Korean J. Environ. Biol. 17(3) : 279~284(1999)

DNA 교잡에 의한 토양 미생물 군집의 다양성과 유사성

김유영[1,2] · 송인근[1,2] · 민병례[3] · 조홍범[4] · 최영길[1,2]

([1]한양대학교 생물학과, [2]서울대학교 분자미생물학연구센터,
[3]상명대학교 생물학과, [4]서경대학교 생물공학과)

적 요 - 토양으로부터 직접 추출한 DNA를 cross hybridization하는 방법을 통해서 서로 다른 토양 환경간에 미생물 군집의 유전형적 유사성과 상대적 다양성을 비교하였다. 그 결과 소나무삼림토양이 다른 토양에 비해 상대적 다양성이 높은 것으로 밝혀졌으며, 경작지, 나지, 초지, 신갈삼림 순으로 다양성 정도를 나타내었다. 또한 유전형적 유사성의 정도에 따른 집괴 분석 결과 소나무삼림과 경작지 토양, 신갈나무삼림과 초지 토양 그리고 나지 등 세 부류로 구분되었다.

서 론

토양생태계에서 나타나는 미생물의 활성은 미생물 군집의 개체군 상호간 그리고 무생물적 환경요인간 상호작용의 총합이라고 할 수 있다. 그러나 토양생태계에서의 미생물 군집의 기능과 다양성, 그리고 이에 따른 제연관성에 대해서는 알려진 바가 적다(Degens & Harris 1997). 이는 전통적으로 미생물 군집의 분석 방법이 분리·배양에 근거함으로써 배양조건에 따라 개체수, 종조성 및 그 분포가 달라질 뿐만 아니라 배양 가능한 세균들이 그 환경의 생태적 기능을 대표한다고 볼 수도 없기 때문이다(홍 등 1997).

전통적인 분리·배양법에 의존하지 않고 토양미생물 군집의 구조와 기능에 대한 포괄적인 이해를 얻기 위한 접근방법으로 토양성분의 lipid 조성에 근거한 군집구조 분석을 통해 다양한 토양 서식처들간의 특성을 비교하기도 하고(Bååth *et al.* 1992; Lindahl *et al.* 1997; Zelles *et al.* 1992), 여러 종류의 유일 탄소원에 대한 이용 정도에 대해 토양시료를 직접 적용한 결과로서 군집 수준의 대사적 잠재력을 지문분석(fingerprinting)하는 빠르고 간편한 방법이 소개되었다(Garland & Mills 1991, 1994; Hitzl *et al.* 1997; 송 등 1999a, b). 하지만 이러한 기법들은 때때로 군집내의 미생물 개체군의 변이 및 군집의 유전형적 특성 규명에 있어서는 한계가 있다.

최근에는 토양에서 DNA를 직접적으로 추출하여 분석하는 방법들이 시도되었고, 서로 다른 서식처에서 적당한 순도를 가진 핵산을 분리하는 많은 방법들이 보고되었으며(Chandler *et al.* 1997; Cho *et al.* 1996; Clegg *et al.* 1997; Tebbe & Vahjen 1993; Trevors & Van Elsas 1995; Tsai & Olsen 1991), 핵산을 분리한 후 16S rRNA 분석, Polymerase Chain Reaction (PCR), DNA reassociation, DNA:DNA hybridization 등 미생물을 배양하지 않고 군집수준에서 유전형을 분석하는 연구들이 진행되고 있다(Franks *et al.* 1998; Griffiths *et al.* 1996; Hadrys *et al.* 1992; Hurek *et al.* 1993; Lee & Fuhrman 1990; Torsvik *et al.* 1990a, b).

특히 토양으로부터 직접 추출된 DNA 시료들간의 DNA hybridization을 통해 유전형적 다양성을 분석하려는 연구들이 진행되었는데, 이를 통해 토양의 구조적 특성에 따른 군집의 유사도, 종 다양성 등을 상대적으로 비교할 수 있었다(Lee & Fuhrman 1990; Ritz & Griffiths 1994; Griffiths *et al.* 1996; Griffiths *et al.* 1997).

