

간행물 등록번호

NNIBR-2021-0000235-10

담수원핵생물 조사·발굴 연구 (2단계-3차년도)

Investigation on the Prokaryotes in Freshwater Environment

원핵생물연구팀

국립낙동강생물자원관

담수원핵생물의 조사·발굴 연구 (2단계-3차년도)

담수생물연구본부 미생물연구실 원핵생물연구팀

한지혜, 김의진, 박상화, 임경준, 조자영, 정상은, 황선이, 엄정혜

Investigation on the Prokaryotes in Freshwater Environment

Ji-Hye Han, Eui-Jin Kim, Sanghwa Park, Kyoung June Yim
Ja Young Cho, Sang Eun Jeong, Seoni Hwang, Junghye Eom

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

2021

목 차

목차	i
표 목차	iii
그림 목차	iv
초록	v
I. 서론	1
1. 연구사업의 필요성	1
가. 연구사업의 배경 및 필요성	1
나. 국내외 연구동향	2
2. 연구사업의 목표	2
II. 연구방법	3
1. 시료 채집	3
가. 원핵생물 조사·발굴을 위한 시료 채집	3
2. 담수 원핵생물 순수 분리 및 미발굴종 탐색	4
가. 담수 원핵생물 배양 및 순수분리	4
나. 담수 원핵생물 미발굴종 탐색	4
3. 담수 원핵생물 미발굴종 특성 분석	5
가. 미기록종의 특성 분석	5
나. 신종후보의 국제등록을 위한 특성 분석	6
4. 신규 및 미기록 발굴종의 유용성 평가	7
가. 기발굴종의 효소활성 평가	7
5. 담수 원핵생물 자원의 다양성과 발굴효율 증대 연구	7

가. 다양한 자원 확보를 위한 배양조건 개선	7
나. 난(難)분류군의 계통학적 심화 연구	8
다. NGS 기반의 담수 원핵생물 군집 분석	9
III. 연구결과 및 고찰	10
1. 담수 원핵생물의 순수분리	10
가. 담수 원핵생물의 분류학적 분포	10
나. 채집지 및 시료별 담수 원핵생물의 분류학적 분포 비교	10
2. 담수 원핵생물의 미발굴종 탐색	15
가. 담수 원핵생물 신종 및 미기록종 발굴	15
나. 신속후보 JU-07 ^T 의 특성 분석	20
다. 신종후보 <i>Emticicia</i> sp. 21SJ11W-3 ^T 의 특성 분석	22
라. 신종후보 <i>Simiduia</i> sp. 21SJ11W-1 ^T 의 특성 분석	23
마. 신종후보 <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 21YS11W-21 ^T 의 특성 분석	23
3. 기발굴종의 유용성 평가	25
가. 기발굴종의 효소활성 검증 결과	25
4. 담수원핵생물 자원의 다양성과 발굴효율 증대 연구	26
가. 다양한 자원 확보를 위한 배양조건 개선	26
나. 난(難)분류군의 계통학적 심화 연구	27
다. NGS 기반의 담수 원핵생물 군집 분석	28
IV. 결론	31
V. 참고문헌	32
VI. 부록	별권
1. 담수 원핵생물의 신종·미기록종 기록지	
2. 기발굴 신종·미기록종 효소 활성 분석	

표 목차

표 1. 담수원핵생물 발굴을 위한 2021 년 현장 조사 채집지 정보	3
표 2. 다중유전자 분석에 활용된 유전자와 primer	8
표 3. 순수분리 담수원핵생물의 분류학적 단위에서 채집지별 다양성	11
표 4. 채집지별 순수분리 원핵생물의 강(class) 수준 분류학적 분포	11
표 5. 채집지별 순수분리 원핵생물의 속(genus) 수준 상위 주요 분류군	14
표 6. 담수원핵생물 미기록종 및 신종 후보 목록	15
표 7. 기발굴된 신종 및 미기록종의 효소활성 검증 결과	25

그림 목차

그림 1. 원핵생물 배양 효율 개선을 위한 활성산소 제거 배지 제작법	8
그림 2. 순수분리 원핵생물의 문(phylum) 수준 분류학적 분포	10
그림 3. 채집지의 시료 형태별 강(class) 수준 분류학적 분포	12
그림 4. 석호 등 특이서식환경에서 발굴된 원핵생물 미기록 16 종의 계통수	17
그림 5. 섬진강에서 발굴된 그람음성 원핵생물 미기록 18 종의 계통수	18
그림 6. 영산강에서 발굴된 그람음성 원핵생물 미기록 15 종의 계통수	19
그림 7. 영산강과 섬진강에서 분리된 그람양성 원핵생물 미기록 12 종의 계통수	20
그림 8. 신속후보 원핵생물 JU-07 ^T 균주의 극성지질분석 및 투과전자현미경 사진	21
그림 9. 신속후보 원핵생물 JU-07 ^T 균주의 Neighbour-joining 계통수	21
그림 10. 신중후보 원핵생물 <i>Emticicia</i> sp. 21SJ11W-3 ^T 균주와 <i>Simiduia</i> sp. 21SJ11W-1 ^T 균주의 Neighbour-joining 계통수	22
그림 11. 신중후보 원핵생물 3 종의 투과전자현미경 사진	23
그림 12. 신중후보 원핵생물 <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 21YS11W-21 ^T 균주의 Neighbour-joining 계통수	24
그림 13. 배지별 분리 균주의 분포 비교	26
그림 14. 공생 원핵생물 CFH1-20 균주와 표준균주의 다중유전자 분석 계통수	27
그림 15. 공생 원핵생물 CFH1-20 균주와 표준균주의 Ortho-ANI heatmap	28
그림 16. 강(class) 수준에서의 섬진강과 영산강의 지점별·계절별 NGS 기반 원핵생물 분포	28
그림 17. LefSe 분석과 PCA 를 활용한 영산강과 섬진강의 담수원핵생물 군집구조 비교	29
그림 18. 영산강과 섬진강의 계절별 원핵생물 분포에 대한 LefSe 분석 결과	30
그림 19. 영산강과 섬진강의 계절별 원핵생물 분포에 대한 PCA 결과	30

초록

본 연구과제는 국내 담수 환경에서 서식하는 원핵생물 70을 발굴하고 이들의 분류학적 특성을 분석하며, 배양체 1,700주를 확보하는 성과목표 달성을 목적으로 수행되었다. 2021년 중점적으로 조사하는 수계는 영산강·섬진강 수계와 특이서식지 석호로 선정하였으며, 섬진강 14지점, 영산강 22지점, 석호 7지점을 포함하여 총 43지점에서 시료를 채취하고 채집지의 수질 데이터를 확보하는 야외 현장 조사를 실시하였다. 특히, 섬진강과 영산강의 각 14지점은 수계별, 계절별 군집 분석을 위해 반복적으로 조사되었다. 확보된 시료는 담수 시료 107점, 하천토 37점으로 총 144점의 시료를 확보하여 담수 원핵생물 발굴에 사용하였다. 종발굴 과정에서 확보된 담수 원핵생물은 7문, 19강, 61목, 137과, 374속으로 분류되었다. 프로테오박테리아의 우점이 영산강, 섬진강, 석호에서 모두 나타났으며, 섬진강과 석호에서는 방선균의 분포가 영산강보다 훨씬 높게 나타나는 등 영산강과 구별되는 분포를 보였는데 이는 토양 시료와 기수환경에 따른 차이로 예상된다. 순수분리된 원핵생물 활성 배양체 중에서 미기록종 검증 시스템을 통해 미기록종 66종과 신종후보 4종을 발굴하였다. 발굴된 종은 Acidobacteria 1종, Actinobacteria 16종, Bacteroidetes 6종, Firmicutes 5종, Proteobacteria 41종, Verrucomicrobia 1종으로 나뉘었다. 이들은 각각 섬진강에서 26종, 영산강에서 21종, 석호 등 그 외 지역에서 17종이 발굴되었다. 모든 발굴종은 최적배양조건에서 형태학적, 생리학적, 계통발생학적 특성을 분석하여 담수생물 자원관리시스템에 입력하고 기록지로 작성되었다. 또한, 2016년부터 2020년까지 발굴된 신종 및 2021년 발굴종을 포함하여 138종의 유용성을 검증하기 위하여 amylose, arabinan, casein, cellulose, chitosan, culdian, pulluran, xylan을 분해하는 효소활성을 검증하였다. 총 29종의 신·미기록종에서 3종 이상의 복합적인 효소활성이 관찰되었으며 특히, *Streptomyces* 속은 효소 6종에 대한 활성이 관찰되었다. 또한, cellulose, xylan 등에 대한 활성이 다수 관찰되어 이들의 후속 연구를 통한 활용이 기대된다. 본 연구과제에서는 추가적으로 발굴효율과 순수분리 자원의 다양성을 증대시키기 위한 연구가 추가적으로 수행되었다. 활성산소를 제거한 배지를 도입하여 배양 자원의 다양성을 높이는 유의미한 결과를 얻었으며, 방선균문의 대표적인 난(難) 분류군인 *Streptomyces* 속의 기확보 자원을 대상으로 다중유전자 분석과 유전체 분석을 통해 표준균주의 재분류 필요성과 기확보 균주의 신규성을 확인하였다. 또한, 영산강과 섬진강의 각각 14지점에 대한 담수원핵생물 종 다양성을 분석하여 수계별, 계절적 차이를 보이는 주요 분류군들이 분석되었다. 이들의 종 분포 데이터는 향후 자원확보를 위한 배양기법 개선 방향, 중점 분류군의 목록화에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 계절에 따라 상이한 분포를 보인 분류군 중에는 전세계적으로 현재까지 배양이 어려운 candidate 분류군이 국내 담수환경에서도 우점하는 결과를 확인함으로써 중장기적으로 확보를 위한 노력이 필요함을 확인하였으며, 발원지와 상류 지역에서의 높은 다양성과 혐기성 원핵생물의 분포, 배양 우점종의 계절적 변화에 대한 정보를 활용하여 향후 담수원핵생물 발굴 전략을 개선해 나갈 수 있을 것으로 생각된다.

I. 서론

1. 연구사업의 필요성

가. 연구사업의 배경 및 필요성

생물자원에 대한 주권적 권리를 인정하는 생물다양성협약(CBD)과 생물자원의 개발과 상업적 이용에서 발생하는 이익의 공정한 공유를 명시하는 나고야의정서의 발효, 그리고 국내 유전 자원법 시행에 따라 우리나라에서도 생물자원의 보전 및 지속가능한 이용을 위해 실행계획을 수립하여 생물종을 전략적으로 발굴하고 있다. 이 중에서도 자생 원핵생물종의 발굴은 환경, 식량, 에너지를 비롯하여 거의 전 미래산업 분야에서 활용이 가능한 잠재력을 바탕으로 생물산업의 국제경쟁력 확보에 필수적이며, 특히 신종 및 미기록종의 발굴 가능성이 높은 담수 환경에 대한 집중적인 원핵생물 조사 연구 수행이 필요하다.

국가생물자원 주권 강화를 위해 환경부는 2025년까지 62,600종의 목록화를 추진 중에 있으며, 2020년 기준 54,428종의 국가생물종이 목록화되었다. 이 중 원핵생물(세균)은 3,207종(전체의 5.89%)이 발굴되었고, 그 비율이 지속적으로 증가 추세에 있으며 전 세계적으로도 점점 더 다양한 국가에서 원핵생물의 새로운 종이 보고되고 있다. 지구의 원핵생물 생물량은 약 5 x 1,030 개체에 이를 것으로 예측되는데 이는 인간 생물량의 약 1,000배에 이르며(Bar-On *et al.*, 2017), 차세대염기서열분석법의 발전에 따른 미생물 군집구조 분석 결과 종수에 있어서도 최소 백만여 종에서 천만여 종 이상 존재할 것으로 추정되는 반면 현재까지 이 중 0.5% 미만의 원핵생물종이 보고되어 향후 미발굴 분류군인 원핵생물 자원에 대한 집중 발굴이 요구된다.

원핵생물은 기본적으로 유기물을 무기물로 전환하는 분해자의 역할을 수행하며, 미소먹이 망을 통해 유기물을 상위의 영양단계로 전달하여 생물량 조절에도 관여한다. 질소, 인, 황, 철 등의 물질순환에 대한 기능이 잘 알려져 있으며, 이산화탄소와 메탄 등 온실가스의 순환에 있어 핵심적인 역할을 수행하기도 한다. 또한, 효소와 대사산물 등을 합성하여 유용 생리활성을 나타내며 이러한 특성을 활용하여 의약품, 식품소재, 환경산업 소재 등으로 높은 부가가치를 창출할 수 있다. 특히, 미생물은 최근 전통적인 식품 분야를 획기적으로 발전시켜 신산업을 육성하기 위한 마이크로바이옴, 메디푸드 등의 그린바이오 사업과 생물자원을 활용하여 기존의 화학 산업을 대체하기 위한 화이트바이오 사업과 같은 첨단기술 개발에 활용되고 있다. 세계적으로 기후변화와 환경교란 등의 문제로 기존의 석유화학 공정을 미생물 자원을 활용하는 공정으로 대체하기 위해 노력하고 있으며, 이를 실현하기 위해서는 각 공정의 특성을 대체할 수 있는 우수한 생리활성을 나타내는 미생물과 효소의 공급이 필요하고, 이는 다양한 미생물자원의 발굴과 활용가치 탐색 연구를 통해 가능할 것이다.

따라서, 국내 주요 수계를 비롯한 다양한 담수 서식지를 대상으로 하는 현장조사 및 미생물다양성 분석 연구는 담수 특이적 원핵생물의 생태학적 역할 구명과 함께 난배양성 미생물의 배양조건 모사와 이에 따른 종발굴의 효율성 증진을 위해서도 반드시 필요하다.

나. 국내외 연구동향

담수는 하천, 호소, 지하수 등의 형태로 존재하며 빙하를 제외하면 지구에 존재하는 전체 물의 약 0.6%에 불과하지만 인간의 생존에 필수적인 자원이며(Wetzel, 2001), 산업화에 따른 기후변화와 환경훼손에 가장 민감하여 1970년 이후 담수 생물종의 84%가 급감하였다. NGS 기반의 대용량 염기서열 정보를 이용한 담수 시료 내 미생물 군집구조 분석 결과는 육상이나 해양에 존재하는 미생물 분석 결과와 뚜렷한 차이를 보여 환경의 고유성을 보여주고 있다. 미생물의 군집구조는 담수 환경 내에서도 유형별, 유역별, 계절별로 높은 변동성을 보이며 특히, 방선균 (Actinobacteria), 알파 및 베타 프로테오박테리아(Proteobacteria), 남세균(Cyanobacteria), 베루코마이크로비아(Verrucomicrobia) 등이 우점하고 있는 특이적인 양상을 나타낸다. 유럽의 주요 담수환경에서 알파 프로테오박테리아의 가장 많은 양을 차지하며 여름철 수층에서 우점하는 LD12 그룹은 2018년 최초로 인공 배양에 성공하였으며(Hensen *et al.*, 2018), 방선균 중 전지구의 호소에서 가장 풍부하게 존재하는 acI 그룹은 2019년 최초로 소양호에서 배양되었다(Kim *et al.*, 2019). 그럼에도 불구하고 아직까지 acIV, acV 등 여러 우점 미생물 그룹이 배양되지 않고 있어 미발굴 및 난배양성 미생물이 많이 서식하고 있을 것으로 추정된다. 최근에는 이러한 방선균에 속하는 난배양 분류군들에 대하여 표준균주 배양체 없이도 유전체 분석을 통해 이들의 특성과 생태학적 역할을 구명하고자 하는 연구가 발표되고 있으며, 이러한 분류군들은 Candidatus 분류군으로 보고되고 있다(Neuenschwander *et al.* 2018).

2. 연구사업의 목표

본 사업에서는 영산강과 섬진강 수계를 중심으로 하천, 습지, 기수역 등 담수 서식지의 이화학적 정보를 조사하고 시료를 채집하고자 한다. 국내 주요 수계 중 영산강은 전라남도 담양군의 가마골 용소에서 발원하여 서해로 흐르며 길이는 115.5 km, 유역면적은 3,371 km²에 이른다. 섬진강은 전라북도 진안군의 데미샘에서 발원하여 남해로 흐르며 길이는 223.8 km, 유역면적은 4,911 km²이며 5대강 중 하구둑이나 보가 없어 기수 환경이 존재하면서 수질이 가장 깨끗한 것으로 알려져 있다. 또한, 석호는 해수와 담수 환경의 중간지점에 속하며 생물종의 다양성이 매우 높은 곳으로 다양한 자원의 발굴에 효율적일 것으로 기대되는 특이서식지이다. 본 연구과제에서는 신종 및 미기록종 후보 70종을 발굴하기 위해 하천수, 하천토와 생물시료로부터 원핵생물을 분리하여 배양체를 확보하고, 이들의 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 1,350 bp 이상의 유전정보를 확보하고자 한다. 또한 분류학적 증거 확보를 위해 투과전자현미경 화상자료 및 배지, 온도, 배양 기간 등의 배양정보, 그리고 다상학적 분류 특성을 분석하고자 한다. 발굴종 70종과 배양체 1,700주에 대한 정보 목록과 서식지 정보를 담수생물자원관리시스템에 입력하여 활용 기반을 마련하고, 마지막으로 발굴종의 활용가치 탐색을 위해 유용효소 활성 보유 여부를 조사하고자 한다.

