Hydroxyapatite 인산염 가용화 균 *Klebsiella* sp. DA 71-1의 분리와 가용화특성

이진우 · 정연주 · 이경아 · 최시림 · 김영길[1] · 최용락*

동아대학교 응용생명공학부, [1]동아대학교 식품과학부

Received November 27, 2003 / Accepted January 13, 2004

Isolation and Characteristic of the Phosphate Solubilizing Bacteria *Klebsiella* sp. DA 71-1. Chin-Woo Lee, Youn-Ju Jung, Kyung-Ah Lee, Si-Lim Choi, Young-Gil Kim[1] and Yong-Lark Choi*. *Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea,* [1]*Faculty of Food Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea* – To develop high effiency biofertilizer, a bacterium having ability to solubilize inorganic phosphate was isolated from cultivated soils, using a sucrose minimal agar-hydroxyapatite medium. The strain was identified as *Klebsiella* sp. DA71-1, based on the physiological and biochemical properties. The activity of solubilizing inorganic phosphate of *Klebsiella* sp. DA71-1 against three types of insoluble phosphate such as tri-calcium phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite were quantitatively determined. The results indicated that the strain solubilized hydroxyapatite. The MPS (mineral phosphate solubilizing) conditions of *Klebsiella* sp. DA71-1, were measured to determine the optimal conditions. The optimal temperature and initial pH to solubilize insoluble phosphate in sucrose minimal medium were 30℃ and pH 6.0, respectively.

Key words – MPS, hydroxyapatite, insoluble phosphate, *Klebsiella* sp.

지금까지 우리 농업은 단위 면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위해 다량의 화학비료와 유기물을 사용해 왔다. 그러나 이들 중의 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실 현상이 일어나게 된다. 인은 식물체에서 핵산, 인지질, phytates 등의 중요 구성성분이며, 식물 및 박테리아 성장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 하는 원소이다[3]. 그러나 인산은 산성토양에서는 철 및 알루미늄 이온과 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화 됨으로서 토양 중에는 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양만 증가되는 결과를 가져다준다[1,13]. 실제로 인산은 토양 중 0.05%(w/w)를 차지하고 있는 반면, 식물이나 미생물이 이용할 수 있는 인산양은 그 중에서도 0.1%이다[15]. 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 존재한다[14]. 이미 보고 되어진 인산 가용화 균으로는 *Bacillus megaterium, B. polymyxol, Pseudomonas striata, Pseudomonas* sp. 등의 세균이 알려져 있으며[2,4,8,18], *Penicillium simplicisimaum, P. aurantiogriseum, P. bilaji, Aspergillus awamori, A. aculeatus, A. niger*[9,11,17,19] 등이 있다. 특히 인산은 토양에서 철 및 알루미늄 이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘 이온과 쉽게 결합하여 불용화 됨으로써 토양의 지력저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져온 주원인이 되고 있다[13]. 앞으로 우리가 지양해야할 농업은 환경친화적이고 부가가치가 높은 무공해 농산물을 생산하는 영농시스템이다[5]. 앞으로 환경 보전을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산 질 비료성분을 충분히 공급해줄 수 있는 biofertilizer의 개발은 시급히 해결해야할 과제가 될 것이다. 따라서 인산 비료의 시용을 대체할 수 있고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 가장 바람직한 방법은 인산 가용화 미생물을 이용하여 토양 속에 다량으로 축적되어 있는 불용성 인산 태를 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다[6,10,12,16]. 본 연구자는 보다 우수한 인산 가용화능을 가진 균주를 분리하여, 환경 친화형 Biofertilizer로 개발하기 위한 기초 연구로서 본 연구실에서 수년간에 걸쳐 인산 가용화능이 우수한 균주인 *Pseudomonas cepacia, Aeromonas hydrophila* 등을 분리하여 가용화특성을 조사하였다[16]. 본 연구에서는 분리한 균주 중에서 *Klebsiella* sp. DA71-1을 선발하여 토양중의 다양한 인산염 중 hydroxyapatite 가용화를 목적으로 하는 미생물로 개발하고자 배양조건에 따른 인산염 가용화특성을 조사하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-51-200-7585, Fax : +82-51-200-6536
E-mail : ylchoi@daunet.donga.ac.kr

