

고추역병 길항미생물 *Bacillus subtilis* AH18과 *Bacillus licheniformis* K11의 토양미생물 생태에 미치는 영향

박기춘¹ · 임종희² · 김상달^{2*} · 이영근³

¹농촌진흥청 인삼과, ²영남대학교 응용미생물학과, ³안동대학교 식물의학과

Effects of Phytophthora Blight-antagonistic Microorganisms *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11 on the Soil Microbial Community

Kee-Choon Park¹, Jong-Hui Lim², Sang-Dal Kim^{2*}, and Young-Keun Yi³

¹Ginseng Research Division, Rural Development Administration, Eumseong 369-873, Korea

²Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

³School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Received April 6, 2009; Accepted September 4, 2009

We measured the influence of antifungal antagonists *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11 on soil microbial community in microcosms. Both antifungal antagonists were confirmed to suppress hot pepper phytophthora blight. Phospholipid fatty acids (PLFA) were analyzed to investigate the soil microbial community. *B. subtilis* AH18 changed the total PLFA composition and bio-indicators of PLFA, compared with other treatments. *B. subtilis* AH18 decreased the proportion of bacteria and gram negative/gram positive bacteria, and increased the fungi/bacteria and anaerobic/aerobic microorganisms. In addition *cy19:0/18:1ω7c*, which means adaptation to unfavorable environmental conditions, was increased by the application of *B. subtilis* AH18. On the other hand the inoculation of *B. licheniformis* K11 or combined inoculation of both antifungal strains did not affect soil microbial community. The suppression of phytophthora blight and preservation of indigenous soil microbial community may be achieved by the combined application of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11.

Key words: antifungal antagonist, microbial control agent, soil microbial community

서 론

길항미생물을 이용하여 식물병을 방제하는 것은 친환경적인 방법으로서 선호되고 있고[Pusey 등, 1996], 많은 길항미생물들이 선발되고 있다[Boland 등, 1998]. 그리고 토양 식물병에 대한 길항미생물은 식물병을 억제하는 효과가 탁월하고, 병 억제 효과가 필요한 기간만큼 지속적으로 토양에서 살아남아야 하지만, 토양에 접종된 미생물은 짧은 시간 내에 그 수가 줄어들고, 곧바로 토양미생물 군락도 원래의 상태로 복원된다[van Veen 등, 1997; Thirup 등, 2003]. 그러나 접종한 미생물이 분비하는 물질 등에 의하여 토양미생물 생태에 기대하지 않는 영향을 줄 수도 있다.

한편 토양미생물상을 분석하는 방법은 여러 가지가 있으며, 각각 장단점이 있다. 배지에 배양하는 미생물 분석 초기의 방법에서부터 근래의 DNA 분석을 통한 비배양 분석까지 다양하게 있지만, 특히 토양 인지질 지방산을 분석하여 미생물상을 분석하는 것은 정량적 분석뿐만 아니라 미생물상의 차이를 확연하게 보여주는 면에서 다른 분석법보다 큰 장점을 지니고 있다. 인지질 지방산을 이용한 토양미생물 군락의 분석법은 전체 지방산의 수를 이용한 다양성 지수뿐만 아니라 주요 미생물 그룹의 존재 유무를 알려주기 때문에 미생물 군락의 구조를 연구하는데 매우 효과적인 방법으로 알려져 있다[Bossio 등, 1998]. 인지질 지방산 분석법은 배양이나 증폭 등의 과정이 없이 토양에서 바로 인지질을 추출하기 때문에 원래 상태의 토양미생물 군락을 파악할 수 있는 장점이 있다. 물론 이 방법으로 군락의 종 구성을 살펴볼 수는 없으나 큰 분류군으로는 정량적으로 접근이 가능하고, 비배양적 방법이기 때문에 미생물 군락 분석에 효과적이라고 할 수 있다[Tunlid 등, 1992]. 그동안 증균속이나 유기물에 의한 미생물 군락의 변화를 측정하는데 이용되어 왔

*Corresponding author
Phone: +82-53-810-3053; Fax: +82-53-810-4663
E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

다[Frostegard 등, 1993; Griffiths 등, 1999; Ekelund 등, 2003].

