*The Korean Journal of Microbiology, Vol. 42, No. 2, June 2006, p. 103-110*
*Copyright©2006, The Microbiological Society of Korea*

# 아미노산 액비를 처리한 들잔디 토양 미생물 군집구조 및 다양성

**김동일 · 김동훈[1]***

충남대학교 산림자원학과, [1]한국교원대학교 생물교육과

**들잔디(*Zoysia japonica*)에 제초제를 살포 한 다음, 아미노산을 포함한 액비(LFcAA)를 처리한 들잔디 토양의 미생물 군집구조 및 다양성을 비교하기 위하여 16S rDNA서열에 기초한 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 분석과 클론의 염기서열 분석을 실시하였다. 제한효소 *Hae*III을 이용한 T-RFLP분석결과 아미노산 액비를 처리한 실험구 KD3과 KD4에서 32, 38개의 유효한 피크를 가진 T-RFs가 나타났다. 23개를 나타낸 아미노산 무처리구인 KD2가 KD3,4에 비해 미생물군집구조가 단순한 것으로 조사되었다. 네 개의 실험구 KD1 (대조구), KD2 (무처리구), KD3 (LFcAA 1X), KD4 (LFcAA 2X)에서 각각 110개의 클론의 16S rDNA 부분 염기서열 분석결과 대부분이 91~99% 유사도 수준에서 GeneBank에 등록된 염기서열 중 대부분 uncultured *bacterium*으로 BLAST결과 조사되었다. 이외의 대부분의 클론들은 *Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteria, Planctomycetes* 그룹들의 클론들이 조사되었고, 특히 LFcAA 2X 처리구인 KD4에서는 KD2에서와는 다르게 *Alphaproteobacteria*의 *Rhizobiales, Sphigomonadales*, 그리고 *Caulobacterales* 목에 속하는 미생물들의 클론이 조사되었으며, *Gammaproteobacteria*의 *Pseudomonas* 속의 세균들이 주로 나타났으며, *Betaproteobacteria* 의 *Nitrosomonadales* 목의 *Nitrosospira* 속들이 주로 조사 되었다. 이 외에도 *Acidobacteria* 그룹, *Actinobacteria* 그룹, *Planctomycetacia*, *Sphingobacteria* 그룹들이 다양하게 조사되었다. 이러한 결과는 제초제를 살포한 미생물 군집구조가 LFcAA 첨가로 들잔디의 미생물 군집 구조에 큰 영향을 주고 있음을 시사하였다.**

**Keywords □ 16S rDNA analysis, bacterial diversity, liquid fertilizer contained amino acids(LFcAA), microbial community structure, *Zoysia japonica***

국내 골프 인구는 수요 측면에서 매년 급신장하고 있으며, 골프코스도 지속적으로 증가하는 추세이다. 따라서 대규모의 토목공사로 인한 자연훼손, 관리를 위한 농약 및 비료 사용, 내장객에 의한 각종 오염물질의 발생 등이 환경에 부정적인 요인으로 작용하고 있다(5). 특히 대상 잡초의 특성에 따라 수많은 제초제가 존재하며 약제 및 처리 시기, 희석량에 따라 약제의 효과도 다르다. 따라서 토양 중 장기간 약제(고독성)의 잔류를 통하여 잡초를 방제하는 토양처리제 및 반감기가 긴 제초제의 장기간 반복 사용은 토양 및 잔디에 있어 위험하다. 또한, 화학비료의 연용으로 인하여 토양 화학성과 미생물 체계가 점차 나빠지게 되어 결국 잔디뿌리 발육에도 나쁜 영향을 미치게 된다(10, 15). 이와 같은 현 잔디골프장의 상황을 개선하기 위해서 최근 시비관리에 있어 시설재배 뿐만 아니라 골프잔디를 관리하는데 있어서도 아미노산 비료가 이용되고 있으며, 이 아미노산 비료가 친환경 농자재에 포함되면서 이용이 증가하고 있다(2).

잔디토양생태계의 미생물 군집구조 및 다양성 연구는 열악한 잔디토양환경에서 미생물의 기능과 역할을 이해하는데 도움을 주고 나아가 잔디토양생태계 내에서 생지화학적 물질 순환과정을 이해할 수 있게 하는 기반을 제공할 것이다. 잔디토양의 생태환경을 이해하기 위해서는 환경에 가장 큰 영향을 미칠 것으로 판단되는 사용되는 농약과 비료의 사용량과 잔류량을 평가하며, 미생물에 의한 물질순환에 대한 연구와 함께 16S ribosomal DNA (rDNA) 염기서열을 이용한 미생물 군집구조 및 다양성과의 관련성에 대한 정보가 요구된다. 대부분의 미생물들은 99% 이상이 표준 배양방법에 의해 배양되지 않는 특성을 갖고 있다(7, 11). 토양미생물의 생태학적인 특성을 연구하기 위한 16S rDNA 서열의 이용은 배양 없이 PCR증폭을 통한 미생물의 확인을 위해 이용되고 있다.

따라서 본 연구는 현재 주로 사용되는 제초제 중 지속적인 반복 사용 시 잔류 위험성이 대두되는 제초제를 선정하고 들잔디(*Zoysia japonica*) 토양에 살포한 후 아미노산 액비를 처리하고, 말단제한절편분석(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)을 통해 미생물 군집구조를 파악하고, 16S rDNA 염기서열분석 방법을 이용하여 들잔디 토양 생태계에서 중요한 위치를 차지하고 있는 미생물의 다양성 분석을 통해 들잔디 토양에서 미생물 생태환경을 이해하기 위한 것이다.

