한국토양비료학회지 제 39권 6호
Korean J. Soil Sci. Fert. Vol. 39, No. 6, 386-391 (2006)

연구보문

논토양의 Indole Acetic Acid 생성능

서장선* · 노형준 · 최수임

농업과학기술원

Indole Acetic Acid Production of Rice Paddy Soils

Jang-Sun Suh*, Hyung-Jun Noh and Soo-Im Choi

Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

This study was conducted to evaluate the indole acetic acid (IAA) formation in soils as a biological indicator for the health of rice paddy soils with control, nitrogen sole, chemical fertilizer (NPK), and chemical fertilizer plus compost (CNPK) plots. There was a positive relationship between colorimetric method and high performance liquid chromatography for IAA in soils determined, and the values were similar between two methods, as 0.83~1.23 μg IAA g^{-1} h^{-1} in colorimetric method, 0.80~1.29 μg IAA g^{-1} h^{-1} in HPLC method.

Numbers of dehydrogenase-producing bacteria and the IAA production in soils were high in NPK and CNPK plots comparing with control and nitrogen sole plots. Also there was high correlation between numbers of dehydrogenase-producing bacteria and IAA production in soils.

Key words : Dehydrogenase, IAA production, Soil

서 언

토양의 질은 작물생산성 및 물과 공기의 질 그리고 인간과 자연의 건전성을 유지하는 토양의 능력으로 (Papendick and Parr, 1992), 토양의 물리화학 및 생물학적 작용이 상호 긴밀하게 작용하여 생태계를 유지하는 기능이라 할 수 있다. 특히 토양의 생화학적 작용은 생태계 순환과 밀접히 관련된 중요한 기작으로 토양에서의 실제적인 생물적 특성이라 할 수 있다. 이들 특성 가운데 효소는 모든 생화학적 작용을 제어하는 기능을 가지고 있기 때문에 토양의 물질순환에 있어 핵심적인 주체라 할 수 있다(Benitez et al., 2006). 또한 생물학적 활성과의 연관성, 측정의 손쉬움, 환경변화에 대한 민감성 등의 장점을 가지고 있는 효소의 이러한 특징은 토양질 평가에 대한 잠재적 지표로 제안되어오고 있다(Pankhurst et al., 1997).

토양에는 효소에 의해 생성되는 화합물중 오옥신과 유사한 기능을 가지고 있는 화합물이 함유되어 있는데 indole 3-acetic acid (IAA)가 토양의 주요 오옥신이며, 토양의 IAA 생성능은 토양의 비옥도 및 유기물 함량에 영향을 받는다고 보고되고 있다 (Chandramohan and Mahadevan, 1968). 식물과 협생하고 있는 미생물에 의한 오옥신, 지베렐린 및 사이토키닌과 같은 식물호르몬 생성은 숙주식물과 미생물간의 상호작용에 있어 매우 중요한 형태로 인식되고 있다. 특히 IAA는 식물세포와 조직의 분열, 증식, 분화와 밀접히 관련되어 있어 그 중요성이 높이 평가되고 있다(Tsavkelova et al., 2005). 토양의 IAA 생성능이 유기물함량과 관련되어 있다는 것은, 오옥신이 근분비물질은 물론 유기물 분해작용 등에 의해 생성되는 트립토판을 전구물질로 하여 합성된다 (Purushothaman et al., 1974)는 것을 설명하는 것이라 할 수 있다.

일반적으로 근권이나 근면에서 분리된 미생물의 오옥신 생성능이 비근권 토양에서 분리된 종류보다 높은 것은 근권 토양에서의 오옥신 생성이 기질과 미생물의 풍부성에 크게 의존하고 있음을 의미한다 (Strzelczyk and Pokojska-Burdzeij, 1984). 따라서 토양에 존재하는 오옥신은 작물생육에 영향을 주는 미생물학적요인이라 할 수 있다(Sarwar et al., 1992). 한편 유기물시용에 의해 작물재배시스템을 조절할 수 있다는 보고와 같이(Benitez et al., 2006), 유기물 종류 및 시용방법 등 영농형태에 따라 토양의 생화학적 특성이 달라진다. 따라서 유기물분해와 식물호르몬 생성 등의 작용은 작물재배에 영향을 주는 토양의 생물학적 주요 요인이라 할 수 있다.

