

Aspergillus sp. PS-104의 액침배양중 mycellial pellet 형성에 미치는 황토의 영향

강선철* · 구본성¹⁾ · 태언희

대구대학교 생물공학과, ¹⁾농업생명공학연구원 신기능소재개발과

(2001년 12월 11일 접수, 2001년 12월 31일 수리)

Effects of Loess on the Mycellial Pellet Formation of Phosphate-solubilizing Fungus, *Aspergillus* sp. PS-104 in the Submerged Culture

Sun-Chul Kang*, Bon-Sung Koo¹⁾ and Un-Hee Tae (Dept. of Biotechnology, Daegu University, Gyungsan 712-714, Korea, ¹⁾Metabolic Engineering Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea)

Abstract : In order to investigate effects of loess on the mycellial pellet formation a phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus* sp. PS-104 was cultured in potato dextrose broth containing loess. The strain formed an amorphous pellet or loose aggregates agitated at a low speed (50 rpm) while spherical and regular pellets at a high speed (150 rpm). The higher concentration of loess was added, the smaller size of a pellet was formed during the submerged culture of the strain. As shown in results, being cultured in the PDB medium supplemented with 1.0% loess the pellet size was maximally reduced to a fourth compared to the control. Evaluating the addition effect of several components of loess such as SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄ and MgCO₃ on the reduction of mycellial pellet size the higher concentration was supplied, the smaller size of pellet was formed except Al₂O₃. And the smallest pellet size was recorded at the concentration of 1.0% (W/V) magnesium carbonate.

Key words : pellet formation, phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus* sp. PS-104, loess.

서 론

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 VAM (vesicular-arbuscular mycorrhizae)¹⁻⁴⁾과 *Rhizobium*이 주로 연구되어^{5,6)} 세계 각지에서 생산하고 있으며, 특히 미국에서는 VAM과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다⁷⁾. 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 있다⁸⁻¹⁰⁾. 2,000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성

인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료 성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

인은 식물체에서 핵산, 인지질, phytates 등의 중요 구성성분이며 식물생장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 한다. 인 비료의 일종인 인광석을 작물에 사용하였을 때 토양중의 인산가용화균의 작용으로 식물에 이용될 수 있다¹¹⁾. 그러나 토양에 잔존하는 인산가용화균은 그 수가 매우 적고 인산가용화 활성이 낮으므로 환경친화적인 유기농법에 적당하지 않다. 따라서 인산가용화능이 우수한 미생물을 생물비료 (biofertilizers)로 개발하여 인광석과 같이 섞어 사용하면 작물의 인 공급 효과를 높일 수 있는 하나의 방법이 된다.

인산가용화균을 이용한 환경친화형 생물비료 (biofertilizers)의 개발노력은 부단히 이루어져 왔다. 이미 1950년대에 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물 (phospho-

*연락처:

Tel: +82-53-850-6553 Fax: +82-53-850-6559

E-mail: sckang@daegu.ac.kr

bacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며 평균 10%의 수량 증가를 보았다¹²⁾. 1980년대는 *Penicillium bilaji* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다¹³⁾. 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 *Bacillus megaterium*¹²⁾, *B. polymyxa*¹⁴⁾, *Pseudomonas striata*^{14,15)}, *Pseudomonas* sp. (PI18/89)¹⁶⁾, *Penicillium simplicissimum*¹⁷⁾, *P. aurantiogriseum*¹⁸⁾, *P. bilaii*¹³⁾, *Aspergillus awamori*^{15,19)}, *A. aculeatus*²⁰⁾, *A. niger*¹⁷⁾ 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 곡물류, 콩과 식물류, 감자류, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고되고 있다¹²⁾.

