

Article

# Alaska 툰드라 토양의 깊이 및 해동 영향에 따른 미생물 군집과 토양 유기 탄소 분해 특성

박하주<sup>1\*</sup> · 김덕규<sup>1</sup> · 박 현<sup>1</sup> · 이방용<sup>2</sup> · 이유경<sup>2</sup>

<sup>1</sup>극지연구소 극지생명과학연구부, <sup>2</sup>극지연구소 북극환경·자원연구센터

## Characterization of microbial communities and soil organic carbon degradation associated with the depth and thawing effects on tundra soil in Alaska

Ha Ju Park<sup>1\*</sup>, Dockyu Kim<sup>1</sup>, Hyun Park<sup>1</sup>, Bang Yong Lee<sup>2</sup>, and Yoo Kyung Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

<sup>2</sup>Arctic Research Center, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

(Received April 26, 2016; Revised July 18, 2016; Accepted August 8, 2016)

**ABSTRACT:** In high-latitude regions, temperature has risen (0.6°C per decade) and this leads to the increase in microbial degradability against soil organic carbon (SOC). Furthermore, the decomposed SOC is converted into green-house gases (CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) and their release could further increase the rate of climate change. Thus, understanding the microbial diversity and their functions linked with SOC degradation in soil-thawing model is necessary. In this study, we divided tundra soil from Council, Alaska into two depth regions (30-40 cm and 50-60 cm of depth, designated as SPF and PF, respectively) and incubated that for 108 days at 0°C. A total of 111,804 reads were obtained through a pyrosequencing-based metagenomic study during the microcosm experiments, and 574-1,128 of bacterial operational taxonomic units (OTUs) and 30-57 of archaeal OTUs were observed. Taxonomic analysis showed that the distribution of bacterial taxa was significantly different between two samples. In detail, the relative abundance of phyla *Actinobacteria* and *Firmicutes* largely increased in SPF and PF soil, respectively, while phyla *Crenarchaeota* was increased in both soil samples. Weight measurement and gel permeation chromatography of the SOC extracts demonstrated that polymerization of humic acids, main component of SOC, occurred during the microcosm experiments. Taken together our results indicate that these bacterial and archaeal phyla could play a key function in SOC degradation and utilization in cold tundra soil.

**Key words:** biodegradation, climate change, soil bacteria, soil organic carbon, sub-arctic

지난 30년간 고위도 지역의 기온 상승은 0.6°C/10년으로, 지구 평균 기온 상승 보다 2배 높다(Schuur *et al.*, 2015). 이러한 현상은 영구동토(permafrost)의 해동을 야기시키며, 해동된 토양 내 유기 탄소는 생리적 활성이 증가된 미생물에 의해 분해된다(Brown and Romanovsky, 2008). 분해된 유기 탄소는 이산화탄소나 메탄 같은 온실 가스의 형태로 전환되어 대기 중 방출되며, 이는 지구 온난화를 가속화시킨다. 약 17,000억 톤의 유기 탄소가 북극과 아북극 지역의 영구동토층에 매

장되어 있고, 이 지역들은 지구에서 가장 많은 유기 탄소 매장지이다(Schuur *et al.*, 2015). 따라서, Alaska 같은 아북극 지역의 영구동토와 활성토양(active layer)에서 유기 탄소의 순환 연구가 활발히 이루어지고 있다(Barber *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2015; Ping *et al.*, 2015).

토양 유기 탄소의 구성 성분인 부식질 분해와 관련하여 white-rot 곰팡이 연구가 활발히 진행되었는데(Paul *et al.*, 1997; Grinhut *et al.*, 2007), 곰팡이 유래 비특이적 산화 효소(non-specific oxidizing enzyme: laccase와 peroxidase)에 의해 부식질이 분해되는 것으로 알려져 있다(Hatakka, 1994; Grinhut

\*For correspondence. E-mail: hajupark@kopri.re.kr;  
Tel.: +82-32-760-5546; Fax: +82-32-760-5509

*et al.*, 2011). 효소에 의해 1차 분해된 분해산물은 미생물의 활성에 따라 2차 분해되어 완전히 무기화 되거나, 비생물적 중합화(humification)에 의해 고분자의 부식질로 재생산된다(Zavarzina *et al.*, 2004; Grinhut *et al.*, 2007). 세균은 저온 같은 극한 환경에서 조차 다양한 생분해 활성을 갖기 때문에, 세균 또한 부식질 분해자로 추정되고 있다. 실제로, 세균에서도 곰팡이 유래 laccase와 유사한 기능을 갖는 laccase-like multicopper oxidase 단백질이 분리된 사례가 있다(Kellner *et al.*, 2008).

종합해 보면, Alaska 영구동토는 지구 온난화에 의해 해동될 것이고, 이에 따라 다량의 유기 탄소가 노출 될 것이기 때문에 중요한 연구 물질이다. 이전 연구에서 Alaska Council의 AK1-75 토양(64°50.682' N, 163°42.673' W) 표층을 이용하여 부식질 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. PAMC 26793과 *Paenibacillus* sp. PAMC 26794를 분리하였고, 세균에 의한 부식질 분해 특성을 보고하였다(Park and Kim, 2015). 또한, AK1-75 토양 표층에 대한 환경 모사 실험을 통해 부식질 분해와 관련된 미생물 군집의 변화를 보고하였다(Park *et al.*, 2015). 이러한 연구와 연계하여 AK1-75의 영구동토가 해동되었을 때, 토양 부식질의 변화를 확인하고 어떠한 세균 또는 고세균이 부식질을 이용하는지 확인하기 위해 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 토양시료 채집

2012년 6월 25일부터 7월 1일까지 Alaska Nome의 Council 지역 내 다양한 목초지 지점에서 코어러 장비(전동 auger)를 이용하여, 깊이가 약 80 cm인 토양 코어 시료를 확보하였다. 이 중, 토양 내 수분함량이 높고, 사초(sedge) 류의 식물이 우점하고 있는 AK1-75 토양 코어 시료가 냉대 툰드라 토양의 해동 모델 연구를 위해 사용되었다. AK1-75 토양을 표층으로부터 10 cm의 깊이 간격으로 분획하고 균질화한 후, 환경 모사 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

### 토양에 대한 환경 모사 실험

현장에서 극지연구소(Incheon, South Korea)로 운반된 각 깊이의 AK1-75 토양 중, 반영구동토층(semi-permafrost)으로 예상되는 30-40 cm (SPF라 명명)와 영구동토층(permafrost)으로 예상되는 50-60 cm (PF라 명명)의 각 토양 200 g을 500 ml 비이커에 넣은 후, 0°C에서 108일간 배양하였다. 비이커 내

각 토양을 54일 간격으로 취하여 부식질 함량을 조사하였고, 세균 및 고세균의 16S rRNA 유전자에 대한 pyrosequence 분석을 수행하였다.

