

동결건조 보호제와 기질이 동결건조된 *Bacillus* sp. SH1RP8의 생존율에 미치는 영향

홍선화, 심준규, 이은영*

수원대학교 환경에너지공학과

Received: July 29, 2015 / Revised: October 15, 2015 / Accepted: October 15, 2015

Effect of Substrates and Lyoprotectant on the Survival Ratio of Lyophilized *Bacillus* sp. SH1RP8

Sunhwa Hong, Jun Gyu Sim, and Eun Young Lee*

Department of Environmental and Energy Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Republic of Korea

In order to develop an eco-friendly biofertilizer, a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR), *Bacillus* sp., SH1RP8 was investigated. SH1RP8 was lyophilized via freeze-drying along with other protective agents that protect cells from lysis. The freeze-dried powder of *Bacillus* sp. SH1RP8, containing 5% skim milk (w/v), exhibited the highest survival rate of 30.6% among all the protective agents (skim milk, glucose, and peptone). The lyoprotective effect of the skim milk, mixture including 5% skim milk, and substrates on the survival of the test strain was examined. Control group was added only skim milk and test groups were added skim milk and other substrates. As a result, the group supplemented with both glycerol and 5% skim milk showed the protective effect much higher by 214.29% than the control group. Freeze-dried *Bacillus* sp. SH1RP8 could be a good candidate as a potential biofertilizer due to its effective PGPR activity.

Keywords: Lyoprotectant, freeze drying, GP plate, substrates

환경보존을 위한 친환경 농법에 대한 연구가 큰 관심을 받고 있다. 화학비료의 사용을 대체할 수 있으며, 토양에 다양한 유용물질을 제공할 수 있는 토양미생물의 탐색과 생물비료의 개발은 시급히 해결해야 할 문제이다. 친환경 농법 중에는 각종 질병으로부터 식물을 보호할 수 있는 미생물을 활용한 생물농약과 식물의 성장을 향상시킬 수 있는 근권 미생물을 활용한 생물비료의 개발이 있다[19, 21]. 이중 식물성장을 촉진시킬 수 있는 기능을 가지고 있는 다양한 근권 미생물의 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[4, 10, 12, 13, 23, 24]. 근권 미생물은 항생물질을 생산하여 토양 내의 병원균으로부터 발생하는 식물의 질병으로부터 식물을 보호하거나[3, 15], indole acetic acid(IAA)와 같은 식물성 호르몬을 합성하며, 인과 같은 미네랄을 가용화시켜 식물이 보다 쉽게 영양물질을 흡수하여 이용할 수 있게 도와준다[11]. 이

밖에도 식물성호르몬이지만 과다하게 분비될 경우 식물뿌리의 성장을 저해시키는 물질인 에틸렌의 농도를 조절하는 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) deaminase activity)를 활성화하거나 식물 성장의 필수 요소이지만 난용성 물질이어서 식물이 이용하기 어려운 철을 식물의 체내에 흡수할 수 있게 도와주는 역할(siderophore synthesis) 등을 한다[7]. 그러나 이러한 미생물들은 지속적인 계대배양으로 인해 항생물질을 포함한 다양한 유용물질의 생산력이 크게 감소되고, 장기간 안정적인 생존상태를 유지하는 것이 어렵다[1, 4, 8]. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 미생물에 적합한 제형으로 제제화 하는 기술 개발이 필수적이다. 미생물의 안정적 제제화 기술로는 크게 기능성 고분자 및 다당류로 캡슐화시키는 방법과 세포 보호제를 첨가하여 동결 건조하는 방법이 주로 이용되고 있다[2, 24, 27]. 동결 건조 시에는 온도와 수분의 손실을 최소화하기 위해 skim milk, starch와 같은 고분자 물질과 glucose, lactose와 같은 저분자 물질 등이 이용된다[27]. 보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결 조건, 건조 시간 등에 따라 다르며, 미생물의 종류에 따라서는 보호제가 생존율에 많은 영향을 미칠 수 있다[6, 25].

