

단일세포 분석방법을 활용한  
남극 호수 미생물 생태 연구 기반 구축  
Preliminary Study on microbial ecology in Antarctic lakes  
based on single-cell analysis





# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “단일세포 분석방법을 활용한 남극 호수 미생물 생태 연구 기반 구축” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



연구책임자 : 김 옥 선

참여연구원 : 김경모, 김소연, 이한별,  
이홍금, 조안나, 조용준  
(이상 극지연구소)

공동연구기관명 : 미국 몬타나주립대학교

공동연구책임자 : John Priscu

공동연구기관명 : 미국 비글로랩

공동연구책임자 : Ramunas Stepanauskas

## 보고서 초록

|   |                        |  |                                 |             |                                 |
|---|------------------------|--|---------------------------------|-------------|---------------------------------|
| 과제관리번호  | PE20340                | 해당단계<br>연구기간   | 2018. 5. 1 ~<br>2020.12.31      | 단계 구분       | 총3개년 / 1단계                      |
| 연구사업명   | 중 사업명                  | 극지연구소 연구·정책지원 사업   |                                 |             |                                 |
|   | 세부사업명                  | Seed형 선행연구   |                                 |             |                                 |
| 연구과제명   | 중 과제명                  |  |                                 |             |                                 |
|   | 세부(단위)과제명              | 단일세포 분석방법을 활용한 남극 호수 미생물 생태 연구 기반 구축   |                                 |             |                                 |
| 연구책임자   | 김 옥 선                  | 해당단계<br>참여연구원수   | 총 : 7 명<br>내부 : 7 명<br>외부 : 0 명 | 해당단계<br>연구비 | 정부: 300,000 천원<br>계: 300,000 천원 |
| 연구기관명<br>및 소속부서명  | 극지연구소<br>생명과학연구본부      |  | 참여기업명                           |             |                                 |
| 국제공동연구  | 상대국명 : 미국<br>상대국명 : 미국 | 상대국연구기관명 : 몬타나 주립대학교<br>상대국연구기관명 : 비글로랩  |                                 |             |                                 |
| 요 약   |                        |  |                                 | 보고서면수       | 86                              |
| <p>○ 단일세포 분석기술 기반 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국생명과학연구원과 한국해양과학기술원의 장비로 단일개체 분리 및 유전체 증폭을 수행</li> <li>- Qiagen REPLi-g mini kit에 세포벽 용해위해 lysozyme 추가하여 유전체 증폭 방법 최적화</li> <li>- 단일세포 분리 및 유전체 증폭 실험 수행은 청정 연구실 내 연구 수행이 필수</li> </ul> <p>○ 드라이벨리 호수 서식 비배양 후보군 미생물의 생태학적 기능연구</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 프리셀 호수의 미생물 군집은 5, 7, 9m는 매우 유사하고, 15m는 확연히 다름</li> <li>- WM88은 상대빈도가 낮은 반면, JS1과 그 외 후보 군에 해당되는 미생물이 우점함</li> <li>- 15m의 미생물 대상 단일세포 유전체 결과 중 후보군 미생물의 유전체 분석 수행</li> <li>- 특이적인 환경에서 후보군 미생물의 생태학적 기능을 유추 완료</li> </ul> <p>○ 빙저호 메르세르 호수에서의 단일세포 유전체 분석 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 호수 물 시료 4점과 퇴적토 시료 5점, Catcher slurry 1점 확보 및 단일세포 분리-증폭 수행</li> <li>- 16S rRNA 유전자 증폭 효율이 가장 높은 27F-907R 프라이머 세트를 선별하여 미생물 동정</li> <li>- <i>Actinobacteria</i>와 <i>Betaproteobacteria</i>가 가장 우점</li> <li>- <i>Gammproteobacteria</i>, <i>Chloroflexi</i>, candidate phyla인 OD1과 OP11 우점</li> </ul> <p>○ 국제 네트워크 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 단일세포 분리 및 증폭 실험 세팅을 위한 국제 연구진과의 교류</li> <li>- 맥머도 장기모니터링 (MCM-LTER) 팀과 바니 호수 환경유전체 분석 공동연구 수행</li> <li>- SALSa 팀과의 국제 협력 및 워크샵 참석하여 결과 공유 및 연구협력</li> </ul> |                        |  |                                 |             |                                 |
| 색 인 어<br>(각 5개 이상)  | 한 글                    | 단일세포 유전체, 환경 유전체, 후보 군, 프리셀 호수, 빙저호 메르세르   |                                 |             |                                 |
|   | 영 어                    | Single cell genomics, Environmental Metagenomics, Candidate Phylum, Lake Fryxell, Subglacial Lake Mercer |                                 |             |                                 |

# 요 약 문

## I. 제 목

단일세포 분석방법을 활용한 남극 호수 미생물 생태 연구 기반 구축

## II. 연구의 목적 및 필요성

- 단일세포 분리 및 분석 기술 적용을 통한 남극 호수 미생물의 생리생태학적 기능 연구 기반 구축

## III. 연구의 내용 및 범위

- 단일세포 분석기술 기반 구축
- 남극 Fryxell 호수 서식 비배양 후보 문 (Candidate Phylum) 미생물의 생태학적 기능 연구
- 2018/19년도 미국 NSF의 제 2 빙저호 탐사 프로그램인 SALSA project (Subglacial Antarctic Lake Science Access) 참여를 통한 Lake Mercer 시료 확보 및 단일세포 분석
- 단일세포 유전체 분석 국제 네트워크 구축

## IV. 연구개발결과

단일세포 분석기술을 확보하기 위하여 한국생명과학연구원과 한국해양과학기술원의 장비를 활용하여 미생물 단일개체 분리 및 유전체 증폭을 수행하였다. 유전체 증폭은 Qiagen REPLi-g mini kit에 세포벽 용해를 위한 lysozyme을 추가하여 증폭 방법을 최적화하였다. 그러나 두 연구기관이 보유한 유세포 분석기기는 청정 시스템이 구축되어 있지 않기 때문에 오염과 온도에 민감하며 신속한 분리가 필요한 단일세포 분석기술에 적합하지 않았다. 단일세포 분리 및 단일개체 유전체 증폭은 오염에 매우 민감하기 때문에 시약 및 연구 장비와 공기의 오염까지 차단된 청정 연구실 내 연구 수행이 필요하다.

남극 드라이벨리의 프리셀 호수는 환경유전체 분석을 통하여 미생물 군집은 5, 7, 9m는 매우 유사하고, 15m는 확연히 다름을 확인하였으며, 그리고 WM88은 상대빈도가 낮은 반면, JS1과 그 외 후보문에 해당되는 미생물이 우점하였다. 15m의 미생물에 대하여 단일세포 분리 및 유전체 증폭 결과물 중 후보문 미생물의 유전체를 선별하여 단일개체 유전체증폭 분석을 수행하였다. 단일개체 유전체 증폭을 통하여 특이적인 환경에서 후보문 미생물의 생태학적 기능을 유추할 수 있을 것으로 판단된다.

남극 빙저호인 메르세르 호수 물 시료 4점과 퇴적토 시료 6점, Catcher slurry 한점을 확보하여 단일세포 분리 및 전장유전체증폭을 수행하였다. 미생물 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 증폭 효율이 가장 높은 27F-907R 프라이머 세트를 선별하여 동정하였다. 그 결과 전체적으로 *Actinobacteria*와 *Betaproteobacteria*가 전체적으로 가장 우점하였고, *Gammproteobacteria*, *Chloroflexi* 그리고 candidate phyla인 OD1과 OP11이 검출되었다.

## V. 연구결과의 활용계획

- 남극 내륙 호수 미생물의 생태학적 기능 연구 결과 연구논문 발표
- 주요과제 “남극 빙저호의 물질순환에 관여하는 미생물의 생태학적 기능 규명” 수행하여 빙저호 미생물 생태진화연구와 단일세포 분석센터 구축 기본 자료로 활용할 예정임

# S U M M A R Y

## I. Title

Preliminary study on microbial ecology in Antarctic lakes based on single-cell analysis

## II. Significance and objectives of the study

- Achievement of a background research through the preliminary study on the microbial ecophysiological research in Antarctic lakes based on single cell isolation and whole-genome amplification technology

## III. Contents and scope of the study

- Setting-up of single cell analysis techniques
- Research on microbial ecological function of uncultivated Candidate Phylum inhabiting in Lake Fryxell, Antarctica
- Collaboration with SALSA (Subglacial Antarctic Lake Science Access) project and single cell analysis in Subglacial Lake Mercer
- Establishment of the international network for single cell analysis

## IV. Results of the study

In order to establish the single cell analysis, this study aimed to isolate the microbial single cell by utilizing the equipment of KRIBB and KIOST, which have single cell isolation devices. Optimization of the genome amplification method after obtaining the microbial single cell was performed by adding lysozyme to the Qiagen REPLi-g mini kit reagent. However, the flow cytometry devices owned by the two research institutes were not suitable for single cell isolation that were sensitive to contamination and temperature and required rapid separation because they were not intended for bacterial single cell isolation and genome amplification. The single cell isolation and genome amplification are very sensitive to contamination, so the clean laboratory is needed which can maintain the clean status of reagents and equipments and block the contamination by air.

Lake Fryxell in the Dry Valleys of Antarctica has a unique habitat, and a number of bacteria from Candidate phylum have been detected as the major microorganisms. Through the environmental metagenomics, the microbial community of Lake Fryxell in 5, 7, 9 m depths was found to be very similar each other, but it of 15 m depth is very different to others with WM88 having low relative frequency, while JS1 and other candidate phylum bacteria were dominant. Water sample at 15 m depth was subjected to single-cell sorting and whole genome amplification. It is believed that the ecological function of Candidate phylum bacteria can be inferred in a specific environment through the bacterial single cell analysis.

Then samples from water columns and sediments in Subglacial Lake Mercer were applied to single cell sorting and amplifying whole genome. For bacterial identification, 16S rRNA genes using 27F-907R primer set has been amplified, which showed the highest efficiency after combination of primers. Through all samples, Actinobacteria and

Betaproteobacteria are predominant and Gammaproteobacteria, Chloroflexi and candidate phyla OD1 and OP11 are also abundant.

#### V. Further Application of the study

- Publication of research papers with the results of microbial ecological function in Antarctic Lakes
- Further Study on microbial ecology and evolution and establishment of the single cell genomic center through conducting the main project “Microbial ecological function related to the biogeochemical cycles in Subglacial Antarctic Lake Ecosystems”



# C O N T E N T S

|  |    |
|--|----|
| Chapter 1 Introduction .....   | 8  |
| Chapter 2 The technology development present state .....                     | 10 |
| Chapter 3 The research development achievements and results .....            | 13 |
| Chapter 4 The extent of aim achievement and contribution of related field... | 80 |
| Chapter 5 The application of research result .....                           | 81 |
| Chapter 6 Reference .....  | 85 |



# 목 차

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 제 1 장 서론 .....                 | 8  |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....        | 10 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....     | 13 |
| 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ..... | 80 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....       | 81 |
| 제 6 장 참고문헌 .....               | 85 |



## 제 1 장 서론

**미생물 암흑물질로부터의 탈출.** 1990년대 후반의 분자생태학적 분석기술의 발전은 환경에 존재하는 비배양 미생물까지 검출하여 자연계의 실제 미생물의 분포를 파악할 수 있게 되었다. 그 결과 약 99% 이상의 미생물은 배양이 불가능 한 것을 알게 되었고, 이를 “미생물 암흑물질(microbial dark matter)” 로 정의하였다. 차세대 염기서열 분석기의 발전과 더불어 환경유전체 분석 기법은 미생물 군집의 분류학적 정보 뿐만이 아니라 생태기능학적 정보까지 알게 되어 미생물 생태학 분야의 급속한 발전에 기여하게 되었다. 그러나 환경유전체 분석 기법은 분석가능한 생물량을 위하여 농축을 한 뒤 염기서열을 얻게 되면 각 염기서열을 조립하여 분석을 하기 때문에 여러 개체의 혼합으로 정확한 단일개체의 기능 규명에는 한계가 있다.

2013년 JGI의 Tanja Voyke와 비글로 랩의 Ramunas Stepanauskas의 공동연구진이 Nature에 발표한 연구에 따르면 자연계에 존재하는 미생물, 특히 아직까지 배양체가 존재하지 않는 **후보문 (Candidate phylum)**을 단일세포 유전체 분석을 통하여 현재까지 알려지지 않았던 많은 연구결과를 확인할 수 있게 되었다 (Christian et al., 2013). 그 결과 단일세포 유전체 분석을 통하여 난배양성 미생물의 분류와 생태학적 기능연구의 정확도를 높임으로써 미생물 생태학 분야의 선도 기술임을 입증할 수 있었다. 단일세포 분석 기법은 시료의 농축과정 없이 1ml의 시료로 단일세포를 각각의 독립된 공간으로 분리시켜 전장유전체 증폭과 염기서열분석을 개별단위의 세포를 대상으로 독립적으로 수행하기 때문에 정확도가 높다. 그러나 전장유전체 증폭 과정으로 인하여 실험과정 상의 에러 발생 가능성이 높고 유전체 완성도가 높지 않아 유전체의 완결성은 낮은 단점이 있다. 그러나 최근에는 이러한 두 가지 분석방법을 동시에 진행하여 환경유전체 조립 유전체와 (metagenomic-assembled genome, MAG)와 단일세포 증폭 유전체 (Single-cell amplified genome, SAG)를 얻어 상호 보완적으로 수행하여 연구의 완결성을 높이고자 하는 시도가 있다 (2017).

**드라이벨리 호수와 프리셀 호수 15m.** 미국은 맥머도 드라이벨리 장기모니터링 연구 (MCM-LTER, McMurdo Dry Valleys Long-Term Ecological Research)를 1992년부터 진행하고 있다. 드라이벨리에는 평균 빙하 5m의 두께가 덮여있는 호수가 존재한다. 겨울에는 꽁꽁 얼어붙지만 여름에는 가장자리가 녹아 Moat을 형성하고, 대기 중으로 증발하는 양이 많지 않아 매년 아주 작지만 수위가 조금씩 증가하고 있다. 그 중 테일러 벨리에 위치하는 프리셀과 바니호수 (East Lobe와 West Lobe), 호아와 마이어스 벨리에 위치하는 마이어스 호수를 대상으로 하여 2012년 10월과 11월에 시료를 채집하여 미생물 군집 분석을 수행하여 생지화학적 데이터와 상호 관련성 분석을 하였고, 미생물 군집은 각 호수

별로 매우 특이적인 미생물이 서식하고 있음을 확인하였다(Kwon et al., 2017). 그 중 프리셀 호수의 경우는 테일러 벨리 끝자락에 위치하며 왼쪽으로는 캐나다 빙하와 오른쪽으로는 컴온웰스 빙하로부터 흘러들어오는 용빙수가 유일한 유입수이며, 유출수는 없다. 이 환경에서 15m에는 현재까지 배양된 미생물을 가지고 있지 않은 후보 문 (candidate phylum)이 56.1~81.8%로 대량 존재함을 알 수 있었다. 특히 WM88은 3um에서 걸러진 미생물이 약 80%를 차지하며, JS1(Ca. Atribacter)는 0.2um 이상에서 25% 이상 존재함을 확인하였다. 이는 현재까지 알려진 지구상의 미생물 연구 지역 중 후보문 미생물의 파라다이스라 할 수 있으며 전무후무하다. GenBank에서 이 후보 문에 속하는 16S rRNA 유전자를 대상으로 하여 계통도를 분석한 결과, 이들은 심해저에서의 유기물을 분석하는 미생물과 매우 유사할 것으로 예상하였고, 생태계에서의 물질 순환에 매우 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

**빙저호**는 수백에서 수천미터 두께의 남극 대륙 빙하 아래에 위치한 호수로, 위에서 누르는 거대한 하중이 만들어 내는 열과 압력, 빙하 아래 얼음의 유동에 의한 마찰열, 또는 지구 내부로부터 기인된 열 등으로 인하여 빙하 하단부가 녹거나 얼지 않게 되어 형성된 것으로 추정된다. 빙저호는 암흑, 낮은 영양분, 높은 수압의 환경으로 호수 물과 퇴적물은 과거 지구의 기후변화에 대한 중요한 정보가 될 것으로 추정한다. 대기, 햇빛의 영향이 미치지 못한 곳으로 수천만 년간 격리된 상태로 존재해 왔기 때문에 지금까지 알려지지 않은 생명체가 존재할 것으로 추측된다. 현재까지 남극 대륙에는 379개의 빙저호가 존재하고 있으며 (Wright & Siegert, 2012), 탐사는 러시아가 보스토크호, 영국이 엘스위스호, 미국이 윌란스호를 대상으로 진행하였고 그 중 미국만이 유일하게 성공하였다.

미국이 탐사하고자 하는 두 번째 빙저호인 **Lake Mercer**는 Whillans Ice Stream에 해당되며, SALSA(Subglacial Antarctic Lake Scientific Access) 프로젝트로서 생명의 근간이 되는 탄소의 순환이 어떻게 이루어져 왔으며, 생태계 유지의 원인 규명을 위하여 시도하고자 한다. 2015년 4월 10일 SALSA 프로젝트에 단일세포 유전체의 주제로 공동연구 참여를 결정하였다.

본 연구과제에서는 단일세포 분리 및 분석기술을 적용하여 남극 호수 미생물의 생리생태학적 기능 연구 기반을 구축하고자 하였다. 이를 위하여 1. 단일세포 분석기술의 핵심이라 할 수 있는 전장 유전체를 증폭하기 위하여 실험방법을 최적화 하였다. 또한 2. 드라이벨리의 프리셀 호수 15m를 대상으로 단일세포 유전체를 수행하여 후보문의 생태학적 기능연구를 수행하였다. 마지막으로 미국 NSF의 SALSA 프로젝트를 참여하여 메르세르 호수 시료를 확보하고 단일세포 분리 및 증폭 후 16S rRNA 유전자를 대상으로 하여 미생물 군집구조를 분석하였다. 본 과제를 통하여 단일세포 유전체 연구와 빙저호 국제 연구 네트워크를 구축하고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 가. 세계적 수준

|         |          |        |           |
|---------|----------|--------|-----------|
| 개념정립 단계 | <b>●</b> | 기업화 단계 | 기술 안정화 단계 |
|---------|----------|--------|-----------|

- 남극 호수 연구
  - 미국이 가장 활발하게 연구하고 있으며, 드라이벨리에 장기모니터링 (MCM-LTER, McMurdo Dry Valley- Long-term Ecological Research) 연구지에는 Lake Bonney, Fryxell, Hoare, Miers 등의 호수 연구가 30년 지속되고 있음
  - 남극에서의 빙저호 연구는 세계 경제 강국인 미국, 영국, 러시아 만의 경쟁의 장소로 현재까지는 미국의 Lake Whillans 탐사가 유일하며, 미국은 2018/19년에 두 번째 호수인 Lake Mercer 탐사를 준비하고 있음
- “Microbial Dark Matters “
  - 미생물학에 있어서의 후보 문 (Candidate Phylum) 연구는 NSC급 유명 학술저널에 발표되는 세계적인 수준임. 이러한 연구는 99%의 난배양성 미생물의 극한환경에서의 적응 기작 및 전지구적 분포 연구를 통하여 서식 가능한 환경의 조건에 대한 탐색을 연구하고 있음
  - 최근의 연구 동향은 환경유전체 분석뿐만이 아니라 단일세포 분석기법을 동시에 진행함으로써 두 분석기술이 장단점을 보완한 상보적임을 확인하였음
- 단일세포 분석기술
  - 미생물에서는 현재까지는 미생물 집합체에 대한 연구를 통하여 우점하는 미생물 연구가 주류를 이루었음. 단일세포 분석기술은 집합체에서 벗어난 단일개체의 생태학적 기능 연구를 수행함으로써 낮은 비율로 존재하지만 생태계에서 중요한 역할을 하고 있는 미생물을 발견할 수 있음
  - 현재까지는 미국의 Beleow Lab과 미국 에너지국(DOE)의 JGI(Joint Genome Institute)가 수행하고 있으며, 그 중 JGI에서는 에너지 생산과 관련된 미생물 연구가 활발하게 진행되고 있으며, Microbial Dark Matters 프로젝트를 주도하고 있음

### 나. 국내수준

- 남극 호수 연구
  - 국내에서는 남극의 접근성이 용이한 극지연구소가 유일한 상태임
- “Microbial Dark Matters”
  - 대한민국은 신종·신속 후보 연구에 있어서는 IJSEM (International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology)에 가장 많은 논문을 발표하는 등 세

- 계 1위
- 하지만 배양하기 어려운 후보 문에 대한 연구는 많은 시도를 하고 있지만 현재까지 발표된 연구 내용은 전무한 상태임
- 단일세포 분석기술
  - 국내에서는 단일세포 분석기술은, 의학, 약학, 응용 생물학 등의 분야에서만 진행되고 있으며 미생물 생태학 분야에서는 전무한 상태임

다. 국내외 관련 연구현황

| 연구수행 기관            | 연구개발의 내용                                       | 연구개발성과의 활용현황                                      |
|--------------------|--|---|
| ○ Begelow Lab (미국) | ○ 해양조류를 대상으로 하여 수행하였으며, 현재는 연구보다는 서비스에 집중하고 있음 | ○ 해양 미세조류 연구에 집중하여 연구가 진행되어 왔음                    |
| ○ DOE-JGI (미국)     | ○ 에너지 관련 미생물에 집중하여 연구가 수행되고 있음                 | ○ 미생물 생태학 분야의 연구를 주도하고 있으며, 미생물 유전체 연구와 연결하여 독보적임 |

라. 지금까지의 연구개발 실적

- 남극에서 호수 연구는 남극의 두 기지를 중심으로 한 바톤반도와 테라노바만 인근에 분포한 호수와 미국의 드라이밸리 장기모니터링 지역의 호수를 대상으로 공동탐사를 통하여 시작하였음. 그 중 드라이밸리 호수에 존재하는 5m 얼음으로 덮인 호수에서의 미생물과 생지화학적 연구를 통하여 각각의 호수에서만 존재하는 독특한 미생물이 존재함을 알게 되었음(Kwon et al., 2017).
- 그 중 Lake Fryxell의 경우 15m는 산소가 고갈된 혐기 상태로 화학성층이 뚜렷하게 나타나고 있으며, 황산이 대량 발생되는 매우 독특한 환경임. 또한 이 지역에서 미생물 후보 문이 대량으로 발견되었고, 이를 대상으로 환경유전체 분석을 수행하였음. 그 결과 후보 문 WM88과 JS1의 생리학적 모델링을 통하여 다른 세균에서는 찾아볼 수 없는 특성을 확인하게 되었음(Lee et al., in preparation).
- 환경유전체 연구를 통하여 얻은 결과는 분석기법의 한계로 인하여, WM88과 JS1 두 문(phyla)만을 대상으로 하였고 이 또한 추측으로만 끝낼 수 밖에 없음. 또한 Fryxell 호수에는 WM88과 JS1 뿐만이 아니라, BRC1, GN02 & 04, JMYB36, NKB19, OD1, OP1, 3, 8, 9 & 11, SAR406, SR1, TDNP, TM6 & 7, WS1, 3 & 5 등의 다양한 후보문이 전체 균집의 57~81%를 차지함. 이는 현재까지 알려진 생태계에서는 전무후무함.

- 환경유전체 분석 기법의 한계점을 극복하여 다양한 후보 문의 생리 생태 유전학적 연구는 **단일세포 분석 기술**을 통하여 해결이 가능하며, 이들의 보다 확실한 생태학적 특성 분석을 가능할 것이라 판단됨. 이러한 연구는 세계 유명 학술지에 발표할 수 있는 학술적 가치가 매우 높음

마. 현기술상태의 취약성

| 구 분                         | 선진국 기술수준   | 우리나라 기술수준   |
|-----------------------------|--|---|
| 남극 호수<br>미생물 연구             | 미국은 LTER을 통하여 호수 생태학 연구를 30년째 수행하고 있음  | 기술수준: 90%<br>미생물 분석 가능<br>시료채집 및 메타데이터는 미국과 공동 수행   |
| “Microbial<br>Dark Matters” | JGI는 전세계 환경샘플로부터 환경유전체 및 단일세포분석기술을 활용하여 세균은 257,535종과 고세균 2,475 균주의 유전체 정보가 해독되었음 (배양된 표준균주 15,541균주 해독) | 기술수준: 50%<br>Fryxell과 바톤반도 토양을 대상으로 환경유전체 분석으로 수준은 60% 이상 확보<br>배양체 유전체분석은 100% 확보<br>후보 문 연구는 기술확립단계 |
| 단일세포<br>분석기술                | 세균과 고세균은 69개의 문이 존재함. 이중 총 30개의 Candidate phyla(후보문)의 염기서열 해독 완료   | 기술수준: 30%<br>생물정보학 분석을 통한 유전체 분석 기술 확립단계<br>단일세포 분석기술 도입단계  |

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 단일세포 분석기술 기반 구축

요약: 현재까지 밝혀지지 않은 환경 미생물 연구를 위하여 최근 가장 큰 관심을 받고 있는 분석기술은 단일세포 분석기술이다. 단일세포 분석기술은 환경시료로부터 하나의 개체를 획득하여 유전체를 분석하는 분석기술로 자연계에 존재하지 않은 99% 이상의 배양되지 않은 미생물을 확보하고 유전정보를 분석할 수 있다. 국내에서는 단일세포 분석기술을 수행할 수 있는 장비와 인력이 존재하지 않으며 국외에서도 단일세포 분석기술을 갖추고 서비스 하는 연구기관은 미국 비글로 해양연구소의 단일세포 유전체 분석센터가 유일하다. 본 연구는 단일세포 분석기술을 구축하기 위하여 국내 연구기관 중 세균의 단일세포 분리가 가능한 유세포 분석기기를 보유하고 있는 한국생명과학연구원과 한국해양과학기술원의 장비를 활용하여 미생물 단일개체를 확보하고자 하였으며, 확보된 단일개체의 유전체 분석을 위하여 유전체 증폭을 수행하고자 하였다. 그러나 두 곳의 연구기관이 보유한 유세포 분석기기는 미생물의 단일개체 분리 및 유전체 증폭을 위한 기기가 아니며 기기가 설치된 연구실에는 청정 시스템이 구축되어 있지 않기 때문에 오염과 온도에 민감하며 신속한 분리가 필요한 단일세포 분석기술에 적합하지 않았다. 미생물 단일 개체 확보 후 유전체 분석을 위한 유전체 증폭은 Qiagen REPLi-g mini kit에 세포벽 용해를 위한 lysozyme을 추가하여 증폭 방법을 최적화하였다. 단일세포 분리 및 단일개체 유전체 증폭은 오염에 매우 민감하기 때문에 시약 및 연구 장비와 공기의 오염까지 차단된 청정 연구실 내 연구 수행이 필요하다.

Abstract. The single cell analysis technology has attracted a lot of attention in recent years for the research of environmental microorganisms. Single cell analysis is performed by acquiring each bacterial cell from environmental samples, which can isolate more than 99% of uncultured microorganisms in environments and analyze their genetic information. There is no equipment and manpower in Korea to perform single cell analysis, and the single cell genome analysis center of the Bigelow Marine Research Institute in the U.S. is the only research institute that can perform the single cell analysis. In order to establish the single cell analysis, this study aimed to isolate the microbial single cell by utilizing the equipment of KRIBB and KIOST, which have single cell isolation devices. However, the flow cytometry devices owned

by the two research institutes were not suitable for single cell isolation that were sensitive to contamination and temperature and required rapid separation because they were not intended for bacterial single cell isolation and genome amplification. Optimization of the genome amplification method after obtaining the microbial single cell was performed by adding lysozyme to the Qiagen REPLi-g mini kit reagent. The single cell isolation and genome amplification are very sensitive to contamination, so the clean laboratory is needed which can maintain the clean status of reagents and equipments and block the contamination by air.



## 1. 서론

미생물 연구는 크게 배양법과 비배양법으로 나뉜다. 그 중 배양법은 단일개체를 얻어서 여러 가지 분자생물학적, 생리학적 연구를 통하여 자연계에서의 적응 방법을 알 수 있다. 그러나 현재까지 개발된 배양방법으로는 자연계에 존재하는 미생물 중 1% 미만만 배양되었다. 비배양방법은 DNA나 RNA와 같은 유전물질을 대상으로 하여 분석하는 분자생물학적 기법을 활용한다. 이 방법은 1990년대부터 진행하여 자연계에 존재하는 99%의 미생물이 배양되지 않음을 밝혔으며, 16S rRNA 유전자를 통한 군집 분석, 총 genomic DNA를 대상으로 하는 환경유전체학 연구, 단일세포로 분리하여 분석하는 단일세포 유전체(single-cell genomics) 연구가 그 대표적인 예이다.

