

제주도 습은물벙뒤 습지 서식 *Alphaproteobacteria* 및 *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 신변이주의 특성

김하늘 · 강지영¹ · 최재희² · 최정욱 · 이상훈³ · 김태의⁴ · 이하나⁵ · 장광엽¹
조장천² · 이현환 · 김규중³ · 김승범⁴ · 천중식⁵ · 조기성*

한국외국어대학교 자연과학대학 생명공학과, ¹전북대학교 자연과학대학 생명과학과
²인하대학교 자연과학대학 생명과학과, ³강릉원주대학교 자연과학대학 생물학과
⁴충남대학교 생명시스템과학대학 미생물분자생명과학과, ⁵서울대학교 자연과학대학 생명과학부

Novel Taxa Belonging to the Class *Alphaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria*, Isolated from the Sumunmulbengdui Wetland Area of Jeju Island

Haneul Kim, Ji Young Kang¹, Jaehee Choi², Jeong-Uk Choe, Sanghoon Lee³, Tae-Ui Kim⁴,
Hana Yi⁵, Kwangyeop Jahng¹, Jang-Cheon Cho², Hyune Hwan Lee, Kyujoong Kim³,
Seung Bum Kim⁴, Jongsik Chun⁵ and Kiseong Joh*

Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies,
Yongin 449-791, Korea

¹Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Korea

³Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

⁴Department of Microbiology & Molecular Biology, Chungnam National University,
Daejeon 305-764, Korea

⁵School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract – In this study, samples were collected from the Sumunmulbangdui wetland at the Halla Mountain in Jeju Island in order to isolate novel bacterial strain. Bacterial strains belonging to the class *Alphaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria* were isolated after spreading samples onto solid agar media. The 16S rRNA gene sequences of the strains assigned to the two classes were compared to those of type strains of the species. The strains that showed less than 98.7% 16S rRNA gene sequence similarity to the validly published species were considered to be novel species candidates. A total of 19 strains were regarded as novel strains which can be regarded as novel species candidates. In the *Alphaproteobacteria*, 6 novel strains were affiliated with the genera *Novosphingobium*, and *Rhizobium*. A total of 13 novel strains belong to *Gammaproteobacteria* that assigned to the family *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, and *Enterobacteriaceae* were identified. Cultural, physiological, chemotaxonomic characteristics and fatty acids compositions have been determined for the novel species candidates, and the characteristics are described in this study.

Key words : Sumunmulbangdi, wetland, bacterial diversity, novel strains, 16S rRNA

* Corresponding author: Kiseong Joh, Tel. 031-330-4271,
Fax. 031-330-4566, E-mail. ksjo@hufs.ac.kr

서 론

습지는 육상생태계와 수생태계의 경계에 해당하는 전이지역으로 독특한 물리화학적, 생물학적 특성을 나타내고 있다. 습지는 상당기간 동안 토양이 물에 침수되어 있는 수문학적 특성, 이탄의 축적이나 환원철의 침적으로 농축되는 토양적 특성, 침수식물 및 이와 연관되어 생활하는 다양한 생물상으로 특징되는 공간으로(강 2004) 종다양성이 높은 생태계로 보고되고 있다(Mitsch and Gosselink 1993). 습지는 일반적으로 내륙습지와 해안습지로 구별되며, 이 중 내륙습지에는 이탄습지(peatland), 소택지(marsh), 하변습지(riparian wetland), 열대습지(swamp) 등이 있고 해안습지로는 갯벌(mud flat), 염습지(salt marsh), 홍수림(mangrove) 등이 있다. 습지가 지구표면에서 차지하고 있는 비율은 2~6%에 지나지 않으며 경제적 이익이나 생태학적 중요성 역시 거의 알려져 있지 않아 지금까지 여러 나라에서 개발 등의 목적으로 지속적으로 파괴되었다. 그러나 20세기 후반 이후 이의 환경적 중요성이 알려진 이후 보호의 대상으로 전환되고 있다.

