

토양 및 퇴적토 환경 시료로부터 DNA 추출하는 방법에 대한 고찰

유근제 · 이재진 · 박준홍*

연세대학교 토목환경공학과

A Review on the Current Methods for Extracting DNA from Soil and Sediment Environmental Samples

Keunje Yoo · Jaejin Lee · Joonhong Park*

School of Civil and Environmental Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

ABSTRACT

In soil and sediment environment, microorganisms play major roles in biochemical cycles of ecological significant elements. Because of its ecological significance, microbial diversity and community structure information are useful as indexes for assessing the quality of subsurface ecological environment and bioremediation. To achieve more accurate assessment, it is requested to gain sufficient yield and purity of DNA extracted from various soil and sediment samples. Although there have been a large number of basic researches regarding soil and sediment DNA extraction methods, little guideline information is given in literature when choosing optimal DNA extraction methods for various purposes such as environmental ecology impact assessment and bioremediation capability evaluation. In this study, we performed a thorough literature review to compare the characteristics of the current DNA extraction methods from soil and sediment samples, and discussed about considerations when selecting and applying DNA extraction methods for environmental impact assessment and bioremediation capability evaluation. This review suggested that one approach is not enough to gain the suitable quantity and yield of DNA for assessing microbial diversity, community structure and population dynamics, and that a careful attention has to be paid for selecting an optimal method for individual environmental purpose.

Keywords : Soil DNA extraction, Direct lysis extraction, Indirect lysis extraction, Soil microorganisms

요 약 문

토양미생물은 토양 및 퇴적토 환경에서 생물학적 물질순환의 중요한 역할을 맡고 있다. 이러한 중요성으로 인해 토양미생물 생태 다양성과 군집구성이 토양 및 퇴적토 생태환경과 자연저감능력을 평가하는 지표로 유용하게 쓰일 수 있다. 보다 정확한 다양성과 군집구조 분석을 위해서는 다양한 토양 및 퇴적토 시료로부터 분석에 필요한 DNA수율과 순도를 확보해야 한다. 지금까지 토양 및 퇴적토에서 DNA추출하는 방법들에 대한 다양한 기초연구가 이루어졌지만, 실제 환경생태영향평가와 분해기능평가에 사용시 DNA추출방법 선정에 대한 지침 및 정보는 매우 부족하다. 이에 본 연구에서는 문헌조사를 통해서 다양한 방법들의 토양 및 퇴적토 내 미생물 DNA 추출 특성을 비교·분석하고, 현재 주로 사용되고 있는 DNA추출방법을 토양 및 퇴적토 환경평가나 오염지하수토양 자연저감능평가에 활용할 경우 고려해야 할 기술적 사항에 대해 고찰하였다. 본 연구를 통해 하나의 특정 추출 방법으로는 미생물다양성, 군집구성 및 개체간 상호작용에 대한 정보를 얻기에는 DNA양과 순도 차원에서 충분하지 않으며, 토양 및 퇴적토 미생물 군집분석의 목적에 따라 적합한 방법의 선택이 매우 중요함을 알 수 있었다.

주제어 : 토양 DNA추출, 직접용해 추출, 간접용해 추출, 토양미생물

1. 서 론

*Corresponding author : parkj@yonsei.ac.kr

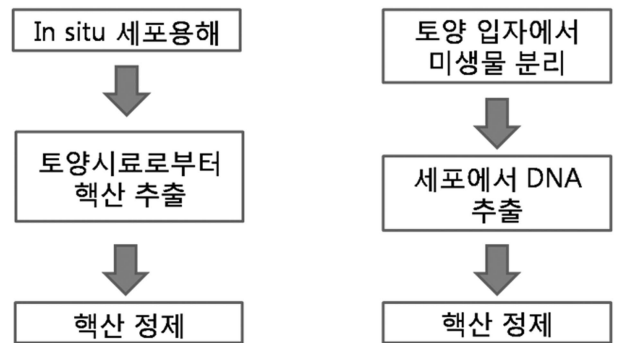
원고접수일 : 2009. 5. 8 심사일 : 2009. 5. 20 게재승인일 : 2009. 6. 24

질의 및 토의 : 2009. 8. 31 까지

토양생태계란 토양이라는 물리적인 기반과 영양분을 의미하는 화학적인 매체에 생물학적인 특성이 서로 얽혀 상호 긴밀한 작용을 주고 받는 살아 숨쉬는 자연을 의미한다(Sylvia et al., 2005). 바로 이러한 살아 있는 자연계의 구성원으로서 토양 및 퇴적물 내에서 고유의 기작을 수행하는 주체를 토양미생물이라 할 수 있다. 토양미생물은 토양 유기물의 1% 보다 적게 차지하고 있음에도 불구하고, 효소학적 반응으로 유기물과 결합된 무기물을 분해하는 등 토양 및 퇴적물 내 생화학적 물질대사에 관여하고 있다. 토양미생물은 물질의 분해·생산 등을 통한 환경정화 및 양분 순환의 기능과 양분 저장고로서 그 중요성이 매우 크기 때문에 토양 및 퇴적토 환경을 평가하고 관리하는 지표로서 현재 널리 이용되고 있다(서장선 외, 2000).

현재 미생물 다양성에 대한 연구는 주로 실험실에서 세포를 포함한 미생물을 배양하고 분리하는데 초점을 맞추어 왔다(Martin-Laurent et al., 2001). 실제 실험실 배양은 토양 내부와 토양 표면 입자들로부터 세포를 분리해내기 위한 토양의 분산, 원심분리 기반의 유기물 입자와 토양으로부터의 미생물 세포 분리 등으로 구성된다. 실험실 배양 방법은 특정한 기질을 이용하여 신진대사를 하거나 유독한 화학물질을 분해하는 능력을 알아보기 위해 대상 균주를 선택적으로 배양할 때는 유효한 방법이다(Lindahl and Bakken, 1995). 그러나 주어진 실험실 환경에서 분리배양되는 미생물 개체 수는 제한되어 있다. 최근 미생물 생태에 대한 분자생물학적 접근방법은 다양한 환경에 존재하는 미생물 중 1% 미만의 개체만이 실험실 조건에서 배양된다는 것을 밝혀냈다(Amann et al., 1995). 복잡한 환경에서의 미생물 다양성에 대한 분자적 분석은 DNA/DNA hybridization, 재조합 kinetics 연구 그리고 주로 16S rDNA 증폭에 의존한다(Torsvik et al., 1990; Von Wintzingerode et al., 1997). 이런 방법들은 환경 시료에서 흔히 발견되는 수많은 방해 물질들로부터 DNA를 추출할 수 있어야 하며, 대상 미생물 균집 전체를 대표할 수 있는 DNA 획득을 전제로 한다(Wilson et al., 1997). 이를 위해서는 DNA 추출 과정에서 고려해야 할 사항들이 매우 복잡하다.