## 재료 및 방법

### 토양 sampling

본 실험은 대전광역시 유성구 갑동 소재 실험포지에서 수행하였고, 공시 잔디는 들잔디(*Zoysia japonica)*를 사용하였다. 공시

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-233-8554, Fax: 043-232-7176
E-mail: kimd730@empal.com

제초제는 Bentazone (8 ml/2 L($H_2$0)/5 $m^2$), MCPP (7 ml/2 L ($H_2$0)/5 $m^2$)를 사용하였고, 공시 비료로는 아미노산이 포함된 액비(LFcAA)를 이용하였다. A사의 아미노산 액비는 필수아미노산 16.39 g/l과 총 아미노산 41.71 g/L로 시중판매 아미노산 액비 중에 가장 많은 양의 아미노산을 포함하고 있다. 화학적 특성은 질소 3.7%, 수용성 인산 2.78%, 수용성 칼륨 4.94%, 수용성 붕소 0.15%, 그리고 수용성 몰리브덴 0.0011%이었고, 아미노산 함량은 41.7 g/L 였다. 시험포장은 100 ㎡ 크기이며, 액비처리에 따라 배치하였고 5 반복으로 수행하였다. 실험은 2005년 3월 10일 실험지를 조성하였으며, 4월 25일에 혼합 제조체 처리를 하였다. 이후 5월 5일 아미노산 액비를 처리한 후 15일이 경과한 후 토양 샘플링을 각각 실시하여 미생물분석을 실시하였다.

### 토양으로부터 DNA 추출, 16S rDNA 정제 및 증폭

전체 DNA는 토양 0.2 g 으로부터 추출되었다. 전체 DNA는 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, German)를 사용하였으며, 추출은 사용서에 포함된 protocol에 따라 추출하였다. 채집된 토양으로부터 16S rDNA 유전자는 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 통하여 20 ul 반응액으로부터 MyGenie 32 Thermal Block (Bioneer, Korea)을 이용하여 증폭되었다. 토양세균의 16S rDNA를 증폭하기 위하여 고안된 universal primer인 27F (*E. coli* numbering 8~27: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')와 1492R (*E.coli* numbering 1492~1510: 5' GGYTACCTTGTTACGACTT 3')가 사용 되었다. PCR 반응조건은 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분씩 25회 반복하고 마지막에는 72°C에서 8분간 처리하였다.

### 말단제한절편 분석(T-RFLP)

T-RFLP 분석 방법이 비록 미생물 종의 정성적 분석과 정량적 분석에 대한 정확한 정보를 제공하기에는 부족할 지라도 이는 미생물 군집 간의 유사도와 분포를 설명하고자 할 땐 비교적 신속하고, 효과적인 방법으로 알려져 있다(6, 8, 9). 정제된 PCR 산물 50 ng/μl을 제한효소 *Hae*III (Bioneer, Korea)으로 최종부피 20 μl로 하여 제조사의 방법대로 처리하였다. 반응이 끝난 말단제한절편은 자동염기서열 결정 장치(모델 ABI 3100, Automated sequencer, Applied Instrument Biosystems, USA)를 사용하였다.

### 16S rDNA 클로닝 및 염기서열분석

PCR 산물은 Gel 정제를 한 후 TOPO TA cloning kit pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen Corporation, USA)를 이용하여 제작사의 protocol에 따라 클로닝 하였다. 개개의 plates에서 16S rDNA의 서열 분석을 위하여 약 110개의 콜로니를 선별하였다. pCR2.1 vector 클론들로부터 rDNA insert들을 vetctor 프라이머인 M13F(GTAAAACGACGGCCAG)와 M13R (CAGGAAA CAGCTATGAC)을 이용하여 PCR 증폭 하였다.

증폭된 클론들은 ABI 3700XL DNA sequencer (Applied Biosysems, USA)의 서열 분석기기를 사용하여 (주)제노텍(Korea)에 서열 분석을 의뢰하였다. 결정된 16S rDNA 염기 서열들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nih.gov/)의 BLAST 검색을 통해 클론과 가장 가까운 그룹을 조사하여 참조 서열을 확보하였다. 염기서열 편집과 정렬은 Clustal X (ver. 1.83) (14)을 이용하였고, 계통도는 TreeView 1.6.6을 이용하여 Neighbor-Joining method를 사용하였다. 계통도내 분지의 안정도를 조사하기 위하여 1000번의 bootstrap resampling 분석을 실시하여 값을 표시하였다.

## 결 과

### T-RFLP분석

들잔디 토양의 미생물 군집구조를 조사하기 위하여 T-RFLP를 실시하였다. 분석결과 대조구(KD1), 무처리구(KD2), 아미노산 액비 1배(KD3), 아미노산 액비 2배(KD4) 에서 나타나는 피크의 양상뿐만 아니라 각각의 T-RFs가 차지하는 상대적인 비율에도 차이를 보였다. KD1에서는 유효 크기를 가진 피크가 69개로 현저히 많은 클론이 나타났음을 알 수 있었다. 아미노산액비를 처리하지 않은 무처리구인 KD2에서는 유효 bp 크기를 가진 피크가 23개를 나타났으며, 연구의 실험처리구인 KD3과 KD4에서는 점차 증가하는 32개, 38개의 피크가 유효 bp 피크를 갖는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이는 아미노산을 포함한 액비가 토양의 미생물 환경생태계에 영향을 주고 이를 통해 다양한 미생물이 서식하게 하는 것으로 판단된다.

