

제주도 숨은물벙뒤 습지 서식 Betaproteobacteria의 종다양성 및 신분류군 분포

신영민 · 김태의 · 최아영¹ · 전지선² · 이상훈³, 김하늘⁴ · 이하나⁵ · 조재형⁴
조장천¹ · 장광엽² · 김규중³ · 조기성⁴ · 천종식⁵ · 이현환⁴ · 김승범*

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

Species Diversity of Betaproteobacteria in the Sumunmulbengdui Wetland Area of Jeju Island and Distribution of Novel Taxa

Young Min Shin, Tae-Ui Kim, Ahyoung Choi¹, Jeesun Chun², Sanghoon Lee³, Haneul Kim⁴,
Hana Yi⁵, Jae Hyung Jo⁴, Jang-Cheon Cho¹, Kwangyeop Jahng², Kyujoong Kim³,
Kiseong Joh⁴, Jongsik Chun⁵, Hyune Hwan Lee⁴ and Seung Bum Kim*

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

¹Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

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

⁴Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies,
Yongin 449-791, Korea

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

Abstract – The species diversity of Betaproteobacteria in the Sumunmulbengdui Wetland Area of Jeju Island was studied using culture based techniques, and candidates for novel taxa were screened. Twenty two novel bacterial strains belonging to Betaproteobacteria were isolated, which could be assigned to 16 genera of 4 families, namely *Burkholderiaceae* (3 strains), *Comamonadaceae* (8 strains), *Oxalobacteraceae* (5 strains), *Neisseriaceae* (5 strains), and an unassigned group belonging to *Burkholderiales* (1 strain) based 16S rRNA gene sequences. The genus *Chromobacterium* contained three candidates of novel species, and each of the genera *Burkholderia*, *Comamonas*, *Pelomonas* and *Herbaspirillum* contained two candidates respectively. Through the analysis of membrane fatty acid profiles and physiological properties using API 20NE as well as morphological and cultural properties, each of the isolates was found to form potentially novel species. Brief description of 22 potential candidates for new species or subspecies is given accordingly.

Key words : Betaproteobacteria, species diversity, 16S rRNA, fatty acid, API20NE

* Corresponding author: Seung Bum Kim, Tel. 042-821-6412,
Fax. 042-822-7367, E-mail. sbk01@cnu.ac.kr

서 론

지구상의 미생물 다양성에 대한 이해는 아직 초기 단계라고 할 수 있으며, 원핵생물의 경우 현재까지 10,000 종 이상이 알려져 있으나 최근 5년간 매년 800여종 이상의 신종이 등록되는 등 아직도 빠른 속도로 신종이 발굴되고 있다 (Euzéby 2011). 미생물 다양성은 분류학적, 생태학적 측면에서의 학술적 가치뿐만 아니라 향후 고유 자원으로서의 높은 잠재적 가치를 가지고 있어 이에 대한 연구는 여러 가지로 큰 의의를 가진다.

Betaproteobacteria 강 (Garrity *et al.* 2006)은 그람 음성 세균의 대표적인 분류군인 Proteobacteria 문에 속하는 세균군이며, 현재 *Burkholderiales*, *Hydrogenophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, “*Procabacteriales*” 및 *Rhodocyclales*의 7개 목과 이에 속한 13과 153속을 보유한 대규모의 분류군이다 (Euzéby 2011). Betaproteobacteria는 다양한 육상 및 수환경에서 발견되고 있으며, 광합성 세균, 인체 및 동식물 병원균, 수소이용 세균, 질화세균, 질소고정세균, methylotroph 등 다양한 생리화학적 특징을 나타내는 세균군들이 포함된다 (Garrity *et al.* 2006). 또한 Betaproteobacteria 중에는 무척추동물에 기생, 또는 공생하는 종류 (Gruwell *et al.* 2010; Lund *et al.* 2010) 및 난분해성 오염물질의 분해에 관여하는 종류 (Aguirre de Cárcer *et al.* 2007; Callaghan *et al.* 2009; Heinzl *et al.* 2009)도 보고된 바 있다. 그러므로 Betaproteobacteria에 대한 연구는 생물다양성에 대한 학문적 측면과 더불어 여러 실용적 측면에서도 높은 가치를 가지고 있다.

