간행물 등록번호
NNIBR-2021-0000242-10

담수 미세조류 조사 · 발굴(2단계 3차년도)

Study of Microalgae Diversity
from the Freshwater of Korea -Vol. Ⅱ(3)-

원생생물연구팀

국립낙동강생물자원관
Nakdonggang National Institute of Biological Resources

발간등록번호: NNIBR-2021-0000242-10

담수 미세조류 조사·발굴(2단계 3차년도)

담수생물연구본부 미생물연구실 원생생물연구팀

이창수, 김지훈, 남승원, 윤석민, 권대률, 박미례

Study of Microalgae Diversity from the Freshwater of Korea -Vol. II(3)-

Chang Soo Lee, Z-Hun Kim, Seung Won Nam,
Suk Min Yun, Daeryul Kwon, Mirye Park

Protist Research Team
Microbial Research Department
Nakdonggang National Institute of Biological Resources

2021

목 차

목 차 i
표 목차 iii
그림 목차 iv
초록 v

I. 서론 1
1. 연구사업의 필요성 1
가. 연구사업의 배경 1
나. 국내외 연구동향 2
다. 연구사업의 필요성 2
2. 연구사업의 목표 3

II. 연구내용 및 방법 4
1. 연구 범위 4
2. 연구 내용 4
가. 신종 및 미기록종 후보의 정의 4
나. 신종/미기록종 후보 발굴 4
다. 표본 확보 및 표본 정보 DB 입력 5
3. 연구진 구성 및 연구 추진체계 6
4. 조사지역 6
가. 국내 담수 및 기수지역 현장조사지역 6
5. 조사 방법 8
가. 현장조사 및 시료 채집 8
나. 표본 제작 9
6. 확보자원의 동정을 위한 유용정보 분석 및 신/미기록종 판별 12
가. 광학현미경을 이용한 형태학적 형질 분석 12
나. 전자현미경을 이용한 미세구조학적 형질 분석 12
다. 염기서열 분석 12

라. 신/미기록종 판별 ····· 12
7. 미세조류의 유용정보 탐색 ····· 13
가. 미세조류의 지질성분 분석 ····· 13

III. 연구결과 및 고찰 ····· 14
1. 신규 담수 미세조류자원 조사·발굴 ····· 14
2. 담수 미세조류자원의 표본 확보 ····· 16
3. 담수 미세조류자원의 유용정보 확보 ····· 17

IV. 결론 ····· 18
1. 담수 미세조류 조사·발굴, 표본·배양체 확보 ····· 18
가. 결론 및 향후 계획 ····· 18
나. 활용 방안 ····· 18

V. 참고문헌 ····· 19

표 목 차

표 1. 연구사업의 정량적 목표 ····· 3
표 2. 과제 및 참여인력의 구성 ····· 6
표 3. 분류군 별 분석 유전자의 primer 염기서열 정보 ····· 13
표 4. 신규 담수 미세조류 발굴 결과 ····· 14
표 5. 미세조류 신/미기록종 목록 ····· 15

그 림 목 차

그림 1. 2021년 전국 192 조사지점 및 분포현황 ····· 7
그림 2. 석호 특이서식지의 계절별 조사 ····· 7
그림 3. 다양한 현장조사 및 채수법 ····· 8
그림 4. 미세조류의 슬라이드 표본 제작과정 ····· 11
그림 5. 완성된 표본의 형태 및 보관 ····· 11
그림 6. 미세조류 표본의 분류군별 비율 ····· 16

초록

나고야의정서 발효에 따라 고유 생물자원 주권 확보와 자원의 산업화 요구 증대되고 있으며, 국가 생물자원 경쟁력 확보를 위해 생물자원의 조사가 선행되어야 하나, 현재까지 국내 고유 담수생물자원에 대한 체계적인 발굴이 미비한 실정이다. 또한, 국내 담수생태계 미세조류의 종 다양성은 상당히 높을 것으로 예측되나, 현재까지 조사가 매우 미비하여 미세조류 추정치에 10% 미만이 보고되어 있다.

담수 미세조류의 조사·발굴을 위하여 2021년 1월부터 12월까지 영산강과 섬진강을 중심으로 낙동강, 한강, 금강 등 우리나라의 주요 강, 강원도 석호와 같은 특이서식지, 상주보 등 인위적 담수수계를 대상으로 총 189개 지점의 조사를 실시하여(그림 1, 부록 2), 신종 및 미기록종의 발굴 20종을 달성하여 100%의 목표를 달성하였으며, 신종(후보)/미기록종 기록지(표 5, 부록 1)를 작성하였다. 표본 확보는 목표인 4,018점의 표본을 확보하여 100.45%의 목표를 달성하였다. 또한 기 발굴된 미세조류 12종의 지질성분을 분석하여 생물소재로 활용될 수 있는 유용정보를 획득하였다(부록 3).