### 16S rDNA 클론 분석

농약 처리 후 들잔디 토양의 깊이 0~10 cm의 토양을 대상으로 대조구(KD1), 무처리구(KD2), 아미노산 액비 1배(KD3), 아미노

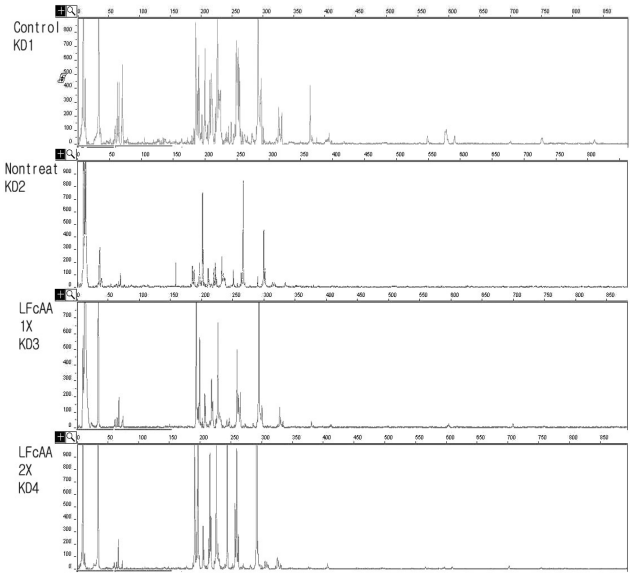


**Fig. 1.** Comparison of electropherograms of the T-RFs for *Hae*III digestion of 16S rDNAs amplified from each genomic DNA of KD1, KD2, KD3 and KD4 samples.

산 액비 2배(KD4) 처리한 토양의 클론을 임의로 각각 110개씩 선택하여 16S rDNA clone partial sequence를 분석하였다. 110개의 분석된 부분 염기서열들은 chromas213 프로그램으로 정렬한 후 GeneBank database를 이용하여 16S rRNA sequence와 비교하였다. 16S rDNA 클론의 염기서열 분석 결과 *Alpha-, Beta-, Gamma-, Deltaproteobacteria* 그룹, *Acidobacteria* 그룹, *Actinobacteria* 그룹, *Sphingobacteria*, *Planctomycetes*에 속하는 클론들로 주로 조사되었다(Table 1, 2, 3, 4). 이중 *Proteobacbacteria* 그룹이 높은 비율로 나타났으며, 특히 KD4의 경우에는 KD2의 경우에는 출현하지 않았던 *Planctomycetales*에 속하는 클론들이 조사되었다. BLAST 검색 결과 대부분의 클론들은 90% 이상의 유사성을 갖는 클론들이었으며, 대부분 95% 이상의 높은 유사성을 갖는 것으로 나타났다.

***Alphaproteobacteria*** : 본 연구에서 *Alphaproteobacteria*가 가장 많은 수의 클론이 조사되었다. 대조구인 KD1에서는 9개의 클론이 조사되었으며, 주로 *Sphingomonadaceae* 그룹에 속하는 배양되지 않는 환경샘플 균주들이 조사되었고 이들은 95-97% 의 유사도를 나타냈다(Fig. 2).

무처리구인 KD2에서도 8개의 클론이 *Sphingomonadaceae*에 속하는 비배양의 환경샘플과 *Sphingomonas* sp. 가 96~97%의 유연관계를 나타냈다(Table 1). 아미노산 액비 1배 처리구인 KD3에서는 8개의 클론이 조사되었는데 이들은 *Sphingomonadaceae*의 비배양 환경샘플과 *Kaistobacter* 속이 94%의 유사성을 나타냈으며, *Caulobacteraceae*과의 *Brevundimonas* 속과 98%의 유사성을

**Table 1.** Molecular identification of clones from *Zoysia japonica* soils that belong to *Alphaproteobacteria* in the GeneBank database

| Clone ID | Accession No. | Closely related taxon | Identities (%) |
|---|---|---|---|
| KD1-5 | AY922159 | Uncultured *alpha proteobacterium* clone AKYH831 | 594/615 (96%) |
| KD1-25 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 717/742 (96%) |
| KD1-29 | AB219941 | Sphingosinicella *microcystinivorans* strain:MDB3 | 336/360 (93%) |
| KD1-48 | AY922004 | Uncultured *alpha proteobacterium* clone AKYG395 | 709/741 (95%) |
| KD1-75 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 811/833 (97%) |
| KD1-81 | AY676115 | *Sphingomonadaceae bacterium* KMM 6042 | 601/628 (95%) |
| KD1-93 | AF235994 | *Alpha proteobacterium* F0917 | 625/638 (97%) |
| KD1-101 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 832/849 (97%) |
| KD1-109 | AY921836 | Uncultured *alpha proteobacterium* clone AKYG832 | 960/1002 (95%) |
| KD2-29 | AB220146 | *Sphingomonadaceae bacterium* PB323 | 715/741 (96%) |
| KD2-44 | AF395032 | *Sphingomonas* sp. SIA181-1A1 | 760/786 (96%) |
| KD2-64 | AB220146 | *Sphingomonadaceae bacterium* PB323 | 729/752 (96%) |
| KD2-71 | AY569282 | Uncultured *Sphingomonas* sp. clone YJQ-4 | 753/790 (95%) |
| KD2-82 | AY922043 | Uncultured *alpha proteobacterium clone* AKYG624 | 745/774 (96%) |
| KD2-98 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 822/844 (97%) |
| KD2-101 | AF409011 | *Sphingomonas* sp. Ellin169 | 786/807 (97%) |
| KD3-8 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 821/844 (97%) |
| KD3-22 | AY921978 | Uncultured *alpha proteobacterium* clone AKYG1729 | 772/807 (95%) |
| KD3-23 | AF235994 | *Alpha proteobacterium* F0917 | 810/834 (97%) |
| KD3-52 | AY922159 | Uncultured *alpha proteobacterium clone* AKYH831 | 646/661 (97%) |
| KD3-80 | AY769083 | *Kaistobacter koreensis* strain PB56 | 605/642 (94%) |
| KD3-86 | DQ108394 | *Brevundimonas* sp. Tibet-IBa1 | 768/783 (98%) |
| KD3-93 | AY360526 | Uncultured *Methylobacteriaceae bacterium* clone 10-3Ba02 | 739/750 (98%) |
| KD3-96 | M83803 | *Caulobacter* sp. FWC2 | 864/892 (96%) |
| KD4-1 | U87783 | *Afipia genosp*. 12 | 882/904 (97%) |
| KD4-5 | AY364020 | *Methylobacterium* sp. iEII3 | 1009/1044 (96%) |
| KD4-15 | X97693 | *Pedomicrobium australicum* | 918/951 (96%) |
| KD4-16 | AY234707 | *Bacterium* Ellin6055 | 903/917 (98%) |
| KD4-26 | AF235994 | *Alpha proteobacterium* F0917 | 874/898 (97%) |
| KD4-67 | UAL532702 | Uncultured *alpha proteobacterium* clone JG34-KF-161 | 842/865 (97%) |
| KD4-71 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 778/804 (96%) |
| KD4-73 | AY922159 | Uncultured *alpha proteobacterium* clone AKYH831 | 516/524 (98%) |
| KD4-78 | AY206687 | *Rhizobium rhizogenes* strain 163C | ?728/742 (98%) |
| KD4-92 | AB196253 | *Sphingomonas* sp. IC145 | 907/982 (92%) |
| KD4-97 | AY081166 | *Sphingomonas* sp. S-2 | 899/935 (96%) |
| KD4-102 | Y18216 | *Phenylobacterium immobile* | 715/753 (94%) |
| KD4-103 | DQ218322 | *Sphingomonas* sp. | 625/658 (94%) |
| KD4-112 | AY360645 | Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* clone M10Ba57 | 821/844 (97%) |