현재 미생물학계에서 상당한 연구자들이 관심을 가지고 있는 것은 단일세포 분석기기를 활용한 미생물 생태 연구이다. 환경유전체학의 경우에는 모든 DNA를 한꺼번에 염기서열을 읽어 유전체를 얻게 되므로 단일 개체에서 유래하였는지를 아는 것은 거의 불가능한 상태이다. 전체 미생물 군집이 매우 복잡할 경우에는 분석 자체가 무의미하다. 그러나 단일세포 분석기술은 well 하나에 하나의 세균만을 집어 넣어줌으로써 개체 하나가 가지고 있는 유전자를 읽게 되는 장점을 가지고 있어 우점하지 않더라도 생태학적으로 유의미할 경우에 선별하여 연구 수행이 가능하다. 그러나 단일세포 유전체는 증폭과정에서 발생하는 에러로 인하여 정확도가 상대적으로 떨어지는 경향이 있다. 환경유전체 분석방법과 단일세포유전체 분석방법의 단점을 보완하여 분석을 수행할 경우, 후보문에 해당되는 미생물의 유전체의 정확도가 상당히 높아 추정에 의거하지 않은 확실한 정보를 얻게 된다.

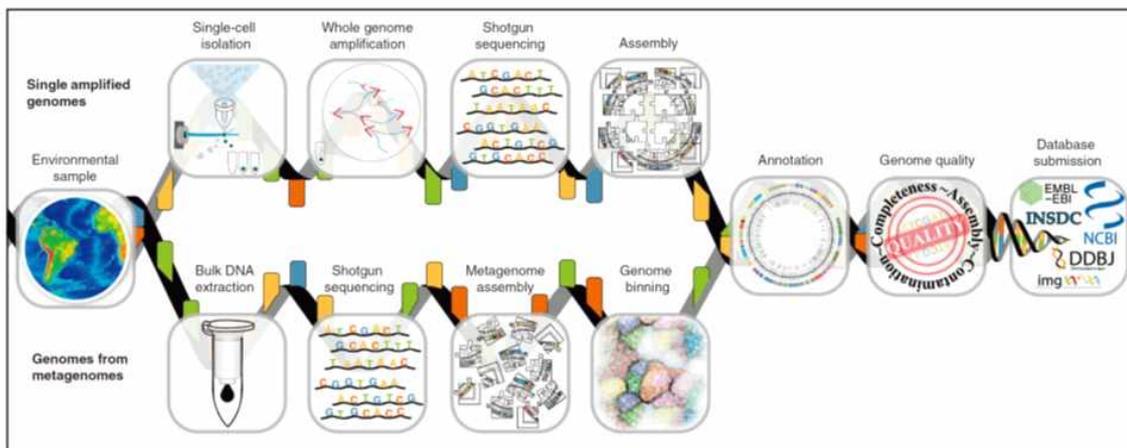


Figure 1. Flowchart of environmental microbiology analysis using single cell genome and environmental genome data

이렇게 얻게 되는 데이터를 대상으로 생태계에서 유의미한 후보문을 찾게 된다

면 후보문에 대한 전세계적인 분포를 파악할 수 있으며, 이는 발견된 미생물의 생존 조건에 대한 정확한 정보를 얻을 수 있게 될 것으로 예상된다. 또한 단일세포 분석방법을 활용하여 지금까지 배양할 수 없었던 까다로운 배양 조건을 좀 더 정교화 할 수 있을 것으로 보인다.

본 연구에서는 아직까지 국내에서 개발 및 사용되지 않은 단일세포 분석방법을 구축하기 위하여 유세포 분석기기를 활용한 단일세포 분리 방법과 단일유전체 증폭방법을 최적화하고자 하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 단일세포 분리 방법 셋업

단일세포 분석기술의 연구방법(Rinke et al., 2014)은 1) 환경시료 채취 후, 2) 시료에 베타인이나 글리세롤, 에탄올 등과 같은 보존액을 첨가하여 실험실 내로 반입하여, 3) 시료 성격에 따라 적합한 전처리를 한다. 4) 단일세포 분리기(single cell sorter)를 적용하여 각 well에 세포 하나씩을 분리 분주한다. 5) 분리된 단일 세포는 알카라인 용액으로 세포벽을 분해하고, 6) MDA(Multiple displacement amplification, 거대 유전체 증폭) 수행으로 단일 개체의 전체 유전체 증폭(WGA, Whole genome amplification)을 진행한다. 7) 증폭된 전체 유전체 중 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 계통학적 분석으로 시료내 존재하는 미생물의 군집 분포를 분석한 후, 8) 군집 내 후보문을 선별하여 전체 유전체 분석을 통하여 선별한 후보문의 생리생태학적 기능 분석을 수행한다.

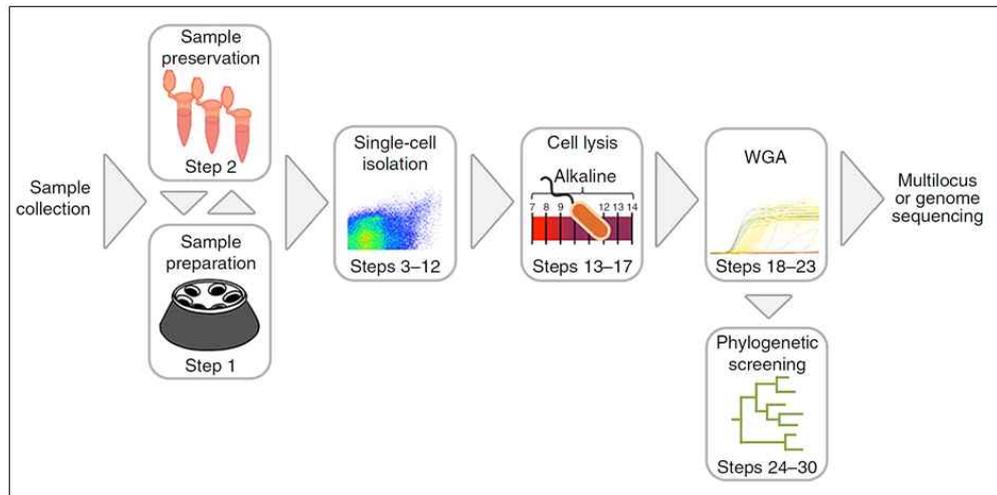


Figure 2. Flowchart of single cell separation analysis

분리된 개체는 전체 유전체 증폭 후 시료의 미생물 분포 스크리닝을 위하여 16S rRNA 유전자를 대상으로 유전자 증폭을 수행하였으며, 미생물의 검출 프라이머는 아래의 프라이머 리스트를 참조로 수행하였다.

Table 1. Primer list for screening distributions of isolated microorganisms

| Description                                | Name    | Sequence (5'→3')       | Refs. |
|--|---------|------------------------|-------|
| Bacterial full length                      | 27F-YM  | AGAGTTTGATYMTGGCTCAG   | 33,34 |
|  | 1492R   | TACGGYTACCTTGTACGACTT  | 35    |
| Universal i-tag (targeting V4 region)      | 515F    | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA    | 36    |
|  | 806R    | GACTACHVGGGTWCTAAT     | 36    |
| Universal pyrotag (targeting V6-8 regions) | 926wF   | AACTYAAAKGAATTGRCCG    | 37,38 |
|  | 1392R   | ACGGGCGGTGTGTRC        | 39,40 |
| Bacterial                                  | 27F     | AGRGTTYGATYMTGGCTCAG   | 41    |
|  | 907R    | CCGTCAATTCMTTTRAGTTT   | 35,39 |
| Archaeal                                   | Arc344F | ACGGGGYGACGACGGCGCGA   | 42,43 |
|  | Arc915R | GTGCTCCCCGCCAATTCCT    | 44    |
| Eukarya                                    | Euk528F | CCGCGGTAATCCAGCTC      | 45    |
|  | EukB    | GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC | 46    |

\*'Universal' refers to primers targeting bacteria and archaea; for all nonuniversal primers the domain bacteria, archaea or eukarya is specified.

**단일세포 분리를 위한 장비비교.** 한국생명공학연구원에서 보유하고 있는 BD사의 FACS Aria III장비와 한국 해양과학기술원의 Sony SH800S 장비를 비교분석하였다. BD사의 FACS Aria III는 서로 다른 발광 파장을 검출하기 위한 레이저의 개수가 많아 동시에 여러 목적 세포에 대한 추적 및 분리가 가능하다. 검출 감도가 현종 장비 가운데 상위에 속하는 수준으로 높고 시료 특성에 따라 검출 영역 및 시료 흐름 등에 대한 세밀한 조정이 가능한 장점이 있으며 초당 최대 70,000 event의 속도로 droplet 검출이 가능하다. Sony SH800S장비는 기존의 유사한 장비와 비교하여 관련 시약감소 및 장비 사용 편의성 측면에서 많은 개선이 있으며 washing, sample loading 등이 손쉽고 장비 운용 프로그램의 사용도 짧은 시간에 교육 및 장비 운용이 가능한 장점이 있다. 그러나 발광 파장 세포에 대한 검출 속도가 상대적으로 낮고(최대 30,000 event/초), 서로 다른 발광 파장을 검출하기 위한 레이저 개수가 적은 문제가 있다.

Table 2. Comparison of single cell separation equipment specifications

|                         | BD Aria III                                    | Sony SH800S                         |
|-------------------------|--|-------------------------------------|
| Excitation              | 375 nm, 405 nm, 445 nm, 488 nm, 561 nm, 633 nm | 488 nm, 405 nm, 561 nm, 638 nm      |
| Optics                  |  |                                     |
| Emission Optics         | FSD, SSD, 5 fluorescesce detectors             | FSD, BSD, 6 fluorescence detectors  |
| Nozzles                 | 70, 85, 100, 130 um                            | 70, 100, 130 um                     |
| Sample Acquisition Rate | 70,000 events per second                       | 30,000 events per second            |
| Purity and Yield        | a purity of >89%, and a yield > 80%            | a purity of >89%, and a yield > 80% |

두 장비를 이용하여 실험을 수행하기 이전에 실제 Thermo사의 CountBright™ Absolute Counting Beads for Flow cytometry (C36950) 표준 입자를 이용하여 단일세포 분리 과정 중 분획된 droplet이 정확히 plate의 목적하는 위치에 낙하하는지 확인하고자 하였다. 이 표준 입자는 7 um의 비교적 큰 입자로 낙하 결과를 쉽게 확인이 가능하고 385-800 nm에 달하는 넓은 범위의 발광 파장을 가지고 있어 장비에서 해당 입자에 대한 검출 및 분리가 손쉬운 장점이 있다.

#### 나. 유전체증폭(MDA) 분석 방법 셋업

**초기 MDA 방법 세팅.** 기기를 이용하여 단일 세균으로 분리하기 전 96 well plate에 **1)** Lysis butter (세포용해액, 400 mM KOH + 10 mM EDTA) 1.5μl씩 분주 후, **2)** 단일 세포 분리기기를 이용하여 한 개의 well에 단일 세균을 분리하여 50°C 에서 10분간 세균의 세포 용해가 이루어지도록 하였다. 세포 용해 이후에는 일반적으로 DNA 증폭 시약으로 알려진 Qiagen REPLi-g mini kit를 사용하였다. **3)** D2 buffer (DLB 55μl + DTT 5μl)를 1.75μl씩 분주 하고 3분 후, **4)** Master Mix(Buffer 725μl + 증류수 250μl+Stop solution 87.5μl+Enzyme 25μl)를 조제하여 21.75μl씩 첨가하고 30°C 에서 16시간동안 반응 시켰다. **5)** 효소의 활성을 막기 위하여 반응 후 65°C 에서 5분간 정치 시켰다. 단일 세균의 MDA의 결과는 젤 사진과 16S rRNA gene의 증폭으로 확인 하였다.

**M1 MDA 방법 세팅.** Joint Genome Institute(JGI)로부터 MDA 수행 방법을 문의 하여 현재 전세계 연구자에게 single cell genomics 연구 서비스를 수행하고 있는 미국 Bigelow Single Cell Genomics Center의 MDA 수행 방법을 획득하였다. Bigelow Single Cell Genomics Center의 경우엔 적은 용량(0.05μl단위)의 시약을 정확하게 수행하기 위하여 시약분주장비를 사용하지만 현재 우리연구소에 구비가 되어 있지 않기 때문에, 사용 시약과 시약 혼합비율은 동일하나 용량을 늘려 파이펫팅으로 가능한 MDA 수행 방

법 M1을 세팅하였다. 새롭게 세팅한 M1 방법은 초기 MDA 방법에는 없는 lysozyme 처리단계(세포벽파괴)를 추가하였으며, 단일 세포 증폭 전용으로 DNA 증폭 시약으로 교체하고 DNA 증폭 반응시간을 6시간으로 제한하였다. **1)** Lysozyme (50 U/ $\mu$ l)을 96 well plate에 3  $\mu$ l씩 분주 후, **2)** 단일 세포 분리기기를 이용하여 한 개의 well에 단일 세균을 분리하여 30°C에서 15분간 반응시켰다. 이 후 반응은 단일 세포 증폭 시약인 Qiagen REPLi-g mini kit를 사용하였으며, kit에 구성되어 있는 **3)** 2.5x Lysis buffer (동결건조된 DLB+DTT 45  $\mu$ l + 증류수 170  $\mu$ l)를 0.5 $\mu$ l씩 분주한 후 5분간 정치하였다. **4)** Stop solution을 1.275  $\mu$ l 처리하고 미리 제조하여 둔 **5)** Master Mix (Buffer 700  $\mu$ l+증류수 202  $\mu$ l + enzyme 48  $\mu$ l)를 16  $\mu$ l 첨가하여 30°C에서 6시간동안 반응시켰다. **6)** 반응이 완료된 후 효소의 활성을 막기 위하여 반응 후 70°C에서 10분간 정치 시켰다. 연속 희석방법으로 1차 테스트를 진행한 후, 단일세포 분석기기를 이용하여 분리한 개체에 적용하여 증폭유무를 확인하였다. 증폭 유무는 16S rRNA 유전자를 대상으로 확인하였다.

**M2 MDA 방법 세팅.** 단일 세포 분리기기를 이용하여 단일 세균 분리 후 MDA 수행 경험이 많은 Joint Genome Institute(JGI)에 현재 연구의 실험진행에 대한 문제점에 대하여 문의한 결과, M1 방법은 시약분주장비가 구비되어 있을 때 사용하는 실험방법임을 확인받았다. M1의 실험방법과 사용 시약 및 수행 과정을 동일하나 시약의 비율 및 Lysozyme 제품(Epicentre Lysozyme)을 교체하여 MDA 수행 방법 M2를 세팅하였다. 기존의 MDA방법은 Lysis buffer또는 Lysozyme을 분주하고 단일 세균을 분리하였으나, M2방법은 실험 수행 전 단일 세포 분리 기기의 작동 및 분리 수준을 체크하고 **1)** 비어 있는 96 well plate에 단일 세균을 분리하였다. **2)** Epicentre Lysozyme(50U/ $\mu$ l)을 단일 세균이 분리되어 있는 96 well plate에 1.6 $\mu$ l씩 분주 후, 상온에서 15분간 반응시켰다. 이 후 반응은 단일 세포 증폭 시약인 Qiagen REPLi-g mini kit를 사용하였으며, kit에 구성되어 있는 **3)** 2.5x Lysis buffer (DLB 220  $\mu$ l + DTT 20  $\mu$ l)를 1.2  $\mu$ l씩 분주한 후 5분간 정치하였다. **4)** Stop solution을 1.2  $\mu$ l 처리하고 미리 제조하여 둔 **5)** Master Mix(Buffer 696  $\mu$ l + 증류수 216  $\mu$ l + enzyme 48  $\mu$ l)를 16  $\mu$ l 첨가하여 30°C에서 6시간 동안 반응시켰다. **6)** 반응이 완료된 후 효소의 활성을 막기 위하여 반응 후 70°C에서 10분간 정치 시켰다. 연속 희석방법으로 1차 테스트를 진행한 후, 단일세포 분석기기를 이용하여 분리한 개체에 적용하여 증폭유무를 확인하였다. 증폭 유무는 16S rRNA 유전자를 대상으로 확인하였다.

### 3. 결과 및 토의

#### 가. 유세포 분리기 장비 비교분석

한국생명공학연구원에서 보유하고 있는 BD사의 FACS Aria III는 실제 실험 결과 눈에 보이지 않는 작은 droplet을 custom plate의 원하는 낙하 위치에 정확하게 분리하여야만 하는 본 실험을 위해서 관련된 셋업이 필요하였으나, 세균의 단일세포 분리의 경우 배양을 목적으로 하는 경우가 일반적이기 때문에 분리 시 배양 media 내에만 낙하시키면 되는 관계로 현장에서는 이에 대한 경험이 없어 많은 준비 시간이 소요되었다. 해당 장비 자체가 제공하는 custom plate 사용 프로토콜 및 장비 조정과정이 실험에 충분한 정도의 정확성을 보장하지 못하는 문제를 발견하였다.



Figure 3. Equipment used in single cell separation analysis in this study. FACS Aria III of BD (left) and SH800S of Sony (right) at KIOST.

Sony사의 SH800S 장비는 한국해양과학기술원 본원에서 해수 시료에 대한 세포 단일 분리에 이용되고 있었기 때문에 별다른 문제없이 세균 분리에 이용할 수 있었다. 한국생명공학연구원 Aria III 장비에서 어려움을 겪었던 custom plate의 장착 및 정확한 위치 조정이 가능하여 단일세포 분리에 적합한 것으로 판단하였다. 이번 실험에 사용된 Fryxell 호수 시료는 형광 현미경 관찰 결과 약  $10^5$  cells/ml로 시료 내에 세균수가 적지 않기 때문에 검출 속도에 문제가 있어도 비교적 소요되는 시간이 적고 단일 종류의 염색약만을 사용하는 단일세포 분리 실험에 있어서는 큰 문제는 아닌 것으로 여겨진다.

#### 나. 형광표지된 표준 입자를 이용한 control 실험

표준 입자를 이용하여 단일세포 분리 과정 중 분획된 droplet이 정확히 plate의 목적하는 위치에 낙하확인 결과 테스트에 사용된 bead는 custom plate를 해당 장비에 맞게 장착 및 관련된 셋업 후 Figure 4와 같이 정확히 plate의 목적하는 위치에 낙하한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어볼 때 단일세포 분리 실험 결과가 나오지 않는 경우, 그 원인 가운데 cell이 다른 위치에 낙하하여 유전체 증폭을 수행할 수 없었을 가능성은 매우 낮은 것으로 유추할 수 있다.

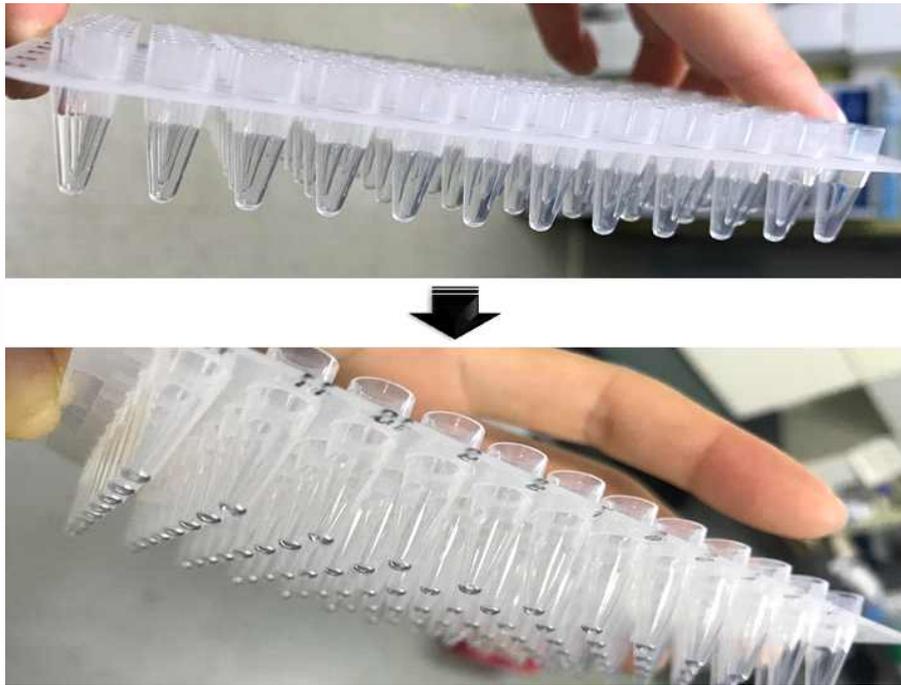


Figure 4. SChecking the control counting beads (standard particles) on the 96-well plate before (top) and after (bottom) drop using Sony SH800S.

#### 다. 오염최소화를 위한 청정랩 구축의 필요성

단일 세포 분리 후 최종적으로 positive control을 제외한 다른 분획 부분에 대하여 유전체 증폭 실험을 수행하여 16S rRNA 염기서열 해독을 통하여 해당 세균의 동정을 진행한 결과 *Curvibacter lanceolatus*, *Acinetobacter junii*, *Sphingomonas melonis*, *Caulobacter vibrioides*, *Aquabacterium*, *Ralstonia pickettii*를 확인하였다. 이들 세균은 프리셀 호수의 세균 군집 분석 결과에서는 발견되지 않은 종류로서 기존의 연구 결과와 비교하여 보았을 때 negative control에서 검출되는 오염 균주로 여겨진다. 특히 이들 6종의 균주 모두 알 수 없는 원인으로 인해 오염된 시약 또는 실험기구에서 나타나는 균주들과 일치하는 결과를 보였다.

표 3 에 빨간색으로 표기된 부분은 이번 단일세포 분리 분석에서 유전체 증폭 및 세균 동정을 진행하여 확인한 세균 속(Genus)이다(Salter et al., 2014). 이들은 일반적으로 시약 자체의 오염이거나 또는 공기 중의 세균이 낙하하여 발생하는 것으로 예상되나, 시료를 연속 희석법(serial dilution)을 이용하여 유전체 증폭한 실험 결과에서는 정상적으로 프리셀 호수의 군집에서 검출된 세균들이 나오는 것에서 미루어볼 때 시약 자체가 오염되었을 가능성은 낮다고 판단된다. 따라서 이러한 결과는 단일세포 분리 실험 중 위로부터 유입된 오염 균주에 의한 것으로 유추할 수 있다.

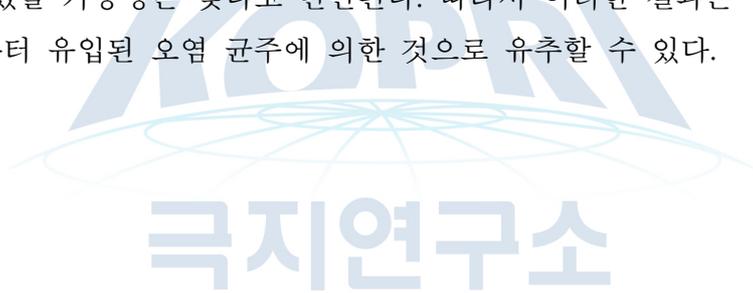


Table 3. List of bacteria (red) detected at the negative 'blank' controls in other studies.

| Phylum              | List of constituent contaminant genera  |
|---------------------|---|
| Proteobacteria      | Alpha-proteobacteria:<br><i>Afiplia</i> , <i>Aquabacterium</i> <sup>g</sup> , <i>Asticcacaulis</i> , <i>Aurantimonas</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Bosea</i> , <i>Bradyrhizobium</i> <sup>d</sup> , <i>Brevundimonas</i> <sup>c</sup> , <i>Caulobacter</i> , <i>Craurococcus</i> , <i>Devosia</i> , <i>Hoeflea</i> <sup>g</sup> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Methylobacterium</i> <sup>c</sup> , <i>Novosphingobium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pedomicrobium</i> , <i>Phyllobacterium</i> <sup>g</sup> , <i>Rhizobium</i> <sup>c,d</sup> , <i>Roseomonas</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingomonas</i> <sup>c,d,g</sup> , <i>Sphingopyxis</i>  |
|                     | Beta-proteobacteria:<br><i>Acidovorax</i> <sup>c,e</sup> , <i>Azoarcus</i> <sup>e</sup> , <i>Azospira</i> , <i>Burkholderia</i> <sup>d</sup> , <i>Comamonas</i> <sup>c</sup> , <i>Cupriavidus</i> <sup>c</sup> , <i>Curvibacter</i> , <i>Delftia</i> <sup>g</sup> , <i>Duganella</i> <sup>g</sup> , <i>Herbaspirillum</i> <sup>a,c</sup> , <i>Janthinobacterium</i> <sup>g</sup> , <i>Kingella</i> , <i>Leptothrix</i> <sup>g</sup> , <i>Limnobacter</i> <sup>e</sup> , <i>Massilia</i> <sup>c</sup> , <i>Methylophilus</i> , <i>Methyloversatilis</i> <sup>g</sup> , <i>Oxalobacter</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Polaromonas</i> <sup>g</sup> , <i>Ralstonia</i> <sup>b,c,d,g</sup> , <i>Schlegelella</i> , <i>Sulfuritalea</i> , <i>Undibacterium</i> <sup>g</sup> , <i>Variovorax</i> |
|                     | Gamma-proteobacteria:<br><i>Acinetobacter</i> <sup>a,d,c</sup> , <i>Enhydrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> <sup>a,c,d,g</sup> , <i>Nevskia</i> <sup>g</sup> , <i>Pseudomonas</i> <sup>b,d,e</sup> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i> <sup>a,b,c,d,e</sup> , <i>Xanthomonas</i> <sup>b</sup>  |
| Actinobacteria      | <i>Aeromicrobium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Beutenbergia</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Janibacter</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Microthricus</i> , <i>Patulibacter</i> , <i>Propionibacterium</i> <sup>g</sup> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Tsukamurella</i>   |
| Firmicutes          | <i>Abiotrophia</i> , <i>Bacillus</i> <sup>b</sup> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Streptococcus</i>  |
| Bacteroidetes       | <i>Chryseobacterium</i> , <i>Dyadobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> <sup>d</sup> , <i>Hydrothalea</i> , <i>Niastella</i> , <i>Olivibacter</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Wautersiella</i>  |
| Deinococcus-Thermus | <i>Deinococcus</i>  |
| Acidobacteria       | Predominantly unclassified Acidobacteria Gp2 organisms  |

## 국시연구소

### 라. 예상되는 오염 원인 및 청정실험 시설의 필요성

실험에서 검출된 오염을 예방 및 제거하기 위해서는 청정한 상태로 관리되고 있는 클린룸 및 입실시 오염 제거를 위한 에어 샤워 등 공조 시설이 필요하나, 이번 실험에서 사용한 한국생명공학연구원 및 한국 해양과학기술원의 단일세포 분리 장비들은 모두 연구자 및 해당 공간의 세균에 대한 오염 제거가 고려되어 있지 않은 개방된 공간에 설치되어 사용하고 있는 상황이었으며 여건 상 이에 대한 통제가 어렵다. 또한 해당 장비들이 일반적으로 진핵세포의 분리에 사용되는 공동기기인 관계로 시료 간 오염을 막기 위해 세균 분리를 위해 사용을 허가해 주는 경우가 드문데다가 어렵게 사용을 허가 받아도 특정 연구자를 위해 고도의 청정 시설을 갖출 수 없는 것이 오염의 원인으로 판단된다. 이러한 문제들의 개선을 위해서는 본 실험을 위한 전용 단일세포 분리 장비의 구축 및 해당 장비의 사용을 위한 클린룸과 관련 시설이 요구된다.



Figure 5. The photograph of the single cell genome analysis center of the Bigelow Marine Research Institute (Stepanauskas 2012).

현재 이 실험을 선도적으로 수행하고 있는 미국 비글로 해양연구소의 단일세포 유전체 분석센터의 경우 단일세포 분리를 위한 전용 시설을 구축하여 안정적으로 운영하고 있다. 공동 연구를 통해 한정된 외부 연구자들의 의뢰를 받아 실험을 수행하고 있으며 이와 관련된 유전체 증폭 효소의 개선이나 관련 프로토콜 등의 분석기술을 개발하여 특허를 출원하고 상업적인 서비스를 제공하고 있다. 그러나 이에 의지하기에는 분석에 소요되는 샘플 수에 비해 비용이 과다하게 소요되며 (384 well 1 plate 당 \$3,800, Illumina 차세대 염기서열 분석까지 의뢰할 경우 10개의 single cell sequencing에 대해 \$9,900. <https://scgc.bigelow.org/capabilities/service-description/>) 관련된 원천기술을 해외의 선도 그룹에 의존하는 문제가 있어, 일회성 분석으로 끝내지 않고 지속적으로 연구를 하여야 할 경우 청정랩과 관련 시설의 구축이 필수적인 것으로 사료된다. 본 실험을 Bigelow 연구실에 의뢰할 경우, 1) 시료마다 최소 1,000개의 single cell에 대해 단일 세포 분리 및 유전체 증폭을 수행하는 것을 가정: 시료 하나 당 \$11,400, 2) 증폭된 유전체 시료 중 10개 샘플에 대한 차세대 염기서열 분석까지 수행하는 것을 가정할 때, 시료 하나 당 \$21,300의 비용이 발생할 것으로 계산된다. 그러나 이를 셋업된 프로토콜을 이용하여 직접 수행할 경우, 1) 시료마다 최소 1,000개의 single cell에 대해 단일세포 분리 및 유전체 증폭을 수행하는 것을 가정할 때, 시료 하나 당 \$3,584, 2) 증폭된 유전

체 시료 중 10개 샘플에 대한 차세대 염기서열 분석까지 수행하는 것을 가정하면 시료 하나 당 \$5,114의 비용이 발생될 것으로 계산되며 프로토콜의 개선에 따라 비용 절감의 여지 있다.

