918014-4

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

포스트게놈다부처유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004041-01

기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발

2022.04.04

주관연구기관 / 연세대학교 원주산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발

2021

농 림 축 산 식 품 부

농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발"(개발기간 : 2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 04

주관연구기관명 : 연세대학교 원주산학협력단 (대표자) 하은호 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 이태권
협동연구책임자 :
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

■ 농림축산식품연구개발사업 관리기준 [별지 제17호 서식] <제23조제3호 관련>

최종보고서				보안등급
				일반[√], 보안[ ]
중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	포스트게놈다부처유전체사업
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)	산업화지원 미생물 유전체 전략연구 (연구역량 강화)
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
		연구개발과제번호		918014-4

기술분류							
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0301	50%	LA0504	25%	LA0506	25%
기술분류	농림식품과학기술분류	RA0301	50%	RA305	30%	RA0401	20%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	*농림축산식품 미생물유전체 전략연구사업단*
	영문	*Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food*
연구개발과제명	국문	기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발
	영문	Development of Raman based cell detachment technology for high-throughput single cell sorting and its genomics

주관연구개발기관	기관명	연세대학교 원주산학협력단	사업자등록번호	224-82-14988
	주소		법인등록번호	141271-0004893

연구책임자	성명		이태권	직위	부교수
	연락처	직장전화		휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	

연구개발기간	전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3 년 9 개월)
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 04. 25 - 2019. 12. 31(1 년 9 개월)
		2단계	2020. 01. 01 - 2021. 12. 31(2 년 0 개월)

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		260,000							260,000		260,000	
1단계	1년차	50,000							50,000		50,000	
	2년차	70,000							70,000		70,000	
2단계	3년차	70,000							70,000		70,000	
	4년차	70,000							70,000		70,000	

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고 역할	비고 기관유형
공동연구개발기관							
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							

연구개발담당자 실무담당자	성명		노지현	직위	석박통합과정
	연락처	직장전화		휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022 년 04 월 4 일

연구책임자: 이 태 권 (인)

주관연구개발기관의 장: 연세대학교 원주산학협력단 하 은 호 (직인)

공동연구개발기관의 장: (직인)

위탁연구개발기관의 장: (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="3">포스트게놈다부처유전체사업</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="3">산업화지원 미생물 유전체 전략 연구 (연구역량 강화)</td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td colspan="2">918014-4</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LB0301</td><td>50%</td><td colspan="2">LA0504</td><td>25%</td><td>LA0506</td><td>25%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>RA0301</td><td>50%</td><td colspan="2">RA305</td><td>30%</td><td>RA0401</td><td>20%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="7">농림축산식품 미생물유전체 전략연구사업단</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="7">기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="7">2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3 년 9 개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="7">총 260,000 천원
(정부지원연구개발비: 260,000 천원, 기관부담연구개발비 : 0 천원,
지방자치단체: 0 천원, 그 외 지원금: 0 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="3">기초[√] 응용[ ] 개발[ ]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td colspan="2">기술성숙도
(해당 시 기재)</td><td colspan="2">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형</td><td colspan="7">자유공모</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성</td><td colspan="7"></td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">연구개발
목표 및 내용</td><td colspan="2">최종 목표</td><td colspan="5">○ Single cell 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 나노입자 기반 라만분광법 기술 개발
- 자성 나노입자를 활용한 기능성 미생물군집 분리 기술 개발
- 동위원소와 라만분광법을 활용한 기능성 미생물 검측 및 고속 분리 기술 개발
- 고속 분리된 Single cell의 유전체 분석 및 배양 기술 개발
- 가뭄조건에서 식물-미생물 상호작용의 핵심 미생물 유전체 분석을 통한 신규 내건성 향상 메커니즘 규명</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 내용</td><td colspan="5">○ 1차년도 : 자성 나노입자를 활용한 기능성 미생물 군집 분리 기술 개발
- 자성 나노입자 제작 조건 확립 및 미생물 분리 효율 평가
- 기능성 미생물 군집 분리 기술 개발 및 분리 군집 기능성 분석
○ 2차년도 : 라만분광법을 기능성 미생물 집단 탈착을 위한 요소 기술 개발
- Ramanome 분석 파이프라인 구축
- 질소고정균주의 Ramanome 분석 및 가뭄환경에서의 라만 특이성 분석
- 대표질소고정균주의 가뭄 내성에 따른 동위원소 기반 활성 평가 실험조건 확립
- 라만 레이저 활용 슬라이드 글라스 및 미생물 포집 Chip 제작
- Pulse laser 활용 미생물 탈착 기술 개발 및 정밀성 평가
- 환경 시료에서 탈착된 균주의 기능성 유전자 스크린 및 메타지놈 분석
- 근권 시료 라만 이미징 분석</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="1"></td><td colspan="2"></td><td>○ 3차년도 : 가뭄조건에서 식물-미생물 공생 균주 분석을 위한 기능성 Single cell 분리
- 동위원소를 활용한 농경지내 가뭄 내성 균주 선별 및 다양성 분석
- 식물 대상으로 동위원소-라만분광법 검측 기술을 활용한 공생 균주 표지
- 가뭄조건에서 식물 내건성 향상 균주 분리 및 유전체 분석
○ 4차년도 : Single cell 유전체 비교분석을 통한 식물 내건성 향상 미생물의 신규 메커니즘 규명
- 가뭄조건에서의 토양 메타지놈 분석 및 내건성 향상 유전체 비교
- 라만으로 기평가 된 가뭄 내성 및 민감성 토양 식물 재배 실험
- 식물 재배 실험 시 토양 메타지놈 분석</td></tr>
<tr><td rowspan="4"></td><td rowspan="2">1단계</td><td>목표</td><td>○ 자성나노입자 및 동위원소 라만분광법 활용 기능성 미생물 검측 및 고속 분리 기술 개발</td></tr>
<tr><td>내용</td><td>- 자성나노입자 기술 및 라만분광법 기술을 토대로 가뭄조건에서 식물-미생물 공생 및 식물 내건성 향상 미생물 Single cell 수준으로 분리</td></tr>
<tr><td rowspan="2">2단계</td><td>목표</td><td>○ 가뭄조건 내에서 분리된 Single cell의 식물-미생물 상호작용 핵심 미생물 유전체 분석을 통해 의 신규 내건성 향상 메커니즘 규명</td></tr>
<tr><td>내용</td><td>- 분리된 Single cell 유전체를 비교분석하여 식물 내건성 향상 미생물의 신규 메커니즘 규명</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td>연구개발성과</td><td>- 라만분광법을 활용하여 기능성 Single cell 선별 및 고속 분리 기술 확보
- 메타지놈 분석을 통해 식물 내건성 향상 미생물의 신규 메커니즘 규명
- SCI(E) 급 논문 6편 게재, 특허 출원/등록 2건, 전략미생물 등록 10건, 메타지놈 등록 5건, NABIC 등록 5건
<연구개발성과 유형></td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="2">구분</td><td rowspan="2">논문</td><td rowspan="2">특허</td><td rowspan="2">보고서 원문</td><td rowspan="2">연구 시설 ·장비</td><td rowspan="2">기술 요약 정보</td><td rowspan="2">소프트 웨어</td><td rowspan="2">화합물</td><td colspan="2">생명자원</td><td colspan="2">신품종</td></tr>
<tr><td>생명 정보</td><td>생물 자원</td><td>정보</td><td>실물</td></tr>
<tr><td>예상성과 (N/Y)</td><td>Y</td><td>Y</td><td>N</td><td>N</td><td>N</td><td>N</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>N</td><td>N</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</td><td>- 환경시료로부터 기능성 Single cell을 분리하여 미생물 유전체 분석 수행함으로써 기존 기술로부터 확보하기 어려운 신규 미생물 및 유전자원을 효율적으로 확보
- 식물-미생물 공생관계에 참여하는 근권 미생물을 single cell 수준으로 분석하여 공생관계에 대한 이해도 증진 및 신규 미생물의 유전정보 수집에 활용</td></tr>
<tr><td>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</td><td>공개</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="3">연구개발성과의 등록·기탁 건수</td><td rowspan="2">논문</td><td rowspan="2">특허</td><td rowspan="2">보고서 원문</td><td rowspan="2">연구 시설 ·장비</td><td rowspan="2">기술 요약 정보</td><td rowspan="2">소프트 웨어</td><td rowspan="2">표준</td><td colspan="2">생명자원</td><td rowspan="2">화합물</td><td colspan="2">신품종</td></tr>
<tr><td>생명 정보</td><td>생물 자원</td><td>정보</td><td>실물</td></tr>
<tr><td>6</td><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>15</td><td>2</td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="2">연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</td><td>구입 기관</td><td>연구시설 ·장비명</td><td>규격 (모델명)</td><td>수량</td><td>구입 연월일</td><td>구입가격 (천원)</td><td>구입처 (전화)</td><td>비고 (설치장소)</td><td>ZEUS 등록번호</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

<table>
<tr><td>국문핵심어</td><td>자성나노입자</td><td>라만분광법</td><td>동위원소</td><td>미생물탈착</td><td>단일세포</td></tr>
<tr><td>영문핵심어 (5개 이내)</td><td>Magnetic nanoparticle</td><td>Raman microspectroscopy</td><td>Stable isotope</td><td>Microbe detachment</td><td>Single cell</td></tr>
</table>

〈 목　　차 〉

1. 연구개발과제의 개요

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 연구개발과제의 개요

1.1. 연구개발의 개요

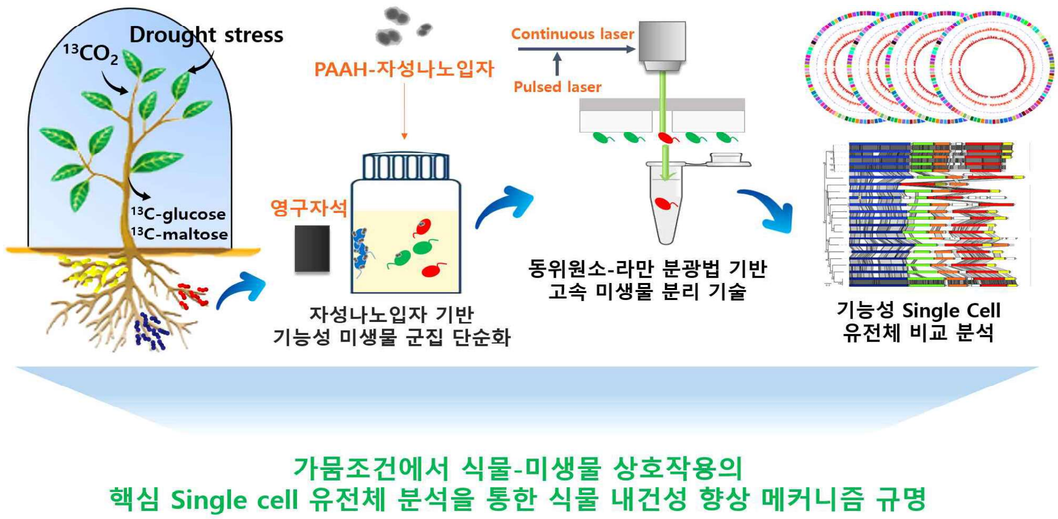


그림 1. 라만분광법 기반 탈착 기술을 활용한 가뭄조건에서 식물과의 공생 single cell 유전체 특성 분석 개요도

1.1.1. 기능성 미생물자원 선별 및 분리 원천 기술 부족

- 전통적인 미생물자원을 활용한 분야는 에너지, 오염 정화 등 거시적인 환경 분야에 집중되었지만, 최근 바이오에탄올, 바이오화학물질 등을 생산하는 미생물들이 각광을 받으면서 단순 실험 대상에서 벗어나 식품, 농업, 화학, 의약 산업의 플랫폼(platform)으로 활용
- 미국 에너지성 산하기구 JGI (Joint Genome Institute)에서는 ETOP (Emerging Technologies Opportunity Program) 프로젝트를 통하여 미생물자원을 효과적으로 확보, 보관, 분석, 응용, 사업화 관련 혁신 기술 개발에 천문학적인 연구비를 지출
- 하지만 국내에서는 여전히 기존에 알려진 배양기술 혹은 메타지노믹스 기술에 의존하여 미생물자원과 유전자원을 확보하다보니 제한적인 정보만을 획득. 특히 연구자들이 관심있는 기능(function)을 보유한 미생물을 선택적으로 분석하기 위한 미생물 선별 방법은 매우 제한적

1.1.2. 총체적 유전자원 확보를 위한 Single cell 수준의 분석 필요 및 기술적 한계

- 비배양 유전체 분석에 가장 대표적인 메타지노믹스 분석은 다량의 미생물 유전정보가 짧은 시퀀스 조각으로 구성되어 있을 뿐더로 시료 내 높은 microdiveristy (종수준의 유전차이)로 인하여 Assembly 등 분석과정이 매우 어려워 시료 내 유용 미생물의 총체적인 유전정보를 확보하는 것은 매우 어려움
- Single cell 수준의 유전체 분석은 메타지노믹스를 보완할 수 있는 유일한 대안이나, 현재 알려진 Single cell 수준의 분석기술은 매우 제한적이며 전문적인 지식 혹은 노하우를 필요로 함. 특히 유전체 분석 과정에서 bioaerosol 및 기타 실험 과정 상 오염 위험성이 매우 높을뿐더러, 유전체 증폭과정에서 사용하는 바이러스 기반 Polymerase 특성상 특정 유전부위만 선별적으로 증폭됨으로써 발생되는 Coverage bias 문제도 유전체 분석에 어려움을 가져다 줌. Single cell을 정밀하게 선별하여 분석하는 기술은 여전히 세계적으로도 도전분야임

1.1.3. 자성나노입자 기반 기능성 미생물 군집 단순화를 통한 검측 효율 향상

- 일반적인 환경시료에서 관심있는 single cell을 찾는 것은 거의 불가능하기 때문에 관심있는 기능을 보이는 single cell을 미생물군집 내 비율을 높이는 과정이 반드시 필요
- 자성 나노입자(Fe_3O_4)는 미생물의 막 표면에 무작위적으로 부착하여 미생물을 영구자석으로 선택적 분리 가능하게 도와줌. 일반적으로 수계에서 미생물을 모아서 제거하는 목적으로 사용되었으나, 최근에는 벤코마이신 혹은 Mannose를 부착하여 특정 미생물 군집에 대한 연구에 활용하기도 함
- 자성나노입자가 부착된 미생물이 생장을 하면서 부착된 자성나노입자의 개수가 줄어듦에 따라 자석에 의해 분리되지 않는 특성을 이용하여 특정 기질 사용여부에 따라 미생물 군집 단순화가 가능. 비록 100% 기능성 미생물군집을 선별하기는 어려우나 군집 내 기능성 single cell 비율을 높혀 검측효율 향상에 매우 중요

1.1.4. 동위원소와 라만분광법을 활용한 기능성 Single cell의 고정밀 검측 기술

- 라만 분광법은 지질, 고고학 등 다양한 분야에 화학구조를 분석에 활용하고 있으며, 최근 분광법 발달로 세포의 지질, 단백질, 핵산 등의 정보를 single cell 수준에서 분석 가능함에 따라 생물학 분야에 적용사례가 증가하고 있음
- 라만시프트 400~1800 cm^{-1} 구간은 미생물의 계통학적 분석에 활용할 수 있을뿐더러 세균이 동위원소 기질을 소모하여 표지된 세균의 특성도 구분할 수 있어 세균의 활성도 정량분석이 가능
- 자성나노입자를 이용하여 단순화된 기능성 미생물 군집 중에 기능성 single cell을 매우 정밀하게 검측 및 선별에 활용가능하며 비파괴 기술로써 추후 미생물의 유전체를 분석하거나 배양에 활용할 수 있음

1.1.5. Pulse 레이저를 활용한 연구자 사용 편의를 높힌 고속 Single cell 탈착 기술

- 기존 라만 기반 세균 분리 기술 (Raman activated cell sorting)은 목표 세균을 매우 정밀하게 분리할 수 있으나 5-10 single cell/day의 매우 낮은 효율을 보이며 optical tweezer를 이용하기 때문에 연구자의 높은 전문성을 필요하기 때문에 많은 연구자가 활용하기 어려움
- Pulse 레이저를 활용하여 Single cell 탈착 기술이 개발되면 추가적인 장비없이 공동기기원의 라만분광법을 이용하여 200-500 cells/day 수준으로 관심있는 single cell을 분리할 수 있을거라 판단

1.1.6. Model system: 가뭄조건에서 삼출액(exudates)을 기질로 활용하는 미생물군집의 single cell 수준 분석을 통한 근권 미생물의 식물 내건성 향상 메커니즘 연구

- 가뭄 조건에서 식물 내 질소농도는 급격히 줄어들어 추가적인 길이 및 부피 생장이 일어나지 않으나, 일부 식물생장촉진균들은 가뭄조건에서도 지속적으로 질소고정을 함으로써 식물 내 질소농도 유지에 도움이 된다는 보고가 있음. 가뭄에서도 질소고정을 통해 식물생장촉진을 할 수 있는 균주를 확보할 수 있으면 식물 내건성 향상을 위한 주요한 기초자료가 될 수 있음
- 대기의 일부를 $^{13}CO_2$로 치환하여 배양한 식물은 광합성을 통해 ^{13}C 표지된 당을 생산함으로써 뿌리 내외부에 공생하는 세균들을 동위원소로 표지하여 실질적으로 공생하는 세균들에 대한 연구 수행이 가능
- 동위원소-라만분광법을 이용한 미생물 탈착 기술을 이용하여 ^{13}C 표지된 공생 미생물들을 분리 및 유전체분석을 수행하여 미생물의 식물 내건성 향상 메커니즘을 새로운 시각으로 접근하여 분석 시도
- 식물-미생물 공생 메커니즘에 대한 연구를 통해 미생물 탈착 기술을 검증하고 다양한 미생물생태의 가설을 검증에 응용할 수 있다고 판단

1.2 연구개발의 중요성

1.2.1. 나노기반 라만분광법을 활용하여 환경시료로부터 기능성 single cell의 고효율 선별 플랫폼 개발

- 복잡한 환경시료에서 single cell 수준에서 선별(screening) 과정은 매우 노동집약적이고, 시간소모가 되는 과정이므로 전처리 과정을 통해 관심있는 기능성 미생물집단을 선 확보할 수 있는 것이 중요
- 자성나노입자를 이용해서 기능성 미생물집단 (population)을 미리 선별하고, 추가적으로 동위원소 기반으로 활성 균주를 검측 가능한 라만분광법을 활용하여 기능성 single cell 정밀하게 분리 가능

1.2.2. 미생물 연구자 편의를 위한 Easy, Fast, Simple한 고속 미생물 분리 기술 개발

- 각 기관에서 보유하고 있는 라만 현미경에 추가적인 장치 구성없이 Pulse laser와 특수 슬라이드를 활용하여 연구자가 관심있는 미생물의 single cell을 200-500 cells/day 수준으로 분리 가능
- 이론적 기술적으로 복잡하지 않아 사용자 편의가 매우 높아 많은 연구진들이 범용적으로 활용

1.2.3. 가뭄조건에서 식물의 내건성 향상에 도움이 되는 신규 미생물 자원 및 유전자원 확보

- 미생물 탈착기술은 기존 배양 기반 기술과 메타지놈 분석에서 찾을 수 없었던 미생물자원과 유전자원을 확보할 수 있는 잠재력이 매우 높으므로 국내 생물자원 확보에 대한 경쟁력 향상에 이바지함
- 특히 가뭄 조건에서 식물 생장에 직접적으로 영향을 미치는 식물성장촉진근권 미생물 중 실질적으로 활성을 보이는 자원을 선택적으로 배양하거나 single cell 분석을 통해 유전정보를 확보 가능

1.3. 연구개발의 창의성 및 혁신성

- 자성나노입자와 라만분광법을 이용하여 환경시료로부터 관심있는 Single cell을 비파괴, 비표지(label free), 고속(200-500cells/day) 분리하는 기술을 개발함으로써 배양기술과 메타지노믹 방법으로 분석할 수 없었던 미생물 유전체 정보를 효율적으로 확보 가능

- 가뭄조건에서 식물-미생물 공생관계를 통해 식물생장촉진에 주요한 역할을 하는 미생물을 동위원소-라만분광법으로 선별하여 미생물자원을 확보함으로써, 유전자 조작 및 스마트팜과 같은 고비용의 기술을 대체할 수 있는 기후변화대응 기술 개발의 초석을 다질 수 있음

- 본 연구에서의 미생물 탈착 기술은 기관 내 대부분의 공동기기원이 가지고 있는 라만분광법에 추가적인 장비 구축 혹은 고비용의 실험재료 구매 없이도 특수 재질로 코팅된 슬라이드 글라스를 이용하여 누구나 쉽게 기능성 Single cell을 분리할 수 있어 국내 미생물 분야의 연구 경쟁력 향상에 기여

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2.1. 자성 나노입자 제작 조건 확립 및 미생물 분리 효율 평가

2.1.1. 자성나노입자 제작 및 개질

- $FeCl_2$와 $FeCl_3$을 1:2 비율로 초정제수에 혼합하여 NH_4OH(14%)를 한 방울씩 넣어 천천히 반응시켜 자성나노입자(Fe_3O_4)를 제작
- 미생물 부착율 향상을 위하여 자성나노입자 표면을 PAAH로 개질(PAAH 주입농도: 10 mg/mL, 초음파 처리시간: 40kHZ, 90W, 15min)하여 개질 유무에 따른 부착율 비교 평가 결과, 50배 이상 높은 효율로 부착율이 향상됨을 확인하였음(자성나노입자 처리 5분 기준) (그림 2)

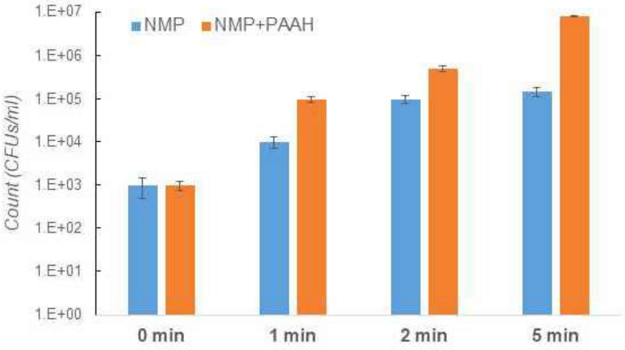


그림 2. 제작한 자성나노입자 (왼쪽)과 표면 개질한 입자를 활용한 미생물 부착율 비교평가 결과(오른쪽)

