

용빙수가 조류-원핵 미생물 상호작용에
미치는 영향 규명

Effect of ice shelf melting on algae-procaryote
interaction



충북대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “아문젠해 빙붕소멸 속도와 해양환경 변동추세(본과제명)” 과제의 위탁연구 “융빙수가 조류-원핵 미생물 상호작용에 미치는 영향 규명(위탁과제명)” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 01. 16

(본과제) 총괄연구책임자 : 김 태 완

극지연구소
위탁연구기관명 : 충북대학교

위탁연구책임자 : 이 성 근

위탁참여연구원 : 곽 주 한

“ : 정 택 수

“ : 조 동 현

“ : 이 지 원

“ : 김 설 희

“ : 홍 희 지



요 약 문

I. 제 목

용빙수가 조류-원핵 미생물 상호작용에 미치는 영향 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

극지역의 용빙은 기후 변화로 가속하여 해수면의 상승 등의 여러 문제를 야기하는 한편 자연스러운 계절 변화의 결과로써 독립영양생물로 하여금 생물학적 1차 생산성을 크게 증가시켜 결과 해당 생태계의 food chain이 활발하게 할 수 있게 한다. 또한, 남극 Amundsen Sea의 polynya는 봄철에 용빙이 진행됨에 따라 phytoplankton에 의한 bloom이 발생할 시에 전 지구상에 생물학적 1차 생산성이 가장 높은 지역으로 알려져 있다. 이러한 특성으로 극지는 기후 변화와 관련한 중요한 지표로 선진국을 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있다 (Screen et al., 2010). 그리고 용빙으로 시작되는 생태학적 상호작용은 극지방에서뿐만 아니라 지구 생태계의 물질 순환에 크게 기여하는 원핵미생물종을 성장할 수 있도록 하며 (Arrigo et al. 2000), 이중 상당 부분의 생태계 우점미생물종이 여전히 난배양성으로 해당종의 생리학적 특성의 규명이 소원하다. 본 연구과제에서는 용빙에 따라 발생하는 주요 1차 생산자 조류의 확보와 빙호의 원핵미생물과의 공동배양을 통해 용빙수가 조류-원핵미생물 상호작용에 미치는 영향을 규명하고자 한다. 이러한 조류-원핵미생물 간의 상호작용의 규명은 가장 낮은 단계의 생태계 food chain의 이해와 더불어 물질순환에 크게 기여하고 있는 것으로 추정되지만 난배양성으로 생리적 특성 연구가 난항에 빠져 있는 주요 미생물종들에 대한 배양의 실마리를 제공할 것으로 기대한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

남극 용빙수 및 1차 생산자 조류 시료 확보를 통해 모델이 되는 원핵미생물과의 공동배양을 시도하여 조류-원핵미생물간의 상호작용을 확인하고, 용빙수의 주요 원핵미생물 지표종의 선정과 함께 조류와의 공동배양을 통해 배양기술을 정립하고자 한다. 정립된 배양기술은 이후에 난배양성 원핵미생물과의 공동배양에 사용하여 농화배양체 수립 후 난배양성 미생물의 분리에도 활용하고자 한다.

IV. 연구개발결과

해빙에 따른 1차생산자의 조성 및 활성 변화 연구를 통하여 남극 ASP에서 bloom 발생시 주요 1차생산자로 *Phaeocystis antarctica*를 확인하였으며, 외곽 해빙 하부에서 1차 생산자로 diatom의 우점을 확인하여 빙호 형성 전후에 주요 1차 생산자로 diatom이 활동함을 확인하였다. 빙호 형성 전후의 metagenome 분석을 통하여 N,C,S 물질순환에 기여하는 원핵미생물 지표종을 확인하였으며 해당 원핵미생물종의 상당 부분이 난배양성에 해당함을 확인하였다. 또한, 공동연구를 통하여 다양한 1차 생산자 배양자원을 확보하였으며, 확보된 자원은 조류-원핵미생물의 공동배양에 사용하여 1차생산자의 원핵미생물에 대한 직접적인 저해 및 2차대사산물에 의한 간접 저해작용을 확인하였다. 한편 추가적인 조류-AOA 공배양 조건의 탐색시도로 특정 조건 하에 상리작용 역시 가능하다는 것을 확인하였으며 해당 조건을 난배양성 주요미생물의 배양에 적용하여 농화배양체를 수립하는데 성공하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 용빙수 조류-원핵 미생물의 길항 및 상리 작용에 대한 주요 결과를 확인할 수 있었다. 실제 환경에서의 상호작용이 어떻게 작용하는지는 추가적인 연구에서 본 연구의 공배양기술이 적용되어 활용될 수 있으며, 이는 실제 빙호 환경에서의 물질 순환에 대한 조류-원핵미생물의 영향 연구에도 활용될 수 있다. 더욱이 조류-원핵미생물의 공배양을 통한 상리작용은 실제로 난배양성 미생물의 농화배양체의 수립에 활용되어 난배양성 미생물을 성장을 촉진하는데에 성공하였으며, 본 연구를 통하여 수립된 공배양 기술과 조건은 추후 난배양성 미생물의 순수분리에 이용하여 그 생리적 특성 연구에 주요한 키가 될 것으로 기대한다.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Effect of ice shelf melting on algae-procaryote interaction

II. Purpose and Necessity of R&D

Polar ice melt is accelerating due to climate change, causing problems such as rising sea levels, and as a result of natural seasonal changes, autotrophic organisms significantly increase biological primary productivity, resulting in an active food chain in the ecosystem. In addition, polynya in the Amundsen Sea, Antarctica, is known to have the highest biological primary productivity in the world when phytoplankton blooms as spring melts. Due to these characteristics, the polar region is an important indicator of climate change, and active research is being conducted in developed countries (Arrigo et al. 2000). And ecological interactions that begin with melting lead to the proliferation of prokaryotic microorganisms that contribute significantly to the material cycles of the global ecosystem as well as in the polar regions (Arrigo et al. 2000), of which a large proportion of ecosystem predominantly microbial species are still cultivated. As a result, the physiological characteristics of the species are desired. This research aims to investigate the effects of thawing water on algal-prokaryotic interactions through the acquisition of major primary producer algae and the co-cultivation of ice lakes with prokaryotic microbes. The identification of these algal-prokaryotic interactions is thought to contribute greatly to the material circulation along with the understanding of the lowest-level ecosystem food chain, but the culture of major microbial species whose physiological characteristics are difficult to study due to difficulty of culturing major microorganisms.

Therefore, this study provides clues to culturing unculturable microorganisms.

III. Contents and Extent of R&D

Try to co-culture with the modeled prokaryotic microorganisms by securing antarctic ice-water and primary producer algae samples to confirm the interaction between algae and prokaryotic microorganisms, and select major prokaryotic microbial indicators in the ice-water. We will establish culture technology through co-culture. The established culture technology will be used for isolation of unculturable microorganisms after the establishment of enriched culture.

IV. R&D Results

Phaeocystis antarctica was identified as the primary producer when the bloom occurred in Antarctic ASP through the study of changes in the primary producer according to the sea ice. As a primary producer, diatom was active. The metagenome analysis before and after the formation of ice caps confirmed prokaryotic microbial markers contributing to N, C, S material circulation. In addition, various primary producer culture resources were secured through joint research, and the resources used for co-cultivation of algae-prokaryotic microorganisms directly inhibited primary producers' prokaryotic microorganisms and indirectly inhibited by secondary metabolites. It was confirmed. On the other hand, it was confirmed that the algae-AOA co-cultivation conditions could also allow for synergism under specific conditions, and succeeded in establishing an enrichment culture by applying the conditions to the culture of major microorganisms in culturing.

