

수변 낙엽퇴적층에서 분리한 호열성 *Geobacillus*의 물질 분해 특성

백현주 · 조영근 · 안태석*

강원대학교 환경학과

수변 낙엽퇴적층에서 호열성 세균의 분포와 물질분해 양상을 파악하기 위하여, 호열성 세균을 분리하고 그 특성을 조사하였다. 고분자 유기물의 분해력이 높고 60°C에서 성장하는 균주들을 탐색한 결과, 10개의 균주가 선별되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하고 계통분석한 결과, 모두 *Geobacillus* 속으로 동정되었다. 균주들의 최적 성장온도는 55°C와 60°C, 최적 pH는 초기 pH가 6.0~8.0일 때로 나타났으며, 염분 3%일 때를 기준으로 성장 속도의 저해가 뚜렷하게 나타났다. 균주의 효소 활성도와 API 50 CHB kit에 의한 탄수화물 이용도를 바탕으로 균주의 생태학적 기능을 알아본 결과, *G. stearothermophilus* 균주들과 *G. kaustophilus* 균주들의 특성은 다른 종의 균주들과 명확히 구분되었으며, 나머지 균주들은 최적 성장환경의 생태학적 특징이 다양하게 나타나, 종별 구분과 정확히 일치하지는 않았다. 약산성 환경에서 최적 성장하는 *G. stearothermophilus* 균주들은 높은 단백질분해 효소활성을 보이면서 다당류 분해와 단당류 이용도가 낮았고, 알칼리환경을 최적 서식지로 하는 *G. kaustophilus* 등은 이와 대조적으로 지질 분해 및 당류의 이용도가 높게 나타났다. 따라서, 수변 낙엽퇴적층에는 호열성 내성 포자 형성 세균인 *Geobacillus* 속 균주들이 다양한 생태학적 지위를 가지며 퇴비화와 유사한 천이과정을 거치면서 수변 퇴적물질을 분해하는데 기여하는 것으로 보여진다.

Key words □ ecological niche, *Geobacillus*, hydrolytic activity, litter deposit, thermophile

45°C 이상의 고온 환경에서 증식하는 호열성 미생물은 열에 안정하고 고온에서 기능을 유지하는 다양한 효소들을 가지고 있다(15). 이 효소들 중 다수는 고비용의 화학공정을 보다 효율적인 생물학적 공정으로 대체하는 데 사용할 수 있어 산업적 가치가 높다(3, 10, 19). 또한, 일부 내열성 효소는 열에 대한 안정성 이외에도, 극한 pH 및 화학변성제에 대한 안정성도 보유하고 있어(14), 안정성이 높은 새로운 내열성 효소를 탐색하여 발견한다면, 각종 화합물 제조 및 처리 공정의 효율성을 제고하는 데 활용할 수 있다.

최적 성장온도가 55°C 이상인 호열성 세균은 고세균(archaeobacteria)과 진정세균(eubacteria) 모두에서 발견된다. 호열성 고세균은 주로 하수처리장, 호수 퇴적층, 심해 열수구 등에서 발견되며, 유기물질의 부식이 일어나는 환경에서 메탄을 생성하는 *Methanobacterium* spp. (11) 등 메탄생성세균과 S, SO₃²⁻, SO₄²⁻와 같은 유황화합물을 최종 전자수용체로 이용하여 H₂S로 환원시켜 성장하는 *Thermococcus* spp. 등 황환원세균이 이에 속한다(1, 13, 22). 호열성 진정세균은 호열성 고세균보다 서식환경이 다양하다(15). 주로 염분이 낮은 화산 및 열수지역 수변에서 분리되며, Bacilli와 Thermotogales 등이 이에 속한다(4, 24).

퇴비화 과정은 자연적으로 열이 발생하는 호기성 상태의 유기

물 분해과정으로, 내열성 및 호열성 미생물들이 유기물질 광물화와 열의 발생을 촉매 함으로써 진행된다. 따라서 퇴비는 각종 내열성 및 호열성 미생물들이 한시적으로 분포하는 인위적 환경을 제공한다(20). 자연환경 중 유기물질의 광물화가 활발한 환경으로는 삼림 지역의 낙엽퇴적층과 호수 기저 퇴적층 및 수변 퇴적층 등, 식물사체가 축적되고 분해되는 장소들을 들 수 있다. 특히, 수변 낙엽퇴적층은 난분해성 물질을 포함하는 다양한 유기물이 다량 존재할 뿐만 아니라, 혐기성, 호기성, 미호기성 등 다양한 미생물의 서식 조건이 형성될 수 있다. 따라서, 임상이 다른 식물 종으로 구성된 삼림토양들이 전혀 다른 미생물상을 가진다는 예가 시사하듯이(2), 수변 낙엽퇴적층은 다른 환경에서는 발견되지 않는 유기물 분해능이 높은 미생물 군집의 서식처가 될 수 있다. 특히, 한시적으로 퇴비와 유사한 환경이 조성되어 고온성 미생물이 분포하고 잔류할 가능성이 있다.

대부분의 수변 낙엽퇴적층은 계절적 수위의 변동과 삼림의 천이 및 생태에 따라 일시적으로 존재하거나, 혐기성 환경과 호기성 환경을 오가는 등 한시성과 역동성을 특징으로 한다. 지금까지 수변 낙엽퇴적층의 탄소순환과정에서의 역할과 분포하는 미생물상에 대한 연구는 미진하였으며, 특히, 호열성 미생물의 분포와 물질 분해능에 대한 탐색과 보고는 전무한 것으로 보여진다. 본 연구에서는 수변 낙엽퇴적층으로부터 고온성 미생물을 분리 및 동정하고, 분리된 균주의 생리·생화학적 특성과 배양학적 특성을 분석하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8574, Fax: 82-33-251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

