

보안과제(), 일반과제(O) / 공개(O), 비공개()

BSPE9944B-11390-3

단세포 분리기를 이용한 해양 비배양 우점미소생물의 분리 및 배양 기술 개발 최종보고서

2017. 04.

주관연구기관 / 한국해양과학기술원

한국해양과학기술원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “단세포 분리기를 이용한 해양 비배양 우점미소생물의 분리 및 배양 기술 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 04. 30

총괄연구책임자 : 최 동 한

참 여 연 구 원 : 노 재 훈

“ : 양 은 찬

“ : 양 원 석

“ : 최 유 리

“ : 이 혜 련

“ : 조 혜 경

보고서 초록

과제고유 번호	PE9944B	해당단계 연구기간	2016.06.01 - 2017.02.28	단계 구분	단년 연구
연구사업명	중사업명	주요사업			
	세부사업명	창의과제			
연구과제명	대과제명	국가사회적 해양과학기술 수요 예측 및 대응 연구(1)			
	세부과제명	단세포 분리기를 이용한 해양 비배양 우점미소생물의 분리 및 배양 기술 개발			
연구책임자	최동한	해당단계 참여연구원수	총 : 7 명 내부: 3 명 외부: 4 명	해당단계 연구비	정부: 55,000천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 명 내부: 명 외부: 명	총 연구비	정부: 천원 기업: 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>지름이 3 μm 이하의 초미소생물에는 원핵생물, 광합성 진핵생물 및 비광합성 진핵생물이 포함된다. 이들 중 원핵생물은 용존유기물을 입자성 유기물로 전환하여 미생물 먹이망에서 핵심적인 역할을 수행할 뿐만 아니라, 다양한 생지화학적 과정에 참여해 해양 물질 순환에서 가장 중요한 생물 중 하나이다. 광합성 초미소진핵생물은 일차생산자로서 중요한 역할을 수행하는데, 특히 빈영양 해역에서 일차생산력의 50% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다. 이러한 중요성에도 불구하고 이들 초미소플랑크톤은 대부분 배양이 되지 않아 그들의 생태적 역할을 규명하는데 어려움이 있다. 본 연구에서는 최근 도입된 단세포분리기 (flowcytometer sorter)를 이용하여 해수 중 초미소플랑크톤을 단세포로 분리하여 배양하는 기법을 개발함으로써 난배양/미배양 초미소생물의 생리, 유전 및 생태적 특성을 규명하기 위한 기반 연구 기술을 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 단세포 분리기를 이용한 세포의 생존 여부 테스트하였으며, 비광합성 초미소생물의 분리 및 순수배양을 위한 live staining 기술을 개발함으로써 본격적인 난배양/미배양 초미소생물의 분리 및 배양을 위한 기반을 구축하였다. 또한 이 기술을 이용하여 11개 그룹에 속하는 초미세조류와 5개의 신종후보 세균 배양체를 분리 확보하였다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	단세포 분리기, 원핵생물, 광합성초미소진핵생물, 분리, 배양			
	영 어	single-cell sorter, prokaryotes, photosynthetic picoeukaryotes, isolation, culture			

요 약 문

I. 제 목: 단세포 분리기를 이용한 해양 비배양 우점 미소생물의 분리 및 배양 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

지름이 3 μm 이하의 초미소생물은 원핵생물, 광합성 진핵생물 및 비광합성 진핵생물이 포함하며, 해양에서 먹이망 및 생지화학적 과정에서 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 초미소플랑크톤은 대부분 배양이 되지 않아 그들의 생태적 역할을 규명하는데 어려움이 있다. 본 연구에서는 최근 도입된 단세포분리기 (flowcytometer sorter)를 이용하여 해수 중 초미소플랑크톤을 단세포로 분리하고 배양하는 기술을 개발함으로써 난배양/미배양 초미소생물의 생리, 유전 및 생태적 특성을 규명하기 위한 기반 연구 기술을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 단세포 분리기를 이용한 세균 및 초미세조류 분리 기술 확립
 - 광합성 초미소진핵생물 분리 조건 확립
 - 원핵생물 염색 및 분리 조건 확립
2. 초미소생물 배양기술 개발
 - Live staining을 통한 초미소생물 순수 분리 기술 개발
 - 초미세조류 단기 보존 기술 확립

IV. 연구개발결과

- 기존에 동물세포의 형광염색에 이용되는 이 초미소생물의 live staining에 적용가능성을 시험하기 위해 최적 염색 농도를 결정하였으며, 해당 농도에서의 생존성을 테스트하였다. 그 결과 2.4 μM 의 Lavacell® (최종농도)에서 세균의 약 70%를 염색하는 것으로 나타났으며, 이 농도에서 대부분의 시험균주가 생존하는 것으로 파악되었다.

- 현장 시료를 이용하여 총 4회에 걸쳐 초미소생물의 분리·배양을 시도하였다. 이때 여러 종류의 배지 구성을 이용함으로써 다양한 영양 요구를 갖는 초미소생물의 분리를 시도하였다. 초미소조류의 경우 고영양염의 배지보다는 0.0 μm 여과지로 여과한 현장 해수에 10~1000배까지 묽은 농도의 f/2 배지의 영양염을 첨가한 배지에서 많은 수의 미세조류가 성장하는 것으로 나타났다. 그러나, 이 경우, 다량으로 성장이 나타나지 않아, flow cytometer를 이용하여 성장의 여부를 판단할 필요가 있었다.

- 3번의 초미세조류 분리 실험에서 11개 그룹에 속하는 초미세조류의 배양체를 확보하였으며, 이들을 -70°C 의 냉동고를 이용하여 간편하게 적용 가능한 방법에 의해 단기간 보존할 수 있는 방법도 확립하였다.

- 2번의 조사를 통해 live staining 후 세균의 단세포 분리·배양을 시도하였으며, 성공적으로 세균의 순수배양체를 얻을 수 있었다. 총 8개 속에 속하는 세균을 분리할 수 있었으며, 이들 중 5 균주는 신종 후보로 파악되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해서 광합성초미소진핵생물 및 세균을 단세포 분리 방법을 통해 순수분리하여 배양시키는 방법을 확립하였다. 이 방법은 이사부호와 같은 대형 선박을 이용한 장기간 현장 조사에도 적용 가능한 방법이기 때문에 본

연구를 통해 확립된 새로운 난배양/미배양 초미소생물 분리·배양 기법을 현장 연구에 적용함으로써, 신생물·신생명자원 발굴과 새로운 생태 기능을 발굴하는데 활용 가능할 것으로 여겨진다.

S U M M A R Y

Picoplankton with a diameter less than 3 μm is composed of prokaryotes, photosynthetic- and heterotrophic-picoeukaryotes. Among them, prokaryotes play an essential role in microbial foodweb by transforming dissolved organic matter to particulate organic matter as well as in elemental cycles by participating in diverse biogeochemical processes. The photosynthetic picoeukaryotes play an important role as a primary producer in marine environments. Especially in oligotrophic open ocean, they are known to represent about 50% of primary production. Despite these significant roles in marine ecosystems, a large proportion of these picoplankton has not been cultivated yet, having been one of major obstacles to reveal their physiology and ecological functions. Therefore, this study was conducted to develop a technique to isolate a single cell of microorganisms and cultivate them using a single-cell sorter which was introduced by the Open-Lab program of KIOST. Using the cell sorter, single cell of autotrophic picophytoplankton could be successfully isolated into each well filled with 1 ml of medium in a 96-well deep plate and the growth of the cells were easily tracked with the naked eye or by flowcytometry. A live-staining method was developed to isolate non-pigmented heterotrophic bacteria as well as to prevent co-cultivation with unseen microorganisms during the isolation step. Using the techniques we obtained 11 groups of photosynthetic picoeukaryote cultures as well as 5 novel bacterial cultures. In addition, a simple technique was also developed to store a culture of photosynthetic picoeukaryotes in -70°C deep freezers for field application.

(KEYWORDS : 단세포 분리기, 원핵생물, 광합성초미소진핵생물, 분리, 배양
/single-cell sorter, prokaryotes, photosynthetic
picoeukaryotes, isolation, culture

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

- 목 차 -

1. 서론	1
가. 연구개요	1
나. 연구필요성	3
2. 연구동향 및 선행연구 분석	6
가. 국내동향	6
나. 국외동향	7
다. 기타선행연구 분석	9
라. 현기술의 한계 분석	11
3. 연구개발수행 내용 및 결과	14
4. 기대성과 및 활용방안	30
가. 기대성과	30
나. 연구개발결과의 활용방안	30
다. 예상파급효과	31

1. 서론

가. 연구 개요

(1) 연구 목표

- 미배양·난배양 해양 우점 초미소생물의 분리·배양 기술 개발을 통한 신생명자원 확보 및 생태 특성 연구 기반 구축
 - 단세포 분리기를 이용한 세균 및 초미세조류 분리 기술 확립
 - 환경 우점 초미세조류의 배양체 확립을 통한 생태 특성 연구 기반 구축

(2) 연구 내용

(가) 유세포 분석기를 이용한 초미소생물 분리 기술 개발

- 세균의 형광 염색을 위한 염료 독성 시험
 - 동물 세포의 세포막 염색에 활용하는 LavaCell™의 적용 가능성 파악
 - 농도에 따른 성장 저해도 및 분리 효율 등을 고려하여 최적 농도를 결정
 - 세균의 성장은 약 50 μ l의 소량을 취한 후 유세포 분석기를 이용하여 세균의 수를 계수하여 측정함

