

표지(기본사업)

(뒷면)

(측면)

(앞면)

주 의 (편집순서)	P E 2 4 4 6 0 생물 종 다 양 성 및 유 전 체 특 성 연 구 남극 멜 버 른 화 산 과 리 트 만 화 산 지 열 생 태 계 의 한 국 해 양 과 학 기 술 원 부 설 극 지 연 구 소	BSPE24460-071-12 남극 멜버른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성 및 유전체 특성 연구 Genomic characterization and biodiversity of geothermal ecosystems in Mount Melbourne and Mount Rittmann 극지연구소 2025. 02. 20 한 국 해 양 과 학 기 술 원 부 설 극 지 연 구 소

보고서발간번호 BSPE24460-071-12

남극 멜버른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성
및 유전체 특성 연구

Genomic characterization and biodiversity of geothermal ecosystems
in Mount Melbourne and Mount Rittmann



2025. 02. 20

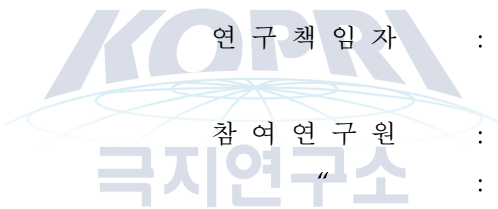
한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 멜버른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성 및 유전체 특성 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 02.



연구책임자	: 김민철
참여연구원	: 이종익
“	: 이영미
“	: 김상희
“	: 명누리
“	: 이원영
“	: 소요한
“	: 남성진
“	: 구만형
“	: 송유하
“	: 김진현

보고서 초록

과제관리번호	PE24460	해당단계 연구기간	2022.07.01.~ 2024.12.31	단계 구분	1단계/ 총 1단계
연구사업명	중 사 업 명	SEED형 선행과제			
	세부사업명				
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	남극 펠머른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성 및 유전체 특성 연구			
연구책임자	김 민 철	해당단계 참여연구원수	총 : 11 명 내부 : 11 명 외부 : 0 명	해당단계 연구비	정부: 300,000 천원 기업: 천원 계: 300,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 생명과학연구본부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약					보고서 면수 43
- 펠머른, 리트만 화산 현장 심층 조사 및 토양 온/습도 자료 획득. 펠머른 화산 지열 사이트의 경우 표층 토양온도 10-45℃, 리트만 화산은 상대적으로 고온인 50-60℃ 확인 - qPCR을 통한 미생물 생물량 확인 결과 전반적으로 매우 낮은 미생물 생물량 확인 - 세균 배양 결과 53균주 획득. 기존에 알려진 배양체들과 높은 16S rRNA 유전자 서열 유사도를 보임. 80% 이상은 해당 사이트에서 처음 배양된 균주들로 판명 - 총 224개의 single-cell genomes(SAGs) 획득. SAGs는 Proterobacteria와 Actinobacteria가 우점함 - HiFi 및 Hi-C 시퀀싱 성공적으로 수행함. Hybrid assembly 결과 single contig로 이루어진 총 76개의 complete metagenome-assembled genomes(cMAG) 획득. 50% 가량은 기존에 보고되지 않은 새로운 속으로 확인됨. 우점 MAGs의 물질대사 경로 분석 결과 80% 이상의 MAGs에서 CO, H2 산화 대사경로가 확인됨 - 리트만 화산에서 고세균 생물량이 더 높게 나타났으며 고세균 문인 Thermoproteota와 세균 문인 Gemmatimonadota가 높은 비율로 나타남, 펠머른 화산은 나머지 세균 문들의 비율이 더 높게 나타남 - 펠머른 vs. 리트만 화산의 지열 마이크로바이옴은 유전체 단위에서 해당 화산지역에 국한된 고유종과 regional habitat generalist 모두 존재하는 것으로 확인되었으며, , 리트만 화산에서 고유종의 비율이 더 높게 나타남					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	남극 화산, 지열 미생물, 펠머른 화산, 리트만 화산, Long-read DNA 시퀀싱			
	영 어	Antarctic volcano, geothermal microbiome, Mount Melbourne, Mount Rittmann, Long-read DNA sequencing			

요 약 문

I. 제 목

남극 멜버른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성 및 유전체
특성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구개발 목적

- 남극 북빅토리아랜드에 위치한 멜버른 화산과 리트만 화산의 지열 지대 조사를 통한 지열 생태계의 생물 종 다양성, 유전체, 기능 특성에 대한 종합적인 이해

○ 연구개발의 필요성

- 두 지역의 지열 사이트 생태계 연구에 최적의 조건을 갖춘 장보고 과학기지의 지리적 이점을 최대한 활용하여 최신 유전체 기술을 접목한 지열 생태계 특성 연구를 실시한다면 남극 연구 선진국들에 견줄만한 연구 결과 도출이 가능함

III. 연구개발의 내용 및 범위

○ 연구개발 내용

- 멜버른, 리트만 화산 현장 조사 및 지중 환경인자 모니터링을 통한 북빅토리아랜드 지열 생태계 환경 특성 파악
- 환경유전체, 단일세포 유전체 분석을 통한 지열 생태계 미생물 종 다양성 및 기능 이해
- 다양한 배양 조건에서의 균주 분리를 통해 지열 생태계 생명·유전자원 확보

○ 연구개발 범위

- 멜버른, 리트만 화산 지열 사이트 루트 개척, 현장 조사, 토양 온/습도 측정, 화산토 샘플들에 대한 토양 미생물 균집, 환경유전체, 토양 이화학적 특성 분석
- 멜버른, 리트만 화산 지열 사이트 샘플들에 대한 토양 세균 균주 분리 배양

IV. 연구개발결과

- 멜버른, 리트만 화산 현장 심층 조사 및 토양 온/습도 자료 획득. 멜버른 화산 지열 사이트의 경우 표층 토양온도 10-45℃, 리트만 화산은 상대적으로 고온인 50-60℃ 확인
- qPCR을 통한 미생물 생물량 확인 결과 전반적으로 매우 낮은 미생물 생물량 확인
- 세균 배양 결과 53균주 획득. 기존에 알려진 배양체들과 높은 16S rRNA 유전자 서열 유사도를 보임. 전체 균주의 80% 이상은 해당 사이트에서 처음 배양된 균주들로 판명
- 총 224개의 single-cell genomes(SAGs) 획득. SAGs는 Proteobacteria와 Actinobacteria가 우점함
- HiFi 및 Hi-C 시퀀싱 성공적으로 수행함. Hybrid assembly 결과 single contig로 이루어진 총 76개의 complete metagenome-assembled genomes(cMAG) 획득. 50% 가량은 기존에 보고되지 않은 새로운 속으로 확인됨. 우점 MAGs의 물질대사 경로 분석 결과 80% 이상의 MAGs에서 CO, H₂ 산화 대사경로 확인
- 리트만 화산에서 고세균 생물량이 더 높게 나타났으며 고세균 문인 Thermoproteota와 세균 문인 Gemmatimonadota가 높은 비율로 나타남, 멜버른 화산은 나머지 세균 문들의 비율이 더 높게 나타남
- 멜버른 vs. 리트만 화산의 지열 마이크로바이옴은 유전체 단위에서 해당 화산지역에 국한된 고유종과 regional habitat generalist 모두 존재하는 것으로 확인되었으며, 리트만 화산에서 고유종의 비율이 더 높게 나타남

V. 연구개발결과의 활용계획

- 그동안 과학적 가치에 비해 연구가 미비했던 멜버른, 리트만 화산의 지열 사이트 내 생태계를 구성하는 미지의 생물 종 다양성 및 유전정보 획득을 통해 남극 연구 선진국에 견줄 수 있는 과학적 성과로 기여
- 역사적으로 새로운 항생제나 유용물질 등의 발견은 미개척지 및 극한 조건에 서식하는 생물들로부터 유래된 사례가 많기에 본 과제에서 새롭게 발견된 생물 종들과 유전체 정보들은 향후 새로운 유용물질 개발(신규 항생물질, 생물 계면활성제 등)에 활용 가능한 잠재력을 지님

S U M M A R Y

I. Title

Genomic characterization and biodiversity of geothermal ecosystems in Mount Melbourne and Mount Rittmann

II. Purpose and Necessity of R&D

○ Purpose of the study

- Understanding of biodiversity and genomic characterization of geothermal ecosystems on Mt. Melbourne and Mt. Rittmann in Victoria Land, Antarctica

○ Necessity of the study

- By leveraging the geographic advantages of the Jang Bogo Research Station, which is ideally situated for geothermal ecosystem studies in both regions, and integrating cutting-edge genomic technologies, it is possible to achieve research outcomes comparable to those of leading Antarctic research nations

III. Contents and Extent of R&D

○ Contents

- Investigation of the Melbourne and Rittmann volcano geothermal sites and monitoring of subsurface environmental factors to understand the geothermal ecosystem characteristics of North Victoria Land.
- Understanding microbial species diversity and functions of the geothermal ecosystem through metagenomics and single-cell genomics analysis.
- Securing biological and genetic resources of the geothermal ecosystem through strain isolation under various cultivation conditions.

○ Scope

- Pioneering routes to the Melbourne and Rittmann volcano geothermal sites, conducting field investigations, measuring soil temperature and moisture, and analyzing soil microbial communities, soil metagenomics, and soil physicochemical properties in geothermal soil samples.
- Isolation and cultivation of soil bacterial strains from samples collected at the Melbourne and Rittmann volcano geothermal sites

IV. R&D Results

- In-depth investigation and soil temperature/moisture data collection at the Melbourne and Ritmann volcano sites. At the Melbourne volcano geothermal site, surface soil temperatures ranged from 10–45°C, while at the Ritmann volcano, relatively high temperatures of 50–60°C were observed.
- Microbial biomass analysis via qPCR revealed generally very low microbial biomass.
- Bacterial cultivation resulted in the isolation of 53 strains. These strains showed high 16S rRNA gene sequence similarity to known cultured strains. Over 80% of the strains were newly isolated from the site.
- A total of 204 single-cell genomes (SAGs) were obtained. SAGs were predominantly from Proteobacteria and Actinobacteria.
- HiFi and Hi-C sequencing were successfully performed. The hybrid assembly resulted in a total of 76 complete metagenome-assembled genomes (cMAGs), each formed into a single contig. Approximately 50% of these were identified as new genera not previously reported. Metabolic pathway analysis of the dominant MAGs revealed CO and H₂ oxidation pathways in over 80% of the MAGs.
- Archaeal biomass was higher in Mount Rittmann, with a higher proportion of the archaeal phylum Thermoproteota and the bacterial phylum Gemmatimonadota. In contrast, Mount Melbourne exhibited a higher relative abundance of other bacterial phyla
- A genomic analysis of the geothermal microbiomes of Mount Melbourne and Mount Rittmann revealed the presence of both site-specific endemic species and regional habitat generalists. Notably, the proportion of endemic species was higher in Mount Rittmann

V. Application Plans of R&D Results

- By obtaining the unknown species diversity and genetic information of the ecosystems in the geothermal sites of Melbourne and Ritmann volcanoes, which have been under-researched relative to their scientific value, this project will contribute to scientific achievements on par with those of leading Antarctic research nations.
- Historically, the discovery of new antibiotics and useful substances has often originated from organisms inhabiting unexplored regions and extreme conditions. Therefore, the newly discovered species and genomic information in this project have potential for future applications in the development of new useful substances (such as novel antibiotics, biosurfactants, etc.)

C O N T E N T S

Chapter 1 Introduction

Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations

1. Domestic technological development
2. International technological development

Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results

1. Investigation of the Melbourne and Rittmann volcano geothermal sites and monitoring of subsurface environmental factors to understand the geothermal ecosystem characteristics of North Victoria Land, Antarctica
2. Understanding microbial species diversity and functions of the geothermal ecosystem through soil metagenomics and single-cell genomics analysis.
3. Securing biological and genetic resources of the geothermal ecosystem through strain isolation under various cultivation conditions.

Chapter 4 Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute

1. Research period
2. Research goals and degree of achievement
2. Contribution to other fields

Chapter 5 Application Plans of R&D Results

Chapter 6 References

목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 현황
2. 국외 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 멜버른, 리트만 화산 현장조사 및 지중 환경인자 모니터링을 통한 북빅토리아랜드 지열 생태계 환경 특성 파악
2. 환경유전체, 단일세포 유전체 분석을 통한 지열 생태계 미생물 종 다양성 및 기능 이해
3. 다양한 배양 조건에서의 균주 분리를 통해 지열 생태계 생명·유전자원 확보

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구기간
2. 목표 달성도
3. 대외 기여도

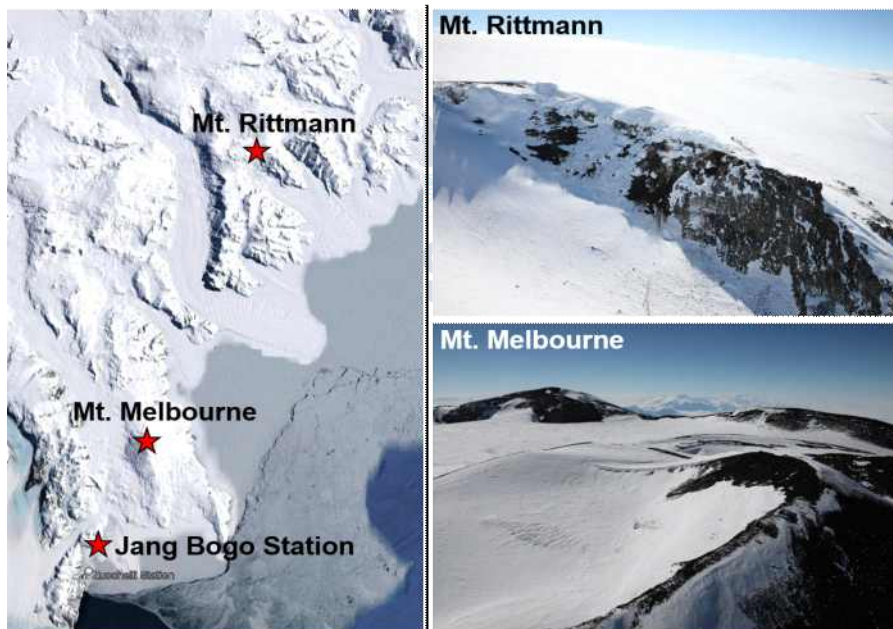
제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 서론

- 현재 남극에서 화산활동이 일어나는 곳은 총 네 곳(Mt. Melbourne, Mt. Rittmann, Mt. Erebus, Deception Island)이며 이들 지역에서는 땅 속 열원으로 인해 다양한 형태의 지열 사이트들(geothermal sites)이 존재함. 남극의 화산활동이라는 특수성과 과학적인 가치로 인해 오랜 기간 화산학자들과 미생물학자들의 관심을 받아왔음.
- 이들 지열 사이트는 극한의 추위과 건조함으로 생물이 살기 힘든 주변 빙하 환경과는 달리 지열로 인해 적정 온도와 수분이 유지되어 원핵생물 뿐만아니라 이끼나 무척추동물과 같은 다양한 종류의 진핵생물들도 서식하는 ‘생물다양성 핫스팟’으로 알려져 있음.
- 1980년대부터 뉴질랜드, 미국, 이탈리아 연구자들에 의한 지열 사이트 생태계 연구가 이어져오고 있으나 표본 관찰이나 분리 배양과 같은 기초적인 생물상 조사에 그침. 특히 접근성과 로지스틱스 한계로 인해 맥머도와 스콧 기지에서 가까운 에레부스 화산에 연구가 집중된 반면 멜버른 화산과 리트만 화산에서의 생물상 연구는 상대적으로 드물게 이루어짐.



