한국토양비료학회지 제 40권 5호
Korean J. Soil Sci. Fert. Vol. 40, No. 5, 405-411 (2007)

연구보문

감귤원 토양에서 분리한 인산염 가용화 미생물 *Bacillus sphaericus* PSB-13의 특성

좌재호* · 임한철 · 한승갑 · 전승종 · 서장선[1]

난지농업연구소, [1]농업과학기술원

Characteristics of *Bacillus sphaericus* PSB-13 as Phosphate Solublizing Bacterium Isolated from Citrus Orchard Soil

Jae-Ho Joa,* Han-Cheol Lim, Seung-Gap Han, Seung-Joung Chun, and Jang-Sun Suh[1]

National Institute of Subtropical Agriculture, RDA, JeJu 695-150, Korea
[1]National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

This study was carried out to measure insoluble phosphorus fractions content fixed in different soil type and isolate a superior phosphate solublizing bacteria(PSB) producing free phosphate in citrus orchard soil. Distribution of insoluble phosphate fraction ordered Al-P>Ca-P>Fe-P in the investigated citrus orchards. Insoluble phosphate fraction such as Al-P, Ca-P, Fe-P were higher in volcanic ash than in non-volcanic ash soil. A PSB with high holo zone in PDA-P medium isolated from citrus orchard soil. This strain identificated by MIDI system as *Bacillus sphaericus*. The optimum growth of pH and temperature were at 4~5, 30℃, respectively. When *Bacillus sphaericus* cultured at 25℃, 150 rpm condition in LB broth medium included different phosphate. *Bacillus sphaericus* produced free phosphate in the culture broth medium from tricalcium-phosphate(207.0 ppm), aluminium phosphate(324.5 ppm) and hydroxyapatite(334.8 ppm) and Phosphatase activity of Bacillus sphaericus was higher at 35℃ culture condition than that of 25℃. Two type preparation inoculated *Bacillus sphaericus* made with carrier materials such as Bentonite, $CaCO_3$, Sodium alginate. Density of PSB in this preparation conserved at 10^5 c.f.u. g^{-1} level during storage in different temperature condition for 7 month. It also showed that free phosphate produced at PDA-P medium.

Key words : Insoluble phosphate, Phosphate solublizing bacteria, Volcanic ash soil, Phosphorus fractions

서 언

제주도 화산회토 토양은 인산의 고정력이 강할 뿐만 아니라 유기물과 allophane이 복합체를 형성하여 분해에 대한 저항성이 강하며 allophane으로부터 용출되는 다량의 알루미늄에 의하여 토양미생물의 활성이 낮다고 하였다(송, 1983). 감귤원의 61%정도가 화산회토에 분포하고 있으며 그동안 수량위주의 화학비료 과다시비로 인하여 토양 산성화가 심하게 진행되어 왔다. 더욱이 화산회토는 인산을 강하게 흡착, 고정하기 때문에 완효성의 용성인비 시용이 권장되어 왔는데 감귤원 토양이 산성화가 진행되면서 시용된 인산이 Al, Fe 과 결합하여 식물이 이용하지 못하는 난용성의 인산염으로 토양 중에 축적되어 왔으며 산성토양을 개량하기 위하여 고토석회의 시용은 토양중 Ca-P의 증가를 가져왔다. 제주도 토양의 무기태 인산 함량(신 등, 1980)과 경작지 축적인산의 형태별 조성 및 유효인산 함량에 관하여 연구되었으며(신 등, 1988), 김 등(2000)은 유기농재배 시설재배지와 과수원 토양내에서 Ca-P가 약 1,330 mg kg^{-1}으로 Extractable P 중 가장 높았다고 보고 한바 있다. 이 등(2002)은 시설재배지에서 윤답전환으로 표토내에서 Al-P와 Ca-P가 Fe-P보다 높게 분포한다고 하였다. 토양에 인산비료가 시용된 후 식물생육에 이용되는 인산은 적으며 대부분의 비료성분이 불용화 되거나 강우나 토양침식과 함께 유실되어 지하수가 오염될 우려가 있다. 따라서 토양중의 축적된 인산을 효과적으로 작물에 흡수 이용할 수 있도록 하여 인산시비량을 감소시키고 이용율을 높일 필요가 있다. 인산을

접 수 : 2007. 9. 13 수 리 : 2007. 10. 5
*연락저자 : Phone: +82647412592,
E-mail: choa0313@rda.go.kr

