

## 아미노산액 처리에 의한 인산가용화균주의 생육 및 가용화 효과

이진우 · 정연주 · 최시림 · 김재훈 · 유주순 · 김영길<sup>1</sup> · 최용락\*

동아대학교 응용생명공학부, <sup>1</sup>동아대학교 식품과학부

Received April 23, 2004 / Accepted May 19, 2004

**Effect of Amino Acid Solution for Cell Growth and MPS Activity of Mineral Phosphate Microorganisms.**  
Jin-Woo Lee, Youn-Ju Jung, Si-Lim Choi, Jae-Hoon Kim, Ju-Soon Yoo, Young-Gil Kim<sup>1</sup> and Yong-Lark Choi\*.  
Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>1</sup>Faculty of Food Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea – Phosphate-solubilizing activities of the two strains (*Burkholderia* sp. DA23 and *Klebsiella* sp. DA71-1) against tri-calcium phosphate and hydroxyapatite were quantitatively determined. Two strains were found to solubilize two types of insoluble phosphate different amounts of amino acid solutions in liquid culture. MPS ability of the strains was increased with concentration of amino acid addition. The optimal solubilization condition of insoluble phosphate in sucrose minimal medium were 0.1% amino acid solution, respectively. The efficiency of amino acid addition was no difference between the two types of insoluble phosphate, tri-calcium phosphate and hydroxyapatite.

**Key words** – MPS, amino acid solution, *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp.

최근 작물 재배 시 퇴비 사용 감소와 화학비료 과다 사용 및 농약의 오남용 등으로 미생물상의 감소와 토양 환경오염 및 특수성분 과부족에 의해 토양이 척박해지고 완충력과 물리성이 나빠지고 있다. 특히 시설(하우스) 재배지의 연작에 의한 염류 집적으로 인한 작물 생육장애와 병해 다발생, 생산성 감소 및 품질저하 등 토양 환경이 날로 악화되고 있다 [11]. 토양중에 비료성분이 적정 수준을 초과하고 있고, 그 성분들이 자연환경에 유출되어 하천과 호수를 오염시키고 있으며, 또한 비료 사용량 증가로 토양중 인산, 칼리 함량 증가로 인해 양분의 불균형을 초래하고 있다[4,5]. 앞으로 우리가 지향해야 할 농업은 환경친화적이고 부가가치가 높은 무공해 농산물을 생산하는 영농시스템이다. 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 인산태를 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다[1,6,8,10,12]. 앞으로 환경보전을 위한 여러 규제들이 강화됨으로서 화학비료에 대한 사용이 제약을 받을 것이며, 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해줄 수 있는 biofertilizer의 개발이 시급히 해결해야 할 과제가 될 것이다[2,3,7,9,13,14,15]. 식물이나 미생물의 경우 자신이 필요로 하는 아미노산을 모두 합성할 수 있기 때문에 필수, 비필수 아미노산의 구별은 없으며, 아미노산의 공급은 식물에 대한 아미노산의 작용 외에도 토양미생물의 영양원으로 작용하여 미생물의 증식을 활발하게 하여 식물의 뿌리활

력과 토양 부식의 기본이 된다. 또한 토양부식은 보수력을 향상시키고, 각종 영양원을 고정화하여 토양의 생산력을 증대시키는 효과가 있다. 따라서 환경친화형 biofertilizer를 개발하기 위한 기초연구로서 인산 가용화능이 우수한 균주들, 즉 *Burkholderia* sp. 및 *Aeromonas hydrophila* 등을 분리하여 아미노산 첨가에 따른 가용화 특성을 조사하였으며, 본 연구에서는 분리한 균주 중에서 *Burkholderia* sp. DA23 및 *Klebsiella* sp. DA71-1 균주를 선택하여 토양 속에 다양한 인산염 중에서 tri-calcium phosphate 및 hydroxyapatite를 가용화시키는 배양조건과 가용화 특성을 조사하고, 또한 아미노산 첨가에 의한 인산염 가용화에 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 유용 미생물의 선별

본 연구실에서 선별해 놓은 균주들 중에서 tri-calcium phosphate와 hydroxyapatite가 함유된 sucrose minimal (SM) 고체배지(sucrose 10 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.27 g, KCl 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, Yeast extract 0.1 g, 난용성 인산염 5 g, agar 12 g/l) [3]에 접종하여 27°C, 3일간 배양하여 가장 높은 투명대(clear zone)를 형성하는 균주를 선별하였다.

