

Isolation and Characterization of a Novel Bacterium, *Bacillus subtilis* HR-1019, with Insoluble Phosphates Solubilizing Activity

Yong-Suk Lee¹, Dong-Ju Park¹, Jae Hoon Kim², Hyeong Seok Kim² and Yong-Lark Choi^{1*}

¹Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Haerim Pharmetic LTD, Busan 617-736, Korea

Received November 29, 2012 / Revised January 24, 2013 / Accepted January 25, 2013

The objective of this study was to develop a mineral phosphate-solubilizing bacterium as a biofertilizer. A mineral phosphate-solubilizing bacterium HR-1019 was isolated from cultivated soils. It was identified as *Bacillus subtilis* by 16S rDNA analysis. The phosphate-solubilizing activities of the HR-1019 strain against three types of insoluble phosphate, hydroxyapatite, tri-calcium phosphate, and aluminum phosphate were quantitatively determined. When 5% of glucose concentration was used as a carbon source, the strain showed marked mineral phosphate-solubilizing activity. Mineral phosphate solubilization was directly related to pH drop in the culture solution of the strain. The pathogenic activity and antifungal effects of the HR-1019 strain were measured in clear zones formed in PDA media.

Key words : Insoluble phosphate, mineral phosphate-solubilization, free phosphate, *Bacillus subtilis* HR-1019, plant pathogen

서 론

작물의 3대 영양소 중의 하나인 인은 토양에는 대부분이 불용성 형태로 존재하기 때문에 식물의 이용이 어려워서 미생물 생태학자들은 tri-calcium phosphate 또는 hydroxy-apatite와 같은 불완전 용해 무기 인산 용해 미생물에 큰 능력에 관심을 가져 왔었다[3].

인은 식물체에서 생물학적 성장과 발육에 필수적인 영양성분이며 핵산, 인지질, phytates 등의 중요 구성성분이며, 식물 및 박테리아 성장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 하는 원소이다. 그러나 인산은 산성토양에서는 철 및 알루미늄 이온과 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화 됨으로써 토양 중에는 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양만 증가되는 결과를 가져다준다. 실제로 인산은 토양 중 0.05% (w/w)를 차지하고 있으나, 식물이나 미생물이 이용할 수 있는 인산양은 그 중에서도 0.1%이다[11]. 난용성 인산염을 식물이나 미생물이 이용하기 쉬운 $H_2PO_4^-$ 나 HPO_4^{2-} 의 이온형태로 전환시켜주는 과정을 가용화라 하며 토양 속에는 이러한 가용화 반응을 일으키는 미생물이 많이 존재한다고 보고되어져 있다[12]. Illmer와 Schinner는 몇몇 PSM (phosphate solubilizing microorganism)이 칼슘-인산(Ca-Ps)

을 용해시키는데 있어서 매우 효과적임을 보여주었다[5].

인산 가용화 균을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizers)의 개발노력은 부단히 이루어져 왔으며, 인산의 흡수를 증대시켜 작물의 수량증가를 보여준 연구결과도 있다[2, 8].

국내에서의 미생물을 이용한 생물비료의 개발은 균주 선발, 배양특성 및 식물재배 효과에서 연구가 수행되었으나, 인산염 가용화 관련 유전자 연구의 유전학적인 접근은 아직 미흡하다[18]. 인산가용화의 기작은 가용화균이 생산하는 글루코닉산과 같은 유기산의 생성에 의한 것이라는 보고가 *Burkholderia* sp., *Aeromonas* sp. 등에서 알려져 있다[15, 16].

이미 보고되어진 인산가용화균으로는 *Bacillus megaterium*, *B. polymyxa*, *Pseudomonas striata*, *Pseudomonas* sp. (P118/89) 등의 세균이 알려져 있으며[1, 2, 5, 19], *Penicillium simplicissimum*, *P. aurantiogriseum*, *P. bilaji*, *Aspergillus awamori*, *A. aculeatus*, *A. niger* 등이 있다[6, 14, 20]. 환경보전을 위한 노력으로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 인산질 비료 성분을 충분히 공급해줄 수 있는 토양미생물의 탐색과 생물비료의 개발은 시급히 해결해야 할 과제다. 그러나 알려진 인산가용화 세균을 이용한 미생물비료의 개발 시에는 장기간 안정적인 생존 상태를 유지시키기가 어려운 것들이 알려져 있다[1, 2, 5, 15, 16, 19].