가용화하여 이용하는 방법으로는 유기물 공급, 흡비작물 재배 후 토양환원, 인산가용화 미생물을 들 수가 있다. 최근 연구가 많이 진행되고 있는 대표적인 것이 인산가용화 미생물의 이용이다. 인산가용화균을 가지고 고정된 인산염의 유리화를 통하여 식물에 이용하려는 연구는 많이 이루어져 *Bacillus*, *Pseudomonas* 속 등의 인산염가용화 우수균을 biofertilizer로 사용했을 때 작물의 생산량이 증가한다고 하였고(Caroline, 1994; Illmer and Schinner, 1995, El- Yazeid et al., 2007), 국내에서도 인산가용화 우수균의 분리 및 제제화에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다(김 등, 1984; 서, 1994; 김 등, 1997; 강 등, 1998; 김 등, 2002). 강 등(1996)은 인산가용화 우수 사상균 *Penicillium* sp.을 선발했고, 서(1994)는 *Pseudomonas putida*와 *Aspergillus niger* 등 인산가용화 우수균을 선발하여 인산염가용화에 대한 유의한 결과를 얻기도 하였다. 강 등(2000)은 균근을 이용하여 화산회토양에서 인공급원과 시용 수준이 탱자유묘의 생육과 공생균근 형성에 미치는 영향에 대하여 검토한 바 토양중 유효인의 과다한 축적을 완화시켜 공생균근의 형성율과 역할을 증대시킴으로써 인산과다시비의 문제점을 해결할 수 있다고 하였다. 박 등(2005)은 *Enterobacter intermedium*으로 제조된 인산생물비료가 인산흡수를 높여 상추 생체중을 증가시켰다고 하였다. 인산의 가용화에는 사상균이 중요한 역할을 하는데 Penicillium sp., Aspergillus sp.등의 인산가용화 능력에 대하여 많은 보고가 있다(Kucey, 1988; 서, 1994). 특히 제주도 화산회토 토양의 인산흡착계수가 높아 해마다 표준 시비량의 2배 이상을 시용하고 있는 점을 고려할 때 누적된 인산염의 가용화를 통한 인산시비량 절감에 대한 연구는 더욱 필요한 실정이다. 미생물을 이용한 제제화는 미생물의 활성을 유지하면서 미생물이 갖고 있는 기능을 극대화 할 수 있어야 한다. 강 등(1999)은 인산가용화 사상균의 포자생성능을 높이기 위하여 보리, 쌀겨 등을 이용하였으며, 김 등(2004)은 alginate나 agar가 gelatin을 담체로 사용하였을 때보다 *Pantoea agglomerans*균주의 인산가용화능이 우수하였다고 하였다. 강 등(2007)은 인산가용화균인 *Aspergillus* sp.의 분생포자 생활력에 계면활성제, 금속이온, 당밀 등 각종 유기물이 미치는 영향을 조사한 결과 Tween 80과 1.0% 맥반석이 장기보존시 생존율이 우수 하였다고 보고하였다.

본 연구는 감귤원 토양 유형별로 난용성 인산염의 형태별 함량을 분석하고 인산가용화 우수균의 분리 및 특성을 조사하여 농업적으로 유용한 미생물을 선발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

난용성 인산염의 형태별 정량 및 인산 가용화균의 분리 토양을 흑색토, 농암갈색토, 암갈색토로 구분하여 각각 10개 감귤원(전체 30개, 1998년)에서 한개 감귤원당3～4지점의 토양을 채취하여 잘 섞은 후 인산염가용화 미생물을 분리하고 토양은 음건하여 토양중 인산염 형태별 함량을 분석하는데 사용하였다. 형태별 난용성인산의 분별정량은 용액에 대한 용해성 차이를 이용하여 토양화학분석법(농진청, 1988)에 따라 분석하였다. Al-P는 토양 1g에 대하여 Saloid-P을 침출하고 난 후 50 mL의 0.5 M NH_4F(pH 8.5)용액을 가하여 1 시간 진탕한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 몰리브덴 청법으로 분석하였다. Fe-P는 Al-P을 침출한 토양에 25 mL의 포화 NaCl 용액으로 2회 세척 후 50 mL의 0.1 M NaOH 용액을 가하고 17시간 진탕 후, Ca-P는 Fe-P을 침출한 토양에 25 mL의 포화 NaCl용액으로 2회 세척 후 50 mL의 0.25 M H_2SO_4용액을 가하고 1시간 진탕 후에 Al-P과 같은 방법으로 분석하였다. 난용성 인산염의 분해능이 우수한 균을 선발하기 위하여 PDA-calcium phosphate(PDA-P) 분리용 배지(Potato dextrose agar 20 g, $CaCl_2$ 5 g, K_2HPO_4 5 g, D.W. 1000 mL)를 이용하여 토양을 멸균수에 희석하고 도말하여 30 에서 1～4일간 배양한 후에 1차 순수분리 후 순수분리균주를 다시 PDA-P배지를 이용하여 2차 배양하여 농암갈색 감귤원 토양에서 균체 주위에 투명대를 형성하는 균주 중 투명대가 크고 생육이 좋은 균주를 선발하였다. 균주 동정은 세포벽 고유 지방산함량에 따른 MIDI system(Sherlock system)을 이용하였다. 분리균주의 표면조직은 LB 배지에서 2일간 배양 후 제조사의 시료처리방법에 따라 표본을 조제하여 주사전자현미경(JEOL, JSM 5410LV)으로 7000배의 배율로 관찰하였다.