연구의 결과를 통하여, 우리나라에 자생하는 담수 미세조류의 실체를 파악하여 국가 생물주권 확립의 근거를 제시하였으며, 유용생물 자원의 탐색, 발굴 및 체계적 보존 대책 수립에 기여할 것으로 기대된다. 또한 발굴된 담수 미세조류는 생물산업(BT)의 일차 소재로서 직접 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 우리나라 생물산업의 기반구축 및 경쟁력 확보에 기여할 것으로 판단된다. 또한 연구의 결과를 논문, 보도자료 등으로 발표하여 국립낙동강생물자원관이 국내 담수생물 전문연구기관으로의 역할을 수행하는 홍보 효과를 창출할 것으로 기대된다(부록 4).

Ⅰ. 서 론

1. 연구사업의 필요성

가. 연구사업의 배경

전 세계는 활발한 산업활동으로 경제발전을 이룩하면서 자원과 에너지를 고갈시키고 자연을 훼손하였으며 여러 가지 환경문제를 일으키고 있다. 생물이 사는 서식지의 파괴, 식량 등 자원으로 이용하기 위한 지나친 남획, 세계화에 따른 외래생물의 확산 등으로 지구의 생물다양성은 급격하게 감소하고 있는 실정이다. 1992년 6월 브라질의 수도 리우데자네이로에서 “지구를 건강하게, 미래를 풍요롭게” 라는 슬로건 아래 지구정상회담이 개최되었다. 리우환경회담에서 채택된 UNCED Agenda 21과 생물다양성협약(CBD: Convention on Biological Diversity))은 생물다양성의 보전과 지속 가능한 이용을 목적으로 하고 있으며, 자원과 기술에 대한 권리를 함께 인정함으로써 원의 소유와 개발 기술의 권리는 이미 국제적인 규제조치로 보장받게 되었다.

유엔에서는 21세기 말까지 생물들의 멸종 속도가 빨라져 생물다양성이 크게 감소할 것으로 예측하고, 이를 방지하고자 2010년을 생물다양성의 해(International Year of Biodiversity)로 정했다. 그리고 생물다양성은 우리의 생명(Biodiversity is our life)이라는 표어를 제시하며, 생물다양성의 중요성을 공감하고 생물다양성 보전을 실천하기 위한 여러 활동을 추진하고 있다. 생물다양성은 인간의 생명을 유지하고 삶을 풍요롭게 하는 원동력으로 매우 중요함에도, 현재까지 알려진 생물종은 Catalogue of Life의 2020년 통계인 약 195만 종과 Algaebase의 통계인 16만종을 합쳐 약 211만종 정도이다. 하지만 지구상에는 1,300만 종이 있을 것으로 추정되며 동시에 매일 70종씩 사라져 2050년까지 생물종의 25%가 멸종할 것으로 예측된다. 이러한 멸종의 속도는 자연적인 멸종에 비해 1,000배 이상 빠른 것으로 보고되고 있다.

최근 “유전자에 대한 접근 및 유전자원 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공명한 공유에 관한 나고야 의정서”가 2014년 10월 12일부로 발효되었으며, 지난 8월 스위스 등 12개국이 비준하면서 10월 6일부터 17일까지 대한민국 강원도 평창에서 제12차 생물다양성협약 당사국 총회(COP12)를 개최하고, 이에 맞춰 10월 13일부터 17일까지 나고야 의정서 제1차 당사국회의(COP-MOP1)가 개최되었다.

우리나라는 1990년 후반에 이르러 국제적인 추세에 동참하기에 이르렀으며, 환경부에서는 2009년 6월 생물다양성 보전을 위한 최상위 국가 계획인 제2차 국가생물다양성전략(National Biodiversity Strategies and Action Plans)을 수립하여 생물다양성의 보전과 지속 가능한 이용, 유전자원의 이용으로부터 발생하는 이익의 공평한 배분 등 생물다양성협약의 목표를 이행하기 위한 5대 추진전략을 마련하였다. 이러한 전략과 국제적인 생물다양성의 중요성을 인식하고자, 국립생물자원관에서는 현재 10만 종으로 추정되는 한반도 자생생물종에 대한 조사 및 발굴사업을 대대적으로 수행하고 있으며, 2015년 출범한 국립낙동강생물자원관에서는 한반도 담수 생물자원을 중심으로 조사·발굴 연구를 시작하였다.

우리나라는 지형의 특성상 산지의 비율이 높기 때문에 생물상 및 다양성 연구의 대부분은 산지에 집중되어 있다. 이에 비해 하천 면적은 우리나라 전체 국토 면적의 일부인 2.8%(2,849 ㎢)에 불과하기 때문에 대부분의 하천 관련 연구들은 주요 하천 및 수계에서의 수변 생물상에 대한 연구로 목록작성 및 다양성 분석에 그치고 있는 실정이다(배 등, 2002; 도 등, 2004; 송 등, 2005; 이와 김, 2008; 임 등, 2013; 박 등, 2014). 최근 나고야의정서 발효 이후 국가별 생물자원의 확보는 지구적인 과제로 급부상하였다. 따라서 우리나라의 생물주원 확립을 위해서는 육지 중심의 종 발굴에서 확장되어 수계로의 생물종 발굴이 시급하다. 국내의 생물자원은 10만종이 서식하고 있는 것으로 추정되나, 2020년 말 기준으로 54,428종으로 이중 조류(藻類)는 6,303종에 그쳐 지속적인 종 발굴이 요구되는 실정이다.