따라서 본 연구의 목적은 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 경제적이고, 고효율적인 생물비료의 개발을 위한 것이다. 미생물제제 개발 시에 제제의 균주 생존 안정성이 비교적 우수 미생물인 *Bacillus* 속을 분리하여 동정하였기에, 선발된 미생물의 배양학적 특성에 따른 난용성 인산가용화를 조사하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7585, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : ylchoi@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

인산가용화균의 분리 및 동정

김해시 대동면 인근의 인산집적이 심한 시설 비닐하우스에서 채취한 토양 10 g를 100 ml의 멸균수에 넣고 200 rpm으로 30분 동안 혼합한 후, 희석 평판법으로 6단계까지 희석한 시료를 LB 배지에 도말 하였다. 생성된 콜로니를 0.5% tri-calcium phosphate가 함유된 sucrose minimal (SM) 고체배지(sucrose 10 g, HH_4NO_3 0.27 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, Yeast extract 0.1 g, 난용성 인산염 5 g, agar 1.2%, $\text{H}_2\text{O}/1$)에 접종하여 27°C, 3일간 배양하여 투명대(clear zone)를 형성하는 균주를 선발하였다[11]. 선발된 균주는 단일 콜로니가 생성되도록 수차례 계대 배양을 실시하였다. 난용성 인산염 가용화능이 확인된 인산가용화균을 동정하기 위하여 동정을 위하여 멸균된 1.5 ml 원심분리 튜브에 0.5 ml 멸균 생리식염수와 균주를 혼합하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상등액을 제거 한 후 16S rDNA를 증폭하기 위해서 두 개의 올리고 뉴클레오타이드 프라이머 5'-GAGTTTGCCTGGCTCAG-3' (position 9 to 27 *E. coli* 16S rDNA), 5'-A GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (position 1,542 to 1,525 *E. coli* 16S rDNA)를 이용하였으며, *tpoB* 유전자의 증폭을 위해서 두 개의 프라이머 5'-AACCAGTTCCTCGTTGGCCTGG-3', 5'-CCTGAACAACACGCTCGGA-3'를 사용하였다[10]. 증폭된 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 후 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm>)에서 BLAST로 검색하여 기존에 보고된 미생물의 16S rRNA와 상동성을 비교하였다.

인산가용화능 측정

난용성인산염이 0.5% 첨가된 SM 배지 100 ml에 전배양한 균주 1%를 식균한 후에, 37°C, 160 rpm으로 필요한 시간 동안 진탕 배양한 배양액을 원심분리로 얻어낸 상등액 내의 유리인산 농도와 pH 변화를 일정시간에 측정하였다. 즉, 균체 배양액 1 ml을 소형 튜브에 담은 후 소형원심분리기로 13,000 rpm, 5분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 10 μl 을 취하고 여기에 멸균수 90 μl 을 첨가하여 총 100 μl 이 되게 하고, 여기에 phosphorus reagent 900 μl 을 첨가하여 혼합한 후 15분간 실온에서 방치한 다음, 340 nm에서 흡광도를 측정하였다[15]. 이때 실험에 사용한 용액은 Sigma사에서 제조한 phosphate reagent kit를 사용하였다.

배양 조건에 따른 인산가용화 특성 조사

분리한 인산가용화균 *Bacillus subtilis* HR-1019 균주를 배양 온도, 배양액의 pH 및 탄소원의 차이에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 조사하였다. 배양온도 차이에 따른 영향은

26°C, 30°C, 37°C에서 실시하였고, 배지의 초기 배양 pH에 따른 영향은 pH 5.0, 6.0, 7.0에서 실시하였다. 배지 조성의 차이에 따른 영향은 37°C, 초기배양 pH 6.0에서 glucose를 1%, 3%, 5% 농도별로 첨가하여 실시하였다. 균주에 의한 pH 변화와 유리 인산 생성능은 매 12시간마다 측정하였으며, 이상의 배양 환경에 관한 모든 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험 오차를 최소화하였다.

난용성 인산염 종류에 따른 인산가용화 특성 조사

분리한 인산가용화균 *Bacillus subtilis* HR-1019 균주의 난용성 인산염 종류에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 조사하였다. 즉, 3종류의 난용성 인산염, tri-calcium phosphate, hydroxy apatite 및 aluminum phosphate가 0.5% 함유된 SM 배지, pH 6.0에서 12시간마다 분리 균주의 인산가용화능 및 pH변화를 측정하였다.

