



갈색거저리 마이크로바이옴 분석을 통한 농가별 박테리아 탐색

조준호 ^{p1}, 장호암 ², 이용석 ², 한연수 ¹, 조용훈 ^{c2}

¹전남대학교 농생명과학대학 응용생물학과, 광주광역시 61186;

²순천향대학교 자연과학대학 생명과학과, 아산시 31538;

초록

대체 육류 단백질의 필요성이 증가하면서, 식용곤충 산업이 각광 받고 있다. 국내에서는 식용곤충으로 이용되는 10종의 곤충 중 갈색거저리가 다양한 측면에서 주로 이용되고 있으며, 전국 농가 수가 약 126농가가 있는 것으로 확인되었다. 식용곤충산업 연구는 원물 생산 및 제품화를 중심으로 진행되고 있으나, 사육 곤충의 유해균 감염으로 인한 폐사에 대한 연구가 부족한 실정이다. 또한, 지역 농가별 갈색거저리의 박테리아 종 다양성 및 풍부도에 대한 조사가 미미하다. 농가에서 사육중인 갈색거저리에 존재하는 유해 박테리아 분석을 조사 하기 전 농가별 박테리아 종 다양성 및 풍부도 대한 기초 자료를 수집하고자 본 연구를 진행 하였다. 본 연구에서는 담양군, 천안시, 화성시 3개 농가의 살아있는 갈색거저리와 죽은 갈색거저리 샘플을 얻어 gDNA 샘플을 확보하였다. QC 진행 후 V4 영역의 prime를 이용해 PCR을 진행하였다. 전기영동을 통해 PCR 산물을 선 별 하여 , endo-repair, A-tailing, 그리고 illumine adapter ligation을 진행하고 illumine NovaSeq으로 분석을 진행하였다. 평균 16,249.33 reads의 Non-chimeric 서열을 이용해 분석하였으며, 샘플별 종의 분포수는 화성 Death 갈색거저리에서 가장 높은 다양성이 확인되었다. 다양성 추정값은 화성 Live 갈색거저리 샘플 에서 가장 높게 나타났다. 계통학적 다양성은 천안 Live 갈색거저리에서 가장 높게 나타났다. 지역별 박테리아 종 균일성은 화성 지역이 가장 높게 나타났고, 갈색거저리 상태별 박테리아 종 균일성은 Death 갈색거저리에서 가장 높게 나타났다. 지역별 갈색거저리 박테리아 다양성은 천안에서 가장 높게 나타났고, Beta diversity 서열 유사성 분석 결과, 천안 Death 갈색거저리를 제외하고 다른 지역의 상태별 갈색거저리까지 서열의 유사성을 보였다. 서열 유사성과 풍부도 분석 결과, 천안 Death 갈색거저리와 화성 Death 갈색거저리가 그룹화 되고, 천안 Live 갈색거저리와 전남 Live 갈색거저리가 유사성이 그룹화 되었다. 그리고 화성 Live 갈색거저리와 전남 Death 갈색거저리가 그룹화되는 것을 확인하였다. 이를 통하여 각 지역의 유사한 박테리아 다양성 및 풍부도를 확인할 수 있었으며, 해당 결과를 기반으로 추후 유해 박테리아를 분석하여, 갈색거저리 농가의 집단 폐사를 억제하는 진단, 방제법을 개발하기 위한 기초 자료로써 활용 가능할 것으로 사료된다.

Keywords: 갈색거저리, 마이크로바이옴, 박테리아

결과

1. Sequencing 및 Quality control

Sample-id	Input	Filtered	Denoised	Merged	Non-chimeric
Live_영암	107,945	62,360	62,324	62,017	23,191
Death_영암	109,596	66,566	66,355	65,253	10,118
Live_천안	96,768	53,576	53,555	53,424	23,643
Death_천안	98,536	61,376	61,121	59,158	13,243
Live_화성	111,412	66,787	66,734	66,431	11,042
Death_화성	112,947	74,506	74,265	72,514	16,259
종합	637,204	385,171	384,354	378,797	97,496
평균	106,200.7	64,195.17	64,059	63,132.83	16,249.33

Table 1. Sequencing 및 Quality control
Quality control 결과, 16,249.33 reads의 Non chimeric 서열을 확보하였다