인산 가용화균의 배양 및 특성분석 분리균주를 LB broth(Peptone 10 g, Yeast extract 5.0 g, NaCl 10 g, pH 6.8, D.W. 1,000 mL)배지 50 mL에 접종하여 pH는 4～7, 온도는 20℃～70℃ 범위에서 150 rpm으로 7일간 진탕배양 후 UV-Visible spectrophotometer(HP 8453A)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생육정도를 조사하였다. 유리인산 생성능을 조사하기 위해서 LB broth배지(pH 6.8)에 Aluminium phosphate〔$AlPO_4$〕, Hydroxyapatite〔$Ca10(PO_4)_6(OH)_2$〕 및 Tricalcium phosphate〔$Ca_3(PO_4)_2$〕를 각각 0.5%(w/v)씩 첨가하였다. 이것을 100 mL 삼각플라스크에 각각 30 mL씩 넣고 여기에 LB broth배지에

서 5일 동안 진탕 배양한 *Bacillus sphaericus* 균체배양액 1 mL를 접종하여 25℃, 150 rpm의 조건에서 25일간 진탕배양하여 생성된 유리인산의 양을 측정하였다. 균체배양액 1.5 mL를 취하여 Eppendorf tube에 담은 후 centrifuge로 15,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 1.0 mL에 증류수 4 mL를 첨가하여 총 5 mL가 되게 하였다. 여기에 몰리브덴산암모늄용액 0.2 mL와 염화제일주석용액 0.025 mL를 가하여 잘 섞은 후 30 에서 10분간 방치한 다음 UV-Visible spectrophotometer(HP 8453A)를 이용하여 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 25℃와 35℃ 온도조건에서 LB broth배지에 인산염 종류별〔AlPO4, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, $Ca_3(PO_4)_2$〕로 각각 0.5%(w/v)씩 첨가 후 150 rpm으로 25일간 진탕배양하여 분리균주의 인산효소활성을 측정하였다. 균주 배양액의 Phosphatase(Phosphomonoesterase)는 배양액 1 mL를 50 mL 삼각플라스크에 취한 후 0.2 mL의 toluene, 4 mL의 MUB 완충용액(pH 6.5), 1 mL의 0.025 M p-nitrophenyl phosphate용액을 가하고 밀봉을 하여 37 에서 1시간 동안 배양 후 UV-Visible spectrophotometer (HP 8453A)를 이용 400 nm에서 측정하였다(농진청, 1988). 대조구로 1 mL의 0.5 M $CaCl_2$ 용액과 4 mL의 0.5 M NaOH용액을 가한 후 배양 현탁액을 여과하기 직전에 1 mL의 0.025 M p-nitrophenyl phosphate용액을 가한 것을 사용하여 여액 중의 p-nitrophenol 함량을 계산하였다. 유리인산 생산기작과 관련하여 LB broth배지를 이용하여 25℃에서 7 일간 배양 후 배양여액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 0.45 um Milli pore로 거른 후 HPLC(Dionex Dx-500)를 이용하여 유기산을 정성 분석하였다.

미생물의 담체고정 및 생존력 인산염가용화 균주를 LB broth배지에서 배양 후 GYN(Glucose 10 g, Yeast extract 4 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, Na_2HPO_4 1.7 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.02 g pH 6.8, D.W. 1,000 mL)배지를 이용하여 30℃, 150 rpm에서 10시간 동안 균주를 진탕배양 후 배양액 500 mL에 흡착제로 $CaCO_3$ 10%, 계면활성제로 polycarboxylate-2 2%를 잘 혼합하여 30℃에서 2일간 건조 후 분말원제를 생산 하였다. 원제에 보조제로 $CaCO_3$와 증량제로 Bentonite를 혼합(1 : 1 : 3)하여 분제형태의 담체고정 Ⅰ을 제조하였으며 균밀도는 0.3 × 10^7 c.f.u. g^{-1}였다. 균주배양액에 Bentonite와 0.1% Sodium alginate 용액을 혼합(89.5 : 10 : 0.5 = v : w : v)하여 1.3 × 10^7 c.f.u. g^{-1}의 입제형태 담체고정 Ⅱ를 만들었다. 제조된 시제품은 4℃, 30℃, 50℃에서 보관하면서 30일, 60일, 120일, 150일, 180일, 210일에 PDA-P배지를 이용하여 생균수를 조사하였으며 3회 반복수행하여 평균값을 구하였다.

