

## 천호지 저질토에서 분리한 철환원세균의 특성

박재홍 · 이일규 · 전은형 · 안태영\*  
단국대학교 미생물학과

금속 이온 환원 세균에 의한 철(III) 환원은 생물지구화학적 물질순환(biogeochemical cycle)에 무척 중요하다. 이는 크롬(VI)이나 우라늄(VI)과 같은 독성 중금속 물질의 환원과 유기물질의 산화에 모델이 되기 때문이다. 총 37 균주의 Fe(III) 환원 세균을 소양호와 천호지의 저질토에서 각각 분리하였다. 두 정점 중 초기 Fe(II)의 함유량이 가장 높았던 것은 소양호의 저질토였으나 Fe(III) 환원능은 반대로 가장 낮은 Fe(II) 함유량을 보여 주었던 천호지가 높게 나타났다. 또한 분리한 균주 중 천호지에서 분리한 균주 C2와 C3가 가장 높은 Fe(III) 환원능을 보여주었으며 이 균주를 이용하여 다양한 전자 공여체의 이용 여부를 실험하였다. Glucose, yeast extract, acetate, ethanol, toluene 등을 이용하여 실험한 결과 두 균주 모두 glucose와 yeast extract만을 전자 공여체로 이용하였다. 또한 전자 수용체로 토양에 광범위하게 존재하는 humic acid와 nitrate를 이용하였으며 수율이 높은 nitrate reduction에 의해 환원되었던 humic acid가 다시 재 산화되는 것을 관찰할 수 있었다. 활성능이 우수한 균주 C2와 C3의 16S rRNA 유전자 분석 결과에 의하면 *Aeromonas hydrophila*와 95%의 유사성을 보여주었다.

Key words □ Fe(III) reduction, 16S rRNA analysis

지구상에는 산소 공급이 원활하지 않은 생태계가 광범위하게 산재하고 있다. 이전까지 이런 혐기성 생태계에서는 황 환원과 메탄 생성에 관해 많이 연구가 되어져 왔다. 이와 달리 금속 이온이 전자 수용체로 이용되어 환원되는 대사는 생합성에 필요한 금속 이온을 환원하는 대사와는 다르다. 혐기성 호흡에서 전자 수용체로 환원되는 금속 이온의 환원을 dissimilatory reduction이라 하며, Fe(III)를 전자 수용체로 이용하는 미생물이 분리되기 전에는 산화된 금속 이온이 혐기적 생태계에서 미생물의 작용으로 생산되는 과산화수소나 황화수소 등에 의해서 화학적으로 환원되는 것으로 생각되었다(8). Ferric iron [Fe(III)]을 ferrous iron [Fe(II)]으로 환원시키는 dissimilatory iron reduction은 1980년대에 들어 *Shewanella putrefaciens*가 분리되면서 알려지기 시작하였다(16). 이외에 대표적인 철 환원 세균으로는 *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens* (7), *Desulfomonas palmitatis* (14), *Pelobacter carbinolicus* (19) 등이 연구되어지고 있다. Fe(III)를 전자 수용체로 이용하는 혐기적 호흡은 에너지 수율이 탈질화 반응만큼 높고 황 환원 세균이나 메탄 생성 세균보다 동일한 전자 공여체로부터 많은 자유 에너지를 얻을 수 있으며(2), 제한적으로 존재하는 질산염에 비해 Fe(III)는 자연계에 광범위하게 존재하기 때문에 혐기성 생태계에서 오염된 유기물의 분해와 탄소의 생물지구화학적 물질순환 (biogeochemical cycling)에 중요하다(5). 철은 자연계에 Fe(III)와 Fe(II)의 두 가지 산화도 (oxidation level)로 존재한다. 용해성이 높은 Fe(II)로 환원되는 Fe(III)와 복합체를 이룬 중금속을 용출시켜 수질을

저하시키는 원인이 되기도 하지만(14), 혐기성 생태계에서 지하수에 오염되는 각종 유기물을 65% 이상 분해할 수 있는 과정이다(3). 특히 그중 유해한 방향족 화합물을 제거하는 역할을 하기도 한다. 또한 Fe(III) 환원에 대한 연구는 실험상 다루고 연구하기 힘든 우라늄과 같은 독성 중금속의 환원 연구에 중요한 모델이 된다. *Desulfovibrio desulfuricans*의 경우 용해도가 높은 U(VI)를 불용성의 U(IV)로 환원시키며(17), 수용성의 Cr(VI)가 불용성의 Cr(III)로 환원되는 것 이외에 Co(VI), Mo(VI), Cu(II), Ag(I) 등의 환원도 마찬가지로 미생물에 의해 이루어진다(15).