2.1.2. 단일 균주 대상으로 자성 나노입자의 미생물 분리효율 평가

- 세포막 특성이 다른 4개 균주(그람 음성균 : *Algoriphagus halophilus, Escherichia coli,* 그람 양성균 : *Lactobacillus plantarum subsp. Plantarum, Lactococcus lactis subsp. lactis*)를 대상으로 미생물 분리 효율 평가 : 세포막 특성과 상관없이 자성나노입자로 표지된 미생물이 대조군 대비 100-1,000 배 이상 선택적으로 분리 (그림 3)

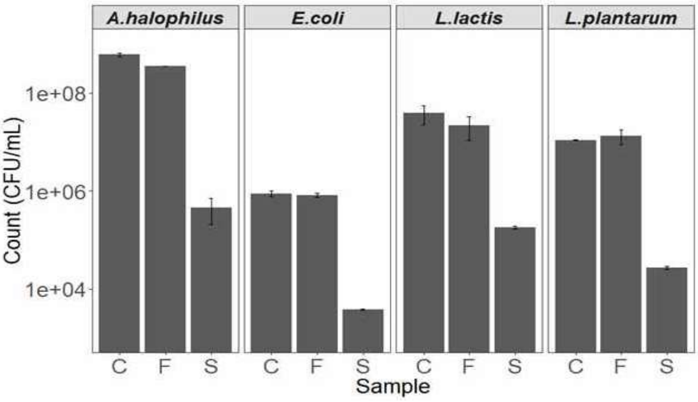


그림 3. 단일 균주 대상 분리 실험 모식도 (왼쪽) 및 단일 균주 대상 분리 효율 평가 (오른쪽, C: 대조군, F: 자석에 부착된 균주, S: 상층액에 존재하는 균주)

- 비록 제한된 균주로 실험을 진행했지만 막 특이성에 따른 자성 나노입자의 분리 효율이 차이가 없으므로 특정 균주를 선택적으로 분리하는 편향(bias) 없이 분리 가능하다고 판단됨

2.2. 기능성 미생물 군집 분리 기술 개발 및 분리 군집 기능성 분석

2.2.1. 자성 나노입자를 활용한 다수의 균주가 혼합된 인공 군집을 대상으로 목표하는 미생물 분리 평가

- 자성 나노입자가 표지된 균주(*L. plantarum*)와 표지되지 않은 균주(*A. halophilus*)를 혼합한 인공 군집을 대상으로 분리 효율을 평가한 결과, 표지된 균주가 다른 균주와 비교하여 약 100배 효율적으로 분리됨을 확인함 (그림 4)
- 표지되지 않은 균주도 영구자석으로 분리한 시료에서 10^{3-4} CFU/ml 수준으로 계수가 되는 것으로 보아 분리 순도(purity)의 한계를 인지해야할 것으로 보임

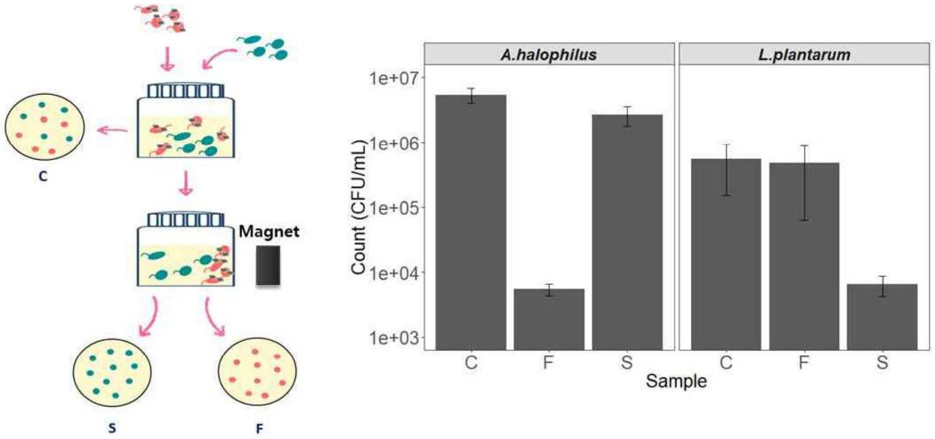


그림 4. 인공군집 실험 개념도 (왼쪽) 및 자성나노입자 분리 실험 결과(오른쪽)

2.2.2. 환경시료로부터 미지의 기능성 미생물 군집 분리 기술 적용성 평가

- 자성나노입자를 이용하여 토양시료로부터 페놀을 선택적으로 분해하는 기능성 군집을 분리 실험 수행
- 토양의 총 미생물 군집을 nycodenz solution을 이용하여 탈착한 후, 제작한 자성나노입자에 모두 부착하여 300 mg/L 페놀과 함께 주입하여 배양함. 페놀을 기질로 사용하는 기능성 미생물 입자는 세포 분열에 의해서 자연적으로 부착된 자성나노입자의 개체수가 줄어 영구자석으로 선별이 어려우므로 분리가 가능함
- 토양으로부터 탈착된 미생물의 농도(10^{4-7} CFUs/ml)와 주입되는 자성나노입자 주입 비율(1:5-1:25)에 따라 기능성 군집 분리 효율이 변동이 됨에 따라 최적 분리 조건 (10^{4-5} CFUs/ml, 1:5) 확립
- 최종적으로 분리된 페놀 분해 군집은 48시간이내에 300 mg/L의 페놀을 모두 분해하였고 대조군 대비 약 30%이상의 높은 분해 효율을 보임 (그림 5)

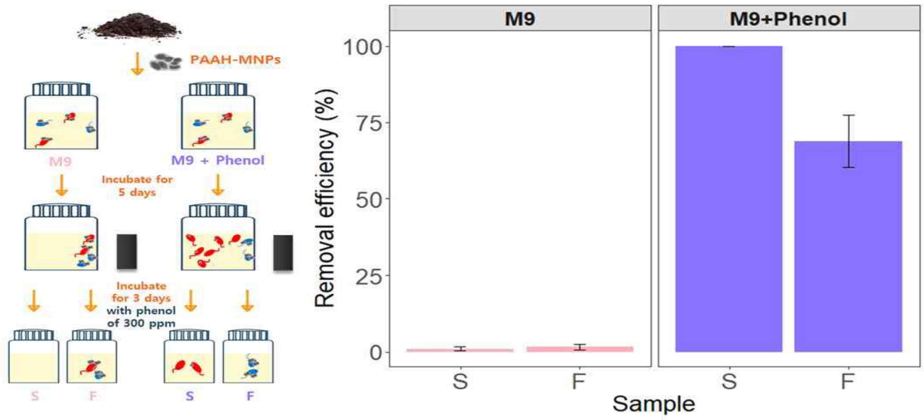


그림 5 . 토양시료 대상 자성나노입자 적용성 시험 개념도(왼쪽)와 분리 군집의 페놀 분해 결과(오른쪽)

2.3. Ramanome 분석 파이프라인 구축

2.3.1. Ramanome 분석 파이프라인 구축

- 국내 라만제작 업체 NanoBase와 협업하여 미생물 검측 및 분리용 라만 분광현미경을 제작 및 실험 조건 확립 (그림 6)

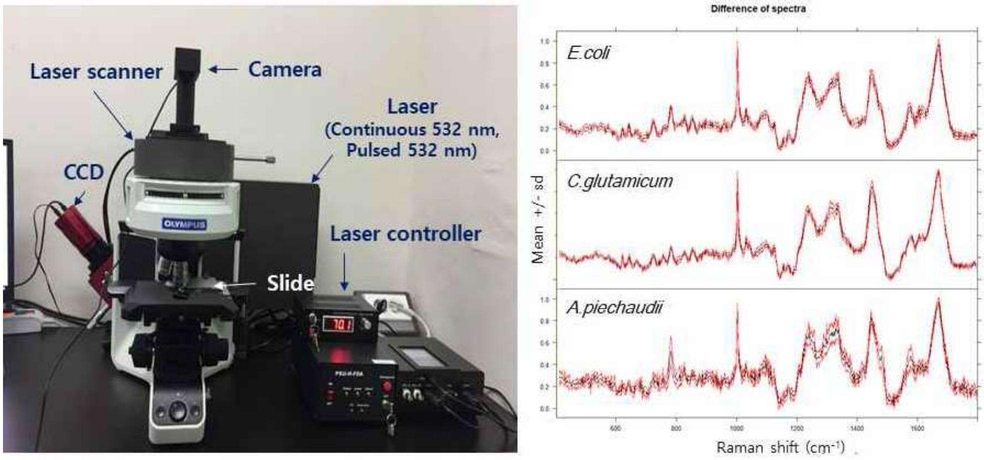


그림 6. 실험에 사용한 라만 분광 현미경 (왼쪽)과 세 균주의 Ramanome 분석 결과 (오른쪽)

- 분광기와 Grating, 초점, 미생물 성장 상태 등에 따라 라만 스펙트럼의 특성이 민감하게 변화하므로, 라만 분광 현미경에 적합한 스펙트럼 분석 파이프라인을 구성이 필요함. 스펙트럼은 반드시 alignment, baseline correction, normalization 등을 포함한 전처리 과정을 수행해야함 (그림 7)

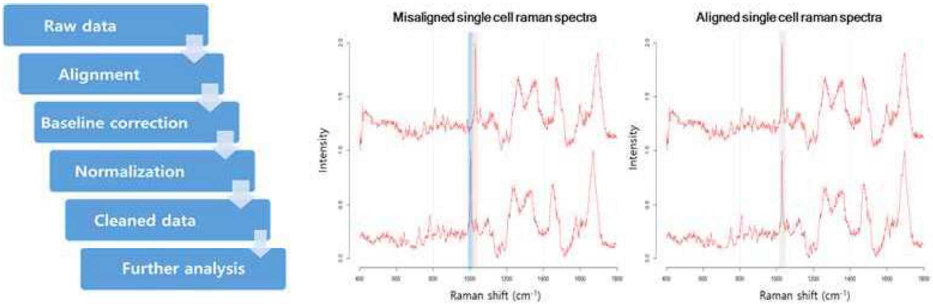


그림 7. 라만 스펙트럼 전처리 순서도 (왼쪽) 및 Alignment 처리 전후 비교 결과 (오른쪽)

- Alignment는 950-1050 cm^{-1} 구간에서 가장 높은 peak인 phenylalanine(bacterial universal peak)을 중심으로 모든 스펙트럼을 alignment 할 수 있도록 디자인 하였음. baseline correction은 als, modpolyfit, peakDetection, rfbaseline 등의 방법, normalization은 PQN, Zero2One 등의 방법을 각각 적용하여 라만 스펙트럼을 통해 종별 구분(Classification)이 명확한 조합을 선정. 종별 구분은 간단한 dendrogram (clustering: Complete, Distance: Euclidean)으로 비교하였으며, 최종적으로 als (baseline correction)와 zero2one (Normalization)을 선정하였으며, Genus 수준에서 충분히 구분됨을 확인하였음 (그림 8)

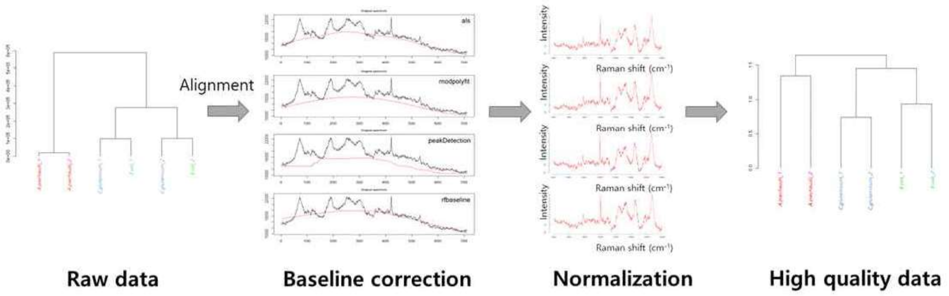


그림 8. Ramanome 분석 파이프라인 활용에 따른 종별 구분 결과 비교

2.4. 질소고정균주의 Ramanome 분석 및 가뭄환경에서의 라만 특이성 분석

2.4.1. 표준 질소고정균주 선정 및 Ramanome 분석

- Actinobacteria 2종 (Arthrobacter), Alphaproteobacteria 8종 (Rhizobium Azospirillum 등), Betaproteobacteria 3종 (Achromobater, Derxia 등), Gammaproteobacteria 2종 (Azomonas, Azotobacter)을 포함한 총 15종의 표준 질소고정 균주 선정 및 10종의 가뭄내성 균주 동정 완료
- 미생물 라만 스펙트럼 중 계통학적 판별이 가능한 지역 (raman shift 400-1800 cm^{-1})을 대상으로 균주별 Ramanome을 확보 : 표준 균주별 라만 특이성 확인 (그림 9)

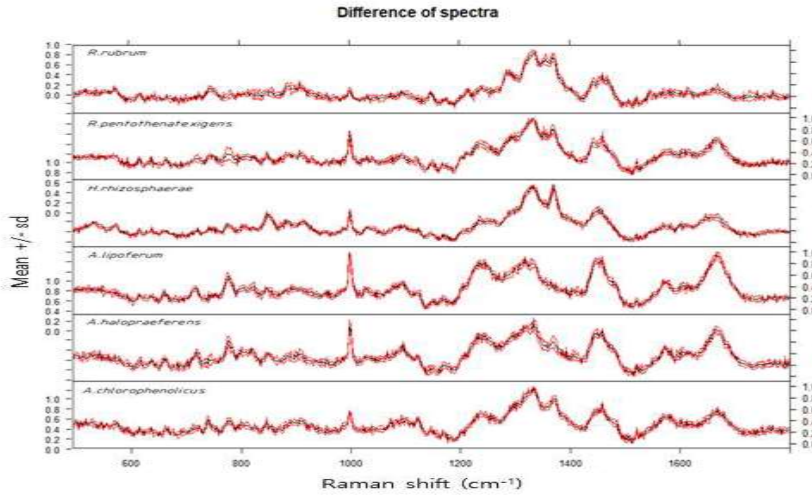


그림 9. 표준 질소고정 균주 중 일부 균주의 Ramanome 분석 결과

2.4.2. 가뭄 조건에서의 균주별 라만 특이성 분석

- 일반조건과 가뭄 조건 (PEG 25% 주입=약1.0 Mpa)에서의 균주별 Ramanome 비교 분석을 통해 가뭄조건에서의 특성 (지질, 단백질, 핵산 등의 정량 변화) 분석을 위해 가뭄 환경 내에서의 균주와 일반 조건에서의 균주 라만 스펙트럼을 비교
- 가뭄조건에 따른 Ramanome 변화 특성은 가뭄 내성 균주와 가뭄 민감성 균주별로 상이함. 가뭄 내성 균주는 Ramanome의 변화가 크지 않은 반면, 가뭄 민감성 균주는 가뭄 조건 내에서 지질과 단백질의 증가, 아미노산의 증가, 핵산의 감소 등의 결과를 나타냄. 해당 결과는 기존의 연구결과와 유사하여 라만 분광법을 이용하여 수분 부족할 경우 균주의 생리적인 특성이 분석 가능한 것으로 보임 (그림 10)

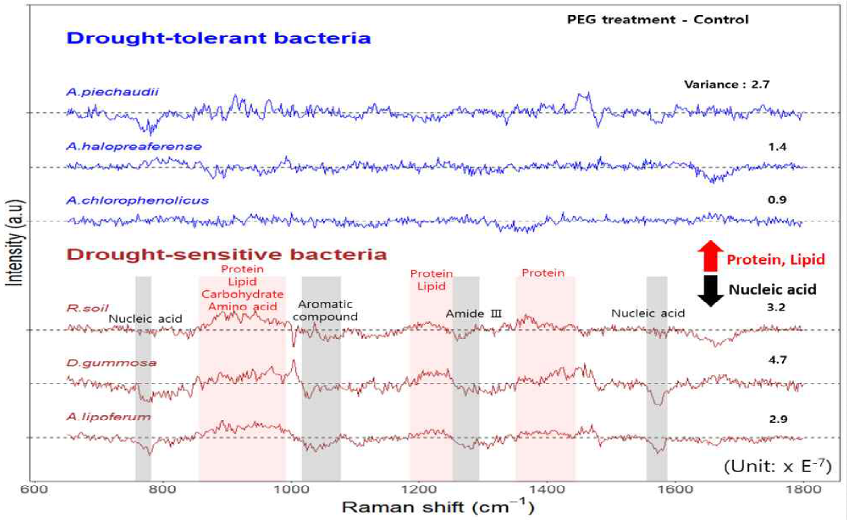


그림 10. 가뭄조건에서의 대표 질소고정 균주의 Ramanome과 일반조건에서의 균주의 Ramanome 차이 비교

2.5. 대표질소고정균주의 가뭄 내성에 따른 동위원소 기반 활성 평가 실험조건 확립

2.5.1. 대표질소고정균주의 중수 기반 활성 평가 실험조건 탐색

- 가뭄내성 균주를 선별하기 위해서는 가뭄 조건에서 미생물의 생리적 활성 여부를 판별할 수 있는 기술이 필요함. 일반적으로 중수(D_2O)가 주입되어 있는 조건에서 미생물이 활성이 있을 때, 세포의 지질의 수소가 Deuterium(D)로 치환되어 라만 스펙트럼 내 CD peak (2040–2300 cm^{-1})가 새롭게 나타나므로 해당 peak를 활용하여 미생물 활성 여부 판단이 가능함
- 대표 균주: A*chromobacter piechaudii*와 *Azospirillum halopraeferens*
- 배양조건: 균주의 활성 평가를 위해 대표질소고정균주를 대상으로 실험 조건을 탐색함. Nutrient broth (NW): 고영양조건, PBS buffer (PW): 빈영양조건, Soil extract solution (SW): 토양유사조건의 각 용액에 중수를 40% 주입한 용액(ND, PD, SD)에 각각 접종하여 최적 배양 온도에서 12시간과 24시간 후에 Ramanome을 확보함
- 활성 평가 방법: CD peak의 생성 정도를 CD ratio로 판단하며 CD peak 면적/ (CD peak 면적 + CH peak 면적)으로 계산함. 균주의 활성과 관계없이 용액 내 존재하는 중수가 균주의 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 포름알데히드로 고정한 활성이 없는 균주를 대조군으로 실험함. 대조군의 결과값을 기준으로 그 이상의 값을 가지는 시료를 활성이 있는 것으로 판단함
- 중수가 포함되지 않은 용액에서 배양된 시료(NW, PW, SW)보다 중수가 포함된 용액에서 배양된 시료(ND, PD, SD)의 CD ratio가 대체로 더 높은 경향을 보였으나 대조군의 CD ratio를 기준으로 한다

면 *A. piechaudii* 균주는 ND 시료만 활성을 보였고 *A. halopraeferens*는 ND와 PD 시료에서 활성을 보였음을 판단할 수 있음. 두 개의 균주 모두에서 활성 여부를 판단하기에 Nutrient broth를 사용하는 것이 적합한 것으로 판단되어 가뭄 조건에서의 단일 균주 활성 평가 실험에 Nutrient broth를 활용하기로 함 (그림 11)

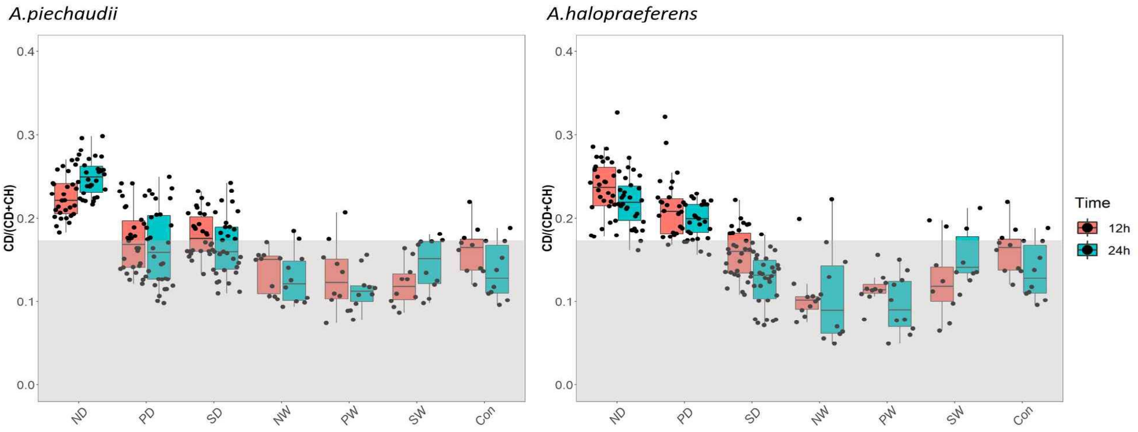


그림 11. 대표질소고정균주의 배양 조건 별 활성 평가

2.5.2. 대표질소고정균주의 가뭄 내성에 따른 중수 기반 활성 평가

- 대표질소고정균주 중 가뭄 내성 균주 3종과 가뭄 민감성 균주 3종을 가뭄 조건 내에서의 활성 평가를 실시함. 중수 40%의 Nutrient broth와 가뭄 조건을 조성하기 위해 중수 40%의 Nutrient broth에 PEG 25%를 혼합한 용액에 각 균주를 접종하고 24시간 후 Ramanome을 확보함
- 가뭄 내성 균주 3종은 일반 배양 조건(검은색)과 가뭄 조건(빨간색)에서도 CD peak가 나타난 반면, 가뭄 민감성 균주 3종은 일반 조건과 달리 가뭄 환경에서는 CD peak가 확인하기 어려움 (그림 12)
- 동위원소(중수)를 이용하여 균주의 가뭄 내성 여부를 판단할 수 있음을 확인함

