

DNA 직접추출법에 따른 산림토양 부식층 내 세균군집의 계통학적 다양성 비교

손희성 · 한송이 · 황경숙*

목원대학교 미생물생태자연연구소, 목원대학교 생명산업학부

개발된 manual법과 ISOIL kit를 이용하여 산림토양의 부식층 토양시료로부터 추출한 DNA를 대상으로 16S rDNA PCR 증폭산물을 cloning하고 구축된 clone에 대해 ARDRA cluster 분석을 수행한 결과, 개발된 manual법에 의해 구축된 136 clones은 45개 ARDRA cluster로, ISOIL kit를 이용한 경우 총 76 clones은 44개 ARDRA cluster로 분류되었다. 각 clone cluster로부터 대표 clone을 선발하여 16S rDNA 염기서열을 결정한 결과, ISOIL kit의 경우 44개 대표 clone은 α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Acidobacteria 및 Actinobacteria의 3개 phylum 계통군이 확인되었으며, 개발된 manual법에 의한 45개 대표 clone은 α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroides, Verrucomicrobia, Planctomycetes, 그리고 Gemmatomonadetes의 총 6개 phylum의 다양한 계통군이 검출되었다. 이상의 결과로부터 개발된 manual법에 의해 추출된 DNA를 대상으로 계통학적 군집해석을 수행한 결과가 보다 더 다양한 계통군을 검출할 수 있음이 밝혀졌다. 한편, ISOIL kit를 이용하여 구축된 총 clone 중 약 40%가 α -proteobacteria 계통군에 속하였으며, 약 30%가 γ -Proteobacteria 계통군에 속하여 우점 계통군으로 확인된 반면, manual법에 의해 구축된 clone의 41%가 Acidobacteria 계통군에 속하였고 α -proteobacteria (28%)가 우점 계통군으로 분포하는 계통학적 특징을 나타내어 DNA 추출법에 따라 토양세균군집 구조의 계통학적 특성이 상이하게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

Key words □ DNA extraction, humus forest soil, ISOIL kit, manual method, phylogenetic diversity

토양 1 g 중에는 약 $10^9 \sim 10^{10}$ 이상의 세균이 존재하지만 실험실 내 배양 조건에서 검출 가능한 미생물은 1% 미만에 불과하다(1, 3, 4, 11, 15). 최근 토양미생물생태학자들은 배양을 통하지 않고 토양환경으로부터 직접 추출한 DNA를 대상으로 배양이 곤란한 이들 미지의 토양미생물 군집구조 해석 및 기능을 파악하기 위해서 FISH, DGGE, PCR-SSCP, PCR-T-RFLP 그리고 ARDRA 등과 같은 다양한 분자생물학적 분석기법을 이용한 토양미생물 군집해석이 진행되고 있다(7, 12, 13, 17, 24). 이와 같은 다양한 분자기법을 통해 최근 밝혀진 토양세균의 종 수는 약 300,000~1,000,000여 종으로 추정되고 있다(16).

유기물 및 다양한 종류의 부식산을 포함하고 있는 토양미생물 군집구조의 계통학적 해석을 수행하기 위해서는 DNA 추출 및 PCR 증폭이 필수적인데 현재 광범위하게 사용되고 있는 DNA 직접추출법(rapid method)에 따라 수행할 경우 토양 시료 내에 다량의 PCR 저해물질 등이 혼입되어 있어 PCR 증폭이 성공적으로 이루어지지 않는 경우가 빈번하여 높은 순도의 DNA를 추출하기 위한 다각적인 방법들이 연구되어 왔고(1, 18, 26, 27, 31, 32), 또한 최근에는 DNA 추출 과정의 간편성과 높은 순도를 얻을 수 있는 상용화된 다양한 종류의 Kit를 이용한 분자생

태학적 연구가 활발하게 진행되고 있다.

DNA 추출법에 따라 미생물군집의 계통학적 상이성이 보여 진다는 사실이 보고됨에 따라 미생물생태학자들은 다양한 방법으로 핵산추출을 시도하여 자연환경 내 미생물 군집의 다양성을 비교·평가하였다(6, 8). 산림토양의 경우 매년 정기적으로 낙엽 및 낙지가 유입되면서 이들 낙엽과 같은 유기물은 일련의 과정을 통해 분해가 진행되면서 부식층(humus layer)을 형성한다. 이들 유기물 분해에 관여하는 토양미생물은 영양염류, 수분, 산소, 기압 등 토양 내 이화학적 성질에 따라 다양한 세균군집 구조를 형성한다(2, 5, 13, 14, 33).

