

토양에서 분리한 국내 미기록종 *Pseudomonas* 속 6종의 생화학적 특성과 계통 분류

김현중¹ · 정유정² · 김해영¹ · 허문석^{2*}

¹경희대학교 생명과학대학 식품생명공학 전공, ²국립생물자원관 생물자원연구부 미생물자원과

Isolation and characterization of 6 unrecorded *Pseudomonas* spp. from Korean soil

Hyun-Joong Kim¹, You-Jung Jung², Hae-Yeong Kim¹, and Moonsuk Hur^{2*}

¹Institute of Life Sciences and Resources Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

²Biological Resources Research Department, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Republic of Korea

(Received November 30, 2018; Revised December 19, 2018; Accepted December 19, 2018)

In 2017, as a study to discover indigenous prokaryotic species in Korea, a total of 6 bacterial strains assigned to the genus *Pseudomonas* were isolated from soil. From the high 16S rRNA gene sequence similarity ($\geq 99.5\%$) and phylogenetic analysis with closely related species, the isolated strains were identified as independent *Pseudomonas* species which were unrecorded in Korea. The six *Pseudomonas* species were *Pseudomonas mandelii*, *P. canadensis*, *P. thivervalensis*, *P. jessenii*, *P. lurida*, and *P. brenneri*. Gram reaction, culture conditions, colony and cell morphology, basic physiological and biochemical characteristics are described in the species description section.

Keywords: *Pseudomonas*, 16S rRNA gene sequencing, gamma-proteobacteria, soil, unrecorded species

Pseudomonas 속은 1894년 Migula에 의해 처음 알려졌고, 여러 탄소원을 이용할 수 있어(Stanier *et al.*, 1966), 동· 식물, 토양, 해수 그리고 담수 등의 광범위한 자연 환경에서 분리가 되는 것으로 확인된다(Palleroni, 1984). *Pseudomonas* 속 미생

물의 공통된 특징은 그람 음성(Gram-negative), 호기성, Oxidase 양성 또는 음성, Catalase 양성, 형태학적으로 간균의 모양을 하고 있다. DNA의 GC 함량은 58~69 mol%이며 하나 혹은 몇 개의 극편모(polar flagella)를 이용하여 운동성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 총 253개 종이 보고 되어 있다(<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>) (Palleroni, 1984; Peix *et al.*, 2009; Mulet *et al.*, 2010). *Pseudomonas* 속 몇 종은 항생 물질을 포함한 800여 종의 생리활성 물질을 생산한다고 알려져 있으며(Berdy, 2005) 환경에서 다양한 생태학적 역할을 수행하고 있다. 비병원성으로 알려져 있으나 일부 종은 식물, 동물 또는 인간에 병원성을 일으키기도 하며(Anzai *et al.*, 2000; Peix *et al.*, 2009; Mulet *et al.*, 2010) 일부 종은 식물의 생장을 돕기도 하는 것으로 알려져 있다(Palleroni, 1984). *Pseudomonas* 속 미생물은 분류학상으로 Proteobacteria (문), Gammaproteobacteria (강), Pseudomonadales (목), Pseudomonadaceae (과)에 속하는 미생물로 토양 등의 자연계에 널리 분포, 존재하는 미생물이다(Peix *et al.*, 2009).

본 연구에서는 국내에 존재하는 자생 미생물 자원의 확보를 목적으로 2017년 전라남도와 강원도 지역의 토양 시료로부터 다양한 미생물을 분리하였고, 동정 결과 6종의 *Pseudomonas* 속 미생물이 국내 미기록 종으로 확인되었으며, 이들의 계통

*For correspondence. E-mail: heomsk@korea.kr;
Tel.: +82-32-590-7175; Fax: +82-32-590-7230

