

보 문

## 상수리림 부식층으로부터 방향족 화합물 분해세균의 분리 및 세균군집의 계통학적 특성

한송이\*

목원대학교 미생물나노소재학과

### Phylogenetic characteristics of bacterial populations and isolation of aromatic compounds utilizing bacteria from humus layer of oak forest

Song-lh Han\*

Department of Microbial and Nanomaterials, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

(Received May 9, 2016; Revised May 16, 2016; Accepted May 16, 2016)

**ABSTRACT:** In this study, we isolated aromatic compounds (lignin polymers) utilizing bacteria in humus layer of oak forest and investigated phylogenetic characteristics and correlation with major bacterial populations in the humus layer by pyrosequencing. Forty-two isolates using aromatic compounds such as *p*-anisic acid, benzoic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid were isolated and phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequences showed that the isolates belonged to the genus *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas*. Among these, *Burkholderia* species which belong to *Betaproteobacteria* class occupied 83% among the isolates. The bacterial populations in humus layer of oak forest were characterized by next generation pyrosequencing based on 16S rRNA gene sequences. The humus sample produced 7,862 reads, 1,821 OTUs and 6.76 variability index with 97% of significance level, respectively. Bacterial populations consist of 22 phyla and *Betaproteobacteria* were the major phylum consisting of 15 genera including *Burkholderia*, *Polaromonas*, *Ralstonia*, *Zoogloea*, and *Variovorax*. Approximately fifty percentage of them was *Burkholderia*. *Burkholderia* as the majority of population in the humus was considered to play a role in degrading lignin in humus layer of oak forest.

**Key words:** *Burkholderia*, aromatic compounds, humus, phylogenetics

산림토양은 초본류, 목본류 등 식물로부터 매년 축적되는 낙엽과 동물의 유체 등 다양한 유기물이 표층에 유입되고 분해가 진행되면서 각 층위로 된 단면을 형성한다(Alexander, 1985). 토양 내에 유입된 다양한 유기물은 다양한 미생물에 의해 분해가 진행되면서 유기산, 다당류, 리그닌, 방향족과 지방족 탄수화물, 단당류, 알코올류, 아미노산, 퓨린, 피리미딘, 단백질, 지질, 그리고 핵산 등과 같은 다양한 종류의 화합물을 생성한다. 이들 화합물 중 리그닌(lignin), 부식탄(humin), 풀브산(fulvic acid), 히마토멜란산(hymatomelanic acid) 그리고 부식산(humic acid)은 토양에 남아 서서히 분해되는 부식(humus)

이라고 부르는 토양층을 형성한다(Stevenson, 1994; Lee *et al.*, 1996).

토양에서 리그닌의 생물학적 분해에 관여하는 미생물에는 *Agaricus*, *Fomes*, *Collybia*, *Pleurotus* 등과 같은 고등균류와 방선균에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다(Pometto and Croward, 1986; Sutherland *et al.*, 1995; Wackett and Ellis, 1999; Kim *et al.*, 2002; Yanagi *et al.*, 2003). 세균의 경우, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* 그리고 *Pseudomonas* 와 같은 극히 일부의 호기성 세균이 곰팡이가 분해한 리그닌으로부터 유도된 방향족 화합물을 분해한다고 보고되었다(Kirk and Farrell, 1987; Wackett and Ellis, 1999; Haritash and Kaushik, 2009). 이와 같이 산림토양의 부식층 내 세균군집은

\*For correspondence. E-mail: h1882@mokwon.ac.kr;  
Tel.: +82-42-829-7554; Fax: +82-42-829-7550

산림토양 생태계에서 난분해성 방향족 화합물 분해, 영양물질 순환 등 다양한 생리적 역할을 담당하고 있다(Mun and Joo, 1994; Lee *et al.*, 1996). 이들 방향족 화합물과 같은 난분해성 방향족화합물 분해에 관여 하는 미생물의 기능과 구조를 폭넓게 이해하기 위해서는 토양 내 존재하는 미생물의 정량적 평가와 종 구성에 관한 연구가 매우 중요하다(Hackl *et al.*, 2004, 2005).

