

## 아산시와 우포늪 토양의 점액세균 다양성

정진우 · 김진우 · 조경연\*

호서대학교 생명공학과 점액세균은행

### Diversity of Myxobacteria in Soil Samples from Asansi and Uponeup in Korea

Jinwoo Chung, Jinwoo Kim, and Kyungyun Cho\*

*Myxobacteria Bank, Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea*

(Received November 29, 2010/Accepted December 29, 2010)

Diversity of myxobacteria in five soil samples from Asansi and Uponeup in Korea was explored by means of polymerase chain reaction (PCR) using primers that specifically bind 16S rDNA of myxobacteria. DNA sequence analysis of 76 PCR fragments containing myxobacterial 16S rDNA revealed five putative novel myxobacterial genera whose 16S rDNA sequences shared <95% sequence identity with those of the type strains. This finding indicates the presence of many uncultured and unidentified myxobacterial species in Korean soil.

**Keywords:** myxobacteria

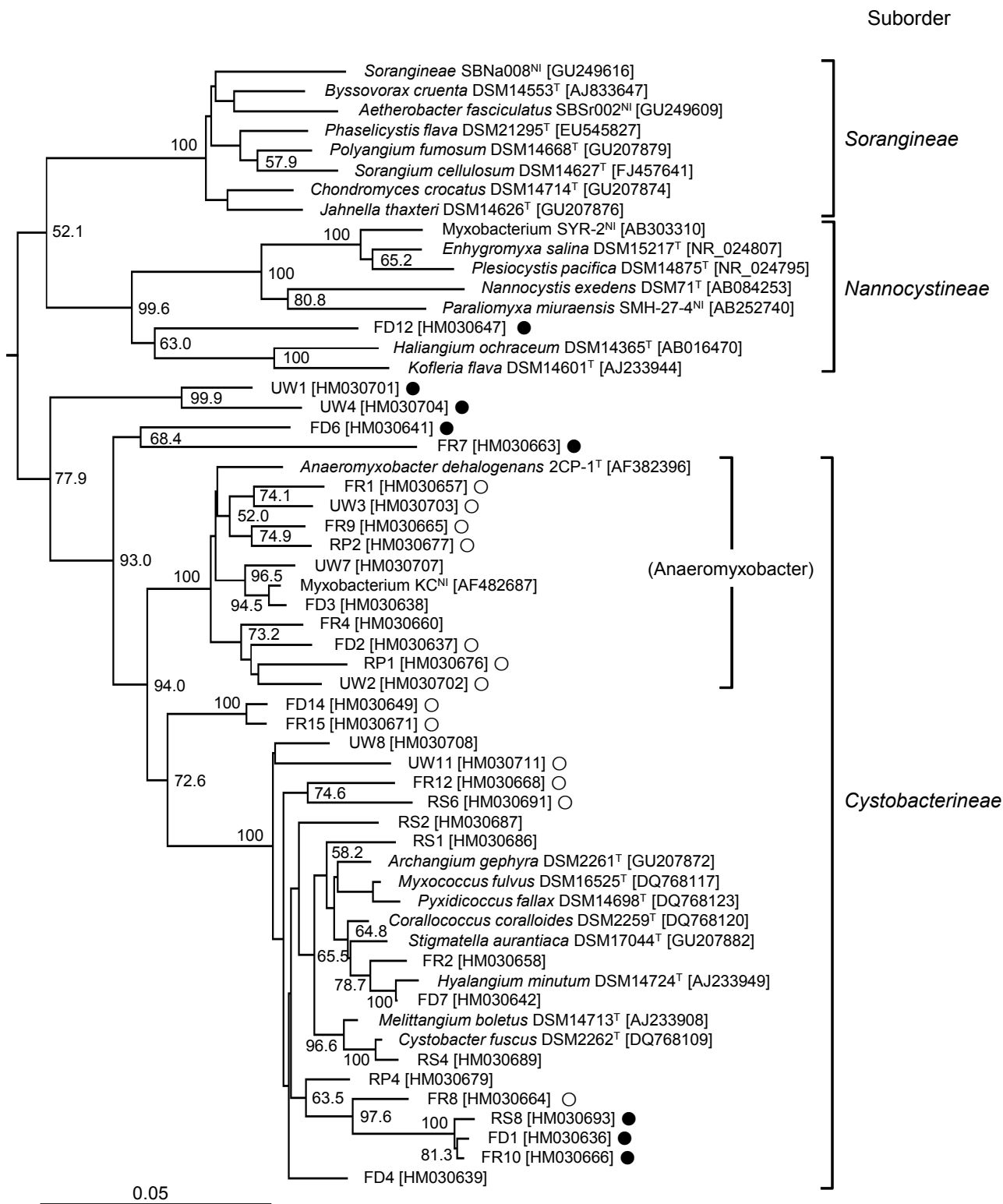
점액세균(myxobacteria)은  $\delta$ -Proteobacteria 문의 *Myxococcales* 목으로 분류되고 활주운동에 의해 이동하며, 대부분의 경우 다양한 형태의 다세포 자실체를 형성하는 토양세균이다(9). 이들 세균은 다양한 이차대사 생리활성물질을 생산하기 때문에 전 세계적으로 10,000균주 이상이 분리될 만큼 많은 관심을 받아왔다(3, 4, 11). 점액세균은 현재 3아목, 6과, 20속 46종이 알려져 있는데(2), Wu 등은 점액세균에 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 분석을 통해 아직까지 분리된 적이 없는 여러 신종 점액세균들이 자연계에 존재함을 확인하였다(12).

