

유용한 바실러스의 토양 접종에 따른 토착 세균 군집의 변화

김이슬¹, 김상윤^{1,2}, 안주희¹, 상미경¹, 원항연¹, 송재경^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

²국립순천대학교 생물환경학과

Received: August 1, 2018 / Revised: August 28, 2018 / Accepted: August 31, 2018

Changes in Resident Soil Bacterial Communities in Response to Inoculation of Soil with Beneficial *Bacillus* spp.

Yiseul Kim¹, Sang Yoon Kim^{1,2}, Ju Hee An¹, Mee Kyung Sang¹, Hang-Yeon Weon¹, and Jaekyeong Song^{1*}

¹Agricultural Microbiology Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

²Department of Bio-environmental Science, Suncheon National University, Suncheon 57922, Republic of Korea

Beneficial microorganisms are widely used in the forestry, livestock, and, in particular, agricultural sectors to control soilborne diseases and promote plant growth. However, the industrial utilization of these microorganisms is very limited, mainly due to uncertainty concerning their ability to colonize and persist in soil. In this study, the survival of beneficial microorganisms in field soil microcosms was investigated for 13 days using quantitative PCR with *B. subtilis* group-specific primers. Bacterial community dynamics of the treated soils were analyzed using 16S ribosomal RNA (rRNA) gene amplicon sequencing on the Illumina MiSeq platform. The average 16S rRNA gene copy number per g dry soil of *Bacillus* spp. was 4.37×10^6 after treatment, which was 1,000 times higher than that of the control. The gene copy number was generally maintained for a week and was reduced thereafter, but remained 100 times higher than that of the control. Bacterial community analysis indicated that *Acidobacteria* ($26.3 \pm 0.9\%$), *Proteobacteria* ($24.2 \pm 0.5\%$), *Chloroflexi* ($11.1 \pm 0.4\%$), and *Actinobacteria* ($9.7 \pm 2.5\%$) were abundant phyla in both treated and non-treated soils. In the treated soils, the relative abundance of *Actinobacteria* was lower, whereas those of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* were higher compared to the control. Differences in total relative abundances of operational taxonomic units belonging to several genera were observed between the treated and non-treated soils, suggesting that inoculation of soil with the *Bacillus* strains influenced the relative abundances of certain groups of bacteria and, therefore, the dynamics of resident bacterial communities. These changes in resident soil bacterial communities in response to inoculation of soil with beneficial *Bacillus* spp. provide important information for the use of beneficial microorganisms in soil for sustainable agriculture.

Keywords: *Bacillus*, bacterial community, beneficial microorganism, soil, survival

서론

토양 1 그램에는 종류와 깊이에 따라 다르지만 약 100억 이상의 미생물이 서식하고 있으며, 이 중 세균은 관행적인 평판 배양으로 약 1억개 정도가 배양이 가능한 것으로 알려져 있다[1, 2]. 토양미생물은 양분 공급, 작물 성장 촉진 호르몬(예; 옥신) 생산, 토양 구조 개량, 병해충 방제, 제초 등

의 다양한 작용을 통해 작물의 성장을 직접적으로 돕는다[3]. 많은 연구자들이 토양으로부터 유용한 세균을 분리하여 작물에 적용하는 연구를 수행하고 있으며, 우수한 활성을 가진 세균으로 미생물제제를 생산하여 농업의 생산성에 기여하고 있다[4–6]. 특히 *Bacillus*와 *Pseudomonas*는 작물의 생육 증진 및 병 방제에 도움을 주는 것으로 잘 알려진 세균이다[7]. 최근 시군 농업기술센터에서는 이러한 유용미생물을 대량으로 배양하여 농가에 보급하는 사업을 추진하고 있으며 해마다 배양사업을 하는 기술센터의 수는 증가하고 있다.

토양미생물 분포에 관한 연구는 선택배지와 단계별 희석 평판법을 사용한 생균수(colony-forming unit, cfu) 측정, 생체

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3041, Fax: +82-63-238-3834

E-mail: mgjksong@korea.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

량 측정, 인지질 지방산 분석 등의 해상도가 낮은 방법에서 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), repetitive sequence based polymerase chain reaction (Rep-PCR), terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), 염기서열 분석법 등 해상도가 높은 분자생물학적 방법을 사용하여 연구하고 있다[8]. 최근에는 16S ribosomal RNA (rRNA) 유전자의 염기서열을 이용한 방법이 미생물 군집 연구에 가장 많이 사용되고 있다. 10년도 안 되는 기간 동안 유전체 연구의 혁명을 가져온 차세대 염기서열 분석법(next-generation sequencing, NGS)의 발달로 16S rRNA 유전자의 대량분석이 가능해져 최근에는 미생물 군집의 구조와 다양성 뿐 아니라 우점하는 종의 분류학적 위치까지도 분석할 수 있게 되었다[9-11].

