

제주도 고산 습지에서 분리한 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 문에 속하는 신종후보 세균

최아영 · 최재희 · 강지영¹ · 최정욱² · 이상훈³ · 김하늘² · 이하나⁴ · 신영민⁵
장광엽¹ · 이현환² · 김규중³ · 조기성² · 천종식⁴ · 김승범⁵ · 조장천*

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

Novel Species Candidates Belonging to the Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria* Isolated from the Halla Mountain Wetlands

Ahyoung Choi, Jaehee Choi, Ji Young Kang¹, Jeong-Uk Choe², Sanghoon Lee³,
Haneul Kim², Hana Yi⁴, Young Min Shin⁵, Kwangyeop Jahng¹, Hyune Hwan Lee²,
Kyujoong Kim³, Kiseong Joh², Jongsik Chun⁴, Seung Bum Kim⁵ and Jang-Cheon Cho*

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

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

²Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies,
Yongin 449-791, Korea

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

⁴School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea

⁵Department of Microbiology & Molecular Biology, Chungnam National University,
Daejeon 305-764, Korea

Abstract – Although Sumnunmulbangdui wetland at the Halla Mountain in Jeju Island, a kind of montane wetlands, has been considered to bear high biodiversity, no study has been reported on the bacterial diversity. In this study, soil and water samples were collected from the wetland in order to isolate novel bacterial species. Bacterial strains belonging to the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria* were isolated after spreading soil and water samples onto solid agar media. The 16S rRNA gene sequences of the strains assigned to the three phyla were compared to those of type strains of the species in the phyla. 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 32 strains were regarded as novel species candidates in the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. Diversity of novel species candidates was very low; the candidates were confined to only few genera. In the *Bacteroidetes*, 13 novel candidate species were affiliated with the genera *Mucilagibacter*, *Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*, and *Chryseobacterium*. A total of 13 novel candidate species that assigned to the genera *Paenibacillus*,

* Corresponding author: Jang-Cheon Cho, Tel. 032-860-7711,
Fax. 032-232-0541, E-mail. chojc@inha.ac.kr

Lysinibacillus, and *Bacillus* were identified in the phylum *Firmicutes*. Only two candidate species that belonged to the genera *Mycobacterium* and *Nocardia* were excavated in the *Actinobacteria*. Cultural, physiological, and chemotaxonomic characteristics have been determined for the novel species candidates, and the characteristics are described in this study.

Key words : Sumnunmulbangdui, wetland, bacterial diversity, novel species, 16S rRNA

서 론

습지는 '식물을 비롯한 여러 생물체의 생장기 또는 상당기간 동안 토양이 물에 침수되거나 토양의 근처에 물이 존재하고 있어 습윤상태를 유지하고 있는 공간'이라 정의할 수 있다(USEPA 2008). 습지는 내륙 토양 생태계와 수계 생태계의 중간지대의 특성을 지니고 있으며, 독특한 환경에 적응하여 진화해 온 특별한 생물상이 서식하고 있어서 종 다양성이 높은 생태계라 여겨지고 있다(Mitsch and Gosselink 1993). 습지는 일반적으로 내륙 습지와 해안 습지로 구별되며, 이 중 내륙 습지는 하천 습지와 산지 습지로 구분된다(권 2006). 본 연구의 대상 지역인 1100 고지 습지와 숨은물벙뒤 습지는 산지 습지로서 제주도 한라산의 해발 980~1,100m에 위치하고 있어서 고산 습지로 구분된다. 숨은물벙뒤 습지는 한라산 고산지대의 삼형제 오름, 노로 오름, 살림 오름의 중앙에 위치하고 있으며, 개방형 평탄지대에 주변 산악 하천에서 유입된 담수와 강우에 의해서 형성된 습지다. 고산 습지는 하천 습지에 비해 인간의 접근성이 낮은 독특한 생태계의 특징을 지니고 있기 때문에 인위적인 생태계 교란이 많지 않으며, 그 결과 생물 다양성 보존과 이해라는 측면에서 관심이 계속 증대되고 있다.

고산 습지 생태계를 구성하는 주요 구성인자로는 기후, 토양, 수리적 특징을 포함하는 물리화학적 환경요인과 동물, 식물, 미생물을 포함하는 생물학적 요인이 있다. 특히 영양염류와 다양한 생물학적 작용의 결과 습지 생태계는 지구상에서 가장 영양물질이 풍부하고 생산성이 높은 생태계로 인식되고 있다. 생산성이 높은 생태계는 생태계에서 분해자의 역할을 수행하고 있는 세균이 식물 및 동물의 사체를 분해하여 입자형태의 유기물과 영양소를 이용 가능한 형태로 전환하여 생태계의 에너지 효율을 높인 결과이다(Nannipieri *et al.* 2003). 그러므로 이러한 생태계에서 세균의 군집구조와 역할을 분석하는 것은 고산 습지 생태계의 먹이사슬과 에너지 및 탄소의 순환과정을 이해하기 위하여 매우 중요하다. 그러나 국내의 경우 고산 습지에 대한 연구는 주로 생물

상 분포와 일부 동물 계통군에 집중되어 있으며, 세균군집에 대한 연구는 극히 저조하다고 볼 수 있다.

지구상에 존재하는 5×10^{30} 개의 (Whitman *et al.* 1998) 미생물 중 현재까지 배양에 성공하여 명명된 세균의 수는 매우 적다. 현재까지 명명된 미생물 종은 약 9,000여 종에 불과하지만 자연계에 존재할 것으로 추정되는 미생물 종은 최소 10만 종 이상이다(<http://www.bacterio.cict.fr>). 새로운 미생물 종의 발견은 생물다양성에 대한 이해를 증진시키고, 새로운 기능을 지닌 단백질 및 유용물질의 발견으로 이어져 생물자원의 확보에 기여한다. 새롭게 분리된 세균의 신종(new species) 여부는 세균 종의 정의로부터 규정된다. 세균의 종개념(species concept) 중 학자들 사이에서 널리 인정되는 개념은 '유전체적 종개념(genomic species concept)'이다. 이는 '전체 DNA의 유사도가 70% 이상이거나 서로 다른 두 DNA의 재결합(re-association)시 ΔT_m 값이 5°C 미만인 개체군'이라 정의된다(Wayne *et al.* 1987). 그러나 DNA-DNA 재결합 실험의 까다로움은 새로운 분자 지표의 필요성을 현실적으로 제기하였고, 이 결과 16S rRNA 유전자의 유사도가 97% 미만이면 항상 DNA-DNA 유사도(relatedness)가 70% 미만임이 실험적으로 입증되었다(Stackebrandt and Goebel 1994). 최근 이 지표는 다시 확장되어 16S rRNA 유사도가 98.7% 미만이면 DNA-DNA 유사도는 70% 미만임이 확인되었다(Stackebrandt and Ebers 2006). 이러한 분자적 지표를 기초로 하여 세균의 형태학적, 생화학적, 생리적, 화학분류적 특징을 종합하는 이른바 다상분류(polyphasic taxonomy) (Vandamme *et al.* 1996)를 통하여 세균의 신분류군이 제안되고 공인된다.

