

이산화탄소 증가가 습지토양의 탈질세균 군집구조에 미치는 영향

이승훈 · 김선영 · 강호정*

이화여자대학교 환경학과

이산화탄소 농도의 증가가 습지토양의 탈질세균 군집구조에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 자연농도 (370 ppm)와 고농도 (740 ppm)의 이산화탄소 조건의 습지생태계를 조성하여 110일 이상 배양한 후 토양 내 미생물 군집구조의 변화양상을 관찰하였다. 미생물 군집구조 분석은 탈질과정에 관여하는 효소중 하나인 nitrite reductase의 유전자인 *nirS* 유전자를 대상으로 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 분석기법을 이용하여 수행하였다. PCR 결과 모든 토양시료에서 *nirS* 유전자가 검출되었고, RFLP 분석을 통해 자연농도의 이산화탄소 조건에서 83개, 고농도 조건에서 95개의 *phylo*type을 획득하여 조성된 습지토양에서 탈질과정이 광범위하게 일어날 수 있음을 확인할 수 있었다. 두 경우 모두 두 종류 (type 1과 type 2)의 *phylo*type이 우점하고 있었고, 고농도 조건의 탈질세균 군집의 풍부도가 저농도 조건에 비해 더 높고, *phylo*type의 종류가 현저하게 변화되는 경향을 확인하였다. 본 연구결과는 습지토양의 탈질세균 군집이 매우 다양한 종류로 이루어져 있고, 이산화탄소의 증가에도 큰 영향을 받지 않는 상당히 안정적인 우점 개체군이 존재하고 있는 반면, 전체 *phylo*type의 약 60%는 이산화탄소 증가에 따라 민감하게 변화함을 보여주었다.

Key words □ CO₂, denitrifying bacterial community, PCR-RFLP, wetland

습지 생태계는 지구표면의 약 4~6% 만을 차지하고 있으나 이산화탄소보다 단위 몰 당 각각 25배, 300여 배 더 강력한 지구온난화 기체인 메탄과 아산화질소의 주 생산처이고, 북극 이탄습지의 경우 약 455 Pg의 탄소를 저장하고 있어 전지구적인 탄소순환에 중요한 역할을 담당한다(10). 따라서 전지구적 기후변화에 따른 습지의 생지화학적 변화는 습지 생태계뿐만 아니라 전지구적 기후변화에도 되먹임으로 작용할 수 있으므로 기후변화가 습지생태계에 미치는 영향에 대한 심도있는 연구가 요구된다.

기후변화가 습지에 미치는 영향에 대한 연구가 중요함에도 불구하고, 이에 대한 선행연구들은 미흡한 실정이다. 더욱이 이산화탄소의 효과를 살핀 대표적인 몇몇 선행연구들은 주로 이산화탄소 증가에 따른 메탄 발생(9), 용존 유기탄소와 아산화질소 발생(6), 습지 식물체 및 잔존 유기물의 화학적 성분변화 등에 초점을 맞추어 왔을 뿐이다. 미생물의 경우 산림토양생태계의 균류를 대상으로 이산화탄소의 영향을 살펴본 연구가 있기 하지만(7), 기후변화에 따른 습지생태계의 토양에 존재하는 세균 군집구조의 변화양상에 대한 연구는 전무하다. 하지만 자연생태계의 에너지와 물질순환에 있어 세균군집이 차지하는 위치는 매우 중요하며 특히 습지생태계 내의 세균군집의 역할 중 탈질(denitrification)과정은 전체 질소 순환과정에서 매우 중요한 위치를 점하고 있으며, 많은 탈질세균이 습지생태계에 존재한다고 알려져 있다. 따라서 습지 토양 내에 존재하는 세균 군집, 특히 탈질세균 군집

에 대한 조사는 습지생태계에 미치는 기후변화의 영향 및 습지생태계의 되먹임 현상을 파악하는 데 있어 매우 중요한 정보를 제공할 수 있다.

탈질화 과정의 각 단계에는 고유의 효소가 작용하는데, 질산염 환원효소 (nitrate reductase), 아질산염 환원효소 (nitrite reductase), 일산화질소 환원효소 (nitric oxide reductase), 아산화질소 환원효소 (nitrous oxide reductase)가 그것이다. 탈질화에 관여하는 네 가지 효소 중 질산염을 아질산염으로 환원시키는 질산염 환원효소의 경우 탈질화과정에도 관여하긴 하지만, 어떤 경우에는 질소 호흡과정에 관여하기도 한다. 실제로 질산염 환원효소의 한 종류인 Nap의 경우 탈질화과정과 함께 호기조건에서 nitrate respiration 과정을 매개한다고 알려져 있다 (1, 2).