(나) 분리된 초미소생물의 배양 기술 개발

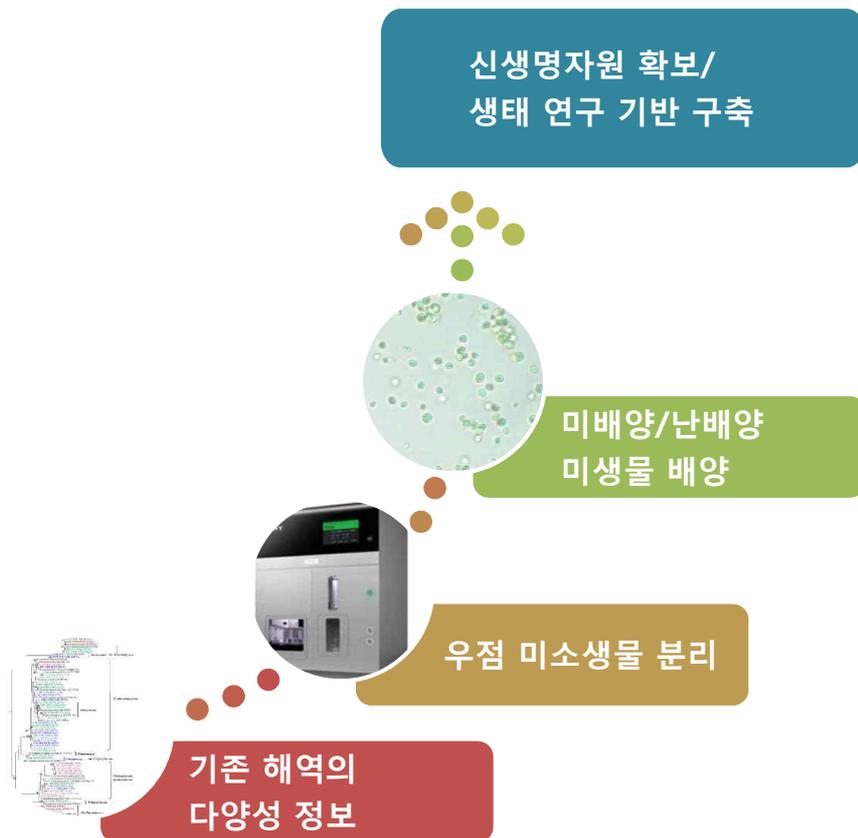
- 광합성 초미소진핵생물은 기존에 각 분류군의 배양에 사용되었던 배지를 기본 배지로 하여 배양을 시도하고, 다른 조성을 갖는 다양한 배지에서 분리를 시도함. 다양한 배지 조성에서도 성장이 확인되지 않은 경우에 0.1~0.2 μ m 여과지로 여과한 현장의 해수를 기본으로 하여 f/2 배지 등을 소량 첨가한 배지에서 성장 여부를 파악함

- 무기영양염, 비타민 등의 다양한 성장 요소를 첨가하여 배양 조건을 찾음
- 이후 세균과 유사한 방식으로 성장 여부를 파악함

(다) 분리된 초미소생물의 보존

- 일반적으로 세균의 보존에 이용되는 glycerol 이나 DMSO를 첨가하여 액체질소에 냉동 보관 하거나 액체질소에 냉동시킨 후 -80℃에 보존하는 방식을 적용하여 보존 여부를 파악함
- 광합성초미소진핵생물은 액체상태로 계대 배양할 수 있도록 함. 연구선을 이용한 현장 조사에서 적용 가능한 보존 방식을 개발

(3) 연구 추진 체계



나. 연구 필요성

□ 기술적 측면

- 생태계의 생지화학적 순환 및 물질 생산에 매우 중요한 지름 3 μm 이하의 초미소 생물 우점 그룹의 대부분은 배양체를 갖지 않음
 - C, N, P, S 및 Fe 등의 물질 순환에 결정적 역할을 수행하는 세균 군집의 우점 그룹은 난배양성으로 대부분 배양체가 없어 생리, 생태적 특성을 파악하기 어려움
 - 유사하게 광합성초미세식물플랑크톤도 일부 녹조류를 제외하면 대부분의 분류군에서 기존 배양체와는 진화적으로 구분되는 미배양 종들이 해양 환경에 우점하는 것으로 나타남
- 단세포 분리기의 도입을 통해 초미소생물 분리의 기술적 한계 극복을 위한 발판 마련
 - 최근 'Open Lab 구축 사업'으로 도입된 '유세포분석-단세포분리기 (flowcytometer-sorter)'를 이용하여 세포의 형광 특성 등에 따라 단세포로 분리 가능
- 단세포 분리기의 최적 활용을 위해 초미소생물 분리 최적 조건의 선결이 요구됨
 - 세균의 경우 자가형광이 없으며, 크기가 1 μm 이하로 작아 형광염료로 염색하지 않고는 유세포 분석기에서 노이즈와 구별이 어려움. 그러나, 여기에 이용되는 형광 염료들의 세포 독성과 처리 후에 세균의 성장에 대해서 알려진 바가 거의 없음
 - 따라서 다양한 형광 염료들의 시험을 통해 독성이 없거나 낮은 염색 시약의 종류와 조건 등 최적 분리 조건의 파악이 선결되어질 필요가 있음
 - 광합성초미세식물플랑크톤의 효율적 분리를 위해 분류군별 분리 조건의 정립이 필요함
- 단일 세포 분리 후 배양체 확립을 위한 배양 조건 (배지 조성, 성장 조건, 최대 밀도 등)의 확립 필요

- 해양 세균은 그들이 서식했던 해수에서 잘 성장하는 것으로 나타났으나, 이 경우 성장 밀도가 제한되어 추가적 분석을 수행하기 위한 생체량을 얻기 어려움. 따라서, 이들의 성장 양상을 파악하여, 성장을 촉진시킬 수 있는 방법 및 최대 밀도 등의 기본 정보를 확보하여 단계적으로 scale-up할 필요가 있음
- 해양광합성초미세진핵생물 그룹 대부분은 배양체가 없으며, 배양체 유지를 위한 배지의 조성과 배양 조건도 알려지지 않음

○ **미배양/난배양성 초미소생물의 배양체 확립을 통한 생명 자원 확보 및 생태 특성 규명**

- 지구적 환경 변화에 따른 해양 산성화와 온난화 등에 의한 생태계 변동은 매우 중요한 환경적 이슈이며, 우점하는 미소생물의 배양을 통한 생리, 생태적 특성 규명은 생태계의 특성과 변동성을 파악하는데 매우 중요한 단계임
- 세균은 종에 따라 매우 다양한 생리적 다양성을 가져 환경 정화, 신물질 개발 등의 산업적 활용성이 매우 높음. 그러나, 약 1% 내외의 종만 배양된 것으로 알려져 배양체 확보를 위한 기술 개발이 요구됨

□ **경제·산업적 측면**

- 기후 변화에 따른 우리나라 주변 해양 생태계 변동성 이해는 미래 경제·산업 정책의 수립에 중요
 - 해수 수온 상승 및 산성화 등의 환경 문제는 해양 생태계 변동을 야기하여 수산업 뿐만 아니라 해양에 기반을 둔 다양한 산업 활동에 영향을 미치기 때문에 생태계 변동에 대한 과학적 연구가 필요함. 우점하는 미소생물의 배양체 확보는 관련 연구를 활성화 시켜 생태계 변동에 대한 보다 정밀한 과학적 정보를 제공함으로써 효과적인 국가 정책 수립에 기여할 수 있음
- 신생명자원의 발굴과 확보는 해양 생물의 산업화 기반을 제공함으로써 경제·산업 발전에 기여
 - 난배양성 미생물의 분리 기술 개발은 신생명 자원 확대하여 상업적 활용 연구를 촉진

진시킴으로써 경제·산업적 발전에 기여할 수 있음

□ 사회·문화적 측면

- 해양 생명자원 확보 및 생태계 연구를 위한 기반 기술을 제공함으로써 관련 분야의 활발한 연구 활동을 지원할 수 있으며, 해양 환경 및 생물 다양성 보존의 중요성에 대한 사회적 인식을 고양시킬 필요가 있음

2. 연구동향 및 선행연구 분석

가. 국내동향

□ 단세포 분리기를 이용한 single-cell sorter 활용 연구 전무

- 초미소생물은 세포 크기가 지름 3 μm 이하로 매우 작아 단일 세포를 분리하기 위해서는 dilution to extinction 방법 등을 사용하여 물리적으로 희석하지 않고서는 분리하는 것이 거의 불가능함
- 단세포 분리기는 고가로 현재까지 해양 분야에서 이 장비를 활용하여 미생물을 분리, 배양하여 생태계의 기능과 생물자원을 확보하기 위한 연구는 수행되지 못함

□ 우리나라 주변해에 초미소생물 다양성에 대한 연구는 활발하게 진행중

- 차세대염기서열 분석 방법을 활용하여 많은 수의 시료에서 대량의 염기서열 분석이 가능해짐에 따라 최근 KIOST의 주요과제를 통해 동해, 동중국해, 서태평양 등의 외해역과 갯벌, 마산만 등 연안역 등에서 세균 및 초미소광합성진핵생물의 다양성 연구가 진행되었음¹⁾²⁾
- 이들 연구를 통해 많은 우점하는 세균 및 초미소광합성진핵생물들이 현재까지 배양체를 가지지 않은 비배양 상태이며, 이의 원인은 크기가 작아 분리·배양하기 어려웠거나(미배양), 인공배지에서 잘 자라지 않는 성질(난배양성)에 기인한 것으로 파악됨

□ 생물자원으로서 미배양/난배양 세균의 분리를 위한 지속적 노력이 계속됨

- 국립생물자원관 및 해양생물자원관에서는 생물자원으로서 세균을 포함한 다양한 생물군에 대해서 새로운 종을 분리·동정하기 위한 다양한 프로그램을 운영중에 있으며, KIOST도 해양 세균의 기탁 기관으로 지정되어 미배양/난배양성 세균의 분리를 위한 다양한 시도를 하고 있음

1) Choi et al. (2016) Dynamic changes in the composition of photosynthetic picoeukaryotes in the northwestern Pacific Ocean revealed by high-throughput tag sequencing of plastid 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol 92: fiv170

2) 최동한 외 (2014) 동해 남부 해역 퇴적물과 저층 해수 세균 군집 조성의 계절적 변화 연구. 한국해양학회지, 바다 19: 147-154

- 인하대학교 조장천 교수 연구팀은 HTC (high-throughput culturing) 기법을 활용하여 난배양성 세균을 분리하려는 노력을 계속하고 있으며, SAR11 및 난배양성 *Gamma-proteobacteria*를 분리한 바 있으나, 많은 시간과 노력이 소요됨
- **광합성 초미소진핵생물 분리·동정 연구는 초기 단계로 파악됨**
- 다양성 연구는 최근에 활발히 수행되었거나 수행 중이나 초미소진핵생물의 분리·동정에 대한 연구는 아직 초기 단계로 파악됨. 이는 초미소진핵생물의 다양성이 최근의 연구를 통해서야 상세히 밝혀졌기 때문임

