

Bacillus amyloliquefaciens ISP-5 균주의 배지 최적화 및 상추를 이용한 식물 성장 촉진 평가

최강현 · 서선일 · 박해성 · 임지환 · 김평일

Medium optimization for growth of *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 strain and evaluation of plant growth promotion using lettuce

Kang-Hyun Choi · Sun Il Seo · Haeseong Park · Ji-hwan Lim · Pyoung Il Kim

Received: 12 December 2022 / Revised: 27 December 2022 / Accepted: 28 December 2022

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Bacillus* sp. is a useful strain for agriculture because it promotes plant growth and controls plant pathogens through a variety of mechanisms. In this study, we obtained a microbial preparation with a high number of viable cells by culturing newly isolated soil bacteria on an optimized medium. Subsequently, we applied this preparation to lettuce to enhance its growth and yield. First, *B. amyloliquefaciens* ISP-5 was isolated from soil. Next, optimization of culture medium was carried out using 5 L scale fermenters. When culturing *B. amyloliquefaciens* ISP-5 on this optimized medium, the number of viable cells was approximately 1000 times higher than that obtained from culturing on the commercial medium. Afterwards, the plant growth promotion properties of the ISP-5 strain were evaluated using lettuce as a test plant. Foliar spray treatment of lettuce was carried out by inoculating half the standard concentration suspension (0.5×10^7 cfu/ml). As a result, leaf width increased by 8.6% and leaf length increased by 12.9% compared to the control group. Live weight also increased by 24.2% and dry weight by 23.9%. Considering the results from field test, *B. amyloliquefaciens* ISP-5 showed potential as a plant growth-promoting bacteria.

Keywords *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5, Carbon source, IAA product, Nitrogen source, Plant growth promoter

K.-H. Choi · S.-I. Seo · H.-S. Park · J.-H. Lim · P.-I. Kim (✉)
(재)농축산용미생물산업지원육성센터
(Center for Industrialization of Agricultural and Livestock
Microorganisms (CIALM), Jeongeup, Korea)
e-mail: pikim30@cialm.or.kr

서론

농약 및 비료의 사용이 본격화된 20세기 초 이래로 다양한 농약 및 비료가 개발되었으며 병해충 구제와 효율적인 작물 재배를 위해 널리 사용되고 있다(Lee 2009). 이러한 화학 제제의 사용은 농업 효율성 상승에 크게 기여하였으나, 무분별한 사용으로 인한 환경오염 및 생태계 교란을 일으키는 등 다양한 환경문제를 유발하고 있다(Kim and Park 2013). 이에 유기농법, 무농약 재배법 등이 개발되어 현장에 이용되고 있으나 이러한 방법을 이용하더라도 여전히 화학 농약과 비료의 사용은 감소하고 있지 않은 상황이다. 농업 유용 미생물을 이용한 친환경 농법은 지속 가능한 농업기반을 마련하고 농업 환경 개선 및 생산성 향상이 탁월하기 때문에 최근 주목을 받고 있다. 이러한 유용미생물을 제품화한 미생물제제는 여러 작물의 성장촉진뿐만 아니라 유도 저항성, 병해충방제 및 토양개량 등 다양한 기능을 보유하고 있다. 현재 미생물제제로 사용되는 미생물은 고초균(*Bacillus subtilis*), 효모(Yeast), 유산균(Lactic acid bacteria), 광합성세균(Photosynthetic bacteria) 등이 있으며, 특히 고초균(*Bacillus subtilis*)이 가장 널리 이용되고 있다(Kim et al. 2006). 미생물은 Indole-3-Acetic acid (IAA), abscisic acid, cytokinin, 에틸렌, ACC deaminase과 같은 식물호르몬 및 성장 조절 물질을 생산하거나 토양과 결합하여 토양 및 대기로부터 영양분을 흡수하도록 도와 식물 성장을 촉진시킨다(Guo et al. 2008; Khan et al. 2008; Reyes et al. 2002). 특히 IAA는 tryptophan을 전구 물질로 하는 auxin 계열의 식물 성장 촉진 호르몬으로 식물의 성장과 생리적 과정에 매우 광범위하게 작용하는 것으로 알려져 있다(Costacurta et al. 1998). 미생물제제는 주로 대량 배양을 통해 생산된 배양액을 액상 형태나 동결건조 및 분무 건조와 같은 제형화를

