

바이칼의 담수 스폰지에서 분리한 방선균의 특성 연구

정유정 · 정요찬 · 안태석*
강원대학교 환경과학과

Characterization of Actinomyces Isolated from Freshwater Sponges in Lake Baikal

You-Jung Jung, Yochan Joung, and Tae-Seok Ahn*

Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received February 23, 2011 / Accepted June 28, 2011)

Five strains of *Actinomyces* were isolated from freshwater sponges, *Baikalospongia* and *Lubomirskia*, in Lake Baikal. By 16S rRNA sequencing, isolates were identified as *Streptomyces griseoplanus*, *S. halstedii*, *S. violascens*, *S. flavovirens*, and *S. microflavus*. Isolates had different characteristics of growth temperature, carbon utilization, enzyme activity, and cellular fatty acid composition. Optimum growth conditions of isolates were 30-37°C, pH 8-9, and 0-1.5% salt concentrations. Major fatty acid compositions were anteiso-C_{15:0}, iso-C_{15:0}, and iso-C_{16:0}. Strain ATS-BA-19 had DNase and chitinase activities and strain ATS-BA-16 had cellulase and protease activities. Colonies of strain ATS-BA-15 and ATS-BA-19 made inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Actinomycetes, fresh water, lake Baikal, sponge

바이칼 호는 동 시베리아 남부에 위치한 호수로 세계에서 가장 깊고 오래된 호수이다. 바이칼 호수내에는 2,000여 종의 동식물이 서식하고 있으며 이 중 75%가 고유종이고, 호수 유역에는 약 3,500여 종의 동식물이 서식하는데 이 중 84%는 이 수역에만 서식하는 고유종이다. 또한 바이칼 호수의 영양 상태는 연중 평균 수온이 10°C이며 극심한 빈영양 상태로 미생물의 생장이 저온과 빈영양에 의하여 이중적으로 제한되는 상태이다. 이러한 바이칼 호에서 서식하는 생물도 환경에 적응된 고유종으로 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

현재 열대 해양, 온난 담수 등 다양한 지역에서 발견된 스폰지는 약 10,000여 종으로 담수 스폰지는 200여 종이다(8). 그 중 바이칼 호수에 서식하는 담수 스폰지는 현재 2과 7속에 14종이 분류되어 있다(9). 스폰지는 계통학적으로 선캄브리아기의 후생 동물과 깊은 관계를 가지고 있는 동물로(10, 19) 체내에 수많은 관을 가지고 있어 방대한 양의 물을 흡수한 뒤 유기물만을 남기고 물은 배출하는 여과 기능을 가지고 있고, 식균작용을 통하여 세균을 흡입하여 체내에 가지고 있다(5, 13, 15, 20). 이러한 스폰지는 다양한 2차 대사물질을 생산하여 그 독특한 구조와 함께 신물질 개발의 재료로서 많은 주목을 받아 왔다(4, 14, 17). 바이칼 호에 서식하는 담수 스폰지

에 관한 선행 연구는 fluorescence in situ hybridization (FISH) 방법으로 분석한 스폰지의 세균 군집 구조 분석과 polymerase chain reaction amplified 16S rRNA denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)와 cloning을 사용한 스폰지 세균의 공생세균 군집 분석에 관한 연구 등이 있다. 연구 결과 Cyanobacteria가 스폰지에 공생하면서 호수의 1차 생산자 역할을 함을 확인할 수 있었다. 또한 스폰지는 호수 연안대에서 광합성 조류와의 공생 관계를 보이는 것으로 나타났으며, 스폰지의 세균 군집 구조는 바이칼 호수에서의 세균 군집구조와 차이가 있다(22). Parfenova 등(12)의 연구에 따르면 스폰지 내 광합성 미생물인 Algae와 Cyanobacteria가 종속영양미생물 군집과 경쟁을 한다고 보고했다.

