

온도변화에 기인한 토양세균 우점종의 변화에 관한 연구 II

박갑주 · 이병철 · 김수영 · 박찬선¹ · 조명환*건국대학교 이과대학 생명과학부, ¹국립목포대학교 해양자원학과Dominant-strains Variation of Soil Microbes by
Temperate Change IIKap Joo Park, Byeong Chol Lee, Soo Young Kim, 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 rhizobacteria, 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 strains: *Pinus densiflora*, *Pinus koraiensis*, *Quercus acutissima*. 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: 24 strains of *Bacillus*, 6 *Paenibacillus* strains, 1 *Pseudomonas* strains. Among these genera, the dominant strains in *Pinus densiflora* was discovered in the same genus. Additionally, those of *Pinus koraiensis* and *Quercus acutissima* changed in both genus and strains which changed into the *Bacillus* genus from the *Paenibacillus* genus at 33°C.

Key words : global warming, rhizobacteria, dominant-strains change

서 론

기후변화와 지구온난화는 현시대의 정치적 의제로 떠

오르고 있다. 그 중에서 가장 이슈가 되고 있는 문제가 바로 지구온난화이다. 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 토양세균에 초점을 맞추었다. 토

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

양세균은 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, 토양세균은 토양 내 다양한 종류의 생물들과의 상호 작용을 통하여 안정된 생태계를 유지하려는 기능을 갖고 있다. 예를 들어 식물 뿌리와의 공생관계, 뿌리 분비물에 의한 세균의 생장 조절, 식물의 병원체로서의 작용과 세균 개체군간의 경쟁 등이 그 예라 할 수 있다. 또한, 세균은 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 잠재가치를 가진 것으로 인정되고 있다 (Choi 2003).

그러나 토양세균 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 세균 중의 수 %만을 반영하는 등 어려움이 많은 특징이 있다 (Yoon 2008).

모든 생물들의 생존은 그 서식지의 환경에 영향을 받게 마련이다. 토양세균들의 경우도 그 생존은 환경과 밀접한 관련이 있다고 단정할 수 있을 것이다. 그 환경 요인들은 매우 다양하지만 기상조건(기온, 강수량, 일조시수), 식생, 토양조건(이화학적) 등에 영향을 받는다. 따라서 본 연구는 심각하게 진행되고 있는 지구온난화가 다양한 토양세균의 삶에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해 한국의 식물생태계에서 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 대표종인 소나무(A), 잣나무(B), 상수리나무(C)를 선발하여 이들 뿌리의 근권세균이 온도변화에 따라 그 우점종에 어떤 변화를 나타내는지 조사하였다. 소나무(*Pinus densiflora*)는 우리나라, 중국 동북지방의 압록강 연안, 산둥반도 그리고 일본의 시코쿠, 큐슈, 혼슈 등 북위 37~38° 사이에서 가장 많이 나타나는 수종으로, 온도와 수분에 폭넓은 적응성을 가지고 있어 소나무 숲은 능선과 같은 건조한 척박지 등에서도 쉽게 군집을 이루기 때문에 한국, 만주 일본에 분포하는 구과식물의 대표적인 경제 수종으로 자리매김하고 있다(임업연구원 1999). 잣나무(*Pinus koraiensis*)는 전 세계의 100여종 소나무속 수종 가운데 유일하게 한국산이라는 종명을 가진 우리나라의 주요한 조림수종으로 우리나라뿐만 아니라 시베리아의 동북부, 만주 및 일본의 몇 곳에 분포하고 있다

(Xu *et al.* 1986). 1920년대부터 인공 식재되기 시작한 잣나무림의 조성면적은 45만 ha에 이르고 있으며 전체 조림면적의 32%, 남한 전체 산림면적의 7%를 차지하는 한국제일의 경제수종이다(산림청 1999). 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). 따라서 한국의 식물생태계에서 중요한 위치를 차지하고 있는 이들 3종의 한국 대표 수목을 이용하여 지구의 온도 상승에 따라 이들 3종 식물의 뿌리에 거주하고 있는 토양세균의 우점종이 어떻게 변화하는지에 대한 연구를 실시하였다. 본 실험은 2009년 8월에 시행되었던 1차 실험과 연계되어 2010년 8월에 시행된 2차 실험에 대한 논문이다.

