

16S rDNA-ARDRA법을 이용한 소나무림과 상수리나무림 토양 내 VBNC 세균군집의 계통학적 특성 비교

한송이 · 김윤지 · 황경숙*

목원대학교 생명산업학부, 미생물생태자원연구소

직접 생균수 측정법(DVC)과 평판계수법(PC)을 이용하여 소나무림과 상수리나무림 토양에 분포하는 세균군집의 정량적 평가를 실시한 결과, DVC법에 의해 계수된 생균수에 대해 평판법에 의해 계수된 생균수 1% 미만으로 나타났다. 이상의 결과로부터 산림토양 내에 평판배양법으로는 배양이 곤란한 난배양성(viable but non-culturable; VBNC) 세균이 99% 이상 존재해 있는 것으로 판단되었다. 이들 VBNC 세균의 군집구조 해석을 위하여 토양으로부터 직접 DNA를 추출하고 16S rDNA-ARDRA 분석을 통하여 계통학적 특성을 검토하였다. 소나무림과 상수리나무림 토양으로부터 각각 111 clones, 108 clones를 획득하고 *Hae*III 절편양상에 따라 30 groups과 26 groups의 ARDRA group으로 분류하였다. 각 ARDRA group으로부터 대표 clone을 선발하여 16S rDNA 염기서열을 결정된 결과, 소나무림 토양의 경우 α -proteobacteria (12 clones), γ -proteobacteria (3 clones), δ -proteobacteria (1 clone), *Flexibacter/Cytophaga* (1 clone), *Actinobacteria* (4 clones), *Acidobacteria* (4 clones), 그리고 *Planctomycetes* (5 clones)의 7개의 계통군이 확인되었으며, 상수리나무림 토양에서는 α -proteobacteria (4 clones), γ -proteobacteria (2 clones), *Actinobacteria* (10 clones), *Acidobacteria* (8 clones), *Planctomycetes* (1 clone), 그리고 *Verrucomicrobia* (1 clone)로 6개의 다양한 계통군이 확인되었다. 이상, 소나무림과 상수리나무림 토양 내에 존재하는 99% 이상의 VBNC 세균군집의 대부분은 미배양성 혹은 미동정균으로 계통학적으로 다양한 미지의 미생물로 구성되어 있음이 확인되었다.

Key words □ 16S rDNA-ARDRA, phylogeny, Pine forest soil, Quercus forest soil, viable but non-culturable (VBNC) bacteria

산림생태계의 구동력이 되는 에너지는 주로 수목으로부터 공급되는 낙엽, 나뭇가지, 고사된 뿌리로 산림토양 중에는 매년 정기적으로 이와 같은 형태의 유기물이 더해진다. 낙엽분해는 산림생태계 유지를 위한 중요한 작용으로(5, 7), 이들 작용의 대부분은 토양에 서식하는 각종 생물에 의한 것으로 토양생물은 식물의 뿌리나 토양을 구성하는 각종 물질 또는 토양생물 상호에게 영향을 주며 중요한 산림토양 생태계를 구성한다. 산림토양 생태계는 기후, 모암, 지형, 식생 등 여러 요인의 영향을 받아 낙엽분해양식 및 토양 미생물 중 등이 변화하므로 보편적 이론으로 설명하기는 어렵다(5). 김과 장 등은 이론적 모델에 기초하여 낙엽분해에 따른 영양소 함량의 변화나 화학적 변화, 낙엽을 통해 유입되는 영양염류의 양과 낙엽의 분해량을 조사하여 산림생태계의 물질순환을 밝힌 바 있다(15).

낙엽과 같은 유기물은 일련의 과정을 통해 분해되면서 낙엽층에서 생성된 분해중간산물은 하층부 광물질 토양층으로 이동하면서 유기물 층위를 형성하며, 이들 분해에 관여하는 미생물은 영양물질, 수분, 산소압 등 각 부위의 이화학적 성질에 따라 다양한 패턴으로 분포하게 된다. 특히 산림을 구성하는 수목의 종

류에 따라 이화학적 성질이 다르고, 이러한 이화학적 환경요인의 변동에 따라 낙엽분해에 관여하는 미생물군집도 변동한다(5, 6, 13, 16, 22). 상수리나무림 및 소나무림 내 미생물군집에 관한 연구보고는 대부분 낙엽분해와 관련하여 상층부의 낙엽층 내 미생물군집 특성에 관해 중점적으로 조사되었다(15, 20, 21).

토양 중에는 다양한 미생물종이 존재해 있음에도 불구하고 토양미생물의 생태학적 연구가 미생물의 순수분리와 배양에 기초하여 연구되어 배양이 곤란한 난배양성 세균(VBNC; viable but non-culturable) 군집을 해석하는데 상당한 문제점이 있다고 지적되어 왔다(3, 8, 11). 최근 미생물생태학자들은 배양을 통하지 않고 자연환경으로부터 직접 추출한 DNA를 대상으로 미생물군집의 구조와 기능을 파악하기 위한 분자생물학적 방법을 시도하고 있다. 특히, ARDRA (amplified rDNA restriction analysis)법은 미생물이 갖는 16S rDNA를 증폭하고 제한효소를 처리하여 미생물 군집의 유전적 다양성을 확인하고 분석하는 방법으로 미생물군집의 생태학적 연구에 광범위하게 이용되고 있다(8, 25, 27).

본 연구에서는 상수리나무(*Quercus acutissima*)림과 소나무(*Pinus densiflora*)림의 하층부 광질토양 내 분포하는 미생물군집의 생태학적 특성을 비교하기 위해 직접검정법과 평판법을 이용하여 정량적 평가를 실시하고 평판배양법에 의해 배양이 곤란한 난배양성 세균(viable but non-culturable bacteria; VBNC)의 분포

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

상황을 조사하여 이들 VBNC 세균을 포함한 산림토양 내 미생물군집의 계통학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

토양시료

본 연구에서는 공주시 계룡산 북사면의 소나무(*Pinus densiflora*)림과 상수리나무(*Quercus acutissima*)림을 조사지로 선정하였다. 각 조사지 산림토양으로부터 상층토(0-20 cm)와 하층토(20-40 cm)로 구분하고 하층부 광질 토양 시료를 채취하였다. 채취된 산림토양 시료는 각각 1 g 씩 정량하여 100 ml의 멸균수에 넣은 다음 homogenizer (AceAM-7, Nikon Seiki Co.)로 15,000 rpm에서 2분간 충분히 분산시키고 멸균수에 넣어 순차적으로 희석한 후 사용하였다(4).

