

Research Article



CrossMark

Open Access

LM 미생물의 환경영향 모사: 대사체와 토양미생물군 분석

이지훈*, 기민규

전북대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

Simulative Study of Effects of LM Microorganism on Environment: Analyses of Metabolomes and Soil Microbial Communities

Ji-Hoon Lee* and Min-Gyu Ki (Department of Bioenvironmental Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea)

Received: 28 June 2019/ Revised: 8 August 2019/ Accepted: 14 August 2019

Copyright © 2019 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Ji-Hoon Lee

<https://orcid.org/0000-0001-8916-149X>

Abstract

BACKGROUND: Living modified microorganisms (LMMs) have been focused in two very different aspects of positive and negative effects on ecology and human health. As a model experiment, wild type and a foreign origin gene-harboring modified *E. coli* strains were subjected to comparison of their metabolomes and potential effects on soil microbiota in the laboratory sets. This study assumes the unintentional release of LMMs and tries to suggest potential effects on the soil microbiota even at minimal settings.

METHODS AND RESULTS: Metabolomes from the wild type and LM *E. coli* were analyzed by NMR and the profiles were compared. In the laboratory soil experiments, the two types of *E. coli* were added to the soils and monitored for the bacterial community compositions. Those metabolomic profiles did not show significant differences. The microbial community structures from the time series soil DNAs for both the sets using wild type and LMO also did not indicate significant changes, but minor by the addition of foreign organisms regardless of wild or LMO.

CONCLUSION: Even if the recombinant microorganism (LMO) is released into the soil environment, the survival of

microorganisms in the environment would be one of the major factors for the transfers of foreign genes to other organisms and diffusion into the soil environment.

Key words: LMO, Metabolome, Soil Microbiota

서론

미생물의 산업적, 농업적 활용은 많은 부가가치를 창출하여 왔고, 환경친화적인 기술들을 제공하여 왔다. 또한 더 경제적이고 생산성이 좋으며 화학비료나 살충제를 덜 사용할 수 있도록 유전적으로 변형된 작물과 미생물(genetically modified organism, GMO)이 등장하게 되었다. GM 미생물(genetically modified microorganisms, GMMs)은 아미노산, 비타민, 효소 생산 등을 위한 기반으로 그 사용이 증가하여 왔다(Cases and de Lorenzo, 2005). 더욱이 전통적으로 식물에서 생산되던 아주 다양한 범주의 화합물질이나 프로바이오틱스, 당류 등이 GM 미생물에 의해 생산되고 가공되어 사용되고 있다. 그러나, 1990년대 중반 이래 GMO의 환경방출과 GM 작물에서 파생된 식품의 판매가 과학적인 측면과 공공적인 측면에서 논쟁을 불러 일으켜 왔다(Buiatti *et al.*, 2013).

GMO에 대한 논쟁의 두 상반된 견해는 다음과 같다. 첫째, 재조합 DNA 기술로 인한 GM 작물 및 미생물의 활용은 농작물 생산성 향상과 의약품 등의 생물학적 대량 생산을 위한 강력한 도구라는 것이다. 또한 살충제 감소, 화학 연료 절약, CO₂ 배출 감소 등으로 농업으로 인한 환경 영향을 줄일

*Corresponding author: Ji-Hoon Lee

Phone: +82-63-270-2546; Fax: +82-63-270-2550;

E-mail: jhlee2@jbnu.ac.kr

수 있을 것으로 여겨졌고, 그래서 지속가능한 농업 발전을 위해 필수적인 것으로 생각되었다. 더욱이 개발도상국들에 당면한 글로벌 식량 및 영양 부족 문제와 관련해 GM 작물은 피할 수 없는 것으로 지지를 받아 오기도 하였다. 미래의 GM 작물은 영양분이 증가된 산물을 생산하거나, 의학적으로 중요한 분자들을 생산하는, 또는 질병, 혹은, 가뭄 등에 저항성을 갖도록 개발되어, 저개발국가들의 식량 안보를 향상시키는데 적합할 수 있을 것이다.

GMO에 대한 다른 측면의 견해로서는, 환경과 인간 건강에 대한 잠재적인 부정적인 영향이 여전히 대부분 미지의 상태로 남아 있고, 앞으로 수십년 동안에도 그 영향을 알기 어렵다는 것이다. 사용되는 GMO가 한정된 공간으로부터 비의도적으로 유출될 가능성이 있고, 재조합된 유전자가 자연 또는 농업 생태계로 전이될 수 있는 잠재성도 있다. 또한 GM 작물이 수확된 후에도 여전히 그 유전자는 잔존하고, 야생형의 생물에 전이될 수 있어, 생태계에 영향을 미칠 수 있을 것이다. 해충이나 질병, 제초제에 저항성을 부여하는 유전자들은 GMO의 생존과 확산의 향상을 초래할 수 있을 것이고, 그 유전자의 전이 잠재성은 더욱 커질 수 있을 것이다. 그러한 식물에 주입 또는 전이된 외래 유전자의 인간 건강에 대한 영향은 예측되지 못하거나 부정적일 수 있다. 위와 같이 GM 미생물을 포함한 GMO의 잠재력에도 불구하고, 그 산물의 생태계 및 환경, 인체 안전성에 대한 우려가 크고, 장기적인 안전성 검증이 부족한 실정이다.

