

2022년도 바이오·의료기술개발사업 최종보고서 (제출용, 세부과제용)

① 부처사업명(대)	원천기술개발사업	④ 보안등급(보안, 일반)	일반	
② 사업명(중)	바이오·의료기술개발사업	⑤ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	
③ 세부사업명(소)	차세대바이오 사회밀착형지원			
⑥ 총괄과제명	해외 유입 감염성 해양바이러스 탐색 및 검출 기술 개발			
⑦ 세부과제명	국 문	글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 프로파일링		
	영 문	Monitoring and profiling of global marine viral pathogens		
⑧ 주관연구기관명	한국해양과학기술원	⑨ 사업자 등록번호	1348201458	
⑩ 위탁과제기관명				
⑪ 주관연구책임자	성 명	이택견	국가연구자번호	10138826
	전 공	분자생물학	직급(직위)	책임연구원
	소속부서	생태위해성연구부	전자우편	tklee@kiost.ac.kr
	전 화	055-639-8630	휴대전화	010-9091-6367

⑫ 연구개발비 현황(단위: 천원)

년 도	정부 출연금 (A)	기업체부담금			정부외출연금 (B)	합계 G=(A+B+E)	상대국 부담금 (F)
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)			
1차년도	200,000			0		200,000	
2차년도	200,000			0		200,000	
3차년도	200,000			0		200,000	
4차년도	230,000			0		230,000	
5차년도	230,000			0		230,000	
합계	1,060,000					1,060,000	

⑬ 총연구기간	2017. 09. 01 - 2022. 05. 31 (57 개월)						
⑭ 다년도연구기간	2020. 02. 01 - 2022. 05. 31 (27 개월)						
⑮ 참여기업 수	중소기업		중견기업		대기업		계
⑯ 국제공동연구	국가명		상대국 연구기관수		상대국 연구개발비		상대국연구책임자수
⑰ 실무담당자	성 명	정승원	휴대전화	010-4173-8430	전자우편	diatom@kiost.ac.kr	

‘글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 프로파일링’ (연구개발 기간 : 2017. 09. 01. ~ 2022. 05. 31.) 과제의 최종보고서를 제출합니다.

주관연구책임자 : 이 택 견 (직인생략)

주관연구기관장 : 김 응 서 (직인생략)

국가연구개발혁신법 제17조(연구개발성과의 활용)에 따라
최종보고서 열람에 동의합니다.

과 학 기 술 정 보 통 신 부 장 관 귀 하

〈 요약 문 〉

연구개발 목표 (500자 내외)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 DB 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 (국가 검염 바이러스 및 NCLDV) 메타분석 - NGS 및 PCR 기반 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 탐색 시스템 개발 - 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 DB 구축 (선박평형수 및 주요 수 출입 항만 해수 기반) ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 프로파일링 및 대응 시스템 제시 <ul style="list-style-type: none"> - 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 프로파일링 및 발생패턴 분석 - 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 대응을 위한 국가관측시스템 제시 			
연구개발 내용 (1000자 내외)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 글로벌 감염성 해양바이러스의 메타분석 <ul style="list-style-type: none"> - 1984-2021년 해양바이러스 연구논문 분석을 통한 국내 연구 현황 파악 ○ NGS 및 PCR 기반 감염성 해양바이러스 모니터링 시스템 정립 <ul style="list-style-type: none"> - NGS 및 PCR 기반 해양바이러스 모니터링 연구 방법 정립 - NGS 기반 감염성 해양바이러스 모니터링 <ul style="list-style-type: none"> - 선박평형수, 항만해수, 북극해수 및 열대해수 채취 및 NGS 분석 - PCR 기반 특정 해양바이러스 모니터링 <ul style="list-style-type: none"> - 선박평형수, 항만해수 채취 및 PCR 분석 ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 DB 구축 ○ 글로벌 감염성 해양바이러스의 시계열 발생 패턴 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 항만해수 연차별 채취 및 NGS를 통한 감염성 바이러스의 연차별 변화 분석 ○ 외래 해양바이러스의 미소생태계에 대한 영향 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 해양미소생태계에서 해양바이러스, 박테리아 및 미세조류 간 상호영향 분석 ○ 감염성 해양바이러스의 숙주 감염 및 숙주세포의 반응 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 선박평형수 농축, 바이러스 integrity 및 감염성 검증 - transcriptomics를 이용한 세포반응 분석 ○ 메타 분석 기반 해양바이러스 위해도 평가 및 주요 해양바이러스 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 선박평형수 및 항만해수 비교 분석을 통하여 관리대상 감염성 해양바이러스 선정 ○ 해양바이러스의 국내 유입에 대한 종합적 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 선박평형수, 항만해수, 북극해수 및 열대해수 유래 virome 분석 - 감염성 해양바이러스에 의한 해양생태계 영향 분석 ○ 글로벌 해양바이러스 국가관측 시스템 제안 <ul style="list-style-type: none"> - 미래 팬더믹 유발 가능 해양바이러스에 대한 국가대응 연구 제안 ○ 선박평형수 기인 병원성 해양박테리아 및 해양생태계에서의 영향 분석 			
활용계획 및 기대효과 (500자 내외) (응용분야 및 활용범위 포함)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미래 발생 가능한 해양바이러스성 감염병 예측 ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 조기경보 시스템 구축 ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 질병의 관리를 위한 국가 정책 수립에 활용 ○ 글로벌 감염성 해양바이러스의 위해성 평가 지표 개발 ○ 생명공학의 소재로 활용 가능한 해양바이러스 유전자원 확보 			
국문핵심어 (8개)	글로벌 감염병	해양바이러스	거대바이러스	모니터링
	프로파일링	선박평형수	항만해수	차세대 염기서열분석
영문핵심어 (8개)	Global infectious disease	Marine virus	Giant virus	Minotoring
	Profiling	Ballast water	Port seawater	Next Generation Sequencing

〈 연구 분야 〉

코드구분	중심분야		관련분야1		관련분야2		관련분야3		관련분야4	
	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중
국가과학기술표준분류	EH0604	100 %		%		%		%		%
국가과학기술표준분류 (적용분야)	X09	100 %		%		%		%		%
과학기술분야분류	G20203	50 %	G13502	50 %		%		%		%
6T 기술분류	050411	80 %	020312	20 %		%		%		%
NTRM 분류	B030306	60 %	B030307	40 %		%		%		%
원천기술 개발분야	0631	100 %		%		%		%		%

< 목 차 >

1. 연구개발 결과 및 추진내용	1
2. 추진내용 · 연구결과 및 추진일정 실적	4
2-1. 추진내용 및 연구개발결과	4
가. 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석	4
나. NGS 기반 감염성 해양바이러스 모니터링 및 프로파일링	9
다. PCR 기반 특정 해양바이러스 병원체 모니터링	28
라. 감염성 해양바이러스-숙주 감염 및 세포반응 분석	31
마. 해양미소생태계에서의 감염성 해양바이러스의 영향	36
바. 선박 기인 감염성 해양바이러스 모니터링 종합적 분석	40
2-2. 추진 일정 실적	46
2-3. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여정도	47
2-4. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	49
2-5. 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항	50
가. 선박평형수 기인 병원성 해양박테리아 분석	50
나. 해양미소생태계에서 해양박테리아의 영향	54
3. 연구 개발 결과의 활용 방안	57
4. 당초 연구계획 대비 주요 변경사항	58

1. 연구개발 목표 및 평가항목별 성과

1-1. 연구개발 목표

최종목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 DB 구축 ○ 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 프로파일링 및 대응 시스템 제시
세부목표	<ol style="list-style-type: none"> 1. 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석 2. NGS 및 PCR 기반 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 탐색 시스템 개발 3. 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 DB 구축 4. 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 프로파일링 및 발생패턴 분석 5. 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 대응을 위한 국가관측시스템 제시
연차별목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도: 국내·외 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석 및 모니터링 ○ 2차년도: 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 주요 해양바이러스 병원체 선정 ○ 3차년도(단계): 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 및 DB 구축 ○ 4차년도: 선박기인 글로벌 해양바이러스 병원체 프로파일링 ○ 5차년도(최종): 선박기인 글로벌 해양바이러스 병원체 대응시스템 개발

1-2 평가항목별 성과

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	달성도 (%)	관련증빙
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석	10	1	1차년도 (1단계 1차년도)	해양바이러스, 감염성 해양바이러스 연구논문 메타분석	1984-2021년 해양바이러스 연구논문 분석을 통한 국내 연구 현황 파악	100	1. 최종연구보고서
NGS 및 PCR 기반 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 시스템 정립	5	2	1차년도 (1단계 1차년도)	NGS 및 PCR 기반 해양바이러스 분석법 개발	NGS 및 PCR 기반 해양바이러스 모니터링 연구방법 정립	100	2. 최종연구보고서 3. 해양바이러스 검출 및 기타 검출기법 연구논문(2-1, 2, 3, 4) 4. 특허(2-1, 2, 3, 4) 5. 언론보도(2-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) 6. SOP(2-1, 2)
NGS 기반 감염성 해양바이러스 모니터링	30	3	1,2,3,4차년도 (1단계 1,2,3 및 2단계 1차년도)	국내·외 해수내 감염성 해양바이러스 조성 분석	선박평형수, 항만해수, 북극해수 및 열대해수 채취 및 NGS 분석	100	6. 최종연구보고서 7. 연구논문(2-5, 6)
PCR 기반 특정 해양바이러스 모니터링	5	3	2차년도 (1단계 1,2차년도)	국내·외 해수내 감염성 해양바이러스 조성 분석	선박평형수, 항만해수 채취 및 PCR 분석	100	8. 최종연구보고서 9. 연구논문(2-7)
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 DB 구축	10	3	1,2,3차년도 (1단계 1,2,3차년도)	감염성 해양바이러스 DB 구축	감염성 해양바이러스 DB구축	100	10. 최종연구보고서 11. 프로그램(특허 2-5)
글로벌 감염성 해양바이러스 시계열 발생 패턴 분석	5	4	4,5차년도 (2단계 1,2차년도)	감염성 해양바이러스 연차별 분석	항만해수 연차별 채취 및 NGS를 통한 연차별 변화 분석	100	12. 최종연구보고서
외래 해양바이러스의 미소생태계 영향 분석	5	4	4,5차년도 (2단계 1,2차년도)	감염성 해양바이러스의 미소생태계에서의 역할 및 영향 분석	해양미소생태계에서 해양바이러스, 박테리아 및 미세조류 간 상호영향 분석	100	13. 최종연구보고서 14. 연구논문(2-8)
감염성 해양바이러스 - 숙주 감염 및 세포반응 분석	5	4	4,5차년도 (2단계 1,2차년도)	해양바이러스 감염-세포반응 분석	선박평형수 농축, 바이러스 integrity 및 감염성 검증 및 세포반응 transcriptomics 분석	100	15. 최종연구보고서
메타분석 기반 해양바이러스 위험도 평가 및 주요 해양바이러스 선정	5	4	5차년도(최종) (2단계 2차년도)	선박평형수 기인 주요 감염성 해양바이러스 선정	선박평형수 및 항만해수 비교 분석을 통하여 관리대상 감염성 해양바이러스 선정	100	16. 최종연구보고서
해양바이러스의 국내 유입에 대한 종합적 분석	10	4	5차년도(최종) (2단계 2차년도)	종합분석	선박평형수, 항만해수, 북극해수 및 열대해수 virome 분석, 생태계 영향 등을 종합한 분석	100	17. 최종연구보고서
글로벌 해양바이러스 국가관측 시스템 제안	5	5	5차년도(최종) (2단계 2차년도)	연구결과의 국가 관측시스템 적용을 위한 제안	미래 팬데믹 유발 가능 해양바이러스에 대한 국가대응 연구 제안	100	18. 최종연구보고서 19. 언론보도(2-10, 11) 20. 기고문(2-1)
기타	5	3	4,5차년도 (2단계 1,2차년도)	-	선박평형수 기인 병원성 해양박테리아 및 해양생태계에서의 영향 분석	100	21. 연구논문(2-9, 10, 11, 12, 13)
합계	100						

2. 추진내용 및 연구개발결과

2-1. 추진내용 및 연구개발결과

가. 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석

(1) 추진전략 및 방법

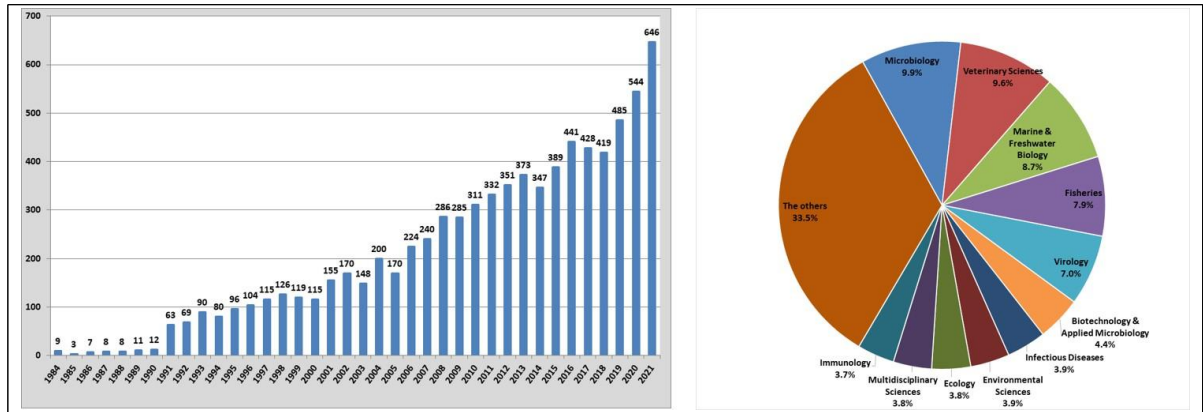
- 수집대상 : Clarivate社의 Web of Science DB - SCIE 논문
- 수집기간 : 1984~2022년 (Early Access 논문 포함)
- 검색필드 : 제목(Title), 초록(Abstracts), 저자키워드(Keyword)
- 논문유형: Article, Review
- 검색어

해양바이러스 (대표키워드)	(marine or ocean or sea or coastal or coast or maritime or estuar* or seawater) and (virus or viral)
세부주제별 키워드 (대표키워드와 조합 후 검색)	
감염	(infection or infectious or communicable or contagious or pathogenic or infective or epidemic or infectivity or epidemical or pestiferous)
인간감염	(Adenovirus* OR Adenoviridae OR Coxsackievirus* OR Picornaviridae OR Cytomegalovirus* OR Herpesviridae OR "Epstein-Barr virus*" OR "Hepatitis A virus*" OR "Hepatitis B virus*" OR Hepadnaviridae OR "Hepatitis C virus*" OR Flaviviridae OR "Herpes simplex virus*" OR HIV OR Retroviridae OR "Human coronavirus*" OR Coronaviridae OR "Human papillomavirus*" OR Papillomaviridae OR "Influenza virus*" OR Orthomyxoviridae OR "Measles virus*" OR Paramyxoviridae OR "Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*" OR "MERS-CoV" OR "Mumps virus*" OR "Parainfluenza virus*" OR "Poliovirus*" OR "Rabies virus*" OR Rhabdoviridae OR "Respiratory syncytial virus*" OR Pneumoviridae OR "Rubella virus*" OR Togaviridae OR "Severe acute respiratory syndrome coronavirus*" OR "Varicella-zoster virus*")
거대바이러스	("Giant virus*" OR megavirus* OR Megaviral OR "ancient virus*" OR "Nucleocytoplasmic large DNA virus*" OR NCLDV OR Poxvirus* OR Poxviridae OR Pandoravirus* OR Pandoraviridae OR Mimivirus* OR Mimiviridae OR Megavirus* OR Megaviridae OR Pithovirus* OR Pithoviridae OR Ascovirus* OR Ascoviridae OR Asfarvirus* OR Asfarviridae OR Iridovirus* OR Iridoviridae OR Marseillevirus* OR Marseilleviridae OR Phycodnavirus* OR Phycodnaviridae OR megavirus* OR Mininucleoviridae OR Cedratvirus* OR Choanovirus* OR Dinodnavirus* OR Faustovirus* OR Kaumobavirus* OR Medusavirus* OR Meelsvirus* OR Mollivirus* OR Namao OR Orpheovirus* OR Pacmanvirus* OR Tupanvirus* OR Usurpativirus* OR Clandestinovirus* OR Yasminevirus*)
다양성	(diversity OR community OR metagenomic OR metagenomics OR virome OR NGS OR monitoring OR identification OR taxonomic OR taxonomy OR profiling)
진단	(diagnostic OR diagnosis)
항바이러스	(antivirus OR antiviral)
치료제	("treatment" OR Therapeutics OR remedy OR medication OR drug)
백신	(vaccine OR "protective immunit*" OR antibod*)

(2) 분석 결과

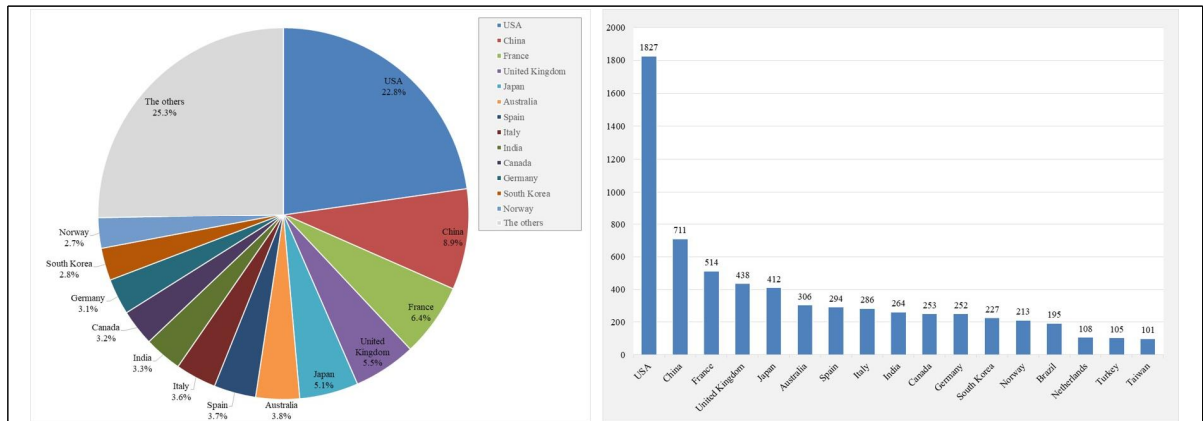
○ 해양바이러스 연구동향

- 해양바이러스 연구는 1990년대에 들어서면서 연구가 증가하기 시작하였고, 2019년 COVID-19 이후 급격하게 증가하고 있음
- 2021년도에는 646편의 논문이 발표되었음
- 연구분야별로는 microbiology, veterinary sciences, Marine & freshwater biology 및 Fisheries 분야가 높은 비율을 차지하였으며, virology는 7.0%로 나타났음



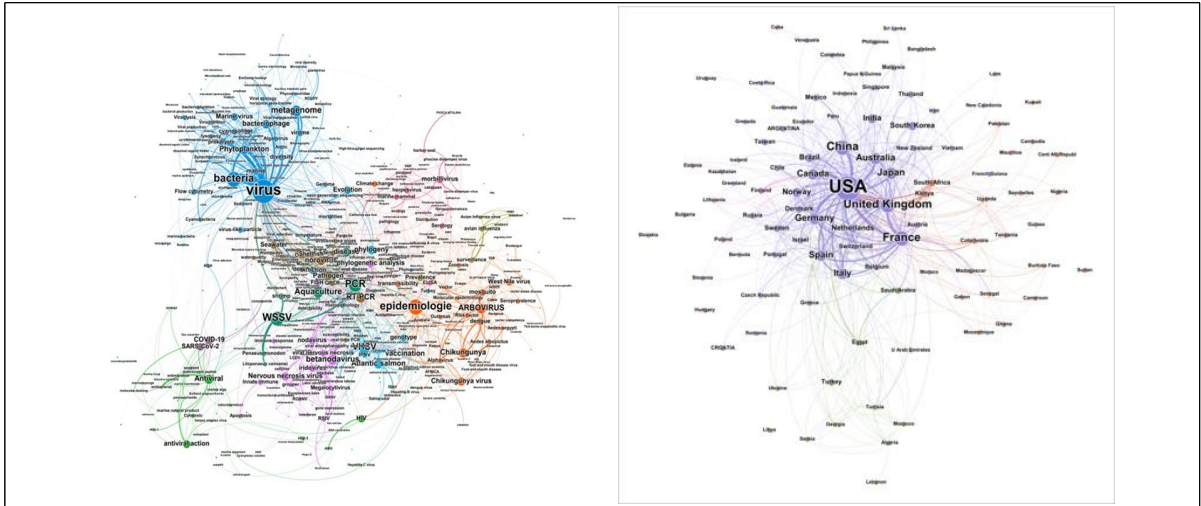
<해양바이러스 논문생산성(좌) 및 연구분야(우)>

- 연구주도 국가는 미국이 22.8%로 가장 높은 연구결과를 산출해 냈으며, 그 외 중국, 프랑스, 영국, 일본이 5% 이상을 보였음.
- 우리나라의 경우 전세계 해양바이러스 관련 연구결과 중 2.8%(227편)를 도출해 냈으며, 이는 전세계 12위에 해당됨
- 연구주도기관은 유럽연구대학 연맹(League of European Research Universities, LERU)이 가장 많은 연구실적인 607편의 연구논문을 출판하였고, 그 뒤를 프랑스 국립과학연구원 (Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS, 403편) 및 Udice French Research Universities(프랑스, 364편)가 추격하고 있음.
- 우리나라에서는 한국해양과학기술원(KIOST)이 13편의 해양바이러스 관련 논문을 출판하여 가장 앞서나가고 있으며, 성균관대학교(12편), 중앙대학교(11편) 등이 뒤를 따르고 있음.



<연구주도 국가>

- 관련 검색어로는 박테리아(바이러스의 숙주), metagenome(최근 바이러스 연구방법), PCR을 비롯한 바이러스 검출방법, Epidemiologie 등이 주요 키워드로 나타났으며, 양식업 등과 관련된 바이러스 및 COVID-19 관련 키워드가 주요하게 검색되었음
- 국가간 연구 협력체계를 보면 미국의 중심으로 프랑스, 중국, 영국, 독일, 스페인, 일본 등이 연구협력체계를 구축하고 있으며, 우리나라의 경우 아직까지는 국제적 연구협력체계에는 합류하고 있지 못하고 있는 것으로 나타남



<해양바이러스 논문 키워드(좌) 및 국가간 연구협력 현황(우)>

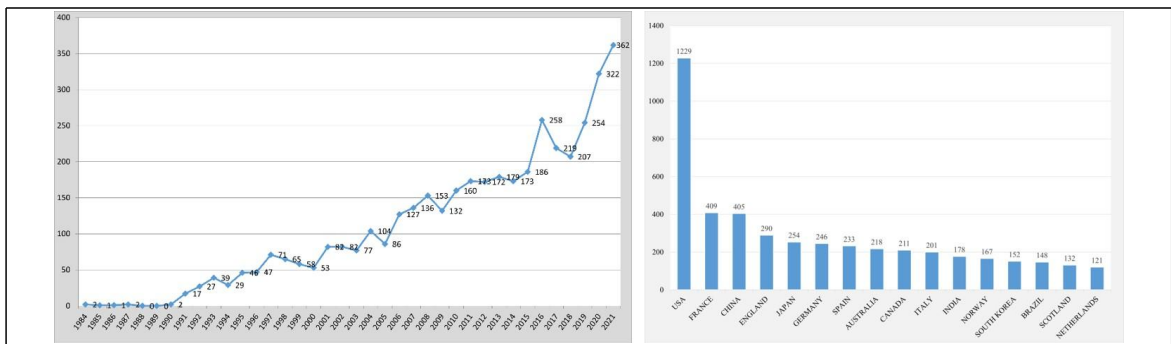
－ 시사점

- * 해양바이러스 연구는 최근 들어 연구가 크게 증가하고 있으나, 전세계적인 CoVID-19의 영향인 것으로 판단됨.
- * 연구는 미국 및 유럽이 연구의 중심을 이루고 있으며, 중국이 해양바이러스 연구 분야에서 급부상 하고 있음.
- * 우리나라는 최근에 한국해양과학기술원과 성균관대학교를 중심으로 해양바이러스 연구가 수행되고 있으나, 아직까지 해양바이러스 모니터링 및 일부 진단 분야에 국한되어 있어, 보다 폭넓은 연구의 수행이 필요한 것으로 판단됨.

○ 해양바이러스 세부과제 연구동향

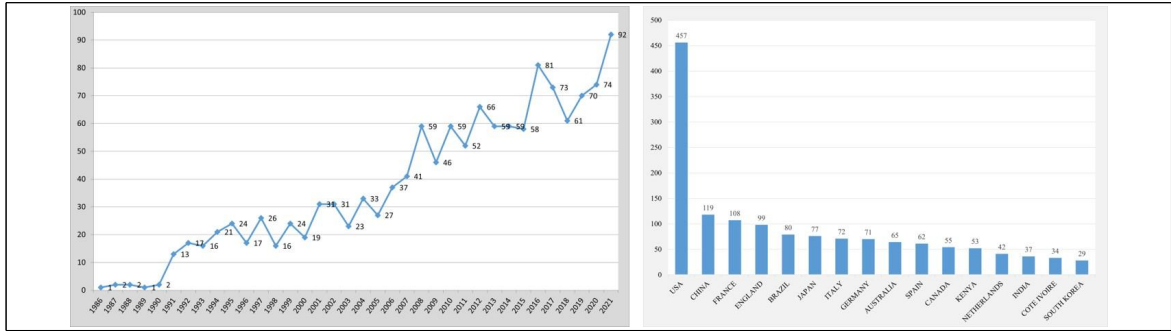
－ 감염성/병원성 해양바이러스

- * 1990년대 들어서면서 연구가 시작
- * 2004년에 100편, 2020년 코비드로 연구 급격히 증가
- * 미국, 프랑스, 중국, 영국 순, 대한민국 13위(152편 논문발표)



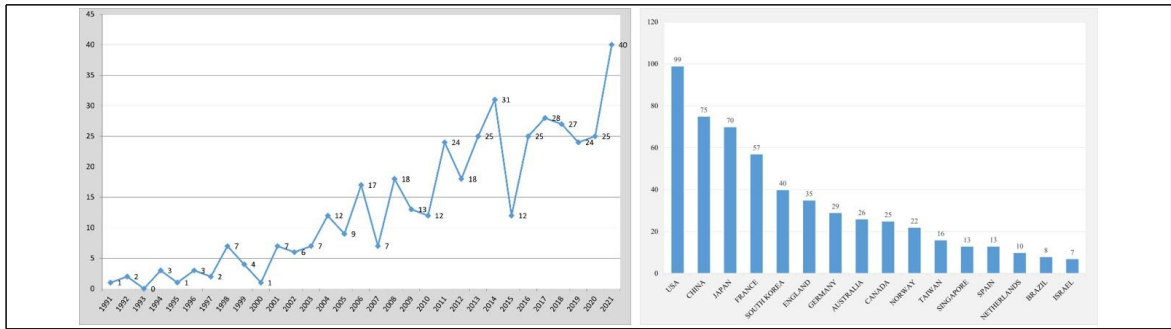
－ 인간감염 해양바이러스

- * 1990년대 들어서면서 연구가 시작
- * 2008년에 50편, 2021년 코비드로 연구 급격히 증가(92편)
- * 미국, 중국, 프랑스, 영국 순, 대한민국 16위(29편 논문발표)



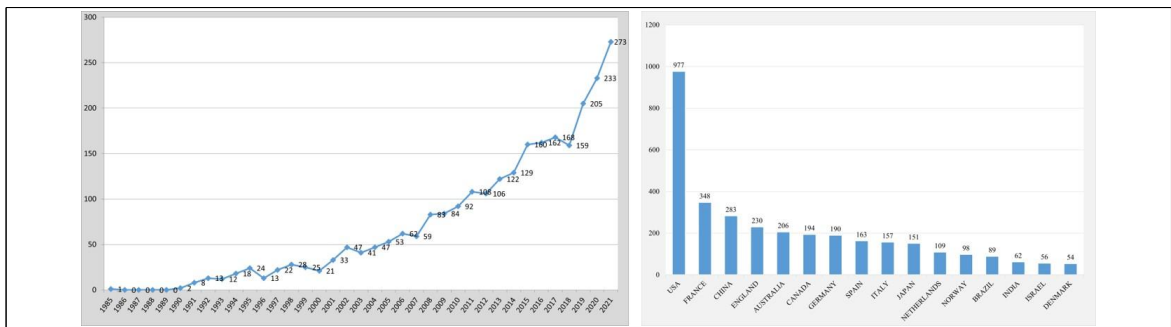
– 거대 해양바이러스

- * 1990년 이전에는 전혀 연구가 이루어진 바 없음
- * 2000년 이후 거대바이러스 존재가 밝혀지면서 연구의 활성화가 시작됨
- * 미국, 중국, 일본 프랑스 순, 대한민국 5위(40편 논문발표) – 최근에 KIOST 중심으로 연구가 증가하고 있음



– 해양바이러스 다양성 연구

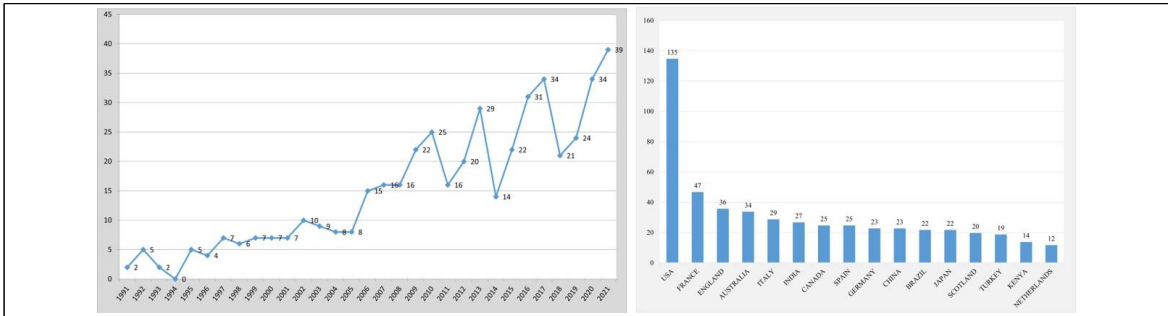
- * 1990년대에 들어서면서 연구가 시작됨
- * 2010년 이후 전세계적으로 100여편 이상의 연구논문이 발표됨.
- * 미국, 프랑스, 중국, 영국 순, 대한민국 순위 안에 없음. 거의 연구가 이루어지고 있지 않았음. 최근에 KIOST에서 다양성 및 미소생태계에서의 해양바이러스의 역할에 관련된 연구가 시작됨



– 해양바이러스 진단 연구

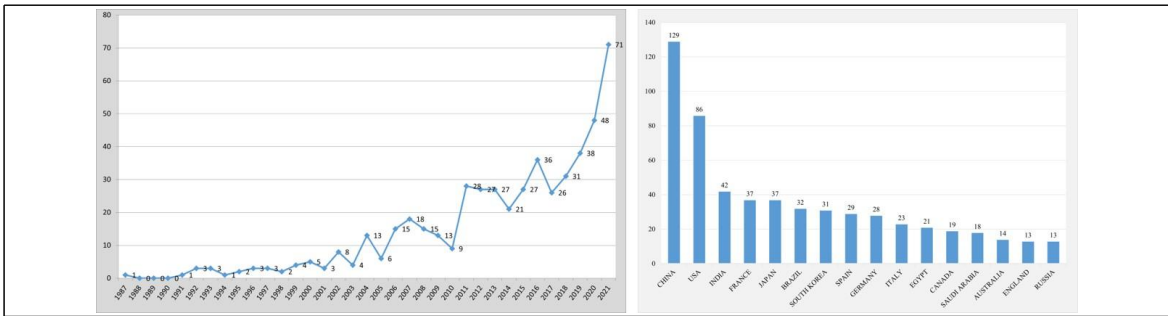
- * 1990년대에 들어서면서 연구가 시작됨
- * 사스와 조류독감등이 전세계적으로 문제를 야기하면서 2005년 이후 진단기술개발 관련 연구가 활성화 됨

- * 진단기술 역시 미국이 선도적인 연구를 수행하고 있으며, 프랑스, 영국, 호주가 연구를 선도함
- * 대한민국은 순위 안에 없음. 그러나 KIOST와 성균관대학교, 한림대학교, 부경대학교를 중심으로 진단 기술 개발과 관련된 연구가 시작되고 있는 시점이며, 조만간 전세계적인 연구 결과의 도출이 기대되고 있는 분야임



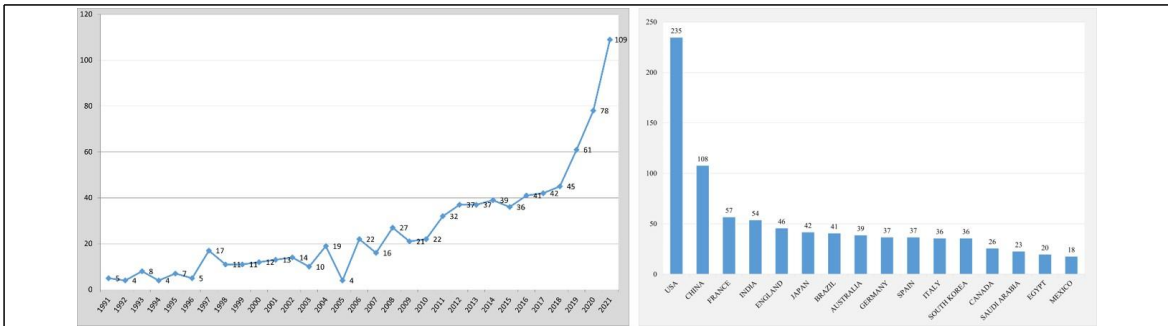
– 항바이러스 소재 개발 연구

- * 2000년 이후 연구가 증가하기 시작하였으며, 코로나 이후 급격한 관심을 받고 있는 분야임
- * 다른 분야와는 달리 항바이러스 소재 개발 분야는 중국(129편)이 선도적인 역할을 담당하고 있으며, 미국, 인도, 프랑스 순으로 나나탐
- * 대한민국은 7위(31편)로 비교적 상위 그룹에 속해 있으며, 천연물 및 생리활성 연구분야의 발전 정도에 비추어보면 발전가능성이 매우 높은 것으로 판단되고 있음



