

간행물 등록번호

NNIBR-2021-0000239-10

담수 원생동물자원 확보

Study on the freshwater protist diversity

원생생물연구팀



국립낙동강생물자원관
Nakdonggang National Institute of Biological Resources

담수 원생동물자원 확보

담수생물연구본부 미생물연구실 원생생물연구팀

남승원, 양혜원, 장석원, 정재호, 김선주, 홍성종,
Atef Ismail Mohamed Omar, 문지혜, 여정현,
유지애, 최호준, 조민지, 최지혜, 양미란

Study on the freshwater protist diversity

Seung Won Nam, Hye-Won Yang, Seok Won Jang, Jae-Ho Jung,
Sunju Kim, Sung Jong Kim, Atef Ismail Mohamed Omar,
Ji Hye Moon, Jeong Hyeon Yeo, Jiae Yoo, Hojoon Choi,
Minji Cho, Ji Hye Choi, Miran Yang

Protist Research Team

Microbial Research Department

Nakdonggang National Institute of Biological Resources

2021

목 차

목 차	i
표 목차	iii
그림 목차	iv
요 약 문	v
I. 서론	1
1. 연구의 목적 및 필요성	1
가. 연구의 필요성	1
나. 연구의 목적	1
다. 원생동물의 정의	2
2. 연구동향	2
가. 국내외 연구동향	2
나. 지금까지 연구결과	4
3. 연구사업의 목표	5
가. 본 사업의 연구내용 및 정량적 성과 목표	5
II. 연구 방법	5
1. 연구범위 및 내용	5
가. 신종 및 미기록종의 정의	5
나. 신종/미기록종 후보 발굴	5
다. 표본 확보 및 정보 DB 입력	6
2. 연구진 구성 및 연구추진체계	6
가. 연구진 구성	6
나. 연구의 추진체계	6
3. 현장조사 및 채수	8

가. 국내 담수 및 기수역 현장조사	8
나. 세포분리 및 배양	9
다. 표본 제작	10
라. 광학현미경, 전자현미경을 이용한 형태, 초미세구조 형질 분석	15
마. 염기서열 분석	15
바. 신/미기록종 판별	15
III. 연구결과 및 고찰	16
1. 담수 담수원생동물자원 신·미기록 자원 조사·발굴	16
가. 발굴 결과	16
나. 주요 연구결과	18
2. 담수 담수원생동물자원 표본 확보	27
3. 성과 목표 달성도	28
가. 게재 및 투고 논문	28
나. 배포 보도자료	29
IV. 결론	30
1. 담수원생동물자원 조사·발굴 및 표본 확보	30
가. 결론 및 향후계획	30
나. 활용방안 및 기대성과	31
V. 참고문헌	32

표 목차

표 1. 지금까지 연구과제의 정량지표	4
표 2. 본 연구사업의 정량적 실적 및 성과 목표	5
표 3. 과제 및 참여인력의 구성	7
표 4. 전년도 평가의견 및 반영사항	8
표 5. 각 분류군 별 분석 유전자의 primer 염기서열 정보	16
표 6. 신규 담수원생생물자원 발굴 결과	17
표 7. 원생동물자원에 대한 신/미기록종 목록	17
표 8. 정량적 성과 목표 및 실적	29

그림 목차

그림 1. 우리나라 국가생물종목록 2020년 기준 분류군 별 발굴 현황	3
그림 2. 2020년 분류군별 국가생물종목록 신규 추가 종 수	4
그림 3. 국내 담수지역 현장조사	9
그림 4. 섬모충류 세포 분리 및 생시료 관찰	10
그림 5. 섬모류 표본 제작을 위한 염색법	12
그림 6. 완성된 슬라이드 표본과 수장형태	13
그림 7. 완성된 액침표본과 수장 형태	14
그림 8. 전자현미경 표본 제작 과정 및 수장형태	14
그림 9. 기 확보된 표본의 분류군별 분포 현황	27
그림 10. '21년 신규확보 표본의 분류군별 분포현황	27
그림 11. 확보된 전자현미경 표본	28
그림 12. 보도자료의 매체보도	30
그림 13. 국내 학술대회 발표된 포스터 자료	31

요 약 문

나고야의정서가 발효됨에 따라 국내 고유 생물자원 발굴 및 생물주권 확보 강화가 필요하며 국가 생물자원 경쟁력을 확보하기 위해서는 생물자원의 체계적인 확보가 선행되어야 하지만, 현재까지 국내 고유 생물자원에 대한 조사가 미비한 실정이다. 2021년 배포된 국가생물종목록에 따르면, 현재까지 발굴된 우리나라 자생생물은 약 54천여종이나, 이 중 39천여종이 동식물에 해당하며, 원생동물은 약 5%에 불과하다. 올해 신규 추가 종 1800종 중 약 14%인 258종이 추가되어 원생동물의 비율이 점차 증가하고 있으나, 아직까지 국내 서식 원생동물은 전세계 예상 다양성의 약 10%에 불과하여 아직 조사발굴이 필요한 분류군 중 하나이다. 본 사업은 국가 생물종목록 확대 및 국가생물주권 확보를 위해 국내 원생동물자원에 대한 다양한 서식지 환경을 탐색하고 체계적인 발굴 및 다양한 생물자료를 확보하고자 하였다. 먼저 2021년 3월부터 11월까지 국내 주요 담수수계 및 저수지, 기수역 등을 대상으로 현장 조사를 실시하였으며, 각 지점의 이화학적 정보자료를 YSI를 통하여 확보하였으며, 이러한 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력·관리하였다. 보다 다양한 분류군에서 신종 및 미기록종 자원 발굴을 위해 기존의 본 과제의 섬모류에 편중되어 있던 종 발굴의 단점을 극복하고, 연구가 미흡한 영역에 대한 신규자원 확보를 위하여 연구진 구성을 다양화하였으며, 편모류 및 섬모류 뿐만 아니라 국내 다양성 연구가 거의 이루어지지 못했던 기생성 원생동물 등 다양한 분류군에 대한 종 발굴을 수행하였다. 이러한 결과로 편모류 4종, 섬모류 22종, 기생성 원생동물류 4종 등 총 30종을 발굴(신종 7종, 미기록종 23종)하였다. 표본은 기존에 다량 확보된 섬모류보다 표본확보가 미진한 편모류 및 유해원생동물 표본 확보를 위한 연구진 구성하였고, 이에 편모류 2,831점, 섬모류 1,041점, 유해원생동물 2,128점 등 총 6,000점 확보 완료하였다. 본 사업의 결과로 국내논문 3편과 SCI급 논문 1편이 게재되었으며, 확보된 신종/미기록종의 실체를 보도자료를 통해 발표하여, 국립낙동강생물자원관의 국내 담수생물 전문연구기관으로의 위상을 높이고, 기관 홍보에 활용하였다. 본 사업의 결과는 기보고된 종들의 실체를 파악하고, 국가 생물주권 확립의 명확한 근거로서 활용함은 물론 국내서식 생물종목록과 다양한 생물 기초정보를 제공함으로써, 생물자원 확보, 이용, 관리 및 보전 체계 구축에 활용할 수 있다.

I. 서론

1. 연구의 목적 및 필요성

가. 연구의 필요성

(1) 정책적 부합성

- 1992년 브라질 리우데자네이우에 개최된 유엔환경개발회의(UNCED)에서 생물 다양성의 보전·생물자원의 지속 가능한 이용·생물자원을 이용하여 얻어지는 이익을 공정하고 공평하게 분배할 것을 목적으로 생물다양성협약(Convention on Biological Diversity: CBD)이 채택됨
- 2010년 10월 나고야의정서가 발효됨에 따라 국내 고유 생물자원 발굴 및 생물주권 확보 강화가 필요하며 국가 생물자원 경쟁력을 확보하기 위해서는 생물자원의 체계적인 확보가 선행되어야 하지만, 현재까지 국내 고유 생물자원에 대한 조사가 미비함
- 국제연합은 2010년을 생물다양성의 해로 지정하여, 생물다양성이 건강한 생태계의 지속에 매우 중요하고, 인간의 삶은 그 일부분임을 강조
- 2014년 대한민국 평창에서 개최된 제 12차 생물다양성협약 당사국 총회는 ‘지속가능 발전을 위한 생물다양성’이라는 슬로건 아래 생물다양성 전략계획 및 목표 달성현황 점검 및 촉진에 대해 협의하고 글로벌 생물다양성 로드맵을 제시
- 2016년 멕시코 칸쿤에서 ‘행복과 안녕을 위한 생물다양성의 주류화’를 주제로 제13차 생물다양성협약 당사국총회가 개최됨. 총회 최초로 어업, 임업, 농업, 관광 분야 각료가 참석하여, 생물다양성의 가치를 반영한 정책수립 방안을 논의함으로써 생물다양성의 중요성을 재확인하는 계기가 되었음
- 2020년 제 15차 생물다양성 협약 당사국총회에서 미래 10년을 위하여 ‘생물다양성 전략 Post-2020’ 수립
- 제 4차 국가생물다양성전략(2018) 수립을 통해 생물다양성협약(CBD) 당사국으로 협약의 성실한 이행

(2) 사회/경제적 필요성

- 생물자원의 확보 및 정보 구축은 21세기를 주도할 생물산업(BT)의 원천소재임
- 국내 자생생물의 실체 파악 및 관리체계의 미비로 우리나라 고유 생물자원의 국외 유출 및 고부가가치 원천소재로의 활용사례가 빈번히 발생하여, 국가 서식 생물종의 명세를 상세히 파악하고 국제적으로 인정받을 수 있는 과학적인 근거자료의 구축이 필수적이며, 이를 위하여 국가 고유 생물자원 확보를 위한 지속적인 연구개발 투자를 통해 국내 자생, 서식하는 생물자원을 발굴 및 생물주권 확보가 필요함

나. 연구의 목적

- 국내 담수 환경 내 서식하고 있는 원생동물자원에 대한 포괄적 탐색을 수행하여 국내 신·미기록 자원을 발굴하고 국내에 서식하고 있는 원생동물 표본을 확보하고자 함
- 확보·발굴된 원생동물 자원에 대한 표본 및 서식지 환경에 대한 이화학적 정보 등은 담수생

물자원관리시스템에 DB화하여 관리

다. 원생동물의 정의

- 원생동물은 단세포로 된 모든 진핵생물들을 지칭하며, 단일계통 분류단위로 표시되는 것이 적절하지 않다는 비교적 최근 연구 결과에 따라 계통발생학적-계통분류학적 정의를 내리기 어려운 분류군임
- 본 과제의 원생동물의 범주는 Ernst Haeckel에 의해 정의되었던 의미에 박테리아를 제외한 단세포 생활로 유형화된 개별생물로 살아가는 모든 진핵 단세포 생물을 포함하는 의미로 정의함

2. 연구동향

가. 국내외 연구동향

- 국내 서식, 자생생물 종은 10만종으로 추정되고 있으나, 현재 54천여종이 발굴되어 있어 미발굴종에 대한 연구가 시급 (2020 국가생물종목록 기준, 2021.02.26. 배포)
- 현재까지 발굴된 54천여종 중에 원생동물은 국가생물종목록의 약 5%에 불과하여, 국내 다양성 연구가 상당히 미진한 연구분야(그림 1)
- 전 세계에 분포하는 원생동물은 약 3만 종으로 추정되나, 국내 자생 원생동물은 10% 미만(26백여종, 2020 국가생물종 목록)이 보고되었음
- 발굴된 종은 50%이상이 유공충(1,192종)이며, 편모충, 섬모충, 아메바 등에 대한 체계적인 발굴은 현재까지 매우 미흡한 상황이다.
- 특히, 섬모충류는 단세포 원생생물로 전세계적으로 토양, 담수, 기수, 해양 등 다양한 환경에 서식하며, 14개의 강으로 구성된 다양성이 높은 분류군
- 보고된 섬모충류는 약 8,000여 종이며, 동종이명을 고려하면 약 4,500여 종일 것으로 추정됨
- 섬모충류 연구가 가장 많이 이루어진 오스트리아의 경우 해양환경이 없음에도 약 1,000여 종이 서식하는 것으로 알려져 있고, 최근 연구가 활발히 이루어지는 중국에서도 약 430종이 보고되었고, 현재 국내는 500종의 섬모충이 발굴됨
- 기생성 원생생물은 수생태계를 구성하는 다양한 생물그룹인 규조류, 녹조류, 위족류, 와편모류, 섬모충류, 히드로충류, 다모류, 윤충류, 갑각류, 치어, 어란 등을 감염시킴 (Coats, 1999, Coats et al., 2010, Coats and Bachvaroff, 2013)
- 이들은 다른 생물(즉, 숙주)의 몸 표면에 붙어 기생하거나(외부기생) 혹은 숙주 체내에 기생(내부기생)하면서 숙주 물질을 이용하고, 생활사의 마지막단계에는 숙주를 죽이고 하나의 숙주세포에서 감염능력을 가지는 수백의 새로운 유주자를 만들어 수중으로 배출하기 때문에 생태계에서 숙주 개체군을 빠르게 제거하는 생물학적 조절 요인으로서 파급력이 매우 강함
- 기생성 원생생물들은 매우 작고, 무색이며, 숙주의 체내에서 기생하는 초기 감염단계나

숙주와 분리되어 물속에서 새로운 숙주를 탐색하는 자유유영단계(free-living stage)에서는 기생성 원생생물을 관찰하는 데 어려움이 있어 종 발굴이 매우 미진함(Skovgaard and Daugbjerg, 2008).