나. 국내외 연구동향

미세조류 중 생물량이나 종다양성이 가장 다양한 것은 돌말류로, 전 세계에 200속 이상 10,000종(Werner 1977) 또는 현생 및 화석종을 포함하면 200,00여종(Mann and Droop 1996)이 존재하는 것으로 보고하였고, 와편모조류는 약 550속 4,000여종(Graham et al. 2010)으로 추정하였다. Scagel 등(1982)은 녹조류는 450속 이상 7,000여종, Xanthophytes는 약 100속 550여종, Chrysophytes는 100속 이상 500여종이 존재한다고 보고하였다. 특히, 국내 담수 유역권은 높은 생물종 다양성을 가지고 있으나 현재까지 담수생물자원에 대한 조사가 미비하다고 알려져 있다.

다. 연구사업의 필요성

1992년 생물다양성 협약(CBD)과 2010년 나고야의정서 채택으로 인류 공동의 자산에서 생물주권으로 생물자원에 관한 인식의 패러다임 변화가 일어났다. 2014년

10월 12일 제 12차 당사국총회(COP12)에서 나고야의정서가 발효됨에 따라 세계 각국은 생물자원에 대한 중요성 및 가치를 인식하고 국가차원에서 생물자원을 확보, 개발, 활용하기 위해 집중투자를 하고 있다.

나고야의정서 발효로 인해 생물주권 확보를 위한 미세조류 발굴, 확보 및 개발의 중요성 증대되고 있으나 높은 담수생물다양성에 비해 4대강 유역 포함한 담수환경 생물자원의 조사가 미비한 것이 현재 우리나라의 현실이다. 따라서 담수생물자원에 대한 생태조사 및 유용식물자원 발굴 연구를 통해 담수생물상 목록을 확보하고 생태자료 구축 및 보존 방안을 마련할 필요가 있다.

미세조류는 다양한 서식지 기반 차별화된 기능 분화로 지구상에 가장 잘 적응된 생물이지만, 국내 담수 미세조류에 분류학적 연구는 미비한 실정이다. 국내 연구진에 따르면 낙동강 유역 조사에서 다수의 신종(후보) 및 미기록종이 나타난다고 보고가 되어 왔으므로, 지속적이고, 체계적인 조사 및 발굴 작업이 필요하다. 또한 담수 미세조류 등 녹조류, 남조류, 돌말류 등은 신규 생물자원으로 활용가치가 크기 때문에, 한반도 고유 담수 미세조류 생물자원의 발굴이 필요하다.

2. 연구사업의 목표

2021년도 담수 미세조류 조사·발굴 사업의 목표는 ① 국내 담수환경 내의 담수 미세조류 신종(후보) 및 미기록종의 발굴(20종), ② 미세조류 표본 확보(4,000점), ③ 논문 2건(국내 1편, SCIE 1편), ④보도자료 2건 배포이다.

표 1. 연구사업의 정량적 목표

구분	신/미기록종 발굴	표본 확보	논문	보도자료
미세조류	20종	4,000점	2편	2건

Ⅱ. 연구내용 및 방법

1. 연구 범위

○ 대상분류군 : 담수 및 기수역 자생 미세조류
○ 신종/미기록종 후보 발굴 : 20종
○ 표본 확보 : 슬라이드 및 액침 표본 4,000점
○ 보도자료 : 보도자료 2건 배포

2. 연구 내용

가. 신종 및 미기록종 후보의 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 정당 공표를 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

(가) 담수 미세조류의 국내 미기록 종은 1차적으로 국립생물자원관의『한반도의 생물다양성 통합관리시스템』의 국가생물종목록에 등재되지 않은 종을 기준으로 한다

나. 신종/미기록종 후보 발굴 : 20종

(1) 신종/미기록종 후보의 기재문 작성

(가) 발굴된 신종/미기록종 후보종에 대한 증거 자료로 『신종 및 미기록종(후보) 기록지』를 작성하였다

(나) 기록지의 기재문 작성시 한글로 작성함을 원칙으로 하되, 경우에 따라 영어 기재문으로 작성하였다.

다. 표본 확보 및 표본 정보 DB 입력

(1) 표본 확보 : 4,000점

(가) 분류군별 표본 제작 방법에 따라 슬라이드표본, 액침표본의 형태로 제작 및 확보

(나) 슬라이드 표본의 경우 봉입제가 완전히 마를 때까지 보관(세워서 보관)

(다) 제작 완료 후, 국립낙동강생물자원관 수장고에 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

3. 연구진 구성 및 연구 추진체계

가. 본 과제는 국립낙동강생물자원관 미생물연구실 원생생물연구팀의 6명의 연구인력 참여

나. 미생물연구실 원생생물연구팀의 이창수 선임연구원이 과제책임자를 맡고 있으며, 과제 참여연구원은 각자의 정량적 업무를 배분받아 역할을 수행하였음.

