

토양중 방선균의 선택적 분리를 위한 배지

조성학 · 황철원¹ · 정호권² · 양창술*

건국대학교 농화학과, ¹농업진흥청 농업유전공학연구소,
²건국대학교 미생물공학과

A New Medium for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes

Cho, Seong-Hag, Cherl-Won Hwang¹, Ho-Kweon Chung² and Chang-Sul Yang*

Department of Agricultural Chemistry, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

¹Agricultural Biotechnology Institute R.D.A., Suwon 441-702, Korea

²Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — For the more effective isolation of soil actinomycetes, we have developed HHV (Hair hydrolysate-vitamin) agar medium, containing hair as the sole source of carbon and nitrogen. The HHV agar medium was superior to other media such as colloidal chitin agar, glycerol-arginine agar and starch-casein-nitrate agar, and HV (humic acid-vitamin) agar. The maximum effect of this medium has been shown in hair dry weight 0.4 g/l medium. Of each soil sample, the greatest number of actinomycetes was isolated from the potato annual planted soil among the tested samples. The genus of actinomycetes isolated from the potato annual planted soil sample was identified such 5 group as *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Nocardia* and *Saccharopolyspora*.

최근, 국제 시장의 개방과 물질 특허제의 도입으로 인하여 신규생리활성 물질의 개발에 대한 국가적 요구가 증가하고 있다. 생리활성 물질 중, 현재까지 미생물에 의해 생산되는 것으로 밝혀진 10,000여 종의 항생물질의 약 70% 정도가 방선균으로부터 발견되고 있어 각종 생리활성 물질의 탐색에 있어서 방선균이 차지하는 비중은 매우 크다(1).

지금까지 방선균을 분리하는 선택배지로서 glycerol-arginine agar, starch-casein nitrate agar 그리고 colloidal chitin agar 배지 등이 많이 사용되어 오다가 최근에 Hayakawa가 보고한 HV(Humic acid-vitamin) agar(2-3) 배지가 방선균을 선택적으로 분리하는데 적당한 배지로 인정되고 있다. 한편 humic acid는 melanin(4) 성분을 함유하고 있으며, 이 melanin은 피부, 머리카락, 곤충의 cuticle, 토양 등에서 어두운 색깔을 띠게 하며 곰팡이 및 세균에서도 발견되는 색소로서 단백질과 결합되어 있으며, 머리카락에 포함된 melanin과 humic acid는 함유된 성분에 있어서 유연성이 인정된다.

따라서 본 연구는 기존의 방선균 선택 배지인 hu-

mic acid-vitamin agar 배지의 변형으로서 humic acid 대신 머리카락 가수분해 산물(5)을 첨가한 배지(HH-VA; hair hydrolysate-vitamin agar)를 이용하여 방선균 선택배지로서의 적합여부를 검토하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

공시 토양

경기도 농촌 진흥원 시험 포장의 토양을 채취하여 실험실로 옮겨 풍건한 후, 2 mm 채로 통과시킨 세토 부분을 사용하였다. 공시 토양의 종류는 참깨 연작지 토양(soil sample A: 수분함량 18.3%, 회분 1.7%, pH 6.1), 감자 연작지 토양(soil sample B: 수분함량 13%, 회분 5.6%, pH 4.9), 채소 연작지 토양(soil sample C: 수분함량 7.6%, 회분 3%, pH 5.5)이었다

머리카락 용액의 조제

수거한 머리카락을 비눗물로 깨끗이 세척한 후 이를 동안 실내온도에서 풍건을 시킨다. 풍건된 머리카락을 1~2 mm 정도로 자른 후 20 g의 머리카락을 1 N-NaOH 용액 200 ml에 넣어 이를 동안 방치하였다. 이 용액을 원심분리(3000 rpm, 20 min)하여 침전물은

