

산림토양으로부터 분리한 저영양성-질소고정세균의 분류학적 특성

황경숙*

목원대학교 생명과학부 미생물학과

산림토양의 각 토양층으로부터 분리된 세균 중에는 통상 농도의 NB배지에서는 증식이 현저히 저해되고 희석한 DNB 배지에서만 증식이 가능한 세균이 다수 포함되어 있었으며, 이들 세균은 NB배지를 10^{-1} ~ 10^{-4} 배로 희석한 배지에서의 증식양상에 따라 4가지형으로 구분되었다. 본 연구에서는 저영양세균의 기준에 따라 10^{-1} NB(1 mg C/liter) 배지에서 양호하게 증식하는 Type II와 IV세균을 저영양세균으로 분류하였고, 60개의 Type IV (편성저영양세균; obligate oligotrophic bacteria) 균주를 순수분리 하였다. 이들 저영양성 세균중 질소고정능을 갖는 11균주에 대하여 화학분류 및 계통분류학적 특성을 검토한 결과 모든 균주는 주요 균체지방산으로 $C_{18:1}$ 을, 퀴논은 Q-10을 함유하였으며, G+C함량은 61~64 mol% 범위를 나타내었다. 16S rDNA염기서열을 결정한 결과 각 균주는 Proteobacteria α -subdivision의 BANA domain (*Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter* 및 *Afipia*)에 속하였고 *Bradyrhizobium japonicum* 및 *Bradyrhizobium elkanii*와 98% 이상의 높은 상동성을 나타내었다.

Key words □ *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, nitrogen-fixation, oligotroph

토양 중에는 다종다양한 미생물이 존재해 있지만 그 대부분이 분리되지 못한 상태이다. 그러나 생태계에서 물질순환이나 식물 생육 등에 세균이 행하고 있는 역할을 생각해 본다면 보다 광범위하게 세균을 분리하여 연구하는 것은 매우 중요하다고 본다. 최근 자연환경에 서식하고 있는 각종 세균의 증식과 영양물 농도에 대해 새로운 관심을 갖게 되었다(3,7). 즉 지금까지 분리되어 연구된 세균은 비교적 고농도 영양조건에서 급속히 증식하는 것이 대부분이었는데, 저농도 영양조건 하에서 더디게 증식하는 세균이 자연환경 중에 다수 존재한다고 여러 미생물생태학자들에 의해 밝혀지면서 담수, 해수 및 토양 중에 분포해 있는 저영양세균에 대한 연구가 활발히 전개되고 있다(5,11,13,19). 이들 저영양세균은 분리하기도 어렵고, 분리되었다 하더라도 배양이 잘 되지 않거나, 배양 도중에 소멸되어버리는 경우가 많기 때문에 분류 또는 생리적 특성에 관하여 충분히 해명되어 있지 못한 실정이다(10,12).

본 연구는 산림토양으로부터 분리된 저영양세균중 아세틸렌 환원 활성 nitrogenase로 확인된 질소고정세균의 화학분류 및 계통분류학적 특성을 검토하여 이들 저영양세균의 분류학적 위치를 알아보았다.

재료 및 방법

토양시료

낙엽 및 나뭇가지로부터 유래되는 유기물이 산림토양 표층부에

더해지고 시간이 흐름에 따라 분해가 진행되면서 4개의 층위로 형성된 litter (L)층, 이들 litter가 분해되어 생성된 부수어져 갈색의 부식층을 형성한 fermented litter (F)층, 더욱 분해가 진행되고 있는 humus (H)층과 표층으로부터 약 20~25 cm 이하에 황색의 광결토양을 이루고 있는 A층으로부터 토양 시료를 채취하였다.

배지

액체영양(nutrient broth:NB) 배지와 NB배지를 희석한(diluted nutrient broth:DNB)배지를 사용하였다. NB배지의 조성은 beef extract, 10 g; peptone, 10 g; NaCl, 5 g; distilled water, 1,000 ml이며 pH 7.0~7.2로 조정하였다. 그리고 NB 배지를 10^{-1} 배, 10^{-2} 배, 10^{-3} 배, 10^{-4} 배로 D.W.에 희석한 4종류의 희석 DNB 배지를 사용하였다.

