

초염기성 사문암 토양 중 세균군집의 계통학적 특성

이종화 · 橋本知義¹ · 황경숙*

목원대학교 생명과학부 미생물학과, ¹九州沖繩農業研究センター

충남 홍성군 광천 사문암 토양지역의 석면폐광석(KS1)과 인근 토양(KG, KS2)은 pH8.5-9.2를 나타내어 초염기성 토양임이 확인되었다. KS1과 KS2 토양으로부터 통상농도의 alkaline 배지(AL)와 AL 배지를 10^{-2} 로 희석한 DAL 배지를 사용하여 평판법으로 세균수를 측정할 결과 AL 배지에서보다 DAL 배지에서 10-100 배 이상 높은 계수치를 나타내었다. 초염기성 사문암 토양으로부터 분리된 75 균주에 대해 통상농도의 AL 배지에서의 증식 유무를 확인한 결과, 통상농도의 AL 배지에서 증식 가능한 「AL세균군」과 AL 배지에서는 증식이 저해되고 DAL 배지에서만 증식 가능한 「DAL 세균군」으로 크게 나누었다. DAL 세균(42균주)은 10^{-3} AL 배지(약 6 mg C/L)에서도 증식 가능한 저영양성세균(oligotrophic bacteria)으로 사문암 토양중 50% 이상 분포해 있음이 확인되었다. 분리된 75 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 계통해석한 결과 proteobacteria α -subdivision (3 균주), β -subdivision (7 균주), γ -subdivision (2 균주), high G+C gram-positive bacteria (19 균주)와 low G+C gram-positive bacteria (14 strains)의 계통군을 나타내었다. 이들 세균중 AL 세균군(34 균주)은 high G+C gram positive bacteria에 속하는 *Streptomyces*과 low G+C gram positive bacteria에 속하는 *Bacillus*로 구성되었다. 한편, DAL 세균군(42 균주)은 high G+C 및 low G+C gram positive 계통군 이외에도 proteobacteria α -subdivision에 속하는 *Afipia*와 *Ralstonia*, proteobacteria β -subdivision에 속하는 *Variovorax*, proteobacteria γ -subdivision에 속하는 *Pseudomonas*로 구성되어 계통학적으로 다양한 세균집이 확인되었다.

Key words □ AL-organisms, DAL-organisms, oligotrophs, phylogenetic characteristics, serpentinite soil

사문암 지역은 전 세계에 광범위하게 분포하고 있다(7). 사문암 지역에 대한 토양 지질학적 연구보고에 의하면 이 지역의 토양은 매우 척박하여 사문암의 구성광물인 Fe과 Mg이 전이원소인 Ni, Co 및 Cr에 의해 치환되기 때문에 사문암에서 풍화된 토양 중에는 Ni, Co 및 Cr이 매우 높은 함량을 나타낸다. 이들 중금속 물질은 식물에 독성을 유발함으로써 식물체의 생존과 생육을 억제하기에(5,6,8,13,15), 식물이 생육하기 좋은 기후의 지역에서조차 생육이 부진함을 나타내었다(10). 우리나라의 사문암체는 충남 서부지역과 울산 및 안동지역에 주로 분포해 있다. 특히 광천과 홍성지역을 중심으로한 사문암 지역은 석면, 활석 또는 제철용제 등을 채광하기 위하여 광산으로 개발되어 왔다(3). 이 지역 사문암 토양의 지화학적 조성과 특징적으로 분포해 있는 대나물(*Gypsophila oldhamiana*) 식물체내의 중금속 함량과 식물체의 생육상태가 검토된바 있다(1,2).

이와 같이 사문암 토양의 지질학적, 지구화학적 및 식생 분포 등에 관한 연구가 세계적으로 다양하게 수행된 반면 미생물학적 연구는 대부분이 사문암 토양내에 다량 함유되어 있는 Ni과 Cr 등 중금속 내성균에 관련된 조사가 주로 수행되어졌다(4,9,16). 사문암 토양 중에 분포하는 미생물군집에 대한 해석은 매우 미흡한 형편으로, 토양 생태계의 기능과 구조를 폭넓게 이해하기

위해서는 토양내에 존재하는 미생물의 정량적 평가와 종 조성에 관하여 연구하는 것이 매우 중요한 일이라 생각된다.

