



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주 Scoria 미생물의 종다양성과  
생리활성 물질에 관한 연구

濟州大學校 教育大學院

生物教育專攻

李東琬

2009年 8月

제주 Scoria 미생물의 종다양성과  
생리활성 물질에 관한 연구

指導教授 李 順 動

李 東 琬

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2009年 8月

李東琬의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ 印

委 員 \_\_\_\_\_ 印

委 員 \_\_\_\_\_ 印

濟州大學校 教育大學院

2009年 8月

A study of microbial diversity and bioactive  
compounds from Jejuscoria bacteria

Dong Wan Lee

(Supervised by professor Soon Dong Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of  
Master of Education

2009. 8.

This thesis has been examined and approved.

.....  
.....  
.....  
.....

Department of Biology Education  
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

<국문초록>

# 제주 Scoria 미생물의 종다양성과 생리활성 물질에 관한 연구

이 동 완

제주대학교 교육대학원 생물교육전공

지도교수 이 순 동

본 연구는 제주도 구좌읍 지역 다랑쉬 오름 근처의 제주 화산석 송이 (Jeuscoria)를 색상별로 채집하여 배양 가능한 미생물을 분리한 후 Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 화산석 송이 미생물의 종다양성을 분석하고 선발된 균주에 대해 다상적 분류방법을 적용하여 분류·동정을 수행하였다. 또한, 항진균활성과 chitin 분해능을 조사하여 생리 활성물질을 탐색하였다.

5개 색상의 Jeuscoria에서 총 100균주의 배양 가능한 미생물이 분리되었다. 분리 균주들의 colony의 색소는 yellow, orange, cream, pink 또는 brown 등으로 다양하게 나타났으며 그람양성균은 63균주이고 그람음성균은 37균주 이었다. 운동성 관찰에서는 총 84균주 중에서 47균주가 운동성을 나타내었다. 균주의 형태는 70균주가 간균 (rod-shaped)이었고 관찰되었고 14균주가 구균 (coccus)이었다. 그리고 균사를 생성하는 16개의 균주의 포자사슬의 형태는 직쇄형 (rectiflexibile), 갈고리형 (hooked) 및 방사형 (spiral)을 띠었다.

Rep-PCR 분석을 통해서 각 균주에서 분리한 DNA의 band pattern을 비교 분석하여 유전적 다양성을 검토하였다. 각 균주들의 DNA fingerprinting pattern 분석을 통해 UPGMA형태의 dendrogram을 작성하였고 유사도를 결정하였다. 유사도 65% 이상의 수준에서 grouping 한 결과, 송이 미생물들은 붉은색 (A; red)

에서 28개의 Rep-group, 갈색 (B; brown)에서 21개의 Rep-group, 적갈색 (C; reddish-brown)에서 6개의 Rep-group, 황갈색 (D; yellow brown)에서 22개의 Rep-group, 그리고 검정색 (E; black)에서 6개의 서로 다른 Rep-group으로 분류되었다. 분리된 총 100균주 전체를 grouping 했을 때 79개의 Rep-group으로 분류되었다.

다랑쉬 지역 Jejuscoria에서 분리된 100균주의 배양 가능한 세균의 Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과 *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Deinococci*,  $\alpha$ -,  $\beta$ -과  $\gamma$ -*Proteobacteria*의 6개 계통군이 확인되었다. 58%는 *Actinobacteria*로 우점을 이루는 것으로 확인되었으며 20%는  $\beta$ -*Proteobacteria*로 확인되었고 14%는  $\alpha$ -*Proteobacteria*, 4%는 *Bacilli*, 3%는  $\gamma$ -*Proteobacteria* 그리고 1%는 *Deinococci*에 속하는 것으로 나타났다. 시료별로 보면, A (red)시료는 cream 색상을 갖는 *Arthrobacter*가, B (brown)시료는 yellow 색상을 갖는 *Nocardioides*와 균사생성 방선균인 *Streptomyces*가 많이 분포하여서 *Actinobacteria* 분류군이 70% 이상 분리되었다. 반면, D (yellow brown)시료는 yellow 혹은 orange 색상을 띠는 *Massilia* 균주들을 포함한 *Proteobacteria* 분류군이 60% 이상 나타났다. C (reddish-brown)와 E (black)시료는 분리균주가 많지 않지만 각 그룹별로 골고루 분포하고 있었다.

생리활성 물질 탐색결과 chitin을 분해하는 균주는 총 100균주 중에 18균주로 나타났다. 투명한 크기는 1cm 미만이 8균주, 1cm 이상 2cm 미만이 5균주 그리고 2cm 이상인 균주가 5균주로 확인되었다. 감귤저장 중 부패를 발생시키는 푸른곰팡이 (*Penicillium italicum*)에 대한 항진균활성은 3균주가 억제환을 나타내었다. *Paenibacillus*에 속하는 1균주와 *Streptomyces*에 속하는 1균주가 2cm 이상의 억제환을 나타내었다.

Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 한 계통분석 결과 31균주가 새로운 속 (genus) 또는 종 (species)으로 분류될 가능성을 나타냈다. 이 균주들 중에서 A36과 D01은 표준균주들과 95.9-98.6%의 염기서열 유사도, 생리·생화학적 특성 비교 및 낮은 DNA-DNA relatedness 값 (16.5-35.4%)을 바탕으로 *Marmoricola korecus* sp. nov. (type strain Sco-A36<sup>T</sup> = KCTC 19596<sup>T</sup> = DSM 22128<sup>T</sup>) 그리고 *Marmoricola scoriae* sp. nov. (type strain Sco-D01<sup>T</sup> = KCTC

19597<sup>T</sup>= DSM 22127<sup>T</sup>)으로 제안되었다. 또한, *Micromonosporaceae* (family)에 속하는 균주 B14는 표준균주들과 95.8% 이하의 낮은 염기서열 유사도, 계통분석 그리고 화학적 특성 (DAP, sugar, menaquinone, polar lipids 및 fatty acid) 분석 비교를 통하여 새로운 속 (genus) 및 종 (species)으로 동정 및 분류 되었다. 균주 이름은 *Allocatelliglobispora scoriae*로 제안되었다.





## 차 례

I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 시료 채취 및 방법 .....	5
2. 분리 및 배양 .....	7
2.1. <i>Jejuscoria</i> 미생물의 선택적 분리 및 보존 .....	7
2.1.1. 연속희석법 .....	7
2.1.2. Stamping 방법 .....	8
2.1.3. 분리 배지 .....	9
2.2. 순수 배양체 확인 및 보관 .....	10
3. 표현형질에 따른 특징 .....	10
3.1. 배양상 특징 .....	10
3.2. 형태학적 특징 .....	10
4. 분자생물학적 방법 .....	11
4.1. DNA의 분리 (1) .....	11
4.2. DNA의 분리 (2) .....	11
4.3. Repetitive DNA 증폭 (Rep-PCR) 및 분석 .....	12
4.4. 16S rRNA 유전자 증폭 .....	14
4.5. 16S rDNA PCR 증폭산물의 정제 및 농도 측정 .....	14
4.6. 염기서열 분석 및 계통학적 분석 .....	15
5. 생리활성 물질 탐색 .....	15
5.1. 키틴분해능 탐색 .....	15
5.2. 항진균 활성 탐색 .....	16
6. 신종의 다상적 분류 및 동정 .....	16
6.1. 세포형태관찰 .....	16
6.1.1. 투과 전자 현미경 (TEM)을 이용한 관찰 .....	16
6.1.2. 주사 전자 현미경 (SEM)을 이용한 관찰 .....	17



6.2. Oxidase, catalase 활성 및 생리·생화학적 특성 분석 .....	17
6.3. 화학적 특성 분석 .....	18
6.3.1. G+C 함량 결정 .....	18
6.3.2. Diaminopimelic acid (DAP) 분석 .....	19
6.3.3. Whole-cell sugar 분석 .....	19
6.3.4. Menaquinone (MK) 및 polar lipid 분석 .....	20
6.3.5. Fatty acid 분석 .....	21
6.3.6. DNA-DNA hybridization .....	22
<b>III. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>23</b>
1. <i>Jejuscoria</i> 미생물의 순수 분리 .....	23
1.1. 평판배양법에 의한 세균수 측정 .....	23
1.2. 분리균주의 배양상 특성 .....	24
2. Rep-PCR을 이용한 <i>Jejuscoria</i> 내 세균군집의 계통학적 해석 .....	30
2.1. Rep-PCR pattern의 분석 .....	30
3. Rep-PCR 대표 strain의 16S rDNA 염기서열 해석 .....	37
3.1. <i>Jejuscoria</i> A (red colored) 내 세균군집의 계통학적 특성 .....	37
3.2. <i>Jejuscoria</i> B (brown colored) 내 세균군집의 계통학적 특성 .....	42
3.3. <i>Jejuscoria</i> C (reddish-brown colored) 내 세균군집의 계통학적 특성...	46
3.4. <i>Jejuscoria</i> D (yellow brown colored) 내 세균군집의 계통학적 특성...	49
3.5. <i>Jejuscoria</i> E (black colored) 내 세균군집의 계통학적 특성 .....	53
4. <i>Jejuscoria</i> bacteria의 군집분석 .....	56
5. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 Rep-PCR 분석의 고찰 .....	58
6. 생리활성 물질 탐색 결과 .....	59
7. <i>Marmoricola</i> 속 신종의 다상적 분류 .....	65
7.1. 표현형적 특성 .....	65
7.1.1. 표준균주 .....	65
7.1.2. 형태 및 배양상 특성 .....	65
7.1.3. 생리 및 생화학적 특성 .....	66

7.2. 화학 분류적 특성.....	67
7.2.1. G+C 함량 .....	67
7.2.2. Menaquinone .....	68
7.2.3. Polar lipid .....	69
7.2.4. Fatty acid .....	70
7.3. 계통분석.....	74
7.4. 염기서열 유사도 (%) .....	76
7.5. DNA-DNA hybridization .....	76
7.6. <i>Marmoricola</i> 속의 신종 Sco-A36 <sup>T</sup> 과 Sco-D01 <sup>T</sup> 의 기술 .....	77
8. <i>Micromonosporaceae</i> 과 새로운 속의 다상적 분류 .....	79
8.1. 표현형적 특성 .....	79
8.1.1. 표준균주 .....	79
8.1.2. 형태 및 배양상 특성 .....	79
8.1.3. 온도, pH, NaCl 내성, 분해능 특성 .....	80
8.2. 화학적 특성 .....	80
8.2.1. G+C 함량 .....	80
8.2.2. DAP .....	81
8.2.3. Whole-cell sugar .....	81
8.2.4. Menaquinone .....	82
8.2.5. Polar lipid .....	83
8.2.6. Fatty acid .....	83
8.3. 계통분석 .....	87
8.4. 염기서열 유사도 (%) .....	89
8.5. <i>Micromonosporaceae</i> 과의 신속 및 신종 Sco-B14 <sup>T</sup> 의 기술 .....	90
IV. 요약 .....	91
V. 참고문헌 .....	93
Summary .....	104
감사의 글 .....	107

표 차례

**Table 1.** Composition of starch-casein agar (SCA)

**Table 2.** Composition of ISP 2 medium (YEME)

**Table 3.** Composition of nutrient agar (NA)

**Table 4.** Colony forming unit per gram (CFU/g) of *Jejuscoria* samples on solid medium

**Table 5.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* A (red colored) strains

**Table 6.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* B (brown colored) strains

**Table 7.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* C (reddish-brown colored) strains

**Table 8.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* D (yellow brown colored) strains

**Table 9.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* E (black colored) strains

**Table 10.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* A (red colored) strains

**Table 11.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* B (brown colored) strains

**Table 12.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* C (reddish-brown colored) strains

**Table 13.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* D (yellow brown colored) strains

**Table 14.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* E (black colored) strains

**Table 15.** Category of *Jejuscoria* strains according to taxonomic hierarchy

**Table 16.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from red *Jejuscoria*

**Table 17.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from brown *Jejuscoria*

**Table 18.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from reddish-brown *Jejuscoria*

**Table 19.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from yellow brown *Jejuscoria*

**Table 20.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from black *Jejuscoria*

**Table 21.** Cellular fatty acid compositions of strains Sco-A36<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup> and the type species *Marmoricola*

**Table 22.** Differential phenotypic properties of strains Sco-A36<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup> and *Marmoricola* species

**Table 23.** 16S rRNA gene sequence similarity values of strains Sco-A36<sup>T</sup>

and Sco-D01<sup>T</sup> with the phylogenetic neighbors

**Table 24.** DNA-DNA relatedness between strains Sco-A36<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup> and their closest relatives

**Table 25.** Cellular fatty acid compositions of strain Sco-B14<sup>T</sup> and phylogenetic neighbors

**Table 26.** Differential characteristics of strain Sco-B14<sup>T</sup> from the other *Micromonosporaceae* genera

**Table 27.** 16S rRNA gene sequence similarity values of strain Sco-B14<sup>T</sup> with the phylogenetic neighbors

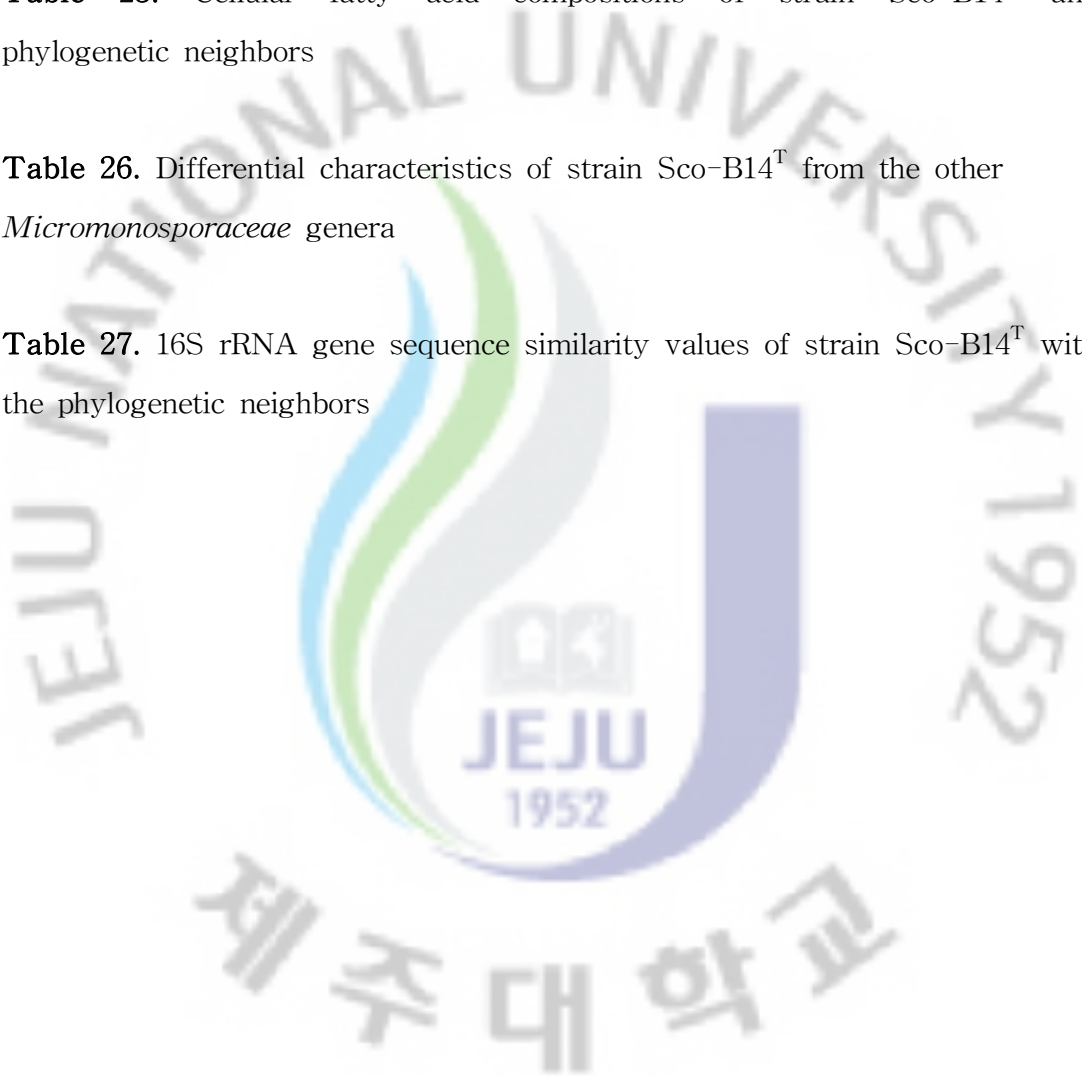


그림 차례

**Fig. 1.** Sampling site of Jejuscoria near Darangshi oreum

**Fig. 2.** Scoria samples of different colors collected from layers of Jejuscoria

**Fig 3.** Serial dilution method for isolation of Jejuscoria bacteria

**Fig 4.** Stamping method for isolation of Jejuscoria bacteria

**Fig. 5.** Method of Rep-PCR genomic DNA fingerprinting

**Fig. 6.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of Jejuscoria A (red colored) bacteria

**Fig. 7.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of Jejuscoria B (brown colored) bacteria

**Fig. 8.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of Jejuscoria C (reddish-brown colored) bacteria

**Fig. 9.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of scoria D (yellow brown colored) bacteria

**Fig. 10.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of Jejuscoria E (black colored) bacteria

**Fig. 11.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of Jejuscoria bacteria

**Fig. 12.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-A (red *Jejuscoria*) bacteria

**Fig. 13.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-B (brown *Jejuscoria*) bacteria

**Fig. 14.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-C (reddish-brown *Jejuscoria*) bacteria

**Fig. 15.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-D (yellow brown *Jejuscoria*) bacteria

**Fig. 16.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-E (black *Jejuscoria*) bacteria

**Fig. 17.** Biodiversity and structure of bacterial community of *Jejuscoria*

**Fig. 18.** Transmission electron microscopy of *Marmoricola* isolates

**Fig. 19.** G+C contents of genomic DNA of strains Sco-A36<sup>T</sup>(a) and Sco-D01<sup>T</sup>(b)

**Fig. 20.** Menaquinone profile of strains Sco-A36<sup>T</sup>(a) and Sco-D01<sup>T</sup>(b) by HPLC

**Fig. 21.** Polar lipids profile of strains Sco-A36<sup>T</sup>(a) and Sco-D01<sup>T</sup>(b) by TLC

**Fig. 22.** 16S rRNA gene sequence tree showing phylogenetic position of strains Sco-A36<sup>T</sup> and Sco-D01<sup>T</sup> with the radiation encompassing



representatives of the family *Nocardioideaceae*

**Fig. 23.** Scanning electron microscopy of strain Sco-B14<sup>T</sup>

**Fig. 24.** G+C content of genomic DNA of strain Sco-B14<sup>T</sup>

**Fig. 25.** The isomer of diaminopimelic acid in cell wall of strain Sco-B14<sup>T</sup> by TLC

**Fig. 26.** Characteristic whole-cell sugars of strain Sco-B14<sup>T</sup> by GC

**Fig. 27.** Menaquinones profile of Sco-B14<sup>T</sup> by HPLC

**Fig. 28.** Polar lipids profile of strain Sco-B14<sup>T</sup> by TLC

**Fig. 29.** 16S rRNA gene sequence tree showing phylogenetic position of strain Sco-B14<sup>T</sup> with the radiation encompassing representatives of family *Micromonosporaceae*

## I. 서론

고등 동·식물과 달리 미생물은 남극 빙하, 온천수나 심해저, 빛이 전혀 없는 동굴 등 극한 환경에서도 생존하고 성장할 수 있으며, 높은 방사능의 노출, 고농도의 염분이나 강산성 혹은 알칼리 환경, 그리고 무기물이 유일한 영양공급원인 환경에서도 살아갈 수 있다. 이러한 다양한 서식처와 대사능력으로 미생물은 신물질 창출, 식품소재, 환경 정화, 생물 농약 및 비료 등의 생명공학의 중요한 소재로 활용되고 있다. 현재 미생물 및 관련 분야의 세계시장 규모는 연간 8천억불로 추정되고 있고 향후에도 신기능 신규 유용 미생물 산업의 시장 규모가 크게 증대될 것으로 예측하고 있다. 이렇게 경제적으로 잠재적 부가가치가 높은 미생물 자원을 국내 뿐 아니라 국외의 특수 환경 및 특이서식지로부터 미생물 자원 확보에 열을 올리고 있다. 하지만 현재의 배양기술로서는 지구상에 분포한 전체 미생물 중 5%미만만을 배양하여 확보할 수 있다. 이처럼 무수히 많은 미생물 자원이 아직 개발되지 않고 있으므로 보다 장기적이고 체계적인 계획의 수립을 통해 국내 토착의 유용물질 생산 미생물 균주 및 다양한 자연환경에서 신규 미생물의 분리 및 탐색을 병행하여야 할 것이다.

제주도의 오름은 신생대 제3-4기에 화산 활동시 분출된 용암이나 가스에 의해 형성된 기생화산으로 제주도 전역에 360여개가 분포되어 있다. 이 오름들을 구성하고 있는 제주 화산석 송이 (Jejuscoria)는 마그마 분출시 점토가 고열의 불에 타 소성된 돌숯 (volcanic ash)으로 기공이 많고 가벼우며 굳어지는 시간에 따라 적갈색, 황갈색, 흑색 및 암회색을 띤다(소, 2002; 오, 2005). Scoria의 주성분은 산화규소, 산화알루미늄, 산화철로 함량이 75%에 달하며 황토, 옥, 맥반석, 게르마늄석등 에는 없는 이산화티타늄이 천연상태로 3-7% 존재하여 광촉매작용을 통해 항균, 살균, 탈취기능을 지닌다. 또한, 납과 구리 같은 중금속에 대한 흡착력이 뛰어나고 빗물의 필터 역할을 수행하여 청정한 제주 삼다수를 만드는데 일조한다(감 등, 2002; 이 등, 2002). 현재까지 제주 화산석 송이(Jejuscoria)을 이용한 강도, 중금속 흡착 및 광촉매 특성에 관한 연구와 송이팩을 비롯한 각종 건강·뷰티 제품개발은 활발하게 진행되고 있으나 제주 화산석 송이에서 미생물 탐색과 연구는 이루어지지 않았다.

배양 가능한 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 계통 진화학적 관계의 규명은 기존의 형태, 생리 및 유전적 데이터를 이용한 데이터를 이용한 전통적인 분류체계에 큰 변화를 가져왔다. 이를 바탕으로 아열대의 기후 조건을 가진 제주도의 해양 및 천연동굴을 비롯한 다양한 자연 환경에서 분리한 미생물들의 유전적 다양성 분석, 분류 및 동정에 관한 연구를 수행해 왔다(Lee, 2006; Lee *et al.*, 2008; Lee and Lee, 2008). 원핵미생물은 형태 분화가 빈약한 단세포 생물로 종 (species) 수준에서 형태학적 특징을 식별하거나 파악하기가 매우 어렵다. 현대 미생물 분류와 미생물 군집해석을 위한 연구방법으로 균체 구성성분이나 유전정보가 적극적으로 도입되어 왔으며 분자생물학의 발전과 더불어 다양한 분자기법을 이용한 미생물 계통분류가 가능하게 되었다(박진숙 외, 2005). Rep-PCR (repetitive sequence based polymerase chain reaction)은 세균의 유전체 내에 반복적으로 존재하는 DNA element들을 증폭 후 strain-specific pattern들을 상호 분석할 수 있는 fingerprinting의 한 방법이다(Versalovic *et al.*, 1991). Rep-PCR은 미생물의 유전적 다양성을 간편하고 신속하게 파악하기 때문에 미지의 미생물을 효과적으로 탐색하는 방법으로 사용되고 있다. 반복적인 단편들은 사용하는 primer에 따라 REP (repetitive extragenic palindromic)단편, ERIC (enterobacterial repetitive consensus)단편과 BOX 단편들이 있다. 또한, Rep-PCR은 16S rRNA 유전자 또는 16S-23S spacer region에 대한 restriction analysis 방법보다 구별력이 더 양호하다고 보고되었다(Vila *et al.*, 1996).

미생물을 분류하는 데 있어서 크게 미생물의 형태, 에너지원, 효소 그리고 다른 여러 가지 특징들을 포함하는 표현형 분류 (phenotypic taxonomy)와 균체의 세포벽 아미노산 조성, 세포내 당, 세포막의 지질조성 등을 포함하는 화학적 분류 (chemotaxonomy) 그리고 16S rRNA의 염기서열 비교, G+C 함량, DNA-DNA hybridization을 포함하는 분자생물학적 분류 (molecular systematics)가 있다. 이것들을 통합적으로 분석하는 것을 다상적 분류 (polyphasic taxonomy)라고 한다. 다상적 분류 방법을 적용하여 분리한 scoria bacteria에서 *Marmoricola* 속의 새로운 종들과 *Micromonosporaceae* 과의 새로운 속 및 종을 동정하였다.

*Propionibacterineae* 아목/ *Nocardioideae* 과/ *Marmoricola* 속은 처음으로 Urzì *et al.* 2000에 의해서 제안되었고 표준종으로 *Marmoricola aurantiacus*

DSM 12652<sup>T</sup>을 포함하였다. 최근예, *Marmoricola aequoreus* Lee 2007와 *Marmoricola bigeumensis* Dastager *et al.* 2008 종들이 이 속에 첨가되었다. *Marmoricola* 속의 종들은 Gram-positive 하고, 내생포자를 형성하지 않는 coccoid 혹은 짧은 rod형태의 cell들로 단일, 쌍 혹은 무리를 지어서 관찰되었다. 색상은 yellow에서 lemon까지 띠었다. 한편, *Micromonosporineae* 아목/*Micromonosporaceae* 과는 Krasil'nikov 1938에 의해서 처음으로 기술되었고 Koch *et al.* 1996 과 Stackebrandt *et al.* 1997에 의해 개정되었다. 처음 7개의 속들 (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes* 그리고 *Pilimelia*)에서 16S rRNA 유전자 서열, signature nucleotides에 의한 계통발생학적 위치와 화학분류적인 특징들을 바탕으로 6개의 속들 (*Spirilliplanes*, *Verrucosispora*, *Virgisporangium*, *Asanoa*, *Longispora* 그리고 *Salinispora*)이 순차적으로 기술되었다. 이후에, *Actinocatenispora* (Thawai *et al.*, 2006)와 *Polymorphospora* (Tamura *et al.*, 2006)가 보고되었고 *Luedemannella* (Ara and kudo, 2007a) 와 *Krasilnikovia* (Ara and kudo, 2007d)가 공식적으로 인정되었다. 또한, Ara *et al.* 2008a에 의해 *Catellatospora koreensis*에서 *Catelliglobosispora koreensis*로 *Catellatospora tsunoensis*에서 *Hamadaea tsunoensis*로 개정되었고 Ara *et al.* 2008b에 의해 *Pseudosporangium*이 보고 되었다. 현재까지 *Micromonosporaceae* 과는 20개의 속들을 포함한다.

유용물질 생산 미생물을 탐색하는 데 있어 가장 먼저 접근한 것이 chitin이다. Chitin은 N-acetylglucosamine이  $\beta$ -1, 4결합으로 중합된 것으로 자연계에 가장 풍부하게 존재하는 유기분자이다. 또한, chitin은 절지동물의 딱딱한 표피나 껍데기의 골격을 만들 뿐만 아니라 곰팡이의 세포벽의 중요한 구성요소를 이루고 있다. 지구상에서 생합성되는 chitin의 양은 연간 약 1천억 톤으로 추정되며, 이는 식물이 생산하는 셀룰로오스에 필적하는 양이다. 그러나, 많은 양이 생합성 되는 동시에 각종 효소들에 의해 생분해되어야만 생태계는 순환될 수 있다. 이 효소 즉, chitinase 역할을 할 수 있는 물질은 식물, 곰팡이, 척추동물과 bacteria같은 유기체에서 발견된다. chitinase는 chitin을 단당류나 다당류로 분해할 뿐 아니라 항균물질로도 작용할 수 있다(Robert and Selitrennikoff, 1988). 따라서, chitin을

분해할 수 있는 bacteria의 탐색은 유용물질을 찾을 수 있는 방법이라 할 수 있다. 두 번째 접근한 것이 감귤 저장병에 관련된 것이다. 제주에서 1차 산업의 근간을 이루고 있으며 연간 1조원을 넘는 산업이 바로 감귤산업이다. 그러나, 저장과 유통시기에 따라 수익률의 차이가 많이 발생한다. 실제 원예산물을 수확 한 후 진균류 발생에 의한 부패로 인해 저장과 유통과정 중 전체 생산물의 25-80%가 손실되고 있다. 감귤류에는 녹색곰팡이병 (lemon green mold; *Penicillium digitatum*)과 푸른곰팡이병 (blue mold; *Penicillium italicum*) 등으로 인한 저장 중 과실 연화 및 부패의 피해가 크다(이 등, 2004). 따라서 이번 연구에서는 분리한 세균들이 푸른곰팡이의 성장을 억제할 수 있는지 항진균 활성 능력을 탐색하였다.

본 연구에서는 제주 화산석 송이 (Jejuscoria) 미생물의 종다양성과 생리 활성 물질을 탐색하기 위하여 미생물을 분리한 후 Rep-PCR 기법과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 송이 미생물의 종다양성을 분석하고 선발된 균주에 대해 다상적 분류방법 (polyphasic taxonomic study)을 적용하여 분류·동정을 수행하였다. 또한, 항진균활성과 chitin 분해능을 조사하여 생리 활성물질을 탐색하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 채취 및 방법

본 연구에서는 제주특별자치도 제주시 구좌읍 세화리 월랑봉 (다랑쉬 오름) 근방에 위치하고 있는 *Jejuscoria* 채석장 (Fig. 1)에서 적색 (red), 갈색 (brown), 적갈색 (reddish-brown), 황갈색 (yellow brown) 및 흑색 (black) *Jejuscoria*를 색상별로 채집하였다. *Jejuscoria* 시료는 멸균된 폴리비닐 백에 담아 실험실로 옮겨서 6시간 이내에 sample들을 처리하였다.

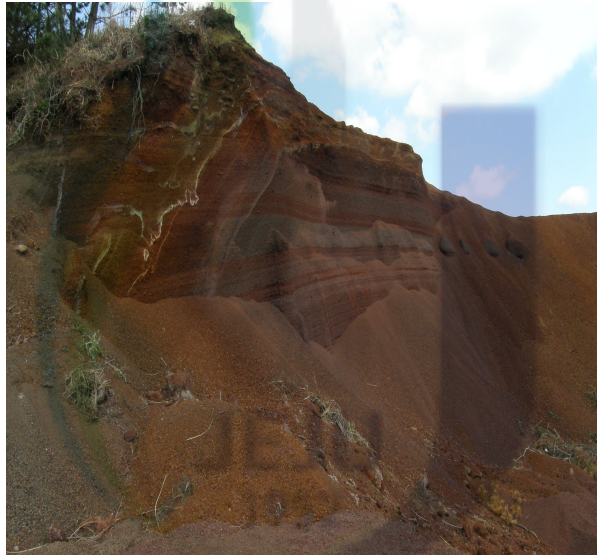
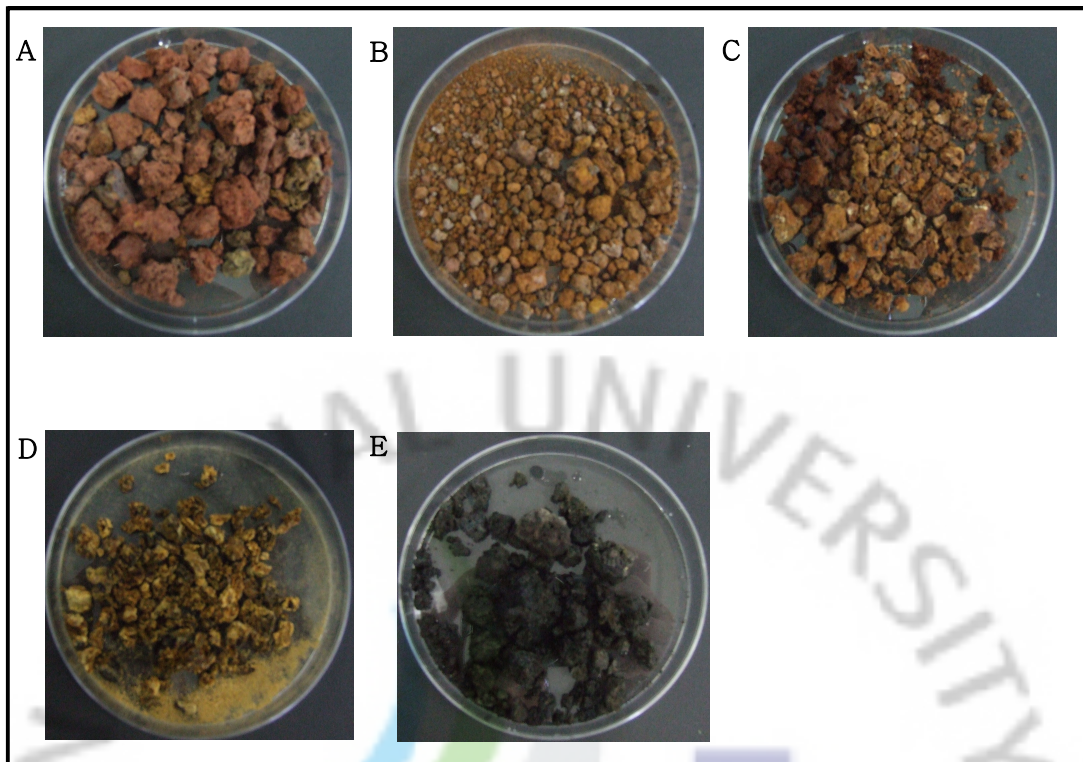


Fig. 1. Sampling site of *Jejuscoria* near Darangshi oreum



**Fig. 2.** Scoria samples of different colors collected from layers of Jejuscoria. (A), red layer; (B), brown layer; (C), reddish-brown layer; (D), yellow brown layer; (E), black layer.