Yang과 Whang (2003)은 리그닌의 polymers인 ferulic acid, *p*-coumaric acid, benzoic acid, *p*-anisic acid와 같은 방향족 화합물을 이용하는 토양세균을 직접 생균수 측정법(direct viable count; DVC)을 이용하여 정량적으로 검출한 결과, ferulic acid와 benzoic acid를 이용하는 토양세균은 산림토양의 표토층에 비해 부식층 내에 2-3배 이상 높게 분포해 있다고 보고하였다. 선행연구에서 ARDRA (amplified rDNA restriction analysis)와 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 기법을 이용하여 상수리림의 각 층위별 토양 세균군집의 계통학적 다양성을 조사한 결과, 낙엽 분해가 왕성하게 진행되는 부식층의 토양세균 밀도는 표층부에 비해 3배 이상 높은 계수치를 나타내며 세균군집의 다양성 지수도 높게 산출되었다. 특히, *Rhizobiales*, *Burkholderiales*, 그리고 *Actinobacteriales* 목은 상수리림 내 주요 세균군집으로서 대표적인 토착세균 군집임으로 보고하였다(Han *et al.*, 2008; Han, 2015).

본 연구에서는 산림토양 부식층 내 다량 함유되어 있는 리그닌과 같은 난분해성 화합물의 대사과정에 관여하는 세균군집의 구조와 생태학적 기능을 밝히기 위해 부식토로부터 방향족 화합물(리그닌 polymer)을 분해하는 세균을 분리하여 계통학적 특성을 밝히고, pyrosequencing 계통분석을 통해 부식층 내 주요 세균군집과의 상관관계를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 부식층 토양시료 채취

부식층 토양시료 채취는 계룡산에 분포해 있는 상수리(*Quercus acutissima*)림 지역에서 실시하였다. 상층부의 낙엽층을 제거한 후 15 cm 부식층 5개 지점에서 시료를 채취하고 균등하게 섞어 시험시료로 사용하였다. 채취한 각 시료는 polyethylene vinyl에 넣어 4°C에 보존한 후 24시간 이내에 실험하였다.

### 방향족 화합물 분해세균의 분리

부식층 시료 1 g을 정량하여 homogenizer (Ace AM-7, Nikon

Seiki Co.)로 15,000 rpm에서 2분간 충분히 분산시킨 다음 멸균수에 넣어 순차적으로 희석한 후 각 시료 당 5개의 petri dish에 1 ml씩 접종하고 R2A 배지에 혼합 배양법으로 15일간 배양하여 평판상에 형성된 세균 콜로니를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주는 R2A 액체배지에 1주일간 전 배양하고 원심분리하여 멸균된 식염수로 세척하여 배지성분을 제거한 균주를  $10^3$  cells/ml이 되도록 조정하고 시험균주로 사용하였다. 방향족 화합물을 첨가한 배지에서의 생육능을 조사하기 위해 R2A 배지를  $10^2$ 로 희석한 기초배지에 1 mM 농도의 방향족 화합물(*p*-anisic acid, benzoic acid, ferulic acid 및 *p*-coumaric acid)을 첨가하고 상기의 전 배양 균주를 각각 접종하여 28°C에서 3주간 배양하면서 24시간마다 분광광도계(UV-Mini 1240, Shimadzu)를 이용하여 파장 595 nm에서 OD값을 측정하였다. 방향족 화합물의 분해능은 각각 다른 파장(*p*-anisic acid, 245 nm; benzoic acid, 225 nm; ferulic acid, 305 nm 그리고 *p*-coumaric acid, 282 nm)에서 흡광도를 측정하고 방향족 화합물 분해능을 확인하였다(Monties, 1988).

### 방향족 화합물 분해세균의 계통학적 특성 분석

분리된 방향족 화합물 분해세균의 계통학적 특성을 확인하기 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 실시하였다. 각 균주의 16S rRNA 유전자 PCR 증폭을 위해 *Escherichia coli* 16S rRNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 이용하였다. 증폭된 PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동을 통하여 증폭여부를 확인하고, QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 16S rRNA 유전자 PCR 증폭 산물은 27F 프라이머를 사용하여 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems)로 cycle sequencing을 수행한 후, ABI PRISM 3700 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 염기서열을 결정하였다. 각 균주의 염기서열은 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)에서 계통군을 확인하고 NCBI/RDP/ DDBJ GenBank database의 BLAST program을 이용하여 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성을 분석하였다.