본 연구에서는 충남 홍성군 광천지역의 초염기성 사문암 토양으로부터 시료를 채취하여 초염기성 사문암 토양중에 분포하는 세균의 정량적 평가와 분리된 세균의 16S rDNA-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 유형을 검토하고 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 계통학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

토양시료

충남 광천과 홍성 일대에 분포해 있는 사문암 토양(KG, KS1, KS2)에서 시료를 채취하였다(Fig. 1). 사문암 토양은 pH 8.5-9.2 이상의 초염기성 토양을 나타내었다. 각 토양시료는 5 cm의 표토층을 제거한 후 각각 1 kg 정도를 채취하였다. 시료로 사용하기 위하여 polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실로 운반하였다. 토양은 4°C에서 보존하면서 12 시간 내에 실험되었다.

세균수 측정 및 분리

세균수는 희석평판법에 의하여 alkaline 배지(AL: glucose 10 g, yeast extract 5 g, peptone 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, Na_2CO_3 10 g, pH 10)와 AL 배지를 10^{-2} 로 희석한 DAL 배지를 사용하여 28°C에서 600 시간 이상 배양하면서 세

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-829-7593, Fax: 042-829-7590
E-mail: kswang@mokwon.ac.kr

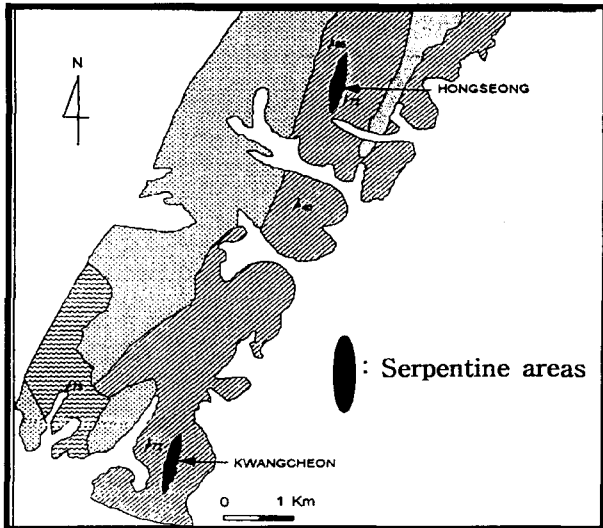


Fig. 1. Serpentine areas of Hongseong and Kwangcheon, Chungnam.

균수를 측정하였다. 세균수 측정에 사용한 AL 및 DAL 배지로 부터 colony를 분리하여 통상농도의 AL 배지에서의 증식 유무를 확인한 후, AL 배지에서 증식가능한 「AL세균」과 AL 배지에서는 증식하지 않고 DAL 배지에서만 증식가능 「DAL세균」으로 분리하였다(11).

DNA 추출 및 16S rDNA의 PCR 증폭

Chromosomal DNA의 분리는 benzyl chloride 방법을 변형하여 수행하였다(12). 회수된 균체에 500 µl의 TE buffer (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하여 잘 현탁시킨 후 100 µl의 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)와 300 µl의 benzyl chloride (Katayama chemicals co.)를 첨가하여 50°C에서 30 분간 배양하였다. 22,250×g에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 혼합액을 첨가하여 10 분간 교반한 다음 4°C, 22,250×g에서 15 분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮기고 위와 같은 방법으로 chloroform/isoamylalcohol (24:1) 혼합액을 2 회 처리하였다. 최종적으로 얻은 상층액에 동량의 2-propanol을 첨가한 후 30 분간 정지하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 4°C에서 22,250×g으로 15 분간 원심분리하고 냉거 70% ethanol과 실온 보관된 100% ethanol로 각각 세척한 다음 회전 농축기(Hetovac, Denmark)를 이용하여 농축하였다.