우리나라 습지의 82%는 갯벌을 포함한 해안습지이며(강 2004) 상대적으로 산지습지를 포함한 내륙습지의 면적은 작은 편이다. 습은물벙뒤 습지는 제주 한라산의 해발 1,000~1,100 m 고지에 위치하고 있는 고지습지로서 주변에 삼형제오름, 노로오름, 한대오름, 붉은오름, 살핀오름 등으로 둘러싸여 있으며 약 100 ha 정도 면적의 타원형을 띠고 있다. 지금까지는 주변이 산지로 둘러싸여 있는 지리적 특성 등에 의해 인간의 접근성이 낮아 자연적 환경을 상당 부분 유지하고 있었으나 최근 관광자원으로서의 개발계획이 수립되고 있어 생태학적 특성에 대한 연구와 생물학적 다양성에 대한 조사가 긴급히 요구되고 있는 지역의 하나이다. 그러나 우리나라 습지연구의 대부분은 대부분 습지식물 및 이와 연관되어 서식하고 있는 일부 소형 동물분류군에 집중되고 있으며 세균 및 archaea에 대한 연구는 거의 없다 할 수 있다. 그러나 습지는 단위 면적당 일차생산성이 가장 높은 생태계의 하나로 생태계 내 유기물 농도가 매우 높을 뿐 아니라 호기성 환경과 혐기성 환경이 모두 포함되어 있어 매우 다양한 종류의 미생물들이 서식할 수 있는 환경이다. 따라서 지금까지 발견되지 않은 많은 미생물자원이 이 환경에 서식하고 있으리라 예상되어, 인간에 의한 간섭이 이루어지기 전에 이들을 분리, 확보하려는 노력이 시급히 요구되고 있다.

Alphaproteobacteria 강에는 *Rhodospirillales*, *Ricketti-*

ales, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*, *Caulobacterales*, *Rhizobiales*의 6목(order)이 포함되어 있다(Brenner *et al.* 2005). 이 분류군에는 대부분의 빈영양성세균들이 포함되어있어 특히 해양환경에 서식하는 세균들이 이 분류군에 많이 포함되어 있다. 또한 식물(Takeuchi *et al.* 1995) 및 동물들과 공생 혹은 기생하는 세균들도 이 분류군에 속하는 것들이 많은 것으로 알려져 있으며(Willey *et al.* 2011) 이에 따라 일부 병원성미생물들도 이에 포함된다. *Gammaproteobacteria*에는 *Chromatiales*, *Xanthomonadales*, *Cardiobacteriales*, *Thiotrichales*, *Legionellales*, *Methylococcales*, *Oceanospirillales*, *Pseudomonadales*, *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales*, *Enterobacteriales* 등의 13목이 포함되어 있다. *Proteobacteria* 문에 속하는 강(class) 중 가장 큰 강이며 생리적으로 매우 다양한 특성을 갖고 있다. 대부분 중속영양세균이며 facultative anaerobic이 많다(Bouvet and Grimont 1986). 많은 종의 장내 세균들이 이 분류군에 포함되어 있기도 하다.

본 연구에서는 한라산 제주도 습은물벙뒤 습지에서 담수 및 토양시료를 채취하여 세균을 분리하고 16S rRNA 유전자 염기서열을 규명하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열의 유사도가 기준에 발표된 종과 현저한 차이(99% 미만)를 나타내는 균주를 변이주로 간주하여 형태학적, 생리학적, 화학분류적 특징을 조사하였다. 이들 대부분은 98.7% 이상의 염기서열 차이를 나타내어 새로운 종(species)의 후보로 간주되기도 한다(Stackebrandt and Ebers 2006). 따라서 본 논문에서는 제주도 습은물벙뒤 습지에서 분리한 *alphaproteobacteria* 및 *gammaproteobacteria* 강에 속하는 새로운 균주들의 기본적 특성을 기재하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료 채취 및 균주의 분리

2010년 9월 21일 제주도 한라산 습은물벙뒤 습지(33° 21'53.8"N 126° 27'0.03"E)에서 토양 및 담수시료를 채취하였다. 각 시료는 멸균된 50 mL 시험관을 이용하여 채취하였다. 채취한 시료를 순차적 희석방법을 이용하여 희석한 다음, Nutrient agar (BD Difco, USA), R2A agar (BD Difco, USA) 및 LB agar (BD Difco, USA)에 도말 후 20~30°C에서 1주일 이상 배양하여 단일콜로니를 분리하였다. 균주는 동일한 배지와 온도에서 계대배양하여 순수 분리하였다. 순수 배양된 균주는 10~20% 글리세롤 수용액에 현탁하여 -70~80°C에 동결 보관하였다.

2. 선별된 균주의 16S rRNA 염기서열 분석

분리한 균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 위하여 27F (5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGY TACCTTGTACGACTT-3') 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 진행하였다. 증폭된 산물은 정제한 후 MacroGen, Inc. (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 균주의 염기서열은 GenBank의 BLASTn을 이용하여 근연 염기서열을 결정한 후 EzTaxon server 2.1 (Chun et al. 2007)을 이용하여 종 수준을 동정하고 근연종을 분석한 다음 계통도를 작성하였다. 계통도 작성은 MEGA version 4 program을 이용하였다 (Tamura et al. 2007).

