

GOVP1200512725

최 중
연구보고서

친환경 미생물을 이용한 인산질
생물비료의 산업화

Industrialization of a phosphate-solubilizing biofertilizer
by using eco-friendly microorganisms

연구기관
(주) 흙살림

농림부

2015/01/30 15:35-운영지원과/검빛나래

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “친환경 미생물을 이용한 인산질 생물비료의 산업화” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 17 일

주관연구기관명 : (주)흙살림

총괄연구책임자 : 이 태 근

연 구 원 : 정 준 영

연 구 원 : 윤 성 희

연 구 원 : 박 동 하

연 구 원 : 이 동 민

연 구 원 : 주 영 직

협동연구기관명 : 대구대학교

협동연구책임자 : 강 선 철

요 약 문

I. 제 목

친환경 미생물을 이용한 인산질 생물비료의 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토양 속에 다량으로 축적되어 있는 불용성 인산태를 인산가용화능이 우수한 미생물을 이용하여 유리인산으로 전환함으로써 화학비료를 대신하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 방법을 고안하고자 한다. 본 연구팀은 이미 국내 토양으로부터 *Penicillium* 속과 *Aspergillus* 속 등의 고효율 인산가용화 사상균들을 다수 선발·보유하고 있으며 이를 본 연구에 이용하고자 한다. 또한 농업부산물인 배추쓰레기를 재활용하여 미생물의 배양배지로 이용할 수 있는 기술을 개발했으며 쌀겨, 밀기울 등을 고체배지로 이용하여 미생물의 포자형성을 촉진할 수 있는 기술을 이미 보유하고 있다. 본 연구는 이 미생물을 산업화하기 위한 핵심기술인 대형 발효조를 통한 발효공정의 최적화와 미생물이 장기간 활력을 유지할 수 있도록 제형화하는 방법을 개발하고, 동시에 이 제형화된 미생물의 토양생존율과 작물재배를 통한 비효검정을 수행하여 농가에서 바로 사용할 수 있는 인산질 생물비료를 생산하고자 한다. 따라서 본 연구에서 생산된 제품은 농업 부산물을 재료로 이용하기 때문에 폐자원 재활용이라는 측면에서 그리고 화학 인산질 비료를 전혀 사용하지 않고 토양 속에 축적된 인산염을 이용하기 때문에 환경보호 측면에서 획기적인 상품이라 하겠다.

지금까지 우리 농업은 단위면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위하여 다량의 화학비료와 유기물을 시용해 왔다. 그러나 이들 중의 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주원인이 되고 있다. 앞으로 우리가 지향해

야할 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.

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizae)과 *Rhizobium*이 주로 연구되어 세계 약 30개 업체에서 생산하고 있으며, 미국 미조리대학에서는 VAM과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다. 국내에서는 일부업체에서 일본에서 수입한 미생물을 그대로 증식하여 유통하고 있으나 미생물이 제제화 되지 않았기 때문에 생활력이 매우 저하되어 실효를 거두지 못하고 있으며 작물 시비효과도 검증되지 않고 있다.

한편 국내에서도 환경농업의 중요성이 인식되면서 여러 대학 및 연구소에서 미생물제제에 대한 연구를 시작하고 있으나 균주선발 및 배양특성 조사, 포장시험 등에 관한 폭넓은 연구의 부족으로 아직 실험실 수준의 초보적인 단계에 머무르고 있다. 2,000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 인산가용화균을 생물비료로 개발하기 위하여 공시균주로서 본 연구팀에 의하여 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 국내토양으로부터 선발 및 분리한 *Penicillium* sp. PS-113 균주를 사용하였다. 인산가용화균의 고체 대량배양기술 확립을 위하여 배지조성, 배지량, 배양온도, 수분함량, 배양용기 및 배양기기 등을 달리하여 고체 대량배양을 위한 최적화조건을 확립하였다. 확립된 최적화 조건에서 100Kg 이상의 배지에서 대량배양을 수행하였다. 또한 인산가용화균을 액체대량배양하기 위하여 1L 발효조를 이용하여 배지조성, 배양온도, agitation 속도 등에 대한 배양조건을 결정하였다. 그리고 이 조건에서 200L 대형발효조를 이용하여 scale-up 시험을 수행하였다.

공시균주의 액침배양시 mycellial pellet의 크기 및 균체생성량의 변화를 알아보기 위하여 30ml의 PDB 배지가 들어있는 100ml 삼각플라스크에 1×10^6 개의 분생포자를 접종한 후 25°C에서 4일간 진탕배양하였다. 이 배양배지 중에 형성된 pellet을 plate에 옮긴 다음 해부현미경 하에서 pellet의 크기를 측정하였다. 균체량의 측정은 배양액을 원심분리(3,000 ×g, 10min)하여 수확한 균체를 freeze drying하여 함수율이 0%가 될 때까지 건조한 후 정량하였으며, 이 값에서 배지의 양을 뺀 값을 균체량으로 결정하였다.

인산가용화균의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 고두밥, 밀, 보리, 쌀겨, 옥수수 등의 다양한 배지에서 배양한 균체를 증량제로서 diatomite, bentonite, zeolite 등의 점토광물을 1:9의 비율로 첨가하여 4°C와 25°C에서 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년간 보관하면서 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서 균수를 측정함으로써 살아있는 포자수를 결정하였다. 또한 생활력 증진을 위하여 계면활성제(Tween 80, SDS, Triton X-100) 및 2가 금속이온(Ca^{2+} , Mo^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+})을 각각 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0% 농도로 첨가하여 생활력에 미치는 영향을 시험하였다. 그리고 각종 유기물(PEG 200, glycerol, 식용유, 종합 vitamin, 설탕, 당밀)도 각각 0, 0.01, 0.1, 1.0, 5.0% 농도로 첨가하여 균체와 장기보관하면서 포자의 생활력에 미치는 영향을 검정하였다.

인산가용화균의 화학농약에 대한 안정성검토를 위해서 현재 시중에 유통중인 산마루(수화제), 엘산(유제) 등 살충제 9종과 포름디(수화제), 산요루(유제) 등 살균제 8종 및 그라목손(액제), 스톱프(유제), 랜드마스타(액제)와 같은 제초제 3종을 구입하여 이들을 토양에서 사용되는 농도의 0.1, 1, 10배 약량으로 PDA배지와 혼합하여 평판배지를 제조한 후 적절히 희석한 인산가용화 균주의 conidia를 도말하여 25°C에서 3~5일간 항온배양하면서 성장한 개체수를 측정하여 균체생존율을 계산하였다.

인산가용화균의 어독성 시험은 미생물농약의 등록시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 의하여 수행하였다. 시험어종은 (주)경농에서 어독성 시험을 위하여 인공사육하고 있는 미꾸라지와 일본송사리를 분양받아 사용하였다. 어류는 수조당 10마리 이상을 넣어 시험하였으며, 인산가용화균의 포자를 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 넣은 후 48시간 및 96시간에서의 치사율을 결정하여 어독성을 시험하였다.

인산가용화균의 작물에 대한 약해시험에서는 배추, 콩, 녹두, 홍대, 옥수수 등의 작물에 대한 인산가용화균의 발아억제시험을 수행하였다. 시험방법은 솥에 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 포자액을 충분히 적신 다음 petri dish의 바닥에 골고루 퍼뜨린다. 이 위에 전처리한 종자를 올려놓고 25°C의 growth chamber에서 3일간 배양하여 작물의 발아 및 생육상태를

조사하였다.

다양한 작물에 대한 시비효과를 검증하기 위하여 토양과 상토를 1 : 1(v/v)로 섞은 토양을 pot에 담고 1.0×10^8 spore/g · 토양 농도로 인산가용화균을 접종한 후 상토에서 발아한 콩(*Glycine max*), 홍대(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*), 녹두(*Phaseolus radiatus*), 옥수수(*Zea mays* Suwon 19), 배추(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*)를 이식하여 2주간 재배하면서 초장, 뿌리길이를 측정하였다. 또한 시설재배 하우스에서의 작물생육시험을 위하여 경북 성주군 초전면(참외재배), 김천시 조마면(감자재배), 칠곡군 약목면(방울토마토), 충북 괴산군 불정면(고추, 오이) 일대의 유기농가 시설하우스에서 재배 시험을 진행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 인산가용화능이 우수한 *Penicillium* sp. PS-113을 공시균주로 활용하여 생물비료로 산업화하고자 한다. 이를 위하여 먼저 고체 대량배양기술을 확보하고자 하였다. 그 결과 고체 대량배양을 위한 최적화 조건은 배지조성은 쌀겨배지, 배양용기는 tray type, 배양온도는 28℃, 수분함량은 50%, 호기조건, 초기 포자접종량은 1.0×10^5 conidia/g · media, 배양기기는 closed system으로 결정되었다. 이 조건에서 100Kg 이상 대량배양한 결과 일주일 이내에 목표포자수인 1.0×10^8 conidia/g · media 보다 10배 이상의 포자를 획득할 수 있었다.

또한 증량제로서 황토를 첨가하여 포자형성 촉진효과를 시험한 결과 포자형성 시간이 단축됨과 동시에 포자형성능이 촉진되어 배양 20일 경에 황토첨가하지 않은 대조구에 비해 모든 곡물배지에서 포자수가 3 ~ 5배까지 높아짐을 관찰할 수 있었다. 그리고 각종 유기물, Ca^{2+} , SDS, 점토광물류를 첨가하여 포자형성 촉진효과를 시험한 결과에서도 vitamin complex 첨가에서 4배, zeolite 첨가에서 2배의 효과를 확인하였다.

인산가용화균을 액체대량배양하기 위하여 1L 발효조를 이용하여 배지조성, 배양온도, agitation 속도 등에 대한 최적배양조건을 시험한 결과 배지조성은 3.0% 쌀겨배지, 배양온도는 28℃, agitation 속도는 200rpm, 초기접종량은 1.0×10^6 conidia/ml, 공기주입량은 70 L/min으로 결정되었다. 이 조건으로 200L 대형발효조를 이용하여 scale-up 시험을 한 결과 36시간만에 최적균체량에 도달하였다.

인산가용화 사상균의 액상배양에서 mycellial pellet이 형성되면 발효공정상에 심각한 문제를 초래하게 된다. 따라서 이를 해결하기 위하여 배지조성, 분생포자의 초기집중농도 등을 조절하거나 점토광물 등의 각종첨가제를 배지에 첨가하여 pellet 크기 감소기술을 개발하고자 하였다. 그 결과 zeolite와 diatomite와 같은 점토광물을 첨가하거나 PEG 200을 첨가했을 때 pellet 감소효과가 탁월하였으며, 특히 PEG 200 첨가시 $0.2\pm 0.1\text{mm}$ 까지 pellet size가 감소하였으며 이는 대조구에 비해 1/20의 크기였다.

본 연구팀은 이 균주의 포자(conidia) 및 균사체(mycelium)를 이용하여 산업화의 필수 단계인 다양한 제형화(액상, 고체분말, 고체과립형 등)를 시도하여 성공적 이를 완성하였다. 액상제형화는 분생포자의 생존율이 균사체에 비하여 월등히 높기 때문에 분생포자만을 포함하는 액상 생물비료를 제조하였다. 그러나 포자를 단순히 멸균증류수에 녹이면 포자가 분산되지 않고 위로 뜨거나, 뭉쳐서 가라앉는 현상이 발생한다. 또한 보관중에 세균오염에 의한 부패문제가 발생하거나, 포자의 생존율이 매우 낮아지는 문제점 등이 발생하였다. 따라서 이와 같은 문제점들을 해결하기 위하여 포자수용액에 Trio 혹은 비누를 처리함으로써 이와같은 문제점들을 완전히 극복하였다. 또한 고체분말 제형화는 가장 손쉬운 방법으로서 건조조건과 포자생존율을 높이는 방안에 대하여 중점 연구하여 증량제 및 첨가제를 조절함으로써 성공적으로 제형화하였다.

인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. PS-113을 생물비료로 단독으로 이용할 경우도 있지만 화학적으로 합성된 살충제, 살균제, 제초제 등과 혼용 사용 혹은 비슷한 시기에 화학농약이 사용될 경우가 있다. 따라서 본 과제에서 개발한 인산가용화 사상균을 생물비료로 효과적으로 이용하기 위해서는 다양한 화학농약에 대한 안정성 평가가 필수적이다. 시험 결과 이 균주는 살충제에서는 시험한 7종의 각종 화학농약에 대해서 100%의 높은 생존율을 보였다. 제초제에서도 시험한 3종에서 100%의 높은 생존율을 보였다. 그러나 살균제는 시험한 7종에 대해서 포름씨(수화제), 산요루(유제), 사프롤(유제), 헥사코나졸(액상수화제) 4종에 대해서는 95% 이상의 높은 생존율을 보였으나 나머지 3종에 대해서는 30% 이하의 낮은 생존율을 보였다. 따라서 인산가용화 사상균을 살균제와 병용해서 사용할 때는 약량을 낮게 조절하거나 혹은 포자생존에 영향을 주지 않는 살균제만을 선택적으로 사용하는 것이 바람직하다.

액상, 고체분말, 고체과립형 등으로 개발된 생물비료를 pH, 수분함량, 총균수, 색도, 냄새 등의 다양한 물리화학적 특성을 조사한 결과 4°C 및 25°C에서 1년까지 보존하여도 대

체적으로 안정한 것으로 나타났다. 이 중에서 총균수는 보관온도 및 제형화조건에 따라 급격히 떨어질 수도 있었으나 보관온도, 증량제 및 첨가제의 조건을 잘 설정하면 1년이 경과한 시점에서도 90 log% 이상의 포자생존률을 보여주었다.

생물비료로 개발된 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 환경생태학적인 안정성 평가는 농업환경에서 대단히 중요하다. 본 연구에서는 미꾸라지와 일본송사리를 이용한 어독성 시험 및 배추, 콩, 녹두, 홍대, 옥수수 등의 주요 작물에 대한 약해시험을 동시에 실시하였다. 이때 처리한 포자농도는 실제의 포장처리 농도보다 1,000배 이상 높은 농도인 1.0×10^8 conidia/ml로 처리한 결과 모든 시험구에서 무해한 것으로 판정되었다.

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 생물비료로서의 작물생육효과를 시험하기 위하여 경북 성주군 초전면(참외재배), 김천시 조마면(감자재배), 칠곡군 약목면(방울토마토), 충북 괴산군 불정면(고추, 오이) 일대의 유기농가 시설하우스에서 재배시험을 진행하였다. 그 결과 성주군에서의 참외재배에서는 인산가용화균 처리구는 참외의 잎색깔이 무처리구에 비해 짙은 녹색을 띠었으며, 열매의 당도가 약 2 Brix 증가함을 관찰하였다. 참외수확량에 있어서도 약 10%의 증수효과가 있었다. 김천시 조마면에서의 감자재배에서는 이식 후 2개월이 경과했을 때 생육효과를 비교한 결과 인산가용화균 처리구는 무처리구에 비해 감자의 초장이 약 1.6배 증가하는 효과가 있었으며, 또한 식물병 발생도 적음을 확인할 수 있었다. 3.5개월이 경과하여 감자를 수확한 후 감자의 수확량, 당도, 수분함량, 감자 더듬이병 발생정도 등을 조사한 결과, 무처리구에 비해 처리구의 감자수확량은 약 1.7배, 당도는 약 1.3배(1 Brix) 증가하였다. 또한 감자 더듬이병의 발생이 현격히 감소하는 효과가 있었다. 칠곡군에서의 방울토마토 재배 결과에서는 인산가용화균을 처리한 시험구에서는 작물 생육이 왕성하였으며, 잎의 색깔도 짙은 녹색을 띠었다. 이에 비해 대조구는 전체적으로 식물의 생육상태가 나쁘고 잎색깔도 옅은 연두색과 연노랑색을 띠는 것을 알 수 있었다. 충북 괴산군 불정면에서의 고추에 대한 작물생육 시험 결과에서는 처리구의 고추 1주당 지상부 식물(잎과 줄기)의 생체중은 평균 38.0g으로 무처리구에 비해 약 1.5배 증가하였으며, 뿌리무게는 13.0g으로서 무처리구에 비해 약 2배 증가하였다. 또한 초장에서도 처리구는 48.3cm로서 무처리구에 비해 약 120%의 신장효과가 있었으며, 수확한 고추의 평균무게도 고추 1주당 221.0g으로서 무처리구에 비해 7.1g씩 높은 효과가 있었다. 괴산군 불정면에서의 오이에 대한 시험 결과에서는 인산가용화균 처리구에서 평균열매 길이가 31.9cm로 무처리구에 비하여 3cm 정도 긴 것으로 조사되었다. 오이의 열매 지름도 처리구가 무처리구에 비하여 0.7cm 더 긴 것으로 나타났으며, 열매 평균 무게도 무처리구에 비하여 89.2g 더

나가는 것으로 조사되었다. 이상의 결과로부터 인산가용화균의 처리가 온실하우스내 참외, 감자, 방울토마토, 고추, 오이 등 시험한 모든 작물의 생육에 매우 뛰어난 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 주관연구기관인 (주)흙살림은 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113 을 대량으로 고체배양하여 성공적으로 시제품을 생산하였으며, 생산된 시제품의 상품명은 “활인산골드”로서 농민단체인 (사)흙살림 회원들을 중심으로 현재 현장검정과 시판을 진행하고 있다.

SUMMARY

A fungus with high phosphate solubilizing activity was isolated from soil using potato dextrose agar-calcium phosphate medium and identified as *Penicillium* sp. PS-113, based on the morphological characteristics of conidiophore, conidia, flask shaped phialides, conidial head and by comparing with standard culture.

The optimum temperature and initial pH to solubilize rock phosphate in potato dextrose broth-rock phosphate medium were 30°C and pH 8.0, respectively. In these conditions phosphate solubilizing activity of *Penicillium* sp. PS-113 was measured in the presence of four types of insoluble phosphate such as tricalcium-phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, and hydroxyapatite, respectively. The maximum phosphate solubilizing activity was obtained with tricalcium phosphate while minimum activity was obtained with hydroxyapatite.

In order to make the mass production of *Penicillium* sp. PS-113, we cultured it on the various solid-based preparations such as each containing rice bran, wheat bran, sawdust and crushed rice. The maximum conidia upto 1.0×10^{10} conidia/g of preparations were recorded after 7 days cultivation almost on all media.

In order to minimize the mycelial pellet formation, an investigation was focused on the culture conditions (media and initial inoculum) and additives (soil, surfactants and polyethylene glycol 200). Culturing the strain in PDB, SDB and YPD media, their pellet sizes decreased to the order of YPD > SDB > PDB. And at the concentrations of the initial inoculum in the range from 1.0×10^3 to and 1.0×10^6 conidia/ml, the small sizes of pellet were formed. For the initial inoculum between 1.0×10^7 and 1.0×10^8 conidia/ml, however, an amorphous pellet or loose aggregate was formed. The addition of soils, zeolite and diatomite, upto 1.0% decreased the pellet sizes to 3/4 and 1/2, respectively, but the pellet size was increased to 2.5 times by the addition of bentonite. Surfactants also affected on the size of pellet. The addition of Triton X-100 and Tween 80 upto 1.0% decreased the pellet sizes maximally to 1/10 and 1/4, respectively,

while SDS completely inhibited the fungal growth. Among the four additives tested, polyethylene glycol 200 was proved most effective on reducing the pellet sizes to 0.2 ± 0.05 mm that resulted in about 20-fold reduction compared to the control.

For the purpose of activation of the conidial growth, some additives (Tween 80, SDS, Triton X-100, glucose, glycerol, corn oil, bio-ceramic, PEG 200, Cu^{++} , Mo^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} and Zn^{++}) were supplemented during the solid cultures by using the rice bran medium. The highest number of the conidia was recorded containing metal ions (0.1% ~ 1.0%).

The fungus, *Penicillium* sp. PS-113, was formulated to a liquid type with various concentrations of Trio (0, 0.001, 0.01, 0.1 and 1.0%, v/v) and soap (0, 0.01, 0.1, 1.0 and 3.0%, w/v) as a dispersing agent. The viability was tested on potato dextrose agar (PDA) medium; that is, the number of *Penicillium* sp. PS-113 conidia stored at 4°C and 25°C for 1 year was counted on PDA at the intervals of 2 weeks. As a result, the liquid formulants containing 0.1%(v/v) Trio was remarkably improved in dispersing ability and the viability of the conidia.

In the case of a solid powder formulation, several factors for the drying process such as drying temperature, overall drying time, and so on, and humidity of a final product are very important for the conidial viability. The viability of conidia depending on the drying temperature(60, 80, 100 and 120°C), humidity(10, 15 and 20%), storage temperature(4 and 25°C) and storage period(0, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 12 months) was tested on PDA medium during the 1 year storage. As a result, the number of *Penicillium* sp. PS-113 conidia stored at 4°C after drying at 80°C was higher than 20 ~ 60 times to compare with the control. But the viability of the conidia stored after drying at more than 100°C was dramatically decreased in spite of the periods of storage.

Another solid formulants with mycellium, which was cultivated at 30°C and 160 rpm in PDB medium, harvested from the submerged liquid culture and then fomulated to powder type including various clay chemicals such as diatomite, bentonite, talc, kaoline and loess, were tested their viability on PDA medium. As results, the mycellium formulants, stored at 4°C containing bentonite, diatomite and loess were remarkably improved their viability upto ~ 85 log% survival ratio during 1 year storage, but the

control had no counts within 2 months.

The phosphate-solubilizing activity of liquid formulant at the 1 year storage was measured in the presence of insoluble phosphate, 0.5%(w/v) rock phosphate. The fungus, even if 1 year storage, stably produced free phosphate to the culture broth with the concentration of 340 ppm at the 8 days cultivation.

On stability test, the fungus showed an exclusive stability against fungicides, pesticides and herbicides at the effective concentrations. And it showed no toxicity against loach(*Misgurnus mizolepis*) and monnow(*Oryzias latipes*), a kind of biological indicator, for 96 hours at the concentrations of 1.0×10^8 conidia/ml inoculum. Additionally, it showed no toxicity against several plants such as Chinese cabbage(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*), mung bean(*Phaseolus radiatus*), soy bean(*Glycine max*), red bean(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*) and corn(*Zea mays*) during their germination at the same concentration of inoculum.

Effect of phosphate-solubilizing fungus as a biofertilizer on the plant growth was studied in soil-based pot experiment with *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* var. *humilis*, *Phaseolus radiatus*, *Zea mays* Suwon 19 and *Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*. As results, it showed remarkable growth promotion for all tested plants. That is, inoculation of *Penicillium* sp. PS-113 increased plant height (1.6 times), and root length (1.6 ~ 2.5 times) at 14-days cultivation, indicating that the fungus was able to enhance the plant growth and development. In field test at several regions, it also showed dramatic growth promotion for all tested plants such as grafted melon, potato(*Solanum tuberosum*), tomato(*Lycopersicon esculentum*), red pepper and cucumber.

Under the basis of those results, we successfully commercialize it a biofertilizer, named as "Active Phosphate Gold".

CONTENTS

Chapter 1. Overview	16
Chapter 2. Background	17
Chapter 3. Subjects and results	19
[1] Subjects	19
[2] Materials and methods	21
[3] Results	25
1. Survey of literatures	25
2. Optimization of solid mass culture	25
3. Optimization of submerged mass culture	40
4. Optimization of submerged mass culture for lactic acid bacteria	48
5. Phosphate-solubilizing activity of the fungus against insoluble phosphates	49
6. Effect of additives on the fungal viability	51
7. Formulation of biofertilizer	76
8. Stability of biofertilizer	110
9. Safety of biofertilizer against environment	113
10. Field test of biofertilizer	118
11. Physicochemical properties of biofertilizer during its storage	140

12. Viability of biofertilizer during its storage	145
13. Phosphate-solubilizing activity of biofertilizer during its storage	172
14. Survival of biofertilizer in soil	173
15. Industrialization and advertizement of biofertilizer	173
Chapter 4. Level of accomplishment and contribution in rerated fields	177
[1] Research goal	177
[2] Factors for research evaluation	177
[3] Level of accomplishment	178
1. 1st year	178
2. 2nd year	181
3. 3rd year	184
Chapter 5. Use plans of results	189
Chapter 6. Information from foreign researchers	190
Chapter 7. References	191

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	16
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	17
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	19
제1절. 연구개발 수행 내용	19
제2절. 연구재료 및 방법	21
제3절. 연구개발 결과	25
1. 문헌조사	25
2. 인산가용화군의 고체 대량배양 최적화	25
3. 인산가용화군의 액체 대량배양 최적화	40
4. 젓산균의 대량배양을 위한 발효공정 최적화	48
5. 난용성 인산염에 대한 인산 가용화능 검정	49
6. 인산가용화군의 생활력 유지에 미치는 첨가제의 영향	51
7. 생물비료의 제형화	76
8. 생물비료의 제형화에 따른 안정성 시험	110
9. 생물비료의 환경생태학적인 안전성	113
10. 생물비료의 비효검정	118
11. 생물비료의 보관조건에 따른 물리화학적 특성	140
12. 생물비료의 보관조건에 따른 생활력 검정	145

13. 장기저장 후의 인산가용화능 검정	172
14. 생물비료의 토양생존율	173
15. 생물비료의 산업화 및 홍보	173
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	177
제1절. 연구개발의 최종목표	177
제2절. 연구평가의 착안점	177
제3절. 연구개발 목표의 달성도	178
1. 제 1차년도	178
2. 제 2차년도	181
3. 제 3차년도	184
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획	189
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	190
제 7 장. 참고문헌	191

제 1 장. 연구개발과제의 개요

본 연구에서는 토양 속에 다량으로 축적되어 있는 불용성 인산태를 인산가용화능이 우수한 미생물을 이용하여 유리인산으로 전환함으로써 화학비료를 대신하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 방법을 고안하고자 한다. 협동연구기관으로 참여하는 대구대학교 연구팀은 지난 5년간 토양으로부터 *Penicillium* 속과 *Aspergillus* 속 등의 고효율 인산가용화 사상균들을 다수 선발·동정하였으며(Kang *et al.*, 1997) 이를 본 연구에 분양하였다. 이 연구팀은 또한 농업부산물인 배추쓰레기를 재활용하여 미생물의 배양배지로 이용할 수 있는 기술을 개발했으며(Kang *et al.*, 1998) 쌀겨, 밀기울 등을 고체배지로 이용하여 미생물의 포자형성을 촉진할 수 있는 기술을 이미 보유하고 있다(Kang *et al.*, 1999). 또한 인산가용화균의 포자를 물에 현탁하여 옥수수 재배토양에 시비한 결과 옥수수의 생장이 뚜렷이 증가하는 것을 검정하였다(Kang *et al.*, 1999). 본 연구는 이 미생물을 산업화하기 위한 핵심기술인 대형 발효조를 통한 발효공정의 최적화와 미생물이 장기간 활력을 유지할 수 있도록 제형화하는 방법을 개발하고, 동시에 이 제형화된 미생물의 토양생존율과 작물재배를 통한 비효검정을 수행하여 농가에서 바로 사용할 수 있는 인산질 생물비료를 생산하고자 한다. 따라서 본 연구에서 생산된 제품은 농업부산물을 재료로 이용하기 때문에 폐자원 재활용이라는 측면에서 그리고 화학 인산질 비료를 전혀 사용하지 않고 토양 속에 축적된 인산염을 이용하기 때문에 환경보호 측면에서 획기적인 상품이라 하겠다.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

지금까지 우리 농업은 단위면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위하여 다량의 화학비료와 유기물을 사용해 왔다. 그러나 이들 중의 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주원인이 되고 있다(Paul and Clark, 1989). 앞으로 우리가 지향해야 할 농업은 환경친화적이고 부가가치가 높은 무공해 농산물을 생산하는 영농 시스템이다. 따라서 인산비료의 사용을 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 인산테를 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 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며 평균 10%의 수량 증가를 보았다(Dubey and Billore, 1992). 1980년대는 *Penicillium bilaji* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다(Kucey, 1988). 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 *Bacillus megaterium*(Dubey and Billore, 1992), *B. polymyxa*(Tiwari et al., 1993), *Pseudomonas striata*(Agasimani et al., 1994), *Pseudomonas* sp. (PI18/89)(Illmer et al., 1995), *Penicillim simplicisimum* (Sayer et al., 1995), *P. aurantiogriseum*(Illmer and Schinner, 1995), *P. bilaji*(Kucey, 1988), *Aspergillus awamori*(Agasimani et al., 1994; Varsha et al., 1993), *A. aculeatus*(Varsha et al., 1995), *A. niger*(Sayer et al., 1995) 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 곡물류, 콩과식물류, 감자류, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고 되고 있다.

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizae)과 *Rhizobium*이 주로 연구되어 세계 약 30개 업체에서 생산하고 있으며, 미국 미조리대학에서는 VAM과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다(Kim et al., 1998). 국내에서는 일부업체에서 일본에서 수입한 미

생물을 그대로 증식하여 유통하고 있으나 미생물이 제제화 되지 않았기 때문에 생활력이 매우 저하되어 실효를 거두지 못하고 있으며 작물 시비효과도 검증되지 않고 있다.

한편 국내에서도 환경농업의 중요성이 인식되면서 여러 대학 및 연구소에서 미생물제제에 대한 연구를 시작하고 있으나 균주선발 및 배양특성 조사, 포장시험 등에 관한 폭넓은 연구의 부족으로 아직 실험실 수준의 초보적인 단계에 머무르고 있다(Kim *et al.*, 1984; Suh *et al.*, 1995). 2,000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발수행 내용

1. 제 1차년도 :

- 쌀겨, 밀기울 등의 농업부산물을 이용한 고체배지의 개발
- pH, 배양시간, 배양온도 등 배양환경의 최적화
- 증량제 (Loess, Zeolite, Bentonite, Vermiculite) 및 첨가제를 이용한 포자형성 조건의 최적화
- 액체배양시 최적 균체생산을 위한 배양조건 확립
- Mycellial pellet size를 최소화 할 수 있는 기술 개발
- 젖산균의 최적 균체생산을 위한 배양조건 확립
- 난용성 인산염 종류별 인산가용화균의 인산 가용화능 검정
- 계면활성제(Tween 80, SDS, Triton X-100) 농도에 따른 인산가용화균의 생활력 유지에 미치는 영향
- 점토광물(vermiculite, bentonite, zeolite 등)과 비결정 점토광물 농도에 따른 균의 생활력 유지에 미치는 영향
- 각종 유기물(식물성 기름, 포도당, 아미노산, 당밀 등) 농도에 따른 균의 생활력 유

지에 미치는 영향

- 미량원소(Mn, Zn, Cu, Fe, Ca, Mo 등) 농도에 따른 균의 생활력 유지에 미치는 영향

2. 제 2차년도 :

- 분생포자만을 포함하는 액상 생물비료의 제제화
- 고체배양후 분생포자와 배지를 포함하는 분말 또는 과립상의 생물비료 제제화
- 액체배양후 균배양액의 액상 또는 과립상 생물비료 제제화
- 인산가용화균과 젖산균의 복합생물비료 제제화
- 생물비료의 각종 농약(살충제, 살균제, 제초제)에 대한 안정성
- 생물비료의 물리적, 화학적 특성 조사(pH, 수분함량, 총균수, 색도, 냄새 등)
- 생물비료의 환경생태학적인 안전성 조사(어독성, 주요작물에 대한 유해성 등)

3. 제 3차년도 :

- 생물비료의 작물시비효과 검증(시설재배 및 노지재배)
- 인산가용화균과 젖산균 혼용시 비효상승효과 검증
- 보관온도, 보관습도, 일광조건에 따라 색상, 물리적 성상, 냄새, 산도, 부식성 등의 품질변화에 대한 조사

- 보관온도, 보관습도, 일광조건에 따라 생활력의 변화 조사
- 보관기간에 따라 색상, 물리적 성상, 냄새, 산도, 부식성 등의 품질변화에 대한 조사
- 생물비료의 보관기간에 따른 미생물의 생활력 조사
- 생물비료의 토양생존을 조사
- 흙살림 회원들에게 홍보, 시범 및 시제품 제공
- 흙살림의 환경농업교육을 통한 홍보 및 시제품 제공
- 흙살림의 자체 기술로 개발한 cyber market을 이용한 홍보 및 판매
- 흙살림에서 매달 정기적으로 발간되는 “흙살림” 신문을 통하여 홍보

제 2 절. 연구재료 및 방법

1. 사용균주 : 공시균주는 본 연구팀에 의하여 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 국내토양으로부터 선발 및 분리한 *Penicillium* sp. PS-113 균주를 사용하였다.
2. 인산가용화균의 고체 대량배양 기술 : 인산가용화균의 고체 대량배양기술 확립을 위하여 배지조성(쌀겨, 보리, 옥수수, 밀기울 등), 배지량(5, 10Kg), 배양온도(24, 28℃), 수분함량(30, 40, 50%), 배양용기(버섯재배용 플라스틱 상자, 버섯재배용 종균병 등) 및 배양기기(농용열풍건조기, 항온항습 growth chamber 등) 등을 달리하여 고체 대량배양을 위한 최적화조건을 확립하였다. 확립된 최적화 조건은 배지조성은 쌀겨배

지, 배양용기는 tray type, 배양온도는 28℃, 수분함량은 50%, 호기조건, 초기 포자접종량은 1.0×10^5 conidia/g · media 이상, 배양기기는 closed system으로 결정되었다. 이 조건에서 100Kg 이상 대량배양을 시험하여 포자수를 측정하였다. 포자수의 측정에는 배양배지를 0.5g 들어내어 멸균수로 적정한 농도로 희석하여 PDA 평판배지 (potato infusion 200g, dextrose 20g, agar 17g per 1L distilled water)에 도말하여 25℃에서 2-3일간 배양하여 생성되는 colony 수를 측정하여 결정하였다.

3. 인산가용화균의 액체 대량배양 기술 : 인산가용화균을 액체대량배양하기 위하여 1L 발효조를 이용하여 배지조성(쌀겨, 쌀겨 추출물, 밀기울, 당밀 등), 배양온도, agitation 속도 등에 대한 배양조건시험을 수행하였다. 먼저 1L 발효조 배양에서는 3% 고형물을 함유한 각각의 배지를 600ml씩 발효조에 채운다음 121℃에서 30분간 멸균하였다. 배양결과 최적배지조성은 3.0% 쌀겨배지, 배양온도는 28℃, agitation 속도는 200rpm, 초기접종량은 1.0×10^6 conidia/ml, 공기주입량은 70 L/min으로 결정되었다. 이 조건으로 200L 대형발효조를 이용하여 scale-up 시험을 수행하였다.
4. 인산가용화균의 mycellial pellet 크기 및 균체량 측정 : 공시균주의 액침배양시 mycellial pellet의 크기 및 균체생성량의 변화를 알아보기 위하여 30ml의 PDB 배지가 들어있는 100ml 삼각플라스크에 1×10^6 개의 분생포자를 접종한 후 25℃에서 4일간 진탕배양하였다. 이 배양배지 중에 형성된 pellet을 plate에 옮긴 다음 해부현미경 하에서 pellet의 크기를 측정하였다. 균체량의 측정은 배양액을 원심분리(3,000×g, 10min)하여 수확한 균체를 freeze drying하여 함수율이 0%[Moisture analyzer, Mettler LJ16 (Swiss)]가 될 때까지 건조한 후 정량하였으며, 이 값에서 배지의 양을 뺀 값을 균체량으로 결정하였다.
5. 난용성 인산염의 인산가용화능 측정 : PDB 배지 5ml에 난용성 인산염을 0.5%(w/v) 첨가한 후 인산가용화균의 포자를 1.0×10^4 개/ml 농도로 접종한다. 이것을 30℃에서 3-7일 동안 200 rpm으로 진탕배양하면서 매일 배양상등액 내의 유리인산의 농도를 측정하여 난용성 인산염의 분해능을 측정한다. 이때 유리인산 농도측정은 균체배양액 1.5ml을 취하여 Eppendorf tube에 담은 후 microfuge로 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1.0 ml을 취하여 증류수 4ml을 첨가하여 총

5ml이 되게하였다. 여기에 폴리브덴산 암모늄용액 0.2ml과 염화제일주석용액 0.025 ml을 가하여 잘 섞은 후 30℃에서 10분간 방치한 다음 690 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

6. 첨가제 및 안정제 등을 이용한 포자의 생활력 유지 기술 : 인산가용화균의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 고두밥, 밀, 보리, 쌀겨, 옥수수 등의 다양한 배지에서 배양한 균체를 증량제로서 diatomite, bentonite, zeolite 등의 점토광물을 1:9의 비율로 첨가하여 4℃와 상온(25℃)에서 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년간 보관하면서 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서 균수를 측정함으로써 살아있는 포자수를 결정하였다. 또한 상온(25℃)에서의 생활력 유지를 위하여 계면활성제(Tween 80, SDS, Triton X-100) 및 2가 금속이온(Ca^{2+} , Mo^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+})을 각각 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0% 농도로 첨가하여 생활력에 미치는 영향을 시험하였다. 그리고 각종 유기물(PEG 200, glycerol, 식용유, 종합 vitamin, 설탕, 당밀)도 각각 0, 0.01, 0.1, 1.0, 5.0% 농도로 첨가하여 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년간 보관하면서 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정함으로써 포자의 생활력에 미치는 영향을 검정하였다.
7. 화학농약(살충제, 제초제, 살균제)에 대한 안정성 시험: 인산가용화균의 화학농약에 대한 안정성검토를 위한 연구방법은 현재 시중에 유통중인 산마루(수화제), 엘산(유제) 등 살충제 9종과 포룸디(수화제), 산요루(유제) 등 살균제 8종 및 그라목손(액제), 스톱프(유제), 랜드마스타(액제)와 같은 제초제 3종을 구입하여 이들을 토양에서 사용되는 농도의 0.1, 1, 10배 약량으로 PDA배지와 혼합하여 평판배지를 제조하였다. 여기에 적절히 희석한 인산가용화 균주의 conidia를 도말하여 25℃에서 3~5일간 항온배양하면서 성장한 개체수를 측정하여 생존율을 계산하였다.
8. 인산가용화균의 어독성 시험: 인산가용화균의 어독성 시험을 위하여 미생물농약의 등록시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 의하여 시험을 수행하였다. 시험어종은 (주) 경농에서 어독성 시험을 위하여 인공사육하고 있는 미꾸라지와 일본송사리를 분양받아 사용하였다. 미꾸라지는 5 ~ 10cm, 송사리는 2 ~ 3cm 정도 크기의 건강

하고 균일한 개체를 사용하였다. 또한 적절한 순화 및 급이를 하였으며, 시험개시 24 시간 전에는 급이를 중단하였다. 시험용 수조는 유리로된 원통수조를 사용하였으며, 시험용수는 지하수를 사용하여 수온을 20 ~ 28℃로 항상 유지하였다. 어류는 수조 당 10마리 이상을 넣어 시험하였으며, 인산가용화균의 포자를 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 넣은 후 48시간 및 96시간에서의 치사율을 결정하여 어독성을 시험하였다.

9. 인산가용화균의 주요작물에 대한 약해 시험: 인산가용화균의 작물에 대한 약해시험을 위하여 본 연구에서는 배추, 콩, 녹두, 홍대, 옥수수 등의 작물에 대한 인산가용화균의 발아억제시험을 수행하였다. 시험방법은 각종 종자를 30초간 70% ethanol에 담귀서 표면살균한 다음, 3회동안 멸균증류수에 세척하였다. 이 종자들은 곧바로 1% 락스에 20분동안 담귀서 꺼낸 후 3회간 멸균증류수로 세척하여 전처리를 완료하였다. 이것을 5시간 동안 멸균증류수에 침지시킨 후 발아시험에 사용하였다. 시험방법은 솜에 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 포자액을 충분히 적신다음 petri dish의 바닥에 골고루 퍼뜨린다. 이 위에 전처리한 종자를 올려놓고 25℃의 growth chamber에서 3일간 배양하여 작물의 발아 및 생육상태를 조사하였다.
10. 인산가용화균의 pot에서의 작물생육 효과시험 : 다양한 작물에 대한 시비효과를 검증하기 위하여 토양과 상토를 1 : 1(v/v)로 섞은 토양을 pot(Φ7.0 × 6.5cm)에 담고 1.0×10^8 spore/g · 토양 농도로 인산가용화균을 접종한 후 상토에서 발아한 콩 (*Glycine max*), 홍대(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*), 녹두(*Phaseolus radiatus*), 옥수수(*Zea mays* Suwon 19), 배추(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*)를 pot에 이식하여 2주간 재배하면서 초장, 뿌리길이를 측정하였다.
11. 인산가용화균의 온실하우스에서의 작물생육 효과시험 : 온실하우스에서 다양한 작물에 대한 인산가용화균의 시비효과를 검증하기 위하여 참외, 감자, 방울토마토, 오이, 고추 등에 대하여 각각 시험하였다. 각 작물의 시험조건은 본문에 상세히 설명하였다.