II. 연구방법

1. 시료 채집

가. 원핵생물 조사·발굴을 위한 시료 채집

2021년 담수 원핵생물의 발굴을 위한 중점 조사 수계는 중장기 계획에 따라 영산강과 섬진강으로 선정하였다. 섬진강과 영산강은 본류와 대하천 지류를 포함하여 각각 14지점, 22지점에서 시료를 채취하였으며, 그 외에 특이서식지로 강원도 일대의 석호 7지점을 추가하여 총 43지점의 담수 환경을 조사하였다(표 1). 특히, 2021년에는 원핵생물의 종 다양성 분포와 수계별, 계절별 차이를 비교 분석하기 위한 30지점에 대해서는 3회 반복하여 조사를 진행하였으며, 모든 현장 조사는 이동식 다항목수질측정기(YSI)를 통해 채집지 담수의 온도, pH, 전기전도도, 용존산소, 염도 등의 데이터를 함께 측정하였다. 현장 조사를 통해 확보된 시료는 담수 시료 총 107점, 하천토 시료 37점을 포함하여 총 144점이 확보되었으며, 원핵생물 분리를 위한 도말 전까지 저온에서 보관하였다.

표 1. 담수원핵생물 발굴을 위한 2021년 현장 조사 채집지 정보

번호	채집지 코드	채집지 GPS	수계	채집지 상세	비고
1	21SJ01	N 35.659031, E 127.471694	섬진강	데미샘	발원지
2	21SJ02	N 35.655544, E 127.225194		호원교	본류
3	21SJ03	N 35.587471, E 127.105020		옥정호	본류
4	21SJ04	N 35.520185, E 127.118017		백일	본류
5	21SJ05	N 35.496203, E 127.190908		강변사리마을	본류
6	21SJ06	N 35.273282, E 127.325496		고달리잠수교	본류
7	21SJ07	N 35.193180, E 127.375249		압록교	본류
8	21SJ08	N 35.165954, E 127.454473		구례구역	본류
9	21SJ09	N 35.199576, E 127.600245		외곡삼거리	본류
10	21SJ10	N 35.063034, E 127.741086		섬진교	본류
11	21SJ11	N 34.995413, E 127.777014		청해소재	본류
12	21SJ12	N 35.140019, E 127.112871		동북	동북댐, 동북호
13	21SJ13	N 35.000459, E 127.118053		합수	상수원 합류
14	21SJ14	N 35.071342, E 127.235951		주암호캠핑장	주암댐
15	21YS01	N 35.447205, E 127.019752	영산강	가마골 용소	발원지
16	21YS02	N 35.365650, E 127.023274		담양댐 하단	본류
17	21YS03	N 35.324610, E 126.983844		담양	본류
18	21YS04	N 35.177769, E 127.029472		영산강 상류	광주댐
19	21YS05	N 35.237851, E 126.874616		우치	본류
20	21YS06	N 35.002027, E 126.709305		나주	본류
21	21YS07	N 34.900032, E 126.525201		무안	본류

번호	채집지 코드	채집지 GPS	수계	채집지 상세	비고
22	21YS08	N 34.786694, E 126.463416		영산호(하구둑)	본류
23	21YS09	N 34.798722, E 126.529583		영암천 합수	영암천 합류
24	21YS10	N 34.784111, E 126.720166		영암천 상류	영암천 상류
25	21YS11	N 35.408942, E 126.865051		장성호	황룡강 상류
26	21YS12	N 35.090769, E 126.801471		합류지점	황룡강 합류
27	21YS13	N 35.130767, E 126.620478		환곡교	고막원천 상류
28	21YS14	N 34.985411, E 126.583298		중천포나루터	고막원천 합류
29	21YS15	N 34.966449, E 126.865246	영산강	나주호	지석천 상류
30	21YS16	N 35.037066, E 126.732770		나주대교	지석천 합류
31	21YS17	N 35.293778, E 126.772939		제2황룡교	황룡강 중간지점
32	21YS18	N 35.033023, E 126.593398		함평고막천석교	고막원천 중간지점
33	21YS19	N 35.444416, E 126.775722		개천 목란제	황룡강 상류
34	21YS20	N 35.458388, E 126.797277		북미천 백암제	황룡강 상류
35	21YS21	N 35.441861, E 126.754305		방장산	황룡강 상류
36	21YS22	N 35.461111, E 126.840611		장성수련원	황룡강 상류
37	L1	N 37.952547, E 128.768976		매호	염도 5.51%
38	L3	N 38.037620, E 128.700504		염개호	염도 0.26%
39	L5	N 38.102356, E 128.647384		가평리 습지	염도 0.70%
40	L6	N 37.820214, E 128.887311	석호	순포 습지	염도 0.83%
41	L7	N 37.792625, E 128.896796		경포호	염도 23.59%
42	L8	N 38.253831, E 128.555642		천진호	염도 0.06%
43	L9	N 37.911743, E 128.806013		향호	염도 6.05%

2. 담수 원핵생물 순수 분리 및 미발굴종 탐색

가. 담수 원핵생물 배양 및 순수분리

모든 시료는 완충용액(PBS buffer, Gibco)으로 희석하여 R2A agar, Tryptic soy agar, Nutrient agar, Marine agar, ISP 4 agar, Actinomycete agar, Humic acid vitamin agar, 1/10 tryptic soy agar, 1/10 nutrient agar, 1/10 marine agar 및 환경모사배지 등 12종 배지에 도말하였다. 도말한 배지는 원핵생물의 분리를 위하여 20°C, 25°C, 및 30°C에서 최소 2주 동안 배양하였다. 배지에서 자란 원핵생물의 집락(colony)을 색상, 모양 등 형태학적 특성에 기초하여 선별하고 동일한 배지에서 계대 배양하며 순수도를 확인하였다.

나. 담수 원핵생물 미발굴종 탐색

순수분리된 원핵생물은 고농도, 고순도의 genomic DNA를 추출한 뒤에 universal primer

인 27F 와 1492R primer를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 염기서열을 분석은 518F 와 800R primer를 이용하였으며, 양방향의 서열을 연결한 뒤에 primer binding 부분을 제외한 1,350bp 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하였다. 확정된 염기서열은 EZ-biocloud (Yoon *et al.*, 2017; <https://www.ezbiocloud.net>) 서버를 이용하여 근연종과의 유사도를 확인하였다. 염기서열이 확정된 원핵생물의 채집지, 분리 정보, 계통분류 정보, 염기서열 정보, 배양 정보 등을 담수생물자원관리시스템에 입력하여 자원번호를 부여받았다. 표준균주와의 염기서열 유사도가 98.7% 이상이면서 근연종과 계통수에서 단일 계통으로 cluster를 형성하고 국내에서 보고되지 않은 원핵생물은 미기록종 후보로 판단하였고, 98.7% 미만의 유사도를 보이는 원핵생물을 신종 후보로 판단하였다(Kim *et al.*, 2014). 미기록종 탐색은 한반도생물다양성의 미생물 검증 시스템을 이용하였으며(<https://species.nibr.go.kr/server/gatePage.do>), 국가생물종목록 및 타 기관의 발굴 종목록과 중복되지 않도록 검토 후에 최종적으로 미기록종 후보를 결정하였다.

3. 담수 원핵생물 미발굴종 특성 분석

가. 미기록종의 특성 분석

1) 16S rRNA 유전자를 이용한 분자계통학적 분석

확정된 미기록종의 16S rRNA 유전자 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI)에 등록하였으며, Ez-biocloud 서버에서 확인한 근연종들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 분자계통학적인 유연관계를 분석하였다. 유전자 염기서열의 정렬을 위해 EZ editor ver. 2 (Jeon *et al.*, 2014) 프로그램을 사용하였고, MEGA ver. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) 프로그램을 연계하여 계통수를 작성하였다. 계통수는 Jukes & Cantor의 one parameter distance (Jukes & Cantor, 1969) 모델과 Neighbour-joining treeing (Saitou & Nei, 1987) 알고리즘을 사용하여 작성하였으며, Bootstrap (Felsenstein, 1985) 방법을 통하여 계통수의 견고성을 검증하였다.

2) 형태 및 생리학적 특성 분석

최적의 생장 조건에서 배양된 미기록종 원핵생물은 집락의 색상, 모양과 고도를 포함하는 형태학적 특성이 관찰되었으며 화상 자료로 확보되었다. 또한, 세포 수준에서의 크기, 편모 유무를 포함하는 형태학적 특성 분석을 위하여 계대 배양 후 지수기(exponential phase)의 원핵생물 집락을 이용하여 전자현미경 분석용 grid 시료를 제작하고 2% uranyl acetate로 염색 후 투과전자현미경 (Jeol, JEM-1400Plus; Hitachi, H-7650)을 이용하여 화상 자료를 확보하였다. 생리학적 특성은 API 20NE(BioMérieux)를 이용하여 질산염 환원, 인돌 생산능, 포도당 발효 및 arginine dihydrolase, urease, β -glucosidase, β -galactosidase, gelatinase 효소의 활성과 12가지 탄소원에 대한 당화시험을 진행하였다. 또한, 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride 용액을 이용하여 산화효소의 유무를 판단하고, 그람 염색으로 그람양성과 음성을 판별하였다.

3) 미기록종 정보의 데이터베이스화 및 보존

모든 미기록종의 분류학적 특성 분석 결과와 채집 정보, 분류체계, 계통수, 유전자 염기서열 국제등록 번호 및 국립낙동강생물자원관 생물자원번호 등은 담수생물자원관리시스템에 모두 입력되었으며, 기록지에 작성되었다(부록). 본 연구 과제를 통해 분리된 원핵생물은 활성 배양체를 국립낙동강생물자원관 생물자원은행에 내부 기탁하였으며, 미기록종의 경우 20% 글리세롤을 동결보존제로 이용하여 -80°C의 초저온 냉동고에 추가적으로 보존하였다.

나. 신종후보의 국제등록을 위한 특성 분석

1) 형태 및 생리학적 특성 분석

신종 후보 원핵생물의 최적 성장조건은 배지, 온도, pH, 염분 및 산소 요구성에 대한 분석을 통해 결정하였다. 최적 성장 조건의 집락을 이용하여 세포의 크기, 모양 및 편모의 유무 등 형태학적 특성은 한국기초과학지원연구원의 투과전자현미경(Jeol, JEM-1400Plus) 분석 서비스를 통해 분석하였다. 신종 후보 원핵생물의 고분자 물질 분해 검증은 최적 성장 배지를 기본으로 하는 배지에 casein(5% skimmed milk, w/v), starch(0.3%, w/v), xanthine(1%, w/v), hypoxanthine(1%, w/v), tyrosine(1%, w/v), CM-Cellulose(1%, 0.008% tryphan blue), tween 20(1%, w/v), tween 40(1%, w/v), tween 60(1%, w/v), tween 80(1%, w/v)을 첨가한 배지와 DNase agar(DNase test agar with methyl green; BD)에 균주를 접종하여 분해효소의 생산 유무를 판단하였다. Cytochrome oxidase와 Catalase의 생성유무는 각각 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 용액과 3% 과산화수소를 이용하여 판별하였다. 또한, API 20NE, API ZYM 및 API 50CH strip을 이용하여 질산염 환원, 인돌 생산능, 25가지의 효소 생산 유무 및 49가지 탄소원에 대한 산화, 발효, 이용여부를 검증하였다. Biolog GEN III microplate를 이용하여 71가지 탄소원 이용능과 23가지 화학물질에 대한 민감성을 분석하였다. 모든 생리학적 특성 분석은 신종 후보의 근연종 표준균주와 동시에 수행되어 신규성 검증의 증거로 활용되었다.

2) 분류화학적 특성 분석

신종 후보와 표준균주 근연종의 지방산(fatty acid) 분석은 최적 배양된 균체를 유리관에 모아서 비누화, 메틸화, 추출 및 세척 과정을 거쳐 가스크로마토그래피와 Sherlock Microbial Identification System ver. 6.2로 균주별 지방산의 조성비율을 분석하였다. 퀴논(respiratory quinone)은 활성균체의 세포벽에서 추출하여 고성능 액체크로마토그래피를 통해 근연종과 결과를 비교하였다. 극성지질(polar lipid)은 동결건조 균체에서 추출하여 박층크로마토그래피를 통해 전개하고 극성지질 검출 시약인 molybdophosphoric acid, ninhydrin, molybdenum blue spray, α -naphthol, periodic acid 및 schiff 용액을 통해 종류를 분석하였다 (Tindall *et al.*, 1987).

3) 분자계통학적 특성 및 전장 유전체 분석

신종 후보 원핵생물의 16S rRNA 유전자 염기서열은 EZ-biocloud 서버 (Yoon *et al.*, 2017; www.ezbiocloud.net)를 이용하여 공인된 표준균주들과 비교분석하였고, EZ-editor (Jeon *et al.*, 2014) 프로그램을 사용하여 정렬하였으며, MEGA ver 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) 프로그램을 이용하여 근연종과의 유연관계를 분석하였다. 계통학적 유연관계 분석을 위해 작성되는 계통수는 one parameter model (Jukes & Cantor, 1969)을 기반으로 하여 Neighbour-joining(NJ), Maximum parsimony(MP) 및 Maximum likelihood(ML) 알고리즘을 이용하여 작성하였으며 (Saitou & Nei, 1987; Felsenstein, 1981), 계통수의 견고성을 검증하기 위해 Bootstrap 방식을 통해 1,000번의 반복 분석을 진행하였다 (Felsenstein, 1985).

4. 신규 및 미기록 발굴종의 유용성 평가

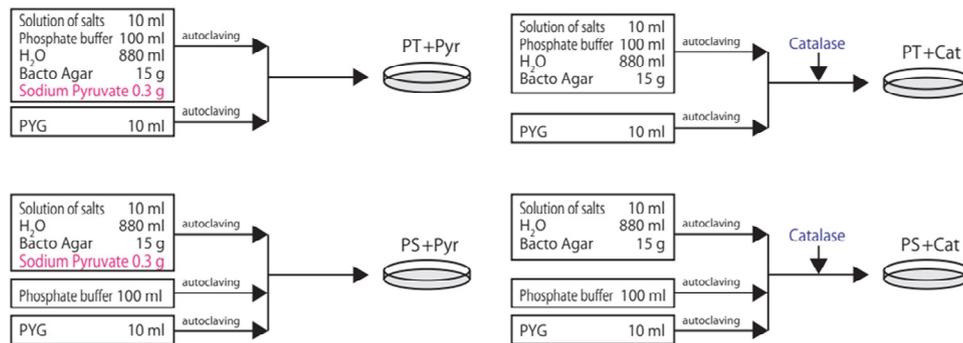
가. 기발굴종의 효소활성 평가

기발굴된 신종 및 미기록종 원핵생물의 유용성 검증을 위하여 8가지 기질을 대상으로 효소 활성을 분석하였다. 활성평가에 사용된 원핵생물 종은 2021년에 발굴된 신종 및 미기록종 122 종과 기발굴 신종을 대상으로 하였으며, 대량의 균주를 동시에 분석하기 위하여 기발굴된 원핵생물의 다수가 최적의 생장을 보이는 R2A agar를 기본배지로 선정하였다. 효소활성은 각각 amylose, arabinan, casein, cellulose, chitosan, culdlan, pulluran, xylan 의 색소기질을 첨가한 배지를 제작하여 균주를 접종하고 3일, 7일, 14일 후에 기질이 분해되어 색소가 용해된 결과를 통해 효소활성 여부를 판단하였다.

5. 담수 원핵생물 자원의 다양성과 발굴효율 증대 연구

가. 다양한 자원 확보를 위한 배양조건 개선

한천(agar)을 사용하여 고체배지를 제작하는 과정에서 한천과 인산염(phosphate)이 만나 생성되는 활성산소(과산화수소)는 환경에 존재하는 많은 원핵생물의 생장을 저해할 수 있으므로 이를 제거하는 방법을 적용하여 배양되는 원핵생물의 다양성을 높이기 위해 배양조건을 개선하고자 하였다. 최근에 난배양성 원핵생물의 배양을 위해 고안된 방법이 보고된 논문을 인용하여 인산염과 한천을 별도로 멸균하여 배지를 제작하거나, 스케빈저로 피브루산 나트륨(sodium pyruvate) 혹은 카탈라아제(catalase)를 첨가하여 활성산소를 제거하는 배지를 제작하고, 일반적인 방법으로 제작된 배지의 원핵생물 다양성을 비교하였다. (Kawasaki & Kamagata, 2017; Kato *et al.*, 2020, Kim *et al.* 2019).



(Kawasaki & Kamagata, 2017)

그림 1. 원핵생물 배양 효율 개선을 위한 활성산소 제거 배지 제작법

나. 난(難)분류군의 계통학적 심화 연구

1) 난(難)분류군의 다중유전자 분석

대표적인 방선균의 난(難) 분류군인 *Streptomyces* 속의 기확보 균주와 일본의 국제표준균주 은행(JCM)에서 분양받은 표준균주를 균주별 최적의 배양조건에서 배양하였다. 배양된 균체는 3일 후에 모아서 genomic DNA를 추출하였으며, 고순도·고농도의 DNA를 다중유전자 증폭을 위해 사용하였다. 다중유전자 분석은 5개의 단백질 유전자로 선정하였으며, 표 2와 같이 각 유전자의 특이적인 primer를 사용하여 증폭하고 염기서열을 분석하였다(Guo *et al.* 2008). 분석된 염기서열은 trimming 후에 MEGA ver 7.0을 활용하여 양방향 서열을 연결하였으며, 향후 연결된 서열을 모두 활용하여 계통수를 분석하였다.

