

Note

국내 폐광산 및 제주 곶자왈 지역내의 미생물 분리 및 특징 분석[§]

김예은¹ · 고현우¹ · 김소정² · 도경탁³ · 박수제^{1*}

¹제주대학교 생물학과, ²한국지질자원연구원 지질환경연구본부, ³제주대학교 생명공학부 동물생명공학전공

Isolation and characterization in the exhausted mine and Jeju Gotjawal[§]

Ye-Eun Kim¹, Hyeon-Woo Koh¹, So-Jeong Kim², Kyoung-Tag Do³, and Soo-Je Park^{1*}

¹Department of Biology, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Geologic Environment Research Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources, Daejeon 34132, Republic of Korea

³Department of Animal Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

(Received January 24, 2017; Revised March 17, 2017; Accepted March 21, 2017)

Most of acidophiles are found in the various low pH environments and affect to metal cycle through oxidation and reduction reactions. The present study was carried out above 50 strains as acidophiles isolated from acidic soils of exhausted mine and Jeju Gotjawal. Finally, total 19 strains obtained and were tentatively identified based on comparative similarity analysis for 16S rRNA gene sequence and physiological characterizations. These isolates belonged to *Gammaproteobacteria* (6 strains), *Actinobacteria* (5 strains), *Betaproteobacteria* (4 strains), *Alphaproteobacteria* (2 strains), and *Bacilli* (2 strains). We observed that these isolates can grow under low pH culture condition. This case study for analysis physiological characterizations of indigenous microorganisms in acidic soil might provide basic information on useful application.

Keywords: acido-tolerant bacteria, contaminant, soil

1900년대 초 Waksman과 Joffe가 희석한 황산에서 황을 산화시키며 살아가는 미생물을 발견한 이래(Waksman and Joffe, 1922), 극한 산성미생물(호산성미생물)에 대한 다양성 및 그들의 생리화학적 특징을 규명하기 위한 연구는 지속되고 있다. 일반적으로, 이러한 호산성미생물은 산성도가 낮은 pH (< pH 3)에서 최적으로 자라는 미생물로 정의되며, 일반적으로 생명

체에 치명적인 금속 및 금속염의 농도를 포함하는, 자연적으로 형성된 온천, 열수구와 인공적으로 만들어진 폐광산 부근(e.g. acid mine drain)과 같은 산성환경에서 살아간다. 현재 분리된 호산성미생물들은 *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* 및 *Verrucomicrobia* 문에 속하며, 또한 이들의 유전체 분석을 통하여 보다 깊은 생리적 특징들이 규명되고 있다(Baker-Austin and Dopson, 2007; Oren, 2010). 흥미롭게도, 대부분의 호산성균은 pH 7 이상, 그리고 상당수는 자신들의 최적 pH보다 두 단위 이상 높은 pH에서는 자라지 못하는 것으로 알려져 있다. 더불어, 몇몇 호산성미생물은 철을 포함한 금속이온의 산화에 관여하는 것으로 알려져 있다(Hedrich *et al.*, 2011). 또한, 최근 금속의 정제, 구리의 추출에서 유용하게 사용되고 있다(Muravyov and Fomchenko, 2013). 이들 호산성 미생물 외에 산성환경에 저항을 지니고 있는 내산성미생물도 산성환경으로부터 발굴되어 지속적으로 연구되고 있다(Liu *et al.*, 2015). 따라서, 이들 미생물은 앞으로 특수한 환경에서의 산업적 이용에 적극활용 될 수 있을 것으로 판단된다. 따라서, 본 연구에서는 국내의 폐광산 및 제주 곶자왈 지역 산성토양환경으로부터 미생물을 발굴하고, 자생 미생물의 생리적, 분자계통학적 특징 분석에 필요한 기초 정보를 제공하고자 한다.

