

광학영상장비를 활용한
식물플랑크톤 이미지 획득 자동화

Automation of Phytoplankton Image Acquisition
using Imaging FlowCytobot



한국해양과학기술원
부설 극지연구소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “광학영상장비를 활용한 식물플랑크톤 이미지 획득 자동화”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 1. 30

연구책임자 : 이 영 주



보고서 초록

과제관리번호	PE19510	해당단계 연구기간	2019.12.01 ~ 2020.11.30	단계 구분	(1단계)/(총1단계)
연구사업명	중 사업명				
	세부사업명	기본연구사업(신진연구자)			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	광학영상장비를 활용한 식물플랑크톤 이미지 획득 자동화			
연구책임자	이 영 주	해당단계 참여연구 원수	총 : 1 명 내부 : 1 명 외부 : 0 명	해당단계 연구비	정부: 30,000 천원 기업: 천원 계: 30,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소 해양연구본부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	45
<p>○ 연구개발의 목적 및 필요성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 목적: IFCB를 활용한 식물플랑크톤 고해상도 이미지 획득 2) 필요성 <ul style="list-style-type: none"> - 급격한 식물플랑크톤의 공간변화가 나타나는 극해역에서 제한된 정점조사를 통한 전통적인 연구방법은 한계에 부딪힘 - 아라온 관측해역에서 식물플랑크톤의 분포변동을 심도있게 파악하기 위하여 연속적인 관측자료 확보를 위한 새로운 자동관측시스템 수립이 필요함 <p>○ 연구개발의 내용 및 범위</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 남·북극해 아라온 관측해역에서 해양환경 기초자료 및 식물플랑크톤 현장시료 수집 2) 아라온에서 IFCB 운용 및 데이터 획득 3) 현장시료 분석 및 획득 데이터 후처리 4) 극해역 식물플랑크톤 군집의 공간분포 특성 파악 <p>○ 연구개발결과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 광학영상장비 Imaging FlowCytobot을 활용하여 아라온 항로상의 표층해수 식물플랑크톤 이미지 획득 자동화 시스템 구축 2) 기계학습을 통하여 식물플랑크톤 이미지 자료의 자동 분류 정확도 ~80% 달성 3) 서남극해 연안해역 식물플랑크톤 군집은 대륙붕단 바깥 해역, 해빙 주변부, 폴리니아 등에서 뚜렷하게 공간적인 분포 특성을 보였고, 폴리니아 내에서도 지역적으로 복잡한 군집구조를 나타냄 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	Imaging FlowCytobot, 극해역, 식물플랑크톤 종 현존량, 자동화			
	영 어	Imaging FlowCytobot, Polar Oceans, Phytoplankton species abundance, Automation			

요 약 문

I. 제 목

- 광학영상장비를 활용한 식물플랑크톤 이미지 획득 자동화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

- IFCB를 활용한 식물플랑크톤 고해상도 이미지 획득

2. 필요성

- 식물플랑크톤은 해양의 기초생산자로서 중요한 역할을 하고, 물리·화학적인 환경요인이나 상위 포식자의 섭식에 의하여 군집구조와 생물량, 생산력이 직접적으로 영향 받으며 이러한 특성으로 인하여 해양의 환경과 생태계를 이해하는데 기초적인 요소로 연구되고 있음
- 급격한 플랑크톤 군집의 변화가 나타나는 극해역에서 제한된 정점조사를 통한 전통적인 연구방법은 한계에 부딪힘
- 아라온 관측해역에서 식물플랑크톤의 분포변동을 심도있게 파악하기 위하여 연속적인 관측자료 확보를 위한 새로운 자동관측시스템 수립이 시급함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 남·북극해 아라온 관측해역에서 해양환경 기초자료 및 식물플랑크톤 현장시료 수집
- 아라온에서 IFCB 운용 및 데이터 획득
- 현장시료 분석 및 획득 데이터 후처리
- 극해역 식물플랑크톤 군집의 공간분포 특성 파악

IV. 연구개발결과

- 광학영상장비 Imaging FlowCytobot을 활용하여 아라온 운항 항로상의 표층 해수 식물플랑크톤 이미지 획득 자동화 시스템 구축
- 기계학습을 통하여 서남극해에서 획득된 식물플랑크톤 이미지 대용량 자료의

자동 분류 정확도 ~80% 달성

- 서남극해 연안해역 식물플랑크톤 군집은 대륙붕단 바깥 해역, 해빙 주변부, 폴리니아 등에서 뚜렷하게 공간적인 분포 특성을 보였고, 폴리니아 내에서도 지역적으로 복잡한 군집구조를 나타냄

V. 연구개발결과의 활용계획

- 남·북극해 해양생태계의 일차생산자인 식물플랑크톤 종조성, 현존량, 생물량 등의 기본 정보를 활용하여 해양생태계 및 생지화학순환 연구분야에서 보다 광역적이고 심도있는 연구 진행 가능
- 아래의 연구항해 및 이동항로에 속하는 전 해역에서 식물플랑크톤 고해상도 이미지 데이터를 연속으로 획득하고 자료처리를 자동화하여 해양 식물플랑크톤 중 현존량의 공간분포를 실시간으로 감시하는데 활용 가능



S U M M A R Y

I. Subject

- Automation of phytoplankton image acquisition using Imaging FlowCytobot

II. Objectives and Necessities

1. Objectives

- Acquisition of high resolution images of phytoplankton using Imaging FlowCytobot

2. Necessities

- Phytoplankton plays an important role as a primary producer in the ocean. Phytoplankton community structure, biomass, and productivity are directly affected by physical and chemical environmental variables, thus their ecology is important to understand the marine environment and ecosystem
- Field survey conducted at limited sampling stations appear to make a deeper understanding of phytoplankton ecology difficult
- It is urgent to establish an automatic observation system to acquire continuous plankton image data in order to deeply understand the phytoplankton distribution on the course of the Araon

III. Contents and Scopes

- Collection of environmental data and phytoplankton samples in the study area of the polar oceans
- IFCB operation and data acquisition in the Araon during the field survey
- Sample analysis and post-processing of acquired data
- Understanding of phytoplankton spatial distribution in the study area

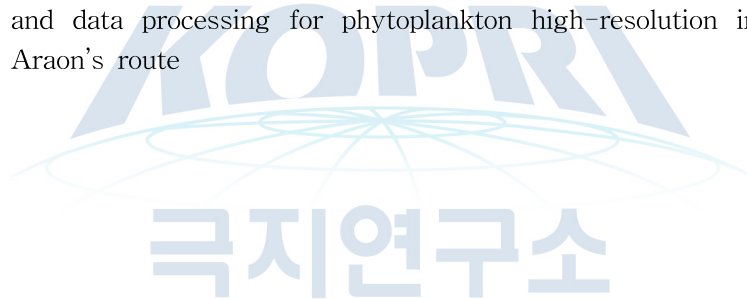
IV. Results

- Successful establishment of the system of automatic observation of phytoplankton image acquisition in the surface water on the course of the Araon

- Achievement of the automated classification accuracy of ~80% of phytoplankton images acquired in the West Antarctic Ocean using machine learning
- In the West Antarctic coastal waters, phytoplankton community showed distinct spatial distribution in the open ocean, marginal sea ice zone, and polynia, and also showed a different community structures within polynya, indicating complex distribution characteristics

V. Application Plans

- Will conduct in-depth research in the field of marine ecosystem and biogeochemical cycle using an information such as phytoplankton species composition, abundance, and biomass, which are the primary producers of the marine food web in the polar oceans
- Will be utilized for monitoring the spatial distribution of phytoplankton species abundance in real time by an automation of continuous observation and data processing for phytoplankton high-resolution image data on the Araon's route



C O N T E N T S

Cover	i
Abstract	ii
Summary(Korean)	iii
Summary(English)	v
Contents(English)	vii
Contents(Korean)	ix
List of Tables	xi
List of Figures	xii
Chapter 1 Introduction	1
Section 1 Objectives	1
Section 2 Necessities	1
1. Technical	1
2. Economic/Industrial	1
3. Scientific	2
4. Social/Cultural	2
Section 3 Contents and Scope	2
Chapter 2 Domestic and Overseas Status of Technological Development	4
Section 1 Overseas Status	4
Section 2 Domestic Status	4
Chapter 3 Contents and Results	5
Section 1 Establishment of an operation system for the IFCB	5
1. Brief introduction of IFCB	5
2. IFCB operation and data acquisition	8
3. IFCB data post-processing	11
4. Phytoplankton sampling	15
5. Comparison of IFCB data and photosynthetic pigments	17
Section 2 Phytoplankton dynamics in the West Antarctica using IFCB data	19
1. Spatial patterns of environmental variables	19

2. Spatial distribution of phytoplankton communities.....	22
Chapter 4 Achievement of Goals and External Contributions.....	26
Section 1 Achievement of Goals.....	27
Section 2 External Contributions.....	28
Chapter 5 Plans for Utilization of Results.....	28
Chapter 6 References.....	30



목 차

제출문	i
보고서 초록	ii
요약문	iii
영문요약문	v
영문목차	vii
목차	ix
표 목차	xi
그림 목차	xii
제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구개발의 목적	1
제 2 절 연구개발의 필요성	1
1. 기술적 필요성	1
2. 경제·산업적 필요성	2
3. 과학적 필요성	2
4. 사회·문화적 필요성	2
제 3 절 연구의 내용 및 범위	3
제 2 장 국내외 연구개발 현황	4
제 1 절 국외수준	4
제 2 절 국내수준	4
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	5
제 1 절 IFCB 운용 시스템 수립	5
1. IFCB 도입	5
2. IFCB 설치 및 데이터 획득	8
3. IFCB 획득 데이터 후처리	11
4. 식물플랑크톤 시료 채집	15
5. IFCB 데이터와 광합성색소 비교	17
제 2 절 IFCB 데이터를 활용한 서남극해 식물플랑크톤 군집분포 특성	19

1. 해양환경의 공간분포 특성	19
2. 식물플랑크톤 군집의 공간분포	22
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	26
제 1 절 목표달성도	26
제 2 절 관련분야에의 기여도	27
제 5 장 연구개발 결과 활용 계획 및 개선점	28
제 6 장 참고문헌	30



표 목차

표 1. 이미지의 수치특성 (Features) 예시.....	11
표 2. HPLC 검보정에 사용된 표준 색소 및 약자.....	16



그림 목차

그림 1. NASA의 PACE (Plankton, Aerosol, Cloud, ocean Ecosystem) 미션 중 플랑크톤 분야.....	6
그림 2. IFCB 유체순환 시스템.....	7
그림 3. IFCB 작동 원리.....	8
그림 4. (a) 광학영상장비 Imaging FlowCytobot (IFCB)와 (b) 아라온호 underway 해수 분석을 위한 설치과정.....	9
그림 5. IFCB 운용 소프트웨어 (IFCBacquire).....	9
그림 6. 2020년 1월-2월 서남극해 아문젠해와 로스해 연안해역에서 연속관측이 수행된 아라온 운항 항로와 (파란색 실선) 해수시료 채집정점 (검은색 동그라미).....	10
그림 7. IFCB를 활용한 이미지 획득과 데이터 후처리 과정의 흐름도.....	12
그림 8. IFCB로 획득된 식물플랑크톤 중 이미지 수동 분류.....	13
그림 9. 수동분류 이미지와 자동분류 이미지의 일치율 테스트 결과 (전체 오차율 18%, 미동정 비율 13%, 최적 threshold를 사용한 오차율 11%).....	14
그림 10. 2020년 1월 서남극해 연안해역 해수시료 채집 정점에서 (a) 광합성 색소농도와 아라온 항로상에서 연속관측된 (b) 식물플랑크톤 중 현존량의 우점율 (%).....	18
그림 11. 2020년 1월 서남극해 연안 아라온 항로상의 underway 해수에서 연속관측된 (a) 염분, (b) 수온 (°C), (c) 엽록소 형광 ($\mu\text{g/L}$).....	20
그림 12. 2020년 1월 - 2월 서남극해 연안해역의 아라온 항로상에서 관측된 일조량 (Photosynthetically available radiation,)	21
그림 13. 남극 아문젠해 연안해역에서 (a) 2020년 1월 1일과 (b) 1월 31일의 일평균 해빙농도의 공간분포 (%).....	22
그림 14. 2020년 1월 – 2월 연구기간 동안 서남극 연안해역의 표층 엽록소 형광 ($\mu\text{g/L}$) 분포.....	23
그림 15. 2020년 1월 – 2월 연구기간 동안 서남극 연안해역의 표층에서 (a) 식물플랑크톤 중 현존량 (cells/mL)과 (b) 우점율 (%)의 공간 분포.....	25

