



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

한국과 미국산 유독 와편모류
Karlodinium veneficum 배양주 간의
연관 세균 군집 비교 분석



2022년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

지 구 환 경 시 스 템 과 학 부 해 양 학 전 공

이 의 수

이 학 석 사 학 위 논 문

한국과 미국산 유독 와편모류
Karlodinium veneficum 배양주 간의
연관 세균 군집 비교 분석



지도교수 김 선 주

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2022년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

지 구 환 경 시 스 템 과 학 부 해 양 학 전 공

이 의 수

이의수의 이학석사 학위논문을 인준함.

2022년 8월 26일



위 원 장 이학박사 양 은 찬 (인)

위 원 이학박사 박 범 수 (인)

위 원 이학박사 김 선 주 (인)

목 차

Abstract	iii
List of Tables	v
List of Figures	vi
 I. 서론	 1
II. 재료 및 방법	4
1. <i>Karlodinium veneficum</i> KR, US의 성장 단계별 PAB, FLB 비교 ...	4
가. <i>K. veneficum</i> 배양주 확보 및 동정	4
나. 배양주 내 PAB 및 FLB 포집	7
다. 포집한 PAB, FLB의 라이브러리 준비 및 시퀀싱	7
라. 생명정보학적 분석(Bioinformatic analysis)	8
1) 품질 관리(Quality control)	8
2) 분류학적 식별(Taxonomic identification)	9
3) 다양성과 풍부도(Diversity and richness)	9
4) 군집 구조 비교(Comparison of community structure)	10
2. <i>K. veneficum</i> KR, US 분리 세균 첨가 실험	11
가. KR, US 배양주 내 세균 분리 및 동정	11
나. 배양주 내 분리 세균 첨가	13
III. 결과	14
1. <i>K. veneficum</i> KR, US의 성장 단계별 PAB, FLB 비교	14
가. 유해적조생물 <i>K. veneficum</i> KR, US 성장 단계 및 PAB, FLB 별 포집 시료의 α -diversity 분석	14
나. <i>K. veneficum</i> KR과 US의 성장 단계 및 PAB, FLB 세균 군집	

변화	20
다. <i>K. veneficum</i> KR과 US의 PAB, FLB 세균 군집 차이	24
2. <i>K. veneficum</i> KR, US 분리 세균 접종 실험 양상	28
IV. 고찰	33
V. 요약	38
VI. 참고문헌	39
VII. 부록	54
VIII. 감사의 말	56



Comparative analysis of bacterial communities associated with Korean and
American strains of the toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum*

Eui Soo Lee

Division of Earth and Environmental System Sciences
The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

Based on recent findings, bacteria are capable of playing a key role in the formation of harmful algal blooms (HABs), but it is still unclear how bacteria can contribute on bloom formation due to lack of evidence. This study compared the toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum* particle-associated bacteria (PAB) and free-living bacteria (FLB) isolated from Korea (KR) and the United States (US) using the Oxford Nanopore MinION method and investigated the growth pattern of *K. veneficum* strains, which acted as growth-associated bacteria isolated within two strains. Consequently, the dominant group among the bacterial communities of the

KR strain was found to belong to the genera *Pseudomonas*, *Sulfitobacter*, *Algoriphagus* and that of the US strain belonged to *Marinobacter*, *Nioella*, *Seoheicola*, and *Robignitalea*. PAB and FLB for the same *K. veneficum* strain was similar. Bacterial community analysis between KR and US confirmed that bacterial composition including PAB and FLB was not species-specific and apparently differed between these communities. However, the percentage of the genus *Limnobacter* increased significantly compared to the PAB in the FLB of both strains, which could be related to the algal substrates of *K. veneficum*, but further analyses are required. Subsequently, bacteria separated from KR and US were inoculated at a concentration gradient to identify the bacterial communities associated with growth. The growth improved compared to control in the KR culture inoculated with the genus *Sulfitobacter*, and two inoculated bacterial species belonging to the same genus showed a similar pattern. The PAB ratio of the KR strain increased as the genus *Sulfitobacter* ratio continued to grow, indicating that the strain induced growth by favoring the functional characteristics of *Sulfitobacter*. However, when two bacteria species belong to the genus *Marinobacter* were inoculated in the same way, the growth of both *K. veneficum* strains was inhibited. That is, substrates of *Marinobacter* are presumed to have induced cell lysis of the two strains, but further experiments are required to verify this.

List of Tables

Table 1. *Karlodinium veneficum* strains used in this study.

Table 2. Primers used in this study.

Table 3. Oxford Nanopore MinION analysis results in this study.

Table 4. α -diversity indices per PAB and FLB bacteria samples isolated from *Karlodinium veneficum* KR and US growth phase.

Table 5. A bacteria isolation list of *Karlodinium veneficum* KR and US. The bacteria were simultaneously isolated at the sampling point in Figure 1.

List of Figures

Figure 1. The growth curves of *Karlodinium veneficum* KR (A) and US (B). Arrows represent each PAB and FLB sampling point. KR, *Karlodinium veneficum* LIMS-PS-3423 strain; US, *Karlodinium veneficum* CCMP2936 strain; PAB, Particle-associated bacteria; FLB, Free-living bacteria.

Figure 2. Rarefaction curve of lag (Lag), exponential (Exp), stationary (Stn) growth phase of *Karlodinium veneficum*.

Figure 3. Community composition of PAB and FLB bacteria in the lag (Lag), exponential (Exp), and stationary (Stn) growth phases of *Karlodinium veneficum* KR and US at the (A) family, (B) genus, and (C) species level. At the family level, the graph on the left side represents the class group at the corresponding family level.

Figure 4. Krona visualization method expressing total bacteria communities in *Karlodinium veneficum* KR and US. (A) KR PAB, (B) KR FLB, (C) US PAB, (D) US FLB.

Figure 5. Histograms of Linear discriminant analysis (LDA) scores of 16S gene sequences of microbes in the samples (A). Key phylotypes of differently abundant taxa were identified using LDA effect size (LEfSe) algorithm in different strains and their relative abundance was

presented accordingly. Cladograms derived from LEfSe analysis of differential microbial taxa (B). The central point denoted the root of the tree of bacteria and expanded to each ring, representing the next lower taxonomic level from phylum to genus. Each circle's diameter represents the relative abundance of the taxon in each microbial community.

Figure 6. Nonmetric multi-dimensional scaling (nMDS) plots of bacterial communities (16S rRNA gene) in *Karlodinium veneficum* KR and US.

Figure 7. Changes in *Karlodinium veneficum* KR and US cell density after inoculating bacteria belonging to the genus *Sulfitobacter*. Control did not inoculate bacteria, and inoculated bacteria applied a gradual concentration gradient.

Figure 8. Changes in *Karlodinium veneficum* KR and US cell density after inoculating bacteria belonging to the genus *Marinobacter*. Control did not inoculate bacteria, and inoculated bacteria applied a gradual concentration gradient.

Figure S1. Phylogenetic analysis of the *Karlodinium veneficum* ITS1-2 sequences. The tree shown is the ML tree.

Figure S2. Evolutionary relationships of bacterial taxa used in this study. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which

the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.



I. 서론

세균(bacteria)은 미세조류에 의해 생성된 유기물을 재광물화(remineralisation)하여 다시 미세조류에 무기영양소를 제공하고(Behrenfeld et al. 2005; Taylor et al. 2014), 비타민 B 등의 미세조류 성장 촉진 화합물을 분비하는 것으로 알려져 있다(Amin et al. 2009; Cruz-Lo'pez and Maske 2016). 미세조류 또한 세균이 없는 무균(axenic) 환경에서보다 세균이 공존하는 환경에서 더 큰 성장 효과를 보인다는 결과가 있다(Amin et al., 2015; Keating et al., 1978). 이는 수계 내에서 두 생물 간의 연관관계가 분명하게 존재함을 의미한다(Grossart 1999; Amin et al. 2015).

미세조류 주변 세균 군집의 경우 조류가 분비하는 물질이나 조류의 성장 단계에 의해서도 영향을 받을 수 있으며(Fernández et al. 1992; Reitan et al. 1994; van Rijssel et al. 2000; Grossart et al. 2005), 세균의 생활 유형에 따라 PAB(Particle-associated bacteria)와 FLB(Free-living bacteria)로 구분된다(DeLong et al. 1993; Crump et al. 1999; Jasti et al. 2005; Rooney-Varga et al. 2005). 기존 연구들을 바탕으로 PAB와 FLB의 세균 군집은 계통 유전학적으로 구분되며, 두 군집 모두 미세조류와 밀접한 관련이 있다고 보고되었다(Crump, Armbrust, & Baross, 1999; Rooney-Varga, Giewat, Savin, LeGresley, & Martin, 2005). 하지만 현장 시료에서의 미세조류를 비롯한 다양한 생물들의 복잡성을 고려할 때, 현장 시료를 이용하여 특정 미세조류의 관련 세균, 특히 PAB에서 관련 세균을 특정하는 것은 어렵다. 이에 다양한 연구에서 이를 대체한 방법으로 실험실 환경에서 미세조류를 이용한 관련 PAB와 FLB에 대해 연구되었다(Park et al. 2017a).

흥미롭게도, 세균이 없는 최적의 성장조건(예 : 배지, 온도, pH 등)이 갖춰졌을 때보다 미세조류 연관 세균을 첨가하여 배양 시 미세조류의 성장 증진을 보이는 것으로 알려져 있다(Bolch et al., 2011; Park et al., 2017b). 하지만 이러한 연구는 연구 종의 단일 배양주(strain)만 분석되었을 뿐, 동일 종의 다른 배양주는 고려되지 않아 해당 현상이 종 특이적인 현상이라고 판단하기 어렵다. 기존 연구 결과에 따르면 미세조류 관련 세균 군집은 군집 주변 환경에 의해 주로 결정되고, 환경 적응을 위해 주변 세균을 축적하는 것으로 보고되었다(Seymour et al., 2017; Xia et al., 2021). 이는 지리적으로 차이가 큰 동일 종 다른 배양주의 경우 주변 세균 군집 구성이 다를 수 있으며, 그에 따른 세균과 미세조류 간의 영향 또한 서로 다르다고 추측할 수 있다. 하지만 위와 같은 요인의 존재에도 불구하고 동일 종의 다른 배양주 간 세균 군집 연구는 미비한 실정이다.

*Karlodinium veneficum*은 유독성 와편모류로, 전 세계적으로 수많은 유해적조(HABs; Harmful Algal Blooms) 및 어류 폐사를 유도하는 것으로 알려져 있다(Kempton et al., 2002; Contact et al., 2002a; Place et al., 2011). 영국(Abott and Ballantine, 1957)에서 처음 분리된 이후부터, 남아프리카(Braud, 1957년), 유럽(Bjornland and Tangen, 1979), 북미(Li et al., 2000a, b), 호주(Ajani et al., 2001; Mooney, 2009) 등 전 세계적으로 적조가 다수 보고되었으며, 2000년 이후 홍콩과 산둥성 등에서 해당 종의 적조가 증가하는 추세이다(Xu et al., 2012; Yang et al., 2019). 하지만 해당 종의 위험성과 더불어 기존 연구에서 미세조류와 그 주변 세균 군집 간의 생태적 중요성에 대한 다양한 연구가 진행되었음에도, *K. veneficum*과 세균 군집에 대한 연구의 경우 일부 살조 세균 접종 실험만 시도되었을 뿐이었다(Tilney et al., 2014).

본 연구의 목적은 유해적조생물 *K. veneficum* 관련 PAB 및 FLB 군집

을 식별하고, 실험실 조건에서 해당 조류의 성장 단계와 관련된 변화를 관찰하는 것이다. 이를 위해 *K. veneficum*의 각 성장 단계에서 샘플을 분리하고 보다 포괄적으로 세균 다양성을 분석할 수 있는 나노포어(Oxford Nanopore MinION) 분석을 PAB 및 FLB 군집 분석에 사용했다. 또한 KR과 US 배양주 내 연관 분리 세균을 농도 구배를 주어 재접종함으로써, 군집 내 특정 세균 접종 시 *K. veneficum*의 성장에 영향을 미치는지 확인하였다.



II. 재료 및 방법

1. *Karlodinium veneficum* KR, US의 성장 단계별 PAB, FLB 비교

가. *K. veneficum* 배양주 확보 및 동정

실험에 사용한 *K. veneficum* 두 배양주에 대하여 KR(*K. veneficum* LIMS-PS-3423)은 한국해양과학기술원 해양시료도서관, US(*K. veneficum* CCMP2936)는 CCMP (National Center for Marine Algae and Microbiota)에서 분양받았다(Table. 1). 분양 받은 배양주는 121℃에서 15 분간 멸균한 f/2-Si(32 psu) 액체 배지에서 20℃, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12 : 12-h 명암조건에서 배양하였다.

KR과 US의 종 동정을 위해 필터 타워 (Sartorius, Goettingen, Germany)에 3.0 μm (pore-size)의 멤브레인 필터 (Millipore, Cork, Ireland; 직경 47 mm)로 여과하여 세포를 포집한 뒤, DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 사용법대로 DNA를 추출 후 -20℃의 냉동고에 보관하였다. 이후 PCR로 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S D1-D3 영역을 증폭시켰다. PCR 반응물은 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix(Takara Bio, Otsu, Japan) 12.5 μl , forward primer 1 μl , reverse primer 1 μl , 추출한 DNA 1 μl , 증류수 9.5 μl 를 첨가하여 최종 용량이 25 μl 가 되도록 하였다. 이후 95℃에서 5 분간 변성과정(denaturation)을 거쳐 95℃ 20 초(변성; denaturation), 60℃ 30 초(결합; annealing), 7

2℃ 1 분(신장; elongation)을 33 회 반복, 마지막으로 72℃ 5 분(신장; elongation)의 PCR thermal cycling으로 증폭시켰다.



