

송이 자생균락 토양 내 난배양성 세균군집의 계통학적 특성

김윤지¹ · 황경숙^{1,2*}

¹목원대학교 미생물생태자원연구소, ²생명산업학부

송이 자생균락 토양 내 세균군집의 정량적 평가를 수행한 결과 CFDA 형광염색법을 이용해 직접 계수된 생균수는 $7.4 \pm 1.19 \times 10^8 \sim 1.07 \pm 0.17 \times 10^9$ cells/g soil로 육즙영양배지(nutrient broth, NB)에서 배양된 생균수는 CFDA 계수치의 5~8%로 계수되었으며, 10^2 으로 희석한 NB (DNB)배지에서는 40~47%의 계수치를 나타내었다. 이상의 결과로부터 송이 자생균락 토양 내에는 배양이 곤란한 난배양성(viable but non-culturable; VBNC) 세균이 다수 존재하는 것으로 추정되었다. 송이 자생균락 토양 내 세균군집의 계통학적 특성을 검토하기 위해 토양으로부터 직접 DNA를 추출하고 16S rDNA-ARDRA cluster 분석을 통하여 대표 clone의 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하였다. 송이 자생균락 토양으로부터 구축된 총 115 clone은 31 ARDRA cluster로 분류되었으며, α -, β -, γ -Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria 그리고 Firmicutes의 6개 계통군이 확인되었다. 이들 계통군 중 약 85%가 Acidobacteria 계통군에 속하여 압도적인 우점균임이 확인되어 매우 독특한 계통학적 특성을 나타내었다.

Key words □ Acidobacteria, forest soil, phylogeny, pine mushroom, VBNC bacterial population

송이의 모체에 있는 균사는 유기물이 적은 광질토양을 좋아하고 기질식물인 소나무의 세균에 균근을 만들어 연간 10~15 cm 정도로 서서히 확대 성장한다. 균근이 분비하는 특수한 항생물질에 의해 송이 자실체에 유해한 세균과 곰팡이는 배제시키지만, 다른 버섯류나 토양미생물과의 경쟁에는 약하고, 낙엽이나 부식질이 많아 유기물의 함량이 높은 비옥한 토양에서는 생육이 미흡한 특성이 있다(1, 7). 송이가 소나무를 기주로 삼을 수 있는 것은 둘 다 생물학적으로는 빈약한 토양조건을 좋아하고 다른 생물의 서식이 부적당한 환경조건에 적합한 성질을 가지고 있기 때문이다. 소나무의 생리학적 특성이나 솔잎 성분 등에 대한 연구 보고와 이들 소나무와 송이와의 상호관계를 통한 생리활성물질 및 생육조건 등에 관한 연구정보는 이미 많은 학자들에 의해 밝혀졌다(1, 3, 6, 7, 10, 17, 24). 또한 송림토양 생태계의 주요 구성원인 토양미생물 중 담자균류의 특성에 관한 연구는 활발하게 진행되어온 반면 토양세균에 대한 연구는 매우 미흡한 실정으로 송림토양으로부터 분리 보고된 세균은 배양을 전제로 하였기에 극히 제한적이라고 할 수 있다(15, 21, 25).

최근 미생물생태학자들은 배양을 통하지 않고 환경시료에서 직접 DNA를 추출하여 미생물군집의 구조와 기능을 파악하기 위해 다양한 종류의 분자생물학적 기법을 이용하고 있다(4, 13, 23). 특히, ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) 지문 분석법은 미생물에 보편적으로 존재하는 리보솜 RNA (rRNA)의 subunit인 16S rRNA (약 1,500~1,800 bp) 내에 공통적인 염기서열의 보존영역이 적어도 10개 이상 존재하고 있다는 원리를 바

탕으로 특정 제한효소를 사용하여 16S rDNA-PCR 증폭산물을 절단하고 이들 DNA 절편 양상에 따라 미생물 군집의 유전적 다양성을 확인하고 분석하는 방법으로 미생물군집의 생태학적 연구에 광범위하게 이용되고 있다(5, 19, 22).

국내 송이 자생균락 지역은 태백산맥과 소백산맥을 중심으로 밀집해 있다고 조사 보고 되었고, 특히 경상북도가 전국 생산량의 약 65%, 강원도가 약 27%를 차지하고 있다(1). 송이 자생균락으로 가장 유명한 곳은 경상북도의 울진, 봉화, 영덕과 강원도의 양양 등으로 본 연구에서는 경상북도 안동시 용두산의 송이 자생균락 지역으로부터 토양시료를 채취하여 상기의 ARDRA 분자기법을 이용한 세균군집의 다양성과 군집구조 특성을 평가하였다.

