

온도변화에 기인한 토양미생물 우점종의 변화에 관한 연구

박갑주 · 이병철 · 이재석 · 박찬선¹ · 조명환*

건국대학교 이과대학 생명과학부, ¹국립목포대학교 해양자원학과

Dominant-species Variation of Soil Microbes by Temperate Change

Kap Joo Park, Byeong Chol Lee, Jae Seok Lee, Chan Sun Park¹ and Myung Hwan Cho*

Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

¹Department of Marine Resources, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

Abstract – Today, the weather is changing continually, due to the progress of global warming. As the weather changes, the habitats of different organisms will change as well. It cannot be predicted whether or not the weather will change with each passing day. In particular, the biological distribution of the areas climate change affects constitutes a major factor in determining the natural state of indigenous plants; additionally, plants are constantly exposed to rhizospheric microorganisms, which are bound to be sensitive to these changes. Interest has grown in the relationship between plants and rhizospheric microorganisms. As a result of this interest we elected to research and experiment further. We researched the dominant changes that occur between plants and rhizospheric organisms due to global warming. First, we used temperature as a variable. We employed four different temperatures and four different sites: room temperature (27°C), +2°C, +4°C, and +6°C. The four different sites we used were populated by the following species: *Pinus densiflora*, *Pinus koraiensis*, *Quercus acutissima*, and *Alnus japonica*. We counted colonies of these plants and divided them. Then, using 16S rRNA analysis we identified the microorganisms. In conclusion, we identified the following genera, which were as follows: 10 species of *Bacillus*, 2 *Enterobacter* species, 4 *Pseudomonas* species, 1 *Arthrobacter* species, 1 *Chryseobacterium* species, and 1 *Rhodococcus* species. Among these genera, the dominant species in *Pinus densiflora* was discovered in the same genus, but a different species dominated at 33°C. Additionally, that of *Pinus koraiensis* changed in both genus and species which changed into the *Chryseobacterium* genus from the *Bacillus* genus at 33°C.

Key words : global warming, rhizosphere microorganisms, dominant-species change

서 론

기후변화와 지구온난화는 현시대의 정치적 의제로 떠오르고 있다. 그 중에서 가장 이슈가 되고 있는 문제가 바로 지구온난화이다. “지구온난화”라는 용어는 오늘날 중요한 환경 문제 중 하나로서 우리들에게 친숙하게 다가와 있

다. 이 문제에 대해서는 파멸의 심판에서부터 비관적인 태도에 이르기까지 많은 견해들이 있어왔다 (Houghton 2007). 지구온난화가 지구에 미치는 영향은 지대하다. 극단적인 기후변화처럼 눈에 보이는 것부터 온도변화에 따른 미세한 변화까지 그 영향은 실로 크다. 본 연구는 지구온난화의 영향에 의한 눈에 보이지 않는 변화에 대한 것으로 토양 미생물에 초점을 맞추었다. 그 이유는 생태계는 생물이 존재하여야 하며, 생태계가 정상적으로

* Corresponding author: Myung Hwan Cho, Tel. 02-447-5018, Fax. 02-3436-5432, E-mail. kkuokj@konkuk.ac.kr

유지되기 위해서는 물질순환이 효율적으로 진행되어야 하는데, 이 과정에서 토양미생물이 깊이 관여하고 있기 때문이다. 토양미생물은 주로 분해자로서의 기능을 수행하고 생물 사체의 분해 및 광물화를 촉진시켜 물질의 재순환에 이바지하며, 토양 부식질을 형성시켜 토양 수분함량을 조절하고, 식물생장에 필요한 무기영양분을 공급하는 등 토양의 비옥화에 기여한다. 또한, 토양 미생물은 토양 내 다양한 종류의 생물들과의 상호 작용을 통하여 안정된 생태계를 유지하려는 기능을 갖고 있다. 예를 들어 식물 뿌리와의 공생관계, 뿌리 분비물에 의한 미생물의 성장 조절, 식물의 병원체로서의 작용과 미생물 개체군 간의 경쟁 등이 그 예라 할 수 있다. 또한, 미생물은 유전적 다양성과 함께 기능적 다양성을 지니고 있기 때문에 지구생태계의 핵심요소를 이루고 있을 뿐만 아니라, 각종 생물소재의 생산과 생태계의 유지를 위해서도 반드시 필요한 자연자원이므로 엄청난 경제적 잠재 가치를 가진 것으로 인정되고 있다. 특히 농업분야에서 미생물의 기능은 농업생산의 안정성 향상, 환경보전, 농업생산물의 부가가치 증진 및 저공해 천연 생물농약의 개발 등 쾌적한 환경 보전을 위한 양적, 질적 생산성 향상에 이용될 수 있기 때문에 거의 무한한 가능성과 잠재력을 지니고 있다(Choi 2003).

그러나 토양미생물 연구는 다른 연구와 달라서 직접 육안으로 확인할 수 없고 토양에서의 환경조건의 변동에 따라 극적으로 영향을 받고 그 균종의 양과 질이 극적으로 변동할 수 있기 때문에 예측이 어려우며, 실험 방법도 배양을 통하여 간접적으로 그 변동양상을 검토해야 하며 현재까지 개발된 그 어떤 배지도 완벽하지 않아서 실제로 토양 중에 존재하는 미생물 종의 수 %만을 반영하는 등 어려움이 많은 특징이 있다(Yoon 2008).