제주도 지역에서는 한라산 산림토에서 분리한 신속인 *Andreprevotia chitinilytica* (Weon *et al.* 2007), 대기중에서 분리한 *Massilia jejuensis* (Weon *et al.* 2010), 한라산 토양에서 분리한 *Polaromonas jejuensis* (Weon *et al.* 2008) 등 비교적 소수의 Betaproteobacteria 소속 신분류군이 기술된 바 있다. 하지만 이는 제주도의 생태학적 특이성 및 다양성을 고려할 때 매우 미흡한 수준이라고 할 수 있다. 제주도는 천혜의 생태 환경을 가진 지역이며, 국내 14개의 탐사르 습지 중 물영아리오름, 물장오리오름 습지 및 1100고지 습지 등 3개의 탐사르 습지를 보유하고 있는데 이들 지역에서의 미생물 다양성에 대한 연구는 아직 수행된 바 없다. 본 조사에서는 제주도 1100고지 습지 인근에 위치한 숨은물벙뒤 습지를 대상으로 2010년도 7~9월에 걸쳐 시료를 채취하였고, 이로부터 배양법에 의해 분리한 세균 분리주 중 Betaproteobacteria에 속하는 34균주를 대상으로 분류학적 연구를 수행하였으며, 신분류군으로서의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취 및 세균 분리

토양 시료는 제주도 숨은물벙뒤 습지에서 2010년도 7~9월 사이에 채취하였다. 채취한 시료는 냉장 보관하여 실험실로 운반하였다. 시료 5g을 증류수 100 mL에 넣어 교반한 후 이의 희석액을 분리배지에 접종하였다. 분리배지는 영양한천배지 (nutrient agar, Difco, USA), R2A 한천배지 (Difco, USA) 및 LB 배지 (Difco, USA)를 이용하였다. 접종 후 20~30°C에서 1주일 이상 배양하여 단일콜로니를 분리하였다. 분리된 세균은 동일 배지에서 계대배양하였고, 또한 균체를 10~20% 글리세롤 수용액에 현탁하여 -20°C 이하에서 냉동 보관하였다.

2. 16S rRNA 유전자 분석

세균 분리주로부터 DNA를 추출하여 16S rRNA의 PCR 증폭을 실시하였다. 프라이머는 27f (5'-AGR GTT YGA TYM TGG CTC AG-3')와 1492r (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 이용하였으며, 증폭된 산물은 정제한 후 MacroGen (Korea)에 의뢰하여 PCR 증폭과 동일한 프라이머를 이용, 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 이용한 종 수준의 동정은 EzTaxon 2.1 (Chun *et al.* 2007)을 이용하였으며, 이로부터 근연종을 검색하여 그 염기서열을 확보한 후 계통도를 작성하였다. 계통도의 작성 및 bootstrap 분석은 Clustal X 2.1 (Larkin *et al.* 2007)를 이용하였다.

3. 표현형 분석

배양학적 특징, 세포 형태 및 그람 염색 특성은 분리 및 계대와 동일한 배지를 이용하여 분석하였다.

세포막 지방산은 Microbial Identification System (MIDI, USA) 방법에 따라 tryptic soy agar (Difco, USA)에서 2일간 배양한 균체를 채취하여 메틸에스터화한 후 분석하였다.

생리, 생화학적 특징은 API 20NE (bioMérieux, France)를 이용하였다.

결과 및 고찰

본 조사에서 분리한 세균의 동정 결과로부터 Betaproteobacteria에 속하는 세균 분리주 중 신종, 또는 신아종 후보가 될 수 있는 22종의 분리주를 확보하였다 (Table 1). 각 균주에 대한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으

Table 1. List of strains and their taxonomic affiliations

| Order | Family | Strain ID | Closest species | 16S rRNA similarity (%) | |
|-----------------|------------------|---------------|-------------------------------------|--|-------|
| Burkholderiales | Burkholderiaceae | IS2100910-03 | <i>Burkholderia arboris</i> | 98.73 | |
| | | JSC-N3-113-1 | <i>Burkholderia phytofirmans</i> | 98.85 | |
| | | JSC-N3-314-1 | <i>Pandoraea faecigallinarum</i> | 98.80 | |
| | Comamonadaceae | IMCC12916 | <i>Comamonas terrigena</i> | 97.45 | |
| | | INCC12801 | <i>Comamonas thiooxidans</i> | 97.48 | |
| | | IMCC12816 | <i>Curvibacter delicates</i> | 97.82 | |
| | | 3JJ-W 5-01 | <i>Delftia lacustris</i> | 98.14 | |
| | | JSC-R2-221-3 | <i>Kinnetia asaccharophila</i> | 98.01 | |
| | | INCC12807 | <i>Pelomonas aquatica</i> | 98.35 | |
| | | IW4100910-R01 | <i>Pelomonas puraquae</i> | 98.21 | |
| | | JSC-R3-121-14 | <i>Variovorax ginsengisoli</i> | 98.80 | |
| | Oxalobacteraceae | IMCC12817 | <i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> | 94.64 | |
| | | JSC-R3-120-1 | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 98.97 | |
| | | JSC-P2-222-10 | <i>Hermiimonas aquatilis</i> | 95.71 | |
| | | JSC-P3-220-2 | <i>Massilia dura</i> | 96.82 | |
| | | HME6890 | <i>Undibacterium pigrum</i> | 97.23 | |
| | Unassigned | HME6814 | <i>Aquicola tertiaricarbonis</i> | 97.64 | |
| | Neisseriales | Neisseriaceae | JW1100901-R05 | <i>Aquitalea denitrificans</i> | 97.44 |
| | | | IMCC12891 | <i>Chromobacterium piscinae</i> | 98.44 |
| | | | HME6876 | <i>Chromobacterium pseudoviolaceum</i> | 98.72 |
| JW1100901-R03 | | | <i>Chromobacterium subtsugae</i> | 98.58 | |
| JS1100901-02 | | | <i>Pseudogulbenkiania subflava</i> | 94.82 | |