재료 및 방법

토양시료의 채취 및 처리

토양시료는 경북 안동시 녹전면 내정리 용두산의 송이 자생균락 송림토양을 조사지로 선정하였다. 용두산 송이 자생균락 3개 지점(MS1, MS2, MS3)을 대상으로 송이 자실체 기저부 토양으로부터 시료를 채취하여 polyethylene vinyl bag과 bottle에 넣어 실험실로 운반하여 12시간 이내에 실험하였다. 각 토양 시료는 1 g씩 정량하여 100 ml의 멸균수에 넣고 homogenizer (Ace AM-7, Nikon Seiki Co.)로 22,040×g에서 2분간 충분히 분산시킨 다음 9 ml의 멸균수에 순차적으로 희석하여 사용하였다(8).

CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) 형광염색법에 의한 생균수 측정

토양현탁액 100 μ l를 10% NaCl이 첨가된 0.2 M phosphate

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-829-7598, Fax: 82-42-829-7599
E-mail: kswang@mokwon.ac.kr

buffer (pH 7.0) 100 μ l와 혼합한 후 2% CFDA 형광염색액 1 μ l를 넣고 잘 혼합한 다음 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 염색 반응 후 0.2 μ m nucleopore filter가 장착된 funnel에 상기의 시료 100 μ l를 흡입여과한 후 토양세균 세포가 놓여있는 nucleopore filter를 슬라이드글라스 위에 옮기고 immersion oil을 떨어뜨린 후 형광 현미경(Nidone ECLIPSE 80i, Nikone Co.)을 이용하여 $\times 400$ 배율로 형광의 녹색을 띄는 세포를 생균수로 측정하였다. 생균수는 20개 시야에서 관찰·계수하여 아래 수식에 의거하여 생균수를 구하였다(2).

$$N(\text{cells/g}) = \frac{\text{유효여과면적} (\text{mm}^2)}{\text{현미경눈금면적} (\text{mm}^2)} \times \frac{\text{현미경눈금 내 평균세포수} (\text{cells}) \times \text{토양생중량}}{\text{토양희석액} \times \text{토양건조중량}}$$

평판 계수법에 의한 생균수 측정

세균수 측정을 위한 배지로는 육즙영양배지(nutrient broth, NB)와 NB를 10^{-2} 배로 희석한 DNB (diluted nutrient broth) 배지를 사용하였고, NB 배지는 D.W. 1 L에 beef extract 10 g, NaCl 5 g, peptone 10 g을 첨가하여 제조하였다. 각 시료 당 5개의 petri dish에 순차적으로 희석된 토양시료를 1 ml씩 접종하고 상기의 NB와 DNB 배지를 각각 첨가하여 혼합 배양하였다. 모든 시료는 28°C에서 50일(약 1,200시간) 이상 배양하면서 정기적으로 평판배지에 형성된 콜로니수를 측정하여 생균수를 산출하였다(8).

토양으로부터 total DNA의 직접 추출

통상적으로 이용되는 Rapid법(30)에 의거하여 채취한 송림토양 시료 5 g을 120 mM phosphate buffer (pH 8.0) 10 ml에 풀어 섞고 토양 내 humic acid 및 PCR 증폭 저해물질 등을 제거하기 위해 토양시료를 3회 세척하였다. 세척된 토양 시료에 solution I (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, D.W. 100 ml, lysozyme 1 g; pH 8.0) 8 ml를 첨가하고 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후, Solution II (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, D.W. 100 ml, SDS 10 g; pH 8.0) 8 ml를 첨가하여 -70°C deep freezer와 65°C의 얼림과 녹임을 반복 처리하고 6,296 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 5 M NaCl 2.7 ml, 10% CTAB 2.1 ml과 동량의 chloroform:isoamylalcohol=24:1 (v/v)을 첨가하고 22,040 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 1.6 M NaCl이 포함된 13% PEG를 첨가하여 DNA pellet 얻었고, DNA pellet을 건조한 후 750 μ l의 D.W.를 첨가하여 37°C에서 녹이고 10 M NH₄OAc 190 μ l과 2배의 ethanol 그리고 동량의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 농축하고 70% ethanol 1 ml로 세척한 후 진공 건조(Micro Vac MV-100, TOMMY)하였다. 최종적으로 DNA 농도는 Spectrophotometer (UV-1650PC, Shimizu Co.)로 측정하였다.

