

가야시대 고분 및 부장품 내에 존재하는 미생물의 다양성 조사

히병석 · 고선철 · 조아름 · 김승락 · 김상우 · 노현수*

경상대학교 자연과학대학 미생물학과

Microbial Diversity inside Ancient Tombs and Burial Accessories from Gaya Age

Byeong-Seok Ha, Seon-Cheol Ko, A-Reum Jo, Seung-Rack Kim, Sang-woo Kim and Hyeon-Su Ro*

Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

ABSTRACT : Microbial diversity of soil samples from ancient stone-lined tombs was investigated. The tombs, discovered at Eoryung Ocheon-Ri site, Korea, were estimated to be belonged to middle class people from an ancient country, Gaya, which existed till AD 559 at the southern part of Korea. Nine fungal stains and 70 bacterial strains were isolated from the twelve soil samples, which were collected from the tomb Nos. 5 and 6. Ribosomal DNA sequence analysis discovered 5 fungal and 22 bacterial strains belonged to 10 genus groups from the tomb No. 5 while 1 fungal and 28 bacterial strains belonged to 6 genus from the tomb No. 6. The higher microbial diversity suggests that the tomb No. 5 was constructed warmer season than the tomb No. 6. Moreover, the discovery of *Staphylococcus warneri*, which is found as part of the skin flora on human and animals, and *Bacillus aquimaris*, which is a marine bacterium and can be discovered from tidal flat, from the surface of large dagger suggests that the ancient people may use meat and seafood at the burial ceremony.

KEYWORDS : Ancient tomb, Burial accessories, Gaya, Microbial diversity, Phylogenetic analysis

서론

곰팡이와 박테리아를 포함한 미생물들은 다양한 환경조건에서 살아남을 수 있는 적응력을 가지고 있다. 지금까지 미생물학은 여러 환경조건 내에서의 종 다양성과 진화, 생물공학적인 응용 등의 측면에서 연구되어 왔지만, 미생물의 다양한 적응능력 및 생존능력을 감안한다면 미생물학이

자연과학이라는 기존의 틀을 넘어 역사적 사건과 그 사건의 배경이 되는 물리적 환경을 밝히는 도구로도 사용될 수 있을 것이다. 특히, 땅속에 오래 동안 발굴되지 않고 숨겨져 왔던 유적지의 경우에 당대의 생활, 문화 양식을 밝힐 수 있는 역사적 자료인 동시에, 그 시대의 미생물 환경 및 미생물 군집을 연구할 수 있는 중요한 미생물학적 자료로도 활용될 수 있다(Cano and Borucki, 1995; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004). 유적지에 부장되어 있는 다양한 유물들의 표면이나 내부에서 발견 되는 미생물들은 당시 생활공간에 공존하였던 미생물들에 관한 정보를 제공해 줄 수 있다(Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004). 이러한 유적지 및 유물들에서 발견되는 미생물 다양성은 해당시기의 기온, 습도 등 자연환경을 반영할 뿐 아니라 당대의 식생활, 유행하였던 질병 등 사료에 기록되지 않은 정보를 제공할 수 있기 때문에 역사학적으로도 중요한 자료로서의 가치가 있다. 일반적으로 유물과 유적은 시간의 흐름에 따라 차츰 손상을 입게 되는데, 이는 곰팡이나 세균 등 미생물의 활동과 밀접한 관계를 가지고 있다(McNamara *et al.*, 2006; Ortega-Morales, 2006). 따라서 해당 유물과 유적의 보존과 보호를 위해서는 우선 서식 미생물 군집을 분석하여 유물에 관련된

Kor. J. Mycol. 2013 June 41(2): 67-73
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.2.67>
 pISSN 0253-651X
 ©The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail : rohyeon@gnu.ac.kr

Received November 11, 2012
 Revised June 1, 2013
 Accepted June 7, 2013

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

미생물의 종을 밝혀내는 것이 급선무라 할 수 있다.