고추역병은 고추 재배지에서 고추 생산을 근본적으로 불가능하게 하는 근원적인식물 토양 병이다. 노지 고추 재배지에서 주로 발병하는 이 병은 재배적 방법이나 농약으로 방제하기에는 매우 힘든 토양 병해이다. 따라서 고추역병을 생물학적으로 방제하기 위한 다양한 방법이 시도되어 오고 있는데, 역병에 대한 저항성 균으로 선발된 *Bacillus subtilis* AH18과 *Bacillus licheniformis* K11은 모두 고추역병에 대한 길항성이 높은 세균으로 확인되었다. 따라서 이들 균들이 토양에 처리되었을 때 토양미생물상에 미치는 효과를 조사하는 것은 이 균들의 역병 억제 효과를 증가시키는 방법을 모색하는데, 도움이 될 뿐만 아니라 이 들 균들이 기존의 토양미생물상에 미치는 영향을 살펴보는 데에도 도움이 될 수 있다. 이 연구의 목표는 고추역병에 대한 길항미생물 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 토양미생물 군락에 미치는 영향을 단독 또는 복합으로 처리하여 관찰하였다. 길항미생물에 의한 토양미생물 군락의 교란은 인지질 지방산을 분석하고 전체 지방산 및 각 미생물 군 및 생태의 지표 지방산을 이용하여 측정하였다.

재료 및 방법

미생물 토양 접종. 고추역병에 대한 길항성이 우수한 것으로 선발된 미생물 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 단독으로 또는 동시에 토양에 접종하였을 경우 토양미생물상에 미치는 효과를 구명하기 위하여 30일간 육묘한 고추 홍심이 품종을 직경 10 cm, 높이 10 cm 정도 크기의 포트에 토양을 넣은 후 두 미생물을 10^6 /mL 농도로 5 mL씩 접종하였다. *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11를 동시에 접종한 시험구는 같은 농도액을 반으로 줄인 량을 접종하였다. 대조구는 미생물이 자라지 않은 배지에 물을 넣은 후 미생물 균 접종 과정에 따라서 수행하였다. 접종 한 포트는 28°C 항온기에 넣은 후 관찰하면서 표면이 마르면 다시 물을 50 mL 관주 하였다. 모든 처리는 완전임의 배치 4반복으로 수행하였다. 미생물 접종 10일 후 포트를 회수하여 토양을 동결 건조한 다음 분석할 때 까지 -80°C 에 보관하였다.

미생물상 분석. 냉동 보관된 토양 시료를 이용하여 인지질 지방산을 추출한 후 토양미생물 군락의 구성을 분석하였다 [Peacock 등, 2001]. 간단히 요약하면, 4g의 토양 시료에 chloroform:methanol:buffer solution(1:2:0.8, v/v/v) 혼합물을 넣고 지질을 추출한 후 silicic acid column으로 neutral-, glyco- 및 phospho-lipid로 분리하였다. 이 중에서 인지질을 메틸화 하여 만들어지는 메틸화된 지방산에 fatty acid methyl ester 19:0를 내부 표준물질로 넣은 다음 MIDI Sherlock Microbial Identification System(MIDI Inc., Newark, DE)으로 지방산을 정성·정량하였다. 각 인지질지방산의 값은 각 시료에서 총 인지질 지방산의 백분율로 표시하였다. fatty acid methyl ester 19:0 150 ng/ μL 농도를 내부 표준 물질로 이용하였다. 각 지방산의 생물학적 지표 분류는 Li 등의 분류 기준을 이용하였다 [Li 등, 2006].

통계분석. 전체 PLFA 41개 중에서 50% 이상의 시료에서 나타나는 지방산 30개만 통계 분석에 이용하였다. 전체 PLFA 데이터는 SAS version 9.13(SAS Inst., Cary, NC)을 이용하여 다변량 분석법의 하나인 주요 요인 분석을 통하여 분석하였다. 주요 요인 분석 결과의 그림에서 보여지는 시료 간의 거리는 시료간의 유사성 정도의 차이를 의미한다. 전체 PLFA 중에서 주요 지표 지방산은 Li 등[2006]의 방법에 따른 지방산 분석 지표들을 이용하여 지방산을 분류하였으며 그 결과는 분산분석으로 분석하였다.

