

인산가용화균 *Aeromonas hydrophila* DA 57의 분리와 배양 중 가용화특성

송옥렬 · 이승진 · 김세훈 · 정수열¹ · 차인호² · 최용락*

동아대학교 생명자원과학대학, ¹동주대학 식품과학계열, ²부산광역시 보건환경연구원

(2001년 10월 12일 접수, 2001년 11월 16일 수리)

난용성 인산염을 가용화 시킬 수 있는 경제적이고 효율적인 생물비료를 개발하기 위하여 난용성 인산염 가용화 능이 우수한 미생물을 염류 집적 및 인산과다처리 재배지로부터 분리하였다. 이 분리균주의 생리·생화학적인 특성을 조사한 결과 *Aeromonas hydrophila* DA57로 동정되었다. *Aeromonas hydrophila* DA57은 hydroxyapatite, tri-calcium phosphate 와 같은 난용성 인산염을 모두 가용화한다. 난용성 인산염의 분해능이 최대가 되는 배양 온도와 배양초기 pH는 각각 30°C와 5.0이었으며, 탄소원으로 glucose를 3% 첨가시 가용화능이 높았다. 배양 pH가 감소함에 따라 가용화된 유리인산의 함량이 증가하였고 gluconic acid의 생성이 확인되었다. 따라서 난용성 인산염의 분해가 우수한 새로운 *Aeromonas hydrophila* DA57를 분리하였고, 이는 하나의 생물비료원으로 활용이 가능하리라고 사료된다.

Key words : 난용성인산염, 인산가용화, 유리인산, *Aeromonas* sp., gluconic acid

서 론

인은 식물체에서 핵산, 인지질, phytates 등의 중요 구성성분이며, 식물 및 박테리아 성장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 하는 원소이다.¹⁾ 그러나 인산은 산성토양에서는 철 및 알루미늄 이온과 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로서 토양 중에는 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양만 증가되는 결과를 가져다 준다.²⁾ 실제로 인산은 토양 중 0.05%(w/w)를 차지하고 있으나, 식물이나 미생물이 이용할 수 있는 인산양은 그 중에서도 0.1%이다.³⁾ 난용성 인산염을 식물이나 미생물이 이용하기 쉬운 H₂PO₄⁻나 HPO₄²⁻의 이온형태로 전환시켜주는 과정을 가용화라 하며 토양 속에는 이러한 가용화 반응을 일으키는 미생물이 많이 존재한다고 보고되어져 있다.^{4,5)} 이미 보고되어진 인산가용화균으로는 *Bacillus megaterium*, *B. polymycol*, *Pseudomonas striata*, *Pseudomonas* sp.(P118/89) 등의 세균이 알려져 있으며,^{6,9)} *Penicillium simplicissima*, *P. aurantiogriseum*, *P. bilaji*, *Aspergillus awamori*, *A. aculeatus*, *A. niger* 등이 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 따라서 인산자원의 재활용이란 측면에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 토양미생물의 탐색과 실용화는 비료 성분의 이용효율을 제고시킬 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(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며, 평균 10%의 수량증가를 보았다.⁶⁾ 1980년대에는 *P. bilaji* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대

시키는 것으로 밝혀졌다.¹⁵⁾ 국내에서는 *Penicillium* sp.를 토양에 처리하여 pot에서 옥수수의 성장과 생산량이 증대됨이 보고된 바 있다.¹⁶⁾

국내에서의 미생물을 이용한 생물비료의 개발은 균주선발 및 배양특성 조사에만 접근한 수준이며, 유전학적인 접근은 아직 미흡하다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 2000년대에는 환경보전을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해줄 수 있는 생물비료의 개발은 시급히 해결해야 할 과제가 될 것이다.

따라서 본 연구의 목적은 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 경제적이고, 고효율적인 생물비료의 개발을 위한 기초 연구로 난용성 인산염의 가용화 우수 미생물을 분리하여 동정하였으며, 선발된 미생물의 배양학적 특성에 따른 난용성 인산가용화를 조사하였다.