본 연구실에서는 인산가용화균을 생물비료로 개발하기 위하여 인산염 분해능이 우수한 균을 토양으로부터 분리·동정하였으며 이 균주가 *Aspergillus* sp. PS-104임을 밝혔다(unpublished data). 이 사상균은 액체배양시 tricalcium-phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite 등의 불용성 인산염을 분해하여 다량의 유리인산을 생성하였다. 이 균주를 생물비료화하기 위한 다음 단계로 batch culture를 시도하였으나 배양용 배지에서 상당한 크기의 mycelial pellet이 형성되었다. 일반적으로 mycelial pellet이 형성되면 표면적 감소에 따른 산소 및 영양분 흡수율 감소, 성장률 감소 등의 비효율적 배양적 특성이 나타난다²¹⁾. 따라서 이 균주의 배양균체를 액상으로 대량생산하기 위해서는 pellet의 형성을 억제하는 배양방법이 필수적으로 요구된다^{22,30)}. 현재까지 *Penicillium* 및 *Aspergillus* sp. 등 생물공학적으로 중요한 사상균을 대량 배양할 때, pellet 형성을 억제하거나 pellet의 크기를 줄일 수 있는 몇 가지 방안들이 보고되었다. Adamek은 Tween 80을 배지중에 첨가하여 pellet 형성을 억제하였으며²²⁾, Inch와 Trinci는 고농도의 glucose를 첨가함으로써 수분활성도 (water activity)를 낮추어 pellet 형성을 억제하였다²³⁾. 또한 Humphreys 등은 배지중에 polyethylene glycol 200 (PEG 200)을 첨가함으로써 수분활성도를 낮추어 pellet 형성을 억제하였으며²⁴⁾, Kleespies 등은 균주의 종류, 배양초기 pH, 배지 종류에 의하여서도 pellet 형성에서 차이가 생길 수 있음을 보고하였다²⁵⁾. 그러나 이러한 연구 성과에도 불구하고 사상균의 발효공학에서 pellet 형성의 억제는 여전히 해결하기 어려운 과제로 남아있다.

따라서 본 연구에서는 공시균주의 액체배양중 발생하는 mycelial pellet 형성을 억제하는 새로운 방법으로서 황토 및 SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃ 등 황토의 주요 화학적 구성성분들을 다양한 농도로 배지에 첨가하여 그 효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주, 배지 및 시약

공시균주는 본 연구실에서 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 토양으로부터 선발 및 분리한 *Aspergillus* sp. PS-104 균주를 사용하였다. 이 균주는 PDA (potato dextrose agar: potatoes

infusion 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g) 배지에서 배양하여 유지하였으며, 액체배양 시에는 PDA 배지에서 agar를 제외한 PDB (potato dextrose broth) 배지를 사용하였다. 균집중원으로 실험에 사용된 분생포자는 공시균주를 PDA 배지에서 25°C로 10일간 배양하여 형성된 포자이며, hemocytometer를 이용하여 현미경 하에서 정확히 포자수를 측정하여 사용하였다. 또한 배양배지에 첨가한 SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄, MgCO₃ 등 그 밖의 모든 시약은 Sigma Co. (USA) 제품을 사용하였다.

황토 채취 및 성분분석

황토의 채취는 경북 일대의 황토지대를 탐방하여 지상으로부터 1 m 깊이까지 판 후 표토와 섞이지 않도록 주의하여 채취하였다. 이것을 음지에서 1주일간 건조한 후 막자사발로 가볍게 간 후에 0.05 mm 이내의 고운 분말이 생기도록 체로 걸렀다. 선별된 토양은 토양화학분석법에 따라 성분분석을 실시하였다²¹⁾.

유리인산 생성균의 pellet 크기 및 균체량 측정

공시균주의 액체배양시 황토 첨가에 따른 mycelial pellet의 크기 및 균체 생성량의 변화를 알아보기 위하여 30 mL의 PDB 배지가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 황토를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (W/V) 농도로 첨가하고, 1.0×10⁶ spore/mL의 분생포자를 접종한 후 25°C에서 4일간 진탕배양하였다. 이 배양을 통하여 형성된 pellet을 plate에 옮긴 다음 해부현미경 하에서 이들의 평균적 크기를 측정하였다.