인슐린의 대량생산과 같이 GM 미생물은 많은 산업적 적용이 있어 왔다. 토양과 지하수에 오염되어 있는 유기 용제 등의 난분해성 유기오염물질 분해 및 정화에, 그러한 성분을 분해할 수 있는 GM 미생물을 개발 및 주입함으로써 복원하고자 하는 많은 연구가 진행되기도 하였다(Cases and de Lorenzo, 2005). 이렇게 GM 미생물도 인간의 삶의 질 향상과 밀접하게 관련이 있다고 할 수 있고, 여러 가지 변형 방법으로 유전자 변형된, 살아 있는 GM 미생물, 즉 LM (living modified) 미생물들이 의약 및 농업, 환경, 최근의 산업 등에 규제와 통제 하에 활용되고 있다. 이 연구는 그러한 규제와 통제에도 불구하고, 비의도적으로 여러가지 용도로 활용되는 LM 미생물이 환경에 유출되었을 경우, 그 LM 미생물로 인한 주변 환경, 특히 토착 토양 미생물군에 미치는 영향을 실험실내 토양실험으로 그 영향을 모사해 보고자 하였다. 또한 LM 미생물과 그 모체 미생물(야생형)의 대사물질에 차이가 있는지를 분석해 잠재적 환경 영향성을 알아보고자 하였다. 하지만 이 실험에서는 토양 환경에서 생존이 어려운 대장균 (*Escherichia coli*)을 실험대상으로 하여, 그 결과가 일반적인 대표성을 나타내는 것은 아니다.

재료 및 방법

유전자변형 미생물(LM 미생물) 제작 및 재조합 유전자 검출

유전자 재조합에 사용된 플라스미드는 pLUG-Prime TA-

cloning Vector II (iNtRON Biotechnology, Deajeon, Korea)이고, ampicillin 항생제 내성 유전자를 내재하고 있다. 키트에서 제공된 control insert DNA(크기 약 600 bp)를 ligation 반응으로 박테리아에 삽입하고, *Escherichia coli* DH5 α 균주에 heat shock으로 형질전환 하였다. Alpha-complementation에 의한 blue/white screening에 의해 형질전환 균주를 확보하고, M13 primer 세트(M13F: TTT TCC CAG TCA CGA C, M13R: TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG A)를 이용한 PCR로 DNA 삽입을 확인하였다.

LM 미생물이 갖는 plasmid 내 삽입된 insert DNA를 각 시점, 각 시료로부터 검출하기 위해 insert DNA를 포함시키는 M13 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 10 μ M의 forward primer, reverse primer 각각 1 μ L, template DNA (5 - 11 ng/ μ L) 2 μ L, *Taq* polymerase를 포함한 premix를 사용 총 50 μ L 용액을 준비해, 94°C에서 5분의 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초의 순환반응을 25회 사용하였다.

미생물 대사체 추출 및 NMR 분석

야생형(wt)과 LM *E. coli*로부터 퀸칭(quenching)을 하여 대사체(metabolomes)를 추출하였다. Lysogeny broth (LB) 한천 배지에 각각 배양한 wt과 LMO 균주에 80% 메탄올 (HPLC grade) 1 mL씩을 떨어뜨리고, 메탄올과 혼합된 미생물 균락을 scrapper로 긁어서 피펫으로 각각 시료용기(e-tube)에 옮기고, 시료를 분석 전까지 초저온냉동고(-80°C)에 보관하였다.

핵자기 공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 분석 전처리로서, 원심분리(4°C, 10분, 13,000 rpm) 후 상층액을 취하고, 물 1.8 mL과 chloroform (CHCl₃) 0.98 mL을 첨가하여 혼합하였다. 이 용액을 다시 원심분리하여 상층액을 SpeedVac을 이용하여 건조시키고, 건조된 시료를 570 μ L의 0.2 M sodium phosphate 버퍼(pH 7, D₂O)와 30 μ L의 10 mM TSP (trimethylsilyl propionate, D₂O)에 녹이고, 5 mm NMR tube로 옮겨 NMR (AVANCEIII 800-MHz NMR spectrometer, Bruker BioSpin AG, Fallanden, Switzerland) 분석을 하였다.

LM 미생물의 토양 미생물군집 영향 실험실내 실험

E. coli wt과 LMO를 LB 배지에 배양하여(LMO는 ampicillin 포함), 세균 세포를 원심분리로 수확해 상층액을 제거하고, 다시 PBS로 1회 세척 후 멸균 증류수를 사용하여 동일 흡광도를 갖도록 표준화하였다(최종 OD₆₀₀ = 1.0). 표준화된 wt과 LM 미생물 세포 현탁액 각 10 mL씩을 18 x 9.5 x 8 cm (길이x넓이x높이) 크기의 용기에 담긴 토양에 주입하였다. 토양은 높이가 약 4.5 cm가 되도록 700 g씩을 넣어, wt, LMO, 비접종대조군(uninoculated control)의 3개 실험군을 준비하였다. 세균 현탁액은 1 cm 깊이로 토양을 파고, 피펫으로 넓이 방향으로 9.5 cm에 걸쳐 고루 주입하였고,

