

## 근권에 존재하는 *Bacillus* 속 균주들의 식물 성장 촉진 활성 특성

오가윤<sup>1</sup>, 김지윤<sup>1</sup>, 이송민<sup>1</sup>, 김희숙<sup>1</sup>, 이광희<sup>1</sup>, 이상현<sup>2</sup>, 장정수<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>㈜엔젤 식품연구소

<sup>2</sup>신라대학교 바이오산업학부 제약공학전공

Received: May 31, 2021 / Revised: July 12, 2021 / Accepted: July 13, 2021

### Plant Growth-Promoting Activity Characteristics of *Bacillus* Strains in the Rhizosphere

Ka-Yoon Oh<sup>1</sup>, Ji-Youn Kim<sup>1</sup>, Song Min Lee<sup>1</sup>, Hee Sook Kim<sup>1</sup>, Kwang Hui Lee<sup>1</sup>, Sang-Hyeon Lee<sup>2</sup>, and Jeong Su Jang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Food Research Center, Angel Co., Ltd., Busan 46988, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46988, Republic of Korea

This study aimed to identify plant growth-promoting activity, phytopathogenic fungi growth inhibitory activity, mineral solubilization ability, and extracellular enzyme activity of the genus *Bacillus* in soil and the rhizosphere. With regards to antifungal activity against phytopathogenic fungi, DDP257 showed antifungal activity against all 10 pathogenic fungi tested. ANG20 showed the highest ability to produce indole-3-acetic acid, a plant growth-promoting factor (70.97 µg/ml). In addition, 10 species were identified to have 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase production ability, and most isolates showed nitrogen fixation and siderophore production abilities. Thereafter, the isolated strains' ability to solubilize minerals such as phosphate, calcite, and zinc was identified. With extracellular enzyme activity, the activity appeared in most enzymes. In particular, all the strains showed similar abilities for alkaline phosphatase, esterase (C4), acid phosphatase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase production. This result was observed because the genus *Bacillus* secreted various organic substances, antibiotics, and extracellular enzymes. Therefore, through the results of this study, we suggest the possibility of using strains contributing to the improvement of the soil environment as microbial agents.

**Keywords:** *Bacillus* sp., mineral solubilization, antifungal activity, plant growth promoting rhizobacteria

## 서론

급격한 농업의 발달은 합성 비료, 농약 등의 사용을 늘림으로써 식물의 생산성을 낮추고, 토양 환경을 악화시키는 결과를 초래하였다. 합성 비료와 농약 등의 사용을 줄이기 위하여 특정 목적에 맞는 미생물제제를 사용함으로써 문제점을 해결할 수 있다[1]. 미생물제제에 사용될 수 있는 미생물들은 토양에 다양하게 존재하고 있어서 토양 환경과 식물의 성장에 직, 간접적으로 도움을 주며 식물 병원성 곰팡이의 방제능을 갖는데, 이러한 미생물을 식물 성장 촉진 근권 세균(plant growth-promoting rhizobacterium, PGPR)이라고 한다[2]. 현재까지 보고된 PGPR은 *Pseudomonas*,

*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*를 포함하여 다양한 미생물이 있는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 식물의 성장에서 PGPR의 직접적인 영향은 미생물에 의해 합성된 화합물을 식물에 제공하거나 토양 환경에서 특정 영양소 흡수를 돕는 것이며, 간접적으로는 대기 중의 질소를 고정하고 토양에서 철을 이용하기 위해서 저분자의 siderophore를 합성하고 인산 등의 미네랄 가용화를 촉진하여 식물 병원성 곰팡이의 유해한 영향을 줄이는 것이다[3, 4]. PGPR은 특히 여러가지 식물 호르몬 중 indoleacetic-3-acid (IAA)을 합성할 수 있어 식물의 성장에 다양한 단계에서 작용하며 식물 호르몬 수치에 영향을 주는 여러 효소를 합성 할 수 있다고 알려져 있다[5].

다양한 종의 식물 성장 촉진 근권 세균 중에서도 *Bacillus* 속의 많은 종은 다양한 병원균에 대한 생물학적 방제제로서 잠재력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. *Bacillus* 속 균

\*Corresponding author

Tel.: +82-51-852-3636

E-mail: jeongsu25@naver.com

주는 호기성의 그람 양성균이며 내생 포자를 생성하여 뿌리 근권의 증식에 잘 적응하며, 펩타이드 항생제, 세포 외 효소의 분비 등의 생리적 특성을 가지고 열악한 환경 조건에서 장기간 생존 할 수 있다. 이러한 *Bacillus* 속에는 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. sphaericus* 등의 종들이 있다[6, 7]. 이러한 균주들을 이용하여 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성을 연구가 활발히 진행되고 있으나, 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성, 미네랄 가용화능 및 세포 외 효소활성을 동시에 가지는 균주들에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 부산, 창원 일대에서 채취한 토양과 뿌리로부터 미생물을 분리하여 *Bacillus* 속에 속하는 분리 균주들의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성, IAA 생성능, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase 생성능, 질소 고정능, siderophore 생성능, 불용성 미네랄 가용화능 및 세포 외 효소 활성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 토양 미생물의 분리

부산, 창원의 텃밭, 해수욕장 등의 토양 및 뿌리를 수집하여 유용 미생물을 분리하였다. 수집한 토양은 시료 1 g과 멸균된 생리 식염수를 혼합한 후 bennet agar (BA, 1% glucose, 0.2% peptone, 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract, 1.5% agar), glucose minimal salts agar (GMSA, 0.2% glucose, 1% yeast extract, 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0002%  $\text{MnSO}_4$ , 1.5% agar), potato dextrose agar (PDA, Difco™), tryptic soy agar (TSA, Difco™) plate에 도말하여 30°C에서 2일간 배양하여 순수 분리하였다. 채취한 뿌리는 계면활성제인 Tween 80과 표백제인 perchloric acid (1%)를 처리하여 표면 미생물을 제거한 후 토양 시료와 같은 방법으로 도말하여 순수 분리하였다[8].