재료 및 방법

1. 토양시료 준비

본 실험에 사용된 토양시료는 건국대학교 과학관 주변의 숲에서 채취하였고 실험에 사용된 식물로는 한국을 대표하는 4개의 자생수목인 소나무(4년생), 잣나무(8년생), 상수리나무(4년생)를 사용하였다. 소나무와 상수리나무는 국립산림품종관리센터에서 2006년 10월에 분양받아 배양토에 파종한 후 포장에서 생육한 개체이며, 잣나무는 2003년 11월 국립산림품종관리센터에서 분양받아 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, 상수리나무를 각각 A, B, C로 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 19개월간 비닐하우스에서 성장하였고 2010년 8월 각각의 비닐하우스의 토양을 채취하여 토양세균을 채취하는 시료로 사용하였다.

이때 각각의 균은 27°C의 비닐하우스에서 성장시킨 소나무의 토양세균균을 A-27, 29°C에서 성장시킨 소나무의 토양세균균을 A-29, 31°C에서 성장시킨 소나무의

토양세균균을 A-31, 33°C에서 성장시킨 소나무의 토양 세균균을 A-33으로 표시하였고, 27~33°C의 비닐하우스에서 성장시킨 잣나무의 토양세균균을 각각 B-27, B-29, B-31, B-33, 27~33°C의 비닐하우스에서 성장시킨 상수리나무의 토양세균균을 각각 C-27, C-29, C-31, C-33으로 구분하였다. 이들 총 12개의 균에서 각각 3번씩 총 36개의 토양시료를 채취하였다. 토양시료를 채취하였을 때의 비닐하우스 외부 실온은 27°C였으며, 모종삽을 이용하여 수목 뿌리 주변의 깊이 5 cm 이상의 토양을 채취하였고, 채취 시에는 멸균된 모종삽과 멸균된 sample 수거용 위생팩을 사용하였다.

2. 사용 배지 및 시약

토양세균 균주의 배양을 위하여 Nutrient-Agar (NA; Difco Inc., USA)배지 및 Nutrient Broth (NB; Difco Inc., USA)배지를 사용하였다. 균주의 보존은 NB에 glycerol이 20% 되도록 조성하여 사용하였으며 -70°C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다. Genomic DNA의 추출 및 정제를 위해 G-spin™ Genomic DNA extraction kit (iNtRON Inc., USA)을 사용하였고, DNA 정제를 위하여 QIAquick®PCR purification kit250 (QIAGEN, USA)을 사용하였으며, DNA 분자의 전기영동확인을 위해 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, USA)를 marker로 사용하였고 Ethidium bromide (Sigma Inc., USA) 및 Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega Inc., USA)를 사용하였다.

3. 토양세균 분리

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

4. Genomic DNA 분리

분리 균주의 genomic DNA는 G-spin™ Genomic DNA extraction kit (iNtRON Inc., USA)를 사용하여 분리하였

Table 1. The sequence of 16S 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

다. NA배지에 도말한 균주를 바늘로 채취하여 100 µL의 3차 증류수가 담겨있는 micro test tube에 희석하였다. 그리고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 뒤 상등액을 버리고 침강된 균체를 회수하였다. 이 균체는 kit의 실험 방법을 거친 후 순수한 genomic DNA를 얻어내었다.

5. Genomic DNA를 주형으로 한 PCR

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 증폭시킨 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/r*를 각각 1 µL씩 분주한 후 Ultra D.W 16 µL, 준비된 genomic DNA 2 µL를 분주하여 PCR을 실시하였다. PCR을 진행한 후 PCR product의 증폭 여부를 확인하기 위해 1.5% agarose gel에서 전기영동 (110 V, 30 min)을 실시하였다. PCR에는 16S ribosomal DNA primer를 사용하였고 sequence는 Table 1에 나타내었다.

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

PCR product에서 sample의 순수 DNA를 분리하기 위하여 QIAquick®PCR purification kit250 (QIAGEN, USA)을 사용하여 PCR product를 정제하였다. 이 과정은 kit의 실험방법을 거친 후 정제된 DNA를 얻어냈다. 정제된 순수 DNA는 전기영동을 통해 최종 확인하였다.

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

전기영동으로 확인된 정제된 PCR product는 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)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 세균을 동정하였다. 이로써 분리한 세균이 어떤 종에 속하는지 알아낼 수 있게 되었으며 우점종을 파악하였다.