본 연구에서는 한국 삼림의 대표적인 활엽수림과 침엽수림인 신갈나무와 소나무 식생을 비롯한 천이과정상의 여러 식생 토양을 대상으로 DNA : DNA cross-hybridization을 통해 토양 미생물 군집간의 유전형적 다양성과 유사성을 상대 분석하였으며, 16S rDNA 분석, 유일탄소원 이용능에 의한 대사적 다양성 분석 등 저자들의 선행된 연구 결과(송 등 1999a, b)들과 식생 천이에 따른 토양 세균의 군집수준 특성을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 시료채취, 입도분석

토양시료는 나지, 초지, 경작지, 그리고 소나무, 신갈나

무 등 식생 별로 경기도 광주군 검단산(Kŏmdan, 650 m)에서 채취하였고, sieving(mesh size, 2 mm) 후 잘 섞어 polyethylene bags에 넣어 4°C에 보관하였다. 토양시료의 토질상태는 입도분석을 통하여 분석하고 미국농무성(USDA) 지침에 의해 분류하였다.

2. DNA 추출

습윤토양으로부터 Ogram 등(1987)의 변형된 방법으로 DNA를 직접 추출하였다. 토양시료 5 g에 추출완충액(120 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 1% SDS, 100 μg/ml proteinase K)을 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 5 M NaCl, 10% cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)을 넣고 잘 섞은 후 65°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 동량의 *chloroform*을 넣어 원심분리(9,000 × g, 4°C, 30분, Beckman J2-21, USA)하여 상등액을 취했다. 상등액은 phenol : chloroform : isoamylalchol (P : C : I) (25 : 24 : 1), chloroform : isoamylalchol (C : I) (24 : 1) 정제과정을 거친 후 0.1배의 5 M NaCl을 가하고 2배 용량의 알콜로 침전시켰다. 기타 자세한 지시사항은 Sambrock 등(1989)의 지침서에 따랐다.

3. DNA 정제와 정량

전기영동상에서 DNA를 확인한 후, 밴드를 잘라 전기용출기(Bio-Rad electro-eluter 422)에서 5V/cm로 1시간 동안 용출하고, 용출된 DNA를 P : C : I, C : I 정제과정을 거친 다음 최종농도 2 M ammonium acetate를 가하고 2배 용량의 알콜로 침전시켰다. DNA 시료의 순도는 spectrophotometer(Biochrome-4060, Pharmacia-LKB)를 이용 260/280 nm 흡광 비율에 의해 측정하고, 정량은 Hoechst 33258로 염색한 후 fluorometer (DyNA Quant 200 Hoefer)로 측정하였다.

4. DNA 탐침 제작과 DNA-DNA 교잡

추출한 DNA는 각각을 probe와 target으로 하여, 시료간에 서로 cross-hybridization하였다. Target DNA의 준비는 각각의 DNA를 0.3 μg을 멸균수로 총 100 μl로 희석한 후 0.4M NaOH, 10 mM EDTA (pH 8.0)를 첨가하여 10분 동안 가열하여 변성시키고, 냉각시킨 후 동량의 2 M ammonium acetate (pH 7.5)로 중화시켰다. 6 × saline-soidium citrate (SSC) buffer에 담근 nylon membrane (Schleicher & Schuell, pore size 0.45 μm)을 dot blot apparatus (Bio-Rad electro-eluter 422)에 장착한 후 변성된 DNA를 진공으로 blot하고, 2X SSC로 헹군 다음 UV cross-linker (XL-1000 UV cross-linker, Spectronics Co.)를 이용하여 고정시켰다.

Probe DNA는 ECL™ direct nucleic acid labelling and detection systems (Amersham Life Science)으로 labelling하고, 과정은 제조사의 지침서에 따랐다. 각각의 DNA를 10 ng/μl으로 희석하여 *Pal*I으로 처리한 후 5분간 가열하여 변성시키고, 냉각시킨 후 동량의 labelling agent와 glutaraldehyde agent을 넣고 섞은 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. Hybridization 완충용액에 NaCl과 blocking agent를 각각 최종농도 0.5 M, 5%로 첨가하여 1시간 동안 교반하면서 42°C로 예열하고, blotter를 hybridization tube에 넣고 준비된 hybridization 용액을 첨가하여 1시간 동안 prehybridization한 후에 labelled probe을 넣고 12시간 반응시켰다.

