

북극 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링
표준 정립

Standardization of sampling strategy for investigating soil
metazoan diversity in the Arctic



2016.04.30

한국해양과학기술원
부설 극지연구소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “북극 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 정립”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 4. 30.

연구책임자 : 김민철

참여연구원 : 이유헌, 정지영, 남성진

: Binu Mani Tripathi



보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2016.03.01. ~ 2017.02.28	단계 구분	1단계	
연구사업명	중 사 업 명	창의연구사업				
	세부사업명	신진연구자 지원사업				
연구과제명	중 과 제 명					
	세부(단위)과제명	북극 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 정립				
연구책임자	김 민 철	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부 : 3 명 외부 : 2 명	해당단계 연구비	정부: 3,000 천원 기업: 천원 계: 3,000 천원	
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 극지생명과학연구부		참여기업명	해당사항 없음		
국제공동연구	해당사항 없음					
위 탁 연 구	해당사항 없음					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고서 면수	19
KOPRI 극지연구소 ○ 북극 건조 툰드라 지역(Svalbard)과 습지 툰드라 지역(Alaska) 서식 토양 미소동물 다양성 실태 파악 - 건조, 습지 툰드라 지역 간 미소동물 군집 다양성 및 종 조성 차이 확인 - 추출법, 샘플링 방법에 따른 토양 미소동물 다양성 및 종 조성 차이 확인 ○ 분석법 간의 비교분석을 통해 북극지역 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 최적화 구현 및 연구 목적에 따른 최적의 샘플링 방법 제시 - 전통적인 미소동물 추출법과 실제 토양 내 미소동물 군집 간의 비교분석 - 추출법이 아닌 토양샘플 자체로부터 미소동물 연구 시 필요한 최소 샘플요구량 제시						
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	토양 미소동물, 북극, 툰드라, 스발바르, 알래스카, 육상 생태계				
	영 어	Soil metazoa, Arctic, tundra, Svalbard, Alaska, terrestrial ecosystem				

요 약 문

I. 제 목

북극 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 정립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 북극권 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 방법, 최소 샘플 요구량에 대한 표준제시의 필요성
- 북극권 육상생태계 연구의 중요 축으로써 토양 미소동물 생태연구 활성화 필요

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 북극 건조 툰드라 지역(Svalbard)과 습지 툰드라 지역(Alaska) 토양 샘플링
- Baermann funnel, centrifugal sugar flotation 방법으로 토양 미소동물 추출
- 0.25-8g 범위의 다양한 샘플 사이즈로 토양 DNA 직접 추출
- 다양한 샘플링 방법 간 종 다양성 및 군집구조 패턴 비교 분석

IV. 연구개발결과

- 북극 건조 툰드라 지역(Svalbard)과 습지 툰드라 지역(Alaska) 서식 토양 미소동물 다양성 실태 확인
- 분석법 간의 비교분석을 통해 북극지역 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 최적화 구현 및 연구 목적에 따른 최적의 샘플링 방법 제시

V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구에서 도출된 결과를 스발바르 및 알래스카지역 토양 생태 특성 자료로 제공
- 본 연구결과를 토대로 토양 미소동물 주제를 기존의 북극 육상 생태계 연구에 접목시킬 계획임

S U M M A R Y

I. Title

Standardization of sampling strategy for investigating soil metazoan diversity in the Arctic

II. Purpose and Necessity of R&D

- Necessity of standardization and optimization of sampling strategies for metazoa diversity research in the Arctic
- Facilitation of soil metazoa research as one of main themes in the Arctic terrestrial ecosystem

III. Contents and Extent of R&D

- Soil sampling in the dry tundra (Svalbard) and moist tundra (Alaska) in the Arctic
- Soil metazoa extraction using Baermann funnel and centrifugal sugar flotation methods
- Direct DNA extraction of 0.25–8g of soils
- Comparison in diversity and community composition between different sampling strategies and extraction methods

IV. R&D Results

- Investigation of ‘real’ soil metazoan diversity in the dry tundra (Svalbard) and moist tundra (Alaska) in the Arctic
- Suggestion of standardized sampling strategies and optimization depending on research purpose

V. Application Plans of R&D Results

- Provide these results as a basic ecological data about soil metazoa diversity in the Arctic
- Application of soil metazoa investigation to the terrestrial ecosystem research in the Arctic

