

근권 토양과 뿌리로부터 분리된 *Bacillus* sp.의 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능 비교

김희숙¹, 오가윤¹, 이송민¹, 김지윤¹, 이광희¹, 이상현², 장정수^{1*}

¹주) 엔젤 식품연구소

²신라대학교 제약공학전공

Received: June 2, 2021 / Revised: August 9, 2021 / Accepted: August 10, 2021

Comparison of Antifungal Activity, Plant Growth Promoting Activity, and Mineral-Solubilizing Ability of *Bacillus* sp. Isolated from Rhizosphere Soil and Root

Hee Sook Kim¹, Ka-Yoon Oh¹, Song Min Lee¹, Ji-Youn Kim¹, Kwang Hui Lee¹, Sang-Hyeon Lee², and Jeong Su Jang^{1*}

¹Food Research Center, Angel Co., Ltd., Busan 46988, Republic of Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

The purpose of this study was to evaluate the antifungal activity, plant-growth-promoting activity, and mineral solubilization ability of 10 species of phytopathogenic fungi to select a *Bacillus* sp. from rhizosphere soils and roots that can be used as a microbial agent. The antifungal activity for phytopathogenic fungi varied based on the *Bacillus* sp. Among the selected strains, DDP4, DDP16, DDP148, SN56, and SN95 exhibited antifungal activity for nine or more species of phytopathogenic fungi. Regarding nitrogen-fixation ability, all *Bacillus* sp. showed similar levels of activity, and siderophore production ability was relatively high in ANG42 and DDP427. The indole-3-acetic acid production abilities were in the range of 1.83-67.91 µg/ml, with variations in activity based on the *Bacillus* sp. One strain with a high activity was selected from each species, and their mineral solubilization abilities were examined. Most *Bacillus* sp. could solubilize phosphoric acid and calcium carbonate, and DDP148 and SN56 could solubilize silicon and zinc, respectively. These results suggested that *Bacillus* sp. can be considered potential multi-purpose microbial agents for plant growth promotion and disease prevention.

Keywords: *Bacillus* sp., microbial agent, mineral solubilization, plant growth promoting rhizobacteria, extracellular enzyme

서론

식물 성장 촉진 근권 미생물(PGPR, plant growth promoting rhizobacteria)은 식물 뿌리 주변에 서식하면서 식물 성장을 촉진시키는 미생물로 질소 고정, siderophore 생성 및 인산, 칼슘, 아연 가용화를 통한 미네랄 공급과 indole-3-acetic acid (IAA)와 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase 생성을 통해 식물의 성장에 도움을 주는 것으로 알려져 있다[1–3]. 현재까지 알려진 PGPR로는 *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*,

Klebsiella, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* 등이 있다 [2]. 그 중에서도 *Bacillus* sp.을 기반으로 한 미생물제제가 다수 존재하는데, 이는 다양한 환경 조건에서 빠른 적응력과 식물 성장 촉진 및 식물 병원성 곰팡이에 대해 높은 항진균 활성 등 *Bacillus* sp.이 가지는 고유한 특성과 관련이 있다[4, 5].

Bacillus sp.은 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대한 방제 활성을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 이에 따른 메커니즘으로는 첫 번째로 토양에서 자원에 대한 경쟁을 일으킴으로써 식물 병원성 곰팡이의 성장을 억제하며, 방제 활성의 정도는 영양소 흡수와 이화 작용의 효율성에 따라 달라진다. 두 번째로는 *Bacillus* sp.에 의해 생산되는 수많은 항진균성 물질과 세포 외 효소 및 휘발성 물질 등에 의해 방제 활성이 일어나며, 이 외에도 유도 전신 저항성(induced systemic resistance, ISR)을 일으켜 다양한 병원체를 제어한다[4, 6].

*Corresponding author

Tel.: +82-51-852-3636

E-mail: jeongsu25@naver.com

현재까지 *Bacillus* sp.은 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* 등 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대해 방제활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며[7-10], 최근 연구들에 의하면, *Bacillus* sp.이 *Alternaria* sp.과 *F. oxysporum*에 의해 유발되는 바나나 질병뿐만 아니라, 토마토에 질병을 일으키는 *Botrytis cinerea*를 효과적으로 제어한다고 보고되었다[11, 12].

식물은 성장하는 동안 건조, 염분, 기온 변화와 같은 환경 및 다양한 질병에 의해 생물학적 스트레스와 비생물학적 스트레스를 받는다[13]. 식물의 성장에 있어 에틸렌은 가장 중요한 식물 호르몬 중 하나로 낮은 농도에서는 식물의 성장, 세포 대사와 같은 활성을 제어하는 데 효과적이거나 가뭄, 홍수, 병원체 공격과 같은 스트레스 조건에서는 에틸렌의 농도가 증가함에 따라 노화와 세포 손상이 가속화되어 오히려 식물 생장이 억제된다[14]. 현재까지 알려진 메커니즘으로는 PGPR에 의해 생성되는 ACC deaminase를 통해 식물 뿌리 주변의 항상성을 유지시킴으로써 스트레스를 감소시키는 것이다[2, 15]. Misra와 Chauhan [16]의 연구에 따르면, ACC deaminase 활성을 가진 *Bacillus* sp.을 접종하여 옥수수를 재배하였을 때, 에틸렌 생합성 효소가 감소하는 것을 확인하였으며 이러한 결과를 통해 스트레스 조건하에서 *Bacillus* sp.이 식물 내의 에틸렌 생합성을 조절할 수 있음을 보고하였다.

미네랄은 식물의 성장과 발달에 필수적이거나 토양 내에서 대부분 불용성의 형태로 존재하고 있어 식물이 이용하는 데 어려움이 있다[17]. 이와 관련하여 식물은 토양 내 존재하는 PGPR을 활용하는데, PGPR은 유기산 등을 생성하여 불용성 미네랄을 가용화함으로써 식물에 미네랄을 공급하여 식물 생장에 도움을 주는 것으로 알려져 있다[17, 18]. 그 중에서도 *Bacillus* sp.의 미네랄 가용화능과 관련한 연구들에 의하면, 옥수수 성장 촉진과 수확량 증대[19], 세포벽 강화와 질병 감소[20] 등을 보고하였다.