재료 및 방법

인산 가용화 균주의 선별

경남 김해지역의 염류집적 및 인산과다처리 재배지로부터 채취한 토양시료를 혼합하여, 10 g을 취하고 100 ml의 멸균수에 넣고 200 rpm, 30분 동안 혼합한 후 6단계 희석 평판법으로 LB 배지에 도말하여 세균의 콜로니를 생성시켰다. 생성된 콜로니를 0.5% hydroxyapatite가 함유된 sucrose minimal (SM) 고체배지(sucrose 10 g, NH_4NO_3 0.27 g, KCl 0.2 g,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 1 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mg, Yeast extract 0.1 g, 난용성 인산염 5 g, H_2O/1L)[4]에 접종하여 27℃, 3일간 배양하여 투명대를 형성하는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 단일 콜로니가 생성되도록 수차례 계대배양을 실시하면서 인산염 가용화 투명대를 확인하였다.

분리균주의 동정

난용성 인산염 가용화능이 확인된 인산 가용화 균을 동정하기 위하여 생화학적, 생리적 특성을 Bergey's manual에 따라 조사하여 동정하였으며, 아울러 정확성을 높이기 위해 그램 염색을 실시한 결과를 이용하여 API system 32GN strip과 API 20E strip을 이용하여 동정하였다.

인산 가용화능의 측정

500 ml 삼각 플라스크에 0.5% Hydroxyapatite가 함유된 SM 액체배지 100 ml에 전배양한 균주를 접종한 후, 배양 시간동안 180 rpm으로 진탕배양하면서 배양 상등액내의 유리 인산 농도와 pH 변화를 12시간 마다 측정하였다. 균체배양액 1 ml을 소형 원심용 튜브에 담은 후 소형원심분리기로 5,500 rpm, 5분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 취하고, 여기에 멸균수를 첨가하여 총 200 μl가 되게 하였다. 여기에 phosphorus reagent 800 μl를 첨가하여 혼합한 후 20분간 50℃에서 반응시킨 다음, 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험에 사용한 용액은 Sigma사에서 제조한 phosphrous reagent kit를 사용하였다.

난용성 인산염 종류별에 따른 인산가용화 특성 조사

인산 가용화균 DA71-1의 난용성 인산염 종류별에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 조사하였다. 세 종류의 난용성 인산염 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, aluminium phosphate가 0.5% 함유된 SM배지(pH 6.0)에서 배양하면서 12시간마다 경시적으로 분리균주의 인산 가용화능을 측정하였다.

배양학적 조건에 따른 인산가용화 특성 조사

인산 가용화 균주, DA71-1 의 배양학적 특성에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 조사하였다. 배양온도 차이에 따른 영향은 26℃, 30℃, 37℃에서 실시하였고, 초기 배양 pH별에 따른 영향은 배양에 사용할 배지의 초기 pH를 5.0, 6.0, 7.0에서 실시하였다. 균주에 의한 pH 변화와 유리인산 생성능은 12시간마다 변화를 측정하였으며, 이상의 배양 환경에 관한 모든 실험은 2회 반복 수행하여 평균값을 구함으로서 실험 오차를 최소화하였다.

결 과

인산 가용화 균의 선별

경남 김해시의 하우스 지역 내 근권 토양을 샘플링 하여 혼합시킨 토양시료 10 g에서 희석 평판 법으로 세균을 분리한 결과, 건조 토양 1 g당 세균 수는 대략 $2\sim5\times10^8$ cfu ml^{-1} 였다. 콜로니의 모양, 색깔 등으로 보아 다른 균주로 생각되는 것을 난용성 인산염이 함유된 SM 고체배지상에 접종하여, 배양하였다. 3일후에 투명대를 관찰한 결과, tri-calcium phosphate가 함유된 배지에서는 10% 이상의 균주가 분명한 투명대를 보였으나, hydroxyapatite가 함유된 배지에서는 투명대를 보이는 균주가 극소수였다. 그 중에서 비교적 투명대 영역이 분명하게 나타난 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주는 hydroxyapatite 첨가 배지에서 유리 인산 생성량이 비교적 높은 수준의 세균을 선발하였으며, 그 중에서 인산가용화능이 가장 우수하며 신규의 인산 가용화균으로 생각되는 DA71-1 균주를 확인하여 실험하였다.