반응이 끝나면 42°C로 준비된 1차 세척액(6 M Urea, 0.4% SDS, 0.5 × SSC)으로 20분, 2회 세척하고, 2차 세척액(2 × SSC)으로 5분, 2회 세척하였다. 세척 후 detection reagent 1과 2를 blot을 덮을 수 있을 정도(0.125 ml/cm²)의 동량으로 섞어 membrane에 직접 가하였다. 1분간 반응시킨 후 wrap으로 싸서 X-ray film (Fuji, RX)에 autoradiography하였다.

5. 유사지수 계산

Hybridization 후 발광정도(chemiluminescence signal extent)는 분석 프로그램(Vilber BioID)이 장착된 densitometer (Arcus II, Loumat, France)로 정량하였고, 유사지수(S_0)는 Lee와 Fuhrman (1990)의 방법으로 계산하였다.

$$S_0=(Rs-Rb)/(Rc-Rb)\times 100\%$$

여기서 Rs는 sample spot에서 얻은 값, Rc는 control spot에서 얻은 값(즉 같은 DNA의 target 값), Rb는 blank spot에서 background count한 값이다. Densitometer로 측정된 정량값은 유사지수(S_0)로 환산하여 군집의 다양성을 알 수 있는 지수로 표현하였다. 이 값에 의한 유사도 행렬은 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetric average) 방법으로 분석하여 시료간의 유사도를 dendrogram으로 표현하였다.

결과 및 고찰

1. 토양으로부터 DNA 추출 및 정제

시료의 토질상태는 신갈나무 식생토양은 sand loamy, 나머지 토양은 sand의 특성을 나타내었다. 각 토양에서 직접 추출한 genomic DNA는 20 ~ 25 kb의 크기를 나타내었으며(Fig. 1), 각 시료의 순도는 $A_{260/280}$비가 1.72 ~ 1.80의 범주로서 DNA 교잡을 비롯한 분자생물학적

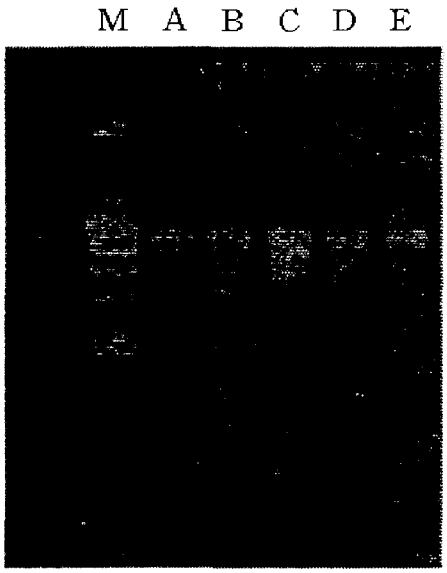

Fig. 1. Genomic DNA extracted from 5 different soils. M: λ DNA/*Hind* III markers, Lane A: *Quercus mongolica* soil, Lane B: *Pinus densiflora* soil, Lane C: Grass soil, Lane D: Agricultured soil, Lane E: Naked soil.

Table 1. Purity of genomic DNA extracted from soils

Soils	$A_{260/280}$[a]	Yield (μg/g)[b]
Quercus mongolica soil	1.79	0.53
Pinus densiflora soil	1.74	0.30
Grass soil	1.80	0.19
Agricultured soil	1.80	0.12
Naked soil	1.72	0.07

a. Calculated based upon UV spectrophotometer (Biochrome 2040, Phamacia-LKB, USA)
b. Calculated based upon fluorometer (DyNa Quant 200, Hoefer)

방법에 적용하기에 충분한 정도였다. 수율면에서는 삼림토양이 비삼림토양보다 1.6~7.6배까지 높았으나, 전반적으로 여러 단계를 거치는 정제과정으로 인해 이론적인 값보다 낮게 나타났다(Table 1). 또한 토양 속에 포함되어 있는 부식질(humic compounds)은 시료의 순도를 떨어뜨리는 동시에 PCR 증폭이나 hybridization의 효율을 떨어뜨리는 원인이 되므로(Tebbe & Vahjen, 1993), 본 실험에서는 전기영동시 부식질이 DNA보다 2배 정도 이동속도가 빠른 점을 이용하여 전기적 용출방법(electro-elution)으로 부식질을 제거하였다.