**Table 2.** Molecular identification of clones from *Zoysia japonica* soils that belong to *Gamma Proteobacteria* in the Genebank database

| Clone ID | Accession No. | Microorganism Strain Name | Identities (%) |
|---|---|---|---|
| KD1-47 | AY921730 | Uncultured *gamma Proteobacterium* clone AKYH1295 | 697/736 (94%) |
| KD1-65 | AY921807 | Uncultured *gamma Proteobacterium* clone AKYG1655 | 588/612 (96%) |
| KD1-73 | AY337597 | *Pseudomonas* sp. HF3/S21027 | 721/737 (97%) |
| KD1-83 | AB074734 | *Gamma Proteobacterium* S-N(2)-25A | 664/681 (97%) |
| KD1-108 | AB244763 | *Rhodanobacter lindaniclasticus* | 908/946 (95%) |
| KD2-35 | AY941838 | *Pantoea agglomerans* strain XW123 | 773/795 (97%) |
| KD2-51 | AY162032 | *Gamma proteobacterium* PI_GH1.1.A2 | 816/838 (97%) |
| KD3-57 | AY884571 | *Dyella koreensis* strain BB4 | 902/925 (97%) |
| KD4-17 | AF154087 | Uncultured *hydrocarbon seep bacterium* BPC023 | 746/804 (92%) |
| KD4-30 | DQ229316 | *Pseudomonas* sp. BCNU171 | 873/919 (94%) |
| KD4-80 | CP000094 | *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 | 912/943 (96%) |
| KD4-82 | AY785740 | *Pseudomonas* sp. OUCZ52A | 769/854 (90%) |

**Table 3.** Molecular identification of clones from *Zoysia japonica* soils that belong to *Beta Proteobacteria* in the GeneBank database

| Clone ID | Accession No. | Microorganism Strain Name | Identities (%) |
|---|---|---|---|
| KD1-68 | AY921702 | Uncultured *beta Proteobacterium* clone AKYG1579 | 862/882 (97%) |
| KD1-87 | AY921700 | Uncultured *beta Proteobacterium* clone AKYG728 | 606/619 (97%) |
| KD2-15 | AY360706 | Uncultured *Oxalobacteraceae bacterium* clone M3Ba42 | 690/730 (94%) |
| KD2-32 | AB196254 | *Janthinobacterium* sp. IC161 | 749/773 (96%) |
| KD2-81 | ASY18617 | *Acidovorax* sp. BSB421 | 779/791 (98%) |
| KD2-85 | AB196254 | *Janthinobacterium* sp. IC161 | 749/774 (96%) |
| KD2-96 | AB196254 | *Janthinobacterium* sp. IC161 | 845/870 (97%) |
| KD2-104 | DQ234219 | Uncultured *Acidovorax* sp. clone DS137 | 657/675 (97%) |
| KD3-13 | AB196254 | *Janthinobacterium* sp. IC161 | 889/908 (97%) |
| KD3-35 | ASY18617 | *Acidovorax* sp. BSB421 | 972/992 (97%) |
| KD3-41 | AY238505 | *Burkholderia* sp. 13 | 969/1000 (96%) |
| KD3-49 | AY123813 | *Nitrosospira* sp. Nsp65 | 600/632 (94%) |
| KD3-57 | AY884571 | *Dyella koreensis* strain BB4 | 902/925 (97%) |
| KD4-47 | AY123796 | *Nitrosospira* sp. L115 | 625/633 (98%) |
| KD4-70 | ASY18617 | *Acidovorax* sp. BSB421 | 875/881 (99%) |
| KD4-76 | AY123796 | *Nitrosospira* sp. L115 | 695/710 (97%) |
| KD4-94 | AY599729 | Uncultured *Variovorax* sp. clone Cl-26-TB3-I | 946/979 (96%) |
| KD4-95 | AB196254 | *Janthinobacterium* sp. IC161 | 968/991 (97%) |