황토 농도가 균체 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 건조분말 형태의 황토를 이용하여 *Aspergillus* sp. PS-104를 상기의 방법으로 배양하였다. 이 배양액을 원심분리 (3000 g, 10 min)하여 수확한 균체를 freeze drying하여 함수율이 0% [Moisture analyzer, Mettler LJ16 (Swiss)]가 될 때까지 건조한 후 정량하였으며, 이 값에서 배지에 첨가한 황토량을 뺀 값을 균체량으로 결정하였다.

황토의 주요성분들이 사상균의 pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄, MgCO₃를 각각 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0% (W/V) 농도로 첨가한 PDB배지에서 상기의 방법으로 *Aspergillus* sp. PS-104를 배양한 후, pellet 크기를 측정하였다. 이상의 실험은 3회 반복 수행하였으며 평균 값을 구하여 유의성을 높였다.

결과 및 고찰

황토의 성분분석

황토는 여러 가지 광물입자로 구성되어 있으며, 그 크기는 0.02~0.05 mm이며, 조립질과 중립질의 먼지를 포함한다. 이 범위의 크기를 갖는 입자비율은 무게비로 전체의 50%이고, 점토 크기 (0.005 mm 이하)의 입자들은 5~10% 정도인 것으로 보고되

Table 1. Content analyses of loess collected from Daegu and Gyungbook area

Soil sample	CEC cmol/kg	Ex. Cations, cmol/kg				pH	OM %	sp. area m ² /g
		Ca	Mg	K	Na			
Jinryang	12.8	22.6	0	0	0	5.8	0.3	30.6
Gyungsan	14.2	2.8	5.1	0.3	0.5	5.8	0.3	32.2
Daegu	15.0	2.5	0	0	0	5.9	0.4	25.9

고 있다³²⁾. 또한 황토는 석영, 장석, 운모, 방해석 등이 들어 있어서 이들 물질이 철분과 함께 산화작용을 받아 황색, 자색, 적색, 회색, 미녹색 등 다채로운 색깔을 나타내는 것으로 알려져 있다³²⁾.

본 연구진들은 유리 인산 생성균 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양중 pellet 형성을 억제하기 위한 방법으로 황토를 배양액에 첨가하여 그 결과를 분석하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 대구·경북 일대의 3개 지점 (진량, 경산, 대구)에서 황토를 채취하여 토양화학분석법³¹⁾에 따라 이들의 성분분석을 실시한 결과 채취원에 따라 황토의 물성이 다르게 나타났으며 특히 치환성 양이온양에서 큰 차이를 보임을 확인하였다 (Table 1).

한편 본 연구를 위한 예비실험에서 각 지역에서 채취한 황토를 1.0% 농도로 배양배지에 첨가하여 액침배양하였을 때, 진량지역의 황토에서는 약 1/3 배, 대구지역의 황토에서는 약 1/2 배, 경산지역의 황토에서는 약 1/4 배의 pellet size 감소효과가 있었다. 이 같은 차이는 황토의 채취원에 따라 치환성 양이온량의 차이가 큰 것과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 따라서 치환성 양이온량이 가장 큰 경산지역에서 채취한 황토 표본을 공시토양으로 이용하여 다음 실험을 수행하였다.

배양배지중 황토의 농도가 pellet 형성에 미치는 영향

Aspergillus sp. 등의 사상균들은 액침배양중 이들 균주가 생성하는 균사체에 의해 서로 엉켜서 종종 mycellial pellet을 형성하게 된다. 이와 같은 pellet 형성은 균체의 대량생산 과정에서 가장 큰 문제가 되고 있다. 따라서 본 연구진들은 유리 인산 생성균 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양중 pellet 형성을 억제하기 위한 효과적인 방법으로서 황토를 배양액에 첨가함으로써 이와 같은 문제점을 해결하고자 하였다.