16S rDNA를 증폭하기 위해서 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로하여 27F (5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3') primer와 1525R (5'AAGGAGGTGATCCAG-CCGCA-3') primer를 이용하였다(22,23). 추출된 DNA 1 µl (50~100 ng)에 27F primer, 1 µl; 1525 Rprimer, 1 µl; TaKaRa Ex Taq (Takara, Tokyo, Japan), 0.25 µl, dNTP Mixture 8 µl, 10× EX Taq Buffer 10 µl와 멸균된 3 차 증류수 78.75 µl를 PCR 반응 tube에 넣고 잘 혼합한 후 다음 조건에 따라 PCR 반응을 실시하였다. 94°C, 6 분간 반응한 다음 94°C, denaturation 1 분,

56°C, annealing 1 분, 72°C, extension 2 분을 30 회 반복하고, 72°C에서 21 분간 final extension을 실시하였다. Thermal cyclers는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 9700; Applied Biosystems)를 이용하였다. 16S rDNA PCR 증폭산물을 전기영동을 통하여 확인하고, Qiagen PCR purification Kit (Qiagen)를 이용하여 정제한 후 band의 단일성을 최종 확인하였다.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석

각 균주의 16S rDNA PCR 증폭산물에 대해 제한효소를 이용하여 각 균주의 절단 양상을 관찰하였다(14). 4 bases를 인식하는 5U의 *Hae*III (5'...GG▼CC...3', 3'...CC▲GG...5') 제한효소 (BioLabs inc.)를 이용하여 PCR product 15 µl, NE buffer 1.5 µl, Enzyme 1 µl, dH₂O 2.5 µl를 혼합하여 최종 20 µl를 반응 tube에 넣은후 37°C에서 8 시간 반응시켰다. 반응물은 1.5%의 agarose gel (1× TAE buffer; 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 0.5× TAE buffer에서 100 V, 25 mA로 120 분간 전기 영동한 후 ethidium bromide (EB)로 염색하여 band의 유형을 확인하였다. 각 band의 유형은 GelCompar software (version 4.0; Applied Maths, Korthrijk, Belgium)를 사용하여 비교하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

ABI PRISM 373 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 결정된 16S rDNA partial (500~580 bp) 염기서열의 homology는 DDBJ/EMBL/GenBank database의 Blast program을 이용하여 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal X (Version 1.8) program package를 이용하여 정렬하였고(18), 근린 결합법에 의거(17), 초염기성 사문암 토양중에 존재하는 세균들의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

결과 및 고찰

초염기성 사문암토양중에 분포하는 세균의 정량적 평가

통상농도의 AL 배지와 AL 배지를 10²로 희석한 DAL 배지를 사용하여 초염기성 사문암 토양중의 세균수를 측정한 결과, 통상농도의 AL 배지보다 DAL 배지에서 10~100배 이상의 높은 계수치를 나타내었다. 이상의 결과로부터 사문암 토양 내에는 통상 농도의 배지에서는 증식하지 않고, 희석한 DAL 배지에서만 증식이 가능한 세균이 다수 분포 한다고 판단되었다(Fig. 2).

분리된 토양 세균을 통상농도의 AL 배지에서의 증식여부를 확인한 결과, 분리된 총 76 균주 중 34 균주가 통상농도의 AL 배지에서 증식 가능한 세균이었으며, 42 균주는 통상농도의 AL 배지에서 증식할 수 없고 희석된 DAL 배지에서만 증식 가능하여 전자를 「AL세균」으로 후자를 「DAL세균」으로 분류하였다(Table 1).

