

보 문

산수리나무림의 토양 층위별 세균군집의 계통학적 특성

한송이*

목원대학교 미생물나노소재학과

Phylogenetic characterization of bacterial populations in different layers of oak forest soil

Song-Ih Han*

Department of Microbial & Nanomaterials, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received April 24, 2015; Accepted June 19, 2015)

ABSTRACT: We have examined the correlation between the physicochemical and microbiological environment variables for the different layers of oak forest soil in Mt. Gyeryong, Korea. The result shows that there is a high correlation in the environment variables between the soil parameters of the fermented (F) layer and humus (H) layer. In particular, the pH level in the F layer shows a high correlation with C and N, while the various organic acids of the H layer turns out to be closely correlated with soil bacteria density. As we evaluated phylogenetic characteristics of bacterial populations by DGGE analysis with DNA extracted. Total of 175 bands including 43 bands from litter (L) layer, 42 bands from F layer, 43 bands from H layer and 47 bands from rhizosphere (A) layer were selected as the major DGGE band of oak forest soil. Based on the 16S rRNA gene sequences, 175 DGGE bands were classified into 32 orders in 7 phylum. The heat map was analyzed in order to compare the quantity of the base sequences of each order and based on the clustering of the different layers of oak forest soil, the result confirms that the F layer and H layer belong to a different cluster from that of L layer and A layer. Furthermore, it also showed that approximately 50% of the total microbial population in different layers is *a-proteobacteria*, which indicates that they belong to the dominant system group. In particular, *Rhizobiales*, *Burkholderiales* and *Actinobacteriales* were observed in all the seasons and layers of oak forest soil, which confirms that they are the indigenous soil bacterial community in oak forest soil.

Key words: bacterial populations, DGGE, oak forest soil, phylogeny

산림토양은 매년 정기적으로 낙엽 등 유기물이 더해지고 유기물은 일련의 과정을 통해 분해되면서 토양층위를 형성한다. 산림토양미생물은 토양 내 유입된 다양한 종류의 유기물을 분해하고 물질순환에 깊이 관여하며 생태계 내에서 중요한 역할을 담당하고 있다(Mun and Kim, 1992; Mun and Joo, 1994; Cho *et al.*, 1997). 산림토양 생태계를 구성 하는 기후, 모재, 지형, 생물, 식생 등 여러 요인에 따라 토양 내 미생물의 수, 종 다양성, 종 조성 그리고 활성도는 다양하게 변화한다(Alexander, 1985; Park and Kim, 1985; White *et al.*, 2005). 따라서 산림토양 내 물질순환에 중요한 역할을 하고 있는 미생물군집의 구조를 이해하는 것은 미생물 다양성 확보를 위해서

매우 중요하다(Hackl *et al.*, 2004, 2005).

산림토양 내 미생물 생태계의 정보 구축을 위해서 Kim과 Chang 등(1989)은 산림토양에서 낙엽분해에 따른 영양소 함량의 변화, 화학적 변화, 낙엽을 통해 유입되는 영양염류의 양과 낙엽의 분해량을 조사하였으며, Hackl 등(2005)은 12종의 서로 다른 식생의 산림토양을 대상으로 토양미생물의 인지질 패턴을 확인하고 식생의 종류에 따라 특정 토양미생물 군집이 형성됨을 확인하였다. 또한, 산림토양의 수층과 토양의 깊이 에 따라 물리 화학적 특성 및 유기물 조성이 다르며, 이는 세균의 밀도와 군집 구성 밀접한 관계가 있음을 확인하였다(Hackl *et al.*, 2004, 2005; Lejon *et al.*, 2005; White *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2009). 많은 미생물생태학자들은 산림 수층에 따른 토양미생물 군집 구조의 차이를 확인하기 위하여 분자생물학적 연구

*For correspondence. E-mail: h1882@mokwon.ac.kr;
Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7550

방법을 이용하여 토양미생물의 군집구조를 밝혔다(Alexander, 1985; Hackl *et al.*, 2004; Lejon *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006). 선행연구에서 ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) 기법을 이용하여 상수리림과 소나무림 부식층 토양 내 세균 군집의 계통학적 특성을 조사한 결과, *Planctomycetes*와 *Verrucomicrobia* 및 *Bacteroidetes* 계통군은 소나무림에서 확인되는 특징적인 계통군으로 산림토양 수중간 미생물 군집의 구조에 특징적인 차이가 있음을 밝힌 바 있다(Han *et al.*, 2006, 2008).