재료 및 방법

인산가용화균의 선별. 염류집적 및 인산과다처리 재배지로부터 채취하여 조제한 토양 10 g을 100 ml의 멸균수에 넣고 200 rpm으로 30분 동안 혼합한 후, 희석평판법으로 6단계까지 희석한 시료를 L broth에 도말하였다. 생성된 콜로니를 0.5% tri-calcium phosphate가 함유된 sucrose minimal(SM) 고체배지(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, 난용성 인산염 5 g, agar 1.2%, H₂O/1L)⁶⁾에 접종하여 27°C, 3일간 배양하여 투명대(clear zone)를 형성하는 균주를 선발하였다.

분리균주의 동정. 난용성 인산염 가용화능이 확인된 인산가용화균을 동정하기 위하여 생화학적, 생리적 특성을 Bergey's

*연락처

Phone: 82-51-200-7585; Fax: 82-51-200-6993
E-mail: ylchoi@mail.donga.ac.kr

manual에 따라 조사하여 동정하였으며, 아울러 정확성을 높이기 위해 그람염색을 실시한 결과를 이용하여 API system 32GN strip과 API 20E strip을 이용하여 동정하였다.

인산가용화능 측정. 300 ml 삼각 flask에 각종 난용성 인산염이 0.5% 첨가된 SM배지 100 ml에 전배양한 균주를 접종한 후, 160 rpm으로 필요한 시간동안 연속적으로 진탕배양하면서 배양액을 원심분리하여 얻어낸 상등액 내의 유리인산 농도와 pH 변화를 일정시간마다 측정하였다. 즉, 균체배양액 1 ml을 eppendorf tube에 담은 후 소형원심분리기로 13,000 rpm, 5분간 실온에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 10 µl을 취하고 여기에 멸균수 90 µl을 첨가하여 총 100 µl가 되게 하고, 여기에 phosphorus reagent 900 µl를 첨가하여 혼합한 후 15분간 실온에서 방치한 다음, 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 실험에 사용한 용액은 Sigma사에서 제조한 phosphorous reagent kit를 사용하였다.

배양학적 조건에 따른 인산가용화 특성 조사. 인산가용화균 DA57 균주의 배양학적 특성에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 조사하였다. 배양온도 차이에 따른 영향은 26°C, 30°C, 37°C에서 실시하였고, 배지의 초기 배양 pH별에 따른 영향은 pH 5.0, 6.0, 7.0에서 실시하였다. 배지 조성의 차이에 따른 영향은 26°C, 초기배양 pH 5.0에서 glucose를 1%, 3%, 5% 농도별로 첨가하여 실시하였다. 균주에 의한 pH변화와 유리 인산 생성능은 12시간마다 측정하였으며, 이상의 배양 환경에 관한 모든 실험은 2회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험 오차를 최소화하였다.

난용성 인산염 종류별에 따른 인산가용화 특성 조사. 인산가용화균 DA57 균주의 난용성 인산염 종류별에 따른 난용성 인산염 가용화능의 차이를 조사하였다. 즉, 3종류의 난용성 인산염, tri-calcium phosphate, hydroxyapatite 및 aluminum phosphate가 0.5% 함유된 SM배지, pH 6.0에서 12시간마다 분리 균주의 인산가용화능 및 pH변화를 측정하였다.

Gluconic acid의 측정. 배양액 속의 gluconic acid의 생성여부는 *Pseudomonas* sp.로부터 정제된 gluconate dehydrogenase (GDH)를 사용하여 측정하였다. L broth에 인산가용화균 DA57 균주를 전 배양 후 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 두 번 씻은 후, glucose 최소 배지(0.4% glucose와 21 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8)에 5%(v/v)가 되게 접종하여 30°C, 160 rpm으로 수일간 배양하였다. 배양액을 eppendorf tube에 담은 후 소형원심분리기로 6,000 rpm, 5분간 실온에서 원심 분리 하였다. 상층액을 반응액(0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 10 mM dichloroindophenol, 3 mM phenazine methosulfate, glucose dehydrogenase 0.1 unit, H₂O /1 ml)¹⁹⁻²⁰에 혼합하여 25°C, 600 nm에서 dichloroindophenol의 감소 정도로 배양액 속의 gluconic acid 함량을 측정하였다.