표 2. 과제 및 참여인력의 구성

성명(소속)		구분	참여율	참여기간(개월)	주요업무
원생생물연구팀	이창수	연구책임자	30	12	과제 총괄
	김지훈	참여연구원	10	12	유용정보 생산
	남승원	참여연구원	20	12	표본 확보
	윤석민	참여연구원	20	12	종 발굴, 표본 확보
	권대률	참여연구원	20	12	종 발굴, 표본 확보
	박미례	참여연구원	40	12	종 발굴, 표본 확보 업무보조

4. 조사지역

가. 국내 담수 및 기수지역 현장조사지역(그림 1, 부록 2)

○ 국내 담수 지역 조사

- 상주보 및 낙동강 상류지역의 월 1회 조사 및 채집
- 영산강·섬진강 지류 및 인근 지역 월 1회 현장 조사 및 채집
- 낙동강, 한강(남한강, 북한강), 금강 분기별 현장 조사 및 채집

○ 기수, 석호, 습지, 저수지 등 조사

- 서해안, 남해안 등 기수역 현장조사 및 채집
- 강원도 석호 현장조사 및 채집(그림 2)

- 습지(고산습지, 내륙습지), 인공 담수수계(저수지, 보 등) 현장조사 및 채집

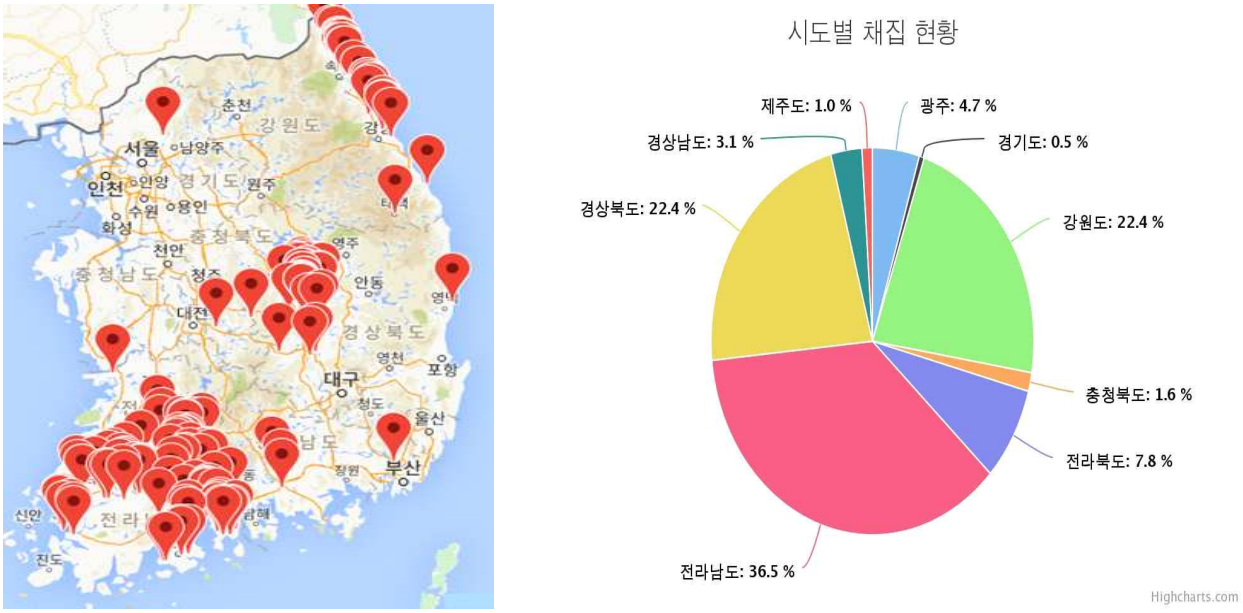

그림 1. 2021년 전국 192 조사지점 및 분포현황

2월				
6월				
8월				
10월				

그림 2. 석호 특이서식지의 계절별 조사

5. 조사 방법

가. 현장조사 및 시료 채집(그림 3)

○ 부유성 미세조류는 플랑크톤 네트(망목크기 20㎛)를 이용하여 수체에 투척 후 이양하여 농축시켰다.

○ 수심이 얕은 담수 또는 기수역의 경우 핸드네트(망목크기 20㎛)를 이용하여 양동이로 일정량의 물을 취해 거르는 방법으로 채집하였다.

○ 수심이 얕은 수체의 수생식물, 암반, 자갈, 기타 고형기질과 같은 피 부착물에 부착하여 서식하는 미세조류는 부드러운 솔 등으로 긁어서 채집하였다.

○ 저서성 미세조류는 수중 토양층으로부터 스포이드 등을 사용하여 채집하였다.

○ YSI를 활용한 환경요인(수온, 염분, DO, 전기전도도, pH 등) 조사하였다.

○ 담수 미세조류의 자생·서식지환경에 대한 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하여 DB화 관리 및 유지하였다.

<플랑크톤네트를 활용한 채집>

<부착조류의 채집>

<현장 수질 측정 및 농축시료>

<플랑크톤 시료 고정 및 운반>

그림 3. 다양한 현장조사 및 채수법

나. 표본 제작

(1) 슬라이드 표본(그림 4))

(가) 일반 미세조류 표본

○ 시료 준비 : 채집한 현장시료나 배양체를 alehyde계열의 고정액에 1시간동안 4ºC에서 고정하여 준비한다.

○ 시료 세척 : 고정된 시료는 증류수를 이용하여 2~3회 수세한다.