본 연구에서는 제주도 한라산 숨은물벙뒤 습지에서 담수 및 토양시료를 채취하여 세균을 분리하고 16S rRNA 유전자 염기서열을 구하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열의 유사도가 기존에 발표된 종과 98.7% 미만인 균주를 신종후보 균주로 간주하여 형태학적, 생리학적, 화학분류적 특징을 조사하였다. 일반적으로 생태계에서 가장 우점하는 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 문(phyllum)에 속하는 후보신종이 숨은물벙뒤 습지에서도 다수가 발굴되었기 때문에 *Proteobacteria* 문은 독립적인 논

문으로 보고될 예정이며, 본 논문에서는 *Proteobacteria* 이외에 토양 및 담수생태계에서 우점하는 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 문에 속하는 신종후보의 발굴과 특징의 기재를 목적으로 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 채취 및 세균의 배양

2010년 7월 21일에 한라산 1100 고지 람사르 습지 및 습은물벙뒤 습지에서, 그리고 2010년 9월 21일 한라산 습은물벙뒤 습지에서 토양 및 담수시료를 멸균된 50 mL 시험관을 이용하여 채취하였다. 채취한 시료를 멸균된 인산 완충용액을 사용하여 희석한 다음, LB, NA, R2A, 1/3 R2A 배지 (BD Difco, USA)에 100 μ L씩 도말하였다. 시료가 도말된 배지를 20~30°C의 배양기에서 일주일 이상 배양하였으며 배양 후에 형성된 집락 수를 계수하였다. 집락의 모양과 크기에 유의하여 각 집락을 백금으로 취한 다음 이후 실험에 사용하였다. 배양된 균주는 순수분리를 위해 단일 균주로 판단될 때까지 계대 배양을 실시하였으며 순수 분리된 균주는 장기 보관을 위해 10~20% 글리세롤 현탁액 상태로 -70~80°C에 동결 보관하였다.

2. 16S rDNA를 이용한 세균의 계통학적 분석

고체 배지에서 분리된 집락에서 DNeasy Tissue Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 추출한 DNA 또는 잘 분리된 집락 그 자체를 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 16S rRNA 유전자 증폭에 사용한 primer로서 일반적인 세균 문을 증폭시키는 primer인 27F-B (*E. coli* numbering 8-27; 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492-1511; 5'-GGYTACCTTGTTACG ACTT-3')을 사용하였다 (Lane 1991). DNA의 증폭을 위하여 94°C에서 denaturation 1분, 56°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하였다. 이후 증폭된 PCR 산물을 *Hae*III 제한효소로 3시간 동안 37°C에서 반응한 다음, 3% agarose gel (NuSieve 3:1 Agarose)을 사용하여 절단 양상을 분석하였다. 효소 절단 패턴 분석을 통해서 고유한 그룹으로 나뉜 세균그룹을 대표하는 세균을 선정한 다음, PCR 산물의 16S rRNA 유전자 염기서열을 27F, 519F, 800R primer를 이용하여 결정하였다. 염기서열은 Macrogen, Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하여 진행하였으며, Sanger 염기서열 분석법이 사용되었다.

확보한 16S rRNA 유전자 염기서열은 1차적으로 Gen-

Bank의 BLASTn을 이용하여 근연 염기서열을 결정하였으며 (Altschul et al. 1997), 표준균주 16S rRNA 유전자 데이터베이스인 EzTaxon 서버를 (Chun et al. 2007) 이용하여 근연종을 분석하고 염기서열 유사도를 결정하였다. 근연종과 98.7% 미만의 16S rRNA 유전자 유사도를 가진 균주의 염기서열을 ARB software package (Ludwig et al. 2004)를 이용하여 정렬하였다. PT-server를 이용하여 계통학적으로 가장 가까운 참고 염기서열의 정렬을 기반으로 신종후보 균주의 염기서열을 자동적으로 정렬한 다음, 수작업으로 다시 정렬하였다. ARB에서 1차적으로 Jukes-Cantor distance (Jukes and Cantor 1969)를 기초로 확인된 계통수의 염기서열을 추출한 다음, 다시 MEGA software (Tamura et al. 2007)를 이용하여 계통수를 최종적으로 결정하였다. 계통수에서 각 분지 (node)의 정확도는 1,000번의 bootstrap resampling 분석을 실시하여 70% 이상의 값을 계통수에 나타내었다.

3. 신종후보 균주의 표현형 특징 분석

신종후보 균주를 배양한 후, 배양학적 특징, 생리적인 특징, 화학분류적 특징을 널리 사용되는 표준방법 (Sneath and Krieg 1994)을 사용하여 분석하였다. 우선 지수 성장기의 세포를 취한 후 그람 염색을 실시하여 그람 양성 및 음성 여부를 확인하였다. 그람 염색 후 광학 또는 위상차 현미경 관찰을 통하여 세포의 모양 및 크기를 확인하였다. 아울러 후기 지수성장기의 집락의 모양을 확대경을 이용하여 관찰한 다음 기록지에 기록하였다. 미생물의 생화학적 특징은 API 20NE kit (bioMérieux)을 이용하여 확인하였으며, 세포 내 지방산 분석은 MIDI Microbial Identification System에 따라서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 신종후보 균주의 총괄

한라산 습은물벙뒤 습지에서 분리된 다양한 세균 중 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 문에 해당하는 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정한 다음, 세균 종 목록에 등재된 표준균주 (type strain)와 16S rDNA 서열의 유사도를 비교하였다. Stackebrandt and Ebers (2006)에 의해 제기된 신종의 실용적인 척도인 98.7% 미만의 16S rDNA 서열의 유사도에 기초하여 신종후보 대상 균주를 결정하였다. 표준균주와 98.7% 미만의 유사도를 보인 균주의 총 수는 32개였으며, *Bacteroidetes* 문에 17개, *Firmicutes* 문에 13개, *Actinobacteria* 문에 2개의 균주가 분