*Corresponding author

Tel: +82-31-220-2614, Fax: +82-31-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

본 연구에서는 동결건조 보호제 이외에 분리균주 *Bacillus* sp. SH1RP8이 빠른 속도로 이용하는 탄소원을 첨가하여 동결건조한 후 보호제와 각각의 기질이 미생물의 생존율에 미치는 영향을 평가하였다.

Bacillus sp. SH1RP8는 식물성장 촉진능이 매우 우수하며 염에 강한 내성을 가진 미생물로서 이전 연구에서 미생물 제제로서의 가능성을 평가하여 그 기능을 확인하였다[7]. 본 균주의 동결건조 시 첨가할 기질을 알아보기 위하여 Gram positive 균주용 GP2 MicroPlate(Biolog Inc., USA)를 이용하여 기질 이용성을 확인하였다. LB broth에 *Bacillus* sp. SH1RP8를 접종하여 증식기에서 정체기로 접어들도록 3일간 30°C incubator에서 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하고 멸균수를 첨가하여 배지 성분을 제거하였다. 배지 제거 과정을 2-3회 반복한 후에 초기 배양액과 같은 양의 멸균수를 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 200 rpm으로 10분간 교반한 후 GP2 plate(Biolog, USA)의 각각의 well에 150 µl씩 접종하였다. 이를 실온(약 25°C)에서 배양하면서, 4시간 간격으로 각 well의 색 변화를 595 nm 파장에서 측정하였다. 평균 발색량을 기준으로 OD가 1.00 이상인 기질을 선택하여 그 중 구입 가능하였던 9종을 동결건조용 기질로 사용하였다. 서로 다른 기질이 코팅되어 있는 GP2 plate를 활용하여 SH1RP8의 기질 이용도를 OD 값을 측정하여 평가하였다.

그 결과 SH1RP8은 plate에 있는 전체 기질을 이용했다. 그 중에서 amine 계열의 L-Alaninamide(1.06 ± 0.06)과 Putrescine(1.07 ± 0.03), Carbohydrate 계열의 Maltose(1.01 ± 0.05), Maltotriose(1.09 ± 0.17), D-Mannitol(1.51 ± 0.28), D-Ribose(1.00 ± 0.06) 그리고 Turanose(1.02 ± 0.02), Carboxylic acid 계열은 α-Hydroxy butyric Acid(1.19 ± 0.05), L-Lactic Acid(1.27 ± 0.12) 그리고 L-Malic Acid(1.10 ± 0.77), Miscellaneous 계열은 Salicin(1.09 ± 0.02)과 Pyruvic Acid Methyl Ester(1.26 ± 0.09), Miscellaneous 중 Phosphorylated chemical 계열은 D-L-α-Glycerol Phosphate(1.56 ± 0.04)과 Glycerol(1.22 ± 0.01), 그리고 Polymer 계열은 Dextrin(1.10 ± 0.11), Tween 40(2.19 ± 0.07) 그리고 Tween 80(2.02 ± 0.06)의 기질 이용성이 높았다. 특히, Polymer 계열의 Tween 40과 Tween 80의 기질 이용도가 가장 우수하였다. 반면에 Amino acid 계열의 기질은 매우 적게 이용하였다.

Othman 등[17]은 토양에서 분리된 *Bacillus* sp. strain A. rzi가 GP2 plate에 포함되어 있는 기질을 98% 이용하였다고 보고하였으며, Nowlan 등[16]은 인도의 염전에서 분리한 *Bacillus okhensis* Kh10-101와 *Bacillus krulwichiae* AM31D의 경우 GP2 plate에 포함되어 있는 기질의 이용도가 서로 매우 다르다는 보고를 하였다. 이러한 결과들은 비

슷한 환경에서 분리한 균주라도 순수균의 기질이용도에 있어서 매우 다양함을 보여주는 결과이다. 특히, *B. okhensis* Kh10-101는 Tween 40과 Tween 80을 이용하지 않는 반면에 *B. krulwichiae* AM31D는 Tween 40과 Tween 80을 이용하였다. 본 연구에서 사용한 SH1RP8 역시 Tween 40과 Tween 80의 기질이용도가 높게 나왔다. Perkins과 Nicholson [20]의 연구에 의하면 *rpoB* mutant *Bacillus subtilis*를 이용해 기질이용도를 측정된 결과, amino acid 계열의 기질을 이용하지 않거나 이용도가 낮았다. 본 연구에서도 SH1RP8 역시 amino acid 계열의 기질이용도가 낮았다.