공시균주는 황토 농도에 관계없이 50 rpm의 속도로 배양했을 경우에 원형의 pellet이 아닌 매우 불규칙적이고 무정형의 pellet을 형성하였다. 반면에 150 rpm의 속도로 진탕배양했을 때는 구형의 pellet을 형성하였다 (Fig. 1). 이상의 결과는 *Aspergillus niger*²⁷⁾와 *Phanerochaete chrysosporium*²⁹⁾의 액침배양에 대한 결과와

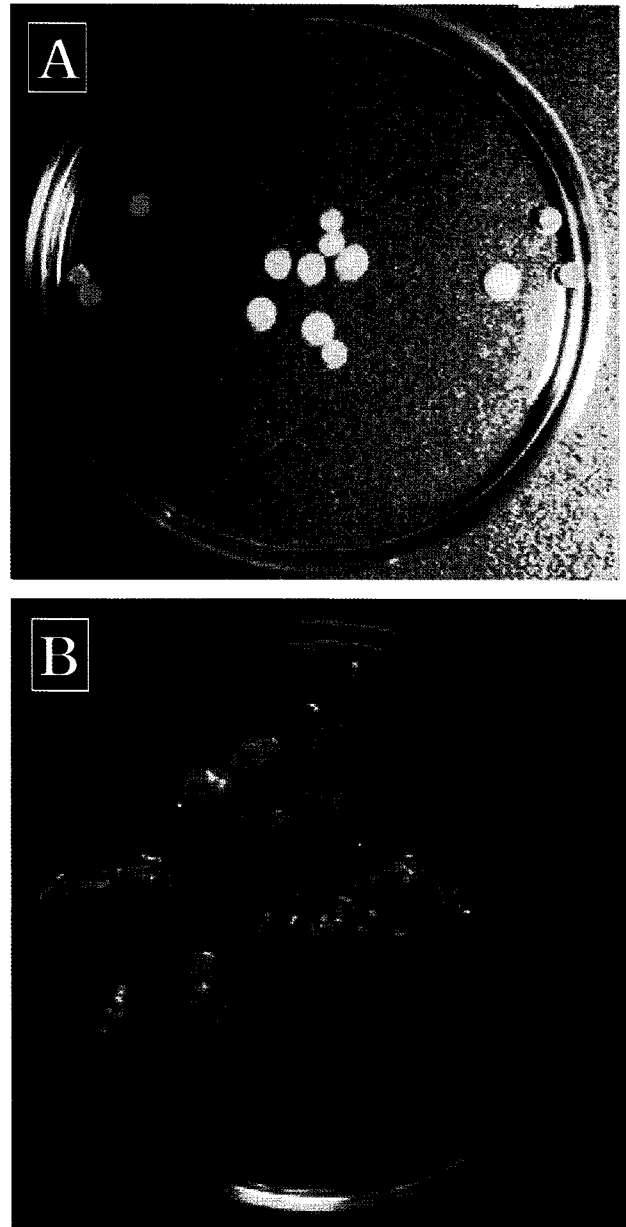


Fig. 1. Photographs showing the difference of the pellet morphology of *Aspergillus* sp. PS-104 affected by the concentrations of loess during the submerged culture. The fungus was cultured at 30°C for 4 days in potato dextrose broth (A) as control and supplemented with 1.5% loess (B) which is typically representing an amorphous pellet.

유사하였다. 이것은 *Aspergillus* sp. PS-104 분생포자가 낮은 속도로 교반할 경우 배양초기에 매우 큰 agglomerate를 형성한 채 분산되지 않고 발아했기 때문에 무정형의 pellet이 형성되었으며, 교반의 속도가 빠를수록 교반의 물리적인 힘에 의하여 상대적

Table 2. Average pellet sizes after 4 days culture of *Aspergillus* sp. PS-104 at different concentrations of loess

Concentration of loess (%)	Pellet diameter (mm)
0 (control)	3.8±0.4
0.1	2.1±0.2
0.2	1.7±0.2
0.5	1.3±0.1
1.0	1.0±0.1
1.5	22.0±2.0 (Amorphous pellet)
2.0	32.0±3.0 (Amorphous pellet)