제 3 절. 연구개발 결과

1. 문헌조사 :

인산가용화균을 이용한 생물비료 개발을 위하여 관련자료를 Inter-Net 및 농과원, 대구대학교, KIST 등의 도서관, 산업기술정보원(KINITI) 등을 통하여 수집하였다.

2. 인산가용화균의 고체대량배양 최적화 :

가. 농용열풍건조기를 이용한 고체배양 :

본 연구팀에 의하여 국내 토양으로부터 분리하여 지난 4년간의 연구결과 인산가용화능이 특히 우수한 것으로 판정된 *Penicillium* sp. PS-113을 공시균주로 활용하여 고체배양을 실시하였다. 쌀겨, 밀기울, 보리, 옥수수 등의 농업부산물을 이용하여 소량의 고체배지를 제조한 후 배지종류별 분생포자(conidia) 형성능을 비교 검토한 결과 이 균은 이들 배지에서 배양 20일경에 gram 당 $2 \sim 5 \times 10^9$ 개의 높은 포자형성능을 보였으며, 이때 배지종류간에는 유의성이 거의 없었다. 또한 이 균주를 이용한 기초연구 결과 분생포자가 균사체에 비해 생존율이 10배 이상 우수하였으므로 1년 이상의 장기저장 및 유통을 위해서는 분생포자를 생산하는 것이 유리할 것으로 생각되며, 단기간의 유통을 위해서는 발효공정이 간편하고 빠른 시간에 높은 균체량을 얻을 수 있는 액체배양이 유리한 것으로 판단하여 대량배양은 고체배양과 액체배양을 동시에 수행하였다. 이와 같은 대량 발효공정기술의 개발은 이 균주를 생물비료로 산업화하기 위한 필수적인 단계가 된다. 본 연구에서는 먼저 배지의 물성과 가격 등의 특성을 고려하여 가격이 싸고 쉽게 구할 수 있는 농업부산물인 쌀겨를 이용하여 고체배양을 실시하였다. 이를 위해 미곡종합처리장에서 구입한 쌀겨를 주원료로 하여 2m²용적의 농용열풍건조기(신흥공업사, Korea)에서 10Kg씩 60×90×5cm 크기의 건조용 tray에 수분함량을 30, 40, 50%로 각각 조절된 배지를 제조하여 균체를 배양하였다. 그리고 접종원으로는 포자현탁액

10ml(포자농도: 1.0×10^6 conidia/ml)을 사용하였다. 배양결과(Table 1)에 의하면 30% 수분함량에서는 배지의 급속한 건조로 인해 균사발달이 저조했으며 40%, 50% 수분에서는 접종 5일까지는 균사생육 및 포자 형성이 양호하였으나 6일부터는 건조에 의해 균생육 속도가 서서히 감소하였다.

또한 배지량을 5kg, 10kg으로 달리하여 수분함량을 50%로 조정한 배지에서 배양한 결과 10Kg 단위로 배양한 경우가 5kg보다 균사발달 및 포자형성이 잘 이루어 졌다(Table 2).

한편 접종농도에 따른 균사 및 포자형성능을 알아보기 위하여 배지의 수분함량을 50%, 배지량을 10Kg으로 하고 접종액을 ml당 각각 1.0×10^4 , 1.0×10^6 conidia/ml로 조정한 포자현탁액을 접종한 결과 Table 3과 같이 접종액의 농도가 높은 경우에서 균사생장 및 포자형성이 보다 우수하였다.

Table 1. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on rice bran solid media at various initial humidities.

Culture time (days) \ Humidity(%)	1	2	3	4	5	6
30	-	-	-	-	-	-
40	-	+	+	+	++	++
50	-	+	+	++	++	++

*. Symbols denote -, weak growth; +, normal growth; ++, good growth.

Table 2. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on the various quantities of the rice bran solid medium.

Culture time (days) \ Quantity of medium(Kg)	1	2	3	4	5	6
5Kg	-	+	+	+	+	++
10Kg	-	+	+	++	++	++

*. Symbols denote -, weak growth; +, normal growth; ++, good growth.

Table 3. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on rice bran solid media at various initial inocula.

Culture time (days) \ Inoculum (conidia/ml)	1	2	3	4	5	6
1×10^4	-	-	-	+	+	+
1×10^6	-	+	+	++	++	++

*. Symbols denote -, weak growth; +, normal growth; ++, good growth.

나. 버섯재배용 플라스틱 배양상자를 이용한 고체배양 :

뚜껑이 있는 버섯재배용 플라스틱 배양상자(40×40×20cm)를 이용하여 고체배양을 실시하였다. 본 연구의 기본배지로는 밀기울을 주원료로 사용하였다. 배지를 담은 배양상자를 멸균한 후 포자수가 ml당 1.0×10^5 으로 조정된 현탁액을 무균상에서 골고루 접종하여 28℃의 항온실에서 균체를 배양하였다. 이때 온도계를 배지에 꽂아 배양중의 온도변화를 측정하였다. 그 결과 수분함량에 따른 균사생육 및 포자형성 정도는 Table 4와 같이 수분 50%와 55%에서는 별다른 차이를 보이지 않았다.

또한 배지량을 2Kg과 3Kg으로 각각 조절하여 실험한 결과 배지량이 2kg인 경우에 균사성장이 보다 빨랐으며(Table 5), 배양중의 온도변화는 28 ~ 32℃ 범위에서 유지되었다(Table 6).

그리고 배양온도를 24℃와 28℃로 조절하여 고체배양한 결과 28℃에서 균사성장 및 포자형성이 다소 양호한 것으로 나타났다(Table 7).

Table 4. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on wheat bran solid media at various initial humidities.

Culture time(days) \ Humidity(%)	1	2	3	4	5	6
50	-	-	+	++	++	++
55	-	-	+	++	++	++

*. Symbols denote -, weak growth; +, normal growth; ++, good growth.

Table 5. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on the various quantities of the wheat bran solid medium.

Culture time(days) \ Quantity of media	1	2	3	4	5	6
2Kg	-	+	+	++	++	++
3Kg	-	-	-	+	++	+++

*. Symbols denote -, weak growth; +, normal growth; ++, good growth; +++, very good growth.

Table 6. Changes in temperature during the solid culture of *Penicillium* sp. PS-113 at various quantities of the wheat bran medium.

Culture time(days) \ Quantity of media	1	2	3	4	5	6
2Kg	28°C	28.5°C	38.5°C	35°C	30°C	30°C
3Kg	28°C	29°C	34.5°C	37°C	40°C	37°C

Table 7. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on the wheat bran solid medium at the various temperature.

Culture time(days) \ Culture temp.	1	2	3	4	5	6
24℃	-	-	-	-	+	++
28℃	-	-	-	+	++	+++

*. Symbols denote -, weak growth; +, normal growth; ++, good growth.

다. 버섯재배용 종균병을 이용한 고체배양 :

버섯재배용 종균병(850ml, 광구)을 이용하여 배지 종류 및 배양온도, 배지의 초기수분함량에 따른 배양정도를 조사하였다(Table 8 ~ Table 11). 배지 제조는 종균병에 1/2까지 쌀겨, 밀기울, 쌀겨 + 톱밥 등의 배지를 채우고 종균병 아래에 2cm 정도의 구멍을 내어 접종이 용이하게 한 후 멸균하였으며, 배지가 상온으로 식은 후 앞에서 설명한 방법대로 포자현탁액을 접종하여 28℃에서 균체를 배양하였다. 그 결과 Table 8에서 보여주는 바와 같이 쌀겨, 밀기울, 싸래기, 쌀겨와 톱밥, 쌀겨와 밀기울 혼합배지 중에서 쌀겨와 톱밥을 1:1로 혼합한 배지에서 균사생장과 포자형성이 가장 빠르고 우수하였다.

한편 배양온도를 24℃와 28℃로 조절하여 배양한 결과 28℃에서 대체로 균사생장 및 포자형성이 상대적으로 우수하였다(Table 9). 배지 중에는 쌀겨배지가 다른 배지보다 상대적으로 균생육이 우수하였다(Table 9).

또한 초기수분함량에 따른 배양실험 결과(Table 10, Table 11), 쌀겨배지에서는 40 ~ 50%에서 별다른 유의성이 없었으나, 밀기울배지에서는 55%보다 60%에서 균사생장 및 포자형성이 우수하였다. 싸래기배지에서는 수분 40%가 50%에 비해 배양상태가 양호한 것으로 나타났다(Table 10, Table 11). 이때 배양 8일째의 포자밀도를 조사한 결과(Table 11) 28℃에서 배양한 경우가 대체로 성장이 좋았으며, 모든 배지 조성에서 gram당 1.0×10^8 개 이상의 높은 포자가 형성되었다.

Table 8. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on the different solid media.

Media \ Culture time(days)	0	2	4	6	8	10	12
Rice bran	0	0.5	1.0	2.5	3.0	4.0	5.0
Rice bran + sawdust	0	1.0	3.5	4.5	4.8	4.9	5.0
Rice bran + wheat bran	0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0	3.5
Wheat bran	0	0.5	2.0	2.6	3.0	3.7	4.5
Crushed rice	0	1.0	2.5	2.8	3.5	3.8	4.0

*, Symbols denote the relative evaluation of mycellial growth and spore formation as numbers; $0 < 1 < 2 < 3 < 4 < 5$.

Table 9. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on the different culture temperatures and media.

Media/Culture temp. \ Culture time(days)	0	2	4	6	8	10	12	
Rice bran	24°C	0	0.5	1.0	1.2	1.5	2.0	2.5
	28°C	0	0.5	1.0	2.5	3.0	4.0	5.0
Wheat bran	24°C	0	0.5	2.0	2.1	2.3	2.5	4.0
	28°C	0	0.5	2.0	2.6	3.0	3.7	4.5
Crushed rice	24°C	0	0.7	1.0	3.0	3.2	3.5	3.5
	28°C	0	1.0	2.5	2.8	3.5	3.8	4.0

*, Symbols denote the relative evaluation of mycellial growth and spore foramation as numbers; $0 < 1 < 2 < 3 < 4 < 5$.

Table 10. Relative evaluation of mycellial growth and spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on the different initial humidities and media.

Medium / Humidity(%)		Culture time(days)						
		0	2	4	6	8	10	12
Rice bran	40	0	0.5	1.0	2.5	3.0	4.0	5.0
	45	0	0.5	1.0	2.5	4.0	4.0	5.0
	50	0	0.0	1.0	2.5	4.0	4.0	5.0
Wheat bran	55	0	0.5	1.0	1.4	2.7	2.7	3.0
	60	0	0.5	2.0	2.6	3.7	3.7	4.5
Crushed rice	40	0	0.7	1.0	3.0	3.5	3.5	3.5
	50	0	0.8	1.2	2.0	2.5	2.5	2.5

*. Symbols denote the relative evaluation of mycellial growth and spore foramtion as numbers; $0 < 1 < 2 < 3 < 4 < 5$.

Table 11. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia growing at various media after 8-days culture.

Media / Culture temp.	No. of conidia(1.0×10^8 /gram)	
Rice bran	24°C	2.7
	28°C	40
Rice bran + wheat bran	24°C	7.3
	28°C	41
Rice bran + sawdust	24°C	12
	28°C	26
Wheat bran	24°C	7.0
	28°C	18
Crushed rice	24°C	1.6
	28°C	14.4

라. 최적화 조건에서 인산가용화균의 고체대량생산 :

이상에서와 같이 배지조성, 배지량, 배양온도, 수분함량, 배양용기 및 배양기기 등을 달리한 다양한 시험조건에서의 고체배양 결과를 토대로 하여 고체 대량배양을 위한 최적화 조건을 아래의 Table 12와 같이 결정하였다. 결정된 최적화 조건에서 100kg 이상의 대량 고체배양시에도 최소한 1.0×10^8 /g media 이상의 분생포자가 생성되는 지를 확인한 결과 Fig. 1의 결과와 같이 일주일 이내에 목표포자수의 10배 이상을 성공적으로 획득하였으며, 배양시간이 경과할수록 포자수는 계속 증가하여 1.0×10^{10} /g media 이상의 포자획득도 가능함을 알 수 있었다.

Table 12. Optimum solid mass culture conditions for the mass cultivation of *Penicillium* sp. PS-113.

Variable for the mass culture	Optimum condition
Media composition	Rice bran
Culture vessel	Tray type
Culture temp.	28°C
Water content	50%
Oxygen requirement	aerobic
Inoculum	1.0×10^5 conidia/g media
Instrument	Closed system

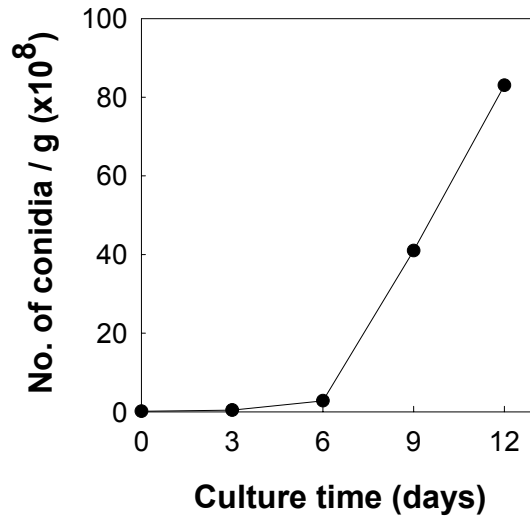


Fig. 1. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during mass culture on rice bran solid media.

마. 증량제 첨가에 의한 포자형성 조건의 최적화 :

증량제로서 황토를 이용하여 인산가용화균의 고체배양시 포자형성에 미치는 효과를 규명하였다. 옥수수, 고두밥, 쌀겨, 퇴비와 같은 고체배지에 최종농도가 4%(w/w)가 되도록 황토를 첨가하여 20일간 고체배양하면서 5일 간격으로 conidia 수를 결정하였다(Fig. 2 ~ Fig. 5). 그 결과 황토첨가에 의하여 포자형성 시간이 단축됨과 동시에 포자형성능이 촉진되어 배양 20일 경에 황토 첨가하지 않은 대조구에 비해 모든 곡물배지에서 포자수가 월등히 높은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-5). 옥수수배지의 경우 황토첨가시에는 대조구에 비해 포자형성능이 높아져서

40% 수분함량에서 최대 3.3×10^9 conidia/g의 포자형성능을 보였으며, 이것은 대조구에 비해 3배 이상 높은 값이 된다. 또한 50%의 수분함량에서도 황토첨가시 대조구에 비해 약 2배 정도, 60%에서는 1.2배 증가함을 알 수 있다(Fig. 2). 그리고 고두밥 배지에서도 황토첨가시 무처리구에 비해 포자형성이 1.6 ~ 4.6배 증가하였다. 즉 황토첨가시 40%의 수분함량에서 최대 4.2×10^9 conidia/g의 포자수를 보였으며, 이에 반해 대조구는 2.8×10^9 conidia/g의 포자수를 보였다(Fig. 3). 쌀겨의 경우에도 황토첨가시 60% 수분함량에서 최대 5.6×10^9 conidia/g(대조구: 5.3×10^9 conidia/g)의 포자수를 보였다. 그러나 이것은 대조구에 비해 포자수는 많지만 다른 배지에 비해서는 상대적으로 그 차이가 미미함을 알 수 있다.

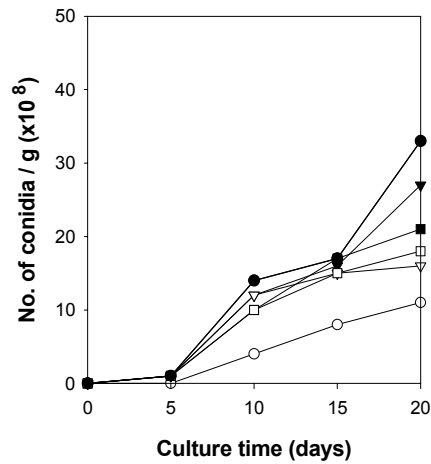


Fig. 2. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia culturing on corn solid media supplemented with(closed symbols) or without(open symbols) loess at various humidities. ●-● and ○-○, 40% humidities; ▼-▼ and ▽-▽, 50% humidities; ■-■ and □-□, 60% humidities.

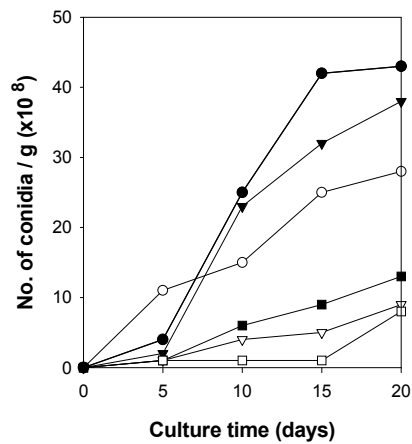


Fig. 3. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia culturing on rice-cooked solid media supplemented with(closed symbols) or without(open symbols) loess at various humidities. ●-● and ○-○, 40% humidities; ▼-▼ and ▽-▽, 50% humidities; ■-■ and □-□, 60% humidities.

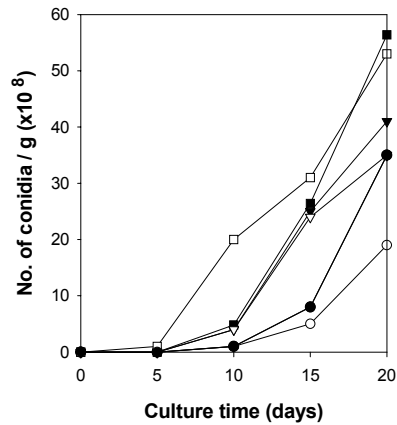


Fig. 4. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia culturing on rice bran solid media supplemented with(closed symbols) or without(open symbols) loess at various humidities. ●-● and ○-○, 40% humidities; ▼-▼ and ▽-▽, 50% humidities; ■-■ and □-□, 60% humidities.

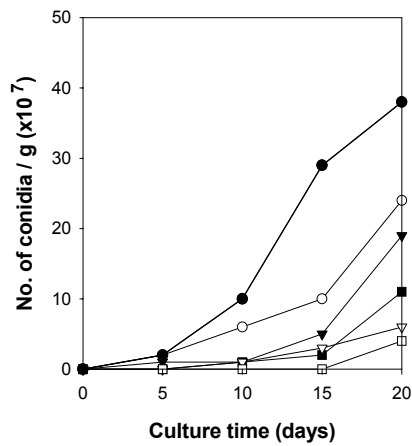


Fig. 5. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia culturing on compost solid media supplemented with(closed symbols) or without(open symbols) loess at various humidities. ●-● and ○-○, 40% humidities; ▼-▼ and ▽-▽, 50% humidities; ■-■ and □-□, 60% humidities.

바. 각종 첨가제를 이용한 포자형성 촉진물질 탐색 :

1) 각종 유기물의 첨가에 따른 인산가용화균의 포자형성 촉진효과 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자형성 촉진을 위하여 유기물로서 vitamin complex, glucose, 당밀, soybean extract를 각각 1.0%씩 첨가하여 28℃에서 배양하면서 3일 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서 포자수를 측정하였다 (Fig. 6). 실험의 정확도를 높이기 위하여 시료수를 최소 3회 이상 반복하였다. 그 결과 vitamin complex를 첨가한 경우가 포자 형성능이 가장 우수하였으며 대조구에 비해 무려 4배 이상 포자를 많이 형성하는 것으로 확인되었다. 그러나 당밀은 대조구에 비해 1/100 수준으로 오히려 포자형성이 억제됨을 확인하였다.

2) Ca^{2+} 및 SDS의 첨가에 따른 인산가용화균의 포자형성 촉진효과 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자형성 촉진을 위하여 Ca^{2+} 와 SDS를 각각 첨가하여 28℃에서 배양하면서 3일 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정하였다(Fig. 7). 그 결과 Ca^{2+} 과 SDS첨가구는 대조구와 큰 차이가 없었으므로 이들에 의한 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자형성 촉진효과가 거의 없는 것으로 나타났다.

3) 점토광물류의 첨가에 따른 인산가용화균의 포자형성 촉진효과 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자형성을 위하여 점토광물(황토, zeolite, bentonite, bio-ceramic)을 첨가하여 28℃에서 배양하면서 3일 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정하였다. 그 결과(Fig. 8) 황토와 zeolite를 첨가한 경우 각각 4배, 2배 포자 형성능이 촉진되었으나 bentonite와 bio-ceramic은 포자형성이 오히려 억제되었다.

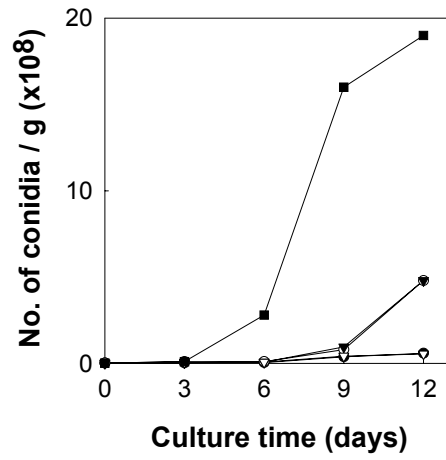


Fig. 6. Effect of organic additives on the spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 28°C. Symbols denote ○-○; control, ●-●; soybean extract, ▼-▼; glucose, ▽-▽; molasses, ■-■; vitamin complex.

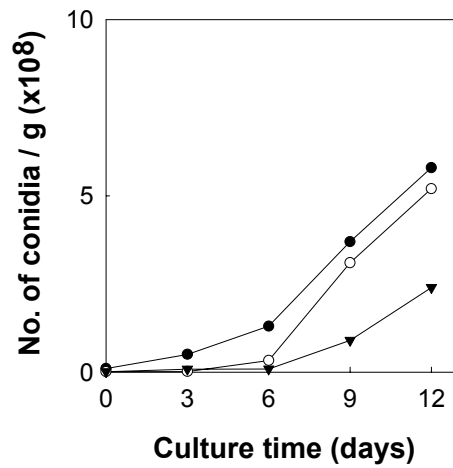


Fig. 7. Effect of Ca²⁺ and SDS on the spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 28°C. Symbols denote ●-●; control, ○-○; Ca²⁺, ▼-▼; SDS.

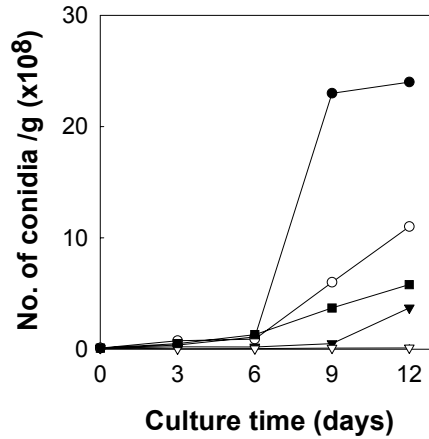


Fig. 8. Effect of soil additives on the spore formation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 28°C. Symbols denote ■-■; control, ○-○; zeolite, ●-●; loess, ▼-▼; bentonite, ▽-▽; bio-ceramic.

3. 인산가용화균의 액체대량배양 최적화 :

가. 액체배양시 최적 균체생산을 위한 배양조건 확립 :

인산가용화균의 대량 액상배양을 위해서 쌀겨, 쌀겨 추출물, 밀기울, 당밀 등의 값싼 배지를 이용하여 배지를 제조한 후 최적 발효공정을 확립하였다. 먼저 1차년도 전반기에는 1L 발효조에서 배양조건 실험을 수행하였으며, 1차년도 후반기에는 200L 대형 발효조를 이용하여 scale-up 실험을 수행하였다. 먼저 1L 발효조 배양에서는 3%의 고형물을 함유한 각각의 배지를 600ml씩 발효조에 채운다음 121°C 에서 30분간 멸균하였다. 균체 배양을 위한 배양온도는 28°C이며, agitation 속도는 150rpm, 초기 접종량은 1.0×10^4 conidia/ml 이었다. 그 결과(Fig. 9) 쌀겨배지에서 가장 우수한 균체성장을 보였으며, 이것은 사상균 배지로 잘 알려진 PDB배지보다 더 좋은 결과였다. 균체량의 측정은 10ml의 배양액을 취하여 2,000rpm에서 20분간

원심분리한 후 생성되는 침전물의 부피를 측정하여 상대적인 값으로 표시하였다. 즉 상대적인 균체량(%) = (침전물의 부피/배양액 10ml - 배지원액 침전물/배지원액 10ml)×100으로 계산하였다.

한편 Fig. 10과 Fig. 11에서는 쌀겨와 밀기울의 첨가량을 달리하여 배양실험을 실시하였다. 그 결과 1~3%의 쌀겨를 함유한 배지가 가장 좋은 것으로 판명되었다.

또한 Fig. 12에서는 쌀겨배지에 0.1%의 유기성 질소원(yeast extract, peptone, soybean meal)을 첨가하여 그 효과를 분석하였다. 그러나 질소원 첨가효과는 거의 없는 것으로 확인되었다.

이상의 다양한 기초실험 결과를 토대로 하여 200L 대형 발효조를 이용한 액체배양 조건을 설정하였다. 최적 발효조건은 배지는 3.0% 쌀겨배지이며, 배양온도는 28℃, agitation 속도는 200rpm, 초기접종량은 1.0×10^6 conidia/ml, 공기 주입량은 70 L/min이었다. 이와 같은 조건에서 200L 발효조에 170L의 배지를 채우고 대량액체 배양을 실시한 결과(Fig. 13), 36시간만에 최적 균체량에 도달하였다. 이와 같은 결과는 1L 발효조에서 3~4일간 배양시 도달할 수 있는 균체량으로 배양시간을 1/3로 단축하였으며, 거품발생이 전혀 없었으며, 또한 mycelial pellet도 형성되지 않았으므로 성공적인 액체 대량배양 기술이 완성되었음을 알 수 있다.

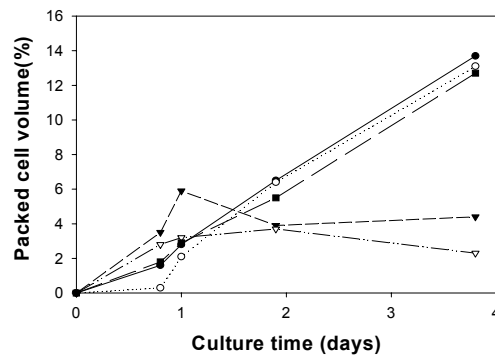


Fig. 9. Relative biomass during the submerged culture of *Penicillium* sp. PS-113 at various media. Symbols denote ●-●, rice bran; ○-○, rice bran extract; ■-■, PDB; ▼-▼, wheat bran; ▽-▽, molasses.

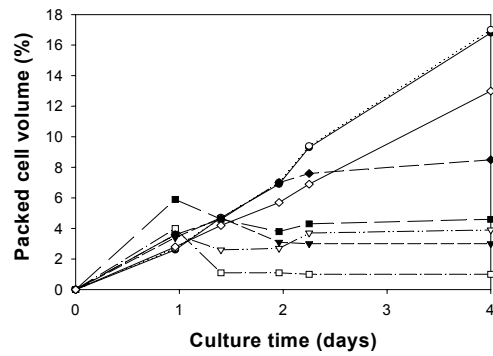


Fig. 10. Relative biomass during the submerged culture of *Penicillium* sp. PS-113 at various medium compositions. Symbols denote ●-●, 1% rice bran; ○-○, 3% rice bran; ▼-▼, 5% rice bran; ▽-▽, 1% wheat bran; ■-■, 3% wheat bran; □-□, 5% wheat bran; ◆-◆, 2:1 mixture of rice bran and wheat bran; ◇-◇, PDB.

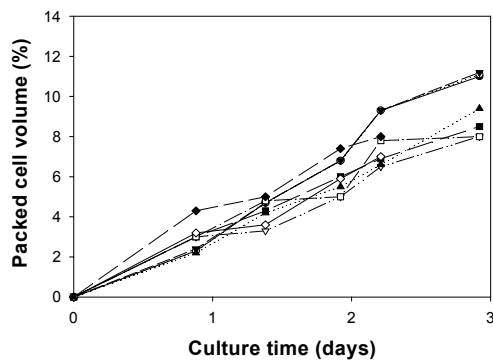


Fig. 11. Relative biomass during the submerged culture of *Penicillium* sp. PS-113 at various medium compositions. Symbols denote ●-●, 1% rice bran; ○-○, 2% rice bran; ▼-▼, 3% rice bran; ▽-▽, 1:1 mixture of rice bran and wheat bran; □-□, 2:1 mixture of rice bran and wheat bran; ■-■, 3:1 mixture of rice bran and wheat bran; ▲-▲, PDB.

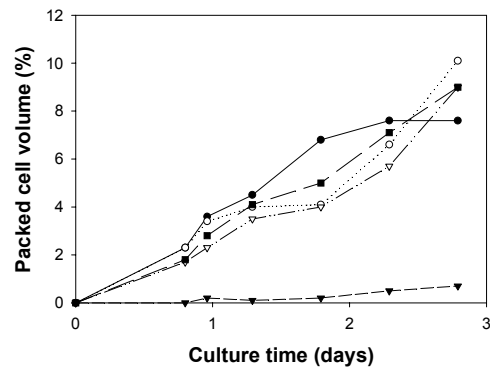


Fig. 12. Relative biomass during the submerged culture of *Penicillium* sp. PS-113 at various medium composition. Symbols denote ○-○, 3% rice bran; ●-●, 3% rice bran supplemented with 0.1% soybean meal; ▽-▽, 3% rice bran supplemented with 0.1% yeast extract; ▼-▼, 3% rice bran supplemented with 0.1% peptone; ■-■, PDB.

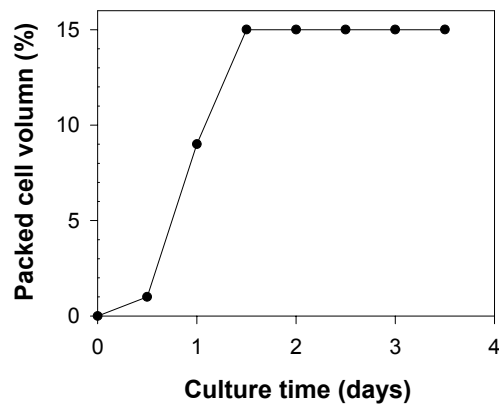


Fig. 13. Relative biomass during the 200L-scale mass culture of *Penicillium* sp. PS-113 in the submerged culture.

나. Mycellial pellet size를 최소화 할 수 있는 기술 개발 :

유리인산 생성균 *Penicillium* sp. PS-113의 액침배양시 가장 큰 문제로 대두되는 mycelial pellet 형성을 억제하기 위한 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 배지 종류, 분생포자의 초기접종농도 및 zeolite, diatomite, bentonite와 같은 점토광물 등을 배지에 첨가하여 pellet 감소에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과(Fig. 14 ~ Fig. 15 and Table 13 ~ Table 16) 이 균주는 PDB, SBD, YPD 배지중 PDB 배지에서 가장 작은 pellet을 형성하였다(Table 13). 또한 이 균주는 분생포자의 초기접종농도가 높을수록, 그리고 점토광물인 zeolite와 diatomite의 농도가 높을수록 pellet 크기가 감소하였다. 특히 PEG 200을 첨가하였을 때 $0.2\pm 0.1\text{mm}$ 로 pellet 크기가 가장 작았으며, 이는 대조군에 비하여 1/20의 크기였다.

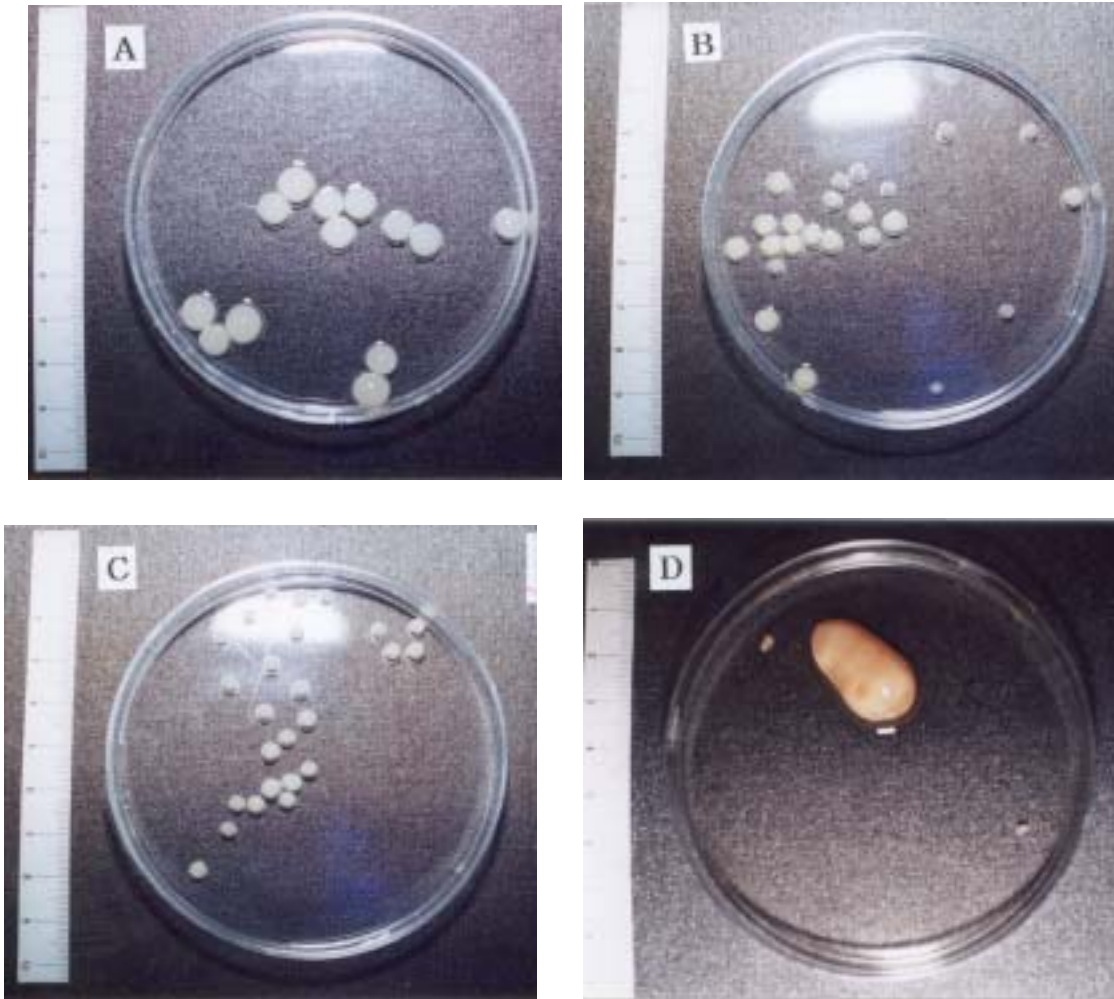


Fig. 14. Photographs showing the mycelial pellet of *Penicillium* sp. PS-113 cultured in PDB media supplemented with various soil additives. A, control; B, 1.0% zeolite; C, 1.0% diatomite; D, 1.0% bentonite.



Fig. 15. Photographs showing the mycelial pellet of *Penicillium* sp. PS-113 cultured in PDB media supplemented with PEG 200. A, control ; B, 1.0% PEG 200.

Table 13. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. PS-113 at different media.

Media	Pellet diameter(mm)
PDB	4.9 ± 0.3
YPD	6.5 ± 0.3
SDB	5.8 ± 0.3

*. Culture conditions : 150rpm, 25°C ; media volume : 30ml.

Table 14. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. PS-113 at various initial inocula in PDB medium.

Conc. of an inoculum (conidia/ml)	Pellet diameter(mm)
1×10^3	55 ± 0.5
1×10^4	4.5 ± 0.3
1×10^5	3.3 ± 0.1
1×10^6	2.9 ± 0.1

*. Culture conditions : 150rpm, 25°C ; media volume : 30ml.

Table 15. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. PS-113 at the various concentrations of soil additives in PDB medium.

Soil additives	Pellet diameter(mm)
Zeolite(%)	
0	4.9 ± 0.3
0.1	6.9 ± 0.5
0.5	5.5 ± 0.3
1.0	2.7 ± 0.1
Diatomite(%)	
0	4.9 ± 0.3
0.1	2.7 ± 0.1
0.5	2.4 ± 0.1
1.0	3.6 ± 0.2
Bentonite(%)	
0	4.9 ± 0.3
0.1	3.0 ± 0.3
0.5	6.0 ± 0.5
1.0	10.0 ± 0.8

*. Default conditions : 150rpm, 25°C, 8.6×10^5 spores/ml PDB medium.

Table 16. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium sp.* PS-113 at the various concentrations of surfactants(SDS, Tween 80 and Triton X-100) and PEG 200 in PDB medium.

Surfactants and PEG 200	Pellet diameter(mm)
SDS(%)	4.9 ± 0.3
0	no growth
0.01	no growth
0.1	no growth
1.0	no growth
Tween 80(%)	4.9 ± 0.3
0	1.8 ± 0.1
0.01	1.2 ± 0.1
0.1	2.3 ± 0.2
1.0	
Triton X-100(%)	4.9 ± 0.3
0	0.9 ± 0.1
0.01	0.5 ± 0.1
0.1	1.5 ± 0.1
1.0	
PEG 200(%)	4.9 ± 0.3
0	2.0 ± 0.1
0.01	0.6 ± 0.05
0.1	0.2 ± 0.05
1.0	

*. Default conditions : 150rpm, 25°C, 8.6×10^5 spores/ml PDB medium.

4. 젖산균의 대량생산을 위한 발효공정 최적화 :

젖산균은 lactic acid, acetic acid 등의 유기산을 생성하여 인광석, hydroxyapatite, aluminium phosphate 등의 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있다. 본 연구팀이 확보하고 있는 8종의 다양한 유산균을 대상으로 인산가용화능을 검정한 결과 40 ppm정도의 유리인산 생성능을 보였다. 이것은 본 연구의 공시균주인 인산가용화 사상균 *Penicillium sp.* PS-113의 1/10 수준의 인산가용화능으로서 인산가용화능은 다소 떨어지지만, 식물이 필요로하는 각종 유기산을 공급하는 효과

가 크므로 인산가용화균과의 혼용사용을 통한 상승효과를 줄 것으로 기대된다. 이 중에서 특히 *Lactobacillus plantarum*은 500 Liter의 대량배양에서도 1 ~ 2일 이내의 빠른 시간에 ml 당 $1.0 \times 10^9 \sim 10^{10}$ 정도의 최대균체수를 보여주었다. 이 균주의 공업적 생산을 위한 배지조성 및 최적배양온도, 최적배양 pH 등에 대해서 이미 '99년말에 자체연구가 완료되어 유산균 단독으로 (주)흙살림에서 판매되고 있다. 따라서 본 연구보고서에서는 기업의 기밀유지를 위하여 이 부분에 대해서는 결과보고를 생략하고자 한다. 그러나 2, 3년차 과제인 유산균과 인산가용화균의 혼용제제화 및 포장시험 등에 대한 연구결과는 보고하였다.

5. 난용성 인산염에 대한 인산 가용화능 검정 :

인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. PS-113의 rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite, tricalcium phosphate와 같은 난용성 인산염에 대한 인산가용화능을 측정한 결과 tricalcium phosphate > rock phosphate > aluminium phosphate ≥ hydroxyapatite 순서로 분해가 잘 되는 것으로 나타났다. 또한 이 균주의 질소원으로서 각각 potassium nitrate, sodium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium nitrate를 첨가한 후 배양하면서 난용성 인산염들에 대한 분해효율을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 16에 나타내었다.