분리균주의 동정

분리균주의 생리 생화학적인 특성을 Bergey's manual에 따라 조사한 결과, *Klebsiella* sp. *Pseudomonas* sp. 및 *Burkholderia* sp.의 가능성이 높았다[16]. 또한, 전자현미경(SEM) 관찰하에서 분리된 균주는 전형적인 간균의 모양을 하고 있었으며, 크기는 0.4~0.5×1.7~2 μm 정도였다(Fig. 1). 동정의 정확성을 기하기 위해 균주를 API system으로 동정한 결과 그 중 DA71-1은 *Klebsiella* sp.와의 유사성은 99%로 Bergey's manual에 의한 동정의 결과와 일치하였다(Table 1). 그리하

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of the isolated *Klebsiella* sp. DA71-1

Characteristics	*Klebsiella* sp. DA 71-1
Gram strain	-
Shape	short rods
D-glucose	+
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-sucrose	+
Maltose	+
D-sorbitol	-
2-ketogluconate	-
Histidine	+
Alanine	-
N-acetyl glucosamine	+
DL-lactate	-
3-hydroxy-benzonate	-
Rhamonse	-
3-hydroxybutyrate	+
L-alanine	+
Sucrose	-
Inositol	+
5-ketogluconate	-
L-proline	+
Suberate	-
Glycogen	+
Malonate	-

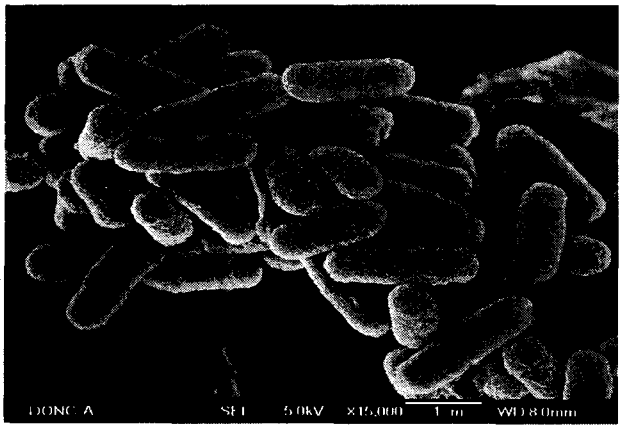

Fig. 1. Scanning electron photographs of the isolated strain *Klebsiella* sp. DA71-1 (×15,000).

여 지금까지 hy- droxyapatite 인산염을 가용화시키는 세균으로 알려지지 않은 *Klebsiella* sp. DA71-1 의 분리균주를 선별하였기에 가용화 특성 실험을 계속하여 수행하였다.

난용성 인산염 종류별에 따른 인산가용화 특성

Klebsiella sp. DA71-1 균주가 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, aluminium phosphate의 난용성 인산염 기질에 대한 인산 가용화능을 비교 조사 하였다(Fig. 2). tri-calcium phosphate를 기질로 사용했을 때, pH 4.6 정도로 저하되었고 최대 148 ppm의 유리인산을 방출하였고, hydroxyapatite를 기질로 사용했을 때, pH는 4.4까지의 저하와 최대 214 ppm의 유리인산을 방출하였다. Aluminium phosphate의 경우는 pH가 4.18로 급격한 저하를 보였으나, 인산 가용화능은 20 ppm 정도로 약했다. 이런 결과는 본 연구실에서 난용성 인산염 우수균주로 분리한 *Pseudomonas cepacia*가 배양시간 72시간에 hydroxyapatite를 가용화한 인산 값보다 우수한 것으로 나타났다(자료 미제시). 따라서 *Klebsiella* sp. DA71-1은 tri-calcium phospahte를 가용화 시킬 뿐만 아니라, 다른 여러 균주에 비해 hydroxyapatite를 가장 잘 가용화시키는 신규의 가용화 균임을 확인하였다. 특히 DA71-1은 다른 인산염들에 비해 높은 hydroxyapatite 가용화능을 보였는데, Kang 등[7]이 분리한 *Penicillium* 균주처럼 hydroxyapatite를 잘 가용화 하는 능력을 보였다.

