



ORIGINAL PAPER

원저

훼손된 산불토양의 미생물다양성

정영률, 송인근, 김진용, 이신근, 김영준
 가톨릭대학교 생명공학부
 (2005년 4월 11일 접수, 2005년 5월 6일 채택)

Microbial Diversity in the Soil Damaged by a Forest Fire

Young-Ryul Jung, In-Geun Song, Jin-Yong Kim, Sin-Geun Lee, Young-Jun Kim

Division of Biotechnology, The Catholic University, Bucheon, Korea / yjunkim@catholic.ac.kr

ABSTRACT

Changes of biochemical and genetic diversity of microbial communities in the soil damaged by a forest fire were analyzed. Soil samples were collected from Gangnung area where a forest fire was broken out in 2000. Two soil samples were from the burnt area, one from the naturally restoring soil (NS) and the other from the artificially restoring soil (AS). A normal, unaffected soil sample (US) was also included as a control. For the biochemical diversity, each sample was directly applied to the BIOLOG system, and the cluster analysis through a statistic process (SPSS) were performed. Genetic diversity was analyzed through DGGE using 16S-rDNA amplified from soil DNA. Among the samples tested, top soils of US and NS, and sub soil of NS revealed more than 70% of the similarity value in biochemical diversity. In case of genetic diversity, however, the similarity value was found to be in the range of 53% to 68% in all samples. This result indicates that the biochemical diversity is not always correlated with the genetic diversity in the analysis of microbial communities.

초 록

산불로 훼손된 토양 미생물군집의 생화학적, 유전적 다양성을 비교하기 위하여 2000년에 산불이 일어났던 강릉지역에서 자연복원지 토양(NS), 인공복원지 토양(AS), 정상토양(NS)을 표토층과 심토층에서 채집하였다. 생화학적 다양성 분석을 위해 각 시료를 BIOLOG system에 직접 적용하였으며 통계처리(SPSS)를 통해 군집분석을 수행하였다. 또한 군집의 유전적 다양성은 토양 미생물의 16S-rDNA를 증폭하여 DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 이용하여 분석하였다. 자연복원지의 심토와 표토, 정상토양의 표토에서만 70% 이상의 생화학적 다양성이 나타났으나, 유전적 다양성의 경우 모든 시

료에서 53%에서 68%의 범위의 상동성을 나타냈다. 이러한 결과는 토양미생물 군집의 생화학적 다양성이 반드시 유전적 다양성을 반영하지 않는다는 것을 보여준다.

1. 서론

유기성 폐기물은 가축분뇨, 인분뇨, 음식쓰레기 및 정원 폐기물, 식품형 부산물, 농업 부산물, 하수 슬러지 등 다양하게 발생하며 재활용 및 처리처분이 어려운 폐기물로서 생활수준의 향상과 더불어 그 발생량이 늘고 있는데 비해 재활용 또는 자원화에 관한 실적이 크게 늘지 않고 있는 실정에 있다.¹⁾ 유기성 자원의 재활용을 위한 적용 방법으로 훼손된 산림 토양의 자연친화적 복원소재를 개발하기 위하여, 퇴비화 등의 방법을 통한 유기물의 재활용 소재 및 기능성 미생물소재를 개발할 필요성이 있다.²⁾ 토양 미생물은 일차분해자로서의 생태적 지위를 통해 다양한 영양원의 분해 및 순환에 깊이 관여하여 식생의 성장과 토양의 비옥도에 지대한 영향을 미친다. 따라서 산불 발생 지역의 토양 미생물 군집의 다양성에 관한 연구는 유기성 자원을 이용한 손상된 산림생태계 복원을 위해 필수적인 일차 자료가 될 수 있다.

최근 미생물 군집의 다양성 분석은 유전적 다양성과 생리생화학적 대사 다양성의 양면으로 연구의 방향이 나아가고 있다. 미생물 군집의 생화학적 다양성 분석은 유일탄소원의 이용능 정도를 분석 지표로 사용한 미생물 군집의 대사적 다양성 분석 방법이 있으며, DGGE에 의한 16S rDNA 패턴을 이용한 미생물 군집의 유전적 다양성 분석은 미생물 생태학 연구에 광범위하게 적용되고 있다.