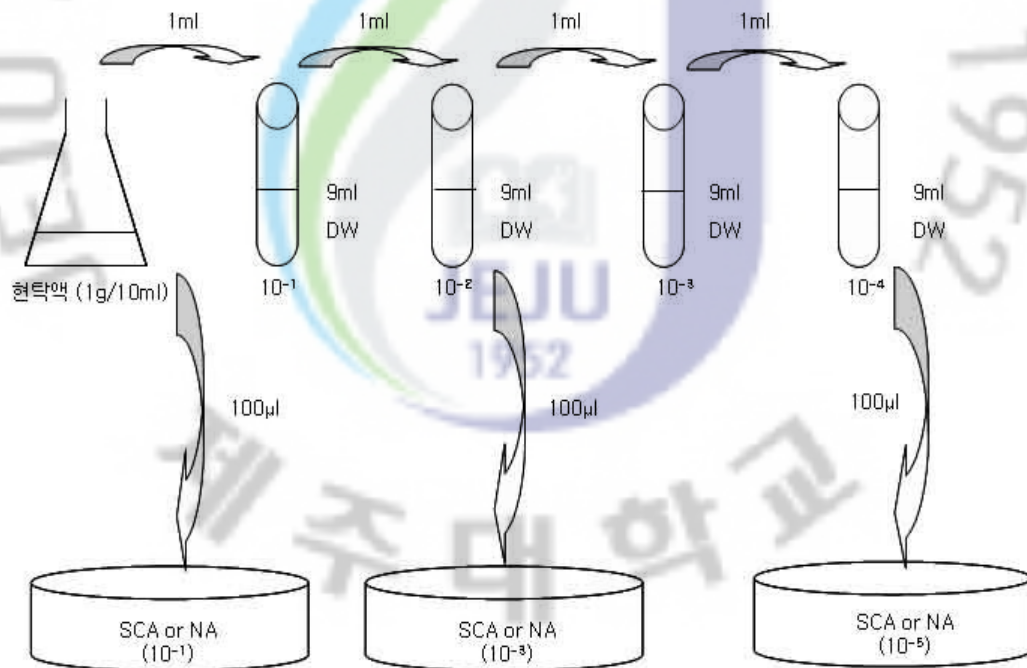


## 2. 분리 및 배양

### 2.1. *Jejunsorbia* 미생물의 선택적 분리 및 보존

#### 2.1.1. 연속희석법

각 시료 1g을 막자사발에 곱게 간 후 멸균된 증류수 10 ml에 현탁하여 rotamix (SLRM-1, SeouLin Bioscience)으로 30분간 섞었다. 현탁액은 멸균된 증류수로 연속 희석하여 적정 최종 희석비가  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  과  $10^{-5}$ 이 되도록 희석액을 만들었다. 희석액은 항진균제인 cyclohexamide (50 $\mu$ g/ml)를 포함한 빈영양고체배지 (starch casein agar; SCA)와 육즙영양배지 (nutrient agar; NA)에 유리봉으로 도말 한 후 30 °C에서 2주간 배양하였다.



**Fig 3.** Serial dilution method for isolation of *Jejunsorbia* bacteria

### 2.1.2. Stamping 방법

시료 1g을 막자사발로 곱게 간 후 유리 페트리디쉬에 넣고 hood 안에서 24시간 건조시켰다. 직경이 14mm인 멸균된 마개를 이용하여 항진균제인 cyclohexamide (50 $\mu$ g/ml)를 포함한 빈영양고체배지 (SCA)와 영양배지 (ISP 2 medium; YEME)에 원을 그리면서 7-8회 찍은 후 30 °C에서 3-7일간 배양하였다.



**Fig 4.** Stamping method for isolation of Jejuscoria bacteria

2.1.3. 분리 배지

**Table 1.** Composition of starch-casein agar (SCA)

Ingredients	Amounts
Soluble starch	10g
Casein	0.3g
KNO <sub>3</sub>	2g
NaCl	2g
CaCO <sub>3</sub>	0.02g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01g
Agar	18g
Cyclohexamide	50mg (50µg/ml)
Distilled water	1L

**Table 2.** Composition of ISP 2 medium (YEME)

Ingredients	Amounts
Yeast extract	4g
Glucose	4g
Malt extract	10g
Agar	18g
Cyclohexamide	50mg (50µg/ml)
Distilled water	1L

**Table 3.** Composition of nutrient agar (NA)

Ingredients	Amounts
Beef extract	3g
Peptone	5g
Agar	15g
Cyclohexamide	50mg (50µg/ml)
Distilled water	1L

## 2.2. 순수 배양체 확인 및 보관

연속 희석법과 stamping 방법으로 접종한 plate에서 각 colony를 선정하여 YEME에 2-3회 계대 배양하였다. 순수 배양체는 배양상 특성을 기록한 후 20% (v/v) 글리세롤에 현탁하고 초저온 냉동고 (-70 °C)에 보관하였다.

## 3. 표현형질에 따른 특징

### 3.1. 배양상 특징

일반세균들은 YEME에 3-5일 배양한 후 콜로니의 색상을 기록하였다. 또한, 일부 균사 생성 방선균은 ISP 4 medium (Difco) 에서도 7일 배양 후 포자의 색상과 기균사 (substrate mycelium) 색상을 함께 기록하였다.

### 3.2. 형태학적 특징

Plate에 배양된 콜로니를 증류수에 현탁시켜서 위상차 현미경 (AFX-IIA, Nikon)과 광학 현미경 (ALPHAPHOT, Nikon)을 통해서 운동성과 형태를 확인하였다. 그람 양성균과 음성균을 구분하기 위하여 그람염색을 하였다. 그람염색은 Color Gram 2 kit (bioMérieux)을 이용하여 균체를 slide glass에 열고정, crystal

violet으로 3분 염색 후 세척, Gram's iodine 으로 3분간 고정 후 세척, 95% ethyl alcohol로 탈색과 safranin으로 30초 대응염색하는 과정을 통해 수행하였다.

#### 4. 분자생물학적 방법

##### 4.1. DNA의 분리 (1)

DNA 분리는 Wizard Genomic Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 분리 하였다. Manual에 따라 plate에 배양된 균체를 면봉을 긁어서 50 mM EDTA 용액 240 $\mu$ l에 현탁시킨 후 lysozyme (10mg/ml) 60 $\mu$ l를 넣고 vortex 하여 37 °C에 1시간 동안 배양 시켜서 세포벽을 용해 시켰다. Nuclei lysis (NL) 용액 300  $\mu$ l 넣고 80 °C에서 5분간 배양 후 실온에서 3분간 정제 시켰다. RNase A (4mg/ml)를 3 $\mu$ l넣고 상하로 2-3번 섞어 37 °C에서 1시간 배양 시켜서 RNA를 제거하였다. 단백질을 제거는 protein precipitation solution (PPS)을 200 $\mu$ l 넣고 30초간 vortex 시켰다. 얼음속에 5-10분간 방치 후에 원심분리 (12,000 rpm, 5분) 하였다. 상층액 600 $\mu$ l를 isopropanol 600 $\mu$ l에 넣고 상하로 부드럽게 섞으면서 DNA가 감기는 것을 확인 하였다. 그 후에 원심분리 (12,000 rpm, 30초) 후에 상층액을 버리고 70% ethanol로 2번 세척하였다. 실온에서 건조 후에 침전된 양에 따라서 TE buffer 50-100 $\mu$ l를 넣고 실온에서 녹였다. 1-2일 후에 DNA가 완전히 녹은 것을 확인한 후에 UV-Vis Spectrophotometer (UV mini 1240, Shamdzu)로 DNA 농도를 측정하고 농도가 측정된 DNA는 4 °C에 보관하였다.

##### 4.2. DNA의 분리 (2)

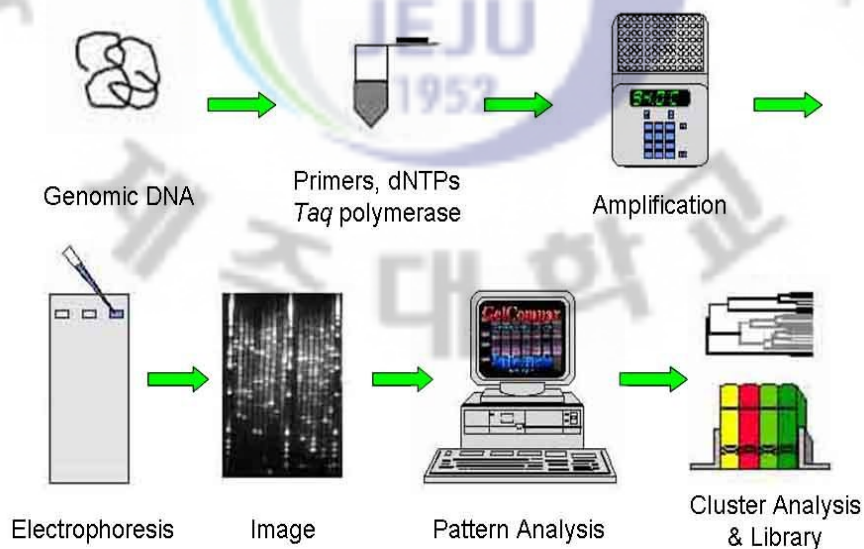
Wizard Genomic Purification Kit (Promega, USA)로 분리하기 힘든 균사생성 방선균이나 G+C 함량을 분석하기 위한 균주들은 액체배양을 통해서 chromosomal DNA를 추출하였다. YEME에 계대하여 단일 colony를 확인 한 후 YMG broth (0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, pH 7.0)에 접종하여 shaking incubater에서 3일간 배양하였다. 무균대에서 오염확인 후에 배

양액 10 ml를 50 ml falcon tube에 넣고 원심분리 (3,500rpm, 10분)하고 상층액 제거 후 증류수로 1회 세척했다. 세포벽을 용해시키기 위해 TE buffer 10 ml를 넣고 lysozyme (Sigma)을 20-25mg 첨가하여서 30 °C에 1시간 반응시키면서 부드럽게 섞어주었다. 단백질을 제거는 상층액 기준으로 EDTA (50mM), SDS (0.5%)과 protease (100µg/µl)를 넣고 55 °C에서 4-10시간 배양하였다. DNA 추출 및 침전을 위해서 phenol 10 ml를 넣고 부드럽게 흔든 후 원심분리 (3,500 rpm, 15분)하였다. 실온에 20분간 방치 후에 깨끗한 상층액 부분을 멸균된 tip으로 50 ml falcon tube로 옮겼다. 옮겨진 부피에 2배의 100% ethanol과 3M sodium acetate (600µl/상층액 10 ml)를 첨가하여 상하로 부드럽게 흔들어서 흰색의 DNA를 확인하였다. 끝이 잘린 tip을 이용해 흰색의 DNA를 1.5ml tube에 옮긴 후 spin-down (12,000 rpm, 10초)하였다. 세척을 위해 70% ethanol 400µl를 첨가하여 상하로 2-3회 섞은 후 spin-down (12,000 rpm, 10초)하였다. 상층액을 버리고 미니건조대에 뒤집어서 10분 정도 건조하여 ethanol을 제거한다. RNA를 제거하기 위해 TE buffer 1.4 ml를 넣고 RNase (4mg/ml)을 10µl를 첨가하여 37 °C에서 1시간 배양하였다. 재추출 및 정제를 위하여 1.5 ml tube에 700µl 씩 분주한 후 phenol 600µl를 넣었다. 상하로 흔든 후 microcentrifuge (MICRO 17TR, Hanil science)에서 원심분리 (12,000 rpm, 5분)하였다. 상층액 600µl를 새로운 1.5 ml tube에 넣고 chloroform: isoamylalcohol (24:1)을 600µl 넣고 상하로 섞은 후 원심분리 (12,000 rpm, 5분)하는 과정을 2회 반복하였다. 상층액 400µl를 새로운 1.5ml tube에 넣고 100% ethanol 800µl과 3M sodium acetate 24µl를 넣고 상하로 2-3회 흔든 후 원심분리 (12,000 rpm, 30초)한다. 상층액을 버린 후 70% ethanol 400µl를 첨가하여 2-3회 섞은 후 원심분리 (12,000 rpm, 30초)하여 세척하였다. 상층액을 버린 후 미니 건조대에 30분-1시간 건조하여 ethanol을 제거한 후 침전된 양에 따라 TE buffer 100µl 기준으로 첨가하여 DNA를 상온에서 녹였다. 1-2일 후에 DNA가 완전히 녹은 것을 확인한 후에 UV-Vis Spectrophotometer (UV mini 1240, Shamdzu)로 DNA 농도를 측정하였다.

#### 4.3. Repetitive DNA 증폭 (Rep-PCR) 및 분석



Repetitive DNA 증폭에 이용된 oligonucleotide primer는 BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')을 단일 primer로 사용하였다. 추출된 DNA (50ng) 1 $\mu$ l, BOX A1R (100pmol/ $\mu$ l) primer 0.3 $\mu$ l, dNTP mixture (Promega, 각 10mM) 0.9 $\mu$ l, DyNAzyme (Finnzymes, 2.5U/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l, 10X DyNAzyme buffer 3.0 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 23.8 $\mu$ l를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 95 °C에서 7분간 반응한 다음 95 °C에서 denaturation 1분, 52 °C에서 annealing 1분, 65 °C에서 extension 8분을 30회 반복하고, 65 °C에서 16분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAmp 27200, Applied Biosystems) 반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 (Powerpac Basic, Bio-Rad)하여 확인 하였다. Rep-PCR product의 전기영동 (Buffer-circulated system)은 2.0% agarose gel을 사용하였고 10 °C에서 70V, 18시간 동안 수행하였다. DNA marker는 1kb BenchTop ladder (Promega)를 사용하였다. 염색은 ethidium bromide (10mg/ml) 100 $\mu$ l를 1XTAE buffer 1L에 넣고 10분간 염색하였다. 염색한 겔은 UV 상에서 디지털 카메라 (C-3020 zoom, Olympus)를 가지고 촬영하여 균주 각각에 고유한 DNA fingerprint를 얻었다. 겔 이미지는 BioNumerics (ver 3.0; Applied Maths, Belgium) 프로그램을 통해 DNA band pattern을 비교 분석하고 UPGMA 형태의 dendrogram을 작성하였다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Method of Rep-PCR genomic DNA fingerprinting



#### 4.4. 16S rRNA 유전자 증폭

16S rRNA 유전자 증폭에 이용된 primer는 27F (*E. coli* numbering 8-27; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (*E. coli* numbering 1492-1511; 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 사용하였다. 추출된 DNA (50ng) 1 $\mu$ l에 27 forward primer (100pmol/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, 1492 reverse primer (100pmol/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, dNTP mixture (Takara, 각 2.5mM) 4.0 $\mu$ l, Go *Taq* DNA polymerase (Promega, 5U/ $\mu$ l) 0.25 $\mu$ l, 5X Colorless Go *Taq* buffer 10.0 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 33.75 $\mu$ l를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 95 °C에서 5분간 반응한 다음 94 °C에서 denaturation 1분, 55 °C에서 annealing 1분, 72 °C에서 extension 3분을 30번 반복하고, 72 °C에서 20분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAmp 27200, Applied Biosystems)반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 (Powerpac Basic, Bio-Rad)하여 확인 하였다.

#### 4.5. 16S rDNA PCR 증폭산물의 정제 및 농도 측정

PCR 증폭산물의 정제는 Wizard PCR Preps DNA Purification System Kit (Promega)을 사용해서 정제 하였다. Protocol에 따라서 1.5 ml tube에 direct purification buffer를 100 $\mu$ l 넣고 PCR 증폭산물을 첨가하여 vortex 하였다. 여기에 resin 1 ml를 첨가한 후 1분 이내에 3번 vortex 하였다. Mini-column과 syringe barrel을 연결 한 후 vacuum manifold (Promega)에 삽입하였다. Resin 과 PCR 증폭산물 혼합물을 syringe barrel에 첨가한 후 aspirator (Jeio tech)를 이용하여 용액을 빼내었다. 80% isopropanol 2 ml을 넣고 1회 세척하고 syringe barrel를 제거한 후 새로운 1.5 ml tube에 mini-column을 넣고 원심분리 (12,000 rpm, 2분) 하였다. 하층액을 버린 후 새로운 1.5 ml tube에 mini-column을 넣고 증류수 20-40 $\mu$ l를 넣고 20분간 상온에서 기다렸다. 원심분리 (12,000 rpm, 20초)후에 하층액을 새로운 1.5ml tube에 넣고 -20 °C에서 임시 보관하였다. 정제된 PCR 증폭산물은 50배 희석 후 UV-Vis Spectrophotometer (UV mini 1240, Shamdzu)으로 농도를 측정하였다.

#### 4.6. 염기서열 분석 및 계통학적 분석

정제된 16S rRNA 유전자는 마크로젠에 의뢰하여 ABI Prism BigDye Terminator cycle Sequencing kit와 automatic DNA sequencer (model 3730xl)를 이용하여 유전자의 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열은 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank database의 유사한 염기서열을 비교하여 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에 의해서 결정된 염기서열과 database에서 회수된 표준 미생물 염기서열은 PHYLIP program (ver 3.5c; Felsenstein, 1993)에 포함된 Clustal X multiple alignment로 정렬하였다. 진화적 거리는 Jukes and Cantor (1969) 방법을 이용하여 계산하고 neighbor-joining 방법 (Saitou and Nei, 1987)을 이용하여 계통수를 작성하였다. Tree topology의 신뢰성을 평가하기 위하여 1000회의 replication을 적용한 bootstrap 분석 (Felsenstein, 1993)을 하였다. 50% 이상의 bootstrap 값을 계통수의 node에 나타냈다. 또한, Juke and Cantor (1969) 방법을 이용해서 계산한 진화적 거리를 다음 식에 대입하여 염기서열 유사도를 구하였다.

$$\text{Sequence similarity (\%)} = \{3/4 \times \exp(-4/3 \times \text{distance}) + 1/4\} \times 100$$

#### 5. 생리활성 물질 탐색

##### 5.1. 키틴 (Chitin)분해능 탐색

Colloidal chitin 제조를 위해 15g의 chitin (Sigma)을 35% HCl 150 ml에 현탁시켜 4 °C에 24시간 방치하였다. 거즈로 여과하여 액상을 추출하였다. 증류수 1.5L를 넣은 후 4 °C에 12시간 방치하여 colloidal chitin을 침전시켰고 상층액을 버린 후 4 °C의 증류수 2L로 pH 5.0이상이 되도록 반복하여 세척하여 침전시켰다. 최종 침전시킨 후 aspirator로 상층액을 제거하고 남은 하층액은 공기중에 말렸다. 키틴 분해 배지는 0.12% colloidal chitin 함유된 배지 (Chitin-Yeast

extract agar; CY medium)를 사용하였다. CY medium은 0.7%  $K_2HPO_4$ , 0.2%  $KH_2PO_4$ , 0.1%  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.01%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05% sodium citrate, 0.1% yeast extract와 0.12% colloidal chitin을 넣고 pH 7.0으로 조정 후 1.5% agar을 넣어 제조하였다. 고체 평판배지인 CY medium에 분리한 균주들을 20 $\mu$ l 접종하여 30 °C에서 3주간 배양 후 균체 주위에 생성된 투명환의 유무로서 chitinase 생성능을 확인하였다.

## 5.2. 항진균활성 탐색

위에서 분리한 균주들은 YEME에 점 접종하여 3-5일간 배양하였다. 억제환의 생성 여부 및 환의 크기를 측정하기 위하여 0.3% top agar을 사용하였다. 0.3% top agar는 육즙영양배지 (nutrient broth; peptone 5g , beef extract 3g , 증류수 1000 ml)를 50 ml 분주한 후 0.3% agar (Difco)를 넣고 습윤멸균 하였다. 멸균 후 상온에서 50 °C까지 식혔다. 590nm에서 흡광도가 0.9로 조정된 시험 균주인 *Penicillium italicum* 1ml를 넣은 후 무균대에서 잘 섞고 위에서 점 접종한 plate에 골고루 퍼지게 부었다. 30 °C에서 2-3일 경과 후 점 접종 주위에 억제환의 생성 여부를 관찰하여 기록하였다.

## 6. 신종의 다상적 분류 및 동정

### 6.1. 세포형태 관찰

미생물의 형태 및 운동성은 광학현미경, 위상차 현미경과 투과 전자 현미경 (Transmission Electron Microscope; TEM)을 이용하여 관찰 하였다. 균사생성 방선균의 포자 형태 및 배열은 주사 전자현미경 (Scanning Electron Microscope ; SEM)을 이용하여 관찰하였다.

#### 6.1.1. 투과 전자 현미경 (TEM)을 이용한 관찰

시료의 제작을 위해 깨끗한 슬라이드 글라스를 0.5% formvar 용액 (0.5g/100ml chloroform)에 살짝 담겼다. 공기 중에 말린 후 면도칼로 슬라이드 글라스 세 방향을 긁어준 후 물 위에 수직으로 세워서 지지막을 떼었다. Grid를 지지막에 올리고 코팅된 paper에 붙여 실온에서 24시간 건조시켰다. 현미경 관찰을 위하여 음성염색 (negative staining)을 하였다. 플레이트에서 배양된 균체를 증류수에 현탁시킨 후 parafilm에 20 $\mu$ l 떨어뜨렸다. 지지막이 입혀진 grid를 떨어뜨린 후 2분간 놓았다. 2% PTA (phosphotungstic acid, pH 7.0)를 가지고 10초간 염색시켰다. 증류수로 세척 후 TEM (JEM-1200EXII, JEOL) holder에 넣고 관찰하였다.

#### 6.1.2. 주사 전자 현미경 (SEM)을 이용한 관찰

균사 생성 방선균은 SEM을 이용하여 포자의 형태를 관찰하였다. 배지는 ISP 2, 3, 4, 5, 6 과 7 medium (Shirling and Gottlieb, 1966) 및 oatmeal-nitrate agar (Prauser and Bergholz, 1974)에 30 °C, 14-30일간 배양하였다. 1% osmium tetroxide를 가지고 1시간 동안 고정한 후 날카로운 면도칼로 균체가 붙어 있는 agar block (1 mm<sup>3</sup>)을 잘랐다. 25%, 50%, 75%, 95%, 100% ethanol과 25%, 50%, 75%, 100% isoamyl acetate를 20분씩 차례로 탈수시켰다. 탈수된 시료는 CPD (critical point dryer)를 이용하여 건조시켰고 시료는 stub에 올려놓고 Osmium Plasma Coater (OPC80T, FILGEN)를 이용하여 100초간 금박 (Au)으로 코팅 (coating)한 후 SEM (JSM-6700F, JEOL) holder에 놓고 관찰하였다.

#### 6.2. Oxidase, catalase 활성 및 생리·생화학적 특성 분석

Oxidase 활성은 1% (w/v) tetramethyl-p-phenylenediamine 용액을 colony에 떨어뜨린 후 10-15초 이내에 보라색 (purple)으로 변하면 양성 (positive)로 기록하였다. Catalase 활성은 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 colony에 떨어뜨렸을 때 기포가 발생하는 것을 양성 (positive)으로 판단하였다.

생리적 특성은 배지, 온도 (4, 10, 20, 30, 37 와 42 °C), pH 생장범위 (4.1-12.1),

NaCl 내성 (0-12%, v/v)을 측정하였고 생화학적 특성은 API Kit ZYM과 20E (bioMérieux, France)를 이용하였다. 탄소원 이용능은 ISP 9 medium (Shirling and Gottlieb, 1966)을 이용하였다. 각각 filter 멸균된 탄수화물 (carbohydrate) 과 알코올 (alcohols)들은 최종 농도가 1% (w/v) 되도록 하고 유기산 (organic acid) 들은 0.1% (w/v) 되도록 하였다. 접종원은 YMG broth에서 30 °C, 5일간 배양 후 멸균된 증류수로 2-3차례 세척하여 사용하였다. 대조구 (control)와 생장 정도를 비교하여 탄소원 이용여부를 결정하였다. 분해능은 0.4% hypoxanthine, 0.4% xanthine, 0.5% DL-tyrosine, 1.0% casein (skim milk), 0.5% chitin, 0.4% elastin 과 0.5% CM-cellulose (Gordon *et al.*, 1974; MacFaddin, 1980)을 이용하였다.

### 6.3. 화학적 특성 분석

#### 6.3.1. G+C 함량 결정

DNA의 G+C함량의 결정은 Mesbah *et al.* (1989)에 기술된 방법에 따라 분석하였다. 시료 준비를 위하여 DNA 용액 25 $\mu$ l (2-25 $\mu$ g)을 5분간 가열 후 재빨리 얼음 속에 담겼다. 여기에 30 mM sodium acetate buffer (pH 5.3) 5 $\mu$ l, 20 mM ZnSO<sub>4</sub> 5 $\mu$ l, Nuclease P1 (US Biological) 용액 5 $\mu$ l을 넣고 37 °C에 2시간 반응시켰다. 에스테르 (ester)결합을 깨기 위해 0.1 M glycine/NaOH buffer (pH 10.4) 5 $\mu$ l, alkaline phosphatase (Roche) 용액 5 $\mu$ l을 넣고 37 °C, 6시간 반응시켰다. 원심분리 (12,000 rpm, 1분) 후에 용액 중 상층액 60 $\mu$ l을 vial에 넣고 역상 컬럼 (Supelcosil™ LC-18-S, Supelco)을 이용하여 HPLC (Spectrasystem, Spectra-Physics Co.)로 분석하였다. 이동상 전개 용매는 0.03M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.3) buffer : methanol = 97.5 : 2.5 혼합액을 filter 여과 후 사용하였다. G+C 함량은 분석하여 나온 히스토그램 면적의 값을 다음 식에 넣어서 평균값을 구하였다.

$$(G+C) \text{ mol } \% = \{1/(1+dA/dG) \times 100 + 1/(1+dT/dC) \times 100\} / 2$$



### 6.3.2. Diaminopimelic acid (DAP) 분석

Peptidoglycan에 존재하는 diaminopimelic acid (DAP)의 형태 (form)를 결정하기 위하여 Staneck and Robert (1974) 방법을 따랐다. 동결건조 균체 30 mg을 screw cap tube에 넣고 6N HCl 1 ml를 첨가한 후 100 °C, 18시간동안 가수분해 (hydrolysis) 시켰다. 원심분리 (12,000 rpm, 5분) 후에 상층액을 rotary evaporater에서 건조시켰다. 증류수로 2-3회 세척하고 1.5 ml tube에 옮긴 후 1N NaOH로 pH 7.0으로 조정하였다. Cellulose HPTLC plate (Merck)에 standard와 함께 점적하여 전개용매 (methanol : water : 6N HCl : pyridine = 80 : 26 : 4 : 10)로 포화된 chamber에 넣고 전개시켰다. 공기 중에서 말린 후 0.2% ninhydrin 용액 (0.2g ninhydrin/ 100ml water-saturated butanol)을 뿌렸다. plate를 100 °C에서 5분간 가열한 후 isomer (LL-, *meso*- 또는 3-OH) form를 검출하였다. 표준부품 (standard)으로 L-ornithine (sigma), L-lysine (sigma), L-2,4-diaminobutyric acid (sigma), LL-DAP (sigma) 그리고 *meso*-DAP (sigma)를 증류수에 현탁시켜서 사용하였다.

### 6.3.3. Whole-cell sugar 분석

세포벽의 특징적인 sugar 분석은 Staneck and Robert (1974) 방법을 따라 수행하였다. 동결 건조 균체 30 mg을 15 ml tube에 넣고 0.5 M HCl 1 ml을 첨가 후 tube를 parafilm으로 감싸서 습윤멸균 (120 °C, 15분) 하였다. 원심분리 (3000 rpm, 10분) 후 상층액을 새로운 15 ml tube에 옮겨서 12 M ammonia 용액 200µl과 2-octanol을 5µl 첨가 하였다. 여기에 sodium borohydride 용액 (100mg/3M ammonia 1 ml)을 200µl 첨가하고 vortex 후 40 °C, 1시간 동안 반응 시켰다. Gacial acetic acid 200µl을 첨가하여 반응물을 산화시키고 산화된 반응 혼합액 중 200µl를 새로운 tube에 옮겼다. n-methyl-imidazole 300µl와 acetic anhydride 2 ml를 첨가하여 vortex 하였다. 실온에 식힌 후 증류수 5 ml와 dichloromethane 1 ml를 첨가하여 vortex 후 원심분리 (3000 rpm, 10분)하였다. Aspirator로 상층액 제거하고 하층액을 1.5 ml tube에 넣고 Centra vac (VS-802, vison)으로 진공

건조하였다. 건조된 시료는 dichloromethane 50 $\mu$ l에 녹인 후 원심분리 (12,000 rpm, 5분) 하였다. 상층액을 vial 속에 옮긴 후 SP<sup>TM</sup>-2380 Capillary column (30m x 0.53mm x 0.2 $\mu$ m, Supelco)이 장착된 Gas chromatograph (6850, Agilent)에서 분석하였다. 표준부품 (standard)은 L-rhamnose (sigma), D-ribose (sigma), D-arabinose (sigma), D-xylose (sigma), D-mannose (sigma), D-galactose (sigma) 및 D-glucose (sigma)를 dichloromethane에 녹여서 사용하였다.

#### 6.3.4. Menaquinone (MK) 및 polar lipid 분석

원핵세균 세포막의 전자전달계 성분인 menaquinone 추출은 Collins (1985) 방법을 이용하였다. 동결건조 균체 50 mg을 15 ml tube에 넣고 M1 용액 (methanol : 0.3% NaCl = 100 : 10, v/v) 2 ml와 petroleum ether 2 ml 첨가 후 vortex 하였다. Tube 회전기 (rotamix)에 넣고 60 rpm, 30분간 혼합시킨 후 원심분리 (3000 rpm, 5분) 하였다. 상층액을 1.5 ml tube에 넣고 진공 건조시켰다. 남아 있는 하층액에 petroleum ether 1 ml를 넣고 30분간 혼합시킨 후 원심분리 (3000 rpm, 5분) 하였다. 상층액을 앞에서 추출한 tube에 넣고 건조 시켰다. 건조된 시료는 용액 (chloroform : methanol = 2 : 1, v/v)에 녹인 후 상층액을 ODS hypersil column (Thermo)이 장착된 HPLC (Spectra)로 분석하였다 (Kroppenstedt, 1985). 전개 용매는 Acetonitril (Merck) : Tetrahydrofuran (Jensei) = 7 : 3 용액을 사용하였다. 동정을 위해서 기존에 분석을 통해서 알려진 관련 종들을 함께 추출하여 분석하였다.