Plasmid DNA의 분리. 인산가용화균 DA57의 plasmid DNA는 Promega Biotech사의 Wizard kit를 사용하여 분리하였으며, DNA 절단 실험을 위한 제한효소는 Takara Shuzo Co사의 제한효소를 사용하였다.

결과 및 고찰

인산가용화균의 선별. 경남 김해시의 비닐하우스 재배 지역 내 근권 토양에서 희석 평판법으로 세균을 계수 한 결과 건조 토양 1 g당 세균수는 대략 $2\sim 5 \times 10^8$ cfu/g 이었다. 콜로니의 모양, 색깔 등으로 보아 다른 균주로 생각되는 것을 tri-calcium phosphate가 함유된 SM 고체배지 상에 접종하여 배양하였다. 3일 후에 투명대를 관찰한 결과, 약 5000개의 분리 균종 중 10% 이상의 균주가 분명한 투명대를 보였으며 그 중에서 비교적 투명대 영역이 넓게 나타난 균주 수십종을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주는 인산염 첨가 배지에서 유리 인산 생성량이 비교적 높은 수준의 세균을 선발하였으며, DA23, DA33, DA57, DA71로 명명된 4종이 높은 인산가용화능을 나타내었다. 그 중에서 인산가용화능이 가장 우수한 DA57 균주를 계속하여 실험하였다.

분리균주의 동정. 우선 분리균주를 동정하기 위하여 그람염

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of isolated DA57

Characteristics	<i>Aeromonas hydrophila</i> DA57
Gram strain	-
Shape	short rods
Assimilation on	
Rhamnose	-
Acetate	+
L-Arabinose	+
2-Ketogluconate	-
N-acetyl-glucosamine	+
DL-Lactate	+
3-Hydroxybutyrate	-
D-Ribose	-
L-Alanine	+
Caprate	+
4-Hydroxybenzoate	-
Inositol	-
Mannitol	+
L-Serine	+
D-Sucrose	+
D-Glucose	+
Citrate	-
L-Proline	+
Maltose	+
Salicin	+
Histidine	+
Itaconate	-
D-Melibiose	-
5-Ketogluconate	-
Suberate	-
L-Fucose	-
Glycogen	+
Malonate	-
D-Sorbitol	-
3-Hydroxybenzoate	-

