

토양세균 군집의 대사 다양성과 16S rDNA의 제한효소 지문분석에 의한 유전적 다양성의 비교

송인근^{1,2} · 김유영¹ · 조홍범³ · 최영길^{1,2*}

¹한양대학교 생물학과, ²서울대학교 분자미생물학연구소,

³서경대학교 생물공학과

BIOLOG GN microplate를 이용한 유일탄소원의 이용능 비교를 통한 대사적 유사성과 16S rDNA의 PCR 증폭 산물의 제한효소 지문 분석에 따른 유전적 유사성을 5종의 식생토양에 따른 토양미생물 군집을 대상으로 비교하였다. 16S rDNA를 증폭하여 제한효소 지문을 분석한 결과, 토양으로부터 직접 추출하여 증폭한 토양세균 군집의 16S rDNA의 유전적 유사도는 BIOLOG GN microplate를 이용한 대사적 구조와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 배양된 종속영양세균 군집의 다양성과는 유전적 유사도가 매우 낮게 나타났다.

KEY WORDS □ ARDRA, BIOLOG, microbial diversity, soil, vegetation

토양내에서의 미생물의 기능을 충분히 이해하기 위해서는 미생물 군집의 구조를 이해하는 것이 매우 중요하다(16, 17). 그러나 기존의 고전적인 토양미생물 군집의 분석은 토양에 존재하는 모든 미생물 종들을 배양하고 분리할 수 없으며 배양된 미생물의 동정 또한 어렵고 많은 시간을 요구하여 토양생태계의 많은 미생물 시료를 대상으로 군집 구조를 이해하는 것은 매우 어려운 실정이다(3).

최근 들어 미생물 시료를 95 종류의 서로 다른 유일탄소원을 포함하는 상용화된 BIOLOG GN microplate를 이용하여 미생물 군집간의 대사적 다양성을 분석하기 위한 방법이 시도되고 있다(6, 23, 25). 이 분석 방법은 유일탄소원 기질의 산화적 대사 정도의 결정에 기초한 방법으로 많은 연구자들에 의하여 유용성이 입증되었다(3, 6, 24, 25). 그러나 이 분석은 미생물 군집간의 기능적 차이를 특징화 할 수 있는 반면에 환경에 의해 유도된 생리적 변화에 영향받을 수 있어 유전형적 구조의 차이를 밝힐 수 없다(4). 또한 궁극적으로는 배양을 통한 미생물의 성장에 기초하기 때문에 미생물 군집내에서 배양이 가능한 미생물들의 대사적 성질만이 분석에 이용되는 단점을 가지고 있다(25). 그러나 유일탄소원의 이용능을 이용한 미생물 군집내 대사적 다양성 분석은 DNA나 지방산 분석 등과 같은 군집 수준의 접근 방법에 비해 상대적으로 간단하고 시간이 소요되지 않기 때문에 다른 방법과 병행하여 연구할 필요가 있다.

분자생물학적 접근 방법은 고전적인 배양방법에 기초한 환경내에 우점하는 미생물 군집 연구의 한계를 극복하여 전체 미생물 군집의 특징을 알 수 있다(11). 최근에는 토양에서 DNA를 직접 추출하여 DNA reassociation 분석(20), DNA G+C 조성비(10), DNA:DNA hybridization(7, 15) 등의

방법론을 이용하여 군집 수준의 분자생물학적 분석에 이용하고 있으며 이들 분석에 필요한 순도를 갖는 핵산을 분리하는 많은 방법들이 보고되고 있다(5, 13, 20). 특히, 원핵생물의 계통유전학적 분석에 이용되어온 16S rDNA는 여러 연구자들에 의해 세균의 동정에 이용하기 위하여 PCR을 이용하기 시작했다(21). 이후 PCR로 증폭된 16S rDNA의 제한효소 지문분석 방법이 이용되면서 ARDRA(amplified ribosomal DNA restriction analysis) 분석법으로 명명되었다(21). ARDRA 분석은 분리세균의 특징화에 이용되었으나 이론적으로는 혼합된 미생물 개체군의 분석에 이용되어질 수 있다(12). 또한 서로 다른 환경의 서식처나 시간에 따른 군집의 유전형적 변화양상을 확인할 수 있다. 16S rDNA 염기서열에 기초한 계통유전학적 접근 방법은 배양하여 분리된 종의 동정에 적용할 수 있으나, ARDRA에 비해 직접적인 염기서열 분석 방법은 시간이 많이 소요되고 배양 가능한 세균의 일상적인 동정에도 부합되지 않는 경우가 있다. ARDRA는 의학적 으로 중요한 세균의 동정에 처음으로 이용되었으나, 최근에는 환경내 군집의 특성 분석(12, 20)이나 서로 다른 생태계에 서식하는 특정 균주의 탐지에 이용되고 있다.