C O N T E N T S

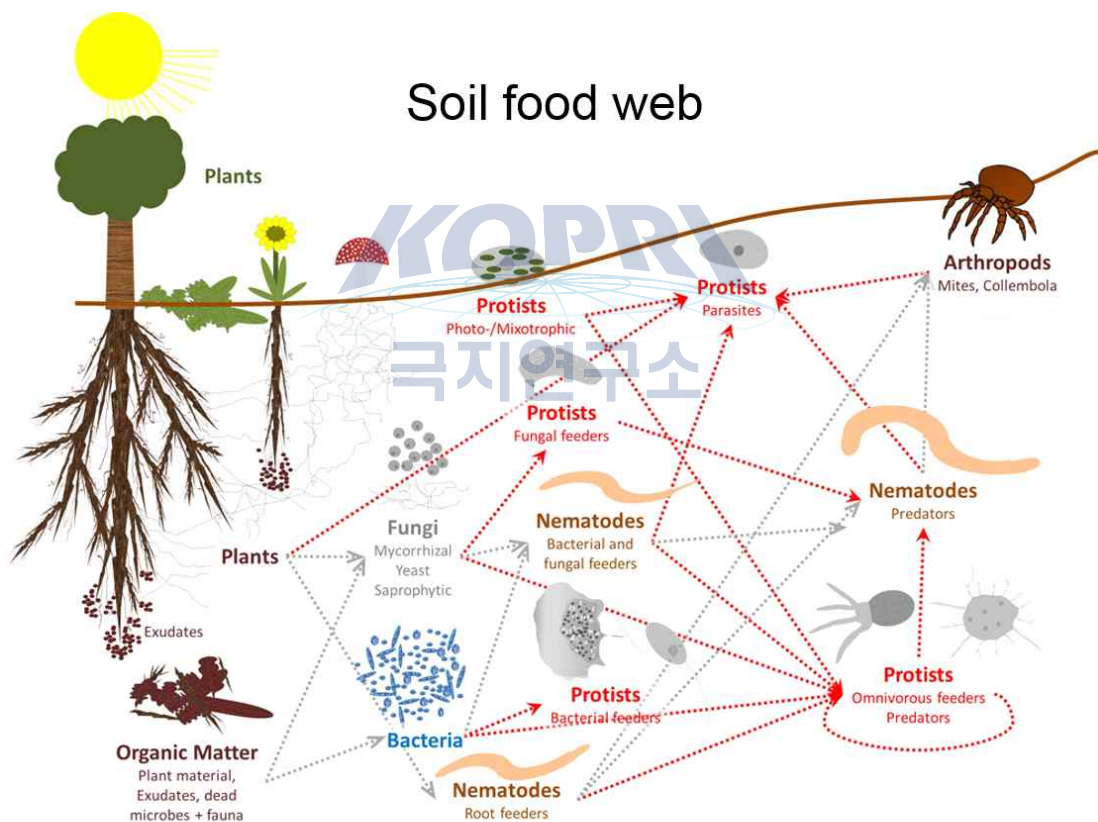
Chapter 1 Introduction	7
Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations	8
Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results	9
I. Final goal of research	9
II. Soil sampling and metazoa extraction in the Arctic	9
III. Community analysis of soil metazoa	11
IV. Standardization of soil sampling for metazoan diversity research in the Arctic	13
Chapter 4 Degree of R&D Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute	15
Chapter 5 Application Plans of R&D Results	17
Chapter 6 References	19

목 차

제 1 장 서론	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
가. 연구개발의 최종목표	9
나. 북극권 토양 샘플링 및 토양 미소동물 추출	9
다. 토양 미소동물 군집 분석	11
라. 북극권 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 정립	13
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도.....	15
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	17
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	19
제 7 장 참고문헌.....	19

제 1 장 서론

- 지금까지 토양 미소동물에 대한 연구는 연구자가 육안으로 식별 가능한 표본위주의 연구가 주를 이룸. 하지만, 실제 토양에는 육안으로 확인할 수 없는 크기의 수많은 미소동물들이 존재하며, 일부 크기가 작은 알이나 유충, 휴면 상태(e.g. cyst)의 미소동물의 경우 해부현미경을 사용하더라도 식별이 쉽지 않음. 따라서, 실제 토양 미소동물 다양성의 깊이를 이해하기 위해 DNA 염기서열을 이용한 분자생물학적 접근이 필요함
- 크기가 더 미세한 토양 세균의 경우 오래전부터 분자생물학적 접근이 시도되어왔고, 현재 0.25-1.0g 정도의 토양 샘플 사이즈가 세균 다양성 연구를 위한 최소 샘플 요구치로 정립되어 있음 (Ranjard et al., 2003; Kang and Mills, 2006). 이에 반해 토양 미소동물의 경우 샘플링 방법이 일원화되어 있지 않고, 미소동물 다양성 연구를 위한 최소 샘플 필요량에 대한 기준이 없음. 많은 연구들이 서로 다른 방법과 기준으로 연구를 수행한 바 메타분석과 같은 스터디간 비교연구가 어려운 실정임



<https://nioo.knaw.nl/en/employees/stefan-geisen>

- 현재 북극권은 지구상에서 기후변화가 가장 빠르게 진행되고 있는 지역 중의 하나이며, 많은 과학자들이 기후변화에 따른 생태계 변화 및 생물 반응을 연구 중임. 이러한 생태 연구에 있어 해당 지역에 서식하는 생물 다양성에 대한 이해도는 필수요건임에도 불구하고 토양 미소동물의 경우 앞서 언급된 방법적인 한계로 인해 북극권 토양 미소동물의 다양성에 대한 이해도는 상당히 낮은 수준임. 따라서, 기후변화에 의한 생물상 변화와 생물학적 되먹임(feedback) 현상을 제대로 이해하기 위해서는 실제 미소동물의 종 다양성을 반영한 조사가 이루어져야하며, 샘플링에 있어 표준화된 방법이 제시되어야함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술 수준

가. 세계적 수준

개념정립 단계	●	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

- Baermann funnel, Berlese-Tullgren funnel과 같이 깔때기를 이용한 전통적인 토양 미소동물 추출법들은 추출되는 미소동물군의 종류가 일관되지 않으며, 휴면 중이거나 이동성에 제약이 있는 개체들을 추출하는데 한계가 있음. 따라서 전체적으로 추출 효율이 떨어지고 방법 간 추출된 미소동물 조성 차이가 심함. 또한, 이러한 방법들은 미소동물 추출에 24-36시간에 이르는 긴 시간이 소요되는 만큼 추출기간 동안 샘플 내 생물학적 변화를 수반할 수 있음.
- 토양 미소동물의 개체 크기와 무게는 다양한 종 구성만큼이나 넓은 스펙트럼을 보이는 만큼 소수의 기질을 이용한 단순한 밀도기울기(density gradient) 차이로는 미소동물의 넓은 밀도 스펙트럼을 반영하는 데 한계가 있음.

나. 국내수준

- 국내에서 이루어지는 토양 미소동물 연구는 농업, 산림 보호의 목적으로 식물 병원체를 중심으로 이루어짐. 생태학적 목적으로 토양 미소동물 연구를 하는 연구 그룹은 전무함.