본 연구에서는 Wu 등이 사용한 방법과 유사하게 특이적인 프라이머를 이용하여 국내 여러 토양에 어떤 점액세균이 분포하고 있는지, 아직까지 분리된 적이 없는 새로운 종이 존재하는지, 또 신종 점액세균을 분리하기 위해서는 어떠한 토양시료를 채취해야 하는지를 조사하였다. 시료는 충남 아산시 배방읍 세출리 지역의 논(RP), 밭(FD), 산(FR), 아스팔트 길가(RS)와 오랜 기간 동안 독특한 생태계를 유지하고 있는 경남 창녕의 우포늪(UW)에서 8월 초순에 채취한 토양을 대상으로 하였다. 시료의 DNA 추출은 보고된 방법을 사용하였다(12). 16S rDNA 증폭을 위해 추출한 DNA를 주형으로 사용하였고, 점액세균의 16S rDNA에 특이적으로 부착하는 것으로 보고된 5'-CCGCGTGTGTGATGAAGGTC-3' (12)과 세균의 16S rDNA에 부착하는 것으로 알려진 5'-CGGTGTGTRCAAGGCC-3'

(8)을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다. 94°C에서 1분, 65°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하는 PCR을 수행하여 얻어진 산물의 크기는 약 1 kb였다. PCR 산물을 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝한 후, 122클론에 대해 16S rDNA 염기서열을 분석하였고, 이 중 점액세균 이외의 세균의 염기서열이거나 서로 동일한 염기서열을 지닌 것들을 제거한 결과, 76개의 클론이 점액세균으로부터 유래하는 것으로 나타났다 (GenBank accession no. HM030636-HM030711).

16S rDNA 염기서열간 상동성이 97% 이상인 세균들은 서로 동일한 종일 가능성이 있기 때문에, 같은 시료에서 유래되었거나 97% 이상의 상동성을 갖는 것들은 대표적인 1개만 선택하여 최종적으로 32개의 클론을 선별하였다. 선별된 32개 클론의 DNA 염기서열은 CLUSTAL X 프로그램(5)을 이용하여 전체 20개 점액세균 속을 대표하는 각각의 표준종(type species)의 표준균주(type strain: T)와 논문으로 발표는 되었지만 아직까지 표준균주로 인정받지 못한 5개 신 속 균주(NI)들의 16S rDNA 염기서열들과 정렬하고, TreeView 프로그램(6)을 사용하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1). 그 결과, 32클론 중 21클론이 표준균주들과 97% 미만의 상동성을 보여 지금까지 분리된 적이 없는 새로운 점액세균 중에서 유래한 16S rDNA일 가능성이 높았다. 또한, 8클론은 95% 미만의 상동성을 보여 새로운 속의 점액세균에서 유래한 것으로 나타났다. 이 중 FD1, FR10, RS8은 서열이 99% 이상 동일하며, UW1과 UW4는 95% 동일하였다. 반면에, FD6, FD12, FR7은 서로 전혀 다른 분류군인 것으로 나타났다. 따라서 8클론은 최소한 5개의 서로