이와 같이 *Bacillus* sp.을 기반으로 한 미생물 제제를 개발하기 위해서 근권 및 다양한 환경으로부터 분리하여 식물 성장 촉진 및 방제 활성에 관한 연구가 활발히 수행되고 있으나 여전히 다양한 활성을 동시에 가진 *Bacillus* sp.에 대한 연구는 미흡한 실정이다[7-12, 16, 19, 20]. 따라서, 방제 활성과 식물 성장 촉진 및 미네랄 공급 등 다기능을 가진 미생물 제제를 개발하기 위해서 부산, 창원 지역의 텃밭, 해수욕장, 갈대밭 등 다양한 조건의 토양과 뿌리로부터 미생물을 분리하고 우수한 활성을 지닌 *Bacillus* sp.을 선별하고자 본 연구를 수행하였다. 미생물 제제 적합성은 10종의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성과 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능으로 평가하였다.

재료 및 방법

미생물 분리

부산, 창원의 텃밭, 해수욕장, 갈대밭 등 중성과 약산성 토양을 중심으로 토양 및 뿌리를 채취하여 미생물을 분리하였다. 채취한 토양은 시료 1 g과 멸균된 생리식염수에 현탁 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% KH_2PO_4 , 0.3% K_2HPO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% MnSO_4 , 1.5% agar), potato dextrose agar (PDA, Difco™), tryptic soy agar (TSA, Difco™) plate에 도말하여 균을 분리하였다. 채취한 뿌리는 계면활성제인 Tween 80과 표백제인 perchloric acid (1%)를 처리하여 표면 미생물을 제거한 후 BA, GMSA, PDA, TSA에 30°C에서 2일간 배양하여 순수 분리하였다. 이후 분리 균주를 이용하여 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능을 조사하였다.

미생물의 동정

분리 균주의 동정을 위하여 universal primer인 27F, 1492R를 이용하였으며, 증폭된 유전자 단편의 염기서열 분석은 Solgent Co., Ltd. (Korea)에 의뢰하였다. Phylogenetic tree 제작은 MEGA 프로그램(version 7.0, MEGA software)을 이용하였다.

식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성

선별된 균주들의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성을 조사하기 위하여 *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 41065 등으로 총 10종을 대상으로 검정하였다. 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항능은 PDA 배지에서 well diffusion법을 이용하여 분리 균주를 접종하여 검정 균주와 25°C에서 대치 배양하였다. 식물 병원성 곰팡이와 미생물 간의 거리를 측정하여 억제율로 환산하였다.

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

R: 식물 병원성 곰팡이와 분리 균주 사이의 거리(mm)

r: 식물 병원성 곰팡이의 성장 반경(mm)

질소고정능, siderophore 생성능

질소를 고정할 능력이 있는 균주만 성장할 수 있는 선택 배지인 nitrogen free bromothymol blue (NFB) 배지를 이용하여 질소고정능을 확인하고자 하였다. NFB 배지에 loop 을 이용하여 전배양된 균주를 접종하여 30°C에서 4일간 배양하면서 배지 색이 푸른색으로 변한 경우를 양성으로 판정 하였다[21]. Siderophore 생성능을 확인하기 위해서 chrome azurol S (CAS) blue agar plate assay 방법을 이용하였다 [22]. 선별된 균주를 접종하여 30°C에서 4일간 배양한 후 orange halo zone 형성 유무에 따라 siderophore 생성능을 확인하였다.

IAA (indole acetic acid) 생성능

IAA 생성능을 확인하기 위해서 0.1%의 트립토판이 첨가된 King's B 배지(2% proteose peptone, 0.25% K₂HPO₄, 0.6% MgSO₄, 1.5% glycerol, pH 7.2)에 전배양된 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 배양액은 원심분리 후 상층액을 분리하여, Salkowski's reagent (35% HClO₄ 50 ml, 0.5 M FeCl₃ 1 ml)와 1:2 (v/v)의 비율로 혼합한 다음 발색되는 동안 상온에서 30분간 정치하였다. 발색의 정도는 분광광도계(Spectrophotometer, Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 표준물질로서는 IAA를 이용하여 검량선을 작성한 뒤 시료의 농도를 환산하였다[23].

ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase 생성능

ACC deaminase 활성을 확인하기 위해서 Barnawal 등 [15]의 방법을 응용하여 측정하였다. 선별된 균주를 TSB 배지에 30°C에서 2일간 배양한 뒤 원심분리하여 균체를 회수 하였다. 회수한 균체는 DF salt 배지(0.4% KH₂PO₄, 0.6% Na₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.0001% FeSO₄, 0.000001% H₃BO₃, 0.000001% MnSO₄·H₂O, 0.000007% ZnSO₄, 0.000005% CuSO₄, 0.000001% MoO₃, 0.2% glucose, 0.2% C₆H₁₂O₇, 0.2% C₆H₈O₇, pH 7.3)로 두 차례 세척한 후 질소 원으로 3 mM ACC가 첨가된 DF salt 배지에 접종하여 30°C에서 5일간 배양하였다. 이후 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 분리 균주의 성장 정도를 통해 ACC deaminase 생성을 확인하였다.

인산과 탄산칼슘 가용화능

인산과 탄산칼슘 가용화능을 확인하기 위해서 calcium phosphate가 첨가된 Pikovskaya (0.05% yeast extract, 1% glucose, 0.5% 10CaO·3P₂O₅·H₂O, 0.05% (NH₄)₂SO₄,

0.02% KCl, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.00001% MnSO₄·5H₂O, 0.00001% FeSO₄·7H₂O, agar 1.5%, pH 6.8) 배지 [24]와 Deveze-Bruni agar (0.5% D-glucose, 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, 0.04% K₂HPO₄, 0.001% MgSO₄, 0.5% NaCl, 0.005% (NH₄)₂SO₄, 0.5% CaCO₃, 1.5% agar, pH 6.8) 배지[25] 이용하였다. 배지 증양에 cork borer를 이용하여 잘라낸 뒤, 선별된 균주의 상등액을 10 µl씩 접종하여 30°C에서 4일간 배양하면서 clear zone의 형성 유무를 확인하였다.