Table 3. Cell mass of *Aspergillus* sp. PS-104 after 4 days culture at various concentrations of loess

Concentration of loess (%)	Dry cell mass (g/30 mL)
0 (control)	0.10±0.01
0.1	0.12±0.01
0.2	0.13±0.01
0.5	0.11±0.01
1.0	0.10±0.01

로 작은 agglomerate가 형성되었고 또 이 agglomerate가 시간이 경과할수록 작게 분산되어 작은 pellet을 형성한 것으로 사료된다²⁷⁾. 결론적으로 교반의 속도가 agglomerate의 수를 많게 하고, 이 agglomerate의 수가 많을수록 pellet의 크기는 작아지는 것으로 볼 수 있다³⁰⁾. Table 2의 결과에 의하면 1.0% 황토 첨가에서 평균 1.0±0.1 mm의 가장 작은 pellet이 형성되었는데, 이는 대조군에 비하여 약 4배 작은 크기이다. 또한 0~1.0% 황토농도에서는 황토농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었다. 이는 황토의 작은 고체 입자들이 분생포자와 상호작용하여 agglomerate 형성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 액침배양에서 pellet 형성은 포자들 간의 상호작용, 균사체 간의 상호작용, 균사와 포자 간의 상호작용, 균사와 고체입자간의 상호작용, pellet 간의 상호작용 등의 요인에 의하여 결정된다고 보고되었다²⁰⁾. 황토의 성분 분석에서 (Table 1) 경산지역에서 채취한 표본이 다른 지역의 표본보다 치환성 양이온량이 높게 나타났는데, 배양배지 중에서 이 황토의 작은 입자들의 음전하가 *Aspergillus* sp. PS-104의 분생포

Table 4. Average pellet sizes after 4 days culture of *Aspergillus* sp. PS-104 at different concentrations of major components of loess

Components of loess and their contents	Pellet diameter (mm)
Al ₂ O ₃ (%)	
0 (control)	3.8±0.4
0.001	6.0±0.6
0.01	6.1±0.6
0.1	6.8±0.7
1.0	7.3±0.7
CaCO ₃ (%)	
0(control)	3.8±0.4
0.001	6.2±0.6
0.01	4.9±0.5
0.1	3.0±0.3
1.0	2.0±0.2
SiO ₂ (%)	
0 (control)	3.8±0.4
0.001	6.7±0.7
0.01	5.0±0.5
0.1	4.9±0.5
1.0	3.8±0.4
Fe ₂ O ₃ (%)	
0 (control)	3.8±0.4
0.001	5.0±0.5
0.01	4.2±0.4
0.1	3.8±0.4
1.0	2.0±0.2
CaSO ₄ (%)	
0 (control)	3.8±0.4
0.001	6.0±0.6
0.01	5.5±0.6
0.1	5.0±0.5
1.0	3.0±0.3
MgCO ₃ (%)	
0 (control)	3.8±0.4
0.001	7.0±0.7
0.01	6.5±0.7
0.1	3.5±0.4
1.0	0.9±0.1