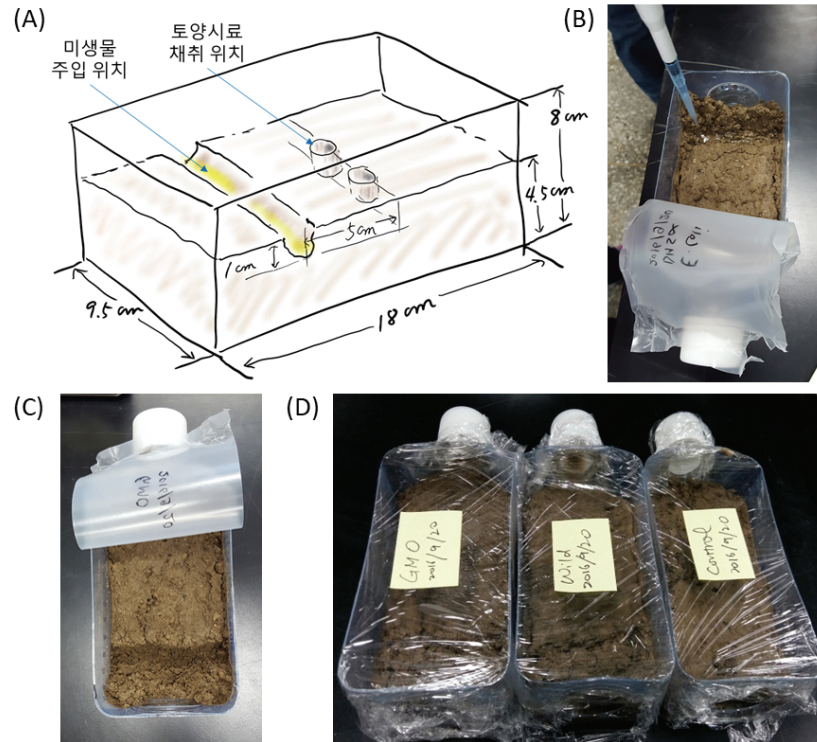


Fig. 1. Experimental setup for the microorganism's migration in the laboratory soil.

토양을 다시 덮어 실험실 상온에 배양하였다(Fig. 1). 사용된 토양은 현지 협조 하 채소재배 시설 농지토양을 채취하여 사용하였고, 실험 시 멸균 증류수를 수시로 3 처리군에 같은 양 (100 mL)을 살포하여 미생물의 잠재적 이동이 용이하도록 하였다. 또한 수분의 증발을 억제하기 위하여 실험군을 비닐 (랩)으로 밀폐하였다.

토양 시료 채취 및 토양 DNA 추출

토양 시료 채취는 접종 및 배양 1일, 5일, 20일 후 미생물 주입 위치로부터 5 cm 이격된 거리에서 1 cm의 깊이 토양을 멸균된 피펫 팁을 활용하여 wt, LMO, 대조군의 3 실험군에서 각각 채취하였다(Fig. 1). 또한 21일 후 최초 wt, LMO 접종 위치에서 토양 시료 채취하여, DNA 추출까지 냉동 보관하였다. wt 미생물 시료는 'W', LM 미생물 시료는 'G'로 시료를 구분 하였다. 모든 시료의 0.25 g 토양으로부터 PowerSoil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA)을 사용해 genomic DNA를 추출하였고, DNA 농도는 Qubit 3.0 Fluorometer를 이용하여 측정하였다.

토양 미생물군집상 NGS (Next Generation Sequencing) 분석

추출한 genomic DNA에 대해 16S rRNA 유전자의 V3-V4 구역을 증폭시켜, 양방향의 염기서열(2 x 250 bp)을 MiSeq 플랫폼(Illumina, San Diego, CA)으로 염기서열 분석되었다(마크로젠, 서울). 16S rRNA 유전자의 V3-V4 구역의 증

폭(약 428 bp 크기)에 사용된 primer는 다음과 같다. 16S amplicon forward primer, 5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG (341F); 16S amplicon reverse primer, 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C (805R).

분석된 염기서열의 raw data를 Mothur (v. 1.38) (Schloss *et al.*, 2009)를 사용하고 MiSeq sequences standard operating procedure (Kozich *et al.*, 2013)를 참고하여 세균 다양성을 분석하였다(alpha-diversity). 또한 sequencing error와 키메라를 제거한 후, OTU (operational taxonomic unit)으로 clustering하여 이 후 분석을 진행하였다.

결과 및 고찰

미생물 야생형과 LMO 대사체 비교 분석

wt과 LMO 대사체를 추출해 NMR로 분석한 결과, 두 군주로부터의 대사체 프로파일은 거의 일치하였고, 강도 (amplification)에서 차이가 나타났다. 그 이유는 분석된 세포의 초기 양에 차이가 있었던 것으로 판단되었다(Fig. 2). wt과 LMO 각각의 대사체 프로파일을 상호 중첩하여 (overlay) 본 결과도 크기의 차이 외에는 특징적인 차이점이 나타나지 않았고, 이는 wt과 LMO의 대사체가 실험 조건에서는 차이가 나지 않았음을 의미하는 것으로 판단할 수 있다