아연 및 규소 가용화능

아연 가용화능을 조사하기 위해서 tris-minimal salt (1% D-glucose, 0.606% Tris-HCl, 0.468 % NaCl, 0.149% KCl, 0.107% NH₄Cl, 0.043% Na₂SO₄, 0.02% MgCl₂·2H₂O, 0.003% CaCl₂·2H₂O, 0.1998% Zn₃(PO₄)₂·4H₂O, 1.5% agar, pH 7.0)를 이용하여 Zn₃(PO₄)₂에 대한 가용화능을 확인하고자 하였다[26]. 규소 가용화능을 조사하기 위해서 silicate agar (1% D-glucose, 0.25% magnesium trisilicate, 1.5% agar, pH 6.8) 배지를 이용하였다. 고체배지 증양에 cork borer를 이용하여 잘라낸 뒤, 선별된 균주의 상등액을 10 µl씩 접종하여 30°C에서 4일간 배양하면서 균체 주위의 clear zone 형성 유무를 조사하여 규소 가용화능을 측정하였다[27].

효소 활성 측정

Amylase 활성은 Miller [28]의 방법을 응용하였으며, 배양 상등액과 1% starch solution을 1:1로 반응시킨 후 DNS (dinitrosalicylic acid)와 혼합하였다. 이후 100°C에서 열처리 한 뒤 얼음에 냉각시킨 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cellulase와 xylanase의 활성은 Shin과 Cho [29]의 방법을 응용하였으며, 배양 상등액과 각각 1% CMC (carboxymethyl cellulose) solution과 1% xylan solution을 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 이후 DNS를 첨가하여 100°C에서 열처리 한 뒤 얼음에 냉각시킨 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성은 Oh 등 [30]의 방법을 응용하여 실시하였다. 배양 상등액은 0.65% casein과 혼합한 뒤 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이후 0.44 M trichloroacetic acid를 첨가하여 37°C에서 10분간 단백질을 응고시킨 뒤 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 후 여과액과 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 흡광도는 660 nm에서 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 \pm 표준편차 (Mean \pm 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

유용 미생물의 분리 및 동정

부산, 창원 지역의 토양 및 뿌리로부터 분리된 510균주 중 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과를 통해 *Bacillus* sp.으로 확인된 13균주를 선별하였다. 선별된 13균주의 염기서열을 분석한 결과, *B. drentensis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. marisflavi*, *B. pumilus*, *B. subterraneus* 균주들과 99% 이상의 높은 상동성을 나타내었다(Table 1). 또한 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 계통도를 분석한 결과, 선별한 균주들은 각각 *B. drentensis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. marisflavi*, *B. pumilus*, *B. subterraneus*와 높은 유연관계를 가지는 것으로 확인되었으며(Fig. 1), Bootstrap 값도 62–100%로 높은 수치를 나타낸 것으로 보아 각각 *Bacillus* sp.에 속하는 것으로 추정된다. 이후 미생물 제제로 적합한 *Bacillus* sp.를 선별하기 위해서 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능을 평가하였다.

식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성

분리한 *Bacillus* sp.을 다양한 작물의 방제제로 적합한 균주를 선별하기 위해서 식물 병원성 곰팡이 10종을 이용하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. *B. drentensis* SN95, *B. licheniformis* DDP16, *B. marisflavi* SN56, *B. subterraneus* DDP4 균주들은 식물 병원성 곰팡이 10종에 대하여 항진균 활성을 갖고 있는 것을 확인하였으며, 그 중에서도 *B. licheniformis* DDP16 균주는 6종의 식물 병원성 곰팡이에 대해 70% 이상의 방제활성을 가짐으로써 분리 균주 중 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 그 다음으로 *B. pumilus* DDP148 균주가 식물 병원성 곰팡이 9종에 대해 항진균 활성을 갖고 있는 것을 확인하였다. 그러나, *B. firmus* DDP296, *B. firmus* SN215, *B. licheniformis* DDP17, *B. pumilus* DDP427, *B. subterraneus* DDP3 균주들에서는 항진균 활성을 확인할 수 없었으며, 결과를 통해 분리된 *Bacillus* sp.에 따라 항진균 활성이 차이가 나는 것을 확인하였다. 결과적으로, 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. 중에서 SN95, DDP16, SN56, DDP4 균주들은 식물 병원성 곰팡이 10종에 대해 항진균 활성을 가짐으로써 검은무늬병, 잣빛 곰팡이, 탄저병, 잎마름병, 시들병, 역병, 뿌리 썩음병, 균핵병 등을 유발하는 곰팡이에 취약한 작물에 적용 가능할 것으로 추정되며, 향후 다양한 처리 방법을 통하여 방제제로써 활용 가능할 것으로 판단된다.

질소고정능과 siderophore 생성능

분리한 *Bacillus* sp.의 질소고정능을 확인한 결과, 모든 균주에서 질소고정능이 확인되었으며(Table 3), Kim 등[31]의

Table 1. Identification of isolated strains abilities 16S rRNA sequencing.

Isolate	Description		
	Strains	Identity (%)	Accession
SN95	<i>Bacillus drentensis</i> strain NBRC 102427	99.9	NR_114085.1
DDP296	<i>Bacillus firmus</i> strain NBRC 15306	99.6	NR_112635.1
SN215	<i>Bacillus firmus</i> strain NBRC 15306	99.6	NR_112635.1
DDP16	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13	99.6	NR_118996.1
DDP17	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13	99.5	NR_118996.1
ANG42	<i>Bacillus marisflavi</i> strain TF-11	99.9	NR_118437.1
DDP343	<i>Bacillus marisflavi</i> strain TF-11	99.9	NR_118437.1
SN56	<i>Bacillus marisflavi</i> strain TF-11	99.9	NR_118437.1
DDP148	<i>Bacillus pumilus</i> strain ATCC 7061	99.9	NR_043242.1
DDP416	<i>Bacillus pumilus</i> strain ATCC 7061	99.9	NR_043242.1
DDP427	<i>Bacillus pumilus</i> strain ATCC 7061	99.9	NR_043242.1
DDP3	<i>Bacillus subterraneus</i> strain COOI3B	99.4	NR_104749.1
DDP4	<i>Bacillus subterraneus</i> strain COOI3B	99.4	NR_104749.1