Polar lipid 추출을 위해서 menaquinone 추출 후 남아 있는 하층액을 100 °C, 5분간 가열하였다. 실온에서 식힌 후 L1 용액 (chloroform : methanol : 3% NaCl = 90 : 100 : 30, v/v/v) 2.3 ml 첨가 하여 vortex 후 tube 회전기에서 1시간 혼합하였다. 원심분리 (3000 rpm, 5분) 후 상층액을 새로운 15 ml tube에 옮긴다. 남은 하층액에 L2 용액 (chloroform : methanol : 3% NaCl = 50 : 100 : 40, v/v/v) 0.75ml 넣고 vortex 후 tube 회전기에서 30분간 혼합하였다. 원심분리 (3000 rpm, 5분) 후 상층액을 앞의 tube에 옮겼다. L3 용액 (0.3% NaCl) 1.3 ml



과 L4 용액 (chloroform) 1.3 ml 넣고 vortex 한 후 원심분리 (3000 rpm, 5분)하였다. Aspirator로 상층액을 제거하고 남은 하층액을 1.5 ml tube에 옮기고 진공 건조기에서 열을 가하여 건조 시켰다(Minnikin *et al.*, 1977). 건조된 시료는 용액 (chloroform : methanol = 2 : 1, v/v)에 녹인 후 2D TLC (silica gel plate, Merck)로 분석하였다. 전개액 A (chloroform : methanol : water = 65 : 25 : 4, v/v/v)로 1차 전개 시켜서 공기중에 건조 후 전개액 B (chloroform : acetic acid : methanol : water = 80 : 15 : 12 : 4, v/v/v/v)를 이용하여 전개 시켰다. 검출은 0.2% ninhydrin reagent 와 zinzade reagent를 가지고 동정하였다. 0.2% ninhydrin reagent는 아미노기 (-NH<sub>2</sub>)를 포함하는 lipid를 검출하기 위한 발색 시약으로 뿌려서 보라색 (purple)을 띠면 ninhydrin에 positive한 lipid를 검출할 수 있다. Zinzade reagent는 모든 phospholipid를 검출하기 위한 시약으로 뿌렸을 때 파란색 (blue) 색상을 띠면 positive한 것으로 판단하였다. 표준부품 (standard)으로 diphosphatidylglycerol (sigma), phosphatidylcholine (sigma), phosphatidylethanolamine (sigma), phosphatidylglycerol (sigma) 및 phosphatidylinositol (sigma)를 사용하였다.

### 6.3.5. Fatty acid 분석

균사 생성 방선균은 표준 균주와 함께 동일한 배지, 시간 그리고 온도에서 배양한 후 alkaline methanolysis 방법 (Minnikin *et al.*, 1984)으로 fatty acid methyl esters (FAMES)를 제조 및 추출하였다. 건조 균체 50 mg 을 15 ml tube에 넣고 15% (v/v) tetrabutylammonium hydroxide (TBAH) 2 ml을 첨가하여 75 °C, 3 시간 가열 후 상온에서 20분간 방치하였다. Iodomethane (Aldrich) 25µl과 dichloromethane (Jensei) 2 ml 첨가하여 tube rotator에서 1시간 혼합한 후 원심 분리 (3000 rpm, 5분) 하였다. Aspirator 로 상층액을 제거 한 후 하층액에 6% aqueous HCl 2 ml와 증류수 2 ml를 첨가하여 vortex 하였다. 원심분리 (3000 rpm, 5분) 후 aspirator 로 상층액을 제거 하였다. 남은 하층액은 1.5 ml tube에 옮겨서 진공건조 시켰고 분석 전에 hexane에 녹인 후 사용하였다.

일반 세균은 MIDI 표준 방법으로 Fatty acid methyl esters (FAMES)를 제조

및 추출하였다. 표준 균주와 함께 동일한 조건으로 고체 배지에 배양한 후 면봉을 이용하여 250 mg 정도의 균체를 15 ml tube에 넣는다. Saponification을 위해서 reagent 1 용액 (sodium hydroxide 9.0 g, methanol 50 ml, 증류수 50ml) 1 ml를 첨가하여 5-10 초간 vortex 한 후 100 °C에서 5분간 중탕한 다음 다시 vortex (5-10초) 한 후 100 °C에서 25분간 중탕하였다. Methylation은 첫 번째 단계 산물에 reagent 2 (6N HCl 52.0 ml, methanol 44.0 ml)를 2 ml를 첨가하여 vortex (5-10초) 후 80 °C에서 25분간 중탕한 후 급냉 시켰다. Extraction은 두 번째 산물에 reagent 3 (hexane 50.0 ml, methyl-tert butyl ether 50.0 ml)을 1.25 ml 넣고 10분간 혼합하여 하층액을 제거하였다. 마지막으로 base wash 단계는 세 번째 산물에 reagent 4 (sodium hydroxide 1.2 g, 증류수 100.0 ml)를 3 ml를 첨가하여 5분간 혼합하여 원심분리 (2000 rpm, 5분) 하였다. 상층액 (유기용매층)을 GC sample vial로 옮긴 후 분석 전까지 4 °C에 보관 하였다.

위 두 가지 방법으로 추출한 FAMEs 는 미생물 분류동정장치 (HP 5890II & MIDI, Hewlett-Packard. Co.)로 분석하였다.

#### 6.3.6. DNA-DNA hybridization

DNA-DNA homology 측정은 독일의 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 의뢰하여 분석하였다. DNA-DNA 잡종화 실험을 위한 genomic DNA는 French press cell (Thermo Spectroni)을 가지고 분리하였고 hydroxyapatite에서 chromatography로 정제했다(Cashion *et al.*, 1977). DNA-DNA hybridization은 Huss *et al.* (1983)의 방법을 바탕으로 변형된 De Ley *et al.* (1970) 방법에 의해서 수행되었다. 그 값이 70% 미만일 때는 새로운 bacteria의 종 (species)으로 보고 될 수 있다(Wayne *et al.*, 1987).

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Jejuscoria 미생물의 순수 분리

##### 1.1. 평판배양법에 의한 세균수 측정

평판배지에 적정한 희석비의 현탁액을 떨어뜨려서 도말한 후 성장한 단일 colony의 수를 세는 것을 세균수 측정법 또는 평판배양법이라고 한다. 평판배지에 나타난 적정 콜로니 수는 30-300개이다.

일반적으로 bacteria는 토양 1g당  $10^6$  정도의 CFU/g을 보인다. 그러나, 분리한 Jejuscoria의 모든 시료에서  $10^3$ - $10^4$ 의 CFU/g를 보였고 특히, 시료 C (reddish-brown colored)와 시료 E (black colored)에서는 colony 색상에 따른 diversity가 훨씬 낮게 관찰 되었다. 한편, 배지에 의한 colony의 수는 크게 차이가 나지 않았다(Table 4).

**Table 4.** Colony forming unit per gram (CFU/g) of Jejuscoria samples on solid medium

Sample	Color of Jejuscoria	Medium	CFU/g	No. of isolates
A	Red	SCA	$9.90 \times 10^3$	32
		NA	$6.50 \times 10^3$	
B	Brown	SCA	$3.10 \times 10^3$	25
		NA	$1.02 \times 10^4$	
C	Reddish-brown	SCA	$1.99 \times 10^4$	6
		NA	$1.64 \times 10^4$	
D	Yellow brown	SCA	$1.87 \times 10^4$	30
		NA	$1.46 \times 10^4$	
E	Black	SCA	$4.10 \times 10^3$	7
		NA	$1.35 \times 10^3$	

## 1.2. 분리균주의 배양상 특성

5개의 scoria 색상에서 분리된 배양 가능한 미생물 총 100균주가 분리되었다. 분리 균주들의 colony의 색소는 ISP 2 medium에서 yellow, orange, cream, pink 또는 brown 등으로 다양하게 나타났으며 그람양성균은 63균주이고 그람음성균은 37균주로 그람양성균이 다소 많이 분포하는 것으로 나타났다. 시료별로 보면 A시료 (red)과 B시료 (brown)에서는 그람양성균 80% 이상 차지하는 것으로 나타난 반면, D시료 (yellow brown)에서는 그람양성균이 66%로 다소 높게 분포하는 것이 관찰되었다. 나머지 C시료 (reddish-brown)과 E시료 (black)에서는 분리된 균주수가 작지만 거의 동일하게 그람양성균과 음성균이 분포하였다. 운동성 실험에서는 총 84균주 중에서 47균주가 운동성을 나타내었다. 나머지 16균주는 *Streptomyces*를 포함하는 균사생성 방선균이므로 측정하지 않았다. 균주의 형태는 간균 (rod-shaped)이 70균주가 관찰되었고 구균 (coccus)이 14균주가 관찰되었다. 균사를 생성하는 16개의 균주는 cover glass를 덮은 후 위상차 현미경으로 관찰하였다. 포자사슬의 형태는 직쇄 형 (rectiflexibile), 갈고리 형 (hooked) 및 방사형 (spiral)을 띠었다. 4개의 균주는 포자가 생성이 되지 않고 단지 기균사 (substrate mycelium)만 관찰되었다(Table 5-9).

**Table 5.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* A (red colored) strains

No.	Strain No.	Gram stain	Color of colony on ISP 2 medium	Morphology	Motility
1	Sco-A01	P	Cream	R	+
2	Sco-A02	P	Cream	R	+
3	Sco-A03	P	Cream	R	+
4	Sco-A04	P	Cream	R	+
5	Sco-A05	P	Cream	C	+
6	Sco-A06	P	Cream	R	-
7	Sco-A07	P	Cream	R	-
8	Sco-A08	P	Yellow	R	-
9	Sco-A09	N	Vivid greenish-yellow	C	+
10	Sco-A10	N	Vivid-pink	R	-
11	Sco-A11	P	Cream	R	-
12	Sco-A12	P	Cream	R	-
13	Sco-A15	P	Cream	R	-
14	Sco-A16	P	Light-yellow	R	+
15	Sco-A17	P	Brilliant orange-yellow	R	+
16	Sco-A18	P	Brilliant greenish-yellow	R	+
17	Sco-A19	P	Cream	R	-
18	Sco-A20	P	Cream	R	-
19	Sco-A21	P	Cream	C	-
20	Sco-A22	P	Brilliant greenish-yellow	R	-
21	Sco-A23	P	Cream	R	-
22	Sco-A24	N	Cream	R	+
23	Sco-A25	P	Strong-yellow	R	-
24	Sco-A26	N	Brilliant-yellow	R	+
25	Sco-A27	N	Vivid-pink	R	+
26	Sco-A28	P	White/vivid orange-yellow	only SM	Nd
27	Sco-A29	P	None or white/green	Hook	Nd
28	Sco-A30	P	None or white/green	only SM	Nd
29	Sco-A31	P	None or white/green	Spiral or hooked	Nd
30	Sco-A34	P	Cream	R	-
31	Sco-A35	N	Light-yellow	R	+
32	Sco-A36	P	Vivid-yellow	C	-

P, Gram-positive; N, Gram-negative; R, rod-shaped; C, coccus; S/SM, spore/substrate mycelium

**Table 6.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* B (brown colored) strains

No.	Strain No.	Gram stain	Color of colony on ISP 2 medium	Morphology	Motility
1	Sco-B01	P	Pink or gray/olive black	Hooked	Nd
2	Sco-B02	P	Pink/strong orange-yellow	Rf	Nd
3	Sco-B03	P	Gray/olive black	Rf	Nd
4	Sco-B04	P	None or white/deep-yellow	Rf	Nd
5	Sco-B05	P	White/deep-yellow	Rf	Nd
6	Sco-B06	P	Light-yellow	R	-
7	Sco-B07	P	Brilliant-yellow	C	+
8	Sco-B08	P	Vivid orange-yellow	R	-
9	Sco-B09	P	Brilliant-yellow	R	+
10	Sco-B10	P	Vivid-yellow	R	-
11	Sco-B11	P	Brilliant greenish-yellow	R	+
12	Sco-B12	N	Yellow	R	+
13	Sco-B13	P	Gray/olive black	Hooked or spiral	Nd
14	Sco-B14	P	Brown	Only SM	Nd
15	Sco-B15	P	Deep-yellow	Rf	Nd
16	Sco-B16	P	Cream	R	-
17	Sco-B17	N	Cream	R	+
18	Sco-B18	N	Vivid greenish-yellow	R	+
19	Sco-B19	P	Brilliant-yellow	R	+
20	Sco-B20	P	Deep-yellow	Only SM	Nd
21	Sco-B21	P	Vivid orange-yellow	R	+
22	Sco-B22	P	Brilliant-yellow	C	+
23	Sco-B23	P	Cream	R	+
24	Sco-B24	P	None/light yellow	Rf	Nd
25	Sco-B25	P	Gray or pink/olive black	Rf	Nd

P, Gram-positive; N, Gram-negative; R, rod-shaped; C, coccus; Rf, rectiflexible; S/SM, spore/substrate mycelium; Nd, not determined



**Table 7.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* C (reddish-brown colored) strains

No.	Strain No.	Gram stain	Color of colony on ISP 2 medium	Morphology	Motility
1	Sco-C01	P	Pale orange-yellow	C	-
2	Sco-C02	N	Cream	R	-
3	Sco-C03	N	Light-yellow	C	+
4	Sco-C04	P	Pale yellow	R	+
5	Sco-C05	P	Vivid greenish-yellow	C	+
6	Sco-C06	N	Strong yellowish-pink	R	-

P, Gram-positive; N, Gram-negative; R, rod-shaped; C, coccus; Nd: not determined



**Table 8.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* D (yellow brown colored) strains

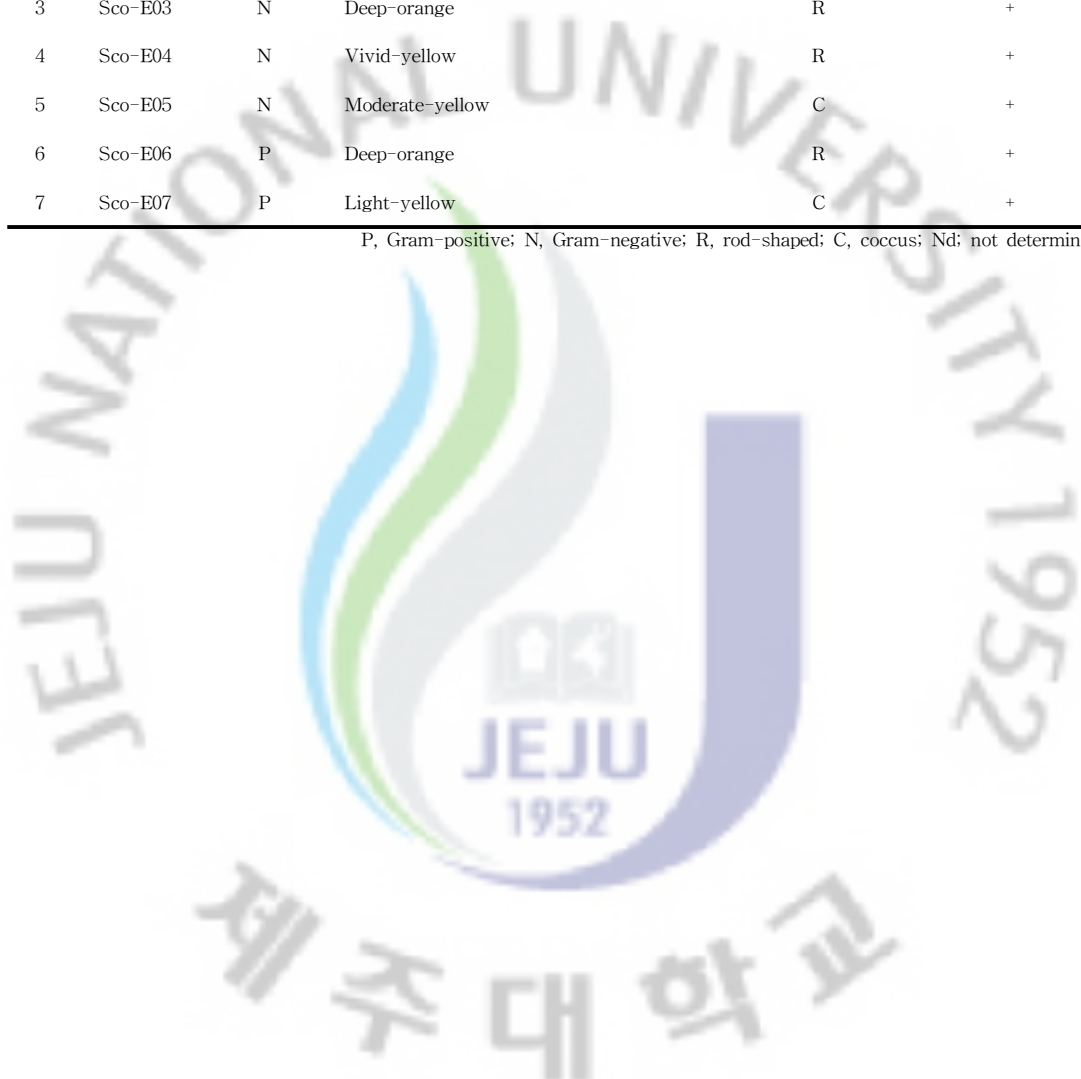
No.	Strain No.	Gram stain	Color of colony on ISP 2 medium	Morphology	Motility
1	Sco-D01	P	Vivid-yellow	C	-
2	Sco-D02	P	Brilliant-yellow	C	-
3	Sco-D03	P	Brilliant-yellow	C	-
4	Sco-D04	P	Vivid-yellow	R	+
5	Sco-D05	N	Vivid orange-yellow	R	+
6	Sco-D06	P	Vivid-yellow	R	-
7	Sco-D07	N	Vivid-yellow	R	+
8	Sco-D08	N	Vivid-orange	R	+
9	Sco-D09	N	Brilliant-yellow	R	+
10	Sco-D10	N	Vivid-orange	R	+
11	Sco-D11	N	Light-yellow	R	-
12	Sco-D12	P	Deep red-orange	R	-
13	Sco-D13	N	Light-pink	R	-
14	Sco-D14	P	White or Gray/pale-yellow	Rf	Nd
15	Sco-D15	N	Light-yellow	R	+
16	Sco-D16	N	Light-yellow	R	+
17	Sco-D17	N	Strong-yellow	R	+
18	Sco-D18	N	Strong-yellow	R	+
19	Sco-D19	N	Vivid orange-yellow	R	-
20	Sco-D20	N	Vivid orange-yellow	R	-
21	Sco-D21	P	Cream	R	-
22	Sco-D22	N	Moderate-yellow	R	+
23	Sco-D23	N	Moderate-yellow	R	+
24	Sco-D24	N	Strong yellow	R	+
25	Sco-D25	P	Light-brown	R	-
26	Sco-D26	N	Pale-yellow	R	+
27	Sco-D27	N	Light-pink	R	-
28	Sco-D28	N	Light-pink	R	-
29	Sco-D29	P	Strong-yellow	R	+
30	Sco-D30	N	Light-yellow	R	+

P, Gram-positive; N, Gram-negative; R, rod-shaped; C, coccus; Rf, rectiflexibile; S/SM, spore/substrate mycelium; Nd, not determined

**Table 9.** Phenotypic characteristics of *Jejuscoria* E (black colored) strains

No.	Strain No.	Gram stain	Color of colony on ISP 2 medium	Morphology	Motility
1	Sco-E01	N	Cream	R	-
2	Sco-E02	N	Brilliant-yellow	R	-
3	Sco-E03	N	Deep-orange	R	+
4	Sco-E04	N	Vivid-yellow	R	+
5	Sco-E05	N	Moderate-yellow	C	+
6	Sco-E06	P	Deep-orange	R	+
7	Sco-E07	P	Light-yellow	C	+

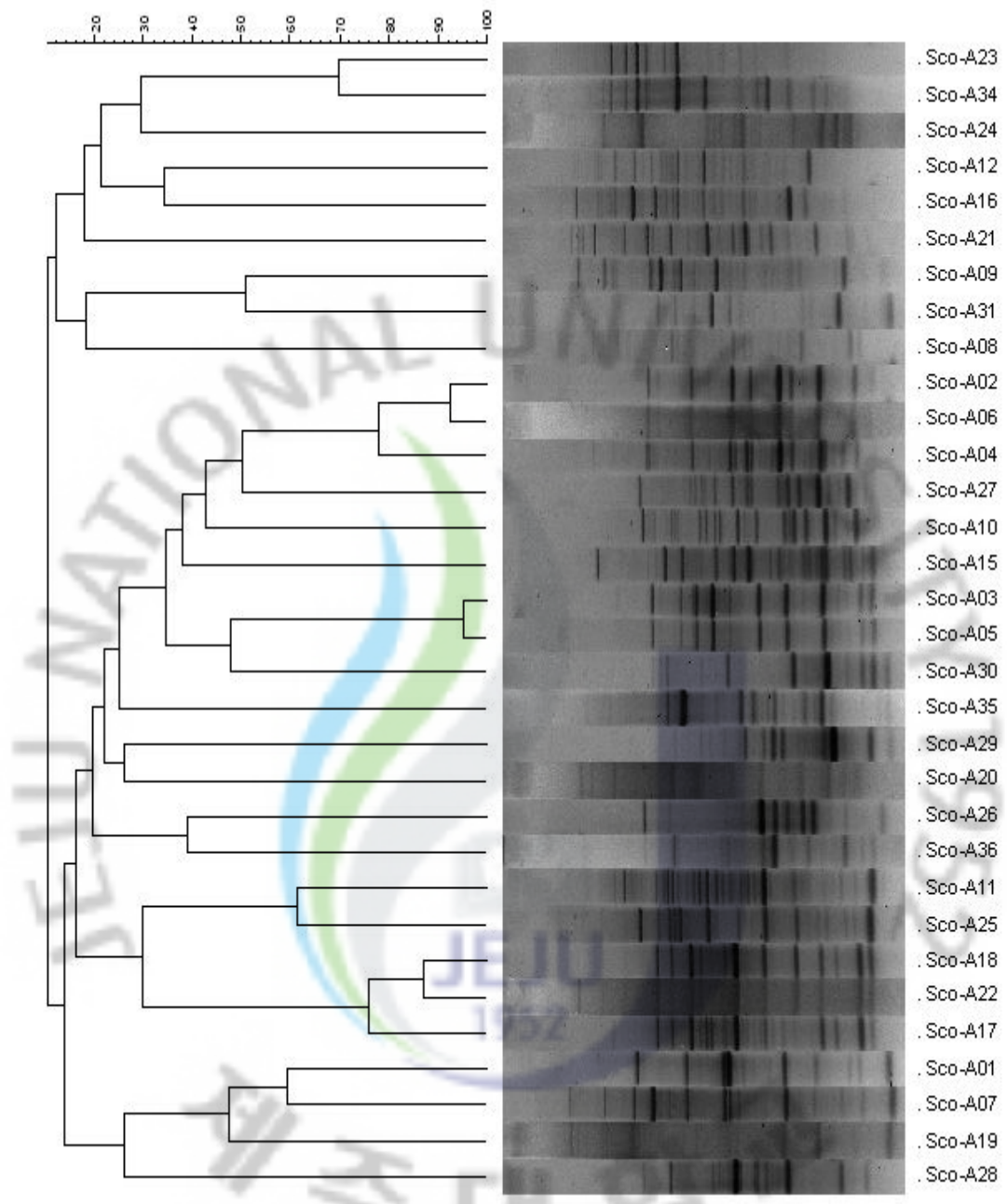
P, Gram-positive; N, Gram-negative; R, rod-shaped; C, coccus; Nd: not determined



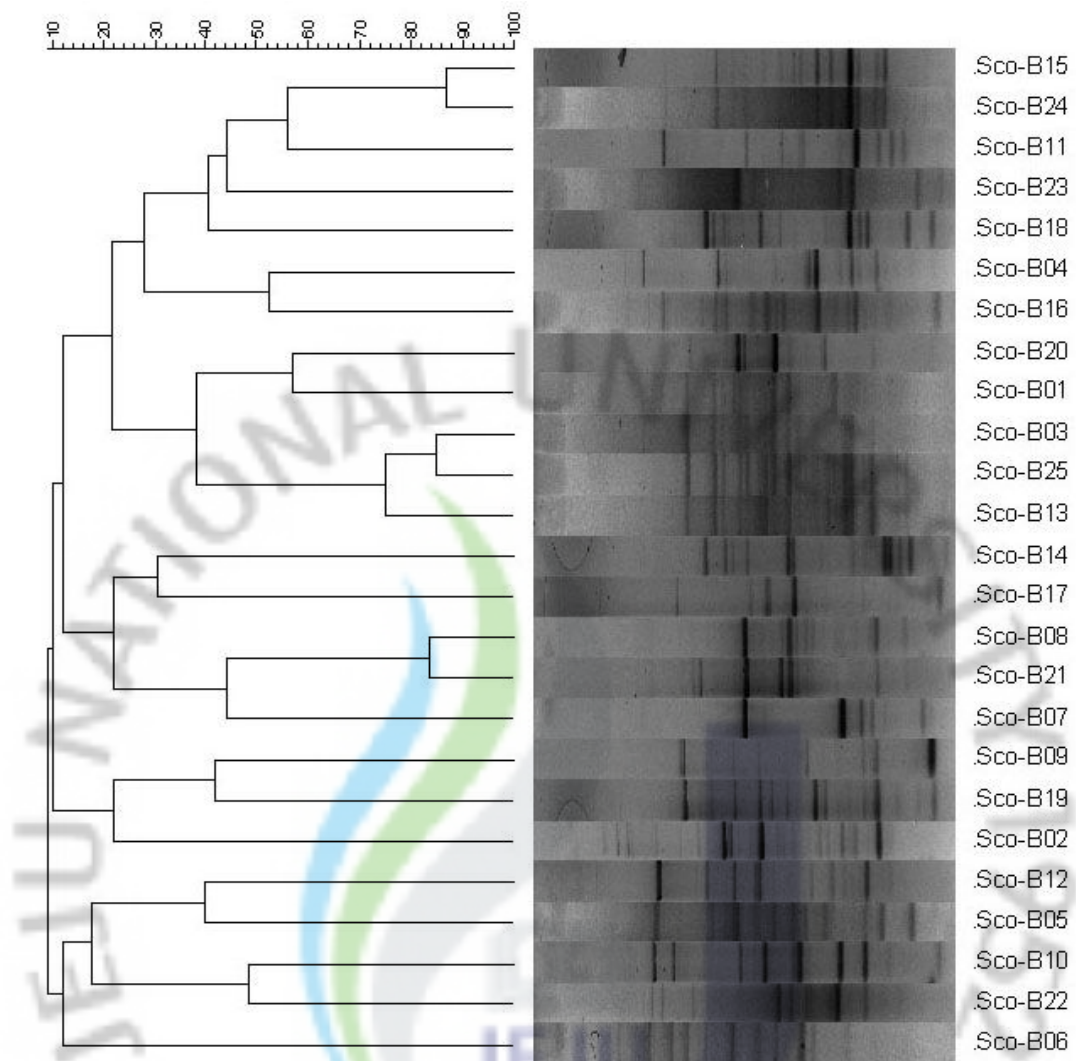
## 2. Rep-PCR 을 이용한 Jejuscoria 내 세균군집의 계통학적 해석

### 2.1. Rep-PCR pattern의 분석

본 연구에서는 색상이 다른 Jejuscoria에서부터 분리한 균주들의 DNA를 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 전에 신속하게 전체적인 bacteria의 유전학적인 다양성을 파악하기 위해 Rep-PCR을 수행하였다. 각 균주에서 분리한 DNA를 BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') primer를 이용하여 PCR을 한 후 DNA fingerprinting을 얻었다. 얻은 이미지는 BioNumerics (ver 3.0; Applied Maths, Belgium)를 통해 DNA band pattern을 비교 분석하고 미생물 계통분류학적 차이 및 군집 다양성을 검토하였다. 각 균주들의 pattern 분석을 통해 UPGMA형태의 dendrogram을 작성하였고 유사도를 확인 하였다. 유사도 65% 이상의 수준에서 grouping 한 결과, 붉은색 (A; red)에서 분리된 총 33균주들은 28 Rep-group (Fig. 6), 갈색 (B; brown)에서 분리된 총 25균주들은 21 Rep-group (Fig. 7), 적갈색 (C; reddish-brown)에서 분리된 총 6균주들은 6 Rep-group (Fig. 8), 황갈색 (D; yellow brown)에서 분리된 총 30균주들은 22 Rep-group (Fig. 9), 그리고 검정색 (E; black)에서 분리된 총 7균주들은 6개의 서로 다른 Rep-group으로 분류되었다 (Fig. 10). Scoria에서 분리된 총 100균주들은 band pattern 유사도 65% 이상에서 79개의 Rep-group으로 분류되었다(Fig. 11).

