

Klebsiella sp. DA71-1/pLYJ의 난용성 인산염 가용화 특성

류아름 · 이진우 · 이용석 · 이상철 · 정수열¹ · 최용락*

동아대학교 응용생명공학부, ¹동주대학 식품과학계열

Received April 12, 2006 / Accepted May 1, 2006

Characteristics of Insoluble Phosphates Solubilizing by *Klebsiella* sp. DA71-1/pLYJ. Ryu Ah-Reum, Jin-Woo Lee, Yong-Seok Lee, Sang-Cheol Lee, Soo-Yeol Chung¹ and Yong-Lark Choi*. *Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resource and Life Science Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Department of Food Science, Dongju College, Busan 604-715, Korea* – To develop high efficiency biofertilizer solubilizing insoluble phosphates, lactate dehydrogenase (*ldh*) gene was isolated from *Staphylococcus* sp. LJ2. Genetic constructions were carried out using the pGEM-T-easy vector and pHSG398. Recombinant DNA plasmids containing the *ldh* gene were transferred to *Klebsiella* sp. DA71-1 by electroporation. The selected transformant was named as a DA71-1/pLYJ. The insoluble phosphates solubilization activity of DA71-1/pLYJ was higher than that of DA71-1 at various culture conditions. Glucose was the best carbon source for insoluble phosphates solubilization among the used carbon sources. Maximal insoluble phosphates solubilizing was found in sucrose minimal (SM) medium containing 3% glucose. The solubilizing activity of DA71-1/pLYJ against three types of insoluble phosphates, such as tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, aluminium phosphate, were quantitatively determined. The optimal temperature and initial pH to solubilize insoluble phosphates in the SM medium was 37°C and pH 5.0, respectively.

Key words – Biofertilizer, lactate dehydrogenase, insoluble phosphates, sucrose minimal medium, *Klebsiella* sp.

서 론

인은 식물체의 성장과 발육에 가장 필수적인 다량영양소 중 하나이다[7]. 실제로 인산은 토양 중에 0.05% (w/w)를 차지하고 있으나, 식물이나 미생물이 이용할 수 있는 인산의 양은 그 중에서도 0.1%에 불과하다[20]. 또한 인산은 산성 토양에서는 철 및 알루미늄 이온과, 알칼리성 토양에서는 칼슘 이온과 쉽게 결합하여 불용화 됨으로써 토양 중에 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양만을 증가시키는 결과를 가져다준다[14]. 이러한 난용성 인산염을 식물이나 미생물이 이용하기 쉬운 H₂PO₄⁻나 HPO₄²⁻의 이온형태로 전환시켜주는 과정을 가용화라 하며 토양 속에는 이러한 가용화 반응을 일으키는 미생물이 많이 존재한다고 알려져 있다[2,15]. 이와 같은 특성을 가지는 인산과 밀접한 관계를 맺고 있는 분야가 바로 농업이라고 할 수 있다. 지금까지 우리 농업은 단위면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위해 다량의 화학비료와 유기물을 사용해 왔다. 그러나 최근 환경오염에 대한 인식변화로 인산가용화균을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizer)의 개발필요성이 제기되어졌고, 개발노력이 부단히 이루어져왔다. 앞으로도 환경보전을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염

을 효과적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해줄 수 있는 생물비료의 개발은 중요한 과제가 될 것이다[4,7,9,16-18]. 따라서 인산비료의 사용을 대체할 수 있고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 가장 바람직한 방법은 인산가용화 미생물을 이용하여 토양 속에 다량으로 축적되어 있는 불용성 인산염을 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다[1,2,5,8,11,20].

미생물에 의한 인산 가용화 기작은 아직 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 대부분의 연구자들은 인산가용화 균들이 세포막 밖에서 직접 산화 과정에 의한 유기산 생성에 따른 산성화에 의해 많은 양의 유리인산이 방출된다고 보고하고 있다. Taha 등[17]에 의해 가용화는 인산가용화 균에 의한 CO₂와 유기산 생성에 의한 것이라고 보고된 바 있으며, Moghimi 등[12,13]은 인산가용화시 2-ketogluconic acid가 많은 양 존재한다고 보고하였다.