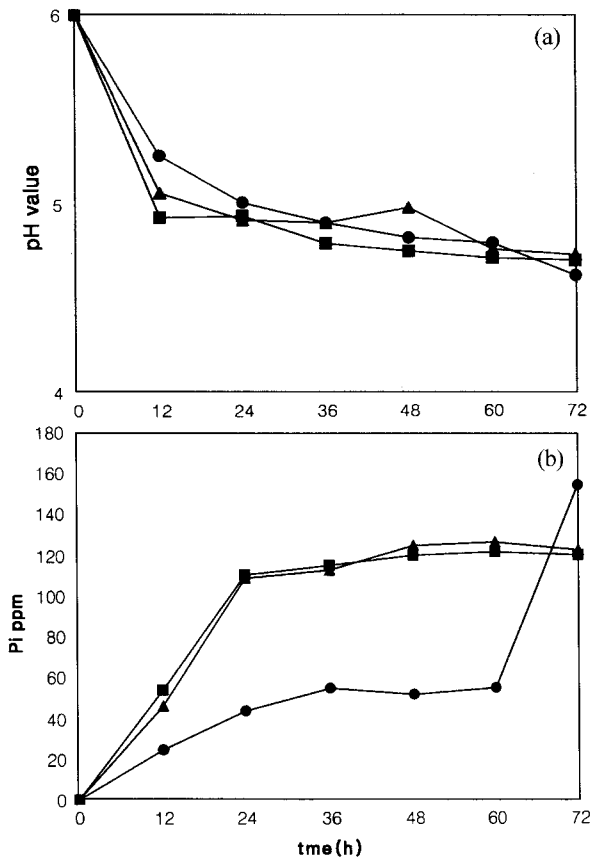


Fig. 1. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Aeromonas hydrophila* DA57 at various temperature with time courses. *Aeromonas hydrophila* DA57 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate. ● : 26°C; ▲ : 30°C; ■ : 37°C. (a) pH value (b) free phosphate concentration.

색, 현미경 관찰 등의 생리 생화학적 특성을 Bergey's manual 에 따라 조사한 결과, 운동성을 가진 그람 음성균으로서 *Vibrio* 속과는 달리 lipase를 생성하고 *D*-mannitol을 이용하는 것으로 보아 *Aeromonas* sp.의 가능성이 높았다. 동정의 정확성을 기하기 위해 균주를 API 20E 및 32GN strip을 사용하여 동정 실험한 결과, DA57은 *Aeromonas hydrophila*와 일치하였다(Table 1). 분리 동정된 *A. hydrophila* DA57은 지금까지 알려지지 않은 인산가용화균이었다.

배양학적 특성에 따른 인산 가용화 특성. *A. hydrophila* DA 57의 배양학적 특성에 따른 인산가용화 특성을 조사하기 위해 배양 온도별, 배양 초기 pH 별, 배지 조성의 차이에 따라 실험하였다. Fig. 1은 26°C, 30°C 및 37°C의 다른 조건에서 배양한 *A. hydrophila* DA57 균주가 나타내는 인산가용화능에 대한 정량적 분석 결과이다. 26°C에서 이 균주는 배양시간 60시간에 도달될 때까지 30°C와 37°C에서의 120 ppm 이상의 유리인산을 방출한 인산가용화능의 절반 수준에도 미치지 못하였으나, 그 이후는 오히려 증가하는 수준이었다. 이러한 경향은 이 균주를 미생물 비료로서 개발하기 위하여, 포장 온도인 저온하에서 좀더 유효한 인산가용화능을 가져야 한다는 조건에 잘 포함되어진다. 모든 처리구의 경우 배양 1일 후부터는 배양액의 pH가 급격히 감소하였으며, 26°C의 경우 72시간에는 pH 4.62

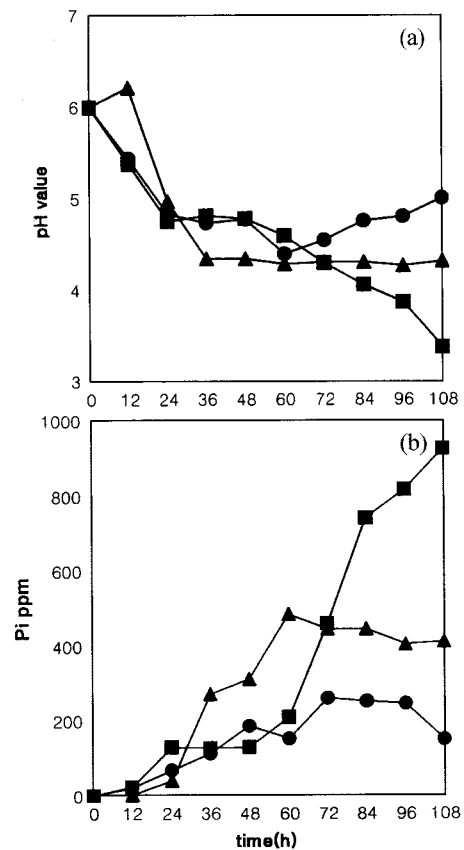


Fig. 2. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Aeromonas hydrophila* DA57 at various concentration of glucose in medium with time courses. *Aeromonas hydrophila* DA57 was cultured in glucose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate at 26°C. ● : glucose 1%; ■ : glucose 3%; ▲ : glucose 5%. (a) pH value (b) free phosphate concentration.

