

유용 극지생물자원 확보 : 내냉성 포식 미생물의 분리와 동정

유용 극지생물자원 확보:  
내냉성 포식 미생물의 분리와 동정

Securing useful arctic biological resources: Isolate and Characterization of Psychrotolerant Predatory Bacteria

극지연구소

울산과학기술원

주 의  
(편집순서8)

울산과학기술원

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “국내 학·연 극지연구진흥프로그램(PAP사업)”에 관한 연구 “유용 극지생물자원 확보: 내빙성 포식 미생물의 분리와 동정” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2024. 02. 14.

연구기관명 : 울산과학기술원

연구책임자 : Robert James Mitchell

참여연구원 : 문 원 식

“ : 장 효 찬

“ : 최 성 열

# 요 약 문

## I. 제 목

유용 극지생물자원 확보: 내냉성 포식 미생물의 분리와 동정

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 극지역의 저온 포식 미생물을 발견하고, 이를 분리 동정 및 기탁하여 특이 생물자원을 확보하는 것을 목표로 함.

기존의 일반 미생물 배양법과는 큰 차이가 있는 ‘포식 미생물’ 배양법을 기반으로, 극지 포식 미생물의 존재 유무와 분리를 통해 극지 미생물 연구의 새로운 방법론을 제시하고 향후 극지 포식 미생물 연구를 위한 기반 자원을 수립하는 것을 목표로 함.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 아래의 3가지 주 연구 내용으로 구성되어 있음

□ 극지 환경에서 포식 미생물을 분리함

- 극지 환경의 포식 미생물을 최초로 분리 시도
- 메타지놈 분석을 통해 포식 미생물의 존재를 확인하고 먹이 미생물을 선정함
- 실제 남극 시료 채취하고 그로부터 포식 미생물을 분리 동정함

□ 분리한 포식 미생물의 특성을 확인하고 분석함

- 극지 포식 미생물의 형태적 특성을 파악함
- 극지 포식 미생물의 형태 외적 특성을 파악함
- 극지 포식 미생물의 포식 방법을 파악함
- 기존 포식 미생물과의 먹이 스펙트럼을 비교 분석함

□ 극지 포식 미생물의 특이성을 통해 생물자원을 확보함

- 극지 포식 미생물의 내냉성 프로테아제 및 효소 관련 유전체 분석
- 유용 미생물, 유전체 등을 기탁 또는 특허 통해 생물자원화함

#### IV. 연구개발결과

##### □ 메타지놈 분석 및 포식 미생물 분리 공정 최적화

- 극지연구소가 확보한 극지 샘플을 바탕으로 메타지놈 분석을 진행, 포식 미생물이 존재할 수 있음을 확인하였음. 포식 미생물 분리를 위해 다양한 프로토콜을 적용해보며 저온 적응 포식 미생물을 분리할 수 있는 방안을 모색하였음. 확보된 8종류의 극지 샘플을 바탕으로 포식 미생물 분리법을 최적화하는 과정에서 3종의 포식 미생물 후보군(후보 1, 2, 3)을 분리 성공하였고, 분리에 성공한 샘플과 실패한 샘플을 비교 분석하며 잠재적으로 유불리한 조건을 탐색하였음.

##### □ 신종 포식 미생물 *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. 분석 및 기탁(자원화)

- 후보 #1 균주인 *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov.에 대한 심층 분석 결과를 제시함. 단일 배양 후 동정, Whole Genome Sequencing(WGS), 특성 분석을 거쳐 이 균주가 *Bdellovibrio*의 신종으로 확인되었으며, *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. str. PAP01로 명명되었음. 분석 결과는 IJSEM 저널에 출판되었음. WGS 정보는 NCBI에 등록되었고, PAP01균주는 Type strain으로서 IJSEM 출판을 위한 선행 조건으로서 한국과 독일 생물자원은행에 각각 기탁되었음(2개 국가 균주은행 기탁).

##### □ 2회에 걸친 세종과학기지 방문 통해 남극 여러 장소에서 포식 미생물 분리 배양체 165개 이상 확보, 비포식 미생물 200개 이상 확보. 최종적으로 신종 포식 미생물 3종 (하위 종 수십개) 분리 동정, 신종 비포식 미생물 6종 분리 동정 및 기탁

- 1차 세종과학기지 방문 통해 24일간 샘플링 및 분리 동정 진행. 1인 파견하여 14개 지점에서 샘플링 진행하였고, 한국으로 샘플 이송하여 분석 진행하였음.

- 해당 샘플로부터, 포식 미생물 PAP05, PAP06, PAP07, PAP08, PAP09, PAP10 배양체를 확보. 이 중 PAP07, 08을 성공적으로 분리 동정 하였고, 16S rRNA 분석 결과 Uncultured bacteria와 높은 유사도를 가지나, 가장 근연종은 *Sphingobacteriaceae* 속 *Mucilaginibacter daejeonensis*로서 91.03%라는 매우 낮은 유사도를 가짐을 확인. 완전히 새로운 ‘속’ 단위의 새로운 박테리아를 분리한 사례. PAP05는 일반적인 포식 미생물과는 다른 양상의 성장을 보여 Candidate Phyla Radiation(CPR)일 가능성에 대해 초점을 맞추고 추가적인 연구 설계를 진행 중

- 1차 세종과학기지 방문에서 비포식성 미생물(Non-predatory bacteria) PPAP05, 10, 11을 분리. 16s rRNA 분석 결과 세 배양체는 근연종이며, PPAP10은 *Polaromonas jejuensis* NBRC 106434과 98.15% 유사함. *Polaromonas potterensis* SM01라 명명하고, Whole genome sequencing 및 특성분석, 균주 기탁을 완료하였음.

- 2차 세종과학기지 방문 통해 57일간 샘플링 및 분리 동정 진행. 1차년도에 성공적으로 수집한 데이터를 바탕으로 연구 범위를 확대. 전문가 2인의 방문(1인 -> 2인), 샘플링 지점의

다양화 (바톤반도 14개 지점 -> 바톤반도 외 2개 지역에서 86개 지점), 먹이 균주의 다양화 (2개 균주 -> 10개 균주(현장 분리 균주 포함)), 배양 방식의 최적화 (고체배지 방식 -> 액체배지 방식)를 통해 High-throughput screening을 진행하였고, 결과적으로 총 86개 지점에서 포식 미생물 배양체 159개, 비포식 미생물 배양체 200개 이상을 확보하였음.

- 대표 포식 미생물 13종 선정하여 16s rRNA 분석한 결과 대다수가 근연종으로 분석됨. 추가적으로 gyrB 유전자 및 포식 특성을 기반으로 각기 차이가 있음을 입증하고, 클러스터를 나누었음. 각각의 특성을 면밀히 분석하고 최종적으로 신종으로 보고할 박테리아 2개 종을 선정하였음. *Bacteriovorax antiarcticum* PP10과 *Halobacteriovorax antiarcticum* VP107.1.

- 직접 채집한 남극 샘플로부터 신종 비포식 미생물 6종을 선별해냈으며, 신종 명칭과 기탁번호는 각각 다음과 같음.

- 1) *Flavobacterium ardleyensis* PL02 (DSM 116602) - 뜻: 아드레이섬 유래
  - 2) *Formosa sejongensis* PL04 (DSM 117045) - 뜻: 세종과학기지 유래
  - 3) *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 (DSM 116981) - 뜻: 저온, 비올라세인 생산
  - 4) *Polaribacter ardleyensis* PL03 (DSM 116992) - 뜻: 아드레이섬 유래
  - 5) *Polaromonas potterensis* SM01 (DSM 116566) - 뜻: 포터소만 유래
  - 6) *Rhizobium antarcticum* PL01 (DSM 116244) - 뜻: 남극 유래
- 비포식 미생물 6종에 대한 면밀한 특성 분석을 진행하였음.

#### □ 난배양성 극지 포식 미생물 특성 분석을 위한 포식 미생물 단기 생물 활성 측정법 개발

- 남극 포식 미생물은 일반 포식 미생물의 분석법이 적용되지 않는 경우가 많았음. 지나치게 느린 성장속도 또는 Plaque 미형성을 이유로 정량이 어려웠음. 이에 기존 3일 ~ 7일 이상 걸리던 공정을 Resazurin 분석법을 도입, 새로운 박테리아 viability 측정 계산법을 개발하여 15분만에 포식 미생물 정량을 가능케 하였고, Plaque를 안정적으로 형성하지 못하는 PAP08 연구에 적극 활용하였음.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

□ 본 연구를 통해 다음과 같은 기대효과를 예상할 수 있음.

- 극지의 포식 미생물을 최초로 분리함
- 일반 미생물 배양 방법과 상이한 포식 미생물 배양 방법과 극지 환경에 최적화된 배양 방법 개발을 통해 향후 포식 미생물 배양에 대한 표준 연구법을 정립
- 다양한 환경 포식 미생물 연구의 연구인력 양성 및 추가 연구의 발판
- 효소가 다양할 것으로 예상하는 포식 미생물의 특성상, 다양한 저온 적응 효소의 유전체를

확보할 것으로 예상

- 다종의 유용 포식 미생물을 확보함으로써 극지 포식 미생물 자체를 추후 산업, 의학, 보건 측면에서 활용할 수 있거나 해당 기초연구에 도움을 줄 수 있으리라 예상



# Summary

## I. Title

Securing useful arctic biological resources: Isolate and Characterization of Psychrotolerant Predatory Bacteria

## II. Purpose and Significance of Research

The aim of this study is to discover low-temperature predatory bacteria in polar regions, isolate and identify them, and deposit them to secure unique biological resources.

Based on a distinctive 'predatory bacteria' cultivation method that significantly differs from conventional microbial cultivation methods, this research aims to introduce a novel methodology for polar microbial studies through the identification and isolation of predatory bacteria in polar regions. The ultimate goal is to establish foundational resources for future research on polar predatory bacteria.

## III. Content and Scope of Research

This study is structured around the following three main research contents:

### Isolation of Predatory Bacteria in Polar Environments

- Attempted the initial isolation of predatory bacteria in polar environments.
- Confirmed the presence of predatory bacteria through metagenomic analysis and selected prey bacteria.
- Actively collected samples from Antarctica and isolated and identified predatory bacteria from these samples.

### Characterization and Analysis of Isolated Predatory Bacteria

- Investigated the morphological characteristics of polar predatory bacteria.

- Examined the external features of polar predatory bacteria.
- Unveiled the predatory mechanisms of polar bacteria.
- Compared and analyzed the prey spectrum of polar predatory bacteria with that of existing predatory bacteria.

#### Acquisition of Biological Resources Through the Uniqueness of Polar Predatory Bacteria

- Conducted genomic analysis of cold-adapted proteases and enzyme-related genes in polar predatory bacteria.
- Biosourced valuable bacteria, genomes, etc., through depositing or patenting.

### IV. Research and Development Results

#### Metagenomic Analysis and Optimization of Predatory bacteria Isolation Process

- Based on polar samples obtained by the Korea Polar Research Institute, metagenomic analysis was conducted, confirming the potential existence of predatory bacteria. Various protocols were applied to optimize the process of isolating cold-adapted predatory bacteria. During the optimization of the predatory bacteria isolation method using the secured eight types of polar samples, three candidate predatory bacteria (Candidate 1, 2, 3) were successfully isolated. Comparative analysis between successful and unsuccessful samples was performed to explore potentially advantageous or disadvantageous conditions.

#### Analysis and Deposit of the Novel Predatory Bacteria *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov.

- In-depth analysis results are presented for Candidate #1 strain, identified as *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. Following isolation through a single culture, the strain underwent taxonomic identification, Whole Genome Sequencing (WGS), and characteristic analysis, confirming it as a novel species within the *Bdellovibrio* genus and named *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. str. PAP01. The analysis results have been published in the IJSEM journal. WGS information has been registered with NCBI, and the PAP01 strain has been deposited as the Type strain to biological resource banks in both South Korea and Germany, respectively.

- Through two visits to the Sejong Science Station, over 165 predatory bacteria isolates and more than 200 non-predatory bacteria isolates were secured from various locations in Antarctica. Ultimately, three novel predatory bacteria (with dozens of sub-species) were isolated and identified, and six novel non-predatory bacteria were isolated,



## identified, and deposited

- During the first visit to the Sejong Science Station, sampling and isolation identification were conducted for 24 days. A team member was dispatched for sampling at 14 different locations, and the samples were transported to Korea for further analysis.
- From these samples, predatory bacteria cultures (PAP05, PAP06, PAP07, PAP08, PAP09, PAP10) were obtained. Among them, PAP07 and PAP08 were successfully isolated and identified. The 16S rRNA analysis revealed a low similarity of 91.03% with the most closely related species identified as *Mucilaginibacter daejeonensis* within the *Sphingobacteriaceae* family, despite having high similarity with Uncultured bacteria. This indicates the isolation of a completely new bacterial unit at the 'family' level. PAP05 exhibited a growth pattern different from typical predatory bacteria, showing potential association with Candidate Phyla Radiation (CPR). Further research designs are underway to focus on this unique aspect.
- During the first visit to the Sejong Science station, non-predatory bacteria (PPAP05, 10, 11) were isolated. The 16S rRNA analysis revealed that these three cultures are closely related, with PPAP10 showing 98.15% similarity to *Polaromonas jejuensis* NBRC 106434. It was named *Polaromonas potterensis* SM01, and the process included Whole Genome Sequencing, characteristic analysis, and the deposition of the strain.
- The second visit to the Sejong Science station involved sampling and isolation identification over a period of 57 days. Building upon the successfully collected data from the first year, the research scope was expanded. Two experts visited (from 1 to 2 individuals), diversification of sampling locations (from 14 locations in the Barton Peninsula to 86 locations in the Barton Peninsula and 2 additional areas), diversification of prey strains (from 2 to 10 strains), and optimization of cultivation methods (from solid medium to liquid medium) were carried out to conduct High-throughput screening. As a result, a total of 159 predatory bacteria cultures and over 200 non-predatory bacteria cultures were obtained from 86 sampling locations.
- Thirteen representative predatory bacteria were selected, and 16S rRNA analysis revealed that the majority were closely related species. Additionally, proof of distinct differences based on the *gyrB* gene and predatory characteristics was provided, leading to the division into clusters. Two bacteria were ultimately selected for reporting as novel species: *Bacteriovorax antiarcticus* PP10 and *Halobacteriovorax antiarcticus* VP107.1.
- Six novel non-predatory bacteria were identified from directly collected Antarctic samples, and their respective names and deposit numbers are as follows:

- *Flavobacterium ardleyensis* PL02 (DSM 116602) - Derived from Ardley Island
- *Formosa sejongensis* PL04 (DSM 117045) - Derived from Sejong Science Station
- *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 (DSM 116981) - Low temperature, violet pigment (Violacein) production
- *Polaribacter ardleyensis* PL03 (DSM 116992) - Derived from Ardley Island
- *Polaromonas potterensis* SM01 (DSM 116566) - Derived from Potter Sound
- *Rhizobium antarcticum* PL01 (DSM 116244) - Derived from Antarctica

A detailed analysis of the characteristics of the six non-predatory bacteria was conducted.

**Development of a Short-Term Biological Activity Measurement Method for Analysis of Non-Culturable Polar Predatory bacteria**

- Analyzing Antarctic predatory bacteria often posed challenges as conventional methods for predatory bacteria analysis were not applicable. The quantification was difficult due to excessively slow growth rates or the absence of plaque formation. To address this, a process that previously took 3 to 7 days or more was streamlined by introducing the Resazurin analysis method. A novel method for calculating bacterial viability was developed, enabling the quantification of predatory bacteria within just 15 minutes. This innovative approach was actively employed in the study of PAP08, which had difficulty forming plaques stably.

**Through this research, the following expected effects can be anticipated**

- Successful isolation of predatory bacteria in polar regions in the first time.
- Establishment of standard research methods for cultivating predatory bacteria in the future, through the development of culture methods optimized for polar environments that differ from conventional microbial cultivation methods.
- Training of research personnel in the study of diverse environmental predatory bacteria and laying the groundwork for additional research.
- Anticipation of securing the genomes of various cold-adapted enzymes, given the diverse characteristics expected in predatory bacteria.
- By securing a variety of beneficial predatory bacteria, it is anticipated that the polar predatory bacteria themselves can be utilized in the future in industries, medicine, and health, or contribute to fundamental research in these areas.

# Contents

I. Introduction

II. Status of the related fields of study

III. Research topics and their results

IV. Achievement of research objectives

V. Utilization Plan of research achievement

VI. References



# 목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4장 연구개발목표 달성도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌



# 제 1 장 서론

## 1절. 연구목표

- 본 연구의 최종목표는 극지역의 저온 포식 미생물의 발견과 이를 통한 생물자원의 확보임.
- 본 연구는 기존의 미생물 배양법과 매우 상이한 포식 미생물 배양법을 바탕으로 극지 미생물 연구의 새로운 방법론을 제시하고, 최초로 극지 포식 미생물의 존재유무와 분리를 확인하며, 이를 생물자원화하여 향후 연구의 기본으로 활용하는 것.

### 1차년도 연구목표

- 1차년도의 연구목표는 1차 샘플링을 통해 포식 미생물의 존재를 확인 및 분리.

### 2차년도 연구목표

- 2차년도의 연구목표는 1차 샘플링에서 분리한 포식 미생물의 특성을 파악, 1차 샘플링 과정에서 얻은 메타지놈 정보 등을 바탕으로 2차 샘플링을 준비 및 진행.

### 3차년도 연구목표

- 3차년도의 연구목표는 1, 2차 샘플링에서 분리한 포식 미생물의 특성을 파악, 유전체등 유용 생물자원을 확보하여 기탁, 특허 출원을 진행.

## 2절. 연구과제의 필요성

- 포식 미생물(*Bdellovibrio* And Like Organism)은 아래와 같은 생물학적 특성을 가지고 있음.
  1. 유전자(DNA, RNA)를 포함한 병원균 및 유래 생물 물질(단백질, LPS 등)의 포식 제거(Jang et al, 2022)
  2. 다양한 먹이 및 영양 미생물 스펙트럼 (Jurkevitch, E et al, 2000, Mun et al, 2023)
  3. 포유동물세포에 대한 무독성 (Gupta et al, 2016, Monnappa et al, 2016)
  4. 포식 작용을 위한 다양하고 풍부한 효소 생산과 그 유전체 (Rendulic et al, 2004)
- 그러나 이러한 생물학적 특성과 중요성에도 불구하고 생물자원으로서의 평가는 평가 자체가 존재하지 않음. 그 이유는 연구의 특이성으로 인한 연구인력이 확보되지 않았고, 연구의 주요연구가 포식 기작 규명 단계에 있기 때문에 경제적, 산업적 필요가 발생하지 않았기 때문
- 따라서 상기된 생물학적 특성으로 향후 대체 항생제, 바이오매스 제거, 풍부한 효소등과 같은 산업적 필요가 발생을 예상할 수 있고 이에 따라 포식 미생물의 확보가 중요. 특히 온도, pH, 염도(Salinity) 등 다양한 조건에서 발견되는 포식 미생물을 확보하는 것으로 산업적 필요에 부합하는 유용 자원을 선점하는 효과를 가질 수 있음
- 이러한 포식 미생물의 가능성 중 대표적인 예로 프로테아제를 들 수 있음. 2010년 극지연구

소에서 출판한 논문에서 언급된 극한 미생물에서 확보한 효소(extremozymes)는 산업생물공학 분야에서 유용한 생물촉매제의 중요성을 언급한 바 있으며, 그중 프로테아제는 총 산업 효소 시장의 총 60%를 차지하고 있고 세제, 식품, 정육, 가죽, 의약품 등 다양한 영역에서 사용됨

- 포식 미생물은 먹이 미생물의 내외부에서부터 먹이미생물을 분해하고 양분을 흡수하는 생활사적 특성상 구성성분 분해효소가 아주 많으며 특히 대표적인 포식 미생물 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100의 경우 150종의 프로테아제를 포함하여 약 300여종의 가수분해효소를 가지고 있는 것으로 알려져 있음. 일반적인 다른 연구실 배양 균주의 프로테아제가 약 30종, *E. coli* K12의 경우 약 75종으로 이보다 2 ~ 5배 많은 효소 자원을 가지고 있음. 더 나아가 일반적인 영양생식을 하지 않아 가수분해 효소의 특징(발현 구역, 지속성, 활동성) 역시 기존의 박테리아 효소와 상이하게 진화하였을 가능성이 있음. 따라서 저온 포식 미생물을 분리하여 분석하는 것만으로도 매우 다양한 저온 분해효소 유전체 후보를 확보할 수 있음. 환경적 영역에 관한 연구를 확장하여, 훈련된 인력을 통한 극한환경 포식 미생물 연구를 진행하고자 함.
- 발전 방향으로서, 이번 연구 경험을 바탕으로 환경적 영역에 관한 연구를 확장하여 훈련된 인력을 통한 극한환경 포식 미생물 연구를 진행할 수 있음. 추후 확장된 표현형의 포식 미생물 분리를 위한 고온의 열수구, 염도가 매우 높은 염수호, pH조건에 따른 유황천, 먹이미생물이 많은 하수구 및 처리장 등과 같이 후보군이 있을 것으로 판단되는 다양한 조건에서의 샘플링을 진행 할 수 있는 파견 연구 인력을 양성할 수 있음.
- 본 연구를 기반으로 각 극한 환경의 포식 미생물 연구를 국제적으로 최초 실행하고 한국에서 해당 생물자원 및 그 연구인력 확보하여 다가올 산업적 필요에 유리한 고점을 미리 선점할 필요가 있음.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내외 기술개발 현황

- 현재까지 알려진 바로는 인류는 전체 미생물에 약 0.1%만을 분리할 수 있는 것으로 알려져 있음. 이는 미생물의 생활상이 매우 다양하며 연구실에서 시도할 수 있는 배양 방법과 미생물의 생활사에 대한 차이가 있음.
- 대표적으로 포식 미생물(*Bdellovibrio* And Like Organism)의 경우 포식될 먹이(pre) 미생물이 없으면 자라지 않는 극단적인 특성상 기존 분리방법으로는 결코 분리할 수 없음.
- 포식 미생물은 그람 음성균으로 다른 그람 음성균을 포식하여 성장, 생식하는 특성이 있는 특이한 박테리아임 (그림1). 바이러스인 박테리오파지와 달리, 먹이 종이 비교적 자유롭고, 먹이종의 DNA나 단백질 등 구성요소를 남기지 않고 제거하는 특성을 가지며 토양계와 수계 등 다양한 환경에서 쉽게 관측되나 먹이를 바탕으로 하는 배양의 어려움 때문에 연구가 적게 진행된 중임.

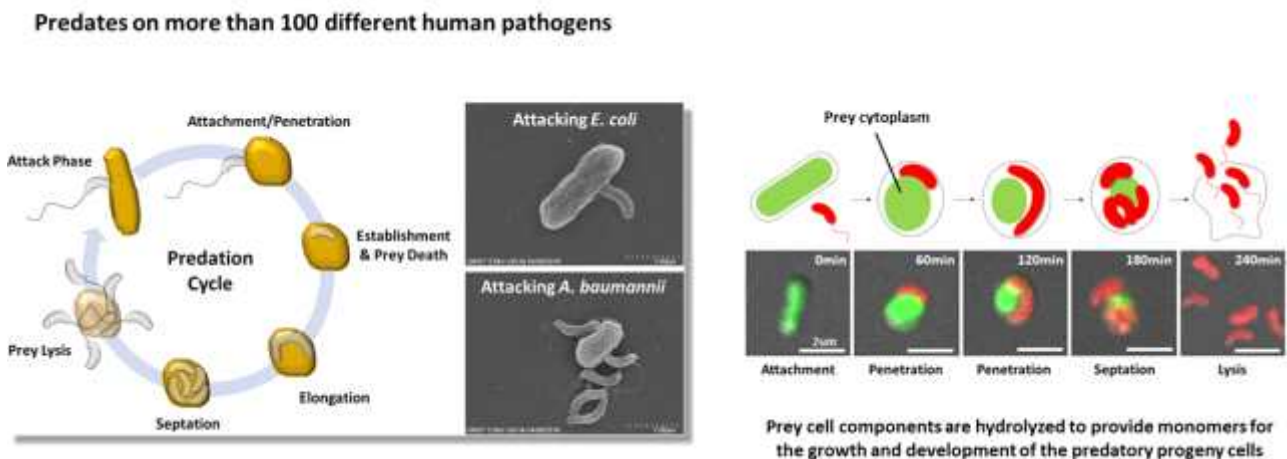


그림 1 포식 미생물(*Bdellovibrio* And Like Organism: BALOs)의 생활사와 먹이균을 섭취 분해하는 기작. 포식 생활사(Predation cycle)은 Attack phase -> Attachment/penetration -> Establishment & Prey Death -> Elongation -> Septation -> Prey Lysis 로 이루어져 있으며 한 사이클 당 4시간 가량 소요되며, 4~6개의 딸세포(Progeny)를 생산함.

- 국내외에서 현재 진행되고 있는 포식 미생물관련 연구는 이러한 특이성 때문에 연구자의 수가 적고 이에 따라 연구의 범위가 한정되어 있음.
- 이러한 좁은 연구 풀의 문제로 과거(2000~2005)년에 진행되던 다양한 환경에 따른 포식 미생물의 분리와 분석 및 특징 확인이 최근에는 많이 이루어지지 않고 있음.
- 현재까지 알려진 포식 미생물(그 중 *Bdellovibrio*)의 서식 온도 배리이션은 4도에서 57도이

다. 저온 4도(USA, Newyork, 겨울)의 경우 유전체만 확인되었으며 분리 분석된 온도는 18도(Norway, Tromso)가 한계인 것으로 알려짐. (Davidov et al, 2004)

- 포식 미생물의 여러 갈래중 하나인 *Bdellovibrio*의 경우만 해당 연구가 극소수 진행되었으며 그렇지 않은 *Micavibrio*, *Halobacteriovorax*, *Predibacter*등의 경우는 극한 환경적 분석이 거의 진행된 바 없음.
- 2021년 메타지놈 연구에 따르면 남극대륙 장보고기지 아래 빅토리아랜드 이탈리아 연구진이 Tethy 만에서 발견한 marine sponge에서 *Bdellovibrio*의 유전체를 확인한 바 있으며 따라서 남극에 포식 미생물이 존재할 가능성이 매우 높음. (Ruocco et al, 2021)
- 본 연구진은 전 세계적으로도 몇 안되는 포식 미생물 전문 연구진이며 한국에서 현재 유일하게 포식 미생물을 연구하고 있음. 특히 외부 자연환경에서 포식 미생물을 분리, 동정 및 유전체를 확보할 수 있는 노하우를 가지고 있음.
- 국내외에서의 포식 미생물 관련 연구는 크게 두 가지 방향임. 하나는 대체 항생제의 가능성으로 병원균제거와 포식기작의 규명을 초점을 맞춘 연구방향이고 다른 하나는 산업적 활용 및 기존에 좁게 형성되었던 포식조건외의 다변화를 꾀하고자 하는 다양한 환경적 포식조건외의 확인임.
- 하지만 이러한 연구들은 후술할 포식 미생물의 자원적 가치를 과소평가하고 있으며, 이는 다양한 포식 미생물 자체의 확보에 중요성에 적은 수의 연구진만이 참여하고 있다는 것을 시사..
- 남극 포식 미생물의 연구는 본 연구진의 시도가 그 첫 사례이며 Norway Tromso의 사례보다 더 낮은 온도의 환경에서 분리를 시도함. 이러한 저온 포식 미생물의 존재가능성은 그간 메타지놈연구로 밝혀진 바 있으나 실제 분리한 사례는 없음.
- 따라서 기존의 메타지놈 분석을 통해 알려진 극지 포식 미생물을 분리하고, 포식 미생물의 먹이가 될 미생물을 탐색하고, 해당 포식 미생물의 저온 적응 관련 유전체 등 유용 생물자원을 확보 할 것. 이를 통해 신규 포식 미생물을 학계에 알리거나, 특허 및 특이기술 선점하여 기존의 한정적인 포식 온도 요인의 저변을 넓힐 수 있으리라 판단함.