본 연구에서는 가야시대의 고분군과 부장품에서 채취한 토양시료로부터 곰팡이와 박테리아를 분리하고, 미생물들의 16S 와 18S rDNA 염기서열을 분석하여 고분군 내에 존재하는 다양한 미생물들의 군집을 조사하였다. 또한 일부 곰팡이 및 박테리아를 선별 후 계통분석을 통해 1500년 전 가야시대 고분군 지역에서 독특하게 관찰되는 미생물 군집을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

토양 시료 채취 및 pH, 수분함량 측정

2012년 5월 23~24일 양일간 경남발전연구원 역사문화센터의 협조를 받아 의령군 오천리 가야 고분군 돌덧널무덤(석곽묘) 5호와 6호 주변토양과, 대부직구호(臺附直口壺, Uncapped large pottery), 유개고배(有蓋高杯, Capped large pottery), 대도(大刀, large dagger) 등 부장품 내외에서 시료를 채취하였다(Fig. 1). 시료 채취시 토양 온도는 24°C였고, 무덤의 깊이는 표면으로부터 약 2 m 정도였다. 채취된 토양시료는 막자와 막자사발을 이용하여 잘게 부순 후, pH 측정기를 이용하여 각 토양시료의 pH를 측정하였으며 65°C Dry Oven에서 24 시간동안 건조시켜 각 시료들의 수분함량을 측정하였다(Table 1).

시료로부터 균 분리 및 순수배양

채취한 토양시료 1 g을 멸균수 9 mL 희석시킨 다음, 100 µL를 LB agar(yeast extract 5 g/L, tryptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15g/L), R₂A(yeast extract 0.5 g/L, peptone 0.5 g/L, casamino acids 0.5 g/L, dextrose, soluble starch 0.5 g/L, sodium pyruvate 0.3 g/L, magnesium sulfate 0.05 g/L, agar 15 g/L (pH 7.2)), PDA(potato extract 4 g/L, dextrose 20 g/L, agar 15 g/L) 고체배지에 도말하여 25°C에서 3일간 배양하였다. 각 배지에서 자란 곰팡이 및 박테리아들 중 구별되는 Phenotype을 보이는 90개의 단일 균주를 확인하였으며 이들을 다시 LB, R₂A, PDA 고체배지로 옮겨서 순수 분리하였다.

곰팡이 및 세균 Genomic DNA 추출

PDA배지에서 분리된 곰팡이 균체는 DNeasy Plant mini kit(QIAGEN)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다(Jizhong *et al.*, 1996). 또한 분리한 세균은 일정량 끊어내어 진탕배양한 후, 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 균을 회수한 후 1 mL의 1 M NaCl로 세척하여 재 원심분리하였다. 회수된 균체에 TE 버퍼(10 mM Tris, 1 mM EDTA) 700 µL를 넣고 잘 섞어 주었다. 세포벽을 부수기 위해 lysozyme(2 mg/mL) 100 µL와 RNase A(10 mg/mL) 30 µL를 넣고 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 10% SDS 60 µL, 10% Sarkosyl 100 µL, 10 mg/mL Protinase K 100 µL를 넣고 37°C에서 1시간 동안