본 연구에서는 현재 광범위하게 이용되고 있는 DNA 직접추출법(Rapid법)과 정제단계 일부를 개량하여 토양시료 내 불순물을 효과적으로 제거하는 개발된 manual법을 이용하여 DNA를 직접 추출하고, 기존의 Kit보다 DNA 추출단계가 간편하고 환경 시료 내 불순물을 효과적으로 제거할 수 있도록 개발된 ISOIL kit를 이용하여 산림토양의 부식층 토양으로부터 각각 추출한 DNA를 대상으로 세균군집의 계통학적 다양성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

토양시료

본 연구에서는 공주시 계룡산 북사면에 밀집해 있는 상수리나무(*Quercus acutissima* Carruth)림을 조사지로 선정하였다. 상수

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-829-7598, Fax: 82-42-829-7599
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

리나무림 지역은 매년 정기적으로 낙엽 및 낙지가 유입되어 이들 낙엽분해가 진행되면서 부식층(humus layer)을 형성하였다. 상수리나무림 낙엽층 15~20 cm 하층부의 부식층으로부터 시료를 채취하였다.

개량된 manual법에 의한 total DNA의 직접추출

산림토양의 부식층에서 채취한 시료로부터 total DNA의 추출은 Tsai 등이 제안한 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가하고 freezing과 thawing을 반복 실시하여 세포의 용해를 돕는 방법인 Rapid법(10, 18, 31)을 개량하여 cell lysis 후, CTAB를 첨가하여 정제하는 manual법으로 total DNA를 추출하였다. 토양시료 5 g에 120 mM phosphate buffer (pH 8.0) 10 ml을 넣고 37°C 항온기에서 12,000×g으로 10분동안 현탁한 후, 12,000×g에서 10분동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 상기의 토양세척은 3회 반복하여 토양 내 humic acid 및 PCR증폭 저해물질 등을 제거하였다. 세척된 토양시료에 solution I (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, D.W. 100 ml, lysozyme 1 g; pH 8.0) 8 ml를 첨가하고 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후, solution II (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, D.W. 100 ml, SDS 10 g; pH 8.0) 8 ml를 첨가하여 -70°C deep freezer에서 냉동과 65°C에서 얼림과 녹임을 3회 반복한 후, 5,600×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 획득된 상등액에 5M NaCl 2.7 µl와 10% CTAB 2.1 µl를 첨가하고 12,000×g에서 10분간 원심분리하고 상등액과 동일한 양의 1.6 M NaCl이 포함된 13% PEG를 첨가하여 DNA pellet을 얻었다. DNA pellet을 건조한 후 750 µl의 d.w를 첨가하여 37°C에서 녹이고 10 M NH₄OAc 190 µl, 1.5 ml의 ethanol 그리고 750 µl isopropanol을 첨가하여 DNA를 농축하고 70% ethanol 1 ml로 세척한 후 진공건조(Micro Vac MV-100, TOMY)하였다. 최종 50 µl의 D.W.를 첨가하여 DNA를 녹이고 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)을 통해 추출여부를 확인하였다. DNA농도는 Spectrophotometer (UV-1650PC, SHIMAZU)을 이용하여 측정하였으며 흡광도 A₂₆₀/A₂₈₀비를 순도로 계산하였다.

ISOIL Kit를 이용한 DNA 직접추출

Takada 등의 bead beating 방법(26)에 DNA 직접추출과정 중 skim milk가 첨가되어 토양 DNA안의 부식산 제거 효과가 탁월하다고 밝혀진 ISOIL kit를 이용하여 부식층에서 채취한 시료로부터 total DNA의 추출하였다. 토양시료 0.5 g을 ISOIL kit (Nippon Kit co., Japan) 매뉴얼에 따라 lysis solution BB 950 µl를 첨가하여 bead beater (Fast prep. Inc., Funakoshj. Japan)로 6 m/sec, 45초간 처리하고, 60°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 10,400×g에서 1분 동안 원심분리하였다. 상등액에 purification solution 400 µl를 첨가하고 섞어준 후 600 µl chloroform을 첨가하고 15초간 vortex한 후 10,400×g에서 15분간 원심분리하였다. 분리된 상등액에 precipitation solution 800 µl을 첨가하여 혼합한 후 12,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침

전물에 washing solution 1 ml를 넣은 후 12,000×g에서 10분간 원심분리하였고 상등액을 제거하고 70% ethanol 1 ml와 ethachinmate 2 µl를 첨가하여 12,000×g에서 원심분리한 후 DNA pellet을 얻었다. DNA pellet을 진공건조(Micro Vac MV-100, TOMY)하고 100 µl의 TE buffer를 첨가하여 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)을 통해 DNA를 확인하였으며, Spectrophotometer (UV-1650PC, SHIMAZU)로 농도를 확인하고 흡광도 A₂₆₀/A₂₈₀비를 계산하여 순도를 측정하였다.