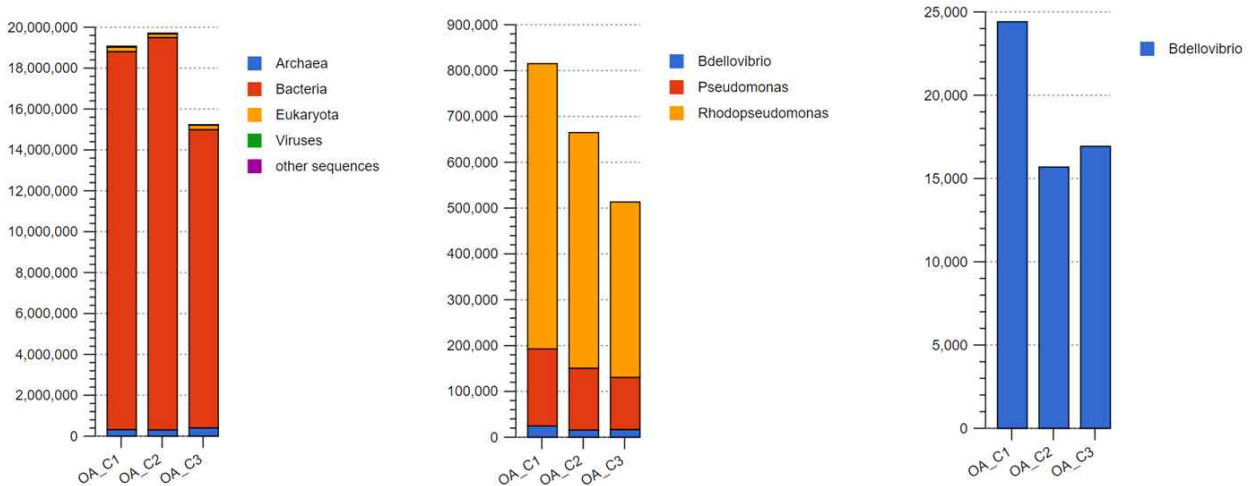


# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 1절. (1차년도) 메타지놈 분석 및 포식 미생물 분리 공정 최적화

### ○ 극지 메타지놈 분석을 통한 포식 미생물 확인

- 극지연구소 김민철 박사님을 통해 극지 메타지놈 정보를 받음. 해당 정보는 아래와 같음: Distinct Taxonomic and Functional Profiles of the Microbiome Associated With Different 토양 Horizons of a Moist Tussock Tundra in Alaska, MG-RAST server under project ID mgp21063 (12 metagenomes) (TRIPATHI et al, 2019)
- 상기의 메타지놈으로부터 *Bdellovibrio spp.*를 확인할 수 있었음. 포식 미생물의 주된 먹이로 알려진 *Pseudomonas spp.*가 토양 대표 미생물이자 우점종인 *Rhodopseudomonas*와 함께 유의미하게 존재함을 확인함. 포식 미생물 분리를 위해 *Pseudomonas putita* KT2440를 추후 분리의 핵심 먹이 균주로 선정하여 활용 (그림2, 그림3).



domain	phylum	className	order	family	genus	OA_C1	OA_C2	OA_C3
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	24409	15687	16933
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	168173	135037	113578
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>	622638	514172	382751

showing rows 1-3 of 3

그림 2 MG-RAST server under project ID mgp21063 분석 결과. 주로 Bacteria가 환경에 우점하며(상단 좌측), 유의미한 수준의 *Pseudomonas*가 우점종 중 하나로 확인됨 (상단 중간). *Bdellovibrio*는 *Pseudomonas* 존재량 대비 3.75%가량 존재하여, 분리 가능한 균주 중 하나로 예상됨(상단 중간 및 우측).

	Total bacteria	Rhodopseudomonas	Pseudomonas	bdellovibrio
OA_C1	18 M	623 k	3.46%	168 k
OA_C2	19 M	514 k	2.71%	135 k
OA_C3	15 M	383 k	2.55%	114 k
Oe_C1	14 M	464 k	3.31%	126 k
Oe_C2	13 M	492 k	3.78%	113 k
Oe_C3	13 M	484 k	3.72%	115 k
A_C1	15 M	450 k	3.00%	130 k
A_C2	16 M	259 k	1.62%	116 k
A_C3	13 M	219 k	1.68%	90 k

- % 는 전체 박테리아 대비 genus 비율
- Rhodopseudomonas는 토양 박테리아의 대표 균주로 비교를 위해 사용됨 일반적으로 1~5% 내외로 존재함

그림 3 전체 박테리아 대비 *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Bdellovibrio*의 비율.

- 2004년 IJSEM의 Norway Tromso (Yaacov et al.), 2018년 김민철 박사의 Alaska Council 메타지놈, 2019년 Marine Drugs의 Antarctic Tethy의 메타지놈(Nadia et al.)에서 모두 저온 포식 미생물의 존재 가능성이 매우 높음을 확인함.

○ 극지연 기 확보 샘플을 이용한 포식 미생물의 분리

- 1차년도 연구개시일부터 1차 샘플링까지의 일정 지연에 따라, 연구기간의 효율적인 활용을 위하여 극지연구소 김민철 박사님의 도움을 받아 극지 샘플을 받아 분리를 진행함.
- 제공받은 샘플은 아래 (표1)과 같음.

Sample	Site	Year
Alaska Permafrost	Alaska	-
Alaska council 1	Alaska	2014
Alaska council 2	Alaska	2014
Chersky, Russia	Chersky	2014
Cambridge Bay Canada	Cambridge Bay	2018
MidtreLovenForeland Biocrust	Svalbard	2021
Adventdalen Biocrust	Svalbard	2021
BiomStrand 2 Biocrust 토양	Svalbard	2021

표 1 극지연구소 포식 미생물 분리를 위한 기 확보 샘플의 종류와 샘플링시기

- 극지 샘플은 활성화작업을 거친 뒤 prey가 존재하는 배지와 혼합. 이후 고체 배지에서 주변 prey의 lysis를 관찰하며 기초 isolation 테스트를 진행함.
- 시험 온도는 현재 15° C, 20° C, 30° C로 구성, prey는 *E. coli* ML35(Yaacov et al. 2004. IJSEM), DNB with BALO salt 배지를 이용하여 분리를 시도.
- 표1의 샘플에서 총 3종의 후보종(candidate)을 분리하였으며 아래 (그림4) 와 같음

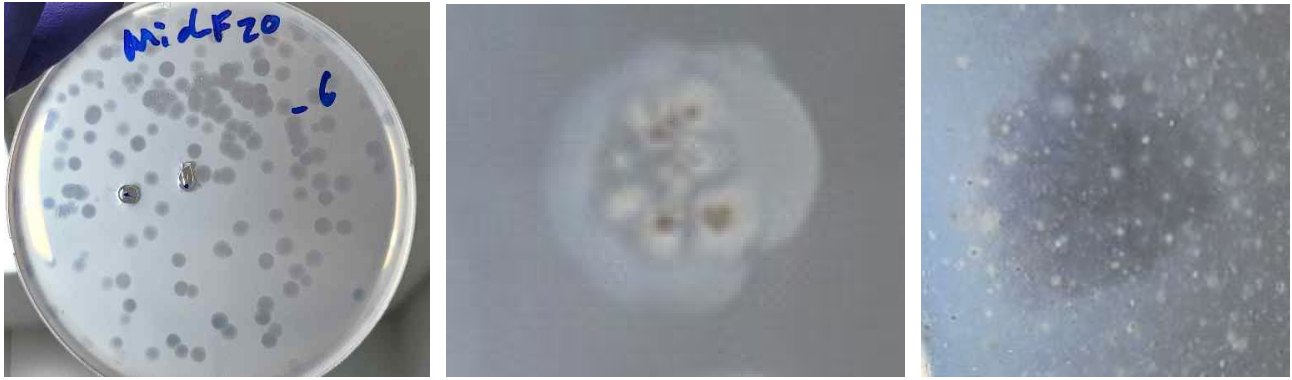


그림 4 (왼쪽) 후보 #1 균주가 생성한 Plaque(Lysis zone). 투명한 원형의 Plaque을 만드는 특징. (중간) 후보 #2 균주가 생성한 Plaque. 투명한 Plaque 위에 콜로니가 형성되는 특징. (오른쪽) 후보 #3 균주가 생성한 Plaque. 다양한 Contaminant 뒤편에 비정형의 Plaque를 형성하는 특징.

#### ○ 후보 #1 (Candidate #1)

- Svalbard Midtre Loven Foreland Biocrust(2021) 15° C, 20° C에서 분리한 박테리아
- 분리 소요시간 5일, 먹이미생물 *E. coli* ML35, *P. putida* KT2440
- 기존 포식 미생물과 비슷한 특성을 보임.
- 16s rRNA 분석 결과 *Bdellovibrio*와 유사한 신종으로 확인되었으며, 이의 특성에 대한 자세한 분석을 진행하였음. 본 분석 내용은 2절에서 다룸.

#### ○ 후보 #2 (Candidate #2)

- Svalbard Adventdalen Biocrust(2021) 15° C, 20° C, 30° C에서 분리한 박테리아
- 분리 소요시간 7일, 먹이미생물 *E. coli* ML35
- 기존 포식 미생물과 달리 colony를 생성함
- colony 주변으로 cell lysis를 보이며 이러한 거동은 15° C, 20° C에서 더 잘 관측됨.

#### ○ 후보 #3 (Candidate #3)

- Canada Cambridge Bay(2018) 15° C, 20° C에서 분리한 박테리아
- 분리 소요시간 10~20일, 먹이미생물 *E. coli* ML35
- 불규칙한 plaque 형태, 긴 포식기간을 가지고 있음이 확인됨.

- Candidates를 비롯한 모든 분리종이 2018년 이후의 샘플에서 확인되었음. 균주의 보관 온도가 영하 20° C인 점을 고려할 때 샘플의 저온 장기보존이 포식 미생물의 분리에 악영향을 줄 수 있음을 예상함.
- 또한 샘플링된 시료가 Biocrust로 일반적인 포식 미생물의 서식환경과 상이하여 분리에 실패한 것으로 간주, 추후 남극 방문 시 해빙 연못, 해안퇴적층, 토착 생물의 배설물 등의 포식 미생물이 풍부한 시료를 샘플링할 필요성을 제시함.
- 이후 후보 #1, #2, #3의 분석과 동시에 본 실험을 1차 샘플 대상을 결정하는 예비실험으로 활용함.

## 제 2절. 후보 #1 균주 - *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. 분석

○ 위의 세 후보균주 중 후보 #1 균주에 대한 심층 분석을 진행하였음. 단일 배양 이후 동정을 진행하고 Whole genome sequencing(WGS) 및 특성 분석을 마침. 본 균주는 *Bdellovibrio*를 근연종으로 하는 신종 균주로 밝혀졌으며, *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. str. PAP01으로 명명함. (표2, 그림5)

- 해당 연구 결과는 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 저널에 투고되어 2024. 01. 12. 날짜로 Accepted 됨 (IJSEM-D-23-00550R2)
- 해당 논문의 제목은 ‘*Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov., a newly described predator isolated from Svalbard, Norway’ .
- WGS 정보는 NCBI에 등록되었음 (Accession: NZ\_JANRMI000000000.1).
- Type strain으로서 기탁 완료하였음(한국, 독일). 기탁명 PAP01<sup>T</sup> (=KCTC92583<sup>T</sup> =DSM115080<sup>T</sup>).

Reference Strain	Accession Number	dDDH (d <sub>4</sub> , %)	C.I. (d <sub>4</sub> , %)	ANI Score (%)	ΔGC (%)
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100 <sup>T</sup>	NC 005363	18.5	[16.4 - 20.9]	72.81	4.96
<i>Bdellovibrio reynosensis</i> <sup>T</sup>	NZ CP093442	19.1	[16.9 - 21.5]	72.36	2.57
<i>Bdellovibrio</i> sp. NC01	NZ CP030034	19.5	[17.3 - 21.9]	75.59	1.23
<i>Bdellovibrio</i> sp. ZAP7	NZ CP030082	19.4	[17.2 - 21.7]	73.33	0.35
<i>Bdellovibrio</i> sp. KM01	NZ CP058348	19.3	[17.1 - 21.7]	73.48	0.22
<i>Bdellovibrio</i> sp. SKB1291214	NZ CP106855	19.0	[16.8 - 21.4]	73.08	0.91
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> str. Tiberius	NC 019567	18.7	[16.5 - 21.1]	72.8	4.17
<i>Pseudobdellovibrio exovorus</i> JSS <sup>T</sup>	NC 020813	18.5	[16.4 - 20.9]	67.9	3.77

표 2 Pairwise comparisons of the genome of *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. DSM 115080<sup>T</sup> against other predatory strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)). *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. DSM 115080와 다른 포식 미생물간의 유사성 검증. dDDH 70%이하, ANI 95%이하인 경우 신종으로 간주됨.

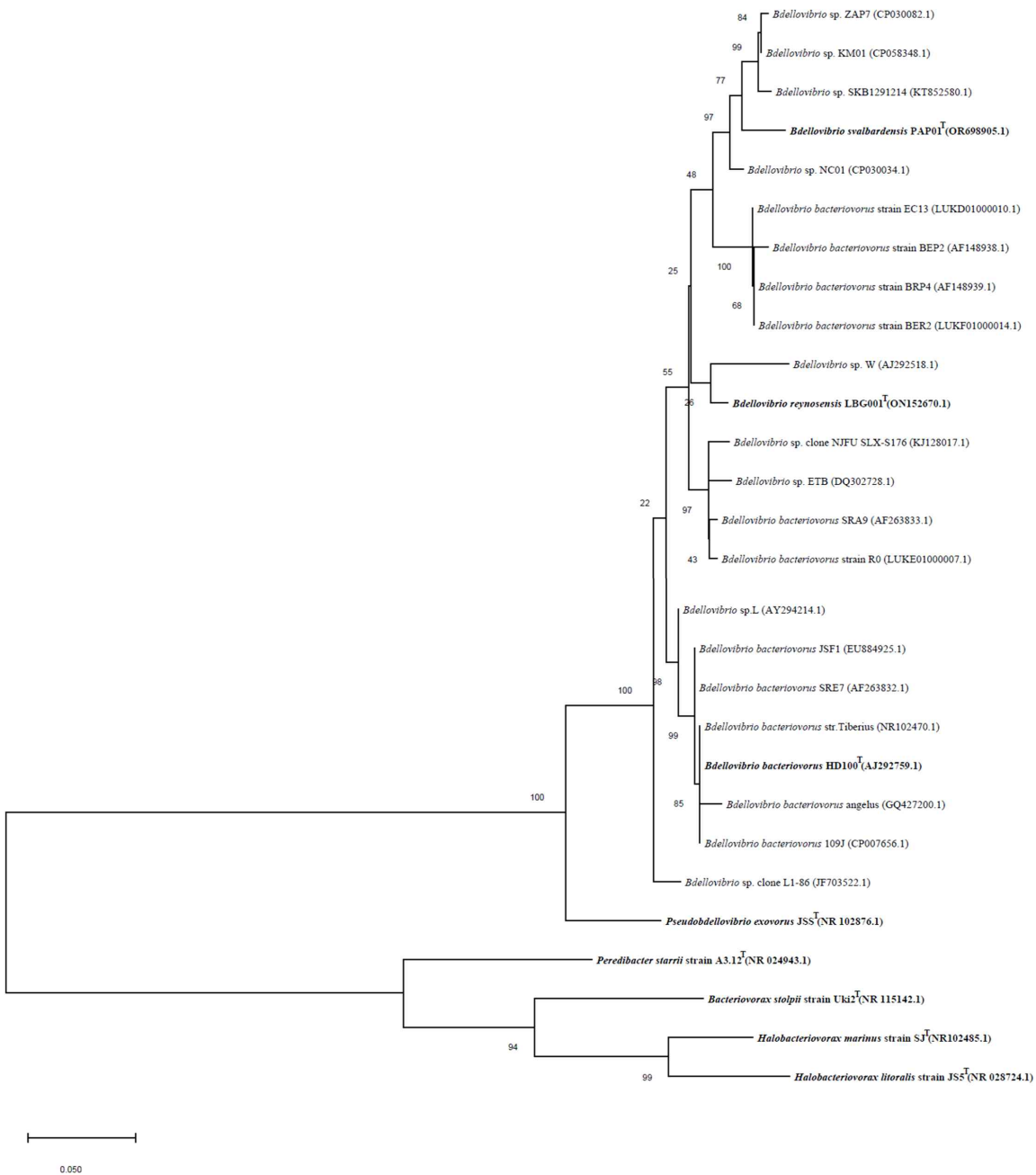


그림 5 *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov. DSM 115080(str. PAP01)와 다른 포식 미생물 간의 계통수 분석.

▷ 분리 및 배양

- 분리 장소는 Midtre Loven Foreland Biocrust, Svalbard, Norway
- 북극에서 분리 배양된 3번째 포식 미생물이며(Norway Tromso에서 2종 분리 배양된 바 있음), 신종으로서는 1번째로 확인.
- 기존 *Bdellovibrio*와 같이 다양한 먹이 미생물을 섭식하는 것을 확인하였으나 Type strain 대비 더 적은 종류를 포식하는 것을 확인함. (그림6)

**Table 2.** *B. svalbardensis* PAP01<sup>T</sup> predatory spectrum and activity at different temperatures. The activities of this new predatory strain were compared against those of *B. bacteriovorus* HD100<sup>T</sup> and *B. bacteriovorus* 109J under identical conditions. In each case where no predation was observed, the cells are shaded, which help illustrate the complete loss of *B. svalbardensis* PAP01<sup>T</sup> activity when the temperature was 37 °C. +++, clear plaque formation; ++, small plaque formation; +, pinpoint or hazy, incomplete plaques; -, No predation evident.

Temperature (°C)	<i>B. svalbardensis</i> PAP01 <sup>T</sup>				<i>B. bacteriovorus</i> HD100 <sup>T</sup>				<i>B. bacteriovorus</i> 109J			
	15	20	30	37	15	20	30	37	15	20	30	37
<b><i>E. coli</i></b>												
<i>E. coli</i> ML35	++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> NCCP 16044	++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> NCCP 14478	++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> NCCP 15657	-	++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> NCCP 14707	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>												
<i>A. baumannii</i> Clinical isolate	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>A. baumannii</i> NCCP 15994	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>												
<i>K. pneumoniae</i> NCCP 15782	++	++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>K. pneumoniae</i> Clinical isolate	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>K. pneumoniae</i> NCCP 14680	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>K. pneumoniae</i> NCCP 16053	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>K. pneumoniae</i> NCCP 14713	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<b><i>Pseudomonas</i></b>												
<i>P. putida</i> KT2440	++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+++	-	+	+	+++	+++	+	+	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> NCCP 16105	-	+	++	-	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> NCCP 14523	-	-	-	-	+	+	++	+	++	+	++	+
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. protegens</i> CHA0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Other Gram-negative strains</b>												
<i>S. enterica</i>	++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	+	+++	+++	++	+	+++	+++	++
<b>Gram-positive strains</b>												
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

그림 6 *Bdellovibrio svalbardensis* sp. nov DSM 115080와 다른 포식 미생물 *B. bacteriovorus* HD100과 109J 먹이 범위 비교 검증. 다양한 온도범위 (15, 20, 30, 37°C)와 다양한 박테리아를 대상으로 검증. Plaque assay를 진행하였음. +++ 는 또렷한 plaque, ++ 는 작은 plaque, + 는 작거나 흐린 plaque, - 는 plaque 형성 없음을 의미.

- 20분 이내에 먹이미생물을 확인하며 60분 내에 침투, 180 ~ 240분 안에 먹이미생물을 제거함. (그림7)

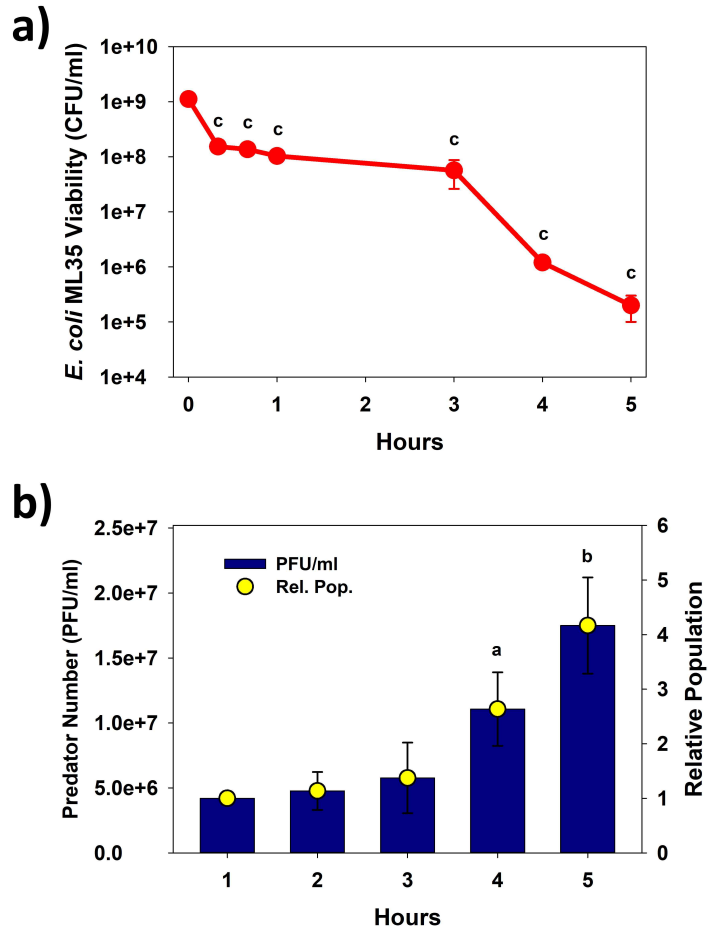


그림 7 *B. svalbardensis* PAP01 (a) 포식 주기 및 (b) 30°C에서 배양시 Titer burst 체크. *E. coli* ML35의 감소 패턴과 포식 미생물의 증가 패턴 관찰을 통해 포식 주기가 대략 4시간 동안 지속된다는 것을 확인. a -  $p < 0.05$ ; b -  $p < 0.01$ ; c -  $p < 0.001$ . (n = 3).

- 기존 *Bdellovibrio*와 같이 intraperiplasmic 섭식을 하는 것으로 확인됨. Rod shaped, 0.3~0.5 $\mu$ m, Gram negative, polar flagellated, Intraperiplasmic growth, motile predatory bacterium (그림8)

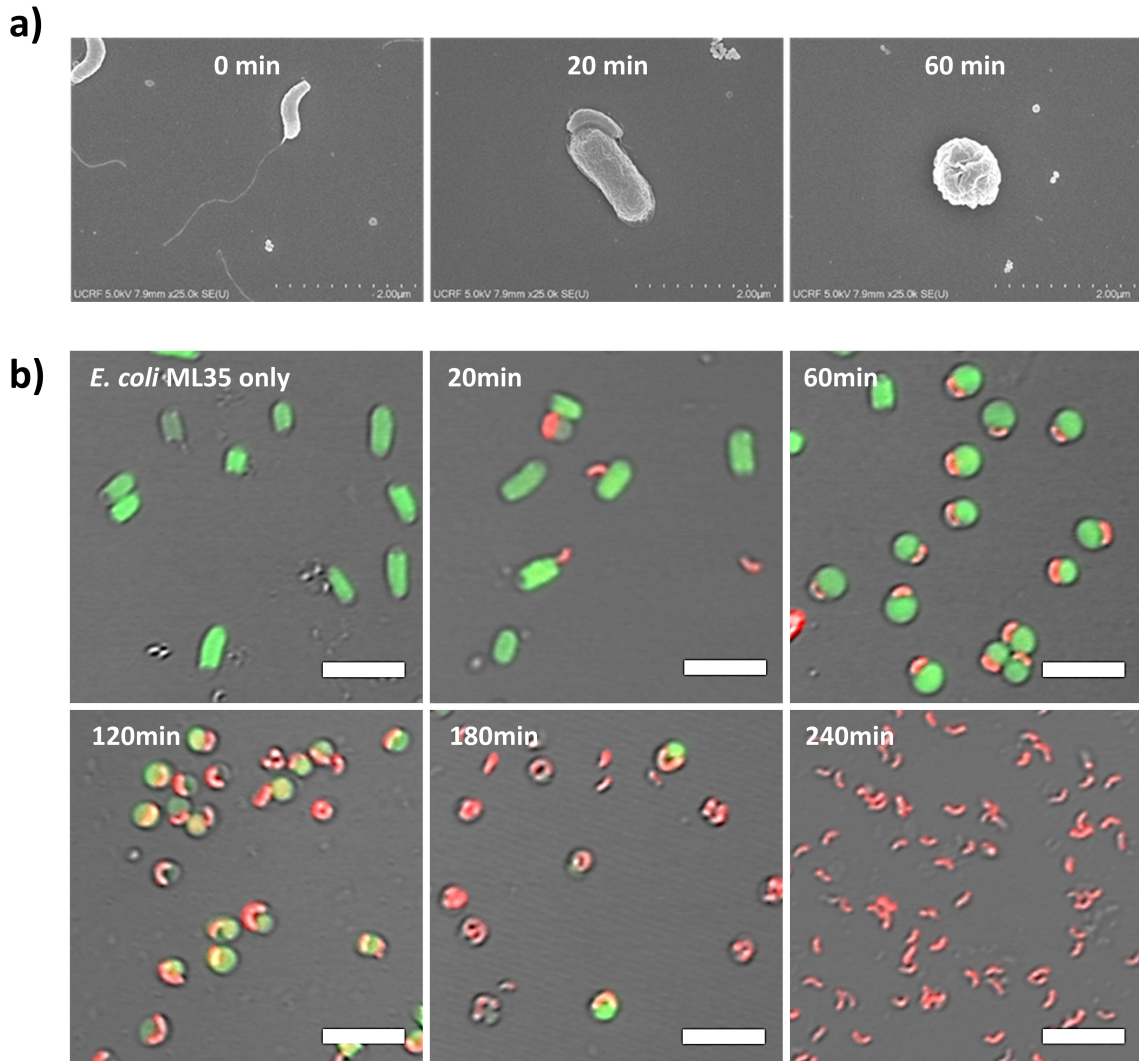


그림 8 현미경으로 촬영한 *B. svalbardensis* PAP01의 생활사. a) 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM)으로 촬영한 *B. svalbardensis* PAP01의 모습. 0, 20, 60분 시점을 촬영. b) 공초점현미경(Confocal microscope, LSM780)으로 촬영한 *B. svalbardensis* PAP01의 모습. *E. coli* only(먹이균 단독), 20, 60, 120, 180, 240분 시점을 촬영. 먹이균과 포식 미생물은 FISH(Fluorescence in situ hybridization)을 통해 염색되었으며 먹이균은 초록색형광, 포식 미생물은 빨간색형광으로 나타냄. Scale bar = 2  $\mu$ m.