### 부식질 추출 및 함량 분석

배양 시간에 따라 얻은 토양을 45°C에서 완전히 건조한 후, 63 µm 직경의 pore로 구성된 230 mesh 체를 이용하여 식물 잔해 및 돌 조각을 제거했다. 1 g의 토양과 25 ml의 0.5 N NaOH를 12시간 동안 상온에서 반응하여 NaOH 추출물을 얻었다. 원심분리(5,500 × g, 15분, 상온)를 통해, 상층의 NaOH 추출물을 얻은 후, 5.0 N HCl을 이용하여 추출물의 pH가 2.0이 되도록 산성화하였다. 산성화된 추출물을 4°C에서 12시간 방치한 후, 원심분리(4,000 × g, 7분, 4°C)를 통해 비가용성의 부식산과 가용성의 펠빅산을 분획하였다. 동결건조를 수행한 부식산과 펠빅산의 무게를 측정 후, gel permeation chromatography를 통해 두 물질의 분자량 분포를 확인하였다. 분자량 확인을 위해, 0.1 N NaOH가 첨가된 10 mg/ml의 부식산 또는 펠빅산 용액을 0.2 µm의 membrane filter에 통과시켰다. Membrane 통과액 10 µl를 Shodex OHpak SB-804 HQ 컬럼(8.0 mm ID × 300 mm, Showa Denko America, Inc.)과 연결되어 있는 Ultrahydrogel-500 컬럼(7.8 mm ID × 300 mm, Waters, Inc.)에 로딩하였다. Hewlett Packard 1100 HPLC 장비를 이용하여 분자량에 따른 용출 분석을 수행하였다. 이 때에 0.5 ml/min의 유속으로 가스가 제거된 증류수를 흘려 주었으며, refractive index detector를 이용하여 분자량 분포를 확인하였다. 부식산과 펠빅산의 분자량 산출을 위해, pullulan 혼합액(788, 212, 47.3, 11.8 kDa pullulan)을 사용하였다.

### 메타게놈 DNA 추출 및 pyrosequencing

환경 모사 실험 내 채취한 SPF와 PF 토양의 metagenomic DNA는 DNA extraction kit (MO Bio)를 통해 추출하였다. 추출한 DNA 중, 원핵생물의 16S rRNA 분석을 위해, V1-V3 (세균) 또는 V5-V6 (고세균) 영역을 증폭하였다. 세균(27F와 518R sequence) 및 고세균(519F와 958R sequence)의 16S rRNA 증폭 sequence, linker (2 염기), 바코드 서열(7-10 염기, 각 reverse primer에서만 사용), 주요 서열(4 염기) 및 454 adapter가 포함된 융합 primer들의 구성은 다음과 같다(Chun and Goodfellow, 1995): 세균 증폭 융합 primer인 V1-F (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 밑줄은 유전자 특이 지역)와 V3-R (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-X-AC-WTTACCGC

GGCTGCTGG-3'; X는 바코드 서열), 고세균 증폭 용합 primer 인 V5-F (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AG-CAGCCGCCGCGGTAA-3')와 V6-R (5'-CCATCTCAT CCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-X-GA-YCCGCGCTTG AMTCCAATT-3'). 각 primer를 이용한 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 PCR을 다음과 같이 진행하였다. 94°C에서 5분 동안 초기 denaturation 후, 94°C에서 30초 동안 denaturation, 55°C에서 45초 동안 annealing과 72°C에서 90초 동안 elongation을 30회 반복. PCR 증폭물을 resin 컬럼을 이용하여 정제한 후, agarose gel 전기영동에서의 크기를 확인( $\geq 300$  bp)하였다. Chunlab Inc.에 설치되어 있는 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche)을 이용하여 DNA library 시료의 pyrosequence를 분석하였다.

### 분류학적 구분 및 분석

분석된 sequence 내 바코드, linker 및 primer sequence를 제거한 후, 각 sequence를 HMMER 3.0 (<http://hmmer.janelia.org/>)과 BLAST로 분석하였다. Chimera가 아닌 선별 16S rRNA sequence의 수를 표준화한 후, EzTaxon-e 데이터베이스 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 검색을 통해 분류학적 카테고리에 따라 정리하였다.

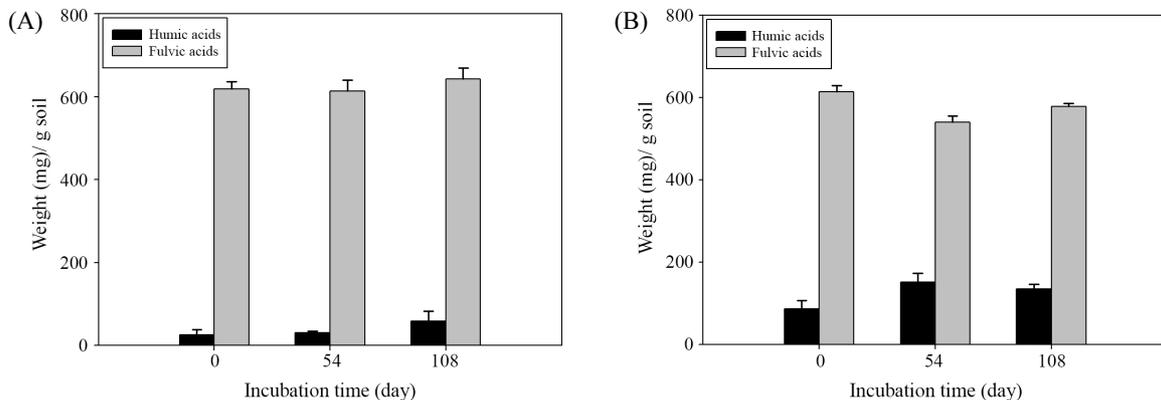
세균 및 고세균에 대한 모든 통계적 분석은 CLcommunity 소프트웨어(Chunlab Inc.)를 통해 수행하였다. Operational taxonomic unit (OTU)는 CD-HIT 프로그램 내에서 97% 이상의 sequence 유사성에 따라 구분하였다. 풍부도(Chao1, ACE 및 Jackknife 지표)와 다양성(Shannon 및 Simpson 지표)은 Mothur 플랫폼을 이용하여 산출하였다(Schloss *et al.*, 2009).