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

1. IFCB를 활용하여 표층해수의 식물플랑크톤 고해상도 이미지를 획득하고 획득된 데이터를 자동으로 처리하여 아라온 운항 항로상에서 표층해수 자동관측 시스템을 수립함
2. 서남극해 연안해역에서 식물플랑크톤 현존량과 군집구조의 정밀공간분포를 관측하고 주요 환경요인을 파악함

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 필요성

- 가. 극해역에서 식물플랑크톤 군집 연구를 위해 오랫동안 사용되어온 현미경 분석과 광합성 색소분석 방법은 각각 분석시간이 오래 걸리고 분석자의 오랜 경험을 필요로 하거나 군집을 지나치게 단순화하는 한계를 가지고 있음
- 나. 기후변화로 인한 대양의 물리·화학적인 환경 변화가 해양생태계에 미치는 영향에 관한 연구에서 식물플랑크톤은 중요한 지시자로서 다양한 정보를 제공하나 제한된 정점조사를 통한 전통적인 연구방법은 시공간적인 분포특성을 이해하는 데 한계에 부딪힘
- 다. 해양관측 분야는 계류, 연속관측, 무인관측을 통한 빅데이터 생산으로 비약적인 발전을 거듭하고 있으나, 기본적으로 복잡계인 해양생물 분야는 물리, 화학 분야에 비해 자동, 연속관측 방법의 발전 속도가 느림

2. 경제·산업적 필요성

- 가. 북극해 배타적 경제수역에서의 비규제 어업협정, 남극해 해양보호구역, 해양생물자원보존위원회의 불법어업국가 후보 지정 등 극해역에서의 해양생물수산자원 이슈에 대응하고 지속가능성 평가를 위하여는 해양의 기초생산자인 식물플랑크톤 분포 변동에 대한 깊이 있는 이해를 바탕으로 해양생태계 기반의 생물수산자원 분포 파악 및 예측이 필요하나 기존의 정점조사 기반 현장관측은 시공간적으로 제한적일 뿐만 아니라 막대한 비용이 소요되어 저비용, 고효율의 대응량 자료획득 방법이 요구됨

3. 과학적 필요성

- 가. 온난화에 따른 해빙감소와 용빙수 유입 등으로 급격한 해양환경 변화가 나타나는 극해역에서 해양의 물리·화학적 환경변화에 직접적으로 영향 받는 식물플랑크톤 군집의 분포변동을 파악하는 것은 해양생태계의 반응을 이해하고 예측하는 데 필수적임
- 나. 식물플랑크톤 군집의 분포특성을 심도있게 파악하기 위해서는 하나하나의 종(species)에 대한 이해의 여부가 중요함

4. 사회·문화적 필요성

- 가. 극해역에서의 과학조사 및 데이터 축적을 통해 해양생물자원보존, 지속가능한 이용에 기여함으로써 외교 역량 강화
- 나. 극해역 연구 선진국인 미국과 유럽을 중심으로 보급이 확대되고 있는 IFCB의 도입 및 활용에 적극 동참함으로써 식물플랑크톤 분포연구 선도국 대열에 합류

제 3 절 연구의 내용 및 범위

1. IFCB 운용 시스템 수립

- 가. IFCB 설치 및 데이터 획득
- 나. IFCB 획득 데이터 후처리
- 다. 식물플랑크톤 시료 채집
- 라. IFCB 데이터와 광합성색소 비교

2. IFCB 데이터를 활용한 서남극해 식물플랑크톤 군집분포 특성 파악

- 가. 해양 환경의 공간분포 특성
- 나. 식물플랑크톤 군집의 공간분포



제 2 장 국내외 연구개발 현황

제 1 절 국외수준

- 가. 극해역에서 식물플랑크톤은 온난화와 기후변화, 산성화, 담수화, 해빙후퇴 등의 환경변화에 직접적으로 영향받는 민감한 지시자일 뿐 아니라 해양생태계의 기저부에서 중요한 역할을 하는 기초생산자이기 때문에 대부분의 해양과학 연구에서 필수적인 연구분야로써 다양한 방법을 통하여 연구되고 있음
- 나. 식물플랑크톤 군집의 분포특성을 심도있게 파악하기 위해서는 하나하나의 종(species)에 대한 이해의 여부가 중요함이 인식됨에 따라 미국 우즈홀해양연구소(WHOI)를 중심으로 IFCB의 개발과 활용이 이루어지고 있으며 해양연구 선진국인 미국과 유럽으로 장비 보급이 빠르게 확산되고 있음
- 다. 유럽과 미국 연구자들에 의하여 북극의 대서양측 해역과 태평양측 해역에서 IFCB를 활용한 연구결과가 발표되고 있으며 남극해에서는 남극반도의 팔머 장기생태연구해역에서 관측이 시도되고 있음

제 2 절 국내수준 **극지연구소**

- 가. 극해역 식물플랑크톤 군집 연구는 제한적인 정점조사 위주로 이루어지고 있으며 연속관측 항목은 식물플랑크톤 총 생물량을 나타내는 엽록소 형광 자료가 유일함
- 나. 아라온 관측해역의 정점조사 기반으로 다양한 해수시료 확보와 분석장비 활용을 통하여 식물플랑크톤 군집구조, 종조성, 현존량, 탄소생물량, 엽록소-a 농도 등을 분석함으로써 식물플랑크톤 군집의 시공간적인 분포특성을 연구해 오고 있음
- 다. 연속관측 장비인 IFCB를 활용한 식물플랑크톤 종 현존량 분포 연구는 국내에서 시도된 바 없음

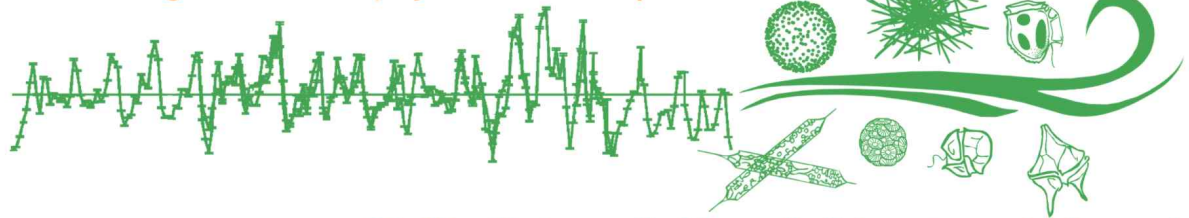
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 IFCB 운용 시스템 수립

1. IFCB 도입

해양과학은 4차 산업혁명과 빅데이터 시대를 맞아 최대한 많은 현장 데이터 확보가 가장 중요한 이슈 중 하나로 부각되고 있다. 위성관측 기술이 전 지구 해양을 모니터링하고 있지만 몇 가지 변수와 알고리즘에 의해 관측되는 수치를 통하여 기본적으로 복잡계인 생태계를 이해하는 데에는 한계가 있는 것이 사실이다. 1978년부터 20년 넘는 시간 동안 해양의 엽록소를 관측해온 NASA에서 이러한 한계를 극복하고자 계획하고 있는 PACE (Plankton, Aerosol, Cloud, ocean Ecosystem) 미션은 이러한 배경을 반영한다 (그림 1). 해양관측 분야에서도 정점조사 기반의 현장조사와 더불어 다양한 센서를 활용한 연속관측, 계류관측, 부이관측, 수중로봇 등을 통한 데이터 확보의 노력이 계속되고 있다. 이러한 시도의 일환으로 연구선에 연속관측 장비를 장착하고 전체 운항 항로에서의 관측데이터 확보가 이루어지고 있으며 이를 위한 다양한 장비들이 개발되어 있다. 그러나 생물분야는 물리, 화학 분야에 비하여 발전 속도가 더딘 편으로 엽록소 형광센서를 통한 관측이 주를 이루어 왔다. 다양하고 복잡한 생물 종을 확인하고 측정하는 데엔 관측기술에 한계가 있었기 때문이다. 최근 인공지능의 발달로 이미지 분석 분야가 급격하게 성장함에 따라 카메라를 활용한 생물 종 관측과 분석이 가능하게 되었다. 더불어 대용량의 관측 데이터를 처리하는 프로그램 코드가 공개되고 활용이 용이해짐에 따라 관련 분야의 발전이 기대된다. IFCB는 생물 종 중에서도 눈에 보이지 않는 미시의 세계를 현미경으로 확대 관찰하고 비디오로 영상을 촬영하여 이미지를 캡처하는 장비이다. 우즈홀 연구소의 Olson 박사 주도로 개발된 FlowCytobot을 기반으로 (Olson et al., 2003) 영상촬영 장치를 추가 장착한 Imaging FlowCytobot이 (Olson et al., 2007) McLANE사 (McLANE Research Laboratories, Inc, USA)를 통하여 출시되어 미국, 유럽을 중심으로 사용자층을 늘리고 있으며 최근 중국에서도 공격적으로 도입 중이다. 한국에서는 본 연구를 통하여 최초로 도입되어 활용 계획에 있다.

NASA's long-term chlorophyll record is unparalleled



PACE will show all chlorophyll is not created equal

그림 1. NASA의 PACE (Plankton, Aerosol, Cloud, ocean Ecosystem) 미션 중 플랑크톤 분야

가. 개요

IFCB는 민감한 전자 장치와 감지 모듈을 갖춘 유체 광학 장치이다 (그림 4a). 이 장비는 $<10 - 150 \mu\text{m}$ 의 크기 범위에서 입자의 크기와 엽록소 함량을 측정할 수 있기 때문에 식물플랑크톤 모니터링에 적합하다. IFCB는 유세포 분석기와 비디오 기술의 조합을 사용하여 부유 입자의 고해상도 이미지를 캡처한다. 레이저광으로 개별 입자의 빛 산란을 측정하여 표적 이미지를 트리거 한다. 광학 및 이미지 데이터는 저장되며 이더넷 연결을 통해 실시간으로 원격 확인할 수 있다. 지속적인 모니터링 중에 수집된 이미지는 자동화 된 이미지 분류 소프트웨어를 사용하여 처리 할 수 있다. IFCB는 프로그래밍 가능한 오염 제어 및 대화 형 원격 조정을 사용하여 장기 모니터링이 가능하도록 설계되어 있다.

나. 작동 원리

IFCB는 비디오 캡처와 레이저 기반 유세포 분석기술을 융합하여 입자를 식별하고 이미지를 캡처하며 각 이미지와 관련된 상대적 크기 및 엽록소 형광을 측정한다. 이 시스템은 살생물제 및 세척용액을 주기적으로 추가함으로써 유체의 흐름을 유지한다. 시료는 다중 포트 밸브 및 주사기 펌프를 통해 채집되고 시스템에 주입된다 (그림 2). 이 과정에서 샘플은 플로우 셀의 중앙에서 얇은 흐름으로 유지되는데 이는 이미지 캡처를 위해 일관된 피사계 심도를 생성하는데 효과적이며 시료가 셀의 내벽과 직접 접촉하지 않기 때문에 셀의 오염을 방지한다.