- 저온 적응성은 기존 Type strain 대비 높지 않으나 고온 적응성이 감소함. (그림9)
- SDS와 같은 surfactant 환경 적응성이 Type strain 대비 향상됨. (Data not shown)
- Osmolarity 적응성은 Type strain 대비 저하됨. (그림9)

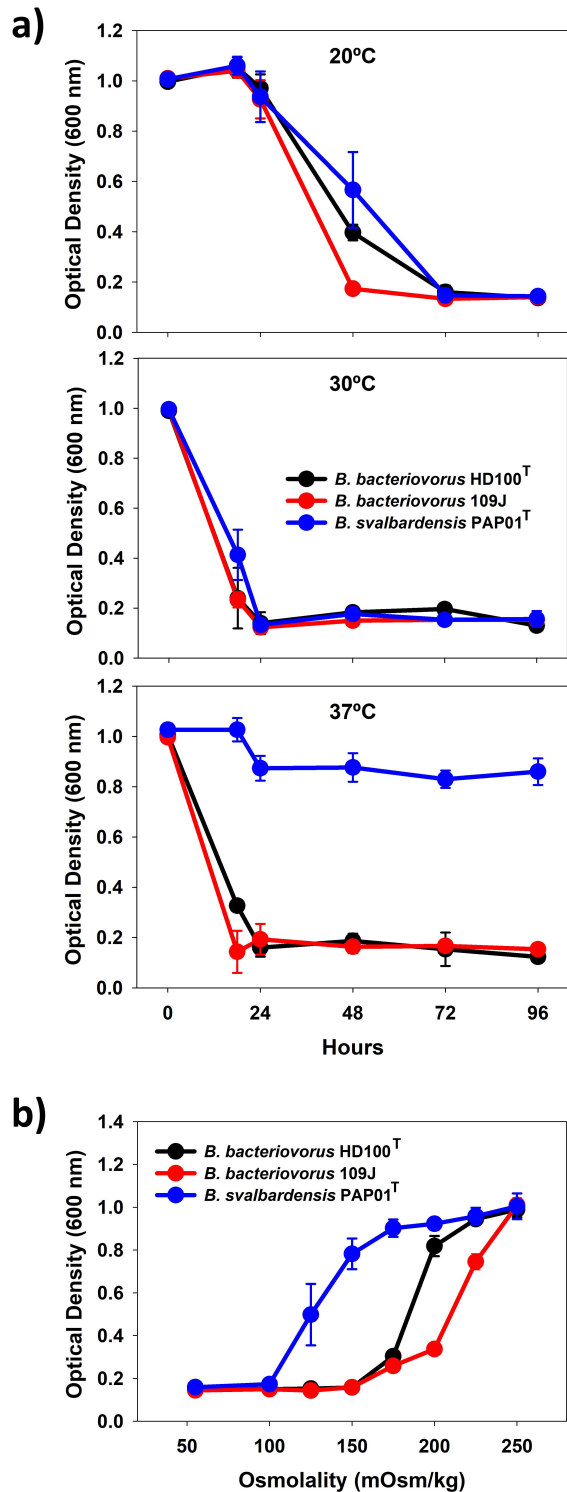


그림 9 *B. svalbardensis* PAP01의 배양 온도 및 배양액 삼투농도(Osmolality)에 따른 포식 활성 평가. Type strain인 *B. bacteriovorus* HD100, 추가로 109J가 비교군으로서 평가되었음. a) 배양 온도에 따른 *B. svalbardensis* PAP01 포식 활성 평가. b) 배양액 삼투농도에 따른 *B. svalbardensis* PAP01의 포식 활성 평가.

- 적응온도 문제로 저온 효소 생물자원으로서의 활용은 어려우나, 포식 미생물의 환경 분포의 이해를 넓히는 근거로서 활용함.

- WGS 분석 결과 3.898Mbp, 3732 gene, G+C contents 45.7mol%의 특성을 지님. [그림10]
- WGS에 따르면 TolA, 담즙 분해 유전자 등 Type strain 대비 다른 유전자가 존재하는 것을 확인함.
- 상기의 TolA 유전자의 확인이 기존 가설인 Surfactant 적응성 저하의 원인이 TolA의 부재라는 점을 뒷받침하는 귀납적 근거로 활용 가능함.

***Bdellovibrio svalbardensis* PAP01 gDNA extraction**

- Pure gDNA isolation
  - gDNA quality 84.6 ug/mL
  - 260/280: 1.90
  - 260/230: 2.05

- Genome features of *Bdellovibrio* sp. PAP01 and others

Predatory Strain	Genome Size (Mb)	GC Content	No. of Genes	Accession No.
<i>Bdellovibrio</i> sp. PAP01	3.898	45.7	3732	
<i>Bdellovibrio</i> sp. NC01	3.975	44.5	3773	CP030034.1
<i>Bdellovibrio</i> sp. ZAP-7	4.124	45.3	3981	CP030082.1
<i>B. bacteriovorus</i> HD100 <sup>1</sup>	3.783	50.6	3619	NC_005363.1

***Bdellovibrio svalbardensis* PAP01 WGS**

- gDNA analysis data set
  - Genome size: 3.90 Mbp
  - GC content: 45.7%
  - Number of Gene: 3696
  - Number of RNA: 36
  - Number of subsystem: 245
- **PAP01 O, HD100 X system**
  - Murine hydrolases
  - Type II secretion system
  - Ammonia assimilation system
  - Choloylglycine(Bile) hydrolase
  - Zinc/Cobalt resistant gene(MRG)

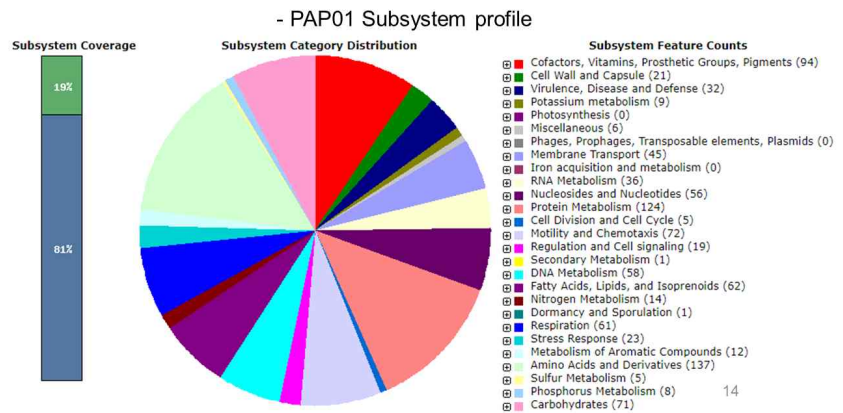


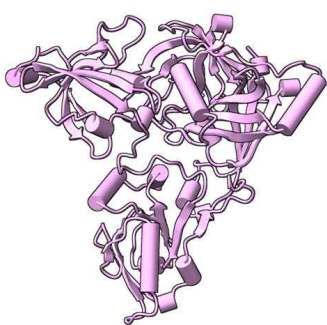
그림 10 *Bdellovibrio svalbardensis* PAP01 Whole genome sequence 분석 결과

- Annotation 이후 확인된 PAP01 균주의 가수분해효소의 Type strain과의 유사성 비교를 진행하였음. 대체로 PAP01의 가수분해효소들을 Type strain을 대상으로 Protein homology 분석을 진행 결과 매우 낮은 유사도(26% ~ 66%)를 보이는 것으로 보아 극지 적응 균주로서의 잠재적 특성을 보유한 것으로 추정됨. 그러나 낮은 Homology로 인해 유전체만으로 유전자원 발굴에 한계가 있음 (그림11).

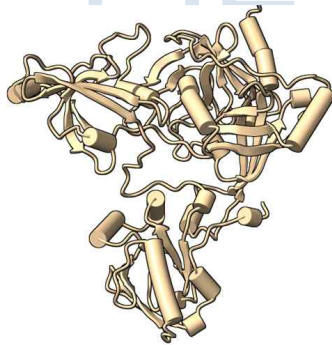
PAP01	Bd. HD100	Protein annotation	Identity	Positive
Peg.571	BD3481	Secreted trypsin-like serine protease	43%	56%
Peg.1125	BD0922	Trypsin-like serine proteases	26%	42%
Peg.3564	BD0922	Trypsin-like serine proteases	66%	78%
Peg.178	BD1283	Subtilisin-like serine proteases	37%	54%
Peg.259	BD1283	Subtilisin-like serine proteases	38%	52%

그림 11 PAP01 균주의 가수분해효소의 Type strain과의 유사성 비교. Protein BLAST를 통한 Protein identity와 positive 비율 분석

- 유전체 기반의 단백질 특성 분석을 위해 Alphafold를 통해 단백질구조(Protein structure)를 파악하였음. 내구성 단백질 분석을 위한 주된 분석은 적은 수의 2차 구조 (Alph-helix, Beta-sheet, H-bond) 확인을 통해 이뤄짐. Type strain과 비교적 높은 유사도를 가진 PAP01 peg.3564 단백질(Trypsin-like serine proteases)을 대표 예시로 서술. PAP01의 peg.3564 단백질은 HD100의 BD0922와 구조적으로 높은 유사도를 가짐. 그러나 낮은 Beta-sheet가 특징적으로 확인되어, 저온 적응 단백질로서의 가능성을 보임 (그림12).



HD100 BD0922



PAP01 peg.3564

- PAP01 peg.3564
  - A-helix: 117 aa residue
  - B-sheet: 144 aa
  - H-bond: 1523 bonds
- HD100 BD0922
  - A-helix: 112 aa residue
  - B-sheet: 173 aa
  - H-bond: 1421 bonds

그림 12 Alphafold를 활용한 HD100의 가수분해효소 BD0922와 PAP01 peg.3564의 구조비교. PAP01은 Beta-sheet가 29 residue만큼 적다는 특징이 나타남.

### 제 3절. (2차년도) 세종과학기지 1차 샘플링 및 신종 포식 미생물 후보 확보

○ 1차 남극 포식 미생물 샘플링

- 2022년 2월 4일부터 2월 28일까지 24일간 포식 미생물의 샘플링 및 현지 분리 배양을 진행함.
- 킹 조지섬 세종기지 인근 담수, 해수, ASPA 171 토양등에서 포식 미생물을 분리시도함.
- 샘플링 장소는 (그림13)를 참조.
- ASPA 171 토양에서 PAP05, PAP06을 확인함.
- Potter Cove 담수, 해수에서 PAP07, PAP08, PAP09, PAP10을 확인함.
- 포식 미생물의 예상 먹이를 확보하는 과정 중 신종 PPAP05, PPAP10, PPAP11이 *Polaromonas* 속 신종임을 확인함.

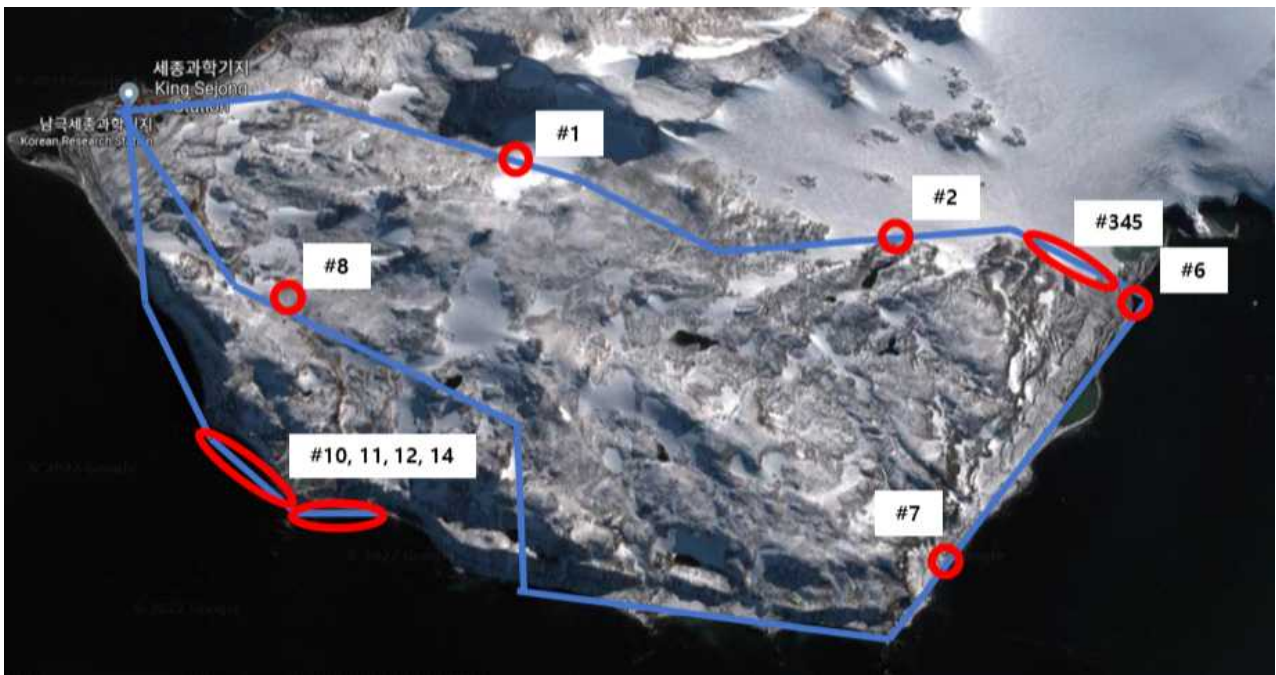


그림 13 1차 남극 샘플링 장소 및 번호. 바톤반도를 중심으로 샘플링 진행하였으며, 전반적으로 흐르는 해빙수와 토양 샘플을 위주로 샘플링을 진행하였음. 그러나 남극에서 해빙유수에서는 충분한 먹이미생물이 없는 것을 확인

○ 1차 남극 포식 미생물 분리 배양

- 남극 방문 전 샘플 확보가 불가능하여, 기확보된 Metagenome을 활용해 미생물 군집 분석을 진행 (그림14). 포식 미생물 중 *Bdellovibrio*와 *Pseudomonas*는 남극 토양에서도 비슷한 비율로 존재 (그림15)
- 이에 1차년도에 활용한 *P. putida* KT2440과 *E. coli* ML35를 지속적으로 활용하였음.

	Reference	MG-RAST ID
Ace Lake 68.47° S 78.18° E	Ng, C., et al. Metaproteogenomic analysis of a dominant green sulfur bacterium from Ace Lake, Antarctica. <i>ISME J.</i> <b>2010</b> , <i>4</i> , 1002–1019.	mgm4443684.3
Newcomb Bay Lake 66.27° S 110.53° E	Williams, T.J, et al. The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. <i>Environ. Microbiol.</i> <b>2013</b> , <i>15</i> , 1302–1317.	mgm4443686.3
Mount Seuss 77.02° S 161.85° E	Van Goethem, et al. A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. <i>Microbiome</i> <b>2018</b> , <i>6</i> , 40.	mgm4667023.3
McMurdo Dry Valleys 77.63° S 162.88° E	Fierer, N, et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>2012</b> , <i>109</i> , 21390–21395.	mgm4575387.3

그림 14 남극 Metagenome 분석에 활용된 데이터 리스트

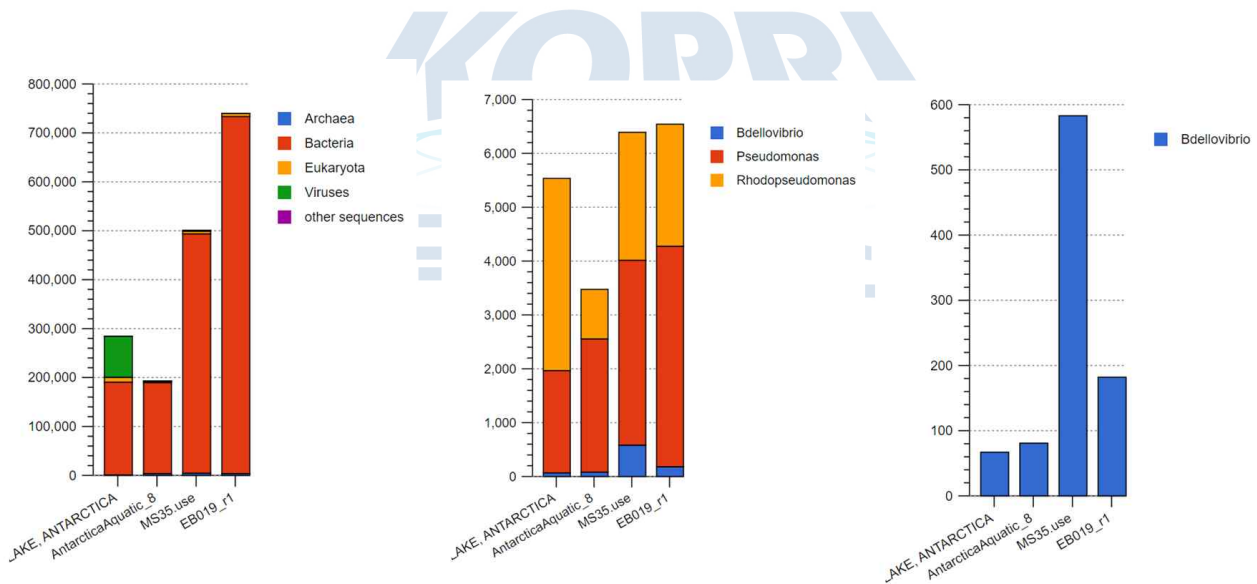


그림 15 대표지점에 대한 분석 결과. 박테리아가 군집의 대다수를 차지하며(좌측) 우점종은 *Pseudomonas*로 확인됨(중간). 샘플링 지점의 특성에 따라 *Bdellovibrio*의 존재량이 달라짐을 확인(중간 및 우측). 특히 토양 샘플에서 호수 샘플보다 *Bdellovibrio*가 많이 확인되며 비율도 높음.

- 포식 미생물 후보 PAP05는 ASPA 171 토양에서 확인함. 0.7% agar에서 Plaque를 형성함. 배양에 성공하였으나 단일 배양에는 지속적 어려움이 있음.
- 포식 미생물 후보 PAP06은 ASPA 171 토양에서 확인함. 주변 박테리아를 용해하는 enzyme을 가진 것으로 확인, 계대배양에 실패.
- 포식 미생물 후보 PAP07, 08은 Potter Cove 담수에서 확인함. 액체 배양에서 먹이 미생물을 용해함. 배양에 성공하였으며 단독 배양물 배양하여 동정함.
- 포식 미생물 후보 PAP09, 10은 Potter Cove 해수에서 확인함. 액체 배양에서 먹이 미생물을 용해함. 분리 배양에 실패함.
- 포식 미생물의 예상 먹이를 확보하는 과정 중 신종 PPAP05, 10, 11의 배양에 성공하였고 분리에 성공함 (*Polaromonas* 속).

### ○ PAP05 특성 분석

#### ▷ 분리 및 배양

- PAP05는 *E. coli* MG1655와 *Pseudomonas fluorescens*를 특이적으로 포식함. 이외의 먹이 미생물에는 변화 없음.
- 온도에 따라 15 ~ 20℃에서 먹이 미생물 포식(Plaque formation) 30℃ 이상에서 성장하지 않음
- 액체 배양에서 박테리아를 용해하지 않으나 Plaque는 형성하는 등 배지 성장에 따른 성장차이 발생. (그림16)

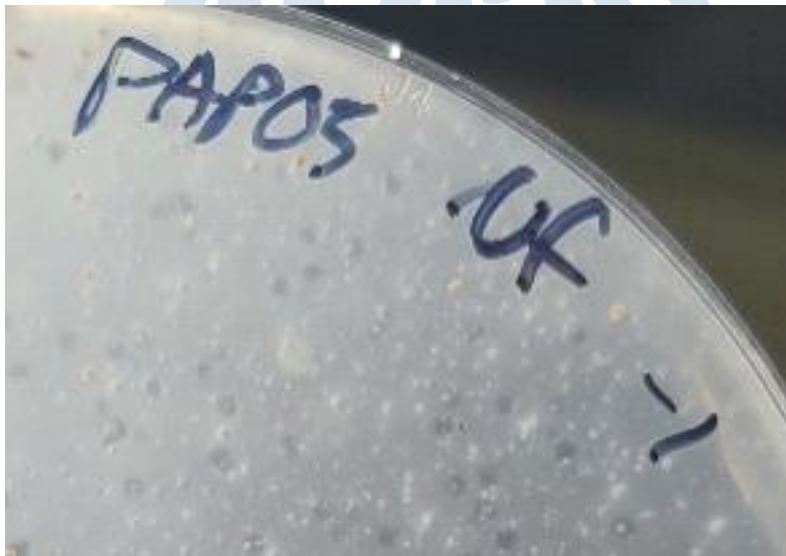


그림 16 PAP05의 plaque 형태.

플라크의 형태는 일정하나 크기가 시간에 따라 증가하지 않음. 따라서 기존의 포식 미생물과 다른 포식 경향을 예측함.

▷ 배양 특이점

- Cellulose acetate(CA) 필터를 통과하는 반면 Polyethersulfone(PES) 필터는 통과하지 않음
- 이를 바탕으로 현미경 관측을 진행하였으나 PAP05로 추정되는 박테리아를 확인하지 못함.
- 상기의 이유로 현재 기존의 박테리아 혹은 바이러스와 완전히 다른 형태의 미생물이라고 판단함.
  - ◁ 일부 필터를 통과하지 못하는 측면, 온도에 따른 포식성 변화, 극단적으로 긴 plaque 형성 시간 등으로 바이러스라 보기 어려움.
  - ◁ 현미경 관측에서 확인되지 않고, Cell lysis가 관찰되지 않아 일반적인 포식 미생물이라 보기 어려움
- 이로 인해 PAP05가 일반적으로 알려진 생물이 아니라 포식성을 가진 Candidate Phyla Radiation(CPR)일 가능성에 대해 초점을 맞추고 추가적인 연구 설계를 진행 중.

○ PAP07, PAP08 특성분석

▷ 분리 및 배양

- PAP07의 경우 *E. coli* ML35만을 특이적으로 섭취하며 배양이 OD600nm absorbance 1 기준 80%감소까지 25°C에서 약 14일 소요됨.
- PAP08의 경우 *E. coli* MG1655, *K. pneumoniae* NCCP 15782를 포식하며 섭취하며 배양이 OD600nm absorbance 1 기준 80%감소까지 25°C에서 약 5일 소요됨.

▷ 유전적 특성 분석

- 16S rRNA 결과 PAP07과 PAP08은 근연종이며 16S rRNA 99.17%로 확인됨. 따라서 빠른 성장속도로 인해 PAP08을 주축으로 연구를 수행함.
- 16S rRNA PAP08은 *Sphingobacteriaceae* 속 *Mucilaginibacter daejeonensis*과 91.03% 유사하나 콜로니를 형성하지 않고, 다른 미생물을 포식하는 특성상 같은 family로 분류하기 어려움.
- 16S rRNA phylogenetic tree는 (그림17)에 나타남.
- NCBI에 등록된 PAP08의 근연종은 모두 **Uncultured bacteria**로 이러한 포식 생장이라는 특수성 때문에 NCBI Metagenome databank에서 확인되나 지금까지 분리 할 수 없었던 것이라 예상됨.
- 따라서 본 연구진은 해당 PAP07, PAP08을 새로운 포식 미생물 family로 간주하고 연구를 진행함.

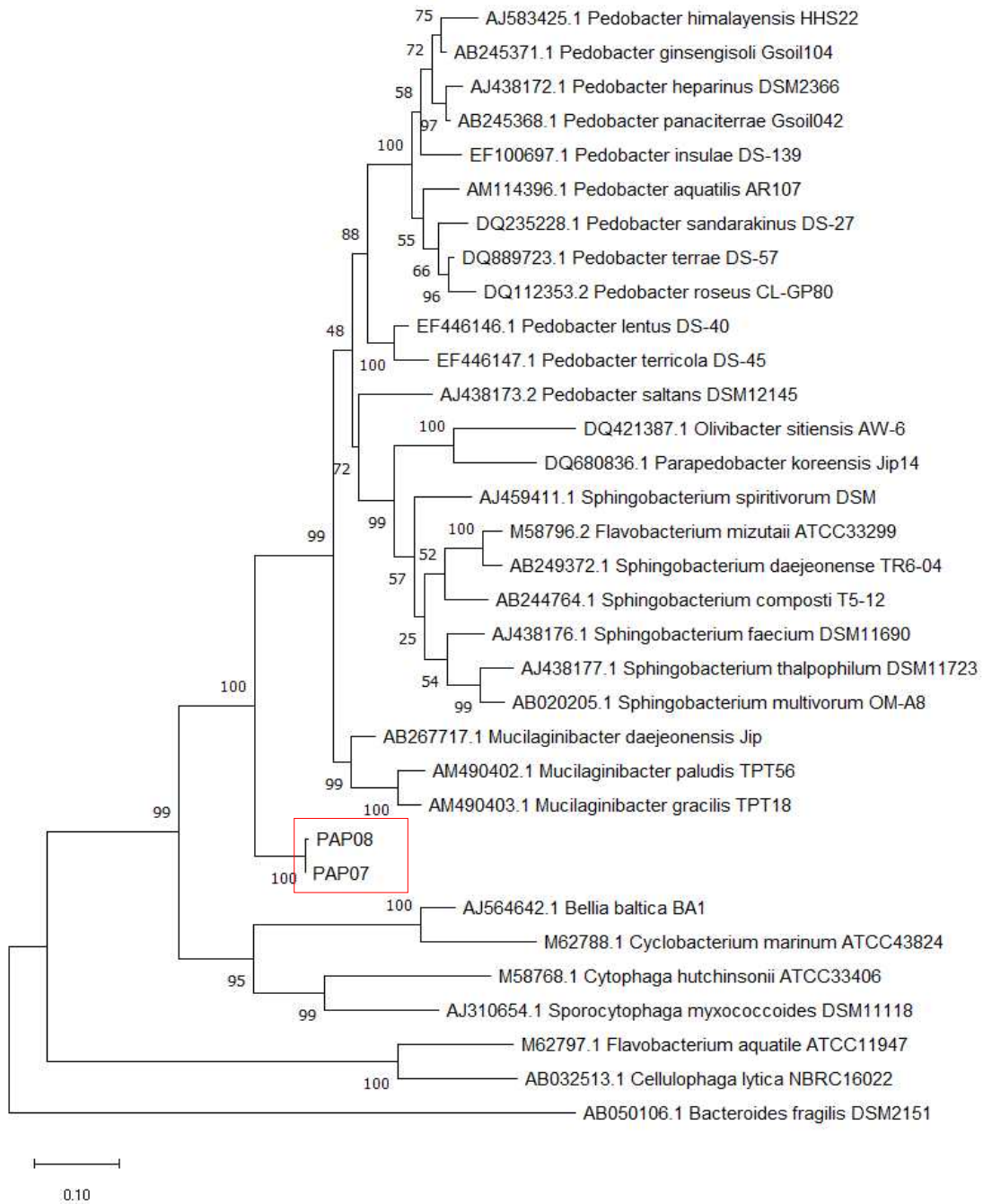


그림 17 PAP07, PAP08의 phylogenetic tree. PAP07과 08은 기존에 알려진 근연 박테리아로부터 상당히 멀리 떨어진 곳에 위치함. 메타지놈 데이터로부터 근연종의 16S는 많이 확인된 바 있으나 배양된 경우는 최초.



