

BSPE99761-12206-3

식물플랑크톤 성장연관 세균군집의 구조 및
생리활성 연구

Studies on structure and physiological activity of the
phytoplankton-associated bacterial community

2020.02.28

한 국 해 양 과 학 기 술 원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “식물플랑크톤 성장연관 세균군집의 구조 및 생리활성 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 02. 28

총괄연구책임자 : 박 범 수

참여연구원 : 김 진 호

보고서 초록

과제고유 번호	PE99761	해당단계 연구기간	2019.06.01. - 2019.12.31.	단계 구분	해당없음
연구사업명	중사업명	미래선도사업			
	세부사업명	주요사업(신진·중견연구자 및 창의적 아이디어 지원)			
연구과제명	대과제명	신진연구자의 연구기반 구축 및 창의적 아이디어 지원			
	세부과제명	식물플랑크톤 성장연관 세균군집의 구조 및 생리활성 연구			
연구책임자	박범수	해당단계 참여연구원수	총 : 2명 내부: 1명 외부: 1명	해당단계 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 2명 내부: 1명 외부: 1명	총 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 해양생태연구센터		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약				보고서 면수	
<p>1. 식물플랑크톤 배양주 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 식물플랑크톤 규조류 (<i>Cosinodiscus granii</i>, <i>Cylindrotheca closterium</i>, <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>), 및 와편모조류(<i>Alexandrium catenella</i>, <i>A. pacificum</i>, <i>Gymnodinium catenatum</i>) 배양주 확보 및 최적성장조건하에서 배양 <p>2. 식물플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ NGS 분석 결과, Alpha-, Gamma-proteobacteria, Flavobacteria가 우점 분류군이었으며, Cluster 및 통계 분석 결과 식물플랑크톤 분류군 별 세균군집구조의 확연한 차이가 나타남 <p>3. 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 생리활성 비교 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 식물플랑크톤 세포수가 증가함에 따라, 세균군집의 효소활성이 증가하였음 ○ 생물정보학적 분석 결과, 식물플랑크톤 배양주내 세균군집은 amino acid와 carbohydrate metabolism관 연관된 유전자가 높은 비율을 차지하는 것으로 예측되었으며, 식물플랑크톤 분류군별 세균군집 차이로 인한 신진대사 유전자 비율의 유의적인 차이는 나타나지 않음 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	식물플랑크톤; 세균; 상호관계; 메타지놈; 세균군집의 생리활성			
	영 어	Phytoplankton; Bacteria; Interaction; Metagenome; Metabolism			

요 약 문

I. 제 목

- 식물플랑크톤 성장연관 세균군집의 구조 및 생리활성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 식물플랑크톤 분류군별 성장연관 세균군집 구조 및 생리적 특성을 규명함으로써, 해양환경변화로 인한 세균군집의 구조 및 기능 변화가 식물플랑크톤 군집에 미치는 영향을 이해하고자 함

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 식물플랑크톤 배양주 확보
 - 각각의 식물플랑크톤 종에 대해서 최소 2개 이상의 배양주 확보
 - 분리된 식물플랑크톤의 최적 배양조건 탐색
2. 식물플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석
 - 각 배양주의 성장단계별 세균 군집구조를 NGS(next generation sequencing)방법을 이용하여 조사
 - 생물정보학적 분석기법을 활용하여, 식물플랑크톤 종별 혹은 분류군별 세균군집 구조 차이 조사
3. 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 생리활성 비교 분석
 - 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 신진대사 및 효소활성 비교 분석
 - 배양주의 성장단계별 세균군집의 신진대사 및 효소활성 변화 조사

IV. 연구개발결과

1. 식물플랑크톤 배양주 확보

- 식물플랑크톤 구조류(3종) 및 와편모조류(3종) 배양주 확보 및 최적성장 조건하에서 배양

2. 식물플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석

- NGS 분석 결과, Alpha-, Gamma-proteobacteria, Flavobacteria가 우점분류군이었으며, UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean), PCoA(Principal coordinates analysis)분석 결과 식물플랑크톤 분류군 별 세균군집구조의 차이가 나타남

3. 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 생리활성 비교 분석

- 식물플랑크톤 세포수가 증가함에 따라, 세균군집의 모든 효소활성은 증가하였음
- PICRUSt(Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)분석 결과, 식물플랑크톤 배양주내 세균군집은 amino acid와 carbohydrate metabolism관 연관된 유전자가 높은 비율을 차지하는 것으로 예측되었으며, 식물플랑크톤 분류군별 세균군집 차이로 인한 신진대사 유전자 비율의 유의적인 차이는 나타나지 않음

V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구를 통해 새로운 가설 및 지식의 축적으로 인해 해양생물과학 분야의 학문·기술발전이 기대됨
- 본 연구로 습득된 지식은 향후 응용연구를 통해 국가경제 및 산업발전에 미치는 파급효과는 매우 광범위할 것으로 기대됨
- 본 연구를 통해 축적된 지식은 효율적인 생태계 자원의 관리, 보호 및 복원을 가능하게 함으로써 사회적 측면에서도 중요성을 가지고 있음

(핵심어: 식물플랑크톤, 세균, 상호관계, 메타지놈, 세균군집의 생리활성)

S U M M A R Y

I. Title

- Studies on structure and physiological activity of the phytoplankton-associated bacterial community

II. Objective and Necessity of the study

- To understand the effect of change in bacterial community structure and function on phytoplankton communities, we characterized structure and function of bacterial communities which are associated with each phytoplankton taxa.

III. Contents and Scope of the study

1. Obtaining of phytoplankton cultures

- Obtaining two cultures for each phytoplankton species
- Screening the optimum culture condition for phytoplankton

2. Analysis of phytoplankton-associated bacterial community structure depending on phytoplankton taxa

- Investigation of bacterial community structure in phytoplankton culture at three different growth stages using a NGS (next generation sequencing) method
- Investigation of difference in phytoplankton-associated bacteria community structure depending on phytoplankton taxa using a bio-informatics tool

3. Comparison of physiological activities of bacterial communities in different phytoplankton cultures
 - Comparison metabolism and enzymatic activities of bacterial communities in different phytoplankton cultures at three different growth stages

IV. Results

1. Obtaining of phytoplankton cultures
 - Obtaining of cultures for diatoms(3 species) and dinoflagellates(3 species), and incubation these cultures under an optimum condition
2. Analysis of phytoplankton-associated bacterial community structure depending on phytoplankton taxa
 - As a result of NGS analysis, Alpha-, Gamma-proteobacteria, and Flavobacteria were dominant bacterial taxa in all phytoplanktin cultures.
 - As a result of UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean) and PCoA(Principal coordinates analysis) analyses, there was a clear difference in bacterial community composition depending on phytoplankton taxa (diatoms vs dinoflagellates).
3. Comparison of physiological activities of bacterial communities in different phytoplankton cultures
 - Enzymatic activities were enhanced according to increase in cell number of phytoplankton
 - As a result of PICRUSt(Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) analysis, functional genes regarding to amino acid and carbohydrate metabolism were commonly the highest proportion in bacterial communities in phytoplankton cultures

V. Application Plans of the results

○This study would provide (1) new theory/knowledge, allowing to better understand marine biology research area, (2) advance in national economy and industries through applicable research in future, and (3) new techniques for management, protection, and restoration of ecological resources

(Keywords : Phytoplankton; Bacteria; Interaction; Metagenome; Metabolism)

C O N T E N T S

Summary.....	5
Contents.....	8
Chapter 1. Introduction.....	10
Session 1. Necessities of the study.....	10
Session 2. Importance of the study.....	12
Session 3. Objectives and contents of the study.....	13
Session 4. Creativity, Innovation, and Challenge of the study.....	15
Chapter 2. Domestic and International Research Trends.....	16
Chapter 3. Results of the study.....	17
Session 1. Necessities of the study.....	17
Session 2. Importance of the study.....	17
Session 3. Objectives and contents of the study.....	22
Chapter 4. Achievements of Objectives and Outcomes.....	25
Chapter 5. Application Plan of the Results of the Study.....	27
Chapter 6. References.....	28