3. 표현형 특징 분석

신종후보 균주의 배양학적 특징, 생리적인 특징, 세포 형태 및 그람염색 특성을 알아보았다. 균주의 분리 및 계대와 표현형 특징 분석은 동일한 배지를 이용하였다. 생리화학적 특징을 알아보기 위하여 API 20NE kit (bioMérieux, France)를 사용하였다. 세포의 지방산 분석은 MIDI

Microbial Identification System에 따라서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 신종후보 균주의 총괄

한라산 숨은물벙뒤 습지에서 분리된 다양한 세균 중 *alphaproteobacteria* 및 *gammaproteobacteria* 강에 해당하는 균주들을 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 선별한 다음, 표준균주 (type strain)와 16S rDNA 서열의 유사도를 비교하였다. 표준균주와 98.7% 미만의 유사도를 보인 균주의 총 수는 *alphaproteobacteria*의 경우 6개 균주 (Table 1), *gammaproteobacteria*는 13개였다 (Table 2). 이들 중 12개 균주가 2% 이상의 16S rDNA 염기서열 차이를 나타내어 보다 엄격한 기준으로도 신변이주가 아닌 신종후보로서 간주되고 있으며 *gammaproteobacteria*에 속하는 분리균주 중 *Pseudomonas* 속에 속하는 JSC-R3-221-1 균주는 염기서열의 최근연종과의 차이가 98.71%

Table 1. Summary of novel strains in the class *alphaproteobacteria*, isolated from Sumunmulbangdui wetland

Characteristic	KSJ-HME6881	JSC-R3-424-3	JSC-P2-623-2	JSC-R2-221-1	KJK-IW4100910-01	JSC-P2-622-8
Most related species	<i>Novosphingobium capsulatum</i>	<i>Novosphingobium rosa</i>	<i>Novosphingobium sediminicola</i>	<i>Novosphingobium sediminicola</i>	<i>Rhizobium vitis</i>	<i>Rhizobium vitis</i>
Similarity (%)	98.39	97.81	96.81	98.20	97.70	97.99
Ccell morphology	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Gram-staining	negative	negative	negative	negative	negative	negative
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	+
Indole production	-	-	-	-	+	-
Glucose fermentation	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	-
Urease	-	-	-	-	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	-	-	+	+
Gelatinase	-	-	-	-	-	-
PNPG (β -galactosidase)	+	+	-	-	-	+

Table 2. Fatty acid composition (%) of novel strains in the class *alphaproteobacteria*, isolated from Sumunmulbangdui wetland

Fatty aci	KSJ-HME6881	JSC-R3-424-3	JSC-P2-623-2	JSC-R2-221-1	KJK-IW4100910-01	JSC-P2-622-8
C _{12:0}	nd	7.82	tr	tr	nd	tr
C _{12:0} aldehyde and/or unknown 10.9525	nd	nd	nd	10.33	29.84	5.46
C _{13:1} at 12-13	nd	nd	nd	nd	5.44	nd
C _{14:0}	nd	tr	tr	6.20	nd	nd
C _{14:0} 2OH	20.90	10.38	nd	nd	nd	nd
C _{16:0}	6.21	27.33	34.49	27.75	tr	9.49
C _{16:0} 3OH	nd	nd	nd	nd	8.82	tr
C _{16:1} ω 7c and/or C _{16:1} ω 6c	11.23	10.22	12.99	20.40	tr	tr
cyclo-C _{17:0}	nd	tr	20.62	6.18	nd	nd
C _{18:0}	nd	14.74	tr	tr	nd	tr
C _{18:1} 2OH	nd	nd	nd	nd	5.93	nd
C _{18:1} ω 7c 11-methyl	nd	nd	nd	nd	nd	18.87
C _{18:1} ω 7c and/or C _{18:1} ω 6c	55.78	18.78	7.78	21.13	40.90	52.34