전세균수 측정

전세균수 측정(TDC)을 위한 형광염색제는 DNA에 친화성이 높은 ethidium bromide (EtBr)를 이용하였다. 상기의 토양희석액 200 μ l을 0.2 μ m nucleopore filter가 장착된 funnel에 흡입여과한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에 0.01%농도로 조제된 EtBr을 첨가하여 3분간 염색하여 형광현미경(Leica DMLS, Leica Co.)하에서 전세균수를 측정하였다. 세균수는 20 시야에서 관찰 및 계수하여 평균값을 구하였다(3, 4).

직접 생균수 측정법에 의한 생균수 측정

직접 생균수 측정법(direct viable count; DVC)은 Kogure의 방법(17, 18)을 변형하여 사용하였다. 토양현탁액은 15,000 rpm에서 10분간 3회 반복하여 원심세척 하여 토양시료 내 수용성유기물을 제거하였다. 토양현탁액 500 μ l에 100 μ l의 DNA 합성 저해제(nalidixic acid, 100 μ g/ml; pipemidic acid, 50 μ g/ml; piromidic acid, 50 μ g/ml)와 200 μ l의 영양기질(DNB, acetic acid)을 혼합한 후 200 μ l의 제균수를 넣어 총량이 1000 μ l이 되도록 조정하였다. 상기의 혼합된 시료를 28°C에서 36시간 배양하면서 6시간마다 시료를 채취하여 EtBr로 염색한 후 형광 현미경(Leica DMLS, Leica co.)을 이용하여 신장·비대화된 세포를 계수하여 생균수로 측정하였다(3).

평판법에 의한 생균수 측정

평판 계수법(plate count; PC)에 의한 생균수 측정은 토양시료를 멸균수에 순차적으로 희석한 후 시료당 5개의 petri dish에 1 ml씩 접종하고 NB (nutrient broth; peptone 1%, beef extract 1%, NaCl 0.5%)를 10-2배 희석한 DNB 한천배지를 이용하여 혼합배양하였다. 모든 시료는 28°C에서 1,200시간 배양하면서 평판상에 형성된 colony 수를 정기적으로 생균수를 측정하였다(4).

Total DNA 분리와 정제

채취한 각 토양시료로부터 total DNA의 추출은 Rapid 변법(26)에 의거하였다. 토양시료 5 g을 120 mM phosphate buffer

(pH 8.0) 10 ml에 현탁하여 토양내 humic acid 및 PCR증폭 저해물질 등을 제거하였다. 세척된 토양시료에 solution I (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, D.W 100 ml, lysozyme 1 g, pH 8.0) 8 ml를 첨가하고 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후, Solution II (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, D.W 100 ml, SDS 10 g, pH 8.0) 8 ml를 첨가하여 -70°C deep freezer와 65°C를 반복 처리하고 7,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 획득된 상층액에 5 M NaCl 2.7 μ l, 10% CTAB 2.1 μ l과 동량의 chloroform:isoamylalcohol=24:1(v/v)을 첨가하고 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 1.6 M NaCl이 포함된 13% PEG를 첨가하여 DNA pellet얻었다. DNA pellet은 건조 후 750 μ l의 D.W를 첨가하여 37°C에서 녹이고 10 M NH₄OAc 190 μ l과 2배의 ethanol 그리고 동량의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 농축하고 70% ethanol 1 ml로 세척한 후 진공건조(Micro Vac MV-100, TOMMY)하였다. 최종적으로 DNA를 정제하고 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)으로 확인하였다(1, 9).

16S rDNA의 PCR 증폭

E. coli 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 이용하였다. Total DNA의 PCR 저해물질을 최소화하기 위하여 DNA를 희석하여 사용하였다. 16S rDNA PCR은 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension의 조건으로 Perkin Elmer (GeneAmpR PCR System 9700, Applied Biosystems)를 사용하여 실시하였다(1). PCR 증폭산물은 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)하여 추출 여부를 확인하였다(1).

16S rDNA Cloning 및 PCR 증폭

증폭된 16S rDNA를 pGEM T-Easy Vector (Promega, USA)와 3:1비율로 적정하고 T4-DNA ligase를 첨가한 다음 4°C에서 12시간 동안 ligation하였다. Competent cell (C.P cell)의 제조는 200 ml의 LB배지(Difco, USA)에 *E. coli* DH5 α 를 접종하고 O.D 값이 0.4가 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하여 균체를 획득하고 5 M CaCl₂ 10 ml를 넣어 ice에서 10분간 방치한 후, 6,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 cell을 수거하고 2 ml의 CaCl₂를 첨가하였다. CP cell 50 μ l와 ligation된 DNA 5 μ l를 천천히 혼합한 후 ice에서 1시간동안 방치한 다음 42°C에서 45초간 heat shock하고 LB배지 450 μ l를 첨가한 다음 37°C에서 1시간동안 진탕배양 한 후 X-gal (20 mg/ml) 1 ml, IPTG (20 mg/ml) 100 μ l 그리고 ampicillin (20 mg/ml) 1 ml이 포함된 LB 한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. LB plate에 생성된 colony는 blue-white colony 선별법 의해 형질전환체를 선별하여 clone library를 만든 후 T7 (5'-TAATACGACTCACT ATAGGG-3') primer와 SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') primer를 사용

하여 colony PCR을 수행 하고 16S rDNA의 vector insert를 확인하였다(24). Colony PCR은 95°C, 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 30초, 60°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 7분간 final extension의 조건으로 Perkin Elmer (GeneAmpR PCR System 9700, Applied Biosystems)를 사용하여 실시하였다(1).