2. 농가별 갈색거저리 상태에 따른 Alpha rarefaction 분석

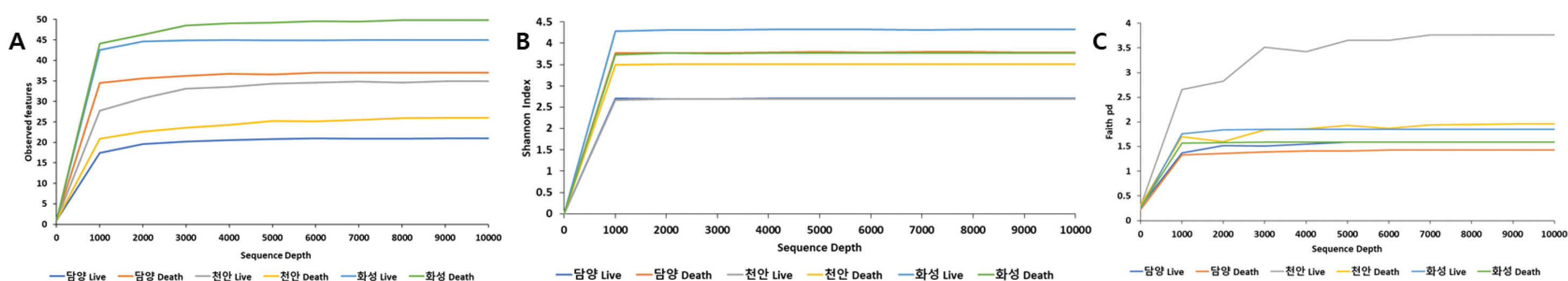


Figure 1. 농가별 갈색거저리 상태에 따른 Alpha rarefaction 분석; A; 종 분포수, B; 종 다양성, C; 계통 다양성
A: 지역별 갈색거저리 샘플에서 종의 분포수 추정값은 화성 Death 샘플에서 가장 높게 나타났다.
B: 지역별 갈색거저리 샘플에서 종의 다양성 추정값은 화성 Live 샘플에서 가장 높게 나타났다.
C: 지역별 갈색거저리 샘플에서 계통 다양성 추정값은 천안 Live 샘플에서 가장 높게 나타났다.

