

호안나대지 식생복원을 위한 *Bacillus subtilis* 분리균주의 식물생장 촉진능

김경미 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 생명과학과

Plant Growth Promotion by Isolated Strain of *Bacillus subtilis* for Revegetation of Barren Lakeside Area

Kyung-Mi Kim and Hong-Gyu Song*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received March 2, 2010/Accepted March 15, 2010)

Rhizobacterial strain isolated from barren soil, *Bacillus subtilis* RFO41 exhibits a high level of phosphate solubilizing activity and produces some phytohormones. Its promoting effect on the growth of *Xanthium italicum* Moore, a wild plant growing at lakeside barren land and thus a good candidate plant for revegetation of barren lakeside was evaluated in the *in situ* test for 19 weeks at Lake Paro, Kangwon-do. Strain RFO41 could enhance the dry weight of *X. italicum* by 67.7%. It also increased the shoot length of *X. italicum* plant by 21.1% compared to that of uninoculated control. Both growth enhancements had statistical significance. However, the inoculation did not show any effect on the root growth, which might be due to the breakage of tiny root. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis showed that the inoculated bacteria were maintained in the soils, and the indigenous bacterial community did not exhibit any significant change. This plant growth promoting capability may be utilized as an environment-friendly and low cost revegetation method, especially for the sensitive areas such as barren lakeside lands.

Keywords: *B. subtilis*, DGGE, plant growth promotion, revegetation

우리나라의 경우 강우가 연중 고르지 않기 때문에 수자원 공급을 위해 여러 가지 형태의 인공호가 많이 조성되어 있다. 이중 대형 댐으로 인해 형성된 큰 호수들은 대부분 하천 상류의 가파른 산간에 위치하고 있고 폭우와 가뭄으로 인하여 호수의 수위 변동이 심하고, 특히 갈수기나 인위적인 대규모 방류 시에는 수위 저하로 인해 넓은 호안나대지가 형성된다. 이렇게 형성된 나대지는 강우 시에 경사지의 붕괴 및 침식이 우려되며, 경사가 가파른 상류지역에서 토사가 흘러 내려와 어패류의 서식처를 파괴하고 생장과 증식에도 악영향을 미쳐 호소 생태계를 크게 훼손시키고 있다. 따라서 이런 나대지의 식생을 복원하는 일은 매우 시급한 일이다. 나대지 식생복원에는 여러 가지 방법이 있을 수 있으나 토양 및 기후 조건으로 인해 식물의 생장이 근본적으로 어렵거나 경우에 따라서는 경사지에의 접근이 어렵거나 식재된 식생들의 유지가 매우 어려울 수 있기 때문에 보다 저비용의 손쉬운 방법이 필요하다. 그런 방법으로

미생물을 이용한 방법을 사용할 수 있으며 이를 위해 식물생장 촉진능을 가진 미생물제의 개발을 위한 노력이 점차 증가하고 있다(7, 13, 16).

식물생장촉진 미생물로는 근권세균이 대표적인데 이들이 다양한 식물생장촉진 기작을 갖고 있기 때문이다(8). 근권세균은 식물 뿌리둘레의 2-3 mm 범위에 사는 세균으로서 이것들의 식물생장 촉진기작은 phytohormone (auxin, cytokinin, gibberellin) 생성(6, 11, 12)과 불용성 인의 용해(15, 20) 등 영양물질이나 호르몬의 공급, 항생물질 분비에 의한 식물병원균에 대한 저항(5) 등 여러 가지가 알려져 있다. 본 연구팀이 이전에 분리했던 근권세균인 *Bacillus subtilis* RFO41은 불용성 인산을 효과적으로 가용화시킬 수 있으며 여러 가지 식물호르몬을 생성할 수 있다(1). 또한 식물병원성 곰팡이인 *Fusarium oxysporum*의 생장을 효과적으로 억제하고 항진균성 물질인 siderophore 생성능과 β -1,3-glucanase의 활성이 우수하였으며(2), 이런 식물생장 촉진능은 토마토의 생장촉진으로 증명된 바 있다(1). 한편 미생물을 환경에 적용하였을 때 처리한 미생물이 환경에서 유

* For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr; Tel: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-251-3990

지되어야 하고 또한 고유 미생물군집에 영향을 미치면 안될 것이며 따라서 접종균주와 고유 미생물군집의 변화를 모니터링 할 필요가 있다. 이러한 미생물군집 분석방법으로 많이 사용하고 있는 것은 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), terminal-restriction fragment length polymorphism 등이 있다 (14).