- 최근 메타바코딩 연구에 의해 기생성 원생생물이 다양한 환경에서 넓은 유전적 다양성과 높은 상대적 풍부도로 분포하는 것이 규명됨(Guillou et al., 2008, Vargas et al., 2015).
- 하지만 기생성 원생생물의 방대한 환경시퀀스의 유전적 다양성에도 불구하고, 기술된 종은 일부 Syndiniales 그룹(약 55여종), Pirsonia 그룹의 경우 6여종만이 보고되었다(Kühn et al., 2004; Gomez, 2012).
- 국내에서는 Syndiniales목에 속한 신종 2종과 미기록종 1종, Pirsonia속에 속한 미기록종 1종만이 기술됨(Park et al., 2013; Jung et al., 2016; Yoo and Kim, 2020; Choi et al., 2021).
- 2020년 신규 추가 종 목록 중 약 14%가 원생동물이며(258종/1800종), 점차 그 비율이 증가되고 있음(그림 2)
- 하지만, 이들에 대한 분류학적 연구를 수행하는 연구진 또한 매우 제한된 상황이며, 이를 위한 전문가 및 전문연구 인력의 양성이 시급함

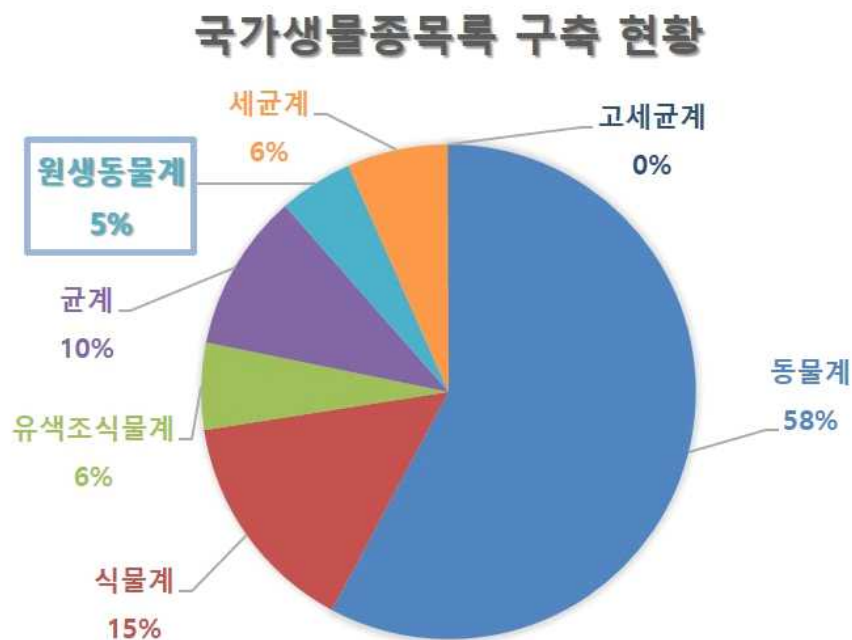


그림 1. 우리나라 국가생물종목록 2020년 기준 분류군 별 발굴 현황. 전체 54천여종 중에 원생동물은 약 5%를 차지하고 있음

2020년 국가생물종 증가현황

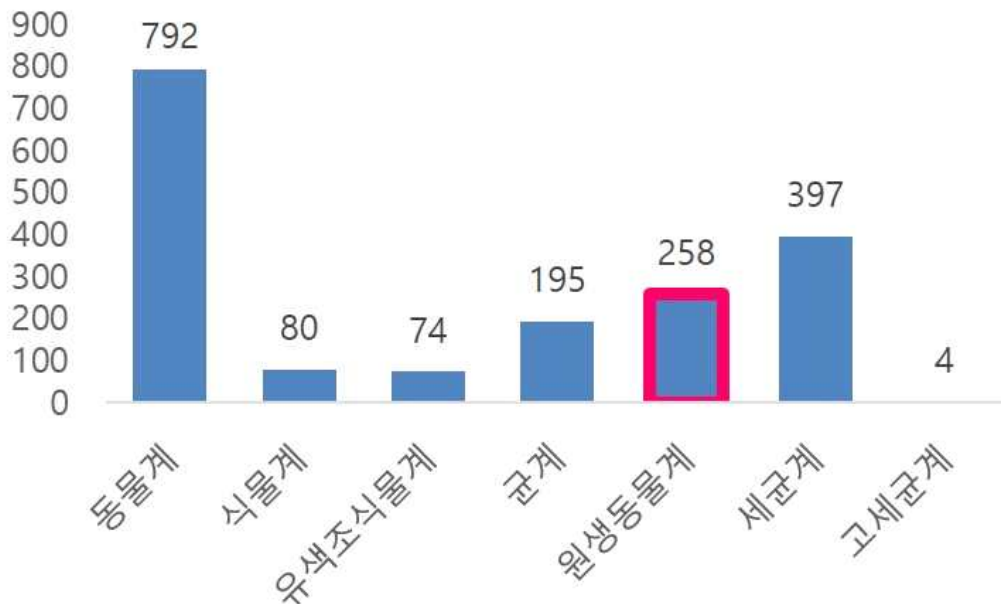


그림 2. 2020년 분류군별 국가생물종목록 신규 추가 종 수. 전체 1800종 중에 258종(약 14%)가 원생동물이며, 이는 원생동물의 비율이 점차 증가되고 있음을 의미함.

나. 지금까지 연구결과(표 1)

- 국내 담수환경 현장조사
 - 국내 주요 수계 담수원생동물자원 조사·발굴
 - 특이서식지 조사·발굴 및 서식환경 조사
- 원생동물자원의 체계적인 발굴 및 생물자료 확보
 - 담수환경 내 원생동물 신종(후보)·미기록종 31종 발굴
 - 슬라이드 및 액침 표본 8,000점 확보

표 1. 지금까지 연구과제의 정량지표

	담수원생동물자원 발굴 수	표본확보 수
1차년도(2020)	신종·미기록종 31종	표본 8,000점 확보

3. 연구사업의 목표

가. 본 사업의 연구내용 및 정량적 성과 목표(표 2)

- 국내 담수환경 현장조사
 - 국내 주요 수계 담수원생동물자원 조사·발굴
 - 특이서식지 조사·발굴 및 서식환경 조사
 - 서식지 환경에 대한 이화학적 정보 확보
- 원생동물자원의 체계적인 발굴 및 생물자료 확보
 - 담수환경 내 원생동물 신종(후보)·미기록종 30종 발굴
 - 담수 원생동물 표본 6,000점 확보
- 확보된 서식환경 정보 및 원생동물자원 정보는 담수생물자원관리시스템에 DB화

표 2. 본 연구사업의 정량적 실적 및 성과목표

구분	신/미기록종 발굴	표본 확보	논문		홍보 (보도자료)
			국내	Scopus, SCI(E)	
2021	30종	6,000점	1	1	1

II. 연구방법

1. 연구범위 및 내용

가. 신종 및 미기록종의 정의

- (1) 신종 : 『신종』은 전 세계적으로 보고가 되지 않은 종(기재문, 사진 및 표본 등의 실체가 알려지지 않은 종)이며, 아직 분류 학술지에 게재되지 않아 정당공표를 받지 못한 종에 대해서는 『신종 후보』라 정의한다
- (2) 미기록종 : 『미기록종』은 국내에서 보고된 적이 없는 종(기재문, 사진 및 표본 등의 실체가 보고되지 않은 종)이며, 논문 게재를 통해 분류학적으로 정당 공표를 받아야 기록종으로 인정될 수 있음. 미기록종으로 발굴되었지만, 아직 분류 학술지에 게재되지 않아 정당공표를 받지 못한 종에 대해서는 『미기록종 후보』라 정의한다

※ 원생동물의 국내 미기록종은 국립생물자원관의 『한반도의 생물다양성 통합관리시스템』의 국가생물종목록에 등재되지 않은 종을 1차 기준으로 한다.

나. 신종/미기록종 후보 발굴

- (1) 신종/미기록종 후보의 기재문 작성

- (가) 발굴된 신종/미기록종 후보종에 대한 증거 자료로 『신종 및 미기록종(후보) 기록지』 작성
- (나) 기록지의 기재문 작성시 한글로 작성함을 원칙으로 하되, 경우에 따라 영어 기재문 작성 가능

다. 표본 확보 및 정보 DB 입력

(1) 표본 확보

- (가) 슬라이드표본, 액침표본, 전자현미경표본 등 학계에서 사용하는 다양한 형태로 제작 및 확보
- (나) 표본의 형태에 따라 적합한 방법으로 표본을 제작 후, 국립낙동강생물자원관 담수생물자원관리시스템에서 부여된 표본번호가 포함된 정규라벨을 부착 후, 국립낙동강생물자원관 수장고에 형태별 수장

(2) 표본 및 채집지 정보 DB 입력

- (가) 국립낙동강생물자원관 담수생물자원관리시스템의 DB 양식에 의해 표본에 대한 정보(자원종류, 자원번호, 학명, 표본유형, 채집 방법, 동정자 등)와 채집지 정보(채집지 정보 번호, 채집자, 채집일, 행정구역, 경위도, 채집 환경 등)등을 작성, 입력하여 관리

2. 연구진 구성 및 연구추진체계

가. 연구진 구성(표 3)

- 본 과제는 남승원 전임연구원이 과제 책임을 맡고 있으며,
- 내부참여연구원은 미생물연구실 원생생물연구팀의 3명(기간제단기근로자 1명 포함)
- 외부참여연구원은 강릉원주대학교 5명, 부경대학교 4명, 중앙대학교 1명이 참여하였으며 각 기관별 정량적 성과목표를 배분하여 진행(표 4)

나. 연구의 추진체계

- 기존의 본 과제의 섬모류에 편중되어 있던 종 발굴 및 표본확보의 단점을 극복하고, 연구가 미흡한 영역에 대한 신규자원 확보를 위하여 연구진 구성을 다양화
- 전년도 자문의견 반영하여, 유해성 및 기생성 원생생물에 대한 연구진 포함(표 3, 4)

표 3. 과제 및 참여인력의 구성

구분	소속	성명	직급	참여 율	참여 기간	주요업무
연구책임자	원생생물연구팀	남승원	전임연구원	50	12개월	· 과제 총괄·관리 · 편모충 조사·발굴 및 표본확보
내부 참여연구자	원생생물연구팀	양혜원	선임연구원	20	12개월	· 유해원생동물 표본확보
내부 참여연구자	원생생물연구팀	장석원	연구원	50	12개월	· 섬모충 표본확보 및 과제관리보조
내부 참여연구자	원생생물연구팀	양미란	기간제단기	100	7개월	· 조사·발굴 및 표본확보 보조
외부 참여연구자	강릉원주대학교	정재호	연구원	30	10개월	· 섬모충 조사·발굴
외부 참여연구자	강릉원주대학교	오마리아킵	연구원	30	10개월	· 섬모충 조사·발굴
외부 참여연구자	강릉원주대학교	문지혜	연구보조원	30	10개월	· 섬모충 조사·발굴
외부 참여연구자	강릉원주대학교	여정현*	연구보조원	30	2개월	· 섬모충 조사·발굴
			보조원	30	8개월	· 섬모충 표본확보
외부 참여연구자	강릉원주대학교	최지혜	보조원	30	10개월	· 섬모충 표본확보
외부 참여연구자	부경대학교	김선주	연구원	23	9개월	· 기생성 원생동물 조사·발굴
외부 참여연구자	부경대학교	유지애	연구보조원	11	9개월	· 기생성 원생동물 조사·발굴
외부 참여연구자	부경대학교	최호준	연구보조원	11	9개월	· 기생성 원생동물 표본확보
외부 참여연구자	부경대학교	조민지	연구보조원	11	9개월	· 기생성 원생동물 표본확보
외부 참여연구자	중앙대학교	홍성중	연구원	10	10개월	· 유해원생동물 표본확보