목 차

요약문.....	3
Summary (영문요약문).....	5
Contents (영문목차).....	8
목차.....	9
제 1 장 서론.....	10
제 1 절 연구개발의 필요성.....	10
제 2 절 연구개발의 중요성.....	12
제 3 절 연구개발의 목표 및 내용.....	13
제 4 절 연구개발의 창의성·혁신성·도전성 등.....	15
제 2 장 국내외 연구동향.....	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	17
제 1 절 식물플랑크톤의 분류군별 배양주 확보.....	17
제 2 절 식물플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석.....	17
제 3 절 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 생리활성 비교 분석.....	22
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도.....	25
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	27
제 6 장 참고문헌.....	28

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 필요성

- 해양생태계는 지구의 탄소 순환 및 에너지 흐름에서 매우 큰 비중을 차지하는 매우 중요한 생태적 역할을 수행함(Falkowski, 2012)
- 1900년대 중·후반 이후 화석연료 사용 증가와 이를 기반으로 하는 산업의 고도화는 전지구적인 환경변화(예, 지구온난화, 부영양화)를 야기하였으며, 이로 인한 해양 생태계 교란은 점차적으로 심각해지는 추세임(Anderson et al., 2012)
- 따라서, 수많은 학자들은 현재 인류가 공통적으로 직면하고 있으며, 지속적으로 발생하고 있는 지구 온난화, 연안의 부영양화 같은 환경 변화가 해양생태계의 기능(예, 탄소 순환 및 에너지 흐름)을 어떻게 변화 시킬지에 대한 과학적 관심도가 매우 높음
- 식물플랑크톤은 지구의 모든 광합성 가능한 생물들 중 1%(생물량, biomass)에도 못 미치지만, 총 일차생산력(primary production) 중 절반 정도를 담당하는 매우 중요한 생태적 역할을 수행하고 있음(Falkowski, 2012)
- 따라서, 많은 과학자들은 생태적으로 중요한 식물플랑크톤 군집을 대상으로 연구함으로써, 지구 온난화 혹은 부영양화와 같은 환경변화가 해양생태계 기능에 미치는 영향을 조사하고, 이를 기반으로 미래의 해양생태계의 변화를 예측하고자 함

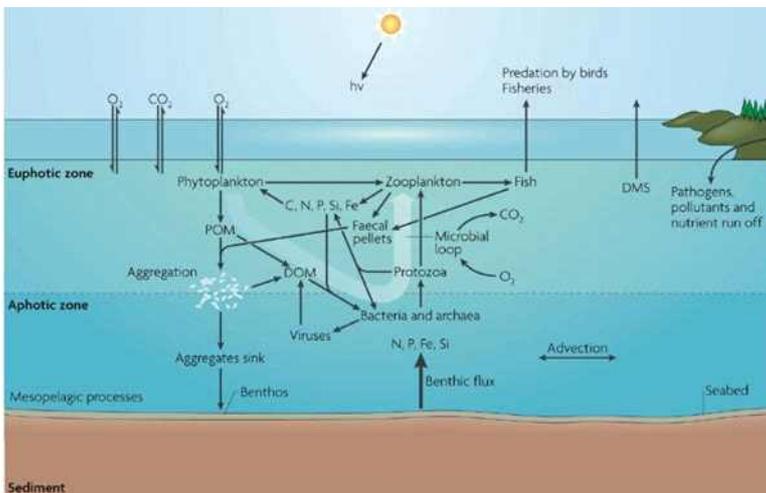


그림 1. 해양에서의 미소생태계 구조(Azam and Malfatti, 2007)

- 현재 이와 관련된 연구는 물리·화학적 환경요인의 변화가 식물플랑크톤 군집구조 및 다양성에 어떠한 영향을 미치는지를 분석하기 위한 실험위주로 수행되었음 (Barton et al., 2016; Hoegh-Guldberg and Bruno, 2010)
- 해양미소생태계(marine microbial ecosystem) 내에서 모든 생물군집들은 밀접한 생태적 상호관계(mutual interaction)를 가지고 있기 때문에(그림 1), 단순하게 하나의 생물군만을 대상으로 하는 단편적인 연구만으로는 실제 현장생태계 내에서 해양환경변화가 미칠 수 있는 영향을 정확하게 이해 및 예측하기에는 분명한 한계가 존재함
- Buchan et al. (2014)에 따르면, 세균(bacteria)과 식물플랑크톤은 생태적으로 매우 밀접한 상호관계를 가지고 있어, 세균 군집구조에 따라 식물플랑크톤 현존량 및 군집구조가 유의적으로 변할 수 있다는 가능성을 제시하였음
- 흥미로운 점은 세균 군집도 해양환경변화로 인해, 현존량 및 군집구조에 유의한 영향을 받는 사실이 널리 알려져 있으나(Vezzulli et al., 2012), 환경변화로 인한 세균군집의 변화가 식물플랑크톤에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 미비한 실정임
- 최근 급속도로 발달한 분자생물학적 기법(예, metagenomics)을 활용하여, 다수의 유해 식물플랑크톤 종의 성장과 연관된 세균군집구조에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 배양이 가능한 세균을 활용한 생리실험을 통해, 이들 두 생물군집의 기능적 상호관계에 대한 연구가 활발하게 수행되었음(Buchan et al., 2014)
- 그러나, 식물플랑크톤 성장연관 세균군집연구의 경우, 대부분 단일 종 혹은 단일 배양주 위주로 연구가 진행되어왔으며, 기능적 상호관계 역시, 배양이 가능한 일부 세균 종으로 대부분 연구가 진행되어 왔기 때문에, 기존의 연구결과만으로는 현장 생태계에서 두 생물군집간의 상호관계를 명확히 이해하는데는 한계가 존재함
- 따라서, 이러한 한계를 극복하기 위해서는 종수준이 보다 넓은 범위의 군집 수준에서의 연구가 필수적으로 요구됨
- 본 연구에서는 다양한 식물플랑크톤 분류군(예, 규조류, 와편모조류)의 성장과 연관 관계를 가지는 세균 군집구조를 메타지노믹스 연구방법을 활용하여 분석하고, 이들 세균 군집의 효소활성(enzymatic activity) 및 predictive functional profiling 조사를 통해 식물플랑크톤과 세균사이의 생태적 상호관계에 대한 이해를 증진시키고자함

제 2 절 연구개발의 중요성

○ 기초학문 발전을 통한 생태계 현상 이해

- 현재 전 지구적으로 발생하고 있는 전 지구적 환경변화(지구온난화)로 인해 발생하는 해양생태계 구조 및 기능변화는 인류의 삶과 매우 밀접하게 연관됨
- 그러나 현재, 연구는 각각의 생물군 별, 기후변화로 인한 해양의 물리적·화학적 변화에 따른 성장률 변화 같은 단편적인 연구에만 초점이 맞추어져 있음
- 그러나, 생태계 내에서 모든 생물들은 서로 밀접한 생태적 관계를 가지고 있기 때문에, 기존의 단편적인 연구로는 기후변화에 따른 생태계 구조 및 기능변화를 예측하는데 한계가 분명히 존재함
- 따라서, 생물군간의 상호작용(식물플랑크톤과 세균)에 대한 지식을 축적함으로써, 보다 정확하게 해양환경변화로 발생할 수 있는 식물플랑크톤 군집구조 및 기능 변화에 대한 이해가 가능함

○ 산업적 활용: 미세조류기반 바이오에너지분야

- 교토의정서에 의거하여, 세계 각국은 온실가스 배출량은 조절해야함에 따라, 화석연료의 사용은 줄이고, 청정에너지원 기술을 개발하기 위한 경쟁이 치열함
- 현재의 내연기관을 그대로 활용가능하다는 점 때문에, 과학적 관심이 매우 높은 바이오에너지분야에서, 식물플랑크톤은 차세대 바이오에너지원으로 인식되고 있음
- 실제로, 식물플랑크톤은 다른 생물(예, 옥수수)에 비해서, 생물량 대비 높은 지질함유량을 가지고 있어, 많은 과학자들이 차세대 바이오에너지원으로 개발하고 있으며, 보다 많은 생물량을 수확하기위해 다양한 방안이 연구되고 있음
- 최근, 공생세균을 활용한 바이오에너지원의 성장증진 방법은 집중적으로 연구되기 시작하였음
- 따라서, 본 연구결과를 통해, 식물플랑크톤과 세균사이의 연관관계에 대한 이해를 바탕으로 식물플랑크톤 성장을 빠르게 증진시킬 수 있는 최적의 세균을 분리 및 확보한다면, 이전보다 경제성을 높임으로써, 바이오에너지기술의 실용화를 앞당길 수 있을 것으로 판단됨