### 미생물의 동정

분리 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 분석하였으며 유전자 단편의 염기서열 분석은 Solgent Co., Ltd. (Korea)에 의뢰하였다. 염기서열은 NCBI의 BLAST에서 분석하였다. 이후 *Bacillus* 속 균주를 선별하여 균주 간의 활성을 비교하였다.

### 분리 균주의 항진균 활성

균주들의 항진균 활성을 측정하기 위하여 사용된 식물 병원성 곰팡이는 *Alternaria alternata* KACC 40019, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Colletotrichum acutatum* KACC

40042, *Corynespora cassiicola* KACC 44719, *Fusarium oxysporum* f.sp. lactucae KACC 42795, *Fusarium solani* KACC 41092, *Fusarium tricinctum* KACC 42097, *Phytophthora capsici*, KACC 40180, *Rhizoctonia solani* AG-2-1 KACC 40124, *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065으로 총 10종을 대상으로 검정하였다. 항진균 활성 측정은 PDA를 이용한 well diffusion법을 이용하였으며, PDA 배지에 분리균주를 접종하여 검정 균주와 25°C에서 대치 배양하였다. 식물 병원성 곰팡이와 유용 미생물 간의 거리를 측정하여 억제율(inhibition rate)로 환산하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = ((R - r)/R) * 100$$

*R*: 식물 병원성 곰팡이와 분리 균주 사이의 거리(mm)

*r*: 식물 병원성 곰팡이의 성장 반경(mm)

### ACC deaminase 생성능 조사

건조, 염, 온도 등 환경스트레스에 대한 저항성 기작의 주요 지표인 ACC deaminase 생성능은 Barnawal 등[9]의 방법을 통하여 조사하였다. 분리된 균주를 TSB 배지에 접종하고 30°C에서 2일 동안 배양한 후 원심분리 하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 DF salt 배지(0.4%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0001%  $\text{FeSO}_4$ , 0.000001%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.000001%  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.000007%  $\text{ZnSO}_4$ , 0.000005%  $\text{CuSO}_4$ , 0.000001%  $\text{MoO}_3$ , 0.2% glucose, 0.2%  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$ , 0.2%  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , pH 7.3)로 두 번 세척하고 질소원으로 3 mM ACC가 첨가된 DF salt 배지에 접종하여 30°C에서 5일 동안 배양하였다. 대조군으로는 질소원으로 아무것도 첨가하지 않은 배지를 사용하였으며, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 분리된 균주의 성장 정도로 ACC deaminase의 생성을 확인하였다.

### Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능 조사

식물성 호르몬인 IAA 생성능을 측정하기 위하여 0.1%의 tryptophan이 첨가된 King's B (2% proteose peptone, 0.25%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.6%  $\text{MgSO}_4$ , 1.5% glycerol, pH 7.2) 배지에 분리 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 원심분리(10,000 rpm, 4°C, 15분) 후 상층액을 분리하여, Salkowski's reagent (35%  $\text{HClO}_4$  50 ml, 0.5 M  $\text{FeCl}_3$  1 ml)와 1:2 (v/v)의 비율로 혼합한 다음, 분홍색이 발색되는 동안 상온에서 30분간 정치하였다. 발색되는 정도를 분광광도계 (Spectrophotometer, Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 530 nm에서 측정하였다. 표준물질로 IAA를 이용하여, 위와 동일한 방법으로 검량선을 작성하여 시료의 농도를 환산하였다[10].

### 질소 고정능 조사

질소 고정능 조사는 Um 등[11]의 방법에 따라 수행하였다. 분리 균주를 30℃에서 130 rpm 조건으로 1일 동안 전배양 후 전배양액을 nitrogen free bromothymol blue (NFB, 0.5% (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH(OH)CO<sub>2</sub>H, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002% NaCl, 0.005% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0002% Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.001% MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% CaCl<sub>2</sub>, 0.4% KOH, 0.2% bromothymol blue (in 0.5% alcohol), 0.175% agar, pH 6.8) 배지에 접종하였다. Test tube에 NFB 배지를 넣고 전배양된 균주를 접종하여 30℃에서 4일간 배양하면서 배지 색이 푸른색으로 변할 경우 양성으로 판단하였다.

### Siderophore 생성능 조사

Siderophore 생성능을 측정하기 위하여 chrome azurol S (CAS) blue agar plate assay 방법을 이용하였다[12]. 선별된 균주를 접종하여 30℃에서 4일간 배양한 후 orange halo zone 형성 유무에 따라 siderophore 생성능을 측정하였다.

### 인산 가용화능

인산 가용화능 측정은 Pande 등[13]의 방법에 따라 측정하였다. 0.5% calcium phosphate가 첨가된 고체 Pikovskaya (PVK) agar 배지(0.05% yeast extract, 1% glucose, 0.5% 10CaO·3P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.02% KCl, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.00001% MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.00001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5% agar, pH 6.8)를 이용하였으며, 순수 분리된 균주의 상등액을 10 µl씩 접종 후 30℃에서 4일간 배양하면서 배지에 clear zone의 형성 유무를 조사하여 인산 가용화능을 확인하였다.

### 탄산칼슘 가용화능

탄산칼슘 가용화능 측정은 Deveze-Bruni agar (0.5% D-glucose, 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, 0.04% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001% MgSO<sub>4</sub>, 0.5% NaCl, 0.005% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% agar, pH 6.8) 배지를 이용하였다[14]. 순수 분리된 균주의 상등액을 10 µl씩 접종 후 30℃에서 4일간 배양하면서 배지에 clear zone 형성 유무를 조사하여 CaCO<sub>3</sub> 가용화능을 확인하였다.