반면, 방선균은 균사상으로 성장하는 특성을 가지는 그람 양성균으로 주로 토양에 널리 분포하고 있으며, 세균의 특성을 나타내기도 하고 일부는 곰팡이와 유사한 특성을 나타내어 형태적 생리적 특성이 매우 다양하다. 다양한 특성을 가지는 방선균은 항생물질로 이용 가능한 2차 대사산물을 생성하는데 이러한 2차 대사산물은 그 배양환경 및 배지의 성분에 많은 영향을 받는다(21). 또한 효소, 효소 저해제, 면역조절물질 등 여러 생리활성 물질을 생성하는 방선균은 광범위한 기질을 분해하는 분해자로서 생태계의 물질 순환에 크게 기여할 뿐만 아니라(1, 6, 16) 산업적으로도 그 연구 가치가 매우 중요한 미생물이다(18). 항생물질의 개발은 1928년 Fleming이 곰팡이

* For correspondence. E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr; Tel: +82-33-250-8574; Fax: +82-33-251-3991

로부터 penicillin을 발견한 이후부터 시작되었으며(11), 1942년 Waksman이 그람 양성 및 음성균 그리고 결핵균에 유효한 항생물질인 streptomycin을 방선균으로부터 발견하였다. 그 후 많은 연구가 진행되어 현재 미생물의 대사산물로부터 발견된 10,000여 종의 항생물질 가운데 74% 이상이 방선균에 의해서 생산되는 것으로 그 중 75%는 *Streptomyces* 속으로부터 생산되고 있다(3).

그러나 지금까지 이러한 방선균 연구는 토양유래 방선균을 중점적으로 진행되어 새로운 물질의 분리에 한계가 다다르고 있다. 따라서 최근에는 새로운 환경인 해양에서의 방선균 연구가 진행되고 있고 또 다양한 환경에서 방선균 분리의 필요성이 대두되어 연구가 진행중에 있다(7). 그러므로 이 연구에서는 특수한 환경인 바이칼호수의 담수스폰지에 서식하는 방선균을 분리하고 그 특성을 알아보았다.

재료 및 방법

시료 채취

시료는 러시아 Listvyanka에 위치한 남 Baikal 호수(51° 50' 41.6"N, 104° 54' 10.5"W)에서 채취하였다(Fig. 1). 시료는 수심 15 m 아래의 바닥에서 2속의 스폰지(*Baikalospongia*와 *Lubomirskia*)를 직접 다이버를 동원하여 채집하였고, 스폰지 주변의 물은 멸균된 주사기로 400 ml를 채수하여, 현장에서 0.2 µm pore-size filter를 이용하여 여과하였다. 온도, 전기 전도도, pH 등의 환경요소는 시료 채취 후 즉시 측정하였다. 채취한 샘플을 호수 물을 채운 멸균 용기에 넣어 냉장 상태로 실험실로 이송하여 분석하였다.



Fig. 1. Map of the sampling site at Lake Baikal in Russia.

시료의 전처리 및 세균의 분리

운반된 스폰지에 3차 멸균 증류수를 첨가하여 충전물을 회수하였다(Limnological Institute, Russian Academy of Science). 저온 세균을 분리하기 위한 배지로는 R2A (BD, USA)를, 방선균을 분리하기 위해서 Glycerin Casein Agar (GCA; 2% Agar, 1% glycerol, 0.2% KNO₃, 0.2% NaCl, 0.2% K₂HPO₄, 0.03% casamino acid, 0.005% MgSO₄ 7H₂O, 0.002% CaCO₃, 0.001% FeSO₄ 7H₂O)를 선택하였으며 10⁰부터 10⁶까지 희석한 시료를 0.1 ml씩 주입평판법으로 접종하였고, 27°C에서 배양하였다. 배양 후 형태와 크기가 다른 colony를 선별하여 각각 R2A, GCA 배지에서 순수분리하였다.

분리한 방선균의 16S rRNA gene 염기서열 분석

분리한 방선균을 R2A 배지에 계대배양 한 후 자란 colony를 이용하여 colony direct PCR을 실시하였다. 순수 분리된 단일 colony를 Lysis Buffer 50 µl에 넣고 끓는 물에서 5분간 끓여주었다. 이 과정에서 추출된 DNA를 template로 하여 16S rRNA 증폭을 위한 PCR을 수행하였다. PCR반응은 추출한 DNA template에 TaKaRa Ex Taq™ (5 unit/µl), 10× Ex Taq™ buffer, MgCl₂ (25 mM), dNTP mixture (2.5 mM each) 그리고 primer를 첨가하여 총량을 50 µl가 되게 하였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 후, DNA 밴드를 확인하였다. 각 균주의 염기서열은 EzTaxon server 2.1에 따라 종명을 동정하였다. 분리된 균주의 계통관계를 파악하기 위하여 Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>), GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database로부터 확인된 염기서열을 MEGA program (ver.4.0)를 이용하여 정렬하였고, Jukes Cantor distance model과 neighbor joining method법을 사용하여 계통도를 작성하였다.