본 연구는 국내의 대표적인 낙엽활엽수인 신갈나무 삼림 토양과 소나무가 우점하는 침엽수림 토양, 경작지 토양, 초지 토양, 그리고 식생이 없는 나지 토양 등, 5종의 식생 토양간 세균군집의 유일탄소원 이용능 분석에 의한 대사기능적 다양성의 차이와 PCR로 증폭한 16S rDNA의 제한효소 지문분석인 ARDRA 분석을 통한 유전형적 유사성을 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

토양시료

토양시료는 경기도 하남시 소재 점단산 및 그 일원에서

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 02-290-0952, Fax: 02-293-9230
E-mail: ykchoi@email.hanyang.ac.kr

신갈나무 삼림식생 토양, 소나무 삼림식생 토양, 초지, 경작지 토양을, 한양대학교에서 나지 토양을 채취하였다. 채집한 토양은 2 mm 체에 걸러 시료로 이용하였다.

BIOLOG GN microplate를 이용한 토양세균 군집의 대사 다양성 분석

토양시료로부터 세균의 추출 및 BIOLOG GN microplate에의 접종 및 발색반응 측정은 송 등(1)의 방법과 같다.

집괴분석

각 식생토양의 TTC 산화 양상에 따른 95개의 각 기질에 대한 색 반응을 총합하여 기질수로 나눈 average well color development(AWCD)를 구하고 상관지수로 유사도를 구하였다. 이 유사성 계수는 Sneath와 Sokal(19)의 SAHN method에 의해 NT-sys software(ver. 1.80)를 사용하여 집괴분석(average linkage cluster analysis)을 실시하였다(18). 여기에 사용한 결합방법은 비가중결합방법(UPGMA: unweighted pair-group method, arithmetic average)을 사용하였으며, 이를 통해 dendrogram을 작성하였다.

DNA 추출

2 mm 체에 거른 습윤토양과 이들 토양 10 g을 각각 LB (Luria Bertani) 배지에 37°C에서 18시간 배양한 후, 3회 계대배양하여 10,000 rpm(Beckman J2-21, USA)으로 고속 원심분리 하여 얻은 침전물을 각각 전체 토양세균 및 증속영양세균 군집의 시료로 이용하였다.

DNA 추출은 Ogram 등(13)의 방법을 변형하여 행하였다.

토양 2 g에 1% SDS와 50 µl/ml의 proteinase K가 함유된 1.2 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)를 처리하여 37°C에서 1시간 동안 교반 배양하였다. 이후, 5 M NaCl 용액 900 µl를 첨가하여 5초간 vortexing한 후, 0.7 M NaCl과 10% CTAB 750 µl를 넣고 65°C에서 20분간 배양하였다. 배양한 시료에 동량의 chloroform을 첨가하여 vortex하고 4°C에서 15분간 10,000 rpm으로 원심분리(Beckman J2-21, USA)하였다. 수용층을 분획하여 동량의 chloroform: isopropanol(24:1) 용액을 첨가하여 4°C에서 15분간 10,000 rpm으로 원심분리(Beckman J2-21, USA)하였다. 분획된 수용층에 0.1배의 5 M NaCl을 넣고 냉각된 95% Et-OH을 2 volume 첨가하였다. -20°C에서 overnight하여 4°C에서 15분간 10,000 rpm으로 원심분리(Beckman J2-21, USA)하였다. 상등액을 버리고 2 ml의 냉각된 70% Et-OH로 수세한 후, 다시 4°C에서 15분간 10,000 rpm으로 원심분리(Beckman J2-21, USA)하였다. 상등액을 버리고 1 ml의 10 mM TE(pH 8.0) 완충액을 처리하여 crude DNA 시료로 사용하였다.

