

《린회토분해균》의 고농도액체배양특성에 대한 연구

소명철, 김시춘

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《농촌경리부문에서 화학비료를 적게 쓰고 여러가지 미생물비료와 유기질비료를 많이 생산하여 리용하도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제21권 460페이지)

농촌경리부문에서 화학비료를 적게 쓰고 여러가지 미생물비료를 많이 생산하여 리용하는것은 생태환경을 보호하면서 농사를 지속적으로 안전하게 지을수 있게 하는 중요한 방도로 된다.

《린회토분해균》종균의 물질생성특성[1, 7, 10-13]과 고체《린회토분해균》비료생산 및 효과성에 대한 연구결과들은 많이 발표[3-9]되었지만 종균의 액체배양특성과 고농도액체 비료생산에 대한 연구는 적게 진행되었다.

우리는 《린회토분해균》의 몇가지 액체배양특성을 밝히는데 기초하여 현장조건에서도 액체《린회토분해균》비료를 쉽게 생산하여 적용할수 있도록 버짚엑스배지를 리용한 《린회토분해균》의 고농도액체배양방법을 연구하였다.

재료 및 방법

미생물종균은 생물배설물에서 분리동정하여 *Bacillus macerans*-827, *Serratia marcescens*-828(국가과학원 균주보존연구소)로, 《린회토분해균》(국규 13323, 2012년 12월 25일)으로 등록하였다.

《린회토분해균》의 액체배양특성을 밝히기 위하여 리용한 배지들은 다음과 같다.

배지 1: 펩톤 1%, 효모엑스 0.5%, K_2HPO_4 0.01%

배지 2: 포도당 1%, 아스파라긴 0.1%, $MgSO_4$ 0.01%, K_2SO_4 0.01%

배지 3: 포도당 1%, 펩톤 1%, 효모엑스 0.5%, K_2HPO_4 0.01%

배지 4: 감자 200g을 잘게 썰어 30min간 끓인 후 거른액의 총체적을 1L로 맞추었다. (20% 감자우림물배지)

배지 5: 마른 버짚을 물에 2.5% 되게 두고 20min간 끓인 다음 뇨소와 쌀겨를 각각 0.2, 2% 되게 넣어 만들었다.(2.5% 버짚우림물배지)

액체《린회토분해균》비료생산용버짚엑스는 해당한 량의 버짚을 잘게 썰어 물에 넣고 30min동안 끓이는 방법으로 만들었다.

고농도액체《린회토분해균》비료생산을 위한 유기, 광물질첨가제로서는 강동지구린회토를 1:10비율로 10% 염산용액속에서 30min동안 약하게 끓인 다음 려과하여 만든 린회토엑스와 아미노산제제(가금털을 4% 염산용액속에 체적상으로 30% 되게 넣고 101.3~202.6kPa(1~2기압)에서 4h동안 쪼는 다음 려과하여 만든 용액)를 리용하였다.

결과 및 논의

1) 《린회토분해균》의 액체배양특성

여러가지 합성 및 천연배지(배지 2-5)들을 리용하여 《린회토분해균》(*Ser. marcescens*-828)을 액체배양하였을 때 최대균수는 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 합성 배지(배지 2, 3)에 비해 천연배지(배지 4, 배지 5)에서 배양할 때 *Ser. marcescens*-828이 더 잘 자랐다. 특히 배지 5에는 벼짚우림물과

함께 뇨소, 쌀겨들이 첨가된것으로 하여 *Ser. marcescens*-828의 생장에 필요한 질소원과 탄소원, 비타민류 등 영양원들이 풍부하기때문에 75h까지도 균수가 줄어들지 않았다.

