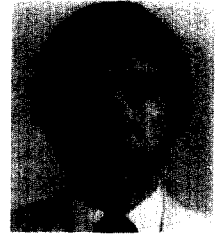


자연생태계에서의 유전물질의 전이



군산대학 생물학과 이 건 형

토양이나 자연환경에서 미생물 내에 존재하는 재조합 DNA의 생존과 영구성 및 효력은 다음과 같은 여러 요인에 의해 영향을 받는다. 즉, (1) 미생물 숙주 및 벡터(예, 플라스미드 또는 박테리오파지)의 특성; (2) 숙주-벡터 체제의 생존, 안정 및 성장; (3) DNA의 유지, 복제 및 분리; (4) 다른 미생물 로의 DNA의 전이 빈도; (5) 생태적 니체(Niche)에서 숙주-벡터 간의 적응성; (6) DNA에 의한 원래의 숙주나 그 다음에 오는 숙주에 미치는 장단점 등이다. 숙주와 재조합 DNA간의 관계 이외에 이러한 현상들은 토양과 자연 생태계의 물리, 화학적 및 생물학적 특성에 의해서도 영향을 받게 된다(표 1). 각각의 환경적 특성의 상대적 중요성은 특수한 서식처[예, 전자기방사(electromagnetic radiation)의 경우 토양에서는 비교적 덜 중요한 반면, 수계생태계에서는 중요]에 따라 다양하고 그들의 효과는 일반적으로 토착성 미생물보다는 외부로부터 유입된 미생물에 더 크다. 더욱이 이러한 특성들 중 어느 것도 각각 독립적으로 나타나지 않고 다른 요인들과 복합적으로 나타나며 비록 하나 또는 몇몇 특성이 특수한 환경에서는 지배적 일지라도 이러한 영향은 다른 특성들에 간접적이고 연속적인 반응으로 나타난다. 결과적으로 환경요인의 변화는 다른 특성에 대해 동시적이거나 연속적인 결과를 나타내게 되어 결국 생태계의 유입된 오래 미생물과 토착성 미생물이 모두 생존하고 안정되게 성장하여 유전정보를 전이할 수 있는 능력을 갖게 된다(Stotzky, 1974, 1986; Stotzky and Krasovsky, 1981). 하지만 환경적 특성들간의 교환 가능성이 매우 다양하기 때문에 새로운 유전정보를 가진 미생물들이 그 정보를 토양에서 성공적으로 전이할 수 있는 상대적인 성공은 쉽게 예측할 수 없다.

Table 1. Factors affecting the activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in natural habitats

Carbon and energy sources
Mineral nutrients
Growth factors
Ionic composition
Available water
Temperature
Pressure
Atmospheric composition
Electromagnetic radiation
pH
Oxidation-reduction potential
Surfaces
Spatial relations
Genetics of the microorganisms
Interactions between microorganisms

연구방법

유전 공학적으로 만들어진 미생물들(genetically engineered microorganisms : GEMs)이 토양이나 다른 자연 생태계에 유입되었을 때의 주요 관심사는 잠재적으로 불리한 환경적 충격, 특히 그들 환경에서의 항상성(homeostasis)이다. 그러므로 GEM들의 생존과 성장, 유전물질 전이를 모니터할 수 있는 민감한 감지법의 발전이 의미있는 생태학적 자료를 얻기 전에 필요하다. 토양은 복잡한 생태계이고(이, 1990) 토착성 미생물들은 종의 다양성에서 뿐만 아니라 군체수도 방대하므로(예, $10^6 \sim 10^9$ cells/g of soil) 토양에 유입된 GEMs들의 생존과 안정, 성장

