

Review

Open Access

유전자변형 작물이 토양 미생물상에 미치는 영향

이기종, 오성덕, 손수인, 류태훈, 박종석, 이장용, 조현석, 안병옥*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

The Effects of Genetically Modified Crops on Soil Microbial Community

Ki-Jong Lee, Sung-Dug Oh, Soo-In Sohn, Tae-Hun Ryu, Jong-Sug Park, Jang-Yong Lee, Hyun-Suk Cho and Byung-Ohg Ahn*(National academy of agricultural science, RDA, Suwon 441-707, Korea)

Received: 18 May 2012 / Accepted: 25 June 2012

© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract

BACKGROUND: Genetically modified (GM) crops must receive relevant regulator's authorization before they can be sold as seed or used food, feed and processing. Before approving any GM crop, the relevant government ministries are required to examine environmental risk assessment to make scientifically sound and socially acceptable decisions. But one of the least studied and understood areas in the environmental risk assessment of GM crops are their impact on soil microbial community.

METHODS AND RESULTS: Recently, advanced methods have been developed to characterize the soil microbial community in various environments. In this study, the culture-dependent and culture-independent technical approaches for profiling soil microbial communities are summarized and their applicability to assess GM crops are discussed.

CONCLUSION(S): We concluded that the effect of GM crops on soil microbial community need to be assessed on a case by case basis. The combination of culture-dependent and culture-independent method was necessary for reliable and detailed assessment of effect of GM crops on soil microbial community.

Key words: Environmental risk assessment, Genetically modified, Soil microbes

서론

제초제 저항성 콩을 상업적으로 재배하기 시작한 1996년 이후 유전자변형(Genetically modified, GM) 작물의 이용과 재배 면적은 해마다 증가하고 있다. 농업생명공학 응용을 위한 국제서비스(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA) 보고에 의하면 2011년에는 29개국 1억 6,000만 헥타르에서 유전자변형 콩, 옥수수, 면화 및 유채 등이 재배되었다(James, 2011). 생명공학 기술을 이용해 제초제 내성, 병·해충 저항성, 환경 스트레스 내성, 기능성 물질 생산을 위한 유전자변형 작물들이 개발되었으며 재배에 주로 이용되는 것은 제초제 내성 및 해충 저항성 작물이다. 다양한 유전자변형 작물 개발과 재배 면적의 꾸준한 증가에도 유전자변형 작물의 이용을 둘러싼 개인간 혹은 국가간 논란은 계속되고 있다. 대부분의 유럽에서는 인간의 건강과 환경에 대한 논란으로 유전자변형 작물이 재배되지 않고 있으나 미국, 브라질 및 중국 등에서는 유전자변형 작물이 빠르게 도입되어 재배되고 있다. 유전자변형 작물과 관련된 논란은 농업 생태계에 대한 위협성으로 외래 식물체의 침입과 확산에 의한 잡초화 가능성(Barton and Dracup, 2000), 화분과 토양 미생물에 의한 비의도적 유전자 이동성, 표적 또는 비표적 생물에 대한 영향(Losey *et al.*, 1999; Germida and Dunfield, 2004) 등이 있다. 안정적인 생태계 유지와 지속 가능한 농업을 위해서는 생물 다양성의 유지가 필수적이기 때문에(Tilman and Downing, 1994) 유전자변형 작물을 이용하기 위해서는 유전자변형 생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(LMO법)에 의거하여 환경에 대한 잠재적 위협성을 평가하고 관련부처에 제출하여 심사 및 승인을 받아야 한다(농촌진흥청 LMO 안전관리 법령집, 2010). 환경위해성 평가는 유전자변형 작물의 지상부

*교신저자(Corresponding author),

Phone: +82-31-299-1141; Fax: +82-31-299-1122;

E-mail: boahn@korea.kr

가 농업 생태계에 미치는 영향에 대해 주로 이루어졌으나 (Bruinsma *et al.*, 2003), 최근 심사의 경향은 유전자변형 작물의 지하부와 토양 미생물의 상호작용에 관한 평가 자료를 제출하도록 요구되고 있는 추세이다. 따라서 유전자변형 작물의 토양 미생물에 대한 평가는 신규 단백질에 의한 미생물 군집의 생물다양성과 유전자변형 작물로부터 토양 미생물로의 수평적 유전자 전달 가능성 등을 중심으로 연구가 수행되고 있다(Germida and Dunfield, 2004). 양분과 에너지 급원인 식물체의 지하부 역할과 토양 미생물의 중요성을 오래 전부터 인식하였음에도 불구하고 토양 생태계의 복잡성으로 인해 미생물의 군집 구조와 기능에 대한 이해는 초보적인 수준에 머물러 있다. 또한 토양 미생물에 대한 영향을 평가하기 위해 예전부터 사용해오던 여러 방법들이 유전자변형 작물의 영향 평가에 폭넓게 적용가능한지는 아직까지 불확실하고(Liu *et al.*, 2005), 특이적 기능을 수행하는 토양 미생물의 작은 변화는 군집 다양성과 식물 생육에도 영향을 미칠 수 있어 이와 관련한 많은 연구가 필요하다. 본 연구는 지금까지 보고된 유전자변형 작물의 토양 미생물 영향 평가들을 고찰하여 유전자변형 작물의 토양 미생물 영향 평가 시 고려해야 할 사항과 과학적이고 합리적인 기준을 제시하고자 한다.