방선균의 성장 환경

분리된 방선균의 최적 성장 환경을 검토하기 위하여 배양 온도와 초기 pH, 염분의 조건을 조절한 R2 broth에 전배양액을 1% (v/v)가 되도록 각각 접종하여 균주의 생육 정도를 조사하였다. 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 42°C에서 배양하였으며, 여기서 최적온도를 알아보려고 하였다. pH는 5, 6, 7, 8, 9로 조절하고 염분은 0, 0.5, 1, 1.5%로 조절하였다. 전배양액은 균주를 각각 R2A broth에 접종하여 27°C에서 2일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

형태 및 생화학적 특성

분리된 균주의 형태학적 특징을 알아보기 위하여 그람염색을 실시한 후 광학현미경(OlympusBX60, Japan)으로 관찰하였다. 균주들의 생화학적 생리 상태를 알아보기 위하여 API 20NE kit (bioMérieux, France)를 사용하였다. R2 broth (Difco Lab., USA) 배지에 분리된 균주를 접종하여 배양한 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 혼탁도를 0.5 McFarland에 맞추고, 잘 혼합된 균주현탁액을 API 20NE strip (bioMérieux)에 무균적으로 분주한 다음 27°C에서 배양하면서 24시간, 48시간 후 미

생물 증식에 의한 색의 변화 여부를 관찰하였다. Oxidase test는 분리된 균주를 R2A에 18시간 배양한 후 colony 일부를 멸균한 백금으로 취해 슬라이드 글라스에 도말한 후 시약(1% N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) 두 방울을 시험할 집락에 직접 떨어뜨렸다. Catalase test는 분리된 균주를 R2A에 18시간 배양한 후 colony 일부를 멸균한 백금으로 취해 슬라이드 글라스에 도말한 후 3% H₂O₂를 가하여 기포 생성 유무를 확인하였다.

효소 활성 검증

분리한 방선균의 유기물질 분해 효소 활성을 알아보기 위하여 섬유소, 전분, 단백질 그리고 지방을 함유한 평판 배지에 분리한 방선균을 접종하고 27°C에서 48시간 배양하였다. Cellulase를 분비하는 균주는 CM-cellulose가 포함된 배지에서 배양 후 분해 여부를 조사하기 위하여 0.1% (w/v) Congo-red로 30분간 염색하였다. 그 후 1 M NaCl 용액으로 30분간 처리하여 colony 주변에 yellow halo가 형성 되었는지 확인하였다. Amylase 생산 균주는 starch가 1%가 함유된 배지에서 배양 후 루골 용액(Lugol's solution)으로 염색하여 colony 주위에 clear zone이 형성된 것으로 결과를 알아보았다. Protease 생산 균주는 skim milk가 함유된 배지에서 배양 후 clear zone이 보이는 것으로, lipase 생산 균주는 sprite blue agar에서 배양 후 white precipitate가 보이는 것으로 활성정도를 판단하였다. DNase 생산 균주는 배양 후 clear zone이 형성된 것을 보았고, chitinase는 colloidal chitin의 분해 여부로 판단하였다(15).

균체 지방산 조성 분석

분리된 방선균의 지방산 조성을 알아보기 위하여 실험을 하였다. 균체의 지방산 추출은 다음과 같은 5단계로 진행되었다. 먼저 Harvesting 단계로 R2A 배지에서 48시간 키운 방선균을 loop를 이용하여 cap tube에 모았다. 다음은 saponification 단계로 균체가 모인 cap tube에 1 ml의 reagent 1을 첨가하여 10초간 섞은 후 100°C에서 5분간 끓여 주었다. 다시 10초간 섞은 뒤 100°C에서 25분간 끓이고 1분간 식혔다. 세 번째는 Methylation 단계로 cap tube에 2 ml의 reagent 2를 첨가하여 10초간 섞은 후 80°C에서 10분간 끓인 뒤 1분간 식혔다. 네 번째는 Extraction 단계로 reagent 3을 1.25 ml 첨가한 후 10분간 흔들어 준 뒤 pasteur pipette으로 cap tube 바닥에 가라앉은 용액을 제거하였다. 마지막으로 Wash 단계는 reagent 4를 3 ml을 넣고, 5분간 흔들어 준 뒤 분리된 추출된 지방산을 GC vial에 담았다. 전 처리된 지방산 분석은 다음의 조건에서 GC (model 7890: Hewlett Packard)를 이용하였다. 분석용 칼럼은 25 m, 0.2 mm phenyl methyl silicone fused silica Capillary column을 사용했고 분석온도는 MIDI program에서 제시하는 온도로 분석을 진행하였다. Sherlock software를 이용하여 GC에서 분석된 chromatogram과 data를 정성 및 정량 분석하여 이를 library와 대조하여 지방산을 명명하였다.

