

액비화 과정 중 인 이용 우수미생물 분리 및 특성

임정수 · 조성백 · 황옥화 · 양승학*

농촌진흥청 국립축산과학원 축산환경과

Isolation and Characterization of Phosphorus Accumulating Microorganisms under Liquid Fertilization of Swine Slurry

Joung-Soo Lim, Sung-Back Cho, Ok-Hwa Hwang, Seung-Hak Yang*

Animal Environment Division, National Institute of Animal Science, RDA, 441-706, Seosuwonro 143-13, Suwon, Republic of Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the bacterial capability to accumulate phosphorus during liquid composting process of pig slurry. Storage liquid compost and pig slurry were analyzed by using MALDI-TOF technique, which showed the colonies of *Acinetobacter towneri* and *Bacillus licheniformis*. In addition, bacterial colonies were isolated under high phosphoric acid conditions using X-phosphate MOPS medium with the addition of 2 mM K_2HPO_4 . Microbial growth was observed in high and low phosphoric conditions due to the growth of bacterial diversities in the liquid fertilizer and slurry. The colonies isolated in the high phosphoric acid medium were uncultured bacterium clone and *Acinetobacter* sp. were identified by analysis of 16S rRNA gene sequences. Uncultured bacterium showed higher growth rate and excellent phosphorus ability than *Acinetobacter* sp.. In addition to *Paenibacillus* sp. AEY-1 isolated from pig slurry performed excellent phosphorus utilizing capability.

(Key words : Swine, Phosphorus, Accumulating, Microorganism, Liquid fertilizer)

서 론

최근 고도성장으로 인한 생활수준의 향상으로 식생활 변화에 따른 육류 소비량이 증가로 축산업의 기업화·대형화로 사육두수의 증가가 불가피해졌다. 이로 인한 축산폐수의 급격한 증가로 인해 과거의 자연적인 자정작용으로는 한계가 있으며, 축산폐수가 처리되

지 않은 상태로 자연계에 노출되어 수질, 토양 오염 및 대기오염 등이 발생하여 축산농가 주변과 인근 주민에게 피해가 발생함에 따라서 많은 민원이 제기될 수 있다. 이처럼 축산폐수는 생활하수나 공장폐수와 달리 질소와 인의 농도가 매우 높으며, 축산폐수에 존재하는 고농도의 인 성분은 다른 오염물질과 더불어 수질오염의 주 오염원으로 하천의

*Corresponding author : Seung-Hak Yang, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, 441-706, Korea, Tel: +82-31-290-1714, Fax: +82-31-290-1731, E-mail: y64h@korea.kr

2014년 5월 10일 투고, 2014년 5월 28일 심사완료, 2014년 6월 4일 게재확정

부영양화 및 적조현상과 같은 환경문제를 발생시킨다.

일반적으로, 인을 제거하는 수 처리 기술로는 크게 화학적 방법과 생물학적 방법이 주로 사용된다. 화학적 처리 방법인 응집 침전법의 경우 시설 유지관리가 간편하고 처리 효율이 높지만, 약품비용과 고가의 슬러지 처분비용으로 인하여 비경제적이며, 많은 슬러지 발생량으로 인한 2차오염원을 발생시킨다. 이에 반하여 생물학적 처리방법은 단일 시스템 내에서 혐기·호기조건으로 교차시키면서, 미생물이 선택적인 활성을 발휘할 수 있도록 하여 공정의 안정성, 경제성 및 신뢰성 등의 장점을 가지고 있어 인 제거 방법으로 폭넓게 적용되고 있다(Barnard, 1974). 이처럼, 혐기·호기조건을 만들어 공정 내에서 Poly-P을 체내 축적하는 미생물(Phosphorus Accumulating Microorganism, PAM)을 우점화시켜 슬러지 내에 인 함유량을 증가시킴으로써 높은 인 제거 효율을 얻을 수 있다(Kornberg, 1995; Kuroda et. al., 2005; Mino et al., 1998; Sedlak, 1991). 이러한 Poly-P 축적 미생물은 X-phosphoric acid(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 분해 시 청색으로 발색되며, 이를 이용한 X-phosphoric acid 함유배지에서 청색 콜로니를 쉽게 선별할 수 있다(Morohoshi et al., 2002). 이밖에도, 지속적으로 인에 대한 물질수지, 활용 및 회수방법이 있는데, 회수방법으로는 HAP기법(Hydroxyapatite)과 MAP기법(Struvite)에 대해 잘 알려져 있다. 또한, 인산염을 분해하는 미생물을 이용하여 흡수효율을 높이는 연구가 수행되었으며, 주로 *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flabo-bacterium* 등이 인산염 등의 불용성 인산을 용해하는 것으로 보고되었다(Rodriguez and Fraga, 1999). 따라서, 본 연구에서는 액비화 과정 중 인 이용에 적합한 조건의 미생