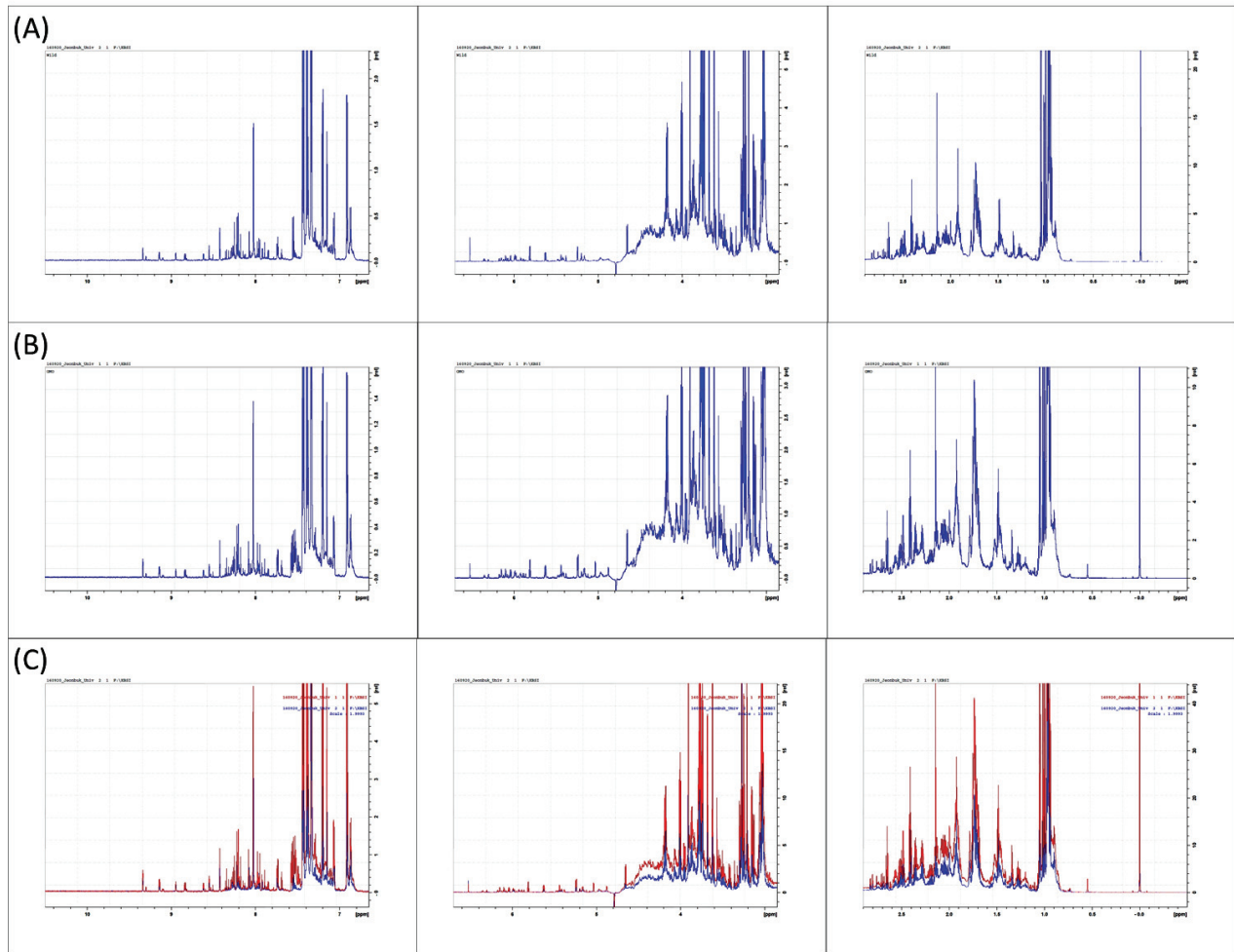


Fig. 2. NMR data profiles of the metabolomes of wild type (wt) and LMO. Divided ranges of (A) wild type, (B) LMO, and (C) overlaid profiles.

(Fig. 2C). 전체 범위에 걸쳐 피크의 크기(amplitude)를 맞춰 분석을 한 결과에서도 대사체 프로파일의 특징적인 차이점은 나타나지 않았다(Fig. S1 in Supplementary Information).

LMO는 대사체 분석을 위한 배양시, ampicillin이 포함된 LB 한천 배지에서 성장한 균주를 사용하였으므로, ampicillin 저항 유전자가 발현되었음을 추정할 수 있고, wt 균주는 항생제 저항 유전자가 없고, 또한 항생제가 들어 있지 않은 배지에서 성장해 항생제 저항 유전자가 발현되지 않았을 것이다. 그러한 조건에서 항생제 유전자 발현으로 인한 대사체의 차이는 대사체 프로파일을 통한 분석으로는 확인하기 쉽지 않음을 알 수 있고, 물질 수준의 차이를 확인하기 위해서는 질량분석기(mass spectrometry)를 활용한 연구가 따라야 할 것으로 사료된다.

