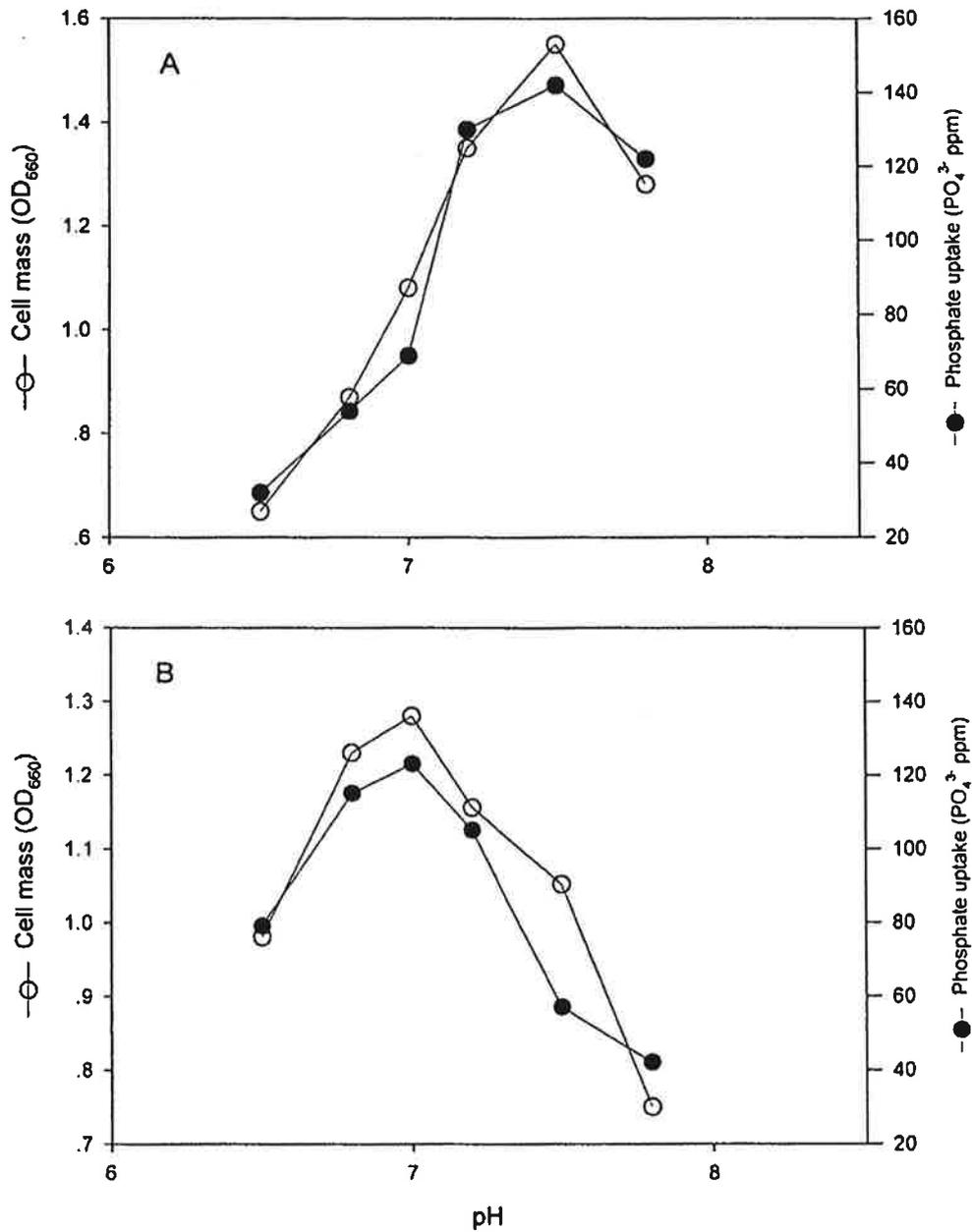


Fig. 12. Effect of initial pH of medium on phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 <A> and *Chromobacterium lividum* PI4 .

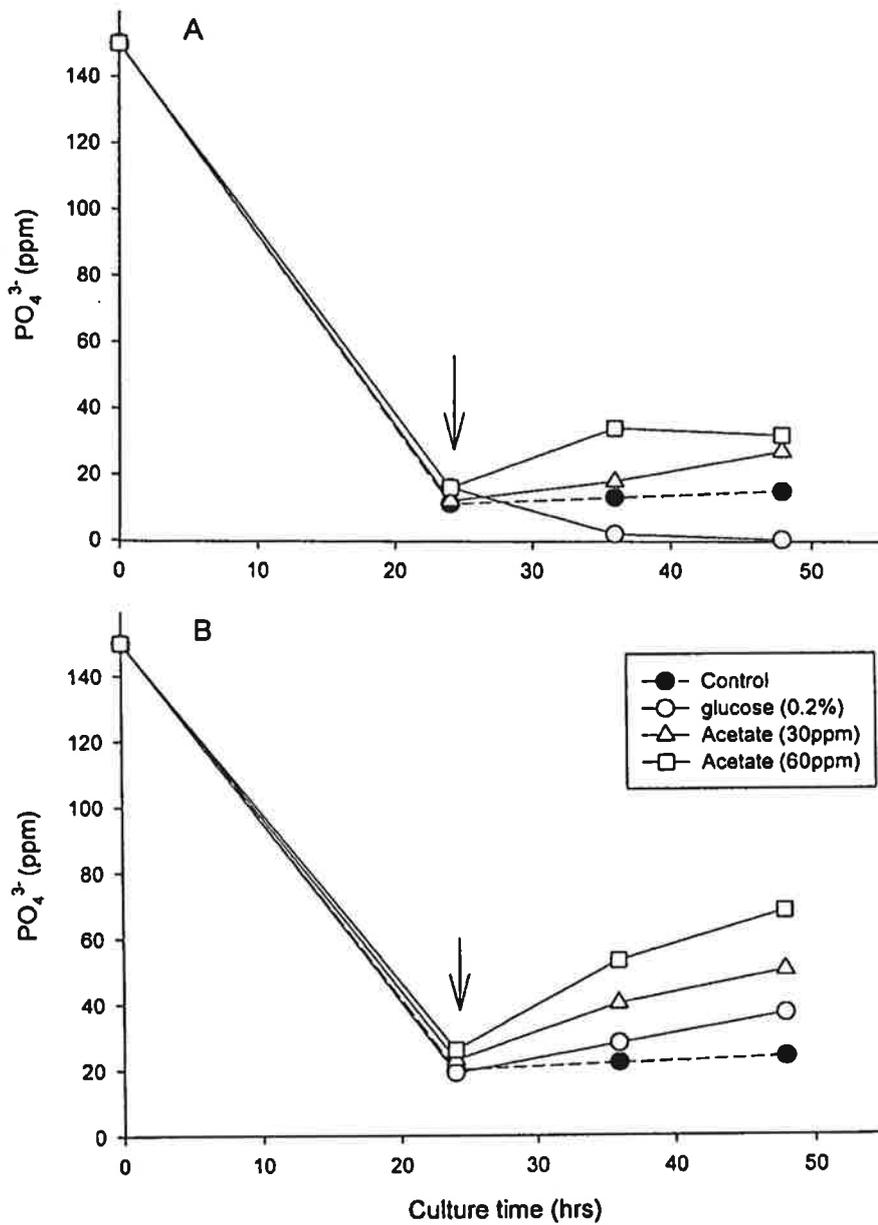


Fig. 14. Effect of subsequent addition of glucose and acetate on release of phosphate during cultivation of *Acinetobacter lwoffii* PO8 <A> and *Chromobacterium lividum* PI4 .

↓: Addition of glucose and acetate (as sodium acetate).

3.4. 인산의 흡수 메카니즘

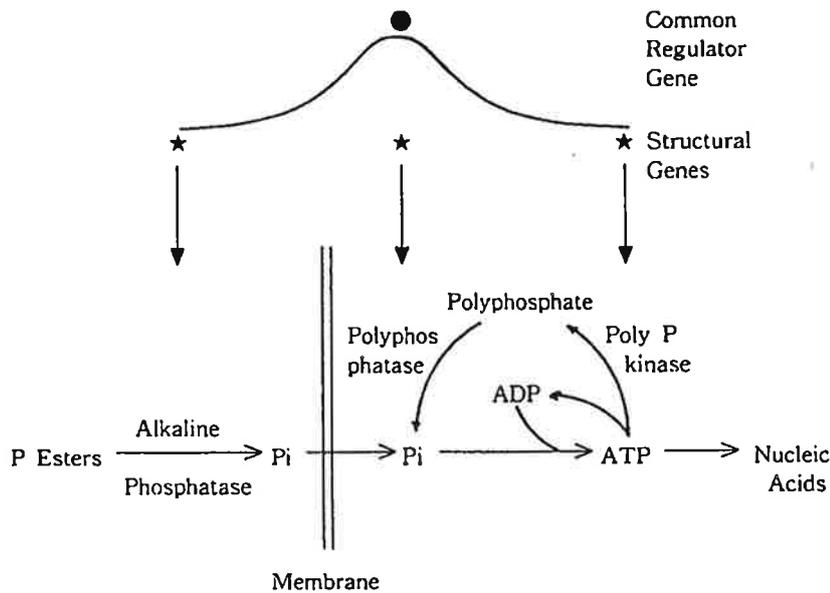
1) 흡수 인산의 분비

탄소원을 세포내로 흡수할 때 에너지원으로서 인산화합물을 필요로 하는데 이때 축적된 인산을 사용하게 되며,^{3,16)} 사용된 인산 즉 ADP, Pi 등은 분비되거나 다시 인산사슬 및 핵산 등을 형성하는 것으로 알려져 있다.^{9,10)} 본 실험에서는 균주의 생육이 정지기에 도달하여 인산을 축적하고 있는 상태에서 탄소원을 추가함으로써 당의 흡수에 사용된 인산이 세포밖으로 분비되는지를 관찰하기 위하여, 배양 24시간후에 glucose와 acetate를 첨가해 주어 그 결과를 Fig. 14에 나타내었다. PO8의 경우 acetate를 첨가한 후 인산이 다소 분비되었으나 glucose 첨가시에는 그렇지 않았다. PI4의 경우에는 acetate와 glucose 모두 인산분비를 유발하였고 acetate 60 ppm에서 뚜렷한 결과를 보였다.

2) 인산축적 효소의 확인

세포내 인산축적에 중요한 역할 <Scheme 1참조>을 하는 효소 polyphosphate kinase (PPK)를 측정하기 위해 T'Seyen²⁰⁾의 방법과 Harold⁸⁾의 방법으로 효소의 활성을 확인하였다.

먼저 T'Seyen 등의 방법에 따라 조효소액과 반응혼합물을 30°C 항온수조에서 30분간 반응시킨후 2 μ L를 취하여 Whatman 3MM Chr지에 점적하고 Ebel⁶⁾의 전개용매로 4시간 동안 약 15 cm 전개한 후 건조하여 X-ray 필름으로 감광시켰다. Fig. 15에 그림으로 나타낸바와 같이 R_f값이 낮은 부위의 감광반점으로 보아 *A. lwoffi* PO8과 *C. lividum* PI4의 PPK에 의하여 다량의 Poly-P 사슬이 생성되었음을 확인할 수 있었다. T'Seyen²⁰⁾은 5% TCA용액을 전개용매로 사용한 경우 저분자량의 인산화합물 즉 Pi, pyrophosphate (PPi), ATP, ADP, AMP 등이 15분내에 Poly-P와 분리되어 전개용매의 상승선을 따라 이동하는 반면에 큰 분자량의 인산사슬은 이동하지 않고 R_f 값이 낮은 부위에 머물었다고 하였다. 또한 Griffin⁷⁾에 의하면 Ebel⁶⁾의 용매로 전



Scheme 1. Polyphosphate cycle and its genetic control in bacteria.

개시켜 점적원점으로 부터 R_f 0.5에 이르는 범위에서 2 units (PPi) 이상의 다양한 크기의 Poly-P를 확인하였으며, R_f 값이 0.13일 때 사슬길이가 230 units 으로 추정되었으므로 점적 부위의 반점은 적어도 500 units 크기의 Poly-P이며, 이는 $(\text{NaPO}_3)_x$ 로 계산하여 대략 분자량 50,000에 상응하는 것이라고 보고 한바 있다.

다음 Harold 등⁸⁾의 방법에 따라 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 기질을 함유하는 반응혼합물을 37°C 에서 시간별로 반응시킨 후 그 200 μL 를 사용하여 PPK의 활성에 의해 생성된 Poly-P의 섬광량을 LSC로 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 16에 나타내었다. 그림에서 보는 바와같이 PPK는 반응초기에 직선으로 상승하다가 30분 후 최고에 달하여 PO8은 144 CPM/mg protein, PI4는 86.4 CPM/mg protein의 활성도에 이르렀으며 이후 점점 활성이 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 이와 병행하여 반응액 2 μL 를 Whatman No. 2에 점적하고 X-ray 필름으로 감광시켜 그 결과를 Fig. 16에 함께 나타내었으며 효소의 활성도와 반점의 감광도가

일치함을 알 수 있었다.

이로서 위와 같은 조건에서 30분이 적절한 반응시간 이었고, 이들 두균주의 PPK에 의하여 큰 분자의 Poly-P 사슬이 생성됨을 확인할 수 있었으나, PPK의 활성화 수준은 *A. lwoffii* PO8의 것이 *C. lividum* PI4보다 현저하게 높았다.

<Fig. 17 참조>

3) 인산축적 효소의 정제

A. lwoffii PO8을 P-1배지에서 24시간 배양하여 얻은 배양액 300 mL를 Fig. 2에서와 같은 방법으로 조효소액을 조제하고 이로부터 황산 암모늄 침전, Sephadex G-100 겔 여과, DEAE-Sephrose 이온교환크로마토그래피를 거쳐 PPK를 부분 정제하였다.

황산암모늄 침전: 조효소액 50 mL (protein: 20.5 mg)으로부터 20~90% 포화도의 황산암모늄 침전물을 얻었다. 이를 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)으로 용해하여 투석하고 5 mL로 농축하여 겔 여과의 시료로 사용하였다. 염석 과정에서 PPK의 활성화도 70.7% 상당하는 효소가 회수되었으며 비활성도가 조효소액에 비하면 1.2배 증가하였다.

Sephadex G-100겔 여과: 황산암모늄 침전과정에서 얻은 시료 (Protein: 11.8 mg, PPK: 71,080 cpm)를 Sephadex G-100 칼럼에 주입하고 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)으로 용출하였다 <부록 Fig. 17>. 분획번호 59과 66을 정점으로 하여 크고 작은 2개의 단백질 부분을 얻을 수 있었고, 앞 부분의 분획번호 57~62 사이에서 주입된 PPK의 43.4%에 상당하는 효소활성이 존재하였으므로, 이 분획을 다음과정의 시료로 사용하였으며 그 비활성도는 조효소액에 비하여 1.4배 증가한 것이었다.

DEAE-Sephrose 이온교환크로마토그래피: Sephadex G-100 겔 여과과정에서 얻은 농축액 5 mL (protein: 6.4 mg, PPK: 49,800 cpm)을 DEAE-Sephrose 음이온교환수지에 흡착시키고, NaCl 농도 구배법으로 용출하였다.

Table 14. Summary of purification steps PPK from *Acinetobacter lwoffii* PO8.

Purification step	Vol (mL)	Total protein (mg)	Total activity (cpm)	Specific activity (cpm/mg)	Yield (%)	Purification factor (-fold)
Cell lysate	50	20.5	114,600	5590	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (20~90%)	8	11.8	71,080	6024	70.7	1.2
Sephadex G-100 (No. 57~62)	5	8.4	49,800	7781	43.4	1.4
DEAE-Sepharose (No. 33~38)	5	2.2	27,900	12682	24.3	2.3

<부록 Fig. 18> 그림에서와 같이 단백질의 용출 정점은 분획번호 11, 35, 48의 3 곳으로 그 중 분획번호 35에서 대부분의 PPK 활성이 존재하는 것으로 확인되었다. 따라서 33~38사이의 분획을 수집하였으며, 이 과정에서 컬럼에 흡착시킨 양의 24.3%에 해당하는 PPK가 회수된 것으로 계산되었으며 비활성도는 배양액에 비하여 2.3배 증가되었다.

이상의 결과를 종합하여 Table 14에 정리하였으며, 순도를 확인하기 위하여 정제성분을 SDS-PAGE로 실험한 결과 분자량 60 kDa에 이르는 단일한 단백질 밴드를 얻었다. <Fig. 19 참조> 한편 Ahn 등¹⁾의 연구에서 *E. coli*의 경우 PPK는 tetramer이고 분자량이 69 kDa이었다고 밝힌바 있다.

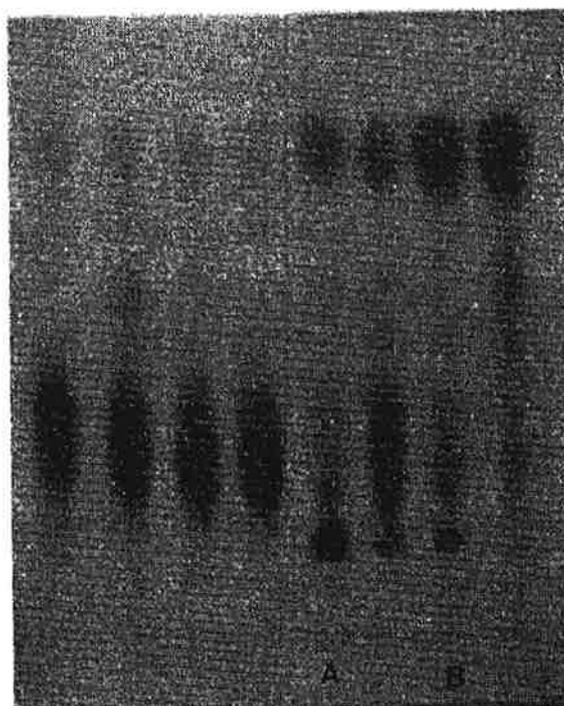


Fig. 15. Autoradiogram of reaction products of the polyphosphate kinases from *Acinetobacter lwoffii* PO8 <A> and *Chromobacterium lividum* PI4 . Reaction samples were chromatographed on Whatman 3MM paper, employing the solvent system of Ebel¹⁰. The paper was covered with X-ray film and incubated for overnight, then the film was developed.