3. 지역별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 Alpha diversity 분석

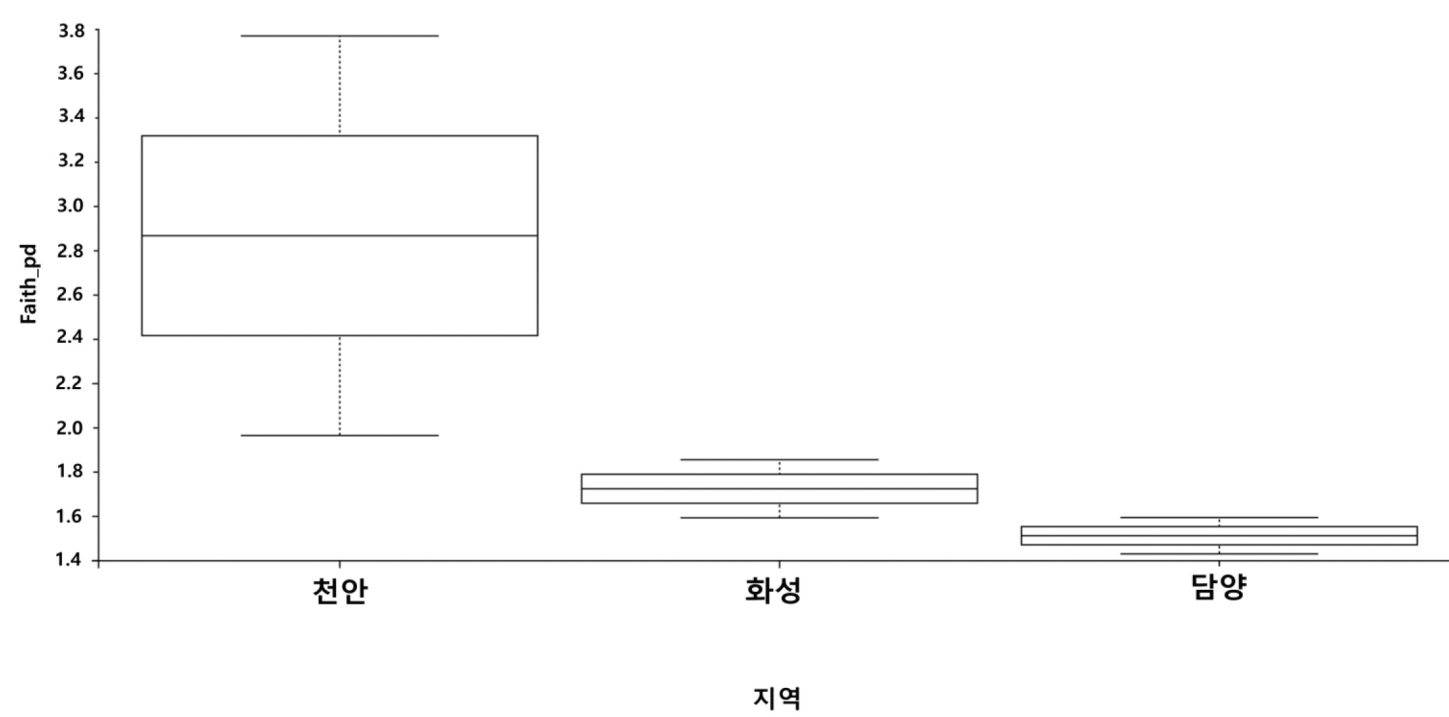


Figure 2. 지역별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 계통 다양성 분석
지역별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 계통 다양성 분석을 진행하였다. 다양성 분석 결과, 천안에서 가장 높은 종 다양성이 나타났다. 막대는 평균 SE를 나타낸다.

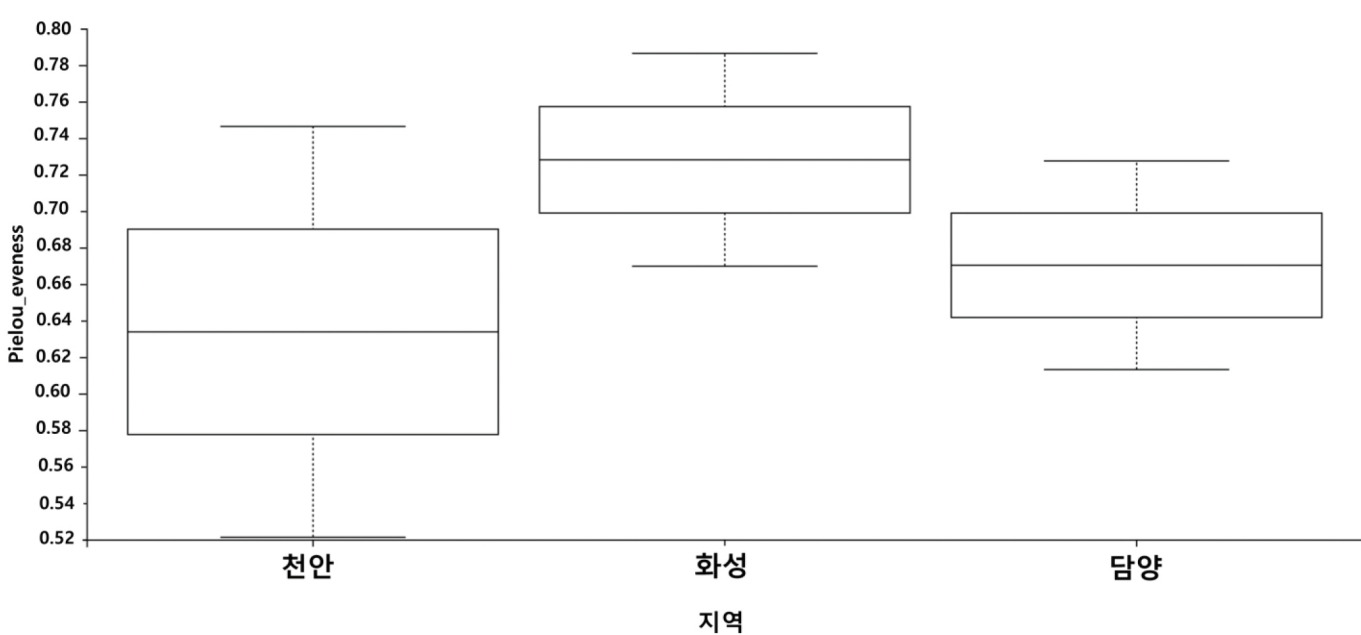


Figure 4. 지역별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 종 균일성 분석
지역별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 종 균일성 분석을 진행하였다. 분석 결과, 화성에서 가장 높은 종 균일성이 나타났다. 막대는 평균 SE를 나타낸다.