[그림 1. 멜버른 화산과 리트만 화산의 지리적 위치 및 지열 사이트 전경]

- 최근 유전체 분석 기술의 발달로 환경 DNA (eDNA) 메타바코딩 기술 및 환경 유전체 분석을 이용한 생태계 조사가 시도되고 있음. 미지의 지열 사이트 생태계와 최신 유전체 기술을 접목하면 큰 시너지를 발휘할 수 있음. 기존의 전통적인 조사 방법으로 검출하지 못했던 숨겨진 생물 종(cryptic species)들의 존재를 파악할 수 있고, 이들의 유전체 정보 획득으로 지열 사이트 생물상의 진화, 기원, 에너지/물질대사에 대한 파악이 가능함.
- 장보고 과학기지는 멜버른 화산과 거리상 매우 인접한 곳에 위치하고 있고, 리트만 화산 또한 기지로부터 헬기로 한 시간 반 거리로서 접근성이 매우 용이함. 장보고 과학기지가 완공된 이후 해당 지역들을 대상으로 극지연구소 연구진에 의한 지질/지구물리/화산학 연

구가 주를 이룬 반면 해당 지역의 생태계 연구는 시도된 적 없음. 따라서, 두 지역의 지열 사이트 생태계 연구에 최적의 조건을 갖춘 장보고 과학기지의 지리적 이점을 최대한 활용하여 최신 유전체 기술을 접목한 지열 생태계 특성 연구를 실시한다면 남극 연구 선진국들에 견줄만한 연구 결과 도출이 가능함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 현황

- 멜버른, 리트만 화산과 관련한 지질 연구는 극지연구소 연구자들에 의해 현재까지도 수행되고 있으나 해당 사이트에서 생물 관련 연구는 국내에서 수행된 바 없음.
- 선행 연구 차원에서 본 연구자가 멜버른 화산 분기공 주변 토양 시료 두 점을 대상으로 비배양 기법을 이용한 미생물 특성 연구를 수행하여 미생물 종 다양성 및 잠재적 기능 연구를 수행한 바 있음(Park et al., 2020).

2. 국외 현황

- 1980년대부터 2000년대 초중반까지 미국, 뉴질랜드, 이탈리아 연구자들을 중심으로 남극 내륙 지열 사이트들에서 표본 채취 및 분리 배양을 수행함. 현재까지 에레부스, 멜버른, 리트만 화산으로부터 총 세 종의 선태식물, 20여 종의 조류(algae), 다섯 종의 원생생물, 10여 종의 진균, 호열성(thermophile)과 중온성(mesophile)을 포함한 30여 종의 세균들이 분리 배양된 바 있음(Broady, 1984, 1987; Hudson and Daniel, 1988, Bargagli et al., 2004).
- 에레부스, 멜버른, 리트만 화산을 대상으로 환경 DNA 탐색을 통해 다양한 조류 종들과 선행동물, 지렁이강에 속하는 무척추동물 뿐만아니라 톡토기 강에 속하는 절지동물의 존재를 확인한 바 있음(Fraser et al., 2018).
- 에레부스 화산의 지열 사이트를 대상으로는 주로 미생물 관련 연구가 많이 이루어짐. 뉴질랜드 그룹에 의해 에레부스 화산에 위치한 Tramway Ridge와 얼음동굴들을 대상으로 배양/비배양 방법을 이용한 미생물 군집 분석, 토양 온도와 산도 구배에 따른 미생물 군집 특성 변화에 대한 연구가 주로 수행됨(Soo et al., 2009; Herbold et al., 2014; Vickers et al., 2016; Noell et al., 2022).
- 산업적 응용 측면에서 에레부스 화산으로부터 분리된 바실러스 EA1 균주로부터 생성된 단백질 분해효소가 상용화된 사례가 있음(Coolbear et al., 1992).

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
○ Waikato University, New Zealand	○ 에레부스 화산 지열 사이트 대상 미생물 특성 연구	○ 지열 환경 특이적인 미생물들의 생리 특성 및 환경인자와의 연관성 규명
○ 국내 연구사례 없음	○	○

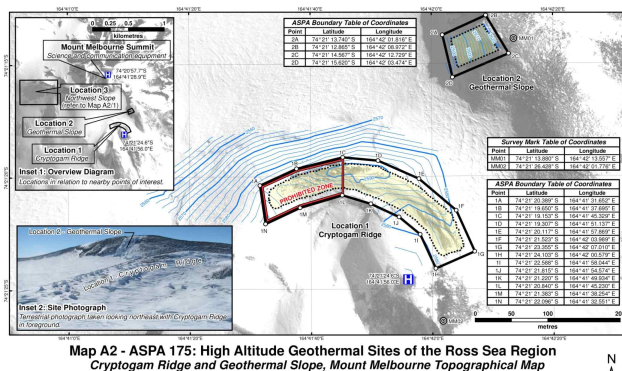
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 멜버른, 리트만 화산 현장조사 및 지중 환경인자 모니터링을 통한 북빅토리아랜드 지열 생태계 환경 특성 파악

가. 멜버른 화산 현장조사

○ 22/23 남극 하계 시즌 멜버른 화산 현장조사 및 시료 채취

- 22/23시즌 해빙 활주로 폐쇄로 본 연구팀의 장보고 기지 출장 취소. 대안으로 미답지 탐사단 출장자인 안전요원 1인에게 현장조사 및 시료 채취 일부를 부탁함. 멜버른 화산 정상 부근 ASPA 175 지역 내 Cryptogam Ridge (Location 1)과 Geothermal Slope (Location 2) 지역 표층 화산토 시료 채취 완료(그림 2)



B 지점 - 1, 2, 3번 샘플링

큰 굴뚝 한 지점에서 3개 샘플링(붉은 색 동그라미)



[그림 2. 멜버른 화산 정상 부근 Cryptogam Ridge (Location 1)와 Geothermal Slope (Location 2) 위치(좌상), Cryptogam Ridge와 ice tower 입구에서의 화산토 채취 모습(2022.11.25.)]

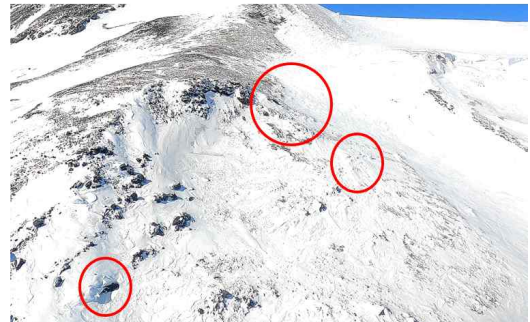
○ 23/24 남극 하계 시즌 멜버른 화산 현장조사 및 시료 채취

- 접근성의 문제로 기존에 연구가 덜 이루어진 멜버른 화산 북서사면과 남동사면에 대해 헬기를 이용하여 상공에서 사전 조사 수행. 수증기 분출 지역을 육안으로 확인하고 23/24시즌 현장조사 대비 접근로 및 안전대책 수립(그림 3)

수증기 분출 확인-남동사면

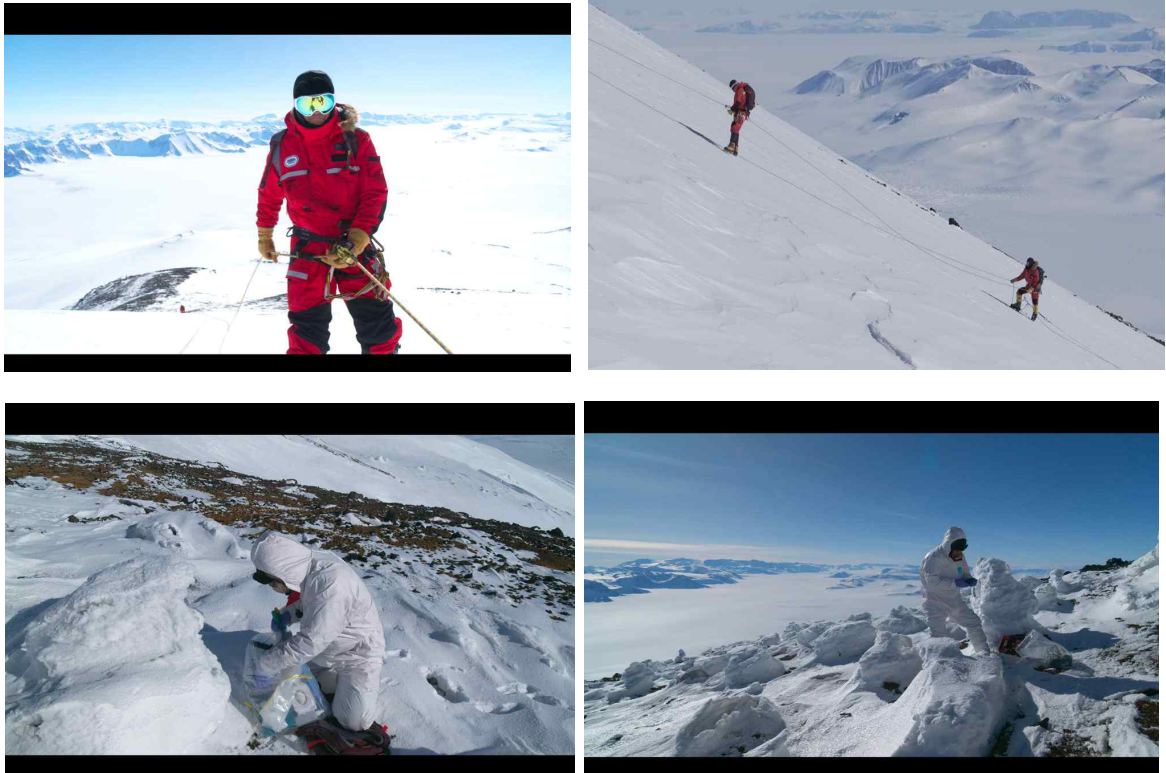


수증기 분출 확인-북서사면



[그림 3. 멜버른 화산 남동사면과 북서사면 수증기 분출 지역 (사진: 2022.11.25.)]

- 남동사면 도보 조사 시 지열 사이트 찾지 못함. 따라서, 도보 조사는 북서사면 위주로 수행. 북서사면의 경우 정상에서 헬기 랜딩 후 1시간 도보로 접근루트 확보 및 지열 사이트 현장조사 수행 완료. 지열 사이트 오염 방지를 위해 클린수트 착용 후 샘플링 및 지중 온도 조사 수행. Ice hummock 총 4곳에서 시료 확보.



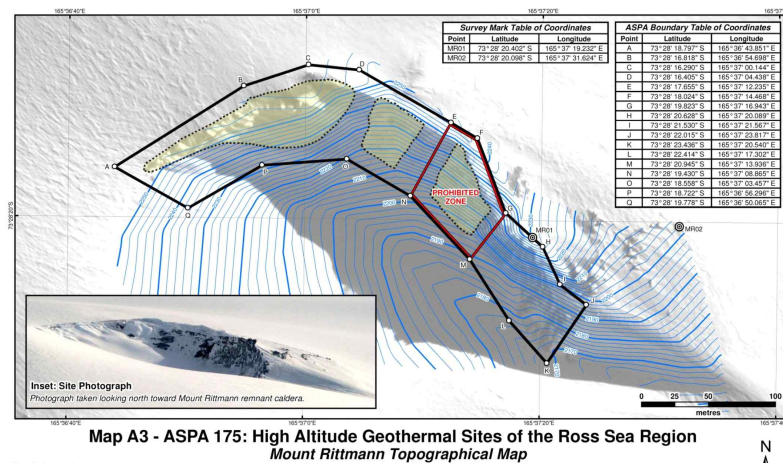
[그림 4. 멜버른 화산 북서사면 지열 사이트 접근 루트 개척(위), 현장조사 및 시료 채취(아래)(사진: 2023.11.20.)]



[그림 5. 멜버른 화산 북서사면 지열 사이트 전경 및 표층 토양(위), Cryptogam Ridge 전경 및 표층 토양(아래)(사진: 2023.11.20.)]

나. 리트만 화산 현장조사

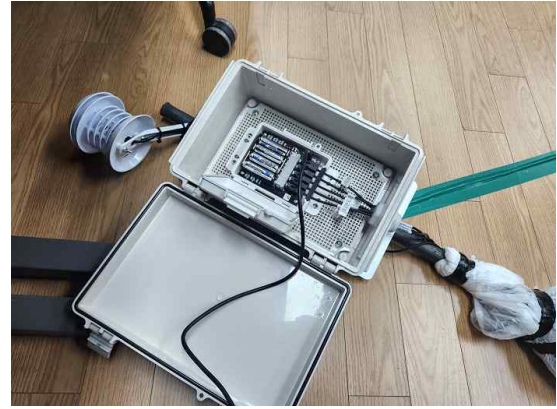
- 22/23 남극 하계 시즌 리트만 화산 현장조사 및 시료 채취
 - 리트만 화산 ASPA 175 지역 칼데라 림 능선 부위에서 지열 사이트 시료 채취 (by 박하동 기술원, 그림 6)



[그림 6. 리트만 화산 칼데라 림 지열 사이트 맵(위), 능선(좌), ice hummock(우), (사진: 2022.12.06.)]

다. 지열 사이트 지중 온/습도 연중 모니터링

- 22/23 시즌 계획된 토양 온습도 관측을 위한 센서 및 로거 설치는 테라노바베이 해빙 활주로 폐쇄로 인해 연구진의 국외 출장이 취소됨에 따라 부득이하게 23/24 시즌으로 연기함
- 23/24 시즌 토양 온습도 관측을 위해 멜버른 화산 Cryptogam Ridge 1곳, 리트만 화산 칼데라 림 1곳에 센서 및 로거 설치. 온습도 센서들은 지중 5-10cm 깊이에 2반복으로 설치, 지상 30cm 높이 대기 중에 백엽상 설치하여 온도 및 상대습도 센서 각 1개씩 설치. HOBO Microstation H21 로거 설치하여 1년간 15분 간격으로 로깅.



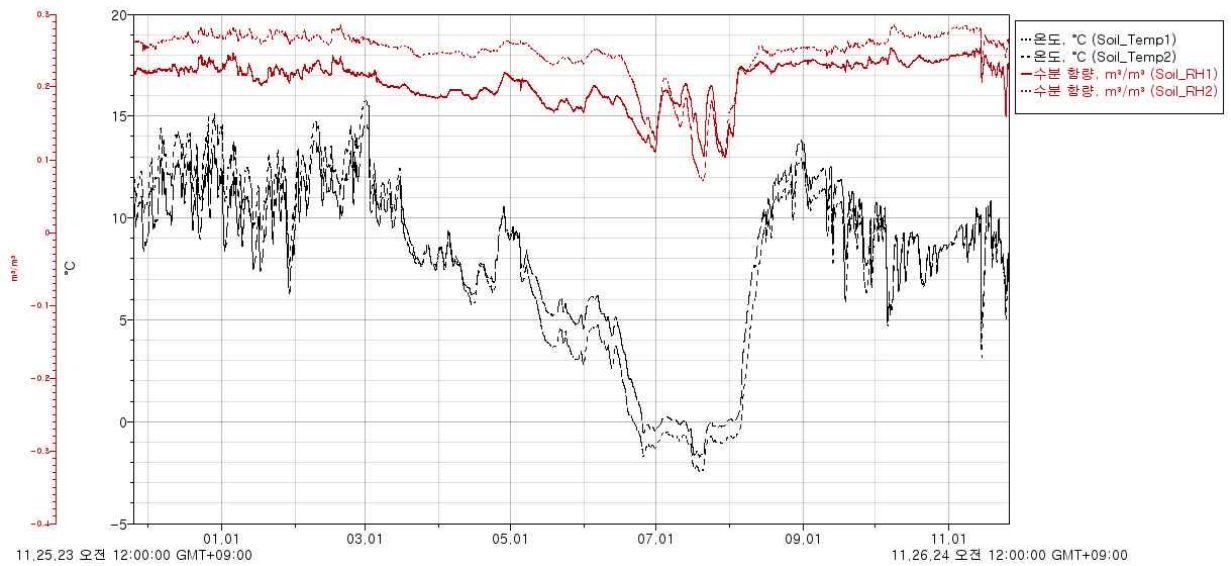
[그림 7. 지중 온습도 로거 준비 장면(위), 멜버른 화산 Cryptogam Ridge 부근 로거 설치 장면(아래). 능선 가운데 ice hummock 지역의 지열 온도가 40-05도로 높으나 금지구역(prohibited zone)으로 지정되어 부득이하게 온도가 다소 낮은 경계면 사이트에서 측정]

- 24/25 시즌 장보고 기지 하계 출장이 방문 예정 팀들 간의 경쟁 심화로 최종 취소됨. 플랜 B로 장보고 기지 현장조사를 수행한 지질화산연구팀 및 안전요원의 도움을 받아 로거 및 센서 수거 완료. 멜버른 화산의 경우 1년치 정상 작동 확인 및 데이터 수거 완료, 리트만 화산 로거의 경우 오작동으로 데이터 회수 실패. 24년을 끝으로 과제는 종료되지만 같은 지역에 각각 재설치 완료