1. 토양 미생물에 대한 유전자변형 작물의 영향

미생물은 토양 중에 포함된 유기물을 분해하고 식물체의 구성과 대사작용에 필요한 무기양분이 되도록 하며 결과적으로 식물체의 생육에 큰 영향을 미친다(Filion, 2008). Neal 등(1970)은 뿌리썩음병에 상대적으로 저항성인 S-615 유전자가 포함된 염색체를 치환한 봄 밀(*Triticum aestivum*, 2n=42)을 재배한 결과, 토양 미생물의 수와 양이 차이가 있음을 보고하였다. 21개의 염색체 중 하나의 염색체를 치환한 전통 육종법에 비해 생명공학 기술로 유전자를 도입한 유전

자변형 작물이 과연 토양 미생물의 생물다양성을 크게 변화시킬지는 논란이 되고 있다(Dunfield and Germida, 2001). 세균(Ahrenholtz *et al.*, 2000; Di Giovanni *et al.*, 1999; Donegan *et al.*, 1997; Dunfield and Germida, 2001; Oger *et al.*, 1997; Siciliano *et al.*, 1998), 비 표적 진균(Donegan *et al.*, 1995), 표적 진균(Clausen *et al.*, 2000), 효소 활성(Griffiths *et al.*, 2000), 기질 이용(Di Giovanni *et al.*, 1999)에 대한 유전자변형 작물의 일시적인 영향이 보고되었음에도 불구하고(Table 1), 명확한 위해성은 아직까지 보고된 바 없다. 따라서 도입유전자와 관련된 생물학적 영향 평가를 위해서는 적절한 분석 목표 집단을 선정하고 생태학적으로 중요한 토양 미생물의 군집을 조사할 필요가 있다.

유전자변형 작물 재배가 토양 미생물에 부정적인 영향을 초래한다면 농업 생태계에 심각한 혼란을 불러일으킬 수도 있다. 토양 미생물과 관련한 대부분의 우려는 유전자변형 작물의 직접적인 영향에 관한 것으로 병·해충 저항성을 위해 도입된 유전자의 단백질이 microfauna 등의 비 표적 토양 생물체에 잠재적인 독성 물질로 되는 것이다(Dunfield and Germida, 2001). 도입 유전자로부터 생성된 단백질은 활성 정도와 토양 축적 양에 따라 직접적인 영향이 다르게 나타날 수 있다(Oger *et al.*, 1997). 또한 토양 내 단백질 축적은 식물체내의 단백질 함량과 식물체 양에 의해 결정되며, 단백질 분해의 난이성, 토양의 이·화학적 재배 환경 등 다양한 요인들에 의해 달라질 수 있다. 유전자를 항시 발현시키는 CaMV 35S promoter를 사용한 유전자변형 작물의 잔존물은 토양 내 단백질 축적을 높일 가능성이 있다(Maizel and Weigel, 2004). 따라서 조직 특이적인 promoter나 유도성 promoter에 의해 유전자의 발현을 부위별 또는 시기적으로 조절할 수 있는 유전자변형 작물을 이용한다면 토양 미생물에 대한 잠재적 위해성은 감소시킬 수 있을 것이다.

Table 1. Studies on the effects of genetically modified plants on rhizosphere microbial community

Trait	Plant	Gene	Observed changes in rhizosphere	Reference
Herbicide tolerance	Canola	<i>EPSPS</i>	Altered community fatty acid	Siciliano <i>et al.</i> (1998)
	Canola	<i>EPSPS</i>	Altered diversity of rhizobacteria	Dunfield and Germida (2001)
	Maize	<i>pat</i>	No differences with SSCP	Schmalenberger and Tebbe (2002)
	Soybean	<i>EPSPS</i>	Taxonomic diversity of root-associated community	Siciliano and Germida (1999)
	Soybean	<i>EPSPS</i>	Increased colonization by <i>Fusarium</i> spp.	Kremer <i>et al.</i> (2005)
Insect resistance	Cotton	<i>Bt</i>	Increased bacteria and fungi	Donegan <i>et al.</i> (1995)
	Maize	<i>Bt</i>	Minor impact on diversity of rhizobacteria	Baumgarte and Tebbe (2005)
	Potato	GNA	Altered CLPP pattern	Griffiths <i>et al.</i> (2000)
	Potato	Con A	No impact on diversity of rhizobacteria	Griffiths <i>et al.</i> (2000)
Pathogen resistance	Potato	T4-lysozyme	Establishment of a T4-tolerant bacteria in rhizosphere	Heuer <i>et al.</i> (2002)
	Potato	T4-lysozyme	No effect on antagonistic bacteria	Lottmann and Berg (2001)
Others	Bird's-foot trefoil	Opine	Increased numbers of opine utilizing bacteria	Oger <i>et al.</i> (1997)