* '21년 03월부터 대학원 진학으로 직급 변경

표 4. 전년도 평가의견 및 반영사항

검토 의견	반영 내용
- 연구계획이 유해원생동물로 더욱 확대 되었으면 함	- 유해원생동물의 조사·발굴은 국내 연구가 상당히 이루어져 있으며, 감염의 우려가 있어 미발굴종 탐색에 상당한 어려움이 있음 - 유해원생동물의 생물표본 확보를 위한 연구진을 포함하여 본 과제 추진
- 환경新산업 및 바이오산업 소재 활용 가능성이 어떤 측면에서 높은지, 그리고 어떻게 하여 소재 활용성을 높일 것인지 제시해주었으면 함	- 자원관의 식물연구팀의 활용분야 연구과제와 협업을 통해 감염성 질환을 유발하는 원생동물에 대한 감염 억제제, 치료제 등의 개발 연구를 진행하고 있음
- 조사·발굴의 효율성을 확보하기 위하여 전략적 연구계획(연차별, 지역별 발굴계획 등) 제시 필요	- 접근이 어려운 <u>강원지역의 효율적 발굴을 위하여 전략적으로 그 지역 연구진을 포함</u> - 다양성이 높다고 알려졌으나, 국내 연구가 <u>미진한 분류군인 섬모충류에 대한 연구진 포함</u> - 국내 연구가 거의 전무했던 <u>기생성 원생생물의 발굴을 위한 연구진 포함</u>

3. 현장조사 및 채수

가. 국내 담수 및 기수역 현장조사

○ 현장지역 조사(그림 3)

- 국내 주요 수계 및 지류 지역 월 1회 현장 조사 및 채집
- 부유성 원생생물은 플랑크톤 네트(망목크기 20 μ m)를 이용하여 수체에 투척 후 이양하여 농축
- 수심이 얕은 담수 또는 기수역의 경우 핸드네트(망목크기 20 μ m)를 이용하여 양동으로 일정량의 물을 취해 거르는 방법으로 채집
- 수심이 얕은 수체의 수생식물, 암반, 자갈, 기타 고형기질과 같은 피부착물에 부착하여 서식하는 원생생물은 부드러운 솔 등으로 긁어서 채집
- 저서성 원생생물은 수중 토양층으로부터 스포이드 등을 사용하여 채집

- 가능하면 수초, 유기 쇄설물, 수중 부착물 등을 포함하여 채수하고 실험실로 운반할 때 온도가 유지 되도록 아이스박스 활용
- 각 지점의 GPS좌표 및 이화학적 정보자료(수온, 염분, DO, 전기전도도, pH 등) 확보 (YSI 이용)
- 섬모충의 경우 생시료 이외에 현장에서 20 μ m 메쉬로 한 번 더 거른 시료를 70% 에탄올, concentrated Bouin's solution, 1% acetic acid의 고정액에 고정 후 표본병에 넣어 고정 한 뒤 운반



그림 3. 국내 담수지역 현장조사. A. 현장 조사 및 채수. B. 현장의 GPS정보 C. YSI를 활용한 현장이화학정보 측정결과.

나. 세포분리 및 배양

(1) 섬모충류의 분리·배양

- 실험실로 운반된 실험 시료를 페트리접시에 옮겨 공기유입이 가능하게 함
- 원배양 상태에서 관찰하고 여러 배양액을 이용하여 실온에서 1~2일 적응 배양 실시
- 포낭이나 유영체형의 세포가 1~2일 지나 발아하면 개체를 관찰함
- 위 상태로 장기간 배양하여 개체군의 변화를 살펴보며 배양
- 장기간 배양가능 개체군은 새로운 페트리 접시에 원배양 상태와 비슷하도록 유기물과 배양액을 넣고 계대배양함

(2) 섬모충의 생시료 관찰(그림 4)

- 해부현미경 아래에서 세포의 전체 외형 및 행동 습성을 관찰
- 피펫을 이용하여 단일 개체를 분리한 후 슬라이드에 옮겨 불순물을 제거
- 커버글라스 네 모서리에 바세린을 적당량 발라 관찰용 시료 준비 후 광학현미경을 이용하여 개체의 형태 및 형태학적 형질 관찰



그림 4. 섬모충류의 세포 분리(좌) 및 생시료 관찰(우).

(3) 편모류, 기생성 원생생물의 세포분리 및 배양

- 도립현미경 하에서 미세유리관을 이용하여 세포를 순수분리하고,
- 분리된 세포는 48- 또는 96-well plate에 적합배지를 넣어 20°C에 초기배양
- 평판배지를 활용하여 환경시료 도말 후, 지속적으로 순수분리 수행
- 초기배양에 성공한 세포는 최적배지가 담긴 15ml 시험관에 넣어 배양주 확립
- 20~22°C, 16:8의 광암주기(LD cycle)로 자동 조절되는 배양기에서 보존
- 순수 분리된 개체군은 1~2달 간격으로 계대배양

다. 표본 제작

(1) 슬라이드 표본

(가) 섬모류의 표본 제작(그림 5)

1) Protargol 염색(Foissner, 2014)

- 알코올램프를 이용하여 유리피펫을 얇게 뽑아 단세포인 섬모충을 분리하여 염색할 개체가 담긴 엠브리오디쉬 위에 Bouin 용액을 약 1:1 비율로 섞어준다. (고정시약은 원하는 염색 상태 또는 대상 생물에 따라 달라질 수 있으며, 알부민으로 슬라이드에 부착한 이후에도 하루 이내에 염색을 진행)
- 15분 동안 개체가 충분히 고정되도록 상온의 방치
- 수돗물로 Bouin's 용액으로 고정된 개체들을 세척 (시약의 색이 보이지 않을 정도로 치환하며 적어도 3회 이상 세척)
- 개체가 마르지 않을 정도의 수돗물만 남겨 알부민과 1:1로 섞고, 개체가 들어있는 용액

을 유리피펫을 이용하여 라벨링 된 슬라이드 위로 떨어뜨린 후 핀셋과 같은 도구로 용액을 얇게 도말

- 고정된 개체를 2시간~2일 안에 아래 순서, 시간으로 염색
- 100% 에탄올 25분 → 70% 에탄올 5분 → 수돗물 5분×3회 → 0.2% Potassium permanganate 30초 → 수돗물 1초 → 2.5% oxalic acid 1분 → 수돗물 3분×2회 → 증류수 3분 → 0.8% protargol 15분 (60°C)
- 해부 현미경 위에서 acetone developer를 슬라이드 위에 떨어뜨려 발색 진행도를 확인
- 발색의 진행도를 확인 후, fixative의 넣어주고 아래 순서, 시간으로 치환
- Fixative 5분 → 수돗물 3분×3회 → 70% 에탄올 5분 → 100% 에탄올 5분 → 100% 에탄올 5분 → xylene 1초 → Xylene 10분×2회
- Xylene 안에 있는 슬라이드를 후드 안에서 꺼내어 permount와 커버글라스를 이용하여 영구 표본 제작

2) 'wet' silver nitrate 염색(Foissner, 2014)

- 젤라틴의 굳는 성질로 상온 100% 에탄올 전까지 모든 시약과 도구는 냉장보관
- 증류수 100ml + 3g silver nitrate = silver nitrate solution (AgNO_3)
- 증류수 95ml + sodium sulfite 2.5g + hydroquinone 0.5g = ordinary developer
- 증류수 100ml + sodium thiosulfate 2.5g = fixative
- Moist chamber = Petri plate에 슬라이드가 들어갈 만큼 증류수로 적신 휴지를 넣어 제작
- 증류수 30ml + 에탄올 70ml = 70% 에탄올
- 증류수 70ml + 에탄올 30ml = 30% 에탄올
- 1% aqueous chromic 7 parts + 3% aqueous potassium dichromate 7 parts + 2% aqueous osmium tetroxide 4 parts = Champy's fixative (후드 보관)
- 고정할 개체들을 Champy's fixative로 10분 간 고정
- 10분간 hit block(56°C)에서 젤라틴을 녹이고 slide warmer(50~60°C)위에서 슬라이드 가열
- 10분이 지나면 Da Fano's fluid 시약으로 치환 후 5분 방치
- 시료와 젤라틴을 데워진 슬라이드 위에 1:1로 넣고 섞으면서 얇게 도말
- 슬라이드를 냉장고에 있는 moist chamber 위에서 경화
- 각 슬라이드를 증류수로 10초 이하로 세척 후 AgNO_3 으로 1시간 처리
- 1시간 후 슬라이드를 증류수가 살짝 들어있는 페트리디쉬 위에 넣어주고 UV를 슬라이드 앞, 뒤에 각각 30분간 처리

- 썬어 준 후 슬라이드를 아래 순서, 시간과 같이 처리
- (냉장에서) Ordinary developer 15분 → 증류수 3분 → fixative 5분 → 증류수 10분 → 30% 에탄올 10분 → 70% 에탄올 10분 → (상온에서) 100% 에탄올 10분×2회 → xylene 1초 → xylene 10분×2회
- Xylene 안에 있는 슬라이드를 후드 안에서 꺼내어 permount와 커버글라스를 이용하여 영구 표본제작

3) Silver carbonate 염색(Foissner, 2014)

- 슬라이드 위에 섬모충이 포함된 시료를 한 방울과 2% 포르말린을 시료에 1~2 방울 떨어뜨려 주고 1~3 분간 고정하며, 이때 슬라이드를 회전하여 개체를 포르말린과 혼합
- 연약한 피질을 가진 종은 1분, 단단한 피질을 가진 종은 3분간 고정해주고, 만약 세포가 터진다면 오스뮴 증기로 고정하기 위해 4% osmium tetroxide 용액의 위에 뒤집은 슬라이드를 1분 간 방치 후 포르말린으로 고정
- 미리 만들어둔 Fernández-Galiano's 용액을 고정이 완료된 시료에 1~3 방울 넣고 10~60초간 슬라이드를 돌려 혼합
- Fernández-Galiano's 용액이 들어있는 시료를 60~70℃로 예열된 핫플레이트에 놓고 2~4분 대기
- 시료의 색이 갈색으로 변하면 해부현미경에서 확인하고 발색이 약하면 추가로 가열
- 발색이 완료되면 5% 티오황산나트륨 용액을 한 방울 추가하여 발색반응 정지

4) 현미경 검경

- 표본제작이 완성된 슬라이드를 광학현미경을 이용해 관찰
- 표본 상의 개체 위치를 확인하기 위해 슬라이드 표본 뒷면에 개체 위치의 원을 그려 표시



그림 5. 섬모류 표본 제작을 위한 염색법. A. Protargol 염색. B. 'Wet' silver nitrate 염색. C. Silver carbonate 염색

(나) 편모류 및 기생성 원생생물류

- 채집한 현장시료나 배양주를 2.5% glutaraldehyde로 1시간동안 4°C에서 고정하여 준비
- 고정된 시료는 증류수를 이용하여 2~3회 수세
- 세척된 시료의 상등액을 제거한 후 glycerol gelatin (Sigma-Aldrich, INC, USA)을 일정량 첨가하고 골고루 섞어준 후, 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어줌(이때 슬라이드 내에 기포가 발생했을 시 아주 약한 미열로 기포를 제거)
- 봉입제가 첨가된 시료는 상온에서 2~3일간 충분히 건조시킴
- 슬라이드 표본이 완벽히 건조된 후 커버글라스의 가장자리를 투명매니큐어로 봉입
- 제작된 슬라이드 표본을 현미경으로 관찰 및 동정 실시, 해당종의 위치를 동그라미로 표시 후 라벨 제작

※ 배양체를 통한 표본 제작시 동그라미 표시 생략가능



그림 6. 완성된 슬라이드 표본의 예(좌)와 수장형태(우).