결과 및 고찰

전체 토양미생물상의 변화. 지방산 구성을 다변량 통계분석법의 하나인 주요인 분석법으로 분석할 경우 미생물 처리가 토양미생물 생태에 미친 영향의 정도를 알 수 있다. 전체 미생물 군락의 차이를 조사하기 위하여 동정된 32개의 각 인지질 지방산을 주요인 분석으로 분석한 결과 처리간 차이가 발견되었다(Fig. 1). 주요 요인 분석으로 얻어지는 그래프 상의 새로운 축인 PC1이 전체 변이의 46.7%를 설명하였고, PC2가 28.5%, PC3가 20.3%를 각각 설명하였다. 가장 큰 변이를 설명하는 PC1에 대해서는 모든 처리간 차이를 보이지 않았고, PC2와 PC3에 대하여 *B. subtilis* AH18 처리구가 무처리 대조구로부터 확연히 구분되었지만, *B. licheniformis* K11 단용 처리구와 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 혼용 처리구는 PC1과 PC2에 대해서도 차이를 보이지 않았다. 따라서 전체 토양미생물상에 미치는 영향은 *B. subtilis* AH18을 단용 처리 했을 때만 관찰되었고, *B. licheniformis* K11의 단용 처리나 두 미생물의 동시 처리에서는 관찰되지 않았다. 이러한 *B. licheniformis* K11의 단독 또는 *B. subtilis* AH18과의 혼용구가 무처리 대조구와 미생물상에서 차이가 없는 것으로 보이는 것은 이들 처리구에서 반복간 차이로 인한 큰 표준편차에 기인한 것으로 사료된다. *B. licheniformis* K11이 처리된 시험구에서 이러한 큰 표준 편차는 *B. licheniformis* K11이 토양미생물상에 미치는 영향에 변이가 심함을 의미하고 또 그 변이가 심하다는 것은 *B. licheniformis* K11이 미세한 토양 환경 변화에 *B. subtilis* AH18보다 민감하게 반응할 수 있음을 보여준다. 토양에 도입되는 미생물에 대한 연구는 대부분 대상 병원균에 초점을 맞추었고 일부 연구만 토양미생물 군락에 대한 영향을 연구하였다. 토양에 접종한 길항미생물의 토양미생물 군락에 대한 영향은 대부분 단기간만 지속되었다[Girlanda 등, 2001; Bakker 등, 2002]. 토양에 접종된 길항균이 토양미생물상에 미치는 효과는 접종량에 따라서 다를 수 있지만, 접종량이 많더라도 그 효과가 9일 이상 오래 지속되지는 못한 결과가 보고된 바 있다 [Johnsen 등, 2005]. 따라서 본 연구에서 관찰된 길항미생물 *B. subtilis* AH18의 토양미생물상에 미치는 강한 영향도 접종 10일 이후까지 지속 가능성은 낮아 보인다. 한편 접종한 길항미생물에 의한 토양미생물상의 변화는 PLFA에 의한 관찰이 유용한 방법이 될 수 있음을 다시 보여 주었다[Johnsen 등, 2005].

생물학적 지표 차이. 동정된 여러 인지질 지방산 중에서 일

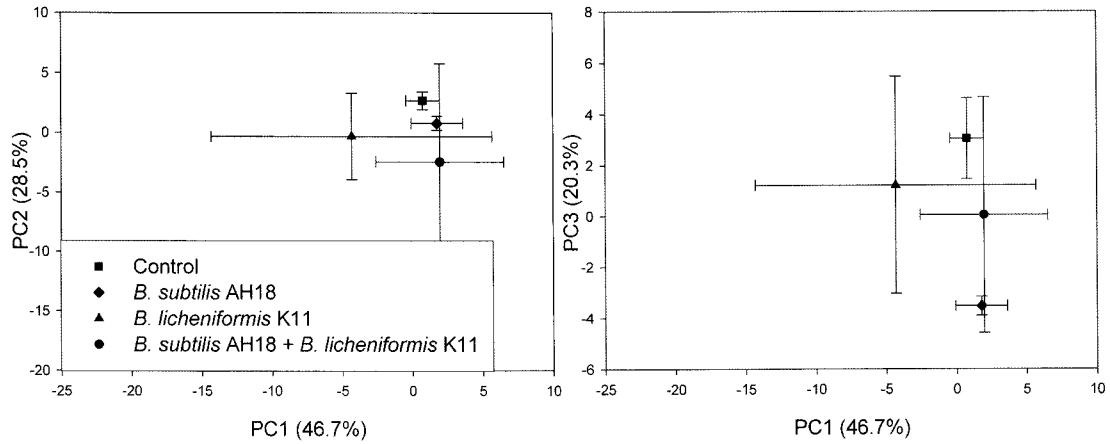


Fig. 1. Ordinate plot from principal component analysis of phospholipid fatty acids extracted from soil inoculated with antifungal antagonists.