저영양세균의 분리

DNB 평판배지 위에 형성된 colony로부터 토양세균을 각각 순수분리 하여, 10 ml의 DNB 액체배지에 분리 균주를 전배양한 후 NB, 10^{-1} NB, 10^{-2} NB 및 10^{-3} NB배지에 대수기의 세포를 각각 접종하여 27°C, 1주일간 배양 후 탁도로써 증식능을 판정하였다. 접종농도는 1 ml당 10^2 ~ 10^3 cell 정도가 되도록 조정하였다. 한편, 10^{-4} 배로 희석한 영양배지는 증식능이 미약하여 탁도로써 증식능 판별이 불가능하였으므로 평판법에 준하여 재확인하였다(19). 즉 접종 3주 후 colony를 계수한 결과 10^6 cells/ml 이상의 colony가 나타나는 것을 증식한 것으로 판정하였다. 통상농도의 NB배지에서 증식하지 못하는 세균 중 10^{-4} 배로 희석한 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균으로 순수분리 하였다. 순수분리된 저영양세균은 20% 글리세롤이 첨가된 배지에 넣어 -80°C에서 보존하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 042-829-7593, Fax: 042-829-7590

E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

아세틸렌환원법에 의한 Nitrogenase 활성의 검출

기초배지(K_2HPO_4 , 50 mg; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg; NaCl, 5 mg; $CaCl_2$, 0.1 mg; $FeCl_3$, 0.1 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 mg; distilled water, 1000 ml)에 0.1%(w/v)의 glucose를 첨가한 후 세균을 접종하였다. 분리된 대부분의 저영양세균은 반고형배지의 표면에서는 증식하지 않고 표면으로부터 2~3 mm 이하의 부분에서 증식하여 미호기성세균임이 확인 되었다. 미호기성 조건에서만 nitrogenase 활성이 관찰된 *Azospirillum*속 세균의 경우, nitrogenase 활성은 0.01~0.02 atm의 산소분압이 적당하다고 보고되고 있어 본 실험에서 사용한 혼합 gas 중의 산소분압은 0.01 atm으로 하였다(17). 시험관 입구를 이중고무선으로 봉한 후 시험관 내부의 기상부는 혼합가스($Ar:C_2H_2:O_2=89.1:9.9:1$, 압력비)로 치환하고 25°C에서 정치배양 하면서 반응 개시 후 시간별로 시험관 기상부의 가스를 0.1 ml 취하여 gas chromatograph (GC-4CM, PF형: Simazu)로 분석하였다.

균체지방산 조성 분석

균체지방산 methyl ester화 및 추출은 Ikemoto & Miyagawa의 방법(4,9)으로 행하였다. 지방산 methyl ester의 분석에는 수소 검출기가 달린 gas chromatograph (5% phenylmethyl-silicon으로 내면을 코팅한 capillary columne, 0.2 mm×25 mm)를 사용하였다. 각 지방산의 동정은 세균지방산 methyl ester혼액(Supelco사, Bacterial acid methyl ester mix CP)에 함유된 27종의 지방산 methyl ester의 retention time과 비교하였다. 각 지방산의 동정은 retention time의 변형인 equivalent chain length (ECL) 값을 참고하였다.

Quinone 분석

Isoprenoid quinone 분자종의 동정은 Collins 등의 방법(2)을 이용하여 건조균체로부터 지질혼합물을 추출하고, 이를 silica-gel TLC plate에 전개하여 표준물질과 동일한 R_f 를 갖는 band를 확인, 채취하여 정제하였다. 이 quinone 혼합물을 Collins 등(1981)의 방법에 따라 각각의 표준물질과 함께 HPLC를 이용하여 각각의 분자종을 동정하였다.

DNA의 추출 및 정제

균체 1~2 mg을 1 mM EDTA (pH 8.0)로 세척한 후 Tris 1% SDS를 첨가하여 60°C에서 10분간 유리봉으로 저어가면서 용균시키고 phenol:chloroform (1:1) 혼합액을 첨가하여 20분간 잘 혼합한 다음 원심분리(8,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 단백질을 침전시켰다. 상등액을 비커에 옮긴 후 상등액의 2배양의 Ethanol (-20°C 보존)을 첨가하여 얻은 DNA pellet을 70%, 80%, 99%의 ethanol로 세척하고 풍건한 후 0.1 X SSC에 용해하여 crude DNA를 얻었다. 10 μ l의 RNase A (Sigma, USA, 10 mg/ml) 용액을 첨가한 후 37°C, 30분간 반응시키고 동량의 phenol:chloroform (1:1)을 첨가하여 정제된 DNA를 얻었다 (1).