LM 미생물 재조합 유전자 검출

E. coli 야생형(wt) 및 LMO 접종균, 균주 비접종 대조군의 3 실험군으로부터 1일 후, 5일 후, 20일 후 채취한 토양에서 추출한 DNA를 M13 primer 세트에 PCR을 수행한 결

과, 1D, 5D, 20D, 21D의 어느 시료에서도 재조합된 insert DNA가 검출되지 않았다(전기영동 자료 생략). 이 결과는 주어진 토양 환경이 집중한 *E. coli*의 wt이나 LMO가 생존하기 어려운 환경이어서, 5 cm 이격된 위치까지 미생물이 유동 또는 확산되지 못한 결과일 수 있다. 또는 미생물이 생존하였다 하더라도, 미생물의 유동 및 확산이 주어진 토양 환경에서 여의치 못한 결과일 수도 있다. 또한 토양 DNA 추출 시 재조합 plasmid가 약 3.4 kb로서 genomic DNA에 비해서 훨씬 작아서 추출되지 않았을 가능성도 배제할 수 없을 것으로 판단된다. 이는 재조합 유전자가 토양에서 생존 가능한 미생물의 염색체(chromosome)에 들어간 경우에, 토양 내에서 그 유전자를 직접 확인하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

시간에 따른 토양 DNA의 NGS 분석

시간에 따른 wt, LMO 주입 토양으로부터 추출한 환경유전체(genomic DNAs)를 MiSeq으로 분석한 원자료를 Mothur로 분석한 결과, 종 분류 기준인 염기서열의 3% 차이를 기준으로

OTU를 clustering한 결과, OTU 수는 시료 별 1812-1996(평균 1903±62)의 read 개수를 보였고(Table 1), OTU 수가 시료를 대표하는 지수인 Good's Coverage는 0.975-0.982(평균 0.980±0.002)로서 시료를 아주 잘 대표한다고 할 수 있다(Table 1). 미생물(세균)의 종의 수를 나타내는 풍부도(richness)는 Chao1 지수로서 확인한 결과, 시료 간 큰 차이를 보이지 않는 것을 알 수 있었고(범위 2222-2497, 평균. 2337±95), 미생물 다양성(diversity)은 풍부도와 균등성(evenness)을 포함하는 예측치로서, Shannon (9.15±0.08)과 Simpson (0.996±0.001) 예측치의 결과는 9개의 시료 간 큰 차이가 보이지 않았다(Table 1).

미생물(세균)의 분포를 문(phylum) 수준에서 보면, 9개의 시료에서 대부분 큰 차이가 없는 것을 볼 수 있지만, 접종 위치에서의 군집과 5-cm 이격된 위치의 군집 사이에 차이가 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 3). *E. coli* wt과 LMO 접종 위치

(GS21D, WS21D)와 5-cm 이격된 위치에서 채취한 7개 시료(control, W1D, G1D, W5D, G5D, W20D, G20D)로부터의 *Bacteroidetes* 문의 군집과 조성 비율이 각각 평균 14.5%(접종 위치)와 9.1%(시간별 시료 채취 위치)로 통계적으로 의미 있는($p < 0.001$) 차이를 보였다. 그 외에 두 그룹 간 차이를 보이는 문은, unclassified *Bacteria* ($p < 0.05$), *Acidobacteria* ($p < 0.05$), *Chlamydiae* ($p < 0.05$), *Chloroflexi* ($p < 0.05$), *Nitrospirae* ($p < 0.05$), *Parcubacteria* ($p < 0.05$)가 있으나, unclassified *Bacteria*나 *Acidobacteria*를 제외하고는 그 조성비가 크지 않았다(Fig. 3). 주입한 *E. coli*가 속한 *Gammaproteobacteria* 강(class)은 21일이 지난 시점이지만 접종위치에 비율이 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 그러나 1일, 5일, 20일 후의 5-cm 이격된 위치의 7개 시료 상호간과 21일 후 접종위치의 2개 시료 상호간 모두 wt과 LMO 시료 간의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

Table 1. Alpha-diversity indices of the microbial communities from all the samples

Sample	OTU number	Good's Coverage	Diversity		
			Richness Chao1	Shannon	Simpson
control	1981	0.982	2408	9.22	0.996
W1D	1888	0.980	2246	9.15	0.996
G1D	1897	0.981	2286	9.18	0.996
W5D	1812	0.975	2222	9.16	0.996
G5D	1996	0.982	2384	9.28	0.996
W20D	1916	0.982	2384	9.12	0.996
G20D	1823	0.979	2232	9.15	0.996
WS21D	1893	0.978	2377	8.99	0.994
GS21D	1921	0.978	2497	9.08	0.995