### DNA 추출, PCR 증폭, pyrosequencing

부식층시료 내 직접 DNA 추출은 Takada-Hoshino와 Matsumoto (2004)의 bead beating 방법을 개량한 ISOIL kit (Nippon Kit Co.)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 세

균의 16S rRNA 유전자의 V1에서 V3 부위를 PCR 증폭하기 위해 barcode를 표지한 9F (5'-CCTATCCCCCTGTGCGCTTGG-AGTC-TCAG-AC-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 541R (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-X-AC-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. PCR 반응은 1× EF-Taq buffer (Solgent), 2.5 unit의 EF-Taq polymerase (Solgent), 0.2 mM dNTP mix, 0.1 μM의 primer, 100 ng의 template DNA를 사용하였다. PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동을 통하여 약 500 bp 크기의 밴드를 확인한 후 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)로 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 이용하여 단일 가닥 DNA library 제작과 emulsion PCR을 진행한 후 pyrosequencing 반응을 진행하였다. 파이로시퀀싱 분석은 GS FLX Titanium system (Roche)를 이용하여 Macrogen에서 실시하였다.

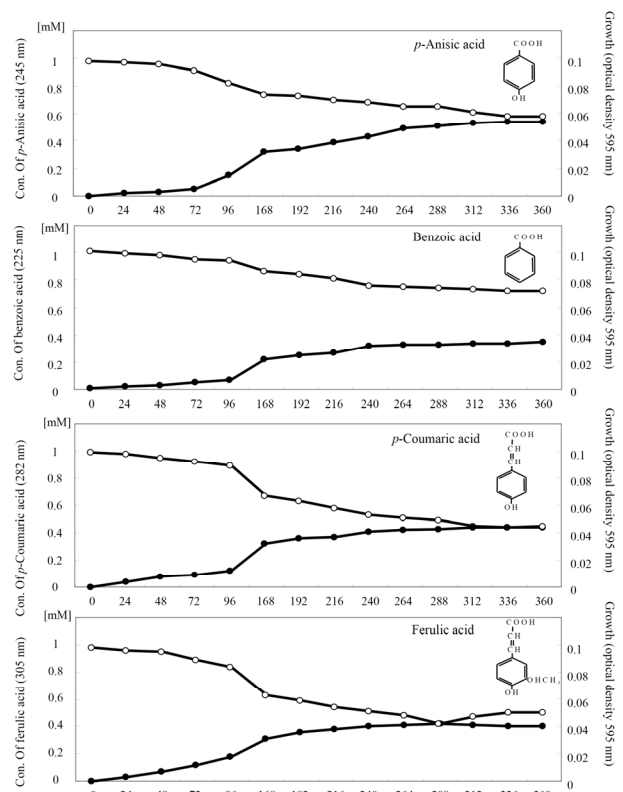
### 염기서열 분석

상수리림 부식층 토양으로부터 pyrosequencing을 통해 얻어진 염기서열 데이터는 우선 GS FLX 소프트웨어(Roche)를 이용하여 염기서열의 adaptor와 PCR primer 부위를 제거하였다. 부정확하게 결정된 염기서열과 PCR 과정에서 발생할 수 있는 염기서열 오류를 최소화하기 위해 길이가 짧은 염기서열 (<300 bp)을 제거하였다(Quince *et al.*, 2011). 또한, mothur version 1.30.1 (Schloss *et al.*, 2009)을 이용하여 chimera로 의심되는 염기서열을 제거하고 RDP Classifier (Cole *et al.*, 2009)를 이용해 계통해석 하였다. 시료 간 OTUs의 상관관계는 Cytoscape (version 3.3, <http://www.cytoscape.org/>) 프로그램을 이용하여 분석하였다(Shanon *et al.*, 2003).

## 결과 및 고찰

### 상수리림 부식층으로부터 방향족 화합물 분해세균의 분리 및 계통해석

상수리림 부식층으로부터 토양세균 총 132균주를 순수분리하고 1 mM 농도의 방향족 화합물(*p*-anisic acid, benzoic acid, ferulic acid 및 *p*-coumaric acid)을 첨가한 배지에 각각 접종하여 생육능과 방향족 화합물의 분해능에 대해 조사하였다 (Fig. 1). 각 균주들은 방향족 화합물을 첨가한 배지에서 72-96 시간부터 생육대수가 진행되면서 168시간 이후에 생육 정상기를 도달하였다. 이들 방향족화합물 첨가 배지에서 생육이 왕성한 세균에 대해 방향족 화합물 분해능을 조사한 결과,



**Fig. 1.** Quantitative changes in UV spectrum of aromatic compounds (*p*-anisic acid, benzoic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid) during incubation period by isolates from humus layer of oak forest. (●) growth of isolates on media contained aromatic compounds, (○) quantitative changes of aromatic compounds.