(다) 정규라벨 부착 및 수장 (그림 6)

- 제작된 표본의 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하고 라벨을 출력하여 슬라이드 왼쪽에 부착
- 라벨이 부착된 슬라이드표본은 동물 건조표본수장고에 수장

(2) 액침 표본 (그림 7)

- 목적에 따라 고정액을 선택하여 세포를 고정
- 99~100%의 에탄올을 Cryo-vial에 분주하고 고정된 시료를 일정량 넣어 교반
- 제작된 표본의 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하고 라벨을 출력하여 Cryo-vial에 부착
- 라벨이 부착된 액침표본은 동물 액침표본수장고에 수장



그림 7. 완성된 액침표본의 예(좌)와 액침표본 저장형태(우).

(3) 전자현미경 표본 (Nam et al. 2015, 그림 8)

- 시료를 2.5% glutaraldehyde로 1시간 고정
- 1차 고정된 시료를 배지 또는 버퍼로 10분씩 3회 수세
- 1% osmium tetroxide를 이용하여 1시간동안 2차 고정
- 2차 고정된 시료를 3차 멸균수로 수세
- 탈수를 위하여 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 에탄올로 10분씩 처리 후, 100% 에탄올 10분씩 3회 처리
- (SEM 표본) 탈수 후 임계점건조기(Quorum Technologies Ltd., Laughton, UK)를 통해 시료 건조시킨 후, 백금코팅기로 백금을 시료에 증착시킨 후 주사전자현미경(Mira-3 FE-SEM, Tescan Ltd., Brno, Czech)을 이용하여 시료 상태 확인



그림 8. 전자현미경 표본 제작 과정 및 저장형태. (A, B) TEM 분석표본 제작을 위한 초박절편 제작 과정. (C) 영국자연사박물관에 저장된 전자현미경 표본.

- (TEM 표본) 탈수 후 포매제를 2일 이상 치환한 뒤, 70°C의 오븐에서 8시간 이상 경화하여 TEM용 블록표본 제작
- TEM 블록표본은 초박절편기(RMC Products, Boeckeler Instruments, Tucson, AZ)을 이용하여 70nm 두께의 초박절편을 제작하고, 이를 grid에 올려 분석표본 제작
- Grid에 올려진 시편은 우라닐아세트산과 납시트르산을 이용하여 이중전자염색 처리
- 투과전자현미경(JEM-1400 plus, JEOL, Tokyo, Japan)으로 시료상태 확인

라. 광학현미경, 전자현미경을 이용한 형태학적, 초미세구조 형질 분석

- 현장 생시료 및 고정시료, 배양체에서 일정량을 멸균된 미세유리관을 활용하여 취한 뒤 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린 후 커버글라스로 살며시 덮어 관찰시료를 제작하거나, 제작된 영구슬라이드 표본을 이용
- 미분간섭 현미경(Differential Interference Contrast Microscope; Nikon ECLIPSE Ni-U, Nikon Co., Japan)하에서 디지털카메라(Nikon DS-Ri2 Camera, Nikon Co., Japan)를 이용하여 400배, 1,000배 배율로 형태분석 및 고해상력의 화상자료 확보
- 제작된 전자현미경 표본을 이용하여, 투과전자현미경(TEM)과 주사전자현미경(SEM)으로 원생생물의 초미세형질 분석 및 화상자료 확보

마. 염기서열 분석

- 배양된 원생생물에서 genomic DNA를 분리하고, 각 분류군, 유전자별 primer를 이용하여 PCR증폭을 수행(표 5)

바. 신/미기록종 판별

- 분석된 염기서열을 이용하여 Blast 유사도 확인 및 계통수 작성
- 참고문헌, 분류 논문 등의 분류학적 정보를 바탕으로 확보된 화상자료를 속별 또는 일정 유형별로 임시로 분류
- 임시 분류 및 동정 과정을 통해서도 동정되지 않은 종에 대한 지속적인 참고문헌 확보 및 분류학적 정보 수집
- 이를 통해 해당종의 미기록종 및 신종 후보 검증

표 5. 각 분류군 별 분석 유전자의 primer 염기서열 정보

유전자	프라이머 이름	염기서열	참고문헌
편모류 ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
편모류 18S	cr_18S_F	CTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCT	Choi et al., 2013
	cr_18S_R	GGAAACCTTGTTACGACTTCTC	
섬모류 ITS	UNIDEUK880F	ACTGTAAACTATGCCRACTTGG	Johnson et al., 2004
	D2C	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA	Scholin et al., 1994
섬모류 18S	New EukA	CTGGTTGATYCTGCCAGT	Medlin et al., 1988
	LSUrev4	GTTAGACTYCTTGGTCCGTG	Sonnenberg et al., 2007
기생성 원생동물 18S	EUKA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Medlin et al., 1988
	EUKF	CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC	Kim et al., 2014
	Euk1209F	GGGCATCACAGACCTG	Giovannoni et al., 1988
	EUKB	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Medlin et al., 1988
아메바류 ITS	Acc18SF(P3)	CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Liu et al., 2005
	Acc18SR(P4)	GGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	

III. 연구결과 및 고찰

1. 담수 원생동물자원 신종·미기록종 조사·발굴

가. 발굴 결과

- 기존의 본 과제의 섬모류에 편중되어 있던 종 발굴의 단점을 극복하고, 연구가 미흡한 영역에 대한 신규자원 확보를 위하여 연구진 구성을 다양화
- 편모류 및 섬모류 뿐만 아니라 국내 다양성 연구가 거의 이루어지지 못했던 기생성 원생동물 등 다양한 분류군에 대한 종 발굴을 수행
- 본 과제의 신종 및 미기록종의 발굴 목표는 30종이며, 연구결과 편모류 4종, 섬모류 22종, 기생성 원생동물류 4종 등 총 30종을 발굴 (신종 7종, 미기록종 23종)하여 100% 목표 달성하였음(표 6, 7)

표 6. 신규 담수원생생물자원 발굴 결과

(단위: 종)

	편모류	섬모류	기생성원생생물류	합계
신종(후보)	1	2	4	7
미기록종	3	20	0	23
합계	4	22	4	30

표 7. 원생동물자원에 대한 신/미기록종 목록

신종(후보) 및 미기록 종 분류군 목록				
연번	분류군	과(class)	학 명	신/미기록
1	섬모류	Acropisthiidae	<i>Fuscheriides insulsus</i> n. sp.(가칭)	신종(후보)
2		Oxytrichidae	<i>Stylonychia</i> n. sp.	신종(후보)
3		Urostylidae	<i>Anteholosticha australis</i>	미기록종
4			<i>Holosticha gibba</i>	미기록종
5		Blepharismidae	<i>Blepharisma elongatum</i>	미기록종
6		Chlamydodontidae	<i>Chlamyodon wilberti</i>	미기록종
7		Uronychiidae	<i>Diophrys apoligothrix</i>	미기록종
8		Euplotidae	<i>Euplotes petzi</i>	미기록종
9			<i>Euplotes raikovi</i>	미기록종
10		Gonostomatidae	<i>Gonostomum fraterculus</i>	미기록종
11		Didiniidae	<i>Monodinium balbianii balbianii</i>	미기록종
12		Strombidiidae	<i>Novistrombidium testaceum</i>	미기록종
13			<i>Propecingulum orientale</i>	미기록종
14		Orchitophryidae	<i>Paranophrys marina</i>	미기록종
15		Lacrymariidae	<i>Phialina binucleata</i>	미기록종
16		Plagiopylidae	<i>Plagiopyla nasuta</i>	미기록종
17		Platyophryidae	<i>Platyophrya spumacola hexasticha</i>	미기록종
18		Philasteridae	<i>Porpostoma notatum</i>	미기록종
19		Trebouxiaceae	<i>Prodiscocephalus borrori</i>	미기록종
20		Tontoniidae	<i>Pseudotontonia cornuta</i>	미기록종
21		Epalxellidae	<i>Saprodinium dentatum</i>	미기록종
22		Placidae	<i>Spathidiopsis luciae</i>	미기록종
23	편모류	Cryptomonadaceae	<i>Cryptomonas stoma</i> n. sp.	신종(후보)
24		Hemiselmidae	<i>Chroomonas nordsteditii</i> *	미기록종
25			<i>Chroomonas coerulea</i> *	미기록종
26		Gymnodiniaceae	<i>Gyrodinium ochraceum</i>	미기록종

신종(후보) 및 미기록 종 분류군 목록				
연번	분류군	과(class)	학 명	신/미기록
27	기생류	Euduboscquellidae	<i>Euduboscqpella</i> sp.1	신종(후보)
28			<i>Euduboscqpella</i> sp.2	신종(후보)
29		Pirsoniaceae	<i>Pirsonia</i> sp.1	신종(후보)
30			<i>Pirsonia</i> sp.2	신종(후보)

* 논문 게재 완료 / Bold체는 주요연구결과로 아래에 소개

나. 주요 연구결과

(1) 섬모류(ciliate)

- 섬모류(ciliate)의 조사·발굴 결과로 총 22종이 발굴되었음
- *Fuscheriides*속(Acropisthiidae) 신종 1종과 *Stylonychia*속(Oxytrichidae) 신종 1종 등 총 2종의 신종이 발굴되었으며, 17과 19속 20종의 미기록종이 발굴되었음
- 대표 연구성파로 Acropisthiidae과 *Fuscheriides*속의 신종인 *F. insulsus* sp. nov.의 연구결과를 아래에 제시함
 - ※ insulsus는 ‘담수의, 염기가 없는’이라는 뜻을 가진 라틴어로 *Fuscheriides*속의 기준종(type species)인 *F. tibetensis*가 염분이 있는 곳에서 발견된 것과 대조적인 이번 한국산 신종의 특징
 - ※ 국제동물명명규약에 따라 남성형의 어미가 붙어 있는 ‘insulsus’를 종명으로 채택 (참고: 남성형-insulsus, 여성형-insulsa, 중성형-insulsum)

* *Fuscheriides insulsus* n. sp. - ciliate

Material examined. A puddle of baugil, San 106, Gyeongpo-dong, Gangneung-si, Gangwon-do, Korea (N 37°46'30.0", E 128°51'46.8").