현재까지는 토양과 퇴적토에서 DNA를 추출해서 미생물 균집과 기능을 분석하기 위한 최적화되고 표준화된 방법이 제안되어 있지 않다. 토양 및 퇴적토 내 미생물 균집 분석에 사용되는 국내 연구들을 보면, 몇몇 실험실 기반의 방법들이나 상용화된 kit 방법들을 주로 사용하고 있는 것이 현실이다. 이러한 상황은 토양 및 퇴적토 환경에서 미생물 균집 DNA를 추출하는 경우에 어느 방법을 선



<직접용해 추출법 >

<간접용해 추출법 >

Fig. 1. Schemes of two different approaches to nucleic acid extraction from soil sample.

정해야 하는지에 대한 지침이나 정보가 문헌에 그다지 충분하지가 않기 때문이다. 이에 본 연구에서는 토양 및 퇴적토 환경 내 미생물 생태와 기능에 대한 연구를 위해서 문헌에서 사용되고 있는 다양한 DNA 추출 방법에 대해서 문헌조사를 하고 방법들의 특성을 분석하여서 토양과 학기술자들이 토양 미생물 DNA 추출시 방법을 선정하거나 응용시 고려해야 할 점에 대해서 고찰하였다.

토양 및 퇴적토 시료로부터 핵산을 추출하는 방법은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 크게 2가지로 분류된다. 첫 번째는 직접용해추출법으로서 in situ로 세포를 용해하고 토양 시료로부터 핵산을 직접 추출한 후, 핵산을 정제하는 방식이다(Ogram et al., 1987). 두 번째는 간접용해추출법으로, 먼저 토양 입자에서 미생물 세포를 분리하고 용해한 후 핵산을 추출하고, 정제하는 방법이다(Holben et al., 1988; Courtois et al., 2001). 두 가지 추출방법들은 DNA의 수율, 목적에 맞는 DNA의 순도 등에 각각 장단점을 갖고 있다(Roose-Amsaleg et al., 2001). 아래에서는 토양 및 퇴적토 내 미생물 생태를 대표할 수 있는 효율적인 DNA 추출방법들을 제안하기 위해 직접용해추출법과 간접용해추출법에 대해 비교·분석 하였고, 문헌을 통해 각 방법들이 주로 사용되는 분야의 특성에 대해 구체적으로 고찰하였다.

2. 직접 용해 추출법

직접 in situ 세포 용해 추출 방법은 지난 10년 동안 널리 사용되어 왔다. 모든 미생물이 완전하게 in situ 용해된다고 가정하는 이 방법은 일반적으로 적당한 시간 내에 최고의 DNA 수율을 제공한다. Ogram et al.(1987)의

Table 1. Characteristics of cell lysis methods

Cell Lysis method	Class	Characteristics
물리적	동결-해빙 (freezing-thawing) 동결-비등 (freezing-boiling)	• 가장 흔하게 사용되는 물리적 붕괴방법. • 가장 흔하게 사용되는 물리적 붕괴방법.
	bead를 이용한 분쇄 균질화 (bead-mill homogenization) Bead-beating	• 가장 흔하게 사용되는 물리적 붕괴방법. • 더 오래, 더 빠른 속도로 beating 하고 추출 용액 (extraction buffer)의 양을 줄이면 DNA 수율이 증가하지만, DNA가 전단되는 손실이 있음
화학적	세포막의 소수성 물질들을 용해시키는 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 같은 세정제	• 가장 흔하게 사용되는 화학적 용해방법. • 세정제는 종종 열처리와 조합되어 사용되거나 EDTA, Chelex 100, 다양한 Tris buffer나 sodium phosphate buffer 등의 킬레이트 시약 (chelating agent) 과 조합되어 사용됨 • 몇몇 연구에서 EDTA 농도를 증가시킨 결과 추출제와 용해제가 강화되어 수율을 높였으나, 분리된 핵산의 순도는 낮아졌음을 보임
	Cetyltrimethyl-ammonium boromide (CTAB) Polyvinylpyrrolidone (PVPP)	• 부식질의 물질(humic compound)을 부분적으로 제거. • 변형된 단백질이나 다당류, 세포 파편과 불용성의 결합물을 형성함 • 부식질의 물질(humic compound)을 부분적으로 제거. • CTAB에 비하여 DNA 손실을 초래함 • PVPP는 세포 용해에 있어 비효율적이지만, 핵산 정제 단계에서 spin column 을 사용할 때는 효과적임
효소이용	리소자임 처리 (lysozyme treatment) achromopeptidase Proteinase K	• 효소를 이용한 붕괴방법에서 가장 일반적인 방법. • 리소자임 가수분해로 DNA 순도를 증가시킬 수 있음. • 처리가 복잡한 Gram-positive 세균의 용해를 증진시키는데 사용 • 방해가 되는 단백질을 제거

절차에서 유래된 이 기술은 2가지 중요한 단계로 요약된다(Fig. 1). 첫 번째 단계는 미생물 세포벽의 붕괴에서 모든 세포내의 핵산이 방출되도록 하는 것이다. 이 단계는 용해에 대한 세포벽의 민감도, 미세 구조 내 세포의 위치, 그리고 토양 입자간의 상호관계로부터 영향을 받는다. 두 번째 단계에서는 핵산을 토양 입자들로부터 분리하고, 이렇게 추출된 핵산을 분석 목적 별 분자생물학적 반응을 위해서 정제하는 과정이다.