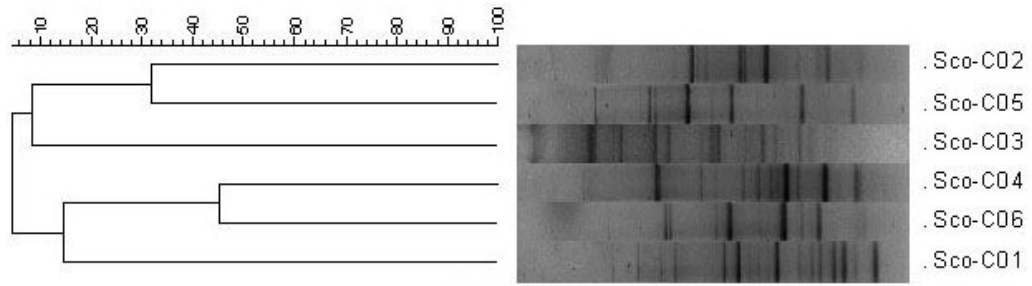


**Fig. 6.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of *Jejuscoria A* (red colored) bacteria



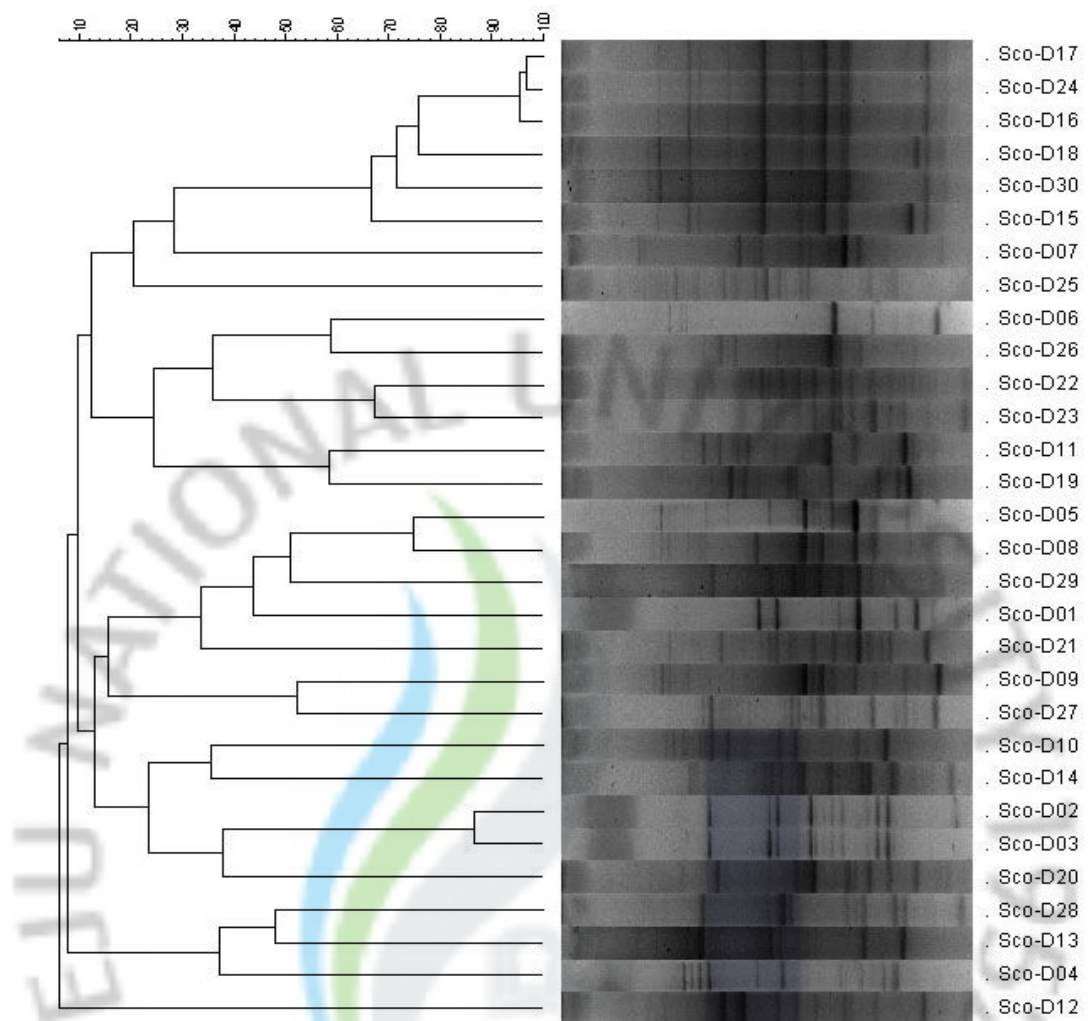
**Fig. 7.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of *Jejuscoria* B (brown colored) bacteria



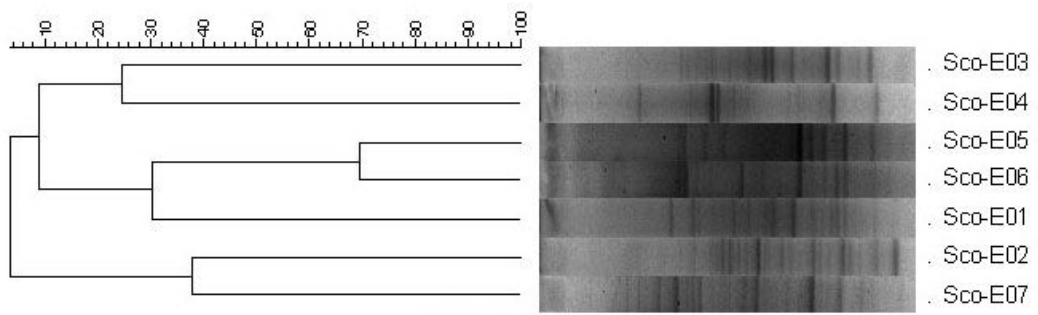


**Fig. 8.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of *Jejuscoria C* (reddish-brown colored) bacteria





**Fig. 9.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of *Jejuscoria* D (yellow brown colored) bacteria



**Fig. 10.** Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of *Jejuscoria* E (black colored) bacteria



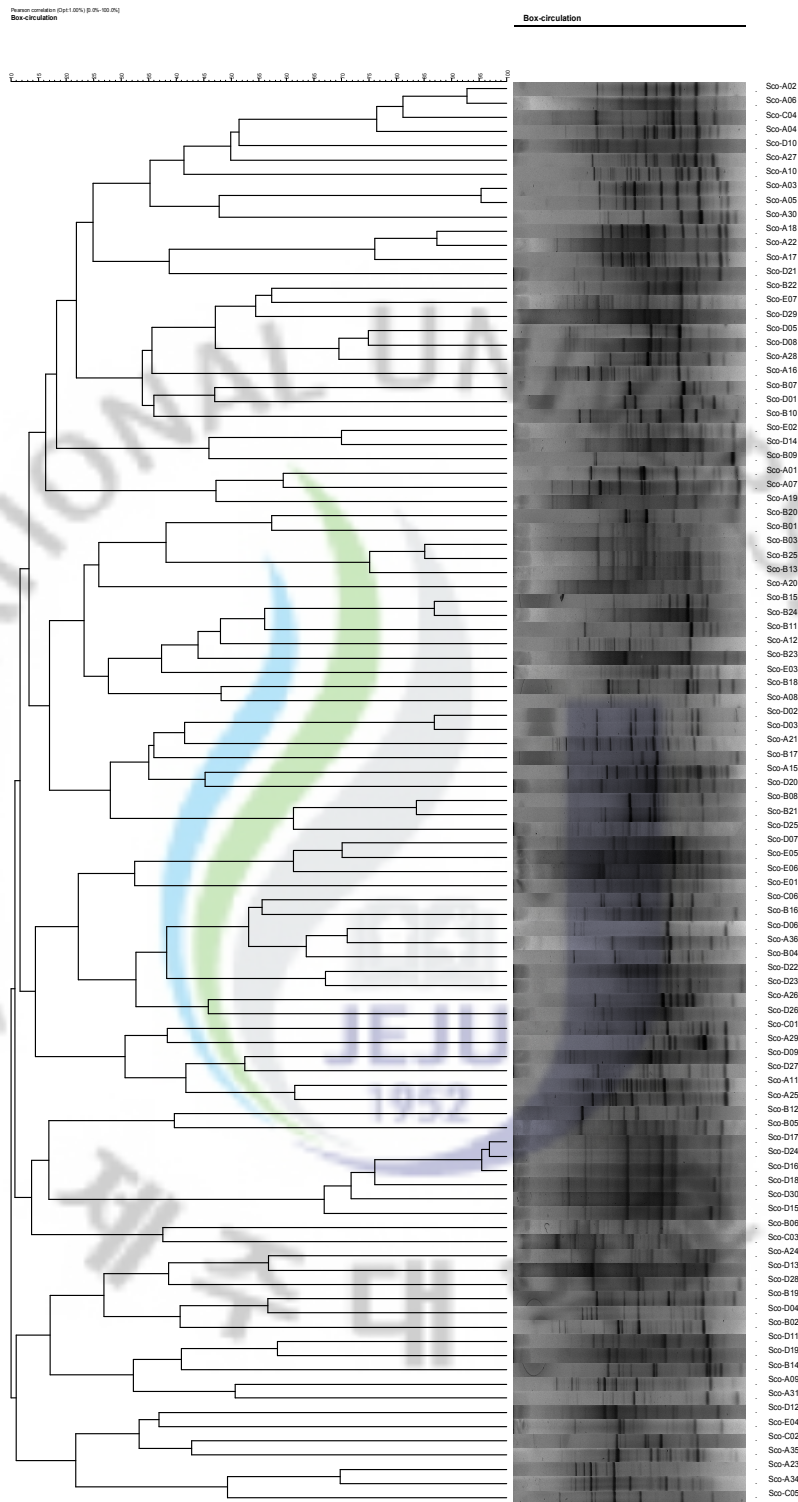


Fig. 11. Dendrogram of Rep-PCR DNA fingerprints of *Jejuscoria* bacteria

### 3. Rep-PCR 대표 strain의 16S rDNA 염기서열 해석

#### 3.1. *Jejuscoria* A (red colored) 내 세균군집의 계통학적 특성

붉은색 (red) *Jejuscoria*에서 분리한 32개의 균주들 중에서 대표 균주들을 부분 염기서열 분석한 결과 *Actinobacteria*, *Fimicutes*와 *Proteobacteria*의 3개의 문 (phylum)이 확인 되었다. *Proteobacteria*에는  $\alpha$ -*Proteobacteria* 와  $\beta$ -*Proteobacteria* 2개의 강(class)을 보였다. *Actinobacteria* (phylum)/*Actinobacteria* (class)/*Actinomycetales* (order) 에는 *Corynebacterineae*, *Micrococcineae*, *Propionibacterineae* 와 *Streptomycineae*의 4개의 아목 (suborder)를 나타내었다. 다시, *Corynebacterineae*에는 *Nocardiaceae* (family)/*Nocardia* (genus)에 1균주 (A28)를 나타내었다. A28은 균사생성 방선균인 *Nocardia niigatensis* IFM 0833<sup>T</sup> (AB092565) 와 98.9%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보였다.

*Micrococcineae*에는 *Intrasporangiaceae* (family)/*Terrabacter* (genus)에 1균주 (A15)와 *Micrococcaceae* (family)/*Arthrobacter* (genus)에 15균주 (A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A23과 A34)들이 분리 되었다. 이들 균주 중 5균주 (A02, A06, A18, A22과 A23)들은 69.8% 이상의 Rep-PCR band pattern으로 동정되었다. A15는 *Terrabacter tumescens* DSM 20308<sup>T</sup> (X83812)와 99.0% 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보였고 *Arthrobacter* 분리주들은 *A. defluvi* 4C1-a<sup>T</sup> (AM409361), *A. globiformis* DSM 20124<sup>T</sup> (X80736), *A. nitroguaiacolicus* CCM 4924<sup>T</sup> (AJ512504), *A. oryzae* KV-651<sup>T</sup> (AB279889)과 *A. ramosus* DSM 20546<sup>T</sup> (X80742) 사이에 98.9-99.9% 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 나타내었다.

*Propionibacterineae*에는 *Nocardioidaceae* (family)/*Marmoricola* (genus)에 1균주 (A36), *Nocardioides* (genus)에 2균주 (A08과 A25)들이 분리 되었고 표준 균주인 *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup> (Y18629), *N. furvisabuli* SBS-26<sup>T</sup> (DQ411542), *N. platarum* NCIMB 12834<sup>T</sup> (AF005008)와 각각 98.1%, 97.9% 그리고 97.4%의 염기서열 유사도를 보였다.



*Streptomycineae*에는 *Streptomycetaceae* (family)/ *Streptomyces* (genus)에 3 균주들 (A29, A30과 A31)이 분리되었다. A29는 *S. cinerochromogense* NBRC 13822<sup>T</sup> (AB184507)과 A30은 *S. capoamus* JCM 4734<sup>T</sup> (AB045877)과 100% 염기서열 유사도를 보였다. 반면, A31은 *S. panayensis* JCM 5042<sup>T</sup> (AB045859)과 99.0% 염기서열 유사도를 나타내었다. 앞에서 언급한 A28를 포함해서 A시료 (red)에서 4균주의 균사생성 방선균을 분리하였다.

*Fimicutes* (phylum)/ *Bacilli* (class)/ *Bacillales* (order)에는 *Bacillaceae* (family)/ *Bacillus* (genus)에 속하는 2균주 (A11과 A12)와 *Paenibacillaceae* (family)/ *Paenibacillus* (genus)에 속하는 1균주 (A16)가 분리되었다. A11은 *B. velezensis* BCRC 14193<sup>T</sup> (EF433408)과 99.9% 유사도를 A12는 *B. subtilis* BCRC 14718<sup>T</sup> (EF423597)과 100% 염기서열 유사도를 보였다. A16은 *P. jamilae* CECT 5266<sup>T</sup> (AJ271157)과 99.2% 염기서열 유사도를 보였다.

*α-Proteobacteria* (class)/ *Rhizobiales* (order)에는 *Methylobacteriaceae* (family)/ *Methylobacterium* (genus)에 속하는 2균주 (A10과 A27)와 *Sphingomonadales* (order)/ *Sphingomonadaceae* (family)/ *Sphingomonas* (genus)에 속하는 1균주 (A09)가 분리되었다. A10과 A27은 *M. tardum* RB677<sup>T</sup> (AB252208)와 100%, A09는 *S. azotifigens* NBRC 15496<sup>T</sup> (AB217473)와 99.9% 염기서열 유사도를 보였다.

*β-Proteobacteria* (class)/ *Burkholderiales* (order)/ *Oxalobacteraceae* (family)에는 *Burkholderia* (genus)에 1균주 (A24), *Herbaspirillum* (genus)에 1균주 (A35)와 *Masillia* (genus)에 1균주가 포함되었다. A24는 *Candidatus Burkholderia verschuerenii* 19750204<sup>T</sup> (AY277699)와 99.2%, A35는 *H. seropedicae* DSM 6445<sup>T</sup> (Y10146)와 97.1% 그리고 A26은 *M. brevitalea* byr23-80<sup>T</sup> (EF546777)와는 98.3% 염기서열 유사도를 보였다(Fig. 12 & Table 10).

이상 붉은색(red) Jejuscoria에서 동정된 총 32개의 균주 중 23균주 (71.8%)가 *Actinobacteria* 계통군에 속하였고, 각각 3균주 (9.4%)씩 *Bacilli* 계통군, *α-Proteobacteria* 계통군 그리고 *β-Proteobacteria* 계통군에 속하는 것이 확인되었다. 또한, 7개의 목 (order) 및 아목 (sub-order), 10개의 과 (family)와 13개의 속(genus)을 나타냈다. 관련된 종들과 16S rRNA 유전자 염기서열 비교를 통

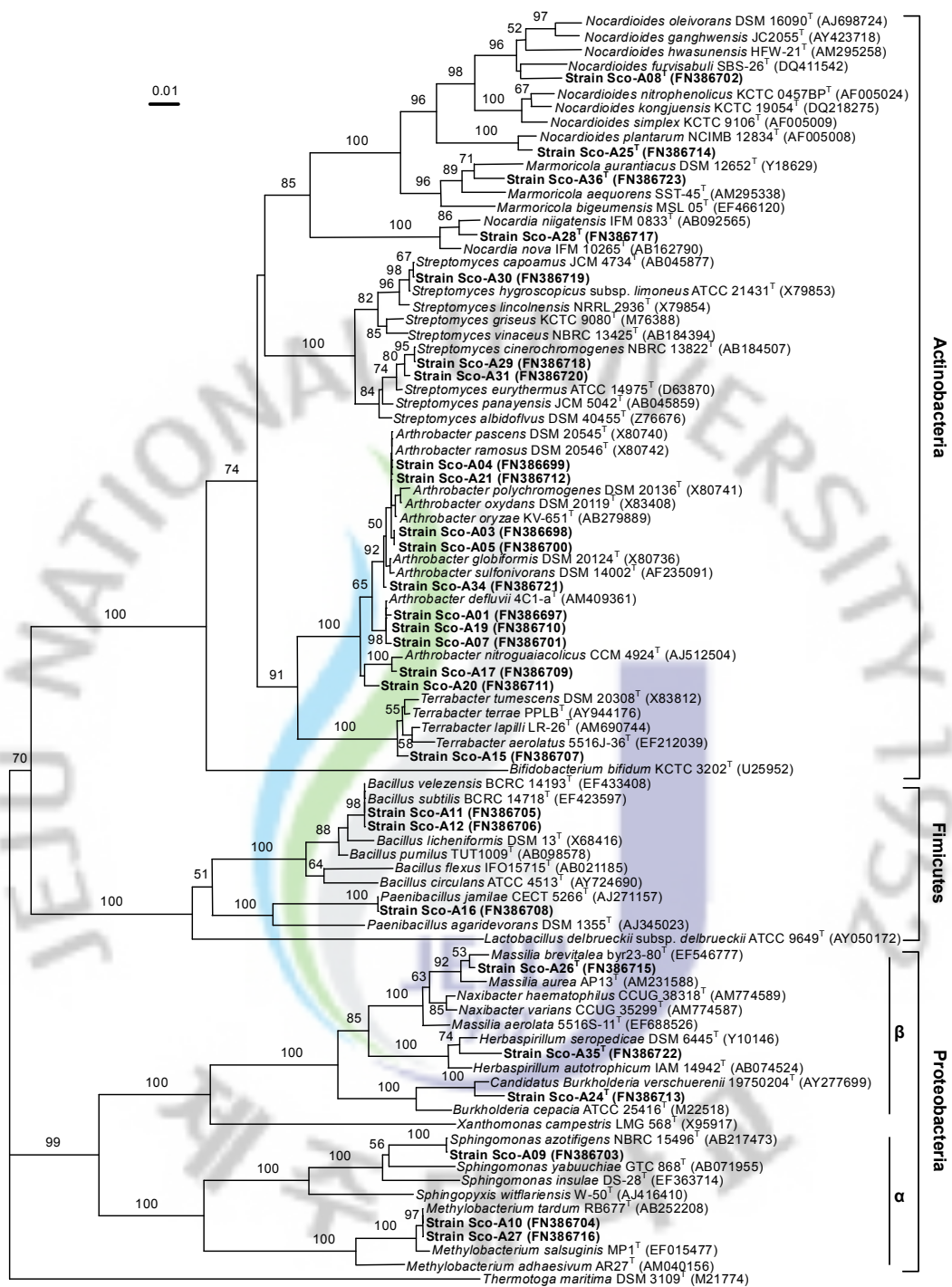


한 계통분석을 통해서 32균주 중에서 7균주가 새로운 종으로 보고될 가능성 있다고 판단되어 진다. 향후 표준균주들과 함께 생리·생화학 분석 및 DNA-DNA hybridization 분석이 수행되어야 할 것이다. Cream 색상을 띠고 있는 colony들이 많이 분포하였고 염기서열 분석결과 *Arthrobacter* (genus)에 속하는 균주들이 많이 있음을 알 수 있었다.



**Table 10.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* A (red colored) strains

No. of Isolate	Taxonomic affiliation	Closest relative species	Sequence similarity	Rep-Group
A28	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardia niigatensis</i>	98.9%	13
A15		<i>Terrabacter tumescens</i>	99.0%	38
A07		<i>Arthrobacter defluvi</i>	99.9%	22
A19		<i>Arthrobacter defluvi</i>	100%	23
A01		<i>Arthrobacter globiformis</i>	99.4%	21
A17		<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	99.0%	7
A18		<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	-	7
A22		<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	-	7
A02		<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	1
A03		<i>Arthrobacter oryzae</i>	99.2%	5
A04		<i>Arthrobacter oryzae</i>	99.9%	1
A05		<i>Arthrobacter oryzae</i>	99.2%	5
A06		<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	1
A21		<i>Arthrobacter oryzae</i>	98.9%	36
A23		<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	78
A34		<i>Arthrobacter oryzae</i>	99.3%	78
A20		<i>Arthrobacter ramosus</i>	99.7%	27
A36		<i>Marmoricola aurantiacus</i>	98.1%	47
A08		<i>Nocardioides furvisabuli</i>	97.9%	34
A25		<i>Nocardioides platarum</i>	97.4%	57
A30		<i>Streptomyces capoamus</i>	100%	6
A29	<i>Streptomyces cinerochromogense</i>	100%	53	
A31	<i>Streptomyces panayensis</i>	99.0%	73	
A11	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus anyloliguefaciens</i>	99.9%	56
A12		<i>Bacillus subtilis</i>	100%	30
A16		<i>Paenibacillus jamilae</i>	99.2%	14
A10	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium tardum</i>	100%	4
A27		<i>Methylobacterium tardum</i>	100%	3
A09		<i>Sphingomonas azotifigens</i>	99.9%	72
A24	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Candidatus Burkholderia verschuerenii</i>	99.2%	63
A35		<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	97.1%	77
A26		<i>Massilia brevitalea</i>	98.3%	50
Total	4	21		



**Fig. 12.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-A (red Jejuscoria) bacteria. Numbers on branch nodes are bootstrap values expressed as percentages (1000 resamplings). Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 3.2. Jejuscoria B (brown colored) 내 세균군집의 계통학적 특성

갈색 (brown) Jejuscoria에서 분리한 25개의 균주들 중에서 대표 균주들을 염기서열 분석한 결과 *Actinobacteria* 와 *Proteobacteria*의 2개의 문 (phylum)이 확인 되었다. *Proteobacteria*에는  $\alpha$ -*Proteobacteria* 와  $\gamma$ -*Proteobacteria* 2개의 강 (class)을 보였다. *Actinobacteria* (phylum)/ *Actinobacteria* (class)/ *Actinomycetales* (order) 에는 *Corynebacterineae*, *Micrococccineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae* 와 *Streptomycineae*의 5개의 아목 (suborder)를 나타내었다.

*Corynebacterineae*에는 *Mycobacteriaceae* (family)/ *Mycobacterium* (genus)에 2균주 (B08과 B21)가 분리되었다. B08과 B21은 *M. wolinskyi* ATCC 700010<sup>T</sup> (AY457083)과 97.0%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보였다. B21은 B08과 Rep-PCR band pattern 유사도가 83.6%로 동일한 균주로 동정하였다.

*Micrococccineae*에는 *Intrasporangiaceae* (family)/ *Phycoccus* (genus)에 1균주 (B23), *Microbacteriaceae* (family)/ *Microbacterium* (genus)에 1균주 (B11)와 *Micrococcaceae* (family)/ *Arthrobacter* (genus)에 2균주 (B06과 B16)들을 포함하였다. B23은 *P. dokdonensis* DS-8<sup>T</sup> (EF555583)과 98.7%, B11은 *M. hydrocarbonoxydans* DSM 16089<sup>T</sup> (AJ698726)과 99.5%, B06은 *A. defluvi* 4C1-a<sup>T</sup> (AM409361)과 100% 그리고 B16은 *A. oryzae* KV-651<sup>T</sup> (AB279889)과 99.8% 유사도 염기서열을 보였다.

*Micromonosporineae*에는 *Micromonospraceae* (family)에 속하는 1균주 (B14)가 분리되었고 *Catellatospora chokoriensis* 2-25(1)<sup>T</sup>(AB200231)와 95.8% 염기서열 유사도를 나타내었다. 낮은 염기서열 유사도와 관련된 표준 종들과 화학적 특성 분석 비교를 통해서 새로운 속 (genus)으로 보고될 가능성 있다고 여겨진다.

*Propionibacterineae*에는 *Nocardioideaceae* (family)/ *Nocardioides* (genus)에 속하는 5균주 (B10, B07, B09, B19과 B22)들을 포함한다. B10은 *N. furvisabuli* SBS-26<sup>T</sup> (DQ411542)와 99.0%, B07, B09과 B19는 *N. oleivorans* DSM 16090<sup>T</sup> (AJ698724)과 각각 98.4, 98.3 그리고 98.4%의 염기서열 유사도를 보였다. 또한, B22는 *N. kongjuensis* KCTC 19054<sup>T</sup> (DQ218275)와 97.0%의 염기서열 유사도를

나타내었다.

*Streptomycineae*에는 *Streptomycetaceae* (family)/ *Streptomyces* (genus)에 속하는 10균주 (B15, B24, B05, B20, B04, B01, B02, B03, B13과 B25)들이 분리되었다. 이들 균주 중 B03, B24와 B25는 75.1% 이상의 Rep-PCR band pattern 유사도에 의해서 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하지 않고 동정되었다. 표준균주들 *S. caeruleus* NBRC 12804<sup>T</sup> (AB184160), *S. griseus* KCTC 9080<sup>T</sup> (M76388), *S. lincolnensis* NRRL 2936<sup>T</sup> (X79854) 그리고 *S. vinaceus* NBRC 13425<sup>T</sup> (AB184394)와 98.8-100%의 유사도를 보였다. 총 10균주가 *Streptomyces*로 분리되었지만 Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 기준에 알려진 5종으로 확인할 수 있었다.

*α-Proteobacteria* (class)/ *Sphingomonadales* (order)/ *Sphingomonadaceae* (family)/ *Sphingopyxis* (genus)에 속하는 1균주 (B12)가 분리되었다. B12는 *S. witflariensis* W-50<sup>T</sup> (AJ416410)과 96.1% 염기서열 유사도를 보였다.

*γ-Proteobacteria* (class)/ *Pseudomonadales* (order)/ *Pseudomonadaceae* (family)에는 *Pseudomonas* (genus)에 1균주 (B17)과 *Xanthomonadales* (order)/ *Xanthomonadaceae* (family)/ *Stenotrophomonas* (genus)에 1균주 (B18)가 포함되었다. B17은 *P. frederiksbergensis* SS17<sup>T</sup> (AB365797)와 99.9%, B18은 *S. maltophilia* LMG 10857<sup>T</sup> (AJ131117)와 99.7%의 염기서열 유사도를 나타내었다 (Fig. 13 & Table 11).

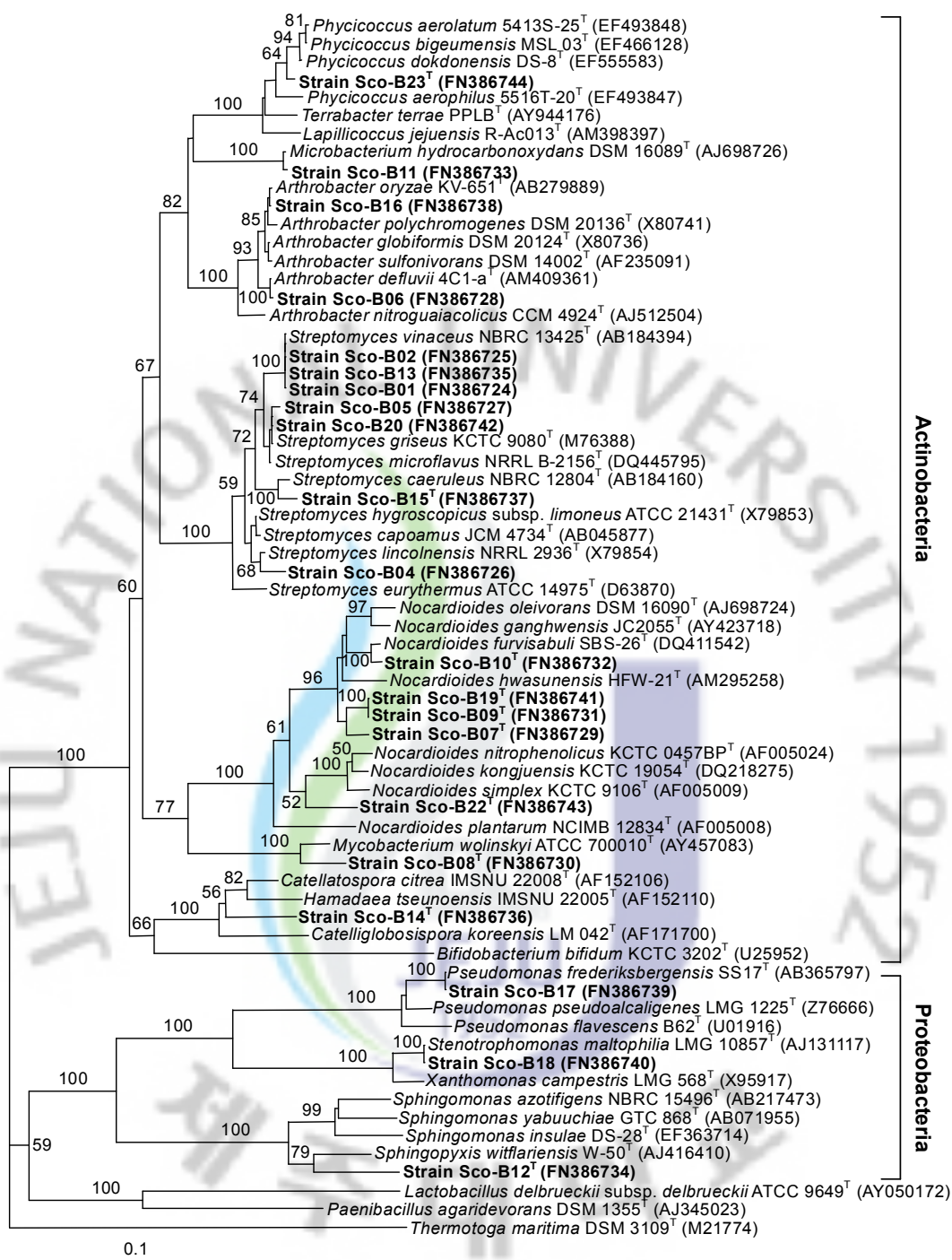
이상 갈색 (brown) Jejuscoria에서 분리된 총 25개의 균주 중 22균주들 (88.0%)이 *Actinobacteria* 계통군에 속하였으며, 2균주 (8.0%)는 *γ-Proteobacteria* 계통군 그리고 1균주 (4.0%)는 *α-Proteobacteria* 계통군에 속하는 것이 확인 되었다. 또한, 8개의 목(order) 및 아목 (suborder), 10개의 과(family)와 10개의 속(genus)을 나타냈다. 관련된 종들과 16S rRNA 유전자 염기서열 비교를 통한 계통분석을 통해서 25균주 중에서 12균주가 새로운 속 (genus) 및 종 (species)으로 보고될 가능성 있다고 판단되어 진다. B14를 포함하여 균사를 생성하는 방선균이 11균주로 5개의 시료에 중에서 가장 많이 분포 하였다.



**Table 11.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* B (brown colored) strains

No. of Isolate	Taxonomic affiliation	Closest relative species	Sequence similarity	Rep-Group
B08	<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	97.0%	40
B21		<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	-	40
B23		<i>Phycoccus dokdonensis</i>	98.7%	31
B11		<i>Microbacterium hydrocarboxydans</i>	99.5%	29
B06		<i>Arthrobacter defluvii</i>	100%	61
B16		<i>Arthrobacter oryzae</i>	99.8%	46
B14		<i>Catellatospora chokoriensis</i>	95.8%	71
B10		<i>Nocardioides furvisabuli</i>	99.0%	17
B07		<i>Nocardioides oleivorans</i>	98.4%	15
B09		<i>Nocardioides oleivorans</i>	98.3%	20
B19		<i>Nocardioides oleivorans</i>	98.4%	66
B22		<i>Nocardioides kongjuensis</i>	97.0%	9
B15		<i>Streptomyces caeruleus</i>	98.2%	28
B24		<i>Streptomyces caeruleus</i>	-	28
B05		<i>Streptomyces griseus</i>	99.3%	59
B20		<i>Streptomyces griseus</i>	99.9%	24
B04		<i>Streptomyces lincolnensis</i>	98.8%	48
B01		<i>Streptomyces vinaceus</i>	99.9%	25
B02		<i>Streptomyces vinaceus</i>	99.7%	68
B03		<i>Streptomyces vinaceus</i>	-	26
B13		<i>Streptomyces vinaceus</i>	100%	26
B25		<i>Streptomyces vinaceus</i>	-	26
B12	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	96.1%	58
B17	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99.9%	37
B18		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.7%	33
Total	3	17		





**Fig. 13.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-B (brown Jejuscoria) bacteria. Numbers on branch nodes are bootstrap values expressed as percentages (1000 resamplings). Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.

### 3.3. Jejuscoria C (reddish-brown colored) 내 세균군집의 계통학적 특성

적갈색 (reddish-brown) Jejuscoria에서 분리한 6개의 균주들 중에서 대표 균주들은 염기서열 분석한 결과 *Actinobacteria*과 *Proteobacteria*의 2개의 문 (phylum)이 확인되었다. *Actinobacteria* (phylum)/ *Actinobacteria* (class)/ *Actinomycetales* (order) 에는 *Corynebacterineae*, *Micrococcinea*와 *Propionibacterineae*의 3개의 아목 (suborder)들을 나타내었다.

*Corynebacterineae*에는 *Nocardiaceae* (family)/ *Rhodococcus* (genus)에 1균주 (C01)가 분리되었고 *R. erythropolis* MPU33<sup>T</sup> (AB334770)과 99.9% 염기서열 유사도를 보였다. *Micrococcinea*에는 *Micrococcaceae* (family)/ *Arthrobacter* (genus)에 1균주 (C04)가 76.4%의 Rep-PCR band pattern 유사도를 바탕으로 A04와 같은 종으로 확인되었다. 한편, C05는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과 A36과 100% 일치하는 것으로 확인되어서 *Propionibacterineae*/ *Nocardioideae* (family)/ *Marmoricola* (genus)에 새로운 종으로 여겨진다.