DNA의 G+C 함량(mol%)

G+C 함량은 Tamaoka와 Komagata의 방법 (16)으로 행하였다.

DNA의 G+C 함량은 정제된 DNA를 가열 변성한 후 nuclease P1으로 가수분해시켜 nucleotide를 만들고 이를 다시 alkaline phosphatase를 처리하여 nucleoside로 만든 다음 HPLC를 이용하여 DNA의 G+C 함량(mol%)을 구하였다.

16SrDNA의 PCR 증폭

16SrDNA를 증폭하기 위해서 사용한 primer는 20F (*E. coli* 16S rRNA 부분의 10-25 bp)와 1540R (*E. coli* 16S rRNA 부분의 1542-1525 bp) 이었다(6,8). PCR은 다음 조건에 따라 이루어졌다. 94°C 5분간 반응한 다음 94°C denaturation 1분, 55°C annealing 1분, 72°C extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension을 실시하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 9700; Applied Biosystems)를 이용하였다. 생성물은 1% agarose gel, 0.5×TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001M EDTA)에서 100V, 25 mA로 30분 전 기역동하여 ethidium bromide (EtBr)에 15분간 염색하여 UV 하에서 확인하고, Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen Inc.)로 정제하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

16S rDNA의 염기서열 결정에는 5F, 338F, 515F, 776F, 1087F, 1174F, 357R, 531R, 810R, 1104R, 1193R, 1540R의 primer를 사용하였고, Microseq™ 16S rRNA Gene Kit (Applied Biosystems)를 이용하여 cycle sequencing을 행한 후 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 염기서열을 결정하였다. 실험을 통하여 얻은 16S rDNA 염기서열의 homology는 DDBJ/EMBL GenBank DNA databases에서 조사하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal W (version 1.7) program package를 이용하여 정렬하였고(18), 근린 결합법에 의거(15), 저영양세균의 계통분류학적 위치를 정하였다.

결과 및 고찰

저영양세균의 분리

희석영양(DNB)배지로부터 분리한 균주 중에는 통상 농도의 NB 배지에서는 증식이 현저히 저해되는 균주가 다수 포함되어 있었다. 통상 농도의 NB에서 증식하지 않고 DNB 배지에서만 증식 가능한 세균으로, 10⁻⁴배로 희석한 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균으로 분리하였다. 저영양세균이란 일반적으로 알려진 세균이 증식할 수 없을 정도로 희석된 저영양배지에서도 양호한 증식을 나타내는 세균으로, 배지 1리터당 1 mg 이하의 유기탄소원을 함유하는 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균으로 정의하고 있다(5,12). 본 실험에서 사용한 NB배지의 경우, 배지 중의 유기탄소 함유량은 7,550 mg C/l로 10⁻⁴배로 희석한 배지에서는 약 1 ppm의 유기탄소원이 포함되어 있었다고 할 수 있다. 따라서 상기의 저영양세균의 기준을 고려해 본다면 10⁻⁴배로 희석한 배지에서 증식한 Type II와 Type IV세균군은 모두 저영양세균이라 할 수 있다. 더욱더 엄밀히 구분한다면 Type II는 통성저영양세균(facultative oligotrophic bacteria), Type IV는

Table 1. Classification of soil bacteria on growth pattern of the bacteria in different concentrations of nutrient broth

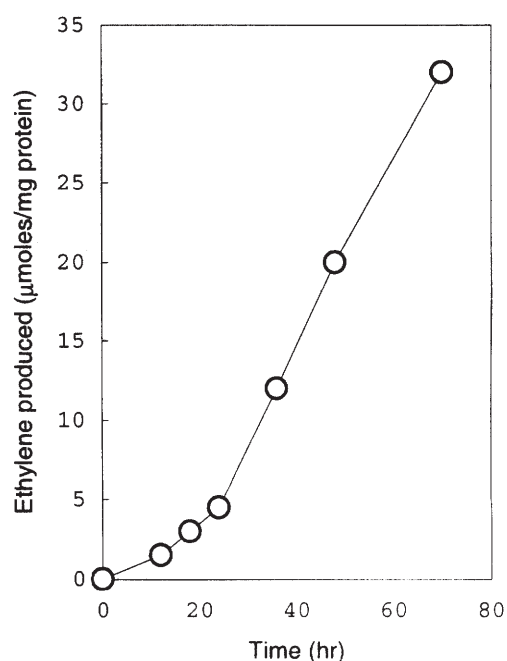
Type	Dilution of nutrient broth					No. of isolates
	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	
I	— ^a	+	+	+	+	29
II	+	+	+	+	+	32
III	—	+	+	+	—	41
IV	+	+	+	+	—	60
Total						162

^aGrowth response; +, growth was observed; —, growth was not observed.