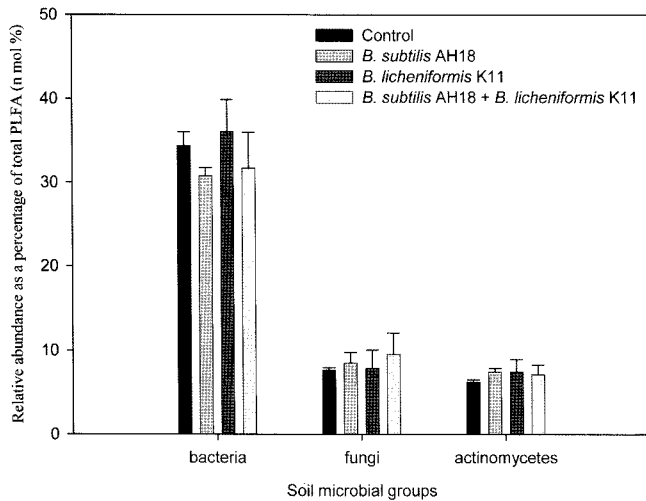


Fig. 2. Relative abundance of bacteria, fungi, and actinomycetes by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *Bacillus subtilis* AH18, *Bacillus licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

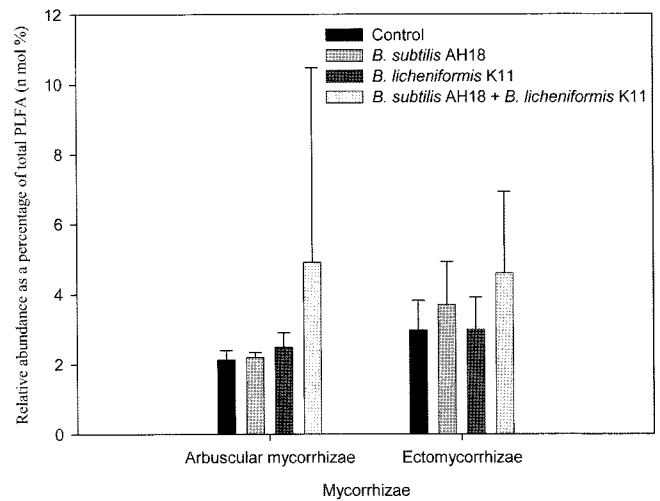


Fig. 3. Relative abundance of arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *Bacillus subtilis* AH18, *Bacillus licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

부 지방산은 생물적 지표로 이용될 수 있는데, 이들 지표를 이용하여 고추역병 저항성균인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 단용 또는 혼용 처리에 따른 토양내의 세균, 곰팡이, 방선균, 근균의 밀도 차이를 분석하였다. 또한 곰팡이/세균, 그람 음성세균/그람 양성세균, 혐기성균/호기성균, *cy19:0/18:1ω7c* 지방산, 단불포화지방산/포화지방산, cyclopropyl fatty acids의 비율 등도 분석하여 토양미생물 군락의 생태를 조사하였다. 세균의 비율은 30.7%인 *B. subtilis* AH18 처리구에서 34.4%인 대조구와 36.1%인 *B. licheniformis* K11 처리구에서 보다 유의성 있게 적었고, 이들 길항균 혼합 처리구와는 유의성 있는 차이가 없었다. *B. licheniformis* K11 처리구와 혼용 처리구에서는 무처리 대조구와 차이가 없었다. 곰팡이 비율은 7.7-9.5%로서 처리간 유의성 있는 차이가 없었지만 두 길항균의 동시 처리구에서 가장 높았다. 방선균은 대조구에서 6.3%로서 7.1-7.5%인 다른 처리구 보다 유의성 있게 적어서 이들 길항균들이 토양의 방선균 밀도를 증가시켰다(Fig. 2). 근균을 내생근과 외생근

근으로 나누어 관찰한 결과 대조구에서 2.1%와 3.0%로서 가장 적었고, 두 미생물을 각각 나누어 처리한 경우에는 대조구 보다 약간 증가했지만 유의성 있는 차이는 없었다. 그리고 두 미생물 동시 처리구에서는 가장 많은 4.9%와 4.6%이었지만 변이가 심해서 다른 처리구와 유의성 있는 차이를 보여주지 못했다(Fig. 3). 한편 주요 생물학 지표 중에서 토양유기물 함량의 지표가 되는 곰팡이/세균의 비율은[Bardgett 등, 1996; Frostegard 등, 1996] *B. subtilis* AH18 처리구에서 0.28로서 0.22인 대조구 보다 높았다. 탄소 영양원이 적은 조건에서 탄소 영양원이 풍부한 조건으로 이동의 지표가 될 수 있는 그람 음성균/그람 양성균 비율은[Borga 등, 1994; Yao 등, 2000] 대조구에서 가장 높은 1.16이었고, *B. subtilis* AH18 처리구에서 0.73으로서 유의성 있게 낮아서 이 균의 밀도 증가는 토양 탄소원 이용을 증가시킨 것으로 보였다. 혐기성균/호기성균의 비율은 *B. subtilis* AH18 처리구가 0.68로서 0.30인 대조구 대조구보다 유의성 있게 증가하였다. *B. subtilis* AH18 처리구에서 낮은 그람 음성균