본 논문에서는 유기물분해와 작물생육촉진 호르몬과

접 수 : 2006. 9. 22 수 리 : 2006. 11. 3
*연락저자 : Phone: +82312900369,
E-mail: suhjsun@rda.go.kr

관련된 미생물활성의 토양질 평가지표로서의 적용성을 확인하고자, 동일한 자재 특히 유기물이 장기간 연용된 영년동일 논토양을 대상으로 토양의 오옥신 생성능에 대한 분석방법의 적합성과 활용가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

시험토양 수원 영년동일 답작포장 처리구 가운데 무처리, 질소단용구(N), 3요소구(NPK), 볏짚퇴비가 시용된 퇴비3요소구(CNPK)를 시험토양으로 하였으며, 조사시점은 수확 후 다음 해 4월 담수전 논토양의 0-20cm의 표토를 대상으로 하였다. 질소는 유안이 시용되었으며, 처리별 주요 토양화학성은 대조구(pH 6.3, OM 17 g kg^{-1}, P_2O_5 36 mg kg^{-1}), 질소단용구(pH 5.6, OM 20 g kg^{-1}, P_2O_5 20 mg kg^{-1}), 3요소구(pH 5.7, OM 23 g kg^{-1}, P_2O_5 205 mg kg^{-1}), 퇴비3요소구 (pH 5.8, OM 29 g kg^{-1}, P_2O_5 241 mg kg^{-1})였다. 토양은 2 mm체로 선별한 후 4℃에 보관하여 분석하였다.

탈수소효소생성세균 계수 탈수소효소생성 세균은 Yeast glucose (YG) 배지 (yeast extract 1.0g, glucose 1.0g, K_2HPO_4 0.3g, KH_2PO_4 0.2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, 한천 15.0g, 증류수 1L, pH 6.8)를 기본배지로 하여 Praveen-Kumar et al. (2003)의 방법을 변경하여 실시하였다. 즉 희석액을 접종한 후 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (0.5% w/v)와 glucose (0.5% w/v)의 1:1 용액을 0.5 ml 씩 각 사례에 가하여 도말 건조시킨 후 28℃에서 3일간 배양하여 배지상에 나타난 붉은 색 콜로니를 탈수소생성세균으로 계수하였다.

토양 IAA 정량 생토 2 g을 50 ml 플라스크 원심분리관에 넣고, 글루코스 (완충액 100 ml 당 글루코스 1 g 해당량)가 함유된 인산완충액 (pH 7.5) 6 ml와 1% 트립토판 (L-tryptophan)용액 4 ml를 가하여, 37℃의 어두운 곳에서 24시간 배양한 후, 5% trichloroacetic acid 2 ml를 넣어 반응을 불활성화시키고 나서, 0.5 M $CaCl_2$ 용액 1 ml를 첨가한 후 5000 x g에서 원심분리 하였다. 대조는 트립토판을 첨가하지 않은 것으로 하였다. 상등액 3 ml를 시험관에 넣고, 발색시약인 salper 용액 (2 ml 0.5M $FeCl_3$ + 98 ml의 35% perchloric acid) 2 ml을 가하고 나서 혼합한 후, 25℃의 어두운 곳에서 30분간 반응시켜 붉은색으로 변한 용액을 비색계를 이용하여 535 nm에서 측정하였다.

HPLC 분석은 IAA 비색법을 위해 준비한 각각의 토양용액 10 ml에 에틸아세테이트(ethyl acetate) 30 ml를 가하여 분획 추출한 후 여과하는 과정을 2회 반복 실시하였다. 얻어진 여액 60 ml를 진공회전농축기(EYELA, Tokyo, Japan)의 플라스크에 넣고 50℃ 수조에서 감압 농축하였다. 에틸아세테이트 분획물 중 IAA를 정량하기 위해서 건조된 분획물에 0.1% acetic acid 수용액과 acetonitrile의 비율이 70:30인 이동상 용매(mobile-phase) 2 ml를 가하여 녹인 후, 주사기용 막여과지(0.45 ㎛)로 여과하여 HPLC 분석용 최종 시료로 하였다. IAA 분석은 photodiode array (PDA) 검출기가 장착된 Waters 2795 Alliance system HPLC (Miford, MA, USA)를 사용하였다. HPLC column은 Waters symmetry C18 column (5 ㎛, 4.6x250 mm)를 사용하였고 column 온도는 30℃로 하여 분석하였다. 칼럼 이동상은 단일용매 시스템(isocratic system)으로 유속(flow rate)은 분당 0.8 ml로 하여 15분 유지하였고, 주입된 시료의 부피는 30 ㎕로 하였다. 각 시료의 분석은 3반복으로 하였으며, 시료 중 IAA함량은 IAA 표준물질 (indole 3-acetic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA)의 검량선에서 구한 값을 Empower chromatography software (Milford, MA, USA)에 적용하여 정량하였다(Wohler, 1997; Benitez et al., 2005; Vivas et al., 2006).

