



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

**A THESIS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

**Biological characteristics of the chemosymbiotic lucinid
clam *Pillucina pisidium* inhabiting the lagoonal seagrass bed
of the subtropical island**

Jong-Seop Shin

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February, 2020

**Biological characteristics of the chemosymbiotic lucinid
clam *Pillucina pisidium* inhabiting the lagoonal seagrass bed
of the subtropical island**

Jong-Seop, Shin
(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of

Master of Science

February 2020

This dissertation has been examined and approved by

Thesis director, Dr. Chang-Keun Kang, Professor, Gwangju Institute of
Science and Technology

Dr. Do-Hyung Kang, Principal Research Scientist, Korean Institute of Ocean
Science & Technology

Dr. Kwang-Sik Choi, Professor, School of Marine Biomedical Science, Jeju
National University

2020.02

Date

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

CONTENTS

ABSTRACTS.....	i
LIST OF FIGURES	ii
LIST OF TABLES.....	iii
1. INTRODUCTION	1
2. MATERIALS AND METHODS.....	4
2.1. Study area and sample collection.....	4
2.2. Histological preparation.....	6
2.3. Scanning electron microscopy	6
2.4. Stable isotope ratio analysis.....	6
2.5. Endosymbiosis community analysis.....	7
2.5.1 Genomic DNA isolation	7
2.5.2. Next generation sequencing.....	7
3. RESULTS	9
3.1. Biometry	9
3.2. Light microscopy	9
3.3. Ultrastructure of internal organs	9
3.4. Origin of organic matters	12
3.5. Bacterial community analysis	12
4. DISCUSSION	15
4.1. Study area.....	15
4.2. Acquisition of symbionts	16
4.3. Bacteria-host interactions.....	17
REFERENCES.....	20
ACKNOWLEDGEMENT	27

Abstract

Chemosymbiotic microbes have been identified in the intertidal zones and the deep-sea hydrothermal vents where the environments are enriched with reduced sulfur. Recently, several studies have reported presence of clams in the sediment of shallow subtidal seagrass, harboring chemosynthetic microbes as symbionts. In this study, we investigated an association of chemosynthetic bacteria with a lucinid bivalve *Pillucina pisidium* occurring in subtidal seagrass bed in a lagoon on the east coast. A total of 360 clams were collected from *Zostera marina* bed for the analysis. *P. pisidium* was a small clam with a mean shell length of 7.0 mm and tissue wet weight of 26.2 mg. Histology revealed that *P. pisidium* has unusually thick gills which attributed to 16.5% of the total tissue weight. Histology also revealed that the digestive gland and stomach were reduced compared to other bivalves, suggesting that *P. pisidium* may have another source of food except the filtered food particles from the ambient environment. Scanning electron microscopy showed symbiotic bacteria in the gills. The results of stable isotope ratio analysis suggest that significantly depleted carbon and nitrogen indicate that bacterial fixation of carbon and nitrogen occurs in the gills. Next Generation Sequencing revealed that thiotrophic and diazotrophic bacteria were dominant gill filaments

Keywords: *Pillucina pisidium*, chemosynthetic symbiosis, Lucinidae, seagrass bed, thiotroph, diazotroph, stable isotope ratio, Next Generation Sequencing

List of Figures

- Fig. 1.** Location of the sampling site of *P. pisidium* were collected from a *Zostera marina* bed meadow at Ojori lagoon on the eastern coast of Jeju island (Kakao map, <https://map.kakao.com>).
- Fig. 2.** Microscopic features of *P. pisidium*. (A) transverse section of *P. pisidium*. (B), (C) reduced digestive organs. (D) gonad development (female). (E) gonad development (male). (F), (G) section of gill filaments. Abbreviations: m, mantle; g, gills; f, foot; o, oocyte; d, digestive tubule; sc, spermatocyte; gc, granulocyte; lz, lateral zone; cz, ciliated zone; bc, bacteriocyte
- Fig. 3.** Ultrastructures of *p. pisidium*. (A) transverse section of gill. (B), (C) gill. epithelial zone. (D) endosymbionts in bacteriocyte (E) cilia zone. (F) section of oocyte. Abbreviations: cz, ciliated; bz, bacteriocyte zone; g, gills; f, foot; es, endosymbionts; c, cilia o, oocyte; n, nucleus
- Fig. 4.** Stable isotopic ratios of the gills, foot, whole tissue of *P. pisidium* and nonsymbiotic bivalve *R. philippinarum*, as a control in the study site Tongbatarr lagoon on the east coast of Jeju Island

List of Tables

Table 1. Biometry of *p. pisidium* used in this study (n=300).

Table 2. Clustering result and Community richness.

Table 3. Bacterial community structure in the gill filaments and sediment (Bold: dominant bacterial species in the gill filaments of *P. pisidium*)

1. Introduction

화학합성공생 (Chemosymbiosis)이란 다세포 동물과 화학합성 미생물의 상리공생으로 미생물은 화학합성을 통해 고정된 유기화합물을 동물 숙주에게 전달하며 다세포 동물은 미생물에게 서식처 및 대사에 필요한 무기물을 제공한다 (Ven et al., 2008; Dubilier et al., 2008). 화학합성 공생은 1977년 갈라파고스 제도의 심해탐사 중 열수구 (hydrothermal vent)에 서식하는 Tube worm (*Riftia pachyptila*)을 통해 최초로 보고되었다 (Cavanaugh et al., 1981). *R. pachyptila*는 1.5m이상 성장하는 초대형 저서생물이나 입과 소화기관이 퇴화되어 있으며, 심해환경의 유기물 농도는 성장에 충분하지 않아 화학합성 공생균에 의한 탄소 고정은 *R. pachyptila*의 에너지 대사 방법으로 제기되었다 (Cavanaugh et al., 1981). 이후 다양한 연구를 통해 *R. pachyptila*의 특수한 헤모글로빈은 황화물 (H_2S)을 영양체 (trophosome)내부의 화학합성박테리아에게 전달하며, 박테리아는 황화물의 산화를 통해 ATP를 생산하고 탄소를 고정하는 공생관계가 밝혀졌다 (Childress et al., 1984; Arp et al., 1984; Powel et al., 1983). *R. pachyptila*의 발견을 시작으로 cold seep, wood fall, volcanic mud 등 다양한 심해환경에서 환형동물, 연체동물, 해면동물 등을 비롯한 7개 문의 동물 분류군에서 화학합성미생물과의 공생관계가 보고되었다 (Dando et al., 1992; Dubilier et al., 2008; Durand et al., 1996; Lorion et al., 2008).

연체동물문 이매패강의 경우 홍합과 (Mytilidae), 비단조개과 (Solemyidae), Vesicomysidae, 말발조개과 (Thyasiridae) 및 꽃잎조개과 (Lucinidae) 등 현재까지 5개의 과 (family)에서 화학합성 공생이 보고되었다 (Page et al., 1991; Duperron, 2013; Page et al., 1991; Morton, 1983; Taylor, 2011). Genus *Bathymodiolus* (family: Mytilidae)는 태평양과 대서양의 열수구와 냉용수 환경에 분포하는 패류로 여과섭이 뿐만 아니라 박테리아에 의한 황의 환원 및 서식 환경에 따라 메탄 및 수소를 에너지

대사에 이용한다 (Fiala-Médioni et al., 2002; Kenk and Wilson, 1985). 관벌레와 마찬가지로 순판 (labial palp), 소화맹낭 (digestive tract)과 같은 유기물의 소화와 관련된 기관은 비교적 축소되어 있는 반면, 아가미가 두껍게 발달되어 있다 (Comitet and Krylova, 1999). 이는 새사 (gill filament) 내부에 박테리아가 서식하는 특수화된 균세포 (bacteriocyte)가 발달되어있기 때문으로, 대부분의 화학합성균과 공생하는 패류에서 나타나는 특징이다 (Won, 2003; Duperron et al., 2005). 균세포는 화학합성 박테리아가 밀집되어 있는 세포로써 수층의 황화물, 수소 및 메탄은 균세포 내부로 전달되고 내부의 박테리아에 의해 산화된다 (Herry et al., 1989; Southward et al., 1986).