본 실험에서 사용한 AL배지의 경우, 배지중의 유기 탄소 함유량은 6075 mg/L로 10⁻³ 배로 희석한 배지에는 약 6 mg/L의 유기 탄소원이 포함되어있다. 이들 DAL 세균은 10⁻³ AL 배지에서도 증식 가능하여 저영양세균(oligotrophic bacteria)으로 판정하였

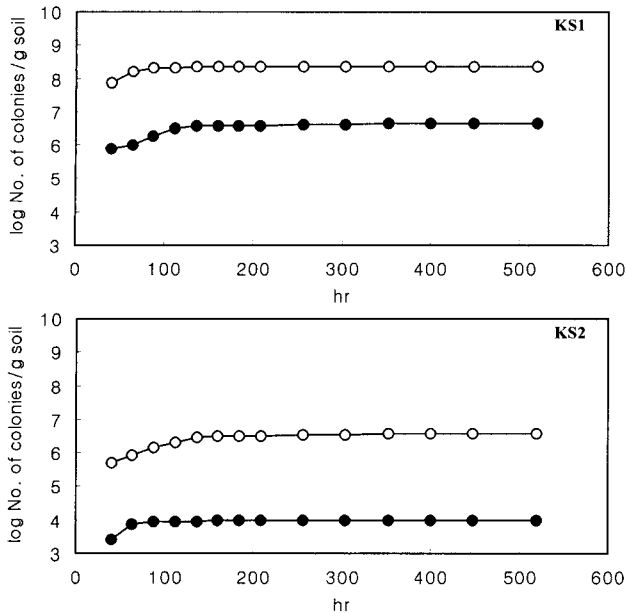


Fig. 2. Comparison of the number of bacterial colonies on alkaline medium (AL) and 10⁻² diluted alkaline medium (DAL) plates collected from serpentinite soil. ●, AL medium; ○, DAL medium

Table 1. Number of AL and DAL organisms collected from serpentinite and metamorphic soil

| Sample | Total isolates | AL- organism | DAL-organism |
|--------|----------------|--------------|--------------|
| KG | 17 | 10 | 7 |
| KS1 | 43 | 21 | 22 |
| KS2 | 15 | 2 | 13 |
| Total | 75 | 33 | 42 |

DAL: diluted 10⁻² of AL medium.

다(Table 1). 이들 저영양세균은 초염기성 사문암 토양으로부터 분리된 총 균주의 55.2%를 차지하여 매우 높은 분포율을 나타내었다.

16S rDNA-RFLP

초염기성 사문암 토양(KG, KS1, KS2)로부터 분리된 75균주의 16S rDNA를 PCR 증폭하여 이들에 대한 RFLP를 비교 분석하였다. 제한효소(*Hae*III)에 의해 절단된 16S rDNA-RFLP 산물의 band는 GelCompar software (version 4.0; Applied Maths, Korthrijk, Belgium)를 사용하여 분석한 결과 43 개 group의 다양한 band의 유형이 확인되었다. 이와 같은 결과로부터 사문암 토양내에 다양한 미생물 종이 존재한다고 판단되었다(Fig. 3).

16S rDNA 계통해석

RFLP 각 유형에 속하는 대표균주 40 균주를 선발하였다. 각 분리균주의 16S rDNA의 염기서열을 결정하여 계통학적 위치를 확인한 결과, 초염기성 사문암 토양으로부터 분리된 AL세균은

