

보 문

## 조릿대 대나무림 토양 내 방선균군집의 계통학적 특성

이효진<sup>1</sup> · 한송이<sup>2</sup> · 황경숙<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>목원대학교 미생물생태자원연구센터, <sup>2</sup>목원대학교 미생물나노소재학과

### Phylogenetic characteristics of actinobacterial population in bamboo (*Sasa borealis*) soil

Hyo-Jin Lee<sup>1</sup>, Song-Ih Han<sup>2</sup>, and Kyung-Sook Whang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

(Received February 17, 2016; Revised March 22, 2016; Accepted March 22, 2016)

**ABSTRACT:** In this study, a pyrosequencing was performed and analyzed to verify the phylogenetic diversity of actinomycetes in the bamboo (*Sasa borealis*) soil as a base study to obtain the genetic resources of actinomycetes. It was found that the rhizosphere soil had much various distribution in bacterial communities showing a diversity of 8.15 with 2,868 OTUs, while the litter layer showed a diversity of 7.55 with 2,588 OTUs. The bacterial community in the bamboo soil was composed of 35 phyla and the predominant phyla were *Proteobacteria* [51-60%], *Bacteroidetes* [16-20%], *Acidobacteria* [4-16%] and *Actinobacteria* [4-14%]. In particular, *Actinobacteria* including *Micromonosporaceae* and *Streptomycetaceae* had a diverse distribution of actinomycetes within the six orders, 35 families and 121 genera, and it was characterized that about 83% of actinomycetes within *Actinomycetales* belonged to the 28 families. Among the dominant actinobacterial populations, *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* and *Streptomycetaceae* were representative family groups in the bamboo soils.

**Key words:** *Actinomycetales*, actinobacterial diversity, bamboo (*Sasa borealis*), pyrosequencing

다양한 종류의 생리활성물질을 생산하는 방선균은 의약품, 농약, 식품, 환경 등 다양한 분야의 바이오산업에 활용되고 있는 유용한 미생물자원이다. 토양, 하천, 해양, 근권, 부엽토, 퇴비 등 자연생태계 내에 분포하는 방선균 다양성 확보를 위해 많은 연구가 활발히 진행되어 왔다(Miyadoh, 1993; Bérdy, 2005; Morales *et al.*, 2007; Jog *et al.*, 2012). 항생물질을 생산하는 방선균 탐색의 끊임없는 노력에도 불구하고 기지의 항생물질이 재차 분리되는 악순환이 이어지면서 방선균 분리법이 강력히 요구되었다. 많은 연구자들은 극한환경 등 다양한 생태계 내에 분포하는 신규 방선균 탐색을 성공적으로 수행해 왔다(Hayakawa, 2008; Olano *et al.*, 2009). 현재 LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature)과 세균 유전자 정보 데이터베이스인 RDP (Ribosomal Database Project)에는 56과(family) 338속(genus) 2423종(species)의 방선균이

등록 보고 되어있다. 우리나라의 경우, 농업유전자원정보센터(KACC)와 미생물자원센터(KCTC)에 등록된 방선균 표준균주는 총 65종으로 전체 방선균의 2.7%에 불과하다.

최근 분자생물학적 기법을 활용한 미생물생태학연구가 발달하면서 자연생태계 내 방선균군집 다양성 분석 및 항생물질 생성에 관여하는 유전자에 대한 접근이 이루어 지고 있다(Wanecke *et al.*, 2004; Morales, 2007; Sun *et al.*, 2010; Jog, 2012; Yadav *et al.*, 2013). Lee 등(2013)은 방선균 특이 primer를 이용하여 장수풍뎅이 유충분변 내에 15속 24종의 다양한 방선균이 존재하고 있음을 밝혔고, 항생물질 생산에 관여하는 유전자를 탐침유전자로 사용하여 이들의 발현 차이에 따라 신규 생리활성 물질을 생성하는 방선균을 탐색한 바 있다(Piepersberg, 1994; Cordovez *et al.*, 2015). 식물의 근권토양 내 서식하는 *Actinobacteria* 군집 다양성을 RT-PCR과 DGGE법을 이용하여 확인한 결과, *Nocardioides* 속, *Streptomyces* 속, *Mycobacterium* 속, *Rhodococcus* 속 그리고 *Actinoplanes*

\*For correspondence. E-mail: kswang@mokwon.ac.kr;  
Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

속 등 14속의 다양한 방선균이 분포한다고 보고한 바 있다 (Nimnoi et al., 2010).