본 연구는 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 경제적이고, 고효율적인 친환경형 생물비료의 개발을 위한 기초연구로 lactate dehydrogenase를 분리하여 토양에서 분리되어진 인산가용화능이 낮은 기존의 균주에 도입한 분자육종 균주의 인산가용화 효과를 확인하였다.

*Corresponding author

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

E-mail : ylchoi@dau.ac.kr

재료 및 방법

ldh gene의 cloning

본 연구실에서 이미 분리되어진 *Staphylococcus* sp. LJ2로부터 lactate dehydrogenase (*ldh*) gene이 cloning되었다. *Staphylococcus* sp. LJ2의 16S rDNA 염기 서열의 분석 결과 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228와 98% 상동성을 나타내었으며, ATCC 12228의 upstream 2,190,308-2,190,334 bp와 downstream 2,191,298-2,191,324 bp의 영역을 oligonucleotide로 작성하여 *ldh* gene을 클로닝하기 위한 primer로 사용하였다(forward primer, LDH3: 5'-TGTGTAACITTTATTATGAAGGAGTTCG-3', reverse primer, LDH4: 5'-TTCACCTCAAACATCTTCGTCATTCTC-3')[19]. PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturalization시키고, 95°C에서 30초 동안 denaturalization, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분간 extension시켰으며, 이를 30회 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 1분간 반응시켰다. PCR 수행 결과 약 1 kb의 PCR product를 획득하였다. 증폭된 DNA 단편은 pGEM-T-easy vector (Promega co., Madison, WI, USA)에 연결되었으며, 이를 pSTL1이라고 명명하였다. pSTL1은 Hanahan법[6]에 의하여 *E. coli* JM109로 형질전환되었다. 형질전환된 재조합체

는 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 변형 배지(polypepton 10 g, NaCl 5 g, yeast extract 5 g, glucose 1 g, per liter)를 이용하여 180 rpm, 37°C에서 배양되었으며, 13,000 rpm에서 1분간 실온에서 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체로부터 pSTL1 plasmid DNA를 분리하고, 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 1 kb의 *ldh* gene을 회수한 다음 pHSG398 cloning vector의 *EcoRI* 절단부위에 연결하였으며, 이를 pLYJ라고 하였다(Fig. 1). pLYJ는 난용성 인산염 가용화능이 낮은 균주로써 토양에서 분리한 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주에 electroporation법[3]으로 형질전환되었다.

인산가용화능 측정

300 ml 삼각 플라스크에 각종 난용성 인산염이 0.5% 첨가된 sucrose minimal (SM)배지 (sucrose 10 g, NH₄NO₃ 0.27 g, KCl 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnSO₄ · 6H₂O 1 mg, FeSO₄ · 7H₂O 1 mg, yeast extract 0.1 g, per liter) 100 ml에 전 배양한 균주를 접종한 후, 96~108 시간동안 180 rpm으로 진탕배양하면서 배양 상등액내의 유리 인산 농도와 pH 변화를 12 시간 마다 측정하였다. 균체배양액 1 ml을 eppendorf tube에 옮겨 담은 후 소형원심분리기로 5,500 rpm, 5분간 실온에서 원심분리하였다. 원심분리 후 일정량의 상등액에 멸

