

독도서식 식물근권에서 분리한 포자형성세균과 질소고정세균의 군집구조 분석

전선애 · 성혜리 · 박유미 · 박재홍 · 김사열*
경북대학교 생명과학부 · 경북대학교 울릉도 독도연구소

Analysis of Endospore-forming Bacteria or Nitrogen-fixing Bacteria Community Isolated from Plants Rhizosphere in Dokdo Island. Jeon, Seon-Ae, Hye-ri Sung, Yu-Mi Park, Jae-Hong Pak, and Sa-Youl Ghim*. School of Life Sciences, and Research Institute for Dokdo & Ulleungdo Islands, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea – Bacteria were isolated from roots of plants belonging to family Solanaceae and Gramineae, inhabited in Dokdo island. Fifty six endospore-forming bacteria grown on tryptic soy broth (TSB) agar medium and 23 nitrogen-fixing bacteria (NFB) grown on nitrogen free agar medium were isolated, respectively. The isolates were partially identified by analyzing the 16S rDNA and categorized into phylogenetic groups. The 16S rDNA sequences of each identified isolates were compared with sequences of each type strains to analyze phylogenetic relationship by phylogenetic tree. As a result, endospore-forming bacteria and nitrogen-fixing bacteria were classified into 4 and 6 lineage groups, respectively. Among these isolated, 18 were presumed to be novel species candidates based on the similarity (lower than 98%) analysis of the 16S rDNA sequences.

Key words: Dokdo, rhizosphere, endospore-forming bacteria, nitrogen-fixing bacteria, 16S rDNA

독도는 북서태평양 연해인 동해의 중남부에 위치하고 있는 화산섬으로서 수리적 위치로 볼 때 아한대남단 해역에 속해 있지만 한류와 난류가 만나 완대류를 형성하는 곳에 위치해 있다. 독도는 연평균 12°C의 기온을 나타내고 50여 일의 맑은 날을 제외하고는 대부분 눈, 비가 내린다. 섬 전체의 면적이 좁고 40° 이상의 급경사 지역이 대부분이며 강한 바람으로 인해 키가 큰 목본류의 식물은 서식하기 어렵다. 토양은 해수와 해수에 의한 고농도의 염분을 포함하고 있는 반면에 유기영양분은 부족하고 조류의 배설물로 인해 치환성 이온을 많이 포함하는 산성을 띄고 있다. 또, 해수에 의한 영향이 크지만 수분함량이 매우 적고, 토심이 얇다[19].

독도의 독특한 환경적 특성으로 인해 형태해부학적, 생리생태학적 및 발생학적으로 제한된 식물이 서식할 것으로 예상되지만, 실제로는 스트레스가 많은 환경을 극복하고 48종이라는 다양한 종류의 식물이 살고 있는 것으로 보고 되었다[19]. 다양한 환경적 스트레스를 이기고 다수의 식물이 독도에 서식하고 있는 것으로 보아 아마도 식물이 그 근권에 서식하는 미생물과 생장에 필요한 도움을 상호간 주고 받고 있음을 추측할 수 있다. 일반적으로 식물 뿌리 주변의 미생물은 뿌리로부터 당류, 아미노산, 비타민 등을 공급받고 식물에게는 성장촉진, 뿌리의 영양분 흡수 촉진, 병원성 세균으로부터 저항성을 가지도록 유도하는 등 이점을 제공하면

서 식물과 상호작용을 하고 있다고 알려져 왔다[9,15,18]. 지구상의 대부분 미생물은 토양에 서식하고 있으며 토양 1 g에는 수천 종의 세균이 분포하고 있음이 밝혀져 있다[21]. 세균의 군집 구조는 서식하고 있는 토양의 온도, 수분함량, 성분, 영양분, pH, 및 기주 식물의 종류 등에 따라 크게 달라진다[3,4]. 따라서 독도의 독특한 토양 환경의 영향과 서식하고 있는 기주 식물의 종류에 따라 매우 다양한 세균이 분포하고 있을 것으로 예상되었다.

독도의 식물상과 동물상에 대해서는 여러 연구팀에 의해 꾸준히 보고되어 왔지만 미생물상에 대해서는 2005년 이전까지 전혀 연구가 없었다. 그러나 2005년 윤 등[23]에 의해 *Virgibacillus dokdonensis*를 독도의 해수에서 분리하여 신종으로 보고한 것을 시작으로 하여 2008년까지 4개의 신속과 30개의 신종을 보고하였다. 그렇지만 독도에 서식하는 식물 뿌리 주변의 세균 군집에 대한 체계적인 조사는 여전히 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 독도에서 다수를 차지하는 야생 버섯과 가지과 식물 뿌리 주변의 토양으로부터 세균을 분리하고 배양한 후 각 분리균에 대하여 16S rDNA를 추출하고 염기서열을 분석하여 부분 동정함으로써 어떤 종류의 세균이 독도에 서식하고 있는지 그 군집구조를 분석하였다. 이를 통하여 세균자원의 확보와 동시에 식물 뿌리 주변의 토양에 서식하는 세균이 독도 환경을 극복한 식물과 어떤 상호작용을 맺고 있는지에 대한 연구를 위한 기초자료로 제공하고자 하였다[10,16].