항균활성 조사

방선균의 항균 활성을 알아보기 위하여 한국생명공학연구원(KCTC)에서 다음의 균주를 분양받아 시험균으로 사용하였다. 그람 양성 시험균으로 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (KCTC1021), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCTC 1916), 그람 음성 시험균으로 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC2513), yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*를 시험균으로 *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC7904)를 사용하였다. R2 broth에 계대 배양된 균액을 625 nm에서 흡광도를 측정하여 혼탁도를 0.5 McFarland에 맞춘 후 NA 배지에 주입평판법을 이용하여 접종하였다. 배양된 균액을 paper disk에 각각 분주하여 disk가 충분히 흡수하도록 하였고 이를 완전히 건조시킨 후 시험균 배지위에 올려놓아 paper disk 범으로 항균활성 여부를 알아보았다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선별

시료채취 현장인 바이칼 호수 15 m 아래 바닥의 수온은 3.0°C로 5.5°C인 표층수와 크게 차이가 나지 않았다. 그리고 pH와 전기전도도 또한 각각 7.3과 12.46 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 으로 수온 또는 화학적 변이도가 거의 없음을 알 수 있었다.

채취한 스폰지 시료에서 회수한 총진물을 주입평판법으로 R2A 배지와 GCA 배지에 접종하여 27°C에서 배양한 후 자란 colony의 형태와 모양에 따라 R2A 배지에 순수분리하여 30균주를 선별하였다. R2A배지에서 순수분리된 균주들 중에서 colony의 형태와 모양에 따라 2차 선별을 실시하여 5개의 균주를 선별하였다. 선별된 5균주는 각각 ATS-BA-1, ATS-BA-4, ATS-BA-15, ATS-BA-16, ATS-BA-19로 명명하였다. 균주 ATS-BA-1, ATS-BA-4, ATS-BA-16의 3균주는 *Lubomirskia*에서 분리되었고 ATS-BA-15, ATS-BA-19의 2균주는 *Baikalospongia*에서 분리되었다.

모든 균주가 30-37°C에서 최적 성장을 보여 중온성 방선균으로 나타났으며, 최적의 pH는 8-9로, 염분 농도는 0-1.5%까지 최대 생장을 하는 것으로 나타났다.

분리한 방선균의 16S rRNA gene 염기서열 분석

분리한 5개 방선균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 27-1,542 bp 영역에서 증폭하고 판독하여 EzTaxon의 표준 균주들 염기서열과 비교한 결과, 분리된 균주는 모두 *Streptomyces* 속에 속하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). ATS-BA-4는 *Streptomyces griseoplanus*로 동정되었고, ATS-BA-1는 *Streptomyces halstedii*, ATS-BA-15는 *Streptomyces violascens*, ATS-BA-16는 *Streptomyces flavovirens*, ATS-BA-19는 *Streptomyces microflavus*로 각각 동정되었다. 분리된 균주는 모두 표준균주와 99% 이상의 염기서열 유사도를 나타내었다. *Streptomyces*는 방선균의 1속으로 균사(직경 0.5-2 μm)를 형성하며 토양에 널리 분포하고 있다. 방선균 중 가장 다양한 종을 포함하며, 약 2,000종류의 생리활성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있