Crude DNA의 정제

crude DNA로부터 부식산과 오염원을 제거하기 위하여 electroelution 하였다(5). 2% ScaKem GTG(FMC, USA) agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후 band를 잘라 Electroeluter(Bio-Rad, USA)로 10 mA에서 1시간 동안 용출하였다.

16S rDNA의 중합연쇄반응(PCR) 증폭

5 종류의 토양으로부터 직접 추출하여 정제된 DNA와 각 토양으로부터 LB 배지에 배양한 증속영양세균으로부터 추출한 각 DNA를 최종 0.5 ng되게 100 µl로 PCR 반응 용액에 희석시켰다. PCR 반응 용액은 PCR buffer(20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet p-40, 50% Glycerol; TaKaRa), deoxynucleotide triphosphate 각 20 mM, primer 각각 50 pmol을 첨가하여 제조하였다.

Primer는 Marchesi 등(11)이 설계한 염기서열을 이용하여 제작(Bioneer, Korea)하였다. forward primer는 63f(5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'), reverse primer는 1392r(5'-GCG CGG WGT GTA CAA GGC-3')을 이용하였다.

PCR 증폭은 thermal cycler(TaKaRa, Japan)을 이용하였고 증폭 조건은 우선 95°C 5 min에서 DNA를 변성시켜, 95°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1.5 min으로 30 cycles을 시행한 후 72°C 10 min 동안 final extension을 하였다.

제한효소절단 분석

시료로부터 증폭된 PCR 산물은 6종의 제한효소를 각 100 U로 처리하여 overnight 하였다. 이후 2% agarose gel(FMC, USA)에서 50V, 1시간 20분 전기영동하였다.

제한효소는 *RsaI*, *Sau3AI*(Promega) *PalI*(Stratagene), *ScaI*(TaKaRa, Japan), *MspI*, *AclI*(Boehringer Mannheim, Germany)의 6종을 사용하였다.

ARDRA 분석

각 제한효소에 의해 절단된 PCR 증폭 산물의 제한효소 절단 단편의 분석은 image analyzer와 그 안에 내장된 Bio-1D 프로그램(ARCUSII, Vilber Lourmat Co., France)을 이용하였다. ARDRA 분석은 제한효소로 절단된 DNA 절편 각각을 하나의 character로 처리하는 phenetic analysis를 이용하였다(2). 각 제한효소마다 Jaccard coefficient(S_j)를 적용하여 유전적 유사도를 구하였다(2).

$$\text{유전적 유사도 } S_j = a/a+b+c$$

a: 비교하는 시료의 공통적인 DNA 절편수

b와 c: 비교하는 시료 각각의 상이한 크기의 DNA 절편수

각 제한효소마다 계산된 유전적 유사도를 평균값으로 환산하여 Genetic similarity matrix를 작성한 후, Unweighed Pair Group Method using arithmetic Average(UPGMA) clustering을 행하여 genetic dendrogram을 작성하였다.

결 과

집괴분석에 의한 토양세균 군집간 유사도 분석

108 시간 배양한 각 식생토양 세균 군집의 TTC 산화 양상에 따른 95개의 각 기질에 대한 색 반응을 총합하여 기질수로 나눈 average well color development(AWCD)를 구하고 상관지수로 유사도를 구하였다.

유일탄소원 이용능의 집괴분석을 통하여 식생토양간 세균 군집의 대사적 유사도는 Fig. 1의 dendrogram과 같다.

Dendrogram에서 유사도가 60% 이하에서 5종의 식생토양

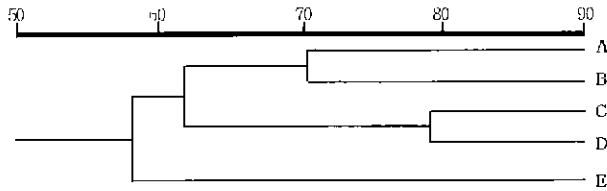


Fig. 1. Dendrogram of the metabolic fingerprints of mean value of each experimental group from the BIOLOG plates inoculated with soil microbial communities of various types of soil vegetation. A, soil of *Q. mongolica* vegetation; B, soil of *P. densiflora* vegetation; C, grass soil; D, agricultured soil; E, naked soil.