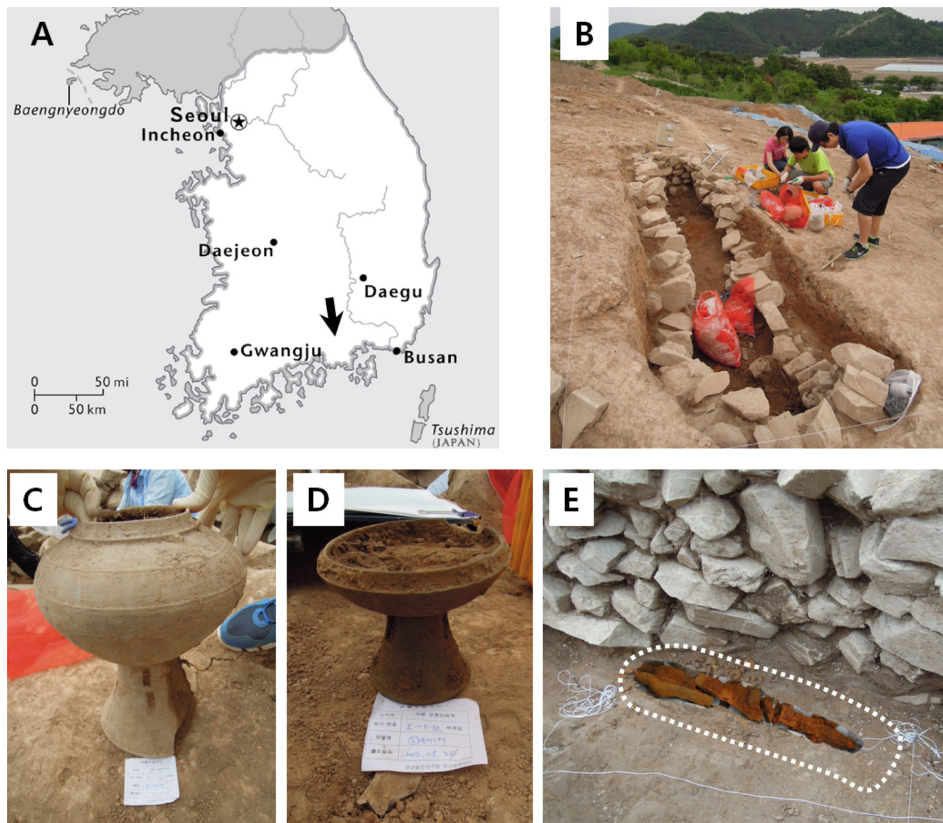


Fig. 1. Soil sampling from ancient tombs and burial accessories of Gaya age (A) Geographic location of the sampling site (arrow). (B) Stone-lined tomb. (C) Uncapped large pottery. (D) Capped large pottery. (D) Large dagger.

Table 1. Soil samples and their physical conditions

Tomb Number	Soil sample		pH	Water content (%)
	No.	Sampling site		
5	1	Inside capped large pottery #5-3	5.8	17
	2	Inside uncapped large pottery #5-8	6.0	18
	3	Surface soil on large dagger #5-13	6.2	19
	4	10 cm under the Large dagger #5-13	6.2	21
	5	3 cm under the Large dagger #5-13	6.1	15
Control	6	20 cm under the top of the tombs	5.2	20
	7	Inside capped large pottery #6-3	5.5	23
	8	Under the capped large pottery #6-3	5.7	18
6	9	Inside capped large pottery #6-2	5.4	17
	10	Inside capped large pottery #6-4	5.5	18
	11	Under the small knife #6-5	5.6	17
	12	Deep inside the tomb	5.5	23

반응을 시킨 후 Phenol 400 μ L 넣고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 700 μ L를 얻었다. 최종적으로 0.33 M ammonium acetate 300 μ L, ethanol 500 μ L를 첨가하고 섞어준 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수된 침전물을 TE 버퍼 50 μ L에 녹여 genomic DNA로 사용하였다.

16S, 18S rDNA 증폭 및 클로닝

토양시료에서 분리한 곰팡이 및 세균으로부터 추출한 genomic DNA로부터 우선 박테리아 균주에 대한 16S rDNA 만을 증폭시키기 위하여 universal primer인 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였고, 곰팡이 균주에 대한 18S rDNA를 증폭시키기 위해서 NS1F(5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCTC-3')와 NS8R(5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3')를 사용하였다. PCR 반응액은 2 μ L의 주형 DNA와 각 20 pM의 primer, 0.5 μ L Taq DNA Polymerase, 3 μ L 10X PCR 버퍼, 1 μ L dNTP, 증류수 21.5 μ L를 넣고 최종 반응 부피를 30 μ L로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 변성(denaturation) 95°C에서 30 초, 부착(annealing) 51°C에서 30 초, 증폭(extension) 72°C에서 1분 30초의 조건으로 30 사이클 반복 후, 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1 % 아가로스 겔에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 DNA를 pTOP V2 TA(Enzymomics)에 연결(ligation)하고 competent *E.coli*(DH5)에 형질 전환하여 LB agar(ampicillin, 50 μ L/mL)배지에 도말하였다. LB agar배지에서 확인된 colony 들에서 plasmid DNA를 추출하여 염기서열을 분석하였다.

염기서열 분석과 계통도 분석

토양시료에서 분리한 곰팡이 및 박테리아의 분석된 16S, 18S rDNA 및 ITS region 염기서열은 BLAST(NCBI

및 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012)를 이용하여 분석하였다. 분리된 균들과 유사한 염기 서열은 ClustalW2를 사용하여 multiple sequence analysis 작업을 수행하였으며, MEGA 5.2 프로그램의 neighbor-joining method를 활용하여 유전자 상호간의 계통수를 작성하였다.