해충저항성 작물에 이용되는 *Bacillus thuringiensis*(Bt) 유래 단백질은 경우에 의해 식물체 잎과 뿌리 잔존물이 토양에 혼입되거나 뿌리 삼출물을 통해 유입될 수 있다(De Vries *et al.*, 1999). 유전자변형 작물과 그 잔존물들의 직·간접적인 영향으로 미생물 군집의 다양성과 밀도 변화가 보고된 바 있다(Filion, 2008). 항균성 단백질로 알려진 T4 lysozyme은 유전자변형 옥수수 뿌리 삼출물에서 발견되었으며, 토양에 유입된 이후에도 생물학적 활성이 유지되었다(Saxena and Stotzky, 2000). 일반적으로 식물체 잔존물은 부식 과정에 의해 대부분의 단백질이 빠르게 분해되지만 토양 입자와 강하게 결합된 일부 단백질은 분해가 제한되기도 한다(Smalla and Gebhard, 1999). 또한 토양에서 식물 유래 DNA의 안정성은 토양내 점토 함량, 토양 pH 등 비생물학적 요인(Widmer *et al.*, 1997)과 토양 내 DNase의 존재 등 생물학적 요인(Lorenz *et al.*, 1997)에 영향을 받는다. 생체중 (g) 당 34 μg 의 CryIIA 단백질을 생성하는 해충저항성 면화의 경우 토양으로 혼입된 잔존물에서 건토 (g) 당 최대 1.6 μg 의 단백질이 존재하였다(Sims and Ream, 1997). 생체중 당 생성하는 단백질에 비해서는 적은 양이지만 혼입 후 토양 미생물 주변에 존재하는 단백질의 잔존성에 의해 잠재적 영향은 달라질 수 있다. 유전자변형 면화의 잔존물은 배양 가능한 세균과 진균 군집을 일시적으로 증가시켰으며(Donegan *et al.*, 1995), 형질전환 담배의 잎 잔존물은 토양 내 탄소원의 이용과 함량 차이, 선충 및 *Collembola* 수에서 차이를 보였다(Donegan *et al.*, 1997). 형질전환 유체에서도 미생물 군집의 탄소 이용 패턴과 FAME profile의 차이, 진정세균 군집의 DGGE 패턴과 *Pseudomonas* 군집의 차이를 보였으나(Siciliano *et al.*, 1998) 다른 유체 품종을 이용한 실험에서는 이러한 차이가 나타나지 않았다(Dunfield and Germida, 2001).

유전자변형 작물의 간접적인 영향은 신규 단백질과 대사 과정 변화로 인한 뿌리 삼출물 성분 변화에 의해 나타날 수 있다. 도입 유전자에 의해 생성된 신규 단백질은 뿌리의 상처부위 혹은 뿌리 삼출을 통해서 토양으로 방출되며, 유전자변형 작물의 수확 후 잔존물로부터도 방출될 수 있다(Donegan *et al.*, 1997). Bt 살충성 내독소는 해충저항성 옥수수 뿌리로부터 토양으로 배출되었으며(Saxena and Stotzky, 2000; Baumgarte and Tebbe, 2005), 유전자변형 옥수수(NK4640)의 뿌리에서도 *cryIAb* 유전자 발현으로 생성된 단백질이 근권으로 배출되었다(Saxena *et al.*, 1999). 유전자변형 작물에 의해 과잉으로 생산된 대사물질은 이들을 특이적으로 분해하는 세균 생장을 촉진함으로써 군집의 변화가 예상된다. Opine을 생산하는 유전자변형 작물은 배양 가능한 전체 미생물 수는 차이가 없었으나 opine을 이용하는 미생물이 80배 이상 증가됨으로써 근권 세균의 군집이 변화되었다(Oger *et al.*, 1997). 근권 내 미생물은 주변 단백질을 영양원으로 이용하므로 유전자변형 작물의 재배기간 중 미생물 군집은 도입 유전자의 산물에 영향을 받는다. 일부 제초제 저항성 콩 품종은 glyphosate 살포로 뿌리 병원균인 *Fusarium*이 증가하여 품종의 유용성이 심각하게 감소되었다(Kremer *et al.*, 2005). 감자 무름병(*Erwinia*

carotovora) 저항성 증진을 위해 개발된 T4 lysozyme 생산 감자는 초기 기내 연구에서 많은 세균과 진균에 저항성을 보였으나(De Vries *et al.*, 1999), T4 lysozyme이 지상식생권과 근권에서 활성이 있는 것으로 나타났다(Heuer and Smalla, 1999). 따라서 유전자변형 감자의 연작으로 생물방제제로 사용되는 세균에 대한 영향을 연구한 결과, 비록 유전자변형 감자 재배 토양에서 T4 lysozyme에 저항성인 *Pseudomonas putida* 군집은 증가되었으나 생물방제제인 미생물에 대한 영향은 포장에서 나타나지 않았다(Lottmann and Berg, 2001). 또한 FAME과 repetitive sequence PCR 분석을 통해 세균의 유전자형과 식물의 유전자형간에는 상관관계가 없는 것으로 나타나 저항성 미생물의 군집 변화는 유전자변형 감자와는 관련이 없는 것으로 보고하였다(Heuer *et al.*, 2002).