편성저영양세균(obligate oligotrophic bacteria)이라고 할 수 있다 (20). 본 연구에서는 Type IV를 저영양세균으로 정의하고 60개의 균주를 순수분리 하였다(Table 1).

질소고정능

무질소배지에서 증식 가능한 저영양세균 중 아세틸렌환원활성

**Fig. 1.** Acetylene reduction to ethylene by MA547.**Table 2.** Cellular fatty acid compositions (%), quinone system, and G+C contents(mol%) of isolates

Characteristics	Oligotrophic-nitrogen fixing isolates										
	MH546	MF100	MH615	MA896	MF834	MH866	MF160	MF777	ML722	ML527	MA803
Fatty acids*											
Saturated											
12:0		0.7 ^a	0.6			0.9	0.5	1.3			
16:0	9.5	10.9	17.4	16.8	11.8	11.5	11.8	14.1	6.5	9.7	10.0
17:0	0.9		0.3	1.6			tr	0.9		tr	0.4
18:0	1.7	1.1	1.5	8.7	8.3	8.9	8.7	11.7	12.9	28.7	32.2
19:0				1.2	15.9	18.4	16.0	5.8	7.1	11.6	3.3
Unsaturated											
16:1(9)	3.3	3.2	2.2	6.9	4.1	3.5	2.1	3.0	4.8	2.2	8.1
18:1	82.0	84.1	77.5	60.5	44.6	39.2	45.6	58.9	55.5	31.9	42.5
20:1				1.2	15.3	16.8	15.2			10.3	3.1
Methyl-branched											
15:0 iso										1.2	
17:0 iso	0.9			2.3							
17:0 anteiso	0.4		0.3	0.8			0.3			4.5	
19:1 iso	0.4							3.1	4.5		
Hydroxy											
12:0 3OH	0.4						0.5	0.5	0.5		
14:0 3OH	0.4				tr		0.4				0.4
Quinone system	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
G+C mol%	62	62	62	62	64	64	64	64	63	63	61

^aFatty acid composition (%).

*Shorthand names of fatty acids: 12:0; dodecanoic acid, 16:0; hexadecanoic (palmitic) acid, 17:0; heptadecanoic (margaric) acid, 18:0; octadecanoic (stearic) acid, 16:1(9); cis-9 hexadecenoic (palmitoleic) acid, 18:1; octadecenoic (vacenic) acid, 15:0 iso; 10 Q-10, 13-methyl tetradecanoic acid, 17:0 iso; 15-methyl hexadecanoic acid, 17:0 anteiso; 14-methyl hexadecanoic acid, 12:0 3OH; 3-Hydroxydodecanoic acid, 14:0 3OH; 3-Hydroxytetradecanoic acid.

을 나타낸 군주는 11군주로, 이들 군주 중 MH547 군주의 아세틸렌환원활성을 Fig. 1에 나타내었다. MH547군주를 저영양 조건 하에서 정치배양 하면서 측정한 결과 12시간 후부터 에틸렌이 생성되기 시작하여 96시간 이후에는 일정한 에틸렌 생성속도를 나타내었다. 다른 군주에 대해서도 같은 활성이 관찰되어 저영양 세균 중에는 질소고정능을 갖는 세균이 다수 포함되어 있음을 알 수 있었다.

균체지방산 조성

11군주의 지방산 methyl ester에 대한 GC분석 결과 모든 군주는 주요 지방산으로 $C_{18:1}$ 을 함유하였으며, MA547, MF100, MH615, MA896 군주는 $C_{18:1}$ 을 60~84% 이상 다량 함유하는 특징을 나타내었다. 또한 포화지방산 $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{19:0}$ 도 각각 검출되었다(Table 2).

Quinone종

Isoprenoid quinone의 분석결과, 모든 군주는 ubiquinone을 함유하고 있었다. HPLC에 의한 정량분석 결과 Q-10이 주요 ubiquinone으로 98%이상 검출되었다(Table 2).