A. lwoffii PO8

C. lividum PI4

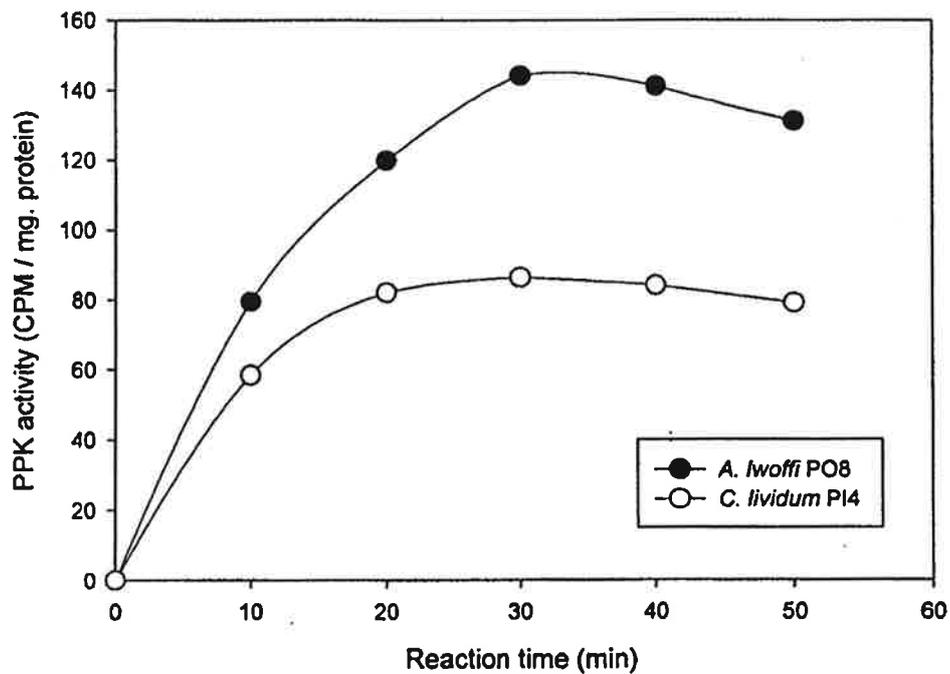
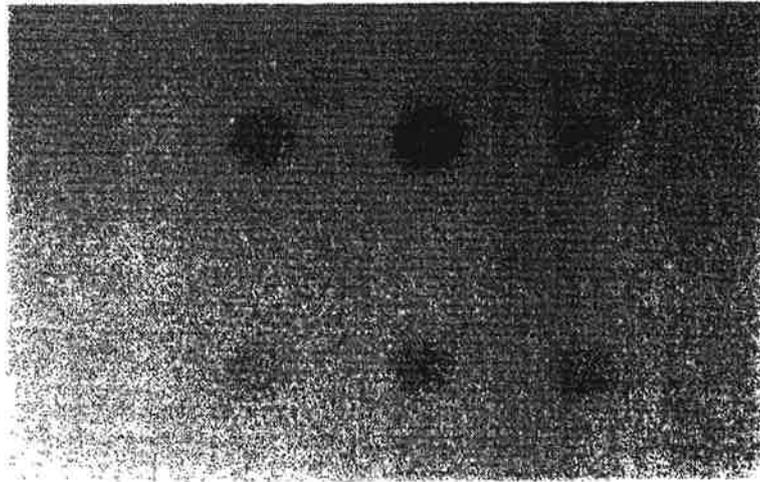


Fig. 16. Optimization of reaction time for determination of polyphosphate kinase by the radioisotopic method of Harold.

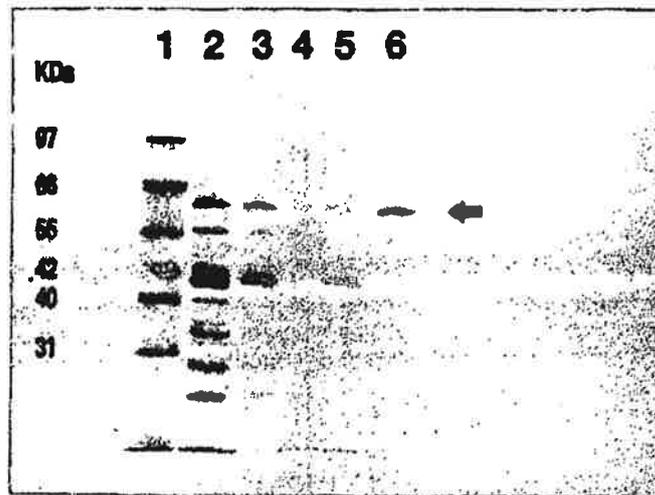


Fig. 19. SDS-PAGE of the partially purified PPK from *Acinetobacter lwoffii* PO8.

Lane 1. Protein marker

2. Crude enzyme

3. Pooled fraction from gel filtration

4. Fractions 11~14 from DEAE-Sepharose chromatography

5. Fractions 45~50 from DEAE-Sepharose chromatography

6. Fractions 30~39 from DEAE-Sepharose chromatography

4절 염류 흡착제의 특성

농업용소재 7종(수입재료 3종포함), 일반 공업용소재 2종, 세제및 소취제 각 1종씩을 대상으로 양이온및 음이온의 흡착력을 측정하고 이들의 입자 크기, 단위 무게 및 부피에 대한 표면적을 측정하여 비교 평가함으로써 실용가능한 소재로서 zeolite(I)과 인도네시아산 호수퇴적 peat, 스리랑카산 Lignocell, 그리고 탈지미강및 vermiculite을 목적 이온에 따라 이용할수 있음을 구명하였다.

각종흡착 흡착제를 사용하여 이온흡착력을 분석 비교하였으며 그 결과를 Fig. 20~23에 이온별로 플롯하여 최대흡착율을 계산하고 비교표로서 Table 15를 작성하였다.

농업용 zeolite(I)는 질산이온을 제외한 다른 모든 이온에 대하여 어느정도 높은 흡착력을 나타내었다. 세제및 소취제용등 특수목적으로 가공처리한 zeolite(II)와 zeolite(III)는 양이온에 대한 흡착력은 11.4~30.5 meq/100 g으로서 월등히 높았으나 음이온 흡착량이 0.16~0.87 meq/100 g로 낮았고 또 이들은 고가품이므로 가격면에서 실용성이 적다.

Table 15에서 보는바와 같이 인도네시아산 호수퇴적 peat는 zeolite(I)과 비슷한 흡착양상을 나타내었고, Lignocell과 vermiculite의 양이온 흡착율(Fe^{2+} 11.2~11.3; K^+ 4~4.6 meq/100 g), 그리고 탈지미강의 질산흡착력(3.7 meq/100 g)은 주목되는 결과이었으며, 이들의 공급가격은 45~90원/Litre로 조사되어 농업용 재료로서 경쟁력이 있다고 판단된다.

한편 이들의 입자크기 및 표면적의 분석 결과는 Fig. 24~26 및 27에 나타내었으며 Table 16에 주요 자료를 정리하였다. 평균 입자의 크기가 작을수록, 단위중량 또는 부피에 대한 표면적이 클수록 이온흡착력이 증가하는 경향이 있었으며, 공극율도 영향이 클것으로 생각된다. Zeolite(I)의 경우 입자의 크기로부터 구한 비표면적과 BET 표면적간에 현저한 차이를 나타냄으로서 peat 및 탈지미강에 비하여 공극율이 높음을 알수있었다.

Table 15. Characteristics of the absorbents tested.

Absorbents	Remarks (properties/supplier)
Lignocell (Coconut peat)	Coir fibre pith (palm peat) from Sri Lanka; C/N(80:1); Air-filled porosity, 10~12; Pore space, 94~96; Particle size*, $289.42 \pm 170.14 \mu\text{m}$; <동신Korea Inc.>
Rice hull	팽윤왕겨(170℃가열분출); $*683.53 \pm 208.57 \mu\text{m}$; <공주원예협동조합>
Rice bran	Defatted and imported; $*179.82 \pm 123.04 \mu\text{m}$; <효성농산(주)>
Peat	Lake sedimentation from Indonesia; $*40.34 \pm 37.66 \mu\text{m}$; <단국대학교농화학과 주문갑교수>
Green carbon (2호)	Active carbon black; $*124.27 \pm 124.86 \mu\text{m}$; <(주)영안엔지니어링>
Perlite	농용(상토); $*55.84 \pm 53.61 \mu\text{m}$; <삼웅산업>
Vermiculite	토양개량제 Silvergreen"SLS"; $*81.93 \pm 46.35 \mu\text{m}$; <미성산업>
Zeolite(I)	농용(상토); $*29.46 \pm 23.08 \mu\text{m}$; <진성화학(주)>
Zeolite(II)	세제용 Zeolite"A"(4A); $*2.85 \pm 2.31 \mu\text{m}$; <애경소재(주)>
Zeolite(III)	소취제용 Greenlite"AK-PQ"; $*3.20 \pm 3.18 \mu\text{m}$; <애경소재(주)>
Tobermolite	경량기포콘크리트 ALC (Calcium-Silicate수화물) 분쇄물; $*67.33 \pm 119.28 \mu\text{m}$; <충남대학교정밀공업화학학과 노재성교수>

*Particle sizes were analyzed by Fritsch Particle Sizer Analysette 22.

Table 16. Maximal absorption rates* of various absorbents for some anions and cations.

Absorbents	Absorption rate (meq/100 g)			
	Fe ²⁺	K ⁺	NO ₃ ⁻ -N	PO ₄ ³⁻ -P
Lignocell	11.18	2.16	0.24	0.29
Peat	9.46	3.99	0.12	6.01
Green carbon	9.46	1.16	0.19	1.57
Rice hull	2.92	1.70	0.79	0.51
Rice bran	3.49	0.90	3.72	0.84
Perlite	5.48	2.40	0.09	0.26
Vermiculite	11.28	4.60	0.21	0.43
Zeolite (I)	8.38	3.45	0.17	6.89
Zeolite (II)	30.52<	13.66<	0.18	0.62
Zeolite (III)	24.40<	11.41<	0.16	0.87

* One gram of the absorbents was mixed with 10 mL of each solution in 15-mL plug seal cap tube and reacted at room temperature on a rotary shaker for 8 hours, then the suspensions were passed through the membrane filters with pore size of 0.45 μm and the residual concentration of the ions were analyzed according to the methods of ion chromatography and/or atomic adsorption spectroscopy as described in the Text.

위의 결과에서 보면 zeolite(II) 와 (III)는 양이온에 대한 흡착력은 높으나 인산염에 대하여는 섬유질재료가 상대적으로 좋은 결과를 보이고 있다. 또한 문헌을 통하여 도토리중의 탄닌성분이나 원두커피 찌꺼기와 같은 재료의 중금속 흡착에 대한보고와 볏짚 또는 톱밥에 의한 염류집적 저감효과를 찾아 볼수 있다. 이러한 현상의 원인을 구명함으로써 보다 체계적인 염류집적 해소방안을 탐색하는데 필요한 자료를 얻고저 인산과 금속(Al³⁺)이온의 존재하에서 다당류의 모델화합물인 catechol과의 반응성을 검토하였다. 생성물 분리과정의 TLC

Table 17. Particle sizes and surface areas of the absorbents.

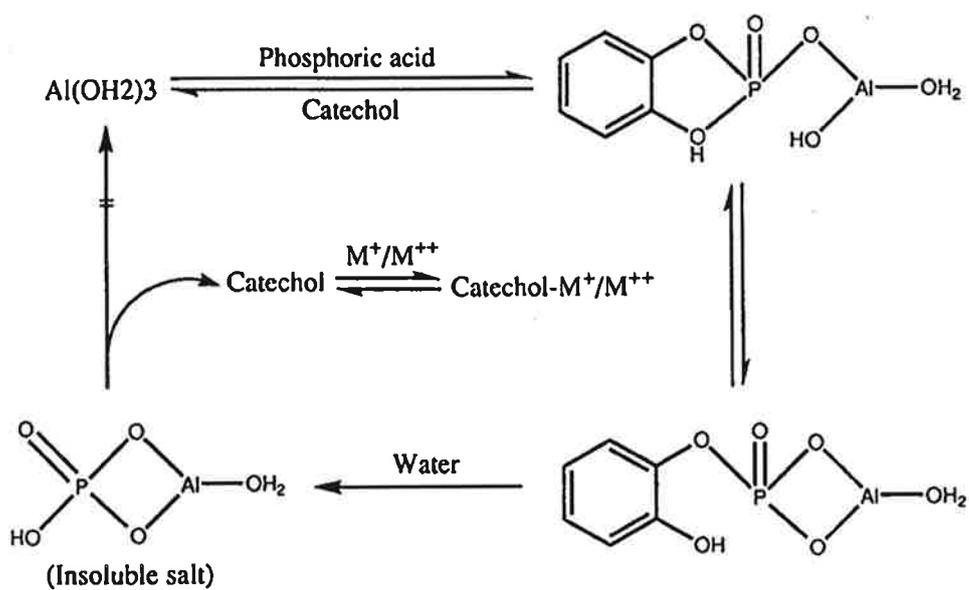
Absorbents	Particle size*		Surface area** (m ² /g)		
	Median (μm)	Spec. surface area (m ² /cc)	BET	Langmuir	Single point
Lignocell	289.52±170.14	0.100	-	-	-
Peat	40.34±36.77	0.723	4.824	6.848	4.456
Green carbon	124.27±124.86	0.152	-	-	-
Rice hull	683.53±208.57	0.058	-	-	-
Rice bran	179.82±123.04	0.286	0.739	1.117	0.630
Perlite	55.84±53.61	0.318	-	-	-
Tobomolite	67.33±119.28	0.529	-	-	-
Vermiculite	81.93±46.35	0.230	-	-	-
Zeolite (I)	29.46±23.08	0.771	73.939	83.735	71.164
Zeolite (II)	2.85±2.31	2.980	-	-	-
Zeolite (III)	3.20±3.18	3.379	-	-	-

* Particle sizes of the absorbent materials were analyzed by Fritsch Particle Sizer Analysette 22.

** BET surface areas were analyzed and determined by the ASAP 2400 system of Micromeritics.

전개 (ethylacetate) 조건에서 catechol (Rf=0.70)이 분리되었다는 사실로부터 catechol의 역할을 다음 scheme과 같이 가정하였다. 만약, X-ray 분석의 해석으로부터 인산-Al 착화합물이 확인된다면 cAMP와 Co(II) 착화합물과의 반응에서 제안된 메카니즘에 따라 본 반응에서도 Scheme 2와 같은 반응 메카니즘을 가정할 수 있으므로, 이당류는 인산과 금속 화합물간의 반응을 촉진시키는 매체로서 작용함을 잘 설명할 수 있다. 그러므로 수용액중에서 불용성의 인산-금속 착화합물 생성을 도모하여 영양원으로 불용화함으로써 염류집적에 의한 피해를 경감시키기 위하여 토양개량을 위한 흡착제는 hydroxyl group을 가

지는 기능성 구조를 유지해야 할 것으로 믿어진다 <부록 Fig. 26~29>.



Scheme 2. Hypothesis of catalytic cycle for the reaction between phosphoric acid and aluminum hydroxide under catechol.

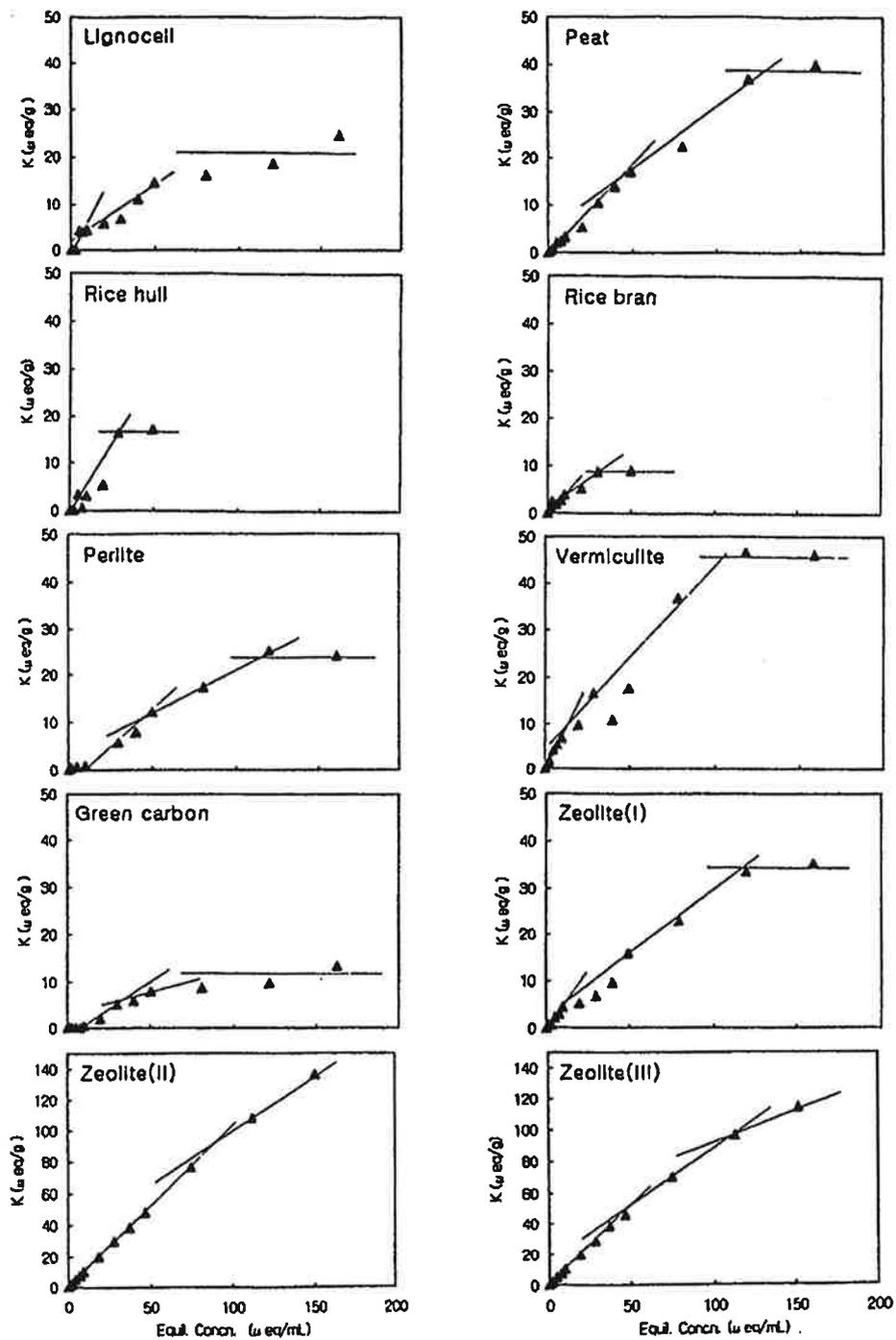


Fig. 20. Absorption patterns of potassium ions by various absorbents.