\* For correspondence. E-mail: kycho@hoseo.edu; Tel: +82-41-540-5627; Fax: +82-41-548-6231



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences from myxobacteria detected in the analyzed soil samples with the 16S rDNA sequences of representative myxobacteria. The numbers in parentheses are GenBank accession numbers of the 16S rDNA sequences. Bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) >50% are shown at the branching points. *Desulfovibrio desulfuricans* (accession number M34113) was used as an out-group. Closed circles indicate sequence identity of <95% with the 16S rDNA sequences of type strains (T) and novel isolates (NI), and open circles indicate sequence identity of <97% with the 16S rDNA sequences of type strains and novel isolates. Scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position.

다른 새로운 속 균주에서 유래한 클론일 것으로 판단되었다. 이 중 2클론은 숲 토양(FR)에서 유래하였으며, 3클론은 밭 토양(FD)에서, 1클론은 길가 토양(RS)에서, 2클론은 늪 토양(UW)에서 유래하였다. 논 토양(RP)에서는 95% 미만의 상동성을 보이는 클론이 발견되지 않았다. 늪 토양에서는 UW1과 UW4가 95%의 상동성이 있었으나 다른 토양에서 얻어진 클론들은 서로 95% 미만의 상동성을 보였다. 따라서 밭 토양에서는 최소한 3개의 새로운 속의 점액세균이 존재하고, 숲 토양에는 최소한 2개의 새로운 속의 점액세균이 존재하며, 늪 토양과 길가 토양에는 각각 최소한 1개의 새로운 속 점액세균이 존재하는 것으로 나타났다.

현재까지 분리된 점액세균은 세 아목으로 분류되고 있는데 (Fig. 1), 전체 32클론 중 27개(84.4%)는 *Cystobacterineae* 아목에, FD12 한 클론은 *Nannocystineae* 아목에 속하였으며, *Sorangineae* 아목에 속하는 클론은 없는 것으로 분석되었다. 이는 PCR에 사용된 프라이머가 *Cystobacterineae* 아목에 특이적이기 때문인 것으로 사료되며, 실제로는 토양에 더 많은 종류의 새로운 점액세균 종이 존재할 것으로 추정된다. 한편, 네 클론 UW1, UW4, FD6, FR7은 기존에 알려진 아목에 속하는 균주들과는 전혀 다른 것으로 분석됨으로써(Fig. 1) 아직까지 알려진 바 없는 새로운 점액세균 아목에 속하는 균주에서 유래했을 것으로 판단되었다.

Wu 등(12)이 사용한 프라이머 조합은 *Anaeromyxobacter* 계열의 균주들을 전혀 검출하지 못했지만, 본 연구에서 사용한 프라이머 조합은 이들도 검출할 수 있었다. 지금까지 알려진 점액세균 중 혐기조건에서 성장 가능한 것은 *Anaeromyxobacter* 속 균주와 myxobacteria KC이며(1, 10), 나머지는 모두 절대호기성이다. 논 토양의 경우 분석된 3클론 중 2클론은 혐기성 점액세균인 *Anaeromyxobacter* 속 균주와 유사하였으며, 늪에서 채취한 토양의 경우에는 분석된 8클론 중 3클론이 *Anaeromyxobacter* 속 균주와 유사한 것으로 나타났다. 반면에 길가 토양에서는 5균주를 분석하였으나 *Anaeromyxobacter* 계열에 속하는 것은 하나도 검출되지 않았다. 숲 토양은 9개 중 3클론이, 밭 토양은 8개 중 2클론이 *Anaeromyxobacter* 계열인 것으로 나타났다.