모든 생물들의 생존은 그 서식지의 환경에 영향을 받게 마련이다. 토양미생물들의 경우도 그 생존은 환경과 밀접한 관련이 있다고 단정할 수 있을 것이다. 그 환경 요인들은 매우 다양하지만 기상조건(기온, 강수량, 일조 시수), 식생, 토양조건(이화학적) 등에 영향을 받는다. 따라서 본 연구는 심각하게 진행되고 있는 지구온난화에 의해서 다양한 토양미생물이 그들의 삶에 어떠한 영향을 받는가를 조사하기 위해 한국의 식물생태계에서 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 대표종인 소나무(A), 잣나무(B), 상수리나무(C), 오리나무(D)를 선발하였다. 이 수목들을 선정한 이유로 소나무(*Pinus densiflora*)는 우리나라, 중국 동북지방의 압록강 연안, 산둥반도 그리고 일본의 시코쿠, 큐슈, 혼슈 등 북위 37~38° 사이에서 가장 많이 나타나는 수종으로, 수직적 공간분포는 제주도의 경우 1,200~1,800m에 출현하며 강원도 화악산과 함경도

추예산 등에서는 1,300m가 그 분포한계선이며 북위 40° 이북에서는 분포한계선이 900m 이하로 나타난다. 그러므로 소나무는 전반적으로 하한계선 100m, 상한계선 900m로 500m 내외의 고도에서 분포하고 있다(임업연구원 1999). 또한 소나무는 양수로서 온도와 수분에 폭넓은 적응성을 가지고 있어 소나무숲은 능선과 같은 건조한 척박지 등에서도 쉽게 군집을 이루기 때문에 한국, 만주 일본에 분포하는 구과식물의 대표적인 경제 수종으로 자리매김하고 있는 대표 수종이며, 잣나무(*Pinus koraiensis*)는 전 세계의 100여 종 소나무속 수종 가운데 유일하게 한국산이라는 종명을 가진 우리나라의 주요한 조림수종으로 우리나라뿐만 아니라 시베리아의 동북부, 만주 및 일본의 몇 곳에 분포하고 있다. 1920년대부터 인공 식재되기 시작한 잣나무림의 조성면적은 45만 ha에 이르고 있으며 전체 조림 면적의 32%, 남한 전체 산림면적의 7%를 차지하는 한국제일의 경제수종이다(산림청 1999). 잣나무는 내한성이 강한 수종으로 표고 100~1,900m 사이에 분포하는 한대수종으로 토심이 깊고 비옥적운한 토양에서 왕성한 성장을 하는 상록침엽교목이다(Xu *et al.* 1986). 그리고 상수리나무(*Quercus acutissima*)는 우리나라 북위 33°20'에 위치한 제주도 한라산으로부터 북위 39°50'에 위치한 함경남도에 이르기까지 한반도 전역의 양지바른 산기슭에 자생하는 활엽수의 대표적인 수종이다. 수직적으로 해발 10m에서 1,100m까지 분포하나 주로 해발 100~200m 지역에서 생육하고 내건성과 내한성, 내음성이 강해 우리나라 전역에 분포하고 있으며(김 등 1981), 인가 주변 및 도로변 산지일대에서 가장 많이 또는 쉽게 접할 수 있는 향토 수종의 하나이다(정과 이 1965). 또한 오리나무(*Alnus japonica*)는 높이가 20m에 달하고 나무껍질은 검은빛이 도는 짙은 갈색의 교목으로 우리나라의 경북, 강원, 함북, 평북지방에 자생하는 낙엽활엽 소교목으로 이 또한 소나무와 같이 남, 북한을 망라한 한국 전 지역에서 자생하는 대표수종이다(Kuroyanagi *et al.* 2005). 따라서 한국의 식물생태계에서 중요한 위치를 차지하고 있는 이들 4종의 한국 대표 수목을 이용하여 지구의 온도 상승에 따라 이들 4종 식물의 뿌리에 거주하고 있는 토양미생물의 우점종이 어떻게 변화하는지에 대한 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 토양 시료 준비

본 실험에 사용된 토양시료는 건국대학교 과학관 주변의 숲에서 채취하였고 실험에 사용된 식물로는 한국을

대표하는 4개의 자생수목인 소나무(3년생), 잣나무(7년생), 상수리나무(3년생), 오리나무(2년생)를 사용하였다. 오리나무는 2007년 10월에 상주시 화덕면 판교리의 채취허가지역에서 굴취한 후 노지에서 생육한 개체이고, 소나무와 상수리나무는 국립산림품종관리센터에서 2006년 10월에 분양 받아 배양토에 파종한 후 포장에서 생육한 개체이며, 잣나무는 2003년 11월 국립산림품종관리센터에서 분양을 받아 노지에서 생육한 개체이다. 관리를 위해 연 2회 잘록병과 진딧물 농약을 살포하였으며, 비료로는 N:P:K 20:20:20 관주용 비료를 사용하였고, 토양은 배양토로 일괄처리 하였다.

소나무, 잣나무, 상수리나무, 오리나무를 각각 A, B, C, D로 분류하고 2009년 2월 이들 각각을 27°C(실온), 29°C(실온+2°C), 31°C(실온+4°C), 33°C(실온+6°C)로 온도가 setting된 비닐하우스에 이식하여 성장시켰다. 이식된 소나무, 잣나무, 상수리나무, 오리나무는 7개월 간 비닐하우스에서 성장하였고 2009년 8월 각각의 비닐하우스의 토양을 채취하여 토양미생물을 채취하는 시료로 사용하였다.

이때 각각의 균은 27°C의 비닐하우스에서 성장시킨 소나무의 토양미생물균을 A-27, 29°C에서 성장시킨 소나무의 토양미생물균을 A-29, 31°C에서 성장시킨 소나무의 토양미생물균을 A-31, 33°C에서 성장시킨 소나무의 토양미생물균을 A-33으로 표시하였고, 27~33°C의 비닐하우스에서 성장시킨 잣나무의 토양미생물균을 각각 B-27, B-29, B-31, B-33, 27~33°C의 비닐하우스에서 성장시킨 상수리나무의 토양미생물균을 각각 C-27, C-29, C-31, C-33, 27~33°C의 비닐하우스에서 성장시킨 오리나무의 토양미생물균을 각각 D-27, D-29, D-31, D-33로 구분하였다. 이 들 총 16개의 균에서 각각 3번씩 총 48개의 토양시료를 채취하였다. 토양시료를 채취하였을 때의 비닐하우스 외부 실온은 27°C였으며, 모종삽을 이용하여 수목 뿌리 주변의 깊이 5cm 이상의 토양을 채취하였고, 채취 시에는 멸균된 모종삽과 멸균된 sample 수거용 위생팩을 사용하였다.