16S rDNA의 PCR 증폭

E. coli 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') primer와 1492R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG C-3') primer를 이용하였다(16, 20). Total DNA의 PCR 저해물질을 최소화하기 위해 DNA 농도를 50 ng으로 조정하여 사용하였으며, 추출된 DNA 1 μ l에 27 F primer, 1 μ l; 1492 R primer, 1 μ l; *EF-Taq* polymerase (Solgent co., Korea), 0.25 μ l; dNTP, 1 μ l; 10 \times buffer, 5 μ l; band doctor, 5 μ l; H₂O, 36.75 μ l를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems)반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad, USA)하여 추출 여부를 확인하였다.

16S rDNA clone library 구축

증폭된 16S rDNA를 pGEM T-Easy Vector (Promega, Madison, USA)와 3:1비율로 적정하고 T4-DNA ligase를 첨가한 다음 4°C에서 12시간 동안 ligation하였다. Competent cell (CP cell)의 제조는 200 ml의 LB배지(Difco. co., USA)에 *E. coli* DH5 α 를 접종하고 O.D값이 0.4가 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하여 균체를 획득하고 5 M CaCl₂ 10 ml를 넣어 ice에서 10분간 방치한 후, 6,296 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 cell을 수거하고 2 ml의 CaCl₂를 첨가하였다. CP cell 50 μ l와 ligation된 DNA 5 μ l를 천천히 혼합한 후 ice에서 1시간동안 방치한 다음 42°C에서 45초간 heat shock하고 LB배지 450 μ l를 첨가한 다음 37°C에서 1시간동안 진탕배양 한 후 X-gal (20 mg/ml) 1 ml, IPTG (20 mg/ml) 100 μ l 그리고 ampicillin (20 mg/ml) 1 ml이 포함된 LB 한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

LB plate에 생성된 colony는 blue-white colony 선별법 의해 형질전환체를 선별하여 clone library를 만든 후 T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') primer와 SP6 (5'-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3') primer를 사용하여 colony PCR을 수행하고 16S rDNA의 vector insert를 확인하였다(29). Colony PCR을 위하여 T7 primer 1 μ l ; SP6 primer, 1 μ l ; *EF-Taq* polymerase, 0.25 μ l ; dNTP, 1 μ l ; band doctor, 5 μ l ; 10 \times buffer, 5 μ l ; D.W 36.75 μ l를 PCR 반응 tube에 넣고 잘 혼합한 후 95°C, 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 30초, 60°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 7분간 final extension의 조건으로 PCR 반응을 실시하였다.

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 분석

각 clone의 16S rDNA PCR 증폭산물에 대하여 제한효소를 처리한 후 절단 양상을 확인하였다. 4 bases를 인식하는 2.5 U의 *Hae*III와 10 U의 *A*hlI을 이용하여 PCR product 1 μ g, 10 \times buffer 2 μ l, enzyme 1 μ l, D.W.를 혼합하여 최종 20 μ l를 맞춰

반응 tube에 넣은 후 37°C에서 4시간 처리하였다. 제한효소를 처리한 산물을 4%의 agarose gel (1× TAE buffer; 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 1× TAE buffer에서 100 V로 1시간 30분 동안 전기 영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 30 분간 염색하여 UV (Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 확인하였다. 확인된 band의 pattern은 Gelcompar II software (version 4.0; Applied Maths, Korthrijk, Belgium)를 사용하여 각 clone 간의 다양성을 비교하였다(22, 31).

16S rDNA 염기서열 분석 및 계통도 작성

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 µl, T7 primer 1 µl, 16S rDNA sample 1 µl (100 ng), 2× buffer 3.4 µl에 멸균 증류수 13.3 µl를 잘 혼합한 후 cycle sequencing 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 µl와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 µl를 첨가한 후 22,040×g에서 25분간 침전시키고, 250 µl의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 µl를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation한 후 얼음위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser를 사용하여 16S rDNA (500~580 bp) 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열의 homology는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 상동성은 alignment CLUSTAL X를 이용하여 병렬로 정렬하였으며 계통도의 작성은 근린 결합법에 의거하여 결정하였다(26, 28).

