

활엽수림과 침엽수림 부식토 내 세균군집의 계통학적 특성 비교

한송이¹ · 조민혜² · 황경숙^{1,2*}

¹독원대학교 생명산업학부, ²독원대학교 미생물생태자원연구소

충남 계룡산 북사면 지역의 대표군락인 상수리림과 소나무림 부식토의 화학적 및 미생물학적 특성을 비교검토한 결과, 상수리림 부식토의 pH는 5.3 ± 0.4 , 소나무림의 pH는 4.1 ± 0.9 이었으며, 소나무림 부식토 내 탄질율은 $21.76 \pm 8\%$ 로 상수리림보다 높게 나타났다. 상수리림과 소나무림 부식토 내 총 유기산은 각각 $69.57 \text{ mM/g dry soil}$, $153.72 \text{ mM/g dry soil}$ 로 나타났으며 소나무림 부식토 내 glutamine, pyruvate, succinate, lactic acid 및 acetic acid의 함량이 상수리림 부식토에 비해 약 1.5~4.5배 높게 나타났다. 상수리림 부식토 내 전세균수는 소나무림보다 약 16배, 세균수는 약 2배 높게 검출되었다. 각 부식토로부터 직접 DNA를 추출하여 16S rRNA-ARDRA법에 의한 세균군집의 계통학적 특성을 평가한 결과, 상수리림 부식토로부터 분리된 대표 clone은 α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria 및 Actinobacteria의 7개 계통군이 확인되었고, 소나무림 부식토의 대표 clone은 α -, β -, γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia 그리고 Bacteroidetes의 8개의 계통군이 확인되었다. Shannon-Wiener법에 의해 다양성 지수를 산출한 결과, 소나무림 부식토 내 세균군집의 다양도는 3.63으로 상수리림보다 높게 나타났으며 PCA 분석을 실시한 결과, Clusters I에 속하는 모든 clone은 상수리림 부식토에서 유래된 clone이었으며, Clusters II에 속하는 clone의 67%, Clusters III에 속하는 clone의 63%가 소나무림 부식토 토양으로부터 유래된 clone으로 확인되어 상수리림과 소나무림 부식토내 세균군집구조는 매우 특징적인 계통학적 특성을 나타내었다.

Key words □ 16S rRNA-ARDRA, humus, pine, quercus

산림토양 생태계는 매년 식물체로부터 낙엽, 나뭇가지 및 동물 유체 등 유기물이 유입되어 표층부에 쌓이게 되는데, 이들 유기물에 존재하는 당류, 전분류, 지질류 및 단백질류와 같은 이분해성 물질은 토양미생물에 의해 신속하게 이용되어 미생물의 다양한 효소작용 및 화학반응을 통하여 토양 내 물질 재순환에 이용되는 반면 리그닌류, 밀랍류, 지방류 및 레진류 등 난분해성(recalcitrant) 물질은 분해가 매우 더디게 일어난다. 이와 같이 상층부의 낙엽 분해과정에서 생성되는 난분해성 물질은 최종적으로 토양의 유기성분인 부식(humus)이라고 부르는 토양유기물(soil organic matter)이 된다. 이들 부식토의 복잡한 화학적 조성을 규명하기 위한 노력이 20세기 내내 계속되었다(37).

부식 형성에 관여하는 미생물은 성장속도도 느리고 쉽게 이용 가능한 유기물질을 분해하는 다른 토양미생물 군집과 경쟁력도 낮아 특정한 미생물에 의해 단계적으로 분해된다고 평가되었다. 유기물 분해와 부식형성에 중요한 역할을 수행하는 토양미생물 군집에 대한 연구보고에 의하면 방선균류는 키틴, 리그닌, 헤미셀룰로스, 케라틴을 비롯하여 다른 토양미생물이 분해할 수 없는 중합체들도 분해할 수 있음이 밝혀졌다(18). 부식은 토양의 점토입자를 결합시켜 토양입단을 형성함으로써 토양구조를 개선할 뿐만 아니라 양분이온 및 물의 보유력을 증대시킴으로써 토양 비옥도를 향상시킨다. 이와 같이 복잡한 화학적 조성

적 구조로 이루어진 부식토 내에 서식하는 토양미생물군집 구조도 매우 다양할 것으로 판단된다(6, 10, 22, 23, 27, 31, 32).

이들 유기물 분해에 관여하는 토양미생물은 산림생태계를 이루고 있는 수목의 종류, 영양염류, 수분 등 이화학적 환경요인에 따라 다양한 세균군집 구조를 형성하게 되는데 특히, 활엽수림과 침엽수림 토양의 이화학적 특성은 매우 다양한 패턴으로 나타난다(2, 7, 8, 11, 29, 30). 공동연구자는 선행연구에서 상수리나무림과 소나무림의 근권토양 내 미생물군집구조의 계통학적 특성을 조사한 결과 수종 간 매우 특징적인 세균군집이 분포해 있음을 확인하였다(9).