유용미생물의 처리는 작물의 생육 증진 및 병 방제에 효과가 있을 뿐만 아니라 토양미생물 분포에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다[3, 5, 12]. 유용미생물 처리가 토양미생물 군집에 미치는 영향은 최근 국외에서 활발히 연구되고 있다. Ambrosini 등은 유용미생물의 처리가 토양미생물 군집에 영향을 주며 척박한 토양에 긍정적인 변동(탄소, 질소 순환 등)을 줄 것으로 추정하였다[12]. You 등은 미생물 방제제로서 *B. subtilis*를 담배 근권에 처리한 결과, 대조구나 살균제 처리구에 비해 토양 세균의 다양성이 증가함을 ARDRA 기법을 통해 확인하였다[13]. Shen 등은 *B. amyloliquefaciens*를 제제화한 미생물비료를 2년 동안 바나나 농장에 처리한 결과, 바나나 시들음병(*Fusarium wilt*)을 감소되었다고 보고하였다[14]. 또한 미생물비료 처리가 세균 종 다양성 증가와 더불어 일부 핵심 세균 군집의 풍부도를 증가시켜 궁극적으로 근권미생물 군집 구조가 변경되었음을 파이로시퀀싱 기법을 통해 확인하였다. 하지만 유용미생물 처리가 토양미생물 군집 구조에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 국내의 연구는 드문 실정이다.

본 연구에서는 작물에 유용한 활성이 있어 특허로 등록된 바실러스 3 균주(Table 1)를 토양에 처리한 후 정량 PCR (quantitative polymerase chain reaction)을 이용하여 이들의 토양 내 생존능을 정량적으로 분석하였다. 또한 차세대염기서열분석 기법인 Illumina MiSeq 플랫폼을 이용하여 바실러스 3 균주 처리구와 대조구의 토양미생물 군집 분포를 비교 및 분석하였다. 유용미생물 처리 후 이들의 토양 내 밀도 변화 양상 및 토양미생물 전체 군집 변화를 평가하는 것

은 유용미생물의 효과적인 현장적용 기술을 개발하기 위한 중요한 주춧돌이 될 것이다.

재료 및 방법

바실러스 배양

본 연구에서 사용한 바실러스 3 균주 *B. subtilis* S37-2 [15], *B. velezensis* GH1-13 [16], *B. vallismortis* BS07M [17]는 모두 작물 생육 촉진 활성을 가지고 있다고 알려져 있다. 바실러스 3 균주를 각각 tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 3 균주의 배양액을 약 1000배 희석하여 1.0×10^6 cfu/ml 농도로 맞춘 후 사용하였다.

시료 채취 및 마이크로코즘 제작

전라북도 완주군에 위치한 국립농업과학원 농업생물부 시험포장에서 밭토양(양토)을 채취하였다. 그늘에서 말린 토양 시료를 2 mm 체로 통과시킨 후 와그너 포트(NF-2/φ256 × φ234 × 297 mm; 1/2000a)에 적당량을 나누어 담았다. 유용미생물이 주로 시설재배지에서 활용되는 점을 고려하여 비닐하우스에 와그너 포트를 설치하였다. 처리구에는 바실러스 3 균주의 배양액(1.0×10^6 cfu/ml)을 와그너 포트에 2 리터씩, 대조구에는 동량의 TSB 배지 1,000배 희석액을 관주하였다. 모든 처리는 3반복으로 실시하였다. 배양액을 처리한 직후부터 3일, 5일, 7일, 11일, 13일 후에 토양 시료를 채취한 후 즉시 DNA를 추출하였다. 나머지 토양 시료는 2 ml 용기(Eppendorf tube)에 분주하여 -80°C에 장기 보존하였다.

DNA 추출 및 정량 분석

토양 시료 0.5 그램으로부터 PowerSoil DNA isolation kit (MoBio, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 micro-volume nucleic acid spectrophotometer ASP-2680 (ACTgene, USA)를 이용하여 농도와 순도를 확인하였다. 와그너 포트에 처리한 토양 내 바실러스의 밀도 변화를 측정하기 위해 추출된 DNA를 이용해 정량 PCR 분석을 수행하였다. 분석을 위해 CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, USA)과 GoTaq qPCR master mix (Promega, USA)를 이용하였다. 또한 *B. subtilis* 그룹의 16S rRNA 유전자에 특이적인 염기서열(595

Table 1. List of beneficial *Bacillus* spp. used in this study.