제 3 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 최종목표

구분	내용
최종목표	식물플랑크톤 분류군별 성장연관 세균군집 구조 및 생리적 특성을 규명함으로써, 해양환경변화로 인한 세균군집의 구조 및 기능 변화가 식물플랑크톤 군집에 미치는 영향을 이해하고자 함
최종목표 설정근거	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지구의 탄소순환에 큰 역할을 하는 식물플랑크톤은 생태적으로 매우 중요한 역할을 수행함 ○ 기후변화로 인한 해양환경변화는 식물플랑크톤의 군집 구조 및 기능변화를 유도함 ○ 세균군집은 식물플랑크톤과 매우 밀접한 생태적 상호관계 가지고 있으며, 해양환경변화로 인한 세균군집 및 생리적 특성변화는 식물플랑크톤 군집 구조 및 기능에도 중요한 영향을 미칠 수 있음 ○ 그러나, 아직까지 세균군집 구조 및 생리변화에 따른 식물플랑크톤 군집에 미치는 영향에 대한 연구는 전무한 실정임
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물플랑크톤 분류군별 배양주 확보 ○ 식물플랑크톤의 분류군별 성장연관 세균군집구조 분석 ○ 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 생리활성 비교 분석

2. 세부목표별 연구내용

가. 식물플랑크톤의 분류군별 배양주 확보

- 문헌조사를 기반으로, 한국 근해에서 우점하는 규조류 및 와편모조류를 각 3종씩 선정
- 현장시료에서 다양한 분리 방법(e.g. MPN(most probable number)법 혹은 capillary를 이용한 단일세포 분리법)을 활용하여, 대상 식물플랑크톤 배양주 확립 혹은 미세조류 은행으로부터 배양주 구입
- 분리된 식물플랑크톤의 최적 배양조건 탐색- 온도, 염분도, 광조건, 식물플랑크톤 배양배지(F/2, L1 배지)
- 보다 유의적인 연구결과(식물플랑크톤 종별 성장연관 세균군집구조 규명)를 확보하기 위해서, 각각의 식물플랑크톤 종에 대해서 최소 2개 이상의 배양주 확보
- 다른 시기 혹은 장소에서 채집된 시료에서 상기의 분리 및 배양방법을 통해 종별로 2개 이상의 배양주 확보

나. 식물플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석

- 식물플랑크톤 성장 연관 세균 군집을 조사하기 위해, 각 배양주의 성장단계별 세균 군집구조를 NGS(next generation sequencing)방법을 이용하여 조사
 - 광학현미경하에서 세포수 계수를 기반으로 성장 곡선을 구하여, 성장단계를 결정한 후, 각 성장단계별(e.g. log, exponential, stationary phase) 자유유영(free-living) 세균 군집을 포집 후, DNA를 추출
 - PCR을 이용하여, 대상 유전자 영역만을 증폭시킨 후, NGS 기법을 이용하여, 메타지놈 분석
- 생물정보학적 분석기법(e.g. Silva rRNA database, QIIME, CD-HIT-OTU software 등)을 활용하여, 식물플랑크톤 성장연관 세균군집구조를 동정하고, 분석된 데이터를 바탕으로

3. 추진전략·방법



그림 2. 연구개발 추진전략 및 방법

제 4 절 연구개발의 창의성·혁신성·도전성 등

- 기존의 대부분의 식물플랑크톤 연관 세균 군집에 대한 연구는 NGS기반의 메타지놈 분석을 통해, 특정 식물플랑크톤이 높은 현존량을 나타냈을 때, 함께 분포하는 세균 군집구조를 분석하는 1차적인 연구가 주를 이루었음
- 세균군집의 식물플랑크톤의 성장연관성을 증명하기 위해서는, 식물플랑크톤 성장에 유의한 영향을 미칠 수 있는 세균군집의 생리적/기능적 특성에 대한 규명이 필수적으로 요구됨에도 불구하고, 이에 대한 연구는 미비한 실정임
- 대부분의 연구가 특정 식물플랑크톤 한종의 성장연관 세균군집에 대한 연구가 주로 행해졌을 뿐 아니라, 배양주를 사용한 실험의 경우, 하나의 배양주만 사용해서, 분석된 세균군집이 식물플랑크톤 종과 연관성 여부를 판단하기에는 부족함이 존재함
- 본 연구에서는 이러한 한계점을 극복하기 위해, 한국근해에서 우점하는 두 분류군(규조류, 와편모조류)내 여러 종들의 다른 지역 혹은 시기에 분리된 2개 이상의 배양주를 확립한 후, 이들 식물플랑크톤 종 혹은 분류군에 따른 연관세균군집을 분석하고자 함
- 뿐만 아니라, 단순히 군집구조만을 분석하는 것이 아니라, 다양한 생물정보학적 분석 기법(PICRUSt, KEGG)을 활용하여, 이들의 신진대사를 예측하고, 실험을 통해 세균의 효소활성을 분석함으로써, 이들 세균이 어떻게 식물플랑크톤의 성장과 연관관계를 가지는 지에 대한 이해를 높이고자함

제 2 장 국내·외 연구동향

- 식물플랑크톤의 현존량 및 군집구조는 세균의 군집구조 및 생리와 매우 밀접하게 연결되어 있음이 국내외 연구진을 통해 증명되었음(그림 3, Buchan et al., 2014)
 - 식물플랑크톤은 세균의 주요먹이원인 dissolved organic carbon(DOC)와 particle organic carbon(POC) 및 복합 다당류(polysaccharide)를 제공 가능함
 - 세균 역시, 식물플랑크톤 성장에 필수적인 영양염류(질소, 인, 철, 비타민등)을 제공함으로써 공생관계를 형성 가능함
 - 일부 세균의 경우, 특정 식물플랑크톤의 성장을 저해하는 살조효과를 나타내기도함

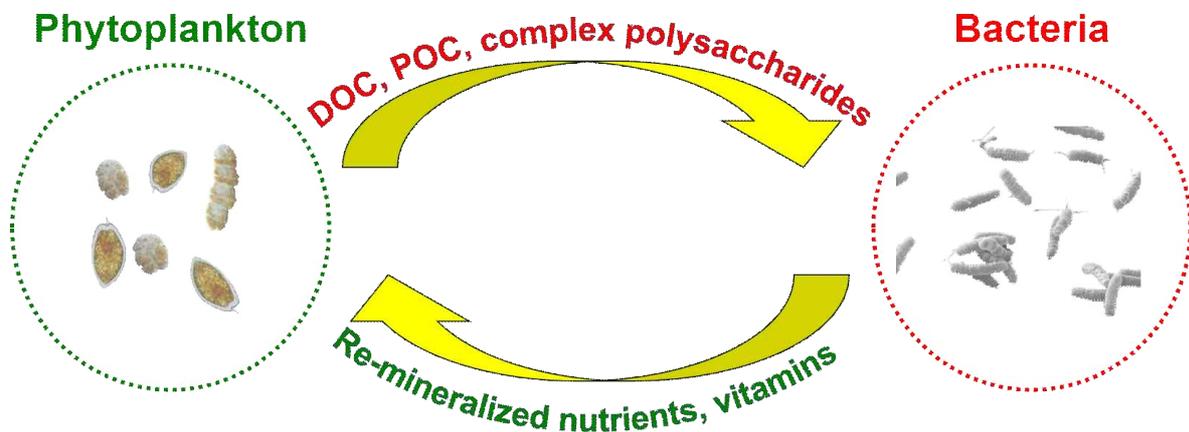


그림3. 식물플랑크톤과 세균의 상호관계

- 다양한 분자생물학적 기법을 활용하여, 특정 식물플랑크톤종의 성장과 연관된 세균 군집 구조가 다수의 국내외 연구진을 통해 수행됨
- 그러나 현재 대부분의 연구는 단순히 특정 식물플랑크톤의 생물 군집이 높은 현존량을 나타낼 때의 세균 군집구조를 분석하거나, 단일 종 혹은 단일 배양주를 기반으로 식물플랑크톤과 세균사이의 기능적 연관관계를 조사하는 등의 단편적인 연구위주로 수행됨
- 식물플랑크톤과 세균사이의 상호관계를 이해하기위한 한 단계 진보된 연구를 위해서는 군집수준에서 이들이 어떠한 기능적인 혹은 기능유전자를 가지고 있기 때문에, 연관관계를 가질 수 있는지에 대한 연구가 필수적으로 요구됨