– 바이러스 치료제 개발 연구

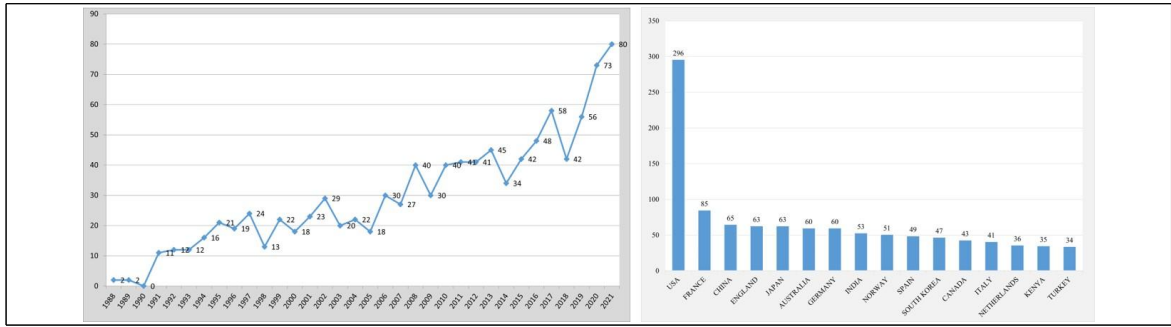
- * 2010년 이후 연구가 증가하기 시작하였으며, 코로나 이후 급격한 관심을 받고 있는 분야임
- * 미국, 중국, 프랑스 및 인도가 연구를 선도하고 있으며, 대한민국은 36편으로 12위 정도임



– 바이러스 백신 개발 연구

- * 백신 개발 연구는 치료제와는 달리 1990년대부터 연구가 수행되고 있었으며, 꾸준이 증가하고 있음

* 역시 미국, 프랑스, 중국, 영국이 연구를 선도하고 있으며, 대한민국은 11위(47편) 정도임



- 시사점

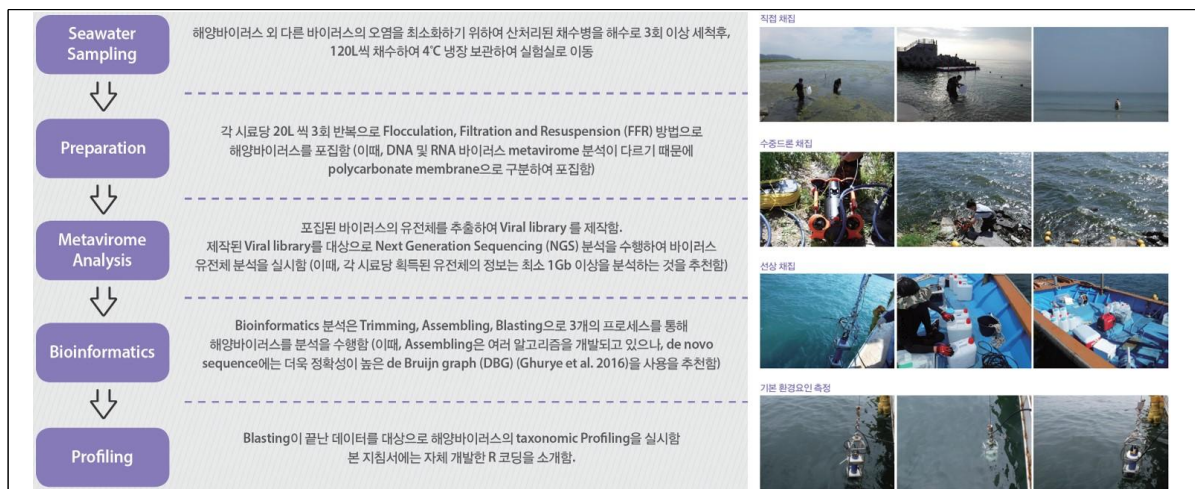
- * 다양성 및 진단기술 개발은 시작단계, 감염, 치료제 및 백신개발은 일반 해양바이러스와 유사하게 11-13위 정도, 거대바이러스와 항바이러스 소재는 4-6위 정도로 상위권을 보이고 있음
- * 최근에 국내에서 해양바이러스 관련 연구과제의 도출 등으로 거대바이러스, 다양성, 진단 등 다양한 분야에서의 의미있는 연구결과의 도출을 기대하고 있음
- * 코비드 이후 WHO의 DiseaseX와 One Health 개념이 알려지면서 다양성 연구도 활성화가 되고 있음 (전세계적으로 코비드 이전(약 160편)에 비해 2021년에 두배 정도 연구가 활성화되고 있음(273편))

나. NGS 기반 감염성 해양바이러스 모니터링 및 프로파일링

(1) 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 시스템 정립

○ 시료(해수) 채집

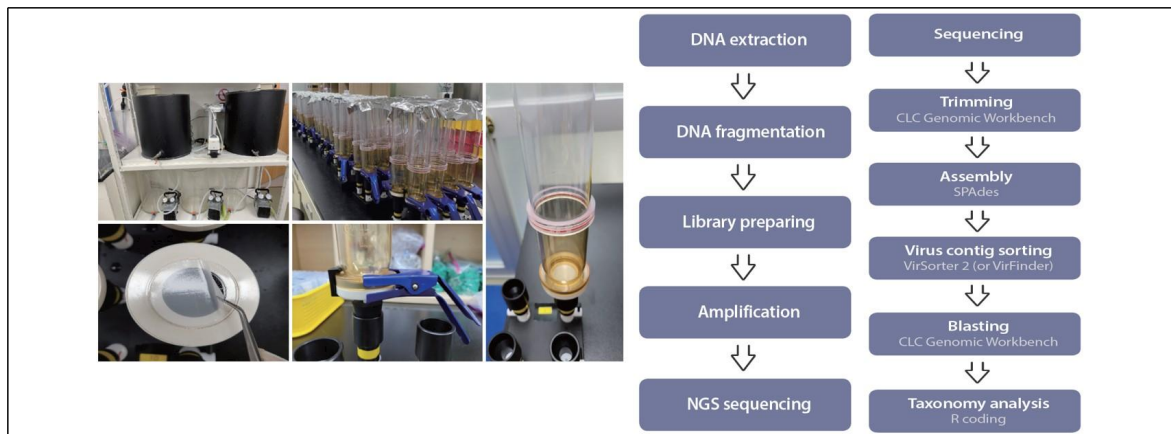
- 해양바이러스 분석을 위한 해수 채집은 크게 1) 육상 인접 해역에서 직접 채집, 2) 수중드론 채집, 3) 선상 채집 등 3가지 방법을 병행하여 채집하며, 정점 표층에서 멸균 세척된 채집 용기에 DNA 바이러스와 RNA 바이러스를 구분하여 20 L 씩 3배수로 포집하기 위하여 총 120 L를 채집함
- 채집된 시료는 4° C 아이스박스에 보관 후 실험실로 이동하여 시료 전처리를 실시함
- 각 채집정점에서는 다항목 수질측정기(EXO2, YSI, USA)를 사용하여 주변 해수로부터 기본 환경요인 측정하고, 실험실에서는 채수된 해수내 용존유기탄소 및 영양염 분석을 위한 전처리를 실시함



<Metavirome 분석 과정(좌) / 해수 시료 채집 및 환경요인 측정(우)>

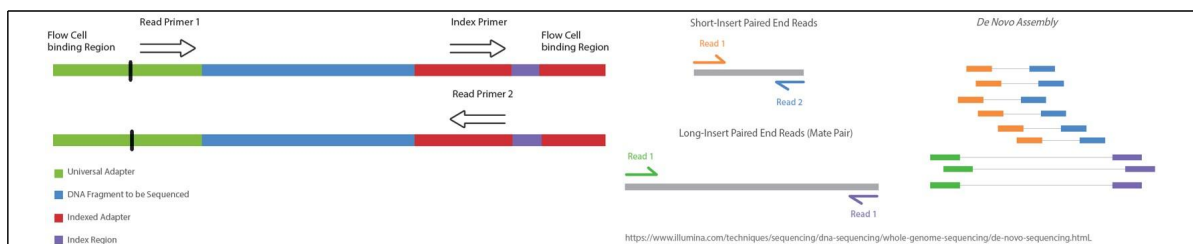
○ 해양바이러스 포집 및 Metavirome 분석

- Pre-filtering: 채집된 해수의 플랑크톤 및 불순물을 제거하기 위하여 3 μm filter cartridge를 이용하여 pre-filtering를 실시함.
- 해수의 유기물 양에 따라 전처리 시간은 다르나 대체적으로 120 L 기준 30분 정도 소요됨
- Virus aggregation: 해양바이러스의 크기가 매우 작기 때문에 FFR 방법에 따라 Fe^{++} 이온으로 해양바이러스를 응집시킴.
- 시약은 실험 직전에 제조해서 사용하고, 보관 시에 4° C 암소 상태로 보관함
- Virus harvesting: 암막수조에서 1시간동안 Fe^{++} 이온과 응집된 해양바이러스를 polycarbonate 재질의 0.2 μm membrane으로 포집함.
- 시료는 120 L를 동시에 filtering할 수 있게 있는 세트 구축(보통 3-4시간 정도면 완료할 수 있음)
- Filtering 전용 습식 분석실을 구축하였으며, 분석실 온도는 저온으로 안정적인 해수의 상태를 유지해야 함.
- 한 정점당 20장의 membrane씩 3배수 실험으로 총 60장의 membrane이 소요됨
- Viral DNA 추출 → DNA 농도 측정 → Fragment DNA 제작 → Adaptor ligation → Size fraction → PCR Amplification → Sequencing 순으로 진행
- Sequencing : 군집비교 분석 결과 결과값 신뢰성이 높은 HiSeq 4000을 사용하여 분석



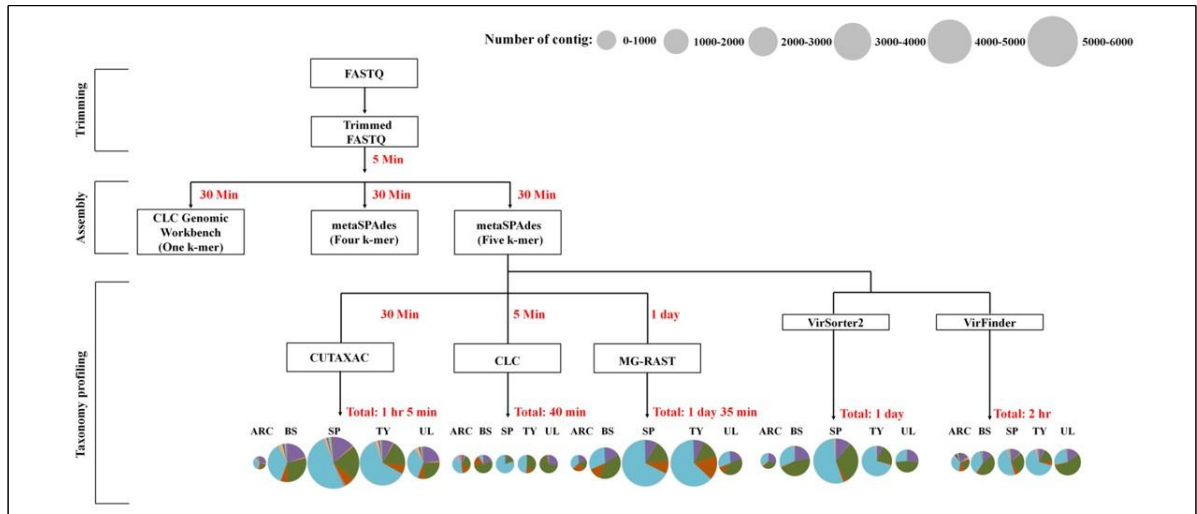
<설치된 Filtering 시스템(좌) 및 Metavirome (우)>

- Trimming: Sequencing을 하기 위해서는 adapter가 있어야 sequence 합성이 가능하나, trimming에서는 adapter를 제거해야 함.
- Program: Trinity, FastQC, Trimmomatic, CLC Genomic workbench, AdapterRemoval
- Assembling: 주로 de-Brujin graph나 overlap theory 같은 graph-based theory algorithm을 사용하게 됨. Velvet, SOAPdenovo, SOAPdenovo2, ALLPATHS, SPAdes, CLC Genomic workbench를 최적의 어셈블리를 위한 프로그램으로 검토하였음



<Trimming 순서(좌) 및 어셈블리 방법(우)>

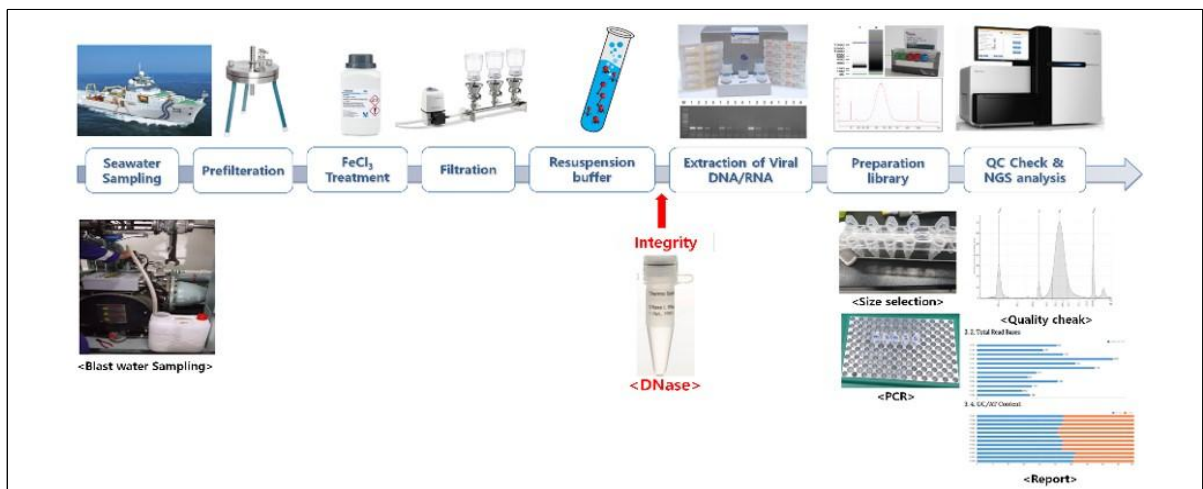
- 바이러스 종판별: VirSorter2를 사용함. 주로 dsDNA phage, NCLDV, RNA, ssDNA Virus를 타겟으로 분류하였음.
- R coding을 이용한 Taxonomic profiling은 다른 프로그램들에 비해 빠른 결과를 얻을 수 있으며, 더욱 다양한 바이러스 군집 구조를 얻을 수 있음.



<다양한 metavirome 분류 프로그램 활용 분석 예>

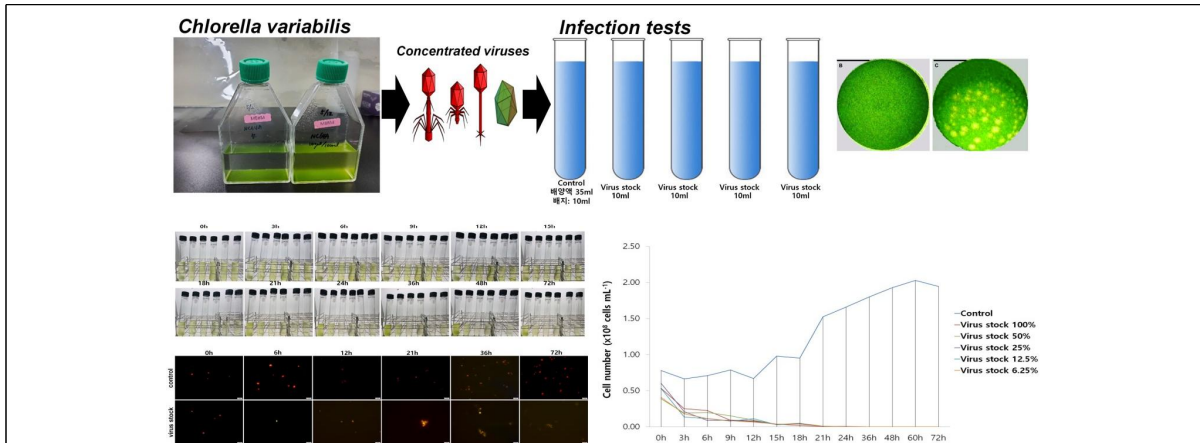
○ 농축 해양바이러스 integrity 및 감염성 검증

- 해수내 잔존되는 DNA debris 및 손상된 해양바이러스는 해양바이러스 군집 분석 과정에서 많은 결과의 외삽을 야기할 수 있기 때문에 분석 전처리 과정에서 이들을 제거해야지만 정확한 데이터를 확보할 수 있음.
- 따라서 이들을 제거하기 위하여 분석의 전처리에서 Integrity 과정에서 추가하여 분석 결과의 신뢰성을 도모하고자 함.
- 농축한 바이러스는 DNase 처리하는 Integrity 과정을 통해 잔존하는 DNA debris 및 손상된 해양바이러스를 제거하였음.
- 대조구로 Integrity 과정을 처리하지 않은 분석 처리 절차를 진행하였음.
- 이후 viral DNA를 추출후 Illumina HiSeq 4000를 통한 NGS 분석하기 전 QC 과정을 통해 처리구와 대조구의 Integrity를 확인 과정과 함께 결과 분석하였음.



<선박평형수 내 Integrity 과정을 포함한 해양 바이러스 분석 과정>

- Integrity 과정을 통해 감염성 바이러스를 통해 Host에 감염실험을 수행하기 위하여, *Chlorella variabilis* 와 specific virus의 감염실험을 수행하였음.
- Test tube에 *C. variabilis* 35 ml과 분리된 specific virus를 integrity 과정을 통해 stock 10 ml 처리하여 숙주 최적 성장 온도인 25° C 배양시키며 감염 반응을 진행하였음.
- 감염 이후 virus stock을 처리한 실험구는 3 h부터 급격한 cell count 감소가 나타났으며, 현미경 관찰 결과에서는 *C. variabilis* cell의 감소를 보였음.
- 이에 반해, 숙주 배양액만 처리한 대조구는 시간이 지날수록 cell count가 증가하였음.
- 따라서, 실험 결과는 숙주인 *Chlorella variabilis*가 integrity 과정을 거친 후에도 바이러스의 감염에 의한 사멸이 관찰되어, 바이러스의 integrity는 유지되고 있음이 확인됨.

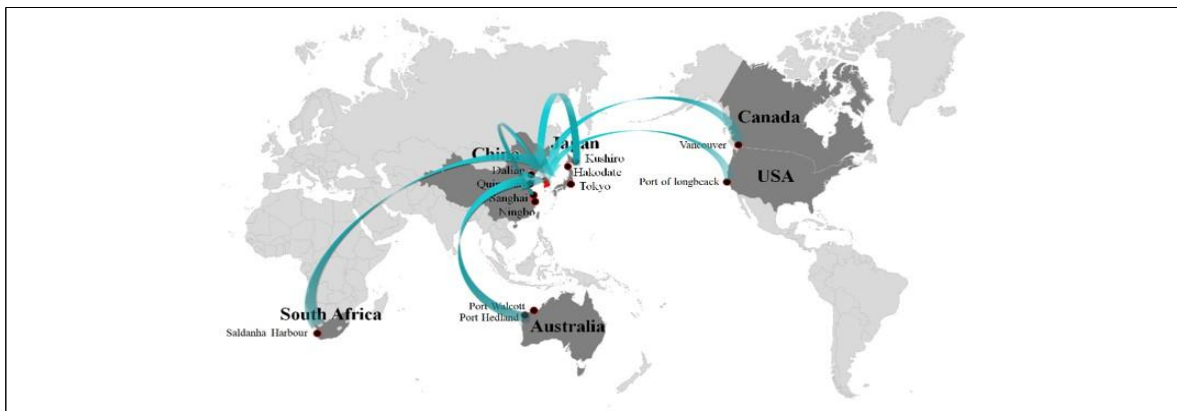


<Chlorella variabilis-Virus 감염 실험 모식도(좌) 및 감염 실험 결과(우)>

(2) 선박평형수 유래 감염성 해양바이러스 모니터링

○ 선박평형수 시료채취

- 선박평형수 시료 분석을 위하여 한국선주협회 및 해운사를 통해 기항지별 선박 정보 및 시료 채취 선박을 확보하고, 부산 및 울산항에 입출항하는 컨테이너선의 선박평형수를 중심으로 NGS 분석을 수행하였음.
- 2018년 베트남, 호주, 남아공, 미국, 캐나다, 2019년 일본 14지역, 중국 4개지역, 베트남, 태국, 홍콩유래 선박평형수 등 총 57개 시료를 확보하였음.
- 선박에서 선박평형수를 채취한 후 시료의 2차 오염을 방지하기 위하여 시험 도구를 멸균하여 준비하였고 이동 시 4°C 이하로 냉장 보관하여 분석을 실시하였음



<선박평형수 채수 지역 및 현황>

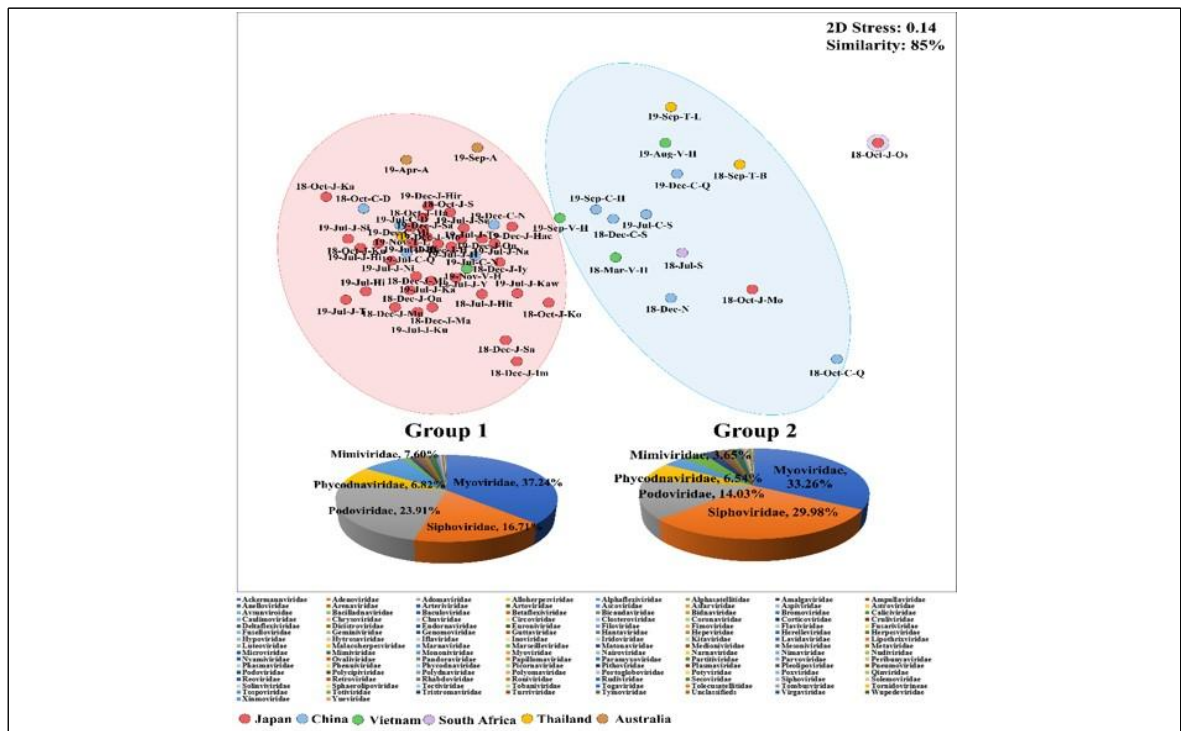
Country	City	Year	Month	abbreviation
South Africa	-	2018	07	BW-Rsa-JUL18
Japan	Kamaishi, Sendai, Kushiro, Hakodate, Kobe, Moji, Osaka, Iyomishima, Hibiki, Mororan, Matsuyama, Misushima, Imabari, Sakata, Hitachinaka, Onahama, Kamashi, Nagoya, Shimizu, Hitachinaka, Kawasaki, Niigata, Tomakomai, Yokohama, Tokyo, Hachinohe, Hiroshima	2018	10,12	BW-KamJa-OCT18, BW-SenJa-OCT18, BW-HakoJa-OCT18, BW-KusJa-OCT18, BW-KobJa-OCT18, BW-MojiJa-OCT18, BW-Osaja-OCT18, BW-IyoJa-DEC18, BW-HibJa-DEC18, BW-MorJa-DEC18, BW-MatJa-DEC18, BW-MisJa-DEC18, BW-ImaJa-DEC18, BW-SakJa-DEC18, BW-HitJa-DEC18, BW-OnaJa-DEC18
		2019	07,12	BW-HibJa-JUL19, BW-HakJa-JUL19, BW-QinJa-JUL19, BW-KamJa-JUL19, BW-NagJa-JUL19, BW-ShiJa-JUL19, BW-HitJa-JUL19, BW-KawJa-JUL19, BW-NigJa-JUL19, BW-OnaJa-JUL19, BW-TomJa-JUL19, BW-YokJa-JUL19, BW-TokJa-JUL19, BW-KusJa-JUL19, BW-SenJa-JUL19, BW-MojiJa-DEC19, BW-HacJa-DEC19, BW-SakJa-DEC19, BW-Hakaja-DEC19, BW-HirJa-DEC19, BW-MijJa-DEC19
Vietnam	Hochiminh	2018	03	BW-HocVi-MAR18
China	Dalian, Shanghai, Ningbo, Qingdao, Hongkong	2019	07,08,09,11	BW-hocVi-AUG19, BW-HocVi-SEP19, BW-HocVi-NOV19, BW-Vi+Ma-JUL19
		2018	10,12	BW-DalCh-OCT18, BW-QinCh-OCT18, BW-ShaCh-DEC18, BW-NinCh-DEC18
Thailand	Laemchabang, Bangkok	2019	09,12	BW-LaeTa-SEP19, BW-BanTa-SEP19, BW-LaeTa-NOV19
Australia	-	2018	04,09	BW-Au-APR18, BW-Au-SEP18

<선박평형수 시료 목록>

○ 선박평형수 metavirome 분석

- 선박평형수 시료에 대해서 nMDS 분석하였을 때, 크게 두 개의 그룹으로 나누어졌음(유사도 85%)

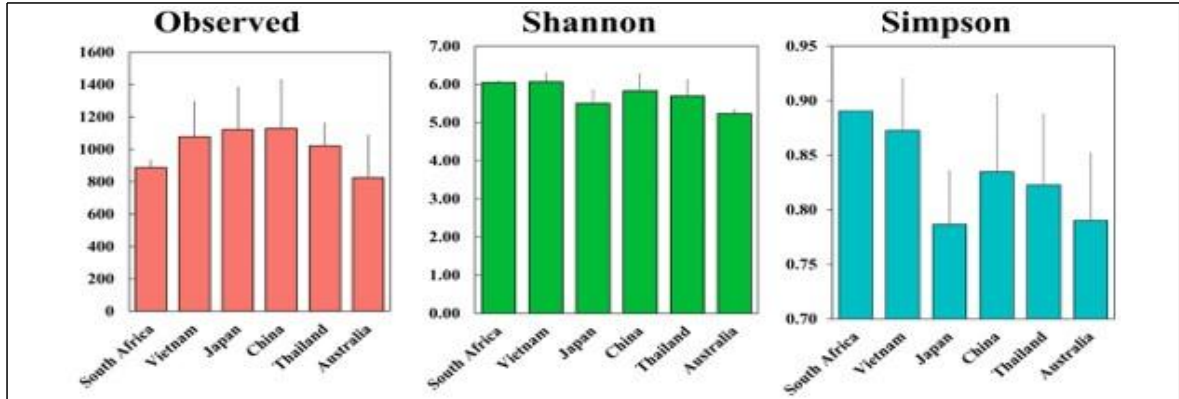
- * GroupI은 남아프리카공화국, 베트남 및 태국 유래 선박평형수이며, GroupII는 일본, 중국 및 호주 시료로 나누어짐
- * Bacteriophage의 경우 모든 시료에서 Myoviridae (30.33-49.12%)가 우점하였으며, Ineectious virus(L_virus) 중에서는 Phycodnaviridae (4.41-7.55%)가 우점하는 것으로 나타났음
- * GroupI은 GroupII에 비해 Podoviridae와 Mimiviridae 비율이 높았으며, GroupII는 GroupI에 비해 Sipoviridae, Pandoraviridae 및 Herpesviridae의 비율이 높은 것으로 나타났음



<선박평형수 nMDS 분석>

- 선박평형수를 a-diversity 분석하였음

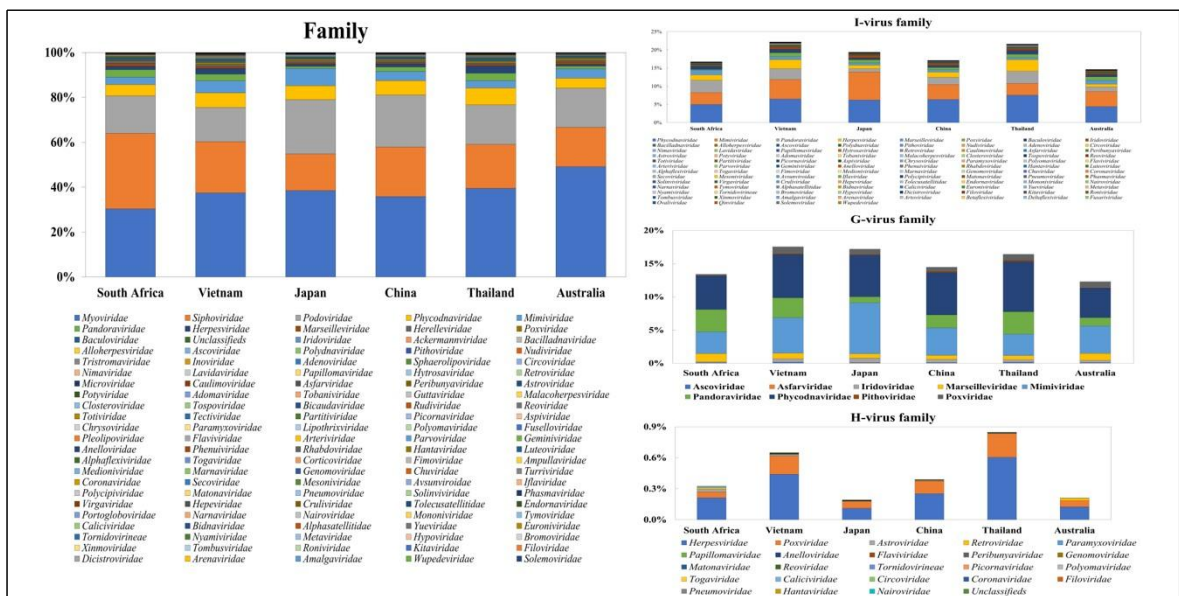
- * 검출된 바이러스 OTU는 825-1129로 나타났으며, 중국 선박평형수에서 가장 많은 바이러스가 검출되었음
- * Shannon index는 5.23-6.07이었으며, Simpson index는 0.79-0.89로 분석되어 시료간 차이가 많지 않은 것으로 나타났음



<선박평형수 a-diversity 분석>

- 선박평형수의 바이러스 taxonomy 분석을 실시하였음

- * 6개국 유래 선박평형수 시료에서 115개 바이러스 Family가 검출되었음
- * 박테리오파지는 77.09-85.09%를 차지하였으며, 감염성 바이러스(Infectious virus, I-virus)는 14.63-22.18%로 분석되었음
- * 파지는 Myoviridae, Sipoviridae 및 Podoviridae가 우점하였으며, I-virus는 Phycodnaviridae, Mimiviridae, Pandoraviridae 및 Herpesviridae가 우점하였음
- * 거대바이러스(Giant virus, G-virus)는 9개 Family가 검출되었으며, Phycodnaviridae (4.41-7.55%), Mimiviridae (3.22-7.70%), Pandoraviridae (0.89-3.38%)가 전 지역에서 우점하였음
- * 인간감염 바이러스(Human virus, H-virus)는 24개의 Family가 검출되었으며, Herpesviridae (0.11-0.60%)와 Poxviridae (0.06-0.23%)가 우점하였으나 전체에서 차지하는 비율은 낮았음



<선박평형수에서 검출된 해양바이러스 Total Family(좌) 및 I-virus, G-virus 및 H-virus Family(우)>

- 선박평형수에서의 G-virus top20과 H-virus top20을 분석하였음

* Marseilleviridae 1종, Mimiviridae 7종, Pandoraviridae 4종 및 Phycodnaviridae 8종이 검출되었으며, 아메바와 조류를 숙주로 하는 바이러스로 나타났음