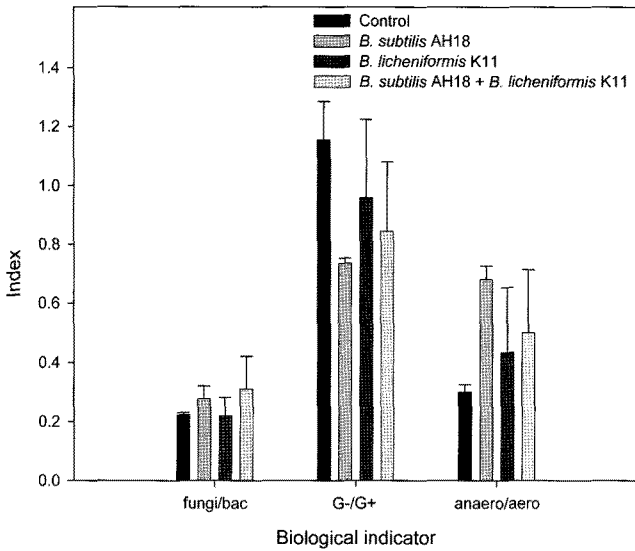


Fig. 4. Indices of biological indicators by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *Bacillus subtilis* AH18, *Bacillus licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

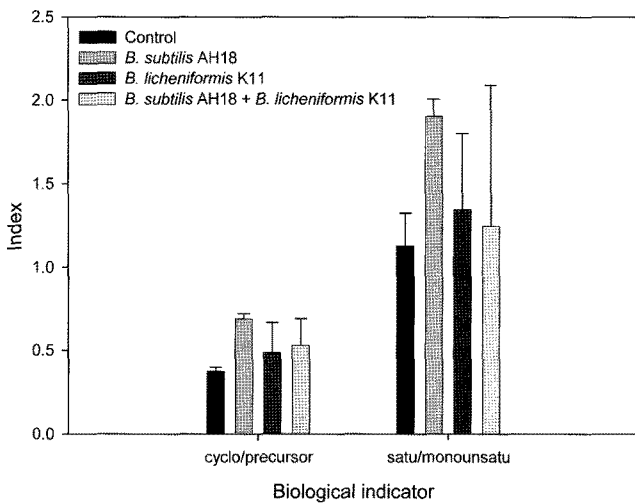


Fig. 5. Biological indicators by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *Bacillus subtilis* AH18, *Bacillus licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

그램양성균 비율과 높은 혐기성균/호기성균 비율은 이 균의 처리가 토양미생물 활성 증가에 효과적임을 보여주고 있다(Fig. 4). 또 다른 토양미생물 지표로서 불량환경 적응성을 의미하는 *cy19:0/18:1ω7c* 지방산 비율과 단불포화지방산/포화지방산 비율도 0.38과 1.13인 대조구에 비하여 0.69와 1.90인 *B. subtilis* AH18 처리구가 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5). 따라서 전체 토양미생물상에 미치는 효과 뿐만 아니라 개별적인 미생물 구성에 있어서도 *B. subtilis* AH18의 단용 처리가 토양미생물상에 가장 큰 영향을 미쳤다. 지방산 분석을 토양미생물상 분석에서 *B. subtilis* AH18의 단용 처리는 미생물을 처리하지 않은 대조구에 비하여 토양미생물상을 뚜렷이 바꾸었지만, *B. subtilis* AH18가 *B. licheniformis* K11와 혼용되었을 때는 토양미생물상

변화에 미치는 영향이 적었다. 따라서 이들 두 미생물의 복합 처리가 단일 처리 보다 고추역병 억제에 효과적인 연구 결과와 비교하면, 이 둘 미생물 조합은 토양미생물상을 크게 변화시키지 않으면서 역병을 억제하는 즉, 토양미생물 생태에 친화적인 생물학적 방제 방법이 될 수 있음을 보여주었다.