및 유전물질의 전이를 모니터 한다는 것은 용이한 일이 아니다. 선택 배지를 이용[예, 그람음성균의 경우 MacConkey agar(MAC)를 사용하거나, 균류의 억제제를 위해 cycloheximide(Cy)를 첨가하는 것, MAC배지에서 Lactose-positive인 *E. coli*의 붉은 콜로니 등]하여 토양으로부터 계수하는 세균의 범위는 감소시킬 수 있다. 숙주에 의하거나 벡터에 의해서 표현된 다른 표현형적 특성들은 몇 가지 예에서 유용할 수 있다. 예를 들어 nalidixic acid(Nx)와 항생제들에 내성이 있는 염색체상의 유전자들은 숙주를 분리하는데 이용되며, toluene, 3-chlorobenzoate, 2, 4D, 중금속 내성과 또 다른 항생제 내성 등 플라스마드상의 유전자들은 이러한 그룹의 유전자가 함유되어 있는 숙주-플라스미드 체계를 분리하는데 이용된다. 하지만 염색체나 벡터상에 있는 항생제(예, streptomycin, chloroamphenicol, tetracycline 등)내성 유전자와 수은과 같은 중금속에 대해 내성을 갖는 특수한 숙주들에 대한 분리는 제한이 따른다. 왜냐하면 토양에 존재하는 많은 세균들은 이러한 항생제성 물질에 내성을 보이고 있으며 실지 일부 토양에서는 분리된 세균의 50% 이상이 이러한 항생제성 물질에 대해 내성을 갖고 있기 때문이다. Auxotrophic marker의 사용은 토양에서 특수한 세균을 직접적 분리하는 데에는 거의 유용성이 없지만 이러한 marker들은 관심의 대상이 되는 특수한 세균이나 DNA를 확인하는 데는 유용할 수 있다. 일반적으로 특수한 표면항원의 발현에 기초를 둔 혈청학적인 방법들도 선택적인 배지를 필요한 세균을 분리한다. 세균은 순수동정하여 polyclonal 또는 monoclonal 항체로 반응시킨다. 이러한 방법은 몇몇의 경우 고도로 특이하지만 일부 세균들의 표면 항체들은 성장하는 동안 변화하고 순수배양시 토양에서와는 다를 수가 있어 효과를 볼 수 없는 경우가 있다. 더우기 면역학적 데이터는 DNA probe와 세균의 다른 특성들로부터 얻은 결과와 항상 같지는 않다(예, Schofield *et al.*, 1987).

숙주-벡터 체계의 동질성을 확인할 수 있는 가장 확실한 방법은 아마도 DNA probe와 전기영동법 일 것이다. 전자의 경우는 숙주나 벡터의 고유한 서열을 갖는 DNA를 radioactive nuclide(예, P^{32})나 염색 물질(예, biotin-streptavidin-alkaline phosphatase dye)로 표시하여 토양에서 선택배지로 분리한 세

균으로부터 얻은 DNA와 hybridization 시키는 방법이다. 이러한 방법은 토양에서 *Rhizobium leguminosarum*과 *Pseudomonas putida*의 생존을 연구하는 microdilution MPN기법에 관련하여 사용된 적이 있다(Fredrickson *et al.*, 1988). 전기영동법의 경우 Jain 등(1988)의 Maniatis 등(1982)에 자세히 언급되어 있으므로 여기에서는 설명을 생략하기로 한다. 위에서 언급된 모든 방법들은 토양에서 원하는 세균을 우선 분리 동정하여야 하는데 이러한 동정이 가능한 것은 아니다. 그리고 몇몇의 유입된 GEM들은 토양에서 약화되어 선택배지에서 잘 자라지 않는다. 결과적으로 토양으로부터 전체적인 세균의 DNA를 분리하여 분리한 DNA probe와 hybridization시키는 것이 토양에서 GEM들의 생존과 안정, 성장 및 유전자 전이를 모니터 하는데 필요하다(Holben *et al.*, 1988). 불행히도 이러한 직접적인 DNA법은 4×10^4 cells/g soil일 때에만 sensitivity를 나타내는 반면 세균동정법은 2×10^1 cells/g soil일 때에도 sensitivity를 나타낸다(Devanas *et al.*, 1986). 가까운 장래에 좀 더 민감하고 특이적이며 신속할 뿐만 아니라 경비도 적게 드는 방법이 개발될 것이다.

최근연구동향

토양에서의 유전물질의 전이에 대한 정보, 특히 GEM들에 대한 대부분의 연구들은 세균을 대상으로 이루어지고 있으며 이러한 기작들로 크게 conjugation, transduction 및 transformation 등이 알려져 있다. 비록 이와 같은 현상들이 실험실에서는(즉, pure culture) 광범위한 그람양성 및 음성균에서 언급되고 있지만 토양이나 자연생태계에서는 이러한 현상들에 대한 보고서가 거의 이루어지지 않는 실정이다(Stotzky and Babich, 1986; Trevors *et al.*, 1987). 토양에서의 유전물질의 전이에 대한 첫번째 연구는 멸균된 토양(sterile soil)에서만 이루어졌고(Weinberg and Stotzky, 1972) 아직까지 자연상태의 토양(nonsterile soil)에서는 적절한 방법이 개발되지 않았다. 멸균된 토양에서 수행된 연구들은 자연상태의 토양에서 일어나는 일과는 거의 무관하다고 본다. 그러므로 멸균된 토양에서부터 얻은 결과로 자연상태에서 일어나는 현상을 설명하려는 것