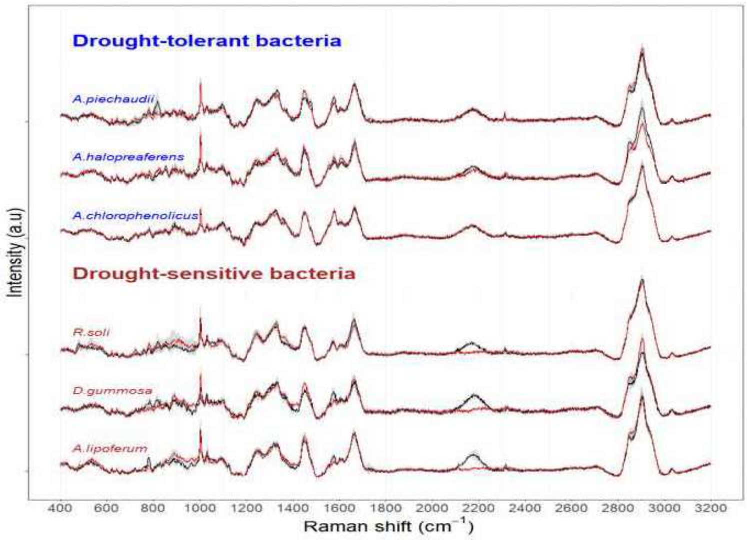


그림 12. 가뭄 내성 균주와 가뭄 민감성 균주의 가뭄 환경에서의 미생물 활성 차이

2.6. 라만 레이저 활용 슬라이드 글라스 및 미생물 포집 Chip 제작

2.6.1. 라만 레이저 활용에 적합한 슬라이드 글라스 제작

- Single cell sorting이 가능한 라만 슬라이드를 제작하기 위해서는 i) 라만 레이저가 투과되면서 라만 간섭이 적은 슬라이드 재질, ii) 슬라이드를 투과해서 미생물 위치가 확인 가능할 정도로 투명하면서 라만간섭이 적은 슬라이드 코팅 재질, iii) Pulse laser로부터 미생물 연소를 방지할 수 있는 슬라이드 코팅 재질이 필요
- 1 mm 두께의 Quartz 슬라이드 재질에 전도성 물질인 Indium Tin Oxide (ITO)를 100 nm 두께로 코팅하였을 경우, 위의 조건과 일치하는 라만 슬라이드를 제작할 수 있었음 (그림 13)
- 슬라이드 재질과 코팅재질인 Quartz와 ITO를 투과하여 미생물을 측정할 수 있는 Long distance objective를 라만 현미경에 추가하여 슬라이드 하단에서의 *E. coli* K-12 라만 스펙트럼과 측정용 알루미늄 슬라이드의 라만 스펙트럼을 비교하여 유효성 평가
- ITO 코팅 슬라이드에서 Long distance objective로 측정한 미생물의 라만 스펙트럼은 알루미늄 코팅 슬라이드에서 측정한 미생물의 라만 스펙트럼과 비교 시 Phenylalanine을 비롯한 라만 스펙트럼이 거의 유사한 형태를 보이는 것을 확인함. Raman shift 1000 cm^{-1} 이하의 구간에서 편차가 있었으나 이는 유의한 수준의 차이는 아니므로 Long distance objective 사용 시 ITO 코팅 슬라이드의 활용이 가능함

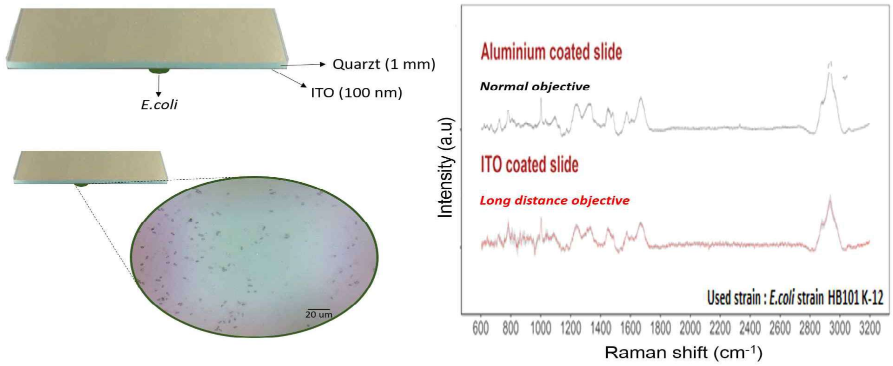


그림 13. 본 연구진이 제작한 ITO 코팅 슬라이드와 Long distance objective 광학 이미지(왼쪽) 및 슬라이드 별 라만 스펙트럼(오른쪽)

2.6.2. 미생물 탈착 시 사용 가능한 미생물 포집 Chip 제작

- Single cell 실험에서 가장 유의해야 할 점은 외부 유입에 의한 시료 오염이므로 시료 오염을 최대한 방지하기 위하여 i) 슬라이드를 외부 오염으로 보호하면서, ii) 탈착된 미생물의 cell lysis를 향상하고, iii) 다량의 탈착 실험을 동시에 진행할 수 있는 미생물 포집용 chip 제작이 필요
- Chip의 성형과 재사용이 가능한 Polydimethylsiloxane (PDMS)를 원료로 제작하였고(가로 80 mm, 세로 25 mm, 높이 5 mm), Chip 위에 슬라이드가 올라간 후 밀폐될 수 있도록 디자인하여 외부 오염을 보호할 수 있도록 디자인함
- 1개의 Chip에 미생물 포집 Well은 직경 2 mm, 깊이 3 mm로 제작하여 cell lysis buffer를 2.5 uL 주입함으로써 탈착과정에서의 세포 분실율(cell loss rate)를 낮추고, cell lysis 효율을 높힐 수 있게 함. 또한 well 간 간격을 6 mm로, 총 30개를 디자인하여 탈착과정에서의 교차오염을 방지함 (그림 14)

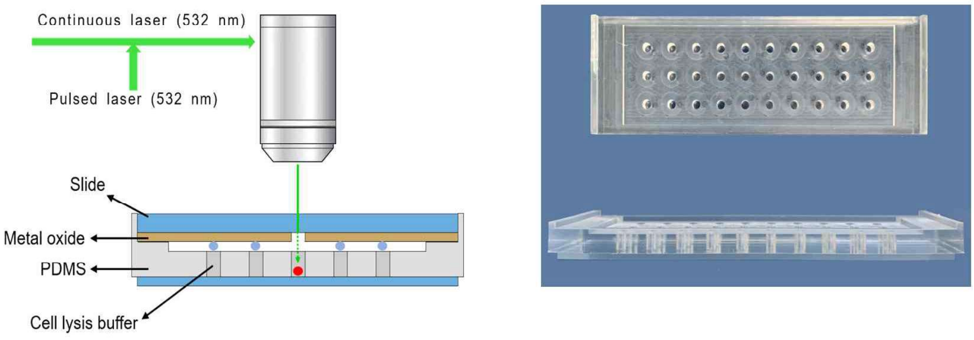


그림 14. 미생물 포집 Chip 모식도 (왼쪽) 및 사진 (오른쪽)

2.7. Pulse laser 활용 미생물 탈착 기술 개발 및 정밀성 평가

2.7.1. 미생물 탈착 기술 개발

- Green fluorescent protein (GFP) 발현 *E.coli* K-12를 고정한 ITO 코팅 슬라이드와 미생물 포집 Chip을 고정시키고 532 nm의 Continuos laser로 라만 스펙트럼 측정하여 Single cell 위치를 확인
- 같은 위치의 미생물을 대상으로 532 nm의 Pulse laser를 사용하여 탈착을 시도할 때, modulation mode (반복적 조사)/ Continuos mode (지속적 조사), Continuos laser power 기준 1 mW/ 1.5 mW/ 2 mW, Pulse laser 조사 시간 5초/ 10초/ 15초 등의 조건 별 실험을 통해 Cell의 상태와 슬라이드 코팅 정도에 따라 탈착 정도가 달라지며 10초 이상 laser 조사 시 산화 부위가 넓어져 Single cell 수준의 탈착이 어려워짐을 확인함. 최종적으로 Pulse laser로 미생물 탈착 시 Modulation mode, Continuos laser power 기준 2 mW, 5초를 선택함
- 위의 조건으로 *E. coli*의 단일 세포를 탈착한 결과, 슬라이드에서 단일 세포가 탈착된 흔적을 육안으로 확인 가능함 (그림 15)

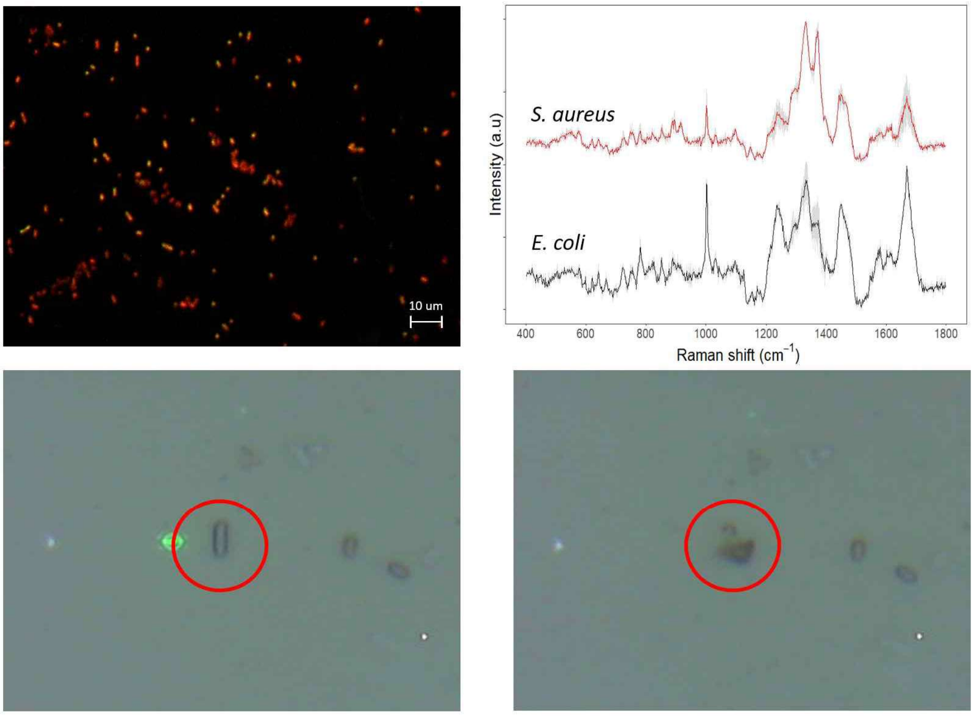


그림 15. 단일 세포로 존재하는 *S. aureus*(빨간색)와 *E. coli*(노란색) 형광현미경 사진 및 각 균주의 라만 스펙트럼(위)과 Pulse laser활용 단일 세포 탈착 전후 비교사진(아래)

2.7.2. 미생물 탈착 기술 정밀성 평가

- *E. coli* K-12와 *Staphylococcus aureus*가 1:1로 혼합된 시료를 대상으로 *E. coli* K-12 20개의 단일 세포를 고유의 라만 스펙트럼을 기준으로 탈착시킨 후, cell lysis를 용이하게 하기 위해 freeze&thaw cycle을 -80 ℃(냉동고) 와 65 ℃(water bath)에서 2 cycle을 반복하고 alkaline lysis를 위해 D2 buffer (DTT + DLB buffer)를 넣은 뒤 65 ℃(water bath)에서 10분간 방치함
- Multiple displacement amplification (MDA) 기법으로 cell lysis 된 시료의 gDNA를 증폭한 후, PCR을 통해 일반 세균 대상의 16S rRNA 유전자 (V4/ V5 region), E. coli K-12 특이 16S rRNA 유전자를 각각 증폭하여 탈착 정밀도 평가. 동일 실험을 20회 반복
- Negative 대조군으로 D.W를 사용하였으며 Sorting 시 교차오염 여부를 판단하기 위해 균주를 포집하는데 사용된 Well 외에 다른 Well 내부의 cell lysis buffer를 대조군으로 지정하여 MDA 시약의 오염정도와 sorting 과정에서의 오염정도를 동시 평가함
- MDA 기법으로 시료의 gDNA를 증폭한 결과, 대조군을 포함한 모든 시료에서 증폭이 확인됨 (DNA 농도 약 2000 ng/uL). 이는 MDA 과정에서 primer로 사용된 hexamer가 엉겨 붙는 현상이 발생하기 때문에 MDA 증폭 결과만으로 cell sorting 여부를 판별하기 어려우므로 반드시 PCR 실험이 진행되어야 함
- PCR 결과, 대조군에서는 모두 16S rRNA 유전자가 존재하지 않은 것으로 보아 sorting 실험 과정에서의 교차 오염은 없는 것으로 판단되며, *E. coli* K-12를 목표로 탈착한 Sorting 시료에서는 16S rRNA 유전자와 K-12 특이 유전자가 존재함을 확인하였고, 반면에 *Staphylococcus를* sorting 한 균주의 경우 16S rRNA에서만 증폭됨 (그림 16)
- Pulsed laser를 이용해서 선택적으로 관심있는 균주만 sorting 할 수 있음을 확인

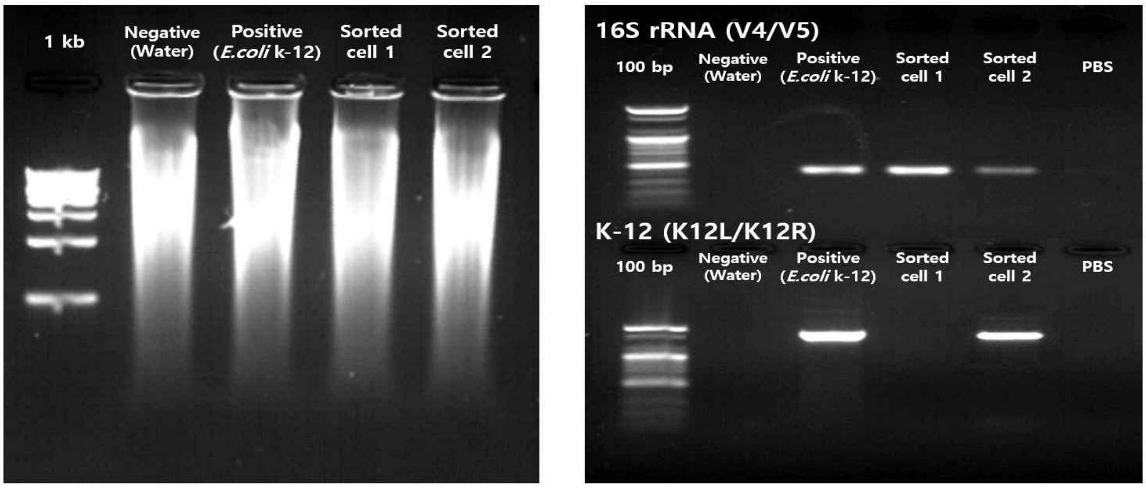


그림 16. 시료 별 MDA 증폭 결과(왼쪽) 및 일반 세균 대상의 16S rRNA 유전자와 K-12 특이 유전자 증폭 결과(오른쪽) (Sorted cell 1: *S. aureus*, Sorted cell 2: *E. coli* k-12)

2.8. 환경 시료에서 탈착된 균주의 기능성 유전자 스크린 및 메타지놈 분석

2.8.1. 콩과 식물 뿌리 근권 시료 대상으로 미생물 탈착 기술 검증

- 뿌리 근권 토양과 Cryosection한 뿌리 혹 절편을 각각 ITO 슬라이드에 고정시켜 Pulse laser로 미생물을 미생물 포집 Chip의 Well에 탈착하여 (뿌리 근권 토양 탈착 미생물: R1, 2, 3/ 뿌리 혹 탈착 미생물: N1, 2, 3) 근권 미생물 군집과 비교함으로써 환경시료를 대상으로 균주 탈착 기술 활용 여부 검증
- 모든 시료는 PCR을 활용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하여 시료 내 미생물 군집 분석을 수행할 예

정(현재 시퀀싱 진행 중) (그림 17)

- 시퀀싱 결과를 바탕으로 환경시료를 대상으로 균주 탈착 기술의 활용 여부를 확인 가능하며, 분리된 균주들과 근권 미생물 군집과의 비교를 통해 기술을 통해 신규 미생물 발굴 여부를 검증할 예정

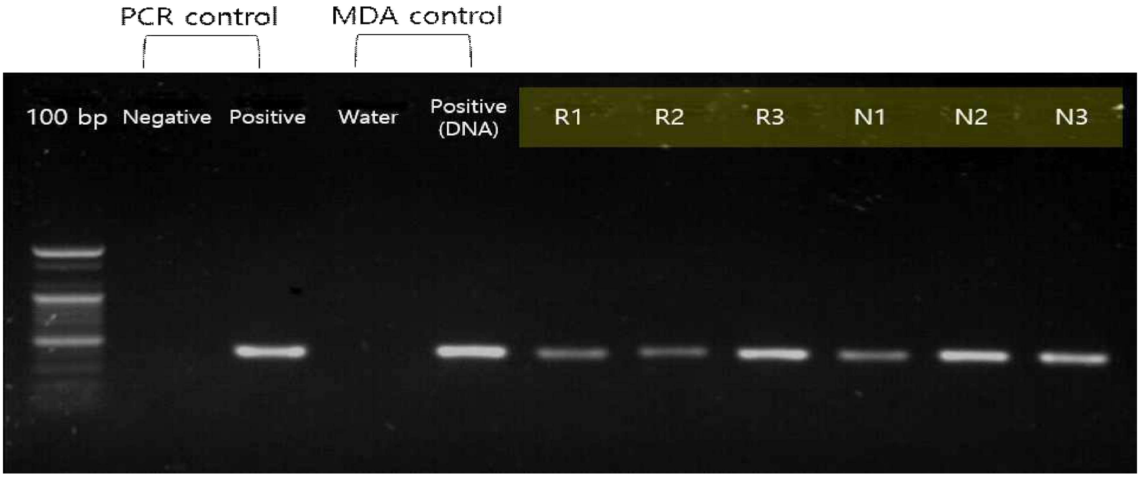


그림 17. Pulse laser로 탈착된 뿌리 근권 균주(R)와 뿌리 혹 내부 균주(N)의 16S rRNA PCR 결과

2.8.2. 기능성 유전자 스크린 프라이머 및 실험조건 선택

- 유전체 분석용 균주 선별: 추후 다양한 환경 시료에서 탈착된 균주의 DNA를 대상으로 기능성 유전자(식물생장촉진 및 환경 스트레스 적응) 소유 여부를 바탕으로 유전체 분석용 균주를 선별함
- 표1에 나타낸 바와 같이 *nifH*와 *TyrR*과 같은 식물생장 촉진 유전자 2개, *ProP, ProT, AqpZ, TreS* 등의 환경스트레스 적응 유전자의 프라이머 4개를 선별하여 환경시료와 대표 균주를 대상으로 실험 조건 확립 (표 1)

표 1. 기능성 유전자 프라이머

유전자	기능	프라이머	Ref
nifH	Nitrogen fixation	nifH_F/ nifH_R	John Christian Gaby et al., 2012
TyrR	Biosynthesis of indole acetic acid (IAA)	TyrR_F/ TyrR_R	Saúl Jijón-Moreno et al., 2019
ProP	Osmoprotectant uptake	proP1/proP2	Doreen E. Culham et al., 2001
ProT	Proline transport	P1U/P1D	Jibao Chen et al., 2016
AqpZ	Maintenance of cell turgor and osmoregulation	GCBU3/GUBU2	Giuseppe Calamita et al., 1995
TreS	Trehalose synthesis	TF1/TF2	Ling Jiang et al., 2013

2.8.3. 환경 시료 내 가뭄 내성 균주의 유전체 분석

- 뿌리 근권 토양에 5일 간 가뭄 환경을 조성한 후 Nycondenz로 토양 균주를 분리함. 분리한 균주를 Pulse laser로 탈착하고 탈착 균주 중 기능성 유전자 유무를 통해 선별된 균주 8종의 유전체 분석을 진행함
- 유전체 분석 결과, 선별한 8종의 균주에서 가뭄 스트레스를 저감시켜주는 물질의 생합성을 향상시키는 2차 대사산물 관련 유전자(Trehalose, Proline, Choline)를 다량 보유하고 있으며 8종의 균주에서 Trehalose, Proline, Choline과 관련된 동일한 유전 체계를 공유하고 있음 (그림 18)

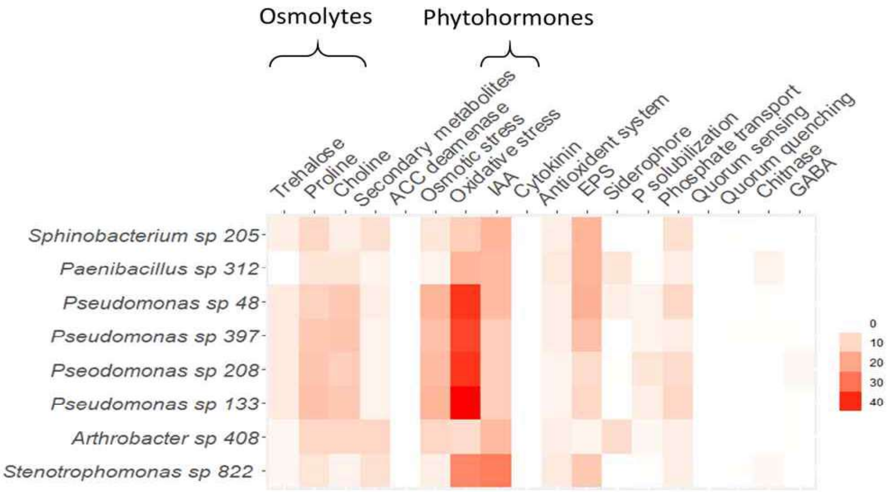


그림 18. 가뭄 내성 및 식물생장관련 유전체계 비교 분석

2.9. 근권 시료 라만 이미징 분석

2.9.1. 라만 이미징 기술 활용 가능성 평가

- 뿌리 혹 내부 미생물의 생태지위 및 생리적 활성 차이를 라만 이미징 기술로 규명 가능한지 여부를 판단하기 위해 실험을 진행함. 콩과 식물의 뿌리 혹을 40% 중수 용액이 포함된 배지에 배양한 후, Cryosection하여 뿌리 혹의 단면을 라만 이미징 기술로 조사함
- 약 400 um^{2}의 면적을 측정하였고 Raman intensity 기반으로 Phenylalanine peak (1003 cm^{-1}), CH peak (2900 cm^{-1}), CD peak (2040–2300 cm^{-1})를 각각의 이미지로 나타냄 (그림 19)
- 광학 이미지와 비교한 결과, Phenylalanine peak와 CH peak를 기반으로 한 라만 이미지는 유사하게 나타났으나 CD peak 이미지는 차이가 있는 것으로 보아 균주의 위치별 활성의 차이가 있음을 확인할 수 있음

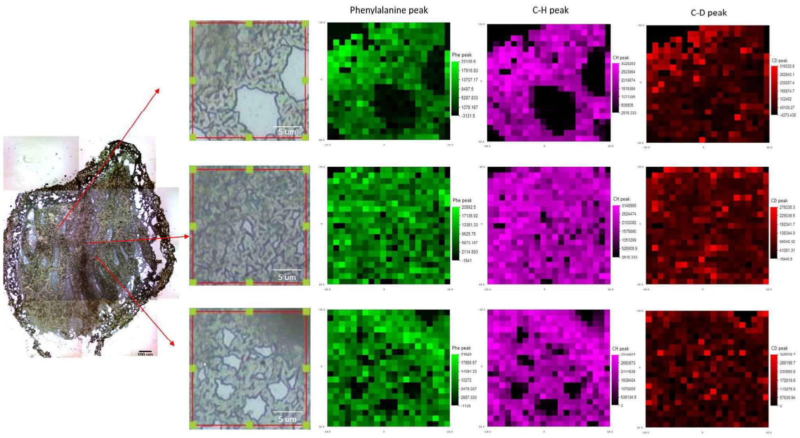


그림 19. 뿌리 혹 절편 광학 이미지(왼쪽) 및 라만 mapping 이미지(오른쪽)