16S rDNA의 PCR 증폭 및 정제

16S rDNA를 증폭하기 위해서 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') primer를 이용하였다(3). PCR 조건은 1× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Solgent co., Korea), template는 10~50ng으로 하였다. 반응 부피는 50 µl로 핵산증폭기(GeneAmpR PCR System 9700, Applied Biosystems)을 이용하여 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 58°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고 72°C에서 10분간 final extension 반응시켰다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동(Mupid-21, Gel Documentation system, Bio-Rad)하여 증폭 여부를 확인하였다(20). 증폭된 16S rDNA는 ethanol precipitation법으로 정제한 후, 30 µl의 D.W.를 첨가하여 -20°C에서 보관하였다.

16S rDNA의 cloning

증폭된 16S rDNA의 cloning은 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, USA)을 이용하여 실시하였다(7, 22). DNA 50 ng, 1× buffer, T Easy Vector 50 ng, T4 DNA Ligase 1 µl에 D.W.을 넣어 총 10 µl을 4°C에서 12시간 이상 보관하여 ligation하였다. 1.5 ml microtube에 competent cell 50 µl(10⁸ cell/ml)와 ligation된 산물 5 µl를 혼합한 후 얼음 위에서 1시간 동안 방치하고 42°C에서 90초간 heat shock하고, 얼음 위에서 2분 방치한다. LB배지 450 µl를 첨가한 다음 37°C에서 144×g로 1시간 동안 진탕배양 한 후, X-gal (20 mg/ml) 1 ml, IPTG (20 mg/ml) 100 µl, 그리고 ampicillin (20 mg/ml) 1 ml이 포함된 LB 한천배지에 도말하여, 37°C에서 24시간 배양하였다. LB plate에 생성된 white colony를 분리하여 clone library를 만든 후 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') primer와 SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') primer를 사용하여 colony PCR을 수행하였다(20, 23). colony PCR을 위하여 1× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Solgent co., Korea)에 D.W.를 넣어 최종 50 µl의 반응물을 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 95°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고 72°C에서 7분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAmpR PCR System 9700, Applied Biosystems)반응을 실시하였다.

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 분석

선별된 clone의 16S rDNA PCR 증폭산물에 대하여 제한효소 *Hae*III (Promega, USA)와 *Alu*I (TAKARA, Japan)을 각각 처리하여 나타난 band 절단 양상을 관찰하였다(3, 19). PCR product 1 µg, 10× buffer 2 µl, enzyme (500 unit) 1 µl, D.W.로 총 20 µl를 반응 tube에 넣은 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 제한효소를 처리한 산물은 4% agarose gel (1× TAE buffer; 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 100 V, 300 mA로 1시간 30분 동안 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 30분간 염색하여 UV (Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 제한효소의 절단 양상을 확인하였다. 확인된 band의 pattern은 Gel Compar II program (version 4.0; Applied Maths, Belgium)을 이용하여 band 단편(restriction fragment; RF)양상을 비교 분석하였다. 각 band 단편의 유사도는 Dice's similarity coefficient로 유사도 지수(S)를 계산하고, dendrogram은 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average)로 작성하였다(18, 21).

$$S = 2 \times n_{xy} / (n_x + n_y)$$

n_{xy} : 비교하는 두 군집의 공통적인 DNA 단편수

n_x/n_y : 비교하는 두 군집의 각각의 상이한 DNA 단편수

통계학적 분석을 통한 세균군집의 다양성 분석

각 시료 내 세균군집의 다양도 지수(Diversity Index)는 Margalef의 정보이론에 의해 유도된 Shannon-Weaver function (H')의 공식을 이용하여 산출하였고(25), 균등도 지수(Evenness Index)는 Pielou에 의해 제안된 지수를 적용하여 계산하였다(9).

16S rDNA 염기서열 분석 및 계통도 작성

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 µl, T7 primer 1 µl, 16S rDNA sample (100 ng) 1 µl, 5× buffer 3.4 µl에 D.W. 13.3 µl를 잘 혼합한 후 cycle sequencing을 실시하였다. PCR산물은 100% ethanol 50 µl와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 µl를 첨가한 후 12,000×g에서 20분간 원심분리하고, 250 µl의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 µl를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation한 후 얼음 위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 16S rDNA (350-600 bp) 염기서열을 결정하였고, 유사도는 RDP II (Ribosomal Database Project II) database의 Sequence Match program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 상동성은 alignment clustal X program을 이용하여 병렬로 정렬하였고 계통도 작성은 근린 결합법(28)에 의거 결정하였다(21).