나. 국외동향

- **단세포 분리를 이용한 single-cell genomics와 생태 기능 연구로의 적용**
- NGS의 발달, 유전자 증폭 기술, 단세포 분리기 등의 첨단 기술을 빠르게 도입하여, 환경 중의 난배양성 세균을 단세포로 분리한 후 유전자를 증폭하여 유전체를 분석함으로써, 생리적 특성과 생태적 역할을 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있음³⁾⁴⁾
- 또한 위의 논문에서 보는 바와 같이 우점하는 속들이 수백 개의 다른 유전 성질의 subpopulation으로 구성되어 있어, 단세포 분리를 통해 우점하는 균주들의 생리·유전적 성질을 규명하는 것이 중요함을 시사하였음
- **single-cell genomics center를 통한 단세포 분리 및 관련 연구의 전문화**
- 영국 Sanger Institute와 미국 Beigelow Laboratory에서 단세포 분리와 연관된 연구를 수행하는 전문센터를 두어 세계 각국으로부터 분석을 의뢰 받거나 협력 연구를 통해 관련 분야를 선도하고 있음⁵⁾.
- 세균을 live 상태로 분리하여 배양하기 위한 체계적인 연구는 수행된 바 없는 것으로 파

3) Field et al (2015) Genomic insights into the uncultivated marine Zetaproteobacteria at Loihi Seamount. ISME J 9:857-870

4) Kashtan et al. (2014) Single cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. Science 344:416-420

5) <http://www.sanger.ac.uk/science/collaboration/sanger-institute-ebi-single-cell-genomics-centre>; <https://scgc.bigelow.org/>

악됨

□ 광합성 초미소진핵생물의 분리·동정 연구

- 국외의 광합성 초미소진핵생물의 다양성 연구는 국내와 비교적 유사한 수준으로 판단되며, 환경에 우점하는 미분리/난배양성 미생물에 대한 분리 연구는 아직 본격적으로 수행되고 있지는 않은 것으로 판단됨
- 최근에 질소고정남세균과 공생하는 prymnesiophyte인 *Braarudosphaera*가 분리되어 해양의 중요 질소고정 남세균의 특성에 대한 규명이 이루어진 바와 같이 일부 생물에 대한 분리 노력이 지속되고 있음⁶⁾

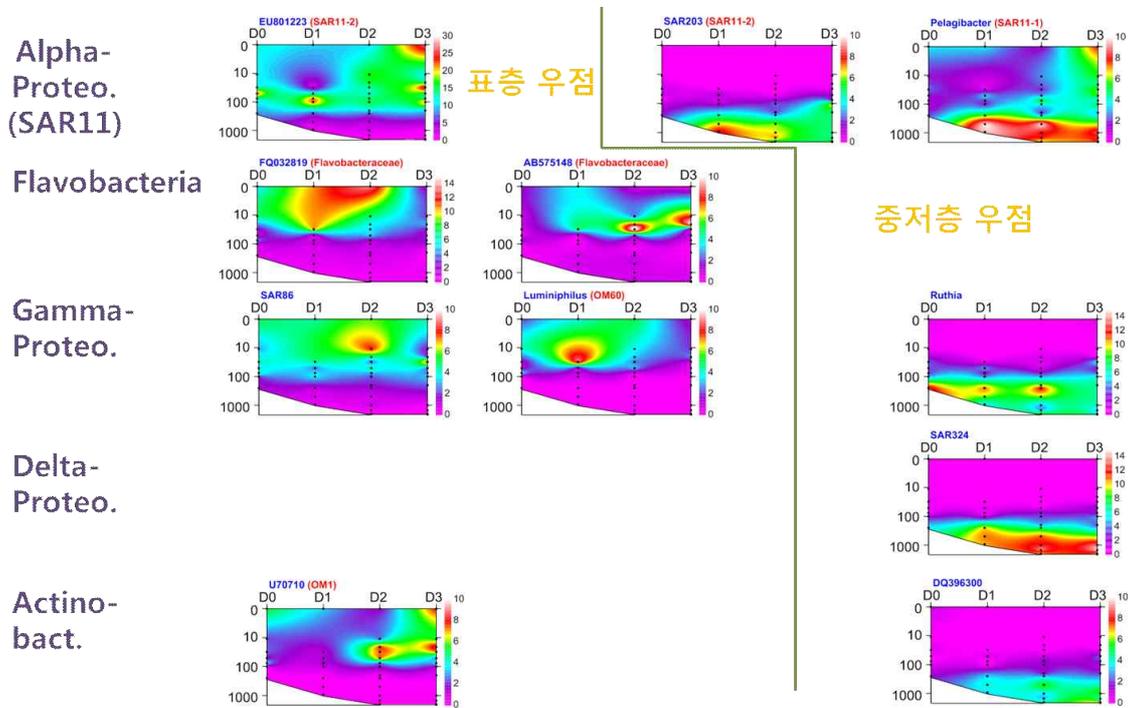
6) Thompson et al (2014) Genetic diversity of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria UCYN-A and its prymnesiophyte host. Environ Microbiol 16: 3238-49

다. 기타 선행연구 분석

□ 우리나라 주변해의 세균의 다양성: 미배양/난배양성 세균이 환경에 우점함

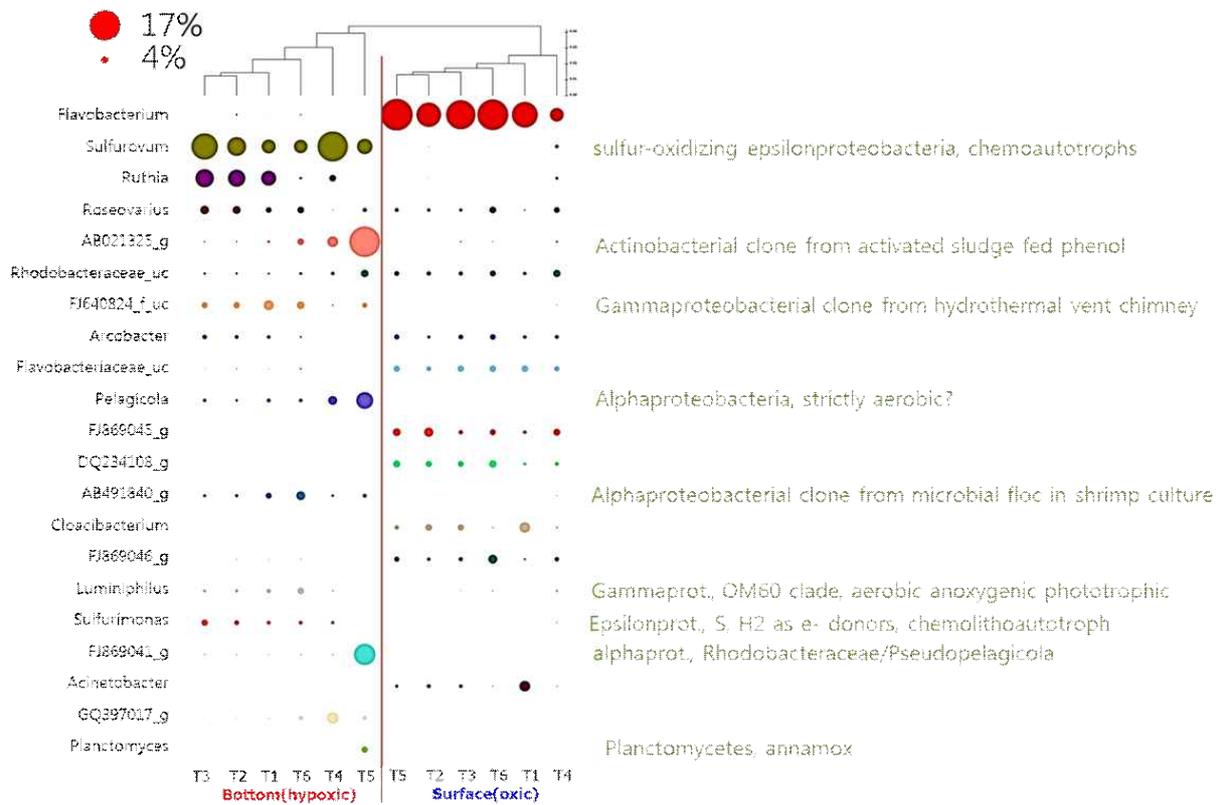
○ 최근 다양한 해역에서 수행된 세균 다양성의 연구 결과 기존에 알려진 배양체와 종, 속, 과 또는 목 이상 수준의 유전적 차이가 있으나 아직 배양체를 갖지 않는 미생물들이 환경내에 우점함을 파악할 수 있었음

- 하계 동해의 수층 세균 다양성 연구 결과는 Pelagibacter를 제외하면 대부분의 우점종들이 미배양 세균 그룹에 포함됨을 보여줌(최, 미발표자료)



<하계 동해 원핵생물 중 우점하는 genus(속)의 수심 분포 특성>

- 마산만 저산소 환경에서의 연구도 많은 우점 그룹의 세균들이 배양체를 갖지 않는 세균 속(genus)에 포함됨을 보여줌(최, 미발표 자료)



<하계 마산만의 표층과 저산소층에 분포하는 세균의 속(genus)수준의 분포>

□ 우리나라 주변해의 광합성 초미소진핵생물의 다양성: 미배양 그룹들이 우점함

- 최근 북서태평양 및 동중국해에서 수행된 색소체의 16S rDNA 분석 연구 결과 녹조류에 속하는 일부 속을 제외하면 대부분의 광합성초미소진핵생물이 아직 배양체를 갖고 있지 않는 것으로 나타나 배양체의 확보가 생태계의 특성을 파악하는데 중요함을 시사함)