본 연구에서는 PCR과 같은 분자생물학적 기법을 통해 습지토양내의 기능성 군집인 탈질세균 군집구조를 비교 분석하기 위하여 실질적인 탈질화과정의 첫 번째 단계인 질산염 환원에 관여하는 효소의 유전자인 *nirS* 유전자를 분석 대상으로 삼아, 이산화탄소의 증가가 습지생태계의 탈질세균 군집구조에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 모형

습지 식물 중 뿌리와 줄기 밑 부분이 항상 물에 잠겨 있는 추수 식물류 3종-부들 (*Typha latifolia*), 큰고랭이 (*Scirpus lacustris*), 풀풀 (*Juncus effusus*)-의 뿌리를 하변에서 채취한 모래(수분 함유능 36.83%±4.62, 유기물 함량 1.582%±0.152)로 채운 직경 12

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-3277-3916, Fax: 02-3277-3275
E-mail: hjkang@ewha.ac.kr

cm, 높이 16 cm 크기의 화분에 심었다. 식물을 심은 화분을 수조에 넣고 대기 중 이산화탄소 농도를 740 ppm으로 유지한 식물 배양실과 일반 대기 조성 (370 ppm)을 유지한 식물 배양실 (140 cm × 74 cm × 1200 cm)(DS-51GSP, 다솔과학)에 각각 정치한 후 25°C에서 110일 간 배양하였으며 동일조건의 실험군은 4반복 실시하였다.

토양시료에서 DNA 추출 및 *nirS* 유전자 PCR 증폭

동일조건의 실험군 중 임의로 하나씩 선택하여, 총 6종류의 토양 근권으로부터 멸균된 spatula로 시료를 각 1회 채취한 후 이 중 약 0.5 g의 토양을 DNA 추출에 이용하였다. 토양시료로부터 DNA 추출은 MoBio 사의 UltraClean soil DNA kit (MoBio, Solano Beach, CA, USA)를 사용하였고 모든 과정은 제조사의 지시에 따랐다.

탈질과정에 관여하는 효소인 질산염 환원효소를 encoding 하는 *nirS* gene을 증폭하기 위한 primer는 832F (5'-TACCACCCCGAGCCGCGCGT-3')와 1606R (5'-AGKCGTGAACCTKCCGGTCGG-3')로 Liu 등이 사용한 것을 참조하였다(6). PCR 반응 tube에 추출된 DNA 2 μl (100~200 ng)에 dNTPs 1 mM, 832F primer 1 μM, 1606R primer 1 μM, MgCl₂ 1.5 mM, bovine serum albumin (Sigma) 4 μg, Taq 1.25 U (Promega, Madison, USA), 10 × PCR buffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl[pH 8.4], 0.1 % Triton-X) 5 μl를 넣고 멸균된 증류수로 총반응 부피를 50 μl로 맞추는 후 thermal cycler (PTC-100, MJ Research, Waltham, MA, USA)를 이용하여 다음 조건에 따라 PCR 반응을 실시하였다. 94°C에서 3 분간 반응한 다음, 94°C denaturation 30 초, 65°C annealing 1 분, 72°C extension 1 분을 35 회 반복하고, 72°C에서 10 분간 final extension을 수행하였다. 반응이 끝난 후 반응산물 5 μl를 1.5% agarose gel (SeaKem LE; FMC Bioproducts, Rockland, Maine)을 사용하여 0.5 × TBE buffer에서 100 V, 25 mA로 30 분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 기 대한 크기의 band 유무를 확인하였다.

시료로부터 추출한 유전자 분포의 불균등성과 PCR 반응의 편향에 따른 오차를 줄이기 위해 모든 PCR 반응은 동일 조건에서 3회 실시하였다.