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5374, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

식물의 근권으로부터 세균의 분리

독도를 구성하는 큰 두 섬인 동도와 서도 중에서 접근하기 비교적 쉬운 동도에서 4군데 다른 장소에 서식하는 가지과 까마중, 2군데에 서식하는 벼과 개밀 3군데에 서식하는 벼과 돌피 등의 뿌리 주변에서 흙을 각각 채취하였다. 독도의 다양한 환경적 스트레스를 극복하고 식물과 상호작용을 하고 있을 것으로 예상되는 세균에 초점을 맞추어 내생포자형성세균과 질소고정세균의 2군으로 나누어 분리하였다[10]. 채취한 토양 시료는 멸균된 tube에 담아 실온에 보관하였다가 실험실에서 0.85% NaCl 용액에 현탁시킨 후 그 용액 100 µL를 덜어 tryptic soy broth(TSB, Difco) 한천 배지와 질소원이 부족한 nitrogen fixing bacteria(NFB) 한천 배지에 [5] 각각 도말하였다. TSB 한천 배지는 내생포자형성세균을 분리하기 위해 65°C 항온 배양기에서 30분 heat shock을 주어 내생포자형성을 유도한 후 37°C에 24시간 동안, 질소원이 부족한 한천 배지는 30°C에서 24시간 동안 각각 배양하였다. 한천 배지상에서 육안으로 관찰하여 순수 콜로니의 모양과 크기, 색깔 등에 따라 세균을 분리한 결과 기주식물의 종류에 따라서 분리된 세균 종류의 수적 차이는 크지 않았

다. 그러나 TSB 한천 배지에서 순수 분리된 내생포자형성 세균의 수가 56종, 질소원이 부족한 배지에서 순수 분리한 질소고정세균의 수가 23종으로 전자에 속하는 세균이 전체적으로 더 많은 수를 차지함을 알 수 있었다(Table 1).

세균을 순수 분리하여 배양하기 위해서는 영양상태, 배양 조건, 서식하고 있던 환경과의 관계 등이 충분히 만족되어야 한다. 그 중 어느 하나라도 부족하면 순수 분리될 수 없는데 실험실 상태에서 순수분리를 할 때는 그와 같은 조건이 충분히 만족될 수 없기 때문에 다양한 세균의 분리가 어렵다[24]. 본 실험에서 토양 시료를 처음 한천 배지에 도말한 후 육안으로 관찰된 콜로니 종류는 매우 다양하게 나타났다. 그러나 각 콜로니를 순수 분리하기 위해 여러 차례의 희석 도말을 시도하여 같은 조건에서 배양하였으나 상당수의 세균이 배양되지 않고 사라졌다. 이것은 토양 시료를 도말한 직후의 초기에는 자연 속 동일한 환경에서 서식하던 세균이 함께 있어서 부분적으로 서로 상호작용을 할 수 있었지만 순수 분리된 후에는 그 상호작용이 끊어지므로 배양되지 않았을 것으로 추측되었다[24].

Table 1. The position of sampling site and isolates number.

Site no. ^a	Position	Host plant	Number of isolates	
			Spore-forming bacteria	Nitrogen-fixing bacteria
1	N37°14'13.7" E131°52'22.1"		7	3
2	N37°14'15.0" E131°52'23.4"	<i>Solanum nigrum</i> L.	10	5
3	N37°14'15.5" E131°52'23.8"	(가지과 까마중)	5	5
4	N37°14'13.6" E131°52'26.2"		5	4
5	N37°14'14.3" E131°52'23.4"	<i>Agropyron tsukushiense</i> var. <i>transiens</i>	5	1
6	N37°14'14.0" E131°52'23.0"	Ohwi (벼과 개밀)	6	-
7	N37°14'11.8" E131°52'20.3"		5	-
8	N37°14'10.9" E131°52'20.5"	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.	5	1
9	N37°14'10.3" E131°52'17.9"	(벼과 돌피)	8	4
Total			56	23

^aEach site number based on Fig. 1.