까지의 저하와 더 높은 인산가용화능이 나타났다. 그러나, 같은 조건과 같은 시간대의 인산가용화능을 비교하면, *A. hydrophila* DA57의 인산가용화능은 30°C일 때 우수하였다. 배지 조성의 차이에 따른 인산가용화능의 효과는 glucose가 3% 함유된 최소배지에서 더욱더 높은 효과를 나타내어 유리인산의 방출량이 108시간에 930 ppm으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 배양시간 60시간에 Kim 등이²¹⁾ 난용성 인산염 우수균으로 분리한 *Rhanella aquatilis*가 hydroxy apatite를 가용화하는 능력보다 2배 정도 우수한 것으로 나타났다. Fig. 3은 초기 배양 pH가 5.0, 6.0 및 7.0의 다른 조건에서 배양한 *A. hydrophila* DA57이 나타내는 인산가용화능에 대한 정량적 분석 결과이다. 이 균주는 초기 배양 pH가 5.0일 때 배양 72시간에 4.8로의 pH 저하와 최대의 유리인산을 방출하였다. 초기 배양 pH가 6.0일 때는 배양 72시간에 4.62의 pH 저하와 최대 유리인산을 방출하였다. 초기 배양 pH가 7.0일 때 배양 36시간에서 72시간까지 pH 저하와 유리인산 방출량이 일정하였다. 모든 처리구에서 배양 72시간 이후는 pH 저하와 최대 유리인산의 방출량은 영향이 없었다. 이 결과에 따라 *A. hydrophila* DA57은 배양시 초기 pH에는 큰 영향을 받지 않으며, 특히 초기 배양 pH가 5.0일 때 인산가용화능이 우수하였다.

난용성 인산염 종류별 인산가용화 특성. *A. hydrophila*

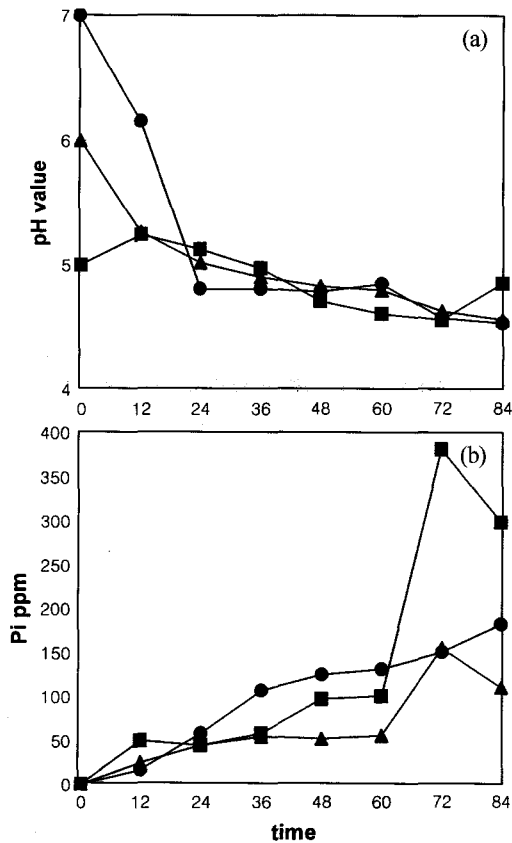


Fig. 3. Changes of free phosphate concentrations and changes of pH values during the cultivation of *Aeromonas hydrophila* DA57 at various initial pHs with time courses. *Aeromonas hydrophila* DA57 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate at 26°C. ● : initial pH 7.0; ▲ : initial pH 6.0; ■ : initial pH 5.0. (a) pH value (b) free phosphate concentration.