Description: Cells size about 55 × 15 μm *in vivo*, and after protargol impregnation cells size about 30 × 15 μm; body shape ovate to cylindrical with a length:width ratio of 1.8-2.8:1 (on average 2.24:1) after protargol impregnation; living cells anterior and posterior end similar size, but mid-body wider than anterior and posterior body, after protargol impregnation cells posterior part wider than anterior part; rounded posteriorly; cortex rigid and non-contractile, colorless. Macronucleus positioned middle of body; 5-12 × 4-7 μm in size after protargol impregnation; circular to elongate shape with a length:width ratio of 0.8-2.7:1 (on average 1.5:1). Micronucleus look like be attached to edge of macronucleus;

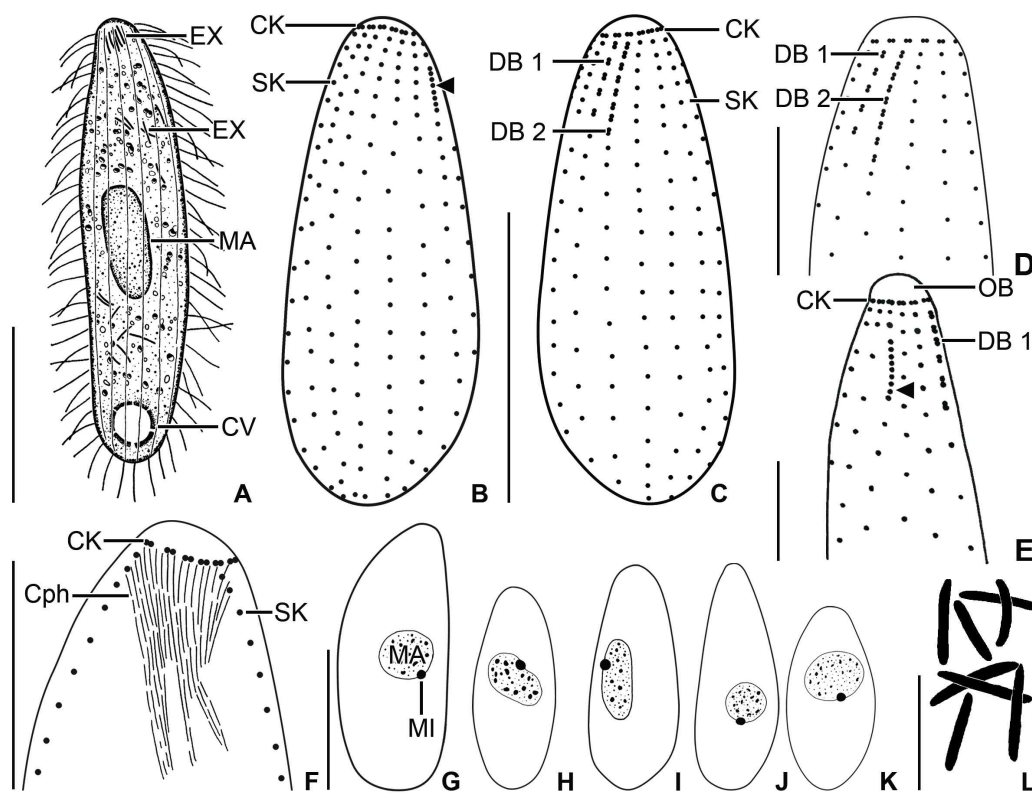


Fig 1. Drawing of *Fuscheriides insulsus* sp. nov. from life (A), after protargol impregnation (B-K) and silver carbonate impregnation (L). **A.** The typical representative individual. **B, C.** Ventral and dorsal views of ciliary pattern, arrowhead pointed condensation kinetid group. **D-F.** Detail of ciliary pattern in anterior body portion, arrowhead indicated condensation kinetid group. **G-K.** Variability of body size and the shape of macronucleus. **L.** Extrusome shaped and size. CK - circumoral kinety, Cph - cytopharynx, CV - contractile vacuole, DB - dorsal brush, Ex - extrusome, MA - macronucleus, MI - micronuclei, OB - oral bulge, SK - somatic kineties. Scale bars: 20 μ m (A-C, G), 10 μ m (D, F), 5 μ m (E, L).

1.1–1.7 $\times$ 1.1–2.2 μ m in size after protargol impregnation; shaped circular to elongate with a length:width ratio of 1.0–1.7:1 (on average 1.2:1). Contractile vacuole located posterior end, about 5 μ m in diameter. We recognized extrusomes *in vivo* and after silver carbonate impregnation; Oral and somatic extrusomes shaped slightly ovate and rod-shaped, sometimes slightly curved; extrusomes 3–5 $\times$ 0.3 μ m long (on average 4 $\times$ 0.3 μ m). Lipid droplets 1 μ m in diameter; scattered in cytoplasm. Cilia about 8 μ m long *in vivo*; ciliary meridional rows arranged in 14–16; anterior end of somatic kineties slightly curved in oral region; anterior and posterior kinetids gap narrower than mid-part kinetids gap; number of a mid-ventral kinety between 16–26. Dorsal brush two rowed and isostichad (dorsal brush row length difference < 20%); two dorsal brush row

composed dikinetids; dorsal brush row 1 composed of 5–6 dikinetids; about 5.0 μm long, dorsal brush row 2 composed of 7–10 dikinetids; about 5.9 μm long, the space between dikinetids of dorsal brush rows gradually wider. Subapical condensation kinetid composed 5–8 monokinetids; about 2.8 μm long; two somatic kinety rows existed between dorsal brush row 1 (shorten dorsal brush) and subapical condensation kinetid groups; two monokinetids located between circumoral dikinetids and most anterior part kinetid of subapical condensation kinetid group. Oral bulge recognized after protargol impregnation; about 1.2 μm height; discoidal in frontal view. Cytopharynx not recognized *in vivo*, though distinguished after protargol impregnation; cytopharynx obconical. Circumoral kinety positioned under the oral bulge; composed 14–16 dikinetids.

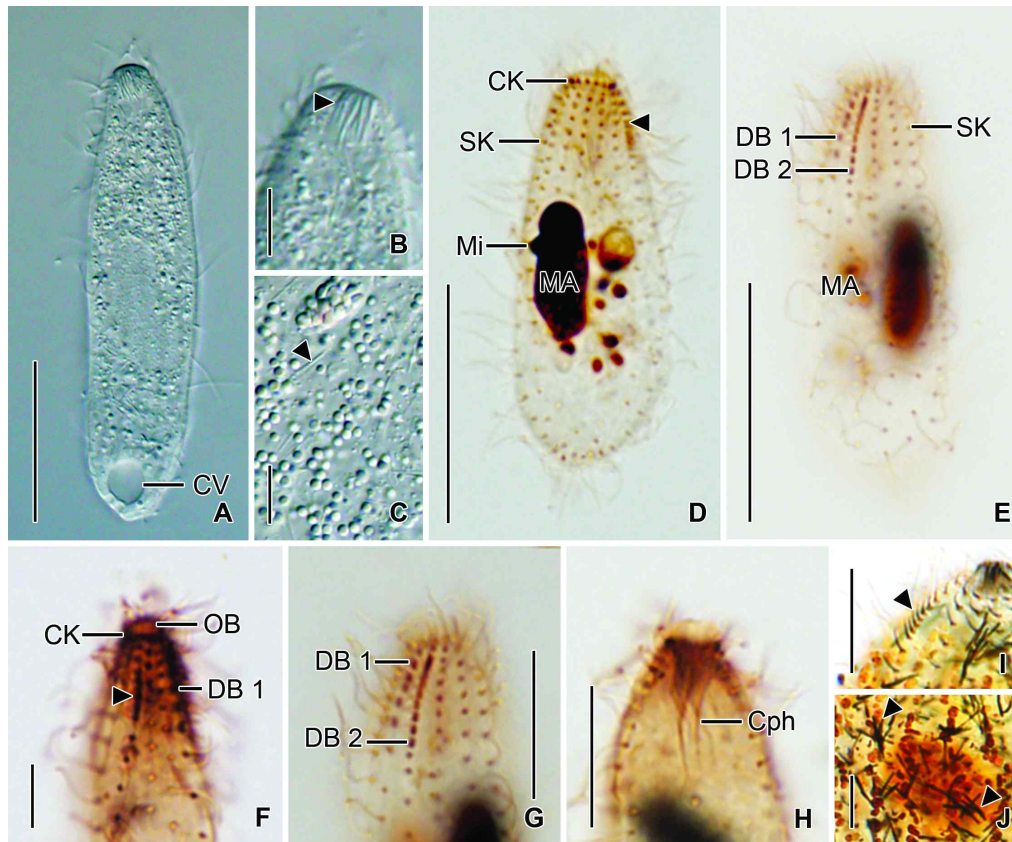


Fig 2. Light micrographs of *Fuscheriides insulsus* sp. nov. from live (A–C), after protargol impregnation (D–H) and silver carbonate impregnation (I, J). **A.** The typical representative individual. **B, C.** oral and body portion extrusome view. **D, E.** ventral and dorsal views of ciliary pattern, arrowhead directed condensation kinetid group. **F–H.** Ciliary pattern details and cytopharynx of anterior portion, arrowhead pointed condensation kinetid group. **I.** Arrowhead directed condensation kinetid group. **J.** Arrowhead pointed extrusome. CV - contractile vacuole, CK - circumoral kinety, Cph - cytopharynx, DB - dorsal brush, MA - macronucleus, Mi - micronuclei, OB - oral bulge, SK - somatic kinety. Scale bars: 20 μm (A, D, E), 10 μm (G, H), 5 μm (B, C, F, I, J).

(2) 편모류(flagellate)

- 편모류(flagellate)의 조사·발굴 결과로 총 4종이 발굴되었음
- *Cryptomonas*속(Cryptomonadaceae) 신종 1종과 2과 2속 3종의 미기록종이 발굴되었음
- 이 중 Hemiselmidae과 *Chroomonas*속 미기록종 2종은 연내 논문게재가 완료되었음
 - * Nam HJ, Kim M, Jang SW, Jo BY, Moon EY, Nam SW. New records of the genus *Chroomonas* and two *Chroomonas* species (Cryptomonadales, Cryptophyceae) from Korea. Korean Journal of Environmental Biology. 39:435-444.
- 대표 연구성으로 *Chroomonas nordstedtii*와 *Chroomonas coerulea*의 연구결과를 아래에 제시함

*** *Chroomonas nordstedtii* & *C. coerulea* - flagellate**

1) *Chroomonas nordstedtii* Hansgirg 1885

Material examined. Freshwater was collected from Pungho pond, Hasidong-ri, Gangdong-myeon, Gangneung-si, Gangwon-do, Republic of Korea (N 37° 44' 18.0", E 128° 57' 13.0"), on January 25, 2017.

Synonym.

Cryptomonas nordstedtii (Hansgirg) Senn 1885

Description. *Chroomonas nordstedtii* cells were biflagellate. Cells were blue-green colored and oval-shaped. The size was 10.51 - 16.21 μm (n = 61, mean = $12.82 \pm 1.26 \mu\text{m}$) long and 5.24 - 10.16 μm (n = 59, mean = $7.17 \pm 1.04 \mu\text{m}$) wide. Two Maupas ovals were observed in the center of the cell. The periplast was composed of hexagonal plates. The cells had a peripheral chloroplast with the pyrenoid penetrated by several thylakoid membranes. The nucleus was located at the posterior end of the cell and contained many chromatin areas. Several ejectosomes were observed in five rows around the gullet. The Golgi body was located ventrally and anteriorly near the gullet. Several starch grains were located in the periplastidal compartment. The nucleomorph was free of the pyrenoid and contained a number of electron-dense granules. Among the flagellar apparatus components, the rhizostyle was arranged perpendicular to the striated fibrous and associated microtubular roots. The striated fibrous root extended parallel to the associated microtubular root, which comprised three microtubules.

2) *Chroomonas coerulea* (Geitler) Skuja 1948

Material examined. Freshwater was collected from the Ichonji pond, 76 - 1, Ichon-ri, Oeseo-myeon, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea (N 36° 29' 57.9", E 128° 3' 45.0"), on November 3, 2016.

Synonyms.

Cryptomonas coerulea Geitler 1922

Chroomonas rosenbergii Huber-Pestalozzi 1950

Description. *Chroomonas coerulea* cells were biflagellate. Cells were blue-green colored and oval-shaped. The size was 7.11 - 10.56 μm ($n = 32$, mean = $8.99 \pm 0.97 \mu\text{m}$) long and 4.98 - 7.63 μm ($n = 34$, mean = $6.16 \pm 0.54 \mu\text{m}$) wide. The pale-yellow colored eyespot was located in the center of the cell. Cells had rectangular periplast plates. The cells had a laterally positioned chloroplast with a pyrenoid, with the pyrenoidal matrix penetrated by two pairs of thylakoid membranes. The pyrenoid was surrounded by starch grains. The nucleus was positioned in the posterior part of the cell and contained many chromatin areas. Several ejectosomes were observed in two rows around the gullet. The Golgi body was observed at the gullet level. Mitochondria had plate-like cristae. The eyespot was located at a small lobe end of the chloroplast and composed of several pigment granules. The nucleomorph was located near the eyespot granules and contained several electron-dense granules and a nucleolus.