나타냈다. 그리고 *Methylobacteriaceae*과의 비배양의 환경샘플 98% 유사성을 나타냈으며, *Caulobacteraceae*과의 *Caulobacter* 속과 96%의 유사성을 나타냈다. *Caulobacter* 속에 속하는 세균은 대개 영양분이 적은 담수나 해수 서식처에서 분리되지만 토양에도 존재한다(1). 그리고 아미노산 액비 2배 처리구인 KD4에서는 14개의 클론이 나타났으며, 대부분의 클론들은 96~98%의 높은 유사성을 갖고 있었다. 특히 KD4에서는 *Rhizobiales, Sphigomonadales*, 그리고 *Caulobacterales* 목에 속하는 미생물들의 클론이 조사되었다. KD4-1(97%), 5(96%), 15(96%), 78(98%)의 4개의 클론은 *Rhizobiales*에 속하는 것으로 조사되었다. *Rhizobiaceae*과의 그룹에 속하는 이 구성원들은 호기성이며, 운동성 간균으로 불리한 환경에서는 모양이 다양하게 변하기도 한다. 또한 이 그룹의 *Rhizobium*은 콩과 식물의 뿌리혹세포와 공생관계를 맺어 질소를 고정하는 박테로이드로 살아간다(1). KD4-71(96%), 92(92%), 97 (96%), 103(94%), 112(97%)의 5개의 클론이 *Sphingomonadales* 목에 속하는 것으로 조사되었다(Table 1). KD4-102(94%)의 1개의 클론은 *Caulobacterales* 목에 속하는 것으로 *Phenylobacterium immobile*로 조사되었다(Fig. 2). 이 클론은 herbicide chloridazon 을 분해하는 미생물로 알려져 있다(13). 이

**Table 4.** 16S rDNA phylotype distribution from *Zoysia japonica*'s soil clones

| Taxonomic group | No. of clones | | | |
|---|---|---|---|---|
| | KD1 | KD2 | KD3 | KD4 |
| *Alphaproteobacteria* | 9 | 8 | 8 | 14 |
| *Betaproteobacteria* | 2 | 7 | 5 | 5 |
| *Gammaproteobacteria* | 5 | 2 | 2 | 4 |
| *Deltaproteobacteria* | 1 | - | - | - |
| Total proteobacteria | 17 | 16 | 15 | 23 |
| *Acidobacteria* | 7 | 3 | 1 | 3 |
| *Actinobacteria* | 3 | 4 | 1 | 1 |
| *Sphingobacteria* | 6 | - | - | 1 |
| *Planctomycetacia* | - | - | 1 | 2 |

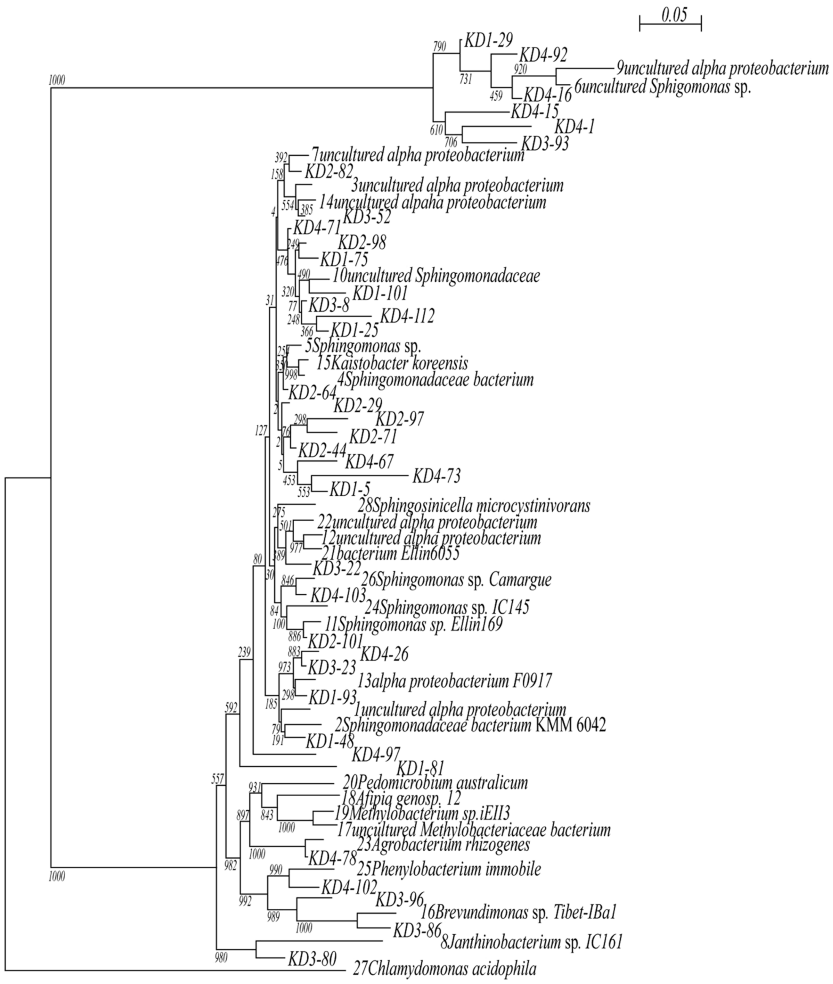


**Fig. 2.** A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of *Zoysia japonica* soil in *Alpha-Proteobacteria*(KD1; control, KD2;nontreated, KD3; LFcAA 1x, KD4; LFcAA 2x).

러한 결과는 아미노산 액비를 2배 정도 처리가 열악한 잔디 환경에서 다양한 미생물들의 생존에 유리하게 작용하는 것으로 판단되었다.