Table 1. *Karlodinium veneficum* strains used in this study.

Species name	Strain name	Collection cite	Isolated
<i>Karlodinium</i>	LIMS-PS-3423 (KR)	East China Sea(33°45'09.20"N 124°00'04.56"E), Korea	2015
<i>veneficum</i>	CCMP2936 (US)	Delaware Inland Bays, Delaware, USA	2007



나. 배양주 내 PAB 및 FLB 포집

고압멸균 처리한 필터 타워 (Sartorius, Goettingen, Germany)를 2단으로 설치하여 PAB(Particle-associated bacteria)와 FLB(Free-living bacteria)를 동시에 포집할 수 있도록 하였다. 성장 단계에 따른 *K. veneficum* 내의 세균 집단을 확보하기 위해 모든 배양주는 유도기, 지수기, 안정기 시기에 맞춰 여과되었으며, 보다 정확한 분석을 위해 2배수의 실험구로 진행하였다. 200 mL의 *K. veneficum* 배양주를 3.0 μm (pore-size)의 멤브레인 필터 (Millipore, Cork, Ireland; 직경 47 mm)로 1차 여과를 진행하여 PAB를 포집하였고, 이후 여과액을 0.2 μm (pore-size)의 멤브레인 필터 (Millipore, Cork, Ireland; 직경 47 mm)에 통과시켜 FLB을 확보하였다. 각각의 필터는 2 mL 튜브(Eppendorf, Hamburg, Germany)에 넣어 DNA가 추출되기 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

다. 포집한 PAB, FLB의 라이브러리 준비 및 시퀀싱

PAB와 FLB 포집 시료의 DNA는 QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출했다. 추출된 모든 DNA 샘플은 Nanodrop 분광 광도계(Nanodrop spectrophotometer)를 사용하여 평가했다. 전체 16S rRNA 유전자의 증폭은 Taq DNA 중합효소(polymerase) LongAmp (NewEngland Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 사용하여 반응 용량 25 μl 으로 중합효소연쇄반응 (PCR)을 진행하였다. PCR 사이클은 98 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 분간 초기 DNA 변성 단계를 거친 후, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 분, 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3 분간 총 35 사이클을 반복하였으며, 최종적으로 72

°C에서 10분간 신장(extension)시킨 후 종료하였다. 이후 전기영동 과정을 통해 PCR 결과물을 확인하였다. 해당 과정을 통해 PCR 산물 내 16S rRNA amplicon 유무를 확인한 후, Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)을 sample-bead 비율 1:3 으로 맞춰 정제(purification)시켰다. 마그네틱 비드(magnetic beads)의 수세(washing) 공정 후 정제시킨 산물을 용출 버퍼(buffer) 10 μ l (10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 50 mM NaCl)로 추출하였다. 라이브러리의 최종 농도는 형광광도계 Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 라이브러리는 Oxford Nanopore Technologies의 프로토콜(protocol)에 따라 제작되었고, R 9.4 flow cell을 사용하여 시퀀싱 되었다. 시퀀싱 과정은 MinKNOW Mk 1c (Oxford Nanopore Technologies) 소프트웨어를 통해 모니터링 되었다.

라. 생명정보학적 분석(Bioinformatic analysis)

1) 품질 관리(Quality control)

시퀀싱 진행 후 생성된 fast5 파일은 Guppy (version 3.2.2, Oxford Nanopore Technologies, UK)를 이용하여 base-called 되었고, 여과 과정(filter step)은 Q-score ≥ 10 (quality filter) 및 length $\geq 1,000$ bp의 시퀀스만 유지하도록 적용하였다. 이후 demultiplexing, primers, barcode trimming이 포함된 Fastq 16S v3.2.1 (Oxford Nanopore Technologies, UK) 파이프라인을 사용하여 시퀀스를 평가하였다. 식별이 애매한 시퀀스

는 분석에서 제외되었다. 중복된 reads가 있는 샘플의 경우 Filtlong v0.20 (<https://github.com/rrwick/Filtlong>)을 사용하여 reads를 1,000 bp 미만으로 읽도록 필터링하고 ~50%의 최적의 reads (best reads)를 유지하였다.

2) 분류학적 식별(Taxonomic identification)

BLASTN은 EPI2ME software package (Oxford Nanopore Technologies) 내의 세균 및 고세균 16S ribosomal RNA database에 대한 NCBI RefSeq과 비교했을 때 명확한 시퀀스를 정렬하였고, 이전 연구(Hatfield et al. 2020)에서 제한한 대로 정확도 $\geq 77\%$ 이상인 시퀀스만 유지하였다. QIIME2 프레임워크에서 ONT 데이터를 분석하기 위한 메타바코딩 파이프라인인 MetONTIME 모듈 또한 비교 대상으로 분류학적 단위를 할당하기 위해 수행되었다(<https://github.com/MaestSi/MetONTIME>) (Caporaso et al. 2010; Bolyen et al. 2019). QIIME 분석의 경우, GenBank에 보관된 BioProject 33175와 균 16S 유전자의 EPI2ME 16S workflow에서 사용된 배열의 결합을 통해 특정 16S rRNA 유전자 데이터베이스를 선별하였다. EPI2ME의 결과물은 in-house python scripts를 이용하여 각 NCBI 분류(taxa) ID의 상대적 빈도수(relative abundance)를 정규화했다. 분류학적 식별자는 NCBI(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/taxonomy/>)에서 차용되었다. 시퀀싱 오류를 줄이기 위해서, 적어도 하나의 샘플에서 상대적 빈도수가 0.01% 미만인 분류군은 제거되었다.

3) 다양성과 풍부도(Diversity and richness)

각 샘플에 대하여 OTU(Operative Taxonomic Unit) 빈도표(frequency table)의 in-house python scripts를 사용하여 구축되었다. 표본과 연관된 미소생물학적 군집(microbiota community)의 알파 다양성은 R package phyloseq (McMurdie and Holmes 2013) (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/phyloseq.html>)의 estimate_richness 기능을 사용하여 관찰된 종(Observed species) 및 Shannon, Simpson, Chao1, ACE 지수를 계산하여 비교했다. 희박화 분석(rarefaction analysis)은 vegan(<https://github.com/vegandevs/vegan/>)을 사용하여 sequencing depth performance 평가를 수행했다. 계산된 모든 다양성 지수는 R 플랫폼 내 ggplot2를 사용하여 시각화했다(<https://ggplot2.tidyverse.org>).

4) 군집 구조 비교(Comparison of community structure)

표본 간 미생물 군집 차이는 단방향 분산 분석을 통해 평가한 뒤 $P\text{-value} < 0.05$ 를 적용하여 사후 다중 비교 Tukey-HSD 테스트를 수행했다. 미생물 군집 구조는 상대적 빈도수 데이터를 기반으로 Bray-Curtis distance를 이용하여 분석하였으며, 주좌표분석(PCoA)은 vegan을 이용한 다변량 비지도 기반 데이터(multivariate unsupervised data) 탐구로 수행되었다. 위에 해당되는 경우 FDR의 $P\text{-value}$ 보정을 통해 두 검체 그룹 간(즉, 두 온도 간) 세균 군집 분류군의 빈도수를 비교했다. PCoA 결과는 ggplot2를 사용하여 시각화했다.

2. *K. veneficum* KR, US 분리 세균 첨가 실험

가. KR, US 배양주 내 세균 분리 및 동정

KR과 US 배양주 내 세균은 Marine Broth 2216(MB) (Difco, Detroit, MI, USA) 평판 배지에서 분리하였다. MB 배지에 한천을 2% 비율로 첨가하여 121℃에서 15 분 간 멸균 후, 배지를 냉각한 후, KR과 US 배양주를 각각 다른 플레이트에 100 µl씩 분주하여 도말하였다. 이후 20℃에서 3-5 일간 배양 후 순수분리 될 때까지 균주 분리 작업을 반복하였다. 선정된 균주의 액체 배양은 한천을 제외한 동일 성분의 배지(MB)를 이용하여 20℃, 100-150 rpm의 조건에서 72 시간 진탕 배양하였다.

KR과 US 배양주로부터 분리한 세균은 16S rRNA universal primer는 Forward primer 27F와 Reverse primer 1492R (Table. 2)을 사용하여 증합 효소 연쇄 반응(PCR; polymerase chain reaction)을 진행하였다. PCR 반응물은 Ex Taq 0.125 µl, 10 Ex Taq buffer 2.5 µl, dNTP 2.5 µl, forward primer 0.5 µl, reverse primer 0.5 µl, 추출한 DNA 3 µl, 증류수 16.375 µl를 첨가하여 최종 용량이 25 µl가 되도록 하였다. 이후 95℃에서 5 분간 변성과정(denaturation)을 거쳐 95℃ 20 초(변성; denaturation), 53℃ 10 초(결합; annealing), 72℃ 15 초(신장; elongation)을 35 회 반복, 마지막으로 72℃ 9 분(신장; elongation)의 PCR thermal cycling으로 증폭시켰다. PCR 반응 결과는 Dyne 100 bp DNA Ladder(DYNEBIO Inc.)를 이용하여 1% 아가로스 젤에서 110V, 30 분간 전기영동 한 후 UV visualization을 통해 확인하였다. 염기서열은 Geneious (Version 7.1.3, Biomatters, Auckland, New Zealand) 프로그램을 이용하여 양방향 염기서열을 교차 분석하였다.

Table 2. Primers used in this study.

Target	Region	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
<i>K. veneficum</i>	18S	AT18F01	YACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG	Ki et al, 2005
		AF18R01	GCTTGATCCTTCTGCAGGTCACC	
	ITS1-ITS2	KvITS1F2	GGTTTCTTTGGGTGGTCTTTATGG	Zhang et al., 2008; Huang et al., 2019
		KvITS2R2	GAGCAGGCTACGAGTCAACAAC	
	28S (D1-D3)	D1R	ACCCGCTGAATTTAAGCATA	Scholin et al., 1994; Mikulski et al. 2005
		D3Ca	ACGAACGATTGCACGTCA	
Bacteria	16S	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane et al., 1991
		1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	



나. 배양주 내 분리 세균 첨가

앞선 방법으로 KR과 US에서 분리한 뒤 액체 배지(MB)에 배양한 세균은 50mL 코니칼 튜브(SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 담아 원심분리(4℃에서 3700 G, 10분 간) 하였다. 이어서 고압멸균 처리한 f/2-Si 배지로 치환 및 수세하는 과정을 3회 반복하였다. 이후 안정기 상태의 *K. veneficum*을 50 mL 쉼처 플라스크(SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 10% 비율로 접종한 뒤 세균을 $1 \times 10^5 - 10^8$ cells/mL의 비율로 차등 접종하였다.

*K. veneficum*의 세포 밀도를 측정하기 위해 일정한 날짜(0, 1, 3, 5, 7, 10, 13, 16, 20일, 20일 이후는 5일 간격)에 맞춰 고정용액으로 포집(subsampling) 한 뒤, 측정 전까지 각각 냉장 보관(-4℃) 하였다. *K. veneficum* 세포 밀도는 글루타르알데하이드(최종 농도 1%)로 고정된 뒤, Sedgwick-Rafter counting chamber를 사용하여 계수하였다.