## 결 과

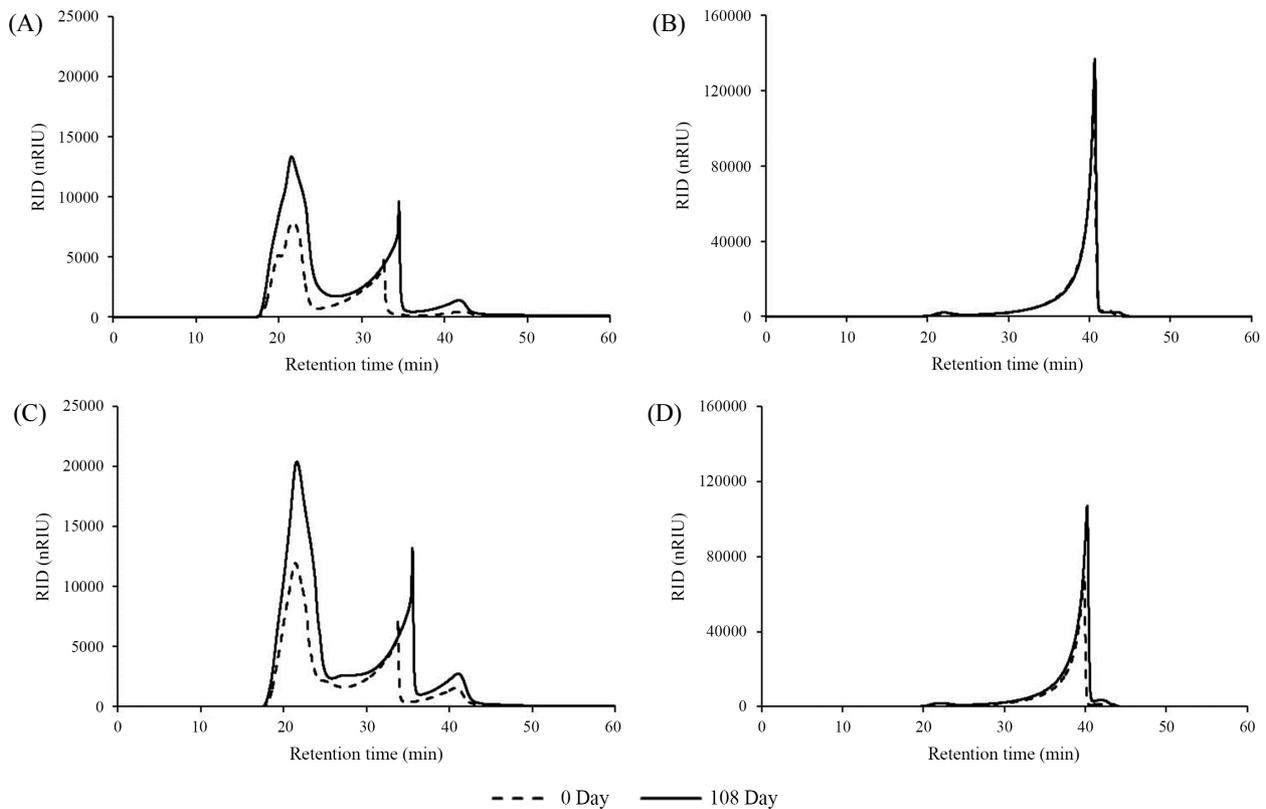
### 환경 모사 실험에서의 부식질 변화

토양 유기물이 풍부한 Alaska 툰드라 토양인 AK1-75 영구 동토층의 해동 모델 연구를 위해, 표층으로부터 깊이 약 80 cm의 토양을 채취하였다. 이 중, SPF와 PF 토양을 0°C의 비이커에서 서서히 해동 및 배양하는 환경 모사 실험을 진행하였다. 두 배양 토양은 54일 배양으로 완전히 해동되었고, 총 108일 동안 환경 모사 실험을 진행하였다. 배양 기간 동안의 부식질 변화를 확인하기 위해, 배양 기간의 매 54일 간격으로 토양을 취해서 부식산과 펠빅산을 추출하였다(Fig. 1). SPF와 PF 토양 1 g 내 펠빅산은 배양 전 각각 618 mg 및 614 mg이었으며, 최종 108일의 배양 기간 동안 큰 변화가 없었다. 부식산의 경우, 배양 전 1 g의 SPF 및 PF 토양에 각각 26 mg 및 59 mg이 함유되어 있었다. 흥미롭게도, 배양 전과 비교하여 SPF의 부식산 함량은 108일의 배양 기간 동안 점진적으로 증가(31 mg, 54일 배양; 59 mg, 108일)하였으며, PF에서의 부식산 함량은 54일 배양에서 151 mg으로의 함량 증가 및 108일 배양에서 135 mg의 함량 감소 변화를 보였다. 이러한 부식산 함량의 증가 변화는 두 깊이 토양에서 humification 작용에 의한 토양 유기탄소의 중합화가 일어 나는 것을 나타낸다.

Gel permeation chromatography를 이용하여 각 깊이 토양에서 추출한 부식산과 펠빅산의 분자량 분포와 변화 패턴을 확인하였다(Fig. 2). 환경 모사 실험 동안 추출한 SPF와 PF 토양 내 모든 펠빅산(retention time = 41 min, Fig. 2B와 D)은 약 1.6 kDa 분자량으로 산출되었으며, 배양 전부터 108일의 배양 시간 동안 변화가 없었다. 반면, Fig. 2A와 C에서 보듯이, 두 깊이의 토양 모두에서 나타나는 retention time 22분(약 780 kDa)



**Fig. 1.** Time-course changes in humic substances content (humic acids and fulvic acids) determined by direct weighting during microcosm experiments at 0°C: Two frozen soil samples (SPF and PF) were homogenized and incubated at 0°C for 108 days. At 54-day intervals, the samples were subjected to humic substances extraction. Solid humic acids and fulvic acids were obtained by lyophilization. (A) SPF soil and (B) PF soil.



**Fig. 2.** Gel permeation chromatography for humic acids and fulvic acids, extracted during microcosm experiments. Humic substances content extracted as shown on Fig. 1 was dissolved in 0.1 N NaOH. Each extracted solution was loaded onto Ultrahydrogel-500 columns linked to a ShodexOHpak SB-804 HQ column. Molecular distribution was monitored with refractive index detector. (A) Humic acids from SPF soil, (B) fulvic acids from SPF soil, (C) humic acids from PF soil, and (D) fulvic acids from PF soil.

과 34분(약 12 kDa)의 부식산 peak는 108일 배양에 따라 명확히 증가하였다. 이러한 chromatogram을 통해 토양 배양에 따른 토양 유기 탄소의 humification을 재확인 하였다.

### 세균 및 고세균 군집에 대한 pyrosequencing 및 통계적 분석

영구동토층을 포함한 모든 토양에서 미생물은 토양 유기물 이용/분해에 중요한 역할을 하기 때문에, 토양 내 미생물의 다양성, 우점 여부 등의 군집 구조 특성 연구는 그들의 유기물 이용능 유추에 중요하다. 두 깊이의 토양에 대한 환경 모사 실험을 108일 동안 수행하며 54일 간격으로 채취한 토양으로부터 세균과 고세균의 16S rRNA pyrosequence 분석을 수행하였다. 0°C에서 해동 및 배양을 수행한 각 깊이의 토양에서 배양 시간에 따라 다음과 같은 미생물의 유효 sequence (약 450 bp 이상)를 얻었다(Table 1): SPF에서 0, 54, 108일 배양에 따른 세균(19,956개)과 고세균(42,738개)의 유효 sequence, PF에서 세균(19,332개)과 고세균(29,768개). CD-HIT 프로그램 내

에서 97%의 sequence 유사도를 기준으로 SPF 및 PF 토양 내 세균과 고세균의 OTU를 얻었다. 두 깊이 토양 모두에서, 배양 시간에 따라 OTU 수가 감소하였으며, 동시에 풍요도(Chao1, ACE 및 JackKnife 지표)와 다양성(Shannon 및 Simpson 지표)이 감소하는 세균 군집 구조 변화를 확인하였다. 비록 0°C의 저온에서 수행한 호기적 토양 배양이기 때문에 감소 정도가 크지 않았지만, 지속적으로 OTU 수, 풍요도 및 다양성이 감소하는 것은 토양 해동에 의해 특정 세균 및 고세균 군집이 부식질을 이용하여 성장/우점하는 것을 나타낸다. 고세균의 경우, 3,874개의 유효 sequence에서 30-75개의 OTU만을 확인하였다. 또한, 고세균은 모든 분석 토양에서 세균에 비해 약 10배 낮은 풍요도와 약 2배 낮은 다양성을 나타냈다. 이를 통해, 세균에 비해 고세균의 다양성이 낮으며, 토양 내 특정 고세균 군집이 배양 전부터 우점하고 있는 것을 유추할 수 있다.