로부터 모든 균주는 *Burkholderiales*, 또는 *Neisseriales*에 속하는 것으로 나타났다. *Burkholderiales*에 속하는 분리주는 총 17균주였고(Fig. 1), 과 수준에서는 *Burkholderiaceae* 3 균주, *Comamonadaceae* 8균주, *Oxalobacteraceae* 5균주 및 분류학적 위치가 알려지지 않은 *Burkholderiales* 소속의 1균주로 구분되었다. *Neisseriales*에 속하는 5균주는 모두 *Neisseriaceae* 소속이었다(Fig. 2). 속 수준에서는 총 16속이 발견되었으며, 이 중 *Chromobacterium* 속의 경우 3종의 신종 후보가, 그리고 *Burkholderia*, *Comamonas*, *Pelomonas* 및 *Herbaspirillum* 속의 경우 각각 2종씩의 신종 후보가 발견되었다.

이 중 *Chromobacterium*의 경우 수환경 및 토양에서 분리한 종들과 근연관계를 나타내었으며, 균주 JW1100901-R03의 근연종인 *C. subtsugae*는 살충작용을 가지고 있는 점이 특이하였다(Martin et al. 2007; Kämpfer et al. 2009). *Burkholderia*의 경우 2종 모두 식물과 연관된 종들과 가까운 유연관계를 가지는 것으로 나타났으며, 한 종은 산림 분리 세균인 *B. arboris*와, 다른 한 종은 식물 공생세균으로 알려진 *B. phytofirmans*와 각각 근연관계를 나타내었다(Sessitsch et al. 2005; Vanlaere et al. 2008). *Comamonas*의 경우 토양 분리 세균인 *C. terrigena*와, 그리고 유향천에서 분리한 *C. thiooxidans*와 각각 유연관계를 나타내었다. *C. thiooxidans*는 아황산을 산화하여 성장할 수 있는 혼합영양형(mixotroph)인 점이 특이하다(Narayan

et al. 2010). *Pelomonas*에 속한 분리주는 인공 수환경 서식 세균인 *P. aquatica* 및 *P. puraquae*와 각각 가깝게 나타났다. *P. aquatica*는 혈액투석수에서, 그리고 *P. puraquae*는 산업용수에서 분리된 종들이다(Gomila et al. 2007). *Herbaspirillum*에 속한 분리주는 식물 연관 종들과 근연관계를 보였다. 이 중 *H. seropedicae*는 식물내생세균으로 뿌리에서 질소고정을 하는 것으로 알려져 있으며(Baldani et al. 1986), *H. rhizosphaerae*는 근권 토양에서 분리된 종이다(Jung et al. 2007).

이와 같은 결과는 본 조사대상 지역의 풍부한 종 다양성을 짐작할 수 있게 해 주는 것이며, 본 지역이 식물생장 촉진 활성 등 유용한 활성을 탐색하는 데 있어서도 좋은 환경임을 말해주고 있다. 본 조사에서 발굴된 22개의 신종, 또는 신아종 후보에 대하여 아래와 같이 기술하였다.

신분류군 후보 목록

1. *Aquicola* sp. HME6814

원형 콜로니 형성. 짧은 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 모두 음성 반응을 나타냄, 12개 탄소원은 malic acid를 제외하고는 모두 이용하지 못함, 주요 지방산으로는 C16:0 (36.02%), C16:1 ω7c/C16:1 ω6c and/or C16:1 ω6c/