Strain name	Scientific name	Deposit number	Characteristics
S37-2	<i>Bacillus subtilis</i>	KACC 91281P	Plant growth promotion and antifungal activity [15]
GH1-13	<i>Bacillus velezensis</i>	KACC 91953P	Plant growth promotion and biocontrol [16]
BS07M	<i>Bacillus vallismortis</i>	KCTC 11991BP	Plant growth promotion and induced resistance [17]

bp)을 증폭하는 Bsub5F (5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3')와 Bsub3R (5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3') 프라이머를 사용하였다[18]. 정량 PCR 반응액 제조 및 반응 조건은 Kim 등의 방법에 따라 수행하였다[19].

미생물 군집 분석

유용미생물을 와그너 포트에 처리한 후 11일째 채취한 시료로부터 추출된 DNA를 토양미생물 군집분석에 이용하였다. 이를 위해 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 증폭하는 318F와 806R 프라이머를 사용하고 천랩(Korea)에서 Illumina MiSeq 플랫폼을 이용하여 paired-end sequencing을 진행하였다. 얻어진 대용량의 시퀀스 데이터는 UCHIME 프로그램 (version 9.1.13)을 이용하여 분석하였다[20]. 고품질의 시퀀스 데이터를 얻기 위해 길이가 짧거나 (300 bp 이하) 높은 에러 임계값(1 이상)을 나타내는 시퀀스를 제거한 후 최종적으로 동일한 시퀀스가 없는 singleton을 제거하였다. 키메라 시퀀스는 UCHIME de novo 알고리즘을 사용하여 제거하였다[20]. Uparse clustering 알고리즘을 이용하여 97% 유사도를 기준으로 operational taxonomic unit (OTU)로 분류하였다. RDP database (version 9)를 이용해 세균 이외의 다른 생물, 즉 진핵생물, 고균, 엽록체, 미토콘드리아와 계(kingdom) 수준에서 분류가 안된 OTU를 제거하였다[21]. 종 다양성 지수 및 종 풍부도 추정치는 Mothur 프로그램을 이용하여 분석하였다[22].

통계 분석

통계분석은 R 통계 프로그램(version 3.3.1)을 이용하였다. 평균 간 유의성 검증은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정으로 Tukey 검정을 실시하였다($\alpha = 0.05$).

결과 및 고찰

정량 PCR을 이용한 바실러스 균주의 토양 생존능 정량 분석

바실러스 그룹 특이 프라이머(Bsub5F, Bsub3R)를 사용하여 본 연구에 사용된 3 균주를 모두 검출할 수 있었다. 이를 사용하여 비닐하우스에서 와그너 포트안에 있는 토양에 처리한 바실러스 3 균주의 토양 내 밀도 변화를 13일 동안 총 5회(처리 후 0일, 5일, 7일, 10일, 13일)에 걸쳐 분석하였다 (Fig. 1). 대조구의 경우 *B. subtilis* 그룹은 처리 0일차에 건조토양 1 그램당 $1.4 \times 10^3 \pm 8.9 \times 10^2$ 유전자수로 존재하였으며, 시기별 유전자수는 통계적 유의성은 없었다(평균 $1.3 \times 10^3 \pm 2.6 \times 10^2$). 반면 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리 직후 토양 내 밀도는 건조토양 1 그램당 각각 $1.2 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^5$, $2.1 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$, $9.8 \times 10^6 \pm 7.4 \times 10^6$

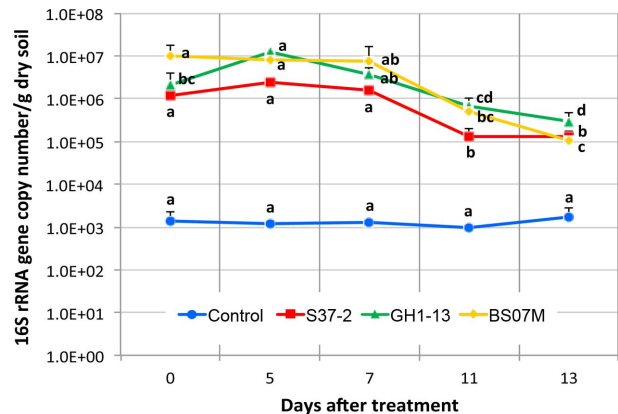


Fig. 1. Quantitative-PCR analysis of three *Bacillus* strains using *B. subtilis* group specific primers. Different letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$). Values were log transformed into log prior to statistical analysis.