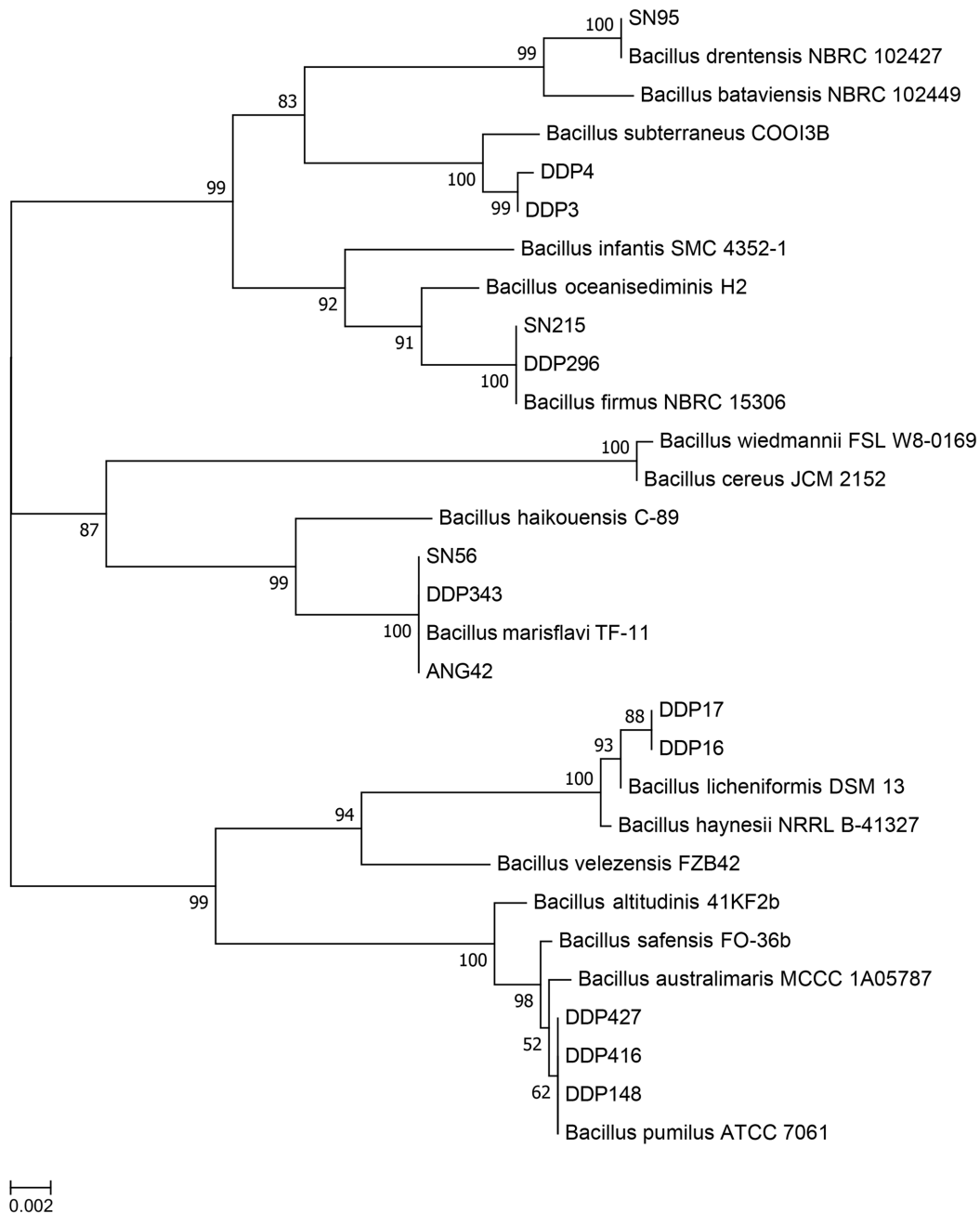


Fig. 1. Phylogenetic tree based on nearly 16S rRNA gene sequences. Numbers at the nodes are percentage bootstrap values (1,000 replicates). Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position.

연구에서도 다양한 *Bacillus* sp.에서 질소고정능을 나타낸다고 보고하였다. 이를 통해 환경문제 및 인체 유해성 등과 같은 다양한 문제를 일으키는 질소비료의 사용을 줄일 수 있을 것으로 보이며, 재생이 불가능한 질소비료의 문제점도 해결할 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 철 공급과 관련하여 siderophore 생성능을 확인한 결과, *B. firmus* SN215, *B.*

pumilus DDP416, *B. subterraneus* DDP3 균주들을 제외한 분리 균주들에서 siderophore 생성능을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 *B. marisflavi* ANG42와 *B. pumilus* DDP427 균주에서 높은 활성을 나타내었다(Table 3). *Bacillus* sp.에 의해 생성되는 siderophore는 곰팡이에 의해 생성되는 siderophore보다 철과의 친화성이 높은 것으로 알