거쳐 생산되는 것이 일반적이다(Bong et al. 2016; Winder et al. 2003; Yanez-Mendizabal et al. 2012). 대량 배양을 통한 생산이 이루어져야 하기 때문에 고가의 상업용 배지를 이용하면 생산원가가 증가하고 제품의 가격이 증가하는 단점이 존재한다. 따라서 산업적으로 우수한 미생물 제제를 생산하기 위해서는 가격경쟁력이 우수한 원료를 발굴하고 최적 사용량을 결정하여 단가를 낮추면서 배양 효율을 높이는 연구가 필수적이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주를 최적 배지에서 배양한 미생물배양액을 이용하여 미생물 제제를 개발하였다. 우선 최적 배지 조성을 확인하기 위해 5종의 탄소원(glucose, fructose, sucrose, maltose, corn starch)과 5종의 질소원(yeast extract, peptone, tryptone, soytone, soy bean flour)을 이용하여 IAA를 생산하는 *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주의 저비용 고효율의 최적 배지의 조성을 결정한 후, 해당 배양액을 이용하여 식물의 생장촉진능(엽장, 엽폭, 생물중 및 건물중)을 측정하여 농업적 활용도를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

본 연구에 사용된 *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주는 토양에서 분리하여 사용하였으며, Tryptic Soy Agar (TSA, BD Difco, USA: tryptone 17 g, soytone 3 g, dextrose 2.5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, agar 15 g, per liter) 배지와 Tryptic Soy Broth (TSB, BD Difco, USA: trptone 17 g, soytone 3 g, dextrose 2.5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, per liter) 배지를 이용하여 30°C 항온배양기에서 배양하여 순수 분리 하였다. 16S ribosomal RNA (rRNA) 유전자 시퀀싱을 통한 분리 미생물의 동정을 위해 순수 분리된 집락에서 균체를 취하여 PCR 작업을 수행하였다. 27f와 1492r의 primer을 이용하여 증폭한 16S rRNA 유전자를 MACROGEN CO., LTD.에 송부하여 염기서열을 비교, 분석하였다(Birbir et al. 2007). 미생물 분류 체계에서 16S rRNA 염기서열의 상동성이 99% 이상이면 기존에 보고된 미생물과 동일 균주로 분류한다(Shin et al. 2005; Sorokin et al. 2006).

최적 탄소원 및 질소원 선발

B. amyloliquefaciens ISP-5 균주의 배양에 적합한 최적 배지 개발을 목표로 최적 탄소원과 질소원 선발을 수행하였다. ISP-5 균주의 최적 탄소원 선발을 위해 yeast extract 0.8%가 첨가된 기본 배지(NaCl 0.15%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05% MgSO₄·7H₂O 0.1%)에 탄소원으로 각각 0.5%의 glucose (DUKSAN, Seoul, Korea), fructose (DUKSAN, Seoul, Korea), sucrose (DUKSAN, Seoul, Korea), maltose (DUKSAN, Seoul,

Korea), corn starch (DUKSAN, Seoul, Korea)를 첨가하여 30°C, 150 rpm에서 48시간 배양 후 생균수를 측정하였다. ISP-5 균주의 최적 질소원 선발을 위해 glucose 0.5%가 첨가된 기본 배지(NaCl 0.15%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05% MgSO₄·7H₂O 0.1%)에 질소원으로 각각 0.8%의 yeast extract (BD Difco, USA), peptone (BD Difco, USA), tryptone (BD Difco, USA), soytone (BD Difco, USA), soy bean flour를 첨가하여 30°C, 150 rpm에서 48시간 배양 후 생균수를 측정하였다.

배지 최적화 및 균주 배양

각각의 5종의 탄소원 및 질소원을 사용하여 배양한 후, *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주의 생균수와 대량 배양에 소요되는 비용을 고려하여 최적 배지를 선발하였다. 최적 배지와 상용화 배지(TSB)를 사용하여 5 L jar fermenter를 이용하여 30°C, 교반 속도 120 rpm, 통기량 0.5~0.6 vvm, 접종량 1% 조건으로 48시간 배양한 후 생균수 및 pH를 비교 분석하였다.