재료 및 방법

균주의 분리 및 선발

호수로 유입되는 하천의 하구에 수직으로 목재와 낙엽이 쌓여 있는 수변 낙엽퇴적층에서 시료를 채취하여 물질 분해능이 우수한 균주를 분리하였다. 표층 30 cm 아래에서 채취한 시료 1 g을 carboxymethyl cellulose (CMC, 1%), starch (1%), peptone (1%), olive oil (1%)을 함유한 액체 배지에 넣은 후 60°C에서 24시간 농화 배양(enrichment culture)하였다. 이 상등액을 고체 배지로 옮겨 순수 분리(pure culture) 과정을 거친 후, 크기와 형태가 서로 다른 colony들을 선발하였다. Cellulase, amylase, protease, lipase를 분비하는 균주를 선발하기 위한 각각의 배지에 균주를 도말한 뒤 60°C에서 24시간 배양하였다. Cellulase 검출배지(1% CMC, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar), amylase 검출배지(0.3% beef extract, 2% soluble starch, 0.5% peptone, 0.5% NaCl, 1.5% agar), protease 검출배지(0.5% pancreatic digest of casein, 0.25% yeast extract, 0.1% glucose, 1% skim milk, 1.5% agar), lipase 검출배지(1% Tween 80, 1% peptone, 0.5% NaCl, 0.01% CaCl₂·H₂O, 1.5% agar)에 형성된 colony 중에서 투명환(clear zone)이 가장 큰 10개의 균주를 선발하였다. 각각의 기질에 대한 활성도는 배양 후 나타나는 colony 주위의 환의 크기로 측정하였고, 환의 크기가 6 mm 이상은 +++, 3~5 mm는 ++, 3 mm 미만은 +로 등급을 나누어 표기하였다. 선발한 균주는 멸균된 20% glycerol에 동결하여 -70°C에 보존하였다.

균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

선발한 균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. Universal primer (27F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 1492R, 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 각 균주의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭하였으며, 27F primer와 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA)을 사용하여 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열들은 accession no. FJ823097~FJ823106로 GenBank에 등재하였다. 각 균주의 염기서열은 Classifier (26)와 RNA Database Project Release 10.9 (6)와 대조하였으며, Taxonomic Outline for Bacteria and Archaea, Release 7.7 (8)에 따라 종명을 동정하였다. 분리된 균주와 Taxonomic Outline 상의 종명과의 계통관계를 파악하기 위하여, Classifier가 도출한 속명에 속하는 표준균주들의 16S rRNA 염기서열과 대상 균주의 염기서열을 RNA Database Project Release 10.9의 염기서열의 정렬에 따라 정렬하고 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화 되도록 보정한 후, Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model과 maximum likelihood (ML)법을 사용하여 계통도를 작성하였다. ML 계통도에 나타난 각 계통관계는 1,000번의 bootstrapping을 실시하여 검증하였다. ML법에 의한 계통분석과 bootstrapping을 위하여, PhyML version 2.4.4 (9)를 사용하였다.

균주의 형태 및 생화학적 특성

균주의 형태학적 특성은 그람염색(12) 후 광학현미경(Olympus BX60, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 생리·생화학적 특성은 API 50 CHB kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여, 60°C에서 3, 6, 24시간 배양하면서 제조사의 지시대로 결과를 판독하였다.

균주의 성장속도

각 균주의 최적 성장조건을 알기 위하여 배양온도와 초기 pH 및 염분의 농도에 변화를 주면서 분리 균주의 성장률을 측정하였다. 분리한 균주를 Nutrient broth에 각각 접종하여 40, 50, 60, 70°C에서 배양하였으며, pH는 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조절하고, 염분은 0, 1, 2, 3, 4%로 달리하여 조사하였다. 염분과 pH에 따른 성장률 조사는 균주의 최적 성장 온도로 나타난 60°C에서 24시간 배양하며 측정하였다. 접종 균주는 60°C에서 24시간 배양한 것을 1% (v/v) 농도로 접종하였다. 균주의 생장은 600 nm에서의 optical density (OD₆₀₀)를 시간에 따라 측정하였고, log (OD₆₀₀)의 시간에 대한 변화율을, 선형변이 구간을 선택하여, 선형 회귀 분석하여 성장속도(μ)로 측정하였다.

통계분석

선형회귀 분석에는 Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Corp., USA)의 LINEST 함수를 사용하였다. 균주들의 물질 분해 특성을 이용하여 균주들 간의 관계를 집락분석(cluster analysis)하기 위하여 cellulase, amylase, protease, lipase 활성은 검출배지상에 형성되는 환의 등급에 따라 0~3으로 분류하고, API 50 CHB kit를 이용한 탄수화물 이용도 결과는 0과 1로 분류하였다. 총 53개의 형질을 사용하여, PAUP* version 4.10b (23)에 구현된 Wagner model과 maximum parsimony법을 적용하여 집락분석을 수행하였다.

결 과

균주의 효소활성도

10개의 균주를 분리한 후, 각 균주의 cellulase, amylase, protease, lipase 활성을 조사한 결과 4개 균주가 두 가지 기질을, 6개 균주가 세 가지 기질을 분해하는 것으로 나타났다(Table 1). 균주 S-36, C-21, C-24, L-14는 CMC를 분해하여 3 mm 미만의 환을 형성하면서 약한 cellulase 활성을 나타내었고, 균주 S-40은 중간 수준의 cellulase 활성을 보였다. Starch를 분해하는 것으로 나타난 균주 P-22, C-21, C-24, L-17은 낮은 amylase 활성을 보였고, 균주 S-36은 중간 수준의 amylase 활성을 나타내었으며, 균주 S-35와 S-40은 큰 환을 형성하면서 높은 amylase 활성을 보였다. 균주 P-21, S-35, C-21, C-24, L-11은 skim milk를 분해하면서 3~5 mm의 분해 환을 형성하여 중간 수준의 protease 활성을 보였고, 균주 P-22는 6 mm 이상의 큰 분해 환을 형성하면서 강한 protease 활성을 나타내었으며, 나머지 균주는 protease 활성을 보이지 않았다. Tween 80을 분해하는 것으로 나타난 균

Table 1. Activities of hydrolytic enzymes based on clear zone diameter

Strain	Enzyme			
	Cellulase	Amylase	Protease	Lipase
C-21	+	+	++	-
C-24	+	+	++	-
S-35	-	+++	++	+
S-36	+	++	-	+
S-40	++	+++	-	+
P-21	-	-	++	+
P-22	-	+	+++	+
L-11	-	-	++	++
L-14	+	-	-	++
L-17	-	+	-	++

-, no clear zone; +, clear zone diameter < 3 mm; ++, clear zone diameter 3~6 mm; +++, clear zone diameter > 6 mm

주 P-21, P-22, S-35, S-36, S-40은 약한 lipase 활성을 나타내었고, 균주 L-11, L-14, L-17은 중간 수준의 lipase 활성을 보였다. 균주 S-35와 S-40은 다른 8개 균주들에 비해 세 가지 기질에서 가장 높은 효소 활성을 보였다.