*K. veneficum*의 성장 효과(Growth effect)는 다음 식에 의해 측정되었다 :

$$\text{Growth effect} = (A'_{(T-\text{Treatment})} - A_{(T-\text{Control})}) / A_{(T-\text{Control})}$$

여기서 $A'_{(T-\text{Treatment})}$ (cells/mL)와 $A_{(T-\text{Control})}$ (cells/mL)은 각각 실험구와 대조구에서의 *K. veneficum* 세포 밀도이고, T는 배양 기간(일)이다. 박테리아의 성장 효과 값이 ≥ 0.2 에서 ≤ -0.2 인 세균은 각각 성장 촉진 세균과 성장 저해 세균으로 간주했다. (Park et al., 2016; Park et al., 2017b)

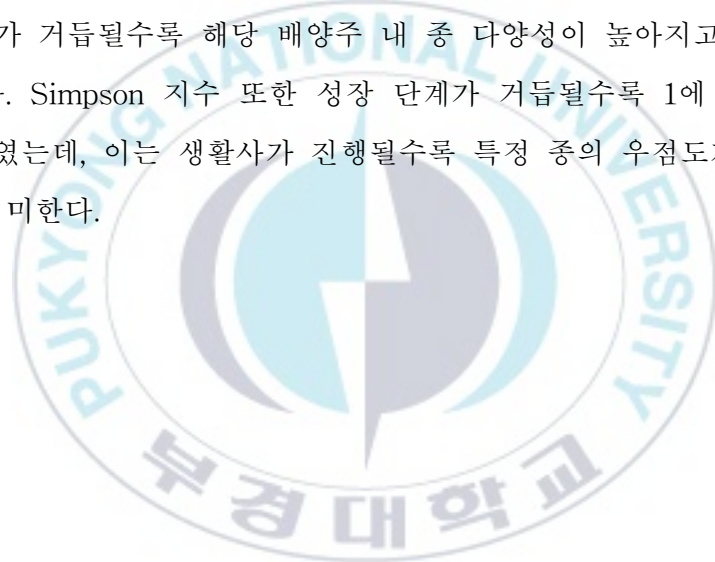
III. 결과

1. *K. veneficum* KR, US의 성장 단계별 PAB, FLB 비교

가. 유해적조생물 *K. veneficum* KR, US 성장 단계 및 PAB, FLB 별 포집 시료의 α -diversity 분석

분석에 들어가기에 앞서, *K. veneficum* KR과 US의 종 동정을 위해 PCR을 진행하였다. KR과 US로부터 추출한 DNA를 이용하여 ITS 영역을 증폭한 결과, 해당 영역의 99%가 일치함을 통해 두 배양주가 동일 종임을 확인하였다(Figure S1). *K. veneficum* KR과 US 두 배양주의 성장 단계 및 PAB와 FLB 세균 포집을 위하여 다음과 같은 시기에 시료를 채집하였다(Figure 1). 포집된 시료는 나노포어(Oxford Nanopore MinION) 분석을 실시하여 각각의 성장 단계 시료로부터 총 17,692-126,562 개의 reads를 확인했다(Table. 3). 두 배양주에서 포집된 모든 분석 시료에 대한 희박화 곡선(rarefaction curve)에서 모든 곡선이 포화상태에 이르지 않았지만, 전체 시료에서 Good's coverage(%) 수치가 99.6% 이상 측정되어 전체 세균 군집을 파악하는 데 충분한 reads를 획득하였고, 해당 분석이 신뢰성을 가지는 것으로 판단하였다(Table 4, Figure 2). 이후 포집한 시료의 세균 군집 분석을 바탕으로 산출된 α -diversity 통계 분석 결과를 정리하였다(Table 4). PAB와 FLB 별 세균 시료의 observe 수치는 *K. veneficum* KR (PAB : 774-1282; FLB : 1501-1943)과 US (PAB : 1327-1845; FLB :

1175-1840) 두 배양주에서 성장에 따라 공통적으로 증가하여, 성장 단계가 거듭될수록 발견되는 종이 증가한다는 것을 확인했다. 시료 내 세균 군집 생태에 대한 다양성과 상대적 빈도수 조사를 위하여 Chao1, ACE, Shannon, Simpson 지표를 사용하여 나타내었다. Chao1과 ACE 지표를 활용한 비모수적 통계분석 결과에서 각 배양주에서의 성장 단계 및 생활사별 종 빈도수에 차이가 있는 것으로 나타났다. KR과 US의 생활사 별 Chao1, ACE 지수는 PAB와 FLB에서 공통적으로 성장 단계가 거듭될수록 값이 증가하였다. Shannon 지수 또한 생활사가 진행될수록 그 값이 점점 커져, 성장 단계가 거듭될수록 해당 배양주 내 종 다양성이 높아지고 있는 것을 확인하였다. Simpson 지수 또한 성장 단계가 거듭될수록 1에 가까워지는 경향을 보였는데, 이는 생활사가 진행될수록 특정 종의 우점도가 높아진다는 것을 의미한다.



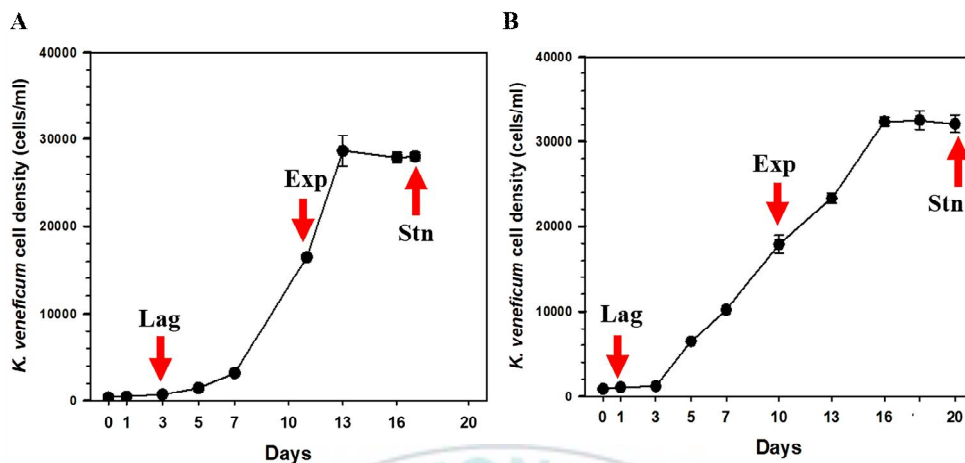


Figure 1. The growth curves of *Karlodinium veneficum* KR (A) and US (B). Arrows represent each PAB and FLB sampling point. KR, *Karlodinium veneficum* LIMS-PS-3423 strain; US, *Karlodinium veneficum* CCMP2936 strain; PAB, Particle-associated bacteria; FLB, Free-living bacteria.

Table 3. Oxford Nanopore MinION analysis results in this study.

		Sample name	Number of total reads	Average length (bp)	Number of qualified reads	Number of classified reads	Number of unclassified reads	Average accuracy
Particle-associated								
KR	Lag	KR_lag_3um_PA_1	69,408	1,220	69,408	67,797	1,611	91%
		KR_lag_3um_PA_2	49,981	1,285	49,981	49,237	744	91%
	Exponential	KR_exp_3um_PA_1	68,774	1,151	68,774	54,052	14,722	88%
		KR_exp_3um_PA_2	90,113	1,142	90,113	72,971	17,142	89%
	Stationary	KR_sta_3um_PA_1	96,138	1,093	96,138	93,895	2,243	90%
		KR_sta_3um_PA_2	81,522	1,098	81,522	66,293	15,229	89%
US	Lag	US_lag_3um_PA_1	28,631	874	28,631	27,100	1,531	89%
		US_lag_3um_PA_2	26,362	1,001	26,362	25,203	1,159	89%
	Exponential	US_exp_3um_PA_1	28,311	899	28,311	26,537	1,774	88%
		US_exp_3um_PA_2	31,816	885	31,816	29,670	2,146	88%
	Stationary	US_sta_3um_PA_1	41,692	652	41,692	38,737	2,955	87%
		US_sta_3um_PA_2	22,958	714	22,958	16,427	5,531	88%
Free-living								
KR	Lag	KR_lag_0.2um_FL_1	78,671	1,137	78,671	77,186	1,485	89%
		KR_lag_0.2um_FL_2	78,522	1,164	78,522	77,191	1,331	89%
	Exponential	KR_exp_0.2um_FL_1	108,400	1,096	108,400	104,051	4,349	89%
		KR_exp_0.2um_FL_2	95,168	1,087	95,168	91,955	3,213	89%
	Stationary	KR_sta_0.2um_FL_1	118,329	1,003	118,329	115,130	3,199	89%
		KR_sta_0.2um_FL_2	126,562	1,057	126,562	123,444	3,118	89%
US	Lag	US_lag_0.2um_FL_1	20,385	972	20,385	19,940	445	88%
		US_lag_0.2um_FL_2	27,603	934	27,603	23,414	4,189	89%
	Exponential	US_exp_0.2um_FL_1	17,692	1,274	17,692	17,608	84	88%
		US_exp_0.2um_FL_2	21,270	1,306	21,270	21,178	92	88%
	Stationary	US_sta_0.2um_FL_1	31,579	963	31,579	30,642	937	88%
		US_sta_0.2um_FL_2	35,019	952	35,019	33,299	1,720	85%

Table 4. α -diversity indices per PAB and FLB bacteria samples isolated from *Karlodinium veneficum* KR and US growth phase.

		Observe	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Good's coverage (%)
Particle-associated							
KR	Lag	470	774.233	815.627	2.168	0.635	99.910
	Exponential	685	1142.139	1175.961	3.313	0.832	99.850
	Stationary	780	1282.168	1322.732	3.651	0.876	99.850
US	Lag	762	1273.775	1327.189	3.518	0.821	99.730
	Exponential	921	1679.797	1724.982	4.140	0.935	99.670
	Stationary	981	1772.556	1845.697	4.453	0.951	99.670
Free-living							
KR	Lag	902	1501.659	1511.387	3.766	0.895	99.845
	Exponential	1120	1749.562	1799.736	4.171	0.889	99.830
	Stationary	1150	1943.049	1985.746	4.102	0.890	99.795
US	Lag	739	1200.018	1175.751	3.854	0.891	99.650
	Exponential	822	1308.358	1343.867	3.597	0.885	99.675
	Stationary	1039	1867.229	1840.696	4.339	0.936	99.725

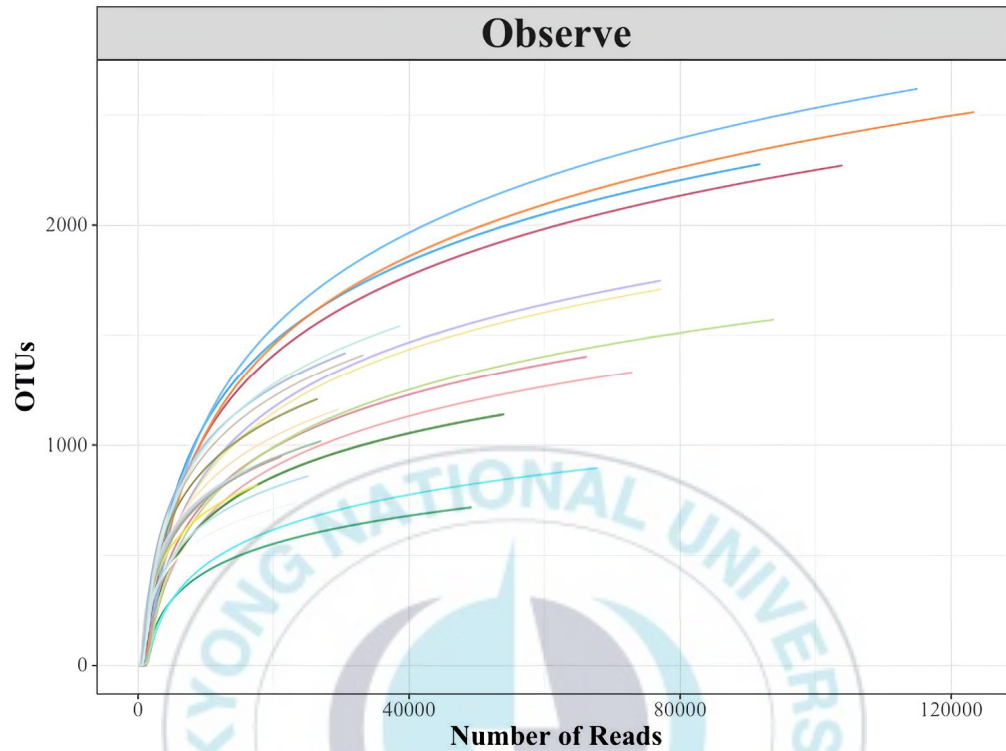


Figure 2. Rarefaction curve of lag (Lag), exponential (Exp), stationary (Stn) growth phase of *Karlodinium veneficum*.

나. *K. veneficum* KR과 US의 성장 단계 및 PAB, FLB 세균 군집 변화

분류군 별 군집 구조를 비교한 결과 KR과 US 간 세균 군집의 차이가 명확했다. KR과 US 두 배양주의 성장 단계 및 생활사별 세균 분포를 비교하기 위해 과(family), 속(genus), 종(species) 분류군 별로 나타내었다(Figure 3). 과(family) 단위의 군집 그래프상에서 왼쪽의 막대그래프는 과 단위와 연관된 강(class) 단위의 분포를 나타내었다(Figure 3A). 과(family) 수준에서 비교 시, KR의 PAB 군집 분석 결과 평균적으로 Pseudomonadaceae(67%)와 Roseobacteraceae(14%) 순으로 우점하였으며, US의 PAB 군집의 경우 Marinobacteraceae(27%)와 Rhodobacteraceae(25%) 순으로 우점하였다(Figure 3A, 4). 반면 FLB 생활사에서, PAB에 비해 KR과 US 공통적으로 Burkholderiaceae의 군집 비율이 높아짐을 확인하였다. KR에서 Burkholderiaceae 비율은 PAB에선 2%에 불과했으나 FLB에선 31%를 차지했고, US의 경우 PAB 내 7%의 비율에서 FLB의 경우 20%까지 그 비율이 높아졌다. 속(genus)과 종(species) 수준에서 비교 시(Figure 3B, 3C, 4), KR의 PAB 군집에서 평균적으로 *Pseudomonas* 속의 *P. chengduensis*(42%), *P. oleovorans*(10%), *P. hydrolytica*(3%)가, *Sulfitobacter* 속의 *S. pontiacus*(8%)가 우점하였다. 해당 군집 내 *Pseudomonas* 속은 성장 단계가 거듭될수록 그 비율이 감소하였다(87-49%). 반면 *Sulfitobacter* 속의 경우 성장 단계가 거듭될수록 비율이 증가하는 양상을 보였다(4-18%). KR의 FLB 군집에서는 전반적으로 PAB 군집 구조와 유사했으나, *Limnobacter* 속의 *L. thiooxidans*의 비율이 성장 단계가 거듭될수록 큰 폭으로 증가하였다(12-33%). 이 밖에도 KR FLB 군집 내에서 *Algoriphagus* 속의 *A. marincola*가 PAB에서와는 달리

성장 단계에 따라 그 비율이 증가하였다(1.5-10%). US의 PAB 군집에선 *Marinobacter* 속의 *M. adhaerens*(19%)가, *Nioella* 속의 *N. sediminis*(14%)가, *Robiginitalea* 속의 *R. biformata*(4%)가 우점하였다. 해당 군집 내 *Marinobacter* 속은 성장 단계가 거듭될수록 그 비율이 큰 폭으로 감소하였다(50-7%). 반면 *Nioella* 속(6-21%)과 *Robiginitalea* 속(1.3-7%)은 성장이 진행될수록 비율이 점차 증가하였다. US의 FLB 군집에서는 전반적으로 PAB에서의 군집과 유사했으나, *Limnobacter* 속의 *L. thiooxidans*(14%)와 *Seohaecicola* 속의 *S. saemankumensis*(9%)가 PAB에 비해 평균적으로 군집 내 큰 비율을 차지했다.