결과 및 고찰

송이 자생균락 토양 내 생균수 측정

토양 시료 내 생균수 측정을 위하여 형광현미경을 이용한 직접계수법과 평판배양법을 이용하였다. 형광현미경 직접계수법에 사용된 형광염료(6-carboxyfluorescein diacetate: CFDA)는 살아있는 세포에만 선택적으로 염색되어 녹색의 형광을 발하는 특징을 나타내는 염료로 세균의 세포막을 쉽게 통과한다. CFDA 형광염색법은 세포내에서 esterase 계통의 효소가 CFDA를 에스테르화하면서 생성된 carboxy fluorescein분자를 형광현미경하에서 관찰하며 생균을 판별하여 계수하는 방법이다. 토양 시료에 상기의 CFDA 형광염색액을 첨가한 후 1시간 동안 염색하고 형광현미경 (510~560 nm) 하에서 형광의 녹색을 띄는 세포를 생균수로 계수하였다. 그 결과, 송이 자생균락 송림토양에서 채취한 각 토양 시료 중 생균수는 MS1 토양에서는 $7.72 \pm 1.84 \times 10^8$ cells/g soil, MS2 토양은 $7.4 \pm 1.19 \times 10^8$ cells/g soil, MS3 토양은 $1.07 \pm 0.17 \times 10^9$ cells/g soil로 계수되었다.

한편, 토양시료를 통상농도의 NB 배지와 NB 배지를 10^2 배로 희석한 DNB 배지를 이용하여 50일 동안 배양하면서 콜로니수가 최대치에 도달했을 때의 값을 계수치로 측정한 결과, NB 배지의 경우, MS1 토양은 6.2×10^7 CFU/g soil, MS2 토양은 3.7×10^7

CFU/g soil, MS3 토양은 6.17×10^7 CFU/g soil로 계수되었고, DNB 배지에서는 MS1 토양은 3.21×10^8 CFU/g soil, MS2 토양은 3.48×10^8 CFU/g soil, MS3 토양은 4.17×10^8 CFU/g soil로 계수되어 DNB 희석배지에서 5.2~9.4배 높은 세균수가 측정되었다.

이상 CFDA 형광염색법에 의해 직접 계수된 생균수에 대해 통상농도의 NB 배지에서 측정된 생균수는 5~8%이며, 희석 저영양배지(DNB)에서 측정된 생균수는 40~47%로 계수되었다. 이와 같이 DNB 배지를 이용한 평판배양법에 의해 측정된 생균수는 형광염색법(CFDA법)을 통해 직접 측정된 생균수에 비해 낮은 계수치를 나타내었다. 이상의 결과로부터 송이 자생균락 토양에는 난배양성 세균이 다수 존재해 있는 것으로 추정되었다(Fig. 1).

송이 자생균락 토양으로부터 16S rDNA ARDRA 분석

송이 자생균락 토양으로부터 Rapid 변법을 이용하여 직접 추출한 DNA를 대상으로 16S rDNA PCR 증폭에 성공하였다. 이들 PCR 증폭산물 중 MS1시료를 선택하여 pGEM-T easy vector를 사용하여 cloning한 후 blue-white colony 선별법에 의하여 16S rDNA가 삽입되었을 것으로 예상되는 white colony를 분리한 후 clone library를 구축하였다. 총 150개 clone을 획득하여 colony PCR을 실행한 결과 115 clones에 16S rDNA 유전자가 삽입되었음이 확인되었다.

상기의 clones PCR 증폭산물에 대하여 4-base를 인식하는 제한효소 *HaeIII*를 처리한 후 각 DNA fragment는 Gel compar II software (version 4.0; Applied Maths, Belgium)를 이용하여 각 clone들의 다양성을 비교하고 UPGMA 분석을 위한 matrix를 구하여 유사도 75%에서 ARDRA cluster 분석을 수행한 결과, 송이 자생균락 MS1 토양에서 분리한 총 115개의 clones은 31개의 ARDRA cluster로 분류되었다(Fig. 2).