Table 1. Summary of novel species candidates in the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*, isolated from montane wetlands in the Halla Mountain

Phylum	Family	Genus	Strain ID	Closest type strain	Similarity	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Mucilaginibacter</i>	HME6827	<i>M. gossypii</i> Gh-67 ^T	97.7%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	JW7100901-R06	<i>M. gossypii</i> Gh-67 ^T	98.1%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	JSC-R3-522-12	<i>M. gracilis</i> TPT18 ^T	97.5%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	JSC-R3-525-1	<i>M. gracilis</i> TPT18 ^T	97.5%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	JSC-R3-521-5	<i>M. boryungensis</i> BDR-9 ^T	97.3%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	IMCC12823	<i>M. frigiditolerans</i> FT22 ^T	95.6%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	JSC-R3-521-13	<i>M. frigiditolerans</i> FT22 ^T	95.6%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	IMCC12884	<i>M. daejeonensis</i> Jip 10 ^T	95.5%	
		<i>Mucilaginibacter</i>	JSC-R3-521-10	<i>M. daejeonensis</i> Jip 10 ^T	95.4%	
		<i>Sphingobacterium</i>	IMCC12925	<i>S. siyangense</i> SY1 ^T	93.9%	
		<i>Pedobacter</i>	IMCC12928	<i>P. suwonensis</i> 15-52 ^T	98.0%	
	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>	JSC-P2-223-10	<i>F. massiliensis</i> URCM1	96.5%	
		<i>Flavobacterium</i>	HHL-303	<i>F. resistens</i> BD-b365 ^T	97.5%	
		<i>Chryseobacterium</i>	IMCC12929	<i>C. indologenes</i> LMG 8337 ^T	97.8%	
		<i>Chryseobacterium</i>	IMCC12937	<i>C. indoltheticum</i> LMG 4025 ^T	92.7%	
		<i>Chryseobacterium</i>	IMCC12895	<i>C. indoltheticum</i> LMG 4025 ^T	97.8%	
		<i>Chryseobacterium</i>	SJ2FN2	<i>C. indoltheticum</i> LMG 4025 ^T	97.8%	
	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	IMCC13003	<i>P. chondroitinus</i> DSM 5051 ^T	98.6%
			<i>Paenibacillus</i>	IS1100910-02	<i>P. pectinilyticus</i> RCB-08 ^T	97.9%
<i>Paenibacillus</i>			JSC-N3-513-1	<i>P. rigui</i> WPCB173 ^T	97.6%	
<i>Paenibacillus</i>			IW4100910-R04	<i>P. rigui</i> WPCB173 ^T	98.0%	
<i>Paenibacillus</i>			JSC-N3-214-3	<i>P. nanensis</i> MX2-3 ^T	97.5%	
<i>Paenibacillus</i>			JSC-N2-612-4	<i>P. sepulcri</i> CCM 7311 ^T	94.1%	
<i>Paenibacillus</i>			JSC-P2-212-7	<i>P. sacheonensis</i> SY01 ^T	97.6%	
<i>Paenibacillus</i>			IS3100910-R05	<i>P. sacheonensis</i> SY01 ^T	97.5%	
<i>Paenibacillus</i>			JSC-N3-413-3	<i>P. chibensis</i> JCM 9905(T)	97.4%	
<i>Paenibacillus</i>			JSC-N3-513-2	<i>P. odorifer</i> TOD45 ^T	98.2%	
<i>Planococcaceae</i>		<i>Lysinibacillus</i>	SJ2SN2	<i>L. sphaericus</i> C3-41 ^T	98.5%	
<i>Bacillaceae</i>		<i>Bacillus</i>	JSC-N3-215-1	<i>B. fumarioli</i> LMG 17489 ^T	97.7%	
		<i>Bacillus</i>	HHL-143	<i>B. methanolicus</i> NCIMB 13113 ^T	96.3%	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	IMCC13010	<i>M. gilvum</i> ATCC 43909 ^T	98.5%	
	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	IMCC12749	<i>N. otitidiscaviarum</i> DSM 43242 ^T	97.9%	

포하였다 (Table 1). 전체적으로 과 (family), 속 (genus) 수준의 다양성은 높지 않았으며, 몇몇 과와 속에 집중되어 신종후보 균주가 발굴되었다. *Bacteroidetes* 문에는 *Sphingobacteriaceae* 과에 11균주, *Flavobacteriaceae* 과에 6균주가 신종후보 균주로서 발굴되었으며, 이들은 *Mucilaginibacter*, *Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* 속에 속하였다. *Firmicutes* 문에는 *Paenibacillaceae* 과에 10균주, *Planococcaceae* 과에 1균주, *Bacillaceae* 과에 2균주가 속하였고, 각 과에는 오직 하나의 속 (*Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Bacillus*)에만 포함되는 신종후보 균주가 배양되었다. *Actinobacteria* 문에 속하는 신종후보 균주는 2 주였으며, 각각 *Mycobacterium* 속과 *Nocardia* 속에 속하는 신종후보 균주로 밝혀졌다. *Bacteroidetes* 문을 제외하고, *Firmicutes*와 *Actinobacteria* 문에는 모든 신종후보 균주가 각각 서로 다른 신종에 해당하였다. *Bacteroidetes* 문에 해당하는 4개의 후보신

종은 각각 서로 다른 두 균주로 구성되었다. 종합하여, *Bacteroidetes* 문에 13개의 후보 신종, *Firmicutes* 문에 13개의 후보 신종, *Actinobacteria* 문에 2개의 후보 신종이 본 연구를 통하여 제주도 한라산 고산 습지에서 발굴되었다.