결과 및 고찰

감귤원 토양 중 난용성 인산염의 형태별 함량 토색별로 감귤원 토양 중 난용성 인산염의 형태별 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 토양중 평균 유효인산함량은 암갈색토 152.7 mg kg^{-1}으로 화산회토인 농암갈색토 71.1 mg kg^{-1}, 흑색토 64.5 mg kg^{-1}보다 많았다. 토양중 난용성 인산염의 형태별함량은 화산

Table 1. Inorganic phosphorus fractions concentration in volcanic ash soils of different colors in citrus orchard.

Soil color		Available-P	Ca-P	Fe-P	Al-P
		mg kg^{-1}			
Black soil	Maximum	13.4	29.6	340.7	982.7
	Minimum	311.4	931.2	1,903.2	1,500.9
	Mean	64.5	391.8	1,002.6	1,244.1
	SD	88.9	270.4	420.1	168.8
Thick dark brown soil	Maximum	10.3	8.7	89.7	304.2
	Minimum	294.7	134.7	723.2	2,356.0
	Mean	71.1	113.5	262.1	1,120.9
	SD	80.8	36.5	178.7	546.2
Dark brown soil	Maximum	5.5	621.9	59.6	221.9
	Minimum	210.0	1,420.8	800.3	1,225.7
	Mean	152.7	884.4	251.9	630.6
	SD	69.2	294.7	218.8	300.8

† Ca-P : calcium bound phosphorus Ca
Fe-P : phosphorus bound to Fe oxides
Al-P : phosphorus bound to Al oxides

회토가 비 화산회토에 비하여 많았으며 Al-P〉Fe-P〉Ca-P순으로 인산 고정량이 많았다. 신 등(1980)이 암갈색토양에서 Al-P가 Ca-P의 함량보다 낮다고 보고한 것과는 일치하나 농암갈색 토양에서는 Al-P〉Fe-P〉Ca-P순으로 분포하였으며 Fe-P함량은 암갈색토와 비슷하였다. 과수생육 적정 토양 pH가 6.0～6.5인데 1960년대의 pH 6.3에서 현재 4.9로 산성화가 진행되어 토양을 개량하기 위하여 고토석회의 시용이 증가하고 있다. 비화산회토양에서 Ca-P함량이 Al-P함량보다 높은 것은 감귤원 토양의 산성을 개량하기 위하여 시용한 고토석회가 토양 중 인산과 결합을 한 것으로 추후 Ca-P는 인산가용화 미생물을 이용하거나 유기물 적정시용 등의 토양관리방법에 따라 작물에 이용이 가능할 것으로 생각된다. 김 등(2002)은 유기농업 실천농가의 과수원 토양이 높은 pH 영향으로 Ca-P가 약 1,330 mg kg^{-1}으로 높았다고 보고한 바 있다. 감귤원 토양의 무기인산의 분포는 투입되는 축분퇴비, 화학비료 등 농자재, 유기재배 등 영농형태와 초생재배 등 토양관리에 의하여 영향을 받는 것으로 생각된다.

_Bacillus sphaericus_의 분리, 인산가용화량 및 배양특성

난용성 인산염을 가용화 하면서 지역 토양환경에 적합한 균주를 선발하기 위하여 채취한 토양을 10^5 수준으로 희석 후 PDA-P 배지상에 접종하여 인산가용화 우수균을 분리하였다(Photo. 1). 분리된 균주 가운데 인산가용화능이 가장 우수한 균주는 MIDI시스템을 이용하여 Bacillus sphaericus로 동정되었으며 전자현미경 관찰결과 그람양성의 간균 형태를 나타냈다(Photo. 2).