종류별 배양학적 특성에 따른 인산 가용화 특성

Klebsiella sp. DA71-1의 배양학적 특성에 따른 인산가용화 특성을 조사하기 위해 배양온도별, 배양 초기 pH별, 당 종류별, Glucose 농도별에 따라 실험하였다. Fig. 3은 배양 온도(26℃, 30℃, 37℃)에 따른 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주의 인산 가용화능에 대한 정량적 분석결과이다. 이 균주는 배양시간 72시간에 26℃에서는 170 ppm, 30℃에서는 210 ppm, 37℃에서는 180 ppm의 유리인산을 방출하였다. 26℃의 경우, 60시간까지는 55 ppm으로 인산가용화능이 낮았으나 72시간에 4.4의 pH 저하와 170 ppm의 높은 인산 가용화능이 나타났다. 이러한 경향은 이 균주를 미생물 비료로서 개발하기 위하여, 포장 온도인 저온 하에서 좀더 유효한 인산 가용화능을 가져야한다는 조건에 잘 부합되어진다. 그러나, 같은 조건과 같은 시간대의 인산 가용화능을 비교하면, *Klebsiella* sp. DA71-1의 인산 가용화 능은 30℃일 때가 보다 우수하였다. Fig. 4는 배양 초기의 배지 pH (5.0, 6.0, 7.0)에 따른 *Klebsiella* sp. DA71-1의 인산 가용화능에 대한 정량적 분석 결과이다. 이 균주는 초기배양 pH가 7.0 일 때 배양 24시간에 4.8로의 pH 저하와 배양 72시간에 최대 180ppm의 유리인산을 방출하였다. 초기배양 pH가 6.0일 때 배양 48시간까지는 유리인산 방출 량이 120 ppm정도로 인산 가용화능이 낮았으나, 배양 84시간에 4.42의 pH 저하와 최대 248 ppm의 유리인산을 방출

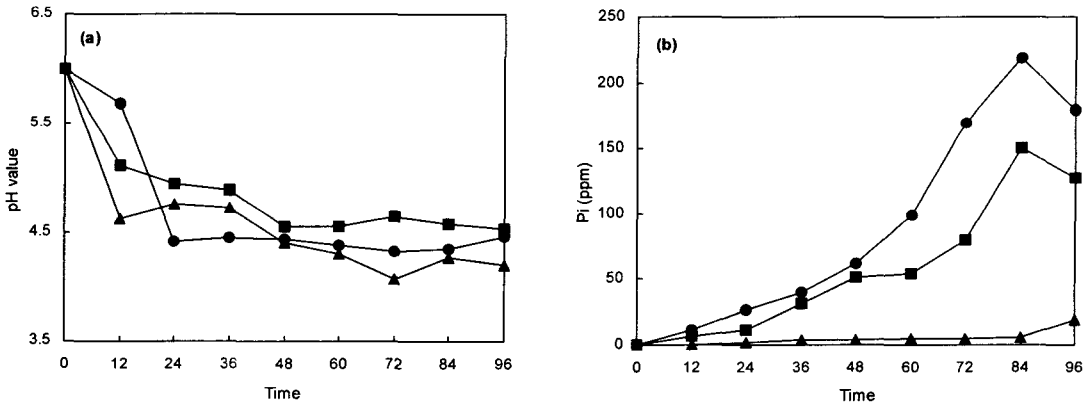

Fig. 2. Changes of free phosphate concentrationsand changes of pH values during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 at various insoluble phosphate with time courses. *Klebsiella* sp. DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% insoluble phosphate at 30℃.

■: tri-calcium phosphate, ▲: aluminium phosphate, ●: hydroxyapatite.

(a) pH value, (b) free phosphate concentration.

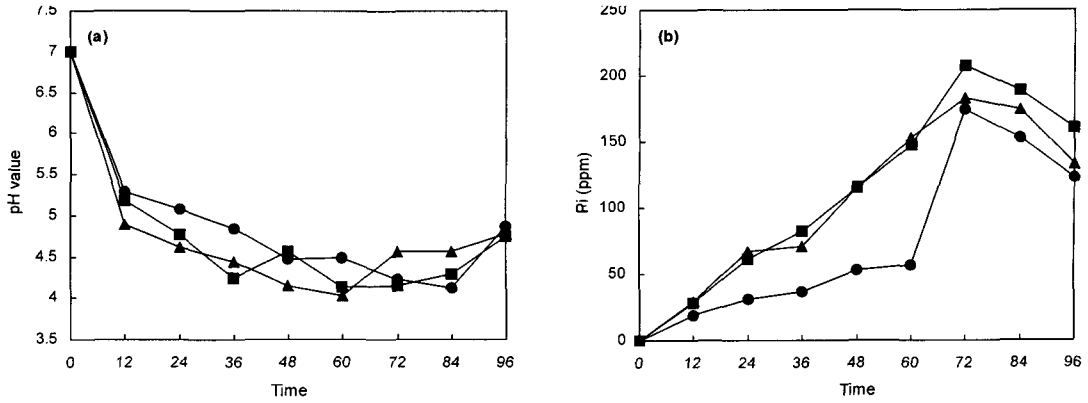

Fig. 3. Changes of free phosphate concentrations and changes of pH values during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 at various temperature with time courses. *Klebsiella* sp. DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% Hydroxyapatite.
●: 26℃, ■: 30℃, ▲: 37℃.
(a) pH value (b) free phosphate concentration.