#### 마. 유전체증폭(MDA) 셋업



Figure 6. Experimental process for method setting of 7 rounds in total.

**1차 실험(2018년 7월 16일).** Glycerol stock으로 보관 중인 프리셀 호수의 수심 15m 시료를 한국해양과학기술원에서 보유하고 있는 장비인 Sony cell sorter SH800S를 이용하여, 96-well plate에 세균의 단일개체 분리를 시도하였다. 분리된 96개의 단일 개체에 대하여 MDA(중합 치환 증폭 Multiple Displacement Amplification) 방법을 사용하기 위해 Qiagen REPLi-g mini kit를 이용하여 단일 개체의 유전체 DNA를 증폭하였다. MDA의 중요한 세포 용해 (cell lysis) 단계는 He et al.(2016)을 참고하여 초기 MDA 실험방법을 세팅하였다.

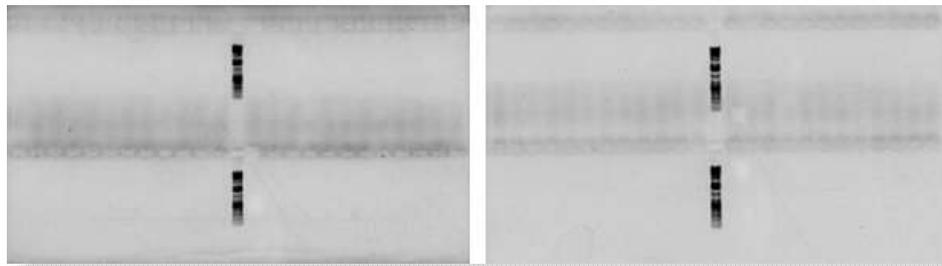


Figure 7. The MDA result of single cell bacteria separated from 15m Fryxell samples

MDA 수행 후 산물은 16S rRNA gene의 V1-V3와 V3-V4 (Primer 27F-518R과 357F-806R) 부분의 증폭으로 단일 개체 세균의 분리를 확인하였으나, 16S rRNA gene

증폭이 되지 않았다. 남극 호수물에서 단일 개체 세균의 분리 및 MDA 실험에 대한 검증이 사전 연구되어야 한다.

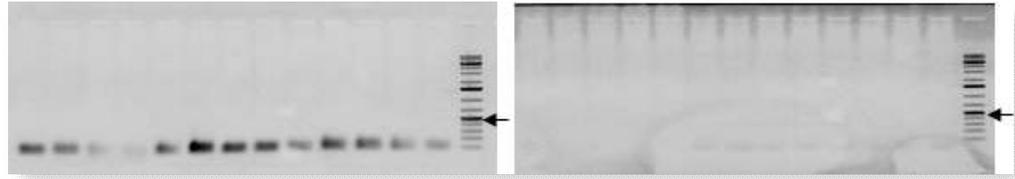


Figure 8. 16S rRNA gene amplification result of MDA result (left; 27f-518r; right; 357f-806r)

**2차 실험(2018년 8월 17일).** 전세계 연구자에게 세균의 단일 개체를 분리하여 single cell genomics 연구 서비스를 수행하고 있는 미국 Bigelow Single Cell Genomics Center의 협력 연구소인 Joint Genome Institute(JGI)로부터 MDA 수행 방법에 대하여 문의하여, 파이펫팅으로 가능한 MDA 방법(M1)을 세팅하였다. 1차 실험에서 Lysozyme 처리 단계(세포벽 파괴)와 유전체 증폭 중합효소를 보완하였다. Glycerol stock으로 보관중인 프리셀 호수의 수심 15 m시료를 한국생명공학연구원에서 보유하고 있는 장비인 BD FACS Aria III를 이용하여, 96 well plate에 세균의 단일 개체 분리하였다. 분리된 96개의 단일 개체에 대하여 Qiagen REPLi-g Single Cell kit를 이용하여 MDA를 진행하였다.

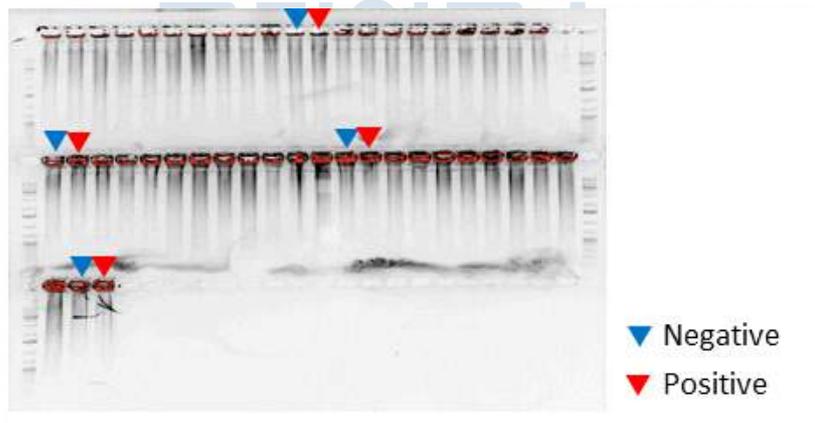


Figure 9. Results of MDA M1 of single cell bacteria separated from Fryxell 15 m sample

MDA M1수행 후 그 산물을 16S rRNA gene의 V1-V9 (Primer 27F-1492R) 부분의 증폭으로 단일 개체 세균의 분리를 확인하였으나, 세균의 16S rRNA gene은 증폭이 되지 않았다(Figure 9). MDA 증폭 여부를 단일 개체 분리 전 확인할 필요가 있다.

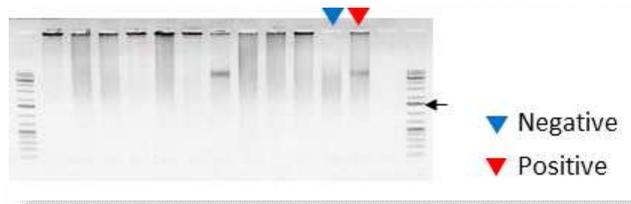


Figure 10. 16S rRNA gene (27f- 1492r) amplification result of MDA M1 product

3차 실험(2018년 9월 5일). JGI에서 제공한 MDA 방법을 파이펫 사용으로 수정하여 세팅한 방법(M1)의 증폭 여부 확인을 위하여, 양성대조균인 대장균을 연속 희석 ( $10^2$  cell,  $10^1$  cell,  $10^0$  cell) 하여 MDA를 수행하였다.

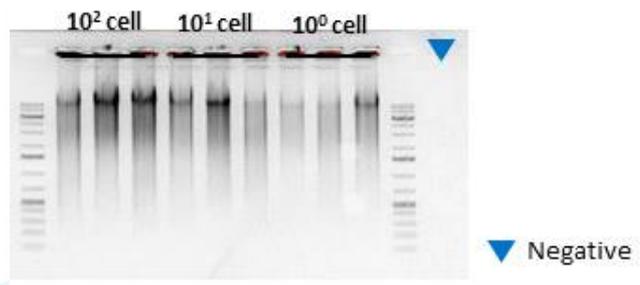


Figure 11. MDA M1 result of serial diluted *E. coli*

MDA 수행 후 그 산물을 1/10과 1/100로 희석하여, 16S rRNA gene의 V1-V9 (Primer 27F-1492R) 부분의 증폭으로 MDA 여부를 확인하였다(Figure 12). 증폭된 16S rRNA gene의 염기서열분석 결과 실험에 사용한 대장균과 일치하는 것을 확인하였다.

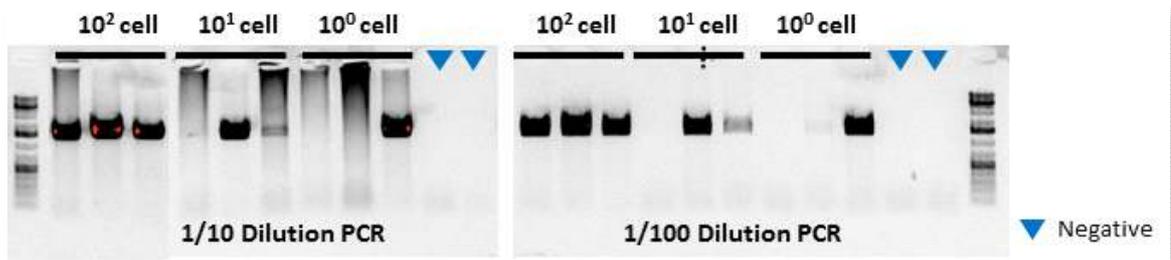


Figure 12. 16S rRNA gene (27f- 1492r) amplification result of MDA M1 product

4차 실험(2018년 10월 10일). JGI에서 제공한 MDA 방법을 파이펫 사용으로 수

정하여 세팅한 방법(M1)의 증폭 여부 확인을 위하여, 양성대조군인 대장균을 연속 희석 ( $10^2$  cell,  $10^1$  cell,  $10^0$  cell) 하여 MDA를 수행하였다. MDA 방법 세팅 확인 후 단일 개체 분리 기기의 개체 분리 능력을 확인하기 위하여 양성대조군 대장균과 Glycerol stock으로 보관중인 Fryxell 호수의 수심 15 m 시료에 대해 한국해양과학기술원 Sony Cell Sorter SH800S 장비를 이용하여, 96 well plate에 다수 또는 단일 개체 분리를 시도하였다. 대장균과 시료에 대하여 각각 50개, 25개, 5개, 1개를 3반복을 진행하였고, 시료는 총 3세트로 분리하였다. 분리된 다수 또는 단일 개체에 대하여 2차와 3차 실험으로 세팅된 MDA M1을 진행하였다.

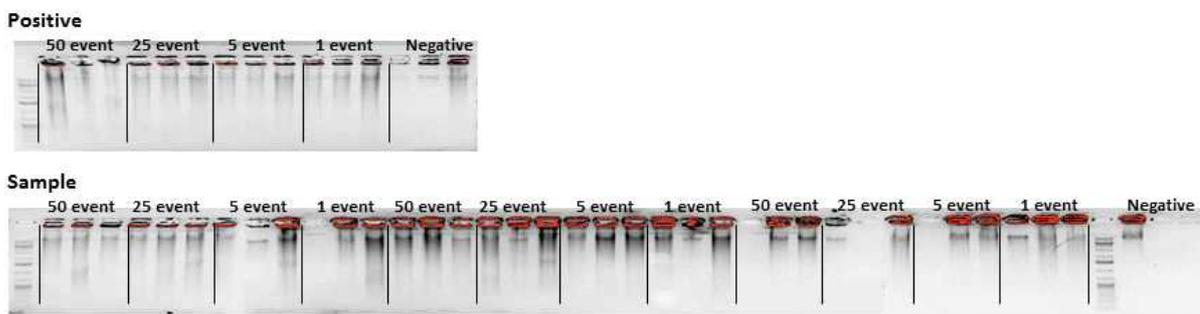


Figure 13. Results of MDA M1 against multi- or single-cell bacteria separated from the *E. coli* (positive control) and Fryxell 15m samples (event per population)

MDA M1수행 후 그 산물을 1/100로 희석하여 16S rRNA gene의 V1-V9 (Primer 27F-1492R) 부분의 증폭으로 개체 분리를 확인하였으며, 대장균 50개를 분리한 well한 개에서 16S rRNA gene이 증폭되었으며, Fryxell 시료의 다수 또는 단일 개체 모두 증폭되지 않았다.

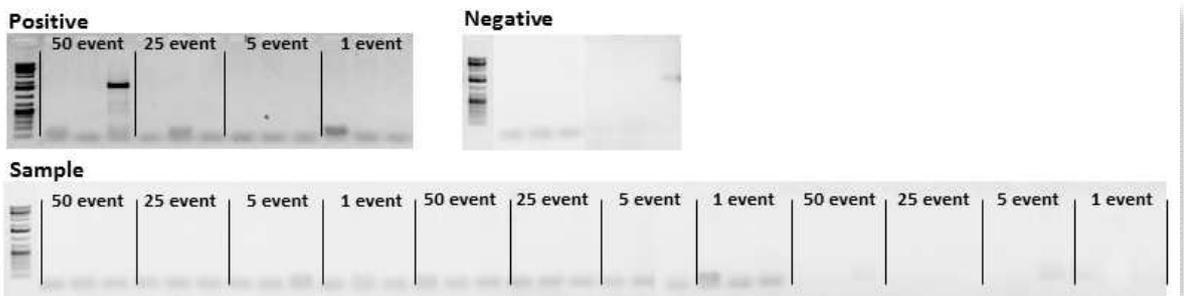


Figure 14. 16S rRNA gene (27f-1492r) amplification result of MDA products

5차 실험(2018년 11월 8일). 연속 희석 방법으로 MDA M1방법 세팅에 대하여 확인하였으나, 기기를 이용한 단일 개체 분리 후 유전체증폭은 되지 않았다. 미국의 Single cell genomics의 선진 그룹인 JGI연구진에게 연구수행에 대한 조언과 수정된 MDA 방법을 받았으며, Lysozyme(세포벽 파괴) 시약교체와 Qiagen REPLi-g Single Cell kit의 용액량을 조절하여 MDA 방법(M2)을 세팅하였다. 기존에 세팅한 MDA 방법(M1)과 새롭게 세팅한 MDA 방법(M2)을 확인하기 위하여, 양성대조군 대장균을 한국해양과학기술원 Sony Cell Sorter SH800S으로 96well plate에 다수 또는 단일 개체 분리를 시도하였다. 대장균을 한 well에 50개, 10개, 1개씩을 8반복으로 2세트 분리 하였고, M1과 M2방법으로 MDA를 수행 수행하였다.

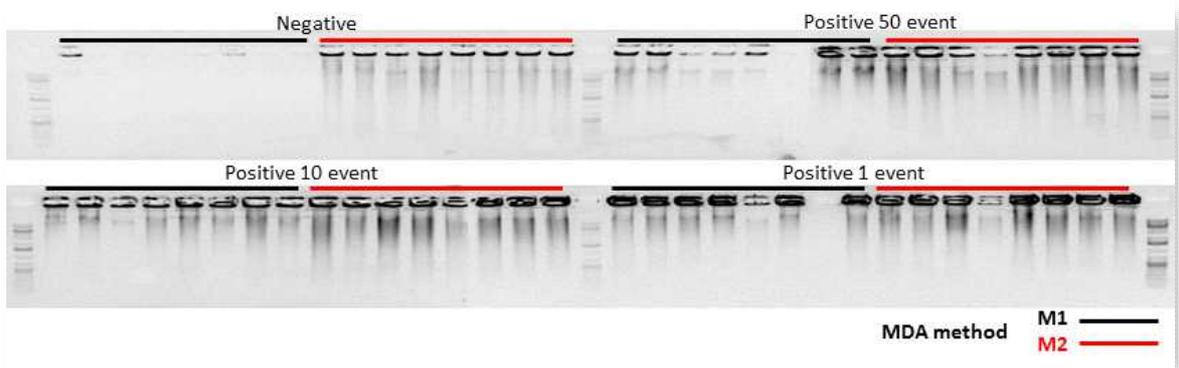


Figure 15. The results of the M1 and M2 methods after separating the *E. coli* (positive control) into multiple cells or single cell (event per population)

MDA M1과 M2 수행 후 그 산물을 1/50로 희석하여 16S rRNA gene의 V1-V9 (Primer 27F- 1492R) 부분의 증폭하였다.

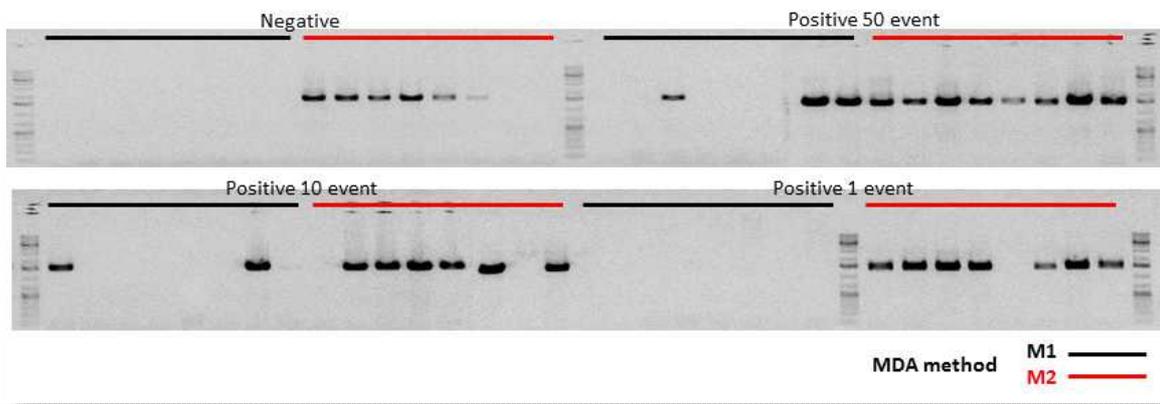


Figure 16. 16S rRNA gene (27f-1492r) amplification result of MDA M1 and M2 method products

증폭된 16S rRNA gene의 염기서열분석 결과, M1 방법은 50개를 분리한 well 3개와 10개를 분리한 well 2개에서 대장균이 증폭되었으며, 대조군과 단일 분리한 well 에서는 MDA 증폭이 이루어지지 않았다. M2 방법은 50개, 10개, 1개씩 분리한 8개의 well에서 각각 8개, 6개, 7개 well에서 세균이 증폭되었다. 그러나 대장균이 증폭된 well 은 10개를 분리한 한 개의 well뿐이었으며, 음성 대조군 well에서도 대장균 외의 세균이 증폭된 것을 확인하였다. 결론적으로, M1보다 M2의 실험방법이 민감도는 높으나, 오염에 대한 민감도도 또한 높다.

Table 4. Identification result of the sequencing data from the amplified 16S rRNA gene (27f-1492r)

| Band No. | Event No. | MDA method | Confirmation of sequence            |
|----------|-----------|------------|-------------------------------------|
| 1        | Negative  | M2         | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 2        |           |            | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |
| 3        |           |            | <i>Ralstoniapickettii</i>           |
| 4        |           |            | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 5        |           |            | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |
| 6        |           |            | <i>Ralstoniapickettii</i>           |
| 7        |           |            | <i>Escherichia coli</i>             |
| 8        | 50 event  | M1         | <i>Escherichia coli</i>             |
| 9        |           |            | <i>Escherichia coli</i>             |
| 10       |           |            | MIX                                 |
| 11       | 50 event  | M2         | Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. |
| 12       |           |            | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |
| 13       |           |            | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 14       |           |            | MIX                                 |
| 15       |           |            | <i>Sphingomonasmelonis</i>          |
| 16       |           |            | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |
| 17       |           |            | MIX                                 |
| 18       | 10 event  | M1         | <i>Escherichia coli</i>             |
| 19       |           |            | <i>Escherichia coli</i>             |
| 20       | 10 event  | M2         | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |

|    |         |    |                                     |
|----|---------|----|-------------------------------------|
| 21 |         |    | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 22 |         |    | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 23 |         |    | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |
| 24 |         |    | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 25 |         |    | <i>Escherichia coli</i>             |
| 26 |         |    | <i>Caulobactervibrioides</i>        |
| 27 |         |    | MIX                                 |
| 28 |         |    | <i>Acinetobacterjunii</i>           |
| 29 | 1 event | M2 | <i>Curvibacterlanceolatus</i>       |
| 30 |         |    | MIX                                 |
| 31 |         |    | Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. |
| 32 |         |    | Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. |

6차 실험(2018년 11월 8일). 대장균 외의 세균이 증폭된 well이 M2 방법이 시약으로 인한 오염인지 확인하기 위하여, 연속 희석( $10^2$  cell,  $10^1$  cell,  $10^0$  cell) 방법으로 대장균(2반복)과 프리셀 15m 시료(5반복)를 5차 실험과 동일한 방법(M1과 M2방법)으로 MDA를 수행하였다.

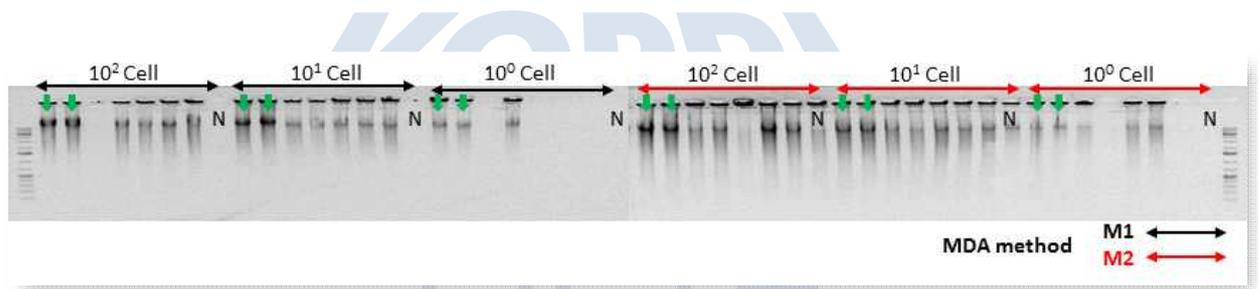


Figure 17. MDA M1 and M2 results (↓; *E. coli*, N; negative control) after diluting *E. coli* and Fryxell 15 m samples to  $10^2$  cells,  $10^1$  cells and  $10^0$  cells by serial dilution.

MDA M1과 M2 수행 후 그 산물을 1/50로 희석하여, 16S rRNA gene의 V1-V9 (Primer 27F-1492R) 부분의 증폭으로 MDA 여부를 확인하였다. 분리기기를 사용하였던 5차 결과와 달리 음성 대조군은 세균이 증폭되지 않았다. 증폭된 16S rRNA gene의 염기서열분석 확인 결과, 양성 대조군은 모두 대장균 이었으며, 시료를 희석하여 넣어준 실험군은 프리셀 15m 사전연구에서 검출되었던 세균이 증폭되었다.

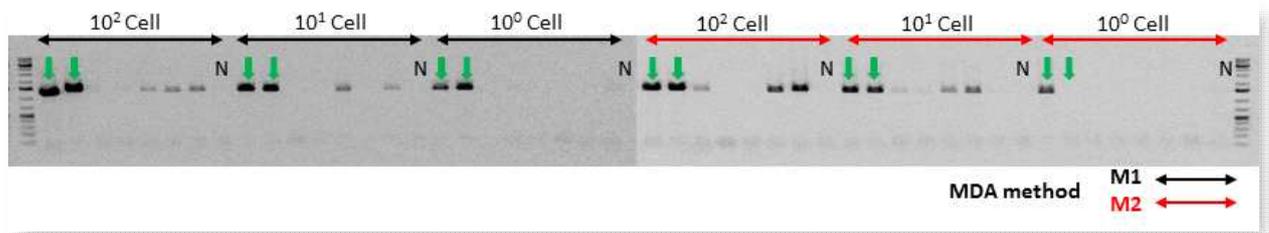


Figure 18. MDA results of 16S rRNA gene (27f-1492r) amplification (↓; *E. coli*, N; negative control)

Table 5. Identification result of the sequencing data from the amplified 16S rRNA gene (27f-1492r)

| Sequence name | Dilution value       | M D A method | origin         | Description   | note   |
|---------------|----------------------|--------------|----------------|---|--|
| #M1-1_27F     | 10 <sup>2</sup> Cell | M1           | Positive       | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M1-2_27F     |                      |              |                | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M1-3_27F     |                      |              |                | Uncultured candidate division JS1Bacterial Diversity in Permanently bacterium clone Fryxell_39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica  |
| #M1-4_27F     | 10 <sup>2</sup> Cell | M1           | Fryxell sample | 15m<br>Uncultured alpha proteobacterium clone Fryxell_41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                       | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                                   |
| #M1-5_27F     |                      |              |                | Uncultured Unclassified bacterium QEDN7DF04   | Towards the definition of a core of 16S rRNA gene from clonemicroorganisms involved in anaerobic digestion of sludge               |
| #M1-6_27F     | 10 <sup>1</sup> Cell | M1           | Positive       | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M1-7_27F     |                      |              |                | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M1-8_27F     | 10 <sup>1</sup> Cell | M1           | Fryxell sample | 15m<br>Uncultured alpha proteobacterium clone Fryxell_41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                       | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                                   |
| #M1-9_27F     |                      |              |                | Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | SUP05 dominates the gammaproteobacterial sulfur oxidizer assemblages in pelagic redoxclines of the central Baltic and Black        |
| #M1-10_27F    | 10 <sup>0</sup> Cell | M1           | Positive       | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M1-11_27F    |                      |              |                | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M2-12_27F    | 10 <sup>2</sup> Cell | M2           | Positive       | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M2-13_27F    |                      |              |                | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M2-14_27F    |                      |              |                | Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Hados.Sed.Eubac.15   | Molecular genetic monitoring of bacterial communities in Manzala lake, Egypt, based on 16S rRNA gene analysis                      |
| #M2-15_27F    | 10 <sup>2</sup> Cell | M2           | Fryxell sample | 15m<br>Uncultured bacterium clone SS1_B_08_35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis |
| #M2-16_27F    |                      |              |                | Uncultured bacterium clone JS2_194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in marine sediments   |
| #M2-17_27F    | 10 <sup>1</sup> Cell | M2           | Positive       | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M2-18_27F    |                      |              |                | <i>Escherichia coli</i>   |  |
| #M2-19_27F    | 10 <sup>1</sup> Cell | M2           | Fryxell        | 15m<br>Uncultured bacterium partial 16S   | Microbial diversity in Los Azufres   |

|            |                      |  |          |   |  |
|------------|----------------------|--|----------|---|--|
|            |                      |  |          | rRNA gene, clone AM1-82   | geothermal field (Michoacan, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers                       |
| #M2-20_27F |                      |  | sample   | Uncultured candidate division JS1<br>bacterium clone Fryxell_39_16S<br>ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                       |
| #M2-21_27F |                      |  |          | Uncultured eubacterium WCHB1-81<br>16S ribosomal RNA gene, partial<br>sequence                              | Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation |
| #M2-22_27F | 10 <sup>0</sup> Cell |  | Positive | <i>Escherichia coli</i>   |  |

7차 실험(2018년 12월 4일). 환경시료에서 분리한 단일 세균의 유전자 증폭방법으로 앞서 세팅한 MDA 방법이 적합함을 확인하였다. 프리셀 15 m 시료를 한국해양과학기술원 Sony Cell Sorter SH800S를 이용하여 96well plate에 양성 대조군(남극환경시료에서 분리 배양한 세균) 및 음성 대조군과 함께 단일 개체 분리를 시도하였다.



#### 4. 결론

현재 국내에서는 미생물 단일개체 분리를 위한 전용 유세포분석기기가 존재하지 않기 때문에 환경시료로부터 단일개체의 유전체 분석을 위하여 그에 적합한 유세포 분석기기의 확보가 필요하다. BD사의 FACS는 장비의 유지보수와 프로토콜이 다루기가 쉽지 않고, 세포의 drop 정확성을 높이기 위해서는 기기의 유지와 활용을 위하여 전문 인력이 필요한 것으로 사료된다. 반면 Sony사의 SH800S 장비는 custom plate의 장착 및 정확한 위치 조정이 비교적 수월하지만 검출 속도가 오래걸리기 때문에 유전체 증폭을 위한 enzyme이 도포되어 있는 plate를 오랜시간 노출시키게 되어 단일 개체 분리 후 유전체 증폭이 제대로 이루어지지 않는 문제가 발생한다. 따라서 안정적으로 단일세포 분리 후 유전체 분석까지 이루어지기 위해서는 BD사의 FACS 장비가 유리한 것으로 판단되며 기기의 유지보수와 유전체 연구를 위한 전문인력이 필요한 것으로 사료된다.

또한 한국생명과학연구원과 한국해양과학기술원에서 수행한 단일세포 분리연구에서 오염된 시약과 실험 기구, 공기 중에 존재하는 세균이 검출된 것을 확인하였다. 분석기기가 활용되는 두 곳은 별도의 청정 시스템이 갖춰지지 않은 연구실이기 때문에 많은 오염에 노출되어 있는 것으로 사료된다. 단일세포분석은 환경시료로부터 단일 개체를 확보하여 유전체를 분석하는 방법이기 때문에 오염에 매우 민감하다. 따라서 단일 세포 분리 분석기기 활용 시 청정연구실내 설치가 필수적으로 요구된다. 단일세포 분리 분석을 선도적으로 수행하고 있는 미국 비글로 해양연구소의 단일세포 유전체 분석센터 역시 단일세균 분리를 위한 전용 연구실 내 분석장비들을 구축한 것을 확인할 수 있다.