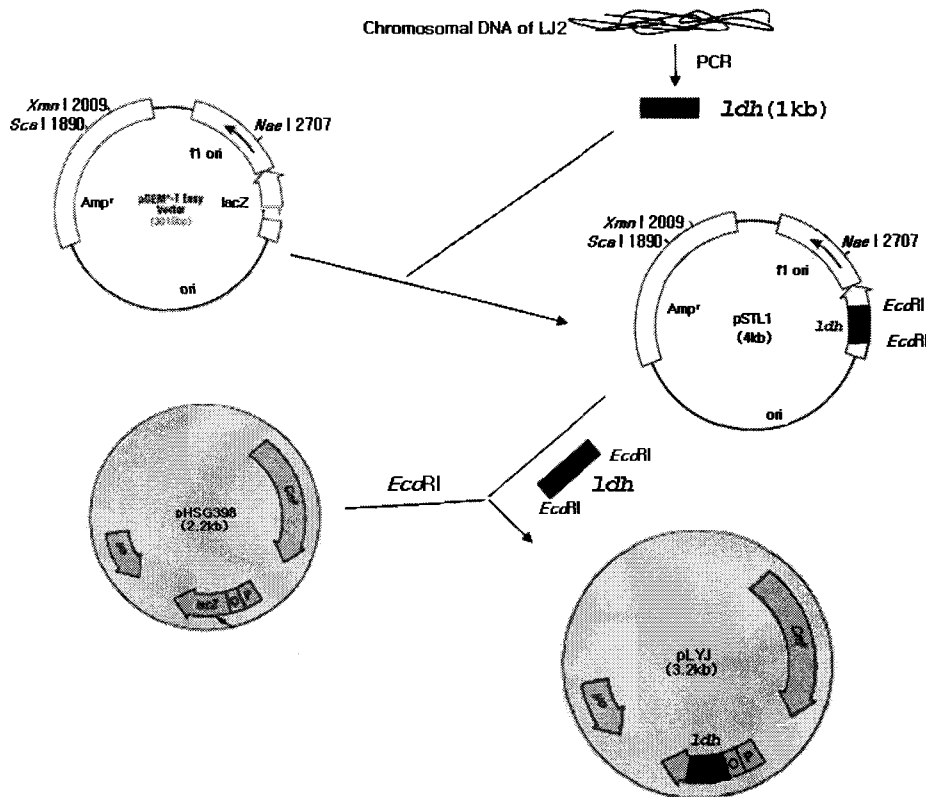


Fig. 1. Construction of recombinant plasmids, pSTL1 and pLYJ, with *ldh* gene from *Staphylococcus* sp. LJ2.

균수를 첨가하여 총 200 μ l가 되게 한 후, 여기에 신선한 molybdate reagent (6N H₂SO₄: 2.5% ammonium molybdate: 10% ascorbic acid: H₂O=1: 1: 1: 2) 800 μ l를 첨가하여 50°C에서 20 분간 반응시킨 다음, UV-VIS spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham)를 이용하여 흡광도 820 nm에서 유리 인산의 양을 측정하였다[10,16].

탄소원의 종류 및 농도에 따른 난용성 인산염 가용화 특성 조사

배지에 첨가된 탄소원이 DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SM 배지 100 ml에 glucose, sucrose, 그리고 maltose를 각각 3%씩 첨가하여 실험을 수행하였다. 또한 탄소원의 농도에 따른 영향을 알아보기 위해 glucose를 1%, 3%, 그리고 5% 첨가하여 실험하였다. 이때 난용성 인산염인 tri-calcium phosphate를 기질로써 0.5% 첨가하였고, 배양초기 pH 6.0, 30°C, 180 rpm으로 108 시간 동안 진탕 배양하면서 12 시간 마다 균주의 유리 인산 생성 정도와 pH 변화를 측정하였다. 이때, *Klebsiella* sp. DA71-1 균주를 대조구로 이용하여 DA71-1/pLYJ 균주와의 차이를 비교하였다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험 오차를 최소화하였다.

난용성 인산염의 종류에 따른 인산가용화 특성 조사

ldh gene를 도입한 DA71-1/pLYJ 균주의 난용성 인산염 종류에 따른 인산가용화능의 차이를 조사하였다. 세 종류의 난용성 인산염 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, 그리고 aluminium phosphate가 각각 0.5% 첨가된 SM배지에서 DA71-1/pLYJ 균주를 96 시간 동안 30°C에서 180 rpm으로 진탕배양하면서 12 시간마다 유리 인산 생성 정도와 pH 변화를 측정하였다. 이때, *Klebsiella* sp. DA71-1 균주를 대조구로 이용하여 DA71-1/pLYJ 균주와의 차이를 비교하였다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험 오차를 최소화하였다.

배양학적 조건에 따른 인산가용화 특성 조사

각기 다른 배양학적 조건에서 DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능의 차이를 조사하였다. 배양온도에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 알아보기 위하여 DA71-1/pLYJ 균주를 0.5% tri-calcium phosphate가 첨가된 SM 배지에서 108 시간 동안 26°C, 30°C, 그리고 37°C에서 진탕 배양하였고, 배지의 배양초기 pH에 따른 인산가용화능의 차이를 알아보기 위하여 pH 5, pH 6, 그리고 pH 7에서 실험하였다. 이들 실험에서 glucose를 각각 3% 첨가하여 실험을 수행하였다. DA71-1/pLYJ 균주에 의한 유리 인산 생성 정도와 pH 변화를 12 시간 마다 측정하였으며, *Klebsiella* sp. DA71-1 균주를 대조구로 이용하여 DA71-1/pLYJ 균주와의 차이를 비교하였

다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험 오차를 최소화하였다.