자들 사이의 인력을 완화하여 agglomerate가 작게 형성되도록 영

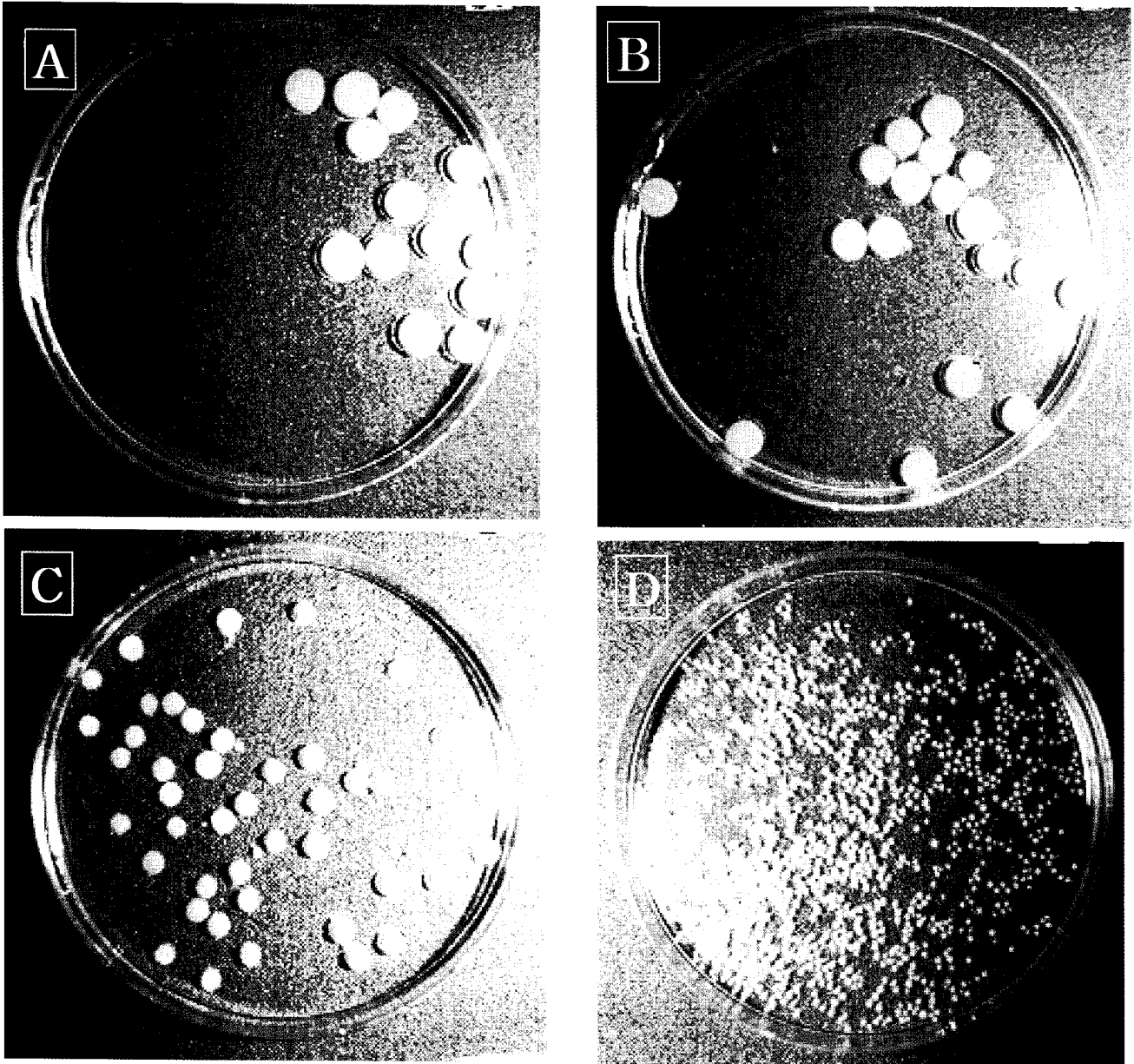


Fig. 2. Photographs showing the pellet sizes of *Aspergillus* sp. PS-104. The fungus was cultured at 30°C for 4 days in potato dextrose broth (PDB) supplemented with various concentrations (W/V) of MgCO₃. A, 0.001% MgCO₃; B, 0.01% MgCO₃; C, 0.1% MgCO₃; D, 1.0% MgCO₃.

향을 준 것으로 생각된다. 그러나 1.5% 이상의 황토 첨가 시에는 무정형의 큰 pellet이 형성되었으며, 이것은 배양배지 중의 황토의 농도가 높아지면 사상균의 균사와 황토의 상호작용에 의하여 배지의 점성이 증가함과 동시에 교반에 의한 agglomerate의 분산이 곤란해지기 때문에 생긴 현상으로 생각된다²⁶⁾.