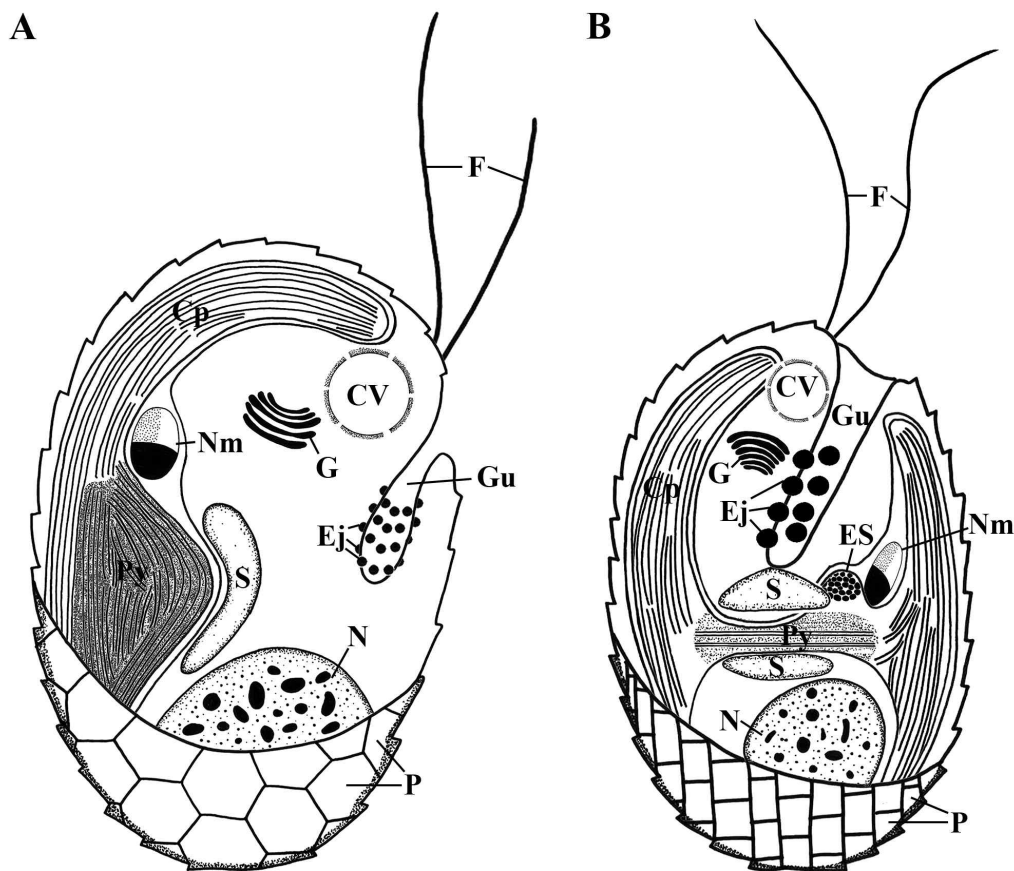


Fig. 1. Drawing of *C. nordstedtii* and *C. coerulea*. Not to scale. A. *C. nordstedtii*. B. *C. coerulea*. CP, Chloroplast; CV, contractile vacuole; EJ, ejectosome; ES, eyespot; F, flagellum; G, Golgi body; Gu, gullet; N, nucleus; Nm, nucleomorph; P, periplast; Py, pyrenoid; S, starch.

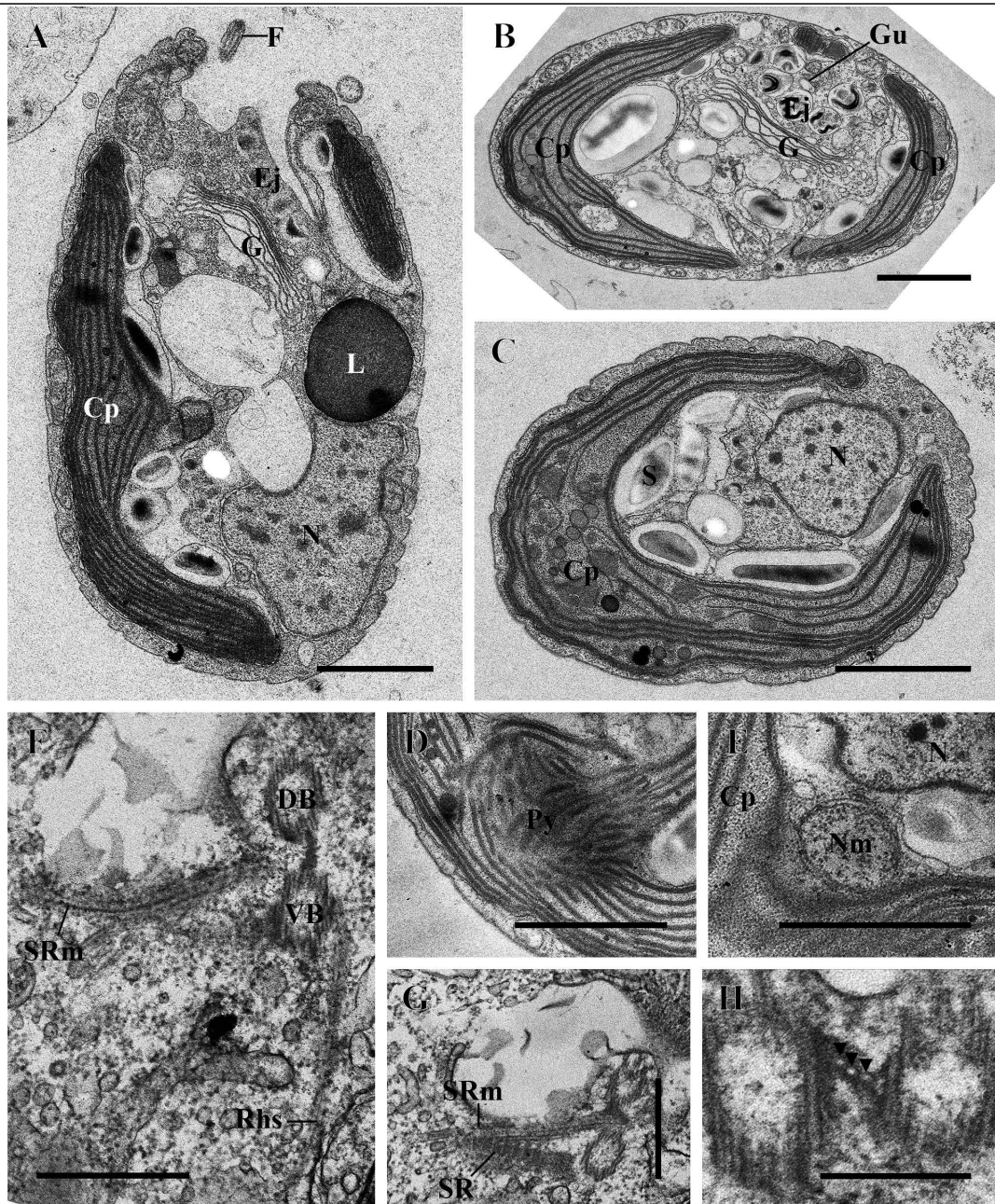


Fig. 2. Transmission electron micrographs of *C. nordstedtii*. **A.** Longitudinal section showing the major organelles. **B.** Cross-section at the gullet level showing the Golgi body and ejectosomes. **C.** Cross-section at the nucleus level showing the chloroplast and nucleus. **D.** Section showing the pyrenoid penetrated by numerous thylakoid membranes. **E.** Section showing the nucleomorph. **F-G.** Serial section of two basal bodies showing the flagellar root components. The striated fibrous root extends parallel to the associated microtubular root. The rhizostyle is positioned perpendicular to SR and SRm. **H.** Oblique section of two basal bodies showing that the SRm comprises three microtubules (arrowhead). DB, dorsal basal body; Ej, ejectosome; F, flagellum; G, Golgi body; Gu, gullet; L, lipids; N, nucleus; Nm, nucleomorph; Py, pyrenoid; Rhs, rhizostyle; S, starch; SR, striated fibrous root; SRm, striated fiber-associated microtubular root; VB, ventral basal body. Scale bar = 2 μ m (A, B, C, D, E), 0.5 μ m (F, G, H)

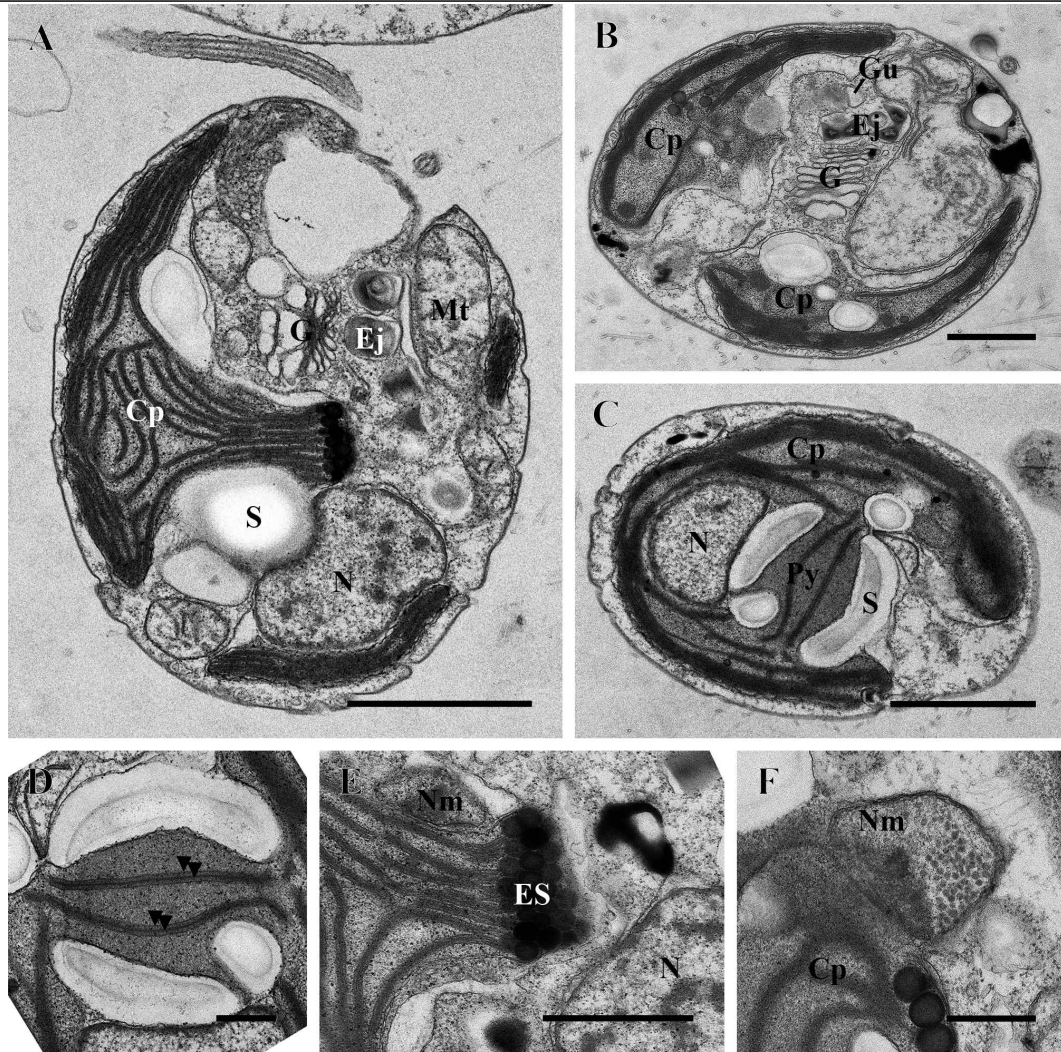


Fig. 3. Transmission electron micrographs of *C. coerulea*. **A.** Longitudinal section of the cell showing the major organelles. **B.** Cross-section at the gullet level showing the Golgi body and ejectosomes. **C.** Cross-section at the nuclear level showing pyrenoids surrounded by starch grains. **D.** Enlargement of the pyrenoid in Fig. C showing that the pyrenoid matrix is penetrated by two pairs of thylakoids (arrowhead). **E.** Section of the chloroplast lobe showing eyespots composed of several granules. **F.** Section showing the nucleomorph near the eyespot. Cp, chloroplast; Ej, ejectosome; ES, eyespot; G, Golgi body; Gu, gullet; Mt, mitochondrion; N, nucleus; Py, pyrenoid; S, starch. Scale bar = 2 μm (A, C), 1 μm (B, E), 0.5 μm (D, F).