Humic substance는 화학적으로 복잡한 물질이며 지구 표면에 광범위하게 존재하고 있다(22). 자연계에서의 Fe(III) 환원은 humic acid 환원과 연결되어 일어난다. 이때 미생물에 의한 직접적인 Fe(III) 환원과 함께 미생물에 의하여 환원된 humic acid가 재산화되면서 Fe(III)를 환원시키는 shuttling effect에 의해, Fe(III) 환원과 그에 따른 유기물의 산화가 증가되는 결과를 보여준다(14).

이에 본 연구에서는 소양호와 천호지의 저질토에서 Fe(III) 환원 세균을 분리한 후, Fe(III) 환원능을 확인하고 분리한 균주의 다양한 전자 공여체의 이용 여부를 밝히며 전자 수용체로써 humic acid의 이용 여부와 nitrate 환원과의 상관관계를 밝히고자 하였다. 또한 활성이 우수한 균주를 선택하여 16S rRNA 유전자 분석을 통해 계통분류학적 분석을 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 채취 및 보관

소양호와 천호지의 저질토 시료를 채집하였다. 소양호 시료의

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 041-550-3451, Fax: 041-561-2210  
E-mail : ahnty@dankook.ac.kr

경우 수심 80 m에 위치하는 저질토로부터 채집하였으며, 천호지 시료의 경우 수위 간만이 심한 저수지 주변의 토양층으로부터 채취하였다. 채취된 시료는 모두 무균적으로 채집하여 혐기적 상태를 유지하였다. 시료를 멸균된 플라스틱 용지에 알맞은 양을 분주한 후 혼합가스(hydrogen 5%, carbone dioxide 10%, nitrogen 85%)로 상층의 공기를 치환시키고, 자동 포장 기계로 밀봉하여 산소의 유입을 완전 차단시킨 후 4°C에서 보관하였다.

### 시료의 Fe (II) 농도와 Fe (III) 환원능

Fe (II)의 함유량과 Fe (III) 환원능을 알아보기 위하여 최소 액체 배지를 50 ml serum bottle에 준비하였다. 최소 액체 배지는 nitrate 최소 배지를 변형한 것으로 nitrate 대신 Fe (III) citrate를 이용하였다. 배지의 조성은 1 l 당 NaCl 2.0 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.03 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g, CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.02 g, Trace Metal sloution 1 ml을 첨가하였고 trace metal solution은 100 ml 당 Fe-EDTA 0.2 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.15 g, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.03 g, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.02 g, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 0.01 g, Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>O<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01 g, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.01 g을 첨가하여 준비하였다. 전자 수용체로 10 mM Fe (III) citrate, 전자 공여체로 10 mM sodium lactate를 배지에 동일하게 분주 후, 각 시료 1 g을 접종하고 rubber와 aluminium cap을 씌운 후, head space를 혼합가스로 치환하여 혐기적 상태로 만들어 주었다. 배지로부터 주사기를 이용하여 100 µl 씩 test tube에 분주한 후 발색 시약(HEPES buffer with ferrozin) 5 ml을 반응시킨 다음, 15 분 후 562 nm에서 Fe (II)를 측정하여 초기 Fe (II)의 양을 결정했다(12). N-[2-Hydroxyethyl] Piperazine-N'-[2-Ethane-sulfonic acid] (HEPES) buffer with 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phen-ylsulfonic acid)-1,2,4-Triazine (ferrozin)의 조성은 1 L 당 ferrozin 1 g, HEPES 50 mM이며 정량을 위한 standard solution은 ferrous ammonium sulfate를 사용하였다. 초기 Fe (II)의 양을 측정 후 6일간 27°C에서 배양하였으며 다시 동일한 방법으로 Fe (II)의 양을 측정하여 Fe (III) 환원능을 측정하였다.