본 실험을 위하여 폐광산 및 제주 곶자왈 지역의 토양을 채취하였다. 시료는 대구광역시 달성군 가창면 상원리(35°46'52.5"N, 128°40'18.6"E)에 있는 폐광산과 제주특별자치도 제주시 조천읍 선흘리(33°30'24.8"N, 126°43'43.9"E)에 있는 대섭이 굴

[§]Supplemental material for this article may be found at <http://www.kjom.or.kr>

*For correspondence. E-mail: sjpark@jejunu.ac.kr;

Tel.: +82-64-753-3524; Fax: +82-64-756-3541

에서 채취하였으며, 표층과 심층의 토양을 멸균된 50 ml 유리 시험관에 채취하였다. 채취한 시료는 약산성(pH 4.0~6.0 정도)으로 확인되었으며, 실험 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다. 달성군의 폐광산과 제주도 대섭이굴에서부터 채취한 토양시료들로부터 미생물을 배양하기 위해서 10^{-1} 으로 희석한 Reasoner's 2A agar (R2A, Difco) 배지와 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) 배지를 이용하였다. R2A와 TSA배지의 조성은 다음과 같다. R2A는 D.W. 1 L 당 yeast extract 0.5 g, proteose peptone 0.5 g, casamino acid 0.5 g, dextrose 0.5 g, soluble starch 0.5 g, sodium pyruvate 0.3 g, dipotassium phosphate 0.3 g 그리고 magnesium sulfate 0.05 g을 각각 넣어 제작하였고, TSA 배지는 증류수 1 L 당 tryptone 15 g, soytone 5 g 그리고 sodium chloride 5 g을 각각 넣어 제작하였다. pH는 6 N HCl을 사용하여 4.0~4.5로 조절하였으며, Bacto agar (Difco)를 최종적으로 2% (w/v)로 넣어 고형화하였다. 제작된 배지는 고압증기멸균기를 이용하여 1.5기압, 121°C에서 20분간 멸균하였다. 10^{-1} 으로 희석한 R2A 액체배지를 이용하여, 폐광산과 제주도 대섭이굴에서부터 채취한 토양시료를 연속희석법(serial dilution)을 이용하여 희석하였으며, 10^{-3} ~ 10^{-5} 희석액을 100 μ l씩 고형배지에 도말한 후 30°C 배양기에서 1주일간 배양하였다. 1주일 배양 후, 배양한 단일 균집들 중 육안으로 비교하였을 때 형태, 색상 그리고 크기 등의 형태학적 특징을 비교하여 선별하고, 동일한 배지와 조건에서 획선평판법(streaking)을 사용하여 순수분리를 시도하였다. 순수분리를 통해 획득한 미생물들은 아래에 기술한 분자생물학적 방법과 계통 분류학적 분석을 실시하고, 생리학적 실험을 통하여 분리한 미생물의 동정을 실시하였다. 배양된 미생물 세포모양은 광학현미경(CX23, Olympus)과 투과전자현미경(Technai G2 Sprite twin)을 이용하여 결정하였다.

순수 분리된 미생물의 분자계통학적 분석을 위하여 genomic DNA extraction kit (GeneAll)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 세균 16S rRNA 유전자 primer 세트인 forward primer 27F (5'-AGAGT TGGATCMTGGCTCAG-3')와 reverse primer 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991)를 사용하였다. 이를 위하여, Dr. Max Master Mix (2 \times , MG Med) 10 μ l 와 3차 증류수 7 μ l, forward primer (10 pmol)와 reverse primer (10 pmol)를 각각 1 μ l씩 넣고, genomic DNA를 1 μ l 넣어, 총 20 μ l의 PCR 반응액을 만들었다. PCR 수행방법으로, 95°C에서 7분 동안 변성(denaturation) 과정을 거친 후 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 90초를 1회로 하여, 총 35회 반복 수행을 한 후 마지막으로 72°C에서 7분간 최종 신장(extension) 과정을 수행하였다. 증폭된 유전자는 1.5% (w/v)

agarose gel 전기영동법을 이용하여 크기를 확인하였다. 그 이후에 증폭된 유전자는 PCR purification kit (Cosmo Genetech)를 이용하여 정제하였으며, 정제된 산물은 MacroGen에서 염기서열 분석을 진행하였다. 분석 결과로 얻은 염기서열 정보는 SeqMan software (DNASStar)를 이용하여 편집하였고, 편집된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)와 Ez-biocloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (Kim et al., 2012)를 사용하여 연관성이 높은 유전자 서열을 획득, 비교 및 분석을 진행하였다. 그 이후에 BioEdit program (Hall, 1999)을 사용하여 염기서열들을 정렬하고, 계통수는 MEGA6 program (Tamura et al., 2013)에서 제공하는 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987), maximum-likelihood (Felsenstein, 1981), 그리고 maximum-parsimony (Fitch, 1971) 방법들을 이용하여 그렸다. 순수 분리된 미생물의 16S rRNA 유전자의 상동성은 Ez-BioCloud를 통해 계산하였다. G+C content 분석은 열변성(thermal denaturation temperature) 방법을 이용하였다 (Gonzalez and Saiz-Jimenez, 2002). 본 연구를 통해 순수 분리한 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI GenBank에 등록하고 균주를 국립생물자원관에 기탁하였다.