Cloning 및 RFLP 분석

증폭된 *nirS* 유전자의 PCR 산물을 DNA purification kit (MoBio, Solano Beach, CA, USA)를 이용하여 회수, 정제한 후 pGEM-T vector (Promega, Madison, USA)에 4°C에서 20시간 이상 ligation 하였다. Ligated product를 *E. coli* DH5α 균주에 transformation한 후 ampicillin과 X-gal이 함유된 LB agar medium에서 37°C에서 20시간 배양하여 white/blue colony selection을 하였다. White colony를 대상으로 colony-PCR을 통해 true transformant clone을 선별하였다. 이후 colony PCR 산물을 *HhaI* 과 *MspI* 제한효소 (DCC-BIONET, Seoul, Korea)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 절단하였다. PCR 산물 5 μl, 제한효소 5 U, 10 × reaction buffer 1 μl를 넣고, 최종반응부피를 10 μl로

맞추어 37°C에서 4시간 반응시켰다. 반응결과물은 2.5%의 agarose gel (NuSieve 3:1; FMC Bioproducts, Rockland, Maine)을 사용하여 0.5 × TBE buffer에서 100 V, 25 mA로 45 분간 전기영동한 후 band 유형을 확인하였다. 각 clone들의 band 유형을 BIO-ID** software (version 99, Vilber Lourmat, Torcy, France)를 이용하여 비교하였다.

미생물 군집 다양성 지수 산출

미생물 군집의 다양성 지수를 구하기 위하여 상이한 RFLP type을 지닌 clone을 독립된 phylotype으로 설정하여 생태계 내 생물 군집의 다양성을 대변하는 여러 다양성 지수를 산출하였다 (11). Species richness의 경우 EstimateS (version 5.01; R. Colwell, University of Connecticut; <http://vicerov.eeb.uconn.edu/estimates>)를 이용하여 시료 내에 존재하는 total species richness의 추정치인 Chao1 estimator value를 산출하였다. 미생물 군집간의 유사도는 Dice coefficient ($s = 2ab/a + b$)로 결정하였고 UPGMA 알고리즘을 이용하여 dendrogram으로 나타내었다.

결과 및 고찰

nirS 유전자 PCR 증폭

실험결과 분석한 6종류의 모든 토양시료에서 *nirS* 유전자가 검출되었다. 이러한 사실은 조사한 습지토양에서 탈질과정이 광범위하게 일어나고 있음을 암시하고 있다. 증폭된 PCR 산물의 농도는 시료마다 조금씩의 차이를 보였지만, 통계학적으로 의미있는 수준은 아니었으며, PCR 반응의 bias로 인해 PCR 산물의 농도만으로 대상 유전자에 대한 정량적 평가는 하기 어려웠다. 다만, 본 연구와 병행하여 수행했던, 또 하나의 질산염 환원효소 유전자인 *nirK* 유전자의 PCR 증폭 결과를 *nirS* 유전자의 결과와 비교했을 때, 모든 시료에서 *nirS* 유전자의 경우가 *nirK* 유전자보다 상대적으로 band 농도가 매우 진함을 확인할 수 있었다(자료 미제시). 이는 아마도 두 효소의 자연계내의 상대적 분포양상의 차이에 기인한 것이라 사료된다. Coyne 등은 거의 동일한 구조와 기능을 지녔음에도 불구하고, *nirS*가 encoding하는 heme 함유 질산염 환원효소가 Cu 함유 질산염 환원효소보다 광범위하게 분포하고 있다고 보고한 바 있다(4). 또한 Liu 등은 *nirS* 함유 세균의 경우 배양 가능한 탈질세균과 유사한 반면 *nirK* 함유 세균의 경우 기존에 알려진 배양 가능한 *nirK* 함유 세균과 유사도가 상대적으로 낮음을 보고한 바 있는데(8), 특별히 *nirK* 유전자의 경우 현재 사용되고 있는 검출 방법을 통해서서는 저평가될 수 있는 가능성도 있다.

RFLP 분석

nirS 유전자 clone들을 대상으로 두 종류의 제한효소를 이용하여 RFLP 분석을 한 결과 다양한 종류의 RFLP type들이 확인되었다 (Table 1). 두 종류의 제한효소를 이용한 반응을 통해, 자연 농도 이산화탄소 조건의 토양시료에서는 83개, 고농도 이산화탄소 조건의 토양시료에서는 95개의 독립된 type을 각각 획득하였

Table 1. Summary of data from RFLP of *nirS* gene fragments from denitrifier communities in soil under ambient or elevated CO₂ concentrations

Source	S ^a	Estimated S _e ^b	H ^c	E(H/H _{max}) ^d	1/D ^e
Ambient CO ₂	83(149)	491 ± 194	3.80	0.60	21.92
High CO ₂	95(142)	835 ± 368	3.97	0.60	20.43