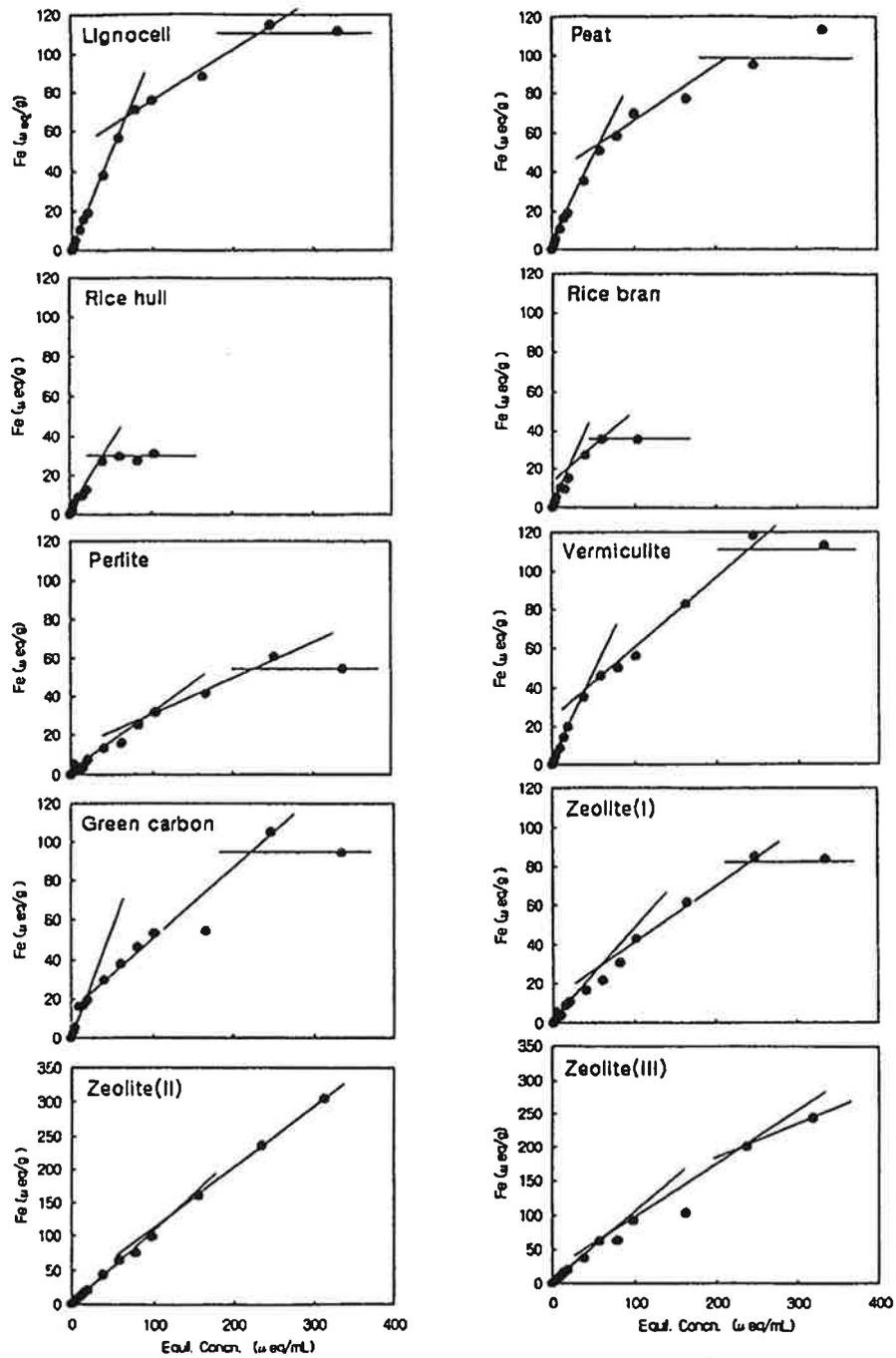


Fig. 21. Absorption patterns of ferric ions by various absorbents.

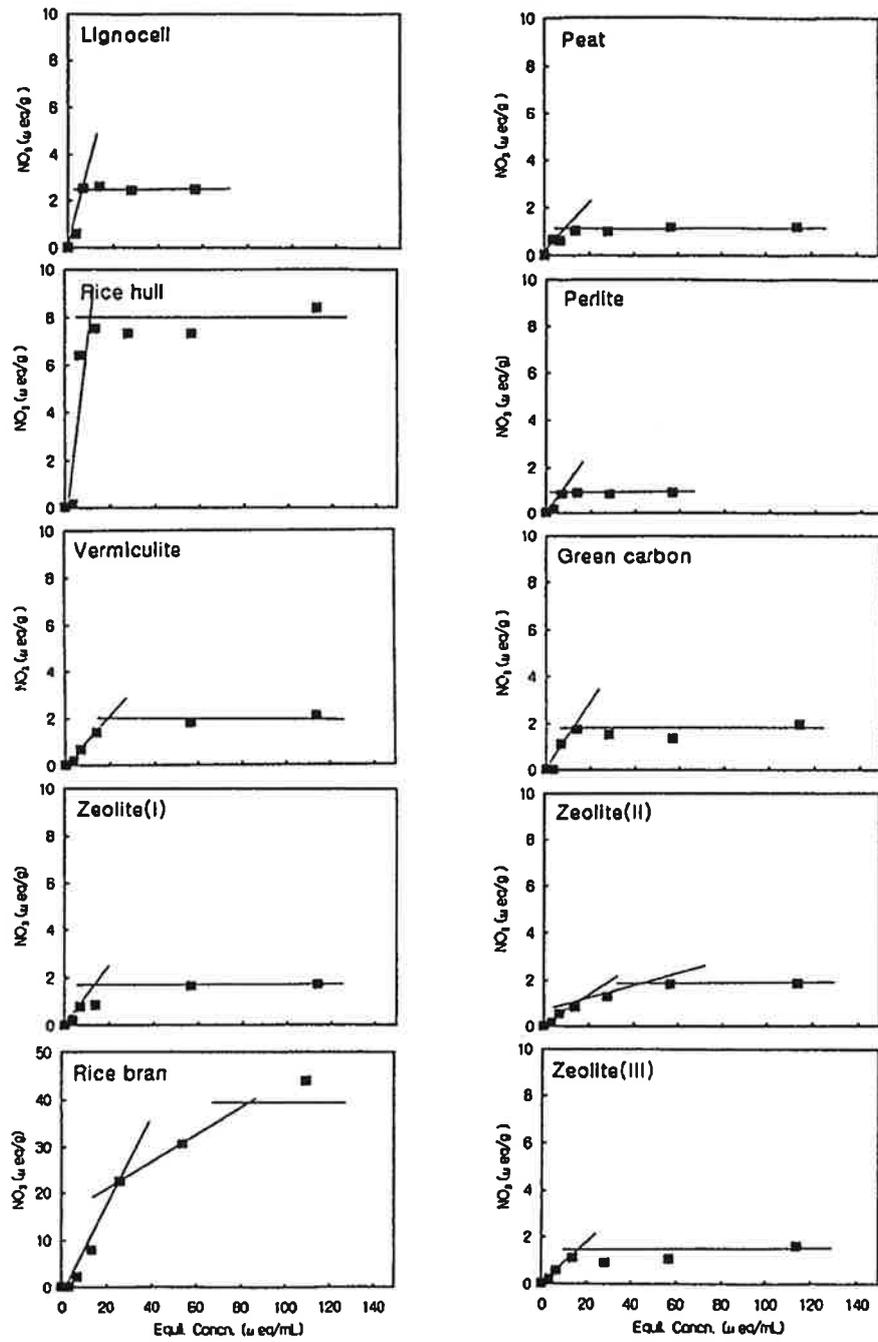


Fig. 22. Absorption patterns of nitrate ions by various absorbents.

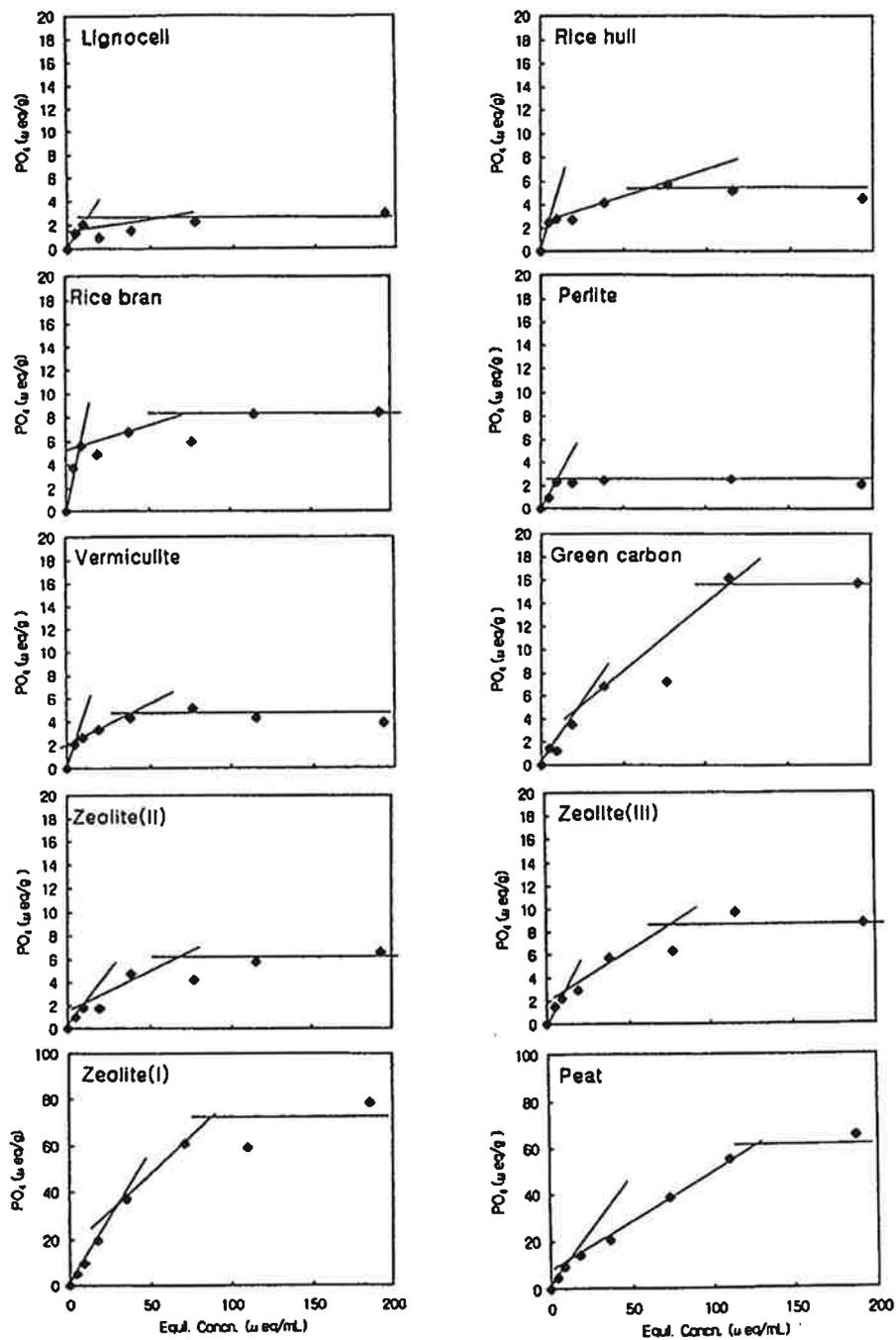


Fig. 23. Absorption patterns of phosphate ions by various absorbents.

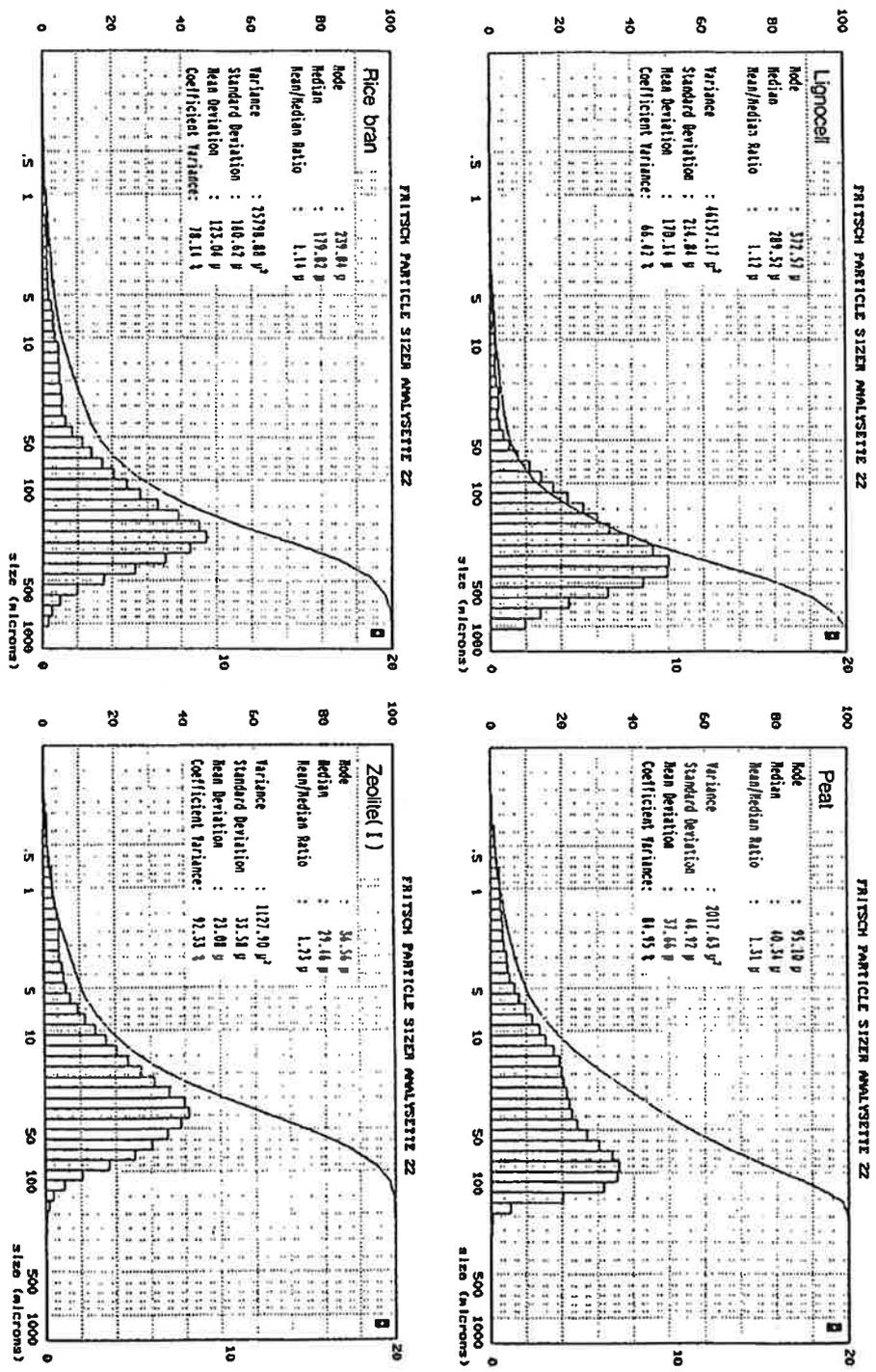


Fig. 24-1. Particle size distributions of the selected absorbents.
 The particle sizes were analysed by Fritsch Particle Sizer Analysette 22

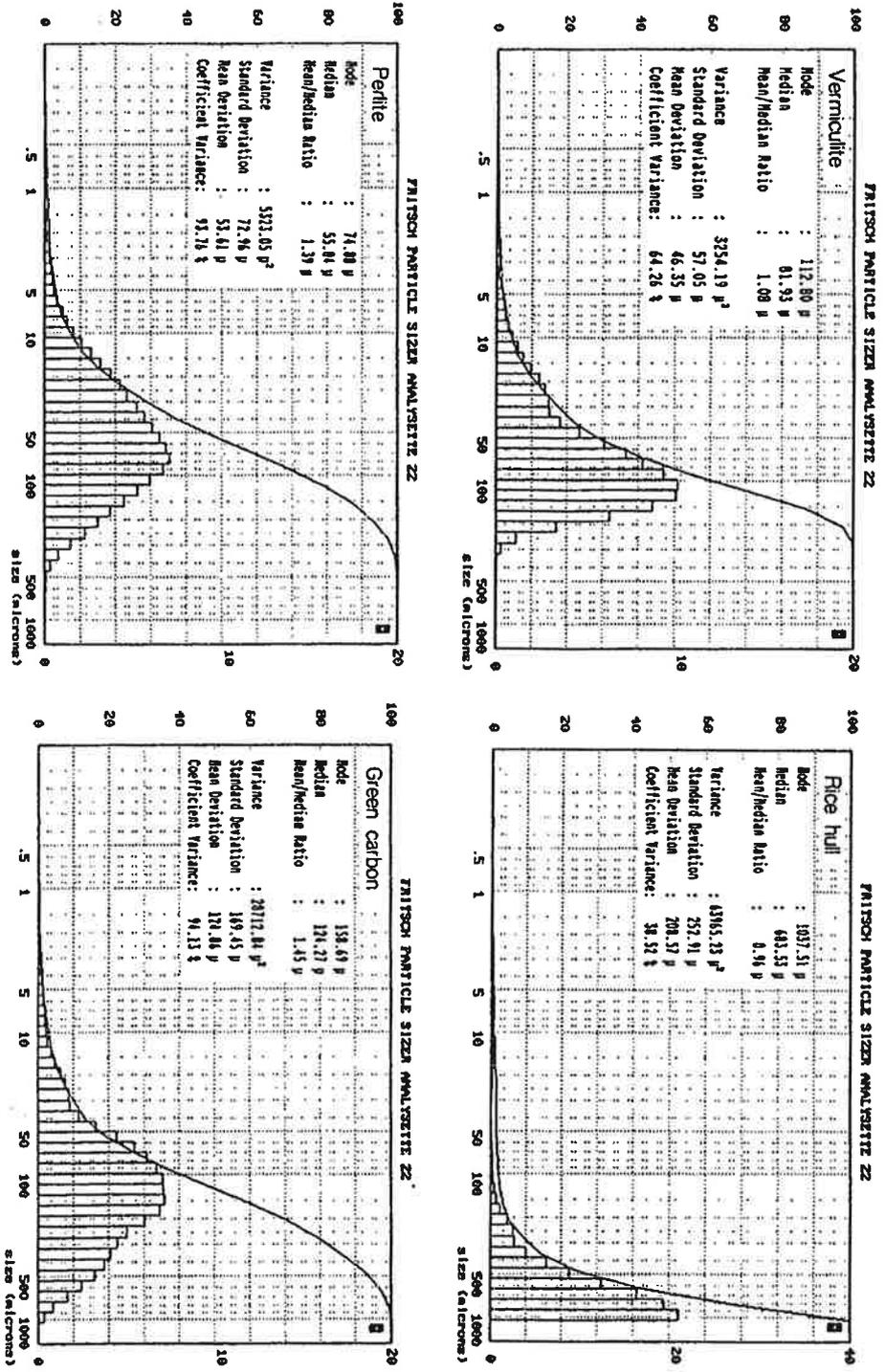


Fig. 24-2. Particle size distributions of the selected absorbents.
 The particle sizes were analysed by Fritsch Particle Sizer Analysette 22