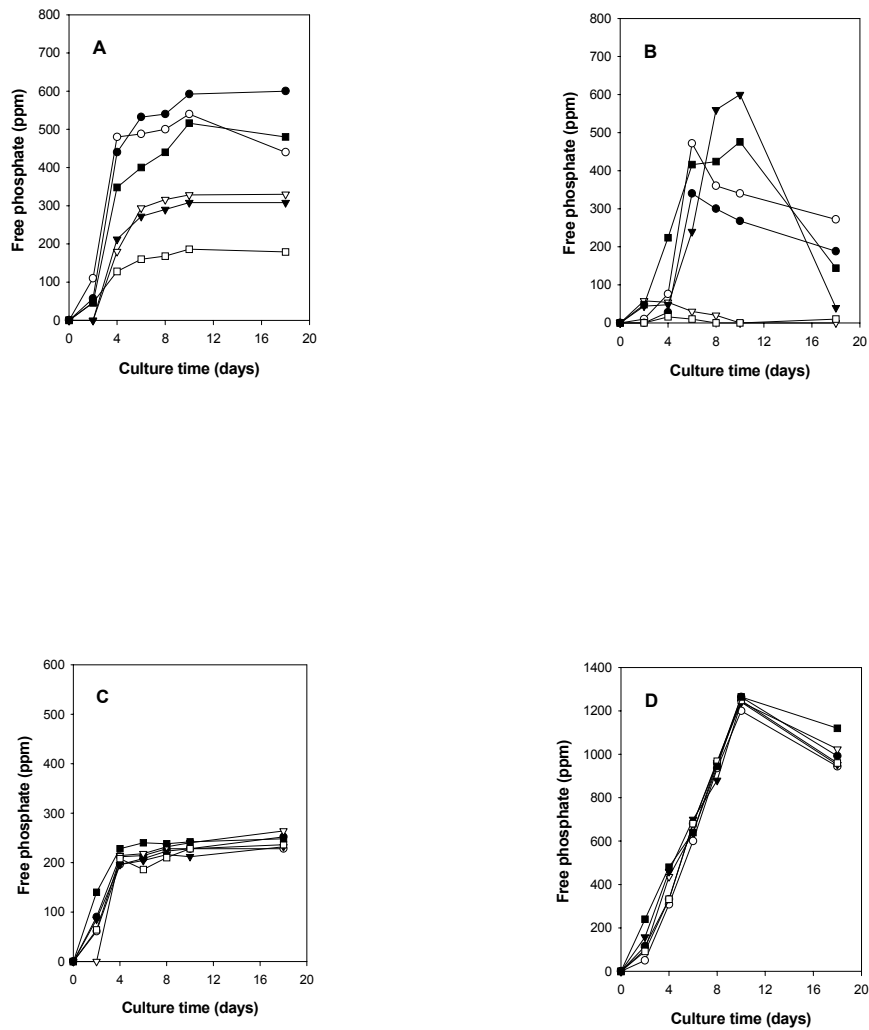


Fig. 16. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses. Symbols denotes ○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate, □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.

6. 인산가용화균의 생활력 유지에 미치는 첨가제의 영향 :

가. 계면활성제 농도에 따른 인산가용화균의 생활력 유지에 미치는 영향 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0%의 다양한 농도의 계면활성제(Tween 80, SDS, Triton X-100)를 첨가하여 상온(25℃)에서 보관한 후 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정하였다(Table 17 ~ Table 19, Fig. 17 ~ Fig. 19). 실험의 정확도를 높이기 위하여 시료와 plate수를 최소 4회 이상 반복하였다.

Tween 80의 경우 6개월 저장시 까지 0.001~1.0%의 첨가구에서 균의 생활력이 10배 정도 증가하였다(Table 17, Fig. 17). SDS의 경우도 마찬가지로 6개월 저장시 0.001~1.0% 첨가구에서 균의 활력이 10배 정도 증가하였다(Table 18, Fig. 18). Triton X-100의 경우 6개월 저장시 0.001~1.0%의 첨가구에서 균의 생활력이 3~6배 증가하였다(Table 19, Fig. 19).

이상의 결과를 종합하면 계면활성제(Tween 80, SDS, Triton X-100)를 0.001~1.0% 범위까지 첨가하여 6개월 이상 장기보존하면 균의 생활력이 크게 증가함을 알 수 있다.

나. 점토광물의 농도에 따른 균의 생활력 유지에 미치는 영향 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 고두밥, 밀, 보리, 쌀겨, 옥수수 등의 다양한 배지에서 배양한 균체를 증량제로서 점토광물(diatomite, bentonite, zeolite)을 1:9의 비율로 첨가하여 4℃와 25℃에서 보관한 후 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정하였다(Table 20 ~ Table 25, Fig. 20 ~ Fig. 25). 실험의 정확도를 높이기 위하여 시료와 plate수를 최소 4회 이상 반복하였다.

그 결과 4℃에서 6개월간 저장했을 때는 배지 및 점토광물의 종류에 관계없이 100%의 생활력을 보였다. 그러나 25℃에서는 4℃에 비해 생활력이 낮았으며, 규조토를

증량제로 사용했을 경우 6개월까지 저장했을 때 50 log%의 포자생존율을 보였다 (Table 23, Fig. 23). 그리고 Bentonite와 zeolite의 경우에는 상온에 저장할 경우 4개월 이내에 균의 생활력이 완전히 상실되었다(Table 20 ~ Table 22, Fig. 20 ~ Fig. 22).

이상의 결과를 종합하여 보면 증량제로서 규조토를 첨가하는 것이 가장 우수하였으며, 적절한 온도관리만 해주어도 인산가용화균의 포자는 1년 이상 장기저장 및 유통이 가능하다는 것을 알 수 있다.

한편 상용화를 위해서는 상온에서 6개월 이상 저장 및 유통하는 것이 매우 유리하므로 이 조건에서 균의 생활력 유지가 필수적이다. 이를 위하여 계면활성제, 각종 유기물, 미량원소 등의 첨가제를 이용한 균의 생활력 향상 연구에 연구력을 집중하였다.

다. 각종 유기물의 농도에 따른 균의 생활력 유지에 미치는 영향 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 다양한 농도의 유기물(PEG 200, glycerol, 식용유, 종합 vitamin, glucose, 설탕, 당밀, Bio-ceramics)을 첨가하여 25°C에서 보관한 후 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정하였다(Table 26 ~ Table 33, Fig. 26 ~ Fig. 33). 실험의 정확도를 높이기 위하여 시료와 plate수를 최소 4회 이상 반복하였다. Fig. 26의 결과에 의하면 PEG 200의 경우 6개월 저장시 0.1%의 첨가구에서 대조구에 비해 10배 이상 균의 생활력이 증가하였다. Glycerol의 경우(Fig. 27) 2.5-3.0배, 식용유, glucose, diatomite, 당밀, 설탕 및 bio-ceramic의 경우 0.01~5.0%의 첨가구에서 1.5 ~ 2배 가량 균의 생활력이 증가하였다.

이상의 결과를 종합하면 유기물 중에서는 PEG 200을 0.1% 첨가하였을 때가 장기보존시 가장 우수함을 확인하였다.

라. 미량원소의 농도에 따른 균의 생활력 유지에 미치는 영향 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 다양한 농도의 2가 금속이온(Ca^{2+} , Mo^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+})을 첨가

하여 25℃에서 보관한 후 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서의 균수를 측정하였다(Table 34 ~ Table 38, Fig. 34 ~ Fig. 38). 실험의 정확도를 높이기 위하여 시료와 plate수를 최소 4회 이상 반복하였다. Fig. 37의 결과에 의하면 6개월 저장시 1.0%의 Cu^{2+} 를 첨가했을 경우 대조구에 비해 약 25배 균의 생활력이 증가하였다. 그 외에도 Ca^{2+} , Mo^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} 의 첨가시에도 0.001~1.0% 첨가구에서 대체적으로 1.2~2.0배 정도 생활력이 증가하였다.

Table 17. Effect of Tween 80 as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Tween 80	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	3.5×10^{10}	3.5×10^{10}	8.4×10^8	7.7×10^7	6.3×10^7	3.1×10^6	2.0×10^2
	0.01 %	3.0×10^{10}	3.5×10^{10}	8.1×10^8	6.5×10^7	5.2×10^7	2.7×10^6	2.0×10^2
	0.1 %	3.5×10^{10}	3.5×10^{10}	5.6×10^8	7.2×10^7	6.0×10^7	3.2×10^6	2.0×10^2
	1.0 %	5.0×10^{10}	3.5×10^{10}	5.5×10^8	5.5×10^7	4.2×10^7	2.1×10^6	0

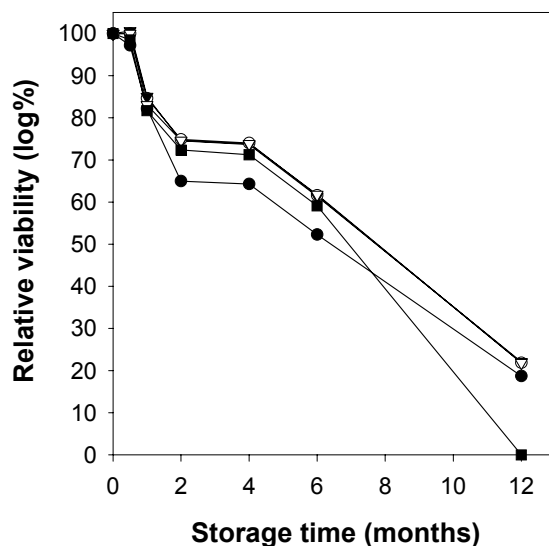


Fig. 17. Effect of Tween 80 on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C . ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 18. Effect of SDS as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
SDS	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	7.5×10^{10}	3.0×10^{10}	6.1×10^8	6.6×10^7	5.2×10^7	2.7×10^6	0
	0.01 %	5.0×10^{10}	3.5×10^{10}	6.2×10^8	1.2×10^8	8.8×10^7	4.6×10^6	3.0×10^2
	0.1 %	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.8×10^8	7.7×10^7	6.2×10^7	3.0×10^6	0
	1.0 %	4.0×10^{10}	3.5×10^{10}	1.1×10^9	6.4×10^7	5.1×10^7	2.7×10^6	0

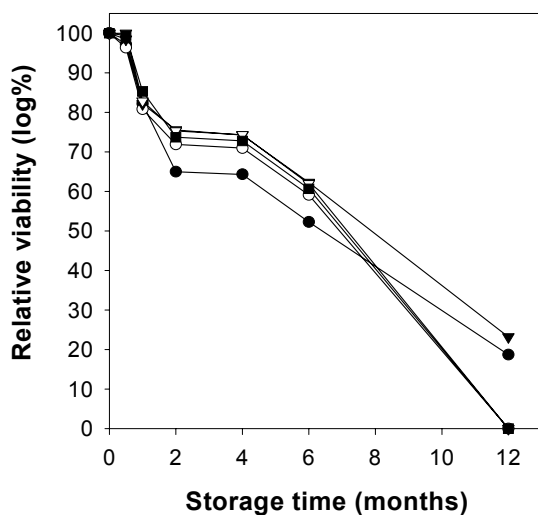


Fig. 18. Effect of SDS on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C . ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 19. Effect of Triton X-100 as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Triton X-100	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	4.5×10^{10}	5.0×10^{10}	7.6×10^8	6.6×10^7	4.8×10^7	2.4×10^6	0
	0.01 %	3.5×10^{10}	3.0×10^{10}	9.4×10^8	5.4×10^7	3.8×10^7	1.9×10^6	0
	0.1 %	6.0×10^{10}	4.0×10^{10}	7.6×10^8	3.6×10^7	1.9×10^7	1.2×10^6	2.0×10^2
	1.0 %	5.5×10^{10}	3.5×10^{10}	7.6×10^8	5.5×10^7	4.2×10^7	2.5×10^6	0

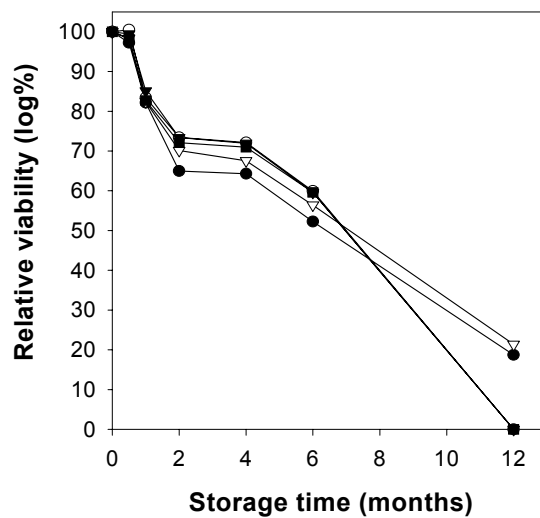


Fig. 19. Effect of Triton X-100 on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C . ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 20. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 4°C in diatomite as an additive .

Storage time Culture media	No. of conidia						
	0 (Control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Rice	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9
Barly	2.1×10^{10}	2.1×10^{10}	2.1×10^{10}	2.1×10^{10}	2.1×10^{10}	2.1×10^{10}	2.1×10^{10}
Wheat	6.8×10^{10}	6.8×10^{10}	6.8×10^{10}	6.8×10^{10}	6.8×10^{10}	6.8×10^{10}	6.8×10^{10}
Corn	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}
Rice bran	6.3×10^{10}	6.3×10^{10}	6.3×10^{10}	6.3×10^{10}	6.3×10^{10}	6.3×10^{10}	6.3×10^{10}

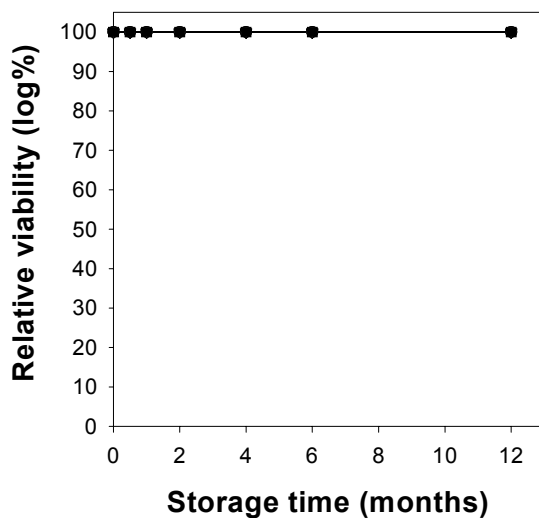


Fig. 20. Effect of the diatomite on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 4°C. ●—●; rice, ○—○; barley, ▼—▼; wheat, ▽—▽; corn, ■—■; rice bran.

Table 21. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 4°C in bentonite as an additive.

Storage time Culture media	No. of conidia						
	0 (Control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Rice	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}
Barly	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}
Wheat	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}
Corn	2.2×10^{10}	2.2×10^{10}	2.2×10^{10}	2.2×10^{10}	2.2×10^{10}	2.2×10^{10}	2.2×10^{10}
Rice bran	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9

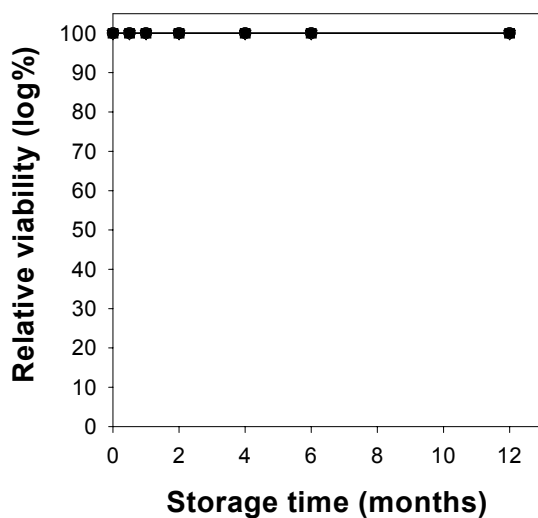


Fig. 21. Effect of the bentonite on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 4°C. ●—●; rice, ○—○; barley, ▼—▼; wheat, ▽—▽; corn, ■—■; rice bran.

Table 22. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 4°C in zeolite as an additive.

Storage time Culture media	No. of conidia						
	0 (Control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Rice	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}	6.1×10^{10}
Barly	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}
Wheat	4.8×10^{11}	4.8×10^{11}	4.8×10^{11}	4.8×10^{11}	4.8×10^{11}	4.8×10^{11}	4.8×10^{11}
Corn	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}
Rice bran	4.9×10^{10}	4.9×10^{10}	4.9×10^{10}	4.9×10^{10}	4.9×10^{10}	4.9×10^{10}	4.9×10^{10}

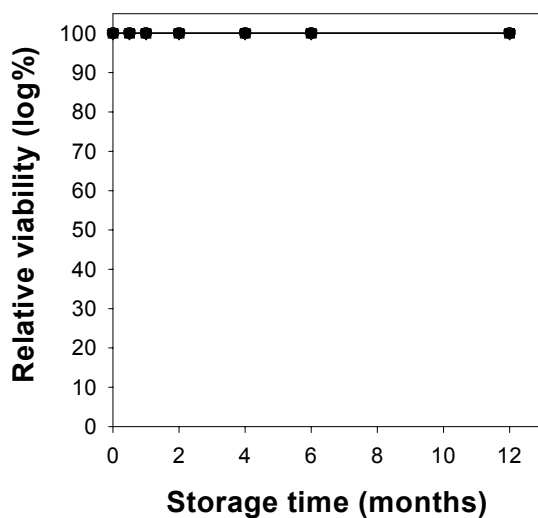


Fig. 22. Effect of the zeolite on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 4°C. ●—●; rice, ○—○; barley, ▼—▼; wheat, ▽—▽; corn, ■—■; rice bran.

Table 23. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C in diatomite as an additive.

Storage time Culture media	No. of conidia						
	0 (Control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Rice	5.0×10^9	5.0×10^9	4.4×10^9	8.0×10^8	4.0×10^8	8.0×10^5	2.0×10^4
Barly	2.1×10^{10}	1.5×10^{10}	1.0×10^{10}	9.2×10^9	9.0×10^8	1.6×10^6	0
Wheat	6.8×10^{10}	2.1×10^{10}	4.0×10^9	2.8×10^9	1.4×10^8	8.0×10^5	0
Corn	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}	1.4×10^{10}	1.1×10^{10}	7.2×10^8	4.0×10^5	0
Rice bran	6.3×10^{10}	3.8×10^{10}	5.2×10^9	2.8×10^9	1.0×10^9	4.0×10^8	3.1×10^6

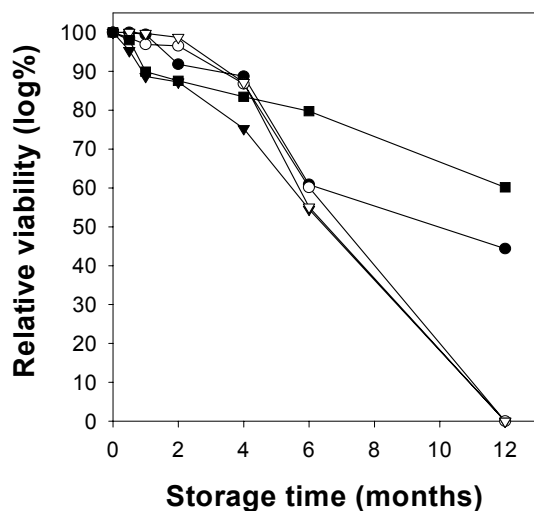


Fig. 23. Effect of the diatomite on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; rice, ○—○; barley, ▼—▼; wheat, ▽—▽; corn, ■—■; rice bran.

Table 24. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C in bentonite as an additive.

Storage time Culture media	No. of conidia						
	0 (Control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Rice	3.8×10^{10}	1.2×10^9	2.8×10^7	4.0×10^6	0	0	0
Barly	6.1×10^{10}	2.0×10^8	1.6×10^6	0	0	0	0
Wheat	1.2×10^{11}	4.0×10^8	4.0×10^7	0	0	0	0
Corn	2.2×10^{10}	8.0×10^8	6.4×10^5	0	0	0	0
Rice bran	5.0×10^9	4.0×10^8	4.0×10^7	0	0	0	0

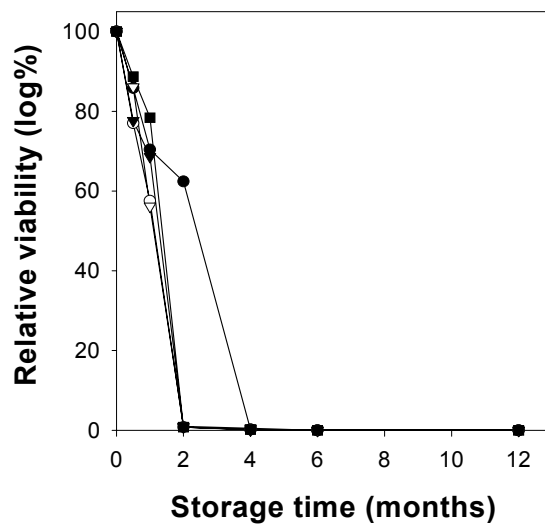


Fig. 24. Effect of the bentonite on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; rice, ○—○; barley, ▼—▼; wheat, ▽—▽; corn, ■—■; rice bran.

Table 25. Numbers of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C in zeolite as an additive.

Storage time Culture media	No. of conidia						
	0 (Control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Rice	6.1×10^{10}	2.4×10^8	0	0	0	0	0
Barly	1.5×10^{11}	4.0×10^8	0	0	0	0	0
Wheat	4.8×10^{11}	8.0×10^8	2.8×10^6	8.0×10^5	4.0×10^5	0	0
Corn	1.8×10^{10}	4.0×10^8	0	0	0	0	0
Rice bran	4.9×10^{10}	8.0×10^7	0	0	0	0	0

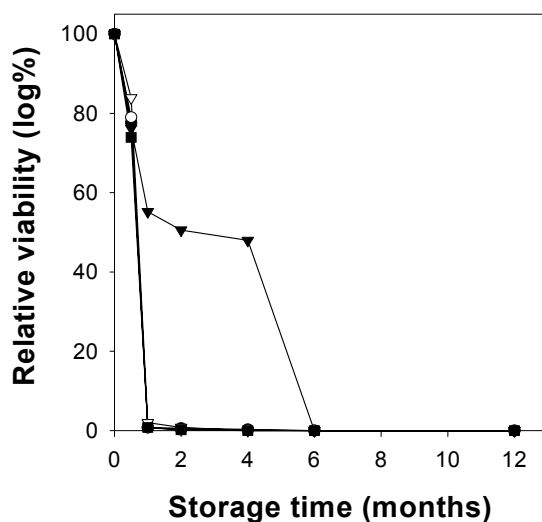


Fig. 25. Effect of the bentonite on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; rice, ○—○; barley, ▼—▼; wheat, ▽—▽; corn, ■—■; rice bran.

Table 26. Effect of PEG 200 as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
PEG 200	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.01 %	6.0×10^{10}	7.5×10^{10}	5.7×10^8	1.2×10^7	8.9×10^6	4.5×10^5	0
	0.1 %	3.5×10^{10}	3.0×10^{10}	9.4×10^8	6.7×10^7	5.6×10^7	2.5×10^6	0
	1.0 %	4.5×10^{10}	3.0×10^{10}	4.6×10^8	1.5×10^7	9.2×10^6	5.4×10^5	0
	5.0 %	4.5×10^{10}	3.0×10^{10}	6.3×10^8	3.1×10^7	1.8×10^7	6.4×10^5	3.0×10^2

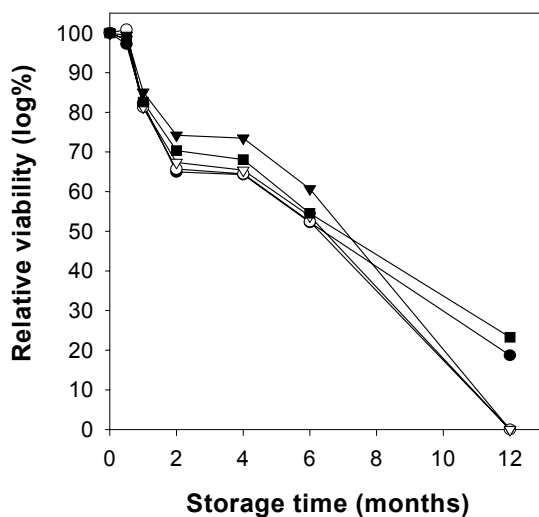


Fig. 26. Effect of PEG 200 on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.01%, ▼—▼; 0.1%, ▽—▽; 1.0%, ■—■; 5.0%.

Table 27. Effect of glycerol as an organic additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Glycerol	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.01 %	5.5×10^{10}	3.0×10^{10}	8.1×10^8	2.4×10^7	1.1×10^7	6.2×10^5	0
	0.1 %	4.5×10^{10}	3.5×10^{10}	8.2×10^8	3.2×10^7	1.8×10^7	1.0×10^6	0
	1.0 %	3.0×10^{10}	4.5×10^{10}	2.7×10^9	2.5×10^7	1.0×10^7	1.1×10^6	0
	5.0 %	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.1×10^9	2.6×10^7	1.2×10^7	1.2×10^6	3.0×10^2

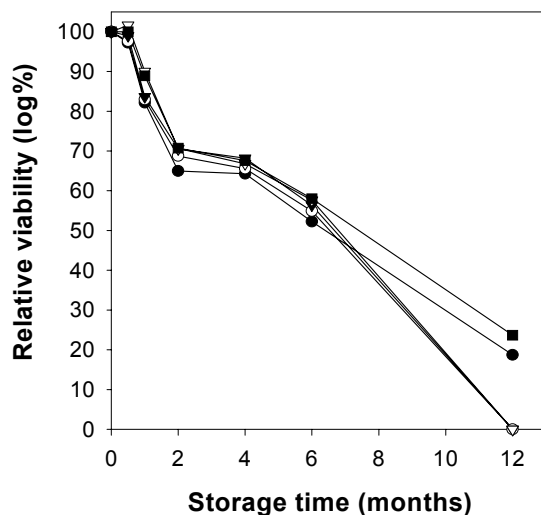


Fig. 27. Effect of glycerol as an organic additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.01%, ▼—▼; 0.1%, ▽—▽; 1.0%, ■—■; 5.0%.

Table 28. Effect of corn oil as an organic additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Corn oil	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.01 %	4.0×10^{10}	2.0×10^{10}	9.1×10^8	1.1×10^7	8.8×10^6	4.8×10^5	0
	0.1 %	3.0×10^{10}	3.5×10^{10}	1.3×10^9	1.6×10^7	9.1×10^6	5.2×10^5	0
	1.0 %	3.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.9×10^8	1.3×10^7	8.9×10^6	5.0×10^5	0
	5.0 %	4.0×10^{10}	4.0×10^{10}	7.0×10^7	1.2×10^7	8.8×10^6	4.9×10^5	0

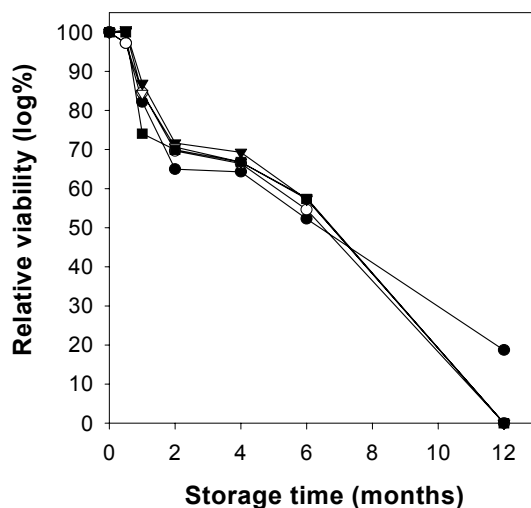


Fig. 28. Effect of corn oil as an organic additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.01%, ▼—▼; 0.1%, ▽—▽; 1.0%, ■—■; 5.0%.

Table 29. Effect of glucose as an organic additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Glucose	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.01 %	2.5×10^{10}	5.5×10^{10}	5.9×10^8	1.2×10^7	9.6×10^6	5.9×10^5	0
	0.1 %	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.3×10^8	2.1×10^7	1.0×10^7	7.3×10^5	0
	1.0 %	4.5×10^{10}	3.5×10^{10}	5.3×10^8	1.4×10^7	9.6×10^6	5.8×10^5	0
	5.0 %	5.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.2×10^8	1.5×10^7	1.0×10^7	6.7×10^5	8.0×10^2

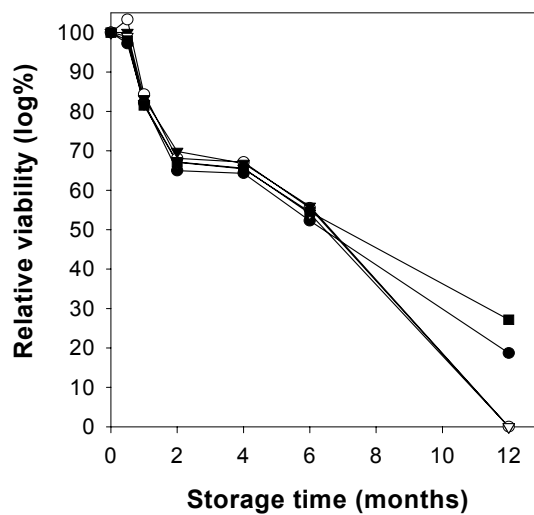


Fig. 29. Effect of glucose as an organic additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.01%, ▼—▼; 0.1%, ▽—▽; 1.0%, ■—■; 5.0%.

Table 30. Effect of vitamin complex as an organic additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Vitamin complex	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.4×10^8	2.4×10^7	1.2×10^7	6.4×10^5	2.0×10^2
	0.01 %	3.5×10^{10}	4.5×10^{10}	4.6×10^8	2.5×10^7	1.3×10^7	7.3×10^5	7.0×10^2
	0.1 %	3.0×10^{10}	4.5×10^{10}	4.4×10^8	1.2×10^7	9.3×10^6	5.6×10^5	6.0×10^2
	1.0 %	3.0×10^{10}	2.0×10^{10}	4.5×10^8	1.5×10^7	9.8×10^6	5.8×10^5	0

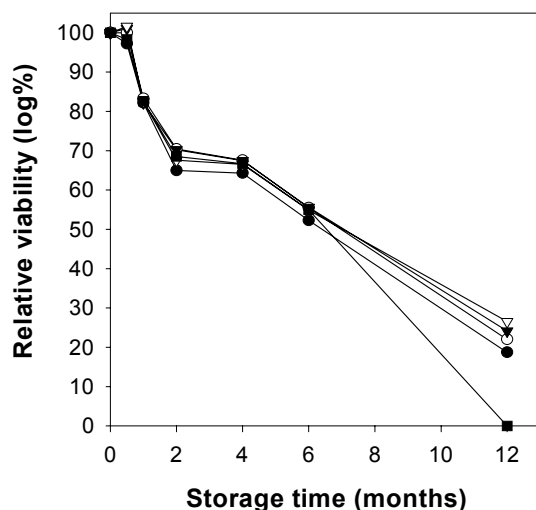


Fig. 30. Effect of vitamin complex as an organic additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 31. Effect of molasses as an organic additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Aditive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Mlasses	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.01 %	2.5×10^{10}	3.0×10^{10}	6.6×10^8	2.5×10^7	1.3×10^7	6.7×10^5	0
	0.1 %	4.5×10^{10}	3.0×10^{10}	6.5×10^8	2.7×10^7	2.0×10^7	1.1×10^6	0
	1.0 %	4.5×10^{10}	4.0×10^{10}	5.3×10^8	3.1×10^7	2.2×10^7	1.3×10^6	0
	5.0 %	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.0×10^8	3.3×10^7	1.8×10^7	1.0×10^6	0

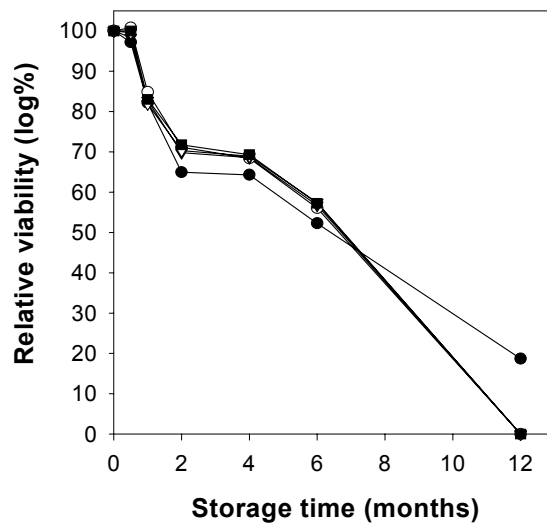


Fig. 31. Effect of molasses as an organic additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.01%, ▼—▼; 0.1%, ▽—▽; 1.0%, ■—■; 5.0%.

Table 32. Effect of sugar as an organic additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Sugar	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.01 %	4.5×10^{10}	3.5×10^{10}	5.9×10^8	2.4×10^7	1.5×10^7	8.8×10^5	0
	0.1 %	3.0×10^{10}	3.5×10^{10}	3.8×10^8	2.2×10^7	1.8×10^7	1.0×10^6	0
	1.0 %	3.5×10^{10}	3.0×10^{10}	6.5×10^8	1.2×10^7	1.0×10^7	7.3×10^5	0
	5.0 %	3.5×10^{10}	3.0×10^{10}	7.6×10^8	1.8×10^7	1.2×10^7	8.3×10^5	0

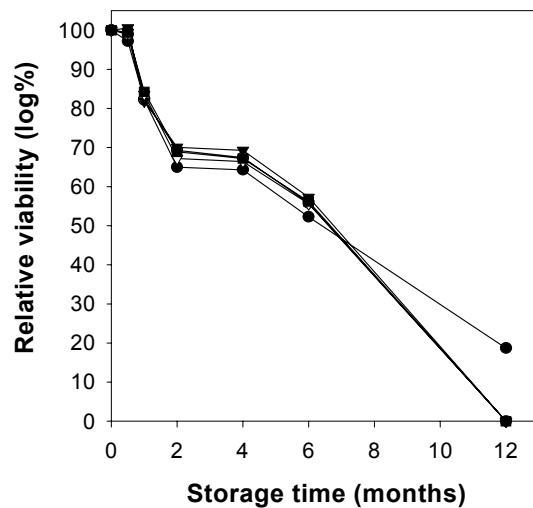


Fig. 32. Effect of sugar as an organic additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.01%, ▼—▼; 0.1%, ▽—▽; 1.0%, ■—■; 5.0%.

Table 33. Effect of bio-ceramics as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Bio-ceramics	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.1 %	3.5×10^{10}	3.0×10^{10}	1.6×10^9	2.4×10^7	1.8×10^7	1.0×10^6	0
	1.0 %	4.5×10^{10}	3.5×10^{10}	2.1×10^9	1.5×10^7	1.2×10^7	8.4×10^5	0
	10.0 %	3.5×10^{10}	2.3×10^9	2.0×10^8	1.6×10^7	1.0×10^7	8.0×10^5	0
	99.0 %	3.0×10^{10}	4.0×10^8	2.1×10^8	2.8×10^7	1.3×10^7	8.8×10^5	0

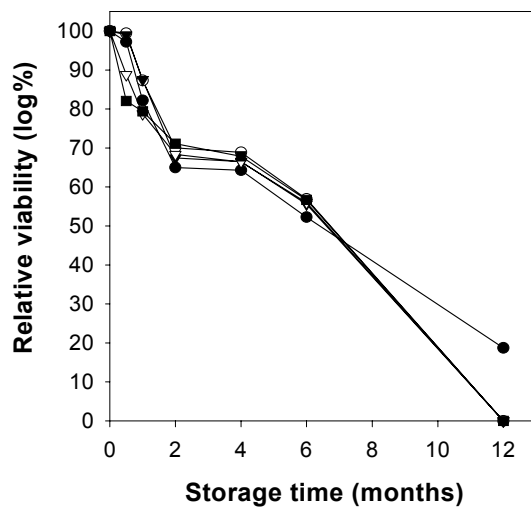


Fig. 33. Effect of bio-ceramics as an additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.1%, ▼—▼; 1.0%, ▽—▽; 10.0%, ■—■; 99.0%.