배양배지중 황토의 농도가 균체 성장에 미치는 영향

황토가 유리 인산 생성균 *Aspergillus* sp. PS-104의 균체 성장

에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDB 배지에 황토를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0% (W/V) 첨가하고 분생포자를 접종한 후, 150 rpm의 속도로 진탕배양하여 균체 생성량을 조사하였다 (Table 3). 그 결과 *Aspergillus* sp. PS-104는 0~0.2% 범위의 황토첨가에서는 황토 첨가량이 증가할수록 균체 생산량이 증가하여 0.2%의 황토 첨가에서 최고의 균체생성량을 나타내었다. 이것은 배양액 중 균체의 pellet 크기가 작을수록 pellet 내부까지 산소의 공급이 용이하며 영양분 흡수율이 증가하기 때문에 0.2%의 황토 농도가

지는 균체생성량이 증가하는 것으로 사료된다. 그러나 0.5~1.0%의 황토농도에서는 오히려 균체 생성량이 감소하였다. 즉 황토의 농도가 높으면 균체의 성장이 방해받을 것으로 나타났다. 이는 황토의 농도가 높으면 pellet 크기가 작게 형성되어 균체 성장에는 유리하지만 배양액의 점성이 증가하여 산소와 영양분 공급이 방해되는 것으로 사료된다²¹⁾. 또한 음으로 하전된 황토의 고체입자는 배양액속에 하전된 무기염류의 양을 감소시켜 균체의 성장을 억제할 수 있으며, 고체입자 자체가 균체의 성장을 억제할 수도 있다. 따라서 황토가 균체 성장을 억제하는 정확한 요인에 대한 분석은 보다 자세한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

황토의 주요성분이 pellet 형성에 미치는 영향

황토의 주요성분인 SiO_2 , Fe_2O_3 , Al_2O_3 , CaCO_3 , CaSO_4 , MgCO_3 의 분말을 0.001, 0.01, 0.1, 1.0% (W/V) 농도로 PDB 배지에 첨가하여 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양중 pellet 형성에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 4, Fig. 2). 그 결과 Al_2O_3 를 제외하고는 대체적으로 첨가물의 농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었으며, 1.0% (W/V)의 MgCO_3 농도에서 가장 작은 pellet size (0.9 ± 0.1 mm)를 나타내었다 (Table 4, Fig. 2). 특이한 것은 같은 탄산염입에도 불구하고 CaCO_3 보다 MgCO_3 를 배지에 첨가했을 때 이 균주는 더 작은 크기의 pellet을 형성하는 것으로 나타났다.

이상의 결과들을 종합하면 황토는 유리 인산 생성균 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양중 분생포자의 agglomerate의 형성을 억제하여 pellet의 크기를 작게 하는 효과가 있음을 규명하였다. 그러나 황토가 사상균의 발효에서 pellet 형성을 억제시키는 분명한 기작을 알기 위해서는 보다 폭넓은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

유리인산 생산균을 생물비료화 하기 위한 노력의 일환으로 인산가용화능이 우수한 *Aspergillus* sp. PS-104 균주를 액침배양하면서 pellet 형성에 미치는 황토의 영향을 조사하였다. *Aspergillus* sp. PS-104의 분생포자를 황토를 포함하는 PDB 배지에 접종하여 50 rpm의 낮은 속도로 교반하여 배양하면 무정형의 불규칙적인 pellet을 형성하는 반면에 150 rpm의 높은 속도로 배양하면 구형의 규칙적인 pellet을 형성하였다. 또한 0~1.0% (W/V) 범위의 황토 첨가시에는 황토의 농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었으며, 1.0% 황토 농도에서 1.0 ± 0.1 mm의 가장 작은 pellet이 형성되었다. 이 결과는 황토를 첨가하지 않는 경우에 비하여 약 4배 작아진 것이다. 그러나 황토 농도가 1.5% 이상 되면 무정형의 큰 pellet이 형성되었다. 또한 황토의 주성분인 SiO_2 , Fe_2O_3 , Al_2O_3 , CaCO_3 , CaSO_4 , MgCO_3 분말을 각각 0~1.0% 농도로 배지에 첨가하여 pellet 형성에 미치는 영향을 조사한 결과