국내 산림을 구성하는 식물 종의 40% 이상이 활엽수로 구성되어 있고 활엽수를 대표하는 상수리나무는 소나무에 비해 낙엽생산량이 우수하고 다량의 무기영양분을 함유하며 활발한 미생물의 양분순환에 의해 임지를 비옥화시킨다고 보고된 바 있다(Kim, 1996). 따라서 본 연구에서는 계통산 복사면에 밀집해 있는 상수리나무(*Quercus acutissima*)림을 조사지로 선정하고 상수리림 토양을 낙엽 및 나뭇가지로부터 유래되는 낙엽층과 낙엽이 분해되는 분해층, 분해가 진행되어 부식을 형성한 부식층 그리고 근권 토양층으로 크게 4개 층위로 구분하여 각 층위별 물리학적, 화학적 그리고 미생물학적 환경변수 간 상관관계를 밝힘과 동시에 DGGE 분자기법을 이용하여 산림토양의 각 층위에 분포하는 토양세균군집의 계통학적 다양성 및 특징을 비교 검토하여 토양미생물 다양성 확보를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

상수리림 산림토양 시료채취

본 연구에서는 공주시 계룡산 복사면에 밀집해 있는 상수리나무(*Quercus acutissima*)림을 조사지로 선정하였다. 토양 시료는 낙엽층(litter layer; L layer), 낙엽 분해층(fermented layer; F layer), 부식층(humus layer; H layer), 표층으로부터 약 20 cm 아래 근권 토양층(rhizosphere soil layer; A layer)으로 구분하여 각 계절별로 시료를 채취하였다(Cho *et al.*, 1997). 토양채취는 각 층위별로 5개 지점에서 채취된 토양을 균등하게 섞어 대표시료로 사용하였다.

상수리림 산림토양의 화학적 특성 분석

토양 내 수분은 건토 중량법으로 토양 시료 5 g을 건조기(MOV-212F, Sanyo)에서 120°C에서 12시간 동안 건조한 후 수분 감량을 측정하였다. 토양시료의 탄소량(T-C), 총 질소

량(T-N), 총 인함량(T-P)의 측정은 ‘토양화학분석법’에 의거하여 수행하였다. 총 질소의 측정은 Kjeldahl법을 이용하여 0.001 N H₂SO₄로 적정하였다. 총 탄소측정은 Tyurin법을 이용하여 측정하였고 총 무기인은 1 g의 시료를 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid로 발색시킨 후 440 nm 분광기(UV-1650PC, Shimadzu)로 측정하였다. 유효인산은 Bray No-1 법에 의거하여 분석하였다(NIAST, 1988).

상수리림 산림토양의 유기산함량측정

토양 20 g과 동량의 D.W. 20 ml를 넣어 100 rpm으로 1시간 동안 진탕한 후 Whatman No.42 여과지에 여과하고 2 µm 여과 filter에 재여과한 다음, 음이온 컬럼(IonPac AS12, Shimadzu)을 이용한 고성능 액체 크로마토그래피(Shimadzu LC-9A, Shimadzu)로 분석하였다(NIAST, 1988).

세균수 측정

각 토양 시료는 1 g씩 정량하여 9 ml의 멸균수에 넣고 현탁시킨 후 멸균수에 순차적으로 희석하여 사용하였다. 희석된 토양 시료를 1 ml씩 접종하고 NB (nutrient broth)를 10²배 희석한 DNB (diluted nutrient broth) 배지를 첨가하여 28°C에서 15일간 배양하고 평판상에 형성된 콜로니수를 측정하였다(Han *et al.*, 2008).

상수리림 산림토양으로부터 total DNA 직접 추출 및 정제

산림토양의 total DNA의 추출은 Tsai와 Olson (1991)이 제안한 Manual법을 이용하였다. 토양시료 5 g에 solution I (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, D.W., 100 ml, lysozyme 1 g, pH 8.0) 8 ml를 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, solution II (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, DW 100 ml, SDS 10 g, pH 8.0) 8 ml를 첨가하여 -70°C deep freezer에서 냉동과 65°C에서 얼림과 녹임을 3회 반복한 후, 7,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1 (v/v)을 첨가한 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액과 동일한 양의 1.6 M NaCl이 포함된 13% PEG를 첨가하여 DNA pellet을 얻었다. DNA pellet은 진공건조(Micro Vac MV-100, TOMY)하고 50 µl의 TE buffer를 첨가하여 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)을 통해 DNA를 확인하였으며, Spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu)로 농도를 측정하고 흡광도 A260/A280비를 계산하여 순도를 측정하였다(Tsai and Olson, 1991; Johnson, 1994).

