

## RFLP, PLFA, CLSU를 이용한 폐기물연용토양의 토양미생물 특성 평가 비교

장갑열<sup>\*</sup> · 원항연 · 이강효 · 권순익<sup>1</sup> · 공원식 · 서장선<sup>2</sup> · 성재모<sup>3</sup>

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 기후변화생태과,  
<sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과, <sup>3</sup>강원대학교 생물환경학부

### Comparison of Biological Characteristics on the Organic Waste-treated Lysimeter Soil by RFLP, PLFA, and CLSU

Kab-Yeul Jang,<sup>\*</sup> Hang-Yeon Weon, Kang-Hyo Lee, Sun-Ik Kwon<sup>1</sup>, Won-sik Kong,  
Jang-sun Suh<sup>2</sup>, and Jae-Mo Sung<sup>3</sup>

*Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707, Korea*

<sup>1</sup>*Climate Change & Agroecology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea*

<sup>2</sup>*Organic Agriculture Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea*

<sup>3</sup>*Department of Environmental Biology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701*

The application of sludge wastes into agricultural fields has been increasing annually in Korea. In particular, sewage sludge application has been widely accepted in decades. Sewage sludge application aid in the recycling of essential nutrients and act as a source of organic matter improving the structure and water-holding properties of the soil. The efficient use of sludge wastes, however, requires an individual assessment of waste products. This study assessed the biological characteristics of organic waste-treated lysimeter soils and develop its indicator to assess the soil health of organic waste-treated lysimeter soils. Several analytical techniques more recently developed such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), phospholipid fatty acid (PLFA), and community level substrate utilization (CLSU) fingerprints allow for detailed analyses of soil microbial communities. PLFA and RFLP was, therefore, used in the study to characterize the microbial communities in soil without the need to isolate individual fungi and bacteria. PLFA, RFLP and CLSU have been utilized to assess microbial characteristics of the lysimeter soils with four different sludge wastes for eight consecutive years. Each of these methods was analyzed for a different aspect of soil microbial characteristics. The study would disclose those methods yielded highly reproductive results for each soil and allow distinguishing the soils based on the structures of specific gene- and PLFA-pools more than CLSU fingerprints. PLFA methods, especially, revealed the same relative similarities of the treated soils based on cluster analysis of the biological characteristics. Pig manure compost-treated soil, however, was only the same relative resemblance among the three methods. These results indicated that PLFA easily assessed the biological soil characterization.

**Key words:** RFLP, PLFA, CLSU, Organic waste-treated soil, Bacteria

## 서 언

산업의 발달과 더불어 폐기물의 발생량도 증가하면서 환경에의 영향을 최소화하기 위한 다각적인 접근이 이루어 지고 있다(권, 2003). 이와 더불어 현재 세계적으로 토양이나 수질 오염등의 정화를 위해 화학적인 방법보다는 친환경적인 방법을 선호하고 있으며

더욱이 생물학적 처리, 물리·화학적 처리, 열적 처리로 구분되는 오염물질 처리기술 중 오염지역 규모가 클 경우는 생물학적 처리가 유리하다. 그러나, 생물학적 처리이전 대상토양에 대한 정확한 정보가 필요하며 특히, 미생물의 생태학적 분석은 필수적이다. 이러한 미생물적 해석을 위해 최근에는 분자생물학적인 기법이 많이 시도 되고 있으며 이러한 기법은 재배없이 미생물군을 분석할 수 있는 장점이 있다(Watanabe, 2001). 토양내 서식 미생물은 토양의 종류, 토양의 비옥도, 첨가된 영양원 및 외부환경에 따

접수 : 2008. 10. 14 수리 : 2008. 12. 12

\*연락처 : Phone: +82312900373,

E-mail: gabriel@rda.go.kr

라 매우 다양한 변화를 보인다. 그러나 DGGE/TGGE 등의 최신 기법은 바로 여러 샘플을 동시에 분석하여 계절적 변화나 환경적 동요를 겪은 미생물군의 복잡한 역학관계까지 모니터링 할 수 있다(Muyzer, 1998). DNA를 통한 오염환경에 대한 군집 변동, 분석은 지표미생물의 기능적인 측면도 분석이 가능하며 이러한 연구는 국내에서는 미흡한 편이다. 본 연구는 생화학 적방법 및 유전공학기법을 활용하여 오염 농경지내 미생물의 경시적 변동조사 및 특정 오염지역의 평가 기법을 개발하는 기초 자료로 활용하고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