tr: Trace (less than 5% of total), nd: not detected

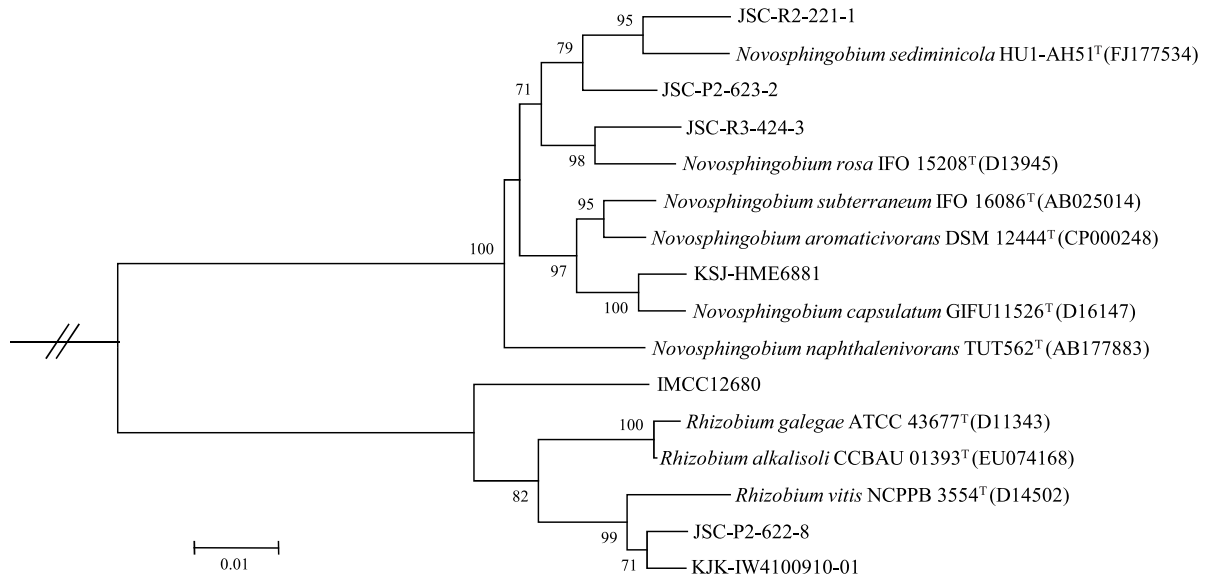


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between novel strains isolated from Sumnummulbangdui wetland and their relatives of the class Alphaproteobacteria. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

로 기준치인 98.7%와 매우 근접하여 추후 생리학적 분석 및 유전체분석등의 결과에 따라 신종으로 편입될 가능성이 있어 후보균주로 간주하였다.

2. Alphaproteobacteria 강에 속하는 신변이주의 계통 분석 및 특징 기재

Alphaproteobacteria 강에 속하는 세균들은 대부분 호기성세균들이며, 탄소원으로는 유기물을 사용하는 종속영양세균과 무기탄소를 이용하는 독립영양세균이 모두 포함되어 있다. genus *Hyphomicrobium* 등 C-1 compound를 이용하는 methylotroph 역시 이 분류군에 속하기도 한다. 빈영양상태의 수환경에 서식하는 세균들이 많이 포함되어 있으며 일부 독립영양세균 역시 특별한 영양공급이 없는 환경에서 서식할 수 있는 종류들이다. 이 분류군에 속하는 종속영양세균의 상당수는 독립적인 생활기능이 한정되어 동물이나 식물과 함께 서식하는 공생 혹은 기생균주 들이며, 이중 *Rhizobium*은 식물과 연관되어 서식하는 균주의 대표적인 예 (Young *et al.* 2001)이며 *Rickettsia*는 동물세포에 기생하는 병원체이다.

본 연구에서 확보한 신종은 모두 *Sphinomnadaceae* 과와 *Rhizobiaceae* 과에 속하였다 (Table 1, Fig. 1). *Sphinomnadaceae* 과에서는 *Novosphingobium* 속에 속하는 변이주들이 발굴되었으며, *Rhizobiaceae* 과에는 *Rhizobium* 속에 해당하는 변이주가 발굴되었다. 지방산분석의 결과 균주들 간의 지방산 조성이 현격한 차이를 나타내었다 (Table 2).

본 논문에서는 이들 기초분석결과를 종합하여, *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 신종후보 균주들의 특징을 다음과 같이 기재한다. 신종후보의 공식적 기술 (description)은 표준 균주와의 엄격한 비교를 통해 최종적으로 발간될 예정이며, 이 논문에서는 주요 특징만을 기재하고자 한다.

변이주 1: *Novosphingobium* sp. KSJ-HME6881

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β-galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{14:0} 2-OH (20.9%), C_{16:0} (6.2%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (11.2%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (55.8%)로 구성되었다. 근연종은 *Novosphingobium capsulatum*으로 98.39%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었다.

변이주 2: *Novosphingobium* sp. JSC-R3-424-3

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β-galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (7.8%), C_{14:0} 2-OH (10.4%), C_{16:0} (27.3%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (10.2%), C_{18:0} (14.7%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (18.8%)로 구성되

었다. 근연종은 *Novospingobium rosa*로 97.81%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었다.