입자에 의해 산란된 레이저광은 일련의 광학필터와 거울을 통하여 산란광 (Scattered light)과 방출광 (Emitted light)으로 분리되며 두 개의 광 검출기를 사용하여 측정된다. 산란광이나 방출광을 트리거 신호로 사용하여 입자가 플로우 셀을 통과할 때 이미지가 촬영된다 (그림 3). 두 개의 카트리지 필터를 통하여 시스와 샘플의 입자

는 걸러지고 플로우 셀로 다시 재활용되며 앤드 캡의 오버플로우 포트를 통해 과잉의 유체는 배출된다. 표준 비드가 주기적으로 분석되어 이미지 초점을 위해 광학시스템을 재 조정하고, 프로그램된 세척주기에 따라 방오 및 세정제가 주입된다.

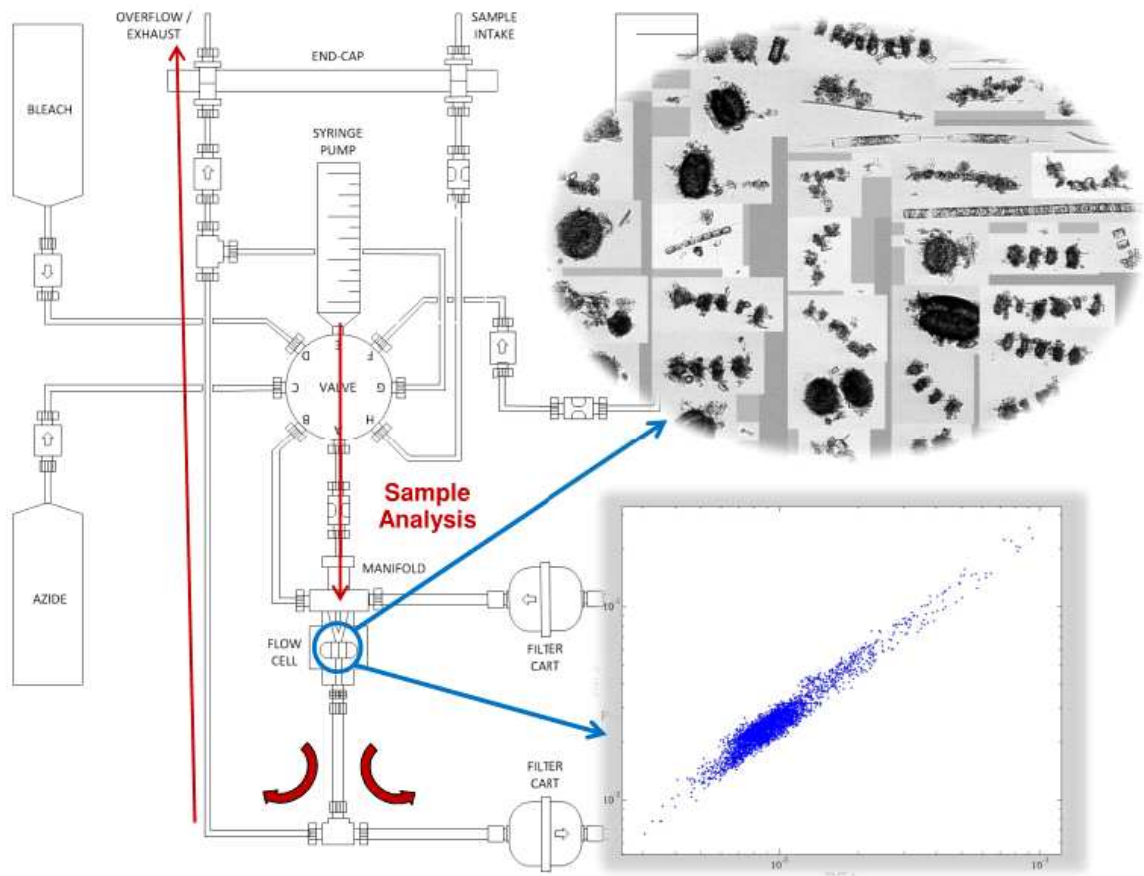


그림 2. IFCB 유체순환 시스템

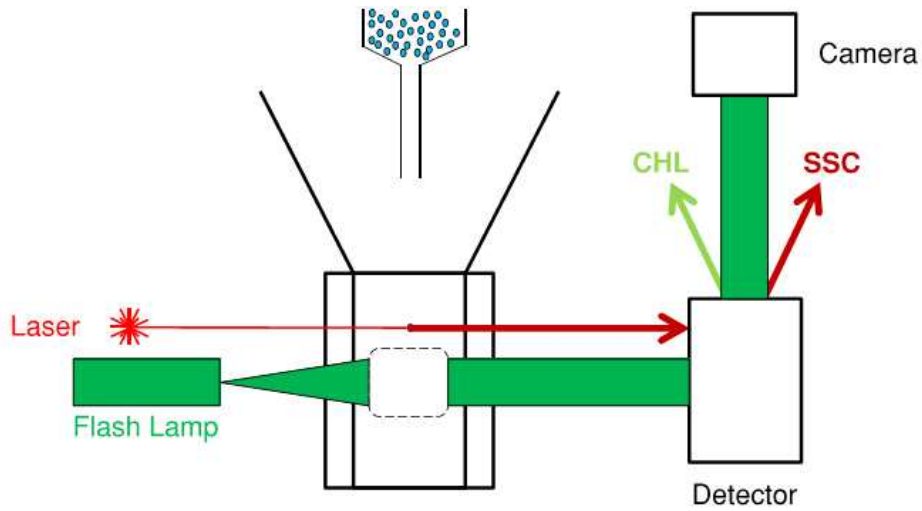


그림 3. IFCB 작동 원리

2. IFCB 설치 및 데이터 획득

가. IFCB 설치 및 운용

IFCB의 광학 시스템 보정, 비드와 시약백 체결, 안정화 과정을 거친 후 장비를 수직으로 세우고 선박에 고정하여 전원과 이더넷을 연결하였다 (그림 4b). 아라운호의 underway 해수공급 장치와 연결 후 시운전을 수행하였다. 장비의 원격조정에 사용되는 노트북을 연결 후 데이터 동기화를 확인하고, 소프트웨어를 실행하여(IFCBacquire) 비드 분석 및 세척 주기, 분석 볼륨 등을 설정하여 해수시료 분석을 시작하였다 (그림 5). 매틀랩 (MATLAB)을 주기적으로 실행하여 획득된 이미지 데이터의 기본적인 수치 특성을 추출하는 과정을 진행하였다. 가상머신에 대시보드를 구동하고 이미지 데이터, 후 처리 데이터가 실시간으로 업데이트 되는지 확인하였다. 아라운 운항중 연속관측 동안에는 일일 점검을 통하여 방오 및 세척, 안정적인 underway 해수공급, 버블 발생 여부, 데이터 획득, 장비 내 누수 및 내부온도 등을 확인하였다.

(a)



(b)

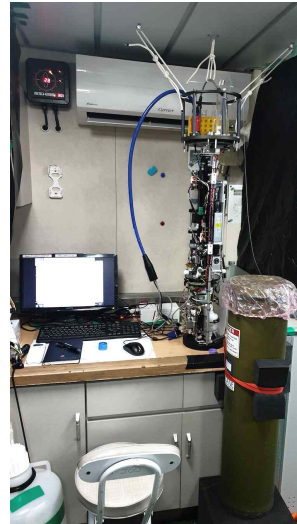


그림 4. (a) 광학영상장비 Imaging FlowCytobot (IFCB)와 (b) 아라온호 underway 해수 분석을 위한 설치과정

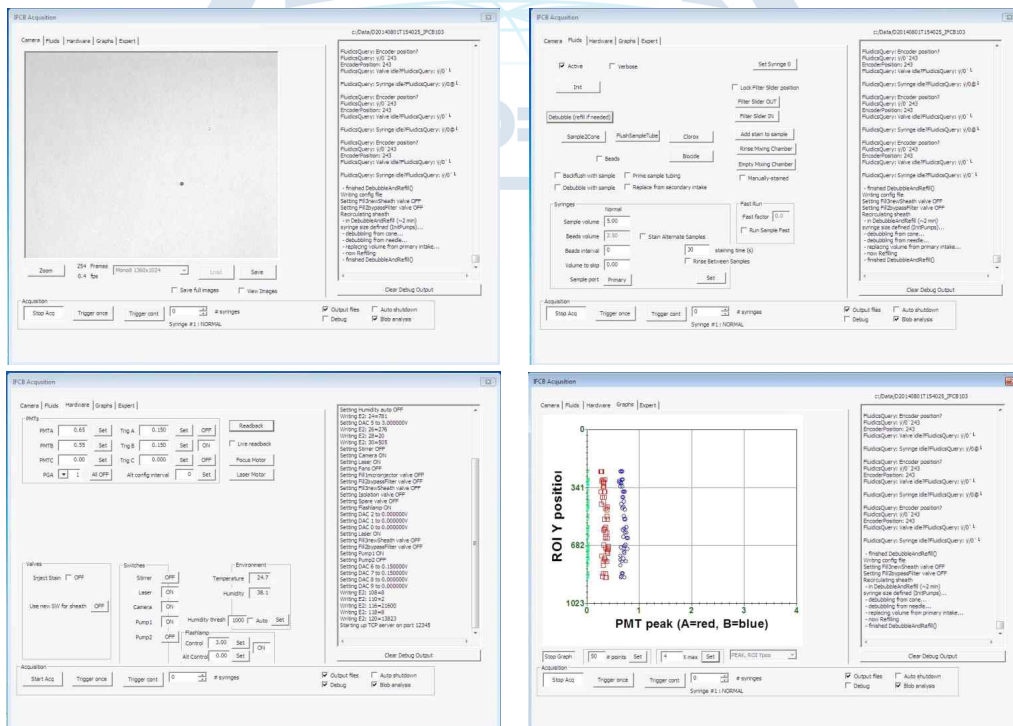


그림 5. IFCB 운용 소프트웨어 (IFCBacquire)

나. IFCB 이미지 데이터 획득

아문젠해와 로스해를 포함하는 서남극 연안해역의 아라온 항로상에서 2020년 1월 3일부터 2월 16일까지 45일간 IFCB를 활용하여 underway 해수의 식물플랑크톤 중 이미지를 획득하였다 (그림 6). 아라온 항로를 개략적으로 설명하면 아문젠해의 게츠 빙봉 서측의 연안해역에서 “화학 추적자를 활용한 서남극 용빙수 거동과 해양순환 변동 연구” 과제 (PE20160)의 정점조사가 수행되었다. 연구항해 중 한국어선 흥진호의 구조 요청으로 1월 10일 로스해로 출발, 1월 14일 구조지역에 도착하여 구조활동 후 연구작업 재개를 위하여 연구지역으로 복귀하였다. 1월 17일 게츠 빙봉 서측 해역에 도착하여 연구활동 재개 후 아문젠 폴리니아로 이동 계획이었으나 두꺼운 해빙이 밀도있게 분포하여 아문젠 폴리니아 대륙붕단의 해빙주변부로 우회를 결정하였고, 외해쪽으로부터 아문젠 폴리니아에 진입하였다. 24개의 정점조사가 계획되어 있었으나 이동항해 및 구조활동에 의한 시간 소모로 인하여 5개 정점조사를 수행하였다. 한 개의 시료 (Syringe)를 분석하는 데에 약 20여분의 시간이 소요되므로 아라온호가 12노트로 운항시 6 - 7 km 간격으로 해수시료 내의 이미지 데이터가 획득되며 전체 연구항해 동안 약 2,000여 개의 시료가 분석되었다.