분류학적, 형태학적, 생화학적 특징에 대하여 분석하였다. 미생물 분리를 위하여 2017년 5월에 전라남도 함평군 함평읍 성남리(126°29'45.9"E, 35°02'52.6"N, 31 m)와 강원도 정선군 화암면 백전리(128°53'55.6"E, 37°14'32.8"N, 711 m)의 토양 시료를 채취하였다. 조사지역은 농경 및 거주 등의 이용이 없는 나대지이며, 약산성 또는 중성(함평군: pH 4.7, 정선군: pH 7.7)으로 확인되었다. 채취한 토양시료는 실험 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다. 채취한 토양시료에서 미생물을 배양하기 위하여 토양 시료 4 g을 각각의 25 ml 배지[M17 (BD), Tryptic Soy Broth (TSB, BD)]에 침지하여 48시간 동안 30°C에서 배양하였다. 토양시료를 배양한 배지는 PBS 용액을 이용하여 연속희석법(serial dilution)으로 희석하였으며, 10^3 ~ 10^5 희석액 200 μ l를 각각의 고체배지에 도말 한 후 30°C 배양기에서 24~48시간 동안 배양하였다. 배양한 단일 균집들 중 형태, 색상 및 크기 등의 형태학적 특성을 비교하여 미생물을 선별하였고 동일한 분리 배지 및 온도에서 24 시간 동안 배양하여 순수분리 하였다.

순수분리한 미생물은 분자생물학적인 기법을 이용하여 계통 분류학적인 분석을 완료한 후 미생물의 동정을 실시하였다. 분리된 미생물의 계통 분류학적 분석을 위하여 genomic DNA extraction kit (GeneAll)를 사용하여 각 미생물의 배양체로부터 genomic DNA를 추출하였다. Universal primer 27F (5'-GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Lane, 1991; Weisburg et al., 1991)을 사용하여 각 미생물의 16S rRNA 유전자를 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭하였다. 이를 위하여 Dyne ready-2X-Go (DYNEBIO) 10 μ l와 3차 증류수 7 μ l, forward primer와 reverse primer를 각각 10 pmol씩 넣고, genomic DNA를 1 μ l 넣어 총 20 μ l의 PCR 반응액을 만들어 PCR을 수행하였다 (Weisburg et al., 1991). 증폭된 PCR 산물은 1.5% (w/v) agarose gel 전기영동법을 이용하여 크기를 확인하였고, PCR purification kit (Cosmo Genetech)를 이용하여 정제한 뒤 유전자 염기서열을 분석하였다. 분석된 16S rRNA 유전자 염기서열 (~1,474 bp)은 Seqman software (DNASTAR) 프로그램을 통하여 편집하였다. 편집된 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)와 EzBioCloud (www.ezbiocloud.net)를 이용하여 상동성이 높은 유전자 서열을 확인하고 분석을 하였다. 확보된 유사한 미생물들과 분리된 미생물의 16S rRNA 유전자 서열을 BioEdit 프로그램을 이용하여 정렬한 뒤, MEGA6 프로그램 (Tamura et al., 2013)의 Kimura2-parameter model (Kimura, 1983)과 neighbor-joining algorithms

(Saitou and Nei, 1987)을 사용하여 계통수(Phylogenetic trees)를 작성하였다.

분리된 미생물의 생리학적 실험은 미생물의 분리에 사용되었던 M17 및 TSB 배지에서 이루어졌으며, Gram stain kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 그람 염색을 실시한 후 광학현미경(CX23, Olympus)을 통하여 염색결과를 확인하였다. 온도 및 pH의 생장 조건 실험은 M17, TSB 액체 배지를 이용하여 4°C~45°C (10°C 간격으로 배양) 및 pH 4.0~10.0 (pH 4, 6, 8, 10)까지의 범위에서 배양되어지는 미생물의 균체 흡광도 (A_{600nm} , Spark 10M, TECAN)를 측정하여 확인하였다. 형태학적 특징은 전자현미경(transmission electron microscopy, JEM 1010, JEOL)을 사용하여 관찰하였다 (Schädler et al., 2008). 생리학적, 생화학적인 특성은 API 20NE, API ZYM 및 API 32GN kit (bioMérieux)를 사용하여 미생물의 다양한 효소 활성 및 당의 이용성을 확인하였다 (Table 2). G+C mol% 분석은 추출한 genomic DNA를 nucleoside 단위로 분해한 뒤, reverse-phase HPLC를 사용하여 분석하였다 (Mesbah et al., 1989).