분리된 단일 개체의 유전체 증폭은 초기 MDA 방법의 결과는 MDA가 제대로 이루어지지 않았다. MDA 유무 확인을 위하여 대장균을 대상으로 연속 희석방법을 수행하였으며, 분리된 단일세포의 MDA를 수행하고 있는 미국 JGI의 MDA방법을 적용하였다. 연속 희석방법으로 대장균을 분리한 후 M1방법으로 MDA를 진행하였을 때, 대장균의 DNA가 증폭된 것을 확인하였다. 그러나 단일 세포 분리기기를 사용하여 분리한 단일 세균은 M1 방법으로 MDA를 수행하였을 때, 단일 세균의 DNA가 증폭되지 않았다. MDA M1을 환경시료에 적용하였을 때는 민감도가 떨어지는 것으로 판단된다. 단일세포 분리 후 세포벽을 용해하는 단계를 발전시킨 M2 방법을 세팅하여 연속 희석방법으로 단일 세균을 분리한 후 M2방법으로 MDA를 진행하였을 때 단일 세균의 DNA가 증폭된 것을 확인하였다. 그러나 단일 세포 분리기기를 사용하여 분리한 단일 세균을 M2방법으로 MDA를 수행하였을 때, 양성 대조군으로 사용한 대장균이 아닌 예상되지 않은 세균의 DNA가 증폭되었다. 이것은 단일 세포 분리기기 사용 시 발생된 오염으로 M2방법의 lysozyme 작용 단계가 매우 민감하게 반응하여 나타난 결과로 추측된다. 따라서 오

염이 완벽히 차단된 상태에서 MDA M2 방법으로 단일개체의 유전체 증폭을 수행할 경우에는 분리된 단일 개체의 유전체 증폭이 이루어 질 것으로 사료된다.



## 제 2절 드라이벨리 호수 서식 비배양 후보군 미생물의 생태학적 기능 연구

요약: 남극 드라이벨리 내 존재하는 호수는 평균 5 m 두께의 얼음으로 덮여 있으며, 매우 독특한 생태계를 가지고 있다. 사전 연구를 통하여 드라이벨리 호수의 미생물 군집은 각 호수별로 매우 특이적인 미생물이 서식하고 있음이 밝혀졌으며, 수심에 따라 우점하는 미생물이 상이한 것으로 나타났다. 그중에서 특히 프리셀 호수는 특이적인 서식환경을 가지고 있으며, 다수의 후보군이 우점 미생물로 검출되었다. 환경유전체 분석을 통하여 프리셀 호수의 미생물 군집은 5, 7, 9m는 매우 유사하고, 15m는 확연히 다름을 확인하였으며, 그리고 WM88은 상대빈도가 낮은 반면, JS1 과 그 외 후보 군에 해당되는 미생물이 우점하였다. 형광 현미경과 FACS를 사용하여 프리셀 호수와 바니 호수의 수심별 미생물의 형태 및 사이즈 관찰과 개체수를 확인하였다. 또한 연속 희석 법으로 분리한 프리셀 호수 15m의 미생물에 대하여 중 동정 후 유전체 증폭을 실시하였다. 이때 획득한 유전체는 2014년 미국 비글로 랩에서 수행한 단일세포 분리 및 유전체 증폭 결과와 비교 분석을 수행하였다. 비글로 랩에서 획득한 유전체 증폭 결과물 중 후보군 미생물의 유전체를 선별하여 단일개체 유전체증폭 분석을 수행하였다. 단일개체 유전체 증폭을 통하여 특이적인 환경에서 후보군 미생물의 생태학적 기능을 유추할 수 있을 것으로 판단된다.

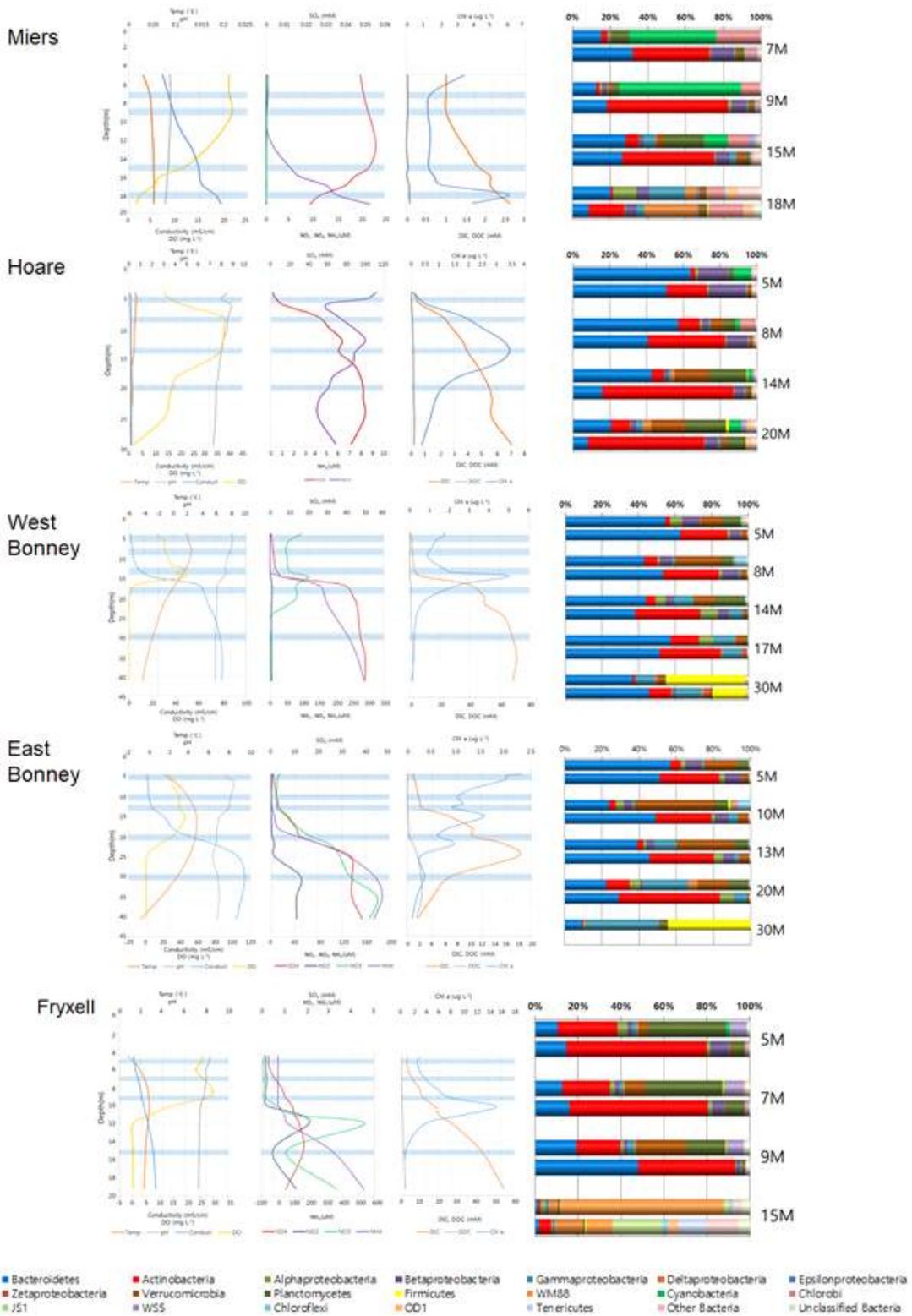
Abstract: The lakes that exist in the Antarctic Dry Valley are covered with an average of 5 m thick ice, and have a very unique ecosystem. Previous studies have shown that the microbial community of Lake Dry Valley can be the source to very unusual microorganisms in each lake, and that the microorganisms that dominate the lake differ depending on the depth of water. Among them, Lake Fryxell has a unique habitat, and a number of bacteria from Candidate phylum have been detected as the major microorganisms. Through the environmental genetic analysis, the microbial community of Lake Fryxell in 5, 7, 9 m depth was found to be very similar each other, but it of 15 m depth is very different to others with WM88 having low relative frequency, while JS1 and other candidate phylum bacteria were dominant. Fluorescence microscopy and FACS are used to identify the form and size of microorganisms by depth in Lake Fryxell and Lake Bonney. In addition, 15 m of Fryxell Lake, separated by serial dilution, was subjected to genome amplification after single cell isolation. The obtained results were compared to the results of single cell isolation and genome amplification conducted in the U.S. Bigelow in 2014. We also performed the single cell genome amplification analysis by screening the Candidate

phylum bacteria from the analysis of Bigelow laboratory. It is believed that the ecological function of Candidate phylum bacteria can be inferred in a specific environment through the bacterial single cell analysis.



## 1. 서론

남극 대륙에서 가장 건조한 지역인 드라이벨리에는 평균 빙하 5m의 두께가 덮여있는 호수가 존재한다. 이 환경에서 유일하게 생명현상을 주도하는 것은 미생물, 특히 세균의 생태학적 역할이 가장 중요하며, 생태계를 유지하는 근간이 되고 있다. 미국은 30년동안 드라이벨리내 호수인 바니(Bonney), 프리셀(Fryxell), 호어(Hoare), 미어스(Miers) 등에 대하여 장기모니터링((MCM-LTER, McMurdo Dry Valley- Long-term Ecological Research)을 지속하고 있다. 미국의 장기모니터링 프로젝트에 참여하여 드라이벨리 내 호수의 미생물 군집과 생지화학적 데이터간의 상호관련성을 연구하였다. 드라이벨리 호수의 미생물 군집은 각 호수별로 매우 특이적인 미생물이 서식하고 있음이 밝혀졌고, 호수의 상층부 미생물의 유사도는 높았으나, 깊어짐에 따라 호수 별로 서식하는 미생물은 매우 다른 것으로 나타났다(Kwon et al., 2017). 그 중 프리셀 호수의 경우는 테일러 벨리 끝자락에 위치하며 왼쪽으로는 캐나다 빙하와 오른쪽으로는 컴온웰스 빙하로부터 흘러들어오는 용빙수가 유일한 유입수이다. 프리셀 호수 15m는 산소가 고갈된 혐기 상태로 화학성층이 뚜렷하게 나타나고 있으며, 황산이 대량 발생하는 매우 독특한 환경이다. 이 수심에서는 현재까지 배양된 미생물을 가지고 있지 않은 후보 문(Phylum)이 56.1~81.8%로 대량 존재하는 것으로 보고되었다. 특히 WM88은 3um에서 걸러진 미생물의 약 80%를 차지하며, JS1(Ca. Atribacter)는 0.2um 이상에서 25%이상 존재하고 있다. 이는 현재까지 알려진 미생물 연구 지역 중 후보문 미생물이 가장 많이 보고된 사례이다. GenBank에서 이 후보 문에 속하는 16S rRNA 유전자를 대상으로 하여 계통도를 분석한 결과, 이들은 심해저에서의 유기물을 분석하는 미생물과 매우 유사할 것으로 예상하였고, 생태계에서의 물질 순환에 매우 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.



단일세포 유전체 분석은 증폭과정에서 발생하는 에러로 인하여 정확도가 떨어

진다. 환경 유전체 분석의 경우 여러 개체에서 유래한 수많은 유전자가 섞여 있어 특정 유전자의 유래에 대한 정확도가 떨어진다. 두 방법의 단점을 보완하여 분석을 수행할 경우, 후보문에 해당되는 미생물의 유전체의 정확도가 상당히 높아 추정에 의거하지 않은 확실한 정보를 획득할 수 있다. 이렇게 얻은 데이터를 대상으로 생태계에서 유의미한 후보문을 찾게 된다면 현재까지 알려지지 않은 후보문에 대한 전세계적인 분포와 정확한 유전체 정보를 파악할 수 있으며, 이는 발견된 미생물의 생존 조건에 대한 정확한 정보를 바탕으로 아직까지 알려지지 않은 미생물의 생태학적 기능을 유추할 수 있다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 드라이벨리 호수 시료 미생물의 현미경 및 Flow Cytometry를 활용한 계수

프릭셀 호수와 바니 호수의 세균 개체수 확인. 단일 세포 분리기기를 보유하고 있는 한국해양과학기술원과 한국생명공학연구원에서 Sony Cell Sorter SH800S와 BD FACS Aria III를 사용하였을 때, 본 과제의 타겟 시료인 프릭셀 호수 수심 15m에서 세균의 개체수가 매우 적게 관찰되었다. 기존에 알려진 바에 의하면 프릭셀 호수의 세균은 1ml에  $10^5$ 개가 존재하는 것으로 밝혀졌기 때문에 이와 상이한 결과를 보여 시료를 검증하고자 우리 연구소에서 보유하고 있는 형광현미경(OLYMPUS)과 Flow Cytometry를 이용하여 프릭셀 호수와 추후 연구를 진행할 바니 호수에 대하여 세균 관찰을 실시하였다.

세균의 현미경 관찰하기 위하여 글리세롤에 보존되어 있는 시료를 0.2  $\mu\text{m}$  millipore membran 필터에 5~10ml 필터한 후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색약을 사용하여 필터된 미생물을 10분간 암실에서 염색하였다. 염색한 필터는 슬라이드 글라스와 커버 글라스로 고정한 후 형광현미경의 UV 하에서 400배 배율로 관찰하였다. 또한 Flow Cytometry는 단일 세포 분리기와 원리가 같으며 세균의 크기와 형태에 따라 구분하여 계수할 수 있는 특징을 가지고 있어, 글리세롤에 보존되어 있는 프릭셀 호수와 바니 호수 시료 1 ml을 SYBR Gold 100X로 암실에서 염색한 후, BD사의 Flow Cytometry를 이용하여 계수하였다.

### 나. 세균의 군집분포 및 유전체 분석

연속 희석법으로 얻어진 단일세균의 16S rRNA와 2017년도 미생물 군집 자료와의 비교 결과. 연속 희석법을 이용한 6차 단일 세포 분리 및 유전체 증폭을 이용해 얻어진 결과를 동정하여 positive control 및 mixed 결과를 제외하고 총 11종의 세균을 얻을 수 있었다. 이렇게 동정된 결과가 실제 프릭셀 호수의 시료에서 나온 것인지 확인하기 위해 미생물 군집 자료와의 비교 분석을 수행하였다. 호수 시료의 미생물 군집 분석 실험은 3.0  $\mu\text{m}$  및 0.2  $\mu\text{m}$  두 종류의 필터를 이용해 세균을 검출한 실험을 2회 반복하여 총 4개의 샘플에 대해 진행하였다. 수행 방법은 Roche 454 NGS 염기서열 분석 장비를 이용해 얻어진 서열을 mothur v1.40.1 프로그램 및 EzTaxon-e (Kim et al., 2012) 미생물 데이터베이스에 대해 동정하여 전체 군집 구조를 얻고 이 가운데 단일 세포 분리 및 유전체 증폭에서 동정된 세균이 존재하는지 BLAST로 해당 염기서열을 분석하였다. 연속 희석법으로 획득한 프릭셀 15 m 시료의 단일세균의 16S rRNA결과는 미국 비글로 랩에서 2014년도에 수행한 단일세포분리 및 유전체 증폭 후 16S rRNA 동정결과와 비교분석을 진행하였다.

프릭셀 호수 단일세포 유전체 (SAG, single amplified genome) 분석. 2014년 비글로 랩에서 프릭셀 호수 15 m 시료에 대하여 단일 세포 분리 및 유전체 증폭을 수행하였다. 분리된 단일세포의 16S rRNA 동정 결과, 768 개의 분리된 단일세포 중 총 58 개에 대하여 유전체 증폭(MDA) 결과를 획득하였다. 유전체 증폭(MDA)은 Qiagen REPLI-g Mini Kit (Cat. No. 150023)을 이용하여 수행하였으며 과정 중에 lysis buffer는 Gram-positive bacteria에 준하여 최적화하였다. (400 mM KOH, 10 mM EDTA > 50°C 10 min) 이상과 같이 단일세포의 형태로 획득하여 유전체가 증폭된 총 58개의 세균 중 현재까지 보고되지 않은 후보문(candidate phylum) 17개를 선정하여 정제 및 정량 후 Illumina MiSeq을 이용한 염기분석을 위해 라이브러리 제작에 이용되었다.

Table 6. Identification results after single cell separation and genome amplification of the Fryxell 15 m sample

| Query                 | Identity | Phylum         | Genus               |
|-----------------------|----------|----------------|---------------------|
| AG-174_A15+AF-253_H06 | 99.8     | JS1            | JS1_g               |
| AG-174_B13+AF-253_A07 | 91.4     | Tenericutes    | GU196243_g          |
| AG-174_C06+AF-253_B07 | 87.8     | Tenericutes    | CU917754_g          |
| AG-174_C07+AF-253_C07 | 97.1     | Chloroflexi    | Pelolinea           |
| AG-174_C08+AF-253_D07 | 99.7     | JS1            | JS1_g               |
| AG-174_C16+AF-253_E07 | 91.6     | OD1            | AB177203_g          |
| AG-174_D21+AF-253_F07 | 94.1     | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-174_E20+AF-253_G07 | 97.1     | Proteobacteria | Desulfobacula       |
| AG-174_E22+AF-253_H07 | 97.1     | Chloroflexi    | Pelolinea           |
| AG-174_F14+AF-253_A08 | 98.2     | Chloroflexi    | GU553783_g          |
| AG-174_G17+AF-253_B08 | 99.6     | JS1            | JS1_g               |
| AG-174_I18+AF-253_C08 | 98.4     | Bacteroidetes  | FJ437992_g          |
| AG-174_J06+AF-253_D08 | 87.8     | Tenericutes    | CU917754_g          |
| AG-174_J20+AF-253_E08 | 89.1     | SAR406         | EU266898_g          |
| AG-174_K07+AF-253_F08 | 99.8     | JS1            | JS1_g               |
| AG-174_L13+AF-253_G08 | 94.2     | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-174_N04+AF-253_H08 | 93.6     | Cloacamonas_p  | EF031090_g          |
| AG-174_O13+AF-253_A09 | 99.7     | JS1            | JS1_g               |
| AG-174_O16+AF-253_B09 | 88.2     | Firmicutes     | GU303975_g          |
| AG-174_P04+AF-253_C09 | 88.7     | Tenericutes    | GU196243_g          |
| AG-174_P10+AF-253_D09 | 96.7     | Tenericutes    | Acholeplasma        |
| AG-174_P18+AF-253_E09 | 94.2     | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-174_P19+AF-253_F09 | 99.1     | Proteobacteria | AM745130_g          |
| AG-173_A06+AF-253_D02 | 99.8     | JS1            | JS1_g               |
| AG-173_A16+AF-253_E02 | 94.2     | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-173_A18+AF-253_F02 | 83.4     | OP3            | AB015559_g          |
| AG-173_A19+AF-253_G02 | 97.7     | JS1            | JS1_g               |
| AG-173_B13+AF-253_H02 | 99       | Proteobacteria | Desulfobacterium_g1 |
| AG-173_B20+AF-253_A03 | 98.4     | Proteobacteria | Smithella           |

|                       |      |                |              |
|-----------------------|------|----------------|--------------|
| AG-173_C04+AF-253_B03 | 100  | JS1            | JS1_g        |
| AG-173_C08+AF-253_C03 | 98.4 | Chloroflexi    | GU553783_g   |
| AG-173_D08+AF-253_D03 | 98   | Actinobacteria | DQ394962_g   |
| AG-173_D17+AF-253_E03 | 94.1 | SAR406         | AF275926_g   |
| AG-173_E11+AF-253_F03 | 97.2 | Actinobacteria | Planktophila |
| AG-173_E19+AF-253_G03 | 87.8 | Tenericutes    | CU917754_g   |
| AG-173_G08+AF-253_H03 | 97.5 | JS1            | JS1_g        |
| AG-173_G14+AF-253_A04 | 97.2 | CU922841_p     | CU922841_g   |
| AG-173_G23+AF-253_B04 | 93   | OP8            | AQSP_g       |
| AG-173_I19+AF-253_C04 | 94.1 | SAR406         | AF275926_g   |
| AG-173_J02+AF-253_D04 | 99.1 | Proteobacteria | AM745130_g   |
| AG-173_J03+AF-253_E04 | 98.7 | Actinobacteria | EU266869_g   |
| AG-173_J16+AF-253_F04 | 87.8 | Tenericutes    | CU917754_g   |
| AG-173_J17+AF-253_G04 | 96.7 | Chloroflexi    | AY548942_g   |
| AG-173_K03+AF-253_H04 | 94.8 | Firmicutes     | GU083673_g   |
| AG-173_K05+AF-253_A05 | 93.6 | Cloacamonas_p  | EF031090_g   |
| AG-173_K16+AF-253_B05 | 96.9 | Tenericutes    | Acholeplasma |
| AG-173_K23+AF-253_C05 | 98.7 | Actinobacteria | EU266869_g   |
| AG-173_L06+AF-253_E05 | 80.8 | DQ404758_p     | DQ404758_g   |
| AG-173_L13+AF-253_F05 | 93.6 | Cloacamonas_p  | EF031090_g   |
| AG-173_L17+AF-253_G05 | 80.8 | DQ404758_p     | DQ404758_g   |
| AG-173_L21+AF-253_H05 | 96.7 | Tenericutes    | Acholeplasma |
| AG-173_M03+AF-253_A06 | 98.7 | Proteobacteria | Smithella    |
| AG-173_N04+AF-253_B06 | 87.8 | Tenericutes    | CU917754_g   |
| AG-173_N06+AF-253_C06 | 98.7 | Proteobacteria | Smithella    |
| AG-173_N19+AF-253_D06 | 99.1 | Actinobacteria | EU801210_g   |
| AG-173_N23+AF-253_E06 | 98.4 | Proteobacteria | EU016437_g   |
| AG-173_O02+AF-253_F06 | 98.7 | Proteobacteria | Smithella    |
| AG-173_O04+AF-253_G06 | 98.7 | Proteobacteria | Smithella    |

증폭 및 정량된 DNA는 샘플 당 100 ng을 시작량으로 하여 NEBNext® Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit for Illumina (Cat. No. E7805S)를 이용해 라이브러리를 제작하였다. 대부분의 과정은 kit의 내용대로 수행하였으나 PCR을 이용한 최종 DNA 증폭 과정에서 샘플 간 편차를 방지하기 위해 20 cycle로 정하였다. 이 경우 PCR duplicates이 생기는 단점이 있으나 최종 라이브러리 결과물이 충분히 얻어지는 장점이 있다. 제작된 라이브러리는 pooling 후 극지연구소가 보유하고 있는 Illumina MiSeq을 통해 차세대 염기서열 분석을 수행하였다.

Table 7. List of single cell bacteria with full analysis

| Query                 | Identity | Phylum | Genus      | Bin ID |
|-----------------------|----------|--------|------------|--------|
| AG-174_C16+AF-253_E07 | 91.6     | OD1    | AB177203_g | 4      |

|                       |      |               |              |    |
|-----------------------|------|---------------|--------------|----|
| AG-174_G17+AF-253_B08 | 99.6 | JS1           | JS1_g        | 6  |
| AG-174_J20+AF-253_E08 | 89.1 | SAR406        | EU266898_g   | 18 |
| AG-174_L13+AF-253_G08 | 94.2 | SAR406        | AF275926_g   | 8  |
| AG-174_P10+AF-253_D09 | 96.7 | Tenericutes   | Acholeplasma | 9  |
| AG-173_A06+AF-253_D02 | 99.8 | JS1           | JS1_g        | 11 |
| AG-173_A18+AF-253_F02 | 83.4 | OP3           | AB015559_g   | 10 |
| AG-173_A19+AF-253_G02 | 97.7 | JS1           | JS1_g        | 13 |
| AG-173_D17+AF-253_E03 | 94.1 | SAR406        | AF275926_g   | 5  |
| AG-173_E19+AF-253_G03 | 87.8 | Tenericutes   | CU917754_g   | 14 |
| AG-173_G08+AF-253_H03 | 97.5 | JS1           | JS1_g        | 12 |
| AG-173_G23+AF-253_B04 | 93   | OP8           | AQSP_g       | 15 |
| AG-173_K05+AF-253_A05 | 93.6 | Cloacamonas_p | EF031090_g   | 16 |
| AG-173_N04+AF-253_B06 | 87.8 | Tenericutes   | CU917754_g   | 17 |

총 17개의 단일 세균의 유전체 증폭(MDA, Multiple displacement amplification)된 결과에 대하여 차세대 염기서열 분석 중 라이브러리 제작이 되지 않은 3개를 제외한 총 14개 샘플의 염기서열을 획득하였다. 해독된 염기서열은 Trimmomatic v.0.36 프로그램을 이용하여 quality-trimming 및 adapter-trimming을 수행하였으며, 그 결과물인 cleaned raw data는 Spades v3.11.1 프로그램을 이용하여 contig 형성을 시도하였다. 과정 중 Spades 프로그램의 parameter는 single-cell MDA임에 주의하여 -sc 옵션을 적용하여 수행하였으며 그 결과 얻어진 최종 contig들은 CheckM v1.1.1 (<https://genome.cshlp.org/content/257/1043>) 프로그램을 이용하여 각 결과에서 일반적인 세균이 보편적으로 가지고 있는 single copy 유전자가 얼마나 발견되는지 탐색하고 그 비율에 비례하도록 전체 유전체 가운데 MDA 과정에서 증폭 및 복원된 부분의 비율을 예측하였다.

Table 8. Genome analysis using CheckM

| Bin Id | Marker       | lineage   | # genomes | # markers | #marker set | 0   | 1  | 2  | 3 | 4 | 5+ | Completeness | Contamination | Strain heterogeneity |
|--------|--------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----|----|----|---|---|----|--------------|---------------|----------------------|
| 4      | k_Bacteria   | (UID203)  | 5449      | 104       | 58          | 30  | 49 | 23 | 2 | 0 | 0  | 60.71        | 9.87          | 3.45                 |
| 6      | p_Firmicutes | (UID203)  | 930       | 213       | 118         | 140 | 66 | 7  | 0 | 0 | 0  | 33.05        | 1.61          | 71.43                |
| 12     | k_Bacteria   | (UID238)  | 2248      | 125       | 78          | 68  | 56 | 1  | 0 | 0 | 0  | 29.17        | 0.12          | 0.00                 |
| 9      | k_Bacteria   | (UID203)  | 5449      | 104       | 58          | 87  | 16 | 1  | 0 | 0 | 0  | 21.16        | 0.16          | 0.00                 |
| 8      | k_Bacteria   | (UID2495) | 2993      | 147       | 91          | 105 | 39 | 3  | 0 | 0 | 0  | 17.52        | 0.23          | 66.67                |
| 10     | k_Bacteria   | (UID203)  | 5449      | 104       | 58          | 84  | 18 | 2  | 0 | 0 | 0  | 10.82        | 0.31          | 50.00                |
| 5      | k_Bacteria   | (UID203)  | 5449      | 104       | 58          | 95  | 8  | 1  | 0 | 0 | 0  | 10.66        | 1.72          | 100.00               |
| 14     | k_Bacteria   | (UID2565) | 2921      | 152       | 93          | 80  | 69 | 3  | 0 | 0 | 0  | 31.12        | 1.27          | 66.67                |
| 17     | k_Bacteria   | (UID2495) | 2993      | 143       | 89          | 96  | 45 | 2  | 0 | 0 | 0  | 30.58        | 2.25          | 100.00               |

|    |            |          |      |     |    |    |    |   |   |   |   |       |      |        |
|----|------------|----------|------|-----|----|----|----|---|---|---|---|-------|------|--------|
| 13 | k_Bacteria | (UID209) | 5443 | 105 | 59 | 77 | 24 | 4 | 0 | 0 | 0 | 19.26 | 2.16 | 0.00   |
| 16 | k_Bacteria | (UID203) | 5449 | 104 | 58 | 94 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10.82 | 0.00 | 0.00   |
| 18 | k_Bacteria | (UID203) | 5449 | 104 | 58 | 91 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.55  | 0.00 | 0.00   |
| 15 | k_Bacteria | (UID203) | 5449 | 100 | 55 | 94 | 5  | 1 | 0 | 0 | 0 | 4.30  | 1.82 | 100.00 |
| 11 | root       | (UID1)   | 5656 | 56  | 24 | 56 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00  | 0.00 | 0.00   |



### 3. 결과 및 토의

#### 가. 드라이벨리 호수 시료 미생물의 현미경 및 Flow Cytometry를 활용한 계수

현미경을 이용한 프리셀 호수와 바니 호수의 세균 개체수 확인. 프리셀 호수와 바니 호수 모두 아이스 아래 상층은 부유하는 형태의 크기가 작은 세균이 관찰되며 개체수는 이미 알려진 바와 같이  $10^5$ cell/ml 이상의 세균이 관찰되었다. 그러나 심층으로 내려갈수록 세균과 식물플랑크톤과 혼재하여 존재하며 심층은 생물이 아닌 불순물이 많아서 세균만 계수하기에는 어려움이 있다.