나타났다(Table 1). 탄소원의 경우 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, adipic acid, malate, trisodium citrate는 이용가능 하였으며 maltose, potassium gluconate, capric acid는 이용하지 못하는 것을 보였다. 균주 ATS-BA-4는 NO₃ reduction, indole, glucose acidification, arginine dihydrolase, urease는 음성으로 나타났고, β-glucosidase, protease, β-galactosidase는 양성으로 나타났다(Table 1). 탄소원의 경우 모두 이용하지 못하는 것을 알 수 있었다. 균주 ATS-BA-15는 NO₃ reduction, β-glucosidase, protease, β-galactosidase가 양성으로 나타났고, glucose acidification, arginine dihydrolase, urease는 음성으로 나타났다(Table 1). 탄소원은 capric acid, adipic acid을 제외한 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, potassium gluconate, malate, trisodium citrate, phenylacetic acid를 모두 이용가능 하였다. 균주 ATS-BA-16의 경우 NO₃ reduction, indole, glucose acidification, arginine dihydrolase, urease, protease는 음성이 나타났고 β-glucosidase, β-galactosidase 두 가지만 양성으로 나타났다(Table 1). 탄소의 경우 maltose,

potassium gluconate, capric acid, adipic acid, phenylacetic acid를 제외한 glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine malate, trisodium citrate, phenylacetic acid는 이용 가능하였다. 균주 ATS-BA-19는 NO₃ reduction, glucose acidification, arginine dihydrolase, urease는 음성으로 나타났고 β-glucosidase, protease, β-galactosidase는 양성으로 나타났다. 탄소의 경우 glucose, capric acid를 제외한 arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, potassium gluconate, adipic acid, malate, trisodium citrate, phenylacetic acid를 이용하였다. API 20NE kit를 이용하여 그 생화학적 특성을 알아본 결과, 바이칼에서 분리한 5개 균주들은 다양한 특징을 나타내는 것을 알 수 있었다. 방선균은 여러 가지 탄소원을 이용할 수 있는 특징을 지니는 것이 바이칼에서 분리한 방선균이 다양한 탄소원에서 공통점을 나타내지 않는 특징을 지닌 것으로 사료된다.

NADH로부터 산소로 전자 전달을 촉매하는 cytochrome oxidase 또는 indophenol oxidase (iron-containing hemoprotein)를 세포내에 함유하고 있는지를 알아보기 위하여 실시한 oxidase 실험결과는 ATS-BA-1, ATS-BA-4, ATS-BA-15의 세 균주가 양성반응을 나타내었고, ATS-BA-16과 ATS-BA-19의 두 균주는 음성 반응을 나타내었다. 또한 Hydrogen peroxide를 물과 산소로 전환하는 catalase를 생산하는지 여부를 알아보기 위하여 실시한 catalase 실험은 분리된 5개 균주 모두 양성 반응을 나타내었다.

Table 1. Differential phenotypic characteristics of isolated strains from freshwater sponges in Lake Baikal

Characteristic	Strain				
	ATS-BA-1	ATS-BA-4	ATS-BA-15	ATS-BA-16	ATS-BA-19
Oxidase	+	+	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
NO ₃ reduction	-	-	+	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Glucose fermentation ^a	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase ^a	+	-	-	-	-
Urease ^a	+	-	-	-	-
β-Glucosidase	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	-	+
β-Galactosidase	+	+	+	+	+
Glucose	+	-	+	+	-
Arabinose	+	-	+	+	+
Mannose	+	-	+	+	+
Mannitol	+	-	+	+	+
N-Acetyl-glucosamine	+	-	+	+	+
Maltose	-	-	+	-	+
Potassium gluconate	-	-	+	-	+
Capric acid	-	-	-	-	-
Adipic acid	+	-	-	-	+
Marate	+	-	+	+	+
Trisodium citrate	+	-	+	+	+
Phenylacetic acid	-	-	+	-	+
Cellulase	-	-	+	+	-
Amylase	-	-	-	-	-
Protease	+	-	-	+	-
Lipase	-	-	+	-	-
DNase	+	+	+	+	+
Chitinase	-	-	-	-	+

분리한 방선균의 효소활성도 측정

분리한 균주의 cellulase, amylase, protease, lipase, DNase 활성과 chitinase 활성을 알아보았다. 균주 ATS-BA-1은 protease와 DNase 활성을 나타내었으며 균주 ATS-BA-4는 DNase 활성만을 나타내었다. 균주 ATS-BA-15는 cellulase, protease, DNase 효소 활성을 나타내었고, 균주 ATS-BA-16은 cellulase, protease, DNase 활성을 띄었으며 균주 ATS-BA-19는 DNase 활성과 chitin을 분해하는 것을 알 수 있었다. 분리된 5개의 방선균은 모두 DNase 활성을 띄었고, 각각의 기질별로 cellulase 2균주, protease 3균주, lipase 2균주가 활성을 띄었다. Chitin 분해능력은 2개 균주에서 나타났고 amylase 활성을 나타내는 균주가 없었다. 분리한 균주의 효소 활성을 측정하였을 때 섬유소와 단백질의 이용도가 높음을 알 수 있었는데, 이는 외부에서 유입되는 유기물과 식물 플랑크톤을 이용하기 때문으로 사료된다(12). 또한 균주 ATS-BA-19는 chitinase 활성이 있는 것으로 많은 *Streptomyces* 내에서 chitinase 활성이 나타나는 것(15)과 유사한 결과를 나타내었다.