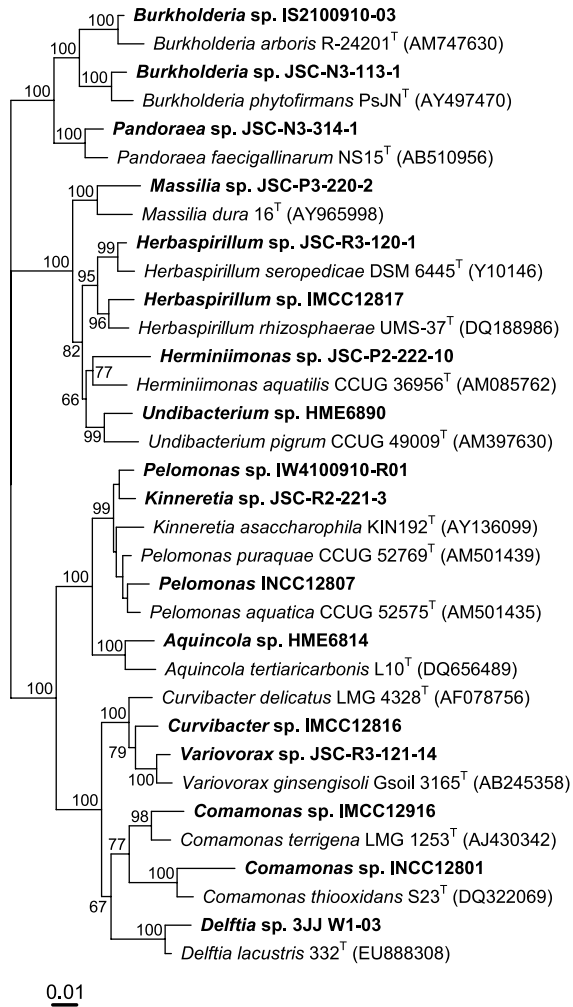


Fig. 1. Neighbor-joining tree of the isolates and related taxa belonging to the order *Burkholderiales*. Numbers at nodes are the bootstrap support (%) based on 1,000 resampled dataset. Scale bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

C16:1 ω 7c (33.03%), C17:0 cyclo (15.26%), C12:0 (9.23%).

대표균주: HME6814, 제주도 숨은물벙뒤 습지 (북위 33° 22.234', 동경 126° 26.961')에서 분리. 근연종은 *Aquincola tertiaricarbonis* (16S rRNA 유사도: 97.64%).

2. *Aquitalea* sp. JW1100901-R05

원형, 선형 돌레, 점성, 녹색의 오탁한 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과 질산 환원, indole 생성, 포도당 발효, arginine dihydrolase, urease, esculin 가수분해에 양성 반응을 보이고, 아질산 환원, gelatinase, PNPG (β -galactosidase)에 음성 반응을 보임, 12개 탄소원은 L-arabinose, D-mannose를 제외한 모든 (D-glucose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, gluconic acid, capric acid,

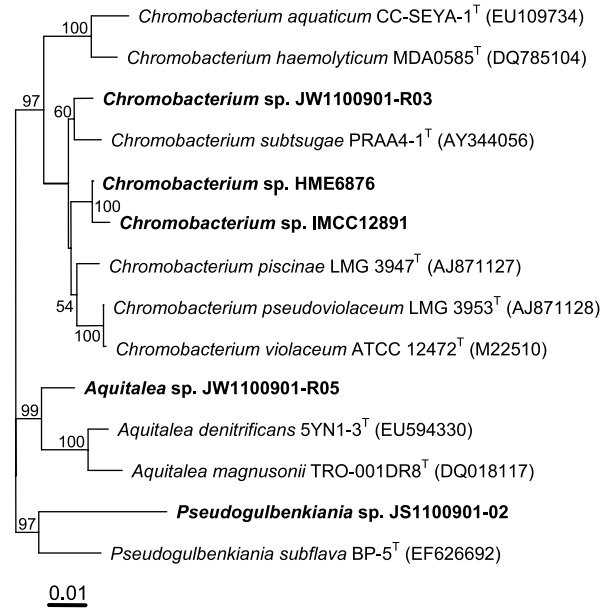


Fig. 2. Neighbor-joining tree of the isolates and related taxa belonging to the order *Neisseriales*. See Fig. 1 for legends.

adipic acid, malic acid, citric acid, phenylacetic acid) 탄소원 이용 가능, 주요 지방산은 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (41.3%), 16:00 (25.25%), 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (12.09), 12:00 (7.65%).

대표균주: JW1100901-R05, 제주도 숨은물벙뒤 습지 (북위 33° 21'54.09", 동경 126° 27'05.01")에서 분리. 근연종은 *Aquitalea denitrificans* (16S rRNA 유사도: 97.44%).

3. *Burkholderia* sp. IS2100910-03

원형, 선형 돌레, 점성, 밀크색의 오탁한 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과 질산 환원, esculin 가수분해에 양성 반응을 보이고 나머지는 음성 반응을 보임, 12개의 탄소원은 D-glucose, D-mannose, gluconic acid, capric acid, malic acid, phenylacetic acid에 양성반응, 나머지는 모두 음성반응으로 이용하지 못함, 주요 지방산은 16:00 (32.13%), 18:00 (15.03%), 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (10.88%), 17:0 cyclo (8.29%), 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (5.4%).