시료간에 cross-hybridization을 할 때 target DNA의 정확한 농도측정이 결과에 큰 영향을 미쳤으므로(data not shown), 형광염료 Hoechst 33258를 사용하는 형광측정법을 통해 DNA의 절대농도를 산출하였다. 이 과정

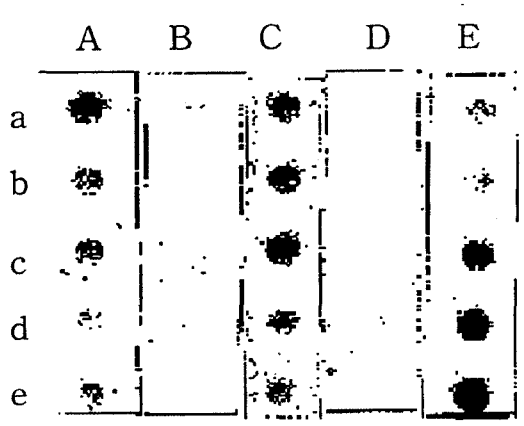

Fig. 2. Cross-hybridization signal with soil samples as a probe (big letter) and target (small letter), respectively. Lane A, a: Quercus mongolica soil, Lane B, b: Pinus densiflora soil, Lane C, c: Grass soil, Lane D, d: Agricultured soil, Lane E, e: Naked soil.

Table 2. The similarity indices of DNA : DNA cross-hybridization

		Target				
		A	B	C	D	E
Probe	A	–	40.5	70.0	28.6	27.5
	B	246.7	–	181.6	105.8	108.3
	C	142.9	55.1	–	40.4	50.8
	D	349.8	94.5	247.4	–	158.1
	E	314.5	92.4	196.9	63.3	–

S_0(%=[target signal /probe signal] × 100) from reciprocal hybridization of DNA.
A, *Quercus mongolica* soil; B, *Pinus densiflora* soil; C, Grass soil; D, Agricultured soil; E, Naked soil.

에서 Hoechst 33258은 DNA보다 Et-Br과 먼저 결합하여 DNA의 정량값을 충분히 반영하지 못하였기 때문에 전기적 용출과정에서 Et-Br 염색과정은 배제하였다.

2. 군집수준의 미생물 다양성과 유사성

각 토양에서 직접 추출한 DNA를 각각 probe와 target으로 하여 2개의 시료간에 상호 교잡율을 비교하였으며, 교잡 정도에 따라 유사지수(similarity indice)를 구한 후 상대적 다양성 정도를 나타내었다(Fig. 2, Table 2). 그 결과, 각 식생토양의 세균 군집 간 유사지수가 비대칭적(asymetric)으로 나타났다. Lee와 Fuhrman (1987)에 의하면 교잡 정도의 비대칭적 결과에서 낮은 지수는 두 군집간의 유사성을, 높은 지수는 유전적 복잡성, 즉 다양성이 큼을 의미한다고 하였다. Table 2에서 소나무 삼림토양(B)과 경작지 토양(D)의 경우, 지수

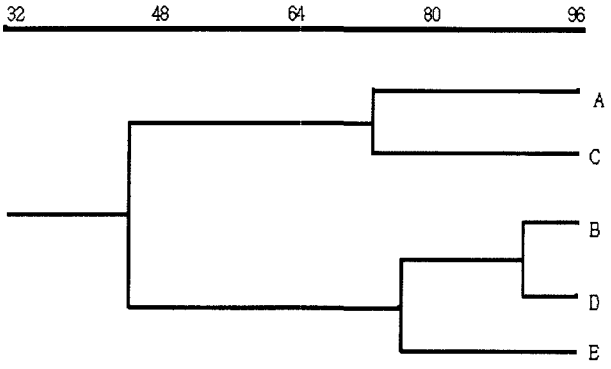

Fig. 3. Dendrogram of genetic similarity matrix values of directly extracted DNA from soils by cross-hybridization.
A: Quercus mongolica soil, B: Pinus densiflora soil, C: Grass soil, D: Agricultured soil, E: Naked soil.