G+C 함량

11군주의 G+C함량을 조사한 결과 61~64 mol%의 범위를 나타내었다(Table 2).

16S rDNA 염기서열

저영양성-질소고정세균의 계통학적 위치를 결정하기 위하여 16S rDNA의 염기서열(1383~1468 bp)을 결정한 결과 quinone종 및 지방산분석 결과를 반영하듯 Proteobacteria α -subdivision 임이 확인되었다. 4개의 군주(MH615, MF100, MA806, MH547)로 구성된 cluster I은 *Bradyrhizobium japonicum*, *Agromonas*, *Blastobacter* 및 *Nitrobacter*에 속하였고, cluster II에 속하는 4개의 군주(MF777, MF160, MH866, MF834)는 *Bradyrhizobium elkanii*에 속하였으며, cluster III (ML722, ML527)은 *Afipia*속, cluster IV는 *Rasbo bacterium*에 속하였다(Fig. 2).

Cluster I의 분리 군주들은 *Bradyrhizobium japonicum*과 98% 이상의 높은 상동성(similarity)을 나타내었으며 저영양성세균의 표준군주인 *Agromonas oligotrophica*^T (D7836)와도 97.2~98.9%의 상동성을 나타내었다. Cluster II에 속하는 분리군주는 *Bradyrhizobium elkanii*의 비교군주들과 98% 이상의 높은 상동성을 나타내어 분리된 11군주의 저영양성 질소고정세균 중 8군주가 *Bradyrhizobium japonicum* 및 *Bradyrhizobium elkanii*와 높은 상동성을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Table 3).