2. 국내외 연구현황

가. 국내 동향

- 극지연구소 PAP 사업(서울대학교 Jonathan M. Adams 교수)을 통해 중앙로벤빙하 후퇴 지역에서 빙하 후퇴 시기에 따른 토양 선충 군집 연구가 이루어진 바 있음. 하지만 기존에 알려진 Baermann funnel 방법을 이용했을 뿐 샘플링 최적화나 표준정립 연구는 수행된 바 없음

나. 국외 동향

- (1) 깔때기(funnel)와 밀도기울기(density gradient)를 이용한 토양 미소동물 연구
- 토양 미소동물들이 중력에 따라 아래로 향하려는 습성과 건조 스트레스로부터 회피하려는 습성을 이용하여 오래전부터 Baermann funnel (Thorne, 1961), Berlese-Tullgren funnel (Berlese, 1905; Tullgren, 1918)과 같이 깔때기(funnel)을 이용한 샘플링 방법이 널리 사용되어옴. 또한, centrifugal sugar flotation (Jenkins, 1964) 방법이 이동성이 적거나 휴면 상태의 미소동물 추출에 더욱 효과적인 것으로 밝혀진 이후 다양한 기질물질을 이용한 밀도 기울기(density gradient)방법이 현재까지도 널리 이용되고 있음. 많은 경우 추출 효율을 높이기 위해 기존 방법에 수정을 가하거나 두세 가지 방법을 혼합하여 사용하고 있는 실정임.
- (2) 토양 DNA 직접 추출을 통한 분자생물학적 미소동물 다양성 연구
- 깔때기나 밀도기울기를 이용한 전통적인 토양 미소동물 추출법들은 추출 효율이 낮고 연구자 개개인에 의해 수많은 수정이 가해져 추출과정이 일관되지 않은 한계를 노출한 바 최근에는 토양으로부터 직접 DNA를 추출하는 방식이 늘어나고 있음 (Hamilton et al, 2009; Wu et al, 2011). 하지만 일관된 기준이 없이 0.25g에서 10g에 이르기까지 넓은 범위에서 토양 DNA 추출이 이루어지고 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 연구개발의 최종목표

- 북극권 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 제시

나. 북극권 토양 샘플링 및 토양 미소동물 추출

- ☐ 북극권 툰드라 토양 샘플링

북극 툰드라 지역 현장조사

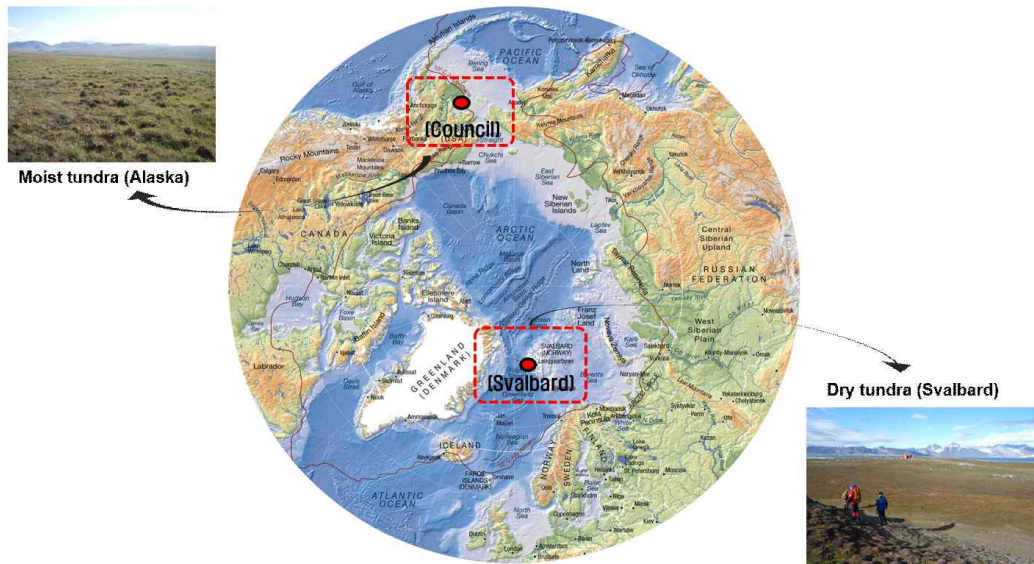


그림1-1. 북극 툰드라 지역 (알래스카, 스발바르) 토양 샘플링

- 대표적인 건조 툰드라(dry tundra) 지역인 스발바르 다산기지 주변 지역과 습지 툰드라(wet and moist tundra) 지역인 알래스카 카운실 tussock tundra를 대상으로 선정. 특성이 다른 두 종류의 북극 툰드라 지역에서 각각 토양 샘플링 수행. 스발바르의 경우 2016년 7월 중순 Ny-Alesund 다산기지 주변, 동로벤 빙하 후퇴지역 소빙하기에 형성된 moraine과 해안가 사이 툰드라 지역에서 채취함. 알래스카는 2016년 8월 중순에 카운실 지역을 방문하여 tussock tundra 지역에서 샘플 채취를 수행함.
- 각 사이트에서 총 5개의 방형구(1m x 1m)를 설정하여 낙엽 및 식물/이끼류 제거 후 표층 토양(top 0-10cm)을 멸균된 모종삽을 이용하여 채취한 후 폴링함(사이트 당 총 150-200g의 토양 샘플링). 방형구 간 20m 간격을 유지하는 interrupted grid system으로 샘플링 수행. 스발바르 토양은 다산과학기지, 알래스카 토양은 KOPRI Lab으로 운반 후 2mm 체로 큰 입자들을 걸러내고 토양을 균질화시킴. 토양 샘플들은 니알슨 과학기지촌 내 marine laboratory에 비치된 -80℃ 초저온 냉동고에 2주간 보관 후 아이스박스에 넣은 채 한국으로 이송. 알래스카 토양은 카운실에 위치한 IARC-KOPRI lab내의 -20℃ 냉동고에 3개월 간 보관 후 아라온 호를 통해 한국으로 냉동상태로 이송.

□ 전통적인 방법을 이용한 토양 미소동물 추출

- Baermann funnel : 2mm 체로 걸러진 균질화된 100g의 토양을 대상으로 Baermann funnel (Thorne, 1961) 방법으로 미소동물 추출. 토양 미소동물들이 중력방향으로 이동하는 습성을 이용하여 48시간 후 깔때기 아랫부분 튜브 속 물질들을 모아 원심분리 후 남

은 펠렛으로 DNA 추출.