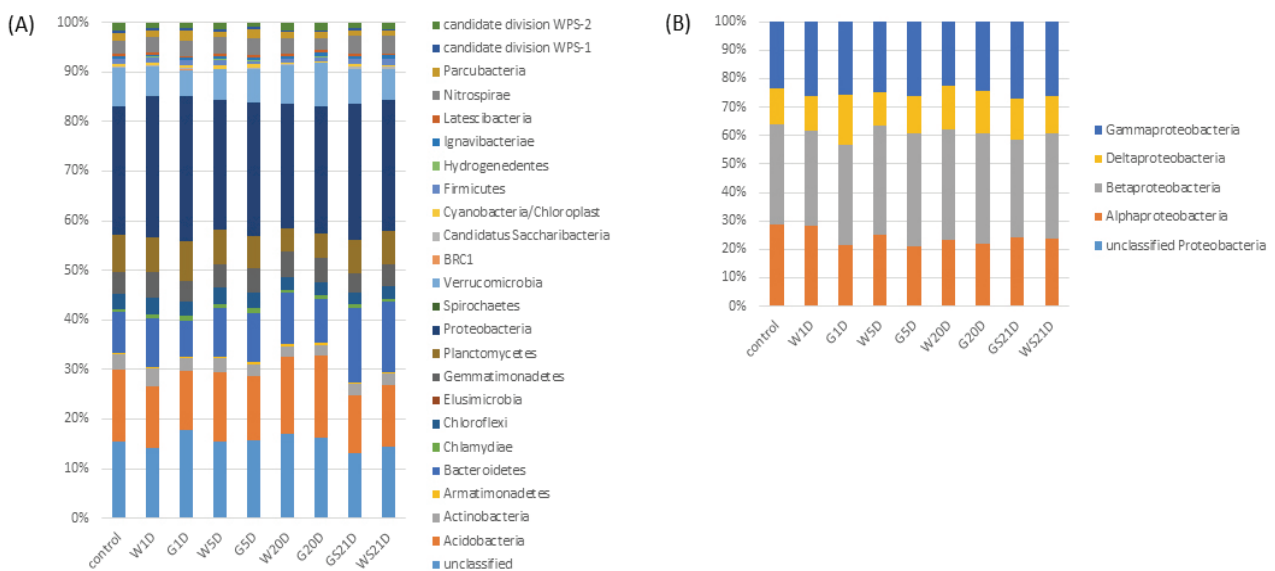


Fig. 3. Relative sequence abundances of (A) phyla and (B) classes of *Proteobacteria*, classified by 3% dissimilarity.

속(genus) 수준에서 적어도 한 시료에 1% 이상 포함되어 있는 OTU만(총 300 속 중 35 OTU) 선택하여, 각 OTU간의 풍부도(abundance)와 상호 연관성을 도식한 heatmap에서 (Fig. 4), 가장 sequence read 수가 많은 속은 unclassified

Bacteria (평균 15.3±1.4%, 범위 12.9-17.4%)와 unclassified *Betaproteobacteria* (평균 6.6±0.3%, 범위 6.1-7.0%)로 나타났다(Fig. 4, Table 2). Fig. 4의 가로 및 세로축의 dendrogram은 각각 미생물들이 클러스터를 이루어서 나타나는 양상과,

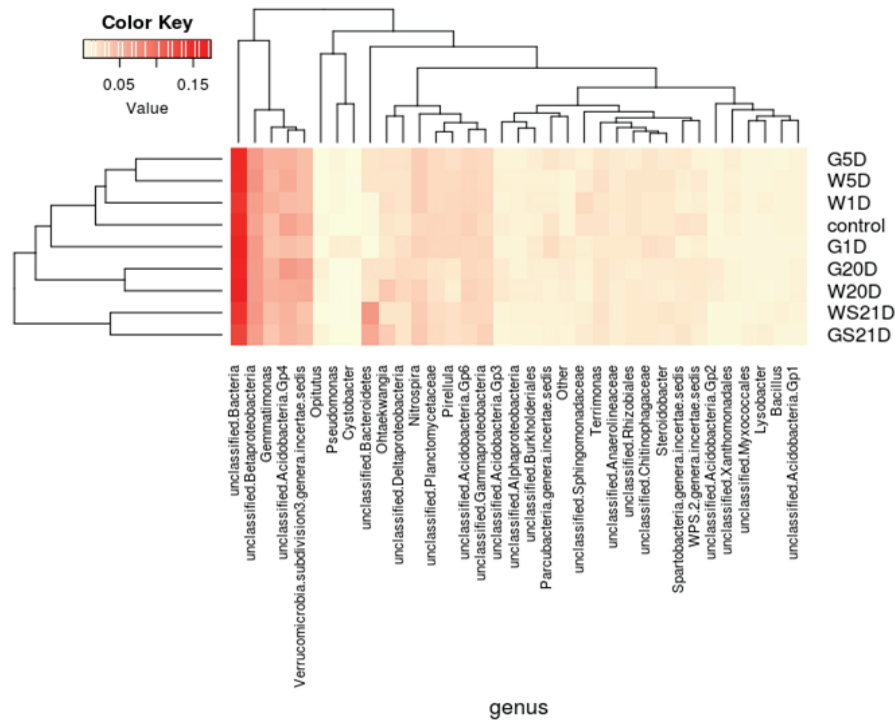


Fig. 4. A heatmap illustrating abundance of the OTUs at the genus level larger than 1% in at least one of the communities. A dendrogram on the horizontal axis is based on the Bray-Curtis dissimilarity matrix. The color gradient indicates fractions summing to 1.