2.10. 동위원소를 활용한 농경지 내 가뭄 내성 균주 선별 및 다양성 분석

2.10.1. 식물 내건성 향상 공생 균주 선별 실험을 위한 토양 선별

- 식물 대상 동위원소-라만분광법 검측 기술 활용 시 가뭄내성 공생균주의 검측 효율 향상시키기 위하여 가뭄내성 균주의 비율이 높은 토양을 동위원소-라만분광법으로 선별하고자 함
- 가뭄 이력이 있는 원주 지역 내 농경지 8 지역(4개 작물: 옥수수, 콩, 고추, 고구마)의 토양시료를 채취하여 Nycodenz 추출법으로 토양 균주를 탈착함. 탈착 된 균주를 가뭄 조건에서 배양하기 위해 Nutrient broth 배양액에 20%의 PEG를 주입하여 48 시간동안 25℃에서 배양함
- 라만 분광법으로 토양 배양액의 단일 세포를 조사하여 CD 비율(CD peak/CD+CH peak) 이 0.11 이상 (대표 가뭄내성 균주의 CD 비율 평균값)인 세포를 가뭄내성 균으로 판정하여 토양 미생물 내 가뭄내성 균주 비율을 산정함
- 시험 토양의 가뭄내성 균주 비율을 비교한 결과, 가뭄 내성 균주의 비율은 토양 특이적이었으며 옥수수1 (52%) > 콩2 (27.3%) > 콩1 (25%) > 고추1 (12.5%) > 옥수수2 (9.1%) > 고구마1 (0%) 순으로 가뭄 내성균주의 비율이 나타났음
- 가장 높은 가뭄 내성균주 비율을 보인 “옥수수1” 토양을 식물 내건성 향상 근권 균주 선별 실험에 사용함 (그림 20)

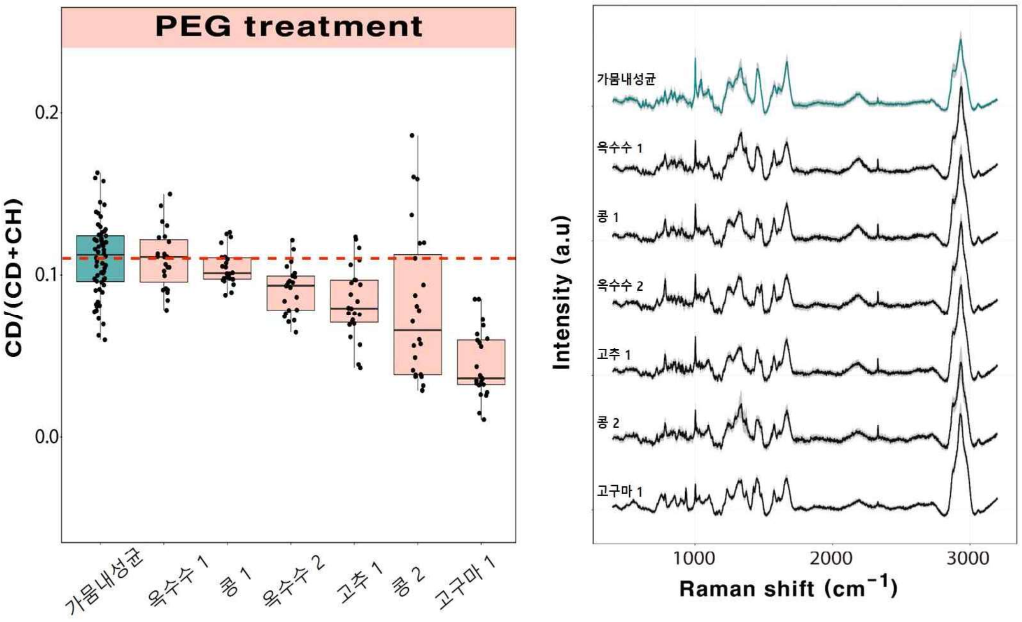


그림 20. 가뭄조건 내 토양 균주 Ramanome의 CD 비율 값(왼쪽) 및
토양 별 균주 Ramanome의 CD peak(오른쪽) 비교

2.10.2. 가뭄 내성 및 민감성 균주 다양성 분석

- 옥수수1 토양에서 획득한 Ramanome을 CD 비율이 0.11을 기준으로 내성 균주(CD 비율 > 0.11)와 민감 균주 (CD 비율 < 0.11)로 구분하여 각각의 다양성을 비교하기 위하여 다변량분석(PCoA 분석)을 수행함 (그림 21)
- 각 균주의 Ramanome의 표현형 이질성 (pheotypic heterogeneity) 분석한 결과, 가뭄 내성 균주들의 이질성이 유의하게 높은 것을 확인할 수 있었음. 예상과 달리 민감 균주의 다양성이 낮은 이유는 가뭄 스트레스에서 생장한 가뭄 민감 균주들의 상당수가 사멸하거나 세포 손상으로 Ramanome 분석이 어려워 측정 가능한 일부 균주들만 선택적으로 조사된 것으로 추정
- 실제로 라만 스펙트럼을 직접 비교하여도 가뭄 내성균주의 Ramanome의 변화의 폭이 더 컸으며,

특히 Amide III (1254 cm^{-1})와 Amide I (1650–1680 cm^{-1})의 차이가 큰 것을 확인함 (그림 21). 가뭄 내성 균주의 높은 다양성은 다양한 균주가 가뭄 내성을 가짐을 의미할뿐더러 스트레스에 대응하는 기작의 차이가 단백질과 지질 구성에 주요한 구성 성분인 Amide의 변화의 폭을 키웠을 가능성을 시사함

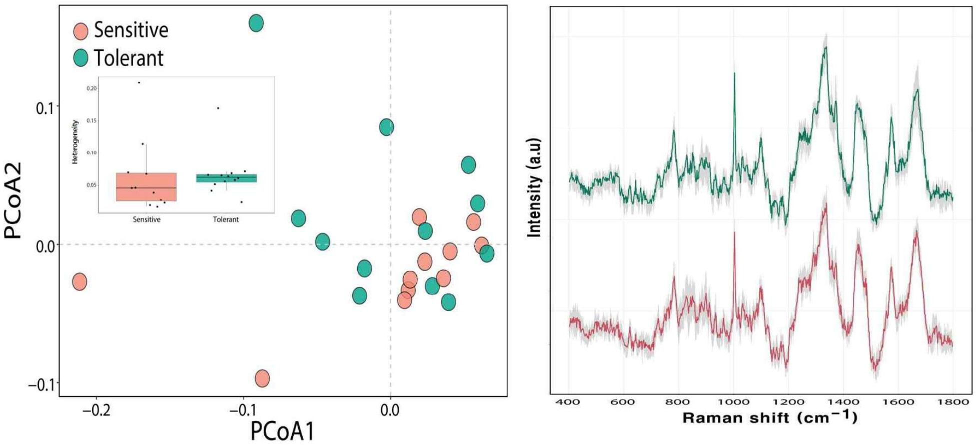


그림 21. 옥수수밭 균주 Ramanome의 PCoA 분석(왼쪽) 및 평균 라만스펙트럼(오른쪽)

- 토양 시료 간 가뭄 내성 균주의 다양성을 비교하기 하기 위하여 각 Ramanome으로부터 CD 비율이 0.11을 이상인 스펙트럼을 선별하여 다변량분석을 수행함 (그림 22)
- 3개의 토양 시료(콩2, 옥수수2, 고추1)에서 획득한 Ramanome이 매우 유사하고 다른 2개의 토양 시료(콩1, 옥수수1)이 다른 지역과 상이한 Ramanome을 가지고 있음을 확인. 가뭄 내성균의 다양성이 토양 의존적이기도 하지만 균주를 공유하고 있음을 시시함

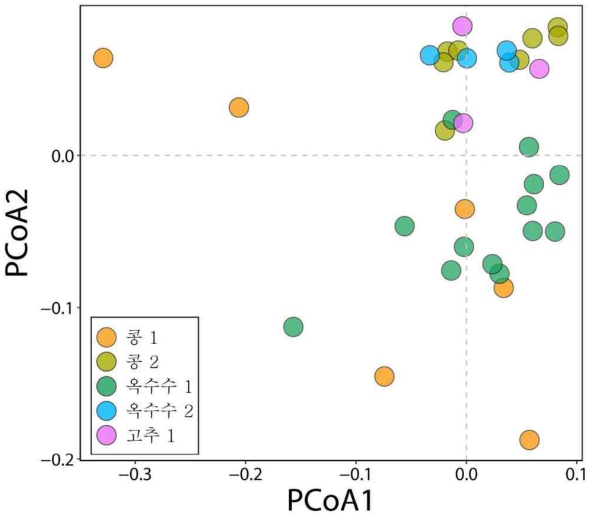


그림 22. 농경지 토양 내 가뭄 내성균주의 Ramanome PCoA 분석

2.11. 식물 대상 동위원소-라만분광법 검측 기술을 활용한 공생 균주 표지

2.11.1. 안정동위원소 가스 활용 가능 챔버 제작

- 식물에 $^{13}CO_2$ 주입이 가능하도록 유체 이동이 제한적인 18 L 용량의 아크릴 챔버(260*200*360 mm)를 제작함

2.11.2. 식물 공생 균주 $^{13}CO_2$ 표지 실험 최적화

- 식물생장상(day: 12 h, 25℃, 습도 60%, 17,000 Lux, night: 12 h, 15℃, 습도 60%, dark)에서 4주간 배양된 콩과작물을 아크릴 챔버에 넣고 $^{13}CO_2$ 주입량 및 주입 시간 등을 조절함 (그림 23)

그림 23. 안정동위원소 가스($^{13}CO_2$) 활용 식물 공생 균주 표지 실험

방법 1) 일반 공기의 $^{12}CO_2$ 농도보다 열 배 높은 농도를 주입하기 위해 $^{13}CO_2$ 가스 50 mL (3%의 CO_2) 주입 후 빛이 있는 조건에서 12 시간 처리 후 아크릴 챔버에서 꺼내 3 일 간 일반 배양

방법 2) $^{13}CO_2$ 가스 50 mL 주입 후 빛이 있는 조건에서 6 시간 처리 후 50 mL 가스를 재주입한 다음, 6 시간 처리 후 아크릴 챔버에서 꺼내 3 일 간 일반 배양

방법 3) 방법 2)와 동일하게 주입한 다음, 6 시간 처리 후 아크릴 챔버에서 꺼내 5 일 간 일반 배양

방법 4) 5 일 간, 빛이 있는 조건에서 6 시간 동안 1 시간 간격으로 $^{13}CO_2$ 가스 15 mL씩 주입 후 아크릴 챔버에서 꺼내 22 시간 동안 일반 배양

- $^{13}CO_2$ 가스를 주입하여 배양한 콩과 작물의 근권 토양 균주를 Nycodenz 추출법으로 탈착하여 30-40개의 단일 세포 Ramanome을 측정함. 측정 결과, 방법 1, 2, 3의 근권 토양 세균의 페닐알라닌 피크는 967 cm^{-1}로 변화된 스펙트럼이 약 1%미만이었으나 방법 4의 근권 토양 균주의 약 17%정도의 페닐알라닌 피크가 967 cm^{-1}에서 나타남에 따라 방법 4가 식물의 공생 균주을 ^{13}C로 표지하는 최적의 방법임을 확인함 (그림 24)

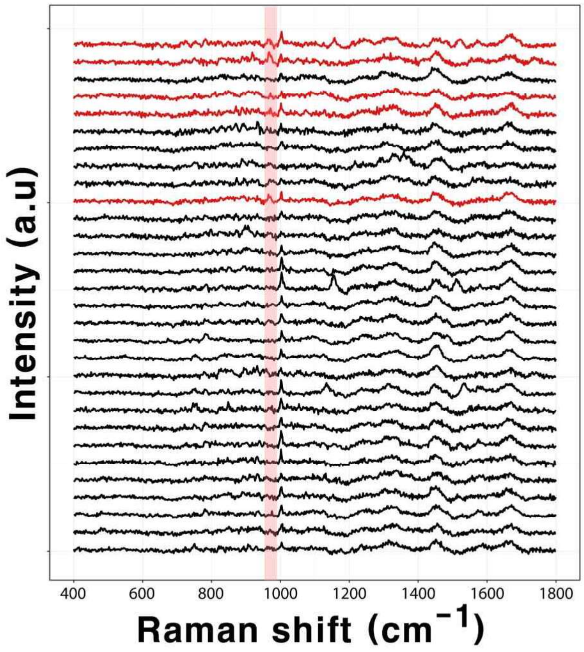


그림 24. 방법 4)로 표지한 균주의 라만스펙트럼 비교

2.11.3. 가뭄 조건에서 동위원소 활용 식물 내건성 향상 근권 균주 분리 및 배양

- 콩과 작물을 "옥수수1" 토양에서 4주 간 배양 후 4 일 동안 가뭄 조건을 유지한 후, 방법 4)로 안정 동위원소 표지함
- 총 9 일 간 가뭄 환경이 유지된 콩과 작물의 근권 토양을 탈착하여 근권 균주 세포를 라만 분광법으로 측정하여 페닐알라닌 피크가 변화된 균주(1003 cm^{-1}> 967 cm^{-1})를 Pulse laser로 PBS buffer가 담긴 Sorting Chip에 탈착함. 1/10 TSB를 Well plate에 주입하고 탈착한 균주를 옮겨 21일 동안 30℃에 배양함 (주기적으로 TSB를 주입하여 배양액 부피를 조절해줌) (그림 25) 탁토가 높아진 well의 배양은 1/10 TSB가 포함된 100 mL 플라스크에 계대 배양함
- 분리된 균주와 유사한 유전 체계를 가진 미생물의 분포와 유전 특성을 확인하기 위하여 동일한 토양 시료의 메타유전체 분석을 의뢰함

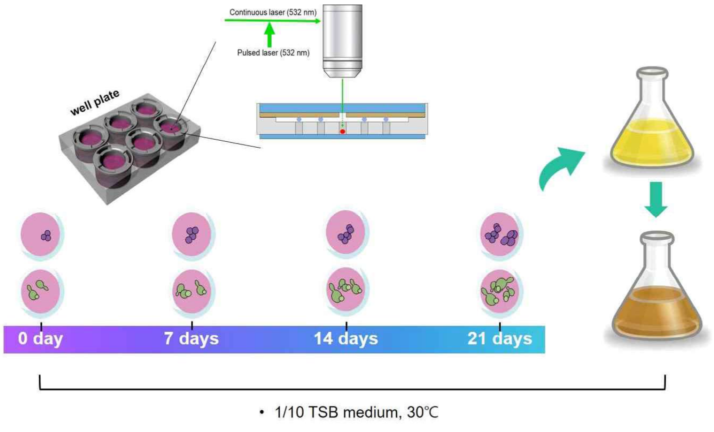


그림 25. 탈착 균주 배양 모식도

2.12. 가뭄조건에서 식물 내건성 향상 균주 분리 및 유전체 분석

2.12.1. 선별 균주의 유전체 및 식물 내건성 향상 대사 경로 분석: *Sphingobacterium* sp. *DR205*

- 선별 균주의 유전체 분석을 통해 *Sphingobacterium* sp. DR205 균주의 대사 경로를 파악함. *Sphingobacterium* sp. DR205 균주의 트립토판 및 트립토판 대사 유전자 클러스터가 IAA를 생산하는 유전자를 가지고 있음. 생산된 IAA는 가뭄 스트레스 내에서 식물의 에틸렌 수준을 조절하여 식물의 생장을 유지시켜주는 것으로 알려져 있음
- *Sphingobacterium* sp. DR205 균주는 식물의 에틸렌을 감소시키는 다양한 기작을 가짐. 티아민과 관련된 유전자를 가짐으로써 IAA 생산이 유도되며 요소 합성 관련 유전자를 통해 질소의 이용률을 증가시켜 에틸렌 감소가 가능함 (그림 26)

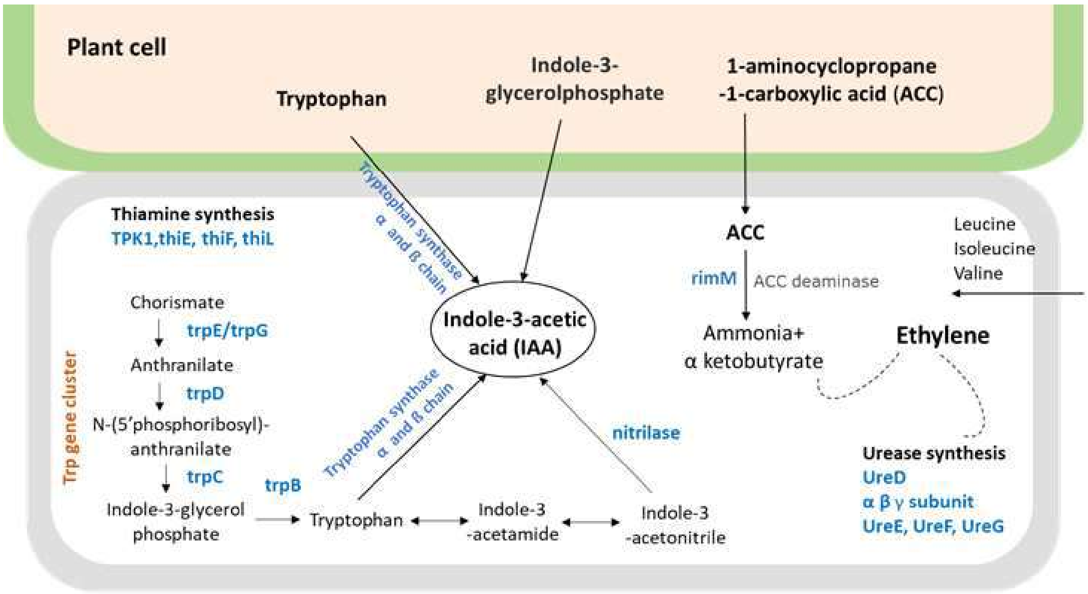


그림 26. *Sphingobacterium* sp. DR205균주의 식물 성장 관련 대사경로

2.12.2. RNASeq 활용 가뭄 및 공생조건에서의 유전체 발현 분석: *Sphingobacterium* sp. DR205

- 가뭄 및 식물 공생 조건에서 변화하는 유전체 발현 차이를 분석하기 위해 *Sphingobacterium* sp. DR205와 *P. fluorescens* DR397를 일반 배양액(M9 medium), 20% PEG를 함유한 배양액 (가뭄조건), 뿌리삼출액과 20% PEG (가뭄/공생조건)를 함유한 배양액에 각각 24시간 배양한 다음, 각각 RNA를 추출하여 유전자 발현량을 비교 분석함
- 가뭄/공생조건에서 배양된 균주의 유전자 중 식물의 에틸렌 감소 기작과 연관성이 높은 유전자의 변화량이 유의하게 나타났으며 그 중 트립토판 생합성(Tryptophan biosynthesis) 유전체계가 평균 2.5배 이상 발현함. *Sphingobacterium* sp. DR205가 가뭄 조건에서 식물과 공생할 때 식물 생육에 중요한 영향을 미친다는 것을 시사함 (그림 27)
- 식물과의 공생 여부와 관계없이 가뭄 조건에서 일반적인 Tryptophan 대사 과정에 필요한 유전체계의 발현량이 유의하게 증가되는 것으로 보아 식물과의 공생은 IAA와 Tryptophan의 생산 향상에 영향을 미치는 것으로 판단됨
- 이 외에도 가뭄 내 식물과 공생하는 조건에서 균주 내 삼투압을 조절하며 작물의 순 광합성 작용을 향상시켜 작물 수확량을 증가시키는 성분인 글리신 베타인, 프롤린 등과 연관된 유전체계가 각각 평균적으로 1.5, 1.8, 3.8 배 증가함을 확인함

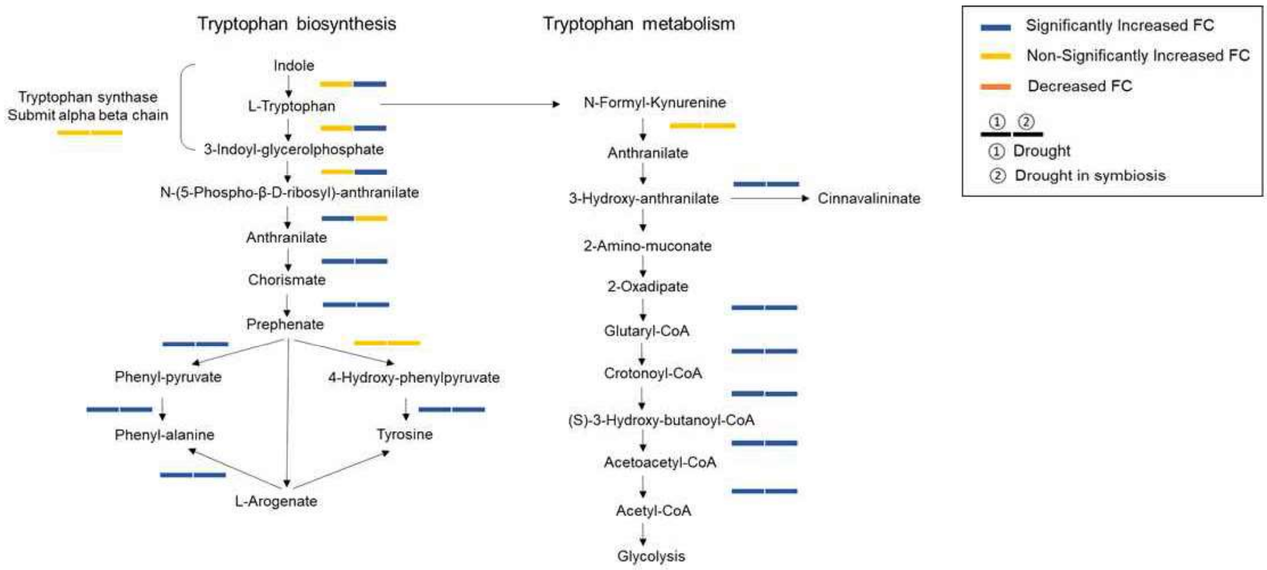


그림 27. *Sphingobacterium* sp. DR205 균주의 트립토판 생성 유전자 발현 경로

- 삼투 보호 물질인 콜린, 글리신 베타인, 트레할로스의 생합성 및 대사와 관련된 *Sphingobacterium* sp. DR205의 유전체계가 가뭄 내 식물 공생 조건에서 유전체 발현량이 대조군에 비해 최대 8배 가까이 증가함에 따라 *Sphingobacterium* sp. DR205가 가뭄 조건 내에서 식물의 생장에 도움을 줄 수 있음을 확인함 (그림 28)