본 연구에서는 식물생장촉진능이 확인된 근권세균인 *B. subtilis* RFO41을 호안나대지에 적용하여 야생식물에 대한 생장촉진효과를 확인하고 접종균주의 생존과 미생물군집에 미치는 영향을 DGGE 분석을 통해 조사하여 친환경적인 미생물제제로서의 가치와 식생복원방법으로서의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

호안나대지 현장실험

식물호르몬 생성성을 가지며 불용성 인산의 가용화능이 우수한 균주인 *B. subtilis* RFO41 (GenBank accession no. AY364963)을 대상으로 호안나대지 식생복원을 위한 현장실험을 2009년 3월 28일부터 실시하였다. 연구 지역은 강원도 화천군 구만리에 위치한 파로호 호반으로 이곳에 실험구역(1 m × 1 m)을 접종균과 미접종 대조군을 각각 연이어 3개씩 설치하였다. 호안나대지 식생복원을 위한 야생 식물종으로는 건조한 나대지에서 잘 자라며 침수 후에도 발아가 되는 가시도꼬마리 (*Xanthium italicum* Moore)를 선정하고 그 종자를 한 구역 당 91개 파종하였다. 균주는 최소 배지에서 72시간 동안 배양한 뒤, 원심분리(7,000×g, 30 min)하여 증류수로 두 번 세척 후 현미경과 hemocytometer를 이용하여 계수하여 구역 당 균주 접종량을 1×10^6 cells/g soil이 되도록 준비하였다. 균주를 호수에서 채취한 물 3리터에 첨가하여 현탁한 후 각 구역에 2009년 3월 28일 1차 접종을 시작으로 매주 1회 고루 살포하였으며 미접종 대조군은 동일한 호수물 3리터만을 살포하였다. 접종 및 물 살포 전후 토양을 채취하여 얼음에 채워 실험실로 운반하여 바로 미생물군집 조사를 실시하였다. 현장실험은 19주간 수행하여 2009년 8월 9일 종결하였다(Fig. 1). 실험 종결 후



Fig. 1. *X. italicum* (left site, uninoculated control; right site, inoculated site) grown in the lakeside experimental site at Lake Paro on July 8, 2009.

현장에 있는 가시도꼬마리를 뿌리째 채취하여 실험실에서 토양을 깨끗이 제거한 후 뿌리와 줄기의 길이를 측정하고 일주일 간 자연 건조하여 건조중량을 측정하였다.

통계분석

균주를 처리한 구역과 물만 처리한 구역의 가시도꼬마리 줄기와 뿌리 길이 및 건조중량의 유의성을 알아보기 위해 SYSTAT (ver. 10, SPSS Inc.) 프로그램을 이용하여 Analysis of Variance로 처리하였다. 파로호 현장에서 가져온 개체는 대조군이 158개, 실험군이 170개로 328개체를 통계분석하여 $P < 0.001$ 신뢰수준을 얻었다.

미생물 군집 조사

토양미생물 군집조사를 위해 토양과 접종 균주의 genomic DNA (g-DNA)를 추출하였다. 호안나대지 현장실험 진행 중 매주 각 구역에서 약 5 g의 토양을 채취하여 상온에서 건조하였다. 토양 시료로부터 g-DNA 추출은 Power Soil DNA Isolation kit (MOBIO, USA)에서 제시한 매뉴얼에 따라 수행하였다. 균주의 배양액으로부터 g-DNA를 추출하는 과정은 G-spin™ genomic DNA extraction for bacteria (Intron, Korea)이 제시하는 매뉴얼에 따라 수행하였다. 토양에서 추출한 g-DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. 추출한 g-DNA는 흡광도(OD_{260})를 측정하여 순도를 파악하였으며, g-DNA를 정량하여 PCR에 주형으로 사용하였다. 16S rDNA의 다양한 V3 부분을 증폭하기 위하여 16S rRNA 유전자에 상보적인 primer P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')와 F325AT (5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACACTACGGGtGGC-3')를 이용하였다. PCR은 PTC DNA Engine System (BioRad, USA)을 이용하였고, PCR을 수행한 조건은 다음과 같다. 앞서 추출한 g-DNA를 50 ng의 농도로 사용하였고 $10 \times$ Taq polymerase buffer 2 μ l, 2.5 mM dNTP 2 μ l, 10 pmol primer 각각 1 μ l, Taq polymerase (Intron, Korea) 0.2 μ l를 혼합하고 증류수를 더하여 22 μ l로 조정하였다. 94°C 5분 1 cycle, 94°C 30초/65°C 30초/72°C 1분으로 하여 이 과정을 20 cycles로 하였고 매 cycle 마다 annealing temperature가 0.1°C씩 감소하는 'touch-down' 방법을 이용하였다. 그 후, 다시 94°C 30초/55°C 30초/72°C 1분으로 하여 이 과정을 20 cycles로 반응, 최종 extension 조건은 72°C에서 3분간 반응하였다. 이렇게 얻은 PCR 산물을 이용하여 DGGE를 시행하였다.