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

Strains	Antifungal activities (%)										
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Corynespora cassicola</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
<i>Bacillus drentensis</i> SN95	62.03 ± 1.84 ^d	56.90 ± 6.80 ^d	65.70 ± 0.87 ^d	70.00 ± 0.30 ^{de}	45.53 ± 2.05 ^c	45.30 ± 4.56 ^{ab}	53.87 ± 3.59 ^c	52.20 ± 2.11 ^d	41.97 ± 3.39 ^b	42.63 ± 4.51 ^c	
<i>Bacillus firmus</i> DDP296	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus firmus</i> SN215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus licheniformis</i> DDP16	77.17 ± 5.29 ^e	75.13 ± 4.21 ^e	73.20 ± 4.20 ^e	72.07 ± 6.35 ^e	68.23 ± 5.12 ^d	49.70 ± 6.03 ^b	55.63 ± 3.92 ^c	66.23 ± 2.43 ^e	70.40 ± 6.36 ^d	73.00 ± 2.77 ^d	
<i>Bacillus licheniformis</i> DDP17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus marisflavi</i> ANG42	35.00 ± 6.15 ^b	16.07 ± 1.85 ^a	44.30 ± 5.14 ^c	40.40 ± 4.70 ^b	26.67 ± 3.51 ^b	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus marisflavi</i> DDP343	-	-	33.70 ± 4.96 ^b	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus marisflavi</i> SN56	51.50 ± 2.60 ^c	41.47 ± 5.55 ^c	65.10 ± 3.15 ^d	65.00 ± 2.30 ^c	42.83 ± 4.15 ^c	42.13 ± 2.95 ^a	49.13 ± 5.85 ^b	45.90 ± 1.73 ^c	47.70 ± 2.25 ^c	29.40 ± 1.40 ^a	
<i>Bacillus pumilus</i> DDP148	15.50 ± 2.19 ^a	23.60 ± 3.34 ^b	17.33 ± 4.09 ^a	26.50 ± 4.17 ^a	19.37 ± 2.17 ^a	-	36.83 ± 2.08 ^a	31.60 ± 5.72 ^b	27.37 ± 5.16 ^a	32.23 ± 4.79 ^a	
<i>Bacillus pumilus</i> DDP416	-	-	-	-	-	-	-	13.53 ± 2.73 ^a	-	-	
<i>Bacillus pumilus</i> DDP427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subterraneus</i> DDP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subterraneus</i> DDP4	64.63 ± 1.79 ^d	56.23 ± 1.50 ^d	65.00 ± 5.83 ^d	67.23 ± 3.93 ^{cd}	46.03 ± 1.38 ^c	43.73 ± 4.99 ^{ab}	51.60 ± 3.74 ^{bc}	55.33 ± 3.43 ^d	37.77 ± 4.97 ^b	35.40 ± 0.87 ^b	

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

려져 있으며, 철 공급뿐만 아니라 다양한 작물(옥수수, 후추, 밀 등)에서 병원균 억제 효과에 관한 연구 결과가 보고되었다[32]. 따라서, 본 연구 결과에서 분리 균주들에 의해서 생성된 siderophore가 병원성 곰팡이와의 철 흡수 경쟁에서 철 흡수율을 높임으로써 철 공급뿐만 아니라 10종의 곰팡이에 대한 항진균 활성에 대해서도 영향을 준 것으로 판단된다.

IAA (Indole-3-acetic acid) 생성능 및 ACC deaminase 생성능

식물 성장 호르몬인 IAA 생성능을 측정된 결과, *Bacillus* sp.은 약 1.83–67.91 µg/ml의 IAA를 생성하였으며, 분리 균주 중에서는 *B. pumilus* DDP427 균주가 67.91 µg/ml의 IAA를 생성함으로써 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 3). Kumar 등[33]은 분리한 *B. pumilus* JPVS11가 64.52 µg/ml의 IAA를 생성하는 것으로 보고했으며, 본 연구에서 분리한 *B. pumilus* DDP427과 유사한 활성을 나타내었다. 또한, Bhutani 등[34]은 *Vigna radiata*에 IAA 생성능을 가진 *Bacillus* 균주를 접종한 결과, 무처리군에 비해 root length (cm)가 약 2.6–4.1배, shoot length (cm)가 약 1.2–1.3배, lateral roots는 약 1.4–2.2배 증가한 것으로 보고하였으며, 이는 IAA 생성이 식물의 성장을 촉진시킬 수 있음을 나타내

었다. 따라서, 본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp.이 식물 뿌리 주변에서 서식하면서 뿌리 삼출물을 통해 IAA를 생성함으로써 식물의 성장과 발달에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

ACC deaminase 생성능 확인한 결과, 분리된 균주 중 *B. drentensis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. marisflavi* 균주들에서는 모두 ACC deaminase 생성능이 확인되었으며, *B. subterraneus*에서는 ACC deaminase 생성능을 확인할 수 없었다. 또한 *B. pumilus*는 DDP416과 DDP427 균주에서만 ACC deaminase 생성능을 확인할 수 있었다(Table 3). Zahir 등[35]의 연구에 의하면, 멸균 조건에서 ACC deaminase 활성을 가진 균주를 이용하여 완두콩을 재배한 결과, 무처리군에 비해서 root length는 약 20–80%, shoot length는 약 7–41%, fresh weight는 약 16–72% 정도로 현저하게 증가하였으며, 또한 물이 부족한 상황에서는 토양층의 물 흡수를 도울 수 있음을 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 IAA와 ACC deaminase 생성능을 가진 *Bacillus* sp.이 에틸렌 수준을 조절함으로써 식물의 성장에 도움을 줄 것으로 추정되며, 향후 환경 스트레스 조건에서 작물재배를 통해 환경 스트레스로부터 식물 성장 촉진 활성에 미치는 영향에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다. 최종적으로 식물

Table 3. Plant growth promoting activities of isolated strains.

Strains	Nitrogen fixation ¹⁾	Siderophore production ²⁾	IAA production (µg/ml) ³⁾	ACC deaminase production ⁴⁾
<i>Bacillus drentensis</i> SN95	+	+	19.75 ± 0.84 ^d	+
<i>Bacillus firmus</i> DDP296	+	+	42.83 ± 3.17 ^f	+
SN215	+	-	18.44 ± 1.76 ^d	+
<i>Bacillus licheniformis</i> DDP16	+	+	8.19 ± 0.12 ^c	+
DDP17	+	+	5.40 ± 0.01 ^{bc}	+
<i>Bacillus marisflavi</i> ANG42	+	++	46.46 ± 1.11 ^g	+
DDP343	+	+	24.20 ± 1.91 ^e	+
SN56	+	+	3.85 ± 0.79 ^{ab}	+
<i>Bacillus pumilus</i> DDP148	+	+	2.67 ± 0.08 ^{ab}	-
DDP416	+	-	24.22 ± 2.67 ^e	+
DDP427	+	++	67.91 ± 3.94 ^h	+
<i>Bacillus subterraneus</i> DDP3	+	-	7.20 ± 1.57 ^c	-
DDP4	+	+	1.83 ± 0.03 ^a	-

¹⁾Nitrogen fixation activity determined by color change of NFB broth.