송이 자생균락 토양 내 세균군집구조의 계통학적 특성

송이 자생균락 토양(MS1)에서 선발한 대표 clone 31개에 대해 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, Proteobacteria phylum 계통군과 Acidobacteria phylum의 2개의 계통군으로 분류되었다. Proteobacteria phylum에 속하는 계통군은 α -proteobacteria, β -

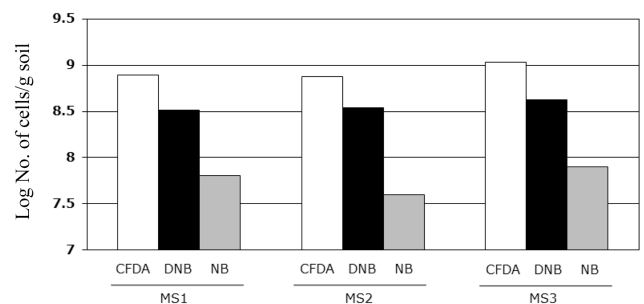


Fig. 1. Comparison of the number of viable count by CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) direct count method and plate count (PC) by using NB and DNB medium.

proteobacteria, γ -proteobacteria, Actinobacteria 및 Firmicutes 계통군으로 세분화 되었다(Fig. 3).

α -Proteobacteria 계통군에 속하는 clone은 *Bradyrhizobium elkanii* (1 clone), *Brevundimonas alba* (4 clones) 및 uncultured α -proteobacteria (3 clones)를 포함하였으며, β -proteobacteria 계통군에 속하는 clone은 *Burkholderia terrae* (3 clones) 및 uncultured β -proteobacteria bacterium (2 clones)을 포함하였다. γ -proteobacteria 계통군에는 *Stenotrophomonas maltophilia* (1 clone)가 검출되었으며, Actinobacteria 계통군 중에는 *Arthrobacter*

stachebrandtii (1 clone) 및 uncultured Actinomycetales bacterium (2 clones)이 포함되었다. Firmicutes 계통군에 속하는 clone은 *Carnobacterium* sp. (1 clone)로 확인 되었다. 한편 Acidobacteria 계통군에 속하는 대부분의 clone은 uncultured Acidobacteria bacterium (97 clones)으로 확인되었다(Table 1).

송이 자생균락 토양으로부터 분리된 총 115 clones에 대하여 각 계통군별 분포율을 검토한 결과 전체 clone의 84.4%가 Acidobacteria 계통군으로 송이 자생균락 토양 내에서 우점을 이루는 것으로 확인되었으며, 약 7%가 α -proteobacteria 계통군, β -