결과 및 고찰

ldh gene의 cloning

ldh gene의 도입을 위하여 pLYJ는 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주로 electroporation되었으며, 이를 DA71-1/pLYJ이라고 명명하였다. DA71-1/pLYJ를 chloramphenicol (25 μ g/ml)이 첨가된 LB 고체배지에서 선별한 결과 200여 개의 colony가 나타났다. 200여 개의 colony중에서 20개를 선택하여 plasmid DNA를 분리하여 확인한 결과 모든 colony에서 재조합 plasmid DNA가 확인되었다. 확인된 균주 중에서 임의로 5개의 균주를 선택한 후 제한효소를 처리하여 *ldh* gene의 삽입 여부를 확인하였다. 난용성 인산염이 0.5% 첨가된 SM 고체배지에서 *ldh* gene이 도입된 DA71-1/pLYJ 균주가 야생형 DA71-1에 비해 3 일 이후 투명대의 크기가 훨씬 크게 나타나는 것을 확인하였다(자료 미제시). 그 중에서도 투명대가 가장 큰 균주를 선택하여 계속적으로 실험을 수행하였다.

탄소원의 종류 및 농도에 따른 난용성 인산염 가용화 특성

비교적 가격이 저렴한 탄소원을 이용하여 경제적인 배양 단가로 대량 배양을 위한 기초실험으로써 탄소원의 종류 (glucose, sucrose, maltose)에 따른 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주와 DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능의 차이에 대한 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, DA71-1/pLYJ 균주는 탄소원으로 glucose를 배지에 첨가하였을 때 sucrose의 7.6배, maltose의 11.9배 이상의 유리 인산을 방출하였고, *Klebsiella* sp. DA71-1 균주에 비해서는 2.6배 이상의 유리 인산을 방출하였다. 또한 glucose를 첨가하였을 때 pH 저하의 정도가 가장 컸다.

탄소원으로써 가장 뛰어난 특성을 나타낸 glucose의 농도(1%, 3%, 5%)에 따른 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주와 DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능의 차이에 대한 분석 결과를 Fig. 3에 나타내었다. DA71-1/pLYJ 균주는 glucose를 1%, 3%, 그리고 5% 첨가한 모든 실험에서 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주보다 난용성 인산염 가용화능이 우수하였으며 각각 9.8배, 2.6배, 그리고 4.1배 이상의 유리 인산을 방출하였다. 특히, DA71-1/pLYJ 균주는 배지에 glucose를 3% 첨가했을 때 가용화능이 가장 뛰어났다. glucose를 1%, 3%, 5% 첨가하였을 때 각각 pH 5.11, 4.85, 4.8로 pH가 저하되었다. 3% 첨가하였을 경우 1% 첨가하였을 때보다 pH 저하의 정도가 컸다. 이러한 결과는 glucose를 1% 첨가하였을 때에 비해 시간에 따른 고갈 정도가 낮은 것에 기인한 것이며, 3% 이상 첨가할 때에는 높은 탄소원의 함량 때문에 기질 저하가 있는 듯했다.