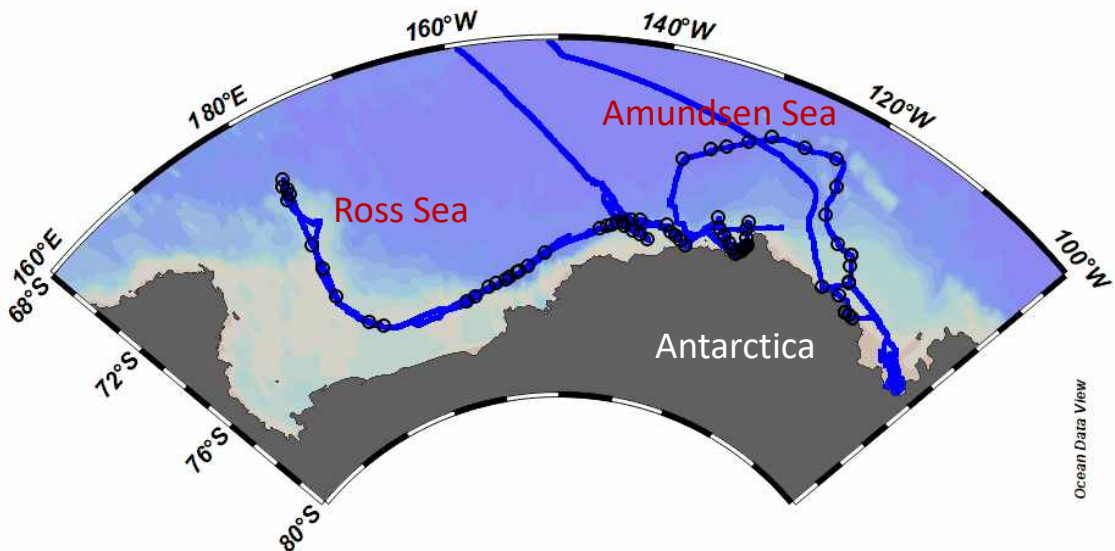


그림 6. 2020년 1월-2월 서남극해 아문젠해와 로스해 연안해역에서 연속관측이 수행된 아라온 운항 항로와 (파란색 실선) 해수시료 채집정점 (검은색 동그라미)

3. IFCB 획득 데이터 후처리

가. 데이터 처리 과정

(1) 개요

IFCB의 비디오 프레임에서 방출광 혹은 산란광으로 트리거된 입자의 이미지는 캡처되어 형광특성 정보와 함께 저장된다. 데이터의 후처리 전 과정은 오픈소스인 (Github) 매틀랩 코드를 통하여 이루어진다. 기본적으로 필요한 매틀랩 툴박스는 Image Processing Toolbox, Neural Network Toolbox, Statistics Toolbox, Curve Fitting Toolbox이며 추가적으로 DIPUM toolbox를 필요로 한다. 데이터 처리를 위한 첫 번째 단계는 이미지에서 대상의 위치를 지정하는 흑백마스크 계산을 위한 Blob extraction 과정이며 다음으로 각 이미지에 대하여 다양한 특성이 계산되는 Feature extraction (표 1) 과정으로 일부 특성은 Blob 이미지에서 추출되므로 순차적인 수행이 필요하다 (그림 7).



표 1. 이미지의 수치특성 (Features) 예시

Features	Description	Units	Additional resources
roi_number	Region of interest (ROI) number, consecutive from original data acquisition	NA	
Area	cross-sectional area of largest contiguous blob in ROI	squared pixels	MATLAB regionprops function
Biovolume	volume estimate for the largest blob, assuming cross-sections in the third dimension are locally circular (solid of revolution for simple shapes; distance map based for complex shapes)	cubed pixels	Moberg and Sosik 2012; doi: 10.4319/lom.2012.10.278
BoundingBox_x_width	dimension along the x-axis of the smallest rectangle containing the largest blob	pixels	MATLAB regionprops function
BoundingBox_y_width	dimension along the y-axis of the smallest rectangle containing the largest blob	pixels	MATLAB regionprops function
ConvexArea	area of the smallest convex polygon that can contain the largest blob (area of the convex hull)	squared pixels	MATLAB regionprops function
ConvexPerimeter	perimeter of the smallest convex polygon that can contain the largest blob	pixels	MATLAB regionprops function; computed from ConvexHull
Eccentricity	eccentricity of the ellipse that has the same second-moments as the largest blob (0 = circle, 1 = line segment)	dimensionless	MATLAB regionprops function
EquivDiameter	diameter of circle with same area as largest blob	pixels	MATLAB regionprops function
Extent	area divided by the area of the bounding box	pixels	MATLAB regionprops function
FeretDiameter	INCORRECTLY computed in v2; maximum distance between any two points along the boundary of the largest blob ("caliper diameter")	pixels	MATLAB regionprops function; computed from ConvexHull

국시연연구소

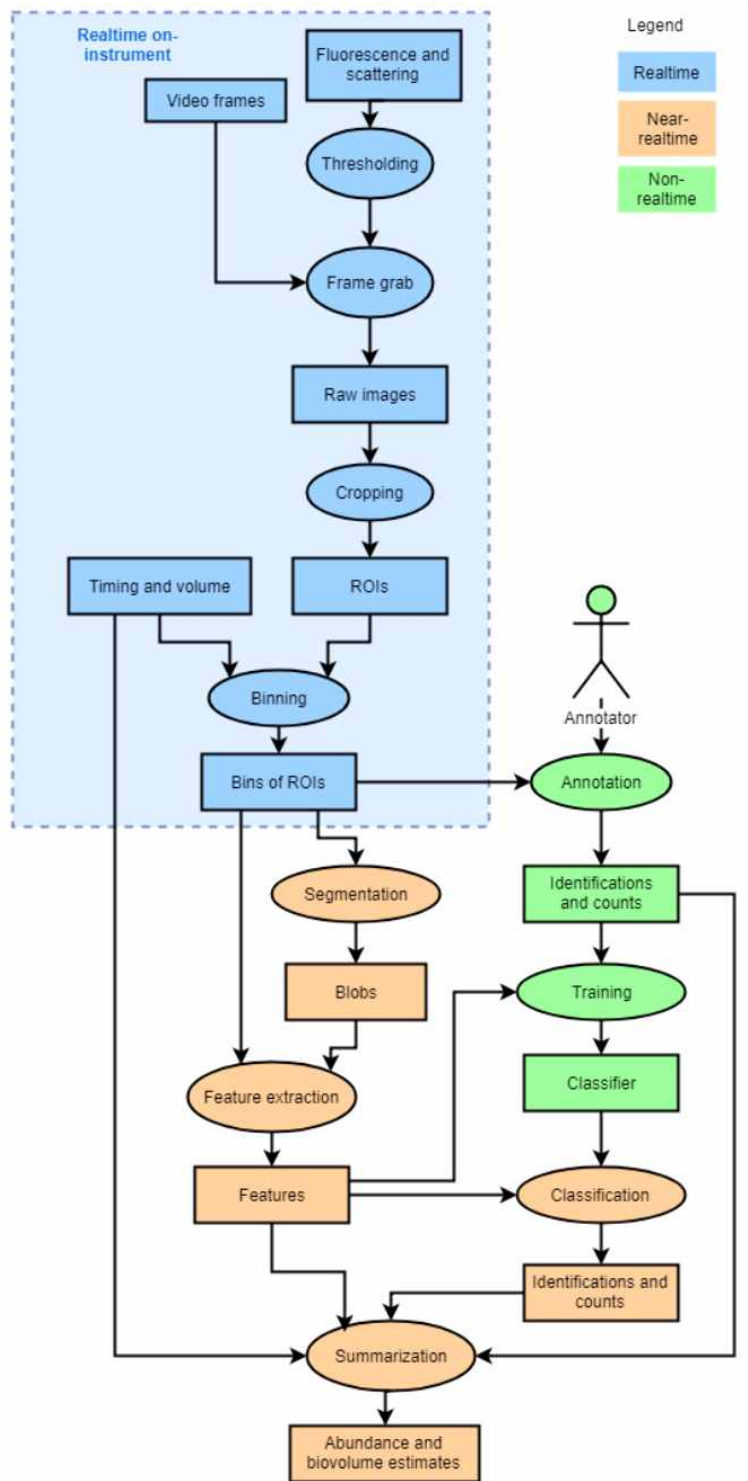


그림 7. IFCB를 활용한 이미지 획득과 데이터 후처리 과정의 흐름도

(2) 이미지 수동 분류

사용자는 클래스 레이블 (분류학적 이름 또는 기타 식별 가능한 문자열)을 지정한 후 각 클래스에 속하는 이미지를 선택한다 (그림 8). 이는 클래스 별 데이터 분석에 사용되며 분류를 위한 트레이닝 세트를 생성하는 데에 필요하다. 분류를 위한 소프트웨어 시스템은 맷랩에서 실행된다. 일련의 이미지 파일이 표시되고 이미지와 클래스 레이블 사이에 매핑되는 출력파일이 생성된다.

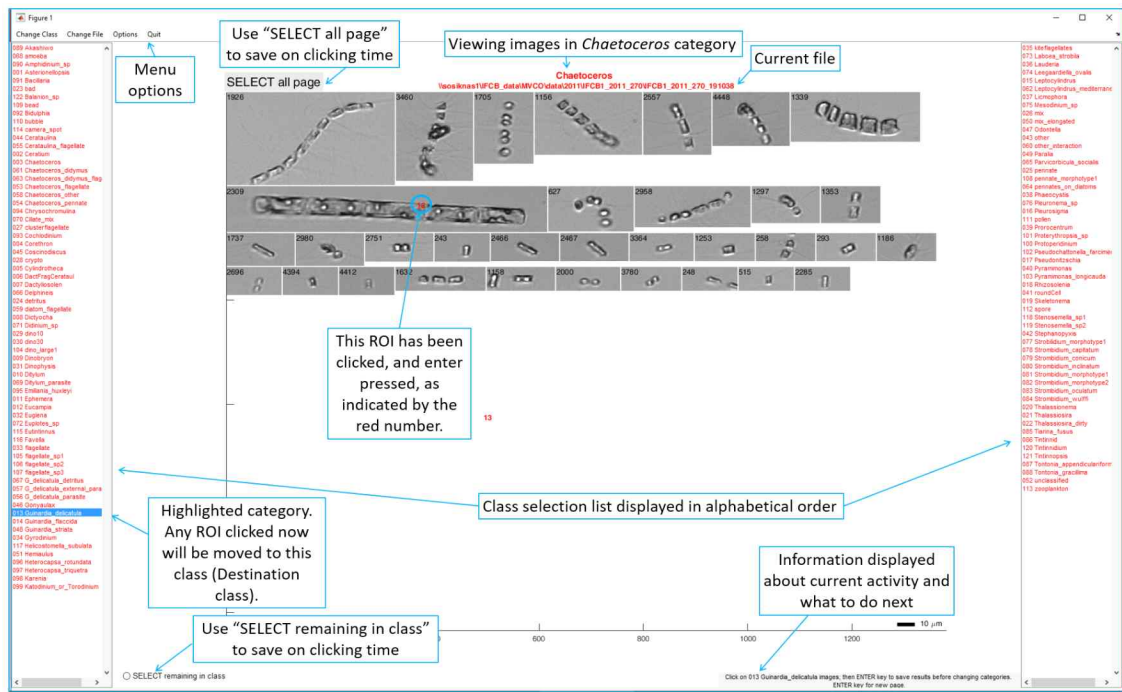


그림 8. IFCB로 획득된 식물플랑크톤 중 이미지 수동 분류

(3) Classifier 만들기

IFCB 이미지 분류는 랜덤 포레스트 알고리즘을 사용한다. 이를 위하여 각 클래스에 대한 Classifier가 필요하다. 이는 이미지에서 추출된 Features를 기반으로 구성된다. 각 클래스에 적절한 수의 이미지에 대한 수동 분류가 완료되면 트레이닝 데이터를 생성하기 위해 Features를 컴파일 한다. 이후 적절한 의사결정 트리의 수를 지정하여 Classifier를 생성하고 동시에 출력되는 일련의 평가 그래프와 통계 결과를 확인한다.