공동연구자들은 국내 산림토양, 퇴비, 중금속 오염토양 그리고 약초 근권토양 등 다양한 환경으로부터 방선균을 수집해 왔다. 특히, 국내에 자생하는 왕대, 분죽, 조릿대 그리고 호마죽과 같은 다양한 대나무류 토양을 대상으로 방선균 밀도를 조사한 결과, 조릿대 대나무류(*Sasa borealis*) 토양의 경우  $2.7 \times 10^8$  CFU/g의 매우 높은 분포율을 나타내어 방선균 유전자원 탐색을 위한 우수한 서식처라고 보고한 바 있다 (Lee and Whang, 2010). 본 연구에서는 방선균 유전자원 확보를 위한 기반 연구를 수행하고자 대용량의 염기서열을 분석할 수 있는 차세대 염기서열분석(pyrosequencing) 기술을 이용해 조릿대 대나무류의 낙엽층과 근권토양 내 분포하는 주요 세균군집의 계통학적 특과 더불어 방선균군집의 계통학적 특성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 채취

전라남도 담양 죽녹원 내에 자생하고 있는 조릿대 대나무류의 낙엽층과 표층으로부터 약 15 cm 아래의 근권으로부터 토양 시료를 3반복으로 채취하였다. 채취한 토양시료는 polyethylene vinyl에 넣어 4°C에 보존한 후 24시간 이내에 실험하였다.

### 직접 DNA 추출 및 파이로시퀀싱 분석

토양시료로부터 genomic DNA 추출은 Takada와 Matsumoto (2004)의 bead beating 방법을 개량한 ISOIL kit (Nippon Kit Co.)를 이용하였다. 파이로시퀀싱 분석을 위해 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)을 이용하여 추출된 DNA의 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 정방향 프라이머는 V1-9F (5'-X-AC-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 역방향 프라이머는 V3-541R (5'-X-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 아가로스겔 전기영동을 통하여 약 500 bp 크기의 밴드를 확인한 후 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)로 정제하였다. 파이로시퀀싱분석은 GS FLX Titanium system (Roche)를 이용하여 Macrogen에서 실시하였다.

### 염기서열 분석

조릿대 낙엽층 및 근권토양 시료로부터 얻어진 염기서열 데이터는 GS FLX 소프트웨어(Roche)를 이용하여 염기서열

의 adaptor와 PCR primer 부위를 제거하고 Mothur 프로그램 (version 1.23.1)을 이용하여 분석하였다 (Schloss et al., 2009). 낮은 품질의 염기서열과 키메라는 PyroNoise algorithm (Quince et al., 2011)과 UCHIME를 이용해서 제거하였다 (Cole et al., 2009; Edgar et al., 2011). 최종 얻어진 서열들은 97% 유사도 수준에서 average neighbor algorithm 방법으로 OTUs (operational taxonomic units)를 결정하였다. 종 풍부도 지수(Chao1, ACE), 종 다양성 지수(Shannon) 등은 Mothur 프로그램을 통해 계산하였으며, 시료 간 OUTs의 상관관계는 Cytoscape (version 3.3) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 조릿대 대나무류 토양 내 종 풍부도 및 다양성 지수

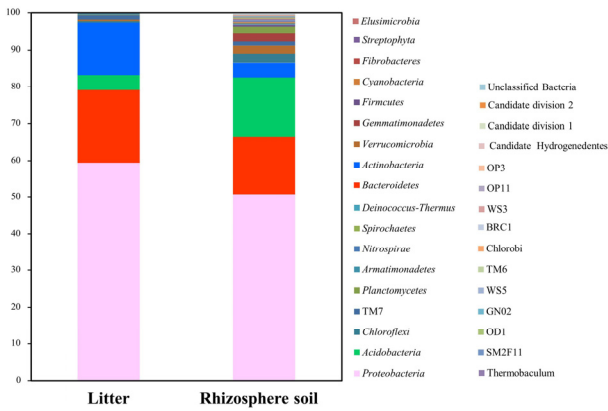
낙엽층 시료와 근권토양 시료로부터 추출한 DNA를 이용하여 PCR 증폭한 16S rRNA 유전자를 pyrosequencing 하고 각각 11,687개 염기서열로 normalization (평균길이 450 bp)하였다. 종 풍부도 추정치(Richness estimator)와 다양성 지수(Diversity index)를 비교하기 위하여 400 bp 이하의 염기서열과 계(kingdom) 수준에서 분류가 안된 염기서열들을 제거한 후 염기서열 유사도 97% 기준으로 cut-off 하였다. 낙엽층 시료의 경우 2,588 OTUs, 다양성 지수 7.55로 나타났으며, 근권토양 시료의 세균군집은 2,703 OTUs, 다양성 지수 7.98로 확인되어 근권토양 내에 더 다양한 세균군집이 균등하게 분포하고 있는 것으로 나타났다 (Table 1).