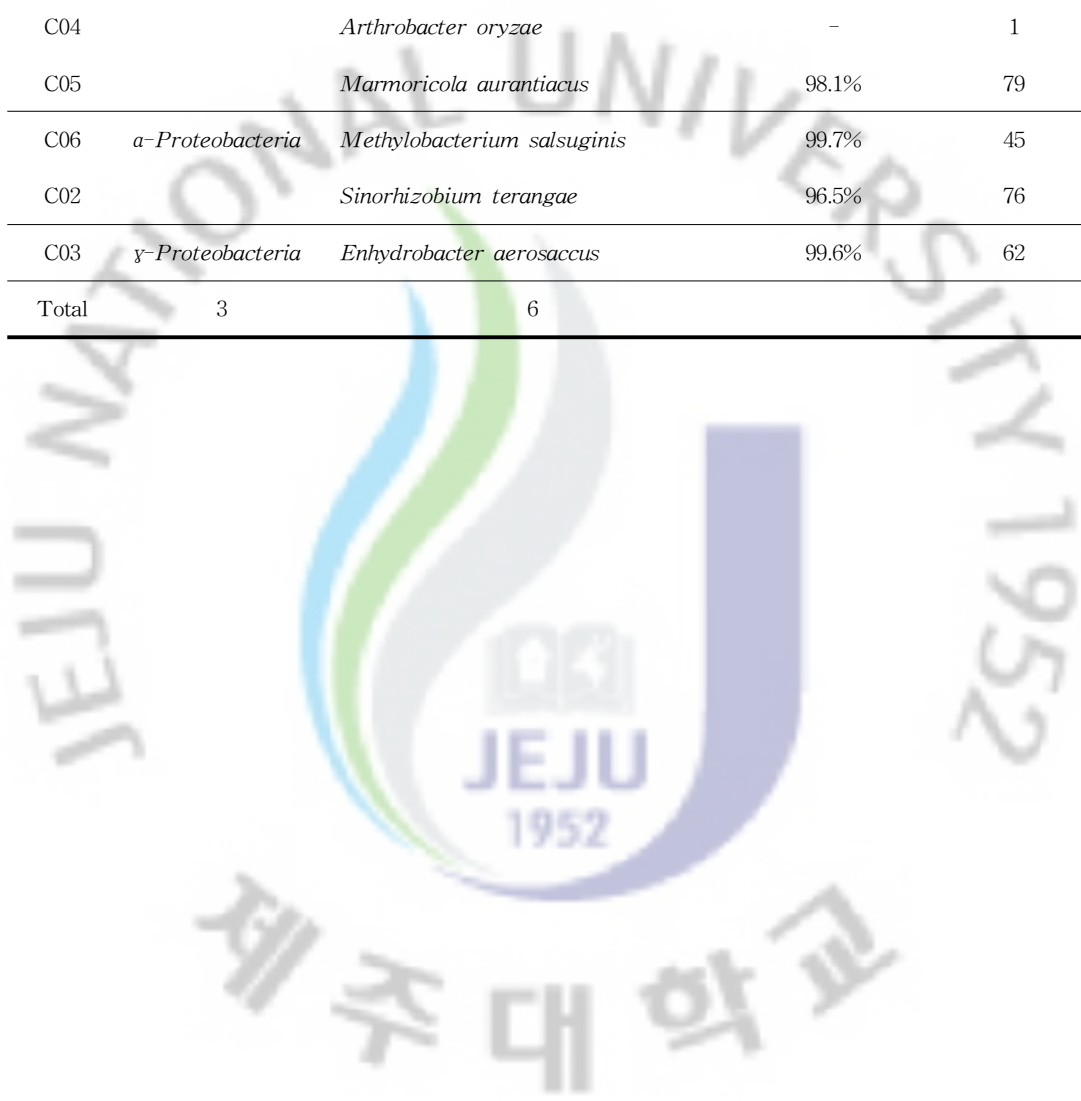
*α-Proteobacteria* (class)/ *Rhizobiales* (order)에는 *Methylobacteriaceae* (family)/ *Methylobacterium* (genus)에 속하는 1균주 (C06)와 *Rhizobiaceae* (family)/ *Sinorhizobium* (genus)에 속하는 1균주 (C02)가 분리되었다. C06은 *M. salsuginis* MP1<sup>T</sup> (EF015477)와 99.7%, C02는 *S. terangae* LMG 7834<sup>T</sup> (X68388)와 96.5%의 염기서열 유사도를 보였다.

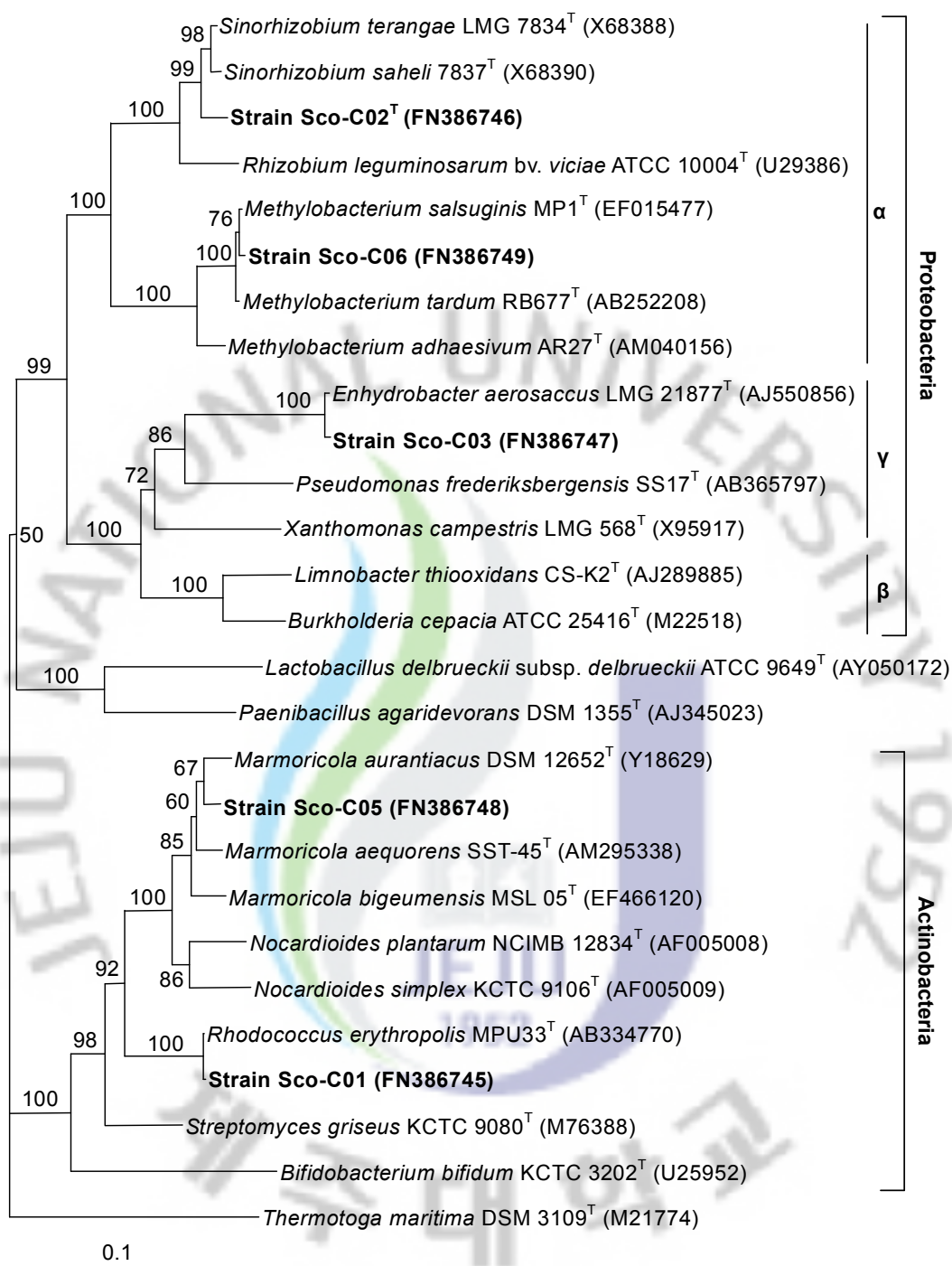
*γ-Proteobacteria* (class)/ *Pseudomonadales* (order)/ *Moraxellaceae* (family)/ *Enhydrobacter* (genus)에 1균주 (C03)은 *E. aerosaccus* LMG 21877<sup>T</sup> (AJ550856)과 99.6%의 염기서열 유사도를 나타내었다(Fig. 14 & Table 12).

이상 적갈색 (reddish-brown) Jejuscoria에서 동정된 총 6개의 균주 중 3균주 (50%) 가 *Actinobacteria* 계통군에 속하였으며, 2균주 (33%)는 *α-Proteobacteria* 계통군 그리고 1균주 (17%)는 *γ-Proteobacteria* 계통군에 속하는 것이 확인되었다. 또한, 5개의 목(order) 및 아목 (suborder), 6개의 과 (family)와 6개의 속 (genus)을 나타냈다. 관련된 종들과 16S rRNA 유전자 염기서열 비교를 통한 계통분석을 통해서 6균주 중에서 2균주가 새로운 종 (species)으로 보고될 가능성이 있다고 판단되어진다.

**Table 12.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* C (reddish-brown colored) strains

No. of Isolate	Taxonomic affiliation	Closest relative species	Sequence similarity	Rep-Group
C01	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	99.9%	52
C04		<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	1
C05		<i>Marmoricola aurantiacus</i>	98.1%	79
C06	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium salsuginis</i>	99.7%	45
C02		<i>Sinorhizobium teranga</i>	96.5%	76
C03	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	99.6%	62
Total	3	6		





**Fig. 14.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-C (reddish-brown Jejuscoria) bacteria. Numbers on branch nodes are bootstrap values expressed as percentages (1000 resamplings). Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.

#### 3.4. Jejuscoria D (yellow brown colored) 내 세균군집의 계통학적 특성

황갈색 (yellow brown) Jejuscoria에서 분리한 30개의 균주들 중에서 대표 균주들은 염기서열 분석한 결과 *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*과 *Deinococcus-Thermus*의 4개의 문 (phylum)이 확인되었다. *Proteobacteria*에는  $\alpha$ -*Proteobacteria*와  $\beta$ -*Proteobacteria* 2개의 강(class)을 보였다.

*Actinobacteria* (phylum)/ *Actinobacteria* (class)/ *Actinomycetales* (order) 에는 *Micrococccinea*, *Propionibacterineae*와 *Streptomycineae*의 3개의 아목 (suborder)들을 나타내었다.

*Micrococccinea*에는 *Intrasporangiaceae* (family)/ *Terrabacter* (genus)에 1균주 (D21)와 *Microbacteriaceae* (family)/ *Cutobacterium* (genus)에 1균주 (D29)가 분리되었다. D21은 *T. tumescens* DSM 20308<sup>T</sup> (X83812)와 99.3%, D29는 *C. flaccumfaciens* LMG 3645<sup>T</sup> (AJ312209)와 99.6%의 염기서열 유사도를 보였다.

*Propionibacterinea*/ *Noacardioidaceae* (family)에는 *Marmoricola* (genus)에 2균주 (D01과 D06)와 *Nocardioides* (genus)에 1균주 (D04)가 분리되었다. D01은 *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup> (Y18629)와 98.7%의 염기서열 유사도를 보였고 D06은 71.0% Rep-PCR band pattern 유사도를 바탕으로 A36과 같은 종으로 확인되었다.

*Streptomycineae*에는 *Streptomycetaceae* (family)/ *Streptomyces* (genus)에 1균주 (D14)가 분리되었고 *S. scabrisporus* NBRC 100760<sup>T</sup> (AB249946)와 95.9%의 염기서열 유사도를 보였다.

*Firmicutes* (phylum)/ *Bacilli* (class)/ *Bacillales* (order)/ *Bacillaceae* (family)/ *Bacillus* (genus)에 속하는 1균주 (D25)가 분리되었고 *B. circulans* ATCC 4513<sup>T</sup> (AY724690)와 100%의 유사도 염기서열을 나타내었다.

$\alpha$ -*Proteobacteria* (class)에는 *Rhizobiales* (order)/ *Methylobacteriaceae* (family)/ *Methylobacterium* (genus)에 속하는 3균주 (D13, D27과 D28)와 *Sphingomonadales* (order)/ *Sphingomonadaceae* (family)/ *Sphingomonas* (genus)에 속하는 1균주 (D10)가 분리되었다. D27과 D28은 *M. adhaesivum* AR27<sup>T</sup> (AM040156)과 98.9%, D13은 *M. salsuginis* MP1<sup>T</sup> (EF015477)과 99.9%의 염기



서열 유사도를 나타내었다. D10은 *S. insulae* DS-28<sup>T</sup> (EF363714)과 99.7%의 염기서열 유사도를 보였다.

*β-Proteobacteria* (class)/ *Burkholderiales* (order)/ *Oxalobacteraceae* (family)에는 *Herbaspirillum* (genus)에 2균주 (D19와 D20)와 *Massilia* (genus)에 14균주 (D05, D07, D08, D09, D11, D15, D16, D17, D18, D22, D23, D24, D26과 D30)가 분리되었다. D19와 D20은 *H. autotrophicum* IAM 14942<sup>T</sup> (AB074524)와 97.4%, *Massilia*에 속하는 분리균주들은 *M. aerolata* 5516S-11<sup>T</sup> (EF688526)과 97.6-99.5%의 염기서열 유사도를 나타내었다. 이 균주들 중 5균주들은 67.1% 이상의 Rep-PCR band pattern 유사도에 의해서 동정되었다.

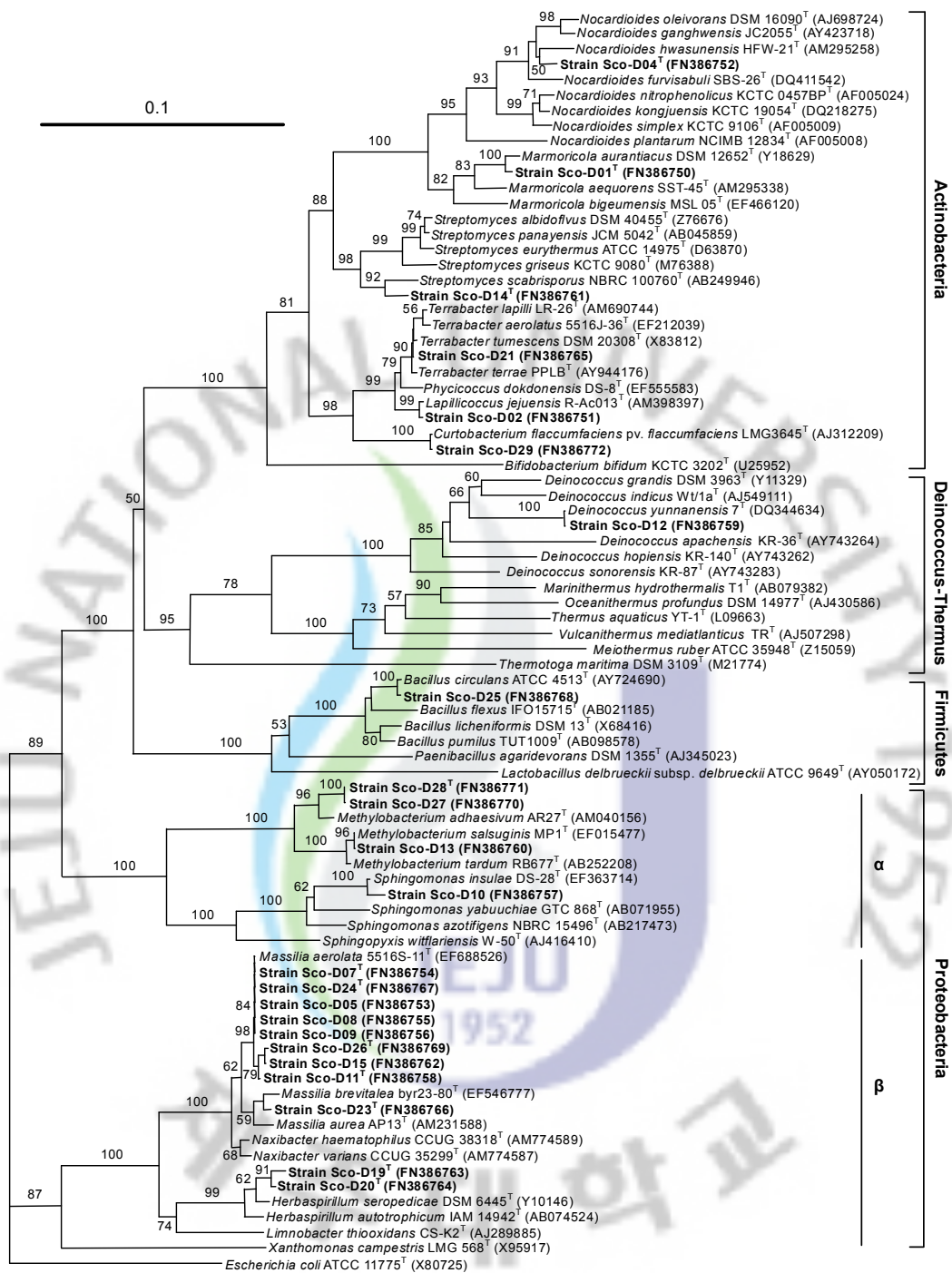
*Deinococcus-Thermus* (phylum)/ *Deinococci* (class)/ *Deinococcales* (order)/ *Deinococcaceae* (family)/ *Deinococcus* (genus)에 속하는 1균주 (D12)는 *D. yunnanensis* 7<sup>T</sup> (DQ344634)과 99.8%의 염기서열 유사도를 보였다(Fig. 15 & Table 13).

이상 황갈색 (yellow brown) *Jejuscoria*에서 동정된 총 30개의 균주 중 16균주 (53.3%)는 *β-Proteobacteria* 계통군에 속하였으며, 8균주 (26.7%)는 *Actinobacteria* 계통군, 4균주 (13.3%)는 *α-proteobacteria* 계통군, 1균주 (3.3%)는 각각 *Bacilli*와 *Deinococci* 계통군에 속하는 것으로 확인 되었다. 또한, 8개의 목(order) 및 아목(suborder), 9개의 과(family)와 11개의 속(genus)들을 나타냈다. 관련된 종들과 16S rRNA 유전자 염기서열 비교를 통한 계통분석을 통해서 30균주 중에서 9균주가 새로운 종 (species)으로 보고될 가능성 있다고 판단되어 진다. 다른 시료 보다 yellow을 띠고 있는 colony 들을 많이 확인 할 수 있었다. 염기서열 분석결과 *Massilia* (genus)에 속하는 균주들이 많은 것을 알 수 있었다. 그래서 다른 시료보다 *Proteobacteria*에 속하는 균주들의 비율이 높게 나타났다.



**Table 13.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* D (yellow brown colored) strains

No. of Isolate	Taxonomic affiliation	Closest relative species	Sequence similarity	Rep-Group
D21	<i>Actinobacteria</i>	<i>Terrabacter tumescens</i>	99.3%	8
D02		<i>Lapillicoccus jejuensis</i>	99.2%	35
D03		<i>Lapillicoccus jejuensis</i>	-	35
D29		<i>Cutobacterium flaccumfaciens</i>	99.6%	11
D01		<i>Marmoricola aurantiacus</i>	98.7%	16
D06		<i>Marmoricola aurantiacus</i>	-	47
D04		<i>Nocardioides oleivorans</i>	98.4%	67
D14		<i>Streptomyces scabrissporus</i>	95.9%	19
D25	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus circulans</i>	100%	41
D27	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	98.9%	55
D28		<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	98.9%	65
D13		<i>Methylobacterium salsuginis</i>	99.9%	64
D10		<i>Shingomonas insulae</i>	99.7%	2
D19	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	97.4%	70
D20		<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	97.4%	39
D05		<i>Massilia aerolata</i>	99.5%	12
D07		<i>Massilia aerolata</i>	99.4%	42
D08		<i>Massilia aerolata</i>	99.4%	12
D09		<i>Massilia aerolata</i>	99.2%	54
D11		<i>Massilia aerolata</i>	99.1%	69
D15		<i>Massilia aerolata</i>	99.2%	60
D16		<i>Massilia aerolata</i>	-	60
D17		<i>Massilia aerolata</i>	-	60
D18		<i>Massilia aerolata</i>	-	60
D22		<i>Massilia aerolata</i>	-	49
D23		<i>Massilia aerolata</i>	97.6%	49
D24		<i>Massilia aerolata</i>	99.5%	60
D26		<i>Massilia aerolata</i>	97.7%	52
D30		<i>Massilia aerolata</i>	-	60
D12	<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcus yunnanensis</i>	99.8%	74
Total	4	15		



**Fig. 15.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-D (yellow brown Jejuscoria) bacteria. Numbers on branch nodes are bootstrap values expressed as percentages (1000 resamplings). Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.

### 3.5. Jejuscoria E (black colored) 내 세균군집의 계통학적 특성

검정색 (black colored) Jejuscoria에서 분리한 7개의 균주들 중에서 대표 균주들은 염기서열 분석한 결과 *Actinobacteria*와 *Proteobacteria*의 2개의 문 (phylum)이 확인되었다. *Proteobacteria*에는  $\alpha$ -*Proteobacteria*와  $\beta$ -*Proteobacteria* 2개의 강(class)을 보였다.

*Actinobacteria* (phylum)/ *Actinobacteria* (class)에는 *Actinomycetales* (order)/ *Propionibacterineae*/ *Nocardioidaceae* (family)/ *Nocardioides* (genus)에 1균주 (E06)가 분리 되었고 *N. exalbidus* RC825<sup>T</sup> (AB273624)와 99.7%의 유사도를 보였다. *Rubrobacteridae* (subclass)/ *Solirubrobacterales* (order)/ *Patulibacteraceae* (family)/ *Patulibacter* (genus)에 속하는 1균주 (E07)가 분리 되었고 *P. minatonensis* KV-614<sup>T</sup> (AB193261)와 99.7%의 유사도를 보였다.

$\alpha$ -*Proteobacteria* (class)에는 *Caulobacterales* (order)/ *Caulobacteraceae* (family)/ *Brevundimonas* (genus)에 속하는 1균주 (E03)와 *Caulobacter* (genus)에 속하는 1균주 (E02)가 분리되었다. E03은 *B. nasdae* GTC 1043<sup>T</sup> (AB071954)와 99.9%, E07은 *C. henricii* ATCC 15253<sup>T</sup> (AJ227758)과 99.4%의 유사도를 나타내었다. *Rhizobiales* (order)/ *Rhizobiaceae* (family)/ *Rhizobium* (genus)에 1균주 (E01)는 *R. loti* R8CS<sup>T</sup> (U50164)와 99.6%의 유사도를, *Sphingomonadales* (order)/ *Sphingomonadaceae* (family)/ *Sphingomonas* (genus)에 속하는 1균주 (E04)는 *S. yabunuchia* GTC 868<sup>T</sup> (AB071955)와 99.1%의 유사도를 보였다.

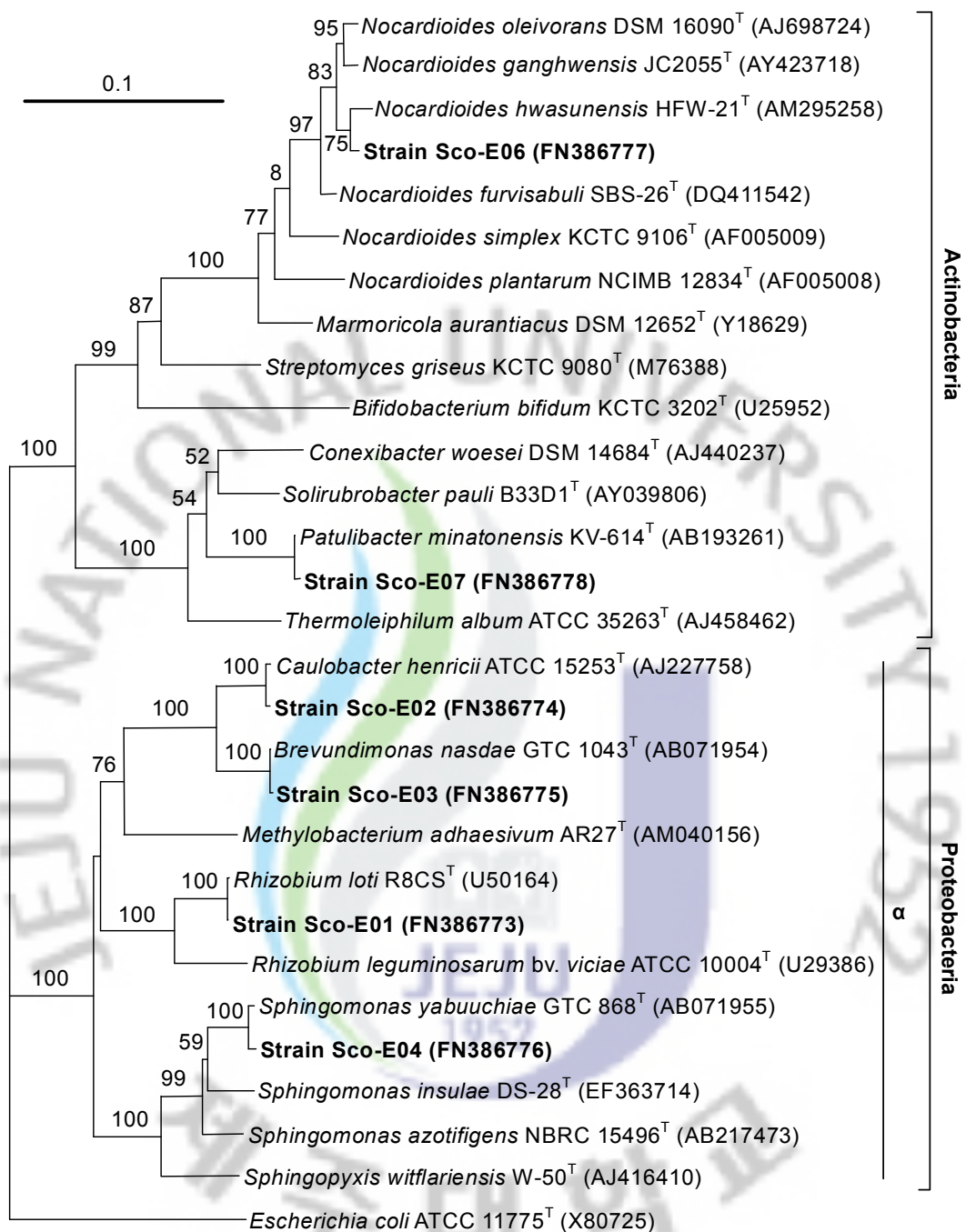
$\beta$ -*Proteobacteria* (class)/ *Burkholderiales* (order)/ *Oxalobacteraceae* (family)/ *Massilia* (genus)에 속하는 E05 균주가 분리 되었다. 이 균주는 70.1%의 Rep-PCR band pattern 유사도를 바탕으로 D07과 동일한 종 (species)으로 판단되었다(Fig 16 & Table 14).

이상 검정색 (black) Jejuscoria에서 동정된 총 7개의 균주 중 4균주 (57.1%)가  $\alpha$ -*Proteobacteria* 계통군에 속하였으며, 2균주 (28.6%)는 *Actinobacteria* 계통군, 1균주 (14.3%)는  $\beta$ -*Proteobacteria* 계통군에 속하는 것으로 확인 되었다. 또한, 6개의 목(order) 및 아목 (suborder), 6개의 과 (family)와 7개의 속(genus)들을 나타냈다.

**Table 14.** The phylogenetic relatives of *Jejuscoria* E (black colored) strains

No. of Isolate	Taxonomic affiliation	Closest relative species	Sequence similarity	Rep-Group
E06	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardioides exalbidus</i>	99.7%	43
E07		<i>Patulibacter minatonensis</i>	99.7%	10
E03	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Brevundimonas nasdae</i>	99.9%	32
E02		<i>Caulobacter henricii</i>	99.4%	18
E01		<i>Rhizobium loti</i>	99.6%	45
E04		<i>Sphingomonas yabuunchiae</i>	99.1%	75
E05	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Massilia aerolata</i>	-	42
Total	3	7		





**Fig. 16.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Sco-E (black Jejuscoria) bacteria. Numbers on branch nodes are bootstrap values expressed as percentages (1000 resamplings). Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.



#### 4. Jejuscoria bacteria의 군집분석

다량취 지역 Scoria에서 분리된 100균주의 배양 가능한 세균의 Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과 *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Deinococci*,  $\alpha$ -,  $\beta$ -과  $\gamma$ -*Proteobacteria*의 6개 계통군이 확인되었다. 58%는 *Actinobacteria*로 우점을 이루는 것으로 확인되었으며 20%는  $\beta$ -*Proteobacteria*로 확인되었고 14%는  $\alpha$ -*Proteobacteria*, 4%는 *Bacilli*, 3%는  $\gamma$ -*Proteobacteria* 그리고 1%는 *Deinococci*에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 21). 계통분석 결과 14개의 목 (order) 및 아목 (sub-order), 17개의 과 (family) 그리고 30개의 속 (genus)으로 구성되었다. 많이 분리된 속 (genus)은 *Arthrobacter* (18균주), *Massilia* (16균주), *Streptomyces* (14균주) 그리고 *Nocardioidea* (9균주) 순으로 나타났다(Table 15). 시료별로 보면, A (red)시료는 cream 색상을 갖는 *Arthrobacter*가, B (brown)시료는 yellow 색상을 갖는 *Nocardioidea*와 군사생성 방선균인 *Streptomyces*가 많이 분포하여서 *Actinobacteria* 분류군이 70% 이상 분리되었다. 반면, D (yellow-brown)시료는 yellow 혹은 orange 색상을 띠는 *Massilia* 균주들이 많이 분포하여서 *Proteobacteria* 분류군이 60% 이상 나타났다. C (reddish-brown)와 E (black)시료는 분리균주가 많지 않지만 각 그룹별로 골고루 분포하고 있었다.

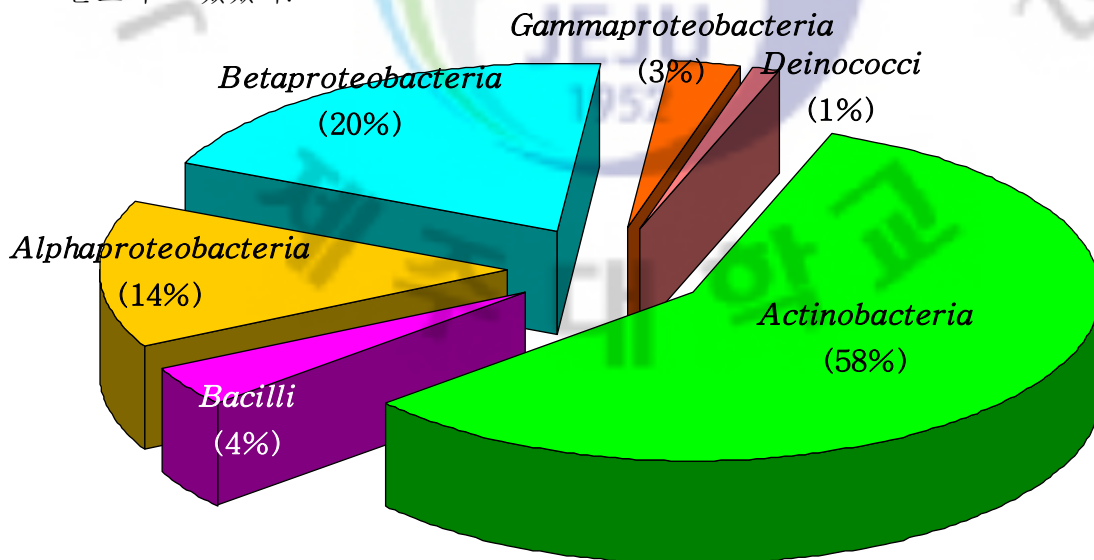


Fig. 17. Biodiversity and structure of bacterial community of Jejuscoria



Table 15. Category of *Jeuscoria* strains according to taxonomic hierarchy

Taxonomic affiliation	Order or suborder	Family	Genus	A	B	C	D	E	No.	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>		2				2	
		<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	1					1	
			<i>Rhodococcus</i>				1			1
	<i>Micrococccineae</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>		<i>Terrabacter</i>	1			1		2
				<i>Lapillicoccus</i>				2		2
		<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	15	2	1				18
		<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Cutobacterium</i>					1		1
			<i>Microbacterium</i>			1				1
		<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Phycococcus</i>		1					1
		<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Catellatospora</i>		1				1
	<i>Propionibacterineae</i>	<i>Nocardioidaceae</i>		<i>Marmoricola</i>	1		1	2		4
				<i>Nocardioides</i>	2	5		1	1	9
	<i>Rubrobacterineae</i>	<i>Patulibacteraceae</i>	<i>Patulibacter</i>						1	1
	<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	3	10		1			14
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	2			1		3	
		<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	1					1	
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>					1	1	
			<i>Caulobacter</i>					1	1	
	<i>Rhizobiales</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	2		1	3		6	
			<i>Rhizobium</i>					1	1	
			<i>Sinorhizobium</i>			1			1	
	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	1			1	1	3	
<i>Sphingopyxis</i>				1				1		
$\beta$ -Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Burkholderia</i>	1					1	
			<i>Herbaspirillum</i>	1			2		3	
			<i>Massilia</i>	1			14	1	16	
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>		1				1	
		<i>Moraxellaceae</i>	<i>Enhydrobacter</i>			1			1	
	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>		1				1	
<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcales</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>				1		1	
6	14	21	30	32	25	6	30	7	100	

A, red; B, brown; C, reddish-brown; D, yellow brown; E, black scoria

## 5. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 Rep-PCR 분석의 고찰

16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 Rep-group의 결과를 검토해 본 결과 일치하는 부분도 있었지만 다르게 group된 부분이 상당 수 존재하였다. 이것은 실험적인 오차도 있을 수 있겠지만 본래 Rep-PCR이 갖고 있는 문제점으로 인해 나타난 부분이 많다고 본다. 왜냐하면, Rep-PCR은 높은 재현성과 식별력에는 불구하고 specific target sequence만 증폭하기 위한 것이 아니라 실험에서 사용한 BOX A1R 같은 universal primer를 이용하여 다양한 band를 증폭하는 것이므로 기존의 다른 PCR에 비해 PCR condition의 영향을 많이 받으며 amplify error의 위험도 높다. 또한, 동일한 조건이 달라지면 pattern이 나타나지 않거나 변할 수 있다. 따라서 그 자체만으로는 상대적인 비교만 가능 하고 단독으로 종 (species) 이나 균주 (strain)의 동정이 불가능하므로 16S rRNA 유전자 염기서열과 같은 또 다른 정보가 있어야 할 것이다. 한편, 다양한 시료로부터 분리한 많은 수의 bacteria에서 Rep-PCR band pattern의 DB가 구축 되면 보다 효율적이고 신속하게 bacteria의 유전적 다양성을 파악할 수 있을 것이다.