▷ 형질적 특성 분석

- Rod shaped, 0.3~0.5 $\mu$ m, Gram negative, motile bacterium (그림18, 그림19)
- PAP08의 Plaque는 배양액 1ml당 30,000~50,000개 수준으로 일반적 포식 미생물과 비교했을 때( $10^9$  plaque/ml) 극단적으로 낮은 plaque 형성 효율을 보임
- Plaque 생성 유도를 다양한 농도의 agar에서 진행해본 결과 0.35% agar에서 25 $^{\circ}$ C에서 5~6일간 소요됨. Agar 0.35% 이상의 농도에서는 성장하지 않으며 이는 motility가 *Bdellovibrio*에 비해 떨어지는 이유 라고 판단됨.
- 영양분(Nutrient)가 있을 경우 포식 속도가 상승하는 현상을 보이며, 단일 배양 분리 후 추가 분석 예정
- PAP07과 08은 0.45 $\mu$ m필터를 통과하지 않으나, CA 필터를 적은 수(population)가 통과하는 현상을 보임.

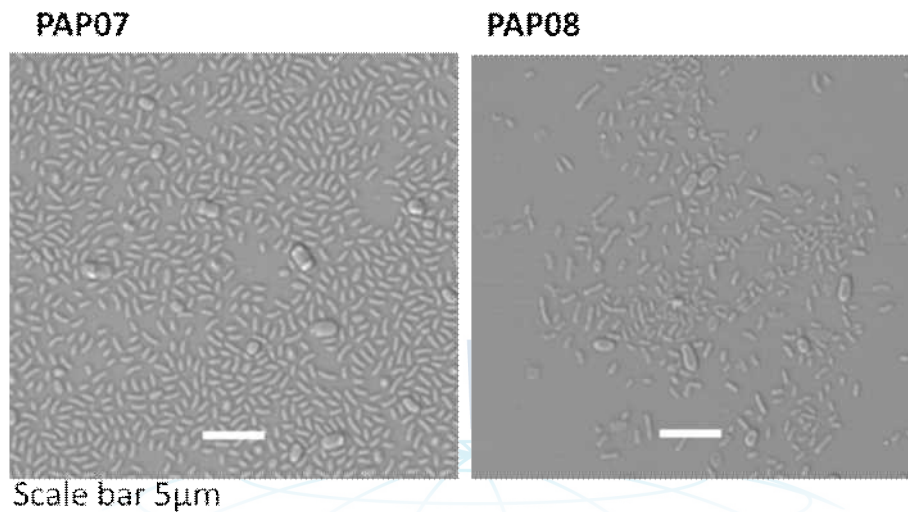


그림 18 CA filter를 거친 PAP07, PAP08의 현미경 관측. 필터를 거친 PAP07 08의 배양물을 원심분리 이후 pellet을 만들어 확인함. 미생물의 크기, 형태등을 파악. 이후 유전적 특징 분석에 활용.

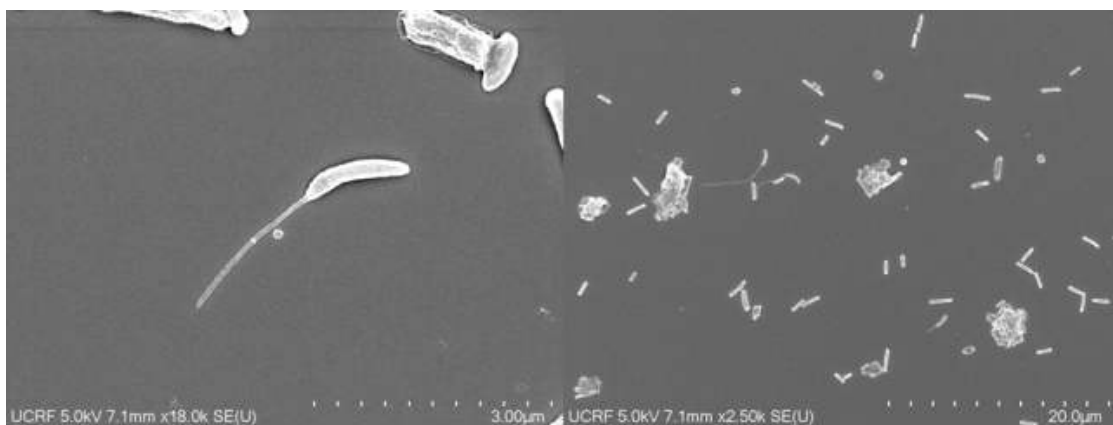


그림 19 PAP 07의 주사전자현미경(SEM) 촬영 이미지. 총 일주일간의 배양 기간 중 배양 3 일차에 샘플링 진행하여 먹이균과 포식 미생물이 섞여있음. (왼쪽) 고배율 18,000배, (오른쪽) 저배율 2,500배.

▷ 난배양성 포식 미생물 생활성 예측을 위한 기술 개발 및 활용

- PAP07과 08의 극단적으로 낮은 plaque formation으로 인해 생활성(viability) 측정에 매우 어려움을 겪음.
- 본 과제를 통해 개발한 포식 미생물의 신속 활성 측정법(아래 ‘제 6 절’에서 자세히 다룸)을 활용하여 plaque forming 없이 생활성 측정을 시도하여 성공함.
- PAP07, PAP08이 계면활성제(surfactant)(시험에 활용한 것은 SDS)에 약하다는 사실을 추가로 확인했으며 이는 *Bdellovibrio*와 유사한 수준의 취약성.
- *Bdellovibrio*, *Halobacteriovorax*, PAP08등 서로 진화적으로 먼 거리의 포식 미생물에게서 일반적으로 나타나는 surfactant의 취약성은, 포식작용에 있어 일반적으로 작동하는 기작에 surfactant가 영향을 끼칠 수 있다는 가설의 근거가 됨.
- 또한 attack phase에서의 계면활성제 취약성, 특히 계면활성제 추가로 인한 NADH의 저하 및 세포 용해(cell lysis) 등과 같은 현상은 세 개의 서로 다른 포식 미생물이 가지는 공통 세포막 구조(membrane structure) 혹은 그 누락(TolA와 같은 막단백질)에서 그 근거를 찾을 수 있음.
- 따라서 본 과제를 통해 확보한 PAP01, PAP08이 기존 포식 미생물 세포막 구조에 대한 이해를 크게 향상시킬 수 있음.

○ 비포식성 미생물(Non-predatory bacteria) PPAP05, 10, 11 특성분석

▷ 분리 및 배양

- PPAP05, 10, 11의 경우, 샘플링 장소 6번에서 먹이 미생물을 탐색하는 과정 중 분리된 신종.
- Single culture 분리에 성공하였으며 배양도 성공.

▷ 특성 분석

- 16S rRNA 결과 PPAP05, 10, 11은 근연종이며 모두 98.7%이하로 신종임. PPAP10이 가장 type strain과 멀기 때문에 이를 중심으로 분석 진행.
- 16S rRNA PPAP10은 *Polaromonas jejuensis* NBRC 106434과 98.15% 유사함.
- 16S rRNA phylogenetic tree는 (그림 20)에 나타남.
- PPAP10을 *Polaromonas potterensis* SM01라 명명하고, Whole genome sequencing 및 특성분석, 균주 기탁을 완료하였음. 해당 내용은 본 장의 아래 ‘제 7 절’에서 자세히 다룸.

○ 2차 남극 샘플링 지점 설정

- PAP05, PAP07 08등의 포식 미생물 분리 경향으로 확인된바 해빙유수의 경우, 남극에서 충분한 먹이미생물이 존재하지 않기 때문에 포식 미생물 분리에 어려움이 있었음.
- 이런 경향으로 인해 온대기후의 포식 미생물과 달리 해빙연못, 혹은 남극생물권역의 충분한 먹이미생물 분포가 있는 지역으로 샘플링 지역 재설정할 필요가 있음.
- 따라서 2차 남극샘플링은 ASPA171, ASPA150등 남극생물권역 위주로 샘플링 계획 변경함.
- 또한, 샘플 냉동 보관에 따른 박테리아 활성 저하 우려가 있으므로, 남극 세종과학기지 에서 포식 미생물 분리를 진행하기로 결정함. 방문 기간을 2개월로 늘리고, 전문가 2인

이 방문하여 포식 미생물 분리를 진행.

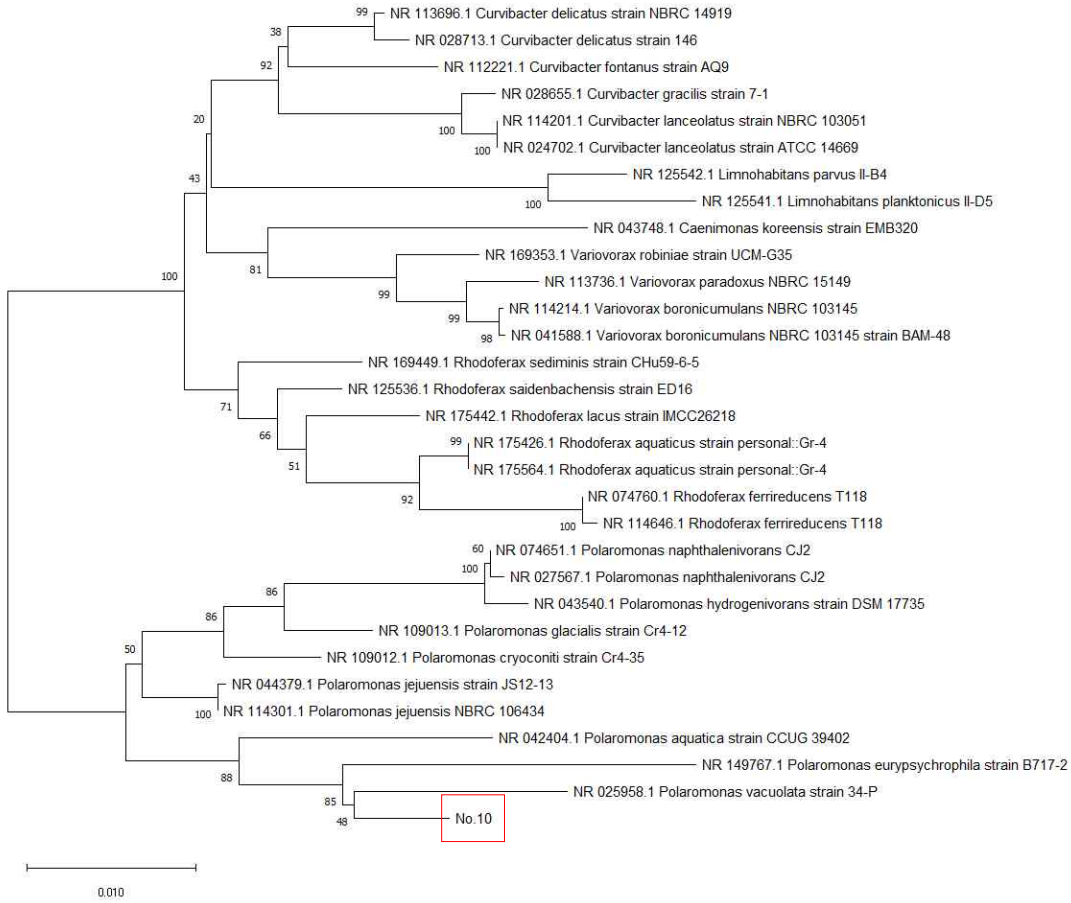


그림 20 PPAP10의 계통수 분석. PPAP10은 먹이미생물 후보로서 연구 진행하고 있으며 *Polaromonas*속의 신규 종으로 확인됨.

## 제 4절. (3차년도) 세종과학기지 2차 샘플링 및 신종 포식 미생물 후보 확보

### ○ 2차 남극 포식 미생물 샘플링

- 2023년 1월 7일부터 3월 5일까지 57일간 포식 미생물의 샘플링 및 현지 분리 배양을 진행함.
- 킹 조지섬 세종기지 인근(바톤반도, 위버반도, 아드레이섬) 담수, 해수, ASPA 171 토양, Biocrust, 줌새풀 뿌리 미생물 군집, 지의류, 펭귄 분변, 물고기 내장 및 아가미 등을 수집하였고(그림21, 그림22, 그림23) 이로부터 포식 미생물을 분리 시도함. 총 샘플링 지점은 86개 지점임.



그림 21 남극 킹조지섬 샘플링 지점 예시. 각기 다른 지점에서 담수, 해수, ASPA 171 토양, Biocrust, 줌새풀 뿌리 미생물 군집, 지의류, 펭귄 분변 등을 수집하였음.



그림 22 남극 킹조지섬 샘플링 예시. 50ml 튜브를 활용하여 자연환경 샘플을 수집하였음. 해당 사진은 전체 샘플의 일부 예시.



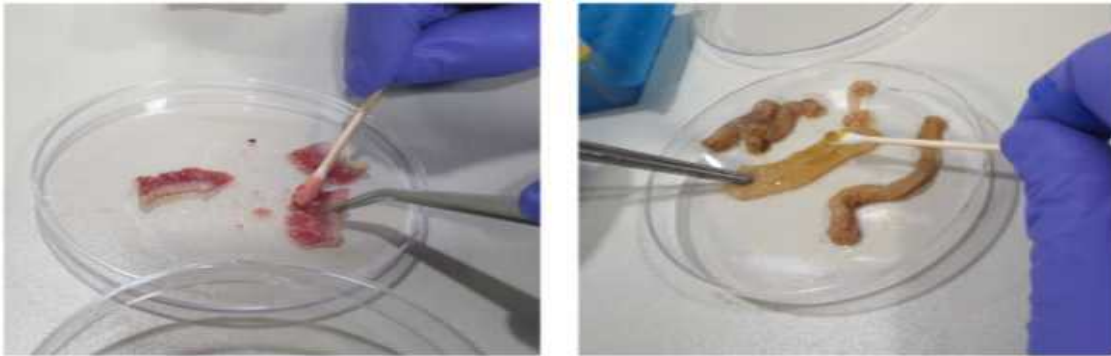
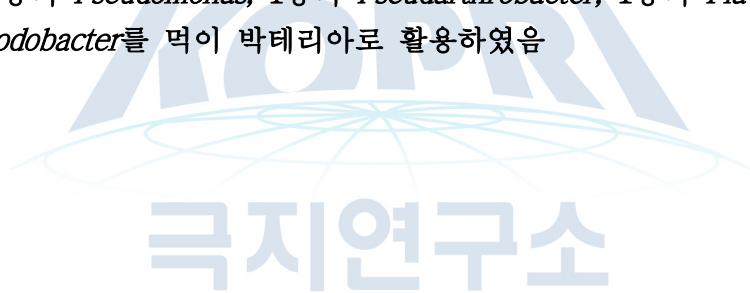


그림 23 남극에서 포획한 남극검은암치(*Notothenia coriiceps*) 및 남극대리석무늬암치 (*Notothenia rossii*)의 아가미(Gill)와 장(Gut)의 Mucin layer에서 샘플링 진행. 해당 어류 샘플은 극지연구소 김진형 박사님 연구팀으로부터 현장에서 살아있는 상태로 기증받음.

극지연구소

○ 2차 남극 포식 미생물 분리 배양

- 지난 연구 데이터를 활용하여, 보다 효과적이고 폭넓은 포식 미생물 분리를 진행. 분리 방법을 기존 고체배지 형식에서 액체배지 형식으로 바꾸고, 현지에서 직접 분리를 진행. 박사후연구원 2인을 파견하여 집중적인 포식 미생물 분리 작업을 수행함
- 샘플링 지점을 다양화하고 (총 86개 지점), 먹이 군주도 기존 2종에서 남극 현장의 자연 분리 균주 8종을 추가하여 총 10종으로 확대함.
- 각 샘플링 장소에서 먹이로 활용가능한 그람 음성균을 분리하고, 이의 콜로니 모양 (Colony Morphology)를 기반으로 구분지어 각기 다른 먹이 박테리아 8종 (Prey A ~ H)를 선별.(그림24, 그림25)
  - 각 먹이 박테리아는 근연종 분석 결과 아래와 같음(%: 16s rDNA identity)
    - Prey A: *Pseudomonas meridiana* strain CMS 38 99.65%
    - Prey B: *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 98.66%
    - Prey C: *Pseudomonas frederiksbergensis* strain DSM13022 99.51%
    - Prey D: *Pseudomonas antarctica* 99.5%
    - Prey E: *Pseudomonas fluorescens* strain NBRC 14160 99.65%
    - Prey F: *Pseudomonas deceptionensis* strain M1 99.24%
    - Prey G: *Flavobacterium hercynium* strain WB 4.2-33 98.97%
    - Prey H: *Iodobacter arcticus* strain AsdM4-16 98.27%
    - 총 5종의 *Pseudomonas*, 1종의 *Pseudarthrobacter*, 1종의 *Flavobacterium*, 1종의 *Iodobacter*를 먹이 박테리아로 활용하였음



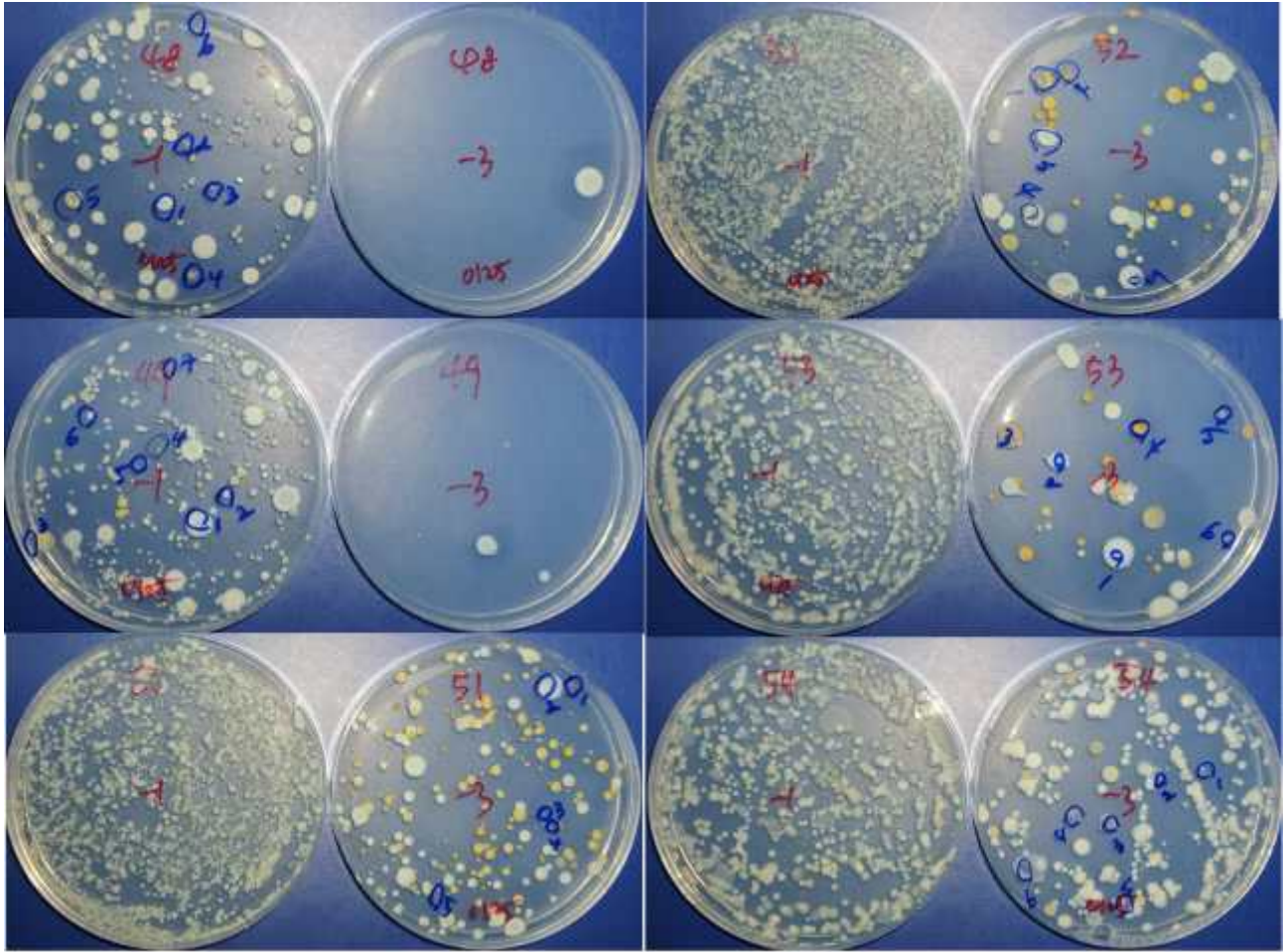


그림 24 먹이박테리아 분리 예시. 빨간 글씨로 적힌 숫자 48 ~ 54는 샘플링 지점을 의미. -1, -3은 샘플 희석 배수를 의미. 해당 사진을 통해 각 플레이트에서 배양된 여러 종류의 박테리아 콜로니를 관찰 할 수 있음. 상기 실험을 위한 배지는 R2A임. 샘플 군집에 따라 각기 다른 배지(MA, Marine R2A, TSB 등)를 활용함. 각기 다른 Morphology나 색, 효소 생산 여부를 기준으로 콜로니를 분리하였음.



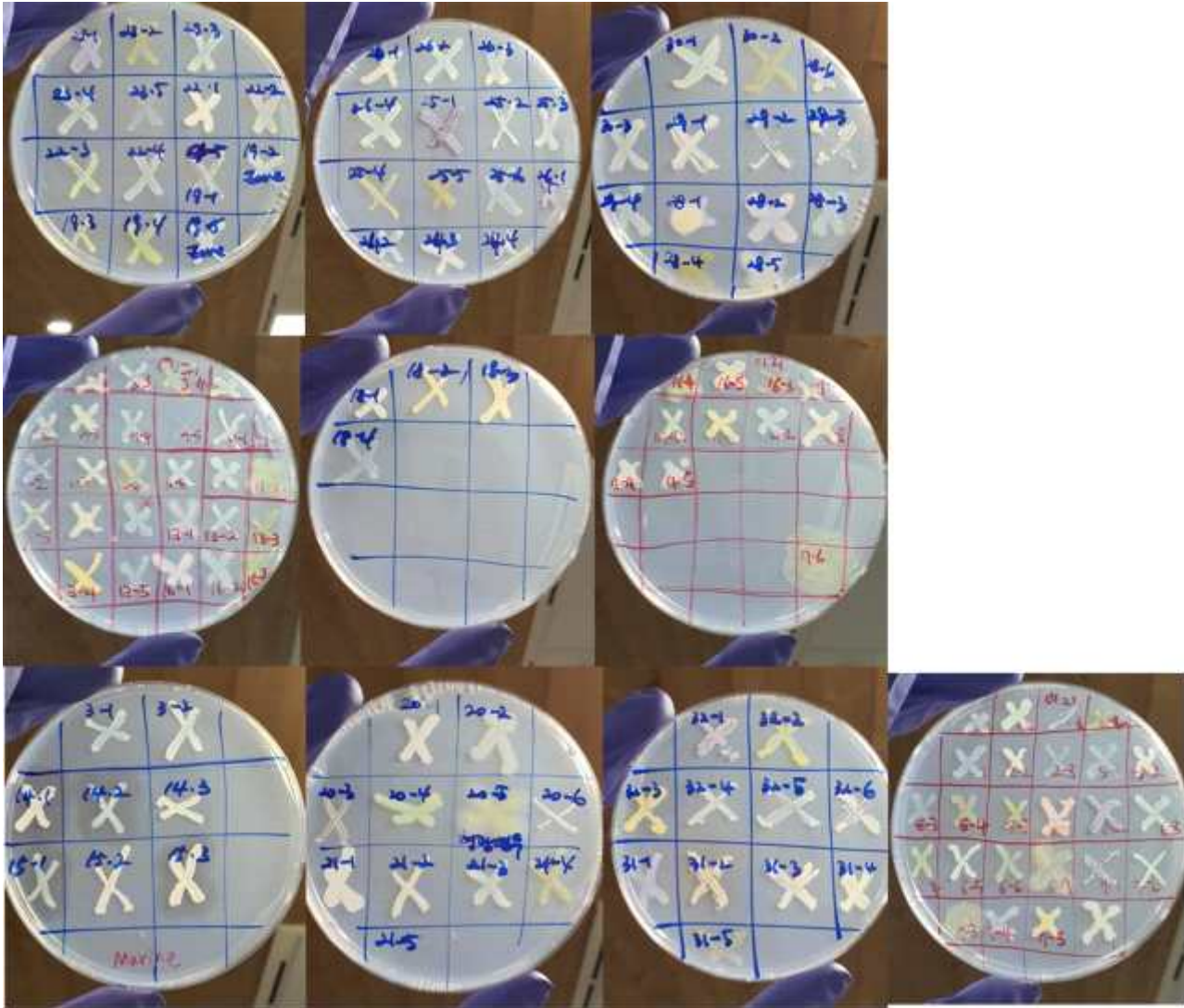


그림 25 환경샘플에서 분리한 비포식성 박테리아(잠재적 먹이 균주)를 콜로니 morphology를 기반으로 선별하여 새로운 배지에 스트리킹한 모습. 특징적인 균주를 구분하여 먹이 균주로 활용하였음. 색소 생산, Starch 분해 효소 등을 생산하는 다양한 박테리아를 확보하였으며, 특이적 성격을 가진 비포식성 박테리아 또한 현재 특성 분석 연구 중에 있음.