* H-virus는 Herpesviridae 13종, Poxviridae 6종 및 Retroviridae 1종이 검출되었음

Species	Family	South Africa	Vietnam	Japan	China	Thailand	Australia	Host
<i>TokyoivirusA1</i>	Marseilleviridae	1.14%	0.68%	0.58%	0.53%	0.52%	0.92%	Acanthamoeba
<i>Acanthamoeba polyphagomoumouivirus</i>		0.39%	0.69%	0.75%	0.44%	0.37%	0.55%	Acanthamoeba
<i>Aureococcusanophagefferensvirus</i>		0.89%	0.56%	0.77%	0.37%	0.40%	0.51%	Algae
<i>Cafeteria roenbergensisvirus</i> BV-PW1	Mimiviridae	0.41%	0.90%	1.10%	0.46%	0.35%	0.70%	Algae
<i>Chrysochromulinaericinavirus</i>		0.32%	1.14%	2.71%	1.32%	0.85%	0.73%	Algae
<i>Megaviruschiliensis</i>		0.67%	0.65%	0.73%	0.39%	0.37%	0.62%	Acanthamoeba
<i>Mimivirusterra2</i>		0.38%	0.35%	0.40%	0.25%	0.27%	0.31%	Acanthamoeba
<i>Phaeocystisglobosavirus</i>		0.15%	0.42%	0.75%	0.40%	0.31%	0.23%	Algae
<i>Pandoravirusdulcis</i>		0.98%	0.82%	0.23%	0.62%	0.97%	0.32%	Acanthamoeba
<i>Pandoravirus inopinatum</i>	Pandoraviridae	0.48%	0.33%	0.13%	0.22%	0.35%	0.10%	Acanthamoeba
<i>Pandoravirus neocaledonia</i>		0.60%	0.57%	0.17%	0.34%	0.67%	0.25%	Acanthamoeba
<i>Pandoravirussalinus</i>		0.77%	0.62%	0.19%	0.40%	0.75%	0.25%	Acanthamoeba
<i>Acanthocystisturfaceachlorella virus 1</i>		0.51%	0.43%	0.23%	0.36%	0.47%	0.19%	Algae
<i>Bathycoccus</i> sp. RCC1105 virus BpV1		0.60%	0.77%	0.75%	0.72%	1.25%	0.32%	Algae
<i>Dishui lake phycodnavirus 1</i>		0.44%	0.34%	0.10%	0.18%	0.31%	0.14%	-
<i>Micromonas</i> sp. RCC1109 virus MpV1	Phycodnaviridae	0.29%	0.55%	0.67%	0.46%	0.73%	0.29%	Algae
<i>Micromonas</i> sp. RCC1109 virus MpV1		0.12%	0.73%	1.19%	1.15%	1.26%	0.89%	Algae
Only Syngen Nebraska virus 5		0.76%	0.52%	0.40%	0.37%	0.42%	0.41%	Algae
<i>Orpheovirus</i> HUMI-LCC2		0.38%	0.20%	0.21%	0.13%	0.14%	0.26%	Vermamoeba
<i>Ostreococcuslucimarinusvirus</i> OIV5		0.06%	0.41%	0.18%	0.20%	0.67%	0.07%	Algae

<선박평형수 G-virus top20>

Species	Family	South Africa	Vietnam	Japan	China	Thailand	Australia
<i>Papiinealphaherpesvirus2</i>		0.03%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%
<i>Cercopithecine alphaherpesvirus2</i>		0.10%	0.08%	0.02%	0.08%	0.15%	0.03%
<i>Macacinealphaherpesvirus1</i>		0.06%	0.09%	0.01%	0.05%	0.12%	0.03%
<i>Human gammaherpesvirus8</i>		0.00%	0.08%	0.01%	0.05%	0.11%	0.02%
<i>Human alphaherpesvirus2</i>		0.01%	0.05%	0.03%	0.02%	0.07%	0.01%
<i>Human alphaherpesvirus1</i>		0.00%	0.08%	0.01%	0.02%	0.07%	0.02%
<i>Human betaherpesvirus7</i>	Herpesviridae	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.02%	0.01%
<i>Human betaherpesvirus6B</i>		0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.03%	0.00%
<i>Human betaherpesvirus6A</i>		0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Human alphaherpesvirus3</i>		0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Human betaherpesvirus5</i>		0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Human herpesvirus 4 type 2</i>		0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Human gammaherpesvirus4</i>		0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Molluscum contagiosum virus</i> subtype 1		0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
Orfvirus		0.06%	0.12%	0.03%	0.08%	0.17%	0.03%
NY_014 poxvirus	Poxviridae	0.00%	0.02%	0.01%	0.02%	0.04%	0.00%
<i>Yaba-like disease virus</i>		0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%
<i>Cowpox virus</i>		0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Yabamonkey tumor virus</i>		0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Human endogenous retrovirus</i> K113	Retroviridae	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%

<선박평형수 H-virus top20>

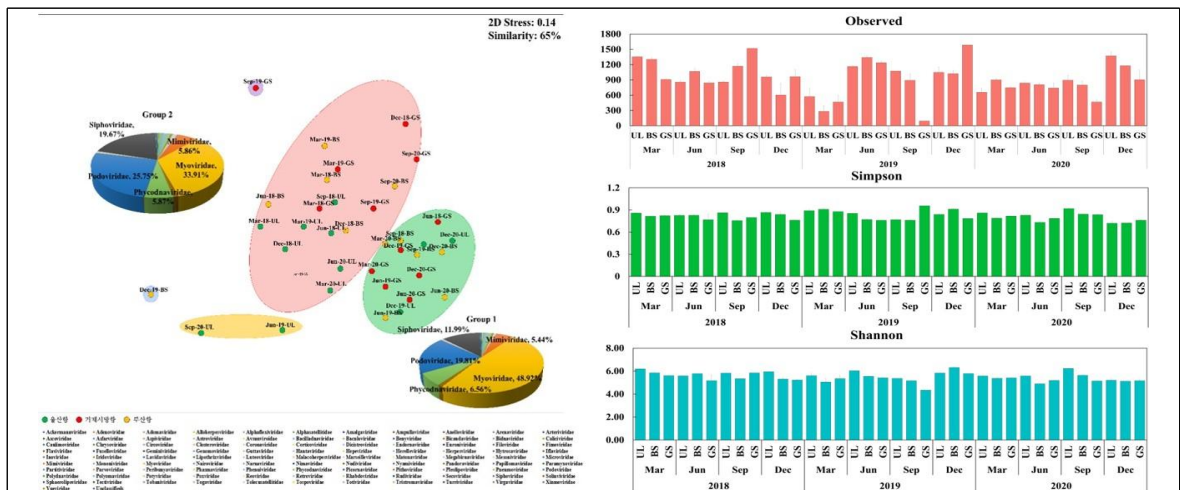
(3) 항만해수 유래 감염성 해양바이러스 모니터링 및 시계열 발생패턴 분석

○ 울산, 부산, 거제항 해수 채취

- 항만해수 시료 분석을 위하여 울산, 부산 및 거제항을 3년간(2018.03-2020.12) 계절별(3,6,9,12월) 해수를 채취하였음
- 12개 해수 시료를 3배수로 채집하였으며, 시료의 2차 오염을 방지하기 위하여 시험 도구를 멸균하여 준비하였고 이동 시 4℃ 이하로 냉장 보관하여 분석을 실시하였음

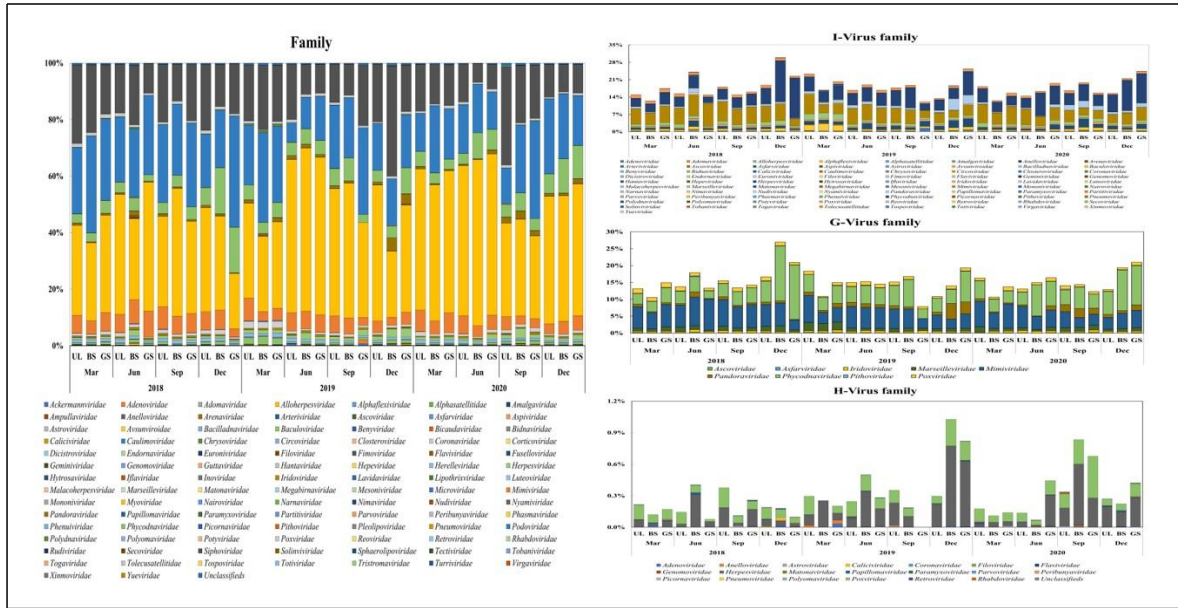
○ 항만해수 NGS 분석

- 항만해수 시료에 대해서 nMDS 분석하였을 때, 크게 두 개의 그룹으로 나누어졌음(유사도 85%)
 - * Group I은 Group II에 비해 Myoviridae의 비율이 높았으며, 두 개의 그룹에는 Phycodnaviridae 및 Mimiviridae가 우점하였음
- 항만해수를 a-diversity 분석하였음
 - * 검출된 바이러스 OTU는 94-1587로 나타났으며, 2019년 12월 거제항 시료에서 가장 많은 바이러스가 검출되었음
 - * Shannon index는 4.35-6.31이었으며, Simpson index는 0.72-0.96로 분석되어 시료간 차이가 크지 않은 것으로 나타났음



<항만해수 nMDS 분석(좌) 및 a-diversity 분석>

- 항만해수의 바이러스 taxonomy 분석을 실시하였음
 - * 항만해수 시료에서 101개 바이러스 Family가 검출되었음
 - * 박테리오파지는 69.61-87.02%를 차지하였으며, I-virus는 12.46-29.94%로 분석되었음
 - * 파지는 Myoviridae, Sipoviridae 및 Podoviridae가 우점하였으며, I-virus는 Phycodnaviridae, Mimiviridae, Pandoraviridae 및 Herpesviridae가 우점하였음
 - * G-virus는 9개 Family가 검출되었으며, Phycodnaviridae (2.26-16.28%), Mimiviridae (2.80-9.15%), Pandoraviridae (0-4.58%)가 전 지역에서 우점하였음
 - * H-virus는 21개의 Family가 검출되었으며, Herpesviridae와 Poxviridae가 우점하였으나 전체에서 차지하는 비율은 매우 낮았음



<항만해수에서 검출된 해양바이러스 Total Family(좌) 및 I-virus, G-virus 및 H-virus Family(우)>

- 항만해수에서의 G-virus top20과 H-virus top20을 분석하였음

- * G-virus는 Marseilleviridae 1종, Mimiviridae 8종, Pandoraviridae 2종 및 Phycodnaviridae 11종이 검출되었으며, 아메바와 조류를 숙주로 하는 바이러스로 나타났음
- * H-virus는 Herpesviridae 10종, Poxviridae 9종 및 Unclassified 1종이 검출되었음

Species	Family	Host	2018			2019			2020		
			UL	BS	GS	UL	BS	GS	UL	BS	GS
<i>TokyovirusA1</i>	Marseilleviridae	Acanthamoeba	1.12%	0.91%	0.67%	0.91%	0.69%	0.75%	0.79%	0.68%	0.91%
<i>Acanthamoeba polyphagomimivirus</i>		Acanthamoeba	0.29%	0.32%	0.28%	0.42%	0.38%	0.39%	0.31%	0.25%	0.38%
<i>Acanthamoeba polyphagomoumavirus</i>		Acanthamoeba	0.95%	0.85%	0.77%	0.82%	0.70%	0.83%	0.71%	0.65%	0.89%
<i>Aureococcusnaphogefferevirus</i>		Algae	0.67%	0.82%	0.54%	0.60%	0.51%	0.71%	0.45%	0.36%	0.55%
<i>Cafeteria roenbergensis</i> BV-PW1	Mimiviridae	Algae	1.10%	1.09%	0.99%	1.10%	0.74%	0.88%	0.78%	0.61%	0.87%
<i>Chrysochromulinaeicnavirus</i>		Algae	1.58%	1.37%	1.92%	1.07%	1.64%	1.19%	1.16%	0.95%	1.18%
<i>Megavirus chilensis</i>		Acanthamoeba	0.82%	0.90%	0.64%	0.82%	0.57%	0.68%	0.59%	0.51%	0.68%
<i>Mimivirus terra2</i>		Acanthamoeba	0.53%	0.41%	0.37%	0.55%	0.40%	0.45%	0.39%	0.33%	0.47%
<i>Phaeocystis globosa virus</i>		Algae	0.60%	0.49%	0.56%	0.36%	0.50%	0.46%	0.33%	0.32%	0.43%
<i>Pandoravirusdulcis</i>	Pandoraviridae	Acanthamoeba	0.12%	0.10%	0.07%	0.21%	0.33%	0.36%	0.19%	0.16%	0.23%
<i>Pandoravirussalinus</i>		Acanthamoeba	0.14%	0.11%	0.08%	0.21%	0.31%	0.31%	0.20%	0.16%	0.27%
<i>Acanthocystisturfataeclarella virus 1</i>		Algae	0.23%	0.21%	0.20%	0.35%	0.22%	0.26%	0.21%	0.18%	0.24%
<i>Bathycoccus</i> sp. RCC1105 virus BpV1		Algae	1.07%	1.07%	1.47%	0.59%	0.54%	0.63%	1.02%	1.04%	1.26%
<i>Micromonaspusillivirus 12T</i>		Algae	0.24%	0.38%	0.55%	0.36%	0.50%	0.54%	0.49%	0.91%	0.74%
<i>Micromonaspusillivirus SP1</i>		Algae	0.13%	0.17%	0.26%	0.17%	0.25%	0.20%	0.21%	0.42%	0.35%
<i>Micromonas</i> sp. RCC1109 virus MpV1		Algae	0.29%	0.46%	1.20%	0.36%	1.39%	0.99%	0.96%	2.23%	1.54%
<i>Only Syngen Nebraska virus 5</i>	Phycodnaviridae	Algae	0.63%	0.50%	0.34%	0.68%	0.45%	0.50%	0.45%	0.34%	0.52%
<i>OrpheovirusHUM-LC2</i>		Vermamoeba	0.26%	0.28%	0.17%	0.21%	0.18%	0.19%	0.18%	0.14%	0.19%
<i>Ostreococcuslucimarinivirus 1</i>		Algae	0.07%	0.20%	0.34%	0.12%	0.23%	0.17%	0.22%	0.40%	0.25%
<i>Ostreococcuslucimarinivirus CIV5</i>		Algae	0.05%	0.37%	0.56%	0.08%	0.20%	0.26%	0.10%	0.22%	0.24%
<i>Tokyovirus A1</i>		Acanthamoeba	1.12%	0.91%	0.67%	0.91%	0.69%	0.75%	0.79%	0.68%	0.91%
<i>Acanthamoeba polyphagomimivirus</i>		Acanthamoeba	0.29%	0.32%	0.28%	0.42%	0.38%	0.39%	0.31%	0.25%	0.38%

<항만해수 G-virus top20>

Species	Family	2018			2019			2020		
		UL	BS	GS	UL	BS	GS	UL	BS	GS
<i>Human gammaherpesvirus8</i>	Herpesviridae	0.02%	0.05%	0.02%	0.02%	0.04%	0.08%	0.04%	0.03%	0.07%
<i>Papillinealpha herpesvirus2</i>		0.02%	0.00%	0.02%	0.03%	0.07%	0.04%	0.03%	0.02%	0.03%
<i>Human alphaherpesvirus2</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.05%	0.04%	0.02%	0.02%	0.03%
<i>Macacinealpha herpesvirus1</i>		0.01%	0.00%	0.00%	0.02%	0.05%	0.04%	0.02%	0.02%	0.03%
<i>Cercopithecine alpha herpesvirus2</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.06%	0.03%	0.01%	0.02%	0.03%
<i>Human betaherpesvirus7</i>		0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.00%
<i>Human alphaherpesvirus1</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Human herpesvirus 4 type 2</i>		0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human alphaherpesvirus3</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Human betaherpesvirus6A</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

<i>Molluscum contagiosum virus subtype 1</i>	Poxviridae	0.05%	0.01%	0.02%	0.03%	0.08%	0.07%	0.03%	0.04%	0.06%
<i>NY_014 poxvirus</i>		0.03%	0.02%	0.01%	0.03%	0.01%	0.01%	0.02%	0.01%	0.01%
<i>Monkeypox virus Zaire-96-1-16</i>		0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%	0.03%
<i>Yaba-like disease virus</i>		0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
<i>Vaccinia virus</i>		0.03%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Orfivirus</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.02%	0.01%	0.01%	0.00%	0.01%
<i>Yabamoney tumor virus</i>		0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%
<i>Cowpox virus</i>		0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Variola virus</i>		0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Senegalvirusmarseillivir</i>		Unclassifieds	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

<항만해수 H-virus top20>

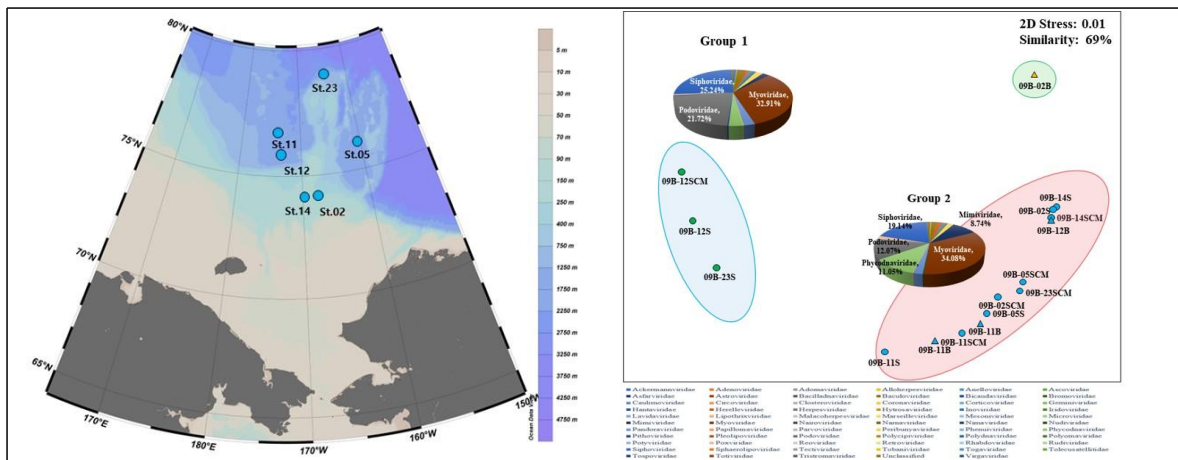
(4) 북극 해수 유래 감염성 해양바이러스 모니터링

○ 북극해수 채집

- 북극 해수 시료 분석을 위하여 베링해 해수를 2018년 8월에 채취하였음
- 12개 해수 시료를 3배수로 채집하였으며, 시료의 2차 오염을 방지하기 위하여 시험 도구를 멸균하여 준비하였고 이동 시 4℃ 이하로 냉장 보관하여 분석을 실시하였음

○ 북극해수 NGS 분석

- 북극해수 시료에 대해서 nMDS 분석하였을 때, 크게 두 개의 그룹으로 나누어졌음(유사도 69%)
- * GroupI은 정점 12CM, 12S 및 23S이었으며, Myoviridae, Mimiviridae, Phycodnaviridae 및 Poxviridae가 상대적으로 높았으며, GroupII는 Sipoviridae, Podoviridae, Baculoviridae 및 Marseilleviridae가 상대적으로 높은 비율로 검출되었음

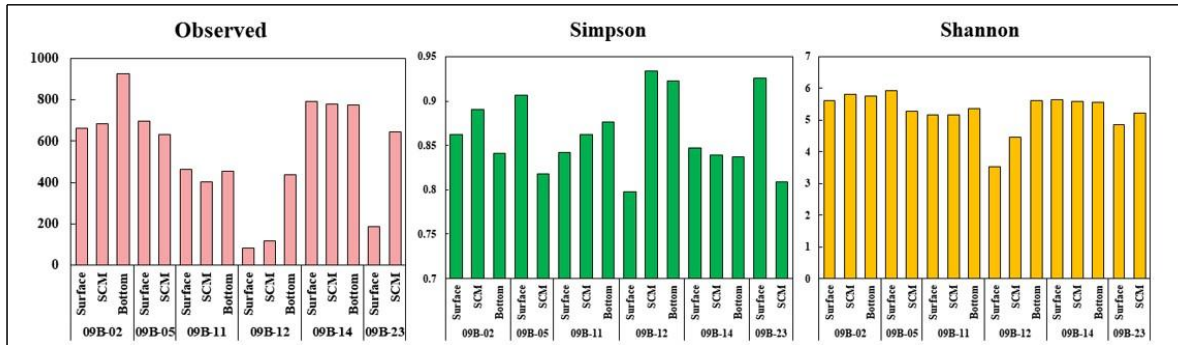


<북극해수 채수해역(좌) 및 북극 해수 nMDS 분석(우)>

- 북극해수를 a-diversity 분석하였음

* 검출된 바이러스 OTU는 평균 546개로 나타났음

* Shannon index는 3.54-5.94이었으며, Simpson index는 0.80-0.93로 분석되어 시료간 차이가 크지 않은 것으로 나타났음



<북극해수 a-diversity 분석>

- 북극해수의 바이러스 taxonomy 분석을 실시하였음

* 북극해수 시료에서 65개 바이러스 Family가 검출되었음

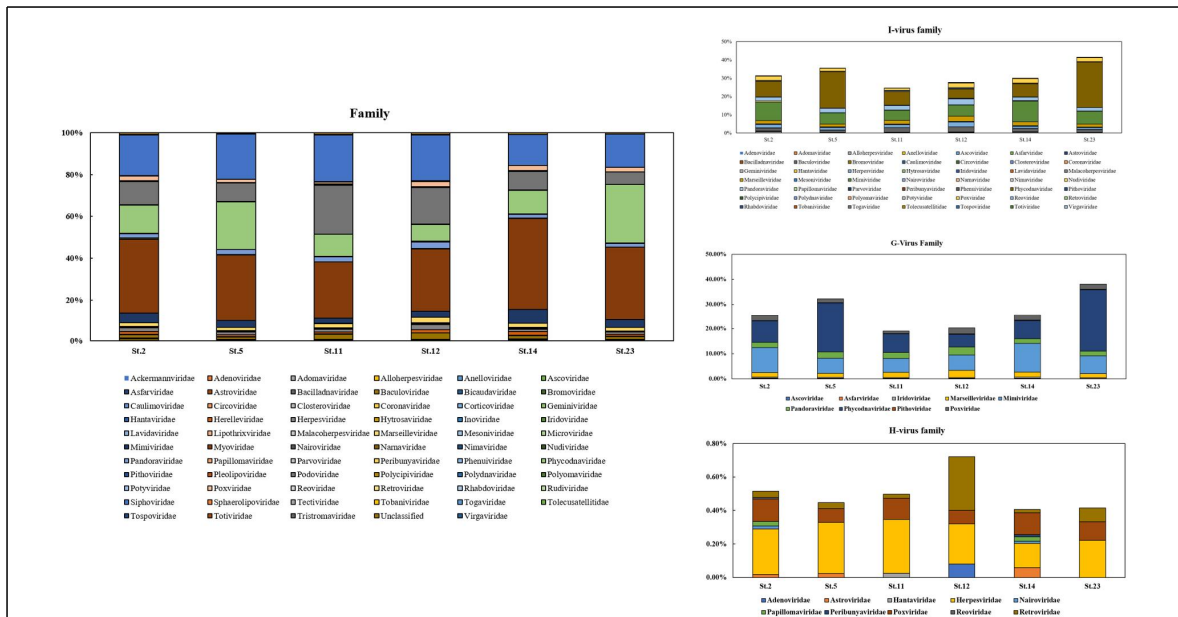
* 박테리오파지는 15개 Family가 검출되었으며, 58.00-74.63%를 차지하였으며, I-virus는 50개 Family가 검출되었으며, 24.48-41.36%로 분석되었음

* I-virus 비율은 분석된 선박평형수, 항만해수 및 남태평양 해수에 비해 가장 높게 나타났음

* 파지는 Myoviridae, Sipoviridae 및 Podoviridae가 우점하였으며, I-virus는 Phycodnaviridae, Mimiviridae, Pandoraviridae 및 Herpesviridae가 우점하였음

* G-virus는 9개 Family가 검출되었으며, Phycodnaviridae (5.04-24.84%), Mimiviridae (5.52-11.42%), Pandoraviridae (1.86-3.20%)가 전 지역에서 우점하였음

* H-virus는 10개의 Family가 검출되었으며, Herpesviridae와 Poxviridae가 우점하였으나, 전체에서 차지하는 비율은 매우 낮았음



<북극해수에서 검출된 해양바이러스 Total Family(좌) 및 I-virus, G-virus 및 H-virus Family(우)>

- 북극 해수에서의 G-virus top20과 H-virus top20을 분석하였음

- * G-virus는 Marseilleviridae 1종, Mimiviridae 7종, Pandoraviridae 3종 및 Phycodnaviridae 6종이 검출되었으며, 아메바와 조류를 숙주로 하는 바이러스로 나타났음
- * H-virus는 Adenoviridae 1종, Astroviridae 1종, Herpesviridae 8종, Poxviridae 7종 및 Retroviridae 1종이 검출되었음

Name	Fam	Host	St.2	St.5	St.11	St.12	St.14	St.23
<i>TokyovirusA1</i>	Marseilleviridae	Acanthamoeba	1.46%	1.48%	1.84%	2.64%	1.85%	1.58%
<i>Acanthamoeba polyphaga moumouvirus</i>		Acanthamoeba	1.19%	0.86%	0.55%	0.40%	1.99%	1.03%
<i>Aureococcus anophagefferens virus</i>		Algae	1.68%	0.61%	1.09%	1.12%	1.45%	1.41%
<i>Cafeteria roenbergensis virus BV-PW1</i>		Algae	1.53%	0.99%	0.77%	0.96%	2.09%	1.41%
<i>Chysochromulina ericina virus</i>	Mimiviridae	Algae	1.91%	1.25%	1.47%	1.04%	1.78%	1.05%
<i>Megaviruschiliensis</i>		Acanthamoeba	1.26%	0.78%	0.55%	0.88%	1.77%	0.86%
<i>Mimivirus terra2</i>		Acanthamoeba	0.61%	0.33%	0.15%	0.48%	0.81%	0.39%
<i>Phaeocystis globosa virus</i>		Algae	1.49%	0.95%	0.50%	0.72%	1.03%	0.75%
<i>Acanthocystis turfacea chlorella virus 1</i>		Algae	0.89%	0.56%	0.62%	0.48%	0.48%	0.44%
<i>Bathycoccus sp. RCC1105 virus BpV1</i>		Algae	0.70%	2.44%	0.47%	0.56%	0.60%	3.88%
<i>Micromonas pusilla virus 12T</i>	Phycodnaviridae	Algae	0.64%	2.69%	0.60%	0.24%	0.43%	4.88%
<i>Micromonas pusilla virus SP1</i>		Algae	0.34%	2.35%	0.67%	0.08%	0.44%	2.72%
<i>Micromonas sp. RCC1109 virus MpV1</i>		Algae	1.29%	6.71%	2.31%	0.40%	0.96%	7.46%
<i>Only Syngen Nebraska virus 5</i>		Algae	0.82%	0.51%	0.32%	0.48%	0.77%	0.47%
<i>Pandoravirus dulcis</i>		Acanthamoeba	0.54%	0.87%	0.72%	0.80%	0.33%	0.44%
<i>Pandoravirus neocaledonia</i>	Pandoraviridae	Acanthamoeba	0.49%	0.45%	0.42%	0.48%	0.51%	0.61%
<i>Pandoravirussalinus</i>		Acanthamoeba	0.32%	0.35%	0.45%	0.80%	0.35%	0.33%

Name	Family	St.2	St.5	St.11	St.12	St.14	St.23	
<i>Human mastadenovirusD</i>	Adenoviridae	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.00%	
<i>Mamastrovirus1</i>	Astroviridae	0.02%	0.02%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%	
<i>Human betaherpesvirus5</i>	Herpesviridae	0.03%	0.07%	0.05%	0.16%	0.01%	0.03%	
<i>Papiinealphaherpesvirus2</i>		0.09%	0.09%	0.07%	0.00%	0.01%	0.03%	
<i>Human gammaherpesvirus8</i>		0.03%	0.01%	0.05%	0.08%	0.03%	0.03%	
<i>Human betaherpesvirus7</i>		0.02%	0.02%	0.05%	0.00%	0.03%	0.03%	
<i>Cercopithecine alphaherpesvirus2</i>		0.03%	0.04%	0.02%	0.00%	0.01%	0.03%	
<i>Macacine alphaherpesvirus 1</i>		0.02%	0.04%	0.00%	0.00%	0.01%	0.06%	
<i>Human alphaherpesvirus 2</i>		0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.03%	
<i>Human gammaherpesvirus4</i>		0.01%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Cowpox virus</i>		Poxviridae	0.02%	0.01%	0.07%	0.08%	0.03%	0.00%
<i>NY_014 poxvirus</i>			0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.06%
<i>Yaba-like disease virus</i>	0.01%		0.02%	0.02%	0.00%	0.00%	0.03%	
<i>Monkeypox virus Zaire-96-I-16</i>	0.03%		0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	
<i>Yabamoney tumor virus</i>	0.01%		0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.03%	
<i>Orf virus</i>	0.01%		0.02%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Molluscum contagiosum virus subtype 1</i>	0.02%		0.01%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	
<i>Human endogenous retrovirus K113</i>	Retroviridae	0.04%	0.04%	0.02%	0.32%	0.02%	0.08%	

<북극 해수 G-virus top20(상) 및 H-virus top20(하)>

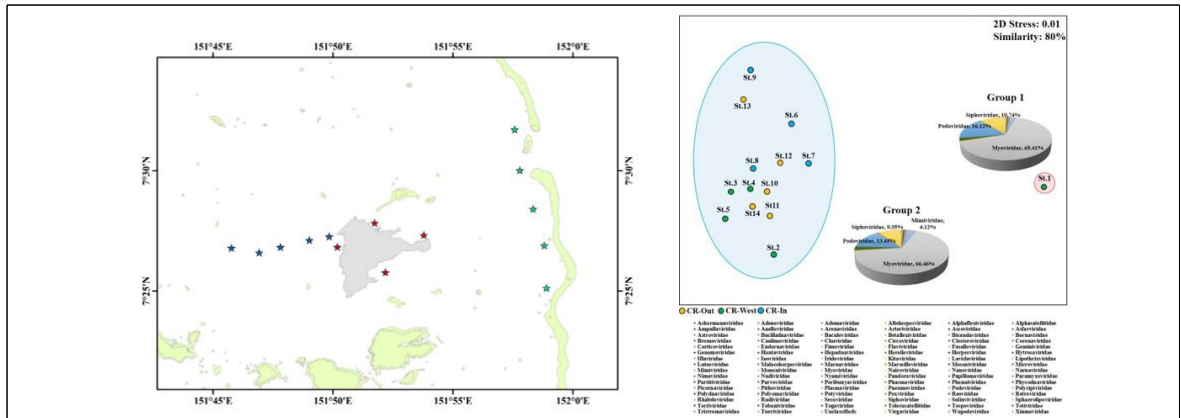
(5) 열대해수 유래 감염성 해양바이러스 모니터링

○ 열대해수 채집

- 열대해수 시료 분석을 위하여 마이크로네시아 축주 웨노섬을 중심으로 웨노섬의 서쪽, 섬 주변 및 라군 유입수를 대상으로 정점을 선정했으며, 해수를 채취하였음
- 12개 해수 시료를 3배수로 채집하였으며, 시료의 2차 오염을 방지하기 위하여 시험 도구를 멸균하여 준비하였고 이동 시 4℃ 이하로 냉장 보관하여 분석을 실시하였음

○ 열대해수 NGS 분석

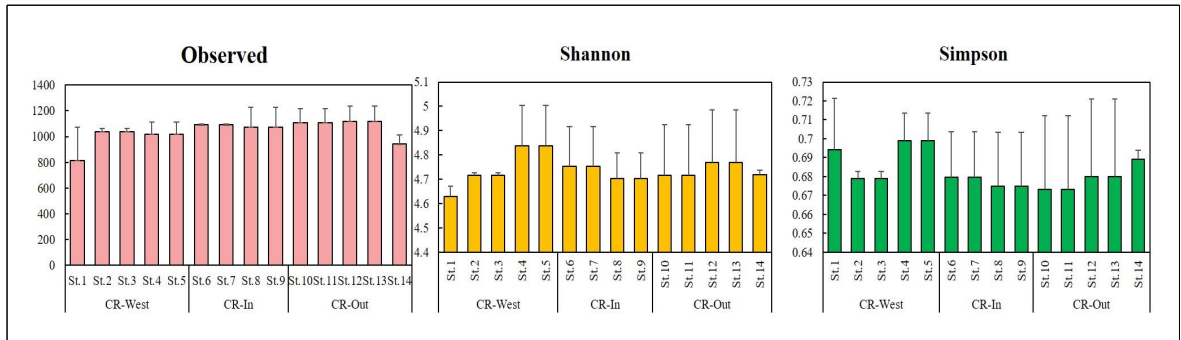
- 열대해수 시료에 대해서 nMDS 분석시 크게 두 개의 그룹으로 나누어졌음(유사도 80%)
- * Group I은 정점 1이었으며, 나머지는 Group II로 모였음