아가미 내부의 화학합성 공생균은 심해뿐만 아니라 연안에서도 보고되고 있다 (Dubilier et al., 2008; Fisher, 1990). 꽃잎조개는 화학합성 공생 패류 중 가장 다양하며 넓게 분포하는 과 (Family)로 수심 2,500m의 심해에서부터 조간대까지, 위도 북위 60°에서 남위 55°까지 분포하며, 화석종을 포함하여 400종 (현생 330종) 이상이 보고되어있다 (Taylor and Glover, 2006; Taylor et al., 2011). *Elliptiolucina labeyrii*은 가장 깊은 수심에서 보고된 종으로 2,500m 수심의 퇴적물에서 발견되었으며 (Cosel & Bouchet, 2008), Genus *Lucinoma*는 2,000m 수심의 mud volcano와 산소극대역 (oxygen minimum zone)의 퇴적물에서 7종이 보고되었다 (Oliver & Holmes, 2006). 열수공 Lucinidae의 서식지로 현재까지 1개 종 *Bathyaustriella thionipta*이 보고되었다 (480-500m) (Glover, Taylor & Rowden, 2004).

이처럼 Lucinidae 다양한 해양환경에 광범위하게 분포하나, 대부분 100m 이내의 천해환경에 분포한다. 특히 온대-열대 지역의 잘피와 밀접한 상관관계를 보이며, 전 세계 97%의 잘피장에서 꽃잎조개과의 분포가 보고되었다 (van der Heide et al., 2012). 잘피장은 잘피의 높은 생산성에서 기인한 유기물과 수피에서 공급되는 유기쇄설물의 분해로 황환원비율이 높은 환경이다 (Thresher et al., 1992;

Holmer et al., 2002). 또한 잘피의 뿌리와 지하경 (rhizome)에서 공급되는 산소는 Lucinidae의 에게 안정된 서식처가 된다 (Taylor et al., 2011). 박테리아에 의한 황 환원은 황화물의 독성을 중화시켜 잘피의 생존력을 높인다 (Ruby et al., 2018). Steven et al., 2014 의 연구에 따르면 백악기말 잘피의 출현 이후 꽃잎조개과의 다양성이 크게 증가하였으며, 이는 환원 환경에서 Lucinidae, 내공생균 그리고 잘피의 공생관계로부터 기인됨을 알 수 있다 (Steven et al., 2014).

에너지 대사 과정에서 박테리아의 기여도를 확인하고 미생물과 숙주의 상호작용을 파악하기 위하여 다양한 방법이 이용되고 있다. 특히 탄소와 질소의 안정동위원소비는 생물체의 먹이원을 파악하여 생태계의 구조를 이해하는 지표로 사용되고 있다. 박테리아에 의한 탄소동화 과정에서 무기탄소는 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)에 의해 최초로 고정되는데 이때 근소한 무게차이로 인해 활성화에너지가 낮은 ^{12}C 가 탄소동화에 우선적으로 사용된다 (Fly, 2007). 반면 상위 에너지 단계로 갈수록 생물체는 질량이 낮은 유기물을 우선적으로 배출하고 질량이 높은 탄소화합물을 축적하여 점차 ^{13}C 의 비율이 증가하는 분별현상 (fractionation)이 나타난다 (Fly, 2007). 질소의 순환 또한 탄소와 유사한 양상이 나타나는데, 최초로 nitrogenase에서 ^{14}N 이 ^{15}N 보다 우선적으로 사용되며, 영양단계로 올라갈수록 ^{15}N 이 축적된다 (Gannes and carlos, 1997). 따라서 박테리아로부터 동화된 유기물을 제공받는 패류의 경우 공생박테리아가 없는 패류에 비해 ^{14}N 및 ^{13}C 의 비율이 높게 측정된다 (Fisher et al., 1990; Kendall et al., 2007; Kharlamenko, 2001; Paul et al., 1985).

Pillucina pisidium (Dunker, 1860)은 꽃잎조개과에 속하는 화학합성 공생 패류로 서아프리카, 인도, 호주, 일본, 러시아 등에 광범위하게 분포한다 (Glover and

Taylor, 2001). 일본의 경우 규슈지역의 Tanabe Bay에서 *Zostera japonica* 와 *P. pisidium* 의 분포 및 생물량의 상관관계에 관하여 연구가 수행된 바 있으며 (TAKAHASHI et al., 2013), Kharlamenko et al., (2001)는 러시아 블라디보스톡에서 채집된 *P.pisidium* 의 지방산 및 탄소 동위원소 분석을 통해 박테리아와의 공생관계를 증명하였다 (Kharlamenko et al., 2001).

우리나라의 경우 9종의 잘피가 보고되었으며, 동, 서 및 남해안에 잘피장을 형성하고 있으나 잘피장에서 화학합성박테리아와 공생하는 패류에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주도 동부 연안 석호의 *Zostera marina* bed에 서식하는 *P. pisidium*과 잘피장과의 상관관계를 밝히고 먹이원 및 공생균의 분석을 통해 *P. pisidium*의 생태와 생리적 특징에 대해 밝히고자 한다.

2. Materials and Methods

2.1. Study area and sample collection

잘피장에 서식하는 *P. pisidium*과 내부에 공생하는 박테리아의 특징을 알아보기 위해 2019년 7월 제주도 동해안 오조리에 위치한 석호내 *Z. marina* 서식지에서 *P. pisidium* 및 환경 박테리아 분석을 위한 퇴적물 시료를 획득하였다 (Fig. 1). *Z. marina*의 뿌리와 근경 (rhizome)의 표층부터 10cm깊이의 퇴적물을 망목 1mm의 체에 걸러 360개체를 채집하였으며, 냉장상태로 실험실까지 운반하였다. 생물학적 정보를 획득하기 위해 300마리의 개체에서 각장 (shell length), 전체 습중량 (tissue wet weight, TWT) 및 아가미의 습중량 (gills wet weight, G-TWT)을 측정하였다. 걸러진 퇴적물은 오염을 방지하기 위해 멸균된 튜브에 담아 미생물 DNA 분석 전까지 -80℃에 보관하였다.