²⁾Siderophore production confirmed by orange halo zone. ++: strong positive (> 15 mm), +: positive (≤ 15 mm), -: negative.

³⁾Data are mean ± SD of at least three replicates. Means with different letter (a-h) indicate significant differences at $p < 0.05$.

⁴⁾ACC deaminase production determined by growth on medium with only ACC as nitrogen source. +: positive (absorbance at 600 nm ≥ 0.1), -: negative.

병원성 곰팡이 방제 활성과 식물 성장 촉진 결과를 비교하여 species마다 활성이 높은 1 균주씩 즉, *B. drentensis* SN95, *B. firmus* DDP296, *B. licheniformis* DDP16, *B. marisflavi* SN56, *B. pumilus* DDP148, *B. subterraneus* DDP4 균주를 최종 선정하였다.

인산 및 탄산칼슘 가용화능

인산 가용화능을 확인한 결과, DDP4 균주를 제외한 SN95, DDP296, DDP16, SN56, DDP148에서 활성을 나타내었다 (Table 4). Prakash와 Arora [36]은 *Mentha arvensis*에 인산 가용화능을 가진 *Bacillus* sp.을 접종한 결과, 무처리군에 비해 total fresh weight와 total dry weight는 각각 46.27%, 49.57% 증가하였으며, shoot length와 root length는 각각 51.11%, 63.66%로 크게 증가한 것으로 보고하였

다. 또한, Alemneh 등[37]은 IAA 생성능과 인산 가용화능 간의 연관성에 대해 인산 가용화의 정도가 IAA 농도와 관련이 있다고 보고하였는데, 본 연구 결과 IAA 생성능을 가진 분리 균주 대부분 인산 가용화능을 갖는 것은 확인하였으나 인산 가용화 정도가 IAA 농도에 비례하여 나타나지는 않았다. 이러한 결과는 인산 가용화능이 IAA 농도의 영향보다는 배양 과정에서 생성되는 유기산의 영향을 더 많이 받기 때문인 것으로 추정된다.

토양 중에 칼슘 함량은 약 0.1–5.0% 정도를 차지하지만 다른 미네랄과 마찬가지로 대부분 이용하기 어려운 형태로 존재하며, 미생물에 의한 탄산칼슘 가용화에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다[17, 25]. 탄산칼슘 가용화능을 확인한 결과, *B. firmus* DDP296, *B. marisflavi* SN56, *B. pumilus* DDP148, *B. subterraneus* DDP4 균주들에서 활성을 갖는

Table 4. Mineral solubilization abilities of isolated strains.¹⁾

Strains	Phosphate	CaCO ₃	Zn ₃ (PO ₄) ₂ ·4H ₂ O	Mg ₂ Si ₃ O ₈
<i>Bacillus drentensis</i> SN95	+	-	-	-
<i>Bacillus firmus</i> DDP296	+	+	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> DDP16	+	-	-	-
<i>Bacillus marisflavi</i> SN56	+	+	-	+
<i>Bacillus pumilus</i> DDP148	+	+	+	-
<i>Bacillus subterraneus</i> DDP4	-	+	-	-

¹⁾+: positive (≥ 15 mm), -: negative.

것으로 나타났다(Table 4). 현재까지 보고된 미네랄 가용화의 메커니즘에 의하면 유기산, 무기산, 킬레이트 물질에 의해 가용화되며, 주로 acetic acid, lactic acid, propionic acid, pyruvic acid, succinic acid와 같은 유기산, phosphatase와 같은 인산 분해 효소 생산에 의해 가용화되는 것으로 알려져 있다[25]. 따라서, 본 연구에서 인산 및 탄산칼슘 가용화능은 배양 중에 생산되는 유기산에 의해 가용화된 것으로 보이며 미네랄을 가용화함으로써 식물이 인과 칼슘을 흡수하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

아연 및 규소 가용화능

아연 가용화능을 확인한 결과, *B. pumilus* DDP148에서만 아연 가용화능을 확인할 수 있었다(Table 4). 또한, 아연으로 오염된 토양에서는 PGPR 존재 여부에 따라 식물체 내에 축적된 아연화합물의 형태에서 차이가 나타나는데, PGPR이 없는 조건에서는 조직 내 아연이 oxalate 혹은 sulfate염 형태로 축적되었으나 PGPR이 존재할 경우에는 독성이 적은 아연 킬레이트 형태로 조직 내부에 축적되었다[38]. 이와 같은 결과는 PGPR이 아연 킬레이트 화합물 형성에 기여하여 독성이 적은 형태로 축적되는 것으로 판단되며, 본 연구에서 분리한 *B. pumilus* DDP148가 아연을 식물이 이용할 수 있는 형태로 가용화시킴으로써 아연을 공급하여 뿌리발달 및 수확량에 도움을 줄 것으로 판단된다. 미량 영양소 중 규소(Si)는 일반적으로 Al, Mg, Ca, Na, K 및 Fe와 치환된 규산염의 형태로 존재하여 이용률이 낮다. 따라서, 본 연구에서는 규소 가용화능을 가진 균주를 확인하고자 하였으며, *B. marisflavi* SN56에서만 규소 가용화능을 확인할 수 있었다. 식물은 monosilicic acid 형태로 규소를 흡수하고 다양한 메커니즘을 통해 세포벽을 강화하며, 강화된 세포벽은 질병과 곤충 그리고 다양한 기후 조건에 대하여 저항성을 증진시키는 것으로 알려져 있다[39]. 따라서, *Bacillus* sp.이 생성하는 유기산, 무기산, 킬레이트 등에 의해 가용화된 미네랄은 다양한 메커니즘을 통해 식물 생장을 촉진시키거나 병원

균에 대해 저항성을 증가시키는 것으로 추정되며, 결과적으로 본 연구에서 미네랄 가용화능이 식물 성장 촉진 활성과 10종의 식물 병원성 곰팡이에 대한 방제활성에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