16S rRNA 유전자의 V3 PCR 증폭

산림토양으로부터 직접 추출한 DNA를 주형으로 16S rRNA 유전자의 V3 region을 PCR 증폭하기 위하여 primer는 Muyzer 등(1993)이 제안한 GC341F/518R primer를 사용하였다. PCR 조건은 최초 94°C 5분간 반응 후 각각 denaturation, annealing, extension은 각각 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 45초 간의 반응을 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 반응시켜 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다. 1.5% agarose gel (Seakem LE agar, Rockland)로 전기영동하고 ethidium bromide로 염색 후 band의 증폭 유무를 확인하였다(Lane, 1991; Koizumi *et al.*, 2003).

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 분석

증폭된 16S rRNA 유전자의 DGGE 분석은 Bio-Rad Dcode system (Bio-Rad)을 이용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 bis acrylamide (Bio-Rad)를 포함한 6.5% polyacrylamide를 이용하여 25%에서 65%의 농도 구배 조성(7 M urea, 40% formamide)으로 전기영동을 수행하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자는 1×TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 running buffer로 사용하여 80 V, 60°C에서 16시간 동안 DCode universal mutation detection system (Bio-Rad)을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 SYBR green I (Amresco)으로 30분간 염색하여 UV illuminator로 band 양상을 확인하였다(Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer, 1999).

16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통 해석

산림토양 내 세균군집의 계통 해석을 위하여 DGGE 젤 상에서 분리된 밴드 중, 각 밴드를 젤에서 잘라내어 50 µl의 DW가 담긴 1.5 ml tube에 담아 상온에 하루 동안 정치하여 DNA를 추출하였다. 이것을 주형으로 GC가 제거된 primer 341F와 518R을 사용하여 위와 동일한 조건으로 PCR을 수행하고 automatic sequencer를 통하여 sequencing 하였다(Lane,

1991). Database 검색은 NCBI network service의 BLAST program (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 및 EzTaxon (<http://eztaxon.ezbiocloud.net/>)을 이용하여 수행하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 NIPALS algorithm을 기초로 한 PhyloMode 프로그램(<http://www.nofimamat.no/phylomode>)을 이용하여 PCA (principal component analysis) 분석을 수행하고 유전학적 유연관계를 구분하였다(Rudi *et al.*, 2006). 16S rRNA 유전자 염기서열의 양적 비교를 위한 heat map 분석은 XLSTAT 프로그램 (<http://www.xlstat.com>)를 이용하였다.

결과 및 고찰

상수리림 낙엽분해토양의 층위별 화학적·미생물학적 특성

산림토양의 각 층위는 낙엽분해에 따라 이화학적 성질이 다르고, 이러한 이화학적 환경요인의 변동에 따라 토양미생물 군집도 변동한다. 본 연구에서는 상수리림 산림토양을 L층과 낙엽분해가 더욱 진행되면서 각종 화합물들이 축합반응에 의해 형성된 F층, H층 그리고 A층으로 구분하여 1년간 봄, 여름, 가을 그리고 겨울에 정기적으로 채취한 시료를 대상으로 물리·화학적 특성과 세균군집의 밀도를 조사하였다(Table 1). 토양 내 수분함량은 생물학적 활성도에 영향을 미치는 중요한 환경요인으로 각 층위별 수분함량을 측정된 결과, L층은 43.0±16%, F층은 51.5±9.7%, H층은 49.9±4.9% 그리고 A층은 39.2±3.1%로 나타내었다. 강수 및 적설 등 계절 변화에 직접적인 영향을 받는 상층부(L층, F층)의 수분함량 편차는 큰 반면, 하층부인 H층과 A층의 경우 계절적 편차가 작게 나타났다. 상수리림의 각 층위별 평균 pH는 5-5.6으로 비교적 안정적인 특징을 나타내었다. 토양 내 유기물 분해도를 나타내는 총탄소량(T-C)과 총질소량(T-N)을 측정하여 탄질율(C/N ratio)을 비교한 결과, L층은 31.0±4.8%, F층은 22.8±4%, H층은 19.4±3.5% 그리고 A층은 15.8±2.8%를 나타내어 낙엽분해가 상당히 진행된 H층과 A층에서 급격하게 낮아지는 경향을 나타내

Table 1. Physical and chemical characteristics of different layers in an oak forest soil

Layer	Water contents (%)	pH	C/N ratio (%)	Total P (nM/g)	Available P ₂ O ₅ (nM/g)	Organic acid (nM/g dry soil)					Log no. of bacteria (CFU/g soil)
						Glu	Pyr	Suc	Lac	Ace	
L	43.0±16.0	5.3±0.1	31.0±4.8	59.7±24.5	26.1±9.3	5.7±2.9	8.7±1.2	9.0±1.0	12.3±2.1	1.9±0.3	7.8±1.7
F	51.5±9.7	5.6±0.1	22.8±4.0	80.0±16.2	34.9±6.4	7.3±2.9	19.2±1.9	20.6±5	20.7±4.8	2.5±0.3	7.8±1.6
H	49.9±4.9	5.3±0.1	19.4±3.5	91.1±17.5	39.8±7.0	8.3±4.6	30.4±4.2	21.3±4.1	22.0±2.3	2.5±0.2	8.2±1.8
A	39.2±3.1	5.0±0.1	15.8±2.8	65.8±29.7	27.4±11.8	4.7±1.9	14.9±1.7	10.8±0.5	10.7±1.7	1.6±0.2	7.9±1.7