분리한 방선균의 지방산 조성 분석

분리한 균주의 세포벽 지방산 조성 분포는 다음과 같다 (Table 2). 균주 ATS-BA-1의 주요 지방산은 iso C_{15:0} (47.9%)과 anteiso C_{15:0} (36.3%)로 조성되어 있었다. 균주 ATS-BA-4는 전체 지방산 중에 C_{16:0} (23.6%)이 가장 높은 비율로 조성되어 있었다. 균주 ATS-BA-15는 iso C_{15:0} (20.5%),

Table 2. Cellular fatty acid compositions (%) of isolated strains from freshwater sponges

Fatty acids	ATS-BA-1	ATS-BA-4	ATS-BA-15	ATS-BA-16	ATS-BA-19
iso C _{13:0}	nd	nd	nd	0.6	tr
iso C _{12:0} 3OH	nd	nd	1.1	nd	nd
C _{12:1} 3OH	nd	0.8	tr	nd	nd
C _{12:0} 3OH	nd	1.4	0.8	nd	nd
iso C _{14:0}	nd	nd	20.5	1.4	5.0
C _{14:0}	tr	1.0	0.7	nd	1.4
C _{13:0} 2OH	nd	nd	0.7	nd	nd
iso C _{15:0}	47.9	0.2	5.1	46.2	5.0
anteiso C _{15:0}	36.3	0.8	18.9	38.4	27.4
iso C _{14:0} 3OH	nd	nd	2.0	nd	nd
alcohol C _{16:1} ω7c	1.7	nd	11.3	1.5	nd
iso C _{16:1} H	nd	nd	nd	nd	3.8
iso C _{16:0}	2.0	0.5	5.9	1.8	13.0
C _{16:1} ω11c	0.8	nd	1.8	0.7	nd
C _{16:0}	1.2	23.6	4.9	1.3	9.0
C _{15:0} 2OH	nd	nd	0.8	nd	nd
iso C _{17:1} ω10c	1.3	nd	0.5	1.7	nd
Sum In Feature 9	nd	nd	nd	nd	1.3
anteiso C _{17:1} ω9c	nd	nd	nd	nd	3.5
iso C _{17:0}	1.5	nd	0.2	1.5	0.7
anteiso C _{17:0}	3.0	nd	0.8	3.0	4.7
C _{17:1} ω8c	nd	0.9	tr	2.0	tr
C _{17:1} ω6c	nd	0.5	nd	nd	nd
cyclo C _{17:0}	nd	nd	nd	nd	4.9
iso C _{18:0}	nd	nd	nd	nd	0.8
C _{18:0}	nd	1.1	0.5	nd	nd
11-methyl C _{18:1} ω7c	nd	1.3	0.5	nd	nd
cyclo C _{19:0} ω8c	nd	nd	1.6	nd	nd
Sum In Feature 3	nd	5.4	2.7	nd	16.6
Summed Feature 4	1.7	nd	1.0	2.0	nd
Summed Feature 5	nd	nd	0.3	nd	tr
Summed Feature 8	nd	62.1	14.9	nd	0.8

* Summed features represent groups of two or three fatty acids that could not be separated using the MIDI system. Summed feature 3 comprised iso-C_{15:0}-2-OH and/or C_{16:1}ω7c, Summed feature 4 comprised anteiso C_{17:1} B and/or iso-C_{17:1} I, Summed feature 5 comprised ante-C_{18:0}/C_{18:2} ω6c and Summed feature 8 comprised C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c.

anteiso C_{15:0} (18.9%), alcohol C_{16:1} ω7c (11.3%)가 주요 지방산으로 조성되어 있었고 균주 ATS-BA-16의 경우 iso C_{15:0} (46.2%), anteiso C_{15:0} (38.4%), 균주 ATS-BA-19는 anteiso C_{15:0} (27.4%)와 iso C_{16:0} (13.0%)으로 주로 조성되어 있었다.