○ 봉입제 첨가 : 세척된 시료의 상등액을 제거한 후 glycerol gelatin (Sigma-Aldrich, INC, USA)을 일정량 첨가하고 골고루 섞어준 후, 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 주었다. 이때 슬라이드 내에 기포가 발생했을 시 아주 약한 미열로 기포를 제거한다.

○ 표본 건조 : 봉입제가 첨가된 시료는 상온에서 2~3일간 충분히 건조한다.

○ 봉입 : 슬라이드 표본이 완벽히 건조된 후 커버글라스의 가장자리를 투명 매니큐어나 봉입제로 봉입한다.

○ 동정 : 제작된 슬라이드 표본을 현미경으로 관찰 및 동정을 실시하고, 해당종의 위치를 동그라미(컬러)로 표시한다..

※ 배양체를 통한 표본 제작시 동그라미 표시 생략

○ 라벨부착 : 제작된 표본의 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하고 라벨을 출력하여 슬라이드 왼쪽에 부착한다.

○ 수장 : 라벨이 부착된 슬라이드 표본은 건조표본수장고에 수장한다.

(나) 돌말류의 슬라이드 표본

○ 시료 준비 : 채집한 현장시료나 배양주를 루골용액(Lugol's solution) 또는 alehyde계열의 고정액에 고정하여 준비한다.

○ 시료 전처리 : 고정된 시료를 test-tube에 넣은 후 시료, 염산(HCl), 과망간산칼륨($KMnO_4$)을 1:1:1로 희석, 시료와 산의 혼합액이 들어있는 test-tube를 물이 들어 있는 비커에 넣은 후 hot plate에서 중탕, 혼합액의 색이 보라색에서 투명한 색으로 변할 때까지 중탕실시, 30분 간격으로 pipetting 실시한다.

○ 시료 세척 : 혼합액이 투명해진 후 증류수를 충분히 첨가하여 하루 정치, 상층액 제거, 이 과정을 5~6회 반복해 준다.

○ 7.6 × 2.6 cm 슬라이드 글라스에 1.8 × 1.8 cm 커버 사용

○ 시료 건조 : cover slip을 hot plate위에 놓은 후 그 위에 산처리 된 시료 1 ml 분주 후 가열 건조한다.

○ 봉입제 첨가 : mounting media(Pleurax 또는 Hyrax)에 에탄올을 첨가하여 적당한 농도 조절 후 6번의 건조된 시료(cover slip)위에 1~2방울 첨가해 준다.

○ 영구슬라이드 제작 : 5번 위에 slide glass를 덮은 후 재빨리 뒤집어 cover slip의 위치 조정을 실시한다.

○ 표본의 가열 : cover slip이 위로 오게 한 후 알코올램프로 mounting media가 한 번 끓어오를 때까지 가열해 준다.

○ 봉입 : 가열된 slide를 찬 곳에 두고 기포가 사라지게 하면서 다시 cover slip 위치를 가운데로 조정, 슬라이드 표본이 완벽히 건조된 후 커버글라스의 가장자리를 투명매니큐어나 봉입제로 봉입한다.

○ 동정 : 제작된 슬라이드 표본을 현미경으로 관찰 및 동정 실시, 해당종의 위치를 동그라미(컬러)로 표시한다.

※ 배양체를 통한 표본 제작시 동그라미 표시 생략

○ 라벨부착 : 제작된 표본의 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하고 라벨을 출력하여 슬라이드 왼쪽에 부착해 준다.

○ 수장 : 라벨이 부착된 슬라이드표본은 건조표본수장고에 수장(그림 5)

(2) 액침 표본

○ 시료준비 : 목적에 따라 고정액을 선택하여 세포를 고정한다.

○ 침윤 : 99~100%의 에탄올을 cryo-bial에 분주하고 고정된 시료를 일정량 넣어 교반한다.

○ 라벨부착 : 제작된 표본의 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하고 라벨을 출력하여 cryo-bial에 부착한다.

○ 수장 : 라벨이 부착된 액침표본은 액침표본수장고에 수장(그림 5)

그림 4. 미세조류의 슬라이드 표본 제작과정

<완성된 슬라이드 표본>

<슬라이드표본 보관>

<완성된 액침표본>

<액침표본의 보관>

그림 5. 완성된 표본의 형태 및 보관

6. 확보자원의 동정을 위한 유용정보 분석 및 신/미기록종 판별

가. 광학현미경을 이용한 형태학적 형질 분석

○ 현장 생시료 및 고정시료, 제작된 영구슬라이드 표본을 이용하거나 배양체에서 일정량을 멸균된 미세유리관을 활용하여 취한 뒤 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린 후 커버글라스로 살며시 덮어 관찰시료를 제작한다.

○ 미분간섭 현미경(Differrential 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 화상자료를 확보한다.

나. 전자현미경을 이용한 미세구조학적 형질 분석

○ 현장 생시료 및 고정시료를 여과크기 20 ㎛ 여과지에 여과한 후 카본 테잎을 이용해 알루미늄 마운트(mount)에 부착하여 준비해 준다.

○ 전계방사형주사전자현미경(FE-SEM)으로 10,000~50,000 배의 고배율로 미세조류의 미세구조 분석 및 화상자료를 확보한다.