DA57의 tri-calcium phosphate, hydroxyapatite, aluminium phosphate 등의 다양한 난용성 인산염 기질에 대한 인산 가용화를 포장온도에 근접한 26°C 처리구에서 비교조사하여 Fig. 4에 나타냈다. 그 결과, tri-calcium phosphate를 기질로 사용했을 때, 배양 72시간에 4.62의 pH 저하로 최대 154.2 ppm의 유리인산을 방출하였으며, hydroxy apatite를 기질로 사용했을 때, 4.71로의 pH 저하와 최대 비교적 높은 유리인산을 방출하였다. 반면에 aluminium phosphate의 경우, 3.8로의 급격한 pH 저하를 보였으나, 유리인산생성이 거의 13 ppm 정도로 인산가용화능이 매우 낮았다.

A. hydrophila DA57의 유기산 생성. 지금까지 난용성 인산염의 가용화 기작은 정확하게 알려져 있지 않다. Periplasm에서 pyrroloquinoline quinone(PQQ)을 생성하는 유전자 family에 의하여 유기산 생성이 증가된다는 것이 알려져 있고 이것이 난용성 인산염의 가용화에 관여한다는 것이 알려져 있다.²²⁻²⁴⁾ Fig. 1, 2, 3, 4의 결과에서 유리인산의 방출량이 증가함에 따라 pH 저하가 나타나는데, 이는 유기산 생성에 의한 결과라고 추정되어진다. 이미 밝혀진 유기산에는 gluconic acid, citric acid 등으로 알려져 있으며, 이 중 GDH에 의한 gluconic acid의 생성 및 2-ketogluconic acid의 생성이 난용성 인산염의 가용화와 밀접한 관계를 가지고 있다고 밝혀져 있다.²²⁾ 이에 분리 균주

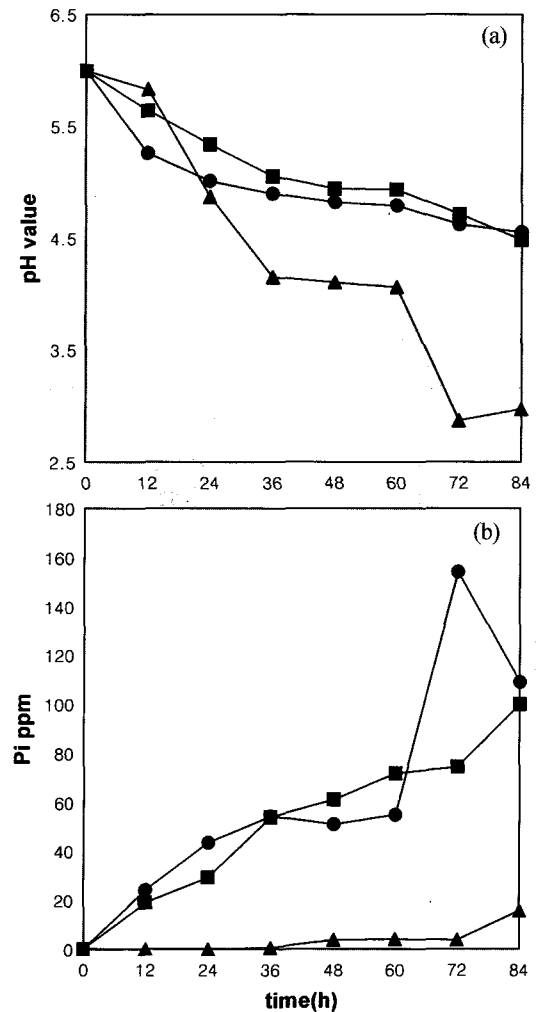


Fig. 4. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Aeromonas hydrophila* DA57 at various insoluble phosphate with time courses. *Aeromonas hydrophila* DA57 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% insoluble phosphate at 26°C. ● : tri-calcium phosphate; ▲ : aluminium phosphate; ■ : hydroxyapatite. (a) pH value (b) free phosphate concentration.