### 아연 가용화능

아연 가용화능 측정[15]은 Tris-minimal salt (1% D-glucose, 0.606% Tris-HCl, 0.468% NaCl, 0.149% KCl, 0.107% NH<sub>4</sub>Cl, 0.043% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.02% MgCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.003% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.5% agar, pH 7.0) 배지에 각 0.1244% ZnO, 0.1998% Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.1728% ZnCO<sub>3</sub>을 첨가하여 각 ZnO, Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnCO<sub>3</sub>에 대한 가용

화능을 확인하고자 하였다. 순수 분리된 균주의 상등액을 10 µl씩 접종 후 30℃에서 4일간 배양하면서 배지에 clear zone 형성 유무를 조사하여 ZnO, Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnCO<sub>3</sub> 가용화능을 측정하였다.

### 세포 외 효소 활성

Amylase 활성은 Miller의 방법[16]을 일부 변형하여 시험을 진행하였으며, 배양 상등액과 1% starch solution (50 mM sodium phosphate buffer)을 1:1로 혼합하여 반응시켰다. 이후 dinitrosalicylic acid (DNS) 시약을 첨가하여 100℃에서 15분 동안 가열 한 다음 얼음에 냉각시킨 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cellulase와 xylanase 활성 측정은 Shin과 Cho의 방법[17]을 이용하여 시험을 진행하였다. 원심분리한 상등액을 각 1% CMC solution (50 mM sodium phosphate buffer)과 1% xylan solution (50 mM sodium phosphate buffer)과 혼합하여 50℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 DNS 시약을 첨가하여 100℃에서 10분 동안 열처리 한 다음 얼음에 냉각시킨 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성은 Oh 등의 방법[18]을 일부 변형하여 시험을 진행하였다. 원심분리한 상등액은 0.65% casein (50 mM sodium phosphate buffer)과 혼합한 뒤 37℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 0.44 M trichloroacetic acid를 첨가하여 37℃에서 30분 동안 반응시키며 단백질을 응고시킨 후 0.45 µm CA syringe filter를 이용하여 여과하였다. 여과액과 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합하여 37℃에서 30분 동안 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 효소적 특성을 분석하기 위해서 API ZYM kit (bioMérieux, France)를 이용하여 분석하였으며 제조사의 매뉴얼에 따라 진행하였다.

### 통계분석

모든 분석은 3회 이상 수행하였으며, 평균 ± 표준편차 (Mean ± SD)로 표현하였다. 평균값의 유의한 차이는 SPSS (version 20.0 for Windows, SPSS Inc., USA)를 이용한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)의 Duncan's multiple range test를 사용하였다. 유의성 검증은 신뢰구간  $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 분리 동정

근권 토양으로부터 유용 미생물을 분리하기 위하여, 부산 다대포 해변가 주변 모래밭과 창원 텃밭의 고추밭 및 대저 토마토밭의 뿌리와 토양을 취하였다. 분리된 균주의

**Table 1. Identification of isolated strains by 16S rRNA sequencing.**

Isolate	Description		
	Strains	Identity (%)	Accession
ANG20	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	100	NR_121761.1
ANG52	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	99.9	NR_115953.1
ANG56	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	99.9	NR_115953.1
DDP254	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	100	NR_121761.1
DDP256	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365	99.9	NR_157735.1
DDP257	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	99.8	NR_152692.1
DDP258	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	99.8	NR_152692.1
DDP269	<i>Bacillus paranthracis</i> strain MCCC 1A00395	99.9	NR_157728.1
DDP279	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235	99.9	NR_112780.1
DDP313	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365	99.9	NR_157735.1
DDP315	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	100	NR_115953.1
DDP337	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	99.9	NR_152692.1
DDP386	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	99.9	NR_115953.1
DDP426	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	100	NR_121761.1

16S rRNA 유전자 염기서열을 BLAST에서 분석하여, *Bacillus* 속에 포함되는 균주들을 선별하였다. 선별된 균주는 *Bacillus aryabhatai* 4균주(ANG52, ANG56, DDP315, DDP386), *Bacillus paranthracis* 1균주(DDP269), *Bacillus proteolyticus* 2균주(DDP256, DDP313), *Bacillus thuringiensis* 1균주(DDP279), *Bacillus toyonensis* 3균주(ANG20, DDP254, DDP426), *Bacillus wiedmannii* 3균주(DDP257, DDP258, DDP337)로(Table 1) 99.8% 이상의 상동성을 가진다. 최근까지의 연구에 따르면 *Bacillus*

*aryabhatai*, *Bacillus paranthracis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus wiedmannii*로 규명된 균주들이 식물 성장 촉진에 기여한다는 보고가 있다[5, 15, 19–22]. 따라서 본 연구에서도 *Bacillus* 속에 속하는 균주들의 식물 성장 촉진 활성, 미네랄 가용화 및 세포의 효소활성을 측정하고자 하였다.