(3) 기생류(parasite)

- 기생류(parasite)의 조사·발굴 결과로 총 4종이 발굴되었음
- *Euduboscqpella*속(Euduboscquellidae) 신종 2종과 *Pirsonia*속(Pirsoniaceae) 신종 2종이 발굴되었음
- 특히, *Euduboscqpella*속은 유충섬모류(tintinid)를 감염시킨다고 알려져 있었으나, 이번 연구를 통해 와편모류(Dinoflagellate)를 감염시키는 종이 발견됨
- 대표 연구성으로 Euduboscquellidae과 *Euduboscqpella*속 신종 2종에 대한 연구결과를 아래에 제시함

* *Euduboscquella* - Parasite

1) *Euduboscquella* sp.1

Material examined. Sample was collected from Yongho in Busan, Korea (35°08'N, 129°06'E), on August 27, 2019.

Description. Trophonts with a large spherical nucleus with a single nucleolus is increasing in size during the development. Shield with converging 29-43 grooves (or ribs) toward center of shield. Tomont had numerous bipolar ribs and a food vacuole were evident during early sporogenesis. Sporogenesis undergo with formation of short sporocyte chains during the first few division, followed by separation and continued division of the sporocytes. Three types of spores: (1) biflagellated dinospore, with bulbous episome and narrower cylindrical hyposome, 8.7-15.0 μm long and 4.4-8.6 μm wide; (2) ovoid spore with single flagellum, 9.7-17.8 μm long and 5.1-8.0 μm wide; (3) spherical spore without any flagella, 6.4-13.7 μm in diameter. Type host is *Cucumeridinium coeruleum*.

2) *Euduboscquella* sp.2

Material examined. Sample was collected from Yongho in Busan, Korea (35°08'N, 129°06'E), on June 24, 2021.

Description. Trophonts with a large spherical nucleus with a single nucleolus is increasing in size during the development. Shield with converging 39 grooves (or ribs) toward center of shield. Tomont had numerous bipolar ribs and a food vacuole were evident during early sporogenesis. Sporogenesis undergo with formation of a long, beaded string of sporocytes. Single type of spore; biflagellated dinospore, with bulbous episome and narrower cylindrical hyposome, 11.5 - 13.1 μm long and 6.1 - 11.5 μm wide. Type host is unidentified *Gyrodinium*.

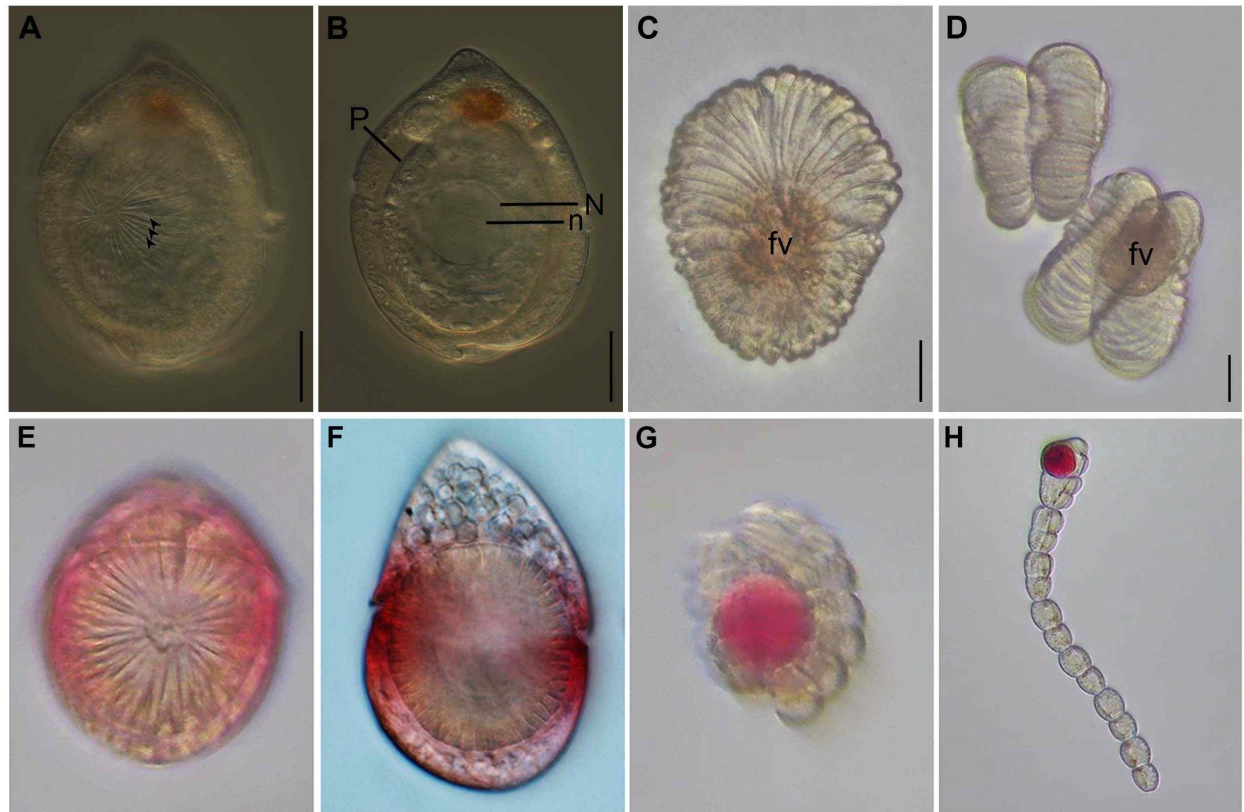


Fig. 1. Micrographs of *Euduboscquella* species infecting dinoflagellates *in vivo*. A-D. *Euduboscquella* sp.1 ex *Cucumeridinium coeruleum*. E-F. *Euduboscquella* sp.2 ex *Gyrodinium* sp.2. **A.** Immature trophont of *Euduboscquella* sp.1 with numerous centripetal grooves and ridges on episome. Arrowhead mark ridges. **B.** Same specimen as A showing parasite nucleus (N), nucleolus (n) and perimeter of parasite (P). **C.** Recently emerged parasite (the tomont) showing bipolar episomal grooves with food vacuole (fv) containing host material. **D.** Middle of second sporogenic division showing four developing sporocytes; food vacuole (fv). **E.** Trophont of *Euduboscquella* sp.2 showing episomal grooves and ridges. **F.** Same specimen as E showing parasite nucleus and nucleolus. **G.** Nascent daughter cells of third sporogenic division. **H.** Middle stage of sporogenesis with long chain of sporocytes.

2. 담수원생생물자원의 표본 확보

- 기 확보된 원생동물의 표본 15,405점 중 섬모류(65%)가 가장 많이 확보되었으며, 그 뒤로 포자충류(18%), 아메바류(11%), 편모류(6%) 순으로 확보됨

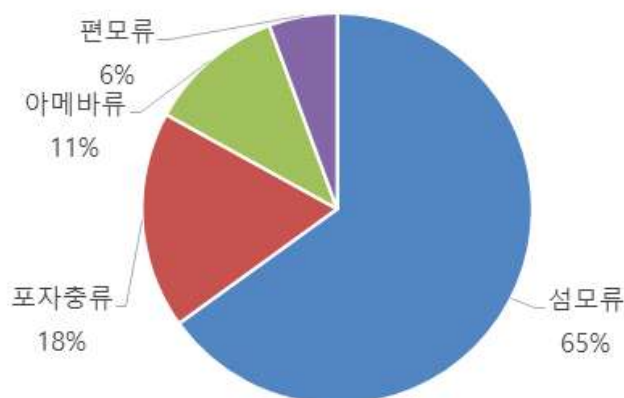


그림 9. 기 확보된 표본 15,405점의 분류군별 분포 현황

- 표본 확보가 미진한 편모류 및 유해원생동물 표본 확보를 위한 연구진 구성
- 총 편모류 2,831점, 섬모류 1,041점, 유해원생동물 2,128점을 확보하여 목표 6,000점 달성
- 이 중 신종의 모식표본(holotype-9종 9점)과 부모식표본(paratype-2종 4점)을 확보하였으며, 미기록종 39종에 대한 302점의 표본을 확보하였음

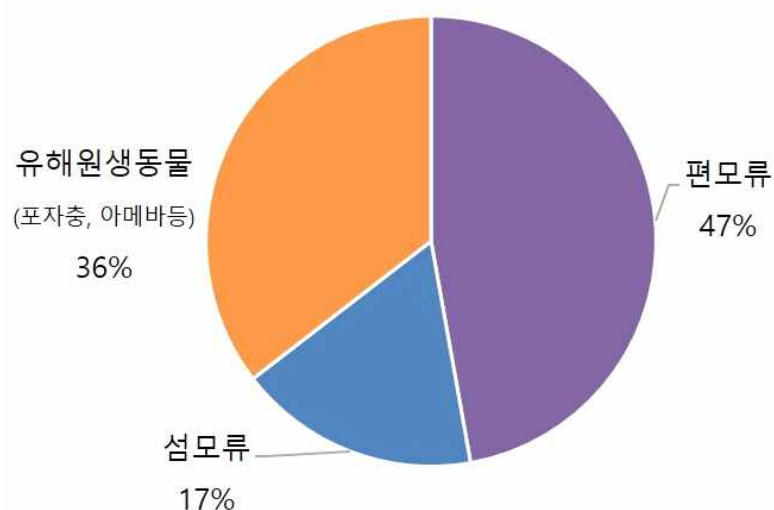


그림 10. '21년 신규 확보 표본의 분류군별 분포현황

○ 금년 확보된 표본의 형태별 현황

- 슬라이드표본 4,113점 / 액침표본 1,870점 / 전자현미경표본 17점



그림 11. 확보된 전자현미경 표본. (좌) 미기록 편모류 2종의 주사전자현미경 표본형태. (우) 학계 기증으로 확보된 신종 7종에 대한 모식표본으로 투과전자현미경 표본의 한 형태.

3. 성과 목표 달성도

가. 게재 및 투고 논문

* 게재 논문 - SCI급 1편, 국내논문 3편

- (SCI) Omar A, Moon JH, Nam SW, Jung J-H. 2021. *Tunicothrix halophila* n. sp., a Secondly Oligomerized Parabirojimid Hypotrich (Ciliophora, Spirotrichea) From Hypersaline Coastal Water in Korea. *Frontiers in microbiology*. 12:691361.
- (국내논문) Cho M, Choi H, Nam SW, Kim S. 2021. Newly recorded unarmored dinoflagellates in the family Kareniaceae (Gymnodiniales) in brackish and coastal waters of Korea. *Korean Journal of Environmental Biology*. 39:236-244.
- (국내논문) Omar A, Jung J-H. 2021. New record of 21 ciliate species (Protozoa, Ciliophora) from South Korea. *Journal of species research*. 10:301-320.
- (국내논문) Nam HJ, Kim M, Jang SW, Jo BY, Moon EY, Nam SW. New records of the genus *Chroomonas* and two *Chroomonas* species (Cryptomonadales, Cryptophyceae) from Korea. *Korean Journal of Environmental Biology*.

* 투고 논문 - SCI급 1편

- (SCI) Nam SW, Kim M, Jang SW, Park MG, Yih W, Kim HS, Shin W. Ultrastructure and Molecular Phylogeny of *Mesodinium annulatum* sp. nov., a New Member of the *M. rubrum*/*M. major* Complex. Journal of Eukaryotic Microbiology.