Average well color development(AWCD)는 미생물의 기질이용도를 평균값으로 나타낸 것으로 그 값이 높을수록 미생물의 기질이용도가 높음을 의미하고, 기질이용속도를 유추할 수 있다. SH1RP8에 의한 기질 이용도를 알아보기 위하여 AWCD 분석은 다음의 식으로 계산하였다[5].

$$AWCD = \sum(C - R)/n$$

C: 각 well의 OD_{595nm} 값

R: Control well의 OD_{595nm} 값

n: 기질의 수(31)

그 결과 본 연구에서 사용된 SH1RP8의 경우는 반응시작 1시간에 최대기질이용도를 나타냈으며, 18시간 이후부터 평균 발색 OD 값이 0.28로 가장 높았고 그 후에 유사값을 유지하였다(Fig. 1).

앞서 언급한 미생물 제제화를 위한 최적조건을 알아보기 위하여 동결건조 시 첨가하는 보호제를 선별하였다. 보호제로는 skim milk, peptone, glucose를 사용하였다. 각각의 보호제는 LB에서 배양된 본 배양액을 1/10로 농축한 현탁액에

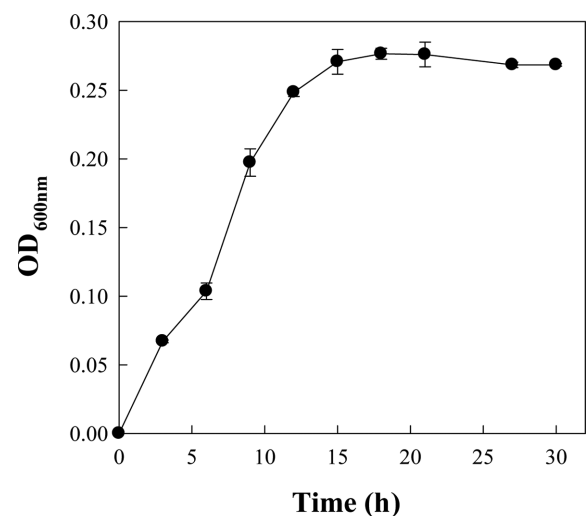


Fig. 1. Time course of average well color development of *Bacillus* sp. SH1RP8 (n = 3).

각각 5와 10%의 비율로 첨가되었다. 또한, 선별된 보호제를 대상으로 보호제의 농도가 미생물 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 보호제의 농도를 미생물 현탁액의 2, 4, 5, 6, 8 그리고 10%로 첨가하여 미생물의 생존율을 평가하였다. 이 밖에도, 앞선 결과에서 SH1RP8의 이용성이 높았던 기질이 균주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기로 선정된 각각의 기질을 1%씩 첨가하였다. 동결건조 전의 생균수와 동결건조 후의 생균수와 비교하여 SH1RP8의 생존율을 평가하였다. 생존율은 아래 식을 이용하였다

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{동결건조된 시료의 cfu 값}}{\text{동결건조 전 시료의 cfu 값}} \times 100$$

그 결과, 각각의 보호제가 5%씩 첨가됐을 때가 10%씩 첨가됐을 때 보다 생존율이 우수하였다. Skim milk는 농축액의 5%가 첨가됐을 때는 30.6%의 생존율을 나타냈고, 10%일 때는 7.5%의 생존율을 나타냈다. 또한, peptone의 경우는 각각 21.3%와 0%였고, glucose는 11.2%와 11.7%로 나타났다 (Table 1).