#### 분리된 균주의 항진균 활성

본 연구에서는 *Bacillus* 속 분리균주의 항진균 활성을 알

**Table 2. Antifungal activity of isolated strains against phytopathogenic fungi.**

Strains	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
ANG20	22.39±10.80 <sup>ab</sup>	-	42.42±2.62 <sup>c</sup>	-	27.59±7.40 <sup>a</sup>	-	-	14.49±2.51 <sup>a</sup>	-	-
ANG52	-	-	-	-	-	49.90±4.35 <sup>e</sup>	-	-	-	-
ANG56	-	-	-	-	-	15.07±2.68 <sup>a</sup>	-	-	-	-
DDP254	38.33±7.64 <sup>d</sup>	-	35.15±5.84 <sup>b</sup>	11.11±3.07 <sup>a</sup>	25.51±3.92 <sup>a</sup>	24.24±6.94 <sup>b</sup>	19.14±1.66 <sup>a</sup>	25.51±3.92 <sup>c</sup>	-	-
DDP256	34.44±3.85 <sup>cd</sup>	11.59±2.51 <sup>a</sup>	28.70±3.02 <sup>a</sup>	33.31±1.48 <sup>de</sup>	-	41.38±3.17 <sup>d</sup>	23.77±4.38 <sup>a</sup>	38.09±1.81 <sup>d</sup>	35.00±0.00 <sup>b</sup>	20.16±3.63 <sup>a</sup>
DDP257	19.22±2.79 <sup>ab</sup>	19.13±1.51 <sup>b</sup>	34.96±4.11 <sup>b</sup>	14.81±1.56 <sup>a</sup>	30.00±8.66 <sup>a</sup>	34.03±6.62 <sup>c</sup>	25.28±3.21 <sup>a</sup>	19.13±1.51 <sup>b</sup>	34.90±1.52 <sup>b</sup>	12.53±3.46 <sup>a</sup>
DDP258	25.91±3.72 <sup>abc</sup>	48.33±10.41 <sup>c</sup>	-	28.97±4.18 <sup>cd</sup>	-	33.76±2.42 <sup>c</sup>	20.46±6.01 <sup>a</sup>	49.14±5.89 <sup>e</sup>	54.05±3.66 <sup>d</sup>	70.54±25.66 <sup>b</sup>
DDP269	16.06±1.84 <sup>a</sup>	-	-	22.73±4.55 <sup>b</sup>	-	-	-	21.86±2.50 <sup>bc</sup>	-	-
DDP279	-	-	28.02±5.30 <sup>a</sup>	37.04±4.39 <sup>e</sup>	-	-	-	-	-	30.55±2.21 <sup>a</sup>
DDP313	32.48±9.79 <sup>cd</sup>	17.85±0.33 <sup>b</sup>	31.97±1.29 <sup>ab</sup>	35.94±4.09 <sup>e</sup>	-	18.26±8.48 <sup>ab</sup>	15.62±7.26 <sup>a</sup>	37.26±3.49 <sup>d</sup>	29.75±7.88 <sup>a</sup>	34.14±3.22 <sup>a</sup>
DDP315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DDP337	26.51±1.31 <sup>bc</sup>	-	-	48.41±5.87 <sup>f</sup>	29.65±1.88 <sup>a</sup>	25.58±6.45 <sup>b</sup>	-	46.02±1.40 <sup>e</sup>	43.89±1.92	-
DDP386	-	-	-	-	-	-	22.37±0.58 <sup>a</sup>	-	-	-
DDP426	74.01±10.52 <sup>e</sup>	-	79.12±2.39 <sup>d</sup>	26.53±5.69 <sup>bc</sup>	49.92±2.51 <sup>b</sup>	-	65.70±24.51 <sup>b</sup>	79.67±4.51 <sup>f</sup>	-	-

Data are mean ± SD of at least three replicates. Means with different letter (a-f) in the same column indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

아보고자 하였다(Table 2). 분리된 균주 중에서 10종의 병원성 곰팡이에서 항진균 활성을 모두 나타낸 균주는 DDP257 이었는데 특히 *C. acutatum*, *F. solani*, *F. tricinctum* 및 *R. solani*에 대해서는 30% 이상의 항진균 활성을 나타냈다. 다음으로는 DDP256과 DDP313으로 총 9종의 병원성 곰팡이에서 11.59–37.26%의 항진균 활성을 나타내었다. 또한 DDP426의 경우에는 총 6종의 식물 병원성 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 보였는데 특히 4종의 식물 병원성 곰팡이에서 65%가 넘는 높은 항진균 활성을 나타내었다. 대부분의 *Bacillus* 속 균주는 2차 대사물질을 분비하여 식물 병원성 미생물의 생육을 억제하는 방제균으로써 중요한 역할을 하기 때문이며, 또한 세포벽을 분해하는 효소인 chitinase, glucanase, protease 등을 생성하고, 다양한 lipopeptide 항균물질을 분비하여 식물 병원균의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구에서도 이러한 물질에 의해서 항진균 활성이 나타난 것으로 판단된다[7, 23].

### IAA 및 ACC deaminase 생성능

식물 성장 호르몬 중 대표적인 옥신(auxin)은 세포의 생장과 분화, 뿌리의 성장에 기인하며, 일부 세균들이 식물 근권에서 옥신을 생성하여 식물이 흡수함으로써 생장에 도움이 된다[24]. 옥신 계열 중에서 대표적인 것이 IAA이며, IAA는 다양한 경로를 통하여 생성된다. 그 중에 한 경로로서 식물의 뿌리 삼출액에 트립토판이나 작은 분자들이 존재하면 이 물질들을 근권미생물이 이용하여 IAA가 생성되고, 생성된

IAA는 식물의 에틸렌 합성을 자극하도록 작용한다[25]. 따라서 본 연구에서는 식물 성장 호르몬 계열인 IAA의 생성능을 확인하고자 하였다(Table 3). 분리된 균주 중에서 IAA 활성이 유의적으로 가장 높은 균주는 ANG20으로 70.97 µg/ml의 활성을 나타내었으며, 그 다음으로는 DDP313이 60.75 µg/ml의 활성을 나타내었다. Contreras-Pérez 등[22]의 연구에 따르면 24.08 µg/ml의 IAA 생성능을 가진 *B. toyonensis*를 이용하여 블루베리(*Vaccinium* spp. var. Biloxi) 작물에 접종한 결과 control에 비하여 *B. toyonensis*를 접종한 실험군의 shoot length (cm)와 chlorophyll content (U)에서 1.24배 및 1.95배 유의적으로 증가하는 것을 확인함으로써 *B. toyonensis*가 식물 성장 촉진에 도움을 주는 것을 확인하였다. 이처럼 본 연구에서도 IAA 생성능을 가진 균주들이 식물 성장 촉진에 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 근권 미생물이 생성하는 ACC deaminase에 의해서 ACC를 가수분해하여 ammonia와 α-ketobutyrate로 분해함으로써 에틸렌 수준을 감소시킬 수 있다[4]. 이렇게 분해된 산물들은 식물이 성장하는 동안 탄소원과 질소원으로 이용되며, 이 과정에서 ACC의 농도가 낮아지고 스트레스 호르몬인 에틸렌의 합성을 저해하게 된다[26]. 이러한 ACC deaminase를 생산하는 근권미생물은 염분, 가뭄, 담수, 온도, 병원성 미생물 등과 같은 스트레스 factors에 따라 가속화되는 에틸렌 생성을 조절함으로써[26], 에틸렌의 전구체인 ACC를 분해하여 식물에 대한 스트레스를 감소시켜 식물의 생장에 도움이 된다[27]. 본 연구에서는 ACC deaminase의 활성