국립공원으로 지정된 계룡산은 온대 남부의 북한계선 식물군락과 온대 중부의 남한계선 식물군락이 다수 혼생하는 곳으로, 계곡부와 사면부에는 느티나무, 신갈나무, 상수리나무와 같은 낙엽활엽수가 주종을 이루고 능선을 따라 소나무가 많이 출현하는 온대중부의 전형적인 식생을 보이는 특징적인 생태계를 이루고 있다(1, 3). 계룡산 산림 생태계에 대한 연구는 주로 토양과 식생간의 관련성, 식생분포 등을 중심으로 진행되어 온 반면 생태계의 일원인 토양미생물에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 활엽수림과 침엽수림의 부식토 내 미생물군집 구조를 검토하기 위하여 계룡산 북사면에 위치한 활엽수지역의 대표군락인 상수리(*Quercus acutissima*)림과 침엽수지역의 대표군락인 소나무(*Pinus densiflora*)림을 조사지점으로 선정하였다. 각 식물군락의 부식토 토양으로부터 시료를 채취하여 화학적 특성을 분석하고, 부식토로부터 직접 DNA를 추출하여 16S rRNA 클로닝

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-829-7598, Fax: 82-42-829-7599
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr



Fig. 1. Sampling site of Qa (*Quercus acutissima*) and Pd (*Pinus densiflora*) in Mt. Kyeryong, Korea.

법에 의해 미생물군집의 계통학적 다양성 및 특성을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

토양시료

활엽수와 침엽수 산림토양 부식층 토양시료의 채취를 위하여 충남 공주시 계룡산 북사면에 분포해 있는 상수리(*Quercus acutissima*)림과 소나무(*Pinus densiflora*)림 지역을 조사지점으로 선정하였다(Fig. 1). 각 산림토양은 매년 정기적으로 유입되는 낙엽과 나뭇가지와 같은 유기물이 일련의 과정을 통해 분해되면서 낙엽 분해층(Humus layer; H layer)을 형성한다. 본 연구에서는 낙엽층으로부터 15~20 cm 하층부의 부식토 시료를 10개 지점에서 각각 50 g씩 채취하고 혼합하여 토양시료로 사용하였다.

토양 화학적 특성 분석

상수리림과 소나무림 부식토의 pH, 총 탄소량(T-C), 총 질소량(T-N), 총 인함량(T-P)의 측정에는 '토양화학분석법'에 의거하여 수행하였다. 총 탄소측정은 Tyurin법을 이용하여 토양 시료 5 g을 120°C에서 5시간 동안 건조한 후 수분을 제거하고, 550°C에서 연소시켜 측정하였다. 총 질소의 측정에는 Kjeldahl법을 이용하여 측정하였으며, 유효인산은 Bray No-1법에 의거하여 분석하였다(4).

유기산 함량 측정

토양 20 g과 DW 20 ml를 넣어 100 rpm으로 1시간 동안 진탕 배양 후 Whatman No.42 여과지에 여과하였다. 여과된 산물은 0.4 µm 여과 filter에 여과한 다음에, 유기산은 고성능 액체 크로마토그래피(Shimadzu LC-9A)로 분석하였다(39).

전세균수 및 생균수 측정

전세균수 측정(total direct cell count; TDC)을 위하여 DNA에

친화성이 높은 ethidium bromide (EtBr)를 사용하였다. 토양 1 g을 10⁻²으로 희석한 토양희석액 200 µl를 nucleopore filter (0.2 µm)가 장착된 깔대기를 이용하여 여과시킨 후 0.01% 농도의 EtBr로 염색하고 형광현미경(Leica DMLS, Leica Co., Germany)하에서 전세균수를 측정하였다. 전세균수는 20시야에서 관찰 및 계수하여 평균값을 구하였다(24, 25). 생균수 측정은 토양 1 g을 10⁻⁶으로 순차적으로 희석한 후 토양희석액 1 ml를 통상농도의 영양배지(nutrient broth; NB, peptone 1%, NaCl 0.5%, beef extract 1%)를 10⁻²배 희석한 희석영양배지(diluted nutrient broth, DNB)에 혼합배양하고 28°C에서 1,200 시간 배양한 후, 5개의 평판에서 형성된 콜로니수를 계수하여 평균값을 구하였다(10, 23).