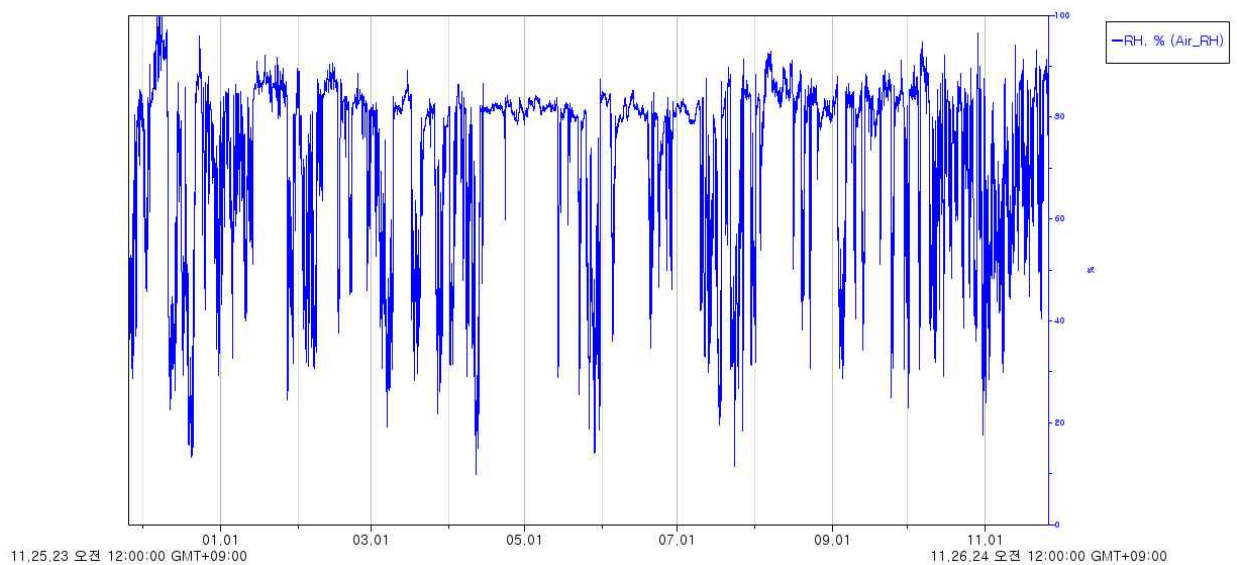


[그림 8. 리트만 화산 칼데라 립 경사면 지열 사이트 내 로거 설치 장면]

- 데이터가 회수된 멜버른 화산 온습도 로거의 경우 2023.11.25.-2024.11.26.까지 1년간 기록됨. 지중 온도 분포 결과 9월-3월 사이에는 5-15℃로 유지되며, 3월-7월 사이에 영하 2℃까지 지속적으로 감소함. 6월 말경부터 8월 초까지 0도에서 영하 2도로 일정하게 유지되다가 8월 초에서 9월 초 사이에 10도 이상의 급격한 온도 상승 곡선을 보임. 표층 5cm 깊이의 온도 측정이기때 대기 중 온도 변화에 크게 영향을 받음을 감안하면, 3월 이후부터 남극의 동계 기간이 시작되며 대기 온도가 감소한 영향을 받았음을 알 수 있음.
- 토양 수분 함량 또한 토양 온도와 거의 유사한 패턴을 보임. 하계기간은 0.2-0.28 범위로 유지되며, 동계 기간 시작부터 토양 수분이 감소하여 수분함량이 가장 낮은 7월 한 달 동안 0.07-0.21 범위에서 큰 변동성을 보임. 표층 30cm 위쪽 대기 상대습도의 경우 시간에 따른 변화양상은 크지 않고 17-90% 사이에서 큰 변동폭을 보임. 큰 변동폭을 보이는 시기들을 제외하면 80% 수준에서 유지되는 것으로 관측됨. 대기 중 온도의 경우 센서 이상으로 측정 실패.

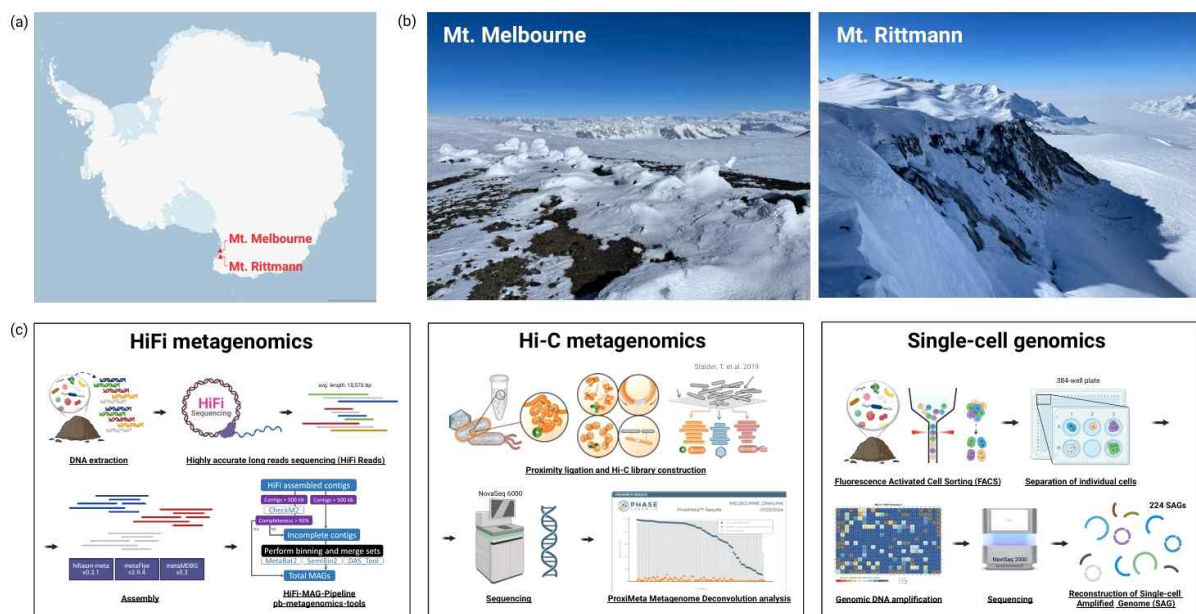


[그림 9. 멜버른 화산 Cryptogam Ridge 지역 토양 5cm 깊이 토양 온도(°C) 및 수분함량(volumetric water content, m^3/m^3)의 연중 분포]



[그림 10. 멜버른 화산 Cryptogam Ridge 지역 표층 위 30cm 높이 대기 상대습도(%)의 연중 분포]

2. 환경유전체, 단일세포 유전체 분석을 통한 지열 생태계 미생물 종 다양성 및 기능 이해



[그림 11. 멜버른, 리트만 화산 지열 사이트 위치, 전경 및 유전체 분석에 사용된 3가지 기법들의 분석 흐름도]

가. Pacbio HiFi 및 Hi-C 시퀀싱 기반 지열 사이트 토양 메타지놈 분석

○ 멜버른, 리트만 화산 지열 사이트 대상 토양 메타지놈 분석

- 다양한 시료들을 포함시키기보다 서로 다른 최신의 분자생물학적 기법들 (Metagenomic sequencing, SAGs, 16S amplicon sequencing 등)을 사용함으로써 해당 사이트 내에 존재하는 미생물 중 다양성을 최대한 커버하는 전략을 사용함. 또한, PacBio HiFi 와 Hi-C 기반 DNA 시퀀싱 기법을 사용함으로써 최대한 고품질의 완전한 유전체 서열과 플라스미드 정보를 얻는 것을 목표로함.

표 1. 메타지놈 및 SAGs 분석에 사용된 토양들의 표층 온도 및 이화학적 특성

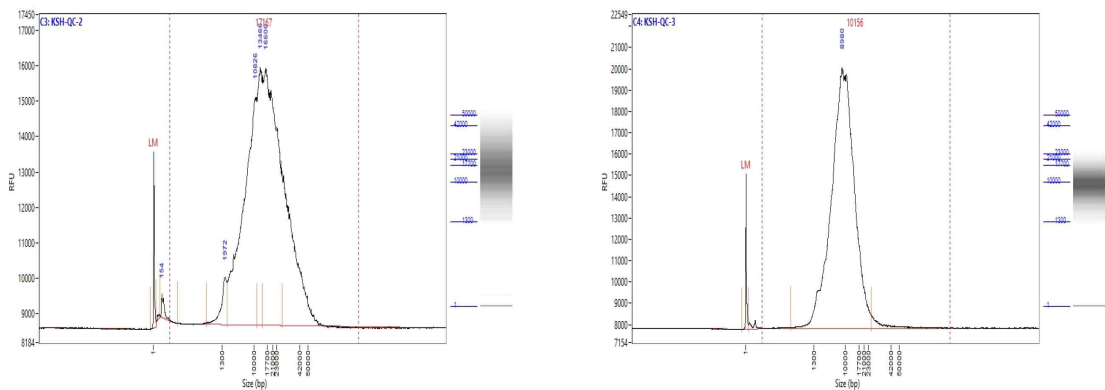
Location	Site ID	Latitude	Longitude	Elevation (m)	Soil temperature (°C) ^a	Sampling date	pH	Total organic carbon (%)	Total nitrogen (%)
Mount Melbourne	MM1	74°21'19.3" S	164°41'45.5" E	2,669	55.4	2021-12-14	5.61	0.21	0.032
	MM2	74°21'19.1" S	164°41'46.2" E	2,667	43.9	2021-12-14	5.89	0.02	0.013
	MM3	74°21'19.5" S	164°41'47.3" E	2,665	44.2	2021-12-14	5.45	0.9	0.055
	MM4	74°21'19.9" S	164°41'48.9" E	2,662	34.8	2021-12-14	5.58	1.59	0.157
Mount Rittmann	MR1	73°28'17.3" S	165°37'06.4" E	2,291	12.5	2021-12-08	6.63	0.41	0.004
	MR2	73°28'17.5" S	165°37'06.6" E	2,291	48.5	2021-12-08	7.04	0.68	0.002
	MR3	73°28'18.3" S	165°37'06.5" E	2,290	53.1	2021-12-08	6.07	0.51	0.011
	MR4	73°28'18.4" S	165°37'06.5" E	2,290	52.3	2021-12-08	6.15	0.78	0.008

○ 기 확보된 시료 대상 화산토 DNA 추출 및 메타지놈 분석

- 멜버른 화산 시료들(MM1-MM4)에서 DNA 추출 및 정량을 진행하였고, 일반 토양에 비해 생물량이 매우 적어 대용량 DNA 추출 키트를 사용하여 3~4회 추출 실시함. Long read 환경 유전체 염기서열 분석에 필요한 최소 DNA양 ($2\mu\text{g}$) 이상 확보 완료(그림 12, 13). 리트만 화산 시료들(MR1-MR4)는 10g에서 추출된 DNA 양으로 충분히 HiFi 시퀀싱 진행 가능

sample	1st			2nd		
	soil (g)	DNA(ng/ul)	total (ng)	soil (g)	DNA(ng/ul)	total (ng)
		final volume (200ul)			final volume (5000ul)	
M1	10.104	0.91	182	10.3	0.708	3540
M2	10.2312	■	■	10.4	0.0088	44
M3	10.212	0.0364	7.28	11.1	0.233	1165
M4	10.398	0.356	71.2	10.6	0.0367	183.5
sample	3rd			4th		
	soil (g)	DNA(ng/ul)	total (ng)	soil (g)	DNA(ng/ul)	total (ng)
		final volume (5000ul)			final volume (5000ul)	
M1	10.3	0.0283	141.5	11.1	1.44	7200
M2	11.1	■	■	■	■	■
M3	10.5	0.171	855	11.2	5.26	26300
M4	10.8	0.032	160	■	■	■

[그림 12. 대용량 DNA 추출 kit를 활용한 화산토 시료 사용량 및 DNA 정량 결과]



[그림 13. 추출된 토양 DNA fragment 길이 분포(두 개 시료 각각 평균 10kbp, 17Kbp 사이즈를 보임)]

표 2. HiFi 시퀀싱 요약 및 accession number

Sample	Total bases (Gb)	Reads mean length (bp)	N50 (bp)	Mean qual (Q)	SRA accession
Mount Melbourne	28.8	11,808 ± 4,112	12,959	35.9	SRR29483437
Mount Rittmann	22.5	9,343 ± 3,139	9,770	39.7	SRR29483436

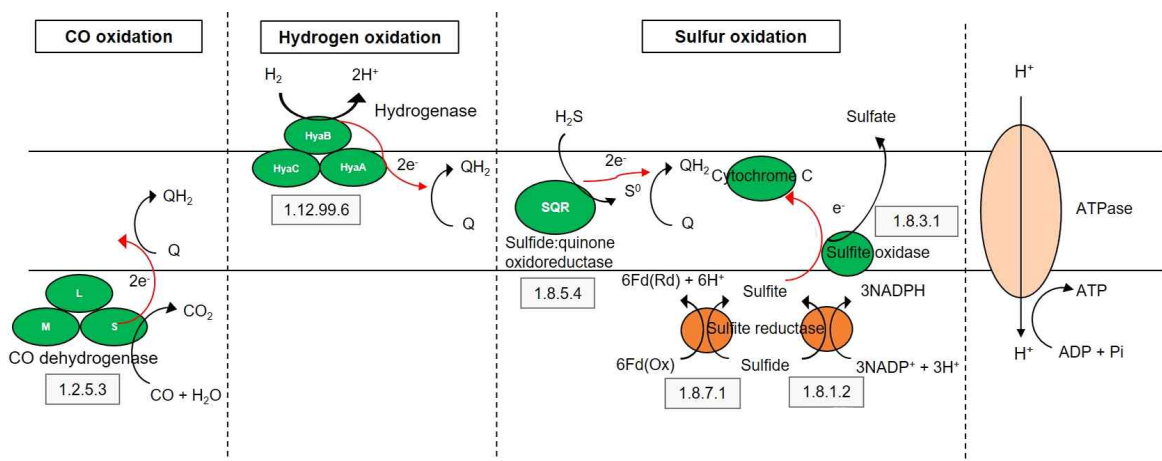
표 3. HiFi 시퀀싱 요약 및 accession number

Sample	Total bases (Gb)	SRA accession	Number of contigs	Total Clusters
Mount Melbourne	42.3	SRR29496778	20210	83
Mount Rittmann	50.4	SRR29496777	35116	259

- 기 확보된 멜버른 화산 예비 시료를 대상으로 shotgun metagenome sequencing 수행 후 genome assembly, binning 과정을 거쳐 Metageneome-assembled genomes (MAGs)를 얻고 유전체 기반 functional annotation 수행. Average nucleotide identity (ANI) > 95% 기준 총 124개의 MAGs가 얻어졌으며, 이 중 과 레벨에서 81%, 속 레벨에서 93%가 새로운 종임을 확인(그림 14). MAGs 대상 KEGG pathway 기반 annotation 결과 20% 이상의 MAGs에서 주요 에너지 대사로 일산화탄소, 수소, 황 산화 유전자들이 확인됨(그림 15). 이는 trace gas oxidation과 황산화 과정을 통해 획득한 전자들로 에너지를 얻고, 이를 탄소고정에 이용하여 일차생산을 수행할 가능성이 높음을 확인



[그림 14. 유전체 기반 동정시 MAGs들의 과(family)와 속(genus) 레벨 신종 비율]