#### 균주의 배양 조건 및 배지

성장 양상을 조사하기 위해 사용한 배지조성(g/l)은 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NaCl 0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, 멸균 전 pH는 7.4이며, CaCl<sub>2</sub> 1 nM, casamino acid 와 Glucose는 분리 멸균하여 최종농도가 각각 0.2%가 되도록 121°C에서 15분간 분리 멸균 후 첨가하였고 아미노산은 멸균

#### \*Corresponding author

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

E-mail : ylchoi@daunet.donga.ac.kr

후 배양액의 0.1%, 0.05%가 되도록 첨가하였다. 계대 배양된 각각의 균주를 500 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 배지에 접종하였다. 아미노산 농도별로 37°C에서 180 rpm으로 rotary에서 108시간동안 배양을 실시한 다음, 주기적으로 성장 양상을 살펴보기 위하여 배양시간에 따른 pH 값의 변화를 측정하였고, 세포 성장률은 분광광도계(Helios β, Unucan, England)를 사용하여 흡광도 600 nm에서 변화 값을 측정하였다.

**아미노산액 농도에 따른 인산가용화 특성 조사**

아미노산액에 의한 가용화 특성은 DA23과 DA71-1 균주를 사용하여 SM 액체배지 100 ml에 아미노산액을 각각 0.1%, 0.05%, 0.01%의 농도로 첨가하여 조사하였다. DA23과 DA71-1은 0.5% tri-calcium phosphate 및 0.5% hydroxyapatite가 포함된 SM배지에서 108시간동안 30°C, pH 6.0, 180 rpm으로 배양하면서 12시간 단위로 균주에 의한 pH 변화와 유리인산 생성능을 조사하였다.

**아미노산액 농도에 따른 DA23, DA71-1의 인산 가용화능의 측정**

삼각 플라스크(500 ml)에 0.5%의 인산염이 함유된 SM 액체배지 100 ml에 전배양한 균주를 접종한 후, 배양 상등액내의 유리인산 농도와 pH 변화를 12시간마다 측정하였다. 균체배양액 1 ml을 소형 원심용 튜브에 담은 후, 소형원심분리기로 실온에서 5,500 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 취하고, 여기에 멸균수를 첨가하여 총 200 ul가 되게 하였다. 여기에 phosphorus reagent 800 ul를 첨가하여 혼합한 후 20분간 50°C에서 반응시킨 다음 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 phosphorus reagent는 kit (Sigma)를 사용하였다[13].

**인산염비에 따른 인산가용화 특성 조사**

인산 가용화 균주, DA23 및 DA71-1의 인산염비에 따른 아미노산에 의한 난용성 인산염 가용화능의 차이는 tri-calcium phosphate와 hydroxyapatite 인산염을 사용하여 조사하였다. 균주에 의한 pH 변화와 유리인산 생성능은 12시간마다 변화를 측정하였으며, 이상의 배양 환경에 관한 모든 실험은 2회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험 오차를 최소화하였다.

**결과 및 고찰**

**아미노산 첨가에 따른 균주의 생육 조건**

*Burkholderia* sp. DA23과 *Klebsiella* sp. DA71-1의 아미노산 첨가에 따른 생육도를 조사하기 위하여 여러 농도의 아미노산을 첨가하여 실험을 수행하였다. 첨가하는 아미노산의 조성은 Table 1에 나타내었다. DA23 균주의 경우 0.05%와 0.1%의 아미노산 첨가 시 생육 촉진 효과는 없지만 정지상에 도

Table 1. A basis properties of matter in animality of complex Amino acid solution