2. Bacteroidetes 문에 속하는 신종후보 세균의 계통 분석 및 특징 기재

Bacteroidetes 문은 *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* 그룹이라 불려왔던 문이며, 이에 속하는 세균 종은 사람이나 동물의 장내 소화관 또는 자연계 도처에 존재하며, 담수, 해양, 토양 등 환경에서 고분자의 유기물을 잘 분해하는 특징을 가지고 있다 (Bernardet et al. 2002). *Bacteroidetes* 문은 크게 *Bacteroidales*, *Flavobacteriales*, *Sphingobacteriales* 목으로 구성되며 각각 *Bacteroides*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* 속을 표준 속으로 삼는 목이

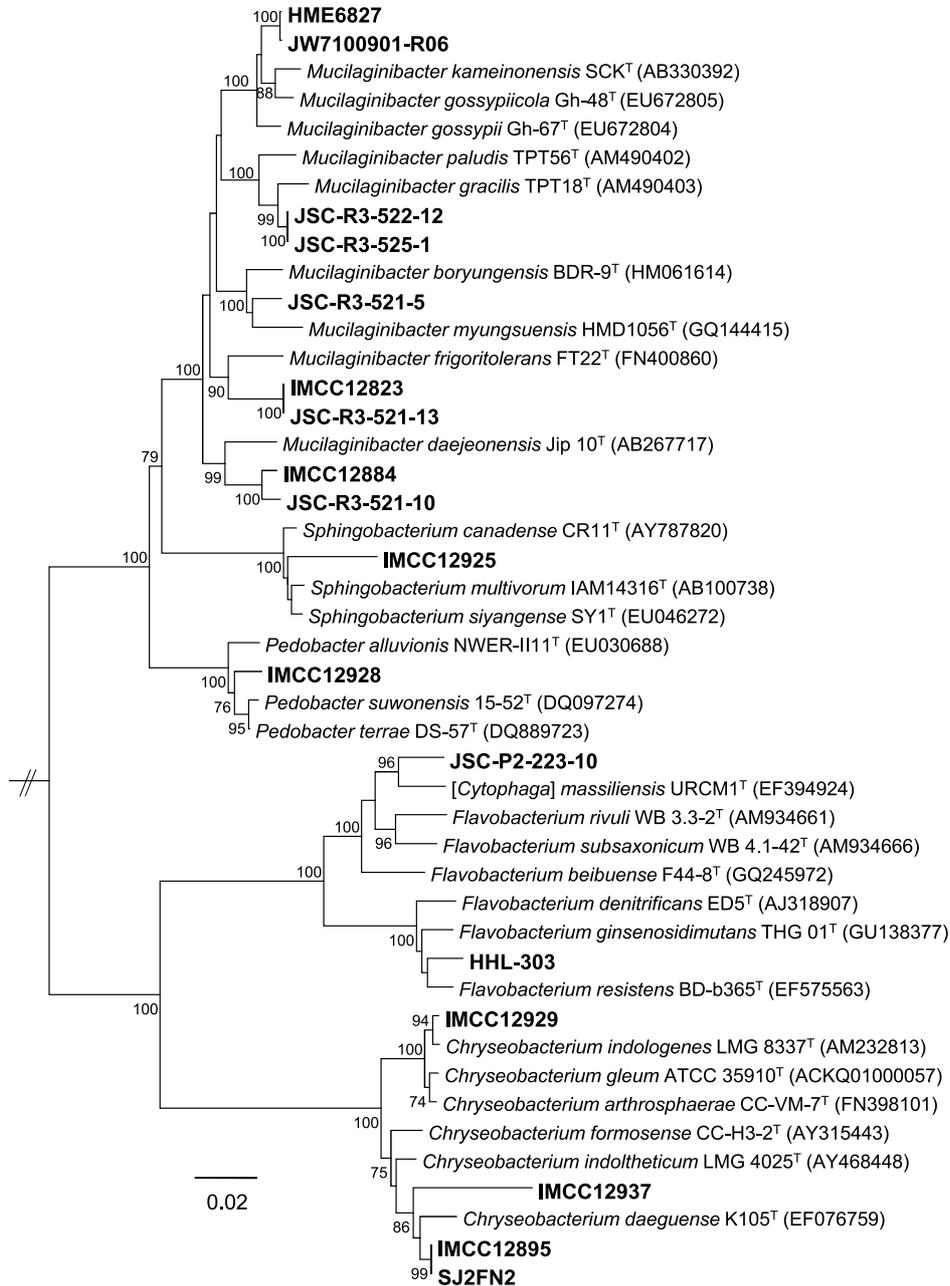


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between novel species candidates isolated from mountain wetlands and their relatives of the phylum *Bacteroidetes*. Bootstrap values representing above 70% are presented. Scale bar: 0.02 substitutions per nucleotide position.

다.

본 연구에서 확보한 신종은 모두 *Sphingobacteriaceae* 과와 *Flavobacteriaceae* 과에 속하였다 (Table 1, Fig. 1). *Sphingobacteriaceae* 과에는 *Mucilaginibacter*, *Sphingobacterium*, *Pedobacter* 속에 속하는 후보신종이 발굴되었으며, *Flavobacteriaceae* 과에는 *Flavobacterium*과 *Chryseobacterium* 속에 해당하는 후보신종이 발굴되었다. 특

히 모든 신종후보 균주는 모두 담수 시료에서 분리되었으며, 토양시료에서 분리된 균주는 없었다. *Mucilaginibacter* 속에 해당하는 후보신종은 총 6개였으며, 이중 HME6827과 JW7100901-R06 균주는 16S rDNA 염기서열의 유사도가 99.9%에 달해 동일 종으로 판정되었다. 유사하게 JSC-R3-522-12와 JSC-R3-525-1는 100%의 유사도, IMCC12823과 JSC-R3-521-13은 99.8%의 유사도

를 보여 동일 종으로 간주되었다. 16S rDNA 염기서열을 이용한 분자계통학적 연구결과, IMCC12884와 JSC-R3-521-10s는 *Mucilaginibacter daejeonensis* Jip 10^T와 각각 유사도 95.5%, 95.4%를 보여 계통도에서도 단계통가지를 구성하였으나, 두 균주의 상호 유사도가 98.2%로 나타나 각각을 독립적인 후보신종으로 판정하였다. 한편, IMCC12925는 비록 *Sphingobacterium siyangense* SY1^T와 93.9%의 낮은 유사도를 나타내어 신속에 해당되는지 여부를 확인하였으나, 계통분석 결과 *Sphingobacterium* 속에 속하는 신종으로 판정되었다. IMCC12928은 *P. suwonensis* 15-52^T과 98.0%의 유사도를 보여 *Pedobacter* 속의 후보신종으로 간주되었다.