표 2. 다중유전자 분석에 활용된 유전자와 primer

Gene	Primer	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size(bp)
<i>gyrB</i>	<i>gyrBPF</i>	GTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCGGCAAGTTCGGC	1305
	<i>gyrBPR</i>	GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCGCCAT	
<i>rpoB</i>	<i>rpoBPF</i>	GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC	994
	<i>rpoBPR</i>	CCTCGTAGTTGTGACCCCTCCACGGCATGA	
<i>trpB</i>	<i>trpBPF</i>	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA	822
	<i>trpBPR</i>	TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC	
<i>recA</i>	<i>recAPF</i>	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC	913
	<i>recAPR</i>	GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG	
<i>atpD</i>	<i>atpDPF</i>	GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC	998
	<i>atpDPR</i>	GTGAACTGCTTGCGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA	

2) 재분류 대상 균주의 전장 유전체 분석

고순도·고농도의 genomic DNA는 정량, 정성 분석을 통해 전장 유전체 분석 가능 여부를 확인한 뒤에 전장 유전체 분석을 위하여 DNA 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 PacBio RSII 또는 Sequel 장비와 HiSeq(Illumina)을 모두 활용하여 대용량 염기서열 분석을 진행하고 데이터를 확보하였다. 확보된 전장 유전체 데이터는 trimming과 assembly 후, 유전자 분석과 주석달기를 통해 분석을 완료하였다. 또한, 원핵생물의 종을 판별하기 위한 국제규격에 따라 OAT 프로그램을 이용하여 Orthologous Average Nucleotide Identity (orthoANI, Lee *et al.*, 2015), Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC, Meier-Kolthoff *et al.*, 2013) 값을 구하고 근연종 표준균주와 비교 분석하였으며, 다중유전자 분석 결과와의 비교를 통해 계통학적 재분류를 완료하였다.

다. NGS 기반의 담수 원핵생물 군집 분석

수계별, 계절별로 채집된 담수 시료는 원핵생물만을 분석하기 위하여 시료별로 2L씩 동일한 양을 3 μ m 필터로 여과한 뒤에, 0.2 μ m 필터에 농축하여 분석에 활용하였다. 각 시료별로 2장의 필터를 DNA 추출에 활용하여 MO-BIO PowerSoil[®] DNA isolation kit를 사용하였다. 추출된 DNA는 RNA 및 단백질 존재 유무, DNA 절단 유무 등을 정성적으로 분석하기 위해 전기영동을 수행하였으며, Picogreen 방법을 이용하여 이중나선 DNA에만 특이적으로 반응하는 형광표지를 통하여 정량적으로 분석하였다. 정량, 정성적으로 분석된 DNA는 원핵생물 특이적인 프라이머를 이용하여 16S rRNA 유전자의 V3-V4 위치를 증폭시켜 라이브러리를 제작하였으며, 이때 향후 결과 분석을 위해 각 시료별로 바코드 프라이머를 이용하였다. 숙주의 DNA 추출에 의한 영향을 확인하고 NGS 플랫폼을 사용할 수 있도록 증폭된 시료를 다시 정성, 정량적인 분석을 진행하였으며, 적정 기준에 부합하는 시료는 마크로젠에 의뢰하여 Illumina사의 Miseq 플랫폼을 이용하여 분석하였다. 대량 염기서열 분석 완료 후 생성된 raw 데이터는 바코드에 따라 시료별로 분리하였으며, 바코드와 프라이머 증폭 부분을 분석에서 제거하였고, 길이가 짧은 서열, 낮은 퀄리티를 보이는 서열, extra long tail을 분석에서 제외하여 분석용 데이터를 제작하였다. 서열의 분류학적 동정과정에서 나타나는 non target 서열을 분석에서 제외하였고, UCHIME (Edgar *et al.* 2011) 프로그램을 통해 chimera 여부를 판정하고 이를 최종 분석에서 제외하였다. 알파 및 베타 다양성 분석을 위하여 전체 염기서열을 97% 기준으로 Operational taxonomic units (OTUs)를 결정하였으며, 이들은 CD-HIT 프로그램(Li & Gozik, 2006)의 de novo clustering 방법에 따라 결정되었다. 분석용 데이터는 EZ taxon-e 데이터베이스를 기준으로 BLASTN과 pairwise 정렬을 이용하여 계통분류학적 분석을 하고 동정하였으며, 최종적으로 분석된 데이터를 기반으로 주성분 분석과 선형 판별분석 효과 크기 방법(LefSe)을 활용하여 시료별 데이터를 비교하였다(Segata *et al.*, 2011).

III. 연구결과 및 고찰

1. 담수 원핵생물의 순수분리

가. 담수 원핵생물의 분류학적 분포

섬진강과 영산강 유역에서 채집된 담수와 강변 토양 시료는 희석도말법을 활용하여 10 여종의 배지에 도말하였으며, 겨울철 시료는 20°C에서 여름철 시료는 25°C에서 7일 이상 배양하였다. 배양 후에 자란 원핵생물 집락의 색상, 모양 등 형태적인 특성을 기준으로 다양한 원핵생물을 순수분리하였으며 배양된 원핵생물은 순수도를 확인 후에 염기서열 분석을 진행하였다. 확보된 모든 자원은 7문, 19강, 61목, 137과, 374속으로 분류되었으며, 문(phylum) 수준에서는 상대적으로 원핵생물 배양의 주요 분류군으로 보고되어 왔던 Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes 순으로 높은 비율을 보였다. 그 외에 배양과 보존이 어려운 것으로 알려져 있던 Verrucomicrobia, Acinobacteria, Deinococcus-Thermus 문에 속하는 소수의 균주가 분리되는 성과를 얻었다(그림 2). 이러한 소수의 균주들은 특히, 영산강과 석호 시료에서 배양되었으며, 영산강 분류로 합류되는 황룡강, 장성호, 영암천 등의 대형 지류에서 분리되어 상류지역의 지류 환경이 다양한 자원의 확보에 효율적임을 보여주었다.

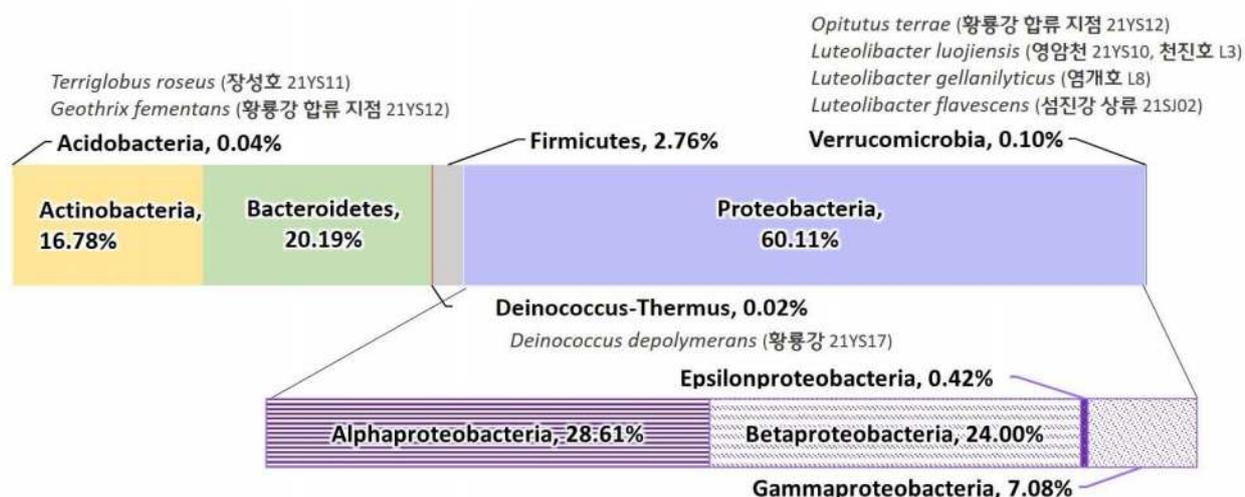


그림 2. 순수분리 원핵생물의 문(phylum) 수준 분류학적 분포

나. 채집지 및 시료별 담수 원핵생물의 분류학적 분포 비교

영산강과 섬진강 및 석호로 수계를 구분하여 배양된 담수원핵생물의 분포를 비교하였다. 그 결과 분류학적 단위에 따른 수계별 다양성은 영산강에서 가장 높았으며, 섬진강, 석호의 순으로 나타났다(표 3). 영산강의 시료에서 가장 다양한 자원이 확보된 이유는 가장 많은 지점에서 채집하여 시료의 수와 확보된 균주의 수가 압도적으로 많았던 것이 영향을 준 것으로 판단된다. 특히, 문(phylum)수준부터 과(family) 수준까지는 영산강의 다양성이 매우 높았으나, 속(genus) 수준에서는 섬진강의 시료와 비슷한 다양성을 보여 가장 많은 시료 수에도 불구하고,

다양한 자원의 확보에는 효율성이 상대적으로 낮은 것으로 파악되었다. 특이서식지인 석호의 경우 상대적으로 시료 수와 균주가 적음에도 불구하고 중복이 적은 다양한 자원이 분리되어 자원 발굴의 측면에서 매우 효율적인 결과를 보여주었다. 이는 석호가 해수와 담수의 영향을 동시에 받아 환경 조건에서 다양한 변화가 있었기 때문인 것으로 유추해 볼 수 있으며, 실제로도 해양에서 주로 발견되는 종과 담수에서 주로 발견되는 종이 동시에 분리되는 결과를 보였다.

표 3. 순수분리 담수원핵생물의 분류학적 단위에서 채집지별 다양성

구분	문 (phylum)	강 (class)	목 (order)	과 (family)	속 (genus)	비고*
영산강	7	18	50	104	232	39
섬진강	5	12	42	81	230	27
석호	5	14	41	73	186	12

* 순수분리에 활용된 시료의 수(담수 및 토양)

표 4. 채집지별 순수분리 원핵생물의 강(class) 수준 분류학적 분포

문 (phylum)	강 (class)	영산강 (YS)	섬진강 (SJ)	석호 (L)
Acidobacteria	Acidobacteriia	0.04 [†]	- [‡]	-
	Holophagae	0.04	-	-
Actinobacteria	Acidimicrobiia	0.04	-	0.10
	Actinomycetia	9.51	24.76	20.10
	Thermoleophilia	0.08	0.17	0.10
Bacteroidetes	Bacteroidia	-	-	0.30
	Chitinophagia	1.17	2.17	1.31
	Cytophagia	3.10	0.63	2.61
	Flavobacteriia	17.65	10.69	8.14
	Sphingobacteriia	2.34	3.72	2.91
Deinococcus-Thermus	Deinococci	0.04	-	-
Firmicutes	Bacilli	1.37	5.32	1.71
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	30.11	23.90	33.17
	Beta-proteobacteria	27.97	19.84	21.41
	Epsilon-proteobacteria	-	0.57	1.21
	Gamma-proteobacteria	6.45	8.18	6.73
Verrucomicrobia	Opitutae	0.04	-	-
	Verrucomicrobiae	0.04	0.06	0.20

† 백분율(%); ‡ 분리균주 없음

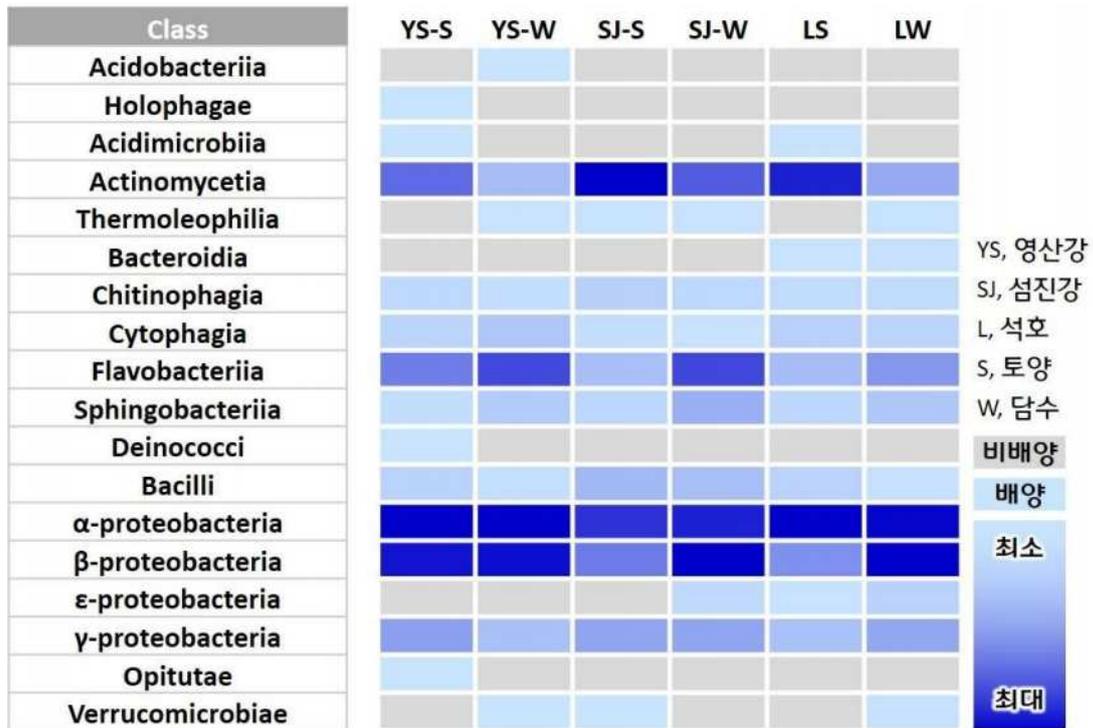


그림 3. 채집지의 시료 형태별 강(class) 수준 분류학적 분포

배양된 자원의 원핵생물 분류학적 분포는 수계에 상관없이 매우 유사한 분포를 보였는데, Proteobacteria의 가장 높은 우점은 모든 채집지에서 공통적으로 나타났다. 특히, 강(class) 수준에서의 분포를 보면 모든 채집지에서 Alpha-proteobacteria와 Beta-proteobacteria의 비율이 매우 높게 확인되는 결과를 보였다(표 4). 수계별로 영산강에서는 Beta-proteobacteria(30.11%), 섬진강에서는 Actinomycetia(24.76%), 석호에서는 Alpha-proteobacteria(33.17%)의 비율이 가장 높게 나타났다. 수계에 따라 큰 차이를 보이는 분류군은 Proteobacteria의 Epsilon-proteobacteria와 Actinomycetia, Flavobacteriia 분류군이었는데 영산강의 분포가 그 외 2개의 채집지 결과와는 구별되는 독특한 분포를 보였다. 섬진강과 석호에서 Actinomyceita의 비율이 20% 이상을 보이며, Alpha 및 Beta-proteobacteria와 비슷한 수준으로 분리된 것과는 다르게 영산강은 Actinomycetia의 비율이 9.5%에 머무르며 상대적으로 낮은 분포를 보여주었다. 그러나 Flavobacteriia의 경우 오히려 반대되는 결과를 보여 영산강에서만 17.6%로 매우 높은 비율을 보여, 이는 시료에 의한 영향도 있을 것으로 예상되어 각 수계별 토양과 담수 시료에 따른 분류학적 분포를 비교해 보았다(그림 3). 그 결과, 대부분의 시료에서 가장 높은 비율을 보인 분류군은 Alpha-ptoteobacteria 혹은 Beta-proteobacteria 였으나 섬진강과 석호의 토양 시료에서만 Actinomycetia 분류군이 가장 높은 비율로 분석된 것이 확인되었다. 섬진강과 석호의 경우 담수와 토양의 분포에서 확연한 차이를 보인 것이다. 그러나, 영산강의 경우 토양과 담수 시료 모두 Alpha 및 Beta-proteobacteria의 비율이 압도적으로 나타나며, 시료에 의한 영향이 적은 것으로 확인되며, 시료에 따른 차이가 수계별 차이에도 영향을 준 것으로 생각되었다.

비율이 아닌 특정 분류군의 배양 유무에서도 영산강은 섬진강이나 석호와는 차별화된 분포를 보였는데 영산강에서만 Acinobacteriia, Holophagae, Deinococci, Opitutae 분류군이 배양되었으며 이들은 난배양 분류군에 포함되는 분류군들이었다. 이는 많은 수의 시료를 활용함으로써 다양한 연구자의 배양·분리 기술이 적용된 결과로 생각된다. 반면, 섬진강과 석호에서만 Epsilon-proteobacteria가 분리된 결과는 이 분류군이 주로 해양을 서식지로 하는 원핵생물이 포함되는 분류군으로 기수환경을 포함하는 섬진강과 해수의 출입이 있는 석호의 환경요인이 크게 작용한 것으로 생각된다.