Amino acids	composition and relative ratio	
	composition (%)	relative ratio (%)
Asp	2.644	10.87
Thr	1.723	7.10
Ser	3.410	14.01
Glu	3.175	13.03
Pro	1.802	7.40
Gly	2.176	8.95
Ala	1.302	5.36
Cys	0.358	1.46
Val	1.645	6.76
Met	0.343	1.40
Ile	0.577	2.38
Leu	0.694	2.86
Tyr	0.405	1.67
Phe	0.967	3.96
Lys	0.624	2.56
His	0.288	1.19
Arg	2.199	9.04
total	24.332	100.00
total nitrogen	6.80%	
pH	5.00	
solidity	more than 45%	

달하는 cell density를 높이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). DA71-1 균주의 경우는 아미노산이 존재할 경우 생육이 지연

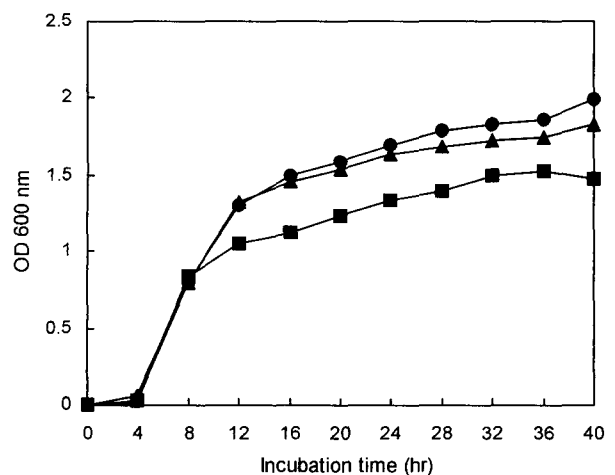


Fig. 1. Effect by addition of insoluble phosphate and concentrations of various amino acid solution in cultural broth of *Burkholderia* sp. DA23 Effect of add to amino acid mixture on growth curve of *Burkholderia* sp. DA23. The strain was aerobically grown at 37°C (pH 6.0) in basal broth medium containing 0.05% and 0.1% amino acids solution for 40 hr. ●: 0.1% amino acid, ▲: 0.05% amino acid, ■: no amino acid.

되지만, 배양시간 20시간 이후 아미노산 처리구가 무처리구에 비해 cell density가 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 두가지의 생육도 실험 결과 아미노산이 인산가용화 균주의 세포밀도 성장에 도움이 되는 것을 확인할 수 있었다.

**아미노산을 첨가한 DA23 균주의 난용성 인산염비에 따른 인산 가용화 특성**

*Burkholderia* sp. DA23 균주의 아미노산 첨가에 따른 인산 가용화 특성을 조사하기 위해 난용성 인산염의 차이에 따라 실험하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.5% tri-calcium phosphate가 포함된 SM배지에서 농도별 아미노산 첨가에 따른 인산 가용화능의 정량적 분석 결과, 0.1%의 아미노산 첨가 시 가장 높은 유리 인산을 방출하였으며, 84시간 배양 하였을 때 500 ppm 이상의 인산 가용화능을 보였다. 모든 아미노산 첨가 처리구에서 아미노산을 첨가하지 않은 처리구 보다 높은 인산 가용화능을 보였으며, 0.1% 아미노산 첨가 처리구의 경우는 아미노산을 첨가하지 않은 처리구에 비해 배양시간 60시간~84시간 배양시 2배 정도 높은 인산 가용화능을 보였다. 이러한 경향은 아미노산 첨가가 균주의 인산 가용화능에 효과가 있다는 것을 보여주는 증거이며, 배양시간이 증가할수록 아미노산을 첨가한 처리구는 아미노산 무처리구에 비해 인산가용화능이 오래 지속됨을 보여주었다. 모든 처리구의 경우 배양 1일후부터 배양액의 pH가 급격히 감소하였으며, 0.1% 아미노산을 첨가하여 84시간 배양하였을 때 pH는 3.9까지 떨어졌으며 더 높은 인산가용화능을 보였다. 0.5% hydroxyapatite가 포함된 SM 배지에서 DA23 균주