Table 34. Effect of Ca^{2+} ion as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Ca^{2+}	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	4.0×10^{10}	3.5×10^{10}	5.0×10^8	2.4×10^7	1.2×10^7	7.7×10^5	7.7×10^5
	0.01 %	4.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.7×10^8	2.8×10^7	1.6×10^7	8.3×10^5	8.3×10^5
	0.1 %	3.5×10^{10}	3.3×10^{10}	2.1×10^9	3.5×10^7	2.2×10^7	1.0×10^5	1.0×10^5
	1.0 %	3.0×10^{10}	3.5×10^{10}	4.5×10^9	2.7×10^7	1.5×10^7	8.5×10^5	8.5×10^5

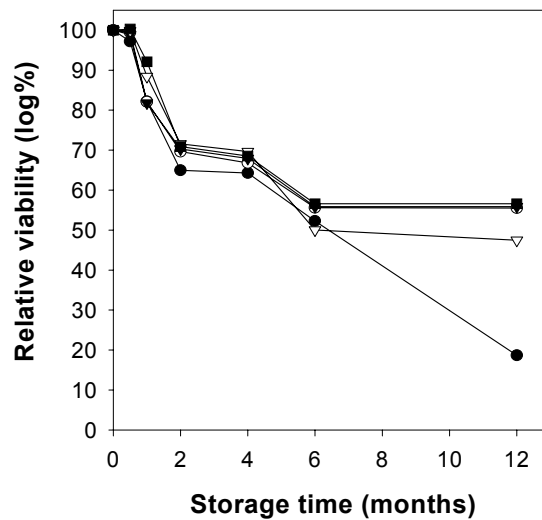


Fig. 34. Effect of Ca^{2+} ion as an additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 35. Effect of Mo^{2+} ion as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Mo^{2+}	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	5.0×10^{10}	3.0×10^{10}	1.6×10^9	1.5×10^8	9.7×10^7	5.3×10^5	0
	0.01 %	4.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.1×10^8	2.4×10^8	1.6×10^8	8.8×10^5	1.2×10^5
	0.1 %	4.5×10^{10}	2.5×10^{10}	5.2×10^8	9.9×10^7	7.6×10^7	4.2×10^5	0
	1.0 %	4.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.1×10^8	1.0×10^8	8.6×10^7	5.3×10^5	0

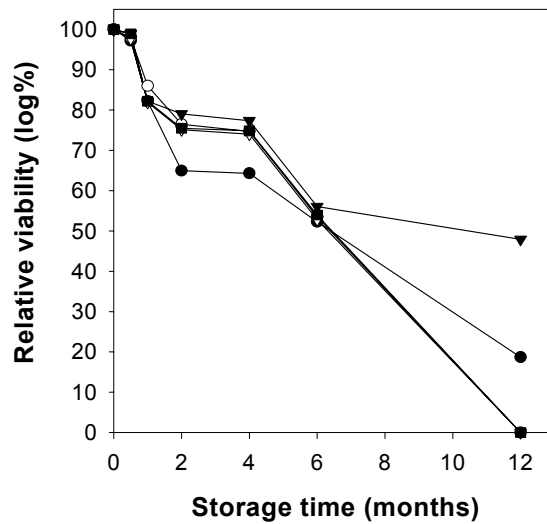


Fig. 35. Effect of Mo^{2+} ion as an additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 36. Effect of Fe^{2+} ion as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Fe^{2+}	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	4.0×10^{10}	3.5×10^{10}	7.6×10^8	8.6×10^7	7.6×10^7	4.5×10^5	4.0×10^4
	0.01 %	5.0×10^{10}	3.5×10^{10}	6.4×10^8	8.4×10^7	7.2×10^7	4.2×10^5	8.0×10^4
	0.1 %	6.0×10^{10}	3.0×10^{10}	5.9×10^8	6.2×10^7	5.0×10^7	3.1×10^5	3.1×10^5
	1.0 %	4.0×10^{10}	6.5×10^{10}	2.5×10^9	5.4×10^7	3.8×10^7	1.9×10^5	1.9×10^5

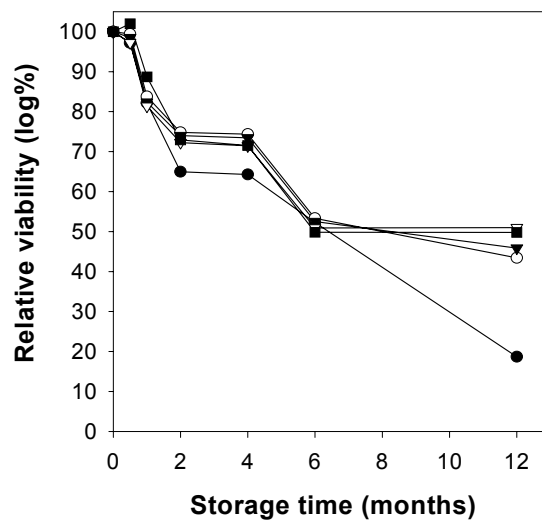


Fig. 36. Effect of Fe^{2+} ion as an additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 37. Effect of Cu^{2+} ion as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Cu^{2+}	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	5.0×10^{10}	5.0×10^{10}	7.0×10^8	1.2×10^8	8.9×10^7	4.9×10^5	1.0×10^5
	0.01 %	5.0×10^{10}	9.0×10^{10}	6.9×10^8	1.6×10^8	9.3×10^7	5.2×10^5	5.2×10^5
	0.1 %	6.0×10^{10}	6.5×10^{10}	6.1×10^8	2.1×10^8	1.0×10^8	8.3×10^5	8.3×10^5
	1.0 %	4.5×10^{10}	1.0×10^{11}	1.8×10^9	3.3×10^8	1.9×10^8	1.0×10^7	6.0×10^6

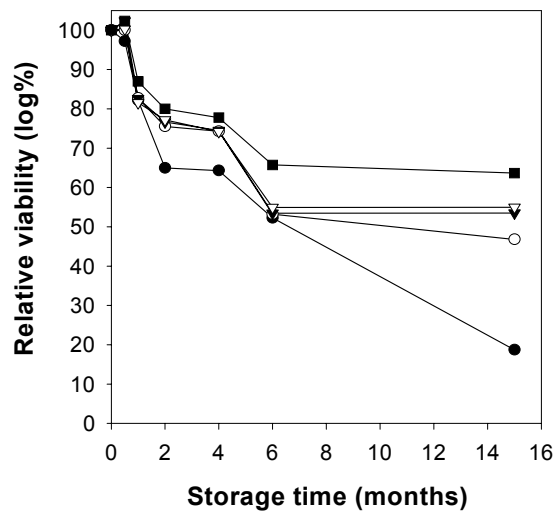


Fig. 37. Effect of Cu^{2+} ion as an additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 38. Effect of Zn^{2+} ion as an additive on the storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia						
		0 (control)	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Zn^{2+}	0 %	5.0×10^{10}	2.5×10^{10}	6.2×10^8	8.9×10^6	7.5×10^6	3.9×10^5	1.0×10^2
	0.001 %	5.0×10^{10}	5.0×10^{10}	7.9×10^8	1.2×10^8	9.3×10^7	5.7×10^5	0
	0.01 %	4.5×10^{10}	4.0×10^{10}	7.1×10^8	5.5×10^7	3.9×10^7	1.8×10^5	1.8×10^5
	0.1 %	5.0×10^{10}	4.7×10^{10}	1.6×10^9	6.5×10^7	4.8×10^7	2.5×10^5	2.5×10^5
	1.0 %	3.5×10^{10}	1.1×10^{11}	3.1×10^9	1.8×10^8	1.0×10^8	6.9×10^5	6.9×10^5

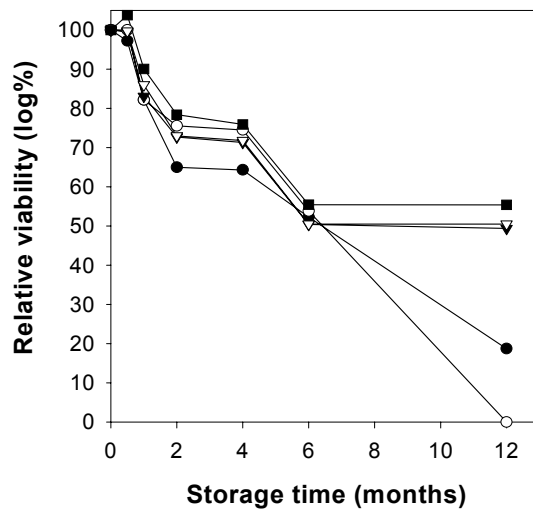


Fig. 38. Effect of Zn^{2+} ion as an additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during the storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

7. 생물비료의 제형화 :

본 연구팀에 의하여 국내토양으로부터 분리하여 지난 5년 동안 다양한 기초연구를 거쳐 인산가용화능이 특히 우수한 *Penicillium* sp. PS-113을 공시균주로 활용하여 제형화 연구를 시도하였다. 그 결과 이 균주의 포자(conidia) 및 균사체(mycelium)를 이용하여 아래와 같이 산업화의 필수단계인 다양한 제형화(액상, 고체분말, 고체과립형 등)를 성공적으로 완성하였다.

가. 분생포자만을 포함하는 액상 생물비료의 제제화 :

분생포자만을 포함하는 액상 생물비료의 제형을 제조하기 위하여 PDA 평판배지, 25℃의 조건으로 1주일 동안 균체를 키워 포자를 수집한다. 이 포자를 plate 당 50ml의 멸균 증류수에 녹이면 대략 $\sim 1.0 \times 10^{13}$ conidia/ml의 농도가 된다. 그러나 포자를 단순히 멸균증류수에 녹이면 포자가 분산되지 않고 위로 뜨거나, 뭉쳐서 가라앉는 현상이 발생한다. 또한 보관중에 세균오염에 의한 부패문제가 발생하거나, 포자의 생존율이 매우 낮은 문제점 등이 발생한다. 따라서 이와 같은 다양한 문제점들을 동시에 해결하기 위하여 포자수용액에 트리오(Fig. 39), 비누(Fig. 40), pH 조절, 트리오와 다른 첨가제(Cu, Mo, bioceramic, Tween 80, PEG 200, diatomite, SDS)의 혼용처리 등과 같은 다양한 방법을 시도하였다. 그 결과 Table 39 ~ Table 47 및 Fig. 41 ~ Fig. 49에 요약/정리한 바와 같이 이상의 문제점들을 대부분 개선할 수 있는 우수한 결과들을 얻을 수 있었다.



Fig. 39. Liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia, biofertilizer, by using Trio as a dispersing agent.

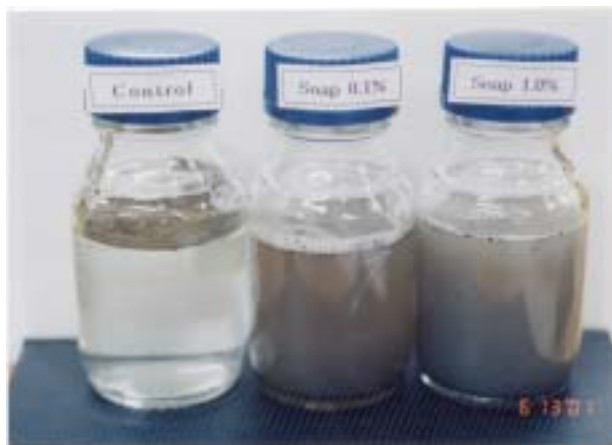


Fig. 40. Liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia, biofertilizer, by using soap as a dispersing agent.

Table 39. Effect of Trio, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 4°C.

Storage time Additive		No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Trio	0%	2.3×10^{14}	5.6×10^{13}	4.2×10^{11}	6.0×10^{10}	2.8×10^9	1.9×10^9
	0.001%	1.5×10^{14}	6.8×10^{13}	5.2×10^{11}	7.0×10^{10}	5.2×10^9	4.0×10^9
	0.01%	2.4×10^{14}	1.9×10^{14}	2.0×10^{12}	1.3×10^{11}	1.2×10^{10}	3.6×10^9
	0.1%	2.0×10^{14}	4.8×10^{13}	1.5×10^{11}	1.8×10^{11}	1.0×10^{10}	3.8×10^9
	1.0%	8.0×10^{13}	1.4×10^{13}	5.0×10^{10}	2.0×10^{10}	6.0×10^9	5.3×10^9

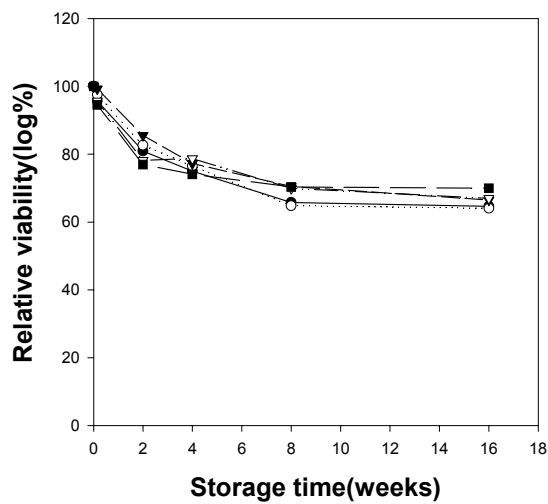


Fig. 41. Effect of Trio on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 4°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 40. Effect of Trio, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 25°C.

Additive \ Storage time		No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Trio	0%	2.5×10^{14}	1.3×10^{14}	3.0×10^{11}	1.0×10^{11}	4.7×10^9	1.4×10^9
	0.001%	1.3×10^{14}	1.6×10^{14}	2.6×10^{11}	1.7×10^{11}	2.1×10^{10}	2.6×10^9
	0.01%	1.8×10^{14}	1.3×10^{14}	3.7×10^{11}	1.6×10^{11}	6.9×10^9	2.1×10^9
	0.1%	2.7×10^{14}	9.7×10^{13}	3.2×10^{11}	1.3×10^{11}	5.5×10^9	2.0×10^9
	1.0%	7.9×10^{13}	5.5×10^{13}	1.8×10^{11}	2.0×10^{10}	4.4×10^9	1.4×10^9

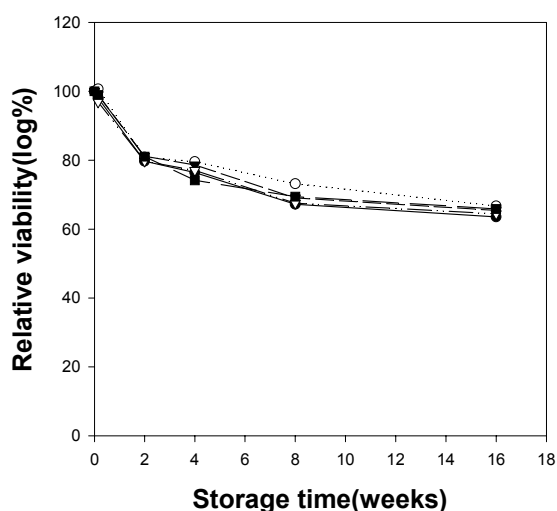


Fig. 42. Effect of Trio on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 41. Effect of soap, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 4°C.

Storage time Additive		No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Soap	0%	4.5×10^{13}	6.0×10^{12}	1.0×10^{10}	4.0×10^8	4.1×10^7	2.0×10^7
	0.1%	4.1×10^{13}	7.0×10^{12}	5.0×10^{10}	5.0×10^8	6.5×10^7	4.8×10^7
	1.0%	2.2×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^{10}	3.0×10^8	1.0×10^6	1.0×10^6
	3.0%	5.0×10^{12}	2.0×10^{10}	1.0×10^9	2.0×10^8	1.3×10^5	6.0×10^4

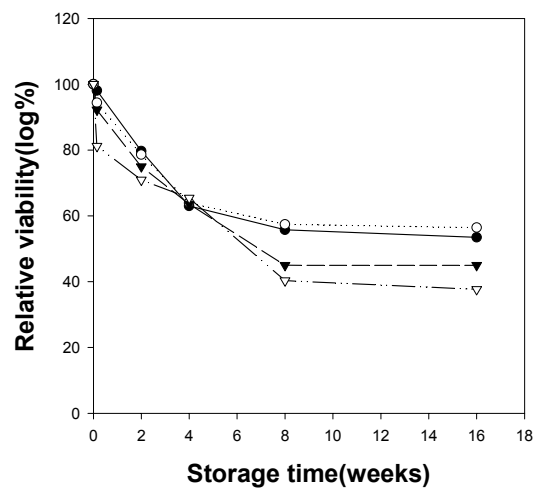


Fig. 43. Effect of soap on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 4°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.1%, ▼—▼; 1.0%, ▽—▽; 3.0%.

Table 42. Effect of soap, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 25°C.

Additive \ Storage time		No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Soap	0%	4.2×10^{13}	5.0×10^{12}	1.0×10^{10}	2.4×10^8	4.8×10^7	5.0×10^6
	0.1%	3.6×10^{13}	1.5×10^{13}	2.0×10^{10}	2.0×10^7	7.0×10^6	3.0×10^6
	1.0%	1.6×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^7	4.0×10^4	4.0×10^3	1.0×10^3
	3.0%	3.0×10^{12}	1.0×10^{10}	1.0×10^5	2.0×10^4	7.0×10^3	1.0×10^3

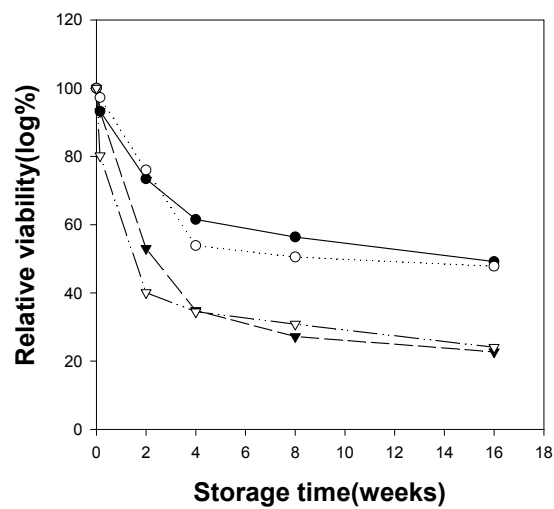


Fig. 44. Effect of soap on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.1%, ▼—▼; 1.0%, ▽—▽; 3.0%.

Table 43. Effect of soap, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 37°C.

Additive		Storage time	No. of conidia					
			0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Soap	0%		3.8×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^4	0	0	0
	0.1%		2.0×10^{13}	1.0×10^{12}	1.0×10^4	0	0	0
	1.0%		8.0×10^{12}	1.0×10^{10}	1.0×10^4	0	0	0
	3.0%		4.0×10^{12}	1.0×10^8	0	0	0	0

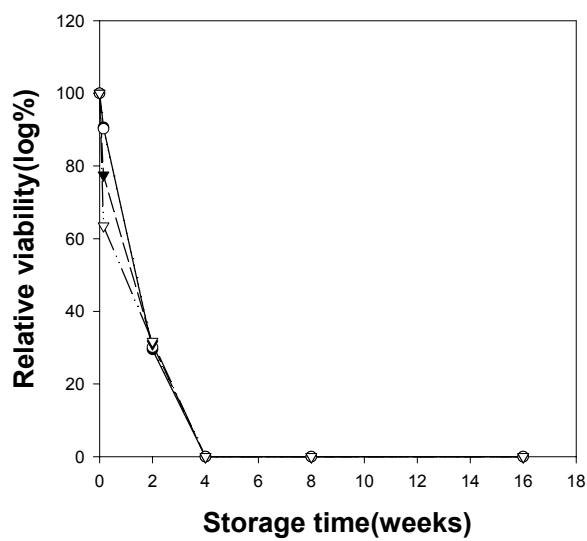


Fig. 45. Effect of soap on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 37°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.1%, ▼—▼; 1.0%, ▽—▽; 3.0%.

Table 44. Effect of pHs on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 25°C.

pH \ Storage time	No. of conidia					
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Control(pH 7.0)	4.3×10^{13}	3.0×10^{12}	3.0×10^{10}	1.9×10^9	3.0×10^7	4.0×10^6
pH 3.0	1.1×10^{13}	4.0×10^8	2.0×10^8	3.0×10^6	2.0×10^4	1.0×10^3
pH 4.0	2.5×10^{13}	2.3×10^{13}	2.0×10^{10}	1.4×10^9	1.5×10^7	3.0×10^6
pH 9.0	2.5×10^{13}	2.4×10^{13}	8.0×10^{10}	1.2×10^9	2.4×10^7	1.7×10^7
pH 10.0	1.3×10^{13}	5.0×10^{12}	7.0×10^8	2.0×10^8	1.3×10^7	7.0×10^6

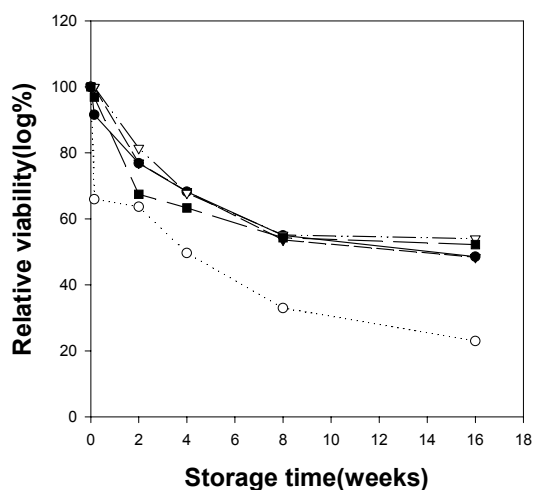


Fig. 46. Effect of pHs on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 25°C. ●—●; pH 7.0 (control), ○—○; pH 3.0, ▼—▼; pH 4.0, ▽—▽; pH 9.0, ■—■; pH 10.0.

Table 45. Effect of Trio and other additives on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 4°C.

Additive	Storage time	No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Trio(0.1%)		4.2×10^{13}	1.2×10^{13}	1.7×10^{11}	2.6×10^9	5.7×10^7	2.5×10^7
Trio(0.1%) + Cu(1.0%)		4.6×10^{13}	1.0×10^{10}	1.0×10^8	0	0	0
Trio(0.1%) + Mo(0.01%)		4.6×10^{13}	1.0×10^{13}	1.2×10^{11}	2.1×10^9	4.2×10^7	2.1×10^7
Trio(0.1%) + bio-ceramic(0.5%)		4.9×10^{13}	2.5×10^{13}	1.8×10^{11}	1.1×10^9	5.1×10^7	2.1×10^7
Trio(0.1%) + Tween 80(1.0%)		4.6×10^{13}	1.1×10^{13}	8.0×10^{11}	3.6×10^9	5.8×10^7	2.6×10^7
Trio(0.1%) + PEG 200(1.0%)		3.8×10^{13}	5.0×10^{12}	1.6×10^{11}	2.6×10^9	9.4×10^7	1.4×10^7
Trio(0.1%) + diatomite(1.0%)		4.4×10^{13}	5.0×10^{12}	1.0×10^{11}	4.0×10^8	9.0×10^6	6.0×10^6
Trio(0.1%) + SDS(0.1%)		4.1×10^{13}	5.0×10^{12}	3.0×10^{10}	3.0×10^8	2.0×10^6	3.0×10^4

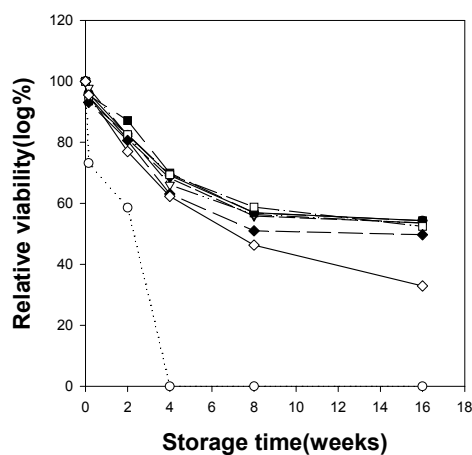


Fig. 47. Effect of Trio and additive on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 4°C . ●—●; Trio (0.1%), ○—○; Trio (0.1%) + Cu (1.0%), ▼—▼; Trio (0.1%) + Mo (0.01%), ▽—▽; Trio (0.1%) + bioceramic (0.5%), ■—■; Trio (0.1%) + Tween 80 (1.0%), □—□; Trio (0.1%) + PEG 200 (1.0%), ◆—◆; Trio (0.1%) + diatomite (1.0%), ◇—◇; Trio (0.1%) + SDS (0.1%).

Table 46. Effect of Trio and other additives on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia at 25°C.

Additive	Storage time	No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Trio(0.1%)		3.8×10^{13}	5.0×10^{12}	3.0×10^{10}	1.5×10^9	1.9×10^7	8.0×10^6
Trio(0.1%) + Cu(1.0%)		1.2×10^{11}	1.0×10^4	1.0×10^4	0	0	0
Trio(0.1%) + Mo(0.01%)		3.7×10^{13}	1.4×10^{13}	8.0×10^{10}	3.4×10^9	1.7×10^7	6.0×10^6
Trio(0.1%) + bio-ceramic(0.5%)		4.6×10^{13}	1.6×10^{13}	1.0×10^{11}	4.5×10^9	4.4×10^7	7.0×10^6
Trio(0.1%) + Tween 80(1.0%)		3.8×10^{13}	1.4×10^{13}	1.0×10^{11}	6.2×10^9	2.8×10^7	1.2×10^7
Trio(0.1%) + PEG 200(1.0%)		3.7×10^{13}	1.3×10^{13}	9.0×10^{10}	1.3×10^9	4.6×10^7	1.1×10^7
Trio(0.1%) + diatomite(1.0%)		3.3×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^8	0	0	0
Trio(0.1%) + SDS(0.1%)		2.6×10^{13}	1.0×10^{12}	1.0×10^7	2.0×10^6	0	0

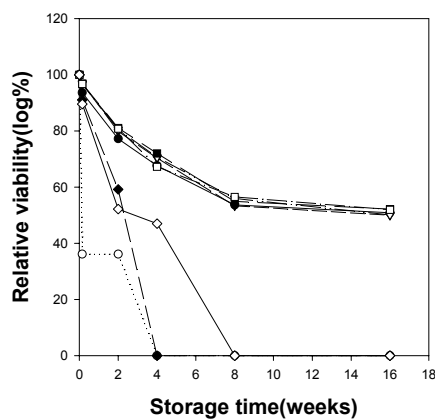


Fig. 48. Effect of Trio and other additives on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 25°C . ●—●; Trio (0.1%), ○—○; Trio (0.1%) + Cu (1.0%), ▼—▼; Trio (0.1%) + Mo (0.01%), ▽—▽; Trio (0.1%) + bioceramic (0.5%), ■—■; Trio (0.1%) + Tween 80 (1.0%), □—□; Trio (0.1%) + PEG 200(1.0%), ◆—◆; Trio (0.1%) + diatomite (1.0%), ◇—◇; Trio (0.1%) + SDS (0.1%).

Table 47. Effect of Trio and other additives on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 37°C.

Additive	Storage time	No. of conidia					
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months
Trio(0.1%)		2.8×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^4	0	0	0
Trio(0.1%) + Cu(1.0%)		1.0×10^{10}	1.0×10^4	1.0×10^4	0	0	0
Trio(0.1%) + Mo(0.01%)		2.5×10^{13}	4.0×10^{12}	1.0×10^6	0	0	0
Trio(0.1%) + bio-ceramic(0.5%)		3.2×10^{13}	1.1×10^{13}	1.0×10^6	0	0	0
Trio(0.1%) + Tween 80(1.0%)		1.8×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^4	0	0	0
Trio(0.1%) + PEG 200(1.0%)		3.0×10^{13}	4.0×10^{12}	1.0×10^4	0	0	0
Trio(0.1%) + diatomite(1.0%)		1.2×10^{13}	1.0×10^8	1.0×10^4	0	0	0
Trio(0.1%) + SDS(0.1%)		5.0×10^{12}	1.0×10^{10}	1.0×10^4	0	0	0

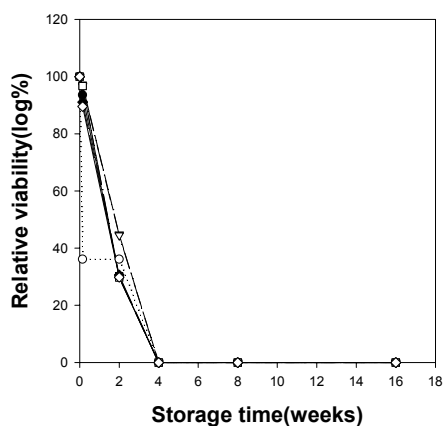


Fig. 49. Effect of Trio and other additives on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 37°C . ●—●; Trio (0.1%), ○—○; Trio (0.1%) + Cu (1.0%), ▼—▼; Trio (0.1%) + Mo (0.01%), ▽—▽; Trio (0.1%) + bioceramic (0.5%), ■—■; Trio (0.1%) + Tween 80 (1.0%), □—□; Trio (0.1%) + PEG 200 (1.0%), ◆—◆; Trio (0.1%) + diatomite (1.0%), ◇—◇; Trio (0.1%) + SDS (0.1%).

나. 고체배양후 분생포자와 배지를 포함하는 분말상의 생물비료 제제화 :

고체배양한 포자와 배지를 포함하는 분말상(powder)의 생물비료 제제를 제조하기 위하여 먼저 덩어리진 배지성분을 60 mesh 체로 거른다. 이때 얻어진 균체의 포자를 분말화하기 위하여 열풍건조기에서 각각 60, 80, 100, 120℃로 건조공정을 거친 후 수분함량을 10, 15, 20%로 각각 조절하였다. 이때 건조온도에 따른 수분함량과 건조시간과의 상관관계에 대한 결과는 Fig. 50 ~ Fig. 53에 나타내었다. 그리고 건조전과 건조후의 생존포자수를 측정하여 비교하였으며, 그 결과 60℃ 및 80℃로 건조한 경우에는 90% 이상의 포자생존율을 보였으나 100℃ 이상에서는 포자가 10% 이상 사멸하였다. 따라서 균체 및 포자의 과립화를 위한 가장 적합한 온도는 건조시간과 생존율을 등을 고려할 때 80℃가 가장 적합하였다. 이와같은 방법으로 건조한 포자를 수분조건을 달리하여 4℃, 25℃, 37℃에 저장하면서 포자의 생존율을 조사하여 Table 48 ~ Table 59 및 Fig. 54 ~ Fig. 65에 나타내었다. 이 결과에 의하면 2개월간 저장했을 때 60 ~ 80℃에서 건조한 경우 초기에는 건조하기 않은 경우에 비해 일시적으로 생존율이 다소 떨어지나 저장기간이 길어질수록 생존율이 10배 이상 증가하였다. 그러나 100℃ 이상에서 건조한 경우에는 저장기간에 관계없이 생존율이 급격히 감소하였다.

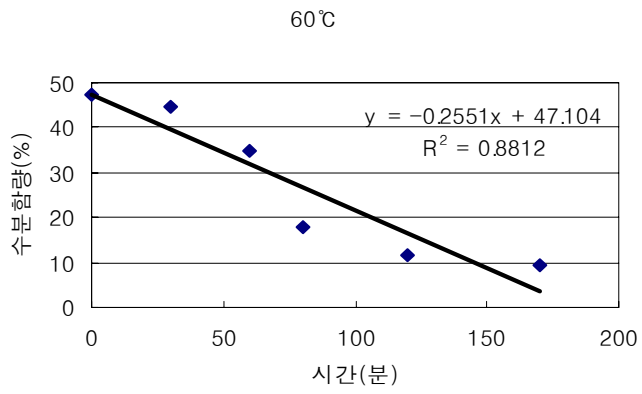


Fig. 50. Relationship between water content(%) and drying time at 60℃.

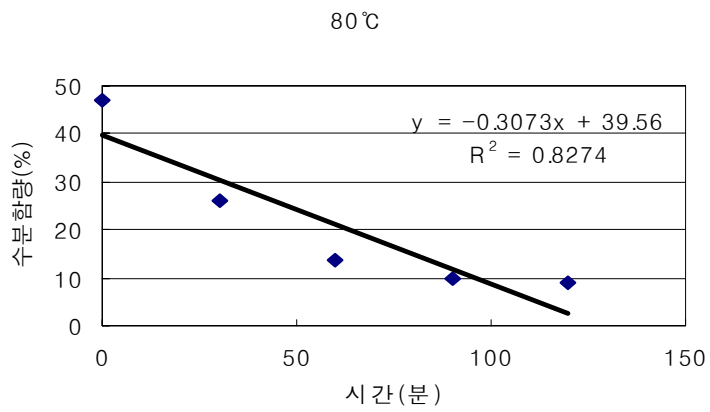


Fig. 51. Relationship between water content(%) and drying time at 80℃.

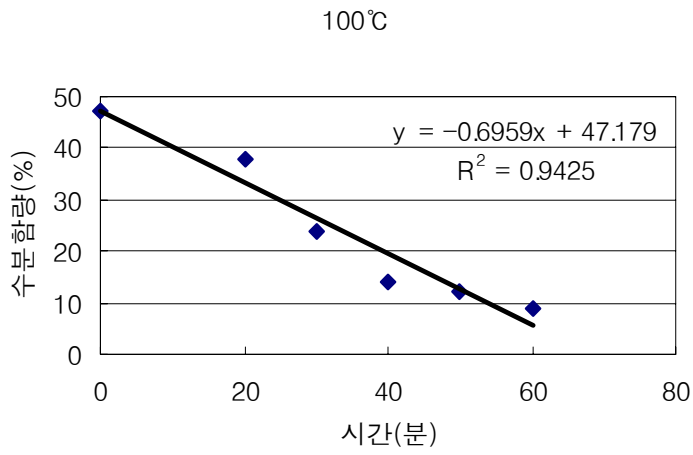


Fig. 52. Relationship between water content(%) and drying time at 100℃.

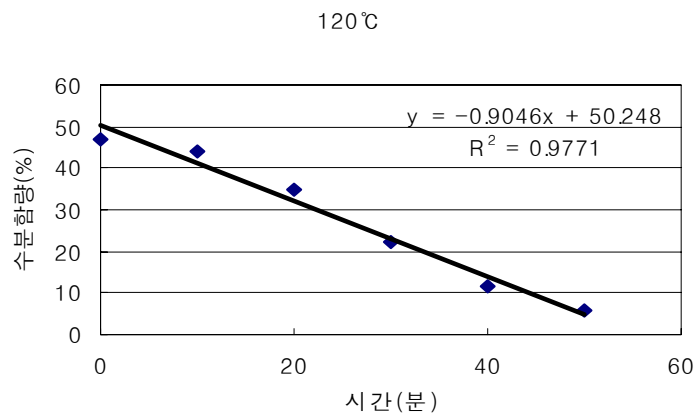


Fig. 53. Relationship between water content(%) and drying time at 120℃.

Table 48. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	4.0×10^7	1.1×10^6
10%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.0×10^9	5.0×10^7	3.9×10^5
15%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	2.0×10^7	1.0×10^6
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	2.2×10^7	3.0×10^6

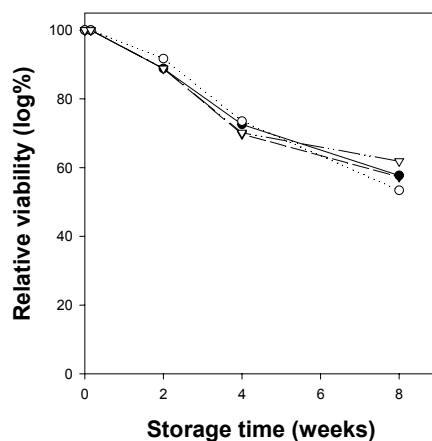


Fig. 54. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 49. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Humidity \ Storage time	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	4.0×10^7	1.1×10^6
10%	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^7	5.0×10^7	3.9×10^7
15%	3.0×10^{10}	2.0×10^8	1.0×10^8	8.0×10^7	6.6×10^7
20%	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^8	5.0×10^7	2.2×10^7

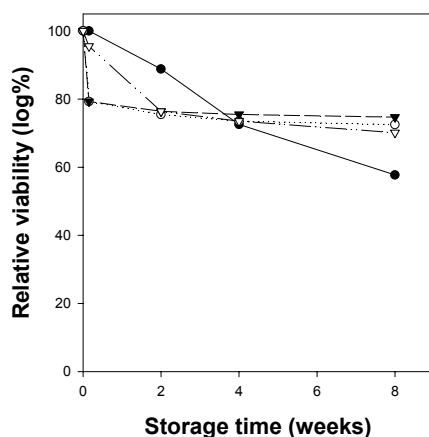


Fig. 55. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 50. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	4.0×10^7	1.1×10^6
10%	3.0×10^{10}	3.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^5	4.3×10^3
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	1.9×10^6	5.0×10^5	3.0×10^4
20%	3.0×10^{10}	6.0×10^8	1.0×10^7	2.0×10^5	1.0×10^4

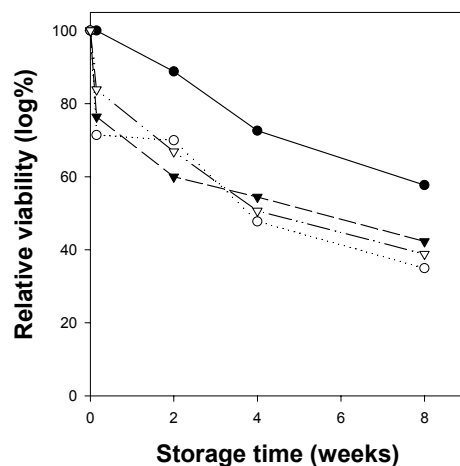


Fig. 56. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 51. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	4.0×10^7	1.1×10^6
10%	3.0×10^{10}	5.0×10^7	2.0×10^7	7.0×10^3	3.0×10^3
15%	3.0×10^{10}	5.0×10^7	1.0×10^6	1.0×10^5	3.2×10^3
20%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	4.0×10^5	5.1×10^4	1.5×10^3

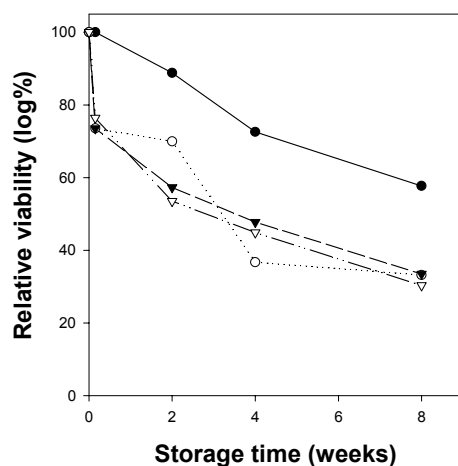


Fig. 57. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 52. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5
10%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.0×10^9	1.0×10^7	2.0×10^6
15%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	8.0×10^9	3.0×10^7	3.0×10^6
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	8.0×10^9	1.2×10^7	2.0×10^6

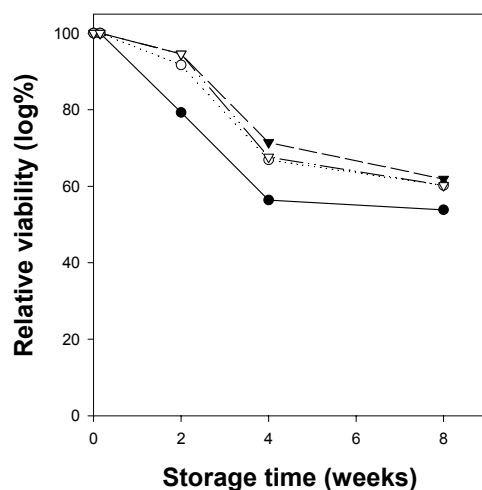


Fig. 52. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 53. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	1.6×10^8	2.0×10^7	1.0×10^6
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	5.0×10^9	4.0×10^7	4.0×10^6
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.0×10^9	7.0×10^7	9.0×10^6

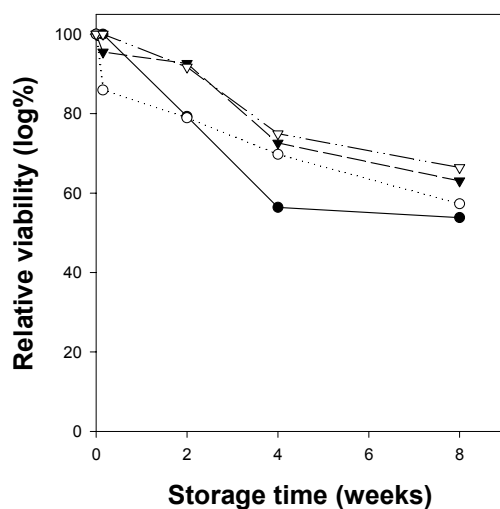


Fig. 59. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 54. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5
10%	3.0×10^{10}	8.0×10^8	2.0×10^7	1.5×10^5	7.0×10^4
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	4.0×10^7	2.0×10^5	1.0×10^4
20%	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^8	7.0×10^7	2.6×10^5

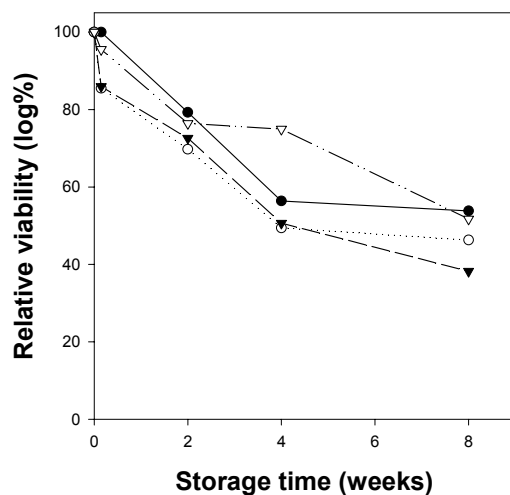


Fig. 60. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 55. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	1.0×10^5	5.0×10^4	1.0×10^4
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	2.0×10^7	2.0×10^5	1.0×10^2
20%	3.0×10^{10}	2.0×10^9	1.0×10^7	0	0

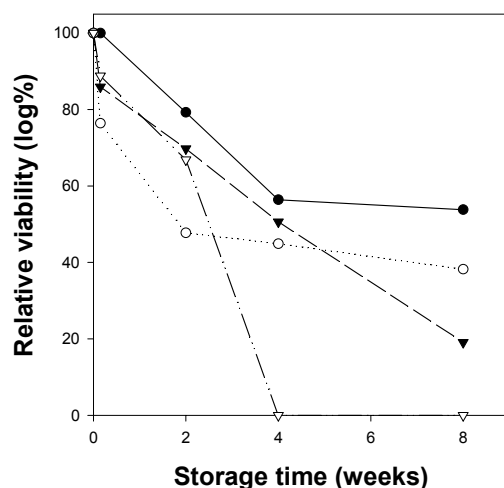


Fig. 61. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 56. Effect of humidities on viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	1.8×10^8	5.0×10^5	2.0×10^5
10%	3.0×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^9	1.0×10^6	1.0×10^4
15%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	3.0×10^8	4.0×10^6	2.0×10^4
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	6.0×10^9	7.0×10^6	4.0×10^4

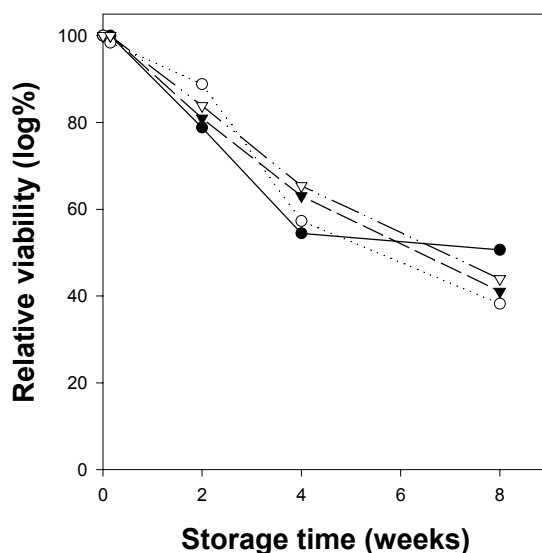


Fig. 62. Effect of humidities on the relative viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 57. Effect of humidities on viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	1.8×10^8	5.0×10^5	2.0×10^5
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	2.0×10^8	2.0×10^5	3.0×10^4
15%	3.0×10^{10}	6.0×10^9	3.0×10^8	1.0×10^5	3.1×10^3
20%	3.0×10^{10}	8.0×10^9	1.1×10^8	1.0×10^6	4.0×10^4

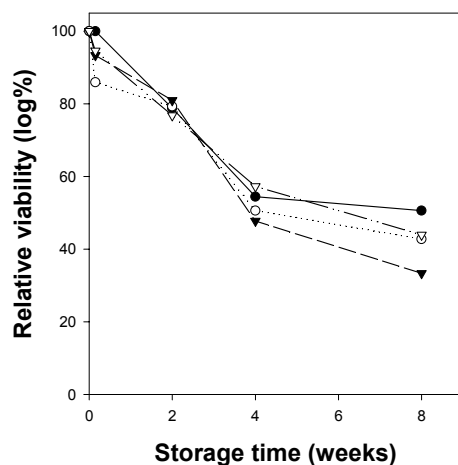


Fig. 63. Effect of humidities on the relative viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 58. Effect of humidities on viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	1.8×10^8	5.0×10^5	2.0×10^5
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	2.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3
15%	3.0×10^{10}	3.0×10^8	1.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3
20%	3.0×10^{10}	5.0×10^8	4.0×10^7	3.0×10^5	3.0×10^3

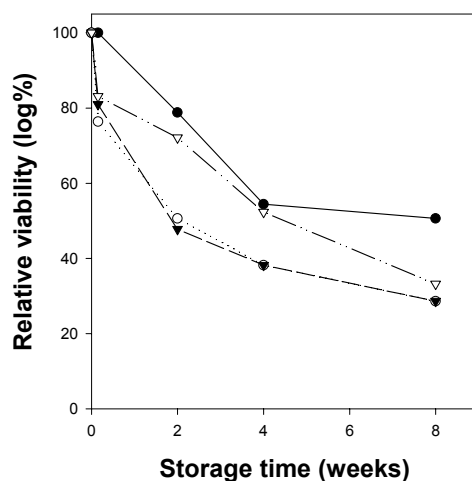


Fig. 64. Effect of humidities on the relative viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 59. Effect of humidities on viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media.