- Centrifugal sugar flotation : 2mm 체로 걸러진 균질화된 100g의 토양을 대상으로 기질(Ludox)을 이용한 밀도기울기(density gradient) 방법 (Jenkins, 1964)으로 미소동물 추출. 1차 토양 유기물분리, 2차 토양입자 침전물 분리를 통해 남은 상등액을 원심분리 후 남은 펠렛으로 DNA 추출.

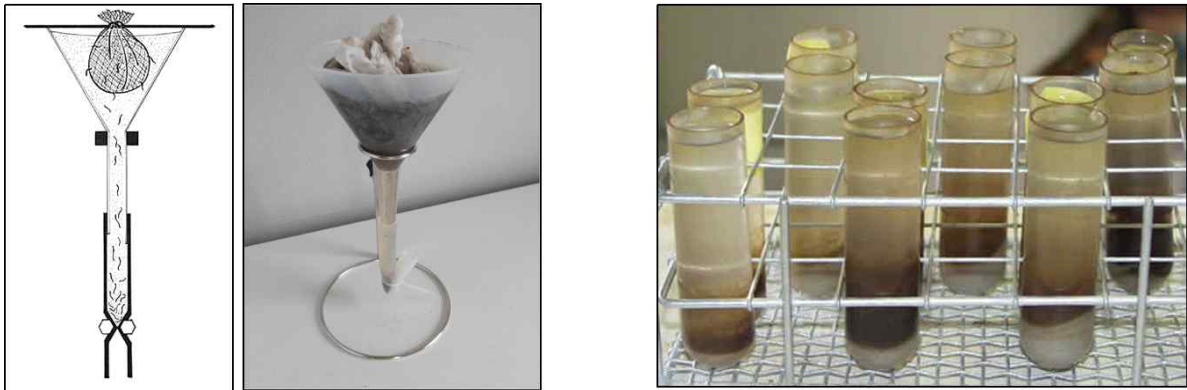


그림 1-2. Baermann funnel(좌), centrifugal sugar flotation(우) 방법으로 토양 미소동물 추출

□ 샘플 사이즈를 달리하여 토양으로부터 직접 DNA 추출

- 토양 샘플사이즈에 따른 1) 종 다양성 saturation 여부 및 샘플간 종 다양성 차이 2) 각 사이즈의 반복수 간, 각 사이즈 간의 군집 변이 정도를 테스트하기 위해 총 6가지의 서로 다른 샘플사이즈 (0.25g, 0.5g, 1g, 2g, 4g, 8g)를 선정 (토양 세균 다양성 연구를 위한 최소 단위인 0.25g을 최소량으로 배정). 각 샘플 사이즈 별 5반복으로 토양 DNA 추출.

다. 토양 미소동물 군집 분석

□ 토양 DNA 추출, PCR, MiSeq 염기서열 분석

- 서로 다른 방법으로 추출된 추출체 및 토양 샘플들은 MoBio Soil DNA extraction kit를 이용하여 DNA 추출을 수행하고 picogreen 시약으로 추출된 DNA 농도를 측정함.
- 18S rRNA V4-V5 region을 타겟으로 하는 eukaryote universal primer인 574*f(5'-CGGTAAAYTCCAGCTCYV-3')/1132r(5'-CCGTCAATTTHCTTYAART-3') (Hugerth et al., 2014)로 amplicon PCR, index PCR을 거친 후 library 제작, MiSeq 2x300bp amplicon sequencing을 차례대로 수행. Amplicon sequencing은 Integrated Microbiome Resource (IMR)에서 수행함.