- 86개 지점 중, 유의미하게 차이있는 총 31개 지점의 샘플을 대상으로 포식 미생물 분리를 시도하였음. 이에 더하여 해양 샘플(바닷물 및 물고기)을 대상으로 *V. parahemolyticus*와 해양분리균주를 먹이로 하여 포식 미생물 분리 하였음.
- 여러 지점에서 신종 포식 미생물을 분리할 수 있었으며 (총 159개 이상의 배양체), 아래에 표로 정리함 (그림26)

Lysis 발생한 배양기간을 기록해 주세요

	MG (1/19)	A(2/5) 포터분유	B 포터분유	C 곰새물	D KGL거름	E 펄린진흙	F 스쿠마틸	G 위버분유	H 위버분유	PP
Fresh Water (sediments)										
1. 방덕암 포터스민 (총합물)		14	10							
2. PAPA7/08 고인물 (분문새우인물)		7	5	6	12	4	4	5	4	5
6. 포터스민 알 바이오말 (붉은 유기물)	6	8	10		9		12			7
9. 포터스민 시냇물 검은이끼 백 균을	5	4	7	15	5	4	4	6	5	5
11. 포터스민 이니목포 붉은유기물 다수	6	6	7	12	7		6			6
12. KGL 거름/물	5	4	7		6	6	5	6	6	5
25. 위버반도 작은호수(1) 붉은바이오필름 (물 위)	8	7	15	15	15	6	8	14		7
28. 위버반도 큰호수(2) 거름		5	8	15	4	4	4	7	6	5
31. 위버반도 해안호수(1) 유기물+흙		9	15	15	14		9	14	15	
32. 위버반도 해안호수(2) 흙물		7	10		15	8		14	15	8
34. 아라온식 퇴적유기물		9	10		11				15	9
63. 현대호위 산 물줄기 붉은유기물			10							8
77. 스쿠마틸칼 풀, 흙, 이끼		13	10	11	8		12	14	8	
4. 포터스민 근처 길매기 조개무덤 이끼	7	6	7				8	8	15	6
5. 포터스민 앞 흙 지형	12	5	10		9			8		7
7. 곰새물 근처지 바리오크리스트 (뿌리/막간의 지의류)	7	8	10		6					6
8. 브르콜리 지의류		11								
10. 포터스민 불미역이끼	5	4	7	6	4	4	4	5	4	4
16. ASPA171 진흙 (PAP05스맛)	4	5	6			9	6	7	7	6
19. 펄린마울 흙 (진흙#2)		14	10							
20. 펄린마울 이끼 흙	7	13	10				14	8	8	5
22. 곰새물 기차근처	7	4	5	11	8	5	4	5	5	4
27. 위버반도 큰호수(2) 근처 맑은 고운흙	14(pp)									
35. 신라불 지의류+이끼							12			
66(65). 검은이끼 퇴류 - 호수 옆										
75. 현대호 위 홍족이끼+검은이끼		7	12						15	8
21. 스쿠마 배설물 신선 (흙 흙 섞임)	4	4	5			9	8	4	4	4
80. ASPA 초입 바위위붉은펄린마울										
81. ASPA 물위 흰물										
82. ASPA 경사로 돌 위 노란색 흐르논물										
86. ASPA 덕관행권 흐르논물 맑은대피소매단										
Total 31 samples	15	21	23	9	15	10	16	15	15	19

그림 26 세종과학기지 2차 샘플 분리 장소 (좌측 열) 및 사용한 먹이균주(MG: *E. coli* MG1655, PP; *Pseudomonas putida*와 Natural isolates bacteria인 A B C D E F G H) (상단 행) 대상으로 포식 미생물 분리한 결과 (초록색 표시, 숫자는 포식 미생물 성장이 관찰된 배양기간(day)). 크게 담수, 흙/식물권/지의류, 분변 샘플 31개 지점을 대상으로 포식 미생물 분리를 진행하였으며, 159개 샘플 확보에 성공하였음. (Prey A: *Pseudomonas meridiana* strain CMS 38 99.65%, Prey B: *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 98.66%, Prey C: *Pseudomonas frederiksbergensis* strain DSM13022 99.51%, Prey D: *Pseudomonas antarctica* 99.5%, Prey E: *Pseudomonas fluorescens* strain NBRC 14160 99.65%, Prey F: *Pseudomonas deceptionensis* strain M1 99.24%, Prey G: *Flavobacterium hercynium* strain WB 4.2-33 98.97%, Prey H: *Iodobacter arcticus* strain AsdM4-16 98.27%)

- 안정적으로 단일 분리 배양된 균주 중 13종을 선정하여 16s rRNA 분석한 결과, Type strain *Bacteriovorax stolpii* DSM 12778과의 유사도가 96.8%로 밝혀짐. 대표 균주 PP10의 경우 dDDH는 18.5%, ANI는 74.92%로 나왔으며 이는 아래 ‘제 5절’에서 자세히 다룸.
- 몇 개의 균주(PP4, PP25, PP11, PP10)를 임의로 선정하여 기존 알려진 포식 미생물과의 계통수 분석을 진행 한 결과 이전에 Norway Tromso 지역에서 분리된 바 있는 *Bacteriovorax* sp. PNEc1과 같은 클러스터로 묶이는 것을 확인함. 이는 북극(Norway)과 남극(킹조지섬) 양 극단에서 서식하는 포식 미생물이 비슷한 종임을 시사하며, 저온에 적응하는 특정한 종이 우점한 것임을 추측할 수 있음. 본 연구진이 새로이 분리한 포식 미생물이 저온 저항성을 대표하는 포식 미생물인 것으로 추정하며, 저온 효소 연구의 핵심 자원으로 자리잡을 것. (그림27)

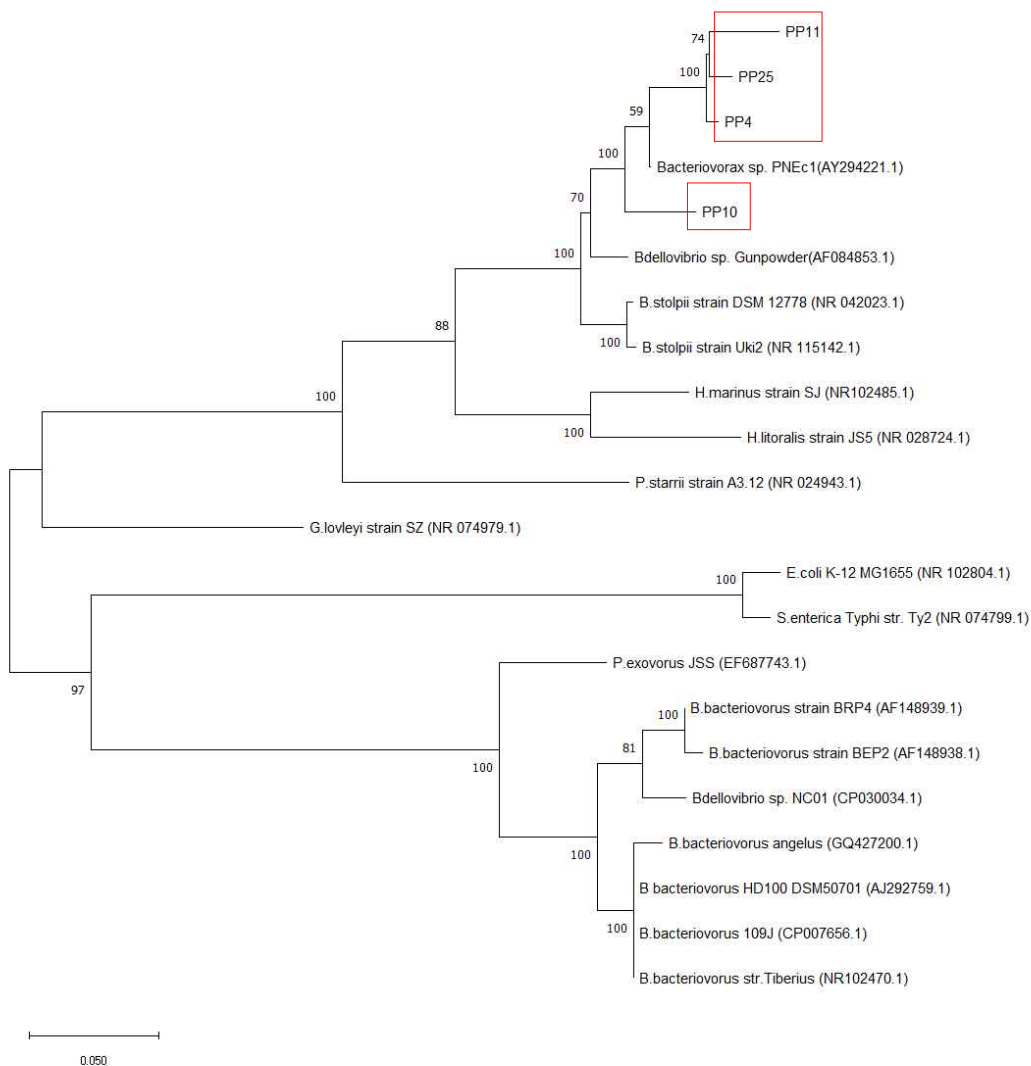


그림 27 남극 분리 포식 미생물 PP4, PP10, PP11, PP25 16s rRNA를 분석하여 작성한 계통수 분석. 남극 분리 포식 미생물은 서로 99%이상의 16s rRNA 일치율을 보여 비슷한 종으로 판단됨. 이들은 Norway Tromso 지역에서 발견되어 16s rRNA 분석이 진행된 바 있는 *Bacteriovorax* sp. PNEc1과 근연종이며, 가장 가까운 Type strain은 *Bacteriovorax stolpii* DSM 12778이 있음.

- 기존에 보고된 *Bacteriovorax* sp. PNEc1는 Whole genome sequencing 분석과 기탁이 이루어지지 않은 균주로서, 본 연구진의 연구가 저온 저항성 포식 미생물의 Whole genome sequencing 분석과 기탁을 진행한 최초의 사례 및 자원으로서 의미를 가짐.
- 안정적으로 배양되는 13개 종을 대상으로 BLAST를 통한 16s rRNA Identity 분석을 진행하였으나, 모두 identity가 99%이상의 유사종으로 밝혀짐. 이에 gyrB 유전자를 대상으로 시퀀싱을 진행하여, 각 포식 미생물의 차이를 면밀히 구분해 내고 3개의 클러스터로 구분함. (그림28)



그림 28 gyrB 유전자를 기반으로 작성한 남극 분리 포식 미생물 13개 배양체에 대한 계통수 분석. 16s rRNA 분석으로는 구분 지을 수 없는 배양체를 gyrB 유전자 분석을 통해 구분지었음. 크게 3개의 클러스터로 구분됨을 확인.

- 9개 종을 대상으로 전자현미경 촬영한 결과, 크기와 생김새에서 큰 차이가 없음을 확인.  
(그림29)

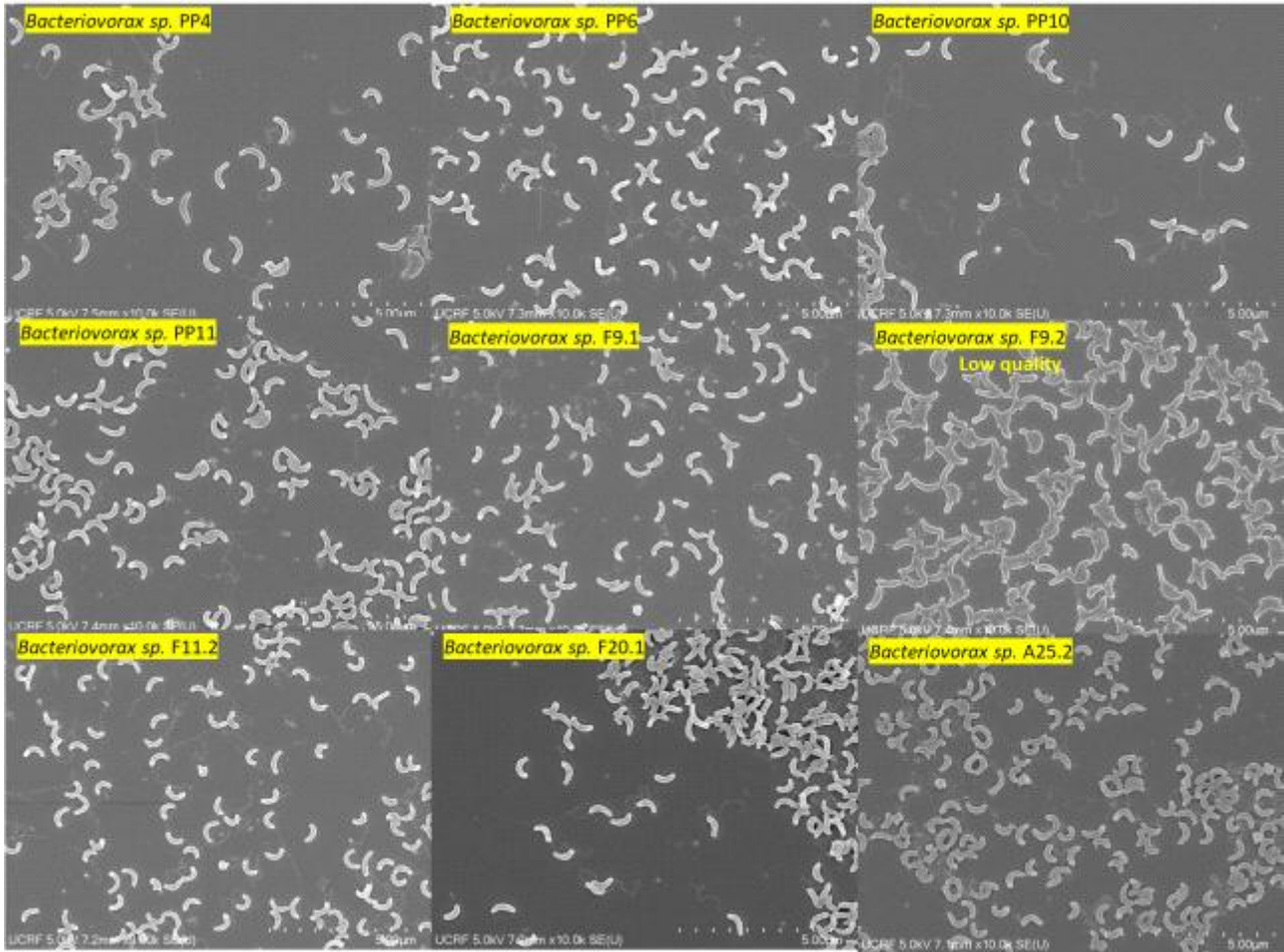


그림 29 남극 분리 포식 미생물 9종에 대한 주사전자현미경(SEM). 사이즈 및 모양새에서 차이가 없음을 확인하였으며, 일반적인 포식 미생물(*Bdellovibrio* 또는 *Bacteriovorax*)와 매우 흡사.

- 9개 종을 대상으로 최적 배양 온도를 확인한 결과 (그림30) ,
  - 모든 종이 20° C에서 최적의 포식 효율을 보이고 (4일간 관찰)
  - F9.2, PP10 균주의 경우는 30° 에서도 성장 가능하였으며 (4일간 관찰)
  - 모든 종이 37° C에서는 배양되지 않음을 확인 함 (14일간 관찰).
  - A25.2, F11.2, F20.1 균주의 경우 4° C에서 배양 가능함을 확인하였음 (8일 이상 관찰). 이러한 결과를 통해 각 균주마다 약간의 표현형적 차이를 가지고 있음을 확인하였음. 4° C에서 배양되는 균주는 저온 효소 연구의 중요 자원으로 활용 가능함. 각기 다른 온도 적응성을 비교함으로써 온도에 관련한 유전체/단백체 이해를 높일 수 있을 것으로 판단.

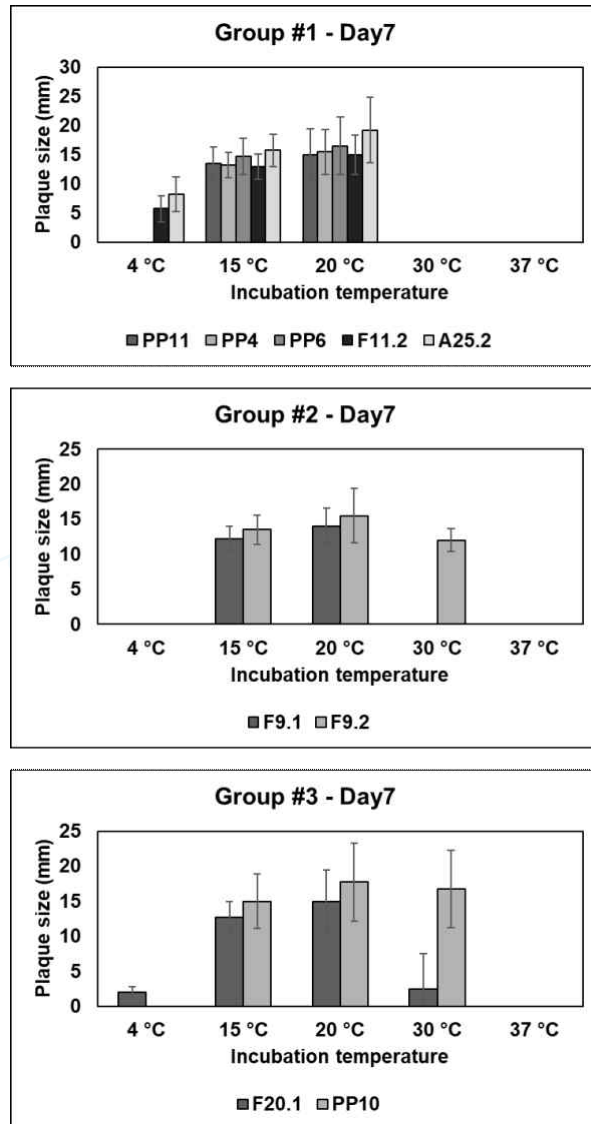
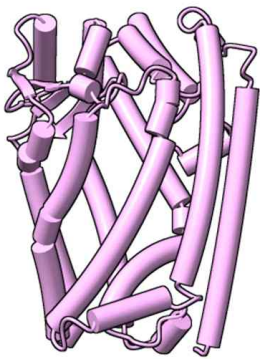


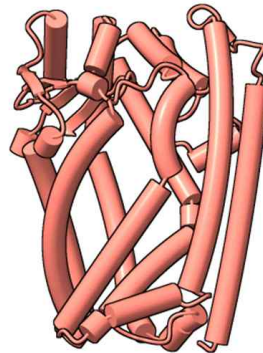
그림 30 남극 포식 미생물 3개 클러스터 내 각 포식 미생물의 최적 배양 온도 및 저온 적응성 평가. 같은 클러스터(Group) 내에서도 고온/저온에 따른 성장 차이가 나타남을 확인. 유전적으로 비슷해도 표현형이 매우 다를 수 있음을 시사.

- Alphafold를 통해 대표균주 *Bacteriovorax* sp. PP10과 Type strain *Bacteriovorax stolpii*의 단

백질 구조를 비교한 결과, 구조적으로 매우 유사한 단백질을 발견(M48 peptidase). 그러나 이의 H-bond가 30 bonds만큼 낮고, Alpha-helix와 Beta-sheet도 각각 1개씩 낮은 구조임을 확인하여 내냉성 효소 자원으로서 유력한 가능성을 확인하였음. (그림31)



*B. stolpii* M48 peptidase



PP10 M48 peptidase

- *B. stolpii*
  - A-helix: 324 aa residue
  - B-sheet: 18 aa
  - H-bond: 1776 bonds
  
- PP10
  - A-helix: 323 aa residue
  - B-sheet: 17 aa
  - H-bond: 1746 bonds

그림 31 Alphafold를 활용한 Type strain *B. stolpii*와 남극 분리 균주 *Bacteriovorax* sp. PP10의 M48 peptidase 단백질 구조 비교. Alpha helix, B-sheet, H-bond의 개수를 수치화.



- 14개 종(1차 분리균(2종) + 2차 분리균(9종) + 일반 포식 미생물(3종))을 대상으로 먹이균 범위를 확인 한 결과, 각기 다른 먹이균 선호 패턴이 관찰됨. 이는 각 균주가 유전적으로 비슷하더라도 표현형적으로는 차이가 있음을 분명하게 시사하는 결과. 추후 연구에서 적절한 스크리닝을 통해 심도 있는 응용 연구가 가능할 것으로 사료됨. (그림32)

## Prey Range of Antarctica Predator

\*Blue with Number: Plaque size in Centimeter. \*\*Blue with +: Pale plaque. \*\*\*Red with -: No plaque at all

		<i>Pseudomonas sp.</i>							<i>Janthinobacterium sp.</i>			<i>E. coli</i> K12 or B		Others		
		<i>P. putida</i>	TSA 1-2	R2A 2-1	TSA 2-1	TSA 2-3	R2A 2-4	R2A 2-8	TSA 1-4	R2A 1-3	TSA 1-1	MG1655	ML35	TSA 2-2	R2A 1-1	TSA1-3
Group 1	F9.1	+	6	7	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	F9.2	12	13	10	12	15	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F11.1	9	12	10	+	12	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Group 2	A25.2	10	14	10	+	13	12	-	10	+	11	-	-	-	8	-
	PP4	10	12	7	+	7	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PP11	10	14	11	+	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PP6	13	13	11	+	15	13	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Group 3	PP10	15	14	13	15	17	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F20.1	9	14	10	12	13	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAP	PAP07	-	7	8	-	-	5	-	6	-	7	-	+	7	-	8
	PAP08	-	6	8	+	-	7	-	-	-	-	7	+	6	-	11
Bd.	109J	15	14	12	14	11	12	-	12	-	12	13	13	-	-	-
	HD100	10	12	10	8	11	8	-	11	-	6	9	11	-	-	-
P. st	<i>P. starrii</i>	14	11	14	12	14	5	-	16	-	16	-	-	5	-	-
Number: Centimeter of plaque		<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mrigulae</i>	<i>P. velutina</i>	<i>P. westphalensis</i>	<i>P. orientalis</i>		<i>J. lividum</i>		<i>J. rivali</i>				<i>Rugamonas rubra</i>		
					<i>P. canavariensis</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>J. svalbardensis</i>					<i>Flavobacterium circumlibens</i>		<i>Rhizobium giardinii</i>

그림 32 15종의 먹이균주(보유 균주 3종, 남극 유래 먹이 균주 12종)에 대한 남극 유래 및 일반 포식 미생물의 포식 범위 프로파일링. 같은 클러스터로 묶이더라도 다소간의 먹이 가용 범위가 다름을 확인 할 수 있음. *Pseudomonas sp.*, *Janthinobacterium sp.*, *E. coli sp.*, *Flavobacterium*, *Rugamonas*, *Rhizobium*을 대상으로 테스트.

극지연구소



- 남극점은암치의 아가미에서 포식 미생물 VP107.1을 성공적으로 분리함. 해당 포식 미생물은 ‘해양 포식 미생물’인 *Halobacteriovorax marinus* SJ 와 16s rRNA 유사도 97.66%를 가져 신종으로 분류됨. 이에 대한 Whole genome sequencing과 기탁이 현재 진행 중에 있음. (그림33)

NIH National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BLAST® → blastn suite → results for RID-TUXY3YG4013

Home Recent Results Saved Strategies Help

← Edit Search Save Search Search Summary ▾

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title: 346526-MA-003-1-vp107.1-27F  
 RID: TUXY3YG4013 Search expires on 01-10-23 4:3 pm Download All ▾  
 Program: BLASTN Citation ▾  
 Database: rRNA\_typestrains/16S\_ribosomalRNA See details ▾  
 Query ID: lcl|Query\_8075301  
 Description: 346526-MA-003-1-vp107.1-27F  
 Molecule type: dna  
 Query Length: 1460  
 Other reports: Distance tree of results MSA viewer ?

**Filter Results**

Organism only top 20 will appear  exclude  
 Type common name, binomial, taxid or group name  
 + Add organism

Percent Identity:  to   
 E value:  to   
 Query Coverage:  to

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Halobacteriovorax marinus SJ 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Halobacteriovorax marinus SJ</a>	2495	2495	99%	0.0	97.66%	555	NR_102485.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Halobacteriovorax marinus SJ 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Halobacteriovorax marinus SJ</a>	2490	2490	99%	0.0	97.66%	1454	NR_028723.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Halobacteriovorax libralis strain J35 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Halobacteriovorax libralis</a>	2023	2023	99%	0.0	91.98%	1475	NR_028724.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Halobacteriovorax marinus SJ 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Halobacteriovorax marinus SJ</a>	1925	1925	75%	0.0	98.19%	1182	NR_115143.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Halobacteriovorax vibronivorans strain BL9 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Halobacteriovorax vibronivorans</a>	1851	1851	99%	0.0	89.87%	1541	NR_105934.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacteriovorax strobil strain DSM 12778 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacteriovorax strobil</a>	1640	1540	91%	0.0	88.98%	1331	NR_042023.1

그림 33 남극 유래 포식 미생물 *Halobacteriovorax antiarcticus* VP107.1의 16s rRNA 분석 결과. Type strain인 *Halobacteriovorax marinus* SJ와 97.66%의 Identity를 가져 신종으로 확인.