본 연구를 통하여 전라남도 함평군과 강원도 정선군 화암면 백전리에서 채취한 토양으로부터 형태학적으로 다양한 미생물 단일 균집을 분리할 수 있었으며 16S rRNA 유전자 서열 분석을 통하여 *Pseudomonas* 속에 속하는 총 6종의 국내 미기록종을 분리하였다 (Table 1 and Fig. 1). 분리된 6종의 *Pseudomonas* 속 미생물은 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과, 국외에서 보고된 *Pseudomonas* 종들과 최소 99.5% 이상의 유전자 염기서열 상동성이 확인되었으며 각각 *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas canadensis*, *Pseudomonas thivervalensis*, *Pseudomonas baetica*, *Pseudomonas lurida*, 및 *Pseudomonas brenneri*로 확인되었다 (Verhille et al., 1999; Achouak et al., 2000; Baïda et al., 2001; Behrendt et al., 2007; López et al., 2012; Tambong et al., 2017). 6종의 미생물들에 대한 계통학적 특성은 Fig. 1과 Table 1에 제시하였다. 분리된 미생물들은 간균 형태로, 단일 편모 또는 한쪽 끝에 다수의 편모가 존재하였다 (Fig. 2).

본 연구를 통하여 분리된 6종의 미생물들은 국내 미기록종임이 확인되었다 (Verhille et al., 1999; Achouak et al., 2000; Baïda et al., 2001; Behrendt et al., 2007; López et al., 2012; Tambong et al., 2017). 본 미생물들의 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI GenBank에 등록하고 균주들은 국립생물자원관에 기탁하였으며, 각각의 미생물들의 특성에 대한 분석결과는 다음과 같다.

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

Table 1. *Pseudomonas* strains isolated from soil in this study

Strain ID (NIBR ID) ^a	Culture condition (medium, Temperature)	Closest type strain ^b		
		Species (Strain name)	GenBank accession number	Similarity (%)
GWJ2056 (NIBRBAC000500425)	M17, 25°C	<i>Pseudomonas mandelii</i> (NBRC 103147)	BDAF01000092	99.5
GWJ2059 (NIBRBAC000500420)	TSB, 25°C	<i>Pseudomonas canadensis</i> (2-92)	AYTD01000015	100
GWJ2060 (NIBRBAC000500421)	TSB, 25°C	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> (DSM 13194)	LHVE01000021	99.5
GWJ2123 (NIBRBAC000500422)	TSB, 25°C	<i>Pseudomonas baetica</i> (a390)	FM201274	99.5
GWJ2125 (NIBRBAC000500423)	M17, 25°C	<i>Pseudomonas lurida</i> (LMG 21995)	PDJB01000001	100
JNP2044 (NIBRBAC000500430)	M17, 25°C	<i>Pseudomonas brenneri</i> (CFML 97-391)	AF268968	99.5

^a GWJ, isolated strains from Jeongseon County, Gangwon-do province; JNP, isolated strain from Hampyeong County, South Jeolla Province; NIBR ID, strain number of the National Institute of Biological Resources.

^b GenBank accession number at the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); similarity, 16S rRNA gene sequence similarity between isolate strain and type strain.

Pseudomonas mandelii GWJ2056

Pseudomonas mandelii GWJ2056 (= NIBRBAC000500425) 미생물은 *Pseudomonas mandelii* NBRC 1031473^T (Verhille *et al.*, 1999)와 99.5%의 16S rRNA 유전자의 상동성을 가지고 있으며 G+C mol%는 56.3%이다. 형태는 간균 형태이며 단일 군집은 옅은 노란색이고 그람 음성, oxidase 음성 및 catalase 양성이다. 성장 온도는 10~37°C이며, 최적온도는 30°C, 성장 pH는 4.5~10.0이며 최적 pH는 6.0~8.0이다. 대부분의 당을 기질로 활용하는 경향을 가지고 있으며 D-Ribose를 기질로 이용한다.

Pseudomonas canadensis GWJ2059

Pseudomonas canadensis GWJ2059 (= NIBRBAC000500420) 미생물은 *Pseudomonas canadensis* 2-92^T (Tambong *et al.*, 2017)와 100%의 16S rRNA 유전자의 상동성을 가지고 있으며 G+C mol%는 60.0%이다. 형태는 간균 형태이며 흰색 또는 옅은 노란색이고 그람 음성, oxidase 및 catalase는 음성이다. 성장 온도는 10~37°C, 최적온도는 30°C, 성장 pH는 4.5~10.0이며 최적 pH는 6.0~8.0이다. 단일 군집은 대부분의 당을 활용하는 경향을 가지고 있으며 Salicin 및 Glycogen을 기질로 이용한다.