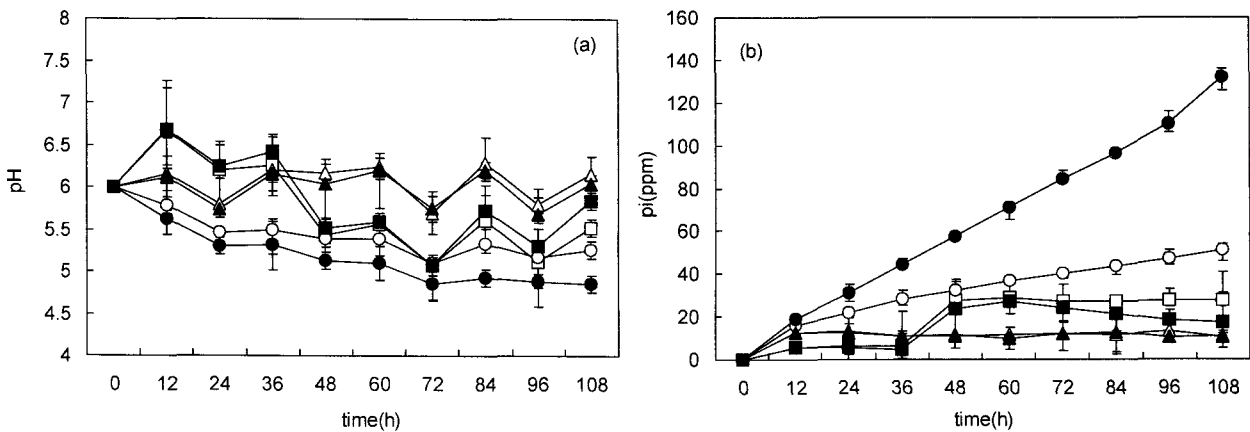


Fig. 2. Changes of free phosphate concentration and changes of pH value during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ. *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ were cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate at 30°C. (a) pH value (b) free phosphate concentration. Circles, glucose; squares, sucrose; triangles, maltose; closed symbols, DA71-1/pLYJ; open symbols, DA71-1

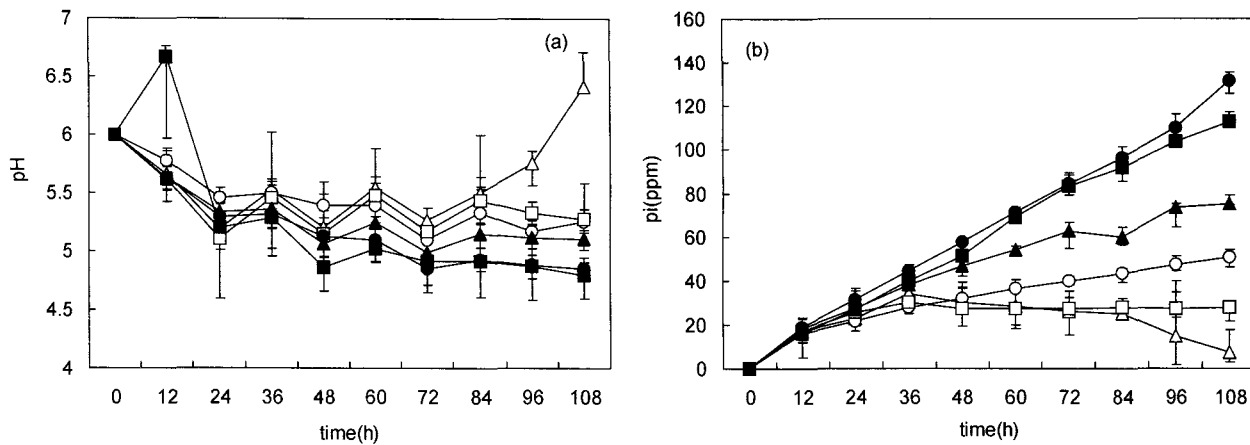


Fig. 3. Changes of free phosphate concentration and changes of pH value during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ. *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ were cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate at 30°C. (a) pH value (b) free phosphate concentration. Circles, glucose 3%; squares, glucose 5%; triangles, glucose 1%; closed symbols, DA71-1/pLYJ; open symbols, DA71-1

난용성 인산염의 종류에 따른 인산가용화 특성

세 종류의 난용성 인산염 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, 그리고 aluminium phosphate를 배지에 첨가하여 배양한 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주와 DA71-1/pLYJ 균주의 난용성 인산염별 인산가용화능의 차이를 Fig. 4에 나타내었다. DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능은 세 종류의 난용성 인산염 모두에서 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주보다 우수한 것으로 나타났다. DA71-1/pLYJ 균주를 96 시간 동안 배양한 결과 난용성 인산염 가용화능은 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, 그리고 aluminium phosphate 사용시, *Klebsiella* sp. DA71-1 균주보다 각각 2.3배, 1.8배, 그리고 1.2배 높은

것으로 나타났다. Aluminium phosphate의 경우에는 pH 3.76으로 급격한 저하를 보였으나, 방출된 유리 인산의 양은 6.69 ppm 정도로 매우 적었다.