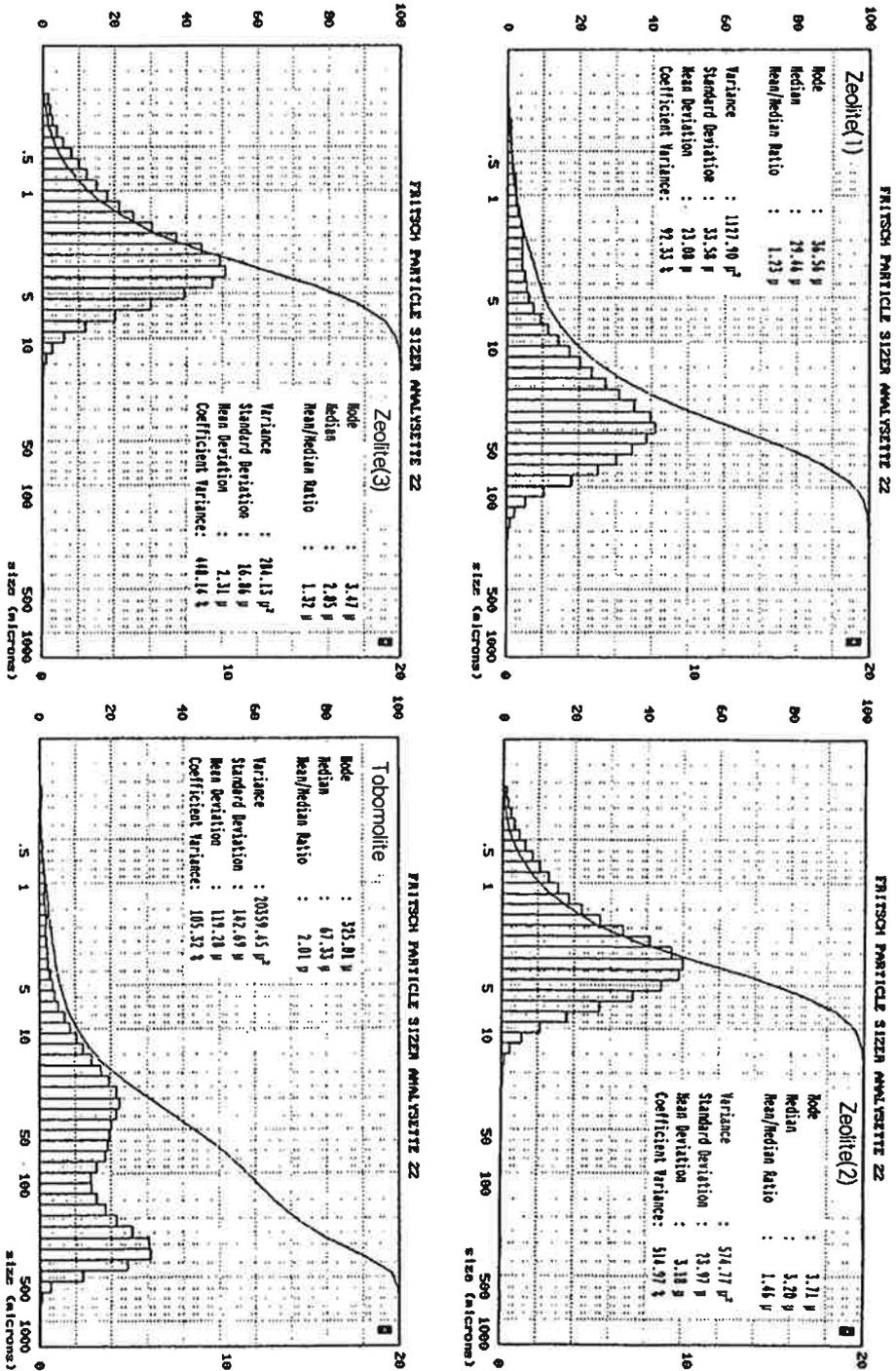


Fig. 24-3. Particle size distributions of the selected absorbents.
The particle sizes were analysed by Fritsch Particle Sizer Analysette 22

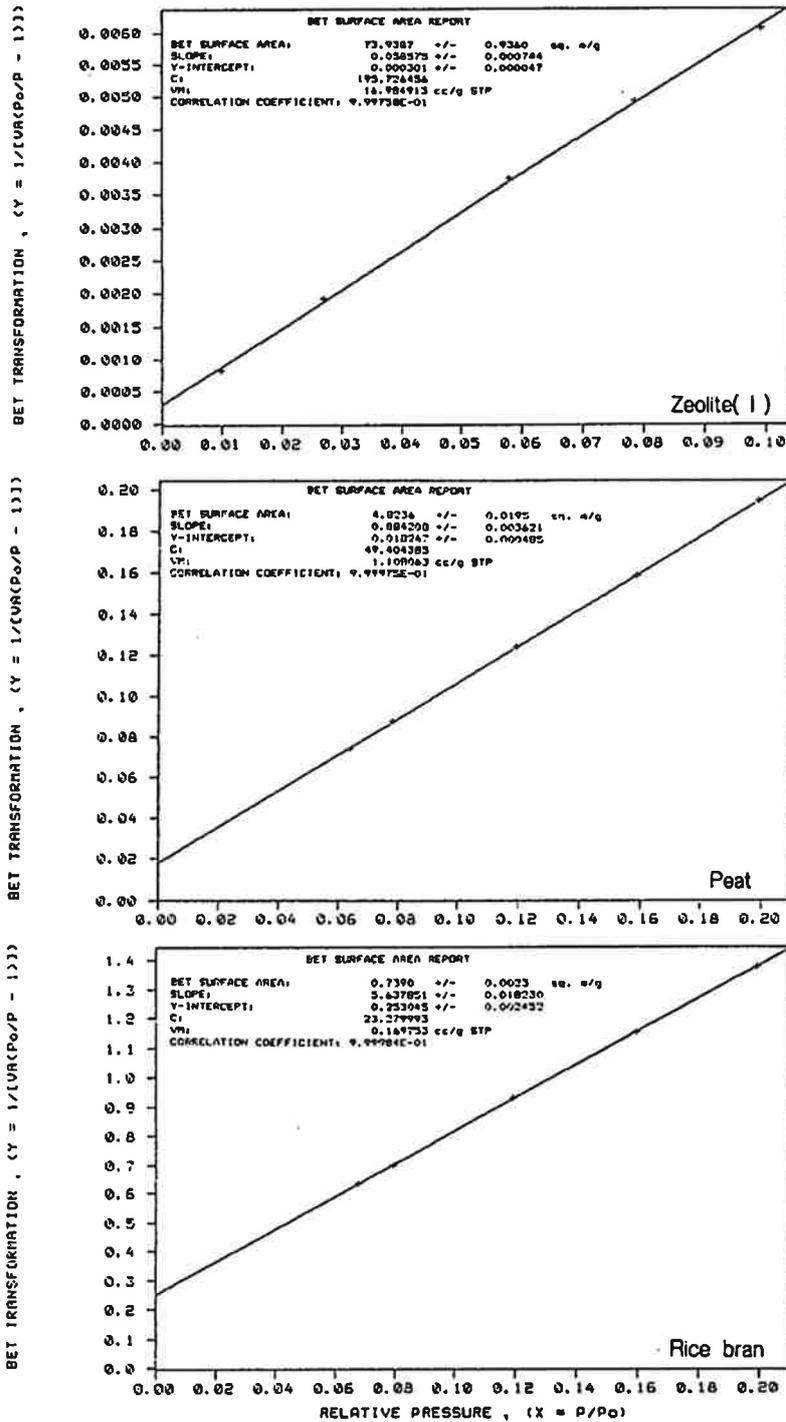


Fig. 25. BET surface area reports for the selected absorbents. The surface areas were determined by the ASAP 2400 system of Micromeritics).

제5절 염류흡착제-미생물복합제의 조제 및 제제화

5.4. 미생물의 대량배양법

Acinetobacter lwoffii PO8과 *Chromobacterium lividum* PI4, 그리고 *Halomonas* sp. HS1-1, *Alcaligenes* sp. DS5 등은 먼저 shake flask에서 최적배지와 배양조건을 검토한 다음 <앞의 3.3항 참조>, 2종의 jar fermentor (한국발효기 MK-25 및 KF-5L)로 parameter를 구하여 대량배양을 위한 기초데이터를 얻었으며, 흡착제와의 혼합을 위한 액체배양물의 배양방법을 확립하였다.

선발균주 HS1-1은 nutrient broth (half strength)에서 36시간 배양후 최대생균수 $\sim 10^9$ cells/mL 수준에 도달하였고, 균주 PO14과 PO8는 P-1배지에서 각각 24시간후 $\sim 10^8$, 36시간후 $\sim 10^9$ 에 도달하였다. 여기에서 회수한 배양액은 같은 배지 (5-fold dilution)로 희석하여 제제화 실험에 사용하였다.

Table 18. Viable titres of the culture broths for preparation of the mixtures.

Strain No	Genus/species	Remarks
PO8	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Phosphate accumulation; 5.6×10^9 cells/mL 24-hr (P-1 medium)
PI4	<i>Chromobacterium lividum</i>	Phosphate accumulation; 8.2×10^8 cells/mL 24-hr (P-1 medium)
DS5	<i>Alcaligenes</i> sp.	Denitrification; 1.1×10^8 cells/mL 48-hr (medium*)
HS1-1	<i>Halomonas</i> sp.	Salt tolerance; 2.0×10^9 cells/mL 36-hr (medium**)

* The medium described by Mycielski and Gucwa (1977).

** Half-strength nutrient broth containing 1.5 M NaCl.

5.2. 복합제의 제제화

액상의 생균배양물은 미리 살균한 흡착제와 혼합하여 1-mm² 금망 (sieve screen)을 통과시키면서 트레이 (33×52×8 또는 16 cm)에 받아 28℃의 항온실에서 3일간 숙성시켰다. Fig. 30에 나타낸 바와 같이 다양한 혼합비율을 적용하였으며 흡착재료중에서 가장 흡착력이 양호한 zeolite (I) 분말과 타재료를 혼합하였다. 숙성을 위한 생균-흡착제 혼합물의 수분함량은 20~60%가 되도록 조정하였으며 숙성후의 수분함량은 20% 이하로 음건하여 zipper bag에 그대로 또는 진공충진 (한국전자공업 M-7EG 진공포장기)한 다음, 상온 또는 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

흡착재료에 대한 적정수분 첨가량은 Lignocell 60%(w/w), 탈지미강 30%, zeolite (I) 20%이었고, 숙성과 보관중 생균수의 유지를 위하여 미리 재료의 pH를 6이상으로 조정할 필요가 있었으며 CaCO₃의 소요량은 Lignocell 1.2~1.4%, 탈지미강 2%, zeolite (I) 3% 수준이었다.

Halomonas sp. HS1-1과 *Chromobacterium lividum* PO14의 두균주는 zeolite (I)와 혼합하여 숙성시키는 경우 생균수의 증식율이 높지 않았으며 zeolite (I)에 10% Lignocell (coconut palm peat)을 혼용한 경우에 균체의 증식이 잘되어 HS1-1균주는 36시간이내에, PO14균주는 24이내에 $<3 \times 10^7$ 의 초

Table 19 Addition of water and calcium carbonate for the selected absorbents.

Absorbents	Amount of water (%, w/w)	Amount of CaCO ₃ to adjust pH 6< (%, w/w)
Lignocell (Coconut peat)	60	1.2~1.4
Rice bran	30	2
Zeolite (I)	20	3

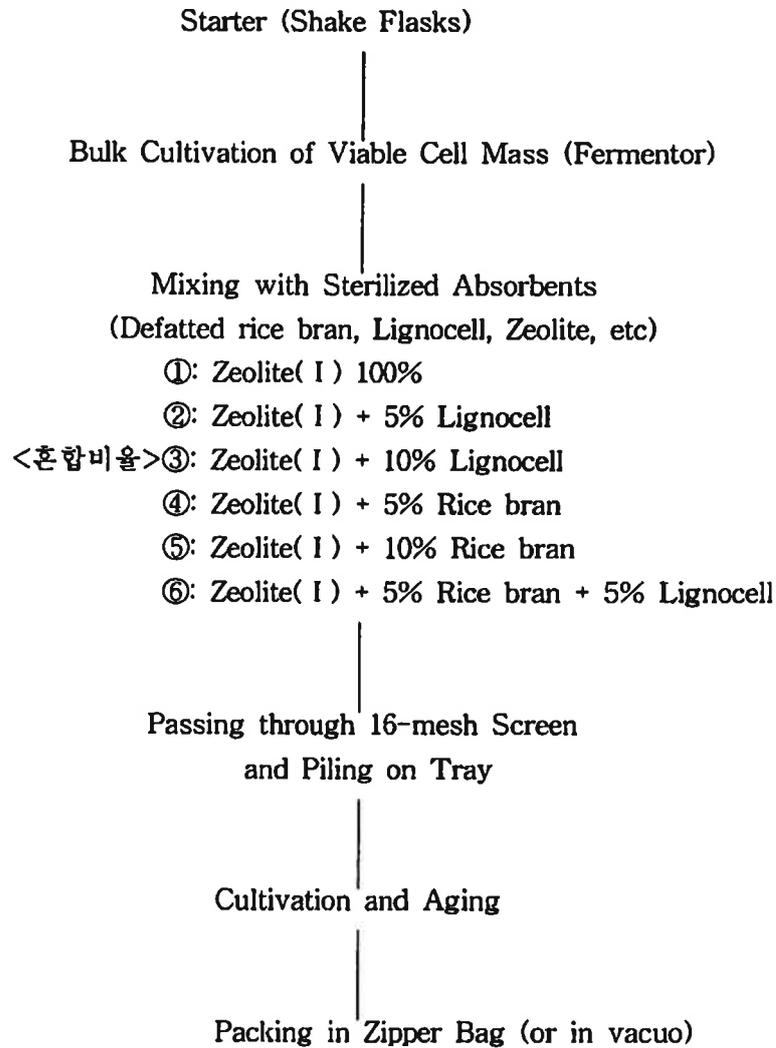


Fig. 30. Procedures for mixing and aging of the absorbent mixtures

기생균수가 $1\sim 2\times 10^9$ 수준으로 상승하였다. 한편 *Acinetobacter lwoffii* PO8 균주는 zeolite 단용의 경우와 Lignocell 혼용의 경우에 별차이가 없었고 72시간 이후에는 5×10^9 수준으로 생균수가 증식되었다.

제제화의 방법은 생균수만을 고려하여 냉동건조 (lyophilization)법을 적용할 수도 있겠으나 냉동건조에 수반하는 시설 및 경비와 공정이 추가되는 점을 감안한다면 본실험에서 적용한 혼합 숙성방법이 적절한 것으로 판단된다.

5.3. 복합제의 보존성

염류흡착제와 미생물 균체의 복합제는 숙성기간중에 수분함량이 감소하므로 더욱 20%이하로 음건하여 그대로 zipper bag에 포장하여 <Fig. 31> 실온과 4℃에서 보관하면서 생균수의 변화를 조사한 결과 90일후 실온에서 지수 2, 4℃에서는 지수 1이하의 감소율을 나타내었다. 탈질균의 경우에는 인산집적균에 비하여 실온에서의 감소율이 커서 지수 3을 나타내었다 <Fig. 32>. 이와같은 결과는 생균의 보존이 비교적 양호한 것이라고 볼수 있으며 이렇게 보존성을 높이고 생균의 안정화를 도모하기 위하여는 전항에서 기술한 바와같이 미리 흡착제의 pH를 보정할 필요가 있었다.

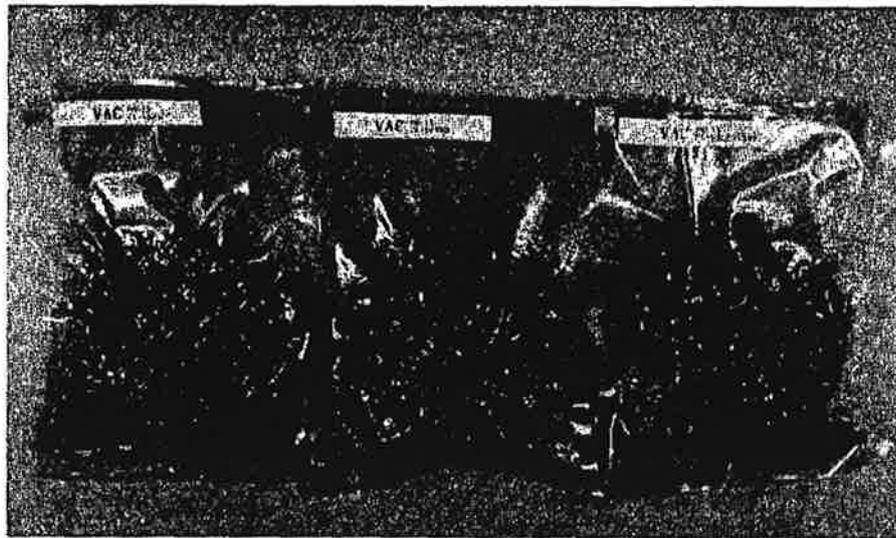
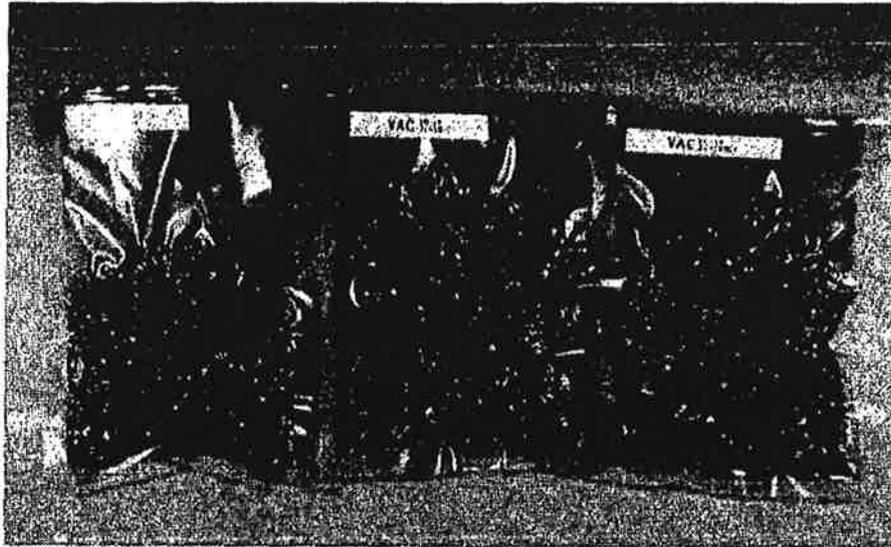


Fig. 31. Packages of the absorbent-microbe mixtures.
The preparations were packed in PE bags in vacuo.

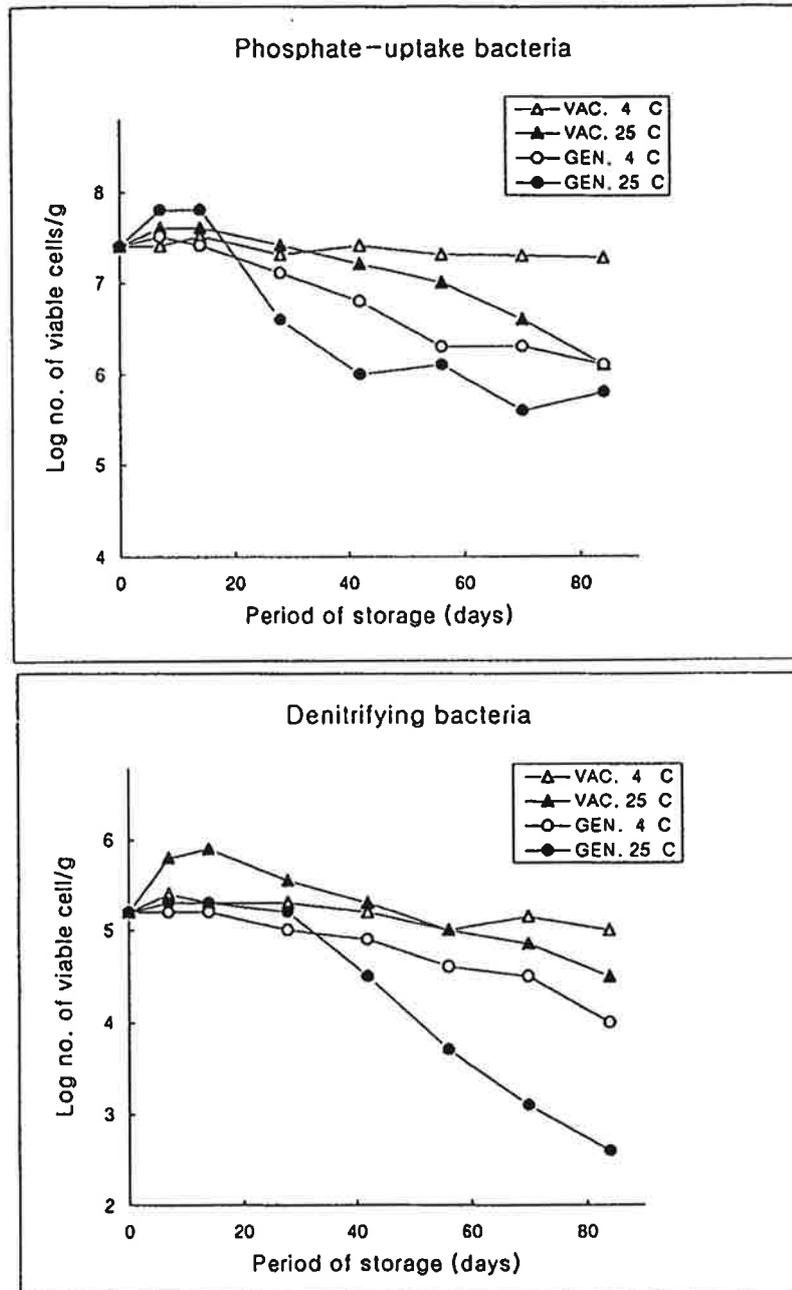


Fig. 32 Changes in viable counts during storage of the absorbent-microbe mixtures. The preparations were packed in PE bags under atmospheric pressure or in vacuo, then stored at 4°C and 25°C.