본 연구를 통하여, 제주특별자치도 제주시와 대구광역시 달성군에서 채취한 토양시료로부터 약 50개의 형태학적으로 구별된 미생물 단일 균집을 획득할 수 있었으며, 계통학적 분석을 통하여 중복되는 종을 최대한 제외하여 총 19종의 서로 다른 미생물들을 분리하였다(Table 1 and Fig. 1): *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 6종, *Actinobacteria* 강에 속하는 5종, *Betaproteobacteria* 강에 속하는 4종, *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 2종, *Bacilli* 강에 속하는 2종이며, 이들의 다양한 생리 및 대사적 특징들은 Supplementary data Table S1에 표시하였다. 순수분리가 확인된 미생물의 생리학적 실험은 일반적으로 TSA 혹은 R2A 배지에서 이루어졌으며, Gram stain kit (BD)를 사용하여 그람 염색을 실시한 후 광학현미경(CX23, Olympus)을 통하여 염색결과를 관찰하였다. 생장온도 실험은 TSA 혹은 R2A 고형배지를 이용하여 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50 그리고 60°C에서 진행하였고, 생장 pH 실험은 TSB 혹은 R2A 액체배지를 Homo-PIPES, MES와 bis-tris propane 버퍼를 이용하여 (Koh et al., 2015b), pH 3.0~10.0 (pH 0.5 간격)으로 진행하였다. 기질 사용 특성 실험은 GEN III MicroPlate (Biolog)를 이용하여 진행하였다.

발굴된 미생물들의 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과, 기존에 국외에서 배양되어 보고된 미생물들과 평균 99.6%의 유전자 상동성이 관찰되었다. 계통학적 분석을 통한 각각의 미생