94.5와 105.8이 나타내는 의미는 두 토양의 미생물 군집간에 94.5%의 높은 유전적 유사도를 갖으며, 소나무 삼림토양이 경작지에 비해 다소 상대적 다양성이 높다는 것을 나타낸다.

이러한 결과로부터 나타나는 상대적 다양성 정도는 소나무>경작지>나지>초지>신갈나무 식생 토양 순으로 나타났다. Griffith (1995)는 일반적으로 삼림토양에서 미생물 군집의 다양성이 비삼림토양보다 상대적으로 높다고 하였으며, 본 연구의 선행 연구결과(송 등 1999a, b)에서도 소나무와 신갈나무 식생토양은 타 비삼림토양보다 다양성이 높았으며, 두 식생토양간 유사도도 매우 높은 것으로 나타난데 비하여, 본 실험결과는 소나무와 신갈나무 식생토양간의 유사도도 매우 낮고, 신갈나무의 경우 가장 다양성이 낮은 것으로 나타남으로써 대조를 이루었다. Lee와 Fuhrman (1987) 그리고 Torsvik 등 (1990a, b)에 의하면 토질에 있어 모래, 점토, 실트질의 순으로 미생물 군집의 다양성이 표현된다고 하였으므로, 본 연구에서 점토성 모래의 성질을 갖는 신갈나무 삼림토양에 비해 소나무를 비롯한 다른 3종의 토양은 모래질이었다는 것과 함께 해석을 할 수 있을 것으로 생각된다. 즉 다양성에 미치는 영향은 식생에 의한 영향 이외에도 토양의 성질에 의해서도 영향을 받는 것 때문으로 판단된다.

한편 유사도지수의 matrix를 이용하여 유전적 유사도에 따른 dendrogram을 구성한 결과(Fig. 3), 전체적으로 유사도는 40.5~94.5%의 수준을 나타내었으며 소나무 삼림토양과 경작지, 신갈삼림토양과 초지 그리고 나지 등 세 부류로 구분되었다. 하지만 이러한 결과는 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)를 통한 유사도(송 등 1999a)의 결과와는 일치하지 않았다. 이는 ARDRA 분석이 세균의 16S rDNA를 대상으로 분석한데 반하여 DNA:DNA hybridization은 토양내에 존재하는 전체 DNA를 대상으로 하였기 때문에 세균 이외에 곰팡이, 효모 및 미소동물의 유전물질이 포함된 결과로 보인다.

이상과 같이 DNA:DNA cross hybridization의 결과는 유전적 형질을 근거로 상대적 다양성을 비교할 수 있는 방법이지만, 생태적 개념에서 다양성으로 표현할 수 있는 종의 수(richness)와 양(evenness)을 구별하지 못할 뿐 아니라 곰팡이와 같은 진핵생물들도 포함되어 있을 것으로 보이며, 이같은 요인들로 인해 선행된 연구들과 상이한 결과를 나타내는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 적용된 DNA:DNA cross hybridization 방법은 토양 세균을 대상으로 하기 보다는 포괄적인 미생물 군집의 상대적 다양성을 비교하는데 유용한 방법으로 생각되며, random primer 컨소시움을 이용한 dd RT-PCR 등과 같이 절대적 평가를 위한 방법을 병행 적용하여 동 연구를 수행한다면 유전형적 다양성에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구의 일부는 서울대학교 분자미생물학 연구센터의 지원을 받아 수행한 것이며, 이에 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

송인근, 김유영, 조홍범, 최영길 (1999a) 토양세균 군집의 대사 다양성과 16S rDNA의 제한효소 지문분석에 의한 유전적 다양성의 비교. 미생물학회지 **35** : 72-77.

송인근, 안영범, 신규철, 조홍범, 최영길 (1999b) 토양세균 군집의 유일탄소원 이용에 의한 지문분석. 미생물학회지 **35** : 65-71.