다. 염기서열 분석

○ 배양된 미세조류에서 genomic DNA를 분리하고, 각 분류군, 유전자별 primer를 이용하여 PCR증폭을 수행해 염기서열을 분석한다(표 3)).

라. 신/미기록종 판별

○ 염기서열을 이용하여 계통수를 작성하고 유사도를 검증한다.

○ 참고문헌, 분류 논문 등의 분류학적 정보를 바탕으로 확보된 화상자료를 속별 또는 일정 유형별로 임시로 분류해 둔다.

○ 임시 분류 및 동정 과정을 통해서도 동정되지 않은 종에 대한 지속적인 참고문헌 확보 및 분류학적 정보를 수집한다.

○ 이를 통해 해당종의 미기록종 및 신종 후보를 검증한다.

표 3. 분류군 별 분석 유전자의 primer 염기서열 정보

유전자 부위	프라이머 이름	염기서열	참고문헌
미세조류 ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
편모충류 18S	cr_18S_F	CTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCT	Choi et al. 2013
	cr_18S_R	GGAAACCTTGTTACGACTTCTC	
섬모충류 ITS	modified UNIDEUK880F	ACTGTAAACTATGCCRACTTGG	Johnson et al. 2004
	D2C	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA	Scholin et al. 1994
아메바류 ITS	Acc18SF(P3)	CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Liu et al. 2005
	Acc18SR(P4)	GGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC	

7. 미세조류의 유용정보 탐색

가. 미세조류의 지질성분 분석

○ 기발굴 미세조류 12종의 유용지질 생산성을 확인하기 위하여 지방산 성분분석을 수행하였다.

○ 배양된 담수조류는 glass fiber 필터로 수거하고, 수거된 조류시료에 chloroform: methanol (2:1 v/v)를 첨가한 후 교반하여 지질성분을 추출 하였다.

○ 증류수를 첨가하여 chloroform: methanol: water의 비율이 1:1:0.9로 조절, chloroform층 건조후 지질량을 측정 하였다(Bligh & Dyer, 1959).

○ 추출된 지질로부터 gas chromatography를 이용하여 fatty acid methyl esters(FAME) 성분을 분석하였다.

○ 건조된 조류시료 50mg을 1mL의 KOH-CH_3OH용액이 담긴 test tube에 넣고 75℃에서 10분간 반응시켰다.

○ 5% HCl과 메탄올을 넣고 75℃에서 10분간 반응하였다.

○ 핵산과 tert-butylmethylether를 첨가하여 반응시켰다.

○ 증류수를 첨가하여 지방산이 포함되어 있는 층을 분리하였다.

○ 분리된 지방산의 성분확인과 농도측정은 표준시약과 함께 gas chromatography를 이용해 측정하였다.

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 신규 담수 미세조류자원 조사·발굴

○ 본 과제의 신종 및 미기록종의 발굴 목표는 20종으로 연구 결과 2종의 신종후보 및 18종의 미기록종이 발굴되어 100%의 목표를 달성하였다(표 4-5, 부록 1)

표 4. 신규 담수 미세조류 발굴 결과

	조류
신종(후보)	2
미기록종	18
합계	20

표 5. 미세조류 신/미기록종 목록

신종(후보) 및 미기록 종 분류군 목록	
학 명	일련번호
Naviculaceae	
Haslea crucigera	미세조류-001
Navicula freesei	미세조류-002
Gomphonemataceae	
Gomphonema guaraniarum	미세조류-003
Gomphonema italicum	미세조류-004
Pinnulariaceae	
Pinnularia nodosa var. percapitata	미세조류-005
Pinnularia bertrandii	미세조류-006
Bacillariaceae	
Hantzschia considerata	미세조류-007
Achnanthaceae	
Achnanthes tumescens	미세조류-008
Eunotiaceae	
Eunotia pseudosudetica	미세조류-009
Pleurosigmataceae	
Gyrosigma sterrenbeurgii	미세조류-010
Rhaphoneidaceae	
Rhaphoneis adamantea	미세조류-011
Rhopalodiaceae	
Epithemia adnata var. *saxonica*	미세조류-012
Cymbellaceae	
Cymbella excisa	미세조류-013
Chlamydomonadaceae	
Chlamydomonas dorsoventrais	미세조류-014
Chlamydomonas moewusii	미세조류-015
Scenedesmaceae	
Coelastrella thermophila	미세조류-016
Mychonastaceae	
Mychonastes pusillus	미세조류-017
Neochloridaceae	
Neochloris aquatica	미세조류-018
Scenedesmaceae	
Tetradesmus distendus	미세조류-019
Tetradesmus reginae	미세조류-020

2. 담수 미세조류자원의 표본 확보

○ 본 과제의 표본은 미세조류를 대상으로 확보하였으며, 총 4,018점의 표본을 제작, 확보하였다.

○ 총 6문 10강 32목 60과 99속으로 구성된다.

○ 녹조류 2,559점, 돌말류 1,220점, 윤조류 60점, 남조류 60점, 유글레나조류 50점, 대롱편모조류 70점을 확보하였다(그림 6).

○ 녹조류와 돌말류의 표본 비율이 64%, 30%로 높았다.