LB broth배지에 인산염을 종류별로 첨가하여 2℃, 150 rpm의 조건에서 25일간 배양하였을 때 *Bacillus sphaericus*는 $AlPO_4$에서 324.5 ppm, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$와 $Ca_3(PO_4)_2$에서 각각 334.8 ppm, 207.0 ppm의 유리인산을 생성하였다(Fig. 1). 김(1997)이 보고한 *Enterobacter agglomerans*보다는 가용화량이 낮았지만 인산염 종류별로 실내배양시 온도와 pH, 배지조성에 따라 인산가용화량은 차이가 있을 것으로 생각된다. 인산은 토양중에서 이동이 느리며 토양온도, 수분함량, pH 등의 영향을 받아 식물이 이용할 수 있는 유리인산형태로 바뀌게 된다. 난용성 인산염으로부터 유리인산 생성기작은 황 및 암모니아 산화에 의한 황산과 질산, 2-ketogluconate 등의 킬레이트물질, 유기산, phosphatase 생성에 의한다고 알려져 있다(Duff and Sundara Rao, 1963; Bajpai et al., 1971; 강 등, 2001, Hwangbo et al., 2003). *Bacillus sphaericus*의 유리인산 생성기작을 알고자 균주을 LB broth배지에서 배양 후 배양여액을 채취하여 배양액의 성분을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과 배양액중에는 Oxalic acid, Formic acid, Citric acid 등의 유기산이 검출되어 *Bacillus sphaericus*가 배양되는 동안 생성된 유기산에 의하여 인산염이 가용화 되는 것으로 생각된다. 인산 가용화 세균 *Enterobacter agglomerans*는 Oxalic acid(김, 1997), 인산가용화 사상균 Penicillium sp.은 citric acid와 phospatase 활성(강 등, 2001)에 의하여 인산염이 가용화되는 것으로 보고 된 바 있다. 유기인산을 무기인산으로 전환하는 데는 인산효소가 중요한 역할을 하는데 *Bacillus sphaericus* 균주를 온도조건을 달리하여 인산염 종류별로 접종 후 LB broth 배지에서 배양하였을 때 배양액의 인산효소활성은 25℃보다 35℃에서 58.3 - 64.5 ㎍ PNP ml^{-1} h^{-1} 정도 높았으며 인산염별로는 $AlPO_4$, $Ca_3(PO_4)_2$에서 높게 나타났다(Fig. 2). *Bacillus sphaericus*의 pH와 온도별 생육특성은 Fig. 3과 같다. pH는 4～7범위에서 생육이 양호하였으며 산성조건인 pH 4～5에서 좋았다. 온도는 20℃～70℃에서 생육이 양호하였으며 30℃에서 생육이 제일 좋았다. 감귤원 토양의 대부분이 나지상태의 청경재배로 토양수분과 온도의 변화가 초생재배보다 크기 때문에 토양중에 시용된 인산은 토양

Photo 1. Characteristics of phosphate solublizing and colony morphology of *Bacillus sphaericus* in PDA-P medium.

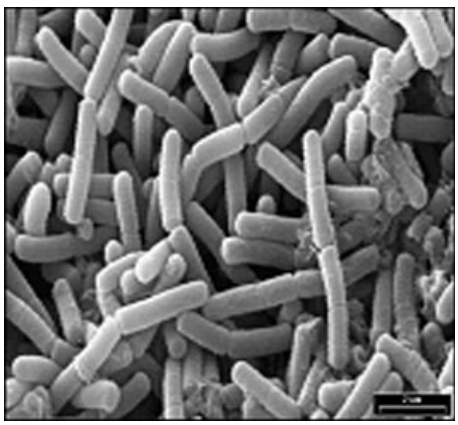

Photo 2. A scanning electron micrograph of *Bacillus sphaericus* cultivated on PDA-P(7,000 ×).

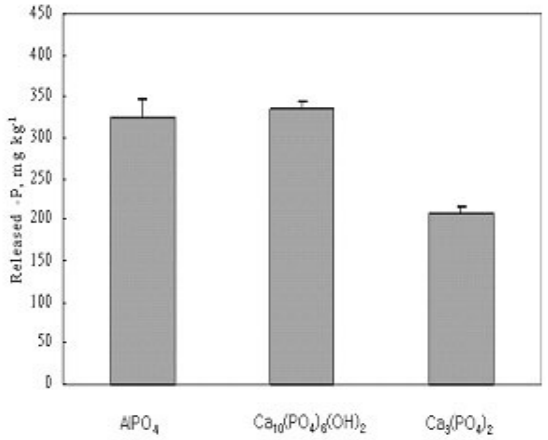

Fig. 1. Phosphorus released by *Bacillus sphaericus* in different insoluble phosphate.

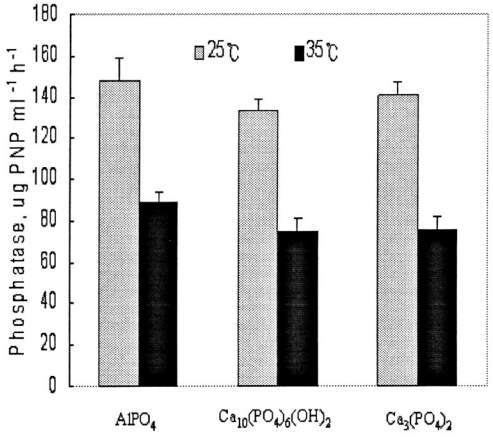

Fig. 2. Phosphatase activities of *Bacillus sphaericus* in LB broth medium with different phosphates and temperature.