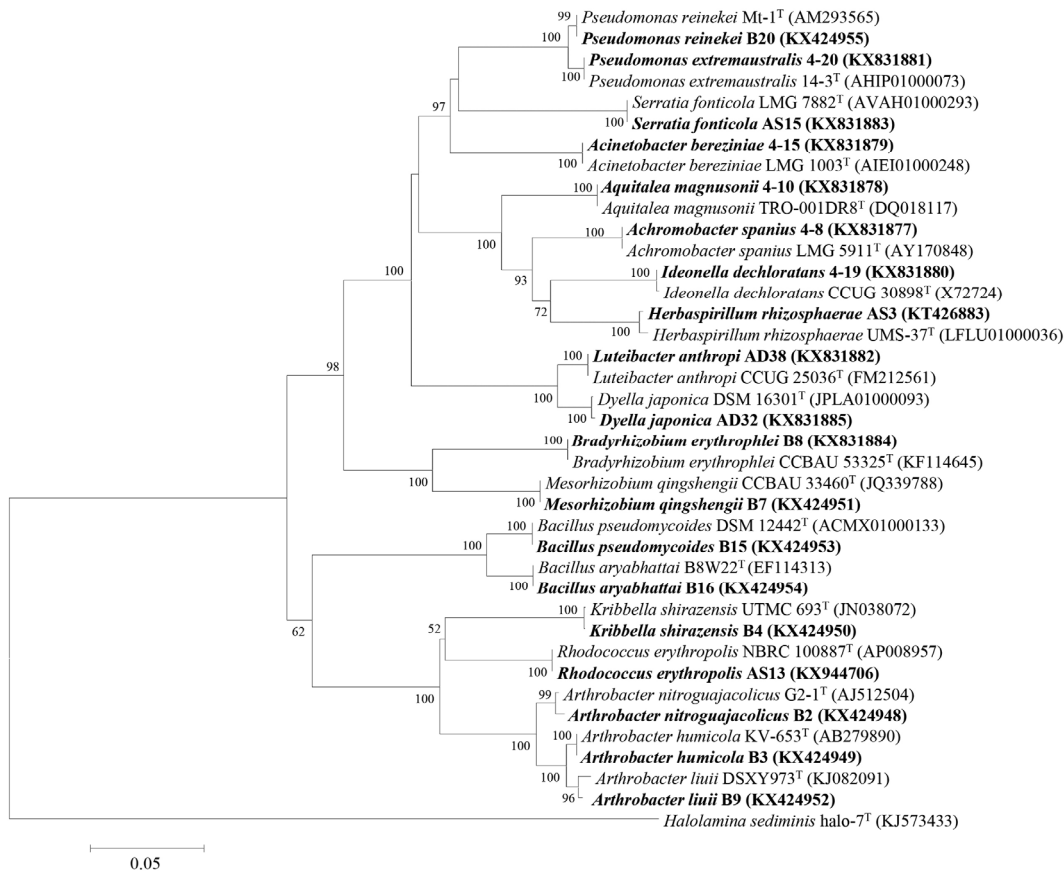


Fig. 1. Phylogenetic position of all isolated acid-tolerants with the closest reference strains based on 16S rRNA gene sequences. GenBank accession numbers are indicated in parentheses. *Halolamina sediminis* halo-7^T was used as an outlier. Bootstrap percentages $\geq 50\%$ (based on 1,000 replicates) from the neighbor-joining, are shown at branch points. Isolated strains are highlighted in bold.

Table 1. Strains obtained from acidic soils

Strains	Isolation sources	Closest type strain (accession number, similarity)
B2	Contaminant soil	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> (AJ512504, 99.6%)
B3	Contaminant soil	<i>Arthrobacter humicola</i> (AB279890, 99.9%)
B4	Acidic wet soil	<i>Kribbella shirazensis</i> (JN038072, 99.8%)
B7	Contaminant soil	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> (JQ339788, 100%)
B8	Contaminant soil	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> (KF114645, 100%)
B9	Contaminant soil	<i>Arthrobacter liuii</i> (KJ082091, 99.0%)
B15	Acidic wet soil	<i>Bacillus pseudomycooides</i> (ACMX01000133, 99.9%)
B16	Acidic wet soil	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313, 99.9%)
B20	Acidic wet soil	<i>Pseudomonas reinekei</i> (AM293565, 100%)
4-8	Acidic wet soil	<i>Achromobacter spanius</i> (AY170848, 99.9%)
4-10	Acidic wet soil	<i>Aquitalea magnusonii</i> (DQ018117, 99.8%)
4-15	Acidic wet soil	<i>Acinetobacter bereziniae</i> (AIEI01000248, 99.8%)
4-19	Acidic wet soil	<i>Ideonella dechloratans</i> (X72724, 99.7%)
4-20	Acidic wet soil	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> (AHIP01000073, 99.9%)
AD38	Contaminant soil	<i>Luteibacter anthropi</i> (FM212561, 99.1%)
AS15	Contaminant soil	<i>Serratia fonticola</i> (AVAH01000293, 99.9%)
AD32	Contaminant soil	<i>Dyella japonica</i> (JPLA01000093, 99.1%)
AS13	Contaminant soil	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (AP008957, 100%)
AS3	Contaminant soil	<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> (LFLU01000036, 99.3%)

물의 유연관계는 Supplementary data Fig. S1A~1E에서 제시하였다. 본 미생물들은 기존에 국외에서는 배양되어 보고되었지만, 국내에서는 현재까지 배양 및 보고된 적이 없는 ‘국내 미기록종’으로 보고될 수 있다(Koh et al., 2015a). 다만, 이들 미생물들은 약산성 조건에서도 성장이 관찰되나, 대부분의 최적 pH는 중성부근임을 알 수 있었다. 이에 따라, 발굴된 미생물들은 산성환경에 내성을 지닌 내산성미생물(acid-tolerant bacteria)로 판단하였다. 내산성미생물의 배양은, 본 연구에서 사용된 배양조성이 호산성미생물이 성장할 수 없는 비적절한 조건으로 판단된다. 따라서, 호산성미생물의 분리를 위하여, 초기배양에 있어 pH 2 부근 혹은 그 이하의 배양배지 조성이 필요하며, 추후 연구에서는 낮은 pH 배양조건이 보다 많은 수의 호산성미생물 발굴에 유용할 것이다.