### Fe (III) 환원 세균의 분리

Fe (III) 환원 세균을 분리하기 위하여 최소배지에 전자 수용체로 Fe (III) citrate, 전자 공여체로 sodium lactate를 첨가하였으며 Bacto agar (Difco, Detroit, USA)를 최종농도 1.5%가 되도록 첨가하여 준비하였다. 또한 tryptic soy agar에 Fe (III) citrate를 첨가한 것도 동시에 이용하였다. 채집된 시료를 단계적으로 희석하여 100 µl 씩 접종하였으며, 접종된 배지는 Anaerobic jar (Merck, Germany)에서 배양하였으며 혐기성 조건을 만들기 위해 Anaerocult A (Merck, Germany)를 제작자의 지침에 따라 사용하였다. 배양은 27°C에서 7일간 시행하였다. 생성된 colony는 Tryptic soy agar (Difco, Detroit, USA)에서 계대 및 순수 배양 후, 최종적으로 Fe (III) 환원능을 확인하였다.

### 분리된 균주의 Fe (III) 환원능

분리된 균주의 Fe (III) 환원능 측정을 위해 최소 배지에 전자

수용체로 Fe (III) citrate, 전자 공여체로 sodium lactate를 첨가한 broth를 50 ml serum bottle에 30 ml 씩 분주하여 준비하였다. 활성 측정을 위해 분리 · 선택한 균주를 Tryptic soy broth (Difco, Detroit, USA)에서 증균 시킨 후, Fe (III) 환원능 측정을 위한 최소배지에 흡광도 0.15 (OD<sub>440</sub>)가 되도록 접종하였다. Head space를 혼합가스로 치환하여 혐기적 상태로 만들어 준 후, 27°C에서 10일간 배양하였다. Fe (III) 환원능은 이전과 동일한 방법으로 Fe (II)의 변화량을 측정하여 결정하였다.

### 전자 공여체

전자 공여체로서 다양한 기질의 이용 여부를 조사하기 위하여 최소 배지에 glucose, yeast extract, acetate, ethanol, toluene 등을 각기 다른 농도로 첨가하여 준비하고, 전자 수용체로 10 mM Fe (III) citrate를 사용하였다. 각 균주간 일정한 inoculum을 제작, 접종하며 혐기성 상태로 만들어 준 후, 27°C에서 6일간 배양하였다. 6일 경과 후 Fe (II)의 양과 440 nm에서의 흡광도 측정으로 Fe (III) 환원능과 균체의 성장률을 결정하였다.

### Humic acid의 환원과 재산화

Humic acid의 환원과 재산화(reoxidation)를 조사하기 위하여 최소 배지에 전자 수용체로 humic acid 유사체인 anthraquinone-2,6-disulfonic acid (AQDS)를 첨가하고 전자 공여체로는 10 mM sodium lactate를 사용하였다. 각 균주간 일정한 inoculum을 제작하여 접종하며, 27°C 혐기성 상태에서 4일간 배양하였다. 450 nm에서 환원된 형태인 anthrahydroquinone-2,6-disulphonate (AHQDS)의 흡광도 변화를 측정하였으며(19), AHQDS 존재하에 다양한 농도(5, 10, 20, 50 mM)의 nitrate를 첨가해 준 후, 4일간 배양하였다. AHQDS의 재산화를 알아보기 위해 450 nm에서 AHQDS의 흡광도를 측정하여 AHQDS의 변화량을 결정하였다.