V. Application Plans of R&D Results

In this study, it was confirmed the main results of antagonism and antagonism of thawing algae-prokaryotic microorganisms. How the interaction in the real environment works can be used in further studies by applying the co-cultivation technology of the present study, which can also be used to study the effects of algae-prokaryotes on

material circulation in the real ice lake environment. Furthermore, the co-cultivation of algae-prokaryotic microorganisms has been successfully utilized to establish the enrichment cultures of unculturable microorganisms, and has succeeded in promoting the growth of unculturable microorganisms. It is expected to be a key factor for the study of physiological properties of isolated cultures of unculturable microorganisms.





목 차

| | |
|---|----|
| 제 1 장 서론 | 15 |
| 제 1 절 연구개발의 목적 및 개요 | 15 |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 | 15 |
| 제 3 절 연구개발의 범위 | 16 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 연구 현황 | 17 |
| 제 1 절 국내 연구 현황 | 17 |
| 제 2 절 국외 연구 현황 | 17 |
| 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 | 19 |
| 제 1 절 해빙에 따른 1차생산자의 조성 및 활성 변화 연구 | 19 |
| 제 2 절 해빙 환경의 핵심물질순환 원핵미생물 자원 확보 | 23 |
| 제 3 절 1차생산자가 원핵미생물의 물질순환 활성화에 미치는 영향 조사 | 27 |
| 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도 | 33 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 35 |
| 제 1 절 학술적 파급효과 | 35 |
| 제 2 절 경제적 파급효과 | 35 |
| 제 6 장 참고문헌 | 36 |



제 1 장 서론

제 1 절. 연구개발의 목적 및 개요

1. 연구개발의 목적

- 가. 서남극 지역의 해빙에 따른 1차생산자(조류)의 활성/조성 변화 추적
- 나. 1차생산자의 변화가 주요 물질순환 원핵미생물의 활성 및 조성에 미치는 영향 규명

2. 연구개발의 개요

| 구분 | 연구 개발 목표 |
|----------------|---|
| 1차년도 (2017) | 해빙에 따른 1차생산자의 조성 및 활성 변화 연구 - 해빙환경의 지표 1차생산자 선정 - 모델 1차생산자 배양 자원 확보 |
| 2차년도 (2018) | 해빙 환경의 핵심물질순환 원핵미생물 자원확보 - N,C,S 물질순환 원핵미생물 지표종 선정 - SOB 등 필수 영양원 제공 Autotroph과 공배양 시도 및 난배양성 지표종 배양 시도 - 서남극해 ASP의 주요 1차 생산자 <i>P. antarctica</i> 이용, 분리된 난배양성 핵심 ASP 고세균 공생배양 시도 |
| 3차년도 (2019) | 1차생산자가 원핵미생물의 물질순환 활성화에 미치는 영향 조사 - 조류-원핵미생물 상호작용 기전 규명 - 제안된 조류-원핵미생물 상호작용의 해빙환경에서 재현성 여부 확인 - 1차 생산자의 조성/활성과 물질순환 활성화의 관련성 규명 |

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 과학기술적 중요성

가. 해양 생태계의 물질 순환을 이해

- (1) 지구상에서 가장 많은 미생물을 보유하고 있는 해양 생태계의 물질 순환을 이해하는 것은 나아가 지구 온난화에 따른 기후 변화와 관련되어 중요한 과학적 자료가 될 것임.

(2) 특히 polynya는 phytoplankton bloom에 따라 생물학적 생산성이 높으며 탄소 remineralization에 관련해 관심을 받고 있는 장소 중의 하나임.

(3) 따라서 이 지역에서 phytoplankton bloom의 시기에 따라 (bloom 초기와 후기) 변하는 군집의 양상을 확인하는 것은 해양 생태계의 물질 순환을 이해하는데 큰 도움이 될 것임.

나. 미생물 군집 및 미생물의 생리/생태학적 역할 규명

(1) 시료의 접근성에 어려움이 있는 만큼, 환경 시료로부터 유전체를 확보함으로써 다양한 빙호 환경에서 군집의 차이를 확인하는 것은 이후의 장기적인 연구에서 해양 생태계를 규명/이해하는데 중요한 과학적 근거가 될 것임.

(2) 군집 분석에서 우점하고 있는 종을 분리해 내 그 생리/생태학적 역할을 규명하는 것은 유전자 분석의 한계를 보완하는 동시에 polynya의 생태를 이해하는데 중요한 과학적 근거가 될 것임.

제 3 절. 연구개발의 범위

1. 연구개발내용 및 범위

| 구분 | 연구개발내용 및 범위 |
|----------------|--|
| 1차년도 (2017) | 남극 ASP 에서 bloom 발생시 우점하는 1차 생산자 제시 - 모델 다양한 1차 생산자 자원 확보 - 모델 1 차생산자와 원핵미생물간의 상호작용 시험 |
| 2차년도 (2018) | N,C,S 물질순환 원핵미생물 지표종 선정 SOB 등 필수 영양원 제공 Autotroph과 공배양 시도 및 난배양성 지표종 배양 시도 서남극해 ASP의 주요 1차 생산자 <i>P. antarctica</i> 이용, 분리된 난배 양성 핵심 ASP 고세균 공생배양 시도 |
| 3차년도 (2019) | 조류-원핵미생물 상호작용 기전 규명 제안된 조류-원핵미생물 상호작용의 해빙 환경에서 재현성 여부 확인 1차 생산자의 조성/활성과 물질순환 활성과의 관련성 규명 |

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내 연구 현황

1. 미생물과 빙호 생태계 간의 상호관계 연구 가능

가. 쇄빙선 Araon호의 도입과 함께 극지역에 접근이 가능하게 됨으로써 지속적인 크루즈 연구를 통하여 Polynya의 시기별, 지역별 등 다양한 시료를 확보할 수 있음.

나. 다양한 분야의 전문 연구 팀의 연구 교류를 통해 미생물과 빙호 생태계간의 상호관계를 밝히는 실마리를 찾는 데 심도 있는 분석을 가능하게 하고 있음.

2. 빙호 환경에서의 미생물 군집분석 연구 현황

가. 본 연구실에서 최근 새로운 pyrosequencing 기술을 통해 극지의 빙호 환경에서 미생물의 군집을 비교 분석 논문이 발표된 바 있으나 (Kim et al, 2014; Choi et al., 2015) 국내 대부분의 극지 관련 논문은 미생물학적 접근방법보다는 지질학적이나 물리학적 접근 방법을 통해 이루어져 있음.

나. 지구 온난화와 관련하여 물질과 미생물간의 상호 작용에 따른 연구가 보고 되었으나 아직 연구 결과의 발표가 미흡한 실정임.

다. 최근에 미생물 자원을 확보를 바탕으로 한 연구가 진행되었으나 이 또한 아직까지는 국내의 미생물학적 접근 방법 연구는 미비한 실정이며 본 연구에서 진행한 서남극해 meta-omics 연구는 시료의 확보와 분석의 어려움으로 국내에서는 거의 시도되지 않음.

제 2 절. 국외 연구 현황

1. 국외 극지역의 미생물 생태 연구 현황

가. 서남극해의 생태학적 중요성의 대두에 따라 국외에서는 비교적 다양한 접근방식을 통하여 극지역의 미생물의 생태계에 대해 연구하고 있음.