***Gammaproteobacteria*** : *Gamma-Proteobacteria*는 조사된 *Proteobacteria* 가운데 두 번째로 많은 클론을 형성하였다. KD1은 5개의 클론들이 조사되었다. 이 그룹은 *Pseudomonadaceae* 과의 *Pseudomonas* 속의 클론이 97%의 유사성을 나타냈으며, 이 그룹은 산소를 수용체로 사용하는 호흡 대사를 하고, 일부는 수소나 일산화탄소를 에너지원으로 사용하는 세균들이다. 비 배양의 환경샘플, 그리고 *Xanthomonadaceae*과의 *Rhodanobacter*속이 95% 유사성이 있는 클론이 조사되었다. KD2는 2개의 클론이 나타났으며 *Enterobacteriaceae*과의 *Pantoea*속과 97% 유의성을 보였지만 계통분류학적으로는 일치하지 않았다(Fig. 3). KD3는 2개의, KD4는 4개의 클론을 형성하였다. 무처리구인 KD2의 클론은 *Enterobacteriaceae*목의 *Pantoea agglomerans* (97%)이 조사되었다(Table 2). KD4의 클론들은 주로 *Pseudomonas* 속들로 조사되었다. 이들은 *Psuedomonadales*목, *Pseudomonadaceae*과에서 가장 중요한 속이다. *Pseudomonas*속의 세균은 곧거나 약간 구부러진 모양을 한 호기성이며, 산소를 수용체로 사용하는 호흡대사를 한다. 많은 종류가 매우 다양한 유기 분자를 분해할 수 있다. 따라서 자연에서나 하수처리 과정에서의 무기질화 과정에 매우 중요하다(1).

***Betaproteobacteria*** : 이 그룹에 속하는 클론들이 KD1에서는 2개, KD2에서는 7개, KD3에서는 5개, KD4에서는 5개의 클론이 출현하였다. KD1은 환경샘플에 속하는 클론들이었고, KD2는 *Burkholderiales*목, *Oxalobacteraceae*과의 *Janthinobacteria*속의 환경샘플과 94%유사성을 갖는 클론이 1개, *Acidovorax* sp. 과 96% 유사성을 갖는 클론이 1개, *Janthinobacterium* sp. 97% 유사성을 나타내는 클론 4개가 조사되었다. 다른 클론 1개는 계통분류학적 분석 결과 *Comamonadaceae*과의 *Acidovorax*속과 97% 유사성을 갖는 것으로 탈질화에 관여하는 분리 균주들로 조사되었다. KD3의 클론은 *Burkholderiaceae*과의 *Burkholderia* 속으로 96% 유사성을 나타냈으며, 또 다른 클론은 *Nitrosomonadaceae*과의 *Nitrosospira*속과 94% 유사성을 나타냈다. KD4에서는 주로

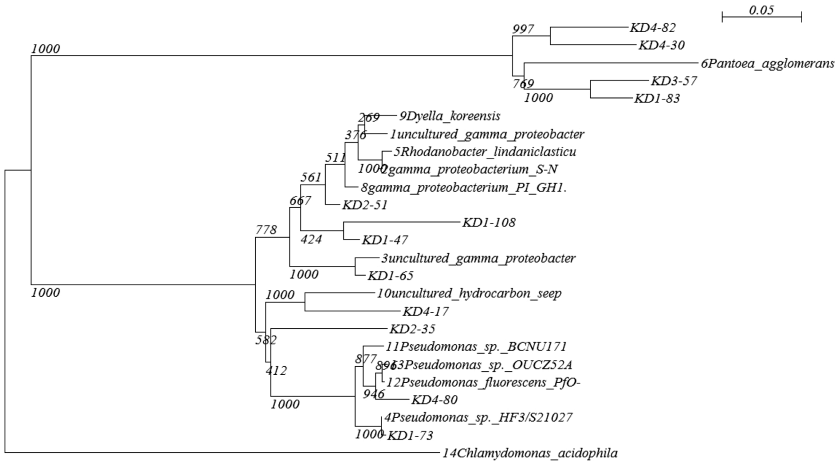


**Fig. 3.** A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of *Zoysia japonica* soil in *Gamma-Proteobacteria* (KD1; control, KD2; nontreated, KD3; LFcAA 1x, KD4; LFcAA 2x).

*Nitrosomonadales* 목의 *Nitrosospira*속들이 주로 조사되었다. KD4에서 나타난 클론들은 *Nitrosospira* 속들과 98%의 높은 유사성을 나타냈다. 이 그룹은 생태적으로 매우 중요하며, 토양이나 하수처리계, 담수와 해수 서식처 등에서 산다. 이들 속은 암모니아를 산화하여 아질산염으로 만들며, 질산염의 질소는 식물에 의해 잘 이용된다(1). *Comamonadaceae* 과의 *Acidovorax* 속에 속하는 클론은 99%의 높은 유사성을 나타냈다. KD4-47,76은 bootstrap값 1000으로 하나의 그룹을 형성하였다(Fig. 4). *Oxalobacteraceae*과의 *Janthinobacteria*속 *Nitrosospira* sp. L115 과 97% 유사성을 갖는 클론이 나타났으며, KD4에서는 무처리구보다 주로 질소 동화에 관여하는 클론들이 주를 이루었다.

***Deltaproteobacteria*** : 본 연구에서 *Deltaproteobacteria*에 속하는 클론들은 KD1에서만 1개의 클론이 *Uncultured delta proteobacterium* clone AKYH836과 92% 유사성을 갖는 것으로 조사되었다. 다른 실험구에서는 조사되지 않았다.

***Acidobacteria*** : 이 그룹은 KD1에서 7개의, KD2에서 1개의, KD4에서 2개의 클론이 조사되었다. 일반적으로 혐기적 환경에서 주로 나타나는 그룹으로 본 연구에서는 KD1에서 많이 나타났다. 이 그룹은 혐기 환경에서 acetate와 propionate등과 같은 다양한 유기산을 이용하여 성장하며, 주로 호산성(acidophilic) 환경에서 화학 종속영양을 하는 그룹이다(12).