Table 2. Top 20 genera by compositional ratios

Genus	Min.	Max.	average	st. dev.
unclassified <i>Bacteria</i>	12.9%	17.4%	15.3%	1.4%
unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	6.1%	7.0%	6.6%	0.3%
unclassified <i>Acidobacteria</i> Gp4	4.3%	6.7%	5.2%	0.8%
<i>Verrucomicrobia</i> subdivision3 genera incertae sedis	3.9%	6.1%	4.7%	0.7%
<i>Gemmatimonas</i>	3.9%	5.2%	4.6%	0.5%
<i>Nitrospira</i>	2.3%	3.6%	3.1%	0.5%
unclassified <i>Acidobacteria</i> Gp6	2.3%	3.1%	2.7%	0.2%
unclassified <i>Gammaproteobacteria</i>	2.2%	3.0%	2.6%	0.2%
unclassified <i>Planctomycetaceae</i>	1.8%	2.7%	2.3%	0.3%
unclassified <i>Bacteroidetes</i>	0.3%	6.9%	2.3%	2.3%
<i>Ohtaekwangia</i>	1.6%	3.6%	2.2%	0.8%
<i>Pirellula</i>	1.1%	2.7%	2.1%	0.5%
unclassified <i>Deltaproteobacteria</i>	1.6%	2.5%	1.9%	0.4%
<i>Terrimonas</i>	1.6%	2.0%	1.8%	0.1%
unclassified <i>Chitinophagaceae</i>	1.3%	2.0%	1.6%	0.2%
unclassified <i>Rhizobiales</i>	1.2%	1.8%	1.5%	0.2%
<i>Steroidobacter</i>	1.3%	1.9%	1.5%	0.2%
<i>Spartobacteria</i> genera incertae sedis	0.9%	1.9%	1.4%	0.3%
<i>Parcubacteria</i> genera incertae sedis	1.0%	2.2%	1.4%	0.4%
unclassified <i>Anaerolineaceae</i>	1.2%	1.6%	1.4%	0.1%

각 시료 간 유사성을 보여준다. 세로축의 dendrogram은 wt과 LMO 시료가 1일 시료를 제외하고는, 각 시간별 상호 유사성을 보이므로, wt과 LM *E. coli* 접종에 따른 토양에서의 차이는 크지 않는 것으로 추측할 수 있다. 하지만 세균 접종을 하지 않은 control 시료와 1일 시료는 비교적 유사함을 보이고 있지만, 5일, 20일, 또는 접종위치의 21일 시료는 control 시료와 달리 그룹이 되어, 토양에 세균을 접종한 효과의 차이가 미약하나 나타났던 것을 확인할 수 있다. 그러나 wt과 LMO 시료에서의 차이는 확인하기 어려웠다.

또한 종(species) 수준의 분류로부터 *E. coli*는 접종 위치와 이격된 위치에서는 하나의 sequence read도 나타나지 않았고, 접종된 위치에서만(21일 후) 2개, 1개의 sequence만이 검출되었다(Table 3). 이는 세균이 최초 높은 농도로 주입이 되었다고 할지라도, 그 세균이 생존하지 못한다면 시간이 지남에 따라 세포와 유전자까지도 분해되는 것으로 추정할 수 있을 것이다.

위와 같은 시간별 시료 상호간의 관계를 재확인하기 위해 weighted UniFrac distance matrix (Lozupone and Knight, 2005)를 계산하여 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) 계통수로 나타내었다(Fig. 5). 5일, 20일, 21일 시료는 서로 그룹으로 나타난 반면, 1일

시료는 wt와 LMO 시료(W1D, G1D)가 그룹을 짓는 유사성으로 나타나지 않는데, 이는 접종한 초기에 *E. coli*가 살아 있는 상태에서 wt과 LMO의 차이로 인해 반영된 것으로 추정된다. 하지만 시간이 지남에 따라 *E. coli*는 주어진 토양 환경에서 성장하지 못하고 사멸해, 그 균체가 토착미생물의 영양분이 되어 시간에 따라 wt과 LMO 시료가 비슷한 양상으로 변화된 것으로 추정하였다. 이 이유때문에 시간별 시료에는 적지만 차이가 보이게 되고, 이것은 LMO의 효과라기보다는 외부 세균의 토양 접종에 의한 것으로 추정할 수 있다. 또한 위에서 구한 weighted UniFrac distance matrix를 PCoA (principal coordinates analysis)로 도식해 보면(Fig. 6), UPGMA 그룹화와 유사한 양상의 그룹화를 보였다. 5일, 20일, 21일 시료는 서로 그룹으로 나타난 반면, 1일 시료는 wt와 LMO 시료가 그룹을 짓지 않는 것으로 나타났다.

위와 같은 환경유전체(metagenomes) 분석을 종합해 보면, 외래 세균을 토양에 접종한 결과 약간의 토양 미생물군에 약간의 변화가 보이지만, wt이나 LMO의 미묘한 차이로 인한 토양미생물상에 차이는 나타나지 않았다. 이는 제한적인 실험 모형에서 다양한 환경 조건의 부재로 인해 자연환경에서의 상황과 결과를 단정 지어 확인할 수는 없지만, wt이나 LMO 형 미생물이 토양 환경에서 생존할 수 있는지의 여부

Table 3. Sequence numbers and ratios of *E. coli* at species level

sequence	control	W1D	G1D	W5D	G5D	W20D	G20D	GS21D	WS21D
Count	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Ratio (%)	-	-	-	-	-	-	-	0.008%	0.004%