결과 및 고찰

고분의 토양 pH 및 수분함량 분석

고분 주변 및 부장품들로부터 채취한 토양시료들의 수분 함량 및 pH는 Table 1에 표시하였다. 시료들의 수분함량은 채취장소에 따라서 17%에서 23%까지 범위였다. 비교 토양인 고분 표면 아래 20 cm 지점 토양의 경우 20 %의 수분함량을 보이는 반면, 고분 부장 도자기 내 토양의 경우 17% 정도의 수분함량을 보였다. 6호 고분의 7번 시료와 12번 시료의 경우 수분함량이 23%로 가장 높았는데, 이는 빗물 등을 통하여 수분이 부장품으로 침투하였기 때문인 것으로 판단된다. pH의 경우 비교토양 시료는 pH 5.2였으나, 고분 부장 도자기 내 토양시료들은 5호 고분의 경우 pH 5.8~6.2, 6호 고분의 경우 pH 5.4~5.7의 범위로 모두 비교토양 시료보다 높은 pH를 나타내었다. 채취된 토양의 수분함량과 pH 분석결과, 고분내 부장 도자기내의 토양은 비교토양과 구분되었으며 이는 도자기내의 토양이 주변 환경으로부터 격리되어 있었음을 의미한다.

분리된 곰팡이의 18S rDNA 분석

고분 부장품 내 토양시료들에서 9종의 곰팡이 균주를 순수 분리하였다. 5호 고분의 모든 토양시료에서는 시료당 1-2종의 곰팡이 균을 분리할 수 있었지만, 6호 고분의 경우에는 유개고배(9번 시료)에서만 1종의 곰팡이가 분리되었다(Table 2). 비교시료에서도 1종의 곰팡이만이 분리되었

Table 2. Partial identification of fungal isolates based on 18S rDNA sequences

Fungal isolate No.	Sampling site No.	Related strain	Accession NO.	Similarity
C-4	1			1647/1650 (99%)
C-9	2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AY251093	1643/1650 (99%)
C-15	3	STE-U 3682		1645/1650 (99%)
C-19	4	<i>Penicillium namyslowskii</i>	AB028190	1704/1713 (99%)
C-21		<i>Penicillium decumbens</i> ML-017	FJ458446	1699/1713 (99%)
C-27	5	<i>Phoma</i> sp.	AB252869	1770/1771 (99%)
C-28		<i>Penicillium decumbens</i> L-06	EU273880	1707/1713 (99%)
C-83	6	<i>Phoma herbarum</i>	AY864822	1751/1773 (99%)
C-51	9	<i>Penicillium namyslowskii</i>	AB028190	1704/1714 (99%)

다. 분리된 곰팡이들의 동정을 위하여 18S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 이들은 *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma* 속에 속하는 곰팡이들이었다(Table 2). 5호 고분의 유개고배(1번 시료), 대부직구호(2번 시료), 대도의 표면(3번 시료)에서는 분리된 곰팡이들의 18S rDNA 분석결과, 이들은 모두 동일한 곰팡이인 *Cladosporium cladosporioides* 균과 99%의 높은 상동성을 보였다. 일반적으로 *Cladosporium*은 생활에 밀접하게 존재하는 자낭균류로서 실내에서 천식이나 알레르기 질환을 유발 시키는 곰팡이로 잘 알려져 있다. *C. cladosporioides* 균은 해인사 장경각 대장경 목판에서 우점균으로서 분리되었고, xylanase 등 목질 분해효소 활성과 목재유물의 훼손에 관해 보고된 바 있다(Hong et al., 2011). *C. cladosporioides* 균이 5호 고분에서만 집중적으로 발견되는 것으로 보아 5호 고분의 매장당시의 환경에 이 균이 주변 환경에 다수 존재하였을 것으로 추정된다. 또한 5호 고분에서는 *Penicillium decumbens*, *Penicillium namyslowskii* 등 *Penicillium* 속 곰팡이들도 발견되었다. *Penicillium decumbens*는 토양에 존재하는 섬유질 분해 곰팡이이다. *Penicillium namyslowskii*는 6호 고분 유개고배(9번 시료)에서 유일하게 분리된 곰팡이이기도 하다. 이상 2기의 가야고분 곰팡이 균 분석의 결과, 5호 고분이 곰팡이 균의 포자가 많이 발생하는 여름, 가을 시기 즈음에 조성된 무덤으로 생각되며, 6호 고분은 겨울, 봄 시기일 것으로 추정된다.