결과 및 고찰

토양시료로부터 DNA의 추출 및 16S rDNA PCR 증폭

토양시료로부터 직접 DNA를 추출하는 과정 중 DNA와 함께 추출되는 부식산(humic acid)과 같은 PCR 저해 물질을 제거하기 위하여 skim milk를 이용한 불순물 정제, gel elution 및 filtration 과정을 통한 정제와 DNA 정제 Kit를 이용하여 정제하는 등 다양한 방법이 소개되고 있다(27, 29).

본 연구에서는 분자생태학 분야에서 일반적으로 널리 이용되고 있는 Rapid법과 Rapid법의 정제과정 중 PCR 저해물질 등 불순물을 효과적으로 제거하기 위해 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)를 첨가하여 사용하는 개량된 manual법 그리고 bead beating을 통하여 토양입자 내 세포 용균율을 높이고 skim milk 정제단계를 거쳐 고도로 정제된 DNA를 얻을 수 있도록 개발된 ISOIL kit를 이용하여 산림토양의 부식층 토양시료로부터 DNA를 추출하고 PCR 증폭을 비교 평가하였다. 통상적인 Rapid법을 이용하여 추출된 DNA 농도(흡광도; O.D.₂₆₀)는 105 ng/µl로 순도(A₂₆₀/A₂₈₀비)가 0.89로 매우 낮았으며, 상기의 추가한 개량된 manual법을 이용하여 DNA를 추출한 결과, DNA 농도는 110 ng/µl로 통상적인 Rapid법과 큰 차이가 없었으나 순도(A₂₆₀/A₂₈₀비)가 1.13으로 측정되었다. 한편, ISOIL kit를 이용하여 DNA를 추출한 결과, 순도(A₂₆₀/A₂₈₀비)가 1.79로 정제면에서 월등히 우수하였다. 그러나 DNA 농도가 98 ng/µl로 manual법에 비해 다소 낮게 나타났다(Table 1).

상기의 다양한 방법으로 추출된 DNA는 최종 농도 50 ng/µl로 조정하여 16S rDNA PCR 증폭을 실시하였다. Rapid법에 의해 추출된 DNA는 16S rDNA PCR 증폭이 이루어지지 않았으나, 개량된 manual법과 ISOIL kit법을 이용해 추출된 DNA를 주형으로 한 경우 성공적으로 16S rDNA의 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있었다(Table 1). 이상의 결과로부터 0.5 g의 토양을 사용하는 ISOIL kit에 비해 5 g의 토양을 사용하여 DNA를 추출하는 rapid법과 개량된 manual법에서 비교적 높은 농도의 DNA가 추출되었다. 그러나 토양의 양을 고려하였을 때, 그 차이가 비교적 낮아 추출되는 DNA 수율 및 순도에 있어서 ISOIL kit의 방법이 더 우수한 것으로 판단되었다. DNA 순도에서 확인할 수 있었듯이 PCR 저해 물질이 효과적으로 정제되지 않는 기존의 Rapid법을 이용한 DNA 추출법으로는 토양 내 부식산 등이 다량 함유되어 있는 산림토양의 세균군집 해석에는 적당하지 않다고 판단되었다.

Table 1. Comparison of DNA yield, quality and PCR amplification of humus forest soil by using different extraction methods

Method	DNA extraction		Amplification to PCR
	DNA yield (µl/ml)	Quality (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	
Rapid	105	0.786	-
Improved Manual	110	0.984	+
ISOIL kit	98	1.109	+

16S rDNA Cloning 및 ARDRA pattern 분석

DNA 추출법에 따라 미생물 군집의 계통학적 특성이 다양하게 나타난다는 사실이 보고됨에 따라 미생물생태학자들은 다양한 방법으로 핵산추출을 시도하여 자연환경 내 미생물 군집의 다양성을 비교·평가하여 왔다(18). 본 연구에서는 상수리나무림 산림 토양의 부식층 내 세균군집의 계통학적 다양성을 평가하기 위하여 상기의 개량된 manual법과 ISOIL kit를 이용하여 각각 추출된 DNA를 대상으로 16S rDNA PCR 증폭산물을 pGEM-T easy vector에 cloning하고 구축된 clone에 대해 ARDRA (amplified rDNA restriction analysis)법, 즉 *Hae*III와 *Alu*I 제한효소를 각각 처리하여 나타난 DNA fragment의 양상에 따라 토양세균군집의 유전적 다양성을 분석하는 방법에 의거하여 상수리나무림 각 층 위 내 세균군집의 계통학적 다양성을 비교 검토하였다.