Indole-3-acetic acid(IAA)의 생산 확인

B. amyloliquefaciens ISP-5 균주를 선발된 최적 배지를 이용하여 5 L jar fermenter에서 30°C, 48시간 배양한 후 IAA의 생산을 확인하였다. IAA 분석을 위해 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) 분석법을 이용하여 전처리 하였다(Lehotay et al. 2010). 시료 각 10 ml을 채취 후, acetonitrile 용액 10 ml, NaCl 1 g 및 MgSO₄ 4 g을 첨가하여 추출하였다. 원심분리(4,000 rpm, 5 min)하여 상층액 8 ml를 취한 후, 0.22 µm spin-X filter를 사용하여 전처리하였다. 시료의 분석은 Agilent 1100 series (Agilent, CA, USA), API 3200 Q TRAP (AB Sciex, CA, USA)에서 X-Bridge C₁₈ (2.1 × 100 mm, 3.5 µm) 칼럼을 이용하였고, 이동상은 Buffer A (0.05 % TFA in H₂O), Buffer B(0.05 % TFA in ACN)을 사용하여 0.2 ml/min 유속으로 분리한 후 MRM Mode를 이용하여 검출하였다.

B. amyloliquefaciens ISP-5 배양액을 이용한 작물 생장 촉진 평가

B. amyloliquefaciens ISP-5 배양액을 이용한 작물 생육을 확인하기 위해 상추(청치마)를 이용하였다. 실험군은 무처리군, 기준량(250배 희석)을 처리한 정상처리군 및 배양(125배 희석)을 처리한 배양처리군으로 나누어 총 3개의 처리구로 3회 반복하였으며 각 주당 25 ml씩 7일 간격으로 3회 관주 처리하였다. 실험은 기상 상황에 영향을 받지 않는 실내에서 원예용 상토를 이용해 진행하였다. 작물의 평가는 각 처리군에 따른 작물의 엽장, 엽폭, 생체중 및 건물중을 측정하여 평가하였다.

결 과

B. amyloliquefaciens ISP-5 균주의 동정 및 배양 최적화

16S rRNA 분석결과, ISP-5 균주의 rRNA는 *B. amyloliquefaciens* 균주의 rRNA 서열과 99% 이상 상동성을 가지는 것으로 *Bacillus* 속 균주로 확인되었다. ISP-5의 군집 형상은 흔히 알려져 있는 *B. amyloliquefaciens* 균주의 군집 형태와 유사도가 높았으며 16S rRNA 분석 결과를 토대로 ISP-5 균주는 *B. amyloliquefaciens*로 동정 되었다. *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주의 최적의 탄소원을 선별하기 위하여 최적 배지에 5종의 탄소원(glucose, fructose, sucrose, maltose, corn starch)을 각각 넣은 배지를 제조하여 48시간 동안 배양한 배양액의 생균수를 측정하였다. 그 결과 glucose (2.3×10^8 cfu/ml), fructose (3.3×10^7 cfu/ml), sucrose (2.5×10^8 cfu/ml), maltose (1.8×10^8 cfu/ml) 및 corn starch (5.8×10^7 cfu/ml)의 생균수를 확인하였다(Table 1). 각 탄소원 중 sucrose를 배지에 투입하였을 때 ISP-5의 생균수가 가장 높은 값을 나타냈으나 생산단가를 고려하여 최적 배지에 투입되는 탄소원으로는 glucose가 선정되었다. 이어서 최적의 질소원을 선별하기 위하여 5종의 질소원(yeast extract, peptone, tryptone, soytone, soy bean flour)을 배양배지에 각각 투입하여 48시간 동안 배양 후 배양액의 생균수를 측정하였다(Table 1). 각 배양 배지별로 yeast extract, 2.3×10^8 cfu/ml; peptone, 1.0×10^6 cfu/ml; tryptone, 2.5×10^7 cfu/ml; soytone, 3.1×10^8 cfu/ml 및 soy bean flour, 5.0×10^8

cfu/ml의 생균수를 확인하였다(Table 1). 각 질소원 중 soy bean flour를 질소원으로 투입하였을 때 가장 높은 생균수를 나타내어 최적 질소원으로 soy bean flour 선택하였다. 최종적으로 선별된 최적 배지의 조성은 glucose 0.5%, soy bean flour 0.8%, NaCl 0.15%, K_2HPO_4 0.25%, Na_2CO_3 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%이다.