16S rDNA 염기서열 분석에 의한 세균의 부분동정

분리된 세균의 16S rDNA 염기서열을 분석하여 동정한

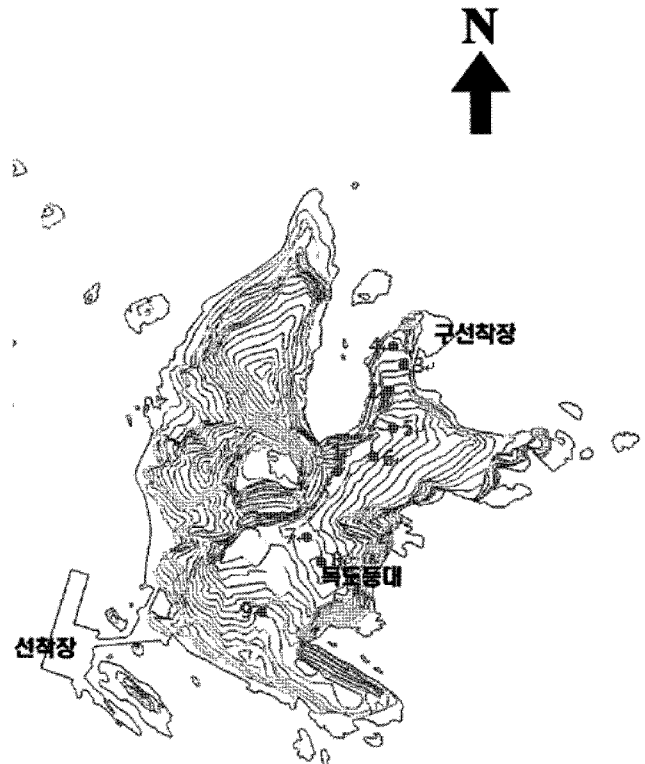


Fig. 1. Map showing the sample sites in east side of Dokdo island.

Table 2. 16S rDNA sequence similarity of endospore-forming bacteria to the closest relative.

Site no. ^a	Host plant	Isolate No.	Accession No.	Phylogenetic group ^b	Closest relative based on 16S rDNA	Similarity (%)
1	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1001	FJ944628	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	98.63
		KUDC1002	FJ944629	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus jamilae</i> (AJ271157)	99.08
		KUDC1003	FJ944630	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	98.25
		KUDC1004	FJ944631	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	98.67
		KUDC1005	FJ944632	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus vallismortis</i> (AB021198)	98.43
		KUDC1006	FJ944633	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (EU179327)	98.48
		KUDC1007	FJ944634	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus pumilus</i> (AY456263)	98.98
2	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1008	FJ944635	High G+C, Gram-positive	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (AJ491806)	99.92
		KUDC1009	FJ944636	alpha proteobacteria	<i>Ochrobactrum lupini</i> (AY457038)	99.10
		KUDC1010	FJ944637	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus anthracis</i> (AB190217)	98.97
		KUDC1011	FJ944638	High G+C, Gram-positive	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (AJ491806)	98.55
		KUDC1012	FJ944639	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus nealsonii</i> (AF234863)	99.67
		KUDC1013	FJ944640	alpha proteobacteria	<i>Ochrobactrum lupini</i> (AY457038)	99.92
		KUDC1014	FJ944641	alpha proteobacteria	<i>Ochrobactrum lupini</i> (AY457038)	100.00
		KUDC1015	FJ944642	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.13
		KUDC1016	FJ944643	High G+C, Gram-positive	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (AJ491806)	98.76
		KUDC1017	FJ944644	alpha proteobacteria	<i>Ochrobactrum lupini</i> (AY457039)	100.00
3	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1019	FJ944645	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	98.81
		KUDC1020	FJ944646	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus thuringiensis</i> (D16281)	100.00
		KUDC1021	FJ944647	Low G+C, Gram-positive	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (AB271743)	99.62
		KUDC1024	FJ944648	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus anthracis</i> (AB190217)	99.54
		KUDC1025	FJ944649	High G+C, Gram-positive	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> (AB249957)	100.00
4	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1027	FJ944650	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.20
		KUDC1028	FJ944651	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	99.90
		KUDC1030	FJ944652	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus elgii</i> (AY090110)	98.79
		KUDC1031	FJ944653	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	95.14
		KUDC1032	FJ944654	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus cereus</i> (D16266)	100.00
5	<i>Agropyron tsukushiense</i> var. <i>transiens</i> Ohwi	KUDC1033	FJ944655	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.63
		KUDC1034	FJ944656	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.71
		KUDC1035	FJ944657	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus pumilus</i> (AY456263)	99.92
		KUDC1036	FJ944658	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	99.77
		KUDC1037	FJ944659	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	98.66
6	<i>Agropyron tsukushiense</i> var. <i>transiens</i> Ohwi	KUDC1038	FJ944660	Low G+C, Gram-positive	<i>Sporosarcina aquimarina</i> (AF202056)	99.23
		KUDC1039	FJ944661	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	99.00
		KUDC1043	FJ944662	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus assamensis</i> (AY884046)	99.04
		KUDC1044	FJ944663	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus pabuli</i> (AB073191)	98.10
		KUDC1045	FJ944664	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	98.53
		KUDC1046	FJ944665	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	98.53
7	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.	KUDC1047	FJ944666	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (EU179327)	97.97
		KUDC1048	FJ944667	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	98.60
		KUDC1049	FJ944668	gamma proteobacteria	<i>Acinetobacter gerveri</i> (AF509829)	99.45
		KUDC1050	FJ944669	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.61
		KUDC1051	FJ944670	High G+C, Gram-positive	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> (AY501364)	99.91
8	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.	KUDC1052	FJ944671	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	97.95
		KUDC1053	FJ944672	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.83
		KUDC1054	FJ944673	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus anthracis</i> (AB190217)	99.28
		KUDC1055	FJ944674	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (D85396)	98.01
		KUDC1056	FJ944675	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus pumilus</i> (AY456263)	99.91