Flavobacteriaceae 과에는 *Flavobacterium* 속과 *Chryseobacterium* 속에 속하는 신종후보가 습은물벙뒤 습지에서 발굴되었다. 균주 JSC-P2-223-10은 *Flavobacterium* 속에 속하지만 잘못 명명된 *Candidatus [Cytophaga] masilensis* (Pagnier *et al.* 2008)와 96.5%를 보여 *Flavobacterium* 속의 후보신종으로 간주되었다. *Chryseobacterium* 속에는 3개의 후보신종이 발굴되었으며, 이 중 IMCC12895와 SJ2FN2는 99.9%의 16S rDNA 서열 유사도를 보여 동일종으로 판정되었다.

모든 신종후보 균주를 분리 당시의 배지에 배양한 후, 배양학적 특징, 생리학적 특징, 화학분류적인 특징을 분석하였다. 본 논문에서는 분석결과를 종합하여, *Bacteroidetes* 문에 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.

후보신종 1: *Mucilaginibacter* sp. HME6827

그람 음성이며 짧은 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 분홍색이며, 원형. API 20NE를 이용한 생화학적인 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (45.8%), iso-C_{15:0} (19.2%), iso-C_{17:0} 3-OH (9.1%), C_{16:1} ω 5c (7.9%), C_{16:0} (5.2%)로 구성됨. 근연종은 *Mucilaginibacter gossypii*임. 제주도 습은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 2: *Mucilaginibacter* sp. JSC-R3-522-12

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 분홍색이며, 원형. API 20NE를 이용한 생화학적인 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 iso-C_{15:0}

(30.1%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (21.0%), iso-C_{17:0} 3-OH (10.5%), anteiso-C_{15:0} (6.4%), C_{16:1} ω 5c (5.8%), C_{16:0} (5.0%)로 구성됨. 근연종은 *Mucilaginibacter gracilis*임. 제주도 습은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 3: *Mucilaginibacter* sp. JSC-R3-521-5

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 베이지색이며, 원형. API 20NE를 이용한 생화학적인 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (34.8%), iso-C_{15:0} (23.8%), iso-C_{17:0} 3-OH (11.5%), C_{16:0} (5.3%)로 구성됨. 이 균주와 근연종은 *Mucilaginibacter boryungensis*임. 제주도 습은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 4: *Mucilaginibacter* sp. IMCC12823

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 노란색이며, 불규칙형. API 20NE를 이용한 생화학적인 동정결과, 질산염 환원, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 iso-C_{17:1} ω 5c (12.1%), C_{15:1} ω 5c (10.9%), C_{18:0} (10.6%), iso-C_{15:0} (10.1%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (7.9%), C_{16:0} (5.4%), iso-C_{17:0} 3-OH (5.4%)로 구성됨. 근연종은 *Mucilaginibacter frigoritolerans*임. 제주도 습은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 5: *Mucilaginibacter* sp. IMCC12884

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 흰색이며 원형. API 20 NE를 이용한 생화학적인 동정결과, 질산염 환원, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (16.2%), iso-C_{15:0} (14.5%), C_{16:0} (10.9%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (7.8%), iso-C_{17:0} 3-OH (7.6%), iso-C_{15:0} 3-OH (6.6%), C_{17:0} cyclo (5.7%)로 구성됨. 근연종은 *Mucilaginibacter daejeonensis*임. 제주도 습은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 6: *Mucilaginibacter* sp. JSC-R3-521-10

그람 음성이며 간균. R2A 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 오렌지색이며, 원형. API 20NE를 이용한 생화학적인 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 iso-C_{15:0} (20.4%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (17.0%), iso-C_{17:0}

3-OH (13.6%), C_{16:0} (6.3%), C_{12:0} (5.9%), anteiso-C_{15:0} (5.6%)로 구성됨. 근연종은 *Mucilaginibacter daejeonensis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 7: *Sphingobacterium* sp. IMCC12925

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 아이보리색이며, 작은 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Indole 생산, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:0} (25.2%), C_{17:0} cyclo (18.0%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (13.4%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (13.4%), C_{14:0} 3-OH and/or iso-C_{16:1} I (7.2%), C_{19:0} cyclo ω 8c (5.3%)로 구성됨. 근연종은 *Sphingobacterium siyangense*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 8: *Pedobacter* sp. IMCC12928

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 연노란색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (18.0%), iso-C_{17:1} ω 5c (11.9%), C_{15:1} ω 5c (10.0%), C_{18:0} (9.6%), iso-C_{17:0} 3-OH (9.3%), iso-C_{15:0} (8.3%)으로 구성됨. 근연종은 *Pedobacter suwonensis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 9: *Flavobacterium* sp. JSC-P2-223-10

그람 음성이며 간균. PYGV 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 밝은 베이지이며, 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 iso-C_{15:0} (16.9%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (15.2%), iso-C_{17:0} 3-OH (12.5%), C_{16:0} (7.3%), C_{12:0} (6.1%)로 구성됨. 근연종은 *Flavobacterium [Cytophaga] massiliensis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 10: *Flavobacterium* sp. HHL-303

그람 음성이며, 짧은 간균. LB 배지에서 37°C 생장 시 콜로니는 노란색이며 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 iso-C_{15:0} (27.4%), iso-C_{15:0} 3-OH (8.7%), iso-C_{17:0} 3-OH (7.0%), C_{16:0} 3-OH (6.0%), iso-C_{15:1} G (5.0%)로 구성됨. 근연종은 *Flavobacterium resistens*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의

담수에서 분리되었음.

후보신종 11: *Chryseobacterium* sp. IMCC12929

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 연노랑색이며 불규칙형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:0} (19.2%), C_{17:0} cyclo (15.5%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (14.0%), iso-C_{15:0} (7.7%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (7.2%)로 구성됨. 근연종은 *Chryseobacterium indologenes*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 12: *Chryseobacterium* sp. IMCC 12937

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 아이보리색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{18:0} (17.1%), iso-C_{17:1} ω 5c (16.3%), C_{15:1} ω 5c (15.6%), C_{16:0} (11.0%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (7.2%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (6.0%)로 구성됨. 근연종은 *Chryseobacterium indoltheticum*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 13: *Chryseobacterium* sp. SJ2FN2

그람 음성이며 간균. NA 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 불투명한 노란색이며, 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Urease, Esculin hydrolysis는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, PNPG (β -galactosidase)는 음성. 세포 내 주요 지방산은 iso-C_{15:0} (33.3%), iso-C_{17:0} 3-OH (22.4%), C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (12.4%), 10-methyl-C_{16:0} and/or iso-C_{17:1} ω 9c (7.9%)로 구성됨. 근연종은 *Chryseobacterium indoltheticum*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

3. Firmicutes 문에 속하는 신종후보 세균의

계통 분석 및 특징 기재

Firmicutes 문은 Low G+C Gram positives라 고전적으로 명명되었던 문으로서, 현재 6개의 강으로 분류된다. 본 연구에서 분리된 신종후보 세균은 모두 *Bacilli* 강, *Bacillales* 목에 속하며, 11개의 균주가 신종후보 균주에 해당하였다 (Table 1, Fig. 2). 11개의 후보신종 균주 중 10개는 *Paenibacillus* 속에 속하였으며, 1개의 균주는 *Lysinibacillus*에 속하였다. *Bacillaceae* 과에는 *Bacillus* 속에 속하는 2개의 신종 후보가 발굴되었다.