부식층 토양시료로부터 추출된 DNA의 16S rDNA PCR 증폭 산물을 cloning한 결과 개량된 manual법에 의해 추출된 DNA의 경우 136 clones 그리고 ISOIL kit를 이용하여 추출한 DNA의 경우 총 76 clones을 구축하였다. 이들 clones에 대하여 제한효소 *Hae*III와 *Alu*I을 각각 첨가함에 따라 나타난 16S DNA 단편 (restriction fragment; RF) 양상은 Gel Compar II program (version 4.0; Applied Maths, Belgium) software를 이용하여 각 clone간의 다양성을 비교하고 UPGMA 분석을 위한 Matrix를 구하여 유사도를 확인하였다.

개량된 manual법에 의해 구축된 총 136 clones은 genus 수준에서 분류가 가능한 유사도 70%에서 45개 ARDRA cluster로 분류되었으며(17) ISOIL kit에 의해 구축된 총 76개 clones은 유사도 70%에서 44개 ARDRA cluster로 확인되었다(Fig. 1).

부식층 토양 내 세균군집의 계통학적 다양성 비교

상수리나무림의 부식층으로부터 서로 다른 DNA 추출방법에 의해 구축된 각 clone cluster로부터 대표 clone을 선발하여 16S rDNA 염기서열을 결정하고, RDP II (Ribosomal Database Project II) database의 Sequence Match program을 이용하여 상동성 검색을 수행하였다.

ISOIL kit를 이용하여 추출된 DNA를 대상으로 구축된 44개 16S rDNA-ARDRA clone cluster로부터 선발된 대표 clone의 16S rDNA 염기서열을 확인한 결과 α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Acidobacteria 및 Actinobacteria phylum의 3개의 계통군이 확인되었다. 이들 각 16S rDNA-ARDRA clone cluster에 속하는 clone들은 *Caulobacteriales* (4 clones), *Rhizobiales* (20 clones) 그리고 unclassified alphaproteobacteria를 포함하는 α -Proteobacteria 계통군과 *Burkholderiales* (6 clones), unclassified betaproteobacteria (2 clones)를 포함하는 β -Proteobacteria 계통군, *Xathononadales* (6 clones), unclassified gammaproteobacteria (15 clones)을 포함하는 γ -Proteobacteria 계통군, unclassified deltaproteobacteria 계통군(2 clones), *Acidobacteriaceae* 계통군(12 clones), *Microbacteriaceae* 계통군(1 clone) 그리고 uncultured Actinobacteria 계통군(2 clones)이 확인되었다(Fig. 3).