유전자변형 작물 재배 후 어떤 경우법을 이용하느냐에 따라 신규 단백질과 토양 군집간의 상호작용에 의한 차이가 나타날 수 있다(Angle, 1994). 무경운 방법은 식물체 잔존물이 토양 표면에만 고농도로 존재하므로 토양 미생물과의 접촉 가능성을 낮출 수 있다. 반면 관행적인 경우법은 유전자산물의 농도는 낮출 수 있으나 접촉 가능한 미생물 수는 오히려 증가할 것이다. 따라서 신규 유전자 산물과 토양 미생물의 접촉은 피할 수 없지만 과연 이러한 접촉이 토양 미생물의 기능과 군집에 어떤 영향을 나타내는지는 현재까지 보고된 바 없다(Donegan *et al.*, 1995). 경운 외에도 시비, 살충제 및 제초제 살포, 윤작 등 다양한 경작법, 계절, 날씨, 지역 등 환경적 요인, 그리고 생육 시기 등의 생물학적 요인들은 토양 미생물의 군집 변화에 다양한 영향을 나타내지만, 일시적인 경우가 대부분이다(Marschner *et al.*, 2004). 유전자변형 작물에 의한 간접적인 영향도 뿌리 삼출물 조성과 토양 미생물 군집 구조에 영향을 미치는 요인들이 광범위하고 재배 조건, 계절적 변동 등에 따라 다르게 나타날 수 있어 정확한 판단을 내리기가 어려울 수 있다. 따라서 토양 미생물의 영향을 정확히 평가하기 위해서는 요인들을 고려한 최적의 실험 디자인 설정이 중요하며 비형질전환 작물에 의한 토양 미생물의 일반 범위 설정과 이를 기준으로 유전자변형 작물에 의한 영향 평가가 이루어져야 한다(Filion, 2008). 시간과 노력이 많이 소요되지만 농업 생태계에 대한 장기적 환경 모니터링을 계획할 경우, 반드시 계절과 연차간 차이 등 환경 요인과 생태학적, 시·공간적 요인을 고려한 분석 시료의 채취 등의 전략이 수립되어야 한다. 유전자변형 작물 재배에 의한 토양 내 단백질 축적과 미생물에 대한 자세한 연구가 없는 상황에서 최근에는 2개 이상의 형질이 도입된 복합형질 유전자변형 작물이 재배되고 있다. 따라서 도입 유전자와 산물에 의한 잠재적 영향 평가는 더욱 복잡하고 어려워질 것으로 예견되고 있어 관련 연구의 필요성이 크게 증대되고 있다.

2. 유전자변형 작물의 수평적 유전자 전달 위해성

선발표지는 유전자변형 작물의 효율적인 선발과 유지를 위해 사용된다. 식물 형질전환에 처음으로 사용된 선발표지는 kanamycin과 neomycin 항생제에 저항성을 나타내는 *E.*

Table 2. Summary of commonly used rhizosphere microbial community profiling methods

Method	Techniques	Advantages	Disadvantages	References
Biochemical-based methods	Plate count	Fast Affordability	Detection of culturable microorganisms	Liu <i>et al.</i> (2005)
	CLPP	Fast Reproducibility	Only represents culturable fraction	Dunfield and Germida (2001)
	FAME	No culturing steps	Can be influenced by external factors	Siciliano <i>et al.</i> (1998)
Molecular-based methods	ARDRA	Detect changes in microbial community Not need special equipment	PCR biases Time and labor intensive	Filiion (2008)
	RFLP	High sensitivity High throughput and short run times	Multiple restriction enzyme are needed PCR biases	Nocker <i>et al.</i> (2007)
	SSCP	Individual bands can be sequencing No clamped primer or restriction digestion are required	High rate of reannealing of DNA One band can represent more than one species	Baumgarte and Tebbe (2005)
	DGGE/TGGE	Affordability Bands can be sequencing Useful to compare community change	Low DNA sequence quality Only detects dominant species	Heuer <i>et al.</i> (2002)
	RISA/ARISA	High resolution of community profile High reproducibility	Requires large quantities of DNA A single organism can represent more than one signal	Kirk <i>et al.</i> (2004)

coli Tn5의 neomycin phosphotransferase(*NPTII*) 유전자이다(Rodenburg *et al.*, 1989). 1994년 미국 식품의약국에서는 *NPTII*를 도입한 형질전환체의 이용이 안전하다고 보고하였지만(Libiakova *et al.*, 2001), 항생제 저항성 유전자가 도입된 유전자변형 작물을 지속적으로 섭취할 경우, 항생제 효과를 비활성 시키거나(Nielsen *et al.*, 2000) 항생제 저항성 유전자의 도입에 의한 병원성 슈퍼박테리아 출현에 대한 우려가 있다(Daniell *et al.*, 2001; Paget *et al.*, 1998). 비록 빈도는 높지 않으나 자연계에서는 형질전환을 통해 외래 DNA를 수용성 세포로 받아들일 수 있다. 그러나 자연계에서의 형질전환이 일어나기 위해서는 순수 DNA 뿐만 아니라 DNA를 받아들일 수 있는 수용성 세균이 아주 가까운 곳에 존재해야 한다(Smalla and Gebhard, 1999). *nptII*와 *cryIAb*를 도입한 일부 형질전환 가문비나무(white spruce)의 경우, 토양 미생물의 군집 다양성이 차이가 있었으나(Filion, 2008) kanamycin 저항성 애기장대는 *E. coli* 군집에 아무런 변화를 보이지 않았다. 또한 형질전환 옥수수과 비형질전환 옥수수를 포장 재배한 결과, 항생제 저항성 유전자에 대한 영향은 나타나지 않았다. 유전자변형 작물의 토양 미생물에 대한 유전자 이동성 연구는 많지 않지만, 아직까지 토양 미생물로 항생제 선발표지 유전자의 이동성은 보고된 바 없다. 반면 정제된 Bt 단백질은 토양에 혼입된 234일 후에도 박각시나방(*Manduca sexta*)에 대한 활성을 보였으며(Saxena and Stotzky, 2000), 항생제 저항성 유전자(*NPTII*)가 도입된 담배와 감자는 토양에서 각각 77일과 137일 후에도 유전자가 검출되었고(Widmer *et al.*, 1997), 사탕무는 일반 포장에서 수개월 동안 검출되기도 하였다(Smalla and Gebhard, 1999). 그러나 유전자변형 작물로부터 토양 미생물의 유전자 전달은 토양 내 식물체 DNA의 분해로 가능성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 그렇기 때문