나. 주로 pyrosequencing 기술을 통해 미생물의 군집이 어떻게 변화해 가는지를 분석하는 연구 발표된 바 있으며(Hahnke et al., 2014), 최근 PNAS와 Frontier in Microbiology에 아문젠해의 metagenome과 metatranscriptome을 이용해 미생물의 기능 유전자를 분석하고 생태학적으로 이들이 미치는 영향 관련한 연구가 보고 되었음 (Delmont et al., 2015; Bertrand et al., 2015).

다. PNAS논문은 cobalamin과 iron의 결핍이 phytoplankton의 군집에 어떠한 영향을 끼치는지 이때 세균과 phytoplankton의 상호관계의 변화를 살펴리며, Frontier in Microbiology에서는 Polynya bloom의 정점 시기일 때 세균의

metagenome을 살펴보는 연구가 진행되었음.
라. 극지에서 순수분리를 바탕으로 미생물을 분리하고 genome과 transcriptome분석을 통해 이 미생물이 생태계에 미치는 역할에 대한 연구가 발표된 바 있음 (Xing et al., 2014).



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 해빙에 따른 1차생산자의 조성 및 활성 변화 연구

1. 연구 접근 방법 및 내용

가. 목표달성 방법

- (1) 해빙기의 남극해에서의 핵심 조류, 원핵미생물 선별 및 배양체 확보
- (2) 공동배양(co-culture)를 통한 상호작용의 정성/정량적 분석
- (3) 상호작용으로 발생하는 extracellular metabolome의 변화 분석
- (4) 조류 유래의 생리활성물질에 의한 원핵미생물의 활성 변화 확인
- (5) 상호작용시 발생하는 유전자발현의 변화가 남극해에서 발생하는 지 확인

나. 시료채취 및 검경

- (1) 해빙환경에서의 1차생산자 분석을 위하여 매 지점 1.5L의 해수 샘플을 채취하여 GF/F 여과를 진행하여 여과함.
- (2) 여과지를 -80°C 에 보관 후 이후 실험은 실험실에 도착 후 진행함.
- (3) 주요 1차 생산자의 분류학적 구성 분포 평가를 위해 해수샘플에서 추출한 pigment를 HPLC 분석하여 추론함.
- (4) 모델 1차 생산자 배양 관련은 공동연구(군산대)를 통해 진행함.
- (5) 모델 1차 생산자 배양 자원은 서해 및 남해에서 분리된 배양체를 가지고 실험 진행함.

다. 모델 1차 생산자 배양 자원 확보

- (1) 모델 1차 생산자 배양 관련은 공동연구(군산대)를 통해 진행함.
- (2) 모델 1차 생산자 배양 자원은 서해 및 남해에서 분리된 배양체를 가지고 실험 진행함.

라. 모델 1차생산자와 원핵미생물 상호작용 시험

- (1) 직접 및 간접 접종 방법으로 실험을 진행.
 - (가) 직접 접종: 고세균 배양액에 10%, 1%의 비율로 1차생산자를 접종.
 - (나) 간접 접종: 1차 생산자를 제거한 배양액의 상층액을 10%, 1%접종. 이때 1차 생산자를 제거할 때에는 원심분리기를 통해 제거.
- (2) 해양 고세균의 활성 검증은 암모니아가 산화되어 전환된 아질산을 측정함.

2. 연구 결과

가. 남극 ASP 에서 bloom 발생시 우점하는 1차 생산자 제시

- (1) 2010, 2011, 2013 3 차례의 Cruise를 통한 시료채취 및 현미경 관찰 (결과는

아래 Table 1 참조)

- (2) 년차별 ASP bloom 발생시 주요 1 차 생산자는 *Phaeocystis antarctica*로 추정됨
- (3) Picoplankton, Flagellate도 관찰되나 우점하는 것은 아닌 것으로 추정됨.
- (4) Seaice에서 Diatom이 우점하는 것으로 보아 빙호형성 전후에는 Diatom이 주요 1차 생산자로 추정됨.
- (5) 2월달의 Fv/Fm의 변화는 1 차생산자로서의 *Phaeocystis antarctica*의 감퇴를 제시함.
- (6) 차기 ASP Cruise를 통하여 1 차생산자의 분자생태학적 분석을 통한 정확한 분포에 관한 연구가 요구됨.

Table 1. 남극 ASP 중심의 1차 생산자 분포 조사

| | Peak-1 | Declining-1* | Declining-2 | Peak-2* | Sea ice* |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Sampling date | 2010/2011 cruise: 07 Jan 2011 | 2011/2012 cruise: 14 Feb 2012 | 2011/2012 cruise: 29 Feb 2012 | 2013/2014 cruise: 03 Jan 2014 | 2010/2011 cruise: 05 Jan 2011 |
| Sampling point (depth) | Polynya (30 m) | Polynya (20 m) | Polynya (25 m) | Polynya (20 m) | Under sea ice (2 m) |
| Abundance of bacteria ($\times 10^6$ 16S rRNA genes/ml) | 2 | 25 | 9.7 | 7.2 | 1.4 |
| NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ (μ mol/L) | 15.0 | 9.6 | 16.6 | 14.9 | 26.6 |
| NH ₄ ⁺ (μ mol/L) | 0.5 | 0.3 | 0.6 | 0.03 | 1.6 |
| PO ₄ ³⁻ (μ mol/L) | N/D | 1.0 | 1.4 | 1.4 | N/D |
| SiO ₂ (μ mol/L) | 79.4 | 74.7 | 77.4 | 84.8 | 76.7 |
| Chl-a (mg/m^3) | 9.5 | 5.9 | 2.4 | 5.8 | 1.0 |
| Phytoplankton composition (μ g C/L) | | | | | |
| <i>Phaeocystis antarctica</i> | 230.9 | 174.0 | 38.5 | 255.3 | 6.0 |
| Autotrophic picoplankton | 2.4 | 10.0 | 1.7 | 0.02 | 3.7 |
| Autotrophic flagellates | 6.7 | 2.8 | 4.4 | 3.6 | 0.9 |
| Diatom | 181.8 | 16.6 | 15.6 | 7.9 | 67.0 |
| Total carbon | 421.8 | 203.3 | 60.1 | 266.8 | 77.6 |
| Carbon to Chl-a | 44.4 | 34.6 | 25.09 | 46 | 81.7 |
| Fv/Fm** | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 |

Supplementary Table S1. Description of location and oceanographic properties of sampling sites.

GPS position: polynya center station, 73.2959 (LAT) -113.0192 (LONG); seaicestation72.3170(LAT), -112.4370(LONG)

*Used for metagenomics and metatranscriptomic analysis

**This value present mean value of upper layer

나. 다양한 모델 1차 생산자 자원 확보

- (1) 공동연구를 통하여 해양환경의 1차생산자 모델 자원으로 다양한 균주를 확보 (아래 리스트와 같음)

[리스트 1]

- ① Oxrrhis Dinoflagellate
- ② Ttraselmis
- ③ Thecadinium
- ④ Prorocentrum

- ⑤ Teleaulax
- ⑥ Cylindrotheca
- ⑦ Heterosigma
- ⑧ Alexandrium
- ⑨ Eutreptiella
- ⑩ Ostreopsis

[리스트 2]

- ① Alexandrium R1
- ② Alexandrium pacificum C6
- ③ Alexandrium andersonii.MS
- ④ Alexandrium andersonii
- ⑤ Alexandrium catenella
- ⑥ Alexandrium pacificum(B4)
- ⑦ Symbiodinium voratum
- ⑧ Thecadinium kofoidii
- ⑨ Akashiwo saguinea
- ⑩ Scrippsiella trochoidea
- ⑪ Prorocentrum rminimum
- ⑫ Synechococcus
- ⑬ Prorocentrum lima
- ⑭ Cochlodinium
- ⑮ Prorocentrum rhatymum

- 이와 더불어, NCMA로부터 다음과 같은 3 종의 1차생산자를 추가로 확보하여 실험에 이용함.