분리 균의 항균 스펙트럼

분리 균주를 이용해 농작물 재배에 피해를 크게 주는 병원균, 잣빛 곰팡이 병원균인 *Botrytis cinerea*, 줄기썩음병원균인 *Rhizoctonia solani* 및 균핵병원균인 *Sclerotinia sclerotiorum* 등에 대하여 PDA plate 대치배양법으로 항균력을 조사하였다. 배지에 병원균과 HR-1019 균주를 동시에 접종하여 30°C에서 3-6일간 배양한 후에 저해 정도를 측정하여 항균 스펙트럼을 조사하였다[8, 9]

결과 및 고찰

인산가용화균의 분리 및 동정

김해시 대동면 인근의 시설 비닐하우스에서 채취한 인산집적이 심한 토양을 희석 평판법으로 분석한 세균 수는 건조 토양 1 g당 $1 \sim 3 \times 10^8$ cfu 였다. 콜로니의 모양, 색깔 등으로 보아 바실러스 속으로 보이는 것을 tri-calcium phosphate가 함유된 SM 고체배지 상에 접종하여 배양하였다. 3일 후에 투명대를 관찰하여 비교적 투명대 영역이 분명하게 나타난 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 인산염 첨가 배지에서 유리 인산 생성량이 비교적 높은 수준의 세균을 선발하였으며, 그 중에서 인산가용화 능이 우수한 HR-1019 균주를 계속하여 실험하였다.

우선 분리 균주를 동정하기 위하여 그람 염색, 현미경 관찰 등의 생리 생화학적인 특성으로 포자형성능과 형태적 특성으로 *Bacillus* 속으로 추정하였다(data not shown). 보다 정확한 유전학적 분류를 보고자 16S rRNA sequencing 분석방법을 통하여 동정을 실시한 결과 본 미생물은 *Bacillus subtilis*와 98%의 일치성을 나타내어 최종적으로 *Bacillus subtilis* HR-1019로 동정되었다.

온도 변화에 따른 인산가용화능력

분리균주 *Bacillus sp* HR-1019 균주의 미생물 처리제 개발을 위하여 자연 환경 조건에서 생육과 높은 인산 가용화능력을 가지는 조건은 매우 중요하다. 사용균주는 인산염을 넣고 배양한 배양액이 pH가 많이 감소한 것은 물론 유리인산의 분해능도 우수하였다. 이러한 결과는 기존의 인산가용화능이 우수한 균주에 비하여 다소 떨어지는 능력이나, 균주의 장기보존 안정성이 매우 우수할 것이라는 *Bacillus* 속이라는 점을 고려하면 매우 긍정적인 결과였다. 따라서 이 균주의 온도 변화에 따른 가용화 능을 시험한 결과는 Fig. 1에 나타났다. 배양 시간이 경과함에 따라 pH 감소의 경향과 차이가 뚜렷하게 나타났다. 가장 pH가 많이 감소한 것은 37°C이었다. 37°C에서는 초기에 pH가 4.7 정도까지 떨어지고 120시간 측정이 끝날 때까지 그 값을 유지했다. 42°C도 초반에 5.2 정도까지 감소하여 그 값이 유지된다. 30°C에서도 pH 값이 5.0 정도로 42°C와 37°C의 중간 값이고, 또 그 값을 계속해서 유지해 가다 84시간을 기준으로 하여 pH 값이 다소 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 pH 값의 감소로 보았을 때 37°C에서 가장 활성이 좋음을 알 수 있다. 온도에 따른 유리 인산의 생성량은 크게 차이가

있음을 알 수 있다. 37°C에서 가장 많은 유리인산을 생산하였고 반면 42°C에서는 유리인산의 생성량이 가장 적었다. 37°C의 경우는 48시간 정도 배양까지 유리인산의 양이 계속해서 증가하고 그 높은 유리인산 양을 120시간까지 유지하는 경향이였다. 30°C에서도 다소 떨어지기는 하나 높은 인산가용화능을 보였다. 이러한 결과는 pH 값의 감소에 따른 유리인산의 생성능으로 보았을 때는 37°C에서 가장 활성이 좋음을 알 수 있으나, 30°C에서도 활성이 다소 높은 편이어서 균주의 생육 안정성이 높은 점을 고려하면 미생물처리제로의 개발에 매우 유용할 것으로 사료되었다.

탄소원 종류에 따른 인산가용화 능력

탄소원의 종류에 따른 균주의 배양과 가용화 능에 대한 영향을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타났다. Starch는 다른 C-source에 비해서 pH의 감소가 낮을 뿐 아니라 다른 조건과 다르게 pH가 일정하지 않았고 또 시간이 지나면 지날수록 pH가 다시 감소하는 것을 볼 수 있다. 반면 sucrose와 glucose는 초반에 4.8 정도까지 pH가 감소하고, 그 값을 거의 유지했으며 시간이 지남에 따라 아주 조금씩 pH가 감소하는 것을 볼 수 있다.