L, litter layer; F, fermented layer; H, humus layer; A, rhizosphere soil layer; Glu, glutamine; Pyr, pyruvate; Suc, succinate; Lac, lactic acid; Ace, acetic acid

었다. 각 층위별 토양시료 내 총 인(T-P)의 함량은 34.5-108.6 nM/g, 유기인산(P₂O₅)은 16.8-46.8 nM/g으로 나타났다. 산림 토양 내 유기물의 물질분해과정에서 생성되는 대표적인 유기 산 중 glutamine, pyruvate, succinate, lactic acid 그리고 acetic acid와 같은 5종의 유기산 함량을 측정된 결과, glutamine은 1.8-12.9 nM/g, pyruvate은 7.5-34.6 nM/g, succinate은 8.0-25.4 nM/g, lactic acid는 9.0-24.3 nM/g 그리고 acetic acid는 1.4-2.8 nM/g로 나타내어, 낙엽 분해가 왕성하게 진행되는 F층과 H층에서 가장 높은 유기산 함량을 나타내었다. 특히, H층 내 토양세균의 밀도는 1.6±0.64×10⁸ CFU/g soil로 상층부 L층에 비해 3배 이상 높은 계수치를 나타내었다.

이상, 상수리림 산림토양 각 층위 내 물리·화학적 환경변수 간 상관관계를 밝히기 위해 각 층위에서 계절별로 채취한 토양시료의 수분함량(%), pH, 탄질률(%), 총인(nM/g), 유효인산(nM/g), 5종류의 유기산(nM/g) 함량과 세균밀도를 환경변수로 이용하여 정리한 PCA 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 상수리림 산림토양의 각 토양 층위는 명확하게 다른 특징적인 생태계를 형성하고 있는 것으로 나타났다. 상수리림 낙엽 및 유기물이 왕성하게 분해되고 있는 F층과 H층은 각 환경변수와 높은 상관관계를 갖는 특징을 나타내었다. 특히, F층에서는 pH가 C (r=0.583, P<0.015) 그리고 N (r=0.791, P<0.015)과 높은 상관관계를 나타내었고 H층에서는 각종 유기산이 토양 세균 밀도와 높은 상관관계(r=0.5, P<0.01)를 나타내어, 산림토양 내 유기물들이 미생물에 의해 분해되면서 생성된 유기산이

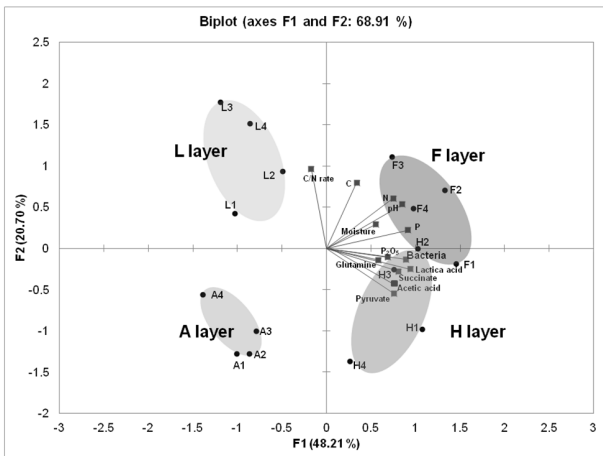


Fig. 1. Principal component analysis comparing the chemical and microbiological characteristics in forest soils. L(1-4) litter layer among seasons; F(1-4), fermented layer among seasons; H(1-4), humus layer among seasons; A(1-4), rhizosphere soil layer among seasons. Variables used in the PCA include water contents (%), pH, C/N ratio (%), total P (nM/g), available P₂O₅ (nM/g), organic acids (nM/g) and No. of bacteria (cfu/g soil).