2.1. 세포 용해

현재 세포 용해(또는 막붕괴)방법은 Table 1과 같이 (i) 물리적 붕괴, (ii) 화학적 붕괴, 그리고 (iii) 효소를 이용한 붕괴, 세 가지의 방식이 독립적으로 또는 조합되어 사용되고 있다(Hurt et al., 2001). 토양구조를 파괴하는 물리적 처리는 토양 미세입자 내 깊게 자리잡고 있는 세포를 포함한 전체 세포 군집에 대해 최대 접근성을 갖는 경향이 있다. 가장 흔히 사용되는 물리적 붕괴 방법은 동결-해빙(freezing-thawing), 동결-비등(freezing-boiling) 또는 bead를 이용한 분쇄 균질화(bead-mill homogenization)이다(Steffan et al., 1988; More et al., 1994; Degrange et al., 1995; Miller et al., 1999; Maarit Niemi et al., 2001; Miller et al., 2001). Mortar mill

grinding, 액화질소분쇄, 초음파, 마이크로파 열충격과 같은 다른 물리적인 방법들도 보고된 바 있다(Picard et al., 1992; Tebbe et al., 1993; Zhou et al., 1996; Porteous et al., 1997; Orsini et al., 2001). Frostegard et al.(1999)은 분쇄되기 전의 토양의 건조과정이 용해 효율을 향상시켰음을 관찰하였다. 일반적으로 물리적 방법들은 식물성 형태(vegetative form), 작은 세포와 생식세포의 붕괴에 효율성을 보여 왔지만 종종 심각하게 DNA를 절단하는 결과를 초래하기도 한다(Liesack et al., 1991; Simonet et al., 1991; Miller et al., 1999). 심하게 DNA가 절단된 경우에는 고분자 유전체 DNA가 필요한 분석(Fosmid나 Cosmid와 같은 metagenomic cloning에서 고분자 유전체 DNA가 요구되거나 operon의 발현이 요구되는 분자생물학적 분석과정)에는 사용이 제한되는 문제가 있다.

화학적 용해 방법은 독립적으로 사용되기도 하고 물리적 방법들과 조합되어 사용되기도 한다. 가장 흔한 방법은 세포막의 소수성 물질들을 용해시키는 sodium dodecyl sulfate(SDS)와 같은 세정제를 이용하는 것이다. 세정제들의 일반적인 특징들은 Table 1에 기재되었다. 한 비교연구에서 Chelex 100을 이용한 처리가 DNA 수율을 낮추는 효과를 낸다는 것을 확인하였다(Miller et al., 1999).

Table 2. Nucleic acid purification methods

Purification method	Characteristics
• 아가로스 젤 전기영동 (agarose gel electrophoresis)	• DNA 세포들은 전기용리를 사용한 젤로부터 얻어짐 • PVP(Polyvinylpyrrolidone)를 사용한 젤 전기영동이 부식질 산으로부터 DNA분리를 촉진함
• Sephadex G200과 G150, Sepharose 2B, 4B, 6B • Biogel P100과 P200	• Sepharose 수지는 부식질 산으로부터 DNA를 더 잘 분리함 • Microspin Sephacryl S-300과 S-400 columns (Pharmacia Biotech)은 초기오염 DNA 추출물을 정제하는데 사용
• 기타 (Promega, Amicon, Quigen 등)	• 초기에 추출된 부식질 산의 97%가 이온 교환 크로마토그래피 (ion-exchange chromatography)를 통해 제거가 가능함

세정제의 핵산추출의 부정적 효과를 최소화하기 위해서 다양한 방법들이 제시되어 왔다. Selenska 와Klingmüller (1991)가 보고한 신속한 DNA추출 방법은 단지 70에서 SDS-sodium phosphate buffer 내의 토양 현탁액을 부드럽게 흔들어주는 것에 기반을 두고 있다. 이 “완속교반”에 의해서 평균 약 25 kb의 상당히 크기가 큰 핵산이 얻어진다. 핵산 추출에 순기능이 있는 것으로Cetyltrimethylammonium boromide(CTAB)와 polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)의 첨가 또한 보고되었다(Von Wintzingerode et al., 1997; Kresk et al., 1999; Nalin et al., 1999). 다른 변형 물질인 guanidine isothiocyanate는 토양으로부터 mRNA를 추출하는데 사용되어 왔지만 토양으로부터의 DNA 추출에 효용성이 있는지는 아직 밝혀지지 않았다(Tsai et al., 1991; Miller et al., 1999; Orsini et al., 2001; Marrit Niemi et al., 2001).

효소를 이용한 용해 방법들도 발전되어왔다(Bruce et al., 1992). 리소자임 처리(lysozyme treatment)는 세포 표면을 용해하는 가장 일반적인 방법이다(Rochelle et al., 1992; Tebbe et al., 1993). 그 밖에 세포벽 용해가 쉽지 않은 Gram-positive 세균의 용해를 위해서 achromopeptidase를 사용하기도 하고, 분자생물학적 분석에 방해가 될 수 있는 단백질의 제거를 위해서 proteinase K를 범용적으로 사용한다.(Table 1) 효소를 이용하는 방법은 물리적, 화학적 용해방법에 비해서 순도 높은 DNA 추출이 가능하나, 그 과정이 시간이 많이 걸리고 알코올 정제 과정이 반복되어서 최종 DNA 수율이 감소하는 단점이 있다.

2.2. 핵산 추출과 정제

토양 구성요소에서 핵산을 분리하고 정제하는 몇 가지 방법들이 연구되어 왔다(Zhou et al., 1996). 주요 토양 구성요소인 부식질 산(humic acid)은 DNA의 restriction enzyme digestion과 polymerase chain reaction(PCR)을

방해하고 hybridization signal을 낮춤으로써 정량적인 membrane hybridization결과를 변형시킨다(Tebbe et al., 1993; Alm et al., 2000). 부식질 산내의 phenolic group은 amide에 붙거나 또는 산화되어 DNA와 공유결합을 통해서 퀴논(quinone)을 형성하고, 이 반응성 물질은 생물학적 분자들을 변성시킨다(Young et al., 1993).