2. 사용 배지 및 시약

토양 미생물 균주의 배양을 위하여 Nutrient-Agar (NA; Difco Inc, U.S.A)배지 및 Nutrient Broth (NB; Difco Inc, U.S.A)배지를 사용하였다. 균주의 보존은 NB에 glycerol이 20% 되도록 조성하여 사용하였으며 -70°C Deep Freezer에 보관하여 사용하였다. Genomic DNA의 추출 및 정제를 위해 G-spin™ Genomic DNA extraction kit (iNtRON Inc., U.S.A)을 사용하였고, DNA purification을 위하여

QIAquick®PCR purification kit250 (QIAGEN, U.S.A)을 사용하였으며, DNA 분자의 전기영동확인을 위해 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, U.S.A)를 marker로 사용하였고 Ethidium bromide (Sigma Inc., U.S.A) 및 Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega Inc., U.S.A)를 사용하였다.

3. 토양 미생물 분리

토양 미생물을 분리하기 위해 saline 희석법을 사용하였다. 각 site에서 채취한 토양 5g을 saline 50 mL에 넣어 Vortex (VISION CO., U.S.A) 이용하여 섞어준 후 이 원액을 10⁻¹부터 10⁻⁶까지 saline으로 계단 희석하였다. 그 후 10⁻¹부터 10⁻⁶까지 희석한 sample들을 NA배지 (Difco Inc, U.S.A)에 100 µL씩 분주하여 spreading한 후 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 생성된 colony를 외부 형태적 특성과 현미경을 이용한 균의 형태 검사를 고려하여 분류하였고 각각의 다른 균을 따로 멸균된 needle로 채취하여 LB배지 (Bacto Inc, U.S.A)에 배양하였다. 배양된 균을 다시 NA배지 (Difco Inc, U.S.A)에 streaking하여 배양한 후 균의 동정실험을 실시하였다.

4. Genomic DNA 분리

분리 균주의 genomic DNA는 G-spin™ Genomic DNA extraction kit (iNtRON Inc., U.S.A)를 사용하여 분리하였다. NA배지에 도달한 균주를 니들로 채취하여 100 µL의 3차 증류수가 담겨있는 E-tube에 희석하였다. 그리고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 뒤 상등액을 버리고 침강된 균체를 회수하였다. 침강된 균체에 Pre-buffer 50 µL와 Lysozyme 3 µL를 넣고 재 현탁한 후에 37°C incubator에서 30분간 반응시켰으며 반응의 효율을 높이기 위해 5분마다 inverting을 해주었다. Incubation이 끝나고 G-buffer 250 µL를 넣고 재 현탁한 후에 65°C에서 30분 incubation 하였으며 반응의 효율을 높이기 위해 5분마다 inverting을 해주었다. 이어서 Binding buffer 250 µL를 넣고 완전히 혼합 될 때까지 pipetting을 10번 이상 실시하였는 바, 이 과정은 효과적인 세포의 분해, 단백질 제거, genomic DNA의 binding 효율에 관련되어 있어 매우 중요하다. Pipetting한 용액을 column에 옮겨 담아 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 실시하였으며 genomic DNA를 제외한 불필요한 것을 제거하기 위하여 Washing buffer A 500 µL를 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 씻겨져 내려온 용액은 버리고 다시 한 번 Washing buffer B 500 µL를 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 실시하였다. 다시 씻겨져 내려온 용액을 버린 후 마지막으로 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 실시하고 새로

운 E-tube에 G-spin™ column을 놓고 3차 증류수 50 µL를 column의 membrane에 직접 넣고 실온에서 1분간 정치하였다. 그리고 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 순수한 genomic DNA를 얻어내었다.

5. Genomic DNA를 주형으로 한 PCR

분리된 genomic DNA를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR에 사용된 primer는 16S ribosomal DNA primer를 채택 하였다. 그 이유는 거의 대부분의 균은 공통된 primer 부착 염기서열인 16S ribosomal DNA 부분을 가지고 있기 때문에 이곳에 primer를 부착하여 DNA를 증폭 시킨 후 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하여 각각의 균주의 종을 동정할 수 있기 때문이다 (Amin *et al.* 2000). 따라서 Premix PCR tube에 10 pmol로 희석한 16S ribosomal DNA primer f/r을 각각 1 µL씩 분주한 후 Ultra D.W 16 µL, 준비된 genomic DNA 2 µL를 분주하여 PCR을 실시하였고 PCR의 반응조건은 Table 1과 같다. PCR을 진행한 후 PCR product의 증폭 여부를 확인하기 위해 1.5% agarose gel에서 전기영동(110 V, 30 min)을 실시하였다. 실시 결과, 오리나무균 D-29를 제외하고는 모든 PCR product가 확인되었다. PCR product가 나오지 않은 D-29의 결과를 얻어내기 위하여 이 균이 토양 미생물이라는 점을 감안해 토양에 널리 분포하는 *Bacillus*속에 특이적으로 결합하는 B16S ribosomal DNA primer를 사용하여 PCR product를 얻어냈다. 이때는 primer가 달라졌기 때문에 annealing temperature를 57°C에서 60°C로 변경하여 실험을 실시하였으며 16S ribosomal DNA primer와 B16S ribosomal DNA primer의 sequence는 Table 2에 나타내었다.

6. PCR product (16S ribosomal DNA 또는 B16S ribosomal DNA)의 purification

PCR product에서 sample의 순수 DNA를 분리하기 위하여 QIAquick® PCR purification kit250 (QIAGEN, U.S.A)을 사용하여 PCR product를 정제하였다. 이 과정은 PCR을 실시할 때 사용되었던 buffer와 염색시약을 제거하여 순수한 DNA를 얻기 위한 과정이다. 즉, PCR product volume의 5배수에 해당하는 PB buffer (DNA binding buffer)를 넣어준 후 pipetting을 실시하여 잘 혼합한 후 이것을 column에 옮겨 centrifuge (13,000 rpm, 30 sec)를 실시한다. 이 과정에서 순수한 DNA는 column membrane에 결합하게 된다. 하층액은 버리고 PE buffer (Wash buffer) 750 µL를 넣고 다시 centrifuge (13,000 rpm, 30 sec)를 실시하여 washing 한다. 그 후 column membrane packing