A. hydrophila DA57을 0.5% 난용성 인산염이 첨가된 배지에서 배양한 배양액속의 gluconic acid의 생성 유무를 경시적으로 측정된 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 배양액 속의 gluconic acid는 반응액 속의 glucose dehydrogenase를 이용하여 DCIP가 감소되는 양으로서 측정하였다. 분리균주는 glucose 최소 배지에서 배양 2일째 4 mM의 gluconic acid를 생성하였으며, 3일째 경과시에는 약간 감소하는 경향을 보였다. 한편, 대조군으로서 사용한 *E. coli* JM109의 배양액에서는 gluconic acid가 검출되지 않았다. 이 결과는 *E. herbicola* EH010의 균주에서 생성된 8.65 mM의 gluconic acid 생성량과 비슷한 결과를 나타낸 것이다.²⁵⁾

Plasmid DNA의 분리. 세균이 보유하는 각종 plasmid는 독소의 생성, 항생제 내성 및 각종 물질의 분해에 관여하는 기능을 가진 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 분리균주에서도 plasmid DNA의 존재 여부 및 존재할 경우 인산가용화에 관여하는 기능이 있는지 밝혀보고자 *A. hydrophila* DA57로부터 미

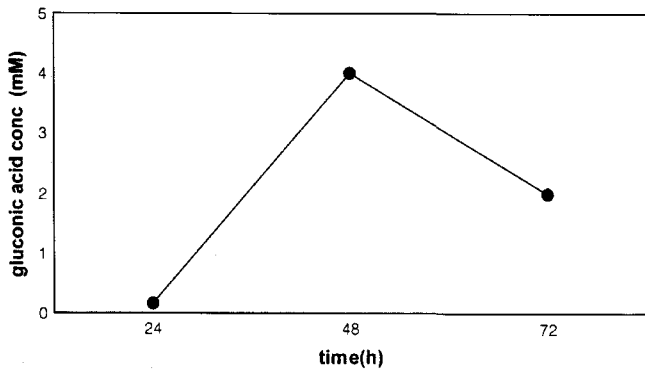


Fig. 5. Gluconic acid production by *Aeromonas hydrophila* DA57. *Aeromonas hydrophila* DA57 was grown in glucose minimal medium containing 21 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8.

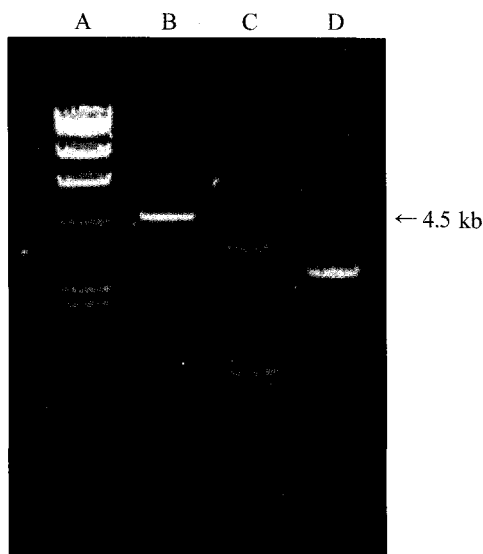


Fig. 6. Cryptic plasmid of *Aeromonas hydrophila* DA 57. Isolation of the plasmid DNA from *Aeromonas hydrophila* DA57 was performed by the method of Wizard mini prep kit of Promega Biotech. A: λ -Hind III; B: digestion of BamH I; C: digestion of Kpn I; D: untreated plasmid.

지의 plasmid DNA를 분리하였다(Fig. 6). BamH I으로 처리한 결과, 단일 band로서 약 4.5 kb의 크기를 나타내었으며, Kpn I으로 처리한 결과 약 1 kb와 3.5 kb 크기를 보여 이 plasmid DNA의 크기는 4.5 kb임을 알 수 있었다. 그러나 인산가용화능과의 관계 및 기능은 미해명된 상태이다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교 교내 연구비(2001년도) 및 경상남도 생명공학 연구비(2001년도)가 일부 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Alexander, M. (1977) In *introduction to soil microbiology*. Wiley, New York.