세포 용해 후에 용출된 DNA를 정제하는 과정은 대부분의 연구에서 ethanol, isopropanol 또는 polyethylene glycol을 이용한 침전에 이온 유기용매 추출(phenol이나 chloroform 이용)로부터 얻어진다(Steffan et al., 1988). 이러한 초기 추출물(crude extracts)은 DNA의 물리, 화학적 성질에 기반한 다양한 방법들로 처리 되어 왔다(Ogram et al., 1987). 핵산이 붙은 hydroxyapatite column로부터 성공적으로 DNA가 추출되었고, 토양과 퇴적물 시료로부터 DNA와 rRNA 가 모두 추출되었다(Steffan et al., 1988; Purdy et al., 1996). Cesium chloride(CsCl) density gradient centrifugation 방법 또한 정제된 핵산의 추가적인 효소 제한 처리로 인해 가능하였다(Ogram et al., 1987; Porteous et al., 1991). 반면, Steffan et al. (1988)은 CsCl gradient centrifugation과 hydroxyapatite chromatography를 이용한 대량의 정제에서조차 DNA 손실이 발생하였고, 부식질 산을 모두 제거하지는 못했음을 보인 바 있다. 불균질한 부식질 산이 CsCl gradient에 골고루 분포하기 때문에, 약간의 부식질 물질들이 DNA band와 함께 추출 될 수 있고, 이는 잔류 부식질 산을 회색하기 위해 추가적인 CsCl gradient centrifugation을 필요로 한다. 그 밖의 시간 소모가 적고 많은 수의 시료 처리에 적합한 방법들과 그 특징들을 Table 2에 정리 하였다(Harry et al., 2000). 생태적, 분자적 PCR 기반의 연구들은 부식질 산과 다른 오염물질들을 제거하기 위해 대량의 정제된 핵산을 필요로 한다. 대량의 정제 동안 발생하는 DNA 손실은 수가 적은 DNA 염기서열의 검출을 어렵도록 만든다.

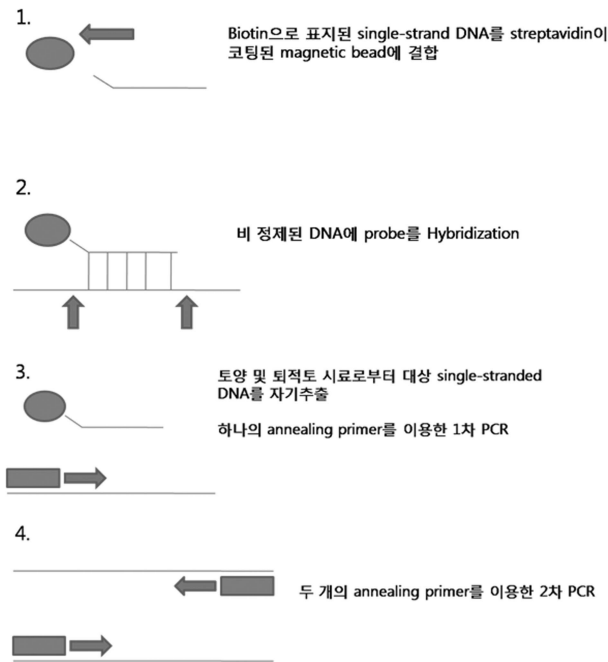


Fig. 2. MCH (Magnetic Capture Hybridization)-PCR Procedure (Jacobsen., 1995).

Jacobsen et al.(1995)은 변형된 magnetic capture hybridization(MCH) 방법을 이용하여 PCR을 방해하는 부식질 산의 영향을 성공적으로 제거하였다. Fig 2와 같이 MCH는 전체 DNA와 부식질 산을 포함한 방해 요소들로부터 특정 DNA만을 분리한다. 비오틴(Biotin)이 표지된 특정 단일 나선 DNA(single-stranded DNA)는 probe의 기능을 하여서 토양 시료의 불특정 핵산들과 결합하는데 사용된다. 자기 추출(magnetic extraction)과 세척을 통한 특정 DNA-DNA 결합물의 회수 후, PCR을 통한 증폭이 수행될 수 있다. Chandler et al.(2000)은 이와 유사한 방법으로 특정부위 대상 결합 유도체로서 PNA(peptide nucleic acids) clamp과 저중합체(oligomer)를 이용하여 affinity magnetic capture를 수행하였다. 이러한 affinity capture 방법은 특히 적은 양의 토양 시료나 적은 생물량을 가진 토양 시료에서 특정 DNA 염기서열을 대상으로 할 때 매우 효과적이다.

토양 및 퇴적토 환경 내 미생물 생태환경을 대표할 수 있는 유전체 핵산을 확보하기 위해서는 모든 미생물의 유전체 핵산은 다양한 토양 구성 요소로부터 고르게 추출되어야 한다. 만약 일부 미생물의 유전체 핵산 추출이 다른 미생물 개체보다 수월하다고 한다면, 추출된 전체 DNA 분석을 통해서 얻어지는 미생물 군집 정보는 엄밀한 의미에서 현장의 미생물 생태를 대표한다고 할 수 없을 것이다. 이를 위해서 토양교질(soil colloids)에 강하게

흡착된 미생물이나 토양 입자의 미세 공극 내에 위치한 세포들로부터 DNA가 효과적으로 추출되어야 한다 (Ranjard et al., 1998).

3. 간접 용해 추출법

미생물 추출 후에 DNA를 용해하고 추출하는 간접 용해 추출법(Fig. 1)은 Faegri et al.(1977) 그리고 Torsvik and Goksoyr(1978) 에 의해 보고되었다. 직접용해추출법에 비해서 간접용해추출법은 미생물이 토양 및 퇴적토에서 분리되는 정도에 민감하다. Hattori(1988)는 배양 가능한 Gram-positive 세포들이 토양의 거대 공극 사이에 더 많이 존재하고, Gram-positive 세포들은 미세 공극에서 우점종을 차지함을 밝혔다. 미생물의 종류 별로 발생하는 추출 차이가 군집분석시 정량적인 오류를 가져올 수도 있다. 반면 직접용해추출법의 경우에는 죽은 세포의 DNA와 살아있는 미생물의 DNA를 분별할 수 없다. 하지만 간접용해추출법은 미생물 내의 DNA를 추출하므로 죽은 세포의 DNA를 분석하는 오류를 극복할 수 있다. 또한 간접용해추출법은 미생물내의 온전한 유전체 DNA에서 추출을 시작할 수 있으므로 직접용해추출법에 비해서 크기가 큰 미생물 유전체 DNA를 추출할 필요가 있을 경우에 적합한 방법이다.

간접용해추출법은 토양 입자의 분산, 퇴적 속도, 부력 밀도 또는 두 가지 모두에 따른 원심분리를 이용한 토양 입자로부터의 세포들의 분리, 추출된 세포들의 용해 그리고 DNA 정제의 순차적 단계에 기초를 두고 있다 (Bakken et al., 1995).