## 제 5 절. 남극 유래 신종 포식 미생물 *Bacteriovorax antarcticus* PP10

- 위의 절에서 선정된 9개의 포식 미생물 중, 배양 안정성이 탁월한 PP10 균주를 대상으로 심층적인 연구를 진행함
  - 20° C에서 *Pseudomonas putida*를 대상으로 3일만에 배양 가능하며, 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup> PFU/ml 정도의 농도를 가짐 (HEPES 배지, pH 7.2)
  - Whole genome sequencing을 진행하고, 근연종을 대상으로 dDDH와 ANI 분석을 진행함. 16S rRNA, dDDH, ANI 분석 결과 신종 균주로 확인되었음 (표3)

Reference Strain	Accession Number	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	rGC (%)
<i>Bacteriovorax stolpii</i> DSM 12778 <sup>T</sup>	CP025704	18.5	[16.3 - 20.8]	<b>74.92</b>	2.49
<i>Halobacteriovorax marinus</i> SJ <sup>T</sup>	CP017414	17.7	[15.6 - 20.1]	<b>67.06</b>	1.70
<i>Peredibacter starrii</i> A3.12 <sup>T</sup>	CP139487	17.6	[15.5 - 19.9]	<b>67.09</b>	4.31
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100 <sup>T</sup>	NC 005363	19.6	[17.4 - 22.0]	<b>64.46</b>	12.25
<i>Bdellovibrio reynosensis</i> <sup>T</sup>	CP093442	19.3	[17.1 - 21.7]	<b>64.96</b>	4.72
<i>Pseudobdellovibrio exovorax</i> JSS <sup>T</sup>	NC 020813	19.6	[17.4 - 22.0]	<b>64.54</b>	3.52

표 3 Pairwise comparisons of the genome of *Bacteriovorax antarcticus* PP10 DSM 116241<sup>T</sup> against other predatory strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



- 한국(KCTC) 및 독일(DSMZ) 미생물자원은행에 기탁을 완료하였음 (기탁번호 DSM 116241)
- 유전체 결과를 바탕으로 Secondary metabolite 분석을 진행. Type strain인 *Bacteriovorax stolpii* DSM 12778 균주와 비교. Amino acid 시퀀스를 기반으로 Protein homology 분석을 진행한 결과 큰 차이를 가짐. 신종 균주로서 개별적 특성이 강함을 나타냄. (표4)

Secondary Metabolite	<i>B. antarcticus</i> PP10 <sup>T</sup>		<i>B. stolpii</i> DSM 12778 <sup>T</sup>		Homology
	Gene ID	Protein Size (a.a.)	Gene ID	Protein Size (a.a.)	
Aryl Polyene	SHI21_13190	395	COV70_14775	418	28.07 %
	SHI21_13195	86	COV70_14770	75	28.95 %
	SHI21_13220	677	COV70_16330	241	26.67 %
	SHI21_13225	251	COV70_17070	262	24.48 %
	SHI21_13230	248	COV70_08380	245	41.83 %
	SHI21_13235	493	COV70_08425	473	21.82 %
	SHI21_13240	418	COV70_14775	418	31.41 %
	SHI21_13245	81	-	-	-
	SHI21_13255	380	COV70_14775	418	29.91 %
Beta Lactone	SHI21_17610	306	COV70_08265	306	86.93 %
	SHI21_17620	272	COV70_08275	272	84.93 %
	SHI21_17655	644	COV70_08305	644	79.81 %
Ni-Siderophore	SHI21_07770	585	COV70_12475	581	22.65 %
	SHI21_07775	339	COV70_12480	329	60.53 %
	SHI21_07780	581	COV70_12485	587	27.73 %
NRPS	SHI21_05835	1884	COV70_13890	2940	62.26 %
	SHI21_08160	1375	COV70_12075	1371	62.65 %
Phosphonate	SHI21_03725	378	COV70_15945	379	81.75 %
	SHI21_03685	443	COV70_15990	446	86.14 %
	SHI21_03680	369	COV70_15995	369	89.43 %
	SHI21_03675	178	COV70_16000	174	79.43 %
	SHI21_03635	386	COV70_16035	385	90.39 %
	SHI21_03630	545	COV70_16040	540	96.66 %
	SHI21_03625	211	COV70_16045	211	75.36 %
	SHI21_03615	257	COV70_16055	249	91.46 %
Ranthipeptide			COV70_17805	372	
			COV70_17810	431	
			COV70_17815	441	
			COV70_17825	298	
	SHI21_10795	330	COV70_17835	309	31.76 %
			COV70_17840	365	
			COV70_17850	322	
			COV70_17860	407	
	SHI21_10805	379	COV70_17880	369	56.71 %
	SHI21_10825	409	COV70_17885	407	35.77 %
			COV70_17890	551	
	SHI21_10850	91	COV70_17895	91	48.86 %
	SHI21_10800	383	COV70_00040	359	40.73 %
	SHI21_10830	244	COV70_17900	244	47.70 %
	SHI21_10845	247	COV70_17900	244	52.70 %
SHI21_10835	337	COV70_15475	333	32.89 %	
SHI21_10855	366	COV70_17750	430	37.69 %	
SHI21_10860	369	COV70_17735	455	55.98 %	
SHI21_10890	360	-	-	-	
T1PKS	SHI21_05830	2221	COV70_13895	2225	74.39 %
T3PKS			COV70_02630	346	31.12 %
	SHI21_06190	350	COV70_13990	350	77.71 %

표 4 Identified secondary metabolite regions within the genomes of *B. stolpii* DSM 12778<sup>T</sup> and *B. antarcticus* PP10<sup>T</sup> using antiSMASH v. 7.1.0. *B. stolpii* DSM 12778<sup>T</sup> genes listed in blue are not present within the biosynthetic gene clusters identified by antiSMASH v. 7.1.0. The percent homology is the amino acid identity between the *B. antarcticus* PP10<sup>T</sup> and *B. stolpii* DSM 12778<sup>T</sup> proteins using BlastP from NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

- 일반적인 포식 미생물에 비해 배양에 소요되는 시간이 긴 만큼, 1주기 생활사(1 Life cycle)에 소요되는 시간을 Resazurin 분석법(제 6장)을 통해 분석하였음. *Bacteriovorax antarticus* PP10는 포식 이후 초기 4시간 동안 지속적으로 먹이 박테리아인 *P. putida*의 생활성을 감소시켰으며 8시간 이후부터 그 양이 크게 증가됨을 확인함. 이에 1주기 생활사는 8시간 간격으로 추정하며, 3일 이라는 배양 기간에 산술적으로 부합하는 것으로 판단함. (그림34)

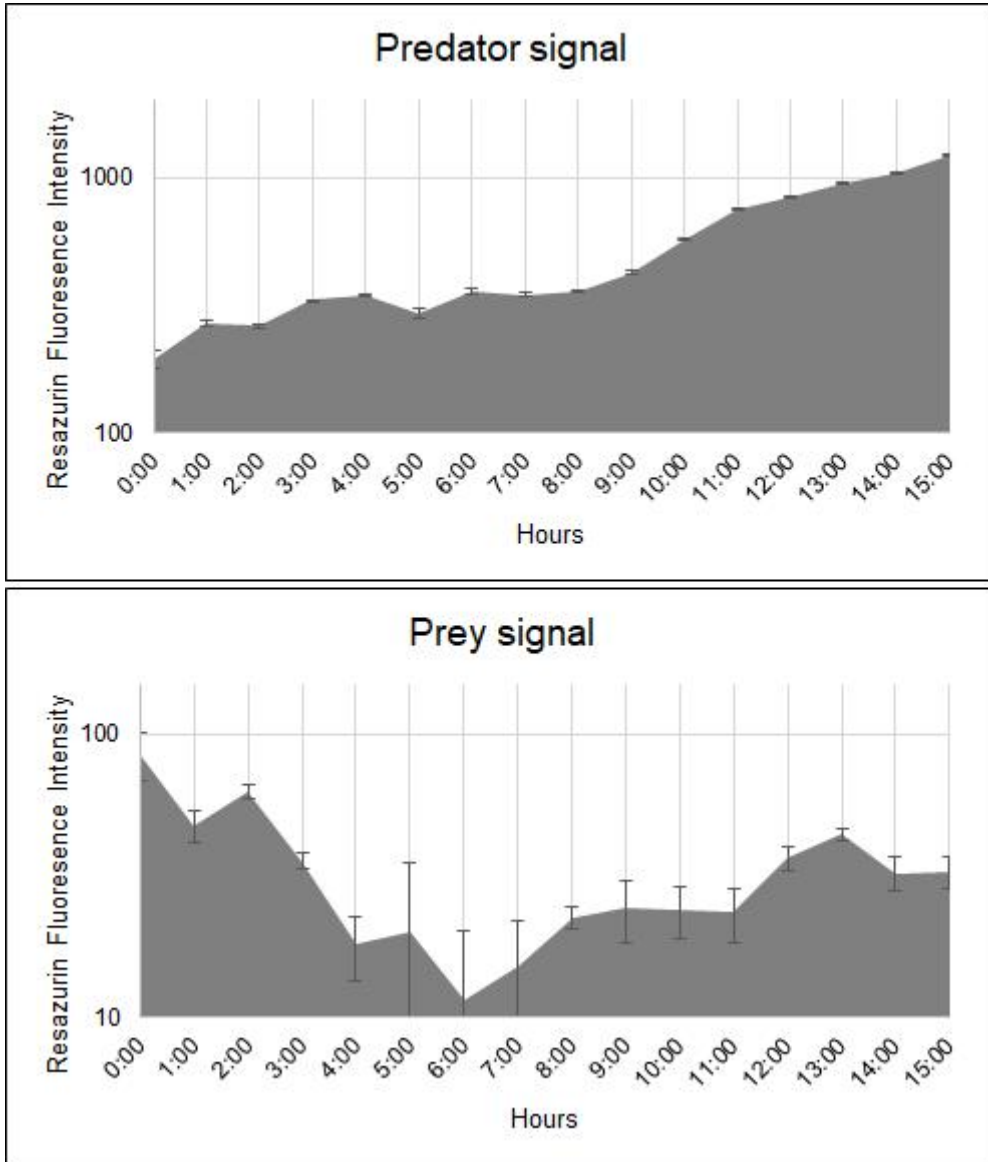


그림 34 Resazurin을 활용한 포식 미생물(Predator: *B. antarcticus* PP10<sup>T</sup>)과 먹이 미생물(Prey: *E. coli* ML35)의 생활성 추적검사. 포식 미생물의 Signal이 8시간 이후로 급증하는 것을 통해 1주기 생활사가 8~10시간 간격으로 구성되어 있음을 파악. 먹이균의 Signal은 초기 2시간 이후 급격히 감소하는 것을 통해 포식의 시작 단계가 2시간 이내에 이루어 짐을 확인.

- *Bacteriovorax antarcticus* PP10의 포식 생활 방식에 대한 분석을 위해 주사전자현미경 촬영을 진행하였음. 고농도의 포식 미생물과 먹이 미생물을 각각 준비하여 혼합한 뒤, 0~9시간 까지 배양기간동안 매 시간마다 샘플링을 진행. Paraformaldehyde 용액(final 4%)으로 세포를 고정하고 관찰 한 결과, 앞서 실험으로 확인 한 바와 같이 8시간부터 lysis가 관찰되기 시작해서 9시간째부터는 모든 먹이 미생물이 사멸하고, 포식 미생물만 있는 것을 확인할 수 있었음. (그림35, 그림36)

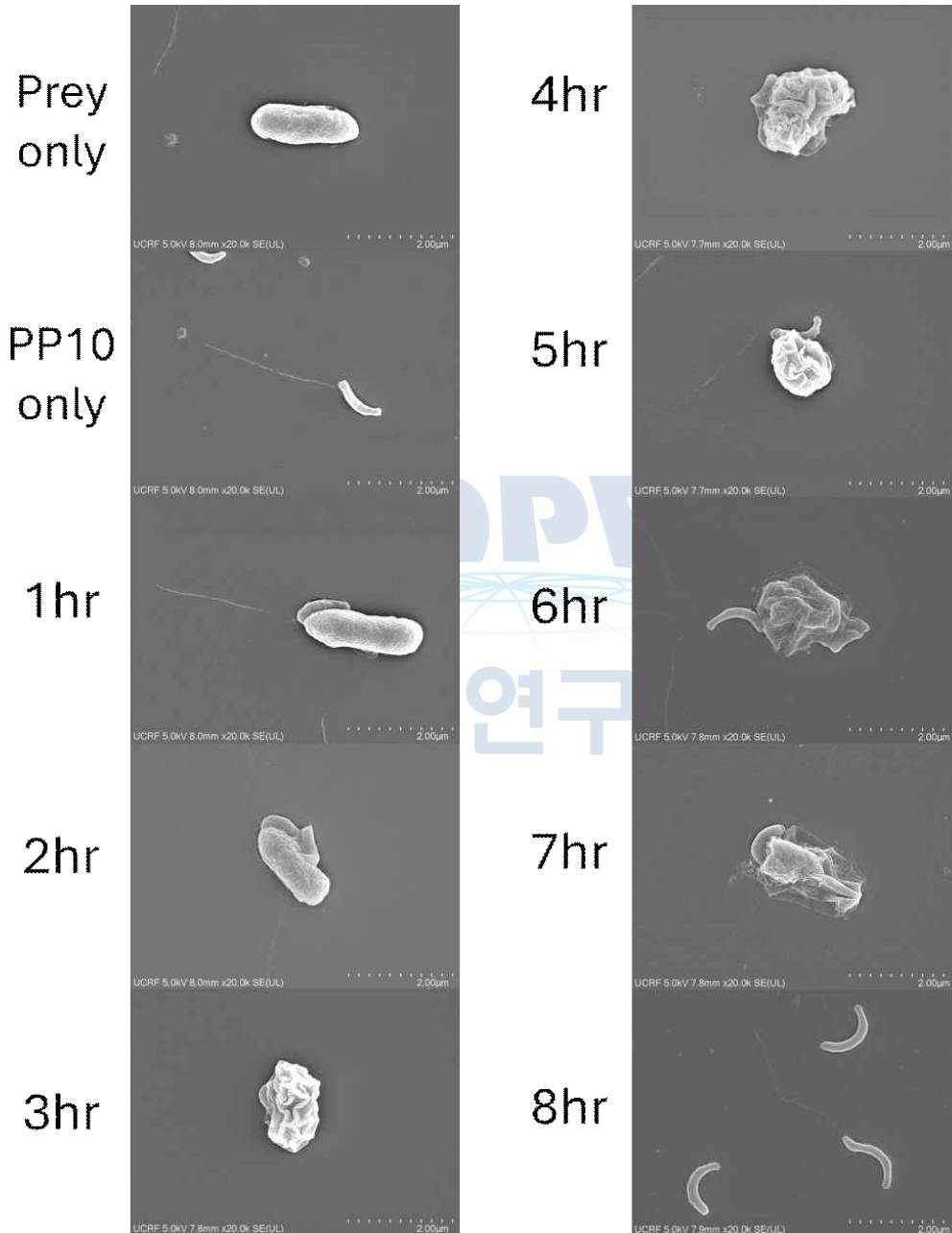


그림 35 *B. antarcticus* PP10<sup>T</sup>의 생활사 파악을 위한 주사전자현미경 촬영. 매시간마다 샘플링해 Paraformaldehyde 4%로 고정한 뒤 촬영하였음. 고배율 20,000배 확대 이미지. 2시간 짜부터 포식 미생물이 먹이 미생물을 파고들기 시작해 3~7시간 동안 먹이 미생물을 파괴. 8시간 짜에는 포식 미생물 만이 확인됨.

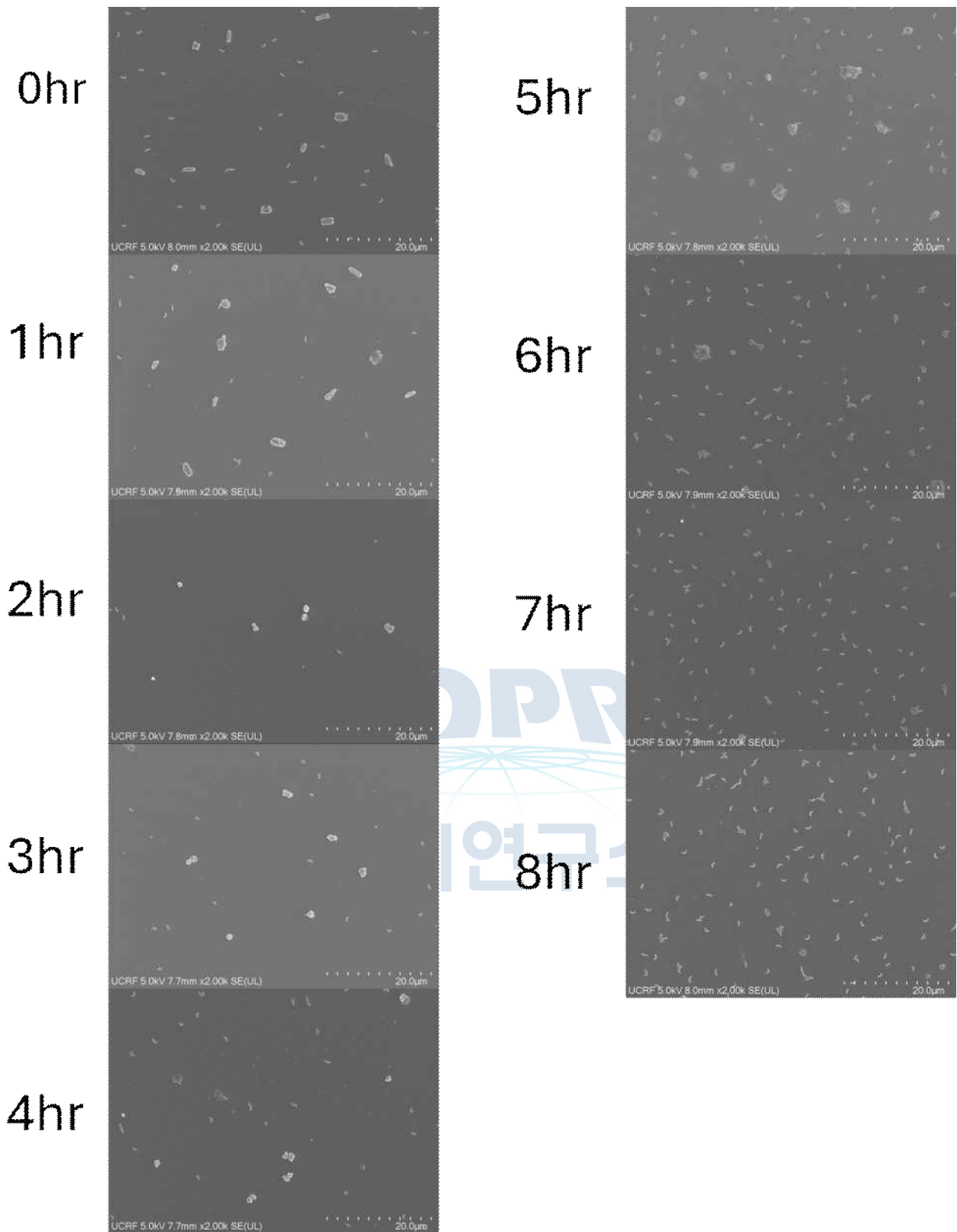


그림 36 *B. antarcticus* PP10<sup>T</sup> 의 생활사 파약을 위한 주사전자현미경 촬영. 매시간마다 샘플링해 Paraformaldehyde 4%로 고정된 뒤 촬영하였음. 저배율 2,000배 확대 이미지. 2시간 짜부터 포식 미생물이 먹이 미생물을 파고들기 시작해 3~7시간 동안 먹이 미생물을 파괴. 8시간 짜에는 포식 미생물 만이 확인됨.

## 제 6 절. 신속 측정법 개발

- 극지 포식 미생물 분리를 위한, 포식 미생물 단기 생물 활성 측정
  - 포식 미생물의 수 및 생활성을 파악하기 위한 방법으로서 기존 Agar 배지를 활용한 Plaque의 측정 방법은 올바른 측정을 위해서는 많은 사전 준비와 최소 3일, 길게는 7일 이상의 기간이 소요. Plaque를 생성하지 못하는 포식 미생물에게는 적용할 수 없는 방법임. 또한 저온 적응 포식 미생물을 Plaque 생성에 일주일 이상의 기간이 소요되므로 실험 진행에 큰 차질이 있음. 이에 기존의 방법과 다른 신속 측정법의 필요성이 대두되었음.
  - 여러 방법 중, 신뢰도 높은 미생물학적 생활성 측정 방법은 Resazurin 측정법이 있음. 그러나 *Bdellovibrio* 또는 *Bacteriovorax* 자체는 Resazurin에 의해 생장이 저해되고, 이들의 기본적인 성장 방식이 LB, NB와 같은 nutrient 배지를 바탕으로 하지 않아 기존의 resazurin 방법을 사용하는 것이 불가능
  - 기존 방안이 배양액에 Resazurin을 넣고 장기간 배양하며 Resorufin 시그널의 증가를 관찰하는 것이었음. 그러나 본 연구진은 무영양 배지에서 단시간 내 시그널(Resorufin 형광)의 변화를 관찰하는 방식으로 박테리아 자체가 가진 NADH 농도를 추산하는 방식으로 포식 미생물의 viability를 20분 내로 측정하는 방법을 개발하였음 (그림37, 그림38).



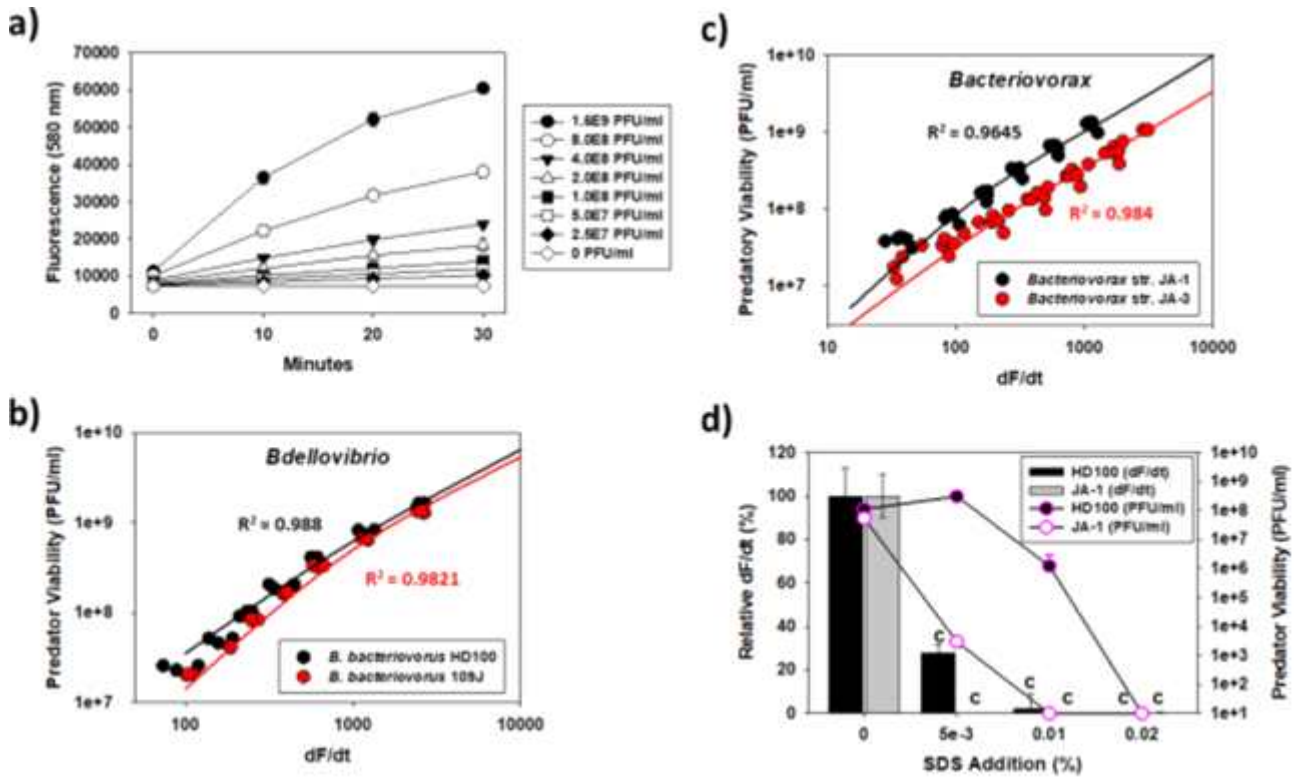


그림 37 레사주린을 사용한 포식성 박테리아의 빠른 계수. (a) B. 박테리오보루스 HD100 농도를 기준으로 형광의 증가를 보여주는 동역학 플롯. 데이터에 따르면 모든 샘플에서 처음 10분 동안 가장 큰 증가가 있었으며, 따라서 항상 0분과 10분 판독값의 차이를 사용하여 dF/dt를 계산했음 (n = 3). (b) 세포 밀도에 대한 장염비브리오 포식성 균주의 dF/dt 값의 플롯으로, 포식성 수치가  $10^7 \sim 10^9$  PFU/mL 사이일 때 높은 상관관계를 보임 (n = 3). (c) 세포 밀도에 대한 할로박테리오보락스 포식성 균주의 dF/dt 값을 플롯한 것으로, 포식성 수치가  $10^7 \sim 10^9$  PFU/mL 사이일 때 다시 한 번 높은 상관관계를 보임 (n = 6). (d) 포식성 배양액이 SDS에 의해 사멸하면 Resorufin 형광이 저하됨. 레사주린을 첨가하기 전에 박테리아 포식자를 다양한 SDS 농도로 1시간 동안 교반 배양했음. 결과는 특정 조건에서 포식자가 사멸하는 시점을 평가하는 데 dF/dt 값을 사용할 수 있음을 보여줌. c, P < 0.0001 (n = 3).



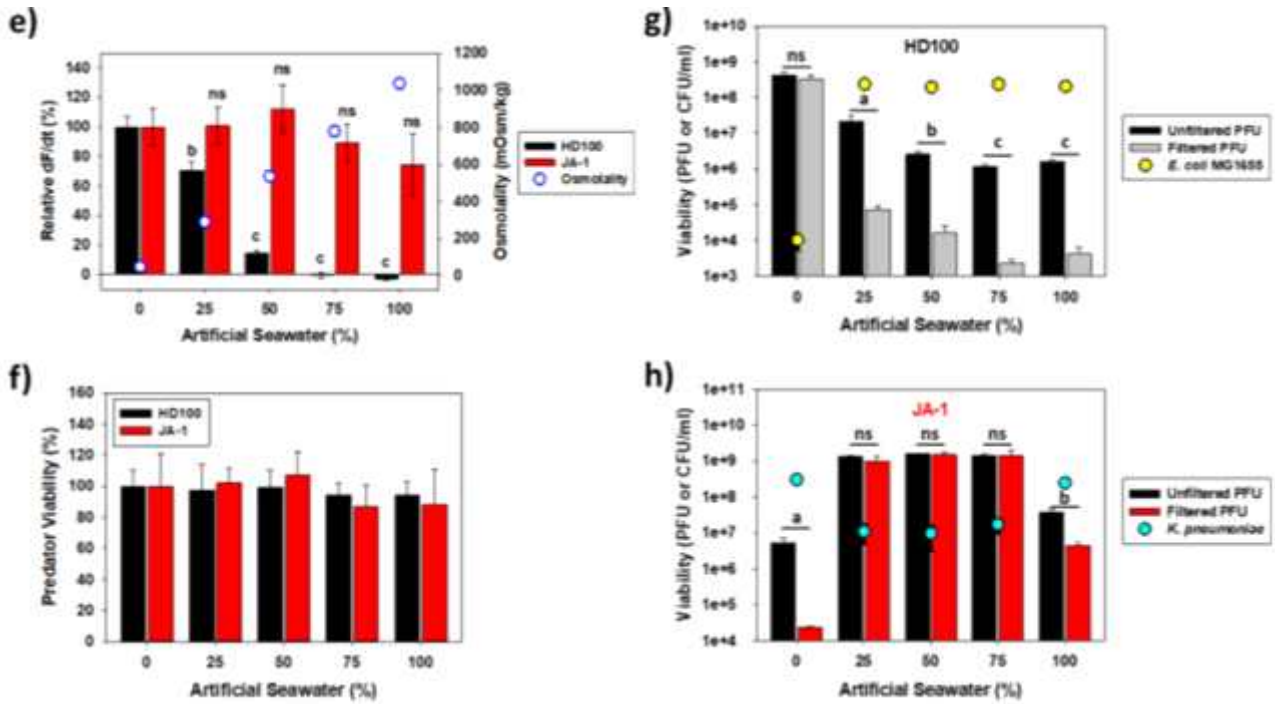


그림 38 (e) 배지의 삼투압이 *B. bacteriovorus* HD100과 *Halobacteriovorax* JA-1의 dF/dt 값에 미치는 영향, 전자는 부정적 영향을 받는 반면 후자는 탄력적임. 포식 미생물에 레사주린을 첨가하기 전에 삼투농도가 다른 배지에서 1시간 동안 배양하였음. ns, 유의하게 다르지 않음; b,  $P < 0.001$ ; c,  $P < 0.0001$  ( $n = 3$ ). (f) 각 포식 미생물의 1시간 생존율. 패널 e의 실험에서 서로 다른 삼투압에서 포식자를 배양한 후, Top agar 플레이트를 사용하여 plaque 계수하여 생존력을 측정된 결과, 어느 포식 미생물도 0% ASW에 비해 생존력에 부정적인 영향을 받지 않는 것으로 나타남 ( $n = 3$ ). (g) *B. bacteriovorus* HD100에 대한 Overnight 포식 결과, 각 삼투압에서 대장균에 대한 포식 활동은 패널 e에서 발견한 dF/dt 값과 잘 상관관계가 있으며, 크게 다르지 않습니다; a,  $P < 0.05$ ; b,  $P < 0.001$ ; c,  $P < 0.0001$  ( $n = 3$ ). (h) 포식이 일어나지 않은 0% ASW를 제외하고 각 삼투압에서 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 포식 활동이 패널 e에서 발견한 dF/dt 값과 잘 상관관계가 있음을 보여주는 *Halobacteriovorax* JA-1의 포식 결과. ns, 크게 다르지 않음; a,  $P < 0.05$ ; b,  $P < 0.001$  ( $n = 3$ ).

- 먹이 미생물과 포식 미생물 혼합물에서는 Sodium dodecyl sulfate를 첨가(final 0.02%)하여 포식 미생물을 선택적으로 사멸시켜 포식 미생물의 signal을 제거할 수 있음. 제거된 양을 계산하여 먹이 미생물과 포식 미생물의 생활성을 각각 추산 할 수 있음. (그림39)
- 해당 아이디어는 다각적인 검증과 활용 예시를 제안하여 Microbiology Spectrum에 출판 완료, 특허 출원 완료.
- 해당 방법을 남극 포식 미생물 생활성 측정에 활용하여 난배양성 포식 미생물 분석법으로서의 활용 가능성을 입증하였음.