Storage time Humidity	No. of conidia				
	0	1 day	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control(50%)	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	1.8×10^8	5.0×10^5	2.0×10^5
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	1.0×10^6	0	0
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	1.0×10^7	1.0×10^5	0
20%	3.0×10^{10}	2.0×10^9	1.0×10^6	1.0×10^5	1.0×10^2

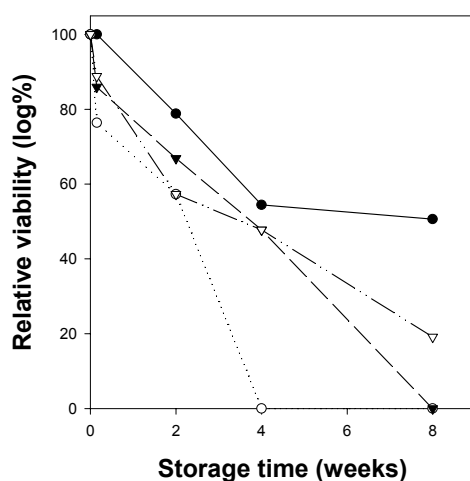


Fig. 65. Effect of humidities on the relative viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

다. 고체배양후 분생포자와 배지를 포함하는 과립상의 생물비료 제제화 :

고체배양한 포자와 배지를 포함하는 과립상(granule)의 생물비료 제제를 제조하기 위하여 먼저 덩어리진 배지성분을 60 mesh 체로 거른다. 이때 얻어진 균체의 포자를 과립화하기 위하여 60 ~ 70 rpm으로 회전하고 있는 코팅드럼에 100g의 PS-113 균체 및 배지를 넣고 접착제로는 PVA 수용액을 이들의 표면에 분사한 후 talc, bentonite, diatomite 등의 다양한 코팅물질을 첨가하여 과립화시켰다. 이때 각각의 과립상의 생물비료는 초기수분함량이 bentonite 8.9%, talc 2.8%, kaoline 1.9%, diatomite는 3.1%로 나타났다.

라. 액체배양후 균배양액의 액상 생물비료 제제화 :

인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. PS-113 균체의 액상배양은 1차년도에 확립된 조건으로 200L 대형 발효조를 이용하여 배양하였다. 발효를 위한 배지조성은 3.0% 쌀겨배지, 배양온도 28℃, agitation 속도 200rpm, 초기접종량은 1.0×10^6 conidia/ml, 공기주입량은 70 L/min의 조건에서 수행하였다. 발효조의 공살균은 121℃에서 20분, 액체배지는 121℃에서 1시간 동안 살균처리하였다. 포자를 접종하여 2일간 배양하여 균체를 생산하였다. 이것은 그 자체로 액상비료로 제형화가 완성되었으므로 보존성을 높이는 방법을 중점 연구하였다. 그 결과 4℃에서는 균체가 더 오래 생존하였으며, 특히 pH 3.0에서는 30일 이상 생존함과 동시에 세균에 의한 오염문제가 해결되어 균사체만 생존함을 확인하였다.

마. 액체배양후 균배양액의 분말상 생물비료 제제화 :

액상배양후 균배양체만을 수확하여 이를 분말상으로 제형화하는 연구를 수행하였다. 증량제로서 talc, bentonite, diatomite, kaolin, loess를 균체와 4:1(V/V)의 비율로 첨가하여 제형화하였으며, 균사체의 생존율은 균체를 PDA 배지에 도말하여 생성되는 colony수를 측정하여 결정하였다. 그 결과 Table 60 ~ Table 61, Fig. 66 ~ Fig. 67에서 보여주는 바와 같이 4℃에서 저장할 경우에는 대부분 생존율이 95% 이상이었으

나, 25°C에 저장할 경우 bentonite와 kaolin은 95% 이상의 생존율을 보여주었으며, 이는 증량제가 없는 무처리구에 비해 1,000배 이상 높은 생존율을 보여주었다.

Table 60. Effect of soil additives on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type.

Additive	Storage time	No. of conidia		
		0	1 week	2 weeks
Control		1.0×10^9	2.4×10^7	3.0×10^5
Talc		3.0×10^6	4.0×10^4	1.0×10^4
Bentonite		1.4×10^6	8.0×10^5	4.2×10^5
Diatomite		5.0×10^5	4.0×10^5	8.0×10^4
Kaolin		4.0×10^5	2.4×10^5	1.0×10^5
Loess		4.0×10^5	3.1×10^5	2.0×10^5

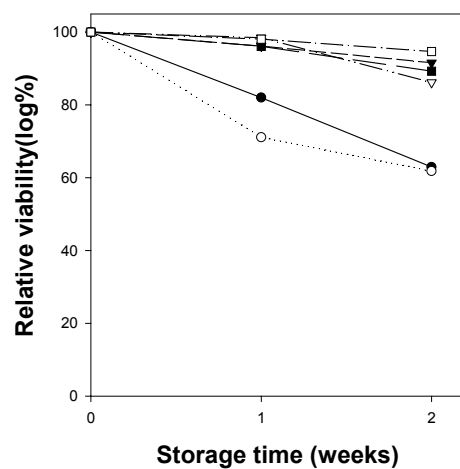


Fig. 66. Effect of soil additives on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type. ●—●; control(no additive), ○—○; talc, ▼—▼; bentonite, ▽—▽; diatomite, ■—■; kaolin, □—□; loess.

Table 61. Effect of soil additives on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type.

Additive	Storage time	No. of conidia		
		0	1 week	2 weeks
Control		1.0×10^9	1.0×10^7	1.1×10^4
Talc		3.0×10^6	1.0×10^5	2.0×10^3
Bentonite		1.4×10^6	1.3×10^6	1.2×10^6
Diatomite		5.0×10^5	1.0×10^5	5.0×10^4
Kaolin		4.0×10^5	3.0×10^5	2.8×10^5
Loess		4.0×10^5	3.4×10^4	3.0×10^3

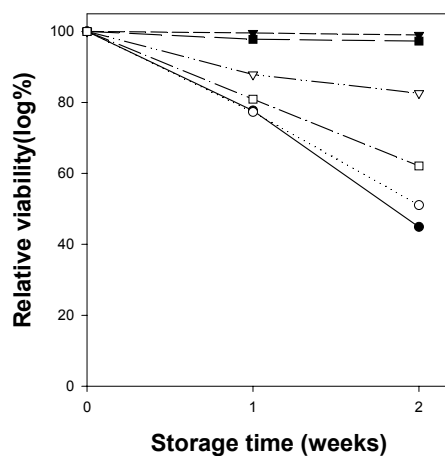


Fig. 67. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type. ●—●; control(no additive), ○—○; talc, ▼—▼; bentonite, ▽—▽; diatomite, ■—■; kaolin, □—□; loess.

바. 인산가용화균과 젖산균의 복합생물비료 제제화 :

인산가용화균의 고체배양 후의 포자와 젖산균(*Lactobacillus plantarum*)의 액상배양 후의 균체를 수확하여 이를 혼합한 복합생물비료의 제형화는 고체과립형의 형태로 제조하였다. 이때 coating 물질로는 talc, bentonite, diatomite, kaolie을 사용하여 균체와 9:1(V/V)의 비율로 혼합하여 제형화하였다. 혼합된 생물비료로부터 균체의 생존율을 조사하기 위하여 인산가용화균을 측정할 때는 70℃에서 2시간 동안 균체를 전처리하여 젖산균을 대부분 사멸한 후에 PDA 평판배지에서 포자수를 측정하였다. 그리고 젖산균의 측정은 젖산균이 포자에 비해 성장이 빠를 뿐만아니라 MRS 선택배지에서 측정함으로써 젖산균만 선택적으로 성장하도록하여 균체수를 측정하였다. 그 결과 Table 62 ~ Table 65 및 Fig. 68 ~ Fig. 71에서 보여주는 바와 같이 4℃ 및 25℃에서 대부분 90% 이상의 높은 생존율을 보여주었다.

Table 62. Effect of soil additives on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media.

Additive \ Storage time	No. of bacterial colony			
	0	1 day	1 week	2 weeks
Talc	2.2×10^8	9.0×10^7	7.0×10^7	5.0×10^7
Bentonite	7.2×10^8	7.1×10^8	4.0×10^8	1.9×10^8
Diatomite	1.9×10^9	2.6×10^8	2.3×10^8	2.0×10^8
Kaolin	2.3×10^8	2.0×10^8	1.8×10^8	8.0×10^7

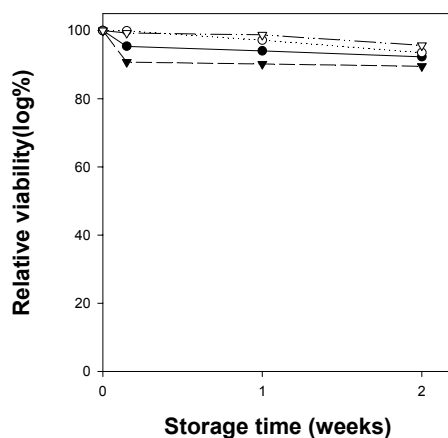


Fig. 68. Effect of soil additives on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 63. Effect of soil additives on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media.

Additive \ Storage time	No. of bacterial colony			
	0	1 day	1 week	2 weeks
Talc	2.2×10^8	9.0×10^7	8.0×10^7	2.0×10^7
Bentonite	7.2×10^8	7.1×10^8	3.0×10^8	1.0×10^8
Diatomite	1.9×10^9	4.6×10^8	2.6×10^8	8.0×10^7
Kaolin	2.3×10^8	7.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^7

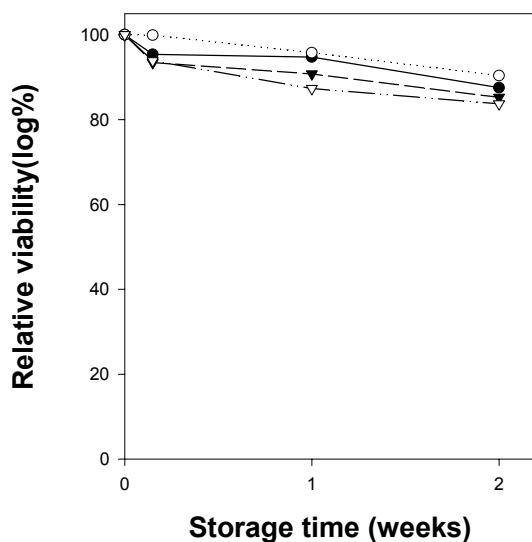


Fig. 69. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 64. Effect of soil additives on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*.

Additive \ Storage time	No. of conidia			
	0	1 day	1 week	2 weeks
Talc	3.0×10^8	5.4×10^7	3.0×10^7	1.0×10^7
Bentonite	1.9×10^8	9.0×10^7	3.0×10^7	2.0×10^7
Diatomite	2.1×10^8	1.0×10^8	4.0×10^7	2.0×10^7
Kaolin	5.0×10^7	3.0×10^7	1.0×10^7	5.0×10^6

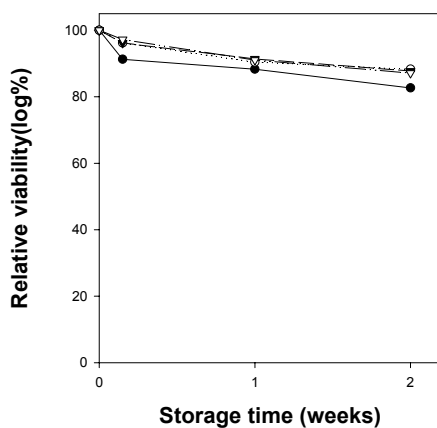


Fig. 70. Effect of soil additives on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 65. Effect of soil additives on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*.

Additive \ Storage time	No. of conidia			
	0	1 day	1 week	2 weeks
Talc	3.0×10^8	5.4×10^7	4.0×10^7	4.0×10^5
Bentonite	1.9×10^8	9.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^7
Diatomite	2.1×10^8	1.0×10^8	7.0×10^7	1.0×10^7
Kaolin	5.0×10^7	3.0×10^7	1.0×10^7	1.0×10^7

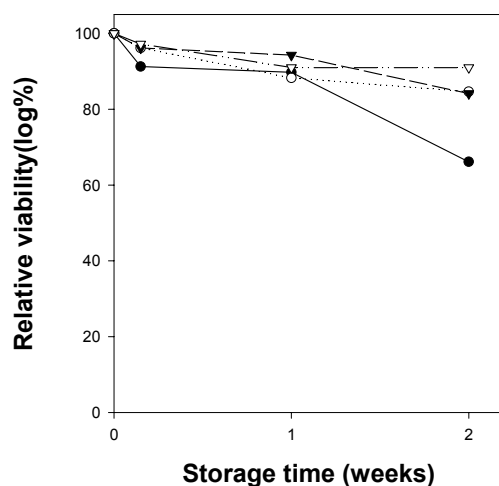


Fig. 71. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

8. 생물비료의 제형화에 따른 안정성 시험 :

가. 생물비료의 각종 농약(살충제, 살균제, 제초제)에 대한 안정성 :

인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. PS-113을 생물비료로 단독으로 이용할 경우도 있지만 화학적으로 합성된 살충제, 살균제, 제초제와 혼용 사용 혹은 비슷한 시기에 화학농약이 사용될 경우가 있다. 따라서 본 과제에서 개발한 인산가용화 사상균을 생물비료로 효과적으로 이용하기 위해서는 다양한 화학농약에 대한 안정성 여부를 검토할 필요가 있다. 본 연구를 수행하기 위한 연구방법은 현재 시중에 유통중인 산마루(수화제), 엘산(유제) 등 살충제 9종과 포룸디(수화제), 산요루(유제) 등 살균제 8종 및 그라목손(액제), 스톱프(유제), 랜드마스타(액제)와 같은 제초제 3종을 구입하여 이들을 토양에서 사용되는 농도의 0.1, 1, 10배 약량으로 PDA배지와 혼합하여 평판배지를 제조하였다. 여기에 적절히 희석한 PS-113 균주의 conidia를 도말하여 25°C에서 3~5일간 항온배양하면서 성장한 개체수를 측정하여 생존율을 계산하였다.

연구결과를 보면 이 균주는 살충제에서는 시험한 7종에 대해서 10배의 약량에서도 90% 이상의 높은 생존율을 보였다(Table 66). 제초제에서도 시험된 1배의 약량에서는 시험한 3종에서 100%의 높은 생존율을 보였으나, 10배의 약량에서는 랜드마스만이 97%의 높은 생존율을 보였다(Table 67). 그러나 살균제는 시험한 7종에 대해서 1배의 약량에서는 포룸씨(수화제), 산요루(유제), 사프롤(유제), 헥사코나졸(액상수화제) 4종에 대해서는 95% 이상의 높은 생존율을 보였으나 나머지 3종에 대해서는 30% 이하의 낮은 생존율을 보였다(Table 68). 특히 10배의 약량에서는 포룸씨(수화제)와 산요루(유제) 2종만이 90% 이상의 높은 포자생존율을 보였으나, 나머지 5종에 대해서는 포자생존이 거의 불가능함을 확인하였다(Table 68). 따라서 인산가용화 사상균을 살균제와 병용해서 사용할 때는 약량을 낮게 조절하거나 혹은 포룸씨(수화제)와 산요루(유제) 등과 같이 포자생존에 영향을 주지 않는 살균제만을 선택적으로 사용하는 것이 바람직한 것을 알 수 있다. 이상의 결과를 종합해 보면 PS-113 균주는 살충제와 제초제에 대해서는 비교적 안정한 편이나 살균제에 대해서는 선택적으로 안정한 것으로 결론지을 수 있다.

Table 66. Effect of commercially available pesticides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Penicillium* sp. PS-113 when treated at the effective concentrations for the pest control.

Trade name of pesticides	Target pest	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Beauveria bassiana</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of pesticides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
산마루 (수화제)	응애	1 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100
로드 (수화제)	진딧물, 배추좀나방 등	1 µg/ml	25.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.6×10 ¹³	97.4
엘산 (유제)	멸구, 온실가루이 등	1 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.6×10 ¹³	97.9	5.4×10 ¹³	95.3
모노포 (액제)	응애, 진딧물 등	1 µl/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100
화스타	진딧물, 잎말이나방	1 µl/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.6×10 ¹³	98.2	5.5×10 ¹³	96.1
메타	진딧물, 꿀꿀나방	1 µl/ml	5.7×10 ¹³	100	5.5×10 ¹³	96.8	5.4×10 ¹³	94.7	5.3×10 ¹³	93.3
메소밀 (수화제)	진딧물, 담배나방	0.65 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100

Table 67. Effect of commercially available herbicides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Penicillium* sp. PS-113 when treated at the effective concentrations for the weed control.

Trade name of herbicides	Target weed	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Beauveria bassiana</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of herbicides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
그라목손 (액제)	잡초	2.5 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	0	0
스톰프 (유제)	광엽 잡초	3.0 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	3.9×10 ¹³	67.6
랜드마스타 (액제)	잡초	3.7 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.5×10 ¹³	97.0

Table 68. Effect of commercially available fungicides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Penicillium* sp. PS-113 when treated at the effective concentrations for the control of fungal pathogens.

Trade name of fungicides	Plant disease	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Beauveria bassiana</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of fungicides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
포름디 (수화제)	역병	2 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	3.7×10 ¹³	65.2	1.9×10 ¹³	32.7	0	0
델란티 (수화제)	겉무늬썩음병	1 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	4.8×10 ¹³	83.5	0	0	0	0
포름씨 (수화제)	역병	2 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.4×10 ¹³	93.9
델란 (수화제)	탄저병, 흑점병 등	1 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	4.9×10 ¹³	84.9	1.3×10 ¹³	22.1	0	0
산요루 (유제)	흰가루병	2 µg/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100
사프롤 (유제)	녹병, 흰가루병	1 µl/ml	5.7×10 ¹³	100	5.6×10 ¹³	98.4	5.5×10 ¹³	95.4	0	0
헥사코나졸 (액상수화제)	별무늬병, 녹병 등	0.5 µl/ml	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	5.7×10 ¹³	100	0	0

나. 생물비료의 물리적, 화학적 특성 조사(pH, 수분함량, 총균수, 색도, 냄새 등) :

인산가용화균 PS-113을 분생포자만을 포함하는 액상 제재, 고체배양 후 분생포자와 배지를 포함하는 분말상의 제재, 고체배양 후 분생포자와 배지를 포함하는 과립상 제재, 액체배양 후 균사체 형태의 액상 제재, 액체배양후 분말상 제재, 인산가용화균과 젖산균의 복합생물비료 등의 다양한 제형으로 제조하여 이들 생물비료의 장기저장에 따른 물리적, 화학적, 생물학적 물성변화를 pH, 수분함량, 총균수, 색도, 냄새 등의 항목으로 조사하였다. 그 결과 pH 변화는 1년 까지 제형에 관계없이 거의 발생하지 않았으며, 단지 비누침가구에서만 첨가농도가 증가함에 따라 pH가 증가하였다. 또한 수분함량도 1년까지 거의 변화가 없음을 관찰하였다. 색도와 냄새는 각각 육안적 및 후각적 판별에 의한 관능평가를 실시한 결과 초기에 비하여 장기저장에 따른 급격한 변화는 거의 관찰되지 않았다.

9. 생물비료의 환경생태학적인 안전성(어독성, 주요작물에 대한 유해성 등) :

생물비료로 개발된 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 환경생태학적인 안정성 평가는 농업환경에서 대단히 중요하다. 그러나 상기 균주는 국내의 토양환경에서 순수 분리하였기 때문에 환경에 피해를 입힐 가능성은 근본적으로 매우 낮은 것으로 생각된다. 본 연구에서는 미꾸라지와 일본송사리를 이용한 어독성 시험 및 배추, 콩, 녹두, 홍대, 옥수수 등의 주요 작물에 대한 약해시험을 동시에 실시하였다.

가. 인산가용화균의 어독성 시험 :

어독성 시험을 위하여 미생물농약의 등록시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 의하여 시험을 수행하였다. 시험어종은 (주) 경농에서 어독성 시험을 위하여 인공사육하고 있는 미꾸라지와 일본송사리를 분양받아 사용하였다. 미꾸라지는 5 ~ 10cm, 송사리는 2 ~ 3cm 정도 크기의 건강하고 균일한 개체를 사용하였다. 또한 적절한 순화 및 급이를 하였으며, 시험개시 24시간 전에는 급이를 중단하였다. 시험용 수조는 유리로 된 원통수조를 사용하였으며, 시험용수는 지하수를 사용하여 수온을 20 ~ 2

8℃로 항상 유지하였다. 어류는 수조당 10마리 이상을 넣어 시험하였으며, 인산가용화균의 포자를 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 넣은 후 48시간 및 96시간에서의 치사율을 결정하여 어독성을 시험하였다. Fig. 72 ~ Fig. 73의 결과가 보여주는 바와 같이 처리한 포자농도가 실제의 포장처리 농도보다 1,000배 이상 높은 농도인 1.0×10^8 conidia/ml로 과용도로 처리했을 때도 50마리의 미꾸라지 및 송사리는 48시간과 96시간 모두 무처리구와 마찬가지로 한 마리도 죽지 않았다. 따라서 인산가용화균은 어독성이 전혀 없는 것으로 판정되었다.



Fig. 72. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against loach (*Misgurnus mizolepis*), a kind of fish, during 96 hours treatment.



Fig. 73. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against monnow (*Oryzias latipes*), a kind of fish, during 96 hours treatment.

나. 인산가용화균의 주요작물에 대한 약해 시험 :

인산가용화균의 작물에 대한 약해시험을 위하여 본 연구에서는 배추, 콩, 녹두, 홍대, 옥수수 등의 작물에 대한 이 균의 발아억제시험을 수행하였다. 시험방법은 각종 종자를 30초간 70% ethanol에 담귀서 표면살균한 다음, 3회동안 멸균증류수에 세척하였다. 이 종자들은 곧바로 1% 락스에 20분동안 담귀서 꺼낸 후 3회간 멸균증류수로 세척하여 전처리를 완료하였다. 이것을 5시간 동안 멸균증류수에 침지시킨 후 발아 시험에 사용하였다. 시험방법은 솜에 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 포자액을 충분히 적신다음 petri dish의 바닥에 골고루 퍼뜨린다. 이 위에 전처리한 종자를 올려놓고 25℃의 growth chamber에서 3일간 배양하여 작물의 발아 및 생육상태를 조사하였다.

그 결과 Fig. 74 ~ Fig. 78에서 보여주는 바와 같이 무처리구와 생물비료 처리구에서 모두 작물의 종자발아가 정상적으로 100% 일어났으며, 식물의 생육상태는 인산가용화균 처리구에서 더 좋은 것으로 나타났다.

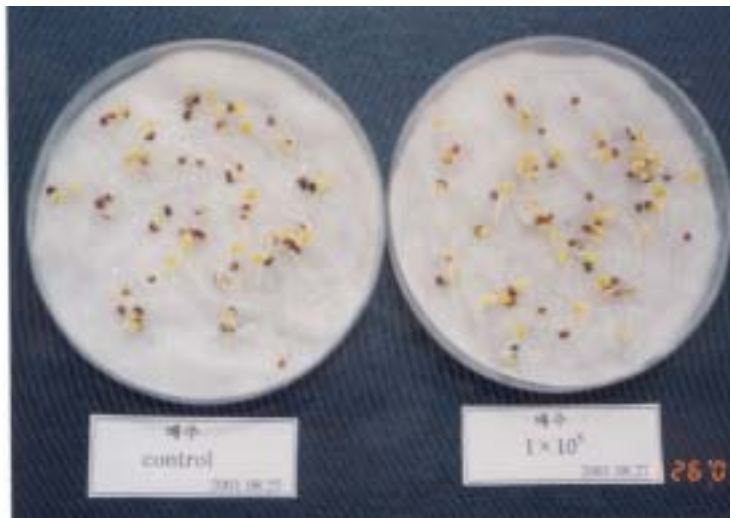


Fig. 74. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*) during 3-days germination.

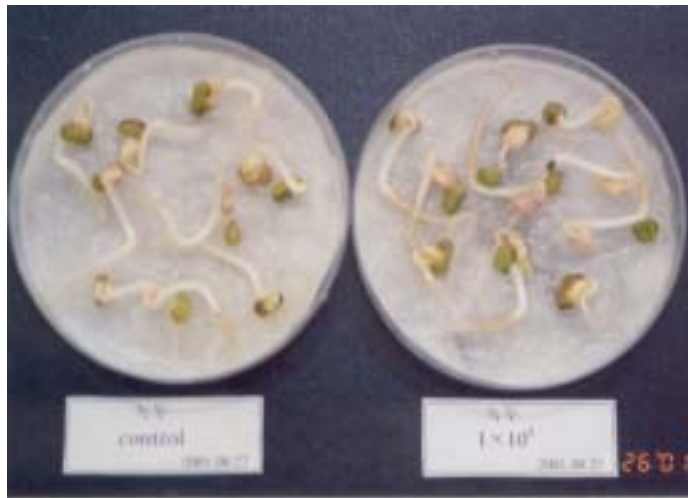


Fig. 75. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against mung bean (*Phaseolus radiatus*) during 3-days germination.

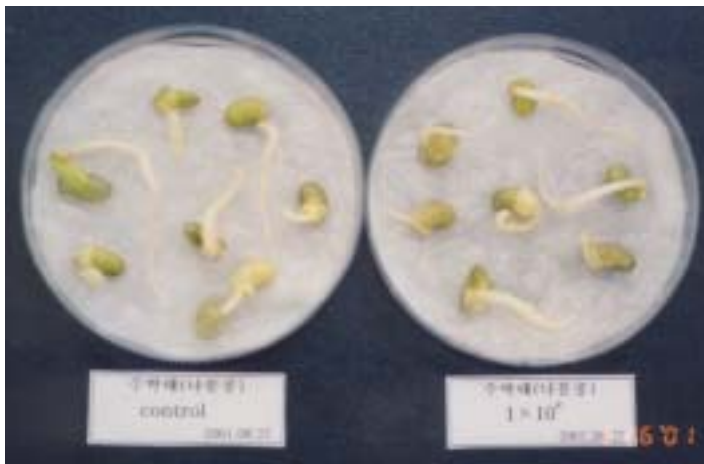


Fig. 76. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against soy bean (*Glycine max*) during 3-days germination.

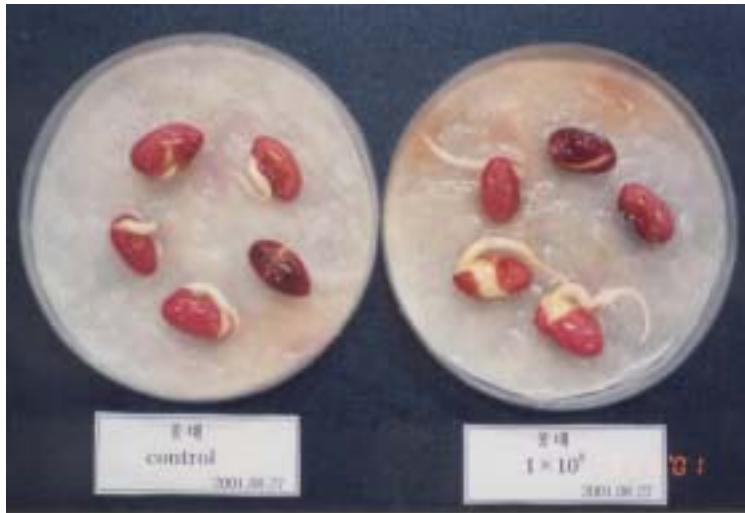


Fig. 77. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against red bean (*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*) during 3-days germination.

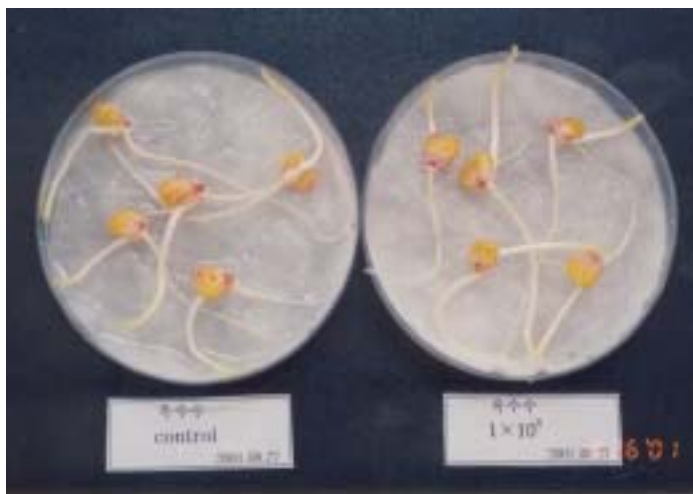


Fig. 78. Toxicity test of *Penicillium* sp. PS-113 conidia (inoculum : 1.0×10^8 conidia/ml) against corn (*Zea mays*) during 3-days germination.

10. 생물비료의 비효검정 :

가. pot에서의 생육시험 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 생물비료로서의 작물생육효과를 시험하기 위하여 일반 발토양과 상토를 1대 1(V/V)로 섞은 토양을 pot(Φ7.0×6.5cm)에 담고 1.0×10^8 spore/g토양 농도로 인산가용화균을 접종한 후 상토에서 발아한 콩(*Glycine max*), 홍대(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*), 녹두(*Phaseolus radiatus*), 옥수수(*Zea mays* Suwon 19), 배추(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*)를 pot에 이식하여 2주간 재배하면서 초장, 뿌리길이를 측정하여 Fig. 79 ~ Fig. 87 및 Table 69에 나타내었다. 이 결과에 의하면 시험한 모든 작물에서 인산가용화균 처리구는 무처리구에 비하여 월등한 생육효과가 있음을 확인할 수 있었다. 특히 콩의 초장은 무처리구에 비해 약 1.5배 더 신장되었으며, 녹두의 뿌리길이는 약 3.4배 더 성장함을 알 수 있었다.

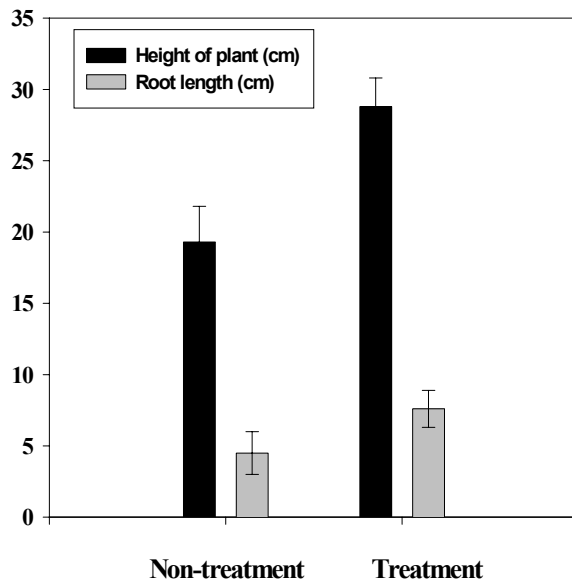


Fig. 79. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of soy bean (*Glycine max*) after 2 weeks cultivation on pot.



대조구

처리구

Fig. 80. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of soy bean (*Glycine max*) after 2 weeks cultivation on pot.

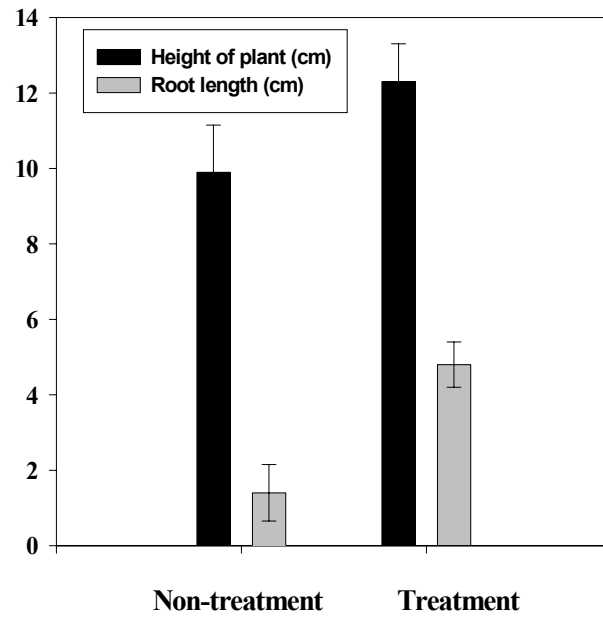


Fig. 81. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of mung bean (*Phaseolus radiatus*) after 2 weeks cultivation on pot.



대조구

처리구

Fig. 82. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of mung bean (*Phaseolus radiatus*) after 2 weeks cultivation on pot.

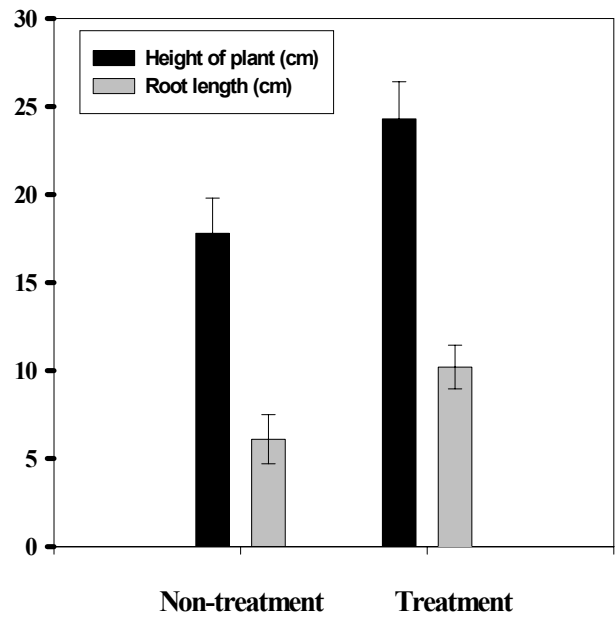


Fig. 83. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of corn (*Zea mays* Suwon 19) after 2 weeks cultivation on pot.



대조구

처리구

Fig. 84. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of corn (*Zea mays*) after 2 weeks cultivation on pot.

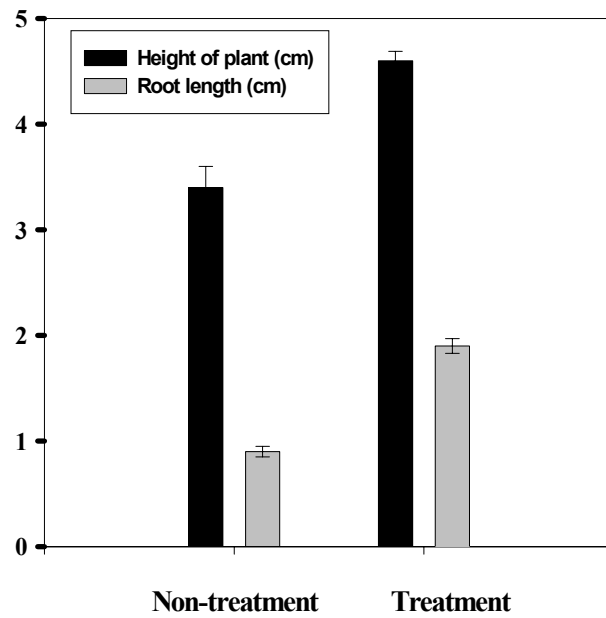


Fig. 85. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*) after 2 weeks cultivation on pot.



대조구

처리구

Fig. 86. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*) after 2 weeks cultivation on pot.

Table 69. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of red bean (*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*) after 2 weeks cultivation on pot.

Treatment	Parameter	Height of plant (cm)
No treatment (Control)		19.5
Treatment		22.8



대조구

처리구

Fig. 87. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of red bean (*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*) after 2 weeks cultivation on pot.

나. 시설재배 하우스에서의 작물생육시험 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 생물비료로서의 작물생육효과를 시험하기 위하여 경북 성주군 초전면(참외재배), 김천시 조마면(감자재배), 칠곡군 약목면(방울 토마토), 충북 괴산군 불정면(고추, 오이) 일대의 유기농가 시설하우스에서 작물생육 시험을 실시하였다.

1) 참외에 대한 생육시험 :

성주군에서의 참외재배에서는 2002년 2월경에 약 100평(3.5 × 100 m)의 시설재배 하우스 3동을 준비하여 각각에 참외 모종을 이식한 후 1동은 무처리구, 2동에는 약 1주후에 1.0×10^{10} conidia/ml 농도의 인산가용화균 포자를 4 Liter 준비하여 물로 10배 희석한 후 1회 토양에 관주하여 생육시험을 실시하였다(Fig. 88). 그 결과 Fig. 89 ~ Fig. 90의 결과에서 보여주는 바와 같이 참외의 잎색깔이 무처리구에 비해 짙은 녹색을 띄었으며, 열매의 당도가 약 2 Brix 증가함을 관찰(Fig. 91)하였다. 이때 참외수확량에 있어서도 약 10%의 증수효과가 있었다. 3동에는 인산가용화균을 5일간 액상배양한 균사체배양액(4 Liter)을 물로 10배 희석하여 처리하였으며, 그 결과 포자처리시와 유사한 생육효과를 보여주었다(Fig. 91).



Fig. 88. Photograph showing grafted melon cultivation at Sungju-Gun area.



대조구



처리구

Fig. 89. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of grafted melon plant.



처리구

대조구

Fig. 90. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the color of grafted melon leaves.