- ① Synechococcus bacillaris
- ② Prochlorococcus marinus
- ③ Micromonas pusilla

다. 모델 1 차생산자와 원핵 미생물간의 상호작용 시험

- (1) 1차생산자와 원핵미생물과의 상호작용 스크리닝 : Ammonia-oxidizing archaea (AOA)를 상호작용 원핵미생물로 이용함. AOA 활성은 암모니아를 아

질산으로 선화시키는 활성을 검출하여 측정함.

(2) S (간접 접종: 상층액), D (직접 접종): 두가지 방법으로 실험 진행. 1차 생산자가 (D) 직접 저해를 주는지, 혹은 1차 생산자가 만들어 내는 2차대사산물 (S)에 저해를 주는지 살펴봄.

| (mM) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
| S1% | 1.036 | 1.028 | 1.058 | 0.976 | 1.044 | 1.049 | 1.008 | 0.164 | 1.006 | 1.082 |
| S10% | 0.992 | 0.892 | 0.636 | 0.961 | 0.956 | 0.967 | 0.943 | 0.870 | 0.950 | 0.804 |
| D1% | 1.020 | 0.817 | 0.418 | 0.863 | 0.880 | 1.015 | 0.989 | 0.687 | 0.955 | 0.798 |
| D10% | 0.928 | 0.839 | 0.107 | 0.912 | 0.877 | 0.903 | 0.881 | 0.931 | 0.901 | 0.893 |
| | | | | | | | | control | 0.786 | |
| S-8 | 0.152 | 0.143 | 0.844 | 0.859 | | | | | | |
| D-3 | 0.630 | 0.613 | 0.096 | 0.097 | | | | | | |

(가) *Thecadinium* (3)과 *Alexandrium* (8) 이 원핵 미생물인 AOA의 활성을 저해하는 것을 확인함.

(나) D-3: (*Thecadinium*)의 경우, D (직접 접종)에서 inhibition 으로 생각되는 현상이 관찰됨. 특히, 고농도일 때, 더 저해되는 현상이 관찰됨. S (간접 접종)에서는 저농도에서는 저해되지 않음을 관찰됨.

(다) S-8: (*Alexandrium*)의 경우, S (간접 접종)일 때 sample의 농도가 저농도인 1% 에서, inhibition이 됨. 상대적으로 고농도인 10%에서 저해가 되지 않은 현상이 특이함. D (직접 접종)에서도 비슷한 저해양상이 나타나지만, 간접접종 일때보다 상대적으로 저해양상이 약하게 나옴.

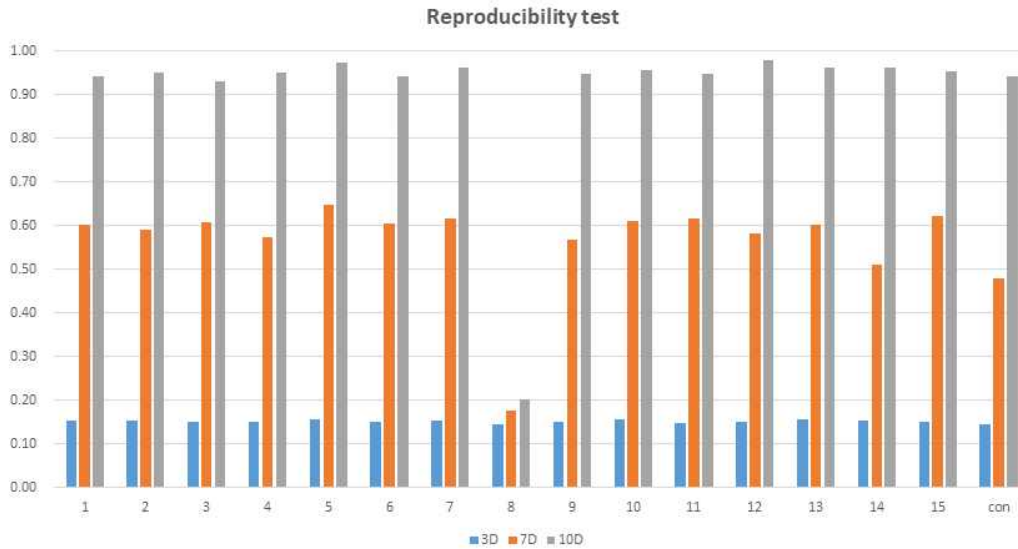
(3) 다양한 1차생산자의 활성을 구체적으로 보기위하여 시간에 따른 시료 채취를 통한 실험을 실시하였음.

(가) *Thecadinium* 배양액(8번 시료)이 AOA의 성장을 저해하여 아질산이 축적되지 않는 것을 확인할 수 있었음.

(나) *Alexandrium*의 경우, 배양조건과 시간에 따라서 AOA를 저해하는 활성이 다르게 나타남. 배양조건과 시간을 달리하여 활성이 나타나는 구간에 대한 구체적인 연구가 필요함.

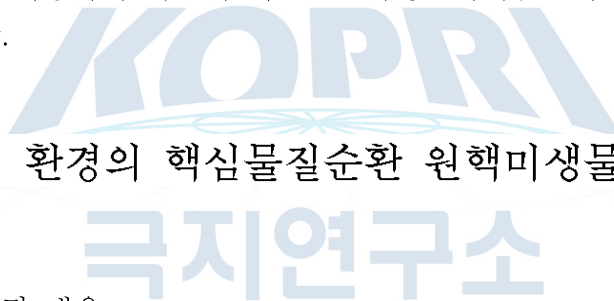
(다) 1차생산자와 원핵미생물(AOA)의 공배양(co-culture) 방법을 이용하여 해양 1차생산자와 원핵미생물간의 상호작용이 일어남을 실제로 확인 함.

(라) *Alexandrium*과 *Thecadium*의 고세균 저해 양상이 상반되게 나타나는 현상이 관찰됨. 고세균과 1차 생산자간의 직접적인 접촉에 의한 저해(cell to cell)와 만들어내는 물질 (2차 대사산물)에 의한 저해로 상반되어 나타남.



(4) ASP의 1차생산자인 *P. antarctica*와 원핵미생물간의 상호작용을 규명할 수 있는 발판을 마련함.

(5) 상기 조건을 이용하여 차년에 확보할 1차생산자 및 원핵미생물의 상호작용을 규명하고자 함.



제 2 절. 해빙 환경의 핵심물질순환 원핵미생물 자원 확보

1. 연구 접근 방법 및 내용

가. 해수 샘플을 채취 후 ITS-NGS 기술을 기반으로 지표 1차생산자를 선정함.

(1) 16S rRNA를 기반으로 해양 환경 샘플로부터 해당 환경의 미생물 분포를 스크리닝함.

(2) 분석 자료를 통해 해수 샘플 내에서 지표종을 선정함.

나. 1차 생산자(algae, SOB 등)와 target 난배양성 미생물의 공배양 및 상호작용 실험

(1) 직접 및 간접 접종 방법으로 실험을 진행

(가) 직접 접종: 고세균 배양액에 10%, 1%의 비율로 1차생산자를 접종

(나) 간접 접종: 1차 생산자를 제거한 배양액의 상층액을 10%, 1%접종. 이때 1차 생산자를 제거할 때에는 원심분리기를 통해 제거

(2) 해양 고세균의 활성 검증은 암모니아가 산화되서 전환된 아질산을 측정함.