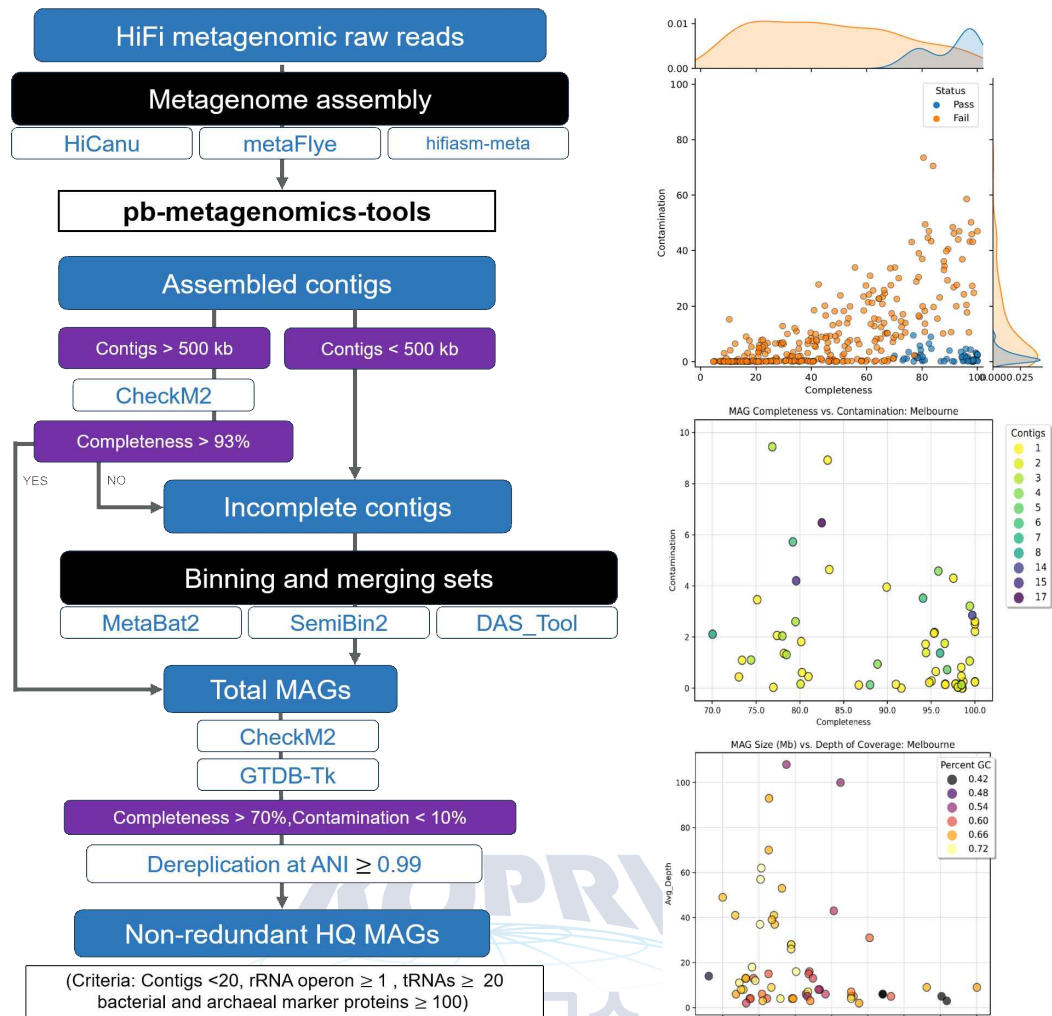


[그림 15. 유전체 기반으로 재복원된 trace gas 산화 및 황산화 과정 모식도]

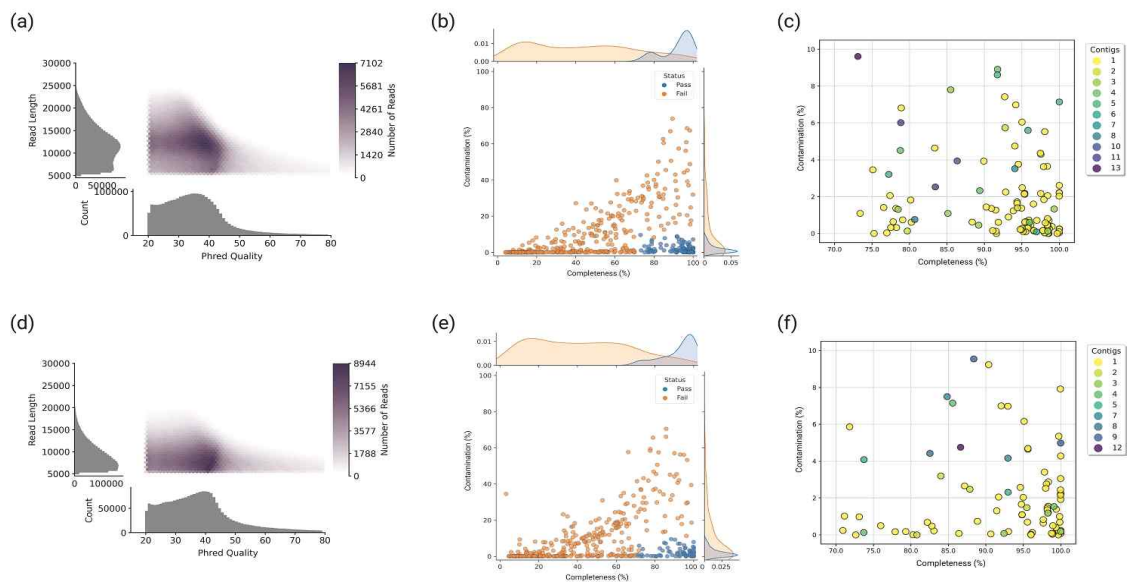
○ Long-read 기반 환경 유전체 분석

- Pacbio HiFi sequencing 진행 결과 멜버른 화산 시료는 28.8Gbp (2.4M reads, mean read length 11,808bp $\pm$ 4,112bp)의 데이터 획득, 리트만 화산은 22.5Gbp (mean read length 9,343bp $\pm$ 3,139bp) 데이터 획득. 세 가지 long-read assembler로 assembly 수행 후 Pacbio사에 제공하는 pb-metagenomics-tool 파이프라인에 따라 binning, MAG refinement, dereplication을 차례대로 수행하여 최종적으로 75개의 non-redundant high-quality MAGs 확인.
- HiFi-MAG-Pipeline 기준($\geq 70\%$ completeness, $\leq 10\%$ contamination, < 20 contigs)을 충족한 MAG에는 멜버른 화산에서 113개 MAGs와 리트만 화산에서 89개 MAGs 획득. 99% ANI를 통해 중복 제거를 통해 57개의 고품질 MAGs가 도출됨.
- ProxiMeta는 멜버른, 리트만 화산 각각 83개와 259개의 클러스터(근접 조립된 게놈)를 생성. 근접 연결 비닝(proximity ligation binning)은 HiFi-MAG-Pipeline만으로 도출된 MAG에 비해 고품질 MAG의 총 수는 57개에서 75개로 31.6% 증가함. 이 중 29개 MAGs(39%)는 HiFi-MAG-Pipeline에만 고유하고, 18개 MAGs(24%)는 ProxiMeta에만 고유하며, 28개 MAGs(37%)는 HiFi-MAG-Pipeline과 ProxiMeta에서 공통으로 나타난 결과임. ProxiMeta는 또한 14개의 바이러스-숙주 연관성을 확인했지만, 숙주 MAG와 연결된 플라스미드는 발견되지 않았음

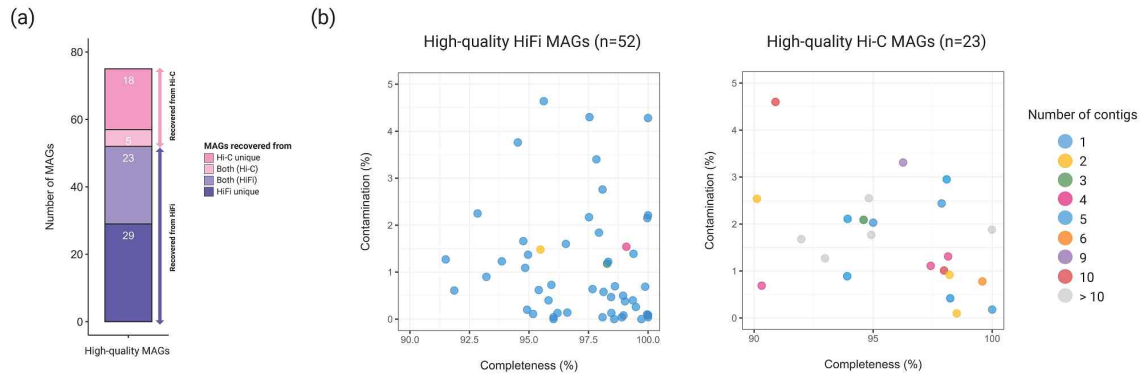




[그림 16. HiFi read 분석 파이프라인(좌), 최종 MAGs (n=75) 특성 결과(우)]

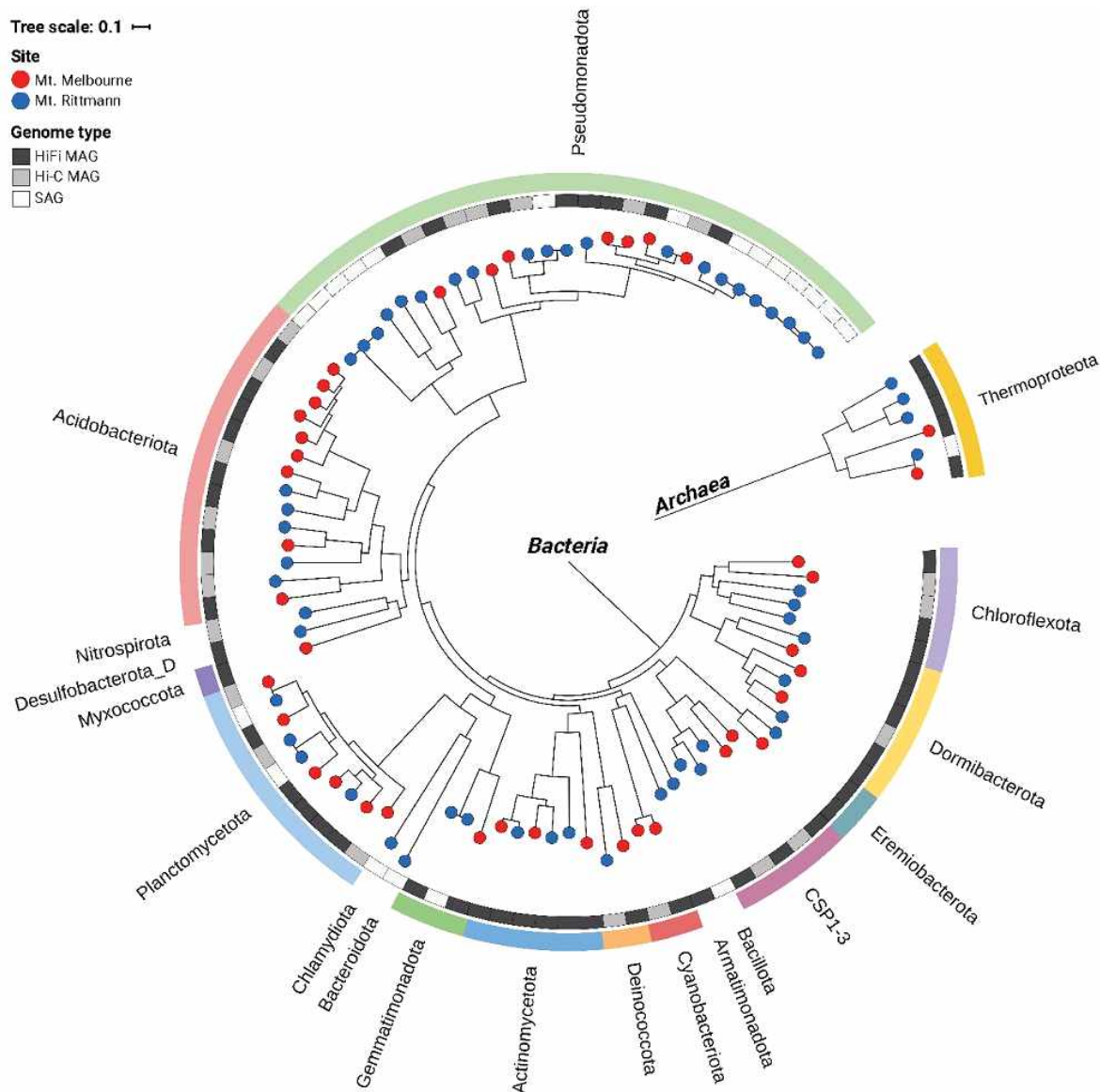


[그림 17. HiFi read 퀄리티 및 길이 분포(a), (d). 획득된 MAGs의 completeness vs. contamination plot (b), (e). 고퀄리티 MAGs (comp>70%, cont <10%)의 contig 숫자 분포(c), (f). 멜버른 화산 결과: (a),(b),(c), 리트만 화산 결과: (d),(e),(f)]

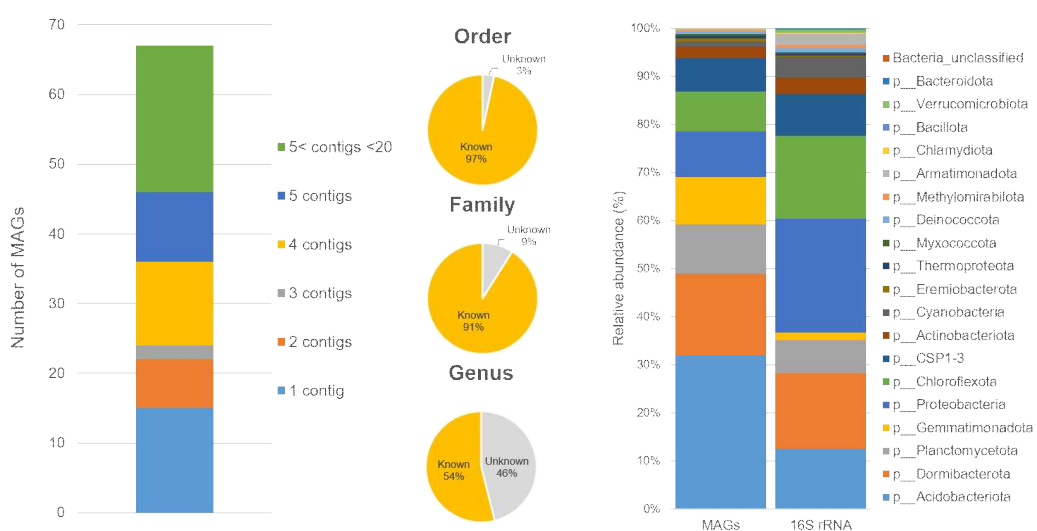


[그림 18. HiFi + Hi-C hybrid assembly 결과로 얻어진 MAGs 분포(a), HiFi 기반 high-quality MAGs(b), Hi-C 기반 high-quality MAGs(c)]

- Single contig로 구성된 유전체는 전체의 22.4% (n=15)를 차지함. GTDB 기반 분류 시 MAGs의 절반 가량(46%)은 기존에 보고되지 않은 새로운 속으로 확인됨. 문 (phylum) 레벨에서의 조성을 살펴본 결과 기능이 잘 알려져 있지 않은 Dormibacterota와 CSP1-3 phylum이 우점하는 특징을 보였으며, 16S rRNA gene 기반 분류 결과와 비교 시 MAGs 분류 결과에는 Acidobacteriota와 Gemmatimonatoda가 상대적으로 많이 검출됨. 우점하는 상위 20개 MAGs에 대한 물질대사 경로 분석 결과 80% 이상에서 특징적으로 trace gas인 CO, H₂ 산화 대사 경로를 지닌 것으로 나타남. MAGs 내 주요 효소들의 유전자 분포를 살펴본 결과 CSP1-3 phylum에 속하는 MAGs에서 CO dehydrogenase의 핵심 유전자들이 상대적으로 많은 copy 수를 보였고, Hydrogenase 유전자들은 Dormibacteria와 Ktedonobacteria lineage에서 검출됨. 이는 지열 사이트 미생물들이 대기 중 기체들을 에너지원으로 삼아 유기물을 합성하는 Chemosynthetic life 모드로 살아감을 보여주는 증거임