7)Choi et al. (2016) Dynamic changes in the composition of photosynthetic picoeukaryotes in the northwestern Pacific Ocean revealed by high-throughput tag sequencing of plastid 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol 92: fiv170

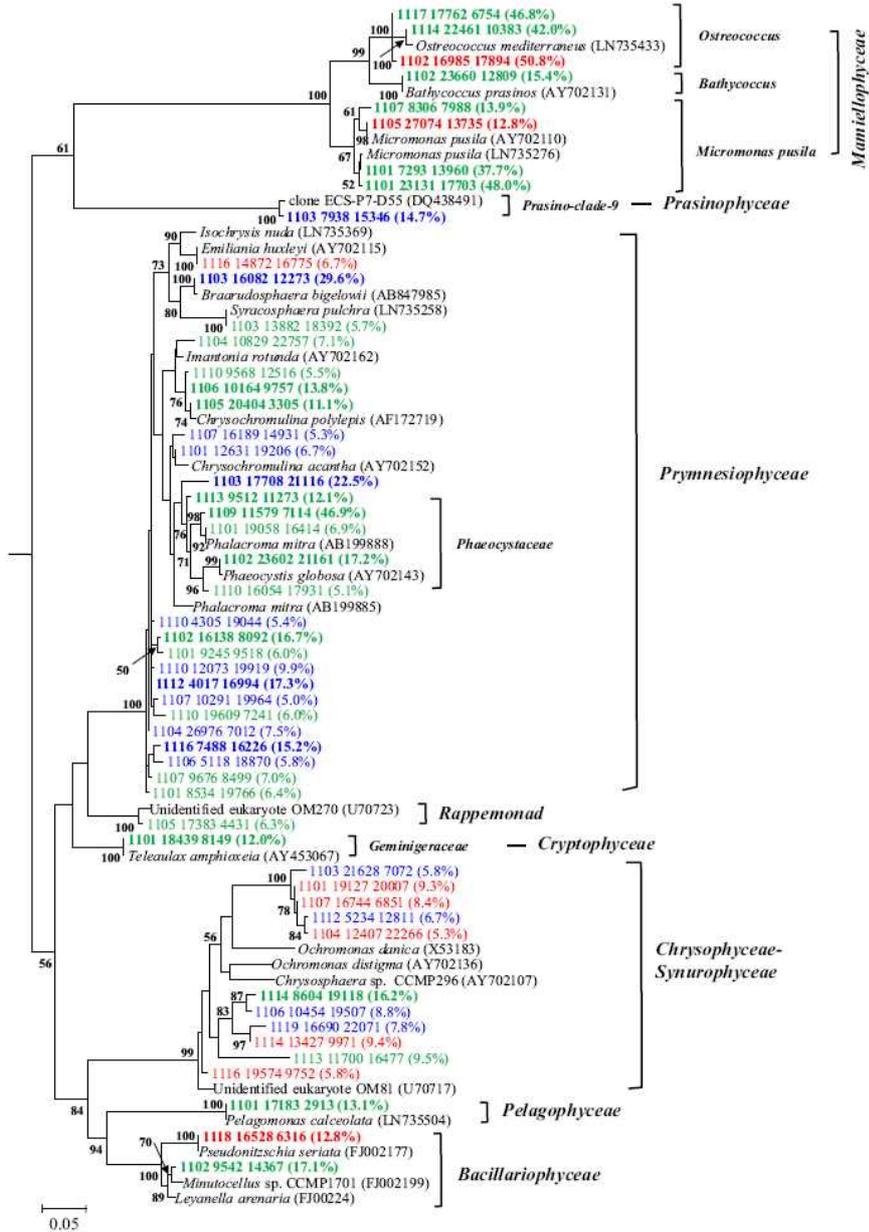


Figure 5. Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic relationships of major OTUs found in >5% of reads of at least one sample. The maximal percentages found are shown in parentheses and the text colors represent regions in which those percentages occurred (green: ECS; red: KC; blue: warm pool). Only bootstrap values >50% are shown at the nodes.

<북서태평양에 우점하는 광합성초미소진핵생물의 계통학적 위치를 나타낸 계통수. 대부분의 염기서열들이 기존에 알려진 종들과는 유전적 유연관계가 먼 것으로 나타남>

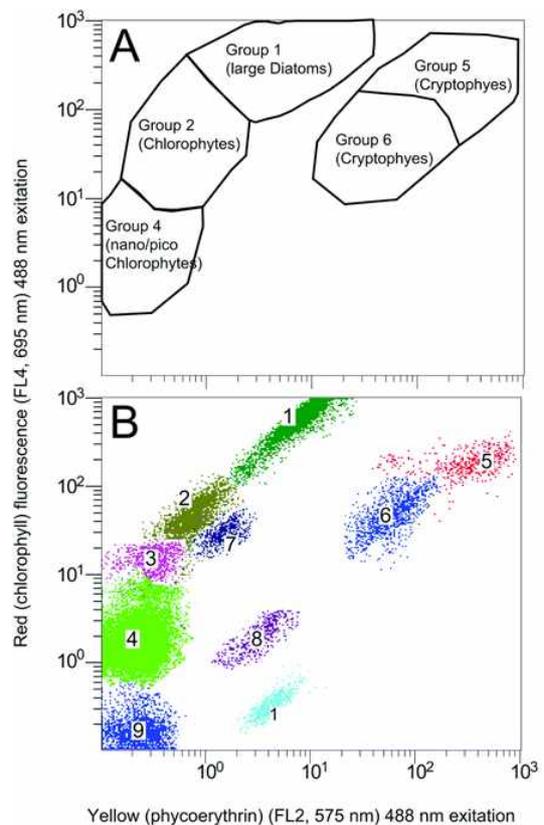
라. 현기술의 한계 분석

□ 미배양/산배양성 세균의 분리·배양의 어려움

- 모든 세균 배양에 적합한 만능 배지는 없으며, 모든 세균이 고체 배지에서 성장하지는 않음
- 세균의 성장에는 온도, 염분 및 유기물 뿐만 아니라 비타민, 미량 금속 등 다양한 성장 요소들이 제공되어야 함. 세균은 매우 높은 생리적 다양성을 갖기 때문에 모든 세균의 성장을 위한 배지를 만들 수 없음
- 현장의 해수는 세균들이 실제로 성장하는 곳으로 세균을 키울 수 있는 조건을 최소한으로 충족하고 있는 상태임. 따라서, 현장의 해수를 배지로 이용한 경우 세균을 성장시킬 수 있음. 그러나, 유기물과 같은 성장 요인의 양이 매우 적기 때문에 높은 밀도로 성장시킬 수 없는 단점이 있음
- 다만 약 $10^3 \sim 10^4$ cells/ml의 농도로 성장이 가능하다면, 점차적으로 scale-up을 하거나, 유전적 특성에 대한 연구를 할 수 있을 것으로 여겨짐

□ 단세포 분리기를 이용한 살아있는 세균의 분리 및 배양 기술 개발 필요

- 세균은 대부분의 경우 크기가 $1 \mu\text{m}$ 이하로 작아 물리적인 특징만으로는 해수중의 작은 입자 및 전기적인 노이즈와의 구별이 어려움. 게다가 광합성 생물과는 다르게 자가 형광도 갖고 있지 않음
- 단세포 분리기를 이용하여 살아있는 세균을 분리하기 위해서는 유세포분석 그래프 상에서 세균을 노이즈와 분리하기 위한 방법의 개발이 선행되어야 할 필요가 있음



□ 광합성 초미소진핵생물 그룹의 유세포 분석상의 분포 특성 규명

- 광합성 초미소진핵생물은 다양한 분류학적 그룹에 속하는 많은 종류의 생물들로 구성되어 있음
- 각각의 그룹은 형태와 색소 조성 등에서 구별되는 차이를 갖고 있으며, 이는 유세포 분석 그래프에서 구별되는 분포 특성을 보일 것으로 여겨짐
- 타겟 그룹의 분리 효율을 높이기 위해서는 시료 특성에 따른 각각의 생물 그룹의 유세포 분석 그래프 상 분포 특성을 파악할 필요가 있음

3. 연구개발 수행 내용 및 결과

(1) 시료 채취

단세포 분리를 통한 초미소생물 (지름 3 μm 이하의 작은 생물로 세균과 초미소 진핵생물을 포함)의 분리 배양은 원해와 근해를 포함하는 4개의 연구 해역에서 진행되었다(그림 1). IB로 표시된 북서태평양의 원해역에서 연안역에 이르는 정점들의 표층 시료는 2016년 9월에 이사부호를 이용하여 채취되었으며, 남해의 B11 정점은 2016년 12월에 이어도호를 이용하여 채취되었다. TS1~3은 대마도 연안에서 2017년 1월에 채취되었으며, KS는 근소만의 갯벌의 물웅덩이에서 2017년 2월에 채취되었다. IB 정점 시료는 처음에는 이사부호에 승선하여 연구할 계획이었으나, 승선계획이 취소되어 채수후 4~8일 후가 경과 후 실험실에서 분리 배양이 이루어져 졌으며, 그 밖의 시료는 채취 후 1~2일 이내에 분리 배양이 진행되었다.

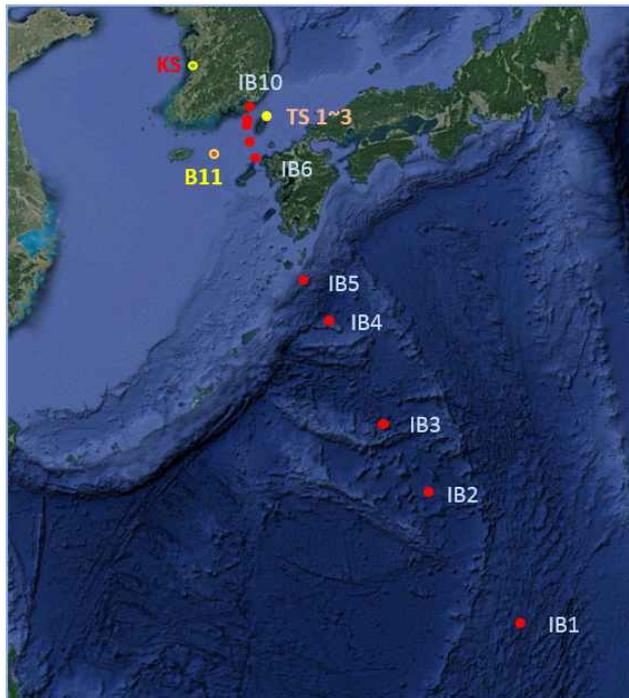


그림 1. 연구 정점을 나타낸 지도(1)

(2) 단세포 분리기

본 연구에서는 Sony사의 SH800 단세포분리기가 사용되었다. 단세포 분리를 위한 sheath 용액으로는 일반적으로 사용되는 불소가 첨가된 용액에 의한 미생물 성장 저해가능성을 제거하기 위해 NaCl (최종 농도 15 ppt) 용액을 이용하였으며, 사용하기 전에 2일간 UV-램프를 직접 sheath 용액에 담아 두어 세균에 의한 오염을 최소화하였다⁸⁾. 미소생물의 분리에는 100 μm 의 chip이 사용되었으며, single cell mode에서 단세포 분리를 수행하였다.