변이주 3: *Novospingobium* sp. JSC-P2-623-2

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase), 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease은 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:0} (34.5%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (13.0%), C_{17:0} cyclo (20.6%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (7.8%)로 구성됨. 이 균주와 근연종은 *Novospingobium sediminicola*로 96.81%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 4: *Novospingobium* sp. JSC-R2-221-1

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase), 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease은 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} aldehyde and/or unknown 10.9525 (10.3%), C_{14:0} (6.2%), C_{16:0} (27.8%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (20.4%), C_{17:0} cyclo (6.2%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (21.1%)로 구성. 이 균주와 근연종은 *Novospingobium sediminicola*로 98.20%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 5: *Rhizobium* sp. KJK-IW4100910-01

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형이며 convex 형태로 접성을 나타낸다. API 20 NE를 이용한 생화학적 동정결과, Indole 생산, Esculin hydrolysis, Urease, Arginine dihydrolase는 양성. 질산염 환원, Glucose 발효, PNPG (β -galactosidase)는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} aldehyde and/or unknown 10.9525 (29.8%), C_{13:1} at 12-13 (5.4%), C_{16:0} 3-OH (8.8%), C_{18:1} 2-OH (5.9%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (40.9%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Rhizobium vitis* (Lu et al. 2009)로 97.70%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 6: *Rhizobium* sp. JSC-P2-622-8

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20 NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Esculin hydrolysis, Urease, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydro-

lase는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} aldehyde and/or unknown 10.9525 (5.5%), C_{16:0} (9.5%), C_{18:1} ω 7c 11-methyl (18.9%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (52.3%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Rhizobium vitis*로 97.99%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

3. *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 신변이주의 계통 분석 및 특징 기재

Gammaproteobacterias 강에 속하는 세균들은 대부분 통성혐기성 (facultative anaerobic)세균들이며, 탄소원으로는 유기물을 사용하는 종속영양세균들이다. 일부 속 (genus)에는 호기성 종속영양세균이나 광합성 또는 화학합성을 하는 종류들이 포함되기도 하여 생리적인 측면에서 매우 다양한 형태가 포함되어 있는 분류군이다. *E. coli* 등 많은 장내세균들이 이 분류군에 포함되어 있으며 *Vibrio* 등의 해양미생물, *Pseudomonas* (Lang et al. 2010)와 같은 유기물 이용범위가 넓어 난분해성물질 분해세균으로 활용되는 종류, *Azotobacter*와 같은 질소고정 토양세균들도 역시 이 분류군에 속한다.

본 연구에서 확보한 신종은 모두 *Moraxellaceae* 과, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* 과에 속하였다 (Table 3, Fig. 2). *Moraxellaceae* 과에서는 *Acinetobacter* 속에 속하는 변이주들이 발굴되었으며, *Pseudomonadaceae* 과에는 *Pseudomonas* 속에 해당하는 변이주가, *Enterobacteriaceae* 과에는 *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leclercia*, *Rahnella*, *Serratia*, *Yersinia* 속에 해당하는 변이주가 발굴되었다. 지방산분석의 결과 균주들 간의 지방산 조성이 현격한 차이를 나타내었다 (Table 4).

본 논문에서는 이들 기초분석 결과를 종합하여, *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 신종후보 균주들의 주요 특징을 다음과 같이 기재한다.

변이주 1: *Acinetobacter* sp. CNU-3JJ-W5-01

그람 음성이며 짧은 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형이다. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase), 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (12.5%), C_{12:0} 3-OH (7.5%), C_{16:0} (15.5%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (7.8%), C_{18:1} ω 9c (34.25)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Acinetobacter baumannii*로 98.55%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

Table 3. Summary of novel strains in the class *gammaproteobacteria*, isolated from Sumnumbangdui wetland

Characteristic	CNU-3J1-W5-01	HHL-q	HHL-130	IMCC12905	JSC-N3-112-2	JSC-R3-323-2	KSJ-HME6891	IMCC12870	JSC-R3-221-1	JSC-N624-3	JSC-N623-1	HHL-302	HHL-Kc21
Most related species	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter radiosistens</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Erwinia billingiae</i>	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	<i>Leclercia adacaroxylata</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas saponiphila</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>palaearctica</i>	<i>Yersinia mollaretii</i>
Similarity (%)	98.55	96.64	98.50	83.77	97.72	98.55	97.94	97.67	98.71	98.14	98.69	98.08	98.02
Cell morphology	short rod	short rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Gram-staining	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative
Nitrate reduction	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Indole production	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Glucose fermentation	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
Arginine dihydrolase	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Urease	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PNPG (β -galactosidase)	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+

Table 4. Fatty acid composition (%) of novel strains in the class *gammaproteobacteria*, isolated from Sumnumbangdui wetland