Al_2O_3 를 제외하고는 첨가물의 농도가 높을수록 작은 크기의 pellet이 형성되었으며, MgCO_3 를 첨가했을 때 가장 작은 크기의 pellet을 형성하였다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bolan, N. S. (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants, *Plant Soil* 65, 189-207.
2. Elmes, R. P. and Mosse, B. (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizae inoculum production. II. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture, *Can. J. Bot.* 62, 1531-1536.
3. Jensen, A. (1982) Influence of four vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and growth in Barley (*Hordeum vulgare*), *New Phytol.* 90, 45-50.
4. Menge, J. A. (1983) Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture, *Can. J. Bot.* 61, 1015-1024.
5. Kumar, H., Arora, N. K., Kumar, V. and Maheshwari, D. K. (1999) Isolation, characterization and selection of salt tolerant Rhizobia nodulating *Acacia catechu* and *A. nilotica*, *Symbiosis* 26, 279-288.
6. Craig, G. F., Atkins, C. A. and 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* 133, 253-262.
7. Kim, K. Y., Jordon, D. and McDonald, G. A. (1988) Effect of Phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity, *Biol. Fertil. Soils* 26, 79-87.
8. Kim, H. O., Uo, Z. K., Lee, S. C. and 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.
9. 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.
10. Choi, M. C., Chung, J. B., Sa, T. M., Lim, S. U. and Kang, S. C. (1997) Solubilization of insoluble phosphates by *Aspe-*

- rgillus sp. PS-104 isolated from soil, *Agric. Chem. Biotechnol.* 40, 329-333.
11. Paul, E. A. and Clark, F. E. (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic press, New York, USA.
 12. Dubey, S. K. and 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Agasimani, C. A., Mudlagiriappa and Sreenivasa, M. N. (1994) Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms, *Groundnut News* 6, 5.
 16. Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. (1995) Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms, *Soil Biol. Biochem.* 27, 265-270.
 17. 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, 987-993.
 18. Illmer, P. and Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms, *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.
 19. Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1993) Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*, *Ind. J. Exp. Biol.* 31, 747-749.
 20. Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1995) Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*, *Ind. J. Exp. Biol.* 33, 91-93.
 21. Byrne, G. S. and Ward, O. P. (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnol. Bioeng.* 33, 912-914.
 22. Adamek, L. (1963) Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae*(Metch.), *Folia Microbiologia* 10, 255-257.
 23. Inch, J. M. M. and Trinci, A. P. J. (1987) Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media, *J. Gen. Microbiol.* 113, 247-252.
 24. Humphreys, A. M., Matewale, P., Trinci, A. P. J. and 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.
 25. Kleespies, R. G. and Zimmermann, G. (1992) Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture, *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 127-135.
 26. Metz, B. and Kossen, N. W. F. (1977) The growth of molds in the form of pellets, *Biotechnol. Bioeng.* 19, 781-799.
 27. Elmayergi, H. (1975) Mechanisms of pellet formation of *Aspergillus niger* with an additive, *J. Ferment. Technol.* 53, 722-729.
 28. Takahashi, J. and Yamada, K. (1959) Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture, II. On the two types of pellet formation in the shaking culture, *J. Agric. Chem.* 33, 707-710.
 29. Wainwright, M. P., Trinci, A. P. J. and 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.
 30. Jimenez-Tobon, G. A., Penninckx, M. J. and Lejeune, R. (1997) The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture, *Enzyme Microbiol. Technol.* 21, 537-542.
 31. Han, K. K., Park, J. K., Jeong, L. K., Lee, C. S., Yoon, J. H., Kim, W. C. and Lee, S. K. (1988) Methodology for the chemical analyses of soil, Sammi Press, p.1-450.
 32. Ryu, D. O. (1995) Secret of loess, Haenglim Press, p.1-429.