에 유전자변형 작물을 재배한 토양에서 도입된 DNA의 존재와 지속성에 대한 보고가 있음에도 포장에서 식물체 DNA가 토양 미생물로 전달되었다는 보고는 아직까지 없다(Paget *et al.*, 1998; Widmer *et al.*, 1997).

3. 토양 미생물상 실험 방법

토양 생태계는 복잡적이고 이질적 집단이기 때문에 다양한 환경조건에 따라 토양 내 존재하는 새로운 미생물들을 배양하거나 분리할 수 있다. 현미경으로 관찰되는 대부분의 토양 세균들은 자생력이 있으나 전통적인 방법으로는 배양이 쉽지 않다. 유전자변형 작물 재배가 토양 생태계에 미치는 잠재적 영향을 평가하기 위해서는 전체 미생물 군집의 변화뿐만 아니라 물리화학적 요소와 생물적 요소가 포함된 토양환경이 분석되어야 한다. 현재까지 우리의 불완전한 이해로 인해 미생물 군집을 연구하기 위해서는 가능한 다양한 방법과 수준에서의 평가가 필요하다. 지금까지 토양 미생물상 연구에 사용된 배지를 이용한 배양 분석법, 배지를 이용하지 않는 분석법, 분자생물학적 기술에 기반한 분석법을 소개하고, 적용된 다양한 사례들을 Table 2에 정리하였다. 특히 분자생물학 기술의 발전으로 배양에 의존하지 않고 토양 미생물에 대한 유전자변형 생물체 영향을 평가할 수 있게 됨으로써 이를 통해 토양 미생물 군집 구조와 미생물의 기능 변화에 대한 위생성 여부를 정확하게 평가할 수 있을 것으로 예상된다.

3.1. 배지를 이용한 분석법

토양 1g에는 약 10^9 - 10^{10} 종류의 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있으나 이중 배양 가능한 것은 약 1%에 불과하다(Kirk *et al.*, 2004). 일련의 희석과정을 거쳐 미생물을 배양하는 평판배양법은 특이적 미생물 동정 및 집단의 변화

확인에 유용한 도구로 사용되고 있다(Oger *et al.*, 1997). 최근에는 미생물 군집의 역동성을 정밀하게 파악할 수 있는 분자생물학적 분석이 주된 경향이지만 평판배양법은 위해성 평가에 중요한 역할을 담당하고 있다(Lynch *et al.*, 2004). 그러나 토양 내 배양 가능한 미생물만을 분석할 수 있으며, 배양 조건에 맞는 일부 미생물만을 빠르게 성장시킴으로써 다른 미생물의 생장이 제한될 수 있다. 또한 미생물마다 서로 다른 복제시간 및 성장속도, 과잉의 탄소원이 첨가된 배지 환경은 군집의 변형을 초래하여 실제 환경의 중 풍부도와 균등성 등을 배양법만으로는 정확히 분석하기가 쉽지 않다.

3.2. 배지를 이용하지 않는 분석법

미생물 군집의 기능 다양성을 분석하는 군집 생리활성 (Community-level physiological profiling, CLPP)은 탄소원의 이용 특성에 기반한 미량정량플레이트를 이용한다 (Filion, 2008). 96 well plate 등이 개발되어 상업적으로 이용 가능하며 미생물의 호흡에 의한 기질의 색 변화와 흡광도 측정으로 처리에 따른 군집의 변화와 미생물 기능에 대한 정보를 제공한다. CLPP는 미생물 군집을 신속하고 간편하게 분석할 수 있어 유용하지만 배양에 의존한 미생물 활성 측정으로 어떤 미생물이 존재하는지 알 수 없으며(Dunfield and Germida, 2001), 기능 변화와 관련한 토양 생태계의 정확한 해석이 어려운 것이 단점이다(Filion, 2008). 토양 미생물의 다양성을 분석하는 Fatty acid methyl ester(FAME) 분석은 미생물의 세포막 지질을 정량분석하는 방법이다. 배양이 불필요하며 미생물의 풍부도, 분류학적 차이, 기능과 군집 다양성 등의 정보와 군집 구조의 차이를 정량적으로 제공한다. 그러나 세포막의 지질 구성은 생리적 또는 환경 스트레스 등의 상호작용에 의해 지질 구성에 변화를 초래하기 때문에 정확한 자료 분석을 위한 다양한 통계 기법이 적용되어야 한다.