각각의 미생물의 특성에 대한 자세한 분석결과는 아래와 같다. 기질 이용성에 사용된 당과 아미노산 정보는 GEN III MicroPlate (Biolog)에 포함된 내용에 관한 것이다.

Actinobacteria 문; *Actinobacteria* 강; *Micrococcales* 목; *Micrococcaceae* 과; *Arthrobacter* 속

Arthrobacter nitroguajacolicus B2

Arthrobacter nitroguajacolicus B2 미생물은 *Arthrobacter nitroguajacolicus* G2-1과 99.6%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *A. nitroguajacolicus* B2 미생물은 비정형적 간균형태이다. 성장온도는 4~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.0~11.0이며, 최적 pH는 6.0~8.0이다. *A. nitroguajacolicus* B2 미생물은 그람 양성균이며, 운동성을 가지고 있고, oxidase와 catalase 양성을 보인다. 단일균집은 노란색을 띤다. 대부분의 당을 기질로 사용하는 경향을 보이며, glycyl-L-proline과 L-aspartic acid를 제외한 대부분의 아미노산들을 기질로 사용한다.

Arthrobacter humicola B3

Arthrobacter humicola B3 미생물은 *Arthrobacter humicola* KV-653과 99.9%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *A. humicola* B3 미생물은 간균-구균 형태이다. 성장온도는 4~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~10.0이며, 최적 pH는 6.0~8.0이다. *A. humicola* B3 미생물은 그람 양성균이며, 운동성을 가지고 있고, oxidase와 catalase 양성을 보인다. 단일균집은 크림색을 띤다. 대부분의 당을 사용하지 않는 경향을 보이나, 대부분의 아미노산들을 기질로 사용한다.

Arthrobacter liuii B9

Arthrobacter liuii B9 미생물은 *Arthrobacter liuii* DSXY973과 99.0%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *A. liuii* B9 미생물은 짧은 간균형태이다. 성장온도는 5~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *A. humicola* B9 미생물은 그람 양성균이며, 운동성은 없고, oxidase 음성, catalase 양성 반응을 보인다. 대부분의 당을 기질로 사용하는 경향을 띄고 있으나 N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-β-D-mannosamine, N-acetyl-D-galactosamine, 와 N-acetylneuraminic acid은 사용하지 않으며, 대부분의 아미노산들을 기질로 사용하는 양상을 보인다.

Actinobacteria 문; *Actinobacteria* 강; *Propionibacteriales* 목; *Nocardiodaceae* 과; *Kribbella* 속

Kribbella shirazensis B4

Kribbella shirazensis B4 미생물은 *Kribbella shirazensis* UTMC 693과 99.8%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *K. shirazensis* B4 미생물은 짧은 간균 형태이다. 성장온도는 15~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.0이며, 최적 pH는 6.0~9.0이다. *K. shirazensis* B4 미생물은 그람 양성균이며, 운동성은 없고, oxidase와 catalase 음성 양상을 보인다. 모든 당과 아미노산을 기질로 이용하지 않는다.

Actinobacteria 문; *Actinobacteria* 강; *Corynebacteriales* 목; *Nocardiaceae* 과; *Rhodococcus* 속

Rhodococcus erythropolis AS13

Rhodococcus erythropolis AS13 미생물은 *Rhodococcus erythropolis* NBRC 100887과 99.5%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *R. erythropolis* AS13 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 20~45°C이며, 최적온도는 20°C이며, 최적 pH는 8.0이다. *R. erythropolis* AS13 미생물은 그람 양성균이며, 운동성은 없다. 당은 N-acetyl-D-glucosamine과 N-acetylneuraminic acid, D-fructose만을 기질로서 쓰고 있으며 아미노산은 L-arginine만을 기질로서 사용한다.

Proteobacteria 문; *Alphaproteobacteria* 강; *Rhizobiales* 목; *Phyllobacteriaceae* 과; *Mesorhizobium* 속

Mesorhizobium qingshengii B7

Mesorhizobium qingshengii B7 미생물은 *Mesorhizobium*

qingshengii CCBAU 33460과 100%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *M. qingshengii* B7 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 10~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *M. qingshengii* B7 미생물은 그람 음성균이며, oxidase와 catalase에 양성 결과를 보인다. 대부분의 당을 기질로 사용하는 성격을 띄고 있으며, 대부분의 아미노산은 사용하지 않는다.