Fig. 2. Gel electrophoresis of PCR products of 16S rDNA from various experimental sites. Lane A-E, Directly extracted microbial DNA from soils; Lane a-e, Extracted bacterial DNA from cultured heterotrophic bacteria in each soils; Lane M, size marker, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. Lane A and a, soil of *Quercus mongolica* vegetation; lane B and b, soil of *Pinus densiflora* vegetation; lane C and c, grass soil; lane D and d, agricultured soil; lane E and e, naked soil.

에 따른 미생물 군집은 2개의 집괴(cluster)로 분석되었다. 즉, 집괴 1은 신갈, 소나무 삼림 토양, 초지, 경작지 토양의 세균 군집이며 집괴 2는 나지토양의 세균 군집으로 나뉘어졌다. 유사도 70% 이상에서는 3개의 집괴로 분석되었다. 3개의 집괴는 삼림 토양의 미생물 군집과 식생의 피복이 덜한 토양의 세균 군집, 그리고 비식생 토양의 세균 군집으로 나뉘어졌다. 초지 토양과 경작지 토양의 미생물 군집 사이에서 80% 이상의 가장 높은 유사도를 보였으며 비식생토양인 나지토양의 세균 군집은 60% 이하로 유사도가 낮았다.

DNA 추출 및 16S rDNA의 ARDRA 분석

토양으로부터 추출된 genomic DNA의 크기는 20-25 kb였으며 이는 Porteous 등(12)이 얻은 결과와 유사하다.

각 식생 토양으로부터 직접 추출한 DNA와 각 토양으로부터 LB 배지에 성장하는 종속영양세균의 군집으로부터 추출한 DNA를 대상으로 16S rDNA에 대한 PCR을 행하여 얻은 PCR 증폭 산물은 1.3 kb의 절편 크기를 보였다(Fig. 2).

증폭된 16S rDNA의 제한효소 절편에 의한 식생토양에 따른 세균 군집의 유전적 구조의 차이를 보기 위하여 4-base 인식 제한효소 및 2종의 5-base 인식 제한효소를 사용하였다. 4-base 인식 제한효소로는 *AluI*, *PalI*, *RsaI*, *Sau3AI*의 4종을 사용하였으며 이중 *PalI*은 일반적으로 순수배양된

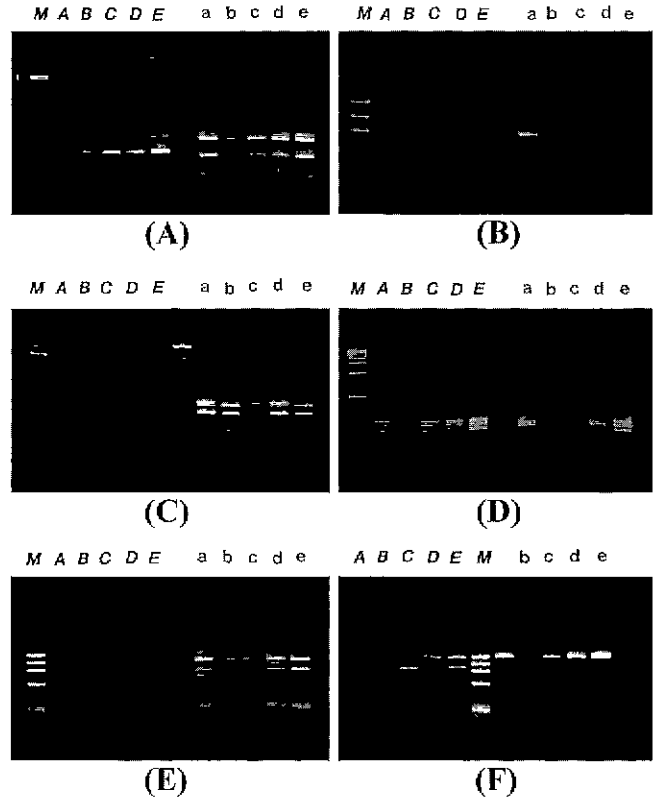


Fig. 3. Restriction profile of amplified 16S rDNA by 6 kinds of restriction enzymes. Legends are same in Fig. 2 (A), *AluI*; (B), *MspI*; (C), *PalI*; (D), *RsaI*; (E), *Sau3AI*; (F), *ScaI*. Size marker is used $\phi \times 174$ DNA/*HaeIII* in 5 restriction analysis. GeneRuler™ 1 kb DNA ladder was used in restriction analysis by *PalI*.