속(genus) 수준에서 높은 비율을 보인 상위 분류군은 채집지에 상관없이 공통적인 분류군들이 많았는데, 이들은 다른 연구에서도 담수 환경에서 주로 배양되어왔던 분류군이었으며(표 5), 이러한 분류군들은 NGS 결과에서도 주요 분류군으로 분석되어 배양학적 방법과 DNA 기반의 연구에서 일관된 결과를 보여주었다. 특히, *Flavobacterium* 속은 모든 채집지에서 1순위 담수 환경의 대표 분류군으로 분석되었으며, 신종 후보인 경우가 많아 지속적으로 이들의 생태학적 특성 분석을 통한 담수 환경의 역할 구명이 필요함을 확인하였다. 또한, *Flavobacterium* 은 색소를 생산하는 대표적인 분류군으로 이들 자원의 색소체 연구 등 활용 분야를 확대해나갈 수 있을 것으로 예상된다. *Flavobacterium*을 제외하고 모든 채집지에서 공통적으로 상위의 비율을 보인 대표적인 분류군은 *Rhodofexax*, *Sphingomonas*, 및 *Nocardioides* 였으며, 각각의 채집지에서 모두 2% 이상의 비율을 보였다. Gamma-proteobacteria의 비율이 모두 10% 미만이었던 결과에 비하면 *Sphingomonas* 속이 주요 속으로 분석된 것은 매우 의외의 결과였으며, 이 분류군은 특히 다양한 분해 능력을 보유한 분류군이기 때문에 이들에 대한 후속 연구로의 활용이 기대된다. 또한, 대부분의 상위 분류군이 Proteobacteria 문에 속했는데, 영산강에서는 상위 15 분류군 중에 Alpha 강이 4속, Beta 강이 4속, Gamma 강이 4속으로 총 12속을 차지했으며, 섬진강은 Alpha 강이 2속, Beta 강이 2속, Gamma 강이 4속으로 8속을 차지했고, 석호는 Alpha 강이 4속, Beta 강이 2속, Gamma 강이 3속으로 총 9속을 차지했다. 영산강 시료에서의 분류학적 분포가 강 수준에 이어서 속 수준까지도 Proteobacteria가 가장 주요한 분류군임을 다시 한번 확인할 수 있었다. 섬진강과 석호의 시료에서도 강 수준에서 방선균의 Actinomycetia 분류군이 주요 분류군이었던 결과가 그대로 반영되어 방선균의 4속이 상위 순위에 주로 분포된 결과를 보여주었다. 특히, *Nocardioides* 속을 제외하면 서로 다른 방선균이 주요 속으로 분석되는 결과를 보여주어, 상위 속을 분석한 결과가 각 시료에서 공통적인 분류군과 차이를 보여주는 분류군을 파악하는데 충분한 정보를 제공함을 알 수 있었다. 전체적으로 1% 이상의 비율을 보인 주요 속은 영산강 20속, 섬진강 24속, 석호 27속뿐이었으며 분리 균주 대부분이 1% 미만의 소수로 분리되는 결과를 보였다. 전체에서 1% 이상의 비율을 보이는 주요 속으로 분리된 균주의 비율은 영산강, 섬진강, 석호에서 각각 62.8%, 55.7%, 60.0%로 우점하는 결과를 보여주었고, 주요 속은 영산강 232속 중의 8.6%, 섬진강 230속 중의 10.4%, 석호 186속 중의 14.5%를 차지하여 영산강에서 배양된 균주의 분포가 중복되거나 배양 우점하는 분류군에 의한 영향이 가장 강했음을 알 수 있으며, 이는 토양 시료의 확보 여부, 유량이나 기수 환경 보유 여부 등에 대한 수계의 특성이 반영된 것으로 생각된다.

표 5. 채집지별 순수분리 원핵생물의 속(genus) 수준 상위 주요 분류군

순위	영산강		비율(%)	섬진강		비율(%)	석호		비율(%)
1	<i>Flavobacterium</i>	Bact.	17.57	<i>Flavobacterium</i>	Bact.	10.41	<i>Flavobacterium</i>	Bact.	6.93
2	<i>Brevundimonas</i>	α -pro.	6.77	<i>Nocardioides</i>	Actino.	7.09	<i>Rhodoferax</i>	α -pro.	4.82
3	<i>Rhodoferax</i>	α -pro.	4.84	<i>Sphingomonas</i>	γ -pro.	5.43	<i>Nocardioides</i>	Actino.	4.42
4	<i>Limnohabitans</i>	β -pro.	3.83	<i>Pseudomonas</i>	γ -pro.	4.35	<i>Polynucleobacter</i>	β -pro.	4.02
5	<i>Erythrobacter</i>	α -pro.	3.51	<i>Pedobacter</i>	Bact.	2.57	<i>Sphingomonas</i>	γ -pro.	3.42
6	<i>Novosphingobium</i>	γ -pro.	2.66	<i>Rhodoferax</i>	α -pro.	2.52	<i>Erythrobacter</i>	α -pro.	3.02
7	<i>Massilia</i>	β -pro.	2.66	<i>Brevundimonas</i>	α -pro.	1.94	<i>Pedobacter</i>	Bact.	2.71
8	<i>Sphingomonas</i>	γ -pro.	2.34	<i>Polaromonas</i>	β -pro.	1.89	<i>Aestuariiivirga</i>	α -pro.	2.61
9	<i>Arenimonas</i>	γ -pro.	2.26	<i>Massilia</i>	β -pro.	1.89	<i>Novosphingobium</i>	γ -pro.	2.31
10	<i>Achromobacter</i>	γ -pro.	2.10	<i>Pedococcus</i>	Actino.	1.54	<i>Hydrogenophaga</i>	β -pro.	2.11
11	<i>Polynucleobacter</i>	β -pro.	2.06	<i>Limnohabitans</i>	β -pro.	1.49	<i>Longivirga</i>	Actino.	2.01
12	<i>Nocardioides</i>	Actino.	2.02	<i>Janthinobacterium</i>	β -pro.	1.37	<i>Terrabacter</i>	Actino.	1.81
13	<i>Sphingorhabdus</i>	α -pro.	1.98	<i>Trichococcus</i>	Firm.	1.26	<i>Tabrizicola</i>	α -pro.	1.81
14	<i>Hydrogenophaga</i>	β -pro.	1.45	<i>Mycolicibacterium</i>	Actino.	1.14	<i>Achromobacter</i>	β -pro.	1.71
15	<i>Aquirufa</i>	Bact.	1.25	<i>Marmoricola</i>	Actino.	1.14	<i>Mycolicibacterium</i>	Actino.	1.61

Actino, Actinobacteria; Bact, Bacteroidetes; Firm., Firmicutes; α -pro., Alpha-proteobacteria; β -pro., Beta-proteobacteria; γ -pro., Gamma-proteobacteria

2. 담수 원핵생물의 미발굴종 탐색

가. 담수 원핵생물 신종 및 미기록종 발굴

본 연구과제를 통해 미기록종 66종과 신종 후보 4종이 분리되어 총 70종을 발굴하였으며 (표 6), 섬진강 26종, 영산강 21종, 석호 등 기타지역에서 17종이 발굴되었다. 발굴종은 계통학적으로 6문, 12강, 27목, 39과, 54속으로 분류되었으며, 문(phylum) 수준에서 Acidobacteria 1종, Actinobacteria 16종, Bacteroidetes 6종, Firmicutes 5종, Proteobacteria 41종, Verrucomicrobia 1종으로 분류되었다. 담수 우점 분류군인 Alpha-proteobacteria 에 속하는 종이 가장 많았으며, 그 외에도 상대적으로 발굴이 저조했던 Acidobacteria 문, Actinobacteria 문의 Thermoleophilia 강, Verrucomicrobia 문의 Verrucomicrobiae 강에서 각각 1종씩 발굴되는 성과를 얻었다. 시료 형태에 따라서는 담수 38종, 강변 토양에서 32종이 발굴되었으며, 토양에서 발굴된 종이 많아 전체 발굴 종의 약 23%가 Actinobacteria 문에 해당하는 결과에 영향을 주었을 것으로 판단된다. 발굴된 모든 종은 최적 성장 조건에서 형태학적, 생리학적 특성을 분석하고 근연종과의 유연관계를 분석하여 기록지로 작성하였다(부록).

표 6. 담수원핵생물 미기록종 및 신종 후보 목록

번호	균주번호	종명	유사도(%)	시료	구분	비고
1	21LS1-25	<i>Pedobacter cryophilus</i>	98.89	토양	미	NNIBR2021641BA31
2	21LS1-37	<i>Novosphingobium arvoaryzae</i>	98.94	토양	미	NNIBR2021641BA34
3	21LS1-75	<i>Asiccacaulis taihuensis</i>	99.49	토양	미	NNIBR2021641BA44
4	21LW1-65	<i>Herminiimonas aquatilis</i>	99.86	담수	미	NNIBR2021641BA18
5	21LW3-03	<i>Aestuariairga litoralis</i>	99.15	담수	미	NNIBR2021641BA56
6	21LW3-14	<i>Bradyrhizobium betae</i>	99.65	담수	미	NNIBR2021641BA60
7	21LS6-111	<i>Nocardioides allogilvus</i>	99.44	토양	미	NNIBR2021641BA147
8	21LS8-22	<i>Nocardia stercoris</i>	99.31	토양	미	NNIBR2021641BA1247
9	21LS8-45	<i>Dyella amyloliquefaciens</i>	99.45	토양	미	NNIBR2021641BA1248
10	21SJ11S-36	<i>Paenibacillus bryophyllum</i>	98.86	토양	미	NNIBR2021641BA1249
11	21SJ11S-37	<i>Mycolicibacterium monacense</i>	99.25	토양	미	NNIBR2021641BA1250
12	21SJ11S-39	<i>Paenibacillus faecis</i>	99.72	토양	미	NNIBR2021641BA1251
13	21SJ12W-32	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	98.76	담수	미	NNIBR2021641BA1252
14	21LS9-103	<i>Catenulispora rubra</i>	99.37	토양	미	NNIBR2021641BA1680
15	21LS9-139	<i>Kandeliimicrobium roseum</i>	99.42	토양	미	NNIBR2021641BA1681
16	21SJ09S-26	<i>Parablastomonas arctica</i>	99.42	토양	미	NNIBR2021641BA1653
17	21SJ02S-50	<i>Tsuneonella troitsensis</i>	99.15	토양	미	NNIBR2021641BA1654
18	21SJ02S-54	<i>Solirubrobacter pauli</i>	99.66	토양	미	NNIBR2021641BA1655
19	21SJ02W-27	<i>Erythrobacter ramosus</i>	98.93	담수	미	NNIBR2021641BA1656
20	21SJ03S-24	<i>Mycolicibacterium pallens</i>	98.88	토양	미	NNIBR2021641BA1657
21	21YS13S-68	<i>Nocardioides aquaticus</i>	99.45	토양	미	NNIBR2021641BA1658
22	21YS14W-18	<i>Aurantimicrobium minutum</i>	99.17	담수	미	NNIBR2021641BA1659
23	21SJ09W-S21	<i>Sphingomonas fonticola</i>	99.65	담수	미	NNIBR2021641BA1660
24	21SJ10S-S20	<i>Tsuneonella amylolytica</i>	99.13	토양	미	NNIBR2021641BA1661
25	21YS07S-S12	<i>Luteimonas notoginsengisoli</i>	99.86	토양	미	NNIBR2021641BA1662

번호	균주번호	종명	유사도(%)	시료	구분	비고
26	21YS07S-S28	<i>Flavobacterium urocaniciphilum</i>	99.93	토양	미	NNIBR2021641BA1663
27	21YS07S-S44	<i>Nocardioides simplex</i>	99.3	토양	미	NNIBR2021641BA1664
28	SJ16W-072	<i>Methylobacterium rhodinum</i>	99.93	담수	미	NNIBR2021641BA1641
29	SJ16W-091	<i>Pseudomonas otitidis</i>	99.38	담수	미	NNIBR2021641BA1642
30	SJ17W-063	<i>Dickeya lacustris</i>	99.52	담수	미	NNIBR2021641BA1643
31	21SJ08S-108	<i>Paenibacillus susongensis</i>	98.84	토양	미	NNIBR2021641BA1644
32	21SJ08S-113	<i>Nocardia aobensis</i>	99.19	토양	미	NNIBR2021641BA1645
33	21SJ08S-043	<i>Neobacillus bataviensis</i>	99.38	토양	미	NNIBR2021641BA1646
34	21SJ08S-065	<i>Paenibacillus rhizoplanae</i>	99.65	토양	미	NNIBR2021641BA1647
35	21SJ08W-001	<i>Sphingomonas aerolata</i>	98.79	담수	미	NNIBR2021641BA1648
36	21SJ08W-015	<i>Flavobacterium caseinilyticum</i>	99.37	담수	미	NNIBR2021641BA1649
37	21SJ08W-016	<i>Orrella amnicola</i>	98.9	담수	미	NNIBR2021641BA1650
38	21SJ08W-046	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	99.24	담수	미	NNIBR2021641BA1651
39	21SJ13W-057	<i>Aureimonas glaciei</i>	99.64	담수	미	NNIBR2021641BA1652
40	YS10WR-01	<i>Lysobacter xinjiangensis</i>	99.72	담수	미	NNIBR2021641BA1527
41	YS10WR-09	<i>Sphingomonas laterariae</i>	99.01	담수	미	NNIBR2021641BA1528
42	YS10WR-12	<i>Chitinophaga silvisoli</i>	98.83	담수	미	NNIBR2021641BA1529
43	21YS08-0M08	<i>Sphingomonas lacunae</i>	99.15	담수	미	NNIBR2021641BA1530
44	21YS10W-ISP05	<i>Luteolibacter luojiensis</i>	98.95	담수	미	NNIBR2021641BA1531
45	21SJ05S-R33	<i>Aestuariimicrobium soli</i>	98.75	토양	미	NNIBR2021641BA1532
46	21SJ05W-0M23	<i>Intrasporangium flavum</i>	98.72	담수	미	NNIBR2021641BA1533
47	21SJ05W-0M51	<i>Rheinheimera rioiphila</i>	99.45	담수	미	NNIBR2021641BA1534
48	21YS10S-0N32	<i>Cypionkella sinensis</i>	100	토양	미	NNIBR2021641BA1666
49	21YS05W-0N23	<i>Polynucleobacter yangtzensis</i>	99.86	담수	미	NNIBR2021641BA1667
50	21YS05S-0R27	<i>Sphingorhabdus planktonica</i>	99.86	토양	미	NNIBR2021641BA1668
51	21YS01W-91	<i>Cupriavidus agavae</i>	99.17	담수	미	NNIBR2021641BA1586
52	YS09W-41	<i>Schumannella luteola</i>	100	담수	미	NNIBR2021641BA1592
53	20DYW-34	<i>Propionicimonas paludicola</i>	100	담수	미	NNIBR2021641BA1594
54	20CGW-69	<i>Paracoccus luteus</i>	100	담수	미	NNIBR2021641BA1593
55	21YS02S-57	<i>Paucibacter toxinivorans</i>	99.51	토양	미	NNIBR2021641BA1587
56	21YS03W-49	<i>Erythrobacter sanguineus</i>	98.93	담수	미	NNIBR2021641BA1588
57	21SJ14S-33	<i>Bosea psychrotolerans</i>	99.78	토양	미	NNIBR2021641BA1589
58	21SJ14W-13	<i>Chitinophaga sancti</i>	98.96	담수	미	NNIBR2021641BA1590
59	21YS21S3-6	<i>Geothrix fermentans</i>	99.04	토양	미	NNIBR2021641BA1591
60	HJ-1-18	<i>Pseudidiomarina gelatinasegens</i>	99.31	담수	미	NNIBR2021641BA1685
61	HJ5-7	<i>Uruburuella suis</i>	99.52	담수	미	NNIBR2021641BA1686
62	HJ5-23	<i>Acidovorax caeni</i>	99.93	담수	미	NNIBR2021641BA1687
63	HJ5-53	<i>Epilithonimonas bovis</i>	99.65	담수	미	NNIBR2021641BA1688
64	HJ5-87	<i>Brevilactibacter flavus</i>	100	담수	미	NNIBR2021641BA1689
65	21SJ11-11	<i>Rheinheimera pleomorphica</i>	99.86	담수	미	NNIBR2021641BA1637
66	21SJ07-11	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i>	99.93	토양	미	NNIBR2021641BA1638
67	21YS11W-21	<i>Metalliresistens</i> sp.	98.11	담수	신	NNIBR2021641BA1683
68	JU-07	<i>Aestuariivirga</i> sp.	93.45	담수	신	NNIBR2021641BA1626
69	21SJ11W-1	<i>Simiduia</i> sp.	98.34	담수	신	NNIBR2021641BA1639
70	21SJ07W-1	<i>Emticicia</i> sp.	98.61	토양	신	NNIBR2021641BA1640