균주의 동정

분리한 10개 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 27~1,492 bp 영역에서 증폭하고 판독한 결과, 52~899 bp 영역 (*Escherichia coli* positions; X80725)의 서열이 명확히 판독되었다. RDP의 표준균주(type strain)들의 염기서열과 비교한 결과, 분리한 10개 균주 모두 *Geobacillus* 속의 표준균주의 16S rRNA 와 99% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 보였다(Fig. 1). 균주 S-36은 *G. tepidamans*, 균주 S-35와 S-40은 *G. caldxylosilyticus*, 균주 P-21, P-22, L-11은 *G. stearothermophilus*, 균주 C-21과 C-24는 *G. thermodenitrificans*, 균주 L-14와 L-17은 *G. kaustophilus*의 표준균주들과 명확한 집락을 형성하여 각각의 종으로 동정되었다.

균주 L-14와 L-17의 경우 서로간에 2 bp의 차이를 보이고, *G.*

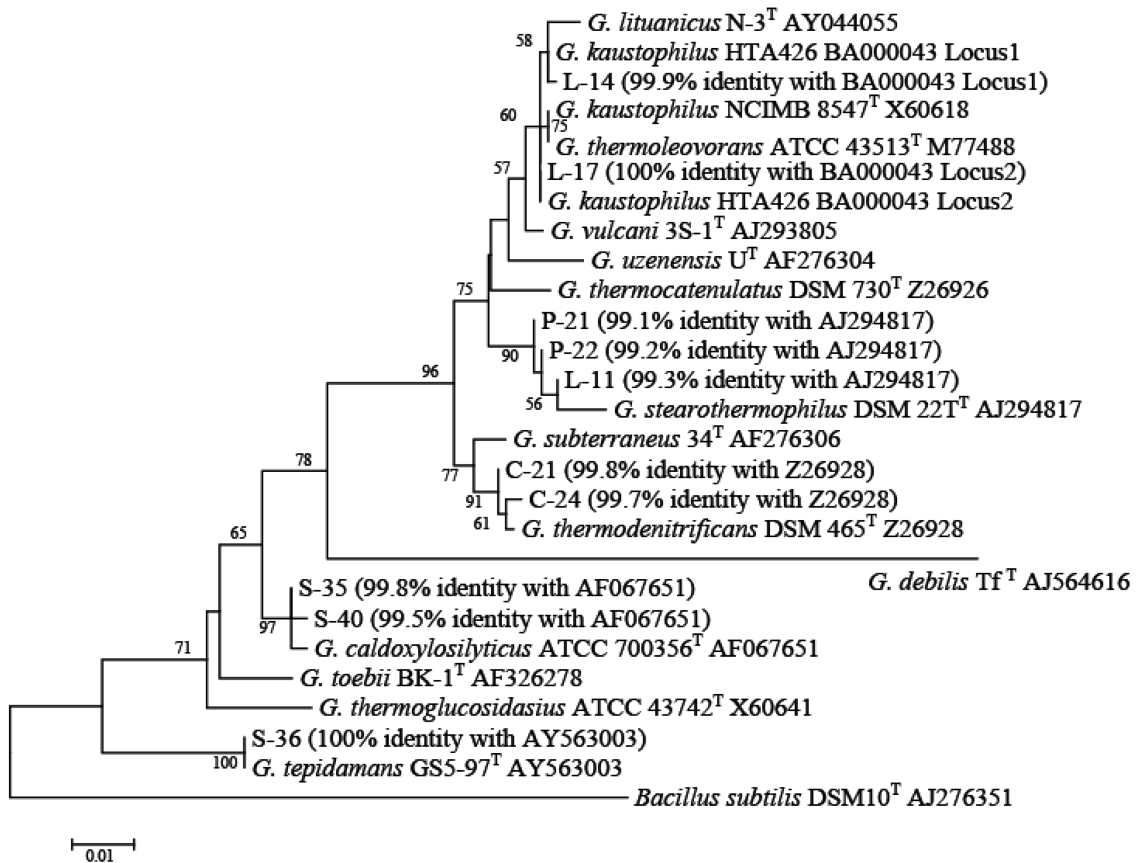


Fig. 1. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences of isolates to those of *Geobacillus* type strains and the strain *G. kaustophilus* HTA426, the genome of which was completely sequenced (GenBank accession no. BA000043). GenBank accession numbers of each strain were shown after the strain name. Maximum likelihood method with HKY substitution model was applied to phylogenetic tree of the present *Geobacillus*. Bootstrap supports with 1,000 times of bootstrap replications, were shown on each branch when the support value was more than 50%. The scale bar represents the number of substitutions per site. Similarity between our isolates and their closest type strains in 16S rRNA was shown in parenthesis.