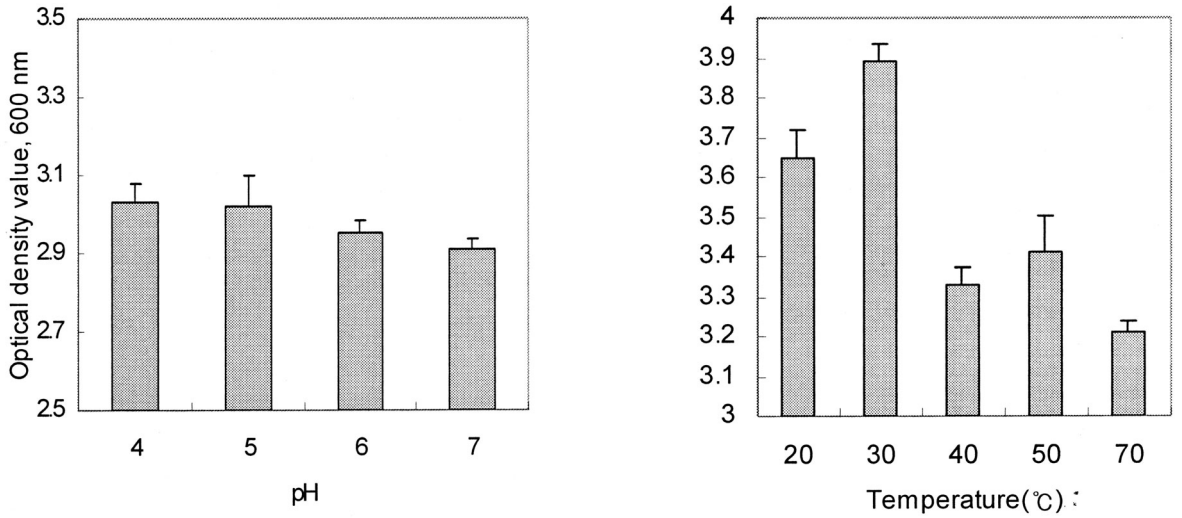

Fig. 3. Effect of pH and temperature on the growth of phosphate solubilizing bacterium *Bacillus sphaericus*.

에 많이 흡착 고정이 된다. 더구나 Al함량이 많아 난용성의 인산염으로 고정되어 식물이 이용하기가 어려운 형태로 토양내에 존재한다. 균주의 배양학적인 특성을 고려할 때 지금까지 알려진 인산가용화 세균보다는 유리인산 생성량이 적지만 현재 암갈색 감귤원 토양에 과다 집적되어 있는 Ca-P인산의 이용율을 높이는데 사용이 가능할 것으로 판단된다. 강 등(1999)은 인산 가용화 사상균 *Penicillium* sp. 을 보리, 쌀겨 등의 고체배지에 배양 후 옥수수를 이용한 pot시험에서 작물생육을 증진하여 생물비료로서 효과가 있었으며, 강 등(2000)은 인산시비를 줄이고 공생균근의 형성을 증대시켜 화산회토양 감귤원에서 인산의 이용율을 높일 수 있다고 보고 한바 있다.

인산염 가용화 미생물 *Bacillus sphaericus*의 담체고정 및 생존력 *Bacillus sphaericus*를 담체에 고정 후 저장온도별 균밀도의 경시적 변화는 Fig. 4와 같다. 담체고정 Ⅰ은 4℃에서는 30일 후 3.7×10^5 c.f.u. g^{-1}, 120일 후 3.8×10^5 c.f.u. g^{-1} 210일 후 0.9×10^5 c.f.u. g^{-1}, 30℃에서는 30일 후 0.7×10^5 c.f.u. g^{-1}, 210일 후 0.8×10^5 c.f.u. g^{-1}, 50℃에서는 210일 후 2.7×10^5 c.f.u. g^{-1}의 균밀도를 나타냈다. 균의 밀도는 초기와 비교하여 210일까지 저장온도 간에 큰 차이는 없었고 10^5 c.f.u. g^{-1} 수준을 유지하였다. 담체고정 Ⅱ는 4℃에서는 30일 후 5.0×10^5 c.f.u. g^{-1}, 120일 후 10.3×10^5 c.f.u. g^{-1}, 210일 후 29.1×10^5 c.f.u. g^{-1}, 30℃에서는 210일 후 3.5×10^5 c.f.u. g^{-1}, 50℃에서는 210일 후 3.5×10^5 c.f.u. g^{-1}의 균밀도를 나타냈다. 담체고정 Ⅱ는 Ⅰ보다 4℃에서 균의 밀도가 높았고 30일경에 검출되지 않았으나 시간이 경과하면서 검출된 것으로 보아 10^5 c.f.u. g^{-1} 수준보다 낮게 분포하는 것으로 생각된다. *Bacillus sphaericus*는 고정담체에 따라서 균의 밀도가 다르게 나타나 담체의 종류를 달리하여 보존하였을 때 균의 밀도는 다를 것으로 추정된다. 김 등(2004)은 *alginate*