통계분석 처리별 통계분석은 SAS를 사용하여 least significant difference (LSD) 및 Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)를 실시하였다.

결과 및 고찰

HPLC와 비색법에 의한 토양 IAA 분석 IAA는 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 비색법과 HPLC법으로 측정할 수 있는데, 여기서는 비색법과 HPLC법 간의 분석정도와 정밀성을 비교하여 토양의 IAA 생성능에 대한 비색법의 이용가능성을 확인하고자 시험하였다. HPLC법은 시료의 추출 및 농축 등으로 인해 비색법에 비해 호르몬 회수율이 상대적으로 낮을 가능성이 있고 비색법은 토양용액 속에 들어있는 방해인자에 의한 영향을 배제할 수 없기 때문이다.

HPLC에 의한 분석은 Fig. 1과 같이 분리시간별 검출되는 물질에 대한 파장대별 흡광도를 동시에 측정하였으며, 본 실험에서는 9.636분(219.8, 280 nm)에서 IAA가 검출되었다. Fig. 2는 비색법과 HPLC에 의한 토양의 IAA분석치에 대한 상관관계로서 유의성이 있는 값이 나왔다. 조사된 토양의 IAA생성량은 HPLC에 의해 도출된 값이 비색법에 비해 약간 낮은 경향이었으나, 비색법에 의해서는 0.83 1.23 ㎍ IAA g^{-1} h^{-1} 이고 HPLC법에 의해서는 0.80 1.29 ㎍ IAA g^{-1} h^{-1}로 거의 비슷한 범위를 보였다.

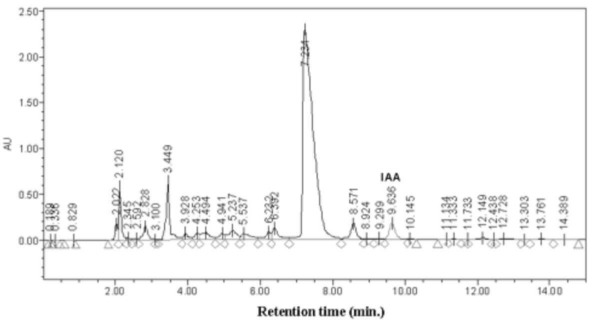


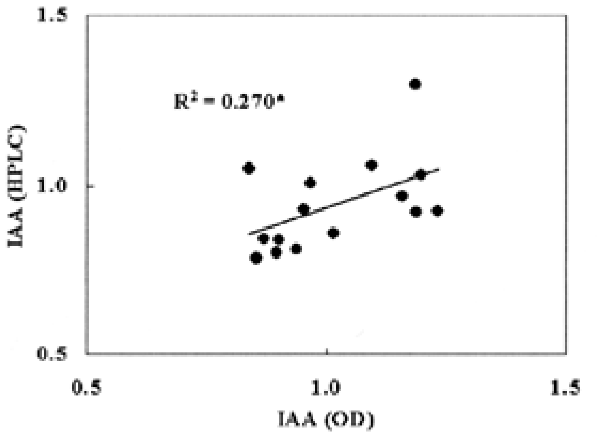
Fig. 1. Analysis of Indole acetic acid by the high performance liquid chromatography.

토양의 탈수소효소생성균과 IAA 생성능 식물생산성을 높이는 접종원으로서 근권세균에 대한 연구가 꾸준히 진행되어오고 있다. 근권미생물의 식물생육 촉진 작용은 IAA, gibberellin, cytokinine 등의 식물호르몬생성 및 인산가용화와 같은 세균에 의한 기작이 포함되어있다. 따라서 토양의 IAA생성능이란 물리화학적인 요인이 아닌 토양에 서식하고 있는 미생물의 생물학적 기능이라 할 수 있다.