(3) 광합성 초미소진핵생물의 분리 및 배양

a. 단세포 분리 조건 확립

광합성 초미소진핵생물의 분리는 488 nm의 레이저를 이용하여 엽록소 형광 (PerCP-H channel)과 피코에리스린(PE channel) 형광의 dot-plot 상에서 이루어졌다 (그림 2). 분리에는 멸균된 96-deep-well 플레이트를 이용하였다.

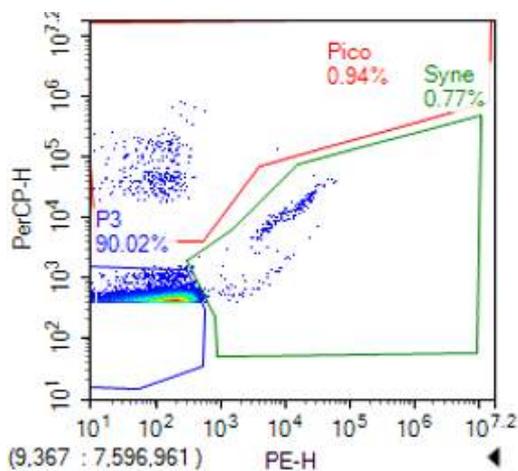


그림 2. 광합성초미소진핵생물의 분리에 이용된 dot-plot의 예. 붉은 색 영역(gate) 내의 세포에 대해 분리가 이루어짐

8) Rinke C, Lee J, Nath N et al. (2014) Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. Nature Protocols, 9:1038-1048

① live staining

해수중에는 미세조류와 세균이 대략 1:1000의 비율로 존재하기 때문에 자가형광(autofluorescence)만을 이용하여 분리할 때, 목적하지 않은 세균도 함께 분리될 수 있다. 따라서, 세균을 포함한 종속영양성 미생물도 형광으로 염색하여 초미세조류와 세균을 구별하여야 세균 등 자가형광을 갖지 않은 생물이 함께 분리되는 것을 막을 수 있다. 또한 세균을 분리하고자 할 때는 형광이 아닌 FSC (forward side-scattering)나 BSC (backward side-scattering)를 이용하여 분리하여야하나 이 경우에 noise signal에 의해 세균 이외의 particle 등이 분리될 확률이 있다. 따라서, 분리·배양의 효율을 높이기 위해서는 세균과 초미세조류 등의 미생물의 성장을 저해하지 않고, 세균 등을 형광 염색하는 방법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 동물세포의 live staining에 이용되는 형광 염료 중 세포 독성이 낮은 것으로 알려진 LavaCell™ (Activemotif Co.)을 이용하여 15분간 세균을 형광 염색하고, 분리한 후 배양하여 생존성을 테스트하였다.

먼저 세균을 염색하기 위한 최적 농도를 결정하기 위해 0.24~24 μM 의 농도 범위에서 농도에 따른 세균 수의 변화를 flowcytometer를 이용하여 관찰하였다(그림 3). 그 결과 약 6.6 μM 의 농도에서 세균의 개체수가 포화되는 경향을 나타내어, 모든 세균을 염색하기 위한 적정 농도로 파악되었다. 그러나, 동물세포의 경우 5 μM 의 LavaCell 농도에서 24시간 동안 세포 독성이 미비하다고 알려져 있었기 때문에, 이보다는 농도가 낮고 약 70%의 세균 세포를 염색할 수 있는 것으로 나타난 2.4 μM 의 농도를 이용하였다.

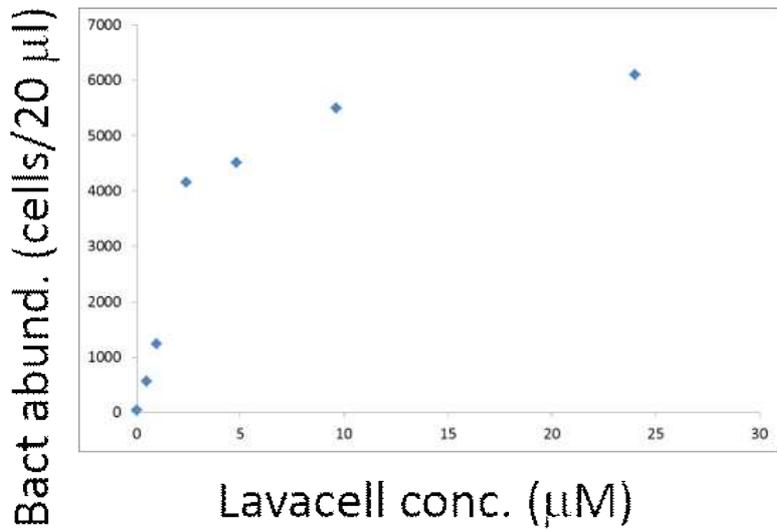


그림 3. LavaCell 농도에 따른 검출 가능한 세균수 변동. 세균수는 flowcytometer를 이용하여 측정하였음.

다음으로 2.4 μM 의 LavaCell 염색이 세포의 성장을 저해하는지 여부를 알아보기 위해 세균 배양체를 이용하여 테스트하였다. 테스트에는 *Salinibacterium amurskense*와 *Pedobacter terricola*를 이용하였다. 15분간 염색 후 1 ml의 marine broth가 들어있는 96-well 플레이트에 단세포 분리하여 배양하였을 때, 두 균주 모두 대부분의 well에서 성장이 확인되어 2.4 μM 의 LavaCell 농도에서 세포 성장의 저해가 크지 않음을 확인하였다(그림 4).

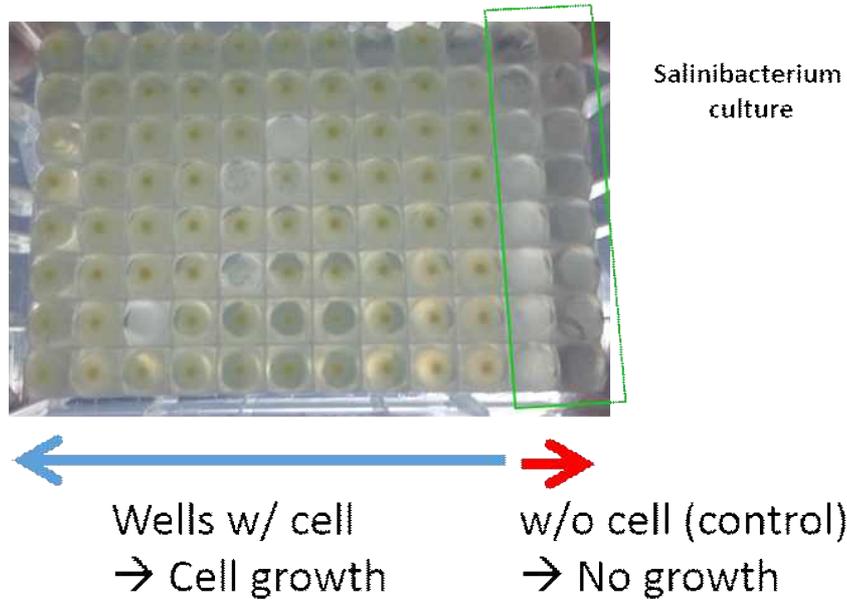


그림 4. LavaCell 염색 후 단세포 분리된 세포의 성장을 보여주는 96-well 플레이트의 사진. 단세포가 들어간 대부분의 well에서 세균의 성장을 확인할 수 있음

b. 배지 조성

광합성 초미세조류의 분리에는 표 1의 배지를 이용하였다. 기존에 식물플랑크톤의 배양에 일반적으로 사용되어진 f/2 배지의 영양염을 기본으로 약간씩 조성을 바꾼 배지도 함께 분리에 사용하였다. 대양 시료의 경우 빈영양 특성을 모사하기 위해 1000배 희석된 영양염을 첨가한 배지(SW-f/2-1000D)를 추가하여 배양 시도 하였으며, 남해 시료에서는 다양한 영양 요구를 충족시키기 위해 일반적으로 식물플랑크톤의 배양에 많이 이용되는 다섯 종류의 배지를 혼합한 배지(AM-100D)를 이용하였다. 대마도와 근소만의 연안 시료에는 BSA를 0.05%로 첨가한 f/2 배지(f/2-BSA)를 이용하여 sorting 동안 laser 노출 및 물리적 충격으로부터의 영향을 줄여 배양을 시도하였다.