### 16S rRNA 유전자 분석

Fe (III) 환원능이 우수한 C2, C3균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 실시하였다. 선택한 두 균주를 tryptic soy agar에 접종하고 27°C에서 1일간 배양 후 0.05 N NaOH 30 µl에 자라난 균주 colony를 one loop씩을 취하여 넣은 후 90°C에서 15분간 반응시켜 template (DNA)를 준비한다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer는 eubacteria의 16S rDNA domain에 특이적으로 부착하여 증폭하는 27F (*E. coli* numbering 8~27: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492~1510: 5'-GGTTACCTGTTCAGACTT-3')를 사용하였다(11). PCR 반응물의 조성은 10 배 반응 용액(100 mM Tris · HCl, 400 mM KCl, 500 µg/ml BSA, pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM dNTPs, 100 pmol primer이며, 준비된 template (DNA) 1 µl와 5 U의 Taq polymerase를 첨가하여 총 50 µl의 혼합물을 만들고 mineral oil 30 µl를 중층하여 반응을 진행시켰다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초씩 30회 반복하

고 마지막에는 72°C에서 10 분간 처리한 후 반응을 중단하였다. 증폭된 PCR 반응물은 agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. DNA sequencing system (ABI PRISM 377 DNA Sequencer)을 이용하여 direct sequencing을 실시하였으며, 결정된 염기 서열을 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)의 database와 비교하였으며, CLUSTAL X와 GeneDoc program (version 2.4)을 이용하여 분류학적 위치를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**시료의 Fe (II) 농도와 Fe (III) 환원능**

소양호와 천호지의 저질토의 Fe (II) 농도는 소양호의 저질토가 163.9 μM g-dwt<sup>-1</sup>, 천호지의 저질토가 49.0 μM g-dwt<sup>-1</sup>로 측정되었다(자료생략). 그러나 Fe (III)의 환원능은 소양호의 저질토가 59.0 μM g-dwt<sup>-1</sup>이었으며 천호지의 저질토가 222.4 μM g-dwt<sup>-1</sup>으로 소양호의 저질토 보다 높았다(Table 1). 소양호의 저질토에서 Fe (II)의 농도가 가장 높은 이유는 소양호의 경우 대규모의 인공호수로 수원지와 가깝고 유기물 유입이 적으며 수위의 편차도 크지 않기 때문으로 추정된다. 수심 80 m에서는 여름철에도 7°C 정도를 유지하고 질소고정능의 변화도 크지 않으며 생태학적으로도 안정된 조건을 보여주므로(1), 오랜 기간 동안 Fe (II)가 축적되어진 것으로 보이며 Fe (III)의 존재 하에 에너지 수율이 높은 Fe (III) 환원이 황 환원과 메탄 생성보다 우선적으로 진행된 것으로 보인다(17). 천호지는 주변 농지를 위한 농업용수의 저장이 목적이고 생활하수의 유입으로 인해 유기물의 농도

가 높으며, 계절별, 시간별 수위의 차가 크기 때문에 Fe (II)의 산화와 Fe (III)의 환원의 주기가 짧을 것으로 추정되어진다. Fe (II)의 함유량이 가장 낮은 이유는 낮은 깊이의 토양시료이기 때문에 산화된 것으로 보이며, 배양 후 높은 Fe (III) 환원능을 보이는 것은 정점 특성상 미생물 분포가 높으며 잦은 수위의 변화로 Fe (III) 환원능이 높은 군집이 서식하고 있는 것으로 추정된다.

**Fe (III) 환원 세균의 분리와 Fe (III) 환원능**

각 정점의 저질토로부터 Fe (III)환원능을 갖는 균주를 선별하여 총 37 균주를 분리하였다. 분리한 균주들의 Fe (III) 환원능은 11.7 μM에서 466.8 μM로 나타났으며(자료생략) 천호지에서 분리된 균주 C2와 C3는 각각 배양 9일에 466.8과 435.4 μM의 Fe (III)환원능을 나타냈다(Table 2). 대표적인 Fe (III) 환원 세균인 *Shewanella putrefaciens*의 경우 30 mM의 탄소원과 50 mM의 Fe (III) citrate 존재 하에서 3일 안에 40 mM 정도를 환원시켰다고 보고하고 있으며(18), 본 실험에서 동일한 조건하에 같이 측정된 *Shewanella putrefaciens* DK-1의 경우 575.1 μM을 환원시켰다(자료생략). 이에 C2균주와 C3균주를 이용하여 실험에 이용하였다.