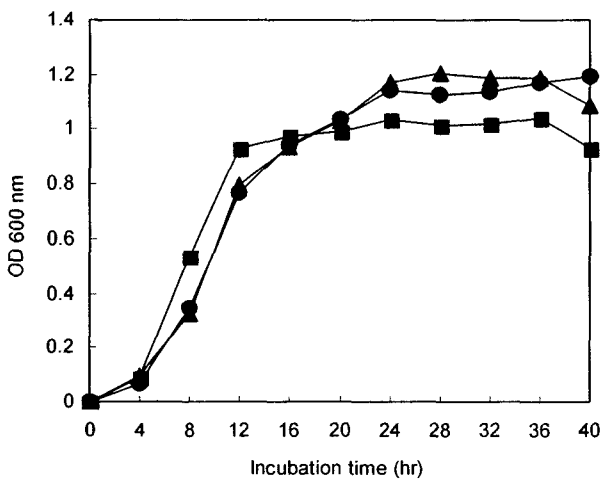


Fig. 2. Effect of add to amino acid mixture on growth curve of *Klebsiella* sp. DA71-1.

The bacterial strain was aerobically grown at 37°C (pH 6.0) in basal broth medium (pH 6.0) containing 0.05% and 0.1% amino acids solution for 40 hr, respectively. ●: 0.1% amino acid, ▲: 0.05% amino acid, ■: no amino acid.

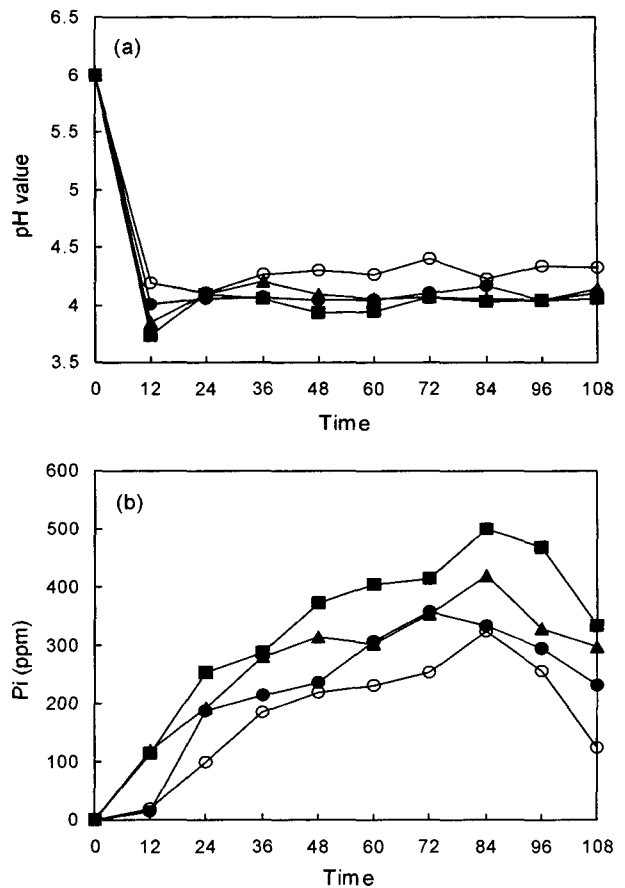


Fig. 3. Solubilization activity of tri-calcium phosphate and changes of pH values during the cultivation of *Burkholderia* sp. DA23 various concentration amino acid solution with time course. *Burkholderia* sp. DA23 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate. ○: no amino acid, ●: 0.01% amino acid, ▲: 0.05% amino acid, ■: 0.1% amino acid. (a) pH value, (b) free phosphate concentration.

의 아미노산 첨가 처리구의 인산 가용화능에 대한 정량적 분석결과(Fig. 4), tri-calcium phosphate를 기질로 사용하였을 때와 마찬가지로 hydroxyapatite가 포함된 SM 배지에서도 0.1% 아미노산 첨가시 가장 높은 인산 가용화능을 나타냈으며, 무처리구의 경우보다 모든 아미노산 첨가의 처리구가 높은 유리인산 방출량을 나타내었다. DA23 균주의 hydroxyapatite 보다는 tri-calcium phosphate를 더 잘 분해하는 특성 때문에 전체적인 인산 방출량은 tri-calcium phosphate를 첨가한 배지보다는 hydroxyapatite를 첨가한 배지가 낮았고, 아미노산 처리구와 무처리구 간의 인산 방출량의 차이도 tri-calcium phosphate를 첨가한 배지보다 약간 작았다. 아미노산을 0.1% 첨가한 처리구에서 배양 72시간후 pH는 3.8로 감소하였고 유리인산은 380 ppm을 방출 하였으며, 0.05% 아미노산 첨가의 경우 pH는 4.2, 유리인산은 높은 수준으로 방출하였다. 반