DNA 직접추출 및 정제

각 부식토로부터 DNA를 직접추출하기 위하여 Takada 등(35)의 bead beating 방법을 이용하였다. 토양시료 0.5 g을 ISOIL kit (Nippon Kit Co., Japan) 매뉴얼에 따라 lysis solution BB 950 µl를 첨가하여 bead beater (Fast prep Inc., Japan)로 6 m/sec, 45초간 처리하고, 60°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 상등액에 purification solution 400 µl를 첨가하고 섞어 준 후 600 µl chloroform을 첨가하여 15초간 현탁한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 분리된 상등액에 precipitation solution 800 µl를 첨가하여 혼합한 후 15,000 rpm에서 15분간 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물에 washing solution 1 µl을 넣은 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고 상등액을 제거하고 70% ethanol 1 µl과 ethachinmate 2 µl을 첨가하여 15,000 rpm에서 원심분리한 후 DNA pellet을 얻었다. DNA pellet을 진공건조(Micro Vac MV-100, TOMMY)하고 50 µl의 TE buffer를 첨가하여 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)을 통해 DNA를 확인하였으며, Spectrophotometer (UV-1650PC, SHIMAZU)로 농도를 측정하고 흡광도 A₂₆₀/A₂₈₀비를 계산하여 순도를 측정하였다(5).

16S rRNA의 PCR 증폭

E. coli 16S rRNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F; 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3' primer와 1492R; 5'-AAG GAGGTGATCCAGCCGC-3' primer를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다(6). 16S rRNA 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 (GeneAmp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems)를 사용하여 실시하였다. PCR 증폭산물은 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)하여 증폭 여부를 확인하였다(5).

16S rRNA 클로닝

16S rRNA 증폭산물을 pGEM T-Easy Vector (Promega, Madison, USA)와 3:1 비율로 적정하고 T4-DNA ligase를 첨가한 다음 4°C에서 12시간 동안 ligation하였다. Ligation된 DNA 5 µl를 competent

cell 50 μ l에 천천히 혼합한 후 ice에서 1시간동안 방치한 다음 42°C에서 45초간 heat shock하고 LB배지 450 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 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 평판배지에 형성된 colony는 blue-white colony 선별법 의해 clone library를 구축한 후 T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' primer와 SP6; 5'-TATTAGGTGACACTATAG-3' primer를 사용하여 colony PCR을 수행하고 16S rRNA의 vector insert를 확인하였다(5, 9). 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 (GeneAmp^R PCR System 9700, Applied Biosystems)를 사용하여 실시하였다(5).

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 분석

Colony PCR을 통해 insert가 확인된 clone의 16S rRNA PCR 증폭산물에 대하여 4 bases를 인식하는 2.5 U의 제한효소 *Hae*III (Promega, USA)와 *Aha*I (TaKaRa, Japan)을 각각 처리하고 4%의 agarose gel (1 \times TAE buffer; 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 1 \times TAE buffer에서 100 V, 300 mA로 1시간 30분 동안 전기 영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 30분간 염색하여 UV (Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 확인하였다. 확인된 band 패턴은 GelCompar II software (version 4.0; Applied Maths, Korthrijk, Belgium)를 이용하여 각 clone 간의 유의성을 비교하였다(6, 9, 38).

16S rRNA 염기서열 분석

상기의 16S rRNA ARDRA group으로부터 대표 clone을 선발하여, 각 clone의 16S rRNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 μ l, T7 primer 1 μ l, 16S rRNA sample 1 μ l (100 ng), 2 \times buffer 3.4 μ l에 멸균 증류수 13.3 μ l를 잘 혼합한 후 cycle sequencing 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 μ l와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 μ l를 첨가한 후 15,000 rpm에서 25분간 침전시키고 250 μ l의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 μ l를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation한 후, 열음 위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 16S rRNA (500~580 bp) 염기서

열을 결정하였다(26). 또한 16S rRNA 염기서열은 Fast groupII 프로그램 (http://biome.sdsu.edu/fastgroup/fg_tools.htm)을 이용하여 ribotype의 수를 구하고 Shannon-Wiener법에 의거하여 다양성 지수 계산하였으며, RDPII GenBank database의 sequence match program을 이용하여 계통학적 위치를 검색하였다(17, 20, 40).

PCA 분석을 통한 계통학적 해석

결정된 16S rRNA 염기서열은 NIPALS algorithm을 기초로 한 PhyloMode 프로그램(www.matforsk.no/web/sampro.nsf/downloadE/Microbial_community)의 PCA (principal component analysis)를 이용하여 구분하였다(33, 34).