*p*-anisic acid, benzoic acid, ferulic acid 및 *p*-coumaric acid 모두 생육이 왕성하게 일어나는 72시간부터 서서히 분해하면서 168시간 이후에 10-60% 이상의 높은 분해율을 나타내었다. 본 연구에서는 방향족 화합물을 10% 이상 감소시키는 세균을 방향족 화합물 분해세균으로 판정하고 최종 선발하였다.

방향족 화합물 *p*-anisic acid를 분해한 세균은 16개 균주로 10.8-53.9%의 분해율을 나타내었고, benzoic acid를 분해한 세균은 20개 균주로 10.6-40.2% 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, ferulic acid 분해능이 확인된 세균은 20균주로 11.3-53.9%의 분해율을 나타내었으며, *p*-coumaric acid의 경우 10균주가 12.3-59.6% 분해능을 나타내어 최종 42균주가 방향족 화합물 분해세균으로 선발되었다(Table 1).

선발된 방향족 화합물 분해세균 42균주에 대하여 16S rRNA 염기서열을 결정하고 계통학적 위치를 확인하였다. 방향족 화합물 분해세균은 *Rhizobium* (3균주), *Sphingomonas* (2균주), *Burkholderia* (35균주) 그리고 *Pseudomonas* (2균주)가 확인되었다. 특히, 방향족 화합물 분해세균으로 분리된 균주

**Table 1.** Utilization of aromatic compounds and phylogenetic analysis of 42 isolates based on 16S rRNA gene sequence by BLAST search

Isolates	Utilization of aromatic compound (%)				Closest relative species (Accession no.)	Similarity (%)
	p-Anisic acid	Benzoic acid	Ferulic acid	p-Coumaric acid		
BCB44	-	16.8	19	-	<i>Rhizobium rhizogenes</i> IFO 13257 <sup>T</sup> (D14501)	99.65
BCB 46	-	23.6	-	26.7	<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30140 <sup>T</sup> (X87273)	99.88
BCB51	-	13.6	-	19.6	<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30140 <sup>T</sup> (X87273)	99.88
BCB45	36.4	-	31.6	-	<i>Sphingomonas koreensis</i> JSS26 <sup>T</sup> (AF131296)	97.68
BCB52	32.1	-	36.9	-	<i>Sphingobium ummariense</i> RL-3 <sup>T</sup> (EF207155)	98.20
BCB6	16.8	-	-	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.36
BCB10	26.5	-	26.3	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.60
BCB11	48.5	-	24.9	34.6	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	99.06
BCB20	-	-	25	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.23
BCB24	50.36	36.5	53.9	59.6	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.47
BCB30	26.5	-	-	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.50
BCB34	-	28.6	-	20.7	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.70
BCB38	34.6	-	-	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.80
SY-48	25.9	-	15.9	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.15
SY-3	50.1	-	-	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.65
SY-66	-	-	16.9	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	99.80
SY-74	-	-	30.1	-	<i>Burkholderia hospita</i> LMG 20598 <sup>T</sup> (AY040365)	98.52
BCB47	38.9	-	28.4	-	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN <sup>T</sup> (CP001053)	98.61
SY-69	-	-	42.6	-	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN <sup>T</sup> (CP001053)	98.36
SY-71	48.6	-	-	-	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN <sup>T</sup> (CP001053)	98.61
SY-72	-	15	-	21.9	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN <sup>T</sup> (CP001053)	98.61
BCB15	-	24.9	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	97.98
BCB17	-	31.8	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	98.23
BCB25	-	31.2	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	99.40
BCB67	-	33.2	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	98.82
BCB68	-	29.6	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	98.33
SY-39	-	31.2	11.3	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	98.50
SY-42	10.8	-	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	97.30
SY-65	-	40.2	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	97.30
SY-67	-	16.9	-	-	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (AY773186)	98.68
BCB16	-	25.5	32.6	-	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	99.10
BCB18	-	28.3	31	-	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	98.95
BCB29	-	-	26.3	-	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	98.69
BCB57	22.8	-	20	-	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	98.70
BCB66	-	36.4	-	18.7	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	97.95
SY-68	-	-	18.9	-	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	98.78
SY-73	-	-	30.6	-	<i>Burkholderia sordidicola</i> S5-B <sup>T</sup> (AF512826)	97.68
SY-60	26.9	-	18.3	-	<i>Burkholderia terrae</i> KMY02 <sup>T</sup> (AB201285)	98.36
SY-64	-	10.6	-	12.3	<i>Burkholderia terrae</i> KMY02 <sup>T</sup> (AB201285)	98.00
SY-70	49.8	-	-	-	<i>Burkholderia terrae</i> KMY02 <sup>T</sup> (AB201285)	98.36
BCB26	-	16.9	-	23.1	<i>Pseudomonas moorei</i> RW10 <sup>T</sup> (AM293566)	99.33
BCB55	-	23	-	29.7	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 <sup>T</sup> (AF468452)	99.78