3.3. 분자생물학적 기술 기반 분석법

최근 미생물 군집 분석은 배양 가능한 미생물의 제한으로 시료로부터 직접 추출한 DNA를 이용하는 분자생물학적 방법이 적용되고 있다. Universal primer로 증폭된 PCR 산물들은 유사한 크기이지만 염기서열에 차이를 보인다(Kirk *et al.*, 2004). PCR산물을 vector에 삽입하여 빠르게 축적되는 염기서열 database와의 비교 분석을 통해 종 구분, 종 유사성 결정 및 계통 발생에 관한 광범위한 정보를 얻을 수 있다(Nocker *et al.*, 2007). 많은 시간과 노력이 소요되는 clone의 screening 초기단계부터 96 wells 또는 384 wells plate를 사용한 자동화로 clone의 직접 염기서열 분석이 가능하다. 대규모 유전체 정보는 강력한 컴퓨터 분석에 의존하며 전체 염기서열 분석은 미생물 군집에 대한 대량의 정보를 제공하여 대사공학 또는 생물지구화학에 대한 더 나은 이해를 가능케 한다(Filion, 2008). 차세대 염기서열 분석기에 의한 고속대량 처리 및 sequencing 분석 기술 발달 등 비용 대비 우수한 효과는 직접 염기서열 분석의 대중화를 선도하고 있다(Kirk *et al.*, 2004).

3.3.1. ARDRA, T-RFLP, SSCP

증폭 rDNA 제한분석(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)은 PCR 증폭된 16S rDNA 염기서열을 제한효소로 절단하고 고농도의 아가로스 겔이나 아크릴아마이드 겔에서 전기영동을 통해 단편을 확인하는 방법이다(Filion, 2008). 효소의 최적 활성 조건을 잡기 어렵고 유전자 상동성 및 실제 기능에 대한 복잡한 profile은 종종 명확한 해석이 쉽지 않다. 이러한 단점을 극복하기 위해 5-carboxyfluorescein으로 표지된 primer를 사용하는 말단 제한효소 단편길이 다형성(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 방법이 도입되었다(Lukow *et al.*, 2000). PCR에 의해 증폭된 집단 DNA를 복수의 제한 효소를 사용하여 군집의 특성 비교가 가능하며(Nocker *et al.*, 2007), 집단내의 세균을 유전형으로 그룹화하는데 주로 이용된다. 상대적으로 단순한 미생물 군집 구조 변화를 검출하는데 유용하지만 특이적인 계통을 검출하거나 다양성을 측정하기에는 제한이 따른다.

3.3.2. SSCP

외가닥구조다형성(Single strand conformation polymorphism, SSCP)은 외가닥 DNA가 분자내 상호작용으로 형성하는 특이적 고차구조를 통해 돌연변이 또는 다형 유무를 검출하는 방법이다(Schmalenberger and Tebbe, 2002). 동일한 분자량의 외가닥 DNA라 하더라도 비 변성조건에서 서로 다른 2차 구조를 형성하면 전기영동 시 이동속도가 다르게 나타나 계통발생의 차이를 구분할 수 있다. 이러한 분자 기술은 미생물 군집 구조의 일반적인 변이를 검정할 수 있을 뿐만 아니라 특이적으로 우점하는 미생물 집단의 변화를 확인하는데 이용 가능하다.

3.3.3. DGGE/TGGE, ARISA

Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)와 temperature gradient gel electrophoresis(TGGE)는 다른 염기서열을 가진 PCR 증폭 산물들을 농도 구배된 아크릴아마이드 겔에서 분리하는 방법이다(Heuer and Smalla, 1999). 증폭된 PCR 산물들은 일반적으로 염기수가 거의 같은 크기이기 때문에 일반적인 아가로스겔이나 변성되지 않은 아크릴아마이드겔에서는 구분할 수 없다. 따라서 전기영동 중 증폭 산물의 이동 차이를 위해 하나의 primer는 약 40bp의 GC 염기로 이루어진 클립(clamp)를 사용한다. DGGE는 urea 혹은 formamide 등의 화학 변성제를 이용하며, TGGE는 온도에 의한 변성 구배로 DNA를 확인한다(Heuer *et al.*, 2002). 미생물 군집 차이를 구별할 수 있어 토양 미생물 군집 분석에 많이 사용되며 염기서열 분석을 통해 미생물의 동정이 가능하나 겔에 기반한 DGGE분석은 토양 미생물 집단 중 최소 1-2%를 대표하는 군집이 검출되는 것으로 추정된다(Kirk *et al.*, 2004).

3.3.4. RISA/ARISA

Ribosomal intergenic spacer analysis(RISA)는 리보솜에 기반한 군집 분석 방법으로 RFLP와 유사하며 16S와 23S 리보솜 subunit 사이의 유전자간 공간(intergenic spacer, IGS) 영역을 PCR로 증폭하고 아크릴아마이드 겔에서 분리시킨다(Kirk *et al.*, 2004). 증폭 영역은 tRNA를 암호화하는 부위로서 생물종마다 가지각색인 IGS의 길이와 염기서열 차이로 세균 계통 간 또는 근연종의 분화 연구에 효과적으로 이용될 수 있다. RISA는 염기서열의 차이를 염색법으로 확인하지만 automated ribosomal intergenic spacer analysis(ARISA)는 형광으로 표지된 primer를 통해 중간 증폭 산물 크기를 구분한다(Kirk *et al.*, 2004). 두 방법 모두 고도의 재현성 있는 세균 군집 패턴을 보여주지만 RISA는 다량의 DNA가 필요하며 시간이 많이 걸리고 염색법에 따라 해상도가 다소 떨어진다. 반면 ARISA는 고감도 군집 분석에 용이하며 시간도 단축되지만(Lee *et al.*, 2010) PCR에 영향을 주는 primer의 종류, PCR 조건(온도, 반복수 등)과 증합효소 등 여러 요인들로 인해 실험의 재현성이 떨어질 수 있다. 많은 생물체들은 1-10bp 크기의 염기서열이 고도로 반복된 염기서열 혹은 미소부수체(microsatellite)를 가지고 있다. 염색체 구조를 기반으로 진화의 정도에 따른 염기서열의 변화와 유사성을 이용하여 중간 또는 계통간 차이와 환경 변화에 의해 야기되는 미생물 군집의 변화를 파악하는데 유용하게 이용될 수 있다. 그러나 미소부수체의 염기서열이 알려진 sequence databank가 많지 않고, 군집의 복잡성에 따라서 제한적으로 이용할 수 있다.