균주로부터 획득한 16S rDNA 증폭 산물을 3-5개 이상의 분명한 단편으로 절단하는 것으로 알려져있다(12).

6종의 제한효소 적용에 따른 PCR 증폭산물의 각 제한효소 지분 양상은 Fig. 3에 나타냈다.

각 시료의 제한효소에 대한 절편은 사용한 제한효소에 따라 다르게 나타났는데, *ScaI*(Fig. 3-(F))은 환경시료로부터 얻은 16S rDNA를 절단하였으나 배양된 각 식생토양의 세균군집으로부터 유래한 16S rDNA를 절단하지 못하였다. 4-base 인식 제한효소의 경우, *RsaI*(Fig. 3-(D))은 모든 시료의 증폭 DNA를 4 band로 잘랐으나 그 차이는 유사하였다. 절편의 양상이 다르게 나온 제한효소는 토양으로부터 직접 얻은 증폭산물의 경우, *PalI*(Fig. 3-(C)), *Sau3AI*(Fig. 3-(E))이었으며, 배양된 세균군집으로부터 상이한 결과를 얻은 것은 *AluI*(Fig. 3-(A)), *MspI*(Fig. 3-(B)), *Sau3AI* 제한효소를 처리한 경우였다. 사용한 4-base 인식 제한효소 모두 각 시료의 미생물 군집에 대한 유전적 구조의 차이를 밝히는데 유용하였다.

전체적으로 각 시료의 제한효소 절편의 차이를 Jaccard similarity를 각 효소에 대해서 각각 구하였고 다시 각 제한효소에 대한 similarity 값을 더하여 평균을 낸 다음 UPGMA 분석을 위한 matrix(Table 1)를 구하여 유사도를 구하였다(Fig. 4).

ARDRA를 이용하여 유사도를 구한 결과, 토양으로부터

Table 1. Genetic similarity matrix of amplified 16S rDNA restriction analysis by 6 restriction enzymes in soil microbial communities

	A	B	C	D	E	a	b	c	d	e
A	1.000									
B	0.795	1.000								
C	0.478	0.727	1.000							
D	0.467	0.667	0.613	1.000						
E	0.463	0.480	0.377	0.558	1.000					
a	0.202	0.212	0.250	0.263	0.245	1.000				
b	0.120	0.148	0.160	0.143	0.210	0.468	1.000			
c	0.090	0.123	0.145	0.215	0.207	0.665	0.492	1.000		
d	0.092	0.077	0.108	0.153	0.180	0.607	0.490	0.633	1.000	
e	0.190	0.140	0.183	0.177	0.135	0.443	0.417	0.328	0.435	1.000

Capital letters(A-E) are amplified 16S rDNA from directly extracted soil microbial DNA. Small letters(a-e) are amplified 16S rDNA from cultured bacteria of each soils. A and a, soil of *Quercus mongolica* vegetation; B and b, soil of *Pinus densiflora*; C and c, grass soil; D and d, agri-cultured soil; E and e, naked soil.

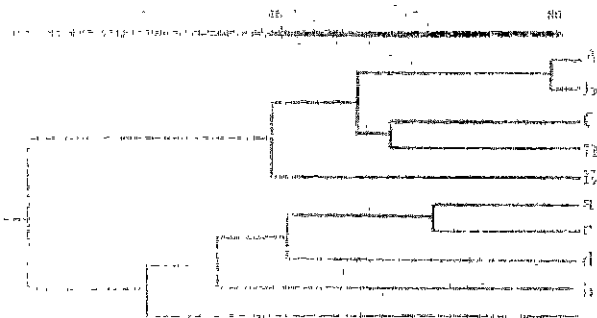


Fig. 4. Dendrogram of genetic similarity values of ARDRA among amplified 16S rDNA of microbial communities from various vegetation soils. The phenogram was constructed from genetic similarity matrix by UPGMA method. Legends are same in Table 1.