배양학적 조건에 따른 인산가용화 특성

Klebsiella sp. DA71-1 균주와 DA71-1/pLYJ 균주의 배양학적 조건의 차이에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 비교 조사하기 위하여 각기 다른 배양온도와 배지의 배양초기 pH에 따라 실험을 수행하였다. 배양온도(26°C, 30°C, 37°C)에 따른 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주와 DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능의 차이에 대한 분석 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

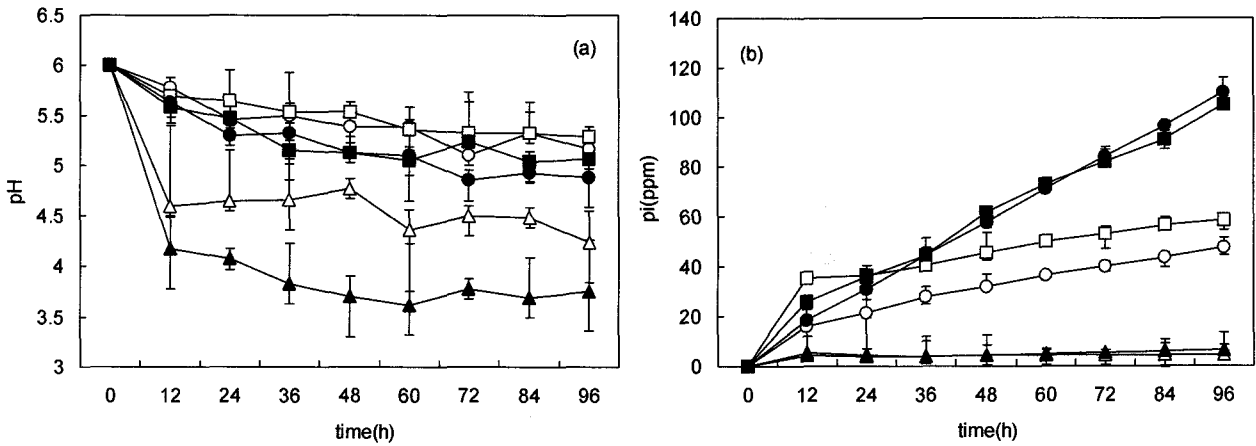


Fig. 4. Changes of free phosphate concentration and changes of pH value during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ. *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ were cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% insoluble phosphate at 30°C. (a) pH value (b) free phosphate concentration. Circles, tri-calcium phosphate; squares, hydroxyapatite; triangles, aluminium phosphate; closed symbols, DA71-1/pLYJ; open symbols, DA71-1