DGGE는 Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad)를 이용하였고, 20 μ l의 PCR products를 20 μ l의 2× loading dye와 섞어 총 40 μ l의 시료를 준비하였다. DGGE에 사용할 gel은 농도 구배를 형성하기 위해 45% (40% acrylamide stock solution 35 ml, 50× TAE buffer 2 ml, formamide 18 ml, urea 18.9 g, up to 100 ml)와 60% (40% acrylamide stock solution 35 ml, 50× TAE buffer 2 ml, formamide 24 ml, urea 25.2 g, up to 100 ml)의 gel solution을 만들었다. 제조한 45% 용액과 60% 용액은 gradient maker를 통해 DGGE gel에 흘러 넣었다. Stocking gel을 만든 후, 40 μ l의 PCR products를 첨

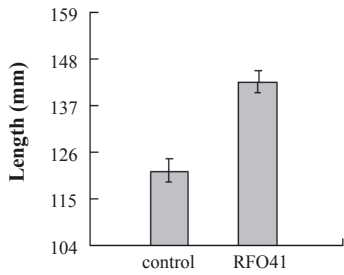


Fig. 2. Shoot lengths of *X. italicum* treated with *B. subtilis* RFO41.

가하여 DGGE의 chamber 온도를 60°C로 고정한 뒤, 20 V에서 20분 동안 시행 후, 60 V에서 22시간 동안 0.5× TAE buffer (40 mM Tris acetate; pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1 mM Na-EDTA)에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔은 ethidium bromide (0.5 mg/L)를 넣은 1× TAE buffer에서 15분간 염색한 뒤, UV transilluminator (Seoulin Scientific, Korea)를 이용하여 Gel Logic imaging system (Kodak, USA)으로 관찰, 분석하였다.

결과 및 고찰

호안나대지 현장실험

파로호 호안나대지에서 2009년 3월 28일부터 현장 실험을 시행하였는데 파종 후 기온이 상승하기 시작한 약 3주 이후부터 발아되기 시작하였다. 6월 이후부터는 눈에 띄게 접종균의 가시도꼬마리가 대조군에 비해 잎이 넓고 크게 자라는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 파로호에서 채취한 가시도꼬마리의 줄기 길이를 측정된 결과 균을 접종하지 않은 대조군의 158개체의 평균 길이는 118.0 mm인데 비해 *B. subtilis* RFO41을 처리한 실험군의 170개체의 평균 길이는 142.8 mm로 21.1% 더 길었으며(Fig. 2), 그 차이는 통계적으로 유의하였다($F=29.997$, $p<0.001$). 이 결과는 조건은 다르지만 *Phosphorobacillus latus*가 소나무류(pine)의 줄기길이 성장을 대조군에 비하여 18.4% 증가시켰다는 보고에 비하여 높은 수치이다(13). 가시도꼬마리의 뿌리 길이 성장을 측정된 결과는 미접종 대조군이 접종군에 비해 길이가 6.9 mm (0.04%) 길었지만(Fig. 3), 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($F=1.548$, $p<0.214$). 이런 결과는 자라난 가시도꼬마리의 뿌리가 가늘고 길었으며 토양에서 그

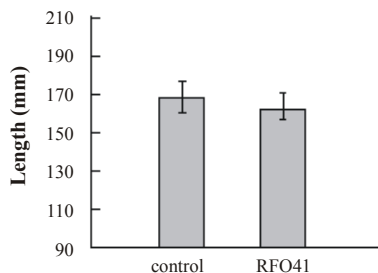


Fig. 3. Root lengths of *X. italicum* treated with *B. subtilis* RFO41.