**Table 3. Plant growth-promoting activities of isolated strains.**

Strains	IAA production (µg/ml) <sup>1)</sup>	ACC deaminase production <sup>2)</sup>	Nitrogen fixation <sup>3)</sup>	Siderophore production <sup>4)</sup>
ANG20	70.97±1.56 <sup>k</sup>	+	++	+++
ANG52	7.27±0.05 <sup>b</sup>	-	+	++
ANG56	3.18±0.03 <sup>a</sup>	-	+	++
DDP254	31.17±1.05 <sup>d</sup>	+	+	+
DDP256	29.89±0.85 <sup>d</sup>	-	+	+
DDP257	33.38±0.58 <sup>e</sup>	+	+	++
DDP258	30.71±0.73 <sup>d</sup>	+	+	+
DDP269	31.61±0.90 <sup>d</sup>	-	+	-
DDP279	38.05±0.65 <sup>f</sup>	+	+	++
DDP313	60.75±1.64 <sup>j</sup>	+	++	+
DDP315	54.73±2.87 <sup>h</sup>	+	++	++
DDP337	57.96±0.57 <sup>i</sup>	+	+	++
DDP386	51.01±1.86 <sup>g</sup>	+	+	+
DDP426	22.73±0.57 <sup>c</sup>	+	+	++

<sup>1)</sup>Data are mean ± SD of at least three replicates. Means with different letter (a-k) indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

<sup>2)</sup>+: positive (absorbance at 600 nm  $\geq 0.1$ ), -: negative.

<sup>3)</sup>Nitrogen fixation activity determined by color change of NFB broth, ++: strong positive, +: positive, -: negative.

<sup>4)</sup>+++ : strong positive (> 20 mm), ++: positive (10-20 mm), +: weakly positive (< 10 mm), -: negative.

을 측정하여 환경 스트레스로부터 식물의 성장과 발달에 미치는 영향을 알아보려고 하였다(Table 3). 분리된 균주 총 14 종 가운데 ANG20, DDP254, DDP257, DDP258, DDP279, DDP313, DDP315, DDP337, DDP386, DDP426에서 ACC deaminase 활성을 나타내었다. 결과적으로 IAA와 ACC deaminase를 생성하는 근권미생물을 이용하여 에틸렌 수준을 조절함으로써 식물의 환경 스트레스를 저해하여 성장촉진에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

**질소 고정능과 siderophore 생성능**

질소는 모든 생물에 필수적인 요소이며 단백질, 핵산 및 다양한 생체분자(biomolecules)의 구성요소이다[28]. 토양에 존재하는 질소는 90% 이상이 유기태 질소이며 이러한 유기태 질소는 식물이 흡수하기 어렵다[28]. 식물의 뿌리가 흡수하는 질소의 주요 형태는 질산태 질소(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)와 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)인 무기태 질소로 알려져 있으며[29], 본 연구 결과(Table 3), 모든 균주가 NFB 배지에서 성장하여, 배지 색이 푸른색으로 변화되는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 ANG20, DDP313 및 DDP315가 높은 활성을 나타냈다. 철은 활성산소를 조절하고 전자 전달, 신진 대사 과정과 산화 환원반응에 관여하기 때문에 미생물과 식물의 대사와 성장에 반드시 필요한 원소이다[29]. 토양에는 미생물과 식물의 성장에 이용되는 철의 함량이 낮기 때문에 식물 주변에서 식하는 근권미생물은 저분자(400-1000 Da)인 siderophore를 생산하여 미생물과 식물의 철 이용률을 높여준다[30]. 이러한 siderophore 생성능을 조사한 결과 DDP269를 제외한 모든 균주에서 활성이 나타났다(Table 3). 그 중에서도

ANG20이 20 mm 이상의 orange halo zone을 나타내어 가장 높은 siderophore 생성능을 보였다. Kamaruzzaman 등[31]에 따르면, 토양 근권에서 *B. proteolyticus* 4D의 IAA 생성능, 질소 고정능, ACC deaminase, siderophore 생성능을 측정된 결과 이 균주는 ACC deaminase 생성능과 siderophore 생성능에서는 활성이 나타나지 않은 것으로 보고된 반면 본 연구에서 분리된 DDP313은 모든 식물 성장 촉진 활성 측정에서 뚜렷한 활성을 보였다.