결과 및 고찰

상수리림과 소나무림 부식토의 화학적·미생물학적 특성

상수리림과 소나무림 부식토의 화학적·미생물학적 특성을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 토양의 화학적 특성 중 가장 중요하게 측정되는 pH는 토양 내에서 식물 영양소 이용도에 중요한 환경요인이 된다. 본 연구에서 각 부식토의 pH를 측정된 결과 상수리림 부식토는 5.3 \pm 0.4으로 나타났으며 소나무림은 4.1 \pm 0.9로 소나무림이 상수리림보다 낮은 pH를 나타내었다. 토양 미생물에 의한 유기물 분해도 및 토양 비옥도를 판정하는 지표로 활용되고 있는 총탄소량(T-C)과 총질소량(T-N)을 측정하여 탄질율(C/N ratio)을 비교하였다. 상수리림 부식토 내 총탄소량은 173.81 mg/g이었으며, 소나무림의 경우 322.10 mg/g로 측정되었고, 총질소량은 상수리림과 소나무림에서 각각 0.97 mg/g, 1.48 mg/g으로 나타났다. 이상의 결과로부터 각 부식토 내 탄질율은 상수리림의 경우 17.84 \pm 4.6%, 소나무림의 부식토는 21.76 \pm 8%로 소나무림 부식토가 상수리림보다 높은 C/N율을 나타내었다. 부식토 내 총인함량은 상수리림이 소나무림에 비해 약 1.5배 높게 나타났다. Mun과 Jun (29)은 상수리나무와 리기다소나무림의 낙엽분해과정을 조사한 결과 소나무림 낙엽의 분해속도가 현저하게 낮게 나타난다는 것을 보고한 바 있으며, Begg 등(13)은 이러한 낙엽 분해율에 미치는 환경요인으로 탄질율과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단하였다.

상수리림과 소나무림의 부식토 내 미생물생태학적 군집구조를 이해하기 위해 전세균수(total direct count; TDC)와 평판계수(plate count; PC)법을 이용한 생균수의 정량적 평가를 실시하였다. 핵산에 친화성이 가장 우수한 EtBr을 이용하여 부식토시료를 염색한 후 형광현미경하에서 직접 계수한 결과, 상수리림 부식토의 경우 4.93 \times 10¹¹ cells/g soil, 소나무림 부식토에는 3.16 \times 10¹⁰

Table 1. Some chemical and microbiological characteristics in a Qa (*Quercus acutissima*) and Pd (*Pinus densiflora*) humus forest soil

Humus sample	pH	T-C (mg/g)	T-N (mg/g)	T-P (mg/g)	P ₂ O ₅ (mg/g)	C/N rate (%)	Log No. of bacteria/g soil	
							TDC	PC
Qa	5.3 \pm 0.4	173.81	0.97	0.99	0.23	17.84 \pm 4.6	11.69	8.1
Pd	4.1 \pm 0.9	322.1	1.48	0.67	0.15	21.76 \pm 8.0	10.5	7.83

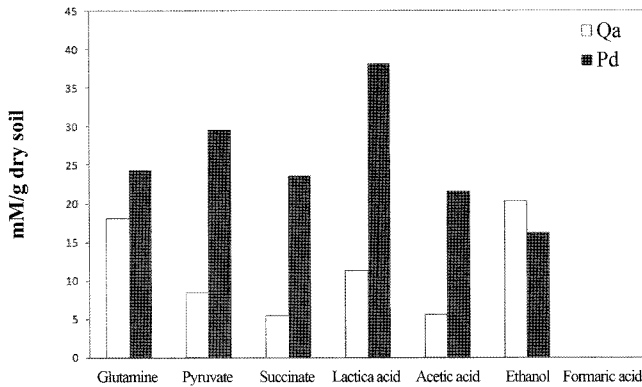


Fig. 2. Comparison of organic acid from Qa (*Quercus acutissima*) and Pd (*Pinus densiflora*) humus forest soil.

cells/g soil이 계수되었다. 희석평판법을 이용하여 상수리림과 소나무림 부식토 내 생균수를 측정된 결과, 상수리림 부식토 내 생균수는 1.25×10^8 cfu/g soil로 나타났으며, 소나무림 부식토에는 7.8×10^7 cfu/g soil로 나타났다. 상수리림 부식토에서 소나무림 부식토보다 전세균수는 약 16배, 생균수는 약 2배 높게 검출되었다(Table 1).