Fatty acid	CNU-3J1-W5-01	HHL-q	HHL-130	IMCC12905	JSC-N3-112-2	JSC-R3-323-2	KSJ-HME6891	IMCC12870	JSC-R3-221-1	JSC-N624-3	JSC-N623-1	HHL-302	HHL-Kc21
C _{10:0} 3OH	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	8.59	tr	tr	nd	nd
C _{12:0}	12.48	6.53	nd	nd	9.26	tr	5.90	tr	8.51	10.67	8.34	nd	5.21
C _{12:0} 2OH	tr	tr	nd	nd	nd	nd	tr	nd	9.52	nd	nd	nd	tr
C _{12:0} 3OH	7.49	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	9.01	nd	tr	nd	tr
C12:0 aldehyde and/or unknown 10.9525	nd	nd	nd	nd	8.39	nd	nd	nd	nd	8.45	nd	nd	nd
C _{14:0}	tr	tr	tr	nd	tr	6.62	tr	nd	tr	tr	tr	tr	tr
iso-C _{15:0}	nd	nd	54.99	32.64	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.46	tr
anteiso-C _{15:0}	tr	nd	12.22	tr	tr	nd	nd	nd	tr	tr	tr	44.29	nd
C _{16:0}	15.50	29.70	tr	tr	23.26	39.50	27.82	27.32	26.05	32.84	25.28	tr	22.32
C _{16:0} 10-methyl and/or iso-C _{17:1} 09c	nd	nd	nd	6.15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C _{16:1} 07c and/or C _{16:1} 06c	7.76	nd	nd	21.36	19.79	10.69	37.29	37.07	tr	7.82	47.30	nd	nd
iso-C _{17:0}	nd	nd	13.31	tr	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	9.90	tr
iso-C _{17:0} 3OH	tr	nd	nd	17.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
anteiso-C _{17:0}	tr	nd	5.45	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	22.66	nd
cyclo-C _{17:0}	nd	23.01	nd	nd	tr	18.31	5.28	tr	14.82	6.33	nd	nd	nd
C _{18:0}	tr	tr	tr	nd	tr	tr	tr	nd	5.06	11.55	tr	tr	tr
C _{18:1} 09c	34.24	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	25.08
C _{18:1} 07c and/or C _{18:1} 06c	nd	nd	nd	nd	19.59	10.21	11.04	16.88	tr	5.76	5.21	nd	nd

tr: Trace (less than 5% of total), nd: not detected.