《린회토분해균》은 배양과정에 포도당을 비롯한 당들을 리용하여 여러가지 유기산들을 생성하므로 배양액의 pH가 낮아지게 된다.[1]

《린회토분해균》의 당리용성을 평가하기 위하여 배지 1에 포도당, 사탕, 감자우림액을 각각 1, 1, 10% 되게 첨가한 각이한 배지들(초기 pH 7로 맞춤)에서 *Ser. marcescens*-828을 배양하였을 때 배양액의 pH변화를 보았다.(그림 1)

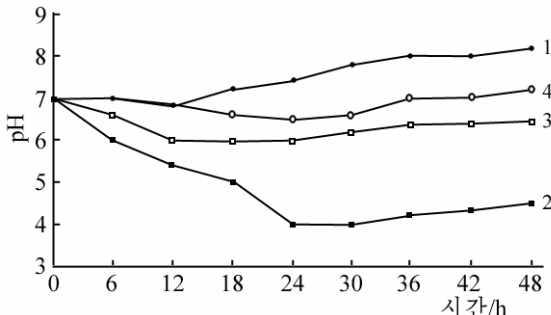


그림 1. 각이한 배지에서 *Ser. marcescens*-828의 배양과정에 배양액의 pH변화
진탕배양(180r/min, 28~30°C), 1-배지 1,
2-배지 1+포도당 1%, 3-배지 1+
사탕 1%, 4-배지 1+감자우림물 10%

그림 1에서 보는바와 같이 당을 첨가하지 않은 배지 1에서는 6~12h사이에 pH가 약간 낮아지다가 그후부터 점차적으로 높아져 48h만에 pH가 8.2까지 높아졌다. 그러나 포도당을 첨가한 배지 2에서는 배양 24h까지 pH가 4까지 급격히 낮아져 유지되다가 배양 36h이후부터 약간씩 높아져 배양 48h 후에는 pH가 4.5에 이르렀다.

사탕이나 감자우림물을 첨가한 배지에서도 포도당을 첨가한 경우보다는 현저한 차이가 있지만 배지 1에 비해 pH가 각각 1.7, 1.0씩 낮아졌다. 이것은 《린회토분해균》

(*Ser. marcescens*-828)이 유기산생성을 위한 당원천으로서 포도당과 같은 하나당류뿐아니라 사탕, 농마와 같은 여러당류들도 리용할수 있다는것을 보여준다.

이로부터 《린회토분해균》의 배양에 당을 비롯한 수용성유기성분과 여러가지 활성물질들이 많이 포함되어있고 식물활성제원료로 많이 리용되고있는 벼짚엑스[1, 2]를 리용할수 있다.

2) 고농도액체《린회토분해균》비료의 생산방법

현장조건에서도 액체미생물비료로서 쉽게 생산하며 운반과 리용의 편리를 보장할수 있도록 집중한 《린회토분해균》의 농도를 높일수 있는 배양조건과 방법을 연구하였다.

먼저 버짚엑스를 리용한 배지에서 버짚엑스의 농도에 따르는 《린회토분해균》의 증식 특성을 보면 표 2와 같다.

표 2. 버짚엑스배지에서 버짚엑스의 농도에 따르는 《린회토분해균》의 균수변화

버짚엑스의 농도/%	0	1	2	4	6	8
균수 $/(\cdot 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.36	0.78	1.02	1.5	1.92	1.32

노소 0.2%, 쌀겨 1% 첨가, 복합균접종, 혈구계산판법, 배양온도 28~30℃, 진탕배양 180r/min, 배양기일 3d

표 2에서 보는바와 같이 버짚엑스배지에서 버짚엑스의 농도에 따라 《린회토분해균》의 균수는 점차 많아지다가 6%에서 최대에 이르렀으며 그 이상에서는 낮아졌다. 이로부터 《린회토분해균》액체배양을 위한 버짚엑스배지에서 버짚엑스의 최적농도는 6%라고 볼수 있다.

6% 버짚엑스배지의 수용성물질함량을 보면 표 3과 같다.

표 3. 6% 버짚엑스의 조성

유기물질/%	다량원소/%					미량원소 $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$				
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Cu	Zn	Mn	B	Fe
11.3	0.05	0.09	0.52	0.15	0.60	0.2	3.0	7.0	0.14	6.6

표 3에서 보는바와 같이 6% 버짚엑스에는 미생물의 생장에 필요한 여러가지 무기원소들과 일정한 량의 유기화합물들이 들어있지만 질소원을 비롯하여 그 함량이 약간 낮다고 볼수 있다. 그러므로 버짚엑스배지에 유기, 광물질첨가제(아미노산제제와 린회토엑스)를 첨가하는 방법으로 《린회토분해균》의 균수를 10~20배이상으로 높였다.