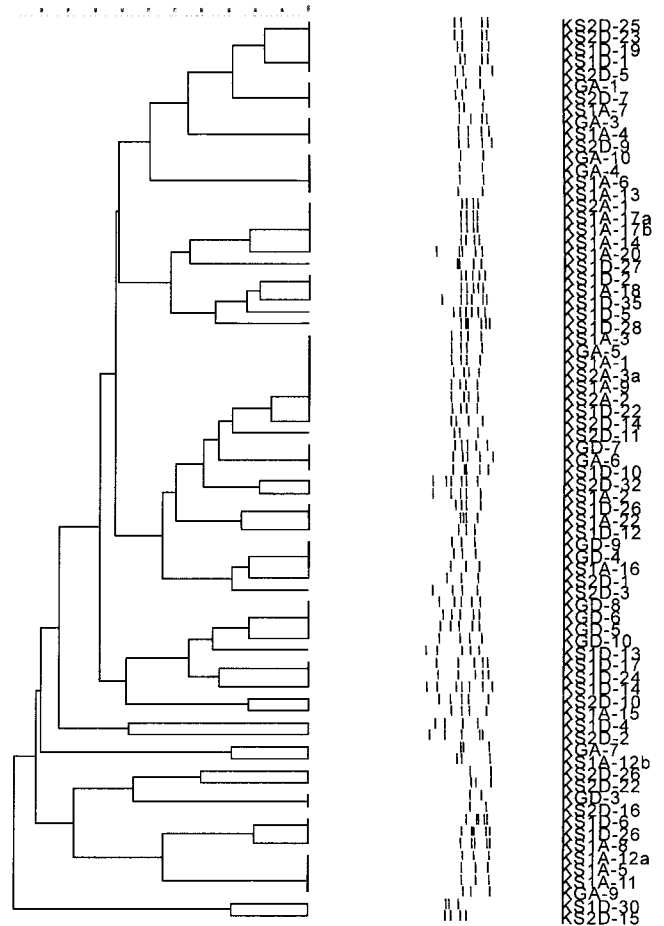


Fig. 3. UPGMA dendrogram among the 75 strains based on the bands on 1.5% agarose gel in 16S rDNA-RFLP.

high G+C gram positive bacteria (11 균주)와 low G+C gram positive bacteria (6 균주) 계통군에 속하는 특징을 나타내었다. AL 세균을 각 cluster별로 정리해 보면 high G+C gram-positive bacteria cluster에 속하는 균주는 *Streptomyces* (9 균주), *Microbacterium* (1 균주) 그리고 *Mycobacterium* (1 균주)으로 구성되었으며, low G+C gram positive bacteria cluster에 속하는 균주는 *Bacillus* (6 균주)로 구성되었다(Fig. 4).

한편 DAL 세균은 proteobacteria α-subdivision (4 균주), β-subdivision (6 균주), γ-subdivision (2 균주) 그리고 high G+C gram-positive bacteria (7 균주)와 low G+C gram-positive bacteria (4 균주) 계통군에 속하여 계통학적 다양성을 나타내었다. DAL 세균을 각 cluster 별로 정리해 보면, proteobacteria α-subdivision의 cluster에 속하는 균주는 *Bradyrhizobiu* (1 균주), *Bosea* (2 균주)과 *Brevundimonas* (1 균주)으로 구성되었고, proteobacteria β-subdivision의 cluster에 속하는 균주는 *Bordetella* (2 균주), *Ralstonia* (2 균주) 및 *Varioverax* (2 균주)에 포함되었으며, proteobacteria γ-subdivision의 cluster에 속하는 균주는 *Pseudomonas* 속(2 균주)으로 구성되었다. High G+C gram-positive bacteria cluster에 속하는 균주는 *Streptomyces* (6 균주),