***Actinobacteria*** : 이 그룹에 속하는 클론들은 KD1과 KD2에서는 3개의, KD3, 4에서는 1개의 클론들이 각각 조사되었다. 이 그룹에 속하는 대부분의 속은 불규칙한 모양을 가졌으며, 포자를 형성하지 않는 그람양성 간균으로 호기성이거나 조건부 호기성 대사를 한다(1).

***Planctomycetacia***: KD3에서는 *Planctomycetales*목의 환경샘플인 *Planctomycetales* bacterium과 89% 유사도를 갖는 클론이 1개, KD4에서도 *Planctomycetales*목의 환경샘플인 *planctomycete* clone과 91%의 유사도를 갖는 클론 2개가 조사되었다.

***Sphingobacteria*** : *Bacteroidetes*에 속하는 이 그룹의 *Sphingobacteria*는 KD1에서 *Sphingobacteriaceae*과의 *Sphingbacterium*

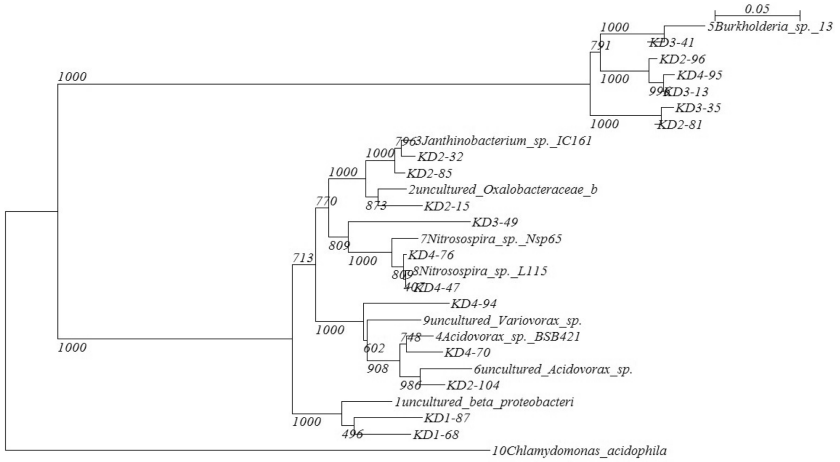


**Fig. 4.** A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of *Zoysia japonica* soil in *Beta-Proteobacteria* (KD1; control, KD2; nontreated, KD3; LFcAA 1x, KD4; LFcAA 2x).

속의 *Spingobacterium* sp.와 97% 유사성을 갖는 클론 1개, *Flexibacteaceae*과의 *Taxeobacter*속의 *Taxeobacter* sp.와 92% 유사성을 갖는 클론 1개, *Adhaeribacter*속의 *Adhaeribacter aquaticus* strain과 90%의 유사성을 갖는 클론이 1개, *Hymenobacter*속의 *Hymenobacter* sp.과 90%의 유사성을 갖는 클론이 2개, *Sphingobacteriaceae*과 *Sphingobacterium*속의 *Pedobacter* sp. 와 97%의 유사성을 나타내는 클론 1개 등 6개의 클론들이 조사되었다. KD4에서는 1개의 클론이 *Flexibacteraceae*과 *Hymenobacter*속의 *Hymenobacter* sp.와 93%의 유사성을 갖는 것으로 조사되었다.

## 고 찰

본 연구는 공시 제초제로 Bentazone (8 ml/2 L($H_20$)/5 $m^2$), MCPP (7 ml/2 L($H_20$)/5 $m^2$)를 사용한 후, 아미노산이 포함된 액비를 처리한 후 들잔디 토양 내 16S rDNA유전자 분석을 통해 미생물 군집구조와 다양성의 변화를 이해하기 위하여 진행되었다. KD1, KD2, KD3, KD4의 토양 미생물들을 T-RFLP 분석을 통하여 아미노산이 포함된 액비 2배액을 처리한 실험구가 무처리구에 비해 미생물군집 구조가 다른 것을 확인하였다(Fig. 1). 16S rDNA 염기서열 분석 결과 아미노산 액비를 처리한 것과 처리하지 않은 곳에서 들잔디에 서식하는 미생물들이 서로 다른 분포를 나타내고 있으며, 대부분의 클론이 배양 가능한 미생물 그룹과 일치하지 않는 결과를 보였다(Fig. 2~Fig. 4). 이러한 결과는 배양 방법만을 이용한 잔디 토양생태계에서 미생물 생태 연구 방법은 다양한 미생물 그룹들의 중요성과 역할에 대한 충분한 정보를 제시하지 못하므로 분자생물학적인 방법을 이용한 해석이 필요하다고 하겠다(6).

들잔디에 농약처리 후 아미노산 액비를 처리한 KD3과 KD4를 아미노산 액비를 처리하지 않은 KD2와 비교해 볼 때 KD3, KD4가 더 다양하고 식물체에 효과적인 미생물들이 서식함을 알 수 있었다. 특히 KD4는 KD3보다도 더 다양한 미생물들이 서식하고 있었다. *Alphaproteobacteria* 에서는 *Rhizobiales, Sphigomonadales*, 그리고 *Caulobacterales* 목에 속하는 미생물들의 클론이 조사되었으며, *Gammaproteobacteria* 에서는 *Pseudomonas* 속의 세균들이 주로 나타났으며, *Betaproteobacteria* 에서는 *Nitrosomonadales* 목의 *Nitrosospira* 속들이 주로 조사되었다. 이 외에도 *Acidobacteria* 그룹, *Actinobacteria* 그룹, *Planctomycetes*, *Sphingobacteria* 그룹들이 다양하게 조사되었다. 이들 KD4에서 조사된 미생물들은 종류가 다양한 유기 분자를 분해하며 자연에서나 하수처리 과정에서의 무기질화 과정에 매우 중요한 역할을 하는 세균들이다. 또한 이들 미생물은 암모니아를 산화하여 아질산염으로 만들며, 질산염의 질소는 식물의 생장에 도움을 주는 중요한 역할을 하는 미생물들이 주로 서식하고 있음을 알 수 있었다. 특히 아미노산이 포함된 액비를 시비했을 때 제초제를 분해하는 *Phenylobacterium immobile* 이 조사되었다. 이 클론은 herbicide chloridazon 을 분해하는 미생물로 알려져 있다.