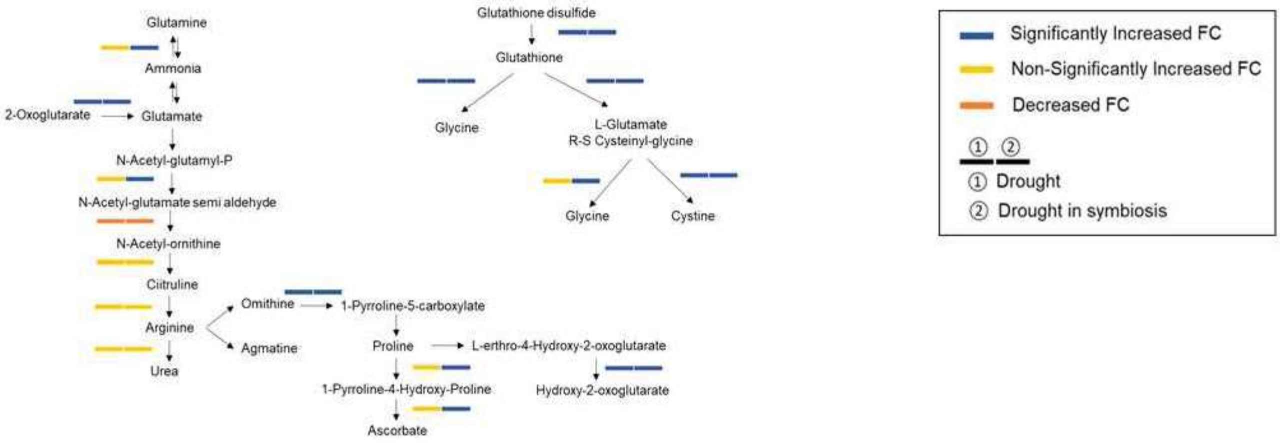


그림 28. *Sphingobacterium* sp. DR205 균주의 가뭄 내 공생조건에서의 대사경로

2.12.3. 선별 균주의 유전체 및 식물 내건성 향상 대사 경로 분석: *P. fluorescens* DR397

- 선별 균주의 유전체 분석을 통해 *P. fluorescens* DR397 균주의 대사 경로를 파악함. *P. fluorescens* DR397 균주 또한 콜린, 글리신 베타인, 트레할로스 등과 같은 삼투질을 생합성하는 유전체계를 가지고 있음 (그림 29)

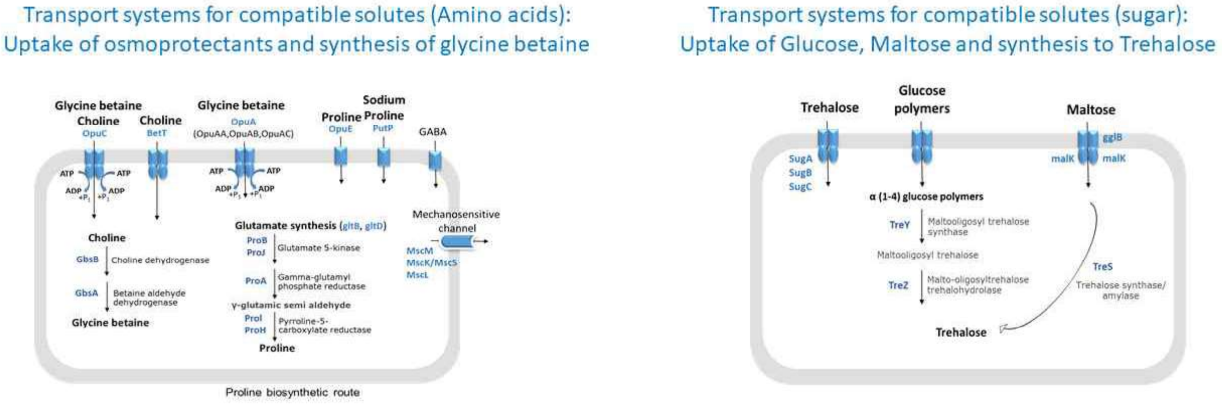


그림 29. *P. fluorescence* DR397 균주의 대사 경로 및 수송 시스템

2.12.4. RNASeq 활용 가뭄 및 공생조건에서의 유전체 발현 분석: *P. fluorescens* DR397

- 콜린, 글리신 베타인, 트레할로스 합성 대사경로에 관여하는 유전체계는 가뭄/공생 조건에서 발현량이 유의하게 증가하였지만 가뭄 조건에서는 증가하지 않음. 따라서 *P. fluorescens* DR397는 식물과 공생함으로써 식물의 가뭄 스트레스를 완화시키는 도움을 주는 것으로 판단됨 (그림 30)
- *P. fluorescens* DR397 또한 콜린, 글리신 베타인, 트레할로스의 생합성 및 대사와 관련된 유전체계가 가뭄 내 식물 공생 조건에서 유전체 발현량이 대조군 대비 최대 8배 가까이 증가함
- *P. fluorescens* DR397는 가뭄 내 식물 공생 조건에서 알지네이트 생합성과 chemotoxisis관련 유효 유전자가 최대 8배까지 증가함. 이러한 유전자들이 근권에서 식물의 성장 촉진 작용을 하는 것으로 판담됨 (그림 30)

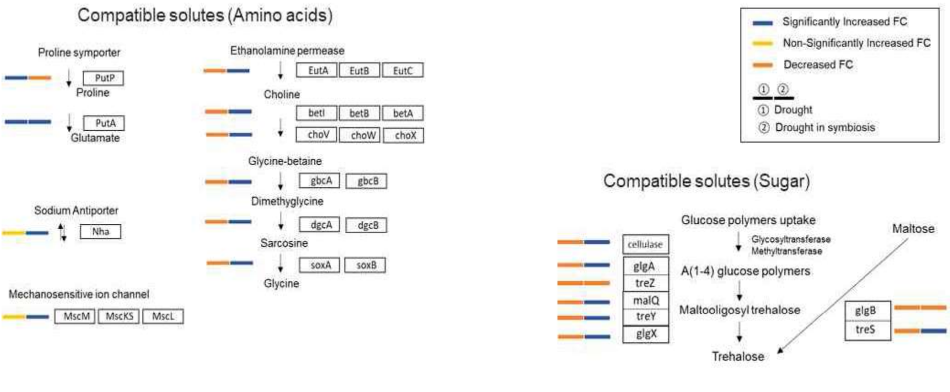


그림 30. *S. fluorescens* DR397 균주의 아미노산 관련 유전체계

- 유전체 및 RNASeq 유전자 발현 분석을 통해 *Sphingobacterium* sp. DR205와 *P. fluorescens* DR397이 가뭄 환경에서 식물의 가뭄 저항성을 증가시킬 가능성이 높아 가뭄 환경에서 식물 생장을 촉진하는 균주임을 증명함

2.13. 가뭄조건에서의 토양 메타지놈 분석 및 내건성 향상 유전체 비교

2.13.1. 가뭄조건 내 토양 메타지놈 분석

- 일주일 간 가뭄 환경(25℃, 습도 50%)을 조성한 토양 DNA를 추출하여 Shotguen metagenome sequencing을 진행함. BBTools를 활용하여 Quality control을 진행한 후, MEGAHIT로 Assembly 하고 IMG/M으로 Annotation함

2.13.2. 가뭄 내성 균주의 라만 특이성과 토양 기능성 유전자와의 상관관계 비교

- 이전 실험에서 Sorting한 가뭄 내성 균주의 내성 관련 기능성 물질(IAA, Cytokinin, Trehalose, Proline, Ethylene, Glycine betaine)을 선택하고 그와 관련된 유전자의 풍부도와 토양의 가뭄 내성 균주 비율의 상관관계를 비교함 (표 2, 그림 31)

표 2. 가뭄 내성 관련 기능성 물질

Type	Products	Enzyme and genes
Osmolytes	Glycinebetaine	Betaine aldehyde dehydrogenase (*betB*), Choline dehydrogenase (*betA*), Choline oxidase (*codA*)
	Trehalose	Trehalose synthase (*treS*), Trehalose 6-phosphate (T6P) synthase (*otsA*), T6P phosphatase (*otsB*), Trehalase (*treA*), Maltooligosyl-trehalose synthase (*treY*), Maltooligosyl-trehalose trehalohydrolase (*treZ*)
	Proline	pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*)
Phytohormeons	Indole-3-acetic acid	Anthranilate synthase (*trpE*), indole-3-glycerol phosphate synthase (*trpC*), Anthranilate phosphoribosyltransferase (*trpD*), Tryptophan synthase (*trpA, trpB*)
	Ethylene	1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase (*acdS*)
	Cytokinin	Isopentenyl diphosphate isomerase (*ipi*), Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (*idi*)

- Tryptophan synthase (rho = 0.900) 와 Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (rho = 0.900) 관련 유전자가 토양의 가뭄 내성 균주 비율과 유의하게 높은 양의 상관관계를 갖음을 확인함 (p-value < 0.05) (그림 31)

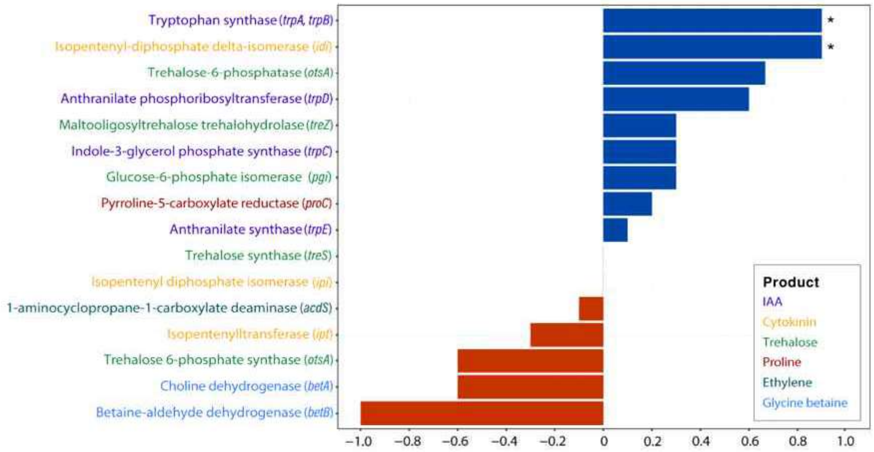


그림 31. 가뭄 내성 관련 유전자의 풍부도와 토양의 가뭄 내성 균주 비율의 상관관계

- Tryptophan synthase 관련 유전자를 갖는 미생물 Phyla 중 Alphaproteobacteria (rho = 0.900), Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase 관련 유전자를 갖는 미생물 Phyla 중 Gammaproteobacteria (rho = 0.975)가 토양 가뭄 내성 균주 비율과 유의하게 높은 양의 상관관계를 갖음을 확인함 (p-value < 0.05) (그림 32)

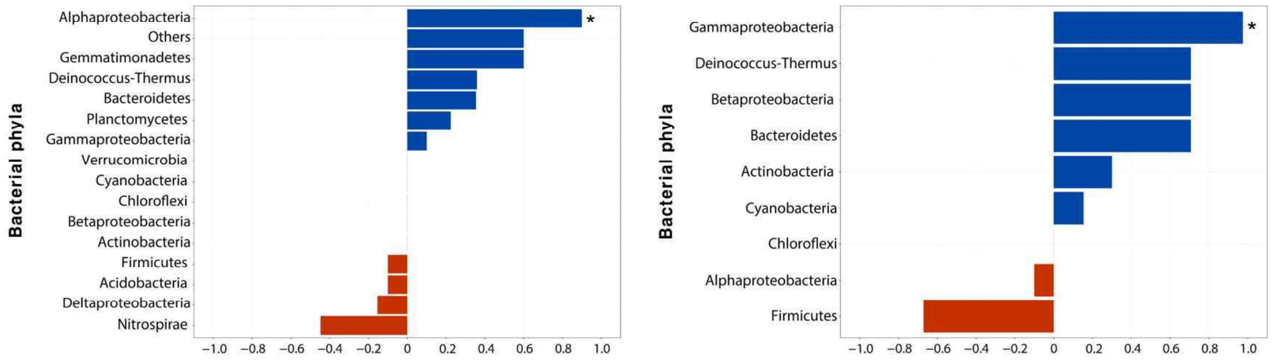


그림 32. Tryptophan synthase 관련 유전자(왼쪽) 및 Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase 관련 유전자(오른쪽)를 갖는 미생물 풍부도와 토양 가뭄 내성 균주 비율의 상관관계

2.14. 라만으로 기평가 된 가뭄 내성 및 민감성 토양 식물 재배 실험

2.14.1. 라만으로 기평가 된 가뭄 내성 및 민감성 토양활용 식물 재배 실험

- 토양의 가뭄 내성 균주의 비율이 높을수록 식물의 가뭄내성능을 향상시키는지 확인하기 위해 식물 교차이식실험을 진행함. 라만 평가 시 가뭄 내성 균주의 비율이 높은 토양을 가뭄 내성토양 (Type T), 비율이 낮은 토양을 민감성토양 (Type S)으로 각각 2종을 선택함

표 3. 토양 샘플 물리화학적 특성

Samples	Proportion of DTB (%)	Proportion of revived plants (%)	pH	Moisture (%)	Soil texture (%)			TN (mg/L)	TP (mg/L)	TOC (mg/L)	DOC (mg/L)
					Clay	Silt	Sand				
T1	52.2	40	6.5	16.4	10.7	5.7	83.6	3.6±0.1	9.7±0.4	43.8	30.6
T2	21.7	40	6.1	17.1	11.9	5.7	87.4	5.8±0.2	5.2±2.8	58.9	37.7
S1	12.5	0	6.7	22.5	9.8	2.4	87.8	10.1±0.0	12.2±0.2	74.6	48.2
S2	0	0	6.7	13.7	11.4	3.2	85.4	6.2±0.2	4.7±0.3	63.4	35.1

- 각 토양에 콩을 2주 간 재배하고 5일간 첫 번째 가뭄 환경을 조성함. 3일간 re-watering한 후, 재배된 콩의 뿌리 주변 토양과 미생물을 sonication (40 kHz, 5 min)하여 제거함. 콩을 가뭄 내성토양과 민감성 토양에 각각 교차로 옮겨 심음. 식물의 적응을 위해 4일간 정상 재배 한 다음, 5일간 두 번째 가뭄 환경을 조성하고 3일간 re-watering을 진행함. 각 시점마다 콩의 뿌리와 줄기 길이를 측정함 (그림 33)

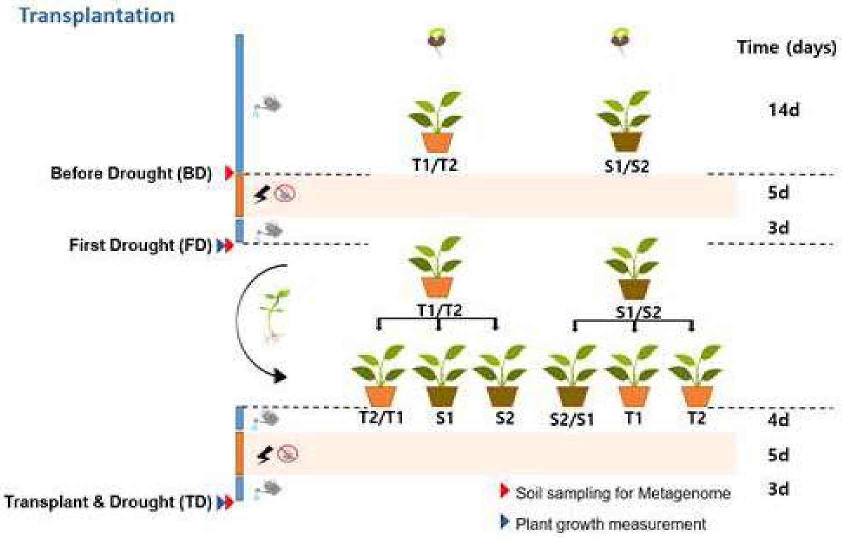


그림 33. 식물교차이식 실험 모식도

- 샘플 T1-S1: T1 토양에서 배양된 콩이 S1 토양으로 이식된 샘플을 의미함
- 콩을 교차 이식한 후 가뭄 조건을 부여했을 때, 가뭄 내성 토양으로 옮겨 심어진 콩이 민감성 토양으로 옮겨 심어진 콩보다 초록색 잎(노란색 원형 표시)을 더 많이 보유하고 있음 (그림 34)

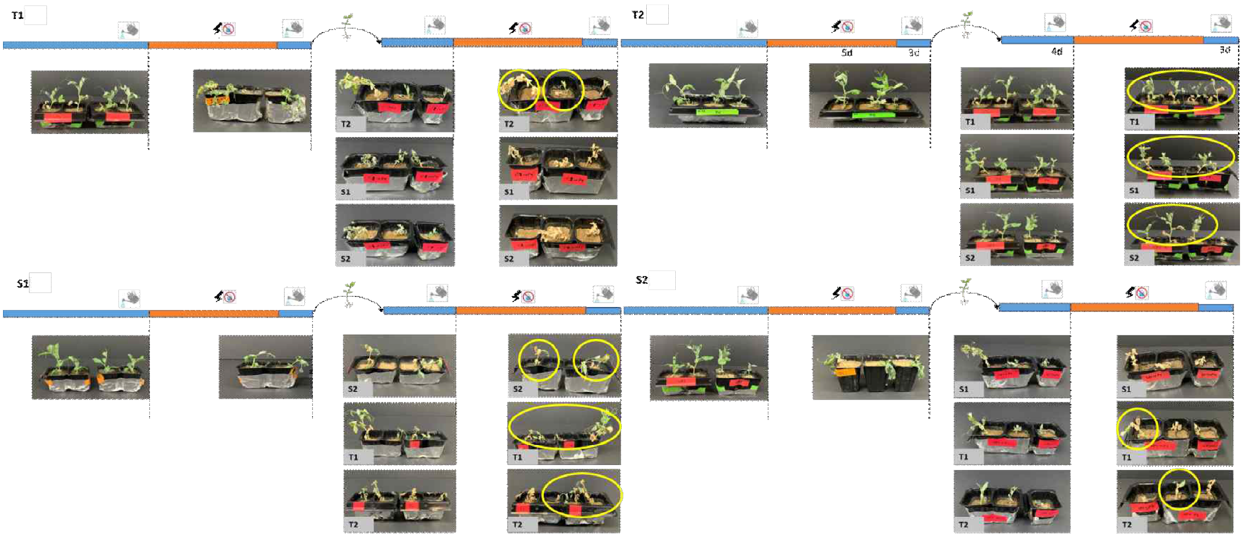


그림 34. 가뭄 및 교차이식의 식물에 대한 영향

- 콩의 뿌리 길이와 줄기 길이를 측정한 결과, 가뭄 내성 토양으로 옮겨진 콩의 뿌리 길이(평균:10.1 ± 2.3 cm)가 민감성 토양의 콩 뿌리 길이(평균: 5.9 ± 1.9 cm) 보다 더 유의하게 긴 것을 확인함 (p-value < 0.05). 가뭄 내성 토양으로 옮겨진 콩의 줄기 길이(평균: 8.4 ± 2.9 cm)도 민감성 토양으로 옮겨진 줄기 길이(평균: 6.2 ± 2.7 cm)보다 길었음. 가뭄 내성 균주를 많이 포함한 토양이 식물의 가뭄내성능을 향상시키는 것으로 보임 (그림 35)

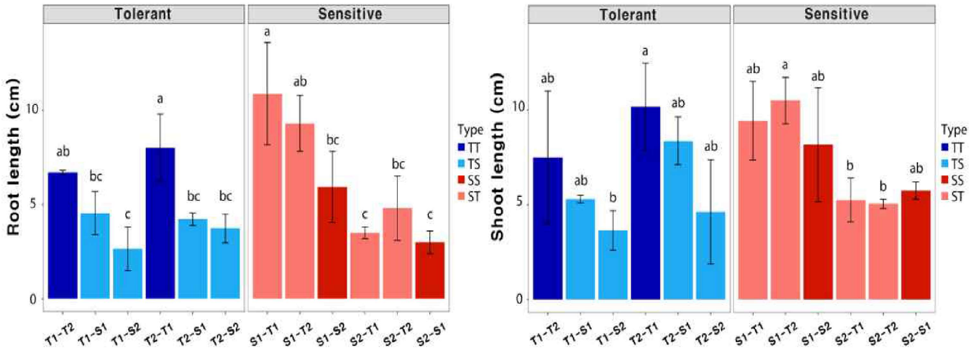


그림 35. 교차이식 후 가뭄 조건(TD)에서의 콩의 뿌리(왼쪽) 및 줄기(오른쪽) 길이

2.15. 식물 재배 실험 시 토양 메타지놈 분석

2.15.1. 16S rRNA amplicon sequencing을 통한 미생물 군집 비교

- 콩 재배 동안 각 시점의 근권 토양을 채취하여 DNA 추출(총 약 60개) 후 16S rRNA amplicon sequencing 분석함
- 16S RNA amplicon sequencing을 진행하여 토양 내 미생물 군집 다양성 변화를 비교함. 첫 번째 가뭄 조건(FD) 이후, 전체 샘플의 Shannon index가 평균 5.9 ± 0.2 에서 5.5 ± 0.4로 유의하게 감소함 (p-value < 0.05). 즉, 가뭄 조건으로 인해 모든 토양의 미생물 다양성이 감소한 것으로 보임 (그림 36)
- 식물이 교차이식 된 후 가뭄 조건이 부여된 샘플(TD)의 경우, 같은 타입의 토양으로 콩이 이식된 샘플이(T1-T2, T2-T1 S1-S2, S2-S1/ Shannon index 평균: 5.8 ± 0.2) 다른 타입의 토양으로 이식된 샘플보다(T1-S1, T1-S2, T2-S1, T2-S2, S1-T1, S1-T2, S2-T1, S2-T2/ Shannon index 평균: 6.0 ± 0.2) Shannon index가 유의하게 낮았음 (p-value < 0.05) (그림 36)