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 식물플랑크톤의 분류군별 배양주 확보

- 규조류 3종(*Coscinodiscus granii*, *Cylindrotheca closterium*, *Pseudo-nitzschia pungens*), 와편모조류 3종(*Alexandrium catenella*, *A. pacificum*, *Gymnodinium catenatum*)을 본 과제의 연구대상종으로 선정
- 보다 유의적인 연구결과(식물플랑크톤 종별 성장연관 세균군집구조 규명)를 도출하기 위해서, 각각의 식물플랑크톤 종에 대해서 최소 2개 이상의 배양주 확보(표1) 및 최적 성장조건하에서 배양

표1. 본 연구에서 사용된 식물플랑크톤 배양주 정보

Taxa	Species	Strain number	Isolation date	Isolation location		
				Region	Latitude	Longitude
Diatom	<i>Coscinodiscus granii</i>	LIMS-PS-3273	June 25, 2018	Eastern coast	35° 36' 33.37" N	129° 36' 25.31" E
		LIMS-PS-3151	June 6, 2017	Southern coast	34° 59' 36.71" N	128° 40' 27.73" E
	<i>Cylindrotheca closterium</i>	LIMS-PS-3150	May 26, 2017	Southern coast	34° 59' 36.71" N	128° 40' 27.73" E
		LIMS-PS-3013	June 13, 2016	Western coast	37° 46' 25.69" N	126° 19' 2.27" E
	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	LIMS-PS-3189	August 3, 2017	Southern coast	34° 59' 36.71" N	128° 40' 27.73" E
		LIMS-PS-3248	May 18, 2017	Southern coast	34° 41' 34.50" N	127° 50' 27.60" E
Dinoflagellate	<i>Alexandrium catenella</i>	AC-1	March 5, 2019	Southern coast	35° 3' 5.40" N	128° 47' 7.80" E
		AC-2	August 29, 2017	Southern coast	34° 45' 9.20" N	128° 22' 46.70" E
	<i>Alexandrium pacificum</i>	AP-1	August 3, 2018	Southern coast	34° 59' 39.10" N	128° 40' 28.80" E
		AP-2	August 29, 2017	Southern coast	34° 45' 9.20" N	128° 22' 46.70" E
	<i>Gymnodinium catenatum</i>	GC-1	August 29, 2017	Southern coast	34° 45' 9.20" N	128° 22' 46.70" E
		GC-2	July 12, 2016	Southern coast	34° 42' 43.21" N	127° 40' 0.45" E

제 2 절 식물플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석

- 규조류 및 와편모조류 3종(각 종별 2개의 배양주)을 대상으로 클로로필 형광값 측정을 통해, 이들의 성장 곡선을 구함(그림 4)
 - 규조류는 접종 후 2일 이후, 지수성장기(exponential growth phase)에 도달하였으며, 7일 후에는 성장 안정기(stationary phase)에 도달하였음 이에 반해, 와편모조류의 경우, 접종 후 6일부터 지수성장을 시작하였으며, 24일 이후, 성장안정기에 도달함

- 성장단계별 세균 군집을 조사하기 위해, 성장유도기(lag growth phase), 지수성장기, 성장안정기때, size-fraction($3 \mu\text{m}$ 이하- $0.2 \mu\text{m}$ 이상)을 통해 자유유형 세균군집을 분리 하였으며, CTAB DNA extraction방법(Park et al. 2014)을 활용하여, 이들 세균군집의 DNA를 추출하였음
- 추출된 DNA를 대상으로, Illumina HiSeq기법을 활용하여, 염기서열을 분석한 결과, 다음과 같은 세균군집구조를 얻을 수 있었음

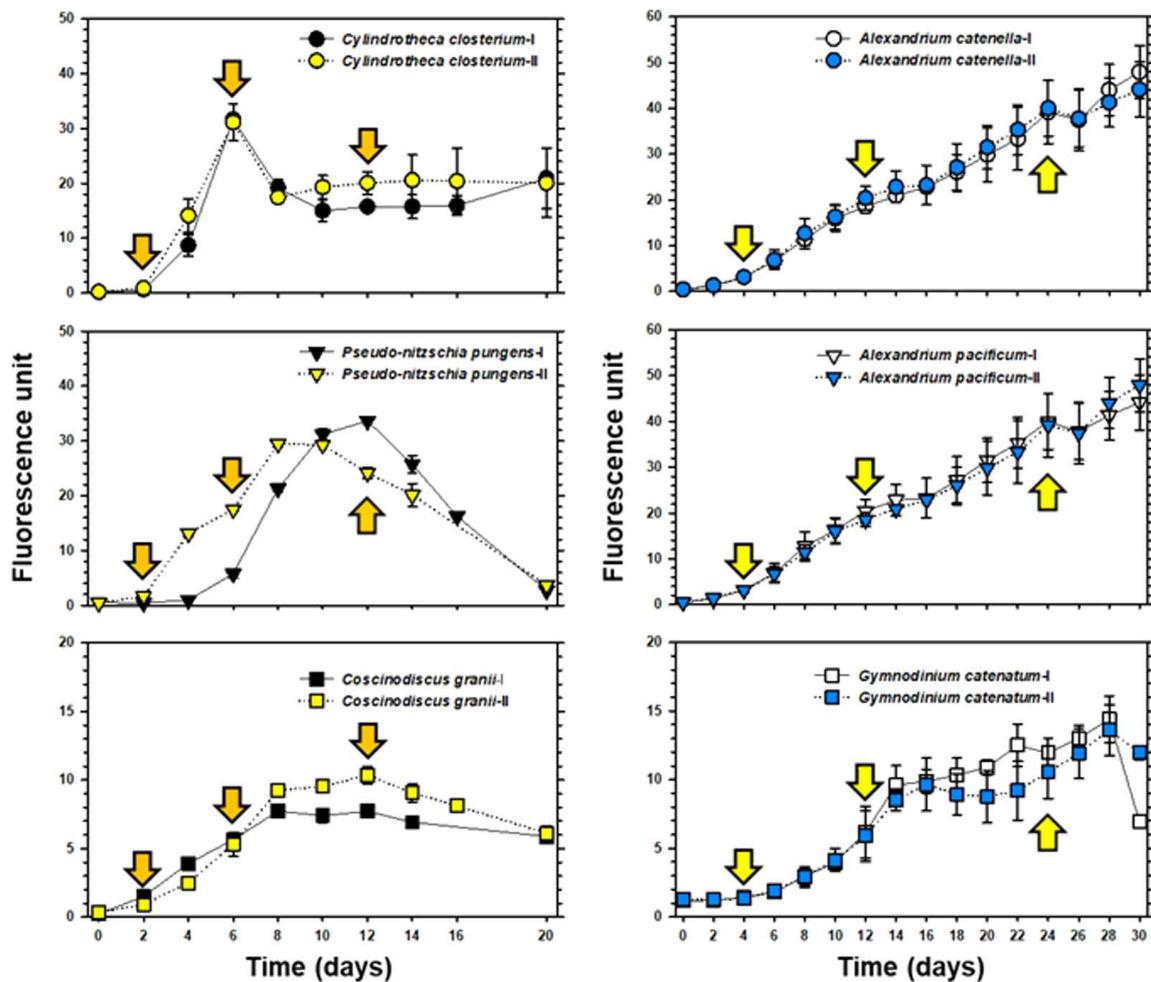


그림 4. 규조류(3종, 왼쪽)와 와편모조류(3종, 오른쪽) 배양주별 성장 곡선. 화살표는 자유유형 세균 군집을 분리한 시점

- 규조류에서는 Bacillii, Flavobacteria, Alpha-와 Gamma-proteobacteria가 우점하였으며, 와편모조류에서는 Cytophagia, Flavobacteria, Planctomycetia, Alpha-와 Gamma-proteobacteria가 우점하였음(그림 5, 6)