### 조릿대 대나무류 토양 내 주요 세균군집

낙엽층과 근권토양으로부터 확보된 16S rRNA 유전자 염기서열을 RDP's pipeline를 이용하여 계통해석 하였다. 낙엽층 내 세균군집은 19개 문으로 분류되었다. 전체 염기서열의 약 60.0%가 *Proteobacteria* 문이었으며, *Bacteroidetes* (20.0%), *Actinobacteria* (14.1%) 그리고 *Acidobacteria* (4.1%)가 4% 이상 차지하는 주요군집으로 확인되었다. 근권토양 내에는 20

**Table 1.** Diversity indexes for the bacterial populations determined from bamboo (*Sasa borealis*) soil

Soil sample	Total sequencing reads	No. of OTUs	Chao1 richness	Ace richness	Shannon index
Litter	11,687	2,588	8936.5	18320.2	7.55
Rhizosphere soil	11,687	2,703	9645.6	28654.3	7.98



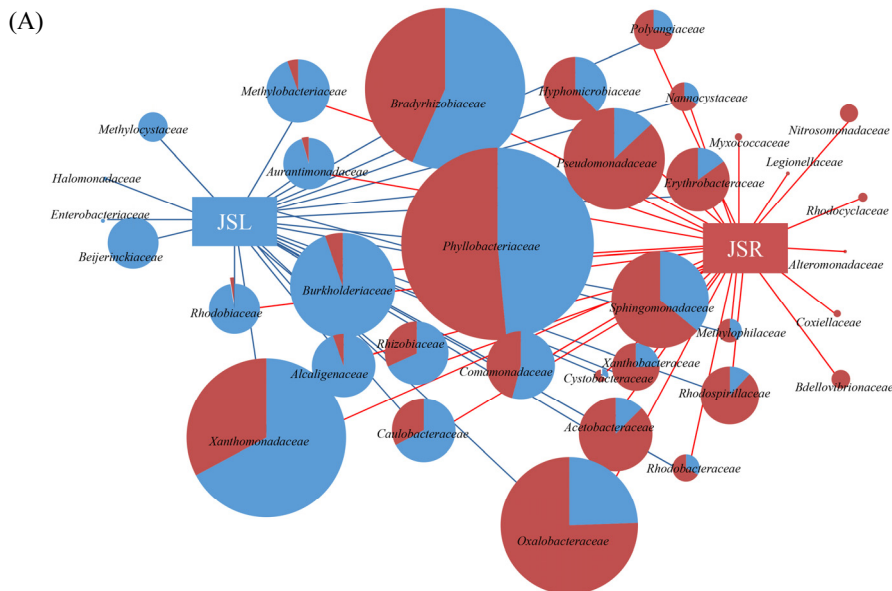
**Fig. 1.** Taxonomic composition by phylum for the 16S rRNA gene sequences retrieved from bamboo (*Sasa borealis*) soil.

개의 phyla와 15개의 미동정 phyla로 분류되었다. 근권토양의 경우도 *Proteobacteria* 문은 전체군집의 51%로 가장 높은 분포율을 나타내었으며, *Acidobacteria* (16.1%), *Bacteroidetes* (16.0%), *Actinobacteria* (4.0%)가 주요 계통군으로 확인되었다(Fig. 1). 이상의 결과로부터, 조릿대 대나무림 내 주요 세균군집은 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* 그리고 *Acidobacteria*로 확인되었다.