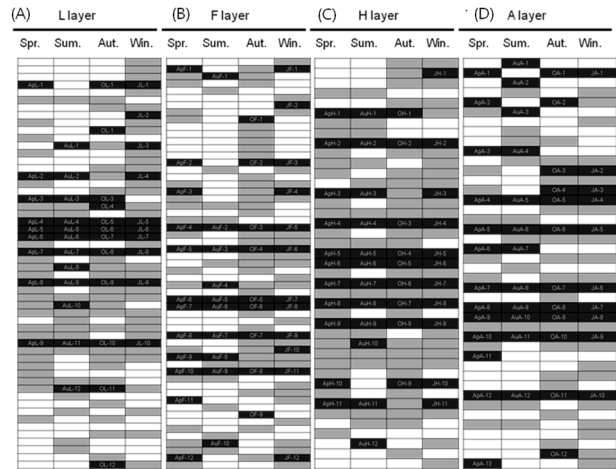


Fig. 2. DGGE band patterns of bacterial populations in a different layers of oak forest soil. Dark boxes are the dominant bands (A), litter layer; (B), fermented layer; (C), humus layer; (D), rhizosphere soil layer.

부식층 내에 축적된 결과라 판단된다.

상수리림 산림토양의 층위별 세균군집의 DGGE band 양상

상수리림 산림토양의 층위별 세균군집 구조의 계통해석을 위해 각 층위별로 1년간 봄, 여름, 가을 그리고 겨울 각 계절시료에서 추출된 DNA의 16S rRNA V3 유전자를 증폭하고 20%에서 60%의 농도 구배 조성(7 M urea, 40% formamide)으로 DGGE 분석을 수행하였다.

DGGE 분석을 통해 확인된 각각의 band는 미생물 개체군을 의미하고, DGGE 주요 bands는 우점 개체군이라 할 수 있다. 상수리림 산림토양을 4개 층위로 구분하여 각 계절별로 DGGE 분석한 결과, L층에서 총 53개의 다양한 DGGE band 양상을 나타내었고 F층은 총 57개의 band 양상을 나타내었다. H층의 경우, 총 41개의 band 양상을 나타내었으며 A층은 총 42개의 band 양상을 나타내었다(Fig. 2).

상수리림 내 각 층에 나타난 주요 DGGE bands를 확인한 결과, L층의 경우 43 bands, F층은 42 bands, H층은 43 bands 그

Table 2. The number of major DGGE bands in different layers of oak forest soil throughout the year

Layer	No. of major DGGE bands				Total
	Spring	Summer	Autumn	Winter	
L	9	12	12	10	43
F	11	10	9	12	42
H	11	13	8	11	43
A	12	12	12	11	47
Total	43	47	41	44	175

리고 A층은 47 bands 로 총 175 bands가 상수리림 산림토양의 DGGE 주요 bands로 최종 선발되었다(Table 2).

상수리림 산림토양의 층위별 주요 세균군집의 계통해석

상수리림 산림토양의 각 층위에서 확보된 총 175 DGGE 주요 bands의 DNA를 각각 추출한 후, 341F와 518R을 이용하여 16S rRNA 유전자를 재증폭하고 클로닝하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 주요 DGGE band의 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 바탕으로 PhyloMode 프로그램을 이용하여 PCA (principal component analysis)를 수행하고 주요 세균군집의 계통학적 다양성 및 유연관계를 Fig. 3에 나타내었다. 낙엽층의 주요 43개 DGGE bands를 계통 해석한 결과, 5개 계통군으로 나타났으며 46%가 *α-proteobacteria* 계통군으로 확인되었으며, *β-proteobacteria* 계통군이 9%, *γ-proteobacteria* 계통군이 7%, *Acidobacteria* 계통군이 14%, *Actinobacteria* 계통군이 14%, *Firmicutes* 계통군이 7%, *Bacteroidetes* 계통군이 2% 그리고 *Chloroflexi* 계통군이 1% 로 나타났으며, 약 1%가 현재까지 밝혀지지 않은 미배양성 미동정 세균으로 확인되었다(Fig. 3A). 낙엽 분해층으로부터 선발된 주요 42개 DGGE bands의 계통 해석한 결과, 4개의 계통군으로 세분류되었고 53%가 *α-proteobacteria* 계통군으로 확인되었으며, *β-proteobacteria* 계통군이 12%, *γ-proteobacteria* 계통군이 9%, *Acidobacteria* 계통군이 12%, *Actinobacteria* 계통군이 2% 그리고 *Firmicutes* 계통군이 12%로 확인되었다(Fig. 3B). 상수리림 H층으로부터 선발된 주요 43개 DGGE bands의 계통 해석한 결과, 42%가 *α-proteobacteria* 계통군으로 확인되

었으며, *β-proteobacteria* 계통군이 14%, *γ-proteobacteria* 계통군이 6%, *Acidobacteria* 계통군이 21%, *Actinobacteria* 계통군이 10%, *Bacteroidetes* 계통군이 5% 그리고 *Firmicutes* 계통군이 2%로 확인되었다(Fig. 3C). 근권 토양층의 경우, 주요 45 DGGE bands는 51%가 *α-proteobacteria* 계통군으로 확인되었으며, *β-proteobacteria* 계통군이 7%, *Acidobacteria* 계통군이 22%, *Actinobacteria* 계통군이 9%, *Gemmatimonadetes* 3% 그리고 *uncultured bacteria* 8%로 확인되었다(Fig. 3D).