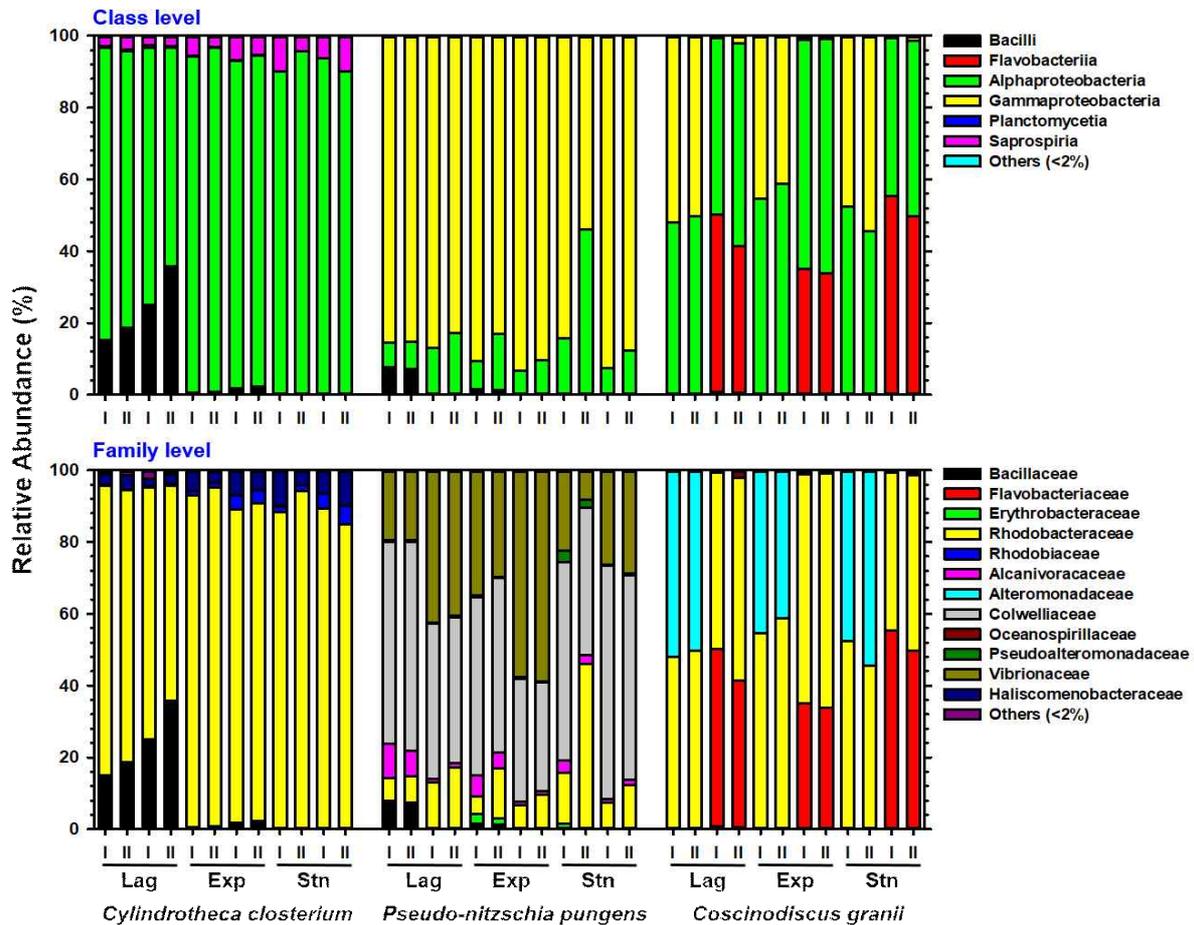


그림 5. 규조류 3종의 배양주 및 성장단계별 세균군집 구조(위:class수준, 밑:Family수준).

Lag, Exp, Stn은 각각 성장유도기, 지수성장기, 성장안정기를 의미함

- Family 수준에서는 규조류는 Bacillaceae, Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae, Colwelliaceae등이 주로 우점하였으며, 와편모조류에서는 Cytophagaceae, Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Rhodospirillaceae, Alteromonadaceae, Planctomycetaceae등이 주로 우점하였음(그림 5, 6)
- UPGMA분석 결과, 식물플랑크톤 종에 따른 세균군집 차이는 상대적으로 높게 나타낸 반면, 같은 종내에서는 배양주의 상관 없이 세균군집의 차이는 낮게 나타남(그림 7)
- 전반적으로 식물플랑크톤의 성장단계에 따른 세균군집구조는 변화하였으며, 특히 와편모조류는 배양주와 관계없이 성장단계별로 세균군집구조가 매우 강한 cluster를 형성하였음. 이는 와편모조류내 배양주내 세균군집은 와편모조류 각각의 종과 매우 밀접한 관계가 있음을 의미함(그림 7)

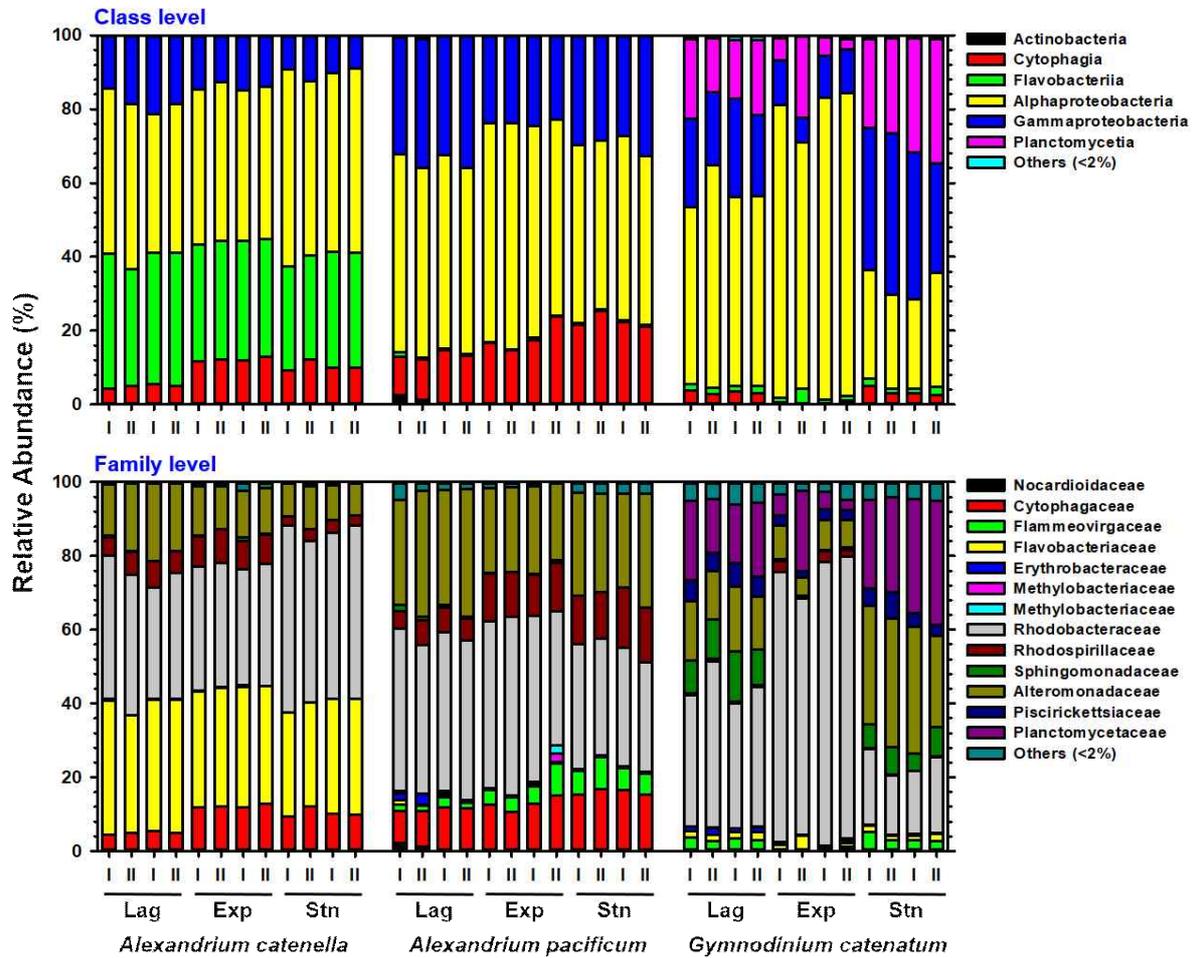


그림 6. 와편모조류 3종의 배양주 및 성장단계별 세균군집 구조(위: class수준, 밑: Family수준). Lag, Exp, Stn은 각각 성장유도기, 지수성장기, 성장안정기를 의미함