**공시 토양** 본 연구를 위하여 Table 1과 같이 생활하수오니(MSS), 공간하수오니(ISS), 피혁오니(LS), 주정오니(FS)등 4종류의 폐기물과 대조구로서 3요소구(NPK)를 라이시미터에 ha당 12.5톤, 25톤, 50톤을 7년동안 사용한 연용포장의 토양을 사용하였다(원 등, 2004).

**미생물 군집 분석법 비교** 미생물의 경시적 군집 변동조사를 위한 체계적이고 효율적인 방법을 선별하고자 Phospholipid Fatty Acids (PLFAs), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Community Level Substrate Utilization (CLSU) 등

총 4가지 방법을 사용하였으며, 각각의 방법으로 폐기물 장기연용 토양별 유연관계를 분석하였다. PLFA 방법은 동결 건조한 토양샘플을 2mm체로 친후 Klamer(1998)방법에 준하여 실시하였으며, Widmer(2001) 방법에 의해 토양의 총 DNA를 추출하여 TGGE는 Felske(1998)방법, RFLP는 송 등(1999) 및 Montagne(2002)의 방법에 준하여 DNA fingerprinting에 의해 군집구조를 해석하였다. 또한 CLSU는 Smalla(1998)의 방법에 준하여 채취한 토양 샘플을 100배로 희석하여 BIOLOG GN2 microplate에 200ul씩 접종한 후 Eliza reader로 발색 값을 측정하여 대사적 유사도를 분석하였다. 발색 적정시간을 찾고자 토양샘플 중 돈분처리구(PMC)와 대조구(NPK) 샘플을 시간대별로 측정해본 결과(Fig. 1), 샘플 접종

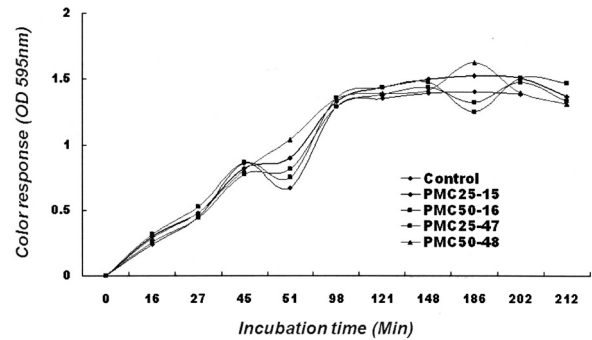


Fig. 1. The color development with incubation. Control : NPK, PMC : Pig Manure.

Table 1. Chemical properties of successive organic waste-treated soil.