Proteobacteria 문; *Alphaproteobacteria* 강; *Rhizobiales* 목; *Bradyrhizobiaceae* 과; *Bradyrhizobium* 속

***Bradyrhizobium erythrophlei* B8**

Bradyrhizobium erythrophlei B8 미생물은 *Bradyrhizobium erythrophlei* CCBAU 53325과 100%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *B. erythrophlei* B8 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 4~60°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~8.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *B. erythrophlei* B8 미생물은 그람 음성균이며, oxidase와 catalase에 양성 반응을 보인다. 대부분의 당을 기질로 사용하지 않는 경향을 보이며, 거의 모든 아미노산을 쓰지 않는다.

Firmicutes 문; *Bacilli* 강; *Bacillales* 목; *Bacillaceae* 과; *Bacillus* 속

***Bacillus pseudomycooides* B15**

Bacillus pseudomycooides B15 미생물은 *Bacillus pseudomycooides* DSM 12442과 99.9%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *B. pseudomycooides* B15 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 15~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.0~7.0이며, 최적 pH는 5.0~6.0이다. *B. pseudomycooides* B15 미생물은 그람 양성균이며, catalase 양성, oxidase 음성 반응을 보인다.

***Bacillus aryabhatai* B16**

Bacillus aryabhatai B16 미생물은 *Bacillus aryabhatai* B8W22와 99.1%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *B. aryabhatai* B16 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 10~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.5이며, 최적 pH는 7.0이다. *B. aryabhatai* B16 미생물은 그람 양성균이며, 운동성을 가지고 있고 catalase 음성, oxidase 양성 반응 양상을 보인다. 대부분의 당과 아미노산을 기질로 사용하는 경향을 보인다.

Proteobacteria 문; *Betaproteobacteria* 강; *Burkholderiales*

목; *Alcaligenaceae* 과; *Achromobacter* 속

***Achromobacter spanius* 4-8**

Achromobacter spanius 4-8 미생물은 *Achromobacter spanius* LMG 5911와 98.8%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *A. spanius* 4-8 미생물은 구균 형태이다. 성장온도는 15~40°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장 pH는 4.5~9.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *A. spanius* 4-8 미생물은 그람 음성균이며, oxidase와 catalase 양성 양상을 보인다. 단일군집의 색은 밝은 갈색을 띤다. 모든 당을 기질로 사용하지 않으며, 대부분의 아미노산도 사용하지 않는 경향을 보인다.

Proteobacteria 문; *Betaproteobacteria* 강; *Burkholderiales* 목; *Comamonadaceae* 과; *Ideonella* 속

***Ideonella dechloratans* 4-19**

Ideonella dechloratans 4-19 미생물은 *Ideonella dechloratans* CCUG 30898과 99.6%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *I. dechloratans* 4-19 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 4~37°C이며, 최적온도는 25~30°C이고, 성장 pH는 4.0~9.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *I. dechloratans* 4-19 미생물은 그람 음성균이며, oxidase와 catalase 양성 반응을 보인다. 대부분의 당을 기질로 사용하지 않으나 대부분의 아미노산은 기질로 사용한다.

Proteobacteria 문; *Betaproteobacteria* 강; *Burkholderiales* 목; *Oxalobacteraceae* 과; *Herbaspirillum* 속

***Herbaspirillum rhizosphaerae* AS3**

Herbaspirillum rhizosphaerae AS3 미생물은 *Herbaspirillum rhizosphaerae* UMS-37과 99.3%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *H. rhizosphaerae* AS3 미생물은 약간 굵은 간균 형태이다. 성장온도는 4~40°C이며, 최적온도는 25~30°C이고, 성장 pH는 4.5~10.5이며, 최적 pH는 6.0~7.0이다. *H. rhizosphaerae* AS3 미생물은 그람 음성균이며, 단일군집은 milky-white색을 띤다. 대부분의 당을 기질로 사용하지 않는다.

Proteobacteria 문; *Betaproteobacteria* 강; *Neisseriales* 목; *Neisseriaceae* 과; *Aquitalea* 속.

***Aquitalea magnusonii* 4-10**

Aquitalea magnusonii 4-10 미생물은 *Aquitalea magnusonii* TRO-001DR8과 99.9%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고

있다. *A. magnusonii* 4-10 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 10~40°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~8.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *A. magnusonii* 4-10 미생물은 그람 음성균이며, 운동성을 가지고 있고, oxidase와 catalase 양성 반응을 보인다. 대부분의 당을 기질로 사용하지 않는 경향을 띄며, 대부분의 아미노산은 기질로 사용한다.