○ 흥미로운 사실은 다른 분류군과는 달리 Alphaproteobacteria 분류군내 세균군집구조로 UPGMA 및 PCoA 분석을 수행했을 때, 규조류와 와편모조류내 세균군집의 차이가 뚜렷이 나타남(그림 8). 이는 Alphaproteobacteria 분류군내 세균군집이 식물플랑크톤 종, 분류군(규조류 vs 와편모조류)별로 특이적으로 군집조성이 형성된다는 것을 알 수 있었음

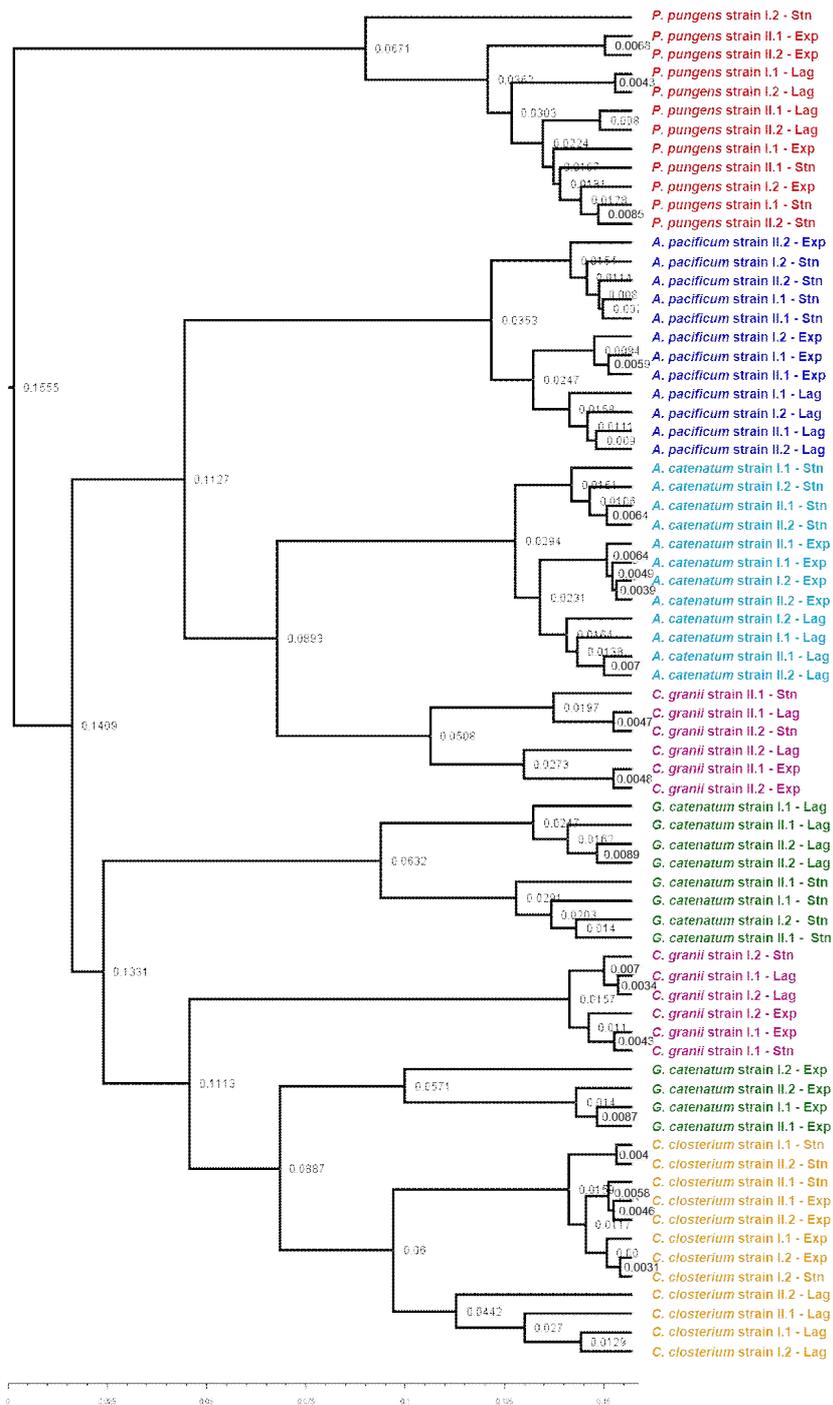


그림 7. UPGMA분석을 활용한 식물플랑크톤의 종, 배양주, 성장단계별 세균군집구조 비교분석. Lag, Exp, Stn은 각각 식물플랑크톤의 성장유도기, 지수성장기, 성장안정기를 의미함

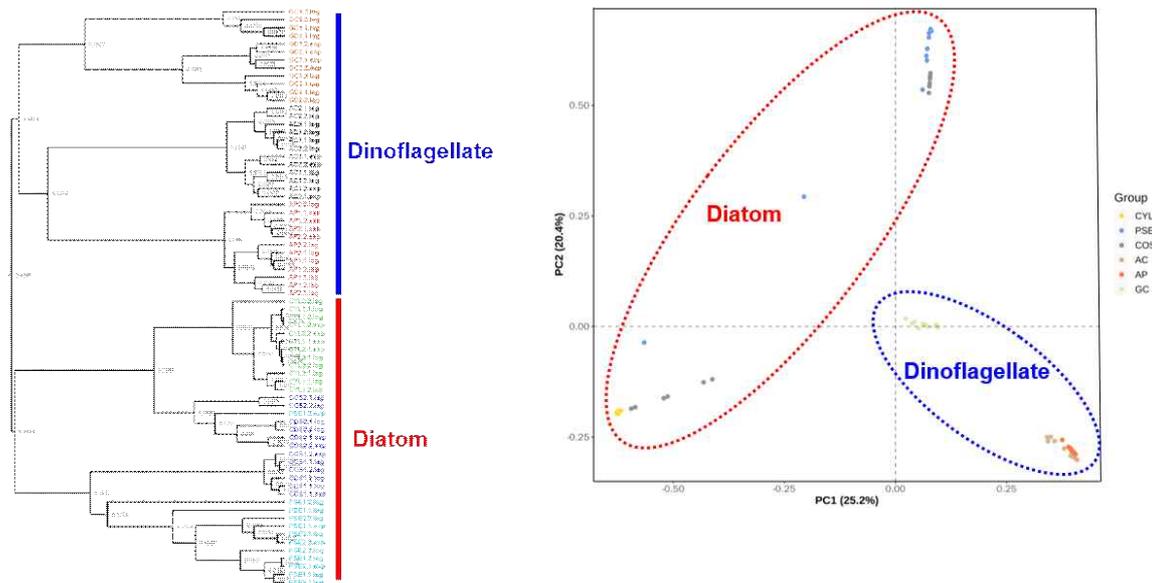


그림 8. Cluster 분석기법(좌: UPGMA, 우:PCoA)을 활용한 식물플랑크톤의 종, 배양주, 성장단계별 출현하는 세균군집 중 Alaphroteobacteria(class)분류군에 속하는 종들의 조성비교분석