유전자수로 대조구에 비해 1,000배 이상 높았다. 바실러스 3 균주의 토양 내 밀도는 처리 후 약 7일까지 유지되었으나 그 이후에는 유의성 있게 감소하는 양상이었다($p < 0.05$). 13일차에 S37-2, GH1-13, BS07M 균주 처리 토양의 밀도는 건조 토양 1그람당 각각 $1.3 \times 10^5 \pm 7.6 \times 10^4$ (11일차), $3.0 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$ (13일차), $1.0 \times 10^5 \pm 4.3 \times 10^4$ (13일차) 유전자수로 채취 시기 중 가장 낮았으나 여전히 대조구에 비해 약 100배 높았다.

Kim 등은 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 토양 내 생존능을 마이크로코즘(실내, 실외 조건) 시험과 포장시험을 통하여 평가하였다[19]. 본 연구결과와 유사하게 실내 마이크로코즘 시험에서는 균주 처리 후 *B. subtilis* 그룹의 16S rRNA 유전자수가 약간 감소하였지만 마지막으로 시료를 채취한 시점에서는 대조구보다 약 100배 이상 많게 유지되었다. 반면 실외의 마이크로코즘 시험과 포장시험에서는 16S rRNA gene copy number가 실내 시험보다 빠른 속도로 감소되다가 대조구와 비슷한 수준이 되었다. 이러한 결과로 비추어 보아 햇빛, 비 등의 날씨 영향을 직접적으로 받는 포장에서 보다 비닐하우스에서 유용미생물이 더 오랜 기간 생존할 수 있을 것으로 예측된다. 본 연구에서 수행한 바실러스 균주의 토양 내 생존능 분석은 유용미생물을 시설재배지에 사용할 때 처리간격을 정하는데 중요한 정보를 제공할 것으로 판단된다.

16S rRNA 유전자를 통한 토양 내 미생물 군집 분석

시퀀싱 결과 요약: 토양 내 미생물 군집분석을 위해 와그너 포트를 이용하여 토양에 처리한 바실러스 3 균주의 밀도가 유의하게 감소된 11일차 토양시료로부터 DNA를 추출하였다. 4처리 3반복으로 얻은 총 12개의 토양 시료로부터 얻은

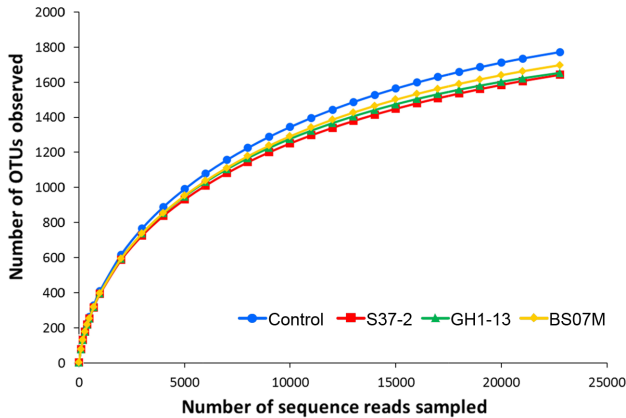


Fig. 2. Rarefaction curves for operational taxonomic units (OTUs) clustering at 97% sequence similarity of 16S rDNA sequences for each sample.

시퀀스 중 예비 여과 과정을 통해 322,290개의 고품질 시퀀스를 얻었다. 각 시료로부터 무작위로 선발된 22,761개의 시퀀스(총 273,132개)를 이용하여 4,299개의 OTU를 얻은 후 미생물 군집분석에 사용하였다.

각 처리구의 α-다양성을 분석한 결과, 3 균주를 처리한 토양에서 관찰된 종 다양성 지수인 Inverse Simpson 값이 대조구보다 약간 낮았으나 통계적으로 유의하지 않았다(Table

2). Rarefaction curve를 이용하여 처리구 간 종 풍부도를 비교한 결과, 처리구보다 대조구의 종 풍부도가 더 높았지만 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2). 이러한 결과는 유용미생물 처리 후 토양미생물 군집의 종 다양성이 증가했다는 이전 연구 결과와는 다른 경향이였다[13, 14]. 이전 연구는 유용미생물을 미생물의 대사작용이 활발한 작물 근권에 직접적으로 처리한 반면, 본 연구에서는 작물이 없는 토양 마이크로코즘이라는 제한된 공간에 처리했기 때문에 이러한 차이가 발생한 것으로 사료된다. 또한 처리한 유용미생물의 종류와 처리 후 분석시기가 다른 점도 결과에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