**인산 가용화능**

인(P)은 질소에 이어 식물의 성장과 발달에 필수 요소이다[32]. 토양 중에 존재하는 인산의 형태는 불용성 상태인 CaHPO<sub>4</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub>로 존재하여 미생물이나 식물이 이용하기에는 어려움이 있다[33]. 인산 가용화 균은 토양 내 불용성으로 존재하는 인산을 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 또는 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>와 같은 형태로 가용화하여 인산의 용해도를 증가시키고, 이로 인해 토양 양분의 순환 및 작물의 양분의 흡수를 도와 식물 성장 촉진에 매우 중요한 역할을 한다[30, 34]. 분리된 균주 가운데 ANG52와 ANG56을 제외한 나머지 균주에서 인산 가용화능이 나타났다(Table 4). 그 중에서도 ANG20과 DDP256이 높은 활성을 나타냈다. Osman 등[5]과 Raddadi 등[35]의 연구에 따르면 분리된 *Bacillus* 속 중에서 *B. wiedmannii*로 유추할 수 있는 ON-4와 SP-7이 인산 가용화능을 나타내었다고 보고하였으며, *B. thuringiensis* 균주의 경우 이 균주에서 생성되는 phytase 또는 acid phosphatase에 의해 인산 가용화능이 나타난 것이라고 보고하였다. 또한 Raddadi 등[35]의 연구에 따르면 *Bacillus* 속에 의해서 생성

**Table 4. Mineral solubilization of isolated strains.<sup>1)</sup>**

Strains	Phosphate	ZnO	Zn <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	ZnCO <sub>3</sub>	CaCO <sub>3</sub>
ANG20	++	-	++	-	+
ANG52	-	-	-	-	+
ANG56	-	-	-	-	+
DDP254	+	-	-	-	-
DDP256	++	-	-	-	-
DDP257	+	-	+	-	-
DDP258	+	-	+	-	-
DDP269	+	-	-	-	+
DDP279	+	-	-	-	-
DDP313	+	-	-	-	-
DDP315	+	-	+	-	+
DDP337	+	-	++	-	-
DDP386	+	-	-	-	-
DDP426	+	-	-	-	+

<sup>1)</sup> ++: positive (10-15 mm), +: weakly positive (<10 mm), -: negative.

되는 인산 분해 효소와 succinic acid, glutamic acid 등과 같은 유기산으로 인하여 인산이 가용화 된 것으로 보고하였는데, 본 연구에서도 분리된 균주가 생성한 효소와 유기산의 작용으로 식물의 인산 이용률을 높이는 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

### 아연 및 탄산칼슘 가용화능

아연은 식물의 적절한 성장과 발달을 위해 소량 필요로 하는 영양소이다. 식물에서의 아연 부족은 작물의 수확량, 꽃가루 형성, 뿌리의 발달에 영향을 미쳐 꽃과 열매의 발달이 저하되고 탄수화물과 식물 호르몬의 합성을 감소시켜 작물의 성숙을 지연시킨다. 식물은 아연을 수용성 형태로 흡수하지만 토양에 존재하는 아연은 불용성 형태로 존재하여 식물이 흡수할 수 없기 때문에 아연 결핍증이 발생한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 뿌리 근권 세균 중 아연 가용화능이 있는 미생물은 아연을 가용화하여 식물이 이용할 수 있도록 한다. 아연 가용화 미생물은 유기산(2-ketogluconic acid 및 gluconic acid), 아미노산, 식물 호르몬의 분비와 산성화를 포함한 다양한 메커니즘을 통하여 아연을 가용화한다[36, 37]. 본 연구에서는 ZnO, Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnCO<sub>3</sub>에 대한 가용화능을 측정하였다(Table 4). 그 결과 ZnO, ZnCO<sub>3</sub>에 대한 활성은 모든 균주에서 나타나지 않았지만, ANG20, DDP257, DDP258, DDP315, DDP337에서 Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O에 대한 가용화능이 나타났다. Ramesh의 연구[15]에서 분리된 균주 중에서 *B. aryabhatai*로 동정된

MDSR7, MDSR11, MDSR14가 ZnO, Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnCO<sub>3</sub>에 대해 가용화능을 보였으며, 이 균주들이 대두와 밀 작물의 수확량을 개선한다고 보고하였다. 칼슘은 식물의 세포벽과 세포막의 안정성을 유지하고, 성장을 조절하기 위하여 반드시 필요한 영양소이다[38]. 미생물에 의한 탄산칼슘의 용해 메커니즘은 acetic acid, lactic acid, propionic acid, succinic acid와 같은 유기산, 무기산, 킬레이트 물질, phosphatase와 같은 가수분해 효소 등에 의하여 가용화되는 것으로 알려져 있다[14]. 탄산칼슘 가용화능을 측정한 결과(Table 4), ANG20, ANG52, ANG56, DDP269, DDP315, DDP426 균주에서 활성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 식물이 토양에서 흡수하기 어려운 영양소를 근권미생물이 가용화하여 식물의 영양소 흡수에 영향을 주어 최종적으로 식물 성장에 도움을 줄 것으로 판단된다.

### 세포 외 효소활성

식물 병원균의 성장을 저해하는 것으로 보고되고 있는 *Bacillus* 속 균주들은 세포벽 분해효소를 생산하고 식물 병원균의 세포벽을 용해하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다[39]. 따라서, 본 연구에서는 분리된 균주 14종을 대상으로 amylase, cellulase, protease, xylanase 활성을 측정하였다(Table 5). 그 결과 DDP426이 amylase 및 xylanase에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. Kim 등[40]의 연구 결과에 따르면 *Bacillus* 속으로 동정된 균주의 세포 외 효소활성을 측정한 결과 cellulase와 protease 효소활성을 확인하였