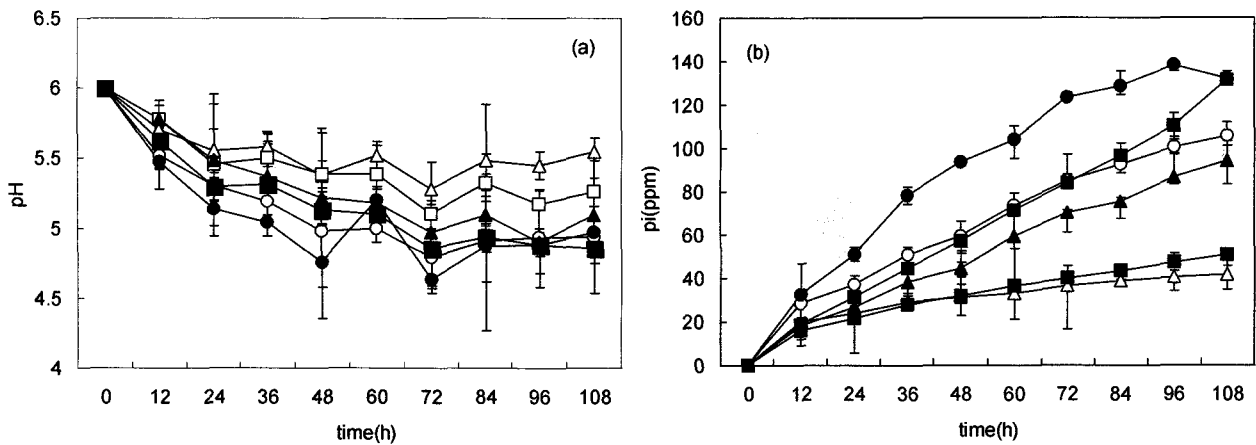


Fig. 5. Changes of free phosphate concentration and changes of pH value during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ. *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ were cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate. (a) pH value (b) free phosphate concentration. Circles, 37°C; squares, 30°C; triangles, 26°C; closed symbols, DA71-1/pLYJ; open symbols; DA71-1

DA71-1/pLYJ 균주는 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주에 비해서 26°C, 30°C, 그리고 37°C에서 각각 2.2배, 2.6배, 그리고 1.3배 이상의 유리 인산을 방출하는 가용화 특성을 보였다. *Klebsiella* sp. DA71-1 균주가 다른 배양온도에 비해 37°C에서만 비교적 높은 인산가용화능을 나타내는데 반해, DA71-1/pLYJ 균주는 각기 다른 배양온도 모두에서 골고루 난용성 인산염 가용화능이 높았다. 이러한 특성은 이 균주를 생물비료로 개발하기 위해 저온에서도 유효한 인산가용화능을 가져야 한다는 조건에도 잘 부합하는 것이다[16].

배양초기 pH (5.0, 6.0, 7.0)에 따른 *Klebsiella* sp. DA71-1

균주와 DA71-1/pLYJ 균주의 인산가용화능의 차이에 대한 분석 결과를 Fig. 6에 나타내었다. DA71-1/pLYJ 균주는 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주에 비해 pH 5, pH 6, 그리고 pH 7에서 각각 1.9배, 2.6배, 그리고 2.5배 이상의 난용성 인산염을 가용화하였다. 특히, DA71-1/pLYJ 균주는 배양초기 pH가 5.0인 산성 배지에서 인산가용화능이 가장 높게 나타났다. 이러한 특성은 인산이 산성 토양에서 철이나 알루미늄 이온과 결합하여 생긴 불용성 인산태를 DA71-1/pLYJ 균주를 이용하여 가용성 인산의 형태로 바꾸므로써 식물 성장에 유용한 생물비료로 개발 가능성을 나타낸다.

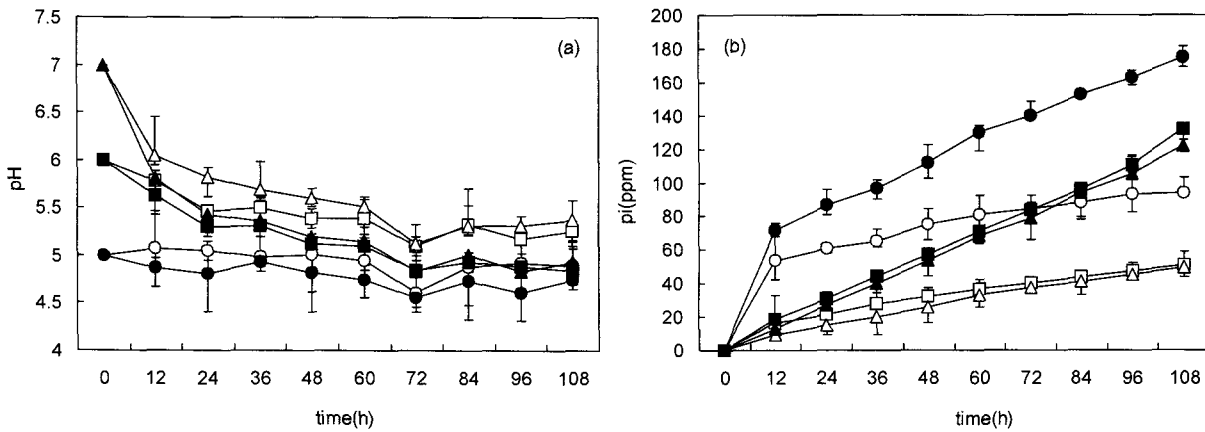


Fig. 6. Changes of free phosphate concentration during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ at various initial pHs. *Klebsiella* sp. DA71-1 and DA71-1/pLYJ were cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate at 30°C. (a) pH value (b) free phosphate concentration.