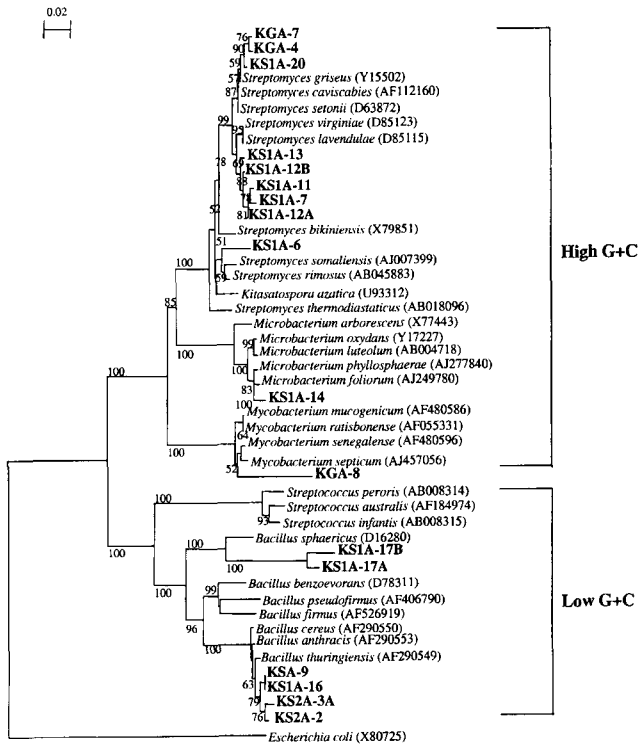


Fig. 4. Phylogenetic tree showing the affiliations of AL organisms found in serpentinite soil.

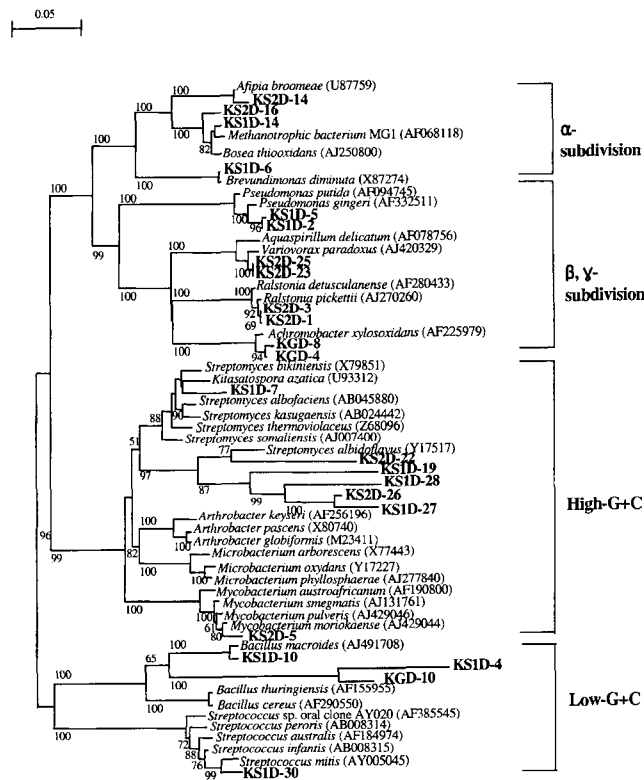


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the affiliations of DAL organisms found in serpentinite soil.

Mycobacterium (1 균주)으로 구성되었으며, low G+C gram positive bacteria cluster에 속하는 균주는 *Bacillus* 속(3 균주) 및 *Streptococcus* 속(1 균주) 균주로 구성되었다(Fig. 5). 이상의 결과로부터 high G+C 및 low G+C gram positive bacteria 계통군 중에는 AL세균과 DAL세균이 공통적으로 분포해 있었으나, proteobacteria 계통군에 속하는 균주는 DAL 세균만 분포하는 특징을 나타내었다.

지금까지 초염기성 사문암 토양중의 미생물군집에 대한 연구 보고는 매우 미흡한 형편으로 대부분 사문암 토양중의 중금속 내성균에 관한 검토에 국한되어 왔다. Mengoni 등(4)은 이탈리아의 사문암 토양으로부터 중금속 니켈에 저항성이 있는 균주를 다수 분리하여 계통학적 해석을 한 결과 high G+C gram positive bacteria에 속하는 *Streptomyces*와 low G+C gram positive bacteria에 속하는 *Chryseobacterium*가 주요한 계통으로 소개되었다.

본 연구에서 저영양배지를 사용하여 분리된 저영양세균(DAL세균)은 proteobacteria α -, β -, γ -subdivision 및 high G+C gram-positive bacteria와 low G+C gram-positive bacteria의 다양한 계통군으로 이루어졌음이 확인되었다.