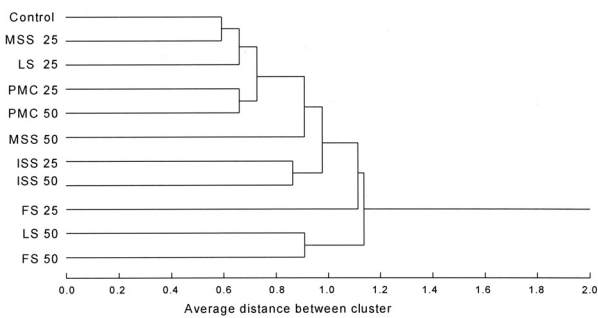
Treatment	OM	T-N	가용성 인산	Exchangeable cations			Heavy metals						
				K	Ca	Mg	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	
Mg ha <sup>-1</sup> Yr <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	----- cmol kg <sup>-1</sup> -----			----- mg kg <sup>-1</sup> , 0.1N HCl ext. -----						
	8	0.6	176	0.14	0.42	0.28	0.9	1.8	26.0	1.1	4.8	3.3	
MSS	12.5	12	1.1	739	0.07	0.64	0.36	0.2	5.5	25.6	0.2	5.0	19.0
	25	21	1.4	1,491	0.09	0.39	0.24	0.5	9.5	28.2	0.2	6.2	18.8
	50	27	2.3	2,256	0.11	0.43	0.27	1.0	14.7	24.4	0.4	6.6	24.9
ISS	12.5	23	1.6	360	0.10	0.31	0.21	6.0	186.8	28.4	4.5	9.9	32.3
	25	30	2.6	567	0.08	0.23	0.16	9.9	246.0	29.5	5.9	12.5	33.1
	50	49	4.1	820	0.08	0.26	0.17	17.6	419.6	13.0	9.4	14.2	44.2
LS	12.5	21	2.3	34	0.05	2.44	1.25	10.5	5.2	54.4	2.0	8.0	15.5
	25	29	4.7	35	0.06	3.28	1.67	20.0	3.5	83.1	1.8	10.2	27.7
	50	49	6.2	41	0.08	4.86	2.47	49.1	3.9	162.9	3.8	12.3	60.1
FS	12.5	22	2.3	408	0.07	0.23	0.15	0.6	5.7	23.2	0.4	3.8	3.9
	25	37	4.6	717	0.11	0.29	0.20	0.1	7.8	15.3	0.2	2.9	2.4
	50	57	8.3	1,057	0.16	0.39	0.28	0.0	13.8	11.0	0.6	1.2	5.0
PMC	12.5	15	1.0	647	0.29	2.17	1.23	0.3	9.4	44.5	0.3	3.6	21.0
	25	23	1.5	1,184	0.45	2.47	1.45	0.2	13.0	61.4	0.4	2.6	47.7
	50	39	3.0	2,139	0.74	3.42	2.08	0.2	16.0	77.1	0.5	1.5	85.5

MSS : Municipal Sewage Sludge-treated Soils, ISS : Industrial Sewage Sludge-treated Soils, LS : Leather Processing Sludge-treated Soils, FS : Alcohol Fermentation Processing Sludge-treated Soils, PMC : Pig Manure

후 약 45분 후에 처리별로 가장 안정된 값을 보여 45분을 측정시간으로 선발하였다. 이렇게 4가지 방법에 의해 주어진 값들은 모두 SAS 통계 프로그램을 이용하여 유연관계를 분석하였다.

### 결과 및 고찰

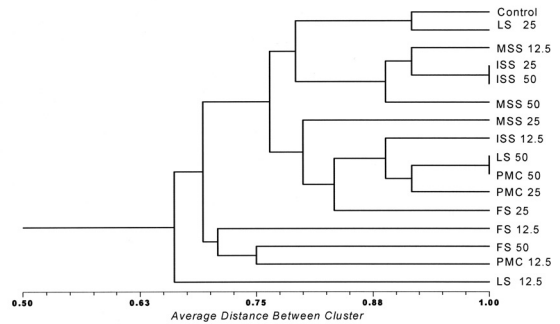
**미생물 군집 분석법 비교 및 선발** 유일 탄소원 이용능(CLSU)의 클러스터 분석을 통하여 폐기물 연용토양의 처리별 생리적 대사 다양성을 비교해 본 결과, 미생물 군집은 3개의 클러스터를 형성하였다. 돈분퇴비 처리구(PMC)와 공단지역 하수 슬러지 처리구(ISS)는 수준별로 같은 클러스터를 형성하였으며 대조구(NPK)와 돈분퇴비 처리구(PMC)는 동일한 클러스터에 포함되었다. 반면에, 피혁오니 처리구(LS)와 주정오니 처리구(FS)는 수준별로 다른 클러스터를 형성하였다(Fig 2).