미생물의 오옥신 생성 능력은 병원성 미생물, 공생미생물은 물론 식물과 협생하지 않고 서식하는 자유생활형인 다양한 세균 가운데에서 발견되고 있는데, IAA를 생성하는 세균에는 *Pseudomonas, Agrobacterium, Azospirillum, Azotobacter, Alcaligenes, Enterobacter, Acetobacter, Rhizobium, Bradyrhizobium, Bacillus, Arthrobacter, Herbaspirillus, Xanthomonas, Klebsiella, Methylobacterium, Methylovorus, Aminobacter, Paracoccus, Mycobacterium, Rhodococcus, Sphingomonas, Micrococcus, Cellulomonas* 등과 같이 매우 다양한 미생물이 속해 있음이 확인되고 있다(Tsavkelova et al., 2005).

동식물의 사체가 분해될 때 유리되거나 살아있는 식물의 뿌리로부터 분비되는 가용성 유기물은 토양미생물에 의해 직접 흡수되어 에너지원이나 미생물체의 구성성분이 된다. 이러한 관점에서 유기물 분해와 관련된 탈수소효소는 미생물활성평가에 중요한 지표가 되고 있다(Camina et al., 1998; De Leij et al., 1993; Praveen-Kumar and Tarafdar, 2003; Ross, 1971; Saviozzi et al., 2002). 한편 Vivas et al. (2005)도 미생물을 접종한 식물의 뿌리구조가 발달하고 이로 인해 근권으로의 탄소 및 양분 분비가 증가되어 탈수소효소활성이 높아짐을 확인하였는데, 이러한 결과는 탈수소효소를 분비하거나 IAA를 생성하는 미생물이 속해있는 근권 토양미생물상도 영향을 받게 됨을 의미한다.

화학비료 및 퇴비 처리별 토양의 탈수소효소분비세균의 밀도는 Fig. 3과 같이, 토양 pH는 처리별 거의 비슷한 수준을 유지하였지만 탈수소효소 분비세균을 포함한 미생물의 밀도는 유기물 함량이 상대적으로 높은 CNPK구와 NPK 처리구가 N구와 무처리구에 비해 비교적 높은 수준을 보였다. 이는 CNPK구 및 NPK 처리구에서 유기물 분해작용과 관련된 미생물 활성이 활발히 진행되고 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다. 또한 토양의 탈수소효소 분비세균과 토양의 IAA 생성능은 Figure 4와 같이 유의성이 높은 정의 상관관계를 가지고 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 유기물 분해와 관련하여 병원성 미생물보다는 부생성 혹은 발효성 미생물이 주로 작용하고 있기 때문에 단순한 의미의 IAA 생성균 보다는 탈수소효소를 분비하는 IAA 생성균이 토양관리 및 작물재배에 있어 보다 큰 의미가 있다고 고려된다.



Statistical significance shown :* $P \leq 0.05$

Fig. 2 Relationship between colorimetric method and high performance liquid chromatography for IAA analysis of soils.

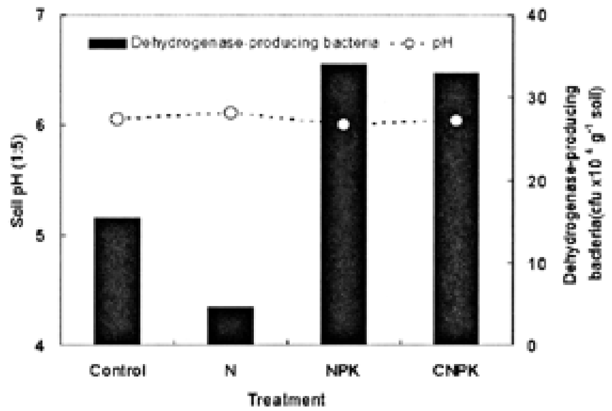
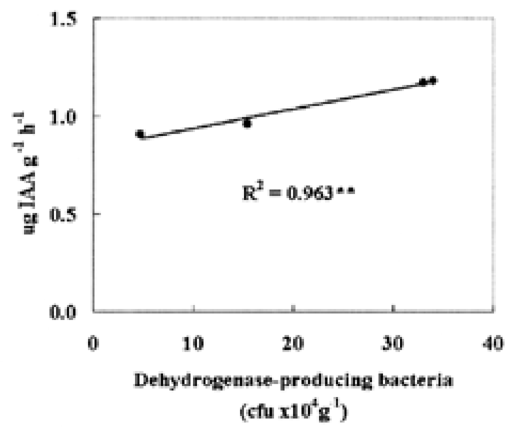