동결건조 보호제의 최종 선정을 위해 선별된 skim milk를 대상으로 보호제의 각기 다른 농도가 미생물 생존에 미치는 영향을 알아본 결과, skim milk의 농도가 2, 4, 5, 6, 8 및 10%로 첨가되었을 때, 생존률이 26.73, 28.72, 30.60, 21.01, 20.35, 및 7.50%로 보호제의 농도가 증가할수록 생존율이 증가하다가 5% 첨가시 최대값을 보이고 그 이후의 농도에서 다시 감소하였다. 이에 보호제의 최적 농도는 5%로 결정하였다.

Park 등[18]은 *Photorhabdus temperate* M1021을 대상으로 동결건조 보호제에 따른 생존율을 평가하였다. 그들의 연구에서 skim milk를 1-10% 첨가하여 생존율을 평가하였는데 고농도로 갈수록 미생물의 생존율이 향상하다가 10%에서는 감소하였다는 연구결과를 발표하였다. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 유사하며 skim milk를 배양액에 10%가 되도록 첨가하였을 때는 오히려 SH1RP8의 생존율이 감소하였다. Skim milk는 단백질, 탄수화물, 및 지방을 포함하고 있으며 단백질 및 당류가 원심분리 시 균체와 함께 침적되

어 균체를 포집 및 포괄하는 작용을 하며 동결 건조 후에는 건조균체의 세포벽과 결합하여 미생물을 코팅하여 균체를 보호한다[9]. 그러나 일정 농도 이상이 되면 미생물 보호제로서의 성능은 증가하지 않고 점성이 증가하여 분리되는 현상이 나타난다(Kolon, Korea Patent No: 10-1996-0078399).

본 연구에서 skim milk가 5%일 때 보다 10% 첨가했을 때 생존율이 낮아졌던 이유도 점성의 증가로 인해 균 농축액과 skim milk가 분리되어 동결 건조 시 skim milk가 보호제로서의 성능이 감소했기 때문이라 사료된다.

동결 건조 시 미생물의 생존 효율을 증대시키고자 *Bacillus* sp. SH1RP8가 선호하는 기질을 첨가하여 건조 후의 생존율 평가하였다. 선정된 기질은 총 9개로 A4; Dextrin, A8, Tween 40, A9; Tween 80, C3; Maltose, C5; D-Mannitol, D7; D-Ribose, G1; L-Alaninamide, G12; Glycerol, H12; D-L- α -Glycerol Phosphate였다. 그 결과, Miscellaneous (Alcohol) 계열의 Glycerol이 214.29%로 생존율이 가장 우수했고, 나머지 모든 기질들은 생존율이 크게 감소하였다(Table 2).

Table 2. Assessment of *Bacillus* sp. SH1RP8 survival ratio according to the substrates with 5% skim milk (each substrate concentration: 1% of the microbial suspension).

Guild	Carbon source	Survival ratio (%)
	w/o	100
Amines/amides	L-Alaninamide (G1)	8.09
Carbohydrate	D-Mannitol (C5)	4.56
	D-Ribose (D7)	4.26
	Maltose (C3)	11.48
Miscellaneous (Phosphorylated chemical)	D-L- α -Glycerol	82.65
	Phosphate (H12)	
Miscellaneous (Alcohol)	Glycerol (G12)	214.29
Polymer	Dextrin (A4)	4.78
	Tween 40 (A8)	10.12
	Tween 80 (A9)	16.51

Table 1. Assessment of *Bacillus* sp. SH1RP8 survival ratio according to the cryoprotectant agents.

Protective agent ratio (%)	Protective agent type	CFU/ml		Survival ratio (%)
		Before drying	After drying	
5	Skim milk	1.2×10^{11}	3.4×10^{10}	30.6
	Peptone	7.5×10^{11}	1.3×10^{11}	21.3
	Glucose	7.5×10^{11}	6.7×10^{10}	11.2
10	Skim milk	3.54×10^{12}	2.6×10^{11}	7.5
	Peptone	7.5×10^{11}	0	0
	Glucose	7.5×10^{11}	1.2×10^{11}	11.7