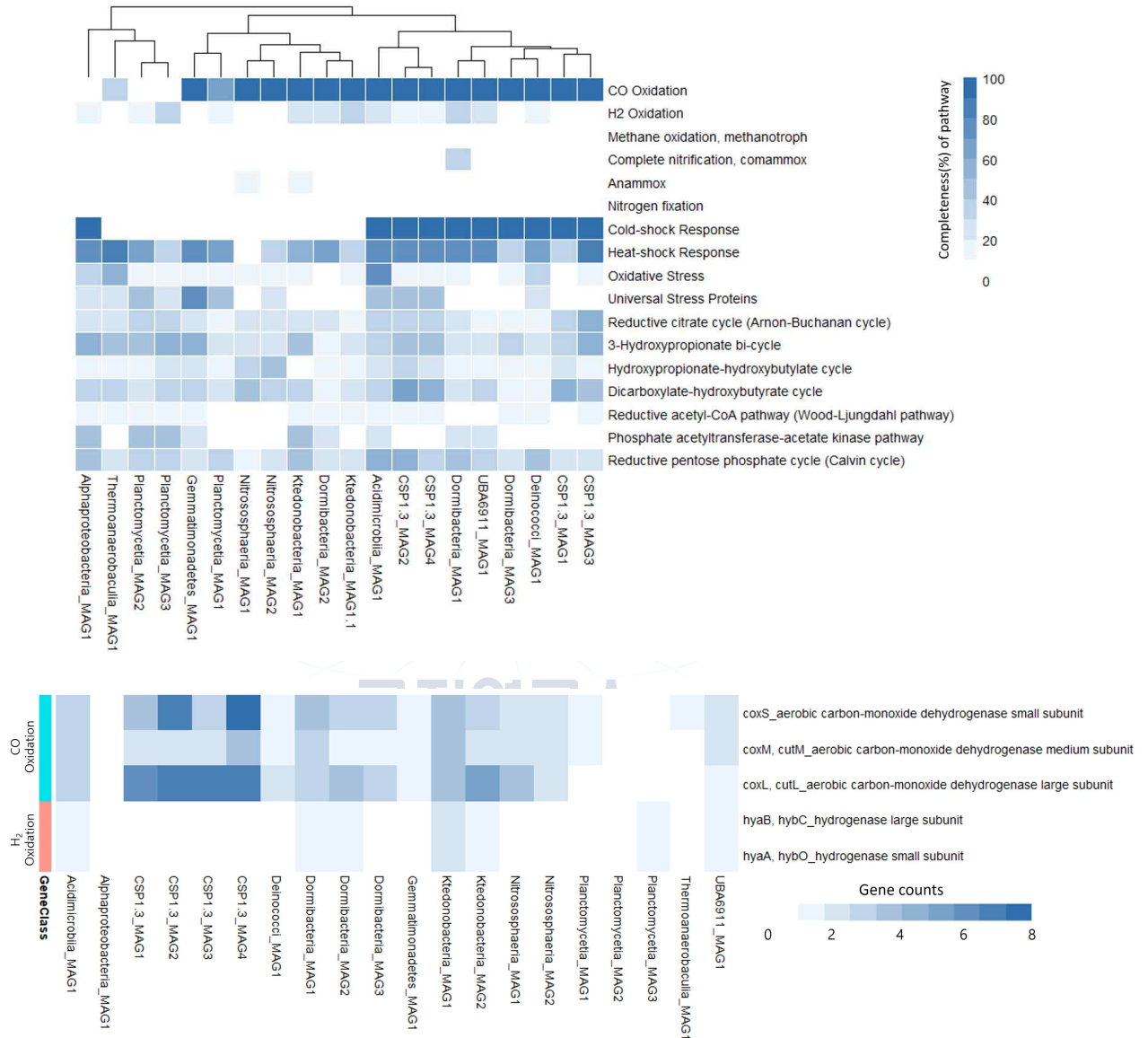


[그림 19. 획득된 HiFi, Hi-C 기반 MAGs과 SAGs의 진화 계통 분포]



[그림 20. 멜버른 화산 시료 대상 67개 MAGs의 contig 수 분포(좌), 기존 DB의

커버리지 비율(중) MAGs와 16S rRNA gene 기반 phylum 분포(우)]

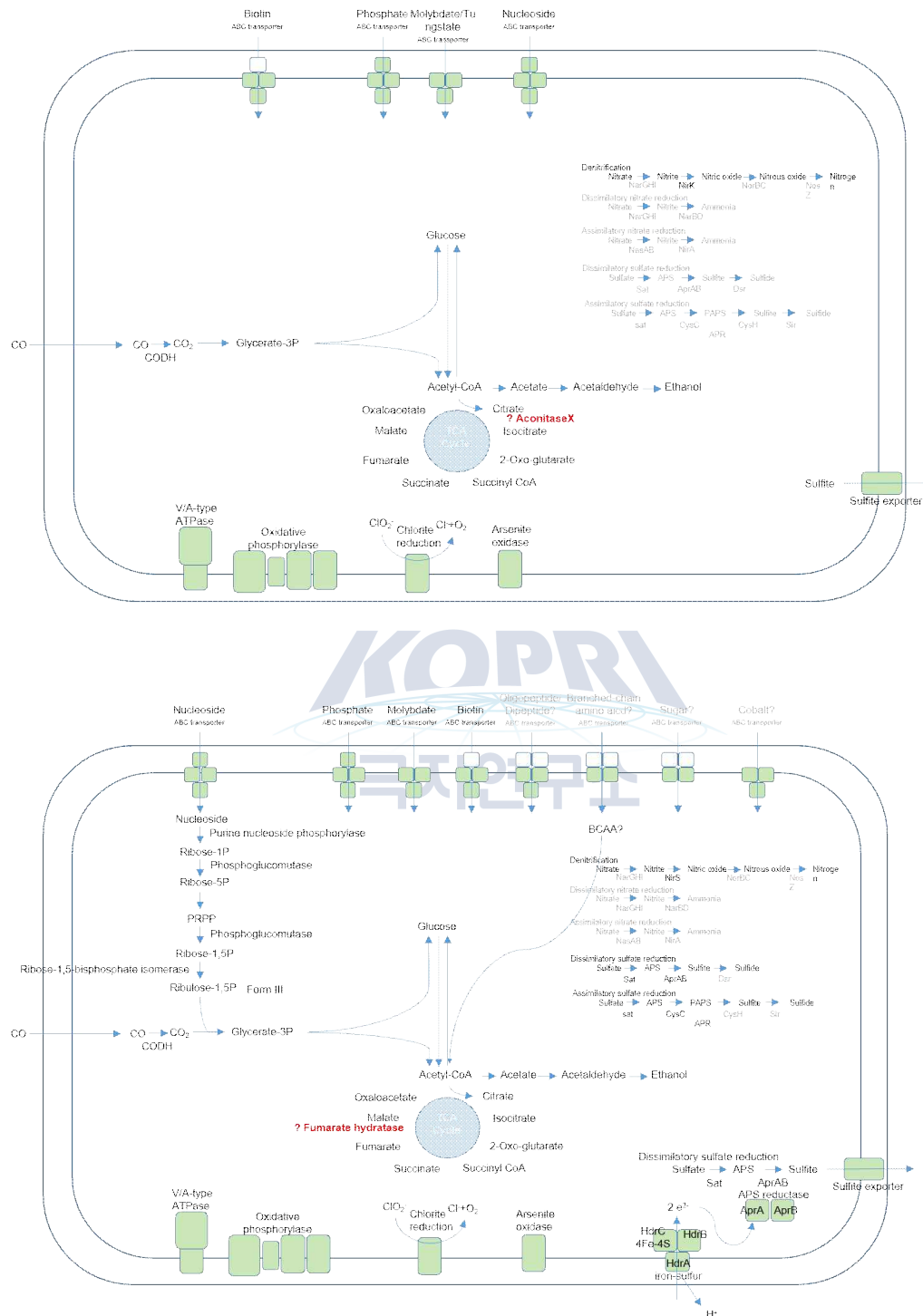


[그림 21. 우점하는 상위 20개 MAGs의 물질대사 경로(위), CO dehydrogenase와 hydrogenase의 주요 유전자 분포(아래)]

○ 두 화산 지열 사이트 우점 미생물들의 대사과정 재구성

- 고순도 MAGs 서열(complete MAG with single contig)을 기반으로 blastKOALA 및 eggNOG mapper 등을 이용한 우점 MAGs의 대사과정 재구성 수행. 고세균의 경우 Thermoproteota에 속하는 두 MAGs에서 nucleoside 및 CO 대사루트 존재 확인, 하지만 불완전한 TCA cycle 존재 확인. Aconitase와 Fumarate hydratase가 각각 존재하지 않는 것으로 확인. 이는 bypass 대사경로가 존재하거나 syntrophs의 존재로 다른 의존하는 미생물이 있을 가능성이 있음. Mel.complete.10701 MAG에서

는 sulfate reduction 루트 추가적으로 확인. 또한, 두 MAG 각각 탈질 과정에 관여하는 NirK와 NirS 유전자가 확인됨.



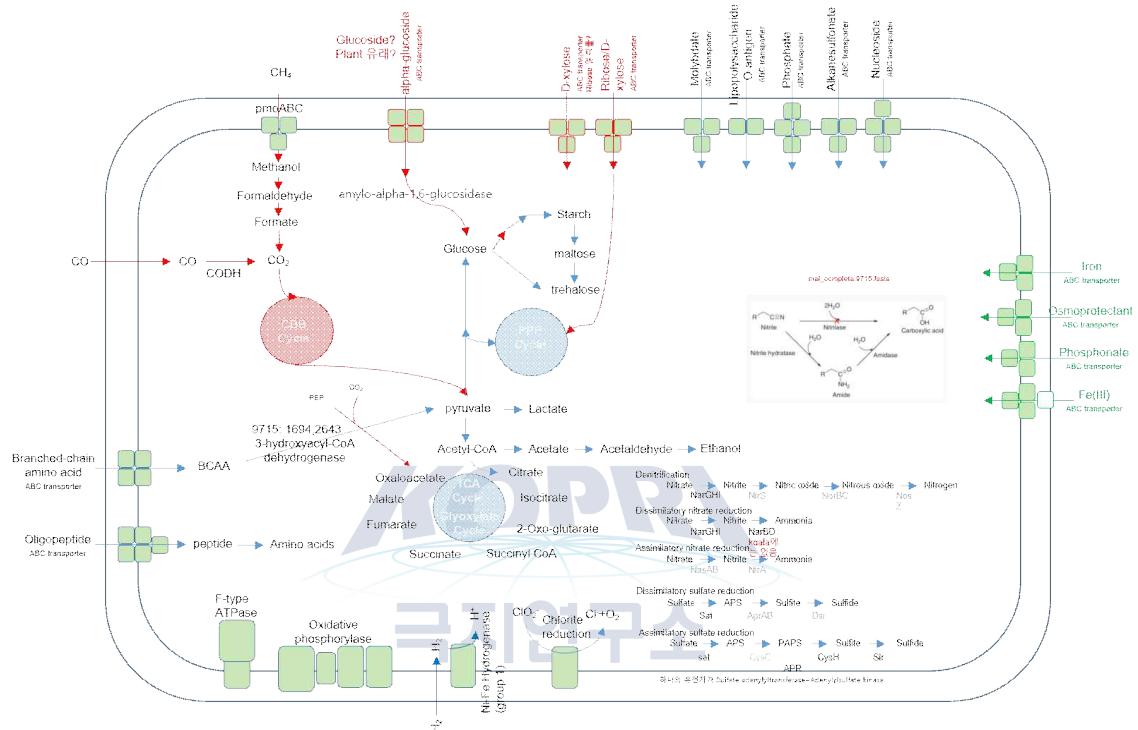
[그림 22. Thermoproteota에 속하는 두 우점 고세균 MAGs의 대사경로 재구성.

Mel.metabat2.367

(d__Archaea;p__Thermoproteota;c__Nitrososphaeria;o__Conexivisphaerales;f__g__
;s__) (위), Mel.complete.10701

(d__Archaea;p__Thermoproteota;c__Nitrososphaeria;o__Conexivisphaerales;f__DTJ
L01;g__;s__) (아래)]

- Dormibacterota에 속하는 우점 MAGs 대사경로 비교 시 두 개체 모두 공통적으로 hydrogenase 및 TCA cycle 존재 확인. Mel.complete.9715의 경우 특이하게 CO와 CH₄ 산화 대사경로 및 탄고 고정을 위한 CBB cycle이 존재함을 확인. 특히, 메탄 산화 경로(pmoABC)의 경우 해당 문에서 처음 보고된 경우로서 해당 경로가 활성화 있는지, 어느 진화경로로 유입이 되었는지 여부는 추가 확인이 필요함.



[그림 23. Dormibacterota에 속하는 두 우점 세균 MAGs의 대사경로 재구성.

Mel.complete.9715 vs. Mel.complete.9700]

나. 단일세포 sorting 및 유전체 분석

○ Single cell genomics 분석

- 멜버른 화산 시료(M1-M4, Cryptogam Ridge) 4개를 혼합하여 단일 시료로 만들고, 전처리 후 해당 시료에 대해 Bigelow laboratory의 Single cell genomics center (SCGC) 서비스를 이용하여 386 well plate 2개 분량의 FACS cell sorting 진행.
- 리트만 화산 시료 또한 칼데라 림 시료 4개를 혼합하여 단일 시료로 만들고, 전처리 후 같은 방식으로 386 well plate 2개 분량의 cell sorting 및 whole genome amplification 진행. WGA-X Cp 값 02:13 hours (실제 유전체 증폭이 이루어졌을 가능성이 큰 Cp 값의 상한선) 이하의 well들을 대상으로 short-read 기반 whole genome amplification (WGA) 진행

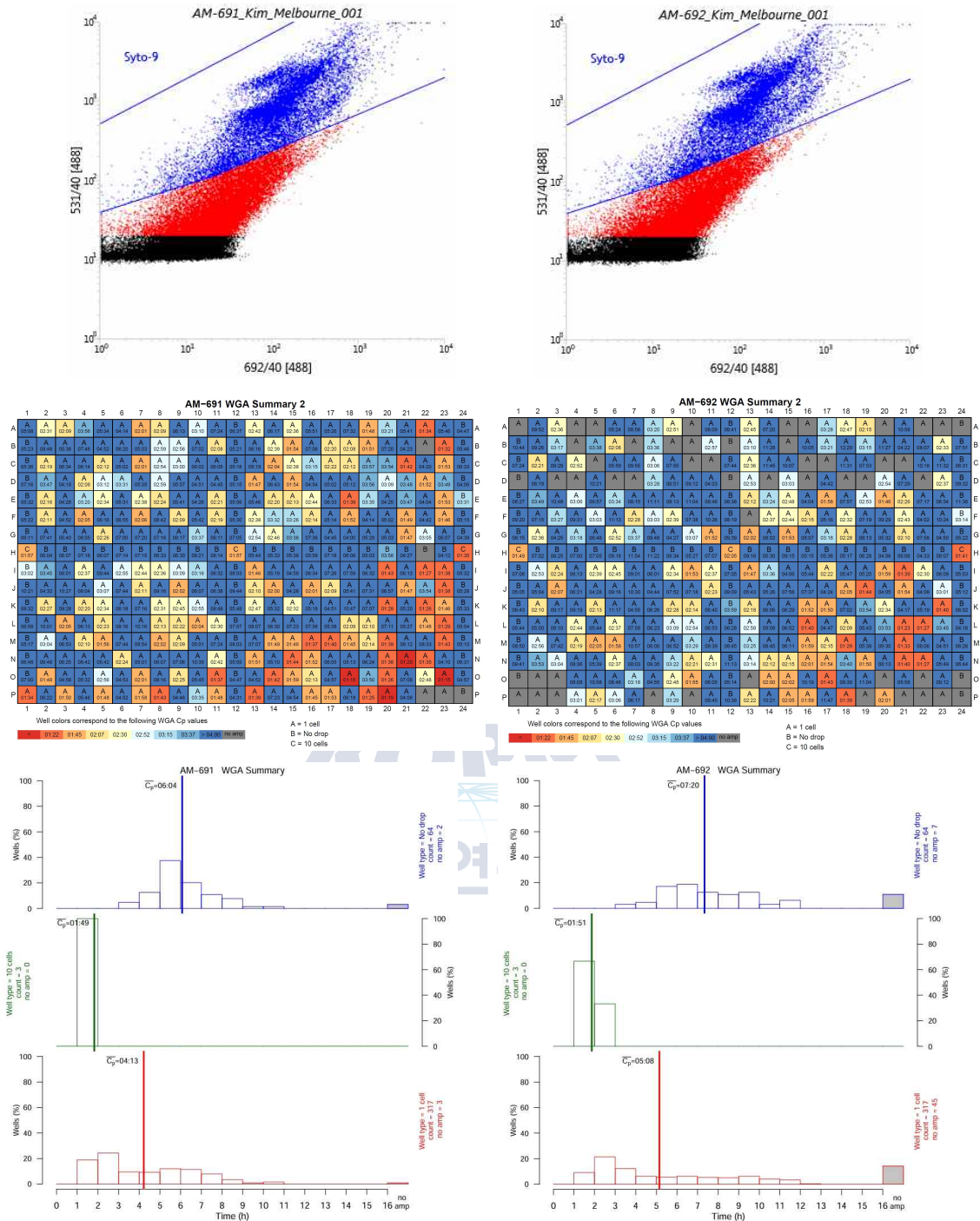
표 4. FACS sorting 결과를 WGA Cp 값에 따라 분류한 표

WGA Cp value (h)	<1:22(h)	1:22-1:45(h)	1:45-2:07(h)	2:07-2:30(h)	2:30(h)<	sum
AM-691(Melbourne)	4	25	42	36	21	128
AM-692(Melbourne)	0	12	25	26	26	89
AM-695(Rittmann)	2	25	34	39	34	134
AM-696(Rittmann)	0	13	42	43	41	139
total sum	6	75	143	144	122	490