**Table 5. Extracellular enzyme activities of isolated strains.<sup>1)</sup>**

Strains	Extracellular enzyme activities (mg/ml)			
	Amylase	Cellulase	Protease	Xylanase
ANG20	0.05±0.02 <sup>a</sup>	0.14±0.00 <sup>bc</sup>	0.55±0.02 <sup>abc</sup>	0.16±0.03 <sup>ab</sup>
ANG52	0.24±0.08 <sup>bcd</sup>	0.15±0.00 <sup>bcd</sup>	0.58±0.02 <sup>abc</sup>	0.14±0.01 <sup>ab</sup>
ANG56	0.11±0.04 <sup>abc</sup>	0.15±0.03 <sup>bcd</sup>	0.61±0.01 <sup>abcd</sup>	0.19±0.03 <sup>ab</sup>
DDP254	0.31±0.15 <sup>de</sup>	0.16±0.05 <sup>bcd</sup>	0.54±0.21 <sup>abc</sup>	0.22±0.09 <sup>ab</sup>
DDP256	0.39±0.04 <sup>e</sup>	0.12±0.01 <sup>b</sup>	0.46±0.14 <sup>ab</sup>	0.25±0.12 <sup>b</sup>
DDP257	0.27±0.04 <sup>cde</sup>	0.16±0.08 <sup>bcd</sup>	0.39±0.14 <sup>a</sup>	0.16±0.02 <sup>ab</sup>
DDP258	0.08±0.01 <sup>ab</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.74±0.28 <sup>cde</sup>	0.13±0.04 <sup>a</sup>
DDP269	0.24±0.06 <sup>bcd</sup>	0.12±0.05 <sup>b</sup>	0.86±0.24 <sup>de</sup>	0.25±0.09 <sup>b</sup>
DDP279	0.29±0.18 <sup>de</sup>	ND	0.60±0.25 <sup>abcd</sup>	0.15±0.04 <sup>ab</sup>
DDP313	0.20±0.06 <sup>abcd</sup>	0.21±0.01 <sup>de</sup>	0.76±0.03 <sup>cde</sup>	0.15±0.04 <sup>ab</sup>
DDP315	0.18±0.03 <sup>abcd</sup>	0.29±0.03 <sup>f</sup>	0.69±0.04 <sup>bcd</sup>	0.17±0.02 <sup>ab</sup>
DDP337	0.19±0.02 <sup>abcd</sup>	0.21±0.02 <sup>de</sup>	0.91±0.01 <sup>e</sup>	0.13±0.02 <sup>a</sup>
DDP386	0.24±0.01 <sup>bcd</sup>	0.20±0.05 <sup>cd</sup>	0.79±0.10 <sup>cde</sup>	0.24±0.06 <sup>b</sup>
DDP426	1.00±0.16 <sup>f</sup>	0.26±0.01 <sup>ef</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	0.70±0.05 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Data are mean ± SD of at least three replicates. Means with different letter (a-c) indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

<sup>2)</sup>ND: not detected.

으며, 이는 본 연구에서 분리한 균주들이 더 다양한 세포 외 효소활성을 나타내는 것으로 판단된다. Osman 등[5]의 연구에서 *B. wiedmannii*로 추정되는 ON-4가 starch 가수분해능을 가지고 있으며 그 외에도 다양한 탄수화물의 이용능을 확인하였으며, 추가적으로 pea plant에 접종하여 식물 성장 촉진 활성을 확인한 결과 plant 당 shoot fresh 무게(g), root fresh 무게(g)를 비교한 결과 물 처리만 한 대조군보다 각각 3.16배 및 3.55배 높게 나타났다. 본 연구에서 *B. wiedmannii*로 추정되는 DDP257은 0.27 mg/ml의 amylase 활성을 보였다. 추가적으로 분리된 균주들의 효소적 활성을 확인하기 위하여 API ZYM kit를 이용하여 측정하였는데, 공통적으로 alkaline phosphatase, esterase (C4), acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서 효소 활성을 나타내었으며, 특히 acid phosphatase에서는 분리된 균주 모두 높은 활성을 나타내었다(Table 6). 분리된 균주 중에서 ANG20과 DDP426은 총 10가지의 다양한 효소에서 활성을 나타냈다.

본 연구 결과에서 동정된 *Bacillus* 속 균주들의 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성, 미네랄 가용화능 및 세포의 효소 활성을 측정함으로써 미생물 제제로의 이용가능성을 조사하였다. 이들 균주 중에서 DDP257은 10종의 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성을 나타냈고, DDP256, DDP313은 9종에 대하여 항진균 활성을 나타내었다. 그리고 ANG20은 식물 성장 촉진 활성과 미네랄 가용화능에서 높은 활성을 나타냈다. 또한 세포 외 효소 활성에서는 DDP426이 amylase와 xylanase에서, DDP315, DDP337이 각각 cellulase, protease에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었

다. 향후 농작물 재배 시 발생하는 병원성 곰팡이의 생장을 억제하고 나아가 토양의 환경 개선에 기여하는 균주들을 확보하기 위하여 이들 균주들의 혼합배양과 작물배양 연구를 통해 식물 성장과 생산성 증대에 영향을 미치는지에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

**요 약**

본 연구에서는 토양 및 근권에 존재하는 *Bacillus* 속의 식물 성장 촉진 활성, 식물 병원성 곰팡이의 생장 억제활성, 미네랄 가용화능 및 세포 외 효소활성을 확인해 보고자 하였다. 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성에서 DDP257은 10종의 병원성 곰팡이에서 항진균 활성이 모두 나타났다. 식물 성장 촉진 인자인 indole-3-acetic acid 생성능에서는 ANG20이 70.97 µg/ml로 가장 높게 나타났다. 추가적으로 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase 생성능 조사에서는 총 10종에서 생성능을 확인하였고, 질소 고정능과 siderophore 생성능 조사에서는 대부분의 분리균주에서 활성을 확인하였다. 이후 분리된 균주에 대하여 phosphate, calcite, zinc과 같은 미네랄 가용화능을 확인하였으며 세포 외 효소활성에서도 대부분의 효소에서 활성이 나타났다. 특히 alkaline phosphatase, esterase (C4), acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서 선별된 균주 모두 유사한 활성을 보였다. 이는 *Bacillus* 속이 다양한 유기물과 항생물질 및 세포 외 효소를 분비함으로써 이러한 결과가 나타난 것으로 판단된다. 따라서, 본 연구 결과를 통해 토양의 환경 개선에 기여하는 균주를 활용하여 미생물 제제로써의

**Table 6. Biochemical characterization of isolated strains by API ZYM kit.**

Characteristics	ANG 20	ANG 52	ANG 56	DDP 254	DDP 256	DDP 257	DDP 258	DDP 269	DDP 279	DDP 313	DDP 315	DDP 337	DDP 386	DDP 426
Alkaline phosphatase	+++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+
Esterase (C8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Leucine arylamidase	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Trypsin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
α-Chymotrypsin	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+++	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
β-Glucuronidase	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
α-Glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
β-Glucosidase	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+++
N-Acetyl-β-glucosaminidase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++

+++ : strong positive (>40 nanomoles), ++ : positive (20-40 nanomoles), + : weakly positive (< 20 nanomoles), - : negative.