동결건조 보호제는 미생물의 생존율에 영향을 미치는 가장 중요한 인자이지만 미생물의 종류에 따라 악영향을 미칠 수도 있다[14]. 본 연구에서는 *Bacillus* sp. SH1RP8가 선호하는 기질을 동결건조 보호제인 skim milk와 함께 적절히 혼합하게 되면 동결 시 상해 방지에 함께 미생물의 기질이 혼합되어 생존율이 크게 향상될 것으로 기대하였다. 그러나 대부분의 기질은 생존율을 향상시키지 못했다. 하지만 또 다른 동결상해방지 효과를 가진 glycerol의 경우는 *Bacillus* sp. SH1RP8가 선호하는 기질의 한 종류로서 skim milk와 함께 혼합하였을 때 동결건조 후의 생존율이 크게 향상됨을 확인하였다. Glycerol은 ethylene glycol과 propylene glycol과 마찬가지로, 비이온성이다. 물-물의 수소결합과 경쟁하여 물과 강력한 수소결합을 형성한다[24]. 이는 온도가 급강하지 않을 경우 얼음의 결정격자를 깨뜨린다. 물에 70% glycerol이 포함되면 빙점이 -37.8°C 까지 저하된다. 또한, 생물독성이 없으며 빙점을 낮추기 때문에 동결건조 시 얼음의 결정격자(ice crystal)에 의한 세포파괴를 막을 수 있어 동결건조 보호제로 이용된다[9].

동결 건조 후에도 *Bacillus* sp. SH1RP8의 식물성장 촉진 능력의 상실 여부를 평가하기 위해 Hong과 Lee[7]의 논문을 참고하여 ACC deaminase 활성을 평가하였다. Deaminase 활성 확인을 위하여 사용한 배지는 DF medium으로 배지의 조성은 증류수 1 L에 3 mM의 ACC, 4 g의 KH_2PO_4 , 15 g의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg의 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 μg 의 B(as H_3BO_3), 11 μg 의 Mn(as $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 125 μg 의 Zn(as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 78 μg 의 Cu(as $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 17 μg 의 Mo(as $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)을 첨가하여 제조하였다. 각각의 보호제 및 기질을 첨가하여 동결건조된 균주를 배지에 5% (w/v)가 되도록 접종하여 30°C 에서 180 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 식물 성장 촉진 근린 미생물이 ACC deaminase 활성을 갖고 있는 경우 ACC를 질소원으로 이용하여 뿌리 주변의 ACC 농도를 조절한다. 에틸렌의 전구체인 ACC가 ACC deaminase에 의해 분해되어 에틸렌 생성으로 인한 식물의 스트레스를 감소시킨다. 이러한 원리를 착안하여 미생물 성장값인 흡광도(optical density, OD) 값을 측정하여 미생물이 ACC를 질소원으로 사용하는지를 측정한다[22]. 이에 배양기간 동안 4시간마다 600 nm에서 OD를 측정하였다. *Bacillus* sp. SH1RP8를 동결 건조 보호제(5% skim milk)만을 첨가하여 동결건조한 대조군과 보호제와 선호기질을 함께 첨가한 실험군으로 나누어 재배양(LB medium)에 3일 배양하여 식물 성장 촉진 능력을 평가하였다. 그 결과, ACC deaminase 활성은 배양 48시간째에 대조군(C)의 OD 값은 0.05 ± 0.01 이었다. 보호제와 기질을 첨가한 실험군은 기질의 첨가로 인해 대조군과 비교하면 효소 활성이 크게 향상되었으며 동결건조전의 효소활성(0.25 ± 0.02)