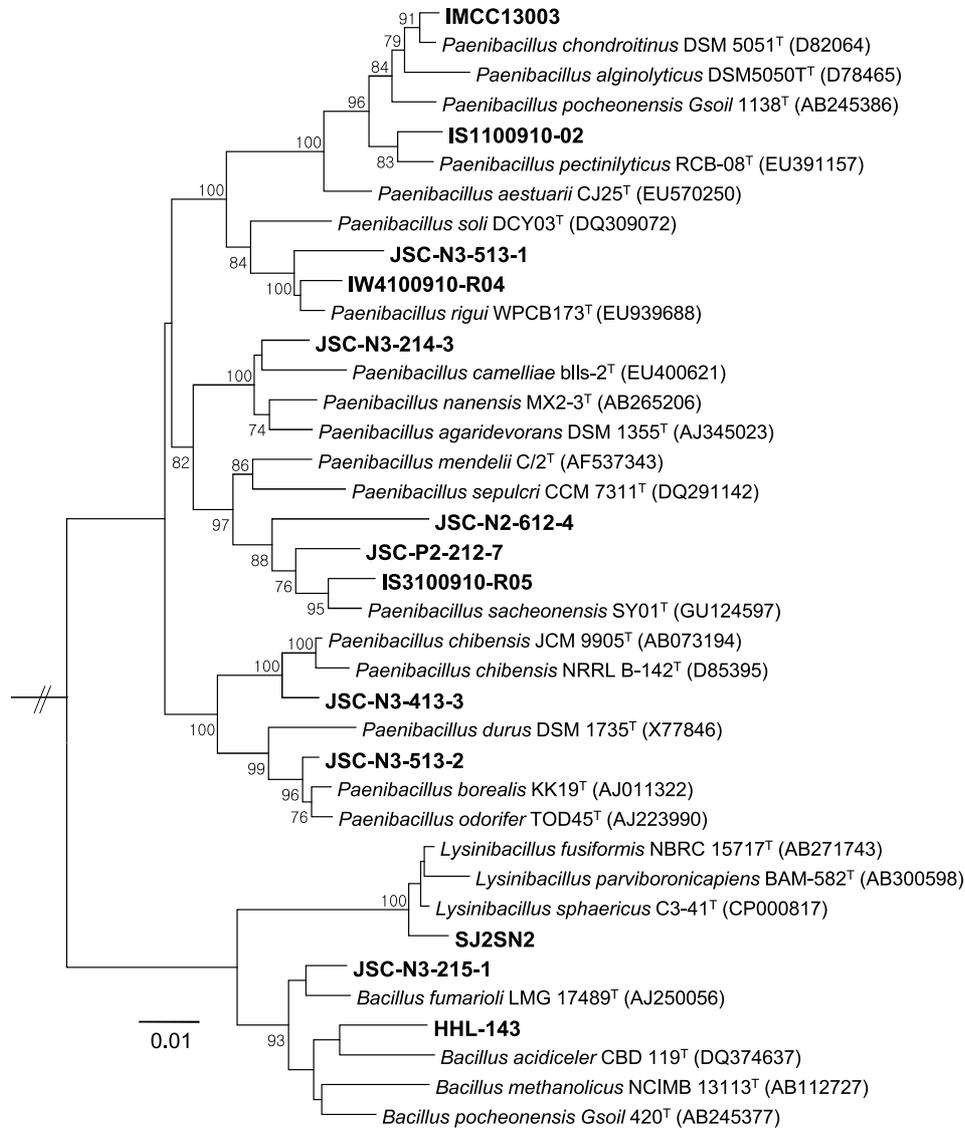


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between novel species candidates isolated from mountain wetlands and their relatives of the phylum Firmicutes. Bootstrap values representing above 70% are presented. Scale bar: 0.01 substitutions per nucleotide position.

16S rDNA 염기서열의 계통분석 결과, *Paenibacillus* 속 에 속한 10개의 균주 모두, 단일 균주가 단일종으로 분류되어 *Paenibacillus* 속에서만 10개의 후보신종이 발굴 되었다 (Fig. 2). *Paenibacillus* 속에 해당하는 신종후보 균주들은 담수와 토양에서 고루 분리되었다. *Paenibacillus* 속에는 128개의 종이 있으며, 이들은 일반적으로 내륙의 토양, 담수, 또는 갯벌에서 분리되었으며, 많은 수의 종들이 다양한 유기물을 분해할 수 있는 능력을 소지하고 있다. 16S rDNA 염기서열을 이용한 분자계통학적 연구 결과, JSC-N3-513-1과 IW4100910-R04 균주는 *Paenibacillus rigui* WPCB173^T와 각각 97.6%, 98.0%의 유사도를

보여, 계통도에서도 단계통가지를 구성하였으나, 두 균주의 상호 유사도가 96.8%로 매우 낮아 각 균주를 후보신종으로 간주하였다. 유사하게 JSC-P2-212-7과 IS3100910-R05 균주는 *Paenibacillus sacheonensis* SY01^T와 각각 97.6%와 77.5%의 유사도를 보이며 계통도에서 단계통가지를 형성하지만, 두 균주의 염기서열 유사도가 96.1%로 낮아 두 균주를 모두 독립적인 후보신종으로 결정하였다. 한편 *Bacillaceae* 과에 속하는 2개의 신종후보 균주인 JSC-N3-215-1와 HHL-143은 *Bacillus fumarioli* LMG 17489^T, *Bacillus methanolicus* NCIMB 13113^T와 각각 97.7%, 96.3%의 16S rDNA 서열 유사도를 나타내어

Bacillus 속의 후보신종으로 결정하였다.

Firmicutes 문, *Bacillales* 목에 속하는 후보신종의 표현형 형질 분석을 통해 확보한 특징을 다음과 같이 기재하고자 한다. 신종후보의 공식적 기술은 이후 표준균주와의 다상분류를 통해 최종적으로 기재될 예정이다.