토양의 유기물 즉, 유기분획물(organic fraction)은 종종 부식(humus)이라고 부르기도 하는데 이것은 토양미생물의 분해작용과 합성작용에 의해 형성된 생산물로 낙엽층 내 끊임없는 미생물 효소작용에 의해 다양한 유기산을 형성하게 된다. 본 연구에서는 산림토양 부식토 내 유기산(glutamine, pyruvate, succinate, lactic acid, acetic acid, formic acid) 및 휘발성 알콜(ethanol)의 함량을 조사하였다(Fig. 2). 상수리림의 부식토로부터 추출된 총 유기산의 함량은 69.57 mM/g dry soil이었으며, 소나무림의 부식토에서는 153.72 mM/g dry soil로 소나무림 부식토에서 약 2배 이상 높은 유기산 함량을 나타내었다. 부식토 내 유기산 및 휘발성 알콜을 검출한 결과, 상수리림의 부식토에서는 glutamine 18.15 mM/g dry soil, pyruvate 8.56 mM/g dry soil, succinate 5.5 mM/g dry soil, lactic acid 11.42 mM/g dry soil, acetic acid 5.6 mM/g dry soil 그리고 ethanol 20.35 mM/g dry soil로 glutamine과 에탄올(ethanol)의 함량이 가장 높게 나타났다. 소나무림 부식토의 경우, glutamine 24.35 mM/g dry soil, pyruvate 29.65 mM/g dry soil, succinate 23.65 mM/g dry soil, lactic acid 38.25 mM/g dry soil, acetic acid 21.6 mM/g dry soil 그리고 ethanol 16.22 mM/g dry soil로 lactic acid와 acetic acid의 함량이 가장 높게 나타났다. 각 부식토 내 유기산의 함량을 비교한 결과 glutamine, pyruvate, succinate, lactic acid 그리고 acetic acid의 경우 상수리림 부식토에 비해 소나무림 부식토 내 유기산 함량이 모두 높게 나타났으며 특히 acetic acid는 소나무림 부식토가 상수리나무 부식토에 비해 약 4배 높은 함량을 나타내었다. 반면, formic acid의 경우, 상수리림 부식토와 소나무림 부식토에서 모두 검출되지 않았다.

이상, 상수리림과 소나무림의 부식토 내 화학적 및 미생물학적 특성을 조사한 결과, 명확한 차이점을 나타내어 이들 토양 미소환경 내에 서식하고 있는 미생물의 활동과 군집 구조에 영향을

미칠 것으로 판단되었으며, 세균군집의 미생물 생태학적 특성평가가 요구되었다.

상수리림과 소나무림 부식토 내 세균군집구조의 다양성 비교

상기의 연구결과에서 상수리림과 소나무림의 부식토 내 미생물수를 측정된 결과 전균수에 비해 생균수가 약 40~4,000배 낮은 계수치를 나타내었다. 즉, 토양 내 존재하는 미생물 중 평판상에서 집락체 형성이 곤란한 난배양성세균(VBNC)이 다수 존재함으로 추정되어(14, 16) 본 연구에서는 배양에 의존하지 않고 직접 토양으로부터 DNA를 추출하여 분자기법을 이용한 미생물군집 구조를 검토하였다.

다량의 유기산이 함유된 부식토로부터 PCR 증폭에 저해가 되는 부식산 등을 제거하기 위해 skim milk와 같은 흡착제가 포함되어 있는 ISOIL kit을 이용하여 DNA를 추출하였고(15), 부식토로 16S rRNA 유전자를 성공적으로 증폭하였다. 상수리림 부식토로부터 76 clone, 소나무림 부식토로부터 74 clone을 각각 얻었다. 획득된 각 clone들에 대하여 제한효소(*Hae*III, *Alu*I)를 처리한 후 전기영동하여 확인된 각 DNA 밴드는 GelCompar II software를 이용하여 DNA 절편 양상 70%-level에서 grouping 하였다. 상수리림 토양으로부터 분리된 총 76 clone은 44 ARDRA groups으로 확인되었으며, 소나무림 부식토로부터 분리된 총 74 clone은 34 ARDRA groups으로 확인되었다.

각 ARDRA group으로부터 대표 clone을 선발하여 16S rRNA 염기서열을 분석하고 OTUs에 따라 계통학적 다양성을 확인하였다(42). 염기서열의 상동성 80% level에서 ribotype의 수를 결정한 결과 상수리림의 경우 대표 44 clone은 39에서 plot을 형성하였으며, 소나무림의 대표 34 clone은 32에서 plot을 형성하고 계통 군집의 다양성을 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 또한 Shannon-Wiener 법(38)에 의거하여 다양성 지수(diversity index)를 확인한 결과, 상수리림 부식토는 3.42로 나타났고, 소나무림 부식토는 3.63으로 확인되어 상수리림보다 소나무림 부식토 내 세균군집의 다양성이 높게 나타났다(Fig. 3).

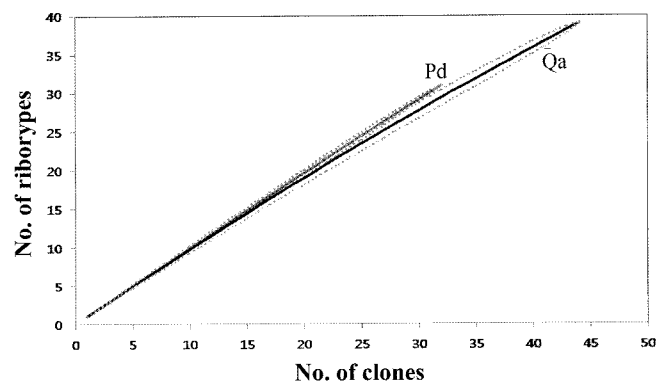


Fig. 3. Rarefaction curves for the bacterial clone libraries constructed from Qa (*Quercus acutissima*) and Pd (*Pinus densiflora*) humus forest soil.