3.1. 토양 분산 방법

토양 입자 내 미생물의 위치와 토양 입자에 부착된 미생물들로 인해, 직접 용해 추출 방식에 있어 물리학적 또는 화학적 방법에 의한 토양 시료의 분산은 중요한 단계이다. 현재 토양을 분산시키는 방법에는 혼합분쇄를 사용하는 방법이 널리 사용되고 있고, 초음파 분쇄와 진동을 이용한 분쇄, 그리고 회전분쇄와 같은 다른 방법들도 사용되고 있다(Faegri et al., 1977; Ramsay et al., 1984; Turpin et al., 1993; Lindahl et al., 1995; Bakken et al., 1995). 이러한 방법들을 비교해 보면, 혼합분쇄와 회전분쇄가 각각 많은 양의 토양 시료와 적은 양의 토양 시료 분산에 가장 효율적인 방법이라 판단된다(Lindahl et al., 1995).

화학적 분산은 기계적인 방법과 종종 함께 사용된다

(Lindahl et al., 1995). 양이온 교환 수지(Chelex 100)은 토양 분산에 효과적임이 증명되었으나, Bakken(1995)은 토양 분산에 있어 증류수와 hexametaphosphate 간의 큰 차이점을 발견하지 못했다(Bakken et al., 1985; Jacobsen et al., 1992). 따라서 양이온 교환수지(Chelex 100)가 아닌 다른 화학 물질들을 사용하는 방법들이 제안되었다. 미생물의 리포다당류(lipopolysaccharides)와 상호작용을 일으키는 세정제들(sodium cholate와 sodium deoxycholate), 소수성 물질을 용해시키는 polyethylene glycol(PEG)와 SDS, 부식질 산을 제거하는 PVPP 등이 대체 화학 물질로써 사용되어 왔다. 그러나 화학적 물질들은 부작용을 일으킬 수 있다(McDonald et al., 1986; Steffan et al., 1988). 예를 들어, SDS와 Chelex 화학 물질이 혼합되어 사용될 때, 세포의 adenosine triphosphate의 수치에 따라 토양 미생물에 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Bakken et al., 1995).

3.2. 원심분리 기반의 세포 분리

원심분리 속도에 따른 토양 입자의 미생물 분리는 Faegri(1977)에 의해 처음으로 밝혀졌다. 이 방법에는 저속원심분리와 고속원심분리가 있다. 저속원심분리는 세포의 Pelleting과 Nuclei, Chloroplast등의 거대 세포 구성성분의 분리에 이용된다. 일반적으로 6,000 rpm(6,000×g) 이하의 속도에서 2~15분 정도 원심분리를 하며, 주로 세포나 핵 등과 같이 쉽게 침전되는 시료의 원심분리에 이용된다. 하지만 속도와 온도의 정밀한 조절이 어려운 단점이 있다. 토양 및 퇴적토 내 미생물 시료의 경우 보통 3,000 rpm 이상에서 15~20분 정도 원심분리 하여 세포를 분리한다.

Holben et al.(1988)은 토양 내 미생물 시료에서 15분 동안 저속 원심분리(1000×g) 하여 fungal biomass와 soil debris를 침전시키고, 상등액을 20분 동안 고속 원심분리(23,000×g)하여 세포를 분리하였다. 이 연구진은 저속 원심분리 후 상등액을 고속 원심분리 한 것을 1 round로 하여 실험하여 각 round에서 토양에 존재하는 전체 세포 중 약 10%를 얻을 수 있다고 보고 하였다. 이 연구진들에 의하면, 한 round 후에 얻어지는 토양 세포들은 여러 round를 거치면서 전체 세포 군집을 대표할 수 있을 만큼 세포를 분리할 수 있다고 한다. 하지만 세포의 회수량을 고려해 볼 때 위 연구진의 방법은 충분한 검토가 필요하다.

저속 원심분리로부터 얻어지는 상등액에는 비세포적 물질이나 부식질 산과 같은 방해 물질들이 포함될 수 있다.

Jacobsen(1992)은 양이온교환수지방법(Cation-Exchange Resin Method)으로 몇몇 토양 시료의 세포 분리 시 CaCl_2 (0.1, 1, or 10 mM)를 이용한 세포 파편과 점토(clay) 입자가 응집되어 세포 회수량을 상당히 감소되는 문제점을 발견 하였다. 이러한 단점을 보완하기 위해 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation)에 기반을 둔 고속 원심분리 방법이 세포들의 부력 밀도를 이용하여 분리하기 위해 개발되었다(Bakken et al., 1985).

고속 원심분리 방법은 보통 10,000-25,000 rpm(60,000×g)으로 밀도기울기 분리에 이용할 수 있으며 주로 세포, 핵, 세포내 소기관 등의 분리에 이용된다. 일반적으로 순도가 높은 plasmic DNA를 얻기 위해서는, CsCl density gradient와 고속 원심분리를 이용하는 방법이 오래 전부터 이용되었다. 그러나 이런 방법은 40시간 이상의 고속 원심분리에 의해서만 가능하였다. 초고속 원심분리기의 개발로 원심분리 시간이 16시간 정도로 단축되기는 했으나 비교적 고가인 CsCl과 또한 초고속 원심분리기의 구매나 유지비용은 일반 연구자에게는 상당한 부담이 되고 있다(이영재 외 1998). 1990년대에 들어 chromatography 법을 이용한 획기적인 방법이 개발되어 CsCl과 고속 원심분리를 이용한 방법을 대체하였으며, 이런 chromatography법을 이용한 DNA분리법은 CsCl과 초고속 원심분리를 이용한 DNA 분리법에 비해 조금도 손색이 없는 순수한 DNA를 분리할 수 있고 3~4시간 내에 그 처리가 완료될 수 있다는 큰 장점을 갖고 있어서 현재 거의 대부분의 연구자들은 이런 kit를 사용하고 있다. 그러나 이런 kit는 최상의 조건에서 분리할 수 있는 DNA의 양이 500 µg 밖에 되지 않는다는 결점을 갖고 있으며, 분자생물학 및 토양 및 퇴적토의 연구에 있어서 이보다 많은 양의 DNA가 필요할 때가 있다.