제6절 흡착제의 작물안전성 및 적용시험

6.1. 작물안전성

국내에서 일반적으로 재배되는 아래의 하우스 원예작물의 종자에 선발균주를 접종하여 발아시험을 한 다음, 복합제를 상토에 사용하여 육묘상에서 생육상태를 대조구와 비교 관찰한 결과, 전 실험구에서 발아 및 초기생장의 차이 또는 특징적인 병징이 발견되지 않았다 <Fig. 33 및 34 참조>.

- 고추(*Capsicum annuum* L.): 금탑(홍농), 우등생(농우), 세계고추(서울)
- 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.): <일반> 서광101, 도태랑;
<방울> 꼬꼬, 페페, 산체리, 미니캐들
- 오이(*Cucumis sativus* L.): <하> 흑진주(서울), 신진주 및 장일반백(홍농); <만추> 내병삼척(홍농); <춘> 은성(홍농), 백미(한농)
- 수박(*Citrus vulgaris* Shrad.): 삼복꿀수박(홍농), 금천(농우), 달고나(서울)
- 참외(*Cucumis melo* L.): 금노다지(농우), 금싸라기(홍농), 금피(서울)
- 호박(*Cucurbita moschata* Duch.): 애호박(중앙/서울), 울쭈키니(중앙)
- 배추(*Brassica pekinensis* Rupr.): 고냉지여름(중앙)
- 상치(*Lactuca sativa* L.): 청치마(농우)

6.2. 토양에서의 인산의 흡수

세균에 의한 토양에서의 인산제거 효율을 조사하기 위하여 *A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4를 살균한 토양 (Top and sub soil)에 접종하여 실내에서 7주 동안 배양실험을 수행하면서 토양중 유리 인산과 유효태 인산의 변화를 측정하였다.

500-mL 조직배양병에 300 g의 A/B층 건조토양 (공시토양의 토성은 아래 Table 20와 같음; Fig. 35의 흡착포화 곡선으로부터 0, 50, 75~80, 100%수준의 농도: 0, 125, 187, 250 cmol/L로 인산을 함유토록 전처리한 것)을 취하고 여기에 미생물제제(*A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4이 토양 g당 $\sim 10^{8-9}$ cells 수

준이 되도록)와 물을 가하여 25°C에서 배양하면서 시간별로 분석하였다. 미생 물체제를 첨가할 때 토양중의 최종 수분함량은 2가지 즉 mass water content (수분/토양무게)로서 25% 및 포화상태 48%로 조정하였으며, 배양기간별로 일정량(5 g×3회=15 g)의 토양시료를 취하고 각각 유리 및 유효태 인산을 정량하였다. 실험결과를 *A. lwoffii* PO8의 것은 Fig. 36에, *C. lividum* PI4의 것을 Fig. 37에 나타내었으며, 각각 생균수의 변화를 함께 정리하였다.

Fig. 36에서 보는바와 같이 *A. lwoffii* PO8의 경우 토양내에 흡착되지 않고 잔존하는 유리 인산의 농도는 배양 초기 3일간 5~25 ppm 농도 범위에서 다소 기복을 보였으나 기간이 지나면서 점차 감소하여 10일 이후에는 최저 수준에 이르러 실험기간중 5 ppm 이하로 유지되었다. Fig. 37의 *C. lividum* PI4의 결과에서도 비슷한 변화를 보였으나 유리인산의 감소폭은 PO8의 경우 보다 약간둔화된 경향을 나타내었다.

유효인산의 변화를 보면 배양 초기 14일간 40~100 cmol/L 진폭으로 실험구에 따라 다양하게 증감하다가 그후에는 큰 변화없이 농도가 유지되었으며, 7주의 실험기간중 기간이 길어질수록 유효인산이 근소하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 변화 경향은 *A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4의 두 균주에서 비슷하게 관찰되었다. 배양초기의 변화 양상은 토양 수분함량에 따라 차이가 있어서, 토양수분 25%의 경우에는 유효인산이 일단 현저하게 증가하였다가 감소하는데 반하여 포화의 경우에는 이러한 증가 현상이 없었다.

한편 생균수에 있어서는 *A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4의 두 균주 모두 배양 4주까지 증가하거나 다소 감소하는 불규칙한 변화 양상을 보였으며 PO8의 경우 4주후에는 평형상태를 유지하였고, PI4는 4주후에도 약간 증가하는 경향을 보였다. 따라서 토양중의 생균수는 실험기간중 최초의 접종수준 즉 PO8의 $\sim 10^9$ cells, PI4의 $\sim 10^8$ cells이 유지되었다.

6.3. 콫트 및 하우스 재배시험

1/5000a 풋트에 과린산석회 16 g 및 복합제 60 g를 사용하고 상치, 치커리 및 들깨의 성장시험을 수행한 결과, 철분 및 아연 등의 결핍 현상은 관찰되지 않았으나 공시작물중 들깨로 부터 채취한 잎의 경도 (여기서는 shear strength 와 puncture strength)가 과린산석회 시용구 (대조구)에서 보다 과린산석회+복합제 시용구에서 낮아지는 경향을 나타내었다 <Table 21>. 전단응력과 착공력은 저작력과 직접 관련이 있으므로 복합제의 사용이 들깨잎의 저작성을 향상시키는 것으로 해석할수 있으며, 이는 복합제가 양분의 흡수 불균형에 기인하는 엽채류의 경화현상을 감소시켜 잎의 경도를 보정하는 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 그러나 이러한 효과는 상치 및 치커리의 경우에는 상치(2)의

Table 21. Average shear and puncture strength of leaves from the tested plants.

Plants	Shear/puncture strength (g)*	
	Plot I **	Plot II ***
Perilla leaves	1942.63±549.78	1759.35±399.96
	183.64±12.40	162.30±23.48
Chicory leaves	4794.82±2822.36	4850.25±1824.15
	ND	ND
Lettuce (1)	2452.88±722.4	2566.27±655.56
	142.17±8.23	141.66±20.19
Lettuce (2)	2992.90±1161.64	2736.96±494.16
	155.48±21.12	144.52±22.93

* The shear strength was determined by SMS Texture Analyer TAXT2i, using the HDP/BS blade as probe. And the puncture strength was determined by the same instrument employing the SMSP-5 probe.

** Plot I : superphosphate (Control), *** II : superphosphate+absorbent

Table 22. Changes of soil composition during cultivation of cucumber in a green house amended by the absorbent-microbe mixture.

Treatments		pH (1:5)	EC (dS/m)	T-N (g/kg)	OM	Av. P ₂ O ₅ (mg/kg)	Ex. cation(cmol+/kg)		
							K	Ca	Mg
Control (none)	EG ¹⁾	6.4	0.65	0.80	14	485	0.44	3.8	0.6
	EH ²⁾	6.3	0.92	0.77	14	447	0.40	3.2	0.7
	LH ³⁾	6.4	0.84	0.70	14	470	0.33	3.5	0.7
30 kg/a Mixture	EG	6.7	0.61	0.87	15	448	0.79	3.6	0.6
	EH	6.2	0.53	0.85	14	438	0.68	3.4	0.7
	LH	6.6	0.53	0.77	14	417	1.65	2.9	0.5
90 kg/a Mixture	EG	6.4	0.56	0.82	14	454	0.41	3.7	0.6
	EH	6.4	0.31	0.77	15	462	0.42	3.3	0.6
	LH	6.6	0.29	0.81	14	421	0.31	3.4	0.6

* Chemical properties were investigated at different growing stage of cucumber; ¹⁾early growth stage (1-week), ²⁾early harvest stage (8-week) and ³⁾late harvest stage (16-week).

착공력을 제외하면 유의성 있는 결과를 얻지 못하였으므로 작물 및 품종간에 차이가 있음을 알수 있었다. <Table 21, Fig. 38 & 39> <부록 Fig. 40~44>

한편 하우스 재배시험을 통하여 오이 (*Cucumis sativus* L., 흥농장일반백)의 성장 및 수량을 대조구와 비교한 결과, 대조구와 시험구간에 성장상태의 차이 점이 관찰되지 않았고, 또 수확량에 있어서도 450 kg/a 수준으로서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 토양성분에 있어서도 Table 22에 나타낸 바와 같이 EC를 제외하면 별다른 차이가 없었으나, 시험구에 있어서는 조류의 발생이 줄어들는 것을 볼수 있었고 이를 A층 토양의 chlorophyll 함량으로 비교하여

보면 대조구에서 평균 26 $\mu\text{g/g}$ 인데 비하여 30kg-시용구에서 평균 17 μg , 90 kg-시용구에서 평균 15 μg 으로 현저한 차이를 나타내었다. 이것은 복합제의 시용이 전체 토양의 성분치에 영향을 줄 정도는 아니라도 재배토양의 표층의 조류 발생률을 저감시킴을 의미하는 결과라고 할 수 있다.

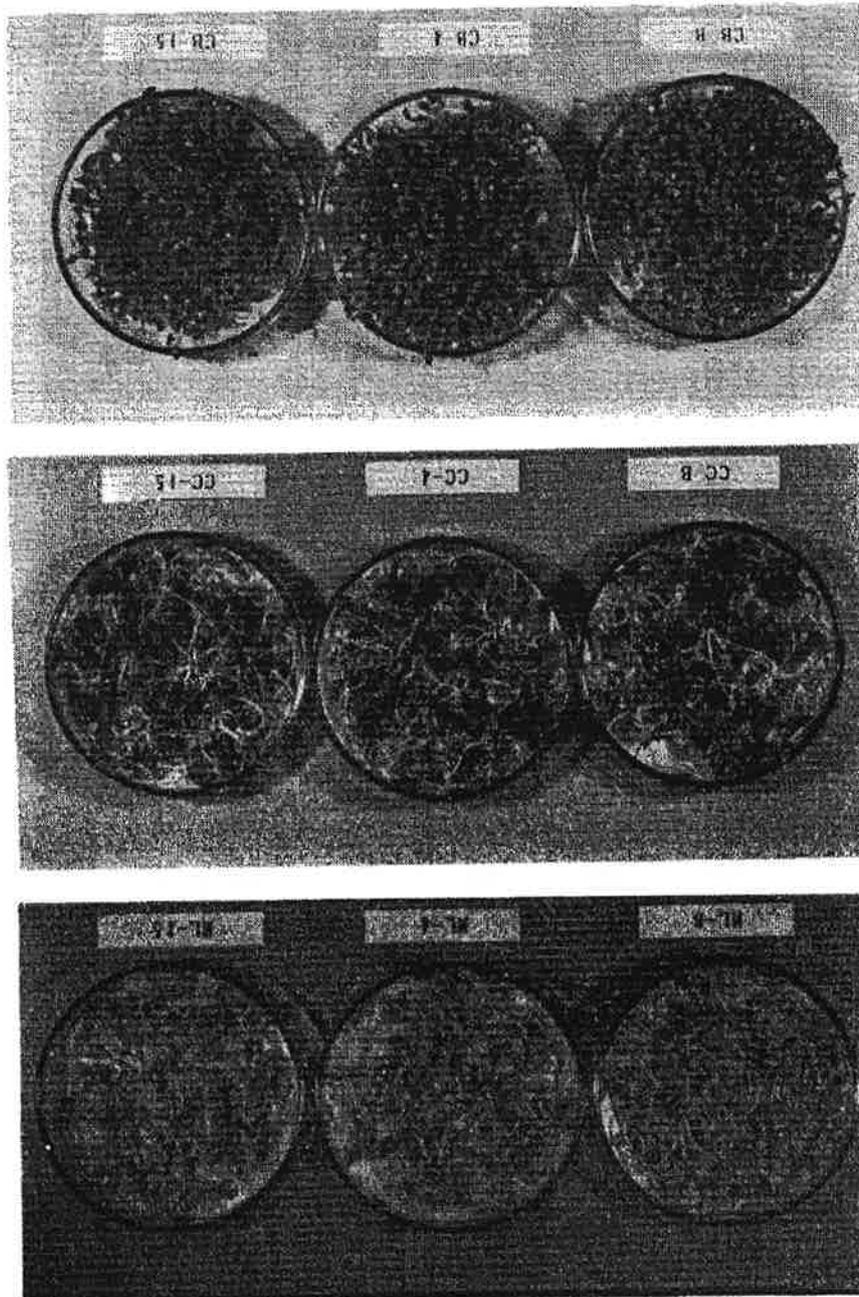


Fig. 33. Germination and initial growth of melon, cucumber, or Chinese cabbage, of which seeds inoculated by the culture of *Acinetobacter lwoffii* PO8 or *Chromobacterium lividum* PI4.

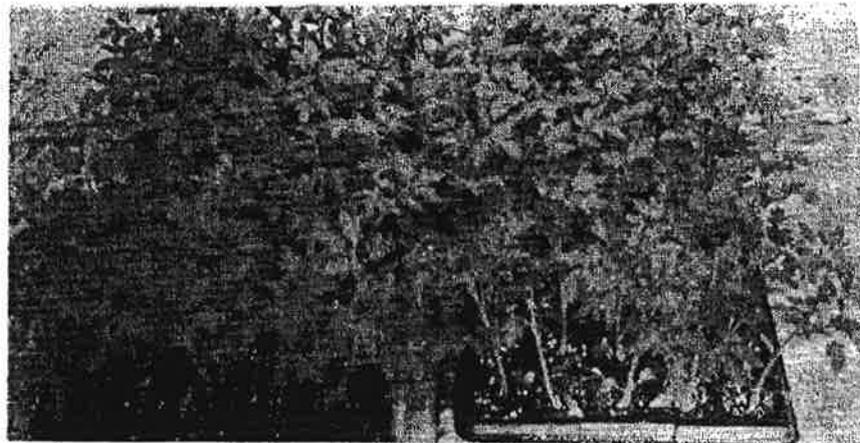
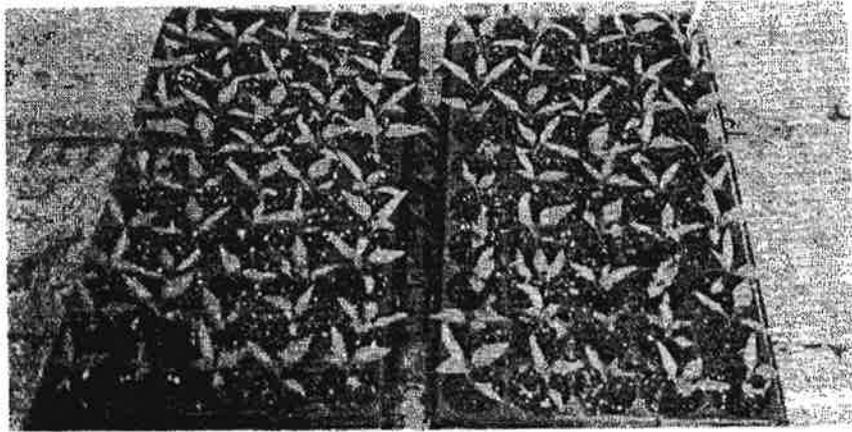
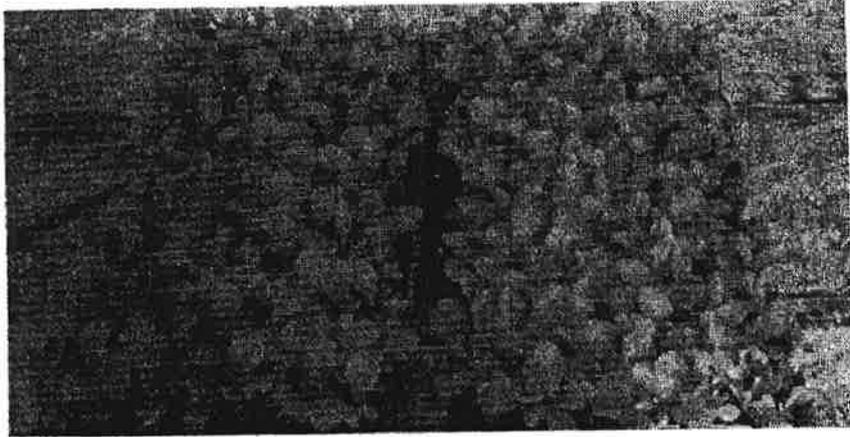


Fig. 34. Sprout growth of melon, cucumber, or Chinese cabbage, when the root media inoculated by the absorbent-microbe mixture.

Table 20. Physicochemical characteristics of soil sample.

	pH ^{c)} (1:5)	OM ^{d)} (%)	EC ^{e)} (dS/m)	Soil class(%)			NH ₄ -N (cmol/kg)	Exch. Al ³⁺ (ppm)	CEC ^{e)} (cmol/kg)			
				Sand	Silt	Clay			K	Na	Ca	Mg
Soil A ^{a)}	5.65	3.76	1.81	86.1	11.8	2.5	8.2	99	0.67	0.75	1.66	0.85
Soil B ^{b)}	5.98	3.86	0.96	81.9	15.9	1.2	8.0	90	0.65	0.70	1.83	0.19

^{a)}Soil A: over 15 cm, ^{b)}Soil B: under 15 cm

^{c)}pH and electroconductivity of the soil were determined by a pH meter (Beckman Φ 34) and an EC meter (TOA CM-119), after diluting it 1:5 with dH₂O and mixing on a rotary shaker for 8 hr.

^{d)}Organic matter was determined by the method described by Walkely-Black.

^{e)}Cation exchange capacity (CEC) was determined by employing an atomic absorption spectrometer (Sunil Analab 9100A), after extraction with 1 N ammonium acetate.

^{f)}The others were determined by the methods described in Chemical Analysis of Soil.