thermoleovorans, *G. lituanicus*, *G. kaustophilus*, *G. vulcani*의 표준균주 염기서열과 1~5 bp 차이를 보이면서 그 중 어느 종에 더 유사도가 높은지 maximum likelihood bootstrapping support value에 의해 결정되지 못 하였다. 이들 중에 속하는 균주들 중, 염색체 전체 염기서열이 결정되어서 염기서열에 대한 신뢰도가 높은 *G. kaustophilus* HTA426 (BA000043)를 추가하여 대조한 결과, HTA426 유전체의 두 개의 유전자 위치(loci)에서 L-14와 1 bp 차이를 보이고, L-17과는 동일한 염기서열이 확인되었다 (Fig. 1). 이 결과에 따르면, *G. kaustophilus*와 *G. thermoleovorans*는 16S rRNA 유전자 염기서열에 의해 구분되지 못하고, 전체 유전체의 변이에 의해 분리되는 종 복합체(species complex)이며, L-14와 L-17은 이 복합체에 속하는 균주들로 볼 수 있다. 이 연구에서는 L-14와 L-17이 *G. kaustophilus* HTA426 (BA000043)의 16S rRNA 유전자들과 동일한, 또는 단지 한 염기만 다른 염기서열을 가지는 것이 확인 되었으므로, 두 균주를 모두 *G. kaustophilus*로 동정하였다.

균주의 형태 및 생리·생화학적 특성

분리된 모든 균주는 그람양성의 간균 형태였고, API 50 CHB kit를 이용하여 49가지 탄수화물의 이용 여부를 확인한 결과, 균주간 특성의 차이로 인지될 수 있는 탄수화물은 24개 이었다 (Table 2). 분리된 균주 모두가 이용한 물질로는 D-glucose, D-fructose, D-mannose, maltose, saccharose, amidon과 같은 6개 종류였고, D-ribose와 esculin은 균주 L-11, D-xylose는 균주 P-21을 제외한 나머지 균주 모두가 이용하는 것으로 나타났다. 반면 D-arabinose와 dulcitol은 균주 L-14만이, methyl-β D-xylopyranoside와 L-rhamnose는 균주 C-24만이, 그리고 methyl-α D-mannopyranoside, lactose와 β-gentiobiose는 균주 S-36만이 이용하였다. Erythritol, L-xylose, D-adonitol, L-sorbose, inositol, D-sorbitol, amygdalin, arbutin, inulin, xylitol, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconate, 2 keto-gluconate, 5 keto-gluconate와 같은 19개 종류는 모든 균주가 이용하지 못하였다.

Table 2. Utilization of carbohydrates by isolates from litter deposit

Carbohydrates	Strain									
	C-21	C-24	S-35	S-36	S-40	P-21	P-22	L-11	L-14	L-17
Glycerol	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Methyl-β D- xylopyranoside	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L-rhamnose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-mannitol	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Methyl-α D-mannopyranoside	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Methyl-α D-glucopyranoside	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
N-acetylglucosamine	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Salicin	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Cellobiose	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Melezitose	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-raffinose	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Glycogen	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
β-gentiobiose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-turanose	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-

Symbols denote positive (+) and negative (-) in sugar utilization patterns of API 50 CHB kit

배양조건에 따른 균주의 성장속도

배양온도를 40, 50, 60, 70°C로 조절하여 6시간 간격으로 균주의 성장률을 측정하고, 60°C에서도 다른 균주들에 비해 성장률이 높았다. 균주 L-14를 제외한 나머지 9개 균주는 60°C가 최적 성장 온도였고, 특히 균주 S-36과 L-17이 다른 균주들에 비해 60°C에서 성장률이 높은 것으로 나타났다. 초기 pH가 6.0~8.0 사이에서 대부분의 균주가 높은 성장을 보였고, 각 균주별로 보면, 균주 C-21, S-40, P-21, P-22, L-11은 pH 6.0, 균주 C-24, S-35는 pH 6.5, 균주 S-36은 pH 7.0, 그리고 균주 L-14와 L-17은 pH 8.0이 최적 pH로 나타났다. 염분 농도가 높아질수록 모든 균주의 성장

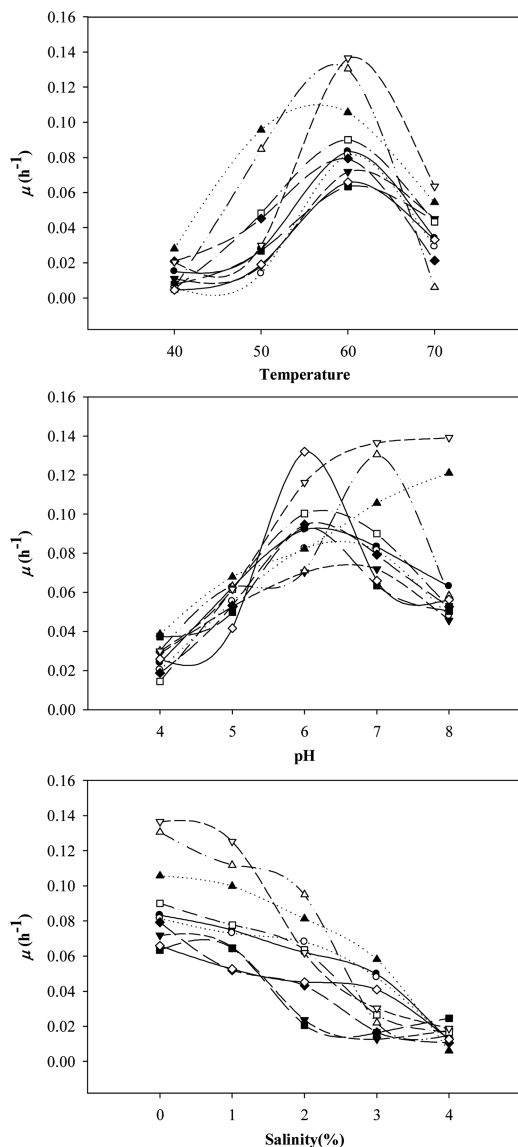


Fig. 2. Variation of specific growth rates (h^{-1}) of *Geobacillus* isolates with temperature (top panel), pH (middle panel) and salinity (bottom panel). Symbol (○) C-24; (●) C-21; (△) S-36; (▲) L-14; (□) P-21; (■) S-40; (▽) L-17; (▼) S-35; (◇) L-11; (◆) P-22.