미, 미기록종; 신, 신종 후보

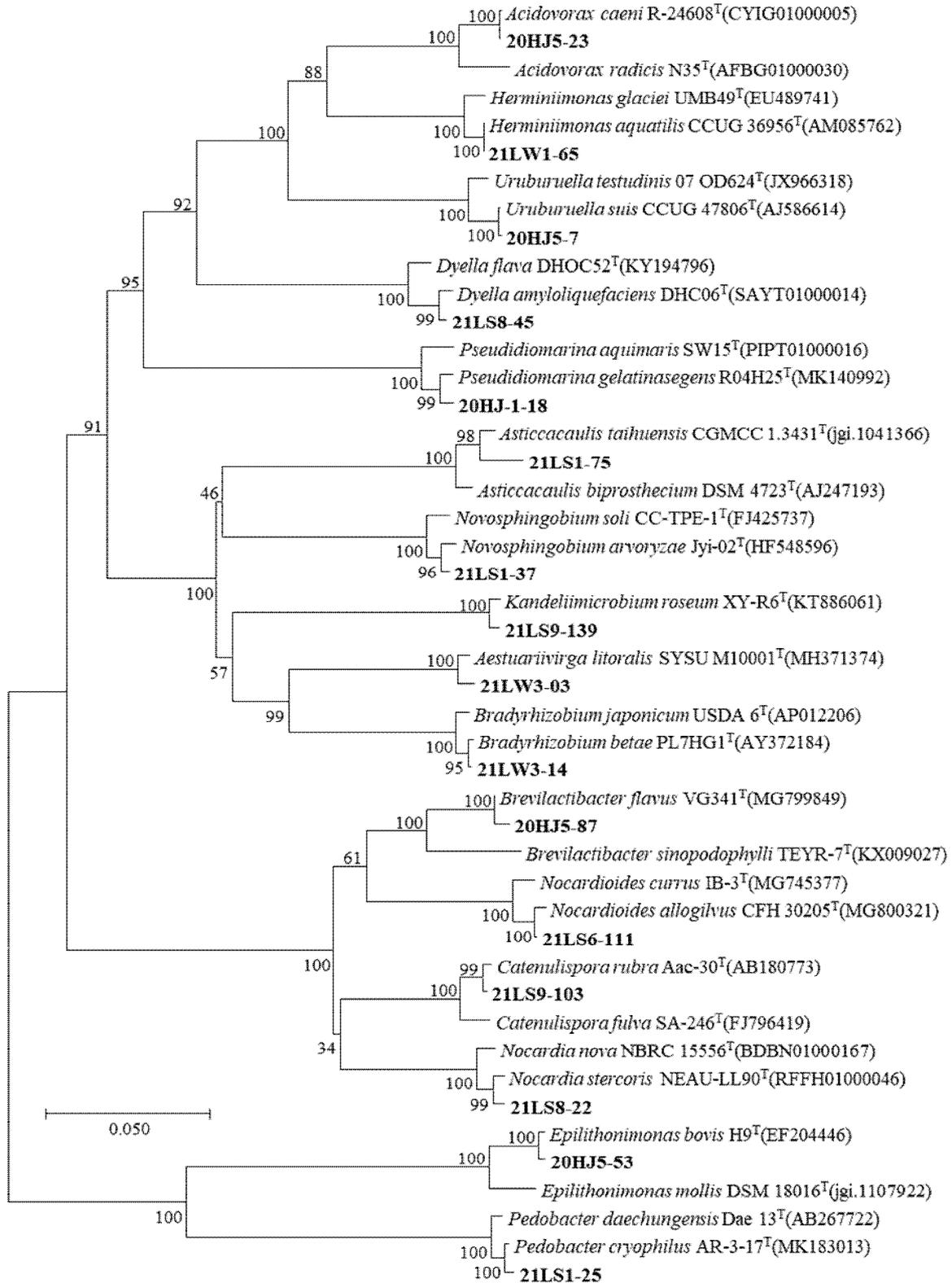


그림 4. 석호 등 특이서식환경에서 발굴된 원핵생물 미기록 16종의 계통수

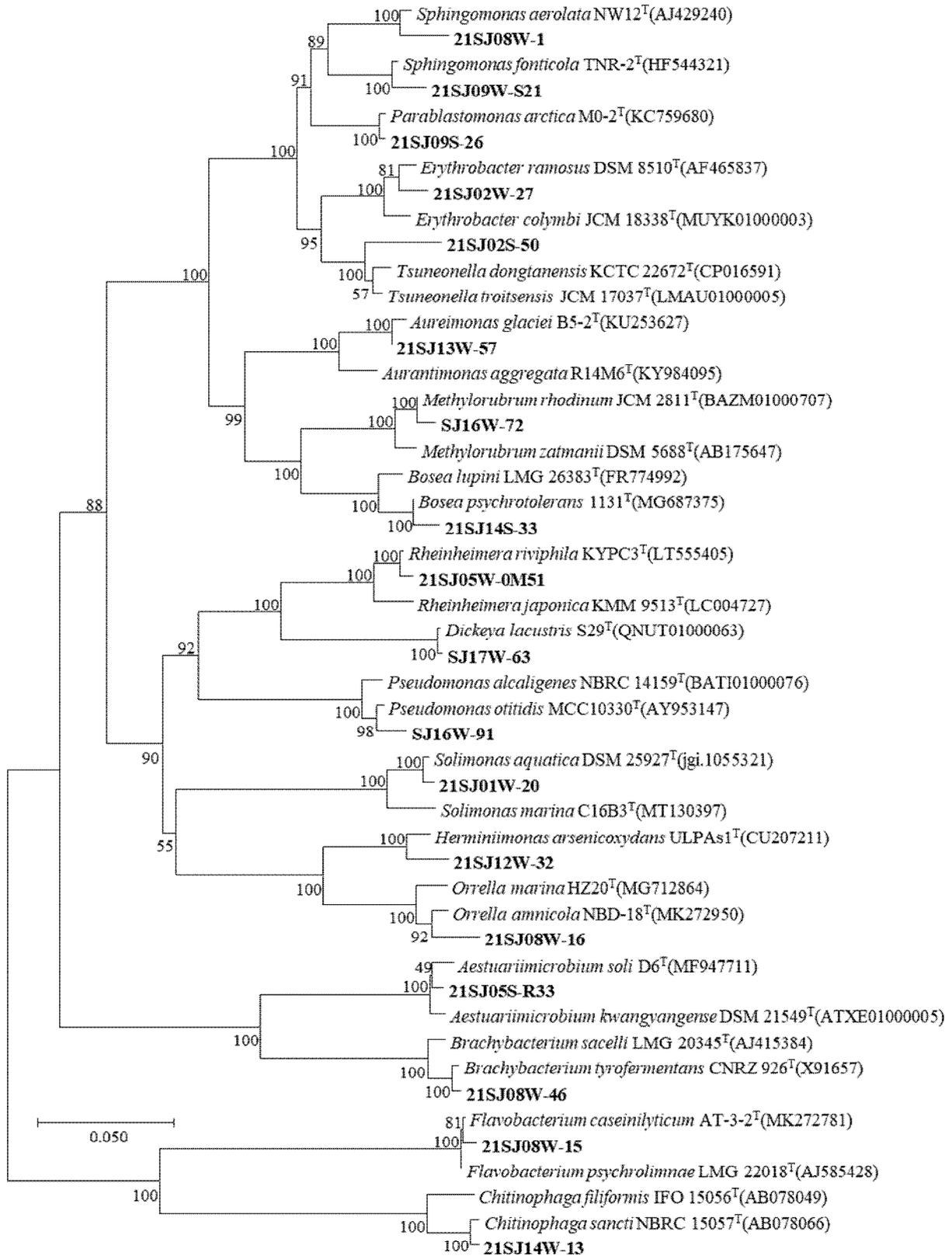


그림 5. 섬진강에서 발굴된 그람 양성 원핵생물 미기록 18종의 계통수

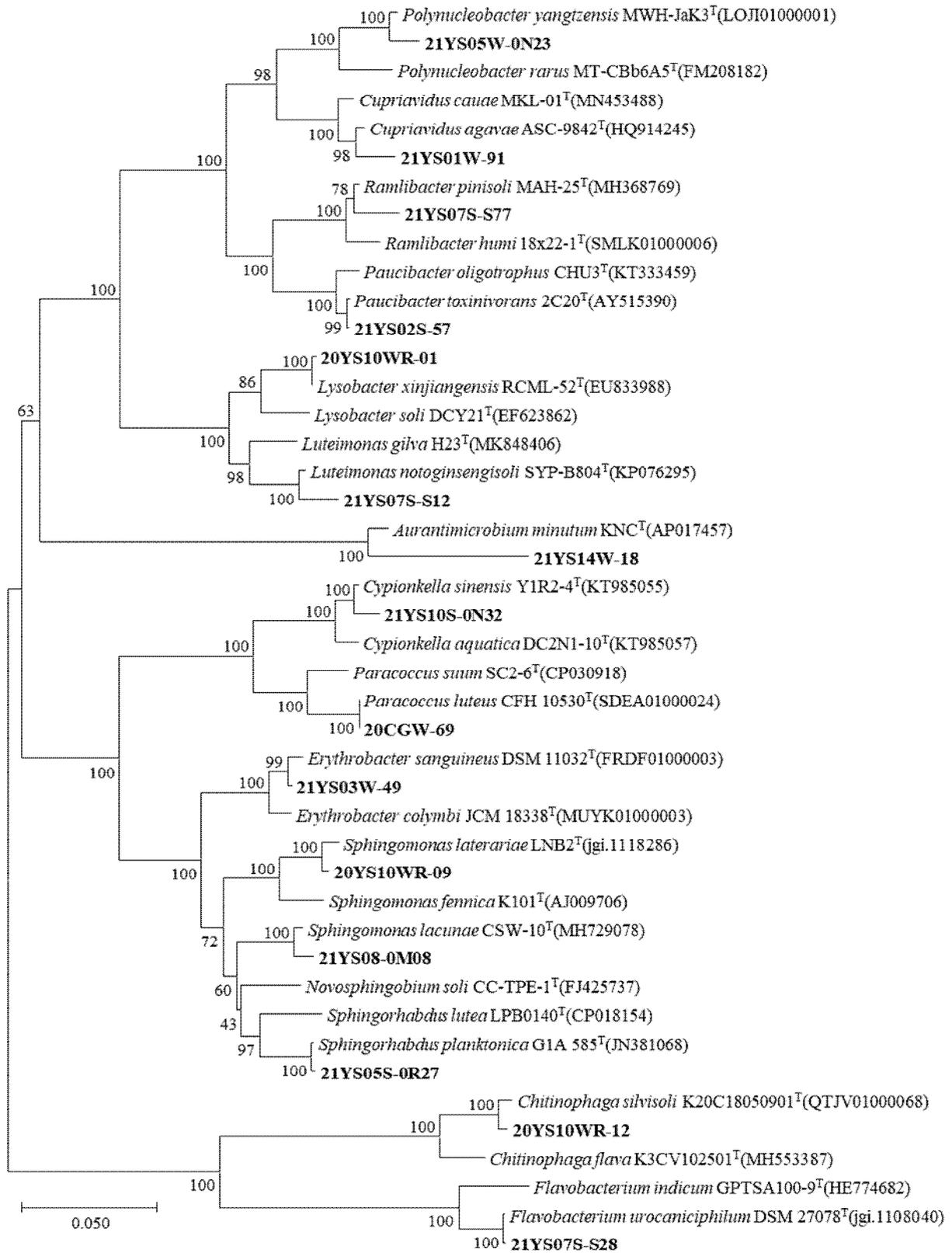


그림 6. 영산강에서 발굴된 그람양성 원핵생물 미기록 15종의 계통수

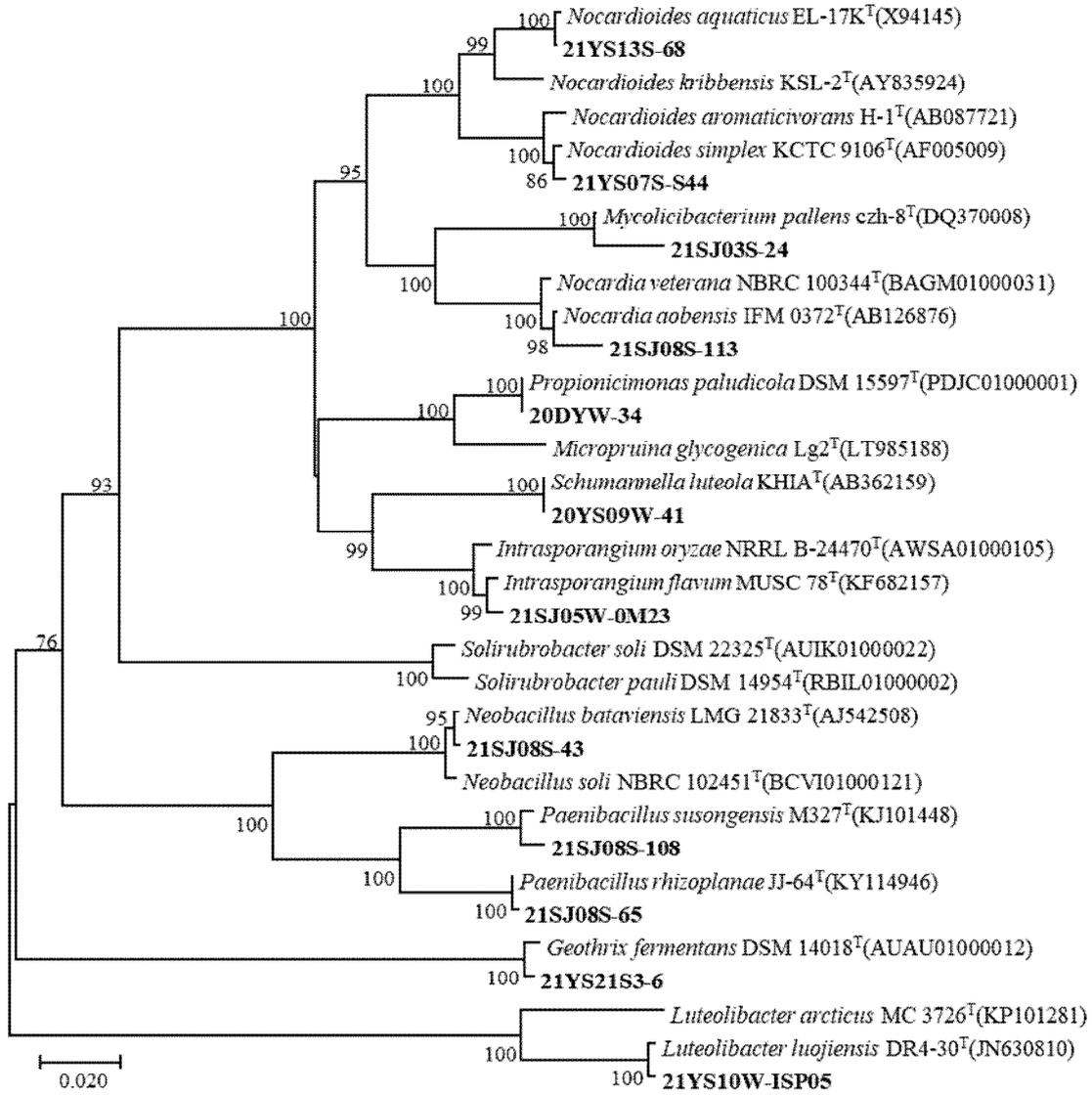


그림 7. 영산강과 섬진강에서 분리된 그람양성 원핵생물 미기록 12종의 계통수

나. 신속 후보 JU-07^T의 특성 분석

금강 수계의 주자천에서 분리된 JU-07^T 균주는 *Aestuariivirga litoralis* SYSU M10001^T와 93.4%, *Mesorhizobium carmichaelinearum* ICMP 18942^T와 90.5%의 16S rRNA 유전자 유사성을 보여 2019년 보고된 *Aestuariivirgaceae* 과의 신속 후보 가능성을 보였다. *Aestuariivirgaceae* 과는 현재 1속, 1종 (*A. litoralis*) 단일 균주로 구성되어 있으며, 본 균주는 *Aestuariivirgaceae* 과에서 두 번째 보고되는 신속으로 예상된다. Illumina사의 Hiseq을 통해 전장 유전체를 분석한 결과 JU-07^T 균주의 G+C 비율은 58.2%로 분석되었으며, 최근연종인 *A. litoralis* SYSU M10001^T와의 유전체 수준에서의 65.5%의 AAI(Average aminoacid indenty)값을 보여 새로운 속의 가능성을 확인할 수 있었다. 또한, 분류화학적 특성 분석에서 주요 지표로 활용되는 퀴논 분석 결과