개량된 manual법에 의해 구축된 각 16S rDNA-ARDRA clone

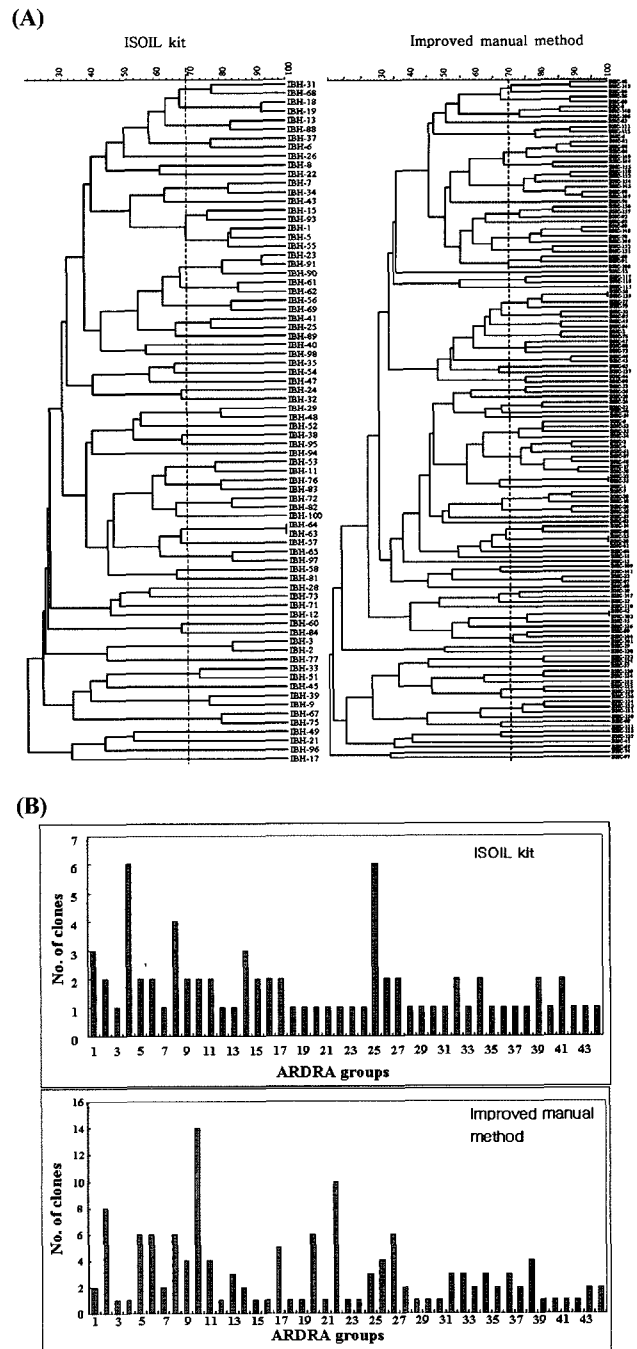


Fig. 1. Dendrogram based on UPGMA clustering (A) and distribution of 16S rDNA ARDRA clusters (B) of clones from humus forest soil with the restriction endonucleases *Alu*I and *Hae*III. Extraction DNA by using improved manual method(left), Extraction DNA by using ISOIL kit (right).

cluster로부터 선발된 45개 대표 clone의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroides, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Gemmatomonadetes phylum 총 6개의 다양한 계통군이 확인되었다. 이들 각 16S rDNA-ARDRA

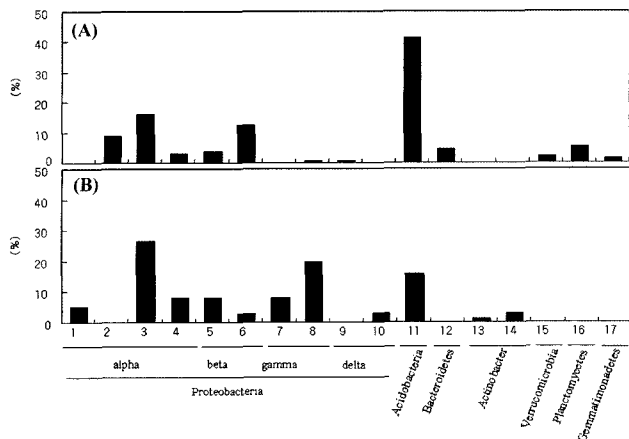


Fig. 2. Comparison of humus forest soil bacterial clones belonging to each phylum. ISOIL kit (A) and improved manual method (B). 1, Caulobacteriales; 2, Rhodospirillales; 3, Rhizobiales; 4, unclassified alphaproteobacteria; 5, Burkholderiales; 6, unclassified betaproteobacteria; 7, Xanthomonadales; 8, unclassified gammaproteobacteria; 9, Myxococcales; 10, unclassified Delta proteobacteria; 11, Acidobacteriales; 12, Sphingobacteriales; 13, Actinobactales; 14, Verrucomicrobiales; 15, Planctomycetales; 16, Gemmatimonadales.

clone cluster에 속하는 clone들은 unclassified *Rhodospirillales* (12 clones), *Rhizobiales* (22 clones) 그리고 unclassified alphaproteobacteria (4 clones)를 포함하는 α -Proteobacteria 계통군과 *Bulkholderiales* (5 clones) 그리고 unclassified betaproteobacteria (17 clones)를 포함하는 β -Proteobacteria 계통군, unclassified gammaproteobacteria 계통군(1 clone), *Myxococcales* (1 clone)를 포함하는 δ -Proteobacteria 계통군, *Acidobacteriaceae* (56 clones)를 포함하는 Acidobacteria 계통군, *Crenotrichaceae* (1 clone)와 *Sphingobacteriaceae* (5 clones)를 포함하는 Bacteroides 계통군, uncultured Verrucomicrobia bacterium (3 clones)를 포함하는 Verrucomicrobia 계통군, unclassified *Planctomycetaceae* (7 clones)을 포함하는 Planctomycetes 계통군 그리고 *Gemmatimonadaceae* (2 clones)를 포함하는 Gemmatimonadetes 계통군의 매우 다양한 계통군이 확인되었다(Fig. 2).

산림토양의 부식층 내에 분포하는 세균군집 구조의 계통학적 다양성을 비교하기 위하여 각 시료의 ARDRA 분석에 따른 다양성 지수와 균등도 지수를 확인하였다. ISOIL kit를 이용한 경우, 다양성지수가 4.85이었으며 균등도 지수는 0.87로 나타났다. 또한, 개량된 manual법을 이용한 경우, 다양성 지수는 5.04이었으며, 균등도 지수는 0.92로 확인되었다(Fig. 3). 이상의 결과로부터 개량된 manual법을 이용하여 추출된 DNA를 대상으로 분석한 결과가 ISOIL kit를 이용한 경우보다 풍부한 종 구성과 안정적인 균등도 지수를 확인할 수 있음이 밝혀졌다.