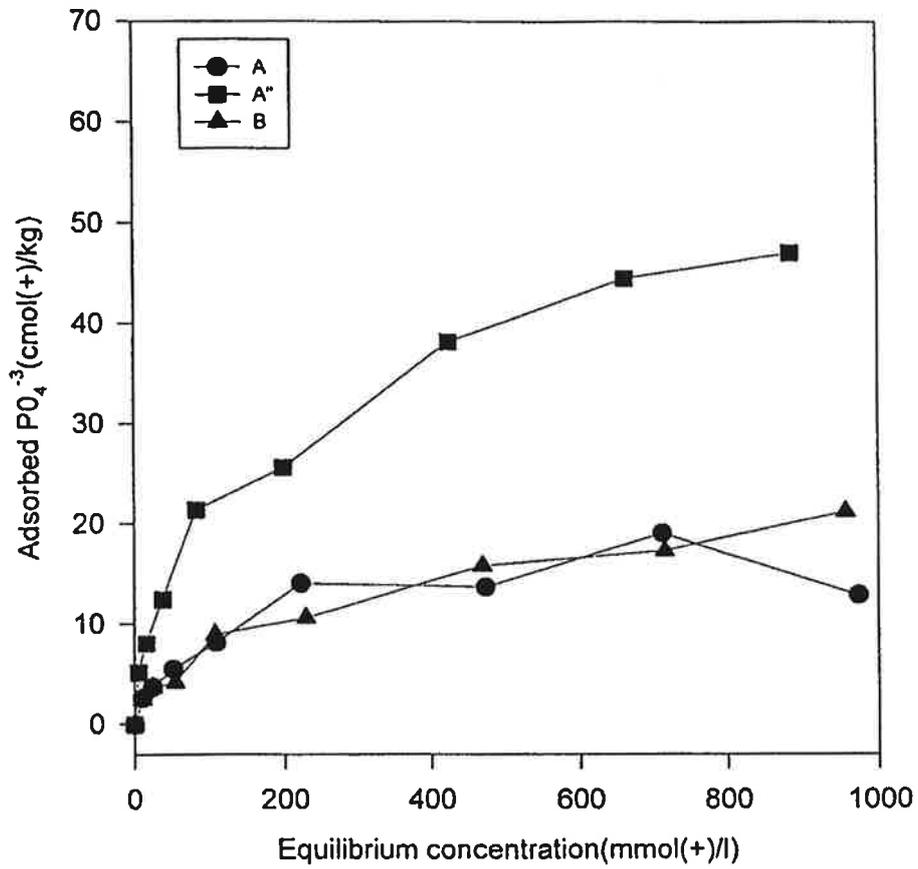


Fig. 35. Adsorption isotherm of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ in soil
 A: Top soil (0~15 cm), A'': Ashed top soil, B: Sub soil (beneath the top 15 cm)

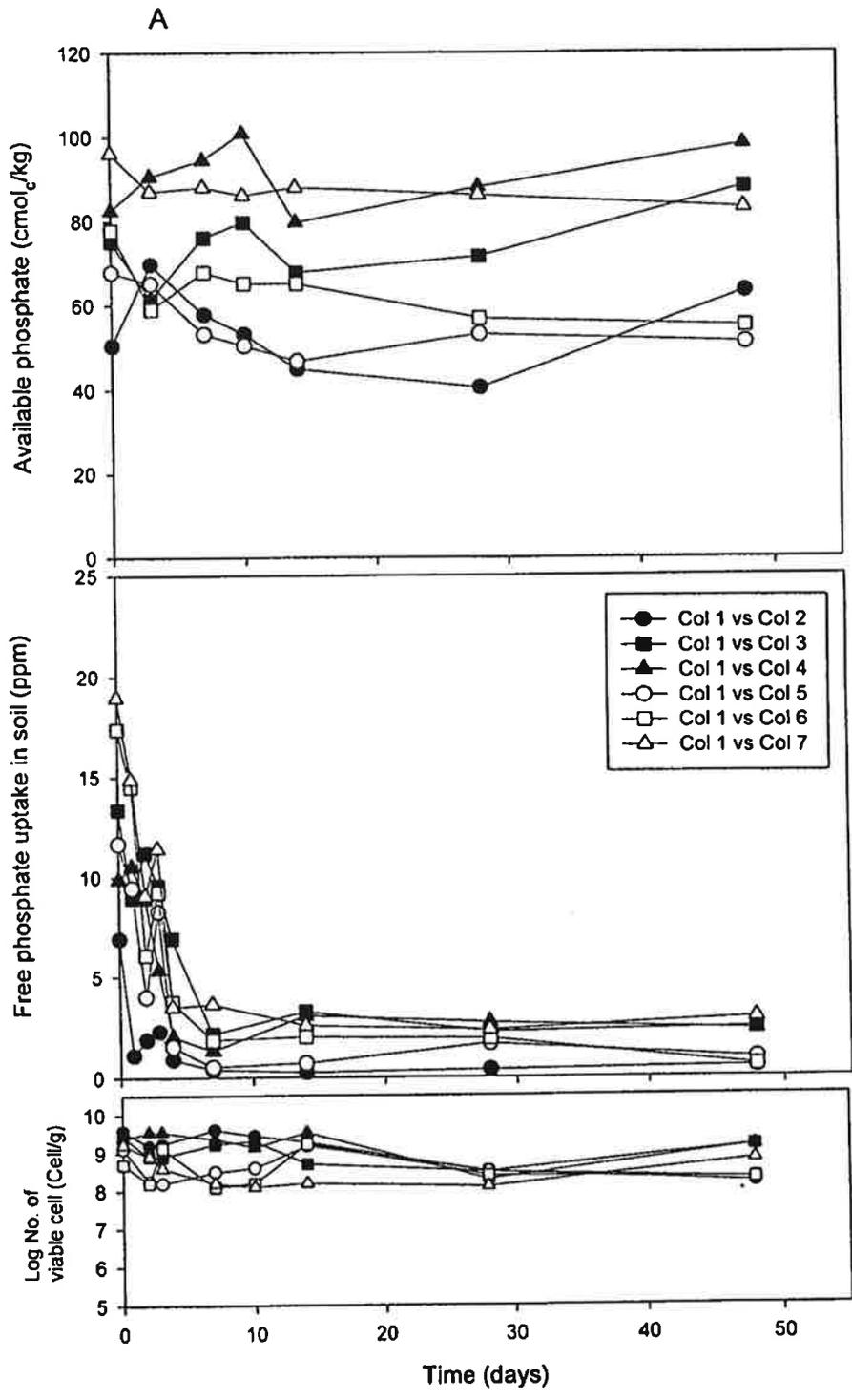


Fig. 36. Changes in free and available phosphates in soils with saturated <○, □, △> and 25% moisture <●, ■, ▲>, in which the precultured cells of *Acinetobacter lwoffii* PO8 were inoculated and incubated at 25°C.

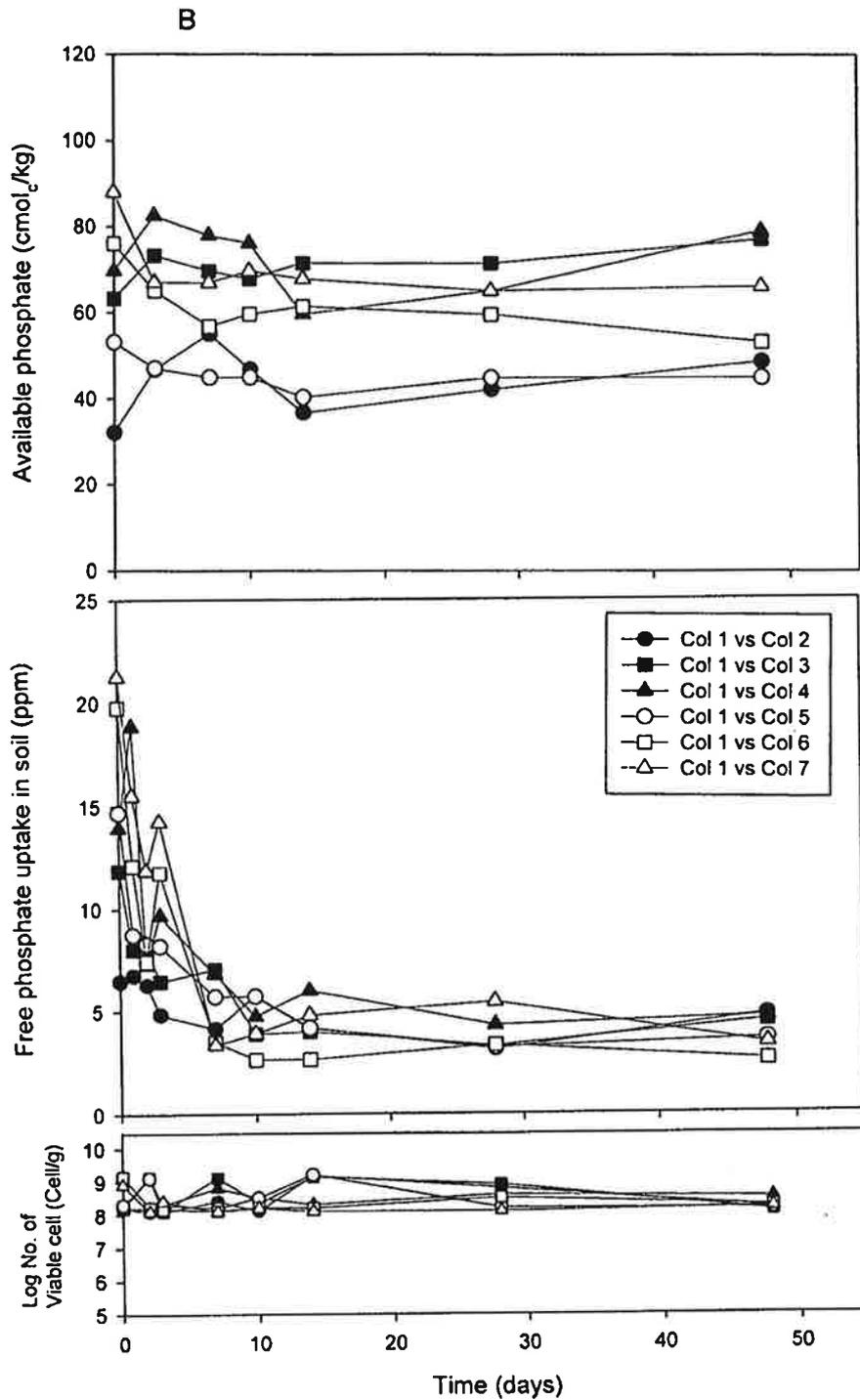


Fig. 37. Changes in free and available phosphates in soils with saturated $\langle \circ, \square, \triangle \rangle$ and 25% moisture $\langle \bullet, \blacksquare, \blacktriangle \rangle$, in which the precultured cells of *Chromobacterium lividum* PI4 were inoculated and incubated at 25°C.

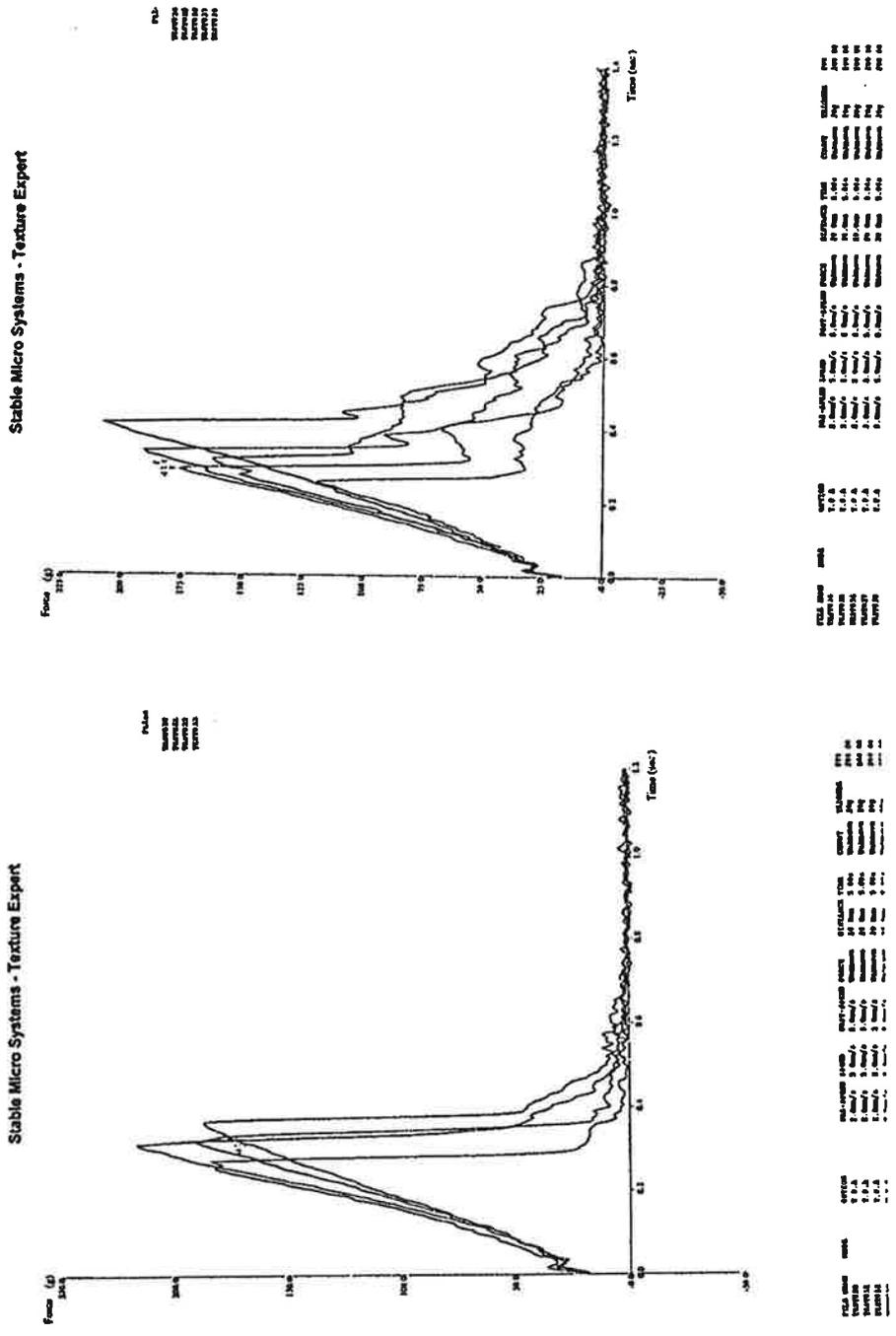


Fig. 39. Puncture strength patterns of perilla leaves from plot I (L) and II (R). The puncture strengths were analysed by SMS texture analyser TATX2i; employing the SMSP-5 probe.

제 4 장 결 론

시설하우스 토양에서 나타나는 염류집적 현상을 경감시키기 위하여, 물리적 제거 또는 희석을 목적으로 하는 흡착제 재료와, 토양내에 분포하면서 염류를 흡수 대사하는 미생물 군체를 혼합함으로써 일종의 흡착제-미생물 복합제를 개발하고자 실험하였으며, 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 염류장해지역의 토성과 미생물의 분포를 조사하였으며: 각도의 농촌진흥원에서 추천하는 염류장해 보고지역으로 부터 192점의 시설하우스 토양시료를 수집하고 화학조성과 토양미생물 즉 세균류와 진균류, 근면미생물의 분포를 구하였다. 이들 장해지역의 토양은 유효인산, 치환성 칼륨 및 칼슘의 함량이 정상 수준보다 높은 분포를 보임으로서 NO₃-N과 함께 염류집적의 주요 원인임을 확인하였다.

2. 염류내성균, 인산축적균, 탈질균등 유용미생물을 분리 선발하고 검정하였다. 전향의 토양시료로부터 고도내염성균 *Halomonas* sp. HS1-1, 탈질균 *Alcaligenes* sp. DS5를 분리하였고, 같은 시료로 부터 autoradiography법에 의하여 인산집적균을 분리한 다음 균체생육에 비하여 인산의 흡수율이 높은 PO8 및 PO14의 2개 균주를 선발하였다. 이들은 각각 *Acinetobacter lwoffii*, *Chromobacterium lividum*으로 분류되었으며, jar fermentor에서 인산흡수율을 실험한 결과 PO8은 배양 1일후 93%를 흡수하였다.

3. 농업용, 일반 공업용소재, 세제 및 소취제등을 대상으로 이온 흡착력, 입자의 크기, 비표면적 및 BET 표면적을 측정하여 비교 평가함으로써 실용가능한 소재로서 zeolite (I)과 인도네시아산 호수퇴적 peat, 스리랑카산 Lignocell, 그리고 탈지미강 및 vermiculite를 목적에 따라 이용할수 있음을 밝혔다.

4. 염류흡착제-미생물복합제의 조제 및 제제화를 위하여 선발균주의 대량배양법을 검토하고 혼합방법 및 비율, 포장과 보관 방법 등을 연구하였다. *Acinetobacter lwoffii* PO8, *Chromobacterium lividum* PI4는 탄소원으로서 glucose 및 glycerol, 질소원으로는 암모니아태의 것이 좋았으며 생육적은 30℃, 최적 pH는 각각 7.5 및 7.0이었다. 이들의 인산축적효소 polyphosphate kinase 활성을 확인하고 PO8의 것은 정제하여 분자량이 약 60 kDa임을 밝혔다. 액체배양물을 생산하기 위한 Jar fermentor에서의 parameter를 구하였고, PO8은 24시간 배양으로 $\sim 10^9$ cells/mL, PI4는 $\sim 10^8$ 수준에 도달하였으므로 회석하여 흡착재료와 혼합 숙성시켰다. 재료는 먼저 1.2~3%의 CaCO₃를 첨가하여 pH를 6이상으로 조정하였으며 zeolite(I) 분말을 주재료로하여 복합제를 조제하였다:

- ①: Zeolite(I) 100%
- ②: Zeolite(I) + 5% Lignocell
- ③: Zeolite(I) + 10% Lignocell
- ④: Zeolite(I) + 5% Rice bran
- ⑤: Zeolite(I) + 10% Rice bran
- ⑥: Zeolite(I) + 5% Rice bran + 5% Lignocell

복합제의 생균수는 숙성중 $10^8 \sim 10^9$ 수준으로 상승하므로 수분함량 20%이하로 음건하여 그대로 zipper bag에 포장하거나 진공포장하였다. 인산축적균은 90일 보관후 실온에서 지수 2, 4℃에서는 지수 1이하의 감소율을 나타내어 보관성이 좋았고 탈질균의 경우에는 지수 3으로서 다소 떨어졌다.

5. 복합제는 발아 및 육묘실험을 통하여 식물안전성을 확인하였고, 인산축적균에 대하여는 토양 배양시험을 수행하면서 유리상태 및 유효태 인산의 흡수량상을 조사하였다. 유리 인산은 초기 3일간 25 ppm의 농도 범위에서 다소 기복을 보였으나 기간이 지나면서 점차 감소하여 10일 이후에는 최저 수준에 이르러 실험기간중 5 ppm 이하로 유지되었다. 유효인산의 변화를 보면 배양 초

기 14일간 40~100 cmolc/L의 진폭으로 다양하게 증감하다가 그후에는 큰 변화없이 농도가 유지되었으며, 7 주의 실험기간중 기간이 길어질수록 유효인산이 근소하게 증가하는 경향을 나타내었다.