○ 표본 4,018점 중 슬라이드표본은 2,398점, 액침표본은 1,620점을 확보하였다.

○ 확보된 표본의 정보는 담수생물자원관리시스템에 입력하고 DB화하여 관리하고 있다.

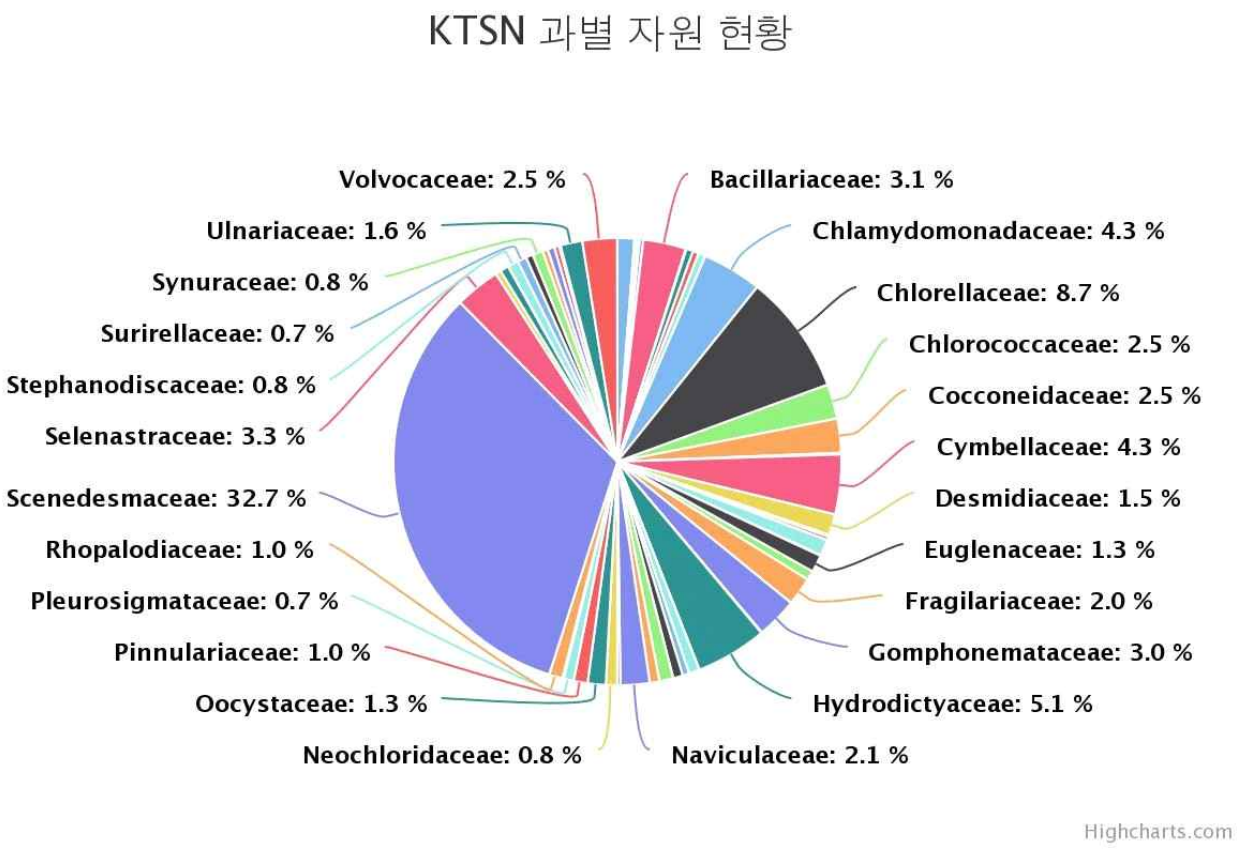

그림 6. 미세조류 표본의 분류군별 비율

3. 담수 미세조류자원의 유용정보 확보

○ 기 발굴 미세조류를 대상으로 생물소재 활용성 제고를 위한 유용정보를 확보하기 위해, 12종의 미세조류에 대한 지질성분을 분석하여 유용지질의 생산가능성을 확인하였다(부록 3).

Ⅳ. 결론

1. 담수 미세조류 조사·발굴, 표본·배양체 확보

가. 결론 및 향후 계획

(1) 결론

(가) 미세조류 신종(후보) 2종, 미기록종 18종을 발굴하여 목표 대비 100% 달성

(나) 미세조류 표본 4,018점 확보로 목표 대비 100.45% 달성

(다) 논문은 3편을 게재 완료하여, 목표 2편 대비 150% 달성

(2) 문제점 및 향후 계획

(가) 다양한 미발굴 분류군 발굴

1) 조사지역 확대, 미발굴 분류군 탐색을 통한 발굴효율을 제고

2) 휴면포자, 유해/유용 미세조류의 생태정보(채집지, 환경인자), 배양정보(배양배지, 온도, 광도), 유전자 염기서열의 확보 및 데이터베이스의 지속적인 업데이트

