

난배양성 토양세균의 배양법 평가 및 신 분류군의 순수분리

김도형 · 이상훈 · 조재창*
한국외국어대학교 환경학과

난배양성 세균의 배양효율을 증진시킬 수 있다고 보고된 배지 첨가물들이 포함된 다양한 종류의 빈영양 배지들을 대상으로 배양효율을 비교평가하고 최적의 배양조건을 모색하였으며, 평가된 배지를 사용하여 토양시료로부터 순수 분리된 난배양성 세균들의 계통분류학적 위치를 분석하였다. 배지 첨가물로는 토양의 화학적 조성을 반영하기 위한 토양추출액(soil extract), 부식질산의 유사체(humic acid analogue)인 anthraquinone disulfonate, 정족수인식 신호물질(quorum-signaling compounds)인 acyl homoserine lactones, 과산화물(exogenous peroxide)로부터 세균을 보호하기 위한 catalase가 사용되었다. CO₂ 과분압(5%, v/v) 조건에서 60일간 배양하였을 때, catalase가 첨가된 배지가 가장 높은 세균집락수(CFU)를 보였다. 이 배지로부터 147개의 균주를 무작위적으로 선택하여 순수분리하고 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용한 계통학적 분석을 실시한 결과, 순수분리된 균주의 약 30%가 이전에 배양 또는 발견된 적이 없는 새로운 종(species)에 속하며, 이 중 약 25%는 새로운 과(family)에 속하는 세균일 가능성이 있는 것으로 나타났다. 또한 난배양성 토양세균으로 알려진 phylum *Acidobacteria*에 속하는 세균들이 성공적으로 배양되었다는 결과를 고려하면, 본 연구에서 사용된 배지 및 배양조건은 난배양성 토양세균의 배양은 물론 신 분류군의 발굴에도 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

Key words □ oligotrophic media, phylogenetic analysis, uncultured bacteria

자연 생태계에 서식하는 세균군집 중에서 극히 일부분(약 1% 미만)만이 배양 가능하다는 “great plate count anomaly” (35, 38)가 알려진 이후, 많은 연구자들이 난배양성 세균들의 효율적인 배양법 개발을 위해 부단한 노력을 해왔지만 생태계에서 주요한 지위를 차지하고 있는 분류군들 중 상당수가 여전히 현존하는 배양법으로는 배양되지 못하는 것으로 알려져 있다(30, 33). 이와 같은 난배양성 세균들에 대해서는 환경 시료로부터 직접 추출된 community DNA로부터 PCR-증폭된 16S rRNA gene의 염기서열을 이용한 계통학적 분석만이 가능한 실정이다.

최근에는 메타게놈(metagenome) 클로닝 기법을 통해서 난배양성 세균들의 생리학적, 분자생물학적 특성들에 대한 부분적인 연구가 가능하게 되기는 하였지만(31), 이러한 분석기법으로부터 얻을 수 있는 정보는 매우 제한적이다. 따라서 자연 생태계의 주요한 생물학적 구성요소이자 지구화학적 물질순환(biogeochemical material cycling)의 대부분을 수행하고 있는 미생물의 생리학적 특성과 분자생물학적 특성, 나아가서는 이들의 생태학적 지위와 기능을 이해하기 위해서는 난배양성 세균들에 대한 효과적인 배양법의 개발이 필수적이다.

많은 연구자들의 지속적인 연구에도 불구하고 난배양성 세균의 배양법에 대해서 아직까지 뚜렷한 성과는 얻어진 바가 없지만, 자연 생태계에 서식하는 대부분의 세균들이 실험실에서 사용되는 일반적인 배양조건으로 배양되지 않는 이유에 대해서 몇

가지 단서가 보고된 바 있다.