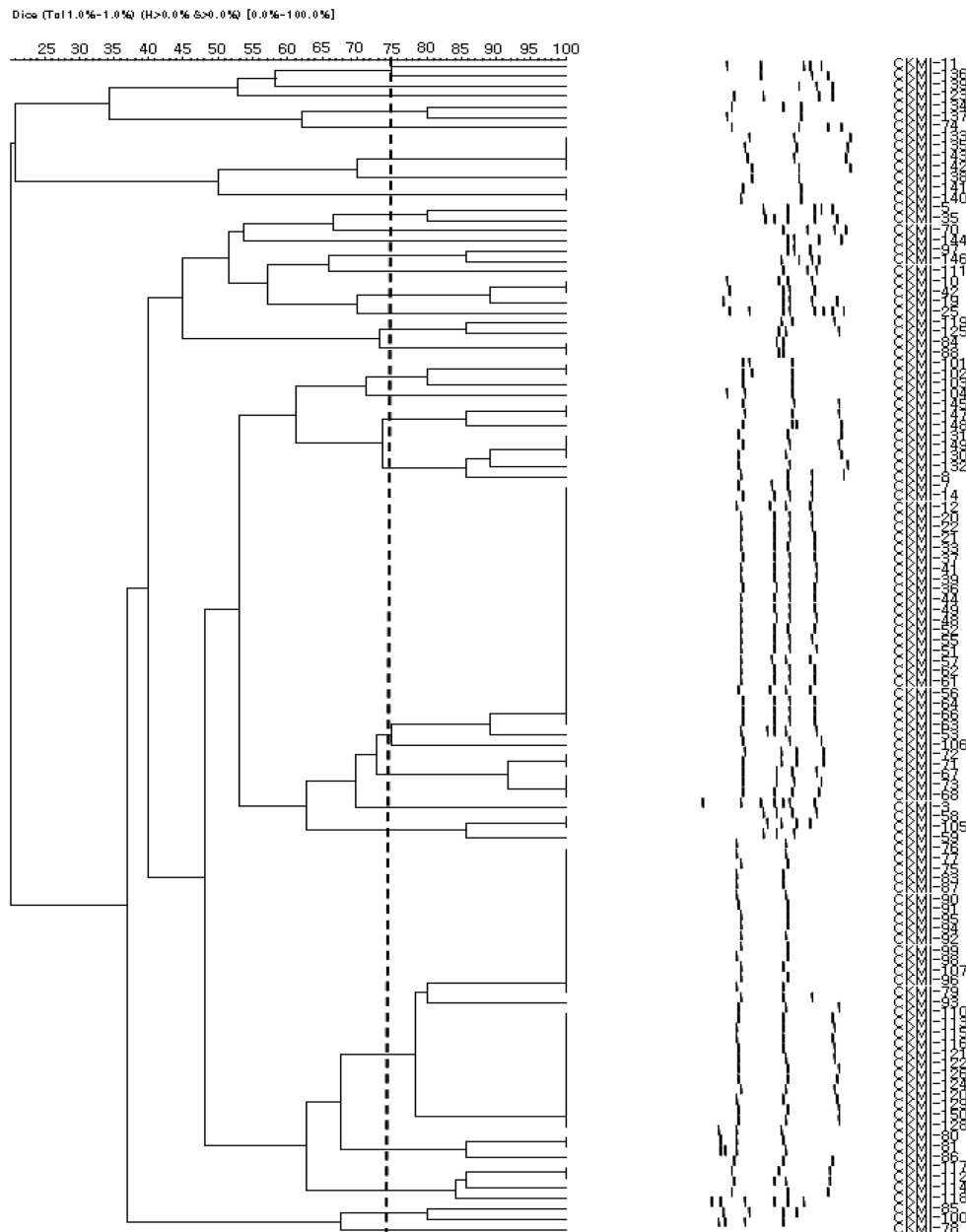


Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity values of ARDRA among amplified 16S rDNA of bacterial population collected from pine mushroom forest soil.



Fig. 3. Neighbor joining tree representing the affiliation of the 16S rDNA clones to their closest related sequence.

proteobacteria 계통군 (4.3%), Actinobacteria 계통군 (2.6%), γ -proteobacteria 계통군 (0.9%) 그리고 Firmicutes 계통군 (0.9%) 순으로 분포하여 매우 독특한 계통학적 특성을 나타내었다(Fig. 4). 자연계의 미생물중 배양 가능한 종은 약 1%미만으로 대부분 α -, γ -Proteobacteria로 알려졌으며, 본 연구를 통하여 송이 자생 균락 토양 내 우점군집으로 확인된 Acidobacteria 계통군은 기존의 배양 방법으로는 분리가 곤란한 난배양성 세균(VBNC; viable but non culturable)으로 송이 자생균락 토양 내에는 난배양성 세균이 다수 존재해 있는 것으로 추정되었다(11).

Acidobacteria 계통군은 이미 전 세계적으로 산림토양, 농경지 토양, 목초지 그리고 온천수와 같은 다양한 환경에 광범위하게 분포하는 것이 밝혀졌다(9, 15, 27). 상기의 다양한 토양을 대상으로 Acidobacteria 계통군의 분포상황을 조사한 결과와 본 연구에서 송이 자생균락 토양에서 조사된 Acidobacteria 계통군의 16S rDNA 염기서열을 비교해본 결과 대부분이 산림토양에서 분리한 Acidobacteria cluster에 속하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이는 Acidobacteria 계통군이 송림토양 생태계 내에서 소나무 및

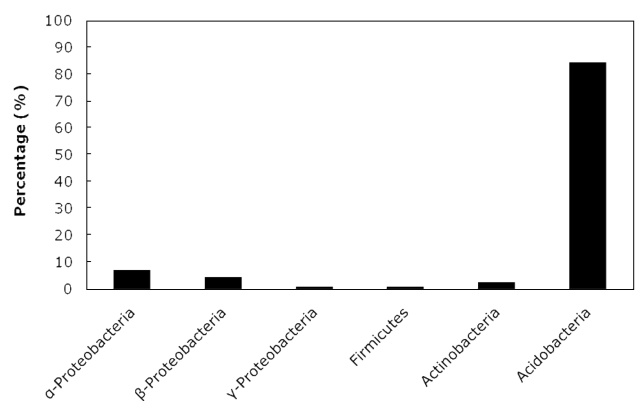


Fig. 4. The number of clones belonging to each bacterial phylum groups.