점액세균의 분리에는 10 mM 3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS), 0.1% CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 300 µg/ml cycloheximide를 함유하고 있는 WCX배지에 대장균을 도말한 후, 토양 시료를 올려놓고 2-4주간 배양하여 형성되는 자실체를 분리하는 방법이 일반적으로 사용된다(7). 본 연구에서 분석한 토양 시료에 최소한 5개 새로운 속 점액세균이 존재하는 것으로 나타났다으므로 본 연구팀은 이들을 분리하고자 하는 시도를 여러 번 반복하였다. 하지만 *Corallococcus*와 *Myxococcus*와 같이 이미 알려진 속에 속하는 균주 외에 다른 새로운 점액세균의 자실체는 관찰할 수 없었다. 이들 균주를 분리하기 위해서는 기존에 사용되어온 방법과는 다른 방법이 필요한 것으로 사료된다.

전 세계적으로 많은 점액세균들이 분리되었지만 대부분 특정 종류에 속하는 것들이었다. 가장 많은 점액세균을 보유하고

있는 독일의 Helmholtz Center for Infection Research의 경우에도 *Corallococcus* 속과 *Myxococcus* 속 균주들이 이 기관이 보유하고 있는 전체 *Cystobacterineae* 아목 균주들의 77.2%를 차지한다(3). 마찬가지로 국내에서 분리된 *Cystobacterineae* 아목 균주들도 대부분 *Corallococcus* 속과 *Myxococcus* 속 균주들이다(7). 하지만 본 연구에서는 이들 속으로부터 유래한 DNA 조각이 전혀 클론되지 않았다. 이러한 결과는 이들 속 균주들이 토양 내 대표적인 점액세균이 아니며, 기존에 일반적으로 사용되고 있는 방법에 의해서는 *Corallococcus* 속과 *Myxococcus* 속 균주들 위주로 선택되어 분리된다는 것을 나타낸다.

결론적으로 토양 속에는 매우 다양한 종류의 점액세균이 존재하고 있으며, 현재까지 보고된 균주들은 토양에 서식하는 점액세균 중 일부에 지나지 않는 것으로 판단된다. 점액세균은 다양한 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있기 때문에 (3, 11), 새로운 균주의 분리는 이로부터 새로운 물질을 발견할 가능성이 높다는 것을 의미한다. 따라서 새로운 점액세균을 분리하기 위한 방법의 개발과 이에 따른 노력이 절실히 요구된다.

## 적요

점액세균의 16S rDNA에 특이적으로 부착하는 프라이머를 사용한 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 아산시와 우포늪에서 채취한 다섯 토양시료 내 점액세균의 다양성을 조사하였다. 점액세균의 16S rDNA를 갖는 76개 PCR 조각의 서열분석 결과, 표준균주와 95% 미만의 상동성을 보이는 5개의 신 속 추정 점액세균이 관찰되어 국내 토양에 아직까지 분리되지 않은 많은 새로운 점액세균들이 존재함을 보여주었다.

## 참고문헌

- Coates, J.D., K.A. Cole, R. Chakraborty, S.M. O'Connor, and L.A. Achenbach. 2002. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2445-2452.
- García, R., K. Gerth, M. Stadler, I.J. Dogma, Jr., and R. Müller. 2010. Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the 'unculturable'. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 878-887.
- Gerth, K., S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, and R. Müller. 2003. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with curious biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotechnol.* 106, 233-253.
- Hyun, H., J. Chung, H. Lee, J. Youn, C. Lee, D. Kim, and K. Cho. 2009. Isolation of cellulose-degrading myxobacteria *Sorangium cellulosum*. *Kor. J. Microbiol.* 45, 48-53.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Page, R.D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.

7. Park, S., B. Lee, J. Kim, C. Lee, E. Chang, and K. Cho. 2004. Isolation and characterization of bacteriolytic wild myxobacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 218-223.
8. Rainey, F.A., W.N. Rainey, R.M. Kroppenstedt, and E. Stackebrandt. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1088-1092.
9. Reichenbach, H. 2005. Order VIII. Myxococcales, pp. 1059-1144. In D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, and G.M. Garrity (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Bergey's Manual Trust, East Lansing, MI, USA.
10. Sanford, R.A., J.R. Cole, and J.M. Tiedje. 2002. Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 893-900.
11. Weissman, K.J. and R. Müller. 2009. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 2121-2136.
12. Wu, Z.H., D.M. Jiang, P. Li, and Y.Z. Li. 2005. Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ. Microbiol.* 7, 1602-1610.