첫째, 영양배지(nutrient medium)에 포함된 농도의 유기물에 의한 영향을 들 수 있다. 여러 실험실에서 세균의 배양을 위해 일반적으로 사용되는 배지는 과량의 탄소원(carbon source) 혹은 영양물질들이 포함된 복합배지(complex media)가 대부분을 차지하고 있다. 이러한 조성의 배지에 빈영양상태(oligotrophic)의 환경으로부터 유래된 세균을 접종할 경우, 갑작스런 영양분 과다로 인한 세균의 영양과잉(nutrient flush)이 세균 개체에 스트레스 요소로 작용하게 된다(1, 7, 8). 둘째, 자연 서식지에서 세균 개체가 접하고 있던 대기조성과 배양시 사용되는 대기조성이 다를 수 있다. 예를 들어 토양공극의 대기조성에 비해 실험실에서 세균을 배양할 때 세균들이 접하는 대기조성은 산소분압이 높고, 이에 따라 생성되는 활성산소(reactive oxygen species)가 배양하려는 세균에게 유해한 영향을 줄 수도 있다(36). 셋째, 세균의 성장속도에 큰 차이가 있을 수 있기 때문에 극히 느리게 성장하는 세균들은 집락(colony)을 형성하는데 2~3일의 배양시간은 충분하지 않을 수도 있다(10, 13).

자연 생태계에 서식하는 세균군집들은 대부분 세대기(generation time)가 긴 K-strategist에 해당하는 것으로 알려져 있으며, 이들은 상대적으로 성장(growth) 속도가 빠른 r-strategist에 비해 짧은 배양 시간 내에는 배양이 불가능하다(12, 20~22, 30, 32). 이 외에도 배지에 첨가되는 다양한 물질들의 영향도 연구된 바 있다. Ammonia와 phosphate 농도가 낮을 경우 미생물 군집들의 배양성을 증진시킨다는 보고가 있었으며(15), 미량원소(trace element)나 정족수인식 신호물질(quorum-signaling compounds) 역시 세균

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-330-4350, Fax: 82-31-330-4529
E-mail: chojc@hufs.ac.kr

의 배양성에 영향 미치는 것으로 확인된 바 있다(4, 5, 26).

위와 같은 연구 결과들을 통해 미루어 보았을 때, 난배양성 토양 세균의 배양을 위해서는 1) 저농도의 영양물질이 포함된 빈 영양 배지의 사용, 2) 배양성을 증진시킬 수 있는 첨가물질의 추가, 3) r-strategists의 생장에 필요한 충분한 배양시간, 4) 서식지 대기조성과 유사한 수준의 이산화탄소 및 산소분압 유지 등을 고려한 배양전략이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 난배양성 토양 세균들의 배양에 적합한 배지 및 배양 조건을 수립하기 위하여, 난배양성 세균의 배양효율을 증진시킬 수 있다고 보고된 배지 첨가물들이 포함된 다양한 종류의 빈영양배지들을 대상으로 배양효율을 비교평가하고 최적의 배양조건을 모색하였다. 또한, 본 연구에서 효율적으로 평가된 배지를 사용하여 토양 시료로부터 순수분리된 난배양성 세균들의 계통분류학적 위치를 분석하였다.