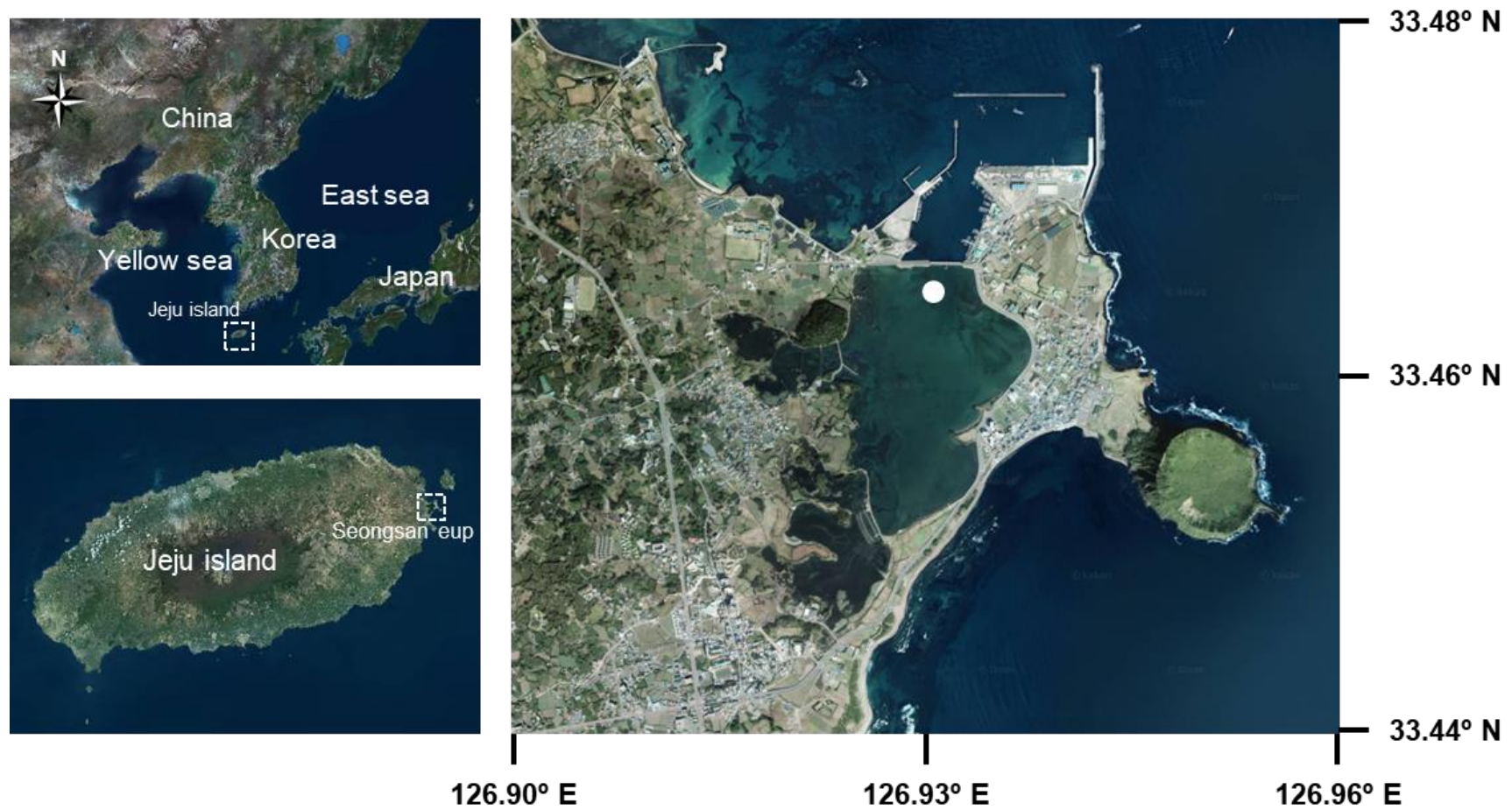


Fig. 1. Location of the sampling site of *P. pisidium* were collected from a *Z. marina* meadow at Ojo-ri lagoon on the eastern coast of Jeju island (Kakao map, <https://map.kakao.com>).

2.2. Histological Preparation

조직염색을 통해 소화기관 및 생식소를 관찰하고자 *P. pisidium* 30개체를 채집 즉시 Davidson's solution에서 24시간 고정 (fixation) 한 후 70% 에탄올에 24시간 동안 치환하였다. 치환 후 조직을 패각에서 분리하여 카세트에 넣고 단계적으로 탈수 및 파라핀에 포매 하였다. 마이크로톰을 이용하여 포매된 조직을 6 μ l 두께로 절개한 후 albumin이 도포된 슬라이드에 부착하여 48시간 동안 건조하였다. 염색은 Howard et al. (2004)의 방법을 따라 Hematoxyline and Eosin Y (H&E) 염색을 진행하였다. 조직 절편은 Harri's hematoxyline 에서 1min 30초 반응 후 Eosin Y 에서 30초 간 염색되어 광학현미경 하에서 관찰되었다.

2.3. Scanning electron microscopy

내부기관과 공생균의 초미세구조 관찰을 위해 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)를 이용하였다. *P. pisidium*의 조직을 분리하여 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA) 에서 60분간 고정하였다. 고정된 조직은 1 X Phosphate buffered saline (PBS; pH 8.0)에서 3회 세척된 후 100%에탄올에 단계적으로 탈수되었다 (30, 50, 70 및 90%에서 각 5분). 탈수가 완료된 조직은 생식소 및 아가미가 포함되도록 배복방향으로 단면을 절개하였다. 절개된 조직은 전기전도를 위해 sputter coater (Q150RS, Quorum Technologies, UK)에서 백금으로 코팅 후 주사전자현미경 (MIRA3, TESCAN, Czech Republic)에서 내부 기관 및 공생 박테리아를 관찰하였다.

2.4. Stable isotope ratio analysis

각 부위별 유기물 기원을 추적하기 위해 아가미, 발 및 전체 조직에서 탄소 및 질소 동위원소 비율을 측정하였다. 50개체에서 아가미 및 발을 분리하여

한 튜브에 5개체씩 모아 24시간 동안 동결건조 하였으며, 5개체는 절개 없이 전체조직을 동결건조 한 후 분석 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다. 안정동위원소비 분석은 광주과학기술원 동위원소생태학 연구실에서 수행되었다. 동결건조가 완료된 조직 샘플을 입자형태로 분쇄 후 틴 캡 (tin capsule)에 넣고 밀봉하여, 안정동위원소분석기 (Elemental Analyzer-Isotope RatioMass Spectrometry, vario Micro cube-Isoprime 100, Elementar-GV Instrument, UK)로 탄소 및 질소의 동위원소 비율을 측정하였으며, 아래의 식으로 산정하여 천분율 (‰)로 나타내었다.

$$\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3 \quad (X = {}^{13}\text{C} \text{ or } {}^{15}\text{N}, R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ or } {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N})$$

탄소동위원소의 표준물질로는 International standards of sucrose (ANU C₁₂H₂₂O₁₁; National Institute of Standards and Technology (NIST), USA)를 사용하였으며, 질소는 ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄; NIST, USA)를 이용하였다. 부위별 동위원소비 측정값의 유의적 차이는 one-way ANOVA를 통해 검정하였다.

2.5. Endosymbiosis community analysis

2.5.1. Genomic DNA isolation

조직 내 미생물 DNA 추출에는 Qiagen사의 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 아가미, 발, 전체조직에서 각각 genomic DNA를 추출하였다. 퇴적물 시료는 Power Soil™ DNA kit (Mo Bio Laboratories, Germany)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 gDNA를 분리하였다. 샘플 내 박테리아의 존재를 확인하기 위하여 bacterial universal primers 57F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용 박테리아의 16s rDNA영역을 증폭 후 1% agarose gel에 전기영동하여 아가미 조직과 퇴적물에서 약 300bp의 반응산물을 확인하였다.

2.5.2. Next generation sequencing

아가미와 퇴적물에서 추출된 gDNA의 NGS 수행은 MacroGen (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, MiSeq (Illumina, Inc, US)장비가 사용되었다. 박테리아의 동정을 위해 16s rRNA의 V4 영역을 증폭 및 시퀀싱하였다. 시퀀싱된 DNA 단편집단 (cluster) 중 97%이상 일치도를 나타내는 operational taxonomic unit (OUT)를 선별하여 종수준까지 동정하였다.

3. Result

3.1. Biometry

*P. pisidium*의 평균 각장은 7.0 ± 0.1 (SE)mm 이었으며, 4.6mm ~ 9.3mm의 분포를 보였다. 전체 조직의 습중량은 26.2 ± 2.1 mg이며, 이중 아가미는 4.5 ± 1.4 mg으로 전체 조직 중 약 17.1%를 차지했다. 동일한 수의 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 새꼬막 (*Anadara kagoshimensis*) 및 꼬막 (*Tegillarca granosa*) 개체에서의 조직습중량과 아가미의 습중량을 Table 1에 나타내었으며, *P. pisidium*의 아가미 비율은 공생균이 없는 종에 비해 2배가량 높게 측정되었다.

Table 1. Biological information of *p.pisidium* (n=300)

Species	G-TWT (mg)	TWT (mg)	Ratio (%)
<i>Pillucina pisidium</i>	4.5	26.2	17.2
<i>Ruditapes philippinarium</i>	125.2	2901.8	8.9
<i>Anadara kagoshimensis</i>	328.2	4120.4	8.0
<i>Tegillarca. granosa</i>	229.2	2709.9	8.46

3.2. Light microscopy

아가미 내부의 공간은 내강 (lumen)없이 세포로 밀집되어 있으며 아가미는 조직의 폭의 21%를 차지하였다 (Fig. 2A). 소화맹낭은 축소되어 있었으며, 내장낭 (visceral mass)의 내부는 생식소가 발달되어 있었으며 난세포 (oocyte)의 지름은 $50\mu\text{m}$ 로 측정되었다 (Fig. 2B, C). 자웅동체는 관찰되지 않았다 (Fig. 2D, E).

3.3. Ultrastructure of internal organs

아가미의 절편을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 ciliated zone과 균세포의 영역이 관찰되었다 (Fig. 4A). 아가미의 내부에서는 균세포의 형태가 았았으나 $2\mu\text{m}$ 크기의 박테리아가 밀집되어있었다 (Fig. 4D). 아가미 표면의 섬모영역과 난세포의 내부에서 박테리아의 군집은 관찰되지 않았다 (Fig. 4E-F).