속도는 감소하였으나, 고농도 염분에 대한 내성(2~4%)은 다양하게 나타났다. 염분도 3.0%를 기준으로 성장속도의 저해가 뚜렷하게 나타났고, 4%에서는 성장률이 최소화되었다(Fig. 2).

고찰

이 연구는 수변 낙엽퇴적층에 분포하는 호열성 세균을 분리하고 그 특성을 분석하는 목적으로 수행되었고, 그 결과 10개의 호열성 균주가 분리되었으며, 16S rRNA 유전자의 염기서열에 근거해 종명을 동정한 결과, 모두 *Geobacillus* 속의 종에 속하였다. 이 속은 대표적인 그람양성균인 *Bacillus* 속으로부터 최근에 분리 명명된 새로운 속이다(17). *Bacillus* 속으로 여겨진 세균들은 매우 다양하며, 그 중 일부는 고온에서 성장하며 내생포자를 형성하는 특징을 가진다. *B. stearothermophilus*, *B. caldxylosilyticus*, *B. thermodenitrificans*, *B. tepidamans*, *B. thermoleovorans*로 불리던 고온성 *Bacillus*들이 그 예인데, 각각 *G. stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans*, *G. thermoleovorans* (17), *G. caldxylosilyticus* (7), *G. tepidamans* (21) 등으로 명명되었다. 이들은 호기성이면서, 통성 혐기성 세균(facultative anaerobe)이고, 45~70°C의 최적 성장 온도를 가지는 것으로 알려져 있다 (17).

호열성 *Geobacillus* 균주의 최적 성장조건

이 연구에서 분리된 *Geobacillus* 속 균주들의 최적성장 온도와 pH, 그리고 염분에 대한 내성을 종합하여, 균주들의 최적 서식지 특성을 추론하였다. 염분에 대한 내성은, 모든 균주의 성장이 일어나는 최고 염도이면서 성장속도의 차이가 두드러진, 3% 염도에서 균주들의 성장속도($\mu_{3\%}$)를 표지(index)로 사용하여 해석하였다. $\mu_{3\%}$ 값을 유의성 95%의 k -평균집락분석법에 의해 분류한 결과, 0.037 h^{-1} 를 경계로 염분내성도가 높은 균주와 상대적으로 내성도가 낮은 균주들로 분류되었다. 균주들의 최적 성장조건은 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거한 종 분류와 일치하게 5개 그룹으로 나누어졌다(Fig. 3). *G. thermodenitrificans* 균주 C-21과 C-24는 $\mu_{3\%}$ 로 나타난 염분내성도가 높고(0.047~0.050 h^{-1}), 60°C의 온도와 pH 6.0~6.5인 조건에서 잘 성장할 수 있는 것으로 나타났다. *G. stearothermophilus* 균주 P-21, P-22와 L-11은 60°C의 온도와 pH 6.0인 조건에서 잘 성장하는 공통성을 보였지만, P-21과 P-22의 경우 염분 내성도가 낮고(0.016 h^{-1} , 0.027 h^{-1}), 균주 L-11은 염분 내성도($\mu_{3\%}$ =0.041 h^{-1})가 높게 나타나는 대비를 보였다. *G. caldxylosilyticus* 균주 S-35와 S-40은 매우 낮은 염분내성도(0.012 h^{-1} , 0.017 h^{-1})가 특징으로, 60°C와 pH 6.0~7.0의 조건에서 잘 성장할 수 있는 것으로 나타났다. 계통적으로 다른 *Geobacillus* 속의 종들과 가장 상이한 *G. tepidamans* 종에 속하는 S-36은 낮은 염분내성도($\mu_{3\%}$ =0.022 h^{-1})와 중성 pH에서 최적 성장하는 특징으로 다른 균주들과 구별되었다. *G. kaustophilus* 종으로 L-14와 L-17가 분리되었는데, 두 균주의 최적 성장환경은 pH 8.0의 알칼리성 환경이라는 점에서 다른 균주들과 매우 달랐다. 또한, 염분내성도가 서로간에도 각각 0.058 h^{-1} 와 0.030 h^{-1} 로 대비되는 이질성을 보였다. 이 연구에서 조사한

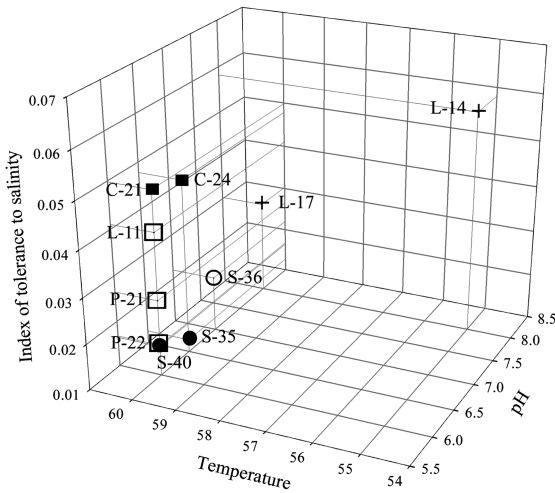


Fig. 3. Distribution of *Geobacillus* isolates by their optimum growth temperature and pH, and tolerance to salinity, i.e., specific growth rate (h^{-1}) at 3% salinity. Two strains (P-22 and S-40) were located at the same position in the three-dimensional coordinate. Symbol (○) *G tepidamans*; (●) *G caldxylosilyticus*; (□) *G stearotherophilus*; (■) *G thermodenitrificans*; (+) *G kaustophilus*.

10개 균주들의 최적 성장온도 분포는 다른 연구에서 관찰된 호열성 *Geobacillus*들의 서식 온도의 분포의 범위와 큰 차이를 보이지는 않았다. 일례로, *G thermodenitrificans* NG80-2는 45~73°C에서 성장하였고, 최적 온도는 65°C로 나타났다(25). 이는 동일종의 균주 C-21과 C-24의 최적 성장온도(60°C)와 유사하였다.