9) Marie D, Le Gall F, Edern R, Gourvil P, Vaultot D (2017) Improvement of phytoplankton culture isolation using single cell sorting by flow cytometry. J Phycol (In press)

표 1. 광합성초미세조류의 분리에 이용된 배지의 종류

배지명	배지 조성	이용된 시료
f/2	f/2 배지	대양시료(IB)
SW-f/2-1000D	0.1 μm 여과 해수에 f/2 배지의 영양염을 1/1000의 양으로 첨가	대양시료(IB)
AM-100D	100배 희석된 f/2, L1, Pro99, Pro5, K-media의 혼합배지	남해시료(B11)
f/2-BSA	f/2 배지에 bovine serum albumin을 0.05%로 첨가	대마도시료(TS), 연안시료(KS)

c. 분리·배양된 광합성초미세조류

2016년 9월 이사부호를 이용하여 일본 서쪽 및 남해역 시료에서 단세포 분리를 이용하여 6개의 96-well 플레이트에 분리한 후 현장 온도에서 배양하였다. 배양 후, 약 2주일 후에 SW-f/2-1000D의 낮은 영양염 배지에서 배양한 시료는 flowcytometer를 이용한 계수를 통해 미세조류의 성장을 확인하였으며, f/2 배지에서 배양한 시료의 경우에는 약 한 달 동안 세포 침강물의 생성 여부를 통해 성장을 확인하였다. 총 528개의 단일 세포를 분리하였으며, 그 중 성장이 확인된 광합성초미소진핵생물은 총 136개로 분리된 세포 중 평균 24%에서 성장이 확인되었다. 한편, 빈영양 배지인 SW-f/2-1000D 배지에서 f/2 배지에 비해 약 3.5배 높은 비율로 미세조류의 성장 비율이 높게 나타나, 빈영양 배지에서 배양 효율이 영양염이 높은 배지에 비해 더 높을 가능성을 시사하였다.

표 2. 2016년 9월에 수행된 광합성초미세조류 분리·배양 결과의 요약

DATE	Samples	No.		
		growing well (/88 wells)	Media	%
Sep. 12	IB10	56	SW-f/2-1000D	64
	IB10	16	f/2	18
	IB9	20	f/2	23
	IB8	21	f/2	24
	IB7	9	f/2	10
	IB6	14	f/2	16

2016년 12월 남해의 정점 B11의 표층부터 75 m 수심까지의 6개 시료에서 각각 88개의 단일세포를 분리하여 AM-100D의 배지 1 ml을 넣은 96-well 플레이트에 배양하였다(표 3). 표층 시료는 flowcytometer 계수 방법으로 그 밖의 시료는 세포 침강물의 생성 유무를 통해 성장을 확인하였다. flowcytometer로 성장을 확인한 표층 시료의 경우 약 36%의 well에서 성장이 나타났다. 그 밖의 시료에서는 6~13개의 well에서 미세조류가 성장하여 세포 침강물이 형성되었다.

표 3. 2016년 12월 수행된 광합성초미세조류 분리·배양 결과의 요약

DATE	Samples	Depth (m)	No.
			growing well (/88 wells)
Dec. 6	B11	0	32
		10	9
		20	9
		30	13
		50	6
		75	7

2017년 1월에 대마도 북쪽 해변의 시료에 대해 f/2-BSA 배지를 이용하여 미세

조류의 분리·배양을 시도하였다. 그러나, 모든 well에서 미세조류의 성장은 나타나지 않은 반면 일부의 well에서는 세균의 성장이 관찰되어, 연구해역의 미세조류 군집이 BSA 첨가시에 성장이 저해되고 일부 미세조류에 부착된 세균이 성장한 것으로 추정되었다. 따라서, 민감한 그룹의 미세조류의 분리/배양을 위해서는 최적 BSA 농도 조건 규명 및 세균의 성장 억제를 위한 항생제의 처리 등 방법적 개선이 필요할 것으로 여겨진다.

d. 배양된 광합성초미세조류의 염기서열 분석 및 계통

4회의 조사에서 총 212개의 well로부터 광합성진핵생물 배양체가 얻어졌으며, 종 동정은 18S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해서 수행되었다. 유전자 염기서열은 DNA 추출-PCR-염기서열 분석의 과정을 통해 분석되었다.

단세포 분리를 통해 총 11개 그룹에 속하는 광합성미세조류가 분리 배양되었으며, 이들은 크게 규조류와 녹조류로 나타났다(그림 5). 이 두 그룹의 초미세조류는 일반적으로 연안 해역에서 우점하는 식물플랑크톤으로서, 우점하는 그룹의 미세조류가 상대적으로 높은 빈도로 분리된 것으로 여겨진다.

규조류에 속하는 배양체는 6개 속 중 하나에 속하는 것으로 파악되었으며, 일부의 배양체는 기존에 알려진 종들과 상당히 먼 유연관계를 보였다.

녹조류 중 4개의 과(family)에 속하는 배양체가 얻어졌는데, 이들은 연안 환경에서 우점하는 그룹인 Bathycoccus, Ostreococcus 및 Pycnococcus에 속하였으며, Picochlorum과 가까운 계통의 배양체도 얻어졌다.

한편, 2017년 9월 시료에서는 종속영양성 원생동물인 Centroheliozoa에 속하는 생물의 염기서열이 얻어졌는데, 이는 앞에서 언급한 바와 같이 형광 염색하지 않은 시료를 이용한 미세조류의 분리시에 형광을 띄지 않는 원생동물이 함께 분리되어 함께 성장하였기 때문으로 여겨진다.

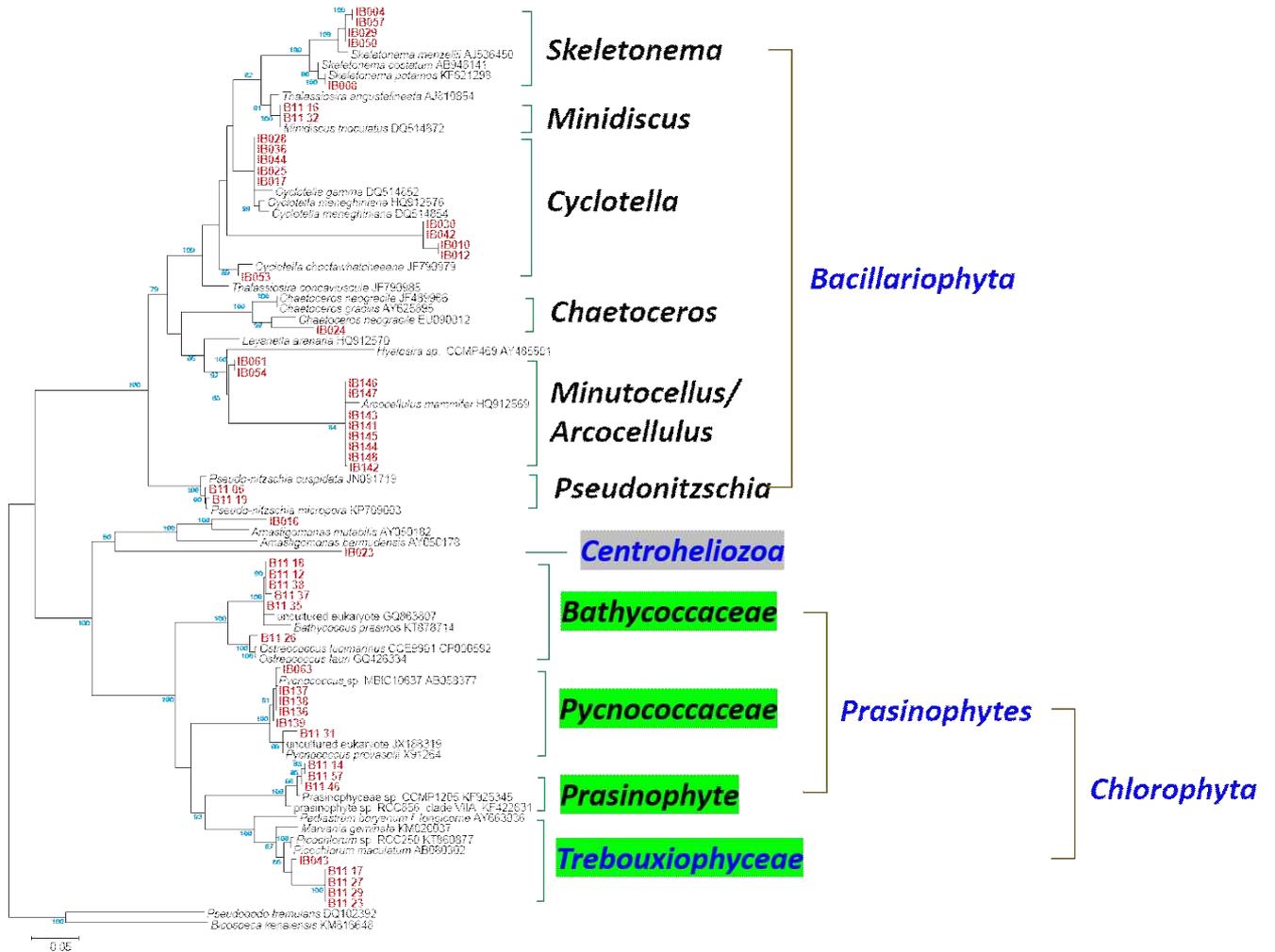


그림 5. 단세포분리 기법을 통해 분리 배양된 배양체의 계통을 나타낸 계통수. 붉은색이 본 연구에서 분리된 배양체임

(4) 원핵생물(세균)의 분리 및 배양

a. 단세포 분리 조건 확립

앞에서 언급한 바와 같이 세균은 자가형광을 갖지 않기 때문에 세균의 분리를 위해서는 크기와 모양을 반영하는 FSC 및 BSC 채널을 이용하여야 한다.

그러나, 이 경우 noise와 뚜렷이 구별되지 않아 분리 효율이 낮아진다. 이러한 점을 극복하기 위해 세균을 live 형광 염색을 하였으며, 이를 통해 원핵생물을 noise 시그널과 분리할 수 있었다(그림 6). 염색 후 세균은 PE와 FITC 채널을 이용하여 남세균과 구분할 수 있었다.