송이와 밀접한 상호관계를 이루며 중요한 역할을 수행하는 것으로 추측되며 송림토양의 생태학적 특성평가에 중요한 기초자료

Table 1. List of the 16S rDNA clones along with their BLAST hits

Name of the clones	Closest blast hits	Acc. no. of closest blast hits	Similarity of clone to its closest match (%)	Number of the clones (n=115)
<i>α-Proteobacteria</i>				
CKMI-78	Uncultured alpha proteobacterium	AJ292593	98	1
CKMI-97	Uncultured alpha proteobacterium	AF431152	98	2
CKMI-111	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AY904778	99	1
CKMI-118	<i>Brevundimonas alba</i>	AJ227785	99	4
<i>β-Proteobacteria</i>				
CKMI-59	<i>Burkholderia terrae</i>	AB201284	99	3
CKMI-85	Uncultured beta proteobacterium clone	AF431328	98	2
<i>γ-Proteobacteria</i>				
CKMI-25	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AF431328	97	1
<i>Actinobacteria</i>				
CKMI-70	Uncultured actinomycetales bacterium	AF431551	98	1
CKMI-136	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	AJ640198	98	1
CKMI-139	Uncultured actinomycetales bacterium	AY694647	97	1
<i>Firmicutes</i>				
CKMI-11	<i>Carnobacterium</i> sp.	AY573048	98	1
<i>Acidobacteria</i>				
CKMI-7	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922122	91	25
CKMI-8	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922122	92	5
CKMI-10	Uncultured Acidobacteria bacterium	AB245339	97	3
CKMI-35	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922122	91	2
CKMI-72	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY834324	92	6
CKMI-74	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY043830	97	1
CKMI-80	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY673303	98	3
CKMI-84	Uncultured Acidobacteria bacterium	DQ828372	99	2
CKMI-103	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922122	92	3
CKMI-104	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY150876	91	1
CKMI-106	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922115	93	1
CKMI-110	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY673303	99	29
CKMI-119	Uncultured Acidobacteria bacterium	AF431473	99	2
CKMI-123	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY043841	98	1
CKMI-133	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922122	93	4
CKMI-137	Uncultured Acidobacteria bacterium	AB245339	98	2
CKMI-138	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY673303	99	1
CKMI-140	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY673303	99	2
CKMI-144	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY922122	91	1
CKMI-148	Uncultured Acidobacteria bacterium	AY673303	99	3

로 활용 되리라 기대한다.

송이 자생균락 토양 내 우점군집으로 검출된 Acidobacteria 계통군에 속하는 균주를 순수 분리하여 세균학적 특성을 보고한

논문은 매우 미흡한 형편으로 Acidobacteria 계통군은 분리 및 배양이 매우 곤란한 난배양성 희귀미생물로 규정하고 있다(12, 14). 1991년 Kishimoto (18)는 무기합성배지에 1 N H₂SO₄를 첨



Fig. 5. Phylogenetic tree of *Acidobacteria* phylum group collected from pine muchroom forest soil with previously reported *Acidobacteria* clones from environment samples.

가하여 pH 2.5~3.0으로 조제한 선택배지를 사용하여 *Acidobacteria*를 성공적으로 순수분리하고 *Acidobacterium capsulatum* ATCC 1168로 동정되었다(18). 향후 송림 및 송이 자생지 토양에 우점적으로 분포해 있는 이들 *Acidobacteria* 계통군의 세균학적 특성 및 송림토양 내에서의 기능을 파악하기 위해서 *Acidobacteria* 계통군의 순수분리가 절실히 요구되어 순수

분리를 위한 기반연구를 수행하고 있다.