Table 1. The reaction conditions of PCR

Step	Temperature	Time
Incubate	95°C	5 min
Incubate	95°C	30 sec
Incubate	57°C	30 sec
Incubate	72°C	1 min
Cycle to step 2 for 30 more times	—	—
Incubate	72°C	5 min
Incubate	4°C	Forever

Table 2. The sequence of 16S ribosomal DNA primer and B16S ribosomal DNA primer

Primers	Nucleotides sequence (5' → 3')
16S ribosomal DNA primer_F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
16S ribosomal DNA primer_R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
B16S ribosomal DNA primer_F	GTG CCA GCA GCC GCG G
B16S ribosomal DNA primer_R	TCG ACC CTT TCC CTC ACG

주위에 남아있는 PE buffer를 micro pipette을 이용하여 빨아내어 제거한 후 PE buffer가 제거된 column을 다시 한번 centrifuge (13,000 rpm, 30 sec)하여 column에 남아 있을 PE buffer를 모두 제거한다. 그리고 column을 새로운 E-tube에 옮겨 담아 실온에 10분간 건조시킨 후 초순수 증류수 30 µL를 column membrane 중앙에 통과시켜 column membrane에 결합하고 있는 DNA를 녹여준다. 이 column을 다시 실온에서 10분간 건조시킨 후 centrifuge (13,000 rpm, 2 min)를 실시하여 정제된 DNA를 얻어냈다. 정제된 순수 DNA는 전기영동을 통해 최종 확인하였다.

7. PCR product (16S ribosomal DNA 또는 B16S ribosomal DNA)의 sequencing

전기영동으로 확인된 정제된 PCR product는 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A)와 Genome Sequencer FLX (Roche, Switzerland)를 이용하여 sequencing을 실시한 후 전체 염기서열 분석결과를 얻어내었다. 이렇게 얻어진 염기서열 결과를 BLAST serch program (<http://www.ncbi.nih.gov>)을 사용하여 분석한 후 최종적으로 각각의 미생물을 동정하였다. 이로써 분리한 미생물이 어떤 종에 속하는지 알아낼 수 있게 되었으며 우점종을 파악하였다.

결 과

1. 토양 미생물의 분리 배양

A-27, A-29, A-31, A-33 및 B-27, B-29, B-31, B-33 및 C-

27, C-29, C-31, C-33, 그리고 D-27, D-29, D-31, D-33로 구분된 총 16개의 균에서 각각 3번씩 총 48개의 토양 시료를 채취하였다. 채취된 시료들은 멸균된 증류수를 이용하여 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 까지 계단희석하였고 각각의 희석된 sample들을 NA배지(Difco Inc, U.S.A)에 100 μ L spreading하여 37°C incubator에서 20시간 배양하였다. 배양 후 생성된 colony들을 외부 형태적 특성과 현미경을 이용한 균의 형태관찰을 통해 분류하여 각각의 온도별로 우점종이라 생각되는 것을 따로 멸균된 needle로 채취하여 LB 배지(Bacto Inc, U.S.A)에서 37°C, 20시간 배양하였다. 배양된 균을 다시 NA배지(Difco Inc, U.S.A)에 streaking하여 하나의 균종인지 확인한 후 균주의 동정을 실시하였다. 이때 A-27균과 A-29균, A-31균에서는 각각 2개의 우점종균이 검출되어 이들을 각각 A-27-1, A-27-2, A-29-1, A-29-2, A-31-1, A-31-2이라 명명하였고, A-33균에서는 3개의 우점종균이 검출되어 A-33-1, A-33-2, A-33-3라 명명하였다. B-27균과 B-29균에서는 각각 3개의 우점종균이 검출되어 이들을 각각 B-27-1, B-27-2, B-27-3, B-29-1, B-29-2, B-29-3이라 명명하였고, B-31균에서는 2개의 우점종균이 검출되어 각각 B-31-1, B-31-2이라 명명하였고, B-33균에서는 3개의 우점종균이 검출되어 각각 B-33-1, B-33-2, B-33-3이라 명명하였다. C-27균에서는 3개의 우점종균이 검출되어 C-27-1, C-27-2, C-27-3이라 명명하였고, C-29, C-31, C-33균에서는 각각 2개의 우점종이 검출되어 이들 역시 C-29-1, C-29-2, C-31-1, C-31-2, C-33-1, C-33-2라 명명하였다. 마지막으로 D-27균에서는 3개의 우점종균이 검출되어 D-27-1, D-27-2, D-27-3으로 명명하였고, D-29균에서는 하나의 우점종균이 검출되어 D-29-1로 D-31과 D-33균에서는 각각 2개의 우점종균이 검출되어 이들 역시 각각 D-31-1, D-31-2, D-33-1, D-33-2로 명명하였다.

2. Genomic DNA 추출, 정제 및 PCR 결과

일반적인 미생물 동정은 크게 두 가지 방법으로 이루어진다. 그중 하나는 세균의 외부적인 형태나 염색의 특징 또는 포자 형성이나 운동성, 화학적 물질에 대한 반응 등을 보는 생화학적 동정법을 통한 동정이고 다른 방법은 대상 균주에서 DNA를 추출하여 염기 서열 확인을 통한 균 동정법이다. 본 실험의 경우 DNA 염기 서열 조사를 통한 균 동정을 우선 실시하기로 하였다. 즉, 균주의 우점종 확인 후에 각각의 균주의 genomic DNA를 추출하였고 이들 각각의 genomic DNA에 대해 PCR을 실시하여 균 동정에 필요한 최종 product를 얻어냈다. PCR을 위해 사용된 primer는 대부분의 균이 16S ribosomal

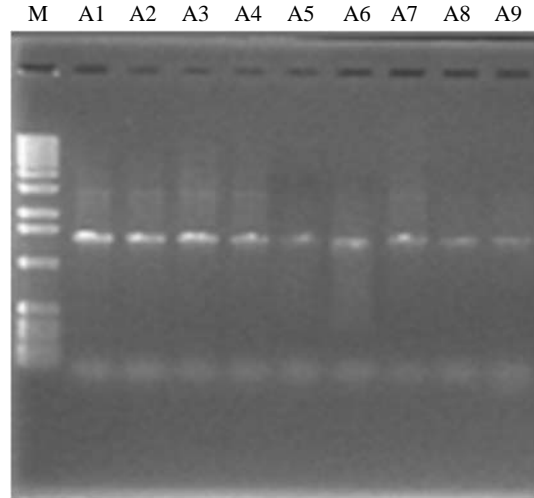


Fig. 1. Electrophoresis result of DNA purification. Lane M: 1 kb ladder marker. Lane A1: A-27-1, A2: A-27-2, A3: A-29-1, A4: A-29-2, A5: A-31-1, A6: A-31-2, A7: A-33-1, A8: A-33-2, A9: A-33-3.