Table 2. The closest microorganism of the clone from Qa (*Quercus acutissima*) and Pd (*Pinus densiflora*) humus forest soil

Phylum	Class	Order	Family	No. of clone	
				Qa	Pd
Proteobacteria	Alpha	Caulobacterales	Caulobacteraceae	4	
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae		9
		Rhizobiales	Rhizobiaceae	21	3
			Bradyrhizobiaceae	5	3
	Beta	Burkholderiales	Burkholderiaceae	6	19
			Oxalobacteraceae	2	
	Gamma	Legionellales	Unclassified Legionellales		1
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	20	2
	Delta	Syntrophobacterales	Unclassified Syntrophobacterales	2	
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	1
Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Microbacteriaceae	3	5
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae		6
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiales Subdivision	3	1
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	12	20
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae		5
Total clone				76	74

Qa, *Quercus acutissima*; Pd, *Pinus densiflora*

상수리림과 소나무림 부식토 내 세균군집의 계통학적 특성

상기의 각 16S rRNA ARDRA group으로부터 선발된 대표 clone에 대하여 16S rRNA 염기서열을 결정하고, RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu/>)를 이용하여 계통학적 위치를 검색하였다. 상수리림 부식토로부터 선발된 43 clone α -Proteobacteria (Caulobacteraceae, Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae), β -Proteobacteria (Burkholderiaceae, Oxalobacteraceae), γ -Proteobacteria (Xanthomonadaceae), δ -Proteobacteria (unclassified Syntrophobacterales), Firmicutes (Bacillaceae), Actinobacteria (Microbacteriaceae) 그리고 Acidobacteria (Acidobacteriaceae)로 7개의 계통군이 확인되었다. 또한 소나무림 부식토로부터 선발된 34 clone은 α -Proteobacteria (Caulobacteraceae, Acetobacteraceae, Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae), β -Proteobacteria (Burkholderiaceae), γ -Proteobacteria (unclassified Legionellales, Xanthomonadaceae), Actinobacteria (Microbacteriaceae), Acidobacteria (Acidobacteriaceae), Planctomycetes (Planctomycetaceae), Verrucomicrobia (Verrucomicrobiales Subdivision 3) 그리고 Bacteroidetes (Sphingobacteriaceae)의 8개의 계통군이 확인되었다.

상수리림과 소나무림 부식토 내에 세균군집의 계통학적 특성을 비교검토한 결과, 상수리림 부식토로부터 구축된 clone의 약 80%가 proteobacteria 계통군이었으며, 그 중 50%가 Caulobacteraceae, Rhizobiaceae 그리고 Bradyrhizobiaceae를 포함하는 α -Proteobacteria 계통군으로 확인되었다. 소나무림 부식토의 경우 약 50%가 Proteobacteria 계통군이었고 Acidobacteria 계통군이 약 30%이었으며, 특히 Planctomycetes와 Verrucomicrobia 및 Bacteroidetes 계통군은 소나무림 부식토에서만 확인되는 계통학

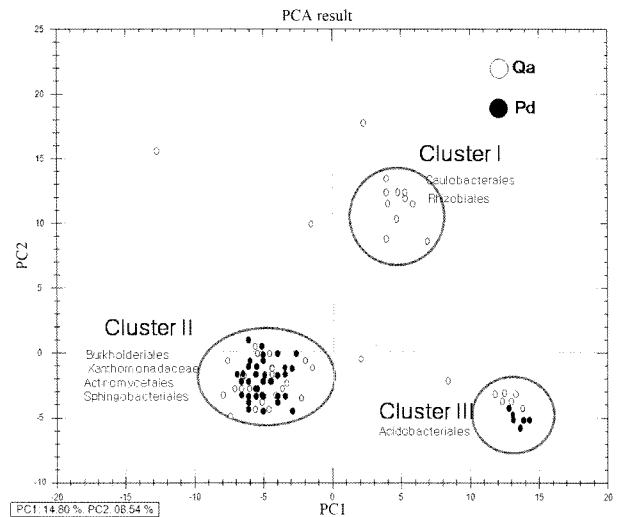


Fig. 4. PCA analyses of 16S rRNA sequence data. Qa, *Quercus acutissima*; Pd, *Pinus densiflora*.

적 특성을 나타내었다(Table 2).