조릿대 대나무림 토양 내 주요 세균군집인 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* 그리고 *Acidobacteria* 계통군의 OTUs network 분석을 통해 낙엽층과 근권토양 내에 공통으로

분포하며 우점을 이루고 있는 세균군집의 토양간 상관관계를 조사하였다. 낙엽층과 근권토양 내에 약 50-60%를 차지하는 *Proteobacteria* 계통군의 상관관계를 조사한 결과, *Bradyrhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae* 그리고 *Commamonadaceae*는  $P < 0.017$ 의 높은 유의성을 나타내어 낙엽층과 근권토양에 변이가 크지 않은 주요 세균군집으로 평가되었다(Fig. 2A). 특히, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* 등을 포함하는 *Bradyrhizobiaceae*는 질소고정능이 있다고 보고된 바 있어(Whang, 2001), 토양 내에서 우점을 이루면서 질소의 물질 순환에 관여하는 것으로 판단되었다.

전체 세균군집의 16-20%를 차지하는 *Bacteroidetes* 계통군의 경우, *Chitinophagaceae*는 시료간  $P < 0.015$ 의 높은 유의성을 나타내어 낙엽층과 근권토양의 주요 세균군집으로 평가되었다. 이들 *Chitinophagaceae* 계통군에는 chitin 분해능이 탁월하여 토양전염성 식물병원균에 대한 길항효과가 있는 특징을 갖는 세균이 다수 포함되어 있다(Yasir et al., 2011). 낙엽층 시료는 *Sphingobacteriaceae*와 높은 상관관계를 나타내었으며, 근권토양은 *Cryomorphaceae*와 유연관계가 높은 특징을 나타내었다(Fig. 2B). 한편, *Acidobacteria* 계통군은 토양 시료간 유의성이 낮아 유전적 변이가 있는 계통군으로 평가되었다. 낙엽층 시료는 *Terriglobus*, *Edaphobacter*, *Acidicapsa* 그리고 *Granulicell*을 포함하는 GP1 그룹과 상관관계가 높았으며, 근권토양은 *Acidobacteria* GP6, GP7 그룹 그리고 GP16 그룹과 유연관계가 높은 특징을 나타내었다(Fig. 2C).



**Fig. 2.** Microbial Network co-occurrence analysis of the OTUs profiles and the taxonomic constitution of profiles. Blue lines represent JSL (litter layer of bamboo soil) correlation between OTUs. Red lines indicate JSR (rhizosphere soil of bamboo) correlation between OTUs. (A) OTUs of *Proteobacteria*; (B) OTUs of *Bacteroidetes*; (C) OTUs of *Acidobacteria*; (D) OTUs of *Actinobacteria*.