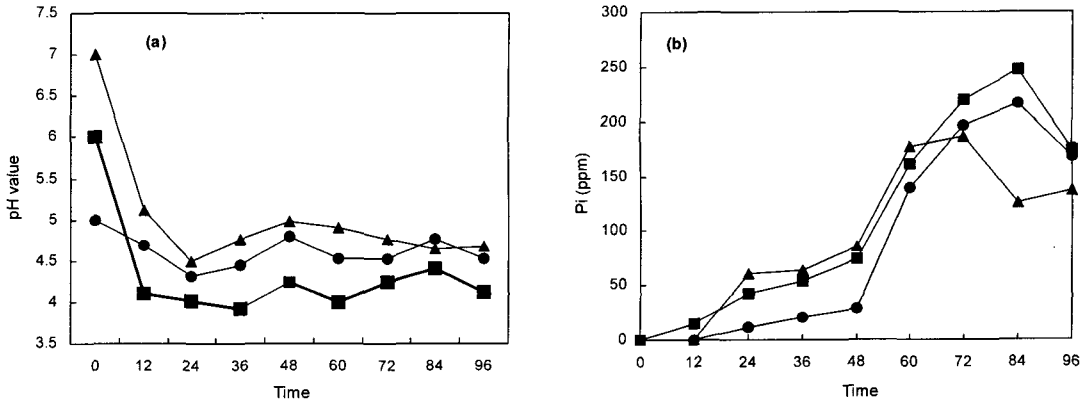

Fig. 4. Changes of free phosphate concentrations and changes of pH values during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 at various initial pHs with time courses. *Klebsiella* sp. DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% Hydroxyapatite at 30℃.
●: initial pH 5.0, ■: initial pH 6.0, ▲: initial pH 7.0.
(a) pH value, (b) free phosphate concentration.

하였다. 초기배양 pH가 5.0일 때 배양 72시간에 4.55의 pH 저하와 최대 230 ppm의 유리인산을 방출하였다. 이 결과에 따라 *Klebsiella* sp. DA71-1은 배양 시 초기 pH에 관계없이 대체적으로 성장이 비슷하며, 특히 초기 배양 pH가 6.0일 때 인산 가용화능이 우수하였다.

탄소 원 종류별에 따른 인산가용화 특성

비교적 가격이 저렴한 탄소원을 이용하여 경제적인 배양 단가로 대량배양을 위한 기초 실험으로서 탄소 원 종류에 따른 인산 가용화능을 측정하여 Fig. 5에 나타냈다. 그 결과 glucose를 기질로 사용하였을 때 84시간 경에 pH가 4.4로 저하되고 최대 230 ppm의 유리인산을 방출하였다. sucrose를 기질로 사용하였을 때는 pH 저하의 폭이 가장 낮았으며 최대 4.5의 pH와 120 ppm의 유리인산을 방출하였다. maltose를 기질로 사용하였을 때는 60시간에 4.82의 pH 저하와 170 ppm의 유리인산을 방출하였으며, fructose를 기질로 사용하였을 때는 최대 4.7의 pH 저하와 180 ppm의 유리인산을 방출하였다. 이러한 결과에 따라 *Klebsiella* sp. DA71-1은 glucose를 기질로 사용하였을 때 인산 가용화능이 가장 우수하였다. 비교적 단가가 저렴한 폐당밀을 이용하여 측정 하였는데 동일한 탄소 농도에서의 균주 생육이 저조 하였으며, 따라서 가용화능은 낮은 편이었다(자료 미 제시).