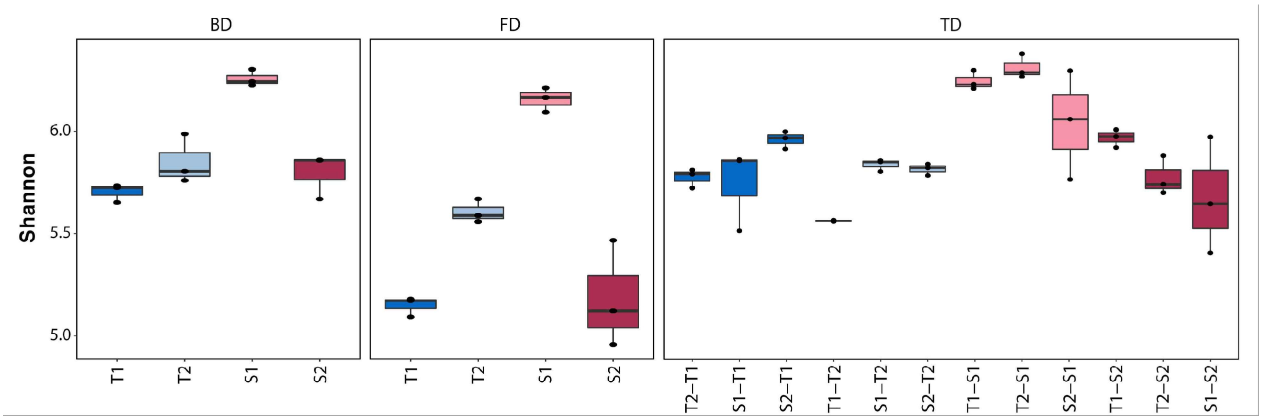


그림 36. 세 가지 다른 조건에서 토양 내 미생물 군집의 Shannon 다양성 비교

- 각 샘플의 미생물 군집을 phylum 수준으로 비교 한 결과, 가뭄 전(BD)과 첫 번째 가뭄 조건(FD)에서 Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria가 우점함. 기존에 알려진 바와 같이, Actinobacteria의 상대적 풍부도는 가뭄 스트레스 후 모든 토양에서 증가함 (그림 37)

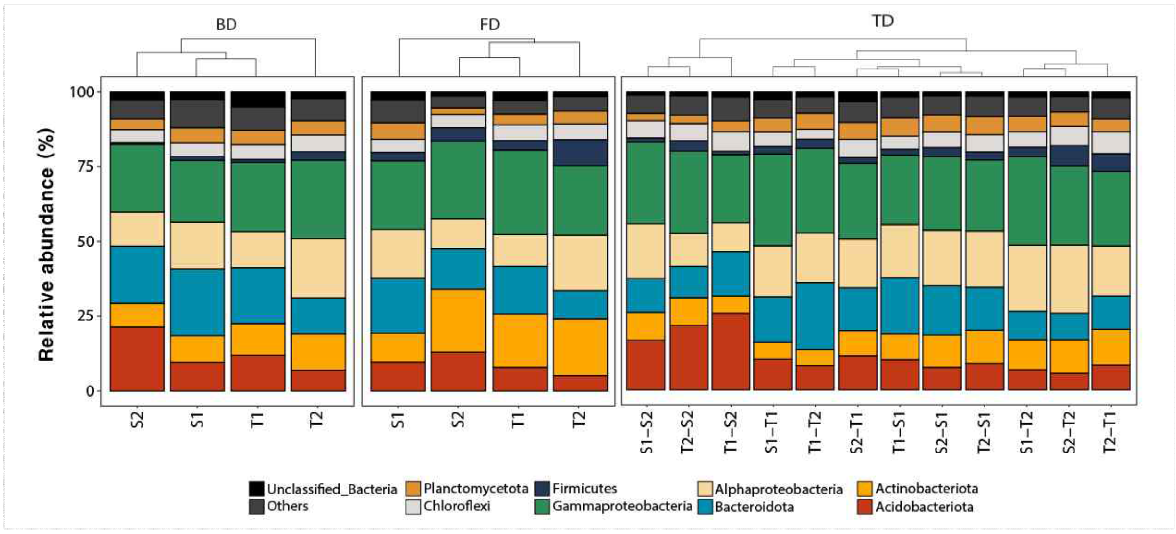


그림 37. 각 샘플 별 Phylum 수준의 미생물 군집 구성 비교

- OTU 수준으로 다변량 분석을 진행함. 가뭄 내성 균주의 비율이 높은 T 토양은 가뭄 전과 후가 거의 차이가 없었음. 그에 비해 가뭄 내성 균주의 비율이 낮은 S 토양은 가뭄 전(BD)과 후(FD)가 조금 멀어진 것으로 보임. OTU 수준의 미생물 군집 구성은 S 토양에서 더 많이 변화함. 이는 동일한 가뭄 스트레스에도 S 토양이 가뭄에 대한 영향을 더 많이 받은 것으로 보임 (그림 38)
- 이식 된 토양에 따라 미생물 군집이 구분되는 것으로 보아 식물의 교차이식이 이전 토양의 간섭 없이 이루어진 것을 확인할 수 있음 (그림 38)

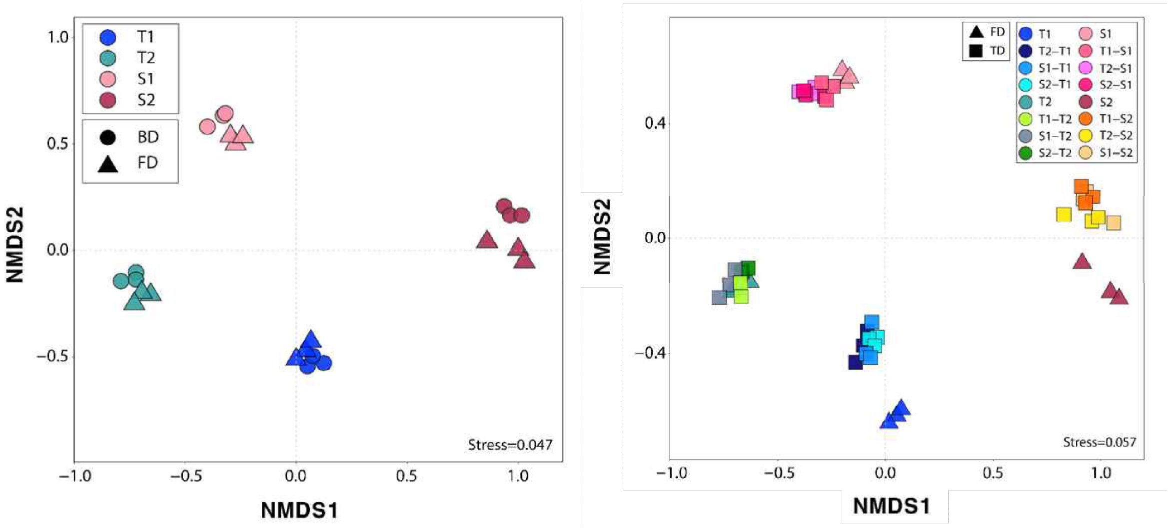


그림 38. 가뭄 조건(왼쪽) 및 교차이식(오른쪽)에 따른 OTU 수준의 미생물 군집 비교

2.15.2. Indicator species analysis를 통한 토양 내 가뭄내성 핵심 균주 확인

- T 토양과 S 토양을 통계적으로 구분 지을 수 있는 핵심 균주를 선별하기 위해 Indicator species analysis를 진행함. 샘플 내 각각의 균주 비율과 전체 샘플 중 균주를 포함하는 샘플의 비율을 계산하여 그 차이가 p-value 0.05이하인 균주를 선별함. Indicator value가 0.9 이상인 균주 중 order 수준으로 1%이상의 풍부도를 갖는 균주의 상대 풍부도를 박스 플랏으로 나타냄 (그림 39)
- 선택 된 6 종의 order의 상대 풍부도가 모두 T 토양에서 높게 나타남. 그 중 Burkholderiales, Thermomicrobiales, Acidobacteriales, Bacillales 모두 통계적으로 유의하게 높음 (p-value < 0.05). 기존의 논문을 통해 가뭄 환경에서 Burkholderiales와 Bacillales의 OTU 비율이 증가한다고 알려져 있으며, 특히 Burkholderiales는 가뭄 환경에서 식물의 가뭄 내성을 증가시킨다고 알려져 있음

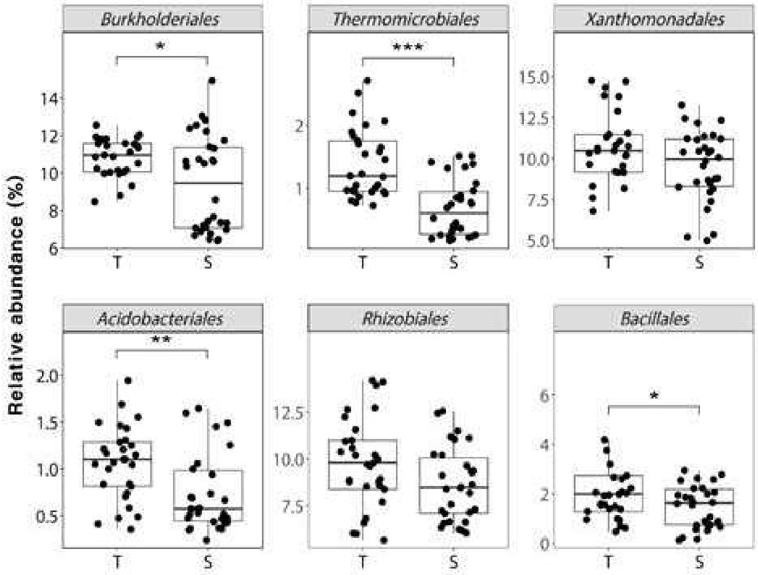


그림 39. Indicator species analysis로 선택된 균주의 상대 풍부도 비교
(*: p < 0.05, **: p < 0.005, ***: p < 0.0005)

2.15.3. Shotgun sequencing을 통한 기능성 유전자 구성 비교

- 샘플 별 기능성 유전자의 차이를 확인하기 위해 콩 재배 동안 각 시점의 근권 토양을 채취하여 DNA 추출(총 약 60개) 후 Shotgun sequencing 분석함
- 기존에 선별한 가뭄내성관련 유전자의 전체 샘플에 대한 상대 풍부도를 히트맵으로 표현함. The Choline dehydrogenase (*betA*) (0.05–0.07%), Tryptophan synthase (*trpA, trpB*) (0.04–0.05%), Anthranilate synthase (*trpE*) (0.03–0.04%)의 상대 풍부도가 모든 샘플에서 높게 나타남 (그림 40)

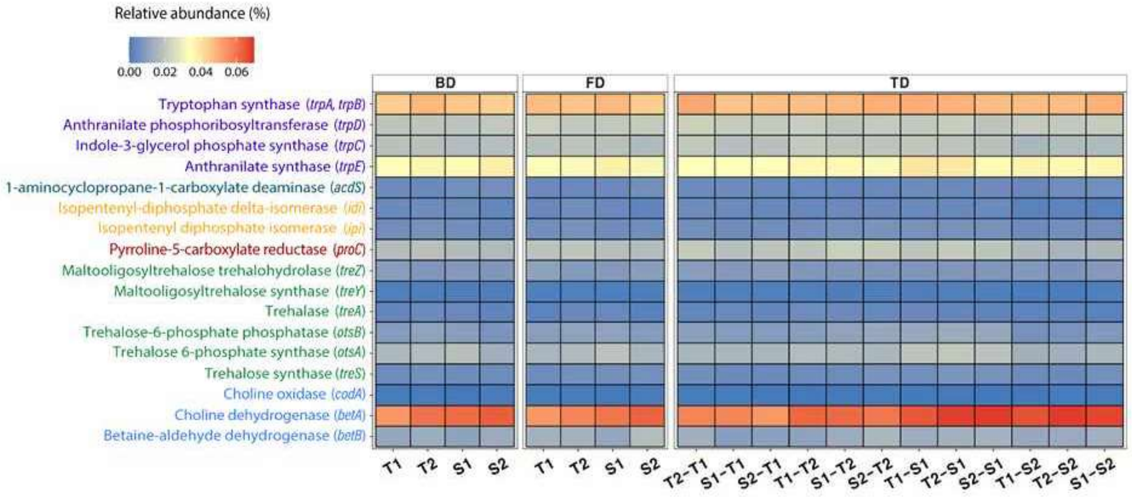


그림 40. 가뭄 내성 관련 기능성 유전자의 샘플 별 상대 풍부도 비교

- 토양의 가뭄내성균주 비율과 유의한 양의 상관관계를 갖는 가뭄 내성 관련 유전자를 확인하기 위해, 각 유전자의 상대 풍부도와 가뭄내성균주의 비율과의 상관관계를 계산함. The Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (*idi*) (rho = 0.631), Maltooligosyltrehalose synthase (*treY*) (rho = 0.546), Indole-3-glycerol phosphate synthase (*trpC*) (rho = 0.521), Pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*) (rho = 0.509) 가 유의하게 높은 양의 상관관계를 나타 냄. (그림 41) 이러한 유전자는 실제로 식물의 가뭄 내성 능력을 돕는 미생물에 의해 합성되는 IAA, trehalose 및 cytokinin의 생산 경로에 필요하다고 알려져 있음

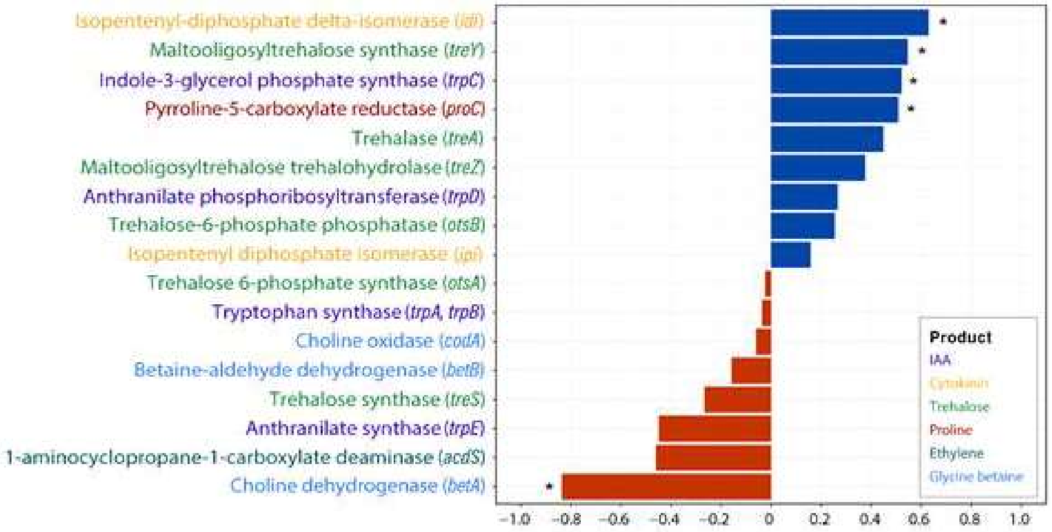


그림 41. 가뭄 조건(FD) 및 교차이식 후 가뭄 조건(TD)에서의
가뭄 내성관련 유전자의 상대 풍부도와 가뭄 내성 균주의 비율간의 상관관계 비교

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

3.1. 연구수행 결과

3.1.1. 정성적 연구개발성과

- 라만분광법 기술을 토대로 가뭄조건에서 식물-미생물 공생 및 식물 내건성 향상 미생물 Single cell 수준으로 분리를 성공함
- 분리된 Single cell 유전체를 비교분석하여 식물 내건성 향상 미생물의 신규 메커니즘을 규명함

3.1.2. 정량적 연구개발성과

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		10			5		5			
1차 년도	목표									
	실적									
2차 년도	목표									
	실적									
3차 년도	목표	5			3					
	실적	8			2					
4차 년도	목표	5			2		5			
	실적	2			3		5			
계	목표	10			5		5			
	실적	10			5		5			

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용홍보		기타(타연구활용등)
												논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	15	15												50	20					
최종목표	2	2										6		3.8	7					
1차년도 목표															1					
1차년도 실적															3					
2차년도 목표	1											1		3	2					
2차년도 실적	1											1		5.64	3					
3차년도 목표	1	1										2		3	2					
3차년도 실적	1	0										1		6.064	2					
4차년도 목표		1										2		5	2					
4차년도 실적		2										3		3.797	3					
소계 목표	2	2										5		3.8	7					
소계 실적	2	2										5		4.619	11					
종료 1차년도												1		6.496			3			
종료 2차년도																				
종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계												1		6.496			3			
합 계	2	2										6		4.932	11		3			

3.1.3. 세부 정량적 연구개발성과

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	*Glutamicibacter halophytocola* DR408	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.07.14	igem-0001503	0.0012
2	*Pseudomonas fluorescens* DR397	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.07.14	igem-0001504	0.0020
3	*Sphingobacterium* sp. DR205	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.07.14	igem-0001505	0.0023
4	*Pseudomonas fluorescens* DR133	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.10.08	igem-0001508	0.0070
5	*Arthrobacter* sp. DR48	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.10.08	igem-0001509	0.0074
6	*Pseudomonas extremorientalis* DR208	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.10.08	igem-0001510	0.0064
7	*Paenibacillus* sp. DR312	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.10.08	igem-0001511	0.0023
8	*Stenotrophomonas* sp. DR822	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2020.10.08	igem-0001512	0.0013
9	Enterobacter ludwigii PP03	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2021.06.23	igem-0002148	0.0049
10	Enterobacter ludwigii NO06	가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인	2021.06.23	igem-0002147	0.0053

전략미생물 해독 증빙: *Sphingobacterium* sp. DR205

2020. 7. 14.　　IGEM생명정보등록확인서

iGEM 생명정보 등록확인서

사업명	기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발		NTIS고유번호	1545017457	
바이오프로젝트	과제명	기능성 단일세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발			
	책임자명	이태권	부처과제번호	918014-04-1-SB010	
	소속기관	연세대학교	부서명	연세대학교 보건과학대학 환경공학부	직위: 조교수
	총 연구기간	2018-04-25 ~ 2021-12-31	과제유형	단위/1세부	
실험	실험명	토양에서 분리한 식물체 가뭄 내성 유도 균주 유전체 분석 (Sphingobacterium sp. DR205)			
	실험설명	토양에서 분리한 균주의 가뭄내성능 및 식물생장촉진능 보유 여부 확인			
	성과지표	전략미생물해독	등록번호	igem-0001505	
	Platform	Unspecified	컨소시엄	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단	
	생물정보 (형태>대분류>소분류)		Nucleotide> Nucleotide> DNA		
	공개일	2020-12-01	NABIC 번호		
샘플	샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.				

「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인합니다.

등록확인 : 2020년 07월 14일

농림축산식품
미생물유전체전략연구사업단장

☐ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

☐ 표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

☐ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Drought tolerant soil_C1	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2020.11.11	igem-0002124	15
2	Drought sensitive soil_SP1	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2020.11.11	igem-0002127	14
3	Drought tolerant soil_B1	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2021.04.19	igem-0002136	14
4	Drought tolerant soil_P2	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2021.04.19	igem-0002137	13
5	Drought sensitive soil_P4	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2021.04.19	igem-0002138	15

메타유전체 분석 증빙: Drought tolerant soil_C1

2020. 11. 11. IGEM생명정보등록확인서

iGEM 생명정보 등록확인서

사업명	기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발			NTIS고유번호	1545020927	
바이오프로젝트	과제명	기능성 단일세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발				
	책임자명	이태권		부처과제번호	918014-04-3-SB010	
	소속기관	연세대학교 미래캠퍼스	부서명	연세대학교 보건과학대학 환경공학부	직위	조교수
	총 연구기간	2018-04-25 ~ 2021-12-31		과제유형	단위/1세부	
실험	실험명	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석 (Drought tolerant soil_C1)				
	실험설명					
	성과지표	메타유전체분석	등록번호	igem-0002124		
	Platform	Illumina HiSeq X Ten	컨소시엄	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단		
	생물정보 (형태>대분류>소분류)			NGS_SRA> Metagenome> Gene		
	공개일	2021-12-31	NABIC 번호			
샘플	샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.					

「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인합니다.

등록확인 : 2020년 11월 11일

농림축산식품

미생물유전체전략연구사업단장

☐ 유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)

☐ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Drought tolerant soil_C1	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2020.11.11	igem-0002124	15
2	Drought sensitive soil_SP1	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2020.11.11	igem-0002127	14
3	Drought tolerant soil_B1	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2021.04.19	igem-0002136	14
4	Drought tolerant soil_P2	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2021.04.19	igem-0002137	13
5	Drought sensitive soil_P4	가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석	2021.04.19	igem-0002138	15

NABIC 등록 증빙: Drought tolerant soil_C1

2020. 11. 11. IGEM생명정보등록확인서

iGEM 생명정보 등록확인서

<table>
<tr><td>사업명</td><td colspan="4">기능성 단일 세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발</td><td>NTIS고유번호</td><td>1545020927</td></tr>
<tr><td rowspan="4">바이오프로젝트</td><td>과제명</td><td colspan="5">기능성 단일세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발</td></tr>
<tr><td>책임자명</td><td colspan="2">이태권</td><td>부처과제번호</td><td colspan="2">918014-04-3-SB010</td></tr>
<tr><td>소속기관</td><td>연세대학교 미래캠퍼스</td><td>부서명</td><td>연세대학교 보건과학대학 환경공학부</td><td>직위</td><td>조교수</td></tr>
<tr><td>총 연구기간</td><td colspan="2">2018-04-25 ~ 2021-12-31</td><td>과제유형</td><td colspan="2">단위/1세부</td></tr>
<tr><td rowspan="6">실험</td><td>실험명</td><td colspan="5">가뭄 환경 내 농경지 토양의 메타유전체 분석 (Drought tolerant soil_C1)</td></tr>
<tr><td>실험설명</td><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td>성과지표</td><td>메타유전체분석</td><td>등록번호</td><td colspan="3">igem-0002124</td></tr>
<tr><td>Platform</td><td>Illumina HiSeq X Ten</td><td>컨소시엄</td><td colspan="3">농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단</td></tr>
<tr><td colspan="3">생물정보 (형태>대분류>소분류)</td><td colspan="3">NGS_SRA> Metagenome> Gene</td></tr>
<tr><td>공개일</td><td>2021-12-31</td><td>NABIC 번호</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>샘플</td><td colspan="6">샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.</td></tr>
</table>

「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인합니다.