Table 2. 16S rDNA sequence similarity of endospore-forming bacteria to the closest relative (continure).

Site no. ^a	Host plant	Isolate No.	Accession No.	Phylogenetic group ^b	Closest relative based on 16S rDNA	Similarity (%)
9	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.	KUDC1057	FJ944676	High G+C, Gram-positive	<i>Microbacterium flavescens</i> (AB004716)	99.09
		KUDC1058	FJ944677	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	98.89
		KUDC1059	FJ944678	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> (AB042938)	97.95
		KUDC1060	FJ944679	High G+C, Gram-positive	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198)	99.75
		KUDC1061	FJ944680	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	98.27
		KUDC1062	FJ944681	Low G+C, Gram-positive	<i>Bacillus thuringiensis</i> (D16281)	100.00
		KUDC1063	FJ944682	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> (AB021183)	99.21
		KUDC1064	FJ944683	Low G+C, Gram-positive	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> (AB021183)	98.43

^aEach site number based on Fig. 1.^bBased on *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition.

결과 내생포자형성세균은 총 10속 26종이 동정되었다(Table 2). 그 중 *Bacillus* 속 8종, *Paenibacillus* 속 9종 등으로 각각 분류되었다. 전체 내생포자형성세균의 75%를 차지하는 이들은 내생포자를 형성하면서 DNA G+C 함량이 낮은 계통의 대표적인 속으로 농작물의 생장과 관련이 깊은 토양 세균으로 알려져 있다[2]. 분리균 KUDC1021과 염기서열 상동성 99.6%를 가지는 *Lysinibacillus fusiformis*는 Iftikhar 등[12]에 의해 형태적, 생화학적 특성에 따라 *Bacillus fusiformis*에서 학명이 바뀐 세균으로 내생포자를 형성하는

세균이다. 분리균 KUDC1038과 염기서열 상동성 99.2%의 유사도를 가지는 *Sporosarcina aquimarina*는 내생포자를 형성하면서 구균에 속하는 호기성 세균이다[1, 14]. 그 외에 12개(25%)의 분리균은 각각 최소 98.5% 이상의 염기서열 상동성을 가지면서 *Acinetobacter gernerii*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Microbacterium flavescens*, *Microbacterium paroxydans*, *Micrococcus luteus*, *Ochrobactrum lupini*, *Streptomyces drozdowiczii* 등으로 부분 동정되었는데 이들은 내생포자를 형성하지 않는 것으로 알려져 있다[14]. 본 연구에

Table 3. 16S rDNA sequence similarity of nitrogen-fixing bacteria to the closest relative.