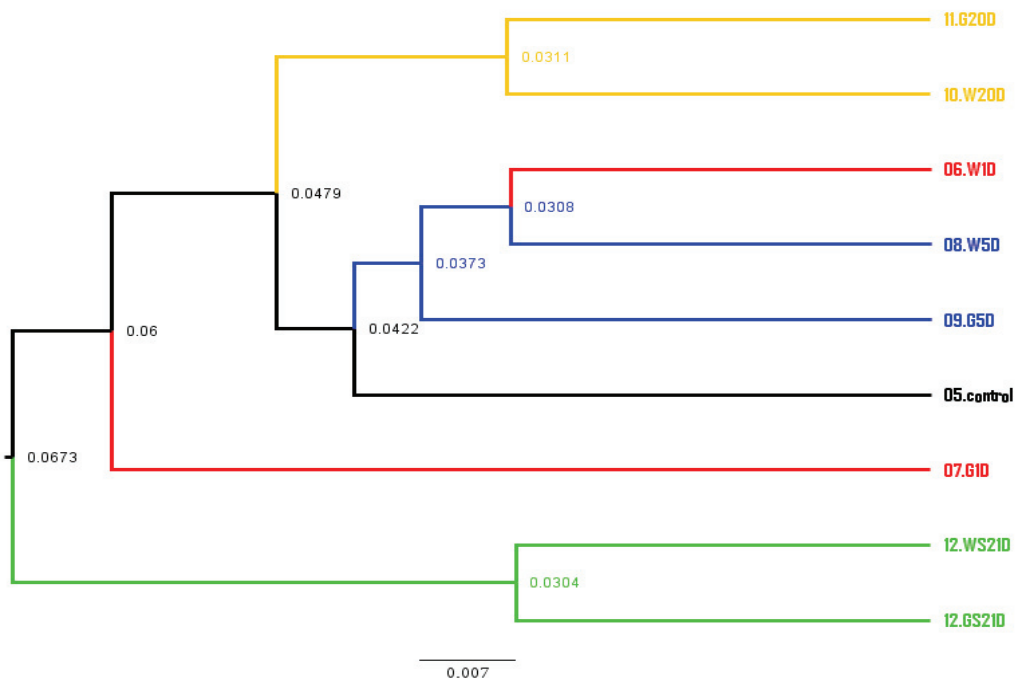


Fig. 5. UPGMA dendrogram using weighted UniFrac distance matrix.

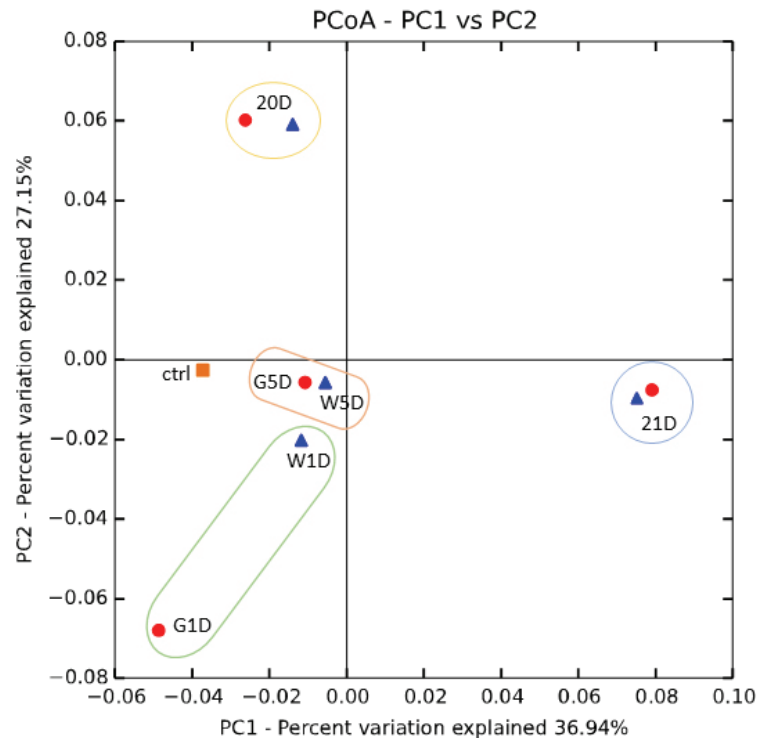


Fig. 6. 2D-PCoA using weighted UniFrac distance matrix. Percentages indicated for the contributing degrees on variations. Blue triangle: W-sample (wt); red circle: G-sample (LMO).

가 토양환경에 미칠 영향에 결정적인 요인일 것으로 추정된다. 이러한 최소한의 결과를 바탕으로 결론을 추론하자면, 만약 유전자 재조합 미생물(LMO)이 토양 환경에 유출이 되더라도, Table 3의 결과에서 확인한 것과 같이 그 미생물의 환경에서의 생존 여부가 외래 유전자의 타 생물 개체로의 전이 및 토양 환경으로의 확산 등의 환경 영향에 결정적인 역할을 할 것으로 판단된다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the Cooperative Research Program for Agricultural Science and Technology Development (PJ013704), Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Buiatti, M., Christou, P., & Pastore, G. (2013). The application of GMOs in agriculture and in food production for a better nutrition: two different scientific points of view. *Genes and Nutrition*, 8(3), 255-270.
- Cases, I., & de Lorenzo, V. (2005). Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *International Microbiology*, 8(3), 213-222.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120.
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228-8235.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541.