의 83%가  $\beta$ -proteobacteria계통군에 속하는 *Burkholderia*로 확인되었다. 이들 *Burkholderia* 속 균주들은 기준에 보고되어진 *Burkholderia hospita* LMG 20598<sup>T</sup> (AY040365)와 98.15–99.06%의 상동성을 나타내었으며, *Burkholderia phytofirmans*

PsJN<sup>T</sup> (CP001053)와 98.36–98.61%, *Burkholderia sabiae* Br3407<sup>T</sup> (AY773186)와 97.98–99.4%, *Burkholderia sordidicola* S5-B<sup>T</sup> (AF512826)와 97.68–99.1% 그리고 *Burkholderia terrae* KMY02<sup>T</sup> (AB201285)와 98–98.36%의 상동성을 나타내었다.



Yang과 Whang (2003)은 산림토양의 각 층위별로 방향족 화합물 분해세균을 분리하고 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과, 52%가 *β-proteobacteria* 계통군으로 분류되었으며 산림토양 내 방향족 화합물을 분해하는 우점적 계통군으로 보고하였다. Song (2009)은 소나무림의 솔잎 분해층에서 *Burkholderia cepacia* 균주가 리그닌에서 유도된 protocatechuate, catechol, phenyl acetate 그리고 *p*-hydroxybenzoic acid와 같은 방향족 탄화수소물질을 분해하는 능력이 있음을 보고한 바 있다. 이상의 결과로부터 상수리림 부식층에서 *Burkholderia* 속 균주들은 리그닌에서 유래된 방향족 화합물을 분해하는 매우 특징적인 계통군으로 평가되었다.

### Pyrosequencing 분석을 통한 상수리림 부식층 내 세균군집의 계통학적 해석

상수리림 부식층 시료로부터 추출한 DNA를 이용하여 PCR 증폭한 16S rRNA 유전자를 pyrosequencing 한 결과, 7,862개의 염기서열(평균길이 427 ± 53 bp)을 확보하였다. 상수리림 부식층 시료로부터 확보된 염기서열을 유사도 97% 기준으로 cut-off 하고 다양성 지수(Diversity index)를 확인한 결과, 세균 군집은 1,821 OTUs 로 나타났으며, 다양성 지수 6.76 로 확인되었다.

상수리림 부식층으로부터 확보된 16S rRNA 염기서열을 RDP pipeline를 이용하여 계통해석 하였다. 상수리림 부식층

내 세균군집은 22개 문으로 분류되었다. 전체 염기서열 중에서 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*는 전체 세균군집의 5% 이상을 차지하는 주요 세균군집으로 확인되었다. 상수리림 부식층 내 전체 세균군집의 35%를 차지하는 *proteobacteria* 계통군은 27개 목 71과 233속으로 세분류 되었다. 이들 *proteobacteria* 계통군 중 약 40%가 *β-proteobacteria* 계통군이었으며, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax* *Herbaspirillum* 속을 포함하는 *Burkholderiales* 목이 가장 높은 분포율을 나타내었다. 특히, *Burkholderia* 속은 전체 *β-proteobacteria* 의 약 50%를 차지하는 주요 세균군집으로 확인되었으며, 산림토양 내 부식층에서 가장 특징적인 계통군으로 평가되었다(Fig. 2).

상수리림 부식층으로부터 배양법으로 분리된 방향족 화합물 분해세균의 16S rRNA 염기서열 분석 결과와 비배양법으로 분리된 DNA로부터 pyrosequencing 기법을 통해 동정된 *Proteobacteria* 계통군의 유전적 상관관계를 분석하기 위하여 Cytoscape 분석(Shannon *et al.*, 2003)을 실시하였다. 방향족 화합물 분해세균의 83%를 나타낸 *Burkholderia*와 pyrosequencing 기법을 통해 major OTUs로 확인된 *Burkholderia* 그룹은  $P < 0.03$ 의 높은 유의성을 나타내었다. 방향족화합물 분해세균 중 *Rhizobium* (2균주)은 토양 내 *Rhizobiaceae*에 속하는 uncultured *Rhizobium* OTUs group과  $P < 0.05$ 의 높은 유의도를 나타내었다. 방향족화합물분해 세균 *Sphingomonas* (1균주) 그리고