효소 활성 측정

근권 미생물을 이용하여 식물 병원성 곰팡이에 생태학적으로 대응하는 방제법 중 하나로 amylase, cellulase, protease, xylanase 등 근권 미생물에 의해 분비되는 세포 외 효소들은 식물 병원성 곰팡이의 세포벽을 분해함으로써 용균작용(degradative parasitism)을 수행한다[40]. 따라서, 최종 선별된 6균주를 대상으로 amylase, cellulase, protease, xylanase 활성을 측정하고자 하였다. 그 결과 최종 선별된 균주들에서 모두 amylase, cellulase, protease, xylanase의 활성을 확인할 수 있었다(Table 5). 특히, cellulase는 식물 병원성 곰팡이의 세포벽이 cellulose로 구성되어 있음에 따라 세포벽을 분해하여 식물 병원성 곰팡이의 생장을 억제하며, protease는 식물의 방어 기작을 조절하여 식물 병원성 곰팡이에 대해 유도 저항성을 갖게 하는 것으로 알려져 있다[41]. 결과적으로, 근권 미생물에 의해 분비되는 세포 외 효소들이 식물 병원성 곰팡이의 생장에 영향을 미치는 것으로 추정되며, 또한 토양 내 식물 성장에는 필요하지만 이용할 수 없는 고분자의 물질을 이용 가능한 저분자의 물질로 변화시킴으로써 식물 성장에도 도움을 줄 것으로 판단된다. 이 외에도 최종 선별된 균주들의 효소 활성을 확인하기 위해서 API ZYM kit를 이용하여 측정하였다. 6균주에서 공통적으로 esterase (C8)와 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase 활성을 나타내었으며, esterase (C4)와 acid phosphatase 효소 활성의 경우에는 1-2균주를 제외한 대부분 균주에서 활성을 나타내었다(Table 6). 최종적으로 선별된 균주들은 다양한 효소 활성을 가짐으로써 병원성 미생물에 대한 방제 활성 및 영양분 공급에도 영향을 미칠 것으로 판단된다.

본 연구는 화학비료 및 농약 사용으로 인한 환경우려와 식

Table 5. Extracellular enzyme activity of isolated strains.¹⁾

Strains		Extracellular enzyme (mg/100 ml)			
		Amylase ²⁾	Cellulase ³⁾	Protease ⁴⁾	Xylanase ⁵⁾
<i>Bacillus drentensis</i>	SN95	53.28 ± 1.67 ^d	12.70 ± 0.97 ^b	60.02 ± 3.93 ^a	125.16 ± 4.92 ^c
<i>Bacillus firmus</i>	DDP296	24.30 ± 1.34 ^b	11.80 ± 0.68 ^b	76.44 ± 3.93 ^c	18.67 ± 1.92 ^b
<i>Bacillus licheniformis</i>	DDP16	29.34 ± 2.91 ^c	17.63 ± 2.60 ^c	94.96 ± 0.25 ^d	21.23 ± 3.75 ^b
<i>Bacillus marisflavi</i>	SN56	22.60 ± 2.82 ^{ab}	16.37 ± 0.69 ^c	57.76 ± 4.33 ^a	15.16 ± 0.52 ^b
<i>Bacillus pumilus</i>	DDP148	18.97 ± 2.36 ^a	6.56 ± 0.51 ^a	79.50 ± 3.61 ^c	6.72 ± 0.07 ^a
<i>Bacillus subterraneus</i>	DDP4	86.04 ± 4.17 ^e	29.67 ± 1.69 ^d	67.84 ± 0.30 ^b	185.76 ± 5.98 ^d

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

²⁾⁻⁵⁾In each assay, the standard substances are maltose, glucose, tyrosine and D-xylose, respectively.

Table 6. Enzyme activity of isolated strains by API kit.¹⁾

Characteristics	<i>B. drentensis</i> SN95	<i>B. firmus</i> DDP296	<i>B. licheniformis</i> DDP16	<i>B. marisflavi</i> SN56	<i>B. pumilus</i> DDP148	<i>B. subtterraneus</i> DDP4
Alkaline phosphatase	-	+	++	-	+	-
Esterase(C4)	+	+	+	-	+	+
Esterase (C8)	+	+	+	+	+	+
Leucine arylamidase	+	-	-	-	-	+
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	+
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	+	-
Acid phosphatase	+	+++	+++	-	++	-
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+
α -Galactosidase	+	-	-	-	-	-
β -Glucuronidase	+	-	-	-	-	-
α -Glucosidase	-	+	+	-	-	++

¹⁾ -: negative, +: weakly positive, ++: positive, +++: strong positive.

품 안전 문제를 해결하기 위한 방법으로 미생물 제제에 적합한 *Bacillus* sp.을 선별하기 위해서 수행하였다. 본 연구 결과, 다양한 토양과 뿌리로부터 선별한 *Bacillus* sp.의 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능을 비교하여 우수한 활성을 갖는 균주들을 선별하였으며, 미생물 제제로서의 활용 가능성을 나타내었다. 향후 미생물 제제로서 활용하기 위해서는 최종 선별된 균주에 대해 단독 또는 복합배양, 제형에 따른 성장 촉진 활성 측정 및 작물 재배 등을 통해 식물 성장 촉진 활성에 미치는 영향에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 근권 토양 및 뿌리에 존재하는 미생물 중 미생물 제제로 적합한 *Bacillus* sp.을 선별하기 위하여 10종의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능을 평가하였다. 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성은 *Bacillus* sp.에 따른 차이를 보였으며, 선별된 균주 중 DDP4, DDP16, DDP148, SN56, SN95는 9종 이상의 식물 병원성 곰팡이에 대해 항진균 활성을 나타내었다. 질소고정능과 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase 생성능에서는 *Bacillus* sp. 모두 비슷한 수준으로 활성을 나타냈으며, siderophore 생성능은 ANG42와 DDP427에서 비교적 높게 나타났다. Indole-3-acetic acid 생성능은 1.83–67.91 $\mu\text{g/ml}$ 으로 확인되었으며, *Bacillus* sp.에 따른 활성 차이를 나타내었다. 이후 각 species마다 활성이 높은 1 균주씩 선정하여 미네랄 가용화능을 확인한 결과, 대부분의 *Bacillus* sp.에서 인산과 탄산칼슘 가용화능을 확인할 수 있었으며, DDP148과 SN56은 각각 규소 가용화능과