상기의 ISOIL kit를 이용하여 구축된 각 clone 중 약 40%가 α -Proteobacteria 계통군에 속하였으며, 약 30%가 γ -Proteobacteria 계통군에 속하여 우점 계통군으로 나타났고, Acidobacteria

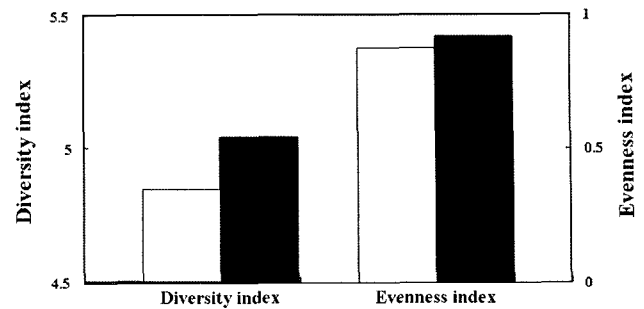


Fig. 3. Comparison of humus forest soil bacterial diversity index and evenness index to each DNA extraction method. □ ; ISOIL kit, ■ ; improved manual method.

(15.8%), β -Proteobacteria (10.4%), Actinobacteria (3.9%) 및 δ -Proteobacteria (2.6%)의 순으로 분포하는 계통학적 특징을 나타내었다.

한편 개량된 manual법에 의해 추출된 DNA를 이용하여 구축된 clone의 41.3%가 Acidobacteria 계통군에 속하였으며, 27.9%가 α -Proteobacteria 계통군에 속하여 우점 계통군으로 나타났고, β -Proteobacteria (16.2%), Planctomycetes (5.1%), Bacteroides (4.4%), Verrucomicrobia (2.2%), Gemmatimonadetes (1.5%), γ -Proteobacteria (0.7%), δ -Proteobacteria (0.7%)의 순으로 분포하는 계통학적 특징을 나타내어 DNA 추출법에 따라 우점하는 토양세균군집 구조의 계통학적 특성이 상이하게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

최근 미생물생태학 실험실에서는 간편하고 쾌속하게 DNA를 추출할 수 있고 토양시료 내 부식산 등을 제거해 줄 수 있는 다양한 종류의 DNA 추출 Kit를 사용하여 토양세균 군집의 계통학적 해석을 수행하고 있으나, 본 연구 결과에서 밝혀진 바와 같이 토양세균군집 구조의 계통학적 해석을 위해서는 대상으로 하는 토양시료의 특성에 따라 DNA 추출법을 고려한 계통학적 다양성 비교 검토가 필요하다고 판단된다. 본 연구 결과는 토양미생물 군집의 분자생태학적 접근 방법의 기초자료로 활용 될 수 있으리라 기대한다.

감사의 말

본 논문은 2007년도 농촌진흥청 바이오그린21사업(200503 0134384) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 임미라, 유찬, 조재창. 2003. 환경시료의 생물군집핵산 (community DNA)추출법 비교. *J. Environ. Sci. Eng.* 5, 17-19.
- 조성진, 박천서, 엄대익. 토양학 2002. 향문사.
- 한송이, 김윤지, 황경숙. 2005. 16S rDNA-ARDRA법을 이용한 소나무림과 상수리나무림 토양 내 VBNC 세균군