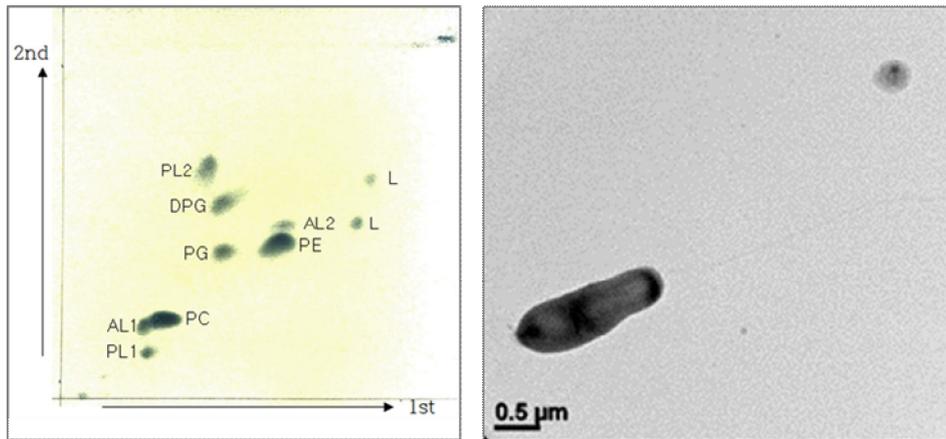


그림 8. 신속후보 원핵생물 JU-07^T 균주의 극성지질분석 및 투과전자현미경 사진

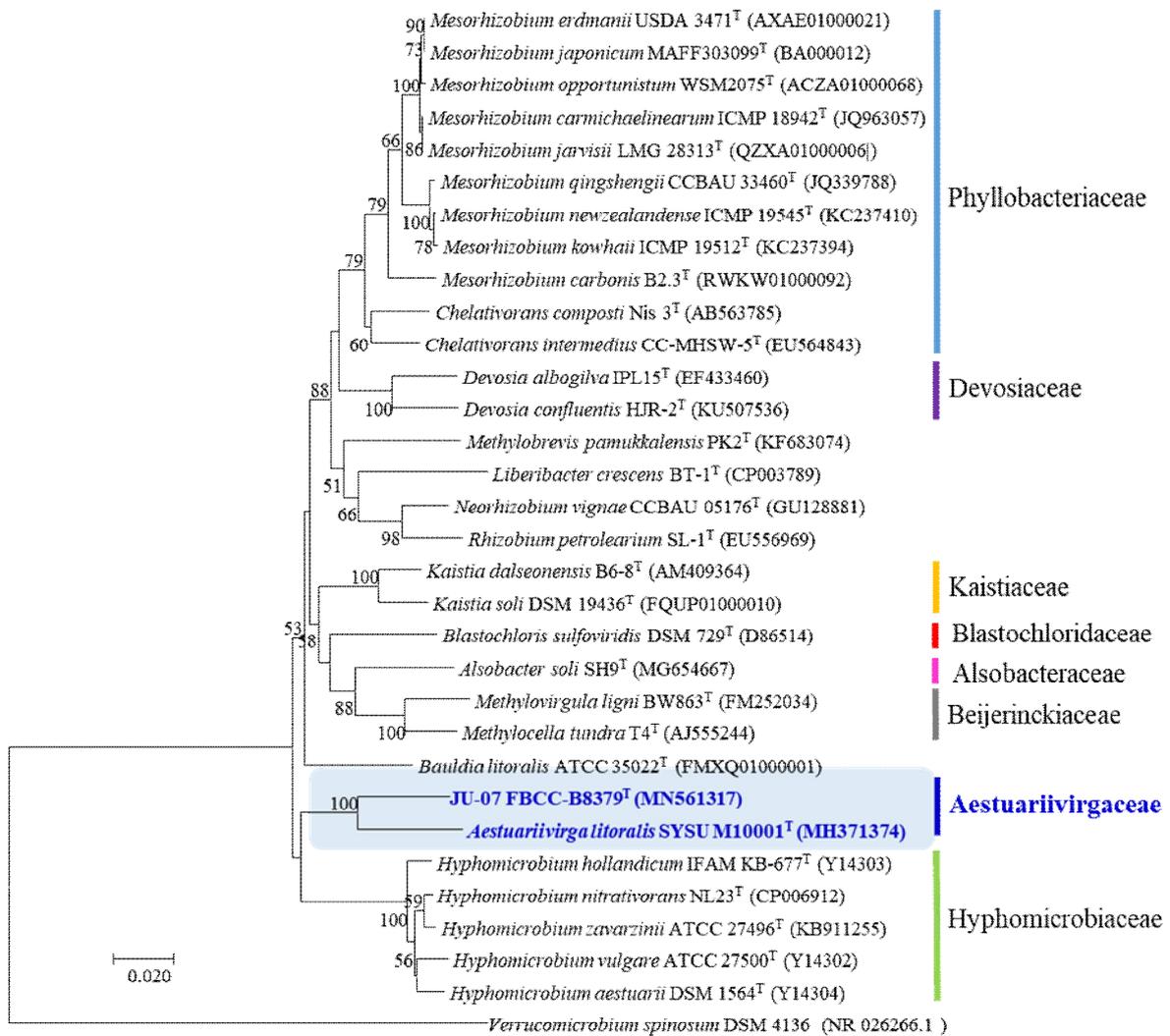


그림 9. 신속후보 원핵생물 JU-07^T 균주의 Neighbour-joining 계통수

A. litoralis 균주는 Ubiquinone-8 (Q-8)를 주요 퀴논으로 보유하고 있으나, JU-07^T 균주는 Ubiquinone-10 (Q-10)으로 분석되어 확연하게 구별되는 결과를 보였다. JU-07^T 균주의 극성 지질(Polar lipid)분석에서는 diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), 그리고 각각 2개의 unidentified aminophospholipid, unidentified phospholipids, unidentified lipids가 발견되었으며, 근연종과 unidentified aminophospholipid 와 unidentified lipids에서 차이가 확인되었다(그림 8). JU-07^T 균주는 투과전자현미경으로 세포 형태를 분석한 결과 편모를 가진 운동성이 있는 간균으로 확인되었다(그림 8). 분류화학적, 유전학적 데이터를 기반으로 JU-07^T 균주는 새로운 속으로 보고 될 수 있음을 충분히 확인할 수 있었으며, 향후 다양한 생리학적 특성 및 지방산 분석 등을 추가하여 신속으로 보고할 예정이다.

다. 신종후보 *Emticicia* sp. 21SJ11W-3^T의 특성 분석

신종 후보인 *Emticicia* sp. 21SJ11W-3^T 균주는 광양시 섬진강 유역의 담수에서 분리되었으며, Cytophagia 강, Cytophagales 목, Cytophagaceae 과에 속하는 *Emticicia* 속으로 분류되었다. *Emticicia* 속은 현재까지 총 9종이 보고되어 있으며 이중 3종(*E. ginsengisoli*, *E. soli*, *E. agri*)은 토양에서 분리되었고, 나머지 6종은 다양한 담수환경에서 분리되었다. 21SJ11W-3^T 균주는 *E. fontis* IMCC1731^T와 98.03%의 가장 높은 16S rRNA 유전자 유사도를 보였으며 계통수에서도 가장 가까운 유연관계를 가진 것으로 분석되었다 (그림 10). 신종후보 21SJ11W-3^T 균주는 R2A agar 배지에서 최적 성장을 보였으며, pH 6.0~8.0, 염농도가 1.0%까지 성장을 보였지만 pH 7.0의 중성조건과 염이 없는 배지에서 최적의 성장을 보였다. 또한, 10°C에서 40°C까지 균주의 생장은 가능하나 30°C가 최적 성장 온도 범위로 분석되었다. 최적 성장 조건에서 2~3일 배양 후 오렌지 색의 둥글고 매끄러운 집락이 형성되며, 투과전자현미경으로 관찰한 세포는 간균의 형태이며 편

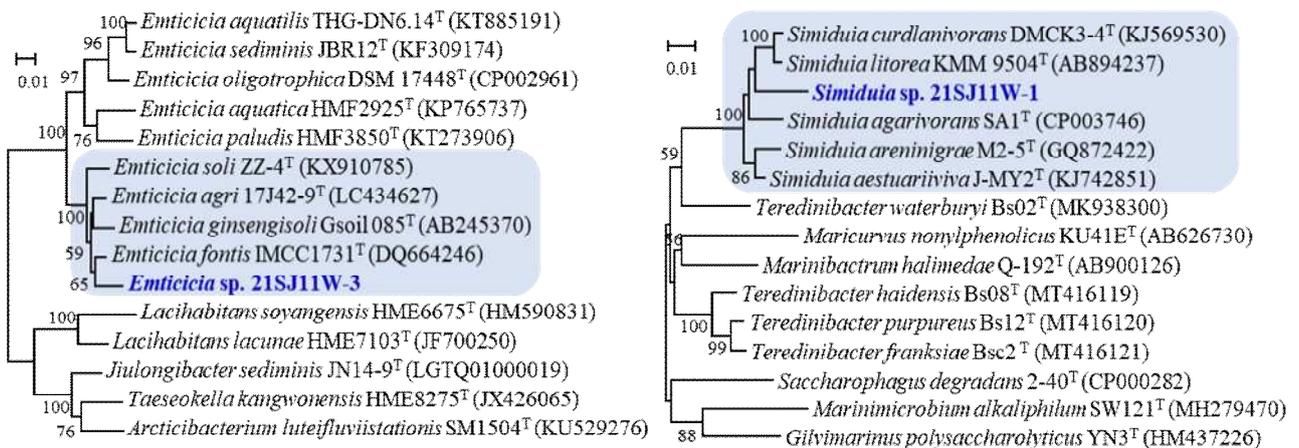


그림 10. 신종후보 원핵생물 *Emticicia* sp. 21SJ11W-3^T 균주(좌)와 *Simidiua* sp. 21SJ11W-1^T 균주(우)의 Neighbour-joining 계통수

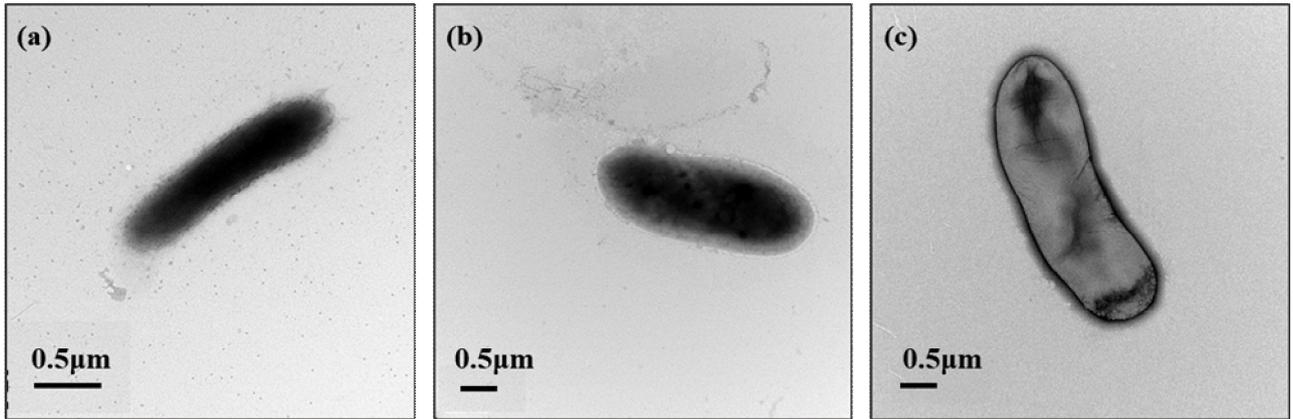


그림 11. 신종후보 원핵생물 3종의 투과전자현미경 사진

(a) *Emticicia* sp. 21SJ11W-3^T; (b) *Simiduia* sp. 21SJ11W-3^T; (c) *Rhodopseudomonas* sp. 21YS11W-21

모는 관찰되지 않았다(그림 11). 생장 조건이 확정된 21SJ11W-3^T 균주는 최적 배양조건에서 생리학적 특성을 분석한 결과 esculin을 분해하고 D-mannose, N-acetyl-glucosamin, D-maltose를 대사하는 것으로 관찰되었다. 또한, urease, β-glucosidase 효소의 활성이 확인되었다. 향후, 전장 유전체 분석과 분류화학적 분석을 통해 근연종 균주와의 분류학적 차이를 검증하여 신종으로 국제 학술계에 보고될 예정이다.

라. 신종후보 *Simiduia* sp. 21SJ11W-1^T의 특성 분석

신종 후보인 *Simiduia* sp. 21SJ11W-1^T 균주는 광양시에 위치한 남해 바닷물이 유입되는 섬진강 유역의 기수에서 분리되었으며, 감마 프로테오박테리아 강, Cellvibrionales 목, Cellvibrionaceae 과에 속하는 *Simiduia* 속으로 분류되었다. *Simiduia* 속은 현재까지 총 5종이 보고되어 있으며 해변의 모래사장이나 바닷물, 그리고 담수와 해수가 만나는 기수에서 분리되었다. 21SJ11W-1^T균주는 5종의 *Simiduia*와 98.34-97.51%의 16S rRNA 유전자 유사도를 보였으며, 계통수에서도 이들 종과 가까운 유연관계를 가진 것으로 분석되었다(그림 10). 신종후보 21SJ11W-1^T 균주는 Marine agar 배지에서 최적 생장을 보였으며, pH 6.0~8.0, 염농도 0-7.0%까지 생장을 보였지만 pH 7.0의 중성조건과 염농도 2%에서 최적의 생장을 보였다. 또한, 15°C에서 40°C까지 균주의 생장은 가능하나 30°C가 최적 생장 온도로 분석되었다. 최적 생장 조건에서 2~3일 배양 후 흰색의 둥글고 매끄러운 집락이 형성되며, 투과전자현미경으로 관찰한 세포는 간균의 형태로 편모는 관찰되지 않았다(그림 11).

마. 신종후보 *Rhodopseudomonas* sp. 21YS11W-21^T의 특성 분석

신종 후보인 *Rhodopseudomonas* sp. 21YS11W-21^T 균주는 영산강 상류의 대형 지류인 황룡강의 장성호 담수에서 분리되었다. 알파 프로테오박테리아의 Rhizobiales 목, Nitrobacteraceae

과에 속하는 *Rhodopseudomonas* 속으로 분류되었다. *Rhodopseudomonas* 속은 현재까지 26종이 보고되었으며, 21YS11W-21^T 균주와 가장 가까운 *Rhodopseudomonas boonkerdii* NS23^T 종은 최초 보고 당시에 중금속에 강한 내성을 보이는 특성을 반영하여 *Metalliresistens boonkerdii* NS23^T 로 명명되었다가 2011년에 재분류되었다. 신종 후보인 *Rhodopseudomonas* sp. 21YS11W-21^T 균주는 근연종 *R. boonkerdii* NS23^T와 98.11%의 16S rRNA 유전자 유사도를 보였으며, 차순위로 *R. palustris* DSM 123^T 종과 97.72%, *Tardiphaga roninae* LMG26467^T 종과 97.66%의 유사도를 보였다. 16S rRNA 유전자를 기반으로 작성한 계통수에서는 *R. boonkerdii* NS23^T, *T. roninae* LMG26467^T 와 함께 cluster를 형성하였다(그림 12). 이후 *Rhodopseudomonas* 속의 균주들과 cluster를 형성한 것으로 보아 차순위 근연종인 *T. roninae* LMG26467^T 는 재분류가 필요한 것으로 보인다.

신종 후보 21YS11W-21^T 균주는 R2A agar에서 최적의 생장을 보였으며, pH 6.0~8.0, 염농도가 1.0%까지 생장을 보였지만 pH 7.0의 중성조건과 염이 없는 배지에서 최적의 생장을 보였다. 또한, 10°C에서 37°C까지 균주의 생장은 가능하나 30°C가 최적 성장 온도로 분석되었다. 최적 성장 조건에서는 2~3일 후에 둥글고 매끄러운 형태의 하얀색 집락이 형성되며, 투과전자현미경으로 관찰한 세포는 간균의 형태에 편모가 없어 비운동성인것으로 관찰되었다. 신종후보 20SJ06S-92^T균주는 산화효소와 카탈라아제가 확인되었으며, DNA, Tyrosine, Starch, tween 20,

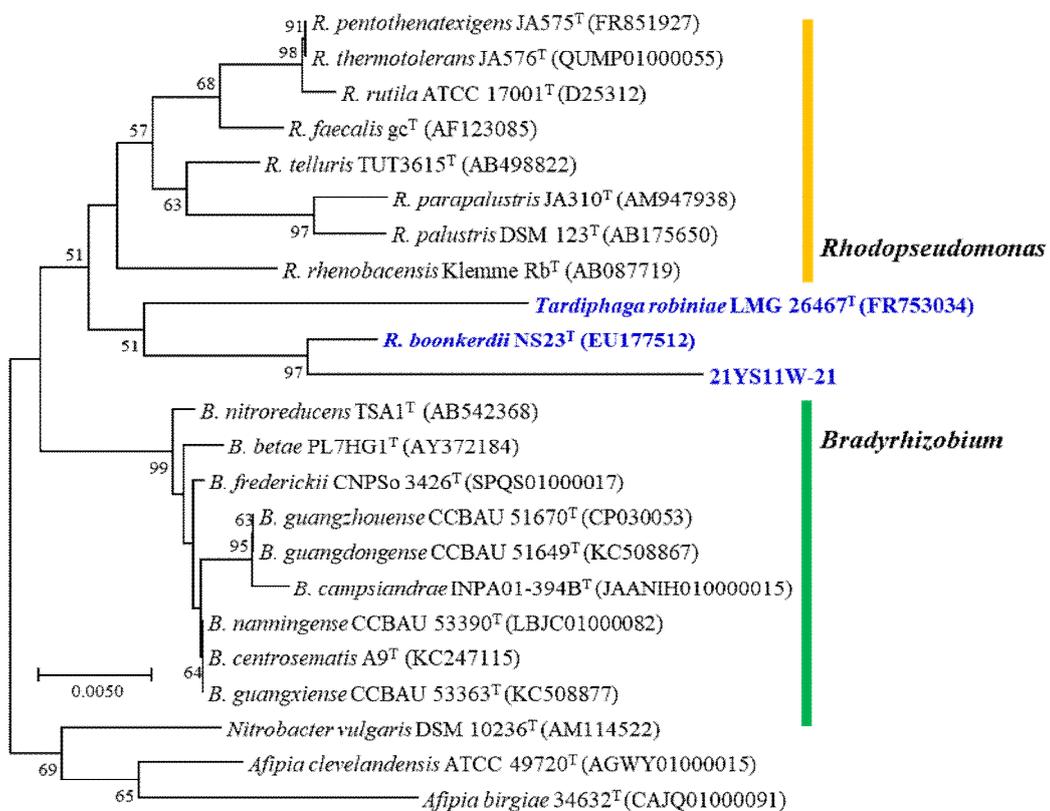


그림 12. 신종후보 원핵생물 *Rhodopseudomonas* sp. 21YS11W-21^T 균주의 Neighbour-joining 계통수

tween 40, tween 80, cellulose 및 다당류를 분해하는 효소가 분비되지 않는 것으로 확인되었으며, xanthine과 hypoxanthine을 일부 분해하는 것이 관찰되었다. 또한, API kit를 통해 생리학적 특성을 분석한 결과 질산염을 환원시키지 못하고 포도당을 발효시키지 못하지만, alginic dihydrolase, urease를 분비하고, esculin을 분해하는 것이 관찰되었다. 또한, 단일 탄소원으로 gluconate, adipic acid, malate를 이용하여 생장이 가능한 것으로 확인되었다. 향후, 근연종 표준균주를 분양받아 중금속 내성과 분류화학적 특성을 비교 분석하고, 전장 유전체를 분석하여 근연종과의 차이를 증명하는 분류학적 증거를 확보함으로써 새로운 종으로 보고할 예정이다.