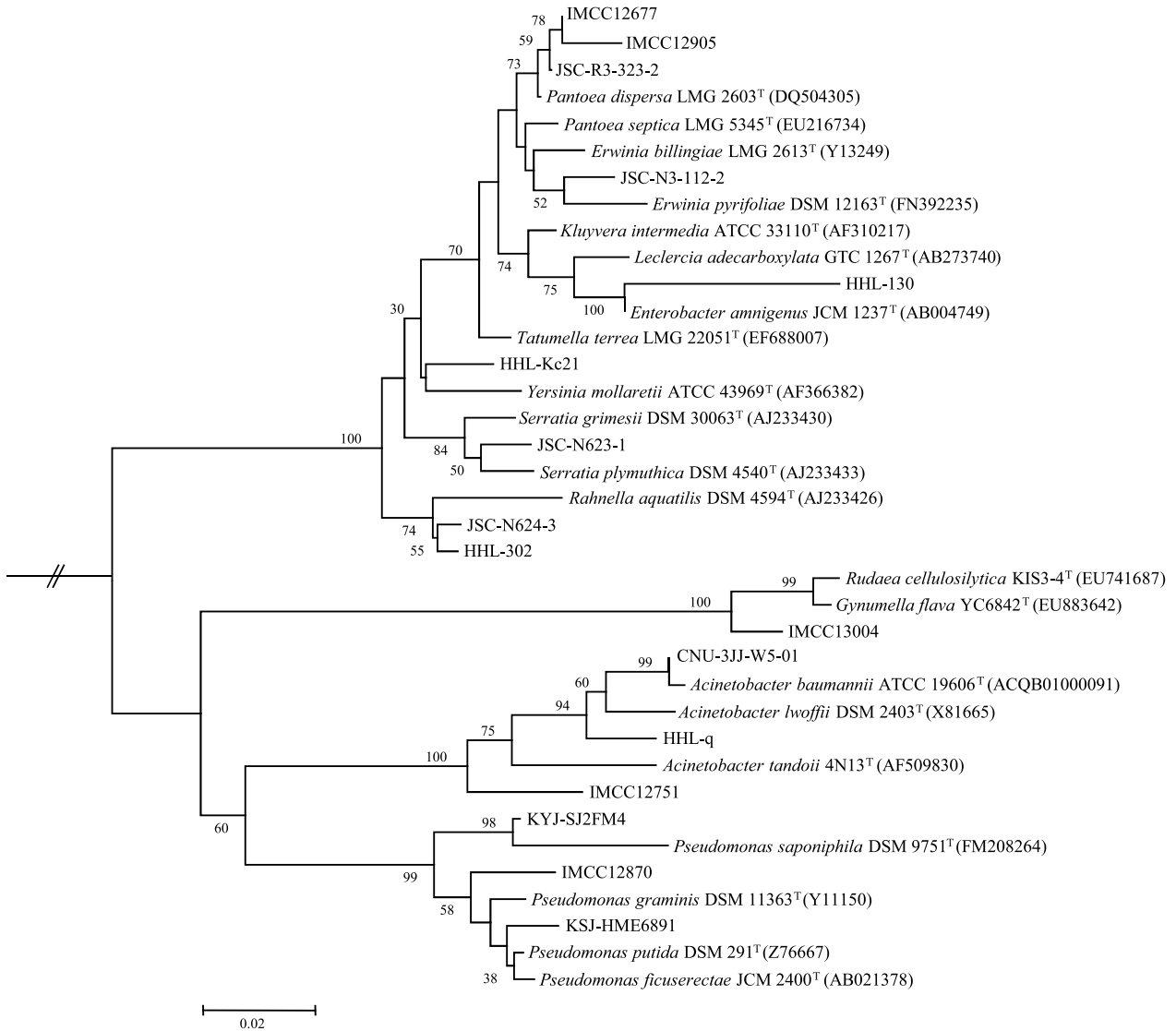


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between novel strains isolated from Sumnunmulbangdwi wetland and their relatives of the class *Gammaproteobacteria*. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

변이주 2: *Acinetobacter* sp. HHL-q

그람 음성이며 짧은 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형이다. API 20NE를 이용한 생화학적 동정 결과, 질산염 환원, Indole 생산, Arginine dihydrolase, Esculin hydrolysis는 양성, Urease, PNPG (β -galactosidase), Glucose 발효는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (6.5%), C_{16:0} (29.7%), C_{17:0} cyclo (23.0%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Acinetobacter radioresistens* (Nishimura et al. 1988)로 96.64%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 습은물뽕뽕 습지에서 분리되었다.

변이주 3: *Enterobacter* sp. HHL-130

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니

는 spread, circular형이다. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Glucose 발효, Esculin hydrolysis는 양성, Indole 생산, Urease, PNPG (β -galactosidase), Arginine dihydrolase는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{15:0} iso (55.0%), C_{15:0} anteiso (12.2%), C_{17:0} iso (5.5%), C_{17:0} cyclo (23.0%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Enterobacter amnigenus*로 98.50%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 습은물뽕뽕 습지에서 분리되었다.

변이주 4: *Erwinia* sp. IMCC12905

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 spindle형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Urease, PNPG (β -galactosidase)는 양성, 질산염 환원, Glu-

cose 발효, Esculin hydrolysis, Indole 생산, Arginine dihydrolase는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{15:0} iso (32.6%), C_{16:0} 10-methyl and/or C_{17:1} iso ω9c anteiso (6.2%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (21.4%), C_{17:0} iso (17.0%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Erwinia billingiae*로 83.77%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내어 신종이 아닌 신속 후보로 간주되며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 5: *Erwinia* sp. JSC-N3-112-2

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β-galactosidase)는 양성, Urease, Indole 생산, Arginine dihydrolase는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (9.3%), C_{12:0} aldehyde and/or unknown 10.9525 (8.4%), C_{16:0} (23.3%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (19.8%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (19.6%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Erwinia pyrofollliae*로 97.72%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 6: *Leclercia* sp. JSC-R3-323-2

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β-galactosidase)는 양성, Urease, Indole 생산, Arginine dihydrolase는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{14:0} (6.6%), C_{16:0} (39.5%), C_{17:0} cyclo (18.3%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (10.7%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (10.2%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Leclercia adecaroxylata*로 98.55%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 7: *Pseudomonas* sp. KSJ-HME-6891

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Esculin hydrolysis, Arginine dihydrolase는 양성, Urease, Indole 생산, 질산염 환원, Glucose 발효, PNPG (β-galactosidase)는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (5.9%), C_{16:0} (27.8%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (37.3%), C_{17:0} cyclo (5.3%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (11.0%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Pseudomonas graminis*로 97.94%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 8: *Pseudomonas* sp. IMCC12870

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Escu-

lin hydrolysis, Urease, Arginine dihydrolase, PNPG (β-galactosidase)는 모두 양성, Indole 생산, 질산염 환원, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:0} (27.3%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (37.0%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (16.9%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Pseudomonas putida*로 97.67%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 9: *Pseudomonas* sp. JSC-R3-221-1

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Arginine dihydrolase는 양성, Esculin hydrolysis, Urease, Indole 생산, 질산염 환원, Glucose 발효, PNPG (β-galactosidase)는 모두 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{10:0} 3-OH (8.6%), C_{12:0} (8.5%), C_{12:0} 2-OH (9.5%), C_{12:0} 3-OH (9.0%), C_{16:0} (26.1%), C_{17:0} cyclo (14.8%), C_{18:0} (5.1%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Pseudomonas saponiphila*로 98.71%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 10: *Rahnella* sp. JSC-N624-3