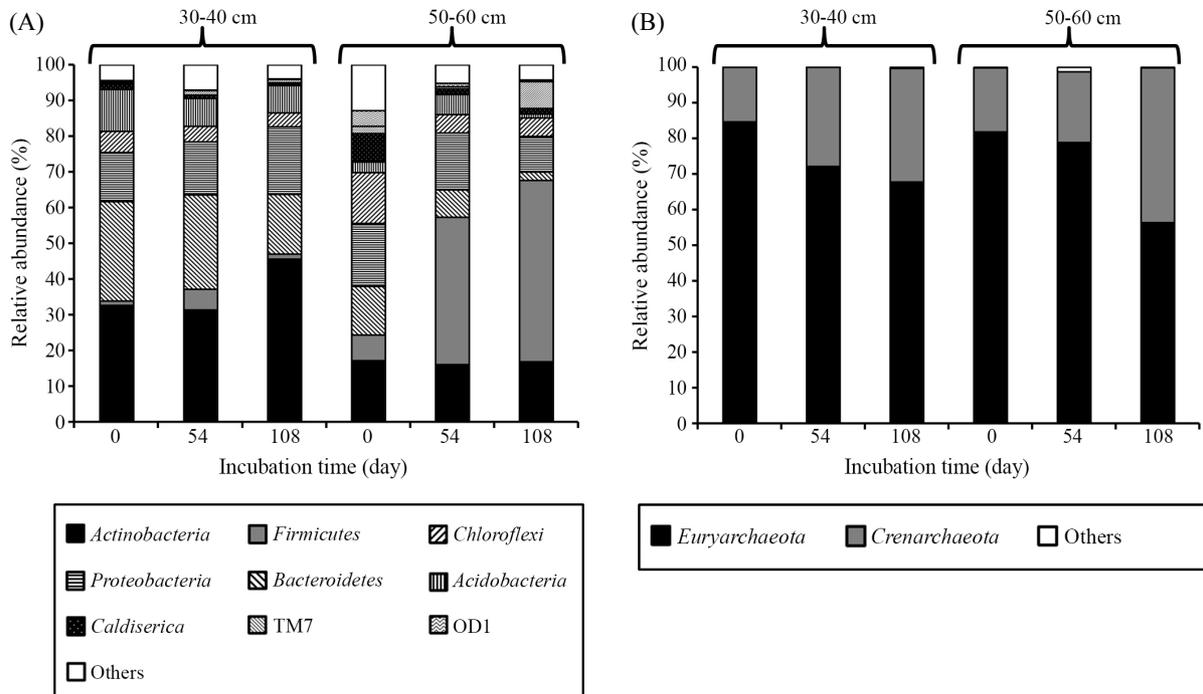
### 미생물 군집의 분류학적 분석

SPF 및 PF 토양과 채취 시기가 동일한 AK1-75의 토양 표층

**Table 1.** Summary of pyrosequencing results and statistical analysis of microbial communities during microcosm experiments

Sample		Number of reads*		OTU richness*			OTU diversity*		
Depth (cm)	Incubation time (day)	Validated	Normalized	Observed	Chao1	ACE	JackKnife	Shannon	Simpson
30-40	0	6,367 (22,923)	5,115 (3,874)	651 (75)	1,136 (106)	1,525 (98)	1,508 (106)	4.960 (2.613)	0.021 (0.118)
	54	8,046 (10,727)	5,115 (3,874)	574 (35)	947 (39)	1,231 (41)	1,131 (43)	4.814 (2.248)	0.025 (0.137)
	108	5,543 (9,088)	5,115 (3,874)	569 (68)	956 (96)	1,332 (94)	1,208 (97)	4.692 (2.423)	0.031 (0.147)
50-60	0	5,118 (15,710)	5,115 (3,874)	1128 (30)	2,071 (37)	2,789 (39)	2,611 (39)	6.056 (1.668)	0.005 (0.313)
	54	8,596 (10,184)	5,115 (3,874)	922 (37)	1,698 (42)	2,334 (47)	2,088 (47)	5.462 (1.959)	0.013 (0.190)
	108	5,618 (3,874)	5,115 (3,874)	651 (51)	1,139 (56)	1,498 (57)	1,411 (60)	5.052 (2.368)	0.016 (0.147)

\*All number of brackets' outside and inside indicates bacteria and archaea, respectively



**Fig. 3.** Shifts analysis of taxonomic composition during microcosm experiments. This figure shows the relative abundance of bacterial and archaeal taxa at phylum level: (A) bacteria and (B) archaea. The results of taxonomic classification were classified using the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>). Others are sum of minimal taxa (<5% of abundance).

(0-20 cm)을 5°C에서 배양하면서 세균과 고세균의 군집 변화 및 이에 따른 부식질의 변화를 보고한 바 있다(Park *et al.*, 2015). 표층에서의 경우와 SPF와 PF 토양에서의 군집 변화를 비교하기 위해, 세균과 고세균의 16S rRNA 유전자 sequence를 EzTaxon-e 서버에서 분석하였고, phylum 수준에서 비교하였다(Fig. 3). 최소 1개의 토양 시료 내에서 5% 미만의 상대적 분

포도를 갖는 세균 및 고세균의 phyla (others로 표시)를 제외하고, 각 토양에서 9종의 세균 phyla와 2종의 고세균 phyla를 확인하였다. 대부분의 토양 세균은 9개의 주요 phyla (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*와 *Gemmatimonadetes*)에 속하는 것으로 알려져 있다(Janssen, 2006). 이와 유사하게 두 깊