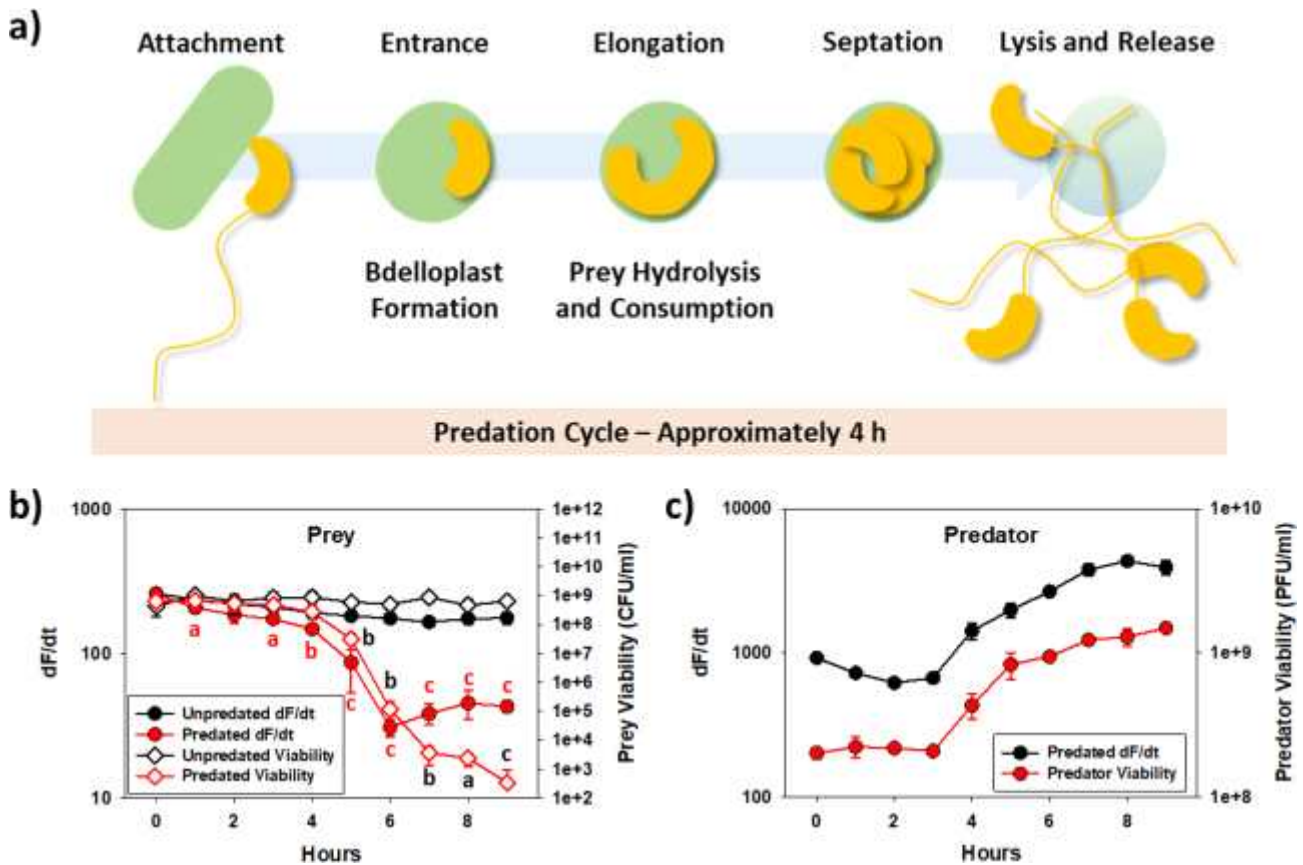


그림 39 포식 중 포식 활동을 모니터링하기 위한 레사주린의 사용. (a) *B. bacteriovorus* HD100의 포식 주기. 일반적으로 한 사이클을 완료하는 데 약 4시간이 걸리므로 포식 테스트는 두 사이클을 포함하도록 9시간 동안 수행. (b) 포식 작용이 먹이균인 *E. coli* MG1655의 레사주린 형광과 생존율에 미치는 영향. 초기 포식 미생물 대 먹이 비율은 약 0.3, 즉 먹이 3마리당 포식 미생물 1마리였음. 포식 미생물의 레소루핀 형광을 제거하기 위해 레사주린을 첨가하고 dF/dt (n = 3)를 측정하기 전에 샘플 시료에 10분 동안 SDS를 첨가. (c) 포식 미생물의 형광(dF/dt)과 생존율 수는 서로 평행을 이룸. 데이터는 두 분석 모두에서 동일한 추세를 보여, 포식 실험 중에도 레사주린을 사용하여 포식자 개체군을 빠르게 평가할 수 있음을 입증함 (n = 3).

## 제7절 남극 신종 박테리아 분리 및 규명

- 남극 토양 및 수계 샘플로부터 6종의 신종 박테리아를 분리 동정하였음.
  - 토양 및 수계 샘플 1g을 HEPES buffer에 5배 희석한 뒤 TSB, LB, NB, R2A 등의 배지에 희석 도말하고 20° C에서 2주간 배양하며 다양한 콜로니를 확보하였음. 특징적인 Morphology 및 색채 특성을 가진 균주를 중심으로 분리 동정을 진행.
  - 다수의 박테리아를 대상으로 16s rRNA 분석 결과 6종의 박테리아가 identity가 98.7% 미만으로 신종 기준에 부합하였음.
  - 포식 미생물 연구 중 다양한 비포식성 박테리아를 분리하였고, 이를 분리 동정하는 과정에서 총 6종의 신종을 발굴하였음. 남극 환경에 적응한 박테리아는 그 자체로서 자원으로서의 가치가 높은바, Whole genome sequencing과 기탁(한국 KCTC, 독일 DSMZ) 완료하여 자원화하였음.
  - 6종의 박테리아의 신종 명칭과 기탁번호는 각각 다음과 같음
    - 1) *Flavobacterium ardleyensis* PL02 (DSM 116602) - 뜻: 아틀레이섬 유래
    - 2) *Formosa sejongensis* PL04 (DSM 117045) - 뜻: 세종과학기지 유래
    - 3) *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 (DSM 116981) - 뜻: 저온, 비올라세인 생산
    - 4) *Polaribacter ardleyensis* PL03 (DSM 116992) - 뜻: 아틀레이섬 유래
    - 5) *Polaromonas potterensis* SM01 (DSM 116566) - 뜻: 포터소만 유래
    - 6) *Rhizobium antarcticum* PL01 (DSM 116244) - 뜻: 남극 유래
  - 모든 균주에 대하여 최적 배양 온도를 분석한 결과, 모든 균주가 4° 에서 배양이 가능하여 저온 적응 균주임을 확인하였고, *Formosa sejongensis* PL04는 25° C에서 최적, *Polaribacter ardleyensis* PL03은 15° C에서 최적, 그 외 4개 균주는 20° C에서 최적으로 배양됨을 확인하였음. (표5)

	4 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C
<i>Flavobacterium ardleyensis</i> PL02	+	+	+++	++	+	-
<i>Formosa sejongensis</i> PL04	+	+	++	+++	-	-
<i>Iodobacter frigidoviolaceus</i> CM08	+	++	+++	+++	-	-
<i>Polaribacter ardleyensis</i> PL03	++	+++	++	+	-	-
<i>Polaromonas potterensis</i> SM01	++	++	+++	++	-	-
<i>Rhizobium antarcticum</i> PL01	+	+	+++	++	-	-

표 5 Permissive temperatures for the non-predatory polar isolates.

- 모든 균주에 대하여 Whole genome sequencing을 바탕으로 dDDH와 ANI 분석을 진행하였으며, 모든 균주에서 dDDH는 일치도 70% 미만, ANI 일치도 95% 미만으로 신종 기준에 부합하였음. (표6, 표7, 표8, 표9, 표10, 표11)
- 모든 균주에 대하여 주사전자현미경 촬영을 통해 박테리아의 모양과 크기를 관찰하였고, 일반적인 특성에 부합함을 확인. (그림40, 그림41, 그림42, 그림43, 그림44, 그림 45)



Reference Strain	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	△GC (%)
<i>Acinetobacter colistiniresistens</i> NIPH 2036	29.0	[26.6 - 31.5]	64.41	6.50
<i>Neisseria zalophi</i> ATCC BAA-2455	28.3	[25.9 - 30.8]	66.93	3.19
<i>Iodobacter fluviatilis</i> DSM 3764	25.0	[22.6 - 27.4]	80.28	0.97
<i>Iodobacter ciconiae</i> H11R3	24.5	[22.2 - 27.0]	79.56	0.29
<i>Peribacillus butanolivorans</i> DSM 18926	22.8	[20.5 - 25.3]	62.40	9.84
<i>Spiroplasma floricola</i> ATCC 29989	21.0	[18.8 - 23.4]	65.68	23.42

표 6 Pairwise comparisons of the genome of *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 (DSM 116981<sup>T</sup>) against other strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



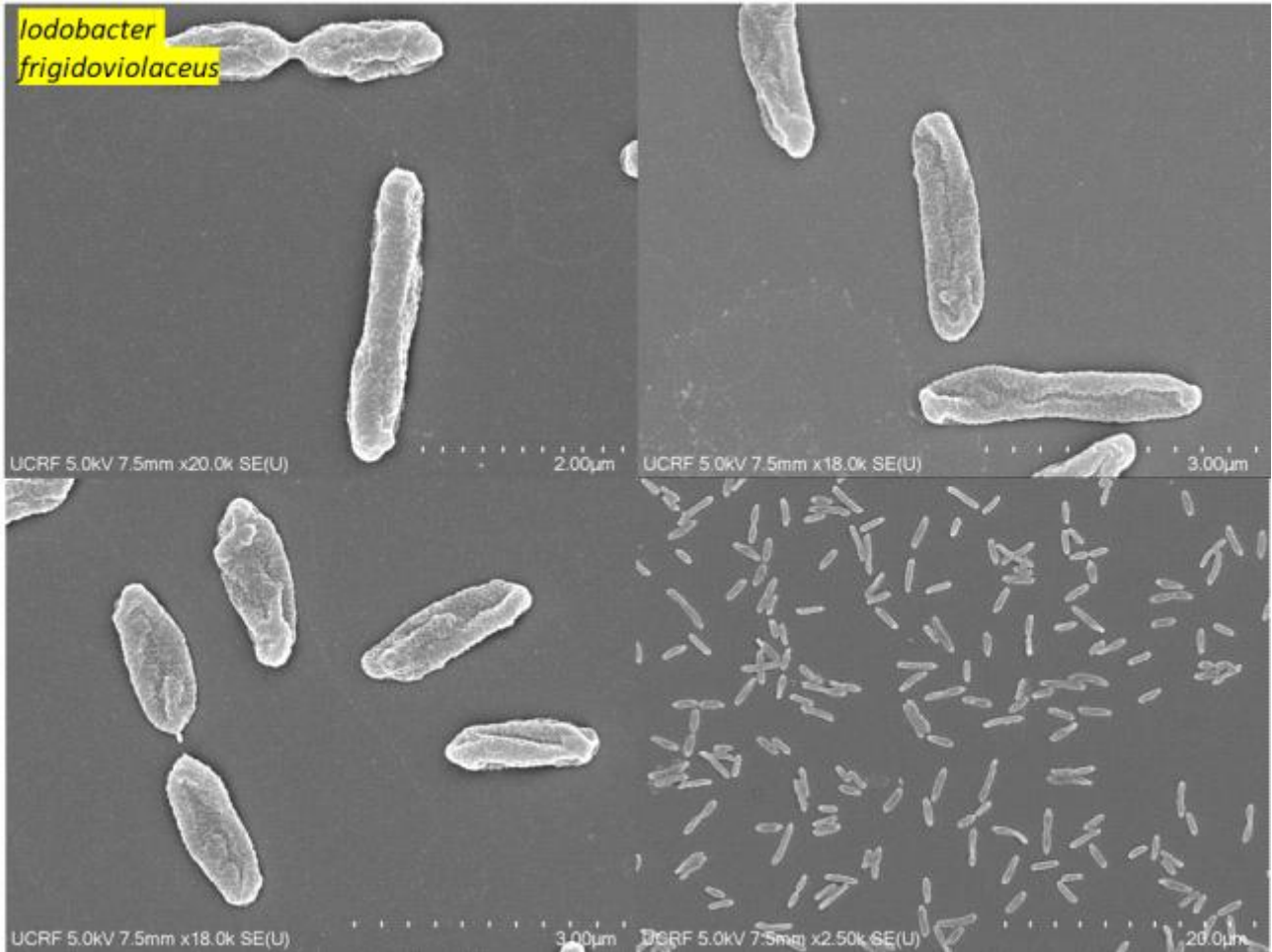


그림 40 *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 (DSM 116981<sup>T</sup>) 배양물의 주사전자현미경 이미지. 3µm 내외의 길이, 0.3µm 내외의 두께를 가짐.

극지연구소

Reference Strain	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	△GC (%)
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	25.0	[22.7 - 27.5]	81.63	0.56
<i>Formosa algae</i> KMM 3553	24.1	[21.8 - 26.5]	80.85	0.50
<i>Formosa haliotis</i> LMG 28520	23.1	[20.6 - 25.4]	79.58	1.46
<i>Formosa sediminum</i> PS13	22.9	[20.6 - 25.4]	80.24	0.67
<i>Bizionia arctica</i> CGMCC 1.12751	22.3	[20.0 - 24.7]	74.53	0.11
<i>Winogradskyella psychrotolerans</i> RS-3	20.0	[17.8 - 22.4]	72.60	0.59

표 7 Pairwise comparisons of the genome of *Formosa sejongensis* PL04 (DSM 117045<sup>T</sup>) against other strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



Formosa SEM image

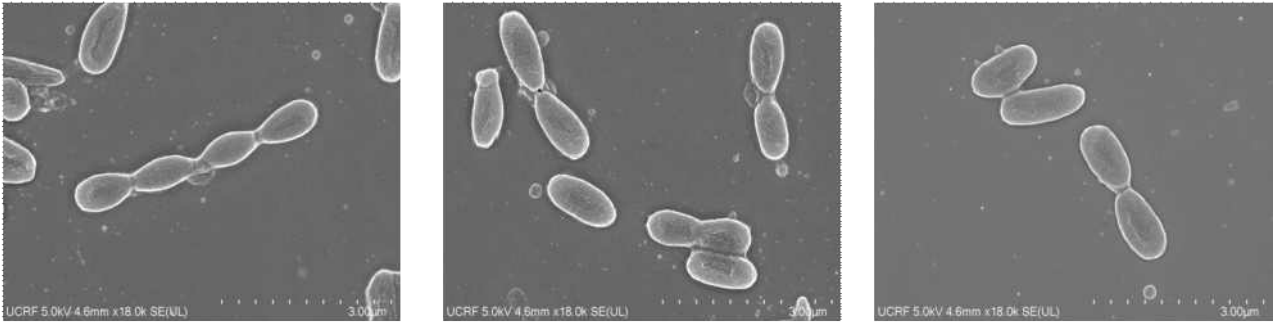


그림 41 *Formosa sejongensis* PL04 (DSM 117045<sup>T</sup>) 배양물의 주사전자현미경 이미지. 1.23µm 내외의 길이, 0.6µm 내외의 두께를 가짐.



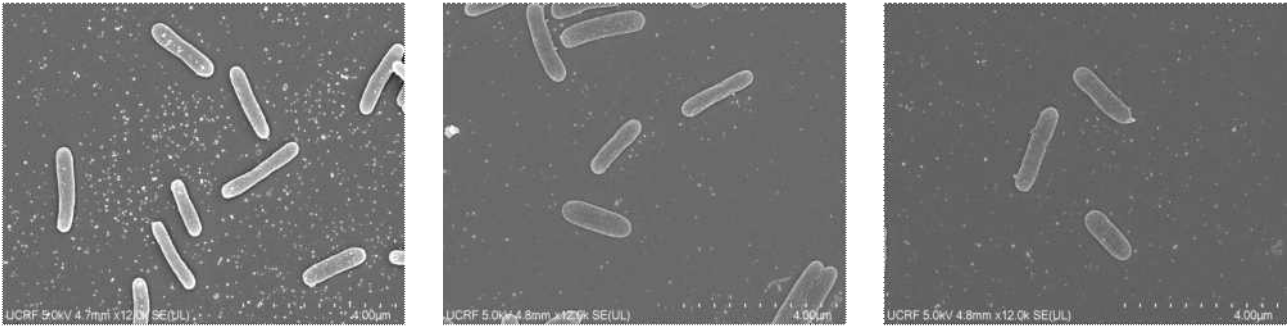


Reference Strain	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	△GC (%)
<i>Polaribacter sejongensis</i> KCTC 23670	24.7	[22.4 - 27.1]	81.07	1.00
<i>Polaribacter butkevichii</i> KCTC 12100	24.4	[22.1 - 26.9]	80.89	0.87
<i>Polaribacter undariae</i> KCTC 42175	24.1	[21.8 - 26.6]	80.58	1.16
<i>Polaribacter atrinae</i> KACC 17473	23.7	[21.4 - 26.2]	80.52	0.85
<i>Polaribacter haliotis</i> RA4-7	23.4	[21.2 - 25.9]	80.49	0.38
<i>Polaribacter pectinis</i> L12M9	23.4	[21.1 - 25.8]	80.75	0.18

표 8 Pairwise comparisons of the genome of *Polaribacter ardleyensis* PL03 (DSM 116992<sup>T</sup>) against other strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



*Polaribacter* SEM image



Length: 1.89µm

Width: 0.48µm

그림 42 *Polaribacter ardleyensis* PL03 (DSM 116992<sup>T</sup>) 배양물의 주사전자현미경 이미지. 1.89µm 내외의 길이, 0.48µm 내외의 두께를 가짐.



Reference Strain	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	ΔGC (%)
<i>Polaromonas eurypsychrophila</i> CGMCC 1.15322	24.4	[22.1 - 26.9]	81.13	0.25
<i>Polaromonas jejuensis</i> NBRC 106434	22.9	[20.6 - 25.4]	79.16	1.07
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	21.7	[19.5 - 24.2]	78.04	0.14
<i>Variovorax terrae</i> CYS-02	20.4	[18.2 - 22.8]	76.36	5.84
<i>Rhodferax sediminis</i> CHu59-6-5 T	20.3	[18.1 - 22.7]	75.82	2.53
<i>Curvibacter cyanobacteriorum</i> HBC61	20.0	[17.8 - 22.4]	74.84	5.35

표 9 Pairwise comparisons of the genome of *Polaromonas potterensis* SM01 (DSM 116566<sup>T</sup>) against other strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



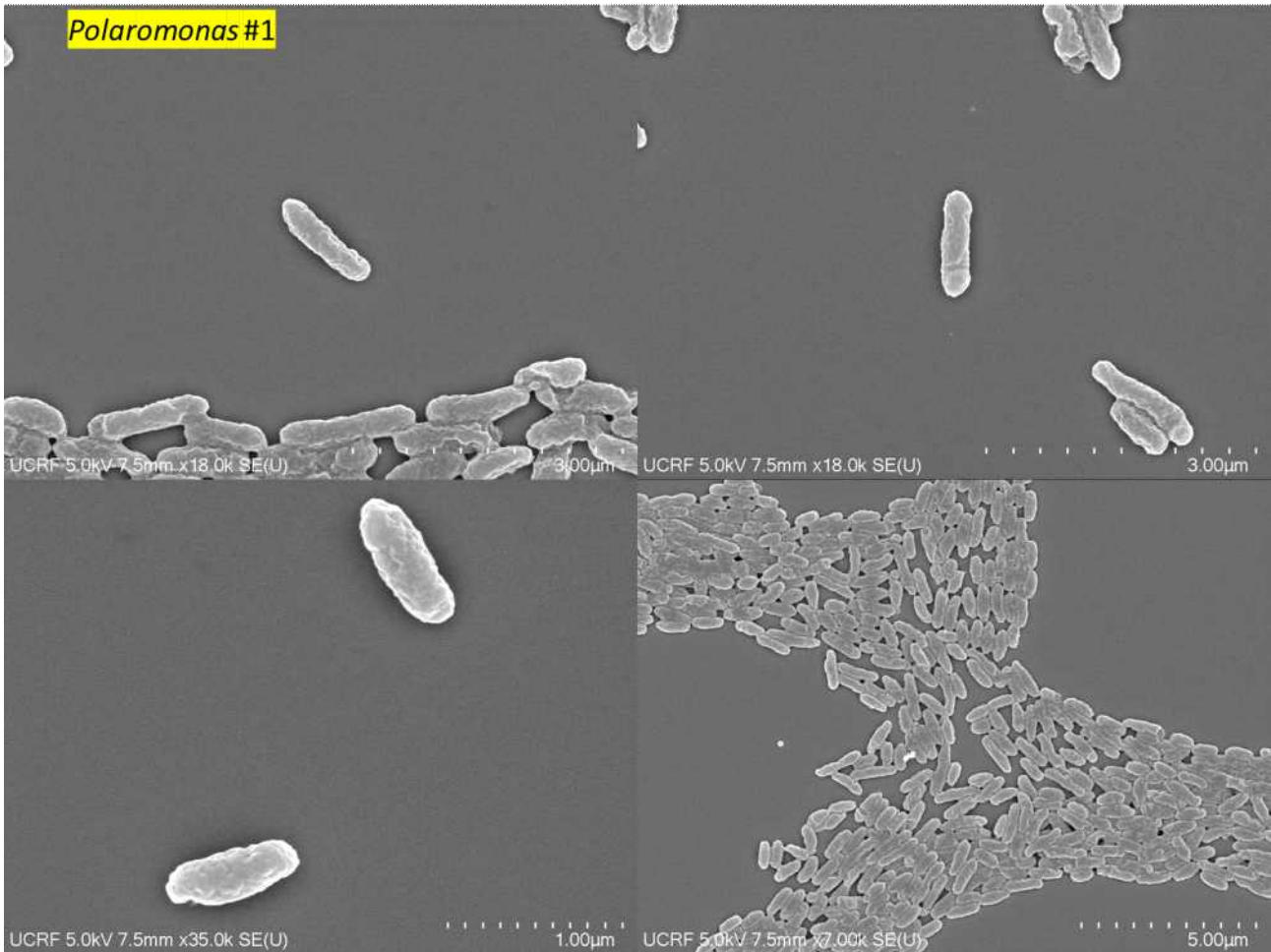


그림 43 *Polaromonas potterensis* SM01 (DSM 116566<sup>T</sup>) 배양물의 주사전자현미경 이미지. 1.5µm 내외의 길이, 0.3µm 내외의 두께를 가짐.

극지연구소

Reference Strain	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	△GC (%)
<i>Pararhizobium polonicum</i> F5.1	28.0	[25.6 - 30.5]	84.25	2.11
<i>Pararhizobium giardinii</i> H152	24.7	[22.4 - 27.2]	81.76	1.63
<i>Rhizobium gei</i> ZFJT-2	22.3	[20.0 - 24.8]	79.43	0.56
<i>Pararhizobium antarcticum</i> 59	22.2	[19.9 - 24.6]	78.73	1.63
<i>Pararhizobium arenae</i> MIM27	21.6	[19.3 - 24.0]	77.75	0.78
<i>Rhizobium quercicola</i> DKSPLA3	21.2	[18.7 - 23.7]	76.52	5.44

표 10 Pairwise comparisons of the genome of *Rhizobium antarcticum* PL01 (DSM 116244<sup>T</sup>) against other strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



*Rhizobium* SEM image

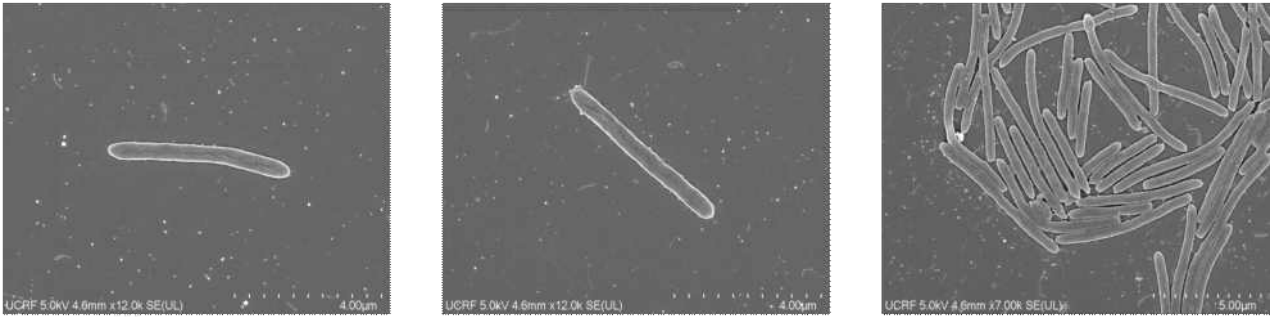


그림 44 *Rhizobium antarcticum* PL01 (DSM 116244<sup>T</sup>) 배양물의 주사전자현미경 이미지. 4.68µm 내외의 길이, 0.44µm 내외의 두께를 가짐.



Reference Strain	dDDH d <sub>4</sub> (in%)	C.I. d <sub>4</sub> (in%)	ANI (%)	△GC (%)
<i>Flavobacterium hydati</i> DSM 2063	41.4	[38.9 - 44.0]	90.40	2.11
<i>Flavobacterium frigiditolerans</i> CGMCC1.11577	33.6	[31.2 - 36.1]	87.30	1.45
<i>Flavobacterium shii</i> CGMCC 1.11581	32.6	[30.2 - 35.1]	86.67	1.63
<i>Flavobacterium branchiarum</i> CECT 7908	29.4	[27.0 - 31.9]	84.81	0.56
<i>Flavobacterium hibernum</i> DSM 12611	23.2	[20.9 - 25.7]	79.07	1.63
<i>Flavobacterium frigidimaris</i> DSM 15937	23.0	[20.7 - 25.5]	78.76	0.3

표 11 Pairwise comparisons of the genome of *Flavobacterium ardleyensis* PL02 (DSM 116602<sup>T</sup>) against other strain genomes using TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) and ANI ([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani)).



*Flavobacterium* SEM image

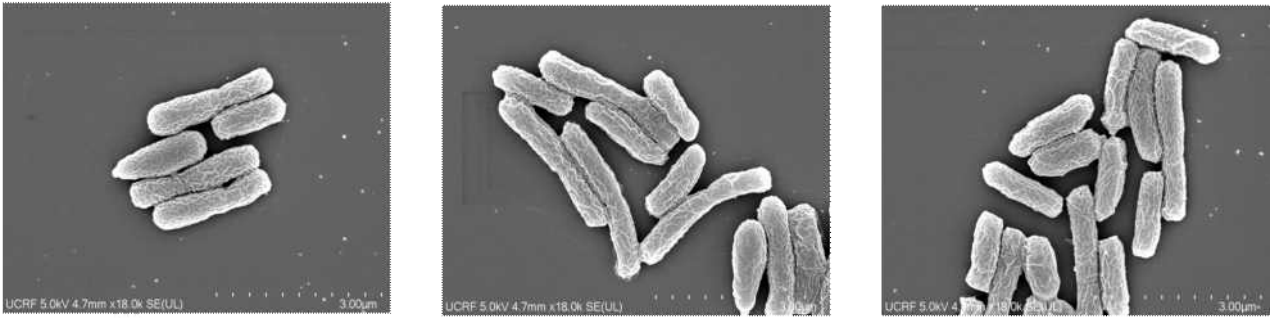


그림 45 *Flavobacterium ardleyensis* PL02 (DSM 116602<sup>T</sup>) 배양물의 주사전자현미경 이미지. 5.45µm 내외의 길이, 0.49µm 내외의 두께를 가짐.