Circles, pH5; squares, pH6; triangles, pH7; closed symbols, DA71-1/pLYJ; open symbols, DA71-1

요 약

친환경형 미생물제제의 난용성 인산염 가용화능의 향상을 위하여 *Staphylococcus* sp. LJ2로부터 분리된 *ldh* gene을 *Klebsiella* sp. DA71-1에 도입하였고, 이를 DA71-1/pLYJ라고 명명하였다. 배지에 glucose를 3% 첨가했을 때 다른 탄소원을 첨가했을 때보다 DA71-1/pLYJ 균주의 난용성 인산염 가용화능이 월등히 우수하였다. 각기 다른 난용성 인산염 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, 그리고 aluminium phosphate에 대하여 그 가용화능이 DA71-1 균주보다 적게는 1.2배, 많게는 2.3배 이상 향상된 결과를 보였다. 그리고 DA71-1/pLYJ 균주는 DA71-1 균주에 비해 배양 온도에 비교적 관계없이 높은 인산가용화능을 나타낸 것이 특징적이었고, 배양초기 pH가 5.0일 때 그 능력이 가장 뛰어났다. 이러한 모든 결과들을 종합해볼 때 DA71-1/pLYJ 균주는 여러 면에서 DA71-1 균주보다 난용성 인산염 가용화능이 월등히 뛰어나며 따라서 효율적이고 친환경적인 미생물제제의 개발에 큰 역할을 할 수 있는 발판을 마련했다 할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2004학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Asea, P. E. A., R. M. N. Kucey and J. W. B. Stewart. 1998. Inorganic phosphate solubilization by two penicillium species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 459-464.
2. Azcon, R., J. M. Barea and D. S. Hayman. 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with *mycorrhizal* fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **8**, 135-138.
3. Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**, 2796.
4. Dubey, S. K. and S. D. Billore. 1992. Phosphate solubilizing microorganism(PSM) as inoculant their role in augmenting crop productivity India-A review. *Crop Res. Hisar.* **5**, 11-17.
5. Gyaneshwar, P., K. G. Naresh and L. J. Parekh. 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 669-673.
6. Hanahan, D., J. Jessee and Bloom, F. R. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Meth. Enzymol.* **204**, 63.
7. Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 389-395.
8. Kang, S. C. and M. C. Choi. 1998. Isolation and cultural characteristics of a phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 497-501.
9. Laheurte, F. and J. Berthelin. 1998. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. *Plant Soil.* **105**, 11-17.
10. Lee, J. W., Y. J. Jung, S. L. Choi, J. H. Kim, J. S. Yoo, Y. G. Kim and Y. L. Choi. 2004. Effect of amino acid solution for cell growth and MPS activity of mineral phosphate microorganisms. *J. Kor. Life Sci.* **14**, 490-495.
11. Mishustin, E. N. and A. N. Naumova. 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. *Microbiol.* **31**, 442-452.

12. Moghimi, A., M. E. Tate and J. M. Oades. 1978. Characterization of rhizosphere products especially 2-ketogluconic acid, *Soil Biol. Biochem.* **10**, 283.
13. Moghimi, A. and M. E. Tate. 1978. Does 2-ketogluconate chelate calcium in the pH range 2.4 to 6.4. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 289.
14. Paul, E. A. and F. E. Clark. 1989. *Method in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. pp.58-62. Academic Press, New York, USA.
15. 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 ³²P uptake. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 105-108.
16. 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. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 251-256.
17. Taha, S. M., S. A. Z. Mahmood, A. H. El-Damaty and A. M. A. El-Hafeg. 1969. Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian soils. *Plant and Soil.* **31**, 149-160.
18. Yadav, K. S. and K. R. Dadarwal. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. In: *Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production* (Dadarwal, K. R., Ed.), pp. 293-308. Scientific Publishers.
19. Zhang, Y. Q., S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin and Y. M. Wen. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol.* **49**, 1577-1593.
20. Zou, K., D. Binkley and K. G. Doxtader. 1992. New methods for estimating gross P mineralization and mobilization rates in soil. *Plant Soil.* **147**, 243-250.