문(phylum) 분포 비교: 바실러스 균주 처리구 간 토양 내 미생물 분포를 문 수준에서 비교 및 분석하였다. 대조구와 처리구 모두 *Acidobacteria* 문(26.3 ± 0.9%)의 상대풍부도가 가장 높았고, *Proteobacteria* 문(24.2 ± 0.5%), *Chloroflexi* 문(11.1 ± 0.4%), *Actinobacteria* 문(9.7 ± 2.5%) 순으로 풍부도가 낮아지는 경향이였다(Fig. 3). 이러한 결과는 이전 연구에서 보고된 농경지 우점세균 문의 분포와 일치한다[23, 24]. 이 중 *Acidobacteria* 문, *Chloroflexi* 문, *Proteobacteria* 문의 비율은 대조구와 처리구에서 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 *Actinobacteria* 문의 비율은 대조구(13.4 ±

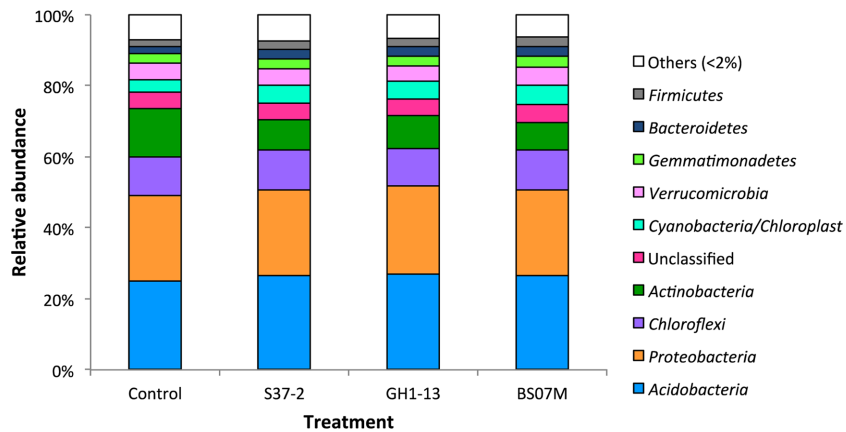


Fig. 3. Relative abundances of bacterial phyla in each sample in 11 days after treatment. The phyla with relative abundances less than 2% are grouped in the “others” category.

Table 2. Summary of Illumina MiSeq data obtained in this study.

Samples	# of OTUs	Chao	Ace	Shannon	Inverse Simpson
Control	1,771.7 ± 130.9	1,912.8 ± 92.4	2,013.8 ± 112.4	5.9 ± 0.02	135.1 ± 4
S37-2	1,642 ± 89.1	1,793.5 ± 79.3	1,895.8 ± 83.1	5.9 ± 0.04	114 ± 9.1
GH1-13	1,653 ± 49.1	1,910.3 ± 20.6	2,008.9 ± 30.3	5.9 ± 0.1	124.3 ± 19.1
BS07M	1,697 ± 60.4	1,988.5 ± 196.7	2,087 ± 217.8	6 ± 0.09	128.1 ± 8.8

Values indicate mean ± standard deviation for three replicated runs.

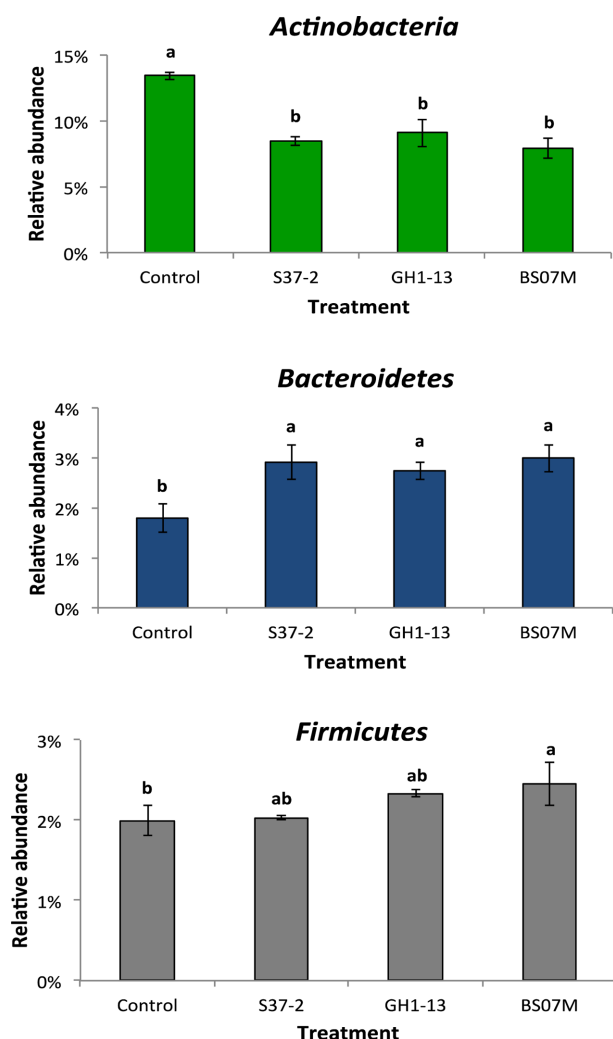


Fig. 4. Relative abundances of three phyla, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes*. Different letters above the bars indicate significant differences between samples ($p < 0.05$).