가능성을 제시한다.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Kang SJ, Kim JH, Joo GJ. 2005. Isolation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and physicochemical properties of compost mixed with microbial formulation. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* **23**: 342-350.
- Santoro MV, Cappellari LR, Giordano W, Banchio E. 2015. Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an *in vitro* study. *Plant Biol.* **17**: 1218-1226.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **163**: 173-181.
- Glick BR, Penrose DM, Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
- Osman NI, Yin S. 2018. Isolation and characterization of pea plant (*Pisum sativum* L.) growth-promoting Rhizobacteria. *Afr. J. Microbiol. Res.* **12**: 820-828.
- Kumar A, Prakash A, Johri BN. 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem, pp. 37-59. In Maheshwari, DK (eds.), *Bacteria in agrobiology: crop ecosystems*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Li XY, Mao ZC, Wu YX, Ho HH, He YQ. 2015. Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Biocontrol Sci. Technol.* **25**: 132-143.
- Khan SA, Hamayun M, Yoon HJ, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK, et al. 2008. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiol.* **8**: 231.
- Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya C, Kalra A. 2014. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* **171**: 884-894.
- Leveau JHJ, 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.
- Um YR, Kim BR, Jeong JJ, Chung CM, Lee Y. 2014. Identification of endophytic bacteria in *Panax ginseng* seeds and their potential for plant growth promotion. *Korean J. Med. Crop Sci.* **22**: 306-312.
- Milagres AMF, Machuca A, Napoleao D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Methods.* **37**: 1-6.
- Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **15**: 379-391.
- Tamilselvi SM, Thiyagarajan C, Uthandi S. 2016. Calcite dissolution by *Brevibacterium* sp. SOTI06: a futuristic approach for the reclamation of calcareous sodic soils. *Front. Plant Sci.* **7**: 1828.
- Ramesh A, Sharma SK, Sharma MP, Yadav N, Joshi OP. 2014. Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Appl. Soil Ecol.* **73**: 87-96.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Shin PY, Cho SJ. 2011. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **44**: 836-840.
- Oh DG, Jang YK, Woo JE, Kim JS, Lee CH. 2016. Metabolomics reveals the effect of garlic on antioxidant- and protease-activities during *Cheonggukjang* (fermented soybean paste) fermentation. *Food Res. Int.* **82**: 86-94.
- Seher NU, Ahmad M, Hussain A, Jamil M. 2020. Potential of exopolysaccharides producing-lead tolerant *Bacillus* strains for improving spinach growth under lead stress. *Int. J. Agric. Biol.* **24**: 1845-1854.
- Saran A, Imperato V, Fernandez L, Gkorezis P, d'Haen J, Merini LJ, et al. 2020. Phytostabilization of polluted military soil supported by bioaugmentation with PGP-trace element tolerant bacteria isolated from *Helianthus petiolaris*. *Agron.* **10**: 204.
- Jo HW, Tagele SB, Pham HQ, Kim MC, Choi SD, Kim MJ, et al. 2020. Response of soil bacterial community and pepper plant growth to application of *Bacillus thuringiensis* KNU-07. *Agron.* **10**: 551.
- Contreras-Pérez M, Hernández-Salmerón J, Rojas-Solis D, Rocha-Granados C, Orozco-Mosqueda M del C, Parra-Cota FI, et al. 2019. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) growth-promoting bacterium. *3 Biotech.* **9**: 1-6.
- Kim HS, Kim JY, Lee SM, Park HJ, Lee SH, Jang JS, et al. 2019. Isolation and characterization of various strains of *Bacillus* sp. having antagonistic effect against phytopathogenic fungi. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**: 603-613.
- Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: a001438.
- Glick BR. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **169**: 30-39.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 635-648.
- Hong SH, Lee MH, Kim JS, Lee EY. 2012. An evaluation of plant growth promoting activities and salt tolerance of rhizobacteria isolated from plants native to coastal sand dunes. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **40**: 261-267.

28. Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR. 2009. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 701-722.
29. Li SX, Wang ZH, Stewart BA. 2013. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. *Adv. Agron.* **118**: 205-397.
30. Hider RC, Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 637-657.
31. Kamaruzzaman MA, Abdullah SRS, Hasan HA, Hassan M, Othman AR, Idris M. 2020. Characterisation of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from *Scirpus grossus*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **23**: 101456.
32. Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
33. Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* **163**: 234-242.
34. Mundra S, Arora R, Stobdan T. 2011. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 2387-2396.
35. Raddadi N, Cherif A, Boudabous A, Daffonchio D. 2008. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Microbiol.* **5**: 47-52.
36. Kamran S, Shahid I, Baig DN, Rizwan M, Malik KA, Mehnaz S. 2017. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Front. Microbiol.* **8**: 2593.
37. Mumtaz MZ, Ahmad M, Jamil M, Hussain T. 2017. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiol. Res.* **202**: 51-60.
38. Shi S, Li S, Asim M, Mao J, Xu D, Ullah Z, et al. 2018. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 1900.
39. Park KH, Park HW, Lee SW, Lee SH, Myung KS, Lee SY, et al. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus* species having antifungal activity against pathogens of ginseng damping off. *Korean J. Pestic. Sci.* **20**: 380-387.
40. Kim BY, Ahn JH, Weon HY, Song J, Kim SI, Kim WG. 2012. Isolation and characterization of *Bacillus* species possessing antifungal activity against ginseng root rot pathogens. *Korean J. Pestic. Sci.* **16**: 357-363.