glucose의 농도에 따른 인산 가용화 특성

Klebsiella sp. DA71-1는 glucose를 기질로 사용하였을 때 가장 높은 유리인산을 방출하기 때문에(Fig. 5) glucose 최적 농도에 따른 최대의 인산 가용화능을 측정하고자 유리인산의 방출양을 비교 조사 하였다(Fig. 6). Glucose가 1%일 때는 최대 4.43으로 pH가 저하되었으며 유리인산 방출량은 170 ppm이었다. Glucose 함량이 3% 일 때는 96시간까지 안정되

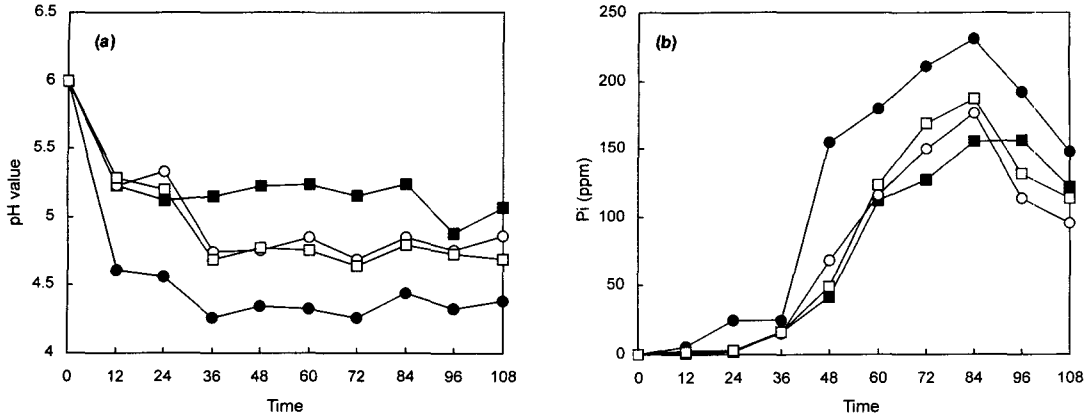

Fig. 5. Changes of free phosphate concentrations and changes of pH during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 at various carborn source with time courses. *Klebsiella* sp DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% Hydroxyapatite at 30℃.
●: glucose, ■: sucrose, ○: maltose, □: fructose.
(a) pH value, (b) free phosphate concentration.

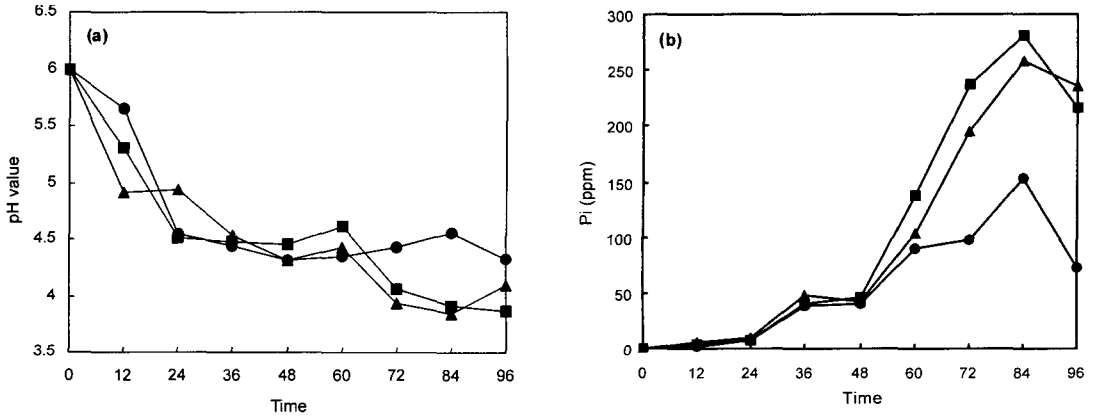

Fig. 6. Changes of free phosphate concentrations and changes of pH values during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 at various initial glucose concentrations with time courses. *Klebsiella* sp.DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% Hydroxyapatite at 30℃.
●: glucose 1%, ■: glucose 3%, ▲: glucose 5%.
(a) pH value, (b) free phosphate concentration.