균주 ATS-BA-1, ATS-BA-15, ATS-BA-16, ATS-BA-19의 지방산 조성은 대부분의 방선균은 지방산 조성과 유사하게 anteiso C_{15:0}이 주된 구성성분이었고, 균주 ATS-BA-4는 특이하게 C_{16:0}이 주된 구성성분이었다.

분리한 방선균의 항균활성

그람 음성균, 그람 양성균, 효모에 대하여 분리된 방선균의 항균 활성을 알아 보았다. 균주 ATS-BA-14의 경우 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*와 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*에 대한 항균활성을 볼 수 있었다. 특히 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*에 대하여 활성을 나타내었다 (Table 3). 균주 ATS-BA-15의 경우 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균 활성이 있었고, ATS-BA-19의 경우 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에 대한 항균 활성을 띠었다. 그러나 균주 ATS-BA-1, ATS-BA-4, ATS-BA-16는 3개의 시험균에서 모두 항균활성이 나타나지 않음을 볼 수 있었다. 분리된 균주 중 그람 음성 시험균에서 항균 활성을 보이는 균주가 2개(ATS-BA-15, ATS-BA-19) 있었으며 효모 시험균에서 항균 활성을 보이는 균주가 1개(ATS-BA-19) 있었다. 두 가지 이상의 시험균에서 항균 활성을 보이는 균주는 1개(ATS-BA-19)가 있었다. 분리된 균주중 ATS-BA-1과 같은 유전적 유연관계로 나타났던 ATS-BA-4 균주에서는 그람 양성 시험균에서 항균 활성을 나타냈다.

바이칼과 스폰지 내 세균 군집구조를 pyrosequencing 결과 (결과 미제시)는 *Baikalospingia*과 *Lubomirskia*에서 *Sphingobacteria*가 46%, 39%로 우점하고, 바이칼 호수는 *Flavobacteria*가 19%로 우점하고 있는 것으로 나타났다. 또, 방선균은 *Baikalospingia*, *Lubomirskia*와 호수수계에서 각각 6, 8과 17%를 차지하고 있었다. 이들 방선균은 호수 생태계와는 다른 종류의 방선균이 존재함을 pyrosequencing을 통해 확인하였다. 바이칼에 존재하는 스폰지는 후생동물로 많은 물을 흡수하여 배출하면서 유기물을 남기고 그것을 이용하는 방법으로 생존한다. 따라서 바이칼의 스폰지에서 분리된 방선균들은 일반토양에서 생존하는 방선균과 다른 환경에서 존재할 것으로 추측한다. 이러한 과정에서 생산되는 다양한 대사물과 유기물들이 스폰지에 존재할 가능성이 매우 높다. 따라서 이번에 분리한 5종의 방선균은 이러한 환경내에서 스폰지와 밀접한 관계를 가지고 있으면서, 바이칼 내의 수계와도 밀접한 영향을 가지고 있는 균주로 추측한다. 특히 ATS-BA-15와 ATS-BA-19 균주들은 그람 음성세균에 대한 항균 활성물질이

Table 3. Antimicrobial activity of isolated strains from freshwater sponges in Lake Baikal

	Strains				
	ATS-BA-1	ATS-BA-14	ATS-BA-15	ATS-BA-16	ATS-BA-19
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	+

* Symbols denote positive (+) and negative (-)

존재하는 것으로 확인이 되었다. 바이칼 지역에 사는 특수한 미생물인 점과, 그 곳에서 분리한 미생물이 항균활성물질들을 분비한다는 점에서 우리나라에서 존재하지 않는 환경내에서 분리한 미생물에서 확인되었으므로 그 가치가 높다고 추측한다. 아울러 국외의 여러 다양한 환경에서 미생물의 발견 및 유용자원으로 활용에 대한 탐색이 이루어져야 한다.

적요

러시아의 바이칼에 존재하는 고유종인 *Baikalospongia*과 *Lubomirskia*의 sponge로부터 방선균을 분리하였다. 분리된 방선균은 16S rRNA gene 분석 결과, *Streptomyces griseoplanus*, *S. halstedii*, *S. violascens*, *S. flavovirens*, *S. microflavus*에 각각 속하였다. 이 방선균들은 온도, 탄소이용, enzyme 활성, fatty acid 조성 등의 실험 결과에서, 각각 서로 다른 특징을 나타냈었다. 분리된 방선균의 배양온도는 30-37, pH는 8-9, 염분농도는 0-1.5에서 가장 잘 자라는 것으로 확인되었다. 주요 cellular fatty acid는 anteiso-C_{15:0}, iso-C_{15:0} and iso-C_{16:0}로 나타났다. 특히 ATS-BA-19는 DNase와 chitinase 활성을 나타내었고, ATS-BA-16는 cellulase와 protease 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또 두개의 분리된 방선균에서 그람 음성 균주인 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생장을 저해함을 확인하였다.