<열대해수 채수해역(좌) 및 nMDS 분석(우)>

- 열대해수를 a-diversity 분석하였음

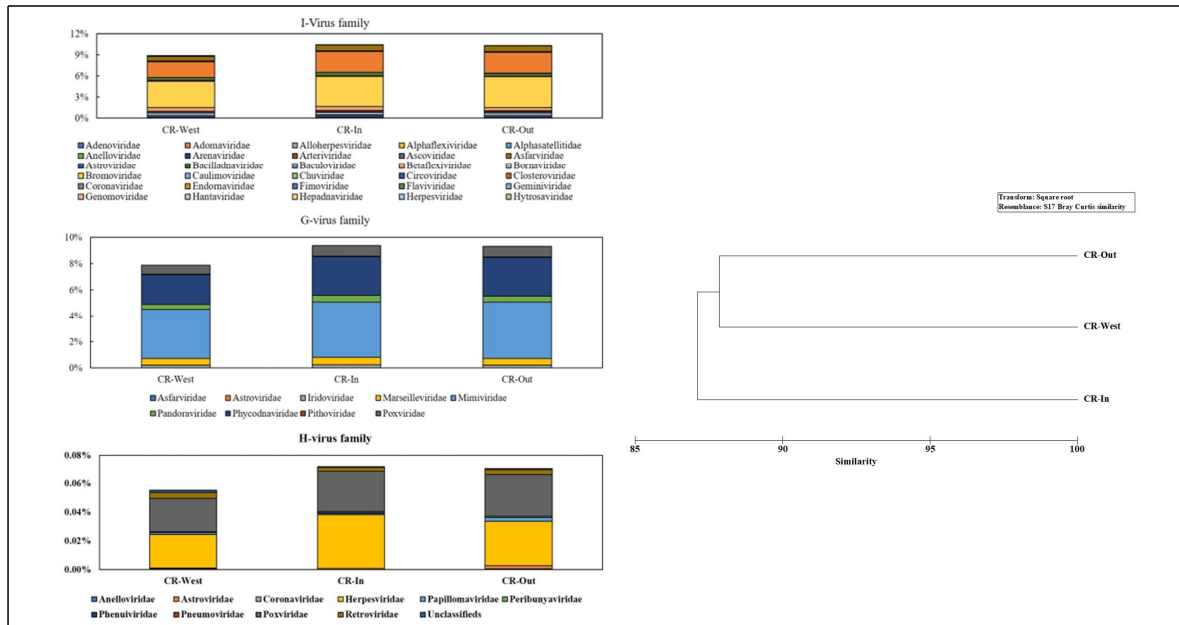
- * 검출된 바이러스 OTU는 814-1117개로 나타났음
- * Shannon index는 4.63-4.84이었으며, Simpson index는 0.67-0.70로 분석되어 시료간 차이가 크지 않은 것으로 나타났음



<열대해수 a-diversity 분석>

- 열대해수의 바이러스 taxonomy 분석을 실시하였음

- * 열대해수 시료에서 96개 바이러스 Family가 검출되었음
- * 박테리오파지는 18개 Family가 검출되었으며, 89.40-90.99%를 차지하였으며, I-virus는 77개 Family가 검출되었으며, 8.82-10.39%로 분석되었음
- * I-virus 비율은 분석된 선박평형수, 향만해수 및 북극 해수에 비해 가장 낮게 나타났음
- * 파지는 Myoviridae, Podoviridae 및 Sipoviridae가 우점하였으며, I-virus는 Phycodnaviridae와 Mimiviridae 외에는 매우 낮은 비율로 검출되었음
- * G-virus는 9개 Family가 검출되었으나, Phycodnaviridae (2.26-2.98%), Mimiviridae (3.98-4.37%) 이 전 지역에서 우점하였음
- * H-virus는 11개의 Family가 검출되었으며, 전체에서 차지하는 비율은 매우 낮았음
- * 각 열대해수의 유사도를 분석하였을 때, CR-west, CR-in, CR-out 모든 시료가 거의 유사한 것으로 나타났음



<열대해수에서 검출된 해양바이러스 I-virus, G-virus 및 H-virus Family(좌) 및 유사도 분석(우)>

- 열대해수에서의 G-virus top20과 H-virus top20을 분석하였음

- * G-virus는 Marseilleviridae 1종, Mimiviridae 9종, Pandoraviridae 1종, Phycodnaviridae 8종 및 Poxviridae 1종이 검출되었으며, 아메바, 조류 및 척삭동물을 숙주로 하는 바이러스로 나타났음
- * H-virus는 Astroviridae 1종, Herpesviridae 8종, Papillomaviridae 1종, Poxviridae 7종 및 Retroviridae 1종이 검출되었음

Species	Family	Host	CR-West	CR-In	CR-Out
<i>TokyoivirusA1</i>	Marseilleviridae	Acanthamoeba	0.46%	0.54%	0.47%
<i>Acanthamoeba polyphagamimivirus</i>		Acanthamoeba	0.13%	0.15%	0.14%
<i>Acanthamoeba polyphagomoumouivirus</i>		Acanthamoeba	0.47%	0.56%	0.57%
<i>Aureococcusanophagefferensvirus</i>		Algae	0.23%	0.29%	0.24%
<i>Cafeteria roenbergensisvirus</i> BV-PW1		Algae	0.55%	0.65%	0.62%
<i>Chrysochromulinaericinavirus</i>	Mimiviridae	Algae	1.26%	1.39%	1.59%
<i>Heterosigmaakashiovirus</i> 01		Algae	0.12%	0.09%	0.10%
<i>Megaviruschiliensis</i>		Acanthamoeba	0.45%	0.53%	0.49%
<i>Mimivirusterra2</i>		Acanthamoeba	0.21%	0.25%	0.23%
<i>Phaeocystisglobosavirus</i>		Algae	0.29%	0.32%	0.33%
<i>Pandoravirusdulcis</i>	Pandoraviridae	Acanthamoeba	0.12%	0.16%	0.14%
<i>Acanthocystisturfaceachlorella virus</i> 1		Algae	0.08%	0.10%	0.08%
<i>Bathycoccus</i> sp. RCC1105 virus BpV1		Algae	0.53%	0.56%	0.66%
<i>Micromonaspusillavirus</i> 12T		Algae	0.18%	0.33%	0.39%
<i>Micromonaspusillavirus</i> SP1	Phycodnaviridae	Algae	0.09%	0.15%	0.16%
<i>Micromonas</i> sp. RCC1109 virus MpV1		Algae	0.18%	0.37%	0.31%
<i>Ostreococcuslucimarinivirus</i> 7		Algae	0.07%	0.08%	0.09%
<i>Only Syngen Nebraska virus</i> 5		Algae	0.20%	0.26%	0.22%
<i>Orpheovirus</i> HUM1-LCC2		Vermamoeba	0.21%	0.21%	0.21%
<i>Amsactamooreientomopoxvirus</i>	Poxviridae	Chordata	0.10%	0.11%	0.12%

<열대해수 G-virus top20>

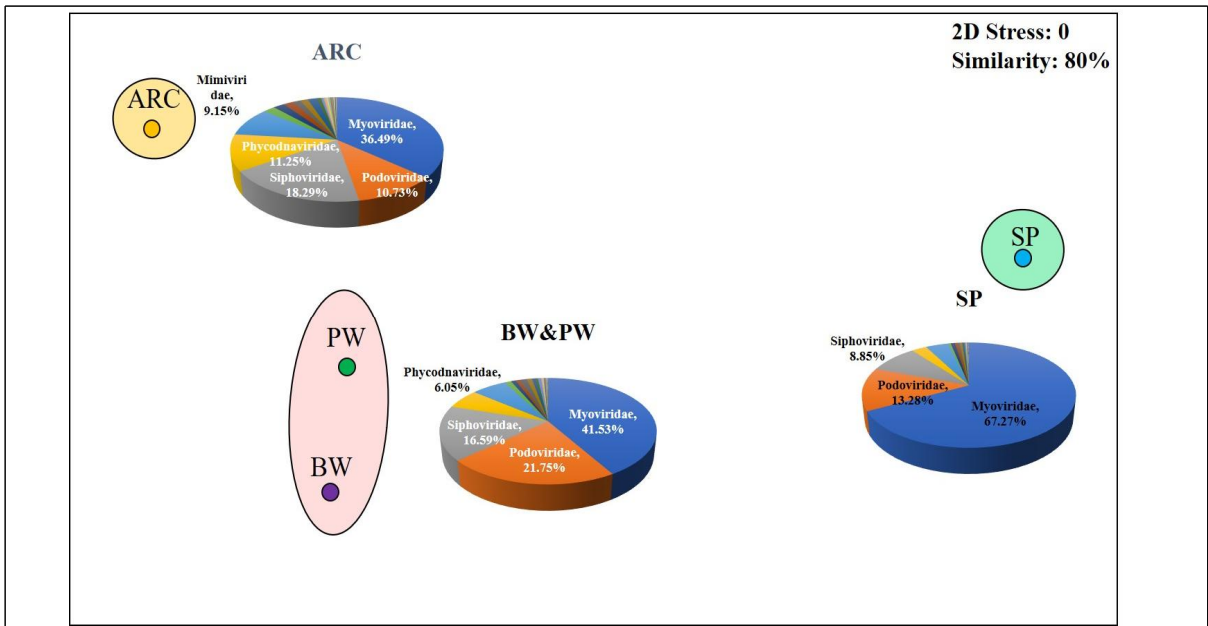
Species	Family	CR-West	CR-In	CR-Out
<i>Mamastrovirus1</i>	Astroviridae	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Cercopithecalphaherpesvirus2</i>		0.01%	0.01%	0.01%
<i>Papiinealphaherpesvirus2</i>		0.01%	0.01%	0.01%
<i>Macacinealphaherpesvirus1</i>		0.00%	0.01%	0.00%
<i>Human betaherpesvirus7</i>	Herpesviridae	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human alphaherpesvirus1</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human alphaherpesvirus2</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human gammaherpesvirus 8</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human herpesvirus 4 type 2</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human papillomavirus type 50</i>	Papillomaviridae	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Yaba-like disease virus</i>		0.01%	0.01%	0.01%
<i>NY_014 poxvirus</i>		0.00%	0.01%	0.00%
<i>Yabamoney tumor virus</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Cowpox virus</i>	Poxviridae	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Molluscum contagiosum virus subtype 1</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Orvirus</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Monkeypoxvirus Zaire-96-I-16</i>		0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human endogenous retrovirus K113</i>	Retroviridae	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Senegalvirusmarseillevirus</i>	Unclassifieds	0.00%	0.00%	0.00%

<열대해수 H-virus top20>

(6) 메타분석 기반 해양바이러스 위해도 평가 및 주요 해양바이러스 병원체 선정

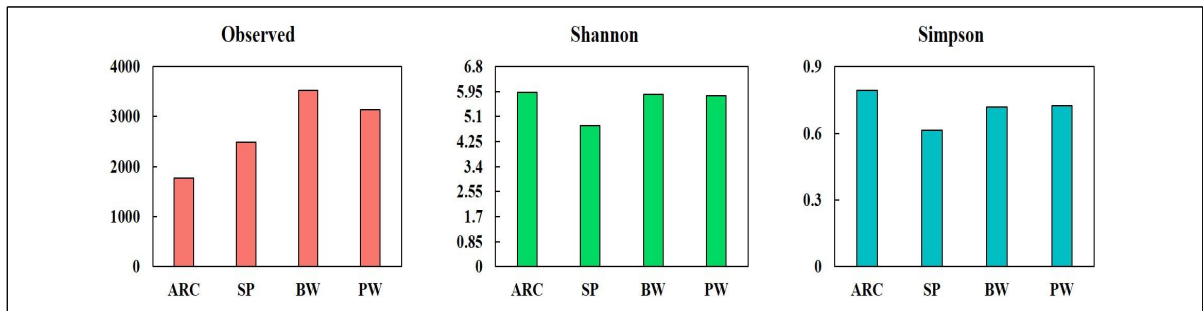
○ 선박평형수, 항만해수, 북극해수 및 열대해수 종합분석

- 열대해수 시료에 대해서 nMDS 분석하였을 때, 북극해수(ARC), 열대해수(SP), 선박평형수(BW)&항만해수(PW) 등 3개의 그룹으로 나누어짐(유사도 80%)
- 일반적인 해수에서 bacteriophage는 Myoviridae>Podoviridae.Sipoviridae의 순으로 비율이 높았으나, ARC의 경우는 Myoviridae>Sipiviridae>Podoviridae 순으로 나타났음
- I-virus의 비율은 ARC>BW&PW>SP 순으로 분명한 차이를 보였음



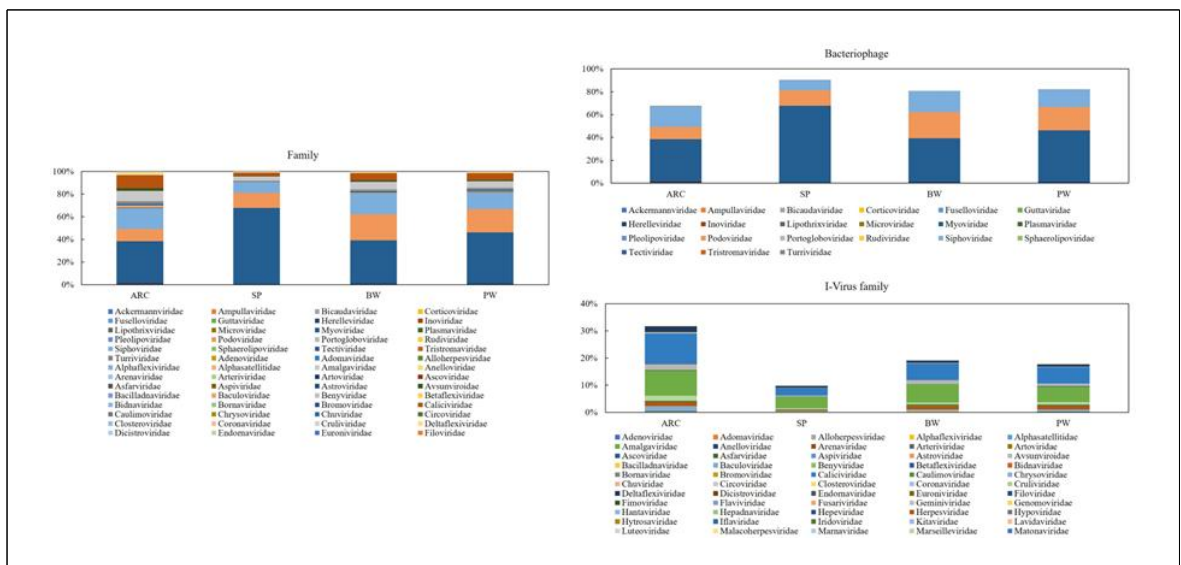
<ARC, BW, PW, SP 해수 nMDS 분석>

- a-diversity 분석하였을 때, 검출된 바이러스 OTU는 ARC의 경우 1770로 가장 낮았으며, BW에서 3522로 가장 높았음
- Shannon index는 4.80-5.93이었으며, Simpson index는 0.61-0.79로 분석되어 시료간 차이가 크지 않은 것으로 나타났음

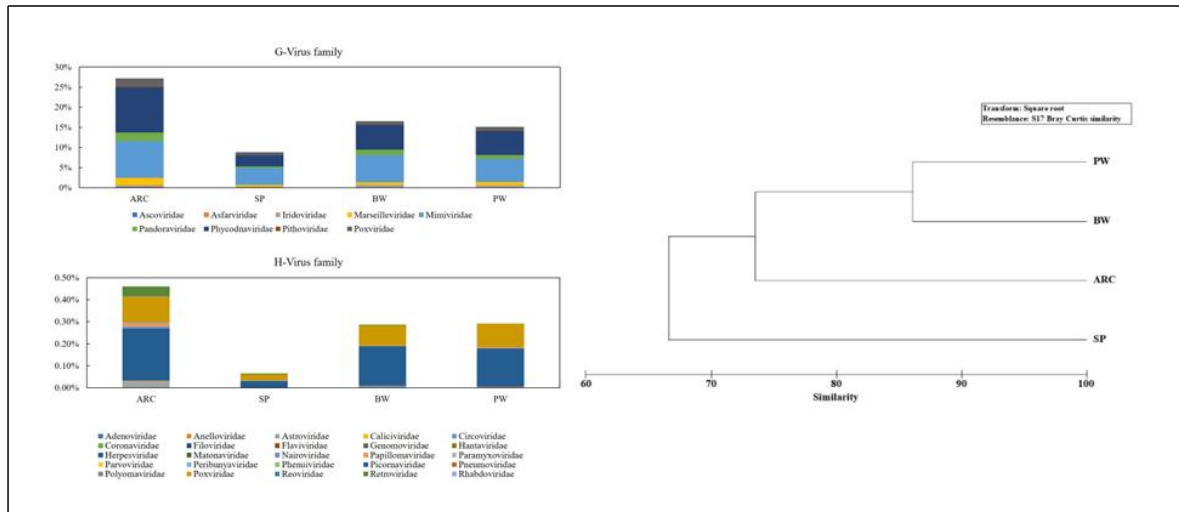


<ARC, BW, PW, SP 해수 a-diversity 분석>

- 북극, 선박평형수, 항만해수 및 열대해수의 바이러스 taxonomy 분석을 실시하였음
 - * 전체 해수 시료에서 127개 바이러스 Family가 검출되었음
 - * 박테리오파지는 21개 Family가 검출되었으며, 북극해수(67.52%)에서 가장 낮았으며, 선박평형수(80.41%), 항만해수(81.86%) 및 열대해수(90.01%)로 열대해수에서 가장 높았음
 - * I-virus 비율은 파지 비율과 정반대로 나타났음
 - * 북극해수에서 I-virus는 31.67%로 가장 높았으며, 선박평형수(19.09%), 항만해수(17.73%), 열대해수(9.79%) 순으로 분석되었음
 - * 열대해수에서의 Phage는 Myoviridae (67.27%)로 압도적으로 높았으며, 북극해수에서는 다른 해수와는 달리 Sipoviridae (18.29%)가 Podoviridae (10.73%)보다 높았음
 - * I-virus는 Phycodnaviridae(2.72-11.25%), Mimiviridae(4.14-9.15%), Pandoraviridae (0.44-2.11%), Poxviridae (0.76-2.05%), Herpesviridae (0.34-1.37%), Marseilleviridae (0.51-1.83%) 및 Baculoviridae (0.23-1.64%) 등이 1% 이상을 차지하는 것으로 분석되었음
 - * 흥미있게도, 모든 I-virus는 북극해수>선박평형수&항만해수>열대해수 순으로 높은 비율을 보임
 - * Herpesviridae(1.23-1.37%)의 경우는 북극해수, 선박평형수, 항만해수가 거의 유사한 비율임



<남태평양 해수에서 검출된 해양바이러스 Family>



<남태평양 해수에서 검출된 해양바이러스 Family 및 유사도 분석>

- 북극, 선박평형수, 항만해수 및 열대해수에서의 G-virus top20과 H-virus top20을 분석하였음
- * G-virus는 Marseilleviridae 1종, Mimiviridae 8종, Pandoraviridae 3종 및 Phycodnaviridae 8종이 검출되었으며, 아메바와 조류를 숙주로 하는 바이러스로 나타났음
- * H-virus는 Astroviridae 1종, Herpesviridae 10종, Papillomaviridae 1종, Poxviridae 7종 및 Retroviridae 1종이 검출되었음

Species	Family	Host	ARC	SP	BW	PW
<i>TokyovirusA1</i>	Marseilleviridae	Acanthamoeba	1.68%	0.49%	0.59%	0.80%
<i>Acanthamoeba polyphagamimivirus</i>		Acanthamoeba	0.33%	0.14%	0.23%	0.34%
<i>Acanthamoeba polyphagomoumouvirus</i>		Acanthamoeba	1.31%	0.53%	0.67%	0.78%
<i>Aureococcus anophagefferens virus</i>		Algae	1.30%	0.25%	0.67%	0.57%
<i>Cafeteria roenbergensisvirus</i> BV-PW1	Mimiviridae	Algae	1.52%	0.60%	0.93%	0.89%
<i>Chrysochromulinaericinavirus</i>		Algae	1.60%	1.42%	2.24%	1.35%
<i>Megaviruschiliensis</i>		Acanthamoeba	1.24%	0.49%	0.65%	0.68%
<i>Mimivirusterra2</i>		Acanthamoeba	0.56%	0.23%	0.37%	0.43%
<i>Phaeocystisglobovirus</i>		Algae	1.05%	0.31%	0.64%	0.45%
<i>Pandoravirus dulcis</i>		Acanthamoeba	0.55%	0.14%	0.38%	0.21%
<i>Pandoravirus neocaledonia</i>	Pandoraviridae	Acanthamoeba	0.49%	0.08%	0.25%	0.18%
<i>Pandoravirus salinus</i>		Acanthamoeba	0.36%	0.07%	0.29%	0.21%
<i>Acanthocystisturfaceachlorella virus 1</i>		Algae	0.61%	0.09%	0.28%	0.23%
<i>Bathycoccus</i> sp. RCC1105 virus BpV1		Algae	1.24%	0.59%	0.77%	0.93%
<i>Micromonaspusillavirus 12T</i>		Algae	1.30%	0.30%	0.62%	0.53%
<i>Micromonaspusillavirus SP1</i>	Phycodnaviridae	Algae	0.99%	0.13%	0.31%	0.24%
<i>Micromonas</i> sp. RCC1109 virus MpV1		Algae	2.81%	0.28%	1.16%	1.09%
Only Syngen Nebraska virus 5		Algae	0.66%	0.22%	0.41%	0.48%
<i>Orpheovirus</i> HUMI-LCC2		Vermamoeba	0.40%	0.21%	0.19%	0.20%
<i>Ostreococcuslucimarinusvirus 1</i>		Algae	0.34%	0.07%	0.21%	0.23%

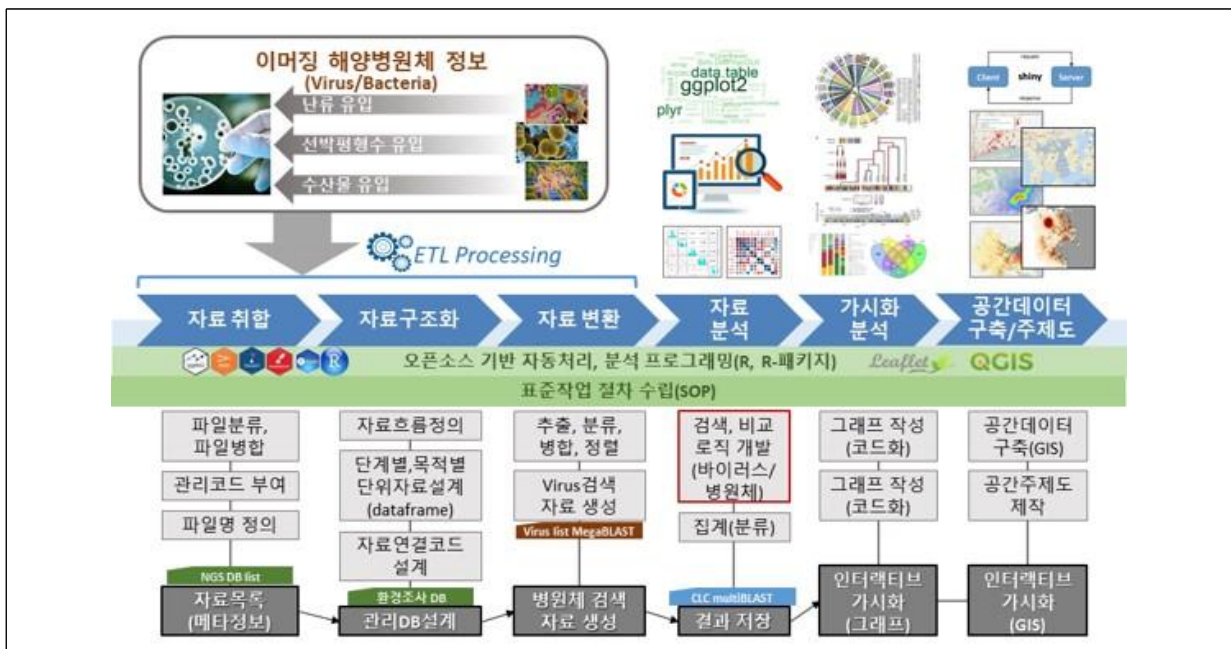
<ARC, BW, PW, SP 해수 G-virus top20>

Species	Family	ARC	SP	BW	PW
<i>Mamastrovirus1</i>	Astroviridae	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Papiinealphaherpesvirus2</i>		0.05%	0.01%	0.04%	0.03%
<i>Human gammaherpesvirus8</i>		0.03%	0.00%	0.03%	0.04%
<i>Cercopithecine alphaherpesvirus 2</i>		0.02%	0.01%	0.03%	0.02%
<i>Macacinealphaherpesvirus1</i>		0.02%	0.00%	0.03%	0.02%
<i>Human alphaherpesvirus2</i>	Herpesviridae	0.02%	0.00%	0.02%	0.02%
<i>Human betaherpesvirus7</i>		0.03%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Human betaherpesvirus 5</i>		0.03%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human alphaherpesvirus1</i>		0.01%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Human herpesvirus 4 type 2</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human betaherpesvirus6B</i>		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human papillomavirus type 92</i>	Papillomaviridae	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Molluscum contagiosum virus subtype 1</i>		0.02%	0.00%	0.05%	0.04%
<i>NY_014 poxvirus</i>		0.02%	0.00%	0.01%	0.02%
<i>Cowpox virus</i>		0.03%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Yaba-like disease virus</i>	Poxviridae	0.01%	0.01%	0.00%	0.01%
<i>Monkeypox virus Zaire-96-I-16</i>		0.02%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Orf virus</i>		0.01%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Yaba monkey tumor virus</i>		0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Human endogenous retrovirus K113</i>	Retroviridae	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%

<ARC, BW, PW, SP 해수 H-virus top20>

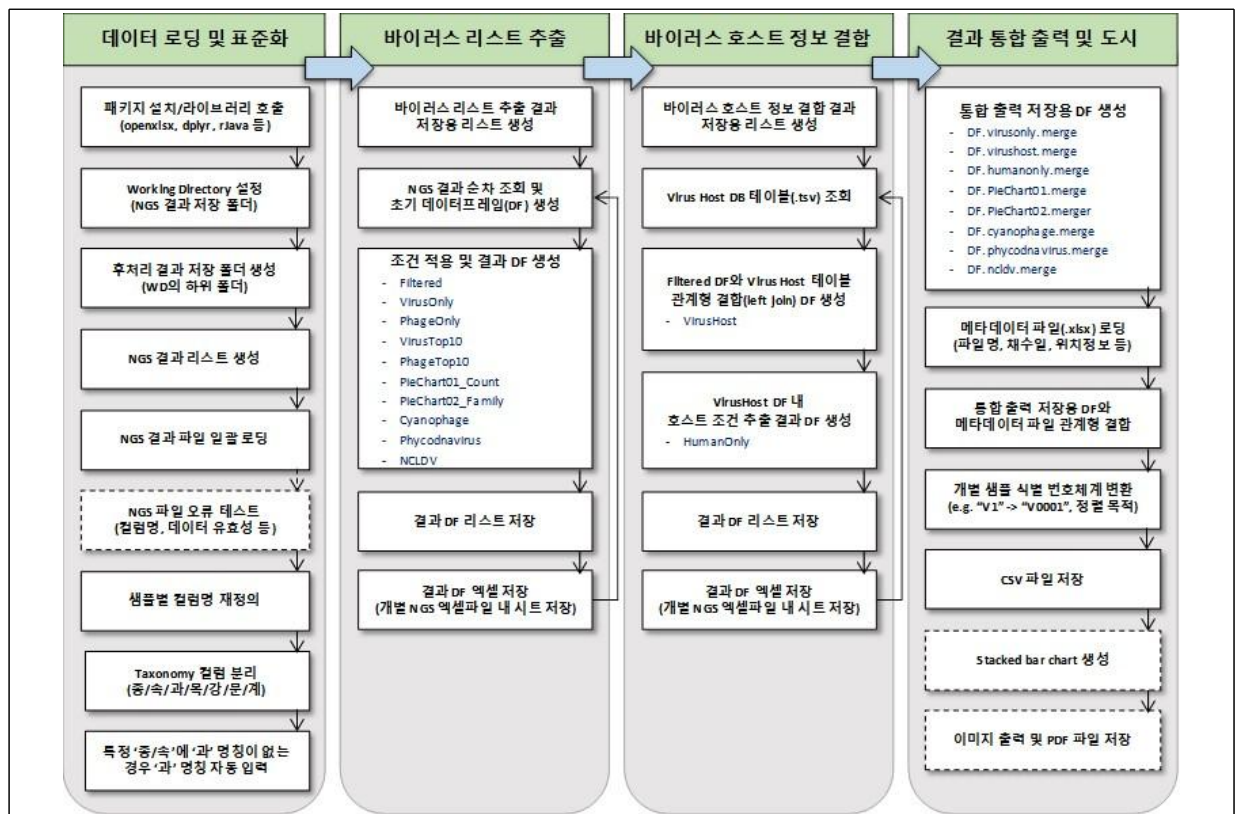
(7) 글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 DB 구축

- 글로벌 감염성 해양바이러스 DB 구축을 지원하기 위해 오픈소스(open-source) 프로그래밍 언어인 R을 이용하여 해양병원체 메타지놈 차세대 염기서열 분석(NGS) 결과를 구조화하고 탐색적 자료 분석을 지원하는 프로그램(이하, 'NGS 결과 분석 프로그램')을 개발함 (저작권 등록(소프트웨어).
- 2019년 5월 7일 등록, 제C-2019-012838호. “해양병원체 메타지놈 차세대 염기서열 분석(NGS) 결과 탐색적 자료 분석 프로그램”)
- 해양병원체 NGS 정보의 수집/분석/가시화 체계 구축을 위한 절차 정의를 실시하였음
 - * NGS 분석 결과 DB 구축에 앞서 우선 NGS 분석 결과의 자료처리 및 가시화 프로세스를 정의하였음
 - * 일단 샘플링 지점별로 NGS 분석 결과가 제공되면, (그림 가운데 화살표를 따라) 자료취합, 구조화, 변환, 분석, 가시화, 출력의 순서로 자료가 활용됨



<해양병원체 NGS 정보의 수집/분석/가시화 체계 구축을 위한 절차 정의>

- 문서 형식의 샘플링 자료 목록을 DB 관리용 메타데이터 형식으로 구조화하였음
- 기존 문서 형식의 샘플링 자료 목록을 전산화하는 작업을 우선적으로 수행
- 용이한 검색 및 추가적인 분석/가시화를 위한 속성(관리코드, 샘플 번호, 날짜, fasta 파일 정보, 위경도 정보 등)을 추가하였음
- NGS 결과 분석 프로그램은 CLC workbench를 이용한 NGS 분석 결과 중에서 유의미한 정보만을 추출하고 관련 통계 및 차트를 제공하는 프로그램임
- Microsoft사의 엑셀 포맷(*.xlsx)으로 출력된 NGS 분석 결과를 입력값으로 읽어들이 데이터를 순차적으로 조건 추출 및 요약하고, 그 결과를 기존 엑셀파일 시트(sheet)로 추가하고 DB 입력용 테이블도 출력하며, 분석 결과 확인을 위한 막대 그래프(stacked bar chart)를 도시하여 이미지 파일(*.pdf)로 저장함.
- R 및 관련한 오픈소스 패키지(package)가 설치되어 있는 컴퓨터 내에 임의 폴더를 생성하고 NGS 결과 엑셀 파일들을 저장한 후, NGS 결과 분석 프로그램을 실행하고 해당 폴더를 작업 경로(working directory)로 설정하면 하위 폴더에 구조화된 결과가 순차적으로 출력됨.
- R을 이용한 NGS 결과 분석 프로그램은 <데이터 로딩 및 표준화>, <바이러스 리스트 추출>, <바이러스 호스트 정보 결합>, <결과 통합 출력 및 도시>의 4단계를 순차적으로 수행함으로써 구조화된 결과를 생산하는데, 테이블 결과들을 DBMS(Database Management System)에 입력함으로써 글로벌 감염성 해양바이러스 DB의 구축이 가능함.



<R을 이용한 NGS 결과 분석 프로그램의 프로세스 순서도>

- 글로벌 감염성 해양병원체 DB 구축 및 분석을 효율적으로 지원을 위하여 해양바이러스 분류기준 및 기타 분석 요구사항을 정리하고 이를 프로그램 설계 및 개발에 반영함. 아울러, NGS 결과 분석 프로그램의 검색 조건 및 분류 조건을 용이하게 변경할 수 있도록 총 7개 시트로 구성된 프로그램 관리용 config 엑셀파일을 만들고 이를 연계토록 설계 및 개발함.
- 1단계 2차년도 및 3차년도 사업에서 기능 개선 과정에서 요구분석을 통해 분류 규칙을 구체화하고, 디버깅을 통해 분류 정확도를 개선함.
- NGS 결과 분석 프로그램은 주석(comment) 처리 부분을 포함하여 약 890라인의 코드로 이루어졌으며, 다양한 분석 조건을 추가하고 설정 등을 쉽게 변경할 수 있도록 구조화하여 개발함.