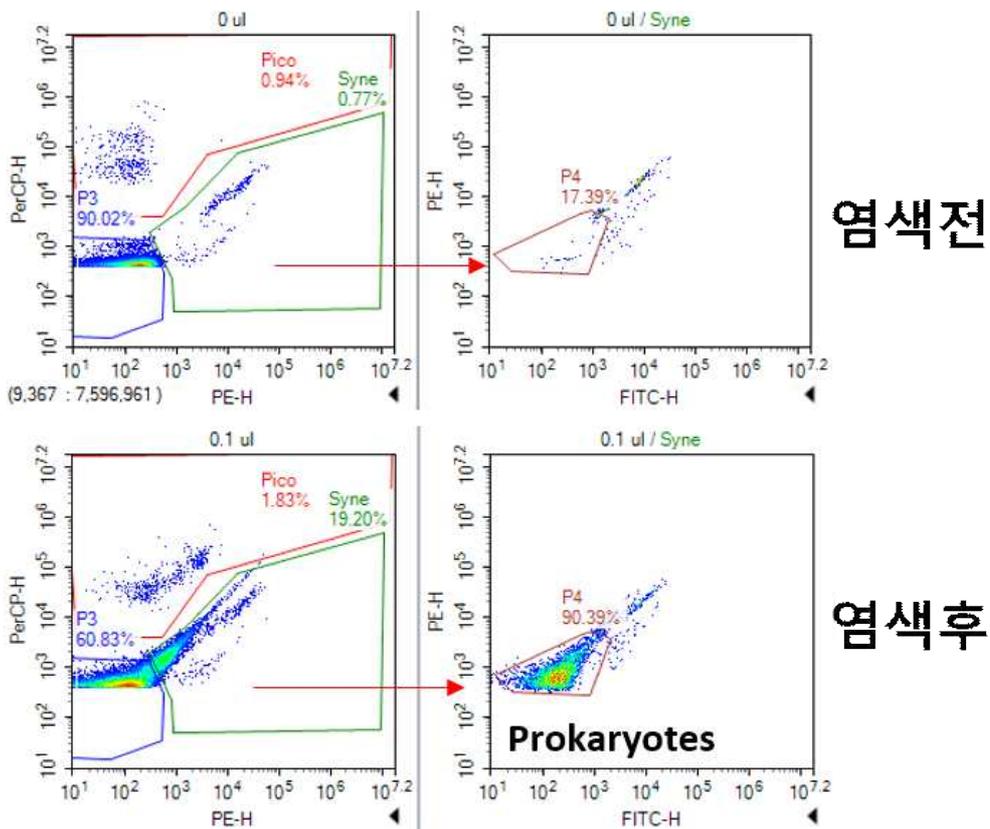


그림 6. LavaCell 염색 전과 후에 원핵생물의 flowcytogram의 차이를 나타낸 그림. 염색 후에 원핵생물이 noise로부터 분리될 수 있음을 보여줌

b. 배지 조성

세균의 단세포 분리 후 배양을 위한 배지로는 i) 멸균 해수, ii) 0.1 μm 여과 해수, iii) 멸균해수 + marine broth (1/10 희석) + 0.1% BSA + trace metal (f/2) + vitamin (f/2), iv) 0.1 μm 여과해수 + marine broth (1/1000 희석) + 0.1% BSA + trace metal (f/2) + vitamin (f/2)의 네 종류가 이용되었다.

c. 세균의 분리·배양

2016년 12월 정점 B11의 10 m 해수, 2017년 1월 25일의 대마도 표층 해수 및 2017년 2월의 근소만 갯벌의 물웅덩이 시료로부터 세균의 분리를 시도하였다. 세균의 성장은 SYBR Green I 염색 후 flowcytometer를 이용하여 계수하거나, 세포 침강물의 유무를 통해 판단하였으며, 성장이 확인된 총 59개의 well에서 세균을 분리한 후 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 동정하였다.

d. 분리된 세균의 계통 분석

계통분석을 통해 단세포 분리를 이용하여 분리된 세균은 8개의 속(genus)과 하나의 신속으로 파악되었다(그림 7). 대부분의 균주는 해양의 연안에서 높은 비율로 나타나는 Gammaproteobacteria 및 Alphaproteobacteria에 속하였으며, Flavobacteriia에 속하는 균주도 분리되었다.

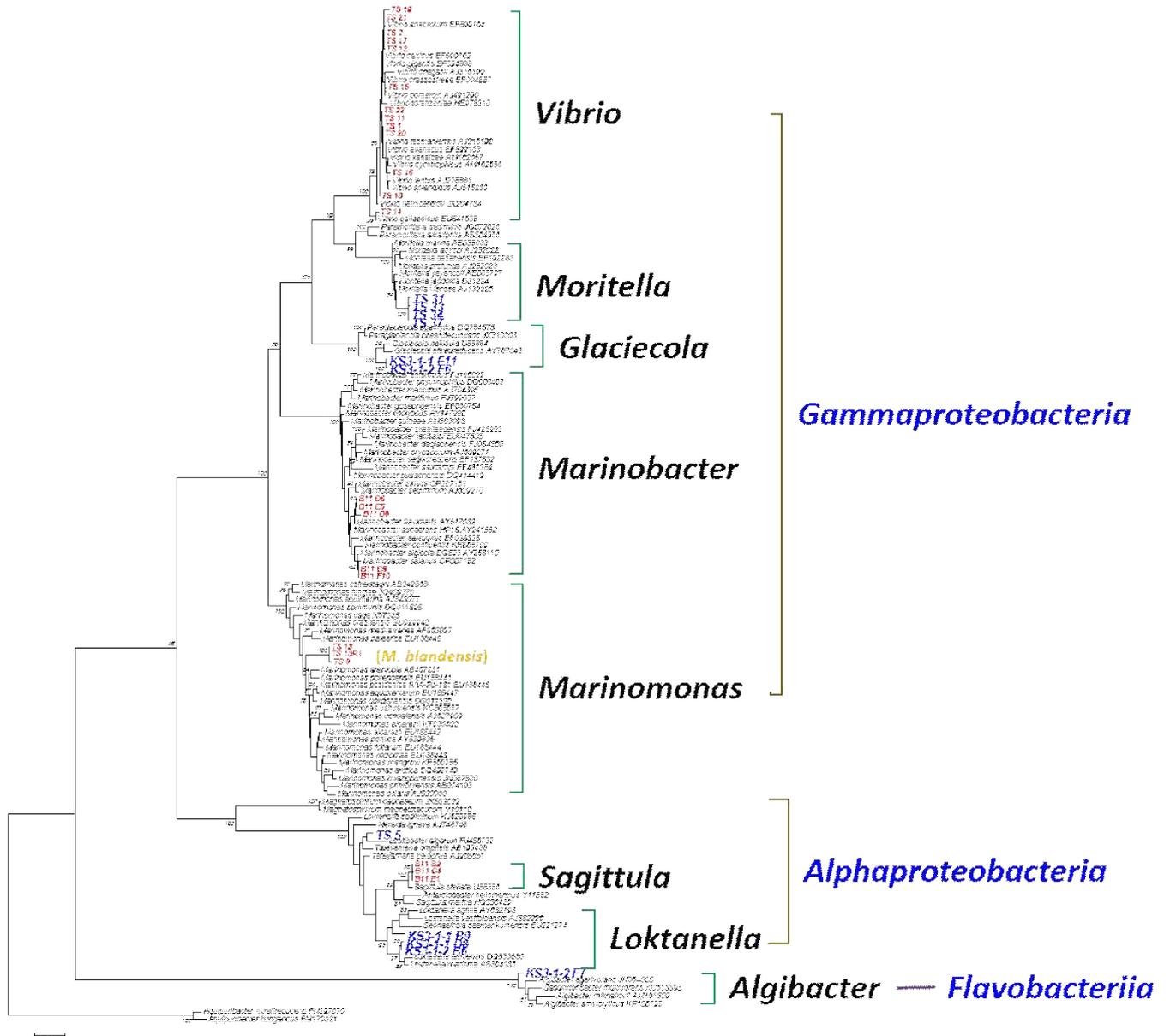


그림 7. 단세포분리 기법을 통해 분리 배양된 배양체의 계통을 나타낸 계통수. 붉은색과 파랑색이 본 연구에서 분리된 배양체로서, 특히 파랑색은 신종 및 신속의 가능성이 높은 균주임.

e. 신종 세균의 계통 분석

신종의 가능성이 높은 세 개의 그룹의 균주에 대해서 16S rDNA 염기서열을 이

용하여 정밀한 계통 분석을 수행하여 신종 여부를 파악하였다. KS3-1-2-F7 균주는 *Algibacter*에 속하는 다른 균주들과 구별되는 branch를 형성하여 새로운 종일 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다(그림 8A).

A

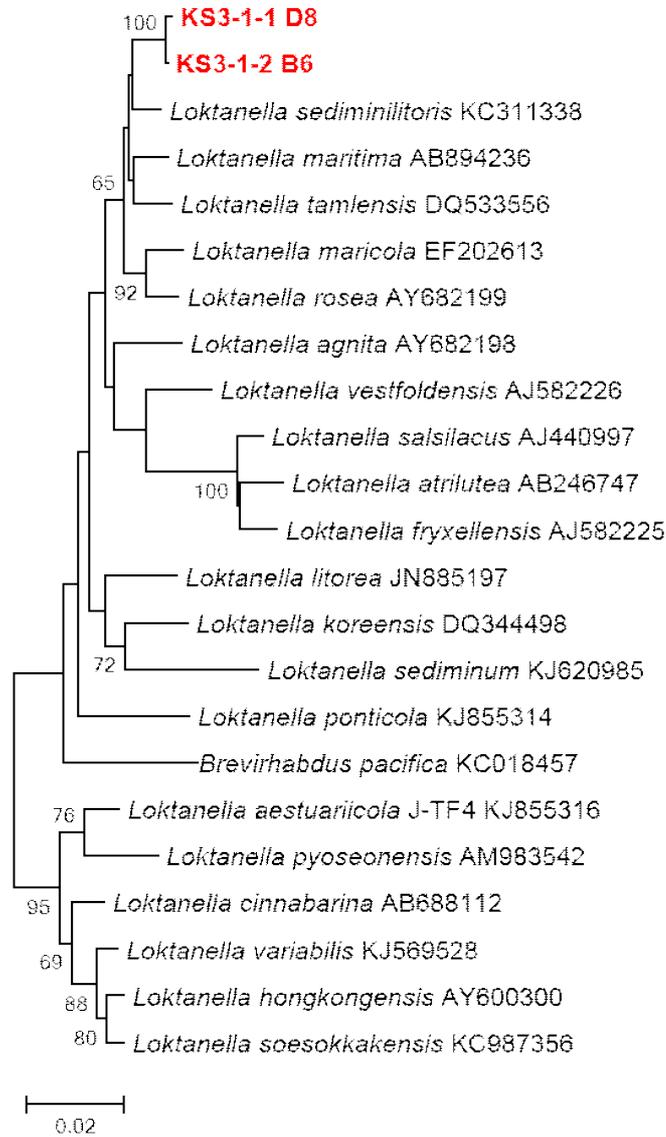
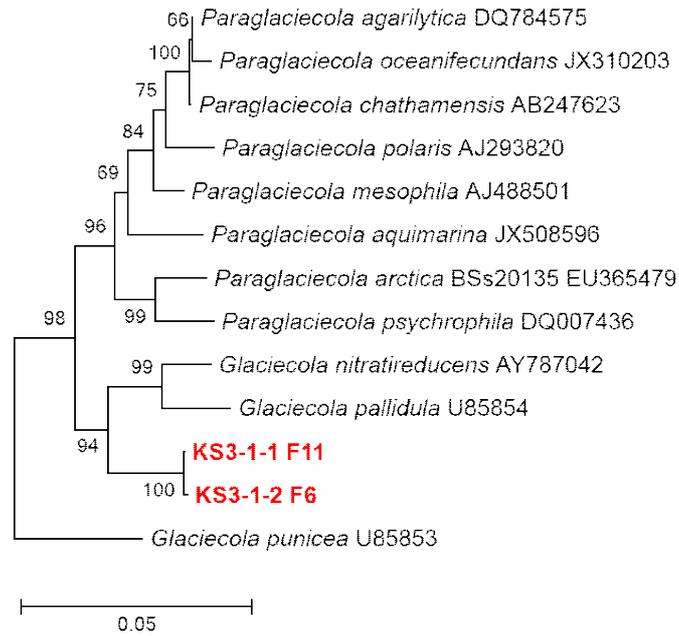