## 6. 생리활성 물질 탐색 결과

Chitin을 분해하는 균주는 총 100균주 중에 18균주로 나타났다. 억제환의 크기는 1cm 미만이 8균주, 1cm 이상 2cm 미만이 5균주 그리고 2cm 이상인 균주가 5균주로 확인되었다(Table 16-20). 대부분이 균사를 생성하는 *Streptomyces*이고 *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*와 *Lapillicoccus*의 종들도 포함되었다. 특히, 새로운 신종으로 보고될 가능성이 있는 *Nocardioides*에 속하는 균주 중 3균주가 분해능을 나타내었다(Table 17).

감귤저장 중 부패를 발생시키는 푸른곰팡이 (*Penicillium italicum*)에 대한 항진균활성은 3균주가 억제환을 나타내었다(Table 16-20). *Paenibacillus*에 속하는 1균주와 *Streptomyces*에 속하는 1균주가 2cm 이상의 억제환을 나타내었다. 실제 적용해 보기 위해서는 이 등, (2004)에서 기술된 것처럼 대량배양하여 액상으로 저장 중 감귤에 살포하여 그 효율을 검증할 수 있을 것이다.

**Table 16.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from red Jejuscoria

No.	Strain No.	Taxonomic affiliation	Bacterial name	Chitin degradation	Anti-fungal activity
1	Sco-A01	Ac	<i>Arthrobacter globiformis</i>	-	-
2	Sco-A02	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
3	Sco-A03	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
4	Sco-A04	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
5	Sco-A05	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
6	Sco-A06	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
7	Sco-A07	Ac	<i>Arthrobacter defluvi</i>	-	-
8	Sco-A08	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	-	-
9	Sco-A09	Alpha	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	-	-
10	Sco-A10	Alpha	<i>Methylobacterium tardum</i>	-	-
11	Sco-A11	Bac	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-
12	Sco-A12	Bac	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
13	Sco-A15	Ac	<i>Terrabacter tumescens</i>	-	-
14	Sco-A16	Bac	<i>Paenibacillus jamilae</i>	-	+++
15	Sco-A17	Ac	<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	-	-
16	Sco-A18	Ac	<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	-	-
17	Sco-A19	Ac	<i>Arthrobacter defluvi</i>	-	-
18	Sco-A20	Ac	<i>Arthrobacter ramosus</i>	-	-
19	Sco-A21	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
20	Sco-A22	Ac	<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	-	-
21	Sco-A23	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
22	Sco-A24	Beta	<i>Candiatus Burkholderia verschuerenii</i>	-	-
23	Sco-A25	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	-	-
24	Sco-A26	Beta	<i>Massilia aetniterrae</i> sp. nov.	-	-
25	Sco-A27	Alpha	<i>Methylobacterium tardum</i>	-	-
26	Sco-A28	Ac	<i>Nocardia</i> sp. nov.	-	-
27	Sco-A29	Ac	<i>Streptomyces cinerochromogense</i>	-	-
28	Sco-A30	Ac	<i>Streptomyces capoamus</i>	+	+++
29	Sco-A31	Ac	<i>Streptomyces panayensis</i>	-	-
30	Sco-A34	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
31	Sco-A35	Beta	<i>Herbaspirillum</i> sp. nov.	-	-
32	Sco-A36	Ac	<i>Marmoricola korecus</i> sp. nov.	-	-

Ac, Actinobacteria; Alpha,  $\alpha$ -Proteobacteria; Beta,  $\beta$ -Proteobacteria; Bac, Bacilli

size of inhibitory zone or clear zone: 0-1cm, +; 1-2cm, ++; >2cm, +++

**Table 17.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from brown Jejuscoria

No.	Strain No.	Taxonomic affiliation	Bacterial name	Chitin degradation	Anti-fungal activity
1	Sco-B01	Ac	<i>Streptomyces vinaceus</i>	+	-
2	Sco-B02	Ac	<i>Streptomyces vinaceus</i>	+	-
3	Sco-B03	Ac	<i>Streptomyces vinaceus</i>	++	-
4	Sco-B04	Ac	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	++	-
5	Sco-B05	Ac	<i>Streptomyces griseus</i>	++	-
6	Sco-B06	Ac	<i>Arthrobacter defluvi</i>	-	-
7	Sco-B07	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	-	-
8	Sco-B08	Ac	<i>Mycobacterium</i> sp. nov.	-	-
9	Sco-B09	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	+	-
10	Sco-B10	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	-	-
11	Sco-B11	Ac	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	-	-
12	Sco-B12	Alpha	<i>Sphingopyxis</i> sp. nov.	-	-
13	Sco-B13	Ac	<i>Streptomyces vinaceus</i>	+	-
14	Sco-B14	Ac	<i>Allocatelli globisporascoriae</i> gen. nov.	-	-
15	Sco-B15	Ac	<i>Streptomyces</i> sp. nov.	-	-
16	Sco-B16	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
17	Sco-B17	Gamma	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	++	-
18	Sco-B18	Gamma	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+++	-
19	Sco-B19	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	+++	-
20	Sco-B20	Ac	<i>Streptomyces griseus</i>	+++	-
21	Sco-B21	Ac	<i>Mycobacterium</i> sp. nov.	-	-
22	Sco-B22	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	++	-
23	Sco-B23	Ac	<i>Phycoccus</i> sp. nov.	-	-
24	Sco-B24	Ac	<i>Streptomyces</i> sp. nov.	+	-
25	Sco-B25	Ac	<i>Streptomyces vinaceus</i>	+	-

Ac, Actinobacteria; Alpha,  $\alpha$ -Proteobacteria; Gamma,  $\gamma$ -Proteobacteria  
size of inhibitory zone or clear zone: 0-1cm, +; 1-2cm, ++; >2cm, +++

**Table 18.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from reddish-brown *Jejuscoria*

No.	Strain No.	Taxonomic affiliation	Bacterial name	Chitin degradation	Anti-fungal activity
1	Sco-C01	Ac	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	-	+
2	Sco-C02	Alpha	<i>Sinorhizobium</i> sp. nov.	-	-
3	Sco-C03	Gamma	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	-	-
4	Sco-C04	Ac	<i>Arthrobacter oryzae</i>	-	-
5	Sco-C05	Ac	<i>Marmoricola korecus</i> sp. nov.	-	-
6	Sco-C06	Alpha	<i>Methylobacterium salsuginis</i>	-	-

Ac, Actinobacteria; Alpha,  $\alpha$ -Proteobacteria; Beta, Gamma,  $\gamma$ -Proteobacteria  
 size of inhibitory zone or clear zone: 0-1cm, +; 1-2cm, ++; >2cm, +++



**Table 19.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from yellow brown *Jejuscoria*

No.	Strain No.	Taxonomic affiliation	Bacterial name	Chitin degradation	Anti-fungal activity
1	Sco-D01	Ac	<i>Marmoricola scoriae</i> sp. nov.	-	-
2	Sco-D02	Ac	<i>Lapillicoccus jejuensis</i>	-	-
3	Sco-D03	Ac	<i>Lapillicoccus jejuensis</i>	+++	-
4	Sco-D04	Ac	<i>Nocardioides</i> sp. nov.	-	-
5	Sco-D05	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
6	Sco-D06	Ac	<i>Marmoricola korecus</i> sp. nov.	-	-
7	Sco-D07	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
8	Sco-D08	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
9	Sco-D09	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
10	Sco-D10	Alpha	<i>Shingomonas insulae</i>	-	-
11	Sco-D11	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
12	Sco-D12	Dei	<i>Deinococcus yunnanensis</i>	-	-
13	Sco-D13	Alpha	<i>Methylobacterium salsuginis</i>	-	-
14	Sco-D14	Ac	<i>Streptomyces</i> sp. nov.	-	-
15	Sco-D15	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
16	Sco-D16	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
17	Sco-D17	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
18	Sco-D18	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	+	-
19	Sco-D19	Beta	<i>Herbaspirillum scoriae</i> sp. nov.	-	-
20	Sco-D20	Beta	<i>Herbaspirillum scoriae</i> sp. nov.	-	-
21	Sco-D21	Ac	<i>Terrabacter tumescens</i>	-	-
22	Sco-D22	Beta	<i>Massilia scoriae</i> sp. nov.	-	-
23	Sco-D23	Beta	<i>Massilia scoriae</i> sp. nov.	-	-
24	Sco-D24	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-
25	Sco-D25	Bac	<i>Bacillus circulans</i>	-	-
26	Sco-D26	Beta	<i>Massilia</i> sp. nov.	-	-
27	Sco-D27	Alpha	<i>Methylobacterium</i> sp. nov.	-	-
28	Sco-D28	Alpha	<i>Methylobacterium</i> sp. nov.	-	-
29	Sco-D29	Ac	<i>Cutobacterium flaccumfaciens</i>	-	-
30	Sco-D30	Beta	<i>Massilia aerolata</i>	-	-

Ac, *Actinobacteria*; Alpha,  $\alpha$ -*Proteobacteria*; Beta,  $\beta$ -*Proteobacteria*; Bac, *Bacilli*; Dei, *Deinococcus*  
size of inhibitory zone or clear zone: 0-1cm, +; 1-2cm, ++; >2cm, +++

**Table 20.** Screening for bioactive compounds of bacteria isolated from black Jejuscoria

No.	Strain No.	Taxonomic affiliation	Bacterial name	Chitin degradation	Anti-fungal activity
1	Sco-E01	Alpha	<i>Rhizobium loti</i>	-	-
2	Sco-E02	Alpha	<i>Caulobacter henricii</i>	-	-
3	Sco-E03	Alpha	<i>Brevundimonas nasdae</i>	-	-
4	Sco-E04	Alpha	<i>Sphingomonas yabuunchiae</i>	-	-
5	Sco-E05	Beta	<i>Massilia</i> sp. nov.	+++	-
6	Sco-E06	Ac	<i>Nocardioides exalbidus</i>	-	-
7	Sco-E07	Ac	<i>Patulibacter minatonensis</i>	-	-

Ac, Actinobacteria; Alpha,  $\alpha$ -Proteobacteria; Beta,  $\beta$ -Proteobacteria  
 size of inhibitory zone or clear zone: 0-1cm, +; 1-2cm, ++; >2cm, +++

## 7. *Marmoricola* 속 신종의 다상적 분류

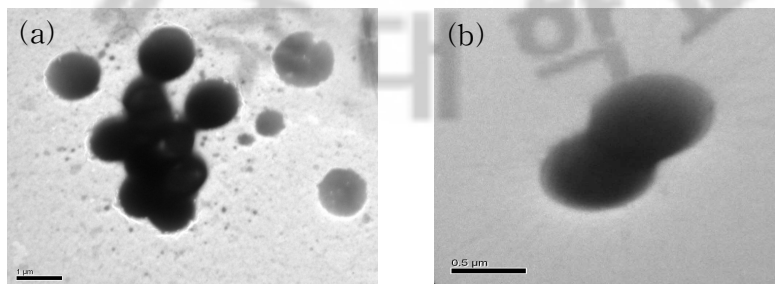
### 7.1. 표현형적 특성

#### 7.1.1. 표준균주

현재까지 보고된 *Marmoricola*의 표준 균주들은 3종이다. 생리·생화학 분석 및 지방산 분석을 위해서 *M. aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>은 JCM (Japan Collection of Microorganisms), *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup>는 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), *M. bigeumensis* KCTC 19287<sup>T</sup>은 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 각각 분양받았다. 표준균주들 재생을 위해서 R2A agar (Difco)와 ISP 2 medium에서 30 °C, 3일간 배양하였다.

#### 7.1.2. 형태 및 배양상 특성

Sco-A36<sup>T</sup>과 Sco-D01<sup>T</sup>는 그람 양성, oxidase-음성, catalase-양성 및 운동성이 없는 구균 (coccus)이었다. TEM을 이용한 관찰 결과 Sco-A36<sup>T</sup>의 크기는 직경이 1.1-1.2  $\mu\text{m}$ 이고 Sco-D01<sup>T</sup>은 0.6-1.0  $\mu\text{m}$ 이었다(Fig. 18). ISP 2 medium에서 30 °C, 5일 배양 후 관찰 결과 colony는 vivid-yellow 색상을 띠며, 가운데가 볼록하고 (convex), 가장자리가 둥그런 원형 (circular) 이루고 있었다. Colony의 크기는 0.1-0.2mm이었다.



**Fig. 18.** Transmission electron microscopy of *Marmoricola* isolates. (a) strain Sco-A36<sup>T</sup>; (b) strain Sco-D01<sup>T</sup>. Bar, 1  $\mu\text{m}$  and 0.5  $\mu\text{m}$ , respectively.

### 7.1.3. 생리 및 생화학적 특성

Sco-A36<sup>T</sup>의 생장온도는 4-37 °C이고 생장 pH는 pH 6.1-12.1이며 30 °C와 pH 6.1-10.1에서 최적 생장을 보였다. 2% (w/v)의 염분 농도까지 성장하였다. Casein과 esculin은 가수분해 하였고 DNA, starch, xanthine, tyrosine, hypoxanthine과 CM-cellulose는 분해실험에서 음성 반응을 보였다. API ZYM strips으로 분석한 효소 이용 실험에서는 alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase와  $\beta$ -glucosidase에 대해서는 강한 활성을 나타내었으며 cystein arylamidase와 trypsin은 약한 활성을 나타내었다. 반면, esterase (C4), lipase (C14),  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase 그리고  $\alpha$ -fucosidase는 음성 반응을 나타내었다. API 20E strip을 이용한 효소 이용능 및 탄소원 이용 실험에서는 voges-proskauer reaction 그리고 gelatinase는 양성 반응을 보였으나  $\beta$ -galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H<sub>2</sub>S production, urease, tryptophane deaminase, indole production, nitrate reduction 그리고 utilization of glucose, mannose, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin 혹은 arabinose는 음성 반응을 보였다.

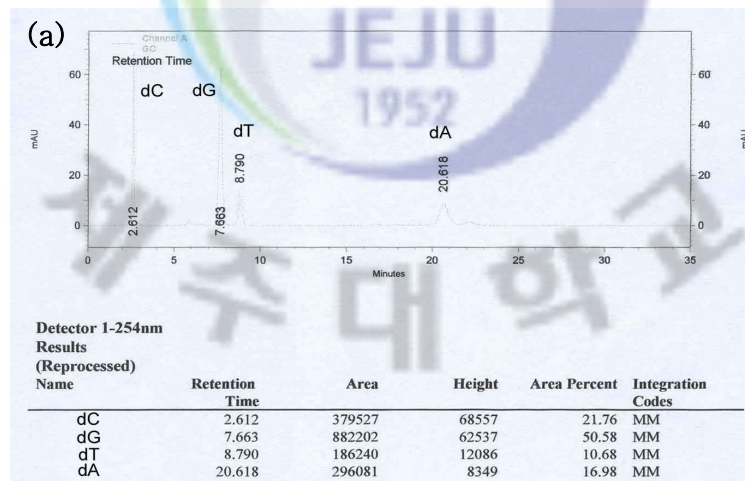
Sco-D01<sup>T</sup>의 생장온도는 10-37 °C이고 생장 pH는 pH 5.1-12.1이며 30°C와 pH 8.1-11.1에서 최적 생장을 보였다. 3% (w/v)의 염분 농도까지 성장하였다. DNA, casein 그리고 esculin은 가수분해 하였고 starch, xanthine, tyrosine, hypoxanthine 그리고 CM-cellulose는 분해실험에서 음성 반응을 보였다. API ZYM strips으로 분석한 효소 이용 실험에서는 alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase와  $\beta$ -glucosidase에 대해서는 강한 활성을 나타내었으며 cystein arylamidase와 trypsin은 약한 활성을 나타내었다. 반면, esterase (C4), lipase (C14),  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase

그리고  $\alpha$ -fucosidase는 음성 반응을 나타내었다. API 20E strip을 이용한 효소 이용능 및 탄소원 이용 실험에서는  $\beta$ -galactosidase, voges-proskauer reaction 그리고 gelatinase는 양성 반응을 보였으나 arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H<sub>2</sub>S production, urease, tryptophane deaminase, indole production, nitrate reduction 그리고 utilization of glucose, mannose, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin과 arabinose 는 음성 반응을 보였다. 나머지 생리·생화학 특징들은 Table 22에 나타내었다.

## 7.2. 화학 분류적 특성

### 7.2.1. G+C 함량

Sco-A36<sup>T</sup>은 71.0 mol%, Sco-D01<sup>T</sup>은 72.0 mol%의 DNA G+C 함량을 보였다 (Fig. 19). *Marmoricola* 표준 균주들은 72.0–72.9 mol% 범위의 G+C 함량이 보고되었다(Urzi *et al.*, 2000; Lee, 2007; Dastager *et al.*, 2008). 따라서 같은 속의 종들로 간주되어 진다(Mesbah *et al.*, 1989).





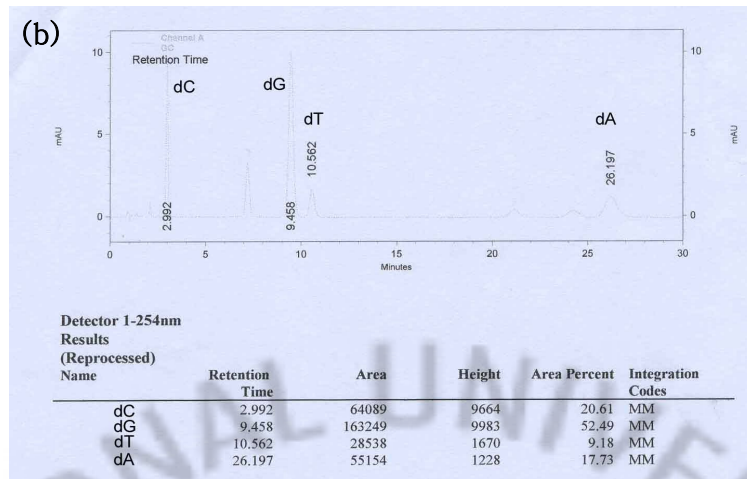
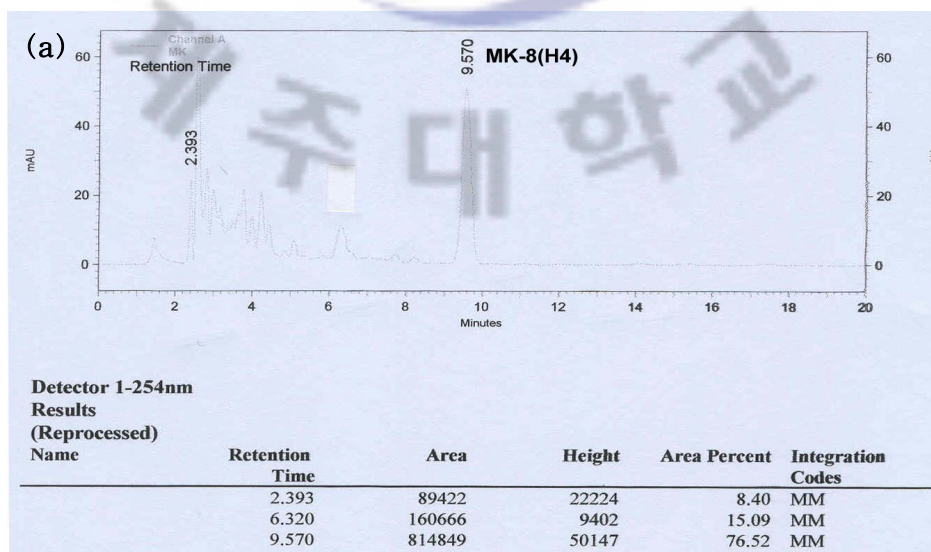


Fig. 19. G+C contents of genomic DNA of strains Sco-A36<sup>T</sup>(a) and Sco-D01<sup>T</sup>(b)

### 7.2.2. Menaquinone

*Propionibacterineae* (suborder)/ *Nacardioidace* (family)의 *Marmoricola* 속에 소속된 표준종(species)들의 주된 menaquinone의 주성분은 MK-8(H<sub>4</sub>)이다(Urzi *et al.*, 2000; Lee, 2007; Dastager *et al.*, 2008). 이번 연구에서 분리된 *Marmoricola* 속의 분리주들, Sco-A36<sup>T</sup> 과 Sco-D01<sup>T</sup>도 표준종들과 동일한 menaquinone profile을 보여주었다(Fig. 20). 분리주들의 peak 동정을 위해 대조군으로 *Marmoricola aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>을 사용하였다.





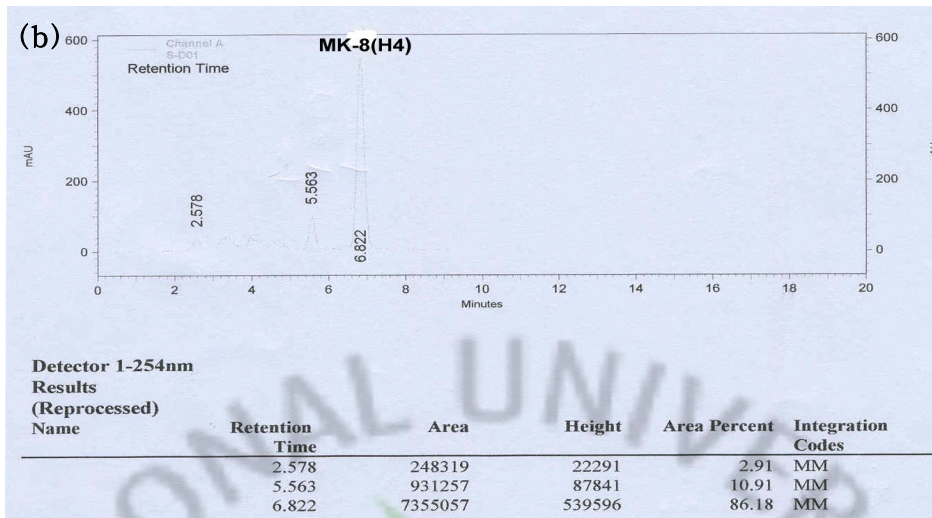


Fig. 20. Menaquinone profile of strains Sco-A36<sup>T</sup>(a) and Sco-D01<sup>T</sup>(b) by HPLC

### 7.2.3. Polar lipid

표준부품 (standard)과 함께 TLC 분석 결과 Sco-A36<sup>T</sup>과 Sco-D01<sup>T</sup> 균주들의 추출물에는 diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine 그리고 한 개의 unknown phospholipid가 존재 하였다(Fig. 21).

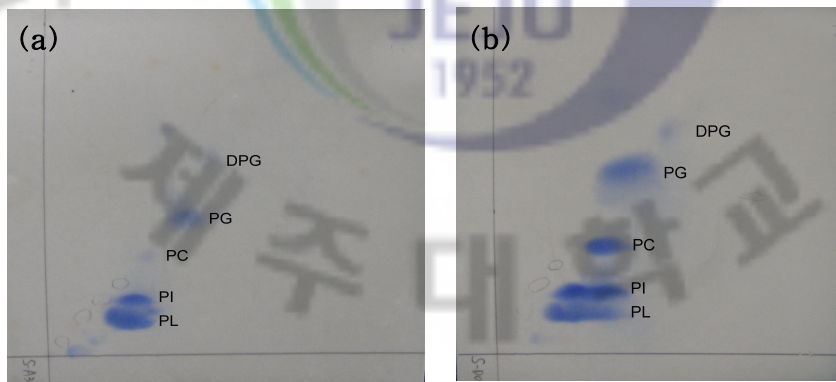


Fig. 21. Polar lipids profile of strains Sco-A36<sup>T</sup>(a) and Sco-D01<sup>T</sup>(b) by TLC. DPG, diphosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PL, unknown phospholipid.

#### 7.2.4. Fatty acid

지방산 분석을 위해 Sco-A36<sup>T</sup>과 Sco-D01<sup>T</sup>은 표준 균주인 *M. aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>, *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup> 그리고 *M. bigeumensis* KCTC 19287<sup>T</sup>와 함께 R2A agar (Difco)에서 30 °C, 5일간 배양하였다. Sco-A36<sup>T</sup>의 지방산 주성분은 C<sub>16:0</sub> (18.1%), C<sub>17:1ω8c</sub> (13.6%), C<sub>18:1ω9c</sub> (12.0%) 그리고 C<sub>16:1ω7c</sub> and/or i-C<sub>15:0</sub>2-OH (10.3%)인 반면, Sco-D01<sup>T</sup>은 C<sub>16:0</sub> (27.7%), C<sub>18:1ω9c</sub> (25.9%) 그리고 10-Methyl C<sub>18:0</sub> (10.2%)이었다. 또한, Sco-A36<sup>T</sup>은 주성분으로 C<sub>17:1ω8c</sub>, Sco-D01<sup>T</sup>은 10-Methyl C<sub>18:0</sub>를 포함하여 다른 표준 종들과 구분된다(Table 21).

**Table 21.** Cellular fatty acid compositions of strains Sco-A36<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup> and the type species *Marmoricola*

Taxa: 1, Strain Sco-A36<sup>T</sup>; 2, Strain Sco-D01<sup>T</sup>; 3, *M. aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>; 4, *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup>; 5, *M. bigeumensis* KCTC 19287<sup>T</sup>. Values less than 1% of total fatty acids are not shown. -, Not detected or not described. Major compositions (>10%) are shown in bold. \*Summed features 4 and 8 contained C<sub>16:1ω7c</sub> and/or i-C<sub>15:0</sub>2-OH and C<sub>19:1ω11c</sub> and/or unknown 18.756, respectively.

Fatty acid	1	2	3	4	5
Saturated fatty acids					
C <sub>12:0</sub>	-	-	2.9	1.0	-
C <sub>14:0</sub>	2.4	-	1.2	1.3	1.2
C <sub>15:0</sub>	8.4	2.1	1.1	1.1	2.1
C <sub>16:0</sub>	<b>18.1</b>	<b>27.7</b>	<b>30.2</b>	<b>37.0</b>	6.8
C <sub>17:0</sub>	7.0	2.0	1.1	-	3.8
C <sub>18:0</sub>	1.5	1.9	2.3	2.1	1.4
Branched fatty acids					
i-C <sub>14:0</sub>	-	-	-	-	4.3
i-C <sub>15:0</sub>	-	-	-	-	5.5
ai-C <sub>15:0</sub>	-	-	-	-	3.3
i-C <sub>16:0</sub>	-	2.5	-	-	<b>27.6</b>
i-C <sub>16:0</sub> 3-OH	-	-	-	-	3.0
i-C <sub>17:0</sub>	-	-	-	-	3.5
ai-C <sub>17:0</sub>	-	-	-	-	5.9
ai-C <sub>19:0</sub>	-	-	6.3	3.3	-
Unsaturated fatty acids					
i-C <sub>16:1</sub> H	-	-	-	-	1.3
i-C <sub>17:1</sub> <i>w</i> 9c	-	-	-	-	1.8
C <sub>17:1</sub> <i>w</i> 8c	<b>13.6</b>	3.6	2.5	2.0	6.9
C <sub>17:1</sub> <i>w</i> 6c	-	1.0	-	-	2.3
C <sub>16:1</sub> 2-OH	-	-	-	-	3.5
ai-C <sub>17:1</sub> <i>w</i> 9c	-	-	-	-	1.0
C <sub>18:1</sub> <i>w</i> 9c	<b>12.0</b>	<b>25.9</b>	<b>26.4</b>	<b>27.0</b>	4.2
C <sub>18:3</sub> <i>w</i> 6c	1.3	-	-	-	-
Hydroxy fatty acids					
C <sub>15:0</sub> 2-OH	1.6	-	-	-	-
C <sub>16:0</sub> 2-OH	7.1	8.0	4.3	4.7	-
C <sub>17:0</sub> 2-OH	3.0	1.1	-	-	-
10-Methyl fatty acids					
C <sub>16:0</sub>	1.3	1.1	1.7	2.0	-
C <sub>17:0</sub>	4.1	1.2	-	-	2.2
C <sub>18:0</sub>	3.4	<b>10.2</b>	7.1	5.4	-
Unknown 9.521	-	-	1.1	-	-
Summed feature*					
4	<b>10.3</b>	6.0	8.2	9.9	2.6
8	-	-	-	-	1.3

**Table 22.** Differential phenotypic properties of strains Sco-A36<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup> and *Marmoricola* species

Taxa: 1, Strain Sco-A36<sup>T</sup>; 2, Strain Sco-D01<sup>T</sup>; 3, *M. aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>(data from Lee, 2007); 4, *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup>(data from Urzì *et al.*, 2000 and this study); 5, *M. bigeumensis* MSL-05<sup>T</sup>(data from Dastager *et al.*, 2008 and this study). All strains are positive aesculin hydrolysis and catalase test, alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase. Negative for oxidase test and urea hydrolysis, lipase (C14),  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase. PI, phosphatidylinositol; DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PL, unknown phospholipid; SF4, C<sub>16:1</sub> $\omega$ 7c and/or i-C<sub>15:0</sub>2-OH; TSBA, tuberculostearic acid; +, Positive; -, negative; w, weakly positive; Nd, not determined.