후보신종 1: *Paenibacillus* sp. IMCC13003

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 흰색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 iso-C_{15:0} (34.5%), anteiso-C_{15:0} (7.9%), C_{17:0} cyclo (6.3%), C_{16:0} (5.9%), iso-C_{17:0} (5.8%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus chondroitinus*임. 제주도 1100 고지 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 2: *Paenibacillus* sp. IS1100910-02

그람 양성이며 짧은 간균. NA 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 우유색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Indole 생산, Glucose 발효, Esculin hydrolysis는 양성. 질산염 환원, Arginine dihydrolase, Urease, PNPG (β -galactosidase)는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (39.3%), iso-C_{15:0} (25.6%), anteiso-C_{13:0} (5.9%), C_{14:0} (5.7%), iso-C_{14:0} (5.4%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus pectinilyticus*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 3: *Paenibacillus* sp. JSC-N3-513-1

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 밝은 베이지색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (32.3%), C_{12:0} (12.1%), C_{14:0} (6.2%), C_{16:0} (7.3%), iso-C_{14:0} (5.6%), C_{16:1} ω 11c (5.0%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus rigui*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 4: *Paenibacillus* sp. IW4100910-R04

그람 양성이며 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 우유색이며, 불규칙형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Arginine dihydrolase는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (49.8%), anteiso-C_{17:1} ω 9c (11.7%), iso-C_{15:0} (7.8%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus rigui*임. 제주도

숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 5: *Paenibacillus* sp. JSC-N3-214-3

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 베이지색이며 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 anteiso-C_{15:0} (46.8%), C_{16:0} (14.4%), C_{12:0} (6.8%), iso-C_{16:0} (6.4%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus nanensis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 6: *Paenibacillus* sp. JSC-N2-612-4

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 밝은 베이지색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Glucose 발효, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis는 음성. D-glucose, D-mannose, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, potassium gluconate, capric acid, malic acid, L-arabinose, D-mannitol, adipic acid, trisodium citrate, phenylacetic acid는 생장에 이용하지 못함. 근연종은 *Paenibacillus sepulcristis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 7: *Paenibacillus* sp. JSC-P2-212-7

그람 양성이며 간균. PYGV 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 흰색이며 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 anteiso-C_{15:0} (31.8%), C_{12:0} (10.7%), C_{11:0} 2-OH (8.2%), C_{16:0} (7.7%), iso-C_{16:0} (6.7%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus sacheonensis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 8: *Paenibacillus* sp. IS3100910-R05

그람 양성이며 간균. R2A 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 분홍색이며 불규칙형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Indole 생산, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (45.1%), iso-C_{15:0} (21.3%), iso-C_{16:0} (13.0%), iso-C_{17:0} (6.2%), C_{16:0} (6.1%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus sacheonensis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 9: *Paenibacillus* sp. JSC-N3-413-3

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 베이지색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적

동정결과, 질산염 환원, Glucose 발효, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (64.0%), anteiso-C_{17:0} (13.7%), iso-C_{16:0} (8.0%), iso-C_{15:0} (4.9%), iso-C_{14:0} (3.7%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus chibensis*이다. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 10: *Paenibacillus* sp. JSC-N3-513-2

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장시 콜로니는 베이지색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease는 음성. NA배지를 이용, 20°C에서 36시간 생장 후 추출한 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (32.3%), C_{12:0} (12.1%), C_{16:0} (7.3%), C_{14:0} (6.2%), iso-C_{14:0} (5.6%), C_{16:1} ω11c (5.0%)로 구성됨. 근연종은 *Paenibacillus odorifer*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 11: *Lysinibacillus* sp. SJ2SN2

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 25°C 생장 시 콜로니는 흰색이며 불규칙형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Urease는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (60.2%), anteiso-C_{17:0} (10.7%), iso-C_{16:0} (9.4%), iso-C_{15:0} (5.2%)로 구성됨. 근연종은 *Lysinibacillus fusiformis*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 12: *Bacillus* sp. JSC-N3-215-1

그람 양성이며 간균. NA 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 베이지색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, 질산염 환원, PNPG (β -galactosidase)는 양성. Indole 생산, Glucose 발효, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis는 음성. 세포 내 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (58.6%), iso-C_{15:0} (9.4%), iso-C_{16:0} (8.4%), C_{16:0} (4.1%)로 구성됨. 근연종은 *Bacillus fumarioli*이다. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

후보신종 13: *Bacillus* sp. HHL-143

그람 양성이며 간균. LB 배지에서 37°C 생장 시 콜로니는 갈색이며, 불규칙형. 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 iso-C_{15:0} (46.6%), anteiso-C_{15:0} (26.8%), iso-C_{14:0} (5.6%), iso-

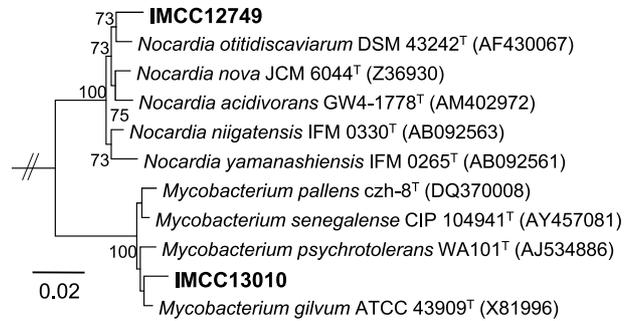


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between novel species candidates isolated from mountain wetlands and their relatives of the phylum Actinobacteria. Bootstrap values representing above 70% are presented. Scale bar: 0.02 substitutions per nucleotide position.

C_{17:0} (4.0%)로 구성됨. 근연종은 *Bacillus methanolicus*임. 제주도 숨은물벙뒤 습지의 토양에서 분리되었음.