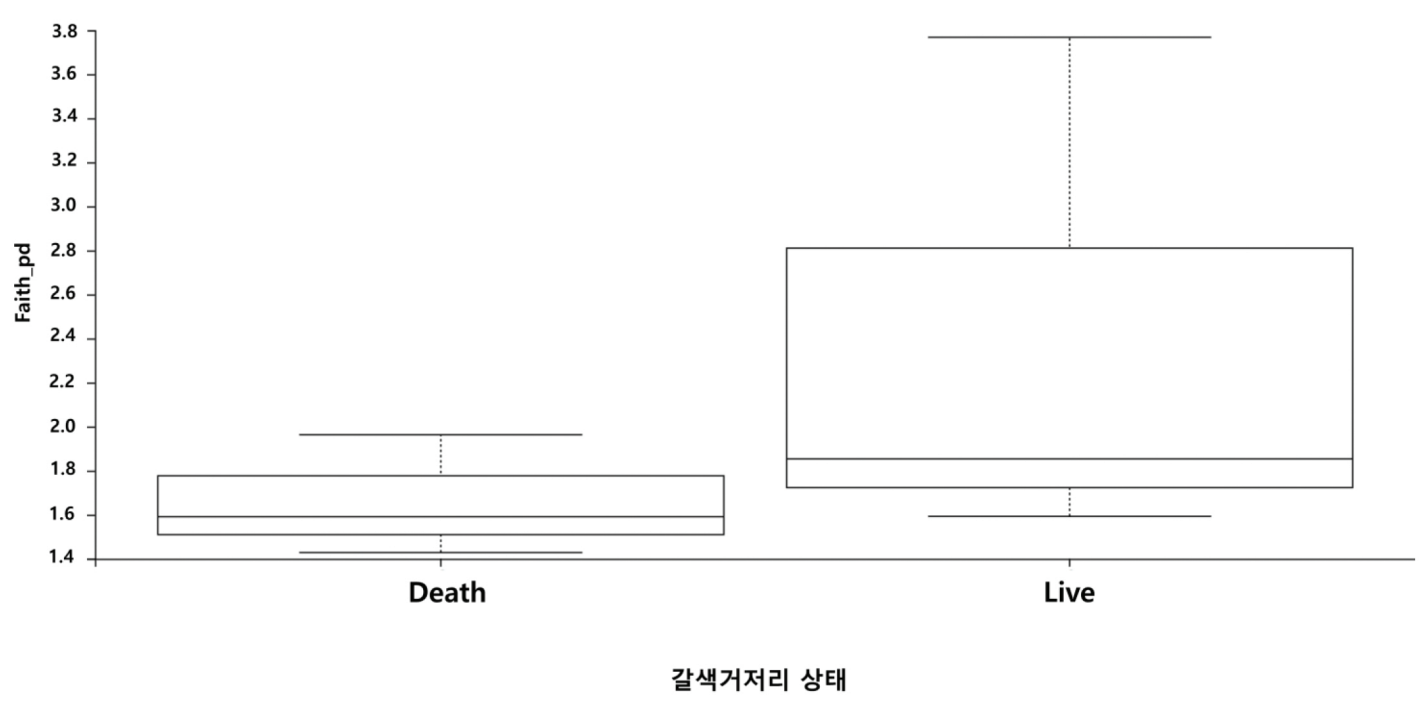


Figure 3. 상태별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 계통 다양성 분석
상태별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 계통 다양성 분석을 진행하였다. 종 다양성 분석 결과, Live 갈색거저리에서 가장 높은 종 다양성이 나타났다. 막대는 평균 SE를 나타낸다.