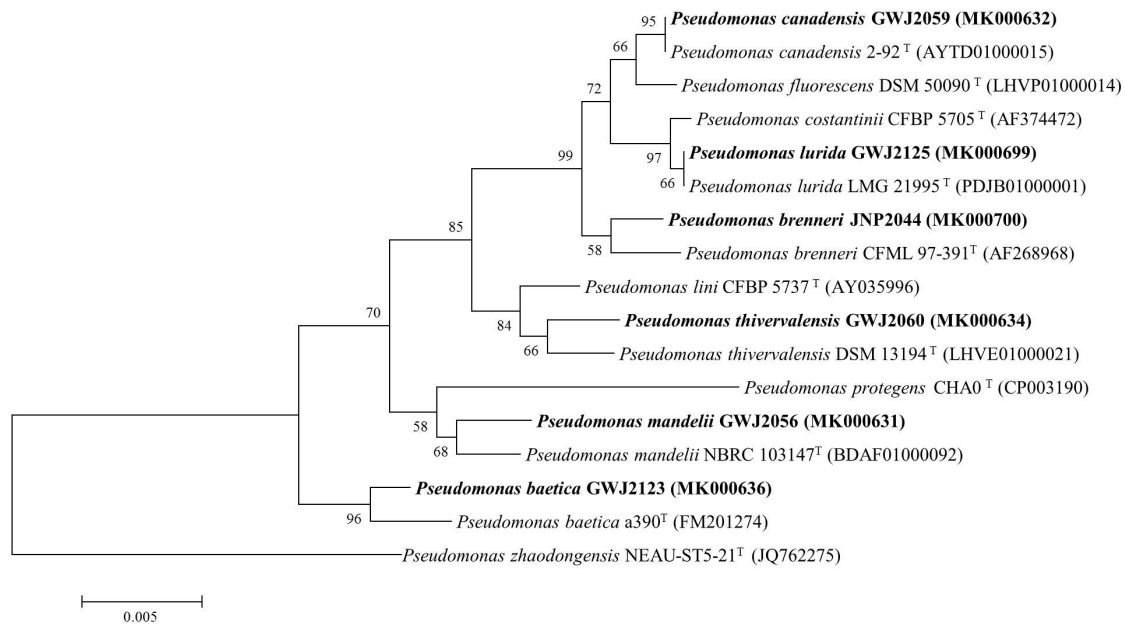


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Pseudomonas* spp. based on the 16S rRNA gene sequence analysis using the neighbor-joining method showing the position of the newly isolated *Pseudomonas* strains (highlighted in bold) compared with the closely reference *Pseudomonas* strains. *Pseudomonas zhaodongensis* NEAU-ST5-21^T was used as an outgroup. Bar, 0.005 changes per nucleotide position.