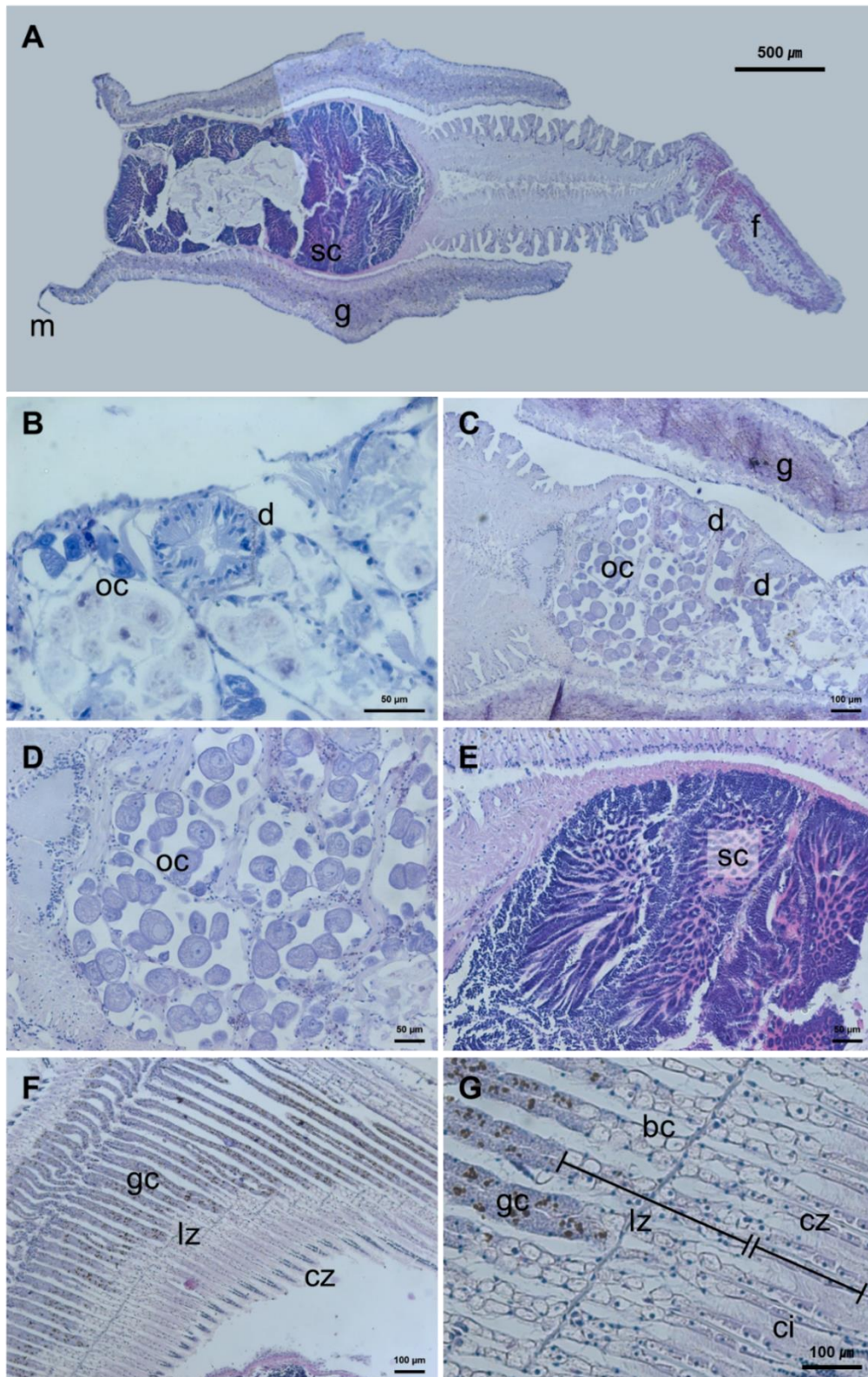


Fig. 2. Microscopic features of *P. pisidium*. (A) transverse section of *P. pisidium*. (B), (C) reduced digestive organs. (D) gonad development (female). (E) gonad development (male). (F), (G) section of gill filaments. Abbreviations: m, mantle; g, gills; f, foot; o, oocyte; d, digestive tube; sc, spermatocyte; gc, granule cyte; lz, lateral zone; cz,

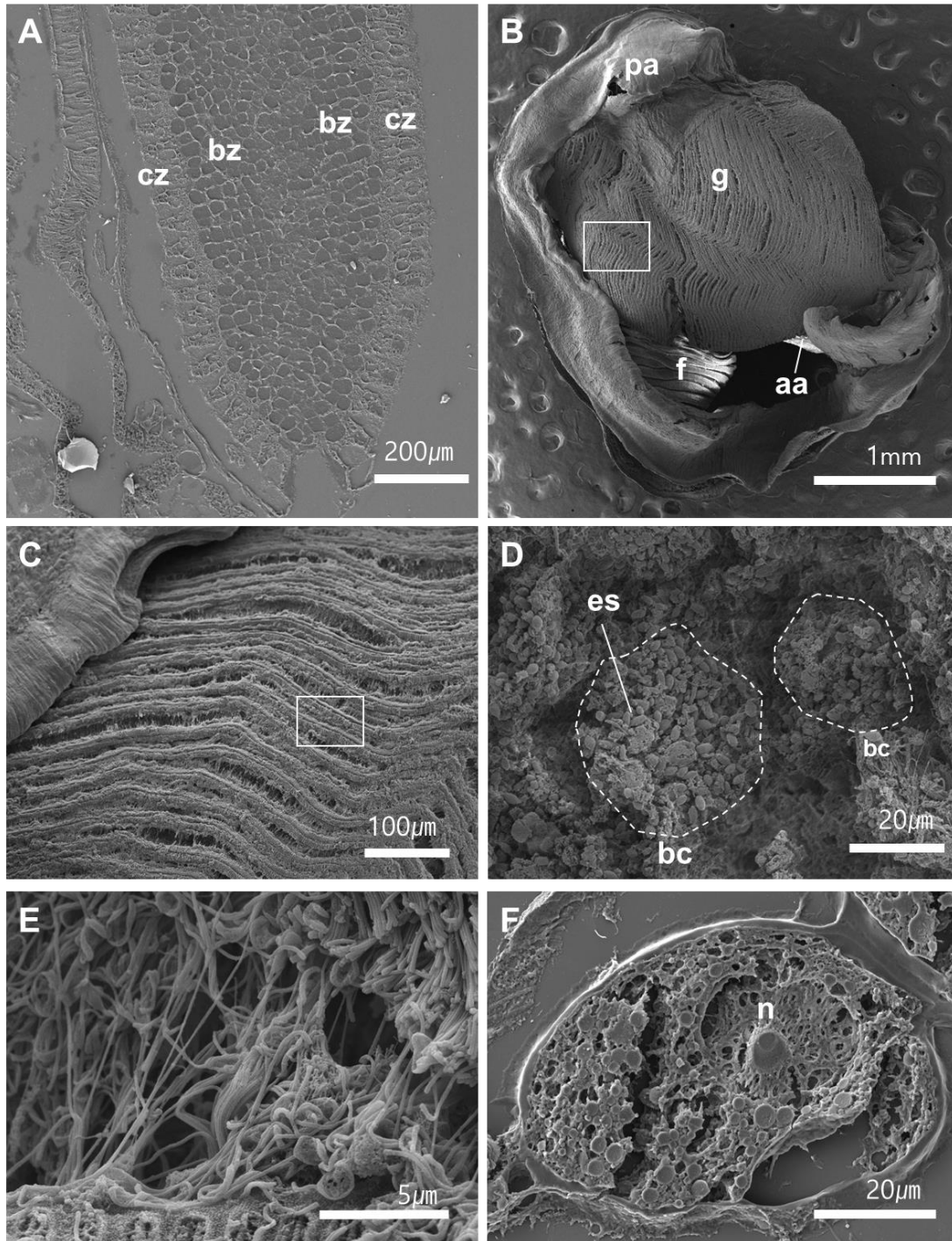


Fig. 3. Ultrastructures of *p. pisidium*. (A) transverse section of the gills. (B), (C) gill. Epithelial zone. (D) endosymbionts in bacteriocyte (E) cilia zone. (F) section of oocyte. Abbreviations: cz, ciliated; bz, bacteriocyte zone; g, gills; f, foot; es, endosymbionts; c, cilia o, oocyte; n, nucleus

