Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 22, No. 2, 222-225 (1994)

단보 (Note)

토양시료의 열처리에 의한 방선균의 선택적 분리

김창진* · 이강현 · 권오성 · 아끼라 시마즈[1] · 유익동
한국과학기술연구원 유전공학연구소, [1]동경대학교 분자세포생물학연구소

Selective Isolation of Actinomycetes by Physical Pretreatment of Soil Sample

Kim, Chang-Jin*, Kang-Hyun Lee, Oh-Sung Kwon, Akira Shimazu[1] and Ick-Dong Yoo
Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon
[1]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Tokyo University

Abstract — Three kinds of pretreatment methods were used for selective isolation of soil actinomycetes. One hundred and six strains were isolated on Bennet's agar and 114 strains were on humic acid-vitamin agar from 5 domestic soil samples. All of these isolates were identified to the genus level based on morphological and physiological characteristics. Among three methods, dry heat was most effective to isolate many different strains including rare actinomycetes. On genus, Bennet's agar was effective for selective isolation of *Nocardia* but humic acid-vitamin agar for another rare actinomycetes.

항생물질등의 생리활성물질을 탐색하기 위한 연구에는 방선균이 많이 이용되고 있다(1). 이와같은 방선균을 분리할 때에 선택적인 균분리 배지를 사용한다 하더라도 일반적인 방법을 사용하면 토양중에 존재하는 방선균 중에서 우점균과 생육이 빠른 방선균만 분리된다. 그러나 각종 생리활성물질을 효과적으로 탐색하기 위하여서는 균분리원에 존재하는 방선균 중에서도 밀도가 낮거나 생육이 느린 방선균을 분리할 필요가 있고 그렇게 함으로써 생리활성물질 탐색의 효율성을 크게 향상시킬 수 있을 것이다. 이를 위한 한가지 방법으로써 토양시료를 전처리한 후 이용하면 우점균의 생육을 저해하거나 생육이 느린 방선균의 생육을 촉진시켜 다양한 희소방선균을 분리할 수 있을 것이다. 희소방선균이란 원래 토양등의 자연계에 분포하는 밀도가 낮거나 인위적으로 분리하고 배양하기가 용이하지 않은 방선균류를 일컫지만 일반적으로는 토양중에 우점하고 있는 *Streptomyces*속 이외의 방선균류를 말한다(2, 3).

균분리용 시료의 전처리 방법으로는 물리적인 방법과 화학적인 방법이 알려져 있다. 물리적인 전처리 방법으로써는 40~52℃ 의 비교적 저온에서 2~16시간 건열처리하는 방법(4), 100~120℃ 의 비교적 고온에서 15~60분간 건열처리하는 방법(5) 그리고 55~100℃ 에서 6~10분간 습열처리하는 방법(6)등이 있으며 화학적인 전처리 방법으로써는 phenol, yeast extract, sodium dodesyl sulfate등을 일정 농도로 처리하는 방법(7-9)등이 보고되어 있다. 이러한 전처리 방법들은 방선균이 토양등의 자연계에 주로 포자 상태로 존재하는 점을 이용하는 것이다. 즉 포자는 일반적으로 내열성이 높기 때문에 여러가지 방법으로 열처리함으로써 다른 미생물들의 생육을 억제하거나 포자의 발아를 촉진시킬 수 있기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 생리활성물질을 효과적으로 screening하기 위한 재료로써, 여러가지 다양한 방선균을 토양으로부터 분리하는데 필요한 기초자료를 얻고자 하였다. 이를 위하여 토양시료를 물리적인 전처리방법의 하나인 열처리 하였을 때 분리되는 방선균을 genus 수준에서 조사하였다.

Key words: Selective isolation, screening, rare actinomycetes, heat pretreatment
*Corresponding author

재료 및 방법

토양시료, 전처리방법 및 균분리

균분리원으로써는 대전시 유성구 일원에서 삼림,

강가, 논, 초지, 밭토양등 각기 그 특성을 달리하는 토양시료 5점을 채취하여 사용하였다. 채취한 각 토양시료는 적절히 전처리한 후 10^{-3}~10^{-5}으로 희석하여 2종류의 각 균분리 배지상에 접종하고 배양하였다. 균분리 배지로서는 방선균의 선택적인 분리배지로 많이 알려져 있는 Bennet's agar(glucose 10 g, yeast extract 1 g, bacto peptone 2 g, beef extract 1 g, agar 20 g, 증류수 1 L)와 humic acid-vitamin agar (humic acid 1 g, Na_2HPO_4 0.5 g, KCl 1.71 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $CaCO_3$ 0.02 g, agar 20 g, 증류수 1 L)(10) 배지를 사용하였다. 토양시료의 전처리는 실온 24시간 풍건처리, 100℃ 1시간 건열처리, 60℃ 24시간 습열처리, 무처리등 4가지 방법으로 하였다. 전처리한 시료는 적당히 희석하여 접종한 후 28℃에서 2주간 배양하였다. 배양 후 나타난 각 colony를 Bennet's agar 배지상에 다시 옮겨, 형태적으로 서로 상이한 균주를 순수 분리한 후 육안 및 광학현미경(long working distance 렌즈)등을 이용하여 각 분리된 방선균별로 genus 수준에서의 동정에 필요한 각종 특징을 조사하였다. 또한 thin layer chromatography(cellulose TLC, Merck 5715, 전개용매 : methanol-H_2O-5 N HCl-pyridine = 80 : 15 : 5 : 10) 방법(11)에 의해 균사 세포벽 성분의 하나인 diaminopimelic acid의 형태를 조사하였으며 필요한 경우에는 ISP 방법(12)과 Bergey's manual(13)에 준하여 생리화학적인 특징을 조사하여 genus 수준에서 동정하였다.