2. 연구 결과

가. N,C,S 물질순환 원핵미생물 지표종 선정

(1) 선행 연구(Table.1 참조)를 통해 남극 ASP 우점 원핵미생물을 선정할 바 있음.
 그로 인하여 선정된 종은 다음과 같음.

Table 1. ASP bloom 시 우점하는 주요 원핵미생물 분포 조사

| | Peak-1 | Declining-1 | Declining-2 | Peak-2 | Sea ice |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Raw reads | 7683 | 5670 | 5042 | 10558 | 6211 |
| OTU* | 2290 | 1832 | 1833 | 3626 | 2051 |
| Chao1 estimated richness | 12894.0 | 9587.4 | 10532.1 | 21865.0 | 10697.8 |
| Shannon's index for diversity | 5.2 | 5.6 | 5.8 | 5.6 | 5.3 |
| Simpson's index for diversity (Inverse) | 22.5 | 45.6 | 53.6 | 22.9 | 19.9 |
| Good's coverage (%) | 74.9 | 72.8 | 69.3 | 70.3 | 78.4 |
| Taxonomy | | | | | |
| Bacteroidetes | | | | | |
| Flavobacteriales | | | | | |
| Unclassified <i>Flavobacteriales</i> | 1.11 | 7.51 | 9.54 | 1.75 | 1.87 |
| U n c l a s s i f i e d <i>Flavobacteriaceae</i> | 1.14 | 8.96 | 12.05 | 1.07 | 1.04 |
| <i>Polaribacter</i> | 35.70 | 9.83 | 7.21 | 49.75 | 5.12 |
| <i>Psychroserpens</i> | tr | 1.05 | tr | tr | N/D |
| Proteobacteria | | | | | |
| Alphaproteobacteria | | | | | |
| Rhodobacteriales | | | | | |
| U n c l a s s i f i e d <i>Rhodobacteraceae</i> | tr | 4.95 | 4.50 | tr | 2.97 |
| <i>Loktanella</i> | tr | 3.67 | 3.14 | tr | 1.46 |
| <i>Octadecabacter</i> | tr | 3.02 | 1.83 | tr | tr |
| <i>Planktomarina</i> | 1.76 | 2.70 | 3.23 | tr | 4.15 |
| SAR11 clade | | | | | |
| <i>Pelagibacter</i> | 10.22 | 24.12 | 21.52 | 3.52 | 49.5 |
| Unclassified SAR11 | tr | tr | tr | tr | 1.01 |
| Gammaproteobacteria | | | | | |
| Alteromonadales | | | | | |
| <i>Pseudoalteromonas</i> | N/D | N/D | N/D | N/D | 2.15 |
| <i>Paraglaciecola</i> | tr | 2.03 | tr | tr | tr |
| SAR92 clade | 8.12 | 2.51 | 2.82 | 6.50 | 4.18 |
| Oceanospirillales | | | | | |
| Ant4D3 | 27.59 | 16.61 | 18.27 | 29.75 | 12.70 |
| <i>Profundimonas</i> | N/D | 3.39 | 1.08 | tr | tr |
| OM182 (order) | | | | | |
| OM182 clade | tr | tr | 1.33 | tr | tr |
| Pseudomonadales | | | | | |
| <i>Dasania</i> | N/D | 1.98 | 1.31 | N/D | tr |
| Ruthia (order) | | | | | |
| Unclassified <i>Ruthia</i> | 2.92 | tr | tr | tr | 1.54 |
| Thiotrichales | | | | | |
| <i>Methylophaga</i> | 1.05 | 2.41 | 4.02 | 3.34 | 1.49 |
| U n c l a s s i f i e d <i>Gammaproteobacteria</i> | tr | 1.13 | 1.01 | tr | tr |

(가)Ant4D3: 남극의 여름에 우점하는 대표적인 Gammaproteobacteria로 배양된 예가 없음.

(나) *Polaribacter*: *Polaribacter*는 배양된 몇 종이 있지만, Metagenome 분석으로 우점하는 *Polaribacter*는 배양되지 않고 있음.

(다) *Pelagibacter*: 전세계의 바다에 우점하는 것으로 알려진 난배양성 미생물로 배양체를 가진 실험실은 제한적임. 남극을 제외한 환경에서는 배양체가 보고되고 있으나, 남극해양에서는 배양체가 거의 없음.

나. SOB 등 필수 영양원 제공 Autotroph과 공배양 시도 및 난배양성 지표종 배양 시도

(1) SOB를 직접 이용하여 배양을 시도하였으나, SOB 이외에도 선행 연구와 기존 논문을 바탕으로 배양에 영향을 미치는 필수 영양원을 선별하여, 배양에 이용함.

(2) 개량된 배지 조성을 이용하여 배양을 시도하였고, 배양 실험을 진행함.

(3) 공배양을 통해 해양 암모니아 산화 고세균 뿐만 아니라 난배양성 heterotroph의 배양도 진행함.



(4) HTC(Hight throughput Cultivation)기술을 이용하여 Extinction Dilution을 실시하여, 1 개의 세포로부터 순수배양체를 얻어내는 과정을 진행함.

(5) 96-well plate와 Flow Cytomter, PCR을 이용하여 난배양성 미생물의 screening을 진행함.

다. 서남극해 ASP의 주요 1차 생산자 *P. antarctica* 이용, 분리된 난배양성 핵심 ASP 고세균 공생배양 시도

(1) ASP의 주요 1차 생산자인 *P. antarctica*를 이용하여 공배양(Co-culture)을 통

해 ASP의 고세균과 공생배양 및 상호작용을 연구함.

| 형광측정 | | 5월 8일 실험 시작 | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| | | 05월 08일 | 05월 09일 | 05월 10일 | 05월 12일 | 05월 14일 | 05월 16일 | 05월 18일 | 05월 20일 | |
| Thecadinium kofoidii | | | | | | | | | | |
| co-culture | DDS1 | 1.107 | | 1.148 | 1.138 | 1.158 | 0.570 | 0.477 | 0.436 | |
| | SW | 1.193 | | 1.335 | 1.291 | 1.416 | 0.649 | 0.344 | 0.351 | |
| control | NH4+AOA culture | | 2.846 | 2.565 | 3.162 | 2.433 | 1.804 | 0.803 | 0.662 | |
| | NH4 | 1.219 | | 0.824 | 1.002 | 0.371 | 0.215 | 0.204 | 0.385 | |
| | NO3 | 1.296 | | 1.307 | 1.481 | 2.463 | 2.698 | 3.488 | 6.618 | |
| Skeletonema | | | | | | | | | | |
| co-culture | DDS1 | 12.005 | | 15.818 | 21.127 | 36.657 | 43.969 | 43.087 | 59.645 | |
| | SW | 11.948 | | 17.934 | 21.148 | 38.376 | 47.442 | 55.610 | 76.096 | |
| control | NH4+AOA culture | | 12.951 | 14.774 | 17.100 | 30.755 | 35.300 | 36.480 | 41.885 | |
| | NH4 | 13.086 | | 19.279 | 23.799 | 37.372 | 40.980 | 39.744 | 41.378 | |
| | NO3 | 12.521 | | 21.005 | 29.263 | 57.981 | 78.085 | 81.389 | 108.118 | |

(2) 저서 생물인 *T. Kofoidii*는 해양 암모니아 산화 고세균(AOA)과의 공배양시, AOA의 암모니아 산화가 저해되는 것이 선행 연구에서 확인되었음.