상기의 상수리림과 소나무림 부식층 토양으로부터 구축된 16S rRNA 염기서열은 PhyloMode 프로그램을 이용하여 pentamer를 기준으로 염기를 수치화하고 각 clone간의 거리를 산출하여 PCA (principal component analysis) 분석을 실시한 결과, 3개의 cluster로 분류되었다. Caulobacterales와 Rhizobiales를 포함하는 clusters I과 Burkholderiales, Xanthomonadales, Actinomycetales 그리고

Sphingobacteriales를 포함하는 Clusters II, Acidobacteriales로 구성된 Clusters III으로 구분되었다. Clusters I에 속하는 모든 clone (100%)은 상수리림 부식토에서 유래된 clone이었으며, Clusters II에 속하는 clone의 67%가 소나무림 부식층토양으로부터 분리된 clone으로 구성되었다. Clusters III에 속하는 clone의 63%가 소나무림 부식층 토양으로부터 분리된 clone으로 확인되어 상수리림과 소나무림 부식토 내 세균군집구조는 매우 특징적인 계통학적 특성을 나타내었다(Fig. 4).

이상의 결과로부터 산림토양의 부식층 내 세균군집은 산림토양 생태계에서 유기물 분해, 영양물질 순환 등 다양한 생리적 역할을 담당하며 다양한 미생물 군집구조를 형성하고 있음으로 판단되었다. Johnson 등(21)은 서로 다른 pH와 유기탄소 함량에 따라 토양세균군집 구조에 차이를 나타내었으며, Marschner 등(28)은 유기물의 종류와 C/N 비율이 토양세균의 구조에 영향을 미친다고 보고하였다. 산림생태계의 주요 구성원인 수목의 종류에 따라 토양의 이화학적 성질이 다르고, 이들 물리화학적 환경요인은 토양미생물 군집의 다양성 및 구조를 변화시킨다(19, 20). 본 연구에서 확인된 상수리림과 소나무림 부식층 토양 내 세균군집 구조의 계통학적 특성은 이들 생태환경에 적용한 세균군집 구조를 반영한 결과라 할 수 있으며 이들 세균군집은 산림 토양 생태계를 변화시키는 원동력이라 판단된다.

감사의 말

본 연구는 2008년도 Biogreen21 사업 중 「농업생물자원의 다양성 확보」 과제(2005030134384)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 계룡산 국립공원관리공단. 1994. 계룡산 자연자원조사.
2. 김춘식, 임중환, 신준환. 2003. 광릉 천연활엽수림의 낙엽 낙지와 낙엽분해에 따른 양분동태. 2003. 한국농림기상학회지 5, 87-93.
3. 김효정, 이미정, 이규석, 박관수, 송호경. 2004. 계룡산 상부 지역의 산림식생. 환경생물학회지 22, 127-132.
4. 농촌진흥청. 1998. 토양화학분석법.
5. 박진숙, 황경숙, 천종식. 2005. 미생물의 분류 동정 실험법. 월드사이언스.
6. 손희성, 한송이, 황경숙. 2007. DNA 직접추출법에 따른 산림토양 부식층 내 세균군집의 계통학적 다양성 비교. 한국미생물학회지 43, 210-216.
7. 이규진, 문형태. 2005. 상수리나무림의 유기탄소 분포에 관한 연구. 한국생태학회지 28, 265-270.
8. 이승우, 원형규, 신만용, 손영모, 이윤영. 2007. 산림 입지토양 환경요인에 의한 상수리나무와 신갈나무의 적지추정. 한국토양비료학회지 40, 429-434.
9. 한송이, 김윤지, 황경숙. 2006. 16S rRNA-ARDRA법을 이용한 소나무림과 상수리나무림 토양 내 VBNC 세균군집의 계통학적 특성 비교. 한국미생물학회지 42, 110-124.
10. 황경숙, 유승현. 1995. 유기영양분 농도에 따른 토양세균의 증식양상과 통상 및 편성 저영양세균의 분리. 한국미생물