등록확인 : 2020년 11월 11일

농림축산식품

미생물유전체전략연구사업단장

□ 병원성미생물진단마커 개발

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 병원성미생물 정보 완성

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 미생물 병발생 기작 규명

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Characterization of a nifH-Harboring Bacterial Community in the Soil-Limited Gotjawal Forest	Frontiers in microbiology	이태권. 설우준	10	스위스	FRONTIERS	SCIE	2019.08.13	1664-302X	50
2	The effect of engineered PLGA nanoparticles on nitrifying bacteria in the soil environment	Journal of industrial and engineering chemistry	Susmita Das Nishu, 이태권	84	대한민국	ELSEVIER	SCIE	2020.04.25	1226-086x	33
3	Short-Term Legacy Effects of Mercury Contamination on Plant Growth and nifH-Harboring Microbial Community in Rice Paddy Soil	Microbial ecology	현혜림, 이태권	82	미국	SPRINGER	SCIE	2021.02.23	0095-3628	50
4	Microbial phenomics linking the phenotype to function: The potential of Raman spectroscopy	Journal of microbiology	홍진경, 김수빈, 류은선, 이태권	59	대한민국	MICROBIOLOGICAL SOCIETY KOREA	SCIE	2021.01.26	1225-8873	33
5	Flow cytometric monitoring of the bacterial phenotypic diversity in aquatic ecosystems	Journal of microbiology	홍진경, 이태권	59	대한민국	MICROBIOLOGICAL SOCIETY KOREA	SCIE	2021.09.23	1225-8873	33
6	Raman-Deuterium Isotope Probing and Metagenomics Reveal the Drought Tolerance of the Soil Microbiome and Its Promotion of Plant Growth	mSystems	노지현, 이태권	7	미국	AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY	SCIE	2022.02.01	2379-5077	50

논문 증빙: The effect of engineered PLGA nanoparticles on nitrifying bacteria in the soil environment

Journal of Industrial and Engineering Chemistry 84 (2020) 297–304

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Industrial and Engineering Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jiec

The effect of engineered PLGA nanoparticles on nitrifying bacteria in the soil environment

Susmita Das Nishu[a], Seungbin Park[b], Yuhyun Ji[b], Il Han[a], Jaehong Key[b,*], Tae Kwon Lee[a,*]

[a] Department of Environmental Engineering, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea
[b] Department of Biomedical Engineering, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 January 2019
Received in revised form 26 July 2019
Accepted 11 January 2020
Available online 20 January 2020

Keywords:
PLGA
Nanoparticles
Nitrification
Microbial community
Soil
Resilience

ABSTRACT

As a result of their biodegradability and biocompatibility, various nanoparticles using poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as a copolymer have shown promising results in biomedical engineering fields, including molecular imaging and drug delivery. However, the potential nanotoxicity of PLGA-based nanoparticles in the environment was poorly understood. Measurement of bacterial nitrification activities and changes in the soil microbial community are both critical parameters that should be used to evaluate potential distrurbances in the functioning of the environmental ecosystem. This study aimed to investigate the impact of PLGA nanoparticles with different zeta-potentials on nitrifying bacterial communities in the soil environment. In pure culture studies, the ammonia oxidation was inhibited by higher than 50% when PLGA cocentration is more than 0.05 mg/L or more regardless of zeta potential and exposure time, but the negligible effects were observed on the nitrite oxidation by most conditions. In the soil microcosm experiment, at the 0.05 concentration of the oparticles, the ammonia and nitrite oxidation were inhibited by more than 50% on the first day regardless of the nanoparticle composition, but all the activity was recovered after 14 days. These results provide a fundamental information on the toxcity of PLGA nanparticles on ecologcial function.

© 2020 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Various studies have used engineered nanoparticles (ENPs) to control physicochemical properties at the nano scale in the production of commercial and industrial products [1]. The widespread application of ENPs increases the possibility of their discharge into the environment through excretion, mechanical processes (abrasion, scratching, and sanding), washing, diffusion, matrix degradation (photo, thermal, and hydrolytic), and incineration [2–4]. ENPs with high surface/volume ratios and reactive properties are considered to be a potential risk to human health and to environmental stability [5]. In most cases, nanotoxicity has been studied with metal-based ENPs that are designed to be highly reactive and can enhance the generation of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress, which may cause bacterial cell damage. Metal-based ENPs, such as silver oxides, zinc oxide, titanium dioxide, iron oxide, and cerium oxide, have been reported to have long-term antibacterial effects influencing bacterial diversity and structure in the environment [6–8]. The toxicological effects following exposure of bacterial cells to ENPs depend on the physiochemical properties of the ENPs including their size, structure, charge, and chemical composition [9,10]. While numerous non-metal based ENPs have been used in a variety of fields, our understanding of the effect of non-metal ENPs on the environment remains inadequate.

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is widely used in a range of biomedical engineering fields because of its biocompatible and biodegradable features that can be used in drug delivery systems including nano-vaccines, protein- or peptide-based nano-medicines, and nano-antigens [11]. Both the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) have approved PLGA for clinical use in humans [12]. PLGA is required to synthesize with hydrophilic polymers such as poly (ethylene glycol) (PEG) and polyethyleneimine to improve their stability in aqueous solution [12]. PEG is known to increase drug stability and prolong circulation time [13]. Polyethyleneimine [14] is commonly used to make highly positively charged PLGA copolymers which can increase intracellular localization compared

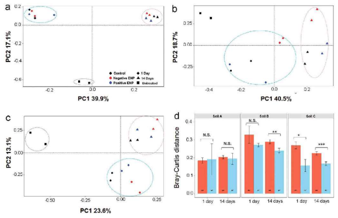


Fig. 6. PCA analysis to illustrate the structural shift in soil microbial communities exposed to PLGA ENPs in (a) Soil A, (b) Soil B, and (c) Soil C after 14 days of exposure; (d) Bray–Curtis distance illustrating the dissimilarity among all the treatments in each soil. Asterisks indicate significant differences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

microbial community shift in all soil samples in this study as it was shown that the community shift was also found in the control. This time-based community shift was also observed when carbonaceous ENPs (e.g., fullerenes, carbon nanotubes, and graphene) were used to treat environmental samples [42,45,46]. The soil bacterial community is transiently affected by the presence of carbon-based nanoparticles for 3 days, but the community completely recovered after 14 days [42]. However, even very low concentration of the silver nanoparticles could cause long-term disadvantages for the nitrification and bacterial community by exerting harmful effects [43]. These results indicate that polymeric or carbonaceous nanomaterials are not strong factors in influencing the microbial community in the environment, unlike the metal-based nanomaterials which can alter the community instantly by producing ROS. The buffer used in this study could be the other reason for the considerable changes in the microbial community since all the populations differed significantly from the untreated soil samples (original soil samples) within 1 day. It is noteworthy that the shifted microbial community could fully oxidize ammonia to nitrate after 14 days, indicating the resilience of microbial ecosystem functions to disturbances in the soil environment. In other words, the soil environments (e.g., non-nitrifying bacteria, pH, organic matter, etc.) might reduce the inhibitory effects of PLGA ENPs. A few studies have reported that some carbonaceous nanoparticles are degraded by exogenous or endogenous enzymes from the soil bacteria [47,48]. Also, the aggregation and soil adsorption of ENPs, controlled by the ionic strength and organic matter in the soil, eventually reduces the toxic effects of PLGA ENPs [49]. The changes in the fluorescence intensity of rhodamine B over time shown in Fig. 4 also indicate that PLGA nanoparticles might be degraded by exogenous or endogenous enzymes from bacteria.

Despite the importance of the exposure time, to investigate the effects of the zeta potential of the PLGA ENPs on the microbial community composition, we calculated the dissimilarity of the soil samples at the same exposure time. The Bray–Curtis dissimilarity (Fig. 6d) revealed that both the positively and negatively charged ENPs had a similar influence on the shift in the community structure of soil A; however, the negatively charged ENPs showed a relatively higher influence in soils B and C after 14 days. These results suggest that the effect of zeta potential on the microbial community shifts could vary depending on the soil properties [46]. The persistence of carbon-based ENPs may reduce or increase the microbial diversity depending on the environment conditions [46,50]. Also, the interaction between the ENPs and organic soil matter or clay minerals might affect the nutrient bioavailability by releasing ions from the clay minerals, changing the pH, direct adsorption, and surface oxidation with dissolved organic matter [51].

In conclusion, our findings suggest that PLGA ENPs reduce nitrification in both cultures of nitrifying strains and in microbial communities in soil samples. The effects of zeta potential on nitrification were not observed, although PLGAs with a positive charge can bind more tightly to bacterial cells than negatively charged PLGAs. Interestingly, in the soil samples, the nitrification activities were fully recovered after 14 days, but the nanotoxicity effects persisted in cultures of the nitrifying strains. These results indicate that in the soil environment there is a resilience of the ecosystem functionality (nitrification) towards nanotoxicity, although the mechanisms by which nanotoxicity is reduced in the environment are still unknown. Although PLGA nanotoxicity could be considered safe with respect to nitrification activity, it might pose a potential environmental risk through alteration in other ecosystem functions. Future work should focus on the effects of PLGA nanotoxicity on the other ecological functions (e.g. carbon or phosphate cycles) or bacterial groups with high-throughput sequencing technologies, and the detoxification mechanism of polymeric nanomaterials in the soil environment. Taken together, we should be concerned about the potential environmental risks of the release of PLGA ENPs into the environment and focus on nanotoxicity of ecosystem functions.

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food (Project No 918014-4), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, the Republic of Korea (as part of the (multi-ministerial) Genome Technology to

Business Translation Program), and the Confocal Core supported by CVMKSU. Authors also thank the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. 2018R1D1A1B07042339, No. 2019K2A9A2A08000123) and by the Yonsei University Wonju Campus Future-Leading Research Initiative of 2018 (2018-62-0054).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.01.011.

References

[1] J.D. Moore, J.P. Stegemeier, K. Bibby, S.M. Marinakos, G.V. Lowry, K.B. Gregory, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 2641–2651.
[2] A.A. Keller, S. McFerran, A. Lazareva, S. Suh, J. Nanopart. Res. 15 (2013) 1692.
[3] E.J. Petersen, L. Zhang, N.T. Mattison, D.M. O'Carroll, A.J. Whelton, N. Uddin, T. Nguyen, Q. Huang, T.B. Henry, R.D. Holbrook, K.L. Chen, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 9837–9856.
[4] R. Turco, M. Bischoff, Z. Tong, L. Nies, Curr. Opin. Biotechnol. 22 (2011) 527–532.
[5] D. Hristozov, I. Malsch, Sustainability 1 (2009) 1161–1194.
[6] V. Nogueira, I. Lopes, T. Rocha-Santos, A.L. Santos, G.M. Rasteiro, F. Antunes, F. Goncalves, A.M. Soares, A. Cunha, A. Almeida, N.C. Gomes, R. Pereira, Sci. Total Environ. 424 (2012) 344–350.
[7] R. Yu, X. Fang, P. Somasundaran, K. Chandran, Chemosphere 128 (2015) 207–215.
[8] Z. Yuan, J. Li, L. Cui, B. Xu, H. Zhang, C.P. Yu, Chemosphere 90 (2013) 1404–1411.
[9] A. Johansen, A.L. Pedersen, K.A. Jensen, U. Karlson, B.M. Hansen, J.J. Scott-Fordsmand, A. Winding, Environ. Toxicol. Chem. 27 (2008) 1895–1903.
[10] Z. Tong, M. Bischoff, L. Nies, B. Applegate, R.F. Turco, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 2985–2991.
[11] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Colloids Surf. B Biointerfaces 75 (2010) 1–18.
[12] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Preat, J. Control. Release 161 (2012) 505–522.
[13] K. Zhang, X. Tang, J. Zhang, W. Lu, X. Lin, Y. Zhang, B. Tian, H. Yang, H. He, J. Control. Release 183 (2014) 77–86.
[14] R.M. Mu, Z.Q. Fan, H.Y. Pei, X.L. Yuan, S.X. Liu, X.R. Wang, J. Environ. Sci. (China) 19 (2007) 1336–1340.
[15] M. Bivas-Benita, S. Romeijn, H.E. Junginger, G. Borchard, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 1–6.
[16] S.F. Hansen, K.N. Nielsen, N. Knudsen, K.D. Grieger, A. Baun, Environ. Sci.: Process. Impacts 15 (2013) 190–203.
[17] A. Prokop, J.M. Davidson, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 3518–3590.
[18] J. Kuzma, J. Romanchek, A. Kokotovich, Risk Anal. 28 (2008) 1081–1098.
[19] K. Kaiser, B. Wemheuer, V. Korolkow, F. Wemheuer, H. Nacke, I. Schoning, M. Schrumpf, R. Daniel, Sci. Rep. 6 (2016) 33696.
[20] H.M. Jin, O.J. Sun, J.F. Liu, J. Plant Ecol. 3 (2010) 209–217.
[21] Y. Zheng, L. Hou, M. Liu, S.E. Newell, G. Yin, C. Yu, H. Zhang, X. Li, D. Gao, J. Gao, R. Wang, C. Liu, Sci. Adv. 3 (2017)e1603229.
[22] D.A. Stahl, J.R. de la Torre, Annu. Rev. Microbiol. 66 (2012) 83–101.
[23] D.J. Dalzell, S. Alte, E. Aspichueta, A. de la Sota, J. Etxebarria, M. Gutierrez, C.C. Hoffmann, D. Sales, U. Obst, N. Christofi, Chemosphere 47 (2002) 535–545.
[24] H. Lu, A.V. Ulanov, M. Nobu, W.T. Liu, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100 (2016) 1843–1852.
[25] I. Guideline, International Organization for Standardization, Genf, Schweiz.
[26] S.W. Culman, R. Bukowski, H.G. Gauch, H. Cadillo-Quiroz, D.H. Buckley, BMC Bioinform. 10 (2009) 171.
[27] R.C. Team, R: A Language and Environment For Statistical Computing [Internet], R Foundation for Statistical Computing; 2015, Vienna, Austria, 2015.
[28] J. Oksanen, R package version, 1 (2011) 11–12.
[29] M.J. Masarudin, S.M. Cutts, B.J. Evison, D.R. Phillips, P.J. Pigram, Nanotechnol. Sci. Appl. 8 (2015) 67.
[30] Y. Patil, J. Panyam, Int. J. Pharm. 367 (2009) 195–203.
[31] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Biomaterials 31 (2010) 3657–3666.
[32] Y. Jiang, S. Huo, T. Mizuhara, R. Das, Y.W. Lee, S. Hou, D.F. Moyano, B. Duncan, X. J. Liang, V.M. Rotello, ACS Nano 9 (2015) 9986–9993.
[33] Y. Yang, M. Li, C. Michels, H. Moreira-Soares, P.J. Alvarez, Environ. Toxicol. Chem. 33 (2014) 2234–2239.
[34] J. Beddow, B. Stolpe, P. Cole, J.R. Lead, M. Sapp, B.P. Lyons, I. Colbeck, C. Whitby, Environ. Microbiol. Rep. 6 (2014) 448–458.
[35] Y.F. Huang, Y.F. Wang, X.P. Yan, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 7908–7913.
[36] W.W. Wilson, M.M. Wade, S.C. Holman, F.R. Champlin, J. Microbiol. Methods 43 (2001) 153–164.
[37] K.H. Jacobson, I.L. Gunsolus, T.R. Kuech, J.M. Troiano, E.S. Melby, S.E. Lohse, D. Hu, W.B. Chrisler, C.J. Murphy, G. Orr, F.M. Geiger, C.L. Haynes, J.A. Pedersen, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 10642–10650.
[38] C.L. Lauber, M.S. Strickland, M.A. Bradford, N. Fierer, Soil Biol. Biochem. 40 (2008) 2407–2415.
[39] X. Zhang, M.R. Servos, J. Liu, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 9910–9913.
[40] N.A.C. Smits, R. Bobbink, H.J. Laanbroek, A.J. Paalman, M.M. Hefting, Plant Soil 337 (2010) 435–445.
[41] K. Schlich, K. Hund-Rinke, Environ. Pollut. 196 (2015) 321–330.
[42] D.F. Rodrigues, D.P. Jaisi, M. Elimelech, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 625–633.
[43] A.D. Samarajeewa, J.R. Velicogna, J.I. Princz, R.M. Subasinghe, R.P. Scroggins, L. A. Beaudette, Environ. Pollut. 220 (2017) 504–513.
[44] A.M. El Badawy, T.P. Luxton, R.G. Silva, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 1260–1266.
[45] Y. Ge, J.H. Priester, M. Mortimer, C.H. Chang, Z. Ji, J.P. Schimel, P.A. Holden, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 3965–3974.
[46] W. Ren, G. Ren, Y. Teng, Z. Li, L. Li, J. Hazard. Mater. 297 (2015) 286–294.
[47] N. Rescignano, L. Tarpani, A. Romani, I. Bicchi, S. Mattioli, C. Emiliani, L. Torre, J. M. Kenny, S. Martino, L. Latterini, I. Armentano, Polym. Degrad. Stab. 134 (2016) 296–304.
[48] C. Zhang, W. Chen, P.J. Alvarez, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 7918–7923.
[49] S. Bae, Y.S. Hwang, Y.J. Lee, S.K. Lee, Environ. Health Toxicol. 28 (2013) e2013006.
[50] D. Kerfahi, B.M. Tripathi, D. Singh, H. Kim, S. Lee, J. Lee, J.M. Adams, PLoS One 10 (2015)e0123042.
[51] Z. Han, F. Zhang, D. Lin, B. Xing, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 6869–6875.

논문 증빙: Raman-Deuterium isotope probing and metagenomics reveal the drought tolerance of the soil microbiome and its promotion of plant growth

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | mSystems®

RESEARCH ARTICLE

Check for updates

Raman-Deuterium Isotope Probing and Metagenomics Reveal the Drought Tolerance of the Soil Microbiome and Its Promotion of Plant Growth

Jee Hyun No,[a] Susmita Das Nishu,[a] Jin-Kyung Hong,[a] Eun Sun Lyou,[a] Min Sung Kim,[a] Gui Nam Wee,[a] Tae Kwon Lee[a]

[a]Department of Environmental Engineering, Yonsei University, Wonju, Republic of Korea

ABSTRACT Drought has become a major agricultural threat leading crop yield loss. Although a few species of rhizobacteria have the ability to promote plant growth under drought, the drought tolerance of the soil microbiome and its relationship with the promotion of plant growth under drought are scarcely studied. This study aimed to develop a novel approach for assessing drought tolerance in agricultural land by quantitatively measuring microbial phenotypes using stable isotopes and Raman spectroscopy. Raman spectroscopy with deuterium isotope probing was used to identify the Raman signatures of drought effects from drought-tolerant bacteria. Counting drought-tolerant cells by applying these phenotypic properties to agricultural samples revealed that 0% to 52.2% of all measured single cells had drought-tolerant properties, depending on the soil sample. The proportions of drought-tolerant cells in each soil type showed similar tendencies to the numbers of revived pea plants cultivated under drought. The phenotype of the soil microbiome and plant behavior under drought conditions therefore appeared to be highly related. Studying metagenomics suggested that there was a reliable link between the phenotype and genotype of the soil microbiome that could explain mechanisms that promote plant growth in drought. In particular, the proportion of drought-tolerant cells was highly correlated with genes encoding phytohormone production, including tryptophan synthase and isopentenyl-diphosphate delta-isomerase; these enzymes are known to alleviate drought stress. Raman spectroscopy with deuterium isotope probing shows high potential as an alternative technology for quantitatively assessing drought tolerance through phenotypic analysis of the soil microbiome.

IMPORTANCE Soil microbiome has played a critical role in the plant survival during drought. However, the drought tolerance of soil microbiome and its ability to promote plant growth under drought is still scarcely studied. In this study, we identified the Raman signature (i.e., phenotype) of drought effects from drought-tolerant bacteria in agricultural soil samples using Raman-deuterium isotope probing (Raman-DIP). Moreover, the number of drought-tolerant cells measured by Raman-DIP was highly related to the survival rate of plant cultivation under drought and the abundance of genes encoding phytohormone production alleviating drought stress in plant. These results suggest Raman-DIP is a promising technology for measuring drought tolerance of soil microbiome. This result give us important insight into further studies of a reliable link between phenotype and genotype of soil microbiome for future plant-bacteria interaction research.

KEYWORDS drought, drought tolerance, Raman-DIP, phenotype, metagenomics, soil microbiome

Editor Joanne B. Emerson, University of California, Davis

Copyright © 2022 No et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Tae Kwon Lee, tklee@yonsei.ac.kr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 13 October 2021
Accepted 11 January 2022
Published 1 February 2022

Drought is a major agricultural threat that limits the productivity of crops. Climate change is leading to drought periods becoming longer and more intense, due to changes in global air temperature and precipitation patterns (1). Drought stress has

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/msystems on 09 February 2022 by 165.132.204.232.

intensity by the relative intensity. The function "clupaSpectra" was used for peak alignment with default value. Raman shifts ranging from 400 to 1,800 cm^{-1} were used to analyze the bacterial phenotypes (51).

The peak areas assigned to C-D (2,040 to 2,300 cm^{-1}), C-H (2,800 to 3,100 cm^{-1}), and the silence region (2,400 to 2,700 cm^{-1}) were integrated using the function "integrate" in the R package "stats." The ratio of (C-D − silence region)/[(C-D − silence region) + (C-H − silence region)] (C-D ratios) was calculated to quantify the level of deuterium incorporation in 20 to 25 bacterial cells of each soil sample. The silence region was adopted to decrease the effects of noise for the Raman spectra. The ratio of proteins to lipids was calculated by dividing the integrated area of 1,209 cm^{-1} by the area of 1,267 cm^{-1} (18).

Plant cultivation test. The plant growth promotion capacity of the soil microbiome under drought conditions was evaluated using a pot test. The surface of pea (*Pisum sativum* L.) seeds were sterilized with 2.5% NaOCl for 3 min and then washing five times with running deionized water. The seeds were kept in a growth chamber for 3 days for pregermination with moisture. Then, 15 g of soil was placed in each pot and one pregerminated seed was sown per pot. During the first 2 weeks, pots were fully watered on alternating days, following which drought stress was applied over the next 7 days by restricting watering. After 7 days of drought stress, plants were rewatered for 3 days and then harvested. The pot test was conducted in a growth chamber with 30/14°C (day/night) temperatures, 14/10 h (day/night) periods, and 50% relative humidity. At the end of the experiment, the numbers of revived green leaves were counted. The experiment was repeated twice, with 10 replicates for each soil sample. We expressed as a percentage the total number of counted plants in two replicates.

Metagenome sequencing. Total genomic DNA was extracted from soil samples after 1 week of drought stress using the FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, USA). DNA quality was measured using a Quanti-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Invitrogen, Waltham, USA). Library construction and sequencing was conducted with an Illumina HiSeq Xten platform (Illumina, San Diego, USA) by Microgen (Seoul, South Korea). The Illumina adapters were removed using BBTools v.38.22 with default parameters in KBase (52). The sequence data were quality filtered using BBTools to remove low quality reads and correct the sequencing errors with default parameters (52). Filtered reads were assembled using MEGAHIT v1.2.9 using a minimum threshold of 300 bp (bp) contigs. The integrated microbial genomes with microbiome samples (IMG/M) annotation pipelines were used to annotate the metagenomic sequence data (53). All genomes were annotated to predict their bacterial classifications with protein-coding genes using Prodigal v.2.6.3. Functional gene annotation was performed using the IMG/M via Cluster of Orthologous Genes and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Orthology analyses (53).