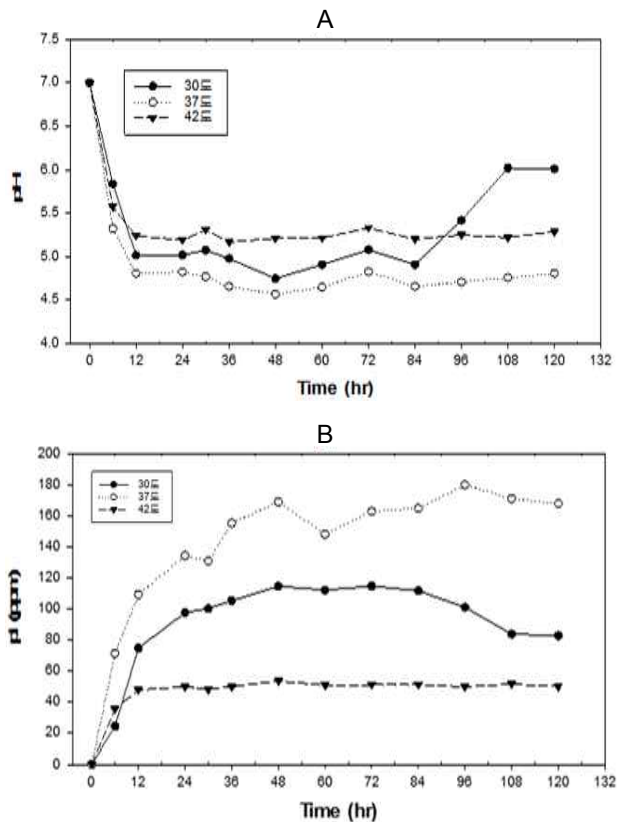


Fig. 1. Effect of temperature on the changes of free phosphate concentration and pH values during the cultivation of *Bacillus subtilis* HR-1019. (A) pH value, (B) phosphorus concentration. Bacteria were cultured in minimal medium containing 0.5% tricalcium phosphate.

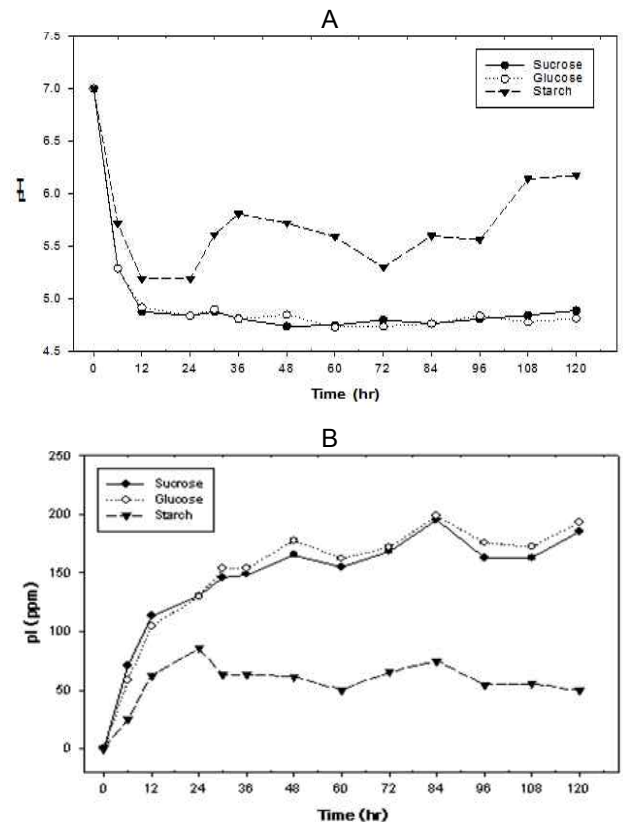


Fig. 2. Effect of carbon source on the changes of free phosphate concentration and pH values during the cultivation of *Bacillus subtilis* HR-1019. (A) pH value, (B) phosphorus concentration. Bacteria were cultured in minimal medium containing 0.5% tricalcium phosphate.

