

한라산 고도별 토양 세균의 군집구조와 다양성

좌재호^{1*}, 원향연², 서형호¹, 문두경¹, 김성철¹

¹국립원예특작과학원 온난화대응농업연구센터, ²국립농업과학원 농업미생물과

Soil Bacterial Community Structure and Diversity According to The Sea Level in Halla Mountain

J. H. Joa^{1*}, H. Y. Weon², H. H. Seo¹, D. K. Moon¹, S. C. Kim¹

¹Agriculture research center for climate change, NIHHS, RDA, Jeju,

²Agricultural Microbiology Division, NAAS, RDA, Suwon,

(Correspondence: choa0313@korea.kr)

1. 서 언

차세대염기서열(Pyrosequencing)분석방법은 염기서열을 분석하여 미생물의 종류와 분포비율을 평가함으로써 세균과 사상균의 군집구조와 다양성을 해석 하는 방법이다. 토양시료로부터 실제에 가까운 많은 정보를 정확하게 얻기 위하여 세균이나 사상균의 데이터베이스를 활용할 수 있으며, 미생물의 군집 변화와 다양성을 평가 할 수 있는 장점이 있다.

제주지역은 해안지대에서부터 한라산 정상까지 온도에 의한 기후대가 뚜렷하고 다양한 식생대가 분포하고 있다. 기후대별 토양미생물의 군집구조의 해석은 온도에 따른 토양생태계의 변화와 유기물의 동태를 파악 할 수 있다. 본 시험은 한라산 고도별 토양 세균의 군집구조와 다양성에 관한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료채취 및 전처리

토양시료는 2011년 5월 상순에 해발 200 m(농경지), 500 m(초지), 800 m(상록활엽수림), 1100 m (습지)지점에서 채취 한 후 잘 혼합하여 2 mm체를 통과 시켜 습토상태로 -80℃에서 냉동보관 후 차세대염기서열분석을 하였다.

2.2 토양 DNA 추출

토양 DNA 추출은 Ultra Clean soil DNA isolation 키트(MoBio Inc., USA)를 이용하였다. 동결된 토양 0.3 g을 2 mL bead solution tube에 넣고 5초간 잘 혼합 한 후 S1 용액, IRS(Inhibitor Removal Solution)용액, S2 용액 250 uL를 첨가하고, 5초 동안 잘 혼합한 후 4℃에서 5분 동안 배양하였다. 이후 키트사용방법에 따라 원심분리를 하고 차례로 S3, S4, S5 용액을 가한 후 DNA를 회수하여 -20℃에 저장하였다.

2.3 DNA 추출 확인

1% Agarose gel을 제조 후 genomic DNA를 loading하여 100 V에서 2시간 동안 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다.

2.4 16S rRNA PCR 증폭

FLX amplicon 시퀀싱을 위하여 PCR 혼합물을 조제 후 mixture 49 uL을 PCR tube에 넣었다. 그런 다음 template DNA를 1 uL씩 넣고 잘 섞이도록 피펫 한 후 30초간 잘 혼합하였다. 혼합 후 PCR 기기에 넣고 94℃에서 5분간 초기배양 후 94℃(30초)에서 denaturation, 60℃(45초)에서 annealing 후 72℃에서(1분30초) extention를 10회 수행하였다. 이후 다시 94℃(30초)에서 denaturation, 55℃(45초)에서 annealing, 72℃에서(1분30초) extention를 20회 증폭과정을 거쳐 4℃에서 반응을 종료 하였다. PCR증폭은 세균 16S rRNA 분석을 위하여 특별히 제작된 fusion primers를 사용하였으며 Tags-linker(AC)-27f: CCTATCCCCTTGTCCTTGGCAGTCTCAGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG, Tags-linker(AC)-518r: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGCACACWTTACC GCGGCTGCTGG를 이용하였다. PCR(PTC-200, Applied Biosystems, USA) 증폭 후 DNA시료를 120 V에서 30분 동안 전기영동하여 PCR이 잘 수행 됐는지 확인하였다.