나. 활용 방안

(1) 보고된 종들의 확증정보를 이용하여 국가 생물주권 확립의 근거로 활용

(2) 자생생물종 목록과 다양한 생물정보를 제공함으로서, 생물자원 확보, 이용, 관리 및 보전 체계 구축에 활용

(3) 신종/미기록종 후보종의 실체를 파악, 정리하여 관련 학술지에 발표를 통해서, 국가적 차원에서 생물자원의 소유권을 국제적으로 인정

(4) 확보된 미세조류 배양체를 대상으로 유용성을 탐색하여 유용 자생생물 자원 탐색, 발굴, 체계적 보존대책 수립에 활용

(5) 조사된 신종/미기록종을 보도자료를 통해 발표함으로써 국립낙동강생물자원관의 국내 담수생물 전문연구기관으로서 위상을 창출하며, 홍보 효과 높임

(6) 다부처선진화 사업의 미세조류 계통분류 및 유용정보 확보 과제와 연관하여 자원관 보유 생물자원의 부가가치 제고에 기여

(7) 미세조류를 이용한 실용화 연구사업과 연계하여 담수 미세조류의 바이오소재 개발 연구에 활용

V. 참고문헌

배경석, 여진동, 최청일. 2002. 조양강·동강 일대 육상곤충 분포 및 변동. 생태와 환경 35(5): 359-371.

도윤호, 문태영, 남상호. 2004. 부산광역시 낙동강 하구 곤충군집의 다양성과 생태학적 특성. 자연과학 14(2): 107-119.

송영주, 김종갑, 배양섭. 2005. 한강(고양시) 고수부지의 환경변화에 따른 곤충 및 저서성대형무척추동물의 분포변화에 관한 분석. 한국습지학회지 7(4): 51-65.

이상돈, 김석철. 2008. 도림천 수변지역 조성을 위한 생태적 관리방안 및 하천환경 관리방안에 관한 연구. 한국습지학회지 10(3): 133-139.

박진영, 박성준, 차진열, 박종균. 2014. 동강 일대의 육상 곤충 다양성에 관한 연구. 한국습지학회지 16(3): 337-346.

Asai K, Watanabe T. 1995. Statistic classification of epilithic diatom species into three ecological groups relating to organic water pollution (2). Saprophilous and saproxenous taxa. Diatom 10: 35-47.

Bligh EG, Dye WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Phys. 37: 911-917.

Descy JP. 1979. A new approach to water quality estimation using diatom. Nova Hedwigia 64:305-323.

Hendey NI. 1974. The permanganate method for cleaning freshly gathered diatoms. Microscopy 32: 423-426.

Kong H, Chung D. 2002. A riboprinting scheme for identification of unknown Acanthamoeba isolates at species level. The Korean Journal of Parasitology. 40(1):25-31.

Kelly MG, Whitton BA. 1995. The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring of eutrophication in rivers. Journal of Applied Phycology 7: 433-444.

Kim HS. 1973. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea. Vol. 14, Anomura·Brachyura. Samhwa Publ. Co. Korea, 694 pp.

Kim HS. 1977. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea. Vol. 19, Macrura. Samhwa Publ. Co. Korea, 414 pp.

Kim HS. 1985. Systematic studies of crustaceans of Korea, I. Decapods. Proc. Coll. Natur. Sci., SNU. vol. 10. no. 1, 69-94.

Krammer K. 2002. Cymbella. Diatoms of Europe. Vol. 3. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by H. Lange-Bertalot. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany. 584 pp.

Krammer K, Lange-Bertalot H. 1986. Bacillariophyceae. Teil 1. Naviculaceae. Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 2/1. Gustav Fisher Verlag, Jena. 876pp.

Krammer, K, Lange-Bertalot H. 1988. Bacillariophyceae. Teil 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 2/2. Gustav Fisher Verlag, Jena. 596 pp.

Krammer K, Lange-Bertalot H. 1991. Bacillariophyceae 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Erganzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. In: H. Ettl et al., Suesswasserflora von Mitteleuropa. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena 2: 1-437 pp, 88 pls., 2048 figs.

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. The Korean Journal of Parasitology. 43(1):7-13.

Patrick R, Reimer CW. 1966. The Diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii. Vol. 1. Monographs of Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 13(1): 1-688 pp.

Shannon CE, Weaver W. 1963. The mathematical theory of communication: 1-117. - University of IllinoisPress, Urbana, Illinois.

Simonsen R. 1979. The Diatom system; Ideas on phyloheny. Bacillaria 2: 9-71.

Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. Nature 163: 688 pp.

Tsarenko PM, Wasser SP, Nevo E. Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Volume 3: Chlorophyta. 1-511 pp.

Watanabe T. 2005. Picture book and ecology of the freshwater diatoms. Uchida Rokakuho Publishing Co., Tokyo 1-666 pp.

Watanabe T, Asai K. 1990. Numerical simulation using diatom assemblage of organic pollution in streams and lakes. Review of Inquiry and Research 52: 99-139.

Watanabe T, Asai K, Houki A. 1986. Numerical estimation to organic pollution of flowing water by using the epilithic diatom assemblage-Diatom assemblages index to organic water pollution(DAIpo). The science of the total environment 55: 209-218.

Watanabe T, Asai K, Houki A, Tanaka S, Hizuka T. 1986. Saprophilous and eurysaprobic diatom taxa to organic water pollution and diatom assemblage index(DAIpo). Diatom 2: 23-73.

White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.