현재 골프 코스에서 농약을 줄이기 위해서 생물학적, 관습적, 유전학적으로 진일보한 수단이 강구되고 있지만, 아직도 기술적으로 많은 부분이 미흡한 수준이다. 기 조성된 골프코스에서 환경에 최소한의 영향을 미치는 병해방재에 최근 많은 관심을 가지고 연구되고 있는 것이 생물학적 방제이다(3, 4).

미생물을 이용한 방제에는 항균 화학물질을 생산하는 박테리아를 이용하는 억제방법이 있으며, 그 외에 병원균의 먹이원을 차단하거나 물리적으로 병원균이 서식하는 지역을 차지함으로써 질병 발생을 억제하는 이식(colonization)이 있다. 이들 미생물들에 의한 생물학적 조절이 가능하기 위해서는 병원균을 억제 할 수 있도록 유효 미생물의 활동성이 커야만 하므로 유효미생물이 더 활성화될 수 있는 조치를 취해야만 한다(5). 그러므로 이와 같은 열악한 잔디 환경에 아미노산을 포함한 액비를 처리한다면 본 연구의 결과에서 나타난 것처럼 다양한 미생물이 서식하게 될 것이며, 식물의 생장에 중요한 양분을 공급할 수 있는 유효 미생물들이 더 활성화 될 것으로 판단된다.

## 참고문헌


1. 김영민, 김경민, 서영훈, 신주옥, 이혜영, 정인실, 조은희, 하영미. 2004. 일반미생물학, 제5판, 라이프사이언스, 서울.
2. 김영선, 이규승, 함선규. 2003. 아미노산 액비가 벤트그라스잔디(Bentgrass)의 생장과 토양에 미치는 영향. 한국잔디학회지 14, 147-154.
3. 심규열, 김희규. 1999. 길항균과 농약의 조합처리에 의한 갈색퍼짐병(라지패취) 방제. 한국잔디학회지 13, 40-67.
4. 이상재, 심경구, 김영권, 허근영. 1998. 길항미생물에 의한 *Rhizoctonia* spp.의 억제 및 길항미생물의 농약 혼용시 생존율. 한국잔디학회지 12, 23-30.
5. 이상재, 허근영, 사공영보. 2001. 국내 골프 코스에서 사용되는 농약 및 비료의 환경적 영향. 한국잔디학회지 15, 87-104.
6. 조혜연, 이정현, 현정호. 2004. 16S rDNA 분석을 이용한 강화도 장화리 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집구조 및 다양성. *Kor. J. Microbiol.* 40, 189-198.
7. Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.1995. Phylogenetic identificaiton and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivaiton. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
8. Blackwood, C. B., T. Marsh, S. -H. Kim, and E. A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 926-932.
9. Dunbar, J., L. O. Ticknor, and C. R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-2950.
10. Emmons, R. D.1995. Turfgrass science and management, 2nd ed., p.39-82. Delmar Publishers. Albany, New York.
11. Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pikup.1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol. Ecol.* 35, 1-21.
12. Lieasck, W., F.Bak, J. U. Kreft, and E.Stackebrandt. 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aroma compounds. *Arch. Microbiol.* 162, 85-90.
13. Lingens, F. 1985. *Phenylobacterium immobile*gen. nov., sp. nov., a gram-negative bacterium that degrades the herbicide chloridazon.

*Int. J. Syst. Bacteriol* 35, 26-39.
14. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
15. Turgeon, A. J. 1991.Turfgrass Management, 3rd ed. p. 5-20. Rentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

**(Received February 27, 2006/Accepted March 14, 2006)**

---

**ABSTRACT: Bacterial Community Structure and Diversity of the *Zoysia japonica* Soil Treated with Liquid Fertilizer Containing Amino Acids**

**Dong-Il Kim and Dong-Hun Kim[1]*** (Department of Forest Resources, Graduated School Chungnam National University, Daejeon 305-764, [1]Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongwon 363-791, Korea)

T-RFLP analysis and clone sequencing analysis based on bacterial 16S rDNA were conducted to assess bacterial community structure and diversity in *Zoysia japonica* soil treated with liquid fertilizer containing amino acids(LFcAA) after spray with herbicide. The results of T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) analysis using restriction enzyme *Hae III* showed that the T-RFs of various size appeared evenly in the 32 clones of KD3 and 38 clones of KD4 respectively that had been treated with liquid fertilizer containing amino acid(LFcAA) compared to 23 clones of KD2 hat had not been treated with LFcAA. The microbial community structure in KD2 appeared less diverse than those in KD3 and KD4. Analysis of partial sequences for 110 clones from KD1 (control), KD2 (non-treated), KD3 (LFcAA 1X), KD4 (LFcAA 2X), respectively, revealed that most bacteria were related with uncultured bacteria in a 16S rDNA sequence similarity range of 91-99% through blast search. Otherwise, the other clones were members of *Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteria* and *Planctomyces* groups. Especially in KD4, members of *Alpha Proteobacteria, Rhizobiales, Sphigomonadales*, *Caulobacterales*, *Gamma Proteobacteria*, the genus *Pseudomonas, Betaproteobacteria*, *Nitrosomonadales* and genus *Nitrosospira* appeared to be dominant. In addition, *Acidobacteria* group, *Actinobacteria* group, *Planctomycetacia* and *Sphingobacteria* were also shown. The microbial community structure in *Z. japonica* soil sprayed with herbicide was affected by LFcAA.