2.5 차세대염기서열(Pyrosequencing)분석

PCR 증폭 산물을 454 Life science genome sequencer(FLX Titanium)를 이용하여 Chunlab Inc.(Korea)에서 분석을 수행하였다. Pyrosequencing 분석은 Chunlab (<http://www.chunlab.com>)에서 제시한 방법을 따랐다.

3. 결 과

Rarefaction curves는 시료간에 분석된 파이로시퀀스를 기반으로 하여 분석된 염기서열 수에 따른 OTUs의 개수를 그래픽으로 표현하여 다양성을 직접적으로 확인 할 수 있는 방법이다. OTUs는 염기서열간 유사도를 기반으로 한 염기서열 집단으로 특정 분류군의 개념으로 사용된다. 97% 염기서열 유사도를 나타내는 rarefaction curves는 한라산 고도 별로 차이가 크게 나타났다(Fig. 1). 분석된 파이로시퀀스수(clone)는 3,840-7,115, OTUs는 891-2,426개의 분포를 보였으며 Rarefaction curves에서 분석된 파이로시퀀스당 OTUs는 해발 200 m에서 가장 많았다.

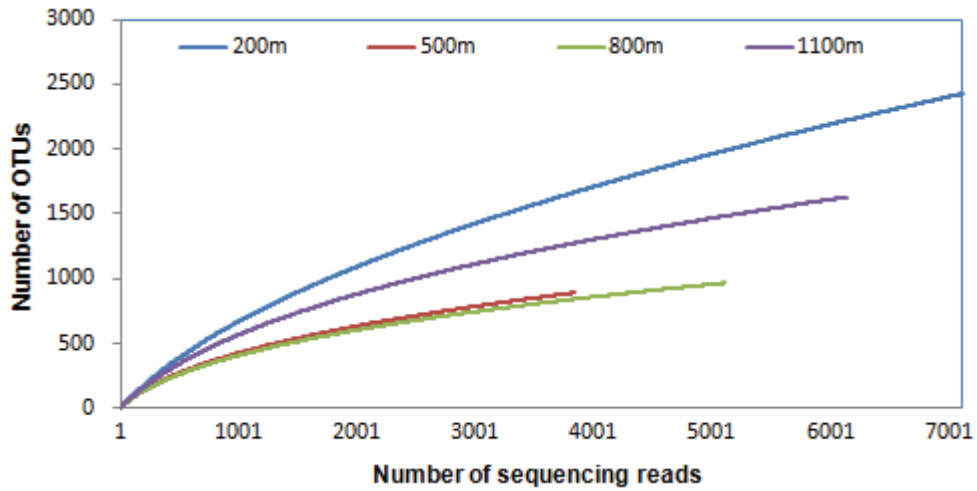


Fig. 1. Rarefaction curves indicating the observed number of operational taxonomic units (OTUs) at a genetic distance of 3% in four different soils.

Ace, Chao1, Shannon 등 세균의 종풍부도 추정치와 다양성 지수는 해발 200 m에서 각각 8,081, 5,521, 7.2 로 가장 높았다(Table 1).

Table 1. Bacterial richness estimators and diversity indices at four different soils according to the sea level in halla mountain.

Sampling sites	Total reads	OTUs	Ace	Chao1	Shannon
200 m	7,115	2,426	8,081	5,521	7.2
500 m	3,840	891	2,026	1,578	5.9
800 m	5,100	965	2,058	1,702	5.8
1,100 m	6,136	1,629	3,897	3,085	6.6

한라산 고도별 문 수준의 우점 세균그룹은 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*가 전체세균의 70.4-87.2%를 차지하였으며 해발 500 m, 800 m 지점이 200 m 지점보다 우점그룹 비율이 높게 나타났다(Fig. 2). 속 수준은 *Pseudolabrys*, *Bradyrhizobium*, *Edaphobacter*, *Conexibacter*가 전체세균의 11.8 - 34.9%를 차지하였으며 해발 200 m 지점이 800 m 지점보다 세균그룹의 다양성이 높았고 고도별로 차이를 보였다(Fig. 3).