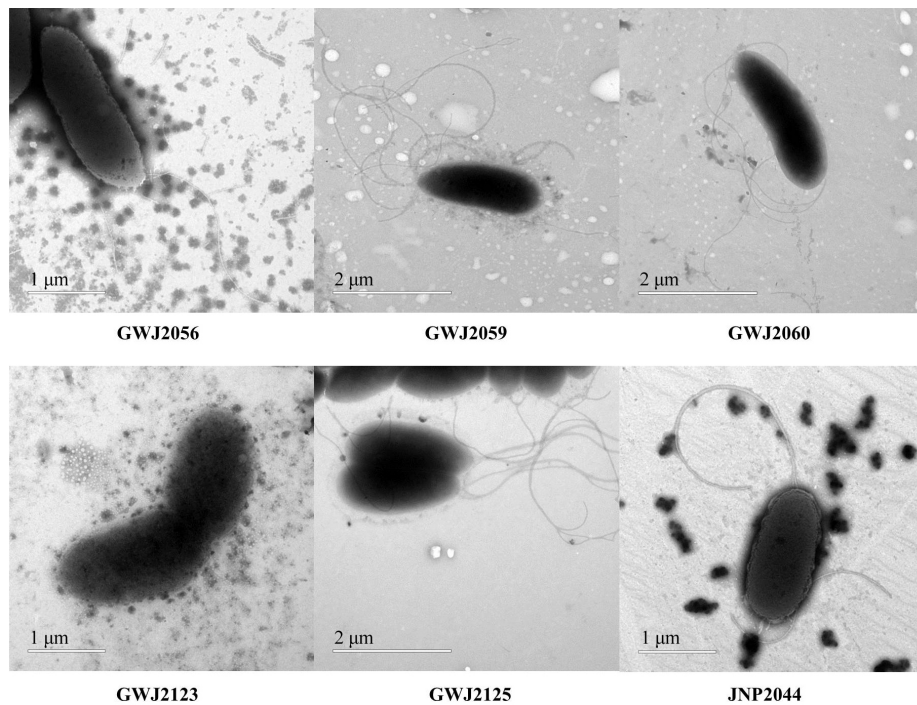


Fig. 2. Transmission electron micrograph of isolated *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas thivervalensis GWJ2060

Pseudomonas thivervalensis GWJ2060 (= NIBRBAC000500421) 미생물은 *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194^T (Achouak *et al.*, 2000)과 99.5%의 16S rRNA 유전자의 상동성을 가지고 있으며 G+C mol%는 60.4%이다. 형태는 간균 형태이며 단일 군집은 흰색이고 그람 음성, oxidase 및 catalase는 음성이다. 성장 온도는 10~37°C, 최적온도는 30°C, 성장 pH는 4.5~10.0이며 최적 pH는 6.0~8.0이다. 대부분의 당을 기질로 활용하고 nitrate를 nitrogen으로 환원 가능하며 Itaconate를 기질로 활용한다. 또한 Valine arylamidase 효소 양성이고, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase 효소 음성이다.

Pseudomonas baetica GWJ2123

Pseudomonas baetica GWJ2123 (= NIBRBAC000500422) 미생물은 *Pseudomonas baetica* a390^T (López *et al.*, 2012)과 99.5%의 16S rRNA 유전자의 상동성을 가지고 있으며 G+C mol%는 59.7%이다. 형태는 간균 형태이며 단일 군집은 흰색이고 그람 음성균이며 oxidase 및 catalase는 양성이다. 성장 온도는 10~37°C, 최적온도는 30°C, 성장 pH는 4.5~10.0이며 최적 pH는 6.0~8.0이다. 대부분의 당을 기질로 활용하는 경향을 가지고 있으며 특히 phenyl-acetate를 이용 가능한 것으로 확인 되었다.

Pseudomonas lurida GWJ2125

Pseudomonas lurida GWJ2125 (= NIBRBAC000500423) 미생물은 *Pseudomonas lurida* LMG 21995^T (Behrendt *et al.*, 2007)과 100%의 16S rRNA 유전자의 상동성을 가지고 있으며 G+C mol%는 61.0%이다. 형태는 간균 형태이며 단일 군집은 옅은 노란색이고 그람 음성균이며 oxidase 및 catalase는 양성이다. 성장 온도는 10~37°C, 최적온도는 25°C, 성장 pH는 4.5~10.0이며 최적 pH는 6.0~8.0이다. 대부분의 당을 기질로 활용하며 Valerate를 기질로 활용하며 L-Alanine을 기질로 활용하지 못한다.

Pseudomonas brenneri JNP2044

Pseudomonas brenneri JNP2044 (= NIBRBAC000500430) 미생물은 *Pseudomonas brenneri* CFML 97-391^T (Baïda *et al.*, 2001)과 99.5%의 16S rRNA 유전자의 상동성을 가지고 있다. G+C mol%는 60.0%이다. 형태는 간균 형태이며 단일 군집은 흰색이고 그람 음성균이며 oxidase 및 catalase는 양성이다. 성장 온도는 10~37°C, 최적온도는 30°C, 성장 pH는 4.5~10.0이며 최적 pH는 6.0~8.0이다. L-Fucose, L-Rhamnose 및 Lactate를 기질로 사용하는 반면 D-Glucose, D-Mannose, Gluconate 그리고 L-Serine은 기질로 사용하지 못한다. Esterase (C4) 및 Esterase Lipase (C8) 효소에 음성이며 Acid phosphatase 효소

Table 2. Physiological and biochemical characteristics and differential carbohydrate assimilation patterns of isolated *Pseudomonas* spp. using API 20NE (2.1) kit, API ZYM kit, and API 32GN kit

–, Negative; +, positive; w, weakly positive.