결론

최근 토양 미생물의 군집과 다양성을 분석하는 방법은 꾸준히 발전되고 있음에도 토양 생태계의 영향을 완벽히 이해하기에는 한계가 있다. 토양 미생물의 다양성 연구는 기초 과학 연구로서 뿐만 아니라 군집 구조 및 미생물의 실제적인 기능을 이해하는데 필수적이다. 유전자변형 작물의 토양 미생물에 대한 영향은 일시적이고 단기적이며, 특정 생육 시기에서만 발생하고, 토양 내 생존 가능한 식물체가 존재할 때에만 나타난다. 현재까지 유전자변형 작물과 도입 유전자 산물에 의해 토양 미생물의 군집과 기능에 명확한 위해성이 나타나지 않았으며, 포장 조건에서 유전자변형 작물로부터 도입 유전자가 토양 미생물로 이동되는 수평적 유전자 이동성에 대해 아직까지 보고된 바 없다. 유전자변형 작물의 토양 미생물에 대한 영향은 현재까지 알려진 지식을 기반으로 군집의 복잡성, 분석의 수준, 보유 기기 및 예산 등을 종합적으로 고려하여 분석되어야 한다. 세균과 진균에 대한 분류학적, 구조적 다양성 연구 방법이 계속적으로 발전하고 있고, 분자생물학적 방법들을 통해 배양 불가능한 미생물들의 정보를 대량으로 얻을 수 있게 됨으로써 토양 생태계에 대한 위해성 평가 역량이 강화될 수 있을 것이다. 따라서 연구자들은 배양에 의존한 방법과 비의존적인 방법을 병행하여 다양성과 미생물 기능간

의 상호작용에 대한 가능한 많은 정보를 수집하고 분석함으로써 유전자변형 작물의 토양 미생물에 대한 이해를 증진시킬 수 있으며, 그에 따라 효과적인 환경위해성 평가와 심사가 이루어질 수 있을 것이다.

요약

유전자변형 작물을 종자로 판매하거나 식품, 사료 혹은 가공용으로 이용하기 위해서는 반드시 관련 기관의 승인을 받아야 한다. 관련부처에서는 유전자변형 작물의 승인에 앞서 환경위해성 평가 자료가 과학적으로 타당한지 검토한다. 환경위해성 평가 중 유전자변형 작물이 토양 미생물 군집에 미치는 영향은 충분히 연구되지 못한 분야이다. 최근 토양 환경 내 미생물 군집의 특성을 연구하기 위한 발전된 방법들이 개발되고 있다. 배양에 의존적인 또는 비의존적인 기술에 의한 토양 미생물의 군집 특성을 조사한 연구와 유전자변형 작물의 환경위해성 평가 적용 가능성을 고찰하였다. 유전자변형 작물의 토양미생물 영향 평가는 사안별 평가 원칙에 의해 이루어져야 한다. 신뢰할 수 있고 상세한 토양 미생물 평가가 이루어지기 위해서는 다양한 분석 방법의 조합이 필요하다.

감사의 글

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ0084842012)", National Academy of Agricultural Science and the Next-Generation BioGreen 21 Program (No. PJ0080082012), Rural Development Administration, Republic of Korea.

참고문헌

- Ahrenholtz, I., Harms, K., de Vries, J., Wackernagel, W., 2000. Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes, *Appl. Environ. Microb.* 66, 1862-1865.
- Angle, J. S., 1994. Release of Transgenic Plants- Biodiversity and Population-Level Considerations, *Mol. Ecol.* 3, 45-50.
- Barton, J. E., Dracup, M., 2000. Genetically modified crops and the environment, *Agron. J.* 92, 797-803.
- Baumgarte, S., Tebbe, C. C., 2005. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere, *Mol. Ecol.* 14, 2539-2551.
- Bruinsma, M., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A., 2003. Effects of genetically modified plants on