실험결과는 분리된 방선균을 각 genus 별로 종합한 후 토양시료 전처리 방법별로 비교하고 각 균분리 배지별로 나타내었다.

Bennet's agar 배지상의 방선균 분리

토양시료 5점으로부터 Bennet's agar 배지상에서는 106종의 방선균주가 분리되었는데 이 중 77%에 해당하는 82개 균주가 *Streptomyces*에 속하고 나머지 23%에 해당하는 24개 균주는 희소방선균에 속하는 것으로 분류되었다(Table 1). 토양처리별로는 건열처리, 무처리, 풍건처리, 습열처리의 순서로 다수의 방선균이 분리되었고 습열처리(29%), 무처리(28%), 건열처리(21%), 풍건처리(11%)의 순서로 희소방선균의 분리빈도가 높았다. 따라서 건열처리와 무처리가 다수의 희소방선균을 포함하는 다양한 방선균을 분리하는데 효과적이었으며 습열처리의 경우 분리된 전체 방선균수는 적은 편이지만 희소방선균의 분리빈도는 높은 편이었다. 토양처리 방법 및 희소방선균의 genus별로 보면 풍건처리에서는 *Nocardia*가, 건열처리에서는

Table 1. Number of actinomycetes isolated on Bennet's agar by various pretreatment of soil

Pretreatment	Genus									Total
	Stm.	*Kit.*	*Mim.*	*Noc.*	*Nop.*	*Acm.*	*Mib.*	*Cha.*	Etc	
Air dry, 24h	16	0	0	2	0	0	0	0	0	18
100℃, 1 h, dry	31	1	3	4	0	0	0	0	0	39
60℃, 24 h, wet	12	0	1	3	1	0	0	0	0	17
Control	23	0	2	3	0	1	0	0	3	32
Total	82	1	6	12	1	1	0	0	3	106

Stm.; *Streptomyces*, *Kit.*; *Kitasatosporia*, *Mim.*; *Micromonospora*, *Noc.*; *Nocardia*, *Nop.*; *Nocardiopsis*, *Acm.*; *Actinomadura*, *Mib.*; *Microbispora*, *Cha.*; *Chainia*, Etc; other genus.

Table 2. Number of actinomycetes isolated on humic acid-vitamin agar by various pretreatment of soil

Pretreatment	Genus									Total
	Stm.	*Kit.*	*Mim.*	*Noc.*	*Nop.*	*Acm.*	*Mib.*	*Cha.*	Etc	
Air dry, 24h	13	0	1	1	0	1	0	0	0	16
100℃, 1 h, dry	25	0	1	4	1	0	0	0	7	38
60℃, 24 h, wet	12	0	1	3	0	1	0	0	1	18
Control	29	3	2	3	1	0	2	1	1	42
Total	79	3	5	11	2	2	2	1	9	114

Stm.; *Streptomyces*, *Kit.*; *Kitasatosporia*, *Mim.*; *Micromonospora*, *Noc.*; *Nocardia*, *Nop.*; *Nocardiopsis*, *Acm.*; *Actinomadura*, *Mib.*; *Microbispora*, *Cha.*; *Chainia*, Etc; other genus.

Table 3. Number of actinomycetes isolated on Bennet's and humic acid-vitamin agar by various pretreatment of soil

Pretreatment	Genus									Total
	Stm.	*Kit.*	*Mim.*	*Noc.*	*Nop.*	*Acm.*	*Mib.*	*Cha.*	Etc	
Air dry, 24h	29	0	1	3	0	1	0	0	0	34
100℃, 1 h, dry	56	1	4	8	1	0	0	0	7	77
60℃, 24 h, wet	24	0	2	6	1	1	0	0	1	35
Control	52	3	4	6	1	1	2	1	4	74
Total	161	4	10	23	3	3	2	1	12	220

Stm.; *Streptomyces*, *Kit.*; *Kitasatosporia*, *Mim.*; *Micromonospora*, *Noc.*; *Nocardia*, *Nop.*; *Nocardiopsis*, *Acm.*; *Actinomadura*, *Mib.*; *Microbispora*, *Cha.*; *Chainia*, Etc; other genus.