- 학회지 21, 319-324.
11. 新土の微生物(1) 日本土壤微生物研究編. 博友社(日本, 東京). 129-154.
12. Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.
13. Berg, B. and G.I. Agren. 1984. Decomposition of needle litter and its organic chemical components: theory and field experiments. Long-term decomposition in a Scots pine forest III. *Can. J. Bot.* 62, 2880-2888.
14. Bloomfield, S.F., G.S.A.B. Stewart, C.E.R. Dodd, I.R. Booth, and E.G.M. Power. 1998. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology* 144, 1-3.
15. Chandler, D.P., R.W. Schreckhise, J.L. Smith, and H. Bolton, Jr. 1997. Electroelution to remove humic compounds from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods* 28, 11-19.
16. Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Hug, and L.M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology* 3, 817-820.
17. Curtis, T.P., W.T. Sloan, and J.W. Scannell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10494-10499.
18. Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 189-216.
19. Holm, E. and V. Jensen. 1972. Aerobic chemoorganotrophic bacteria of a Danish beech forest. *Oikos* 23, 248-260.
20. Insam, H. and K. Haselwandter. 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia* 79, 174-178.
21. Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, p. 683-700. In P. Gerhardt, R.E.G. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
22. 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.
23. Kim, J.H. and H.W. Lee. 1989. Growth of soil microorganism for the leachates from leaf litter. *Korean J. Ecol.* 12, 67-74.
24. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.
25. 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.
26. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, England.
27. Martin, J.P. and D.D. Focht. 1977. Biological properties of soils, p. 115-169. In L.F. Elliott and F.J. Stevenson (eds.), *Soils for management of organic wastes and waste waters*. Soil Science Society of America, Madison, Wis., USA.
28. Marschner, P., E. Kandeler, and B. Marschner. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35, 453-461.
29. Mun, H.T. and H.T. Joo. 1994. Litter production and decomposition in the *Quercus acutissima* and *Pinus rigida* forests. *Korean J. Ecol.* 17, 345-353.
30. Mun, H.T. and J.H. Kim. 1992. Litterfall decomposition, and nutrient dynamics of litter in red pine (*Pinus densiflora*) and Chi-

- nese thuja (*Thuja orientalis*) stands in the lime stone area. *Korean J. Ecol.* 15, 147-155.
31. Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655-670.
 32. Park, B.K. and M.R. Kim. 1985. The decomposition rate of litter and soil microorganisms on slope directions. *Korean J. Ecol.* 8, 31-37.
 33. Rudi, K., M. Zimonja, and T. Næs. 2006. Alignment independent bi-linear multivariate modeling (AIBIMM) for global analyses of 16S rRNA phylogeny. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1565-1575.
 34. Rudi, K., G.H. Kleiberg, R. Heiberg, and J.T. Rosnes. 2007. Rapid identification and classification of bacteria by 16S rRNA restriction fragment melting curve analyses (RFMCA). *Food Microbiol.* 24, 474-481.
 35. Scow, K.M., M.A. Bruns, K. Graham, D. Bossio, and E. Schwartz. 1998. Development of indices of microbial community structure for soil quality assessment, p. 110-123. In A. Zabel and G. Sposito (eds.), *Soil Quality in the California Environment*. Kearny Foundation of Soil Science Annual Report of Research Projects 1997-1998.
 36. Stackebrandt, E., W. Liesack, and B.M. Goebel. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7, 232-236.
 37. Stevenson, F.J. 1994. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.
 38. Vaneechoutte, 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.
 39. Yang, S.S., H.Y. Fan, C.K. Yang, and I.C. Lin. 2003. Microbial population of spruce soil in Tatachia mountain of Taiwan. *Chemosphere* 52, 1489-1498.
 40. Yu, Y., M. Breitbart, P. McNairnie, and F. Rohwer. 2006. Fast-GroupII: a web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC Bioinformatics* 7, 57.

(Received June 17, 2008/Accepted July 29, 2008)

ABSTRACT: Comparison of Phylogenetic Characteristics of Bacterial Populations in a Quercus and Pine Humus Forest Soil

SongIl Han¹, MinHye Cho², and Kyung Sook Whang^{1,2*} (¹Department of Biotechnology, Mokwon University, ²Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea)

Chemical and microbial characteristics of bacterial populations were investigated in a quercus and pine humus forest soil. Soil pH was 5.3 ± 0.4 and 4.1 ± 0.9 from each sample of a quercus and pine humus forest soil; C/N ratio of humus forest soil was $17.84 \pm 4.6\%$ and $21.76 \pm 8\%$, respectively. Total organic acid was investigated as 69.57 mM/g dry soil and 53.72 mM/g dry soil in each humus forest soil. Glutamine, pyruvate, succinate, lactic acid and acetic acid of pine humus forest soil were 1.5~4.5 times higher than those of quercus humus forest soil. As we evaluated phylogenetic characteristics of bacterial populations by 16S rRNA-ARDRA analysis with DNA extracted from each humus forest soil. Based on the 16S rRNA sequences, 44 clone from ARDRA groups of quercus humus forest soil were classified into 7 phyla: α , β , γ , δ -Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes. Thirty-two clone from ARDRA groups of pine humus forest soil were classified into 8 phyla: α , β , γ -Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroides, Verrucomicrobia, Planctomycetes, and Gemmatomonadetes. According to PCA (Principal Component Analysis) based on 16S rRNA base sequence, there were three main groups of bacteria. All clone of Cluster I were originated from quercus humus forest soil, while 67% clone of Cluster II and 63% clone of Clusters III were separated from pine humus forest soil.