배지종류 및 배양조건에 따른 배양효율의 평가

세균의 배양에 사용된 배지는 모두 탄소원(carbon source)이나 에너지원(energy source)이 최소로 첨가된 빈영양배지(oligotrophic medium)를 기본배지(basal medium)로 사용하였으며, 기본배지에 4종류의 첨가물을 추가하여 각각 배양 효율을 평가하였다. 기본배지는 0.2 g의 KH_2PO_4 , 0.25 g의 NH_4Cl , 0.5 g의 KCl , 0.15 g의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g의 NaCl , 1.0 g, 0.62 g의 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.84 g의 Na_2SO_4 , HEPES (pH 6.8) 10 mM(최종농도), 1 ml의 미량원소용액(trace element solution)($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 190 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg; ZnCl_2 , 70 mg; H_3BO_3 , 6 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 36 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 24 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 mg; 25% HCl , v/v, 10 ml), 1 ml의 vitamin B12 solution (50 mg/L), 1 ml의 mixed vitamin solution (4-aminobenzoic acid, 40 mg/L; D-(+)-biotin, 10 mg/L; nicotinic acid, 100 mg/L; calcium D-(+)-pantothenate, 50 mg/L; pyridoxamine dihydrochloride, 100 mg/L; thiamine dihydrochloride, 100 mg/L) 및 15 g의 Bacto Agar (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA)를 증류수에 첨가하여 1 L가 되도록 제작하였다. 기본배지의 최종 pH는 6.8~7.0으로 조정하였다. 기본배지에 첨가되는 물질로는 1) 토양의 화학적 조성을 배지에 반영하기 위한 토양추출액(100 ml/L)(34), 2) 부식질산(humic acid)의 유사체인 disodium anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)(2 g/L)(36), 3) 정족수인식(quorum sensing) 기작처럼 세균의 생장에 신호물질(signaling molecule)로 적용하는 N-(butyryl, heptanoyl, hexanoyl, beta-ketocaproyl, octanoyl, and tetradecanoyl)-DL-homoserine lactone (Sigma-Aldrich)이 각각 0.1% (v/v) 첨가된 N-acyl homoserine lactone (acyl-HSL) cocktail (1 μM) (36), 4) 세균의 대사과정에서 혹은 배지 제작시 고압멸균(autoclave)의 결과로 생겨나는 활성산소(reactive oxygen species)(25, 36)의 제거를 위한 catalase (2,000 U/L)가 사용되었다.

토양시료는 경기도 용인시 왕산에 위치한 밤나무 근권(rhizosphere) 토양으로부터 채취되었다. 채취된 토양시료의 이화학적 분석은 USDA (United States Department of Agriculture)의

토양분석법을 따랐다. 채취된 시료는 사질양토(sandy loam)이었으며, pH는 5.5, 수분함유량(w/w)은 2.8%, 총 유기탄소(TOC) 함량은 0.08%이었다. 채취한 토양시료를 인산완충액(phosphate-buffered saline; pH 7.0)을 이용하여 균질화(homogenization)한 후, 순차희석(serial dilution, $10^3 \sim 10^7$)하여 각 배지에 접종하고 25°C에서 60일간 배양하였다. 대기 조건은 호기(aerobic) 상태와 CO_2 과분압 상태(5%, v/v)로 구분하여 적용하였다. CO_2 과분압 조건은 토양세균들이 대기보다 높은 농도의 CO_2 및 낮은 농도의 O_2 조건에 적응된 상태일 가능성(29)을 고려하여 사용하였다.

본 연구에서 사용된 배지는 Stevenson 등(36)의 연구에서 사용된 기본배지(basal medium)에 4종류의 각기 다른 첨가물질을 추가하는 방법으로 제작되었다. 제작된 배지에 접종된 세균들은 25°C에서 대기 조성을 달리하여(aerobic 및 CO_2 -enriched) 60일간 배양되었으며, CFU (colony forming unit)수의 비교를 통해 배양효율을 평가하였다. 사용된 배지 별로 호기 조건과 이산화탄소 과분압 조건으로 구분하여 관찰된 CFU수를 Table 1에 요약하였다. 배양시 사용한 대기 조성의 차이가 배양효율에 미치는 영향을 평가하기 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 결과에서 대기 조성의 차이에 따른 CFU수의 차이는 없는 것으로 나타났다. 배지 첨가물들에 대한 평가 결과, catalase가 첨가된 배지를 사용하여 CO_2 과분압 상태에서 배양하는 경우 가장 높은 CFU값이 관찰되었으며, catalase를 첨가한 배지는 호기 및 CO_2 과분압 조건 모두에서 타 첨가물이 포함된 배지에 비해 배양효율이 높은 것으로 확인되었다(ANOVA, $P < 0.01$). 토양추출액, AQDS, Acyl-HSL이 첨가된 배지는 첨가물이 포함되지 않은 기본배지와 CFU 수에서 유의미한 수준의 차이를 보이지 않았다(ANOVA, $P > 0.2$).