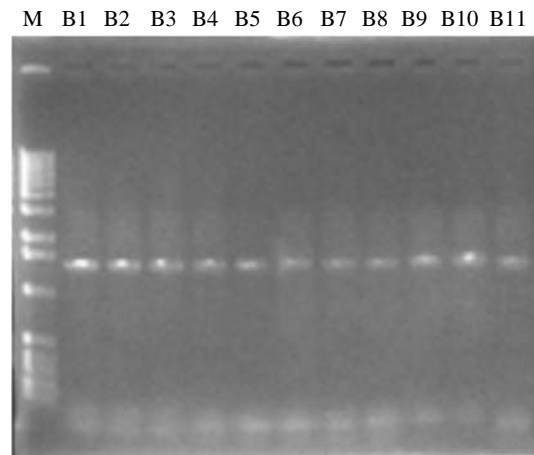


Fig. 2. Electrophoresis result of DNA purification. Lane M: 1 kb ladder marker. Lane B1: B-27-1, B2: B-27-2, B3: B-27-3, B4: B-29-1, B5: B-29-2, B6: B-29-3, B7: B-31-1, B8: B-31-2, B9: B-33-1, B10: B-33-2, B11: B-33-3.

DNA라는 primer 부착 염기서열을 가지고 있다는 점을 이용하여 이곳에 부착할 수 있는 16S ribosomal DNA primer를 사용하였다. 이 PCR product에 대해 DNA purification을 실시하여 순수한 DNA를 추출하였고 이를 electrophoresis (1.5% agarose gel)를 실시하여 확인한 후 그 결과를 Figs. 1-4에 나타내었다.

3. 각 온도별 site 우점종의 16S ribosomal DNA 염기 서열 분석에 의한 동정결과

동정 결과 각 site에서 검출된 미생물은 총 6개 속 37

개종으로 확인되었으며 그 결과를 Tables 3-6에 나타내었다.

소나무(*Pinus densiflora*)에서는 27°C에서 *Bacillus cereus* (A-27-1)와 *Enterobacter* sp. CCBAU 15492 (A-27-2), 29°C에서는 *Bacillus* sp. 210_64 (A-29-1)와 *Enterobacter* sp. CCBAU 15492 (A-29-2), 31°C에서는 *Bacillus* sp. 210_64 (A-31-1)와 *Enterobacter ludwigii* (A-31-2), 33°C에서는 *Bacillus* sp. 210_64 (A-33-1)와 *Enterobacter* sp. CCBAU 15492 (A-33-2), *Bacillus marisflavi* strain DS6 (A-33-3)가 각각 우점종으로 확인되어 각 온도별로 *Bacillus*와 *Enterobacter*속이 우점종임이 확인 되었고, 그러나 특이하게 33°C에서는 새롭게 나타난 *Bacillus marisflavi* strain DS6가 우점종으로 발견되었다. 이 종은 colony 상태에서 외형적으로 두 개의 우점종과는 다르게 노란색을 띠고 있었다.

잣나무(*Pinus koraiensis*)에서는 27°C에서 *Bacillus cereus* Q1 (B-27-1)와, *Pseudomonas* sp. PR1-3 (B-27-2), *Arthrobacter woluwensis* strain CBU05/5295 (B-27-3), 29°C에서는 *Bacillus* sp. G3 (B-29-1)와 *Pseudomonas* sp. PR1-3 (B-29-2), *Bacillus* sp. 210_24 (B-29-3), 31°C에서는 *Bacillus cereus* Q1 (B-31-1)와 *Pseudomonas* sp. PR1-3 (B-31-2), 33°C에서는 *Bacillus coagulans* strain (B-33-1)와 *Pseudomonas* sp. PR1-3 (B-33-2), *Chryseobacterium* sp. COLI2 (B-33-3), 각 온도별로 *Pseudomonas*와 *Bacillus*속이 우점종으로 확인되었고, 27°C에서 *Arthrobacter*속이 1종 확인되었으며, 33°C에서는 새로운 우점종으로 *Chryseobacterium* sp. COLI2가 발견되었다.

상수리나무(*Quercus acutissima*)에서는 27°C에서 *Bacillus cereus* strain B1 (C-27-1)와 *Pseudomonas putida* strain

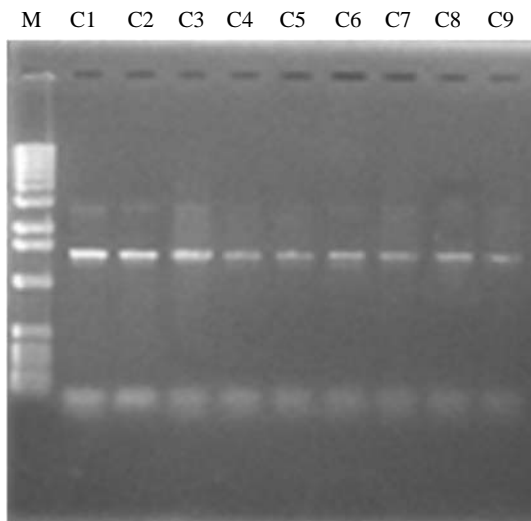


Fig. 3. Electrophoresis result of DNA purification. Lane M: 1 kb ladder marker. Lane C1: C-27-1, C2: C-27-2, C3: C-27-3, C4: C-29-1, C5: C-29-2, C6: C-31-1, C7: C-31-2, C8: C-33-1, C9: C-33-2.