3.4. Origin of organic compounds

탄소동위원소비는 아가미 조직에서 $-27.0\sim-24.5\%$ 로 가장 낮은 수치를 보였으며, 발조직에서 $-23.3\sim-21.7\%$, 전체 조직에서 $-24.8\sim-19.9\%$ 의 범위로 분석됐다. 질소동위원소비 측정결과 또한 탄소동위원소비율과 동일한 양상을 보였다. 아가미조직에서 가장 낮은 값 ($-4.3\sim-2.0\%$)을 보였으며, 발조직은 $0.7\sim1.6\%$, 전체 조직은 $-2.0\sim2.5\%$ 의 범위로 측정됐다 (Fig. 5). 전체조직과 발에서의 측정값의 one way ANOVA검정 결과 $\delta^{13}\text{C}$ 의 경우 $p=0.76$, $\delta^{15}\text{N}$ 에서 $p=0.34$ 로 평균값의 유의적 차이는 없었으나, 아가미의 동위원소비와는 차이를 보였다 ($p<0.05$).

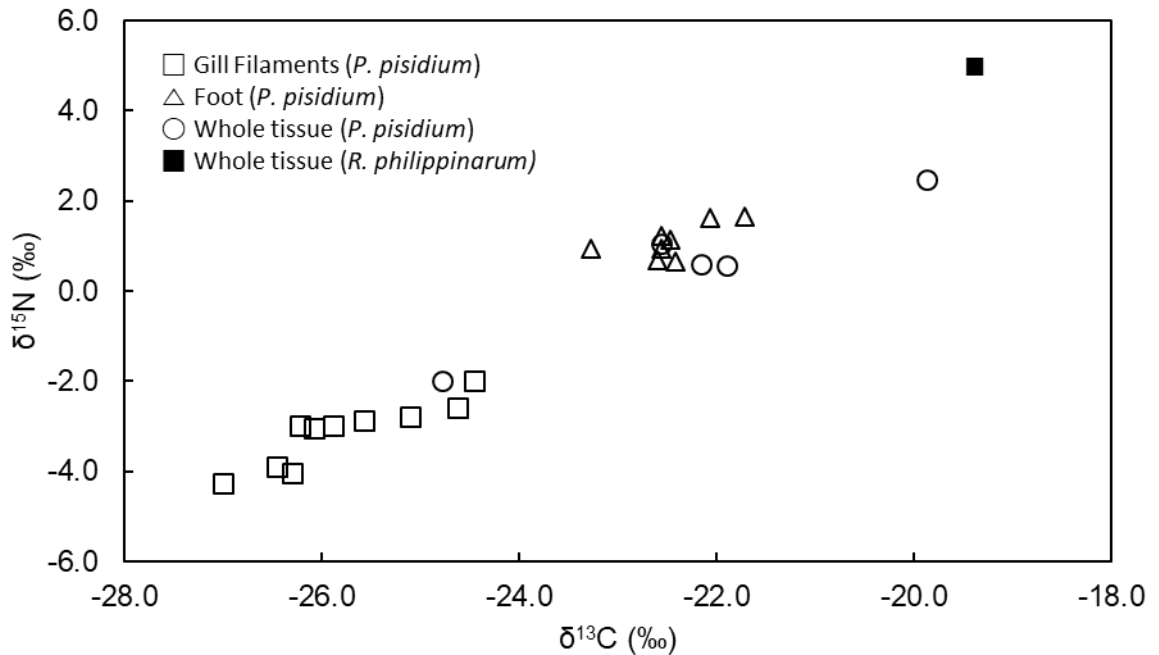


Fig. 4. Stable isotopic ratios of the gills, foot, whole tissue of *P. pisidium* and nonsymbiotic bivalve *R. philippinarum*, as a control in the study site Tongbatarr lagoon on the east coast of Jeju Island

3.5. Bacterial community analysis

아가미조직과 퇴적물 시료에서 각각 107,619, 124,426개의 염기서열을 획득하였으며 이중 chimera, low-quality, ambiguous 등을 제외한 뒤 97%이상의 유사도를 갖는 OTU를 선별하였다. 최종적으로 아가미에서 88개의 OTU (44,003 reads),

퇴적물에서 230OTU (9,222 reads)를 획득하였다. 획득된 OTU의 염기서열과 library의 데이터의 유사성을 의미하는 Good's coverage는 두 시료에서 모두 99.9% 이상으로 모든 OTU는 종 수준까지 동정되었다. 아가미와 퇴적물에서의 Shannon index는 각각 1.44, 5.53로 퇴적물에서 종 수준의 다양성이 높게 관찰된 것을 알 수 있다 (Table 2).

강 (class) 수준에서 아가미 조직과 퇴적물 내 박테리아 군집 분석결과 전체 34개 강이 나타났으며 이중 1% 이상의 풍부도를 보이는 박테리아 분류군을 Fig. 6A에 나타냈다. 아가미 조직에서는 Spirochaetia강이 54.31%로 가장 우점하였으며, Gammaproteobacteria가 43.59%의 비율을 차지했다. 퇴적물 시료에서는 Gamma-proteobacteria가 27.15%로 가장 우점하였으며, Deltaproteobacteria (23.88%) Epsilon-proteobacteria (17.91%) 순으로 강 수준의 relatively advanced가 측정되었다. 종 수준까지 동정한 결과 아가미에서 64종, 퇴적물에서 134종이 확인되었으며, 아가미에서는 Alkalispirochaeta sphaeroplastigenens (class Spirochaetia)가 54.17%로 가장 우점하였고 Sedimenticola thiotaurini (class Gammaproteobacteria) 40.96%를 차지하였다. 아가미에서 발견된 박테리아는 퇴적물에서 또한 존재하였으며, A. sphaeroplastigenens는 퇴적물 시료에서 0.01%, S. thiotaurini는 1.16%의 비율을 차지했다 (Fig. 6B).

Table 2. Clustering result and community richness

	Read count	OTUs	Chao1	Shannon	Good's coverage (%)
Gill filaments	44,003	88	97.75	1.44	99.97%
Sediment	9,222	230	232	5.53	99.94

Table 3. Bacterial community structure in the gill filaments and sediment (Bold: dominant bacterial species in the gill filaments of *P. pisidium*)

Gill filaments of <i>P. pisidium</i>		Sediment	
Species	Relative Abundance	Species	Relative Abundance
<i>Alkalispirochaeta sphaeroplastigenens</i>	54.17%	<i>Sulfurovum lithotrophicum</i>	16.92%
<i>Sedimenticola thiotaurini</i>	40.96%	<i>Thiopfundum lithotrophicum</i>	12.24%
<i>Pseudoalteromonas piratica</i>	1.08%	<i>Desulfosarcina widdelii</i>	11.21%
<i>Arcobacter pacificus</i>	0.64%	<i>Desulfonatronobacter acidivorans</i>	5.70%
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.39%	<i>Actinokineospora spheciospongiae</i>	4.77%
<i>Calothrix desertica</i>	0.35%	<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i>	3.10%
<i>Aestuariibacter halophilus</i>	0.28%	<i>Sedimenticola thiotaurini</i>	1.16%
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	0.25%	<i>Alkalispirochaeta sphaeroplastigenens</i>	0.01%
Others	1.27%	Others	44.88%

4. Discussion

4.1. Study area

잘피는 꽃잎조개 개체군의 서식 밀도 및 크기 분포에 영향을 미치는 중요한 요인으로 작용한다. 이는 잘피가 꽃잎조개류의 대사에 필요한 산소를 공급하고 황화물이 풍부한 퇴적층을 형성할 뿐만 아니라 뿌리와 근경의 복잡한 구조는 포식자의 접근을 제한하기 때문이다 (Heck and Orth, 2006; van der Heide et al., 2012). Takahashi et al. (2013)의 연구에 따르면, Uchinoura (Wakayama, Japan)의 조간대에서 서식환경에 따른 *P. pisidium*의 분포양상을 조사한 결과 *Zostera japonica*가 서식하는 정점에서 밀도 및 단위면적 당 총 중량이 가장 높게 측정된 바 있다 (Takahashi et al., 2013). 또한 Lee et al. (2014)의 제주 동부 통밭알 석호의 연체동물 군집에 관한 연구에서 석호 내 조사 정점 중 *Z. marina* 서식지에서 *P. pisidium*의 밀도가 가장 높게 보고되었다 (Lee et al., 2014). 따라서 본 연구가 수행된 통밭알 석호의 *Z. marina* 또한 *P. pisidium*이 서식하기에 적합한 서식처를 형성하는 것으로 사료된다.