본 연구는 산불에 의해 훼손된 산림토양 미생물 군집의 생화학적인 다양성과 유전적 다양성을 비교·분석하여 산불토양의 생태적 복원을 위한 유기성 자원과 기능성 미생물 소재 개발을 위한 기초자료로 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료채집

산림 토양 시료는 북위 37°49'~7°50'5", 동경 128°47'45"~128°49'15"에 위치한 강원도 강릉시 사천면 노동리 지역에서 채집되었다. 이 지역은 2000년도 4월에 강원도 고성군, 강릉시, 삼척시, 동해시 및 경상북도 울진군에 이르는 동해안 지역에서 발생한 산불피해지의 중간지대이다. 산불의 영향을 받지 않은 정상토양(Site I : US, Unburnt Soil), 산불피해 후 자연적으로 복원된 토양(Site II : NS, Naturally restoring Soil) 그리고 송이재배를 목적으로 소나무 묘목식재를 통해 인공복원을 시도하였으나 복원되지 못하고 있는 토양(Site III : AS, Artificial restoring Soil) 이 분포하고 있는 지역을 시료채집 장소로 결정하였으며, 표토층(0~20cm)의 토양(T, top-soil) 과 심토층(<20cm)의 토양(S, sub-soil)을 동량 채집하여 각각 혼합하였다.

2.2 BIOLOG를 이용한 생화학적 다양성 분석

토양 미생물군집의 유일탄소원 이용능 차이를 GN2(Gram negative) microplate(Biolog Inc., USA)를 이용하여 분석하였다. Plate는 25℃에서 배양하였으며 8일 동안 24시간 간격으로 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, BIOLOG GN2 microplate로부터 측정된 분석치는 평균 발색량(Average Well Color Development, AWCD= $[\sum(C-R)]/95$)으로 나타내었다.

2.3 DGGE에 의한 유전적 다양성 분석

*UltraClean*TM soil DNA isolation kit(MO BIO. Laboratories, Inc.)를 사용하여 토양의 DNA를 추출하였고³⁾, 추출한 토양 DNA로부터 계통분류학적으로 고유한 특성을 가진 16S rDNA를 PCR 증폭하였다. 16S rRNA의 V3 부위를 증폭하기 위하여 증폭된 16S rDNA를 주형으로 nest PCR을 수행하였다. PCR 반응 시 사용한 primer

f341GC, 518r 은 약 200 bp의 16S rRNA의 V3 부위를 증폭할 때 이용된다⁴⁾. 정제된 nest PCR 증폭산물을 D-code™ System(Bio-Rad, USA)을 이용하여 DGGE를 수행하였다. DGGE 패턴 분석은 Quantity One® 1-D Analysis Software v4.5.0 (Bio-rad, USA)을 이용하였다.

3. 결과

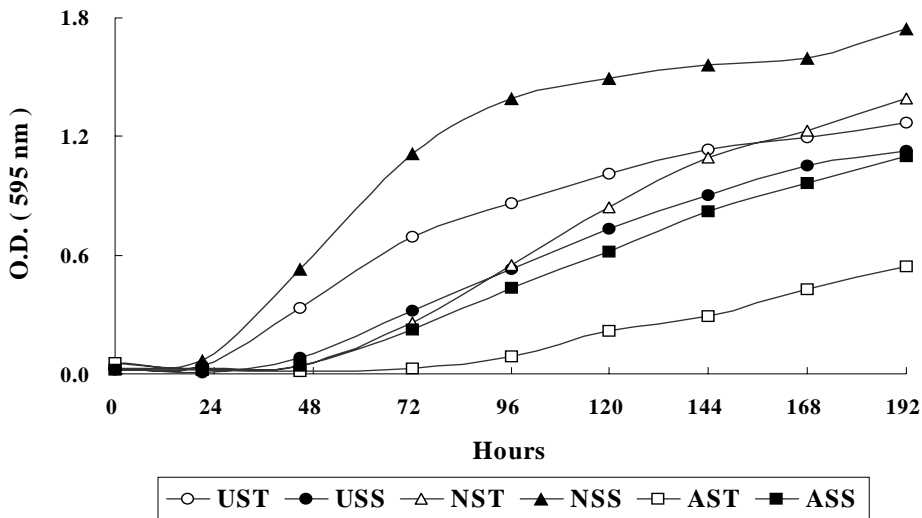
3.1 미생물 군집의 생화학적 다양성

BIOLOG GN2 plate의 배양 시간에 따른 평균 발색량 (AWCD, Average well color development)을 통해 시간이 증가할수록 자연복원지 토양 내 미생물 군집의 유일탄소원 이용률이 높이 증가함을 확인할 수 있으며, 특히 자연복원지 심토(NSS)의 활성이 가장 두드러지게 높게 나타났다. 반면 인공복원지 표토(AST)의 미생물 군집의 유일탄소원 이용에 대한 생화학적 활성은 매우 낮은 수준으로 증가하였다(Fig. 1). SPSS 통계 프로그램을 이용하여 산불의 발생유무 및 복원형태에 따른 산림토양 내 미생물 군집과 유일탄소원의 이용에 대한 생화학적 대사 다양성의 유사도를