Site no. ^a	Host plant	Isolate No.	Accession No.	Phylogenetic group ^b	Closest relative based on 16S rDNA	Similarity (%)
1	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1065	FJ944684	alpha proteobacteria	<i>Novosphingobium panipatense</i> (EF424402)	98.66
		KUDC1066	FJ944685	beta proteobacteria	<i>Pandoraea sputorum</i> (AF139176)	98.23
		KUDC1068	FJ944686	gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)	99.49
2	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1069	FJ944687	alpha proteobacteria	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (Z30542)	98.98
		KUDC1070	FJ944688	Flavobacteria	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (M5905)	97.44
		KUDC1071	FJ944689	gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> (AB021405)	99.64
		KUDC1072	FJ944690	Flavobacteria	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (M59051)	97.43
		KUDC1073	FJ944691	High G+C, Gram-positive	<i>Microbacterium aerolatum</i> (AJ309929)	99.22
3	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1074	FJ944692	gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)	99.82
		KUDC1075	FJ944693	gamma proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AB008509)	99.45
		KUDC1076	FJ944694	Sphingobacteria	<i>Flexibacter aurantiacus</i> (M62792)	97.35
		KUDC1077	FJ944695	alpha proteobacteria	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> (AM422371)	100.00
		KUDC1078	FJ944696	gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas indoloxdians</i> (DQ916277)	98.46
4	<i>Solanum nigrum</i> L.	KUDC1079	FJ944697	gamma proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AB008509)	98.87
		KUDC1080	FJ944698	High G+C, Gram-positive	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> (AB249957)	100.00
		KUDC1081	FJ944699	gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)	98.47
		KUDC1082	FJ944700	gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)	99.49
5	<i>Agropyron tsukushiense</i> var. <i>transiens</i> Ohwi	KUDC1083	FJ944701	High G+C, Gram-positive	<i>Microbacterium lacus</i> (AB286030)	99.47
8	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.	KUDC1084	FJ944702	High G+C, Gram-positive	<i>Rhodococcus equi</i> (X80614)	100.00
9	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.	KUDC1085	FJ944703	gamma proteobacteria	<i>Acinetobacter baylyi</i> (AF509820)	98.89
		KUDC1086	FJ944704	gamma proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AB008509)	99.23
		KUDC1087	FJ944705	gamma proteobacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i> (AJ251468)	98.91
		KUDC1088	FJ944706	gamma proteobacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i> (AJ251468)	98.37

^aEach site number based on Fig. 1.^bBased on *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition.

서는 내생포자형성세균 분리 시 세균이 고온에 노출되었을 때 극한 환경을 극복하기 위해 내생 포자를 형성할 것으로 예상하고 토양 시료를 한천 배지에 도달한 후 60°C에 30분간 노출시켰다가 30°C에 배양하는 방법을 사용하였다. 결과적으로, 75%는 내생포자형성세균으로 알려진 세균이 분리되었으나, 25%를 차지하는 12개의 분리균은 내생포자를 형성하지 않는 것으로 알려진 세균이 분리되었다. 이 분리균들은 내생포자를 형성하지 않고도 30분간 60°C의 극한 고온의 환경을 견뎌내고 배양되어 독도의 가지과와 벼과의 뿌리에 서식하고 있는 것으로 확인되었다. 이 12개의 분리균들이 극한 환경에도 불구하고 어떻게 배양될 수 있었는지 독도의 환경과 연관지어 더 정밀한 실험이 필요할 것으로 여겨진다.

한편, 질소원이 부족한 배지에서 분리된 세균은 분리균 수에 비해 13속 16종이라는 비교적 다양한 종류에 속한 세균이 분리되었다(Table 3). 각 분리균은 앞서 여러 연구에서 질소고정세균으로 토양에서 분리된 바 있는 세균으로서 질소를 고정하는데 필요한 nitrogenase 활성이 조사되어 보고된 바 있다[5]. 질소는 식물의 생장에 필수적이며 특히 농작물에게 없어서는 안 되는 아주 중요한 영양원으로 비료 형태로 많이 사용되어 효과가 좋은 것으로 알려져 있다. 그러나 토양을 산성화시킬 뿐만 아니라 질소 비료의 생산 공정 중에 발생하는 이산화탄소로 인한 대기오염 등 여러 가지 문제를 일으키고 있는 것으로 나타났다[13]. 그러한 문제점을 해결하기 위해 질소고정세균을 이용하여 질소 비료를 대체하려는 많은 연구들이 이루어져 왔다[17]. 따라서 질소고정