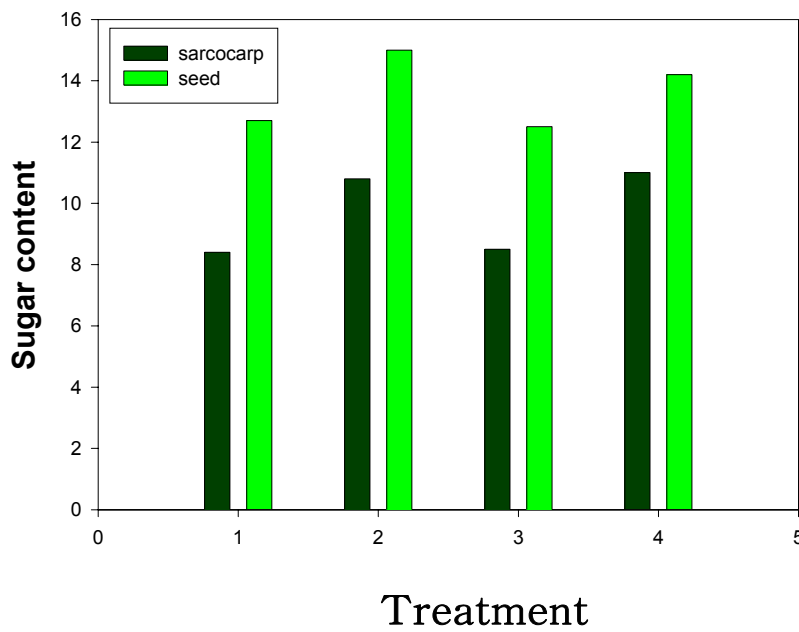


Fig. 91. Sugar content in the grafted melon treated with conidia(1, 2) and culture broth(3, 4) of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113. 1. no treatment(control), 2. *Penicillium* sp, PS-113 conidia, 3. no treatment(control), 4. *Penicillium* sp. PS-113 mycellium.

2) 감자에 대한 생육시험:

경북 김천시 조마면에서의 감자재배에서는 2001년 12월 26일에 약 100평(5.5 × 66 m)의 시설재배 하우스 4동에 감자 종근을 이식한 후 각 동을 절반씩 구획하여 절반은 무처리구, 절반은 인산가용화균 처리구로 구분하였다. 즉 처리구는 이식 후 2주 경에 1.0×10^{10} conidia/ml 농도의 인산가용화균 포자를 2 Liter씩 준비하여 10배 희석하여 1회 작물에 뿌려준 후 생육시험을 실시하였다. 이식 후 2개월이 경과했을 때(2002. 2. 22) 생육효과를 비교한 결과 Table 70 및 Fig. 92 ~ Fig. 93의 결과에서 보여주는 바와 같이 인산가용화균 처리구는 무처리구에 비해 감자의 초장이 약 1.6배 증가하는 효과가 있었으며(Table 70, Fig. 92), 또한 식물병 발생도 적음을 확인할 수 있었다(Fig. 92 ~ Fig. 93).

3.5개월이 경과하여(2002. 4. 10) 감자를 수확한 후 감자의 수확량, 당도, 수분함량, 감자 더듬이병 발생정도 등을 조사한 결과(Table 70, Fig. 94 ~ Fig. 96), 무처리구에 비해 처리구의 감자수확량은 약 1.7배(Table 71), 당도는 약 1.3배(1 Brix)증가하였다(Fig. 94). 또한 감자 더듬이병의 발생이 현격히 감소하는 효과가 있었다(Fig. 95). 그러나 수확한 감자의 수분함량에서는 처리구와 무처리구 간에 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다(Fig. 96). 이상의 결과로부터 인산가용화균의 처리가 온실하우스내 감자생육에 매우 뛰어난 효과가 있음을 알 수 있다.

Table 70. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of potato(*Solanum tuberosum*) after 2 months cultivation in greenhouse.

Treatment	Parameter	Height of plant (cm)
No treatment (Control)		34.0 ± 3.0
Treatment		54.0 ± 2.0



대조구



처리구

Fig. 92. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the growth of potato(*Solanum tuberosum*).



대조구

실험구

Fig. 93. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the leave of potato(*Solanum tuberosum*).

Table 71. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the yield of potato(*Solanum tuberosum*) after 3.5 months cultivation in greenhouse.

Treatment	Parameter	Yield (Kg/100m ²)
No treatment (Control)		167.8
Treatment		282.4

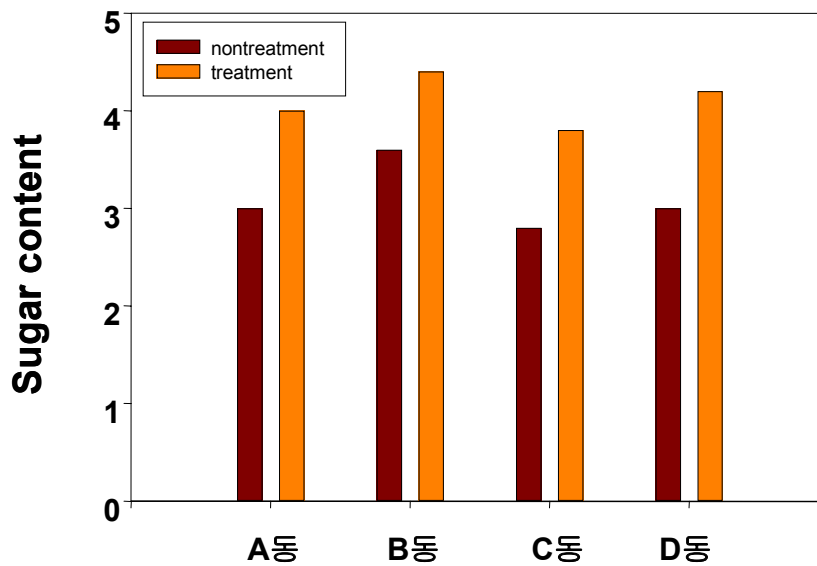


Fig. 94. Sugar content in the potato(*Solanum tuberosum*) treated with and without of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113.



감자더탱이병
(무처리구)



처리구

Fig. 95. Effect of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113, on the potato scab disease of potato(*Solanum tuberosum*).

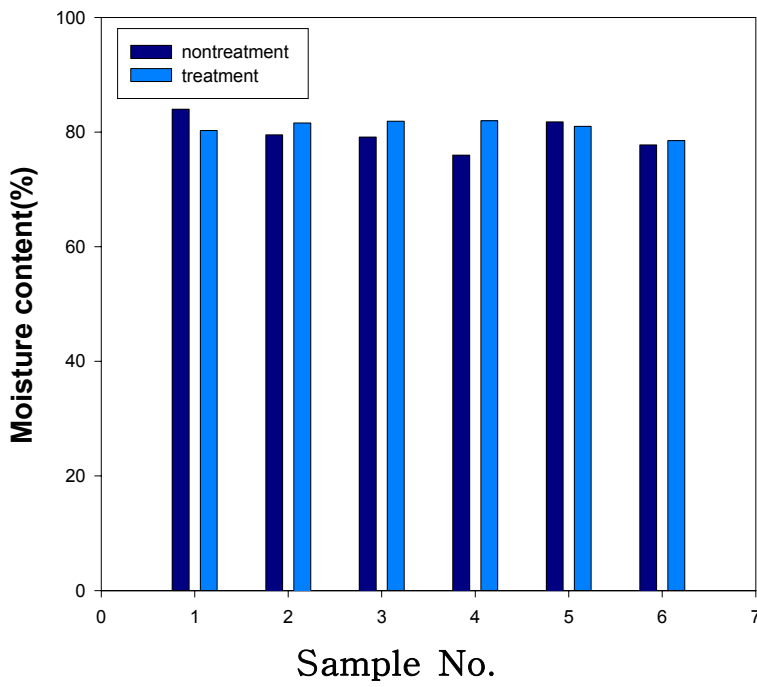


Fig. 96. Moisture content in the potato(*Solanum tuberosum*) treated with and without of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113.

3) 방울토마토에 대한 생육시험 :

경북 칠곡군에 소재한 방울토마토를 대단지로 재배하는 일반농가의 100평 온실하우스에 1.0×10^5 농도로 희석한 인산가용화균의 분생포자를 시비하여 대조구(무처리구)와 비교한 결과를 Fig. 97, Fig. 98에서 보여주고 있다. 이 결과에서 보여주는 바와 같이 인산가용화균을 처리한 시험구에서는 방울토마토의 생육이 왕성하였으며, 잎의 색깔도 짙은 녹색을 띠었다. 이에 비해 대조구는 전체적으로 식물의 생육상태가 나쁘고 잎 색깔도 옅은 연두색과 연노랑색을 띠을 수 있다(Fig. 97, Fig. 98).



처리구



대조구

Fig. 97. Effect of phosphate-solubilizing fungi on the growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*).

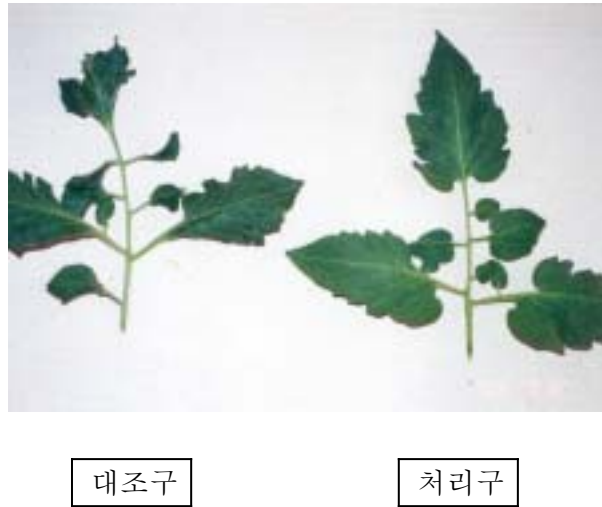


Fig. 98. Effect of phosphate-solubilizing fungi on the leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*).

4) 고추에 대한 생육시험 :

난용성 인산염을 토양중에서 쉽게 가용화시킬 수 있는 인산가용화균(시제품명: 활인산골드) 및 유산균을 고추에 처리하여 고추의 생육증진 효과를 검정하고자 하였다. 본 연구를 위하여 (주)흙살림의 시험포장(충북 괴산군 불정면 앵천리 소재)에서 고체배양한 *Penicillium* sp. PS-113 균의 포자를 무처리, 5.0×10^4 , 5.0×10^5 , 5.0×10^6 spore/ml 농도로 각각 제작하여 50ml씩 정식 10일 후부터 7일 간격으로 4회 관주처리하였다. 그 결과(Table 72, Fig. 99) 처리구의 고추 1주당 지상부 식물(잎과 줄기)의 생체중은 평균 38.0g으로 무처리구에 비해 약 1.5배 증가하였으며, 뿌리무게는 13.0g으로서 무처리구에 비해 약 2배 증가하였다. 또한 초장에서도 처리구는 48.3cm로서 무처리구에 비해 약 120%의 신장효과가 있었으며, 수확한 고추의 평균무게는 고추 1주당 221.0g으로서 무처리구에 비해 7.1g씩 높은 효과가 있었다.

Table 72. Total wet weight and numbers of red pepper harvested from the various treatments.

Treatment	Total weight of red pepper (g)	Total No. of red pepper
<i>Penicillium</i> sp. PS-113 (5.0×10^4 conidia/ml)	154.2	30
<i>Penicillium</i> sp. PS-113 (5.0×10^5 conidia/ml)	184.5	41
<i>Penicillium</i> sp. PS-113 (5.0×10^6 conidia/ml)	199.9	27
<i>Penicillium</i> sp. PS-113 (5.0×10^4 conidia/ml) + <i>Lactobacillus</i> sp. H-20 (500 times diluted)	155.5	31
<i>Penicillium</i> sp. PS-113 (5.0×10^5 conidia/ml) + <i>Lactobacillus</i> sp. H-20 (500 times diluted)	203.0	29
<i>Penicillium</i> sp. PS-113 (5.0×10^6 conidia/ml) + <i>Lactobacillus</i> sp. H-20 (500 times diluted)	221.0	32
<i>Lactobacillus</i> sp. H-20 (500 times diluted)	151.7	32
Non-treatment	135.3	36



Fig. 99. Photograph showing the different growth rate of red pepper depending on the treatment conditions. 1; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^6 conidia/ml), 2; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^6 conidia/ml) + *Lactobacillus* sp. H-20 (500 times diluted), 3; *Lactobacillus* sp. H-20 (500 times diluted), 4; non-treatment (control).

5) 오이에 대한 생육시험 :

인산가용화균(상품명: 활인산골드) 및 유산균을 오이에 처리하여 오이의 생육증진 효과를 검정하고자 하였다. 본 연구를 위하여 (주)흙살림의 온실하우스 시험포장 약 200평(충북 괴산군 불정면 앵천리 소재)에서 재배시험을 실시하였다(Fig. 100). 고체배 양한 *Penicillium* sp. PS-113 균의 포자를 무처리, 5.0×10^4 , 5.0×10^5 , 5.0×10^6 spore/ml 농도로 각각 제작하여 주당 200ml씩 정식 10일 후부터 7일 간격으로 4회 관주처리하였다. 그 결과 Fig. 101 및 Fig. 102에서 보는 바와 같이 F (활인산골드 5.0×10^6 cfu/ml + 유산균 500배) 처리구에서 평균열매 길이가 31.9cm로 무처리구(CON)에 비하여 3cm 정도 긴 것으로 조사되었고, A, B, C, E, G 처리구 모두 무처리구(CON)에 비하여 0.4~2.3cm의 차이를 보였다. 전체적으로 볼 때 모든 처리구가 무처리구에 비하여 열매 평균 길이가 긴 것으로 조사되었다. 또한 F 처리구가 다른 처리구에 비하여 열매 중간 평균 지름이 3.9cm로 가장 길게 조사되었으며, 무처리구에 비하여 0.7cm 더 긴 것으로 나타났다. F 처리구를 제외한 다른 처리구의 경우 무처리구와 비교했을 때 0.2~0.4cm의 차이를 나타냈다. 그 결과 모든 처리구 가운데 F 처리구에서 열매 평균 무게가 310.6g으로 무처리구에 비하여 89.2g 더 나가는 것으로 조사되었으며, A, B, C, D, E, G 처리구 모두 무처리에 비하여 열매 평균 무게가 22.7~62.3g 더 나가는 것으로 조사되었다.



Fig. 100. Photograph showing cucumber cultivation at Goisan-Gun area.

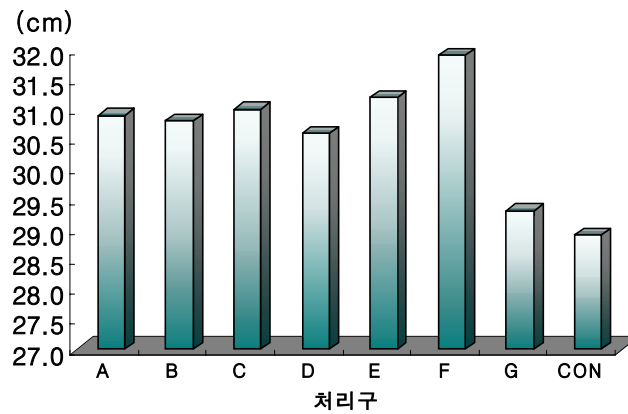


Fig. 101. Comparison of average length of harvested cucumber according to the treatment conditions. A; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^4 conidia/ml), B; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^5 conidia/ml), C; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^6 conidia/ml), D; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^4 conidia/ml) + *Lactobacillus* sp. H-20 (500 times diluted), E; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^5 conidia/ml) + *Lactobacillus* sp. H-20 (500 times diluted), F; *Penicillium* sp. PS-113 (5.0×10^6 conidia/ml) + *Lactobacillus* sp. H-20 (500 times diluted), G; *Lactobacillus* sp. H-20 (500 times diluted), Con; non-treatment.

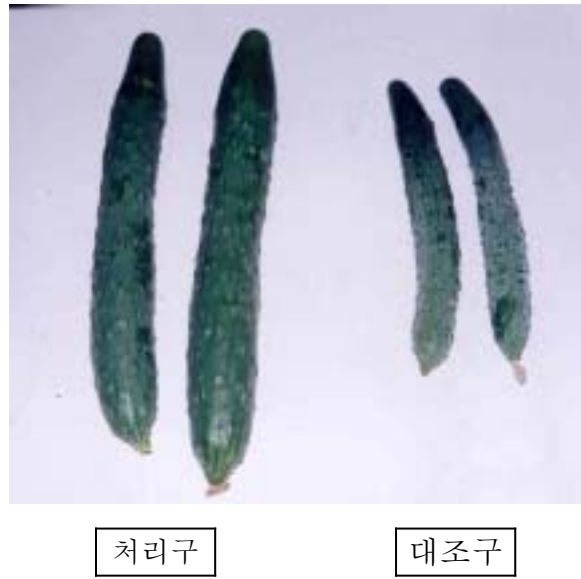


Fig. 102. Effect of phosphate-solubilizing fungi on the growth of cucumber.

다. 인산가용화균과 젖산균 혼용시 비효상승효과 검정 :

인산가용화균과 젖산균 혼용시 비효상승효과를 검정하기 위하여 시설재배 하우스에서의 생육시험을 실시하였다. 성주군에서의 참외재배는 2002년 2월경에 약 100평 (3.5 × 100 m)의 시설재배 하우스 2동을 준비하여 각각에 참외 모종을 이식한 후 1동은 무처리구, 2동에는 약 1주후에 1.0×10^{10} cfu/ml 유산균과 1.0×10^{10} conidia/ml 인산가용화균의 포자를 각각 2 Liter씩 준비하여 이들을 혼합하여 물로 10배 희석한 후 1회 토양에 관주하여 생육시험을 실시하였다(Fig. 103). 그 결과 혼용처리구에서는 무처리구에 비해 당도에 있어서 다소 높은 결과를 보여주었으나 (Fig. 1103), 인산가용화균을 단독으로 처리한 결과(Fig. 91)에 비해서는 오히려 낮은 당도를 보여주었다. 따라서 인산가용화균과 유산균의 혼용처리는 참외재배에서 약간의 효과만 있음을 확인할 수 있었다.

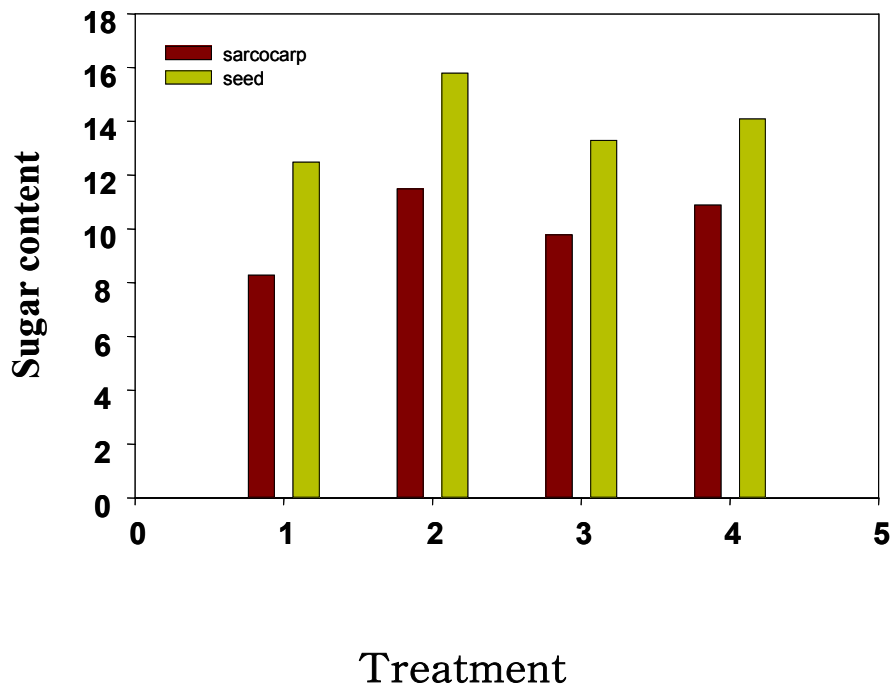


Fig. 103. Sugar content in the grafted melon treated with the mixtures of phosphate-solubilizing microorganisms, *Penicillium* sp. PS-113 and *Lactobacillus plantarum*. 1. no treatment(control), 2. *Lactobacillus plantarum* only, 3. mixtures of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum*, 4. mixtures of *Penicillium* sp. PS-113 mycellium and *Lactobacillus plantarum*.

11. 생물비료의 보관조건에 따른 물리화학적 특성 :

인산가용화균의 포자에 대한 고체분말상, 고체과립상, 액상 등의 각종 제형을 보관온도(4, 25, 37℃) 및 보관습도(10, 15, 20%)에 따라 색상, 냄새, pH 변화 등의 품질변화를 조사하였다. 그 결과 Table 73 ~ 82의 결과에서 보여주는 바와 같이 6개월 간의 저장 후에도 별다른 품질변화가 관찰되지 않았다. 즉 pH 변화는 제형에 관계없이 거의 발생하지 않았으며, 색도와 냄새에서도 각각 육안적 및 후각적 관별에 의한 관능평가를 실시한 결과 초기에 비하여 장기저장에 따른 변화는 거의 관찰되지 않았다. 단지 액상제형 중에서 비누를 첨가한 제형은 비누성분 자체의 물성변화 때문에 1.0% 이상의 비누첨가 시에 4 ~ 25℃의 온도범위에서 보관할 시에 gel 화가 일어났다.

Table 73. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with bentonite to powder type during the 6 months storage.

Storage condition \ Parameter		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	dark grey	dark grey	fermented	fermented	6.9	6.9
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"
Humidity	10 %	"	"	"	"	"	"
	15 %	"	"	"	"	"	"
	20 %	"	"	"	"	"	"

Table 74. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with diatomite to powder type during the 6 months storage.

Storage condition \ Parameter		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	light brown	light brown	fermented	fermented	7.4	7.4
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"
Humidity	10 %	"	"	"	"	"	"
	15 %	"	"	"	"	"	"
	20 %	"	"	"	"	"	"

Table 75. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with kaoline to powder type during the 6 months storage.

Storage condition \ Parameter		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	dark ivory	dark ivory	fermented	fermented	5.5	5.5
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"
Humidity	10 %	"	"	"	"	"	"
	15 %	"	"	"	"	"	"
	20 %	"	"	"	"	"	"

Table 76. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with talc to powder type during the 6 months storage.

Storage condition \ Parameter		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	light brown	light brown	fermented	fermented	6.5	6.5
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"
Humidity	10 %	"	"	"	"	"	"
	15 %	"	"	"	"	"	"
	20 %	"	"	"	"	"	"

Table 77. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with bentonite to granule type during the 6 months storage.

Storage condition		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	dark grey	dark grey	fermented	fermented	6.9	6.9
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"

Table 78. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with diatomite to granule type during the 6 months storage.

Storage condition		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	light brown	light brown	fermented	fermented	7.4	7.4
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"

Table 79. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with kaoline to granule type during the 6 months storage.

Storage condition		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	dark ivory	dark ivory	fermented	fermented	5.5	5.5
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"

Table 80. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with talc to granule type during the 6 months storage.

Storage condition		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	light brown	light brown	fermented	fermented	6.5	6.5
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"

Table 81. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with 0.1% Trio(V/V) to liquid type during the 6 months storage.

Storage condition		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	green	green	no	no	4.9	5.0
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"

Table 82. Changes of physicochemical properties of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with 0.1% soap(V/V) to liquid type during the 6 months storage.

Storage condition		Color		Odor		pH	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Storage temperature	4 °C	ivory	ivory	soap	soap	5.8	4.8
	25 °C	"	"	"	"	"	"
	37 °C	"	"	"	"	"	"

12. 생물비료의 보관조건에 따른 생활력 검정 :

가. 액상비료의 장기보관에 따른 생활력검정 :

본 연구에서는 많은 종류의 계면활성제 중에서 예비실험을 통하여 가장 효과가 뛰어난 트리오(Trio)와 비누를 포함하는 제형에 대하여 생활력을 검정하였다. 이들을 4℃, 25℃에 보관하면서 0, 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서 생존포자수를 측정하였다(Table 83 ~ Table 86, Fig. 104 ~ Fig. 107). 그 결과 Trio 및 비누의 첨가에 따른 포자의 분산력은 확연하게 개선되었으며, 생존포자수도 대조구에 비해 증가하였다. 즉 Trio의 첨가에 따른 포자의 분산력은 0.1% 첨가구에서 가장 좋았으며, 4℃에서 6개월 저장시 포자생존률은 약 63 log%로서 무첨가구보다 3.4배 증가하였다. 그리고 대체로 저장온도 조건이 낮을수록 생존포자율이 증가하여 1년간 보관 후에도 54 log%의 포자생존률을 확인할 수 있었다. 비누 첨가구에서는 1.0% 이상의 첨가구에서는 액상자체가 gel화 되는 현상이 나타났다. 액상자체가 gel화 되는 것은 액상제제형태보다는 취급과 제품운송과정이 편리할 것이라 판단되나, Trio에 비하여 보관기간에 따른 포자의 생존률이 다소 낮은 것으로 나타났다.

Table 83. Effect of Trio, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 4°C.

Storage time Additive		No. of conidia							
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Trio	0%	2.3×10^{14}	5.6×10^{13}	4.2×10^{11}	6.0×10^{10}	2.8×10^9	1.9×10^9	2.5×10^8	1.1×10^7
	0.001%	1.5×10^{14}	6.8×10^{13}	5.2×10^{11}	7.0×10^{10}	5.2×10^9	4.0×10^9	5.8×10^8	1.5×10^1
	0.01%	2.4×10^{14}	1.9×10^{14}	2.0×10^{12}	1.3×10^{11}	1.2×10^{10}	3.6×10^9	7.4×10^8	4.8×10^7
	0.1%	2.0×10^{14}	4.8×10^{13}	1.5×10^{11}	1.8×10^{11}	1.0×10^{10}	3.8×10^9	8.7×10^8	5.8×10^7
	1.0%	8.0×10^{13}	1.4×10^{13}	5.0×10^{10}	2.0×10^{10}	6.0×10^9	5.3×10^9	1.7×10^8	3.0×10^6

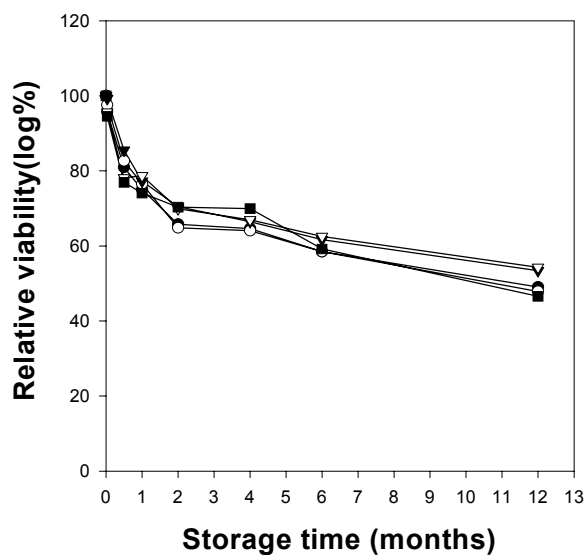


Fig. 104. Effect of Trio on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 4°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 84. Effect of Trio, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia							
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Trio	0%	2.5×10^{14}	1.3×10^{14}	3.0×10^{11}	1.0×10^{11}	4.7×10^9	1.4×10^9	2.2×10^8	1.0×10^6
	0.001%	1.3×10^{14}	1.6×10^{14}	2.6×10^{11}	1.7×10^{11}	2.1×10^{10}	2.6×10^9	2.7×10^8	1.2×10^5
	0.01%	1.8×10^{14}	1.3×10^{14}	3.7×10^{11}	1.6×10^{11}	6.9×10^9	2.1×10^9	3.8×10^8	1.0×10^6
	0.1%	2.7×10^{14}	9.7×10^{13}	3.2×10^{11}	1.3×10^{11}	5.5×10^9	2.0×10^9	3.5×10^8	3.0×10^6
	1.0%	7.9×10^{13}	5.5×10^{13}	1.8×10^{11}	2.0×10^{10}	4.4×10^9	1.4×10^9	4.0×10^7	2.5×10^5

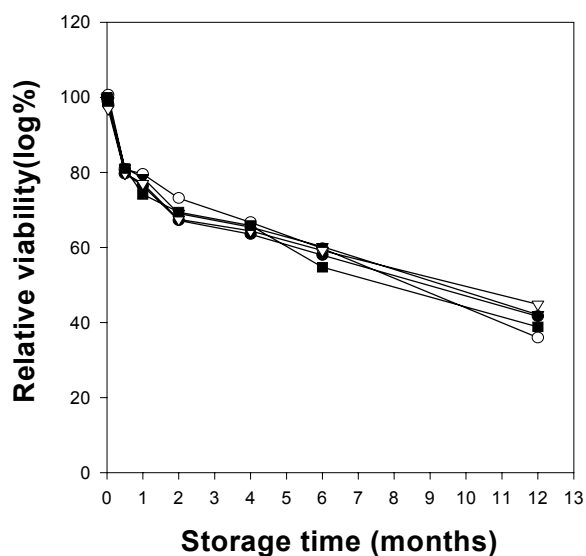


Fig. 105. Effect of Trio on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.001%, ▼—▼; 0.01%, ▽—▽; 0.1%, ■—■; 1.0%.

Table 85. Effect of soap, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 4°C.

Storage time Additive		No. of conidia							
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Soap	0%	4.5×10^{13}	6.0×10^{12}	1.0×10^{10}	4.0×10^8	6.4×10^7	4.1×10^7	2.0×10^7	7.8×10^5
	0.1%	4.1×10^{13}	7.0×10^{12}	5.0×10^{10}	5.0×10^8	9.2×10^7	6.5×10^7	4.8×10^7	3.0×10^6
	1.0%	2.2×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^{10}	3.0×10^8	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	2.0×10^2
	3.0%	5.0×10^{12}	2.0×10^{10}	1.0×10^9	2.0×10^8	1.3×10^5	6.0×10^4	5.0×10^4	0

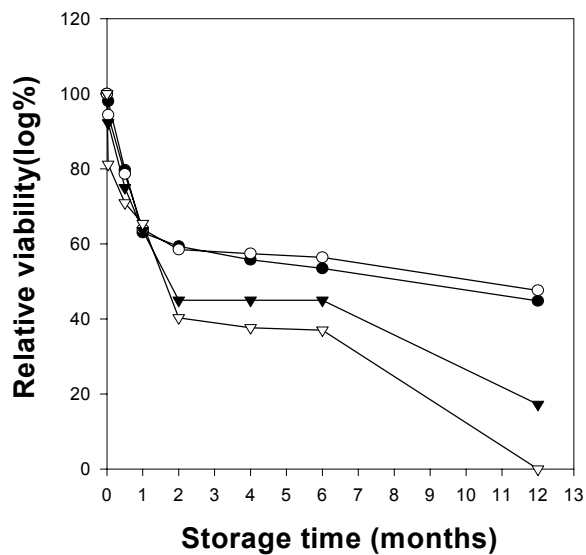


Fig. 106. Effect of soap on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 4°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.1%, ▼—▼; 1.0%, ▽—▽; 3.0%.

Table 86. Effect of soap, an additive, on the liquid formulation of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was tested. The viability of conidia was counted after storing it at 25°C.

Storage time Additive		No. of conidia							
		0	1 day	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Soap	0%	4.2×10^{13}	5.0×10^{12}	1.0×10^{10}	2.4×10^8	4.8×10^7	1.7×10^7	5.0×10^6	8.0×10^5
	0.1%	3.6×10^{13}	1.5×10^{13}	2.0×10^{10}	3.0×10^7	2.0×10^7	7.0×10^6	3.0×10^6	5.0×10^5
	1.0%	1.6×10^{13}	2.0×10^{12}	1.0×10^7	4.0×10^4	4.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^2	1.0×10^1
	3.0%	3.0×10^{12}	1.0×10^{10}	1.0×10^5	2.0×10^4	7.0×10^3	1.0×10^3	0	0

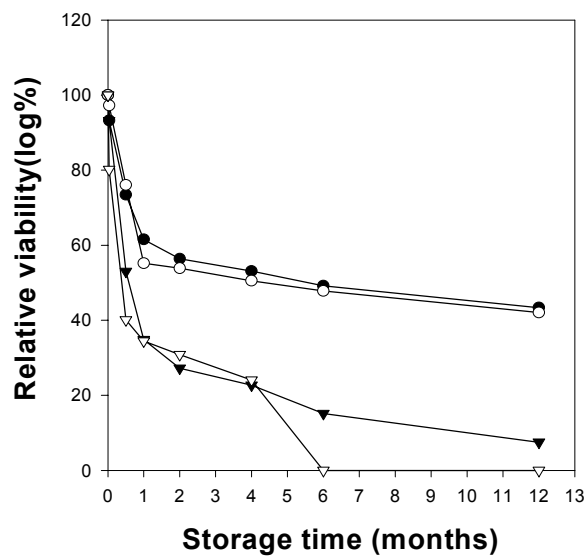


Fig. 107. Effect of soap on the relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia during storage at 25°C. ●—●; 0%, ○—○; 0.1%, ▼—▼; 1.0%, ▽—▽; 3.0%.

나. 고체분말비료의 장기보관에 따른 생활력검정 :

고체배양한 포자와 배지를 포함하는 분말상(powder)의 생물비료를 건조전과 건조 후로 구분하여 생존포자수를 측정하여 비교하였으며, 이들을 4℃ 및 25℃에서 장기저장하면서 포자의 생존율을 조사하였다. 그 결과(Table 87 ~ Table 94, Fig. 108 ~ Fig. 115)에 의하면 60℃ ~ 80℃에서 건조한 경우 2개월까지는 건조공정을 거치지 않은 경우에 비해 일시적으로 생존율이 다소 떨어지나 저장기간이 더 길어질수록 포자의 생존율이 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 100℃ 이상에서 건조한 경우에는 저장기간에 관계없이 생존율이 크게 감소하였기 때문에 이와 같은 조건에서 건조하는 것은 적당하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 고체분말제제를 위한 가장 적합한 온도는 건조시간과 생존율 등을 고려할 때 80℃가 가장 적합한 것으로 결론지었다. 그리고 고체분말 비료의 4℃, 25℃에서의 장기저장에 따른 포자의 생존율을 비교한 결과 큰 차이가 없었다(Table 87 ~ Table 94, Fig. 108 ~ Fig. 115).

Table 87. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^7	4.0×10^7	1.1×10^6	3.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2
10%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.0×10^9	5.0×10^7	3.9×10^5	5.0×10^4	3.0×10^4	1.7×10^3
15%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	2.0×10^7	1.0×10^6	1.0×10^6	2.0×10^5	1.0×10^4
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^9	2.2×10^7	3.0×10^6	3.0×10^6	4.0×10^5	2.0×10^4

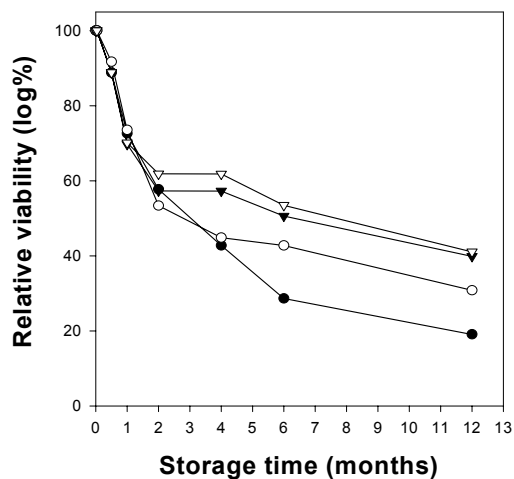


Fig. 108. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 88. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^7	4.0×10^7	1.1×10^6	3.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2
10%	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^7	5.0×10^7	3.9×10^7	2.0×10^6	3.0×10^5	2.0×10^4
15%	3.0×10^{10}	2.0×10^8	1.0×10^8	8.0×10^7	6.6×10^7	6.5×10^7	1.0×10^6	4.7×10^4
20%	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^8	5.0×10^7	2.2×10^7	3.0×10^6	2.0×10^5	1.0×10^4

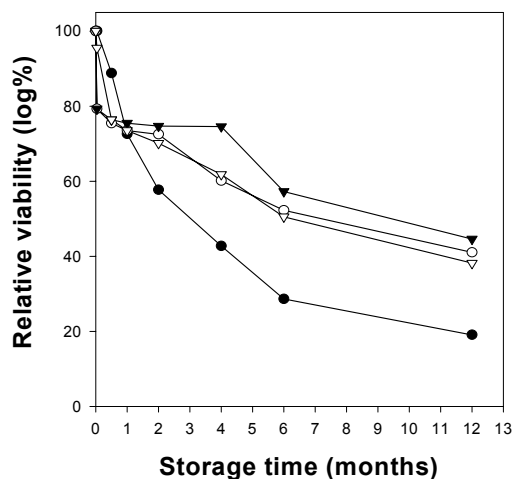


Fig. 109. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 89. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^7	4.0×10^7	1.1×10^6	3.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2
10%	3.0×10^{10}	3.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^5	4.3×10^3	2.0×10^2	0	0
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	1.9×10^6	5.0×10^5	3.0×10^4	2.0×10^4	1.0×10^3	2.0×10^2
20%	3.0×10^{10}	6.0×10^8	1.0×10^7	2.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3	6.0×10^2	0

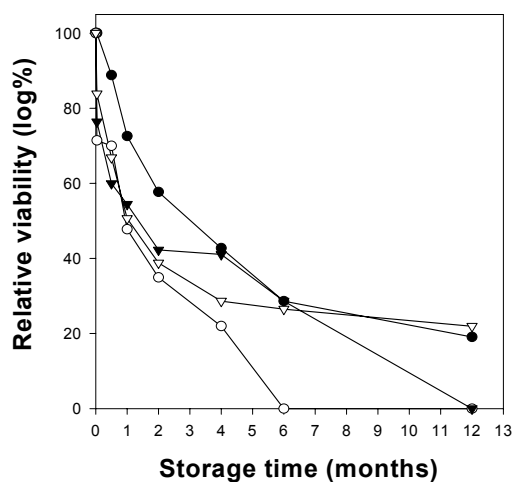


Fig. 110. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 90. Effect of humidities on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C.