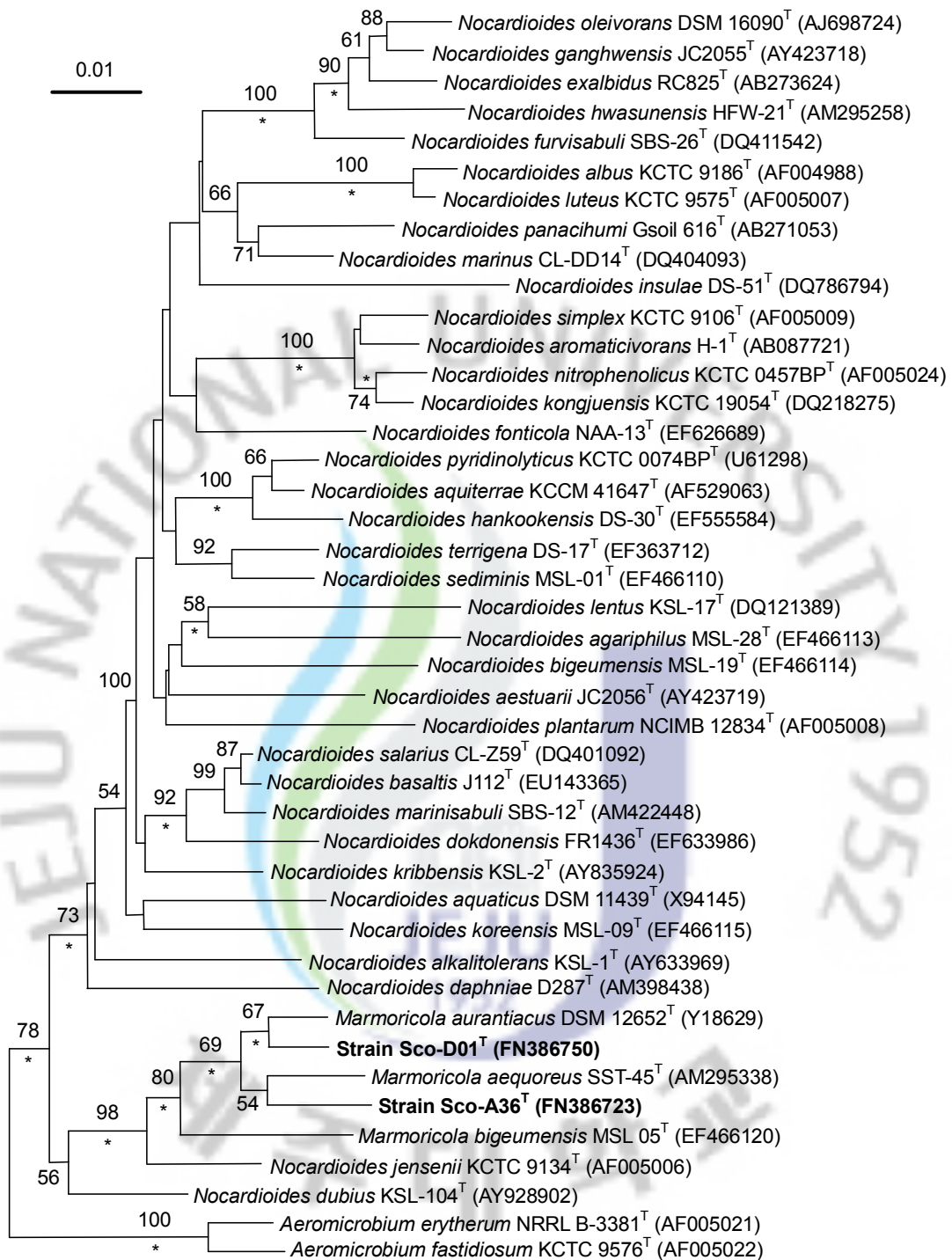
Characteristic	1	2	3	4	5
Colony color	Vivid yellow	Vivid yellow	Yellow	Orange	Lemon yellow
Morphology	Single, pairs or clusters	Single, pairs or clusters	Single, pairs or clusters	Single, pairs or clusters	Single cocci
Motility	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Motile
Temperature range (° C)	4-37	10-37	10-37	18-28	20-37
Growth range for NaCl (%)	0-2.0	0-3.0	0-7.0	0.5-2.0	0-7.0
pH range	5.1-12.1	6.1-12.1	5.1-12.1	5.1-8.7	6.0-12.0
Nitrate reduction	-	-	+	-	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	-	-
β-galactosidase	-	+	+	w	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	+	Nd	-
Degradation of:					
DNA	-	+	Nd	-	-
Starch	-	-	-	-	+
Casein	+	+	+	-	-
Xanthine	-	-	-	-	+
Tyrosine	-	-	-	-	+
Hypoxanthine	-	-	-	+	Nd
Utilization of :					
D-Arabinose	-	+	-	+	-
Dextran	-	-	+	+	+
D-Fructose	-	+	+	+	-
D-Galactose	-	+	+	+	-
D-Glucose	-	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+
D-Melezitose	-	+	+	+	-
D-Raffinose	-	+	-	+	-
L-Rhamnose	-	+	-	+	+
L-Ribose	-	+	+	+	-
Salicin	-	+	-	+	-
Sucrose	-	+	+	+	-
D-Trehalose	-	-	+	+	-
Adonitol	+	-	-	+	-
Glycerol	-	-	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	+	+	+
D-Xylitol	+	-	-	+	+
Acetate	-	+	+	+	+
Citrate	-	+	+	+	-
Malate	-	+	+	+	-
Succinate	+	-	+	+	-
Tartrate	-	-	-	+	-
DNA G+C content (mol%)	71.0	72.0	72.4	72.0	72.9
Polar lipids	DPG, PC, PG, PI, PL	DPG, PC, PG, PI, PL	DPG, PC, PG, PI,	DPG, PG, PI, PL	DPG, PG, PI, PL
Major fatty acids (>10%)	C <sub>16:0</sub> , C <sub>17:1a8c</sub> , C <sub>18:1a9c</sub> , SF4	C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:1a9c</sub> , TSBA	C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:1a9c</sub>	C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:1a9c</sub>	i-C <sub>16:0</sub>
Source of isolation	Volcanic ash	Volcanic ash	Beach sediment	Marble	Agricultural soil

### 7.3. 계통분석

이번 연구에서 결정된 Sco-A36<sup>T</sup>와 Sco-D01<sup>T</sup>의 거의 완전한 16S rRNA 유전자 염기서열 (1425 nt 와 1426 nt)들은 *Marmoricola* 속과 관련된 분류군들의 염기서열과 비교되었다. Neighbor-joining으로 계통수 (tree)를 작성한 결과 분리주들은 *Marmoricola* 속에 독특한 2개의 sublineage를 형성하였다(Fig. 22). 이 결과는 67%와 54%의 bootstrap 값들과 maximum-likelihood와 maximum-parsimony 계통수 (tree)에 의해서 지지 되었다.

**Fig. 22.** 16S rRNA gene sequence tree showing phylogenetic position of strains Sco-A36<sup>T</sup> and Sco-D01<sup>T</sup> with the radiation encompassing representatives of the family *Nocardioideae*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbor-joining method (Saitou and Neil, 1987). The sequence of *Streptomyces griseus* KCTC 9080<sup>T</sup>(M76388) served as the outgroup. Asterisks indicated branches that were also recovered using maximum-likelihood (Fitch, 1971) and maximum-parsimony (Felsenstein, 1981) trees. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) >50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.





#### 7.4. 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도 (%)

Juke and Cantor (1969) 방법을 이용해서 계산된 진화적 거리를 이용하여 염기서열 유사도를 구한 결과 Sco-A36<sup>T</sup>은 *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup>와 98.0%, *M. aequoreus* SST-45<sup>T</sup>와 97.7% 그리고 *M. bigeumensis* MSL 05<sup>T</sup>와 96.6%을 나타냈다(Table 23). 관련된 *Nocardioides* 속의 표준 균주들과는 91.4-95.5%의 분포를 나타내었다. 한편, Sco-D01<sup>T</sup>은 *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup>와 98.6%, Sco-A36<sup>T</sup>와 97.8%, *M. aequoreus* SST-45<sup>T</sup>와 97.6% 그리고 *M. bigeumensis* MSL 05<sup>T</sup>와 95.9%을 나타냈다(Table 23). 관련된 *Nocardioides* 속의 표준 균주들과는 91.6-96.3%의 분포를 나타내었다.

**Table 23.** 16S rRNA gene sequence similarity values of strains Sco-A36<sup>T</sup> and Sco-D01<sup>T</sup> with the phylogenetic neighbors

Closest neighbors	Strain Sco-A36 <sup>T</sup>	Strain Sco-D01 <sup>T</sup>
<i>Marmoricola aurantiacus</i> DSM 12652 <sup>T</sup> (Y18629)	98.0	98.6
<i>Marmoricola aequoreus</i> SST-45 <sup>T</sup> (AM295338)	97.7	97.6
<i>Marmoricola bigeumensis</i> MSL 05 <sup>T</sup> (EF466120)	96.6	95.9
Strain Sco-A36 <sup>T</sup>	100.0	97.8
Strain Sco-D01 <sup>T</sup>	97.8	100.0

#### 7.5. DNA-DNA hybridization

16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 (Fig. 22과 Table 23)를 바탕으로 가장 근접한 종들과 DNA-DNA homology를 측정하였다. Sco-A36<sup>T</sup> 과 *M. aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>는 16.5-25.9%의 값을 갖고 Sco-D01<sup>T</sup>과 *M. aurantiacus* DSM

12652<sup>T</sup>는 30.2-35.4%의 값을 나타내었다(Table 24). 이 값들은 70%보다 낮기 때문에 *Marmoricola* 속의 새로운 종 (species)으로 보고 될 수 있다(Wayne *et al.*, 1987). Sco-D01<sup>T</sup>과 *M. aequoreus* JCM 13812<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup>과 Sco-A36<sup>T</sup>의 homology는 Sco-D01<sup>T</sup>과 *M. aurantiacus* DSM 12652<sup>T</sup>의 염기서열 유사도 보다 낮기 때문에 측정하지 않았다(Table 23).

**Table 24.** DNA-DNA relatedness between strains Sco-A36<sup>T</sup>, Sco-D01<sup>T</sup> and their closest relatives

Closest neighbors	Strain Sco-A36 <sup>T</sup>	Strain Sco-D01 <sup>T</sup>
<i>Marmoricola aurantiacus</i> DSM 12652 <sup>T</sup>	-	30.2-35.4
<i>Marmoricola aequoreus</i> JCM 13812 <sup>T</sup>	16.5-25.9	-

#### 7.6. *Marmoricola* 속의 신종 Sco-A36<sup>T</sup>과 Sco-D01<sup>T</sup>의 기술

Gram-positive하고 coccoid 형태를 갖는 두 개의 새로운 균주들, Sco-A36<sup>T</sup>과 Sco-D01<sup>T</sup>는 제주에 있는 오름 (기생화산)으로부터 수집된 화산재로부터 분리되었다. Cell들은 호기적, oxidase-음성 그리고 catalase-양성이다. Colony들은 매끈하고 가운데가 오목한 원형이며 색상은 yellow 이다. 두 개의 균주들은 모두 세포벽에 특징적인 LL-diaminopimelic acid를 가졌다. Menaquinone의 주성분은 MK-8(H<sub>4</sub>)이고 세포막의 극성 지질은 phosphatidylinositol, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine 그리고 unknown phospholipid를 갖는다. 지방산 profile들은 포화 및 불포화 지방산, 10-methyl 과 hydroxyl을 갖는 지방산들을 포함하였다. DNA G+C 함량은 71.0-72.0mol% 이었다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 새로운 균주들은 *Nocardioidea* 과에 속하였고 *Marmoricola* 속에서 두 개의 독특한 sublineage들을 형성하였다. 분리주와 친족들과의 DNA-DNA homology 값들은

bacteria의 종을 구분하는 70% 보다 훨씬 낮았다. 여기에 기술된 표현형적인 결과와 DNA-DNA 잠종화 실험 결과를 바탕으로 분리주들은 *Marmoricola* 속의 2개의 새로운 종 (species)들로 여겨졌다. 균주 이름은 *Marmoricola korecus* sp. nov. (type strain Sco-A36<sup>T</sup>= KCTC 19596<sup>T</sup>= DSM 22128<sup>T</sup>) 그리고 *Marmoricola scoriae* sp. nov. (type strain Sco-D01<sup>T</sup>= KCTC 19597<sup>T</sup>= DSM 22127<sup>T</sup>) 으로 제안되었다.



## 8. *Micromonosporaceae* 과 새로운 속의 다상적 분류

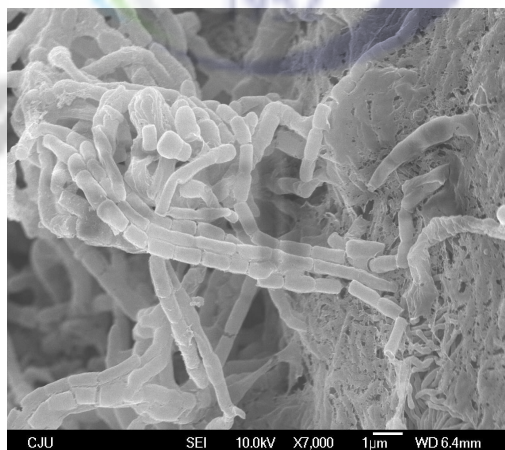
### 8.1. 표현형적 특성 분석

#### 8.1.1. 표준균주

지방산 (fatty acid)을 비롯한 화학적 특성을 비교하기 위해서 *Hamadaea tseunoensis* IMSNU 22005<sup>T</sup>와 *Catelliglobospora koreensis* JCM 10976<sup>T</sup>를 표준균주로 사용하였다.

#### 8.1.2. 형태 및 배양상 특성

Colony는 ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5 medium 그리고 oatmeal-nitrate agar에서 잘 자라고 ISP 6과 ISP 7 medium에서는 약하게 성장하였다. 잘 발달된 기균사 (substrate mycelium) 위에 포자들이 긴 사슬이 단일 혹은 무리를 지어서 나타났다(Fig. 23). 기층 균사들 (aerial mycelia)은 white 색상을 띠어서 ISP 3, ISP 5 그리고 oatmeal-nitrate agar에서 드물게 보였다. Colony의 background 색상은 light-brown에서 brown으로 나타났고 colony 주위로 퍼지는 색소는 ISP 3과 oatmeal-nitrate agar에서만 brown 색상을 나타내었다.



**Fig. 23.** Scanning electron microscopy of strain Sco-B14<sup>T</sup>



### 8.1.3. 온도, pH, NaCl 내성 및 분해능 특성

Sco-B14<sup>T</sup>의 생장온도는 20-30 °C이고 생장 pH는 pH 7.1-8.1이며 0% (w/v)의 염분 농도까지 성장하였다. Starch와 esculin은 가수분해 하였고 DNA, casein, xanthine, tyrosine, hypoxanthine과 CM-cellulose는 분해실험에서 음성 반응을 보였다.

## 8.2. 화학적 특성

### 8.2.1. G+C 함량

Sco-B14<sup>T</sup>은 70.1 mol%의 DNA G+C 함량을 보였다(Fig. 24). 이 값은 관련된 종들의 G+C 함량 (70-72 mol%) 범위에 속하였다(Lee *et al.*, 2000; Lee and Hah, 2002; Ara and Kudo, 2006; Ara *et al.*, 2008a).

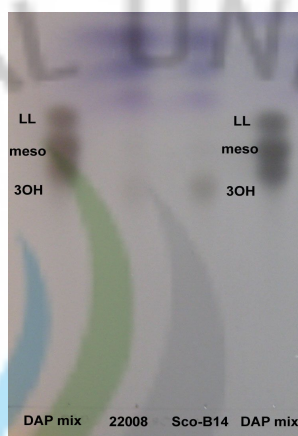


Fig. 24. G+C content of genomic DNA of strain Sco-B14<sup>T</sup>



### 8.2.2. DAP

TLC로 diamino acid 분석한 결과 DAP의 isomer (이성질체)는 3OH-form이었다(Fig. 25). 3OH-form isomer의 동정을 위하여 3OH-form을 갖는 참고균주인 *Catellatospora citrea* IMSNU 22008<sup>T</sup>를 사용하였다(Lee *et al.*, 2000; Ara *et al.*, 2008a).



**Fig. 25.** The isomer of diaminopimelic acid in cell wall of strain Sco-B14<sup>T</sup> by TLC

### 8.2.3. Whole-cell sugar

GC로 분석한 결과 Sco-B14<sup>T</sup>는 특징적인 whole-cell sugar로 glucose, rhamnose, ribose, xylose, arabinose, galactose 그리고 mannose를 포함하였다(Fig. 26). Arabinose와 xylose의 존재는 *Micromonosporaceae* 과에 소속된 표준 종들의 공통된 특성을 나타낸다(Vobis, 1989).

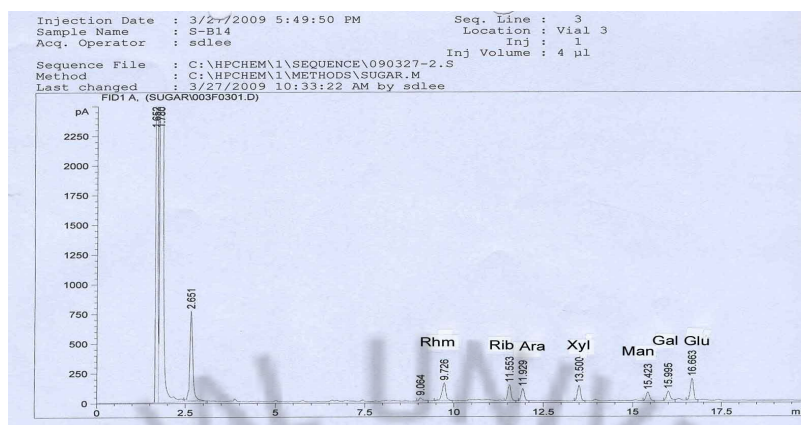


Fig. 26. Characteristic whole-cell sugars of strain Sco-B14<sup>T</sup> by GC

#### 8.2.4. Menaquinone

Menaquinone의 주성분은 MK-10(H<sub>4</sub>)이였고 (49%) minor한 성분으로 MK-9(H<sub>4</sub>), MK-10(H<sub>6</sub>)와 MK-9(H<sub>6</sub>)가 존재하였다(Fig. 27). 그 비율은 24 : 18 : 9로 나타났다. MK-10(H<sub>4</sub>) peak 동정을 위해 *Catelliglobispora koreensis* JCM 10976<sup>T</sup> (Lee *et al.*, 2000; Ara *et al.*, 2008), MK-9(H<sub>4</sub>)와 MK-9(H<sub>6</sub>) 동정을 위해 *Actinomadura spadix* DSM 43459<sup>T</sup> (Goodfellow, 1989) 그리고 MK-10(H<sub>6</sub>)를 위해서는 *Asanoa ferruginea* IFO 14496<sup>T</sup> (Lee and Hah, 2002)을 참고 균주로 사용하였다.

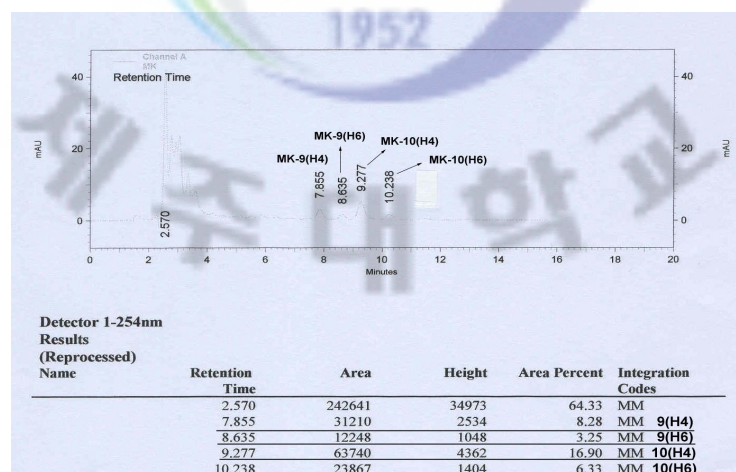
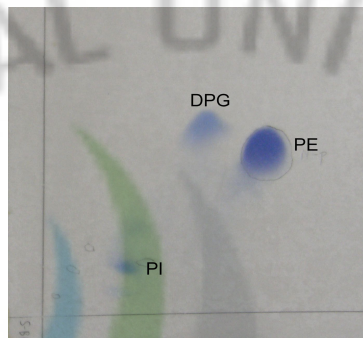


Fig. 27. Menaquinones profile of Sco-B14<sup>T</sup> by HPLC

### 8.2.5. Polar lipid

Polar lipid 성분은 표준부품 (standard)과 함께 분석한 결과 diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine 그리고 phosphatidylinositol을 포함하였다(Fig. 28). 이 성분들은 Lechevalier *et al.* (1981)에 의한 분류에 따라서 PII phospholipid type으로 나타되어진다(Table 26).



**Fig. 28.** Polar lipids profile of strain Sco-B14<sup>T</sup> by TLC. PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine.

### 8.2.6. Fatty acid

지방산 분석을 위해서 Sco-B14<sup>T</sup>는 *Catelliglobospora koreensis* JCM 10976<sup>T</sup>와 *Hamadaea tsunoensis* IMSNU 22005<sup>T</sup> 함께 동일한 조건으로 배양 및 추출 후 분석하였다. Sco-B14<sup>T</sup>의 지방산 주성분은 i-C<sub>15:0</sub> (21.2%) 과 C<sub>17:0</sub> (12.3%)을 갖는다(Table 25). 이 성분들은 Kroppenstedt (1985)의 분류에 따라서 3b type으로 나타내어진다(Table 26).

**Table 25.** Cellular fatty acid compositions of strain Sco-B14<sup>T</sup> and phylogenetic neighbors

Taxa: 1, Strain Sco-B14<sup>T</sup>; 2, *Catelliglobospora koreensis* JCM 10976<sup>T</sup>; 3, *Hamadaea tsunoensis* IMSNU 22005<sup>T</sup>. Values less than 1.0% are not shown. i, iso; ai, anteiso; -, Not detected or not described. Parentheses are from Ara *et al.* (2008a). Main compositions (>10%) are showed in bold. <sup>†</sup> Summed features 3 and 8 contain i-C<sub>15:0</sub>2-OH and/or C<sub>16:1</sub>ω7c and C<sub>19:1</sub>ω11c and/or unknown 18.756, respectively.

Fatty acid	1	2	3
Saturated fatty acids			
C <sub>15:0</sub>	5.5	- ( - )	1.2 (1.0)
C <sub>16:0</sub>	3.1	2.8 (1.2)	3.4 (3.1)
C <sub>17:0</sub>	<b>12.3</b>	1.7 (1.2)	<b>11.3</b> (7.6)
C <sub>18:0</sub>	3.9	6.0 (2.6)	4.6 (2.9)
C <sub>19:0</sub>	3.0	- ( - )	1.0 ( - )
Branched fatty acids			
i-C <sub>14:0</sub>	1.2	4.0 ( <b>10.8</b> )	- ( - )
i-C <sub>15:0</sub>	<b>21.2</b>	7.2 (8.5)	<b>19.9</b> ( <b>29.5</b> )
ai-C <sub>15:0</sub>	6.6	3.3 (3.7)	4.1 (8.8)
i-C <sub>16:0</sub>	7.5	<b>40.1</b> ( <b>44.5</b> )	<b>16.2</b> ( <b>10.4</b> )
ai-C <sub>16:0</sub>	-	- ( - )	1.1 ( - )
i-C <sub>17:0</sub>	2.8	2.2 (1.7)	5.6 (5.4)
ai-C <sub>17:0</sub>	8.4	<b>10.4</b> (6.6)	<b>13.2</b> ( <b>15.6</b> )
i-C <sub>18:0</sub>	-	4.1 (3.0)	1.0 ( - )
Unsaturated fatty acids			
C <sub>16:1</sub> 2-OH	-	3.8 (2.9)	2.9 ( - )
i-C <sub>16:1</sub>	-	- (8.6)	- ( - )
i-C <sub>16:1</sub> H	-	1.9 ( - )	- ( - )
C <sub>17:1</sub> ω6c	-	- ( - )	- (2.7)
C <sub>17:1</sub> ω8c	2.2	1.9 ( - )	1.0 (1.7)
i-C <sub>17:1</sub> ω9c	1.3	- ( - )	- ( - )
ai-C <sub>17:1</sub> ω9c	-	1.0 (1.5)	- ( - )
C <sub>18:1</sub> ω9c	1.0	1.4 ( - )	- ( - )
10-Methyl fatty acids			
C <sub>17:0</sub>	8.2	2.2 ( - )	6.3 (3.6)
C <sub>18:0</sub>	3.2	- ( - )	2.7 (1.5)
C <sub>19:0</sub>	1.8	- ( - )	- ( - )
Summed feature <sup>†</sup>			
3	-	- ( - )	- (2.0)
8	2.1	- ( - )	- ( - )

**Table 26.** Differential characteristics of strain Sco-B14<sup>T</sup> from the other *Micromonosporaceae* genera

Taxa: 1, Sco-B14<sup>T</sup>; 2, *Actinocatenispora* (Thawai *et al.*, 2006); 3, *Actinoplanes* (Vobis, 1989; Stackebrandt and Kroppenstedt, 1987; Horan and Brodsky, 1986; Goodfellow *et al.*, 1990; Tamura and Hatano, 2001); 4, *Asanoa* (Lee and Hah, 2002); 5, *Catellatospora* (Asano *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Ara and Kudo, 2006); 6, *Catelliglosispora* (Lee *et al.*, 2000; Ara *et al.*, 2008a); 7, *Catenuloplanes* (Yokota *et al.*, 1993; Kudo *et al.*, 1999); 8, *Couchioplanes* (Tamura *et al.*, 1994); 9, *Dactylosporangium* (Thiemann and Beretta, 1967; Sharples and Williams, 1974); 10, *Hamadaea* (Asano *et al.*, 1989; Ara *et al.*, 2008a); 11, *Krasilnikovia* (Ara and Kudo, 2007d); 12, *Longispora* (Matsumoto *et al.*, 2003); 13, *Luedemannella* (Ara and Kudo, 2007a); 14, *Micromonospora* (Ara and Kudo, 2007b); 15, *Pilimelia* (Kane, 1996); 16, *Polymorphospora* (Tamura *et al.*, 2006); 17, *Pseudosporangium* (Ara *et al.*, 2008b); 18, *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005); 19, *Spirilliplanes* (Tamura *et al.*, 1997); 20, *Verrucosispora* (Rheim *et al.*, 1998); 21, *Virgisporangium* (Tamura *et al.*, 2001). \* According to the classification of Kroppenstedt (1985). † According to the classification of Lechevalier *et al.* (1981). Ara, arabinose; Gal, galactose; Man, mannose; Rhm, rhamnose; Rib, ribose; Xyl, xylose; Glu, glucose; +, Present; -, absent; Nd, not determined.

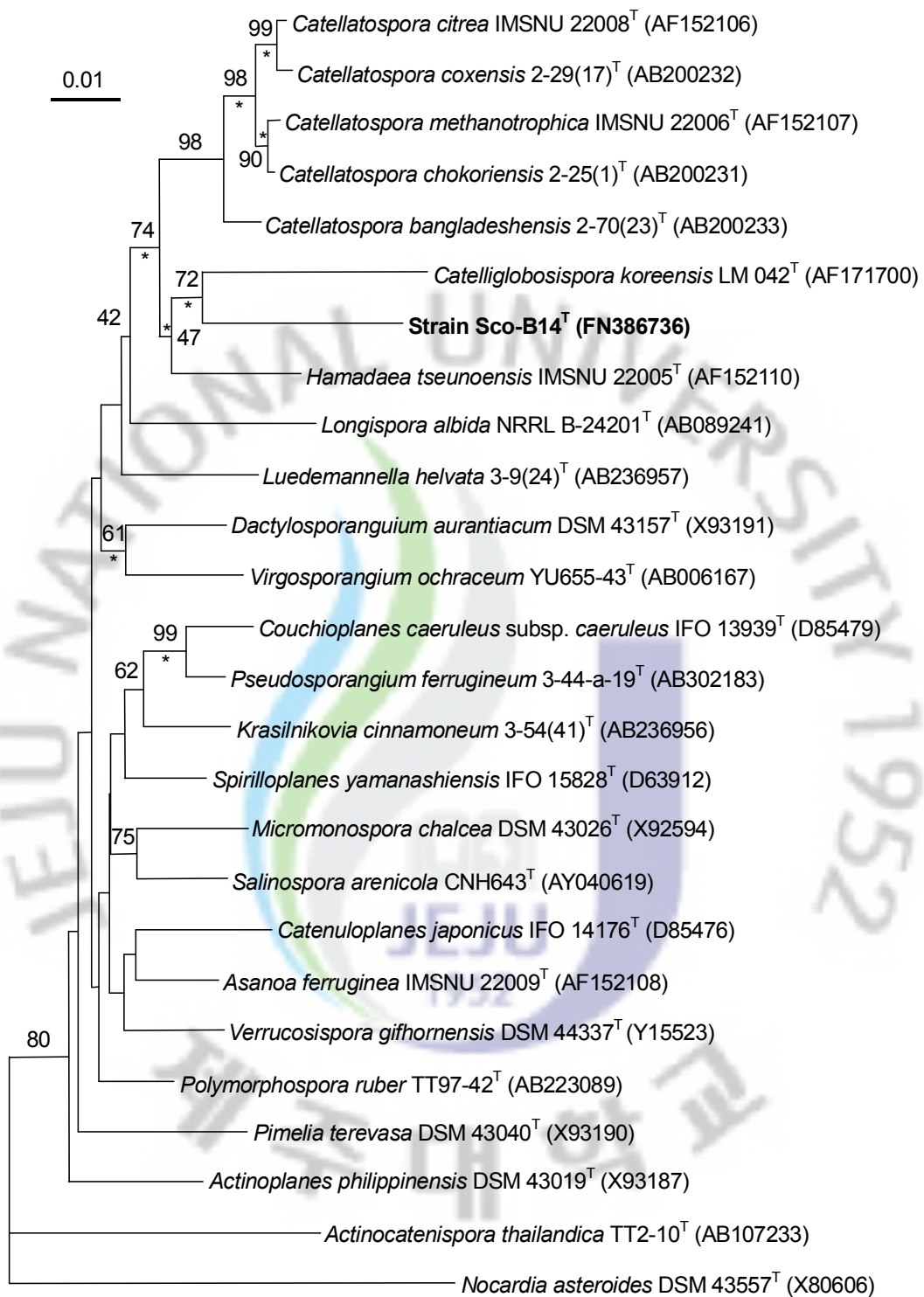
Genus	Sporangium	Spore motility	Diamino acid(s)	Whole-cell sugar(s)	Fatty acid type <sup>†</sup>	Major menaquinone(s) (MK-)	Phospholipid type <sup>†</sup>	DNA G+C content (mol%)
1	-	-	3OH-DAP	Glu, Rhm, Rib, Xyl, Ara, Gal, Man	3b	10(H <sub>4</sub> )	PII	70.1
2	-	-	<i>meso</i> -DAP	Ara, Gal, Xyl	3b	9(H <sub>4,6</sub> )	PII	72
3	+	+	<i>meso</i> -DAP	Ara, Xyl	2d	9(H <sub>4</sub> ), 10(H <sub>4</sub> )	PII	72-73
4	-	-	<i>meso</i> -DAP	Ara, Gal, Xyl	2d	10(H <sub>6,8</sub> )	PII	71-72
5	-	-	<i>meso</i> -DAP, 3OH-DAP	Xyl, Man, Gal, Ara, Rhm, Rib, Glu	3b	9(H <sub>4</sub> )	PII	70-71
6	-	-	<i>meso</i> -DAP	Rhm, Man, Xyl, Gal, Glu	3b	10(H <sub>4</sub> )	PII	70.4
7	-	+	L-lysine	Xyl	2c	9(H <sub>8</sub> ), 10(H <sub>8</sub> )	PIII	71-73
8	-	+	L-lysine	Ara, Gal, Xyl	2c	9(H <sub>4</sub> )	PII	70-72
9	+	+	<i>meso</i> -DAP	Ara, Xyl	3b	9(H <sub>4,6,8</sub> )	PII	71-73
10	-	-	<i>meso</i> -DAP, 3OH-DAP	Xyl, Gal, Man, Rib, Ara, Rhm, Glu	3b	9(H <sub>6</sub> )	PII	70
11	-	-	<i>meso</i> -DAP	Gal, Man, Xyl, Ara, Rib	2d	9(H <sub>6,4,8</sub> )	PII	71
12	-	-	<i>meso</i> -DAP	Ara, Gal, Xyl	2d	10(H <sub>4,6</sub> )	PII	70
13	+	-	<i>meso</i> -DAP	Xyl, Gal, Man, Rhm, Rib, Ara	2d	9(H <sub>6,4,2,8</sub> )	PII	71
14	-	-	<i>meso</i> -DAP	Ara, Xyl	3b	10(H <sub>4,6</sub> ), 9(H <sub>4,6</sub> )	PII	71-72
15	+	+	<i>meso</i> -DAP	Ara, Xyl	2d	9(H <sub>4,2</sub> )	PII	Nd
16	-	-	<i>meso</i> -DAP	Xyl	2a	10(H <sub>6,4</sub> ), 9(H <sub>6,4</sub> )	PII	71
17	-	-	<i>meso</i> -DAP, 3OH-DAP	Ara, Gal, Glu, Man, Rib, Xyl	2d	9(H <sub>6</sub> )	PII	73.6
18	-	-	<i>meso</i> -DAP	Ara, Gal, Xyl	3a	9(H <sub>4</sub> )	PII	70-73
19	-	+	<i>meso</i> -DAP	Ara, Xyl	2d	10(H <sub>4</sub> )	PII	69
20	-	-	<i>meso</i> -DAP	Man, Xyl	2b	9(H <sub>4</sub> )	PII	70
21	+	-	<i>meso</i> -DAP	Ara, Gal, Xyl	2d	10(H <sub>4,6,8</sub> )	PII	71



### 8.3. 계통분석

Sco-B14<sup>T</sup>의 거의 완전한 16S rRNA 유전자 염기서열 (1424 nt)이 결정 되었고 *Micromonosporaceae* 과에 포함된 속들의 표준종들과 비교되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 neighbor-joining 계통수 (tree)를 작성한 결과 *Micromonosporaceae* 과의 *Catelliglobospora* 속과 *Hamadaea* 속 사이에 독특한 계통군을 형성하였다(Fig. 29). 이 계통군은 maximum-likelihood와 maximum-parsimony 계통수 (tree)에서도 보여졌다. Tree의 신뢰도는 72%와 47% bootstrap 값으로 나타났다.