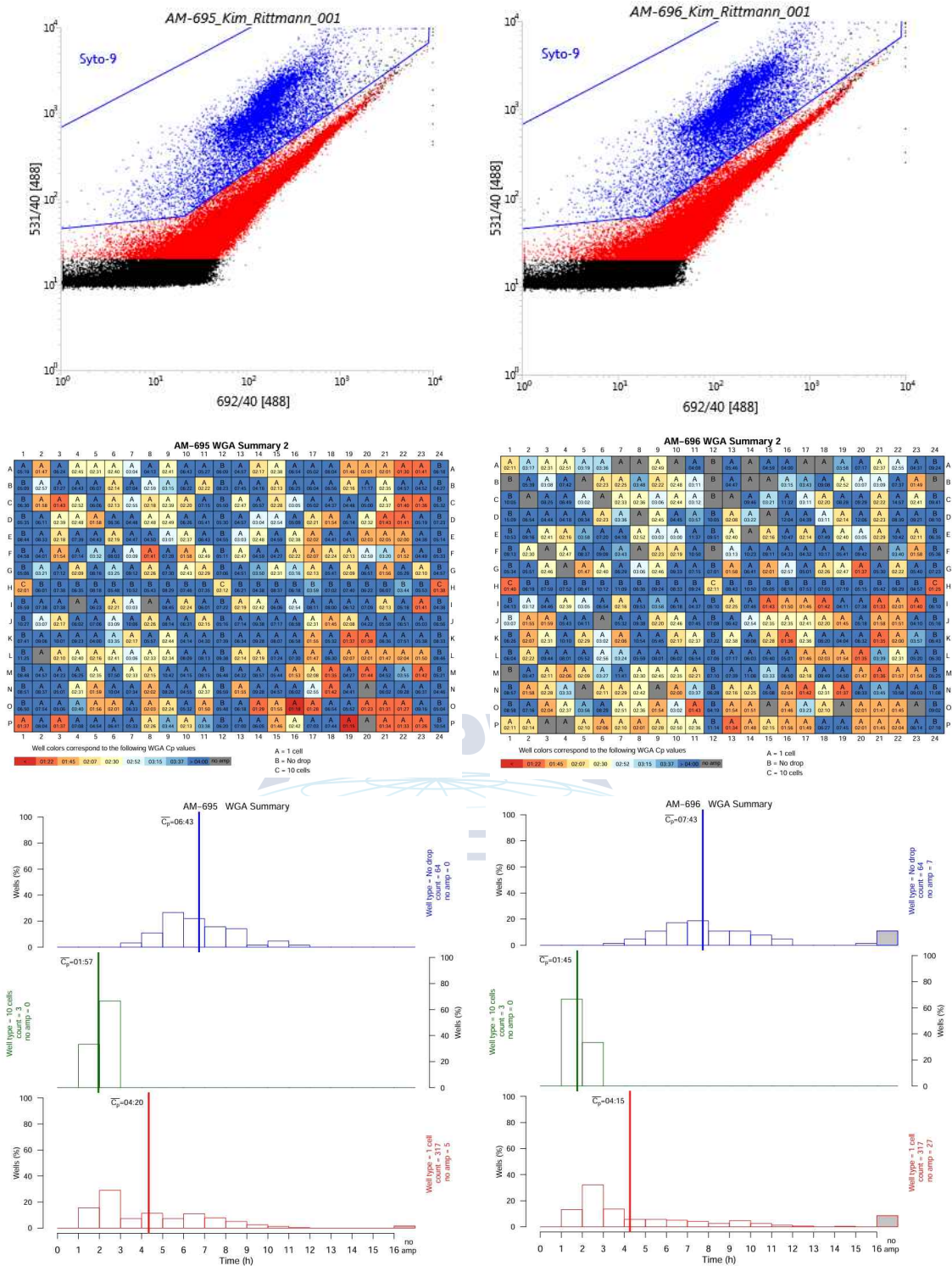
표 5. SAGs 결과 요약 및 accession number

Sample	Total SAGs	Sequenced SAGs	SRA accession
Mount Melbourne	217	108	SAMN41938692 - SAMN41938799
Mount Rittmann	273	116	SAMN41938800 - SAMN41938915





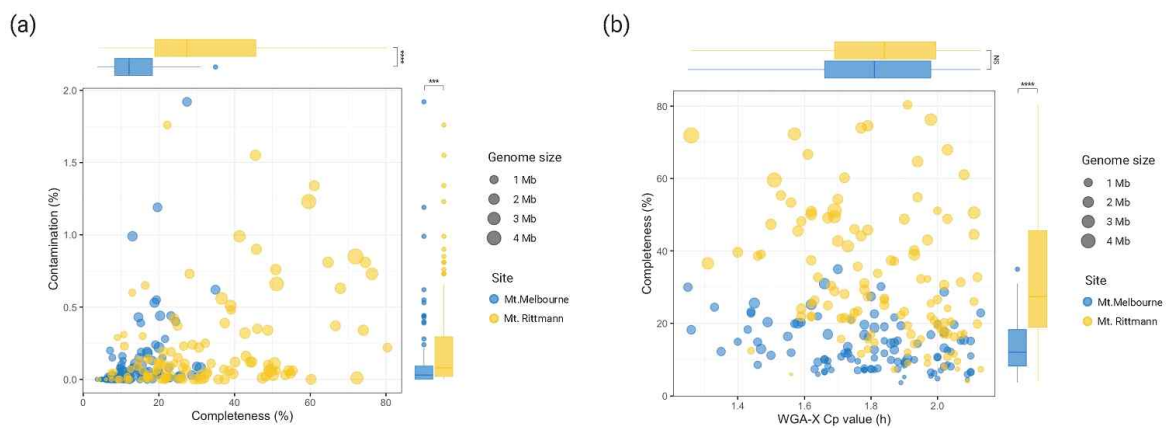
[그림 24. 멜버른 화산 시료에 대한 FACS sorting 영역(위), Whole Genome Amplification 진행 후 plate 별 Cp 값(h) 분포(중간), WGA 결과 분포 summary(아래)]



[그림 25. 리트만 화산 시료에 대한 FACS sorting 영역(위), Whole Genome Amplification 진행 후 plate 별 Cp 값(h) 분포(중간), WGA 결과 분포 summary(아래)]

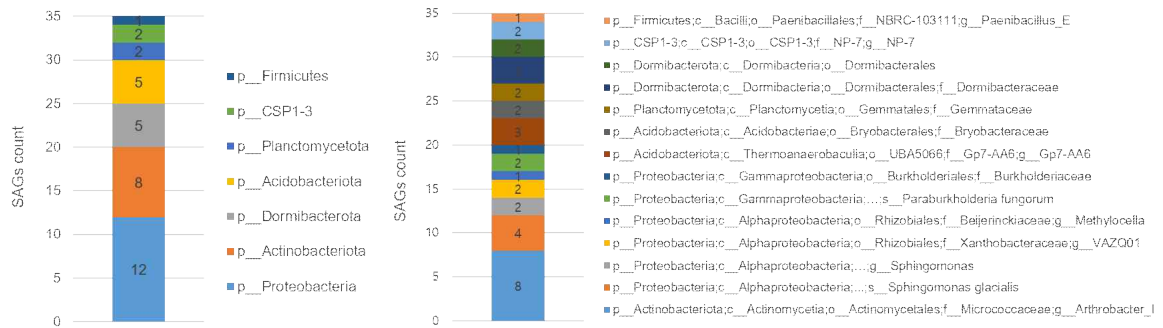
- FACS sorting 결과 총 490개 well, 멜버른 화산(n=217), 리트만 화산(n=273), 에서 single cell sorting이 이루어짐. Whole Genome Sequencing 진행 결과 총 224개, 멜버른 화산(n=108), 리트만 화산(n=116), 의 Single-cell amplified genomes

(SAGs)가 얻어짐 (그림 7). CheckM2 기반 Genome Completeness 평가 시 assembly completeness는 멜버른 화산의 경우 3.7-35(%)로 상당히 낮게 나왔으며, 리트만 화산의 경우 3.7-80.4(%)로 상대적으로 높게 나타남. 평균 23.6%의 낮은 completeness를 보였고, 평균 0.22%의 매우 낮은 contamination 비율을 보였고 대부분의 SAGs에서 <2%의 contamination 비율을 보임. Genome size 또한 평균적인 원핵생물들의 유전체 크기에 비해 현저히 떨어지는 결과가 관찰됨. WGA-X의 Cp value(h)가 낮을수록 whole genome amplification이 또한, 224개의 SAGs 중 60.3%(n=135)에서 16S rRNA 유전자가 검출됨. 총 24개의 SAGs에서 23S rRNA 유전자가 검출됨. 하지만 이러한 결과는 SAGs 분석에 사용된 시료가 토양임을 감안할 때 양호한 수준의 결과로 판단됨



[그림 26. SAGs의 WGA-X Cp vs. genome completeness vs. genome size 비교 결과.
(a) Completeness vs. Contamination, (b) WGA-X Cp values vs. Completeness

- 시퀀싱 라이브러리는 Nextera XT (Illumina)를 사용하여 준비하였고, 시퀀싱은 P3 시약(2x100bp)을 이용한 Illumina NextSeq2000으로 수행하여 약 11억개의 paired end reads를 생성. 초기 quality trimming은 Trimmomatic v0.3936을 사용하였고, de novo genome assembly는 SPAdes v2.2.1037을 사용. 2,000bp보다 짧은 contig는 제거하였으며 SAG의 완전성 및 오염도는 tetramer 분포를 기반으로 한 주성분 분석을 통해 식별함. Annotation은 Prokka를 이용하였고, Swiss-Prot DB로 추가적인 annotation 수행함.
- GTDB 기반 유전체 계통 분류 결과 총 224개의 SAGs 중 69.6%(n=156)만 분류가 이루어짐(그림 8). Long-read에서 얻어진 MAGs와 비교 시 전체적으로 미생물 다양성은 떨어지고 Proteobacteria와 Actinobacteria가 상대적으로 우점함하였고. 종 수준에서는 *Sphingomonas glacialis*와 *Paraburkholdria fungorum*이 확인됨



[그림 27. SAGs의 문(phylum) 분포(좌), GTDB 기반 하위 계통 분류(우)]

다. 지열 사이트 토양 생지화학적 특성 분석

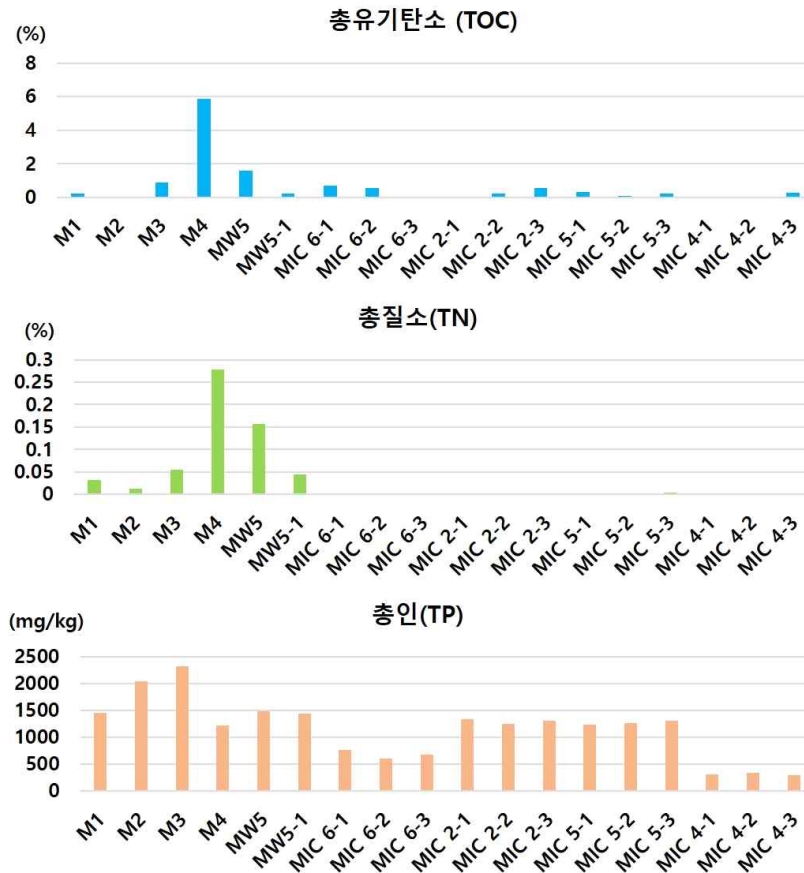
○ 토양 화학적 특성 분석

- 멜버른 정상 부근 지열이 발생하는 3개 지점에서 18개 화산토 시료 확보

No.	Site	sample name	Type	coordinate
1	Melbourne Ice tower	M1	Soil	74° 21.345'S164° 41.611'E 2687m
2	Melbourne Ice tower	M2	Soil	74° 21.343'S164° 41.595'E 2688m
3	Melbourne Ice tower	M3	Soil	74° 21.341'S164° 41.576'E 2691m
4	Melbourne Ice tower	M4	Soil	74° 21.341'S164° 41.569'E 2691m
5	Melbourne ice free 5	MW5	Soil	74° 21.334'S 164° 41.723'E 2646m
6	Melbourne ice free 5-1	MW5-1	Soil	74° 21.334'S 164° 41.723'E 2646m
7	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 6-1	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
8	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 6-2	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
9	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 6-3	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
10	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 2-1	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
11	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 2-2	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
12	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 2-3	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
13	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 5-1	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
14	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 5-2	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
15	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 5-3	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
16	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 4-1	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
17	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 4-2	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E
18	Melbourne-fumarolic ice cave	MIC 4-3	Soil	74°21'11.95"S 164°42'17.20"E

[그림 28. 기 확보된 멜버른 화산 지열 사이트 예비 시료 목록]

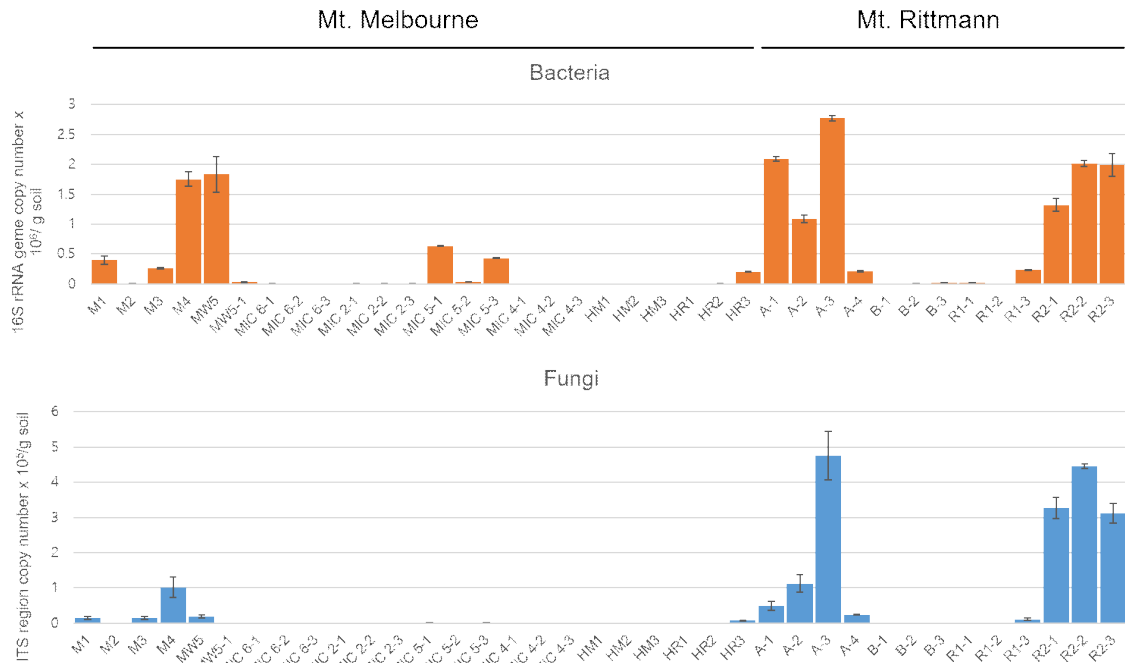
- 각 시료에서 총유기탄소 (Total Organic Carbon), 총질소 (Total Nitrogen), 총인 (Total Phosphorus) 분석을 진행함
- 총유기탄소와 총질소는 시료 간 유사한 패턴을 보였으며, 상대적으로 분석값이 높게 나타난 시료는 해당 지점 인근에서 이끼류의 자생이 확인된 지점임
- 총인은 ice cave 지역의 시료보다 ice tower의 시료에서 상대적으로 더 높게 나타났으며 ice cave 시료의 경우 동굴의 깊이가 가장 깊은 곳에서 채취된 시료의 총인이 가장 낮게 나타남이 확인됨



[그림 29. 멜버른 화산 시료들의 TOC, TN, TP 분포]