물을 탐색하고 그 활용방안을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 배양

본 실험에 사용된 인 이용 미생물은 국립 축산과학원 시험돈사의 돈분뇨 및 액비저장액을 분리원으로 하여 균주를 순수 분리하였다. 균주의 분리동정을 위해 X-phosphoric acid medium인 MOPS medium(KisanBio, Korea)을 사용하였으며, 모든 배양은 25℃에서 48 hr 동안 진행되었다. 하지만, 혐기배양의 경우 AnaeroPack(MITSUBISHI GAS CHEMICAL, Tokyo, Japan)을 넣은 Anaerobic jar를 이용하여 혐기조건을 조성해 주었다. 또한, MOPS medium에 2 mM K₂HPO₄의 첨가유무에 따라서 고인산·저인산 배지로 분류하여 사용하였으며 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다.

2. 인 이용미생물 선별 및 동정

인 이용능이 있는 미생물을 분리하기 위해 MOPS medium에 도말하여 배양 후 형성된 청색 콜로니를 취해 순수분리를 시도하였다. 이렇게 순수분리 된 콜로니는 2 mM K₂HPO₄이 첨가된 MOPS medium에서 한 차례 더 순수분리를 진행하였다. 또한 유전학적 동정을 위하여 16S rRNA의 염기서열을 분석하였다.

3. MALDI-TOF MS 분석

MALDI-TOF MS(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)는 휘발성이 적거나 불용성 시료의 분석이 가능하며, 기존의 질량분석법과 다르게 열 분해 조건이 필요하지 않고 column을 사용하지 않기 때문에, 다루기가 쉽다는 장점이 있다(Krishnamurthy and Ross, 1996). MALDI-TOF

Table 1. The composition of MOPS medium.

Compound	Concentration (g/L)
MOPS	8.372
Tricine	0.717
Potassium Phosphate Dibasic	0.23
Ammonium Molybdate	0.0000036
Boric acid	0.0000248
Cobalt Chloride	0.0000072
Cupric Sulfate	0.0000024
Manganese Chloride	0.000016
Zinc Sulfate	0.0000028
Agar	15.0
Added solution*	17.235 ml
† Potassium Phosphate Dibasic	2 mM

† Final pH = 7.2 ± 0.2 at 25°C

*Solution	Concentration (ml/L)
0.01M Ferrous Sulfate Heptahydrate	1.0
1.9M Ammonium Chloride	5.0
0.297M Potassium Sulfate	1.0
0.02M Calcium Chloride Dihydrate	0.025
2.5M Magnesium Chloride	0.21
5M Sodium Chloride	10.0

Total volume to 1 L by solution compound

MS를 이용하여 미생물의 질량을 측정된 후 분석프로그램을 이용하여 미생물의 동정 결과를 얻을 수 있는 새로운 방법이다(Hsieh et al., 2008). MALDI-TOF MS를 이용한 미생물 동정연구는 *Clostridium species*(Grosse-Herrenthey et al., 2008), *Escherichia coli*(Parisi et al., 2008), *Listeria species*(Barbuddhe et al., 2008), *Staphylococcus aureus*(Brenardo et al., 2002; Due et al., 2002; Edward-Jones et al., 2000; Walker et al., 2002; Szabados et al., 2010), *Yersinia enterocolitica*(Parisi et al., 2009) 등 다양하게 연구되었다. 이에 본 연구에서는 액비저장액과 돈분 슬러리용액 내에 존재하는 미생물을 동정하기 위한 방법으로 MALDI-TOF MS 분석기기(MALDI Biotyper, Bruker Daltonik GmbH, Germany)를 이용하여 분석하였다. 또한, Hsieh 등(2008)은 병원성 미생물

의 분류와 동정에 MADI-TOF MS의 효율성을 검증하기 위하여 *S. aureus*, *E. coli*, *klebsiella*, *Salmonella* 등을 동정하고, classification model을 검증하였는데, 높은 신뢰도와 빠른 동정이 가능하며, 혼합시료에서 여러 종류의 세균을 동시에 검출할 수 있으며, 낮은 검출 한계를 가지고 있다고 보고하였다. Szabados 등(2010)은 *S. aureus*에 대한 MALDI-TOF MS 동정법의 정확도를 확인하기 위하여 VITEK2 system, DNA Sequencing와 비교한 결과, 높은 정확도와 신속한 동정이 가능하다고 보고하였다. 그 밖에도, MALDI-TOF MS는 단백질 분석과 검출, 미생물 분석, 생체 재료 표면의 탄수화물 역할 분석, 항원-항체반응 등 생체물질의 특이성을 분석하는 방법으로 널리 이용되고 있다.