상수리림 낙엽분해토양의 각 층위 내에 분포하는 세균군집의 계통학적 다양성을 비교하기 위하여 Shannon-Weaver function (H')에 의해 세균군집의 다양도 지수(Diversity Index)를 산출하였다. L층은 다양성 지수는 1.2를 나타내었으며, F층은 1.87, H층은 2.1 그리고 A층은 1.71로 산출되었다. 상기의 연구에서 유기물 분해가 왕성하게 일어나며, 환경변수와 밀접한 상관관계를 이루고 있는 F층과 H층에서 높은 세균 다양성을 나타내었다. 또한, A층에서도 비교적 높은 다양성 지수를 나타내었다. 이는 F층과 H층에서 미생물에 의해 분해되고 형성된 유기물이 토양의 점토입자를 결합시키고 토양구조를 개선시켜 토양 비옥도를 향상시킨 결과라 판단되었다.

이상, 상수리림 산림토양의 각 층위에서 계절별로 수집된 시료를 대상으로 DGGE 기법을 이용하여 주요 세균군집의 계통학적 특성을 확인하였다. 상수리림 산림토양의 각 층위에서 선발된 175개 DGGE 주요 bands를 16S rRNA 유전자 염기서열 분석하고 RDP database (<http://rdp.cme.msu.edu/>)를 이용하여 계통 해석한 결과, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* 그리고 *Chloroflexi*의 7개 phylum, 32개 order로 세분류되었다. 각 order에 속하는 염기서열의 양적 비교를 위하여 heat map 분석하고 상수리림 산림토양의 각 층위를 clustering 한 결과, 상수리림 산림토양 환경변수와 밀접한 상관관계를 갖고 높은 세균다양성을 나타낸 F층과 H층은 상층부인 L층과 A층과 서로 다른 Cluster를 형성하는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 특히, *Alteromonadales* 그리고 *Acidobacteria* Gp7는 L층에서, *Gemmatimonadales*는 근권 토양층에서 보여지는 특징적인 계통군으로 확인되었다.

상수리림 산림토양의 각 층위에서 보여진 주요 DGGE bands 중 *α-proteobacteria* 계통군이 L층의 경우 46%, F층은 53%, H층은 42% 그리고 A층에 51%가 분포하는 특징을 나타내었다. 특히, 상수리림 산림토양의 각 층위에서 주요 DGGE bands 중 우점계통군으로 확인된 *α-proteobacteria* 계통군 중 *Bradyrhizobium* 속, *Afipia* 속 그리고 *Rhizobium* 속 등을 포함하는 *Rhizobiales* 계통군이 가장 높은 비율을 나타내었다.

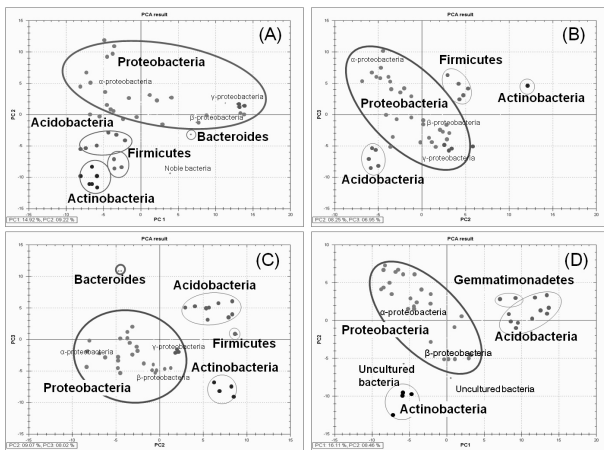


Fig. 3. Principal component analysis of 16S rRNA gene sequences in different layer of forest soil. (A) litter layer of forest soil, (B) fermented layer of forest soil, (C) humus layer of forest soil, (D) rhizosphere soil layer of forest soil.