아연 가용화능도 나타내었다. 따라서, 본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp.의 항진균 활성, 식물 성장 촉진 활성 및 미네랄 가용화능 결과를 통해 다목적 기능을 가진 미생물 제제로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Rodriguez PA, Rothballer M, Chowdhury SP, Nussbaumer T, Gutjahr C, Falter-Braum P. 2019. Systems biology of plant-microbiome interactions. *Mol. Plant* **12**: 804-821.
- Kour D, Rana KL, Yadav AN, Yadav N, Kumar V, Kumar A, et al. 2019. Drought-tolerant phosphorus-solubilizing microbes: biodiversity and biotechnological applications for alleviation of drought stress in plants. pp. 255-308. In Sayyed RZ, Arora NK, Reddy MS (eds.), *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management*, Microorganisms for sustainability. Springer, Singapore.
- Saharan BS, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* **21**: 1-30.
- Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M. 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. pp. 274-302. In Stoytcheva M (eds.), *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. InTech, New York.
- Samaras A, Nikolaidis M, Antequera-Gómez ML, Cámara-Almirón J, Romero D, Moschakis T, et al. 2020. Whole genome sequencing and root colonization studies reveal novel insights in the biocontrol potential and growth promotion by *Bacillus subtilis* MBI 600 on cucumber. *Front. Microbiol.* **11**: 600393.
- Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms

- and applications. *Scientifica* **2012**: 963401.
7. Zhang D, Yu S, Yang Y, Zhang J, Zhao D, Pan Y, et al. 2020. Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. *Front. Microbiol.* **11**: 1196.
 8. Kang BR, Kim YH, Nam HS, Kim YC. 2017. Correlation between biosurfactants and antifungal activity of a biocontrol bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* LM11. *Res. Plant Dis.* **23**: 177-185.
 9. Montesinos E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**: 1-11.
 10. Li XY, Mao ZC, Wu YX, Ho HH, He YQ. 2014. 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.
 11. Win TT, Bo B, Malec P, Fu P. 2021. The effect of a consortium of *Penicillium* sp. and *Bacillus* spp. in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. *J. Appl. Microbiol.* **131**: 1890-1908.
 12. Bu S, Munir S, He P, Li Y, Wu Y, Li X, et al. 2021. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control.* **157**: 104568.
 13. Yoo SJ, Sang MK. 2017. Induced systemic tolerance to multiple stresses including biotic and abiotic factors by rhizobacteria. *Res. Plant Dis.* **23**: 99-113.
 14. Glick BR. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**: 1-7.
 15. 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.
 16. Misra S, Chauhan PS. 2020. ACC deaminase-producing rhizosphere competent *Bacillus* spp. mitigate salt stress and promote *Zea mays* growth by modulating ethylene metabolism. *3 Biotech.* **10**: 1-14.
 17. Kumawat N, Kumar R, Khandkar U, Yadav R, Saurabh K, Mishra J, et al. 2019. Silicon (Si)-and zinc (Zn)-solubilizing microorganisms: role in sustainable agriculture, pp. 109-135. In Giri B, Prasad R, Wu QS, Varma A (eds.), *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*. Soil Biology, Springer, Switzerland AG.
 18. Tamilselvi SM, Thiyagarajan C, Uthandi S. 2018. Calcite dissolution by *Bacillus subtilis* SSRC102: An *in vitro* study for the reclamation of calcareous saline-sodic soils. *Indian J. Mar. Sci.* **47**: 1267-1273.
 19. Mumtaz MZ, Malik A, Nazli F, Latif M, Zaheer A, Ali Q, et al. 2020. Potential of zinc solubilizing *Bacillus* strains to improve growth, yield, and quality of maize (*Zea mays*). *Int. J. Agric. Biol.* **24**: 691-698.
 20. Bist V, Niranjana A, Ranjan M, Lehri A, Seem K, Srivastava S. 2020. Silicon-solubilizing media and its implication for characterization of bacteria to mitigate biotic stress. *Front. Plant Sci.* **11**: 28.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Tamilselvi SM, Thiyagarajan C, Uthandi S. 2016. Calcite dissolution by *Brevibacterium* sp. SOT106: a futuristic approach for the reclamation of calcareous sodic soils. *Front. Plant Sci.* **7**: 1828.
 26. Ranmesh 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.
 27. Kang SM, Waqas M, Shahzad R, You YH, Asaf S, Khan MA, et al. 2017. Isolation and characterization of a novel silicate-solubilizing bacterial strain *Burkholderia eburnea* CS4-2 that promotes growth of japonica rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin). *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **63**: 233-241.
 28. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 29. Shin PY, Cho SJ. 2011. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **44**: 836-840.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Miljaković D, Marinković J, Balešević-Tubić S. 2020. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* **7**: 1037.
 33. Kumar A, Singh S, Mukherjee A, Rastogi RP, Verma JP. 2021. Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPV511 for enhancing plant growth attributes of rice and soil health management under salinity stress. *Microbiol. Res.* **242**: 126616.
 34. Bhutani N, Maheshwari R, Negi M, Suneja P. 2018. Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiate* for their potential use as plant growth promoters. *Isr. J. Plant Sci.* **65**: 83-96.
 35. Zahir ZA, Munir A, Asghar HN, Shaharoona B, Arshad M. 2018. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC-deaminase for

- growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 958-963.
36. Prakash J, Arora NK. 2019. Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotech.* **9**: 126.
37. Alemneh AA, Cawthray GR, Zhou Y, Ryder MH, Denton MD. 2021. Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilizing activity of rhizobacteria. *Arch. Microbiol.* **203**: 3825-3837.
38. Cho KS. 2020. Plant growth-promoting bacteria for remediation of heavy metal contaminated soil: characteristics, application and prospects. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**: 399-422.
39. Bist V, Niranjana A, Ranjan M, Lehri A, Seem K, Srivastava S. 2020. Silicon-solubilizing media and its implication for characterization of bacteria to mitigate biotic stress. *Front. Plant Sci.* **11**: 28.
40. Yang HJ, Jeong SJ, Jeong SY, Jeong DY. 2014. Screening of antagonistic bacteria having antifungal activity against various phytopathogens. *Korean J. Mycol.* **42**: 333-340.
41. 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.