**전자 공여체**

선택한 균주 C2, C3의 다양한 전자 공여체의 이용 여부를 실험한 결과, 다양한 농도(1, 10, 20 mM)의 glucose에서 성장률과 Fe (III) 환원능이 비례하여 증가하는 것을 볼 수 있었다(Table 3). 균주의 성장은 균주 C2의 경우 1 mM glucose에서 0.1 (OD<sub>440</sub>), 10 mM glucose에서 0.188 (OD<sub>440</sub>)로 나타났으며 20 mM glucose에서 최고 0.207 (OD<sub>440</sub>)의 증가를 보여 주었다. Fe

**Table 1.** Fe (III) reducing activities in sediments of the lake Soyang and Chunho reservoir

Time (days)	Fe (III) reducing activity (μM/g-dwt)	
	Soyang	Chunho
0	0.0	0.0
1	1.5	94.7
2	5.8	180.1
3	17.1	194.2
4	48.8	208.9
5	51.6	215.1
6	59.0	222.4

**Table 2.** The Fe (III) reducing activities of isolated strains

Time (days)	Fe (III) reducing activity (μM)	
	Strain C2	Strain C3
0	0.0	0.0
1	33.7	45.3
3	68.8	98.4
6	205.9	287.9
9	466.8	435.4

**Table 3.** Effect of electron donors on growth rate and Fe (III) reducing activity

		Glucose (mM)			Yeast extract (mg/L)			Acetate (mM)			Ethanol (mM)			Toluene (mM)		
		1	10	20	1	10	20	1	10	20	1	10	20	1	10	20
Strain C2	Growth	0.100	0.188	0.207	0.013	0.089	0.112	0.010	0.008	ND	0.008	0.011	ND	0.004	0.007	0.000
	Fe (III)-reducing activity	229.9	274.5	288.7	196.1	228.4	249.8	ND	20.3	ND	ND	4.1	1.0	ND	ND	ND
Strain C3	Growth	0.128	0.200	0.241	0.023	0.113	0.151	0.010	0.018	ND	0.006	0.002	ND	ND	ND	ND
	Fe (III)-reducing activity	228.3	258.8	289.7	165.2	210.1	240.7	1.5	7.9	ND	3.6	1.5	ND	ND	4.4	ND

(III) 환원능 또한 1 mM glucose에서 229.9  $\mu$ M, 10 mM glucose에서 274.5  $\mu$ M, 20 mM glucose에서 288.7  $\mu$ M로 증가의 양상을 보였으며 C3 균주에서도 정도의 차이는 있지만 glucose의 농도의 증가에 따른 성장률과 Fe (III) 환원능의 증가를 보이므로 실험한 두 균주 모두 glucose를 전자 공여체로써 이용하고 있다는 사실을 알 수 있었다. Yeast extract의 경우에도 glucose보다 약간 낮은 성장률과 Fe (III) 환원능을 보여 주었지만 기질의 농도에 비례하여 성장률과 Fe (III) 환원능 또한 증가하는 것을 볼 수 있었다. 하지만 acetate와 ethanol, toluene의 경우 성장률과 Fe (III) 환원능이 거의 나타나지 않았다. Acetate의 경우 성장률이 0.01 ( $OD_{440}$ ) 이하의 증가와 20  $\mu$ M 이하의 Fe (III) 환원능을 보였으며 ethanol은 0.011 ( $OD_{440}$ ) 이하의 성장률과 4.1  $\mu$ M 이하의 Fe (III) 환원능을 보여주었고, toluene은 가장 낮은 성장률 0.007 ( $OD_{440}$ )과 4.4  $\mu$ M 이하의 가장 낮은 Fe (III) 환원능을 보이므로 이들 기질을 전자 공여체로 이용하고 있지 않고 있다는 사실을 알 수 있었다(Table 3). 이와 같이 acetate를 전자 공여체로 이용하지 못하는 균주로는 *Shewanella putrefaciens*가 있으며(18), *Geobacter metal-lireducens*의 경우 acetate를 전자 공여체로 이용하며 방향족 화합물과 같이 난분해성 물질을 이용한다고 알려져 있다(14). 최근 항구의 유류오염지역의 토양 실험에서 alkane이나 PAHs의 분해가 호기적 조건에서만뿐만 아니라 혐기적 조건에서 Fe (III) 환원 세균 또는 황 환원 세균에 의해 일어난다고 알려져 있다(4).