풋트에서 과린산석회를 과다시비하고 상치, 치커리 및 들깨를 재배하면서 복합제의 접종효과를 비교한 결과, 철분및 아연 등의 영양결핍 현상은 관찰되지 않았으며 채취한 잎의 경도 즉 전단용력과 착공력 등이 복합제 시용구에서 낮아져 엽채류 특히 들깨잎의 경화현상을 감소시키는 효과를 나타내었다. 시설하우스 적용시험에서도 작물 안전성을 확인하고 녹조류 발생의 저감효과를 얻었다

제 5 장 인 용 문 헌

1. Ahn, K., and A. Kornberg. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 265(20): 11734~11739.
2. Callaway, J. O. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association. Washington, D.C., PP. 175~176.
3. Comeau, Y., K. J. Hall, R. E. W. Hancock, and W. K. Oldham. 1986. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. Wat. Res., 20(12): 1511~1521.
4. Cowan and Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria (2nd edition). Cambridge University Press.
5. David, A. F., and H. C. Li. 1973. A rapid paper chromatographic assay for protein kinase. Anal. Biochem., 52: 300~304.
6. Ebel. 1963. Paper chromatography of very long chain phosphates. Anal. Chem., 35: 1984~1985.
7. Griffin, J. B., N. M. Davidian, and R. Penniall. 1965. Studies of phosphorus metabolism by isolated nuclei. J. Biol. Chem., 240(11): 4427~4434.
8. Harold, F. M. 1964. Enzymic and genetic control of polyphosphate accumulation in *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbiol., 35: 81~90.
9. Harold, F. M. 1963. Accumulation of inorganic polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*. J. Bacteriol., 86: 216~221.
10. Harold, F. M. 1966. Inorganic polyphosphates in biology structure, metabolism, and function. Bacteriol. Rev., 30(4): 772~794.
11. Komagata, K., and K. I. Suzuki. 1987. Lipid and cell wall analysis in

- bacterial systematics. Academic Press, 19: 161~207.
12. Krieg, N. R., and J. G. Holt. 1974. Bergey's manual of systematic bacteriology. The William Willkins Co., Baltimore.
 13. Kushner, D. J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: Halophlic bacteria. In Microbial Life in Extreme Environments (ed. Kushner) Academic Press: p318-346.
 14. Laybourn, R. L. 1924. A modification of Albert's stain for the *Diphtheria bacillus*. J. Am. Med. Assoc., 83:121
 15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. Farr, and R. T. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 215~275.
 16. Marais G. V. R., R. E. Loowenthal, and I. P. Siebritz. 1983. Review: Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake. Wat. Sci. Technol., 15(3/4) 15~41.
 17. Mycielski, R., and D. Gucwa. 1977. Nitrite agar method for the isolation and enumeration of denitrifying bacteria. Acta Microbiol. Polonica 26: 317~318.
 18. Nakamura, K. 1988. 생물학적 인제거 프로세스에 있어서의 세균의 역할과 제어.(일본 미생물 생태학회편: 환경정화와 Biotechnology: p31~46)
 19. Shoda, M., T. Ohsumi, and S. Uda. 1980. Screening for high phosphate accumulating bacteria. Agric. Biol. Chem., 44(2): 319~324.
Ibid. Influence of cultural conditions on phosphate accumulation of *Arthrobacter globiformis* PAB-6. 8. Agric. Biol. Chem., 44(2): 325~331.
 20. T'Seyen, J., D. Malnou, J. C. Block, and G. Faup. 1985. Polyphosphate kinase activity during phosphate uptake by bacteria. Wat. Sci. Tech., 17: 43~56.
 21. Ubukata, Y., and S. Takii. 1994. Induction ability of excess phosphate

- accumulation for phosphate removing bacteria. *Wat. Res.*, 28(1): 247~249.
22. Ye, Q., H. Ohtake, and K. Toda. 1988. Phosphorus removal by pure and mixed cultures of microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, 66(2): 207~212.
 23. 김영식, 이상규. 1993. 시설재배지 토양의 조류 생태연구. 농업기술연구소 (Ss-2-4):p 373~378.
 24. 농촌진흥청 농업기술연구소. 1988. 토양화학분석법.
 25. 박문희, 안수봉. 1979. 염류토에서 석고량과 생고량간의 제염효과 시험. 충남진흥원(토비-충남-9): p378~388
 26. 박창선. 1995. 대장균에서 inorganic polyphosphate의 동태 변화. 미생물학회 심포지움.
 27. 서장선. 1994. 난용성 인산염 가용화 미생물에 의한 토양 축적인산의 생물학적 이용에 관한 연구. 전남대학교 대학원 박사학위 논문.
 28. 이상은, 이강만, 1985. 시설원예지 염류집적 토양에 대한 화학적 특성 조사. 농업기술연구소(토비-농연-토화20):p 318~323.
 29. 이상은, 송요성, 이용재, 이춘수. 1993. 시설재배지 연작지 시비량과 토양양분 변화에 관한 연구. 경기진흥원(Ss-2-2):p 302~311.
 30. 이한생, 김종균, 조재규. 1993. 하우스 딸기의 염류피해농도 및 완효성 복비 효과 시험. 경남진흥원(Ss-2-2): p420~425.
 31. 윤정희, 김유학, 정병간. 1993. 양분축적지 토양의 토심별 무기성분 집적양상연구. 농업기술연구소(Ss-2-2): p170~172.

부 록 (APPENDIX)

Table 10. Profiles of cellular fatty acids from the isolates.

The strain PO8		The strain PI4	
Fatty acid profile	%	Fatty acid profile	%
14:0 Iso	5.72	10:0 3OH	2.94
14:0	3.38	12:0	2.69
15:0 Iso	6.34	12:0 2OH	6.21
15:0 Anteiso	60.83	12:1 3OH	3.71
15:0	1.86	14:0	0.90
16:0 Iso	10.05	16:1 w7c/15 Iso 2OH	31.89
16:0	6.65	16:0	35.54
17:0 Iso	0.40	17:0 cyclo	8.08
17:0 Anteiso	4.76	18:1 w7c/w9t/w12t, w9c/w12t/w7c, w12t/w9t/w7c	8.04

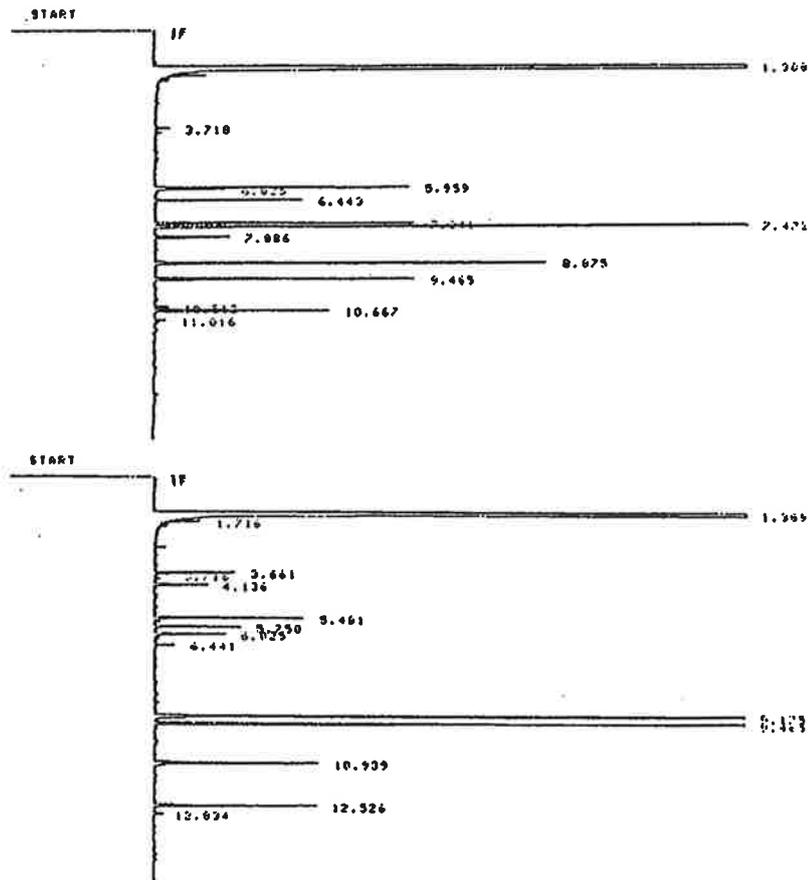


Fig. 7. Gas chromatograms of cellular fatty acids of the isolates: PO8 <A> and PI4 .

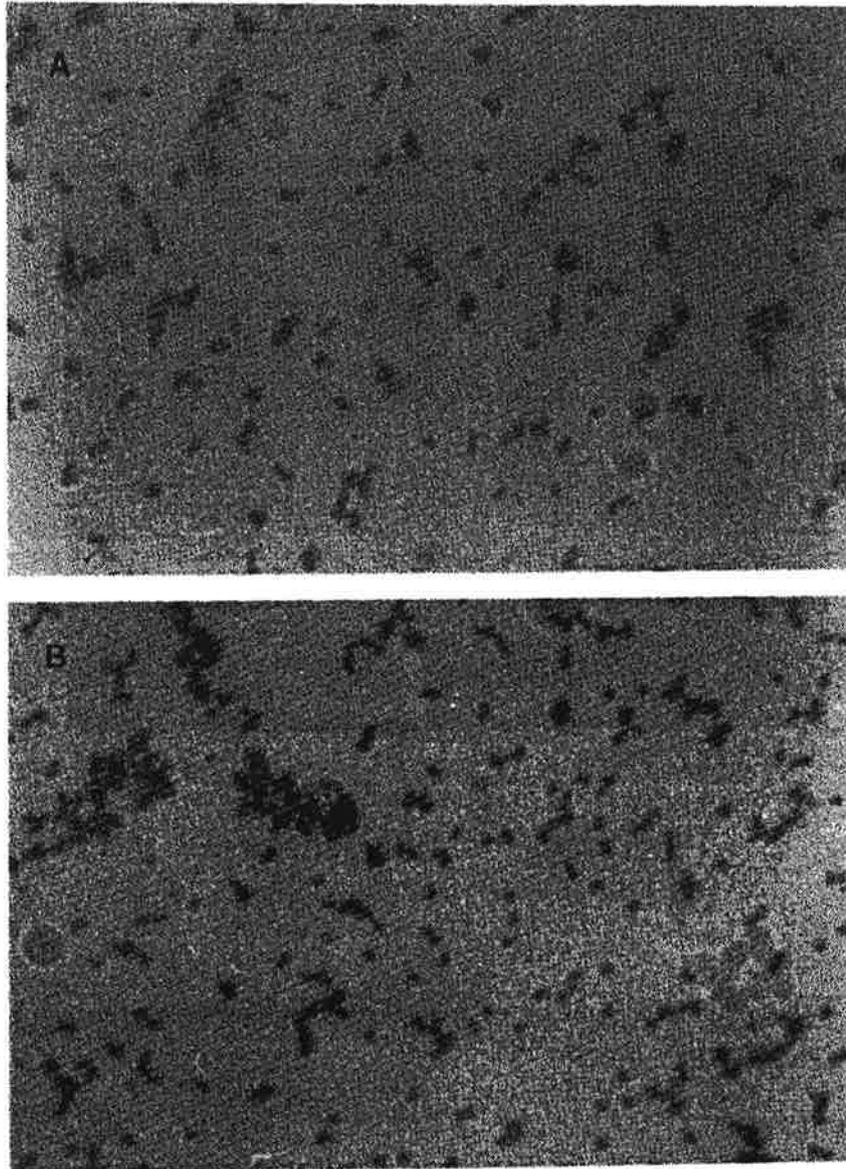


Fig. 9. Staining for the volutin granules in the cells of *Acinetobacter lwoffii* PO8, which grown on P-1 medium for 12 hours <A> and for 24 hours .

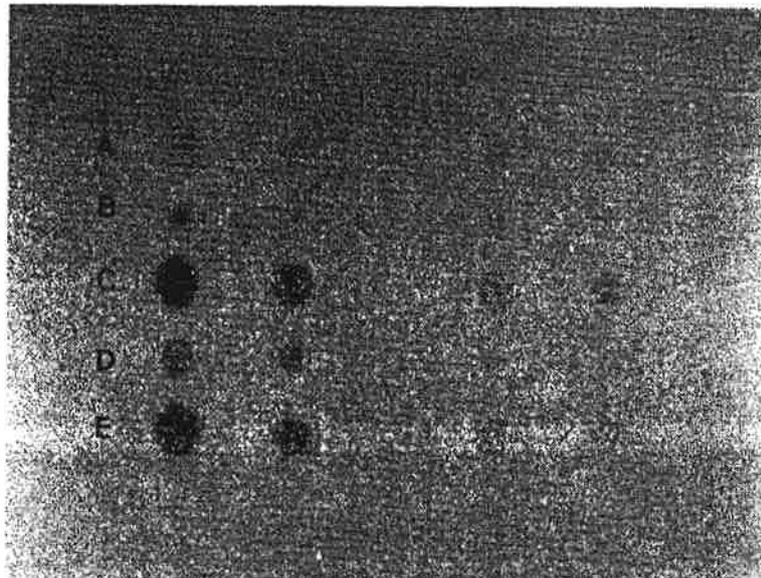


Fig. 10. Intracellular location of polyphosphates in *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4.

Fraction I: Free Pi, nucleotide, and low molecular Poly-P,

Fraction II: Lipid,

Fraction III: Nucleic acids and high molecular Poly-P,

Fraction IV: Protein,

Fraction V: High molecular Poly-P.

Table 11. Effect of carbon sources on growth and phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4.

Carbon source	<i>A. lwoffii</i> PO8		<i>C. lividum</i> PI4	
	Growth (OD ₆₆₀)	Relative uptake(%)	Growth (OD ₆₆₀)	Relative uptake(%)
Arabinose	1.26	91	1.01	68
Xylose	1.68	89	0.53	1
Glucose	1.39	93	1.24	85
Saccharose	1.50	90	0.10	18
Maltose	0.12	31	0.03	19
Lactose	0.01	12	0.01	6
Galactose	0.34	22	0.44	67
Glycerol	1.64	93	1.12	90
Sorbitol	1.55	88	0.88	30
Mannitol	1.63	81	0.96	83

The organisms were grown on P-1 media which glucose (0.2%) substituted by various carbon sources for 24 hr, then the uptake rates of phosphate were determined by the molybdenum blue method.

Table 12. Effect of nitrogen sources on phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4.

Nitrogen source	<i>A. lwoffii</i> PO8		<i>C. lividum</i> PI4	
	Growth (OD ₆₆₀)	Relative uptake(%)	Growth (OD ₆₆₀)	Relative uptake(%)
NH ₄ Cl	1.32	93	1.25	86
NH ₄ NO ₃	1.48	95	1.28	88
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.52	96	1.34	90
(NH ₂) ₂ CO	1.41	92	1.31	84
NaNO ₃	1.08	65	0.99	45
KNO ₃	1.14	73	0.81	31
NaNO ₂	0.25	2	0.15	1

The organisms were grown on P-1 media which NH₄Cl (0.1%) substituted by various sources for 24hr, then the uptake rates of phosphate were determined by the molybdenum blue method.

Table 13. Influences of inorganic ions on phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4.

Metal source	Conc. (ppm)	<i>A. lwoffii</i> PO8		<i>C. lividum</i> PI4	
		Growth (OD ₆₆₀)	Relative uptake(%)	Growth (OD ₆₆₀)	Relative uptake(%)
Control		1.31	90	1.21	84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	5	1.27	85	1.18	73
	10	1.42	92	1.01	69
MnSO ₄	5	1.30	88	1.25	79
	10	1.06	69	1.13	76
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5	0.82	32	0.71	23
	10	0.77	22	0.41	17
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5	0.34	7	0.16	4
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5	0.15	4	0.21	5

The organisms were grown in a shaking flask with basal medium containing various metal ions (5ppm and 10ppm).

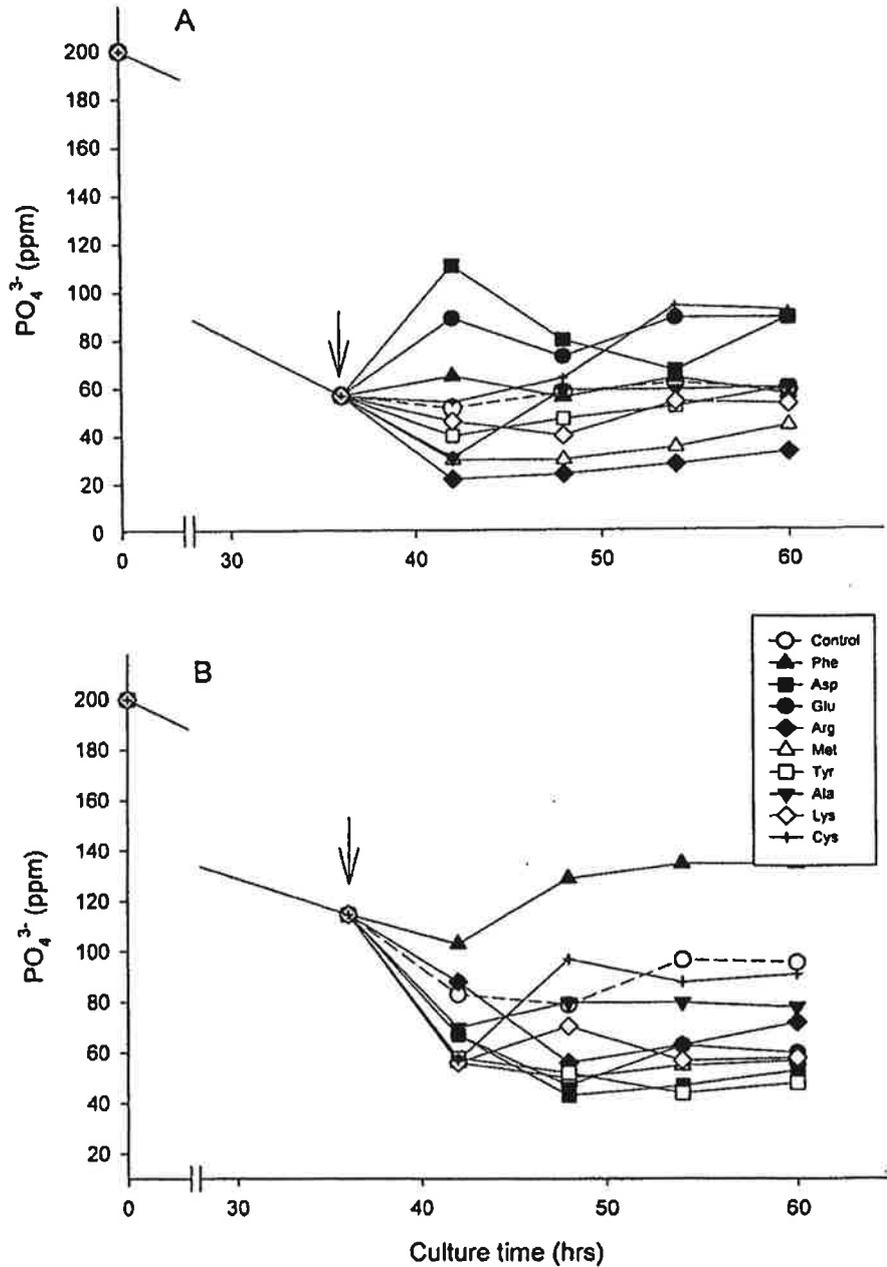


Fig. 13. Effect of addition of amino acid during cultivation on phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 <A> and *Chromobacterium lividum* PI4 .