Sucrose와 glucose는 전체적으로 비슷한 값을 가진다. 유리인산의 생성능은 sucrose나 glucose를 탄소원으로 배양한 경우는 인산가용화 값이 배양시간이 경과함에 따라서 조금씩 유리인산의 양이 증가했으며, 그 전체적인 경향이 비슷하게 나타났다. 반면 starch는 24시간까지는 유리인산의 양이 증가하다가 80 ppm 정도에서 더 이상 증가하지 않고 시간이 지남에 따라 점점 떨어졌다. 유리인산의 생성량과 pH 저하 값으로 보았을 때 glucose와 sucrose는 거의 비슷한 활성을 나타내는 결과를 보였으나 사용이 용이한 glucose를 지속적인 가용화 특성 실험에 사용 하였다.

탄소원의 농도변화에 따른 인산가용화 능력

탄소원으로 glucose 1%, 3%, 5%의 농도 조건에서의 인산염 가용화능을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 초기에는 1%와 3%의 pH값이 5%의 pH값 보다 더 낮게 나타나는 경향이하나, 배양 시간이 어느 정도 경과하면 5%에서는 pH가 계속해서 조금씩 감소하고 1%와 3%의 pH값은 일정한 값을 유지하여 30시간이 지나면서부터는 5%의 pH값이 1%와 3% 처리구의

pH값에 비하여 더욱 감소하였다. 하지만 농도에 따라 pH의 감소량이 다르기는 하지만 같은 C-source를 사용했기 때문 인지 전체적인 pH 감소형태는 비슷한 것 같다. 배양 초기에는 유리인산의 값은 아주 비슷하게 나왔다. 12시간 까지는 세 가지 조건 모두에서 비슷한 유리인산량을 나타내는 것을 알 수 있다. 하지만 그 뒤로부터 각 조건에 따른 반응이 나타나는데, 농도가 가장 높은 5%에서 가장 활성이 좋게 나타난다. 그 뒤로 3%와 1% 순으로 나타나는 것이 glucose 양의 농도가 높을수록 인산가용화능이 높게 나타났다. 배양 60시간에서 최대의 유리인산양을 나타냈으며 5% 농도에서는 약 두 배 정도의 높은 값을 계속 유지하였다. 이러한 결과로 보아 사용 균주의 탄소원 농도별 인산가용화능은 농도가 5% 정도 까지 높을수록 높게 나타나는 경향 있으나, 배양의 경제적인 조건 등을 고려한 대량 배양 조건의 탐색이 필요할 것으로 보였다.

초기 pH의 차이에 따른 인산가용화능력

배양 초기 pH 별 인산가용화능은 6단계의 조건으로 나누어서 실험하였다(Fig. 4). pH 5.0부터 pH 10.0까지 pH값 1씩 올라가면서 인산가용화능에 따른 pH값 변화를 알아보았다. 하지만 초기 pH값이 현저히 다른 것에 비해 12시간쯤이 되자 거의 모든 조건에서의 pH값이 5.0대로 떨어졌고 거의 비슷한 양상으로 나타났다. 시간이 지남에 따라 조금씩 다른 차이가 나기 시작했으나, 일관적으로 보았을 때 거의 비슷한 수준의 pH값을 가진다. 하지만 자세히 비교하여 보면, 전체적으로 pH값은 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 초기 pH에 따른 인산가용화 결과는 실험결과 시간이 지남에 따라 유리인산의 양이 증가하는 거의 비슷한 양상을 나타내기는 했지만, 조금씩 초기 pH값에 따라 값이 다르게 나타났다. 가장 높은 유리 인산 량을 나타낸 처리구는 초기 pH 값이 가장 낮은 pH 5.0이였고, 가장 낮은 유리 인산 양을 나타낸 것은 초기 pH값이 가장 높은 pH 10.0에서 였다. 이러한 결과는 산성과 알칼리의 배지 조건에서도 배양하면서 pH를 저하시키고, 인산염을 가용화 시키는 능력이 우수함으로 보아 다양한 필드 조건에서의 인산염 가용화 효과가 기대되는 균주로 평가되어 진다.

인산염의 종류에 따른 인산가용화능력

Bacillus subtilis HR-1019의 난용성인산염의 종류에 따른 인산가용화능을 알아보려고 사용한 난용성인산염으로는 TCP (tri-calcium phosphate), hydroxy apatite, aluminum phosphate의 3종류를 사용하였다.