결 과

1. 토양세균의 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-33으로 군분류한 총 12개의 군에서 각각 3번씩 총 36개의 토양시료를 채취하였다. 채취된 시료들은 멸균된 증류수를 이용하여 10^{-1} ~ 10^{-6} 까지 계단희석하였고 각각의 희석된 sample들을 NA배지(Difco Inc., USA)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 바늘로 채취하여 LB배지(Bacto Inc., USA)에서 37°C, 20시간 배양하였다. 배양된 균을 다시 NA배지(Difco Inc., USA)에 희석도말하여 하나의 균종인지 확인한 후 균주의 동정을 실시하였다. 이때 A-27군과 A-29군, A-31군에서는 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-33군에서는 3개의 우점종균이 검출되어 A-33-1, A-33-2, A-33-3라 명명하였다. B-27군과 B-29군, B-31군에서는 각각 3개의 우점종균이 검출되어 이들을 각각 B-27-1, B-27-2, B-27-3, B-29-1, B-29-2, B-29-3, B-31-1, B-31-2, B-31-3이라 명명하였고, B-33군에서는 2개의 우점종균이 검출되어 각각 B-33-1, B-33-2이라 명명하였다. C-27군에서는 3개의 우점종균이 검출되어 C-27-1, C-27-2, C-27-3이라 명명하였고, C-29군에서는 2개의 우점종균이 검출되어 C-29-1, C-29-2라 명명하였고, C-31군에서는 4개의 우점종이 검출되어 C-31-1, C-31-2, C-31-3, C-31-4라 명명하였고, C-33군에서는 2개의 우점종이 검출되어 C-33-1, C-33-2라 명명하였다.

2. Genomic DNA 추출, 정제 및 PCR 결과

일반적인 세균 동정은 크게 두 가지 방법으로 이루어

진다. 그 중 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 염기서열 확인을 통한 균 동정법이다. 본 실험의 경우 DNA 염기서열 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 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 확인하였다.

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

동정 결과 각 site에서 검출된 세균은 총 3개 속 31개 균주로 확인 후 그 결과를 Tables 2~4에 나타내었다.

소나무 (*Pinus densiflora*) 27°C에서는 *Bacillus* sp.와 *Bacillus ginsengihumi*, 소나무 29°C에서는 *Bacillus* sp.와 *Bacillus ginsengihumi*, 소나무 31°C에서는 *Bacillus* sp.와 *Bacillus ginsengihumi*, 소나무 33°C에서는 *Bacillus* sp.와 *Bacillus ginsengihumi*, *Bacillus arbutinivorans*가 각각 우점종으로 확인되어 각 온도별로 *Bacillus*속이 우점종임이 확인되었다.

잣나무 (*Pinus koraiensis*) 27°C에서는 *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Bacillus altitudinis*, 잣나무 29°C에서는 *Bacillus* sp., *Paenibacillus tundrae*, *Bacillus flexus*, 잣나무 31°C에서는 *Paenibacillus tundrae*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, 잣나무 33°C에서는 *Bacillus* sp. cp-h57, *Bacillus ginsengihumi*, 각 온도별로 *Paenibacillus*와 *Bacillus*속이 우점종으로 확인되었다.

Table 2. 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</i> sp. BBAR-01d (FJ217187)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
A-27-2	<i>Bacillus ginsengihumi</i> strain BS-2 (GQ262731)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
A-29-1	<i>Bacillus</i> sp. YX (DQ883446)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
A-29-2	<i>Bacillus ginsengihumi</i> strain BS-2 (GQ262731)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
A-31-1	<i>Bacillus</i> sp. YX (DQ883446)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
A-31-2	<i>Bacillus ginsengihumi</i> strain BS-2 (GQ262731)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
A-33-1	<i>Bacillus</i> sp. YX (DQ883446)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
A-33-2	<i>Bacillus ginsengihumi</i> strain BS-2 (GQ262731)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
A-33-3	<i>Bacillus arbutinivorans</i> strain BQN3L-02d	16S rRNA F: 100%, R: 96%

Table 3. 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>Bacillus</i> sp. B02 (2010) (HM209345)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
B-27-2	<i>Paenibacillus</i> sp. B2 (2008) (EU876668)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
B-27-3	<i>Bacillus altitudinis</i> strain 124YG55YY12 (FJ174661)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
B-29-1	<i>Bacillus</i> sp. J5 (EU372974)	16S rRNA F: 99%, R: 97%
B-29-2	<i>Paenibacillus tundrae</i> strain Ab10b (EU558284)	16S rRNA F: 100%, R: 97%
B-29-3	<i>Bacillus flexus</i> strain JMC-UBL 24 (HM451429)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
B-31-1	<i>Bacillus megaterium</i> strain TOBCMDU-1 (GU048867)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
B-31-2	<i>Paenibacillus tundrae</i> strain Ab10b (EU558284)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
B-31-3	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SL2 (GQ184581)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
B-33-1	<i>Bacillus</i> sp. cp-h57 (EU584550)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
B-33-2	<i>Bacillus ginsengihumi</i> strain BS-2 (GQ262731)	16S rRNA F: 100%, R: 99%