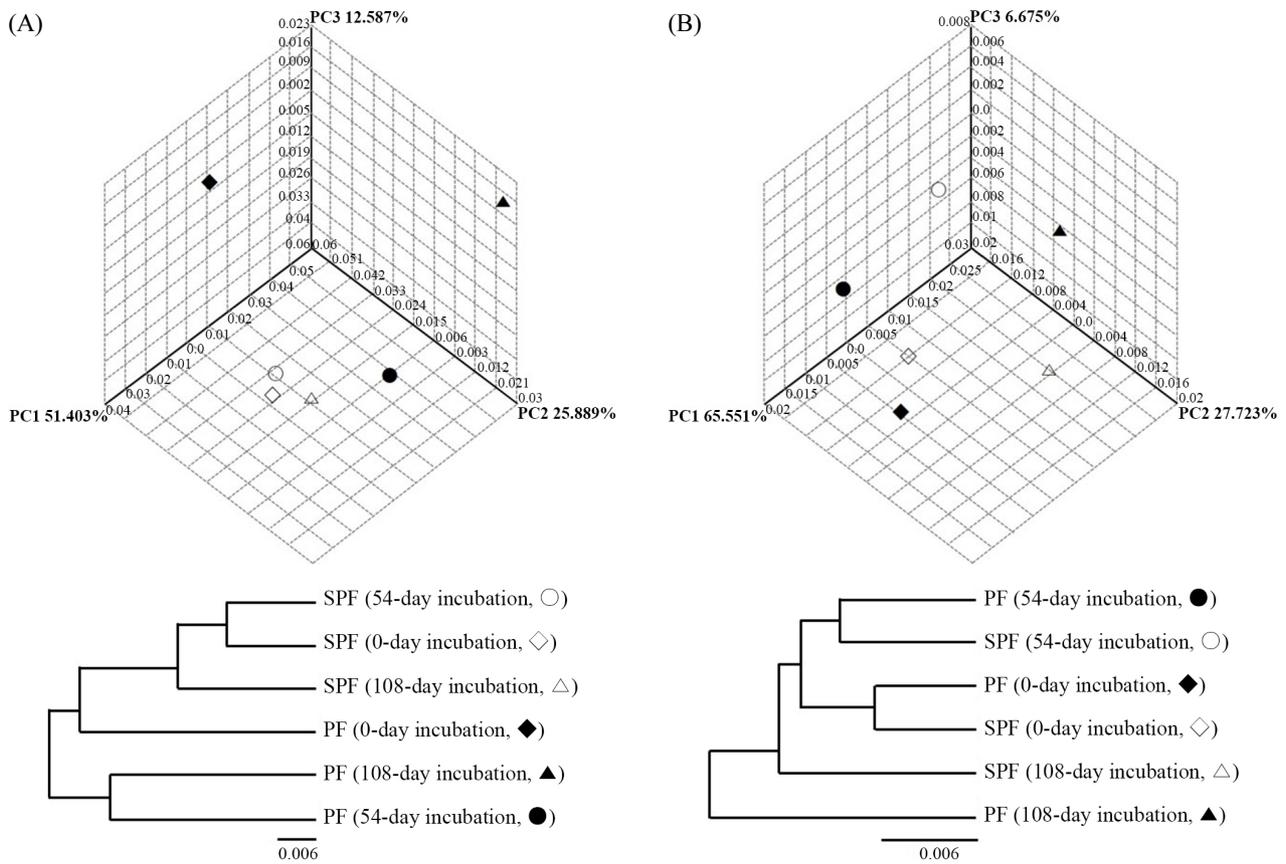
이의 배양 토양 내에도 73–93%의 상대적 분포도를 다음의 6 종 phyla가 차지하였다: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*와 *Acidobacteria*. 흥미롭게도, SPF와 PF 토양은 배양에 따라 서로 다른 세균 phyla의 우점 경향을 확인하였다. SPF의 경우, 108일 배양으로 *Actinobacteria* phyla는 33%에서 46%로, *Proteobacteria* phyla는 14%에서 19%로의 분포도 증가(Fig. 3A)를 보인 반면, PF에서는 *Firmicutes* phyla만이 7%에서 51%로 뚜렷한 분포도 증가(Fig. 3B)를 보였다. 고세균의 경우, 배양 전의 SPF와 PF 토양 모두에서 *Euryarchaeota* phyla가 우점하고 있었지만, 배양에 따라 *Crenarchaeota* phyla가 15%에서 32% (SPF) 및 18%에서 44% (PF)로 증가하였다. 이러한 해동에 따른 두 토양 내 세균 및 고세균의 군집 변화 경향은 AK1-75 표층 토양에서의 변화와 큰 차이가 있었다. 표층 토양을 5°C에서 99일 배양했을 때에는 다음과 같은 세균과 고세균의 군집 변화가 있었다: *Proteobacteria* phyla 분포 증가, *Firmicutes* phyla 감소, *Euryarchaeota* phyla 증가 및 *Crenarchaeota* phyla 감소.

Genus 수준에서, 최소 1개의 토양 시료 내에서 2% 이상의 상대적 분포도를 갖는 8종의 고세균 및 14종의 세균 genera의 변화 경향을 확인하였다(Table 2). SPF와 PF 토양 모두에서 배양 시간에 따라 일부 genera (EU155918\_g, GQ396871\_g 및 GU454901\_g genera)의 분포가 감소하는 동안, *Euryarchaeota* phyla의 *Methanoperedens*, *Crenarchaeota*의 AF424768\_g와 AF424775\_g, TM7의 *Saccharimonas* genera 분포는 증가하였다. 특히, 두 토양에서 고세균 *Crenarchaeota*의 AF424768\_g genera가 분포 증가(SPF 및 PF의 108일 배양에서 각각 30.0 및 36.9% 분포)한 것과 세균 *Actinobacteria*의 *Oryzihumus* (SPF에서 36.7%)와 *Firmicutes*의 *Desulfosporosinus* (PF에서 36.0%) genera가 증가한 것을 확인하였다.

SPF 및 PF의 배양에 따른 세균 및 고세균의 16S rRNA 유전자 sequence들의 구성 변화를 Fast UniFrac 분석 방법을 이용하여 평가하였다(Fig. 4). 배양 전의 SPF와 PF 토양 내 고세균의 OTU 간의 Unifrac 거리는  $1.3 \times 10^{-2}$ 였으며, 각 토양의 0일 배양과 비교하여 54 및 108일 배양에 따라 다음과 같은 거리

**Table 2.** Selected microbial genera with abundance level for over 2% among total reads

Microorganism	Phylum	Genus	Relative abundance (%)						
			Incubation time (SPF soil)			Incubation time (PF soil)			
			0-day	54-day	108-day	0-day	54-day	108-day	
Archaea	<i>Euryarchaeota</i>	<i>AY175392_g</i>	51.6	39.9	52.7	52.6	40.4	34.2	
		<i>Methanobacterium</i>	10.2	13.9	8.3	12.6	23.1	13.1	
		<i>Methanosaeta</i>	3.6	6.7	2.8	10.8	9.2	5.0	
		<i>EU155918_g</i>	8.1	7.9	0.1	4.0	3.8	0.1	
		<i>Methanosarcina</i>	7.6	3.4	2.2	1.5	2.0	1.4	
	<i>Crenarchaeota</i>	<i>Methanoperedens</i>	0.1	0.1	1.2	0.1	0.1	2.4	
		<i>AF424768_g</i>	14.0	26.4	30.0	16.0	17.7	36.9	
	Bacteria	<i>Crenarchaeota</i>	<i>AF424775_g</i>	0.1	0.1	0.2	1.1	1.4	5.2
			<i>Oryzihumus</i>	21.1	15.3	36.7	5.3	6.6	12.6
		<i>Actinobacteria</i>	<i>AY345497_g</i>	2.5	3.2	1.0	3.4	1.5	0.5
<i>Aciditerrimonas</i>			3.6	2.6	2.4	0.6	1.2	0.2	
<i>GQ393959_g</i>			2.0	3.1	1.0	1.2	0.8	0.7	
<i>Firmicutes</i>		<i>Clostridium</i>	0.7	2.6	0.6	2.5	38.9	12.0	
		<i>Desulfosporosinus</i>	0.1	0.1	0.1	0.4	0.5	36	
<i>Chloroflexi</i>		<i>GQ396871_g</i>	20.8	19.3	12.4	5.7	4.1	1.3	
		<i>Pseudolabrys</i>	3.6	5.0	6.4	1.4	1.6	0.4	
		<i>Proteobacteria</i>	<i>Smithella</i>	2.2	0.9	1.0	6.7	1.9	1.0
	<i>Geobacter</i>		0.2	0.5	2.0	0.7	0.5	5.7	
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>GU454901_g</i>	3.8	2.0	1.6	3.8	1.7	0.8	
	<i>Acidobacteria</i>	<i>AM180888_g</i>	3.6	2.5	2.1	0.4	0.6	0.2	
	<i>Caldiserica</i>	<i>EU266853_g</i>	0.9	0.6	0.8	5.3	0.9	1.6	
	TM7	<i>Saccharimonas</i>	0.1	0.1	0.8	0.1	0.1	7.2	