Proteobacteria 문; *Gammaproteobacteria* 강; *Pseudomonadales* 목; *Pseudomonadaceae* 과; *Pseudomonas* 속

Pseudomonas reinekei B20

Pseudomonas reinekei B20 미생물은 *Pseudomonas reinekei* Mt-1과 99.5%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *P. reinekei* B20 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 10~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.5이며, 최적 pH는 7.0이다. *P. reinekei* B20 미생물은 그람 음성균이며, oxidase와 catalase 양성 양상을 보인다. α -D-glucose와 D-fructose를 제외한 모든 당을 기질로 사용하지 않으며, 대부분의 아미노산은 기질로서 사용한다.

Pseudomonas extremaustralis 4-20

Pseudomonas extremaustralis 4-20 미생물은 *Pseudomonas extremaustralis* 14-3과 99.9%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *P. extremaustralis* 4-20 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 4~37°C이며, 최적온도는 25~30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *P. extremaustralis* 4-20 미생물은 그람 음성균이며, 운동성을 가지고 있고, oxidase와 catalase 양성인 양상을 보인다. 대부분의 당을 기질로 사용하지 않는 경향을 띄고 있으나, 아미노산은 대부분 기질로 사용하는 경향을 보인다.

Proteobacteria 문; *Gammaproteobacteria* 강; *Pseudomonadales* 목; *Moraxellaceae* 과; *Acinetobacter* 속

Acinetobacter bereziniae 4-15

Acinetobacter bereziniae 4-15 미생물은 *Acinetobacter bereziniae* LMG 1003과 99.8%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *A. bereziniae* 4-15 미생물은 구상간균(coccobacillus) 형태이다. 성장온도는 25~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~8.0이며, 최적 pH는 6.0이다. *A. bereziniae* 4-15 미생물은 그람 음성균이며, catalase와 oxidase에 양성반응을 보인다.

D-galactose와 D-fucose, L-fucose를 제외한 모든 당을 기질로 사용하지 않으며, 대부분의 아미노산을 기질로 사용한다.

Proteobacteria 문; *Gammaproteobacteria* 강; *Xanthomonadales* 목; *Xanthomonadaceae* 과; *Dyella* 속

Dyella japonica AD32

Dyella japonica AD32 미생물은 *Dyella japonica* DSM 16301과 99.1%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *D. japonica* AD32 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 10~37°C이며, 최적온도는 25~30°C이고, 성장 pH는 4.5~8.0이며, 최적 pH는 6.5~7.0이다. *D. japonica* AD32 미생물은 그람 음성균이며, 운동성을 가지고 있고, catalase에 양성 반응을 보인다. 단일균체는 노란색을 띠며, 대부분의 아미노산을 기질로 사용하지 못하였다.

Proteobacteria 문; *Gammaproteobacteria* 강; *Xanthomonadales* 목; *Xanthomonadaceae* 과; *Luteibacter* 속

Luteibacter anthropi AD38

Luteibacter anthropi AD38 미생물은 *Luteibacter anthropi* CCUG 25036과 100%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *L. anthropi* AD38 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 10~37°C이며, 최적온도는 30°C이고, 성장 pH는 4.5~9.5이며, 최적 pH는 7.0이다. *L. anthropi* AD38 미생물은 그람 음성균이며, 운동성을 가지고 있고, oxidase에 양성인 양상을 보인다. 단일균체는 노란색을 띤다. 대부분의 당을 기질로 사용하는 경향을 보인다.

Proteobacteria 문; *Gammaproteobacteria* 강; *Enterobacteriales* 목; *Enterobacteriaceae* 과; *Serratia* 속

Serratia fonticola AS15

Serratia fonticola AS15 미생물은 *Serratia fonticola* LMG 7882과 100%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *S. fonticola* AS15 미생물은 간균 형태이다. 성장온도는 4~37°C이며, 최적온도는 25~30°C이고, 성장 pH는 4.0~8.0이며, 최적 pH는 7.0이다. *S. fonticola* AS15 미생물은 그람 음성균이며, 운동성을 가지고 있고, catalase에 양성 반응을 보인다. 대부분의 당과 아미노산을 기질로 사용하는 경향을 보인다.