- 모든 균주에 대하여 Whole genome sequencing data 활용, AntiSMASH 분석을 통해 Secondary metabolite profile 분석을 진행 (표12). 추가로 API 20NE와 API ZYM kit를 통해 metabolism profile을 분석하였음. (표13, 표14)

Strain	B-Lact one	PKS Systems	NRPS Systems	RIPP	Aryl	Res	Lanthi	Ranthe	Sid	Ter	HSL
<i>Flavobacterium</i>	1	T3 (2) Additional (2)			2	1	1	1	1	2	
<i>Formosa</i>		T3 (1)								1	
<i>Iodobacter</i>			2	2	1	1				1	
<i>Polaribacter</i>		T3 (1)			1					2	
<i>Polaromonas</i>	1				1					1	
<i>Rhizobium</i>		T1 (1) T3 (3)		2						1	3

표 12 Secondary metabolites produced by the non-predatory isolates based on AntiSMASH v. 7.1.0 \* NRPS - Nonribosomal Peptides; RIPP - Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptide; Aryl - Arylpolyene; Res - Resorcinol; Lanthi - Lanthipeptide; Ranthe - Ranthepeptide; Sid - Siderophore; Ter - Terpene; HSL - Homoserine Lactone



API 20NE	<i>Flavobacterium ardleyensis</i> PL02	<i>Formosasejongensis</i> PL04	<i>Iodobacter frigidoviolaceus</i> CM08	<i>Polaribacter ardleyensis</i> PL03	<i>Polaromonas potterensis</i> SM01	<i>Rhizobium antarcticum</i> PL01
Nitrate	+ (nitrates to nitrites) - (nitrates to nitrogen)	- (nitrates to nitrites) - (nitrates to nitrogen)	+ (nitrates to nitrites) - (nitrates to nitrogen)	- (nitrates to nitrites) + (nitrates to nitrogen)	-	- (nitrates to nitrites) - (nitrates to nitrogen)
Indole	-	-	-	+	-	-
Glucose fermentation	-	+	-	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	+	+	+	+	+
Urease	-	+	+	+	+	+
Aesculin hydrolysis	+	+	-	+	-	+
Gelatinase	+	-	-	+	-	-
$\beta$ -galactosidase	+	+	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	-	+/-
Arabinose	+	+	-	-/+	-	+
Mannose	-	-/+	-	-/+	-	+/-
Mannitol	-	+	-	+	-	-
N-acetyl-glucosamine	+	-	-	-	-	+
Maltose	+	-/+	-	-	-	+
Gluconate	-	+	+	-/+	-	-
Caprate	-	+	-	+	-	+
Adipate	-	+	-	-/+	-	+
Malate	+	+	-	-/+	-	+/-
Citrate	-	+	-	+	-	-
Phenyl-acetate	-	-	-	-	-	+/-
Oxidase	-	-	-	-	-	-

표 13 API 20NE results for each of the polar, non-predatory isolates \*Rating color comparing with standard +(1,2), ++(3), +++(4,5)

API 20NE	<i>Flavobacterium ardleyensis</i> PL02	<i>Formosa sejongensis</i> PL04	<i>Iodobacter frigidoviolaceus</i> CM08	<i>Polaribacter ardleyensis</i> PL03	<i>Polaromonas potterensis</i> SM01	<i>Rhizobium antarcticum</i> PL01
Alkaline phosphatase	+++	+++	+++	+++	+	++
Esterase	++	++	++	+	+	+++
Esterase Lipase	+	+	+	+	+	+++
Lipase	-	-	-	-	+	+
Leucine arylamidase	+++	+++	++	+++	+	+++
Valine arylamidase	+++	++	-	++	+	++
Cystine arylamidase	+	-	-	-	+	-
Trypsin	-	-	-	-	+	+
a-chymotrypsin	-	-	-	-	+	-
Acid phosphatase	+++	++	+++	+++	-	+++
Naphthol-AS-B1-phosp hohydrolase	+++	++	+++	++	-	+++
a-Galactosidase	-	-	+/-	-	-	+
b-Galactosidase	-	-	-	-	-	+
b-Glucuronidase	-	-	-	-	+	+
a-Glucosidase	++	-	+/-	-	+	+++
B-Glucosidase	-	-	-	-	-	++
N-acetyl-B-glucosamid ase	+	-	+/-	-	+	++
a-manosidase	-	-	-	-	-	+
a-fucosidase	-	+	-	-	-	++

표 14 API ZYM results for each of the polar, non-predatory isolates \*Rating color comparing with standard +(1,2), ++(3), +++(4,5)



- 세포 외 분비 효소에 대한 추가적인 분석으로서 Starch, Tween 20, Tween 80 분해 시험, DNase, Protease 존재 여부 시험을 진행하였음. *Flavobacterium ardleyensis* PL02의 경우 Protease를 생산하는 것으로 확인되어 유용한 Protease를 발굴할 수 있는 주요 자원 중 하나로 판단됨. 그 외에는 각기 다른 분해 특성을 보임 (표15)

	Starch	Tween 20	Tween 80	DNase	Protease
<i>Rhizobium antarcticum</i> PL01	X	X	X	X	X
<i>Flavobacterium ardleyensis</i> PL02	O	X	X	X	O
<i>Polaribacter ardleyensis</i> PL03	X	O	O	X	X
<i>Formosa sejongensis</i> PL04	O	O	O	X	X

표 15 Hydrolysis of Starch, Tween-20, Tween-80 and DNase/Protease Tests

- 최적 배양을 위한 삼투농도 확인을 진행. NaCl을 각기 다른 농도로 첨가하여 삼투농도를 달리하고, 박테리아 접종 이후 성장하는 속도를 관찰. 대체로 낮은 삼투농도(2% 이내)에서 최적 성장을 보였으나 각기 차이를 가짐. (표16)

	0% NaCl	0.5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	7.5% NaCl	10% NaCl
<i>Flavobacterium ardleyensis</i> PL02	++	+++	+	-	-	-	-	-	-
<i>Formosa sejongensis</i> PL04	-	+	+++	++	+	-	-	-	-
<i>Iodobacter frigidoviolaceus</i> CM08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Polaribacter ardleyensis</i> PL03	-	+	++	+++	++	++	+	-	-
<i>Polaromonas potterensis</i> SM01	+++	++	++	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium antarcticum</i> PL01	++	+++	++	+	-	-	-	-	-

표 16 Salt requirements for the non-predatory polar isolates. \*ND: Not determined

- 최적 배양을 위한 pH 확인을 진행. Media를 각기 다른 pH로 만들고 박테리아 접종 이후 성장 속도 관찰 한 결과 대부분 중성 pH(6.5~7.5)에서 최적 배양을 보였으나, *Rhizobium antarcticum* PL01은 pH 5.5 ~ 10까지 모두 안정적인 배양을 보여 특이적인 특성을 가짐을 확인함. (표17)

	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
<i>Flavobacterium ardleyensis</i> PL02	-	-	-	-	++	++	+++	++	++	+	+	-	-
<i>Formosa sejongensis</i> PL04	-	-	-	-	-	+++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Iodobacter frigidoviolaceus</i> CM08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Polaribacter ardleyensis</i> PL03	-	-	-	-	-	+++	+++	++	++	-	-	-	-
<i>Polaromonas potterensis</i> SM01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Rhizobium antarcticum</i> PL01	--	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

표 17 pH endurance for the non-predatory polar isolates. \*ND: Not determined



- *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08는 항균, 항진, 항암 물질로 알려진 Violacein을 생산하는 균주로 확인되어 천연 유래 유용 물질 생산에 유용할 것으로 판단됨. 배양 조건에 따른 Violacein 생산 기초 연구를 진행하였고, KMB 미디어, 15 °C 배양조건에서 Violacein 생산량이 두드러지게 향상되는 점을 확인 할 수 있었음. (그림46)

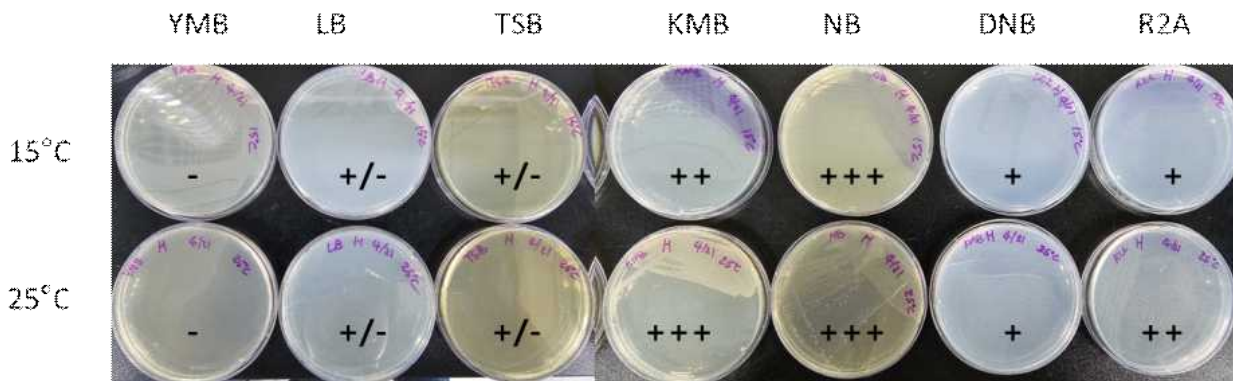


그림 46 *Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 (DSM 116981<sup>T</sup>)를 각기 다른 배지와 온도에서 배양한 결과. KMB(Kings medium B) 15°C와 NB 15°C, 25°C 조건에서 가장 성장이 빠르며, 15°C 환경에서 가장 높은 Violacein 생산을 보임.



## 제8절 종합 성과 및 후속 연구 계획

### ○ 종합 연구 성과

- 최종적으로 극지방으로부터 분리하여 동정한 샘플과 이를 종합한 정보는 아래와 같음. 각 연도별로 성공적으로 분리되어 동정까지 마친 균주를 중심으로 서술하였으며(계대배양 및 분리 동정 실패의 경우 표에서 제외), 포식미생물과 일반미생물(비포식)을 종합하여 연도별로 나열하였음. 대표 균주를 중심으로 전장유전체 분석과 기탁을 수행하였음(그림 47)

분리연도	분리Code	박테리아 명칭	분리장소/시료	분리 먹이	적응 온도 범위 (°C)	포식 방법	전장 유전체 분석	기탁 여부
2021	PAP01	(신종) <i>Bdellovibrio svalbardensis</i>	Svalbard Midtre Loven Foreland Biocrust	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 and <i>E. coli</i> ML35	20-30 (30 opt.)	Intraperipl asmic	O (JANRMI000000000)	KCTC 92583, DSM 115080
2022	PAP07	(신속/신과) 명칭 없음	킹조지섬 Potter cove 근처 담수	<i>E. coli</i> ML35	4-25 (20 opt.)	분석 중	X	X
	PAP08	(신속/신과) 명칭 없음	킹조지섬 Potter cove 근처 담수	<i>E. coli</i> MG1655	4-25 (20 opt.)	분석 중	X	X
	*PPAP10 (SM1)	(신종) <i>Polaromonas potterensis</i>	킹조지섬 Potter cove 근처 담수	R2A media	4-25 (20 opt.)	해당없음	O (JAWQLX000000000)	KCTC기탁 및 DSM 116566
2023	F9.1	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 담수 이끼층	<i>Pseudomonas deceptionis</i>	15-20 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	F9.2	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 담수 이끼층	<i>Pseudomonas deceptionis</i>	15-30 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	F11.1	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 담수 붉은유기물 덩어리	<i>Pseudomonas deceptionis</i>	4-20 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	F20.1	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 ASPA171 토양	<i>Pseudomonas deceptionis</i>	4-30 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	A25.2	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 위버반도 담수 호수 붉은유기물 덩어리	<i>Pseudomonas meridiana</i>	4-20 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	PP4	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 토양 이끼층	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	15-20 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	PP11	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 담수 붉은유기물 덩어리	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	15-20 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	PP6	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 토양 빨형태	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	15-20 (20 opt.)	Intraperipl asmic	X	X
	PP10	(신종) <i>Bacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 Potter cove 근처 토양 이끼층	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	15-30 (20 opt.)	Intraperipl asmic	O (JAYGJQ000000000)	KCTC기탁 및 DSM116241
	Vp107.1	(신종) <i>Halobacteriovorax</i> sp.	킹조지섬 근처 채집 물고기(남극검은암치) 내장 점막	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	분석 중	분석 중	X	X
	*PL02	<i>Flavobacterium arduoyensis</i>	남극 Ardley 섬 호수	Tryptic soy broth	4-25 (20 opt.)	해당없음	O (JAYGJP000000000)	KCTC기탁 및 DSM 116602
	*PL04	<i>Formosa sejongensis</i>	남극 위버반도 호수	Marine agar	4-25 (25 opt.)	해당없음	O (JAWQUN000000000)	KCTC기탁 및 DSM 117045
	*CM08	<i>Iodobacter frigidoviolaceus</i>	남극 세종과학기지 근처 토양	Nutrient broth	4-25 (20 opt.)	해당없음	O (JAWQU000000000)	KCTC기탁 및 DSM 116981
	*PL03	<i>Polaribacter arduoyensis</i>	남극 Ardley 섬 호수	Marine agar	4-25 (15 opt.)	해당없음	O (JAWZSV000000000)	KCTC기탁 및 DSM 116992
	*PL01	<i>Rhizobium antarcticum</i>	킹조지섬 위버반도 호수	Tryptic soy broth	4-25 (20 opt.)	해당없음	O (JAWQUM000000000)	KCTC기탁 및 DSM 116244

그림 47 연도별 분리 동정된 박테리아 리스트.

- 3년간 수집한 샘플로부터 포식 미생물 배양체 165개, 비포식 미생물 배양체 200개 이상이라는 괄목할만한 성과를 확보하였으므로, 안정적으로 배양되는 우수 샘플을 중심으로 분리 동정/특성 분석/유전체 분석 및 기탁을 수행하였음. 그 외 보유한 모든 배양체는 냉동 stock으로 보존되어 있으므로 향후 각기 다른 지역/먹이 균주를 중심으로 다변화하여 연구를 진행하는 것이 가능함.
- 극지라는 미지의 연구 장소에서 4종의 신규 포식 미생물과 6종의 신규 일반 미생물(비포식)을 분리하여 규명하는 성과를 달성하였음.

### ○ 후속 연구 계획

- 중온성 포식미생물과의 비교유전체 및 비교단백체 관련 후속연구계획
  - 본 연구에서 중온성 포식미생물과 극지 포식미생물 사이의 유전체 상의 유사도가 매우 낮음을 확인하였음(GC content 차이와 낮은 ANI 값). 이에 따라 후속 비교는 유전체 그

자체가 아닌 '번역(Translation)' 수준에서 이루어져야 하며, 각기 다른 포식미생물 간의 주석된 유전자 비교를 중심으로 Protease, Nuclease, Lipase 등을 분석할 수 있음. 이러한 비교는 단백질 유사도(Protein homologies) 비교를 통해 잠재적인 동종체 확보 또는 Alphafold와 같은 AI 예측 도구를 활용한 구조적 유사도 비교를 통해 유전체 차이를 확인할 것임. 이러한 결과를 통해 저온 특화된 단백질 후보군을 발굴하고 클로닝을 통해 발현하여 생화학적 분석을 진행할 것임.

- 포식 미생물에서 발굴 가능한 유용 단백질의 활용 분야를 고려한 후속연구계획

- 본 연구에서는 극지 포식미생물이 여러 종류의 미생물을 포식할 수 있음을 보여주었음. 이러한 결과는 극지 포식미생물이 미생물을 구성하는 보편적인 단백질을 가수분해할 수 있음을 시사함. 이러한 '폭넓은(Broad)' 가수분해 활성과 저온 적응 단백질이라는 두 가지 특성을 결합하면, 다양한 활용 분야를 고려할 수 있음. 식품 산업 전반과 함께 오염된 세탁물을 찬물에서 세척할 때 효율을 높이기 위한 단백질/지질 제거제 용도, 저온 환경에서 진행되는 의료적 활용 등이 그 예시가 될 수 있음. 유용한 단백질을 확보한 후, 해당 실험 모델을 구축하여 그의 기능성을 테스트할 예정.

- 향후 논문 투고 시기

- 본 연구를 통해 확보한 여러 신종 박테리아에 대한 분석을 진행 중임. 이들은 *Bacteriovorax antarcticus* PP10, *Flavobacterium ardleyensis* PL02, *Formosa sejongensis* PL04, *Polaribacter ardleyensis* CM08, *Polaromonas potterensis* SM01, *Rhizobium antarcticum* PL01을 포함됨. 각각의 논문은 향후 6개월 이내에 IJSEM 또는 다른 관련 저널에 제출될 예정이며, 이 외에도, 두 가지 추가로 확보한 신종 박테리아 (*Iodobacter frigidoviolaceus* CM08 및 다른 신규 포식미생물인 *Halobacteriovorax antarcticus* Vp105.1)가 연구 중에 있음. 이 두 새로운 박테리아 종에 대한 논문 일정은 구체적으로 시기를 정하기는 어렵지만, 내년 안에 투고할 수 있도록 연구 중에 있음. 따라서 2024년에는 5개의 논문을 제출할 계획이며, 추가로 2025년 말까지 2개의 논문을 더 제출할 예정



# 제 4장 연구개발목표 달성도

## 제 1절. 목표달성도

### 1. 정성적 성과

구분	연구개발목표	연구개발계획	연구 수행 내역 및 성과	달성도(%)
1차년도	극지 샘플링 및 포식 미생물 분리	킹 조지 섬의 토양, 수계 샘플링을 바탕으로 포식 미생물 분리	해당년도 킹 조지 섬 방문 불가하였으나, 극지연으로부터 샘플 제공받아 극지 포식 미생물 분리에 성공함.	100%
	극지 샘플 메타지놈 분석	메타지놈 분석에 따른 극지 환경 시료 내 저온 포식 미생물 존재 확인 및 먹이 미생물 예측	극지연으로부터 제공받은 샘플의 메타지놈 분석을 통해 극지 포식 미생물 1종의 존재를 확인. 우점하는 먹이 미생물 군 확인. 이를 활용해 성공적으로 포식 미생물 분리하였음	100%
2차년도	극지 샘플 메타지놈 분석	메타지놈 분석을 2차년도까지 확장하여 진행	메타지놈 분석을 남극샘플로 확장 진행. 포식 미생물과 우점 먹이 미생물 확인	100%
	1차 샘플링 및 분리된 포식 미생물 특성 확인	1차 샘플링 및 이로부터 분리된 포식 미생물의 형태, 생리, 포식 조건등의 특성을 탐색	극지연에서 샘플로부터 분리한 포식 미생물 PAP01의 특성 분석하였음.  1차 샘플링으로서 킹 조지섬 방문하여 14개 지점의 샘플링 진행. 6개의 극지 포식 미생물 배양체 확보. 현미경으로 형태 분석. 생리 및 포식 조건 특성 탐색함.  PAP07, PAP08의 경우 새로운 ‘속’ 수준의 새로운 포식 미생물로 확인되며, 저온에서 성장. PAP01 논문 1건 출판하였고, 기탁 완료하였음	100%
3차년도	2차 샘플링 및 포식 미생물 분리	1차 분리결과를 바탕으로 세종기지 주변 토양, 수계 샘플링 후보지 선정 및 포식 미생물 분리	2차 샘플링에서는 전년도 경험을 바탕으로 샘플의 신선도를 고려, 현장 분리에 보다 중점을 두고 전문가 1인 증원 (총 2인), 샘플링 지점 다양화 (바톤반도 외 2개 지역에서 86개 지점), 먹이 균주의 다양화 (10개 먹이 균주(현장분리균주활용)), 배양 방식 최적화 (액체배지 방식)을 통해 High-throughput screening을 진행.  결과적으로 총 31개 지점에서 포식	100%

			미생물 배양체 159개, 비포식 미생물 배양체 200개 이상 확보. 테스트하지 않은 샘플은 모두 한국으로 냉동 이송하여 연구 자원으로 확보	
2차 분리 포식 미생물 특성 확인	2차 샘플링에서 분리된 포식 미생물의 형태, 생리, 포식 조건등의 특성을 탐색		포식 미생물 신종 2종 확인. <i>Bacteriovorax antiarcticus</i> PP10을 비롯한 9종의 포식미생물에 대해 현미경으로 형태 분석, 생리 분석 진행하였고, 포식 조건 분석에 대한 다양한 실험 진행하여 논문 작성 중.  물고기 아가미 유래의 신종 포식 미생물 <i>Halobacteriovorax antiarcticum</i> VP107.1. 에 대한 특성 분석 진행 중	100%
포식 미생물 유전체 및 세부 분석	1차 2차를 거쳐 샘플링 된 포식 미생물의 유전체 분석을 통한 세부분석		3종의 신종 포식 미생물에 대한 Whole genome sequencing 진행 완료하였고, dDDH, ANI, AntiSMASH 등을 통한 동등성 검사, Secondary metabolite 분석 진행. Protein homology, Alphafold 분석 진행	100%
유용 생물자원 확보	유용 유전자, 효소, 포식 미생물종을 선출하고 기탁하여 생물자원화		2종의 신종 포식 미생물에 대한 기탁 완료. 그 외 6종의 신종 비포식 미생물에 대한 기탁 완료 및 특성 분석(whole genome sequencing 및 대사 분석) 완료.	100%

2. 정량적 성과

구 분		목표 (건)	달성 (건)	주저자 실적	달성도		증빙자료(제출)	비고
'21	국 립 문 헌	SCI(E)	-	-	-	-	-	-
	국 립 문 헌	SCI(E)	-	-	-	-	-	-
	특허		-	-	-	-	-	-
'22	국 립 문 헌	SCI(E)	2	0	-	0 %	-	-
	국 립 문 헌	SCI(E)	-	-	-	-	-	-
	특허		-	-	-	-	-	-
'23	국 립 문 헌	SCI(E)	3	1	주저자 1건	33 %	증빙자료 1	연구종료 후 12개월 이내 현재까지 확보한 신종 포식 미생물 2건, 신종 비포식 미생물 6건에 대한 특성 분석 데이터를 종합하여 앞으로 논문 <b>6건 투고 예정</b>
	국 립 문 헌	SCI(E)	-	-	-	-	-	-
	특허		1	1	주저자 1건	100 %	증빙자료 2	국내특허출원

극지연구소

3) 인력양성

(명)

구 분	학사		석사		박사		계	
	목표	달성	목표	달성	목표	달성	목표	달성
'21	-	-	-	-	1	1	1	1
'22	-	-	2	0	1	1	3	1
'23	-	-	3	1	1	0	4	1



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절. 활용방안

- 해당 과제의 극지 연구의 경험을 바탕으로 다양한 극한환경에서의 포식 미생물을 탐색하여 기존의 제한적으로 연구되던 포식 미생물의 종류를 늘리고 조건을 다변화함.
- 포식 미생물이 가지고 있는 풍부한 분해 효소 유전체를 확보함.
- 이를 통해 저온 DNA 제거, 단백질 제거 등 산업적 활용 가능성을 발굴하고 산업화의 핵심 자원으로 활용.
- 산업적 필요가 발생하는 경우 확보한 저온 포식 미생물 배양 방법 및 극지 유래 프로테아제 유전체를 특허로 만들고 기술이전을 통해 산업화에 활용함.
- 포식 미생물 관련 연구인력을 양성하고 극한환경 연구에서 시도할 수 있는 미생물 분석의 기술을 추가함으로써 향후 극지 연구에서 추가적인 연구를 할 수 있는 기술을 확보함.
- 본 연구를 기반으로 확장된 조건에서 활용할 수 있는 포식 미생물의 발굴을 통해 산업적인 활용을 넓히고 경제성을 확보

### 제 2절. 기대효과

- 현재의 극지연구는 미생물을 분석할 시에 메타지놈 연구, 분리 연구, 구성요소 변화 등과 같은 일반적으로 잘 알려진 연구실에서 할 있는 배양 방법을 바탕으로 진행됨.
- 그러나 새로운 포식 미생물이란 다른 배양방식의 추가를 통해 같은 메타지놈 연구, 분리 연구에서 활용할 수 있는 틀을 추가로 확보하고 연구 노하우를 공유하여 비교적 높은 비용이 드는 극지연구에서 그 활용의 저변을 넓히고 연구역량과 영역의 양적인 확대를 노릴 수 있음.
- 포식 미생물 자체의 풍부한 효소 및 그 유전체를 생물자원으로 미리 확보하여 선점하고 향후 기타 미생물을 통한 대량생산 시스템에 적용 가능.
- 포식 미생물을 신규 항생 물질로서 다제내성 병원균 제거방법으로서 활용하여 현시대 만연하는 항생제내성 유전체 확산 방지 방안으로 연구 가능

- 세계에서 첫 극지 포식 미생물을 분리하고 분석한 연구로서 해당 연구 분야를 선도하는 한국의 우수한 인력자원을 미리 확보할 수 있음.
- 본 과제에서 확인하거나 확보한 저온 프로테아제, 리파아제를 중심으로 극지연과의 협업 및 지속적인 저온 분해효소 후보군을 극지연에 제시할 수 있음. 향후 지속적인 협력관계 구축과 인적 교류를 통해 극지연에서는 기존과 다른 포식 미생물이라는 새로운 연구방향으로 지속적인 분해효소 유전자풀을 확보할 수 있음.
  - 1차적으로 본과제에서 확보한 유전체 정보를 분석하고, 극지연과 함께 활용하여 산업적 분해효소를 대량으로 확보하고 향후 분해효소 시장에 기술 이전하는 등의 계획을 통해 지속적인 파급효과를 불러올 수 있음



## 제 6 장 참고문헌

Tripathi, B. M., Kim, H. M., Jung, J. Y., Nam, S., Ju, H. T., Kim, M., & Lee, Y. K. (2019). Distinct taxonomic and functional profiles of the microbiome associated with different soil horizons of a moist tussock tundra in Alaska. *Frontiers in microbiology*, 10, 1442.

Jang, H., Choi, S. Y., Mun, W., Jeong, S. H., & Mitchell, R. J. (2022). Predation of colistin- and carbapenem-resistant bacterial pathogenic populations and their antibiotic resistance genes in simulated microgravity. *Microbiological Research*, 255, 126941.

Mun, W., Choi, S. Y., Upatissa, S., & Mitchell, R. J. (2023). Predatory bacteria as potential biofilm control and eradication agents in the food industry. *Food Science and Biotechnology*, 1-15.

Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., & Barel, G. (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of 토양 and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2365-2371.

Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., ... & Schuster, S. C. (2004). A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303(5658), 689-692.

Gupta, S., Tang, C., Tran, M., & Kadouri, D. E. (2016). Effect of predatory bacteria on human cell lines. *PloS one*, 11(8), e0161242.

Monnappa, A. K., Bari, W., Choi, S. Y., & Mitchell, R. J. (2016). Investigating the responses of human epithelial cells to predatory bacteria. *Scientific Reports*, 6(1), 33485.

Davidov, Y., & Jurkevitch, E. (2004). Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax*-*Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1439-1452.

Ruocco, N., Esposito, R., Bertolino, M., Zazo, G., Sonnessa, M., Andreani, F., ... & Costantini, M. (2021). A metataxonomic approach reveals diversified bacterial communities in antarctic sponges. *Marine drugs*, 19(3), 173.

## 주 의

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