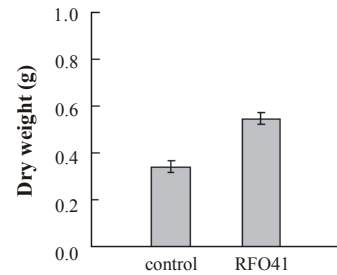


Fig. 4. Dry weight of *X. italicum* (shoot and root) treated with *B. subtilis* RFO41.

것을 채취할 때 쉽게 끊어져 균주 접종 효과의 관찰하기 어려웠던 것이 부분적인 이유인 것으로 추정된다.

가시도꼬마리의 건조중량은 대조군에 비해 접종군이 67.7% 높았다(Fig. 4). 역시 통계처리를 한 결과 그 차이는 유의성이 있는 것으로 나타났다($F=31.481$, $p<0.001$). 이 결과는 *Acidithiobacillus* sp.가 rock phosphate가 적용된 토양 내에서 콩의 건조중량을 대조군에 비하여 8.68% 증가시켰다는 보고에 비하여 높은 수치임을 알 수 있다(18). 또한 조건은 다르지만 가문비나무 종자에 *Bacillus*와 *Pseudomonas*를 각각 처리했을 때 가문비나무의 생체량이 전체적으로 약 20% 정도 증가한 것과 비교할 때 본 연구의 생장촉진 효과는 매우 높은 수준이다(17). 줄기와 뿌리의 길이생장과 건조중량을 비교했을 때 접종 시 줄기 길이가 21.1% 증가하고 뿌리 길이 측정치가 큰 차이가 없었음에도 불구하고 건조중량은 접종군이 월등히 높았는데 따라서 RFO41 균주가 가시도꼬마리 줄기의 길이생장보다 부피생장을 더욱 촉진한다고 추정할 수 있다.

2007년 동일 지역에서 73일간 진행된 현장실험에서 나대지 자생종인 싸리나무(*Kummerowia triata*), 짚신나무속 식물(*Bidens tripartita*), 뚝새풀(*Setaria viridis*), 사초(*Carex leiorhyncha*), 수수(*Panicum bisulcatum*), 우산사초(*Cyperus amuricus*), 달맞이꽃(*Oenothera erythrosepala*), 사상자(*Caucalis scabra*)에 *Pseudomonas* spp.를 접종하여 식물 생장을 비교한 결과 균주를 접종한 야생 식물의 줄기와 뿌리길이 생장이 대조군보다 50% 가까이 높았으며 건조중량은 19.7% 더 높았다(3). 동일 지역에서 실시한 두 시험의 결과를 비교하였을 때 대상 식물종이 다르지만 길이생장에 대한 효과는 RFO41이 다소 낮으나 생체량 증가에 있어 *Pseudomonas* spp. 보다 뛰어나다고 할 수 있다. 동일지역에서 채취한 토양으로 구성된 microcosm에 *Bacillus megaterium*과 *Azotobacter vinelandii*를 처리한 실험에서 야생식물의 줄기길이는 26%, 건조 중량은 67% 증가한 것(4)과 비교했을 때 줄기 길이 생장은 다소 낮고 건조 중량은 조금 높은 결과이다. 그러나 microcosm 실험은 유리온실에서 이루어졌기 때문에 수분 스트레스와 고온 및 큰 일교차 같은 외부환경에 노출된 본 연구의 현장실험 결과는 상당히 고무적인 것으로 평가될 수 있다. 더욱이 가시도꼬마리는 척박한 나대지에서 잘 자랄 뿐만 아니라 침수 후에도 생장과 발아가 가능하므로(미발표 자료) 호안나대지 식생복원에 적합한 후보 식물종이며 이러한 결과로 보아 인산가용화능이 우수하고 식물