6% 버짚엑스배지에 아미노산제제를 0.3%(330배 희석)로 첨가하였을 때 《린회토분해균》의 수는 진탕배양 3일만에 $3.12 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$ 로서 최대에 이르렀다.(그림 2)

또한 아미노산제제를 첨가한 버짚엑스배지에 린회토엑스를 광물질첨가제로 더 넣었을 때 《린회토분해균》의 생장이 크게 촉진되었다.(그림 3)

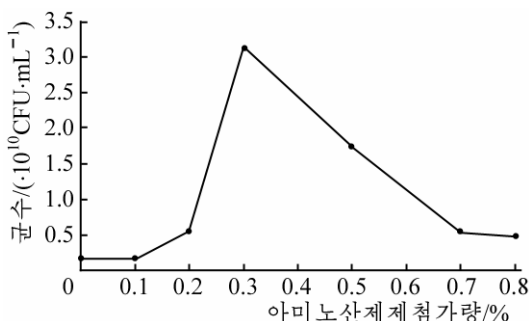


그림 2. 아미노산제제첨가량에 따르는 접종균수의 변화
6% 버짚엑스배지, 복합균접종, 배양온도 30℃, 진탕배양 3d

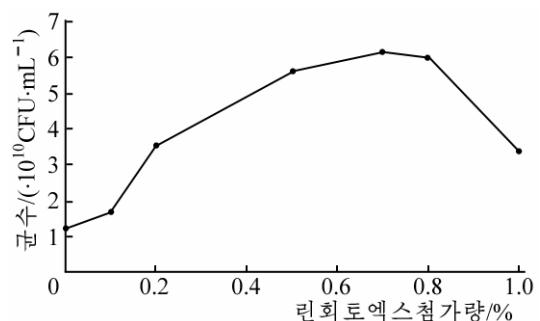


그림 3. 린회토엑스첨가량에 따르는 접종균수의 변화
아미노산제제를 0.3% 첨가한 6% 버짚엑스배지, 복합균접종, 배양온도 30℃, 진탕배양 3d

그림 3에서 보는바와 같이 아미노산제제를 0.3% 되게 첨가한 버짚엑스배지에 린회토엑스를 0.7%(150배 희석) 되게 더 첨가하였을 때 진탕배양 3일만에 《린회토분해균》의 수는 $6.16 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$ 로서 최대에 이르렀다. 이것은 아미노산제제와 린회토엑스속에 들어있는

유기 및 광물질성분들이 《린회토분해균》의 성장을 크게 촉진한다는것을 말해준다.

이때 평판배양법을 리용하여 최대에 이른 《린회토분해균》총수(6.16×10^{10} CFU/mL)에서 *Ser. marcescens*-828과 *Bac. macerans*-827의 수를 조사한데 의하면 각각 4.3×10^{10} CFU/mL(69.8%), 1.86×10^{10} CFU/mL(30.2%)로서 *Ser. marcescens*-828이 2배이상 더 높은 비율을 차지하였다.

다음으로 액체《린회토분해균》비료를 대량생산하는데서 중요한 문제는 《린회토분해균》의 산소요구성을 평가한데 기초하여 진탕배양과 함께 정치배양의 최적배양기일을 정확히 확정하는것이다.

《린회토분해균》의 산소요구성을 평가하기 위하여 감자엑스배지에 *Ser. marcescens*-828, *Bac. macerans*-827균들을 백금침으로 찌름접종하고 30℃에서 24h동안 배양하였다. 배양후 균들이 자라는 모습을 관찰한데 의하면 *Ser. marcescens*-828을 찌름접종했을 때 산소와 접촉한 부위에서 균이 특별히 많이 자라는것과 함께 찌름자리를 따라서도 균이 자랐다. 이것은 *Ser. marcescens*-828이 산소가 부족한 곳에서도 자라는 통성혐기성균이라는것을 보여준다. 또한 *Bac. macerans*-827의 배양결과도 *Ser. marcescens*-828과 같았다. 이로부터 *Bac. macerans*-827도 통성혐기성균이라는것을 알수 있다.