각 난용성인산염에 따른 pH 저하 값은 TCP (tri-calcium phosphate), hydroxy apatite는 비슷한 양상으로 pH가 감소한 것으로 보인다. 최대 4.3 정도까지 pH가 떨어지면서 높은 활성

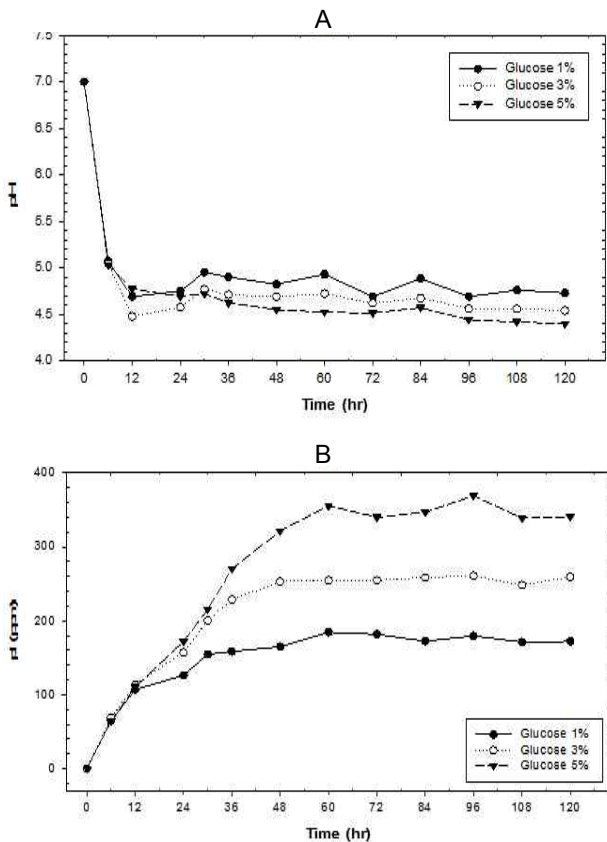


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the changes of free phosphate concentration and pH values during the cultivation of *Bacillus subtilis* HR-1019. (A) pH value, (B) phosphorus concentration. Bacteria were cultured in minimal medium containing 0.5% tricalcium phosphate.

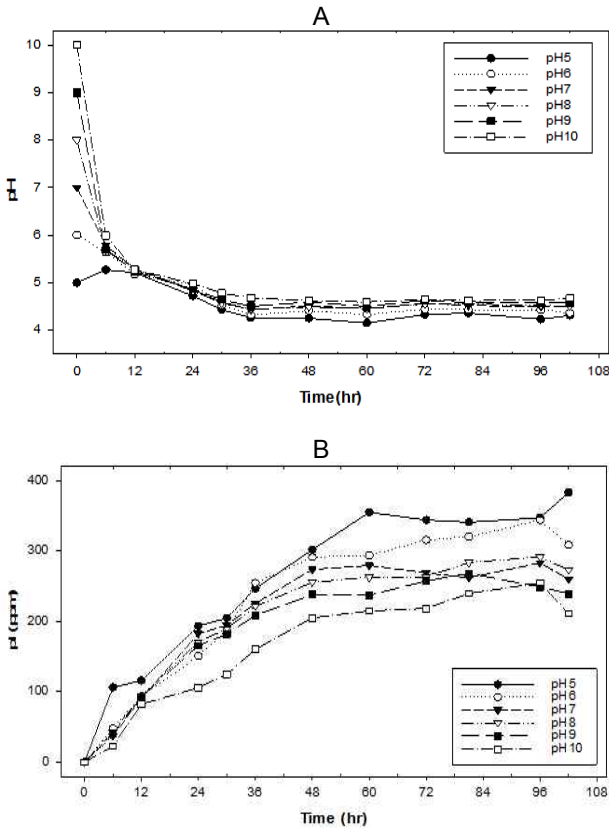


Fig. 4. Effect of initial pH on the changes of free phosphate concentration and pH values during the cultivation of *Bacillus subtilis* HR-1019. (A) pH value, (B) phosphorus concentration. Bacteria were cultured in minimal medium containing 0.5% tricalcium phosphate.

을 나타냄을 알 수 있다. 반면 aluminum phosphate는 다소 낮은 것으로서 어느 정도 이상 떨어지지 않음을 알 수 있다. 난용성인산염의 종류에 따른 pI값을 살펴보면 TCP, hydroxy apatite는 거의 비슷한 양상을 보이며 400 ppm 정도까지 증가하였다. 반면 aluminum phosphate 처리구에서는 생성되는 유리인산의 함량이 매우 저조하였다. 이 결과는 분리균주의 인산염 용해 특성이 hydroxyapatite와 TCP를 잘 분해하고, aluminum phosphate에서는 활성을 거의 나타내지 않는 것 같았다.