K. veneficum KR과 US 배양주의 시료 분석 결과를 종합하여 배양주 별, PAB와 FLB 별 세균 군집을 크로나 차트(Krona charts)로 나타내었다(Figure 4). 두 배양주에 대한 PAB와 FLB 군집 구조 분석 결과, 공통적으로 문(phylum) 단위에서 Proteobacteria가 우점하였다(KR PAB : 90%; KR FLB : 94%; US PAB : 86%; US FLB : 97%). KR 배양주는 PAB 군집구조에선 Gammaproteobacteria(70%), Alphaproteobacteria(18%), unclassified Cyanobacteria(7%), Betaproteobacteria(2%) 순으로 우점했고, FLB 군집 구조에선 PAB 군집에 비해 Gammaproteobacteria의 비율이 줄고(35%) Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Cyclophagales의 비율이 늘어났다(각각 31%, 28%, 5%). US배양주의 PAB 군집구조는 Alphaproteobacteria(48%), Gammaproteobacteria(31%), Betaproteobacteria(7%), Flavobacteriales(6%), Verrucomicrobiae(4%), Phycisphaerae(2%) 순으로 우점하였고, FLB 군집 구조에선 PAB 군집에 비해 Gammaproteobacteria, Flavobacteriales 비율이 줄고(각각 17%, 2%) Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria의 비율이 증가했다(각각 59%, 21%).

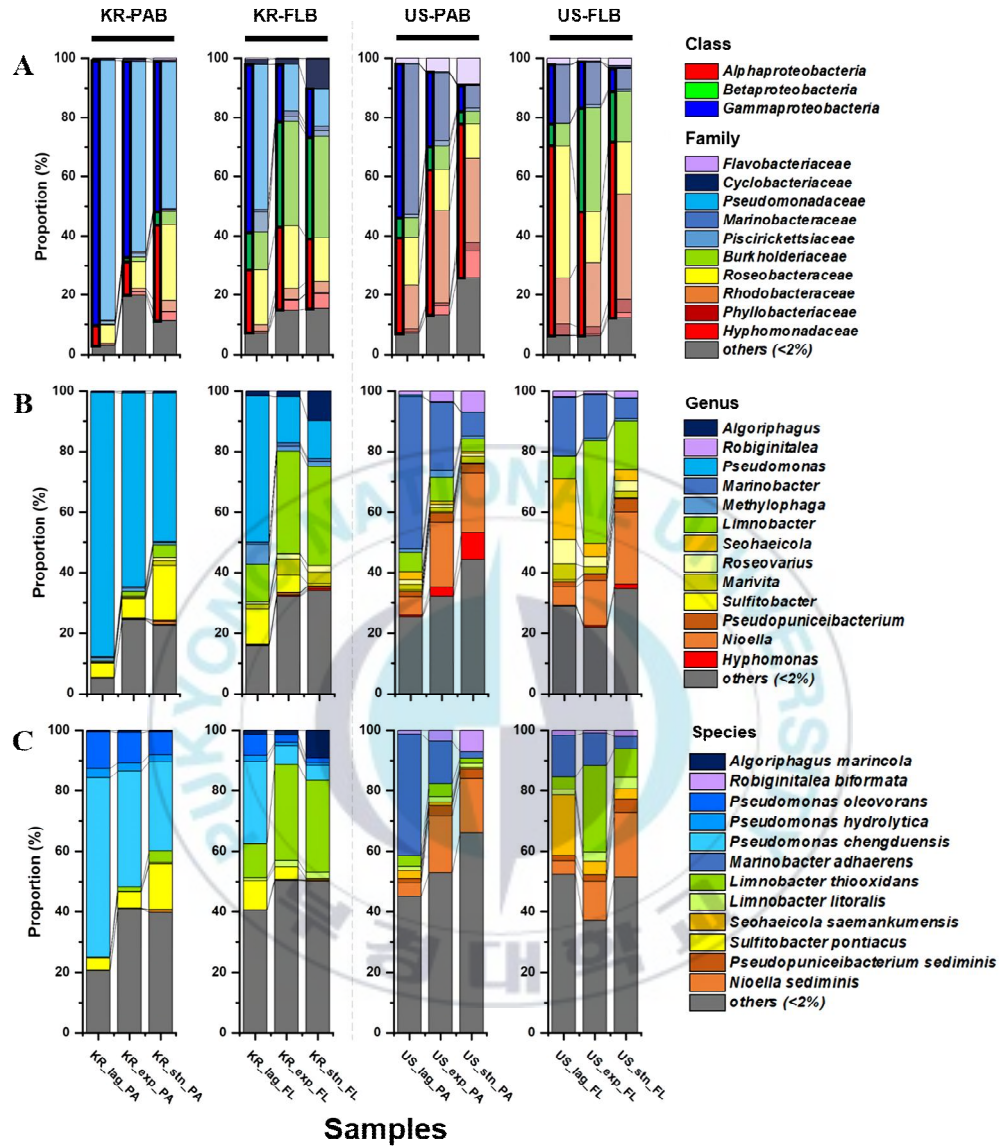


Figure 3. Community composition of PAB and FLB bacteria in the lag (Lag), exponential (Exp), and stationary (Stn) growth phases of *Karlodinium veneficum* KR and US at the (A) family, (B) genus, and (C) species level. At the family level, the graph on the left side represents the class group at the corresponding family level.

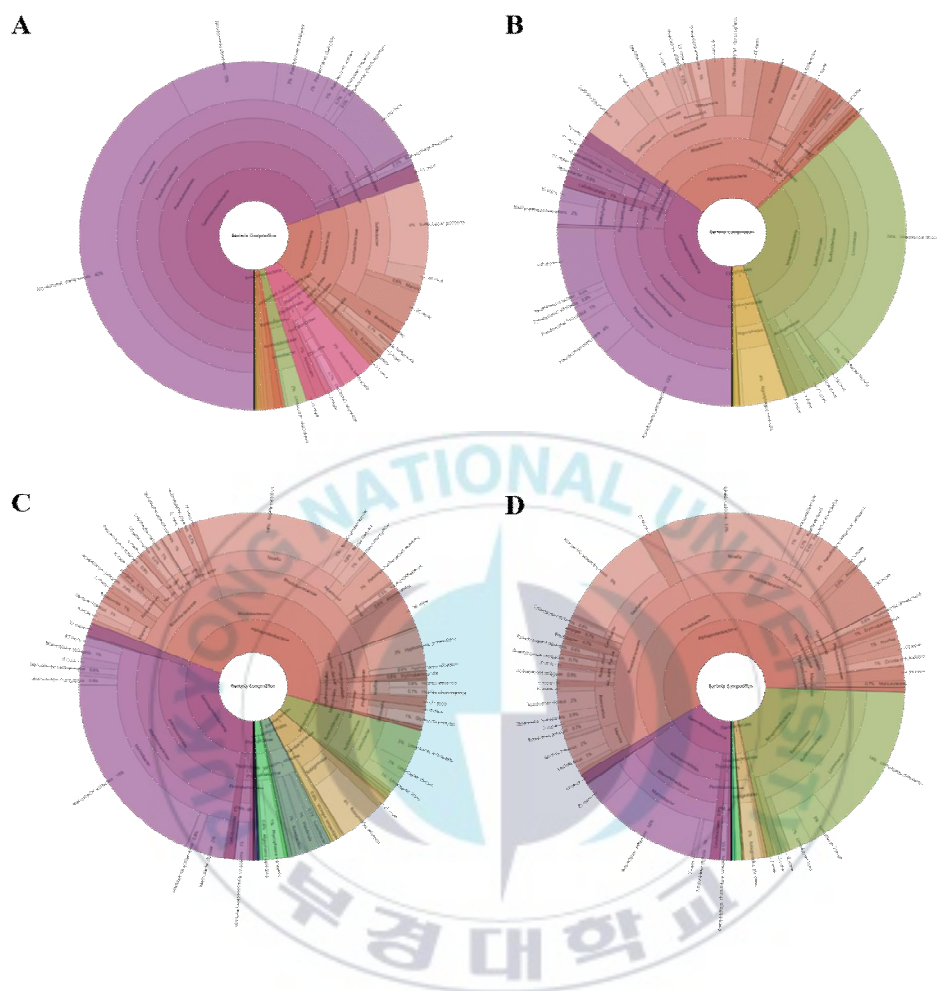


Figure 4. KRONA visualization method expressing total bacteria communities in *Karlodinium veneficum* KR and US. (A) KR PAB, (B) KR FLB, (C) US PAB, (D) US FLB.

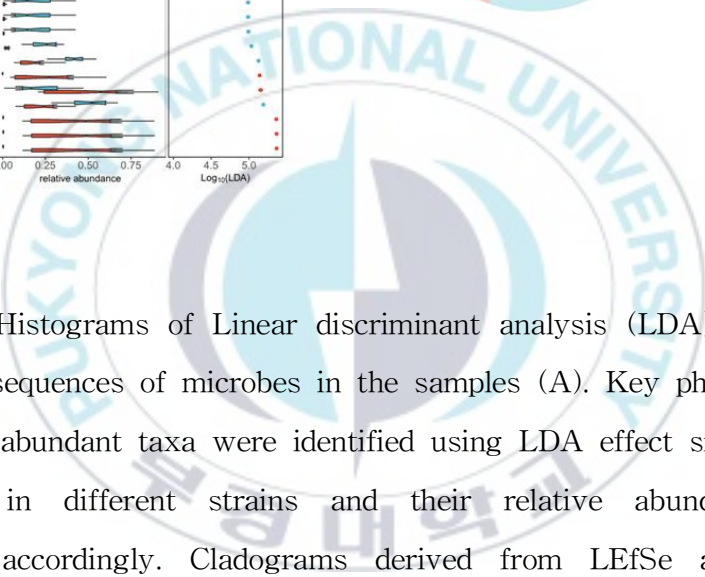
다. *K. veneficum* KR과 US의 PAB, FLB 세균 군집 차이

강(class) 수준의 단계부터 종(species) 수준의 단계까지 *K. veneficum* KR과 US 배양주 분석 시료의 상대적인 비율에 차이가 있어, 유의적으로 차이가 나는 각 세균 군집을 대표하는 분류군을 조사하기 위해 선형 판별 분석 효과 크기(Linear discriminant analysis effect, LEfSe) 분석법을 사용하였다(Figure 5). 4.0 이상의 LDA(Linear discriminant analysis)값을 지표로 사용하였으며, LEfSe 분석 결과를 바탕으로 LDA 값이 높은 상위 40종의 taxon과 수치를 확인하였다(Figure 5a). 이후 다음 결과를 바탕으로 두 배양주 간 생물 분류군 별 연관성을 Cladogram으로 도식화하였다(Figure 5b).

그 결과, 강(class) 수준부터 KR과 US 간 세균 군집의 차이를 확인할 수 있었고, LDA값에 대하여 KR에선 Gammaproteobacteria (5.2)가, US에선 Alphaproteobacteria (5.3)가 해당 세균 군집 내에서 유의적으로 높게 측정되었다. KR의 분석 시료 내에서 우점 속은 *Pseudomonas* (5.4; Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae), *Sulfitobacter* (4.6; Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Roseobacteraceae), *Algoriphagus* (4.1; Cytophagia, Cytophagales, Cyclobacteriaceae) 순으로 분석되었고, 해당 속과 연관된 모든 생물분류군이 KR 배양주 내에서 상대적 빈도수가 높게 측정되었다. US의 분석시료 내에서 우점 속은 *Marinobacter* (5.0; Gammaproteobacteria, Pseudomonadales (= Alteromonadales), Marinobacteraceae(=Alteromonadaceae)), *Nioella* (4.9; Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae), *Seohaecicola*

(4.4; Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Roseobacteraceae), *Robiginitalea* (4.1; Flavobacteriia, Flavobacteriales, Flavobacteriaceae) 순으로 분석되었고, 해당 속과 연관된 모든 생물분류군이 US 배양주 내에서 상대적 빈도수가 높게 측정되었다.