Flowchart of methodology

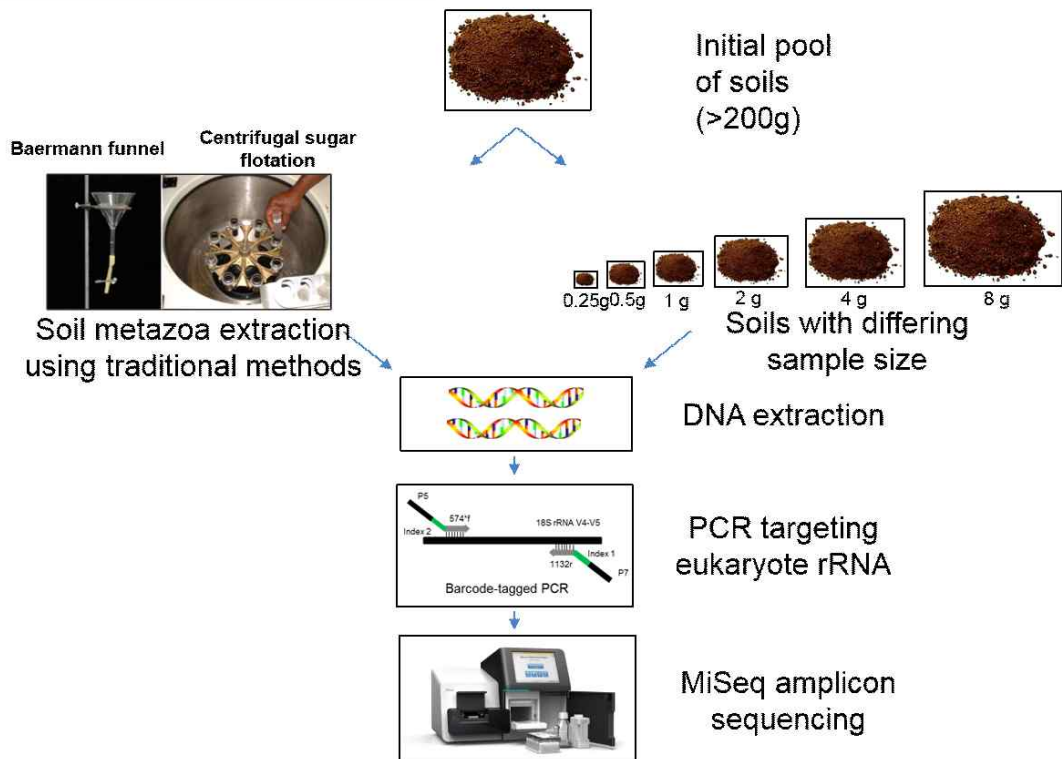


그림 1-3. 토양 미소동물 추출부터 진핵생물 DNA 염기서열 분석까지의 전체 workflow

□ 생물정보학, 통계분석

- NGS 기반 미생물 분석 툴들(mothur, QIIME)을 활용한 생물정보학적 분석 수행. 초기 quality-trimming (Sickle)과 error correction (BayeHammer)을 수행하고 PANDAseq을 이용하여 paired-end assembly 수행. SILVA SSU reference DB를 기준으로 alignment를 수행하고 denovo UCHIME 알고리즘을 이용하여 chimera 제거. Hierarchical clustering의 한 종류인 average neighbor방법으로 OTU clustering을 수행하고, taxonomic classification과정은 Protist Ribosomal Reference database (PR2) (Guilou et al., 2013) 최신버전을 이용하여 수행함.
- 서로 다른 처리구 및 샘플간 종 다양성 비교를 위해 t-test, ANOVA와 같은 가설검증을 수행함. 샘플간 군집구성 비교를 위해서는 PERMANOVA나 ANOSIM과 같은 다변량 가설검증 기법을 활용함. NMDS와 같은 다변량 시각화기법을 통해 샘플간 미소동물 군집구성의 차이를 시각적으로 나타내고, 샘플 간 종 구성에 기반한 Bray-Curtis dissimilarity를 계산하여 처리구 내(within group) 군집 구조 분산(community variance) 정도를 비교분석함.

라. 북극권 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 정립

□ 샘플링 방법, 샘플사이즈에 따른 토양 미소동물 군집 차이 비교

- 스발바르 토양을 대상으로 서로 다른 추출법 간에 미소동물 군집을 비교한 결과 funnel, sugar flotation, soil 세 가지 모두에서 phylum 레벨에서 큰 조성의 차이를 보임(그림 1-4). Funnel로 추출한 경우 metazoa의 비율이 다른 두 방법에 비해 상대적으로 높게 관찰되었고, soil DNA 자체를 관찰한 경우 Streptophyta의 상대적 빈도가 평균 25%로 높게 나타남. 또한 토양 DNA 자체를 분석한 경우에는 다른 두 추출법의 경우보다 훨씬 다양한 진핵생물 phylum들이 관찰됨. 알래스카와 스발바르 두 지역 툰드라 간 비교에서는 스발바르 지역에서 Metazoa와 Streptophyta가 상대적으로 많이 검출된 반면, 알래스카 카운실지역에서는 균류가 우점하는 것으로 나타남. 제한된 두 지역에서만 샘플링이 이루어져 현 결과로서는 이러한 조성의 차이가 지리적 요인 혹은 환경적 요인에 의한 것인지 판단하기 어려움.