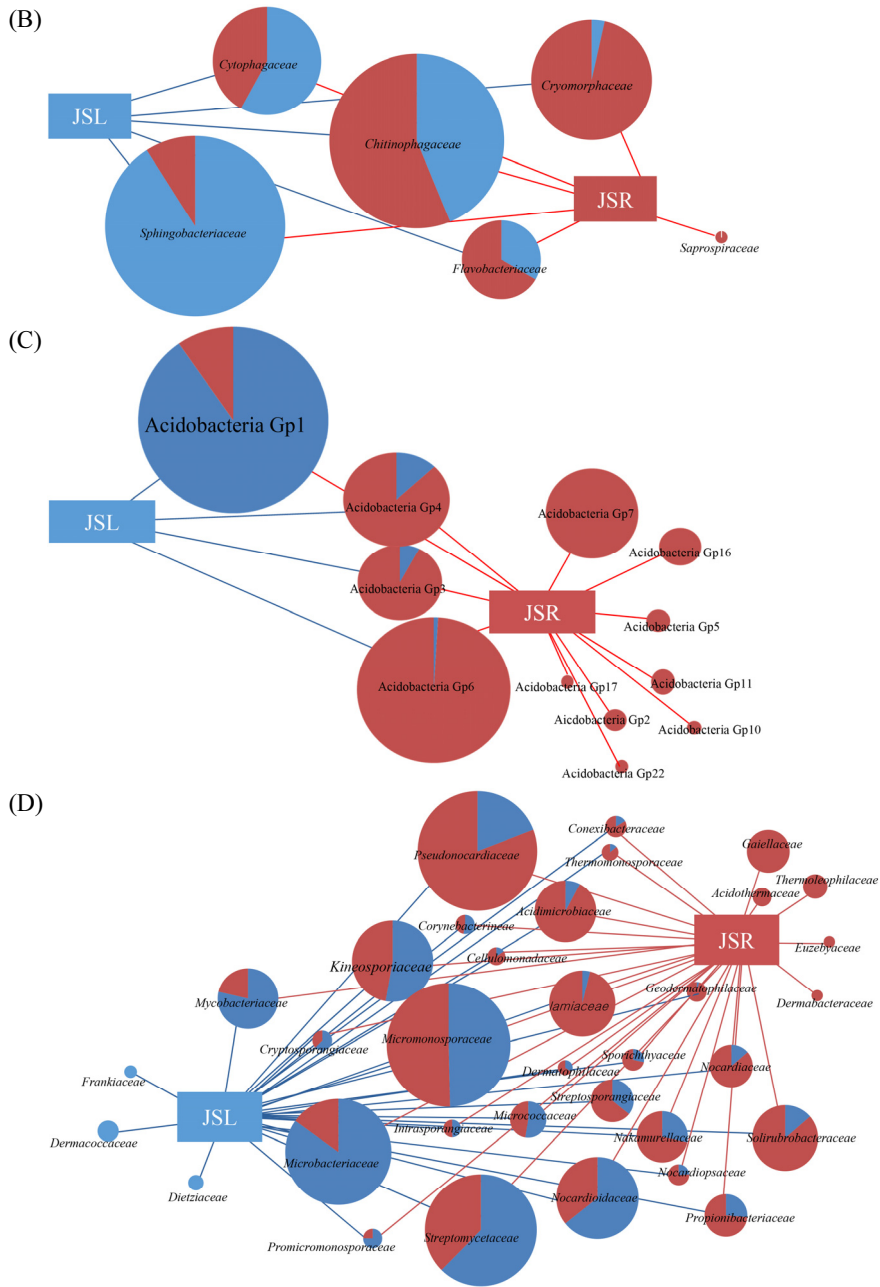


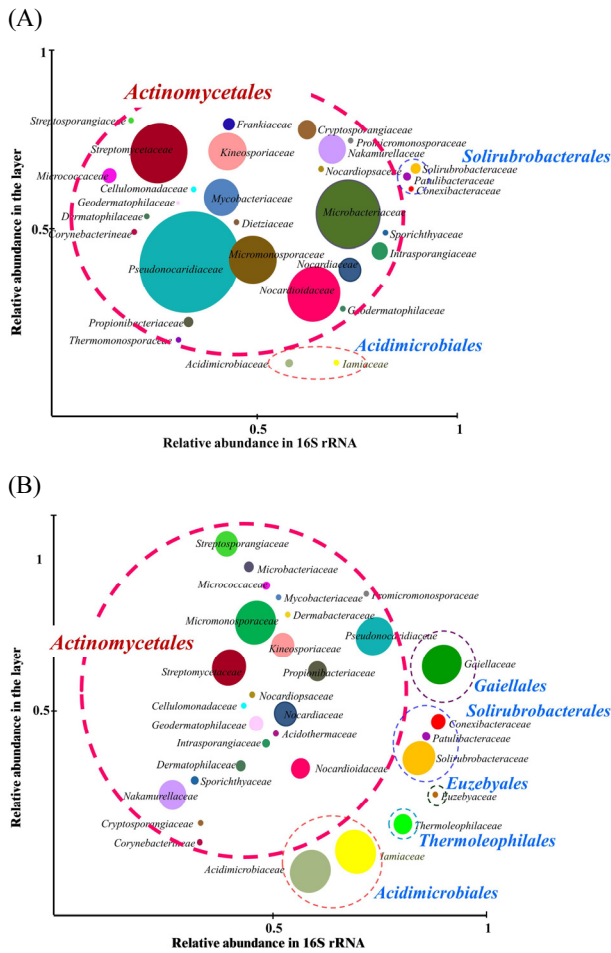
Fig. 2. Continued.

전체 세균군집의 4-14%를 차지하는 방선균군집은 총 35개 과로 구성되었으며, *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* 그리고 *Streptomycetaceae*는 낙엽층과 근권토양에서 높은 비율로 존재하고 토양간  $P < 0.015$ 의 높은 유의성을 나타내는 대표 방선균군집으로 확인되었다. 한편, *Dermacoccaceae*, *Dietziaceae*, *Frankiaceae* 그리고 *Microbacteriaceae* 계통군은 낙엽층에서 보여주는 특징적인 계통군으로 확인되었으며, *Acidimicrobiaceae*, *Iamiaceae*, *Acidothermaceae*, *Dermabacteraceae*,

*Geodermatophilaceae*, *Gaiellaceae*, *Thermoleophilaceae* 그리고 *Euzebyaceae*는 근권토양에서 보여주는 특징적인 방선균군집으로 확인되었다(Fig. 2D).