4. T-P 분석

고체 배지에서 순수 분리된 인 제거 미생물 균주를 백금이로 취하여 돈사에서 채취한 뇨 원액 50 ml에 각 균주 배양액 10 ml를 접종시킨 후 30℃로 설정된 shaking incubator에서 배양한 후 시간에 따른 균주별 인 제거능을 조사하였다. 흡광도는 DR5000 Spectro-photometer(HACH Co, USA)를 사용하였으며, 880 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 액비화 과정에서의 우점미생물의 종류

액비화가 진행되기 전의 돈분 슬러리액 및 액비화가 끝난 액비저장조의 미생물 분포현황을 나타내었다(Table 2). 이 중 돈분 슬러리 용액의 호기·혐기조건에서 순수 분리된 콜로니를 취하여 MALDI-TOF MS를 이용하여 분석한 결과 호기조건에서는 *Bacillus licheniformis*가 우점하였으며, 혐기조건에서는 *Bacillus* 3종(*Bacillus sonorensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*)이 우점하는 것으로 나타났다. 그 중 통성혐기성 미생물 2종이 60% 이상을 차지하는 것으로 조사되었으며, *Acinetobacter townneri* 등 대표적인 인 제거미생물이 포함되어 있었다.

*Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*는 장류 발효에 있어서 중요한 세균이며, 일부 균주들은 다양한 종류의 계면 활성제나 항생 물질들을 생산하여 경쟁 관계에 있는 주위 균들의 증식을 저해하는 것으로 보고되었다(Grangemard et al., 2001; Ryu et al., 2007; Tagg et al., 1976; Yang and Chang, 2007). 또한, *Bacillus subtilis*의 bacitracin, surfactin, iturins, *Bacillus licheniformis*의 lichenysin, lichenicidine 등은 이와 같은 펩타이드계 물질로서 항세균 또는 항진균 특성을 나타낸다(Dischinger et al., 2009; Jung et al., 2009; Tagg et al., 1976; Yakimov et al., 1995; Yang and Chang, 2007).

2. 인 이용 미생물 동정

순수 배양된 미생물을 선별하여 염기서열을 분석하였고, 이후 염기서열을 조합하여 NCBI(The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 제공하는 Advanced Blast search(Altschul et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25: 3389-3402)를 이용하여 Genebank의 염기서열과 비교하였다(Table 3). 주로 *Acinetobacter*가 인산농도와 상관없이 모든 조건에서 관찰되

Table 2. The distribution status of bacteria under aeration condition.

Condition	Species		
	Pig slurry	%	Liquid manure storage tank
Aerobic	<i>Comamonas kerstersii</i>	40	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Acinetobacter townneri</i>	26.6	
	<i>Escherichia coli</i>	20	
Anaerobic	<i>Escherichia coli</i>	43.8	<i>Bacillus sonorensis</i>
	<i>Comamonas kerstersii</i>	25.0	
	<i>Acinetobacter townneri</i>	12.5	<i>Bacillus licheniformis</i>
			<i>Bacillus subtilis</i>

Table 3. Analysis of nucleotide sequence under phosphoric acid concentration.

Conditions			
High phosphoric acid		Low phosphoric acid	
Species	Identity (%)	Species	Identity (%)
<i>Uncultured bacterium clone</i>	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	99
<i>Uncultured bacterium clone</i>	99	<i>Gamma proteobacterium</i>	99
<i>Uncultured bacterium clone</i>	99	<i>Uncultured bacterium clone</i>	99
<i>Uncultured bacterium clone</i>	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	99
<i>Uncultured bacterium clone</i>	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	99
<i>Uncultured bacterium partial</i>	99	<i>Gamma proteobacterium</i>	99
<i>Acinetobacter sp.</i>	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	99
<i>Uncultured bacterium clone</i>	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	99
<i>Bacterium H2S BIOF-1 partial</i>	99	<i>Uncultured bacterium clone</i>	99
<i>Acinetobacter sp.</i>	99	<i>Uncultured bacterium clone</i>	99

었으며, 고인산 조건에서는 *Uncultured bacterium clone*이 주로 검출되었는데, 이는 대표적인 *Acinetobacter* 외에도 인 이용이 우수한 미생물들이 다수 존재하는 것으로 판단된다. *Acinetobacter*는 그람 음성, 구균으로 비운동성이며 호기성 균주이고 포자 형성은 하지 않으며, 토양, 물 등의 자연계에서 광범위하게 분리된다. *Acinetobacter spp.*는 Juni 등에 의해 처음 알려지게 되었으며, 꾸준히 연구되어 왔다(Loubinoux et al., 2003; Misbah et al., 2005).