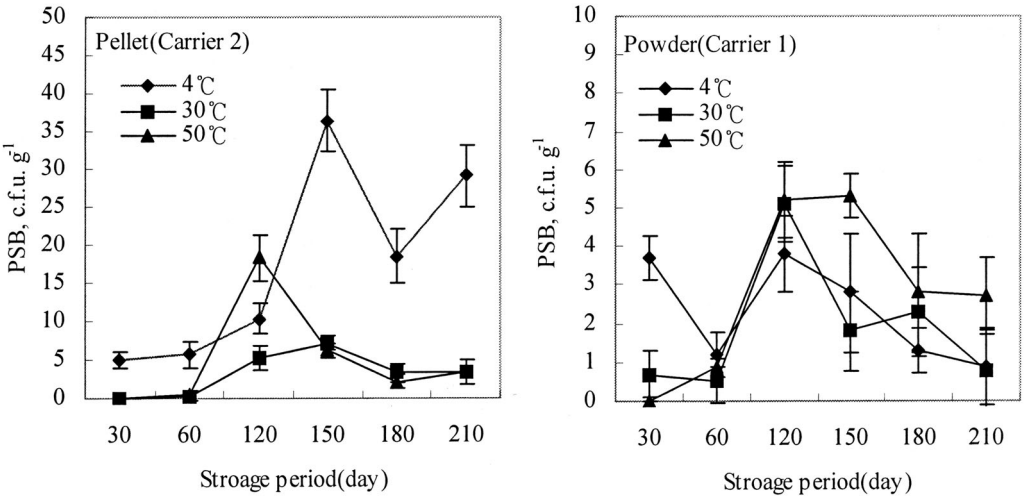

Fig. 4. Effect of pH and temperature on the growth of phosphate solubilizing bacterium *Bacillus sphaericus*.

가 gelatin을 담체로 사용하였을 때보다 **Pantoea** *agglomerans*균주의 인산가용화능이 우수하였으며, 강 등(2007)은 인산가용화균인 *Aspergillus* sp.의 분생포자를 Tween 80과 1.0% 맥반석에 장기보존시 생존율이 우수 하였다고 보고하였다. 감귤원 봄비료 시용시 토양의 지온이 10 ~13℃임을 고려하면 유박, 어분 등의 유기질비료와 혼합하여 사용할 때 토양에 정착 후 일정기간 *Bacillus sphaericus*의 밀도를 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 감귤원 토양유형별로 고정되어 있는 난용성 인산염함량을 파악하고 이를 생물학적으로 이용하고자 인산가용화 우수미생물을 선발하여 특성을 조사하였다. 토양중 난용성 인산염의 형태별 분포는 Al-P〉Ca-P〉Fe-P 순으로 화산회토 토양이 비화산회토 보다 많았다. PDA-P배지를 이용하여 인산염 가용화능이 우수한 *Bacillus sphaericus*를 분리하였으며 pH 4~5와 30℃에서 생육이 제일 좋았다. *Bacillus sphaericus*은 $AlPO_4$에서 324.5 ppm, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$에서 334.8 ppm, $Ca3(PO_4)_2$에서 207.0 ppm의 유리인산을 생성하였으며 인산효소활성은 35℃에서 배양할 때 높았다. *Bacillus sphaericus*를 Bentonite 등 담체에 고정 후 온도를 달리하여 7개월 보존기간 동안 밀도 변화를 조사한 결과 10^5 c.f.u. g^{-1} 수준과 인산가용화능을 유지하여 추후 생물비료로 이용이 가능할 것으로 기대된다.

인 용 문 헌

Bajpai, P.D. and W.V.B. Sundara Rao. 1971. Phosphate solubilising bacteria. Part Ⅲ. Soil inoculation with phosphorus solubilising bacteria. Soil Sci. Plant Nutr. 17: 46-53.

Caroline C. 1994. Field studies on two rock phosphate solubilizing actinomycete isolates as biofertilizer sources. Environmental management. 18(2):263-269.

Duff, R. B., D.M. Webley, and R.O. Scott. 1963. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria Soil Sci. 95:105-114.