○ 미생물 생물량 분석

- 멜버른, 리트만 화산 지열 사이트 토양 시료들에 존재하는 세균과 진균 군집의 생물량을 알아보기 위해 그룹 특이적인 마커 유전자를 타겟으로 qPCR 진행. 멜버른 화산에서는 Cryptogam Ridge (M1~M4, MW5)에서 채취된 시료의 세균, 진균 생물량이 상대적으로 높게 검출되었고, 리트만 화산은 칼데라 립 경사면(R2-1~R2-3)과 능선(A-1~A-4) 수증기 분출 지역에서 미생물 생물량이 높게 나타남. 얼음 동굴 안쪽(MIC)과 Fumarole 분출구(HM) 시료들에서는 세균, 진균 모두 상대적으로 매우 낮은 미생물 생물량이 확인됨

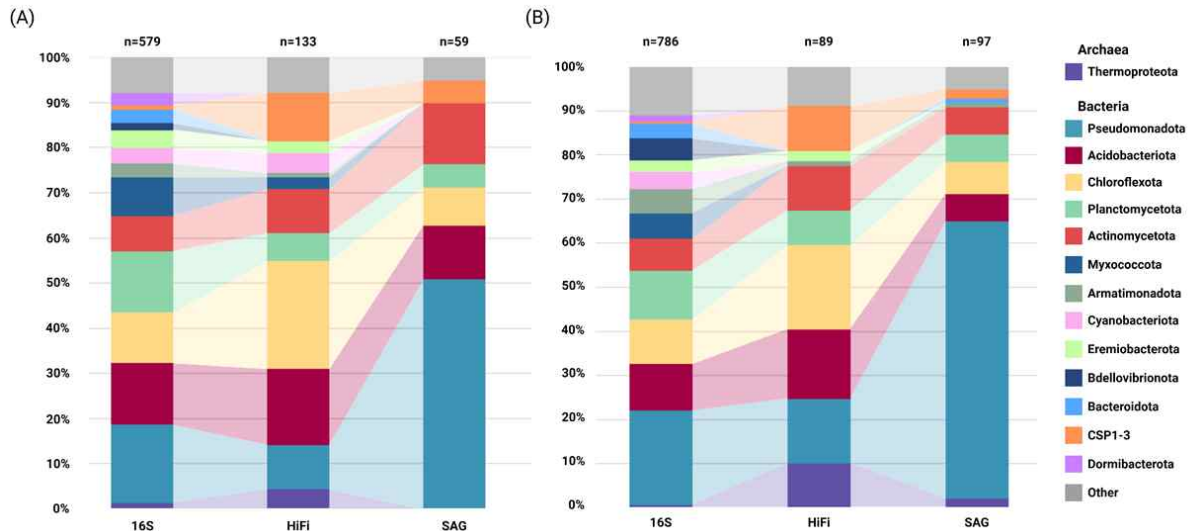


[그림 30. 멜버른, 리트만 화산 시료들의 세균 군집 16S rRNA gene copy number (위), 진균 군집 ITS region copy number(아래)]

라. 멜버른 vs. 리트만 화산 간 비교 분석

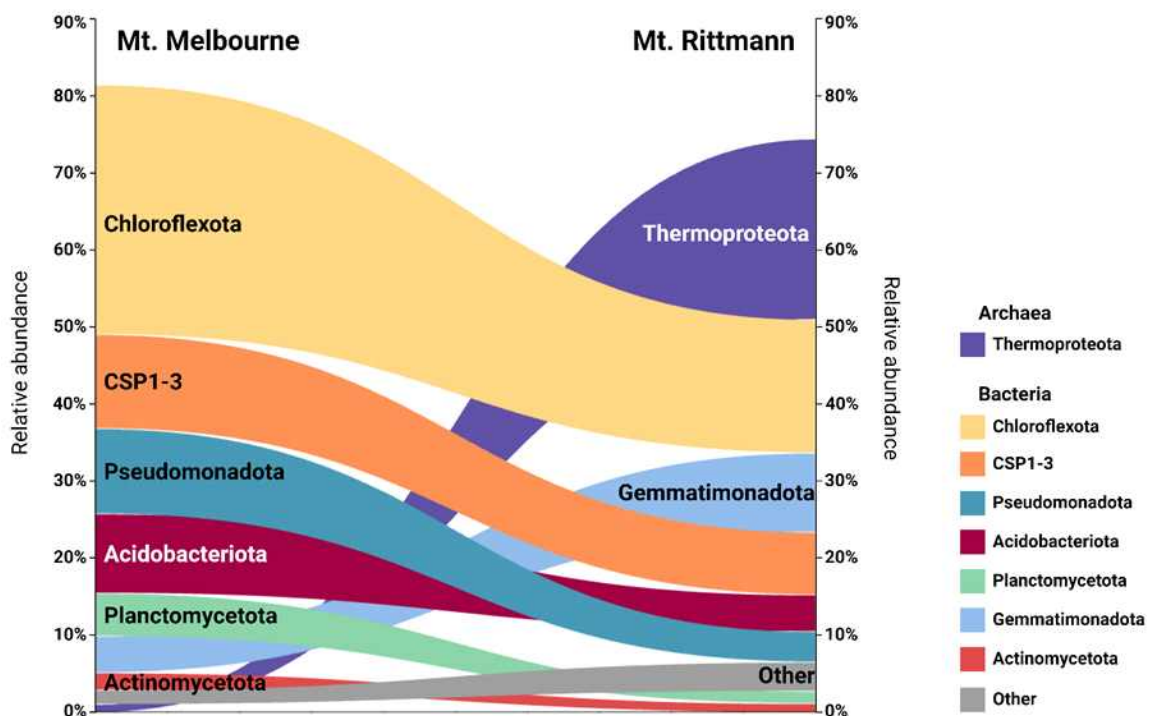
○ 분석 방법에 따른 문(phylum) 레벨에서의 원핵생물 분포 비교

- 문(phylum) 단위에서 16S V4-V5 region amplicon sequencing, PacBio HiFi 기반 MAGs, SAGs 간의 상대수도를 비교함. 두 지열 사이트 모두에서 16S 유전자 대비 HiFi MAGs에서 더 높은 비율의 고세균(Thermoproteota) 및 세균(CSP1-3, Chloroflexota)가 얻어짐. 반대로 Planctomycetota, Myxococcota, Bdellovibrionota, Bacteroidota는 더 낮은 비율로 나옴. Ground truth가 없어 어느 쪽이 더 실제와 가까운지 판단은 어렵지만, 16S amplicon sequencing의 경우 primer mismatch 및 PCR 증폭 과정으로 인해 bias가 더 클 가능성이 높음.
- SAGs의 경우 Pseudomonadota가 50%이상을 차지하는 것으로 나타남. Acidobacteriota, Chloroflexota, Planctomycetota, Actinomycetota는 유사한 비율로 나타남. Pseudomonadota가 단일 세포 sorting이 잘 이루어지는 세포 형태로 이루어져 있음을 짐작할 수 있고, 반면 Dormibacterota 등은 단일 세포 sorting이 잘 되지 않는 aggregates 이거나 filamentous 형일 가능성이 있음.



[그림 31. 멜버른 화산(좌), 리트만 화산(우). 문(phylum) 단위에서 16S V4-V5 region amplicon sequencing, PacBio HiFi 기반 MAGs, SAGs 간의 상대수도 비교]

- 두 화산 간 HiFi MAGs + SAGs을 이용한 문(phylum) 단위 비교 결과 리트만 화산에서 고세균 문인 Thermoproteota가 월등히 높은 비율을 차지하고 세균 문인 Gemmatimonadota 또한 높은 비율로 나타남. 나머지 문들은 대체적으로 멜버른 화산에서 상대적으로 조금씩 더 높은 비율들로 나타남. 차가운 남극 대륙에서 희귀한 두 지열 사이트 간에 일반종(generalist species)과 고유종(endemic species)이 모두 상존하며, 리트만 화산의 경우 고유종의 비율이 조금 더 높은 것으로 판단됨.



[그림 32. 멜버른 vs. 리트만 화산 간 미생물 유전체 기반(MAGs + SAGs) 분포 비교]

3. 다양한 배양 조건에서의 균주 분리를 통해 지열 생태계 생명·유전자원 확보

가. 세균 배양

○ 다양한 배양 조건에서 세균 균주 순수 분리 배양

- 다양한 배양 조건에서 배양을 시도하고 16S rRNA 마커유전자로 종 동정을 수행한 결과 총 53균주가 획득됨 (0.01X R2B, R2A, M31, VL55 at 10℃, 0.01X R2-Gellan gum at 25℃, 37℃ 배양). 16S rRNA gene 유사도 분석 결과 대부분 기존에 알려진 균주들과 상당히 높은 유사도를 보임(>99.1%). *Paraburkholderia fungorum* 균주는 fumarole 전용인 FS1VG 배지(37℃)에서만 검출됨. *S. glacialis*와 *P. fungorum*은 SAGs 결과에서도 확인됨. 전체적으로 16S 유사도는 높지만 80% 이상은 해당 지열 환경에서 처음 배양된 균주들이므로 이후 생리 특성 및 유전체 분석을 수행할 가치가 있을 것으로 판단됨. 하지만 배양을 통해서만 메타지놈 상에 나타난 우점 미생물 그룹들은 전혀 획득되지 않은 한계를 보임.

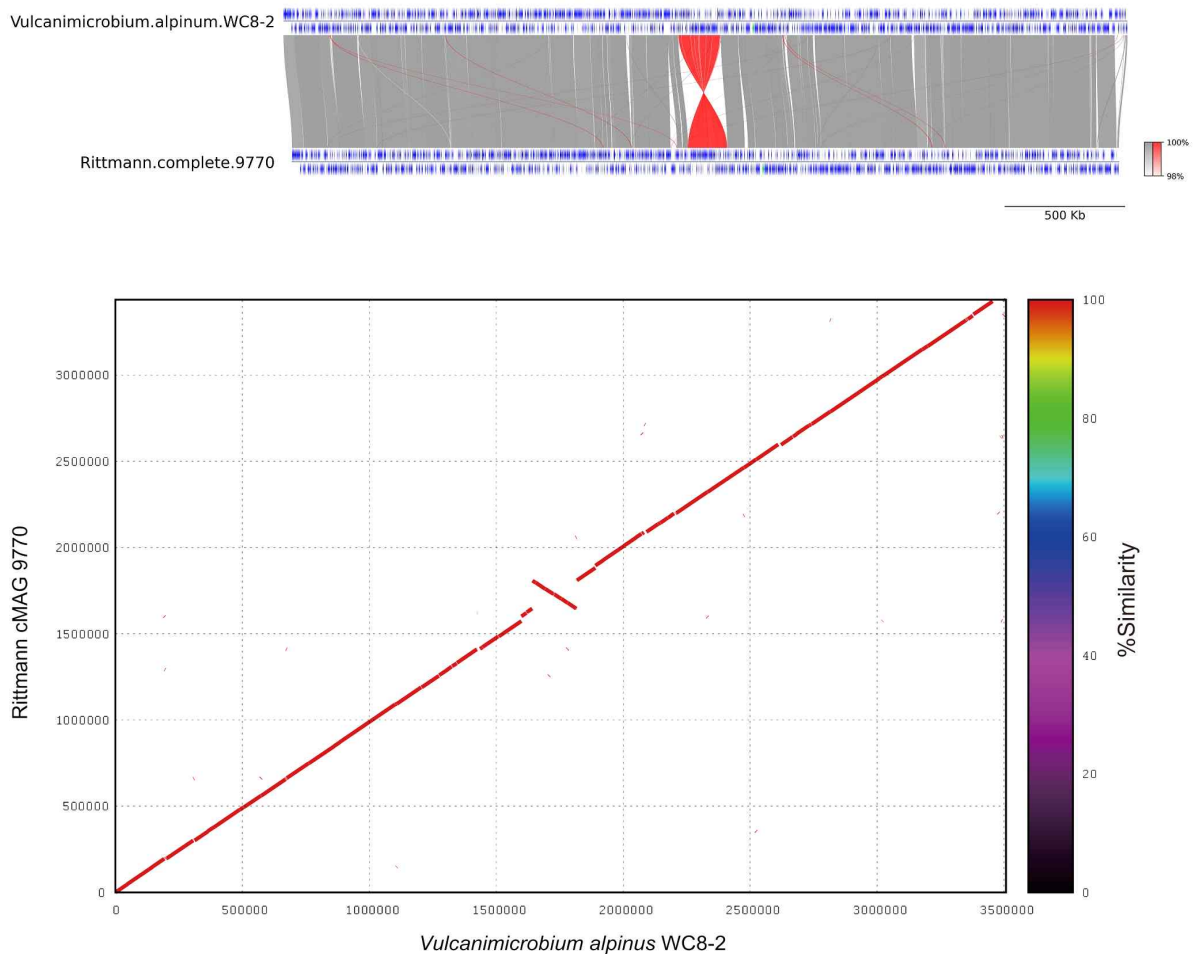
표 6. 멜버른과 리트만 화산으로부터 채취한 배양체의 분류학적 정보

Phylum	Scientific name	Isolation source	
		Mt.Melbourne	Mt.Rittmann
Actinobacteriota	<i>Jatrophihabitans telluris</i>		1
	<i>Arthrobacter oryzae</i>	1	
	<i>Brevibacillus levickii</i>	1	
Firmicutes	<i>Neobacillus fumarioli</i>		1
	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>		1
	<i>Bradyrhizobium cosmicum</i>		1
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	1	
	<i>Cupriavidus respiraculi</i>	1	
	<i>Mesorhizobium qingshengii</i>		2
	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>		
	<i>Mesorhizobium australicum</i>		2
	<i>Novosphingobium resinovororum</i>	3	1
Proteobacteria	<i>Pseudomonas iranensis</i>		1
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	17	8
	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>		1
	<i>Sphingomonas aquatilis</i>	2	4
	<i>Sphingomonas glacialis</i>	2	
	<i>Paraburkholderia fungorum</i>	2	
Total		30	23

○ 배양체 유전체와 메타지놈 기반 획득된 고순도 MAG 간 비교 분석

- 배양된 균주 중 유일하게 메타지놈 서열상으로 우점하는 균주는 남극 에레부스 화

산에서 배양된 Eremiobacterota (aka. WPS-2 cadidate division) 문의 첫 배양 균주인 *Vulcanimicrobium alpinum* WC8-2임. 해당 균주와 ANI 99% 이상 유사한 유전체가 리트만 화산 HiFi MAG (Rittmann complete 9770)에서 얻어졌기에 유전체 및 대사경로 비교를 추가로 수행함. 두 지역 간 regional generalist species 존재 여부 파악을 위해 genome v.s genome 비교 수행. 비교 결과 유전체 기반 종 동정 상 동일 종에 속하는 서로 다른 strain인 것으로 판명됨. 중간에 inversion이 일어난 부분이 특이적임



[그림 33. *Vulcanimicrobium alpinum* WC8-2과 리트만 화산 유래 MAG (Rittmann.complete.9770) 서열 간 유전체 비교 결과]

- 대사경로 비교 결과 거의 동일한 대사경로를 가진 것으로 확인됨. 두 개체 모두 CO 및 수소를 대사하며 탄소 고정 CBB cycle 확인됨. 또한 황 산화를 통해 전자를 얻는 에너지 획득 루트도 확인. 다만 Rittmann.complete.9770의 경우 starch 합성경로가 추가로 존재하며, *V. alpinum* WC8-2는 group 1의 Ni-Fe Hydrogenase인 반면 Rittmann.complete.9770에서는 group 2a에 속하는 Ni-Fe Hydrogenase가 추가로 확인됨.