본 연구에서 CO_2 과분압 조건이 배양 효율의 증진에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났지만, 토양세균은 대기보다 높은 농도의 CO_2 및 낮은 농도의 O_2 조건에 적응된 상태일 가능성이 높으며(29) 세균에 따라서는 자가영양(autotrophy)이 아니더라도 CO_2 가 대사과정에 필수적일 수도 있기 때문에(16, 36) 토양세균의 배양에 대기보다 높은 농도의 CO_2 조건을 적용하는 것이 필요할 것으로 사료된다. 또한 세균의 대사과정 또는 배지의 멸균과정(25)에서 생성된 H_2O_2 (peroxide), O_2^- (superoxide) 및 OH^\cdot (hydroxyl radical)과 같은 활성산소(reactive oxygen species)에 대한 방어기작이 충분치 않거나 발현되지 않은 상태의 세균들은 이러한 저해요인에 노출될 경우 배양성에 큰 영향을 받을 수도

Table 1. Effect of different medium additives and incubation conditions on CFU ($\times 10^4$) recovered

Medium additives	Incubation conditions	
	Aerobic	CO_2 -enriched
None	4.9 \pm 2.2	8.8 \pm 6.0
Soil extract	7.1 \pm 2.7	7.7 \pm 6.1
AQDS	1.2 \pm 0.3	3.9 \pm 1.6
acyl-HSLs	8.8 \pm 3.2	10.8 \pm 7.3
Catalase	47.8 \pm 64.0	20.5 \pm 24.8

Table 2. Proportions of major phylogenetic groups within bacterial isolates obtained from soil using catalase-amended media

Phylogenetic affiliation	No. of isolates (%)
<i>Proteobacteria</i>	125 (85.0)
<i>α-proteobacteria</i>	26 (17.7)
<i>β-proteobacteria</i>	68 (46.2)
<i>γ-proteobacteria</i>	31 (21.1)
<i>Actinobacteria</i>	12 (8.2)
<i>Acidobacteria</i>	5 (3.4)
<i>Bacteroidetes</i>	5 (3.4)

있다. 통성혐기성(facultative anaerobe) 세균이라 할지라도 혐기조건에서 배양시키다가 갑자기 호기조건으로 전환하였을 때, 생장이 급격하게 저해된다는 결과도 보고된바 있다(23). 또한 기아(starvation) 상태의 *E. coli*와 *Vibrio vulnificus*를 호기 조건에서 배양할 경우, H₂O₂의 제거에 도움이 되는 catalase 또는 pyruvate를 배지에 첨가하는 것이 배양성을 크게 증진시킨다는 보고도 있었다(3, 28). 이상과 같은 타 연구자들의 연구결과 및 본 연구에서 얻어진 결과를 고려하면, 난배양성 토양세균의 배양을 위해서는 CO₂ 과분압 조건과 함께 catalase가 첨가된 배지를 사용하는 것이 유용할 것으로 사료된다.