홍선희, 변명섭, 안태석 (1997) 16S와 23S rRNA에 결합하는 probe를 이용한 겨울철 소양호 세균 군집 구조의 분석. 미생물학회지 **33** : 257-261.

Bååth EA, Å Frostegård & H Fritze (1992) Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 4026-4031.

Chandler DP, RW Schreckhise, JL Smith & H Bolten Jr (1997) Electroelution to remove humic compounds from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods* **28** : 11-19.

Cho JC, DH Lee, YC Cho, JC Cho & SJ Kim (1996) Direct extraction of DNA from soil for amplification of 16S

rRNA gene sequences by polymerase chain reaction. *J. Microbiology* **34** : 229-235.

Clegg CD, K Ritz & BS Griffiths (1997) Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Lett. Appl. Microbiol.* **25** : 30-33.

Degens BP & JA Harris (1997) Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **29** : 1309-1320.

Franks AH, HJM Marmsen, GC Raangs, GJ Jansen, F Schut & GW Welling (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 3336-3345.

Garland JL & AL Mills (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2351-2359.

Garland JL & AL Mills (1994) A community-level physiological approach for studying microbial communities. pp. 77-83. In K. Ritz, J. Dighton and KE Giller (eds) Beyond the Biomass. John Wiley & Sons.

Griffiths BS, K Ritz & LA Glover (1996) Broad-scale approaches to the determination of soil miocrobial community structure: application of the community DNA hybridization technique. *Microbiol. Ecol.* **31** : 269-280.

Griffiths BS, M Diaz-Rviňna, K Ritz, JW McNicol, N Ebblewhite & E Bååth (1997) Community DNA hybridization and % G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24** : 103-112.

Hadrys H, M Balick & B Schierwater (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1** : 55-63.

Hitzl W, A Rangger, S Sharma & H Insam (1997) Separation power of the 95 substrates of the BIOLOG system determined in various soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22** : 167-174.

Hurek T, S Burggraf, CR Woese & B Reinhold-Hurek (1993) 16S rRNA targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization to screen for *Azoarcus* spp., grass-associated diazotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3816-3824.

Lee SH & JA Fuhrman (1990) DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 739-746.

Lindahl V, Å Frostegård, L Bakken & EA Bååth (1997) Phospholipid fatty acid composition of size fractionated indigeous soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **29** : 1565-1569.

Ogram A, GS Sayler & TJ Barkay (1987) DNA extraction and purification from sediments. *J. Microbiol. Methods* **7** : 57-66.

Ritz K & BS Griffiths (1994) Potential applications of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **26** : 963-971.

Sambrock J, EF Fritsch & T Maniatis (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edi. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Tebbe CC & W Vahjen (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 2657-2665.

Torsvik VL, J Gokφyr & FL Daae (1990a) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 782-787.

Torsvik VL, K Salte, R Sørheim & J. Gokφyr (1990b) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 776-781.

Trevors JT & JD Van Elsas (Eds) (1995) Nucleic acids in the Environment: Methods and Applications, Springer-Verlag, Berlin Geidelberg.

Tsai YL & BH Olson (1991) Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1070-1074.

Tsai YL & BH Olson (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2292-2295.

Zelles L, QY Bai, T Beck & F Beese (1992) Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* **24** : 317-323.

The Diversity and Similarity of Soil Microbial Communities by DNA Cross Hybrization

You-Young Kim[1,2], In-Geun Song[1,2], Byeong-Rye Min[3], Hong-Bum Cho[4] and Yong-Keel Choi[1,2,*]

([1]*Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791,*
[2]*Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742,*
[3]*Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743,*
[4]*Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-104, Korea*)

Abstract - To investigate soil bacterial diversity according to vegetation types, directly extracted DNA from 5 different soils were cross-hybridized with each other as a probe and target. *Pinus densiflora* soil was shown the highest value then agricultured soil>naked soil>grass soil> *Quercus mongolicas* soil in the order of diversity. Cluster analysis by similarity showed that soil microbial communities were categorized into three groups. [Soil bacterial community, DNA : DNA hybridization, Diversity].