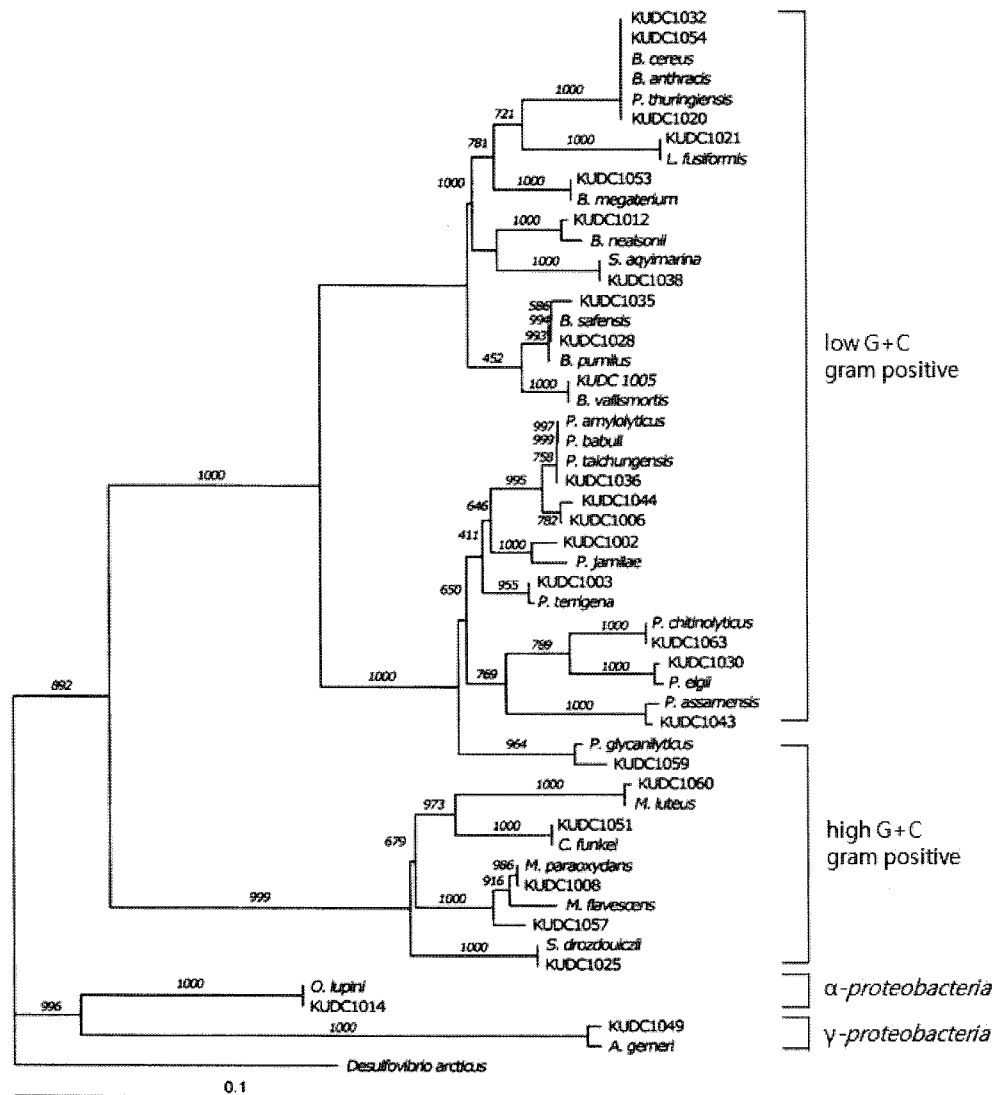


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the affiliations of 16S rDNA sequences of endospore-forming bacteria to selected reference type strain sequence. The tree was constructed from a distance matrix by the Neighbour-Joining analysis. Bootstrap percentages higher than 50% are placed alongside the node considered. The bar represents 0.1 estimated sequence divergence. *Desulfovibrio arcticus* (DQ296030) served as the outgroup.

세균을 농업자원으로 확보해 두는 것은 매우 중요하다. 특히 독도라는 스트레스 요인이 많은 섬 환경에 서식하고 있는 질소고정세균은 일반적인 육지의 농경지에 서식하고 있는 세균에 비해 높은 유용성을 가질 가능성이 있으므로 보다 큰 크기의 군집 조사와 세균의 확보가 필요하다.

전체 분리균 79개 중에서 16S rDNA 염기서열 상동성이 GenBank database의 기존 세균의 그것과 비교하였을 때, 98.5% 이하에 해당되는 것이 18개, 즉 약 20%의 분리균은 신종 가능성을 가진 균주로 추정되었다[22]. 독도 환경은 육지 환경과 다른 것은 물론 다른 섬에 비해서도 매우 독특한 기후 및 토양 환경을 가지고 있어서 보고되지 않은 신속이나 신종의 세균이 다양하게 분포하고 있을 것으로 여겨진다.

앞서 언급하였듯이, 실제로 윤 등[23]에 의하여 독도에서 4속 30종의 새로운 세균이 국제 학계에 보고된 바 있어서 독도가 생태학적으로 중요한 미생물 신종의 보물창고일 가능성은 매우 높다.

계통분석을 통한 세균군집 구조분석

분리된 세균의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 얻은 library에서 각각의 종마다 상동성이 가장 높게 판별된 균주를 선택하고 그 균주의 type strain의 염기서열을 모아서 phylogenetic tree를 작성하였다[7, 12, 23]. 내생포자형성세균의 계통분석 결과 *alpha-*, *gamma-Proteobacteria*, low