분리된 세균들의 계통분석 및 미생물 군집 조사

고분 내 부장품들로부터 채취한 12개의 토양 시료들로부터 총 70개의 분리주(isolate)를 얻었다. 이들의 부분동정을 위하여 16S rDNA 염기서열을 결정하였고 얻어진 염기서열의 분석을 통하여 Table 3과 같이 각 분리주들을 부분동정 하였고, 각 균주들에 대한 계통도(Phylogenetic tree)를 MEGA 프로그램을 통해 분석하였다(Fig. 2). 분리된 균주 중 42 균주가 Firmicutes 문(phylum)에 속하는 세균들로서 이들 중 37 균주가 *Bacillus* 균들이었다. *Bacillus* 들은 내생포자를 형성하기 때문에 토양 속에서도 장기간 보존 될 수 있는 특징이 있다(Cano and Borucki, 1995). 두 번째로 많이 발견된 세균은 Actinobacterium 문에 속하는

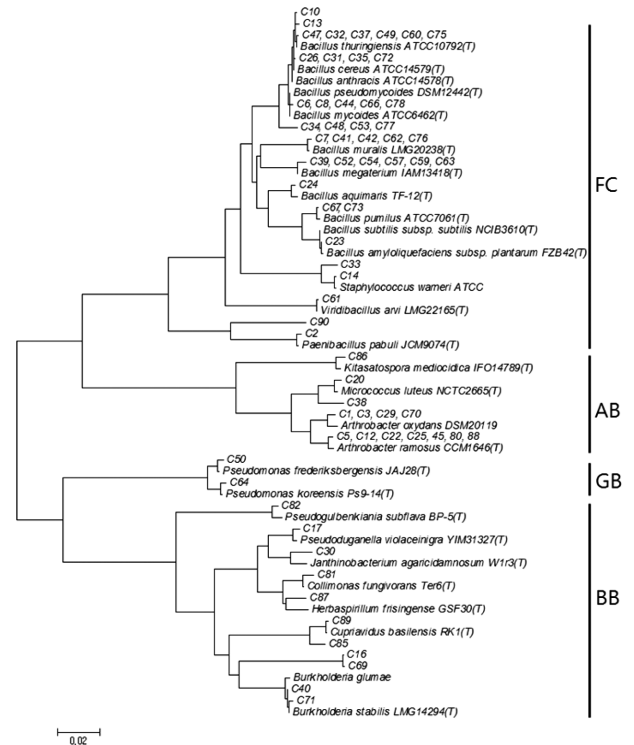


Fig. 2. Phylogenetic tree of bacterial isolates based on 16S rDNA sequences. Numbers indicate the isolate numbers in Table 3. Abbreviations at the right side bar represent bacterial groups belonged to firmicutes (FC), actinobacteria (AB), gammaproteobacteria (GB), and betaproteobacteria (BB).

Arthrobacter 속(genus) 균들로 총 12 균주가 관찰되었다. *Arthrobacter* 는 생활사 중 정체기에 cocci form을 만들어 영양분이 고갈된 상태에서도 오랫동안 생존할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그 외 9종의 Beta-Proteobacteria와 2종의 Gamma-Proteobacteria도 발견되었다.

시료별 분리된 균을 보면, 비교토양인 고분 상부토양에서 19 균주의 세균이 분리되었으나, 고분내 부장품에서 채취된 토양에서는 4~6 균주들만 관찰되어, 지하 2 m 정도 깊이의 산소공급이 없는 환경에서 장기간 생존할 수 있는 호기성 및 통성 혐기성 세균이 매우 드물다는 것을 나타내고 있다. 세균의 다양성 측면에서는 5호 고분(시료번호

Table 3. The closest taxa for 16S rDNA sequences of Bacteria isolated from soil samples