3차 년도	2024		메타지놈 및 SAGs 기반 지열 생태계 중 구성 및 기능 분석	
		◦ 지열 생태계 생명·유전자원 확보	- 다양한 조건의 배지 조합으로 미생물 분리 배양 및 동정	100%
		◦ 남극 내륙 북빅토리아랜드 지열 생태계 환경 파악	- 멜버른 vs. 리트만 지열 생태계 간 토양 특성 비교 분석	100%
		◦ 지열 생태계 생물 중 다양성 및 기능 이해	- 리트만 화산 대상 HiFi + Hi-C 메타지놈 및 SAGs 기반 지열 생태계 중 구성 및 기능 분석	100%
		◦ 지열 생태계 생명·유전자원 확보	- 두 화산 간 cMAG 및 SAGs 기반 유전체 특성 비교 분석	
			- 다양한 조건의 배지 조합으로 미생물 분리 배양 및 동정	100%

다. 정량적 성과 목표 및 달성도 (단위 : 건)

구분	국외논문		달성도
	목표치(SCIE)	달성(SCIE)	
1차년도			
2차년도			
3차년도	2	1	50%

- 정량 성과 증빙자료

구분	내용	IF 및 게재일
국외전문학술지	Myeong, N. R., Choe, Y. H., Shin, S. C., Kim, J., Sul, W. J., & Kim, M. (2024). Genomic profiling of Antarctic geothermal microbiomes using long-read, Hi-C, and single-cell techniques. Scientific Data, 11(1), 1023.	IF: 5.8, 2024.09.19

- 기타 정량 성과
- 언론 홍보 1건 (KBS 다큐 3부작 '빙하' 2부에 연구 내용 소개)

라. 대외기여도

기여항목 및 기술명	기여형태
남극 멜버른, 리트만 화산 지열 생태계 대상 유전체 기반 미생물 특성 연구	미지의 생태계로 남아 있는 남극의 두 화산 지열 생태계를 이루는 미생물들의 유전체 특성 및 생태적 기능에 대한 이해에 기여

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 역사적으로 새로운 항생제, 치료제 발견이나 바이오 산업적으로 유용한 물질들은 미지의 생태계를 탐색하는 과정에서 발견된 사례가 많았음. 본 과제 연구지역인 남극 내륙 지열 사이트는 미지의 생태계로 남아 있어 의약학, 바이오 산업적으로 큰 잠재력을 가지고 있기에 생물/유전자원확보의 차원에서 연구개발을 수행할 필요가 있음. 실제로 에레부스 화산에서 분리된 세균 배양체로부터 얻어진 단백질 분해효소가 상용화된 사례가 있음. 따라서, 기 확보된 균주들은 향후 색소, 이차대사물, 효소활성 등 생리활성 스크리닝 진행으로 유용물질 개발에 활용 예정
- 남극 내륙 화산지대의 지열 사이트는 기존에 알려지지 않은 미지의 생물들이 서식하는 매우 특수한 형태의 생태계로서 생물상과 유전정보 조사를 통해 얻어진 연구 결과를 적극 홍보하여 극지에 대한 국민적 관심을 불러일으킬 수 있음
- 빙하지대에 발생하는 화산활동(glaciovolcanism)은 화성이나 유로파와 같은 태양계 행성, 위성들에서도 유사하게 나타나는 현상임. 본 과제를 통해 얻어질 남극 빙하 화산의 지열 생태계 연구 결과는 향후 외계 생명체 탐사와 같은 국가 차원의 중장기 우주 정책 수립에 기초자료로 활용될 수 있음
- 메타지놈을 통해 획득된 고순도 미생물 유전체 서열들은 향후 지열 사이트 고유종들의 진화 분석에 활용 예정임. 또한, 본 과제 결과물들을 바탕으로 향후 화산/지질/지열생태계를 융합한 다학제적 연구사업 개발에 기초 자료로 활용 예정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- Park, M., Choe, Y. H., & Kim, M. (2021). Soil Metagenome Sequences from a Geothermal Site at Mount Melbourne in Antarctica. *Microbiology Resource Announcements*, 10(10), 10-1128.
- Herbold, C. W., McDonald, I. R. & Cary, S. C. Microbial Ecology of Geothermal Habitats in Antarctica. In *Antarctic Terrestrial Microbiology* (ed. Cowan, D.) 181-215 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2014).
- Hudson, J. A. & Daniel, R. M. Enumeration of thermophilic heterotrophs in geothermally heated soils from Mount Erebus, Ross Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 622-624 (1988).
- Nicolaus, B. et al. "Bacillus thermoantarcticus" sp. nov., from Mount Melbourne, Antarctica: a novel thermophilic species. *Polar Biol.* 16, 101-104 (1996).
- Nicolaus, B. et al. Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. *Polar Biol.* 19, 133-141 (1998).

- Allan, R. et al. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovens* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1039–1050 (2005).
- Soo, R. M., Wood, S. A., Grzymski, J. J., McDonald, I. R. & Cary, S. C. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. *Environ. Microbiol.* 11, 715–728 (2009).
- Vicente, J., de Celis, M., Alonso, A., Marquina, D. & Santos, A. Microbial Communities Present in Hydrothermal Sediments from Deception Island, Antarctica. *Microorganisms*. 9, 1631 (2021).
- Noell, S. E. et al. Antarctic geothermal soils exhibit an absence of regional habitat generalist microorganisms. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.06.06.597824> (2024).
- Noell, S. E., Baptista, M. S., Smith, E., McDonald, I. R., Lee, C. K., Stott, M. B., Cary, S. C. (2022). Unique geothermal chemistry shapes microbial communities on Mt. Erebus, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 13, 836943.
- Bendia, A. G. et al. A mosaic of geothermal and marine features shapes microbial community structure on deception Island Volcano, Antarctica. *Front. Microbiol.* 9, 899 (2018).
- Herbold, C. W., Lee, C. K., McDonald, I. R. & Cary, S. C. Evidence of global-scale aeolian dispersal and endemism in isolated geothermal microbial communities of Antarctica. *Nat. Commun.*, 5, 3875 (2014).
- Kim, C. Y., Ma, J. & Lee, I. HiFi metagenomic sequencing enables assembly of accurate and complete genomes from human gut microbiota. *Nat. Commun.* 13, 6367 (2022).
- Bargagli, R., Broady, P. & Walton, D. Preliminary investigation of the thermal biosystem of Mount Rittmann fumaroles (northern Victoria Land, Antarctica). *Antarct. Sci.* 8, 121–126 (1996).
- Fraser, C. I., Connell, L., Lee, C. K., & Cary, S. C. (2018). Evidence of plant and animal communities at exposed and subglacial (cave) geothermal sites in Antarctica. *Polar Biology*, 41, 417–421.
- Vickers, C. J., Herbold, C. W., Cary, S. C., & McDonald, I. R. (2016). Insights into the metabolism of the high temperature microbial community of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. *Antarctic Science*, 28(4), 241–249.
- Broady, P.A. (1984) Taxonomic and ecological investigations of algae on steam-warmed soil on Mount Erebus, Ross Island, Antarctica. *Phycologia* 23: 257 - 271.
- Broady, P., Given, D., Greenfield, L., and Thompson, K. (1987) The biota and environment of fumaroles on Mt Melbourne, northern Victoria Land. *Polar Biol* 7: 97 - 113.
- Coolbear, T., Whittaker, J. M., & Daniel, R. M. (1992). The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA. 1. *Biochemical Journal*, 287(2), 367–374.
- Myeong, N. R., Choe, Y. H., Shin, S. C., Kim, J., Sul, W. J., & Kim, M. (2024). Genomic profiling of Antarctic geothermal microbiomes using long-read, Hi-C, and single-cell techniques. *Scientific data*, 11(1), 1023.

발표자 (과제유형)	평가의견
김민철 책임연구원 (Seed형 선행과제)	과제명: 남극 펠머른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성 및 유전체 특성 연구
	○ 성과활용 방안 및 기대효과 - 남극 빙저 화산을 남극연구계에서 주목받고 있는 연구주제임 - 남극 현장탐사의 어려움에도 우수한 성과를 달성함 - 더 규모가 큰 과제로 발전할 가능성이 높음 - 정량성과가 미비한데 이는 아마도 현장 참사의 어려움 때문으로 여겨짐 - 정량 성과가 데이터 저널에 게재한 내용이어서 과학적인 오리지널리티를 증빙할 수 있는 논문 성과 추진 필요 - 기확보한 미생물 및 유전자원의 유용성 또는 위해성 파악이 필요함 - 논문 및 학술 발표를 통해 남극 지열 생태계의 생지화학적 특성 이해에 기여할 수 있을 것으로 기대함 - 본 과제를 바탕으로 화산/지질-생태계를 연계하는 다학제적 연구사업 추진의 필요성 제시 - 남극 화산 지열 생태계에 대한 향후 연구에 기초자료로 활용할 수 있을 것 같음 ○ 최종보고서에 반영할 내용 - 성과의 활용 방안이 본 연구의 구체적 결과에 근거하기보다는 일반적인 사항에 대해 기술하고 있어 보완이 필요해 보임. 예를 들면 아래 사항들에 대한 활용 계획이 보완될 수 있음 1) 본 과제의 결과 확보된 균주의 활용 방안 2) 배양체가 획득되지 않았으나 메타지놈 분석을 통해 얻어진 유전 정보의 활용 방안 3) 지열 환경 특성에 따른 생물 다양성 차이와 해당 환경이 군집 구조나 진화와 관련한 연구 개발을 위한 활용 방안 등 - 지열관측 등 현장탐사 자료에 나타난 연구지역의 지열생태계 환경에 대한 특성을 자세히 기술할 것 - 일반적인 남극 고산 노출지 생태계에서 나타나는 대조군들과의 비교가 필요한 지? - 본 과제는 극지연구 주제 발굴을 위한 seed형 과제이므로 연구 결과에 따른 활용 방안을 구체적으로 작성하여 보완하고 향후 연구개발 기획에 활용할 수 있도록 함 - 확보 시료에 관한 자세한 정보 제공 (펠머른 화산 유래, 리트만 화산 유래, 형태, 양, 주변 환경에 관한 내용 등) - 요약문에 펠머른 화산과 리트만 화산 지열 생태계 사이의 차이점이 보다 명확하게 기술되면 좋을 것 같음. 그리고 Deception Island와 Mt. Erebus 지열 생태계와 비교했을 때 차이점이 있다면 함께 기술하면 좋을 것 같음 ○ 기타 종합의견 - 정량 성과가 데이터 저널에 게재한 내용이어서 과학적인 오리지널리티를 증빙할 수 있는 논문 성과 추진 필요 - 향후 연구에서는 각 화산들의 지질학적/광물학적/토양학적/지열환경적 차이 등 다학제적/협력 연구 필요성 고려 요망 - 남극 현장과 국내외 어려운 상황에서 연구 수행에 어려움이 많았으나, 환경 변화에 적절히 대응하여 남극 시료 확보와 고품질의 분석 자료를 성실히 획득 하였음. 이러한 노력이 결실을 맺을 수 있도록 후속 논문 작성과 관련 추가 연구가 진행될 수 있도록 노력할 필요 있음

- 향후 추가 시료 확보 계획을 언급했는데, 비전공자가 아닌 연구자의 현장 방문이 꼭 필요할 것으로 보임
- 남극의 지열지역은 모두 남극특별보호구역(ASPA)로 관리하고 있으므로, 최신 관리계획 숙지 후 활동이 필요함. 본 과제 의 연구 현장인 ASPA 175의 관리계획은 2024년 개정되었으며, 고유 미생물상 보존을 위해 연구자에 의한 교란을 최소화할 수 있도록 개정되었음
- 입남극에 관한 불확실성으로 시료 채취에 어려움이 많았음에도 일부 미생물을 분리하고 확보하였음
- 확보한 미생물의 특성을 면밀히 파악하여 연구결과를 발표하고, 향후 응용 가능성도 제시하기 바람
- 토양 시료의 경우 금지품수입허가 신청 필요 여부를 확인하기 바람
- 현장 관측 제약에도 불구하고 좋은 연구 성과를 내신 것으로 생각됨. 연구 결과를 정리해서 논문으로 출판하면 좋을 것 같음



연구·정책지원사업 최종 결과보고서 평가의견 반영사항

과제 구분	(Seed형 선행과제)		
과제명	남극 펠버른 화산과 리트만 화산 지열 생태계의 생물 종 다양성 및 유전체 특성 연구 (계정번호: PE24460)	연구기간	2022.07.01. ~ 2024.12.31.
연구책임자	김민철	연구비(직접비)	300,000 천원

과제개요, 연구성과 및 최종 결과보고서 평가의견 반영 사항

(1) 과제목적

◦ 남극 북빅토리아랜드에 위치한 펠버른 화산과 리트만 화산의 지열 지대 조사를 통한 지열 생태계의 생물 종 다양성, 유전체, 기능 특성에 대한 종합적인 이해

(2) 최종성과

◦ HiFi 및 Hi-C 시퀀싱 성공적으로 수행을 통해 single contig로 이루어진 총 76개의 complete metagenome-assembled genomes(cMAG) 획득. 유전체 50% 이상은 새로운 속으로 미지의 지열 생태계 확인. 80%이상의 미생물 유전체에서 CO, H2 산화 대사경로 우점 확인

◦ 펠버른 vs. 리트만 화산의 지열 마이크로바이옴은 유전체 단위에서 해당 화산지역에 국한된 고유종과 regional habitat generalist 모두 존재하는 것으로 확인됨

(3) 성과의 향후 연구소 활용방안 또는 기대효과

◦ 그동안 과학적 가치에 비해 연구가 미비했던 펠버른, 리트만 화산의 지열 사이트 내 생태계를 구성하는 미지의 생물 종 다양성 및 유전정보 획득을 통해 남극 연구 선진국에 견줄 수 있는 과학적 성과로 기여

◦ 역사적으로 새로운 항생제나 유용물질 등의 발견은 미개척지 및 극한 조건에 서식하는 생물들로부터 유래된 사례가 많기에 본 과제에서 새롭게 발견된 생물 종들과 유전체 정보들은 향후 새로운 유용물질 개발(신규 항생물질, 생물 계면활성제 등)에 활용 가능한 잠재력을 지님

(4) 최종 결과보고서에 평가의견 반영 사항

평가의견	반영사항	비고
- 성과의 활용 방안이 본 연구의 구체적인 결과에 근거하기보다는 일반적인 사항에 대해 기술하고 있어 보완이 필요해 보임. 예를 들면 아래 사항들에 대한 활용 계획이 보완될 수 있음 1) 본 과제의 결과 확보된 균주의 활용 방안 2) 배양체가 획득되지 않았으나 메타지놈 분석을 통해 얻어진 유전 정보의 활용 방안 3) 지열 환경 특성에 따른 생물 다양성 차이와 해당 환경이 군집 구조나 진화와 관련한 연구개발을 위한 활용 방안 등	- 확보된 균주들에 대한 색소, 대사체, 효소활성 등 생리활성 스크리닝 진행으로 활용 예정 - 메타지놈을 통해 획득된 고순도 미생물 유전체는 지열 사이트 고유종의 진화 분석에 활용 예정임. 향후 화산/지열/지열생태계 융합의 다학제적 연구사업 개발에 기초 자료로 활용 예정 - 위 두 사례에 대한 내용을 활용계획에 추가함	연구보고서 p.42 참조
지열관측 등 현장탐사 자료에 나타난 연구지역의 지열생태계 환경에 대한 특성을 자세히 기술할 것. 확보 시료에 관한 자세한 정보 제공 (멜버른 화산 유래, 리트만 화산 유래, 형태, 양, 주변 환경에 관한 내용 등)	지열환경의 온/습도 관측은 멜버른 한 곳만 성공한 관계로 이 부분만 자세히 반영됨. 시료가 확보된 주변 환경에 대한 내용은 다양한 현장 사진들과 함께 관련 내용을 기술함. 시료들의 생지화학적 특성은 '다. 지열 사이트 토양 생지화학적 특성 분석'에 자세히 기술됨	연구보고서 p.13-19, 34-36 참조
일반적인 남극 고산 노출지 생태계에서 나타나는 대조군들과의 비교가 필요한 지?	지열 사이트와 극저온에 노출된 남극 고산 환경과의 비교는 본 과제의 범위를 넘어서는 것으로 판단됨. 향후 미생물의 원거리 이동과 관련한 주제로 서로 비교한다면 흥미로운 결과 도출이 예상됨	
본 과제는 극지연구 주제 발굴을 위한 seed형 과제이므로 연구 결과에 따른 활용 방안을 구체적으로 작성하여 보완하고 향후 연구개발 기획에 활용할 수 있도록 함	연구개발결과의 활용계획에 산업적/의약학적 활용, 우주생물학 관점의 활용가능성을 제시함	연구보고서 p.42 참조
요약문에 멜버른 화산과 리트만 화산 지열 생태계 사이의 차이점이 보다 명확하게 기술되면 좋을 것 같음. 그리고 Deception Island와 Mt. Erebus 지열 생태계와 비교했을 때 차이점이 있다면 함께 기술하면 좋을 것 같음	요약문 내 연구개발결과에 두 화산 생태계의 차이를 명확히 언급함. Deception Island와 Mt. Erebus 지열 생태계의 경우 시료는 확보가 되었지만 유전체 분석은 이루어지지 않음. 이 부분은 향후 후속과제에서 다뤄질 예정임	연구보고서 p.6 참조

※본 양식은 필요시 작성하여 최종결과보고서에 포함하여 제출

(국내 과제용)

주 의

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