호열성 *Geobacillus* 균주 간의 생태학적 다양성과 분화

균주들은 온도, pH, 염분 조건에 따라 최적 성장환경이 다른 것으로 나타났고(Fig. 3), 균주 각각의 탄수화물 이용 특성도 다른 경향을 보였다(Tables 1 and 2). 따라서 각 균주들은 서식지에서 분해 역할이 서로 다를 것으로 판단된다. 종 및 균주에 따라 분해 혹은 흡수/이용할 수 있는 탄수화물과 고분자 유기물의 차이를 시각화하여 고찰하기 위하여, 각 균주의 4가지 가수분해 효소 발현양상(Table 1)과 API 50 CHB kit에 포함된 49가지 탄수화물 이용양상(Table 2)을 maximum parsimony법에 의해 집락 분석하였다(Fig. 4). Bootstrap support에 의해 *G stearotherophilus* 종인 L-11, P-21, P-22 균주는 다른 균주들과 명확히 다른 물질분해 양상을 가짐을 알 수 있었고, *G kaustophilus*인 L-14와 L-17 또한 유사한 기질 이용양상을 보였다. 그러나 S-35와 S-40, 그리고 C-21과 C-24는 각각 동일 종임에도 불구하고, *G stearotherophilus*와 *G kaustophilus*의 기질 이용 양상과 유사도를 보였다. 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 계통분석 결과를 보면(Fig. 1), *G tepidamans* S-36이 *Geobacillus* 속의 공통조상과 가장 친화도를 보이므로, Fig. 4의 계통도의 root는 균주 S-36 분지 지점 근처에 위치한다고 볼 수 있다. 이에 따라 *G stearotherophilus*와 *G kaustophilus* 균주들의 집락이 공통적으로 가지는 기질 이용 양상의 계통도에 따른 변화를 보면(Fig. 4의 굵은 화살표와 점선으로 연결된 박스), 공

통조상(화살표의 시작점)에서 자손의 단계(화살표의 종점)로 변화해 갈 때, *G stearotherophilus*와 *G kaustophilus* 균주들의 집락들이 대체로 서로 상이한 기질 분해능을 습득하거나 상실하는 것을 볼 수 있다. 특히 두드러진 점은 *G stearotherophilus* 집락을 만든 계통적 변화는 cellulose, cellobiose, melibiose 등의 다당류 분해와 trehalose, salicin, arabinose 등의 단당류 이용능력을 상실하는 방향으로 진행된다는 점이다. 이 관찰 결과를 Table 1의 고분자 유기물 분해 양상과 비교하면, 당류 이용능이 상대적으로 미약한 *G stearotherophilus* 균주들이 최고의 protease 활성을 가진다는 점과 대조됨을 볼 수 있다.

이와 대조적으로 *G caldxylosilyticus* S-35와 S-40, 그리고 *G thermodenitrificans* C-21과 C-24는 동일종 균주들의 물질 분해능이 상이하게 분포하는 경우이다. S-35와 S-40은 cellulase와 protease의 활성 유무에서 서로 반대의 경우이고(Table 1), 6가지 당류의 이용도에 차이가 있었다(Table 2). C-21과 C-24 사이는 7가지 당류의 이용도에 차이가 있었다(Table 2). 이는 *G stearotherophilus*와 *G kaustophilus*의 물질 분해능 관련 형질들이 자연선택을 받으며, 종 수준에서 생태적 지위가 결정되도록 특화되어가는 반면, *G caldxylosilyticus*와 *G thermodenitrificans*의 경우 물질 분해능의 다양성이 요구되는 생태적 지위를 형성하는 것으로 볼 수 있다.

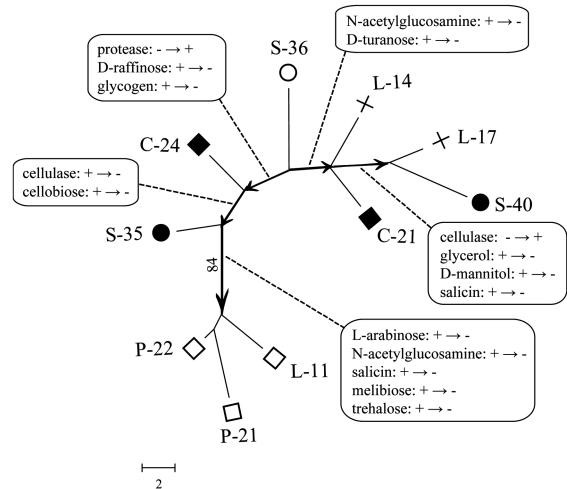


Fig. 4. Unrooted maximum parsimony tree for phenotypic clustering of *Geobacillus* isolates based on activities of the four kinds of hydrolytic enzymes and the usage pattern of 49 carbohydrates tested by the API 50 CHB kit. Bootstrap supports higher than 50 were shown next to corresponding branches. Based on the phylogeny by 16S rRNA gene sequences (Fig. 1), S-36 was assumed to branch directly out from the common progenitor of all isolates. Arrows indicate the route of evolution from the presumed common progenitor. Boxes connected to each arrow by dashed lines list change of characters during each step of evolution (a branch marked as an arrow). Small arrows within a box indicate the direction of change of a character along with the evolutionary step. The scale bar indicates the number of different characters. Symbol (○) *G tepidamans*; (●) *G caldxylosilyticus*; (□) *G stearotherophilus*; (■) *G thermodenitrificans*; (+) *G kaustophilus*.

균주들의 최적 성장 환경 특성(Fig. 3)은 세균 중 동정 결과(Fig. 1)와 일치하고, Table 1, 2와 Fig. 4에 제시된 기질 이용 양상의 다양성도 대체로 증명과 성장환경 특성의 집락들에 부합한다. 즉, *G. stearothermophilus*와 *G. kaustophilus* 균주들은 각각 pH 6.0과 pH 8.0으로 대비되는 서식환경을 최적 성장환경으로 분화하고, *G. caldxylosilyticus*와 *G. thermodenitrificans* 균주들은 pH 6.0~6.5의 서식환경에 산포하면서, 염분내성도가 종에 따라 분리되는 양상을 보인다. *Geobacillus* 속의 공통조상과 계통적 친연성이 가장 높은 *G. tepidamans* S-36의 경우 중간적 최적 성장 환경(Fig. 3)과 물질 분해능 분포(Fig. 4)를 보였다.