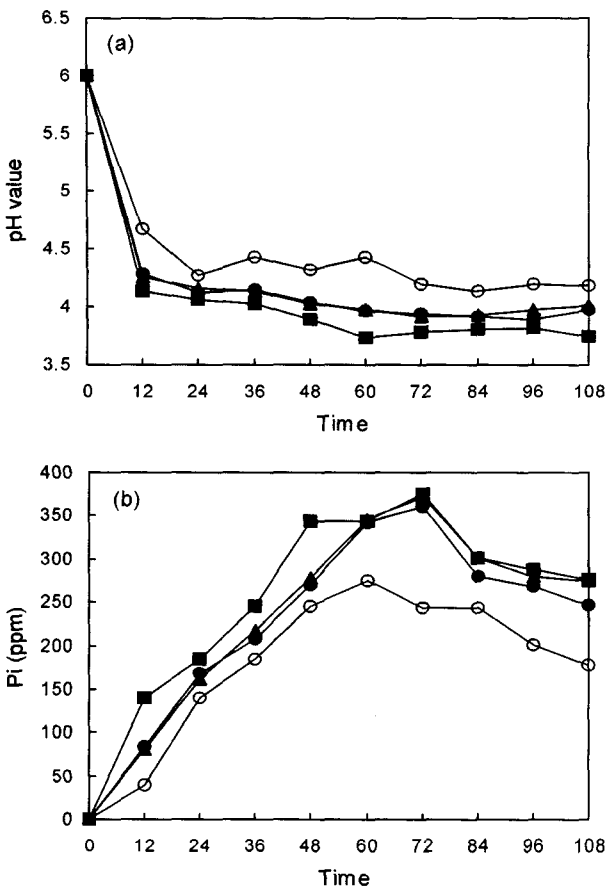


Fig. 4. Solubilization activity of hydroxyapatite and changes of pH values during the cultivation of *Burkholderia* sp. DA23 various concentration amino acid solution with time courses. *Burkholderia* sp. DA23 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% hydroxyapatite. ○: no amino acid, ●: 0.01% amino acid, ▲: 0.05% amino acid, ■: 0.1% amino acid. (a) pH value, (b) free phosphate concentration.

권에 아미노산 무처리의 경우, pH는 4.4로 감소하였고 유리 인산생성이 250 ppm 정도로 아미노산을 첨가한 처리구에 비해 인산가용화능이 낮았다.

**아미노산을 첨가한 DA71-1 균주의 난용성 인산염 종류별 에 따른 인산가용화 특성**

*Klebsiella* sp. DA71-1 균주의 아미노산 첨가에 따른 tri-calcium phosphate 및 hydroxyapatite의 난용성 인산염 기질에 대한 인산 가용화능을 비교 조사한 결과(Fig. 5), tri-calcium phosphate를 기질로 사용했을 때, 0.1%의 아미노산 처리구의 경우 pH는 4.2 정도로 저하되었고 최대 370 ppm의 유리인산을 방출하였다. 이것은 무처리구에 비해 2배 이상 높은 인산 방출량으로 아미노산을 첨가한 실험중에서 가장 큰 인산가용화 편차를 보여주었다. 아미노산 농도 0.05%와 0.01%를 첨가한 처리구에서 pH는 각각 4.5와 4.6으로 저하되