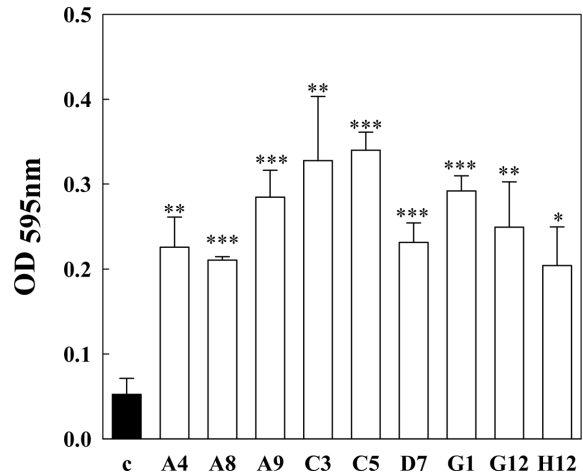


Fig. 2. ACC deaminase activity of lyophilized *Bacillus* sp. SH1RP8 with skim milk and various substrates (n = 3). (C, control (without substrates); A4, Dextrin; A8, Tween 40; A9, Tween 80; C3, Maltose; C5, D-Mannitol; D7, D-Ribose; G1, L-Alaninamide; G12, Glycerol; H12, D-L- α -Glycerol Phosphate). (*, $0.01 < p \leq 0.05$; **, $0.001 < p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$).

과 비교하면 증가하거나 유사한 값을 나타내었다(0.20 ± 0.4 – 0.34 ± 0.02) (Fig. 2). 실험군의 효소활성은 대조군과 비교하였을 때 크게 향상되는 것을 유의적으로 확인하였다(SPSS 18(PASW statistic 18)). 또한, Glycerol(G12)을 기준으로 다른 기질의 효소활성도에 대한 유의차를 분석한 결과 p value 값은 D-mannitol(C5)가 0.052의 최저값을 가지며, 0.052–0.652의 범위를 보인다. 즉, 기질간의 효소활성도의 차이는 통계적으로 큰 의미가 없는 것으로 나타났다.

즉, 기질로도 이용되고 보호제로도 이용된 glycerol은 동결건조 후 해동과정에서 보호제의 역할로 생존율에 기여하였으며, 기타 기질이용도가 높은 기질의 경우 동결건조 시 첨가할 경우 해동 후 미생물의 초기 생육을 촉진시켜 이차 대사과정인 ACC deaminase 활성을 향상시켜 주는 것으로 사료된다.

앞에서도 언급했듯이 동결건조 보호제는 미생물의 생존율에 영향을 미치는 가장 중요한 인자이지만 미생물의 종류에 따라 악영향을 미칠 수도 있다. 이러한 문제를 보완하고자 본 연구에서는 특정미생물이 선호하는 기질을 추가로 첨가하여 동결건조 후 미생물의 생존률과 활성을 보호하고자 하였다. 5% skim milk를 첨가한 *Bacillus* sp. SH1RP8의 동결건조 시 maltose, D-mannitol 등 다양한 기질을 첨가하였을 때 생존율에 미치는 영향을 알아보았다(Table 2). 그 중 glycerol 첨가 시 생존률이 크게 향상되었다. 이에 본 연구에서는 미생물의 생존률을 향상시킨 5% skim milk와 생존률과 효소활성을 함께 향상시킨 1% glycerol을 첨가하면 우수한 미생물 제제를 생산할 수 있을 것이라고 사료된다.

요약

본 연구는 식물성장촉진 근권세균인 *Bacillus* sp. SH1RP8를 친환경 생물비료로 이용하기 위하여 수행되었다. SH1RP8 균주를 동결건조시 세포의 용해를 방지하도록 여러 가지 동결건조 보호제를 첨가하여 균주의 성장과 활성에 미치는 영향을 알아보았다. SH1RP8 균주의 동결건조 시 동결건조 보호제로 skim milk, glucose, peptone 등을 이용하였을 때, 그 중 5%의 skim milk를 첨가하였을 때 가장 높은 (30.6%)의 생존율을 보였다. 또한, 균주의 성장을 촉진하는 기질 그룹을 첨가하여 5%의 skim milk 단독으로 첨가한 경우와 기질 그룹을 각각 첨가한 경우의 동결건조 보호 효과를 비교하여 보았다. 그 결과 5% skim milk에 glycerol을 동시에 첨가할 경우 균주의 생존율이 skim milk 단독 첨가효과와 비교 시 214.29%의 향상율을 보여주었다. 또한 동결건조된 *Bacillus* sp. SH1RP8은 매우 효과적인 PGPR로 활성을 보여주어 생물비료로서의 훌륭한 기능이 기대된다.