4.2. Acquisition of symbionts

세균의 화학합성에 의존하는 패류는 다양한 방법으로 공생균을 획득하고 세균의 개체군을 조절한다. Vesicomylidae에 속하는 *Calyptogena okutanii*는 산란 시 공생박테리아가 자손에게 전달되는 종으로써 난세포와 초기 유생에서 PCR 과 in situ hybridization (ISH)를 통해 공생 박테리아가 검출되었다. 또한, 전체 genome 분석을 통해 Vesicomylidae의 공생균은 분열에 필요한 유전자가 결핍되어 균세포 밖에서 생존이 제한되며, 분열은 숙주로부터 전사된 박테리아 분열 유전자에 의해 조절됨이 밝혀졌다 (Kuwahara et al., 2007). 반면, *Bathymodiolus* (Family: Mytilidae), *Thyasira* (Family: Thyasiridae) 및 *Codakia* (Family: Lucinidae)는 유생단계의 아가미와 난세포에서 공생균이 검출되지 않았으며, 기질에 착저 후 환경으로부터 박테리아를 획득하는 것으로 알려져 있다 (Brissac et al., 2009; Caro et al., 2007, 2009; Elisabeth et al., 2014; Gros et al., 1999, 2003; Kleiner et al., 2012). 비록 PCR 또는 ISH를 통해 *P. pisidium*의 생식소에서 정량적인 박테리아의 검출이 추가적으로 필요하나, 전자현미경을 통해 박테리아의 분포는 아가미 내부에서만 확인되었으며 섬모 및 난세포에서는 관찰되지 않았고 (Fig. 3), *P. pisidium*의 아가미에서 검출된 박테리아 종이 퇴적물에서도 존재하는 것으로 *P. pisidium*의 공생 박테리아는 번식 시 전달되지 않으며, 환경을 통해 획득되는 것으로 판단된다. 또한 *P. pisidium*의 아가미내부의 박테리아 군집구조에서 *A. sphaeroplastigenens*와 *S. thiotaurini* 가 각각 54.17% 및 40.96%의 높은 비율로 우점하는 반면, 퇴적물 시료에서는 1.16% 및 0.01%로 낮은 비율로 측정되었으며 (Table 3), 이는 *P. pisidium*이 능동적으로 미생물 군집을 조절한 결과로 해석된다.

4.4. Bacteria-host interaction

이 연구에서는 *P. pisidium*을 구성하는 유기물의 기원을 파악하고자 탄소와 질소의 안정동위원소비를 측정하였다. 그 결과, 2010년 동일한 지역에서 채집된 바지락에 비해 탄소는 약 4% 이상, 질소의 경우 5% 이상으로 가벼운 동위원소의 비율이 높게 측정되었다 (Fig. 4). 이러한 동위원소 비율의 차이는 화학합성에 의한 탄소고정 뿐만 아니라 박테리아의 무기질소 고정으로 설명된다.

일반적으로 바지락의 탄소동위원소비는 서식지의 입자성유기물질 (particulate organic matter; POM)의 측정값의 범위 내에 분포하는데, 이는 수층의 플랑크톤이 여과식자인 바지락의 주요 먹이원이며, 유기탄소가 상위 영양단계로 이동할 때 약 0.4 ~ 1%의 비교적 낮은 비율로 무거운 동위원소가 축적되기 때문이다 (Fry and Sherr, 1989; McCutchan et al., 2003; Kharlamenko et al., 2001). 반면, 화학합성균과 공생하는 패류는 아가미 내 박테리아에 의해 고정된 유기물에 의존하기 때문에 공생균이 없는 패류에 비해 가벼운 원소의 비율이 높게 나타난다 (Fisher and Childress, 1992; Robinson et al., 1995). 유기물 획득을 화학합성 박테리아에 전적으로 의존하는 *Solemya velum* (Family: Solemyidae)에서 -38.4 에서 -45.3%의 탄소동위원소비가 측정된 바 있으며 (Conway and Capuzzo, 1991), 일부 *Thyasira*에서 또한 -38%의 동위원소비를 보였다 (Fiala-Médioni et al., 1993). 하지만, 다양한 공생패류들이 세균의 동화작용 뿐만 아니라 여과섭이를 통해 수층의 유기물을 획득하는 혼합영양생물 (mixotroph)로 알려져 있으며, 이 경우 $\delta^{13}\text{C}$ 는 -28 ~ -20%의 비율을 보인다 (Petersen et al., 2017). 따라서 본 연구에서 측정된 *P. pisidium* 전체조직의 탄소 동위원소비 (-24.8 ~ -19.9%)를 통해 *P. pisidium*은 혼합영양생물임을 판단할 수 있다. 전체조직과 발 조직에 비해 아가미에서 ^{12}C 의 비율은 3.4%의 차이를 보였는데, 이러한 차이는 아가미에서 고정된 유기물이 전체 조직으로 이동할 때의 분별작용보다 높은 수치로써, 화학합성으로 인한 탄소동화 뿐만 아니라 외부 유기

물의 소화가 이루어진 결과로 사료된다.

질소동위원소 비율은 에너지 대사에 있어 공생균의 기여를 확인하는 지표로써 이용된다 (Zanden & Rasmussen, 2001). 질소는 아미노산 형태로 상위 영양 단계로 이동하며, 아미노 전이 (transamination) 또는 탈아미노 (deamination) 과정에서 ^{15}N -amine 그룹이 선호되고 ^{14}N -amine 그룹이 우선 배출되는 분별현상이 나타난다 (O'Brien and Rio, 1997). 반면, 질소고정균과 공생하는 동물의 경우 ^{14}N 은 배출되지 않고 내부 공생박테리아에게 공급되어 재순환되는 과정으로 종속영양 생물에 비해 ^{14}N 의 비율이 높아지는 경향을 보인다 (Sigman et al., 2009). 박테리아에 의한 질소 동화작용은 질소원의 종류에 따라 상이한 동위원소비를 나타낸다. 대기중 질소 (N_2)의 안정동위원소비는 0‰로 알려져 있으며, 질소고정박테리아 (diazotroph)에 의해 고정되어 -2‰ 에서 0‰의 비율을 나타낸다 (Fry, 2007). 반면 ammonium, urea 또는 질산염 (nitrate) 등 용존무기질소의 동화는 4‰ 에서 6‰로 비교적 무거운 양상을 보인다 (Sigman et al., 2009) 공생 박테리아는 환경 조건에 따라 다양한 형태의 질소화합물을 대사에 이용한다고 알려져 있다 (Cardini et al., 2019; König et al., 2016). 본 연구에서 측정된 *P. pisidium*의 질소 동위원소비는 아가미 조직에서 -4.3‰에서 -2.0‰을 보여 공생박테리아에 의한 질소동화과정이 있음이 사료되며, 전체 조직에서 측정된 -2.0‰에서 2.5‰의 비교적 넓은 범위의 질소 동위원소비는 아가미에서 조직으로 전달되는 과정에서의 분별작용 외에도 박테리아의 질소동화과정에서 다양한 질소화합물이 이용되기 때문이라고 생각된다.