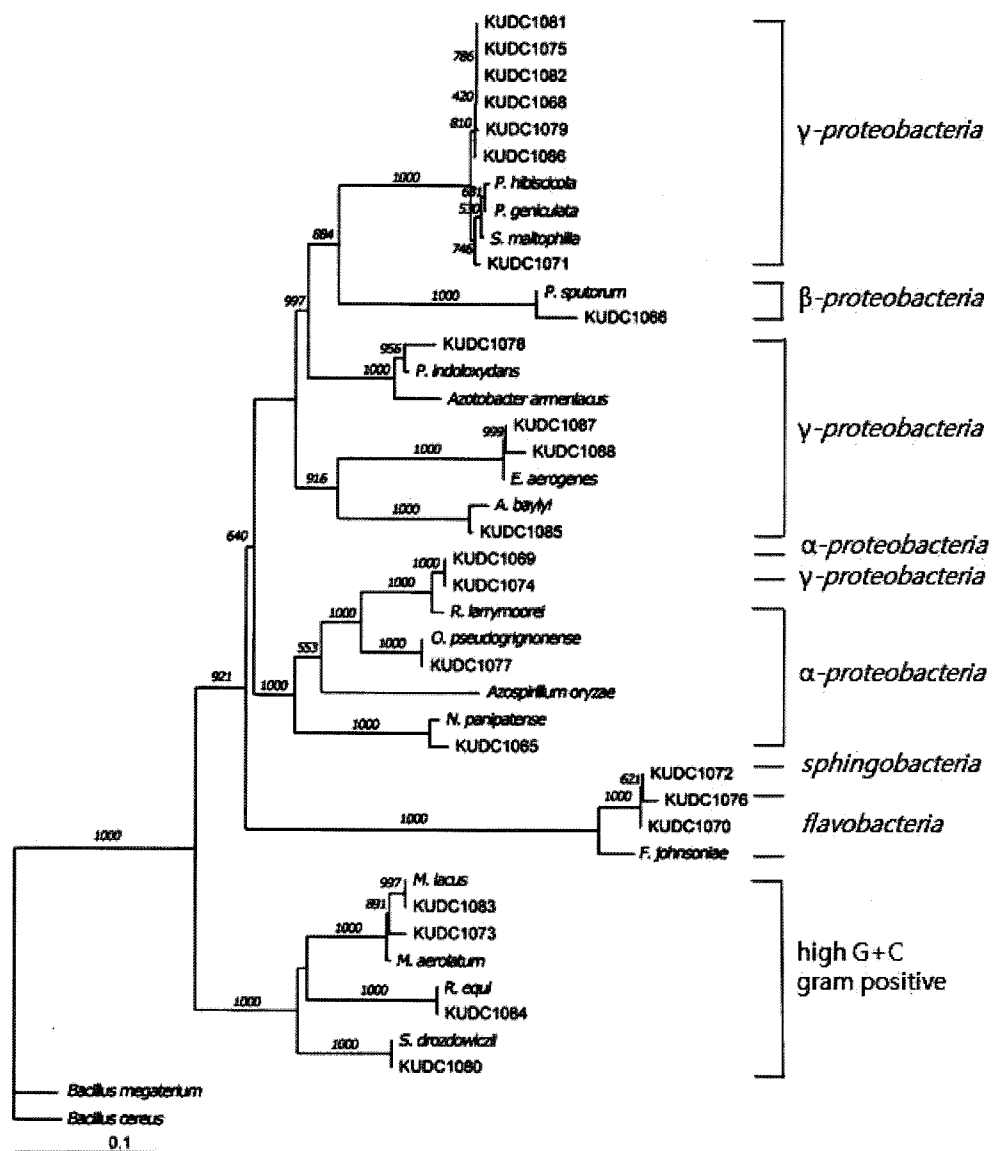


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the affiliations of 16S rDNA sequences of nitrogen-fixing bacteria to selected reference type strain sequence. The tree was constructed from a distance matrix by the Neighbour-Joining analysis. Bootstrap percentages higher than 50% are placed alongside the node considered. The bar represents 0.1 estimated sequence divergence. *Bacillus cereus* (D16273) served as the outgroup.

G+C Gram positive bacteria, high G+C Gram positive bacteria 등 4개의 주요 계통으로 나누어졌다(Fig. 2). 내생포자형성세균 56개의 분리군 중 44개인 75%가 low G+C Gram-positive bacteria에 속하는 세균이었고, 그 다음으로 high G+C Gram-positive bacteria 7개, *alpha-proteobacteria* 4개, *gamma-proteobacteria* 1개 등의 분리군이 각각 속해 있었다.