**Actinomycetales 방선균군집의 계통학적 특성**

상기의 연구에서 전체 방선균군집 35개 과 중 28개 과는 *Actinomycetales* 목에 속하는 주요 방선균군집으로 확인되었



**Fig. 3.** Taxonomic composition at the family level within the phylum *Actinobacteria* for the 16S rRNA gene sequences retrieved from bamboo (*Sasa borealis*) soil. (A) litter layer of bamboo; (B) rhizosphere soil of bamboo.

다. 이들 *Actinomycetales* 목에 속하는 방선균군의 계통학적 특성을 검토하기 위하여 PCA (principal component analysis) 분석하였다.

낙엽층 내 방선균군집은 총 3목 30과 81속으로 구성되었으며, 전체 방선균군집의 약 96%가 *Actinomycetales* 목으로 *Pseudonocardiaceae* (22.7%), *Microbacteriaceae* (10.6%), *Streptomycetaceae* (11.3%), *Nocardioideaceae* (10.9%) 그리고 *Micromonosporaceae* (10.6%)을 포함하는 26개 과가 확인되었다(Fig. 3A).

근권토양의 경우, 총 6목 32과 88속으로 구성되었으며 전체 방선균군집의 약 60%를 차지하는 *Actinomycetales* 목은 *Micromonosporaceae* (15.6%), *Pseudonocardiaceae* (12%), *Streptomycetaceae* (10.2%), *Nakamurellaceae* (8.1%), *Nocardiaceae* (7.9%) 그리고 *Kineosporiaceae* (5.6%)을 포함하는 24개 과로

확인되었다(Fig. 3B).

이상 조릿대 대나무토양 내 전체 방선균군집의 83% 차지하는 *Actinomycetales* 목은 28개 과로 세분류되었으며, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Actinophytocola*, *Actinomycetospora* 속을 포함하는 *Pseudonocardiaceae*와 *Catenuloplanes*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* 속을 포함하는 *Micromonosporaceae* 그리고 *Streptomyces* 속을 포함하는 *Streptomycetaceae*는 낙엽층과 근권토양에서 변이가 적고 높은 분포율을 나타내는 대표 방선균군집으로 확인되었다.

생태계 내 방선균군집 구조 해석에 관한 연구는 다양한 방선균의 확보를 위한 중요한 연구목표가 된다. 많은 연구자들은 자연환경으로부터 다양한 방선균을 확보해 왔으며, 현재 RDP (Ribosomal Database Project, <https://rdp.cme.msu.edu/>)에 등록된 방선균 표준균주는 338속이 보고되었다. 이들 방선균 표준균주 중 *Streptomyces* 속이 약 70%, *Micromonospora* 속이 11%, *Nocardia* 속이 6%로 확인되었다. Lechevalier 등 (1970)은 16종의 토양으로부터 5,000주의 방선균을 분리 동정하여 *Streptomyces* 속 방선균이 95%를 차지함을 보고한 바 있으며, Kim 등(1997)은 산림, 밭 초지, 논 등 다양한 토양에서 *Streptomyces* 속을 제외한 희소 방선균은 30-40%를 차지한다고 밝힌 바 있다. 공동연구자는 선행연구에서 조릿대 대나무림 토양으로부터 방선균 총 200균주를 분리하고 16S rRNA 유전자 염기서열 해석한 결과, 분리 균주의 94%가 *Streptomyces* 이었음을 보고한 바 있다(Lee and Whang, 2010). 본 연구에서 대용량의 염기서열을 분석할 수 있는 454 pyrosequencing 기법으로 염기서열을 분석한 결과, 조릿대 대나무림 토양 시료 내에는 6목 36과 121속을 포함하는 다양한 방선균군집이 분포해 있음을 확인하였다. 이들 방선균 군집의 83%가 *Actinomycetales* 목에 속하였으며, *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae* 그리고 *Streptomycetaceae*은 조릿대 대나무림의 대표 방선균군집으로 확인되었다. 이상 pyrosequencing 기법을 통해 확인된 조릿대 대나무림의 낙엽층과 근권토양 내 방선균군집의 계통해석 결과는 향후 방선균 유전자원의 다양성 확보를 위한 기반연구가 되리라 기대한다.