최적 배지를 이용한 5 L jar-fermenter에서의 조건 확립

상기의 최적 배지를 이용하여 배양 규모를 증가시켰을 때의 생균수 변화양상에 대해 알아보기 위해, 5 L jar-fermenter에서 회분식 배양을 수행하였다. 48시간 동안 회분식 배양 결과 실험군 배양액의 pH는 접종 직후 7.22였으며 48시간에서는 7.31로 나타났다. 대조군 배양액에서는 pH 7.22에서 7.74로 실험군에 비해 pH값이 0.4가 증가하였다(Fig. 1a). 최적 배지에서 시간대별 생균수를 측정할 결과, 12시간, 24시간, 36시간 및 48시간에서 각각 3.6×10^7 , 1.0×10^{11} , 2.5×10^{11} 및 5.7×10^{10} 으로 측정되었고, 배양 36시간 후 최대 2.5×10^{11} cfu/ml의 생균수를 보였으며 배양 48시간 데이터에서는 생균수가 감소하는 모습을 보였다. 반면 대조군 배지의 경우 12시간, 24시간, 36시간 및 48시간에서 각각 3.3×10^7 , 1.0×10^8 , 1.0×10^8 및 3.1×10^8 으로 측정되었으며 48시간에서 3.1×10^8 cfu/ml의 생균수를 확인하였다(Fig. 1b). 배양 36시간 기준 최적 배지에서 ISP-5균주를 배양하였을 때 상용 배지인 TSB에 비해 약 2500배 이상 높은 생균수를 나타내었다.

Table 1 Culture profile of *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 using 5 carbon and 5 nitrogen sources

Carbon source ^{a)}	Total viable cells (cfu/mL)	Nitrogen source ^{b)}	Total viable cells (cfu/mL)
glucose	2.3×10^8	yeast extract	2.3×10^8
fructose	3.3×10^7	peptone	1.0×10^6
sucrose	2.5×10^8	tryptone	2.5×10^7
maltose	1.8×10^8	soytone	3.1×10^8
corn starch	5.8×10^7	soy bean flour	5.0×10^8

^{a)}fixation of 0.8% yeast extract

^{b)}fixation of 0.5% glucose

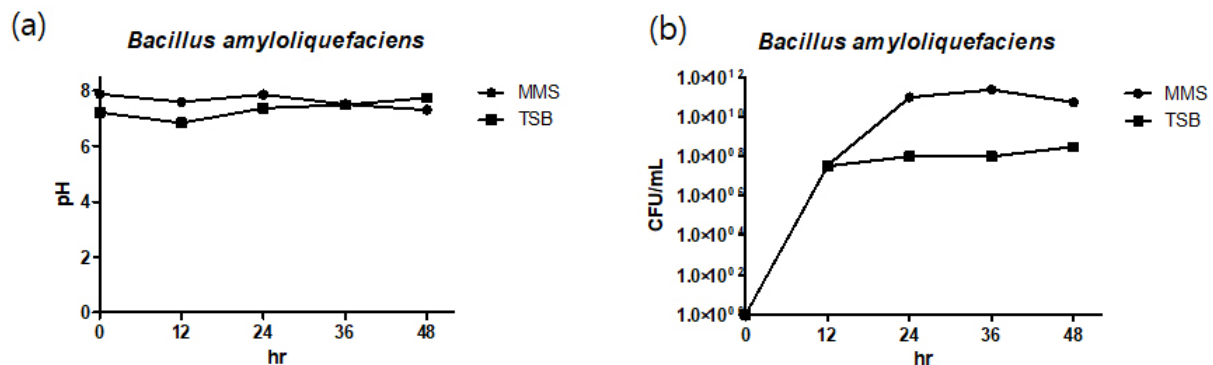


Fig. 1 Culture profile of *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 on optimal medium (MMS) and TSB medium in 5 L jar fermenter