	Isolated <i>Pseudomonas</i> strain					
	<i>Pseudomonas mandelii</i> GWJ2056	<i>Pseudomonas canadensis</i> GWJ2059	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> GWJ2060	<i>Pseudomonas baetica</i> GWJ2123	<i>Pseudomonas lurida</i> GWJ2125	<i>Pseudomonas brenneri</i> JNP2044
API 20NE (2.1)						
Nitrate reduction (NO ₃ → NO ₂ ⁻)	+	–	–	+	–	–
Reduction of nitrates to nitrogen	–	–	+	w	–	–
Arginine dihydrolase	–	+	+	–	+	+
Protease (gelatin hydrolysis)	+	–	–	–	–	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	–
L-Arbinose	–	+	+	–	+	–
D-Mannose	+	+	+	+	+	–
N-Acetyl-D-glucosamine	–	+	–	w	–	–
Gluconate	+	+	+	+	+	–
Caprate	–	+	+	+	+	–
Adipate	–	–	–	–	–	–
Malate	–	+	+	w	+	–
Phenyl-acetate	–	–	–	w	–	–
API ZYM						
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	–
Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+	+	–
Leucine arylamidase	+	–	–	+	–	+
Valine arylamidase	–	–	+	–	–	–
Acid phosphatase	–	–	–	–	–	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	–	+	+	+
N-acetyl-β-glucosaminidase	–	+	–	+	–	–
API 32GN						
D-Glucose	+	+	+	+	+	–
Salicin	–	+	–	–	–	–
D-Melibiose	+	+	–	–	–	–
L-Fucose	–	–	–	–	–	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	–	–
L-Arabinose	–	+	+	–	+	–
Caprate	–	+	+	+	+	–
Valerate	–	–	–	–	+	–
2-Ketogluconate	+	–	–	+	+	+
4-Hydroxy-benzoate	–	+	+	+	–	–
L-Proline	+	–	–	–	–	+
L-Rhamnose	–	–	–	–	–	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	–	+	–	+	–	–
D-Ribose	+	–	–	–	–	–
D-Maltose	–	+	+	–	–	–
Itaconate	–	–	+	–	–	–
Acetate	+	–	+	–	+	–
Lactate	–	–	–	–	–	+
L-Alanine	+	+	+	+	–	+
Glycogen	–	+	–	–	–	–
3-Hydroxy-benzoate	+	+	–	+	–	+
L-Serine	+	+	+	+	+	–

All isolated *Pseudomonas* strains resulted positive reaction on D-Mannitol, citrate and resulted negative reaction on indole production, glucose acidification, urease, β-glucosidase (esculin hydrolysis), β-galactosidase (PNPG), D-maltose, adipate of API 20NE kit (data not shown).

All isolated *Pseudomonas* strains resulted positive reaction on alkaline phosphatase and resulted negative reaction on lipase (C14), cystine arylamidase, trypsin, a-chymotrypsin, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, a-mannosidase, a-fucosidase of API ZYM kit (data not shown).

All isolated *Pseudomonas* strains resulted positive reaction on D-mannitol, propionate, citrate, L-histidine, 3-hydroxy-butyrate and resulted negative reaction on inositol, D-sucrose, suberate, malonate, 5-ketogluconate of API 32GN kit (data not shown).

에 양성이다.