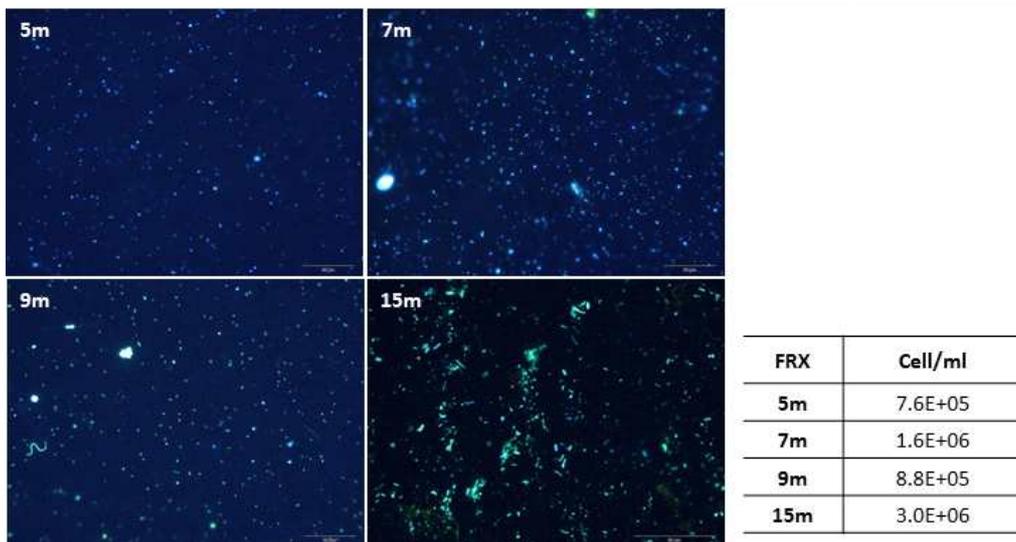


Figure 20. Microscopic observations of Lake Fryxell sample

본 과제의 타겟 시료인 프리셀 호수의 15 m 시료에서는 상층의 부유 세균보다 크기가 훨씬 큰 세균들이 관찰되었으며 개체수는  $3 \times 10^6$ cell/ml로 측정되었다. 바니 호수와 프리셀 호수의 세균 개체수의 차이는 크게 나타나지 않았다. West 바니 호수와 East 바니 호수는 모든 수심에서 세균수는 큰 차이가 나지 않았으며, 평균 세균수는 각각  $4.6 \times 10^5$ cell/ml,  $4.4 \times 10^5$ cell/ml 로 나타났다.

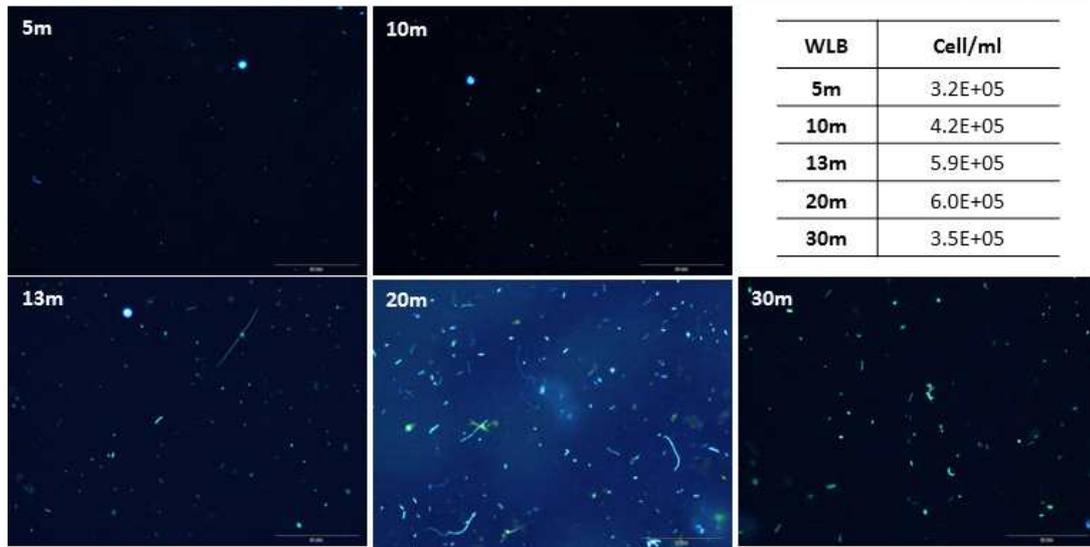


Figure 21. Microscopic observations of Lake West Bonney sample

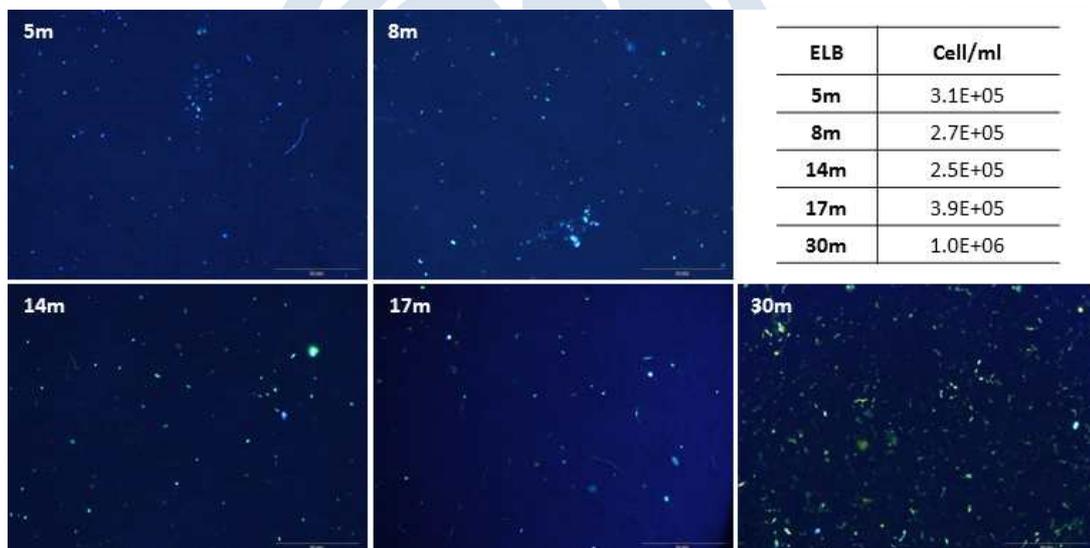


Figure 22. Microscopic observations of Lake East Bonney sample

Flow Cytometry를 이용한 프리셀 호수와 바니 호수의 세균 개체수 확인. 프리셀 호수는 5 m, 7 m 그리고 9 m의 시료에 존재하는 세균은 비슷한 경향으로 나타났으며, 15 m는 상층의 세균과는 확연하게 다른 형태의 세균이 분포하는 것으로 나타났다 (Figure 23).

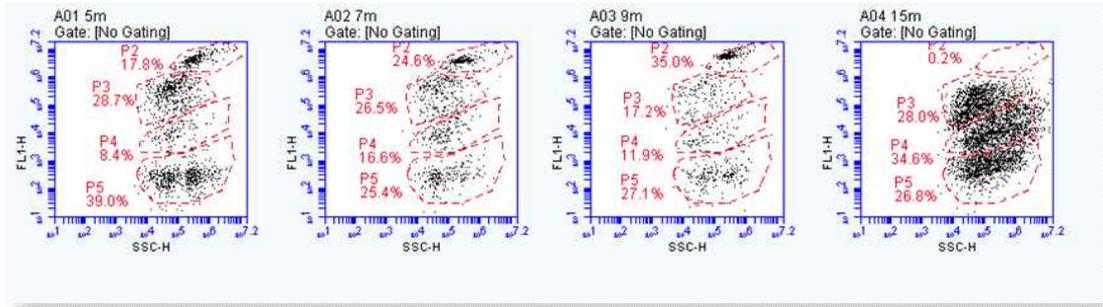


Figure 23. Flow Cytometry Observation of Lake Fryxell sample

현미경으로 관찰된 바와 같이 사이즈가 큰 세균 또는 aggregate 세균이 존재하는 것으로 사료 된다. 세균의 개체수는 상층인 5 m는  $1.4 \times 10^4$  cell/ml로 측정되었으며, 15 m는  $3.8 \times 10^4$  cell/ml로 현미경으로 계수한 결과 값보다 훨씬 적게 측정되었다(표 6).

Table 9. Bacterial counts of Lake Fryxell sample by using flow cytometry

| FRX | Gate | Count/102 $\mu$ L | Events / $\mu$ L |
|-----|------|-------------------|------------------|
| 5m  | All  | 1,440             | 14               |
|     | P2   | 256               | 2                |
|     | P3   | 413               | 4                |
|     | P4   | 121               | 1                |
|     | P5   | 561               | 5                |
| 7m  | All  | 893               | 9                |
|     | P2   | 220               | 2                |
|     | P3   | 237               | 2                |
|     | P4   | 148               | 1                |
|     | P5   | 227               | 2                |
| 9m  | All  | 763               | 7                |
|     | P2   | 267               | 3                |
|     | P3   | 131               | 1                |
|     | P4   | 91                | 1                |
|     | P5   | 207               | 2                |
| 15m | All  | 3940              | 38               |
|     | P2   | 6                 | 0                |
|     | P3   | 1105              | 11               |
|     | P4   | 1362              | 13               |
|     | P5   | 1056              | 10               |

West 바니 호수의 5 m, 10 m와 13 m에서 존재하는 세균은 비슷한 경향으로 나타났으나, 20 m와 30 m에서는 완전히 다른 세균이 분포하는 것으로 나타났다. East

바니 호수 역시 상층인 5 m와 8 m에서는 현미경 관찰에서 보인바와 같이 작은 크기의 부유세균으로 추정되는 그룹의 세균이 구분되어 나타났으나, 심층인 30 m에서는 전혀 관찰되지 않았다.

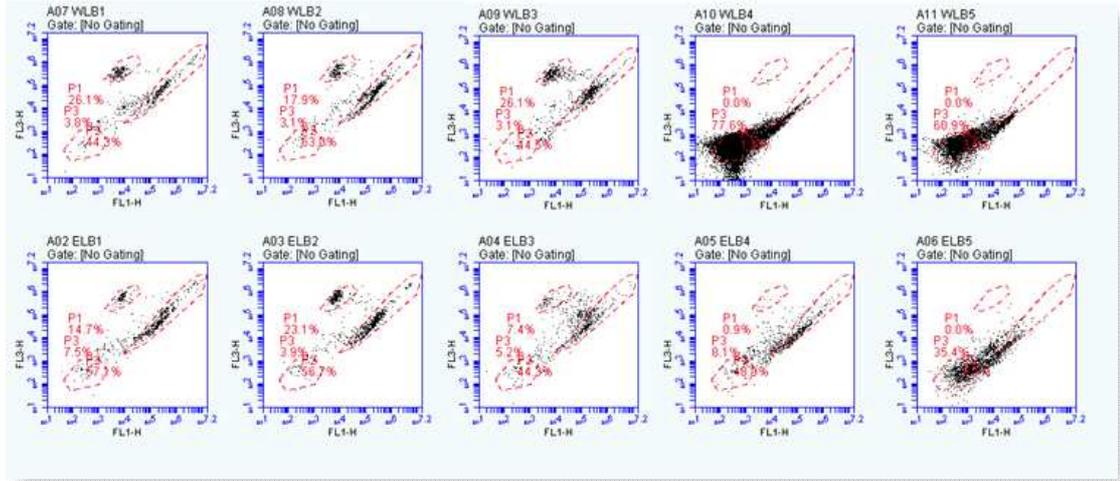


Figure 24. Flow cytometry observation result of Lake Bonney sample. (up: Lake West Bonney, down: Lake East Bonney)

Table 10. Bacterial counts of Lake Bonney sample by using flow cytometry

| WLB | Gate | Count /102 $\mu$ L | Events / $\mu$ L | ELB | Gate | Count /102 $\mu$ L | Events / $\mu$ L |
|-----|------|--------------------|------------------|-----|------|--------------------|------------------|
| 5m  | All  | 528                | 5                | 5m  | All  | 590                | 6                |
|     | P1   | 138                | 1                |     | P1   | 87                 | 1                |
|     | P2   | 234                | 2                |     | P2   | 337                | 3                |
|     | P3   | 20                 | 0                |     | P3   | 44                 | 0                |
| 10m | All  | 744                | 7                | 8m  | All  | 793                | 8                |
|     | P1   | 133                | 1                |     | P1   | 183                | 2                |
|     | P2   | 469                | 5                |     | P2   | 450                | 4                |
|     | P3   | 23                 | 0                |     | P3   | 31                 | 0                |
| 13m | All  | 708                | 7                | 14m | All  | 635                | 6                |
|     | P1   | 185                | 2                |     | P1   | 47                 | 0                |
|     | P2   | 315                | 3                |     | P2   | 281                | 3                |
|     | P3   | 22                 | 0                |     | P3   | 33                 | 0                |
| 20m | All  | 18905              | 184              | 17m | All  | 652                | 6                |
|     | P1   | 2                  | 0                |     | P1   | 6                  | 0                |
|     | P2   | 264                | 3                |     | P2   | 319                | 3                |
|     | P3   | 14677              | 142              |     | P3   | 53                 | 1                |
| 30m | All  | 4593               | 45               | 30m | All  | 1566               | 15               |
|     | P1   | 2                  | 0                |     | P1   | 0                  | 0                |
|     | P2   | 161                | 2                |     | P2   | 142                | 1                |
|     | P3   | 2796               | 27               |     | P3   | 554                | 5                |

현미경관찰 결과와 개체수 계수 경향성은 비슷하게 나타났다. 그러나 물질의 분포 사이즈를 선택하여 계수하기 때문에 세균과 그외 미생물 또는 비생물과의 구분이 어려웠다.

#### 나. 세균 군집구조자료 획득

연속 희석법(6차 실험) 결과로 얻어진 단일세균의 16S rRNA와 2017년도 미생물 군집 자료와의 비교 결과, 연속 희석법에 의한 유전체 증폭 후 16S rRNA 동정 결과 총 11종의 세균 가운데 9종이 호수 시료에 대한 미생물 군집 염기서열 4샘플에서 모두 확인되었으며 발견된 비율 역시 어느 정도 군집 구조를 반영하는 것으로 나타났다. 9종의 세균 가운데에는 난배양성 candidate phylum으로 알려진 JS1이 2종 포함되어 있었으며, 이외에 *Lentisphaerae*, *Chloroflexi*, *Deltaproteobacteria*, *Actinobacteria*에 속하는 종이 동정되었다. 이러한 결과에서 유추해볼 때 연속 희석법을 이용한 6차 단일 세포 분리 및 유전체 증폭 과정은 프리셀 호수 시료의 군집에서 분리된 단일 세포가 정상적으로 증폭된 것으로 판단된다.

Table 11. Identification results for 16S rRNA gene from single cell bacteria obtained by serial dilution method. Those obtained from the microbial community data were marked in blue.

|            | Dilution value | Total score | Query cover | Identity | Accession  | note  | EzTaxon Phylum      | EzTaxon Genus                 |
|------------|----------------|-------------|-------------|----------|------------|---|---------------------|-------------------------------|
| #M1-3_27F  |                | 2013        | 100%        | 99%      | KP862894.1 | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                            | JS1                 | JS1_g                         |
| #M1-4_27F  | 102/ul         | 1631        | 100%        | 98%      | KP862892.1 | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                            | Alphaproteobacteria | Rhodobacteraceae_unclassified |
| #M1-5_27F  |                | 1181        | 100%        | 93%      | CU926480.1 | Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge                                | Lentisphaerae       | GU112195_g                    |
| #M1-8_27F  | 101/ul         | 1286        | 100%        | 99%      | KP862892.1 | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                            | Alphaproteobacteria | Rhodobacteraceae_unclassified |
| #M1-9_27F  | 101/ul         | 1629        | 99%         | 95%      | KC492878.1 | SUP05 dominates the gammaproteobacterial sulfur oxidizer assemblages in pelagic redoxclines of the central Baltic and Black | Lentisphaerae       | GQ259262_g_unclassified       |
| #M2-14_27F | 102/ul         | 1572        | 100%        | 97%      | AB355084.1 | Molecular genetic monitoring of bacterial communities in Manzala lake,  | Chloroflexi         | AY548942_g_unclassified       |

|            |        |      |      |     |            |   |                     |                     |
|------------|--------|------|------|-----|------------|---|---------------------|---------------------|
|            |        |      |      |     |            | Egypt, based on 16S rRNA gene analysis  |                     | d                   |
| #M2-15_27F |        | 1663 | 100% | 95% | EU050937.1 | Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis  | Lentisphaerae       | EU050937_g          |
| #M2-16_27F |        | 1925 | 100% | 99% | KR824968.1 | Gamma proteobacteria dominate dark carbon fixation in marine sediments  | Deltaproteobacteria | Desulfobacterium_g1 |
| #M2-19_27F |        | 1607 | 100% | 99% | HF677541.1 | Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacan, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers | Escherichia         | coli                |
| #M2-20_27F | 101/ul | 1711 | 100% | 99% | KP862894.1 | Bacterial Diversity in Permanently Ice-covered Lakes of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica                                    | JS1                 | JS1_g               |
| #M2-21_27F |        | 1803 | 100% | 99% | AF050572.1 | Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation              | Actinobacteria      | AF050572_g          |

Table 12. Microbial community result of 16S rRNA gene of single cell bacteria obtained by serial dilution method. The corresponding phylum to the result of 16S rRNA identification was marked in blue.

| Phylum                | Frax15_L1_02 | Frax15_L1_30 | Frax15_L2_02 | Frax15_L2_30 |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AY345499_p            | 0            | 2            | 0            | 0            |
| Acidobacteria         | 0            | 0            | 0            | 4            |
| Actinobacteria        | 181          | 21           | 33           | 172          |
| Armatimonadetes       | 0            | 0            | 0            | 19           |
| BRC1                  | 0            | 0            | 0            | 6            |
| Bacteria_unclassified | 306          | 35           | 48           | 208          |
| Bacteroidetes         | 34           | 16           | 8            | 78           |
| CU922841_p            | 56           | 41           | 32           | 68           |
| Caldiserica           | 3            | 0            | 0            | 10           |
| Caldithrix_p          | 2            | 0            | 0            | 0            |
| Chlorobi              | 2            | 0            | 0            | 0            |
| Chloroflexi           | 51           | 7            | 14           | 148          |
| Cloacamonas_p         | 105          | 0            | 22           | 129          |
| Cyanobacteria         | 0            | 0            | 0            | 6            |
| Elusimicrobia         | 10           | 0            | 0            | 0            |
| Firmicutes            | 23           | 17           | 7            | 58           |

|                 |     |      |     |      |
|-----------------|-----|------|-----|------|
| GN02            | 16  | 0    | 5   | 9    |
| GN04            | 0   | 0    | 0   | 6    |
| GU363019_p      | 0   | 0    | 0   | 2    |
| GU454958_p      | 0   | 0    | 0   | 3    |
| JS1             | 869 | 32   | 221 | 483  |
| Lentisphaerae   | 12  | 4    | 7   | 86   |
| NKB19           | 0   | 0    | 0   | 2    |
| OD1             | 20  | 14   | 51  | 17   |
| OP1             | 0   | 0    | 0   | 2    |
| OP11            | 42  | 7    | 9   | 15   |
| OP3             | 35  | 13   | 7   | 12   |
| OP8             | 8   | 0    | 2   | 30   |
| Planctomycetes  | 21  | 24   | 0   | 109  |
| Proteobacteria  | 366 | 120  | 64  | 728  |
| SAR406          | 174 | 4    | 83  | 18   |
| SR1             | 17  | 4    | 23  | 55   |
| Spirochaetes    | 16  | 0    | 0   | 3    |
| TDNP            | 0   | 0    | 0   | 4    |
| TM6             | 7   | 0    | 23  | 5    |
| TM7             | 0   | 0    | 0   | 4    |
| Tenericutes     | 132 | 9    | 59  | 35   |
| Verrucomicrobia | 0   | 0    | 0   | 28   |
| WM88            | 440 | 1349 | 59  | 3784 |
| WS1             | 2   | 0    | 0   | 60   |
| WS3             | 2   | 0    | 0   | 9    |
| WS5             | 5   | 0    | 2   | 3    |

## 극지연구소

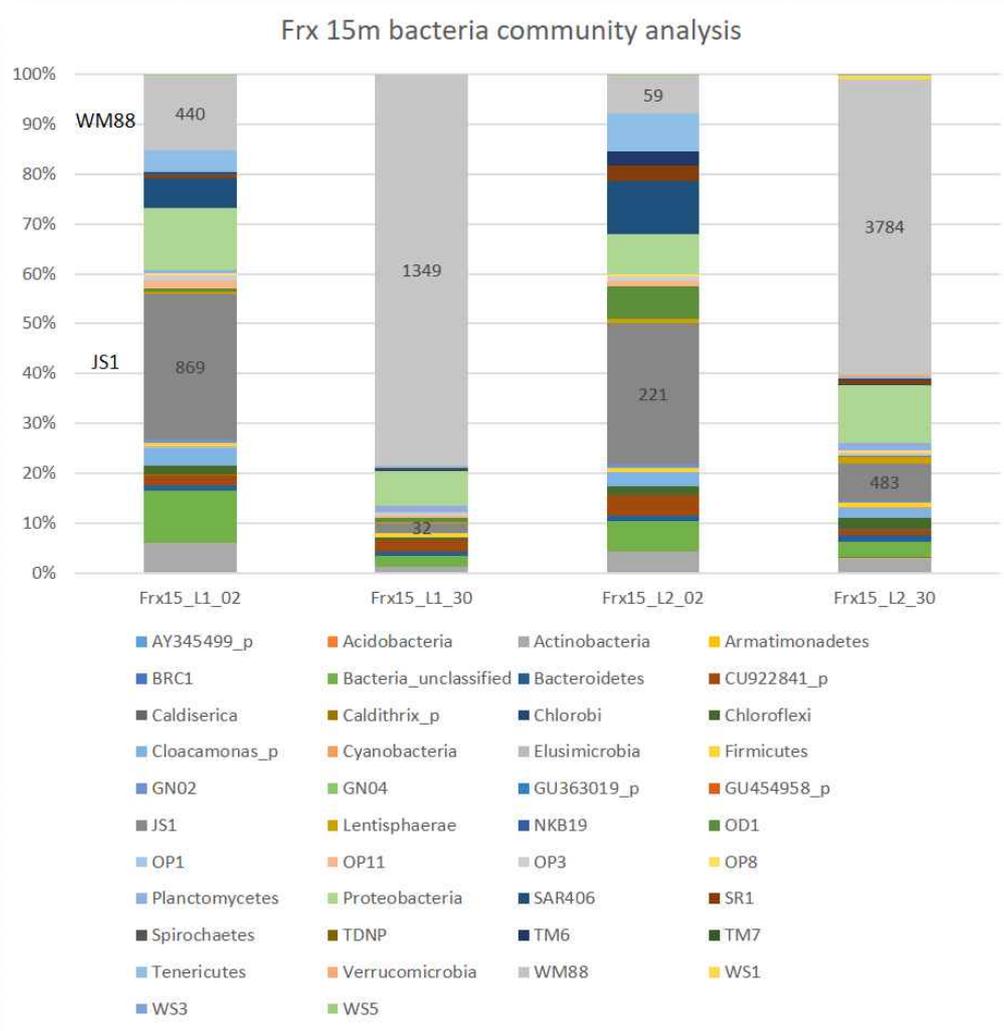


Figure 25. Microbial community analysis result of 4 samples in the Fryxell 15 m sample

**프릭셀 호수 15m 시료의 단일 세포 분리 및 유전체 증폭 후 16S rRNA 동정 결과.** 2014년도에 비글로 랩에서 수행한 프릭셀 15 m 시료의 단일 세포 분리 및 유전체 증폭 후 16S rRNA 동정 결과, 768 개의 분리 세균 가운데 총 58종에 대해 결과를 얻을 수 있었고 그 내용은 표와 같다. 연속 희석법 결과에서 증폭되어 동정된 세균들이 모두 포함되어 있었으며 군집 구조 결과에서는 기존 결과와 어느 정도 차이가 있으나 JS1, *Proteobacteria* 등의 문(phyla)에 대해서는 비슷한 비율로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 16S rRNA를 대상으로 하는 PCR-based sequencing이 종에 따라 어느 정도 증폭 편향을 가지기 때문인 것으로 여겨진다. 연속 희석법으로 분리된 결과에서 증폭되어 동정된 세균들이 이 결과에서도 70% 이상 발견되는 것으로 유추하여 볼 때 모든 실험에서 프릭셀 호수 시료의 군집에서 분리된 단일 세포가 정상적으로 증폭된 것으로 보인다.

Table 13. 16S rRNA gene identification result from the single cell isolation and genome amplification of the Fryxell 15 m sample

| query                 | identity | evalue | Phylum         | Genus         |
|-----------------------|----------|--------|----------------|---------------|
| AG-174_A15+AF-253_H06 | 99.8     | 0      | JS1            | JS1_g         |
| AG-174_B13+AF-253_A07 | 91.4     | 0      | Tenericutes    | GU196243_g    |
| AG-174_C06+AF-253_B07 | 87.8     | 0      | Tenericutes    | CU917754_g    |
| AG-174_C07+AF-253_C07 | 97.1     | 0      | Chloroflexi    | Pelolinea     |
| AG-174_C08+AF-253_D07 | 99.7     | 0      | JS1            | JS1_g         |
| AG-174_C16+AF-253_E07 | 91.6     | 0      | OD1            | AB177203_g    |
| AG-174_D21+AF-253_F07 | 94.1     | 0      | SAR406         | AF275926_g    |
| AG-174_E20+AF-253_G07 | 97.1     | 0      | Proteobacteria | Desulfobacula |
| AG-174_E22+AF-253_H07 | 97.1     | 0      | Chloroflexi    | Pelolinea     |
| AG-174_F14+AF-253_A08 | 98.2     | 0      | Chloroflexi    | GU553783_g    |
| AG-174_G17+AF-253_B08 | 99.6     | 0      | JS1            | JS1_g         |
| AG-174_I18+AF-253_C08 | 98.4     | 0      | Bacteroidetes  | FJ437992_g    |
| AG-174_J06+AF-253_D08 | 87.8     | 0      | Tenericutes    | CU917754_g    |
| AG-174_J20+AF-253_E08 | 89.1     | 0      | SAR406         | EU266898_g    |
| AG-174_K07+AF-253_F08 | 99.8     | 0      | JS1            | JS1_g         |
| AG-174_L13+AF-253_G08 | 94.2     | 0      | SAR406         | AF275926_g    |
| AG-174_N04+AF-253_H08 | 93.6     | 0      | Cloacamonas_p  | EF031090_g    |
| AG-174_O13+AF-253_A09 | 99.7     | 0      | JS1            | JS1_g         |
| AG-174_O16+AF-253_B09 | 88.2     | 0      | Firmicutes     | GU303975_g    |
| AG-174_P04+AF-253_C09 | 88.7     | 0      | Tenericutes    | GU196243_g    |
| AG-174_P10+AF-253_D09 | 96.7     | 0      | Tenericutes    | Acholeplasma  |
| AG-174_P18+AF-253_E09 | 94.2     | 0      | SAR406         | AF275926_g    |
| AG-174_P19+AF-253_F09 | 99.1     | 0      | Proteobacteria | AM745130_g    |
| AG-173_A06+AF-253_D02 | 99.8     | 0      | JS1            | JS1_g         |

|                       |       |           |                |                     |
|-----------------------|-------|-----------|----------------|---------------------|
| AG-173_A16+AF-253_E02 | 94.2  | 0         | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-173_A18+AF-253_F02 | 83.4  | 0         | OP3            | AB015559_g          |
| AG-173_A19+AF-253_G02 | 97.7  | 0         | JS1            | JS1_g               |
| AG-173_B13+AF-253_H02 | 99.0  | 0         | Proteobacteria | Desulfobacterium_g1 |
| AG-173_B20+AF-253_A03 | 98.4  | 0         | Proteobacteria | Smithella           |
| AG-173_C04+AF-253_B03 | 100.0 | 0         | JS1            | JS1_g               |
| AG-173_C08+AF-253_C03 | 98.4  | 0         | Chloroflexi    | GU553783_g          |
| AG-173_D08+AF-253_D03 | 98.0  | 0         | Actinobacteria | DQ394962_g          |
| AG-173_D17+AF-253_E03 | 94.1  | 0         | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-173_E11+AF-253_F03 | 97.2  | 0         | Actinobacteria | Planktophila        |
| AG-173_E19+AF-253_G03 | 87.8  | 0         | Tenericutes    | CU917754_g          |
| AG-173_G08+AF-253_H03 | 97.5  | 0         | JS1            | JS1_g               |
| AG-173_G14+AF-253_A04 | 97.2  | 0         | CU922841_p     | CU922841_g          |
| AG-173_G23+AF-253_B04 | 93.0  | 0         | OP8            | AQSP_g              |
| AG-173_I19+AF-253_C04 | 94.1  | 0         | SAR406         | AF275926_g          |
| AG-173_J02+AF-253_D04 | 99.1  | 0         | Proteobacteria | AM745130_g          |
| AG-173_J03+AF-253_E04 | 98.7  | 0         | Actinobacteria | EU266869_g          |
| AG-173_J16+AF-253_F04 | 87.8  | 0         | Tenericutes    | CU917754_g          |
| AG-173_J17+AF-253_G04 | 96.7  | 0         | Chloroflexi    | AY548942_g          |
| AG-173_K03+AF-253_H04 | 94.8  | 0         | Firmicutes     | GU083673_g          |
| AG-173_K05+AF-253_A05 | 93.6  | 0         | Cloacamonas_p  | EF031090_g          |
| AG-173_K16+AF-253_B05 | 96.9  | 0         | Tenericutes    | Acholeplasma        |
| AG-173_K23+AF-253_C05 | 98.7  | 0         | Actinobacteria | EU266869_g          |
| AG-173_L06+AF-253_E05 | 80.8  | 2.69E-140 | DQ404758_p     | DQ404758_g          |
| AG-173_L13+AF-253_F05 | 93.6  | 0         | Cloacamonas_p  | EF031090_g          |
| AG-173_L17+AF-253_G05 | 80.8  | 7.50E-141 | DQ404758_p     | DQ404758_g          |
| AG-173_L21+AF-253_H05 | 96.7  | 0         | Tenericutes    | Acholeplasma        |
| AG-173_M03+AF-253_A06 | 98.7  | 0         | Proteobacteria | Smithella           |
| AG-173_N04+AF-253_B06 | 87.8  | 0         | Tenericutes    | CU917754_g          |
| AG-173_N06+AF-253_C06 | 98.7  | 0         | Proteobacteria | Smithella           |
| AG-173_N19+AF-253_D06 | 99.1  | 0         | Actinobacteria | EU801210_g          |
| AG-173_N23+AF-253_E06 | 98.4  | 0         | Proteobacteria | EU016437_g          |
| AG-173_O02+AF-253_F06 | 98.7  | 0         | Proteobacteria | Smithella           |
| AG-173_O04+AF-253_G06 | 98.7  | 0         | Proteobacteria | Smithella           |

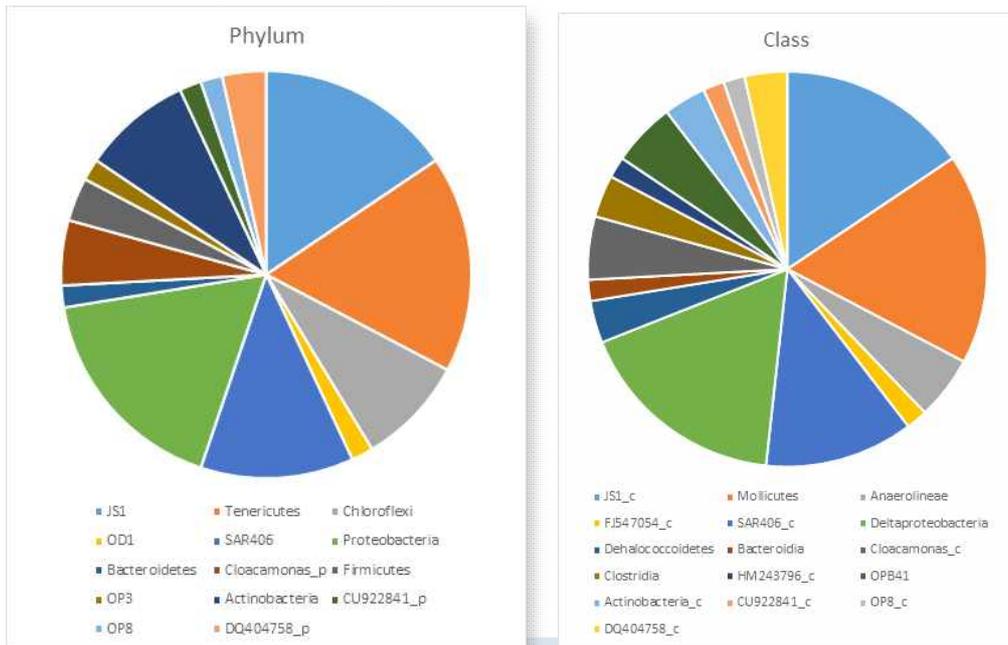


Figure 26. 16S rRNA gene identification result from the single cell isolation and genome amplification of the Fryxell 15 m sample

#### 다. 프리셀 호수 단일세포 유전체 (SAG, single amplified genome) 결과

분석 결과 가장 높은 복원 비율을 보이는 OD1 후보문 단일 세균의 경우 전체 유전체에서 약 60% 정도가 복원된 것으로 예상되었으나 다른 샘플들의 경우 평균 30% 정도의 유전체 복원 비율을 보이는 것으로 계산되었다. 이는 MDA를 이용한 일반적인 세균 유전체 복원 비율이 20-60% 정도 (Labonte et al., 2019)인 것을 감안할 때 평균적인 수준인 것으로 사료된다. 또한 모든 결과는 현재까지 보고되어 있지 않은 후보문 (candidate phylum)의 미생물이었던 사전 결과와 일치하여 적절한 종(species) 또는 속(genus)으로 동정되지 않았다.