Acknowledgments

This research was supported by Korea Ministry of Environment as "EI Project" (Project No. E315-00013-0301-1), for which the authors are grateful.

References

1. Agasimani CA, Mudagiryappa M, Sreenivas MN. 1994. Response of ground nut to phosphate solubilizing microorganisms. *Groundnut News* **6**: 5-7.
2. Bozolu TF, Özilgen M, Bakir U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzym Microbiol. Tech.* **9**: 531-537.
3. Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, van der Bij AJ, van der Drift KMG, Schripsema J, Kroon B, et al. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1069-1077.
4. Dubey SK, Billore SD. 1992. Phosphate solubilising microorganisms (PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India: A review. *Crop. Res.* **5**: 11-24.
5. Garland JL, Mills AL. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2351-2359.
6. Heckly RJ. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. *Adv. Appl. Microbiol.* **2**: 1-28.
7. Hong SH, Lee EY. 2014. Vegetation restoration and prevention of coastal sand dunes erosion using ion exchange resins and the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus* sp. SH1RP8 isolated from indigenous plants. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **95**: 262-269.
8. Illmer P, Schinner E. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 389-395.
9. Jeong EJ, Moon DW, Oh JS, Moon JS, Eom HJ, Choi HS, et al. 2012. Composition optimization of cabbage extract medium for cell growth of *Lactobacillus plantarum*. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **27**: 347-351.
10. Johnson DL, Anderson DR, McGrath SP. 2005. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 2334-2336.
11. Lebeau T, Braud A, Jézéquel K. 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ. Pollut.* **153**: 497-522.
12. Lee EY, Hong SH. 2013. Plant growth-promoting ability by the newly isolated bacterium *Bacillus aerius* MH1RS1 from indigenous plant in sand dune. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **35**: 687-693.
13. Leveau JH, Lindow SE. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2365-2371.
14. Lim YB, Park NS, Kim YM. 2001. Screening of lactic acid bacteria for the development of probiotics and the effect of cryoprotectant agents. *Korean J. Food Nutr.* **14**: 441-445.
15. Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004. Application of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**: 1-25.
16. Nowlan B, Dodia MS, Singh SP, Patel BKC. 2006. *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1073-1077.
17. Othman AR, Bakar NA, Halmi MIE, Johari WLW, Ahmad A, Jirangon H. et al. 2013. Kinetics of molybdenum reduction to molybdenum blue by *Bacillus* sp. strain A.rzi. *BioMed Res. Int.* **2013**: 1-9.
18. Park GS, Jang EK, Kim MS, Shin JH. 2012. Insecticidal activity and stability by freeze-drying of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus temperata* M1021. *J. Appl. Biol. Chem.* **55**: 123-127.
19. Park KS. 2011. Development of biopesticide and role of *Bacillus* spp. *KIC News.* **14**: 1-12.
20. Perkins AE, Nicholson WL. 2008. Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotype profiling of rifampin-resistant *rpoB* mutants. *J. Bacteriol.* **190**: 807-814.
21. Seo SY, Kim YG. 2011. Development of "Bt-Plus" biopesticide using entomopathogenic bacterial (*Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) metabolites. *Korean J. Appl. Entomol.* **50**: 171-178.
22. Safronova VI, Stepanok VV, Engqvist GL, Alekseyev YV, Belimov AA. 2006. Root associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improve

- growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biol. Fertil. Soils* **42**: 267–272.
23. Stamford NP, Santos CERS, Dias SHL. 2007. Phosphate rock biofertilizer with *Acidithiobacillus* and rhizobia improves nodulation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) in greenhouse and field conditions. *Trop. Grassl.* **41**: 222–230.
24. Tao XQ, Lu GN, Liu JP, Li T, Yang LN. 2009. Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **6**: 2470–2480.
25. Yoon SS, Lee HO, Yu JH. 1986. Effect of the amino acid mixture on freeze-drying and preservation of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 421–426.
26. Wolfe J, Bryant G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* **39**: 103–129.
27. Zhao G, Zhang G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 333–338.