순수분리된 세균의 계통학적 분석

Catalase가 첨가된 기본배지에서 배양된 세균들을 대상으로 현재까지 배양되지 못한 신 분류군에 속하는 세균이 포함되어 있는지 여부를 파악하기 위하여 catalase가 첨가된 배지에 생성된 세균균락 중 147개를 무작위적으로 선정하고, 16S rDNA gene을 PCR 증폭한 후, 염기서열을 파악하여 계통분류학적 분석을 실시하였다. 사용된 primer는 27F; 5'-AGA GIT TGA TCC TGG CTC AG-3'와 1492R; 5'-ACG GIT ACC TTG TTA CGA CTT-3'이었으며, thermal profile은 다음과 같다: (1) 초기 denaturation (94°C, 5분), (2) denaturation (94°C, 1분), annealing (55°C, 1분) 및 extension (72°C, 2분)의 30회 반복, (3) 최종 elongation (72°C, 20분). 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, valentia, USA)를 사용해 정제하고 DNA analyzer 3730 (Applied & Biology, Foster City, USA)을 이용하여 염기서열을 파악하였다. 순수 분리된 세균들의 계통분류학적 위치(phylogenetic position)는 RDP Bayesian classifier (<http://rdp.cme.msu.edu>)를 사용하여 결정하였다. 또한 BLAST를 이용하여 GenBank database에 수록된 염기서열들과의 유사도를 비교 분석하였다. 위 과정을 통해 본 연구에서 순수분리된 세균들과 유전적 거리가 가장 가까운 균주(closest relative)를 찾았고, 분류학적으로 관련된 세균들의 16S rDNA gene 염기서열들을 CLUSTAL W (9)를 이용하여 서열정렬(alignment)을 실시하였다. 최종적으로 Kimura 2-parameter model과 neighbor joining algorithm을 구현하는 MEGA software (37)를 이용하여 계통수를 작성하였다. RDP Bayesian classifier를 이용한 문(phylum) 수준

의 분석 결과, 순수분리된 세균들 중에서 *Proteobacteria*가 가장 우점(85.0%)하였으며, 그 중 *β-Proteobacteria*가 가장 높은 비율(46.2%)을 차지하였다.

이 외에도 *Acidobacteria*가 3.4%, *Actinobacteria*가 8.2%, *Bacteroidetes*가 3.4%로 관찰되었다(Table 2). Everett 등(17)은 16S rDNA gene (rDNA) 염기서열의 유전적 유사도(evolutionary similarity)가 97% 이상이면 같은 종(species), 95% 이상이며 97% 미만이면 같은 속(genus)의 다른 종(species)이라고 제안한바 있다. 16S rDNA 염기서열만으로 세균의 분류학적 위치를 정확히 결정할 수는 없지만, 이들의 연구결과를 바탕으로 본 연구에서 순수분리된 세균들이 기존에 보고된 적이 없는 새로운 분류군(taxa)에 속하는지를 분석하였다. GenBank BLAST를 이용하여 염기서열들 간의 유사도를 비교분석한 결과, 본 연구에서 배양된 세균들의 29%가 기존에 보고된 종(species)들과 97% 미만의 유사도를 보였으며, 15%는 기존에 보고된 속(genus)에 속하는 세균들과 95% 미만의 유사도를 보였다. 또한 본 연구에서 순수 분리된 12개의 세균은 기존에 알려진 과(family)에 속하는 세균들과 90~85% 미만의 유사도를 보였다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 catalase가 첨가된 배지를 이용하여 CO₂ 과분압 조건에서 배양된 세균들의 약 30%는 이전에 배양 또는 발견된 적이 없는 새로운 종에 해당하는 세균일 가능성이 높으며, 이 중 약 25%는 새로운 과(family)에 속하는 세균일 수 있다는 것을 의미한다. 신 분류군(novel taxon)일 가능성이 높은 세균들에 대하여 보다 정확한 분류학적 위치를 유추하기 위하여, 3종의 세균을 임의로 선택하여 분류학적으로 인접한 세균들과 함께 계통학적 분석(phylogenetic analysis)을 실시하였다(Fig. 1)

본 연구에서 순수분리된 균주 CE-77은 *Proteobacteria*에 속하는 세균으로써 우리나라로 오염된 토양에서 16S rDNA 염기서열의 형태(envIRONMENTAL clone)로만 관찰되었던 clone AKAU4098 (GenBank accession no. DQ125862)과 16S rDNA 염기서열의 유사도(99.5%)가 가장 높은 것으로 나타났다.