**Humic acid의 환원과 재산화**

Humic acid는 복잡한 난분해성 혼합물이며 짙은 갈색을 띠는 콜로이드 상태의 유기물질이다. 다양한 토양 유기물에 의해 합성된 유기물로, 형성되어지는 경로에 대해서는 완전하게 알려져 있지 않으며 화학적·생물학적 기작 또한 알려져 있지 않다(22). Humic acid에서 미생물에 의한 호흡의 중요한 electron accepting group은 quinone부위이다(21). 분자량을 알 수 없으며 색상도 짙은 갈색을 띠고 있어 흡광도 변화량의 측정이 불가능하여 quinoid model compound인 AQDS를 이용하여 humic acid의 환원을 확인하였다(6). 균주 C2와 C3 균주는 거의 비슷한 활성을 보여주었으며 AQDS를 전자 수용체로 이용하여 AHQDS의 양이

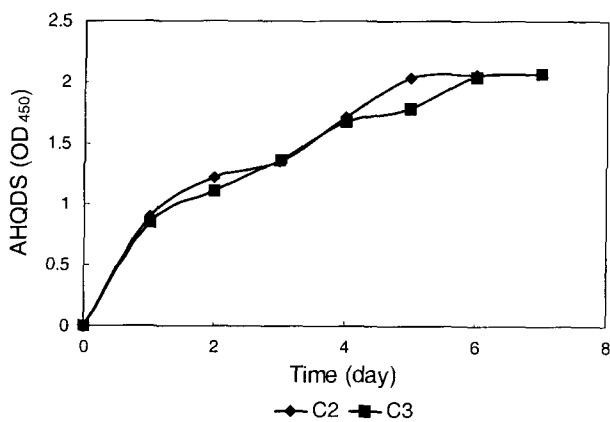


Fig. 1. Reduction of AQDS by isolated strains.

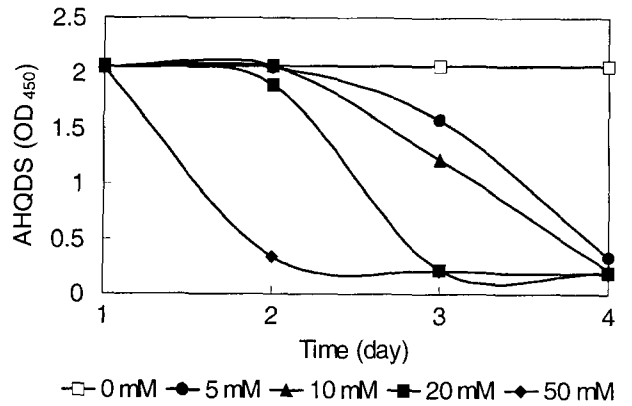


Fig. 2. Reoxidation of AHQDS by C2 strain in various concentrations of nitrate.

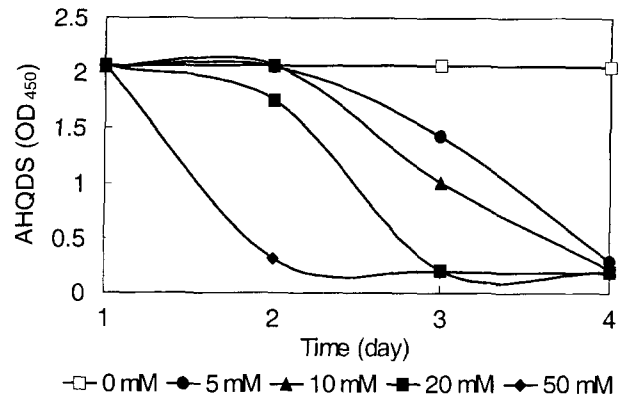
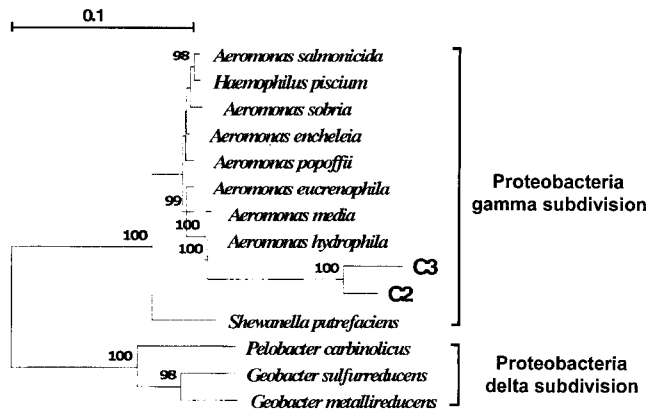


Fig. 3. Reoxidation of AHQDS by C3 strain in various concentrations of nitrate.