제 3 절 식물플랑크톤 분류군별 세균 군집의 생리활성 비교 분석

- 와편모조류인 *Prorocentrum minumum*과 *P. texanum* 배양주를 활용하여, 각각의 성장단계별 자유유형 세균들의 효소활성을 분석한 결과, 와편모조류의 세포수가 증가함에 따라 전반적으로 조사된 모든 효소들(aminopeptidase, glucosidase, lipase, phosphatase)의 활성이 증가하는 경향을 나타냄 (그림 9)
- PICRUSt(Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)을 활용하여, 식물플랑크톤 배양주내 세균군집의 예측되는 기능을 profile한 결과, metabolism 기능과 연관된 유전자 비율이 가장 높은 비율로 나타났으며(그림 10위), metabolism내에서는 amino acid와 carbohydrate metabolism 관련 유전자가 높은 비율로 나타남 (그림 10아래)

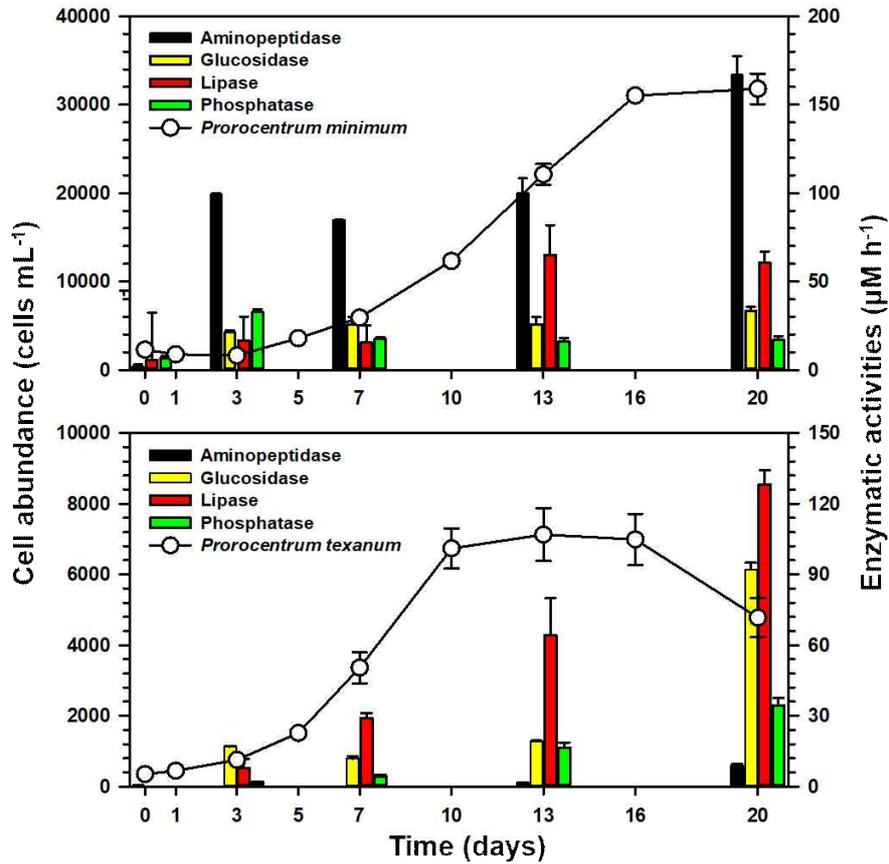


그림 9. 와편모조류 *Prorocentrum minimum*(위)과 *P. texanum*(아래)의 세포수 및 자유유영 세균의 4가지 효소(aminopeptidase, glucosidase, lipase, phosphatase) 활성 변화

- 본 연구결과에서는 식물플랑크톤의 종/성장단계에 따른 세균군집의 예측되는 기능의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으나, 향후 추가적으로 보다 면밀한 분석(혹은 실험)을 통해서 식물플랑크톤과 종/성장단계별 세균군집과의 기능적 연결고리 규명이 요구됨

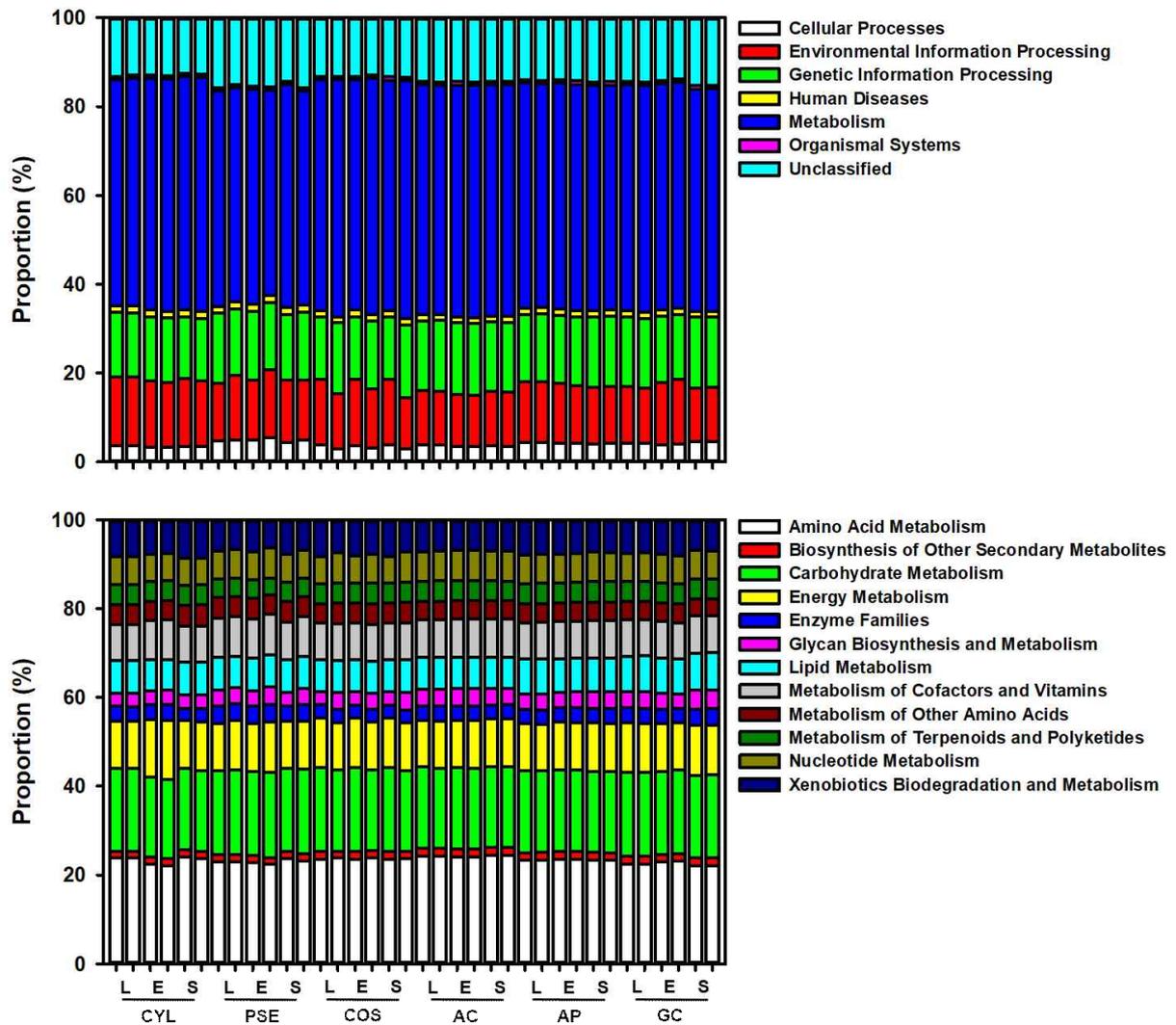


그림 10. PICRUSt분석을 활용한 식물플랑크톤 배양주내 세균군집의 예측기능(predictive functional profile): 전체(위), Metabolism내(아래). CYL, PSE, COS, AC, AP, GC는 *Cy. closterium*, *P. pungens*, *C. granii*, *A. catenella*, *A. pacificum*, *G. catenatum*을 의미함 L, E, S는 각각 성장유도기, 지수성장기, 성장안정기를 의미함