이처럼, 인 이용능이 있는 미생물을 분리 동정하기 위해 MOPS Agar 배지에 X-Pi를 첨가하여 청색의 미생물 콜로니를 취해 순수배양을 실시하였다(Morohoshi 등, 2003).

돈분슬러리액과 액비저장액에서는 미생물 수는 유의적으로 차이가 없었지만, 인을 이

용하는 미생물이 다수 존재하는 것으로 판단된다.

3. 분리균주 *Paenibacillus sp.* AEY-1의 인 이용능

돈 분뇨에서 6종의 균주가 순수 분리되었다(Table 5). 순수 분리되어진 6종의 균주를 이용하여 배지에 함유된 인 함량을 조사한 결과 모든 균주들은 최초 인을 섭취했다가 도중에 배출하였고 그 이후 다시 인을 흡수하는 전형적인 과정을 보였다. 배양 12 hr 이내에 *Staphylococcus sp.* AEY-2 (PAM-1)과 *Brachybacterium sp.* (PAM-2)를 제외한 균주들은 배지 내의 모든 인을 흡수하였으며, 배양이 끝난 120 hr에서는 모든 균주들이 50% 이상의 인을 이용한 것으로 나타났다. 하지만,

Table 4. Microbial growth with X-phosphoric acid medium concentration. (*Aerobic, 25°C, 48 hr)

Item	High phosphoric acid		Low phosphoric acid	
	White colony	Blue colony	White colony	Blue colony
Pig slurry	8×10^5	1×10^5	2.1×10^6	1.0×10^6
Liquid manure storage tank	1.3×10^6	1×10^5	2.6×10^6	1.1×10^6

Table 5. Strains isolated from pig slurry.

Strain	Microbial species
PAM-1	<i>Staphylococcus</i> sp. AEY-2
PAM-2	<i>Brachybacterium</i> sp.
PAM-3	<i>Paenibacillus</i> sp. AEY-1
PAM-4	<i>Micrococcus luteus</i> AEY-1
PAM-5	<i>Bacillus subtilis</i> AEY-1
PAM-6	<i>Leifsonia Kafniensis</i> AEY-1

Paenibacillus sp. AEY-1 (PAM-3)의 경우 배양 시간이 지날수록 인 이용 효율면에서 가장 우수한 결과를 보였으며 지속적으로 인을 이용하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

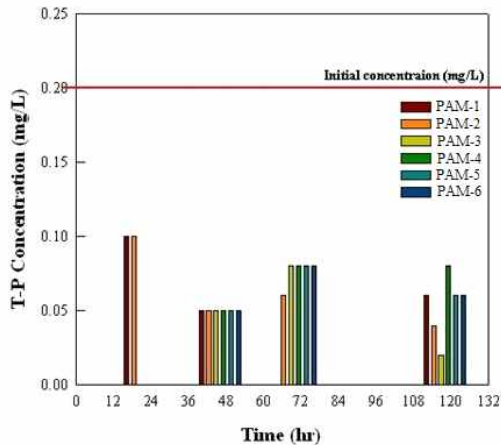


Fig. 1. Removal of T-P concentration during incubation time.

결 론

액비화과정 중 인 제거 미생물을 선발하기 위해 돈분슬러리액과 액비 등을 채취하여 미생물의 증식능력 및 인 이용능을 조사하였다. 돈분슬러리액과 액비저장액을 이용하여 존재하는 미생물의 수, 종류 및 성상을 생균수 측정과 MALDI-TOF 기법을 통해 조사한 결과 돈분슬러리액에는 *Acinetobacter towneri* 등이, 액비저장액에는 *Bacillus licheniformis*