표 8. 정량적 성과 목표 및 실적

(): 투고 논문수

구분	1. 정책건의		2. 논문게재		3. 산업재산권			4. 홍보		기타
	제정	개정	국내논문	Scopus, SCI(E)	출원	등록	기술이전	보도자료	기고	
계획			1	1				1		
실적			3	1(1)				2		
달성률			300%	100%				200%		

나. 보도자료

- 국립낙동강생물자원관, 국가생물자원 이미지 전문분석 기관으로 발돋움(2021.10.07.)-8건 보도
- 국립낙동강생물자원관, 적조현상을 일으키는 새로운 섬모충 발견(2021.11.26.)-9건 보도

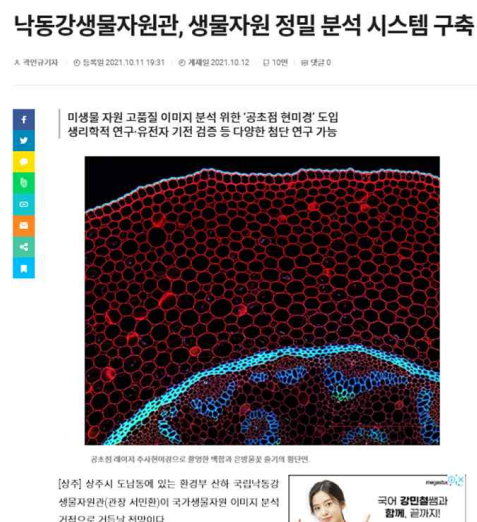
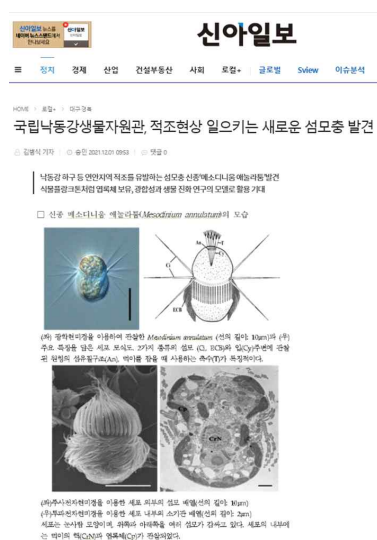


그림 12. 배포된 보도자료의 매체보도

IV. 결론

1. 담수원생생물자원 조사·발굴 및 표본 확보

가. 결론 및 향후 계획

(1) 결론

- (가) 원생생물자원 편모류 4종, 섬모류 22종, 기생성원생생물 4종 등 30종을 발굴하여 목표대비 100%를 달성
- (나) 이는 신종(후보) 7종, 미기록종 23종으로 구성되어 있음
- (다) 표본은 편모류 2841점, 섬모류 1041점, 유해원생동물 2128점 등 6000점을 확보하여 목표대비 100% 달성
- (라) **(고가치표본)**모식표본은 9종 9점이 확보되었고, 부모식표본은 2종 4점이 확보되었으며, 미기록종 39종에 대한 302점 표본을 확보하였음
- (마) **(신유형표본)**기존에 확보되던 슬라이드표본 4,113점, 액침표본 1,870점을 비롯하여 기존에 확보되지 않았던 전자현미경 표본 17점을 새로이 확보하였음
- (바) 논문은 4편에 대해 게재 확정되어 목표 2편 대비 200% 달성 (1편 추가 투고완료)
- (사) 보도자료는 2건이 배포되어 목표대비 200% 달성

(2) 문제점 및 향후 계획

(가) 미개척분류군에 대한 연구 필요

- 1) 원생생물은 상당히 방대한 분류군을 포함하고 있으나, 기존 과제 수행결과 섬모류에 편중되어 있던 종 발굴의 단점을 극복하고, 연구가 미흡한 영역에 대한 신규자원 확보가 요구됨
- 2) 기 확보된 원생동물의 표본 중 확보가 미진한 편모류 및 유해원생동물 표본 확보를 위한 노력 필요 (섬모류(65%), 포자충류(18%), 아메바류(11%), 편모류(6%)순으로 확보)
- 3) 금년 과제처럼 다양한 분류군에 대한 전문연구진을 포함하여 기존에 자원관이나, 국내에 확보되지 않았거나, 연구 및 확보가 미진한 분류군에 대한 자원의 확보 추진

(나) 미조사지점에 대한 현장조사 및 채집

- 1) 기 발굴지역은 물론 조사되지 않은 지점에 대한 통계조사 및 현장 채수를 통해 발굴 효율 재고
- 2) 조사지역의 확대(담수를 비롯한 기수역 및 산간 습지 등)로 발굴효율 재고
- 3) 외부연구자를 활용한 분류군의 다양성 확보

나. 활용 방안 및 기대성과

- (1) **(과학학문분야)** 국내 담수 및 기수역 서식 원생동물자원에 대한 생물상 및 분류학적 기초정보 확보를 통해 국내 담수원생동물자원 현황을 파악하고, 분류학적 연구정보를 제공
- (2) **(생물주권확보분야)** 아직 연구가 미흡한 연구영역인 섬모류 및 기생성 원생생물 자원에 대한 신규 종 확보를 통해 국가 생물주권 확보에 기여
- (3) **(활용 및 경제산업분야)** 기 발굴된 원생동물자원 중 일부는 식물연구팀의 활용분야 연구과제와 협업을 통해 감염성 질환을 유발하는 원생동물에 대한 감염 억제제, 치료제 등의 개발 연구를 진행하고 있으며, 추후, 확보될 원생동물자원 역시 국내 고유 유용자원으로서 대내외 공동연구를 위한 중요한 산학연의 생물재료로 활용 예정
- (4) **(홍보분야)** 본 연구의 자료는 국내 주요 수계 생물상 조사 및 분류학적 연구 자료로 활용되어 여러 학술지(28쪽 참조) 및 학술대회(그림 13)에 발표되었으며, 관련 내용이 매체를 통해 보도되어, 자원관 및 국내의 원생동물학 분야에 대한 높은 연구수준을 대중에게 인식시키고 이미지 제고에 기여
- (5) **(인력양성분야)** 본 연구 수행 간 각 기관의 학생인력의 참여를 통한 미래 연구자 양성 (금년 6명의 대학(원)생이 연구보조원, 보조원으로 참여)

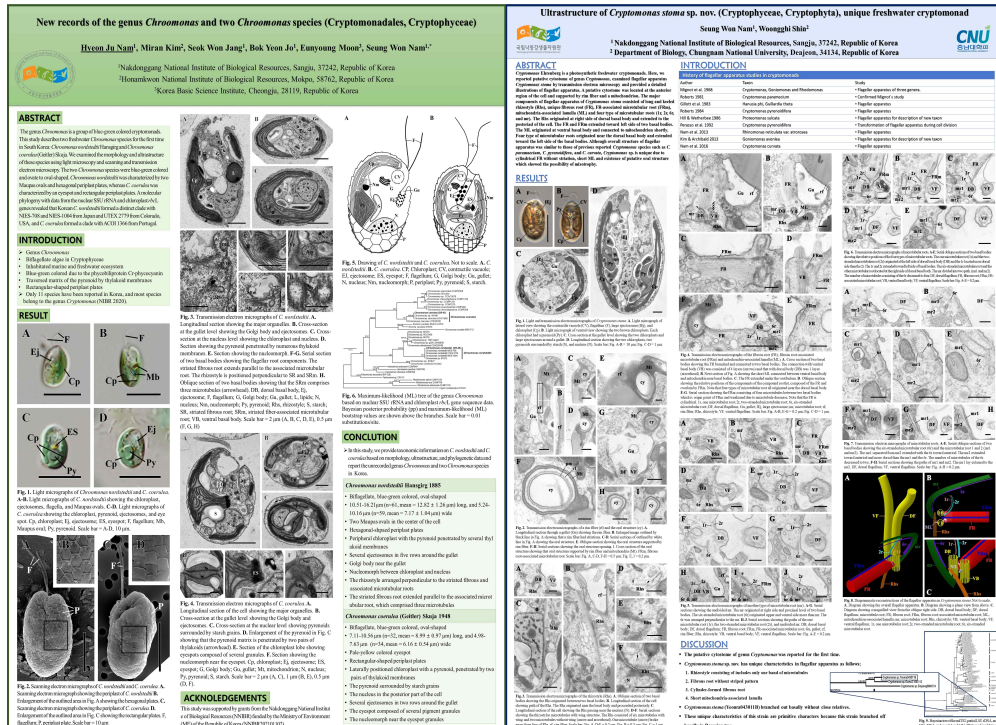


그림 13. 국내 학술대회 발표된 포스터 자료. (좌) 미기록 편모류 2종. (우) 신종 편모류 1종.

V. 참고문헌

- Choi JM, Jung JH, Kim KH, Coats DW, Kim YO. 2021. A novel parasitic, syndinean dinoflagellate *Euduboscquella triangula* infecting the tintinnid *Helicostomella longa*. Front. Mar. Sci. 8: 720424.
- Choi B, Son M, Kim JI, Shin W. 2013. Taxonomy and phylogeny of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae, Cryptophyta) from Korea. Algae 28:307–330.
- Coats DW. 1999. Parasitic life styles of marine dinoflagellates. J. Eukaryot. Microbiol. 46:402–409.
- Coats DW, Bachvaroff TR. 2013. Parasites of tintinnids. In The biology and ecology of tintinnid ciliates. Models for marine plankton. (Dolan JR, Montagnes DJS, Agatha S, Coats DW, Stoecker DK, ed.) pp. 145–170. John Wiley, Chichester.
- Coats DW, Kim S, Bachvaroff TR, Handy S, Delwiche CF. 2010. *Tintinnophagus acutus* n. gen., n. sp. (Phylum Dinoflagellata), an ectoparasite of the ciliate *Tintinnopsis cylindrica* Daday, 1887, and its relationship to *Duboscquodinium collini* Grasse 1952. J. Eukaryot. Microbiol. 57:468–482.
- de Vargas C, Audic S, Henry N, Decelle J, Mahe F, Logares R, Lara E, Berney C, Le Bescot N, Probert I, Carmichael M. 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. Science. 348:1261605.
- Foissner W. 2014. An update of ‘basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa’. Int. J. Syst. Evol. 64: 271–292.
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol. 170: 720–726.
- Gómez F. 2012. A checklist and classification of living dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). CICIMAR Oceanides 27:65–140.
- Guillou L, Viprey M, Chambouvet A, Welsh RM, Kirkham AR, Massana R, Scanlan DJ, Worden AZ. 2008. Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). Environ. Microbiol. 10:3349–3365.
- Johnson MD, Tengs T, Oldach DW, Delwiche CF, Stoecker DK. 2004. Highly divergent SSU rRNA genes found in the marine ciliates *Myrionecta rubra* and *Mesodinium pulex*. Protist 155:347–359.
- Jung JH, Choi JM, Coats DW, Kim YO. 2016. *Euduboscquella costata* n. sp. (Dinoflagellata, Syndinea), an intracellular parasite of the ciliate *Schmidingerella*

- arcuata*: morphology, molecular phylogeny, life cycle, prevalence, and infection intensity. J. Eukaryot. Microbiol. 63:3–15.
- Kim S, Park MG, 2014. *Amoebophrya* spp. from the bloom-forming dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*: parasites not nested in the “*Amoebophrya ceratii* domplex”. J. Eukaryot. Microbiol. 61:173–181.
- Kühn S, Medlin L, Eller G. 2004. Phylogenetic position of the parasitoid nanoflagellate *Pirsonia* inferred from nuclear-encoded small subunit ribosomal DNA and a description of *Pseudopirsonia* n. gen. and *Pseudopirsonia mucosa* (Drebes) comb. nov. Protist 155:143–156.
- Liu H, Moon E, Yu H, Jeong H, Hong Y, Kong H, Chung D. 2005. Evaluation of taxonomic validity of four species of *Acanthamoeba*: *A. divionensis*, *A. paradivionensis*, *A. mauritaniensis*, and *A. rhysodes*, inferred from molecular analyses. Korean J. Parasitol. 43:7–13.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogen ML. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene, 71:491–499.
- Nam SW, Shin W, Kang M, Yih W, Park MG. 2015. Ultrastructure and Molecular Phylogeny of *Mesodinium coatsi* sp. nov., a Benthic Marine Ciliate. J. Eukaryot. Microbiol. 62:102–120.
- Park MG, Kim S, Shin EY, Yih W, Coats DW. 2013. Parasitism of harmful dinoflagellates in Korean coastal waters. Harmful Algae 30:562–574.
- Scholin CA, Herzog M, Sogin M, Anderson DM. 1994. Identification of group-specific and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU ribosomal RNA gene. J. Phycol. 30:999–1011.
- Skovgaard A, Daugbjerg N. 2008. Identity and systematic position of *Paradinium poucheti* and other *Paradinium*-like parasites of marine copepods based on morphology and nuclear-encoded SSU rDNA. Protist 159:401–413.
- Sonnenberg R, Nolte AW, Tautz D. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1–D2 sequences for their use in species identification. Front. Zool. 4:6.
- Yoo J, Kim S. 2020. Infection of marine diatom *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae) by the parasitic nanoflagellate *Pirsonia diadema* (Stramenopiles) from Yongho Bay in Korea. Korean J. Environ. Biol. 38:567–577.