**Fig. 2. Cluster analysis of the transformed data sets derived from Biolog analysis, MSS : Municipal Sewage Sludge-treated Soils, ISS : Industrial Sewage Sludge-treated Soils, LS : Leather Processing Sludge-treated Soils, FS : Alcohol Fermentation Processing Sludge-treated Soils, PMC : Pig Manure Compost-treated Soils.**

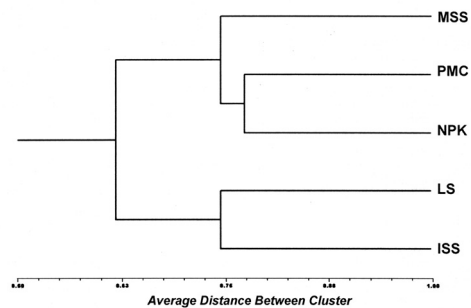
Hae III 제한 효소를 이용한 RFLP 방법에 의해 공시토양의 유전적 유사도를 알아보았다(Fig. 3). 총 4개의 클러스터로 분석되었으나 토양 처리별로 뚜렷한 경향을 볼 수가 없었다. 특히, 피혁오니(LS) 12.5톤 처리구는 유연관계가 가장 멀게 나타났으며 대조구는 돈분퇴비 처리구와 상이한 클러스터에 포함되었다. 일반적으로, RFLP 방법은 미생물 군집분석에 많이 이용되고 있으며 유용성이 입증되었다(Zhou, 2000). 그러나 아직 RFLP 방법은 *Pseudomonas*, 질소고정 박테리아 등 특정 균에 대한 유연관계분석에 이용되었으며((Pace, 1996; Widmer 등, 1998) 전체 미생물상을 분석하기에는 아직 비효율적이라고 생각된다. 또한, 본 실험에서는 1개의 제한효소를 사용하여 뚜렷한 경향성을 찾을 수가 없었다.

또한, 공시 토양으로부터 처리별 genomic DNA를 추출하여 이들의 16s rDNA를 PCR로 증폭하여



**Fig. 3. Cluster analysis of the transformed data sets derived from RFLP analysis, MSS : Municipal Sewage Sludge-treated Soils, ISS : Industrial Sewage Sludge-treated Soils, LS : Leather Processing Sludge-treated Soils, FS : Alcohol Fermentation Processing Sludge-treated Soils, PMC : Pig Manure Compost-treated Soils.**

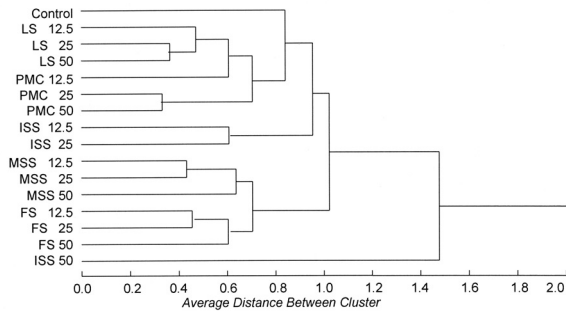
TGGE를 통한 각처리간의 다형성을 비교해 보았다(Fig. 4). 그 결과, 화학비료를 시용한 대조구를 포함한 5처리구의 미생물 군집은 2개의 클러스터를 형성하였다. 즉, 클러스터 1은 생활하수오니 처리구(MSS), 돈분퇴비 처리구(PMC), 대조구(NPK) 토양의 세균 군집이며 클러스터 2는 피혁오니 처리구(LS), 공단지역 하수오니 처리구(ISS) 토양의 세균 군집으로 나누어 졌다. 이 중에서, 돈분퇴비 처리구(PMC)는 대조구(NPK)의 세균군집 구조와 가장 유사하였다.



**Fig. 4. Cluster analysis of the transformed data sets derived from TGGE analysis, MSS : Municipal Sewage Sludge-treated Soils, ISS : Industrial Sewage Sludge-treated Soils, LS : Leather Processing Sludge-treated Soils, PMC : Pig Manure Compost-treated Soils.**

지방산 추출법(PLFA)에 의해 미생물의 군집구조를 조사한 결과(Fig. 5), 3개의 클러스터로 분석되어 졌으며, NPK 처리구와 LS, PMC 처리구가 같은 클러스터로 속했으며 MSS 처리구와 FS 처리구가 같은 클러스터로 형성되었다. 또한 ISS 처리구는 단독으로 클러스터를 형성하여 다른 처리구와 분명한 차이를 보였다. 이상의 결과로, PLFA 방법 등 총 4가지 방법을 사용하여 폐기물 장기 연용토양의 군집구조를 분석한 결과, 모두 비슷한 경향을 보였다. DNA,

PLFA와 CLSU 방법은 토양의 생물학적 특징을 분석하는 데 일반적으로 사용된다(Zelles 등, 1992). 그러나, 토양전체의 미생물 변동상이나 공시 토양의 처리 및 시용 수준을 가장 잘 대변한 방법은 PLFA 방법이었다. 이러한 PLFA 방법은 경시적으로 토양을 평가하고 미생물 군집구조를 해석할 수 있는 신속 정확한 방법이라고 생각한다.