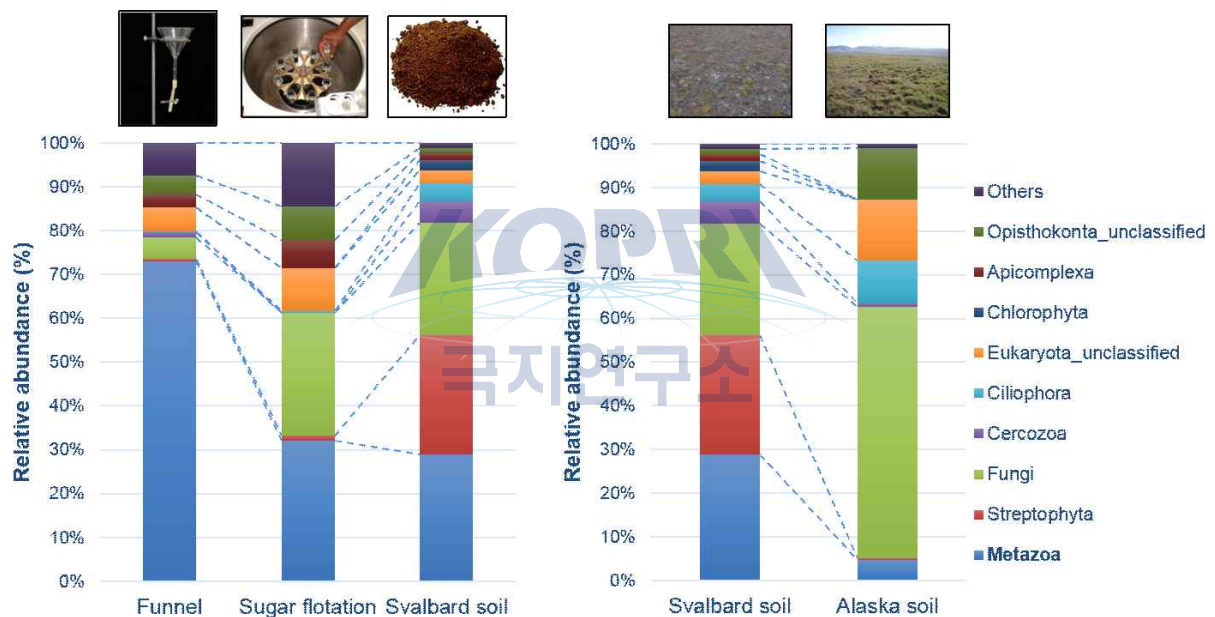


그림 1-4. 토양 샘플링 방법(좌) 및 지역 간(우) 차이에 따른 토양 미소동물 군집 분포 비교

- 비록 본 연구결과에서는 미소동물 이외의 다른 많은 종류의 진핵생물들이 검출되었지만 본 연구에 사용된 추출법들은 기본적으로 토양 미소동물 검출이 주 목적인만큼 metazoa 하위레벨 개체군에 대한 비교분석을 수행함. Funnel, sugar flotation 추출 및 토양 자체 DNA에서의 미소동물 조성 비교결과 Nematoda와 Arthropoda가 우점하는 것으로 나타남(그림 1-5). 하지만 funnel 추출법의 경우 선충이 주 타겟으로 알려져 있음에도 오히려 Arthropoda가 상대적으로 더 많은 비율로 검출됨. Sugar flotation 추출법의 경우 Nematoda그룹이 상대적으로 더 많은 비율로 검출되었고, 또한 Annelida가 높은 비율로 검출됨. 추출법이 아닌 실제 토양에서 추출된 DNA기반 조사에서는 추출법들에 비해 Tardigrada, Rotifera, Platyhelminthes 그룹의 개체들이 상대적으로 많이 관찰됨. 이는

중력방향 이동, 개체들의 비중차이에 의한 분리 등 기존에 선충, microarthropoda 중심의 추출법으로는 이들 개체군들을 추출하는 데에는 한계가 있음을 시사함. 이들 그룹은 보통 사이즈에 의해 meiofauna로 분류되는 선충, microarthropoda와는 다른 그룹 특이적인 추출법을 사용하거나 토양 자체 DNA 조사를 통한 검출이 이루어져야함. 또한 이러한 결과는 연구목적에 따라 분석법을 달리해야함을 시사함. 예를 들어, 활성이 있는 개체를 대상으로 할 경우 funnel과 같은 방법은 여전히 강력한 추출법이 될 수 있지만, 토양 내 전체 미소동물의 다양성을 조사할 경우 혹은 샘플링 가능한 토양의 양이 제한적일 경우 직접적인 토양 샘플링 방법이 더 효율적일 수 있음. 서로 다른 추출법 간 종 다양성 비교에서는 funnel 방법에서 현저하게 낮은 종 다양성이 관찰되었고, sugar flotation추출 시에는 토양 자체에서 관찰된 다양성 범위의 최하위 레벨과 유사한 정도의 종 다양성을 보였음.

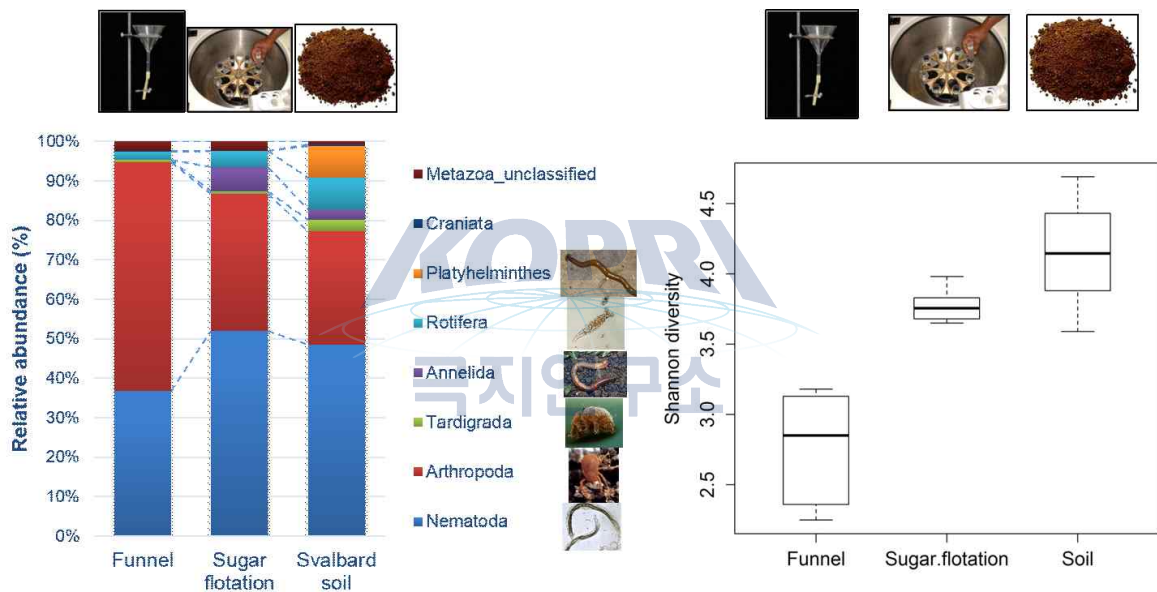


그림 1-5. 서로 다른 추출법 간 차이에 따른 metazoa 분포(좌) 및 종 다양성 (우) 비교

- 전통적인 미소동물 추출법이 아닌 토양에서 직접적으로 DNA를 추출했을 때 샘플 사이즈에 따라 미소동물 군집 간 변이가 얼마나 차이가 나는지 알아보기 위한 테스트를 수행함(그림1-6). 스발바르와 알래스카 토양 모두 가장 작은 샘플사이즈(0.25g)에서 군집 간 변이가 가장 크게 나타남. 0.5g, 1g, 2g에서는 중간 레벨 정도의 군집 간 변이 범위를 보였고, 4g, 8g에서는 상대적으로 변이의 정도가 적게 나타남. 직선회귀분석 결과 0.25g에서 8g으로 토양 샘플링 양을 늘림에 따라 각 처리군 내 군집의 유사도는 감소하는 경향을 보임(스발바르 $R^2=0.35$, $P<0.01$; 알래스카 $R^2=0.42$, $P<0.01$)(그림 1-6). 각 처리군 별로 군집 간 변이(variance in community dissimilarities between samples within treatment)의 정도가 어떻게 변화하는지 알아보기 위해 변이의 상대적인 범위를 나타내는 값인 SDL(standard deviation of log(Bray-Curtis dissimilarity)) 과 샘플링 양과의 상관관계 분