Bacillus subtilis HR-1019의 병원균에 대한 항균 효과

본 연구에서 확보한 *Bacillus subtilis* HR-1019 균주를 이용하여 식물생장 조절을 위한 다기능성을 보유한 생장조절제의 개발을 위하여 인산 가용화 능력 이외에도 식물의 병원성 균에 대한 항균 효과의 능력을 검토하였다. 농작물 재배에 피해를 크게 주는 병원균, 잣빛 곰팡이 병원균인 *Botrytis cinerea*, 줄기썩음 병원균인 *Rhizoctonia solani* 및 균핵 병원균인 *Sclerotinia sclerotiorum* 등에 대하여 PDA plate 대치배양법으

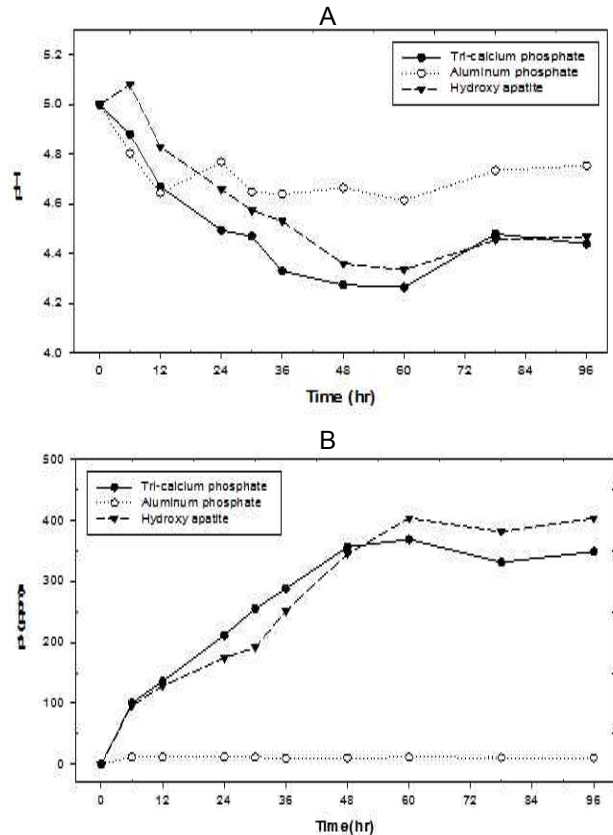


Fig. 5. Effect of the kind of insoluble phosphate on the changes of free phosphate concentration and pH values during the cultivation of *Bacillus subtilis* HR-1019. (A) pH value, (B) phosphorus concentration. Bacteria were cultured in minimal medium containing 0.5% tricalcium phosphate.

로 항균력을 조사하였다. 그 결과로 잣빛 곰팡이 병원균인 *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* 및 *Sclerotinia sclerotiorum*의 3종의 균주에 대하여 실험한 결과 Fig. 6에서와 같이 병원균의 생육을 저지하는 분명한 생육저지의 clear zone을 보였고, 이는 *Bacillus subtilis* HR-1019 균주가 인산 가용화 능력 이외에도 식물의 일부 병원성 균에 대한 항균 효과를 가진 것으로 판명되어서 HR 1019를 이용하여 미생물제제를 개발하면 인산가용화를 통한 식물생장촉진과 식물병의 저해 효과에도 크게 도움이 될 것으로 보여 효과적인 제품개발이 가능할 것으로 생각되어진다. 이러한 항균성은 *Bacillus sp*가 large patch 병원균인 *Rhizoctonia solani*에 항균효과를 보여서 골프장의 *Rhizoctonia solani* 방제용 처리제로서의 효과도 기대된다는 연구결과와 비슷한 효과가 기대되는 바이다[7].

감사의 글

본 연구는 동아대학교의 연구비 일부로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

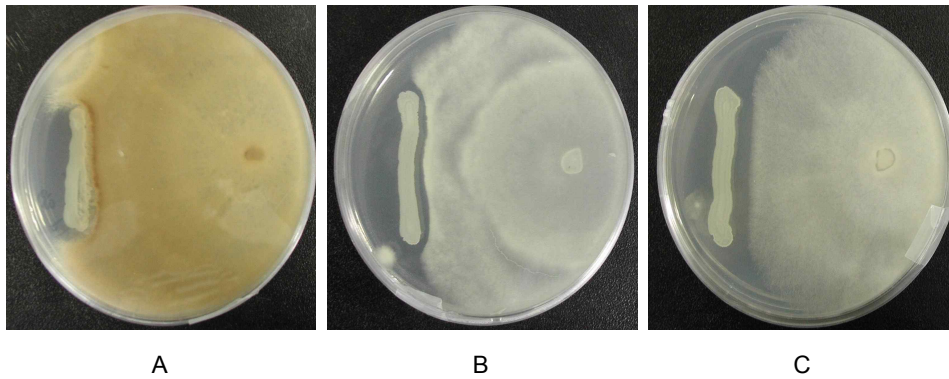


Fig. 6. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by *Bacillus subtilis* HR-1019. (A) *Botrytis cinerea*, (B) *Rhizoctonia solani*, (C) *Sclerotinia sclerotiorum*