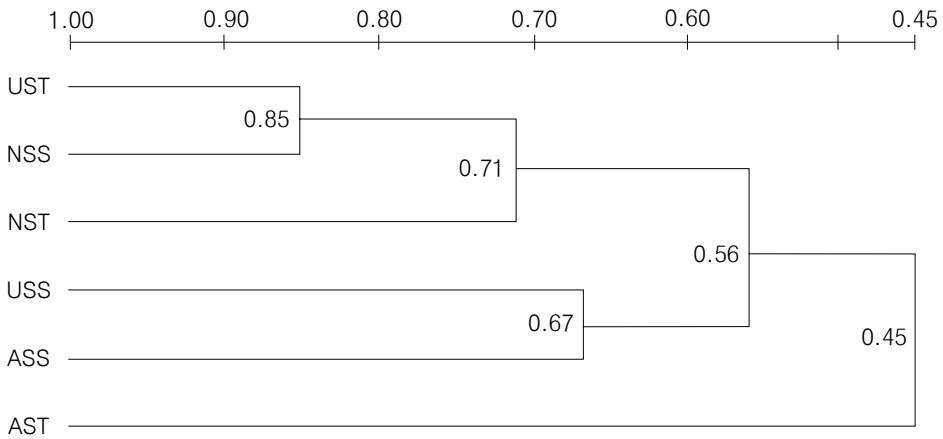
알아보고자 군집분석을 수행하였다. 분석 값들은 배양 종료 시(192hr) 측정된 O.D. 값을 이용하였다. 생화학적 유사성의 군집분석 dendrogram은 SPSS 프로그램을 통하여 토양사이의 similarity matrix를 근거로 작성되었다(Fig. 2). 정상산림의 표토(UST)와 자연복원지 심토(NSS)의 생화학적 유사성이 85%로 가장 높게 나타났으며, 인공복원지의 표토(AST)는 45%로 다른 토양들에 비해 생화학적 유사도가 가장 낮았다.

3.2 미생물 군집의 유전적 다양성

토양으로부터 추출된 genomic DNA의 크기는 10 kb 이상이었으며, 토양 DNA로부터 약 1.5 kb의 16S rDNA를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻은 16S rDNA로부터 V3 부위를 증폭하기 위하여 nest PCR을 수행하였다. Nest PCR은 한번 PCR로 증폭한 DNA 단편을 한 번 더 내부의 primer를 사용하여 증폭하는 방법으로 이는 비특이적 반응을 감소시키며, PCR을 2회 실시하므로 감도가 상승하는 효과를 얻을 수 있다. Nest PCR 결과 약 200 bp의 16S rDNA V3 부위의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 3-A). DGGE loading 결과 모든 토양



[Fig. 1] Time courses of average well color development(AWCD) during incubation. plots represent the color response in six different microbial communities in the soils. Soils are described in the text.



[Fig. 2] The dendrogram of biochemical similarities of microbial communities in soils. Soils are described in the text.