**Fig. 29.** 16S rRNA gene sequence tree showing phylogenetic position of strain Sco-B14<sup>T</sup> with the radiation encompassing representatives of family *Micromonosporaceae*. The tree was reconstructed by the using neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987). The sequence of *Nocardia asteroides* DSM 43557<sup>T</sup>(X80606) was used as an outgroup. Asterisks represent the branches also found in both maximum-likelihood (Fitch, 1971) and maximum-parsimony (Felsenstein, 1981) trees. Bootstrap percentages based on 1000 replications are indicated at nodes (only values above 40% are shown). Bar, 0.01 substitutions per site.



#### 8.4. 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도 (%)

Sco-B14<sup>T</sup>과 *Micromonosporaceae* 과에 포함된 속들의 표준 종들과 16S rRNA 염기서열 유사도 값은 *Catellatospora* 속의 표준 종들과 95.0–95.7%, *Hamadaea tseunoensis*와 94.8%, *Longispora albida*와 94.7% 그리고 *Catelliglobospora koreensis*와 94.1%를 나타내었다. 다른 속들의 표준 종들과 90.0–94.2%의 유사도를 보였다(Table 27).

**Table 27.** 16S rRNA gene sequence similarity values of strain Sco-B14<sup>T</sup> with the phylogenetic neighbors

No.	Closest neighbors	Strain Sco-B14 <sup>T</sup>
1	<i>Catellatospora chokoriensis</i> 2-25(1) <sup>T</sup> (AB200231)	95.7
2	<i>Catellatospora methanotrophica</i> IMSNU 22006 <sup>T</sup> (AF152107)	95.6
3	<i>Catellatospora citrea</i> IMSNU 22008 <sup>T</sup> (AF152106)	95.5
4	<i>Catellatospora coxensis</i> 2-29(17) <sup>T</sup> (AB200232)	95.4
5	<i>Catellatospora bangladeshensis</i> 2-70(23) <sup>T</sup> (AB200233)	95.0
6	<i>Hamadaea tseunoensis</i> IMSNU 22005 <sup>T</sup> (AF152110)	94.8
7	<i>Longispora albida</i> NRRL B-24201 <sup>T</sup> (AB089241)	94.7
8	<i>Polymorphospora ruber</i> TT97-42 <sup>T</sup> (AB223089)	94.2
9	<i>Catelliglobospora koreensis</i> LM 042 <sup>T</sup> (AF171700)	94.1
10	<i>Luedemannella helvata</i> 3-9(24) <sup>T</sup> (AB236957)	94.1
11	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup> (X92594)	93.9
12	<i>Spirilloplanes yamanashiensis</i> IFO 15828 <sup>T</sup> (D63912)	93.9
13	<i>Virgosporangium ochraceum</i> YU655-43 <sup>T</sup> (AB006167)	93.9
14	<i>Actinoplanes philippinensis</i> DSM 43019 <sup>T</sup> (X93187)	93.8
15	<i>Verrucosipora gifhornensis</i> DSM 44337 <sup>T</sup> (Y15523)	93.8
16	<i>Asanoa ferruginea</i> IMSNU 22009 <sup>T</sup> (AF152108)	93.7
17	<i>Krasilnikovia cinnamoneum</i> 3-54(41) <sup>T</sup> (AB236956)	93.7
18	<i>Dactylosporanguium aurantiacum</i> DSM 43157 <sup>T</sup> (X93191)	93.5
19	<i>Pimelia terevasa</i> DSM 43040 <sup>T</sup> (X93190)	93.4
20	<i>Pseudosporangium ferrugineum</i> 3-44-a-19 <sup>T</sup> (AB302183)	93.4
21	<i>Salinospora arenicola</i> CNH643 <sup>T</sup> (AY040619)	93.4
22	<i>Catenuloplanes japonicus</i> IFO 14176 <sup>T</sup> (D85476)	93.2
23	<i>Couchioplanes caeruleus</i> subsp. <i>caeruleus</i> IFO 13939 <sup>T</sup> (D85479)	93.2
24	<i>Actinocatenispora thailandica</i> TT2-10 <sup>T</sup> (AB107233)	90.0

## 8.5. *Micromonosporaceae* 과의 신속 및 신종 Sco-B14<sup>T</sup>의 기술

새로운 방선균 Sco-B14<sup>T</sup>는 제주의 오름 (기생화산)에서 수집한 화산재로부터 분리되었다. 그 유기체는 가지모양의 잘 발달된 기균사 (substrate mycelium)을 형성하였다. 기층균사 (aerial mycelia)는 약하게 생성하였다. 운동성을 갖지 않는 긴 사슬모양의 포자들이 배지 표면위에 영양 균사체로부터 단일 혹은 묶음을 이루어서 발생하였다. Colony의 background 색상은 light brown에서 brown을 띠었고 주위로 퍼지는 색소는 ISP 3 medium과 oatmeal-nitrate agar에서만 관찰되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 한 계통분석 결과 Sco-B14<sup>T</sup>은 *Micromonosporaceae* 과에서 기존의 다른 genus에 포함되지 않는 독특한 lineage를 형성하였다. Sco-B14<sup>T</sup>과 *Micromonosporaceae* 과에 포함된 속들의 표준 종들과 16S rRNA 염기서열 유사도 값은 *Catellatospora* 속의 표준 종들과 95.0-95.7%, *Hamadaea tseunoensis*와 94.8%, *Longispora albida*와 94.7% 그리고 *Catelliglobispora koreensis*와 94.1%을 나타내었다. 나머지 속들의 표준 종들과는 90.0-94.2%를 보였다. 다음의 화학분류적 특징들은 이 균주가 *Micromonosporaceae* 과의 포함된다는 것을 나타내었다. 3OH-DAP isomer을 세포벽에 특징적인 diamino acid로 갖고 whole-cell sugar들은 glucose, rhamnose, ribose, xylose, arabinose, galactose 그리고 mannose을 포함하였다. 세포막의 극성 지질 (polar lipid)은 diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine 그리고 phosphatidylinositol이었다. Menaquinone의 주 성분은 MK-10(H<sub>4</sub>)이고 fatty acids의 주 성분은 i-C<sub>15:0</sub>와 C<sub>17:0</sub> 이며 DNA G+C 함량은 70.1mol%을 보였다. 화학분류학적 특성들과 계통발생학적 data의 조합은 이 분리주를 기존에 알려진 *Micromonosporaceae* 과 (family) 속들 (genera)의 표준 종들과 명백하게 구분하였다. 여기에 기술된 계통발생학적 data와 화학분류적 특성들을 바탕으로 Sco-B14<sup>T</sup>은 *Micromonosporaceae* 과의 새로운 속 (genus) 및 종 (species)을 나타내었다. 균주 이름은 *Allocatelliglobispora scoriae* gen. nov., sp. nov.으로 제안되었다.

#### IV. 요약

본 연구는 제주도 구좌읍 지역 다랑쉬 오름 근처의 제주 화산석 송이 (Jejuscoria)를 색상별로 채집하여 배양 가능한 미생물을 분리한 후 Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 화산석 송이 미생물의 종 다양성을 분석하고 선별된 균주에 대해 다상적 분류방법을 적용하여 분류·동정을 수행하였다. 또한, 항진균활성과 chitin 분해능을 조사하여 생리 활성물질을 탐색하였다.

5개 색상의 scoria에서 총 100균주의 배양 가능한 미생물이 분리되었다. 분리 균주들의 colony의 색소는 yellow, orange, cream, pink 또는 brown 등으로 다양하게 나타났으며 그람양성균은 63균주이고 그람음성균은 37균주 이었다. 운동성 관찰에서는 총 84균주 중에서 47균주가 운동성을 나타내었다. 균주의 형태는 70균주가 간균 (rod-shaped)이었고 관찰되었고 14균주가 구균 (coccus)이었다. 그리고 균사를 생성하는 16개의 균주의 포자사슬의 형태는 직쇄 형 (rectiflexibile), 갈고리 형 (hooked) 및 방사형 (spiral)을 띠었다.

Rep-PCR 분석을 통해서 각 균주에서 분리한 DNA의 band pattern을 비교 분석하여 유전적 다양성을 검토하였다. 각 균주들의 DNA fingerprinting pattern 분석을 통해 UPGMA 형태의 dendrogram을 작성하였고 유사도를 결정하였다. 유사도 65% 이상의 수준에서 grouping 한 결과, 화산석 송이 미생물들은 붉은색 (A; red)에서 28개의 Rep-group, 갈색 (B; brown)에서 21개의 Rep-group, 적갈색 (C; reddish-brown)에서 6개의 Rep-group, 황갈색 (D; yellow brown)에서 22개의 Rep-group, 그리고 검정색 (E; black)에서 6개의 서로 다른 Rep-group으로 분류되었다. 분리된 총 100균주 전체를 grouping 했을 때 79개의 Rep-group으로 분류되었다.

다랑쉬 지역 Scoria에서 분리된 100균주의 배양 가능한 세균의 Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과 *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Deinococci*,  $\alpha$ -,  $\beta$ -과  $\gamma$ -*Proteobacteria*의 6개 계통군이 확인되었다. 58%는 *Actinobacteria*로 우점을 이루는 것으로 확인되었으며 20%는  $\beta$ -*Proteobacteria*로 확인되었고 14%는  $\alpha$ -*Proteobacteria*, 4%는 *Bacilli*, 3%는  $\gamma$ -*Proteobacteria* 그리고 1%는 *Deinococci*에 속하는 것으로 나타났다. 계통분석 결과 14개의 목 (order) 및 아목



(sub-order), 17개의 과 (family) 그리고 30개의 속 (genus)으로 구성되었다. 많이 분리된 속 (genus)은 *Arthrobacter* (18균주), *Massilia* (16균주), *Streptomyces* (14균주) 그리고 *Nocardioides* (9균주) 순으로 나타났다. 시료별로 보면, A (red) 시료는 cream 색상을 갖는 *Arthrobacter*가, B (brown)시료는 yellow 색상을 갖는 *Nocardioides*와 균사생성 방선균인 *Streptomyces*가 많이 분포하여서 *Actinobacteria* 분류군이 70% 이상 분리되었다. 반면, D (yellow brown)시료는 yellow 혹은 orange 색상을 띠는 *Massilia* 균주들을 포함하여서 *Proteobacteria* 분류군이 60% 이상 나타났다. C (reddish-brown)와 E (black)시료는 분리균주가 많지 않지만 각 그룹별로 골고루 분포하고 있었다.

생리활성 물질 탐색결과 chitin을 분해하는 균주는 총 100균주 중에 18균주로 나타났다. 억제환의 크기는 1cm 미만이 8균주, 1cm 이상 2cm 미만이 5균주 그리고 2cm 이상인 균주가 5균주로 확인되었다. 대부분이 균사를 생성하는 *Streptomyces*이고 *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*과 *Lapillicoccus*의 종들도 포함되었다. 감귤저장 중 부패를 발생시키는 푸른곰팡이 (*Penicillium italicum*)에 대한 항진균활성은 3균주가 억제환을 나타내었다. *Paenibacillus*에 속하는 1균주와 *Streptomyces*에 속하는 1균주가 2cm 이상의 억제환을 나타내었다.

Rep-PCR과 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 한 계통분석 결과 31균주가 표준균주들과 함께 형태 및 생리·생화학 분석, 화학적 특성 분석 그리고 DNA-DNA hybridization 분석을 통한 다상적 분류를 통해서 새로운 속 (genus) 또는 종 (species)으로 분류될 가능성을 나타냈다. 이 균주들 중에서 A36과 D01은 표준균주들과 95.9-98.6%의 염기서열 유사도, 생리·생화학적 특성 비교 및 낮은 DNA-DNA relatedness 값 (16.5-35.4%)을 바탕으로 *Marmoricola korecus* sp. nov. (type strain Sco-A36<sup>T</sup> = KCTC 19596<sup>T</sup> = DSM 22128<sup>T</sup>) 그리고 *Marmoricola scoriae* sp. nov. (type strain Sco-D01<sup>T</sup> = KCTC 19597<sup>T</sup> = DSM 22127<sup>T</sup>)으로 제안되었다. 또한, *Micromonospraceae* (family)에 속하는 균주 B14는 표준균주들과 95.8% 이하의 낮은 염기서열 유사도, 계통분석 그리고 화학적 특성 (DAP, sugar, menaquinone, polar lipids 및 fatty acid) 분석 비교를 통하여 새로운 속 (genus) 및 종 (species)으로 동정 및 분류 되었다. 균주 이름은 *Allocatelliglobispora scoriae*로 제안되었다.



## 참 고 문 헌

감상규, 현성수, 이민규. 2002. 제주 스코리아에 의한 구리 및 납 이온의 흡착특성. 대한환경공학회지, 1(24), 57-69.

박진숙, 황경숙, 천종식. 2005. 미생물의 분류·동정 실험법. 월드사이언스

소재관. 2002. 송이 (Scoria)의 거동특성 및 예측에 관한 연구, 제주대학교 석사학위논문, pp. 43-66.

오동일. 2005. 송이 (Scoria)의 강도특성 및 CRB에 관한 연구, 제주대학교 석사학위논문

이민규, 임준혁, 현성수, 감상규. 2002. 제주 Scoria에 의한 구리 이온의 흡착특성. 화학공학회지, 40(2), 252-258.

이창후, 김성복, 김정선. 2004. 항진균활성 미생물을 이용한 감귤의 저장. 생명자원연구 12, 27-40.

Ara, I. and T. Kudo. 2006. Three novel species of the genus *Catellatospora*, *Catellatospora chokoriensis* sp. nov., *Catellatospora coxensis* sp. nov. and *Catellatospora bangladeshensis* sp. nov. and transfer of *Catellatospora citrea* subsp. *methionotrophica* Asano and Kawamoto 1988 to *Catellatospora methionotrophica* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 393-400.

Ara, I. and T. Kudo. 2007a. *Luedemannella* gen. nov., a new genus of the family *Micromonosporaceae* and description of *Luedemannella helvata* sp. nov. and *Luedemannella flava* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 39-51.

Ara, I. and T. Kudo. 2007b. Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 29–37.

Ara, I. and T. Kudo. 2007d. *Krasilnikovia* gen. nov., a new genus of the family *Micromonosporaceae* and description of *Krasilnikovia cinnamomea* sp. nov. *Actinomycetologica.* 21, 1–10.

Ara, I., M.A. Bakir, and T. Kudo. 2008a. Transfer of *Catellatospora koreensis* Lee *et al.* 2000 as *Catelliglobospora koreensis* gen. nov., comb. nov. and *Catellatospora tsunoense* Asano *et al.* 1989 as *Hamadaea tsunoensis* gen. nov., comb. nov., and emended description of the genus *Catellatospora* Asano and Kawamoto 1986 emend. Lee and Hah2002. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1950–1960.

Ara, I., A. Matsumoto, M.A. Bakir, T. Kudo, S. Ómura, and Y. Takahashi. 2008b. *Pseudosporangium ferrugineum* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1644–1652.

Asano, K. and I. Kawamoto. 1986. *Catellatospora*, a new genus of the *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 512–517.

Asano, K. and I. Kawamoto. 1988. *Catellatospora citrea* subsp. *methionotrophica* subsp. nov., a methionine-deficient auxotroph of the *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 326–327.

Asano, K., I. Masunaga, and I. Kawamoto 1989. *Catellatospora matsumotoense* sp. nov. and *C. tsunoense* sp. nov., actinomycetes found in woodland soils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 309–313.

Couch, J. N. (1950). Actinoplanes a new genus of the Actinomycetales. *J Elisha Mitchell Sci Soc* 66, 87 - 92.

Cashion, P., M.A. Hodler-Franklin, J. McCully, and M. Franklin. 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Bio. chem.* 81, 461-466.

Collins, M. D. 1985. Analysis of isoprenoid quinones. *Methods. Microbiol.* 18, 329 - 366.

Dastager, S.G., J.-C. Lee, Y.-J. Ju, D.-J. Park, and C.-J. Kim. 2008. *Marmoricola bigeumensis* sp. nov., a member of the family *Nocardioideaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1060 - 1063.

De Ley, J., H. Cattoir, and A. Reynaerts. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12, 133-142.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, seattle, USA.

Fitch, W. M. 1971. Towards defining the course of course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *System. Zool.* 20, 406-416.

Goodfellow, M. 1989. Maduromycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2509-2551. Edited by Williams, S.T. and J.G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.

Goodfellow, M.L., J. Stanton, K.E. Simpson, and D.E. Minnikin. 1990. Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 136, 19-36.

Gordon, R.E., D.A. Barnett, J.E. Handerhan, and C.H.-N. Pang. 1974. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24, 54 - 63.

Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*. Norwich: JohnInnes Foundation.

Horan, A.C. and B. Brodsky. 1986. *Actinoplanes caeruleus* sp. nov., a blue-pigmented species of the genus *Actinoplanes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 187-191.

Huss, V.A.R., H. Festl, and K.H. Schleifer. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 184-192.

Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp.132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.

Kane, W.D. 1966. A new genus of *Actinoplanaceae*, *Pilimelia*, with a description of two species, *Pilimelia terevasa* and *Pilimelia anulata*. *J. Elisha Mitchell. Sci. Soc.* 82, 220–230.

Kim, S.Y., J.H. Kim, C.I. Kim, and O.K. Oh. 1996. Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.* 18, 1161–1164.

Koch, C., R.M. Kroppenstedt, F.A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1996. 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 765–768.

Krasil'nikov, N.A. 1938. *Ray Fungi and Related Organisms - Actinomycetales*. Moscow: Akademii Nauk SSSR (in Russian).

Kroppenstedt, R.M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 173 - 199. Edited by M. Goodfellow and D.E. Minnikin. London: Academic Press.

Kudo, T., Y. Nakajima, and K. Suzuki. 1999. *Catenuloplane crispus* (Petrolini *et al.* 1993) comb. nov.: incorporation of the genus *Planopolyspora* Petrolini 1993 into the genus *Catenuloplanes* Yokota *et al.* 1993 with an amended description of the genus *Catenuloplanes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1853–1860.

Lechevalier, M.P., A.E. Stern, and H.A. Lechevalier. 1981. Phospholipids in



the taxonomy of actinomycetes. *Zentbl. Bakteriolog. Hyg. Abt. 1*. (Suppl. 11), 111–116.

Lee, D.W. and S.D. Lee. 2008. *Aeromicrobium ponti* sp. nov., isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 987–991.

Lee, J.-E., J.P. Seo, D.W. Lee, Y.-H. Ko, and S.D. Lee. 2008. *Terrabacter lapilli* sp. nov., an actinomycete isolated from stone. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1084–1088.

Lee, S.D. 2006. *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave in Jeju, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 559–562.

Lee, S.D. 2007. *Marmoricola aequoreus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1391–1395.

Lee, S.D. and Y.C. Hah. 2002. Proposal to transfer *Catellatospora ferruginea* and '*Catellatospora ishikariense*' to *Asanoagen.* nov. as *Asanoa ferruginea* comb. nov. and *Asanoa ishikariensis* sp. nov., with emended description of the genus *Catellatospora*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 967–972.

Lee, S.D., M. Goodfellow, and Y.C. Hah. 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoense* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. nov. *FEMS. Microbiol. Lett.* 178, 349–354.

Lee, S.D., S.-O. Kang, and Y.C. Hah. 2000. *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

*Microbiol.* 50, 1103–1111.

Mac Faddin JF. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd ed. Baltimore:Williams & Wilkins.

Maldonado, L.A., W. Fenical, P.R. Jensen, C.A. Kauffman, T.J. Mincer, A.C. Ward, A.T. Bull, and M. Goodfellow. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1759–1766.

Matsumoto, A., Y. Takahashi, M. Shinose, A. Seino, Y. Iwai, and S. Omura. 2003. *Longispora albida* gen. nov., a novel genus of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1553–1559.

Mesbah M, U. Premachandran, and W.B. Whitman. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 159–167.

Minnikin D.E, A.G. O'Donnell, M. Goodfellow, G. Alderson, M. Athalye, A. Schaal, and J.H. Parlett. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J. Microbiol. Methods.* 2, 233–241.

Minnikin D.E, L. Alshamaony, and M. Goodfellow. 1977. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin layer chromatographic analysis of whole-cell methanolysates. *J. Gen. Microbiol.* 88, 200–204.

Rademaker J.L.W, F.J Louws, and F.J. De Bruijn. 1998. Characterization of the

diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Mol. Microbiol. Ecol. Manual.* 3, 1-27.

Rheims, H., P. Schumann, M. Rohde, and E. Stackebrandt. 1998. *Verrucosipora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1119-1127.

Roberts, W.K. and C.P. Selitrennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 134, 169-176.

Saitou N. and M. Nei 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

Sharples, G.P. and S.T. Williams. 1974. Fine structure of the globose bodies of *Dactylosporangium thailandense* (Actinomycetales). *J. Gen. Microbiol.* 84, 219-222.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340.

Stackebrandt, E., F.A. Rainey, and N.L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 479 - 491.

Stackebrandt, E. and R.M. Kroppenstedt. 1987. Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch, and *Amorphosporangium* Couch in are defined genus *Actinoplanes*. *Syst. Appl. Microbiol.* 9, 110-114.

Staneck, J.L. and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28, 226 - 231.

Tamura, T. and K. Hatano. 2001. Phylogenetic analysis of the genus *Actinoplanes* and transfer of *Actinoplanes minutisporangius* Ruan *et al.* 1986 and '*Actinoplanes aurantiacus*' to *Cryptosporangium minutisporangius* comb. nov. and *Cryptosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2119-2125.

Tamura, T., Y. Nakagaito, T. Nishii, T. Hasegawa, E. Stackebrandt, and A. Yokota. 1994. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplane scaeruleus* (Horanand Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplane scaeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 193-203.

Tamura, T., M. Hayakawa, and K. Hatano 1997. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 97-102.

Tamura, T., M. Hayakawa, and K. Hatano. 2001. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Virgosporangium* gen. nov., with descriptions of *Virgosporangium ochraceum* sp. nov. and *Virgosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1809-1816.

Tamura, T., K. Hatano, and K. Suzuki. 2006. A new genus of the family *Micromonosporaceae*, *Polymorphospora* gen. nov., with description of *Polymorphospora rubra* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1959-1964.

Thawai, C., S. Tanasupawat, T. Itoh, and T. Kudo. 2006. *Actinocatenispora thailandica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1789–1794.

Thiemann, J.E., H. Pagani, and G. Beretta. 1967. A new genus of the *Actinoplanaceae*: *Dactylosporangium*, gen. nov. *Arch. Mikrobiol.* 58, 42 - 52.

Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24, 4876 - 4882.

Urzi, C., P. Salamone, P. Schumann, and E. Stackebrandt 2000. *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family *Nocardioideae* isolated from a marble statue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 529 - 536.

Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, and other authors. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463 - 464.

Prauser, H. and M. Bergholz. 1974. Taxonomy of actinomycetes and screening for antibiotic substances. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 28, 441–457.

Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acids. Res.* 19, 6823–6831.



Vobis, G. 1989. Actinoplanetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2418-2450. Edited by Williams, S.T., M.E. Sharpe and J.G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.

Vila, J., M.A. Marcos, and M.T. Jimenez de Anta. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* 44, 482-489.

Yokota, A., T. Tamura, T. Hasegawa, and L.H. Huang. 1993. *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 805-812.



<Summary>

## A study of microbial diversity and bioactive compounds from *Jejuscoria* bacteria

Dong Wan Lee

(Supervised by professor Soon Dong Lee)

The aim of this study was to investigate the diversity of the culturable bacteria of *Jejuscoria* collected nearby Darangshi oreum in Jeju Island, based on Rep-PCR DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analyses, and to screen for antifungal and chitin-degrading activities from them. Also, some of the isolated strains was designed to be described as novel bacterial species through the classification and identification of them by a polyphasic taxonomic approach.

A total of 100 culturable bacteria were isolated and maintained from five *Jejuscoria* of various colors. The isolates were characterized by colony pigmentation such as yellow, orange, cream, pink and brown. Among them, 63 strains were Gram-positive and 37 strains were Gram-negative. Of 84 strains tested, 47 strains were motile. Morphological characteristics were variable depending on strains. Most of them (70 strains) were rod-shaped and 14 strains were coccoid-shaped. The actinomycete strains including 16 isolates produced well-developed substrate and aerial mycelia, on the tips of which spore chains were arranged in rectiflexibles, hooks or spirals.

DNA fingerprints obtained from genomic DNA of isolates using repetitive sequence-based PCR were compared for evaluating genetic diversity. The

Rep-PCR DNA fingerprints of 100 bacterial strains constituted 79 Rep-groups and were divided into 28 Rep-groups for red-colored *Jejuscoria* (A), 21 Rep-groups for brown-colored *Jejuscoria* (B), 6 Rep-groups for reddish-brown *Jejuscoria* (C), 22 Rep-groups for yellow brown *Jejuscoria* (D) and 6 Rep-groups for black-colored *Jejuscoria* (E) at the level of more than 65% similarity.

On the basis of the comparative analyses of Rep-PCR DNA fingerprints and partial 16S rRNA gene sequences, 100 isolates were divided into 6 major groups: *Actinobacteria* (58%),  $\beta$ -*Proteobacteria* (20%),  $\alpha$ -*Proteobacteria* (14%), *Bacilli* (4%),  $\gamma$ -*Proteobacteria* (3%) and *Deinococci* (1%). Among *Actinobacteria*, more than 70% of actinobacterial strains were mainly distributed in red-colored *Jejuscoria* (A) and brown-colored *Jejuscoria* (B) in that many cream-colored *Arthrobacter* spp. were isolated from A sample, and yellow-colored *Nocardioides* spp. and *Streptomyces*-like spp. were isolated from B sample. Among strains belonging to the *Proteobacteria*, more than 60% proteobacterial strains, most of which were designated as yellow- or orange-colored *Massilia* spp., were distributed in yellow-brown *Jejuscoria* (D). On the other hand, reddish brown *Jejuscoria* (C) and black-colored *Jejuscoria* (E) evenly contained representatives of all the major groups, albeit with small number of the isolates.

The isolates having chitin-degrading activity were 18% of a total (18 strains). Among these, 8 strains showed the diameters of clearance zones less than 1cm, 5 strains the diameters ranged from 1-2cm and 5 strains the diameters above than 2cm. On the other hand, only two strains showed anti-fungal activities against *Penicillium italicum* (mold of tangerine): one was *Paenibacillus* sp. (strain Sco-A16) and the other was *Streptomyces* sp. (strain Sco-A30).

It was strongly suggested that 31 isolates were candidates of new genus or species based on the analyses of Rep-PCR DNA fingerprints and 16S rRNA

gene sequences. Among them, strains Sco-A36<sup>T</sup> and Sco-D01<sup>T</sup> were described as members of two novel species of the genus *Marmoricola* on the basis of the 16S rRNA gene sequence similarity (95.9–98.6%), phenotypic features and low DNA relatedness values of 16.5–35.4%, for which the names *Marmoricola korecus* sp. nov. (type strain Sco-A36<sup>T</sup>= KCTC 19596<sup>T</sup>= DSM 22128<sup>T</sup>) and *Marmoricola scoriae* sp. nov. (type strain Sco-D01<sup>T</sup>= KCTC 19597<sup>T</sup>= DSM 22127<sup>T</sup>) are proposed. Also, strain Sco-B14<sup>T</sup> was described as a member of novel genus of the family *Micromonosporaceae* based on the low 16S rRNA gene sequence similarity (<95.8%), phylogenetic evidence and chemotaxonomic characteristics such as the isomer of diaminopimelic acid, menaquinone, polar lipids and fatty acid, for which the name *Allocatelliglobispora scoriae* gen. nov., sp. nov. is proposed.



## 감사의 글

어느 새 석사과정을 마무리할 시기가 다가왔습니다. 어렵게 돌고 돌아서 더디게 지내온 시간들이 이제는 까마득하게 느껴집니다. 후회도 많이 하고 고민도 많이 하면서 보내온 나날들이지만 이제와 생각해보니 그런 과정이 있었기에 제가 조금 성숙해 지지 않았나 생각합니다. 주어지는 것은 아무것도 없었고 설령 주어졌다 하더라도 반드시 대가를 지불해야 되는 것임을 알게 되었습니다. 교육자의 길에서 연구자의 길로 들어서는 관문에 서있는 제 자신을 발견하게 되었습니다. 저 혼자였으면 아마 여기까지 오지 못했을 것입니다. 저를 여기까지 오도록 격려와 칭찬을 아끼지 않으신 모든 분들께 감사의 맘을 전하고자 이 글을 씁니다.

우선, 미생물에 대해서 전혀 모르는 저를 석사 과정 생으로 받아서 우여곡절 끝에 무사히 석사 과정을 마칠 수 있도록 해주신 이순동 교수님께 진심으로 감사드립니다. 연구에 대한 열정, 항상 ready 상태가 되어 있으라는 충고, 내가 무엇인가를 갖고 있어서 당당할 수 있다는 것 등 많은 조언과 격려들이 머릿속에 혹은 메모장을 채우고 있습니다. 내가 지쳐있을 때 다독이는 것보다 오히려 더 호되게 야단을 치셔서 더 강하게 만드셨습니다. 그 덕분에 스스로 강해질 수 있는 힘을 키울 수 있었습니다. 그래서 이렇게나마 작은 결과를 낼 수 있지 않았을까 생각합니다.

흔쾌히 석사 논문 심사위원장을 맡아주시고 학부과정 때부터 유독 칭찬과 격려를 아끼지 않으셨던 정충덕 교수님, 동문선배님으로서 누구보다 제 앞길을 걱정해 주시고 조언해 주신 오홍식 교수님, 두세 번 똑같은 발표수업을 시키면서 발표능력을 향상시켜 주신 임평옥 교수님 감사합니다. 그리고 오다가며 응원해 주신 강동식 교수님과 강영봉 교수님을 비롯한 물리교육과 교수님들께도 감사의 뜻을 전합니다.

실험실에 연구원으로 계시면서 많이 챙겨주셨던 교수 사모님 감사합니다. 실험실 선배로써 잘 해주지도 못했는데 잘 따라준 성해, 4학년이라 임용고시 준비에 정신이 없는 혜순이, 그리고 경험을 쌓기 위해 실험실에 들어왔다는 아람이에게도 고맙다는 말을 전합니다. 늘 석사과정을 밟고 있는 내가 자랑스럽다고 여겨주는 99학번 과학교육과 동기들과 중학교 동창들, 항상 챙겨주시고 얘기 상대가



되어 준 조교 선생님 순혁이형, 민성이형 그리고 택중이 형에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로, 막내 아들을 위해 늘 기도하시는 부모님, 막내 동생이 잘 되는 것을 항상 바라고 걱정해주시는 큰 형, 둘째 형, 작은 형, 큰 누나, 큰 매형, 작은 누나 그리고 조카들의 열렬한 응원에도 감사의 맘을 전합니다. 더 열심히 해서 부끄럽지 않은 막내 아들, 막내 동생이 되겠습니다.

이제, 아득하고 먼 길을 가기 위해 할 발짝 내딛었습니다. 작은 것에도 소중히 하고 감사해하며 겸손한 마음으로 당차게 앞길을 헤쳐 나가겠습니다. 다시 한 번 저를 아껴주시고 격려해 주신 모든 분들께 머리 숙여 감사드립니다. 계속 지켜봐 주십시오.