(4) 이미지 자동 분류

만들어진 Classifier를 전체 이미지 데이터에 대한 클래스 분석에 활용한다. 시료의 파일명에서 날짜와 시간을 추출하고 아라온 운항정보를 활용하여 위도와 경도를 적용한다. IFCB 분석 파일로부터 시료의 분석 부피를 확인하고 이렇게 생성된 결과들을 활용하여 각 클래스의 세포 계수, 탄소생물량 계산 등이 이루어질 수 있다.

나. 데이터 처리 결과

(1) 이미지 자동분류 정확도

만들어진 Classifier에 대하여 평가 그래프와 통계가 표시된다. 2020년 1 - 2월 서남극해 연안해역의 전체 식물플랑크톤 중 이미지 데이터에 대한 클래스 구분은 수동 분류와 자동분류 클래스의 오차율이 전체 18%이며, 미동정으로 구분되는 비율은 13%, 최적 threshold를 사용한 오차율은 11%로 나타나 (그림 9) 최근 발표되는 연구논문의 오차율 약 20% 전후와 유사한 결과를 나타냈다 (Angles et al., 2015; Selz et al., 2018).

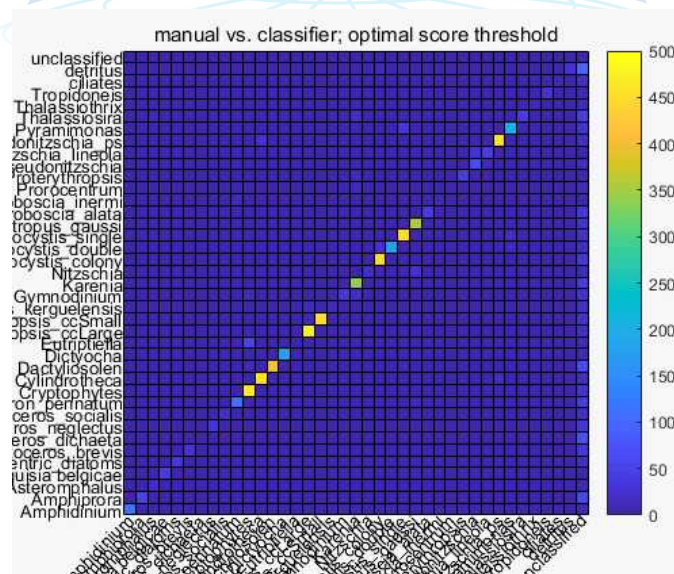


그림 9. 수동분류 이미지와 자동분류 이미지의 일치율 테스트 결과 (전체 오차율 18%, 미동정 비율 13%, 최적 threshold를 사용한 오차율 11%)

4. 식물플랑크톤 시료 채집

가. 엽록소-a 농도

총 엽록소-a 농도 분석을 위하여 underway 해수를 47 mm. 유리섬유 여과지에 여과한 후 분석전 까지 냉동보관 하였다. 추출을 위해 90% 아세톤에 여과지를 넣어 냉암소에서 보관하였고, 24시간 후 0.4 μm pore size의 시린지 필터로 (25mm) 여과하여 입자 및 여과지를 걸러낸 후 표준 엽록소-a (Sigma)로 보정된 형광광도계 (fluorometer; Trilogy model, Turner Designs, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, UNESCO (1976) 계산식을 통하여 계산하였다 (Parson et al., 1984).

나. 광합성 색소

아래온호 항로상의 underway 해수를 직경 47 mm의 유리섬유여과지 (GF/F, Whatman)에 여과하여 분석 전까지 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 여과지는 95% 메탄올 3 ml에 넣고 5분 동안 초음파처리 (ultrasonication) 되었으며 분석 전까지 냉암소에서 24시간 추출되었다. 분석을 위해 25 mm 직경의 테프론 syringe filter (MFS, 0.2 μm pore size)로 추출액을 거른 후, 피크의 왜곡을 피하기 위하여 분석 직전 추출액 1 ml에 0.3 ml의 증류수를 첨가하였다. 식물플랑크톤 광합성 색소분석을 위하여 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, series 1200 chromatographic system; Agilent, Germany)가 이용되었으며 21개의 표준 색소를 이용하여 보정되었다 (표 2) (DHI Water & Environment, Denmark). 색소분석은 Zapata et al. (2000)의 방법을 따랐다. 피크의 분리를 위해 C8 column (XDB-C8; Agilent, USA)이 사용되었다. 색소는 photodiode array detector (SPD-M10VP)를 사용하여 440 nm에서 검출되었고 각 피크의 스펙트럼 (350 - 750 nm) 또한 분석되었다. 각 피크의 머무름 시간은 표준색소의 머무름 시간과 비교하여 구분하였으며 response factor는 표준색소의 주입량 (ng)과 peak 면적의 비율로 계산하였다. 표준색소의 농도는 분광광도계 (spectrophotometry)로 측정된 최대흡광도 파장과 알려져 있는 각 표준색소의 흡광계수를 이용하여 보정되었다 (Jeffrey et al., 1997).

표 2. HPLC 검보정에 사용된 표준 색소 및 약자

Pigments	Abbreviation
Chlorophyll <i>c</i> ₃	Chl <i>c</i> ₃
Chlorophyllide <i>a</i>	Chlide <i>a</i>
Chlorophyll <i>c</i> ₂	Chl <i>c</i> ₂
Peridinin	Perid
Pheophrobide <i>a</i>	Phide <i>a</i>
19'-Butanoyloxyfucoxanthin	But-fuco
Fucoxanthin	Fuco
Prasincoxanthin	Pras
Violaxanthin	Viola
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	Hex-fuco
Diadinoxanthin	Diadino
Alloxanthin	Allo
Diatoxanthin	Diato
Zeaxanthin	Zea
Lutein	Lut
Canthaxanthin	Cantha
Chlorophyll <i>b</i>	Chl <i>b</i>
Divinyl Chlorophyll <i>a</i>	DV chl <i>a</i>
Chlorophyll <i>a</i>	Chl <i>a</i>
Pheophytin <i>a</i>	Phytin <i>a</i>
ββ-carotene	β-car

다. 초미소 식물플랑크톤

초미소식물플랑크톤 분석을 위하여 채집된 해수 2 ml를 cryogenic 튜브에 넣고 10% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde) 0.2 ml을 첨가하여 약 15분 동안 실온에서 고정하였으며 분석 전까지 -80 °C에 보관되었다. 분석 직전 시료를 녹인 후 산란과 형광을 표준화하기 위한 내부표준물질 yellow-green fluorescent microsphere (0.5 μm 직경의 beads; Polysciences Inc., USA)를 혼합하여 사용하였다. 초미소식물플랑크톤 Synechococcus, pico-eukaryotes의 개체수는 488 nm의 아르곤 이온 레이저가 장착된 유세포분석기 (flow cytometer, Accuri C6, Becton Dickinson and Company, USA)를 이용하여 계수하였다 (Marie et al., 1997). 초미소식물플랑크톤은 90°-angle light scatter (SSC)와 엽록소에 의한 적색형광 (red fluorescence), phycoerythrin에 의한 오

렌지색 형광 (orange fluorescence) 특성 등을 이용하여 분리, 계수하였다. 유세포분석기에서 산출된 자료는 FlowJo 프로그램 (Tree Star, Inc., www.flowjo.com)을 이용하여 분석하였다.

5. IFCB 데이터와 광합성색소 비교

광합성 색소 조성은 식물플랑크톤 종 현존량 기반의 군집구조를 잘 반영하는 결과를 보였다 (그림 10). 아문젠해의 게츠 빙붕 (Getz Iceshelf) 서측 연안해역에서는 착편모조류인 *Phaeocystis antarctica*가 식물플랑크톤 현존량에 최우점하였으며 광합성 색소는 착편모류의 지시색소인 Hex-fuco의 농도가 높게 나타났다. 로스해 해빙 주변부에서는 은편모류와 규조류의 현존량이 우점하여 나타났으며 이들 그룹의 지시색소인 Allo와 Fuco의 농도가 상대적으로 높게 나타났다. 아문젠해 대륙붕단의 해빙 주변부에서 로스해와 마찬가지로 규조류의 우점율이 높았으며 Fuco 농도가 로스해와 유사한 우점율로 나타났다. 아문젠 폴라니아에서는 전반적으로 식물플랑크톤 현존량에 *P. antarctica*가 우점하였으나 일부 해역에서 규조류의 우점율이 높게 나타났고, 광합성 색소 또한 Fuco의 농도가 높아 IFCB와 HPLC를 활용한 식물플랑크톤 관측 결과가 공간적인 식물플랑크톤 군집의 변동성을 일관되게 보여주었다.

극지연구소

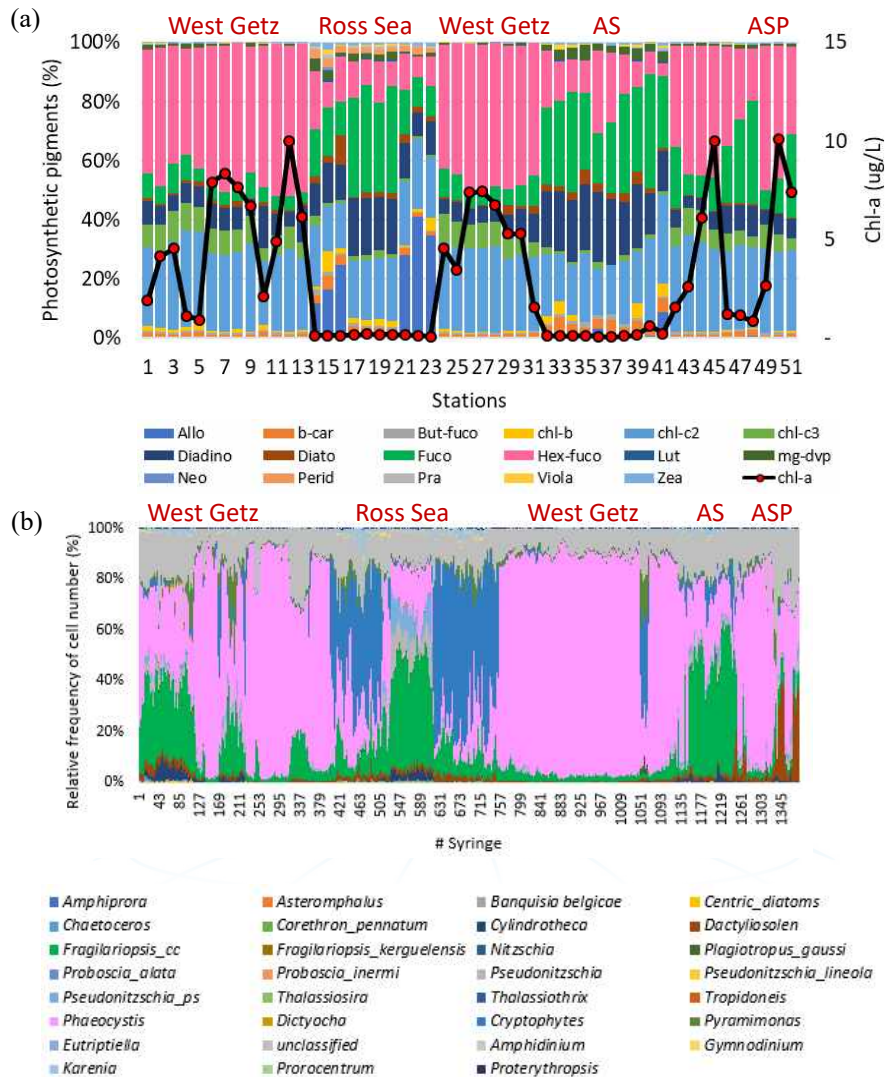


그림 10. 2020년 1월 서남극해 연안해역 해수시료 채집 정점에서 (a) 광합성 색소농도와 아라온 항로상에서 연속관측된 (b) 식물플랑크톤 종 현존량의 우점율 (%)