Storage time \ Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^7	4.0×10^7	1.1×10^6	3.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2
10%	3.0×10^{10}	5.0×10^7	2.0×10^7	7.0×10^3	3.0×10^3	2.0×10^3	1.0×10^2	0
15%	3.0×10^{10}	5.0×10^7	1.0×10^6	1.0×10^5	3.2×10^3	2.0×10^2	0	0
20%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	4.0×10^5	5.1×10^4	1.5×10^3	1.0×10^3	5.0×10^2	1.0×10^2

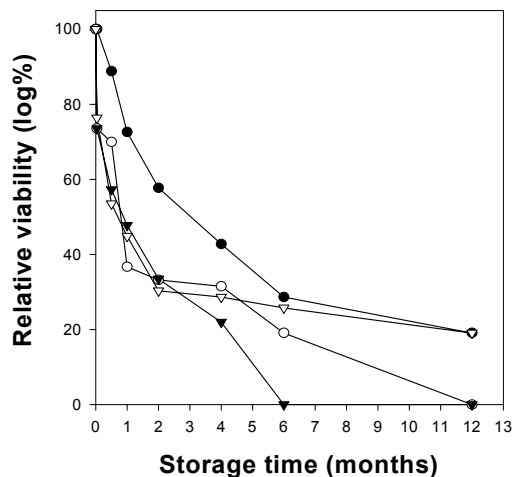


Fig. 111. Effect of humidities on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 91. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5	1.0×10^5	1.0×10^2	0
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	1.6×10^8	2.0×10^7	1.0×10^6	1.9×10^5	7.0×10^4	3.0×10^4
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	5.0×10^9	4.0×10^7	1.0×10^7	9.0×10^6	7.0×10^6	5.0×10^6
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.0×10^9	7.0×10^7	9.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^3	0

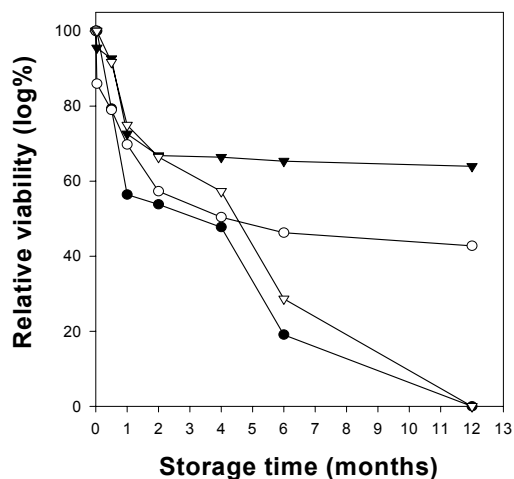


Fig. 112. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 60°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 92. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5	1.0×10^5	1.0×10^2	0
10%	3.0×10^{10}	8.0×10^8	2.0×10^7	1.5×10^5	7.0×10^4	2.0×10^4	5.0×10^3	1.0×10^2
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	4.0×10^7	2.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^4	1.0×10^3	5.0×10^2
20%	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^8	7.0×10^7	2.6×10^7	4.2×10^6	2.7×10^6	1.4×10^6

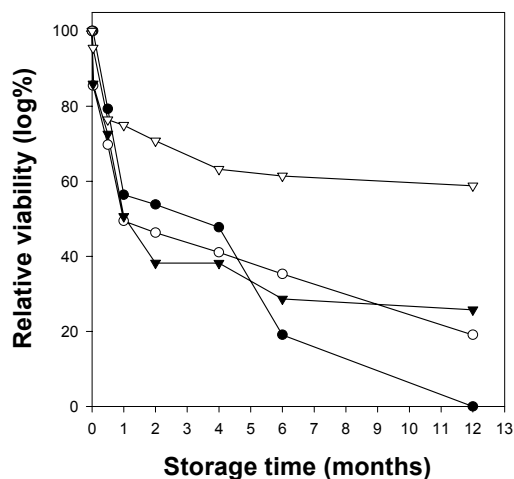


Fig. 113. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 80°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 93. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5	1.0×10^5	1.0×10^2	0
10%	3.0×10^{10}	1.0×10^8	1.0×10^5	5.0×10^4	1.0×10^4	5.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^2
15%	3.0×10^{10}	1.0×10^9	2.0×10^7	2.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^4	2.0×10^2	0
20%	3.0×10^{10}	2.0×10^9	1.0×10^7	1.0×10^5	1.0×10^4	5.0×10^3	1.0×10^2	0

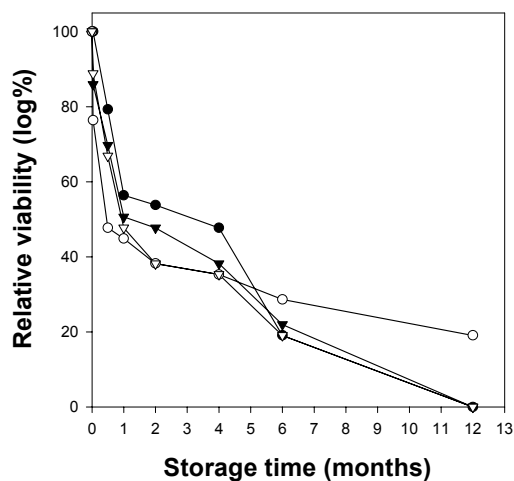


Fig. 114. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 100°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

Table 94. Effect of humidities on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C.

Storage time Humidity	No. of conidia							
	0 time	after dry	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	2.0×10^8	8.0×10^5	4.3×10^5	1.0×10^5	1.0×10^2	0
10%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	4.0×10^9	1.0×10^7	2.0×10^6	5.0×10^5	2.0×10^2	0
15%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	8.0×10^9	3.0×10^7	3.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^3	0
20%	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}	8.0×10^9	1.2×10^7	2.0×10^6	4.0×10^5	2.0×10^2	0

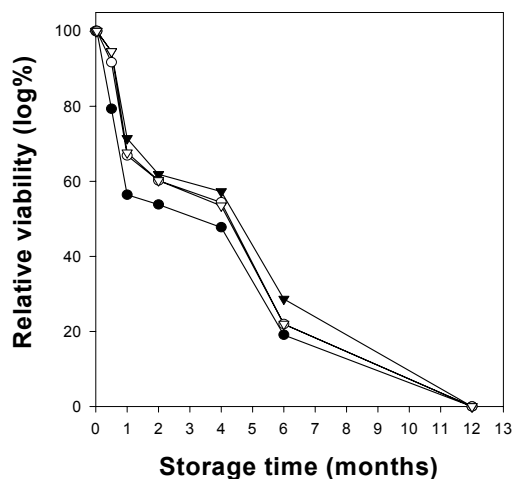


Fig. 115. Effect of humidities on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia after being formulated with powder type, and then dried at 120°C. ●—●; control(50% humidities), ○—○; 10% humidities, ▼—▼; 15% humidities, ▽—▽; 20% humidities.

다. 고체과립상 생물비료의 장기보관에 따른 생활력 검정 :

고체과립상 형태로 제형화한 생물비료를 1년간 4, 25, 37℃에서 저장한 후의 수분함량을 조사한 결과 coating 물질에 관계없이 초기수분함량과 거의 차이가 없었다. 또한 이것을 4, 25, 37℃에서 2주, 1달, 2달, 4개월, 6개월, 1년 동안 장기보관하면서 포자의 생존율을 조사하였다. 그 결과는 Table 95 및 Fig. 116 ~ Fig. 119에 나타내었다. 이상의 결과를 보면 포자를 과립화하여 1년간 장기 저장한 후에도 bentonite와 diatomite로 코팅한 경우 4℃와 25℃ 저장구에서 80 ~ 90 log% 이상의 대단히 높은 생존율을 보였다. 37℃에서 저장할 경우에도 60 ~ 80 log%의 경이적인 포자생존율을 보여주었다.

Table 95. Viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with granule type.

Coating material		Storage time (month)						
		0	0.5	1	2	4	6	12
Bentonite	4℃	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	1.6×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶
	25℃	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	4.9×10 ⁵	3.2×10 ⁵	8.0×10 ⁴
	37℃	2.0×10 ⁶	6.8×10 ⁵	6.2×10 ⁵	2.2×10 ⁴	2.0×10 ⁴	1.8×10 ⁴	3.0×10 ³
Talc	4℃	2.0×10 ⁷	1.0×10 ⁷	9.4×10 ⁶	7.0×10 ⁶	1.3×10 ⁶	4.8×10 ⁵	4.8×10 ⁵
	25℃	2.0×10 ⁷	1.0×10 ⁷	8.6×10 ⁶	2.0×10 ⁶	4.8×10 ⁵	4.5×10 ⁴	4.5×10 ⁴
	37℃	2.0×10 ⁷	3.3×10 ⁵	2.8×10 ⁵	6.0×10 ⁴	5.0×10 ⁴	8.4×10 ³	8.4×10 ³
Kaolin	4℃	8.2×10 ⁸	7.0×10 ⁸	6.2×10 ⁸	6.2×10 ⁸	2.7×10 ⁸	5.8×10 ⁷	1.0×10 ⁷
	25℃	8.2×10 ⁸	6.8×10 ⁸	5.8×10 ⁸	5.8×10 ⁸	6.3×10 ⁷	1.3×10 ⁷	4.0×10 ⁴
	37℃	8.2×10 ⁸	5.0×10 ⁸	4.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	1.3×10 ⁷	5.2×10 ⁶	3.0×10 ²
Diatomite	4℃	2.4×10 ⁸	2.0×10 ⁸	2.0×10 ⁸	2.0×10 ⁸	1.8×10 ⁸	5.2×10 ⁷	5.0×10 ⁷
	25℃	2.4×10 ⁸	2.0×10 ⁸	2.0×10 ⁸	2.0×10 ⁸	1.6×10 ⁸	2.1×10 ⁷	8.0×10 ⁶
	37℃	2.4×10 ⁸	2.0×10 ⁸	2.0×10 ⁸	1.8×10 ⁷	1.4×10 ⁷	7.2×10 ⁶	2.5×10 ⁵

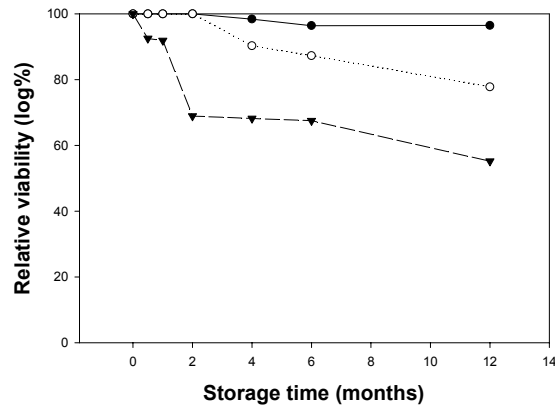


Fig. 116. Relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with granule type by using bentonite as a coating material. ●—●; 4°C, ○—○; 25°C, ▼—▼; 37°C.

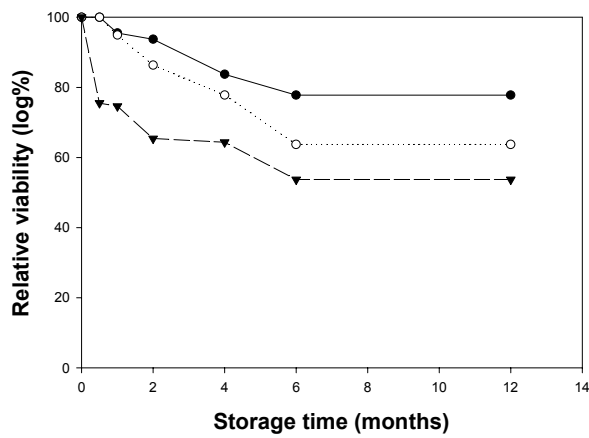


Fig. 117. Relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with granule type by using talc as a coating material. ●—●; 4°C, ○—○; 25°C, ▼—▼; 37°C.

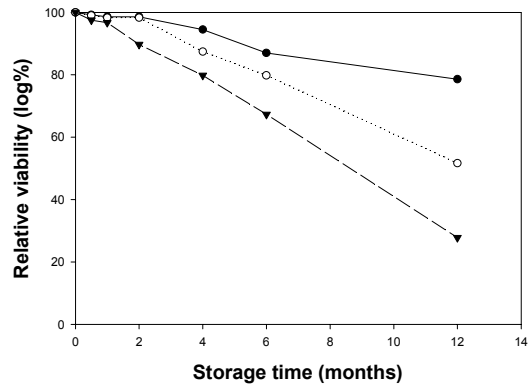


Fig. 118. Relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with granule type by using kaolin as a coating material. ●—●; 4°C, ○—○; 25°C, ▼—▼; 37°C.

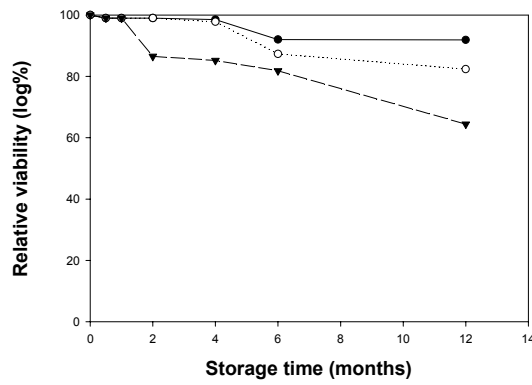


Fig. 119. Relative viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia formulated with granule type by using diatomite as a coating material. ●—●; 4°C, ○—○; 25°C, ▼—▼; 37°C.

라. 균사체 분말비료의 장기보관에 따른 생활력검정 :

균사체 분말비료를 4℃ 및 25℃에서 장기보관하면서 0, 1주, 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서 생존포자수를 측정하였다. 그 결과 Table 96 ~ Table 97, Fig. 120 ~ Fig. 121에서 보여주는 바와 같이 4℃에서 저장한 loess, bentonite, diatomite 첨가구는 1년간의 장기저장 후에도 63 log% 이상의 매우 높은 생존율을 보였다. 그리고 25℃에서 저장한 kaolin, loess, bentonite, diatomite 첨가구는 61 log% 이상의 높은 생존율을 보였다. 저장온도에 따른 균사체 생존율은 loess, bentonite, diatomite, talc 첨가구에서는 크게 변화가 없었으나, kaolin 첨가구는 특이하게도 4℃에서 1년간 보관하였을 때 보다 25℃의 보관온도에서 3.3배 높은 균사체의 생존율을 보여주었다.

다양한 점토광물 첨가에 따른 수분함량변화는 Fig. 122 에서 보여준다. 증량제를 첨가하지 않은 무처리구는 2개월 후 시료자체가 완전히 오염되고 균사체가 전부 사멸되었는데, 이와 같은 문제는 증량제인 점토광물을 첨가함으로써 시료자체의 수분함량을 감소시켜줌으로써 해결할 수 있었다.

Table 96. Effect of soil additives on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type.

Storage time \ Additive	No. of conidia							
	0 time	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	1.0×10^9	2.4×10^7	3.0×10^5	4.0×10^4	0	0	0	0
Talc	3.0×10^6	4.0×10^4	1.0×10^4	5.0×10^3	4.0×10^3	3.0×10^3	2.0×10^3	8.0×10^1
Bentonite	1.4×10^6	8.0×10^5	4.2×10^5	4.0×10^5	3.5×10^5	3.0×10^5	2.2×10^5	6.2×10^4
Diatomite	5.0×10^5	4.0×10^5	8.0×10^4	8.0×10^4	7.0×10^4	7.0×10^4	6.0×10^4	4.0×10^3
Kaolin	4.0×10^5	2.4×10^5	1.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3	2.0×10^2	3.0×10^1	2.0×10^1
Loess	4.0×10^5	3.1×10^5	3.0×10^5	2.8×10^5	2.7×10^5	2.6×10^5	2.6×10^5	4.8×10^4

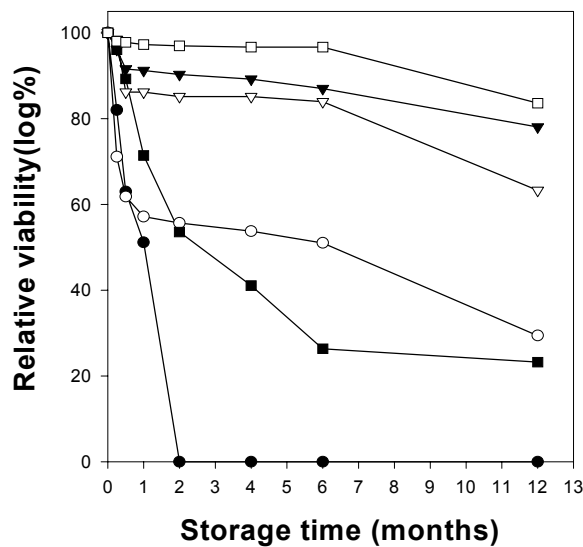


Fig. 120. Effect of soil additives on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type. ●—●; control(no additive), ○—○; talc, ▼—▼; bentonite, ▽—▽; diatomite, ■—■; kaolin, □—□; loess.

Table 97. Effect of soil additives on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type.

Storage time Additive	No. of conidia							
	0 time	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Control	1.0×10^9	1.0×10^7	1.1×10^4	0	0	0	0	0
Talc	3.0×10^6	1.0×10^5	2.0×10^3	1.0×10^3	7.0×10^2	4.0×10^2	1.1×10^2	5.0×10^1
Bentonite	1.4×10^6	1.3×10^6	1.2×10^6	9.0×10^5	5.0×10^5	1.0×10^5	6.2×10^4	1.1×10^4
Diatomite	5.0×10^5	1.0×10^5	5.0×10^4	3.0×10^4	2.5×10^4	2.2×10^4	2.0×10^4	3.0×10^3
Kaolin	4.0×10^5	3.0×10^5	2.8×10^5	2.0×10^5	1.0×10^5	8.0×10^4	6.3×10^4	2.1×10^4
Loess	4.0×10^5	4.8×10^4	4.8×10^4	4.6×10^4	4.3×10^4	4.2×10^4	4.0×10^4	1.1×10^4

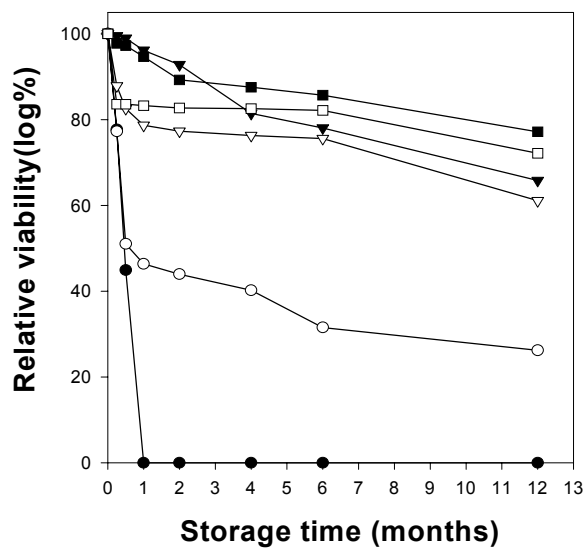


Fig. 121. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 mycelium formulated with powder type. ●—●; control(no additive), ○—○; talc, ▼—▼; bentonite, ▽—▽; diatomite, ■—■; kaolin, □—□; loess.

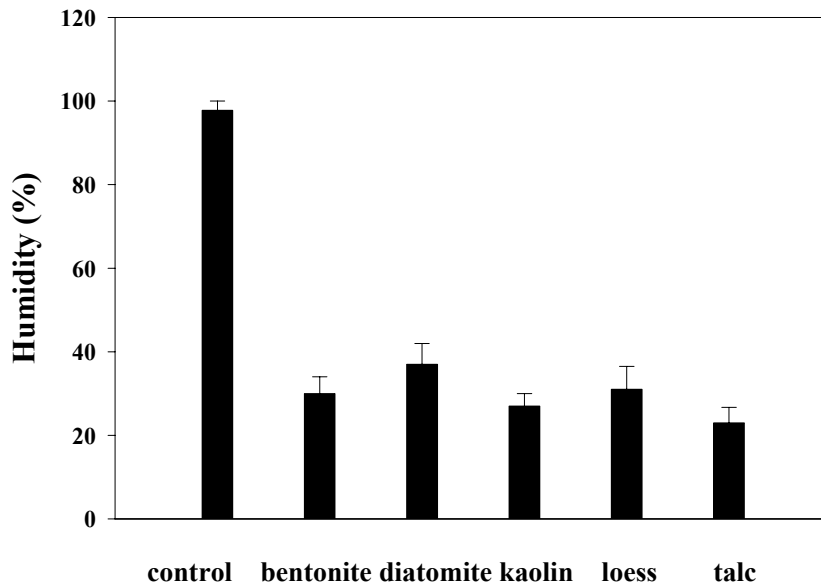


Fig. 122. Humidity change of formulants by adding various clay chemicals.

마. 인산가용화균과 젖산균의 복합비료의 장기보관에 따른 생활력 검정 :

인산가용화균과 젖산균의 복합비료 형태의 제형을 4℃, 25℃, 37℃에 장기보관하면서 0, 1주, 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 간격으로 시료를 채취하여 PDA 평판배지에서 생존포자수를 측정하였다. 혼합된 생물비료로부터 균체의 생존율을 조사하기 위하여 인산가용화균을 측정할 때는 70℃에서 2시간 동안 균체를 전처리하여 젖산균을 대부분 사멸한 후에 PDA 평판배지에서 포자수를 측정하였다. 그리고 젖산균의 측정은 젖산균이 포자에 비해 성장이 빠를 뿐만아니라 MRS 선택배지에서 측정함으로써 젖산균만 선택적으로 성장하도록하여 균체수를 측정하였다. 그 결과 Table 98 ~ Table 103 및 Fig. 123 ~ Fig. 128에서 보여주는 바와 같이 1년간의 장기보관 시에도 규조토 첨가구에서 저장온도에 관계없이(4℃, 25℃) 두 균주가 대부분 80 log% 내외의 높은 생존율을 보여주었다.

Table 98. Effect of soil additives on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media.

Storage time Additive	No. of conidia								
	Before coating	After coating	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Talc	2.2×10^8	9.0×10^7	7.0×10^7	5.0×10^7	3.0×10^7	1.0×10^7	6.3×10^6	1.6×10^6	4.5×10^4
Bentonite	7.2×10^8	7.1×10^8	4.0×10^7	1.9×10^8	8.0×10^7	6.0×10^7	5.0×10^7	2.5×10^6	8.0×10^6
Diatomite	1.9×10^9	2.6×10^8	1.7×10^8	2.0×10^8	1.3×10^8	9.0×10^7	7.0×10^7	2.4×10^7	9.6×10^6
Kaolin	2.3×10^8	2.0×10^7	1.8×10^8	8.0×10^7	5.0×10^7	3.2×10^7	2.0×10^7	5.3×10^6	4.0×10^5

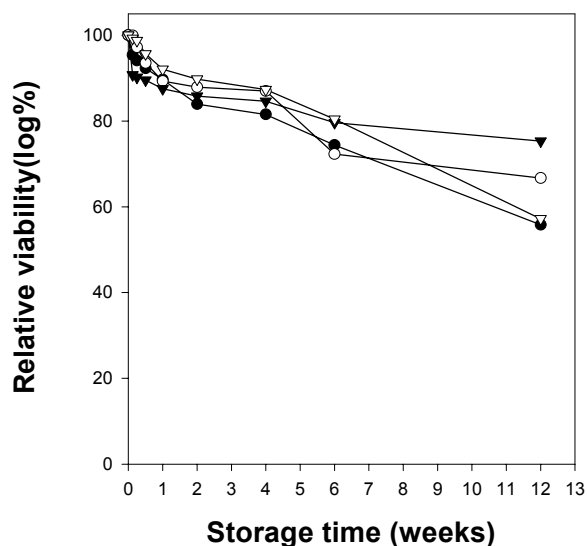


Fig. 123. Effect of soil additives on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 99. Effect of soil additives on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media.

Storage time Additive	No. of conidia								
	Before coating	After coating	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Talc	2.2×10^8	9.0×10^7	8.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^7	1.0×10^5	1.0×10^4	0	0
Bentonite	7.2×10^8	7.1×10^8	7.0×10^7	1.0×10^8	1.0×10^7	1.0×10^6	3.0×10^5	1.0×10^2	1.0×10^1
Diatomite	1.9×10^9	2.6×10^8	4.6×10^8	8.0×10^7	7.0×10^7	4.0×10^7	1.8×10^7	1.0×10^6	6.0×10^5
Kaolin	2.3×10^8	2.0×10^7	7.0×10^7	1.0×10^7	1.0×10^6	5.0×10^5	2.0×10^4	1.0×10^4	1.0×10^3

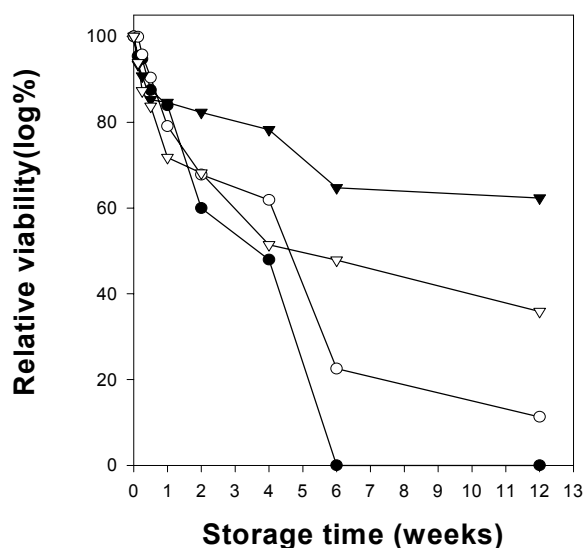


Fig. 124. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 100. Effect of soil additives on viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media.

Storage time Additive	No. of conidia								
	Before coating	After coating	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Talc	2.2×10^8	9.0×10^7	2.0×10^6	4.2×10^4	5.3×10^3	1.0×10^3	1.0×10^2	0	0
Bentonite	7.2×10^8	7.1×10^8	1.0×10^6	7.8×10^4	2.0×10^3	2.0×10^3	7.0×10^2	2.4×10^2	2.1×10^1
Diatomite	1.9×10^9	2.6×10^8	3.0×10^6	2.5×10^5	6.0×10^4	6.0×10^4	1.0×10^4	8.0×10^3	6.0×10^1
Kaolin	2.3×10^8	2.0×10^7	9.0×10^5	9.0×10^4	9.0×10^3	9.0×10^3	2.0×10^3	1.0×10^2	0

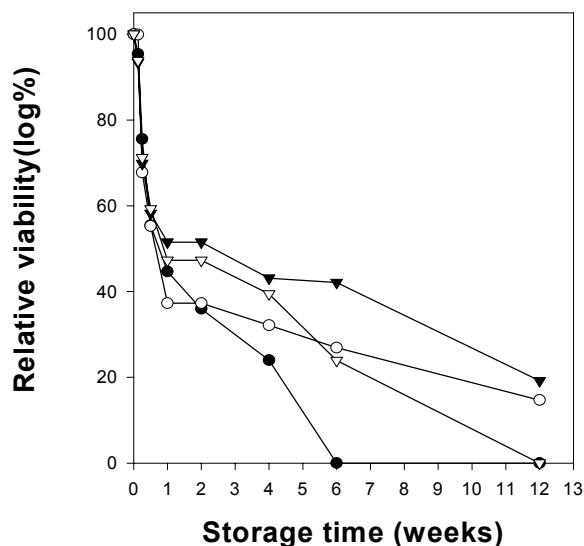


Fig. 125. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Lactobacillus plantarum* was counted on MRS-agar media, selective media. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 101. Effect of soil additives on viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*.

Storage time Additive	No. of conidia								
	Before coating	After coating	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Talc	3.0×10^8	5.4×10^7	3.0×10^6	1.0×10^7	8.0×10^6	7.8×10^6	5.0×10^6	1.6×10^6	4.0×10^5
Bentonite	1.9×10^8	9.0×10^7	2.0×10^7	2.0×10^7	1.3×10^7	1.0×10^7	4.5×10^6	1.4×10^6	2.0×10^5
Diatomite	2.1×10^8	1.0×10^8	2.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^7	8.5×10^6	4.1×10^6	2.2×10^6	2.1×10^6
Kaolin	5.0×10^7	3.0×10^7	1.0×10^7	5.0×10^6	4.0×10^6	3.1×10^6	2.2×10^6	1.2×10^6	7.0×10^5

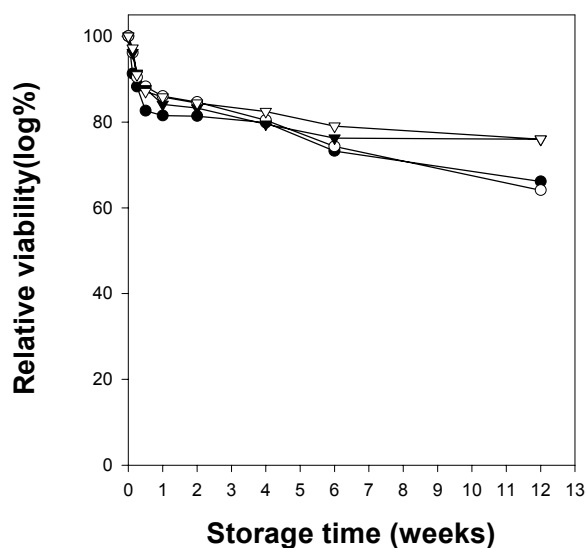


Fig. 126. Effect of soil additives on the relative viability during the 4°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 102. Effect of soil additives on viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*.

Storage time Additive	No. of conidia								
	Before coating	After coating	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Talc	3.0×10^8	5.4×10^7	4.0×10^7	4.0×10^6	3.1×10^6	1.0×10^6	8.0×10^5	7.0×10^5	1.0×10^4
Bentonite	1.9×10^8	9.0×10^7	2.0×10^7	1.0×10^7	9.7×10^6	5.6×10^6	2.9×10^6	3.0×10^5	2.0×10^5
Diatomite	2.1×10^8	1.0×10^8	7.0×10^7	1.0×10^7	3.2×10^6	1.0×10^6	6.0×10^5	5.0×10^5	1.0×10^5
Kaolin	5.0×10^7	3.0×10^7	1.0×10^7	1.0×10^7	2.0×10^6	1.8×10^6	1.0×10^6	9.0×10^5	3.0×10^5

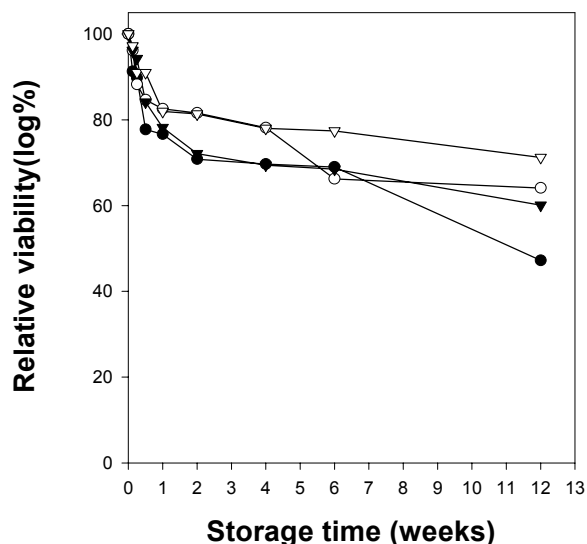


Fig. 127. Effect of soil additives on the relative viability during the 25°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

Table 103. Effect of soil additives on viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*.

Storage time Additive	No. of conidia								
	Before coating	After coating	1 week	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months	6 months	12 months
Talc	3.0×10^8	5.4×10^7	2.1×10^7	4.0×10^6	3.0×10^5	1.6×10^5	1.2×10^5	8.7×10^4	1.0×10^3
Bentonite	1.9×10^8	9.0×10^7	2.9×10^6	6.0×10^5	4.0×10^5	2.5×10^4	2.5×10^4	1.6×10^4	2.0×10^3
Diatomite	2.1×10^8	1.0×10^8	2.3×10^6	2.0×10^5	1.0×10^5	9.5×10^3	9.5×10^3	6.0×10^3	1.0×10^3
Kaolin	5.0×10^7	3.0×10^7	4.9×10^6	1.0×10^6	1.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^4	4.0×10^3	7.0×10^1

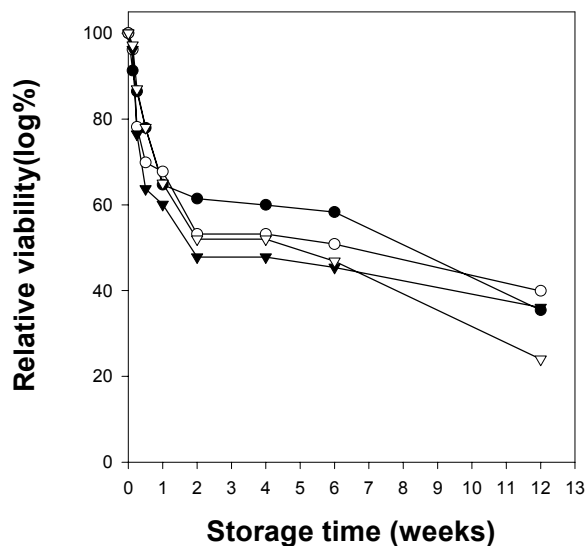


Fig. 128. Effect of soil additives on the relative viability during the 37°C storage of *Penicillium* sp. PS-113 conidia and *Lactobacillus plantarum* formulated with granule type. The viability of *Penicillium* sp. PS-113 conidia was counted on PDA media, selective media, which was preheated at 70°C for 2 hours after spreading the stored microorganisms to kill only *L. plantarum*. ●—●; talc, ○—○; bentonite, ▼—▼; diatomite, ▽—▽; kaolin.

13. 장기저장 후의 인산가용화능 검정 :

0.1% Trio를 첨가하여 제조한 액상비료를 1년간 보관 후에 인산가용화능을 검증하기 위하여 인광석을 0.5%(w/v)로 첨가한 PDB배지에 1.0×10^3 conidia/ml로 단계 희석한 액상비료액 20 μ l를 접종한 후 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm으로 9일 동안 진탕배양하면서 하루 간격으로 유리인산 생성능을 측정하였다. 그 결과(Fig. 129) 저장하지 않은 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113은 배양 8일경에 최대 585 ppm의 유리인산을 생성하였으며, 1년간 보관 후에도 340 ppm의 상당히 높은 수준의 유리인산을 생성하였다.

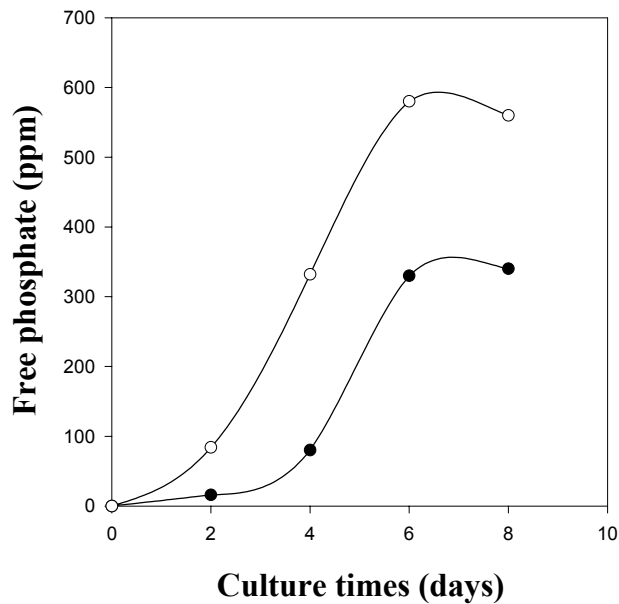


Fig. 129. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 in the PDB media containing 0.5%(w/v) rock phosphate with time courses. ○—○; control(no storage), ●—●; one year storage.

14. 생물비료의 토양생존율 :

생물비료인 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113을 토양에 시비했을 때 이들의 생존율이 높으면 시비횟수를 줄일 수 있기 때문에 실용화 측면에서 대단히 중요한 요소가 된다. 따라서 인산가용화균의 토양에서의 실제 생존율을 조사하기 위하여 토양 1g 당 4.3×10^5 개수의 분생포자를 접종한 후 30일, 60일 경과시점에 토양시료를 채취하여 균수를 측정하였다. 인산가용화균은 사상균이기 때문에 일반세균에 비해 성장속도가 느려 70°C에서 2시간 동안 토양시료를 전처리하여 일반세균을 대부분 사멸시킨 후 PDA-calcium phosphate 평판배지에서 투명환을 형성하는 균을 최종적으로 공시균으로 측정하였다. 그 결과 30일, 60일 경과 시 토양 1g 당 생존한 균수는 각각 7.5×10^4 및 5.2×10^4 으로 나타났다. 이것은 각각 초기 접종량의 57.7%와 40.0%의 생존율로서 상당히 높은 수준의 결과를 보여주었다. 이상의 결과로부터 이 사상균을 생물비료로 사용할 시 단 1회의 시비로서 1세대의 작물생육에는 충분한 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

15. 생물비료의 산업화 및 홍보 :

이상에서 보여준 다양한 연구결과를 기초로하여 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113을 대량으로 고체배양하여 시제품을 생산하였다(Fig. 130, Fig. 131). 생산된 시제품의 상품명은 “활인산골드(Fig. 131)”이며 주관기관인 (주)흙살림에서 흙살림 회원들을 중심으로 현재 시판되고 있다.

이 제품의 홍보를 위하여 (사)흙살림에서 매달 정기적으로 발간되는 “흙살림”신문에 2001년 11월호 및 2002년 3월호, 4월호, 10월호, 11월호에 5회에 걸쳐 광고하였으며, 신문의 광고 내용은 Fig. 132에 소개하였다.

또한 오송 국제바이오 엑스포(2002. 9. 24 ~ 10. 25 ; 충북 청주시), 경북 세계농업한마당(2002. 10. 11 ~ 10. 23 ; 경북 경주시), 2002 국제 농업기계 박람회(2002. 11. 8 ~ 11/ 13 ; 서울 COEX 전시관) 등의 전국적인 각종 전시회에도 이 상품을 출품하여 호평을 받았다.



Fig. 130. Photograph showing solid mass culture for the commercialization of *Penicillium* sp. PS-113.



Fig. 131. Photograph showing final products for the commercialization of *Penicillium* sp. PS-113.

- 휴살림 신제품 출시 -

좋은 어머니의 꿈입니다.
좋은 생명의 어머니입니다.
활인산 골드는 흙에 생명을 불어넣어
살아있는 양을 만들어
값을 약속합니다.

활인산 골드

활인산 골드는 우리땅에서 분리해낸
과다 보육 피성을 합니다.
활인산 골드는 국제 최초로 그 우수성이
검정된 인삼가용피판으로 보양제, 보
양성, 건강제, 피로요구, 집중, 기억력하
에 생명을 촉진합니다.
활인산 골드는 전산할, 치료제, 사육을
올라주어 환경을 보호합니다.

구입 및 문의 사항
☎ (주)휴살림 바이오테크
080-333-8179

Fig. 132. Advertisement for *Penicillium* sp. PS-113 on the Heuksalim Newspaper.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발의 최종목표

인산가용화균을 산업화하기 위한 핵심기술인 발효조를 통한 대량배양법과 제제화 연구 및 장기보존법 등을 개발하고, 동시에 작물 시비효과 검정을 수행하여 농가에서 바로 사용할 수 있는 인산질 생물비료를 생산하고자 한다.

제 2절. 연구평가의 착안점

구 분	평 가 의 착 안 점
	착 안 사 항
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> • 인산가용화균의 고체 대량배양시 목표포자수(1.0×10^8 spore/g · media) 생성 여부 • 인산가용화균의 액체 대량배양시 균체 생성량 획득 여부 • Mycellial pellet size를 최소화할 수 있는 기법 확립 여부 • 젖산균의 대량생산기술(1.0×10^7 cell/ml · media) 확립 여부 • 난용성 인산염 종류별 생물비료의 인산가용화능 측정여부 • 인산가용화균의 제형화를 위하여 각종 첨가제 및 안정제 등을 사용할 때 균의 생활력 유지 여부
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> • 생물비료 시제품 제작 여부 • 제제화된 생물비료의 생활력 검정 여부 • 제제화된 생물비료의 인산가용화능 효과 여부 • 제제화된 생물비료의 유기물 성분 분석 여부 • 제제화된 생물비료의 살포방법(관주, 엽면시비 등) 확립 여부 • 생물비료의 각종 농약(살충제, 살균제, 제초제)에 대한 안정성 여부 • 개발된 생물비료의 물리적, 화학적 성질의 적합성 평가 여부 • 개발된 생물비료의 환경생태학적인 위해성 평가 여부
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> • 생물비료가 유통기간 동안 생활력 유지 여부 • 개발된 생물비료를 작물에 적용했을 때의 시비효과 및 작물생육 촉진효과 검정여부 • 젖산균을 혼용하였을 때 비효의 상승효과 여부 • 생물비료의 보관조건에 따른 품질변화 여부 • 토양에 살포된 생물비료의 토착화 여부 • 시제품을 사용한 농민들의 호응도 평가 여부
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> • 인산가용화균의 고체 및 액체 대량배양법 확립 여부 • 젖산균의 대량배양법 확립 여부 • 생물비료의 제제화 기술 확립 여부 • 생물비료의 동·식물 등의 환경생태에 대한 안전성 시험 여부 • 인산가용화균과 젖산균의 복합제제화 기술 확립 여부 • 개발된 생물비료의 각종 농약에 대한 안정성 검정 여부 • 생물비료의 작물에 대한 시비효과 및 작물생육촉진 효과 검정 여부

제 3절. 연구개발 목표의 달성도

1. 제 1차년도 :

제 1차년도의 연구에서는 계획한 연구목표를 완전히 달성하였다고 평가된다. 구체적인 목표달성 내용은 아래와 같다.