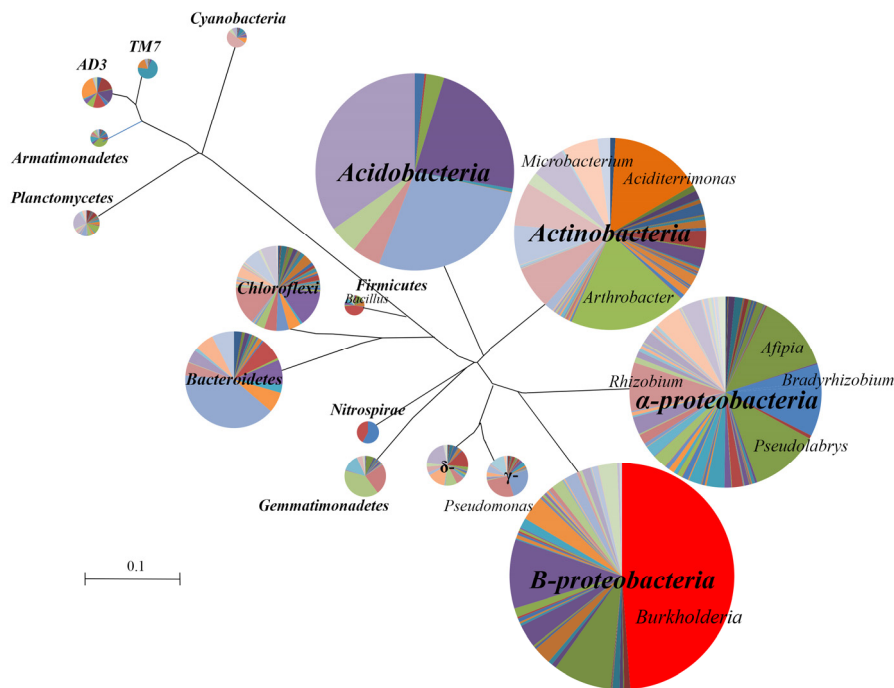
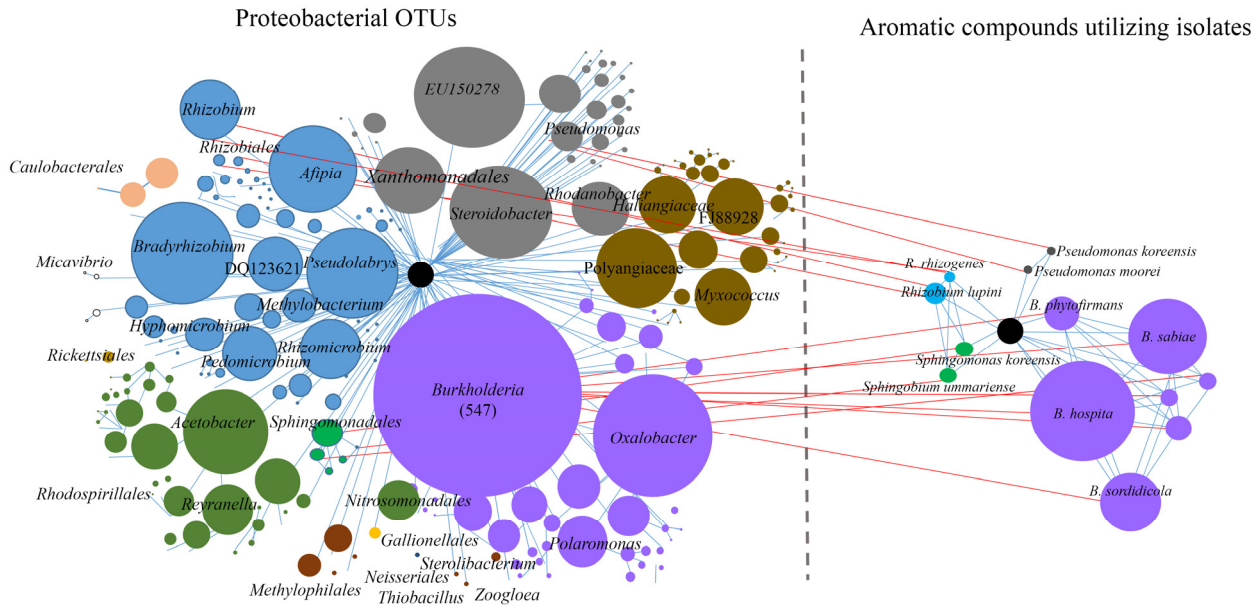


Fig. 2. Biodiversity of bacterial populations in a humus forest soil by tag-encoded 454 FLX-titanium amplification.