Rodionov and Yushin (1991)은 *P. pisidium* 아가미 내부 박테리아의 형태적 연구를 통해 2가지 형태의 박테리아를 보고한 바 있으며, 본 연구 NGS에서 또한 *S. thiotaurini*와 *A. sphaeroplastigenens*가 95.1%로 우점하여 *P. pisidium*의 에너지대사에

영향을 미치는 주요 박테리아로 사료된다. *S. thiotaurini*가 속하는 class Gammaproteobacteria는 해양환경 내에서 주로 호기성 호흡을 통해 에너지를 생산하는 것으로 알려져 있으며, 용존산소가 분포하는 상층부 퇴적물에 서식한다 (da Silva et al., 2013). 갈피장 또는 mangrove 등 천해환경에 서식하는 대부분의 Lucinidae에서 Gammaproteobacteria가 보고 되었으며, *Codakia orbiculate*와 *Stewartia floridana*에서는 Sedimenticola가 우점하는 것으로 보고되었다 (Goemann, 2015; Petersen et al., 2017). 또한 König et al. (2016)은 *S. thiotaurini*에서 황산화효소 (flavocytochrome) 유전자의 발현을 확인하였으며, 용존질소 고정에 관여하는 nitrogenase을 비롯하여 암모니아 및 아질산 고정효소를 발견한바 있다. 따라서 *S. thiotaurini*의 황과 질소대사를 통해 유기물을 생산하는 기능은 *P. pisidium*를 구성하는 박테리아 기원 유기물과 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다. *P. pisidium*의 아가미에서 가장 많은 비율을 차지하는 *A. sphaeroplastigenens*는 현재까지 Lucinidae에서 발견된 기록은 없으며, *A. sphaeroplastigenens*가 속하는 Spirochaetaceae는 일부 Lucinidae에서 5.5%의 낮은 비율로 관찰된 바 있다 (Lim et al., 2019). 하지만 *Spirochaeta (AlkaiSpirochaeta)*는 황화수소가 풍부한 퇴적물에 서식하는 것으로 알려져 있으며 단일 균주배양시 N₂가 없는 배지에서 증식이 되지 않은 점으로 질소고정기능이 확인된 바 있다 (Reddy et al., 2013; Sravanthi et al., 2016). 따라서 *A. sphaeroplastigenens* 또한 *P. pisidium*의 대사에 관여한다고 사료된다.

References

- 이희중, 박상률, 홍현기, 이병걸, & 최광식. (2014). 제주 동부연안 통박알 석호의 연체동물상 보고. *The Korean Journal of Malacology*, 30(1), 95-99.
- Allen, J. (1953). Function of the foot in the Lucinacea (Eulamellibranchia). *Nature*, 171(4364), 1117-1118.
- Allen, J. (1958). On the Basic Form and Adaptations to Habitat in the Lucinacea (Eulamellibranchia). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 421-484.
- Arp, A. J., & Childress, J. J. (1983). Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science*, 219(4582), 295-297.
- Brissac, T., Rodrigues, C. F., Gros, O., & Duperron, S. (2011). Characterization of bacterial symbioses in *Myrtea* sp.(Bivalvia: Lucinidae) and *Thyasira* sp.(Bivalvia: Thyasiridae) from a cold seep in the Eastern Mediterranean. *Marine Ecology*, 32(2), 198-210.
- Cardini, U., Bartoli, M., Lee, R., Luecker, S., Mooshammer, M., Polzin, J., . . . Petersen, J. (2019). Chemosymbiotic bivalves contribute to the nitrogen budget of seagrass ecosystems. *bioRxiv*, 537746.
- Caro, A., Got, P., Bouvy, M., Troussellier, M., & Gros, O. (2009). Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(10), 3304-3313.
- Cavanaugh, C., McKinness, Z., Newton, I., & Stewart, F. (2006). Marine chemosynthetic symbioses. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbial Community* (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E, eds). In: Springer, New York.

- Cavanaugh, C. M., Gardiner, S. L., Jones, M. L., Jannasch, H. W., & Waterbury, J. B. (1981). Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science*, 340-342.
- Childress, J., Arp, A., & Fisher, C. (1984). Metabolic and blood characteristics of the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila*. *Marine Biology*, 83(2), 109-124.
- Childress, J., Fisher, C., Favuzzi, J., Arp, A., & Oros, D. (1993). The role of a zinc-based, serum-borne sulphide-binding component in the uptake and transport of dissolved sulphide by the chemoautotrophic symbiont-containing clam *Calyptogena elongata*. *Journal of Experimental Biology*, 179(1), 131-158.
- Comitet, T., & Krylova, E. M. (1999). *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores triple junction and the Logatchev hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge. *Veliger*, 42(3), 218-248.
- Distel, D., & Felbeck, H. (1987). Endosymbiosis in the lucinid clams *Lucinoma aequizonata*, *Lucinoma annulata* and *Lucina floridana*: a reexamination of the functional morphology of the gills as bacteria-bearing organs. *Marine Biology*, 96(1), 79-86.
- Dubilier, N., Bergin, C., & Lott, C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 725.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pernthaler, A., McKiness, Z. P., . . . Dubilier, N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 8(8), 1441-1447.
- Duperron, S., Fiala-Medioni, A., Caprais, J.-C., Olu, K., & Sibuet, M. (2007). Evidence for chemoautotrophic symbiosis in a Mediterranean cold seep clam (Bivalvia: Lucinidae): comparative sequence analysis of bacterial 16S rRNA, APS reductase and Ru-bisCO genes. *FEMS microbiology ecology*, 59(1), 64-70.

- Duperron, S., Gaudron, S., Rodrigues, C., Cunha, M., Decker, C., & Olu, K. (2013). An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, *10*(5), 3241-3267.
- Duperron, S., Halary, S., Lorion, J., Sibuet, M., & Gaill, F. (2008). Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environmental Microbiology*, *10*(2), 433-445.
- Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.-C., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Amann, R., & Dubilier, N. (2005). Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp. mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (Southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl. Environ. Microbiol.*, *71*(4), 1694-1700.
- Duplessis, M., Dufour, S., Blankenship, L., Felbeck, H., & Yayanos, A. (2004). Anatomical and experimental evidence for particulate feeding in *Lucinoma aequizonata* and *Parvilucina tenuisculpta* (Bivalvia: Lucinidae) from the Santa Barbara Basin. *Marine Biology*, *145*(3), 551-561.
- Duplessis, M. R., Ziebis, W., Gros, O., Caro, A., Robidart, J., & Felbeck, H. (2004). Respiration strategies utilized by the gill endosymbiont from the host lucinid *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, *70*(7), 4144-4150.
- Elisabeth, N. H., Caro, A., Césaire, T., Mansot, J.-L., Escalas, A., Sylvestre, M.-N., . . . Gros, O. (2014). Comparative modifications in bacterial gill-endosymbiotic populations of the two bivalves *Codakia orbiculata* and *Lucina pensylvanica* during bacterial loss and reacquisition. *FEMS microbiology ecology*, *89*(3), 646-658.
- Fiala-Médioni, A., Métivier, C., Herry, A., & Le Pennec, M. (1986). Ultrastructure of the gill of the hydrothermal-vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Marine Biology*, *92*(1), 65-72.
- Fisher, C., Kennicutt, M., & Brooks, J. (1990). Stable carbon isotopic evidence for carbon limitation in hydrothermal vent vestimentiferans. *Science*, *247*(4946), 1094-1096.
- Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology* (Vol. 521): Springer.

- Fry, B., & Sherr, E. B. (1989). $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. In *Stable isotopes in ecological research* (pp. 196-229): Springer.
- Gannes, L. Z., O'Brien, D. M., & Del Rio, C. M. (1997). Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology*, 78(4), 1271-1276.
- GLOVER, E. A., TAYLOR, J. D., & ROWDEN, A. A. (2004). Bathyaustriella thionipta, a new lucinid bivalve from a hydrothermal vent on the Kermadec Ridge, New Zealand and its relationship to shallow-water taxa (Bivalvia: Lucinidae). *Journal of Molluscan Studies*, 70(3), 283-295.
- Goemann, A. M. (2015). Rare occurrences of free-living bacteria belonging to Sedimenticola from subtidal seagrass beds associated with the lucinid clam, Stewartia floridana.
- Gros, O., Darrasse, A., Durand, P., Frenkiel, L., & Moueza, M. (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve Codakia orbicularis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7), 2324-2330.
- Gros, O., DUPLESSIS, M. R., & FELBECK, H. (1999). Embryonic development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam Lucinoma aequizonata (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate reproduction & development*, 36(1-3), 93-103.
- Gros, O., Frenkiel, L., & Moueza, M. (1997). Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam Codakia orbicularis (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology*, 86-101.
- Gros, O., Liberge, M., Heddi, A., Khatchadourian, C., & Felbeck, H. (2003). Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (Thalassia testudinum environment). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(10), 6264-6267.
- Heck Jr, K. L., & Orth, R. J. (2007). Predation in seagrass beds. In *Seagrasses: biology, Ecology and conservation* (pp. 537-550): Springer.