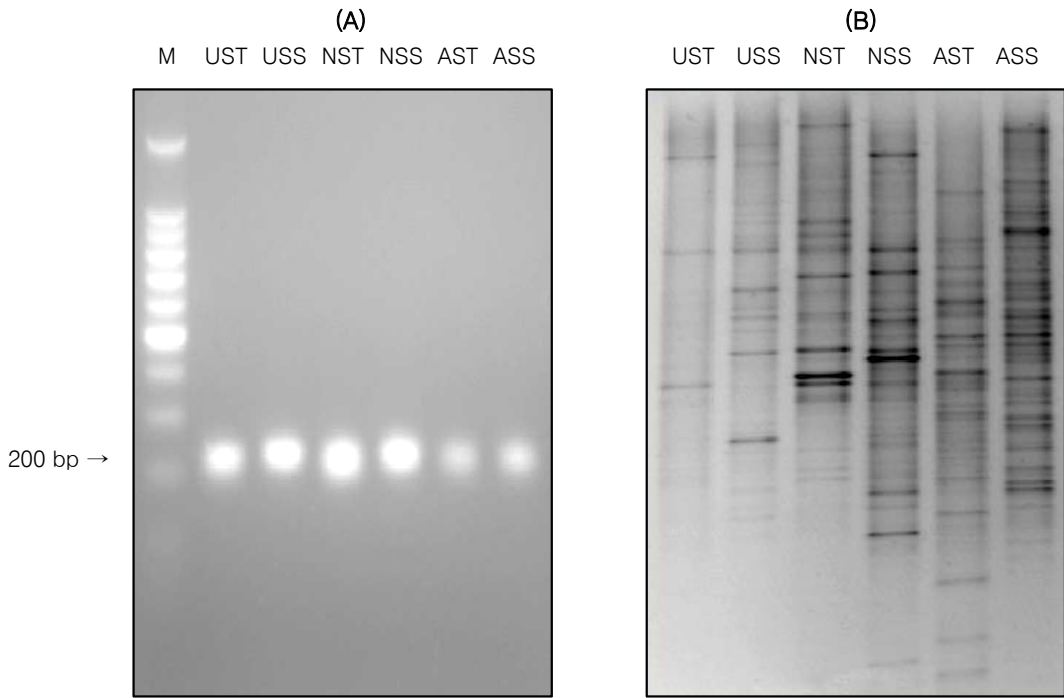
시료의 DGGE band의 양상은 모두 다양하게 나타났으며 band의 수에서는 차이가 없었다(약 30~40개). 그러나 다른 토양에 비해 자연복원지 토양에서는 진한 DGGE band가 두드러지게 나타났대[Fig. 3-B]. DGGE 패턴의 분석결과는 dendrogram으로 나타냈다[Fig. 4]. 토양별 유전적 다양성의 유사도는 Biolog plate에 의한 생화학적 유사도와는 다르게 나타났다. 70% 이상의 유사성을 갖는 토양은 없었으며 모든 시료에서 53%에서 68%의 범위의 상동성을 나타냈다.

4. 결론

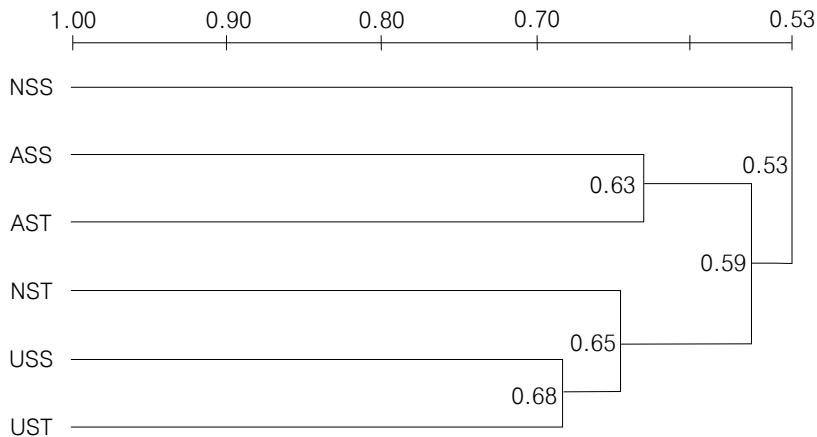
생물학적 다양성을 연구하는데 있어서 유전적 다양성, 분류학적 다양성 그리고 기능적 다양성을 통해 총 다양성을 표현할 수 있다. 분류학적 다양성은 모두 유전적 다양성에 포함되지만, 유전적 다양성과 분류학적 다양성이 모두 기능적 다양성으로 전환되는 것이 아니기 때문에 총 다양성을 표현하기 위해서는 상호 보완적인 연구가 수행되어야 한다⁵⁾. 독성물질의 양이 많아질수록 미생물군집의 구조적(유전적) 다양성과 대사적(생화학적) 다양성은 감소한다. 즉, 단기적인 환경변화로 인하여 미생물군집의 유전적 다양성과 탄소원 이용률이 높은 상관관계를 보이기도 한다⁶⁾. 그러나 모든 유

전적인 특성이 대사적 특성으로 나타나는 것이 아니며 대사적인 특성 또한 모든 유전적인 특성을 대변하지는 않는다. 따라서 토양미생물 군집의 다양성을 연구하고자 할 때에도 유전적 다양성과 생화학적 대사 다양성의 통합적인 연구가 필요하다. Griffiths 등(2003)의 연구에 따르면 수분에 의한 환경 스트레스의 영향이 DGGE 분석을 통한 유전적 다양성에는 영향을 미치지 않으며 Biolog GN2 plate를 이용한 생리적 다양성에는 영향을 미치는 것으로 나타났다⁷⁾.