최적 성장환경 특성, 계통분류에 근거한 세균 증명, 기질 이용 양상 등의 자료를 종합하면, 10개의 *Geobacillus* 분리 균주들은 5개의 종류로 분류되어 그 생태적 특성이 다음과 같이 요약될 수 있다. *G. kaustophilus* L-14와 L-17 (group 1)은 55~60°C, pH 8.0의 알칼리성에서 서식하고, 지질 분해 효소를 내며, *G. tepidaman* S-36 (group 2)은 60°C, pH 7.0의 조건에서 서식하며 섬유소, 전분, 지질 분해 효소를 낸다. *G. caldxylosilyticus* S-35와 S-40 (group 3)은 60°C 조건에서 서식하며 amylase 활성이 매우 높다. *G. thermodenitrificans* C-21과 C-24 (group 4)는 60°C 조건에서 서식하며 섬유소, 전분, 단백질 분해 효소를 낸다. Group 3~4의 균주들은 기질 이용 양상의 다양성이 높고, 최적 성장 pH는 6.0~6.5로 다양하다. *G. stearothermophilus* P-21, P-22와 L-11 (group 5)은 60°C, 약산성(pH 6.0) 조건에서 서식하며 protease 활성이 높다.

Cellobiose 및 melibiose, glycogen, β -gentiobiose 등과 같은 이당류 혹은 다당류는 중성이나 알칼리성 조건에서 서식하는 그룹에서 주로 이용하는 것으로 나타났다. pH가 중성에 가까울수록 탄수화물 이용도가 높았으며, 최적 서식환경이 pH 6.0인 균주 P-21, P-22, L-11은 다른 균주들에 비해 탄수화물이용도가 낮게 나타났다. 전형적인 퇴비화 과정에서 중성에서 약 알칼리성 방향으로의 산성도 변화는 단백질 분해 시 암모니아이온의 발생 때문에 나타날 수 있다(20). *G. stearothermophilus* 균주들은 당류를 이용하는 능력이 제한된 반면(Fig. 4, Tables 1 and 2), 단백질 분해 효소의 활성이 높았다. 알칼리성 조건에서 최적 성장하는 *G. kaustophilus* L-14와 L-17은 이와 대조적으로 지질분해 효소의 활성이 높고(Table 1), 다양한 당류를 이용할 수 있었다(Fig. 4 and Table 2). 따라서, *G. stearothermophilus*로부터 *G. kaustophilus*로 천이가 진행되면서, 단백질 분해에서 지질 및 당류 이용으로, 수변 낙엽퇴적층의 호열성 세균에 의한 퇴비화가 진행되는 과정을 추론할 수 있다. 그러나, 수변 낙엽퇴적층에서는 내열성 세균으로 내성포자를 형성하는 *Geobacillus* 속만이 분리되었다는 점과, 수변 낙엽퇴적층에서 열이 발생하는 것을 관찰한 예가 보고되지 않는다는 점에서, 이런 퇴비화 과정은 일회적 혹은 한시적으로 나타난다고 보아야 타당하다.

이 연구에서 조사한 균주들의 기질 이용 양상과 최적 성장환경이 일부 종에서는 유사도를 보이면서도, 동일 종내 균주간 분화도가 또한 유의미한 정도라는 점이, 이미 보고된 다른 균주들의 특성과 비교할 때 나타난다. 균주 L-14, L-17은 *G.*

kaustophilus DSM 7263^T (17)과 같이 xylose, cellobiose, trehalose를 이용하였으나, 두 균주 모두 *G. kaustophilus* DSM 7263^T가 이용하지 못한 ribose를 이용하였고, 균주 L-14의 경우는 glycerol도 이용하는 것으로 나타났으며, 염분 내성도는 0~2%로 유사하였다. 균주 S-35와 S-40는 *G. caldxylosilyticus* DSM 12041 (7)과 같이 xylose를 이용하였고, glucose와 lactose는 이용하지 못하였다. 균주 C-21과 C-24는 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T (16)와 같이 ribose, xylose, trehalose를 이용하지만, lactose는 이용하지 못하였고, cellobiose는 균주 C-24만이 이용하였다. 균주 P-21, P-22, L-11은 Claus와 Berkeley의 연구에서 분리된 *G. stearothermophilus* (5)와 같이 cellobiose와 lactose는 이용하지 못하였지만, 균주 P-21의 경우에는 galactose를 이용하는 것으로 나타났다. 이와 같이 각 균주들은 기존에 분리된 동일종 균주들과는 다소 다른 특성을 보였다.

분리된 균주들의 서식 특성과 생태학적 기능을 살펴본 결과 수변 낙엽퇴적층은 내성포자를 형성하는 다양한 호열성 세균의 한시적 서식처로 작용하며, 유기물질 분해능이 우수한 내열성 효소의 탐색 및 분리원으로 활용가치가 있음이 확인되었다. 따라서, 이들 균주들과 그 가수분해 효소들은 고열상태에서 폐기물을 처리하는 과정에 이용 가능할 것으로 생각된다. 특히, Rhee et al. (18)의 연구에서 균주 SC-1와 *Geobacillus* sp. SK-1를 혼합 배양하였을 때 단독 배양 보다 생장이 높았던 점과, 본 연구에서 분리된 *Geobacillus* 균주들이 분해하는 기질의 종류가 종 및 균주에 따라 상이함을 고려한다면, 균주간의 편리공생과 영양공생(syntrophism) 및 천이에 의해 물질분해 효율이 보다 높아짐을 기대할 수 있다. 따라서, 폐기물 처리에 호열성 *Geobacillus*를 이용할 경우에는 균주를 혼합하여 사용하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문 저자 중 백현주와 조영근은 「2008년도 2단계 BK21 사업」의 지원금을 받았음.