이와 같이 《린회토분해균》은 통성혐기성균으로서 산소가 없거나 부족한 배양조건에서도 다량생산할수 있다.

진탕배양 및 정치배양때 배양기일에 따르는 《린회토분해균》의 증식특성을 보면 표 4와 같다.

표 4. 배양방법에 따르는 《린회토분해균》의 증식특성

배양형식	배양일수에 따르는 균수변화 /($\cdot 10^{10}$ CFU \cdot mL $^{-1}$)						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
진탕배양	0.043	0.48	6.2	6.4	6.8	5.6	4.5
정치배양	0.006 4	0.064	0.088	0.29	8.8	1.4	1.3

아미노산제제 0.3%, 린회토엑스를 0.7% 첨가한 6% 벼질엑스배지, 복합균접종, 배양온도 30℃, 진탕배양 180r/min, 혈구계산판법

표 4에서 보는바와 같이 진탕배양할 때에는 3일, 정치배양할 때에는 6일만에 균수가 10^{10} CFU/mL이상의 높은 수준에 이르렀다. 그러므로 액체《린회토분해균》비료를 생산하여 리용할 때에는 최적배양기일을 3일(진탕배양) 또는 6일(정치배양)로 하여야 한다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 60, 8, 102, 주체103(2014).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 60, 8, 108, 주체103(2014).
- [3] 김일성종합대학학보(자연과학), 52, 2, 115, 주체95(2006).
- [4] 김일성종합대학학보(자연과학), 50, 1, 137, 주체93(2004).
- [5] 김일성종합대학학보(자연과학), 52, 3, 110, 주체95(2006).
- [6] 김일성종합대학학보(자연과학), 59, 3, 133, 주체102(2013).

- [7] 소명철 등; 김일성종합대학창립 65돛기념 국제학술토론회논문집(생명과학), 김일성종합대학출판사, 15~18, 주체100(2011).
- [8] 리선득 등; 전국대학교원과학토론회논문집(생물 화학 지리), 김일성종합대학출판사, 105~108, 주체94(2005).
- [9] 리재모 등; 전국대학교원과학토론회논문집, 김일성종합대학출판사, 108~110, 주체93(2004).
- [10] F. Selles et al.; Soil Soc. Am. J., **59**, 140, 1995.
- [11] Anita Khanafari et al.; Journal of Biological Sciences, **6**, 1, 1, 2006.
- [12] Helvia W. Casullo de Araújo et al.; Molecules, **15**, 6931, 2010.
- [13] N. Sundaramoorthy et al.; Indian Journal of Science and Technology, **2**, 10, 2009.

주체105(2016)년 1월 5일 원고접수

Properties of High Density Liquid Culture for Phosphorus Solubilizing Bacteria

So Myong Chol, Kim Si Chun

The method of liquid culture for phosphorus solubilizing bacteria(*Serratia marcescens*-827, *Bacillus macerans*-828) using the extract of rice straw was studied in order to produce and apply microbial fertilizer readily in even local condition.

Phosphorus solubilizing bacteria (*Ser. marcescens*-827, *Bac. macerans*-828) grow more in the culture medium with potato-extract and rice straw-extract rich in nutrients such as vitamins as well as the sources of nitrogen and carbon compared with various composite culture mediums.

The strains can utilize polysaccharides such as sugar and starch as well as monosaccharides such as glucose during liquid culture.

The culture medium of rice straw-extract with 0.3% of decomposed poultry feathers and 0.7% of phosphorite-extract is reasonable for the production of high density liquid microbial fertilizer.

The numbers of phosphorus solubilizing bacteria, the common anaerobic bacteria reach more than 10^{10} CFU/mL after 3 days in shaking culture and 6 days in stationary culture.

Key words: phosphorus solubilizing bacteria, *Serratia marcescens*, *Bacillus macerans*, high density liquid culture, rice straw extract