- Herry, A., Diouris, M., & Le Pennec, M. (1989). Chemoautotrophic symbionts and translocation of fixed carbon from bacteria to host tissues in the littoral bivalve *Loripes lucinalis* (Lucinidae). *Marine Biology*, *101*(3), 305-312.
- Holmer, M., Duarte, C. M., & Marbá, N. (2003). Sulfur cycling and seagrass (*Posidonia oceanica*) status in carbonate sediments. *Biogeochemistry*, *66*(3), 223-239.
- Kenk, V. C. (1985). A new mussel (*Bivalvia*, Mytilidae) from hydrothermal vents in the Galapagos Rift zone. *Malacologia*, *26*, 253-271.
- Kharlamenko, V., Kiyashko, S., Imbs, A., & Vyshkvartzev, D. (2001). Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Marine Ecology Progress Series*, *220*, 103-117.
- Koenig, S., Gros, O., Heiden, S. E., Hinzke, T., Thuermer, A., Poehlein, A., . . . Toczny, J. (2016). Nitrogen fixation in a chemoautotrophic lucinid symbiosis. *Nature microbiology*, *2*(1), 1-10.
- Lim, S. J., Alexander, L., Engel, A. S., Paterson, A. T., Anderson, L. C., & Campbell, B. J. (2019). Extensive Thioautotrophic Gill Endosymbiont Diversity within a Single *Ctena orbiculata* (*Bivalvia*: Lucinidae) Population and Implications for Defining Host-Symbiont Specificity and Species Recognition. *mSystems*, *4*(4), e00280-00219.
- Morton, B. (1983). Feeding and digestion in *Bivalvia*. *The Mollusca. Physiology Part*, *2*, 65-147.
- Paull, C., Jull, A. T., Toolin, L., & Linick, T. (1985). Stable isotope evidence for chemosynthesis in an abyssal seep community. *Nature*, *317*(6039), 709.
- Petersen, J. M., Kemper, A., Gruber-Vodicka, H., Cardini, U., Van Der Geest, M., Kleiner, M., . . . Seah, B. K. (2017). Chemosynthetic symbionts of marine invertebrate animals are capable of nitrogen fixation. *Nature microbiology*, *2*(1), 16195.

- POWELL, M. A., & Somero, G. N. (1983). Blood components prevent sulfide poisoning of respiration of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science*, 219(4582), 297-299.
- Reddy, S. V., Aspana, S., Tushar, D., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2013). Spirochaeta sphaeroplastigenens sp. nov., a halo-alkaliphilic, obligately anaerobic spirochaete isolated from soda lake Lonar. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(6), 2223-2228.
- Rodionov, I., & Yushin, V. (1991). PROKARYOTIC SYMBIONTS IN GILL CELLS OF THE BIVALVE MOLLUSK *PILLUCINA-PISIDIUM*. *BIOLOGIYA MORYA-MARINE BIOLOGY*(1), 39-46.
- Samanta, P., Shin, S., Jang, S., Song, Y.-C., Oh, S., & Kim, J. K. (2019). Stable carbon and nitrogen isotopic characterization and tracing nutrient sources of *Ulva* blooms around Jeju coastal areas. *Environmental Pollution*, 254, 113033.
- Southward, E. C. (1986). Gill symbionts in thyasirids and other bivalve molluscs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(4), 889-914.
- Stanley, S. M. (2014). Evolutionary radiation of shallow-water Lucinidae (Bivalvia with endosymbionts) as a result of the rise of seagrasses and mangroves. *Geology*, 42(9), 803-806.
- Taylor, J. D., & Glover, E. A. (2000). Functional anatomy, chemosymbiosis and evolution of the Lucinidae. *Geological Society, London, Special Publications*, 177(1), 207-225.
- Taylor, J. D., & Glover, E. A. (2006). Lucinidae (Bivalvia)—the most diverse group of chemosymbiotic molluscs. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148(3), 421-438.
- Taylor, J. D., Glover, E. A., Smith, L., Dyal, P., & Williams, S. T. (2011). Molecular phylogeny and classification of the chemosymbiotic bivalve family Lucinidae (Mollusca: Bivalvia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 163(1), 15-49.

- Thresher, R. E., Nichols, P. D., Gunn, J. S., Bruce, B. D., & Furlani, D. M. (1992). Seagrass detritus as the basis of a coastal planktonic food chain. *Limnology and Oceanography*, 37(8), 1754-1758.
- UEDE, T., YAMAUCHI, M., & TAKAHASHI, Y. (2013). Distribution and Habitat Environment of *Pillucina pisidium* (Bivalvia, Lucinidae) in *Zostera japonica* Beds in the Intertidal Zone at Uchinoura, Tanabe Bay, Wakayama, Japan. *Japanese Journal of Benthology*, 68, 28-36.
- van der Heide, T., Govers, L. L., de Fouw, J., Olf, H., van der Geest, M., van Katwijk, M. M., . . . Smolders, A. J. (2012). A three-stage symbiosis forms the foundation of seagrass ecosystems. *Science*, 336(6087), 1432-1434.
- Venn, A., Loram, J., & Douglas, A. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of experimental botany*, 59(5), 1069-1080.
- Zamorano, P., & Hendrickx, M. E. (2012). Distribution of *Lucinoma heroica* (Mollusca: Bivalvia: Lucinidae) in the minimum oxygen zone in the Gulf of California, Mexico. *Marine Biodiversity Records*, 5. doi:10.1017/s1755267212000644

Acknowledgements

실험실에 들어와 석사학위과정을 마치기까지 2년동안 많은 분들의 도움이 있었기에 성공적으로 학위 과정을 마칠 수 있었습니다. 이 논문을 빌어 감사의 말씀을 전합니다.

가장 먼저 흥미로운 연구주제를 제공해주시고, 연구자의 기본을 지도해주신 최광식 교수님, 부족한 저에게 과학자의 길을 열어주심에 깊은 감사를 드립니다. 안정동위원소 분석을 흔쾌히 수락해주시고 조언을 주신 광주과학기술원 강창근 교수님과 학교 안팎에서 충고해주시고 응원해주시는 한국해양과학기술원 강도형 박사님 정말 감사드립니다. 또한 석사과정 동안 수업과 세미나를 통해 조언해주시고 지적해주신 전유진 교수님, 이제희 교수님, 이경준 교수님께도 감사드립니다.

지난 2년간 하루의 대부분을 함께했던 실험실 동료들과 즐거웠던 추억, 고생했던 추억을 생각하면 정말 행복한 기간이었던 것 같습니다. 2년간 함께해준 실험실 식구들에게도 감사의 말씀을 드립니다. 퇴근 후 시간을 함께 보내며 실험실 생활에 많은 조언을 해주신 홍현기 박사님, 실험실 실장으로 항상 고생하시고 세심한 부분까지 챙겨주시는 이혜미 누나, 실험실 생활을 하면서 힘든일이 있을 때 가장 먼저 도와주시는 조영관 형, 샘플 채집을 함께해주고 작은 크기를 측정하는데 고생해준 Subramaniam Thachaneshkanth, 여러 실험 방법을 알려준 Nainanayaka Pathirannehelage Harshani, 더운 날씨에 함께 채집해준 이경태형, 항상 서로 의지가 되는 동기 김정화, 항상 술선수범하는 가지노 노부히사, 먼 타지에서 고생해주는 Mai Nguyen Anh Thu에게도 깊은 감사를 드립니다.

어린시절부터 과학자의 꿈을 갖게 해주시고 물심양면으로 지원해주시는 부모님, 지금까지의 사랑과 응원에 감사드립니다. 아직 많이 부족하지만 열심히 수학하여 당신의 자부심이 되겠습니다.