자연복원지 토양에서 두드러지는 생화학적 활성으로부터 그 지역의 생물학적 환경이 복원되었거나 더 나은 방향으로 복원이 진행 중일 것으로 판단된다. 유일탄소원 이용능을 통한 미생물 군집의 생화학적 다양성 비교는 본 연구에서 산불과 연관된 토양에 따른 미생물군집의 다양성에 있어 유사성과 차이를 잘 보여주고 있다. DGGE 분석에서 계통발생학적으로 의미가 있는 세균의 16S rDNA의 다양하게 나타나는 부분(variable region) 중, 가장 다양한 것으로 알려져 있고 일반적으로 연구되고 있는 약 200 bp의 V3 부분을 이용하였다. DGGE 분석결과 미생물 종수를 나타내는 band의 숫자로는 각 토양 미생물군집이 거의 차이가 없었고, 단지 자연복원지 토양에서 진하게 나타나는 band가 존재하였다. 토양의 DGGE band 개수는



[Fig. 3] (A) PCR amplified and purified V3 region of 16S rDNA for DGGE. Lanes M contained a marker, and other lanes are soils. (B) DGGE profiles of PCR-amplified V3 variable region of bacterial 16S rRNA genes from soils. Soils are described in the text.



[Fig. 4] Dendrogram representing the genetic similarity of the microbial community profiles obtained by PCR-DGGE. The scale bar represents percent similarity. Soils are described in the text.

토양미생물 군집의 미생물 종수를 의미한다⁸⁾. 각 토양의 유전적 다양성의 유사도, 즉 구조적 유사성은 생화학적 유사성과는 다른 양상으로 나타났다. 이것은 미생물 군집이 구조적인 모습이 모두 대사적 모습으로 나타나지는 않는다는 것을 말해준다. 대사적 활성이 높게 나타났던 정상토양 표토(UST)와 자연복원지 표토(NST), 심토(NSS)의 생화학적 유사도는 70%이상이었으나, 유전적 유사도에서는 전체적으로 크게 다르지 않은 것으로 나타났다. 이 결과는 산물로 인해 파괴된 유전적 다양성은 오랜 시간을 통해 회복되지만 그 표현형인 생리적, 대사적 다양성이 반드시 회복되지는 않는다는 것을 말해준다.

본 연구의 목적을 통하여 토양 미생물 군집의 유전적 특징과 생화학적 특징을 규명하여 산물에 의한 미생물 군집의 특성과 유사성을 밝혀내고자 하였다. 본 연구는 군집의 유전적, 생화학적 특징을 종합적으로 연구함으로써 유기성 자원을 이용한 산물토양 복원을 위한 모니터링에 필요한 자료가 될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 일부 연구로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 정재훈, “유기성폐기물 관리와 지렁이 처리의 역할”, 유기성자원학회지 10(4), pp. 7~14 (2002).
2. 정영률, 송인근, 김영준, “유기성폐자원을 이용한 산물토양의 생태학적 복원을 위한 토양의 생물학적, 물리화학적 기초특성연구”, 유기성자원학회지 13(1), pp. 79~89 (2005).
3. Parham, J.A., S.P. Deng, H.N. Da, H.Y. Sun and W.R. Raun, “Long-term cattle manure application in soil. II. Effect on soil microbial populations and community structure.” *Biol. Fertil. Soils*, 38, pp. 209~215 (2003).
4. Muyzer, G., E.D. De Waal and A.G. Uitterlinden. “Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA.” *Appl. Environ. Microbiol.* 59, pp. 695~700 (1993).
5. Zak, C.J., M.R. Willing, D.L. Moorhead, and H.J. Wildman, “Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*”, 26, pp. 1101~1108 (1994).
6. Wang, A., J. Chen and D.E. Crowley. “Change in metabolic and structural diversity of a soil bacterial community in response to cadmium toxicity.” *Biol. Fertil. Soils*, 39, pp. 452~456 (2004).
7. Griffiths, R.I., A.S. Whiteley, A.G. O'Donnell and M.J. Bailey. “Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress.” *Appl. Environ. Microbiol.* 69, pp. 6961~6968 (2003).
8. Haack, S.K., L.R. Fogarty, T.G. West, E.W. Alm, J.T. McGuire, D.T. Long, D.W. Hyndman and L.J. Forney. “Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer.” *Environ. Microbiol.* 6, pp. 438~448 (2004). ☐