0.3%) 보다 처리구($8.5 \pm 0.6\%$)에서 뚜렷하게 낮은 경향이 있었다($p < 0.05$, Fig. 4). 반대로 *Bacteroidetes* 문과 *Firmicutes* 문의 비율은 대조구(각각 $1.8 \pm 0.3\%$, $2.0 \pm 0.2\%$)에 비해 처리구($2.9 \pm 0.1\%$, $2.3 \pm 0.2\%$)에서 높았다($p < 0.05$).

속 다양성 비교: 유용미생물 처리구 간 문 분포의 차이는 바실러스 균주 처리에 의한 결과라고 판단하고 이러한 차이를 이끄는 주요 OTU를 속(genus) 수준에서 비교 분석하였다(Fig. 5). *Arthrobacter* 속의 3개의 OTU 비율은 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 1.6%, 1.9%, 1.4% 인 반면 대조구에서 3.2%로 그 비율이 가장 높았다. *Gaiella* 속에 속하는 6개의 OTU 비율은 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 1.8%, 1.8%, 1.6%인 반면 대조구에서 2.5%로 그 비율이 가장 높았다. 마찬가지로 *Intrasporangiaceae*

과의 *Janibacter* 속과 *Terrabacter* 속으로 분류된 2개의 OTU 비율 역시 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 0.6%, 0.7%, 0.5%인 반면 대조구에서 1.2%로 그 비율이 가장 높았다. 이러한 경향은 *Streptomycetaceae* 과의 *Streptomyces* 속과 분류되지 않은 새로운 속에 속하는 2개의 OTU에서도 발견되었다. 이로 보아 본 연구에서 사용된 바실러스 3 균주를 토양에 처리함에 따라 토양미생물 군집의 *Actinobacteria* 문 *Actinobacteria* 목에 속하는 세균의 비율이 감소하는 것으로 확인되었다.

이와는 반대로 대조구에 비해 처리구에서 높은 비율을 보인 OTU도 관찰되었다. *Chitinophagaceae* 과 *Flavisolibacter* 속과 *Chitinophagaceae*-gen에 속하는 85개의 OTU 비율은 대조구에서 1.0%인데 비해 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 1.6%, 1.5%, 1.6%로 그 비율이 증가되었다. *Mucilaginibacter* 속의 25개의 OTU 비율은 대조구에서 0.3%인데 비해 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 0.6%, 0.4%, 0.5%로 감소하는 경향이 있었다. 마찬가지로 *Massilia* 속으로 분류된 5개의 OTU 비율은 대조구에서 1.4%인데 비해 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 1.7%, 1.9%, 2.0%로 더 높았다. 마지막으로 *Bacillus* 속으로 분류된 10개의 OTU 비율은 대조구에서 0.6%인데 비해 S37-2, GH1-13, BS07M 균주의 처리구에서 각각 0.7%, 1.1%, 0.9%를 나타냄으로써 같은 양상을 보였다. 이로 보아 본 연구에서 사용된 바실러스 3 균주의 토양에 처리하였을 때 *Actinobacteria* 문 *Actinobacteria* 목에 속하는 세균의 비율을 대체적으로 낮아지고, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* 문에 속하는 일부 세균은 증가하는 것으로 확인되었다.

본 연구결과를 통해서 유용미생물 처리가 토양미생물 군집에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 바실러스 3 균주의 처리가 어떤 분류군에 속하는 세균을 일정한 비율로 증가시키거나 감소시켰다는 결론을 내리기는 어렵지만 전체 토양미생물 군집을 변경시켰음을 관찰할 수 있었다. 이는 미생물 처리가 일부 세균 군집의 종 풍부도에 영향을 줌으로써 전체 근권미생물 군집 구조를 변경시켰다는 이전의 연구결과와 일치한다[14]. 이러한 군집 분포의 변화는 유용미생물의 처리에 의한 토양내 양분의 경쟁 또는 대사물질의 활성으로 인해 특정 미생물 종의 분포가 증가 또는 감소할 수 있을 것으로 추정되고 있다[25, 26].