↓: Addition of amino acids (100ppm)

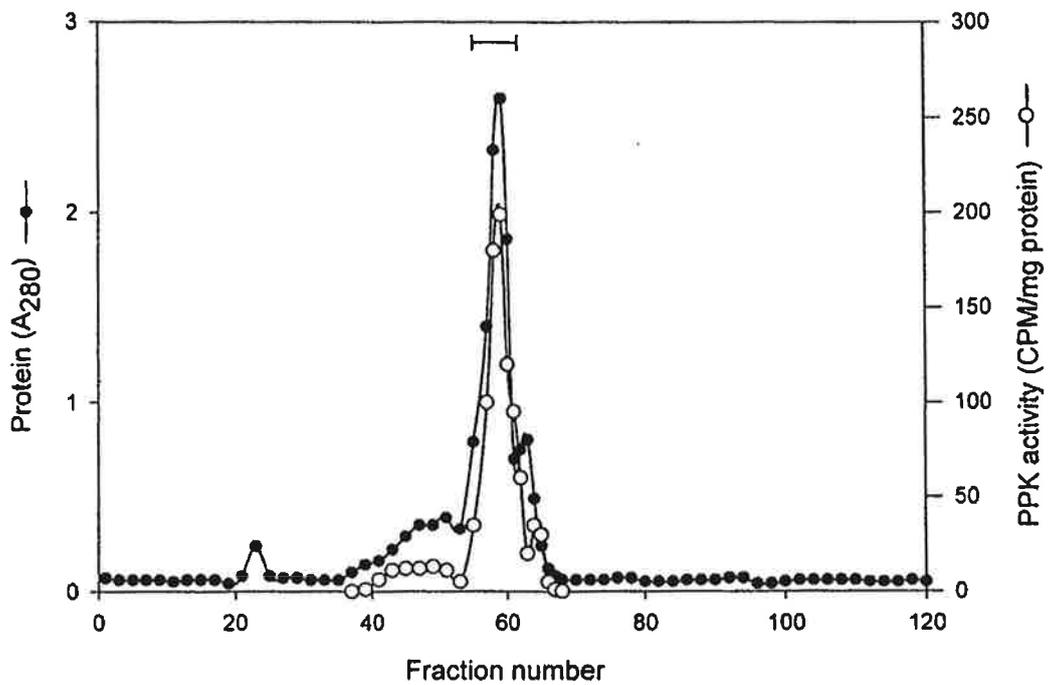


Fig. 17. Gel filtration of PPK from *Acinetobacter lwoffii* PO8.
 Column: glass column 2×110 cm, Sephadex G-100
 Elution: 20 mM Tris HCl buffer, pH 7.6
 Flow rate: 20 mL/min with fraction volume of 4 mL

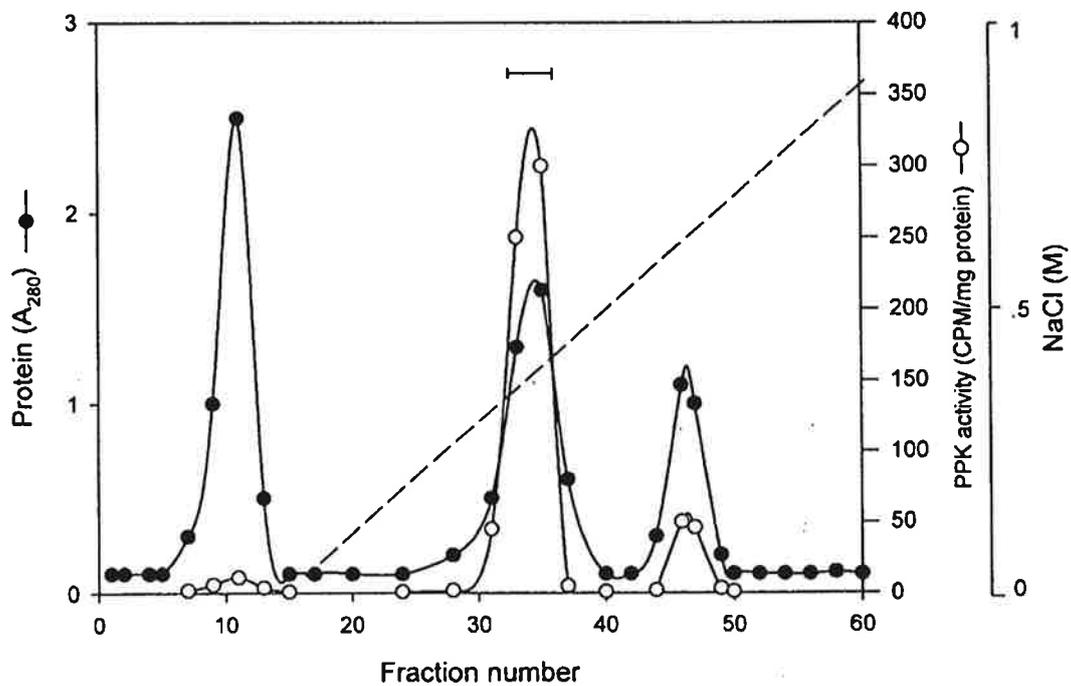


Fig. 18. Ion exchange chromatography of PPK from *Acinetobacter lwoffii* PO8 on DEAE-Sephrose.

One mL sample of the pooled fractions from previous GF step was loaded on a ResourceTM Q column and eluted with 50 mL of starting buffer then NaCl gradient upto 0.8 M at the flow rate of 1 mL per min with fraction volume of 1 mL.

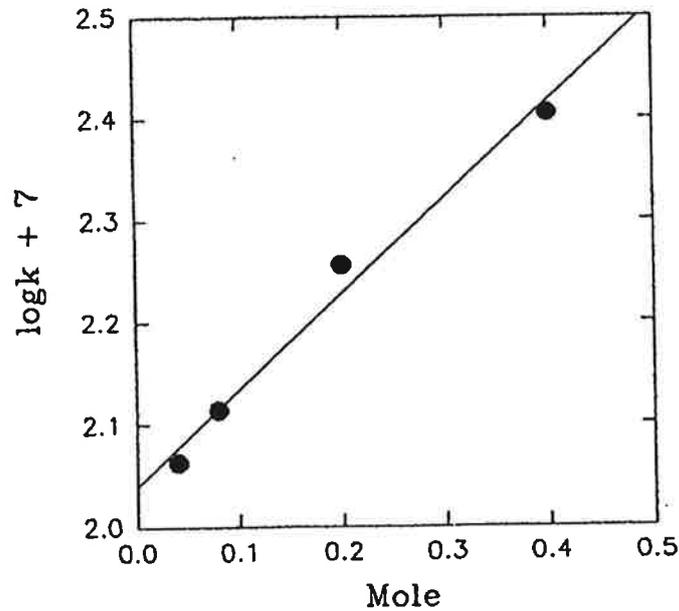
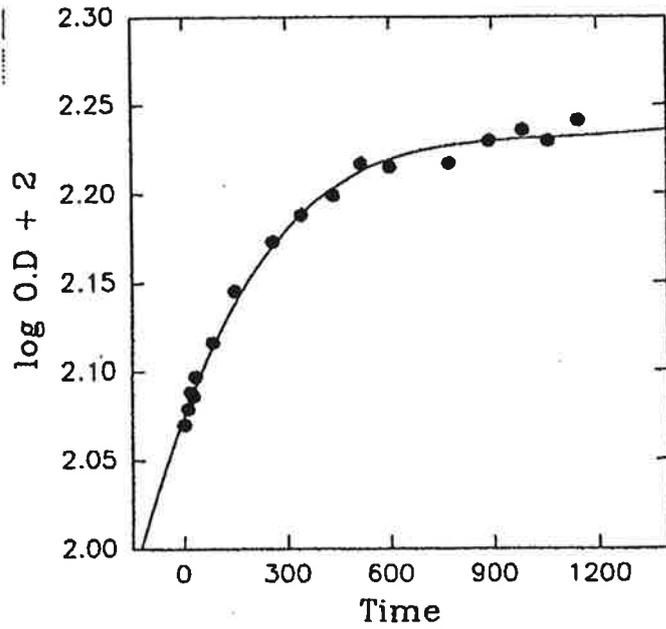
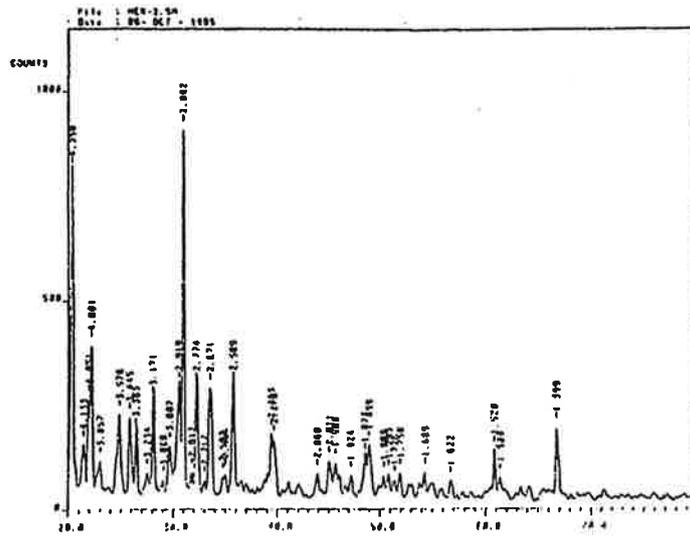
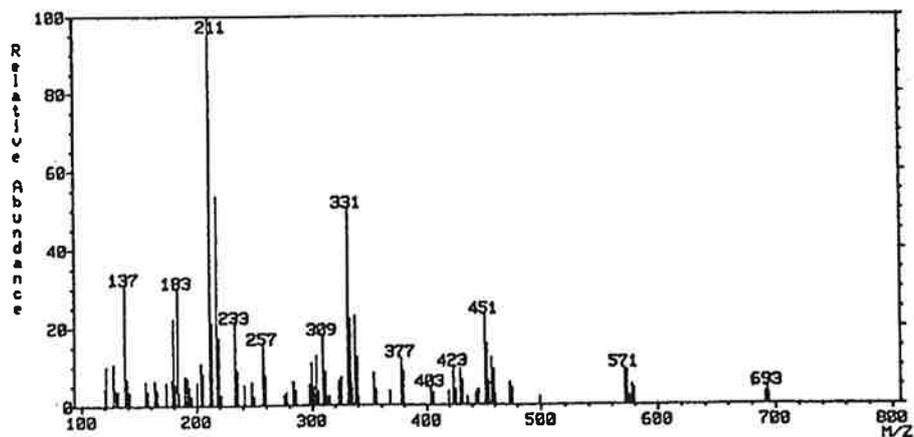


Fig. 26-1. The plot of logOD+2 vs. time (sec.) for the reaction of catechol to phosphoric acid at pH 7.0 and 55°C <Upper>.

Fig. 26-2 The plot of pseudo first order rate constant ($k_1 \text{sec}^{-1}$) at pH 7.0: the dependence of the k_1 constant for the reaction of catechol with phosphoric acid according to the concentration of phosphoric acid <Lower>.



MASS SPECTRUM Data File: NO3 16-SEP-95 14:41
 Sample: HSJ-2
 RT 0'45" FAB(Neg.) GC 1.4c BP: m/z 211.0000 Int. 5.0548 Lv 2.00
 Scan# (3 to 9)



MASS SPECTRUM Data File: NO2 15-SEP-95 16:32
 Sample: HSJ-2
 RT 0'36" FAB(Pos.) GC 1.4c BP: m/z 213.0000 Int. 26.0693 Lv 2.00
 Scan# (3 to 5)

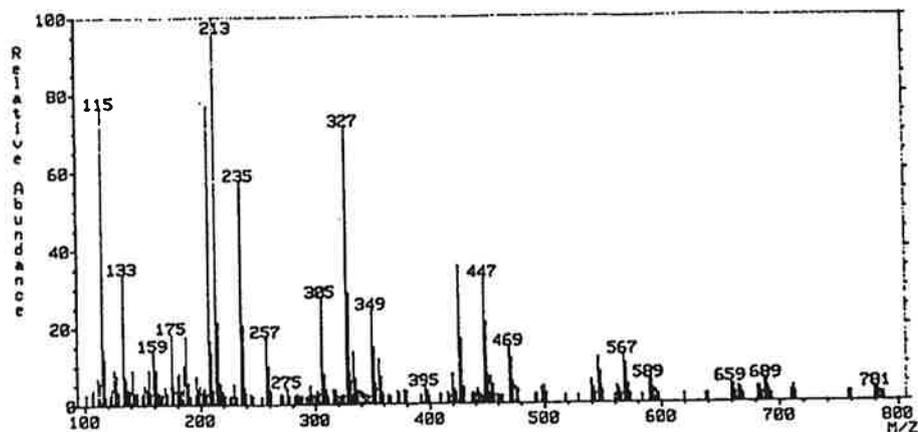


Fig. 29. FAB Mass spectrum of catechol-phosphoric acid <Upper> and catechol-phosphoric acid-aluminium complex <Lower>.

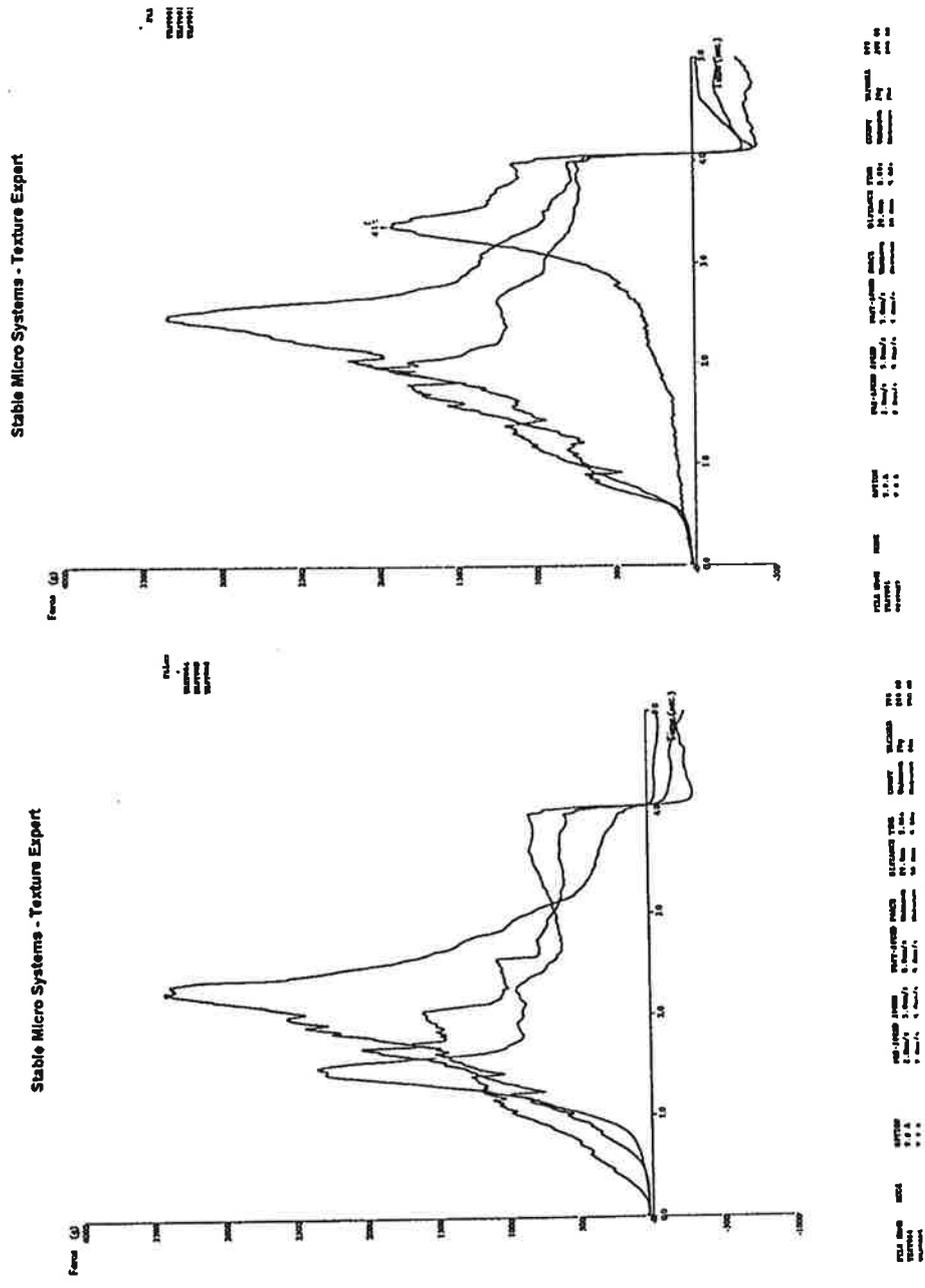


Fig. 41. Shear strength patterns of lettuce (1) from plot I (L) and II (R) The shear strengths were analysed by SMS texture analyser TATX2i employing the HDP/BS blade as probe.

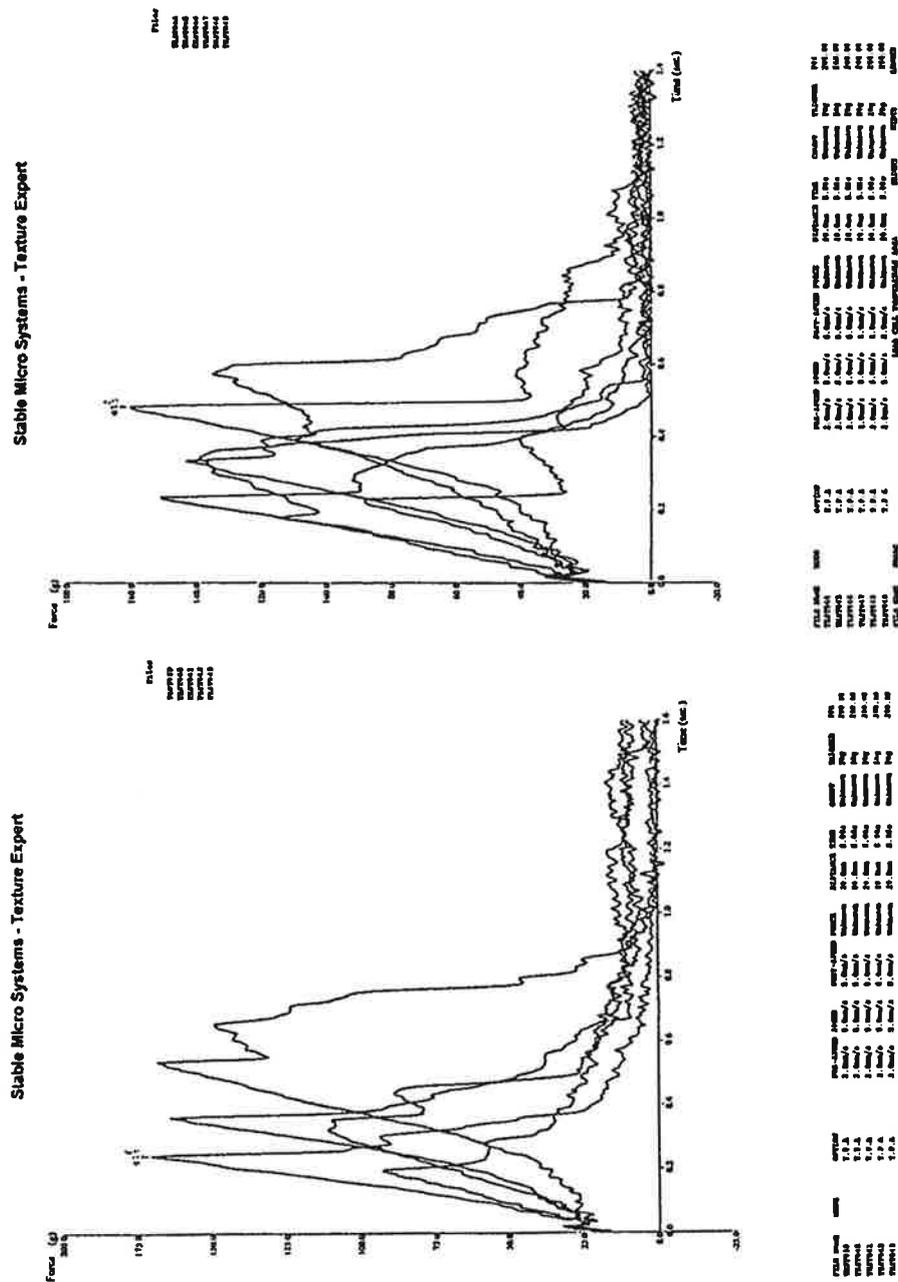


Fig. 43. Puncture strength patterns of lettuce (1) from plot I (L) and II (R) The puncture strengths were analysed by SMS texture analyser TATX2i employing the SMSP-5 probe.