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 분석

선별된 clone의 16S rDNA PCR 증폭산물에 대하여 제한효소를 처리한 후 각 clone의 절단 양상을 관찰하였다. 4 bases를 인식하는 2.5U 의 *Hae*III (5'...GG▼CC...3', 3'...CC▲GG...5')를 이용하여 PCR product 1 µg, 10X buffer 2 µl, enzyme 1 µl, D. W 를 혼합하여 최종 20 µl를 맞춰 반응 tube에 넣은 후 37°C에서 4시간 처리하였다. 제한효소를 처리한 산물을 4%의 agarose gel (1X TAE buffer; 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 1X TAE buffer에서 100 V, 300 mA로 1시간 30분 동안 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 30분간 염색하여 UV (Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 확인하였다. 확인된 band의 pattern은 Gelcompar II software (version 4.0; Applied Maths, Belgium)를 사용하여 각 clone 간의 다양성을 비교하였다(27).

16S rDNA 염기서열 분석

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 µl, T7 primer 1 µl, 16S rDNA sample 1 µl (100 ng), 2X buffer 3.4 µl에 멸균 증류수 13.3 µl를 잘 혼합한 후 cycle sequencing 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 µl와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 µl를 첨가한 후 15,000 rpm에서 25분간 침전시키고, 250 µl의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 µl를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation 한 후 얼음위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 16S rDNA (500-580 bp) 염기서열을 결정하였다(19).

DNA 염기서열 분석 및 계통도 작성

결정된 16S rDNA 염기서열의 homology는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 상동성은 alignment Clustal X program를 이용하여 병렬로 정렬하였으며 계통도의 작성은 근린 결합법에 의거하여 결정하였다(23, 24).

결과 및 고찰

전세균수 및 생균수 측정

소나무림과 상수리나무림의 광질층 토양 내 전세균수(total

direct count; TDC)를 측정하기 위해 DNA에 친화성이 높은 EtBr을 이용하여 토양시료를 염색한 후 직접 검경법에 의해 계수한 결과, 소나무림 토양의 경우 1.7×10^{10} cells/g soil, 상수리나무림 토양 중에는 4.46×10^{11} cells/g soil이 계수되었다. 또한 평판계수법(plate count; PC)에 의해 생균수를 측정한 결과, 소나무림 토양의 경우 4.9×10^7 CFU/g soil, 상수리나무림 토양시료에서는 3.71×10^7 CFU/g soil이 계수되어 전세균수의 약 0.01-0.28%의 낮은 계수치를 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 산림토양 내에 평판배양법으로는 배양이 곤란한 난배양성 세균이 다수 존재해 있음으로 판단되었다.

직접 생균수 측정법(DVC)은 자연환경 시료에 영양기질과 DNA 합성 저해제를 첨가하고 단시간 배양하면서 세포분열이 억제된 상태에서 신장·비대화된 세포(기질을 이용하여 단백질합성능을 갖는 생균)를 형광염색하여 계수하는 방법으로 배양을 통하지 않고 균체합성능이 있는 'viable'한 VBNC세균을 검출할 수 있는 유효한 방법이다(3, 10). 본 연구에서는 DVC법을 이용하여 소나무림과 상수리나무림 토양 내에 존재하는 이들 VBNC세균의 정량적 평가를 수행하였다. Kogure 등이(17, 18) 제안한 DVC법을 토양시료에 적용하기 위해 DVC 변법(3)을 이용하여 생균수 측정을 수행한 결과, 소나무림 토양내 DVC 값은 1.5×10^{10} cells/g soil로 전세균수의 88.2%, 상수리나무림 토양 중에는 1.91×10^{11} cells/g soil로 전세균수의 약 43%가 생균수로 확인되었다. 이와 같은 결과는 상기의 평판법에 의해 계수된 결과보다 300-5000배 이상 높은 계수 결과를 나타내어, DVC법에 의해 계수된 생균수에 대해 평판법에 의해 계수된 생균수(PC)의 비율은 소나무림 토양의 경우 0.33%, 상수리나무림 토양에서는 0.02%로 배양 가능한 세균은 1% 미만으로 나타났다(Fig. 1). 즉, 유기물 대사에서 세포분열까지는 진행되나 집락체 형성이 곤란한 VBNC 세균이 산림토양 내에 99% 이상 존재함으로 추정되었다. 특히, 상수리나무림 토양의 경우 소나무림 토양보다 VBNC세균이 수십배 높게 검출되어 이들 세균군집의 생태학적

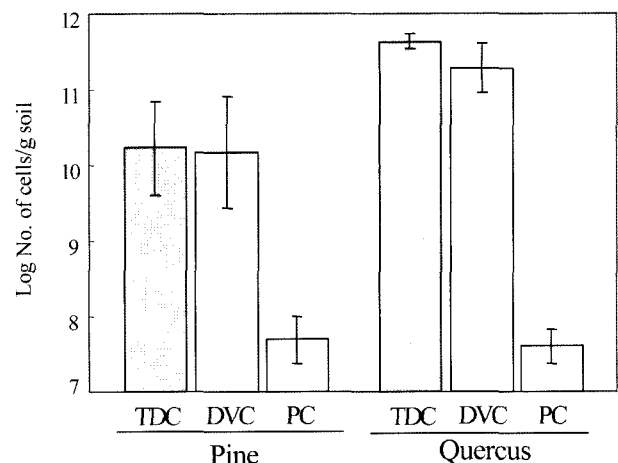


Fig. 1. Comparison of the number of bacteria obtained by total direct count (TDC), direct viable counting (DVC) and plate counting (PC) collected from Pine and Quercus forest soil.

특성 평가가 요구되었다.

16S rDNA Cloning 및 ARDRA pattern 분석

상기의 연구결과에서 나타난 바와 같이 산림토양 내에는 평판 배양법에 의해 배양이 곤란한 VBNC 세균이 99% 이상 존재하는 것으로 확인되어 기존의 배양법에 기초하여 산림토양 내 전체 미생물군집 구조를 해석하는데 있어서 많은 한계점이 있음을 시사하였다. 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 최근에는 배양에 의존하지 않고 ARDRA, DGGE 그리고 RFLP 등과 같은 다양한 분자생물학적 분석기법을 이용한 미생물 군집해석이 시도되고 있다(14, 27). 본 연구에서는 소나무림과 상수리나무림 토양 내 VBNC 세균군집의 계통학적 해석을 위하여 Rapid 변법으로 DNA를 직접 추출하였다. 각 토양시료로부터 추출된 DNA의 16S rDNA 증폭산물을 cloning하여 소나무림 토양으로부터 111 clones, 상수리나무림 토양으로부터 108 clones을 각각 얻었다.