요 약

유용미생물은 임업과 축산 분야에 활용될 뿐만 아니라 병해충 방제와 작물 생육 증진 등의 용도로 농업에서 널리 이용되고 있다. 하지만 유용미생물의 토양에서의 생존율과 정

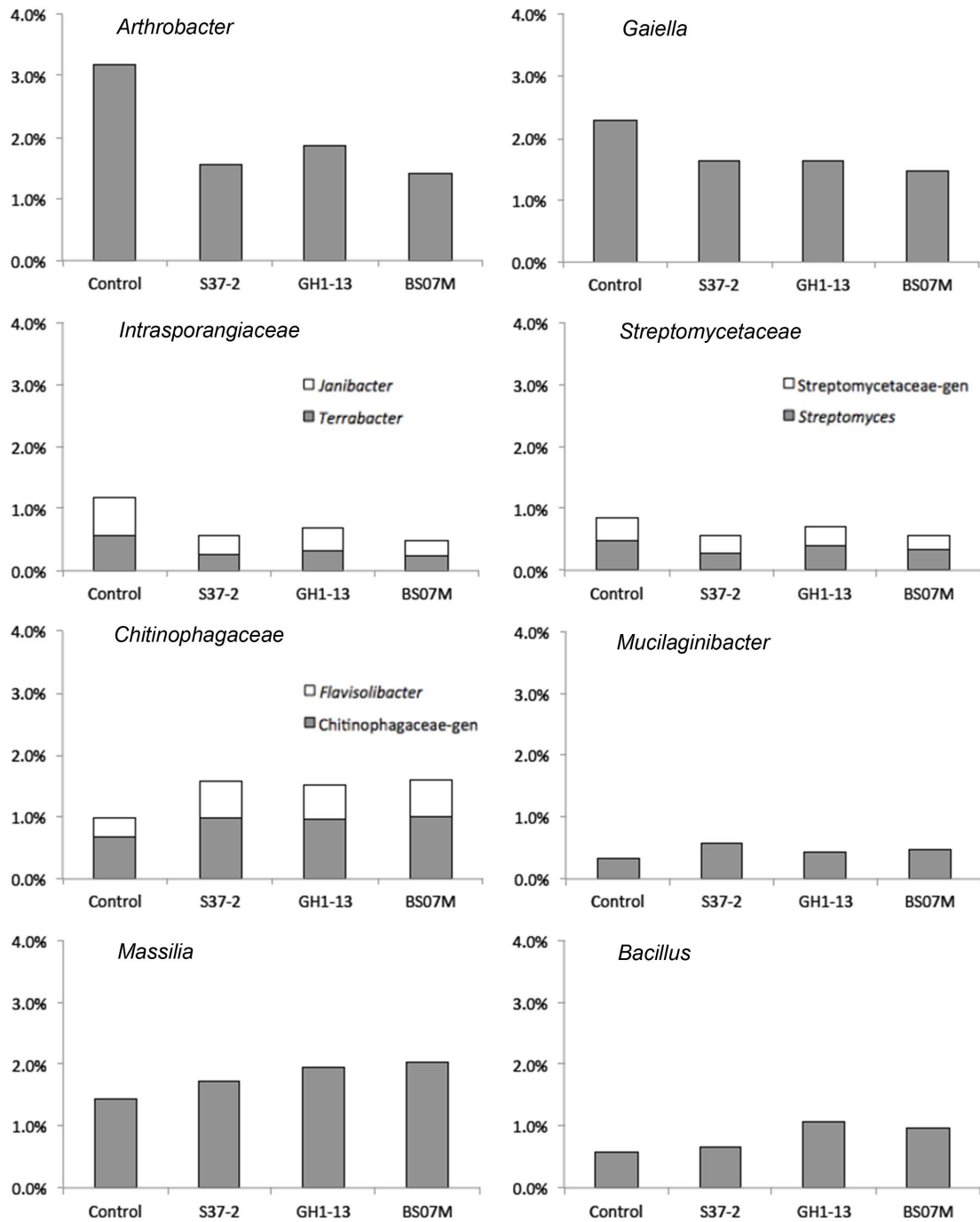


Fig. 5. Change of relative abundance of genera affected by application of beneficial *Bacillus* spp. Vertical axis indicates total relative abundance of operational taxonomic unit (OTU) belonging to genus. *Chitinophagaceae-gen means unknown genus belonged to the family of *Chitinophagaceae*.