- microbial communities and processes in soil, *Biol. Fert. Soils* 37, 329-337.
- Clausen, M., Krauter, R., Schachermayr, G., Potrykus, I., Sautter, C., 2000. Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat, *Nat. Biotech.* 18, 446-449.
- Daniell, H., Muthukumar, B., Lee, S. B., 2001. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection, *Curr. Genet.* 39, 109-116.
- De Vries, J., Harms, K., Broer, I., Kriete, G., Mahn, A., Düring, K., Wackernagel, W., 1999. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil-and phytopathogenic bacteria, *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 280-286.
- Di Giovanni, G. D., Watrud, L. S., Seidler, R. J., Widmer, F., 1999. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR), *Microb. Ecol.* 37, 129-139.
- Donegan, K. K., Palm, C. J., Fieland, V. J., Porteous, L. A., Ganio, L. M., Schaller, D. L., Bucaco, L. Q., Seidler, R. J., 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil-microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* Var. *Kurstaki* endotoxin, *Appl. Soil. Ecol.* 2, 111-124.
- Donegan, K. K., Seidler, R. J., Fieland, V. J., Schaller, D. L., Palm, C. J., Ganio, L. M., Cardwell, D. M., Steinberger, Y., 1997. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: Persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations, *J. Appl. Ecol.* 34, 767-777.
- Dunfield, K. E., Germida, J. J., 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*, *Fems Microbiol. Ecol.* 38, 1-9.
- Filion, M., 2008. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations?, *Microb. Biotechnol.* 1, 463-475.
- Germida, J. J., Dunfield, K. E., 2004. Impact of genetically modified crops on soil-and plant-associated microbial communities, *J. Environ. Qual.* 33, 806-815.
- Griffiths, B. S., Geoghegan, I. E., Robertson, W. M., 2000. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes, *J. Appl. Ecol.* 37, 159-170.
- Heuer, H., Kroppenstedt, R. M., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K., 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors, *Appl. Environ. Microb.* 68, 1325-1335.
- Heuer, H., Smalla, K., 1999. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants, *Fems Microbiol Ecol* 28, 357-371.
- James, C., 2011. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011*, No. 43., ISAAA, Ithaca, NY.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Khironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity, *J. Microbiol Meth* 58, 169-188.
- Kremer, R. J., Means, N. E., Kim, S. J., 2005. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms, *Int J Environ an Ch* 85, 1165-1174.
- Lee EH, Park HJ, Jo YS, Ryu HW, KS, C., 2010. Application of methodology for microbial community analysis to gas-phase biofilters, *Korean J. Chem. Eng.* 48, 147-156.
- Libiakova, G., Jorgensen, B., Palmgren, G., Ulvskov, P., Johansen, E., 2001. Efficacy of an intron-containing kanamycin resistance gene as a selectable marker in plant transformation, *Plant Cell Rep* 20, 610-615.
- Liu, B., Zeng, Q., Yan, F., Xu, H., Xu, C., 2005. Effects of transgenic plants on soil microorganisms, *Plant Soil* 271, 1-13.
- Lorenz, M. G., Blum, S. A. E., Wackernagel, W., 1997. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils, *Syst Appl Microbiol* 20, 513-521.
- Losey, J. E., Rayor, L. S., Carter, M. E., 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae, *Nature* 399, 214-214.
- Lottmann, J., Berg, G., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants, *Microbiol Res* 156, 75-82.
- Lukow, T., Dunfield, P. F., Liesack, W., 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community

- structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants, *Fems Microbiol Ecol* 32, 241-247.
- Lynch, J. M., Benedetti, A., Insam, H., Nuti, M. P., Smalla, K., Torsvik, V., Nannipieri, P., 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms, *Biol Fert Soils* 40, 363-385.
- Maizel, A., Weigel, D., 2004. Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J* 38, 164-171.
- Marschner, P., Crowley, D., Yang, C. H., 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type, *Plant Soil* 261, 199-208.
- Neal, J. L., Atkinson, T. G., Larson, R. I., 1970. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome, *Can J Microbiol* 16, 153-158.
- Nielsen, K. M., van Elsas, J. D., Smalla, K., 2000. Transformation of *Acinetobacter* sp strain BD413 (pFG4 Delta nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants, *Appl Environ Microb* 66, 1237-1242.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A. K., 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review, *Microbial Ecology* 54, 276-289.
- Oger, P., Petit, A., Dessaux, Y., 1997. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment, *Nat Biotechnol* 15, 369-372.
- Paget, E., Lebrun, M., Freyssinet, G., Simonet, P., 1998. The fate of recombinant plant DNA in soil, *Eur J Soil Biol* 34, 81-88.
- Rodenburg, K. W., Degroot, M. J. A., Schilperoort, R. A., Hooykaas, P. J. J., 1989. Single-Stranded-DNA Used as an Efficient New Vehicle for Transformation of Plant-Protoplasts, *Plant Mol Biol* 13, 711-719.
- Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G., 1999. Transgenic plants-Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn, *Nature* 402, 480-480.
- Saxena, D., Stotzky, G., 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt* corn in vitro and in situ, *Fems Microbiol Ecol* 33, 35-39.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C. C., 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore, *Fems Microbiol Ecol* 40, 29-37.
- Siciliano, S. D., Germida, J. J., 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland, *Fems Microbiol Ecol* 29, 263-272.
- Siciliano, S. D., Theoret, C. M., de Freitas, J. R., Hucl, P. J., Germida, J. J., 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat, *Can J Microbiol* 44, 844-851.
- Sims, S. R., Ream, J. E., 1997. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: Laboratory microcosm and field studies, *J Agr Food Chem* 45, 1502-1505.
- Smalla, K., Gebhard, F., 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer, *Fems Microbiol Ecol* 28, 261-272.
- Tilman, D., Downing, J. A., 1994. Biodiversity and stability in grasslands, *Nature* 367, 363-365.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Donegan, K. K., Reed, G. L., 1997. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field, *Mol Ecol* 6, 1-7.