DNA의 순도와 수율이 높은 상태로 토양 및 퇴적토에서 세포를 분리 하기 위해 Percoll, metrizamide, Ficoll 400, Nycodenz, stractan과 같은 각종 gradient material을 이용한 방법, 세포가 플라스틱 또는 유리표면에 부착하는 정도의 차이를 이용한 방법, 그리고 효소를 이용하여 불필요한 세포만을 제거하는 방법 등이 소개 되었다(Alpini et al., 1994). 그러나 이상의 방법들은 아직까지도 분리하고자 하는 세포의 순도와 수율에 있어서 만족스럽지 못한 경우가 많으며, 몇몇 방법들은 높은 순도에도 불구하고 그 과정이 복잡하고 많은 시간이 요구되며, 따라서 세포 수율이 낮아지는 문제점이 발생된다. 현재까지 원심분리에서 세포를 분리할 때 어느 방법을 선정할지는 목적에 따라 적용 방법이 다르고, 지침이나 문헌에 정보

Table 3. Comparison of “direct” and “indirect” extraction methods

Method of extraction	Application	Advantage	Drawback
Direct extraction	<ul style="list-style-type: none"> • DNA소모가 많은 실험시 • 다량의 핵산이 필요할 때 • 통계적으로 의미있는 미생물들의 검출시 • 활동시료 전체 다양성을 대표할 수 있는 샘플링이 수반되어야 할 경우 	<ul style="list-style-type: none"> • 대상 군집의 미생물DNA를 거의 추출할 수 있음 • 덜 노동 집약적임 • 더 높은 핵산 수율 • DNA 회수율이 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • 핵산 추출의 결과물은 대개 전단 변형이 일어남 • 부식질 산에 의해 오염됨 • 추출물은 종종 알 수 없는 양의 체외 세포 및 진핵 생물의 DNA를 포함함
Indirect extraction	<ul style="list-style-type: none"> • 원핵생물 군집만을 대상 • 고순도의 DNA가 필요할 경우 (방해물질에 민감한 실험들을 수행할시) • 분자량이 큰 DNA 회수가 필요할 경우 	<ul style="list-style-type: none"> • 고순도의 DNA를 얻을 수 있음 • 분자량이 큰 DNA 회수가 쉬움 	<ul style="list-style-type: none"> • 시간소모가 큼 • 핵산 수율이 낮음 • 노동 집약적임

가 충분하지 않기 때문에 세밀한 검토를 필요로 한다.

3.3. 핵산 분리와 정제

토양미생물 DNA는 Table 1에서 언급된 물리적, 화학적, 효소적 방식들을 통해 정제된 세포들로부터 추출할 수 있다. Cesium chloride-ethidium bromide equilibrium density centrifugation는 커다란 크기(최소 48 kb)의 순수한 DNA를 성공적으로 회수하였다(Tiedje et al., 1988; Jacobsen et al., 1992; Courtois et al., 2003). Torsvik (1990)은 세포의 용해제가 hydroxyapatite column을 통과함으로써 정제되는 방법을 개발하였다. 고농도의 요소(urea)는 DNA와 부식질 산(humic acid) 사이의 수소결합을 떨어지게 하는데 사용되었다. Steffan(1988)등은 PVPP에 의한 부식질 산(humic acid)의 제거가 DNA 순도를 크게 향상 시키지만, DNA의 회수를 약간 떨어뜨리는 것을 발견하였다(Steffan et al., 1988). CsCl 밀도 원심분리(density centrifugation)과 hydroxyapatite column chromatographic purification은 spectrophotometer의 A_{260/280} 비율과 A_{260/230} 비율을 통해 측정되는 DNA 순도를 높여주지만 두 경우 모두 DNA 추출량 차원에서는 손실을 일으킨다(Steffan et al., 1988).

부드러운 세포 용해를 수행하기 전의 agarose gel electrophoresis는 기계적인 전단에 한계가 있는 수백 kb의 DNA들을 회수할 수 있다. 이 방식은 몇몇 미생물(*Methanosarcina thermophila*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*)의 큰 DNA들을 포함하고 있는 BAC clone library를 수립하는데 사용되었다(Brosch et al., 1998; Dewar et al., 1998; Diaz-Perez et al., 1997; Rondon et al., 1999).

4. 토의 및 결론

몇 가지 추출 방법들에 대한 비교 연구에서, 직접용해 추출방법이 대상 군집 미생물의 DNA를 대부분 추출할 수 있고, 덜 노동 집약적이며, 더 높은 핵산 수율을 낸다고 알려져 왔다(Table 3). 직접용해추출방법은 DNA 소모가 많은 실험에 다량의 핵산이 필요할 때, 환경영향평가와 같이 통계적으로 의미 있는 미생물들의 검출시, 그리고 환경 시료의 전체 다양성과 군집구성을 대표할 수 있는 샘플링이 수반되어야 하는 경우에 사용된다.

하지만 직접추출법을 이용해서 미생물 개체간의 상호작용 특히 기능적인 정보 획득에는 다소 부적절할 수도 있다. Leff et al.(1993)은 Ogram et al.(1987)이 사용했던 bead-beating-SDS 방법이 가장 높은 DNA 수율을 내지만, Tsai and Olson(1991)은 부드러운 동결-해빙 리조자임(gentle freezing-thawing lysozyme) 방법이 위의 방법과 비교하여 DNA 전단이 증가한다는 결과를 설명 하였다. 이와 같이 핵산 추출의 결과물은 대개 전단 변형이 일어나고 부식질 산(humic acid)에 의해 오염된다. 게다가, 추출물은 종종 알 수 없는 양의 체외세포 및 진핵생물의 DNA를 포함한다. 이러한 직접용해추출방법의 단점을 보완하기 위해서 낮은 DNA 수율을 내지만 DNA 전단 정도가 적어 가장 높은 DNA 순도를 보이는 간접용해추출 방법이 사용되고 있다(Jacobsen and Rasmussen, 1992). 간접용해추출방법들은 원핵생물 군집만을 대상으로 하거나, 자연저감평가와 같이 방해물질에 민감한 고순도의 DNA가 필요한 실험들 그리고 분자량이 큰 DNA 회수가 필요할 때 사용될 수 있다. 하지만 시간소모가 크기 때문에 노동 집약적이며 핵산 수율이 낮은 단점이 있다.