직접 추출하여 증폭한 토양미생물 군집의 유사도는 식생토양간의 유사도 정도가 대사적 다양성에 의한 식생토양간의 결과와 정도의 차이는 BIOLOG plate를 이용한 대사적 유사도와 일치하는 결과를 보여주었다. 그러나 배양된 종속영양세균 군집간의 유전적 유사도 정도는 전체 미생물 군집내에서의 식생토양간의 구조와는 다른 상태로 변화하였다. 대사 다양성 분석에서와 마찬가지로 ARDRA 분석에서도 5개의 토양형에 따른 미생물 군집은 크게 삼림토양과 비삼림토양, 비식생토양의 세 그룹으로 분류되었다.

고 찰

토양미생물의 유전적 구조의 다양성을 이해하기 위해서는 먼저 토양으로부터 DNA를 추출해야 하나 크게 두가지 문제점이 항상 도출되고 있다. 하나는 추출된 DNA를 가지고 다음 연구를 할 수 있을 충분한 양의 DNA를 확보해야 하며 다른 하나는 토양의 부식산의 간섭이 없는 정제된 DNA를 얻는 것이 그것이다.

본 연구에서는 Ogram(13)의 방법을 변형한 direct lysis 방

법과 crude DNA의 Electro elution을 이용한 정제로 PCR을 적용할 수 있는 정도의 순도를 갖는 DNA를 추출할 수 있었다.

CsCl 원심분리를 통한 DNA의 정제와 Elutip column을 이용한 정제를 시도하였으나 충분히 정제된 DNA를 얻지 못하였으며 Elution 방법을 통하여 정제하였다. 이는 부식산(humic acid)이 전기영동상에서 DNA에 비해 약 2배 정도 빠르게 이동하는 성질을 이용하였다(5).

PCR primer는 Marchesi 등(11)이 설계한 63f와 1387r random primer를 사용하였다. 이 primer는 일부 이론적인 편향성을 보이긴 하지만 세균 군집 분석에 일반적으로 쓰여지고 있는 다른 primer에 비해 넓은 범위의 세균으로부터 유래되는 16S rRNA gene의 증폭이 가능한 것으로 보고되었다. 본 연구에서 얻은 토양세균 군집의 PCR product는 약 1.3 kb의 분자량을 갖는 것으로 나타났고 다른 연구자들이 보여준 결과와도 일치하였다(13).

16S rDNA의 PCR 증폭산물의 제한효소 지문분석에 사용되는 제한효소는 가능한 짧은 단위의 염기서열을 인식하여 자르는 것이 유용하다. 본 연구에서 사용된 4종의 4-base 인식 제한효소는 모두 유의한 결과를 보여주었으나 6-base 인식 제한효소인 *ScaI*의 경우, 직접 추출한 식생토양의 16S rDNA는 3 절편으로 절단하였지만 배양세균인 종속영양세균군집에서 얻은 16S rDNA는 절단된 절편이 없었다.

이러한 4-base 인식 효소의 유용성은 Pukall 등(13)의 결과와도 일치한다. Pukall 등은 서로 다른 계통유전학적 group에 속하는 40종의 세균 균주로부터 얻은 16S rDNA를 39 종류의 제한효소를 처리하여 이중 14 가지의 제한효소가 40가지의 모든 16S rDNA 서열을 절단하였다. 이중 가장 좋은 결과를 보인 제한효소는 *HaeIII*, *BstUI*, *HhaI*, *AhaI*, *RsaI*였다. 이러한 결과는 본 실험에서 사용된 4-base 인식 제한효소의 유용성과 일치하였다.

각 토양 식생간 토양미생물 군집의 ARDRA 결과는 BIOLOG GN microplate를 이용한 대사적 다양성과 유사한 경향성을 보였다. 그러나 ARDRA 분석에서 총세균 군집과 배양 세균군집인 종속영양세균 군집의 유전적 유사도는 17%의 낮은 유사도를 보이는 별개의 두 그룹으로 나뉘어졌다.

또한 식생토양간에 종속영양세균 군집의 유전적 유사도는 총세균 군집과는 달리 신갈나무 삼림토양과 초지토양, 소나무 삼림토양과 경작지 토양에서 더 큰 유사도를 나타내었다. 이는 배양으로 인한 VBNCB(viable but non-cultured bacteria)와 필요한 영양원의 결핍, 생존조건의 변화 등의 여러 요인에 의해 종조성과 종의 richness가 변화한 것으로 사료된다.