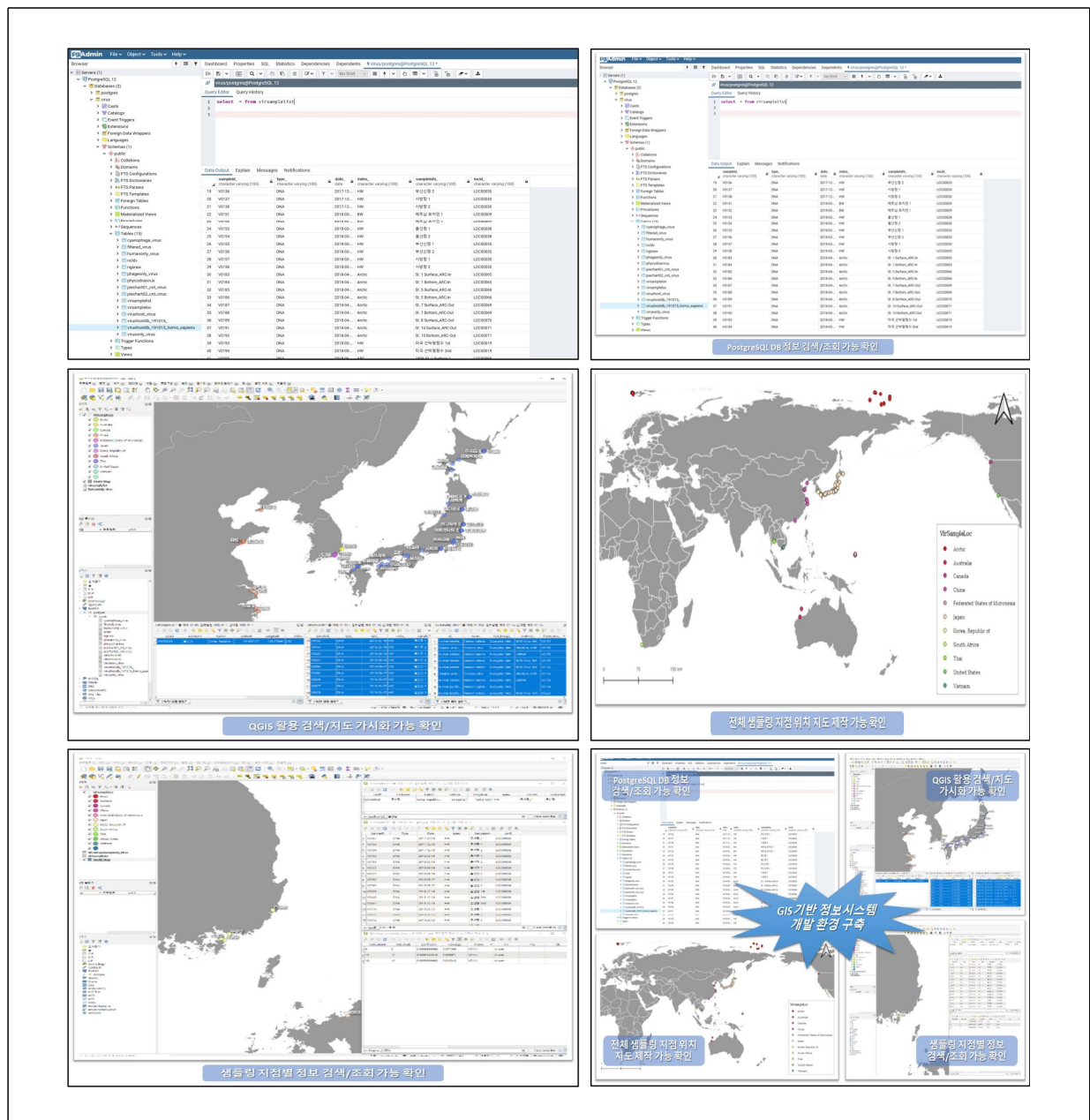
- 글로벌 감염성 해양바이러스 DB를 구축하기 위한 RDBMS(Relational DMBS)로써 오픈소스 기반의 PostgreSQL v12를 선정하고, DB에 구성될 테이블 및 필드 규칙 등 DB 스키마를 설계함.
- 참고로, 향후 연구에서 시간 및 위치 기반의 검색 및 분석, 시각화를 지원할 수 있도록 샘플링 당시 시간 정보 및 위치 정보를 함께 저장하도록 DB 테이블 및 스키마를 설계함.
- 프로그램 실행을 통해 엑셀파일 내 추가 시트로 분석 결과 확인이 가능
- 앞서 정의한 프로세스에 따라 특정 조건의 통계산출 결과나, 특정 조건을 만족하는 결과를 출력할 수 있음
- 프로그램 실행을 통해 stacked bar chart형식으로 결과 비교 확인이 가능
- 해양병원체 NGS 정보를 다양한 규칙으로 처리하였으며, 그 결과가 출력 및 저장되도록 하였음
- 한편, DB 일괄 입력을 위해 ‘DB 입력용 통합 테이블’ 생성 및 csv 파일 출력되도록 하였음
- 엑셀 파일은 단일 샘플에 대한 결과를 하나씩 출력 저장한 것이고, csv 파일은 전체 샘플의 데이터를 통째로 출력 저장한 것임
- 참고로 csv 파일은 DB에 데이터를 일괄 입력하기 위해 생산된 것으로, 해당 파일이 DB에 그대로 입력되게 됨

출력 산출물	내 용	
V####.xlsx	Filtered	Unclassified sequence 제외한 행만 추출 저장한 결과
	VirusOnly	Species 명칭 기준으로 virus 로 구분되는 행만 추출 저장한 결과
	PhageOnly	Species 명칭 기준으로 phage 로 구분되는 행만 추출 저장한 결과
	VirusTop10	VirusOnly 결과 중 read 개수 상위 10 개 행만 추출 저장한 결과
	PhageTop10	PhageOnly 결과 중 read 개수 상위 10 개 행만 추출 저장한 결과
	PieChart01_Count	“Filtered” 시트 결과 기준으로 total read 개수, virus’s read 개수, phage’s read 개수 등을 요약한 결과
	PieChart02_Family	“Filtered” 시트 결과 기준으로 family 별 total read 개수를 요약한 결과
	Cyanophage	Cyanophage 분류에 포함된 행만 추출 저장한 결과
	Phycodnavirus	Phycodnavirus 분류에 포함된 행만 추출 저장한 결과
	NCLDV	NCLDV 분류에 포함되는 행만 추출 저장한 결과
DB 입력용 통합 테이블	VirusHost	“VirusOnly” 시트에 VirusHost DB 정보를 관계형 결합(join)한 결과
	HumanOnly	“VirusHost” 시트에서 바이러스 호스트가 인간(Homo sapiens)인 행만을 추출 저장한 결과
	ldf.merge.humanonly_Virus.csv	모든 샘플 데이터의 “HumanOnly” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.PieChart01.Cnt_Virus.csv	모든 샘플 데이터의 “PieChart01_Count” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.PieChart02.Fam_Virus.csv	모든 샘플 데이터의 “PieChart02_Family” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.NGSraw.csv	모든 샘플 데이터의 NGS 분석 원시자료(raw data)를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.virusonly_Virus.csv	모든 샘플 데이터의 “VirusOnly” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.virusHost_Virus.csv	모든 샘플 데이터의 “VirusHost” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.cyanophage.csv	모든 샘플 데이터의 “Cyanophage” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
	ldf.merge.phycodnavirus.csv	모든 샘플 데이터의 “Phycodnavirus” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과
ldf.merge.ncldv.csv	모든 샘플 데이터의 “NCLDV” 시트를 단일 csv 파일로 합친 결과	
Virus_Barchart_Family_xx.pdf	모든 샘플에 대한 Family 별 포함 비율을 막대그래프(bar stacked chart) 형식으로 도식한 결과를 하나의 파일로 저장한 pdf 파일	

<NGS 결과 분석 프로그램 출력 내역>

- NGS 결과 분석 프로그램 결과의 효율적인 검색 및 관리를 고려한 글로벌 감염성 해양바이러스 DB를 설계 하였음
- 총 268건 NGS 분석 결과를 PostgreSQL에 입력 및 구축(R 및 QGIS 접근 가능)하였음
- DB의 외부접근을 통한 활용이 가능한지를 R 및 QGIS를 통해 테스트하였고, 이상없이 작동하는 것을 확인 하였음
- 참고로, Sample ID는 관계형 결합을 통해 다양한 통계 자료의 검색 및 추출을 가능하게 하며, Loc ID는 관계형 결합을 통해 특정 공간 영역에 포함된 샘플링 정보의 검색이나 지도 가시화를 가능하게 함
- NGS 결과 분석 프로그램을 통해 산출된 DB 입력용 통합 테이블, 샘플링 메타데이터 테이블, Genome DB 테이블을 설치된 PostgreSQL에 입력하여 DB를 구축함.
- 1단계 사업을 통해 글로벌 감염성 해양바이러스 DB에 총 268건의 NGS 결과 분석 자료가 입력 및 저장되었으며, 샘플링 위치를 기준으로 89곳의 샘플링 자료가 DB에 입력 및 저장됨.

- R 및 QGIS 등의 프로그래밍 환경에서 접속 드라이버를 통해 외부 접근이 가능한 지를 테스트하고 정상 작동됨을 확인하였으며, 다양한 조건에 의해 검색된 자료를 각종 그래프 또는 지도로써 가시화할 수 있음을 확인함.
- 향후에는 지속적인 자료 업데이트 및 유지운을 통해 글로벌 감염성 해양바이러스 분석 시스템 및 이를 활용한 각종 의사결정 지원 시스템 개발에 활용이 가능할 것으로 판단됨.
- 특히, 2단계 연구에서 전 세계 해양환경 및 해양생태에 관한 데이터를 자동 또는 수동으로 수집 및 추가함으로써 글로벌 감염성 해양바이러스 DB를 확장시킬 수 있을 것을 기대함.
- 또한 각종 DB 연계 및 빅데이터 수집을 통해 다양한 시공간 조건 검색 및 시각화가 가능한 탐색적 데이터 분석(EDA, Exploratory Data Analysis) 지원 시스템 개발은 물론, 글로벌 감염성 해양바이러스 감시 및 예보를 위한 국가 대응 시스템의 프로토타입 개발도 가능할 것으로 기대함.



<글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 DB 구축 결과 - PostgreSQL 화면>

다. PCR 기반 특정 해양바이러스 병원체 모니터링

(1) 추진전략 및 방법

- NGS를 통한 해양바이러스 탐색 뿐만 아니라 PCR법을 기반으로 주요 항만해수와 선박평형수에 포함된 수산생물 질병원인 바이러스 모니터링을 수행하고자 함.
- 본 연구사업에서는 OIE 지정 해양바이러스 뿐만 아니라 호주, 미국, 유럽, 중국, 대만에서 검역대상으로 알려진 바이러스 21종 중 10종과 2차년도에 메타분석을 기반으로 선정된 주요 해양바이러스 4종으로 총 14종을 모니터링 대상으로 선정하였음.
- 검역 바이러스 검출을 위한 각 프라이머를 디자인하였으며, 최적의 PCR 조성물과 반응시간 및 반응온도가 정립되었음.
- RNA 바이러스 검출을 위해 해수바이러스의 RNA를 이용하여 RT-PCR을 진행한 후, Conventional PCR을 진행하였으며, DNA 바이러스 검출은 해수바이러스의 DNA를 이용하여 Conventional PCR을 실시하였음.

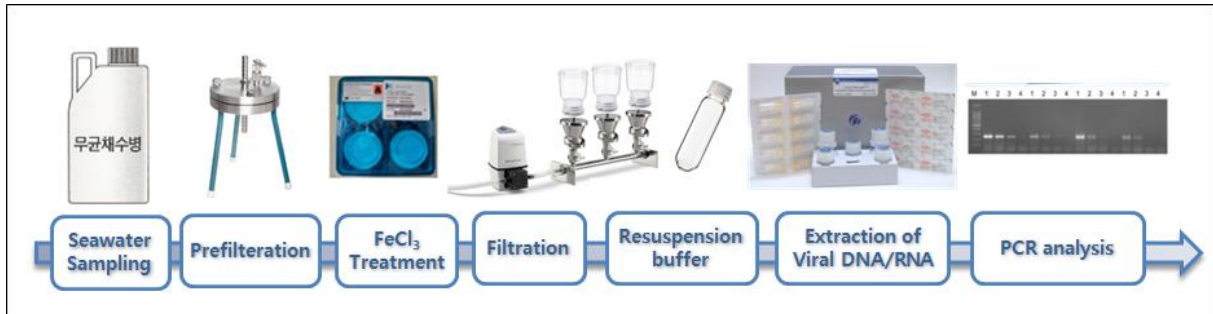
구분	명칭	염기서열	크기 (mer)	Product size (bp)	핵산 형태
Infectious haematopoietic necrosis virus	Forward	IHNV F 5'-ATCTTCGACGATGAGAACACGGG-3'	22	451	RNA
	Reverse	IHNV R 5'-AATCACAGGCTGGTATCCCT-3'	20		
Infection salmon anaemia virus	Forward	ISAV F 5'-TACAACGACTGCACTGAGGGC-3'	22	684	RNA
	Reverse	ISAV R 5'-TGAGTATCTGTGTTCCGAGCCC-3'	23		
Koi herpesvirus disease	Forward	KHV F 5'-AAAGTACCAGATCGTAAACACGG-3'	23	387	DNA
	Reverse	KHV R 5'-ATCATGGAGAAGATCACGTCCA-3'	22		
Spring viraemia of carp	Forward	SVC F 5'-TAGTGGAAATATACTTTGTGTGAAGG-3'	25	242	RNA
	Reverse	SVC R 5'-ATCCCAGAATACTCTTGAGGC-3'	21		
White spot syndrome virus	Forward	WSSV F 5'-AATAAGGGTAAAAATACCCCGTC-3'	24	366	DNA
	Reverse	WSSV R 5'-ACAAGTCTTCCATGCCGTCG-3'	21		
Yellow head virus genotype 1	Forward	YHV F 5'-TCCTCTACGATGTTCTGGC-3'	20	371	RNA
	Reverse	YHV R 5'-TCCGAATCGCAGTGATGCG-3'	20		
Channel catfish virus	Forward	CCV F 5'-ATCGCCCATGTACATCAACAACG-3'	23	400	DNA
	Reverse	CCV R 5'-TAACATTCGGTTGAAAGAGGCCG-3'	23		
Nervous necrosis virus	Forward	NNV F 5'-ACGCACCTGTGTCTAAGGC-3'	19	478	RNA
	Reverse	NNV R 5'-ACCACATCAGTGTGTGGC-3'	20		
Redseabream iridovirus	Forward	RSIV F 5'-AACGTAACCAAGTGGGTTTCATC-3'	21	500	DNA
	Reverse	RSIV R 5'-ATGGGCAAATTAAGGTAGGCG-3'	21		
Viralhaemorrhagicsepticaemia virus	Forward	VHSV F 5'-ACACCACGTTTCAGATGAGG-3'	20	378	RNA
	Reverse	VHSV R 5'-TCTGATATTTCTCGATATCTGGG-3'	23		
BeAn 58058 virus	Forward	BeAn F 5'-GACATGTGTGAAAGATGAACC-3'	22	314	DNA
	Reverse	BeAn R 5'-GGGATCAAGTTTGAAGATTTTG-3'	23		
Nile crocodilepox virus	Forward	NCV F 5'-AACTGCAAGTCAACATCGG-3'	20	247	DNA
	Reverse	NCV R 5'-CGAGACCTACGTCAGCAAAA-3'	20		
Pandoravirus dulcis	Forward	Pan. dul F 5'-AGTCCTCGACAATGATTGCC-3'	20	455	DNA
	Reverse	Pan. dul R 5'-GGCATGGAATCTCTCCAGA-3'	20		
Pandoravirus salinus	Forward	Pan. sal F 5'-ATTGAGTGGATCGAGTCTCG-3'	20	363	DNA
	Reverse	Pan. sal R 5'-CTGGGAAGCAATTGAGCGAT-3'	20		

<PCR 기반 모니터링 대상 해양바이러스 병원체 검출용 프라이머 유전자 서열>

(2) PCR 기반 선박평형수 기인 감염성 해양바이러스 검출시스템 구축

- PCR 검출을 위한 해양바이러스 농축은 FFR (Fe-based virus flocculation, filtration, and resuspension) 법을 일부 수정하여 사용함
- 채집된 20 L의 해수를 5- μ m filter (TMTP04700; Merck Millipore)를 통하여 pre-filtration함
- Pre-filtered seawater에 FeCl₃를 0.1%되도록 처리하고 1시간 이상 4 ° C에서 반응시킴
- FeCl₃ 처리된 시료는 0.2- μ m polycarbonate membrane (111,106; Whatman, Buckinghamshire, UK)을 통하여 여과하고 DNA 추출 때까지 -80° C에 저장함

- 바이러스가 농축된 membrane을 여러조각으로 잘라 50-mL conical tube에 두고, suspension buffer (10 mL of 2 M Mg2EDTA, 10 mL of 2.5 M Tris HCl, 25 mL of 1 M oxalic acid)를 처리함
- Membrane에 붙어있는 flocculated viruses를 부유시키고, 약 5 mL의 10 M NaOH가 포함된 buffer를 처리함
- Total gDNA는 Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seoul, South Korea)를 사용하여 추출함.



<해양바이러스 PCR 분석 과정 모식도>

- PCR 반응은 아래의 조건으로 수행함

구성	용량 (μl)	gDNA 제거 반응	45°C	2 min
주형 (template) RNA	5	정지	25°C	역전사 효소 및 mix 추가 후 재진행
gDNA 제거 mix	2	Annealing	25°C	3 min
역전사 효소	1	역전사 반응	45°C	10 min
역전사 mix	4	반응 비활성화	85°C	5 min
증류수	up to 20			

<Reverse-Transcription PCR 조성물, 반응시간 및 반응온도>

구성	용량 (μl)
주형 (template)	1
정방향 프라이머	1
역방향 프라이머	1
10X PCR buffer	2
dNTP mix	2
Taq polymerase	0.5
증류수	up to 20

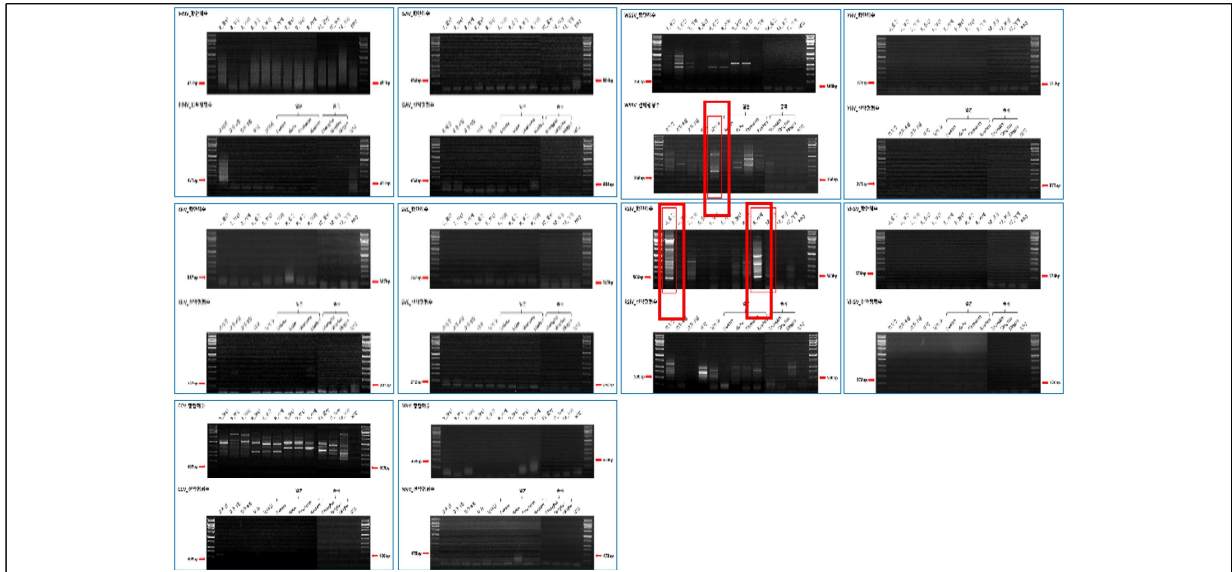
Pre-denaturation	95°C	5 min
Amplification	Denaturation	95°C 30 sec 40 cycles
	Annealing	55°C 30 sec
	Extension	72°C 60 sec
Final-Extension	72°C	5 min

<Conventional PCR의 조성물, 반응시간 및 반응온도>

(3) 향만해수 및 선박평형수 PCR 분석 결과

- 선정된 14종을 대상으로 하여 PCR 법을 기반으로 계절별 향만해수 (울산항, 부산신항, 거제 시방항)와 선박평형수의 바이러스 모니터링을 수행함.
- 2018년도 5월 남아프리카 공화국에서 채수한 선박평형수에서 White spot syndrome virus (WSSV)가 검출

되었고, 3월 울산항과 9월 거제항, 12월 울산항에서 Red sea bream iridovirus (RSIV)가 검출되었음.



<2018년도 항만해수, 선박평형수 PCR 검출실험 결과>

- 2019년도 9월 홍콩에서 채수한 선박평형수에서 Red sea bream iridovirus (RSIV), Pandoravirus dulcis (Pan. dul), Pandoravirus salinus (Pan. sal)가 검출되었음.

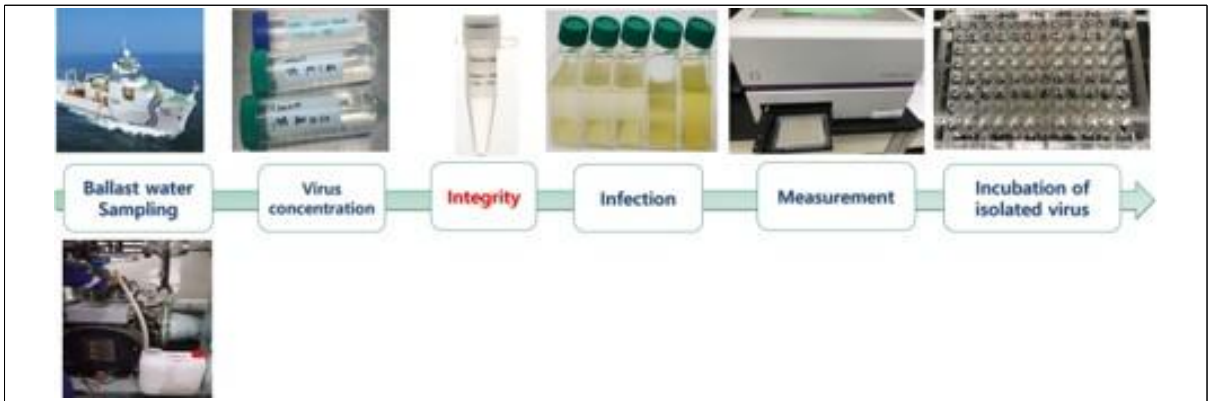


<2019년도 항만해수, 선박평형수 PCR 검출실험 결과>

라. 감염성 해양바이러스-숙주 감염 및 세포반응 분석

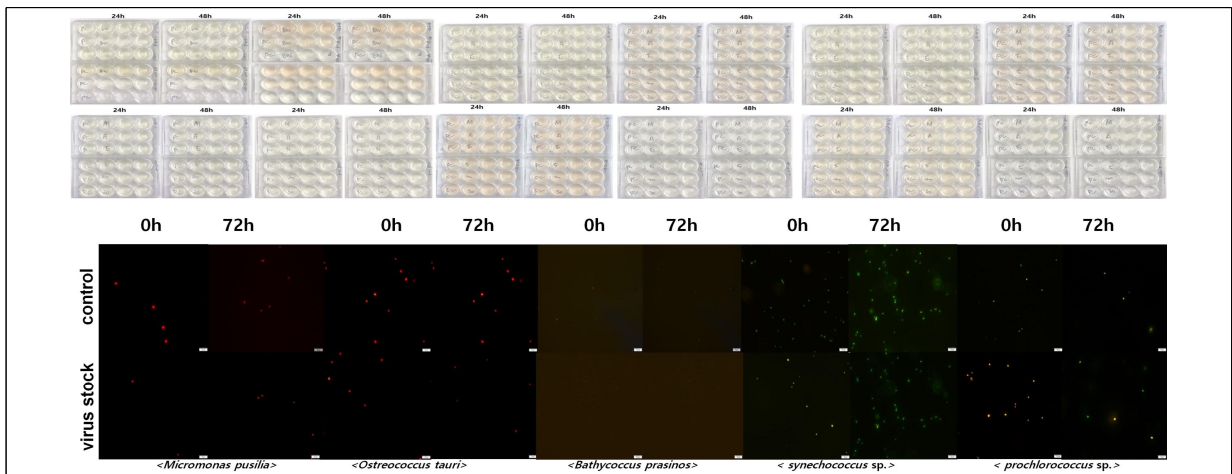
(1) 선박평형수 유래 해양바이러스 감염실험

- 선박평형수의 감염성 해양바이러스와 숙주의 감염/세포 반응을 연구하고자 이사부호 (KIOST R/V)내 선박 평형수 탱크에서 선박평형수를 채집하였음.
- 또한 대조구로 장목연안 및 통영연안에서 시계열별 해수를 채집하여 감염실험을 수행하였음.
- 채집된 해수는 해수안에 존재하는 바이러스를 농축하기 위해 0.45 um membrane 필터를 이용하여 실린지 주사기를 통해 유기 및 무기입자들을 제거하였음.
- 필터된 여액에 DNase 처리를 통하여 바이러스 integrity 과정을 수행하였음.
- 이후 숙주 배양액에 바이러스 농축액을 접종함에 감염실험을 수행하였으며, 감염 초기(0h)와 감염이후 72h 까지 변화를 관찰하였음.
- 이때, 현미경과 Microplate reader(670nm)를 이용하여 숙주의 변화를 확인하였음.



<해양 바이러스-숙주 감염 실험 과정>

- 감염실험에 사용된 target hosts는 *Micromonas pusilia*, *Bathycoccus prasino*, *Ostreococcus tauri*, 등 녹조류 3종이며 *Synechococcus* sp., *Prochlorococcus* sp. 등 남조류 2종으로 Roscoff culture collection에서 분양받았음.
- 선박평형수, 장목해수 및 통영 해수 등 총 48회의 감염실험을 수행하고 있으며, 세포 사멸 등은 형광현미경 및 Spectrophotometer에서 관찰하였음.
- 향후, 세포 사멸이 관찰시 바이러스를 분리하여 Algal lawn에 접종하여 플라크 어세이 방법을 수행하여 순수 분리 예정이며, 이렇게 분리된 바이러스는 세포 반응 실험에 사용하였음.





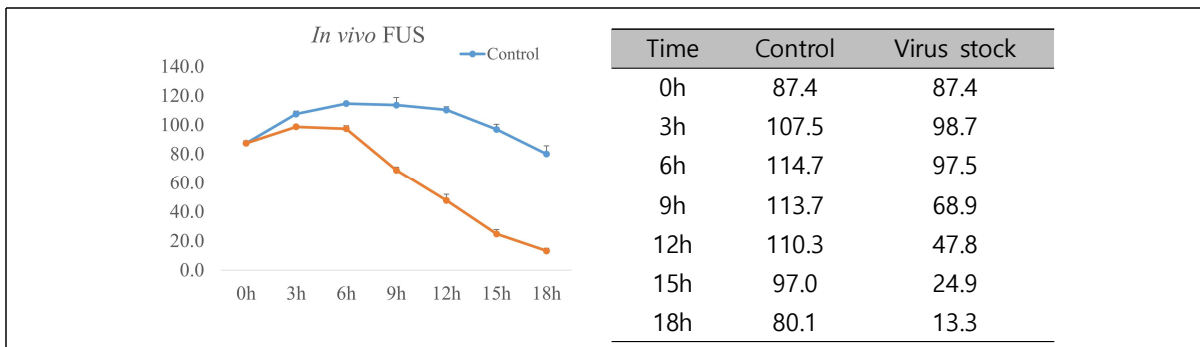
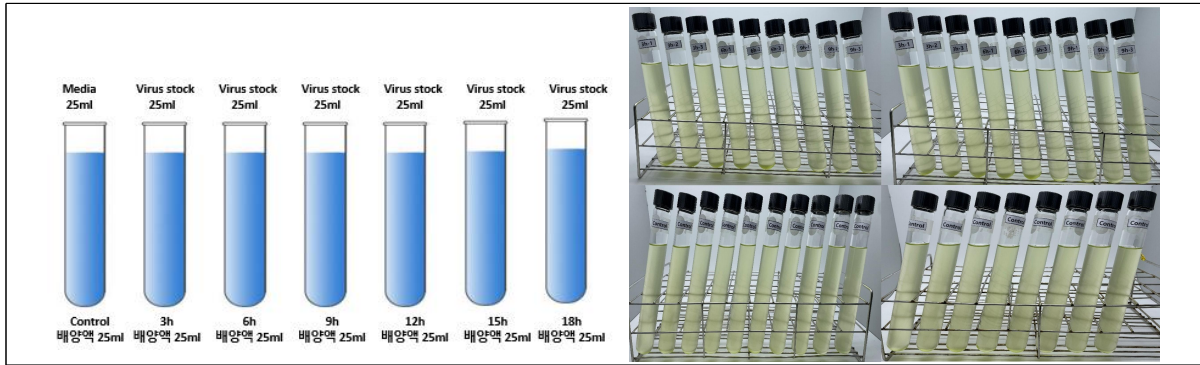
<해수를 이용한 바이러스 감염 스크리닝 결과>

(2) PBCV-1 *Chlorella* 바이러스 감염 및 세포반응 분석

○ 감염실험

- Host (*Chlorella variabilis*)
- Virus sample harvest
 - * *Chlorella variabilis* 500 ml + virus stock 50 ml 감염시킨 virus stock 이용
 - * Virus stock GF/F membrane으로 filter 후 0.45 μm membrane으로 filter 여액사용
- Growth curve
 - * 3시간 마다 FSU 측정
 - * 이때 control sample은 aliquot 1.25 ml에 glutaraldehyde 0.1 ml로 고정
 - * 3시간 마다 배양액 확인
- RNA sequencing
 - * 3시간 간격 control, virus 감염 실험구 원심분리(4000 rpm, 30 min, 4°C) 후 pellet 모음
 - * Trisol 150 μl 첨가 후 centrifuge tube sample pestle으로 cell 분쇄
 - * -80°C 보관
- 실험 디자인
 - * Control은 시간별(3, 9, 15 hr)로 모두 3배수로 샘플 제작
 - * Virus 감염 실험구(3, 9, 15 hr)도 모두 3배수로 샘플 제작
 - * 배양은 20°C 하였으며, control과 virus 감염 샘플 따로 배양

- * 빛에 대한 stress 없애기 위해서 dark time 없이 light만 24h
- * 동일한 광양 위해서 같은 위치에서 일렬로 배양 진행



○ 감염 시료 샘플링과 염기서열 분석

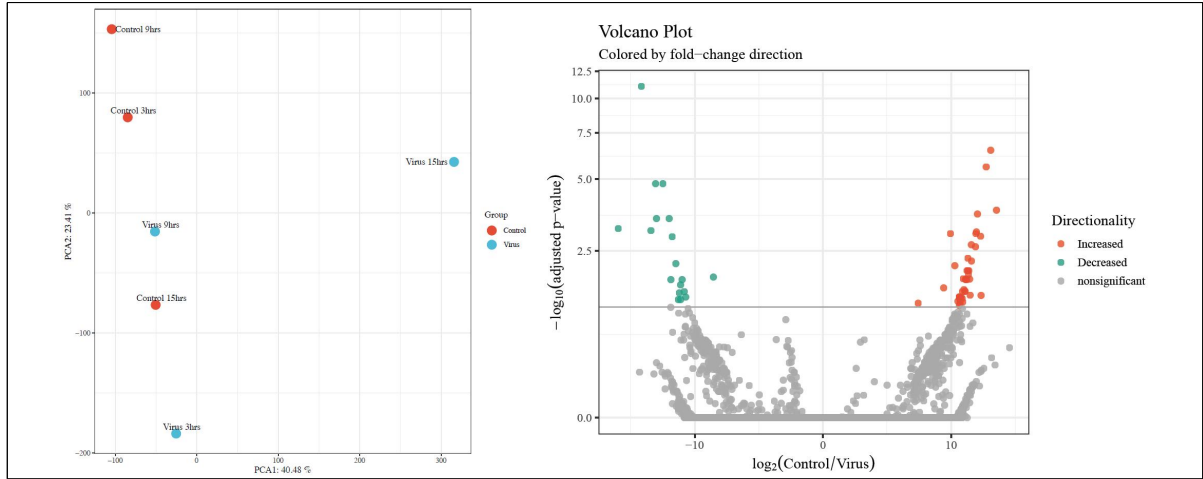
- 전체 6개 시료(c-3, c9, c-15, v-3, v-9, v-15)의 total RNA를 추출하였음
- RNA의 quality와 integrity는 Qubit 4(Thermo fisher scientific)를 사용하여 확인하였음
- High RNA integrity number (RIN) scores (criterion RIN > 8, range 9.1-9.8)가 확인된 total RNA를 Illumina Nexa sequencers를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였음

○ Bioinformatics analysis

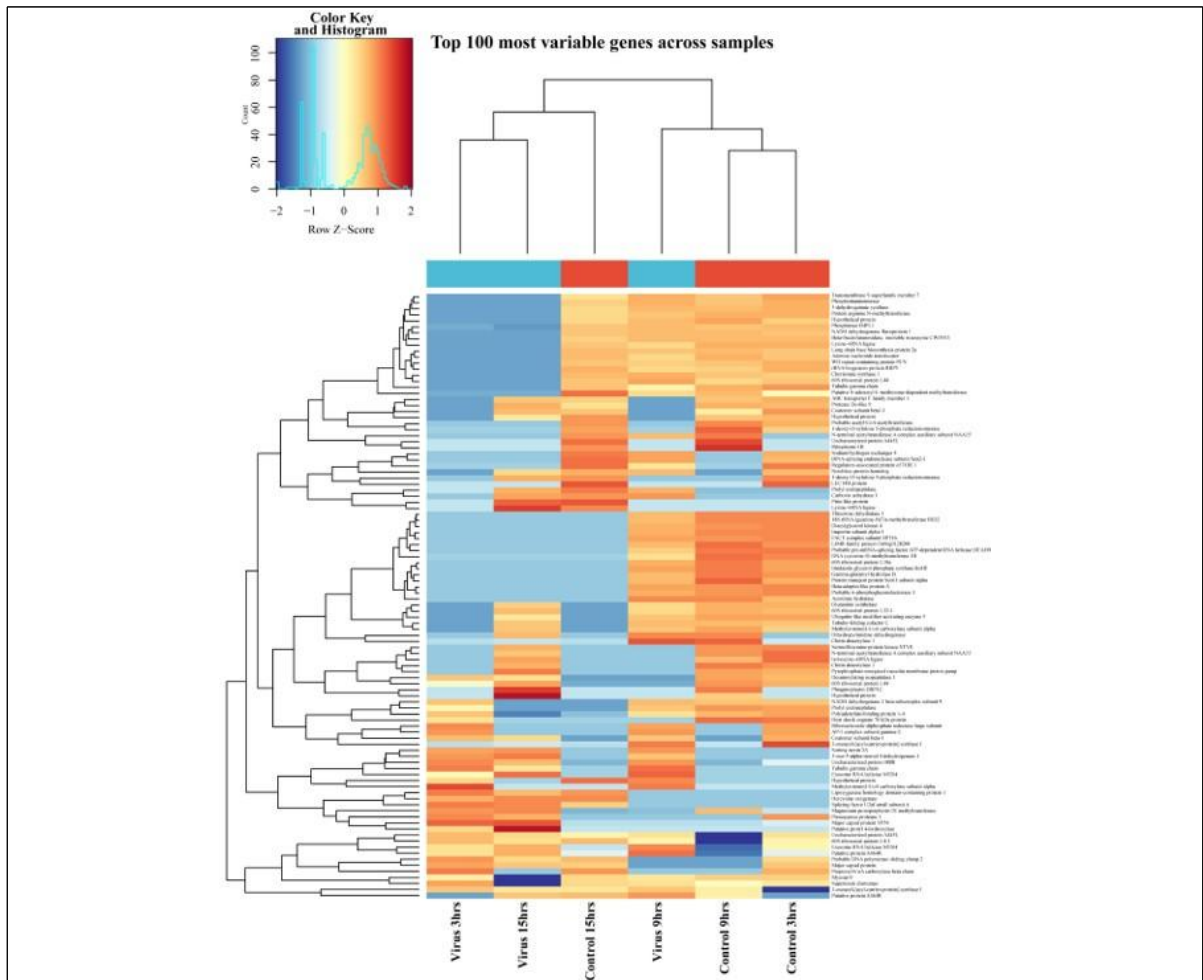
- De novo assembly and genome-guided assembly
 - * Adapters를 제거하기 위하여 Trimmomatic/0.36-Java-1.8.0_121을 사용하였음
 - * de novo assembly를 위해서 Trinity (Grabherr et al. 2011)를 사용하였으며, reference genome-guided transcriptome assembly를 위해서는 Tophat and Cufflinks (Trapnell et al. 2012)가 사용되었음
- Annotations of transcripts
 - * Transcripts를 UniProt/Swiss-Prot release 2021_03 database (Apweiler et al. 2004) with the e-value of 1e-10, coverage >=50% and identity >=30%에 대하여 blastx를 이용하여 스캔하였음
 - * Blastx 산출물은 Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.kegg.jp/dmf>) 사용하여 분석하였음
 - * 모든 transcripts는 Transdecoder v.5.0.2 ([http:// 34 transdecoder.github.io](http://34.transdecoder.github.io))를 사용하여 annotate 하였음