게 pH가 저하 되었으며 84시간에 pH는 3.93으로 저하되고 유리 인산의 방출량은 280ppm으로 최대에 이르렀다. 이는 기질로 사용한 glucose가 시간이 지나도 glucose 1%에 비해 고갈되지 않은 것에 기인한 것인데 3%의 함량 이상 일 때는 높은 기질의 함량때문에 기질저하가 있는 듯 했다. 인산값은 3%에 비해 낮게 나왔으며, 최대 3.82의 pH 저하와 257 ppm의 유리인산을 방출하였다. 이 결과에 따라 *Klebsiella* sp. DA71-1는 glucose의 함량이 3% 일때 높은 유리인산을 방출하였다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교의 공모과제 연구비의 지원에 의하여 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

요 약

난용성 인산염을 가용화시키는 균주를 염류직접 및 인산과다처리 재배지로부터 다수 분리하였다. 다수의 균들은 대다수가 tri-calcium phosphate의 가용화능을 가진 균주들이었고 hydroxyapatite의 가용화능을 가진 균주가 소수있었다. 본 연구는 hydroxyapatite 가용화능을 가진 분리균주 *Klebsiella* sp. DA71-1의 배양특성에 따른 난용성 인산염(hydroxyapatite, tri-calcium phosphate, aluminium phosphate), pH변화 및 배양온도에 따른 인산염의 가용화특성 등을 조사하였다. 인산 가용화능은 유기산 생성과 밀접한 관련이 있다고 많이 보고 되어 졌지만 아직 pH 저하에 따른 인산 가용화의 정확한 기작은 확인이 되지않은 상태이며 배지내의 pH저하는 균주의 유기산 생성에 따른 것으로 사료되어진다. 조사한 결과

배양시간 12 이후부터 pH 저하를 나타냈으며 pH저하는 균 생육에 영향을 미치지 않는 범위내에서 이루어졌으며 pH가 저하된 상태의 배지 조건에서 균의 생육이 계속될수록 인산 가용화능이 높게 이루어졌다. 또한 DA71-1은 초기 pH에 영향을 크게 받지 않았으며 일반 토양의 온도와 비슷한 조건의 온도에서도 가용화 능력이 뛰어난 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Abd-Alla, M. H. 1994. Phosphates and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 294-296.
2. Agasimani, C., A. Mudlagiriyappa, and M. N. Sreenivasa, 1994. Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms. *Groundnut News*. **6**, 5-11.
3. Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology, Wiley, New York.
4. Dubey, S. K. and S. D. Billore, 1992. Phophate solubilizing microorganism(PSM) as inoculant their role in augmenting crop productivity India-A review. *Crop. Res. Hisar*. **5**, 11-17.
5. Goldstein, A. G. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates : historical perspectives and future prospects. *Am. J. Alt. Agric*. **1**, 51-57.
6. Gyaneshwar, P., Naresh, K. G., and Parekh, L. J. 1998. Effect of buffering on the phophate-solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. & Biotechnol*. **14**, 669-673.
7. Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner, 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil. Biol. Biochem*. **27**, 265-270.
8. Illmer, P. and F. Schinner, 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate-solubilization mechanisms. *Soil. Biol. Biochem*. **27**, 257-263.
9. Illmer, P. and F. Schinner, 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*. **24**, 389-395.
10. Kang, S. C. and M. C. Choi, 1998. Isolation and cultural characteristics of a phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. **13**, 497-501.
11. Kim, H. O., Z. K. Uo, S. C. Lee, and R. M. N. Kucey, 1984. *Mycorrhizae* distribution and rock phosphate dissolution by soil fungi in the citrus fields in Jeju-do. *Cheju National University Journal*. **17**, 45-50.
12. Mishustin, E. N. and A. N. Naumova, 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. *Microbiology*. **31**, 442-452.
13. Paul, E. A. and F. E. Clark, 1989. Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press, New York, U. S. A.
14. Raj, J., D. J. Bagyaraj, and A. Manjunath, 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.
15. Sayer, J. A., S. L. Raggett, and G. M. Gadd, 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.
16. Scheffer, F. and P. Schachtschabel, 1992. *Lehrbuch der Bodenkunde*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart Azcon, R., Barea, J. M. and Hayman, D. S. 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with *mycorrgizal* fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil.Biol.Biochem*. **8**, 135-138.
17. Song, O. R., S. J. Lee, S. H. Kim, S. Y. Chung, I. H. Cha, and Y. L. Choi. 2001. Isolation and Cultural Characteristics of a Phosphate-Solubilizing Bacterium, *Aeromonas hydrophila* DA57. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol*. **44**, 257-261.
18. Tiwari, V. N., A. N. Pathak, and L. K. Lehri, 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., T. Jugnu, and H. H. Patel, 1993. Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*. *Ind. J. Exp. Biol*. **31**, 747-749.