또한 가장 높은 복원 비율을 보이는 OD1 후보문 단일 세균의 결과의 경우 9.87%의 오염(contamination) 비율을 나타내고 있는데 단일 세포 분리체 샘플임에도 불구하고 이러한 결과가 나오는 것은 유전체 증폭(MDA) 과정 중 시약(reagent) 자체의 오염 및 실험에 사용된 기구들의 오염 제거(decontamination)가 충분치 않았던 것으로 사료된다. 일반적으로 시약 자체의 오염은 원천적으로 100%의 제거가 불가능하기 때문에 실험을 수행할 때 UV를 이용하여 다시 제거하는 과정이 필수적이거나 장시간의 UV

조사는 시약 자체의 성능에 저하를 일으키기 때문에 충분한 시간 및 강도로 수행하기 어렵고, 기구 역시 대부분 멸균된 1회용품을 사용함에도 불구하고 외부와 격리되지 않은 일반 등급의 실험실에서는 실험 과정 중 항상 외부 DNA의 오염의 가능성이 있어 청정 등급의 실험실이 아닌 환경에서 유전체 증폭 실험을 수행하면서 오염을 완벽히 제거하는 것은 현실적으로 어렵다고 여겨진다.

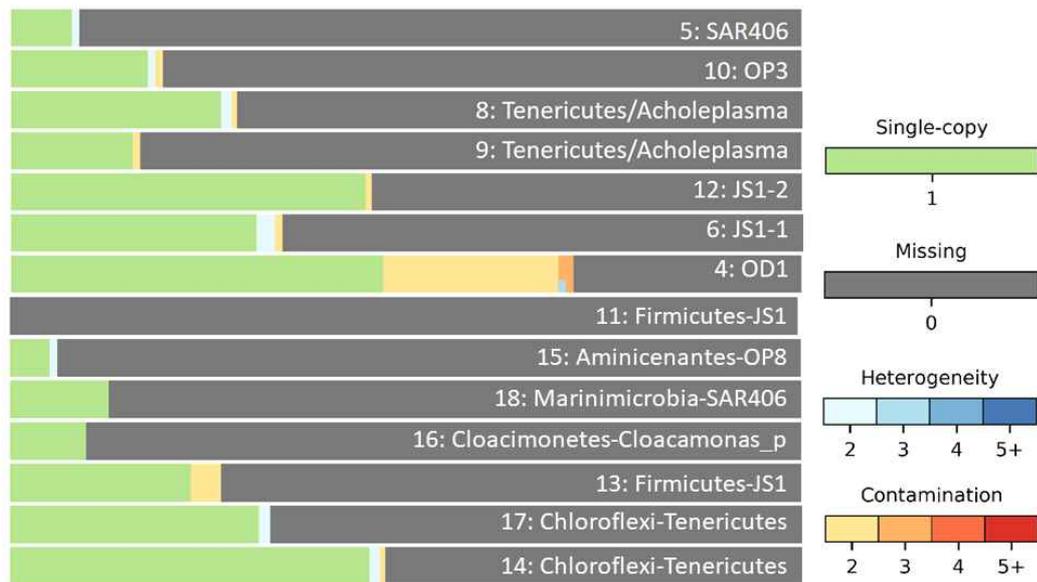


Figure 27. Percentage of the restored genome after MDA of the single cell isolation from Lake Fryxell

결과들 가운데 Tenericutes 후보문 단일 세균의 두 샘플 결과를 서로 합하여 최종 결과를 향상시킬 수 있는지에 대해 알아보았다. 두 결과는 각각의 유전체 복원 비율이 21.2%, 17.5%를 나타내고 있었으나 두 결과의 raw data를 합하여 재조립을 시도하였을 때 26.3%의 복원 비율을 얻을 수 있었다. 그러나 1.5%의 비율로 이전에 없었던 중복되는 single copy 유전자가 발견되는 것을 확인하였으며 이는 다중 결과의 혼합에 의한 mis-assembly일 것으로 판단된다. 비율 자체의 절대값은 낮아보이나 약 5-9%의 향상률과 비교하면 상대적으로 높은 비율의 contamination을 보이는 것을 보아 향후 염기서열 조립 시 이러한 점을 염두에 두고 contamination의 최소 기준을 정하여 유전체 복원 결과 향상을 시도하여야 할 것으로 보이나, 구체적인 기준 설정에 대해서는 더 많은 데이터가 필요할 것으로 여겨진다. 또한 이들 두 후보문이 정말로 같은 종의 미생물인가에 대해서도 판단이 어렵기 때문에 향후 이러한 다중 결과의 혼합 분석은 이상의 내용에 주의하여 수행할 필요가 있을 것으로 생각된다.

SAG의 생태학적 기능 분석. 얻어진 결과 가운데 가장 높은 복원 비율을 보이는

4:OD1 샘플의 경우 복원 비율 (60.7%) 대비 487 kb의 contig를 얻을 수 있었으며 전체 유전체의 예상 사이즈는 802 kb가 될 것으로 계산된다. 이는 기존에 예상된 OD1 후보문의 유전체 크기 예상 (< 1 Mb)과 유사하다. 그 내용을 살펴보면 복원된 contig에서 예측된 전체 538개의 유전자들 가운데 약 40%인 214개의 유전자에 대해 기능 추정이 가능하였으며 TCA cycle 등의 주요 대사 과정에 관련된 유전자들이 전부 결여되어 있고 DNA 합성, 복제 및 유지에 관련된 유전자들과 chaperone 등 protein 안정화에 관련된 유전자들만이 보존되어 있는 것을 볼 때 각종 영양 물질들이 극히 제한된 환경에서 일반적인 대사활동을 하지 않고 외부에서 직접 가져오거나 또는 다른 생물체 내에서 공생하는 방식으로 생존하는 것이 아닐까 여겨진다. 특히 D-inositol-3-phosphate glycosyltransferase와 같은 mycothiol 합성에 관련된 유전자가 발견되는 것이 특징인데 이 물질은 세포 내 산화-환원 전위 (redox potential)을 유지하는 역할을 담당하고 있으며 주로 Actinomycetes 등의 토양 미생물에서 외부의 산화적 스트레스에 대해 방어하는 기작에 연관된 것으로 알려져 있다. 즉 OD1의 경우 복잡한 전사 조절 기작에 의해 세포를 유지하는 것이 아니라 세포질의 버퍼의 안정적인 조성을 유지하는 방식으로 평형을 이루고 있을 것으로 생각된다. 또한, phosphate propanoyltransferase, propionate kinase 등의 propanoate pathway 연관 유전자들이 발견되는 것으로 볼 때 lactate을 이용한 기질 수준 인산화 및 발효(fermentation)을 통해 에너지를 획득하는 것으로 예상된다. 특히 전체의 약 60%의 유전체가 해독되었는데도 발견된 대사 기능 유전자들이 얼마 되지 않는 것으로 볼 때 전체 유전체가 해독되어도 관련 기능 유전자들의 pool은 극히 빈약할 것으로 여겨진다. 이외의 다른 SAG 유전체들에 대해서도 내용을 분석하여 보았으나 contig 및 얻을 수 있는 예측 유전자들의 숫자가 너무 적어 최소 전체 유전체의 50% 이상의 정보를 획득하여야 기능적으로 유추가 가능한 정도의 데이터를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

#### 4. 결론

프릭셀 호수와 바니 호수 상층에서는 부유하는 형태의 크기가 작은 세균이 관찰되며, 개체수는 이미 알려진 바와 같이  $10^5$  cell/ml 이상의 세균이 관찰되었다. 그러나 심층으로 내려갈수록 세균과 그 외 유기물이 혼재하여 존재하며, 심층은 생물이 아닌 불순물이 많아서 세균만 계수하기에는 어려움이 있다. 프릭셀 호수는 5 m, 7 m 그리고 9m 깊이의 시료에 존재하는 세균은 비슷한 경향으로 나타났으며, 15 m 깊이에서는 상층의 세균과는 확연하게 다른 형태의 세균이 분포하는 것으로 나타났다. 바니 호수의 미생물 개체수는 모든 수심이 비슷한 경향으로 나타났다. FACS 분석 결과 프릭셀 호수에서는 사이즈가 큰 세균 또는 aggregate 세균이 존재하는 것으로 사료 된다. 세균의 개체수는 현미경으로 계수한 결과 값보다 훨씬 적게 측정되었다. West 바니 호수의 5 m, 10 m와 13 m에서 존재하는 세균은 비슷한 경향으로 나타났으나, 20 m와 30 m에서는 완전히 다른 세균이 분포하는 것으로 나타났다. East 바니 호수 역시 상층인 5 m와 8 m에서는 현미경 관찰에서 보인바와 같이 작은 크기의 부유세균으로 추정되는 그룹의 세균이 구분되어 나타났으나, 심층인 30 m에서는 전혀 관찰되지 않았다. FACS 분석 결과, 현미경을 이용한 개체수 계수 경향성은 비슷하게 나타났으나, 물질의 분포 사이즈를 선택하여 계수하기 때문에 세균과 그외 미생물 또는 비생물과의 구분이 어려운 단점이 있다.

2014년도에 비글로 랩에서 수행한 프릭셀 15m 시료의 단일 세포 분리 및 유전체 증폭 후 16S rRNA 동정 결과, 768 개의 분리 세균 가운데 총 58종에 대해 결과를 얻을 수 있었다. 연속 희석법 결과에서 증폭되어 동정된 세균들이 모두 포함되어 있었으며, 이는 프릭셀 호수 시료의 군집에서 분리된 단일 세포가 정상적으로 증폭된 것으로 보인다. 분석 결과 가장 높은 복원 비율을 보이는 OD1 후보문 단일 세균의 경우 전체 유전체에서 약 60% 정도가 복원된 것으로 예상되었으나, 다른 샘플들의 경우 평균 30% 정도의 유전체 복원 비율을 보이는 것으로 계산되었다. OD1 후보문 단일 세균의 경우 대부분의 대사과정 유전자들이 결여되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 세포 내 산화-환원 전위 유지 및 propanoate pathway 관련 유전자들을 일부 보존하고 있는 것으로 볼 때 극히 제한된 환경에서 다른 생물체와 공생하거나 외부로부터 제한된 영양 물질을 받아 특정 pathway에 의존하여 에너지를 생성하고 있을 것으로 예상된다.

### 제 3절 빙저호 메르세르 호수에서의 단일세포 유전체 분석 적용 - SALSA (Subglacial Antarctic Lake Scientific Access) 참여

요약: 남극 빙하 평원의 수생태계를 파악하기 위한 미국의 SALSA 프로젝트로부터 빙저호인 메르세르 호수 물 시료 4점과 퇴적토 시료 6점을 확보하였다. 메르세르 호수 10개 시료를 BD 사의 cell sorter를 이용하여 각각 384 well plate 1개씩 단일세포분석을 실시하였다. 분리한 단일 원핵생물은 알칼라인 용액으로 세포벽을 분해한 뒤 EquiPhi29 효소를 이용하여 최종 10 $\mu$ l로 유전체 증폭(WGA, Whole-Genome Amplification)을 수행하였으며, 총 2,431개 증폭 (WGA, Whole Genome Amplification)되었다. 미생물 동정을 위하여, 27F-907R 프라이머 세트를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 산출된 염기서열은 EzTaxon-e 데이터베이스를 기반으로 동정을 수행하였다. Actinobacteria와 Betaproteobacteria가 가장 우점하였으며, 물시료 0.2 $\mu$ m 미만에서는 주로 candidate phyla인 OD1과 OP11이 우점하였다. 0.2 $\mu$ m 이상의 물시료에서는 주로 Betaproteobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria가 우점하였다. 반면 퇴적토는 2~8cm 깊이에서는 Actinobacteria가 현격히 우점하였으나 0-2와 8-10, Catcher slurry 시료에서는 Actinobacteria, Betaproteobacteria, Chloroflexi가 관찰되어 예상 외로 다양한 미생물이 발견되었다.

Abstract. The SALSA project in the United States to identify the aquatic ecosystem of the Antarctic Glacier Plains has acquired the four samples of Lake Mercer and the six samples of its sedimentary soil. Total ten samples of Lake Mercer were analyzed by using BD's cell sorter for a single cell analysis into the 384 well plate each. The isolated single cell bacteria samples were lysed their cell walls with alkaline solutions and performed to a final 10 ul of whole genome amplification (WGA) using EquiPhi29 enzymes, resulting in a total of 2,431 amplifications (WGA). For isolated and amplified bacterial genomes, we performed a 16S rRNA gene-based sequencing analysis using conserved primers of 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') and 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') primers. The identification of amplified WGA results was conducted by BLAST Search using the EzTaxon-e database.

## 1. 서론

빙저호 메르세르. 미국은 WISSARD(Whillans Ice Stream Scientific Access Research Drill, 2009~2015)와 SALSA(Subglacial Antarctic Lake Science Access, 2018~2020) 프로젝트를 통하여 윌란스 빙하 평원의 수생태계를 파악하여 정밀한 지형도를 제작하고 있으며, 윌란스 호수와 메르세르 호수를 둘러싸고 있는 암석, 퇴적토, 물, 빙하 시료를 확보하여 생명의 근간이 되는 탄소 순환과 생태계 유지의 원인규명에 대하여 수행하고 있다.

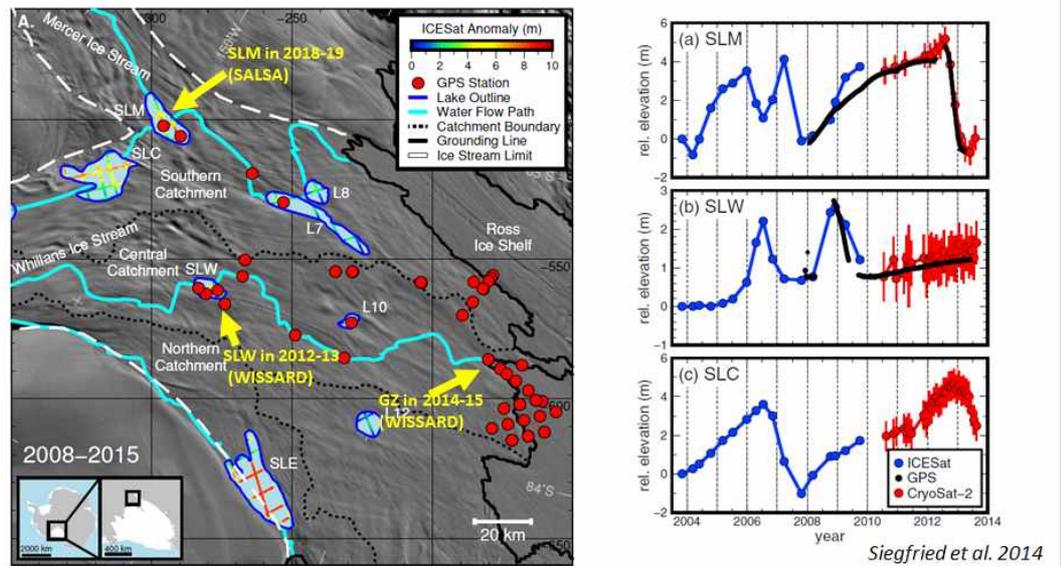


Figure 28. The location of the first Subglacial Lake Whillans (SLW), the second Subglacial Lake Mercer (SLM) and the Grounding Zone (GZ) (left), ICESat, GPS and CryoSat-2 data (right) from 2004 to 2014 published in Siegfried et al., (2014)

메르세르 호수는 Whillans Ice Stream에 해당하며, 바로 위에 콘웨이 호수와 연결되어 있고 콘웨이는 서남극과 동남극 빙하가 녹은 물이 동시에 흘러들어오는 빙저호이다. 약 10년(수리학적 체류시간)의 순환주기로 용빙수가 유입되어 완전히 채워져서 최대 수심이 약 15m가 되며, 이후 완전히 배수되는 “Active Lake”이다.

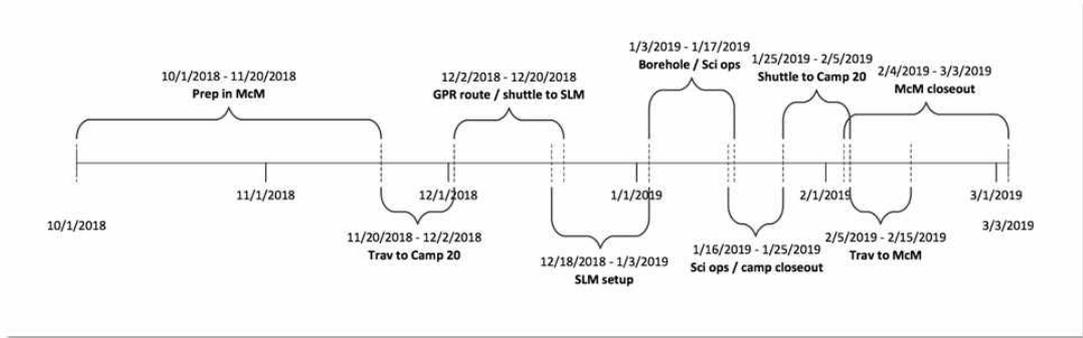


Figure 29. Master plan of the exploration for Subglacial Lake Mercer in the season 2018/2019

2019년 1월 3일부터 17일까지 시추 및 현장탐사를 실시하였다. 빙저호를 둘러싸고 있는 서식처에서의 미생물 상호작용에 의하여 생합성/생분해가 지속적으로 일어남으로써 저영양 상태에서도 생태계가 유지되고 광물화와 물질순환이 조절될 것으로 예상된다. 탐사 당시 메르세르 호수의 수심은 15m였다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 메르세르 호수 시료 확보 및 전처리

호수 물과 퇴적토 시료 확보 및 전처리 수행. 미국의 SALSA 프로젝트로부터 물 시료 4점과 퇴적토 시료 5점, 자동여과장치에 부착되어 있는 퇴적토 1점을 확보하였다. 미생물 분석용 물 시료는 빙저호 시추 시 가장먼저 채취한 시료로 바로 연구실로 옮겨 TE(Tris+EDTA) 용액과 글리세롤 용액을 첨가하였다. TEgly용액은 미생물의 RNA와 DNA가 파괴되는 것을 막고, 장기간 냉동 보관 시 세포막과 세포벽이 파괴되는 것을 방지함으로써 단일세포 분리 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 퇴적토 시료는 분석 직전에 잘 섞은 후 30초간 2000rpm으로 원심분리기를 이용하여 상층액을 추출하여 사용하였다.

Table 14. Samples from water column and sediment in Lake Mercer

| Name                        | Sample Type | Details   | No of Samples |
|-----------------------------|-------------|---|---------------|
| LV catcher slurry           | sediment    | Sediment taken off the bottom of the water filtration vehicle. Mixture from all filtration deployments        | 3             |
| LV #1 >3.0 $\mu\text{m}$    | water       | Water taken from the first water filtration deployment that was above the 3.0 $\mu\text{m}$ filter            | 3             |
| LV #1 3.0-0.8 $\mu\text{m}$ | water       | Water taken from the first water filtration deployment that was between the 3.0 and 0.8 $\mu\text{m}$ filters | 3             |
| LV #1 0.8-0.2 $\mu\text{m}$ | water       | Water taken from the first water filtration deployment that was between the 0.8 and 0.2 $\mu\text{m}$ filters | 3             |
| LV #1 <0.2                  | water       | Water taken from the first water filtration deployment that was below the 0.2 $\mu\text{m}$ filter            | 3             |
| MC-1B 0-2cm                 | sediment    | Multicore 1B is from the first multicoring deployment, column B 0-2 cm below the sediment surface             | 2             |
| MC-1B 2-4cm                 | sediment    | Multicore 1B is from the first multicoring deployment, column B 2-4 cm below the sediment surface             | 2             |
| MC-1B 4-6cm                 | sediment    | Multicore 1B is from the first multicoring deployment, column B 4-6 cm below the sediment surface             | 2             |
| MC-1B 6-8cm                 | sediment    | Multicore 1B is from the first multicoring deployment, column B 6-8 cm below the sediment surface             | 2             |
| MC-1B 8-10cm                | sediment    | Multicore 1B is from the first multicoring deployment, column B 8-10 cm below the sediment surface            | 2             |

### 나. 원핵생물 분리/증폭, 동정

호수물과 퇴적토에서 원핵생물 분리 및 유전체 증폭. 분석할 시료에 SYTO9을 첨가하여 30분 동안 생물의 DNA를 염색한 후 단일세포 분리기기에 주입하여, 40 $\mu\text{m}$ 보다 입자가 굵은 것은 prefiltering을 수행하여 제거하였다. 세포의 DNA를 SYTO9으로 염색함으로써 원하는 크기와 모양의 세포를 레이저로 검출하여 분리할 수 있기 때문에 Fluorescence- activated cell sorting (FACS)를 통하여 붉은 색으로 표시된 유기물 입자를 가급적 피하고 파란색으로 표시된 시료의 모든 미생물을 확인하고 그 중 원핵생물의 범위를 지정(gating)하여 시료 내 원핵생물에 대하여 단일개체로 분리하였다. 파란색은 SYTO9으로 염색 된 미생물이고, 붉은 색은 자가형광을 띄는 유기물, 검정색은 세포와 결합되지 않은 입자와 SYTO9을 포함한 백그라운드이다. 아래의 오른쪽 상단 사진은 호수 물 시료로 이 경우에는 미생물이 예상되는 범위에 잘 위치하고 있어 단일 세균 분리가 용이하였다. 이와는 대조적으로 오른쪽 하단 사진은 퇴적토 사진으로 이 경우에는 세균으로 예상되는 파란색 점이 거의 보이지 않고, 유기물이나 백그라운드가 우

세하였다.

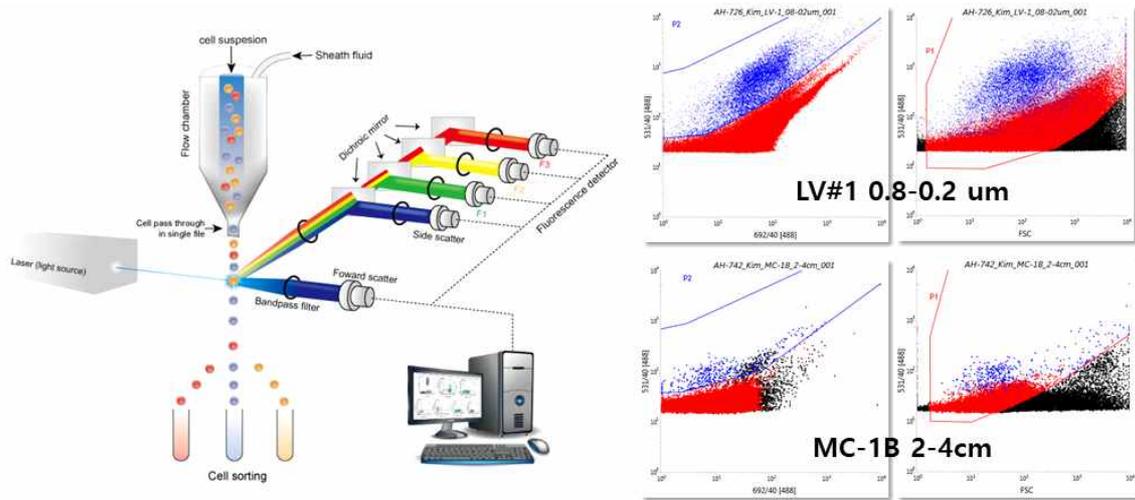


Figure 30. A scheme of single cell isolation by FACS (left) and images of water (top) and sediment samples (bottom) from the Lake Mercer (right)

BD 사의 cell sorter를 이용하였으며, 물 시료 4점과 퇴적토 시료 6점에 대하여 각각 384 well plate 1판씩 분석하였다. 이때 384 well에 미리 TE buffer 60nl씩 분주하고 단일 개체 분리를 수행하였으며, 3개는 positive well(10 cell drop), 64개는 negative well(no drop) 그리고 317개 well에는 단일 개체의 원핵세포를 분리하였다.

FACS의 경우 미생물이  $10^6$  cells/ml이 최적으로 시료를 분석하기 전에 세포 수를 측정하여 농축하거나 희석하는 과정을 거쳤다. 호수 물 시료는 McClane을 통하여 미생물을 현장에서 농축하였기 때문에 384 well plate 1개를 분리하는데 큰 어려움이 없이 진행하였다. 그러나 퇴적토의 경우 미생물 개체수가  $10^4$  cells/g으로 detection limit에 해당되었다. 분석시간이 오래 소요되어 (30분 이상) LV catheter slurry시료와 MC-1B 8-10cm 시료는 384 well을 모두 채우지 못하였다. 분리한 단일 원핵생물은 알칼라인 용액으로 세포벽을 분해한 뒤 Equiph29 polymerase와 Equiph29 reaction buffer, dithiothreitol, dNTP, random heptamers, SYTO9를 첨가후 증류수로 최종  $10\mu\text{l}$  용량을 맞추었다. 분리된 단일생물과 이 혼합물은  $45^\circ\text{C}$ 에서 12-16시간 동안 증폭반응 후,  $75^\circ\text{C}$ 에서 15분 동안 증폭된 유전체의 안정화를 거쳐 유전체 증폭(WGA, Whole-Genome Amplification)을 완료하였다.