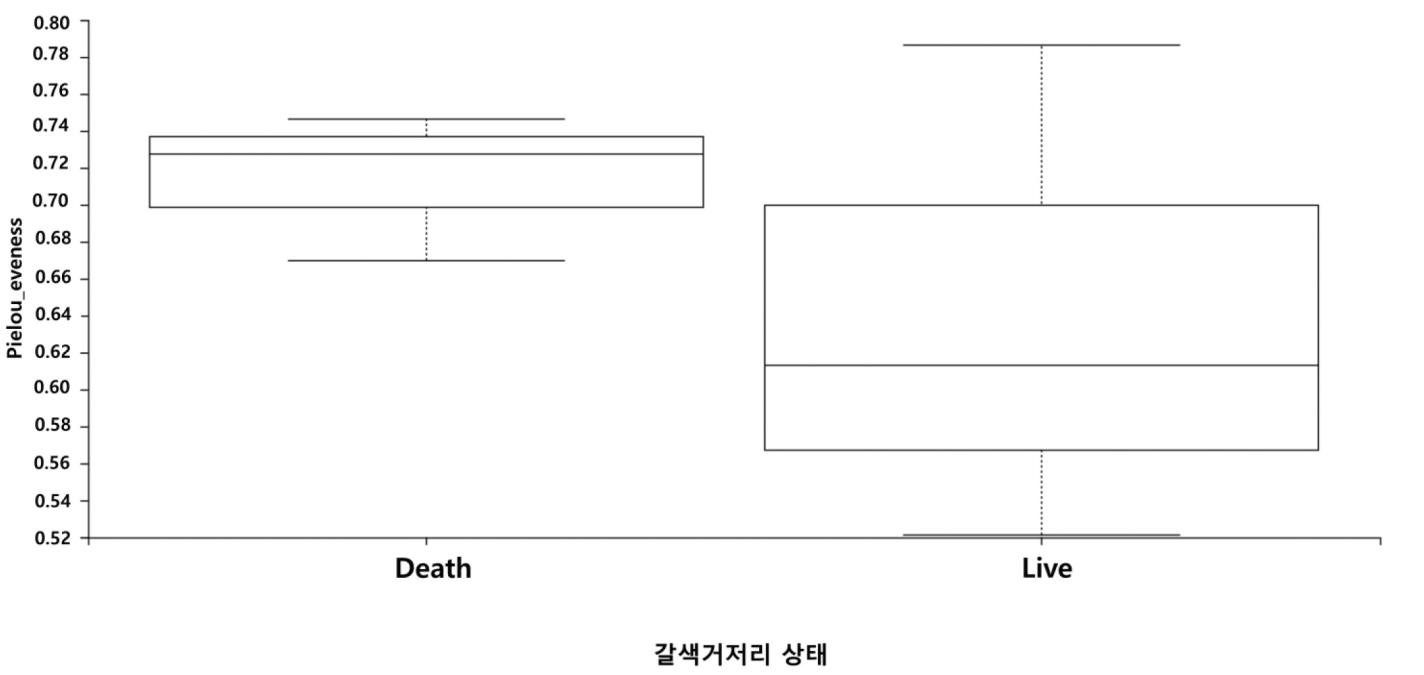


Figure 5. 상태별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 종 균일성 분석
상태별 갈색거저리에서 확인된 박테리아의 종 균일성 분석을 진행하였다. 종 균일성 분석 결과, Death 갈색거저리에서 가장 높은 종 균일성이 나타났다. 막대는 평균 SE를 나타낸다.