참고문헌

1. 이정현. 2006. 해양유래 초고온성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1 유전체 해독과 활용. 유전체 소식 6, 29-34.
2. 이희선, 심재국. 1994. 삼림토양의 미생물군집과 아밀라아제 활성에 관한 연구. 한국생태학회지 17, 171-183.
3. Adams, M.W.W., F.B. Perler, and R.M. Kelly. 1995. Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. *Nat. Biotechnol.* 13, 662-668.
4. Amend, J.P. and E.L. Shock. 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 175-243.
5. Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, pp. 1105-1139. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
6. Cole, J.R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A.S.

- Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity, and J.M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, 141-145.
7. Fortina, M.G., D. Mora, P. Schumann, C. Parini, P.L. Manachini, and E. Stackebrandt. 2001. Reclassification of *Saccharococcus caldoxylosilyticus* as *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Ahmad *et al.* 2000) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2063-2071.
 8. Garrity, G.M., T.G. Lilburn, J.R. Cole, S.H. Harrison, J. Euzéby, and B.J. Tindall. 2007. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. In TOBA Release 7.7. Michigan State University Board of Trustees, East Lansing, MI, USA.
 9. Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704.
 10. Haki, G.D. and S.K. Rakshit. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Biores. Technol.* 89, 17-34.
 11. Hedderich, R., S.P.J. Albracht, D. Linder, J. Koch, and R.K. Thauer. 1992. Isolation and characterization of polyferredoxin from *Methanobacterium thermoautotrophicum* The *mvhb* gene product of the methylviologen-reducing hydrogenase operon. *FEBS Lett.* 298, 65-68.
 12. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Group 18: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, pp. 559-564. In J.G. Holt, K.H. Schleifer, J.G. Tully, J. Ursing, M. Bryant, N.R. Krieg, J. Liston, J.W. Moulder, R.G.E. Murray, C.F. Niven, and N. Pfennig (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
 13. Kwak, Y.S., T. Kobayashi, T. Akiba, K. Hirikoshi, and Y.B. Kim. 1994. Isolation and characterization of an extremely thermophilic sulfur-metabolizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent system. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4, 36-40.
 14. Ladenstein, R. and G. Antranikian. 1998. Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61, 37-85.
 15. Madigan, M.T. and J.M. Martino. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed, p. 136. Upper saddle river: Pearson/Prentice Hall, NJ, USA.
 16. Manachini, P.L., D. Mora, G. Nicastro, C. Parini, E. Stackebrandt, R. Pukall, and M.G. Fortina. 2000. *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1331-1337.
 17. Nazina, T.N., T.P. Tourova, A.B. Poltarau, E.V. Novikova, A.A. Grigoryan, A.E. Ivanova, A.M. Lysenko, V.V. Petrunyaka, G.A. Osipov, S.S. Belyaev, and M.V. Ivanov. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 433-446.
 18. Rhee, S.K., C. Jeon, J.W. Bae, K. Kim, J. Song, J.J. Kim, S.G. Lee, H.I. Kim, S.P. Hong, Y.H. Choi, S.M. Kim, and M.H. Sung. 2002. Characterization of *Symbiobacterium toebii*, an obligate commensal thermophile isolated from compost. *Extremophiles* 6, 57-64.
 19. Russell, R.J.M. and G.L. Taylor. 1995. Engineering thermostability: lessons from thermophilic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 370-374.
 20. Ryckeboer, J., J. Mergaert, K. Vaes, S. Klammer, D.D. Clercq, J. Coosemans, H. Insam, and J. Swings. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol.* 53, 349-410.
 21. Schaffer, C., W.L. Franck, A. Scheberl, P. Kosma, T.R. McDermott, and P. Messner. 2004. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2361-2368.
 22. Stetter, K., A. Segerer, W. Zillig, G. Huber, G. Fiala, R. Huber, and H. König. 1986. Extremely thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 7, 393-397.
 23. Swofford, D.L. 1998. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. 4.0 ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
 24. Takai, K. and K. Horikoshi. 2000. *Thermosipho japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* 4, 9-17.
 25. Wang, L., Y. Tang, S. Wang, R.L. Liu, M.Z. Liu, Y. Zhang, F.L. Liang, and L. Feng. 2006. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles* 10, 347-356.
 26. Wang, Q., G.M. Garrity, J.M. Tiedje, and J.R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261-5267.

(Received February 17, 2009/Accepted March 19, 2009)

ABSTRACT : Hydrolytic and Metabolic Capacities of Thermophilic *Geobacillus* Isolated from Litter Deposit of a Lakeshore

Hyun Ju Baek, Young-Gun Zo, and Tae-Seok Ahn* (Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea)

To understand contribution of thermophilic microorganisms in decomposition of litter deposits on shore of lakes, we surveyed a lakeshore litter deposit for bacteria growing at 60°C. Ten thermophilic isolates were selected for in-depth characterization, based on their high capacity to degrade high molecular weight organic compounds. Based on phylogenetic analysis on their 16S rRNA gene sequences, all isolates were identified as *Geobacillus*. The optimal growth temperature and pH of the strains ranged 55~60°C and 6.0~8.0, respectively. Salinity was inhibitory to the growth of the isolates, showing marked decrease of growth rates at 3% salinity. Based on activities of hydrolytic enzymes and profiles of carbohydrate utilization (determined by API 50 CHB kit), three *G. stearothermophilus* strains showed patterns clearly distinctive from other isolates. Two *G. kaustophilus* strains also demonstrated distinctiveness in their metabolic pattern and ecological parameters. However, ecological and metabolic profiles of the other five isolates were more variable and showed some degree of digression from their phylogenetic classification. Therefore, it could be concluded that endospore-forming thermophilic bacteria in lakeshore litter deposits contribute to degradation of organic materials with diverse ecological niches while having successions similar to microbial flora in compost. We propose that the thermophilic isolates and/or their thermo-tolerant enzymes can be applied to industrial processes as appropriate mixtures.