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β-galactosidase)는 모두 양성, Urease, Indole 생산, Arginine dihydrolase는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (10.7%), C_{12:0} aldehyde and/or unknown 10.9525 (8.5%), C_{16:0} (32.8%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (7.8%), C_{17:0} cyclo (6.3%), C_{18:0} (11.6%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (5.8%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Rahnella aquatilis*로 98.14%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 11: *Serratia* sp. JSC-N623-1

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Indole 생산, Arginine dihydrolase는 양성, Urease, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β-galactosidase)는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (8.3%), C_{16:0} (25.3%), C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c (47.3%), C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (5.2%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Serratia plymuthica*로 98.69%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 12: *Yersinia* sp. HHL-302

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Indole 생

산, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 모두 양성, 질산염 환원, Urease, Arginine dihydrolase는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{15:0} iso (7.5%), C_{15:0} anteiso (44.3%), C_{17:0} iso (9.9%), C_{17:0} anteiso (22.7%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Yersinia enterocolitica* subsp. *palaearctica*로 98.08%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

변이주 13: *Yersinia* HHL-Kc21

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 성장 시 콜로니는 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 모두 양성, Urease, Arginine dihydrolase는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{12:0} (5.2%), C_{16:0} (22.3%), C_{18:1} ω9c (25.1%)로 구성되었다. 이 균주와 근연종은 *Yersinia mollaretii* (Neubauer et al. 2000)로 98.02%의 16S rDNA 서열의 유사도를 나타내었으며 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 분리되었다.

적 요

제주도 한라산에 위치한 국내 최대규모의 고산습지인 숨은물벙뒤 습지의 *Alphaproteobacteria*와 *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 세균 종의 다양성을 조사하였고, 신분류군 후보 균주 19종을 확보하였다. 신종후보 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였을 때 표준균주와 98.7% 미만의 유사도를 보이는 균주들을 신종후보 균주로 간주하였다. 총 19종의 세균이 *Alphaproteobacteria*와 *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 신종후보 균주들로 발견되었다. *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 균주들은 *Sphingomonadaceae* 과 *Novosphingobium* 속에 속하는 4종과 *Rhizobiaceae* 과 *Rhizobium* 속에 속하는 2종이 분리되었다. *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 균주들은 *Moraxellaceae* 과 *Acinetobacter* 속에 속하는 2종, *Pseudomonadaceae* 과 *Pseudomonas* 속에 속하는 3종, *Enterobacteriaceae* 과의 *Enterobacter* 속에 속하는 1종, *Erwinia* 속의 2종, *Leclercia* 속의 1종, *Rahnella* 속의 1종, *Serratia* 속의 1종, *Yersinia* 속의 2종이 분리되었다. 분리된 19개 후보신종에 대하여 배양학적 특징, 생리화학적 특징 및 지방산 분석 결과를 정리하였다.

사 사

본 연구는 2010년 환경부 자생생물발굴 사업의 연구

비 지원을 받아 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 강호정. 2004. 습지의 생지화학적 반응과 전지구적 기후 변화의 영향. 생물화공심포지움.
- Bouvet PJM and PAD Grimont. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:228-240.
- Brenner DJ, NR Krieg, JT Staley and GM Garrity (eds). 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria). Springer. New York. pp. 575.
- Chun J, JH Lee, Y Jung, M Kim, S Kim, BK Kim and YW Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2259-2261.
- Lang E, M Burghartz, S Spring, J Swiderski and C Sproer. 2010. *Pseudomonas benzenivorans* sp. nov. and *Pseudomonas saponiphila* sp. nov., represented by xenobiotics degrading type strains. Curr. Microbiol. 60:85-91.
- Lu YL, WF Chen, LL Han, ET Wang and WX Chen. 2009. *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from Caragana intermedia growing in saline-alkaline soils in the north of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:3006-3011.
- Mitsch WJ and JG Gosselink. 1993. Wetlands, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Neubauer H, S Aleksic, A Hensel, EJ Finke and H Meyer. 2000. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. Int. J. Med. Microbiol. 290:61-64.
- Nishimura Y, T Ino and H Iizuka. 1988. *Acinetobacter radiorensistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:209-211.
- Stackebrandt E and J Ebers. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today. 06:153-155.
- Takeuchi M, T Sakane, M Yanagi, K Yamasato, K Hamana and A Yokota. 1995. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov. and *Sphingomonas mali* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:334-341.
- Tamura K, J Dudley, M Nei and S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software

version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.

Willey JM, LM Sherwood and CJ Woolverton. 2011. Prescott's Microbiology. McGraw-Hill, New York.

Young JM, LD Kuykendall, E Martinez-Romero, A Kerr and H Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium*

undicola de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:89-103.

Manuscript Received: May 26, 2011

Revision Accepted: July 19, 2011

Responsible Editor: Kap Joo Park