등 *Bacillus* 계열의 미생물들이 스크리닝되었다. 인 이용균주의 분리동정에는 X-phosphoric acid medium인 MOPS medium을 이용하였는데, 2 mM K₂HPO₄가 첨가된 고인산 조건에서의 분리 동정을 하였다. 고인산배지의 미생물 집락만을 선택하여 순수배양 후 염기서열 분석을 수행하였는데, 주로 *Acinetobacter*가 인산농도와 상관없이 관찰되었으며 인 이용량과 성장속도에서 *Uncultured bacterium clone*이 우수한 것으로 나타났다. 결론적으로, 액비화과정 중 최적의 미생물 선발을 통해 인 제거가 가능하며 *Paenibacillus* sp. AEY-1가 가장 우수했다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(PJ 90711005)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

- Anhalt, J.P., Fenselau, C., 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* 47, 219-225.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbank, S., Collins, M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. microbiol.* 13, 202-206.
- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrixassisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5402-5407.
- Barnard, J.L., 1974. Cut P and N without Chemicals-Part 1 and 2. *Wat. Was. Eng.*

- 11, 33-41.
5. Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fleer, S., Hunger, F., Kronke, M., 2002. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*. 2, 747-753.
 6. Bitton, G., 1994. *Wastewater Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., Publication; USA. 3, 63-65.
 7. Carroll, K.C., Weinstein, M.P., 2007. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: *Manual of clinical microbiology*. 9th ed., Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M.L., Tenover, M.A. (ed). Washington D.C., American Society for Microbiology, 192-217.
 8. Cloete, T.E., Steyn, P.L., 1988. The role of *Acinetobacter* as a phosphorus removing agent in an activated sludge. *Water Res.* 22, 971-976.
 9. Dischinger, J., Josten, M., Szekat, C., Sahl, H., Bierbaum, G., 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS One* 4, 1-11.
 10. Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y., Wang, J., 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 5487-5491.
 11. Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J., Gordon, D.B., 2000. Rapid discrimination between methicillin sensitive methicillin sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 49, 295-300.
 12. Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., Peypoux, F., 2001. Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotech.* 90, 199-210.
 13. Grosse-Herrenthey, A., Maier, T., Gessler, F., Schaumann, R., Bohnel, H., Kostrzewa, M., Kruger, M., 2008. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS). *Anaerobe.* 14, 242-249.
 14. Hsieh, S.Y., Tseng, C.L., Lee, Y.S., Kuo, A.J., Sun, C.F., Lin, Y.H., Chen, J.K., 2008. High efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics.* 27, 448-456.
 15. Jung, S.S., Choi, J.I., Joo, W.H., Suh, H.H., Na, A.S., Cho, Y.K., Moon, J.Y., Ha, K.C., Paik, D.H., Kang, D.O., 2009. Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.* 19, 994-1002.
 16. Juni, E., 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* 47, 837-841.
 17. Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177, 491-496.
 18. Krishnamurthy, T., Ross, P.L., 1996. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1992-1996.
 19. Kuroda, A., Takiguchi, N., Kato, J.,

- Ohtake, H., 2005. Development of Technologies to Save Phosphorus Resources in Response to Phosphate Crisis. *J. Environ. Biotech.* 4, 87.
20. Loubinoux, J., Mihaila-Amrouche, L., Fleche, A.L., Pigne, E., Huchon, G., Grimont, P.A.D., Bouvet, A., 2003. Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1337-133.
 21. Löter, L.H., Murphy, M., 1985. The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge plant with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water SA* 11, 179-184.
 22. Mino, T., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. Microbiology and Biochemistry of the Enhanced Biological Phosphate Removal Process. *Water Res.* 32, 3193-3207.
 23. Misbah, S., Hassan, H., Yusof, M.Y., Hanifah, Y.A., Abubakar, S., 2005. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Med J.* 46, 461.
 24. Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kuroda, A., 2002. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4107-4110.
 25. Parisi, D., Magliulo, M., Nanni, P., Casale, M., Forina, M., Roda, A. 2008. Analysis and classification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and a chemometric approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2127-2134.
 26. Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.* 17, 319-339.
 27. Ryu, H.S., Shon, M.Y., Cho, S.J., Park, S.K., Lee, S.W., 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50, 87-94.
 28. Sedlak, R.I., 1991. Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: Principles and Practice, 2nd ed., New York, USA., Lewis publishers.
 29. Szabados, F., Woloszyn, J., Richter, C., Kaase, M., Gatermann, S., 2010. Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J. Med. Microbiol.* 59, 787- 790.
 30. Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
 31. Walker, J., Fox, A.J., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B., 2002. Intact cell mass spectrometry(ICMS) used to type methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J. Microbiol. Meth.* 48, 117-126.
 32. Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.H., 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1706-1713.
 33. Yang, E.J., Chang, H.C., 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechn.* 35, 339-346.