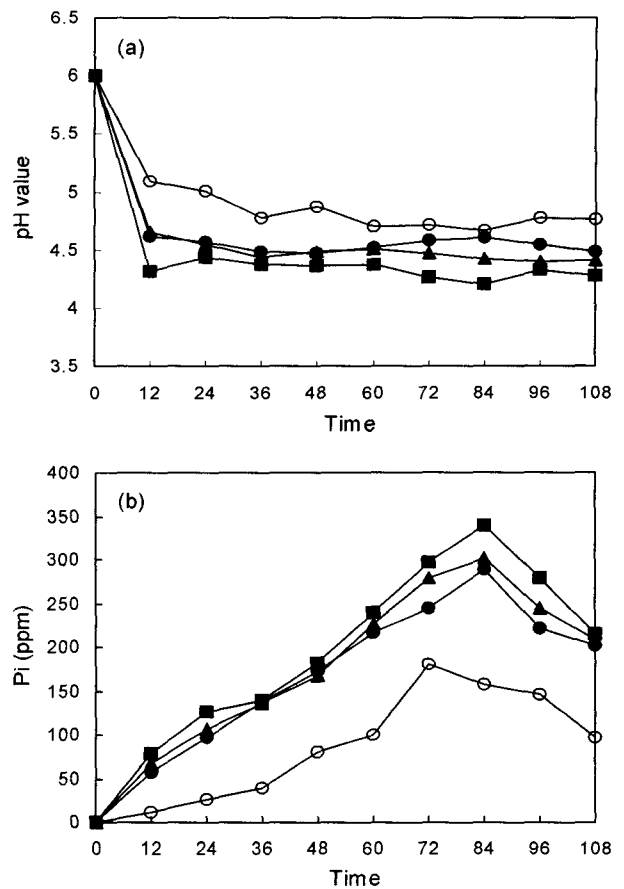


Fig. 5. Solubilization activity of tri-calcium phosphate and pH values during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 with various concentration amino acid solution with time courses. *Klebsiella* sp. DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% tri-calcium phosphate. ○: no amino acid, ●: 0.01% amino acid, ▲: 0.05% amino acid, ■: 0.1% amino acid. (a) pH value, (b) free phosphate concentration.

었으며, 인산 가용화 방출은 270 ppm 및 260 ppm 으로 나타났으며, 무처리구에 비해 훨씬 높은 인산 가용화능을 보였다. 이것은 아주 적은 농도에서라도 아미노산의 첨가가 인산 가용화능에 도움이 되는 것을 보여주었으며, 이 균주를 산업적으로 이용하기 위한 대량배양시 적은 양의 아미노산 첨가에 의해 높은 인산 가용화능을 유지할 수 있을 것으로 사료된다. hydroxyapatite를 기질로 사용하여, 0.1% 아미노산 첨가 시 pH는 4.1로 감소하였고, 최대 380 ppm의 유리인산을 방출하였다. 아미노산 농도 0.05% 및 0.01%의 아미노산 첨가의 경우 pH가 4.12와 4.2로 감소하였으며, 인산 가용화능은 tri-calcium phosphate에서 보다 높은 360 ppm과 300 ppm으로 나타났다. 이런 결과는 DA71-1균주의 경우 tri-calcium phosphate보다 hydroxyapatite 가용화의 경우 적은 농도의 아미노산으로도 많은 유리 인산 방출량을 나타냈으며 이러한 결