**Fig. 3.** Co-occurrence networks between the proteobacterial OTUs and the number of shared aromatic compounds utilizing isolates in a humus forest soil. Each node represents a different OTU, and the most abundant OTUs are colored and annotated to indicate the species or unclassified species in a genus (sp.). The sizes of the nodes are proportional to the average relative abundances of the OTUs. Edges between each pair of OTUs indicate significantly correlations, respectively (Spearman's correlation coefficient  $> 0.4$  or  $< -0.4$ ,  $P < 0.05$ ).

*Sphingobium* (1균주)은 *Novosphingobium*, *Sphingobium* 그리고 *Sphingomonas*에 속하는 OTUs와 유연관계를 나타내었으며, *Pseudomonas* (2균주)는 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter*에 속하는 OTUs와 유연관계를 나타내었다. 이들 *Sphingomonas* 속과 *Pseudomonas* 속에 속하는 균주들은 phenanthrene, naphthalene, fluoranthene, toluene, benzoic acid 등 다양한 종류의 난분해성 방향족화합물을 탄소원으로 이용한다고 보고된 바 있다(Story *et al.*, 2004; Basu *et al.*, 2006; Baboshin *et al.*, 2008).

현재 LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature)에 등록 보고된 *Burkholderia* 속은 99종이 기재되어 있다. 이들 *Burkholderia* 속 균주들은 산림토양, 산성토양, 식물근권, 수계 등 다양한 환경에서 독성화합물, 난분해성 오염물질 PAHs (polynuclear aromatic hydrocarbons) 등을 생분해할 수 있다고 보고되었다(Vandamme *et al.*, 2007; Otsuka *et al.*, 2011). Park (2016)은 메타게놈 분석을 이용하여 비자나무 분해산물 내 ligno-cellulose 분해 세균군집을 조사한 결과, *Proteobacteria*와 *Actinobacteria*에 속하는 세균이 ligno-cellulose 분해 역할을 하며, *Burkholderiales*와 *Solirubrobacterales*는 xylan, mannan 그리고 리그닌 분자를 분해한다고 보고하였다. 일본의 Kato 등(2015)은 metagenomics 기술을 이용하여 난분해성 방향족 화합물 분해 세균군집을 확인하고 *Burkholderia* 속은 토양 내에서 phenanthrene과 같은 방향족화합물의 생물정

화를 위한 gene pool을 형성한다고 보고하였다.

이상, 본 연구에서 상수리림 부식층 내 난분해성 방향족 화합물을 분해하는 세균의 계통학적 특성을 확인하고 pyrosequencing 기법을 통해 확인된 주요 세균군집과의 상관관계를 검토한 결과, *Burkholderia* 계통군은 산림토양의 부식층에 우점적으로 존재하면서 난분해성 방향족 화합물을 분해하는 생태학적 기능을 수행한다고 판단되었다.

## 적요

본 연구에서는 상수리림 부식층으로부터 방향족 화합물(리그닌 polymers) 분해세균을 분리하여 계통학적 특성을 밝히고, pyrosequencing 계통분석을 통해 부식층 내 주요 세균군집과의 상관관계를 검토하고자 하였다. 방향족 화합물(*p*-anisic acid, benzoic acid, ferulic acid 및 *p*-coumaric acid)을 이용하는 세균 42균주를 분리하여 16S rRNA 계통해석한 결과, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* 계통군으로 확인되었다. 이들 방향족화합물 분해세균 중 *Burkholderia* 계통군은 전체 분리균주의 83%로 높은 비율을 차지하였다. 차세대 염기서열 분석법(pyrosequencing)을 이용하여 부식층 시료로부터 7,862개의 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻었으며, 유의성 97% 수준에서 1,821 OTUs와 다양성 지수 6.76가

확인되었다. 상수리림 부식층 내 세균군집은 총 22개 문 (phylum)으로 구성되었으며, 주요 세균군집으로 확인된  $\beta$ -*proteobacteria* 계통군은 *Burkholderia*, *Polaromonas*, *Ralstonia*, *Zoogloea*, *Variovorax*를 포함하는 15개 속으로 세분류 되었다. 이들 세균 중 약 50%가 *Burkholderia* 속으로 확인되었다. 상수리림 부식층 내 우점군집으로 밝혀진 *Burkholderia* 계통군은 산림 생태계에서 리그닌 분해 대사 과정에 중요한 미생물생태학적 역할을 수행하는 것으로 판단되었다.