3. 기발균종의 유용성 평가

가. 기발균종의 효소활성 검증 결과

본 연구과제에서 발굴된 70종을 포함하는 총 138종의 기발균종의 유용성을 평가하기 위해 총 8가지의 기질을 대상으로 효소활성을 평가하였다. 8가지 기질은 색소체를 함유한 기질을 활용하여, 분해효소를 통해 기질이 분해되었을 때 색소가 배지 내부로 퍼져나가는 것으로 효소의 활성 유무를 판단하였다. 배양 조건은 대부분의 균주가 성장하는 25°C에서 배양하였으며, 최소한의 배지 성분을 활용하도록 R2A agar 배지를 기본 배지로 활용하였다. 8가지 기질에 대해 각 균주별로 다양한 분해효소를 분비하는 것이 관찰되었으며, 특히, 위탁 연구사업을 통해 분리되었던 *Streptomyces* 속의 균주들이 다양한 효소를 분비하는 것으로 확인되었다. *Streptomyces* 속은 방선균에 속하는 주요 분류군 중의 하나로 현재까지 약 900종이 보고되어 있으며, 생장 과정에서 한천 배지의 한천을 녹여서 substrate mycelium을 자라게 하는 특성을 보유하고 있다. 또한, 이들은 이차대사산물을 만들어내는 주요한 분류군으로 알려져 있어 본 연구결과에서도 다양한 효소활성이 관찰된 것으로 판단된다. 기질별로 분해효소를 분비한 균주의 수는 표 7 및 부록과 같으며, amylose를 분해하는 균주가 52종으로 가장 많았고, pullulan 과 casein을 분해하는 균주가 각각 42종, 37종으로 다수 관찰되었다. 그 외에도 난분해성인 xylan과 cellulose를 분해하는 균주가 각각 21균주, 6균주로 확인되어 이들은 환경 개선 등 다양한 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 3종 이상의 분해효소를 분비하는 균주는 총 29종으로 확인되어 다양한 효소를 복합적으로 분비하는 균주들의 유용 유전자, 활성 심화 연구가 진행된다면 신종 및 미기록종으로 발굴된 자원의 가치를 높이는 데 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 발굴된 자원의 분류학적 특성과 분해효소 활성을 연계하면, 향후 발굴하는 자원의 활용성을 더욱 높일 수 있도록 분류군 특이적인 발굴기법을 수립하는데 활용될 수 있을 것으로 보인다.

표 7. 기발균된 신종 및 미기록종의 효소활성 검증 결과

기질	Arabinan	Amylose	Casein	Cellulose	Chitosan	Curdlan	Pulluran	Xylan
활성균주(종)	6	52	37	6	-	21	42	21

4. 담수원핵생물 자원의 다양성과 발굴효율 증대 연구

가. 다양한 자원 확보를 위한 배양조건 개선

원핵생물을 배양하는 가장 기본적인 방법은 한천배지를 활용하는 것으로 집락의 형태에 따라 다양한 자원을 순수분리하는 것이다. 이 과정에서 다양한 배지 성분을 활용하여, 환경 시료 내에 존재하는 원핵생물의 성장 조건을 맞춰줌으로써 아직까지 발굴하지 못했던 다양한 자원을 배양하고자 하는 노력이 지속되고 있다. 최근에는 인산염이 포함된 배지를 한천(agar) 혹은 gellan 등과 같은 gelling agent와 함께 멸균하여 배지를 제작하였을 때 과산화수소와 같은 활성산소가 생성되고 이들이 일부 원핵생물의 성장을 저해할 수 있다는 많은 연구가 보고되었다. 또한, 이러한 활성산소를 제거하기 위하여 스캐빈저로 피르부산 나트륨과 카탈라아제를 첨가한 경우, 스캐빈저를 사용하지 않은 배지보다 성장하는 집락의 수가 크게 증가하는 결과를 보였으며, 이는 호기성과 혐기성 모두에서 적용되는 것으로 보고되었다. 특히, 국내 연구진은 이 방법을 활용하여 담수의 주요 방선균인 acI clade를 배양한 성과도 보고되어 본 연구에서 직접 섬진강의 담수 시료에 적용하여 배양을 진행하였다. 배양된 균주를 순수분리하고 분류학적 분포를 비교한 결과, 두 종류의 배지는 공통적으로 4문, 7강에 속하는 원핵생물 종이 분리되었으나, 목(order) 수준에서 일반배지는 13목, 활성산소를 제거한 PS 배지는 16목으로 분류되며 개선된 배지 제작법이 다양한 자원 확보의 가능성을 보여주었다(그림 13). 종 수준에서는 일반배지에서 47종, 활성산소 제거 배지에서 48종이 분리되어 분리된 균주 수는 유사했으나 이들 중에 11종만이 공통 분류군이었으며, 이 방법을 적용하여 신종 후보인 *Simiduia* 속 균주가 최초로 분리되는 성과도 보였다. 연구자의 순수분리 기법과 시료, 배지 외의 배양조건에 대한 영향이 있었다 하더라도 다양한 자원을 확보하는데 충분히 유의미한 결과를 얻었기에 이 방법은 차년도에 더욱 넓은 범위의 시료에 적용하여 다양한 자원의 확보에 활용할 예정이다.

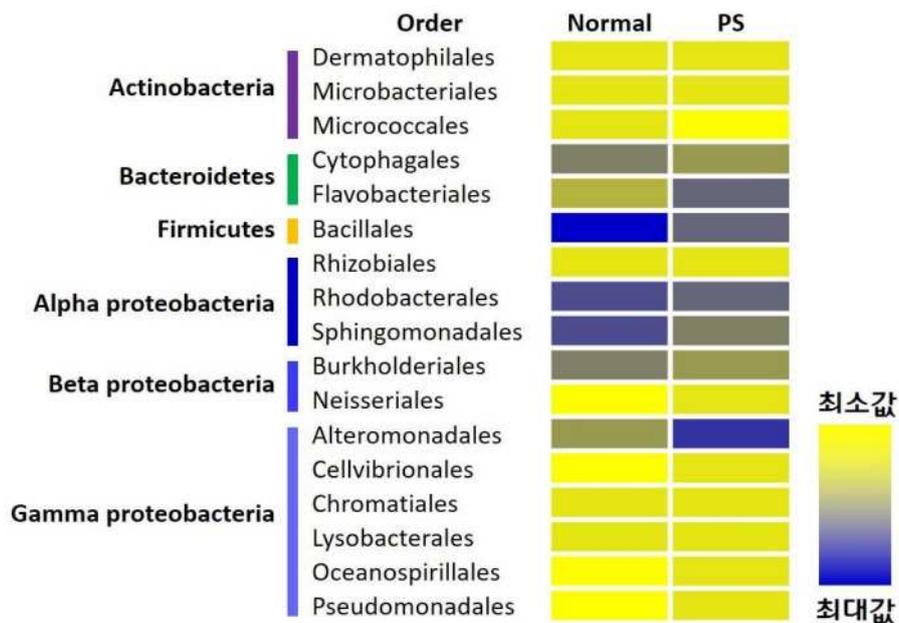


그림 13. 배지별 분리 균주의 분포 비교

나. 난(難)분류군의 계통학적 심화 연구

방선균은 원핵생물에서 매우 큰 분류군의 하나로 다양한 특성의 균주들을 포함하고 있다. 그 중에서도 *Streptomyces*는 다양한 2차 대사산물을 생산하여 가장 많이 분리되고 연구된 분류군이다. 그러나 이러한 유용 활성을 위해 미생물분야 초창기에 분리된 많은 자원들은 유전적 데이터가 없거나, 현재의 원핵생물 분류학적 증거에 해당하는 다상학적 데이터가 누락되어 있어 이들의 정확한 동정이 어려운 실정이다. 특히, 900여종이 넘는 *Streptomyces* 종들은 원핵생물의 가장 기본적인 분류기법인 16S rRNA 유전자로는 분류가 매우 어려운데, 형태적으로 매우 분화된 특성을 가져도 16S rRNA 유전자의 염기서열이 동일하거나, 매우 높은 유사도를 보이는 경우가 다수 발견되었다. 본 연구과제에서도 과거 다양한 *Streptomyces* 종이 발굴되었으나 이러한 문제로 인해 오동정, 미동정된 균주들이 있어 이들을 활용한 다중유전자 분석을 통해 *Streptomyces* 속 균주들의 분류학적 기법을 확립하고자 하였다. 올해 대상으로 정한 균주는 2019년 춘천의 호수에서 채집된 병어의 내장에서 분리된 공생 원핵생물 CFH1-20 균주로 *Streptomyces sporoverrucosus* 종, *Streptomyces goshikiensis* 종과 16S rRNA 유전자의 유사도가 100%로 동일하게 분석되어 동정이 불가능한 균주였다. 표준균주와 공생 원핵생물 CFH1-20 균주의 유연관계를 명확하게 하기 위해 국제표준균주은행에서 표준균주를 분양받아 고순도 DNA를 추출 후에, 5개의 단백질 유전자 *gyrB*, *rpoB*, *trpB*, *atpD*, *recA*의 염기서열을 분석하여 다중유전자 염기서열 계통수를 분석하였다(그림 14). 그 결과 표준균주 2종은 서로 단일종처럼 cluster를 형성하였고, CFH1-20 균주는 확연하게 구별되어 다른 균주와 cluster를 형성하는 결과를 얻었다. 이러한 다중유전자를 분석한 방법의 신뢰도를 확인하고 원핵생물의 종 분류 기준을 적용하여 판단하고자, 각각의 유전체 염기서열을 기반으로 하여 *in silico* DDH 방법인 GGDC (Genome to genome distance calculation)와 ortho-ANI (average nucleotide identity)를 분석한 수치는 다중유전자의 결과와 동일한 결과를 보여주었다(그림 15). *Streptomyces*종의 유전

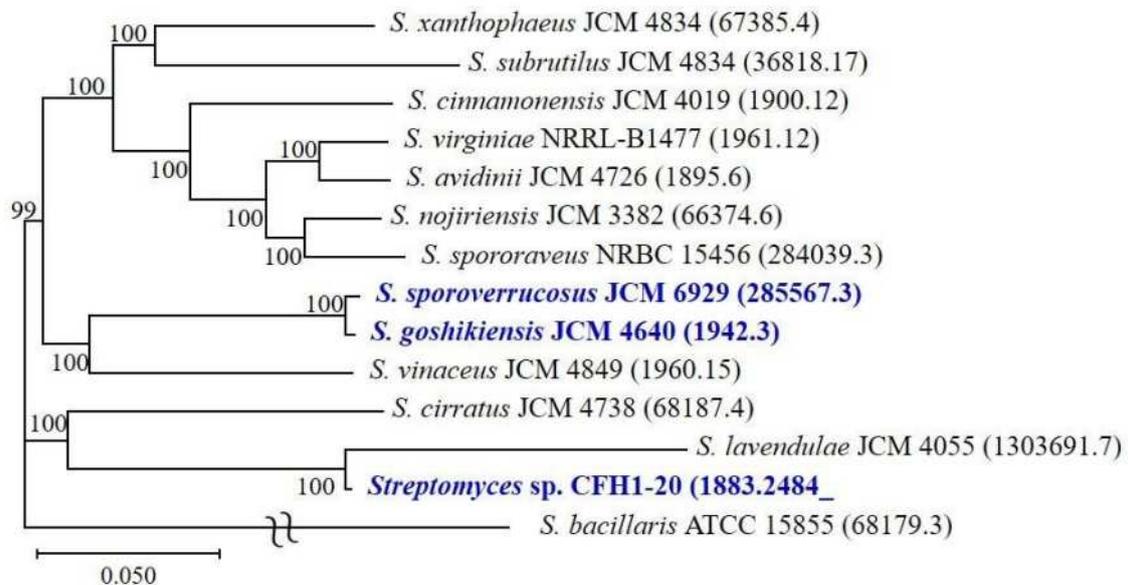


그림 14. 공생 원핵생물 CFH1-20 균주와 표준균주의 다중유전자 분석 계통수

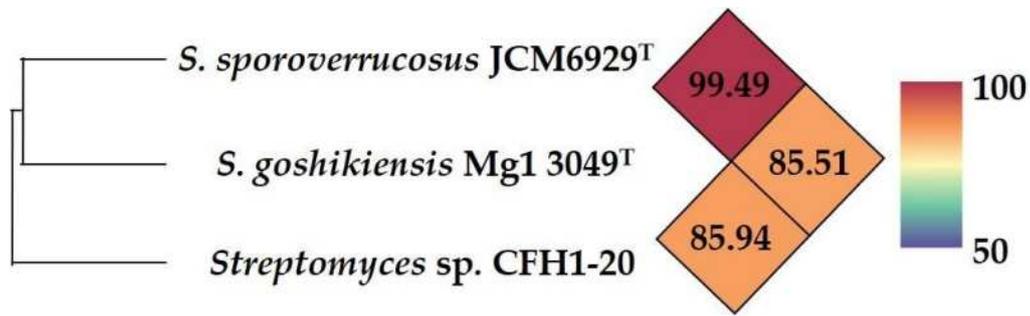


그림 15. 공생 원핵생물 CFH1-20 균주와 표준균주의 Ortho-ANI heatmap

체를 비교한 결과에 미루어 볼 때, 다중유전자를 활용한 기법은 기확보되어 있던 *Streptomyces* 균주를 새롭게 동정하는데 유용한 정보를 제공하고, 적절한 기법으로 활용될 수 있음을 보여주었다. 향후, 실제로 확보되었으나 동정이 불가능해 활용되지 못했던 다수의 *Streptomyces* 종들을 대상으로 다중유전자를 활용한 기법을 적용하여 재분류를 진행할 예정이며, 이 과정에서 확보되는 유전체 정보는 물질생산 등의 유용한 특성을 보유한 분류군의 특성에 맞추어 유용 유전자 탐색과 물질 생산 가능성을 유추하는데 활용할 예정이다.

다. NGS 기반의 담수 원핵생물 군집 분석

영산강 14지점과 섬진강 14지점의 봄, 여름 담수의 원핵생물 종 다양성을 분석하고자 NGS 분석을 진행하였다. 총 56 시료에 대해 분석한 결과 3,530,642 reads가 확보되었으며, 평균적으로 시료 당 60,777 reads로 분석되었다. 각 시료별로 증폭된 염기서열의 OTUs는 평균적으로 2,528 OTUs로 분석되었는데 수계 채집지에 따라 차이는 있으나 영산강 시료는 평균 2,207 OTUs, 섬진강 시료는 평균 2,848 OTUs로 분석되어 섬진강 시료에서 조금 더 다양한 원핵생물 종이 확인되었다. 이들의 분류학적 분포를 EZ-biocloud의 데이터베이스를 통해 분석한 결과, 발원지는 계절에 상관없이 원핵생물의 종 분포가 유사하게 나타났으며 수계 내에서 가장 높은 다양성과 함께 다른 지점들과는 확연히 구별되는 독특한 분포를 보였다.