**Fig. 5.** Cluster analysis of the transformed data sets derived from PLFA analysis, MSS : Municipal Sewage Sludge-treated Soils, ISS : Industrial Sewage Sludge-treated Soils, LS : Leather Processing Sludge-treated Soils, FS : Alcohol Fermentation Processing Sludge-treated Soils, PMC : Pig Manure Compost-treated Soils.

## 적 요

폐기물 연용토양의 미생물 군집 분석을 위해 공단지역 하수 슬러지 처리등 16처리(3수준)에 대하여 가장 좋은 방법을 찾고자, RFLP, CLSU, PLFA, TGGE의 4가지 방법을 이용하였으며, 이들 4가지 방법에 대하여 시기별 군집변동 조사를 통한 통계적 비교 분석을 하였다. 그 결과, 미생물의 경시적 군집 변동상 관찰은 PLFAs (Phospholipid Fatty Acids) 방법이 가장 효율적이었으며 RFLP는 많은 종류의 제한효소의 사용이 필요하다. TGGE는 DNA 추출을 통해 비배양학적인 분석에서는 가장 좋은 방법이나 PCR 조건 등 실험 과정에서 토양종류에 따라 민감하게 반응하여 비슷한 조성의 토양분석에 효율적이라고 생각한다.

## 인 용 문 헌

Felske, A., Wolterink, A., Lis, R.V., and Akkermans, A.D.L.. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in drentse a grassland soils (The Netherlands). *Appl. Envir. Microbiol.* 64(3):871-879.

- Montagne, M.G., Michel, F.C. Holden, P.A. and Reddy, C.A. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods.* 49: 255-264.
- Muyzer, G., and Smalla, K. 1998. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology.
- Klamer, K., and Baath, E. 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 27 : 9-20.
- Pace, N.R., 1996. New perspective on the natural microbial world : molecular microbial ecology. *ASM News* 62 :463-470.
- Smalla, K. Wachtendorf, U., Heuer, H., LIU, W.T., and Forney, L. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Envir. Microbiol.* 64(4):1220-1225.
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3): 237-241.
- Widmer, F., Seidler, R.J., Gillevet, P.M., Watrud, L.S., and Di Giovanni, G.D., 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2545-553.
- Widmer, F., Fliebach, A., Laczko, E., Schulze-Aurich, J., and Zeyer, J. 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog-analyses. *Soil Biology & Biochemistry* 33 : 1029-1036.
- Widmer, F., Seidler, R.J., Gillevet, P.M., and Watrud, L.S., 2002. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Envir. Microbiol.* 1998 64: 2545-2553
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T., and Beese, F., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 24: 317-323.
- Zhou, G. Whong, W.Z. Ong, T. and Chen, B. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Molecular and Cellular Probes.* 14(6): 339-348.
- 권순익, 2003. 농촌진흥청 농업과학기술원 농업환경연구.
- 송인근, 김유영, 조홍범, 최영길. 1999. 토양세균 군집의 대사 다양성과 16S rDNA의 제한효소 지문분석에 의한 유전적 다양성의 비교. *한국미생물학회.* 35(1): 72-77.
- 원향연, 권순우, 송재경, 남재작, 장갑열. 2004. 폐기물 연용지의 세균 분포조사. 농촌진흥청 농업과학기술원 농업환경연구.
- 원향연, 권장식, 서장선, 최우영. 1999. 돈분퇴비의 시용이 배추재배지 토양의 미생물상 및 화학성에 미치는 영향. *한국토양비료학회지.* 32:76-83.