착육에 대한 연구는 미미한 형편이다. 본 연구에서는 마이크로코즘을 이용해 바실러스 3 균주를 토양에 처리한 후, 이들의 토양 내 생존능을 정량 PCR을 이용하여 13일 동안 정량적으로 분석하였다. 또한 Illumina MiSeq 플랫폼을 이용하

여 바실러스 3 균주 처리구와 대조구의 토양미생물 군집 분포를 비교 및 분석하였다. 바실러스 3 균주의 처리 직후 토양 내 밀도는 건조토양 1 그램당 평균 4.4×10^6 유전자수로 대조구에 비해 1,000배 이상 높았다. 바실러스 균주의 토양

내 밀도는 처리 후 약 일주일 간 유지되었고 그 후부터는 유의성 있게 감소하였지만 여전히 대조구보다 100배 이상 높았다. 바실러스 균주 처리 후 토양 내 미생물 군집 구조 분석 결과, 대조구와 처리구 모두 *Acidobacteria* 문(26.3 ± 0.9%), *Proteobacteria* 문(24.2 ± 0.5%), *Chloroflexi* 문(11.1 ± 0.4%), *Actinobacteria* 문(9.7 ± 2.5%)에 속하는 세균이 우점하였다. 대조구 대비 처리구에서 *Actinobacteria* 문의 비율은 뚜렷하게 감소하였지만 *Bacteroidetes* 문과 *Firmicutes* 문의 비율은 증가하는 경향이였다. 속 수준에서 바실러스 3 균주를 처리함에 따라 일부 세균 군집의 종 풍부도를 변화되었고, 결국 전체 토착 미생물 군집 구조가 변화되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 수행한 유용한 바실러스의 토양 접종 후 이들의 토양 내 생존능 분석 및 토착 세균 군집의 변화는 유용미생물을 생물적 제제로 시설재배지에 사용할 때 중요한 정보를 제공할 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This study was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ010825)"; Rural Development Administration, Republic of Korea.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Taylor JP, Wilson B, Mills MS, Burns RG. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* **34**: 387-401.
- Foster RC. 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils.* **6**: 189-203.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* **60**: 579-598.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959.
- Lahlali R, Peng G, Gossen BD, McGregor L, Yu FQ, Hynes RK, et al. 2012. Evidence that the biofungicide serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. *Phytopathology* **103**: 245-254.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MdC, Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Techn.* **22**: 855-872.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**: 655-670.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods.* **55**: 541-555.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.* **21**: 1794-1805.
- Janssen PH. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1719-1728.
- Ambrosini A, de Souza R, Passaglia LMP. 2016. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. *Plant Soil.* **400**: 193-207.
- You C, Zhang C, Kong F, Feng C, Wang J. 2016. Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl-mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. *Ecol. Eng.* **91**: 119-125.
- Shen Z, Ruan Y, Chao X, Zhang J, Li R, Shen Q. 2015. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana Fusarium wilt disease suppression. *Biol. Fertil. Soils.* **51**: 553-562.
- Kwon JS WH, Suh JS, Kim WG, Jang KY, Noh HJ. 2007. Plant growth promoting effect and antifungal activity of *Bacillus subtilis* S37-2. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **40**: 447-453.
- Kim SY, Sang MK, Weon HY, Jeon YA, Ryoo JH, Song J. 2016. Characterization of multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13. *Korean J. Pestic. Sci.* **20**: 189-196.
- Lee YH, Song J, Weon H-Y, Park K, Sang MK. 2016. Plant growth promotion and induced resistance by the formulated *Bacillus vallismortis* BS07M in Pepper. *Res. Plant Dis.* **22**: 284-288.
- Wattiau P, Renard M-E, Ledent P, Debois V, Blackman G, Agathos S. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 816-819.
- Kim DY, Kim BY, Ahn JH, Weon HY, Kim SI, Kim WG, et al. 2015. Quantitative analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* GR4-5 in soil. *Korean J. Org. Agric.* **23**: 847-858.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**: 2194-2200.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. 2009. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**: 141-145.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-

- independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7537-7541.
23. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2017. Shifts in microbial communities in soil, rhizosphere and roots of two major crop systems under elevated CO₂ and O₃. *Sci. Rep.* **7**: 15019.
 24. Wu Y, Zeng J, Zhu Q, Zhang Z, Lin X. 2017. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Sci. Rep.* **7**: 40093.
 25. Kozdroj J, Trevors JT, van Elsas JD. 2004. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **36**: 1775-1784.
 26. Wu B, Wang X, Yang L, Yang H, Zeng H, Qiu Y, *et al.* 2016. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* ZM9 on bacterial wilt and rhizosphere microbial communities of tobacco. *Appl. Soil Ecol.* **103**: 1-12.