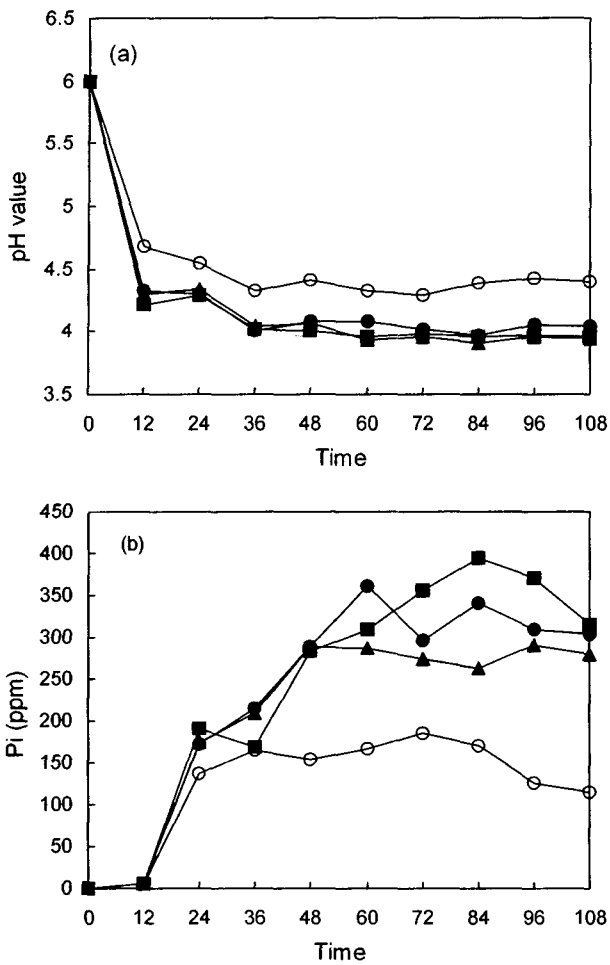


Fig. 6. Solubilization activity of hydroxyapatite and pH values during the cultivation of *Klebsiella* sp. DA71-1 with various concentration amino acid solution with time courses. *Klebsiella* sp. DA71-1 was cultured in sucrose minimal medium containing 0.5% hydroxyapatite. ○: no amino acid, ●: 0.01% amino acid, ▲: 0.05% amino acid, ■: 0.1% amino acid. (a) pH value, (b) free phosphate concentration.

과는 tri-calcium phosphate보다 hydroxyapatite를 더 잘 분해하는 DA71-1의 배양학적 특성하고도 잘 부합된다. 따라서 아미노산의 첨가는 인산 가용화 균주의 인산염 분해에 도움을 주는 역할을 할 뿐만 아니라 가용화가 오래 지속 될 수 있도록 균주의 생육에도 도움을 주는 것으로 본 실험을 통해 보여 주었다.

**아미노산 첨가의 배양학적 특성에 따른 인산 가용화 특성**

Fig. 7은 DA23균주의 아미노산 첨가에 따른 인산 가용화 효과를 무첨가 처리를 기준으로 한 효과를 %로 나타내어 보여준 결과이다. DA23균주의 경우 아미노산의 농도가 증가할수록 인산가용화 또한 높게 일어나는 것을 보여주고 있으며, tri-calcium phosphate를 기질로 하였을 때가 hydroxyapatite

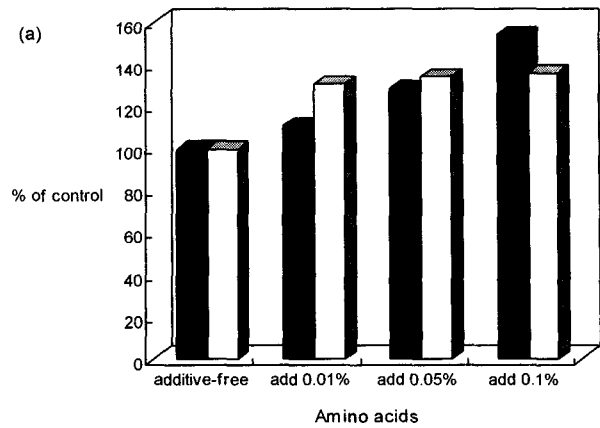


Fig. 7. Effect by addition of insoluble phosphate and concentrations of various amino acid solution in cultural broth of *Burkholderia* sp. DA23. ■: Tri-calcium phosphate, □: Hydroxyapatite.

를 기질로 하였을 때 보다 아미노산 농도에 따른 가용화의 효과가 있음을 보여주고 있다. Hydroxyapatite를 기질로 하였을 경우 낮은 농도에도 불구하고 아미노산 무처리와의 유리 인산 방출량보다 훨씬 높은 인산가용화의 효과를 보여주지만 농도에 독립적인 효과를 보였다. 그러나 tri-calcium phosphate는 농도에 의존적으로 가용화를 보이고 있다. Fig. 8은 DA71-1균주의 아미노산 첨가에 따른 인산 가용화 효과를 무첨가 처리를 기준으로 한 효과를 %로 나타내어 보여준 결과이다. DA71-1균주의 경우 DA23균주와 마찬가지로 아미노산의 농도가 커질수록 인산가용화의 효과 또한 아미노산 무처리에 비해 훨씬 높게 나타나고 있으며 DA23균주와는 반대로 hydroxyapatite를 기질로 하였을 때가 tri-calcium phosphate를 기질로 하였을 때 보다 농도에 따른 가용화의 효과가 있음을 보여주고 있다. 하지만 전체적인 아미노산 처리의 효과는