미생물 군집 구성과 기능에 대한 정보 획득이라는 차원에서 현재까지 사용되고 있는 직접과 간접용해추출방법이

얼마만의 차이를 제공하는지에 대한 과학적 연구들이 수행되어 왔다. Steffan et al.(1988)은 회수된 DNA의 제한 효소 처리(restriction endonuclease digestion)에 필요한 순도가 사용되는 제한 효소에 따라 달라짐을 보였다. CsCl 정제 후 *PvuII*는 추가적인 hydroxyapatite 정제를 필요로 하지 않은 반면, *EcoRI*을 이용한 대상 DNA의 제한 효소 처리는 대량의 CsCl-hydroxyapatite 정제를 통한 세포 분류 방법을 이용하여 DNA를 회수하였을 때만 관찰되었다. 두 추출 방법 모두 *SaII*을 이용한 제한 효소 처리에는 실패하였다. 추출 방법들 간의 차이를 보기 위해 몇몇 저자들은 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 사용하였다(Heuer et al., 1997; Krsek et al., 1999; Maarit Niemi et al., 2001). Krsek et al.(1999)은 DGGE band의 강도가 추출 방법에 따라 달라지는 것을 알아 내었다. 또한, 토양미생물의 다양성에 대한 ribosomal intergenic spacer analysis(RISA)를 통해 세포 군집의 존재 정도와 우점종이 추출 방법에 의해 영향을 받는다는 점이 밝혀졌다(Martin-Laurent et al., 2001). 이와 같이 연구자에 따라 다소 차이가 있지만 직접과 간접 두 추출방법이 미생물 군집분석에 영향을 미친다는 것은 과학적으로 입증 되었다. 따라서 미생물 군집분석의 구체적인 목적에 따라서 적합한 추출방법을 선택하는 것이 필요하다고 결론을 내릴 수 있을 것이다. 하지만 DNA추출 방법의 영향에 대한 현재의 지식이 부족하므로 좀 더 체계적인 실험평가를 통해서 DNA 추출 방법이 미생물 군집분석에 미치는 영향에 대한 추가적 연구가 필요하다는 결론도 본 연구의 결과를 토대로 얻을 수 있었다.

사 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)”으로 지원받은 과제입니다(051-081-031).

참 고 문 헌

서장선, 김상효, 엄명호, 2000, 토양미생물 다양성과 Biomass에 의한 토양건전성 평가, 한국유기농업, 2(7)135-148.
이영재, 한인숙, 1998, Superscale Plasmid DNA Preparation Using Wizard Plus Maxipreps Kit, *MEDLIS*, 17, 136-140.
Alm, E.W., Zheng, D., and Raskin, L., 2000, The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4547-4554.

Alpini, G., Phillips, J.O., Vroman, B., and Larusso, N.F., 1994, Recent advances in the isolation of liver cells, *Hepatology*, 20, 494-514.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H., 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.

Bakkern, L.R., 1985, Separation and purification of bacteria from soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1482-1487.

Bakken, L.R. and Lindahl, V., 1995, Recovery of bacterial cells from soil, *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 9-27.

Brosch, R., Gordon, S.V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B.G., and Cole, S.T., 1998, Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing and comparative genomics, *Infect. Immun.*, 66, 2221-2229.

Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P., and Ritchie, D.A., 1992, Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3413-3416.

Burgmann, H., Pesaro, M., Widmer, F., and Zeyer, J., 2001, A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil, *J. Microbiol. Methods*, 45, 7-20.

Chandler, D.P., Stults, J.R., Cebula, S., Schuck, B.L., Weaver, D. W., Anderson, K.K., Egholm, M., and Brockman, F.J., 2000, Affinity purification of DNA and RNA from environmental samples with peptide nucleic acid clamps, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3438-3445.

Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeanin, P., and Simonet, P., 2001, Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation, *Environ. Microbiol.*, 3, 431-439.

Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., August, P.R., Nalin, R., Guerineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., and Pernodet, J.L., 2003, Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 49-55.

Curtis, T.P., Sloan, W.T., and Scannell, J.W., 2002, Estimating prokaryotic diversity and its limits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 10494-10499.

Diaz-Perez, S.V., Alatrisme-Mondragon, F., Hernandez, R., Birren, B., and Gunsalus, R.P., 1997, Bacterial artificial chromosome (BAC) library as a tool for physical mapping of the archaeon *Methanosarcina thermophila* TM-1, *Microb. Comp. Genomics*, 2, 275-286.

- Degrange, V. and Bardin, R., 1995, Detection and counting of nitrobacter populations in soil by PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2093-2098.
- Dewar, K., Sabbagh, L., Cardinal, G., Veilleux, F., Sanschagrin, F., Birren, B., and Levesque, R.C., 1998, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacterial artificial chromosomes: strategies for mapping, screening, and sequencing 100kb loci of the 5.9 Mb genome, *Microb. Comp. Genomics*, **3**, 105-117.
- Edhcomb, V.P., McDonald, J.H., Devereux, R., and Smith, D.W., 1999, Estimation of bacterial cell numbers in humic acid-rich salt marsh sediments with probes directed to 16S ribosomal DNA, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1516-1523.
- Faegri, V., Torsvik, V.L., and Goksoyr, J., 1977, Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique, *Soil Biol. Biochem.* **9**, 105-112.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramišse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., and Simonet, P., 1999, Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5409-5420.
- Hary, M., Gambier, B., and Garnier Sillam, E., 2000, Soil conservation for DNA preservation for bacterial molecular studies, *Eur. J. Soil Biol.* **36**, 51-55.
- Hattori, T., 1988, aggregates as microhabitats of microorganisms, *Biol. Fertil. Soils* **6**, 189-203.
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., and Gottschalk, G., 1999, Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3901-3907.
- Herron, P.R. and Wellington, E.M.H., 1990, New method for extraction of Streptomyces spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and non sterile soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1406-1412.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., and Wellington, E.M., 1997, Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233-3241.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., and Tiedje, J.M., 1988, DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 703-711.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., and Pace, N.R., 1998, Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *J. Bacteriol.* **180**, 4765-4774.
- Hurt, R., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., and Zhou, Z., 2001, Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4495-4503.
- Jackson, C.R., Harper, J.P., Willoughby, D., Roden, E.E., and Churchill, P.F., 1997, A simple efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4993-4995.
- Jacobsen, C.S. and Rasmussen, O.F., 1992, Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2458-2462.
- Jacobsen, C.S., 1995, Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3347-3352.
- Krsek, M. and Wellington, E.M., 1999, Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil (In Process Citation), *J. Microbiol. Methods*, **39**, 1-16.
- Kuske, C.R., Banton, K.L., Adorada, D.L., Stark, P.C., Hill, K. K., and Jackson, P.J., 1998, Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2463-2472.
- Lamontagne, 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, *J. Microbiol. Methods*, **49**, 255-264.
- Leff, L.G., Dana, J.R., McArthur, J.V., and Shimkets, L.J., 1995, Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1141-1143.
- Liesack, W., Weyland H., and Stackebrandt, E., 1991, Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria, *Microb. Ecol.* **21**, 191-198.
- Liesack, W. and Stackebrandt, E., 1992, Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment, *J. Bacteriol.* **174**, 5072-5078.
- Lindahl, V. and Bakken, L.R., 1995, Evaluation of methods for extraction of bacterial from soil, *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**, 135-142.
- Lee, Y.S., Bollinger, J., Bezdicek, D., and Ogram, A., 1996, Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3787-3793.
- Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., and Lindstrom, K., 2001, Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia, *J. Microbiol. Methods*, **45**, 155-165.
- Martin-Laurent, F., philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Ger-