^aPhylotype richness, S, was calculated as the total number of unique RFLP patterns in soil. Numbers in parentheses indicate the overall numbers of clones of the expected size screened by RFLP

^bEstimated phylotype richness, S_e, as estimated by nonparametric Chao1 estimator. The data are the mean standard error of mean

^cShannon diversity index

^dEvenness of population

^eSimpson's index

다. 두 경우 모두 두 종류의 type이 우점하고 있으며, 대부분의 clone들이 동일한 유형의 clone들이 존재하지 않는 singleton이었다(자연농도 CO₂; 49%, 고농도 CO₂; 60%). 특히 이산화탄소 농도의 높고 낮음과 관계없이 세균군집내의 우점종의 변화는 없었으나, 군집을 구성하고 있는 phylotype의 종류는 현저하게 변화하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 조사한 습지토양의 탈질세균 군집이 매우 다양한 종류로 이루어져있고, 외부 변화에 큰 영향을 받지 않는 상당히 안정적인 우점 개체군이 존재함을 보여준다. 또한 적은 수의 개체군의 경우 외부영향에 민감하게 반응하여 군집 내에서 개체군 전이가 일어날 수 있음을 보여준다고 사료되는데, Smit 등도 DGGE를 이용한 미생물군집구조 분석연구에서 자연상태의 CO₂ 농도에서 계절적인 군집구조의 변화를 보고한 바 있다(12).

미생물 군집 다양성 지수 및 유사도 산출

RFLP 분석을 통해 상이한 RFLP pattern을 보이는 clone들을 독립된 phylotype으로 설정한 후 각각의 습지생태계내의 탈질세균군집의 다양성 지수를 통계학적으로 추정, 분석하였다(Table 1).

Table 1에서 보는 바와 같이 이산화탄소의 증가로 말미암아 전체 탈질세균의 richness가 증가되는 경향을 확인할 수 있었다. 세균군집을 대상으로 한 기존의 연구결과가 전무한 상황이라 직접적인 비교는 어렵지만 균류군집을 대상으로 한 Klamer 등의 연구결과와 비교했을 때 본 연구결과는 다소 상이한 결과를 나타내었다. Klamer 등은 야외조건에서 고농도 이산화탄소가 fungal species richness에 유의할만한 수준의 영향은 미치지 않았다고

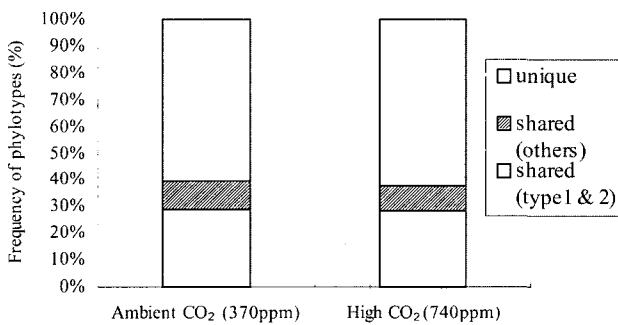


Fig. 1. Distribution of phylotypes in each wetland soil sample.

보고한 바 있다(7). 이는 아마도 분석 대상 생태계의 조건, 대상 미생물 군집의 종류의 차이에 기인한 것이라 사료된다. 또한 Klamer 등이 전체 균류를 목표로 삼아, 잘 보존된 internal transcribed spacer (ITS) region을 사용한 반면, 본 연구는 *nirS* 유전자라는 상대적으로 less conservative 특이 유전자를 대상으로 하였다는 점도 결과의 상이함을 가져온 원인이라고 사료된다. 각 실험군 간의 유사도 분석을 통해 이산화탄소 농도의 변화유무가 식생종류와 상관없이 습지토양의 세균군집구조에 큰 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다(Fig. 2).

결론적으로 본 연구결과는 그 정확한 원인은 명확하지 않지만 고농도의 이산화탄소 증가가 일정한 시점에 이르러서는 탈질세균 군집 구조에 크나큰 변화를 유발할 수 있으며, 일반적인 예측과는 달리 군집 내 종의 다양성이 풍부해지는 결과를 가져올 수 있음을 보여주었다. 앞으로 기후변화에 따른 습지생태계의 세균군집구조 변화양상을 보다 정밀히 고찰하기 위하여 획득한 phylotype의 염기서열 분석 및 다양한 요인과의 상관관계 분석, 그리고 다양한 종류의 유전자를 대상으로 한 분석, 그리고 가능하면 실제 자연생태계와 유사한 조건에서의 장기간 모니터링 등과 같은 진전된 연구가 필요할 것이라 사료된다.