Table 4. 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>Paenibacillus pabuli</i> strain CSB13 (FJ189798)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-27-2	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> strain TGX5E (GU830879)	16S rRNA F: 100%, R: 100%
C-27-3	<i>Bacillus</i> sp. DU89 (2010) (HM567146)	16S rRNA F: 98%, R: 97%
C-29-1	<i>Paenibacillus pabuli</i> strain CSB13 (FJ189798)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-29-2	<i>Bacillus ginsengihumi</i> strain BS-2 (GQ262731)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-31-1	<i>Bacillus</i> sp. GIMN1.006 (HM212416)	16S rRNA F: 100%, R: 99%
C-31-2	<i>Bacillus</i> sp. NII-45 (FJ897470)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-31-2	<i>Bacillus</i> sp. J5 (EU372974)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-31-2	<i>Pseudomonas</i> sp. MI-o1 (DQ180954)	16S rRNA F: 99%, R: 98%
C-33-1	<i>Bacillus</i> sp. J5 (EU372974)	16S rRNA F: 99%, R: 99%
C-33-2	<i>Bacillus</i> sp. NII-45 (FJ897470)	16S rRNA F: 99%, R: 98%

상수리나무(*Quercus acutissima*)에서는 27°C에서 *Paenibacillus pabuli*, *Paenibacillus rhizosphaerae*, *Bacillus* sp., 상수리나무 29°C에서는 *Paenibacillus pabuli*, *Bacillus ginsengihumi*, 상수리나무 31°C에서는 *Bacillus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., 상수리나무 33°C에서는 *Bacillus* sp., *Bacillus* sp., 각 온도별로 *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*속이 우점종으로 확인되었다.

고찰

본 연구는 가속화하고 있는 지구온난화에 따른 기온 상승에 대해 한국자생수목인 소나무, 잣나무, 상수리나무의 뿌리에 서식하는 토양세균 우점종이 어떻게 변화하는가를 측정하기 위해 실시한 실험으로 실온에서 최대 +6°C까지 조절할 수 있는 온실에서 실험을 실시하였다. 따라서 한국의 6월 평균기온인 27°C를 기준으로 하여 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 성장

해온 소나무, 잣나무, 상수리나무의 토양세균을 외형과 클로니 계수법을 통하여 각 군에서 우점종을 선별한 뒤 16S rRNA 분석에 의해 동정하였고, 그 결과 *Bacillus*속 24군주, *Paenibacillus*속 6군주, *Pseudomonas*속 1군주 등 총 31군주를 동정하였다.

실험결과, 소나무 27°C에서는 *Bacillus* sp.이 우점종으로 확인되었지만 온도가 상승함에 따라 개체수가 감소하는 경향을 나타내었고 33°C에서는 *Bacillus arbutinivorans*가 27~31°C에서는 발견되지 않다가 온도가 상승함에 따라 출현한 새로운 우점종으로 나타났다. 잣나무와 상수리나무에서는 온도가 증가함에 따라 전체적인 개체수(colony)가 감소하는 경향을 보였고, *Paenibacillus*속에서 *Bacillus*속으로 우점종이 변화하는 것이 관찰되었다. 또한 잣나무 31°C에서는 *Bacillus licheniformis*가 새로운 우점종으로 나타났다. 전체적으로 *Bacillus*속이 우점종으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 토양 내 *Bacillus*속은 토양중의 축적된 인산을 효과적으로 작물에 흡수 이용될 수 있도록 하여 인산 시비량을 감소시키고 이용율을 높여주는 역할을 하는 대표적인 인산가용화 미생물이다(좌 등 2007). 인산가용화균을 가지고 고정된 인산염