○ 분석결과

- PCA 분석 결과 v-15시료와 다른 시료와의 차이가 확인되었음
- 500 DEGs 중 control 대비 바이러스 감염시료에서 발현이 감소된 유전자 및 증가된 유전자를 volcano plot을 통하여 확인하였음



<500 DEGs 비교를 통한 3개 그룹의 PCA plot(좌) 및 volcano plot(우)>



<Heatmap of clustering the top DEGs of chlorella response to virus infection in 95 different time point. Hierarchical sample and gene clustering is presented on the top and left sides>

- 바이러스에 감염된 Chlorella 세포내에서

- * RNA 및 단백질 분해 (Exosome RNA helicase MTR4), 바이러스 capsid 단백질 (Major capsid protein VP54), 신호전달 (Uncharacterized protein 088R, 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1), 아미노산 대사 (Dihydropyrimidine dehydrogenase, Putative prolyl 4-hydroxylase), 막수송 (AP-1 complex subunit gamma-2) **단백질의 발현이 증가되었음**
- * 에너지생산 (Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1, Probable acetyl-CoA acetyltransferase), 리보솜 생산 (rRNA biogenesis protein RRP5, WD repeat-containing protein PCN, ABC transporter F family member 1), 막수송 (60S ribosomal protein L44, LEC14B protein, Lysine-tRNA ligase), 신호전달과 세포내 과정 (Transmembrane 9 superfamily member 7, Phosphomannomutase, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Protein arginine N-methyltransferase, Beta-adaptin-like protein A, Long chain base biosynthesis protein 2a, Adenine nucleotide translocator) 및 mRNA surveillance pathway (NADH dehydrogenase flavoprotein 1) **관련 단백질의 발현이 감소하는 것으로 분석되었음**,

Labels on heatmap	Protein families	Metabolism
Exosome RNA helicase MTR4	genetic information processing	Ubiquitin system
Dihydropyrimidine dehydrogenase	Amino acid metabolism	Cysteine and methionine metabolism
Major capsid protein VP54	Not Included in Pathway or Brite	Unclassified: metabolism
Uncharacterized protein 088R	Environmental Information Processing	Signal transduction
Putative prolyl 4-hydroxylase	Amino acid metabolism	Arginine and proline metabolism
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha	Transcription	Spliceosome
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	Lipid metabolism	00140 Steroid hormone biosynthesis
AP-1 complex subunit gamma-2	genetic information processing	Membrane trafficking

Labels on heatmap	Protein families	Metabolism
FACT complex subunit SPT16	genetic information processing	Ubiquitin system
Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1	Metabolism of cofactors and vitamins	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
ABC transporter F family member 1	genetic information processing	Ribosome biogenesis
Lysine-tRNA ligase	genetic information processing	Membrane trafficking
Transmembrane 9 superfamily member 7	signaling and cellular processes	Cytoskeleton proteins
LEC14B protein	genetic information processing	Membrane trafficking
NADH dehydrogenase flavoprotein 1	Translation	mRNA surveillance pathway
Phosphomannomutase	signaling and cellular processes	Transporters
Probable acetyl-CoA acetyltransferase	Lipid metabolism	Fatty acid degradation
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	signaling and cellular processes	Cilium and associated proteins
Protein arginine N-methyltransferase	Signal transduction	FoxO signaling pathway
Protease Do-like 9	Unclassified: metabolism	Enzymes with EC numbers
Beta-adaptin-like protein A	Glycan biosynthesis and metabolism	N-Glycan biosynthesis
Long chain base biosynthesis protein 2a	metabolism	01002 Peptidases and inhibitors
Chorismate synthase 1	Folding, sorting and degradation	03018 RNA degradation
Adenine nucleotide translocator	metabolism	Protein kinases
WD repeat-containing protein PCN	genetic information processing	Ribosome biogenesis
rRNA biogenesis protein RRP5	genetic information processing	Ribosome biogenesis
60S ribosomal protein L44	genetic information processing	Membrane trafficking

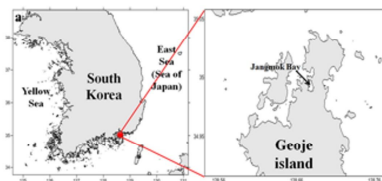
<Control 대비 증가(상) 및 감소(하)된 metabolisms>

마. 해양미소생태계에서의 감염성 해양바이러스의 영향

○ 추진전략

- Giant Virus라고 불리는 Nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV)는 다양한 진핵생물을 감염시키며, 해양에 많이 존재하여 Viral shunt를 통해 해양환경의 Biogeochemical cycling에 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.
- 현재 NCLDV에 관한 연구는 Pole to Pole의 biogeography, diversity 및 식물플랑크톤과 감염에 따른 Metabolism에 연구들이 다양함.
- 그러나, 우리나라에서는 Chlorella를 이용한 감염 실험을 통해 거대바이러스 분리 및 대사 작용 등에 대한 연구 수행되고 있지만, 다양한 해양에서의 군집 다양성 및 interplay의 관계 등에 연구는 전무한 상태임.
- 따라서, 본 연구는 우리나라 연안에서 NCLDV와 부유성 진핵생물 간의 interplay의 관계를 파악하기 위하여 남해 장목만(반폐쇄성)에서 일주일 간격으로 일년 동안(57회) metagenomics를 통해 이들의 변동 및 상관성을 분석하였음.

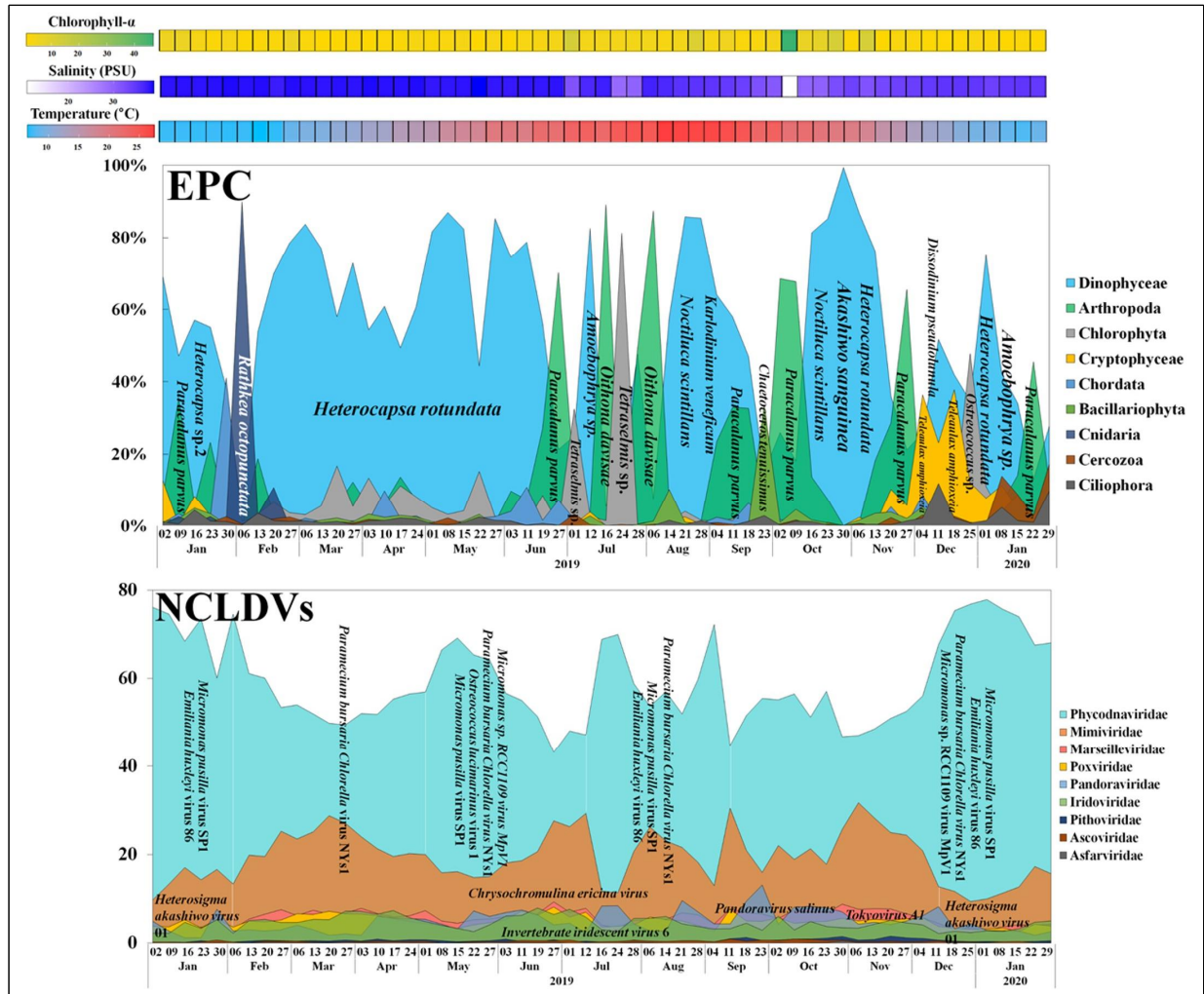
○ 분석방법

Sample collection	
<p>Sampling site</p> <ul style="list-style-type: none"> • 장목 연안 시계열 모니터링 (34°59'37"N, 128°40'27"E) <p>Sampling date</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2019년 1월부터 2020년 1월까지 주별 (총 57회) 표층 해수 1L 채수하여 진핵생물 필터링 하였음 • 표층해수 20L 채수하여 바이러스 필터링 하였음 	
Environmental factor	Statistical analysis
<p>수온, 염분 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> • YSI EXO2 <p>Chlorophyll a 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 °C에서 24시간 동안 암실에서 용출시킨 후 10-AU Fluorometer 이용하여 측정 	<p>Spearman Correlation analysis</p> <ul style="list-style-type: none"> • SPSS Statistics <p>Cluster (Bray-Curtis similarity method)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Primer V.6
Microbial communities	
<p>Eukaryotic Plankton Community (EPC) (Amplicon metabarcoding)</p> <p>1L of seawater (surface layers) → Eukaryote harvested using a 0.2-µm → gDNA extraction (DNeasy PowerSoil Kit) → 1st and 2nd PCR (V4-V5 regions of 18S rDNA) → Mi-Seq platform (Illumina) → Mi-Seq Control Software/FastQC/fast length adjustment of short reads/BLAST/CD-HIT-OTU</p>	
<p>Nucleocytoplasmic Large DNA Virus (NCLDV) (Shotgun sequencing)</p> <p>20L of seawater (surface layers) → Pre-filtering through a 3-µm filter → FFR method with FeCl₃ (Virus aggregation) → Virus harvested using a 0.2-µm → gDNA extraction (with a suspension buffer and Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction Kit) → NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit → HiSeq 2500 (Illumina) → CLC genomics workbench (removed low-quality adapters)/metaSPAdes (K-mer 21, 33, 55, 77, and 99 for assembly)/BLAST/ Virus classification/NCLDV data sorting</p>	

○ 분석결과

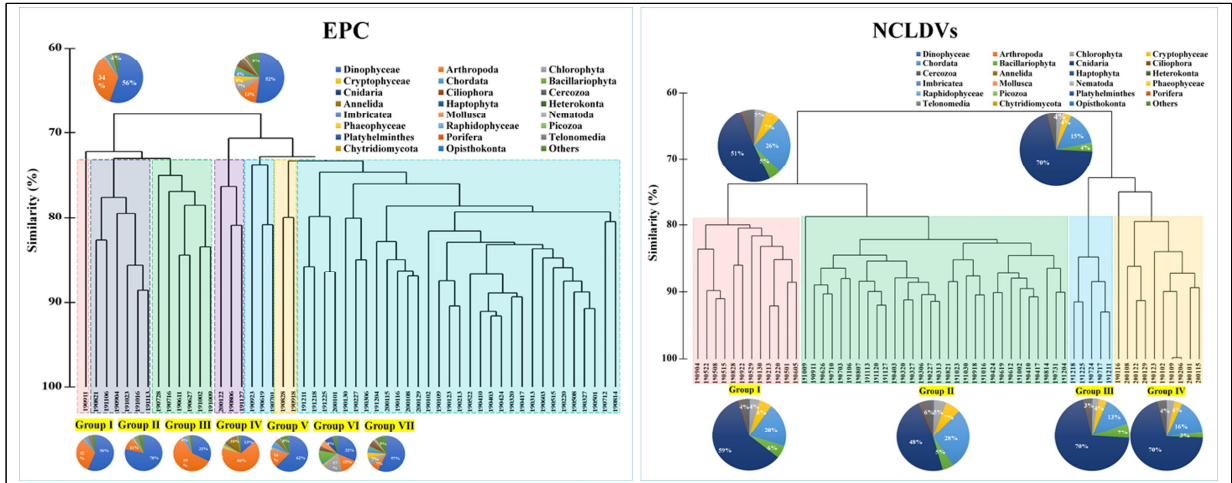
- 진핵생물 및 NCLDV의 군집 연중 변화를 살펴본 결과, 진핵생물은 외편모조류(54%), 절지동물(17.4%), 녹조류(6.6%)을 차지하였고, NCLDV는 Phycodnaviridae(59.6%), Mimiviridae(19.5%), Marseilleviridae(5.7%)가 주요 분류군으로 나타났음.
- EPC의 연간 변화를 살펴보면, Dinophyceae 및 Arthropoda가 주로 우점하였으며, Heterocapsa rotundata (Dinophyceae), Paracalpus parvus (Arthropoda) 가 최우점종이었음.

- NCLDV의 연간군집 변화를 살펴보면, Phycodnaviridae 와 Mimiviridae가 주로 우점하며 연간 증변화를 이끄는 것으로 나타났다.
- 그 중에서도 Phycodnaviridae는 다양한 종들이 우점하였지만 수온 증가시 Paramecium bursaria chlorella virus NYs1이 우점하였다. 반대로 저수온시 Micromonas pusilla가 우점하였음.



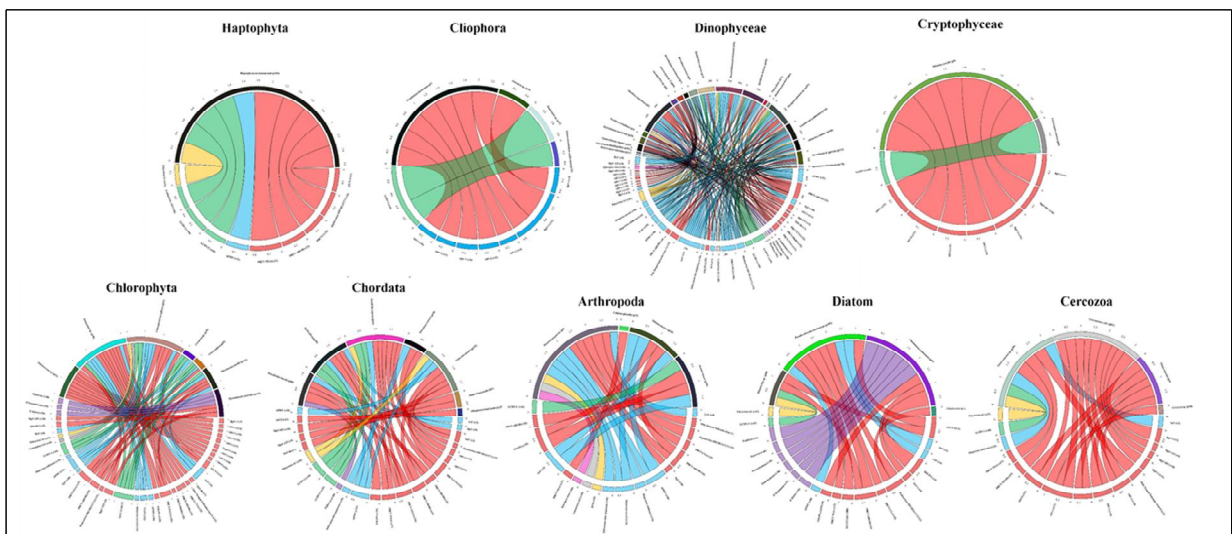
<2019-2020년 장목만 NCLDVs와 EPC의 변화>

- EPC의 Phylum (or Class) Level에서 군집분석시 (67% similarity) 총 2개로 그룹으로 구분되었고, 주로 Dinophyceae 및 Arthropoda의 변화에 따라서 나누어짐.
- 하위 72%의 유사성으로 볼 때 총 7개로 그룹으로 구분되었으며, Group I은 Dinophyceae (56%), Arthropoda(32%) 나타났고, Group II는 Dinophyceae(78%)임. Group III는 Arthropoda (58%)로 나타났으며, Group IV는 다른 그룹에 비해 Annelida(9%)가 높게 나타났다.
- Group V는 Bacillariophyta(11%) 와 Chlorophyta(17%), Group VI는 Chordata(6%), Group VII는 Cryptophyceae (5%)가 다른 군집에 비해 높게 나타났다.
- NCLDVs 군집을 Family level에서 62% similarity 로 구분되었을 때, 총 2개의 Group으로 구분되었으며, Phycodnaviridae 및 Mimiviridae의 차이에 따라서 나누어졌음.
- 하위 73% similarity로는 총 4개의 Group으로 묶였으며. Group I은 Phycodnaviridae (59%), Mimiviridae (19%), Pandoraviridae (6%), Group II는 Phycodnaviridae (47%), Mimiviridae (28%), Marseilleviridae (5%)로 나타났다.
- Group III는 Phycodnaviridae (70%), Mimiviridae (13%), Pandoraviridae (6%)이며, Group iv는 Phycodnaviridae (70%), Mimiviridae (16%), Marseilleviridae (3%)로 나타났다.



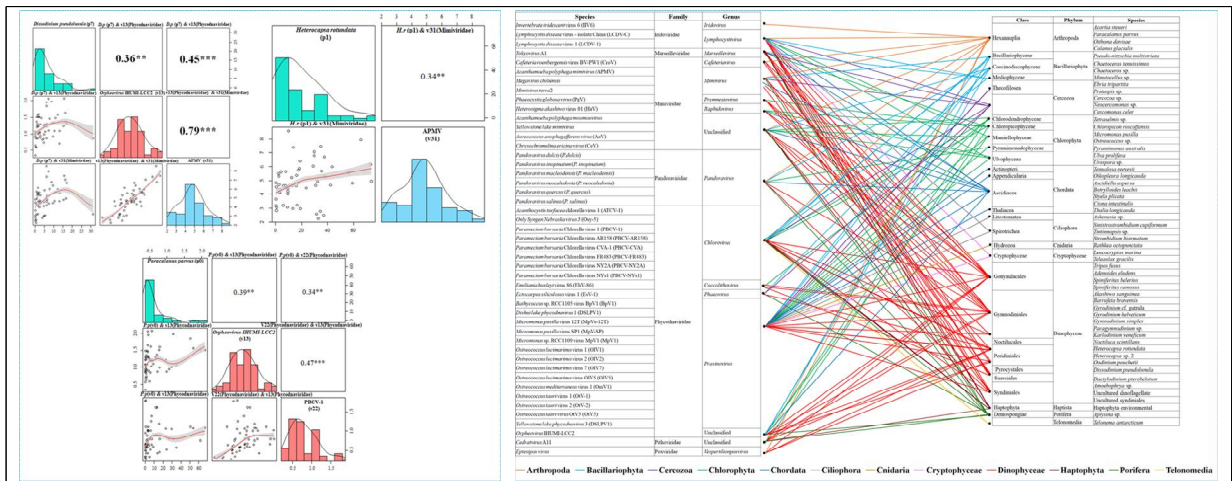
<2019-2020년 장목만 EPC의 군집 분석 결과(좌) 및 2019-2020년 장목만 NCLDV의 군집 분석 결과>

- EPC와 NCLDV의 Spearman significant correlation를 분석해 본 결과, 다양한 EPC 및 NCLDVs 사이에서 상관관계 나타났고 Phycodnaviridae가 가장 많은 상관성을 보였음.
- 특히, Dinophyceae와 NCLDVs 사이에 가장 많은 상관관계를 나타냈으며, 대부분이 Phycodnaviridae 및 Mimiviridae에 속하는 OTUs로 나타났음.
- NCLDVs와 진핵생물 군집 간의 interplay를 파악하고자 상관관계를 분석한 결과 외편모조류, 절지동물 및 녹조류 모두 Phycodnaviridae와 Mimiviridae와 가장 유의한 상관관계를 보였음.
- 특히 외편모조류가 출현 비율이 높을 시에는 Phycodnaviridae가 증가하였고, 녹조류 및 절지동물과는 Phycodnaviridae 및 Mimiviridae의 상관관계가 높았음. 종수준에서 가장 연관성이 높은 NCLDVs는 절지동물과 Yellowstone lake phycodnavirus 3, 녹조류와 Paramecium bursaria Chlorella virus NYs1, 외편모조류와 Paramecium bursaria Chlorella virus CVA-1로 나타났음.
- 이렇게 진핵생물과 유의한 관계를 보이는 Phycodnaviridae와 Mimiviridae는 식물플랑크톤 뿐만 아니라 다른 진핵생물들도 조절 (Killing or Inhibition) 작용을 할 것으로 추정됨.
- 또한 이러한 결과는 NCLDVs가 더욱 폭넓은 숙주의 범위를 가질 수 있으며, 생태학적으로 중요한 숙주를 감염시킬 수도 있음을 암시함.



<Spearman correlation에 의한 중요 NCLDVs와 EPC의 상관관계>

- 가장 높은 출현빈도를 보인 EPC OTUs인 *Paracalanus parvurus*는 Phycodnaviridae (V13, V22), *Heterocapsa rotundata*는 Mimiviridae (V31), *Dissodinium pseudolunula*는 Phycodnaviridae (V13) 및 Mimiviridae (V31)과 significant correlation을 보였음.
- 2019-2020년에 남해 장목만에서 주별 총 57회의 시계열 데이터를 분석한 결과 EPC는 Dinophyceae와 Arthropoda가 주요 군집으로 나타났으며, NCLDV는 Phycodnaviridae 와 Mimiviridae가 주요 군집으로 나타났음.
- 이들 사이의 상관관계를 분석하였을 때, Dinophyceae가 식물플랑크톤을 감염시키는 Phycodnaviridae 및 Mimiviridae와 가장 상관관계가 다양하고 높게 나타나 Phycodnaviridae 및 Mimiviridae가 Dinophyceae의 군집을 생물학적으로 조절시키는 주요 요인으로 작용할 수 있을 것으로 판단됨.
- 또한 NCLDV는 식물플랑크톤 뿐만 아니라 다양한 EPC를 감염시키는 것으로 판단되며, 본 연구에서는 단순히 식물플랑크톤 뿐만 아니라 섬모충, 요각류 등 다양한 범주의 숙주를 감염시킬 수 있는 가능성의 생태학적인 증거를 확보함.
- 향후 Specific host에 대한 NCLDV를 분리하여 infection 실험을 통해 숙주의 세포 감염 반응 연구를 통하여 숙주의 대사반응에 대한 연구를 수행할 계획임.



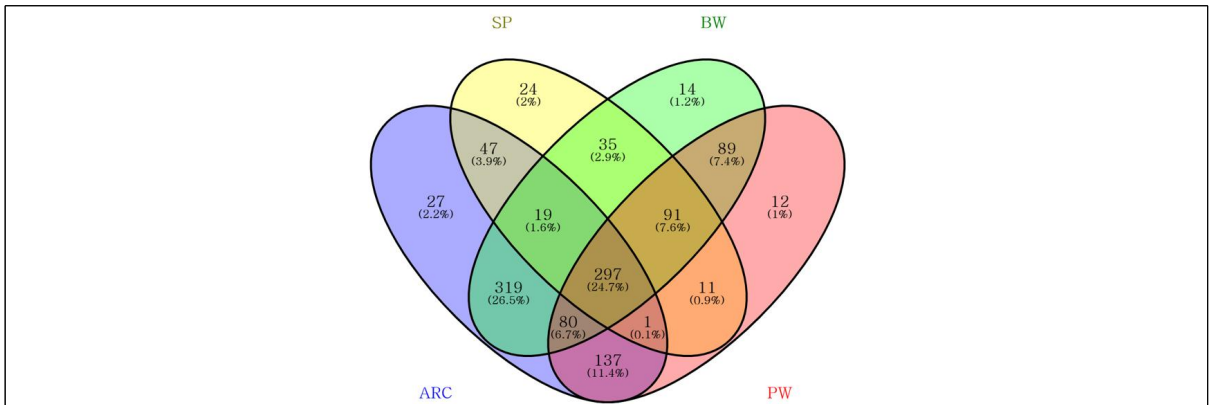
<가장 높은 출현빈도를 보인 *Paracalanus parvurus*와 Phycodnaviridae (V13, V22), *Heterocapsa rotundata*와 Mimiviridae (V31), *Dissodinium pseudolunula*와 Phycodnaviridae (V13) 및 Mimiviridae (V31)의 유의적 상관관계 및 NCLDV와 EPC의 다양한 연관관계>

바. 선박 기인 감염성 해양바이러스 모니터링 종합적 분석

(1) 감염성 해양바이러스 국내 유입에 대한 종합적 분석

○ 종합분석 및 주요 감염성 바이러스 선정

- 북극해수, 선박평형수, 항만해수 및 열대해수의 공통종 및 고유종을 분석하였음
- 북극해수의 고유종은 27종, 선박평형수의 고유종은 14, 항만해수의 고유종은 12, 열대해수의 고유종은 24 종으로 나타났으며, 북극, 열대 등 극한지역에서 고유종이 많은 것으로 나타났음
- 4개 지역 공통종은 297종으로 나타났으며, 전세계 해수에 공통으로 존재하는 것으로 판단됨
- 특이한 점은 북극해수와 선박평형수의 공통종이 319종으로 26.5%로 분석되었으며, 이는 북극에서의 I-virus의 전세계로의 확산에 선박평형수가 중요한 역할을 할 수 있음을 의미함



<북극해수, 선박평형수, 항만해수 및 열대해수 바이러스 공통종 및 고유종 분석>

- 현재 우리나라 해수의 감염성 해양바이러스 조성에 영향을 미치고 있는 해양바이러스를 선정하기 위하여 항만해수와 선박평형수의 고유종 top10과 인간감염 바이러스 top10을 분석하였음
- 고유종 top10 선정을 위하여 숙주, 출판된 논문수 및 출현된 시료수를 분석하고, 1-5점으로 노멀라이징 하였음
 - * 항만해수에는 *Rous sarcoma virus* (Retroviridae), *Madariaga virus* (Togaviridae), *Porcine bocavirus 3* (Parvoviridae)이 위해도가 높은 것으로 나타났음
 - * *Rous sarcoma virus* (RSV)의 유전자는 positive sense RNA이며, 최초의 oncovirus이고, 닭에서 육종을 유발하는 감염성 바이러스임
 - * *Madariaga virus* (MADV)는 South American eastern equine encephalitis virus라고도 하며, 중남미에서 동물과 인간에게서 검출되는 바이러스임
 - * *Porcine bocavirus*는 single-stranded DNA 바이러스이며, 이유후 전신성 소모성 증후군 (postweaning multisystemic wasting syndrome)을 앓고 있는 돼지의 림프절에서 발견됨
 - * 선박평형수에는 *Human mastadenovirus E* (Adenoviridae), *Bat mastadenovirus WIV11* (Adenoviridae), *Fujinami sarcoma virus* (Retroviridae)가 위해도가 높은 것으로 나타났음
 - * *Human mastadenovirus E*는 dsDNA바이러스이며, 주로 호흡기와 위장 및 눈을 감염시킴
 - * *Bat mastadenovirus WIV11*는 dsDNA 바이러스이며, 간염과 호흡기 질환을 유발함
 - * *Fujinami sarcoma virus* (FSV)는 RNA 바이러스이며, 조류에서 종양을 유발하는 바이러스임
- 인간감염 바이러스 top10 선정을 위해서 출현량이 높은 인간감염 바이러스 중 출판된 논문수 및 출현된 시료수를 분석하고, 1-5점으로 노멀라이징 하였음
 - * 항만해수와 선박평형수에 공통적으로 존재하는 인간감염 바이러스는 Poxviridae에 속하는 *Cowpox*

virus, Orfvirus, Yabamoney tumor virus, Yaba-like disease virus, NY_014 poxvirus 등이 검출되었으며, Herpesviridae에 속하는 Human gammaherpesvirus 8과 Macacine alphaherpesvirus 1이 확인되었음

- * 항만해수와 선박평형수에 존재하는 인간감염 바이러스 top10 중 7종이 공통종으로 존재한다는 것은 인간감염 바이러스가 널리 퍼져 있다는 의미이고, 고온, 고압이 적용되는 선박평형수에서도 쉽게 파괴되지 않을 수 있음을 의미함

Name	Family	Host	Published Papers	Samples (33)	Mean	Ranking
<i>Rous sarcoma virus</i>	Retroviridae	Aves (3)	1,891 (5)	1 (1)	3	1
<i>Macariaga virus</i>	Togaviridae	Mammalia (4)	15 (2)	3 (1)	2.33	2
<i>Porcine bocavirus 3</i>	Parvoviridae	Mammalia (4)	3 (1)	3 (1)	2	3
<i>Sumatran orang-utanpolyomavirus</i>	Polyomaviridae	Mammalia (4)	1 (1)	3 (1)	2	4
<i>Possam adenovirus 1</i>	Adenoviridae	Mammalia (4)	1 (1)	2 (1)	2	5
<i>Skua adenovirus 1</i>	Adenoviridae	Aves (3)	3 (1)	2 (1)	1.67	6
<i>Formica exsectavirus 1</i>	Dicistroviridae	avian (3)	1 (1)	3 (1)	1.67	7
<i>Pidgey virus</i>	Phenuiviridae	Insecta (3)	0 (1)	3 (1)	1.67	8
<i>Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 26</i>	Circoviridae	Mollusca (2)	0 (1)	2 (1)	1.67	9
<i>Glis glis polyomavirus 1</i>	Polyomaviridae	Arthropoda (2)	1 (1)	3 (1)	1.33	10

Name	Family	Host	Published Papers	Samples (58)	Mean	Ranking
<i>Human mastadenovirus E</i>	Adenoviridae	Homo (5)	4 (1)	2 (1)	2.33	1
<i>Bat mastadenovirusWV11</i>	Adenoviridae	Mammalia (4)	2 (1)	13 (2)	2.33	2
<i>Fujinami sarcoma virus</i>	Retroviridae	Aves (3)	148 (3)	6 (1)	2.33	3
<i>Puma lentivirus 14</i>	Retroviridae	Mammalia (4)	8 (1)	4 (1)	2.00	4
<i>Caprine alphaherpesvirus1</i>	Herpesviridae	Mammalia (4)	6 (1)	8 (1)	2	5
<i>Bat astrovirus Tm/Guangxi/LD77/2007</i>	Astroviridae	Mammalia (4)	4 (1)	4 (1)	2	6
<i>Black sea bass polyomavirus 1</i>	Polyomaviridae	Fish (3)	2 (1)	3 (1)	1.67	7
<i>Rochambeau virus</i>	Rhabdoviridae	Insecta (3)	3 (1)	3 (1)	1.67	8
<i>Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 8</i>	Circoviridae	Mollusca (2)	- (1)	2 (1)	1.33	9
<i>Rice stripe tenuivirus</i>	Phenuiviridae	Plant (1)	22 (2)	5 (1)	1.33	10

<항만해수(상)와 선박평형수(하)에서 검출되는 고유종 top10>

Name	Family	Published Papers	Samples (33)	Mean	Ranking
<i>Vaccinia virus</i>	Poxviridae	14,097 (5)	12 (2)	3.5	1
<i>Variola virus</i>	Poxviridae	2,366 (5)	13 (2)	3.5	2
<i>Cowpox virus</i>	Poxviridae	763 (4)	16 (3)	3.5	3
<i>Human gammaherpesvirus8</i>	Herpesviridae	11 (2)	33 (5)	3.5	4
<i>Orfvirus</i>	Poxviridae	659 (4)	14 (2)	3	5
<i>Yabamoney tumor virus</i>	Poxviridae	121 (3)	19 (3)	3	6
<i>Yaba-like disease virus</i>	Poxviridae	18 (2)	28 (4)	3	7
<i>Macacinealphaherpesvirus1</i>	Herpesviridae	12 (2)	23 (4)	3	8
<i>Molluscum contagiosum virus subtype 1</i>	Poxviridae	10 (1)	29 (5)	3	9
<i>NY_014 poxvirus</i>	Poxviridae	2 (1)	29 (5)	3	10

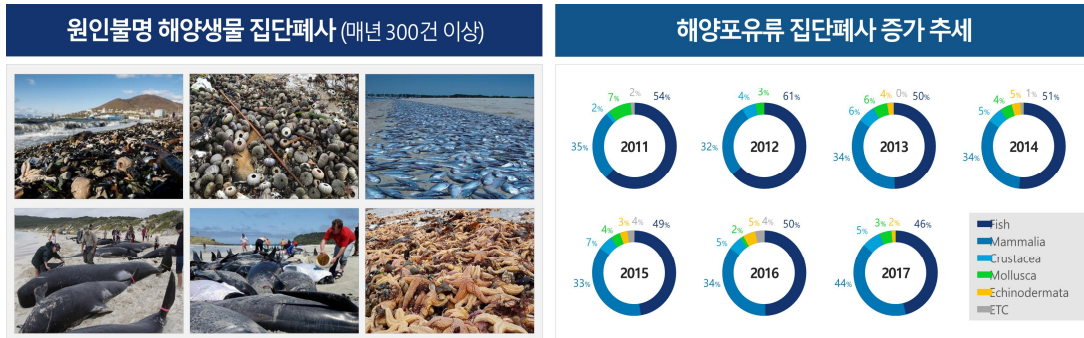
Species	Family	Published Papers	Samples (58)	Mean	Ranking
<i>Orfvirus</i>	Poxviridae	659 (4)	44 (4)	4	1
<i>Yabamoney tumor virus</i>	Poxviridae	121 (3)	49 (5)	4	2
<i>Cowpox virus</i>	Poxviridae	763 (4)	34 (3)	3.5	3
<i>Macacinealphaherpesvirus1</i>	Herpesviridae	12 (2)	52 (5)	3.5	4
<i>Human gammaherpesvirus 8</i>	Herpesviridae	11 (2)	54 (5)	3.5	5
<i>Human alphaherpesvirus1</i>	Herpesviridae	22 (2)	38 (4)	3	6
<i>Yaba-like disease virus</i>	Poxviridae	18 (2)	38 (4)	3	7
<i>NY_014 poxvirus</i>	Poxviridae	2 (1)	52 (5)	3	8
<i>Human herpesvirus 4 type 2</i>	Herpesviridae	17 (2)	27 (3)	2.5	9
<i>Human alphaherpesvirus2</i>	Herpesviridae	5 (1)	39 (4)	2.5	10

<항만해수(상)와 선박평형수(하)에서 검출되는 인간감염 바이러스 top10>

(2) 감염성 해양바이러스 국가 관측 시스템 제안

○ 감염성 해양바이러스의 위험성

- 해양은 지구 면적의 70%를 차지하여 지표 대부분을 덮고 있으며, 지구 생물의 80% 이상이 해양을 기반으로 하여 서식한다는 것은 잘 알려져 있음.
- 다양한 해양생태계에서 전 세계적으로 매년 수백 건 이상의 해양생물 집단폐사가 보고되고 있으며, 조사된 집단폐사 중 약 50%의 발생 원인이 규명되고 있지 않은 실정임.
- 특히, 2010년 이후의 해양생물 집단폐사 관련 데이터를 분석한 결과 각 대륙별로 200건 이상의 원인을 알지 못하는 집단폐사가 발생되고 있음.