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 목표달성도

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)				
연차별 달성내용				연차별 계획대비 연구실적 달성율 (%)
성과목표	연구내용	가 중 치	달성실적	
1. 식물 플랑크톤의 분류군별 배양주 확보	1-1. 현장시료에서 다양한 분리 방법을 활용하여, 한국 근해에서 우점하는 규조류 및 와편모조류의 배양주 확립 혹은 미세조류 은행으로부터 배양주 구입	0.1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물플랑크톤 규조류 (<i>C. granii</i>, <i>Cy. closterium</i>, <i>P. pungens</i>), 및 와편모조류 (<i>A. catenella</i>, <i>A. pacificum</i>, <i>G. catenatum</i>) 배양주 확보 및 최적성장조건하에서 배양 ○ 식물플랑크톤 종별 2개의 배양주 확보 	100
	1-2. 분리된 식물플랑크톤의 최적 배양조건 탐색	0.1		100
	1-3. 보다 유의적인 연구결과(식물플랑크톤 종별 성장연관 세균군집 구조 규명)를 도출하기 위해서, 각각의 식물플랑크톤 종에 대해서 최소 2개 이상의 배양주 확보	0.1		100
2. 식물 플랑크톤의 분류군별 성장 연관 세균군집 구조 분석	2-1. 식물플랑크톤 성장 연관 세균 군집을 조사하기 위해, 각 배양주의 성장단계별 세균 군집구조를 NGS(next generation sequencing) 방법을 이용하여 조사	0.3	<ul style="list-style-type: none"> ○ 와편모조류, 규조류 배양주별 성장단계별 세균군집의 분리 및 DNA 확보 ○ NGS 분석방법을 활용하여, 세균군집 조사 	100

	2-2. 생물정보학적 분석기법을 활용하여, 식물플랑크톤 성장연관 세균군집 구조를 동정하고, 분석된 데이터를 바탕으로 식물플랑크톤 종별 혹은 분류군별 세균군집구조 차이 유무를 조사	0.2	○ 식물플랑크톤 분류군별 세균군집 구조 차이를 분석하기 위해, beta diversity (PCoA, UPGMA tree) 분석	100
3. 식물플랑크톤 분류군별 세균군집의 생리활성 비교 분석	3-1 배양주의 성장단계별 세균군집의 신진대사 (metabolism) 및 효소활성 (enzymatic activity) 변화 조사	0.2	○ <i>Prorocentrum</i> 배양주를 대상으로 성장단계별 세균군집의 효소활성 변화 조사 ○ PICRUSt를 활용하여, 세균군집의 predictive metabolism을 조사	100
계		1.0		100

2. 대외기여도

- 식물플랑크톤과 세균사이의 생태적 상호관계에 대한 새로운 가설을 바탕으로, 해양환경변화에 따른 미소먹이망 구조 및 기능변화 및 기작연구에 활용
- 한국근해에서 자주 발생하는 적조 현상의 원인을 규명하기 위한 새로운 생태적 시각을 제공함으로써, 보다 정확한 적조예측기법기술(예, 모델링)을 개발하는데 활용

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1, 연구개발결과의 활용계획

- 식물플랑크톤과 세균의 생태적 상호관계에 대한 연구는 해양생태계내의 다양한 생명 현상에 대한 새로운 가설 및 지식축적을 제공함으로써, 해양생명과학분야의 지식의 발전에 기여
 - 본 연구를 통해 얻어질 수 있는 식물플랑크톤 종별 세균군집 구조와 이들의 생리활성(신진대사 및 효소활성)결과는 기존의 연구(기후변화로 인한 해양환경변화의 물리화학적 요인이 식물플랑크톤의 군집 구조 및 기능에 대한 단편적 연구)에서 알 수 없었던 새로운 생태적 시각을 제공할 것으로 사료됨
- 본 연구로 습득된 지식은 향후 응용연구를 통해 국가경제 및 산업 발전에 기여
 - 지속가능한 발전을 위해, 화석연료를 대신할 청정에너지 개발은 전 인류의 과제이며, 우리나라에서도 이와 관련하여 ‘분산형 청정에너지 시스템으로 전환’이 국가차원의 10대 아젠더로 설정함
 - 따라서, 청정에너지원 중 하나인 식물플랑크톤 기반의 바이오에너지에 대한 관심은 매우 높음
 - 본 연구를 통해 성장증진에 중요한 역할을 하는 공생세균을 활용하여, 식물플랑크톤 배양기술을 발전시킨다면, 보다 효율적인 식물플랑크톤 생산이 가능해짐에 따라, 기술 실용화를 앞당길 수 있으며, 최신기술을 선점함으로써 국가 경쟁력에 기여가능
- 본 연구를 통하여 축적된 지식은 효율적인 생태계 자원의 관리, 보호 및 복원을 가능하게 함으로써 사회적 측면에서도 중요성을 가지고 있음

2, 향후 연구 계획

- 본 과제는 현장이 아닌 실험실내 배양주만을 활용하여, 식물플랑크톤 종별 세균군집을 조사하였기 때문에, 보다 신뢰할 만한 결과를 얻기 위해서는 실제 현장에서의 데이터가 필수적으로 요구됨
 - 따라서, 규조류 혹은 와편모조류 적조가 발생하였을 때, 주변 해역의 시료를 채수하여, 각각의 분류군별 세균군집을 NGS 기법을 활용하여 분석하고자 함
 - 또한, 적조 발생지역에서 채수할 때, 신뢰성 있는 데이터를 얻기 위해, 지리적으로 거리가 먼 정점에서 다른 시기에 현장채수를 진행하고자 함

제 6 장 참고문헌

- Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual review of marine science*, 4, pp.143-176.
- Azam, F. and Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), p.782.
- Barton, A.D., Irwin, A.J., Finkel, Z.V. and Stock, C.A., 2016. Anthropogenic climate change drives shift and shuffle in North Atlantic phytoplankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), pp.2964-2969.
- Buchan, A., LeClerc, G.R., Gulvik, C.A. and González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), p.686.
- Falkowski, P., 2012. The power of plankton. *Nature*, 483 (Suppl 7387), p.S17.
- Hoegh-Guldberg, O. and Bruno, J.F., 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 328(5985), pp.1523-1528.
- Hoppe, H.G., 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. Marine ecology progress series, pp.299-308.
- Park, B.S., Guo, R., Lim, W.A. and Ki, J.S., 2018. Importance of free-living and particle-associated bacteria for the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*: evidence in culture stages. *Marine and Freshwater Research*, 69(2), pp.290-299.
- Park, B.S., Guo, R., Lim, W.A. and Ki, J.S., 2017a. Pyrosequencing reveals specific associations of bacterial clades *Roseobacter* and *Flavobacterium* with the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* growing in culture. *Marine Ecology*, 38(6), p.e12474.

- Park, J., Park, B.S., Wang, P., Patidar, S.K., Kim, J.H., Kim, S.H. and Han, M.S., 2017b. Phycospheric native bacteria *Pelagibaca bermudensis* and *Stappia* sp. ameliorate biomass productivity of *Tetraselmis striata* (KCTC1432BP) in co-cultivation system through mutualistic interaction. *Frontiers in plant science*, 8, p.289.
- Park, B.S., Joo, J.H., Baek, K.D. and Han, M.S., 2016. A mutualistic interaction between the bacterium *Pseudomonas asplenii* and the harmful algal species *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 56, pp.29–36.
- Park, B.S., Kim, J.H., Kim, J.H., Gobler, C.J., Baek, S.H. and Han, M.S., 2015. Dynamics of bacterial community structure during blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in Korean coastal waters. *Harmful Algae*, 48, pp.44–54.
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G. and Pruzzo, C., 2012. Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME journal*, 6(1), p.21.
- Van Wambeke, F., Ghiglione, J.F., Nedoma, J., Mével, G. and Raimbault, P., 2009. Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer–autumn transition in the open NW Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 6(4), pp.705–720.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.