감사의 말

본 논문은 2007년도 농촌진흥청 바이오그린21사업 (2005030134384) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 강안석, 김양섭, 차동열, 박용환. 1988. 송이버섯 발생과 관련되는 기후 특성 분석 연구. 한국균학회지 16, 256-256.
- 김인기, 염국효, 황경숙. 2002. 형광현미경을 이용한 음용지하수내 배양 불능 세균의 관찰 및 정량적 평가. 한국미생물학회지 38, 180-185.
- 문형태. 1994. 삼림생태계의 낙엽생산물, 분해량 및 분해 과정에 따른 화학적 구성원의 변화. 한국과학재단.
- 박진숙, 황경숙, 천종식. 2005. 미생물의 분류동정 실험법, 월드사이언스.
- 송인근, 김유영, 조홍범, 최영길. 1999. 토양세균 군집의 대사 다양성과 16S rDNA의 제한 효소 지문분석에 의한 유전적 다양성 비교. 한국미생물학회지 35, 72-77.
- 이재곤, 이창국, 장희진, 곽재진. 2004. Purge and Trap Headspace 법에 의한 솔잎 (*Pinus densiflora* S.)의 휘발성 성분. 한국식품영양학회지 17, 260-265.
- 차동열. 1981. 송이버섯에 대한 연구현황. 한국균학회지 9, 164-165.
- 황경숙, 유승현. 1995. 유기영양분 농도에 따른 토양세균의 증식양상과 통상 및 편성 저영양세균의 분리. 한국미생물학회지 21, 319-324.
- Barns, S.M., S.L. Takala, and C.R. Kuske. 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1731-1737.
- Berg, B. and G. Agren. 1984. Decomposition of needle litter and its organic chemical component: theory and field experiments. Long-term decomposition in a Scots pine forest III. *Can. J. Bot.* 62, 2880-2888.
- Bloomfield, S.F., G.S.A.B. Stewart, C.E.R. Dodd, I.R. Booth, and E.G.M. Power. 1998. The viable but nonculturable phenomenon explained. *Microbiology* 144, 1-3.
- Borneman, J. and E.W. Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2647-2653.
- Chandler, D.P., R.W. Schreckhise, J.L. Smith, and H. Bolton, Jr. 1997. Electroelution to remove humic acids from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods* 28, 11-19.
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel, and N.R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774.
- Ito, J. 1994. The present status of *Matsutake* production technique in Japan. *Korean J. Mycol.* 9, 211-222.
- Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, pp. 683-700. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (ed.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Kim, J.G. and N.K. Chang. 1989. Litter production and decomposition in the *pinus rigida* plantation in Mt. Kwan-ak. *Korean J. Ecol.* 12, 9-20.
- Kishimoto, N., Y. Kosako, and T. Tano. 1991. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* 22, 1-7.
- Lagac, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2052-2060.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Lee, C.-Y., O.-P. Hong, M.-J. Jung, and Y.-H. Han. 1997. Effect of carbon sources and vitamins on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Korean J. Mycol.* 25, 226-232.
- Massol-Deya, A.A., D.A. Odellson, R.F. Hickey, and J.M. Tiedje. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA), pp. 3.3.2/1.3.3.2/8. In A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, and F.J. de Bruijn (ed.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer, Netherlands.
- Mark, G.W., J.V. McArthur, and L.J. Shimkets. 1997. Bacterial diversity of a carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1505-1514.
- Mun, H.T. and J.H. Kim. 1992. Litter fall decomposition, and nutrient dynamics of litter in red pine (*pinus densiflora*) and Chinese thuja (*Thuja orientalis*) stands in the lime stone area. *Korean J. Ecol.* 15, 147-155.
- Ogawa, M. 1981. Mycorrhiza in the pine forest-the ecological study of matsutake as a microorganism. *Korean J. Mycol.* 9, 225-227.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Stackebrandt, E., W. Liesack, and B.M. Goebel. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7, 232-236.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Torsvik, V., J. Gosksoyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
- Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
- Vaneechoute, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234.

(Received August 6, 2007/Accepted September 22, 2007)

ABSTRACT : Phylogenetic Characteristics of Viable but Nonculturable Bacterial Populations in a Pine Mushroom (*Tricholoma matsutake*) Forest Soil

Yun-Ji Kim¹ and Kyung-Sook Whang^{1,2*} (¹Institute of Microbial Ecology & Resources,
²Department of Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea)

The CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) direct viable count method and plate count (PC) method using conventional nutrient broth (NB) medium and 10⁻² diluted NB (DNB) medium were applied to samples collected from Mt. Yongdoo in Andong, in an effort to determine the number of living bacteria pine mushroom forest soil. The number of living bacteria determined via plate count in NB medium comprised 5~8% of the CFDA direct viable count, and the bacteria in the DNB medium comprised 40~47%. This result indicated that viable but non-culturable (VBNC) bacteria existed in the pine mushroom forest soil at a high percentage. The phylogenetic characteristics of the VBNC bacterial populations in the samples of pine mushroom (*Tricholoma matsutake*) forest soil were analyzed via the direct extraction of DNA and 16S rDNA-ARDRA. The 115 clones from pine mushroom forest soil were clustered into 31 different RFLP phylotypes by ARDRA. Based on the 16S rDNA sequences, the 31 ARDRA clusters were classified into 6 phylogenetic groups: α -, β -, γ -Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria and Firmicutes. Among these bacterial populations, approximately 85% were classified as members of phylum *Acidobacteria*. The *Acidobacteria* phylum was shown to exist abundantly in the pine mushroom forest soil.