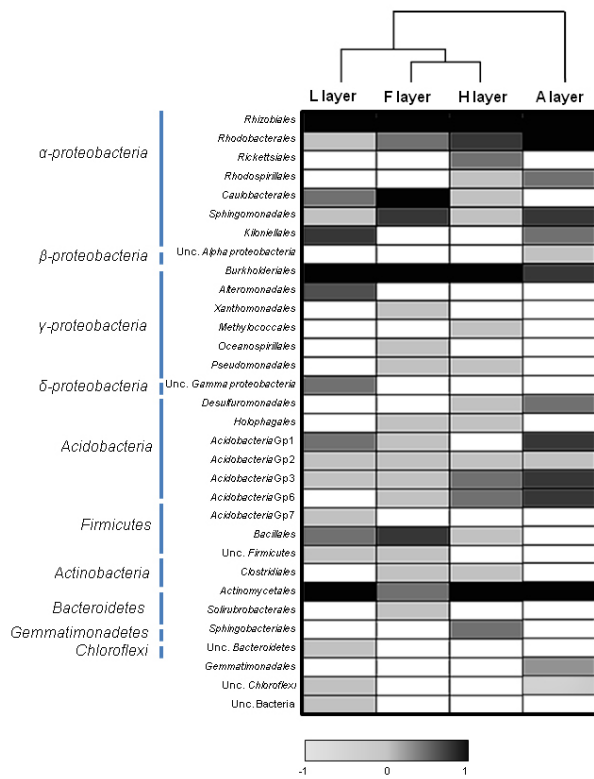


Fig. 4. Heat map of the 32 orders based on the number of sequences in different layers of oak forest soil. These different layers of oak forest soil were clustered with a conventional heat map analysis, with black blocks representing the high number of sequences and white blocks representing the low number of sequences. Unc., unclassified.

Janssen (2006)은 다양한 산림토양 내 *Proteobacteria* 계통군은 매우 풍부하게 분포되어 있고 *α-proteobacteria*의 *Bradyrhizobium* 계통군은 질소고정에 관여하는 종을 포함하며, 유기물 분해 및 식물 성장 촉진 역할을 한다고 보고한 바 있다(Zhang and Xu, 2008; Yarwood et al., 2009).

상수리림 각 층위 전 계절에분포하는 주요 세균군집을 확인한 결과, *Rhizobiales*는 산림토양의 모든 층위와 모든 계절에서 19.5–28.6%로 분포하였으며, *Burkholderiales*는 7.3–14.3% 그리고 *Actinobacteriales*는 4.8–12.2% 분포하여 상수리림 산림토양 내 대표적인 토착세균군집으로 판단되었다(Table 3). 선행연구에서 16S rRNA-ARDRA법에 의거하여 상수리림과 소나무림 부식층 토양내 세균군집의 계통학적 특성을 확인한 결과 *Rhizobiales*, *β-proteobacteria*의 *Burkholderiaceae* 그리고 *Actinobacteria* 계통군이 우점계통군으로 보고되어 동일한 결과를 나타내었다(Han et al., 2008).

토착형 미생물은 토양 내 일정한 군집규모를 유지하며 토양생태계 내에서 복잡한 영양소 이용과 같은 고등생물이 갖지

못하는 특이적인 대사경로를 갖거나 특수한 기능성 물질을 생성할 수 있다. 따라서 토착미생물군집의 다양성 해석 및 정보화는 유전 생태학적 기능을 이해하고 신기능 미생물을 발견하기 위한 전제적 연구가 될 것이다. 본 연구에서 DGGE 분석을 통하여 확인된 상수리림 산림토양의 각 층위에 분포하는 세균군집 계통학적 특성 결과는 향후, 산림토양생태계 내 미생물학적 기능 및 물질대사에 관련한 토착미생물 유전자원의 다양성 확보를 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료된다.

적 요

상수리림 산림토양 각 층위 내 물리·화학적, 미생물학적 환경변수간 상관관계를 확인한 결과, 낙엽 분해 층(F)과 부식층(H)은 각 환경변수와 높은 상관관계를 갖는 특징을 나타내었다. 특히, F층에서는 pH가 C 그리고 N과 높은 상관관계를 나타내었고, 부식층(H)에서는 각종 유기산이 토양 세균 밀도와 높은 상관관계를 나타내었다. 상수리림 산림토양의 층위별 세균군집 구조의 계통해석을 위해 각 층위의 계절별 시료로부터 DNA를 직접 추출하고 DGGE 분석한 결과 낙엽층(L)의 경우 43 bands, F층은 42 bands, H층은 43 bands 그리고 근권 토양층(A)은 47 bands로 총 175 bands가 상수리림 산림토양의 DGGE 주요 bands로 선발되었다. 확보된 총 175 DGGE 주요 bands의 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 바탕으로 세균군집의 계통 해석한 결과, 7개 phylum에 32개 order로 세 분류되었다. 각 order에 속하는 염기서열을 heat map 분석하고 상수리림 산림토양의 각 층위를 clustering 한 결과 F층과 H층이 L층 그리고 A층과 서로 다른 cluster를 형성하는 것이 확인되었다. 또한, 산림토양의 각 층위에 존재하는 세균군집 중 약 50%가 *α-proteobacteria*로 우점계통군으로 나타났다. 특히, *Rhizobiales*, *Burkholderiales*, 그리고 *Actinobacteriales* 목은 모든 계절과 모든 층위에서 보여지는 세균군집으로 확인되어 상수리림 산림토양에서 대표적인 토착세균 군집임이 확인되었다.