4. Actinobacteria 문에 속하는 신종후보 세균의 계통 분석 및 특징 기재

Actinobacteria 문은 High G+C Gram positives라 고전적으로 명명되었던 문으로서, 현재 5개의 아강(subclass)으로 분류된다. 흔히 국내에서 방선균류라 불리는 Actinobacteria 문은 육상생태계가 주요 서식처이며 해양의 퇴적토에도 서식한다. 특히 이 문의 많은 종은 항생물질을 비롯한 2차 대사산물을 생산하여, 산업적으로 널리 이용되고 있어 적극적인 탐색대상이 되고 있다. 제주도 고산 습지에서는 Actinobacteria 문에 속하는 많은 수의 세균이 배양되었으나, 대부분 기준에 알려진 종과 98.7% 이상의 16S rRNA 유전자 서열의 유사도를 나타내었다. 그 결과 Actinobacteria 문의 후보신종은 단 2종만이 배양되었으며, IMCC13010과 IMCC12749가 후보신종으로 판정되었다(Table 1, Fig. 3). 균주 IMCC13010은 Actinomycetales 목, Corynebacterineae 아목, Mycobacteriaceae 과에 속하는 Mycobacterium 속의 신종으로 판정되었으며, 균주 IMCC12749는 Actinomycetales 목, Corynebacterineae 아목, Nocardiaceae 과의 Nocardia 속의 후보신종으로 간주되었다.

Actinobacteria 문에 속하는 후보신종의 표현형 형질 분석을 통해 확보한 특징을 다음과 같이 기재하고자 한다. 신종후보의 공식적 기술은 이후 표준 균주와 다상분류를 통해 최종적으로 기재될 예정이다.

후보신종 1: *Mycobacterium* sp. IMCC13010

그람 양성이며 간균. R2A 배지에서 20°C 생장 시 콜로

니는 보라색이며 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, indole 생산, glucose 발효는 음성. 세포 내 주요 지방산은 C_{16:1} ω 7c and/or C_{16:1} ω 6c (28.2%), C_{16:0} (25.8%), C_{18:1} ω 7c and/or C_{18:1} ω 6c (14.4%), C_{17:0} cyclo (7.8%), C_{10:0} 3-OH (4.5%)로 구성됨. 근연종은 *Mycobacterium gilvum*임. 제주도 1100 고지 습지의 담수에서 분리되었음.

후보신종 2: *Nocardia* sp. IMCC12749

그람 양성이며 간균. R2A 배지에서 20°C 생장 시 콜로니는 흰색이며 작은 원형. API 20NE를 이용한 생화학적 동정결과, Arginine dihydrolase, Urease, Esculin hydrolysis, PNPG (β -galactosidase)는 양성. 질산염 환원, Indole 생산, Glucose 발효는 음성. R2A 배지를 이용, 20°C에서 3일 생장 후 추출한 세포 내 주요 지방산은 iso-C_{15:0} (39.3%), anteiso-C_{15:0} (23.5%), iso-C_{16:0} (4.2%)로 구성됨. 근연종은 *Nocardia otitidiscaviarum*임. 제주도 1100 고지 습지의 담수에서 분리되었음.

적 요

제주도 한라산의 습은물벙뒤 습지는 여러 다른 생태계에 비해 접근이 용이하지 않아 생물다양성이 높다고 여겨져 왔으나, 세균의 다양성과 새로운 종에 대한 보고는 전혀 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 제주도 한라산의 고산 습지인 습은물벙뒤 습지에서 담수 및 토양시료를 채취하여 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 문에 속하는 세균을 분리하였다. 분리된 세균 중 위의 3개의 문에 속하는 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 구한 다음 표준균주와 비교하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열의 유사도가 표준균주와 98.7% 미만인 균주를 신종후보 균주로 간주하였다. 전체적으로 과 및 속 수준의 다양성은 높지 않았으며, 특정 계통에 집중되어 신종후보 균주가 발굴되었다. *Bacteroidetes* 문에는 *Mucilaginibacter*, *Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* 속에 속하는 13개의 후보신종이 확인되었다. *Firmicutes* 문에는 *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Bacillus* 속에 해당하는 13개의 후보신종이 배양되었다. *Actinobacteria* 문에는 *Mycobacterium*과 *Nocardia*에 속하는 후보신종 2개가 발굴되었다. 분리된 28개의 후보신종에 대하여 배양학적 특징, 생리학적 특징, 화학분류적 특징을 조사하였으며 본 논문에 기재하였다. 종합적으로 습은물벙뒤 습지는 아직까지 배양되지 않은 많은 수의 신종 미생물을 포함하고 있는 생태계임이 확인되었다.

사 사

본 연구는 2010년 환경부 자생생물발굴 사업의 연구비 지원을 받아 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 권동희. 2006. 한국의 지형. 한올아카데미.
- Altschul SF, TL Madden, AA Schäfer, J Zhang, Z Zhang, W Miller and DJ Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Bernardet JF, Y Nakagawa and B Holmes. 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1049-1070.
- 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.
- Jukes TH and CR Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. pp. 121-132. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro HN ed.). Academic Press. New York.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115-147. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt E and M Goodfellow eds.). John Wiley & Sons. New York.
- Ludwig W, O Strunk, R Westram, L Richter, H Meier, Yadhu-kumar, A Buchner, T Lai, S Steppi, G Jobb, W Forster, I Brettske, S Gerber, AW Ginhart, O Gross, S Grumann, S Hermann, R Jost, A König, T Liss, R Lussmann, M May, B Nonhoff, B Reichel, R Strehlow, A Stamatakis, N Stuckmann, A Vilbig, M Lenke, T Ludwig, A Bode and KH Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.
- Mitsch WJ and JG Gosselink. 1993. *Wetlands*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Nannipieri P, J Ascher, MT Ceccherini, L Landi, G Pietramelara and G Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54:655-670.
- Pagnier I, D Raoult and B La Scola. 2008. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ. Microbiol.* 10:1135-1144.
- Smibert RM and NR Krieg. 1994. Phenotypic characterization. pp. 611-654. In *Methods for General and Molecular Microbiology* (Gerhardt P, RGE Murray, WA Wood and NR Krieg

- eds.). American Society for Microbiology. Washington, DC.
- Stackebrandt E and BM Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.
- Stackebrandt E and J Ebers. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*. Nov 06:153-155.
- 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.
- USEPA. 2008. America's Wetland-Our Vital Link Between Land and Water. <http://water.epa.gov/type/wetlands/toc.cfm>.
- Vandamme P, B Pot, M Gillis, P De Vos, K Kersters and J Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Wayne LG, DJ Brenner, RR Colwell, PAD Grimont, O Kandler, MI Krichevsky, LH Moore, WEC Moore, RGE Murray, E Stackebrandt, MP Starr and HG Trüfer. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.
- Whitman WB, DC Coleman and WJ Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:6578-6583.

Manuscript Received: May 20, 2011

Revision Accepted: July 14, 2011

Responsible Editor: Kap Joo Park