이미 보고된 종들 중에서 유전적 거리가 가장 가까운 종은 *Rhodospirillales* 목(order)의 *Rhodospirillaceae* 과(family)에 속하는 *Azospirillum brasilense*이었지만 16S rDNA 염기서열의 유사도는 86.4%에 불과하였다. Everett 등(17)이 제안한 기준으로 평가할 때, 균주 CE-77은 *Azospirillum brasilense*와는 다른 과(family)에 속하며 *Rhodospirillales* 목(order)의 새로운 과(family)에 속할 세균일 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 균주 BA-72 역시 *Proteobacteria*에 속하는 세균으로써 *Burkholderia tuberum* (GenBank accession no. AJ302311)과 95.5%의 16S rDNA 염기서열 유사도를 보였으며 *Burkholderia* 속(genus)에 속하는 다른 종(species)일 것으로 사료된다.

균주 AM-86은 phylum *Acidobacteria*에 속하는 것으로 나타났는데, phylum *Acidobacteria*에 속하는 세균들은 토양을 비롯한 다양한 환경에 광범위하게 서식함에도 불구하고 배양이 어려운 대표적인 난배양성 세균으로 알려져 있다(2, 19, 27). 본 연구에서 순수분리된 BA-72와 16S rDNA 염기서열이 가장 유사한 것 역시 clone UNssu057 (GenBank accession no. AY913279)이었

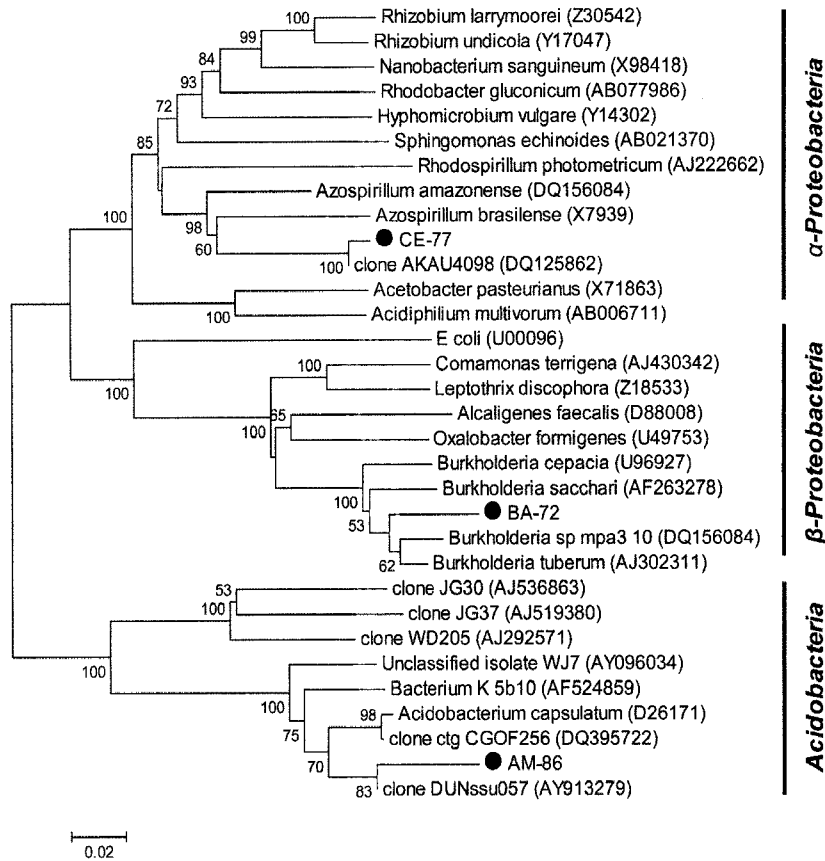


Fig. 1. Phylogenetic positions of bacterial strains isolated from soil. The 16S rRNA gene sequences of the isolates were compared with the most closely related sequences obtained from database (RDP-II), as well as other representatives of related bacterial groups. The phylogenetic distances of each sequence were calculated using the Kimura 2-parameter model and the tree was constructed using the neighbor-joining algorithm. The numbers at the nodes indicate the bootstrap score (as a percentage) and are shown for frequencies at or above the threshold of 50%. The scale bar represents the expected number of changes per nucleotide position.