속(genus) 단계에서의 세균 군집 차이를 시각화하고, 각 배양주 별 생태의 유사성 비교를 하기 위해 Bray-Curtis distance를 이용하여 다변량 통계분석법인 non-metric multidimensional scaling (nMDS) 도표를 나타내었다(Figure 6). 분석 결과 KR PAB에는 *Pseudomonas*, *Sulfitobacter*로 나타났고, KR FLB는 *Algoriphagus*가 표시되었다. US PAB에는 *Hyphomonas*, *Robiginitalea*, *Nioella*, *Marinobacter*로 나타났고, KR FLB는 *Seohaecicola*, *Roseovirus*로 나타났다. *Limnobacter*의 경우 KR FLB와 US FLB 중간 지점에 표시되었다. 해당 분석 결과 KR과 US 배양주 별 세균 군집 분포 양상에서 뚜렷한 차이가 나타났으며, 같은 배양주 내에서도 PAB, FLB 상에서 차이가 있음을 확인하였다.



parent strains and their relative
ly. Cladograms derived from

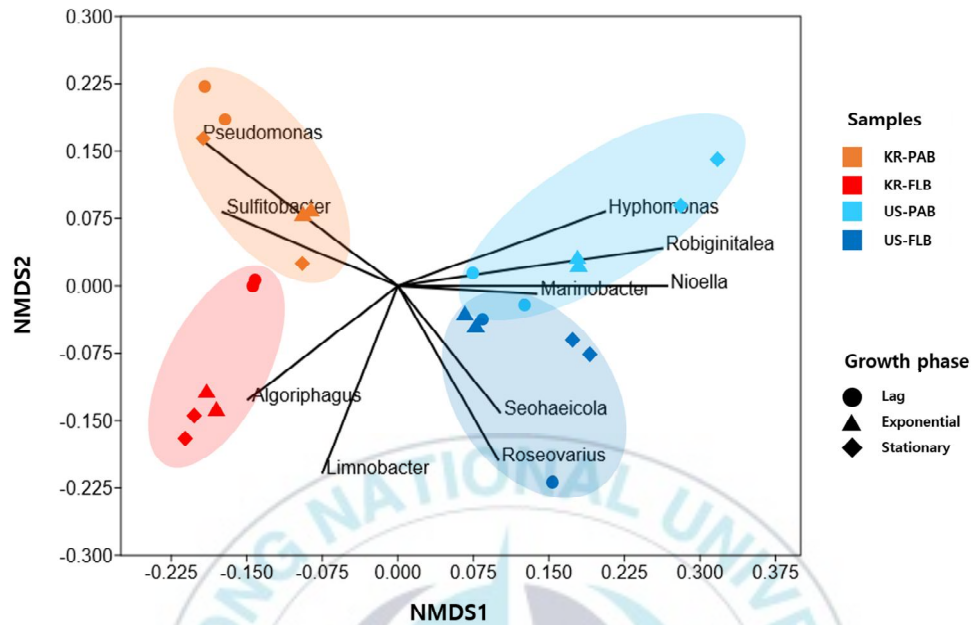


Figure 6. Nonmetric multi-dimensional scaling (nMDS) plots of bacterial communities (16S rRNA gene) in *Karlodinium veneficum* KR and US.

2. *K. veneficum* KR, US 분리 세균 접종 실험 양상

KR과 US의 배양주 내에서 분리한 세균 중 상호작용 가능성이 있는 특정 세균을 접종하여 성장 양상을 확인하였다. 먼저 배양주 내 분리 가능한 세균을 분리 및 동정하였다. 분리된 균주에 대하여 1×10^6 cells/mL 농도로 KR 배양주 내에서 screening test를 진행하여 성장 증감이 뚜렷한 균주를 선별하였고, 해당 균주의 종은 *Marinobacter* 속과 *Sulfitobacter* 속으로 동정 되었다(Table 5, Figure S2).

이후 각 배양주 내에서 분리된 균주를 접종하여, 세균 군집 구조를 치환하였을 때 KR과 US의 배양주 세포 밀도 양상을 확인하기 위해 분리 균주 농도 별($1 \times 10^5 - 10^8$ cells/mL) 혼합 배양을 진행하였다(Figure 7, 8). *Sulfitobacter* 속의 두 종에 대하여 KR과 US 배양주에 농도별 혼합 배양을 진행한 결과 KR 배양주 내에서 일부 실험구에서 대조구 대비 높은 성장 효과를 보였다($P < 0.05$). KR 배양주의 경우, 대조구에 비해 *S. pontiacus* 실험구에서 더 높은 성장률을 보였으며, 1×10^5 cells/mL 농도에서 가장 높은 성장 증진 효과와 성장률($0.2, 0.11 \text{ d}^{-1}$, $P < 0.05$)을 보였다(Figure 7). 마찬가지로 *S. porphyrae* 실험구에서도 동일한 양상을 보였으며, 1×10^7 cells/mL 농도에서 가장 높은 성장 증진 효과와 성장률($0.5, 0.18 \text{ d}^{-1}$, $P < 0.05$)을 보였다. 반면 US 배양주 내에서는 *S. porphyrae* 1×10^6 cells/mL 접종 실험구를 제외한 *S. pontiacus*, *S. porphyrae* 실험구 모두 대조구 대비 유의한 성장 변화가 없었다(전체 $P < 0.05$).

Marinobacter 속의 두 종에 대하여 해당 배양주에 농도별 혼합 배양을 진행한 결과는 다음과 같았다(Figure 8). KR 배양주 내 대조구 대비 *M. adhaerens* 일부 실험구에서 성장 저해 효과를 보였다($-0.02 \sim -0.95$, $P <$

0.05). 마찬가지로 동일 배양주 대조구 대비 *M. algicola* 일부 실험구에 대해서도 성장이 저해되었다(-0.04~-0.96, $P < 0.05$). US 배양주에 대해서 *M. adhaerens* 일부 실험구에서 명확한 성장 저해가 확인되었고 (-0.19~-0.79, $P < 0.05$), 동일 배양주 대조구 대비 *M. algicola* 전체 실험구에 대해서도 일부 실험구에서 성장이 저해되었다(-0.06~-0.84, $P < 0.05$).



Table 5. A bacteria isolation list of *Karlodinium veneficum* KR and US. The bacteria were simultaneously isolated at the sampling point in Figure 1.

Host algal species	Strain Number	Culture medium	Species identification	Screening test (Growth effect)
<i>Karlodinium veneficum</i> (LIMS-PS-3423) (Korea strain)	MB-KV-lag-001	MB	Unidentified	-0.23
	MB-KV-lag-002*	MB	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	0.23
	MB-KV-lag-003	MB	<i>Marinobacter algicola</i>	-0.27
	MB-KV-lag-008	MB	Unidentified	-0.34
	MB-KR-KV-lag-005	MB	Unidentified	0.02
	MB-KR-KV-lag-007	MB	Unidentified	0.28
	MB-KR-KV-lag-008	MB	Unidentified	-0.16
	MB-KR-KV-exp-001	MB	Unidentified	0.04
	MB-KR-KV-exp-002	MB	Unidentified	-0.02
	MB-KR-KV-exp-003	MB	Unidentified	0.22
	MB-KR-KV-exp-004	MB	Unidentified	-0.01
	MB-KR-KV-sta-001	MB	Unidentified	0.03
	MB-KR-KV-sta-002	MB	Unidentified	-0.17
<i>Karlodinium veneficum</i> (CCMP2936) (United states strain)	MB-US-KV-lag-001	MB	Unidentified	-0.13
	MB-US-KV-lag-002	MB	Unidentified	-0.04
	MB-US-KV-lag-003*	MB	<i>Sulfitobacter porphyrae</i>	0.45
	MB-US-KV-lag-004*	MB	<i>Marinobacter adhaerens</i>	-0.30
	MB-US-KV-exp-002	MB	Unidentified	-0.18
	MB-US-KV-exp-003	MB	Unidentified	-0.19
	MB-US-KV-exp-004	MB	Unidentified	-0.20
	MB-US-KV-sta-001*	MB	<i>Marinobacter algicola</i>	-0.39
	MB-US-KV-sta-002	MB	Unidentified	-0.01
	MB-US-KV-sta-003	MB	Unidentified	0.25

* The species used in this study.

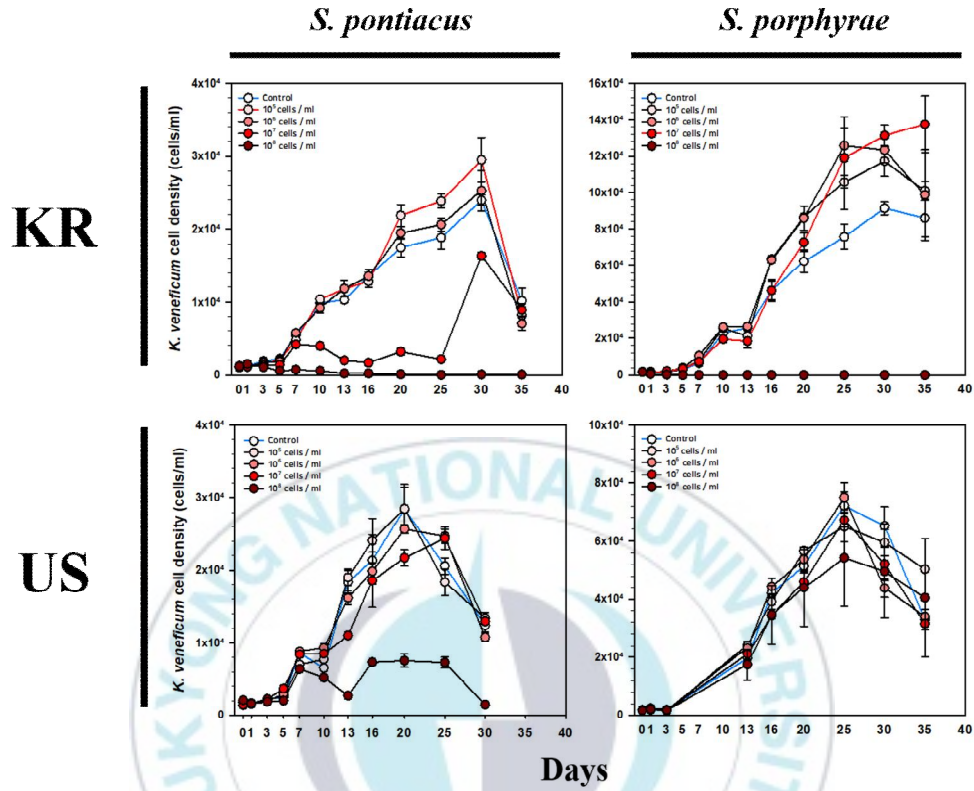


Figure 7. Changes in *Karlodinium veneficum* KR and US cell density after inoculating bacteria belonging to the genus *Sulfitobacter*. Control did not inoculate bacteria, and inoculated bacteria applied a gradual concentration gradient.

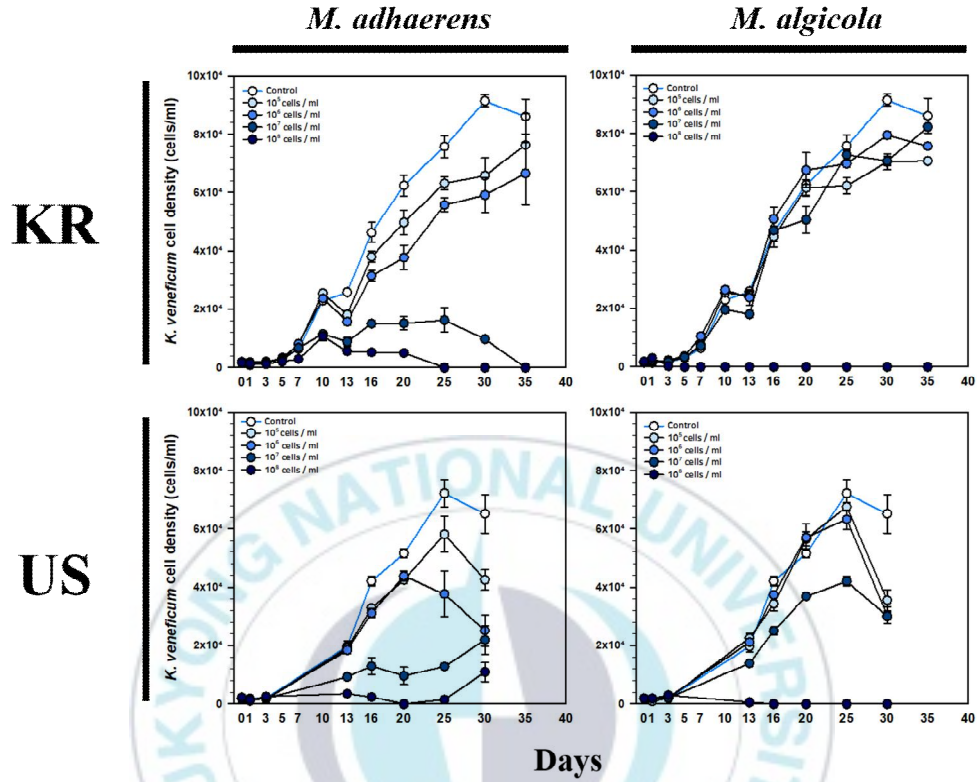


Figure 8. Changes in *Karlodinium veneficum* KR and US cell density after inoculating bacteria belonging to the genus *Marinobacter*. Control did not inoculate bacteria, and inoculated bacteria applied a gradual concentration gradient.