초 록

고추역병에 대한 길항미생물로 선발된 *Bacillus subtilis* AH18 과 *Bacillus licheniformis* K11의 토양미생물 생태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이들 미생물을 단독 또는 복합으로 토양에 처리한 후 토양미생물상의 변화를 관찰하였다. 토양미생물 생태의 변화는 토양에서 인지질 지방산을 추출한 후 전체 지방산과 지표 지방산의 상대적 비율로 분석하였다. 전체적 인지질 지방산 구성과 각 지표 지방산 분석에 의해서 *B. subtilis* AH18 처리구는 무처리 대조구와 완전히 구분되었다. 전체 토양미생물상을 *B. subtilis* AH18 처리가 바꾸었고 세균 비율을 감소시켰으며, 곰팡이/세균 비율을 높였으며, 그람음성균/그램양성균의 비율을 낮추었으며, 혐기성균/호기성균의 비율은 증가시켰다. 또한 불량환경 적응성을 의미하는 *cy19:0/18:1ω7c* 지방산 비율과 단불포화지방산/포화지방산 비율도 *B. subtilis* AH18 처리구가 증가시켰다. 이에 반하여 *B. licheniformis* K11 처리나 두 미생물의 동시 처리는 전술한 토양미생물 지표에 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서 지방산 분석을 토양미생물상 분석에서 *B. subtilis* AH18의 단용처리는 미생물을 처리하지 않은 대조구에 비하여 토양미생물상을 뚜렷이 바꾸었지만, *B. subtilis* AH18 가 *B. licheniformis* K11와 혼용되었을 때는 토양미생물상 변화에 미치는 영향이 적었다. 따라서 이들 두 미생물을 동시에 처리할 경우 고추역병 방제와 토양미생물 생태 보존의 두 목적을 동시에 이룰 수 있을 것으로 기대된다.

Key words: antifungal antagonist, microbial control agent, soil microbial community

감사의 글

본 연구는 2007년 농림기술관리센터 과제(과제관리 번호: 107013-03)의 지원에 의해 이루어진 것으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

Bakker PAHM, Glandorf DCM, Viebahn M, Ouwens TWM, Smit E, Leeftang P, Wernar K, Thomashow LS, Thomas-Oate JE, and van Loon LC (2002) Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 617-624.
 Bardgett RD, Hobbs PJ, and Frostegard A (1996) Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fert Soils*

- 22, 261-264.
- Boland GJ and Kuykendall LD (1998) In *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, New York, NY, U.S.A.
- Borga P, Nilsson M, and Tunlid A (1994) Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol Biochem* **26**, 841-848.
- Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, and Graham KJ (1998) Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb Ecol* **36**, 1-12.
- Ekelund F, Olsson S, and Johansen A (2003) Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biol Biochem* **35**, 1507-1516.
- Frostegard A and E Baath (1996) The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils* **22**, 59-65.
- Frostegard A, Tunlid A, and Baath E (1993) Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3605-3617.
- Girlanda M, Perotto S, Moßner-Locoz Y, Bergero R, Lazzari A, Dezfago G, Bonfante P, and Luppi AM (2001) Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1851-1864.
- Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, and Dobson G (1999) Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* **31**, 145-153.
- Johansen A and Olsson S (2005) Using Phospholipid Fatty Acid Technique to Study Short-Term Effects of the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the Microbial Microbiota in Barley Rhizosphere. *Microb Ecol* **49**, 271-281.
- Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR, and Yang ZY (2006) Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed, *Mikania micrantha* HBK. *Plant Soil* **281**, 309-324.
- Peacock A D, Mullen MD, Ringelberg, DB, Tyler DD, Hedrick DB, Gale PM, and White DC (2001) Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications *Soil Biol Biochem* **33**, 1011-1019.
- Pusey PL (1996) Micro-organisms as agents in plant disease control. Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues. *Crit Rep Appl Chem* **35**, 426-436.
- Thirup L, Johansen A, and Winding A (2003) Microbial succession in the rhizosphere of live and decomposing barley roots as affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54-BN14 or the fungicide imazalil. *FEMS Microb Ecol* **43**, 383-392.
- Tunlid A and White DC (1992) Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. *Soil Biochemistry* **7**, 229-262.
- Van Veen JA, Van Overbeek LS, and Van Elsas JD (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Rev* **61**, 121-135.
- Yao H, He Z, Wilson MJ, and Campbell CD (2000) Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb Ecol* **40**, 223-237.