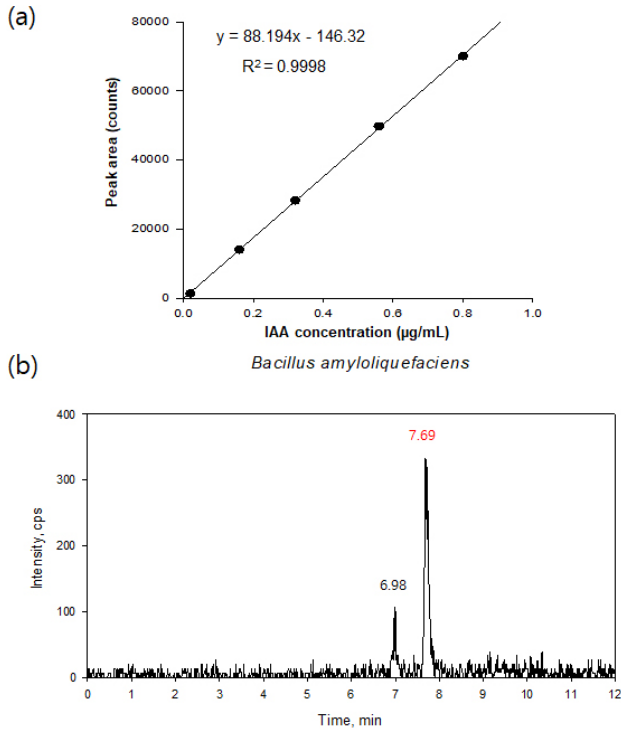


Fig. 2 IAA production of *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 in culture medium. (a) Standard curve of IAA, (b) IAA production of *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 in (MMS?) culture medium

B. amyloliquefaciens ISP-5 균주에서의 IAA의 생산 확인

B. amyloliquefaciens ISP-5 배양에서 IAA의 정량분석을 위해 IAA 표준품을 이용한 표준 곡선을 얻었고 0.999 이상의 R² 값을 확인하였다(Fig. 2a). 최적 배지를 이용한 ISP-5 배양액에서 식물 생장에 도움이 되는 IAA의 함량을 확인한 결과, IAA의 피크를 확인할 수 있었고 평균 $5.89 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ 의 IAA 함량이 확인되었다(Fig. 2b).

B. amyloliquefaciens ISP-5 배양액을 이용한 상추의 생육 평가

B. amyloliquefaciens ISP-5 배양액을 이용한 상추 생육에서의 엽폭, 엽장, 생체중 및 건물중을 측정하였다(Fig. 3). 엽폭은 무처리구, 정량처리구 및 배양처리구에서 각각 5.30 ± 0.17 , 5.76 ± 0.14 및 5.64 ± 0.17 cm로 측정되었으며, 무처리구에 비해 정량처리구에서는 약 8.6%, 배양처리구는 약 6.3% 증가되었고, 엽장은 무처리구, 정량처리구 및 배양처리구에서 각각 11.91 ± 0.06 , 13.44 ± 0.20 및 12.90 ± 0.29 cm로 측정되었으며, 정량처리구에서 12.9%, 배양처리구에서 8.3% 증가되었다(Table 2). 배양액처리에 따른 수확량 조사 결과를 확인한 결과 생체중은 무처리구, 정량처리구 및 배양처리구에서 각각 8.95 ± 0.15 , 11.11 ± 0.03 및 10.41 ± 0.38 g로 측정되었