획득된 각 clone들에 대하여 제한효소(*Hae*III, Promega)를 처리하고 얻어진 절편 양상을 분석하여 세균군집의 다양성을 검토하였다. 그 결과, 소나무림 토양으로부터 분리된 111 clones은 30 groups (100%-level)의 ARDRA pattern으로 확인되었으며(Fig. 2) 상수리나무림 토양으로부터 분리된 108 clones은 26 groups (70%-level)의 ARDRA pattern으로 확인되었다(Fig. 3).

16S rDNA 염기서열 해석

소나무림 과 상수리나무림 토양으로부터 획득된 각 clone의 16S rDNA-ARDRA pattern 양상에 따른 각 ARDRA group으로부터 대표 clones을 선발하여 16S rDNA 염기서열을 결정하고, Gene Bank database BLAST search 프로그램을 이용하여 기지의 미생물과 16S rDNA 염기서열을 비교 검색하였다. 소나무림 토양으로부터 선발된 30개 대표 clones은 α -proteobacteria (12 clones), γ -proteobacteria (3 clones), δ -proteobacteria (1 clone),

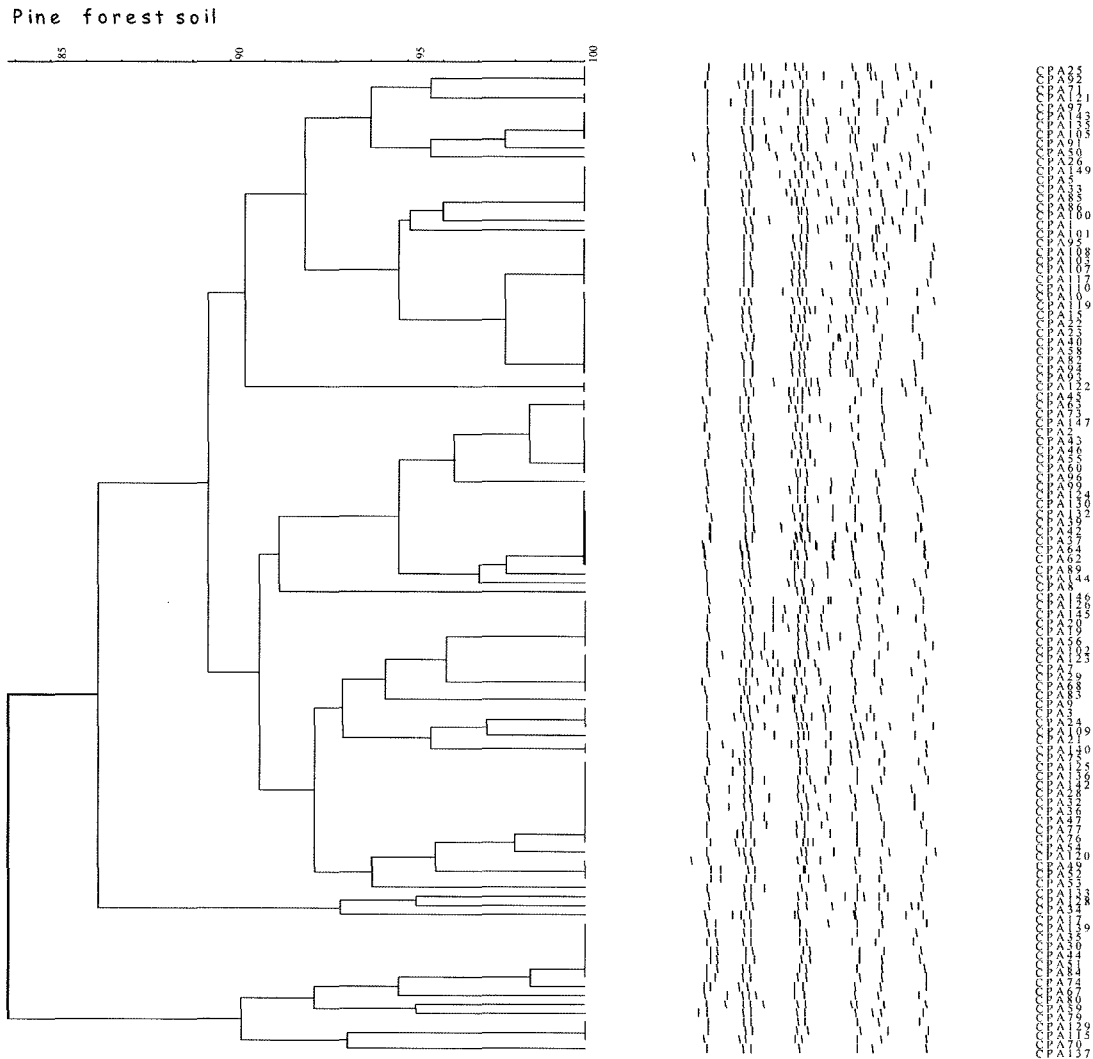


Fig. 2. Analysis of microbial community in a forest soil by using ARDRA. UPGMA dendrogram of cluster analysis of ARDRA based on the *Hae*III 16S rDNA. 16S rDNA genes were extracted from pine forest soil.