그림 8. 단세포 분리배양된 세균의 신종 가능성을 보여주는 계통수
(뒷페이지 계속)

B



C

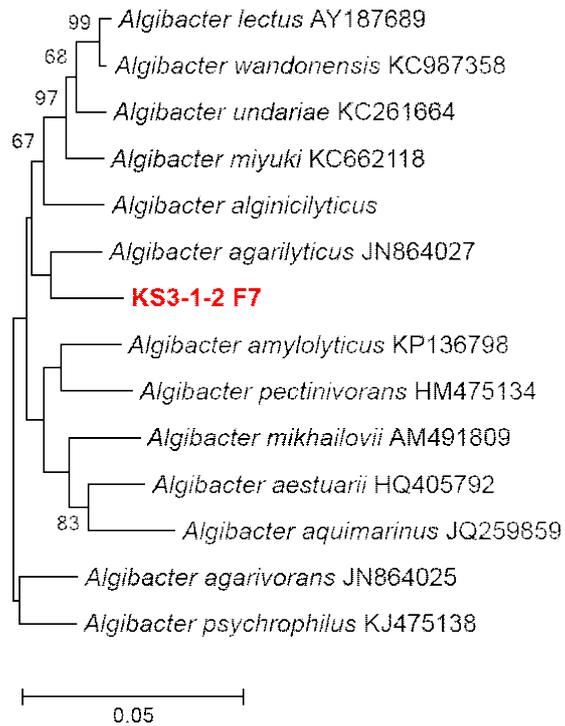


그림 8. 단세포 분리배양된 세균의 신종 가능성을 보여주는 계통수 (앞페이지 이어서)

유사하게 KS3-1-1-F11과 KS3-1-2-F6 균주도 *Glaciicola*에 속하는 알려진 종들과 구별되는 유연관계를 나타내어 새로운 종의 가능성이 높은 것으로 나타났으며 (그림 8B), KS3-1-1-D8과 KS3-1-2-B6도 *Loktanella* 속에 속하는 다른 종들과 뚜렷히 구별되는 branch를 형성하여 신종으로 예측되었다(그림 8C).

(5) 광합성 미세조류의 보존 방법 탐색

현재까지 세균은 동결건조, glycerol이나 DMSO (dimethylsulfoxide) 등의 anti-freezing agent를 넣은 후 -70°C 또는 액체질소 보관 등의 방법을 통해 비교적 잘 보존되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 광합성 미세조류는 세균에 비해 초저온 냉동을 통한 보존은 매우 제한적 그룹에서 적용가능한 것으로 알려져 있으며, 그나마 현재 일부 그룹의 보존을 위해 사용되는 방법을 적용하기 위해서는 고가의 초저온 냉동보존 장비가 필요하다. 따라서, 기존에는 지속적인 계대 배양을 통해 배양체를 유지하고 있으나, 이는 계속적으로 인력과 배지 등의 물품이 투입되어야 하기 때문에 비경제적인 면이 있다. 본 연구에서는 -70°C 의 초저온 냉동고를 이용하여 단계적 냉각을 통해 동물 세포를 보존할 수 있는 것으로 알려진 Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing container (Nalgene)를 이용하여 분리·배양된 미세조류의 냉동보존 가능성을 탐색하였다.

지수 성장하고 있는 배양체 0.9 ml에 DMSO를 0.1 ml을 넣은 후 2 ml의 cryovial에 넣어, container의 사용 방법에 따라 초저온 냉동고에 넣어 4시간 단계적으로 얼린 후, 알루미늄 포일에 싸서 초저온 냉동고에 계속 보관하였다. 보관된 vial을 1, 3, 7, 10, 15, 20, 25일 후에 하나씩 꺼내어 다음과 같이 세포의 생존여부를 시험하였다: 꺼낸 vial을 실온의 물에 넣어 신속히 녹인 후, 20 ml의 배지가 들어 있는 50 ml 배양병에 배양체를 넣고 알루미늄 포일로 빛을 차단한 후 적정 온도의 배양기에 24시간 암배양 하였다. 이후 호일을 벗겨서 암/광배양 주기에 맞게 배양하였으며, 시간이 지난 후 세포의 침강물 생성 여부로 성장을 확인하였다.

시험에 이용한 녹조류인 *Micromonas*와 규조류인 *Skeletonema* 속은 25일간의 초저온 냉동 보관 후에 재접종 하였을 때, 모두 잘 성장하는 것으로 나타나, 최소한 두 종은 이상의 간단한 과정을 통해 배양체의 냉동보존이 가능함을 확인할 수 있었다(그림 9). 그 밖의 분류군도 배양체에 대한 냉동보존 테스트를 통해 보존성 여부를 지속적으로 파악하여 활용도를 높일 필요가 있을 것으로 여겨진다.

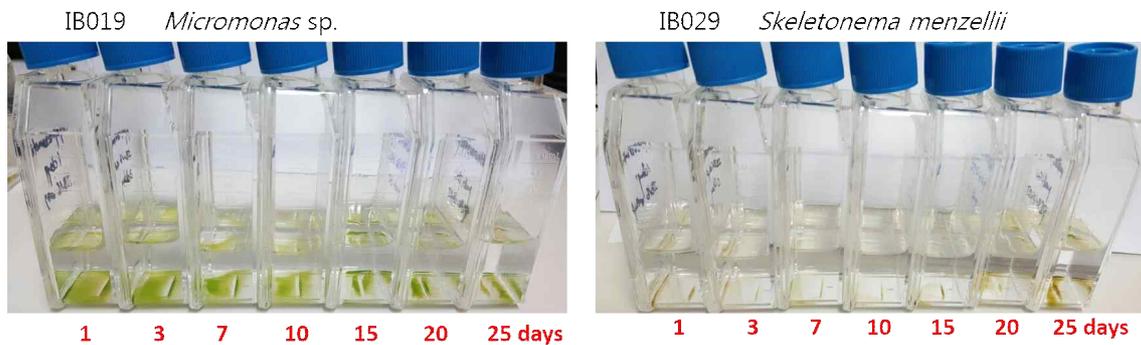


그림 9. 초저온 냉동 보존된 균주의 재성장 실험 결과. 녹조류와 규조류 모두에서 25일 초저온 냉동보존 후에 성장 배지에 다시 접종하였을 때 성장을 확인할 수 있었음

4. 기대성과 및 활용방안

가. 기대성과

신생명자원 활용/생태계 연구 기반 구축

- 미배양/난배양성 미소생물의 배양을 통해 신생명 자원 확보 기술을 제공하고, 이들의 상업적 활용을 위한 탐색 기반을 제공할 수 있음
- 생태계에 우점하는 미소생물의 배양체를 확보하여 생리·생태·유전적 특성을 파악함으로써 생태계에서 미소생물의 역할과 기능을 연구하기 위한 기반을 제공할 것으로 기대됨

단세포 분리기를 활용한 연구 경험 축적 및 연구 서비스

- 단세포 분리기를 활용하여 단세포를 분리하는 연구 노하우를 축적함으로써 관련 연구 분야의 수요에 대응할 수 있으며, 'KIOST 오픈랩' 사업의 취지에 맞는 연구 서비스가 가능할 것으로 기대됨

나. 연구개발결과의 활용방안

지속적인 신생물 자원 발굴에 활용

- 전체 미생물 종의 90% 이상에 이를 것으로 예측되는 미소생물의 분리·배양에 본 연구 결과를 활용함으로써 신생물 자원 발굴에 활용할 수 있음

생태계의 특성과 기후 변화에 따른 생태계 변동 연구에 활용

- 다양한 그룹의 미소생물에 대한 배양체를 확보하여 유전·생태적 다양성을 상호 비교함으로써 생물의 진화와 생태계 기능 연구 등에 활용

- 해양 환경 변동에 따른 우점 그룹의 생리·생태 연구가 가능하여 생태계 반응을 종 단위의 수준에서 면밀히 분석할 수 있음

다. 예상파급 효과

미배양/난배양 미생물 특성 연구를 위해 사용되어 왔던 단세포유전체 및 단세포전사체 연구의 대안으로 단세포분리 및 배양 기술을 접목하여 연구에 활용함으로써 기존의 방법 보다 훨씬 정확하고 신뢰도 높은 결과를 얻을 수 있어, 일부 배양 가능한 종에 대한 연구 방식의 전환이 가능할 것임

주 의

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