증가하는 AQDS 환원능을 보여 주었다(Fig. 1, Fig. 2). AQDS를 환원시킨 각 배지에 다양한 농도의 nitrate를 첨가하고 3 일 경과 후, 두 균주에서 모두 AHQDS가 감소하였으므로 재산화가 일어났다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 가장 높은 농도의 nitrate 존재 하에서 급격한 AHQDS의 감소를 볼 수 있었으며 20 mM과 50 mM의 nitrate 존재 하에서 2일만에 거의 AHQDS가 감소된 것을 볼 수 있었으며 3일째에는 초기값으로 재산화되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, 3). 이전의 연구에서는 미생물에 의한 Fe (III) 환원은 extracellular quinone을 환원할 수 있는 지에 달려 있다고 보고하고 있다(20). 예를 들면 *Geobacteraceae*에 속하는 모든 Fe (III) 환원 세균은 humic acid를 환원시킬 수 있는 반면 가장 가까운 종의 *Desulfomonile tiedjei*는 Fe (III)와 humic acid 모두 환원시키지 못한다(12). 이러한 사실로 환원된 humic acid를 산화시키는 것은 dissimilatory Fe (III) 환원 균주로 제한되어 있음을 추정할 수 있다. 본 실험의 결과에서도 실험에 사용된 Fe (III) 환원 세균으로 분리된 두 균주가 모두 humic acid를 환원시키고 또한 nitrate 환원에 의해 humic acid를 다시 산화시키는 것을 볼 수 있었다. 혐기성 생태계에서 humic acid의 미생물에 의한 대사는 nitrate 존재 시 humic acid가 산화되면서 nitrate를 환원시키는 것과 같이 자연계의 높은 산



**Fig. 4.** Phylogenetic tree showing placement of the Fe (III) reducing isolates. Bootstrap values are shown for nodes that had >90% support in a bootstrap analysis of 100 replicates.

화 환원 전위를 갖는 물질(비소, 셀레늄)들이 존재 할 때 자신은 산화되면서 이들을 독성이 없는 산화도로 환원시키는 역할을 기대할 수 있다는 점에서 생태학적으로 혐기성 생태계의 연구의 중요한 대사라 할 수 있겠다.

**16S rRNA 유전자 분석**

PCR 결과 증폭된 16S rDNA gene을 주형으로 direct sequencing을 실시한 결과, 약 700 bp의 염기 서열이 결정되었다. 결정된 염기서열을 가지고 GenBank의 database와 비교한 결과, *Aeromonas hydrophila*와 95%, *Aeromonas media*와 94%의 유사성을 나타내었다(자료생략). 분석한 균주 C2와 C3와 *Aeromonas hydrophila*의 염기 서열을 재배열하여 phylogenetic tree를 그린 결과를 보면(Fig. 4), *Shewanella putrefaciens*와 함께 proteobacteria gamma subdivision에 속하는 것으로 나타났다. *Aeromonas hydrophila*의 경우 주로 음식물과 음용수에서 분리되는 병원성 세균으로 많은 연구와 배양법이 연구되어지고 있는 균주이다(9). Fe (III) 환원과 관련된 균주로는 같은 종의 *Aeromonas veronii*가 제한된 기질 하에서 dissimilatory iron 환원에 대한 연구가 있었다(10).

**감사의 글**

이 연구는 2001년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

**참고문헌**

1. 이일규. 1994. 소양호와 대청호에서의 중속영양세균에 의한 질소고정능. 단국대학교 대학원 석사학위 논문.
2. Arnold, R. G., M.R. Hoffmann, T.J. Dischristina, and F.W. Picardal. 1990. Regulation of dissimilatory Fe (III) reduction activity in *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2811-2817.
3. Canfield, D.E. 1989. Reactive iron in marine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53, 619-632.
4. Coates, J.D., J. Woodward, J. Allen, P. Philp, and D.R. Lovley.