*Micromonospora*와 *Nocardia*가, 습열처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*가, 무처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura*와 기타 방선균등이 잘 분리되는 경향을 나타내었다.

Humic acid-vitamin agar 배지상의 방선균 분리

토양시료 5점으로부터 humic acid-vitamin agar 배지상에서는 114종의 방선균주가 분리되었는데 이 중 69%에 해당하는 79개 균주가 *Streptomyces*에 속하고 나머지 31%에 해당하는 35개 균주는 희소방선균에 속하는 것으로 분류되었다(Table 2). 토양처리별로는 무처리, 건열처리, 습열처리, 풍건처리의 순서로 다수의 방선균이 분리되었고 건열처리(34%), 습열처리(33%), 무처리(31%), 풍건처리(19%)의 순서로 희소방선균의 분리빈도가 높았다. 따라서 건열처리와 무처리가 다수의 희소방선균을 포함하는 다양한 방선균을 분리하는데 효과적이었으며 습열처리의 경우 분리된 전체 방선균의 수는 적은 편이지만 희소방선균의 분리빈도는 높은 편이었다. 토양처리 방법 및 방선균의 genus별로 보면 풍건처리에서는 *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*가, 건열처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*와 기타 방선균등이, 습열처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura*가, 무처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Kitasatosporia*, *Microbispora*, *Nocardiopsis*, *Chainia*와 기타 방선균등이 잘 분리되는 경향을 나타내었다.

결과 및 고찰

이상의 결과를 종합하면 토양시료 5점으로부터 Bennet's agar와 humic acid-vitamin agar 배지상에서 총 220종의 방선균주가 분리되었는데 이 중 73%에 해당하는 161개 균주가 *Streptomyces*에 속하고 나머지 27%에 해당하는 59개 균주는 희소방선균에 속하는 것으로 분류되었다(Table 3). 토양처리별로는 건열처리, 무처리, 습열처리, 풍건처리의 순서로 다수의 방선균이 분리되었으며 특히 건열처리와 무처리에서 많은 수의 방선균이 분리되었다. 희소방선균의 분리빈도는 습열처리(31%), 무처리(30%), 건열처리(27%), 풍건처리(15%)의 순서이었다. 따라서 건열처리와 무처리가 다수의 희소방선균을 포함하는 다양한 방선균을 분리하는데 효과적이었으며 습열처리의 경우 분리되는 전체 방선균의 수는 적은 편이지만 희소방선균의 분리빈도는 높은 편이었다. 일반적으로 풍건처리를 하면 무처리에 비하여 균분리 배지상에 나타나는 세균의 수를 감소시켜 방선균의 분리를 용이하게 하는 것으로 알려져 있으나(10) 본 연구결과에서는 효과가 낮은 것으로 나타났다.

한편 토양전처리 방법 및 희소방선균의 genus별로 보면 풍건처리에서는 *Nocardia*가, 건열처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*와 기타 방선균등이, 습열처리에서는 *Nocardia*와 *Micromonospora*가, 무처리에서는 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Kitasatosporia*, *Microbispora*와 기타 방선균등이 잘 분리되는 경향을 나타내었다.

본 실험에서 사용된 균분리 배지별 희소방선균 분리빈도의 결과에 의하면 humic acid-vitamin agar 배지가 31%로서 Bennet's agar 배지의 23%보다 높게 나타나 희소방선균을 분리하는데 있어서는 humic acid-vitamin agar가 Bennet's agar 보다는 유용한 것으로 판단되었으며 Bennet's agar 배지에서는 *Nocardia*가 특히 잘 분리되었고 기타 희소방선균들은 humic acid-vitamin agar 배지에서 잘 분리되는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Tanaka, Y. and S. Omura. 1990. Metabolism and products of actinomycetes-an introduction. *Actinomycetol.* **4**: 13-14.
2. Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes-new breed of actinomycetes. *J. Microorganism* **3**: 453-461.
3. Iwai, H. and Y. Takahashi. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds, Pp. 281-302. *In* S. Omura(ed.), *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*, Springer-Verlag, New York.
4. Williams, S.T., M. Shameemullah, E.T. Watson, and C.I. Mayfield. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 215-225.
5. Athalye, M., J. Lacey, and M. Goodfellow. 1981. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* **51**: 289-297.
6. Rowbotham, T.J. and T. Cross. 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 231-240.
7. Nonomura, H. 1988. Isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* **3**: 45-54.
8. Nonomura, H. and M. Hayakawa. 1988. New methods for the selective isolation of soil actinomycetes, Pp. 288-293. *In* Y. Okami, T. Beppu, and H. Ogawara(ed.), *Biology of Actinomycetes '88*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
9. Hayakawa, M. 1990. Selective isolation methods and distribution of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* **4**: 103-112.
10. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501-509.
11. Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
12. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
13. Lechevalier, H.A. 1989. A practical guide to generic identification, Pp. 2344-2347. *In* S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt(ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore.

(Received February 3, 1994)