Sample No.	Isolate No.	Related strain	Accession No.	Identity	%	Phylum
1	C-1	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119	EU086821	1487/1488	99	Actinobacteria
	C-2	<i>Paenibacillus</i> sp	HM233974	1500/1516	99	Firmicutes
	C-3	<i>Arthrobacter</i> sp	DQ453812	1474/1481	99	Actinobacteria
	C-5	<i>Arthrobacter</i> sp	AB531403	1476/1486	99	Actinobacteria
	C-6	<i>Bacillus samanii</i>	FN433015	1511/1515	99	Firmicutes
	C-7	<i>Bacillus</i> sp	JQ435679	1502/1515	99	Firmicutes
	2	C-8	<i>Bacillus samanii</i>	FN433015	1512/1515	99
C-10		<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP003763	1513/1516	99	Firmicutes
3	C-12	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	NR_027199	1455/1477	99	Actinobacteria
	C-13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP003763	1510/1516	99	Firmicutes
	C-14	<i>Staphylococcus warneri</i>	HQ407248	1513/1517	99	Firmicutes
	C-16	<i>Bacterium endosymbiont</i>	AB558493	1446/1479	98	unclassified
	C-17	<i>Duganella nigrescens</i>	F584756	1453/1471	99	β-Proteobacteria
	C-20	<i>Micrococcus</i> sp	EU373424	1484/1487	99	Actinobacteria
4	C-22	<i>Arthrobacter</i> sp	AB531403	1476/1483	99	Actinobacteria
	C-23	<i>Bacillus subtilis</i>	GU826160	1514/1514	100	Firmicutes
	C-24	<i>Bacillus aquimaris</i>	EU231632	1511/1517	99	Firmicutes
	C-25	<i>Arthrobacter</i> sp	JF772512	1476/1489	99	Actinobacteria
5	C-26	<i>Bacillus cereus</i>	GQ149481	1514/1516	99	Firmicutes
	C-29	<i>Arthrobacter</i> sp	DQ453812	1470/1480	99	Actinobacteria
	C-30	<i>Janthinobacterium</i> sp	D84590	1462/1486	98	β-Proteobacteria
	C-81	<i>Collimonas</i> sp	AB531415	1483/1488	99	β-Proteobacteria
	C-31	<i>Bacillus cereus</i>	CP003187	1515/1516	99	Firmicutes
6	C-32	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP003763	1513/1516	99	Firmicutes
	C-33	<i>Staphylococcus</i> sp	HQ323413	1512/1517	99	Firmicutes
	C-34	<i>Bacillus</i> sp	AB531397	1505/1508	99	Firmicutes
	C-35	<i>Bacillus cereus</i>	CP003747	1502/1516	99	Firmicutes
	C-73	<i>Bacillus pumilus</i>	EF488975	1513/1513	100	Firmicutes
	C-75	<i>Bacillus thuringiensis</i>	FN433029	1513/1516	99	Firmicutes
	C-76	<i>Bacillus simplex</i>	GU086427	1512/1515	99	Firmicutes
	C-77	<i>Bacillus</i> sp	AB531397	1501/1509	99	Firmicutes
	C-78	<i>Bacillus</i> sp	GU086432	1513/1516	99	Firmicutes
	C-80	<i>Arthrobacter ramosus</i>	HQ242762	1475/1487	99	Actinobacteria
	C-82	<i>Pseudogulbenkiania</i> sp	AP012224	1482/1501	99	β-Proteobacteria
	C-84	<i>Arthrobacter</i> sp	JF772512	1486/1487	99	Actinobacteria
	C-85	<i>Cupriavidus</i> sp	HE660045	1495/1498	99	β-Proteobacteria
C-86	<i>Kitasatospora</i> sp	FN550139	1469/1476	99	Actinobacteria	
C-87	<i>Herbaspirillum</i> sp.	FJ812351	1395/1397	99	β-Proteobacteria	
C-88	<i>Arthrobacter</i> sp	JF772512	1487/1487	100	Actinobacteria	
C-89	<i>Cupriavidus basilensis</i>	NR_025138	1469/1476	99	β-Proteobacteria	
C-90	Uncultured <i>Paenibacillus</i>	JN793856	1483/1521	98	Firmicutes	