대표균주: IS2100910-03, 제주도 숨은물벙뒤 습지 (북위 33° 21'54.09", 동경 126° 27'05.01")에서 분리. 근연종은 *Burkholderia arboris* (16S rRNA 유사도: 98.73%).

4. *Burkholderia* sp. JSC-N3-113-1

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는

PNPG (β -galactosidase)만 양성 반응을 보이고 나머지는 모두 음성 반응을 보임, 12개 탄소원은 D-mannitol, D-maltose, capric acid를 제외하고 모두 이용 가능, 주요 지방산은 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (14.7%), 17:0 iso 3OH (7.09%).

대표균주: JSC-N3-113-1, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 24', 동경 126° 28'에서 분리. 근연종은 *Burkholderia phytofirmans* (16S rRNA 유사도: 98.85%).

5. *Chromobacterium* sp. IMCC12891

원형 콜로니 생성. 간균, 그람 음성. flexirubin 생성, API 20NE 결과는 질산 환원, arginine dihydrolase, urease, esculin 가수분해, gelatinase, PNPG (β -galactosidase)에서 양성 반응을 보임, 12개 탄소원은 D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, gluconic acid, capric acid, citric acid에서 양성 반응을 보임, 주요 지방산으로는 16:1 ω 7c and/or 16:1 ω 6c (8.44%), C16:0 (27.67%), 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (17.01%).

대표균주: IMCC12891, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 22.227', 동경 126° 26.963')에서 분리. 근연종은 *Chromobacterium piscinae* (16S rRNA 유사도: 98.44%).

6. *Chromobacterium* sp. HME6876

원형 콜로니 형성. 짧은 간균. 그람 음성. API 20NE 결과는 아질산 환원, 포도당 발효, arginine dihydrolase, gelatinase에 양성 반응을 보임, 12개 탄소원은 D-glucose, N-acetyl-glucosamine, gluconic acid, capric acid, malic acid에 양성 반응을 보임, 주요 지방산으로는 C16:1 ω 7c/C16:1 ω 6c and/or C16:1 ω 6c/C16:1 ω 7c (39.68%), C16:0 (22.84%), C18:1 ω 7c and/or C18:1 ω 6c (18.29%), C12:0 (5.78%).

대표균주: HME6876, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 22.234', 동경 126° 26.961')에서 분리. 근연종은 *Chromobacterium pseudoviolaceum* (16S rRNA 유사도: 98.72%).

7. *Chromobacterium* sp. JW1100901-R03

원형, 선형 둘레, 점성, 밀크색이며 윤택있고 오목한 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과 질산 환원, indole 생성, 포도당 발효, arginine dihydrolase, gelatinase에 양성 반응을 보임, 12개 탄소원은 D-glucose, D-mannose, N-acetyl-glucosamine, gluconic acid, malic acid에서 양성 반응을 보임, 주요 지방산은 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (33.43%), 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (19.32%), 16:0 (19.11%), 12:0 (9.16%), 10:0 3OH (5.49%), 17:0 cyclo (5.06%).

대표균주: JW1100901-R03, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 21'54.09", 동경 126° 27'05.01")에서 분리. 근연종은 *Chromobacterium subtsugae* (16S rRNA 유사도: 98.58%).

8. *Comamonas* sp. IMCC12916

원형 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 질산 환원, indole 생성, 포도당 발효에 음성 반응, 나머지는 모두 양성 반응, 12개 탄소원은 phenylacetic acid를 제외하고 모두 양성 반응으로 이용 가능, 주요 지방산은 16:1 ω 7c and/or 16:1 ω 6c (27.53%), 14:0 3OH and/or 16:1 iso I (20.53%), C16:0 (15.22%), 17:0 cyclo (7.08%), 15:0 iso (6.56%)

대표균주: IMCC12916, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 22.227', 동경 126° 26.963')에서 분리. 근연종은 *Comamonas terrigena* (16S rRNA 유사도: 97.45%).

9. *Comamonas* sp. INCC12801

불규칙한 형태의 콜로니 형성. 짧은 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 질산 환원, arginine dihydrolase, urease, esculin 가수분해, gelatinase, PNPG (β -galactosidase)에서 양성 반응을 보임, 12개 탄소원은 D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, gluconic acid, capric acid, adipic acid, phenylacetic acid에서 양성 반응을 보이며 이용 가능, 주요 지방산은 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (27.32%), C16:0 (19.65%), 19:0 cyclo ω 8c (17.59%), 16:1 ω 7c and/or 16:1 ω 6c (11.67%), 17:0 cyclo (6.08%).