독도의 질소고정세균은 *alpha*-, *beta*-, *gamma-proteobacteria*, high G+C Gram positive bacteria, *flavobacteria*, *sphingobacteria* 등 6개의 계통으로 나누어졌다(Fig. 3). 질소고정세균의 경우, 내생포자형성세균과는 다르게 *proteobacteria*에 속하는 분리군이 65% 이상 분리되었고, low G+C Gram positive bacteria는 나타나지 않았다. 그 중에서도 특히 12개의 분리군이 속하는 *gamma-proteobacteria*가 가장 많았고 *alpha-proteobacteria*, *beta-proteobacteria* 등에 각각 3개, 1개의 분리군이 속해 있었다. 그 외에 high G+C Gram-positive, *flavobacteria*, *sphingobacteria*의 순으로 세균이 각각 분리되었다. 이전의 벼과식물에서 분리한 질소고정세균의 경우와 비교하여 보면 Engelhard 등[6]이 벼에서 분리한 세균 군집은 주로 gram-positive의 세균이 많았고, 최 등[5]이 벼과에 속하는 밀, 옥수수, 보리 등에서 분리한 세균의 군집은 *alpha-proteobacteria*에 속하는 세균이 가장 많았다. 본 연구에서 벼과 식물인 개밀과 돌피의 뿌리주변 토양으로부터 분리한 세균은 *gamma-proteobacteria*에 속하는 세균이 많았다(52%). 독도의 질소고정세균이 다소 다른 군집 특성을 보여준 것은 이전에 다른 연구팀에 의해 질소고정세균이 분리되었던 환경과 달리 아마도, 독도의 토양이 스트레스가 많은 환경이라는 점이 영향을 미쳤을 가능성이 크다고 볼 수 있겠다.

REFERENCES

- An, S. Y., T. Haga, H. Kasai, K. Goto, and A. Yokota. 2007. *Sporosarcina saromensis* sp. nov., an aerobic endospore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1868-1871.
- Brian, B., and M. Gardener. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathol.* **94**: 1252-1258.
- Buckley, D. H., and T. M. Schmid. 2001. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* **42**: 11-21.
- Buckley, D. H., and T. M. Schmid. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agroecosystems. *Environ. Microbiol.* **5**: 441-452.
- Choi, E. H., S. E. Lee, K. S. Yoon, D. K. Kwon, J. K. Sohn, S. H. Park, M. S. Han, and S. -Y. Ghim. 2003. Isolation of nitrogen-fixing bacteria from *gramineous* crops and measurement of nitrogenase activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 18-24.
- Engelgard, M., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* **2**: 131-141.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
- George, M. G. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Guido, B. V., and B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **4**: 343-350.
- Ham, M. S., Y. M. Park, M. Sumayo, C. M. Ryu, S. H. Park, and S. Y. Ghim. 2009. Characterization of rhizobacteria isolated from family *Solanaceae* plants in Dokdo island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 110-117.
- Hong, X. W., Y. P. Zhang, Y. W. Chu, H. F. Gao, Z. G. Jiang, and S. D. Xiong. 2008. Complete sequence determination and phylogenetic analysis of FKN among seven higher primates including homonids and Old World Monkeys. *Yi Chuan.* **30**: 595-601.
- Ifitkhar, A., A. Yokota, A. Yamazoe, and T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1117-1125.
- Lee, S. J., S. E. Lee, K. J. Seul, S. H. Park, and S. -Y. Ghim. 2006. Plant growth-promoting capabilities of diazotrophs from wild *Gramineous* crops. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 78-82.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2000. Endospore-forming, low G+C, gram-positive bacteria. pp.507-512. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall. New Jersey. USA.
- Murphy, J. F., M. S. Reddy, C.-M. Ryu, J. W. Kloepper, and R. Li. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against cucumber mosaic virus. *Phytopathol.* **93**:1301-1307.
- Park, K. S., D. Paul, and W. H. Yeh. 2006. *Bacillus vallismortis* EXTN-1-mediated growth promotion and disease suppression in rice. *Plant Pathol. J.* **22**: 278-282.
- Patriarca, E. J., R. Tate, and M. Iaccarino. 2002. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *M.M.B.R.* **66**: 203-222.
- Persello-cartieaux, F., L. Nussaume, and C. Robaglia. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* **26**: 189-199.
- Research Institute for Dokdo & Ulleungdo Islands. 2008. The flora of Dokdo island. pp.166-221. Nature of Dokdo island. Kyungpook National University Press. Daegu. Korea.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

21. Torsvik, V., J. Glksoyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 782-787.
22. Woo., P. C. Y., S. K. P. Lau, J. L. L. Teng, H. Tse, and K. Y. Yuen. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *C.M.I.* **14**: 908-934.
23. Yoon, J. H., S. J. Kang, S. Y. Lee, M. H. Lee, and T. K. Oh. 2005. *Virgibacillus dokdonensis* sp. nov., isolated from a Korean island, Dokdo, located at the edge of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1079-1086.
24. Zhiyong, L., L. He, and X. Miao. 2007. Cultivable bacterial community from south China sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.* **55**: 465-472.

(Received Jly 22, 2009/Accepted Sep. 6, 2009)