El- Yazeid, A. A., H.E. Abou-Aly, M.A. Mady, and S.A.M. Moussa. 2007. Enhancing Growth, Productivity and Quality of Squash Plants Using Phosphate Dissolving Microorganisms (Bio phos-phor) Combined with Boron Foliar Spray. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 3(4): 274-286.

Gerritse, R.G. and H. van Dijk. 1978. Determination of phosphatase activities of soils and animal wastes. Soil Biol. Biochem. 10:545-551.

Hwangbo, H., R.D. Park, Y.W. Kim, Y.S. Rim, K.H. Park, T.H. Kim, J.S. Suh, and K.Y. Kim. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. Current Microbiology. 47: 87-92.

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

강석범, 좌성민, 문두길, 한해룡, 정종배. 2000. 화산회토양에서 인 공급원과 시용 수준이 탱자유묘의 생육과 공생균근 형성에 미치는 영향. 한국환경농학회지. 19(3):206-212.

강선철, 최명철. 1998. 인산가용화 사상균 *Penicillium sp.* PS-113 균주의 분리 및 배양 특성. 한국생물공학회지. 13(5):497-501.

강선철, 최명철. 1999. 인산가용화 사상균 *Penicillium sp.* PS-113의 고체배양. 한국미생물생명공학회. 27(1):1-7.

강선철, 양미옥, 태언희. 2001. 인산가용화균 *Penicillium sp.* GL - 101 의 유리인산 생성기작에 관한 연구. 한국환경농학회지. 20(1):1-7.

강선철, 김은량. 2007. *Aspergillus sp.* PS-104의 분생포자 생활력에 미치는 첨가제 효과. 한국환경농학회지

26(1):77-84.
김길용. 1997. 인산염 가용화균 *Enterobacter agglomerans*에 의한 Hydroxyapatite 가용화와 유기산 생성. 한국토양비료학회지. 30(2):189-195.
김길용, 황보훈, 김용웅, 김효정, 박근형, 김영철, 성기영. 2002. *Enterobacter intermedium* 60-2G의 유기산 생성과 불용성인의 가용화. 한국토양비료학회지. 35(1):59-67.
김은희, 박성애, 박명수, 양진철, 사동민, Munusamy Madhaiyan, Sundaram Seshadri. 2004. 고정화된 pantoea agglomerans에 의한 난용성 인산의 가용화. 한국토양비료학회지. 37(1):36-40.
김필주, 이상민, 박양호, 이주영, 김석철, 윤홍배, 최두회. 2000. 유기농업실천농가 포장내 인산의 분포특성. 한국토양비료학회지.33(4):234-241.
김형옥, 유장걸, 이신찬. R.M.N.Kucey. 1984. 제주도 감귤원 토양의 V.A-mycorrhizae 분포 및 사상균에 의한 인광석의 용해에 관한 연구. 제주대 논문집. 17:45-50.
Kucey, R.M.N. 1988. Effect of *penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and Micronutrients from soil by wheat. Can. J. Soil. Sci. 68:261-270.
Metting, F.B. Jr. 1992. Soil microbial ecology : applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker. New York.
농촌진흥청 농업기술연구소. 1988. 토양화학분석법: Ⅲ. 토양미생물 실험법.
박범기, 나정행, 황보훈, 이인중, 김길용, 김용웅. 2005. Enterobacter intermedium으로 제조된 인산생물비료가 토양 특성 및 상추의 생육에 미치는 영향. 한국토양비료학회지. 38(1): 15-24.
서장선. 1994. 난용성 인산염 가용화 미생물에 의한 토양 축적인산의 미생물학적 이용에 관한 연구. 박사학위논문. 전남대학교.
송관철. 1990. 제주도 대표토양의 Andic properties에 관한 연구. 박사학위논문. 서울대학교.
신철우, 류인수, 윤정희. 1980. 제주도 토양의 무기태 인산 조성과 유효인산의 정량법 비교. 한국토양비료학회지. 13(3):93-97.
신철우, 김정제, 윤정희. 1988. 경작지 전토양의 인산특성에 관한 연구 Ⅰ. 축적인산의 형태별 조성과 유효인산 함량과의 관계. 한국토양비료학회지. 21(1):21-29.
이용복, 이인복, 황준영, 이경동, 김필주. 2002. 시설재배지에서 윤답 전환체계가 인산분포에 미치는 영향. 한국토양비료학회지. 35(1):47-58.
Trasar-Cepeda, M.C. and F. Gil-Sotres. 1987. Phosphatase activity in acid high organic matter soils in galicia. Soil Biol. Biochem. 19(3):281-287.