IV. 고찰

수계 내에서 미세조류와 종속영양세균 간 발생하는 생태학적 상호작용은 해양환경에서 중요한 생물 간 연관관계를 보인다(Jiao et al., 2010; Seymour et al., 2017). 이러한 상호작용에는 상리공생(mutualism), 편리공생(commensalism), 기생(parasitism) 및 경쟁(competition)이 포함될 수 있으며, 일반적으로 매우 복잡하다(Amin et al., 2012; Seymour et al., 2017; Sher et al., 2011; Xia et al., 2021). 특히 생태계 내 현장에서 특정 미세조류와 상호작용을 갖는 미생물을 분석하는 것에 대한 어려움으로 인하여, 실험실 내에서의 PAB 분석에 대한 다양한 연구가 요구되었다(Crump et al., 1999; Rooney-Varga et al., 2005). 이에 본 연구는 유독성 와편모류 *K. veneficum* KR과 US 배양주의 성장 단계별, PAB와 FLB 별 세균 군집을 나노포어 분석법으로 비교하여 두 배양주 간 공통적인 세균 군집 유무를 파악하고, 배양주 내에서 분리한 세균을 접종하여 배양주 내 세균 군집 내 비율을 임의 변경 시 어떤 성장 양상을 보이는지 확인하고자 하였다.

실험실 내에서의 결과와 기존 연구 결과들을 종합해보면, 세균 군집 구성은 미세조류의 성장 단계와 생리적인 상태에 의한 영향을 받을 수 있다. 이전 연구 결과를 바탕으로(Jasti et al., 2005; Rooney-Varga et al., 2005), KR과 US 각 배양주 별 PAB와 FLB 군집 구성 차이가 관찰될 것으로 예상되었다. 실제, 본 연구에서 *K. veneficum* 배양주의 세 가지 성장 단계 동안 PAB와 FLB 군집 조성의 변동이 뚜렷하게 구분됨을 확인하였다(Figure 3, 4). KR 배양주에서 class 단위를 비교했을 때 PAB와 FLB간 Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria의 군집 비

율에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. KR의 PAB에선 *Pseudomonas*, *Sulfitobacter* 등 2개의 주요 그룹이 있고, 이 중 *Pseudomonas*가 가장 우세했다. 반면 FLB의 경우 전체적인 군집 구조는 비슷했으나 *Algoriphagus*, *Limnobacter*가 PAB에 비해 군집 비율이 증가했다. US의 PAB에선 *Hyphomonas*, *Robiginitalea*, *Nioella*, *Marinobacter* 등 4개의 주요 그룹이 있고, *Marinobacter*가 가장 우세했다. 반면 FLB의 경우 *Roseovirus*, *Seohaecicola*와 *Limnobacter* 군집 비율이 PAB에 비해 증가했다. LEfSe 분석 결과 또한 앞선 결과와 일치했다. KR에서 가장 LDA값이 높은 속은 *Pseudomonas*로, 해당 속의 상위 분류군에도 동일 배양주 내에서 높은 LDA값이 검출되었다. US에서 가장 LDA값이 높은 속은 *Marinobacter*로, 해당 속의 상위 분류군에서 동일 배양주 내에서 높은 LDA값이 검출되었다. KR과 US 세균 군집 분석 결과, 두 배양주는 동일 종임에도 불구하고 세균 군집 차이가 크게 나타났으며, 이들의 세균 군집은 각자 분리된 해역에서의 영향을 받은 것으로 보여진다. 이는 미세조류 관련 세균 군집은 군집 주변 환경에 의해 주로 결정되고, 환경 적응을 위해 주변 세균을 축적한다는 기존의 연구 결과와 일치한다(Seymour et al., 2017; Xia et al., 2021).

nMDS 분석 결과에서도 마찬가지로 KR과 US 간 세균 군집의 대부분은 세균 구성에 큰 차이를 보였으나, 두 배양주의 FLB에서 공통적으로 Betaproteobacteria의 *Limnobacter* 속 비율이 증가함을 확인하였다(Figure 4). 기존 연구 결과에 따르면 Betaproteobacteria는 DOM 분해효율이 높은 것으로 알려져 있으며, 해당 분류군의 비율이 높은 것은 저분자량의 조류 유래용출물(low-molecular weight algally-derived substrates)과 양의 상관관계를 가진 것으로 나타났다(Niemi et al., 2009; Newton et al., 2011; Louati et al., 2015). 이처럼 두 배양주 FLB에서 *Limnobacter* 속이 성장

진행될수록 비율이 증가하는 것에 대해 *K. veneficum*이 방출하는 조류 용출물과 밀접한 관련이 있다고 추론할 수 있으나, 본 연구만으로는 명확히 판단할 수 없어 이에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

다양한 실험실 환경 및 현장 연구를 통해 알 수 있듯(Fernandez et al., 1992; Reitan et al., 1994; van Rijssel et al., 2000; Bagatini et al.; 2014) 미세조류와 공존하는 세균 군집 구조는 성장 단계 및 생리적 상태에 따라 변화할 수 있다. 또한 군집 내 세균은 다양한 상호작용을 통해 미세조류의 성장에 영향을 줄 수 있다는 것을 제시한다. 위 근거를 바탕으로, 본 연구에선 KR과 US의 성장 단계별 군집 구조 분석과 더불어 배양주 내에서 분리한 세균 중 상호작용 가능성이 있는 특정 세균을 접종하여 성장 양상을 확인하였다. KR과 US에서 단일 분리 및 배양한 세균 중 *Sulfitobacter* 속과 *Marinobacter* 속에 속하는 세균을 *K. veneficum* 배양주에 농도 구배별($1 \times 10^5 - 10^8$ cells/mL)로 접종한 결과, KR 배양주에 *Sulfitobacter* 속의 세균을 접종한 실험구에서 유의한 성장 증진 효과를 보였다(Figure 7). 기존 미세조류 관련 세균 군집 구성에 대한 연구 결과에 따르면, PAB가 FLB에 비해 미세조류와 종특이적으로 연관되어 있다고 알려져 있다(Worm and Sondergaard 1998; Bagatini et al. 2014). 앞선 *K. veneficum* 배양주 별 세균 군집 비율에 대한 결과에서, KR의 성장 단계가 진행될수록 PAB 내 *Sulfitobacter* 속의 비율이 증가하였다(Figure 3). 이는 *Sulfitobacter* 속의 박테리아가 KR의 성장에 분명하게 기여했다고 추측할 수 있다. 또한 KR에서 분리한 세균인 *S. pontiacus*와 마찬가지로 US에서 분리한 *S. porphyrae*를 동일한 방법으로 접종하였을 때, KR 내 *S. pontiacus* 접종 시와 유사한 성장 양상을 보였다. 기존 연구 결과에서 미세조류는 특정한 세균 종과의 상호작용보다는 특정 세균 분류군의 기능적 특성을 선호한다고 알려져 있다(Ramanan et al., 2015). 따라서 서로 다른

배양주에서 분리되었지만 유사한 기능적 특성을 보이는 두 세균이 KR에서 성장 증진을 유도한 것으로 판단된다. 반면 US는 동일 속 접종 시 대조구와 대비하여 유의한 성장 증진 효과는 없었는데, 이는 동일 종 내에서도 미세조류와 세균 간 상호작용이 다를 수 있음을 보여준다.

기존 연구결과에 따르면 Gammaproteobacteria는 다수의 살조 세균이 포함되어있는 문(Phylum)으로 알려져있다(Yoshinaga et al., 1998; Salomon and Imai 2006; Imai 2011). 본 연구에서 *K. veneficum* 두 배양주에 *Marinobacter* 속 세균의 농도 구배 별 접종 결과, KR과 US 모두 대조구 대비 성장 저해 효과를 보였다(Figure 8). 기존 *Marinobacter* 속은 Gammaproteobacteria에 속함에도 불구하고 규조류 등 다양한 미세조류에서 첨가 시 성장 증진 효과를 보이는 것으로 알려져 있다(Amin et al., 2009; Cirri et al., 2019; Wang et al., 2022). 하지만 해당 속의 세균을 *Karenia mikimotoi*와 *Prorocentrum donghaiense*를 포함한 일부 와편모류에 접종 시, 조류의 세포가 용해되어(cell lysis) 오히려 살조 현상을 유도한 것으로 나타났다(Ding et al., 2022). 또한 기존 연구에서, *Marinobacter*와 동일 문에 속하는 *Alteromonas* E401의 경우, *K. mikimotoi*와 *Gymnodinium catenatum*에 살조 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 위 세균은 앞선 특정 종들을 제외한 다른 와편모류 및 규조류 등에는 살조 효과를 보이지 않았지만, *K. mikimotoi*와 *G. catenatum*에서 분비하는 유기물질(EOM, excreted organic matter)에 반응하여 살조 활성을 보이는 고분자량의 화합물을 생성하는 것으로 밝혀졌다(Yoshinaga, 1995). 마찬가지로 *K. mikimotoi*와 동일한 과(Kareniaceae)에 속하는 *K. veneficum* 또한 같은 이유로 인해 *Marinobacter* 속 접종 실험구에서 성장 저해 효과가 나타난 것으로 추정된다. 이에 *Marinobacter* 접종에 의한 성장 저해 효과에 대해서 해석하기 위하여, *K. veneficum* 용출물과 해당 박테리아 간의 상관관

계에 대한 추가적인 분석이 요구된다.



V. 요약

수계 내에서 미세조류와 세균 사이의 상호작용이 알려져 왔음에도 불구하고, 유해독성과편모류 *Karlodinium veneficum* 연관 세균 군집에 관한 연구가 부족한 실정이다. 본 연구에서는 나노포어(Oxford Nanopore MinION) 분석을 사용하여 다른 해역에서 분리된 *K. veneficum* 한국(KR)과 미국(US) 배양주 별 공통 핵심 군집 존재 여부와 더불어 각 배양주 별 PAB와 FLB 군집을 비교하였다. 또한 KR, US 배양주 내 분리 세균을 접종하여 *K. veneficum*의 성장 증감 양상을 확인하였다. KR과 US 간 군집 구조 분석 결과, PAB와 FLB를 비롯한 세균 군집 구조는 종특이적으로 공통적이지 않을 수 있음을 확인하였다. 또한 기존 연구 결과와 마찬가지로 동일 배양주 내 PAB와 FLB 군집 구조는 다르게 나타났으며, 성장 단계별로 군집 비율 변화가 확인되었다. KR과 US 배양주에서 순수분리한 박테리아 중 *Sulfitobacter* 속과 *Marinobacter* 속의 세균을 배양 후 농도 구배를 주어 접종한 결과, *Sulfitobacter* 속을 접종한 KR 배양주에서 실험구 대비 성장 증진 효과를 보였다. KR의 PAB 군집 구조 결과와 비교했을 때 *Sulfitobacter* 속이 성장 단계를 거둬들수록 비율이 증가하였고, 이는 KR 배양주가 *Sulfitobacter* 속의 기능적 특성을 선호하여 성장 증진 효과를 유도한 것으로 판단된다. 반면 두 배양주에 *Marinobacter* 속을 접종 시 성장 저해 현상이 일어났다. 이는 동일 과(family)에 속하는 조류에 접종 시 세포 용해(cell lysis)가 된 것을 바탕으로 *K. veneficum* 역시 같은 이유로 성장이 저해된 것으로 추측되며, 이를 증명하기 위해선 추가적인 분석이 요구된다.

VI. 참고문헌

- Abbott, B. C. and Dorothy Ballantine. 1957. "The Toxin from *Gymnodinium Veneficum* Ballantine." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 36 (1): 169-189.
- Ajani, P., GUSTAAF Hallegraeff, and T. Pritchard. 2001. "Historic Overview of Algal Blooms in Marine and Estuarine Waters of New South Wales, Australia." *Linnean Society of New South Wales*, .
- Ajani, Penelope A., Tim Kahlke, Nachshon Siboni, Rick Carney, Shauna A. Murray, and Justin R. Seymour. 2018. "The Microbiome of the Cosmopolitan Diatom *Leptocylindrus* Reveals Significant Spatial and Temporal Variability." *Frontiers in Microbiology*: 2758.
- Amin, S. A., L. R. Hmelo, H. M. Van Tol, B. P. Durham, L. T. Carlson, K. R. Heal, R. L. Morales, C. T. Berthiaume, M. S. Parker, and B. Djunaedi. 2015. "Interaction and Signalling between a Cosmopolitan Phytoplankton and Associated Bacteria." *Nature* 522 (7554): 98-101.
- Amin, Shady A., David H. Green, Mark C. Hart, Frithjof C. Küpper, William G. Sunda, and Carl J. Carrano. 2009. "Photolysis of Iron - siderophore Chelates Promotes Bacterial - algal Mutualism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (40):

17071–17076.

Amin, Shady A., Micaela S. Parker, and E. Virginia Armbrust. 2012. "Interactions between Diatoms and Bacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (3): 667–684.

Bagatini, Inessa Lacativa, Alexander Eiler, Stefan Bertilsson, Dag Klaveness, Leticia Piton Tessarolli, and Armando Augusto Henriques Vieira. 2014. "Host-Specificity and Dynamics in Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Phytoplankton." *PloS One* 9 (1): e85950.

Behrenfeld, Michael J., Emmanuel Boss, David A. Siegel, and Donald M. Shea. 2005. "Carbon based Ocean Productivity and Phytoplankton Physiology from Space." *Global Biogeochemical Cycles* 19 (1).

Behringer, Gregory, Michael A. Ochsenkühn, Cong Fei, Jhamal Fanning, Julie A. Koester, and Shady A. Amin. 2018. "Bacterial Communities of Diatoms Display Strong Conservation Across Strains and Time." *Frontiers in Microbiology* 9: 659.