**Fig. 4.** UniFrac distance-based Jackknife clustering of bacterial (A) and archaeal (B) communities associated with different incubation time from different sampling depths. UniFrac Principal Coordinates Analysis (PCoA) images were captured from 3D UniFrac PCoA to illustrate differences in the microorganism among the different samples. The following UniFrac PCoA analyses were based on the OTU data, with three principal coordinates (PCs) shown. Diamond, circle, and triangle indicate 0-, 54-, and 108-day incubation, respectively; opened, 30-40 cm of depth; closed, 50-60 cm of depth.

증가를 확인하였다(Fig. 4B): SPF 토양에서 54 및 108일 배양에 따라  $2.5 \times 10^2$  및  $2.6 \times 10^2$ 의 거리 변화와 PF 토양에서 54 및 108일 배양에 따라  $1.8 \times 10^2$  및  $3.9 \times 10^2$ 의 거리 변화. 흥미롭게도, dendrogram 상에서 108일 배양을 제외한 두 토양 내 고세균 OTU 구조는 배양 기간과 관련하여 clustering 되었다. 세균에 대한 UniFrac 분석 결과는 고세균의 경우와 차이를 보였다(Fig. 4A). 배양 전 두 토양 사이의 세균 OTU 구조(거리 =  $7.7 \times 10^2$ )는 고세균의 것 보다 많은 차이를 보였다. 게다가, 두 토양은 배양에 따라 서로 다른 OTU 구조 변화를 나타냈다. SPF 토양은 모든 배양 기간을 비교하였을 때,  $3.0 \times 10^2$ - $4.7 \times 10^2$ 의 거리 내에서 clustering 되었지만, 0일 배양의 PF 토양 내 세균 OTU 구조 거리는 54 및 108일 배양한 경위와 각각  $7.6 \times 10^2$  및  $9.6 \times 10^2$ 인 군집 구조의 변화를 나타냈다. Fast UniFrac 분석을 통해, PF의 토양이 녹는다면, 토양 내 고세균 군집은 SPF 내 군집과 유사하게 변화하고, 세균의 군집은 SPF의 경우와 다르게 변화할 것으로 유추할 수 있다.

## 고 찰

Alaska는 대기와의 탄소 순환과 유기 탄소 매장량 등의 측면에서 중요한 연구 지역이다. Alaska 툰드라 지역의 0-3 m 깊이의 토양에는 약  $30\text{-}50 \text{ kg 탄소/m}^2$ 이 매장되어 있고, 대부분의 토양은 2년 이상의 기간 동안 영하의 온도를 유지하는 영구 동토층에 해당한다(Schuur *et al.*, 2015). 이러한 특징의 툰드라 토양이 지구 온난화에 의해 해동된다면, 미생물에 의한 토양 유기 탄소 분해가 증가할 것이고, 이는 지구 온난화의 가속화를 야기시킬 것이다.

Alaska 토양은 깊이와 관련하여 유기물과 무기물 토양층을 형성하는데, 유기물 토양층 내 토양 부피밀도( $0.15\text{-}0.18 \text{ g/cm}^3$ )는 무기물 토양층( $1.33\text{-}1.53 \text{ g/cm}^3$ ) 보다 낮고, 두 토양층의 porosity ( $0.86\text{-}0.90$ , 유기물 토양층;  $0.46\text{-}0.77$ , 무기물 토양층)는 많은 차이를 보인다(Hinzman *et al.*, 1991). 이에 따라, 유기물 토양층의 수리전도도(hydraulic conductivity)는 약 14.9

$\times 10^{-3}$  cm/sec으로 무기물 토양층과 비교하여 약 14배 높다. 이러한 수문학적 특징은 하계 기간의 Alaska 유기물 토양에 새로운 용존 탄소와 질소의 유입 그리고/또는 유출을 야기시키며, 배수에 의한 일부 토양의 호기적 환경 변화를 야기시킨다 (Douglas et al., 2013; Schuur et al., 2015). 이러한 복잡한 환경과 더불어, Alaska 지역의 평균 활성 토양층 깊이는 약 47 cm이기 때문에 (Mishra and Riley, 2012), 토양 근권의 환경 내에 활성층과 영구동토층이 함께 존재하는 특징이 있다. 실험에 사용한 AK1-75의 SPF 토양(30-40cm 깊이)은 영구동토층에 근접한 반영구동토층이며, 하계 기간 동안 0-5°C 사이의 온도일 것으로 예측된다. PF 토양(50-60 cm 깊이)은 영구동토층으로 예상되며, 연 중 0°C 이하의 온도를 유지할 것으로 예측된다. 지구 온난화 같은 환경 변화에 의한 토양 근권 생태계 변화를 확인하기 위해, SPF와 PF 토양을 채취한 후, 냉동 상태로 보관한 두 토양을 0°C에서 108일 동안 호기적 해동 모사 실험을 진행하며, 부식질 함량 및 원핵 생물의 군집 변화를 확인하였다. 이전에 실험이 진행된 동일한 시기에 채취한 AK1-75의 활성 토양 표층(0-20 cm)의 부식질 함량과 배양 전의 SPF 및 PF 토양 내 함량은 많은 차이를 보였다. 표층 토양은 43%의 부식산과 30%의 펠빅산으로 구성된 것과 비교하여, SPF 및 PF 토양 내 부식산 함량은 각각 2.6% 및 8.7%였으며, 펠빅산 함량은 각각 62% 및 61%였다. 즉, 표층에 비해 두 깊이의 토양은 낮은 부식산과 높은 펠빅산 함량의 특징을 보였으며, 동토 해동 모사 실험 동안 부식산 함량이 SPF 및 PF 토양에서 각각 175 및 165%로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 해동된 SPF 및 PF 토양 내 부식산 함량 증가 변화는 0°C에서의 토양 미생물에 의한 부식질 이용을 나타낸다. 미생물의 부식질 분해는 비특이적 산소화 효소(laccase 또는 peroxidase)의 생산과 관련된 것으로 예상되는데, 효소에 의해 저분자화(depolymerization)된 부식산은 최종적으로 이산화탄소나 메탄으로 전환(degradation)되거나, 토양 내 유기물, 무기물 또는 분해된 부식산과 재결합(repolymerization)하는 humification 과정을 겪는 것으로 알려져 있다(Grinhut et al., 2007). 구체적으로, 효소에 의해 분해된 부식산에는 phenoxyl free radical이 형성되고, 이후 미생물의 에너지원으로 사용되어 온실가스로 방출되거나, humification 작용으로 거대 부식산으로 전환된다(Zavarzina et al., 2004). 곰팡이, 식물 또는 곤충 같은 진핵생물만이 비특이적 산소화 효소를 이용하는 부식질 분해자로 여겨져 왔지만(Mayer and Staples, 2002), 최근 *Actinobacteria* (*Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Nocardia* 및 *Microbacterium* genera), *Firmicutes* (*Bacillus*, *Oceanobacillus* 및 *Staphylococcus* genera), *Proteobacteria* (*Pseudomonas* genera) phyla의 세균

과 *Crenarchaeota* (*Pyrobaculum* genera) phyla의 고세균 또한 유사한 효소를 생산하고 부식질을 분해하는 것으로 생각되고 있다(Kellner et al., 2008; Bugg et al., 2010; Claus, 2015). 실제로, AK1-75 토양에서 분리한 세균인 *Pseudomonas* sp. PAMC 26793과 *Paenibacillus* sp. PAMC 26794는 부식산을 에너지원으로 이용하여 성장하며 동시에 부식산을 재생산하였다(Park and Kim, 2015).