가. 인산가용화균의 고체 대량배양시 목표포자수(1.0×10^8 spore/g · media) 생성 여부:

본 연구팀에 의하여 국내토양으로부터 분리하여 지난 4년 동안 다양한 기초 연구를 거쳐 인산가용화능이 특히 우수한 *Penicillium* sp. PS-113을 공시균주로 활용하여 산업화를 위한 필수단계인 고체 대량배양기술을 확보하고자 하였다. 이를 위하여 농용열풍건조기, 버섯재배용 플라스틱 상자, 버섯재배용 종균병, 항온항습 growth chamber 등을 이용하여 배지조성, 배지량, 배양온도, 수분함량 배양용기 및 배양기기 등을 달리하여 고체 대량배양을 위한 최적화조건을 확립하였다. 확립한 최적화 조건은 배지조성은 쌀겨배지, 배양용기는 tray type, 배양온도는 28℃, 수분함량은 50%, 호기조건, 초기 포자접종량은 1.0×10^5 conidia/g · media, 배양기기는 closed system으로 결정되었다. 이 조건에서 100Kg 이상 대량배양한 결과 일주일 이내에 목표포자수인 1.0×10^8 conidia/g · media 보다 10배 이상의 포자를 획득할 수 있었다. 따라서 인산가용화균의 고체대량배양 기술은 성공적으로 확립된 것으로 평가된다.

또한 증량제로서 황토를 첨가하여 포자형성 촉진효과를 시험한 결과 포자형성 시간이 단축됨과 동시에 포자형성능이 촉진되어 배양 20일 경에 황토첨가하지 않은 대조구에 비해 모든 곡물배지에서 포자수가 3-5배까지 높아짐을 관찰할 수 있었다. 그리고 각종 유기물, Ca^{2+} , SDS, 점토광물류를 첨가하여 포자형성 촉진효과를 시험한 결과에서도 vitamin complex 첨가에서 4배, zeolite 첨가에서 2배의 효과를 확인하였다.

나. 인산가용화균의 액체 대량배양시 균체 생성량 획득 여부:

인산가용화균을 액체대량배양하기 위하여 1L 발효조를 이용하여 배지조성, 배양온도, agitation 속도 등에 대한 최적배양조건을 시험한 결과 배지조성은 3.0% 쌀겨배지, 배양온도는 28℃, agitation 속도는 200rpm, 초기접종량은 1.0×10^6 conidia/ml, 공기주입량은 70 L/min으로 결정되었다. 이 조건으로 200L 대형발효조를 이용하여 scale-up 시험을 한 결과 36시간만에 최적균체량에 도달하였으며, 이와같은 결과는 1L 발효조에서 3 ~ 4일간의 배양에서 달성할 수 있는 균체량으로 배양시간을 1/3로 단축할 수 있었으며, 거품발생도 전혀 없었기 때문에 성공적으로 액체대량배양기술이 확립된 것으로 평가된다.

다. Mycellial pellet size를 최소화할 수 있는 기술 확립 여부:

인산가용화 사상균의 액상배양에서 mycellial pellet이 형성되면 발효공정상에 심각한 문제를 초래하게 된다. 따라서 이를 해결하기 위하여 배지조성, 분생포자의 초기접종농도 등을 조절하거나 점토광물 등의 각종첨가제를 배지에 첨가하여 pellet 크기 감소기술을 개발하고자 하였다. 그 결과 zeolite와 diatomite와 같은 점토광물을 첨가하거나 PEG 200을 첨가했을 때 pellet 감소효과가 탁월하였으며, 특히 PEG 200 첨가시 0.2 ± 0.1 mm까지 pellet size가 감소하였으며 이는 대조구에 비해 1/20의 크기였다. 그러나 batch culture 혹은 1L 이내의 배양에서는 mycellial pellet이 형성되어 문제를 유발하였으나 200L 대량액체배양에서는 mycellial pellet이 거의 형성되지 않았으므로 대량발효공정에는 전혀 문제가 없는 것으로 생각된다.

라. 젖산균의 대량생산기술(1.0×10^7 cell/ml · media) 확립 여부:

젖산균은 각종 유기산을 식물에 제공하여 식물성장을 촉진하기 때문에 인산가용화균과 혼용사용함으로써 생물비료로서 synergy effect를 제공할 수 있다. 이를 위하여 젖산균의 액상대량발효기술이 필요하게 된다. 본 연구에서는 유산균의 일

종인 *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 500L 대량액상배양을 수행하여 1 ~ 2 일만에 목표균체량인 1.0×10^7 cell/ml · media의 100 ~ 1,000배 수준인 1.0×10^9 ~ 10^{10} cell/ml · media의 고농도 발효를 성공적으로 수행하였다.

마. 난용성 인산염 종류별 생물비료의 인산가용화능 측정여부:

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite, tricalcium phosphate와 같은 난용성 인산염에 대한 인산가용화능을 측정한 결과 tricalcium phosphate > rock phosphate > aluminium phosphate ≥ hydroxyapatite 순서로 분해가 잘 되는 것으로 나타났으며, 이 균주는 tricalcium phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite를 최적조건에서 각각 최대 1300, 600, 600, 250 ppm 수준까지 분해할 수 있었다. 이것은 이 균주가 난용성 인산염을 이용하여 작물생육에 적절한 100 ~ 200 ppm 보다 월등히 높은 유효인산을 생성할 수 있음을 알 수 있다.

바. 인산가용화균의 제형화를 위하여 각종 첨가제 및 안정제 등을 사용할 때 균의 생활력 유지 여부:

인산가용화균의 포자를 6개월 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를 위하여 고두밥, 밀, 보리, 쌀겨, 옥수수 등의 다양한 배지에서 배양한 균체를 증량제로서 diatomite, bentonite, zeolite 등의 점토광물을 1:9의 비율로 첨가하여 4℃와 상온(25℃)에서 6개월간 보관한 후 살아있는 포자수를 측정한 결과, 4℃의 경우에는 증량제 및 배양배지의 종류에 관계없이 모든 시험구에서 100%의 생활력을 보였다. 이에 비해 상온(25℃)에서 6개월간 저장한 경우 규조토를 증량제로 사용했을 때만이 50 log% 이상의 포자생존율을 보였으나, bentonite와 zeolite를 증량제로 사용하면 4개월 이내에 균의 생활력이 완전히 상실되었다. 따라서 규조토를 증량제로 사용하여 상온에서 포자의 생활력을 높이기 위한 연구로서 각종 첨가제 및 안정제를 이용하여 포자생존율을 조사한 결과, Tween 80 및 SDS를 0.001 ~ 1.0% 첨가했을 때 10배 이상 생활력이 증가하였다. 또한 PEG 200을 0.1% 첨가하여 저장했을 때도 포자의 생활력이 10배 이상 증가하였다. 따라

서 증량제와 첨가제를 적절히 조절하면 상온에서도 6개월 이상 저장 및 유통이 가능한 생물비료를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 제 2차년도 :

제 2차년도의 연구에서는 계획한 연구목표를 완전히 달성하였다고 평가된다. 구체적인 목표달성 내용은 아래와 같다.

가. 인산가용화균을 이용한 생물비료 시제품 제작 여부 :

본 연구팀에 의하여 국내토양으로부터 분리하여 지난 5년 동안 다양한 기초 연구를 거쳐 인산가용화능이 특히 우수한 *Penicillium* sp. PS-113을 공시균주로 활용하여 시제품 개발을 시도하였다. 그 결과 이 균주의 포자(conidia) 및 균사체(mycelium)를 이용하여 산업화의 필수단계인 다양한 제형화(액상, 고체분말, 고체과립형 등)를 성공적 완성하였으며, 이것은 그 자체가 각종 시제품이 된다. 액상제형화는 분생포자의 생존율이 균사체에 비하여 월등히 높기 때문에 분생포자만을 포함하는 액상 생물비료를 제조하였다. 그러나 포자를 단순히 멸균증류수에 녹이면 포자가 분산되지 않고 위로 뜨거나, 뭉쳐서 가라앉는 현상이 발생한다. 또한 보관중에 세균오염에 의한 부패문제가 발생하거나, 포자의 생존율이 매우 낮아지는 문제점 등이 발생한다. 따라서 이와 같은 문제점들을 해결하기 위하여 포자수용액에 Trio 혹은 비누를 처리함으로써 이와같은 문제점들을 완전히 극복하였다. 또한 고체분말 제형화는 가장 손쉬운 방법으로서 건조조건과 포자생존율을 높이는 방안에 대하여 중점 연구하여 증량제 및 첨가제를 조절함으로써 성공적으로 제형화를 완성하였다. 그리고 고체과립형 제형화는 포자와 균사체 생존율이 가장 높은 제형으로서 가장 효과적인 제형으로 판단되며, 본 연구팀은 성공적으로 이것을 제형화하였다.

나. 제제화된 생물비료의 장기저장/유통을 위한 생활력 검정 여부:

인산가용화균의 포자를 1년 이상 장기보존함과 동시에 균의 생활력 유지를

위하여 고두밥, 밀, 보리, 쌀겨, 옥수수 등의 다양한 배지에서 배양한 다음 균체를 증량제로서 diatomite, bentonite, zeolite 등의 점토광물을 1:9의 비율로 첨가하여 4℃와 상온(25℃)에서 1년 이상 보관한 후 살아있는 포자수를 측정한 결과, 4℃의 경우에는 증량제 및 배양배지의 종류에 관계없이 모든 시험구에서 100%의 생활력을 보였다. 이에 비해 상온(25℃)에서 1년간 저장한 경우 규조토를 증량제로 사용하고, 쌀겨 및 쌀에서 배양했을 때만이 50 log% 이상의 포자생존율을 보였으나, bentonite와 zeolite를 증량제로 사용하면 4개월 이내에 균의 생활력이 완전히 상실되었다. 따라서 규조토를 증량제로 사용하여 상온에서 포자의 생활력을 높이기 위한 연구로서 각종 첨가제 및 안정제를 이용하여 포자생존율을 조사한 결과 Cu^{++} , Zn^{++} 등의 금속이온을 첨가했을 때 포자의 생활력이 2배 이상 증가하였다. 따라서 증량제와 첨가제를 적절히 조절하면 상온에서도 1년까지 저장 및 유통이 가능한 생물비료를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

다. 제제화된 생물비료의 인산가용화능 효과 여부 :

액상, 고체분말, 고체과립형 등으로 제제화된 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 인산가용화능을 측정하기 위하여 선택배지로서 PDA-calcium phosphate 평판배지상에서 균체성장에 따른 투명대 생성여부를 조사하였다. 그 결과 시험한 모든 제형에서 투명대가 확연하게 나타났으므로 이 균의 인산가용화능은 제형에 관계없이 유지되고 있음을 확인할 수 있었다.

라. 제제화된 생물비료의 유기물 성분분석 여부 :

제제화된 생물비료의 유기물 성분분석은 유기물 성분 자체가 비료로서의 효과가 있는지 여부 및 저장중의 제품의 변질 유무를 검토하기 위하여 실행되었다. 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113 균주의 분생포자 배양은 주로 값싼 쌀겨배지에서 이루어졌으므로, 쌀겨의 유기물 성분분석을 실시하였다. 그 결과 탄소 79.8%, 질소 2.3%, 인산 5.2%, 가리 1.3%, 수분함량 11.3%로 나타났다. 배지 제조시에 수분함량은 50% 정도로 조절하였으며, 포자가 생성된 후에도 수분함량과 나머지 유기물의 성분간 구성비는 멸균전의 초기상태와 거의 변화가 없었

음으로 제품의 변질가능성은 낮은 것으로 보인다. 뿐만아니라 실제로 인산가용 화균을 생물비료로 사용할 경우 1,000 배 이상 희석하여 사용하기 때문에 생물 비료 자체가 갖는 유기물 성분이 비료로서 갖는 효과 또한 미미한 것으로 판단 된다. 따라서 인산가용화균은 주로 토양중의 난용성 인산염을 쉽게 가용화함으로써 생물비료로서 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

마. 제제화된 생물비료의 살포방법(관주, 엽면시비, 토양시비 등) 확립 여부 :

액상, 고체분말, 고체과립형 등의 형태로 제제화된 생물비료는 제형에 따라 사용방법이 달라진다. 즉 액상은 관주, 엽면, 토양시비가 모두 가능하였으며, 고체분말은 엽면 및 토양시비만이 가능하였다. 그리고 고체과립형은 1 시간 이상 물에 녹이면 과립이 해체되어 물속으로 잘 분산되었기 때문에 이 또한 관주, 엽면, 토양시비가 가능하였다.

바. 생물비료의 각종 농약(살충제, 살균제, 제초제)에 대한 안정성 여부 :

인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. PS-113을 생물비료로 단독으로 이용할 경우도 있지만 화학적으로 합성된 살충제, 살균제, 제초제 등과 혼용 사용 혹은 비슷한 시기에 화학농약이 사용될 경우가 있다. 따라서 본 과제에서 개발한 인산가용화 사상균을 생물비료로 효과적으로 이용하기 위해서는 다양한 화학농약에 대한 안정성 평가가 필수적이다. 시험 결과 이 균주는 살충제에서는 시험한 7종의 각종 화학농약에 대해서 100%의 높은 생존율을 보였다. 제초제에서도 시험한 3종에서 100%의 높은 생존율을 보였다. 그러나 살균제는 시험한 7종에 대해서 포름씨(수화제), 산요루(유제), 사프롤(유제), 헥사코나졸(액상수화제) 4종에 대해서는 95% 이상의 높은 생존율을 보였으나 나머지 3종에 대해서는 30% 이하의 낮은 생존율을 보였다. 따라서 인산가용화 사상균을 살균제와 병용해서 사용할 때는 약량을 낮게 조절하거나 혹은 포자생존에 영향을 주지 않는 살균제만을 선택적으로 사용하는 것이 바람직한 것으로 결론지었다.

사. 개발된 생물비료의 물리적, 화학적 성질의 적합성 평가 여부 :

액상, 고체분말, 고체과립형 등으로 개발된 생물비료를 pH, 수분함량, 총균수, 색도, 냄새 등의 다양한 물리화학적 특성에 대하여 조사한 결과 4℃ 및 25℃에서 1년까지 보존하여도 대체적으로 안정한 것으로 나타났다. 이 중에서 총균수는 보관온도 및 제형화조건에 따라 급격히 떨어질 수도 있었으나 보관온도, 증량제 및 첨가제의 조건을 잘 설정하면 1년이 경과한 시점에서도 90% 이상의 포자생존률을 보여주었다.

아. 개발된 생물비료의 환경생태학적인 위해성 평가 여부 :

생물비료로 개발된 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 환경생태학적인 안정성 평가는 농업환경에서 대단히 중요하다. 그러나 상기 균주는 국내의 토양환경에서 순수 분리하였기 때문에 환경에 피해를 입힐 가능성은 근본적으로 매우 낮은 것으로 생각된다. 본 연구에서는 미꾸라지와 일본송사리를 이용한 어독성 시험 및 배추, 콩, 녹두, 홍대, 옥수수 등의 주요 작물에 대한 약해시험을 동시에 실시하였다. 이때 처리한 포자농도는 실제의 포장처리 농도보다 1,000배 이상 높은 농도인 1.0×10^8 conidia/ml로 처리한 결과 모든 시험구에서 무해한 것으로 판정되었다.

3. 제 3차년도 :

제 3차년도의 연구에서는 계획한 연구목표를 완전히 달성하였다고 평가된다. 구체적인 목표달성 내용은 아래와 같다.

가. 생물비료가 유통기간 동안 생활력 유지 여부 :

2차년도의 연구를 통하여 인산가용화균의 분생포자를 이용한 액상, 분말상,

과립상 제제와 균사체를 이용한 분말상 제제 및 젖산균과 혼용한 복합제제 등의 다양한 제형을 완성하였다. 이와같은 제형을 1년간 장기 보관했을 때 균체의 생활력 여부를 조사하였다.

그 결과 액상비료의 경우 트리오(Trio)를 첨가한 경우 장기 저장했을 때 4℃에서 6개월 저장시 포자생존률은 약 63 log%로서 무첨가구보다 3.4배 증가하였다. 그리고 1년간 보관 후에도 54 log%의 높은 포자생존률을 확인할 수 있었다. 비누 첨가구에서는 1.0% 이상의 첨가구에서는 액상자체가 gel화 되는 현상이 나타났으며, 이것은 액상제제보다 취급과 제품운송과정이 편리할 것이라 판단된다.

고체분말비료의 장기보관에서는 60℃ ~ 80℃에서 건조한 경우 2개월까지는 건조공정을 거치지 않은 경우에 비해 일시적으로 생존율이 다소 떨어지나 저장기간이 더 길어질수록 포자의 생존율이 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 100℃ 이상에서 건조한 경우에는 저장기간에 관계없이 생존율이 크게 감소하였기 때문에 이와 같은 조건에서 건조하는 것은 적당하지 않음을 알 수 있었다. 그리고 고체분말 비료의 4℃, 25℃에서의 장기저장에 따른 포자의 생존율을 비교한 결과 큰 차이가 없었으며, 1년간 저장했을 때 첨가제의 종류에 따라 60 ~ 95 log%의 높은 생존율을 보여주었다.

고체과립상 생물비료의 장기보관에서는 1년간 장기 저장한 후에도 bentonite와 diatomite로 코팅한 경우 4℃와 25℃ 저장구에서 80 ~ 90 log% 이상의 대단히 높은 생존율을 보였다. 37℃에서 저장할 경우에도 60 ~ 80 log%의 경이적인 포자생존율을 보여주었다.

균사체 분말비료의 장기보관에서는 4℃에서 저장한 loess, bentonite, diatomite 첨가구는 1년간의 장기저장 후에도 63 log% 이상의 매우 높은 생존율을 보였다. 그리고 25℃에서 저장한 kaolin, loess, bentonite, diatomite 첨가구는 61 log% 이상의 높은 생존율을 보였다. 저장온도에 따른 균사체 생존율은 loess, bentonite, diatomite, talc 첨가구에서는 크게 변화가 없었으나, kaolin 첨가구는 특이하게도 4℃에서 1년간 보관하였을 때 보다 25℃의 보관온도에서 3.3배 높은 균사체의 생존율을 보여주었다.

인산가용화균과 젖산균의 복합제형의 장기보관에서는 1년간의 장기보관 시에도 규조토 첨가구에서 저장온도에 관계없이(4℃, 25℃) 두 균주가 대부분 80

log% 내외의 높은 생존율을 보여주었다.

이상의 결과를 종합하면 인산가용화균을 이용한 생물비료는 제형에 관계없이 1년까지도 균의 생활력이 대부분 유지되었기 때문에 장기보관 및 유통이 가능함을 확인할 수 있었다.

나. 개발된 생물비료를 작물에 적용했을 때의 시비효과 및 작물생육 촉진효과 검정여부 :

인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113의 생물비료로서의 작물생육효과를 시험하기 위하여 먼저 pot에 1.0×10^8 spore/g · 토양 농도로 인산가용화균을 접종한 후 상토에서 발아한 콩(*Glycine max*), 홍대(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*), 녹두(*Phaseolus radiatus*), 옥수수(*Zea mays* Suwon 19), 배추(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*)를 이식하여 2주간 재배하면서 초장, 뿌리길이를 측정한 결과 시험한 모든 작물에서 인산가용화균 처리구는 무처리구에 비하여 월등한 생육효과가 있음을 확인할 수 있었다. 특히 콩의 초장은 무처리구에 비해 약 1.5배 더 신장되었으며, 녹두의 뿌리길이는 약 3.4배 더 성장함을 알 수 있었다.

또한 시설재배 하우스에서의 작물생육시험을 위하여 경북 성주군 초전면(참외재배), 김천시 조마면(감자재배), 칠곡군 약목면(방울토마토), 충북 괴산군 불정면(고추, 오이) 일대의 유기농가 시설하우스에서 재배시험을 진행하였다.

그 결과 성주군에서의 참외재배에서는 인산가용화균 처리구는 참외의 잎색깔이 무처리구에 비해 짙은 녹색을 띄었으며, 열매의 당도가 약 2 Brix 증가함을 관찰하였다. 참외수확량에 있어서도 약 10%의 증수효과가 있었다.

김천시 조마면에서의 감자재배에서는 이식 후 2개월이 경과했을 때 생육효과를 비교한 결과 인산가용화균 처리구는 무처리구에 비해 감자의 초장이 약 1.6배 증가하는 효과가 있었으며, 또한 식물병 발생도 적음을 확인할 수 있었다. 3.5개월이 경과하여 감자를 수확한 후 감자의 수확량, 당도, 수분함량, 감자 더텅이병 발생정도 등을 조사한 결과, 무처리구에 비해 처리구의 감자수확량은 약 1.7배, 당도는 약 1.3배(1 Brix)증가하였다. 또한 감자 더텅이병의 발생이 현격히 감소하는 효과가 있었다.

칠곡군에서의 방울토마토 재배 결과에서는 인산가용화균을 처리한 시험구에

서는 작물 생육이 왕성하였으며, 잎의 색깔도 짙은 녹색을 띠었다. 이에 비해 대조구는 전체적으로 식물의 생육상태가 나쁘고 잎 색깔도 옅은 연두색과 연노랑색을 띠을 알 수 있었다.

충북 괴산군 불정면에서의 고추에 대한 작물생육 시험 결과에서는 처리구의 고추 1주당 지상부 식물(잎과 줄기)의 생체중은 평균 38.0g으로 무처리구에 비해 약 1.5배 증가하였으며, 뿌리무게는 13.0g으로서 무처리구에 비해 약 2배 증가하였다. 또한 초장에서도 처리구는 48.3cm로서 무처리구에 비해 약 120%의 신장효과가 있었으며, 수확한 고추의 평균무게도 고추 1주당 221.0g으로서 무처리구에 비해 7.1g씩 높은 효과가 있었다.

괴산군 불정면에서의 오이에 대한 시험 결과에서는 인산가용화균 처리구에서 평균열매 길이가 31.9cm로 무처리구에 비하여 3cm 정도 긴 것으로 조사되었다. 오이의 열매 지름도 처리구가 무처리구에 비하여 0.7cm 더 긴 것으로 나타났다. 열매 평균 무게도 무처리구에 비하여 89.2g 더 나가는 것으로 조사되었다.

이상의 결과로부터 인산가용화균의 처리가 온실하우스내 참외, 감자, 방울토마토, 고추, 오이 등 시험한 모든 작물의 생육에 매우 뛰어난 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

다. 젖산균을 혼용하였을 때 비효의 상승효과 여부 :

인산가용화균과 젖산균의 혼용시 비효상승효과를 검증하기 위하여 참외재배에 적용한 결과 혼용처리구에서는 무처리구에 비해 당도가 다소 높았으나, 인산가용화균만을 단독으로 처리한 경우에 비해서는 오히려 낮은 당도를 보여주었다. 따라서 인산가용화균과 유산균의 혼용처리는 참외재배에서 약간의 효과만 있는 것으로 확인되었다.

라. 생물비료의 보관조건에 따른 품질변화 여부 :

인산가용화균의 포자에 대한 고체분말상, 고체과립상, 액상 등의 각종 제형을 보관온도(4, 25, 37℃) 및 보관습도(10, 15, 20%)에 따라 색상, 냄새, pH 변화를

등의 품질변화를 조사한 결과 6개월 간의 저장 후에도 별다른 품질변화가 관찰되지 않았다. 즉 pH 변화는 제형에 관계없이 거의 발생하지 않았으며, 색도와 냄새에서도 각각 육안적 및 후각적 관별에 의한 관능평가를 실시한 결과 초기에 비하여 장기저장에 따른 변화는 거의 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 인산가용화균을 이용한 각종 제제는 장기보관에 따른 품질변화가 거의 없기 때문에 산업화에 별다른 장애가 없음을 확인할 수 있었다.

마. 토양에 살포된 생물비료의 토착화 여부 :

인산가용화균을 토양에 살포했을 때 이들의 실제 생존율을 조사하기 위하여 토양 1g 당 4.3×10^5 갯수의 분생포자를 접종한 후 30일, 60일 경과시점에 토양시료를 채취하여 균수를 측정하였다. 그 결과 30일, 60일 경과 시 토양 1g 당 생존한 균수는 각각 7.5×10^4 및 5.2×10^4 으로 나타났으며, 이것은 각각 초기 접종량의 57.7%와 40.0%의 생존율로서 상당히 높은 수준의 생존율을 보여주었다. 따라서 인산가용화균을 생물비료로 사용하면 토양에 잘 정착하여 1회의 시용으로도 작물생육에 충분히 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

바. 시제품을 사용한 농민들의 호응도 평가 여부 :

본 연구결과를 이용하여 주관연구기관인 (주)흙살림은 인산가용화균 *Penicillium* sp. PS-113을 대량으로 고체배양하여 성공적으로 시제품을 생산하였다. 생산된 시제품의 상품명은 “활인산골드”이며 농민단체인 (사)흙살림 회원들을 중심으로 이미 현장검정과 시판을 진행하였다. 그 결과 현재까지는 만족도가 대단히 높은 편이며, 내년이면 일반농민을 대상으로 판매가 확대될 예정임으로 보다 광범위한 호응도 분석이 가능할 것으로 평가된다.

한편 이 제품의 홍보를 위하여 (사)흙살림에서 매달 정기적으로 발간되는 “흙살림”신문에 5회에 걸쳐 광고를 게재하였으며, 오송 국제바이오 엑스포, 경북 세계농업한마당, 2002 국제 농업기계 박람회 등의 전국적인 농업 전시회에도 이 상품을 출품하여 호평을 받았다.

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 산업화한 생물비료는 인산질 화학비료의 대용으로 농가에서 편리하게 사용할 수 있다. 지금까지 시설재배 등에서 화학비료와 유기질 비료를 집중적으로 투여해 온 토양은 이미 다량의 불용성 인산염이 축적되어 있으므로 인산가용화균을 토양에 사용하여 작물의 생육과 에너지 대사에 필요한 인을 공급할 수 있다. 새롭게 개간한 토양이나 인산염 함량이 낮은 토양은 천연광석인 인광석과 인산가용화균을 함께 시용함으로써 지속적으로 작물이 필요로 하는 인을 공급할 수 있다. 지력이 현저하게 떨어진 토양은 농가부산물인 인산가용화균의 배지로 이용한 후 미생물과 그 배양물을 같이 시용함으로써 배지중의 유기물과 식물성장에 필요한 영양분을 동시에 공급할 수 있다.

본 연구를 통한 인산질 생물 비료의 제형화는 다음과 같이 구분할 수 있다.

1. 인산가용화균의 분생포자를 모아 물에 현탁한 액비 형태이다. 쌀겨나 밀기울 등의 농업 부산물을 이용하여 인산가용화균을 대량배양한 다음 그 분생포자를 회수한 후 물에 현탁하여 실온에서도 발아되지 않고 생활력이 보존될 수 있도록 제형화 하였다. 이 제품은 작물 정식시 관주 혹은 엽면을 통하여 시비가 가능하였다.
2. 인산가용화균을 고체배양하여 입제화한 형태이다. 인산가용화균을 1의 방법과 같이 배양배양 후 균배양체에 적절한 증량제를 첨가하여 입제형태로 제형화 하였다. 이 때 젓산균을 혼용하여 제형화할 수도 있다. 이 제품은 인산질비료와 유기물을 동시에 시용한 효과를 가져올 수 있다.
3. 인산가용화균을 액침배양한 액체 균배양체 형태이다. 이 경우 쌀겨 배지를 이용하여 인산가용화균을 발효조에서 배양조건을 최적화하여 대량배양한 후 균배양체를 액체상태로 제형화하여 노지 혹은 온실하우스의 작물에 살포하거나 관주한다. 여기서도 젓산균을 혼용하여 사용할 수 있다.

다음으로 인산질 생물비료의 저장기간별, 저장조건별(온도, pH, 첨가제, 분산제 등) 미생물의 생활력과 작물 시비효과를 검정하였다. 시비효과 검정을 위한 재배작물은 인 비료

를 많이 필요로 하는 참외, 오이, 감자, 방울토마토, 고추 등으로 선정하였다. 선정된 작물들은 시설하우스 재배와 노지재배로 나누어서 실험을 수행한다.

본 연구를 통하여 인산질 생물비료의 작물에 대한 시비효과는 확실하게 검정되었으며, 시제품도 성공적으로 생산되었다. 현재는 다양한 경로를 통한 홍보가 진행중에 있으며, 농가 보급도 본격적으로 진행되고 있다.

향후에는 생물비료의 활용도를 더욱 높이기 위하여 인산가용화균과 길항미생물을 혼합한 복합제제의 개발이 추가적으로 필요할 것이다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

미국, 호주, 인도 등을 중심으로 다양한 미생물을 이용한 생물비료의 개발이 대학, 연구소, 기업체에서 활발하게 진행중임.

제 7 장. 참고문헌

1. Adammek, L. (1963). Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.). *Folia Microbiologia*, 10, 255-257.
2. Agaisse, H. & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. *J. Bacteriol.*, 177, 6027-6032.
3. Agasimani, C. A., Mudlagiriyappa & Sreenivase, M. N. (1994). Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms. *Groundnut News*, 6, 5.
4. Azcon, R., Barea, J. M. & Hayman (1976). Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, 8, 135-138.
5. Bagyaraj, D. J. & Sreeramulu, R. (1982). Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer. *Plant and Soil*, 69, 375-381.
6. Berrow, M. L., Davidson, S. & Burridge, J. C. (1982). Trace elements extractable by 2-ketogluconic acid from soils and their relationship to plant contents. *Plant Soil*, 66, 161-171.
7. Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plant. *Plant Soil*, 65, 189-207.
8. Byme, G. S. & Ward, O. P. (1989). Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 912-914.

9. Choi, M. C., Chung, J. B., Sa, T. M., Lim, S. U. & Kang, S. C. (1997). Solubilization of insoluble phosphates by *Penicillium* sp. GL-101 isolated from soil. *Agric. Chem. Biotechnol.*, 40, 239-333.
10. Choo, H. Y. & Kaya, H. K. (1994). Biological control of the brown planthopper by a mermithid nematode. *Korean J. Appl. Entomol.*, 33(4), 207-215.
11. Chung, Y. C., Kim, Y. W., Kang, S. K., Rho, J. S. & Sung, N. K. (1990). Molecular cloning and expression of cellulase of gene of *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 18(6), 633-639.
12. Cline, G. R., Powell, P. E., Szanislo, P. J. & Reid, C. P. P. (1982). Comparison of the abilities of hydroxamic, synthetic, and other natural organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46, 1158-1164.
13. Craig, G. F., Atkins, C. A. & Bell, D. T. (1991). Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil. Fertil. Soils*, 26, 79-87.
14. Dubey, S. K., & Billore, S. D. (1992). Phosphate solubilizing microorganism (PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India - a review” *Crop Res. Hisar.*, 5, 11.
15. Duff, R. B., Webley, D. M. & Scott, R. O. (1963). Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. *Soil Sci.*, 95, 105-114.
16. Elmayergi, H. (1975). Mechanisms of pellet formation of *Aspergillus niger* with an additive, *J. Ferment. Technol.*, 53, 722-729.

17. Elmes, R. P. & Mosse, B. (1984). Vesicular-arbuscular endo-mycorrhizae inoculum production. II. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.*, 62, 1531-1536.
18. Fenice, M., Selbman, L., Federici, F. & Vassilev, N. (2000). Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization. *Bioresource Technol.*, 32, 559-565.
19. Fenice, M., Selbman, L., Federici, F. & Vassilev, N. (2000). Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Technology*, 73, 157-162.
20. Fox, T. R. & Comerford, N. B. (1990). Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the Southeastern USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 1139-1144.
21. Freitas, J. R., Banerjee, M. R. & Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 24, 358-364.
22. Gworek, B. (1992). Inactivation of cadmium in contaminated soils using synthetic zeolite. *Environmental pollution*, 75, 269-271.
23. Hagin, J. (1961). Availability of phosphorus in soil and in fertilizers. *Symposium on phosphorus in the soil*, pp. 51-59.
24. Hagin, J. (1981). Arid phosphate rock for direct application. *Technion-Israel Institute of Technology of Agricultural Engineering Soils and Fertilizers Research Center*, pp. 40.
25. Hammond, L. L. (1977). Effectiveness of phosphate rocks in colombian soils as

measured by crop response and phosphorus levels. Ph. D. thesis. Michigan State University. Michigan, USA.

26. Han, K. K., Park, J. K., Jeong, L. K., Lee, C. S., Yoon, J. H., Kim, W. C. & Lee, S. K. (1998). Methodology for the chemical analyses of soil, *Asmmi Press*, pp. 1-450.
27. Humphreys, A. M., Matewele, P., Trinci, A. P. J. & Gillespie, A. T. (1989). Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in fed-batch culture. *Mycol. Res.*, 92, 257-264.
28. Illmer, P. & Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 257-263.
29. Illmer, P., Barbato, A. & Schinner, F. (1995). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms, *Soil Biol. Biochem.*, 27, 265-270.
30. Inch, J. M. M. & Trinci, A. P. J. (1987). Effect of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *J. Gen. Microbiol.*, 113, 247-252.
31. Jasson, M. (1987). Anaerobic dissolution of iron-phosphorus complexes in sediment due to the activity of nitrate-reducing bacteria, *Micro. Ecol.*, 14, 81-89.
32. Jensen, A. (1982). Influence of four vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and growth in barley (*Hordeum vulgare*). *New phytol.*, 90, 45-50.
33. Jimenez-Tobon, G. A., Penninckx, M. J. & Lejeune, R. (1997). The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete*

chrysochlorium in submerged culture, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 21, 537-542.

34. Johri, J. K., Surange, S. & Nautiyal, C. S. (1999). Occurrence of Salt, pH, and Temperature-tolerant, Phosphate-solubilizing Bacteria in Alkaline Soils. *Current Microbiology*, 39, 89-93.
35. Jun, Y. J., Lee, E. H. & Kim, S. K. (1996). Physiological function of chitin(1). *Kor. J. Chitin Chitosan*, 1(1), 4-13.
36. Kang, S. C., Lee, D. G., Ha, C. G. & Lee, T. G. (1999). Culture conditions and additives affecting to the mycelial pellet size of *Penicillium* sp. GL-101 in the submerged culture. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 14, 337-341.
37. Khasawneh, F. E. & Doll, E. C. (1978). The use of phosphate rock for direct application to soils. *In Advances Agronomy*, 30, 159-206.
38. Khasawneh, F. E. & Olsen, S. R. (1980). Use and limitations of physical-chemical criteria for assessing the status of phosphorus in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44, 361-410.
39. Kim, H. O., Uo, Z. K., Lee, S. C. & Kucey, R. M. N. (1984). Mycorrhizae distribution and rock phosphate dissolution by soil fungi in the citrus fields in Jeju-do. *Cheju Natl. Univ. J.*, 17, 45-50.
40. Kim, H. S., Roh, J. Y., Lee, D. W., Chang, J. H., Je, Y. H., Woo, S. D., Kim, J. K., Yu, Y. M. & Kang, S. K. (1998). Formulation of a new *Bacillus thuringiensis* NT0423. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26(4), 358-364.
41. Kim, K. Y., Jordan, D. & McDonald, G. A. (1998). *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil: Effect of carbon

sources. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 995-1003.

42. Kim, K. Y., Jordon, D. & McDonald, G. A. (1998). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Bio. Fertil. Soils*, 26, 79-87.
43. Kim, K. Y., Tordan, D. & McDonald, G. A. (1998). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils*, 26, 79-87.
44. Kleespies, R. G. & Zimmermann, G. (1992). Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2, 127-135.
45. Knudsen, K. C. (1972). NPK production by ion-exchange operating experience. Proceedings of the ISMA Technical Conference. *Seville. Spain*, pp. 11-16.
46. Ko, H. J., Kim, H. K., Kang, S. C. & Kwon, S. T. (1996). Optimal production of proteases from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 39(6), 449-454.
47. Kumar, H., Arora, N. K., Kumar, V. & Maheshwari, D. K. (1999). Isolation, characterization and selection of salt tolerant *Rhizobia* nodulating *Acacia catechu* and *A. nilotica*. *Symbiosis*, 26, 279-288.
48. Kuncney, R. M. N. (1998). Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Can. J. Soil Sci.*, 68, 261-270.
49. Kwon, O. J. & Chung, Y. G. (1994). Isolation and physiological characteristics of cellulolytic bacteria. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 37(4), 226-233.

50. Laheurte, F. & Berthelin, J. (1988). Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. *Plant and Soil*, 105, 11-17.
51. Lee, E. T. & Kim, S. D. (1999). Isolation and antifungal activity of the chitinase producing bacterium *Serratia* sp. 3095 as antagonistic bacterium against *Fusarium* sp.. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 42, 181-187.
52. Lee, Y. S., Son, H. J., Kim, I. H. & Mheen, T. I. (1983). Studies on the Production of Gibberellic acid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 3, 217-222.
53. Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing Bacteria. *Current Microbiology*, 43, 51-56.
54. Menge, J. A. (1983). Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Can. J. Bot.*, 61, 1015-1024.
55. Metz, B. & Kossen, N. W. F. (1997). The growth of molds in the form of pellets. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 781-799.
56. Molla, M. A. Z., Chowdhury, A. A., Islam, A. & Hoque (1984). Microbial mineralization of organic phosphate in soil. *Plant and Soil*, 78, 393-399.
57. Narsian, V. & Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 559-565.
58. Okazaki, K., Kato, F., Miyamoto, K., Kato, H., Moriwaki, M. & Hayakawa, S. (1995). Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(8), 1586-1587.

59. 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 journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 211-218.
60. Onishi, H. R., Tkacs, J. S. & Lampen, J. Q. (1979). Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Bio. Chem.*, 254, 11943-11952.
61. Paul, E. A., & Clark, F. E. (1989). "Soil Microbiology and Biochemistry" Academic press, New York, USA.
62. Paul, N. B. & Sundara Rao, W. V. B. (1971). Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant and Soil*, 35, 127-132.
63. Peaslee, D. E., Anderson, C. A., Burns, G. R. & Black, C. A. (1962). Estimation of relative value of phosphate rock and superphosphate to plants on different soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 26, 566-570.
64. Rahman, M. K. & Parsons, J. W. (1997). Effects of inoculation with *Glomus mosseae*, *Azorhizobium caulinodans* and rock phosphate on the growth of and nitrogen and phosphorus accumulation in *Sesbania rostrata*. *Biol. Fertil. Soils*, 25, 47-52.
65. Rogers, H. T., Pearson, R. W. & Ensminger, L. E. (1953). Comparative efficiency of various phosphate fertilizers. In soil and fertilizer phosphorus in crop nutrition. *Agronomy Monography*, 4, 189-412.
66. Roukas, T. (1999). Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 54-59.

67. Ryu, D. O. (1995). Secret of loess. *Haenglim Press*, pp. 1-420.
68. Sayer, J. A., Raggett, S. L. & Gadd, G. M. (1995). Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: Development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycol. Res.*, 99, 987-993.
69. Shekhar Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270.
70. Sudhansu, S. (1998). Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and Soil*, 198, 169-177.
71. Suh, J. S., Lee, S. K., Kim, K. S. & Seong, K. Y. (1995). Solubilization of insoluble phosphates by *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger* isolated from Korean soil. *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.*, 28, 278-286.
72. Takahashi, J. & Yamada, K. (1959). Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture. *J. Agric. Chem.*, 33, 707-710.
73. Tiwari, V. N., Pathak, A. N. & Lehri, L. K. (1993). Rock phosphate-superphosphate in wheat in relation to inoculation with phosphate solubilizing organic waste. *Ind. J. Agric. Res.*, 27, 137-145.
74. Varsha, N. & Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 559-565.
75. Varsha, N., Jugnu, T. & Patel, H. H. (1993). Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus aculeatus*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 31, 747-749.

76. Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M. & Vassilev, N. (2000). Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 35, 693-697.
77. Venkatateswarlu, B., Rao, A. V. & Raina, P. (1984). Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from aridsol. *J. Ind. Soc. Soil Sci.*, 32, 273-277.
78. Virakornphanich, P. & Egashira, K. (1998). Synthesis of zeolite from waste lignite ash from Thailand. *Soil Sci. plant nutr.*, 44(4), 707-710.
79. Wainwright, M. P., Trinci, A. P. J. & Moore, D. (1993). Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process. *Mycol. Res.*, 97, 801-806.
80. Whitelaw, M. A., Harden, T. J. & Helyar, K. R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil biology and Biochemistry*, 31, 655-665.
81. Yoo, I. D., Seo, H. C., Kim, W. G., Park, D. J., Jo, K. Y. & Kim, C. J. (1993). Effect of dual inoculation with *Glomus mosseae* and *Rhizobium meliloti* on growth and nitrogenase activity of *Medicago sativa* L. *kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21(2), 95-100.
82. Yu, Y. S. & Park, S. H. (2000). Biological control of apple pests with entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp.. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(1), 106-111.