제 2 절 IFCB 데이터를 활용한 서남극해 식물플랑크톤 군집분포 특성

1. 해양환경의 공간분포 특성

가. 수온, 염분

조사기간 동안 아라온에서 관측된 underway 해수의 수온과 염분 자료를 살펴보았다. 서남극해 연안해역에서 표층 수온과 염분은 뚜렷한 공간특성을 보였다 (그림 11). 남극해에서는 계절적으로 춘계에 해빙이 녹기 시작하며 해안에서 해빙을 밀어내는 강한 활강바람 (katabatic wind)에 의해 폴리니아가 형성된다. 하계에는 해수 표층이 태양광에 노출되어 점차 데워지기 시작하므로 해빙 후퇴 후 시간이 지남에 따라 표층수온이 증가하여 나타난다 (Arrigo et al., 2012). 이와 동시에 표층 염분은 해빙이 녹으며 표층으로 유입되는 담수에 의하여 낮은 값을 보인다. 이후로 시간이 지남에 따라 해수 표층이 바람에 노출되어 수직으로 혼합되면서 표층혼합층이 깊어지고, 깊은 수심의 저온고염분수와 섞여 표층 수온과 염분은 각각 감소, 그리고 증가하는 복잡한 양상을 나타낸다. 2020년 1월 아문젠해 게츠빙봉 앞 연안해역과 아문젠 폴리니아에서 표층수온은 다른 해역에 비하여 뚜렷하게 높았고, 표층염분은 복잡한 양상을 나타냈으나 비교적 폴리니아 해역에서 낮은 값을 보여 시간에 따른 해빙농도 변동과 바람에 의한 표층 혼합에 복잡하게 기인하는 결과를 나타냈다.

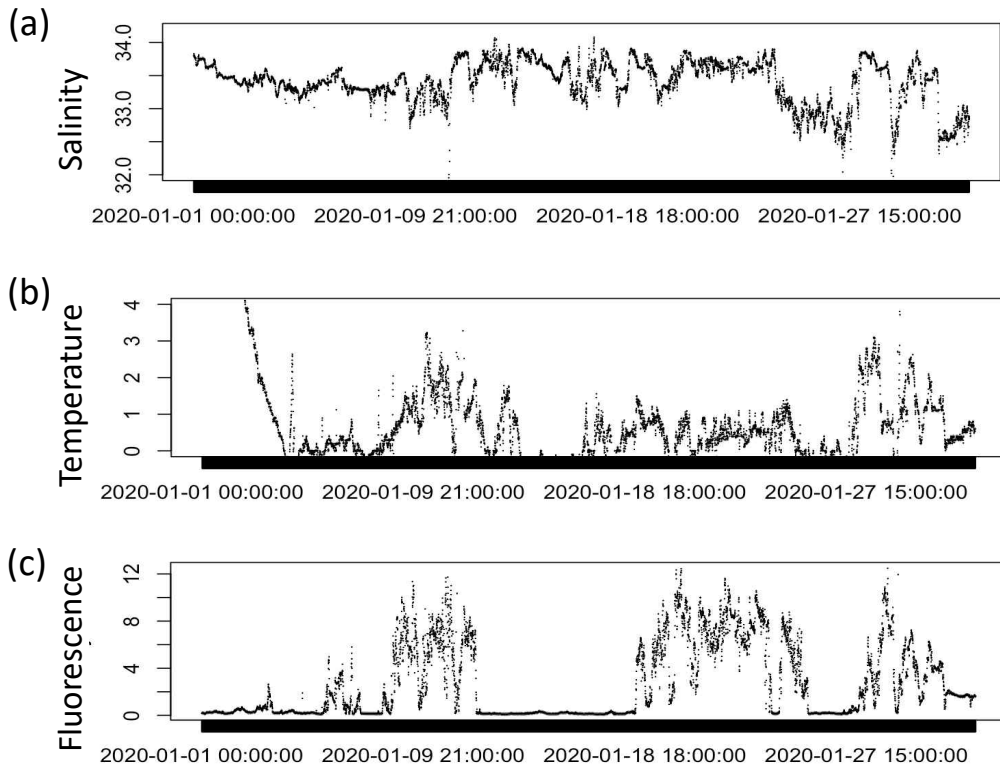


그림 11. 2020년 1월 서남극해 연안 아라온 항로상의 underway 해수에서 연속관측된 (a) 염분, (b) 수온 (°C), (c) 엽록소 형광 ($\mu\text{g/L}$)

극지연구소

나. 일조량

조사 기간 동안 아라온호 갑판에 설치된 광량계 (LI-1400, LI-COR Inc., USA)를 활용하여 5분 단위로 일조량을 관측하였다. 게츠 빙봉 앞에서부터 로스해를 거쳐 아문젠 폴리니아까지 2020년 1월 - 2월간 수행된 현장조사기간 동안 일조량 (Photosynthetically available radiation, PAR)은 1월 초에 상대적으로 높은 피크를 보였고 1월 10일 이후부터 2월 중순까지 점차 감소하였으며 그 이후 다소 증가하는 양상을 나타냈다 (그림 12). 남극의 일조량은 하계인 12월에 피크를 보이고 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 계절변동 양상을 보이며 (Arrigo et al., 2012) 본 연구결과는 서경 100° 에서 180° 에 이르는 공간범위 내에서 PAR값의 계절적 변동특성을 보인 것으로 판단된다. 계절 변동 뿐 아니라 아문젠 저기압과 바람 등 대기환경에 기인하는 구름 분포는 일조량의 일일 변동에 영향을 미치며 (Raphael et al., 2016) 이러한 계절 및 대기 변동의 영향이 복잡하게 나타나는 것으로 판단된다.

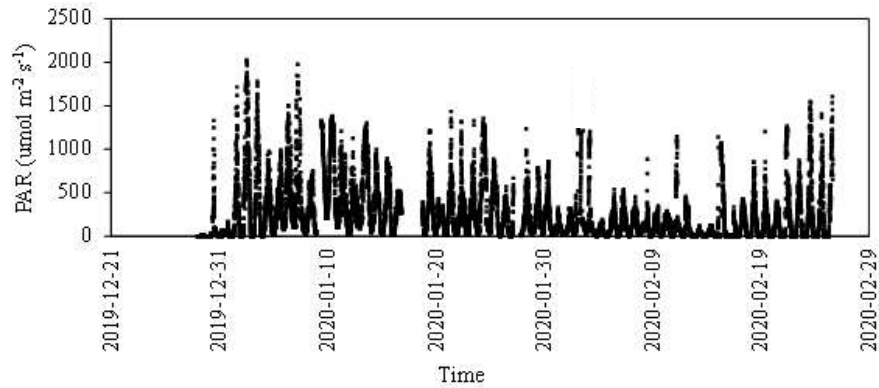


그림 12. 2020년 1월 - 2월 서남극해 연안해역의 아라온 항로상에서 관측된 일조량 (Photosynthetically available radiation, $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)

다. 해빙농도

해빙 데이터는 Nimbus-7 Scanning Multichannel Microwave Radiometer (SMMR) and Special Sensor Microwave/Image (SSM/I) 위성센서로 관측된 자료를 활용하였다 (Cavalieri et al., 1996). 조사 해역에서 해빙농도는 뚜렷한 시공간적 변동양상을 보였다 (그림 13). 2020년 1월 1일의 일평균 해빙농도를 살펴보면 게츠 빙봉 서측의 연안해역과 아문젠 폴리니아가 형성되어 있는 것이 확인되며 대륙붕단 바깥의 외해에도 해빙이 넓은 공간에 걸쳐 분포하는 것으로 나타났다. 그러나 한달 후인 1월 31일의 일평균 해빙농도는 각 폴리니아의 넓이가 1월 1일보다 더욱 확장되어 있으며 대륙붕단 바깥 해역의 해빙은 대부분이 녹아 관측되지 않는 것으로 확인되었다.

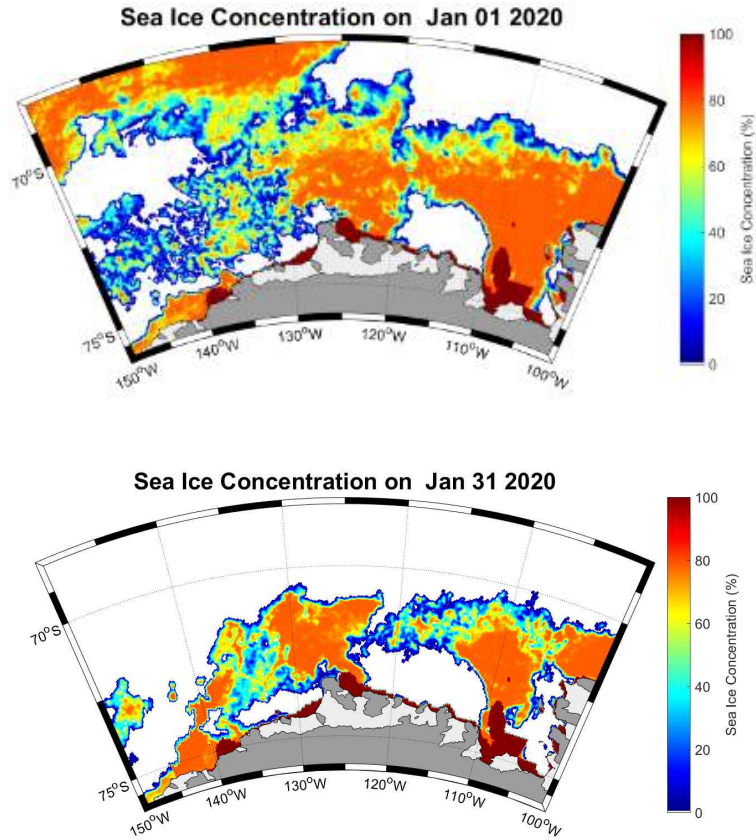


그림 13. 남극 아문젠해 연안해역에서 (a) 2020년 1월 1일과 (b) 1월 31일의 일평균 해빙농도의 공간분포 (%)

2. 식물플랑크톤 군집의 공간분포

가. 엽록소-a 형광

서남극 아문젠해와 로스해 연안해역에서 남극의 하계기간인 2020년 1월부터 2월 까지 표층 엽록소-a 농도는 급격한 공간변동을 보였다 (그림 14). 먼저 대륙붕단을 기준으로 바깥 해역은 전반적으로 $1 \mu\text{g/L}$ 이하의 낮은 엽록소-a 농도분포를 보였다. 연안해역에서는 공간변이가 크게 나타났다. 로스해와 아문젠해의 해빙 주변부에서는 외해와 유사하게 낮은 엽록소-a 농도를 보였다. 그러나 폴리니아가 형성되어 있는 게츠 빙봉 서측 해역에서는 $10 \mu\text{g/L}$ 이상의 높은 엽록소-a 농도를 보이기도 하는 등 좁은 공간 내에서 변동양상이 크게 나타났다. 폴리니아 내에서는 바깥쪽의 해빙 주변부로부터 연안쪽으로 들어오면서 엽록소-a 농도가 점차 증가하다가 빙봉 전면부에서 감소하는