차세대 시퀀싱 기법의 보편화로 인하여, 그동안 확인되지 않았던 다양한 미생물이 존재하는 것이 확인되고 있다. 특히

희박생물권(rare biosphere)에 존재하는 난배양성 미생물들의 존재는 극한환경을 비롯한 다양한 환경 내에서 생태학적 기능 규명 가능성을 제시하고 있으며(Choi *et al.*, 2016), 이들의 존재는 최종적으로 배양을 통하여 보다 정확한 생리적 기능을 확인할 수 있다. 극한환경에서 배양되는 미생물의 경우, 그 산업적 응용성에 있어 국외적으로 미생물 배양 및 특징분석에 많은 관심을 두고 있다. 본 연구에서는 국내에서는 보고 되지 않은 미생물들을 포함하여, 최종적으로 19종의 내산성미생물들을 폐광산 및 곳자왈 인근 토양시료로부터 분리 하여 이들의 특성을 분석하였다. 본 연구를 통해서, 자생 내산성미생물의 다양성, 생리적 결과와 이들 미생물의 분리 기술들은 자생 미생물의 자원화에 기초적인 정보를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

호산성미생물은 pH가 낮은 환경에서 살아가는 미생물로서 산화, 환원 반응을 통하여, 금속을 포함한 물질들의 순환에 영향을 미친다. 본 연구에서는, 국내의 폐광산 및 제주 곳자왈 지역의 산성토양으로부터 배양을 통해 50여 종 이상의 미생물을 분리하였으며, 분자계통학적 분석을 통하여 최종, *Gammaproteobacteria* 강에 속하는 미생물 6종, *Actinobacteria* 강에 속하는 미생물 5종, *Betaproteobacteria* 강에 속하는 미생물 4종, *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 미생물 2종, *Bacilli* 강에 속하는 미생물 2종을 얻을 수 있었다. 이들은 공통적으로 낮은 pH의 조건에서 살아가는 미생물임을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 확보한 산성토양내의 미생물들의 생리적 특징은 앞으로의 다양한 국내 미생물 자원의 활용에 기초적인 지식을 제공할 것으로 기대된다.

감사의 말

이 논문은 환경부의 재원으로 국립생물자원관 자생생물 조사 발굴사업(No. NIBR201501119, NIBR201501113, NIBR201601113)의 지원과 한국연구재단의 신진연구지원사업(No. 2015R1C1A1A01053750, 2016R1C1B1010946)의 지원을 받아 수행하였습니다.

References

- Baker-Austin, C. and Dopson, M.** 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**, 165-171.
- Choi, H., Koh, H.W., Kim, H., Chae, J.C., and Park, S.J.** 2016. Microbial community composition in the marine sediments of Jeju island: next-generation sequencing surveys. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 883-890.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376.
- Fitch, W.M.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Biol.* **20**, 406-416.
- Gonzalez, J.M. and Saiz-Jimenez, C.** 2002. A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environ. Microbiol.* **4**, 770-773.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hedrich, S., Schlomann, M., and Johnson, D.B.** 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology* **157**, 1551-1564.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., et al.** 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716-721.
- Koh, H.W., Hong, H., Min, U.G., Kang, M.S., Kim, S.G., Na, J.G., Rhee, S.K., and Park, S.J.** 2015a. *Rhodanobacter aciditrophus* sp. nov., an acidophilic bacterium isolated from mine wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4574-4579.
- Koh, H.W., Kim, S.J., Rhee, S.K., and Park, S.J.** 2015b. Isolation and characterization analysis of the halophilic archaea isolated from solar saltern, Gomso. *Korean J. Microbiol.* **51**, 427-434.
- Liu, Y., Tang, H., Lin, Z., and Xu, P.** 2015. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1484-1492.
- Muravyov, M.I. and Fomchenko, N.V.** 2013. Leaching of nonferrous metals from copper converter slag with application of acidophilic microorganisms. *Appl. Biochem. Microbiol.* **49**, 562-569.
- Oren, A.** 2010. Acidophiles. John Wiley & Sons, Inc., Online Publication.
- Saitou, N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S.** 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
- Waksman, S.A. and Joffe, J.S.** 1922. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: II. *Thiobacillus, Thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *J. Bacteriol.* **7**, 239-256.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.