은 상당한 문제가 있는데, 왜냐하면 토양 추출물로 행한 실험은 microhabitat가 파괴되고 물리화학적인 특성이 변성되기 때문이다. 그럼에도 불구하고 멸균된 토양에서의 연구는 자연상태의 토양과 병행하여 연구하면 자연상태의 토양에서 빈번히 사용되는 기술을 개발할 수 있고, 표면과 물리, 화학적 특성들, 그리고 토착성 미생물군의 생존과 안정, 성장 및 유전물질 전이에 대한 효과를 측정할 수 있기 때문에 가치가 있다. 기존의 많은 실험들은 토착성 토양 미생물군이 아님에도 불구하고 많은 장점을 지녔기 때문에 주로 *E. coli*로 수행하였는데, 최근에는 유전적 특성이 밝혀진 토착성 토양 미생물군들로 실험하려는 경향이 늘고 있다. 이러한 연구들의 주요 관심사는 자연환경, 특히 토양에서 농업적 목적(예, 질소고정의 증진, 해충의 생물학적 조절, 동해방지)과 그 외의 목적(예, 난분해성 유기오염물의 분해) 등으로 GEM들이 유출되었을 때의 문제들이다. 이때의 문제는 유출된 GEM들이 그들 목적으로만 기능을 수행하는 것이 아니라 토양생태계의 항상성을 깨고 토양미생물군의 활동과 생태 및 군집 동태에 바람직하지 못한 영향을 끼치기 때문인 것이다.

결 론

Avery, MacLeod, McCarty가 1944년에 세균에서 유전적 재조합이 이루어진다는 사실을 발견한 후 세균은 진화 학자들과 미생물 학자들로부터 주목을 받기 시작했다. 왜냐하면 세균은 자연생태계에서 또다른 형태의 유전적 적응성을 지니고 그러한 돌연변이들 중 일부는 모세포(parent cell)보다도 주변환경에 더 잘 적응되었기 때문이다. 이제까지 GEM들이 생태계에서 유전자들 전이시키는 빈도가 대부분 낮았고, 토양이나 다른 자연생태계에서 유전자의 전이가 지속적으로 일어난다는 실험적 증거는 없었지만 이들을 생태계에 방출한 결과 유전자 전이가 몇몇 실험에서 확인된 적이 있어 토양에서의 유전적 전이의 가능성을 강하게 암시하고 있다. 하지만 어떻게 전이되고 토양의 물리, 화학 및 전이에 필요한 최소한의 donor와 recipient의 수와 정확한 감지 방법 등이 아직까지 밝혀져 있지 않은 상태이다. 더우기 토양환경에서 미생물의 활성과 생태, 군집 동태에 영향을 줄 수 있는 기능을 나타내려면

얼마만큼의 재조합 세균이 단위면적당 필요한지도 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서 이러한 여러 가지 문제점을 밝히는 것은 학문적인면 뿐만 아니라 진화론적인 이론에도 도움이 되며 GEM들이 토양이나 다른 자연생태계에 유출되었을 때의 환경영향평가나 규제를 하는 데에도 도움이 될 수 있다고 본다.

참고문헌

1. 이진형, 1990. 토양환경에서 Transformation에 의한 유전물질의 전이. 미생물과 산업. Vol. 16, pp. 18-19. 한국미생물학회.
2. Devanas, M.A., Rafaeli-Eshkol, D., and Stotzky, G. 1986. Survival of plasmid containing strains of *Escherichia coli* in soil : Effect of plasmid size and nutrients on survival of hosts and maintenance of plasmids. *Curr. Microbiol.* 13 : 269-277.
3. Fredrickson, J.K., Bezdicek, D.F., Brockman, F.J., and Li, S.W. 1988. Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by using a most-probable-number-DNA hybridization procedure and antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 446-453.
4. 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.
5. Jain, R.K., Burlage, R.S., and Sayler, G.S. 1988. Methods for detecting recombinant DNA in the environment. *Crit. Rev. Biotech.* 8 : 33-84.
6. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
7. Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F., and Watson, J.M. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2942-2947.
8. Stotzky, G., 1974. Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. In ; Microbial Ecology. Eds : A.I. Laskin and H. Lechevalier. pp. 57-135, CRC press, Boca Raton.

9. Stotzky, G, 1986. Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion and ecology of microbes and viruses, In ; Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. Ed. : P.M. Huang and M. Schnitzer. pp.305-428, Soil Science Society of America, Madison.
10. Stotzky, G., and Babich, H. 1986. Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.* **31** : 93-138.
11. Stotzky, G., and V.N. Krasovsky. 1981. Ecological factors that affect the survival, establishment, growth, and genetic biology, In ; Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids. Ed. : S.B. Levy, R.C. Clowes, and E.L. Koenig. pp.31-42, Plenum, New York.
12. Trevors, J.T., Barkay, T., and Bourquin, A.W. 1987. Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments : A review. *Can. J. Microbiol.* **33** : 191-198.
13. Weinberg, S.R., and Stotzky, G. 1972. Conjugation and genetic recombination of *Escherichia coli* in soil. *Soil Biol Biochem.* **4** : 171-180.