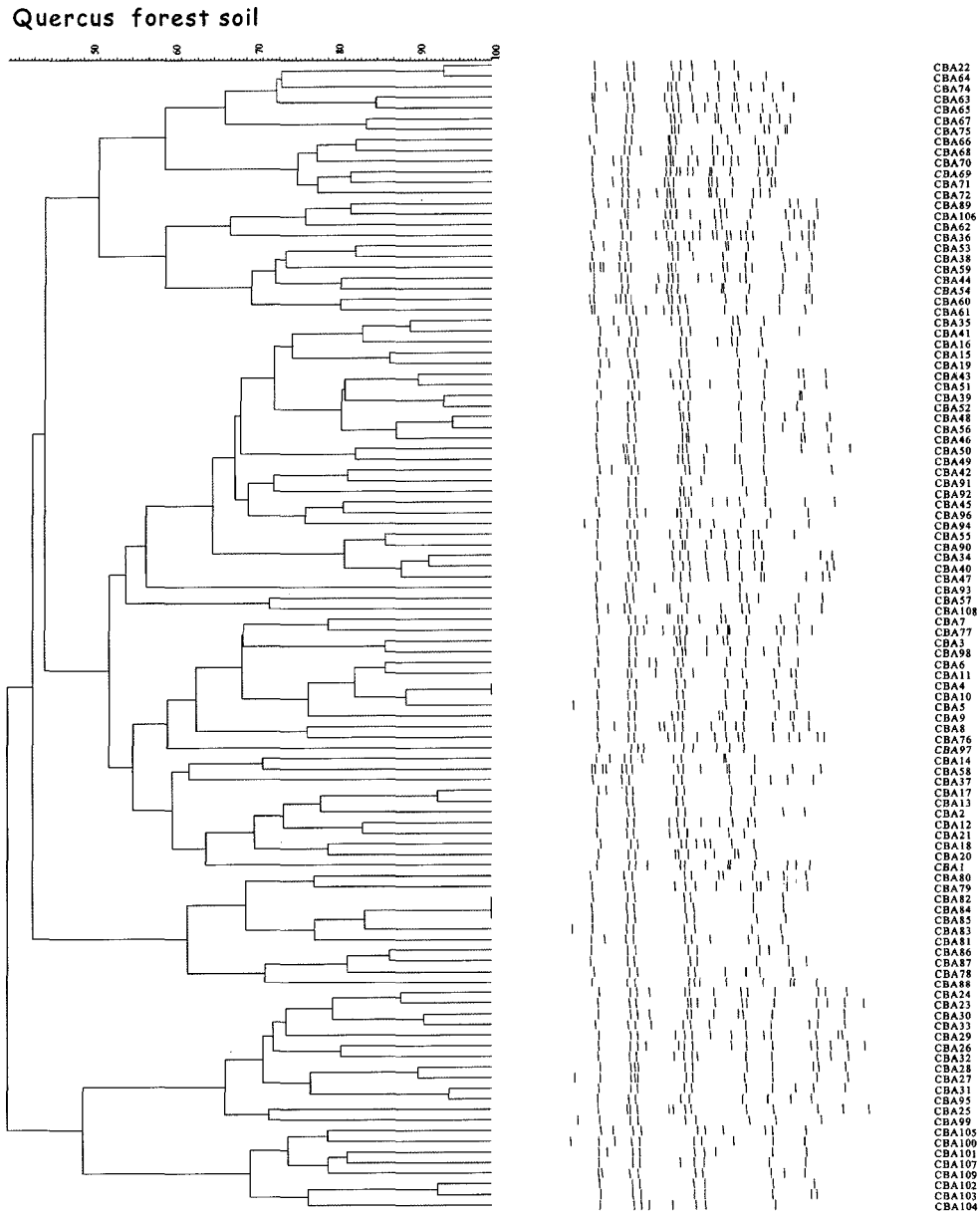


Fig. 3. Analysis of microbial community in forest soil by using ARDRA. UPGMA dendrogram of cluster analysis of ARDRA based on the *Hae*III 16S rDNA. 16S rDNA genes were extracted from *Quercus* forest soil.

Flexibacter/Cytophaga (1 clone), *Actinobacteria* (4 clones), *Acidobacteria* (4 clones), 그리고 *Planctomycetes* (5 clones)의 7개의 계통군이 확인되었다. 또한, 상수리나무림 토양에서는 α -proteobacteria (4 clones), γ -proteobacteria (2 clones), *Actinobacteria* (10 clones), *Acidobacteria* (8 clones), *Planctomycetes* (1 clone), 그리고 *Verrucomicrobia* (1 clone)로 6개의 계통군이 확인되었다 (Table 1). 이들 clones의 16S rDNA 염기서열을 기지의 미생물과 상동성을 검색한 결과 대부분이 미배양성 혹은 미동정균으로 확인되어 산림토양 내에 존재하는 VBNC 세균은 계통학적으로 매우 다양한 미지의 미생물로 구성되어 있음으로 해석되었다.

소나무림과 상수리나무림 토양 내 VBNC 세균군집의 계통학적 특성

상기의 Fig. 2와 3에 나타난 ARDRA pattern 양상에 의거하여 분류된 소나무림 토양의 ARDRA groups 중 6개 이상의 clones을 포함하는 ARDRA groups (group 6, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 20, 25)을 주요 세균군집으로 선발하였다(Fig. 4). 이들 소나무림의 주요 ARDRA groups는 *Rhodoplanes*속을 포함하는 group 8 (6 clones), group 12 (7 clones) 그리고 *Bradzhriyobium* 및 *Afipia*속을 포함하는 group 9 (10 clones), group 20 (10 clones), group 14 (12 clones)의 총 5개 groups이 α -proteobacteria로 확인되었으며, group 15 (6 clones)는 γ -proteobacteria에 속하였다. 그

Table 1. The closest microorganism of the dominant clones on ARDRA groups from Pine and Quercus forest soil