Table 15. The specification of WGA reagent

| 시약 | 용량 | 최종농도 |  |  |
|----|----|------|--|--|
|    |    |      |  |  |

|                           |          |         |                             |  |
|---------------------------|----------|---------|-----------------------------|--|
| EquiPhi29 polymerase      | 0.2      | 0.2U/ul | Thermo Fisher scientific    | 10U/ul   |
| EquiPhi29 reaction buffer | 1        | 1X      | Thermo Fisher scientific    | 10X  |
| dithiothreitol            | 1        | 10mM    | Thermo Fisher scientific    | 100mM  |
| dNTP                      | 0.4      | 0.4mM   | NEB                         | 10mM   |
| random heptamers          |          | 40uM    | Integrated DNA Technologies | (two 3'-terminal phosphorothioated nucleotide bonds) |
| SYTO9                     | 0.2      | 1uM     | Thermo Fisher scientific    | 5mM (50uM)   |
| DDW                       | up to 10 |         |                             |  |

**분리·증폭된 개체의 16S rRNA 기반 동정.** LoCoS분석이 시료 당 15,000\$로 비용을 절감하기 위하여 모든 개체에 대하여 16S RNA gene을 대상으로 PCR을 수행하여 스크리닝을 진행하였다. 유전체 증폭 산물의 동정 효율을 높이기 위하여 16S rRNA gene을 대상으로 하여 발표된 모든 프라이머의 조합을 시도하였다.

Table 16. The primer list for 16S rRNA gene sequencing

| Name   | Sequence (5'→3')              | Description          |
|--------|-------------------------------|----------------------|
| 27F    | AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG    | Bacteria full length |
| 1492R  | TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T |                      |
| 337F   | GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG   | Bacteria             |
| 338R   | GCT GCC TCC CGT AGG AGT       |                      |
| 518F   | CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG    |                      |
| 519R   | GTA TTA CCG CGG CKG CTG       |                      |
| 785F   | GGA TTA GAT ACC CTG GTA       |                      |
| 907R   | CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT    |                      |
| 2AFb   | TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA    |                      |
| U1406R | GAC GGG CGG TGT GTR CA        |                      |
| 515F   | GTG YCA GCM GCC GCG GTA A     | Universal prokaryote |
| 806R   | GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT    |                      |
| 787F   | ATT AGA TAC CCN GGT AG        | Universal prokaryote |
| 1391R  | ACG GGC GGT GWG TRC           |                      |

원핵생물 중 세균 검출을 위한 9개 프라이머 세트와 고세균 검출을 위한 1개의 프라이머 세트, 그리고 세균과 고세균 모두 검출이 가능한 2개의 프라이머 세트에 대하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 프라이머 선별을 위한 테스트는 LoCoS를 수행하였던 물 시료 LV#1 0.8-0.2 μm에서 24점을 1/100로 희석하여 수행하였다.

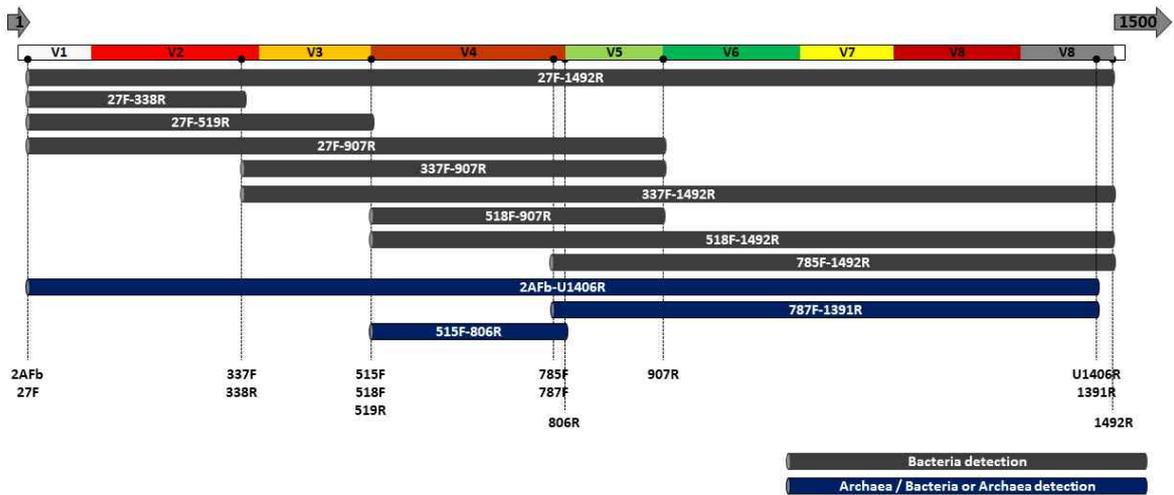


Figure 31. The primer sets for 16S rRNA gene amplification

세균은 가장 높은 증폭 효율을 보인 27F-907R세트로 총 3,170점의 개체를 대상으로 PCR과 염기서열 분석을 수행하였다. 분석된 염기서열은 EzTaxon-e 데이터베이스를 활용하여 BLAST Search를 진행하여 동정하였다.



### 3. 결과 및 토의

#### 가. 원핵생물 분리/증폭 결과

메르세르 호수 10개 시료에 대하여 분리된 단일 미생물의 유전체는 총 2,431개 증폭 (WGA, Whole Genome Amplification)되었으며, 평균 243개가 증폭되었다. 물 시료인 LV#1 0.8-0.2 $\mu$ m의 분석 plate는 LoCoS™ (Low Coverage Sequencing)를 진행하여 단일 개체의 유전체 증폭에 대하여 1차적인 스크리닝 분석을 진행하였다. LV#1 0.8-0.2 $\mu$ m 시료는 317개체를 분리하여 264개가 증폭에 성공하였으며, LoCoS 결과, CheckM 프로그램 이용하여 동정하였을 때 115개의 세균과 6개의 고세균이 검출되었다. 그러나 16S RNA gene은 총 24점에서만 검출되어 동정하였다.

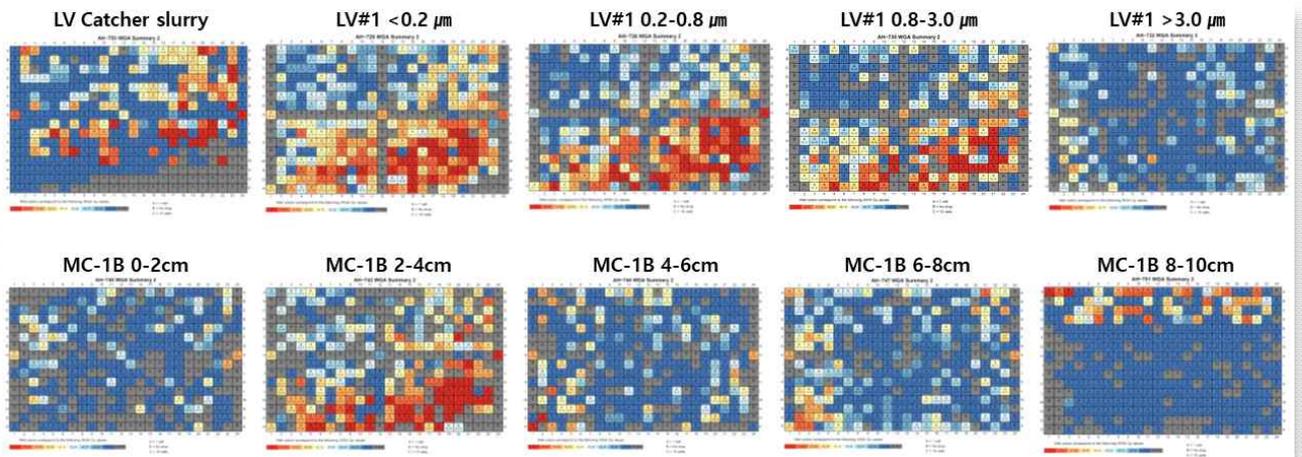


Figure 32 The results of whole genome amplification (WGA)

#### 나. 미생물 군집구조.

LoCoS™의 결과에서 세균과 고세균이 모두 검출된 K well의 24점의 개체를 대상으로 하였다. 세균은 27F-907R의 조합에서 15개체에서 증폭되어 가장 높은 증폭 효율을 보였다 (표 17). 따라서 메르세르 호수로부터 분리된 세균의 동정을 위한 프라이머는 27F-907R을 선택하여 유전체 증폭된 3,170점의 개체를 대상으로 16S rRNA gene(27F-907R)을 PCR을 수행하였다. 증폭 산물 중 871개체의 염기서열을 확보하였고 EzTaxon-e 데이터베이스를 활용하여 BLAST Search를 진행하여 동정하였다.

871점에 대한 16S rRNA 계통도에 나타났듯이 Actinobacteria가 400점으로 가장 많이 검출되었고, 다음으로 Betaproteobacteria가 189점, Gammaproteobacteria가 40점으로 우점하였다. 특이한 점은 OD1, OP11, GN02, WS5, TM7, SR1 등의 후보문(candidate phylum)이 예상외로 다양하게 검출되었다. 이었다. 수체의 군집 구성은 0.2 $\mu$ m 이하와 이상에서 확연히 달리 관찰되었다. 0.2 $\mu$ m 이하에서는 OD1이 58점, OP11

이 11점, Actinobacteria가 11점이 우점하는 반면 0.2um 이상에서는 주로 Betaproteobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria가 우점하였다. 퇴적토의 시료는 두 개의 cluster가 관찰 되었는데, 하나의 cluster에는 2-4, 4-6, 6-8의 경우는 주로 Actinobacteria가 90% 이상 우점하고, 다음으로 Betaproteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi가 주로 검출되었다. 다른 하나의 cluster는 0-2와 8-10, CS가 유사한 군집을 보였는데, 여기에서는 Actinobacteria는 약 50%의 비율을 차지하고, Bacteriobacteriota, Chloroflexi가 상대적으로 다소 높은 비율을 보였다.

표 17 Amplification test result of 16S rRNA gene using different primer sets

| Sample | 27F-1492R | 27F-338R | 27F-519R | 27F-907R | 337F-907R | 337F-1492R | 518F-907R | 518F-1492R | 785F-1492R | 2AFb-U1406R | 787F-1391R | 515F-806R |
|--------|-----------|----------|----------|----------|-----------|------------|-----------|------------|------------|-------------|------------|-----------|
| K01    |           |          |          |          |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K02    | ○         | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          | ○          |             | ○          | ○         |
| K03    |           |          |          |          |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K04    |           |          |          |          |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K05    | ○         | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          | ○          |             | ○          | ○         |
| K06    |           |          |          |          |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K07    |           | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          | ○          |             |            | ○         |
| K08    |           | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          | ○          |             |            | ○         |
| K09    |           |          |          |          |           |            |           |            | ○          |             |            |           |
| K10    |           | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          | ○          |             |            | ○         |
| K11    |           | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          |            |             | ○          | ○         |
| K12    |           |          |          |          |           |            |           |            | ○          |             |            |           |
| K13    |           | ○        |          | ●        | ○         |            | ○         |            |            |             |            |           |
| K14    |           | ○        |          | ●        | ○         |            | ○         |            |            |             |            | ○         |
| K15    |           |          |          |          | ○         |            |           |            |            |             |            |           |
| K16    |           |          |          |          |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K17    |           | ○        |          | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          |            |             |            | ○         |
| K18    | ○         | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          | ○          |             | ○          | ○         |
| K19    |           |          |          | ●        |           |            |           |            | ○          |             |            |           |
| K20    | ○         | ○        | ○        | ●        | ○         | ○          | ○         | ○          |            |             | ○          | ○         |
| K21    |           | ○        |          | ●        |           |            |           |            | ○          |             |            |           |
| K22    |           |          |          | ●        |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K23    |           |          |          |          |           |            |           |            |            |             |            |           |
| K24    |           |          |          | ●        |           |            |           |            |            |             |            |           |
| 계      | 4         | 12       | 7        | 15       | 11        | 9          | 11        | 9          | 10         | -           | 5          | 10        |

18 Taxonomy of 24 cells based on LoCoS results by CheckM and SSU and 16S rRNA genes amplification by EzTaxon

| well | well type | checkM_classification   | SSU_classification_1  | Top hit taxonomy (EzTaxon-e)  | SeqID (%)# |
|------|-----------|---|---|---|------------|
| K01  | No drop   | NA  | NA  |   |            |
| K02  | 1 cell    | NA;unresolved   | k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__Planctomycetacia;o__Planctomycetales:f__?;g__?;s__?                            | Bacteria:Planctomycetes:Planctomycetacia:Planctomycetales:Planctomycetaceae:EU335333_g:EU335333_s:                | 92.39      |
| K03  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  |   |            |
| K04  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Nitriliruptorales:f__Nitriliruptoraceae:g__Nitriliruptor;s__Nitriliruptor_alkaliphilus   | no SSU regions found  |   |            |
| K05  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales:f__Acetobacteraceae:g__Granulibacter;s__Granulibacter_bethesdensis | k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales:f__Acetobacteraceae:g__Acidocella;s__? | Bacteria:Proteobacteria:Alphaproteobacteria:Rhodospirillales:Acetobacteraceae:AJ292609_g:EF516844_s:              | 96.33      |
| K06  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  |   |            |
| K07  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Methylococcales:f__Methylococcaceae:g__Methylobacter;s__Methylobacter_tundripaludum | no SSU regions found  | Bacteria:Proteobacteria:Gammaproteobacteria:Methylococcales:Methylobacter:Methylobacter_tundripaludum:            | 98.44      |
| K08  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  | Bacteria:Proteobacteria:Betaproteobacteria:Burkholderiales:Comamonadaceae:Polaromonas:Polaromonas_aquatica:       | 97.87      |
| K09  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  |   |            |
| K10  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;unresolved  | no SSUs were classified   | Bacteria:Proteobacteria:Betaproteobacteria:Gallionellales:Gallionellaceae:Nitrotoga:Nitrotoga_arctica:            | 96.57      |
| K11  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  | Bacteria:Proteobacteria:Betaproteobacteria:Gallionellales:Gallionellaceae:Nitrotoga:Nitrotoga_arctica:            | 96.1       |
| K12  | No drop   | NA  | NA  |   |            |
| K13  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  | Bacteria:Proteobacteria:Betaproteobacteria:Gallionellales:Gallionellaceae:Nitrotoga:Nitrotoga_arctica:            | 96.34      |
| K14  | 1 cell    | k__Bacteria (root):k__Bacteria  | no SSU regions found  | Bacteria:OP11:DQ404773_c:DQ404658_o:DQ404658_f:DQ404658_g:DQ837239_s:   | 90.91      |
| K15  | 1 cell    | NA  | NA  | Bacteria:Firmicutes:Bacilli:Bacillales:Bacillaceae:Bacillus:Bacillus_subtilis:Bacillus_subtilis_subsp_inaquosorum | 99.88      |
| K16  | 1 cell    | k__Archaea;p__Thaumarchaeota;c__Nitrosopumilales;o__Nitrosopumilales:f__Nitrosopumilaceae   | no SSU regions found  |   |            |
| K17  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Cyanobacteria  | no SSU regions found  | Bacteria:Chloroflexi:GQ396871_c:GQ396871_o:GQ396871_f:GQ396871_g:GQ396871_s:                                      | 98.29      |
| K18  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Chloroflexi  | k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Chloroflexi_Subdivision_10;o__SL56_marine_group:f__?;g__?;s__?                    | Bacteria:Chloroflexi:GQ396871_c:GQ396871_o:GQ396871_f:EU803902_g:EU803902_s:                                      | 98.42      |
| K19  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  |   |            |
| K20  | 1 cell    | NA;unresolved   | k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria(class);o__Frankiales:f__Sporichthyaceae:g__?;s__?               | Bacteria:Actinobacteria:Actinobacteria_c:Planktophila_o:Planktophila_f:Planktophila:AQUB_s:                       | 97.93      |
| K21  | 1 cell    | k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;unresolved  | no SSU regions found  | Bacteria:Proteobacteria:Betaproteobacteria:EU786132_o:EU786132_f:EU786132_g:EF520485_s:                           | 96.93      |
| K22  | 1 cell    | NA  | NA  |   |            |
| K23  | 1 cell    | NA;unresolved   | no SSU regions found  |   |            |
| K24  | No drop   | NA  | NA  |   |            |

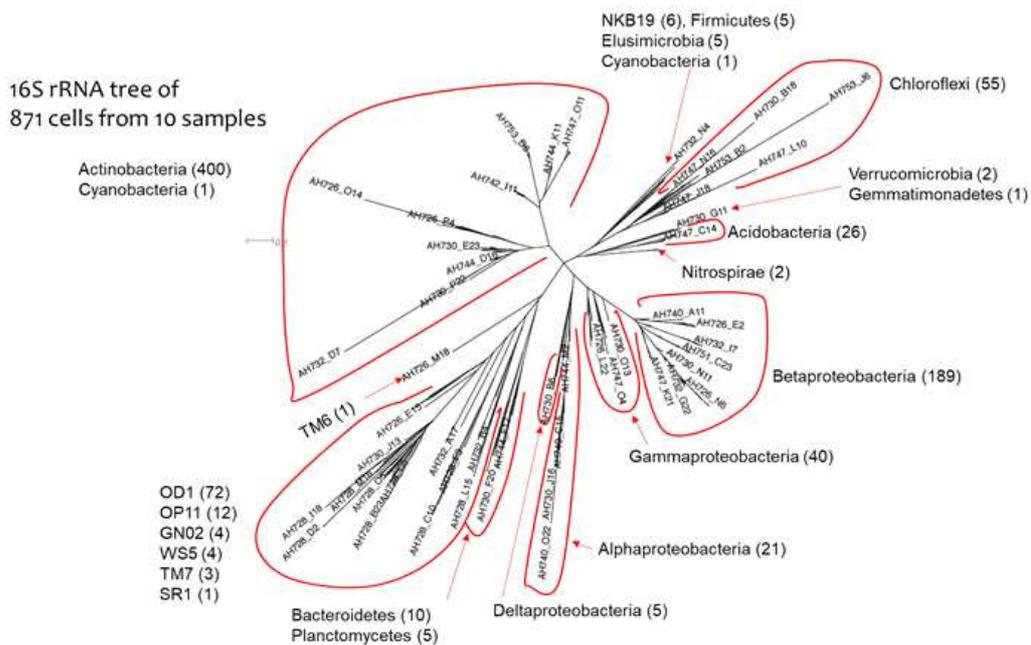


Figure 33. Phylogenetic tree for 871 cells from 10 samples

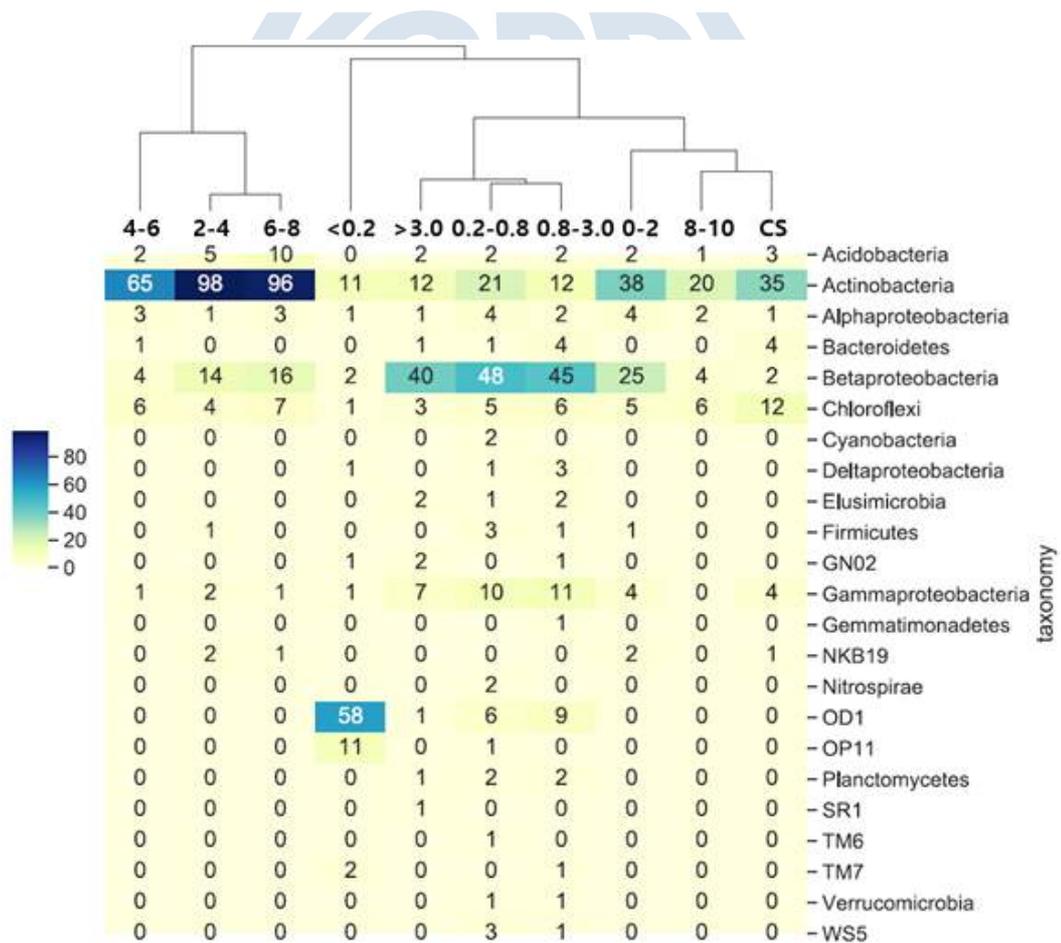


Figure 34. Heatmap of bacterial communities

#### 4. 결론

메르세르 호수 물 시료 4개와 퇴적토 시료6개, 총10개 시료에 대하여 단일 세포 분리 및 개체 유전체 증폭을 실시하였다. 분리된 단일 미생물 중 총 2,431개의 개체에 대하여 유전체 증폭 (WGA, Whole Genome Amplification)산물을 확보하였으며, 이는 하나의 시료 당 평균 243개가 증폭되었다. 물 시료인 LV#1 0.8-0.2 $\mu$ m의 분석 plate는 LoCoSTM (Low Coverage Sequencing)를 진행하여 단일 개체의 유전체 증폭에 대하여 1차적인 스크리닝 분석을 진행하였다. LoCoS 결과, CheckM 프로그램 이용하여 동정하였을 때 115개의 세균과 6개의 고세균이 검출되었다. 그러나 16S rRNA gene은 총 24점에 서만 검출되어 동정하였다.

유전체 증폭 산물의 세균 동정 효율을 높이기 위하여 16S rRNA gene을 대상으로 사전 연구된 프라이머 조합에 대하여 검출 효율 테스트를 진행하였다. 하지만 고세균은 고세균 특이적 프라이머와 원핵생물 프라이머 모두에서 검출되지 않았다. 세균 검출 프라이머 테스트에서 가장 높은 증폭 효율을 보인 27F-907R세트로 유전체 증폭된 3,170점의 개체를 대상으로 16S rRNA gene 염기서열 분석 결과 Actinobacteria와 Betaproteobacteria가 가장 우점하였다. 물시료의 경우 0.2미만에서는 주로 candidate phyla인 OD1과 OP11이 우점하였다. 반면, 0.2 이상의 물시료에서는 주로 Betaproteobacteria가 가장 우점하고 그 다음으로 Actinobacteria, Gammaproteobacteria가 많이 관찰되었다. 반면 퇴적토는 2~8cm 깊이에서는 Actinobacteria가 현격히 우점하였으나 0-2와 8-10, CS 시료에서는 Actinobacteria 뿐만이 아니라 Betaproteobacteria, Chloroflexi도 관찰되어 좀 더 높은 다양성을 보였다.

## 제 4절 국제 네트워크 구축

### 1. 단일세포 분리 및 증폭 실험 세팅을 위한 국제 연구진 교류

Joint Genome Institute의 Drs. rederick Schulz, Dr Rex Malmstrom, Danielle Goudeau와 공동연구를 진행하였다. 2018년 10월 19일부터 Danielle Goudeau와 Rex Malmstrom 박사와 이메일 교환으로 유전체 증폭 실험방법 세팅에 도움을 받았다. 비글로 해양연구소의 Dr. Ramunas Stepanausk와 성균관대학교 윤환수 교수의 도움으로 2019년 7월 방문하여 단일세포 분리 시 워크샵에 참석하여 메르세르 빙저호 시료 10점에 대하여 분석 수행하였다. 또한 2019년 9월 비글로 랩에서 진행된 단일세포 유전체 심포지엄에 참석하였다.

비글로 해양연구소의 단일세포 유전체 센터. 단일세포 분리기술을 활용한 연구 협의 및 청정 연구실 구축을 위한 제안하였다. Bigelow laboratory의 Single Cell Genomics Center에 2019년 7월 10월부터 12일에 방문하여 빙저호 메르세르 호수의 물 시료 4개와 퇴적토 시료 6개에 대하여 단일세포 분리 연구를 수행하였다.



Figure 35. The experimental process conducted at the single cell genome center of the Bigelow Laboratory

단일세포 유전체 센터장인 Dr. Ramunas Stepanauskas와 수계 Cytometry 분과장인 Dr. Nicole J. Poulton와 연구 협의 및 자문 제하였다. Dr. Ramunas Stepanauskas가 현재 수행하고 있는 해양 표층수 단일세균 유전체 분석 프로젝트에 대하여 소개하였다. 이 프로젝트는 환경유전체 분석을 위한 정교하게 잘 만들어진 데이터베이스 구축을 목적이다. 주로 광합성 하는 세균이 대상이고 이들 세균의 호흡량 등을 측정하였다. 극지연구소가 보유하고 있는 양극지역과 아라온 이동항해 기간동안의 표층수 채수 시료 공동 실험 수행 분석에 대하여 논의하였다.

본 과제와 미국과 함께 진행하고 있는 빙저호 SALSA 프로젝트에 대하여 간략하게 소개하였다. Dr. Ramunas Stepanauskas의 경우 광합성이 가능한 유광층의 광합성 세균(phototrphos) 집중을 하고 있으나, 심층의 무광층에서 많은 역할을 하고 있을 화

학자가영양세균(chemolithotrophs), 특히 질소나 황 순환과 관련된 미생물 연구로 시료는 공유하되 타겟하는 주제는 달라 시료 공유 및 단일세포 유전체 분석에 대한 협업이 가능할 것으로 예상된다. 당초 계획으로는 2020년 4월에 있을 한국미생물학회와 연계하여 극지연구 방문 및 세미나 계획하였으나, 코로나 19로 일정을 연기하였다.

또한 기술 이전에 대하여 논의를 진행하였다. 현재까지 독일, 스웨덴, 영국을 포함하여 전세계 총10군대를 세팅 완성하였다. 청정연구실 시스템 및 장비 구축, 2년동안의 기본적인 실험 분석 방법 정립, 10년의 보증까지 포함하여 약 \$3,000,000이다. 현실적으로 불가능할 것으로 보이나, 가장 빠르고 완벽하게 세팅할 수 있는 방법이기도 하다.

생물학 분야에 있어 Blue Technology라고 할 수 있는 단일세포 분석 연구실을 방문하여 전문가들의 분석 수행을 볼 수 있었고, 빙저호 시료 분석에 많은 도움을 받을 수 있었음. 청정랩 구축의 필요성을 인지하였고, BD사의 유세포 분리기와 Bravo의 자동액체 처리플랫폼 등의 첨단 분석 장비, 분석업무의 전문가 육성의 필요성에 대하여 확인 할 수 있었다. 단일세포 분리 실험실의 규모 및 설비를 직접 확인함으로써 연구소내에서의 셋업할 때 구체적이고 가시적인 계획 수립이 가능할 것으로 기대한다. 연구소 내에 구축할 단일세포 분석센터는 원핵 뿐만이 아니라 진핵미생물에도 적용 가능하며, 생명과학연구부 뿐만 아니라 해양생물을 분석하는 해양연구부 등 다양한 분야에서 다양한 극지 시료에 대한 연구가 가능할 것으로 기대한다. 또한 단일세포 분석 센터와 연계하여 단일세포 유전체 분석 및 데이터베이스 구축이 뒷받침될 수 있으면 시너지 효과가 매우 클 것으로 기대한다.

**단일세포 분리기기를 활용한 연구 국제 컨퍼런스 참석.** 2019년 9월 22일부터 26일까지 단일세포 유전체 워크샵 참석에 참석함. 첨단 분석 기술인 단일세포 유전체 워크샵에 총 63명이 전세계에서 참여하였다. 워크샵은 연구를 시작하는 가장 기초적인 연구와 실제 환경에서의 미생물이 관여하는 지에 대한 연구, 그리고 향후 새로운 기술과의 접목의 주제로 진행하여 연구에 대하여 발표 및 질의응답이 진행되었다.