의 유리화를 통하여 식물에 이용하려는 연구는 많이 이루어져 *Bacillus*, *Pseudomonas*속 등의 인산염가용화 우수 균을 biofertilizer로 사용했을 때 작물의 생산량이 증가한다는 보고가 있다(Caroline 1994; Illmer *et al.* 1995). 또한 *Bacillus*속의 *B. megaterium*종은 길항작용을 가지고 있어 미생물 농약으로 쓰이고 있다. 최근 화학 농약의 대체방안으로 생물농약이 대두되고 그 중 미생물의 길항작용(Davison 1988; Lee *et al.* 1995)을 이용하여 생태학적으로 병원균의 활동을 억제하며 근권토양 중 식물 병원균에 대한 길항미생물 분포나 밀도를 증가시키는 미생물농약이 출현하였다. 미생물농약의 길항기작은 항생물질에 의한 항생작용(Kim 1994; Kim and Kim 1994; Kim *et al.* 2000), siderophore를 통한 Fe^{+3} 에 대한 경쟁적 길항작용을 하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.* 1999; Lim *et al.* 2002).

이번 연구에서는 대부분의 온도에서 우점종이 *Bacillus*속으로 귀결되는 것이 관찰되었다. 이는 1년 전 선행 실험의 결과와는 다른 양상이다. 선행 실험에서는 *Bacillus*속 10균주, *Enterobacter*속 2균주, *Pseudomonas*속 4균주, *Arthrobacter*속 1균주, *Chryseobacterium*속 1균주, *Rhodococcus*속 1균주 등 총 19개의 균주가 관찰되어 우점종의 다양성을 확인 할 수 있었다. 그러나 이번 실험에서는 관찰된 31개의 균주 중 24개의 균주가 *Bacillus*속이라는 것을 감안하면 많은 변화가 있다는 것을 알 수 있다. 이번 연구를 통하여 지구온난화로 인한 기온상승으로 토양세균의 우점종 변화의 가능성을 확인하였다. 한국의 대표적인 자생수목인 소나무, 잣나무, 상수리나무의 뿌리에 서식하는 토양세균들은 온도의 증가에 따라 개체수의 증감을 보였고, 새롭게 출현하는 우점종이 발견되는 등 온도변화에 의한 토양세균 우점종 변화의 가능성을 충분히 보여주었다. 본 실험의 데이터를 기초로 하여 보다 더 높은 온도에서의 추가적인 실험을 실시하여 토양세균의 최종적인 우점종 변화를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

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 연

- 구(V). 참나무과의 분포도. 고려대학교 이론공집. pp. 93-133.
- 산림청. 1999. 산림입지조사요령. pp.24-25.
- 임업연구원. 1999. 소나무 소나무림. 임업연구원. pp.192-203.
- 좌재호, 임한철, 한승갑, 전승중, 서장선. 2007. 감귤원 토양에서 분리한 인산염 가용화 미생물 *Bacillus sphaericus* PBS-13의 특성. 한국토양비료학회지. 40:405-411.
- 정태현, 이우철. 1965. 한국삼림식물대 및 적지적수론. 성균관대학교논문집. 10:329-435.
- 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.
- Caroline C. 1994. Field studies on two rock phosphate solubilizing actinomycete isolates as biofertilizer sources. Environmental Management 18:263-269.
- 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.
- Davison J. 1988. Plant beneficial bacteria. Biotechnology 6: 282-286.
- Houghton J. 2007. Global Warming. Hanul Academy. pp. 236-238.
- Illmer P and F Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27:257-263.
- Kim HR. 1994. Antifungal antibiotic of antagonistic bacterium *Bacillus* sp. YH-16 against *Fusarium solani* causing plant root-rot. Department of applied microbiology. Graduate school. Yeungnam University. 26:86-87.
- Kim KK, JG Kang, SS Moon and KY Kang. 2000. Isolation and identification of antifungal *N*-butylbenzylsulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. J. Antibiotics. 53:131-136.
- Kim YS and SD Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. J. Microbiol. Biotech. 4:296-304.
- Lee EJ, KS Kim, SH Hong and JH Ha. 1995. The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. Against *Fusarium solani* causing planar root-rot disease. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:91-97.
- Lee JM, HS Lim, TH Chang and SD Kim. 1999. Isolation of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root-rot disease. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech. 27:427-432.
- Lim HS, JM Lee and SD Kim. 2002. A plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20-mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol

- efficacy. J. Microbiol. Biotech. 12:240-249.
- Yoon SY. 2008. Microbiological Diversity of Highland and Development of Biological Assessment Technology. Rural Development Administration. pp. 1-3.
- 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.
- Manuscript Received: July 8, 2011
Revision Accepted: August 12, 2011
Responsible Editor: Seung-Bum Kim