으며, 보고된 종들 중에서는 *Acidobacterium capsulatum* (GenBank accession no. D26171)과 94.3%의 유사도를 보였다.

본 연구에서 사용한 catalase가 첨가된 빈영양배지는 난배양성 세균들의 배양에 효율적인 것으로 판단되며, 유의미한 차이는 없었지만 CO₂ 과분압 조건 역시 난배양성 세균들의 배양에 도움을 줄 것으로 사료된다. 특히 난배양성 토양세균으로 알려진 phylum *Acidobacteria*에 속하는 세균들이 배양되었다는 점은 본 연구에서 얻어진 팔목할 만한 성과 중의 하나라고 생각된다. Phylum *Acidobacteria*는 Garity 등(18)에 의하면 3개의 종 (*Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans*, and *Holophaga foetida*)만으로 기술되어 있으며 최근 4개의 종 (*Edaphobacter aggregans*, *Edaphobacter modestus*, *Chloracidobacterium thermophilum*, and *Terriglobus roseus*)이 신규로 보고되기는 하였지만(6, 14, 24), RDP database(11)에 수록된 2만개 이상의 phylum *Acidobacteria*에 속하는 16S rDNA 염기서열은 환경시료로부터 직접 추출된 community DNA에서만 보고된 것이 거의 대부분을 차지한다(19).

Phylum *Acidobacteria*에 속하는 보다 다양한 종들이 순수분리되어 이들의 생리학적 특성과 분자생물학적 특성이 파악된다면

토양 생태계에서 이들의 생태학적 지위와 기능을 이해하는데 큰 도움이 될 것이다. 아울러 본 연구에서 배양된 세균들의 30% 정도가 이전에 배양 또는 발견된 적이 없는 새로운 종(species)에 속하며 이중 약 25%는 새로운 과(family)에 속하는 세균일 가능성을 고려하면, 본 연구에서 사용된 배지 및 배양조건은 신 분류군의 발굴에도 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 2008년 한국외국어대학교 학술연구비 지원으로 수행되었다.

참고문헌

1. Aagot, N., O. Nybroe, P. Nielsen, and K. Johnsen. 2001. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5233-5239.
2. Barns, S.M., S.L. Takala, and C.R. Kuske. 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacte-*