- mon, J.C., Soulas, G., and Catroux, G., 2001, DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2354-2359.
- Mayr, C., Winding, A., and Hendriksen, N. B., 1999, Community level physiological profile of soil bacteria unaffected by extraction method, *J. Microbiol. Methods*, **36**, 29-33.
- McDonalds, R.M., 1986, Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation, *Soil Biol. Biochem.*, **18**, 399-406.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., Ghiorse, W.C., and Madsen, E.L., 1994, Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1572-1580.
- Miller, D.N., 2001, Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments, *J. Microbiol. Methods*, **44**, 49-58.
- More, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C., and Madsen, E.L., 1994, Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1572-1580.
- Nalin, R., Normand, P., Simonet, P., and Domenach, A.M., 1999, Polymerase chain reaction and hybridization on DNA extracted from soil as a tool for *Frankia* spp. Population distribution studies in soil, *Can. J. Bot.*, **77**, 1239-1247.
- Ogram, A., Sayler, G.S., and Barkay, T., 1987, The extraction and purification of microbial DNA from sediments, *J. Microbiol. Methods*, **7**, 57-66.
- Orsini, M. and Romano-Spica, V., 2001, A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples, *Letts. Appl. Microbiol.*, **33**, 17-20.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., and Simonet, P., 1992, Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2717-2722.
- Pillai, S.D., Josephson, K.L., Bailey, R.L., Gerba, C.P., and Pepper, I. L., 1991, Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2283-2286.
- Porteous, L.A. and Armstrong, J.L., 1991, Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method, *Curr. Microbiol.*, **22**, 345-348.
- Porteous, L.A., Sidler, R.J., and Watrud, L.S., 1997, An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications, *Mol. Ecol.*, **6**, 787-791.
- Purdy, K.J., Embley, T.M., Takii, S., and Nedwell, D.B., 1996, Rapid extraction of DNA and rDNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3905-3907.
- Ramsay, A.J., 1984, Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography, *Soil Biol. Biochem.*, **16**, 457-481.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., and Nazaret, S., 1998, A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities, *Eur. J. Soil Biol.*, **34**, 89-97.
- Rochelle, P.A., Fry, J.C., Parkes, R.J., and Weightman, A.J., 1992, DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities, *Fems. Microbiol. Lett.*, **79**, 59-65.
- Rondon, M.R., Raffel, S.J., Goodman, R.M., and Handelsman, R., 1999, Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6451-6455.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R.M., 2000, Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2541-2547.
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., and Harry, M., 2001, Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples, *Appl. Soil Ecol.*, **18**, 47-60.
- Saano, A., Tas, E., Pippola, S., Lindstrom, K., and Van Elsas, J.D., 1995, Extraction and analysis of microbial DNA from soil, in: *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 49-67.
- Selenska, S. and Klingmuller, W., 1991, DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil, *Letts. Appl. Microbiol.*, **13**, 21-24.
- Simonet, P., Capellano, A., Navarro, E., Bardin, R., and Moiroud, A., 1984, An improved method for lysis of *Frankia* with achromopeptidase allows detection of new plasmids, *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1292-1295.
- Simonet, P., Grosjean, M.C., Misra, A.K., Nazaret, S., Cournoyer, B., and Normand, P., 1991, *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3278-3286.
- Steffan, R.J., Goksoyr, J., Bej, A.K., and Atlas, R.M., 1988, Recovery of DNA from soils and sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2908-2915.

- Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. and Zuberer, D.A., 2005, Principles and Applications of Soil Microbiology, 동화기술 교역, 경기도, p. 26-38, p. 54-69, p. 85-98.
- Tebbe, C.C. and Vahjen, W., 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.
- Tien, C.C., Chao, C.C., and Chao, W.L., 1999, Methods for DNA extraction from various soils: a comparison, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2657-2665.
- Tien, C.C., Chao, C.C., and Chao, W.L., 1999, Methods for DNA extraction from various soils: a comparison, *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 937-943.
- Torsvik, V.L. and Goksoyr, J., 1978, Determination of bacterial DNA in soil, *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 7-12.
- Torsvik, V.L., 1980, Isolation of bacterial DNA from soil, *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 15-21.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L., 1990, High diversity in DNA of soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782-787.
- Torsvik, V.L., Daae, F.L., and Goksoyr, J., 1995, Extraction, purification, and analysis of DNA from soil bacteria, in: *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 29-48.
- Tsai, Y.L. and Olson, B.H., 1991, Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1070-1074.
- Tsai, Y.L., Park, M.J., and Olson, B.H., 1991, Rapid method for direct extraction of mRNA from seeded soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 765-768.
- Turpin, P.E., Maycroft, K.A., Rowlands, C.L., and Wellington, E.M., 1993, An ion-exchange based extraction method for the detection of salmonellas in soil, *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 181-190.
- Von Wintzingerode, F., Gobel, U.B., and Stackebrandt, E., 1997, Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis, *Fems. Microbiol. Rev.*, **21**, 213-229.
- Von Wintzingerode, F., Gobel, U.B., and Stackebrandt, E., 1997, Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis, *Fems. Microbiol. Rev.*, **21**, 213-229.
- Wilson, I.G., 1997, Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3741-3751.
- Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim, J.G., Minak-Berberio, V., Lute, J.R., and Hinton, S.M., 1993, Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction amplifiable DNA from soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1972-1974.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M., 1996, DNA recovery from soils of diverse composition, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 316-322.