(가) *Skeletonema*는 *T. Kofoidii*에 비해 저해작용 없이 AOA와 공생을 하는 것으로 관찰됨.

(나) *P.antartica*를 이용하여 공생배양을 시도하였으나, *P.antartica* 배양체 확보가 어려워 기존에 확보한 자원을 이용 해당 연구를 진행함.

| Nitrite 측정 | | | | | | | | | |
|-------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|--|
| | | 05월 10일 | 05월 12일 | 05월 14일 | 05월 16일 | 05월 18일 | 05월 20일 | | |
| co-culture | | | | | | | | | |
| T.kofoidii | DDS1 | | 0.081 | 0.093 | 0.085 | 0.107 | 0.130 | 0.121 | |
| | SW | | 0.133 | 0.161 | 0.162 | 0.216 | 0.281 | 0.296 | |
| Skeletonema | DDS1 | | 0.084 | 0.113 | 0.134 | 0.240 | 0.481 | 0.726 | |
| | SW | | 0.138 | 0.218 | 0.308 | 0.634 | 0.968 | 0.901 | |
| control | | | | | | | | | |
| A2 | DDS2 | | 0.081 | 0.116 | 0.171 | 0.395 | 0.665 | 0.929 | |
| | SW | | 0.171 | 0.270 | 0.286 | 0.371 | 0.476 | 0.625 | |
| T.kofoidii | AOA culture | | 0.114 | 0.113 | 0.095 | 0.115 | 0.124 | 0.113 | |
| | Only NH4 | | | | -0.018 | | | | |
| Skeletonema | AOA culture | | 0.107 | 0.109 | 0.089 | 0.101 | 0.121 | 0.108 | |
| | Only NH4 | | | | -0.020 | | | | |

제 3 절. 1차생산자가 원핵미생물의 물질순환 활성화에 미치는 영향 조사

1. 연구 접근 방법 및 내용

가. 1차 생산자 (algae) 와 target 난배양성 미생물의 공배양 및 상호작용 실험

- (1) 조류와 AOA의 공배양을 위해 16S rRNA를 기반으로 조류 배양체의 미생물 분포를 스크리닝
- (2) 분석 자료를 통해 조류와 AOA의 공배양을 실시하고 공배양을 위한 최적 조건을 탐색

나. 제안된 조류-원핵미생물 상호작용의 해빙환경에서 재현성 여부 확인

- (1) 조류-원핵미생물의 상호작용 재현성을 파악하기 위해 조류와 남극 ASP 해수 시료의 농화배양을 수행
- (2) 난배양성 미생물의 농화배양 및 순수분리를 위해 algae lysate를 이용하여 농화배양 실시
- (3) 조류 lysate와 환원된 N, S영양원을 접종하여 농화배양 수행
- (4) 기질 활성 검증 및 flow cytometry를 통한 cell 양을 측정
- (5) serial dilution을 통한 순수분리 시도

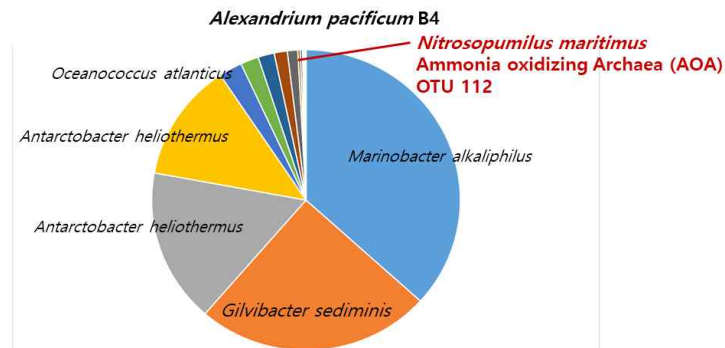
다. 1차 생산자의 조성/활성과 물질순환 활성화와의 관련성 규명

- (1) 1차 생산자와 공배양하는 미생물 순수분리 실험 진행
- (2) 순수분리 후 핵심 원핵미생물의 지놈분석 및 생리생화학적 기능 분석 수행 예정
- (3) Target 난배양성 미생물의 최적 조건 탐색
- (4) Target 난배양성 미생물의 순수분리가 완료된 후, 지놈 분석을 통해 핵심미생물의 기능 분석을 수행
- (5) 1차 생산자와 순수배양된 원핵미생물의 재구성(two-membered culture)을 통해 상호작용 규명

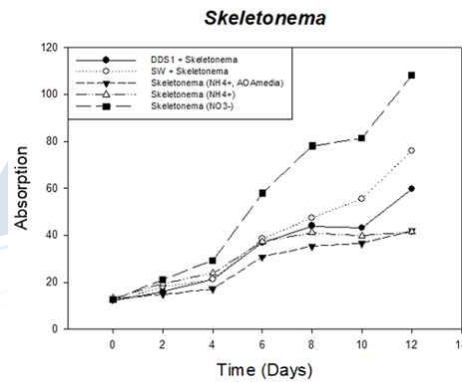
2. 연구 결과

가. 조류-원핵미생물 상호작용 기전 규명

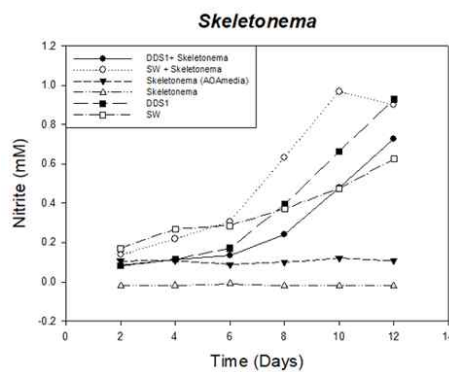
- (1) 조류와 원핵미생물의 상호작용 기전을 파악하기 위해 *Alexandrium pacificum* B4 배양체의 미생물 군집 분석을 실시함.
- (2) 조류 배양체의 16S rRNA amplicon sequencing 결과, *Alexandrium pacificum* B4 배양체 내에서 nitrifier 중 Ammonia-oxidizing Archaea(AOA)가 존재함을 확인함. 고균의 비중이 작으나 질소 순환의 주요 역할(nitrification)을 해당 고균이 주도할 것이라 예측됨.
- (3) 이를 기반으로, 조류와 상호작용하는 nitrifier의 공생배양을 연구함. 다만, 조류와 AOA 최적 성장 조건이 상이하여 공생배양을 위한 조건을 확보 시도함.



- (4) 광도 테스트를 거쳐 확인해본 결과, dinoflagellate는 대부분 높은 광도 (63PPFD이상)에서 성장함. Dinoflagellate 중 *Gambierdiscus*는 보다 낮은 광도에서 성장할 수 있으나, 느린 성장속도를 고려하여 co-culture로는 맞지 않음.
- (5) 낮은 광도에서의 성장 속도와 nitrate에 대한 선호도를 고려해 보았을 때, AOA와 co-culture에 적합한 algae는 *Skeletonema*로 확인함.



- (6) 조류 성장도 측정 결과, *Skeletonema*는 nitrate를 선호하여 AOA와의 공생배양 시 더 높은 성장도를 보임.



- (7) AOA 성장도 측정 결과, strain SW의 성장 속도의 경우 algae가 함께 있을 때 더 높은 성장도를 보임.