Source	Taxonomic affiliation	no. of clones	The closet microorganisms	Similarity (%)	ARDRA group	
Pine forest soil	<i>α-proteobacteria</i>	CPA-22	<i>Afipia broomeae</i>	99	9	
		CPA-34	Uncultured bacterium clone	95	24	
		CPA-37	<i>Afipia broomeae</i>	99	14	
		CPA-46	Uncultured alpha proteobacterium	98	12	
		CPA-50	Uncultured soil bacterium clone	95	4	
		CPA-73	Uncultured soil bacterium clone	95	11	
		CPA-97	Uncultured bacterium	92	2	
		CPA-99	Uncultured bacterium clone	96	13	
		CPA-117	Uncultured bacterium clone	99	8	
		CPA-120	Uncultured bacterium clone	98	21	
		CPA-125	Uncultured alpha proteobacterium clone	98	20	
		CPA-137	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	97	30	
		<i>γ-proteobacteria</i>	CPA-20	Uncultured bacterium clone	98	15
	CPA-70		Uncultured soil bacterium clone	98	29	
	CPA-75		Bacterium Ellin405	99	19	
	<i>δ-proteobacteria</i>	CPA-21	Uncultured delta proteo bacterim clone	95	18	
		<i>Acidobacteria</i>	CPA-44	Uncultured Acidobacteriaceae bacterium	97	25
	CPA-59		Uncultured eubacterium WD261	99	27	
	CPA-68		Uncultured soil bacterium clone	98	16	
	CPA-133		Uncultured Acidobacteriales bacterium	99	23	
	<i>Actinobacteria</i>		CPA-52	Uncultured soil bacterim clone	99	22
			CPA-67	Uncultured eubacterium	98	26
			CPA-92	Uncultured eubacterium WD294	90	1
		CPA-122	Uncultured actinobacterium clone	98	10	
	<i>planctomycete</i>	CPA-1	Uncultured plan ctomycete clone	91	7	
		CPA-24	Uncultured forest soil bacterium clone	97	17	
		CPA-26	Uncultured bacterium clone	92	5	
		CPA-33	Uncultured bacterium	93	6	
CPA-91		Uncultured soil bacterium clone	91	3		
<i>Flexibacter/Cytophaga</i>		CPA-79	Uncultured bacterium DSSD32	95	28	
Quercus forest soil	<i>α-proteobacteria</i>	CBA-2	<i>Afipia</i> sp.	93	20	
		CBA-26	Uncultured soil bacterium	93	24	
		CBA-57	Uncultured bacterium	92	13	
		CBA-107	Bacterium Ellin5003	94	26	
	<i>γ-proteobacteria</i>	CBA-25	Uncultured bacterium	90	25	
		CBA-44	Uncultured gamma proteobacterium	98	6	
	<i>Acidobacteria</i>	CBA-1	Uncultured bacterium	95	21	
		CBA-37	Uncultured soil bacterium clone	92	19	
		CBA-58	Uncultured Acidobacteria bacterium	94	18	
		CBA-67	Uncultured bacterium clone	97	2	
		CBA-77	Uncultured soil bacterium	92	14	
		CBA-88	Uncultured soil bacterium	92	23	
		CBA-93	Uncultured eubacterium WD205	92	12	
		CBA-106	Uncultured bacterium clone	90	4	
		<i>Actinobacteria</i>	CBA-11	Uncultured actinobacterium	94	15
			CBA-36	<i>Curtobacterium</i> sp.	95	5
			CBA-43	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	97	7
	CBA-45		<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	98	10	
	CBA-47		<i>Curtobacterium</i> sp.	91	11	
	CBA-49		<i>Curtobacterium</i> sp.	90	8	
	CBA-63		<i>Curtobacterium</i> sp.	97	1	
	CBA-76		<i>Curtobacterium</i> sp.	92	16	
	CBA-92		<i>Curtobacterium</i> sp.	97	9	
	CBA-79		<i>Curtobacterium</i> sp.	94	22	
	<i>planctomycete</i>	CBA-97	Uncultured bacterium	91	17	
	<i>Verrucomicrobia</i>	CBA-70	Uncultured Verrucomicrobiabacterium	93	3	

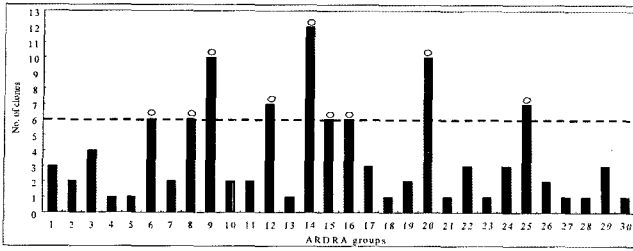


Fig. 4. Distribution of the ARDRA groups obtained by restriction analysis of 16S rDNA with the endonuclease *Hae*III from Pine forest soil.

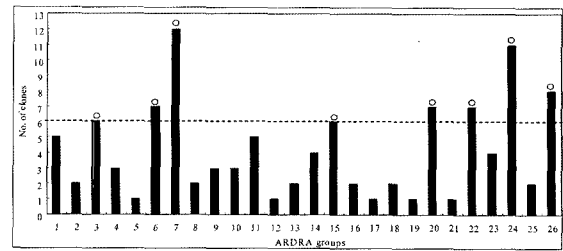


Fig. 6. Distribution of the ARDRA groups obtained by restriction analysis of 16S rDNA with the endonuclease *Hae*III from Quercus forest soil.

리고 group 16 (6 clones)과 group 25 (7 clones)는 *Acidobacteria*에 속하였고, group 6 (6 clones)은 *Planctomycetes* 계통군에 속하였다(Fig. 5).

또한, 상수리나무림 토양의 ARDRA groups 중 6개 이상의 clones을 포함하는 8개의 ARDRA groups (3, 6, 7, 15, 20, 22, 24, 26)을 주요 ARDRA group으로 선발하였다(Fig. 6). 선발된 상수리나무 토양의 주요 ARDRA groups은 *Bradrrhizobium*속, *Afpia*속을 포함하는 group 20 (7 clones), group 24 (11 clones) 그리고 *Azospirillum*속을 포함하는 group 26 (8 clones)의 3개 groups이 α -proteobacteria 계통군에 속하는 것으로 확인되었으며, group 6 (7 clones)은 γ -proteobacteria에 속하였다. Group 3 (6 clones)은 *Verrucomicrobia*에 속하였고, group 7 (12 clones), group 15 (6 clones), group 22 (7 clones)는 *Actinobacteria* 계통군에 속하였다(Fig. 7).

본 연구에서 소나무림과 상수리나무림 토양 내에 99% 이상 존재해 있는 것으로 평가된 VBNC 세균군집의 계통학적 특성을 검토한 결과, 소나무림 토양내에 분포하는 세균군집 중 50% 이상이 α -proteobacteria 계통군으로 가장 우점적인 계통군으로 확인되었고, *Acidobacteria* 와 *Planctomycetes* 계통군이 각각 15%를 차지하여 주요 계통군으로 나타났다. 상수리나무림의 경우 토양 내 세균군집 중 약 40% 이상이 *Actinobacteria* 계통군으로 가장

우점적인 계통군으로 확인되었고, *Acidobacteria* 계통군은 약 17%를 차지하였다. 특히 *Verrucomicrobia* 계통군은 상수리나무림 토양에서만 나타난 매우 특징적인 계통군으로 해석되었다.