Fig. 3. Changes of dehydrogenase-producing bacteria in rice paddy soils on the treatments.

처리별 토양의 IAA생성능 Tryptophan은 IAA 생성의 주요 전구물질로서 미생물의 식물호르몬 생산을 향상시킨다. 따라서 고등식물의 트립토판 분비량과 IAA 생성능 간에는 밀접한 관계가 있다. 미생물의 IAA 생성능은 난초류인 *Dendrobium moschatum* 뿌리에서 분리된 세균에 tryptophan을 ml당 200 μg을 처리한 결과, *Sphingomonas, Microbacterium, Bacillus, Rhizobium* 속이 각각 50.2, 53.1, 92.9, 37.6 μg IAA ml^{-1}이고, *Acampe papillosa* 뿌리에서 분리된 *Sphingomonas, Rhodococcus, Cellulomonas, Pseudomonas, Micrococcus*는 각각 69.4, 49.6, 53.9, 31.0, 39.2 μg IAA ml^{-1}이라고 하듯이 미생물에 의해 상당량의 IAA가 전구물질인 트립토판에 의해 생성됨이 확인되고 있다(Tsavkelova et al., 2005). 또한 식물 표면에 널리 분포하는 pink-pigmented facultative methylotropic bacteria(PPFMs)의 IAA생성량도 L-tryptophan에 의해 크게 촉진됨이 밝혀졌다(Omer et al., 2004). 이와 같이 토양에 서식하는 미생물의 IAA 생성능은 트립토판과 같은 물질이 함유되어있는 근분비물에 주로 의존한다. 벼 뿌리에서는 serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine 등의 아미노산과 arabinose, mannose, galactose, glucose, glucuronic acid 등의 당류가 분비되고(Bacilio-Jimenez et al., 2003), 비둘기콩 (*Cajanus*) 에서는 glutamate, isoleucine, methionine, tryptophan 등의 아미노산과 방향족물질 및 유기산 등이 분비된다는 보고와 같이(Pandya et al., 1999) 식물 종류에 따라 분비되는 물질이 상이하므로 작부체계도 IAA를 생성하는 토양미생물상에 큰 영향을 주는 요인이 된다.

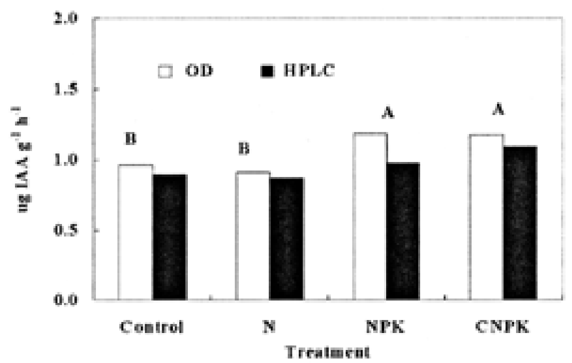
투입되는 유기물의 종류와 양에 의해 토양 미생물상이 달라지면, 그에 따라 토양이 가지고 있는 IAA 생성능도 달라진다. 따라서 토양의 IAA 생성능을 비교하고자 토양에 IAA전구물질인 트립토판을 가하여 처리별 IAA생성량을 조사하였다. 토양의 IAA 생성능은 Fig. 5와 같이 대조구와 질소단용구에 비해 유기물함량이 높은 NPK구 및 퇴비가 시용된 CNPK구에서 유의적으로 높은 결과를 보였다. 벼 뿌리에서는 트립토판이 분비되고 있지 않다는 보고(Bacilio-Jimenez et al., 2003)를 고려하면 NPK구 및 CNPK 구에서 IAA생성능이 높은 것은, 토양 유기물함량이 대조구 17 g kg^{-1}, 질소단용구 20 g kg^{-1}, 3요소구 23 g kg^{-1}, 퇴비3요소구 29 g kg^{-1}인 바와 같이 토양에 들어있는 유기물의 영향이 크게 작용하였으리라 생각할 수 있다. 세균 생육기간 중 최대의 IAA 생성시기는 생육안정기 초기 혹은 후반기라고 보고되고(Tsavkelova et al., 2005)있는 바와 같이 미생물 생육단계별로 다르지만, 인공배양기가 아닌 토양 생태계에서의 미생물 생육은 미생물의 종류 및 수가 다양하고 많기 때문에 배양기의 조건처럼 짧은 기간의 일정시기에 증식되거나 사멸되는 것이 아니라, 장기간에 걸쳐 생육상이 일정하게 진행된다고 할 수 있다. 따라서 토양에서의 미생물에 의한 IAA 생성은 미생물 활성에 영향을 주는 기후, 재배작물, 유기물시용 등 외부적 환경요인이 고려되어야 한다. 그러나 본 시험조건에서는 기후와 재배작물이 동일하기 때문에 비료 및 유기물 시용 방법에 의한 영향이라 할 수 있다.