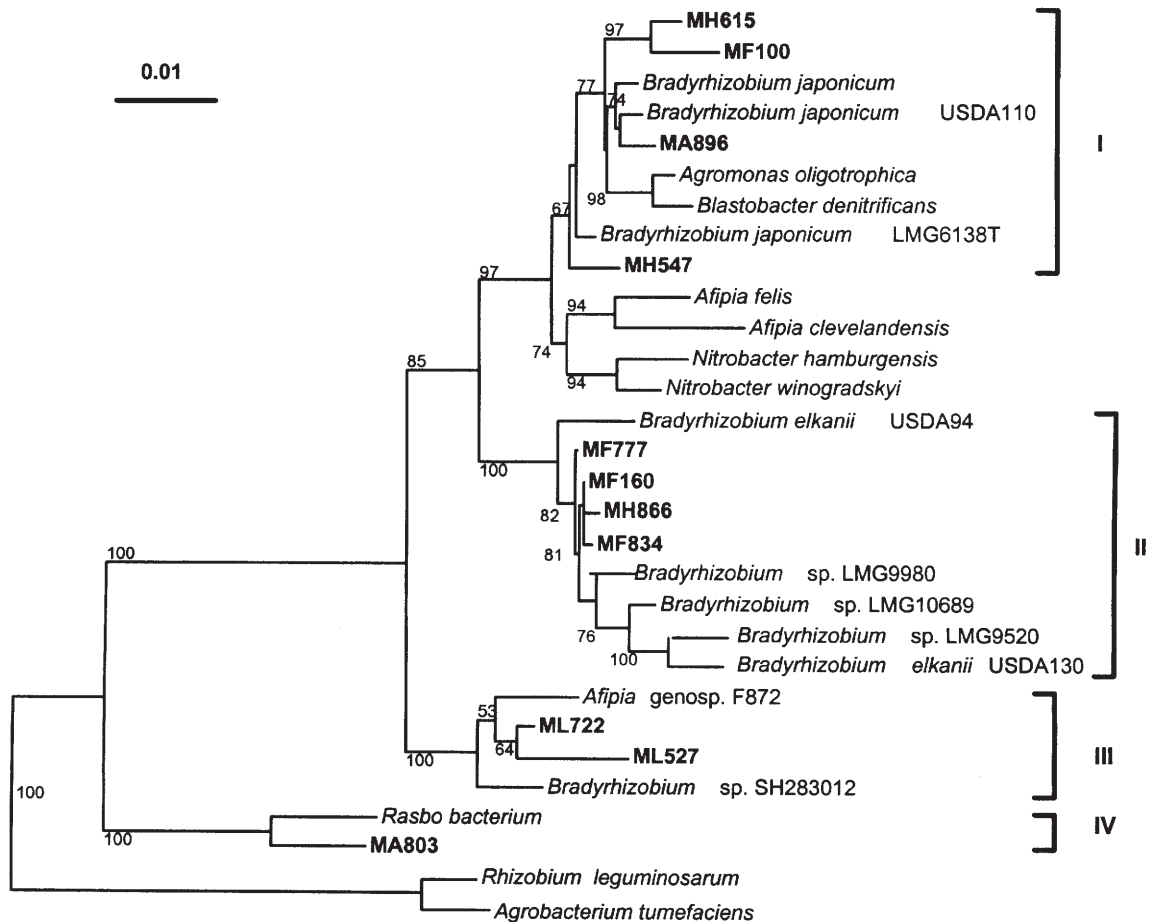


Fig. 2. Phylogenetic tree showing relatedness of nitrogen-fixing oligotrophic bacteria by neighbor-joining grouping of the aligned sequences of the 16S rDNA. Bar indicates 0.01 base substitution per nucleotide.

Table 3. Similarity (%) of strains on the basis of 16S rDNA sequence analysis

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1																						
2	97.9																					
3	98.7	97.6																				
4	98.8	97.3	99.4																			
5	98.5	97.2	98.9	98.8																		
6	98.1	96.9	98.6	98.6	99.1																	
7	98.3	97.0	98.8	98.7	98.4	97.7																
8	97.4	96.4	97.5	97.3	97.2	96.7	98.1															
9	97.1	96.1	97.0	97.3	97.2	96.7	97.8	97.1														
10	96.2	94.9	96.9	96.5	96.2	96.0	97.1	95.5	96.2													
11	96.6	95.6	97.3	96.9	96.9	96.7	97.4	96.2	96.2	98.5												
12	96.6	95.5	97.1	96.9	96.8	96.5	97.3	96.2	95.8	98.3	99.4											
13	96.6	95.5	97.1	96.9	96.8	96.5	97.3	96.2	95.8	98.3	99.4	99.4										
14	96.6	95.4	97.1	96.9	96.9	96.5	97.3	96.2	95.9	98.3	99.4	99.4	99.4									
15	96.4	95.6	97.0	96.7	96.8	96.4	97.1	96.3	96.3	98.3	99.1	98.9	98.9	99.0								
16	95.0	93.3	95.0	95.3	95.3	95.1	95.5	95.3	95.1	96.5	96.3	96.2	96.1	96.2	96.8							
17	95.2	93.9	95.5	95.3	95.8	95.8	96.1	95.7	95.7	96.8	96.8	96.7	96.7	96.7	97.2	98.9						
18	94.3	93.3	94.6	94.5	95.0	94.6	95.3	95.0	94.6	95.8	96.0	95.7	95.8	96.0	96.6	97.8	98.9					
19	95.5	94.1	95.5	95.7	96.2	96.1	96.4	95.8	95.3	96.6	97.2	97.1	97.0	97.0	96.9	98.6	99.2	98.1				
20	90.8	90.1	90.9	90.8	91.4	91.0	91.6	91.8	91.5	91.1	91.8	91.2	91.3	91.3	91.5	92.7	92.5	91.5	92.5			
21	90.9	90.2	91.1	90.9	91.5	91.5	91.4	92.0	91.4	90.9	91.6	91.3	91.3	91.3	91.7	92.6	92.5	91.5	92.5	98.0		
22	88.3	87.7	87.9	88.0	88.0	88.4	88.5	88.6	88.0	88.2	89.0	88.4	88.2	88.3	88.7	88.2	89.0	87.9	88.8	91.6	91.5	

1, MH615; 2, MF100; 3, *Bradyrhizobium japonicum* (X87272); 4, MA896; 5, *Agromonas oligotrophica* (D78366); 6, *Blastobacter denitrificans* (X66025); 7, MH547; 8, *Afipia felis* (M65248); 9, *Nitrobacter hamburgensis* (L11663); 10, *Bradyrhizobium elkanii* USDA94(D13429); 11, MF777; 12, MF160; 13, MH866; 14, MF834; 15, *Bradyrhizobium* sp. LMG 10689; 16, *Afipia* genosp. F872(U87763); 17, ML722; 18, ML527; 19, *Bradyrhizobium* sp. SH283012 (AF041446); 20, *Rasbo bacterium* (AF007948); 21, MA803; 22, *Rhizobium leguminosarum* (X91211).