Bjørnland, T. and Karl Tangen. 1979. "Pigmentation and Morphology of a Marine Gyrodinium (Dinophyceae) with a Major Carotenoid Different from Peridinin and Fucoxanthin 1." *Journal of Phycology* 15 (4): 457–463.

Bolch, Christopher JS, Thaila A. Subramanian, and David H. Green. 2011. "The Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (Dinophyceae) Requires Marine Bacteria for Growth 1." *Journal of Phycology* 47 (5): 1009–1022.

Braarud, TRYGVE. 1957. "A Red Water Organism from Walvis Bay." *Galathea Rep* 1: 137–138.

Cirri, Emilio and Georg Pohnert. 2019. "Algae– Bacteria Interactions that Balance the Planktonic Microbiome." *New Phytologist* 223 (1): 100–106.

Crump, Byron C., E. Virginia Armbrust, and John A. Baross. 1999. "Phylogenetic Analysis of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Columbia River, its Estuary, and the Adjacent Coastal Ocean." *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 3192–3204.

Cruz-López, Ricardo and Helmut Maske. 2016. "The Vitamin B1 and B12 Required by the Marine Dinoflagellate *Lingulodinium Polyedrum* can be Provided by its Associated Bacterial Community in Culture." *Frontiers in Microbiology* 7: 560.

Deeds, Jonathan R., Daniel E. Terlizzi, Jason E. Adolf, Diane K.

- Stoecker, and Allen R. Place. 2002. "Toxic Activity from Cultures of *Karlodinium Micrum* (= *Gyrodinium Galatheanum*)(Dinophyceae) –a Dinoflagellate Associated with Fish Mortalities in an Estuarine Aquaculture Facility." *Harmful Algae* 1 (2): 169–189.
- DeLong, Edward F., Diana G. Franks, and Alice L. Alldredge. 1993. "Phylogenetic Diversity of Aggregate attached Vs. Free living Marine Bacterial Assemblages." *Limnology and Oceanography* 38 (5): 924–934.
- Ding, Ning, Peike Gao, Dezheng Xu, Enjing Xing, Yu Li, Li Sun, Renjun Wang, and Wanglong Zhang. 2022. "Characterization and Algicidal Activity of Bacteria from the Phycosphere of the Harmful Alga *Karenia Mikimotoi*." *Brazilian Journal of Microbiology* 53 (2): 891–901.
- Fernandez, Emilio, Pablo Serret, Iosu de Madariaga, Derek S. Harbour, and Anthony G. Davies. 1992. "Photosynthetic Carbon Metabolism and Biochemical Composition of Spring Phytoplankton Assemblages Enclosed in Microcosms: The Diatom-Phaeocystis Sp. Succession." *Marine Ecology Progress Series*. Oldendorf 90 (1): 89–102.
- Grossart, Hans Peter, Florian Levold, Martin Allgaier, Meinhard Simon, and Thorsten Brinkhoff. 2005. "Marine Diatom Species Harbour Distinct Bacterial Communities." *Environmental Microbiology* 7 (6):

860-873.

Grossart, Hans-Peter. 1999. "Interactions between Marine Bacteria and Axenic Diatoms (*Cylindrotheca Fusiformis*, *Nitzschia Laevis*, and *Thalassiosira Weissflogii*) Incubated Under various Conditions in the Lab." *Aquatic Microbial Ecology* 19 (1): 1-11.

Hiruma, Kei, Nina Gerlach, Soledad Sacristán, Ryohei Thomas Nakano, Stéphane Hacquard, Barbara Kracher, Ulla Neumann, Diana Ramírez, Marcel Bucher, and Richard J. O'Connell. 2016. "Root Endophyte *Colletotrichum Tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that are Phosphate Status Dependent." *Cell* 165 (2): 464-474.

Huang, Hai-Long, Qian-Wen Shao, Xiao-Juan Zhu, Jie Luo, Ran Meng, Cheng-Xu Zhou, Peng Zhu, Yi-Feng Zhu, and Xiao-Jun Yan. 2019. "Distribution of *Karlodinium Veneficum* in the Coastal Region of Xiangshan Bay in the East China Sea, as Detected by a Real-Time Quantitative PCR Assay of Ribosomal ITS Sequence." *Harmful Algae* 81: 65-76.

Imai, I. 2011. "Biology and Ecology of Harmful Algal Blooms (13): Bacteria that Kill Red Tide Phytoplankton." *Aquabiol* 33: 97-103.

Jasti, Suresh, Michael E. Sieracki, Nicole J. Poulton, Michael W. Giewat, and Juliette N. Rooney-Varga. 2005. "Phylogenetic Diversity and

Specificity of Bacteria Closely Associated with *Alexandrium* Spp. and Other Phytoplankton." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7): 3483-3494.

Jiao, Nianzhi, Gerhard J. Herndl, Dennis A. Hansell, Ronald Benner, Gerhard Kattner, Steven W. Wilhelm, David L. Kirchman, Markus G. Weinbauer, Tingwei Luo, and Feng Chen. 2010. "Microbial Production of Recalcitrant Dissolved Organic Matter: Long-Term Carbon Storage in the Global Ocean." *Nature Reviews Microbiology* 8 (8): 593-599.

Jousset, Alexandre, Christina Bienhold, Antonis Chatzinotas, Laure Gallien, Angélique Gobet, Viola Kurm, Kirsten Küsel, Matthias C. Rillig, Damian W. Rivett, and Joana F. Salles. 2017. "Where Less may be More: How the Rare Biosphere Pulls Ecosystems Strings." *The ISME Journal* 11 (4): 853-862.

Keating, Kathleen Irwin. 1978. "Blue-Green Algal Inhibition of Diatom Growth: Transition from Mesotrophic to Eutrophic Community Structure." *Science* 199 (4332): 971-973.

Kempton, Jason W., Alan J. Lewitus, Jonathan R. Deeds, J. McHugh Law, and Allen R. Place. 2002. "Toxicity of *Karlodinium* *Micrum* (Dinophyceae) Associated with a Fish Kill in a South Carolina Brackish Retention Pond." *Harmful Algae* 1 (2): 233-241.

- Ki, Jang-Seu and Myung-Soo Han. 2005. "Molecular Analysis of Complete Ssu to Lsu Rdna Sequence in the Harmful Dinoflagellate *Alexandrium Tamarensis* (Korean Isolate, HY970328M)." *Ocean Science Journal* 40 (3): 43-54.
- Kirchman, David L., Ana I. Dittell, Rex R. Malmstrom, and Matthew T. Cottrell. 2005. "Biogeography of Major Bacterial Groups in the Delaware Estuary." *Limnology and Oceanography* 50 (5): 1697-1706.
- Kokou, Fotini, Goor Sasson, Jonathan Friedman, Stav Eyal, Ofer Ovadia, Sheenan Harpaz, Avner Cnaani, and Itzhak Mizrahi. 2019. "Core Gut Microbial Communities are Maintained by Beneficial Interactions and Strain Variability in Fish." *Nature Microbiology* 4 (12): 2456-2465.
- Koren, Omry, Julia K. Goodrich, Tyler C. Cullender, Aymé Spor, Kirsi Laitinen, Helene Kling Bäckhed, Antonio Gonzalez, Jeffrey J. Werner, Largus T. Angenent, and Rob Knight. 2012. "Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy." *Cell* 150 (3): 470-480.
- Lane, DJ 1. 1991. "16S/23S rRNA Sequencing." *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*: 115-175.

- Li, Aishao, Diane K. Stoecker, and D. Wayne Coats. 2000. "Spatial and Temporal Aspects of Gyrodinium Galatheanum in Chesapeake Bay: Distribution and Mixotrophy." *Journal of Plankton Research* 22 (11): 2105-2124.
- Limei, Shi, Cai Yuanfeng, Yang Hualin, Xing Peng, Li Pengfu, Kong Lingdong, and Kong Fanxiang. 2009. "Phylogenetic Diversity and Specificity of Bacteria Associated with *Microcystis Aeruginosa* and Other Cyanobacteria." *Journal of Environmental Sciences* 21 (11): 1581-1590.
- Louati, Imen, Noémie Pascault, Didier Debroas, Cécile Bernard, Jean-François Humbert, and Julie Leloup. 2015. "Structural Diversity of Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Cyanobacteria Differs According to the Cyanobacterial Genus." *PloS One* 10 (11): e0140614.
- Mooney, Ben D., Miguel De Salas, Gustaaf M. Hallegraeff, and Allen R. Place. 2009. "Survey for Karlotoxin Production in 15 Species of Gymnodinioid Dinoflagellates (Kareniaceae, Dinophyta) 1." *Journal of Phycology* 45 (1): 164-175.
- Newton, Ryan J., Stuart E. Jones, Alexander Eiler, Katherine D. McMahon, and Stefan Bertilsson. 2011. "A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria." *Microbiology and Molecular*

Biology Reviews 75 (1): 14–49.

Niemi, R. Maarit, Ilse Heiskanen, Riitta Heine, and Jarkko Rapala. 2009.

"Previously Uncultured B-Proteobacteria Dominate in Biologically Active Granular Activated Carbon (BAC) Filters." *Water Research* 43 (20): 5075–5086.

Park, Bum Soo, Ruoyu Guo, Weol-Ae Lim, and Jang-Seu Ki. 2017.

"Importance of Free-Living and Particle-Associated Bacteria for the Growth of the Harmful Dinoflagellate *Prorocentrum Minimum*: Evidence in Culture Stages." *Marine and Freshwater Research* 69 (2): 290–299.

Park, Bum Soo, Jae-Hyoung Joo, Kyung-Duck Baek, and Myung-Soo Han. 2016.

"A Mutualistic Interaction between the Bacterium *Pseudomonas Asplenii* and the Harmful Algal Species *Chattonella Marina* (Raphidophyceae)." *Harmful Algae* 56: 29–36.
[doi:https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.006](https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.006).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988316300191>.

Park, Jungsoo, Bum Soo Park, Pengbin Wang, Shailesh K. Patidar, Jin

Ho Kim, Sae-Hee Kim, and Myung-Soo Han. 2017. "Phycospheric Native Bacteria *Pelagibaca Bermudensis* and *Stappia* Sp. Ameliorate Biomass Productivity of *Tetraselmis Striata* (KCTC1432BP) in Co-Cultivation System through Mutualistic Interaction." *Frontiers in*

Plant Science 8: 289.

Pitcher, Grant C., Charles J. Foord, Brett M. Macey, Lisa Mansfield, Anna Mouton, Marie E. Smith, Steven J. Osmond, and Lynndal van der Molen. 2019. "Devastating Farmed Abalone Mortalities Attributed to Yessotoxin-Producing Dinoflagellates." *Harmful Algae* 81: 30-41.

Place, Allen R., Holly A. Bowers, Tsetvan R. Bachvaroff, Jason E. Adolf, Jonathan R. Deeds, and Jian Sheng. 2012. "Karlodinium veneficum – The Little Dinoflagellate with a Big Bite." *Harmful Algae* 14: 179-195.

Ramanan, Rishiram, Zion Kang, Byung-Hyuk Kim, Dae-Hyun Cho, Long Jin, Hee-Mock Oh, and Hee-Sik Kim. 2015. "Phycosphere Bacterial Diversity in Green Algae Reveals an Apparent Similarity Across Habitats." *Algal Research* 8: 140-144.

Rang, Franka J., Wigard P. Kloosterman, and Jeroen de Ridder. 2018. "From Squiggle to Basepair: Computational Approaches for Improving Nanopore Sequencing Read Accuracy." *Genome Biology* 19 (1): 1-11.

Reitan, Kjell Inge, Jose R. Rainuzzo, and Yngvar Olsen. 1994. "Effect of Nutrient Limitation on Fatty Acid and Lipid Content of Marine

- Microalgae 1." *Journal of Phycology* 30 (6): 972–979.
- Risely, Alice. 2020. "Applying the Core Microbiome to Understand Host - microbe Systems." *Journal of Animal Ecology* 89 (7): 1549–1558.
- Rooney-Varga, Juliette N., Michael W. Giewat, Mary C. Savin, S. Sood, M. LeGresley, and J. L. Martin. 2005. "Links between Phytoplankton and Bacterial Community Dynamics in a Coastal Marine Environment." *Microbial Ecology* 49 (1): 163–175.
- Salomon, P. S. and Ichiro Imai. 2006. "Pathogens of Harmful Microalgae." In *Ecology of Harmful Algae*, 271–282: Springer.
- Scholin, Christopher A., Michel Herzog, Mitchell Sogin, and Donald M. Anderson. 1994. "Identification of Group and Strain specific Genetic Markers for Globally Distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). Ii. Sequence Analysis of a Fragment of the LSU rRNA Gene 1." *Journal of Phycology* 30 (6): 999–1011.
- Seger, Andreas and Gustaaf Hallegraeff. 2022. "Application of Clay Minerals to Remove Extracellular Ichthyotoxins Produced by the Dinoflagellates *Karlodinium Veneficum* and *Karenia Mikimotoi*." *Harmful Algae* 111: 102151. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102151>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988321001815>.

Seymour, Justin R., Shady A. Amin, Jean-Baptiste Raina, and Roman Stocker. 2017. "Zooming in on the Phycosphere: The Ecological Interface for Phytoplankton - bacteria Relationships." *Nature Microbiology* 2 (7): 1-12.