IAA 생성과 관련된 세균에 *Rhodococcus, Rhizobium, Arthrobacter, Bacillus, Xanthomonas, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas* 등이 있으며 이 가운데 가장 활성적인 IAA 생성세균은 *Pseudomonas* 속이라는 인용 보고(Tsavkelova et al., 2005)처럼, 유기물 분해와 관련된



Statistical significance shown : ** $P \leq 0.01$

Fig. 4. Corelation between dehydrogenase-producing culturable bacteria and IAA production in soils.



Mean values (three replicates) not sharing a letter differ significantly according to Duncan' multiple range test ($P \leq 0.05$)

Fig. 5. Indole acetic acid production in rice paddy soils on the treatments.

Table 1. Colony forming units (cfu) of microbes in soils on different treatments (cfu × 10^4)

Treatment	Aerobic bacteria	Actinomycetes	Fungi	Gram negative bacteria	Fluorescent *Pseudomonas*	Mesophilic *Bacillus*
Control	479.7c	80.6b	2.7a	1.8b	0.9c	16.0b
N	865.8b	33.3c	0.4b	1.2b	0.4cd	16.4b
NPK	1234.8a	97.0b	0.9b	10.1a	1.6b	20.2a
CNPK	1479.6a	164.5a	1.2b	4.4b	2.7a	96.5a

C: rice straw compost, N; ammonium sulphate
Same letters are not significant at $P \leq 0.05$

미생물 가운데 *Bacillus* 속 및 형광성 *Pseudomonas* 속과 같은 미생물이 두 처리에 상대적으로 우점한 결과라 생각할 수 있다.

처리별 미생물상은 Table 1과 같이 NPK구 및 CNPK 구에서 호기성세균의 수가 많았으며 주요 IAA생성 미생물인 *Bacillus* 속 및 형광성 *Pseudomonas* 속도 이 두 처리에서 상대적으로 높아 시험토양의 IAA 생성능은 이들 미생물에 의한 영향이라 생각할 수 있다. 이러한 결과는 IAA 생성균 가운데 유기물 분해와 관련된 탈수소효소를 생성하는 부생성 유용미생물의 밀도가 높아졌음을 보여주는 것이라 할 수 있어, 이 두 요인의 생물학적 토양평가지표 혹은 토양의 생물학적관리 평가요인으로서의 가능성이 높음을 의미하지만, 관련 미생물에 대한 분류 및 생리 생태학적 특성 구명에 대한 연구도 지속적으로 추진되어야 할 필요성이 있다. 왜냐하면 IAA는 유용미생물뿐만 아니라 유해미생물에 의해서도 생성되고 있음이 보고되고 있기 때문이다(Tsavkelova et al., 2005). 유해미생물의 우점을 방지하기 위해서는 토양의 생물학적 오염과 관련된 지표미생물에 대한 조사 뿐 만 아니라, 토양개량을 위해 사용되는 유기물도 질을 고려하지 않은 무분별한 시용보다는 Bacillus 속이나 형광성 Pseudomonas 속 혹은 근류균과 같이 대부분 유용미생물에 속하는 균이 선택적으로 증식할 수 있는 즉 이들 미생물의 활성을 촉진할 수 있는 방향으로의 생물학적 관리도 고려되어야 할 것이다.