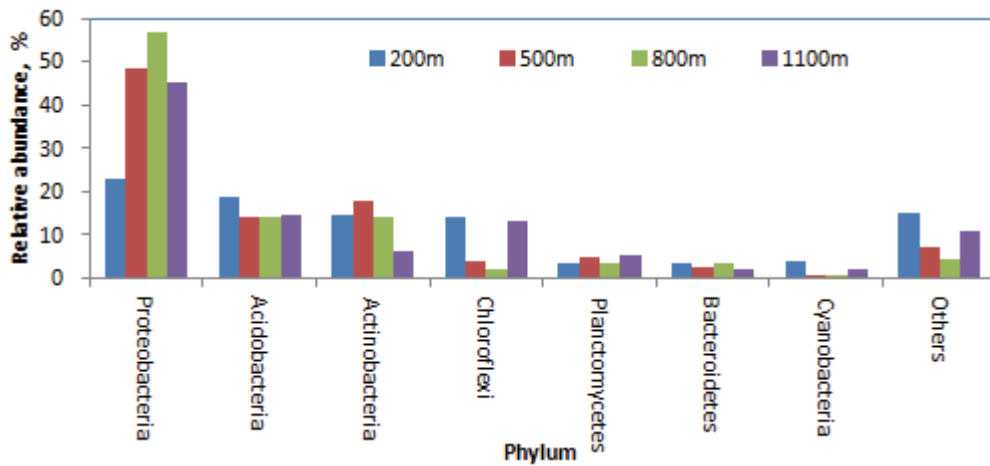


Fig. 2. Relative abundances of dominant bacterial phyla level in four different sites soil of halla mountain.

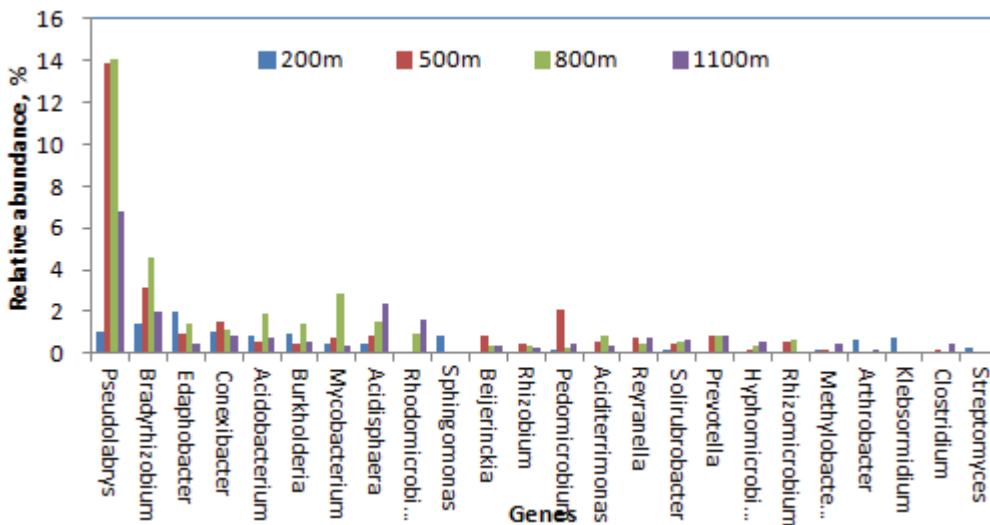


Fig. 3. Relative abundances of dominant bacterial genera level in four different sites soil of halla mountain.

인용문헌

Roesch, L. F. W., R. R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A. K. M. Hadwin, A. D. Kent, S. H. Daroub, F. A. O. Camargo, W. G. Farmerie, and E. W. Triplett, 2007: Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 283 - 290.

Nacke, H., A. Thürmer, A. Wollherr, C. Will, L. Hodac, N. Herold, I. Schöning, M. Schrupf, and R. Daniel, 2011: Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in german forest and grassland soils. *PLoS One* 6:e17000.