양상을 보여 폴리니아 중앙해역에서 엽록소-a 농도가 높은 패턴을 나타냈다. 게츠 빙붕 앞 폴리니아와 달리 아문젠 폴리니아는 상대적으로 엽록소-a 농도가 낮았으나 닛슨 빙붕 전면의 해역에서 높은 엽록소-a 농도를 보여 폴리니아에 따라 엽록소-a 농도의 공간분포 경향은 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 파인아일랜드 만 (Pine Island Bay)의 폴리니아에서는 다른 두 폴리니아보다 상대적으로 엽록소-a 농도가 낮게 나타났으며 이러한 특성이 폴리니아간의 특성인지, 1월 초부터 2월 중순으로 이어지는 시간적인 차이인지는 계절변동을 나타내는 환경 요인들과 함께 (수온, 일조량, 해빙 등) 좀 더 면밀한 검토가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

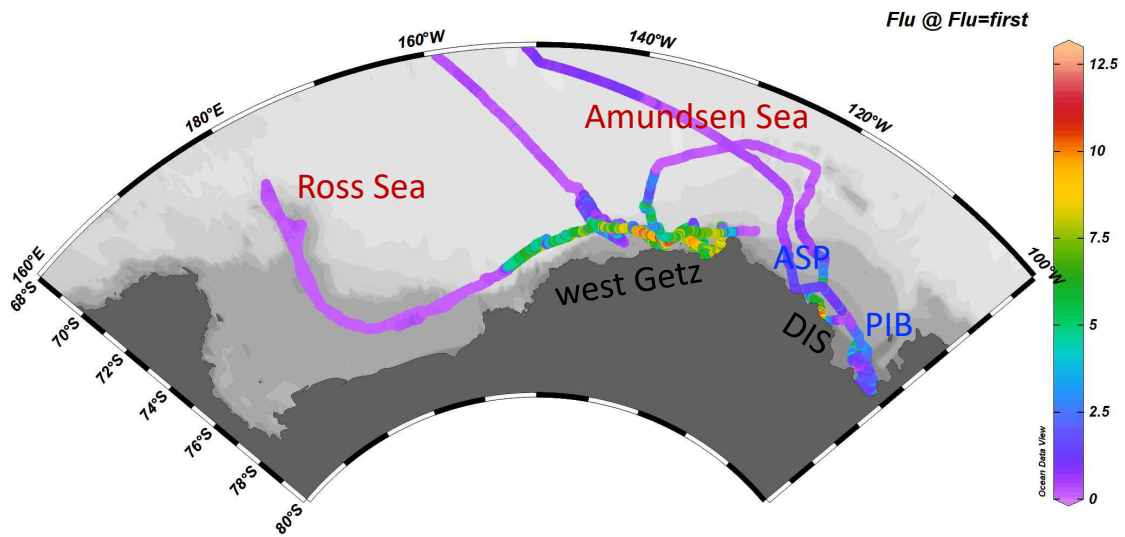


그림 14. 2020년 1월 - 2월 연구기간 동안 서남극 연안해역의 표층 엽록소 형광 ($\mu\text{g/L}$) 분포

나. 식물플랑크톤 중 현존량

서남극 연안해역에서 IFCB를 활용한 식물플랑크톤 중 현존량의 연속공간분포는 뚜렷한 시공간적 분포특성을 나타냈다 (그림 15). 2020년 1월 3일 시작된 연구항해에서 아문젠해 게츠 빙붕 서측 연안해역에는 대륙붕단쪽 해빙 주변부에서 현존량이 낮으나 규조류 *Fragilariopsis* 속과 착편모류 *P. antarctica*가 우점하였다. 폴리니아 중앙에서는 *P. antarctica*가 최우점하였으며 해빙 주변부와 폴리니아의 중간해역에서는 은편모류,

Pyramimonas 속 등의 우점율이 간헐적으로 높았다. 로스해로 이동하며 측정된 해빙 주변부 식물플랑크톤은 낮은 현존량을 보였지만 군집 구조는 해역에 따라 다른 특성을 보였다. 동쪽에서 서쪽으로 이동하는 기간 동안에는 은편모류가 식물플랑크톤 현존량에 우점하여 나타났고 남쪽에서 북쪽으로 이동하는 기간 동안에는 규조류 *Fragilariopsis* 속과 *Pseudonitzschia* 속이 우점하는 것으로 나타났다. 로스해에서의 홍진호 구조작업 종료 후 같은 항로를 이용한 복귀기간 동안 식물플랑크톤 군집구조는 3 - 4일의 시간 차이에도 유사한 분포패턴을 보였다. 게츠 빙봉 서측 연안해역에서 연구작업을 재개하였으며 약 7일 전보다 식물플랑크톤 현존량은 더 높았고 군집구조는 *P. antarctica*에 의한 우점율이 더 높게 나타났다.

아문젠 폴리니아로 이동하기 위해 대륙붕단의 해빙 주변부를 우회하였으며 식물플랑크톤 현존량은 낮았고 *Fragilariopsis* 속에 의한 우점율이 높게 나타나 서남극해 연안해역 해빙 주변부의 특성을 보였다. 아문젠 폴리니아에서는 게츠 빙봉 서측 연안해역의 폴리니아와 유사한 식물플랑크톤 현존량과 *P. antarctica*에 우점된 군집구조를 보였으나 규조류 *Dactyliosolen* 속에 의해 지역적으로 우점된 군집구조를 나타내 폴리니아간 다소 차이를 보였다.



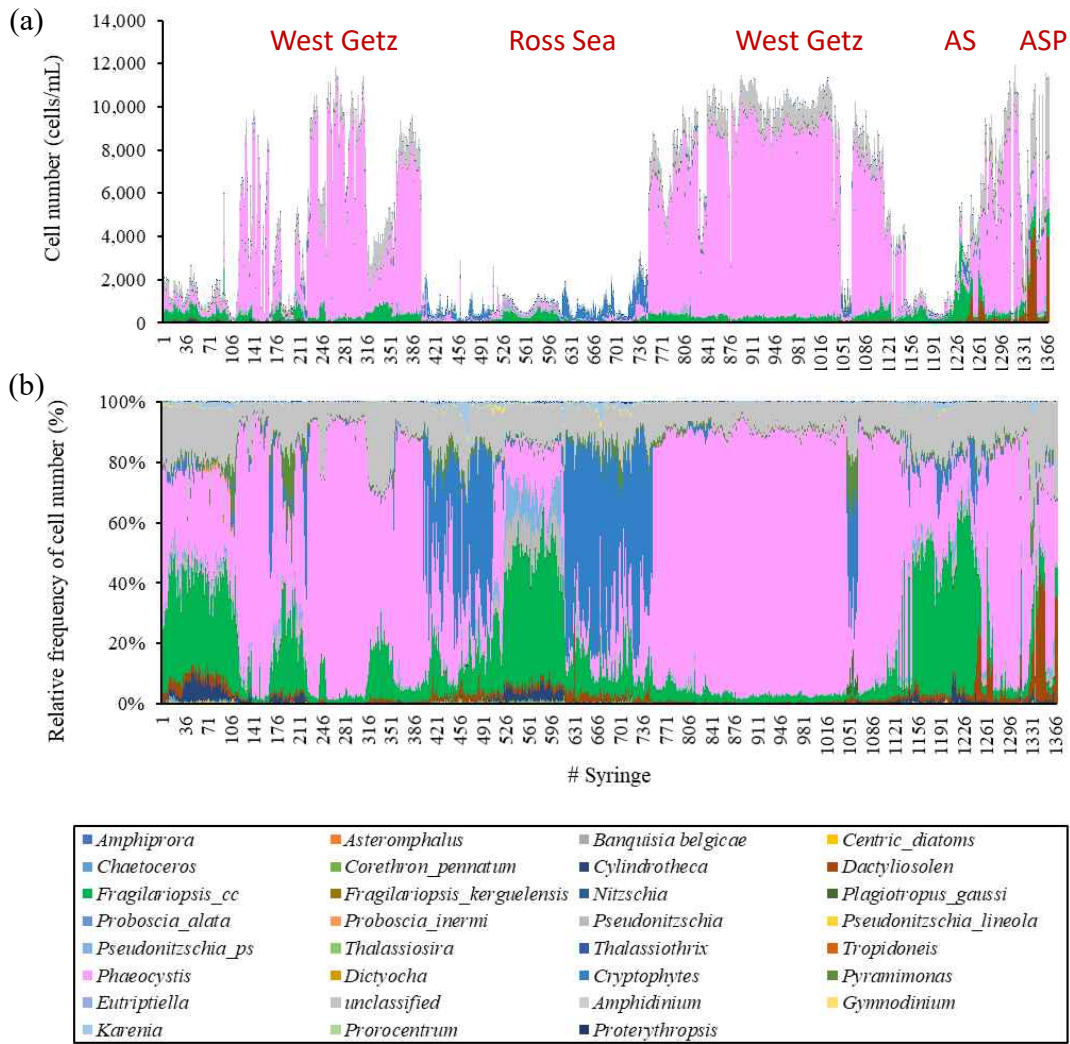


그림 15. 2020년 1월 - 2월 연구기간 동안 서남극 연안해역의 표층에서 (a) 식물플랑크톤 중 현존량 (cells/mL)과 (b) 우점율 (%)의 공간 분포

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

- 본 과제의 연구목표로 제시한 IFCB를 활용한 식물플랑크톤 고해상도 이미지 획득 자동화를 수립하였다. 자동화 시스템은 크게 두 가지, 자동 연속데이터 획득과 자동 데이터 후처리 과정으로 구분된다. 먼저 연속데이터 획득을 위해서는 아라온에서 underway 해수의 공급, IFCB에 시료주입, 분석, 획득이미지 저장, 네트워크 동기화를 통한 데이터 백업 과정이 안정적으로 진행되어야 한다. 이를 위하여 2019년 12월 뉴질랜드 리틀톤항에서 인수받은 IFCB를 아라온에 장착하고 연속분석 시스템을 구축하여 2020년 1월부터 2월까지 진행된 아라온 남극항차 기간 동안 자료를 획득하였다. 다음으로 데이터 후처리는 누적된 데이터로 훈련된 기계학습을 통하여 전체 이미지를 자동 분류하는 과정을 포함한다. 식물플랑크톤 종의 형태분류에 기반한 분석자와 컴퓨터 간의 이미지 분석 훈련과정은 데이터가 누적되면서 정확도가 증가하며 본 연구기간 동안 약 80 %의 분류 정확도를 달성하였다. 미동정 식물플랑크톤 그룹을 하나의 그룹으로 포함시킨다면 예러 확률은 약 11 %로 떨어진다. 앞으로 데이터가 누적되고 분석 결과를 반영하여 기계학습이 반복된다면 분류 정확도는 더욱 증가할 것으로 판단된다.
- IFCB를 이용하여 획득된 식물플랑크톤 중 이미지 자료의 활용 가능성을 판단하기 위하여 기존의 시료분석 결과와 비교 분석하였다. HPLC로 분석된 광합성 색소는 식물플랑크톤 그룹별 색소조성의 차이에 기반한 군집연구 방법에 활용된다. 남극해에서는 대부분의 식물플랑크톤 군집 연구가 HPLC 기반으로 이루어지는데 다양한 종으로 구성된 규조류 그룹의 복잡성을 반영하지 못하는 단점이 있다. HPLC와 IFCB 비교 분석 결과를 살펴보면 우점종과 우점 색소가 잘 일치하는 경향을 보여 IFCB가 식물플랑크톤 생태연구에 활용 가능성이 높은 것으로 판단된다. 2020년 1월 서남극해 연안해역에서 식물플랑크톤 군집은 대륙붕단 바깥해역, 해빙 주변부, 폴리니아 등에서 뚜렷하게 공간적인 분포특성을 보였고, 폴리니아 내에서도 지역적으로 복잡한 군집분포를 나타냈으며 게츠 빙봉 앞 연안해역과 아문젠 폴리니아에서 다소 다른 식물플랑크톤 군집구조를 보였다. 이는 서남극 연안해역에서 남극 하계에 해빙농도, 수온, 염분, 수괴의 수직구조, 영양염, 일조량 등의 변동이 식물플랑크톤 군집에 복잡하게 영향을 주는데 기인하는 것으로 제한된 공간 내에서도 급격한 분포변동을 보이는 식물플랑크톤 군집에 IFCB를 활용한 정밀공간분포 연구가 필요함을 시사한다.