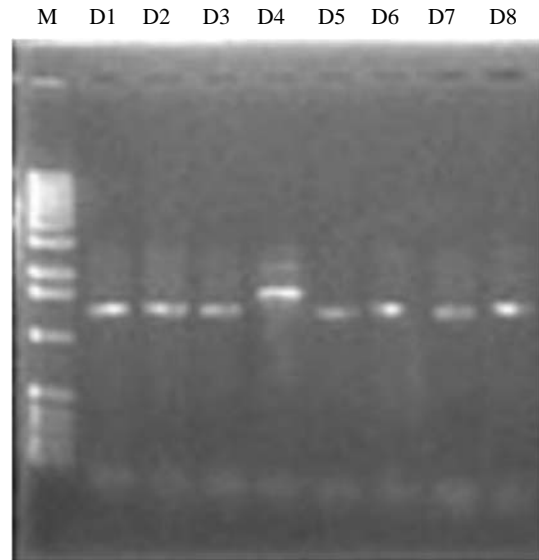


Fig. 4. Electrophoresis result of DNA purification. Lane M: 1 kb ladder marker. Lane D1: D-27-1, D2: D-27-2, D3: D-27-3, D4: D-29-1, D5: D-31-1, D6: D-31-2, D7: D-33-1, D8: D-33-2.

Table 3. Identification of isolated strains from site A of a wild *Pinus densiflora* community by 16S rRNA sequence analysis

Strain No.	Homologous microorganism	16S rRNA % identity
A-27-1	<i>Bacillus cereus</i> (DQ115540.1)	16S rRNA F: 99%, R: 91%
A-27-2	<i>Enterobacter</i> sp. CCBAU 15492 (DQ988939.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
A-29-1	<i>Enterobacter</i> sp. CCBAU 15492 (DQ988939.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
A-29-2	<i>Bacillus</i> sp. 210_64 (GQ199766.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
A-31-1	<i>Enterobacter ludwigii</i> culture-collection CGMCC:3092 (GQ380575.1)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
A-31-2	<i>Bacillus</i> sp. 210_64 (GQ199766.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
A-33-1	<i>Bacillus</i> sp. 210_64 (GQ199766.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
A-33-2	<i>Enterobacter</i> sp. CCBAU 15492 (DQ988939.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
A-33-3	<i>Bacillus marisflavi</i> strain DS6 (EU835732.1)	16S rRNA F: 99%, R: 96%

Table 4. Identification of isolated strains from site A of a wild *Pinus koraiensis* community by 16S rRNA sequence analysis

Strain No.	Homologous microorganism	16S rRNA % identity
B-27-1	<i>Pseudomonas</i> sp. PR1-3 (FJ889637.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
B-27-2	<i>Bacillus cereus</i> Q1 (CP000227.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
B-27-3	<i>Arthrobacter woluwensis</i> strain CBU05/5295 (DQ317590.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
B-29-1	<i>Bacillus</i> sp. G3 (2009) (GQ402829.1)	16S rRNA F: 98%, R: 97%
B-29-2	<i>Pseudomonas</i> sp. PR1-3 (FJ889637.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
B-29-3	<i>Bacillus</i> sp. 210_24 (GQ199726.1)	16S rRNA F: 96%, R: 93%
B-31-1	<i>Bacillus cereus</i> Q1 (CP000227.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
B-31-2	<i>Pseudomonas</i> sp. PR1-3 (FJ889637.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
B-33-1	<i>Bacillus coagulans</i> strain C1H (GQ214131.1)	16S rRNA F: 98%, R: 97%
B-33-2	<i>Pseudomonas</i> sp. PR1-3 (FJ889637.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
B-33-3	<i>Chryseobacterium</i> sp. COLI2 (EF442766.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%

Table 5. Identification of isolated strains from site A of a wild *Quercus acutissima* community by 16S rRNA sequence analysis

Strain No.	Homologous microorganism	16S rRNA % identity
C-27-1	<i>Bacillus cereus</i> strain B1 (EU857430.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-27-2	<i>Pseudomonas putida</i> strain W30 (GQ303714.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
C-27-3	<i>Arthrobacter woluwensis</i> strain CBU05/5295 (DQ317590.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-29-1	<i>Pseudomonas putida</i> strain W30 (GQ303714.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
C-29-2	<i>Bacillus cereus</i> strain CICC10185 (AY842872.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
C-31-1	<i>Pseudomonas</i> sp. W15Feb9B (EU680989.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-31-2	<i>Bacillus cereus</i> strain CG-T2 (GQ342295.1)	16S rRNA F: 98%, R: 98%
C-33-1	<i>Arthrobacter woluwensis</i> strain CBU05/5295 (DQ317590.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-33-2	<i>Bacillus</i> sp. CCBAU 51490 (EF377314.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%

Table 6. Identification of isolated strains from site A of a wild *Alnus japonica* community by 16S rRNA sequence analysis

Strain No.	Homologous microorganism	16S rRNA % identity
D-27-1	<i>Pseudomonas</i> sp. PD 16 (DQ377757.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
D-27-2	<i>Enterobacter</i> sp. CCBAU 15492 (DQ988939.1)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
D-27-3	<i>Bacillus</i> sp. B18 (2008) (EU362164.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
D-29-1	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 (AP008957.1)	16S rRNA F: 98%, R: 98%
D-31-1	<i>Pseudomonas</i> sp. PD 16 (DQ377757.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
D-31-2	<i>Enterobacter cloacae</i> (AF157695.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
D-33-1	<i>Bacillus subtilis</i> strain SYH15 (GQ375788.1)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
D-33-2	<i>Pseudomonas</i> sp. PD 16 (DQ377757.1)	16S rRNA F: 99%, R: 99%

W30(C-27-2), *Arthrobacter woluwensis* strain CBU05/5295 (C-27-3), 29°C에서는 *Bacillus cereus* strain CICC10185 (C-29-1)와 *Pseudomonas putida* strain W30 (C-29-2), 31°C에서는 *Bacillus cereus* strain CG-T2 (C-31-1)와 *Pseudomonas* sp. W15Feb9B (C-31-2), 33°C에서는 *Bacillus* sp. CCBAU 51490 (C-33-1)와 *Arthrobacter woluwensis* strain CBU05/5295 (C-33-2), 각 온도별로 *Arthrobacter*, *Bacillus*속이 우점종으로 확인되었다.