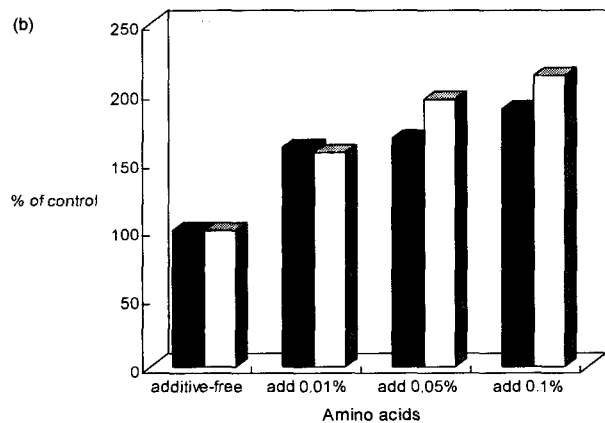


Fig. 8. Effect by addition of insoluble phosphate and concentrations of various amino acid solution in cultural broth of *Klebsiella* sp. DA71-1. ■: Tri-calcium phosphate, □: Hydroxyapatite.

DA71-1균주가 DA23균주보다 뛰어났으며 hydroxyapatite를 기질로 했을 경우 0.1%의 아미노산 첨가는 무처리에 비해 2배 이상 높은 인산 가용화 효과를 보여주고 있다.

## 요 약

인산가용화능이 우수한 균주인 *Burkholderia* sp. DA23과 *Klebsiella* sp. DA71-1 두 균주를 사용하여 농도별 아미노산 첨가에 따른 성장 양상과 유리인산 방출량을 조사한 결과, 두 균주의 생육과 인산가용화에 있어 아미노산이 도움이 되는 것으로 나타났다. DA23과 DA71-1 모두 0.05%와 0.1%의 아미노산을 SM배지에 첨가하여 성장 양상을 확인한 결과 아미노산을 첨가한 배지의 균주가 아미노산을 처리하지 않은 배지의 균주에 비해 높은 세포 밀도 성장을 보여주었다. 인산가용화 균주의 아미노산 첨가의 경우 무처리보다 높은 pH 저하를 보였으며, 또한 아미노산 첨가가 아미노산 무처리구에 비해 2배이상 높은 인산가용화 효과를 보였다. DA71-1의 아미노산 첨가의 경우는 DA23의 아미노산 첨가보다 아미노산 첨가에 의한 인산가용화 효과가 더 있는 것으로 나타났다. hydroxyapatite 와 tri-calcium phosphate 의 인산염 차이에 따른 아미노산 처리 효과는 없었으며, 0.05%의 미량의 농도에서도 인산가용화로의 세포밀도 성장 및 가용화능에 효과를 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 동아대학교의 공모과제 연구비의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이진우 연구조원은 2003년도 Brain Busan 21 사업연구 장학금을 지원 받았습니다.

## 참 고 문 헌

- Asea, P. E. A., R. M. N. Kucey and J. W. B. Stewart 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 459-464
- Berthelin, J., C. Leyval, F. Laheurte and P. De-Giudici. 1991. Involvements of roots and rhizosphere microflora in the chemical weathering of soil minerals. In *Plant Root Growth; an Ecological Perspective* (D. Atkinson, ed.). Special Publication series of the British Ecological Society, No. 10. Blackwell Scientific, Oxford.
- 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.
- Goldstein, A. G. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates : historical perspectives and future prospects. *Am. J. Alt. Agric.* **1**, 51-57.
- Goldstein, A. H. and S. T. Lin, 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Ewinia herbicola*. *BIO/TECH.* **5**, 72-74.
- 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.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* **24**, 389-395.
- 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.
- Kim, H. O., Z. K. Vo, 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
- Mishustin, E. N. and A. N. Naumova. 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. *Microbiology* **31**, 442-452.
- Paul, E. A. and F. E. Clark. 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, New York, U. S. A.
- 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 mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil. Biol. Biochem.* **8**, 135-138.
- 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.
- 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
- Yadav, K. S. and K. R. Dadarwal. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. *Jodhpur, India. Scientific Publishers*, 293-308.