경기도 광릉 시험림 내 활엽수 낙엽과 침엽수 낙엽의 분해과정에 따른 영양염류의 함량을 비교 조사한 결과에 의하면 낙엽 분해과정에 따른 영양염류 함량의 변화 및 잔존량은 낙엽의 종류에 따라 큰 차이를 나타낸다고 보고하였다(2). 낙엽과 같은 유기물은 일련의 과정을 통해 분해되면서 낙엽층에서 생성된 분해 중간산물은 하층부 광물질 토양층으로 이동한다. 이들 분해에 관여하는 미생물은 영양염류, 수분, 산소, 기압 등 토양 내 이화학적 성질에 따라 다양한 패턴으로 분포하게 된다. 특히 산림을 구성하는 수목의 종류에 따라 이화학적 성질이 다르고, 이러한 이화학적 환경요인의 변동에 따라 낙엽분해에 관여하는 미생물군집도 변동한다(5, 6, 13, 16, 22). 본 연구에서 침엽수림(소나무)과 활엽수림(상수리나무) 토양에서 조사된 주요 계통군은 각 서식처에 가장 잘 적응된 세균군집을 반영한 결과라고 판단할 수 있다.

배양법에 기초하여 유럽의 밤나무림 토양으로부터 분리된 세균에 대해 조사한 결과에 의하면 활엽수림 광물층 토양의 주요한 세균은 *Bacillus* 등 포자형성세균, 비색소생성 간균, *Artrobacter* 상의 다형태성세균, 방선균 등 다양한 종으로 구성되어 있다(14).

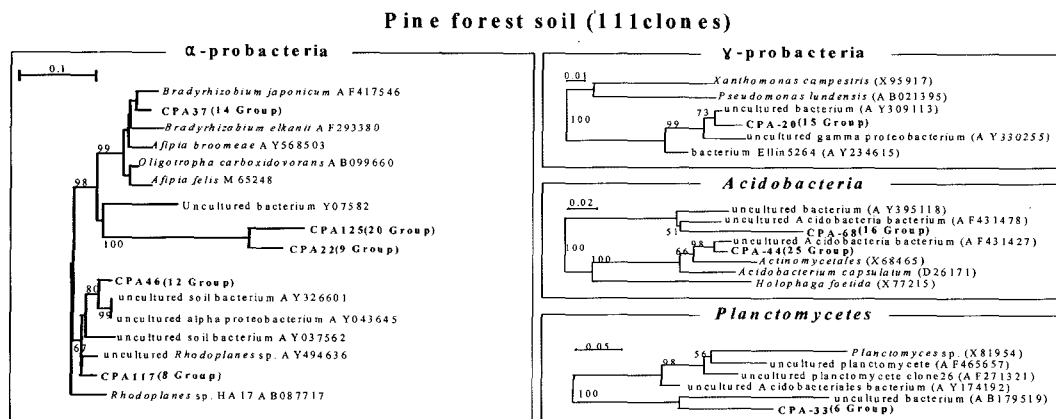


Fig. 5. Phylogenetic trees showing the relationships among the 16S rDNA sequences of clones to dominant ARDRA groups from Pine forest soil.

Quercus forest soil (108 clones)

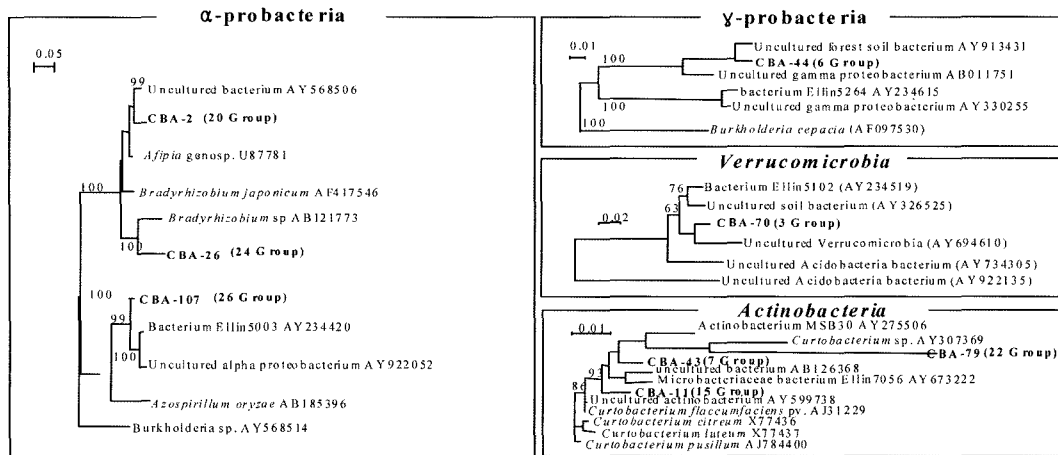


Fig. 7. Phylogenetic trees showing the relationships among the 16S rDNA sequences of clones to dominant ARDRA groups from Quercus forest soil.

한편 침엽수림 토양세균 flora는 그람양성 세균군 중에서도 *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces* 등 4속이 전체의 90% 이상을 차지하고 있다고 보고되었다(12). 이와 같은 결과는 배양법에 기초하여 분리된 산림토양 세균에 대한 결과로, 본 연구에서는 소나무림과 상수리나무림 토양 내에 99% 이상 존재해 있는 것으로 평가된 VBNC 세균군집의 계통학적 해석을 위하여 배양에 의존하지 않고 토양으로부터 직접 DNA를 추출하여 16S rDNA-ARDRA 분자기법을 통해 분석한 결과 VBNC 세균의 대부분은 미배양성 혹은 미동정균으로 계통학적으로 매우 다양한 미지의 미생물로 구성되어 있음이 확인되었다. 산림토양 생태계 내 이들 VBNC 세균의 미생물학적 기능 및 물질대사에 관한 정보수집과 유전자원 탐색을 위하여 VBNC 세균의 순수분리 및 배양법에 관한 미생물학적 기초연구와 노력이 요구된다.