대표균주: INCC12801, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 22.227', 동경 126° 26.963')에서 분리. 근연종은 *Comamonas thiooxidans* (16S rRNA 유사도: 97.48%).

10. *Curvibacter* sp. IMCC12816

원형 콜로니 형성. 구부러진 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 아질산 환원, arginine dihydrolase, urease, gelatinase, PNPG (β -galactosidase)에 양성 반응을 보임, 12개 탄소원은 D-mannose, D-maltose에 양성 반응을 보임 나머지는 모두 음성 반응, 주요 지방산으로는 C16:1 ω 7c/C16:1 ω 6c and/or C16:1 ω 6c/C16:1 ω 7c (61.77%), C16:0 (17.54%), C16:0 anteiso (10.84%).

대표균주: IMCC12816, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 21'28.81", 동경 126° 27'50.60")에서 분리. 근연종은 *Curvibacter delicatus* (16S rRNA 유사도: 97.82%).

11. *Delftia* sp. 3JJ-W 5-01

원형 콜로니 형성. 짧은 간균. 그람 음성. API 20NE 검정 결과 모두 음성으로 나타남. 주요 지방산은 C12:0 (12.48%), C12:0 3OH (7.49%), C16:1 ω 7c/16:1 ω 6c (7.76%), C16:0 (15.5%) 및 C18:1 ω 9c (34.24%).

대표균주: 3JJ-W 5-01, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 22.234', 동경 126° 26.961')에서 분리. 근연종은 *Delftia lacustris* (16S rRNA 유사도: 98.14%).

12. *Herbaspirillum* sp. IMCC12817

원형, non-pigment, 구부러진 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 질산 환원, indole 생성, arginine dihydrolase, urease, esculin 가수분해, PNPG (β -galactosidase)에서 양성 반응을 보임, 12개 탄소원은 모두 양성 반응으로 이용 가능, 주요 지방산으로는 C16:0 (25.45%), 17:0 cyclo (21.9%), 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (16.28%), 16:1 ω 7c and/or 16:1 ω 6c (13.18%).

대표균주: IMCC12817, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 21'28.81", 동경 126° 27'50.60")에서 분리. 근연종은 *Herbaspirillum rhizosphaerae* (16S rRNA 유사도: 94.64%).

13. *Herbaspirillum* sp. JSC-R3-120-1

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 모두 음성, 12개 탄소원은 L-arabinose, D-mannitol, gluconic acid, capric acid, malic acid, citric acid 이용 가능, 나머지는 음성으로 이용하지 못함, 주요 지방산은 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (44.55%), 16:0 (31.18%), 10:0 3OH (8.22%).

대표균주: JSC-R3-120-1, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 41', 동경 126° 45')에서 분리. 근연종은 *Herbaspirillum seropedicae* (16S rRNA 유사도: 98.97%).

14. *Herminiimonas* sp. JSC-P2-222-10

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 esculin 가수분해, PNPG (β -galactosidase)에 양성 반응을 보임, 나머지는 모두 음성, 12개 탄소원은 L-arabinose, D-maltose에 양성 반응, 나머지는 모두 음성 반응, 주요 지방산은 15:0 anteiso (50.97%), 16:0 iso (12.12%), 16:0 (10.14%), 12:0 (5.57%).

대표균주: JSC-P2-222-10, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 35', 동경 126° 39')에서 분리. 근연종은 *Herminiimonas aquatilis* (16S rRNA 유사도: 95.71%).

15. *Kinneretia* sp. JSC-R2-221-3

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 모두 음성, 12개 탄소원은 D-mannose만 이용 가능하고 나머지는 모두 이용하지 못함, 주요 지방산은 16:0 (25.69%), 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (15.66%), 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (13.6%), 12:0 (12.12%), 12:0 aldehyde (8.64%), 11:0 2OH (5.45%).

대표균주: JSC-R2-221-3, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 40', 동경 126° 44')에서 분리. 근연종은 *Kinneretia asaccharophila* (16S rRNA 유사도: 98.01%).

16. *Massilia* sp. JSC-P3-220-2

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 esculin 가수분해, PNPG (β -galactosidase)에 양성 반응을 보임, 나머지는 모두 음성, 12개 탄소원은 L-arabinose, D-mannose, D-maltose, malic acid에 양성 반응을 보임, 나머지는 모두 음성, 주요 지방산은 16:0 (36.75%), 17:0 cyclo (24.36%), 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (16.7%), 10:0 3OH (6.52%), 12:0 (5.4%).

대표균주: JSC-P3-220-2, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 39', 동경 126° 43')에서 분리. 근연종은 *Massilia dura* (16S rRNA 유사도: 96.82%).