참고문헌

- 김명희, 민일식, 송석환. 1997. 사문암 지역에서 생육하는 대나물(*Gypsophila oldhamiana*)의 중금속 함량. 한국환경생태학회지 20, 385-391.
- 김명희, 송석환, 민일식, 장인수. 2000. 충남 사문암 지역 토양 식물체 및 계류의 중금속 오염. 한국환경생태학회지 14, 119-126.
- 우영균, 최석원, 박기화. 1991. 충남 예산지구 활광산의 성인에 대한 연구. 광산지질 24, 363-378.
- Mengoni, A., R. Barzanti, C. Gonnelli, R. Gabbriellini and M. Bazzicalupo. 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environ. Microbiol.* 3, 691-698.
- Aumento, F. 1970. Serpentine mineralogy of ultrabasic intrusion in Canada and on the Midatlantic Ridge. Geological Survey of Canada. Department of Energy, Mines and Resources. *Ottawa, Ontario.*, pp. 53-69.
- Bakre, A. J. M., J. Protocol, and R. D. Reeves. 1992. The Vegetation of ultramafic (serpentinite) soils. Intercepts LTD., Andover, United Kingdom.
- Brooks, R.R. 1987. Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary.
- Crooke, W. M. 1956. Effect of soil reaction on uptake of nickel from a serpentine soil. *Soil Sci.* 81, 269-276.
- Diels, L., De M. Smet, L. Hooyberghs, and P. Corbisier, 1999. Heavy metals bioremediation of soil. *Mol. Biotechnol.* 12, 149-158.
- Gordon, A. and C. B. Lipman. 1926. Why the serpentine and other magnesian soils infertile? *Soil Sci.* 22, 291-302.
- Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on diluted nutrient broth as a culture medium. *Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.* 27, 23-30.
- Zhu, H., F. Qu, and L.-H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21, 5279-5280.

13. Hunter, J. G. and O. Vergnano. 1952. Nickel toxicity in plants. *Ann. Appl. Biol.* 39, 279-284.
14. Moyer, C.L., F.C. Dobbs, and D.M. Karl. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871-879.
15. Reeves, R.D., R.R. Brook, and R.M. MacFarlane. 1981. Nickel uptake by *Streptanthus* and *Caulanthus* with particular reference to the hyperaccumulator *S. polygaloides* Gray. *Am. J. Bot.* 68, 708-712.
16. Roane, T.M. and S.T. Kellogg. 1996. Characterization of microbial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 42, 593-603
17. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
18. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.

(Received November 1, 2002/Accepted February 18, 2003)

ABSTRACT : Phylogenetic Characteristics of Bacterial Populations Found in Serpentinite Soil

Jong-Wha Lee, Tomoyoshi Hashimoto¹, and Kyung-Sook Whang* (Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea, ¹Department of Agro-Environmental Research, National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Kumamoto, 861-1192, Japan)

A phylogenetic analysis of bacterial populations inhabiting soil derived from serpentine was conducted. The samples were collected from adjacent metamorphic rocks and serpentinite soil at Kwangcheon. The pH of the serpentine areas ranged from 8.5 to 9.2. The number of bacteria on the DAL medium which was diluted with 10⁻² of AL medium was 10~100 fold higher than that from the full strength of AL medium, and which indicates that oligotrophs are distributed in the serpentinite soil. Of a total of 76 isolates, 42 isolates were oligotrophic bacteria, which grew only on the DAL medium. Based on a phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences, these isolates are found to fall within five major phylogenetic groups: proteobacteria α -subdivision (3 strains), α -subdivision (7 strains), γ -subdivision (2 strains); high G+C gram-positive bacteria (19 strains); low G+C gram-positive bacteria (14 strains). Bacteria of the genus *Streptomyces* (high G+C division) and *Bacillus* (low G+C division) have been considered to form a numerically important fraction of serpentinite soil. Oligotrophic strains categorized as *Afipia* (α -subdivision), *Ralstonia*, *Variovorax* (β -subdivision), *Pseudomonas* (γ -subdivision), *Arthrobacter* (high G+C division), and *Streptomyces* (low G+C division).