1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3589-3593.
5. Cornwell, J.C. 1986. Diagnostic trace-metal profiles in arctic lake sediment. *Environ. Sci. Technol.* 20, 299-302.
6. Dummivant, F.M., R.P. Schwarzenbach, and D.L. Macalady. 1992. Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2133-2141.
7. Gaspard, S., F. Vazquez, and C. Holliger. 1998. Localization and solubilization of the iron (III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3188-3194.
8. Ghiorse, W.C. 1988. Microbial reduction of manganese and iron, pp. 305-331. In A.J.B. Zehnder(ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
9. Handfield, M., P. Simard, and R. Letarte. 1996. Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3544-3547.
10. Knight, V., F. Caccavo, S. Wudyka, and R. Blakemore. 1996. Synergistic iron reduction and citrate dissimilation by *Shewanella alga* and *Aeromonas veronii*. *Arch. Microbiol.* 166, 269-274.
11. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y. pp. 115-175.
12. Lonergan, D.J., H. Jenter, J.D. Coates, E.J.P. Phillips, T. Schmidt, and D.R. Lovley. 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe (III) reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 2402-2408.
13. Lovley, D.R. 1991. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Microbiol. Rev.* 55, 259-287.
14. Lovley, D.R. 1997. Microbial Fe (III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 305-313.
15. Lovley, D.R. and E.J.P. Phillips. 1986. Organic matter mineralization with Reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 683-689.
16. Lovley, D.R. and E.J.P. Phillips. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480.
17. Lovley, D.R. and E.J.P. Phillips. 1992. Reduction of uranium by desulfovibrio desulfuricans. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 850-856.
18. Lovley, D.R., E.J.P. Phillips, Jr. Frank Caccavo., H.K. Nealson, and C. Myers. 1992. Letter to the editor: Acetate oxidation by dissimilatory Fe (III) reducers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3205-3208.
19. Lovley, D.R., E.J.P. Phillips, D.J. Lonergan, and P.K. Widman. 1995. Fe (III) and S<sup>0</sup> oxidation by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2132-2138.
20. Lovley, D.R., J.D. Coates, E.L. Blunt-Harris, E.J.P. Phillips, and J. Woodward. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature.* 382, 445-448.
21. Scott, D.T., D.M. McKnight, E.L. Blunt-Harris, S.E. Kolesar, and D.R. Lovley. 1998. Quinine moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humic-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2984-2989.
22. Stevenson, F.J. 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. John Wiley & Sons, New York, N.Y. pp. 68-87.

(Received May 24, 2002/Accepted June 10, 2002)

---

**ABSTRACT: Characterization of Fe (III)-Reducing Bacteria Isolated from the Sediment of Chunho Reservoir**

**Jae-Heung Park, Il-Gyu Lee, Eun-Hyoung Jeon and Tae-Young Ahn\*** (Dept. of Microbiology, Dankook University, Chunan 330-714, Korea)

Microbial Fe (III) reduction is important for the biogeochemical cycle in the sediment of freshwater system. Also, the Fe (III) reducing mechanism make a model of oxidizing organic compounds and reducing toxic heavy metals, such as chrome or uranium. Thirty-seven strains which have Fe (III) reducing activity were isolated from sediments in lake Soyang and Chunho reservoir. The initial concentration of Fe (II) was the highest in sediments of lake Soyang. However, the highest Fe (III) reducing activity was shown in Chunho reservoir. All isolates were tested for Fe (III) reducing activity. Strains C2 and C3, which were isolated from sediments of Chunho reservoir, showed the highest activity. These strains were tested to see if they utilize various electron donors such as glucose, yeast extract, acetate, ethanol and toluene. Significantly, glucose and yeast extract were used as electron donors. Also these strains were confirmed to use humic acid and nitrate as electron acceptors. The 16S rRNA sequences of strains C2 and C3 were closely related to *Aeromonas hydrophila* with 95% similarity.