- 특히 해양바이러스는 전 지구적인 해양환경 문제로 급부상하고 있으며, OECD Global Forum에서도 'Emerging pathogens in the environment' 라는 주제로 병원체-질병-환경 변화 간의 연결에 초점을 맞추어 논의된 바 있음.
- 해양바이러스는 감염률에 있어서는 다른 해양병원체와 큰 차이가 없지만, 감염 시 치료 방법이 존재하지 않아 70% 이상의 높은 치사율을 나타내는 등 위험성이 매우 높으며, 육상병원체에 비해 훨씬 빠른 전파 속도를 가지고 있는 것으로 알려져 있음.
- 따라서 해양바이러스 탐색 및 진단에 대한 연구와 기술 개발을 통하여 검역 대상 해양바이러스를 확대하고, 이에 선제적으로 대응할 수 있는 능력을 갖추는 것이 시급함.

○ 인수공통바이러스의 위험성

- 인수공통 감염병은 동물과 사람이 함께 감염되는 질병이라는 뜻으로, 좀 더 정확하게 얘기하자면 동물을 보유숙주로 하면서 사람에게 옮겨 감염되는 질병을 의미함.
- 이러한 인수공통 전염병은 그 발생시기나 장소에 대한 예측이 불가하며 발생에 따른 피해 또한 예상하기 어려움. 대표적인 예로 '신종 코로나바이러스(SARS-CoV-2)' 가 있음.
- 인류에게 위협이 되는 인수공통감염병은 무척추동물 또는 척추동물과 같은 다양한 매개체를 통해 인간에게 감염됨.
- 인수공통 감염병 출현의 증가는 자연환경의 변화에 의한 인간과 동물의 서식지 공유가 증가되고 기후변화 및 국제적인 교역 증가 등이 제시되고 있음.
- 글로벌 관광, 무역과 같은 인구 이동의 증가로 한 지역에 기존에 없던 감염병 바이러스가 새롭게 유입되거나, 해외에서 감염되어 귀국하는 사례도 증가하고 있음.

○ Disease X의 위험성

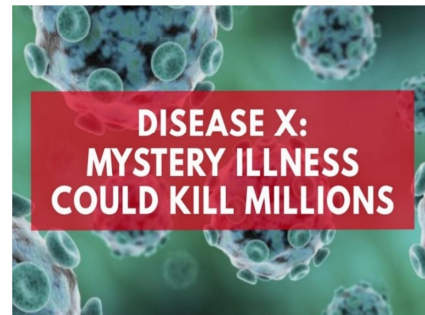
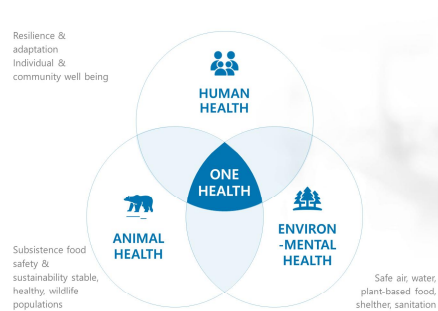
- 신종 감염병은 지난 100년 간 꾸준히 발생해 왔으며, 최근 그 발생주기가 빨라지고 있음.
- 스페인독감(1918년, 5000만 명 이상 사망), 아시아독감(1957년, 100만 명 이상 사망), 홍콩독감(1968년, 80만 명 이상 사망), 신종플루(H1N1, 2009년), 에볼라(2014년), 지카(2015-2016년), 에볼라(2018-현재), COVID-19(2019-현재) 등이 대표적임.

- 이 중, 홍콩 독감(1968년)과 신종플루(2009년), COVID-19(2019-현재)는 팬데믹이 선언됨.
- WHO에서는 예측 불가능한 감염병 'Disease X' 를 제시하며 새로운 바이러스의 출현 가능성에 대해 경고하고 있음.
- 2018년 개정된 WHO R&D Blueprint는 세계 공공보건에 심각한 위협이 될 질병을 다음과 같이 지정하고 있음: 크림-콩고 출혈열, 에볼라, 말버그병, 라사열병, 메르스 코로나, 사스, 니파, 리프트밸리열병, 지카, 원인불명인 Disease X를 경고함.
- 이에 원인불명인 Disease X를 제어하기 위해서는 인간과 환경과 동물의 건강은 서로 별개가 아니라, 하나로 연결되어 있다는 'One health' 적 접근이 필요함.
- 따라서, 해양바이러스에 대한 네트워크를 분석하여 Disease X를 감시(monitoring) · 조기진단 · 제어(control)함으로써 해양생태계 유래의 next pandemic을 막아야 함.

At present, the priority diseases are



- 01 **COVID-19**
- 02 Crimean-Congo haemorrhagic fever
- 03 Ebola virus disease and Marburg virus disease
- 04 Lassa fever
- 05 Middle Est respiratory syndrome coronavirus(MERS-CoV) and Severe Acute Respiratory Syndrome(SARS)
- 06 Nipah and henipaviral diseases
- 07 Rift Valley fever
- 08 Zika
- 09 **"Disease X"**



○ DiseaseX에 대한 대응현황

- 2019년 팬데믹을 유발한 COVID-19는 21세기 들어서 가장 많은 사망자를 발생시켰으며, 이에 따라 각 국에서는 엔데믹 상황을 대비하기 위한 준비를 하고 있음

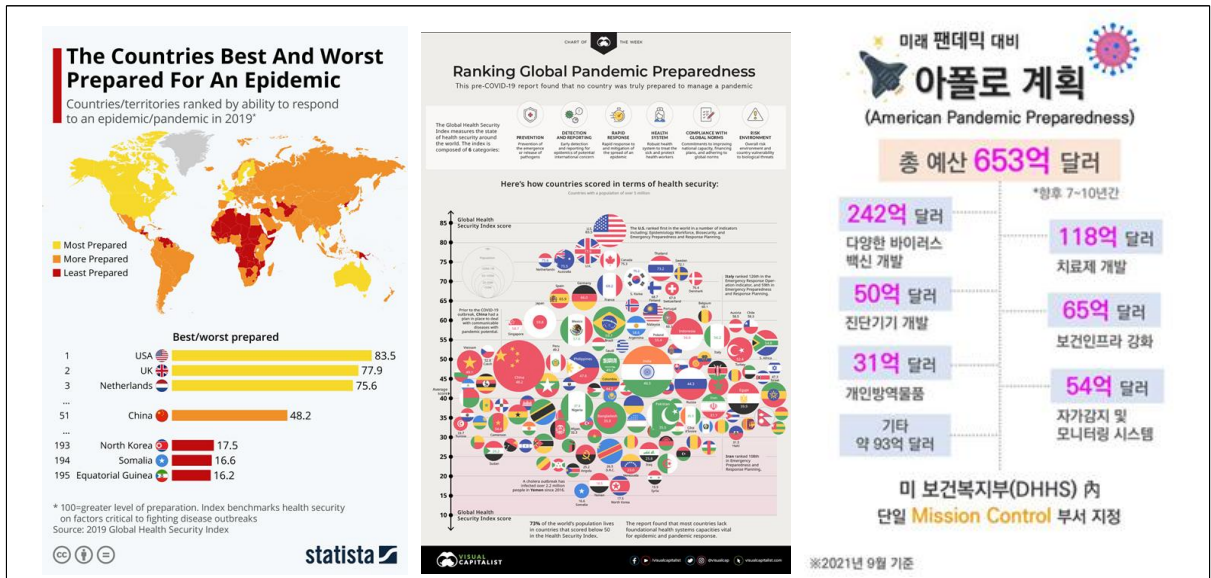
Table 1. Serious Viral Outbreaks Over Past 100 Years

	Name	Virus Type	Year Began	Global Deaths	US. Deaths
1	Spanish Flu	Orthomyxovirus	1918	50,000,000	675,000
2	Asian Flu (H2N2)	Orthomyxovirus	1957	1,100,000	116,000
3	Hong Kong Flu (H3N2)	Orthomyxovirus	1968	1,000,000	100,000
4	HIV	Retrovirus	1981	32,700,000	700,000
5	SARS-CoV-1	Coronavirus	2002	774	
6	Influenza (H1N1)	Orthomyxovirus	2009	284,000	12,469
7	MERS	Coronavirus	2012	875	
8	Ebola	Filovirus	2014	11,310	1
9	Zika	Flavivirus	2015	N/A	
10	Ebola	Filovirus	2018	2,300	
11	SARS-CoV-2	Coronavirus	2019	4,100,000+	621,000+

- 각국의 질병관리처에서는 one health 기반 대응정책을 준비 중이며, 우리나라의 대비는 전세계적으로 약 9위 정도인 것으로 평가받고 있음

Rank	Country	GHS Index Score
#1	United States	83.5
#2	United Kingdom	77.9
#3	Netherlands	75.6
#4	Australia	75.5
#5	Canada	75.3
#6	Thailand	73.2
#7	Sweden	72.1
#8	Denmark	70.4
#9	South Korea	70.2
#10	Finland	68.7

- 미국은 '미래 팬데믹' 대비 대규모 투자를 계획하고 있고, 'Disease X' 에 대비한 중장기 대응책이 시급한 것으로 인식하고 있음
- 이에 따라 미국 팬데믹예방 전략(American Pandemic Preparedness, Apollo Plan, 아폴로 계획)을 수립하여 코로나19 이후 또 다른 팬데믹 10년간에 대비하기 위하여 653억불 투자하기로 하고, 백신·치료제, 감염병 모니터링, 응급처치 등의 분야에 초기 긴급 투자를 결정하였음
- 미행정부 발표에 따르면 계획이행에 투입될 예산으로 제시된 금액은 향후 7~10년 동안 총 653억 달러로, 보건복지부 내 전담 부서(Mission Control Office)를 중심으로 계획을 이행하게 됨
- 또 계획초기 투입비용은 150~200억 달러로 예상되며, 긴급 투자 분야는 백신·치료제 등 의약품 및 진단기기 개발, 감염병 모니터링 강화, 응급처치 개선, 보호장구 추가 등으로 알려졌음
- 우리나라의 경우도 우리가 알지 못하는 많은 병원균과 바이러스에 의해 유발 가능한 미지의 질병(Disease X)에 대한 연구개발이 필요함



○ 해양 유래 DiseaseX 대비 연구개발 플랫폼 개발

- 해양은 전지구의 70% 이상의 면적을 차지하고 있으며, 지구생물의 80% 이상이 서식하는 것으로 알려져 있기 때문에 다양한 해양생물을 숙주로 하는 바이러스가 육상에 비해 월등히 많을 것으로 예측되고 있음
- 또한 해양을 통한 물류 이동의 증가, 어류 및 어패류에 의한 인수공통 바이러스의 저장소 또는 전이 매

개체로의 가능성이 지적되고 있으며, 다양한 해양포유류 시장 활성화로 인하여 감염성 바이러스의 확산 가능성이 증가하고 있음

- 따라서 전세계적인 해수 및 다양한 해양생물 시료로부터 감염성 해양바이러스 존재 여부를 분석하고, 국가차원에서의 대응을 위한 기반을 구축하여야 함이 지적되고 있는 시점임
- 해양 유래 감염성 바이러스 또는 인수공통바이러스 대응을 위하여, 1) 감염성 해양바이러스 빅데이터 구축 및 데이터마이닝 기술개발, 2) 핵산/항체 기반 감염성 해양바이러스 진단기술 개발, 3) 감염성 해양바이러스 감염 모델 개발, 4) 해양생물 유래 항바이러스 전략 소재 개발, 5) 광범위 항바이러스 치료제 개발 등, 5가지 세부분야의 연구가 수행되어야 하며, 세부분야간 유기적 구성을 통하여 해양내 감염성 해양바이러스의 위험요소를 조기에 인지하고, 진단하여 향후 해양바이러스 위협으로부터 대응하기 위한 체계를 구축하여야 함.
- 상기의 연구는 미래 해양유래 바이러스성 감염병 관리 및 해양생태계 보존을 위한 국가관측시스템 구축 및 국가 대응전략 설계의 근간으로 활용될 수 있을 것으로 기대됨



2-2. 추진 일정 실적

1차년도 (1단계 1차년도)												
개발내용	추진 일정										책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	9	10	11	12	1	2	3	4	5			
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석											이택견 (해양과학기술원)	
NGS 기반 전체 해양바이러스 병원체 모니터링											이택견 (해양과학기술원)	
PCR 기반 특정 해양바이러스 모니터링											이택견 (해양과학기술원)	

2차년도 (1단계 2차년도)												
개발내용	추진 일정										책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
NGS 기반 전체 해양바이러스 병원체 모니터링											이택견 (해양과학기술원)	
PCR 기반 특정 해양바이러스 모니터링											이택견 (해양과학기술원)	
메타분석 기반 해양바이러스 위해도 평가 및 주요 해양바이러스 병원체 선정											이택견 (해양과학기술원)	

3차년도 (1단계 3차년도)												
개발내용	추진 일정										책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1		
NGS 기반 전체 해양바이러스 병원체 모니터링											이택견 (해양과학기술원)	
PCR 기반 특정 해양바이러스 모니터링											이택견 (해양과학기술원)	
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 DB 구축											이택견 (해양과학기술원)	
NGS 및 PCR 기반 거대 해양바이러스 병원체 모니터링 시스템 정립											이택견 (해양과학기술원)	

4차년도 (2단계 1차년도)														
개발내용	추진 일정										책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12	1
NGS 기반 전체 해양바이러스 병원체 모니터링													이택견 (해양과학기술원)	
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 시계열 발생 패턴 분석													이택견 (해양과학기술원)	
선박기인 외래 해양바이러스 유입에 따른 국내연안 미소생태계 영향 분석													이택견 (해양과학기술원)	
해양바이러스 농축, integrity 및 감염성 검증													이택견 (해양과학기술원)	
감염성 해양바이러스 - 숙주 감염 및 세포반응 분석													이택견 (해양과학기술원)	

5차년도 (2단계 2차년도)																		
개발내용	추진 일정										책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)						
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12	1	2	3	4	5
감염성 해양바이러스 - 숙주 감염 및 세포반응 분석																	이택견 (해양과학기술원)	
해양바이러스의 국내 유입에 대한 종합적 분석																	이택견 (해양과학기술원)	
글로벌 해양바이러스 병원체 국가관측 시스템 제안																	이택견 (해양과학기술원)	

2-3. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여정도

○ 국내 감염성 해양바이러스의 연구 현황

- 국내 해양병원체 및 해양바이러스 모니터링 및 프로파일링 연구는 실질적으로 한국해양과학기술원에서 2012년부터 시작되었다고 볼 수 있음
- 2012-2016년까지 수행된 연구를 통하여 NGS 기반 해양바이러스 탐색 및 프로파일링 뿐만 아니라 일부 바이러스에 대한 PCR 및 항체 기반 검출기술 개발이 이루어졌음
- 국내연안 해수 뿐만 아니라 열대해수 및 선박평형수 채수 및 해양바이러스 농축, gDNA 분리, library 구축 등 marine virome 분석을 위한 기반 기술이 발전되었음

연구과제	연구기간 (총연구비)	수행기관 (연구책임자)	연구비 지원기관	연구성과
병원성 해양바이러스 진단을 위한 YSD시스템 개발	2012.03-2013.02 (70,000천원)	한국해양과학기술원 (이택건)	해양과기원	- 항체 기반 해양바이러스 검출을 위한 항원 선별기술 개발
남해생태계 이머징 해양병원체 탐색 및 검출기술 개발	2013.01-2015.12 (750,000천원)	한국해양과학기술원 (이택건)	해양과기원	- NGS 기반 해양병원체(해양바이러스, 해양박테리아, 해양기생충) 탐색 기술 개발 - PCR 기반 해양병원체 검출기술 개발
기후변화에 따른 해양 세균성 병원체 탐색기술 개발	2013.01-2014.12 (140,000천원)	한국해양과학기술원 (이택건)	식약처	- NGS 기반 국내연안 해수 및 열대해수에서의 병원성 해양박테리아 탐색
해양병원체 진단 및 예찰시스템개발 기획 연구	2013.10-2014.04 (60,000천원)	한국해양과학기술원 (이택건)	해양수산부	- 해양병원체 탐색 모니터링 및 프로파일링에 관련된 이론적 토대 구축
선박기인 외래 해양병원체 탐색 및 진단기술 개발	2015.07-2016.12 (318,000천원)	한국해양과학기술원 (이택건)	해양환경관리공단	- NGS 기반 선박평형수 유래 해양바이러스 탐색 및 특성분석 기술 개발
해양바이러스 병원체 진단키트 실용화 기술 개발	2016.07-2017.12 (238,000천원)	한국해양과학기술원 (이택건)	해양과기원	- RSIV 및 NNW 진단키트 개발 및 상용화 기술개발

○ 본 연구과제의 성과

- 1984년부터 2021년까지 메타분석을 통하여 전세계적인 연구현황을 파악하였으며, 본 연구결과 및 국내 해양바이러스 관련 연구의 방향성 설정 파악이 가능하게 되었음
- 본 연구과제를 통하여 선박평형수, 연안해수, 북극해수 및 열대해수 채집 및 연구실 현장에 맞는 해양바이러스 분석기술이 정립되었음
- 감염성 해양바이러스 DB 구축을 통하여 빅데이터 구축을 위한 기반이 확립되었음
- 해양미소생태계에서 해양바이러스의 생태학적 위치 및 상호작용에서의 역할을 분석할 수 있는 기술 개발되고 있음

연구개발 결과	해당 연구분야 기여
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 메타분석	- 1984-2021년 해양바이러스 연구논문 분석을 통한 전세계적 연구현황 파악 및 향후 연구방향 설정
NGS 및 PCR 기반 감염성 해양바이러스 병원체 모니터링 시스템 정립	- NGS 및 PCR 기반 해양바이러스 모니터링 연구방법 정립
NGS 및 PCR 기반 감염성 해양바이러스 모니터링 및 메타 분석 기반 주요 해양바이러스 선정	- 선박평형수, 항만해수, 북극해수 및 열대해수 채취 및 전체 및 특정 해양바이러스 분석 기법 정립 - 메타분석 기반 해양바이러스 위해도평가 및 관리대상 감염성 해양바이러스 선정
글로벌 감염성 해양바이러스 병원체 DB 구축	- 감염성 해양바이러스 DB 구축을 통한 국내외 해양바이러스 목록 확보

글로벌 감염성 해양바이러스 시계열 발생 패턴 분석 및 외래 해양바이러스의 미소생태계 영향 분석	- 계절별 및 연도별 감염성 해양바이러스 프로파일링 기술 확보 - 해양미소생태계에서 해양바이러스, 박테리아 및 미세조류 간 상호영향 분석 기술
감염성 해양바이러스 - 숙주 감염 및 세포반응 분석	- 선박평형수 농축, 바이러스 integrity 및 감염성 검증 및 세포반응 transcriptomics 분석 기술 확보
선박평형수 기인 병원성 해양박테리아 및 해양생태계에서의 영향 분석	- 해양미소생태계에서의 미생물간 상호영향분석 기술 확보
글로벌 해양바이러스 국가관측 시스템 제안	- 미래 팬데믹 유발 가능 고위험 감염성 해양바이러스에 대한 국가대응 방안 제안

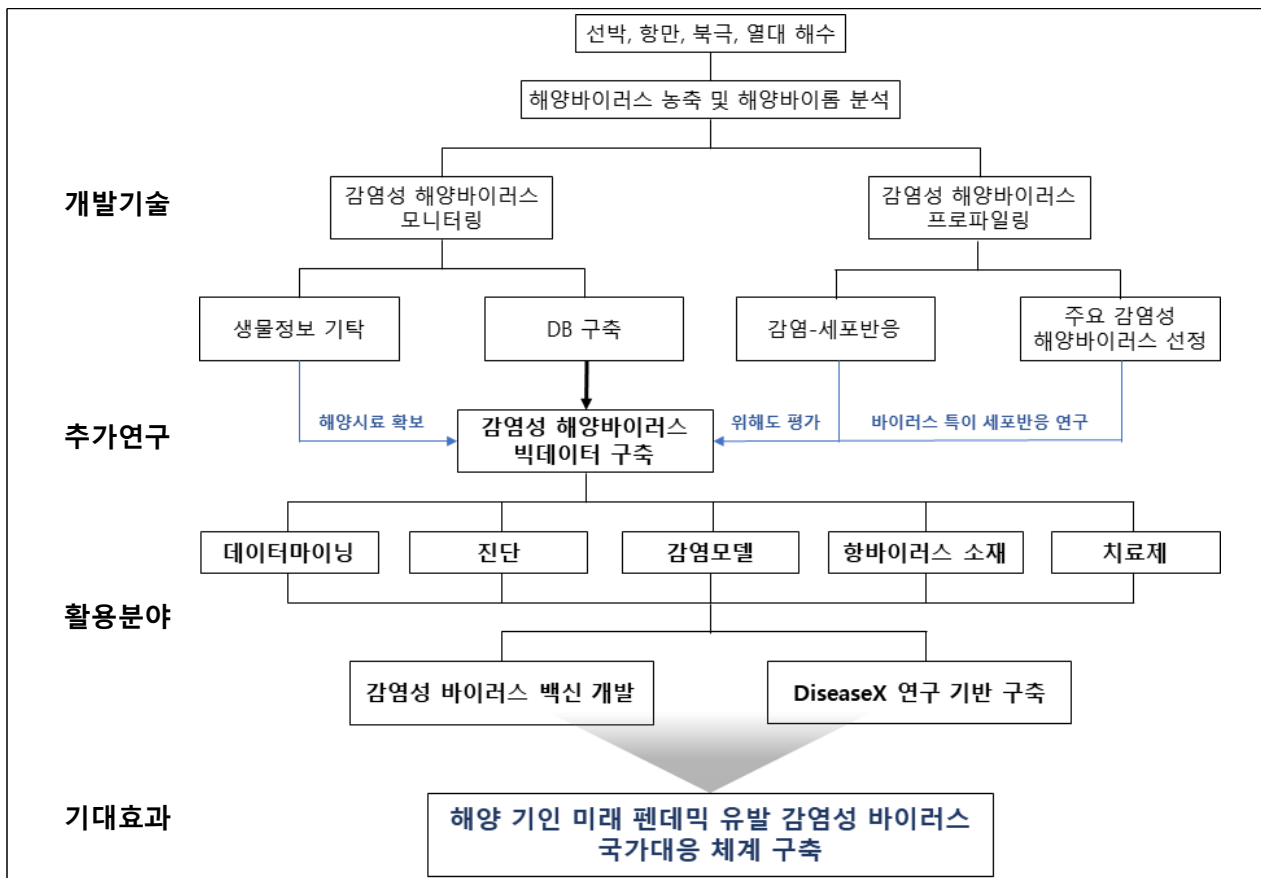
○ 국내외 기술개발 현황에 기여한 점

- 미래 전세계적인 팬데믹을 유발할 수 있는 DiseaseX에 대비하기 위한 국가대응 시스템 구축을 위하여 **감염성 해양바이러스 빅데이터 구축, 진단기술 개발, 감염모델 개발, 항바이러스 소재 도출 및 치료제 개발** 등 5개의 연구분야가 포함된 연구플랫폼이 구축되어야 함
- 빅데이터 구축 및 활용을 위해서는 국내외 다양한 해수 및 해양생물에서의 NGS 분석을 통한 감염성 해양 바이러스 모니터링과 프로파일링을 통한 특성분석 기술이 요구되고 있으며, 본 연구과제를 통하여 확보된 기술이 직접적으로 적용가능한 것으로 판단하고 있음
- 국내외 감염성 해양바이러스 진단기술은 아직까지 PCR 기반 기술이 주를 이루고 있으며, 항체 기반기술도 일부 육상생물에 국한되어 연구되고 있으나 해양 유래 감염성 바이러스에 대해서는 연구되고 있지 않음
- 본 연구과제를 통하여 정립된 LFA, RDA, multiplex 기술 및 재조합 항체(scFv) 기반 진단기술을 기반으로 해당 기술개발의 확립이 기대되며, 최신의 NGS 기반 진단시스템 구축을 위한 시험방법의 기여가 기대됨
- 특히 본 연구과제를 통하여 구축된 감염성 해양바이러스 목록은 감염모델 개발, 항바이러스 소재 도출 및 치료제 개발을 위한 연구대상 해양바이러스 우선순위 선정에 기여함으로써 연구 활성화가 기대됨

연구 분야	연구현황		기여 기술 및 전망
	국내	국외	
감염성 해양바이러스 빅데이터 구축 및 데이터 마이닝 기술 개발	- 해양바이러스 탐색연구 기간 짧음 - 종합적인 감염성 해양바이러스 연구 미비 - 감염성 해양바이러스 빅데이터 구축 전무	- 전지구적인 해양바이러스 탐색 연구 수행중 - 해양바이러스 유전체 및 숙주와의 관계 DB 구축 중이나 연구팀 수준에서 진행 중	- NGS 기반 해양 virome 분석기술 - 감염성 해양바이러스 특성분석 기술 - 빅데이터 구축을 위한 DB 및 데이터 추출 기술
감염성 해양바이러스 진단기술 개발	- 검역 바이러스 진단 기술 개발에 국한됨 - 항체 기반 진단기술 개발은 시작단계임 - PCR 기반 기술개발이 대부분임	- 기술수준은 국내외 유사함	- PCR, LFA, RDA, multiplex 기술 및 재조합 항체(scFv) 기반 진단기술 제공을 통한 기술개발 활성화 - NGS 기반 진단시스템 구축을 위한 시험방법 전수
감염성 해양바이러스 감염모델 개발	- 코로나 바이러스, 한타바이러스 등 인간감염 관련 연구에 집중되고 있음	- 기술수준은 국내외 유사함	- 국내외 해수유래 감염성 해양바이러스 목록 공유를 통한 연구대상 바이러스 우선순위 선정
항바이러스 소재 개발	- 해양소재 유래 항바이러스 소재 개발은 시작단계임 - 최근 육상바이러스를 대상으로한 시 기반 항바이러스 소재 도출 연구 진행 중	- si 기반 항바이러스 소재 탐색 연구 시작됨	- 국내외 해수유래 감염성 해양바이러스 목록 공유를 통한 연구대상 바이러스 우선순위 선정
감염성 해양바이러스 치료제 개발	- 인체 감염 관련 치료제 개발 수행 중이며, 해양바이러스를 대상으로 연구된 바 없음	- 기술수준은 국내외 유사함	- 국내외 해수유래 감염성 해양바이러스 목록 공유를 통한 연구대상 바이러스 우선순위 선정

2-4. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 본 과제를 통하여 지역별 해수 농축 및 해양바이러스 분석기술이 확보됨
- 감염성 해양바이러스 모니터링 및 프로파일링 노하우가 축적되었으며, 생물정보는 국가기관에 기탁하고 DB를 구축하여 연구된 시료 정보를 확보하였음
- 바이러스 감염 및 세포반응 연구와 위해도 평가 기초연구를 통하여 선박평형수 및 항만해수 유래 주요 감염성 해양바이러스 목록을 제시할 수 있는 기술이 확보되었음
- 확보된 기술은 보다 광범위하고, 집중적인 해양시료의 확보, 바이러스 특이 세포반응 연구 및 각 바이러스별 심층적인 위해도 평가 연구 결과가 포함된 감염성 해양바이러스 빅데이터 구축 연구가 요구되고 있음
- 구축될 빅데이터는 사용자의 니즈에 맞는 데이터마이닝 기술개발, 감염성 해양바이러스 특이 진단기술 개발, 항바이러스 소재 도출 및 특이/광범위 바이러스 치료제 개발 등의 연구에 활용이 가능할 것임
- 상기의 기술개발은 감염성 바이러스 백신 개발 및 DiseaseX 연구 기반 구축의 기반이 될 것이며, 이는 해양 기인 미래 팬데믹 유발 감염성 바이러스에 대한 국가대응체계 구축에 기여하게 될 것임-

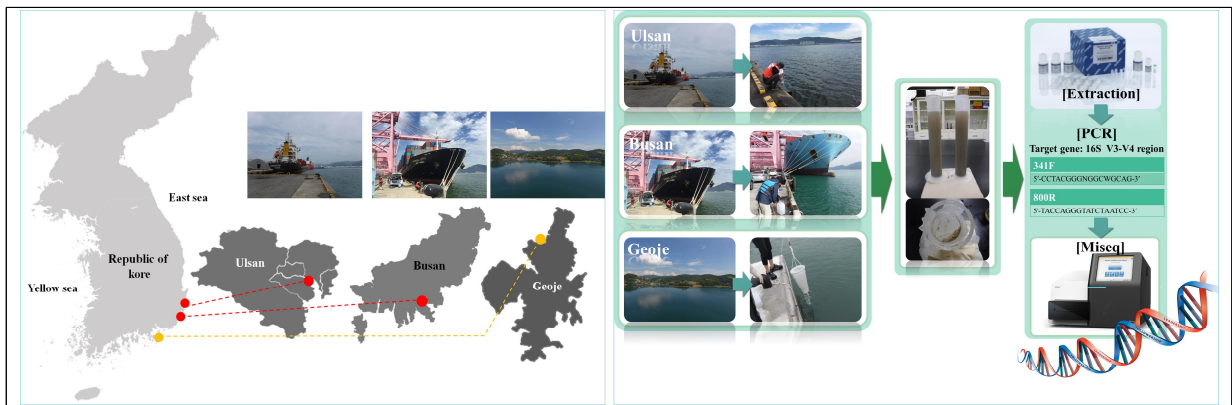


2-5. 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

가. 선박평형수 기인 병원성 해양박테리아 분석

○ 추진전략 및 방법

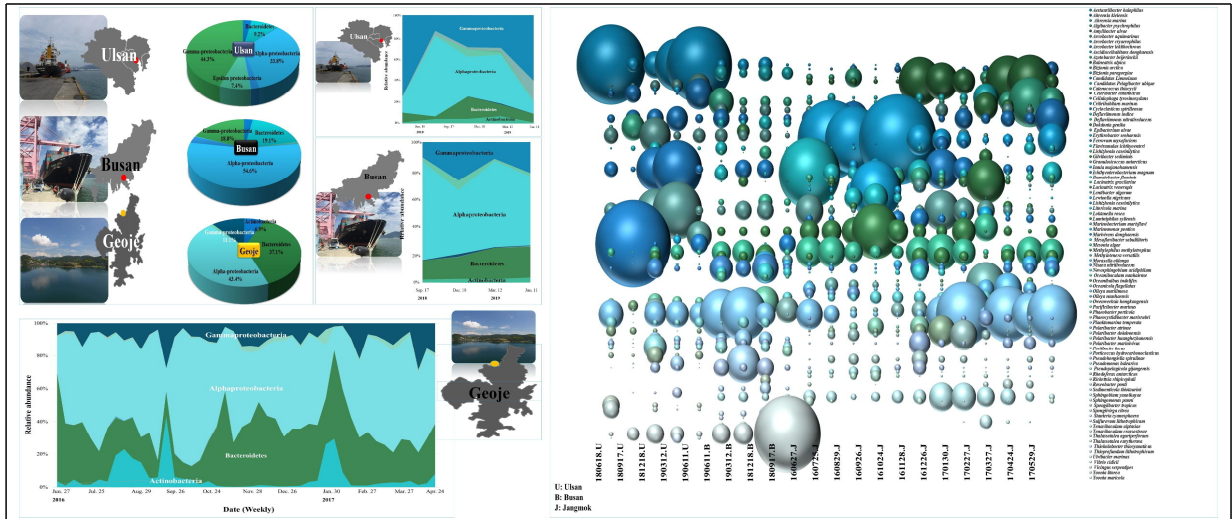
- 선박 기인 박테리아 군집의 차이를 관찰하고자 우리나라 물동량 top 5의 항만인 부산항과 울산항, 그리고 대조구로서 거제 장목 연안을 선정하여 박테리아 군집을 분석하였음
- 선박평형수내의 박테리아 군집을 파악하고자 총 15회의 선박평형수의 박테리아 군집을 분석하였음.
- 울산항, 부산항, 거제 장목만의 해양 박테리아 모니터링
- 우리나라 주요 항만 및 선박평형수의 박테리아 군집을 파악하기 위하여 조사정점에서 각각 1L씩 채수를 하여 0.2 um polycarbonate membrane으로 filter를 한 후, 16s rDNA V3-V4 region을 이용하여 metagenomic Next Generation Sequencing (mNGS) 기법을 통해 분석하였음.