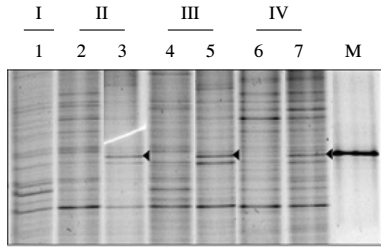


Fig. 5. DGGE profiles of the bacterial populations in the rhizosphere soil of *X. italicum* at barren lakeside area of Lake Paro treated with *B. subtilis* RFO41. (M, PCR product of 16S rDNA from *B. subtilis* RFO41; lanes: I, March 28; II, April 26 sample; III, May 30 sample; IV, July 8 sample. Lanes: 1, 2, 4 and 6, uninoculated control soil; 3, 5, 7: soil treated with *B. subtilis* RFO41)

호르몬을 생산하는 RFO41 균주가 나대지에서 식생복원을 위한 가시도꼬마리의 성장을 촉진한다고 볼 수 있다.

미생물군집 조사

DGGE를 이용하여 토양 내 미생물군집과 접종균주의 동태를 분석하였다. 현장에서 채취한 토양으로부터 추출한 미생물의 g-DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. PCR에 사용한 primer (P2, F325AT)는 universal primer로 다양한 세균의 16S rDNA를 증폭할 수 있다. 이를 이용하여 touch-down PCR을 수행한 결과, 약 200-250 bp의 PCR 산물을 얻었다. 이렇게 얻은 PCR products를 시료로 이용하여 DGGE를 시행하였다. 파로호 호안나대지에 RFO41 균주를 처리하였을 때 RFO41 균주가 유지되고 있는 것을 볼 수 있었으며 고유 세균군집에 큰 변화를 일으키지 않는 것으로 나타났다(Fig. 5). 고유 세균군집과 비교했을 때 약간의 차이는 토양과 미생물 분포의 불균일성 뿐만 아니라 균주 접종물 준비시 현탁용으로 첨가하였거나 대조군 지역에 수분보충을 위해 살포된 파로호 호수물에 존재하는 세균군집 때문일 수 있다. 이런 현상은 대조군에서 살수 전후의 세균군집의 DGGE band pattern의 차이에서 쉽게 알 수 있다 (Fig. 6). 접종 균주가 유지되는 것은 확인되었지만 시간 경과에 따라 얼마나 생존하는지 real-time PCR 등을 통해 정량할 필요가 있다.

식물상 복원에 있어 식물의 성장을 돕는 근권 미생물의 역할이 중요하다고 알려져 있다(9, 10). 식물생장촉진 근권세균은 호안나대지와 같은 민감한 불모의 땅을 녹화시키는데 좋은 방법이 될 수 있는데 환경조건이 좋지 못한 토양에서 고유 미생물의 활성이 억제될 때 그것을 접종하면 대부분 식물생장촉진 효과를 얻을 수 있기 때문이다(19). 이제까지 식물생장촉진 미생물들은 주로 경제적으로 중요한 작물이나 수목을 대상으로 하였으며 나대지 식생복원을 위한 야생식물에 대해서는 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 이런 측면에서 본 연구에서는 식물이 자라기 어려운 호안나대지의 식생 복원에 있어 친환경적으로 미생물을 이용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이를 실제로 활용할 수 있기 위해서는 가시도꼬마리 뿐만 아니라 여러 가지 나대지 자생식물을 이용하여 대규모 현장실험이 요구

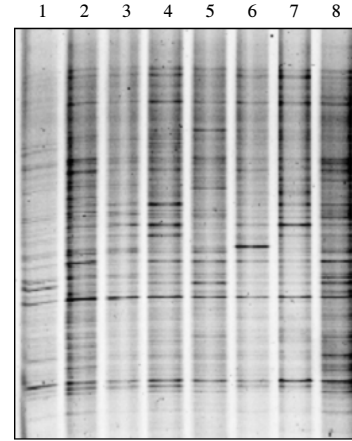


Fig. 6. DGGE profiles of the bacterial populations in the uninoculated rhizosphere soil of *X. italicum* at barren lakeside area of Lake Paro. Lanes: 1, March 28 sample; 2-3, April 26 sample; 4-5, May 30 sample; 6-7, July 8 sample; 8, August 9 sample; 2, 4 and 6, before water addition; 3, 5 and 7, after water addition.

된다.