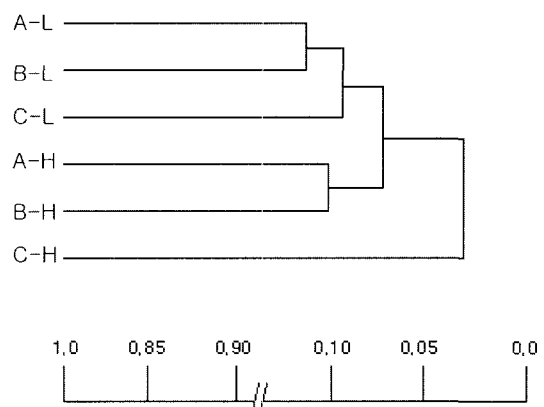


Fig. 2. Similarity of denitrifying bacterial community structure. Dendrogram was produced by cluster analysis (UPGMA) of Dice similarity coefficient calculated from the profile of phylotypes. (A: *Typha latifolia*, B: *Scirpus lacustris*, C: *Juncus effusus*; L: Low(370 ppm) CO₂, H: High (740 ppm) CO₂).

감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단의 선도연구자 지원사업(D00345)과 한국과학재단의 신진연구자 연수지원사업(M02-2003-000-20646-0)의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. Bedzyk, L., and R.W. Ye. 1999. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.* 175, 1165-1172.
2. Berks, B.C., S.J. Ferguson, J.W.B. Moir, and D.J. Richardson. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1232, 97-173.
3. Chao, A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 30, 101-110.
4. Coyne, M.S., A. Arunakumari, B.A. Averill, and J.M. Tiedje. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and non-heme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2924-2931.
5. Gregory, L.G., A. Karakas-Sen, D.J. Richardson, and S. Spiro. 2000. Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 275-279.
6. Kang, H., C. Freeman, and T. Ashenden. 2001. Effects of elevated CO₂ on fen peat biogeochemistry. *Sci. Total Environ.* 279, 45-50.
7. Klamer, M., M.S. Roberts, L.H. Levine, B.G. Drake, and J.L. Garland. 2002. Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4370-4376.
8. Liu, X., S.M. Tiquia, G. Holguin, L. Wu, S.C. Nold, A.H. Devol, K. Luo, A.V. Palumbo, J.M. Tiedje, and J. Zhou. 2003. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3549-3560.
9. Megonigal, J.P., and W.H. Schlesinger. 1997. Enhanced CH₄ emissions from a wetland soil exposed to elevated CO₂. *Biogeochemistry* 37: 77-88.
10. Mitsch, W.J., and Gosselink, J.G. 1993. Wetlands. John Wiley and Sons, New York.
11. Odum, E.P. 1983. Basic ecology. Saunders College Publishing, Philadelphia.
12. Smit, E., P. Leeflang, S. Gommans, J. van den Broek, van M.S., and K. Wernars. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2284-2291.

(Received June 2, 2004/Accepted September 8, 2004)

ABSTRACT: Influence of Elevated CO₂ on Denitrifying Bacterial Community in a Wetland Soil
Seung-Hoon Lee, Seonyoung Kim, and Hojeong Kang* (Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea)

To investigate the effects of elevated CO₂ on the denitrifying bacterial community structure in a wetland soil, dynamics of bacterial community structure was explored in an artificial wetland ecosystem with one of three plant species (*T. latifolia*, *S. lacustris*, and *J. effusus*) under two levels of CO₂ (370 ppm or 740 ppm) after 110-day incubation. For the analysis of bacterial community structure, functional genes such as nitrite reductase genes (*nirS*) were PCR-amplified followed by cloning of PCR products and screening by restriction fragment length polymorphism (RFLP). *nirS* gene fragments were amplified in all analyzed soil samples. Species richness estimated by the number of distinct phylotypes were 83 and 95 in the ambient CO₂ treatment and the elevated treatment, respectively. Two phylotypes (type 1 and type 2) were dominant in both of the treatments. Elevated CO₂ treatment increased species richness of denitrifiers as well as changed a large proportion of denitrifier phylotypes compared to those of the ambient treatment. Overall, the data in this study suggested that the denitrifying communities in the wetland soil are diverse and that the richness of denitrifying bacterial community might be affected by elevated CO₂ treatment.