북극과 아북극 지역의 토양은 깊이에 따라 서로 다른 토양 특성을 갖는다. 구체적으로, 토양 깊이가 깊을수록 토양 수분 및 토양 유기 탄소 함량이 낮아지는 특성이 있으며, 이는 미생물 군집 구조에 영향을 준다(Lee et al., 2013). 특히, 토양 수분 함량은 세균과 고세균 군집 구조에 영향을 주고, 토양 유기 탄소는 세균 군집 구조에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 사용한 독립적인 호기적 동토 해동 모델을 통해, 제한적 환경에서의 깊이에 따라 미생물 군집의 변화 패턴을 확인하였다(Fig. 4). 흥미롭게도, 토양의 깊이와 관계 없이 해동 배양 기간에 따라 SPF와 PF 토양에서 서로 유사한 고세균 군집 변화가 발생한 반면, 세균 군집 변화는 두 토양에서 명확한 차이를 보였다. 하계 기간에 해동의 환경이 형성되고 새로 유입되는 수분 및 토양 유기물이 많은 SPF 토양 내 세균 군집은 해동의 환경 영향을 상대적으로 덜 받는 반면, 수년간 해동의 환경과 분리된 영구동토 환경이었던 PF 토양 내 세균 군집은 토양 해동에 따라 눈에 띄는 영향을 받았다. Deng 등(2015)은 30년 이상의 Alaska 영구동토 해동 실험을 통해, 토양 깊이에 따라 우점하는 미생물 군집이 명확하게 구분되는 것을 보고하였다. 특히, 긴 기간의 토양 해동으로 토양 표층에서는 *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Alphaproteobacteria* 및 *Gammaproteobacteria* phyla가 증가하였으며, 영구동토층으로 향할수록 *Bacteroidetes*, *Deltaproteobacteria* 및 *Firmicutes* phyla가 증가하였다. 이와 유사하고 Fast Unifrac 분석 결과와 일치하게 토양 깊이와 토양 해동에 따라 AK1-75 토양 내에서 미생물 군집이 변화하였다. AK1-75 표층에서는 *Euryarchaeota*와 *Proteobacteria* phyla의 우점 경향을 보인 반면, SPF 및 PF 토양 모두에서는 고세균 *Crenarchaeota* phyla가 증가하였고, 세균 *Actinobacteria* (SPF), *Firmicutes* (PF) phyla가 우점하였다. 구체적으로, 고세균 *Crenarchaeota*의 AF424768\_g genera가 SPF 및 PF 토양에서 30 및 37%로 증가하였으며, 세균 중, *Actinobacteria*의 *Oryzihumus*와 *Firmicutes*의 *Desulfosporosinus* genera가 각 토양에서 21%에서 37% (SPF)로, 0.4%에서 36% (PF)로 증가하였다. 이러한 SPF 및 PF 토양 내 미생물 군집 변화는 고세균 *Crenarchaeota* phyla와 세균 *Actinobacteria* 및 *Firmicutes* phyla가 반영구동토층과 영구동토층에서의 부식질 분해자

이며, 기질을 이용한 생장으로 군집 내에서 우점하는 것을 의미한다. 앞서 언급했듯이, *Actinobacteria*, *Firmicutes* 및 *Crenarchaeota* phyla에 속하는 다양한 미생물은 peroxidase와 laccase 등의 효소 생산자이기 때문에(Dari *et al.*, 1995; Bugg *et al.*, 2010), 이러한 효소를 이용하여 부식산을 분해하는 것으로 예상된다.

토양 해동에 따라 증가하는 고세균 *Crenarchaeota* phyla와 세균 *Actinobacteria* (SPF) 및 *Firmicutes* (PF) phyla는 질소 순환 측면에서도 환경 내 많은 영향을 끼칠 것으로 예상된다. *Actinobacteria*와 *Firmicutes* phyla를 포함한 많은 세균의 nitrogen fixation 유전자들에 대한 연구가 활발히 이루어졌으며 이를 통해 세균의 질소 고정 및 질소 순환과 관련된 역할이 밝혀졌지만(Henson *et al.*, 2004; Gtari *et al.*, 2012), 고세균에서는 *Euryarchaeota* phyla (*Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium* genera) 미생물만이 질소 순환에 관련된 것으로 알려져 왔다(Leigh, 2000). 그에 비해, *Crenarchaeota* phyla는 주로 고온 미생물이며 질소 고정 같은 생물학적 질소 순환 시스템에 관여하지 않는 것으로 알려졌지만, 최근 질소 고정에 관여할 것으로 예상되는 비고온성 *Crenarchaeota* 그룹 고세균이 발견되고 있다(Quaiser *et al.*, 2002). 이 그룹의 고세균들은 nitrite reductase (denitrification)와 ammonia monooxygenase 유사 단백질(nitrification)의 유전자를 보유하고 있다. 결국, 하계 기간에 SPF 및 PF 토양이 해동되면, 토양에 유입된 용존 질소 그리고/또는 미생물 활성(ammonification)에 의해 방출된 토양 유기물 유래  $\text{NH}_4^+$ 는 토양 내 증가된 *Crenarchaeota*, *Actinobacteria* 및 *Firmicutes* phyla 미생물에 의해 순환되고, 최종적으로 대기로 방출되거나 토양 근권 식물 성장에 영향을 줄 것으로 예상된다(Treusch *et al.*, 2005; Paul, 2014; Strawn *et al.*, 2015).

결론적으로, 냉대의 툰드라 영구동토층이 해동되었을 때, 토양 유기 탄소 분해와 질소 순환에 주요한 역할을 하는 미생물은 활성 토양층과는 다르게 *Actinobacteria*, *Firmicutes* 및 *Crenarchaeota* phyla에 속할 것임을 확인하였다. 향후, 추가적인 실험을 통해 위의 phyla에 속하는 미생물이 어떠한 방법으로 부식질을 분해하는 지 확인하고 미생물에 의한 탄소 및 질소 순환 등을 확인한다면, 지구 온난화 같은 기후 변화에 의한 극지역 생태 영향을 예측할 수 있을 것이다.