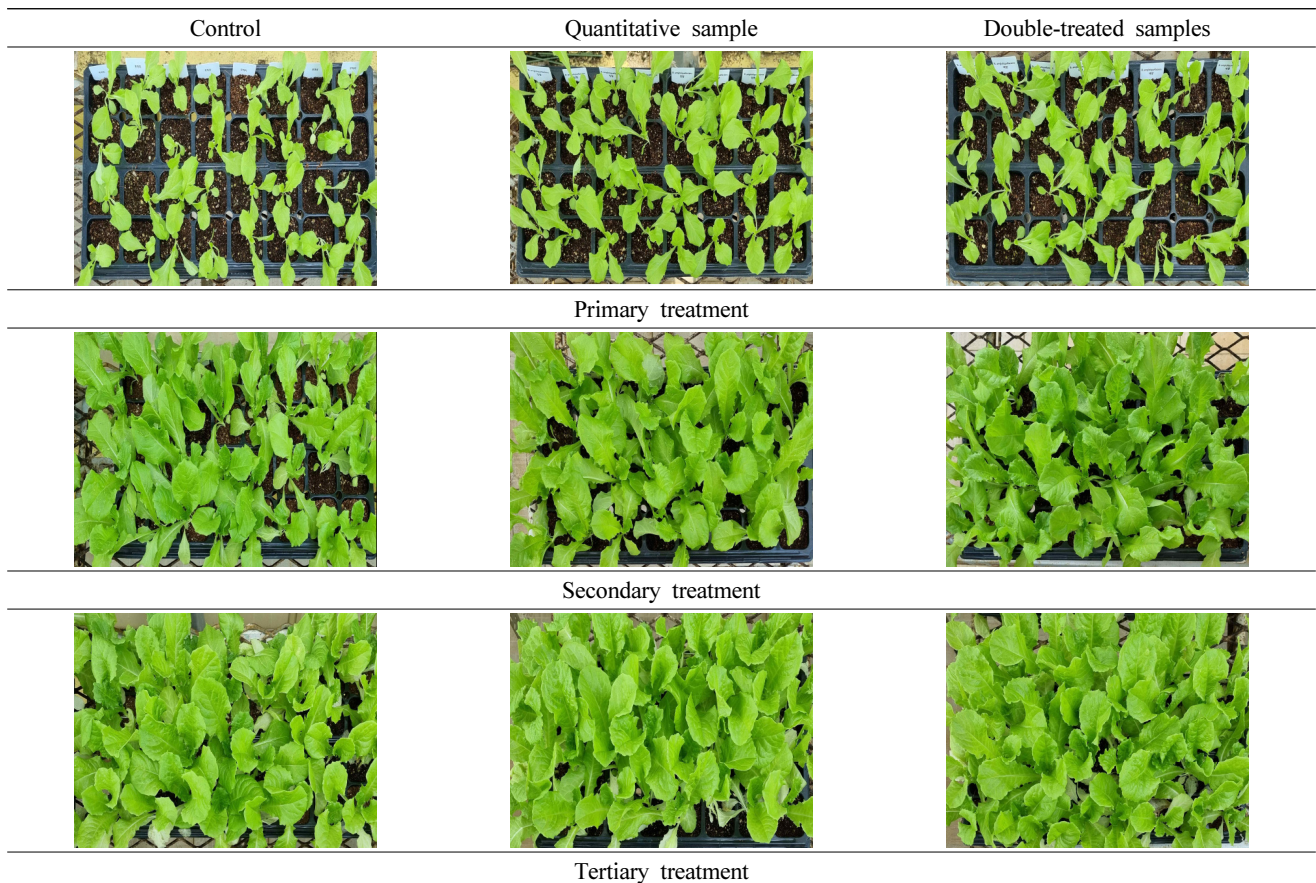


Fig. 3 Growth promotion in lettuce by *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 culture

Table 2 Growth evaluation of leaf width and leaf height in lettuce using *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 culture

Treatment	Leaf width		Leaf height	
	Width (cm)	Index (%) ^{a)}	Height (cm)	Index (%) ^{a)}
Control	5.30 ± 0.17	100.0 ^a	11.91 ± 0.06	100.0 ^a
Quantitative sample	5.76 ± 0.14	108.6 ^b	13.44 ± 0.20	112.9 ^b
Double-treated samples	5.64 ± 0.17	106.3 ^b	12.90 ± 0.29	108.3 ^b

^{a)}Duncan's multiple range test at 5% level

Table 3 Growth evaluation of live and dry weight in lettuce using *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 culture

Treatment	Live weight		Dry weight	
	weight (g)	index (%) ^{a)}	weight (g)	index (%) ^{a)}
Control	8.95 ± 0.15	100.0 ^a	1.15 ± 0.02	100.0 ^a
Quantitative sample	11.11 ± 0.03	124.2 ^c	1.43 ± 0.02	123.9 ^b
Double-treated samples	10.41 ± 0.38	116.3 ^b	1.34 ± 0.09	116.1 ^b

^{a)}Duncan's multiple range test at 5% level

으며 무처리구와 비교하여 정량처리구 24.2%, 배양처리구 16.3% 증가하였다 건물중은 무처리구, 정량처리구 및 배양처리구에서 각각 1.15 ± 0.02, 1.43 ± 0.02 및 1.34 ± 0.09 g로 측정되었으며 무처리구 대비 정량처리구에서 23.9%, 배양처리구에서 16.1% 증가하였다(Table 3). 식물의 생장 측정지표인 엽폭, 엽장 및 생체중, 건물중을 측정된 결과, 정량처리군이 무처리구 및 배양처리구 보다 뛰어난 생장을 나타내었다.

고 찰

B. amyloliquefaciens 균은 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGRP) 미생물의 한 종류로 식물생장촉진효과가 있는 생물농약으로 알려져 있다(Kim et al. 2003). 또한 IAA는 트립토판을 전구물질로 하는 식물 생장에 관여하는 여러 호르몬 중 하나로 알려져 있다(Idris et al. 2007). *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주의 최적 배지에 IAA 전구 물질인 트립토판을 첨가한다면 더욱 많이 양의 IAA 생산이 기대된다.