<조사정점인 우리나라 주요 항만 울산항, 부산항과 거제 장목만(좌) 및 mNGS 방법 순서도(우)>

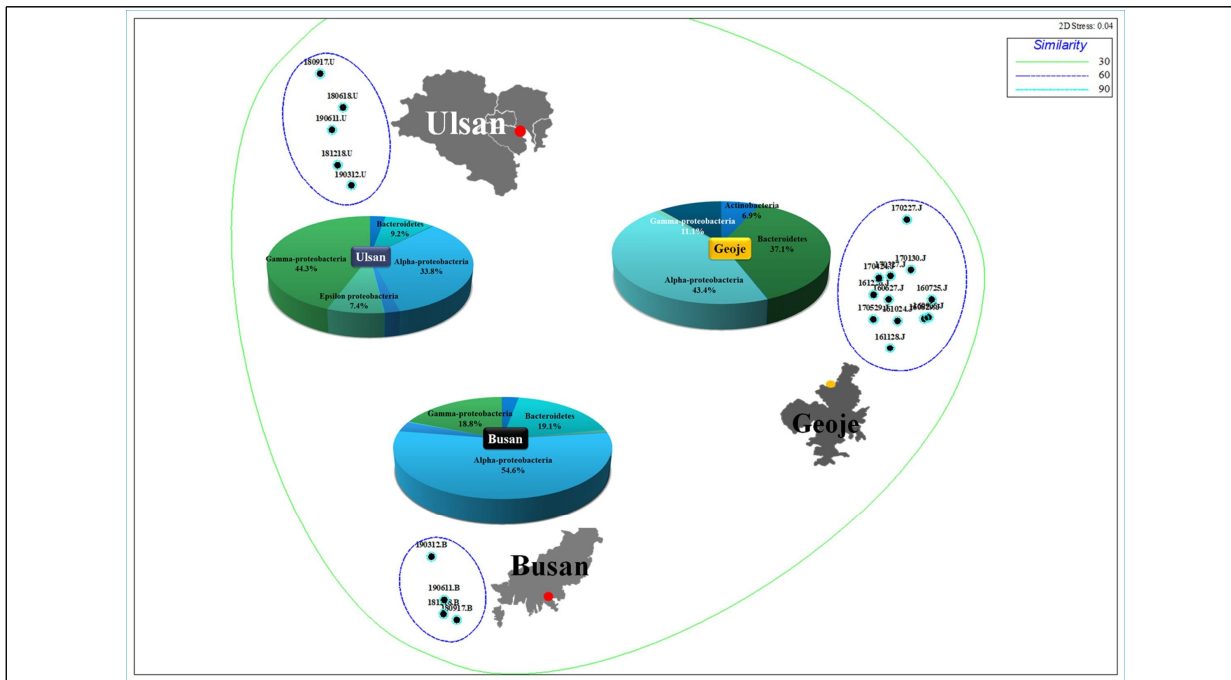
○ 우리나라 주요 항만 박테리아 community 분석

- 조사정점 (항만)별 박테리아 군집의 평균 차이를 보면, 울산항에서는 Gamma-proteobacteria: 44.3%, Alpha-proteobacteria: 33.8%, Bacteroidetes: 9.2%로 Gamma-proteobacteria가 가장 높았음.
- 부산항은 Gamma-proteobacteria: 18.8%, Alpha-proteobacteria: 54.6%, Bacteroidetes: 19.1%로 Alpha-proteobacteria가 가장 높았음.
- 대조구인 거제 장목만은 Gamma-proteobacteria: 11.1%, Alpha-proteobacteria: 43.4%, Bacteroidetes: 37.1%은 Alpha-proteobacteria와 Bacteroidetes가 높게 출현하여 조사정점별로 특이적인 박테리아 군집이 우점을 하였음.
- 울산항은 Alpha-proteobacteria가 전반적으로 우점을 하였으나, Gamma-proteobacteria: 6월 (초여름)이 가장 높으며, 9월 (초가을)이 가장 낮게 나타났으며, Alpha-proteobacteria는 반대되는 양상을 보였음.
- 부산항과 거제 장목만의 박테리아 군집의 변화는 계절별로 큰 차이를 보이지 않았음. 부산항은 전반적으로 Alpha-proteobacteria가 우점하는 양상을 보였고, Bacteroidetes도 10-20%의 출현빈도를 보였음.
- 거제 장목만은 주별로 intensive하게 관찰을 한 결과, 전반적으로 Alpha-proteobacteria가 우점을 하였고, 9월에 Actinobacteria가 빠르게 증가하는 등의 특정기간의 event적인 변화를 보였음.
- 울산항, 부산항, 장목연안에서 평균 1% 이상 또는 및 조사시기별 1% 이상 출현종을 선정하였을 때 출현 종은 91종이었으며, 각 정점별로는 울산항에서 35종, 부산항에서 44종, 장목만에서 54종이 출현하였음.



<울산항, 부산항, 거제 장목만에서 박테리아 군집의 변화(좌) 및 1% 이상 출현 박테리아>

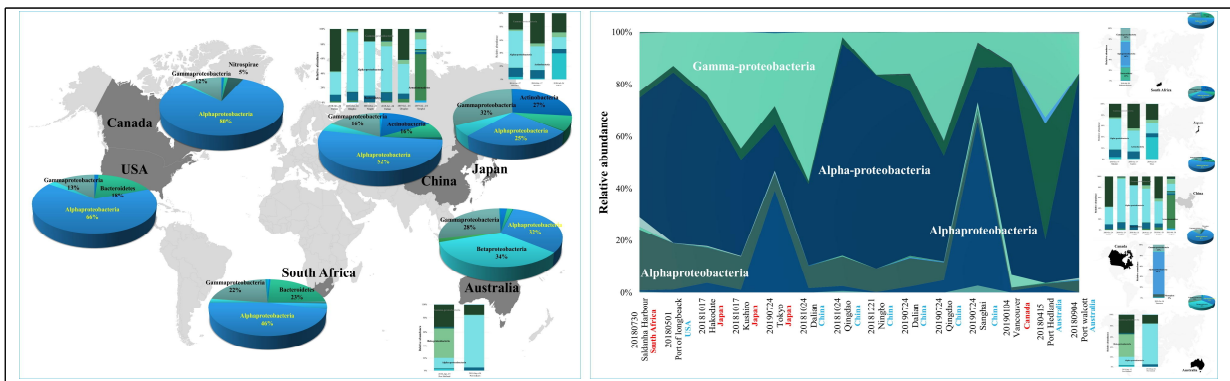
- Relative abundance의 누적합계 70%까지의 출현종은 울산항에서 총 9종이 출현하였으며, *Aestuuriibacter halophilus* (Gamma-proteobacteria)가 최우점종으로 평균 27.40%이었음.
- 부산항에서는 21종이 출현하였고, 최우점종이 *Yoonia litorea* (Alpha proteobacteria)와 *Planktomarina temperate* (Alpha proteobacteria)가 각각 15.99% 및 12.90%를 나타내었음.
- 대조구의 거제 장목만은 14종이 출현하였고, 최우점종은 *Cribrihabitans marinus* (Alpha-proteobacteria)와 *Planktomarina temperate* (Alpha-proteobacteria)가 각각 16.13%와 11.19%를 차지하였음.
- Nonmetric Multi-Dimensional Scaling analysis (nMDS) 분석 결과 유사도 60% 수준에서 울산항과 부산항, 장목만에서 평균 1% 이상 출현한 박테리아들이 군집의 차이를 보였음.
- 특히, 울산항은 Gamma-proteobacteria가, 부산항과 거제 장목만에서는 Alpha-proteobacteria가 높은 출현비율을 보이고 있어, 박테리아 군집이 뚜렷한 차이를 보이고 있음.



<nMDS 분석을 통한 1% 이상 박테리아 군집의 점점별 유사도 차이(우)>

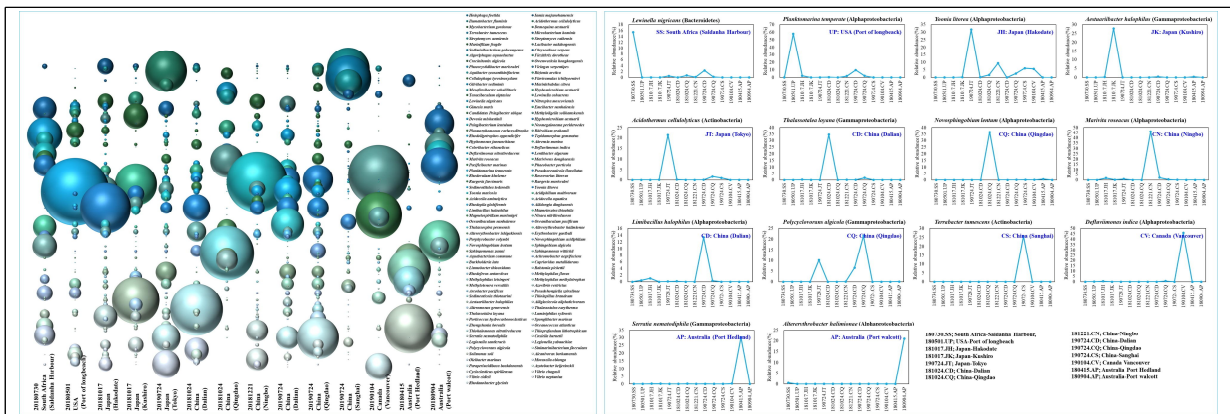
(2) 선박평형수내 해양 박테리아 모니터링

- 우리나라 주요 항만 및 선박평형수의 박테리아 군집을 파악하기 위하여 조사정점에서 각각 1L씩 채수를 하여 0.2um polycarbonate membrane으로 filter를 한 후, 16s rDNA V3-V4 region을 이용하여 metagenomic Next Generation Sequencing (mNGS) 기법을 통해 분석하였음.
- 중국 유래 선박평형수: Alpha-proteobacteria 52%, Gamma-proteobacteria 16%, Actinobacteria 16%, 일본 유래 선박평형수: Alpha-proteobacteria 26%, Gamma-proteobacteria 32%, Actinobacteria 27%, 호주 유래 선박평형수: Beta-proteobacteria 34%, Gamma-proteobacteria 28%, Alpha-proteobacteria 32%, 남아프리카공화국 유래 선박평형수: Alpha-proteobacteria 46%, Gamma-proteobacteria 22%, Bacteroidetes: 23%, 미국 유래 선박평형수: Alpha-proteobacteria 66%, Gamma-proteobacteria 13%, Bacteroidetes 18%, 캐나다 유래 선박평형수: Alpha-proteobacteria 80%, Gamma-proteobacteria 12%가 검출됨
- 일본 유래되는 선박평형수에서 다른 국가보다 상대적으로 높은 Gammaproteobacteria가 검출되었음.



<선박평형수 박테리아 군집의 변화(좌) 및 국가별 선박평형수내 박테리아 군집의 차이(우)>

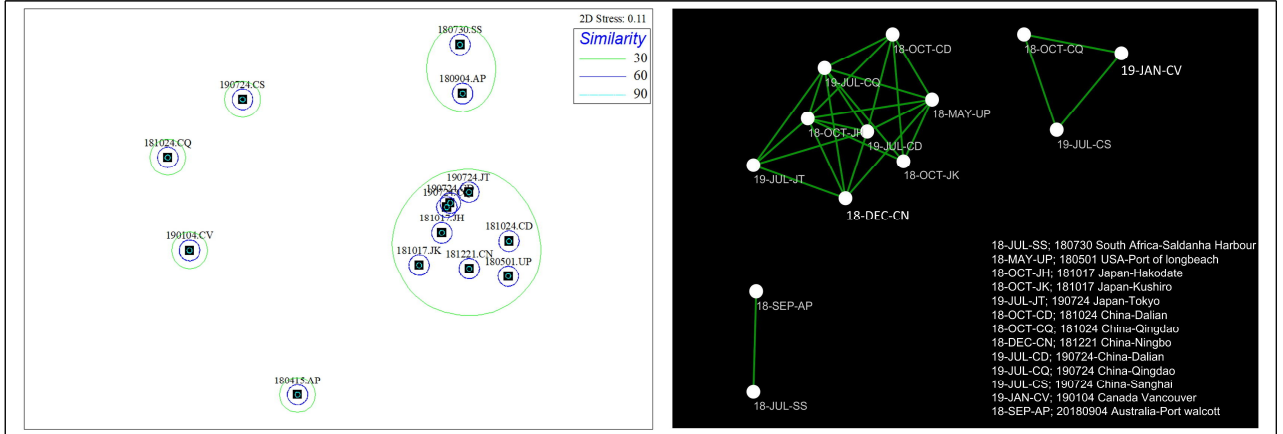
- 15개 선박평형수의 박테리아 군집 중 평균 1% 이상 및 각 선박평형수에서 1%이상 출현한 박테리아를 선별한 결과 129 OTUs가 관찰됨. 각 선박평형수별 가장 높은 Relative abundance를 보인 종들은 그림과 같으며, 각기 다른 종들이 출현하였음.



<국가별 선박평형수내 주요 박테리아 출현종(좌) 및 출현변화(우)>

- 전체 선박평형수에서 출현한 상위 출현종은 총 14종이며 이들 출현종은 각 평형수별로 다른 변화를 보이고 있었음.
- 특히, *Yoonia iltorea*는 상대적으로 다양한 선박평형수에서 출현을 나타내었음
- 선박평형수 유래 박테리아 군집의 nMDS 분석 및 각 선박평형수 간의 Co-occurrence의 상관관계를 분석하고자 Network 분석 (p<0.01, q<0.05 level)을 실시하였음.

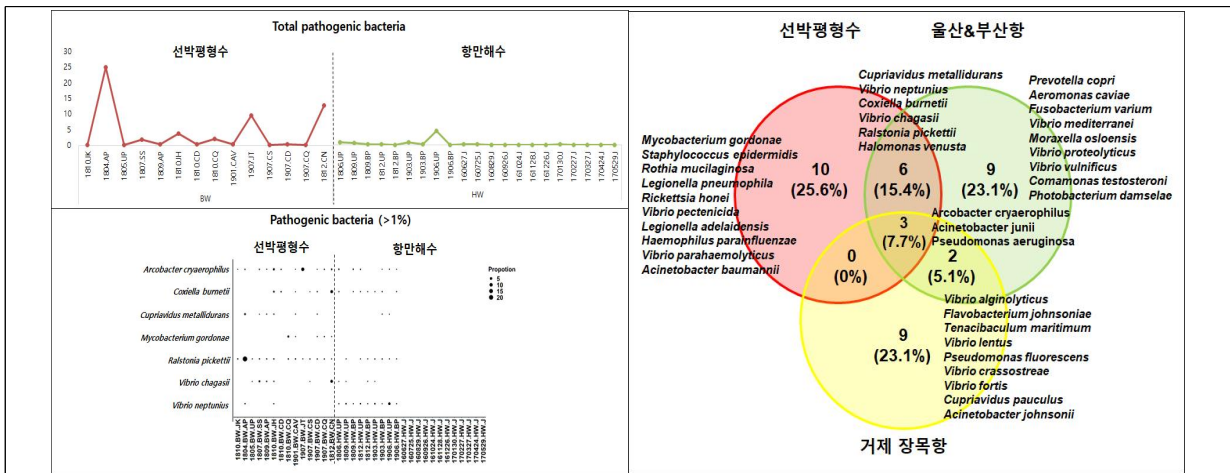
- 선박 평형수의 nMDS 분석 결과 30%의 낮은 유사도에서 중국 및 일본, 미국의 선박평형수의 박테리아 군집이 묶이는 것을 확인하였음.
- Network 분석에서는 미국 선박평형수와 일본 하코다테에서 유입된 선박평형수에서 가장 다양한 6개의 선박평형수 (6 edges) network이 형성되었음.
- 세부적으로 미국 선박평형수는 일본 하코다테와 일본 쿠시로 선박평형수 및 중국 4개 항구에서 출발한 선박평형수와 network이 구성되었고 일본 하코다테의 선박평형수는 다른 일본 선박평형수와 중국 Dalian 및 Ningbo와 network이 구성되었음. 그 외 선박평형수는 1-3개의 network이 구성되었음.



<1% 이상의 박테리아 군집의 nMDS 분석(좌) 및 Network 분석(우)>

(3) 선박기인 병원성 해양박테리아 분석

- 선박평형수와 국내 항만별 병원성 박테리아 중 1% 이상 병원성 박테리아를 분석한 결과, 호주>중국(Ningbo)>일본(Hakodate) 유래 선박평형수 순으로 각각 24.94%>12.69%>9.61%의 높은 병원성 박테리아가 출현하였음.
- 반면 국내항만 해수에서는 2019년 6월 울산항에서만 4.09%의 병원성 박테리아가 출현하였음.
- 선박평형수와 국내 항만에 출현한 병원성 박테리아는 총 39종이었으며, 그 중 선박평형수에만 존재하는 병원성 박테리아는 10종이며, 선박평형수와 울산&부산에 6종이 공통적으로 출현하였음.
- 특히, 모든 해수에 공통적으로 3종의 병원성 박테리아가 출현하였으며, 선박평형수와 거제 장목만에 공통적으로 출현하는 병원성 박테리아는 존재하지 않음.



<선박평형수 및 국내 항만 출현 병원성 박테리아>

- 1% 이상 출현한 병원성 박테리아 7종에 대한 특성을 분석한 결과 6종이 proteobacteria에 속하며, 5종이

인간을 감염시켜 폐질환부터 Q fever까지 다양한 질병의 원인인 박테리아임을 확인함.

- 2종은 산호와 연체동물에 치명적인 질병의 원인으로 보고되어 있음.

Pathogenic bacteria	Class	Host	Symptom
<i>Mycobacterium gordonae</i>	Actinobacteria	Human, Vertebrate	Pulmonary Disease (폐질환)
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Betaproteobacteria	Human, Vertebrate	Septicemia (패혈증)
<i>Ralstonia pickettii</i>	Betaproteobacteria	Human, Vertebrate	Septicemia (패혈증)
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Epsilonproteobacteria	Human, Vertebrate	Diarrhea
<i>Coxiella burnetii</i>	Gammaproteobacteria	Human, Vertebrate	Q fever (like flu)
<i>Vibrio chagasii</i>	Gammaproteobacteria	Coral	Coral bleaching
<i>Vibrio neptunius</i>	Gammaproteobacteria	Molluscan (연체동물)	Mortality

<출현 병원성 박테리아 목록 및 특성 분석>

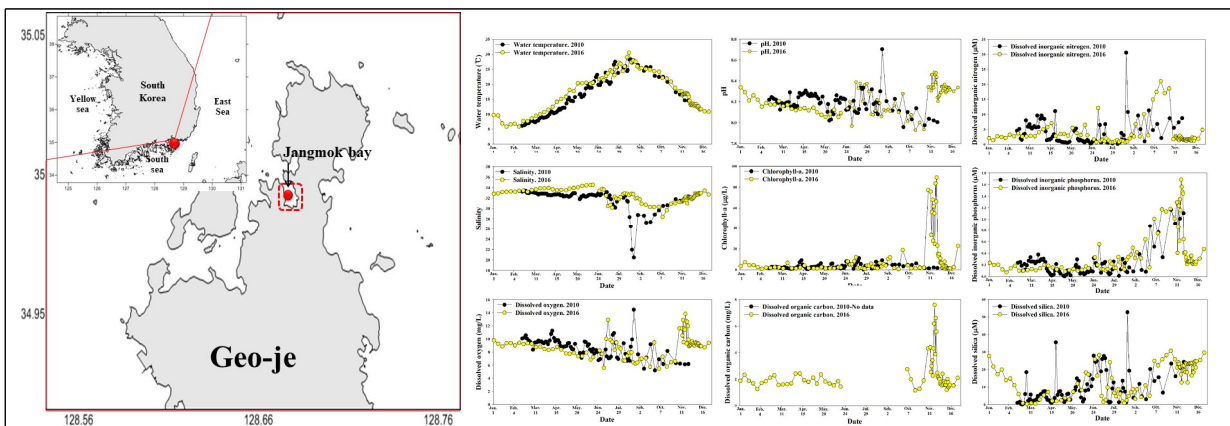
나. 해양미소생태계에서 해양박테리아의 영향

(1) 추진전략 및 방법

- 전세계적으로 연구가 거의 이루어지고 있지 않은 해양 미소생태계에서 해양 박테리아의 에너지 대사에서의 중심 역할을 분석함.
- 특히 식물플랑크톤 군집에서 Attached bacteria와 Free living bacteria간의 관계를 규명하였음.
- 미소생태계 군집 분석 항목
 - * 조사시기: 2010년 1월 ~ 12월 (월 1회), 2016년 06월 27 ~ 2017년 06월 12일 (주 1회/총 51회)
 - * 조사장소: 장목만 (경남 거제시 소재), 표층 (0.5m) 채수
 - * 식물플랑크톤 군집 및 박테리아 군집 분석

(2) 거제 장목만에서 환경요인의 변화

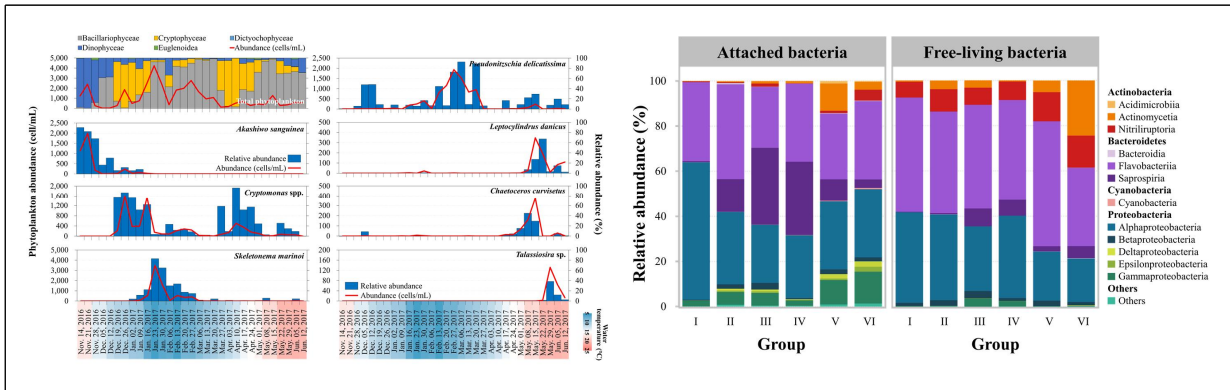
- 수온, 염분 등 수환경요인은 전형적인 우리나라 연안해역의 변화패턴을 보였으나, 용존무기인, 용존무기탄소의 경우 *A. sanguinea* 적조 발생후 급격한 증가를 보였음.



<거제 장목만 조사 정점 및 조사기간 중 환경요인의 변화>

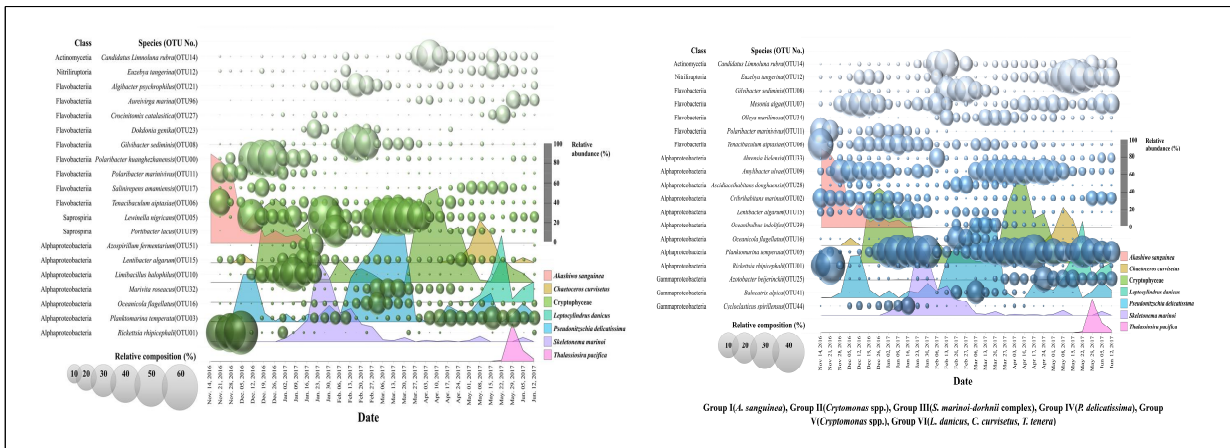
(3) 2010년과 2016년의 식물플랑크톤의 연변화

- 2010년의 주요 식물플랑크톤: *Chaetoceros compressus*, *Chaetoceros debilis*, *Chaetoceros radicans*, *Pseudo-nitzschia pungens*, *Leptocylindrus spp.*, *Skeletonema marinoi*-*dohnii* complex, *Scrippsiella trochoidea* 발생
- 2016년의 주요 식물플랑크톤: *Skeletonema marinoi*-*dohnii* complex, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros costatus*, *Leptocylindrus danicus*, *Akashiwo sanguinea* 발생하여 주요종은 일치를 하나, 2016년 저수온기의 *Akashiwo sanguinea* 발생은 차이를 보였음.
- 박테리아 군집에서 Attached bacteria의 생태계의 영향 및 Free-living bacteria와 Attached bacteria의 연관관계를 규명하고자 함.



<2016-2017년 식물플랑크톤 군집의 출현 및 주요 출현종의 변화(좌) 및 주요 식물플랑크톤 출현종 (그룹)에 따른 Attached bacteria와 Free-living bacteria간의 출현 차이(우)>

- Attached bacteria vs Free-living bacteria: AB와 FB는 주요 박테리아 OTUs 및 relative abundance에서 분명한 차이를 보임.
- 식물플랑크톤 우점종에 따라, AB와 FB의 OTUs 구성이 달랐으며, 특히 Group II(*Cryptomonas* spp.)와 Group III(*S. marinoi* complex)에 뚜렷하게 확인됨.

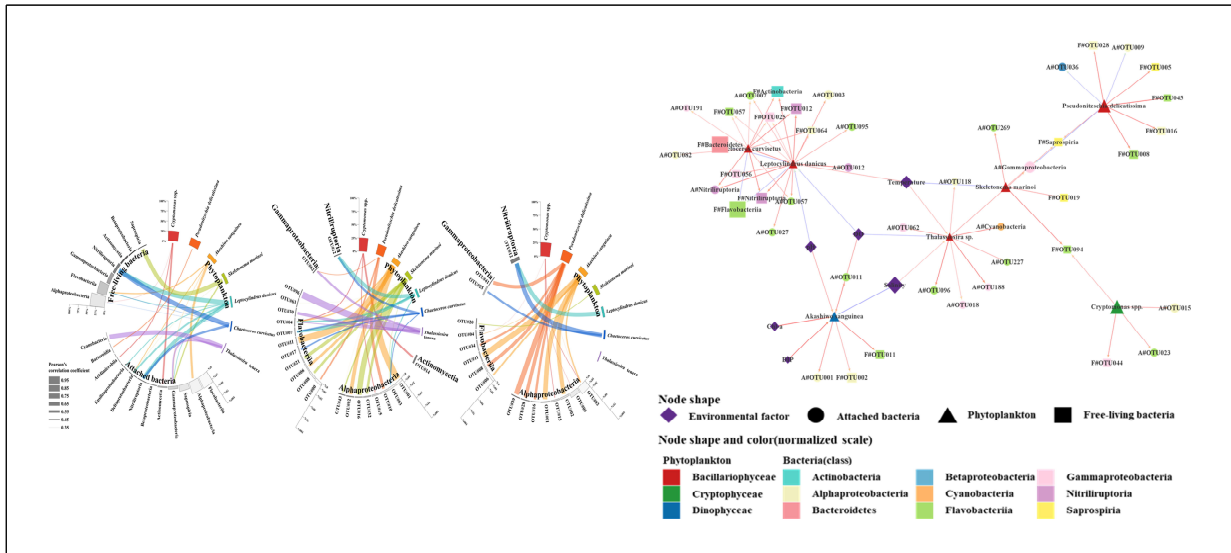


<주요 Attached bacteria의 변동(좌) 및 주요 Free-living bacteria의 변동(우)>

- 식물플랑크톤과 AB는 10개 Class 및 FB는 4개 Class와 유의한 상관관계를 보임. 특히, AB와 강한 상관관계를 보인 식물플랑크톤은 *Cryptomonas* spp., *P. delicatissima*, *A. sanguinea*, *S. marinoi* complex, *T. pacifica*이고 FB와는 *L. danicus*, *C. curvisetus*임.
- 네트워크 분석결과, 환경요인은 식물플랑크톤과 AB, FB와 Co-occurrence의 연관관계가 있었으며, 특히

주요 식물플랑크톤은 환경요인과 박테리아를 통해 하나의 네트워크를 구성하고 있었음.

- 즉, AB는 Phycospehre를 통하여 서식처로의 보호를 받을 뿐만 아니라 식물플랑크톤이 분비하는 extracellular polysaccharide를 에너지원으로 활용할 수 있기 때문에, FB보다 종다양성이 더 높다고 판단됨.
- 또한 AB는 해수와 식물플랑크톤 사이의 유기 및 무기물질의 순환에 기여하며, 식물플랑크톤과 해수의 영양염류 활용에 있어서 경쟁적 관계를 가지고 있음.
- 반면 FB는 특정 서식처가 없고 해수를 통하여 에너지원을 공급받기 때문에 상대적으로 낮은 종 다양성을 보인다고 판단됨.



<주요 식물플랑크톤 출현종과 Attached bacteria, Free-living bacteria의 중요 상관관계(좌) 및 장목만 식물플랑크톤 군집과 이에 따른 Attached bacteria 및 Free-living bacteria의 네트워크(우)>

3. 연구 개발 결과의 활용 방안

○ 연구성과의 활용분야 및 활용 방안

- 해양 기인 감염성 해양바이러스 빅데이터 구축, 데이터마이닝, 진단, 감염, 항바이러스 소재, 치료제 및 백신 개발 분야의 기반이 됨
- 미래 해양 기인 팬데믹에 대비한 국가 대응체계 구축을 위한 정책 마련에 활용

○ 타 연구에의 응용 방안

- 현재 해양과기원, 한국연구재단 및 해양수산부에서 연구비가 지원되는 4개의 과제에서 해양바이러스 관련 연구가 포함되어 수행되고 있음
- 양식생물, 양식장 해수, 해양쓰레기에서의 감염성 해양바이러스 모니터링 및 프로파일링 연구가 수행중이며, 거대바이러스와 해양미소생태계 구성 미생물(해양박테리아, 미세조류)과의 상호작용 규명 관련 연구에서 해양바이러스 NGS 분석 및 프로파일링 기술이 접목되어 활용 중에 있음
- 본 과제에서 확보된 다양한 해수시료 및 감염성 해양바이러스 목록의 제공을 통하여 고위험 감염성 해양바이러스 진단, 항바이러스 소재 탐색 및 치료제 개발 관련 연구의 활성화에 기여하고 있음

연구과제	연구기간 (총연구비)	수행기관 (연구책임자)	연구비 지원기관	담당 연구내용	기여 기술
해양바이오 기반 청정 기능성 산업소재 대량생산 기술 개발	2019.01-2022.12 (7,024,000천원)	해양과기원 (권개경)	해양과기원	- 양식생물 감염성 해양바이러스 탐색 및 프로파일링	- 해양바이러스 NGS 분석기술 - 해양바이러스 프로파일링 기술
거대바이러스의 해양 일차생산자 감염 및 해양 생태계 조절기작의 중심 역할 연구	2020.03-2025.02 (950,000천원)	해양과기원 (정승원)	한국연구재단	- 국내외 해수 유래 거대바이러스 모니터링 - 미세조류감염을 통한 해양생태계 조절 규명	- 해양바이러스 NGS 분석기술 - 해양바이러스 프로파일링 기술 - 해양바이러스 감염 및 세포반응 분석기술 - 해양미소생태계내 해양바이러스와 미세조류 상호작용 분석 기술
해양 생태계에 미치는 플라스틱 쓰레기의 영향평가 기술 개발	2021.01-2025.12 (6,500,000천원)	해양과기원 (심원준)	해양과기원	- 해양 플라스틱 쓰레기에 결합되어 이동하는 감염성 해양바이러스 모니터링 및 거동 분석	- 해양바이러스 NGS 분석기술 - 해양바이러스 프로파일링 기술 - 해양바이러스와 해양미생물과의 상호작용 분석 기술
해양환경내 감염성 바이러스 빅데이터 기반 진단, 치료 및 제어기술	2021.04-2026.12 (13,000,200천원)	해양과기원 (이택건)	해양수산부	- 감염성 해양바이러스 빅데이터 구축, 진단, 감염, 항바이러스 소재 및 치료제 개발	- 해양바이러스 NGS 분석기술 - 해양바이러스 프로파일링 기술 - 해양바이러스 DB 구축 기술 - 해양바이러스 검출기술 - 해양바이러스 감염 및 세포반응 분석기술

4. 당초 연구계획 대비 주요 변경사항

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구목표 및 주요내용	-	감염성 해양바이러스 - 숙주 감염 및 세포반응 분석	- 농축된 해양바이러스의 감염성 확인 필요 - 2단계 연구내용에 포함	2020.02.01

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 과학기술정보통신부에서 시행한 원천기술연구개발사업 차세대바이오 사회밀착형지원 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술정보통신부(한국연구재단)에서 시행한 차세대바이오 사회밀착형지원 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.