감사의 말

이 연구는 서울대학교 분자미생물학연구센터의 연구비에 수행되었습니다.

참고문헌

1. 송인근, 안영범, 신규철, 조홍범, 최영길. 1999. 토양세균 군집의 탄소원 이용에 의한 지문분석. 한국미생물학회지, 35(1), 65-71.
2. Austin, B. and F.G. Priest. 1986. Modern Bacterial Taxonomy. Van Nostrand Reinhold Co. UK.
3. Bossio, D.A. and K.M. Scow. 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4043-4050.
4. Buyer, J.S. and L.E. Drinkwater. 1997. Comparison of substrate utilization assay and fatty acid analysis of soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 30, 3-11.
5. Chandler, D.P., R.W. Schreckhise, J.L. Smith, and H. Bolton Jr. 1997. Electroelution to remove humic acids from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods* 28, 11-19.
6. Garland, J.L. and A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level soli-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351-2359.
7. Haak, S.K., H. Garchow, M.J. Klug, and L.J. Forney. 1995. Analysis factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 273-278.
8. Holben, W.E., J.K. Janssen, B.K. Cheln, and J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703-711.
9. Jensen, M.A., J.A. Webster, and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945-952.
10. Leser, T.D., M. Boye, and N.B. Hendriksen. 1995. Survival and activity of *Pseudomonas* sp. strain B13(FR1) in a marine microcosm determined by quantitative PCR and an rRNA-targeting probe and its effect on the indigenous bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1201-1207.
11. Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCRT primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795-799.
12. Massol-Déya, A., D.A. Hickey, R.F. Odelson, and J.M. Tiedje. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis(ARDRA). pp. 3.3.2/1.3.3.2/8. In A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer, Netherlands.
13. Ogram, A., G.S. Sayler, and T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57-66.
14. Porteous, L.A., J.L. Armstrong, R.J. Seidler, and L.S. Watrud. 1994. An effective methods to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Curr. Microbiol.* 29, 301-307.
15. Pukall, R., E. Brambilla, and E. Stackebrandt. 1998. Automated fragment length analysis of fluorescently-labeled 16S rDNA after digestion with 4-base cutting restriction enzymes. *J. Microbiol. Methods* 32, 55-63.
16. Ritz, K. and B.S. Griffiths. 1994. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 26, 963-971.
17. Ritz, K., J. Dighton, and K.E. Giller. 1994. Beyond biomass: compositional and functional analysis of soil microbial communities. John Wiley & Sons, Chichester, England.
18. Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80, Exeter Software, New York.
19. Sneath, P.H.A. and P.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
20. Torsvik, V., J. Gosksøyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
21. Vanechoutee, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis(ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234.
22. Weidner, S., W. Arnold, and A. Pühler. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophilla stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 766-771.
23. Winding, A.K. 1994. Fingerprinting bacterial soil communities using Biolog microtitre plates, p 85-94. In K. Ritz, J. Dighton, K.E. Giller (eds) *Beyond the Biomass*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
24. Zabinski, C.A. and J.E. Gannon. 1997. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. *Environ. Management* 21, 233-238.
25. Zak, C.J., M.R. Willing, D.L. Moorhead, and H.J. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101-1108.

(Received December 11, 1998/Accepted February 25, 1999)

ABSTRACT: Comparison of metabolic diversity by sole carbon source utilization and genetic diversity by restriction patterns of amplified 16S rDNA (ARDRA) in soil bacterial communities.

In-Geun Song^{1,2}, You Young Kim¹, Hong-Bum Cho³, and Yong-Keel Choi^{1,2}
(¹Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, ²Research Center for Molecular Microbiology, Seoul Nat'l University, Seoul 151-742, ³Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-104, Korea)

To investigate soil bacterial diversity according to vegetation types, utilizing ability of sole carbon sources and restriction enzyme patterns of 16s rDNA were analyzed. From the both results, five kinds of soil microbial communities were grouped as forest soil (*Quercus mongolica* and *Pinus densiflora* vegetation), grass-agricultured soil and microbial communities of naked soil. But, both soil microbial communities of directly extracted from the soil and indirectly extracted from heterotrophic bacteria that cultured soil in LB medium showed very different similarity.