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using R (v. 3.6.3) (54). Discriminant analysis of principal components (DAPC) was conducted for all processed spectra to identify Raman spectra signatures of DTB. The DAPC was conducted by employing the principal-component analysis scores of as explanatory variables of the discriminant analysis using the R package "adegenet" (55). The distances in the DAPC plots were calculated and the average and standard deviation were calculated between each centroid of each control and each dot of each PEG-treated group. To calculate the significance of differences between control and PEG treated samples in the DAPC which was expressed as LD1 and LD2, we conducted the Wilcoxon test for LD1 and LD2 of control and PEG treated samples in each species.

To calculate the significance of differences in the SCRS, Wilcoxon tests or *t*-tests were performed based on the results of a normality test which was conducted using the Shapiro test. Dendrograms were constructed at the phylum level using hierarchical clustering based on the Bray-Curtis Dissimilarity index, using the R package "vegan" (56). Spearman rank correlations between the proportion of drought-tolerant cells and the abundance of gene products were calculated using the R function "cor.test."

Data availability. The metagenome sequences were deposited in the IMG/M web site (https://img.jgi.doe.gov) under the accession number Ga0477069, Ga0483887, Ga0483885, Ga0483897, and Ga0477070.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.
TEXT S1, DOCX file, 0.03 MB.
FIG S1, TIF file, 1 MB.
FIG S2, TIF file, 1.3 MB.
FIG S3, TIF file, 0.3 MB.
FIG S4, TIF file, 0.4 MB.
FIG S5, TIF file, 0.6 MB.
TABLE S1, DOCX file, 0.03 MB.
TABLE S2, DOCX file, 0.03 MB.
TABLE S3, DOCX file, 0.03 MB.
TABLE S4, DOCX file, 0.03 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (iPET) through The Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food, funded by Ministry of Agriculture, Food and

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/msystems on 09 February 2022 by 165.132.204.232.

Rural Affairs (MAFRA) (Project No. 918014-4). This study was also supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. 2020R1C1C1006249).

REFERENCES

1. Lau JA, Lennon JT. 2012. Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. Proc Natl Acad Sci U S A 109:14058–14062. https://doi.org/10.1073/pnas.1202319109.
2. Xu L, Dong Z, Chiniquy D, Pierroz G, Deng S, Gao C, Diamond S, Simmons T, Wipf HM-L, Caddell D, Varoquaux N, Madera MA, Hutmacher R, Deutschbauer A, Dahlberg JA, Guerinot ML, Purdom E, Banfield JF, Taylor JW, Lemaux PG, Coleman-Derr D. 2021. Genome-resolved metagenomics reveals role of iron metabolism in drought-induced rhizosphere microbiome dynamics. Nat Commun 12:1–17. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23553-7.
3. Karlowsky S, Augusti A, Ingrisch J, Akanda MKU, Bahn M, Gleixner G. 2018. Drought-induced accumulation of root exudates supports post-drought recovery of microbes in mountain grassland. Front Plant Sci 9:1593. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01593.
4. Vardharajula S, Zulfikar Ali S, Grover M, Reddy G, Bandi V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting Bacillus spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. J Plant Interactions 6:1–14. https://doi.org/10.1080/17429145.2010.535178.
5. Naseem H, Ahsan M, Shahid MA, Khan N. 2018. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. J Basic Microbiol 58:1009–1022. https://doi.org/10.1002/jobm.201800309.
6. Moreno-Galván AE, Cortés-Patiño S, Romero-Perdomo F, Uribe-Vélez D, Bashan Y, Bonilla RR. 2020. Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. Appl Soil Ecol 147:103367. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367.
7. Dodd I, Zinovkina N, Safronova V, Belimov A. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. Annals of Applied Biology 157:361–379. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x.
8. Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant Physiol 134:1017–1026. https://doi.org/10.1104/pp.103.026583.
9. Niu X, Song L, Xiao Y, Ge W. 2017. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. Front Microbiol 8:2580. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02580.
10. Meisner A, Jacquiod S, Snoek BL, Ten Hooven FC, Van Der Putten WH. 2018. Drought legacy effects on the composition of soil fungal and prokaryote communities. Front Microbiol 9:294. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00294.
11. Santos-Medellín C, Edwards J, Liechty Z, Nguyen B, Sundaresan V. 2017. Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes. mBio 8:e00764-17. https://doi.org/10.1128/mBio.00764-17.
12. Dai L, Zhang G, Yu Z, Ding H, Xu Y, Zhang Z. 2019. Effect of drought stress and developmental stages on microbial community structure and diversity in peanut rhizosphere soil. Int J Mol Sci 20:2265. https://doi.org/10.3390/ijms20092265.
13. Li M, Xu J, Romero-Gonzalez M, Banwart SA, Huang WE. 2012. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging. Curr Opin Biotechnol 23:56–63. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.019.
14. Zhao X, Li M, Xu Z. 2018. Detection of foodborne pathogens by surface enhanced raman spectroscopy. Front Microbiol 9:1236. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01236.
15. Ren Y, Ji Y, Teng L, Zhang H. 2017. Using Raman spectroscopy and chemometrics to identify the growth phase of Lactobacillus casei Zhang during batch culture at the single-cell level. Microb Cell Fact 16:1–10. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0849-8.
16. Teng L, Wang X, Wang X, Gou H, Ren L, Wang T, Wang Y, Ji Y, Huang WE, Xu J. 2016. Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in E. coli via ramanome. Sci Rep 6:1–10. https://doi.org/10.1038/srep34359.
17. Novelli-Rousseau A, Espagnon I, Filiputti D, Gal O, Douet A, Mallard F, Josso Q. 2018. Culture-free antibiotic-susceptibility determination from single-bacterium Raman spectra. Sci Rep 8:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22392-9.
18. Mukherjee R, Verma T, Nandi D, Umapathy S. 2020. Understanding the effects of culture conditions in bacterial growth: A biochemical perspective using Raman microscopy. J Biophotonics 13:e201900233. https://doi.org/10.1002/jbio.201900233.
19. Huang WE, Stoecker K, Griffiths R, Newbold L, Daims H, Whiteley AS, Wagner M. 2007. Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function. Environ Microbiol 9:1878–1889. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01352.x.
20. Cui L, Yang K, Li H-Z, Zhang H, Su J-Q, Paraskevaidi M, Martin FL, Ren B, Zhu Y-G. 2018. Functional single-cell approach to probing nitrogen-fixing bacteria in soil communities by resonance Raman spectroscopy with 15N2 labeling. Anal Chem 90:5082–5089. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05080.
21. Li M, Canniffe DP, Jackson PJ, Davison PA, FitzGerald S, Dickman MJ, Burgess JG, Hunter CN, Huang WE. 2012. Rapid resonance Raman microspectroscopy to probe carbon dioxide fixation by single cells in microbial communities. ISME J 6:875–885. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.150.
22. Berry D, Mader E, Lee TK, Woebken D, Wang Y, Zhu D, Palatinszky M, Schintlmeister A, Schmid MC, Hanson BT, Shterzer N, Mizrahi I, Rauch I, Decker T, Bocklitz T, Popp J, Gibson CM, Fowler PW, Huang WE, Wagner M. 2015. Tracking heavy water (D2O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 112:E194–E203. https://doi.org/10.1073/pnas.1420406112.
23. Song Y, Cui L, López JÁS, Xu J, Zhu Y-G, Thompson IP, Huang WE. 2017. Raman-Deuterium Isotope Probing for in-situ identification of antimicrobial resistant bacteria in Thames River. Sci Rep 7:1–10. https://doi.org/10.1038/s41598 017 16898 x.
24. Matanfack GA, Taubert M, Guo S, Houhou R, Bocklitz T, Küsel K, Rösch P, Popp J. Jr, 2020. Influence of carbon sources on quantification of deuterium incorporation in heterotrophic bacteria: a raman-stable isotope labeling approach. Anal Chem 92:11429–11437. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02443.
25. Guo L, Ye C, Cui L, Wan K, Chen S, Zhang S, Yu X. 2019. Population and single cell metabolic activity of UV-induced VBNC bacteria determined by CTC-FCM and D2O-labeled Raman spectroscopy. Environ Int 130:104883. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.077.
26. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol Res 184:13–24. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003.
27. Ansary MH, Rahmani HA, Ardakani MR, Paknejad F, Habibi D, Mafakheri S. 2012. Effect of Pseudomonas fluorescent on proline and phytohormonal status of maize (Zea mays L.) under water deficit stress. Annals of Biological Res 3:1054–1062.
28. Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y. 2010. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. Mol Plant 3:469–490. https://doi.org/10.1093/mp/ssq016.
29. Dose K, Bieger-Dose A, Kerz O, Gill M. 1991. DNA-strand breaks limit survival in extreme dryness. Orig Life Evol Biosph 21:177–187. https://doi.org/10.1007/BF01809446.
30. Wang Y, Song Y, Tao Y, Muhamadali H, Goodacre R, Zhou N-Y, Preston GM, Xu J, Huang WE. 2016. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level. Anal Chem 88:9443–9450. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01602.
31. Schimel J, Balser TC, Wallenstein M. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. Ecology 88:1386–1394. https://doi.org/10.1890/06 0219.
32. Stenström J, Svensson K, Johansson M. 2001. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. FEMS Microbiol Ecol 36:93–104. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00829.x.
33. Doherty SJ, Barbato RA, Grandy AS, Thomas WK, Monteux S, Dorrepaal E, Johansson M, Ernakovich JG. 2020. The transition from stochastic to deterministic bacterial community assembly during permafrost thaw succession. Front Microbiol 11:596589. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596589.
34. Arzanesh MH, Alikhani H, Khavazi K, Rahimian H, Miransari M. 2011. Wheat (Triticum aestivum L.) growth enhancement by Azospirillum sp. under drought stress. World J Microbiol Biotechnol 27:197–205. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0444-1.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/msystems on 09 February 2022 by 165.132.204.232.

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	KMB 2018 국제학술대회 및 정기학술대회	노지현	2018.06.29	여수	대한민국
2	10th ASME	노지현	2018.07.13	오키나와	일본
3	17th ISME	노지현	2018.08.13	라이프치히	독일
4	2019 한국미생물학회	노지현	2019.04.18	제주도	대한민국
5	ASME&TSME meeting 2019	류은선	2019.05.12	타이중	대만
6	15th Bageco	노지현	2019.05.28	리스본	포르투갈
7	MSK2020	노지현	2020.10.07	e-conference	대한민국
8	MSK2020	Nishu Susmita Das	2020.10.07	e-conference	대한민국
9	World Microbe Forum	노지현	2021.06.22	e-conference	미국
10	World Microbe Forum	Nishu Susmita Das	2021.06.20	e-conference	미국
11	World Microbe Forum	Nishu Susmita Das	2021.06.20	e-conference	미국

학술발표 증빙: World Microbe Forum 노지현

WORLD MICROBE FORUM

Session AES119 - Rapid Fire: AES - Techniques in Agricultural Microbiology

Functional Single Cell Approach to Identify Drought-tolerant Bacteria in Soil by Raman-DIP

June 22, 2021, 12:45 PM - 12:55 PM | Channel 4

Authors

J. No, S. Nishu, T. Lee; Yonsei Univ., Wonju, Korea, Republic of

Disclosures

J. No: None. **S. Nishu:** None. **T. Lee:** None.

Abstract

Drought has become one of the major agricultural threats such as the crop yield loss. Although plants have the mechanisms to tolerate drought stress, these mechanisms are difficult to apply in extreme drought condition. A few of rhizobacteria have an ability of plant-growth promotion under drought stress. The conventional approaches are difficult to quantitative evaluation for unknown drought-tolerant rhizobacteria and to determine its actual performance in environmental samples. We evaluated the semi-quantitation of drought-tolerant rhizobacteria in soil samples using Raman microspectroscopy with deuterium water. The C-D ratio (C-D bands/(C-D bands + C-H bands)) can be used to semi-quantitative indicator of metabolic activity of drought-tolerant rhizobacteria. The six model bacterial species and detached bacteria from five types of agricultural soil samples were incubated for 48 h in nutrient broth medium containing 40% deuterium supplemented with 20% Polyethylene glycol (PEG). We tested the plant recovery for these soils in drought condition. In the Raman spectra of model bacterial species with PEG, the drought-sensitive rhizobacteria had more significant physiological changes than -tolerant rhizobacteria in the cells between control and PEG treatment. The spectra of drought-sensitive rhizobacteria did not show any detectable C-D bands, whereas the spectra of drought-tolerant rhizobacteria were detected the C-D bands. The mean of C-D ratio in the spectra of the drought-tolerant rhizobacteria in PEG treatment was 0.11 which represents the active level for the drought-tolerant rhizobacteria. The C-D ratio of the detached rhizobacteria from soil samples were compared with that of each samples after PEG treatment. The percentages of active rhizobacteria with a level of C-D ratio higher than 0.11 were 52.2%, 25%, 21.7%, 12.5% and 0% in the five soil samples with drought condition. These results were matched that experiment for plant recovery in drought condition. The metagenome for these soil samples were analyzed after drought stress. The C-D ratio showed a positive correlation with the gene product relative to synthesis of Indole-3-acetic acid (IAA) which can protect host from environmental stress. This novel approach

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Enterobacter ludwigii NP-07	KCTC13960BP	KCTC	2019
2	Pseudomonas fluorescens DR397	KCCM12710P	KCCM	2020

생명자원 기탁 증빙: Enterobacter ludwigii NP-07

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: **KANG, Bo Ram**
KANG, Bo Ram
1, Yeonsedae-gil, Heungeop-myeon, Wonju-si, Gangwon-do
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
***Enterobacter ludwigii* NP-07**	**KCTC 13960BP**

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:
[ ] a scientific description
[ ] a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on **September 25, 2019.**

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: **Korean Collection for Type Cultures** Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): KIM, Song-Gun, Director Date: **September 25, 2019**

Form BP/4 (KCTC Form 17) sole page

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2019.10.08
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2019-0124880 (접수번호 1-1-2019-1028921-63)
출 원 인 명 칭 연세대학교 원주산학협력단(1-2012-010773-8)
대 리 인 성 명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1)
발 명 자 성 명 이태권 강보람 노지현
발 명 의 명 칭 식물생장촉진 효과를 갖는 신규한 엔테로박터속 균주 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8.기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

2019-10-08

【연구사업명】 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
【연구과제명】 기능성 단일세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기술 개발
【기여율】 1/2
【주관기관】 연세대학교 원주산학협력단
【연구기간】 2019.01.01 ~ 2019.12.31
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1395058777
【부처명】 농촌진흥청
【연구관리 전문기관】 농촌진흥청
【연구사업명】 차세대바이오그린21(R&D)
【연구과제명】 콩과작물의 질소고정 균주 유전체 비교분석을 통한 가뭄 내성 기반 구축 및 활용
【기여율】 1/2
【주관기관】 연세대학교 원주산학협력단
【연구기간】 2019.01.01 ~ 2019.12.31
【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.
대리인 특허법인 피씨알 (서명 또는 인)

【수수료】
【출원료】 0 면 46,000 원

23-3

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	식물생장촉진 효과를 갖는 신규한 엔테로박터속 균주 및 이의 용도	대한민국	연세대학교 원주산학협력단	2019. 10.08	10-2019-0124880	연세대학교 원주산학협력단	2021.06. 25	10-2271642	50	미활용
2	식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도	대한민국	연세대학교 원주산학협력단	2020. 06.11	10-2020-0070977	연세대학교 원주산학협력단	2021.11. 05	10-2324981	50	미활용

특허 증빙: 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도

등록특허 10-2324981

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월12일
(11) 등록번호 10-2324981
(24) 등록일자 2021년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/20* (2020.01)
C12R 1/39 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A01N 63/20 (2020.01)
(21) 출원번호 10-2020-0070977
(22) 출원일자 2020년06월11일
심사청구일자 2020년06월11일
(56) 선행기술조사문헌
Genbank Accession No.CP048408.1(2020.02.12.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
이태권
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
니슈 수스미타 다스
26493, 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

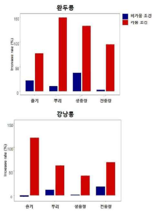
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물, 이를 이용한 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 상기 균주는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도함으로써 물 부족 환경에서도 식물 성장을 지속하고 촉진하는 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



- 1 -

등록특허 10-2324981

(52) CPC특허분류
C12R 2001/39 (2021.05)
(72) 발명자
현혜림
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
노지현
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(56) 선행기술조사문헌
Acta agriculturae Slovenica, Vol.111(1), pp.63-72(2018.04.)*
KR1020090048773 A
KR1020050116297 A
KR1020160121994 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395062657
과제번호 PJ013176012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 콩과작물의 질소고정 균주 유전체 비교분석을 통한 가뭄 내성 기반 구축 및 활용
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교 원주산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545020927
과제번호 918014043SB010
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
연구과제명 기능성 단일세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탐착 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교 원주산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
공지예외적용 : 있음

- 2 -

ㅇ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√					√				
2	√					√				

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분1」	인증여부2」	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류3」	제안/인증일자

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분1」	표준명	표준기구명2」	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식3」	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식1」	사업화 형태2」	지역3」	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」 기술이전 또는 자기실시
* 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

<table>
<tr><td colspan="3">성과</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td rowspan="9">사업화 계획</td><td colspan="2">사업화 소요기간(년)</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td colspan="2">소요예산(천원)</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">예상 매출규모(천원)</td><td>현재까지</td><td>3년 후</td><td>5년 후</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">시장 점유율</td><td>단위(%)</td><td>현재까지</td><td>3년 후</td><td>5년 후</td></tr>
<tr><td>국내</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>국외</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td rowspan="3">무역 수지 개선 효과(천원)</td><td colspan="2" rowspan="2">수입대체(내수)</td><td>현재</td><td>3년 후</td><td>5년 후</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">수출</td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

<table>
<tr><td colspan="3">구분</td><td>고용 효과(명)</td></tr>
<tr><td rowspan="4">고용 효과</td><td rowspan="2">개발 전</td><td>연구인력</td><td></td></tr>
<tr><td>생산인력</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="2">개발 후</td><td>연구인력</td><td></td></tr>
<tr><td>생산인력</td><td></td></tr>
</table>

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설・장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

3.1.4. 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

3.2. 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
○ **자성 나노입자를 활용한 기능성 미생물군집 분리 기술 개발**	- $FeCl_2$와 $FeCl_3$를 활용하여 자성 나노입자 제작 및 개량 - 자성 나노입자를 활용하여 기능성 미생물의 90% 회수 - 토양시료로부터 페놀 분해 기능성 미생물군집 확보 및 대조군 대비 30% 이상 높은 분해 효율 보임	100
○ **동위원소와 라만분광법을 활용한 기능성 미생물 검측 및 고속 분리 기술 개발**	- 단일세포의 표현형(Ramanome) 분석 파이프라인 구축 완료 - 가뭄 내성능을 가진 질소고정 미생물의 라만 특이성 확보 - 중수와 라만분광법을 활용하여 가뭄 내성능 평가 기술 개발 - 라만레이지 활용 슬라이드 글라스 및 미생물 포집 chip 제작 - 근권 시료의 라만이미징 분석을 통해 목표 균주 생태지위 확인 - Pulse laser를 활용한 가뭄 내성능 보유한 미생물 분리	100
○ **고속 분리된 Single cell의 유전체 분석 및 배양 기술 개발**	- 환경시료로부터 가뭄 내성 균주 8종 분리 및 유전체 분석 - Trehalose, Glycine-Betain, Choline, IAA 생합성 유전자를 공동 보유 확인 - 식물호르몬, 인가용화 등 식물생장촉진 관련 유전자 보유 확인 - RNASeq 분석을 통해 가뭄 조건에서의 유전자 발현 분석 완료 - Trehalose, Glycine-Betain과 EPS 생합성 유전자 8배 이상 발현 증가	100
○ **가뭄조건에서 식물-미생물 상호작용의 핵심 미생물 유전체 분석을 통한 신규 내건성 향상 메커니즘 규명**	- 라만분광법과 동위원소 활용하여 토양 마이크로바이옴의 가뭄 내성능 정량적 평가 수행 - 메타유전체 분석과 가뭄내성능의 정량적 결과의 연관성 분석 - IAA 생합성과 연관된 Tryptophan synthase 유전자의 풍부도와 토양마이크로바옴의 가뭄 내성능과 밀접한 연관성 확인 - 가뭄 내성능이 다른 토양에 작물의 교차이식 실험 수행한 결과, 높은 가뭄 내성능을 보유한 토양 마이크로바이옴에 이식된 작물의 생장이 촉진 되는 것을 확인	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당사항 없음)

4.1. 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

4.2. 자체 보완활동

4.3. 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 광학기술과 동위원소를 활용한 미생물 검측 및 분리 기술을 활용하여 식물의 가뭄 내성능을 증진하는 미생물자원 효과적으로 선별 가능
- 환경시료에서 획득되는 메타유전체의 파편화된 정보에서 벗어나 마이크로바이옴의 기능 중심의 선택적 유전체 연구를 수행함으로써 연구수월성을 향상 가능
- 식물-미생물 상호작용에 의한 식물 내건성 증진을 정량적으로 평가할 수 있는 실험적 기반을 마련함으로써 토양 마이크로바이옴 연구에 새로운 패러다임 제시 가능
- 광학기술을 활용한 단일 세포의 표현형 결과를 유전체 분석과 연계함으로써 관심있는 미생물의 기능을 보유하고 있는 마이크로바이옴을 선택적으로 분석함으로써 고해상도의 유전 정보를 제공 가능

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 기후변화에서 안정적으로 작물 생산을 유지할 수 있는 미생물비료 소재 발굴에 활용
- 가뭄 뿐만아니라 고온, 냉해 등 외부 스트레스에 내성이 높은 미생물비료 소재 발굴에 응용
- 가뭄으로 작물의 생산량이 감소된 농경지의 원인분석 및 토양 개선에 기술 지원
- 기후변화 민감 농경지 혹은 토양 환경에 대한 사전 예측을 통해 이상기후 재해 사전 방지
- 다수의 작물 대상으로 가뭄 내성능 증진을 평가 및 효과적인 시비방법 체계화 추진
- 국내 비료회사에 미생물비료 소재로 기술이전 추진

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		1
	비SCIE		
	계		1
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		1
	박사		2
	계		3
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단 연구개발과제 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.