석을 수행한 결과, 두 요소 간의 상관관계가 높은 것으로 나타남(스발바르 Pearson's $r=0.79$, $P<0.01$; 알래스카 $r=0.84$, $P<0.01$). 두 지역 토양 모두 4g에서 군집 간 변이의 정도가 확연하게 떨어지는 것으로 보아 토양 세균 군집의 경우 0.25-0.5g이 최소샘플 표준으로 많이 이용되는 것처럼, 추출법이 아닌 직접적인 토양 자체를 미소동물 군집분석에 이용할 경우 최소 4g의 샘플요구량이 필요함을 증명함. 물론, 본 연구결과의 경우 두 지역만을 대상으로 했기에 이를 북극 전체지역으로 혹은 토양 미소동물 전체로 일반화하기는 어려움. 또한 현실적인 이유로 인해 8g 이상의 샘플사이즈에서는 테스트를 수행하지 않았기에 더 많은 양의 샘플사이즈에서 군집 간 변이가 수렴하는 패턴을 보이는지 아닌지 추가 관찰이 필요함. 그럼에도 불구하고 4g에서 군집 내 변이가 갑자기 감소한 패턴을 보였다는 사실은 미소동물의 생활환경, community assembly 과정 등과 맞물려 큰 의미를 가짐. 앞으로 토양 샘플사이즈가 가지는 미소동물 군집의 생태적, 기능적 의미에 대한 추가 고찰이 필요함.

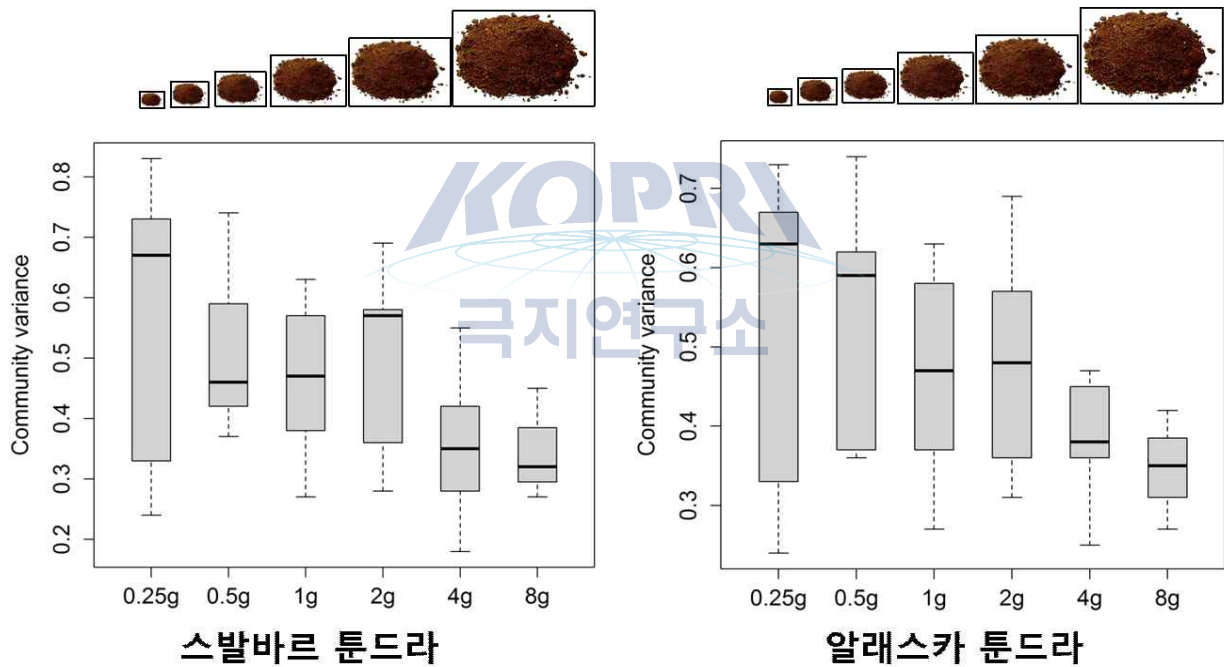


그림 1-6. 샘플 사이즈에 따른 토양 미소동물 군집 구조 유사도 분산 차이 비교

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

가. 연구기간 :총 1년 (2016.03.01. ~ 2017.02.28.)

나. 목표 달성도

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				연차별 계획대비 연구실적 달성율(B) (%)
	세부연구목표	연구내용	가중치 (A)	달성실적	
1년차 (2016)	○ 샘플링 방법, 샘플 사이즈에 따른 토양 미소동물 군집 차이비교를 통한 북극권 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 표준 제시	- 북극 건조 툰드라 지역(Svalbard)과 습지 툰드라 지역(Alaska) 토양 샘플링 - Baermann funnel, centrifugal sugar flotation 방법으로 토양 미소동물 추출 - 0.25-8g 범위의 다양한 샘플 사이즈로 토양 DNA 직접 추출 - Eukaryote universal primer를 이용한 DNA 염기서열 분석 수행 (MiSeq 2x300bp 활용) - 다양한 샘플링 방법 간 중 다양성 및 군집구조 패턴 비교 분석	1.0	- 북극 건조 툰드라 지역(Svalbard)과 습지 툰드라 지역(Alaska) 토양 샘플링 및 토양 미소동물 추출 완료 - 토양 DNA 추출 및 MiSeq amplicon sequencing, 군집 다양성 비교 분석 완료 - 분석법 간의 비교분석을 통해 북극지역 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 최적화 구현	100
		계	1.0		100

다. 대외기여도

(1) 과학 분야

- 북극지역에서 토양 미소동물 다양성 연구를 위한 샘플링 최적화 연구를 수행함으로써 앞으로 토양 미소동물 생태연구 발전에 이바지함
- 본 연구를 통해 토양 미소동물 다양성 연구에 NGS 기술을 적극 활용하는 바 생물정보학적 기술발전에 기여

(2) 사회/경제적 분야

- 현미경을 이용한 전통적인 방법들이 주를 이루던 토양 미소동물 다양성 연구에 최신 분석기술인 차세대 염기서열분석기술(NGS)을 적용함으로써, 연구범위 확대를 통한 생명공학, 생물정보학 발전에 기여.
- 다양성 연구를 통해 새롭게 발견되는 미소동물 종들의 존재는 신생명자원 부가가치 창출을 위한 잠재력을 지님.