- (8) 이전 선행 연구와 더불어 AOA 성장도 측정 결과, *Skeletonema*가 조류와 nitrifier의 상호작용을 살펴보는데 적합한 것으로 생각됨.

나. 제안된 조류-원핵미생물 상호작용의 해빙환경에서 재현성 여부 확인

- (1) 선행 연구된 조류와 원핵미생물의 상호작용을 해빙환경에서 재현되는지 확인

하기 위해 아문젠 해수 시료를 이용해 농화배양을 시도함.

| Station | Surrounding | Sampling Date | Sampling Depth (m) | Latitude (°S) | Longitude (°W) |
|---------|------------------------|---------------|------------------------------|---------------|----------------|
| 7 | open ocean | 2017-12-29 | 20, 40, 100, 500, 1000, 2711 | 56.00 | 145.71 |
| 9 | open ocean | 2017-12-30 | 45, 100, 1200, 3010 | 56.99 | 147.39 |
| 22 | Western Getz Ice shelf | 2018-01-20 | 35, 725 | 74.22 | 128.55 |
| 27 | Middle Getz Ice shelf | 2018-01-22 | 270, 1011 | 73.88 | 118.72 |
| 31 | Polynya center | 2018-01-23 | 20, 358 | 73.50 | 116.50 |
| 33 | Polynya center | 2018-01-23 | 40, 812 | 73.27 | 114.94 |
| 38 | Dotson Ice shelf | 2018-01-24 | 22, 1047 | 74.17 | 112.72 |
| 46 | Polynya center | 2018-01-28 | 10, 440 | 72.85 | 112.50 |
| 49 | Polynya center | 2018-01-29 | 40, 577 | 72.78 | 115.12 |
| 50 | Polynya margin | 2018-01-29 | 35, 528 | 72.45 | 116.35 |
| 52 | Polynya margin | 2018-01-31 | 40, 480 | 72.00 | 118.41 |
| 53 | open ocean | 2018-01-30 | 35, 2380 | 71.00 | 120.00 |

(2) 난배양성 원핵미생물(Ant4D3, Pelagibacter)의 canonical metabolic pathway 가 부재함을 파악하고 다음과 같은 조건으로 농화배양을 시도함.

(가) *Prochlorococcus marinus* (lysate, 20% of total volume), 0.05mM ammonia, 0.05mM pyruvate, 0.01mM Methionine, 0.05mM Leucine and 0.01mM Glycine

(나) *Phaeocystis antarctica* (sea water samples filtered using 0.45um, 20% of total volume), 0.05mM ammonia, 0.05mM pyruvate, 0.01mM Methionine, 0.05mM Leucine and 0.01mM Glycine

(3) Target microorganism은 결실된 canonical metabolic pathway로 인해 환원된 형태의 N, S source를 환경에서 확보해야 하는 상황임. 따라서 해당 환원형의 N, S source를 공배양 하는 다른 organism을 통해 공급 받을 것으로 가정함.

(4) 96-well plate를 이용하여 조류와 난배양성 원핵미생물의 공생배양을 시도함.

| st.46 (Polyna Centre) scm&bottom | | | | | | | | | | | | Nitrite (mM) | |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|--|
| 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0 | |
| 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.1 | |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.2 | |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.3 | |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.4 | |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.5 | |

| st.46 (Polyna Centre) scm (10m) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|------|------|-------|-------|-------|------|------|-------|------|-------|
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | -0.01 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 |

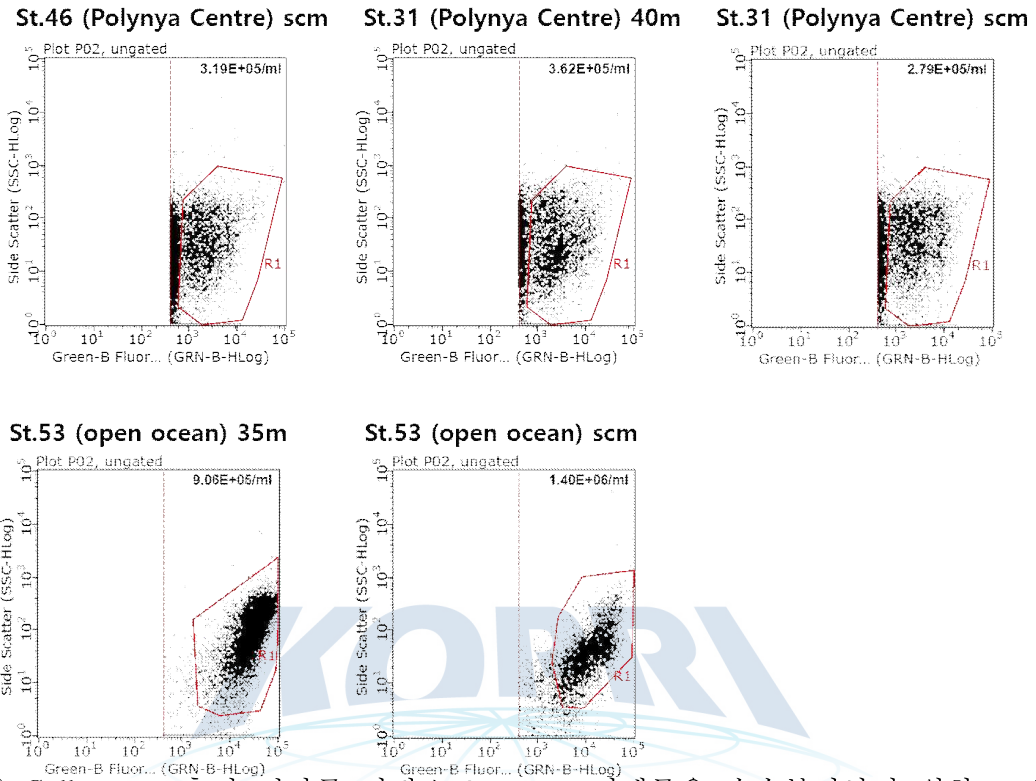
| st.31 (Polyna Centre) 40m | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|-------|------|------|-------|------|------|------|-------|-------|------|
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.01 | 0.00 | -0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

| st.31 (Polyna Centre) scm&bottom | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| -0.01 | 0.00 | -0.01 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 |

| st.53 (open ocean) 35m | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.01 |
| 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.01 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.02 |
| 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 |

| st.53 (open ocean) scm&bottom | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| -0.01 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| -0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.01 | 0.00 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

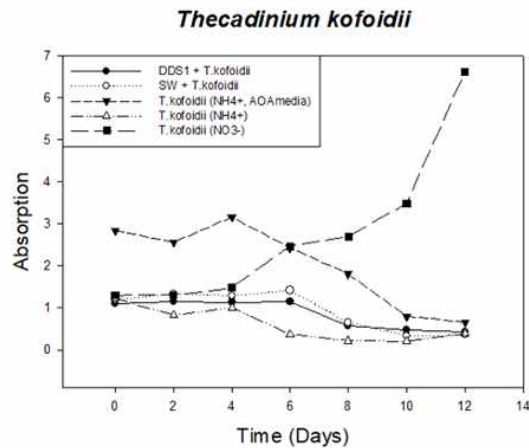
(5) 기질 측정을 통해, 몇가지 활성을 나타내는 배양체를 선별하고 flow cytometry를 통해 cell count를 측정함.



(6) Cell count 측정 결과를 바탕으로 target 미생물을 순수분리하기 위한 serial dilution을 진행하였음.