## 적 요

고위도에서의 온도 상승은 0.6°C/10년으로, 이는 토양 유

기 탄소에 대한 미생물의 분해 활성 증가를 유도한다. 게다가, 분해된 토양 유기 탄소는 이산화탄소 또는 메탄 같은 온실가스로 전환, 방출되어 기후 변화를 가속화시킨다. 따라서, 토양 유기 탄소 분해와 관련된 미생물의 다양성 및 기능 이해를 위한 토양 해동 모델 연구가 필요하다. 이러한 연구를 위하여 Alaska Council의 두 깊이의 토양(SPF와 PF라 각각 명명한 30-40와 50-60 cm 깊이의 토양)을 0°C에서 108일 동안 배양하였다. 환경 모사 실험 동안 pyrosequencing을 수행하였고, metagenome을 분석하여 총 111,804개의 미생물 sequence를 얻었다. 이 중, 574-1,128개의 세균 operational taxonomic unit (OTU)과 30-57개의 고세균 OTU를 확인하였다. 토양 배양에 따라 두 토양 모두에서 *Crenarchaeota* phyla의 상대적 분포가 증가하였으며, *Actinobacteria*와 *Firmicutes* phyla의 분포가 SPF와 PF에서 각각 크게 증가하였다. 추출한 토양 유기 탄소에 대한 무게 측정 및 gel permeation chromatography를 통해, 환경 모사 실험이 진행되는 동안 토양 유기 탄소의 주요 구성 성분인 부식산(humic acids)이 중합화(humification)되는 것을 확인하였다. 결론적으로, 냉대 툰드라 동토의 해동은 *Crenarchaeota*, *Actinobacteria* 및 *Firmicutes* phyla의 증가를 야기시키며, 미생물에 의한 토양 유기 탄소 분해 및 이용을 야기시키는 것으로 예측된다.

## 감사의 말

이 논문은 2016년도 극지연구소 남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴(PE16070) 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## References

- Barber, V.A., Juday, G.P., and Finney, B.P. 2000. Reduced growth of Alaskan white spruce in the twentieth century from temperature-induced drought stress. *Nature* **405**, 668-673.
- Brown, J. and Romanovsky, V.E. 2008. Report from the International Permafrost Association: state of permafrost in the first decade of the 21st century. *Permafrost. Periglac. Process.* **19**, 255-260.
- Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., and Singh, R. 2010. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 1-7.
- Chowdhury, T.R., Herndon, E.M., Phelps, T.J., Elias, D.A., Gu, B., Liang, L., Wullschleger, S.D., and Graham, D.E. 2015. Stoichiometry and temperature sensitivity of methanogenesis and CO<sub>2</sub> production from saturated polygonal tundra in Barrow,

- Alaska. *Glob. Change Biol.* **21**, 722–737.
- Chun, J. and Goodfellow, M.** 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 240–245.
- Claus, H.** 2015. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **35**, 93–96.
- Dari, K., Béchet, M., and Blondeau, R.** 1995. Isolation of soil *Sterptomyces* strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**, 115–122.
- Deng, J., Gu, Y., Zhang, J., Xue, K., Qin, Y., Yuan, M., Yin, H., He, Z., Wu, L., Schuur, E.A.G., et al.** 2015. Shifts of tundra bacteria and archaeal communities along a permafrost thaw gradient in Alaska. *Mol. Ecol.* **24**, 222–234.
- Douglas, T.A., Blum, J.D., Guo, L., Kellner, K., and Gleason, J.D.** 2013. Hydrogeochemistry of seasonal flow regimes in the Chena River, a subarctic watershed draining discontinuous permafrost in interior Alaska (USA). *Chem. Geol.* **335**, 48–62.
- Grinhut, T., Hertkom N., Schmitt-Kopplin, P., Hadar, Y., and Chen, Y.** 2011. Mechanisms of humic acids degradation by white rot fungi explored using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 2748–2754.
- Grinhut, T., Hadar, Y., and Chen, Y.** 2007. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. *Fungal Biol. Rev.* **21**, 179–189.
- Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Beauchemin, N., and Tisa, L.S.** 2012. Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Arch. Microbiol.* **194**, 3–11.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi-production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125–135.
- Henson, B.J., Watson, L.E., and Bamum, S.R.** 2004. The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *NifD*. *J. Mol. Evol.* **58**, 390–399.
- Hinzman, L.D., Kane, D.L., Gieck, R.E., and Everett, K.R.** 1991. Hydrologic and thermal properties of the active layer in the Alaska Arctic. *Cold Reg. Sci. Technol.* **19**, 95–110.
- 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.
- Kellner, H., Luis, P., Zimdars, B., Kiesel, B., and Buscot, F.** 2008. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 638–648.
- Lee, S.H., Jang, I., Chae, N., Choi, T., and Kang, H.** 2013. Organic layer serves as a hotspot of microbial activity and abundance in Arctic tundra soils. *Microb. Ecol.* **65**, 405–414.
- Leigh, J.A.** 2000. Nitrogen fixation in methanogens: The archaeal perspective. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**, 125–131.
- Mayer, A.M. and Staples, R.C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551–565.
- Mishra, U. and Riley, W.J.** 2012. Spatial variability of the active layer, permafrost, and soil profile depth in Alaskan soils, pp. 83–88. In Minasny, B., Brendan, M., and McBratney, A.B. (eds.), *Digital Soil Assessments and Beyond: Proceedings of the 5th Global Workshop on Digital Soil Mapping 2012*, Taylor and Francis Group, London, UK.
- Park, H.J., Chae, N., Sul, W.J., Lee, B.Y., Lee, Y.K., and Kim, D.** 2015. Temporal changes in soil bacterial diversity and humic substances degradation in subarctic tundra soil. *Microb. Ecol.* **69**, 668–675.
- Park, H.J. and Kim, D.** 2015. Isolation and characterization of humic substances-degrading bacteria from the subarctic Alaska grasslands. *J. Basic Microbiol.* **55**, 54–61.
- Paul, E.A.** 2014. Soil microbiology, ecology, and biochemistry, pp. 421–446. 4th ed. Academic press, USA.
- Paul, E.A., Follett, R.F., Leavitt, S.W., Halvorson, A., Peterson, G.A., and Lyon, D.J.** 1997. Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. *Soil Sci. Am. J.* **61**, 1058–1067.
- Ping, C.L., Jastrow, J.D., Jorgenson, M.T., Michaelson, G.J., and Shur, Y.L.** 2015. Permafrost soils and carbon cycling. *Soil* **1**, 147–171.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H., Kletzin, A., Treusch, A.H., Meurer, G., Eck, J., Sensen, C.W., and Schleper, C.** 2002. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environ. Microbiol.* **4**, 603–611.
- 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.
- Schuur, E.A.G., McGuire, A.D., Schädel, C., Grosse, G., Harden, J.W., Hayes, D.J., Hugelius, G., Koven, C.D., Kuhry, P., Lawrence, D.M., et al.** 2015. Climate change and the permafrost carbon feedback. *Nature* **520**, 171–179.
- Strawn, D.G., Bohn, H.L., and O'Connor G.A.** 2015. Soil chemistry, pp. 138–141. 4th ed. Wiley-Blackwell, USA.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H., and Schleper, C.** 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* **72**, 1985–1995.
- Zavazina, A.G., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., and Trofimov, S.Y.** 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an *in vitro* study. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 359–369.