References

Alexander, M. 1985. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, Newyork, USA.
 Cho, S.J., Park, C.S., and Uhm, D.I. 1997. Soil Science, pp. 321–325. In Hyangmoon Press, Seoul, Korea.
 Hackl, E., Pfeffer, M., Donat, C., Bachmann, G., and Zechmeister-

Table 3. Delineation of closely related 32 orders based on the presence and absence detected sequences for the different layers of oak forest soil

Order	L layer				F layer				H layer				A layer			
	Sp.	Su.	A.	W.	Sp.	Su.	A.	W.	Sp.	Su.	A.	W.	Sp.	Su.	A.	W.
<i>Rhizobiales</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodobacterales</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>Rickettsiales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodospirillales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>Caulobacteriales</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonadales</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Kiloniellales</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Unc. Alphaproteobacteria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Burkholderiales</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alteromonadales</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonadales</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylococcales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanospirillales</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonadales</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Unc. Gammaproteobacteria</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfuromonadales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Holophagales</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Acidobacteria Gp1</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>Acidobacteria Gp2</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Acidobacteria Gp3</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Acidobacteria Gp6</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Acidobacteria Gp7</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillales</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Unc. Firmicutes</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridiales</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomycetales</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Solirubrobacterales</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingobacteriales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Unc. Bacteroidetes</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gemmatimonadales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Unc. Chloroflexi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Unc. Bacteria</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sp., spring; Su., summer; A., autumn; W., winter; Unc., unclassified

Boltenstem, 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-Boltenstem, 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., Cho, M.H., and Whang, K.S. 2008. Comparison of phylogenetic characteristics of bacterial populations in a oak and pine humus forest soil. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 237-243.

Han, S.I., Kim, Y.J., and Whang, K.S. 2006. Comparison of phylogenetic characteristics of viable but non-culturable (VBNC) bacterial populations in the pine and oak forest soil by 16S rDNA-ARDRA. *Kor. J. Microbiol.* **42**, 116-124.

Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1719-1728.

Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, *In* Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., and Krieg, N.R. (eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*, pp. 683-700. American

- Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Kim, J.W.** 1996. Floristic characterization of the temperate oak forests in the Korean Peninsula using high-rank taxa. *J. Pl. Biol.* **39**, 149–159.
- Kim, J.G. and Chang, N.L.** 1989. Litter production and decomposition in the *Pinus rigida* plantation in Mt. Kwan-ak. *Korea J. Ecol.* **12**, 9–20.
- Koizumi, Y., Kozima, Y., and Fukui, M.** 2003. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**, 147–157.
- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115–175. John Wiley and Sons, Chichester.
- Lejon, D.P., Chaussod, R., Ranger, J., and Ranjard, L.** 2005. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microb. Ecol.* **50**, 614–625.
- 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.
- Mun, H.T. and Kim, J.H.** 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.
- Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- NIAST.** 1988. *Methods of soil chemical analysis*. National institute of agricultural science and technology, RDA, Suwon, Korea.
- Park, B.K. and Kim, M.R.** 1985. The decomposition rate of litter and soil microorganisms in slope directions. *Korean J. Ecol.* **8**, 31–37.
- Rudi, K., Zimonja, M., and Naes, T.** 2006. Alignment independent bi-linear multivariate modeling (ALBIMM) for global analyses of 16S rRNA phylogeny. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1565–1575.
- Tsai, Y.L. and Olson, B.H.** 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1070–1074.
- Tsai, S.H., Selvam, A., Chang, Y.P., and Yang, S.S.** 2009. Soil bacterial community composition across different topographic sites characterized by 16S rRNA gene clones in the fushan forest of Taiwan. *Bot. Stud.* **50**, 57–68.
- White, C., Tardif, J.C., Adkins, A., and Staniforth, R.** 2005. Functional diversity of microbial communities in the mixed boreal plain forest of central Canada. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1359–1372.
- Yarwood, S.A., Myrold, D.D., and Högberg, M.N.** 2009. Termination of below-ground C allocation by tree alters soil fungal and bacterial communities in a boreal forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* **70**, 151–162.
- Zhang, L. and Xu, Z.** 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *J. Soils Sediments* **8**, 379–388.