## 적 요

본 연구에서는 차세대 염기서열분석(pyrosequencing) 기술을 이용해 조릿대(*Sasa borealis*) 대나무림의 낙엽층과 근권토양 내 주요 군집인 방선균군집의 계통학적 특성을 분석하여 방선균 유전자원 다양성 확보를 위한 기반 연구를 수행하고자

하였다. 낙엽층 시료 내 세균군집은 2,588 OTUs, 다양성 지수 7.55로 나타났으며, 근권토양 시료의 경우 2,868 OTUs, 다양성 지수 8.15로 다양한 세균군집이 균등하게 분포하고 있는 것으로 확인되었다. 대나무림 토양시료 내 세균군집은 총 35개의 문으로 구성되었으며, *Proteobacteria* (51–60%), *Bacteroidetes* (16–20%), *Acidobacteria* (4–16%) 그리고 *Actinobacteria* (4–14%) 계통군이 주요 세균군집으로 확인되었다. 특히, *Actinobacteria* 은 총 6목 35과 121속의 다양한 방선균이 분포하였으며, 전체 방선균군집의 83%가 *Actinomycetales* 목으로 확인되었다. 이들 *Actinomycetales* 목은 28개 과로 구성되었으며, *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* 그리고 *Streptomycetaceae*는 조릿대 대나무림의 낙엽층과 근권토양에서 풍부도가 가장 높고 변이가 적은 대표 방선균군집으로 확인되었다.

## 감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 농업생명자원관리기관사업 지원에 의해 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

## References

- Bérty, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* **58**, 1–26.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garity, G.M., et al. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, 141–145.
- Cordovez, V., Carrion, V.J., Etalo, D.W., Mumm, R., Zhu, H., van Wezel, G.P., and Raaijmakers, J.M. 2015. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Front. Microbiol.* **6**, 1081.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. 2011. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.
- Hayakawa, M. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol.* **22**, 12–19.
- Jog, R., Nareshkumar, G., and Rajkumar, S. 2012. Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 1154–1164.
- Kim, P.K., Kwon, O.S., Lim, C.Y., Park, D.J., and Kim, C.J. 1997. Genus distribution of soil actinomycetes on different depth. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 534–536.
- Lee, H.W., Ahn, J.H., Kim, M.W., Weon, H.Y., Song, J.K., Lee, S.J., and Kim, B.Y. 2013. Diversity and antimicrobial activity of actinomycetes from fecal sample of rhinoceros beetle larvae. *Kor. J. Microbiol.* **49**, 156–164.
- Lee, H.J. and Whang, K.S. 2010. Biodiversity and phylogenetic analysis of *Streptomyces* collected from bamboo forest soil. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 262–269.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetologica* **7**, 100–106.
- Morales, D.K., Ocampo, W., and Zambrano, M.M. 2007. Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2704–2712.
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., and Lumyong, S. 2010. Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by actinomycetes-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**, 595–601.
- Olan, C., Méndez, C., and Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar. Drugs* **7**, 210–248.
- Piepersberg, W. 1994. Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, 251–285.
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J., and Turnbaugh, P.J. 2011. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**, 38.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.
- Sun, W., Dai, S., Jiang, S., Wang, G., Liu, G., Wu, H., and Li, X. 2010. Culture-dependent and culture-independent diversity of *Actinobacteria* associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek* **98**, 65–75.
- Takada-Hoshino, Y. and Matsumoto, M. 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes Environ.* **19**, 13–19.
- Warnecke, F., Amann, R., and Pernthaler, J. 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* **6**, 242–253.
- Whang, K.S. 2001. Taxonomic characteristics of nitrogen-fixing oligotrophic bacteria from forest soil. *Kor. J. Microbiol.* **37**, 114–119.
- Yadav, A.K., Kumar, R., Saikia, R., Bora, T.C., and Arora, D.K. 2009. Novel copper resistant and antimicrobial *Streptomyces* isolated from Bay of Bengal, India. *J. Med. Mycol.* **19**, 234–240.
- Yasir, M., Aslam, Z., Song, G.C., Bibi, F., Jeon, C.O., and Chung, Y.R. 2011. *Chitinophaga vermicomposti* sp. nov., with antifungal activity, isolated from vermicompost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2373–2378.