## SCGC Workshop 2019

### Fourth Microbial Single Cell Genomics Workshop

September 22-26, 2019  
Spruce Point Inn, Boothbay Harbor, Maine



#### Organizing Committee:

Ramunas Stepanauskas (chair), Bigelow Laboratory for Ocean Sciences  
Tanja Woyke, DOE Joint Genome Institute  
Michael Wagner, University of Vienna  
Beth Orcutt, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences  
David Emerson, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences  
Nicole Poulton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences

#### Workshop Coordinator:

[Brian Thompson](#), Bigelow Laboratory for Ocean Sciences

*Abstract submission and registration have not started yet.*

#### Confirmed Speakers:

Paul Berube, Massachusetts Institute of Technology  
Diane Dickel, University of California Berkeley  
A. Murat Eren (Meren), University of Chicago  
Gerhard Herrndl, University of Vienna  
Eugene Koonin, National Institutes of Health (keynote)  
Victoria Orphan, Caltech (keynote)  
Michael Wagner, University of Vienna (keynote)  
Patrick Wincker, Genoscope  
Tanja Woyke, Joint Genome Institute  
Aaron Wright, Pacific Northwest National Laboratory

Figure 36. International conference on microbial single cell genomics workshop

극지연구소

## 2. 맥머도 장기모니터링 (MCM-LTER) 팀과의 국제협력

Bonney 호수 환경유전체 데이터로 미국과 공동연구 수행. “Methane production in the oxygenated water column of a perennially ice-covered Antarctic Lake” 의 제목으로 *Limnology and Oceanography* 저널에 논문을 출판하였다(Li et al., 2020). 주요 연구 파트너는 몬타나 주립대학교의 John Priscu (교신저자), Wei Li(제1저자), August Steigmeyer, Mark Skidmore와 플로리다 대학교의 Brent Christner와 Peter Kibler, 마이애미 대학교의 Rachael Morgan-Kiss이다. 주요 연구 내용은 드라이벨리에서 “Blood Fall “로 유명한 바니 호수에서 산소가 풍부한 상층부에서 메탄이 대기농도의 약 200% 이상 높게 관찰되었다. 이것은 기존에 알려진 호수의 퇴적토나 혐기조건의 저층부에서 메탄생성 고세균(Methanogen)에 의해 만들어지는 것이 아니라, 산소가 풍부한 수계에 존재하는 미생물이 methylphosphonate를 분해하여 인을 섭취하는 과정에서 메탄이 부산물로 생성됨을 밝힌 것이다. 본 연구진의 역할은 환경유전체를 분석하여 이 과정에 관여하는 미생물의 비율이 매우 높고 또한 유전자인 C-P lyase의 비율도 매우 높음을 확인하였다. 또한 기존에 알려져 있는 혐기조건에서 메탄을 생성하는 미생물이 수층에 전혀 존재하지 않고 관련 유전자도 전혀 검출되지 않음을 확인하였다.

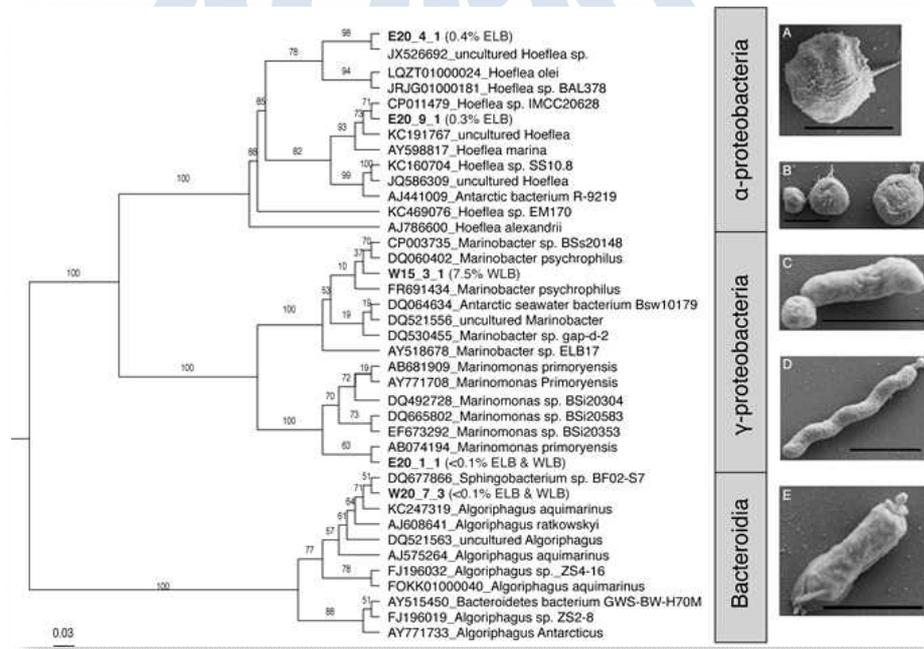


Figure 37. A maximum-likelihood tree illustrating the phylogenetic relationships of Lake Bonney isolates. RAxML with 1000 bootstrap replicates(Figure 4 from Li et al., 2020)

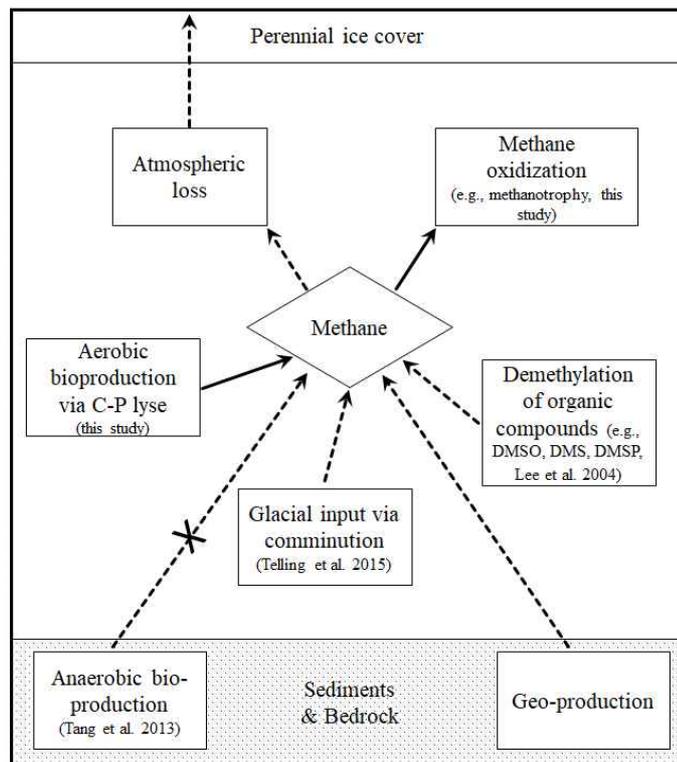


Figure 38. A conceptual model for methane sources and sinks in Lake Bonney. The solid arrows indicate sources or sinks that have known evidence. Dashed arrows indicate sources or sinks that have not been tested. X indicates that an experiment in the lake has been performed and no evidence of anaerobic bio-production has been found (Tan et al., 2013, Figure 5 in Li et al., 2020)

### 3. SALSA (Subglacial Antarctic Lake Scientific Access) 팀과의 국제협력

SALSA 프로젝트 워크샵 참석. NSF 연구프로젝트인 남극 빙저호 Mercer 탐사 (SALSA프로젝트) 워크샵에 초대 되어 2019년 8월 1일부터 2일에 미팅을 참석하였다.



Figure 39. Invitation letter of SALSA Workshop

NSF의 남극 프로그램 담당자의 향후 10년의 장기 프로젝트 계획 요청, 시료 운송 과정에서의 온도 변화 체크를 통하여 운송 시스템 개선 논의, Drilling operation 및 in-situ 장비의 운용 등에 대한 논의 진행하였다. 퇴적토 연구는 과거 ANDRILL 참여 연구자들이 주축으로 진행하였다. Amy Leventer가 세부 책임자 퇴적토 특성 및 연대 측정, 공극수 지화학 분석은 주로 가스상, 이온, DOC가 주로 진행이 되었으며, bulk sediments의 경우 기본적인 지화학 분석 및 연대 측정, 그리고 고생물학적 특성과 미생물에 의한 이온 산화 및 환원이 주 연구를 이루었다. 수층과 basal ice 연구는 수층에서의 CTD 데이터, 지화학, 용존유기탄소, 메탄과 산소 생지화학, 노블가스에 대한 연구 초기 결과 발표 및 논의, 열수 시추 시의 clean access 논의 및 미생물 유전체, 배양, 암모니아 산화 미생물, 메탄 산화 미생물 연구 결과 및 계획에 대하여 소개하였음. 수층에서의 탄소 동위원소, DIC, DOC, POC 연구에 대한 논의 및, 수문학적 특성과 빙하 거동의 연관성에 대하여 논의를 하였다.

본 과제 책임자는 미생물 단일세포 분석 결과 초기 데이터 및 진행상황에 대한 발표를 하였다. McClane 이라는 *in-situ* 여과장비를 활용하여 호수 물 하나의 시료에서 3.0 um 이상, 0.8-3.0 um, 0.2-0.8 um, 0.2 um 이하로 4개의 size-fraction을 하여채취된 4개의 물 시료와 퇴적토 0-2cm, 2-4cm, 4-6cm, 6-8cm, 8-10cm와 채수기에 포집된 slurry 1개로 6개의 퇴적토 시료로 총 10의 시료를 대상으로 단일세포 분리 수행내용을 발표하였다. 이중 0.2-0.8um를 대상으로 단일세포 분리 및 LoCoS분석 후 동정한 결과를 주로 발표하였으며, 암모니아 산화 고세균/세균, 메탄산화 세균, 철 산화와 관련된 세균이 검출되었고, 이를 통하여 SALSA 가설이 맞게 접근한 것을 확인하였다. 또한 본 결과를 토대로 첫 번째 빙저호 Whillans 호수의 물/퇴적토 시료, Grounding zone의 퇴적토 시료도 확보하였다.

논문 게재 및 데이터 공유 정책 및 논문 집필 계획에 대하여 논의를 하였다. 이 과정에서 1) Mercer 호수 단독 논문 출판, 2) SLW (Subglacial Lake Whillans, 윌란스 호수)와 SLM (Subglacial Lake Mercer, 메르세르 호수) 수층 4개의 size fraction에서의 미생물 단일세포 연구 결과, 3) SLW, SLM, Grounding zone 세 지점의 퇴적토 미생물 단일세포 연구 결과로 세편의 논문 집필 계획도 수립하였다. 2019년 8월에는 NSF에 제출하는 연차보고에 메르세르 단일세포 유전체 분석 내용 포함하여 제출하였다. 또한 연구결과의 수월성을 인정하여 공동연구자에서 Co-PI로서 SALSA 프로젝트에 참여하게 되었다.

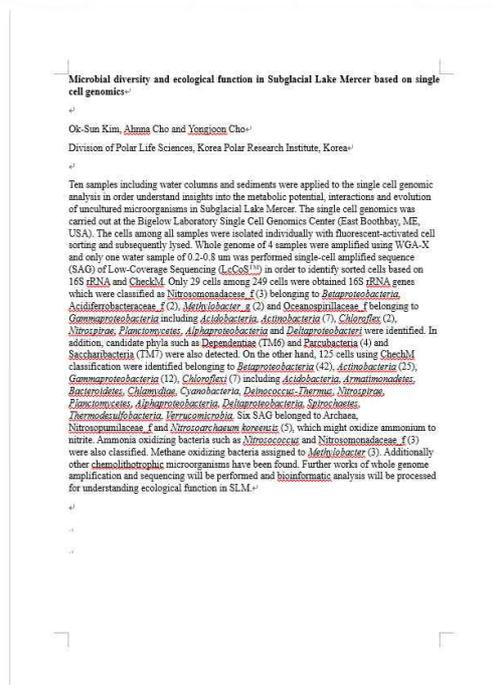


Figure 40. Annual report of the single cell genomics in SALSA project

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

가. 연구기간 : 총 3년 (2018. 5. 1. ~ 2020. 12. 31)

나. 목표달성도

| 구 분                | %    | 성취도 판단 |    | 특기사항<br>(우수성 또는 부진사유 등)  |
|--------------------|------|--------|----|--|
|                    |      | 정상     | 부진 |  |
| 2018년<br>목표<br>달성도 | 100  | √      |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단일세포 분리기 적용<br/>: 목표 대비 초과 달성 (시료 10점 초과 확보, 물리화학 분석 30건과 생물다양성 분석 80건 초과 달성)</li> <li>○ MDA 방법 세팅</li> <li>○ 세균군집자료 확보</li> </ul>            |
| 2019년<br>목표<br>달성도 | 100  | √      |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 빙저호 시료 총 10점 확보</li> <li>○ 단일세균 분석 총 3,120점 분리, 2,431 전장유전체 증폭 완료</li> <li>○ 국제 네트워크 구축: 비글로 랩의 단일세포 유전체, SALSA 워크샵 초청 및 Co-PI로 참여</li> </ul> |
| 2020년<br>목표<br>달성도 | 80   | √      |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 프리셀 호수 환경유전체와 단일세균 유전체 분석 수행</li> <li>○ 프리셀 호수 유전체 분석 중이며, 투고는 과제 종료 후 수행 예정임</li> </ul>  |
| 최종목표<br>대비<br>달성도  | 93.3 | √      |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구목표 달성</li> </ul>  |

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 가. 연구개발결과의 활용방안

- 본 과제를 기반으로 제 5기 주요사업의 신규과제 수행 (2020~2022)
  - “남극 빙저호의 물질순환에 관여하는 미생물의 생태학적 기능규명”
  - SLASA 프로젝트 Co-PI로서 참여
  - 단일세포 분석 센터 운영을 위한 청정랩과 유세포 분리기 및 관련 장비 구축
- 남극 내륙 호수 미생물의 생태학적 기능 연구 확장에 활용
  - 환경유전체와 단일세포 유전체 연구를 통하여 미생물의 생태학적 기능연구 심화
  - 생지화학적 물질순환에서 현재까지 알려지지 않은 미생물의 새로운 기능 규명
  - 장기모니터링을 통한 기후변화에 따른 호수 생태계 반응연구에 활용
  - 우주생물학 연구 기반 마련으로 우주시대 준비에 활용

### 나. 기대 파급효과

- 글로벌 이슈 대응
  - 빙저호 연구는 남극에서 수행하는 가장 큰 거대과학으로 미래 극지연 탐사 준비
  - 우주시대 준비를 위한 우주생물학 발전에 기여
- 과학적 가치 창출
  - 후보문의 생태학적 기능 연구의 수월성 확보
  - 국내 유일의 청정시설이 구비된 단일세포 분석센터 구축의 기반 마련
- 극지연 미개척 영영분야로의 진입
  - 극지연에서는 전무하였던 호수생태연구 시작
  - 향후 남극, 북극, 고산지대의 호수까지 국내외 연구진과의 연구 수행 기반 마련

다. 극지(연) 주도 장기계획 수립



1. 호수생태 연구

- 전지구적 물순환의 관점에서 수환경에서의 미생물 생태학적 기능규명과 생물지도작성을 목표로 함
- 1단계. 5기 주요과제 (2020-2022)에서는 미국의 SALSА 팀과 빙저호 메르세르에서의 단일 세포 유전체 비교 분석을 통하여 미생물에 의한 생지화학적 물질순환과 환경적응 진화적 관점에서 연구 수행
- 2단계. 6기 주요과제 (2023-2025)에서는 극지연 주도의 MCM-LTER (맥머도 장기모니터링) 팀과 SALSА 팀과 남극 호수 공동연구 수행
- 3단계. 7기 주요과제 (2026-2028)에서는 미국, 캐나다, 아이슬란드, 노르웨이와의 협력을 통하여 북극/고산지대의 호수생태연구를 공동 수행하고자 함
- 단일세포유전체와 환경유전체 분석을 통하여 전반적인 호수생태계 내의 1) 전체적인 유전자의 다양성을 이해하고, 2) 생지화학적 물질순환과 관련된 핵심 유전자 파악 및 주요기능을 하는 미생물이 누구인지, 마지막으로 이들의 3) 전지구적 분포 패턴을 알기 위한 생물지도 작성 및 계통도를 이해하여 4) 적응/진화 관점에서 이해하고자 함

## 2. 단일세포 분석 센터 구축 및 운영

- 본 과제에서는 단일세포 유전체에서 가장 핵심이 되는 단계인 유전체 증폭 방법을 최적화하여 확보하였음. 그리고 생공연, 해양연, 비글로 랩에서의 장비 운영 방법과 실제로 실험을 수행하여 단일세포의 분리 유전체 증폭에 대한 실험 방법을 셋업할 수 있는 노하우를 습득하였음.
- 이것을 바탕으로 현재 주요과제(1단계)에서는 1차년도에는 Class 1000의 **청정랩**을 구축하였고, 2차년도에는 **유세포 분리기** 도입, 3차년도에는 **자동액체처리 플랫폼**을 도입하여 대량의 세포를 분리하여 증폭방법을 셋업하고자 함.
- 2단계에서는 대량의 유전체 분석을 위한 라이브러리 제작까지 수행하도록 일련의 실험과정을 셋업할 계획임. 또한 3단계에서는 **DNA** 뿐만이 아니라 **RNA** 또는 특정 유전자 보유 **미생물 타겟**으로 선별하여 유전체 분석을 수행할 수 있는 기반을 마련하고자 함.
- 단일세포 유전체, 환경유전체와 같이 대량의 유전체 데이터가 생산이 되면 양질의 데이터를 선별하고, 이후 유전체 조립과 주석 처리를 위하여 생물학적 파이프라인을 셋업하고 순차적으로 서버를 증설할 계획임.
- 단일세포 유전체 센터가 갖추어지려면, 비글로 운영을 기본으로 할 때 **최소 4인**의 전담인력이 필요함. 워크샵 기간을 보통은 1주일로 하고, 보통 1일 5개의 시료를 처리함(시료의 특성에 바뀔 수 있음). 기본적으로 단일세포를 분리하는 워크샵 기간 동안, 총괄 및 세포 염색 (1인, 전담인력) - FACS 장비운영 (1인, 전담인력) - 자동액체 처리 플랫폼 장비 운영 (1인, 전담인력)으로 실험 수행을 위하여는 최소 3인이 필요함. 이후의 유전체 증폭과 라이브러리 제작을 위하여 메인 1인과 보조 1인이 필요한데, 이는 전담 인력으로 운영을 진행하면 됨. 생물정보학 분석 서비스를 제공할 경우도 전담인력 1인이 필요함.
- 진핵생물 분리 1인과 바이러스 1인은 전담인력보다는 워크샵 수행기간동안 업무를 수행하는 임시인력으로 연구 소내의 선임급 이상의 연구원과 실험방법 최적화 등 협력으로 진행하는 형태로 운영
- 센터 운영 시에는 유전체 증폭과 결과 확인을 위한 전용 **실험공간**(현재 청정실험실의 절반 공간, 0.5모듈)과 분석 시료 보관 및 증폭대기 시료와 증폭 후의 보관 공간, 제작된 라이브러리의 **보존을 위한 공간**(0.5 모듈, 초저온 냉동고, 냉동고, 냉장고)이 확보되어야 함

### 3. 극지연 빙저호 탐사를 위한 선행 조건

(연구정책지원사업 “남극 빅토리아랜드 Korean Route 사전조사와 빙저호 탐사를 위한 기획연구(PE15260)” 보고서 BSPE15260-042-12 참조)

- : **지구물리 탐사.** 빙하의 두께, 빙저호 수심과 지형 구조, 유입과 유출 등 빙저수계의 배수시스템 파악
- : **포괄적 환경영향평가 수행 및 ATCM 동의 획득.** 빙저 수환경 탐사를 위한 과학 및 환경적 책무 수행. 빙저 수환경(SAE) 탐사를 위한 과학 및 환경적 책무 이행 13개 권고
- : **열수시추 시스템 구축.** 빙하 두께에 따른 시추 장비의 모듈화, 기술력 확보, 국내외 인력 네트워크 구축. 연료 운영 방식 결정. 2중 여과장치와 자외선 살균 시스템을 갖춘 멸균시스템 장착
- : **보급 및 현장 캠프 구축.** 현장 연구 지원을 위한 물품 및 연료 보급과 현장 연구 캠프 운영 계획
- : **탐사 장비 제작 (in-situ probe & sampler).** 카메라, CTD, water sampler, sediment corer 등 빙저호 수체 내에 투입하여 이화학적 특성 분석을 위한 장비와 시료 채집 장비의 초소형으로 제작. 오염 최소화를 위하여 장비 세척 및 멸균 밀봉하여 현장 보급
- : **현장연구 시설구축 (in-situ Lab).** 현장 시료 채집 후의 시료 처리를 위한 청정도 제어 가능한 생물, 화학, 퇴적학 실험실.
- : **과학프로그램 계획.** 지화학, 퇴적학, 생물학적 연구 계획 수립

## 제 6 장 참고문헌

- Bowers RM, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Harmon-Smith M, Doud D, Reddy TBK, Schulz Frederik, Jarett J, Rivers AR, Eloë-Fadrosch EA, Tringe SG, Ivanova NN, Copeland A, Clum A, Becraft ED, Malmstrom RR, Birren B, Podar M, Borka P, Weinstock GM, Garrity GM, Dodsworth Ja, Yooseph S, Sutton G, Glockner FO, Gilbert JA, Nelson WC, Hallam SJ, Jungbluth SP, Etema TJG, Tighe S, Konstantinidis KT, Liu WT, Baker BJ, Rattei T, Eisen JA, Hedlund B, McMahon KD, Fierer N, Knight R, Finn R, Cochrane G, Karsch-Mizrachi I, Tyson GW, Rinker C, The Genome Standards Consortium, Lapidus A, Meyer F, Yilmaz P, Parks DH, Eren AM, Schriml L, Banfield JF, Hugenholtz P, Woyke T. 2017. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology*. 35: 725-731.
- Christner BC, Prsicu JC, Achberger AM, Barbante C, Carter SP, Christianson K, Michaud AB, Mikuki JA, Mitchell AC, Skidmore ML, Vick-Majors TJ & WISSARD Science Team. 2014. *Nature*. 512: 310-313.
- Gawad C, Koh W & Quake S. 2016. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature Review Genetics*. 17:175-188.
- Ghylin TW, Gracia SL, Moya F, Oyserman BO, Schwientek P, Forest KT, Mutschler J, Dwulit-Smith J, Chan LK, Martinez-Garcia M, Sczyrba A, Stepanauskas R, Grossart HP, Woyke T, Warnecke F, Malmstrom R, Bertilsson S, McMahon KD. 2014. Comparative single-cell genomics reveals potential ecological niches for the freshwater actinobacteria lineage. *The ISME Journal*. 8:2503-2516.
- He J, Du S, Tan X, Arefin A, Han CS. 2018. Improve lysis of single bacterial cells by a modified alkaline-thermal shock procedure. *BioTechniques*. 61: 129-135.
- Labonte JM, Pachiadaki M, Fergusson E., McNichol J, Grosche A, Gulmann LK, Vetriani C, Sievert SM & Stepanauskas R. 2019. Single cell genomics-based analysis of gene content and expression of Prophages in a Diffuse-Flow Deep-Sea Hydrothermal System. *Frontiers in Microbiology*. 10:1262.
- Li W, dore JE, Steigmeyer AJ, Cho YJ, Kim OS, Liu Y, Morgan-Kiss RM, Skidmore ML, Prsicu JC. 2020. Methane production in the oxygenated water column of a perennially ice-covered Antarctic lake. *Limnology and Oceanography*. 65: 143-156.
- Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PSG, Dubinsky EA, Fortney JL, Han J, Holman HY, Hultman J, Lamendella R, Mackelprang R, Malfatti S, Tom LM, Tringe SH, Woyke T, Zhou J, Rubin EM & Jansson JK. 2012. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME Journal*. 6: 1715-1727.
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Chen JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P & Woyke T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*.

499:431-437.

- Rinke C, Lee J, Nath N, Goudeau D, Thompson B, Poulton N, Dmitrieff E, Malmstrom R, Stepanauskas R & Woyke T. 2014. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nature Protocols*. 9:1038-1048.
- Siegfried M, Fricker HA, Roberts M, Scambos TA, Tulaczyk S. 2014. A decade of west Antarctic subglacial lake interactions from combined ICESat and CryoSat-2 altimetry. *Geophysical Research Letters*. 41:891-898.
- Stepanauskas R. 2012. Single cell genomics: an individual look at microbes. *Current Opinion in Microbiology*. 15:613-620.
- Stepanauskas R, Fergusson EA, Brown J, Poulton NJ, Tupper B, Labonte JM, Becraft ED, Brown, JM, Pachiadaki MG, Povilaitis T, Thompson BP, Mascena CJ, Bellows WK & Lubys A. 2017. Improved genome recovery and integrated cell-size analyses of individual uncultured microbial cells and viral particles. *Nature Communications*. 8:84.
- Slater SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffat MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ & Walker AW. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*. 12:87.
- Solden L, Lloyd K & Wrighton K. 2016. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Current Opinion in Microbiology*. 31:217-226.
- Tang KW, McGinnis DF, Ionescu D, & Grossart HP. 2016. Methane production in oxid lake waters potentially increases aquatic methane flux to air. *Environmental Science and Technology Letters*. 3:227-233.

극지연구소

## 연구·정책지원사업 최종 결과보고서 평가의견 반영사항

|   |  |   |                          |
|---|--|---|--------------------------|
| 과제 구분   | (Seed형 선행과제)                                   |   |                          |
| 과제명   | 단일세포 분석방법을 활용한 남극 호수 미생물 생태 연구 기반 구축 (PE20340) | 연구기간  | 2018.05.01. ~ 2020.12.30 |
| 연구책임자   | 김 옥 선  | 연구비(직접비)  | 300,000천원                |
| 과제개요, 연구성과 및 최종 결과보고서 평가의견 반영 사항  |  |   |                          |
| <p>(1) 과제의 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단일세포 분리 및 분석 기술 적용을 통한 남극 호수 미생물의 생리생태학적 기능 연구 기반 구축</li> </ul> <p>(2) 최종성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단일세포 분석의 핵심인 전장유전체 증폭 방법 셋업 완료</li> <li>○ 프리셀 호수 서식 비배양 후보문의 생태학적 기능 규명</li> <li>○ 메르세르 호수 10점 확보 및 단일세포 분석을 통하여 미생물 군집구조 분석 완료</li> <li>○ 단일세포 유전체 연구와 호수생태연구 네트워크 구축 완료</li> </ul> <p>(3) 성과의 향후 연구소 활용방안 또는 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 과제를 기반으로 연구소내 주요과제 수행 및 향후 장기연구계획 수립에 활용</li> <li>○ 빙저호, 극지역 호수생태연구, 우주생물학 연구 기반 마련 및 과학 영역확장</li> </ul> <p>(4) 최종 결과보고서에 평가의견 반영 사항</p> |  |   |                          |
| 평가의견  |  | 반영사항  | 비고                       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 향후 단일세포 분석 방법을 활용한 남극 호수 미생물의 생태학적 기능 연구를 위한 단·중·장기 계획을 소내와 국내·국제 공동연구의 관점에서 기술 요망</li> </ul>  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본과제는 전지구적 물순환의 관점에서 수환경에서의 미생물의 생태기능 역할 규명을 목표로 장기연구수행을 목표로 함. 호수생태연구의 장기계획은 5장의 연구개발 활용계획에서 상세히 기술하였음</li> </ul>                                      | 연구보고서 p.82 참조            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 현재 주요 과제에서 진행하고 있는 청정생물연구실 구축과 단일세포 분석 장비 구축 계획 실현을 위한 지원 요청 사항(공간 확보와 전문 인력 양성 지원 등)을 최종보고서에 포함 요망</li> </ul>   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단일세포 분석센터 운영의 장기계획은 5장의 연구개발 활용계획에서 상세히 기술하였음</li> </ul>   | 연구보고서 p.83 참조            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 인프라 구축 실적 최종보고서 기술 요망</li> </ul>   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 3장의 연구개발결과 기술 1절 전장유전체 증폭 방법 최적화 3절 단일세포 분리-증폭과 스크리닝 2절 유전체 분석 방법 최적화</li> </ul>   | 보고서 3장 참조                |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능연구의 진취적인 프로세스 구축이 있을 경우, 보고서에 포함 요망</li> </ul>   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 3장 2절의 프리셀 호수에서의 미생물 기능연구 내용이며, 주로 세포 내에서 만들어내지 않고, 필요 물질을 세포 내로 수송하는 산화환원전위차에 관련된 유전자가 매우 풍부함.</li> </ul>   | 보고서 3장의 2절 참조            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Seed형 과제 수행 내용과 기관고유사업 연구계획에 대한 순차적 비교 정리 요망</li> </ul>  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단일세포 실험수행 방법 최적화는 Seed형 수행내용이고, 실험수행을 위한 시설과 장비를 연구소 내에 구축하는 것은 기관 고유사업</li> <li>○ 메르세르호수의 경우는 단일세포 분리 및 증폭까지가 Seed형 과제의 내용이고 유전체 분석은 주요과제임</li> </ul> |                          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구 수행을 위한 극지역연구소 빙저호 시추기술의 조건 기술 요망</li> </ul>   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 빙저호 시추기술의 조건에 대하여는 5장의 연구개발 활용계획에서 상세히 기술하였음</li> </ul>  | 연구보고서 p.84 참조            |



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