본 연구에서 분리된 미생물들은 기존에 보고된 근연종과 비교하였을 때 몇 가지 다른 특징을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 토양에서 분리된 *Pseudomonas mandelii* GWJ2056의 경우 oxidase 활성이 없는 것으로 확인되었으나 담수에서 분리된 근연종인 *Pseudomonas mandelii* NBRC 103147는 oxidase 활성이 있고, 탄소원의 이용에 있어 *Pseudomonas mandelii* GWJ2056는 L-Histidin을 이용하고 N-Acetyl-D-Glucosamine과 Malonate를 이용하지 않는 것으로 확인되었으나 근연종인 *Pseudomonas mandelii* NBRC 103147와 상반되는 결과가 관찰되었다(Verhille et al., 1999). 토양에서 분리된 *Pseudomonas canadensis* GWJ2059는 요소 및 젤라틴 분해능, catalase와 oxidase가 모두 음성반응임을 확인하였으나, 토양에서 분리된 근연종인 *Pseudomonas canadensis* 2-92의 경우에는 요소 및 젤라틴 분해능, catalase와 oxidase가 양성반응을 보인 것으로 보고되어 있다(Tambong et al., 2017). 또한 *Pseudomonas thivervalensis* GWJ2060은 젤라틴 분해능에 음성, D-Mannitol에 양성이었으나 근연종인 *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194는 각각 양성, 음성의 결과로 보고되어 있으며(Achouak et al., 2000), *Pseudomonas lurida* GWJ2125는 젤라틴 분해능과 D-Sorbitol이 음성으로 확인되었으나 *Pseudomonas lurida* LMG 21995의 경우 모두 양성의 결과가 보고되어 있다(Behrendt et al., 2007). 이러한 결과는 같은 종의 미생물이라도 서식 환경 등에 따라 생리학적, 생화학적 기능이 달라질 수 있음을 추측할 수 있다(Moore et al., 1998; Jaspers and Overmann, 2004; Lee et al., 2012). 따라서 다른 환경에서 분리된 종들의 특성을 분석하고 비교하는 것은 다양한 환경 내에서 미생물들의 생태학적 기능을 이해하는데 중요한 자료로 활용될 수 있다. 본 연구를 통한 국내 미기록 미생물의 발굴과 특성 분석 결과는 미생물의 생태적 기능 파악과 산업적 응용을 위한 자생 미생물의 자원화에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

생명공학산업의 주요한 자원인 미생물의 가치는 날로 증대하고 있으며, 이로 인해 생물자원을 확보하기 위한 국가간의 경쟁은 심화되고 있다. 이에 다양한 환경에서 미생물자원을 발굴하고 특성을 확인하는 것은 미래의 잠재적 생물자원을 확보하는데 큰 의미가 있다. 본 연구에서는 *Pseudomonas*속 속하는 6종의 미생물들을 일반 토양에서 분리하여 분자계통학적 분석을 통해 국내 미기록종을 확인하였다. 본 연구로

확보된 미생물들은 자생 생물자원의 다양성을 늘리고, 산업계에 생물자원의 선택의 폭을 늘리는데 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 말

이 논문은 환경부의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR 201701105).

References

- Achouak W, Sutra L, Heulin T, Meyer JM, Fromin N, Degraeve S, Christen R, and Gardan L. 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 9–18.
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, and Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1563–1589.
- Baïda N, Yazourh A, Singer E, and Izard D. 2001. *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Res. Microbiol.* **152**, 493–502.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Meyer JM, and Spröer C. 2007. *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 979–985.
- Berty JJ. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* **58**, 1–26.
- Jaspers E and Overmann J. 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4831–4839.
- Kimura M. 1983. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Mol. Biol. Evol.* **1**, 84–93.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115–175. In Stackebrandt E and Goodfellow M (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Lee YM, Kim GH, Jung YJ, Choe CD, Yim JH, Lee HK, and Hong SG. 2012. Polar and alpine microbial collection (PAMC): a culture collection dedicated to polar and alpine microorganisms. *Polar Biol.* **35**, 1433–1438.
- López JR, Diéguez AL, Doce A, De la Roca E, De la Herran R, Navas JI, Toranzo AE, and Romalde JL. 2012. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneate* (Moreau). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 874–882.
- Mesbah M, Premachandran U, and Whitman WB. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

- 39, 159–167.
- Moore LR, Rocap G, and Chisholm SW.** 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**, 464–467.
- Mulet M, Lalucat J, and García-Valdés E.** 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* **12**, 1513–1530.
- Palleroni NJ.** 1984. Genus I. *Pseudomonas*. pp. 141–199. In Krieg NR and Holt JG (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, and Velázquez E.** 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 1132–1147.
- Saitou N, and Nei M.** 1987. The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Schädler S, Burkhardt C, and Kappler A.** 2008. Evaluation of electron microscopic sample preparation methods and imaging techniques for characterization of cell-mineral aggregates. *Geomicrobiol. J.* **25**, 228–239.
- Stanier RY, Palleroni NJ, and Doudoroff M.** 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159–271.
- Tambong JT, Xu R, and Bromfield ESP.** 2017. *Pseudomonas canadensis* sp. nov., a biological control agent isolated from a field plot under long-term mineral fertilization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 889–895.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, and Kumar S.** 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, and Leclerc H.** 1999. Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 45–58.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, and Lane DJ.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703.