17. *Pandoraea* sp. JSC-N3-314-1

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 아질산 환원만 양성 반응을 보이고 나머지는 모두 음성 반응, 12개 탄소원은 gluconic acid, capric acid, malic acid, phenylacetic acid에서 양성 반응을 보임, 나머지는 모두 음성 반응, 주요 지방산은 16:1 ω 7c/16:1 ω 6c and/or 16:1 ω 6c/16:1 ω 7c (15.1%), 12:0 aldehyde (6.76%), 16:0 3OH (4.84%), 19:0 cyclo ω 8c (3.19%).

대표균주: JSC-N3-314-1, 제주도 숨은물뱅뒤 습지 (북위 33° 27', 동경 126° 31')에서 분리. 근연종은 *Pandoraea faecigallinarum* (16S rRNA 유사도: 98.8%).

18. *Pelomonas* sp. INCC12807

소형 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 아질산 환원, indole 생성, 포도당 발효를 제외하고 모두 양성 반응, 12개 탄소원은 malic acid, citric acid를 제외하고 모두 양성 반응으로 이용 가능, 주요 지방산은 18:1 ω 7c and/or 18:1 ω 6c (27.32%), C16:0 (19.65%), 19:0 cyclo ω 8c (17.59%), 16:1 ω 7c and/or 16:1 ω 6c (11.67%), 17:0 cyclo (6.08%).

대표균주: INCC12807, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 22.227', 동경 126° 26.963')에서 분리. 근연종은 *Pelomonas aquatica* (16S rRNA 유사도: 98.35%).

19. *Pelomonas* sp. JW4100910-R01

원형, 선형 돌레, 지방성, 밀크색의 용기한 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과 포도당 발효만 양성 반응을 보이고 나머지는 모두 음성 반응을 보임, 12개의 탄소원은 citric acid만 이용 가능, 나머지는 모두 음성 반응으로 이용하지 못함, 주요 지방산은 16:00 (30.65%), 17:0 cyclo (15.78%), 12:0 aldehyde and/or 14:0 3OH/16:1 iso I (13.33%), 16:1 ω7c/16:1 ω6c and/or 16:1 ω6c/16:1 ω7c (11.71%), 18:1 ω7c and/or 18:1 ω6c (8.98%), 14:00 (7.2%).

대표균주: JW4100910-R01, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 21'54.09", 동경 126° 27'05.01")에서 분리. 근연종은 *Pelomonas puraquae* (16S rRNA 유사도: 98.21%).

20. *Pseudogulbenkiania* sp. JS1100901-02

원형, 선형 돌레, 지방성, 황색이며 오목한 콜로니 형성. 구균. 그람 음성. API 20NE 결과 아질산 환원, 인돌 생산, esculin 가수분해 및 gelatinase 활성은 양성이고, 질산 환원, 포도당 발효, arginine dihydrolase, urease, PNPG (β-galactosidase) 활성은 음성으로 나타남. 12개 탄소원은 모두 이용 못함. 주요 지방산은 15:0 anteiso (39.06%), 15:0 iso (23.58%), 14:00 (7.84%), 14:0 iso (6.29%), 13:0 anteiso (5.24%) 및 13:0 iso (4.16%).

대표균주: JS1100901-02. 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 21'54.09", 동경 126° 27'05.01")에서 분리. 근연종은 *Pseudogulbenkiania subflava* (16S rRNA 유사도: 94.82%).

21. *Undibacterium* sp. HME6890

원형 콜로니 형성. 짧은 간균, 그람 음성. API 20NE 결과는 모두 음성. 12개 탄소원은 D-glucose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, adipic acid에서 양성 반응을 나타냄, 주요 지방산으로는 C16:1 ω7c/C16:1 ω6c and/or C16:1 ω6c/C16:1 ω7c (59.35%), C16:0 (28.58%).

대표균주: HME6890, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 22.234', 동경 126° 26.961')에서 분리. 근연종은 *Undibacterium pigrum* (16S rRNA 유사도: 97.23%).

22. *Variovorax* sp. JSC-R3-121-14

원형의 콜로니 형성. 간균, 그람 음성. API 20NE 결과

는 urease를 제외하고는 모두 음성 반응, 12개 탄소원은 L-arabinose, D-mannitol, gluconic acid, adipic acid 이용 가능, 나머지는 모두 음성 반응, 주요 지방산은 15:0 anteiso (51.09%), 16:0 (10.99%), 17:0 anteiso (6.61%), 12:0 (5.27%).

대표균주: JSC-R3-121-14, 제주도 숨은물벙뒤 습지(북위 33° 42', 동경 126° 46')에서 분리. 근연종은 *Variovorax ginsengisoli* (16S rRNA 유사도: 98.8%).