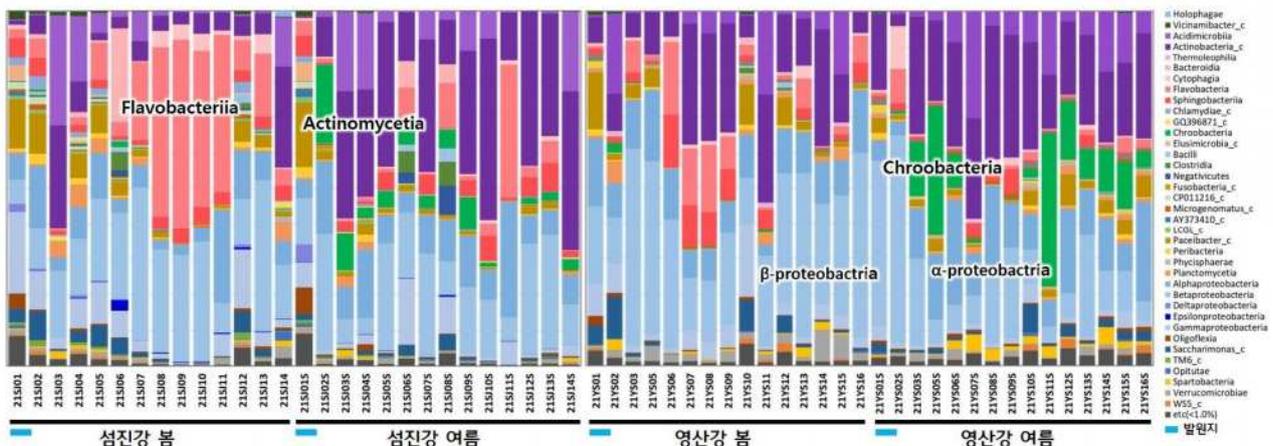


그림 16. 강(class) 수준에서의 섬진강과 영산강의 지점별·계절별 NGS 기반 원핵생물 분포

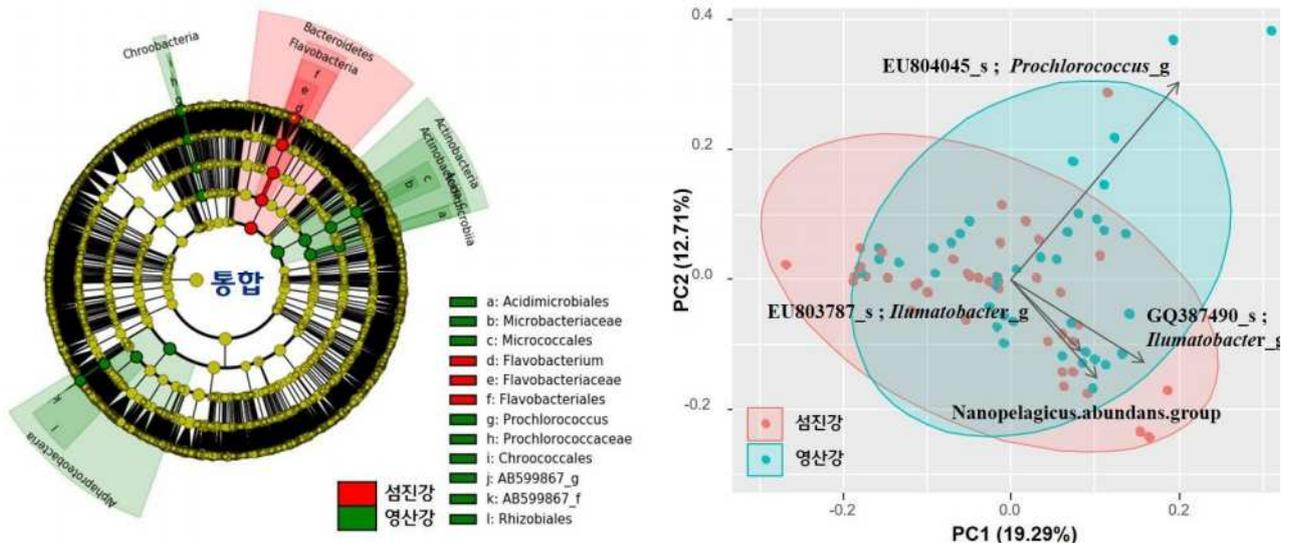


그림 17. LefSe 분석과 PCA를 활용한 영산강과 섬진강의 담수원핵생물 군집구조 비교

대체적으로 영산강보다 섬진강에서 더욱 다양한 분포를 보였는데, 이는 강의 크기와 유량 등의 영향으로 영산강의 분포가 우점 분류군에 의한 영향을 크게 받았기 때문으로 생각된다. 공통적으로 나타나는 분류군은 Proteobacteria 특히, Alpha-proteobacteria와 Beta-proteobacteria의 비율이 높게 분석되었으며 이는 영산강에서 더욱 강하게 나타났다. 섬진강과 영산강의 분포에서 가장 큰 차이는 섬진강에서 Bacteroidetes 분류군이 훨씬 더 높은 비율로 나타난 것에 비해 영산강은 Alpha-proteobacteria와 Actinobacteria 분류군의 분포가 더욱 두드러지게 나타났다는 것이다(그림 17). 특히, 섬진강의 Bacteroidetes는 *Flavobacterium* 속의 비율이 높았고 영산강은 Actinobacteria 문의 Micrococcales 목과 Cyanobacteria 문의 *Prochlorococcus* 속의 비율이 높았으며, 주성분 분석의 결과에서도 현재까지 배양되지 못한 *Prochlorococcus*, Actinobacteria 문의 *Illumatobacter* 속과 *Nanopelagicus abundans* 종 그룹이 섬진강과 구별되는 분류군으로 나타났다.

각 수계 내에서 계절별로 나타나는 원핵생물 군집의 차이를 비교한 결과에서는 섬진강의 경우 봄 시료에서는 *Flavobacterium* 속, 여름에는 Cyanobacteria의 Chroobacteria, Actinobacteria의 *Planktophilia_f* 분류군이 계절별로 차별화되어 나타나는 주요 분류군으로 분석되었다(그림 18). 특히, 종(species) 수준의 주성분 분석에서는 *Flavobacterium succinicans*, *Limnohabitans parvus* 종이 가장 영향을 준 요인으로 분석되었는데 도말에 활용했던 시료에서 다수로 분리된 종들이었고, 배양을 통한 원핵생물 분포와 일관된 데이터를 보여 원핵생물 자원 배양 조건이 적절하게 적용되었음을 알 수 있었다. 그러나 여름철 시료의 경우, *Nanopelagicus abundans* 종과 *Planktophilia versatilis* 종 그룹이 주요한 종이였음에도 불구하고 전혀 배양되지 못한 결과를 보였다. 이 분류군들은 여름철 수계의 주요 분류군임에도 불구하고 배양이 어려워 전세계적으로도 실질적인 배양체가 확보되지 못한 candidatus 분류군이며, 방선균에 속하는 분류군임에도 불구하고 Cyanobacteria와 같은 특성을 보이는 것으로 보고되어 있다. 또한, 방선균임에도 불구하고 유전체의 크기가 매우 작아 대사과정에 필요한 대량의 유전자들이 결핍되어 있어 담수

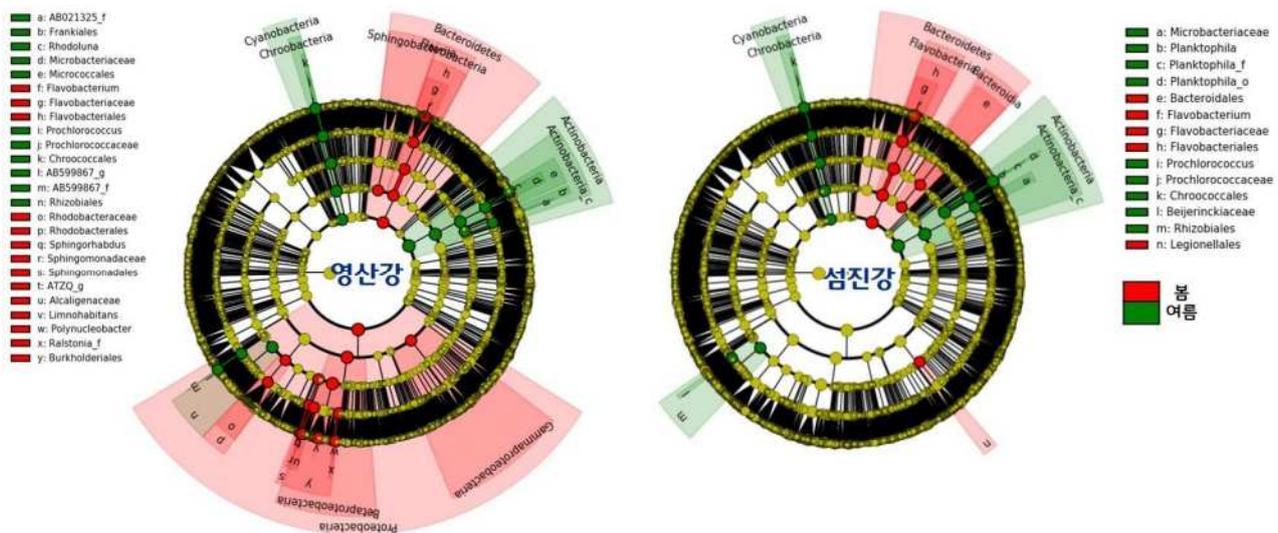


그림 18. 영산강과 섬진강의 계절별 원핵생물 분포에 대한 LefSe 분석 결과

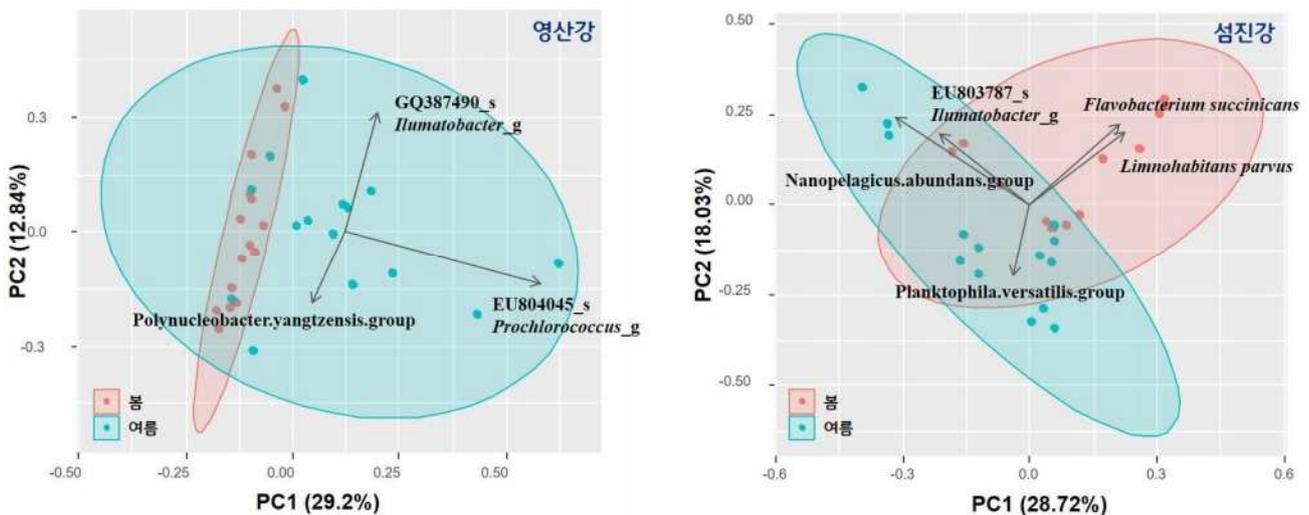


그림 19. 영산강과 섬진강의 계절별 원핵생물 분포에 대한 PCA 결과

생태계에 존재하는 다양한 생물과의 상호작용이 필수적으로 요구되는 분류군이다. 이러한 분류군들의 분포는 영산강의 여름철 시료에서도 동일하게 나타났다. 그 외에도 영산강 수계 내에서는 봄철 시료의 주요 분류군이 Bacteroidetes 의 *Flavobacterium*, Proteobacteria 의 *Limnohabitans*, *Polynucleobacter*, *Sphingomonas* 등 다양한 분류군을 포함하여 계절적 차이가 섬진강보다 더욱 크게 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 계절적 차이를 보이며 시기에 따라 우점하는 분류군들은 담수 환경의 변화와 상관관계가 매우 높을 것으로 생각되므로 향후 중장기적인 계획에 따라 필수적으로 확보해 나가야 할 것이다. 또한, 이들의 생태학적 역할 구명을 통해 담수생태계를 이해하고 보존해 나가는데 활용할 수 있도록 해야 할 것이다.

수계와 계절에 따른 차이에 대한 분석 외에도 담수 시료의 원핵생물 군집에서는 다양한 혐

기성 원핵생물의 존재가 확인되었으나, 호기성 원핵생물의 발굴을 중점적으로 수행해왔던 본 연구과제에서는 배양체로 확보되지는 못했다. *Chloroflexi*, *Clostridia*, *Bacteroides* 등 담수 환경에서 존재하는 것이 확인된 혐기성 원핵생물의 자원에 대한 발굴이 향후 새롭게 도입되어야 할 것이며, 이는 호기적 환경에만 국한되어 있던 담수환경의 원핵생물에 대한 이해를 높힐 수 있을 것이다. 그 외에도 군집 다양성이 가장 높았던 발원지와 상류 지역에 대한 집중발굴은 확보되는 자원의 다양성을 증대시키는데 크게 기여할 수 있을것으로 기대되므로, 차년도 발굴 계획에 반영할 예정이다. 또한, 담수 시료에서의 다양성은 강우량, 계절 등에 영향을 받아 자주 바뀔 수 있지만 담수 퇴적토에서의 원핵생물 다양성은 장기간 누적되어 담수의 분포와는 차별적인 군집 구조를 보일 수 있으며, 생태계의 물질순환에 관련된 다양한 역할을 수행하는 원핵생물이 분포하고 있을 것이므로 차년도 계획에 반영하여 담수와 담수 퇴적토에 대한 비교 연구도 함께 추진되어야 할 것이다.

IV. 결론

본 연구는 담수 원핵생물 배양체 확보에 있어 자원의 다양성 확대와 생물종 발굴을 효율적으로 수행하기 위해 중장기 계획에 따라 매년 중점 조사지역을 선정하여 수행하고 있으며, 지난 해에 이어 영산강과 섬진강의 본류, 대형지류 및 특이서식지 석호 등 다양한 채집지에서 시료를 확보하였다. 전체 7문, 19강, 61목, 137과, 374속의 다양한 원핵생물이 배양을 통해 확보되었으며 특히, 영산강에서는 배양이 어려운 *Acidobacteria*, *Deinococcus*, *Verrucomicrobia* 등에 속하는 균주들이 분리되는 성과를 거두었다. 본 연구에서 발굴된 미기록 66종과 신종후보 4종은 섬진강에서 26종, 영산강에서 21종, 석호 등 기타지역에서 17종이 발굴되었다. 발굴 종은 계통학적으로 6문, 12강, 27목, 39과, 54속으로 분류되었으며, *Acidobacteria* 1종, *Actinobacteria* 16종, *Bacteroidetes* 6종, *Firmicutes* 5종, *Proteobacteria* 41종, *Verrucomicrobia* 1종으로 분류되었다. 또한, 시료 형태에 따라서는 담수 38종, 강변 토양에서 32종이 분리되어 담수 강변 토양 등의 시료 활용이 발굴 효율에 크게 기여한 것으로 생각된다. 본 연구를 통해 발굴된 자원은 기발굴종과 함께 8종의 기질을 분해하는 유용 효소 활성을 탐색하였으며 *Streptomyces* 분류군 등 3종 이상의 효소 활성을 보이는 29종이 확인되었다. 확보된 발굴자원과 자원의 기초 정보와 유용효소활성 정보는 차년도에 수행되는 원핵생물 자원을 활용한 항암, 항균, 계면활성 등에 유용자원을 스크리닝하고 심화연구를 진행하는 후속 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

마지막으로, 본 연구과제는 다양한 자원의 확보와 발굴효율을 증대하기 위하여 활성산소 제거배지의 도입과 기확보된 난(難)분류군의 계통심화연구를 통한 유의미한 결과를 얻었으며, 본 연구를 통해 확립된 방법들은 차년도 연구에서도 적용하여 자원 발굴의 효율성을 증진하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, NGS 기반의 원핵생물 군집 구조 분석을 통해 수계별, 계절별 주요 분류군을 확인하였으며 중장기 발굴 전략 구축에 활용하여, 원핵생물 발굴과 자원 확보의 향후 나아갈 방향을 정하는데 기여할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

- Bar-On, Y.M., Phillips, R., Milo, R., 2018.** The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115:6506-6511.
- Felsenstein, J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):83-791.
- Guo, U., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y. 2008.** A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *In J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:149-159
- Henson, M.W., Lanclos, V.C., Faircloth, B.C., Thrash, J.C., 2018.** Cultivation and genomics of the first freshwater SAR11 (LD12) isolate. *The ISME journal* 12:1846-1860.
- Jeon, Y.-S., Lee, K., Park, S.-C., Kim, B.-S., Cho, Y.-J., Ha, S.-M., Chun, J. 2013.** EzEditor : A versatile sequence alignment editor for both ribosomal RNA and protein coding genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 689-691.
- Jukes T. H., Cantor C. R. 1969.** Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21 - 132. Edited by Munro H. N. New York: Academic Press.
- Kato, S., Terashima, M., Yama, A., Sato, M., Kitagawa, W., Kawasaki, K., Kamagata, Y. 2020.** Improved isolation of uncultured anaerobic bacteria using medium prepared with separate sterilization of agar and phosphate. *Microbes Environ.* 35(1):ME19060.
- Kawasaki, K., Kamagata, Y. 2017.** Phosphate-catalyzed hydrogen peroxide formation from agar, gellan, and κ -carrageenan and recovery of microbial cultivability via catalase and pyruvate. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(21):e01366-17.
- Kim, S., Kang, I., Seo, J.H., Cho, J.C., 2019.** Culturing the ubiquitous freshwater actinobacterial acI lineage by supplying a biochemical 'helper' catalase. *The ISME journal* 13:2252-2263.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870-1874.
- Lee, I., Kim, Y. O., Park, S. C., Chun, J. 2015.** OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:1100-1103.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P., Göker, M. 2013.** Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.
- Neuenschwander, S.M., Ghai, R., Pernthaler, J., Salcher, M.M. 2018.** Microdiversification

in genome-streamlined ubiquitous freshwater Actinobacteria. *ISME J.* 12:185-198

Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. 12(6):R60.

Tindall, B.J., Tomlinson, G.A., Hochstein, L.I. 1987. Polar lipid composition of a new halobacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 9:6-8.

Wetzel, R. G. 2001. Limnology: lake and river ecosystems: Gulf Professional Publishing.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67:1613-1617.