마지막으로 오리나무(*Alnus japonica*)에서는 27°C에서 *Bacillus* sp. B18 (D-27-1)와 *Pseudomonas* sp. PD 16 (D-27-2), *Enterobacter* sp. CCBAU 15492 (D-27-3), 29°C에서는

Rhodococcus erythropolis PR4 (D-29-1), 31°C에서는 *Enterobacter cloacae* (D-31-1)와 *Pseudomonas* sp. PD 16 (D-31-2), 33°C에서는 *Bacillus subtilis* strain SYH15 (D-33-1)와 *Pseudomonas* sp. PD 16 (D-33-2), 각 온도별로 *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*속의 4종의 우점종이 고루 확인되었다.

고 찰

본 연구는 가속화하고 있는 지구온난화에 따른 기온상

승에 대해 한국자생수목인 소나무, 잣나무, 상수리나무, 오리나무의 뿌리에 서식하는 토양미생물 우점종이 어떻게 변화하는가를 측정하기 위해 실시한 실험으로 실온에서 최대 +6°C까지 조절할 수 있는 온실 house에서 실험을 실시하였다. 따라서 한국의 6월 평균기온인 27°C를 기준으로하여 각각 2°C씩 온도가 상승한 비닐하우스를 제작하였다. 즉, 실온인 27°C, 29°C(실온+2°C), 31°C(실온+4°C), 33°C(실온+6°C)로 setting 해놓은 4개의 site에서 1년 이상 생장해온 소나무, 잣나무, 상수리나무, 오리나무의 토양미생물을 screening하여 colony counting을 통하여 각 site에서 우점종을 선별한 뒤 16S rRNA 분석에 의해 동정하였고, 그 결과 *Bacillus*속 10종, *Enterobacter*속 2종, *Pseudomonas*속 4종, *Arthrobacter*속 1종, *Chryseobacterium*속 1종, *Rhodococcus*속 1종 등 총 19종을 동정하였다.

실험결과, 잣나무를 제외한 나머지 수목의 토양미생물은 우점종의 변화가 뚜렷하게 발견되지 않았다. 하지만 일부 미생물들이 온도가 증가하면서 개체수(colony)가 증가하거나 또는 감소하는 경향을 보였다. 소나무의 *Enterobacter*속 미생물과 상수리나무의 *Arthrobacter*속 미생물은 온도가 증가함에 따라 개체수가 소폭 증가하는 경향을 보였다. 이는 차후 더 높은 온도에서 추가 실험을 통하여 온도가 *Enterobacter*속과 *Arthrobacter*속 미생물의 개체수 증가에 미치는 영향에 대해 확인하는 연구가 필요 할 것으로 사료된다. 특히 *Enterobacter*속 미생물은 장내세균과에 속하는 그람음성간균으로 물, 토양, 분변 등 일상생활 중 흔히 접할 수 있는 환경에 분포하고 있으며, 병원감염의 주요 원인균으로서 사람에서 가장 흔히 질병을 일으키는 병원체로 알려져 있기 때문에 주목해야 할 필요가 있다고 생각된다(Sanders and Sanders 1997; Abbott 1999). 뿐만 아니라 *Arthrobacter*속 미생물은 난분해성 물질인 glyphosate, methyl tert-butyl ether, 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D), L-nicotine, 4-nitrophenol, dimethylsilanediol, fluorine, phthalate, nitroglycerine, s-triazine 등을 대사 분해하는 중요한 미생물이며(Lee et al. 2003; Chang et al. 2007), 특히 *Arthrobacter*속 미생물은 담배 식물 주위에 서식하면서, L-nicotine을 식물이 성장 에너지원으로 이용할 수 있도록 catabolic plasmid pA01을 이용하여 carbon, nitrogen 및 다양한 에너지원으로 분해하는 중요한 토양미생물 자원이기 때문에 온도 상승에 따른 *Arthrobacter*속 미생물의 개체수 증가를 나타낸 본 연구의 결과는 토양미생물 분야에 유용한 데이터를 제공할 것으로 사료된다(Brandsch 2006). 한편, 잣나무에서만 유일하게 우점종의 변화가 뚜렷하게 발견되었는 바, *Chryseobacterium*속의 미생물은 33°C의 온도에서 새롭

게 출현하여 많은 개체수로 우점종을 차지하였다. 이 미생물은 spore를 형성하지 않은 rod모양의 그람음성세균이고, colony는 yellowish, circular이고 shiny를 띠며, nutrient agar 25~30°C에서 잘 자라고, 5°C에서도 자라지만 42°C 이상에서는 자라지 않는 토양 미생물이다(Dunbar et al. 1999; Mantelin and Touraine 2004).

결론적으로, 이번 연구를 통하여 지구온난화로 인한 기온상승으로 토양미생물의 우점종 변화의 가능성을 확인하였다. 한국의 대표적인 자생수목인 소나무, 잣나무, 상수리나무, 오리나무의 뿌리에 서식하는 토양미생물들은 온도의 증가에 따라 개체수의 증감을 보였고, 새롭게 출현하는 우점종이 발견되는 등 온도변화에 의한 토양미생물 우점종 변화의 가능성을 충분히 보여주었다. 본 실험의 데이터를 기초로하여 보다 더 높은 온도에서의 추가적인 실험을 실시하여 토양미생물의 최종적인 우점종 변화를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