## References

- Alexander, M. 1985. Introduction to soil microbiology. 2nd. John Wiley & Sons.
- Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T.L., Khan, S.U., and Golovleva, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. *Biodegradation* 19, 567-576.
- Basu, A., Apte, S.K., and Phale, P.S. 2006. Preferential utilization of aromatic compounds over glucose by *Pseudomonas putida* CSV86. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2226-2230.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., et al. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, 141-145.
- Hackl, E., Pfeffer, M., Donat, C., Bachmann, G., and Zechmeister-Boltenstern, S. 2005. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biol. Biochem.* 37, 661-671.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L., and Sessitsch, A. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5057-5065.
- Han, S.I. 2015. Phylogenetic characterization of bacterial populations in different layers of oak forest soil. *Korean J. Microbiol.* 51, 133-140.
- Han, S.I., Cho, M.H., and Whang, K.S. 2008. Comparison of phylogenetic characteristics of bacterial populations in a quercus and pine humus forest soil. *Korean J. Microbiol.* 44, 237-243.
- Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard Mater.* 169, 1-15.
- Kato, H., Mori, H., Maruyama, F., Toyoda, A., Oshima, K., Endo, R., Fuchu, G., Miyakoshi, M., Dozono, A., Ohtsubo, Y., et al. 2015. Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Res.* 22, 413-424.
- Kim, Y.G., Son, H.J., Kim, K.K., Kim, H.S., and Lee, Y.G. 2002. Isolation of a lignolytic bacterium for degradation and utilization of lignocellulose. *J. Life Sci.* 12, 392-398.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- Lee, K.J., Han, S.S., Kim, J.H., and Kim, E.S. 1996. Forest ecology (in Korean). Hyang Moon Sa, Seoul, Korea.
- Monties, B. 1988. Preparation of dioxane lignin fractions by acidolysis, pp. 31-35. In Wood, W.A. and Kellogg, S.T. (eds.). *Methods in Enzymology*, Vol. 161. Academy press, New York, USA.
- Mun, H.T. and Joo, H.T. 1994. Litter production and decomposition in the *Quercus acutissima* and *Pinus rigida* forest soil. *Korean J. Ecol.* 17, 345-353.
- Otsuka, Y., Muramatus, Y., Nakagawa, Y., Matsuda, M., Nakamura, M., and Murata, H. 2011. *Burkholderia oxyphila* sp. nov., isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 249-254.
- Park, J.W. 2016. Metagenome analysis of plant detritus from the *Torreya nucifera* reveals a novel lignocellulose degrading community. Master's thesis. Chung-Ang University.
- Pometto, A.L. and Caward, D.L. 1986. Catabolic fate of *Streptomyces viridosporus* T7A-produced, acid-precipitable polymeric lignin upon incubation with lignolytic 15. *Streptomyces* species and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 171-179.
- 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.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498-2504.
- Song, Y.J. 2009. Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from pine litter. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 37, 333-339.
- Stevenson, F.J. 1994. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.
- Story, S.P., Kline, E.L., Hughes, T.A., Riley, M.B., and Hayasaka, S.S. 2004. Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 168-176.
- Sutherland, J.B., Rafii, F., Kahn, A.A., and Cerniglia, C.E. 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, pp. 269-306. In Young, L.Y. and Cerniglia, C.E. (eds.),

Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss, NY, USA.

- Takada-Hoshino, Y. and Matsumoto, M.** 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly absorb DNA. *Microbes Environ.* **19**, 13-19.
- Vandamme, P., Govan, J.R.W., and LiPuma, J.J.** 2007. Diversity and role of *Burkholderia* spp. *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 1-28. In Coenye, T. and Vandamme, P. (eds.). Horizon Bioscience, Wymondham, UK.
- Wackett, L.P. and Ellis, L.B.** 1999. Predicting biodegradation. *Environ. Microbiol.* **1**, 119-124.
- Yanagi, Y., Hamaguchi, S., Tamaki, H., Suzuki, T., Otsuka, H., and Fujitake, N.** 2003. Relation of chemical properties of soil humic acids to decolorization by white rot fungus-*Coriolus consors*. *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**, 201-206.
- Yang, H.C. and Whang, K.S.** 2003. Phylogenetic characteristics and a quantitative evaluation of aromatic compounds utilizing bacteria in forest soil. *J. Inst. Sci. Technol.* **12**, 67-77.