Sher, Daniel, Jessie W. Thompson, Nadav Kashtan, Laura Croal, and Sallie W. Chisholm. 2011. "Response of *Prochlorococcus* Ecotypes to Co-Culture with Diverse Marine Bacteria." *The ISME Journal* 5 (7): 1125-1132.

Shin, HyeonSeok, Eunju Lee, Jongoh Shin, So-Ra Ko, Hyung-Seok Oh, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh, Byung-Kwan Cho, and Suhyung Cho. 2018. "Elucidation of the Bacterial Communities Associated with the Harmful Microalgae *Alexandrium Tamarense* and *Cochlodinium Polykrikoides* using Nanopore Sequencing." *Scientific Reports* 8 (1): 1-8.

Sommer, Felix, Marcus Ståhlman, Olga Ilkayeva, Jon M. Arnemo, Jonas Kindberg, Johan Josefsson, Christopher B. Newgard, Ole Frøbert, and Fredrik Bäckhed. 2016. "The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus Arctos*." *Cell Reports* 14 (7): 1655-1661.

Suh, Sung-Suk, Mirye Park, Jinik Hwang, Eui-Joon Kil, Seung Won

- Jung, Sukchan Lee, and Taek-Kyun Lee. 2015. "Seasonal Dynamics of Marine Microbial Community in the South Sea of Korea." *PLoS One* 10 (6): e0131633.
- Taylor, Joe D., Samuel D. Cottingham, Jack Billinge, and Michael Cunliffe. 2014. "Seasonal Microbial Community Dynamics Correlate with Phytoplankton-Derived Polysaccharides in Surface Coastal Waters." *The ISME Journal* 8 (1): 245-248.
- Thomas, Torsten, Jack Gilbert, and Folker Meyer. 2012. "Metagenomics—a Guide from Sampling to Data Analysis." *Microbial Informatics and Experimentation* 2 (1): 1-12.
- Tilney, Charles L., Kaytee L. Pokrzywinski, Kathryn J. Coyne, and Mark E. Warner. 2014. "Effects of a Bacterial Algicide, IRI-160AA, on Dinoflagellates and the Microbial Community in Microcosm Experiments." *Harmful Algae* 39: 210-222.
- Van Rijssel, M., I. Janse, DJB Noordkamp, and WWC Gieskes. 2000. "An Inventory of Factors that Affect Polysaccharide Production by *Phaeocystis Globosa*." *Journal of Sea Research* 43 (3-4): 297-306.
- Velazquez, Eric M., Henry Nguyen, Keaton T. Heasley, Cheng H. Saechao, Lindsey M. Gil, Andrew WL Rogers, Brittany M. Miller, Matthew R. Rolston, Christopher A. Lopez, and Yael Litvak. 2019.

"Endogenous Enterobacteriaceae Underlie Variation in Susceptibility to Salmonella Infection." *Nature Microbiology* 4 (6): 1057–1064.

Wang, Ying-Ying, Si-Min Xu, Jia-Yi Cao, Min-Nan Wu, Jing-Hao Lin, Cheng-Xu Zhou, Lin Zhang, Hai-Bo Zhou, Yan-Rong Li, and Ji-Lin Xu. 2022. "Co-Cultivation of Isochrysis Galbana and Marinobacter Sp. can Enhance Algal Growth and Docosahexaenoic Acid Production." *Aquaculture* 556: 738248.

Worm, Jakob and Morten Søndergaard. 1998. "Dynamics of Heterotrophic Bacteria Attached to Microcystis Spp.(Cyanobacteria)." *Aquatic Microbial Ecology* 14 (1): 19–28.

Xia, Xiaomin, Qiang Zheng, Sze Ki Leung, Yu Wang, Pui Yin Lee, Hongmei Jing, Nianzhi Jiao, and Hongbin Liu. 2021. "Distinct Metabolic Strategies of the Dominant Heterotrophic Bacterial Groups Associated with Marine Synechococcus." *Science of the Total Environment* 798: 149208.

Xu, Na, Shao-jun Pang, and Feng Liu. 2012. "Molecular Identification of a Bloom-Forming Species Isolated from Sanggou Bay in Shandong Province." *Mar.Sci* 36 (4): 13–18.

Yoshinaga, I. 1995. "Lysis of Gymnodinium Nagasakiense by Marine Bacteria." *Harmful Marine Algal Blooms*: 687–692.

Yoshinaga, Ikuo, Mu-Chan Kim, Noriaki Katanozaka, Ichiro Imai, Aritsune Uchida, and Yuzaburo Ishida. 1998. "Population Structure of Algicidal Marine Bacteria Targeting the Red Tide Forming Alga *Heterosigma Akashiwo* (Raphidophyceae), Determined by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Bacterial 16S Ribosomal RNA Genes." *Marine Ecology Progress Series* 170: 33-44.

Zhang, Huan, Wayne Litaker, Mark W. Vandersea, Patricia Tester, and Senjie Lin. 2008. "Geographic Distribution of *Karlodinium Veneficum* in the US East Coast as Detected by ITS - ferredoxin Real-Time PCR Assay." *Journal of Plankton Research* 30 (8): 905-922.

Zheng, Qiang, Jiayao Lu, Yu Wang, and Nianzhi Jiao. 2019. "Genomic Reconstructions and Potential Metabolic Strategies of Generalist and Specialist Heterotrophic Bacteria Associated with an Estuary *Synechococcus* Culture." *FEMS Microbiology Ecology* 95 (3): fiz017.

Zheng, Qiang, Yu Wang, Rui Xie, Andrew S. Lang, Yanting Liu, Jiayao Lu, Xiaodong Zhang, Jun Sun, Curtis A. Suttle, and Nianzhi Jiao. 2018. "Dynamics of Heterotrophic Bacterial Assemblages within *Synechococcus* Cultures." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (3): 1517.

VII. 부록

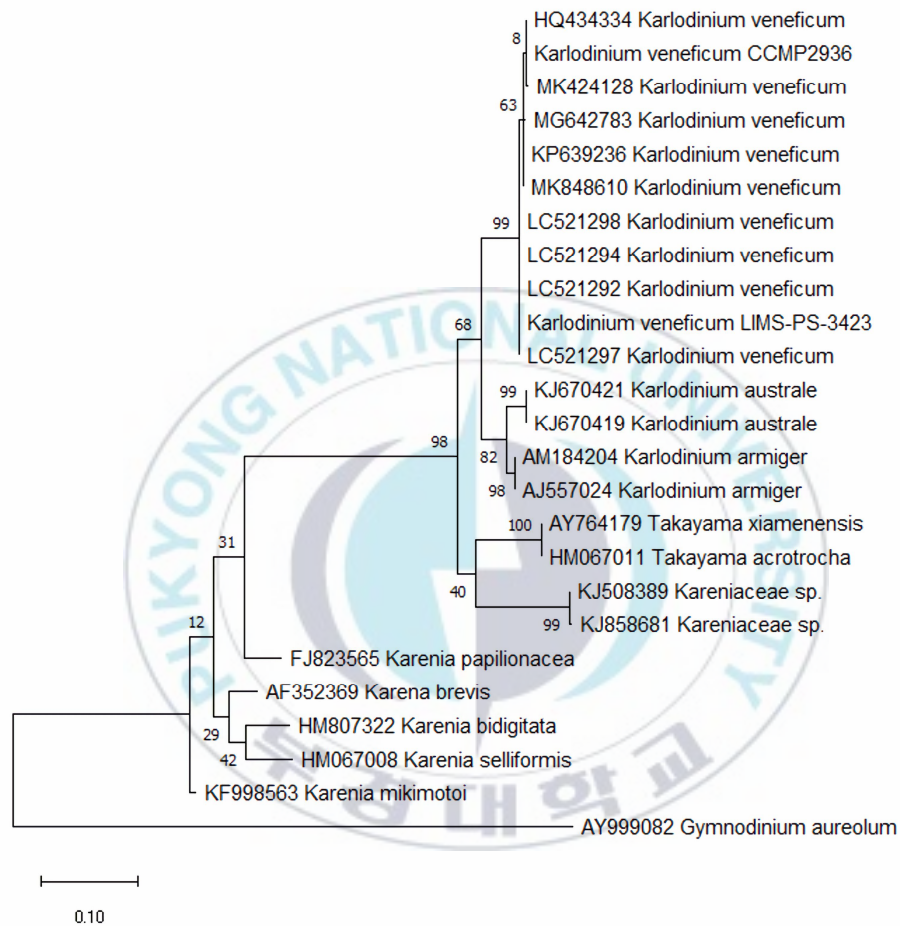


Figure S1. Phylogenetic analysis of the *Karlodinium veneficum* ITS1-2 sequences. The tree shown is the ML tree.

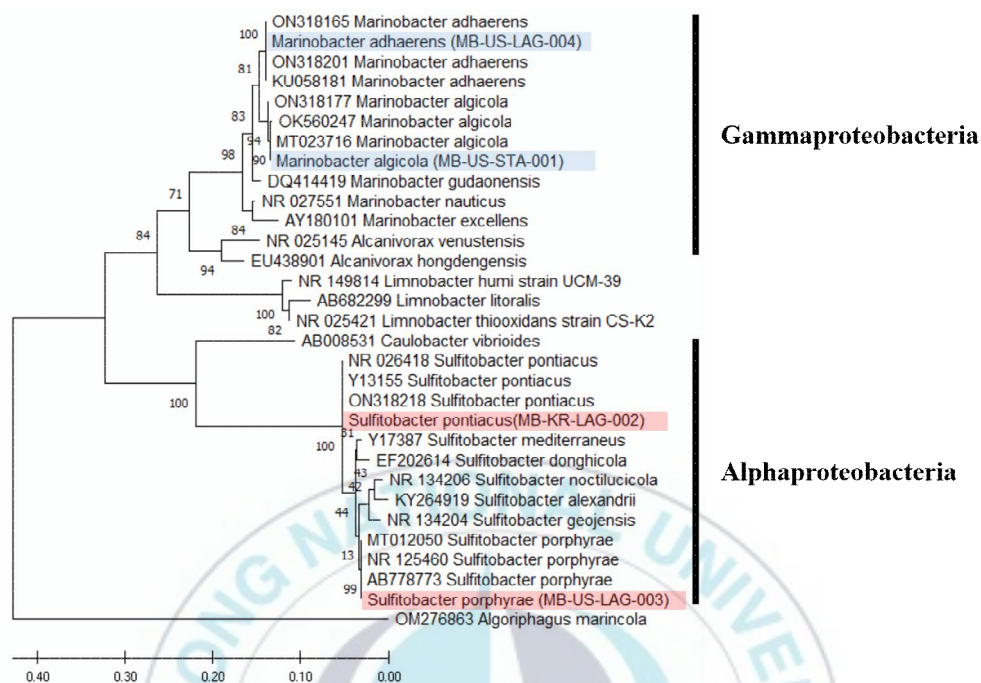


Figure S2. Evolutionary relationships of bacterial taxa used in this study. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

VIII. 감사의 말

이 자리를 빌어 2년간의 석사과정 동안 조언과 격려를 받아 이 자리에 있을 수 있었기에, 함께해주신 모든 분들께 진심으로 감사드립니다. 먼저 학부 과정부터 저에게 해양에 대한 호기심을 길러주시고, 저를 위해 아낌없는 조언과 힘을 주신 김선주 교수님께 감사드립니다. 또한 한국해양과학기술원에서 석사 생활을 이어나가게 도와주시고, 저의 미래를 위해 아낌없는 조언을 해주신 박범수 박사님께 감사의 마음을 전합니다. 교수님과 박사님의 지도 덕분에 지금 이 자리까지 무사히 올 수 있었습니다. 아직 부족한 점이 많지만 일깨워주신 가르침을 되새기며 더욱 노력하겠습니다. 또한 학부생 시절 실습생 신분일 때 많은 배움의 기회를 주시고, 논문 심사도 맡아주시며 격려해주신 양은찬 박사님께도 감사드립니다. 그리고 항상 양질의 강의로 해양학에 대하여 아낌없이 지도해주셨던 해양학과 교수님들께 감사의 인사 드립니다. 모든 분들의 가르침을 잊지 않고 더욱 정진하도록 하겠습니다. 한국해양과학기술원에서 석사 생활을 하며 가장 오랜 시간 함께 했던 지연이언니, 세희오빠, 성민이 덕분에 힘든 순간도 즐거운 순간도 서로 나눌 수 있어 행복했습니다. 그리고 실습생 시절부터 지금까지 함께 해주신 한국해양과학기술원 연구원분들과 박사님들께 감사드립니다. 대학원 생활을 함께하며 많은 격려를 해준 지영이에게도 감사의 말을 전합니다. 그리고 짧은 시간이었지만 함께 동고동락하며 응원해준 LOMME 식구들에게도 감사드립니다. 이외에도 학위 기간 동안 큰 힘이 되어준 고향 친구들과 대학 친구들 덕분에 앞으로 나아갈 수 있었습니다. 그밖에 언급하지 못했지만, 셀 수 없는 많은 순간 함께 해준 모든 분들이 각자의 자리에서 항상 행복하시길 바랍니다. 마지막으로 누구보다도 저를 지지해주고 믿어주시며, 제가 가고자 하는 길을 응원해주신 어머니, 아버지, 그리고 동생 상수에게도 사랑의 마음을 전합니다.