적 요

제주도 숨은물벙뒤 습지에서 Betaproteobacteria의 종 다양성을 조사하였고, 신분류군 후보 22균주를 확보하였다. 분리주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 *Burkholderiaceae* (3균주), *Comamonadaceae* (8균주), *Oxalobacteraceae* (5균주) 및 *Neisseriaceae* (5균주) 등 4개 과에 속한 15속, 그리고 소속 미상의 *Burkholderiales* 소속 1속(1균주)으로 동정되었다. *Chromobacterium* 속에 속한 3종의 신분류군 후보를 확보하였고, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Pelomonas* 및 *Herbaspirillum*의 4속에는 각각 2종씩, 그리고 나머지 속은 각각 1종씩의 신분류군 후보를 확보할 수 있었다. 이들 신분류군 후보에 대해 형태 및 배양학적 특징의 분석과 더불어 막지방산 및 API 20NE 분석을 실시하여 22종의 신분류군 후보에 대한 특징을 기술하였다.

사 사

본 연구는 환경부 국립생물자원관이 지원하는 자생생물 조사 발굴 연구 사업(2단계)의 연구비 지원을 받아 수행되었다.

참 고 문 헌

- Aguirre de Cárcer D, M Martín, U Karlson and R Rivilla. 2007. Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6224-6232.
- Baldani JI, VLD Baldani, L Seldin and J Döbereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:86-93.
- Callaghan AV, M Tierney, CD Phelps and LY Young. 2009. An-

- aerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1339-1344.
- 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.
- Euzéby JP. 2011. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, as of April 2011 (www.bacterio.net).
- Garrity GM, JA Bell and T Lilburn. 2005. Class II. *Betaproteobacteria* class. nov. p. 575. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2, part C (Brenner DJ, NR Krieg, JT Staley and GM Garrity eds.). Springer. New York.
- Gomila M, B Bowien, E Falsen, ERB Moore and J Lalucat. 2007. Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2629-2635.
- Gruwell ME, NB Hardy, PJ Gullan and K Dittmar. 2010. Evolutionary relationships among primary endosymbionts of the mealybug subfamily Phenacoccinae (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7521-7525.
- Heinzel E, S Hedrich, E Janneck, F Glombitza, J Seifert and M Schlömann. 2009. Bacterial diversity in a mine water treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:858-861.
- Jung SY, MH Lee, TK Oh and JH Yoon. 2007. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2284-2288.
- Kämpfer P, HJ Busse and HC Scholz. 2009. *Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2486-2490.
- Larkin MA, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA McGettigan, H McWilliam, F Valentin, IM Wallace, A Wilm, R Lopez, JD Thompson, TJ Gibson and DG Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lund MB, M Holmstrup, BA Lomstein, C Damgaard and A Schramm. 2010. Beneficial effect of *Verminephrobacter nephridial* symbionts on the fitness of the earthworm *Aporrectodea tuberculata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4738-4743.
- Martin PAW, D Gundersen-Rindal, M Blackburn and J Buyer. 2007. *Chromobacterium subsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:993-999.
- Narayan KD, SK Pandey and SK Das. 2010. Characterization of *Comamonas thiooxidans* sp. nov., and comparison of thiosulfate oxidation with *Comamonas testosteroni* and *Comamonas composti*. *Curr. Microbiol.* 61:248-253.
- Park MS, SR Jung, MS Lee, KO Kim, JO Do, KH Lee, SB Kim and KS Bae. 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *J. Microbiol.* 43:219-227.
- Sessitsch A, T Coenye, AV Sturz, P Vandamme, E Ait Barka, JF Salles, JD Van Elsas, D Faure, B Reiter, BR Glick, G Wang-Pruski and J Nowak. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1187-1192.
- Vanlaere E, JJ LiPuma, A Baldwin, D Henry, E De Brandt, E Mahenthalingam, D Speert, C Dowson and P Vandamme. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1580-1590.
- Weon HY, BY Kim, SH Yoo, JH Joa, SW Kwon and WG Kim. 2007. *Andreprevotia chitinilytica* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil from Halla Mountain, Jeju Island, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1572-1575.
- Weon HY, SH Yoo, SB Hong, SW Kwon, E Stackebrandt, SJ Go and BS Koo. 2008. *Polaromonas jejuensis* sp. nov., isolated from soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1525-1528.
- Weon HY, SH Yoo, SJ Kim, YS Kim, R Anandham and SW Kwon. 2010. *Massilia jejuensis* sp. nov. and *Naxibacter suwonensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1938-1943.

Manuscript Received: May 18, 2011

Revision Accepted: July 21, 2011

Responsible Editor: Kap Joo Park