적요

근권토양에서 분리한 세균 *Bacillus subtilis* RFO41은 인산 가용화능이 높고 auxin 등의 식물호르몬을 생산한다. 이 균주를 이용하여 가시도꼬마리(*Xanthium italicum* Moore)의 성장 촉진 실험을 화천군 파로호의 호안나대지에서 수행하였다. 19주 경과 후 자라난 가시도꼬마리를 채취하여 줄기와 뿌리 길이를 측정하고 식물을 건조시켜 중량을 측정하였다. 균주를 처리한 접종균이 미접종 대조군보다 가시도꼬마리의 건조중량이 67.7%나 높았으며 또한 가시도꼬마리의 줄기 길이도 균주를 처리한 접종균이 미접종 대조군보다 21.1% 길었는데 모두 통계적 유의성을 가졌다. 접종균주의 동태를 denaturing gradient gel electrophoresis 방법으로 조사하였는데 나대지 토양에서 접종균주가 유지되고 있으며 토양의 고유 세균군집에는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 따라서 척박한 호안나대지 토양에서 *B. subtilis* RFO41의 인산가용화능과 식물호르몬의 생성능 등의 식물생장촉진 효과가 가시도꼬마리의 성장에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있다. 이러한 식물 성장 촉진효과는 친환경적 미생물비료, 특히 민감한 호안나대지 등의 미생물학적 식생복원방법으로서의 가치를 뒷받침하는 것이라 할 수 있다.

감사의 말

본 연구는 환경부 Eco-STAR Project의 수생태복원사업 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 이강형, 송홍규. 2007. 근권에서 분리한 *Bacillus* sp.의 적용에 의한 토마토의 생장 촉진. *한국미생물학회지* 43, 279-284.
2. 이강형, 송홍규. 2008. *Phytophthora infestans*와 *Fusarium oxysporum*의 생장을 저해하는 *Bacillus* 분리 균주들의 항진균성 물질 생성능. *한국미생물학회지* 44, 258-263.
3. Ahn, T.S., J.O. Ka, G.H. Lee, and H.G. Song. 2007a. Revegetation of a lakeside barren area by the application of plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Microbiol.* 45, 171-174.
4. Ahn, T., J. Ka, G. Lee, and H. Song. 2007b. Microcosm study for revegetation of barren land with wild plants by some plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 52-57.
5. Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement, and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951-4959.
6. Costacurta, A., P. Mazzafera, and Y. Rosato. 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 215-220.
7. Domenech, J., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J.A. Lucas-García, J.J. Colon, and F.J. Gutierrez-Manero. 2004. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *For. Ecol. Manage.* 194, 293-303.
8. Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl. Soil Ecol.* 36, 184-189.
9. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109-117.
10. Johnson, D.L., D.R. Anderson, and S.P. McGrath. 2005. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 2334-2336.
11. Kaufman P.B., L.L. Wu, T.G. Brock, and D. Kim. 1995. Hormones and the orientation of growth, pp. 547-571. In P.J. Davies (ed.), *Plant Hormones*, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
12. Kende, H. and J. Zeevaart. 1997. The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell* 9, 1197-1210.
13. Lucas-García, J.A., J. Domenech, C. Santnmaria, M. Camacho, A. Daza, and F.J. Gutiérrez-Mañero. 2004. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environ. Exp. Botany* 52, 239-251.
14. Muzyer, G., C.W. Ellen, and G.U. Andre. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
15. Narsian, V. and H.H. Patel. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559-565.
16. Probanza, A., J.A. Lucas-García, M. Ruiz Palomino, B. Ramos, and F.J. Gutiérrez Mañero. 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilis* CECT 5105). *Appl. Soil Ecol.* 20, 75-84.
17. Shishido, M. and C.P. Chanway. 1998. Forest soil community responses to plant growth-promoting rhizobacteria and spruce seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 26, 179-186.
18. Stamford, N.P., P.R. Santo, C.E.S. Sntos, A.D.S. Freitas, S.H.L. Dias, and M.A. Lira, Jr. 2007. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* for yam bean grown on a Brazilian tableland acidic soil. *Bioresour. Technol.* 98, 1311-1318.
19. Strigul, N. and L. Kravchenko. 2006. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environ. Model Softw.* 21, 1158-1171.
20. Wu, S.C., Z.H. Caob, Z.G. Lib, K.C. Cheunga, and M.H. Wonga. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125, 155-166.