(3) 정책 분야

- 북극정책기본계획과 시행계획에 제시된 ‘북극다산기지 기반 연구·활동 확대’에 대한 성과에 기여

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 연구개발결과의 국제 사회 활용 방안

- 본 연구에서 도출된 결과를 스발바르 및 알래스카지역 토양 생태 특성 자료로 제공
- 스발바르 관련 국제네트워크(NySMAC, SSF 등)에서 연구 결과 발표

나. 연구개발결과의 추후 연구 활용 방안



- 본 연구를 통해 얻어진 정보들(1. 북극 툰드라 지역 토양 미소동물 다양성 실태, 2. 연구목적에 따른 토양 샘플링 최적화 및 표준)을 발판삼아 현재 북극 각지에서 이루어지고 있는 다양한 육상 생태연구에 적용할 계획임. 현재 북극 육상생태계 연구는 크게 세 가지 주제로 이루어지고 있음. 빙하후퇴에 따른 생태계 변화 연구(스발바르), 동토 용해에 따른 생태계 변화 연구(알래스카 카운실), 기후변화모사에 따른 생태계 변화 연구(캐나다 캠브리지 베이)가 수행 중임. 이 세 가지 테마들에서 현재는 토양 미생물, 군집구조 중심으로 연구가 이루어지고 있지만, 향후 금번 연구결과를 발전시켜 토양 미소동물 군집과 생태계 기능 연구로까지 육상 생태계 연구영역을 확장시킬 계획임.



스발바르 빙하 소멸 지역



알래스카 툰드라 동토층



캐나다 기후변화모사 실험

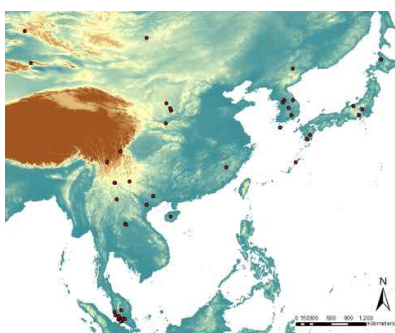
현재

- 토양 미생물 (세균, 고세균, 진균)
- 종 다양성 및 군집 구조 연구 중심

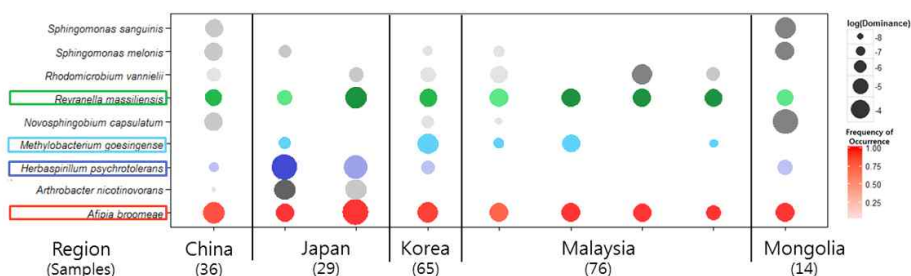
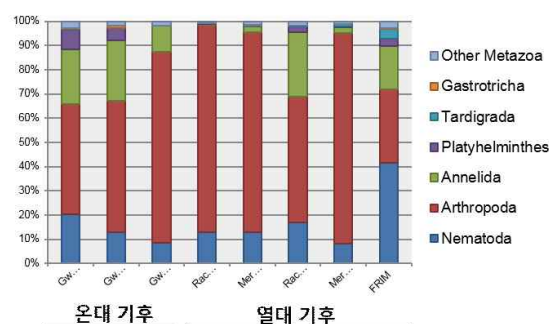
향후 계획

- 토양 미소 동물 (선충, 진드기, 원생생물 등)
- 생태계 기능/역할 연구 중심

- 본 연구는 북극 툰드라 지역을 대상으로 수행되었지만 동일한 방법론을 다른 biome 에도 적용할 수 있는 바 향후 남극뿐만 아니라, 열대 온대지역에 이르기까지 토양 미소동물의 지리적 분포 패턴 연구에 활용될 수 있을 것으로 판단됨.



Geographic sampling



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장. 참고문헌

- Berlese A. 1905. Apparenocchio per raccogliere presto ed in gran numero piccoli. Atropodi. Redia, Vol.2:85-90.
- Guilou L, Bachar D, Audic S, Bass D, B, Berney C, Bittner L. et al. 2013. The Protist Ribosomal Reference database(PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. Nucleic Acids Research 31:D597-D604.
- Hamilton HC, Strickland MS, Wickings K, Bradford MA, and Fierer N. 2011. Surveying soil faunal communities using a direct molecular approach. Soil Biology & Biochemistry 41:1311-1314.
- Hugerth LW, Muller EL, Hu MY, Lebrun LA, Roume H, Lundin D et al. 2014. Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. PLoS ONE. 10(1):e0117636.
- Jenkins WR. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Dis Rep 48:692.
- Kang S, and Mills AL. 2006. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. Journal of Microbiological Methods 66:242-250.
- Ranjard L, Lejon PD, Mougel C, Schehrer L, Merdinoglu D, and Chaussod R. 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. Environmental Microbiology 5(11):1111-1120.
- Thorne G. 1961. Principles of Nematology, McGraw Hill Book co. Inc. New York:553.
- Tullgren A. 1918. Ein sehr einfacher Ausleseapparat fur terricole Tierfaunen. Zeitschrift fur angewandte Entomologie Vol.4:149-150.
- Wu T, Ayres E, Bardgett R, Wall DH, and Garey JR. 2011. Molecular study of worldwide distribution and diversity of soil animals. 108(43):17720-17725.

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.