4. 지역 농가의 갈색거저리 상태별 마이크로바이옴 Beta-diversities 분석

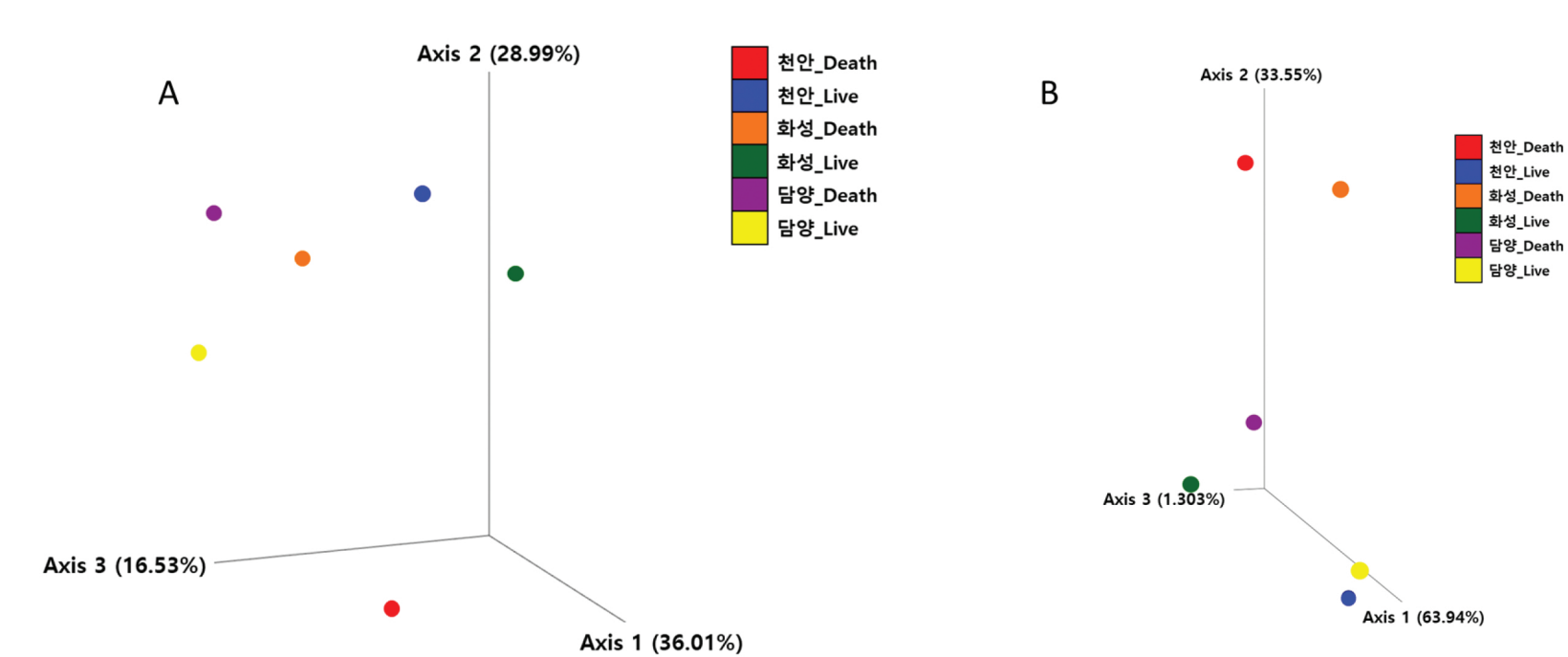


Figure 6. 지역 농가의 갈색거저리 상태별 마이크로바이옴 Beta-diversities 분석; A: Unweighted unifracs emperor, B: weighted unifracs emperor
A: 축1에서 36.01%, 축2에서 28.99%, 축3에서 16.53%로 확인되었다. 해당 결과는 천안 Death를 제외한 나머지 샘플이 유사한 박테리아 조성을 보여주고 있음을 나타내고 있다.
B: 축1에서 63.94%, 축2에서 33.55%, 축3에서 1.308%로 확인되었다. 이러한 결과는 천안 Live, 화성 Death가 그룹을 이루고 있고, 천안 Live, 담양 Live가 그룹화, 화성 Live, 담양 Death가 그룹을 이루고 있어, 서열 유사성과 종의 풍부도가 유사함을 나타내고 있다.