본 연구에서 *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주의 최적 배지에서는 기존 상업용 배지인 TSB보다 뛰어난 생균수를 확인할 수 있었고, 식물생장호르몬으로 알려진 호르몬 중 하나인 IAA의 생산을 확인할 수 있었다. 또한 그 배양액을 이용한 상추에서의 생육 평가에서는 엽장, 엽폭, 생체중 및 전체 중의 증가를 확인하였다. 이는 ISP-5 균주의 식물생장촉진제의 가능성을 확인하였고, 추후 최종 현장 적용이 가능한 미생물제제로 개발할 계획이다.

적 요

본 연구에서는 *Bacillus amyloliquefaciens* ISP-5 균주의 최적 배지조성을 확인하기 위해 5종의 탄소원(glucose, fructose, sucrose, maltose, corn starch)과 5종의 질소원(yeast extract, peptone, tryptone, soytone, soy bean flour)을 이용하여 각각의 생육을 측정하였다. 그 결과 glucose와 soy bean flour를 각각 최적 탄소원과 질소원으로 확립하였으며 최적 배지를 이용하였을 때 상업용 배지(TSB)에 비해 약 2500배의 생육을 확인할 수 있었다. *B. amyloliquefaciens* ISP-5 배양액을 상추에 엽면 살포하였을 때 상추의 엽폭과 엽장은 대조군에 비해 8.6%, 12.9%의 증가하였으며, 생체중과 건물중은 대조군에 비해 각각 24.2%, 23.9% 증가하였다. 이러한 결과들을 종합해보았을 때 *B. amyloliquefaciens* ISP-5 균주를 이용한 미생물 제제는 상추용 식물생장촉진제로써 활용할 수 있을 것이라 기대된다.

사 사

본 연구는 농림식품기획평가원(과제 번호: 320102032HD 020)의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

References

- Birbir M, Calli B, Mertoglu B, Bardavid RE, Oren A, Ogmen MN and Ogan A (2007) Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik saltlens. *World J Microbiol Biotech* 23:309-316
- Bong KM, Kim JM, Yoo JH, Park IC, Lee CW, Kim PI (2016)

- Mass cultivation and secondary metabolite analysis of *Rhodobacter capsulatus* PS-2. KSBB J 31:158-164
- Costacurta A, Mazzafera P, Rosato Y (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
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K (2008) Bioactive natural products from endophytes: A review. Applied Biochemistry and Microbiology 44:153-158
- Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 20(6):619-626
- Khan SA, Hamayun M, Yoon HJ (2008) Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. BMC Microbiol 8:231
- Kim GH, Oh SO, Hur JS, Yum KJ, Koh YJ (2006) Optimum cultivation conditions for mass production of an antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* BD0310 for development of a microbial agent controlling gray blight of tea plants. Korean Society of Plant Pathology 12:85-90
- Kim JH, Choi YH, Kang SJ, Joo GJ, Suh JS, Lim TH (2003) Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* MJ-3 and Its Effect on the Early Growth Promotion of Red Pepper Plug Seedlings in Compost 13(5):582-589
- Kim WS, Park JS (2013) Selection and control effect of environmental friendly organic materials for controlling the ginseng alternaria blight. Korean Journal of Medicinal Crop Science 21:388-393
- Lee HJ (2009) Monitoring of ergosterol biosynthesis inhibitor (EBI) pesticide residues in commercial agricultural products and risk assessment. Korean J Food Sci 38(12):1779-1784
- Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N (2010) Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. J Chromatogr A 1217: 2548-2560
- Reyes I, Bernier L, Antoun H (2002) Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. Microbial Ecology 44:39-48
- Shin TS, Park CK, Lee SH, Han KH (2005) Effect of age on chemical composition in sun-dried salts. Kor J Food Sci Technol 37:312-317
- Sorokin DY, Tourova TP, Lysenko AM, uyer G (2006) Diversity of culturable halophilic sulfur oxidizing bacteria in hypersaline habitats. Microbiology 152:3013-3023
- Winder RS, Wheeler JJ, Conder N, Otvos IS, Nevill R, Duan L (2003) Microencapsulation: A strategy for formulation of inoculum. Biocontrol Sci Technol 13:155-169
- Yanez-Mendizabal V, Vinas I, Usall J, Torres R, Solsona C (2012) Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. J Appl Microbiol 112: 954-965