References

1. Agasimani, C., Mudlagiriappa, A. and Sreenivasa, M. N. 1994. Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms. *Groundnut News* **6**, 5-8.
2. Dubey, S. K. and Billore, S. D. 1992. Phosphate solubilizing microorganism (PSM) as inoculant their role in augmenting crop productivity India-A review. *Crop Res Hisar* **5**, 11-17.
3. Goldstein, A. H. 1986. Bacterial mineral phosphate solubilization: Historical perspective and future prospects. *Am J Altern* **1**, 57-65.
4. Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem* **27**, 265-270.
5. Illmer, P. and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology Biochem* **24**, 389-395.
6. Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate-solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* **27**, 257-263.
7. Joo, W. H., Han, S. J., Choi, Y. L. and Jeong, Y. K. 2004. Antifungal compound produced by *Bacillus* sp. TBM912. *J Life Sci* **14**, 193-197.
8. Kang, S. C. and Choi, M. C. 1999. Solid culture of phosphate - solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS - 113. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* **27**, 1-7.
9. Kim, K. K., Kim, K. H., Moon, S. S. and Kang, K. Y. 1997. Isolation and structure identification of antifungal substance from *Aspergillus terreus*. *Agric Chem Biotechnol* **40**, 593-596.
10. 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.
11. Paul, E. A. and Clark, F. E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry: Academic Press, New York, U.S.A.
12. Raj, J., Bagyaraj, D. J. and Manjunath, A. 1981. Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular *mycorrhiza* and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and ^{32}P uptake. *Soil Biol Biochem* **13**, 105-108.
13. Sayer, J. A., Raggett, S. L. and Gadd, G. M. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: Development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Res* **99**, 987-991.
14. Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S. and Her, M. S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Biores Biotechnol* **97**, 204-210.
15. Song, O. R., Lee, S. J., Kim, S. H., Chung, S. Y., Cha, I. H. and Choi, Y. L. 2001. Isolation and cultural characteristics phosphate solubilization bacterium, *Aeromonas hydrophyla* DA57. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* **44**, 257-261.
16. Song, O. R., Lee, S. J., Lee, Y. S., Lee, S. C., Kim, K. K. and Choi, Y. L. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian J Microbiol* **39**, 1-6.
17. Suh, J. S., Lee, S. K., Kim, K. S. and Seong, K. Y. 1995. Solubilization of insoluble phosphates by *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger* isolated from Korean soils. *J Korean Soc Soil Sci Fert* **28**, 278-286.
18. Tiwari, V. N., Pathak, A. N. and Lehri, L. K. 1993. Rock phosphate-superphosphate in wheat in relation to inoculation with phosphate solubilizing organism and organic waste. *Ind J Agr Res* **27**, 137-145.
19. Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. 1995. Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Ind J Exp Biol* **33**, 91-93.

초록 : 인산가용화 활성을 갖는 바실러스 서브틸리스 HR-1019 분리와 특성

이용석¹ · 박동주¹ · 김재훈² · 김형석² · 최용락^{1*}

(¹동아대학교 생명공학과, ²(주) 해림과메틱)

본 연구의 목적은 우수한 미생물 제제 개발용 인산염 가용화 균주의 개발이다. 경작지 토양에서 분리한 인산염 가용화 균주의 특성 및 16S rDNA 염기서열을 조사한 결과 *Bacillus subtilis* HR-1019로 동정되었다. *Bacillus subtilis* HR-1019는 hydroxyapatite, tri-calcium phosphate 및 aluminum phosphate 3가지의 난용성 인산염을 모두 가용화하였다. 난용성 인산염의 분해능이 최대가 되는 배양온도는 37°C 이었으며, 배양초기 pH가 5.0이었다. 탄소 원으로 glucose를 5% 첨가시 가용화능이 높았으며, 가용화된 유리인산의 함량이 증가함에 따라 pH가 크게 감소하였다. 분리균주 HR-1019가 식물병원균에 대하여 균의 생육을 저지하는 clear zone 확인으로 항균효과를 확인하였다.