감사의 말

본 연구는 2006년도 Biogreen21사업 중 농업생물자원의 다양성 확보과제의 지원(과제번호: 20050301-034-384-006-01-00)으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 박진숙, 황경숙, 천중식. 2005. 미생물의 분류·동정 실험법. 월드사이언스.
2. 유영한, 남궁정, 이윤영, 김정희, 이종영, 문병태. 2000. 광릉 시험림 내의 낙엽의 분해와 분해과정에 따른 영양염류의 변화. 한국임학회지. 89, 41-48.
3. 황경숙, 양희찬, Takashi Someya. 2003. 변형된 DVC법을 이용한 난배양성 토양세균 검출 및 정량적 평가. 한국미생물학회지. 39, 181-186.
4. 황경숙, 유승현. 1995. 유기영양분 농도에 따른 토양세균의 증식양상과 통상 및 편성 저영양세균의 분리. 한국미

- 생물학회지 21, 319-324.
5. 新·土の微生物(1) 日本土壤微生物研究会編. 博友社(日本, 東京). 129-154.
6. Alexander, M. 1985. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, New York.
7. Berg, B. and G. Agren. 1984. Decomposition of needle litter and its organic chemical component: theory and field experiments. Long-term decomposition in a Scots pine forest III. *Can. J. Bot.* 62, 2880-2888.
8. Bloomfield, S., G. Stewart., C. Dodd., R. Booth., and E. Power. 1998. The viable but nonculturable phenomenon explained. *J. Microbiol.* 144, 1-3.
9. Chandler, D. P., R. W. Schreckhise, J. L. Smith, and H. Bolton Jr. 1997. Electroelution to remove humic acids from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol.* 61, 273-278.
10. Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Rozak, S. A. Huq, and L. M. Plamer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholera* and related pathogens on the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol.* 3, 817-820.
11. Curtis, T. P., W. T. Sloan, and J. C. Scannell. 2002. Estimation prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10494-10499.
12. Holms, E. and V. Jensen. 1972. Aerobic chemoorganotrophic bacteria of a Danish beech forest. *Oikos*, 23, 248-260.
13. Insam, H. and K. Haselwandter. 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia* 79, 174-178.
14. Johnson, J. L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, In Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg (ed.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC. 683-700.
15. Kim, J. G. and N. K. Chang. 1989. Litter production and decomposition in the *pinus rigida* plantation in Mt. Kwan-ak. *Korean J. Ecol.* 12, 9-20.
16. Kim, J. H. and H. W. Lee. 1989. Growth of soil microorganism for the leachates from leaf litter. *Korean J. Ecol.* 12, 67-74.
17. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1984. An improved direct

- viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.
18. Kogure, K., U. Simidu, N. Taga, and R. R. Colwell. 1987. Correlation of direction of direct viable counts with heterotrophic activity for marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2332-2337.
 19. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In Stackebrandt, E., M. Good fellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester. pp. 115-175.
 20. Mun, H. T. and H. T. Joo. 1994. Litter production and decomposition in the *Quercus acutissima* and *pinus rigida* forest soil. *Korean J. Ecol.* 17, 345-353.
 21. Mun, H. T. and J. H. Kim. 1992. Litterfall decomposition, and nutrient dynamics of litter in red pine (*pinus densiflora*) and Chinese thuja (*Thuja orientalis*) stands in the lime stone area, *Korean J. Ecol.* 15, 147-155.
 22. Park, B. K. and M. R. Kim. 1985. The decomposition rate of litter and soil microorganisms in slope directions. *Korean J. Ecol.* 8, 31-37.
 23. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 24. Thomson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 25. Torsvik, V., J. Gosksoyr, and F. L. Daae. 1990 High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
 26. Tsai, Y. L. and B. H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of dna from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
 27. Vanechoutte M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA restriction analysis(ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234.

(Received April 25, 2006/Accepted June 1, 2006)

ABSTRACT: Comparison of Phylogenetic Characteristics of Viable but Non-Culturable (VBNC) Bacterial Populations in the Pine and Quercus Forest Soil by 16S rDNA-ARDRA

Song-Ih Han*, Youn-Ji Kim, and Kyung-Sook Whang (Department of Biotechnology and Institute of Microbial Ecology Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea)

In this study was performed to analyze quantitatively the number of viable but non-culturable bacteria in the Pine and Quercus forest soil by improved direct viable count (DVC) and plate count (PC) methods. The number of living bacteria of Pine and Quercus forest soil by PC method were less than 1% of DVC method. This result showed that viable but non-culturable (VBNC) bacteria existed in the forest soil with high percentage. Diversity and structure of VBNC bacterial populations in forest soil were analyzed by direct extracting of DNA and 16S rDNA-ARDRA from Pine and Quercus forest soil. Each of them obtained 111 clones and 108 clones from Pine and Quercus forest soil. Thirty different RFLP types were detected from Pine forest soil and twenty-six different RFLP types were detected from Quercus forest soil by *HaeIII*. From ARDRA groups, dominant clones were selected for determining their phylogenetic characteristics based on 16S rDNA sequence. Based on the 16S rDNA sequences, dominant clones from ARDRA groups of Pine forest soil were classified into 7 major phylogenetic groups: α -proteobacteria (12 clones), γ -proteobacteria (3 clones), δ -proteobacteria (1 clone), *Flexibacter/Cytophaga* (1 clone), *Actinobacteria* (4 clones), *Acidobacteria* (4 clones), *Planctomycetes* (5 clones). Also, dominant clones from ARDRA groups of Quercus forest soil were classified into 6 major phylogenetic groups: α -proteobacteria (4 clones), γ -proteobacteria (2 clones), *Actinobacteria* (10 clones), *Acidobacteria* (8 clones), *Planctomycetes* (1 clone), and *Verrucomicobia* (1 clone). Result of phylogenetic analysis of microbial community from Pine and Quercus forest soils were mostly confirmed at uncultured or unidentified bacteria, VBNC bacteria of over 99% existent in forest soil were confirmed variable composition of unknown microorganism.