지금까지 근권토양으로부터 분리된 질소고정세균은 주로 *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, 및 *Deraxia* 등이 보고되었는데, 본 연구에서 산림토양으로부터 분리한 저영양성 질소고정세균의 계통분류학적 특징은 이전 초지토양으로부터 분리된 저영양세균의 계통분류학적 연구결과에서 밝혀진 BANA (*Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter*, and *Afipia*) domain과 유사한 계통군에 속 하여(14) *Bradyrhizobium* 속은 토양 중 대표적인 저영양성세균으로, 특히 산림토양의 각 층(L, F, H, A)에 널리 분포하면서 질소 순환에 중요한 역할을 담당하고 있다고 사료되었다.

감사의 글

본 논문은 1999년도 목원대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Sediman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, Chichester. pp.241-245.
- Collins, M.D. and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbial Rev.* 45, 316-354.
- Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on a diluted nutrient broth as a culture medium. *Rep. Inst. Agric. Res., Tohoku Univ.* 27, 23-30.
- Ikemoto, S., M. Kuraishi, K. Komagata, R. Azuma, R. Suto, and H. Murooka. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24, 199-213.
- Ishida, Y. and H. Kadota. 1979. A new method for enumeration of oligotrophic bacteria in lake water. *Arch. Hydrobiol.* 12, 77-85.
- Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, In Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg (Eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.683-700.
- Kuznetsov, S.I., G.A. Dubinnina, and N.A. Lapteva, 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 377-387.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In Stackebrandt, E., M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester. pp.115-175.
- Miyagawa, E., R. Azuma, and T. Suto. 1980. Cellular fatty acid

1. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Sediman,

- composition in gram-negative obligately anaerobic rods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 41-51.
10. Nikitin, D.I. and K.V. Chumakov. 1985. The functional role of oligotrophic microorganisms. In V. Jensen (ed.), *Microbial communities in soil. FEMS Symposium.* 33, 177-189.
 11. Ohta, H. and T. Hattori. 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26, 99-107.
 12. Ohta, H. and T. Hattori. 1983. Oligotrophic bacteria on organic debris and plant roots in a paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.* 15, 1-8.
 13. Poindexter, J.S. 1981. Oligotrophy. Fast and famine existence. In M. Alexander(Ed) *Advances in microbial ecology.* Plenum Press, New York. Vol. 5, 63-89.
 14. Saito, A., H. Mitsui, R. Hattori, K. Minamisawa, and T. Hattori. 1998. Slow-growing and oligotrophic soil bacteria phylogenetically close to *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 277-286.
 15. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 16. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reserved-phased high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25, 125-128.
 17. Tarrand, J.J., N. R. Kriege and J. Dobereiner. 1983. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24, 967-980.
 18. Thompson, 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.
 19. Whang, K. and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 54, 19-37.
 20. Whang, K. and S. Yu. 1995. Growth patterns of soil bacteria in different organic concentrations, and isolation of facultative and obligate oligotrophic bacteria. *The Microorganisms & Industry.* 21, 319-324.

(Received April 7, 2001/Accepted June 4, 2001)

ABSTRACT: Taxonomic Characteristics of Nitrogen-Fixing Oligotrophic Bacteria from Forest Soil

Kyung-Sook Whang (Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea)

Many isolates from different forest soil layers did not show appreciable growth on full strength of the conventional nutrient broth (NB medium) but grow on its 100-fold dilution (DNB medium). These isolates were divided into four types according to organic nutrient concentration in the growth medium from 1^{-1} to 10^{-4} dilution of normal NB medium. Oligotrophic bacteria were type II and type IV which grew in 10^{-4} dilution of NB (1 mg C/l) medium. Sixty strains were isolated for obligate oligotrophic bacteria. Chemotaxonomic and phylogenetic characteristics of eleven isolates of acetylene-reducing (nitrogen-fixing) oligotrophic bacteria from forest soil were investigated. They showed similar characteristics: the cellular fatty acid mainly consisted of straight-chain unsaturated $C_{18:1}$ (60-84% of total fatty acids). Ubiquinone Q-10 and a high guanine-plus-cytosine content (61-64 mol%) were found. Eleven isolates of nitrogen-fixing oligotrophic bacteria were found to be closely related by full 16S rDNA sequence similarity and many common taxonomic traits. Analysis of full 16S rDNA sequences of eleven isolates indicated that they were more closely related to *Bradyrhizobium* (similarity values: 98.1-98.8%), *Agromonas*, *Nitrobacter*, and *Afipia*.