2. Paul, E. A. and Clark, F. E. (1989) In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, New York, USA.
3. Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1992) In *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
4. Azcon, R., Barea, J. M. and Hayman, D. S. (1976) Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil. Biol. Biochem.* **8**, 135-138.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Agasimani, C., Mudlagiriappa, A. and Sreenivasa, M. N. (1994) Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms. *Groundnut News.* **6**, 5-11.
9. Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. (1995) Solubilization of hardly-soluble AlPO_4 with P-solubilizing microorganisms. *Soil. Biol. Biochem.* **27**, 265-270.
10. 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.
11. Illmer, P. and Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphate-solubilization mechanisms. *Soil. Biol. Biochem.* **27**, 257-263.
12. 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 National University Journal* **17**, 45-50.
13. 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.
14. Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1995) Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Ind. J. Exp. Biol.* **33**, 91-93.
15. 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.
16. Kang, S. C. and Choi, M. C. (1999) Solid Culture of Phosphate-solubilizing Fungus, *Penicillium* sp. PS-113. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1-7.
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. *F. Korean Soc. Soil. Sci. Fert.* **28**, 278-286.
18. Uo, Z. K., Kim, H. O. and Lee, S. C. (1985) Improvement of rock phosphate utilization efficiency-Distribution of V.A. mycorrhizae on Cheju island, and isolation and cultivation of rock phosphate solubilizing fungi. *Cheju National University Journal* **20**, 81-92.

19. Matsushita, K., Arents, J. C., Bader, R., Yamada, M., Adachi, O. and Potna, P. W. (1997) *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone(PQQ). *Microbiology* **143**, 3149-3156.
20. Matsushita, K., Shinagawa, E. and Ameyama, M. (1982) D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**, 187-193.
21. Kim, K. Y., Jordan, D. and Krishnan, H. B. (1998) Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Letters* **159**, 121-127.
22. Goldstein, A., Rogers, R. D. and Mead, G. (1993) Separating phosphate from ores via bioprocessing. *BioTechnology* **11**, 1250-1254.
23. Ameyama, M., Matsushita, K., Ohno, Y., Shinagawa, E. and Adachi, O. (1981) D-glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* solubilization, purification, and characterization. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 851-861.
24. Duine, J. A. (1991) Quinoproteins : enzymes containing the quinoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur. J. Biochem.* **200**, 271-284.
25. Liu, S. T., Lee, L. Y., Tai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. M., Rogers, R. and Goldstein, A. H. (1992) Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* **174**, 5814-5819.

Isolation and Cultural Characteristics of a Phosphate-Solubilizing Bacterium, *Aeromonas hydrophila* DA57

Ok-Ryul Song, Seung-Jin Lee, Se-Hoon Kim, Soo-Yeol Chung¹, In-Ho Cha² and Yong-Lark Choi* (*Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University; ¹Dept. of Food Science, Dongju College; ²Institute of Health & Environment, Busan 614-103, Korea*)

Abstract: To develop biofertilizer solubilizing inorganic phosphate, a bacterium having high abilities to solubilize inorganic phosphate were isolated from cultivated soils. The strain was identified to *Aeromonas hydrophila* DA57, based on the physiological and biochemical properties. The optimum temperature and initial pH to solubilize insoluble phosphate in sucrose minimal medium were 30°C and pH 7.0, respectively. In these conditions phosphate solubilizing activities of the strain against three types of insoluble phosphate were quantitatively determined. It was possible to distinguish between solubilization through release of gluconic acid and still unknown mechanism. *Aeromonas hydrophila* DA57 harbored a 4.5 kb cryptic plasmid.

Key words: insoluble phosphate, solubilizing, free phosphate, *Aeromonas* sp., gluconic acid

*Corresponding author