적 요

식물과 그 식물의 근권미생물과의 협력관계는 이미 오래전부터 관심을 받아왔고 지구 기후변화에 따라 식물과 그 근권미생물의 생태 및 지구환경에 대한 적응성은 막대한 지장을 받을 것으로 생각되어 왔다. 따라서 지구온난화에 따라 식물뿌리에 서식하는 근권미생물인 토양미생물의 우점종이 어떻게 변화하는지에 대해 규명하고자 본 실험을 실시하였다. 우선 한국 식물생태계의 대표종인 소나무(A), 잣나무(B), 상수리나무(C), 오리나무(D)를 선발하여 각각 실온인 27°C와 29°C(실온+2°C), 31°C(실온+4°C), 33°C(실온+6°C)에서 1년 이상 성장시킨 후 이들의 뿌리토양을 무균적으로 채취하여 미생물 screening법과 colony counting을 통하여 각각의 군에서 우점종을 선별한 뒤 16S rRNA 분석에 의해 이들 각각의 우점종을 동정하였다. 그 결과 소나무 27°C에서는 *Bacillus cereus*와 *Enterobacter* sp. CCBAU 15492, 소나무 29°C에서는 *Bacillus* sp. 210_64와 *Enterobacter* sp. CCBAU 15492, 소나무 31°C에서는 *Bacillus* sp. 210_64와 *Enterobacter ludwigii*, 소나무 33°C에서는 *Bacillus* sp. 210_64와 *Enterobacter* sp. CCBAU 15492, *Bacillus marisflavi* strain DS6이 검출되었고, 잣나무 27°C에서는 *Bacillus cereus* Q1, *Pseudomonas* sp. PR1-3, *Arthrobacter woluwensis* strain CBU05/5295, 잣나무 29°C에서는 *Bacillus* sp. G3, *Pseudomonas* sp. PR1-3, *Bacillus* sp. 210_24, 잣나무 31°C에서는 *Bacillus cereus* Q1, *Pseudomonas* sp. PR1-3, 잣나무 33°C에서는 *Bacillus coagulans* strain, *Pseudomo-*

nas sp. PR1-3, *Chryseobacterium* sp. COLI2, 상수리나무 27°C에서는 *Bacillus cereus* strain B1, *Pseudomonas putida* strain W30, *Arthrobacter woluwensis* strain CBU05/5295, 상수리나무 29°C에서는 *Bacillus cereus* strain CICC10185, *Pseudomonas putida* strain W30, 상수리나무 31°C에서는 *Bacillus cereus* strain CG-T2, *Pseudomonas* sp. W15Feb9B, 상수리나무 33°C에서는 *Bacillus* sp. CCBAU 51490, *Arthrobacter woluwensis* strain CBU05/5295, 오리나무 27°C에서는 *Bacillus* sp. B18, *Pseudomonas* sp. PD 16, *Enterobacter* sp. CCBAU 15492, 오리나무 29°C에서는 *Rhodococcus erythropolis* PR4, 오리나무 31°C에서는 *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* sp. PD 16, 오리나무 33°C에서는 *Bacillus subtilis* strain SYH15, *Pseudomonas* sp. PD 16을 우점종으로 동정하였다.

이 중 소나무는 33°C에서 *Bacillus marisflavi* strain DS6가 27~31°C에서는 발견되지 않다가 온도가 상승함에 따라 출현한 새로운 우점종으로 나타났고 잣나무에서는 27°C에서 *Bacillus cereus* Q1, 29°C에서는 *Bacillus* sp. G3, 31°C에서는 *Bacillus cereus* Q1 등의 *Bacillus*속이 주요 우점종으로 나타났으나 온도가 가장 많이 상승한 33°C에서는 *Chryseobacterium* sp. COLI2으로 우점종이 변한 것을 확인하였다. 본 실험은 차후 더 다양한 온도에서의 토양미생물 우점종 변화에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며 이들 연구결과들이 연계되어 지구온난화와 미생물의 관계, 그리고 새롭게 출현한 토양미생물과 식물간의 관계를 규명하는데 도움이 되는 데이터가 도출 될 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임 (2009-0093828)

참 고 문 헌

- 김윤식, 고성철, 오병운. 1981. 한국식물의 분포도에 관한 연구(V). 참나무과의 분포도. 고려대학교 이론공집. pp.93-133.
- 산림청. 1999. 산림입지조사요령.
- 임업연구원. 1999. 소나무 소나무림. 임업연구원.
- 정태현, 이우철. 1965. 한국삼림식물대 및 적지적수론. 성균관대학교논문집. 10:329-435.
- Abbott S. 1999. *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia*. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology Press., Washington D.C. pp. 475-482.
- Amin El, HS Hanson, B Petterson, B Petrini and LV Von Stedingk. 2000. Identification of non-tuberculous mycobacteria: 16S rRNA gene sequence analysis vs. conventional methods. Scand J Infect Dis 32:47-50.
- Brandsch R. 2006. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69:493-498.
- Chang HW, JW Bae, YD Nam, HY Kwon, JR Park, KS Shiin, KH Kim, ZX Quan, SK Rhee, KG An and YH Park. 2007. *Arthrobacter subterraneus*. sp. nov., isolated from deep subsurface water of the south coast of Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 17:1875-1879.
- Choi MY. 2003. Microbial Diversity on an Industrialized and Agricultural District. Department of Biotechnology and Chemical Engineering Graduate School Yosun National University. pp.2-3.
- Dunbar J, S Takara, SM Barns, JA Davis and CR Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. Appl. Environ. Microbiol. 65:1662-1669.
- Houghton J. 2007. Global Warming. Hanul Academy.
- Kuroyanagi M, M Simomae, Y Nagashima, M Muto, T Okuda, N Kawahara, T Nakane and T Sano. 2005. New diarylheptanoids from *Alnus Japonica* and their antioxidative activity. Chem. Pharm. Bull. 53:1519-1523.
- Lee JS, KC Lee and Bae KS. 2003. *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1277-1280.
- Mantelin S and B Touraine. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. J. Exp. Bot. 55:27-34.
- Sanders WE Jr. and CC Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin. Microbiol. Rev. 10:220-241.
- Xu Z, H Dai and X Li. 1986. Rational management of broad-leaved *Pinus Koraiensis* (korean pine) forest and improvement of woodland productivity in north-east China. The Temperate Forest Ecosystem. Institute of Terrestrial Ecology. National Environment Research Council. pp.59-67.
- Yoon SY. 2008. Microbiological Diversity of Highland and Development of Biological Assessment Technology. Rural Development Administration. pp.1-3.