Table 3. Continued

Sample No.	Isolate No.	Related strain	Accession No.	Identity	%	Phylum
	C-37	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP003763	1514/1516	99	Firmicutes
	C-38	<i>Citricoccus</i> sp	JF274865	1482/1489	99	Actinobacteria
7	C-39	<i>Bacillus</i> sp	HQ236073	1513/1516	99	Firmicutes
	C-40	<i>Burkholderia cepacia</i>	AB114607	1496/1497	99	β -Proteobacteria
	C-41	<i>Bacillus</i> sp	HM234008	1514/1515	99	Firmicutes
	C-42	<i>Bacillus</i> sp	JQ435679	1512/1515	99	Firmicutes
	C-44	<i>Bacillus samanii</i>	FN433015	1514/1515	99	Firmicutes
8	C-45	<i>Arthrobacter</i> sp	JF772512	1487/1487	100	Actinobacteria
	C-47	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP003763	1512/1516	99	Firmicutes
	C-48	<i>Bacillus</i> sp	AB531397	1505/1508	99	Firmicutes
	C-49	<i>Bacillus</i> sp	JN872500	1511/1513	99	Firmicutes
	C-50	<i>Pseudomonas</i> sp	AB534594	1493/1496	99	γ -Proteobacteria
9	C-52	<i>Bacillus megaterium</i>	JN208059	1515/1516	99	Firmicutes
	C-53	<i>Bacillus</i> sp	AB531397	1503/1508	99	Firmicutes
	C-54	<i>Bacillus megaterium</i>	JN208059	1514/1516	99	Firmicutes
	C-56	<i>Bacillus</i> sp	D84560	1507/1511	99	Firmicutes
10	C-57	<i>Bacillus horikoshii</i>	GU232770	1512/1515	99	Firmicutes
	C-59	<i>Bacillus</i> sp	HQ236073	1514/1516	99	Firmicutes
	C-60	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP003763	1512/1516	99	Firmicutes
	C-61	<i>Bacillus arvi</i>	AJ627211	1494/1497	99	Firmicutes
	C-62	<i>Bacillus</i> sp	HM234008	1512/1515	99	Firmicutes
11	C-63	<i>Bacillus megaterium</i>	JN208059	1515/1516	99	Firmicutes
	C-64	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CP000094	1499/1501	99	γ -Proteobacteria
	C-66	<i>Bacillus samanii</i>	FN433015	1512/1515	99	Firmicutes
	C-67	<i>Bacillus pumilus</i>	JQ046373	1510/1514	99	Firmicutes
	C-69	<i>Bacterium endosymbiont</i>	AB558493	1444/1479	98	unclassified
12	C-70	<i>Arthrobacter</i> sp	EU086821	1485/1488	99	Actinobacteria
	C-71	<i>Burkholderia</i> sp	JX010979	1492/1497	99	β -Proteobacteria
	C-72	<i>Bacillus cereus</i>	HM015630	1515/1516	99	Firmicutes

1~5)에서 10 속, 22 균주, 6호 고분(시료번호 7~12)에서 6 속, 28 균주로 6호 고분에서 더 많은 세균이 분리되었지만, 5호 고분의 다양성이 더 높은 것으로 나타났다. 이는 상기 곰팡이균의 다양성 결과와 유사한 것으로 고분이 조성될 당시의 계절적 요인에 의한 것으로 생각된다.

5호 고분 분리 세균들 중 대도의 표면(시료번호 3)과 대도의 아래쪽 토양(시료번호 4, 5)에서는 *Staphylococcus warneri*, *Duganella nigrescens*, *Bacillus aquimaris*, *Janthinobacterium* sp., *Collimonas* sp.와 같은 세균들이 특징적으로 관찰되었다. *S. warneri*는 사람이나 동물의 피부나 점막에서 발견되는 세균으로 질병을 일으키는 병원성 세균으로 알려져 있다(Campoccia et al., 2010). 따라서 *S. warneri*는 매장당시 칼표면에 묻힌 상태로 보존되어 있었을 가능성이 크다. *D. nigrescens* 균의 상세한 분류학적 특징은 아직 보고되지 않고 있으며,

16S rDNA 서열만 보고되어 있다. *B. aquimaris*의 경우 우리나라 황해의 갯벌지역에서 분리된 바 있는 해양성 세균(marine bacteria)이다(Yoon et al., 2003). 이 세균이 산중턱의 고분에서 발견되기는 힘들 것으로 판단되며, 따라서 매장당시의 해산물을 통하여 유입되었을 것으로 생각된다. *Janthinobacterium*으로 분류된 C-30 균주의 경우에는 *Janthinobacterium*에서 특징적으로 나타나는 보라색 콜로니가 관찰되지 않았으므로 *Janthinobacterium*이 아닌 미분류 세균으로 판단된다(Pantanello et al., 2007). *Collimonas*는 척박한 토양환경에서 잘 적응하여 자라는 세균으로, 영양분을 살아있는 곰팡이로부터 획득하는 특징이 있어서, 식물의 곰팡이 질병을 막는 생물농약의 일종으로 연구되고 있다(Leveau et al., 2010).