- rium* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1731-1737.
3. Bogosian, G., N.D. Aardema, E.V. Bourneuf, P.J. Morris, and J.P. O'Neil. 2000. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 182, 5070-5075.
 4. Bruns, A., H. Cypionka, and J. Overmann. 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3978-3987.
 5. Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka, and J. Overmann. 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1980-1989.
 6. Bryant, D.A., A.M. Costas, J.A. Maresca, A.G. Chew, C.G. Klatt, M.M. Bateson, L.J. Tallon, J. Hostetler, W.C. Nelson, J.F. Heidelberg, and D.M. Ward. 2007. Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic *Acidobacterium*. *Science* 317, 523-526.
 7. Bussmann, I., B. Philipp, and B. Schink. 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *J. Microbiol. Methods* 47, 41-50.
 8. Button, D.K., B.R. Robertson, and P. Quang. 2001. Isolation of oligobacteria. *Methods Microbiol.* 30, 161-173.
 9. Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins, and J.D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31, 3497-3500.
 10. Cho, J.C. and S.J. Giovannoni. 2004. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 432-440.
 11. Cole, J.R., B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, D.M. McGarrell, G.M. Garrity, and J.M. Tiedje. 2005. The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, D294-296.
 12. Connon, S.A. and S.J. Giovannoni. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3878-3885.
 13. Davis, K.E., S.J. Joseph, and P.H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 826-834.
 14. Eichorst, S.A., J.A. Breznak, and T.M. Schmidt. 2007. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2708-2717.
 15. Eilers, H., J. Pernthaler, J. Peplies, F.O. Glockner, G. Gerds, and R. Amann. 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contribution to surface picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5134-5142.
 16. Ensign, S.A., F.J. Small, J.R. Allen, and M.K. Sluis. 1998. New roles for CO₂ in the microbial metabolism of aliphatic epoxides and ketones. *Arch. Microbiol.* 169, 179-187.
 17. Everett, K.D., R.M. Bush, and A.A. Andersen. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, 415-440.
 18. Garrity, G.M., J.A. Bell, and D.B. Searles. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., release 5.0. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.
 19. Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719-1728.
 20. Janssen, P.H., P.S. Yates, B.E. Grinton, P.M. Taylor, and M. Sait. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2391-2396.
 21. Joseph, S.J., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C.A. Osborne, and P.H. Janssen. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7210-7215.
 22. Kaerberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127-1129.
 23. Kargalioglu, Y. and J.A. Imlay. 1994. Importance of anaerobic superoxide dismutase synthesis in facilitating outgrowth of *Escherichia coli* upon entry into an aerobic habitat. *J. Bacteriol.* 176, 7653-7658.
 24. Koch, I.H., F. Gich, P.F. Dunfield, and J. Overmann. 2008. *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1114-1122.
 25. Krieg, N.R. and P.S. Hoffman. 1986. Microaerophily and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 107-130.
 26. Leadbetter, J.R. 2003. Cultivation of recalcitrant microbes; cell are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 274-281.
 27. Lee, S.H., J.O. Ka, and J.C. Cho. 2008. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 263-269.
 28. Mizunoe, Y., S.N. Wai, A. Takade, and S. Yoshida. 1999. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Arch. Microbiol.* 172, 63-67.
 29. Paul, E.A. and F.E. Clark. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, Calif., USA.
 30. Rappe, M.S. and S.J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369-394.
 31. Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2541-2547.
 32. Sait, M., P. Hugenholtz, and P.H. Janssen. 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* 4, 654-666.
 33. Schloss, P.D. and J. Handelsman. 2004. Status of the microbial census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 686-691.
 34. Stackebrandt, E. and H. Prauser. 1991. The family *Cellulomadaceae*, p. 1323-1345. *The prokaryotes*, 2nd ed., vol 4. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.
 35. Staley, J.T. and A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activi-

- ties of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321-346.
36. Stevenson, B.S., S.A. Eichorst, J.T. Wertz, T.M. Schmidt, and J.A. Breznak. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4748-4755.
37. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4; Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
38. Torsvik, V. and L. Ovreas. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240-245.

(Received September 22, 2008/Accepted November 23, 2008)

ABSTRACT : Evaluation of Various Oligotrophic Media for Cultivation of Previously Uncultured Soil Bacteria

Do-Hyoung Kim, Sang-Hoon Lee, and Jae-Chang Cho* (Department of Environmental Sciences, Hankuk University of Foreign Studies, Yong-In 449-791, Republic of Korea)

We evaluated cultivation methods to obtain pure cultures of previously uncultivated bacteria from soil. Soil bacteria (suspensions) were inoculated onto various oligotrophic media with one of the following additives: 1) soil extract; 2) anthraquinone disulfonate (humic acid analogue); 3) acyl homoserine lactones (quorum-signaling compounds); 4) catalase (for the protection of bacteria from exogenous peroxides). After the relatively long period (60 days) of incubation with elevated concentrations of CO₂ (5%, v/v), the media containing catalase showed the highest colony count. We purified 147 randomly selected colonies from the media and the isolates were subjected to the phylogenetic analyses of their 16S rRNA gene sequences. Phylogenetic analysis revealed that approximately 30% of the isolates might belong to novel species or novel family, suggesting that the media and incubation conditions used could be useful for the cultivation of as-yet-uncultured bacteria. Especially, bacteria belonging to the phylum *Acidobacteria*, ubiquitous bacterial taxon known as an uncultured bacterial group (at least difficult to culture from environmental samples), were successfully cultured in this study.