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 지금까지 식물플랑크톤 중 기반의 군집구조 및 생태 연구는 전통적인 현미경 분석 방법으로 이루어져 왔으나 이는 분석자의 지식과 경험에 따라 분석결과가 상이할 수 있고 상당한 시간과 노력이 필요하기 때문에 연구에 어려움이 있어왔다.
- IFCB는 저비용, 고효율의 식물플랑크톤 중 자동분석 장비로 활용도가 높아 미국과 유럽 중심으로 사용자층이 확대되고 있으나 한국에는 최초로 도입되는 바, 장비를 활용하기 위한 복잡한 광학계 조정 및 장비 매뉴얼 숙지에서부터 현장 관측을 위한 연속 시료주입 장치 셋업, 네트워크 구성 등의 연속관측 시스템 구축과 데이터 후처리 과정을 위한 매텔랩 오픈소스 응용, 가상환경, 기계 학습 활용 등에 대한 기본적인 습득이 요구된다.
- 본 과제를 통하여 IFCB의 현장관측 시스템 구축에서부터 데이터 처리까지 일련의 활용 가능성을 확인함으로써 중 기반의 식물플랑크톤 현존량 데이터 획득의 자동화를 수립하고, 나아가 이를 해양 식물플랑크톤 생태, 먹이망, 탄소순환, 생지화학순환 등 다양한 연구분야에서 활용 가능한 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 결과 활용 계획 및 개선점

제 1 절 연구개발 결과 활용 계획

- IFCB를 활용한 극해역 식물플랑크톤 종(species)의 연속 자동관측시스템을 수립함으로써 저비용 고효율의 대용량 자료획득이 가능하며 기 구축된 물리·화학 분야의 연속관측 자료와 연계하여 극해역 식물플랑크톤 군집 생태연구가 활발히 진행될 수 있을 것으로 기대됨
- 극해역에서의 해양생물수산자원 이슈 대응을 위한 해양생태계 기반의 생물수산자원 분포 파악 및 예측에 중요한 자료이며, 남·북극 해역에서의 지속가능성 평가에 기초자료로 활용될 것으로 기대됨
- 남·북극해 해양생태계의 일차생산자인 식물플랑크톤 종조성, 현존량, 생물량 등의 기본 정보를 활용하여 해양생태계 및 생지화학순환 연구분야에서 보다 광역적이고 심도있는 연구 진행 가능
- 아라온 연구항해 및 이동항로에 속하는 진 해역에서 식물플랑크톤 고해상도 이미지 데이터를 연속으로 획득하고 자료처리를 자동화하여 해양 식물플랑크톤 종 현존량의 공간분포를 실시간으로 감시하는데 활용 가능

제 2 절 개선점

- 현재 아라온호에 구축된 IFCB 연속관측 시스템은 underway 해수 펌프로부터 공급되는 해수를 연속적으로 주입하도록 구성되어 있다. 그러나 극지해역 특성상 해빙이 분포하고, 아라온호가 해빙역을 운항하거나 쇄빙을 수행하는 동안 작은 얼음조각이 해수관으로 유입되어 해수공급이 중단되는 현상이 자주 발생한다. 상황을 빠르게 인지하는 경우 문제해결이 가능하지만 그렇지 못한 경우 일정시간 동안 해수관에 해수가 정체되어 IFCB 뿐 아니라 아라온에 장착된 모든 연속관측 장비 (수온, 염분계, 다양한 화학특성 분석 장비, 엽록소 형광 측정기 등)의 데이터에 오류가 발생한다. 뿐만 아니라 일부 민감한 장비들의 경우 해수 순환이 원활하지 못하여 기계적인 문제가 발생하고 문제해결을 위하여 상당한 시간과 기술이 요구되기도 한

다. 더욱이 막혔던 해수관을 인위적으로 통하게 한 직후 관내에 누적되어 있던 높은 압력이 순간적으로 폭발하듯 해수 공급관에서 해수를 뿜어내어 실험실 내에 많은 문제를 발생시킨다. 이러한 고질적인 문제를 해결하기 위한 방법으로는 두 가지가 가능하다. 하나는 선제적으로 해수관에 얼음조각이 유입되지 않도록 차단하는 장치를 설치하는 것이며, 또 다른 하나는 해수공급이 멈추는 상황을 대비하는 연속 해수시료 공급 시스템을 장비별로 구축하고 해수공급 중단 상황을 알리는 경보장치를 설치하여 이러한 상황을 빠르게 벗어나는 것이다.

- IFCB는 <10 - 150 μm 의 크기범위에 있는 식물플랑크톤 종을 주로 분석하는 장비이다. 10 μm 이하의 크기는 민감도로 인하여 감지가 어려우며 150 μm 이상의 크기는 장비 내의 시료관을 막히게 하기 때문에 시료주입 사전 단계에서 필터를 통하여 걸러내므로 분석이 불가하다. 대부분의 해양에서 150 μm 이상 크기의 식물플랑크톤 종은 드물게 분포하므로 군집을 이해하는데 큰 문제가 되지 않는다. 그러나 10 μm 이하 크기의 초미소, 미소 식물플랑크톤은 전 세계 해양에 분포할 뿐 아니라 빈영양 해역이나 외양의 표층에서는 우점 군집으로써 해양 생태계와 생지화학순환에 중요한 일차생산자로서의 역할을 한다. 이를 보완하기 위하여는 초미소, 미소 식물플랑크톤을 분석하기 위한 방법이 필요하다. 현재 이 그룹을 분석하기 위한 장비로는 유세포분석기 (Flowcytometer)가 활용되고 있다. 또한 연속자동분석을 위한 장비들이 개발되어 있거나 개발중에 있다. 따라서 본 연구장비인 IFCB와 초미소 식물플랑크톤 연속분석장비를 조합한다면 전체 식물플랑크톤 군집의 종 기반 생태 연구가 가능할 것으로 판단된다.

제 6 장 참고문헌

- Anglès, S., Jordi, A., & Campbell, L. (2015). Responses of the coastal phytoplankton community to tropical cyclones revealed by high-frequency imaging flow cytometry. *Limnol. Oceanogr.*, 60(5), 1562-1576.
- Arrigo, K. R., Lowry, K. E., & van Dijken, G. L. (2012). Annual changes in sea ice and phytoplankton in polynyas of the Amundsen Sea, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 71, 5-15.
- Cavalieri, D. J., Parkinson, C. L., Gloersen, P., & Zwally, H. J. (1996, updated yearly). Sea Ice Concentrations from Nimbus-7 SMMR and DMSP SSM/I-SSMIS Passive Microwave Data, Version 1. [2013-2014]. Boulder, Colorado USA. NASA National Snow and Ice Data Center Distributed Active Archive Center. <http://dx.doi.org/10.5067/8GQ8LZQVL0VL>.
- Jeffrey, S., Mantoura, R., & Wright, S. (1997). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, Unesco, Paris.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., & Vaultot, D. (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(1), 186-193.
- Olson, R. J., & Sosik, H. M. (2007). A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton: Imaging FlowCytobot. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 5(6), 195-203.
- Olson, R. J., Shalapyonok, A., & Sosik, H. M. (2003). An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Res. PT I*, 50(2), 301-315.
- Parsons, T., Maita, Y., & Lalli, C. (1984). *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*, edited, Pergamon Press, Oxford, 173p.

- Raphael, M. N., Marshall, G., Turner, J., Fogt, R., Schneider, D., Dixon, D., et al. (2016). The Amundsen sea low: variability, change, and impact on Antarctic climate. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 97(1), 111-121.
- Selz, V., Laney, S., Arnsten, A. E., Lewis, K. M., Lowry, K. E., Joy-Warren, H. L., et al. (2018). Ice algal communities in the Chukchi and Beaufort Seas in spring and early summer: Composition, distribution, and coupling with phytoplankton assemblages. *Limnol. Oceanogr.*, 63(3), 1109-1133.
- Zapata, M., Rodriguez, F., & Garrido, J. L. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 195, 29-45.



연구지원사업 최종 결과보고서 평가의견 반영사항

과제 구분	(신진연구원지원과제)		
과제명	광학영상장비를 활용한 식물플랑크톤 이미지 획득 자동화 (계정번호: 19510)	연구기간	2019.12.01 ~ 2020.11.30
연구책임자	이 영 주	연구비(직접비)	30,000 천원
과제개요, 연구성과 및 최종 결과보고서 평가의견 반영 사항			
<p>(1) 과제목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ IFCB를 활용한 식물플랑크톤 고해상도 이미지 획득 <p>(2) 최종성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ IFCB를 활용하여 서남극해 식물플랑크톤의 고해상도 이미지를 획득함 ◦ 기계학습을 통하여 식물플랑크톤 이미지 데이터 자동분류 정확도 약 80% 달성 <p>(3) 성과의 향후 연구소 활용방안 또는 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 남·북극해 해양생태계의 일차생산자인 식물플랑크톤 종조성, 현존량, 생물량 등의 기본 정보를 활용하여 해양생태계 및 생지화학순환 연구분야에서 보다 광역적이고 심도있는 연구 진행 가능 ◦ 아래온 연구항해 및 이동항로에 속하는 전 해역에서 식물플랑크톤 고해상도 이미지 데이터를 연속으로 획득하고 자료처리를 자동화하여 해양 식물플랑크톤 중 현존량의 공간분포를 실시간으로 감시하는데 활용 가능 <p>(4) 최종 결과보고서에 평가의견 반영 사항</p>			
평가의견	반영사항	비고	
◦ 향후 다른 연구원이 기기 운용시 참고 가능하도록 기기 설치법 및 작동법, 사용시 주의사항을 간략히 요약하여 기재	◦ IFCB 설치 및 작동법을 요약하여 기술함	연구보고서 p.6-8 참조	
◦ 식물플랑크톤 군집 분포의 시간변화를 탐지할 수 있는 대체 방안 마련	◦ 3장 2절에서 식물플랑크톤 군집분포의 시간변화 탐지에 관해 논의함	연구보고서 p.23-24 참조	
◦ 본 과제 종료 후 후속 연구 발전 방안에 대한 내용 보완	◦ 5장에서 후속연구 발전 방안에 대해 기술함	연구보고서 p.28-29 참조	
◦ IFCB를 활용, 향후 연구 적용 계획 기술	◦ 5장에서 향후 연구 계획에 대해 기술함	연구보고서 p.28-29 참조	

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.