5. QIIME2 bar-plot을 사용해 지역별 갈색거저리 박테리아 빈도 분석(Genus)

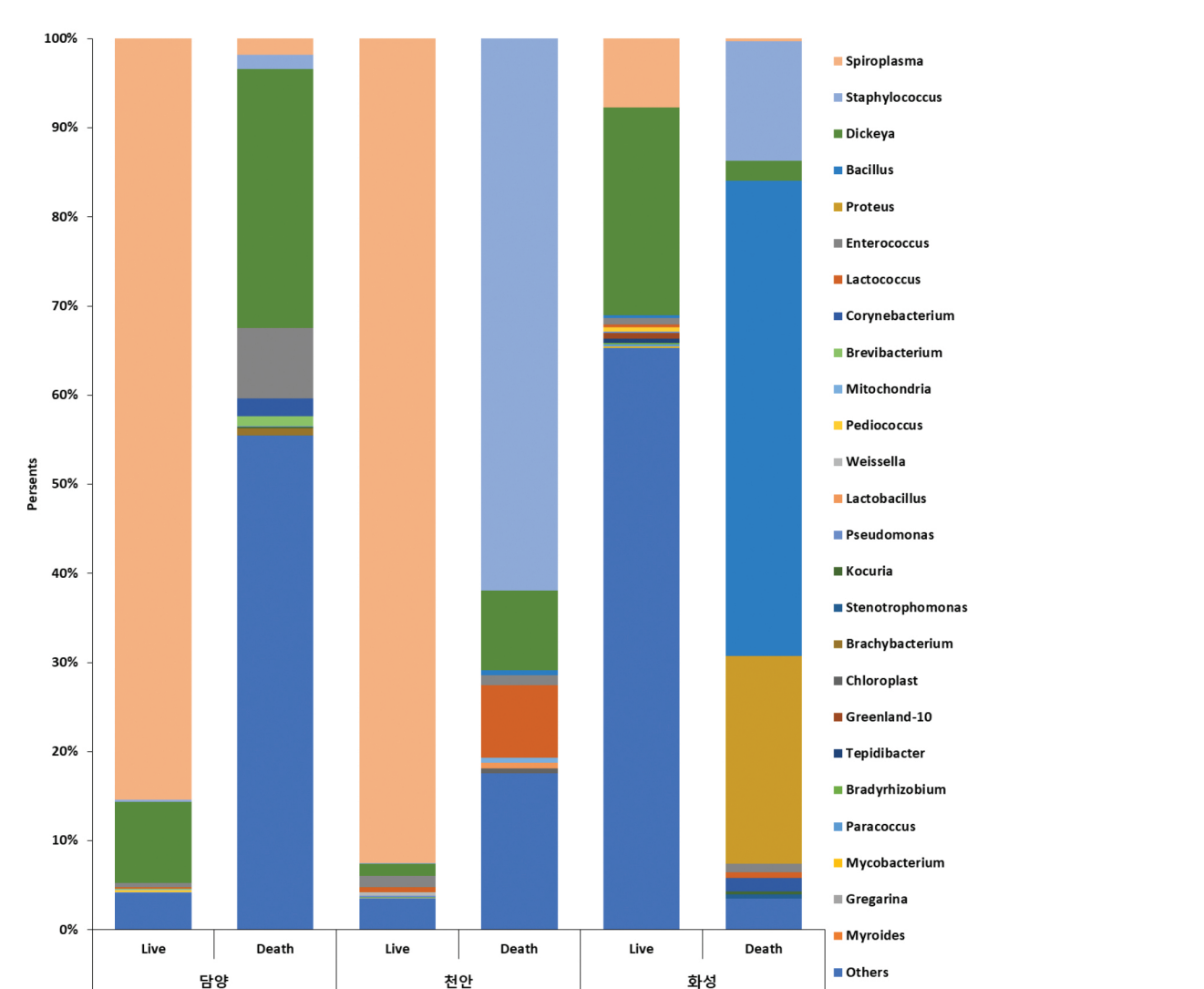


Figure 7. QIIME2 bar-plot을 사용해 지역별 갈색거저리 박테리아 빈도 분석 (Genus)
QIIME2 분석을 통해 담양, 천안, 화성의 Live, Death 갈색거저리에서 확인된 박테리아를 Genus 별로 빈도 분석을 확인하였다.

결론

본 연구 결과를 통해 갈색거저리 농가 및 상태별 다양성과 풍부도를 확인할 수 있었으며, bar-plot 결과를 통해 *Spiroplasma*, *Staphylococcus*, *Dickeya* 속으로 추정되는 박테리아들이 확인되었다. 확인된 박테리아들은 식용으로 이용하기 전에 열처리 과정을 통해 멸균할 수 있어, 식품으로서 사용하는 것은 안전할 것으로 사료된다.
추후 해당 연구를 기반으로, 전국에 위치하고 있는 갈색거저리 농가의 박테리아를 분석하여 사육 환경에 따른 박테리아를 조사하고, 곤충 유해성 박테리아, 인간 유해성 박테리아 등 사육 및 식용에 영향을 미치는 박테리아들을 분석하는 연구의 기초 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.