다. 1차 생산자의 조성/활성과 물질순환 활성과의 관련성 규명

- (1) 선행 연구 결과, *Skeletonema* (diatom)의 경우, AOA (nitrifier)와 공배양이 가능하였음. 하지만 *Thecadinium* (dinoflagellate)의 경우, 공배양이 불가능하다는 것을 확인함.



- (2) 남극 ASP blooming 시, dinoflagellate 우점하는 것을 확인하였음. Diatom과 AOA의 공배양은 가능하나 일부 dinoflagellate와 target AOA가 공배양이 어려움(antagonistic interaction). 따라서 남극 ASP blooming 시, 해수 시료를 이용하여 난배양성 미생물과 조류(algae)의 상호관계를 규명하는 기전을 파악하기 위한 공배양 실험에 어려움이 있어, 다양한 원핵미생물과 dinoflagellate의 공배양을 진행할 예정임.
- (3) 이전에 활성을 보였던 남극 해수 시료를 이용한 농화배양체의 순수분리 과정에서 배양체의 활성이 사라지는 현상이 관찰됨. 이는 최적의 배양 조건을 탐색하였지만, 난배양성 미생물의 최적 배양 조건을 찾는 데 어려움을 겪음.
- (4) 순수 분리 후 핵심 원핵미생물의 지놈분석 및 생리생화학적 기능 분석 수행할 예정이었지만, 순수분리에 어려움을 겪어 농화배양체의 조류와 난배양성 원핵미생물의 공생배양으로 1차생산자가 원핵미생물의 물질순환 활성에 미치는 가능성을 제시함.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

| 연차 | 성과목표 | 세부목표 | 달성 주요내용 | 달성도 (%) |
|----------------|------------------------------|--|---|---------|
| 1차년도 (2017) | 해빙에 따른 1차생산자의 조성 및 활성 변화 연구 | (1-1) 해빙환경의 지표 1차생산자 선정 | - 지금까지 관찰한 결과를 종합하면 bloom 발생시 주요 1 차 생산자는 <i>Phaeocystis antarctica</i> 로 추정됨 | 100 |
| | | (1-2) 모델 1차생산자 배양 자원 확보 | - 2017/2018 Cruise를 통하여 Field 에서 직접 <i>Phaeocystis antarctica</i> 배양자원을 확보하고자 함. - 2018년도 상호작용 예비실험을 위하여 다양한 1차 생산자 확보 및 상호작용 연구 | 100 |
| 2차년도 (2018) | 해빙 환경에서의 핵심 물질순환 원핵미생물 자원 확보 | (1-1) N,C,S 물질순환 원핵미생물 지표종 선정 | - 남극 ASP에 우점하는 원핵미생물의 선별 및 상호작용 연구 | 100 |
| | | (1-2) SOB 등 필수 영양원 제공 Autotroph과 공배양 시도 및 난배양성 지표종 배양 시도 | - SOB를 통한 간접적인 영양원 제공보다는 필수영양원을 직접 제공하여 난배양성 지표종과 공배양 실시 | 80 |
| | | (1-3) 서남극해 ASP의 주요 1차 생산자 <i>P. antarctica</i> 이용, 분리된 난배양성 핵심 ASP 고세균 공생배양 시도 | - algae/dinoflagellate와 고세균을 공배양하는 실험을 진행 - 공배양과 더불어 두 미생물 간의 상호작용 관찰 | 85 |

| | | | | |
|--------------------|--|---|---|-----|
| 3차년 도 (2019) | 1차생산 자가 원핵미생 물의 물질순환 활성에 미치는 영향 조사 | (1-1) 조류-원핵미생 물 상호작용 기전 규명 | - 조류와 nitrifier인 AOA의 상호작용 가능성 및 공배양 조건 파악 | 100 |
| | | (1-2) 제안된 조류-원핵미생 물 상호작용의 해빙환경에서 재현성 여부 확인 | - 조류 lysate를 통한 영양원을 제 공하여 남극 ASP 해수 시료에서 난배양성 미생물 배양. - 배양을 시도한 샘플은 cell count 및 농화배양과 serial dilution을 통한 순수분리 시도. | 100 |
| | | (2-1) 1차 생산자의 조성/활성과 물질순환 활성과의 관련성 규명 | - 1차 생산자의 물질순환 활성화와 관 련성을 규명하기 위해 1차 생산자 와 공배양하는 미생물 순수 분리 실험 진행. - 순수 분리 후 핵심 원핵미생물의 지놈분석 및 생리생화학적 기능 분석 수행 예정. | 100 |

* 1차년도 목표로 제시한 “해빙에 따른 1차 생산자의 색소 형광특성(Fm/Fv) 변화 연구”는 극지연구소의 해양물리 및 해양화학팀이 이미 분석자료를 확보/발표하였음. 따라서, 기발표된 자료를 이용함.

극지연구소

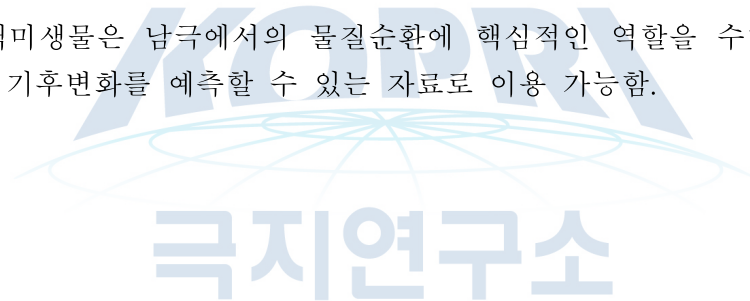
제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 학술적 파급효과

1. Phycosphere에서의 조류와 원핵미생물간의 상호작용에 관한 연구는 물질순환에 미치는 중요함에도 불구하고 미비함. 특히, 극지에서의 연구는 거의 없음
2. 조류인 *Phaeocystis*가 기질이 아닌 다른 메커니즘으로 Bacteria(*Polaribacter*), Archaea(*Nitrosopumilus*)의 조성과 활성을 조절한다면 매우 파급효과가 큰 연구 결과임.
3. 생물 상호작용 조절 메커니즘을 metabolome 수준에서 규명하는 것은 매우 어려운 연구로 국내 연구의 지평을 넓힐 수 있음

제 2 절. 경제적 파급효과

1. 목표 원핵미생물은 남극에서의 물질순환에 핵심적인 역할을 수행하므로, 남극 및 지구의 기후변화를 예측할 수 있는 자료로 이용 가능함.



제 6 장 참고문헌

Screen, J. A., & Simmonds, I. (2010). The central role of diminishing sea ice in recent Arctic temperature amplification. *Nature*, 464(7293), 1334-1337.

Arrigo., et al. (2000). Phytoplankton taxonomic variability in nutrient utilization and primary production in the Ross Sea. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 105(C4), 8827-8846

Kim., et al. (2014). Unveiling abundance and distribution of planktonic Bacteria and Archaea in a polynya in Amundsen Sea, Antarctica. *Environmental microbiology* 16.6: 1566-1578.

Delmont, Tom O., et al. (2015). Genome reconstructions indicate the partitioning of ecological functions inside a phytoplankton bloom in the Amundsen Sea, Antarctica. *Frontiers in microbiology* 6.

Bertrand, Erin M., et al. (2015). Phytoplankton-bacterial interactions mediate micronutrient colimitation at the coastal Antarctic sea ice edge. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.32: 9938-9943.

Choi and Kim., et al. (2015, accepted). Cultivation and biochemical characterization of heterotrophic bacteria associated with phytoplankton bloom in the Amundsen sea polynya, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*.

뒷 면

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.