감사의 말

이 연구는 극지연구소의 “바이칼호 서식 담수 스폰지 유래 유용미생물 분리 및 이용” 연구비에 관한 연구의 연구비와 환경부의 “차세대 핵심 환경 기술 개발 사업(Eco-technopia 21 project)” 과제의 연구비로 진행되었습니다.

참고문헌

1. Beppu, T. and S. Horinouchi. 1991. Molecular mechanisms in *Streptomyces*. *Planta Medica*. 57, 44-47.
2. Chang, H.B., S.C. Kim, and J.H. Kim. 2006. Chemical characteristics and biological activities of herbimycin A and dihydroherbimycin A produced by soil isolated *Streptomyces* sp. *J. Microbiol.* 42, 47-53.
3. Datta, K., S. Shiha, and P. Chattopadhyay. 2000. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl. Med. J. India* 13, 304-310.
4. Dröscher, I. and J. Waringer. 2007. Abundance and microhabitats of freshwater sponges (*Spongillidae*) in a Danubean

- floodplain* in Austria. *Freshw. Biol.* 52, 998-1008.
5. Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A.B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker, and B.S. Moore. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4431-4440.
6. Jones, G.H. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces* antibiotics. *J. Bacteriol.* 163, 1215-1221.
7. Kin, S.L. 2006. Diversity of novel metabolites from marine *Actinomycetes*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 245-251.
8. Manconi, R. and R. Pronzato. 2008. Global diversity of sponges (Porifera: *Spongillia*) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 27-33.
9. Masuda, Y. 2009. Studies on the taxonomy and distribution of freshwater sponges in Lake Baikal. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 47, 81-110.
10. Müller, W.E., G.M. Böhm, V.A. Grebenjuk, A. Skorokhod, I.M. Müller, and V. Gamulin. 2002. Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* 295, 299-309.
11. Neicolaou, K.C., E.A. Theodorakis, and C.F. Chaibome. 1996. Chemistry and biology of selected natural products. *Pure Appl. Chem.* 11, 2129-2136.
12. Parfenova, V.V., I.A. Terkina, T.I. Kostomova, I.G. Nikulina, V.I. Chernykh, and E.A. Maksimova. 2008. Microbial community of freshwater sponges in Lake Baikal. *Biol. Bulletin* 35, 374-379.
13. Piel, J. 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr. Med. Chem.* 13, 39-50.
14. Reisinger, H. 1974. Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 14, 231-246.
15. Shigeo, S., E. Nakanishi, K. Furihata, K. Miyamoto, H. Tsujibo, T. Watanabe, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, H. Nagasawa, and S. sakuda. 2008. Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally. *Inter. J. Biol. Macromol.* 43, 13-19.
16. Shin, J. 1991. Mid-and Long-term Reserch Plan on Marine Natural Products. KORDI.
17. Tanka, Y. and S. Omura. 1990. Metabolism and products of *Actinomycetes* an introduction. *Actinomycetal* 4, 13-14.
18. Vacelet, J. 1975. Etude en microscopie Electronique de l'association entre bacteries et spongiaires du genre *Verongia*. *J. Microsc. Biol. Cell.* 23, 271-288.
19. Wehrl, M. 2001. Masters thesis. Universitat Wurzburg, Wurzburg, Germany.
20. Weinberg, X.D. 1974. Secondary metabolism: Control by temperature and inorganic phosphate. *Dev. Ind. Microbiol.* 15, 70-81.
21. Wiens, M., P. Wrede, V.A. Grebenjuk, O.V. Kaluzhnaya, S.I. Belikov, H.C. Schröder, and W.E. Müller. 2009. Towards a molecular systematics of the Lake Baikal/Lake Tuva sponges. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 47, 111-144.
22. Zahner, H. 1985. The secondary metabolism of microorganisms: An inexhaustible source for new products. *Pestic. Sci.* 16, 424-425.