결론적으로, 5호 고분의 곰팡이 및 세균의 다양성과 분

리된 세균의 생리학적 특징과 토양의 물리적 특징들로 미루어, 5호 고분은 미생물의 성장이 활발한 여름-가을의 시기에 조성되었을 것으로 추정할 수 있었다. 또한 동물의 피부에서 서식하는 세균과 깃털에서 서식하는 해양성 세균이 부장된 칼의 표면에서 동시에 관찰되어, 매장당시의 의식에 육류와 해산물이 사용되었을 가능성을 보여주었다. 본 연구는 매장 유물 및 유적지의 미생물 다양성 연구가 고대의 생활문화와 기후조건을 밝히는 단서가 될 수 있음을 보여주고 있다. 향후에도 이러한 미생물학적 연구가 고고학 및 역사학의 내용을 좀 더 충실하게 만드는 도구가 되기를 기대한다.

적 요

가야시대(경남 의령, 아라가야) 돌덧널무덤 5호와 6호의 부장품 속에서 채취한 12개의 토양시료에서 곰팡이균 9종과 세균 70종을 순수분리하였다. 분리된 미생물의 16S 및 18S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 5호 고분에서 곰팡이 5 균주, 세균 10 속, 22 균주가 발견되었으며, 6호 고분에서는 곰팡이 1 균주, 세균 6 속, 28 균주가 발견되었다. 5호 고분의 높은 미생물다양성으로 미루어 5호 고분이 6호 고분보다는 좀 더 미생물 성장에 좋은 기후조건(여름이나 초가을)에 조성되었을 것으로 추정되었다. 또한 5호 고분에 부장된 대도의 표면에서 동물의 피부에 서식하는 *Staphylococcus warneri*와 깃털에서 서식하는 해양성세균인 *Bacillus aquimaris*와 같은 독특한 세균이 발견됨에 따라, 매장당시의 의식에 육류와 해산물이 사용되었음을 추정할 수 있다. 결론적으로 본 연구는 미생물학적 연구가 역사학 연구의 도구가 될 수 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 2012년 한국과학창의재단 학부생연구프로그램(URP)과 국립생물자원관의 지원을 받아 진행하였음을 밝힙니다. 또한, 시료채취에 도움을 주신 경남발전연구원 역사문화센터 및 동서문물연구원 연구원들에게 감사의 말을 전합니다.

참고문헌

Campanella, D., Montanaro, L., Visai, L., Corazzari, T., Poggio, C., Pegreffi, F., Maso, A., Pirini, V., Ravaioli, S., Cangini, I., Speziale, P. and Arciola, C. R. 2010. Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs* 33:575-581.

Cano, R. J. and Borucki, M. K. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268:1060-1064.

Hong, J. Y., Kim, Y. H., Jung, M. H., Jo, C. W. and Choi, J. E. 2011. Characterization of xylanase of *Cladosporium cladosporioides* H1 isolated from Janggyeong Panjeon in Haeinsa temple. *Mycobiology* 39:306-309.

Jizhong, Z., Burns, M. A. and Tiedje, J. A. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316-322.

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., Won, S. and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylogenies that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:716-721.

Leveau, J. H., Uroz, S. and de Boer W. 2010. The bacterial genus *Collimonas*: mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ. Microbiol.* 12:281-292.

McNamara, C. J., Perry, T. D., Bearce, K. A., Hamandez-Dugue, G. and Mitchell, R. 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb. Ecol.* 51:51-64.

Ortega-Morales, B. O. 2006. Cyanobacterial diversity and ecology on historic monuments in Latin America. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48:188-195.

Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C. and Schippa, S. 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol.* 102:992-999.

Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Pinar, G., Lubitz, W. and Rolfe, S. 2004. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llona and La Garma). *FEMS Microbiol. Ecol.* 47:235-247.

Yoon, J. H., Kim, I. G., Kang, K. H., Oh, T. K. and Park, Y. H. 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1297-1303.