- 집의 계통학적 특성 비교. 한국미생물학회지 42, 116-124.
4. 황경숙, 유승현. 1995. 유기영양분 농도에 따른 토양세균의 증식양상과 통상 및 편성 저영양세균의 분리. 한국미생물학회지 21, 319-324.
 5. Alexander, M. 1985. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, New York, USA.
 6. Amagliani, G., C. Giammarini, E. Omiccioli, G. Brandi, and M. Magnani. 2007. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control*. 18, 1137-1142.
 7. Brümmer, I.H.M., A. Felske, and I. Wagner-Döbler. 2003. Diversity and seasonal variability of β -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4463-4473.
 8. Di Pinto, A., V.T. Forte, M.C. Guastadisegni, C. Martino, F.P. Schena, and G. Tantillo. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*. 18, 76-80.
 9. Dilly, O., J. Bloem, A. Vos, and J.C. Munch. 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 468-474.
 10. Fortin, N., D. Beaumier, K. Lee, and C.W. Greer. 2004. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J. Microbiol. Methods* 56, 181-191.
 11. Greene, K. 2002. New method for culturing bacteria. *Science* 296, 1000.
 12. Guan, L.L., K.E. Hagen, G.W. Tannock, D.R. Korver, G.M. Fasenko, and G.E. Allison. 2003. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6750-6757.
 13. Ibekwe, A.M., A.C. Kennedy, J.J. Halvorson, and C.-H. Yang. 2007. Characterization of developing microbial communities in Mount St. Helens pyroclastic substrate. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2496-2507.
 14. Insam, H. and K. Haselwandter. 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia*. 79, 174-178.
 15. Kaeberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2002. Isolating "Uncultivable" microorganism in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127-1129.
 16. Kim, M.J. and J.S. Chun. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 91-96.
 17. Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2052-2060.
 18. Lloyd-Jones, G. and D.W.F. Hunter. 2001. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 2053-2059.
 19. Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematics model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76, 5269-5273.
 20. Plourde-Owobi, L., D. Seguin, M.-A. Baudin, C. Moste, and B. Rokbi. 2005. Molecular characterization of *Clostridium tetani* strains by pulsed-field gel electrophoresis and colony PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5604-5606.
 21. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 281-295.
 22. Sebat, J.L., F.S. Colwell, and R.L. Crawford. 2003. Metagenomic profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4927-4934.
 23. Sheu, D.S., Y.T. Wang, and C.Y. Lee. 2000. Rapid detection of polyhydroxy-alkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* 146, 2019-2025.
 24. Smalla, K., M. Oros-Sichler, A. Milling, H. Heuer, S. Baumgarte, R. Becker, G. Neuber, S. Kropf, A. Ulrich, and C.C. Tebbe. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP, and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *J. Microbiol. Methods* 69, 470-479.
 25. Stackebrandt, E., W. Liesack, and B.M. Goebel. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7, 232-236.
 26. Takada-Hoshino, Y. and N. Matsumoto. 2004. "An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA". *Microbes Environ.* 19, 13-19.
 27. Tebbe, C.C. and W. Vahjen. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657-2665.
 28. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 29. Torsvik, V., F.L. Daae, R.A. Sandaa, and L. Ovreas. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64, 53-62.
 30. Torsvik, V. and L. Ovreas. 2007. Microbial phylogeny and diversity in soil. pp. 23-54. In J.D. van Elsas, J.K. Jansson, and J.T. Trevors (ed.), *Modern Soil Microbiology*, 2nd. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
 31. Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
 32. Whitehouse, C.A. and H.E. Hottel. 2007. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol. Cell. Probes* 21, 92-96.
 33. Wolters, V., W.L. Silver, D.E. Bignell, D.C. Coleman, P. Lavelle, W.H. van der Putten, P. de Ruiter, J. Rusek, D.H. Wall, D.A. Wardle, L. Brussaard, J.M. Dangerfield, V.K. Brown, K. Giller, D.U. Hooper, O. Sala, J. Tiedje, and J.A. van Veen. 2000. Effects of global changes on above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: implications for ecosystem functioning. *BioScience* 50, 1089-1098.

(Received August 6, 2007/Accepted September 21, 2007)

ABSTRACT : Comparison of the Phylogenetic Diversity of Humus Forest Soil Bacterial Populations via Different Direct DNA Extraction Methods**Hee-Seong Son, Song-Ih Han, and Kyung-Sook Whang*** (Institute of Microbial Ecology & Resources and Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 302-318, Korea)

The principal objective of this study was to analyze 16S rDNA-ARDRA of the humus forest soil via an improved manual method and an ISOIL kit on the basis of the UPGMA clustering of the 16S rDNA combined profile, 44 ARDRA clusters of 76 clones via the ISOIL kit method and 45 ARDRA clusters of 136 clones via the improved manual method. On the basis of the 16S rDNA sequences, 44 clones from the ARDRA clusters by the ISOIL kit were classified into 3 phyla : α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Acidobacteria and Actinobacteria. Using the improved manual method, the specimens were classified into 6 phyla : the α -, β -, γ -, δ -Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroides, Verrucomicrobia, Planctomycetes and Gemmatomonadetes. As a result, the modified manual method indicated greater phylogenetic diversity than was detected by the ISOIL kit. Approximately 40 percent of the total clones were identified as α -Proteobacteria and 30 percent of the total clones were γ -Proteobacteria and assigned to dominant phylogenetic groups using the ISOIL kit. Using the modified manual method, 41 percent of the total clones were identified as Acidobacteria and 28 percent of total clones were identified as α -proteobacteria and assigned to dominant phylogenetic groups.