적 요

본 연구는 생물학적 토양건전성평가 지표로서의 토양의 탈수소효소 생성균 밀도와 IAA생성능의 적용가능성을 살펴보고자, 무시용구, 질소 단용구, 3요소 시용구 및 퇴비 3요소 시용구로 처리된 논토양에서의 탈수소효소 생성균 및 토양의 IAA 생성능의 변화에 대해 조사하였다. 비색법과 HPLC법 간의 IAA분석치는 유의성 있는 정의 상관관계가 있었으며, 시험토양의 IAA생성량은 비색법 0.83 1.23 μg IAA g^{-1} h^{-1}, HPLC법 0.80 1.29 μg IAA g^{-1} h^{-1}로 분석법 간에 거의 비슷한 수준을 보였다. 탈수소효소생성 토양세균과 토양의 IAA생성능은 대조구와 N 단용구에 비해 NPK구 및 CNPK구에서 유의적으로 높은 결과를 보였으며, 탈수소효소 생성세균과 토양의 IAA 생성능 간에는 유의성이 높은 정의 상관관계를 보였다.

인 용 문 헌

Bacilio-Jimenez, M., A. Aguilar-Flores, E. Ventura-Zapata, E. Perez-Campos. S. Bouquelet, and E. Zenteno. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice(*Oryza sativa* L.) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. Plant & Soil. 249:271-277.

Benitez E., R. Nogales, M. Campos, and F. Ruano. 2005. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. Applied Soil Ecology. Article in press.

Camina F., C. Trasar-Cepeda, F. Gil-Sotres, and C. Leiros. 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. Soil Biol. Biochem. 30:1005-1011.

Chandramohan, D., and A. Mahadevan. 1968. Indole acetic acid metabolism in soils. Curr. Sci. 37:112-113.

De Leij F.A.A.M., J.M. Whipps, and J.M. Lynch. 1993. The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. Microb. Ecol. 27:81-97.

Omer Z.S., R. tombolini, A. Broberg, and B. Gerhardson. 2004. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. Plant growth Regulation. 43:93-96.

Pandya S., P. Lyer, V. Gaitonde, T. Parekh, A. Desai. 1999. Chemotaxis of *rhizobium* sp. S2 towards *Cajanus cajan* root exudate and its major components. current microbiology. 38:205-209.

Pankhurst C.E., B.M. Doube., V.V.S.R. Gupta. 1997. Biological indicators of soil health. p 5-7. CAB international. New York. USA.

Papendick, R.I., J.F Parr. 1992. Soil quality - the key to a sustainable agriculture. Am. J. Alter. Agric. 7:2-3.

Praveen-Kumar, and J.C. Tarafdar. 2003. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. Biol Fertil. Soils. 38:186-189.

Purushothaman, D., T. Marimuthu, C.V. Venkataramanan, and R. Kesavan R. 1974. Role of actinomycetes in the biosynthesis of indole acetic acid in soil. Curr. Sci. 43. 413-414.

Ross D.J. 1971. Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. 3:97-110.

Saviozzi A., P. Bufalino, R. Levi-Minzi, and R. Riffaldi. 2002. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. Biol. Fertil. Soils. 35:96-101.

Sarwar, M., M. Arshad, D.A. Martens, and W.T. Frankenberger Jr. 1992. Tryptophan-dependent buosynthesis of auxins in soil. Plant and Soil 147: 207-215.

Strzelczyk, E. and A. Pokojska-Burdzeij. 1984. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine(*Pinus silvestris* L.) Plant and Soil 81:185-194

Tsavkelova E.A., T.A. Cherdyntseva, and A.I. Netrusov. 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. Microbiology. 74:46-53 .

Vivas A., J.M. Barea, B. Biro, and R. Azcon. 2005. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae,* both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. Environmental pollution. 134:257-266.

Vivas, A., J.M. Barea, B. Biro, and R. Azcon. 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on Trifolium growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. J. Appl. Microbiol. 100:587-598.

Wohler, L. 1997. Auxin-indole derivates in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. Microbiol. Res. 152, 399-405.