Key words: Selective isolation of soil actinomycetes, hair solution

*Corresponding author

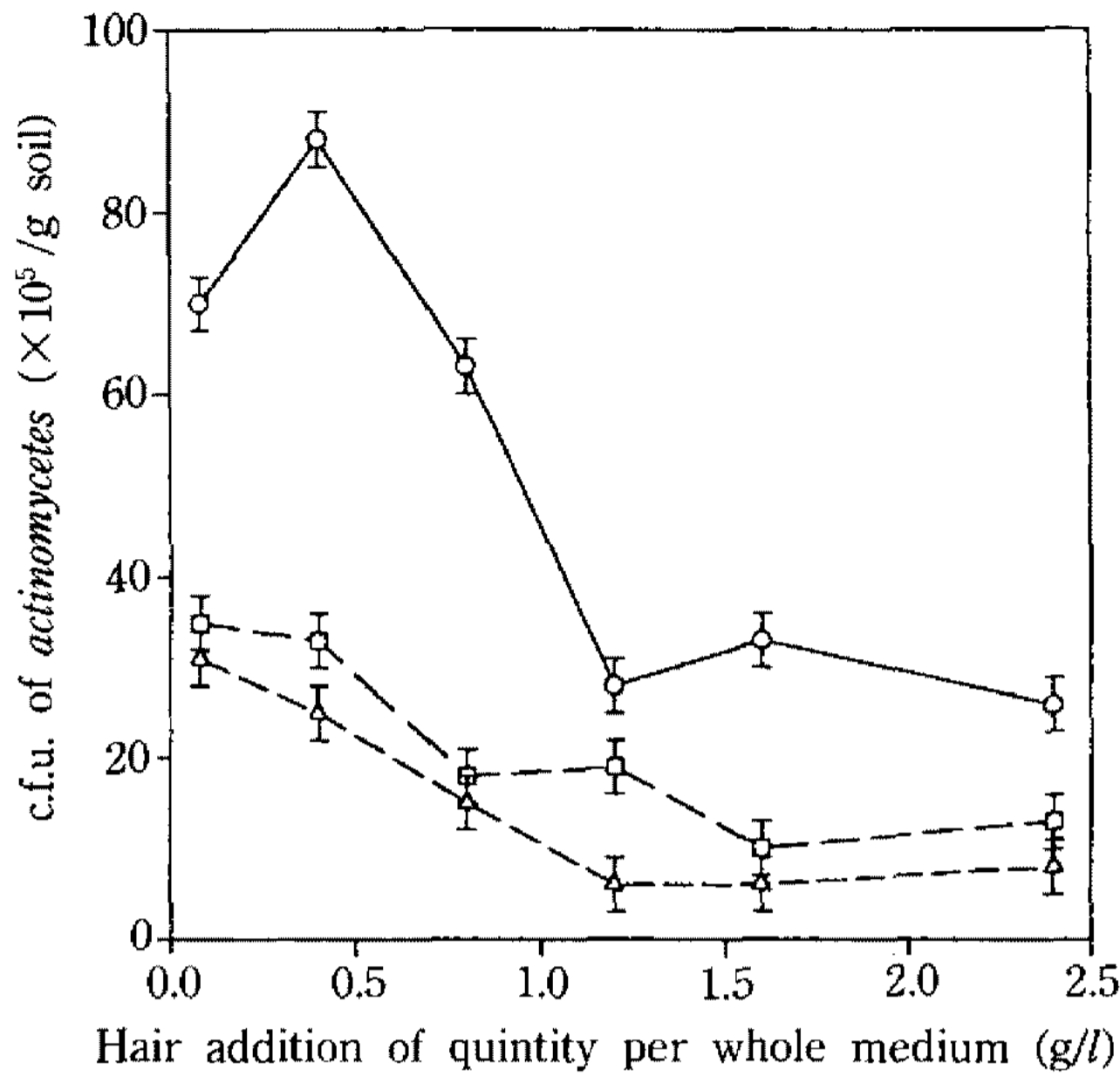


Fig. 1. Distribution of actinomycetes in soil depended on hair addition quantity.
 -○-: soil sample B, -□-: soil sample C, -△-: soil sample A

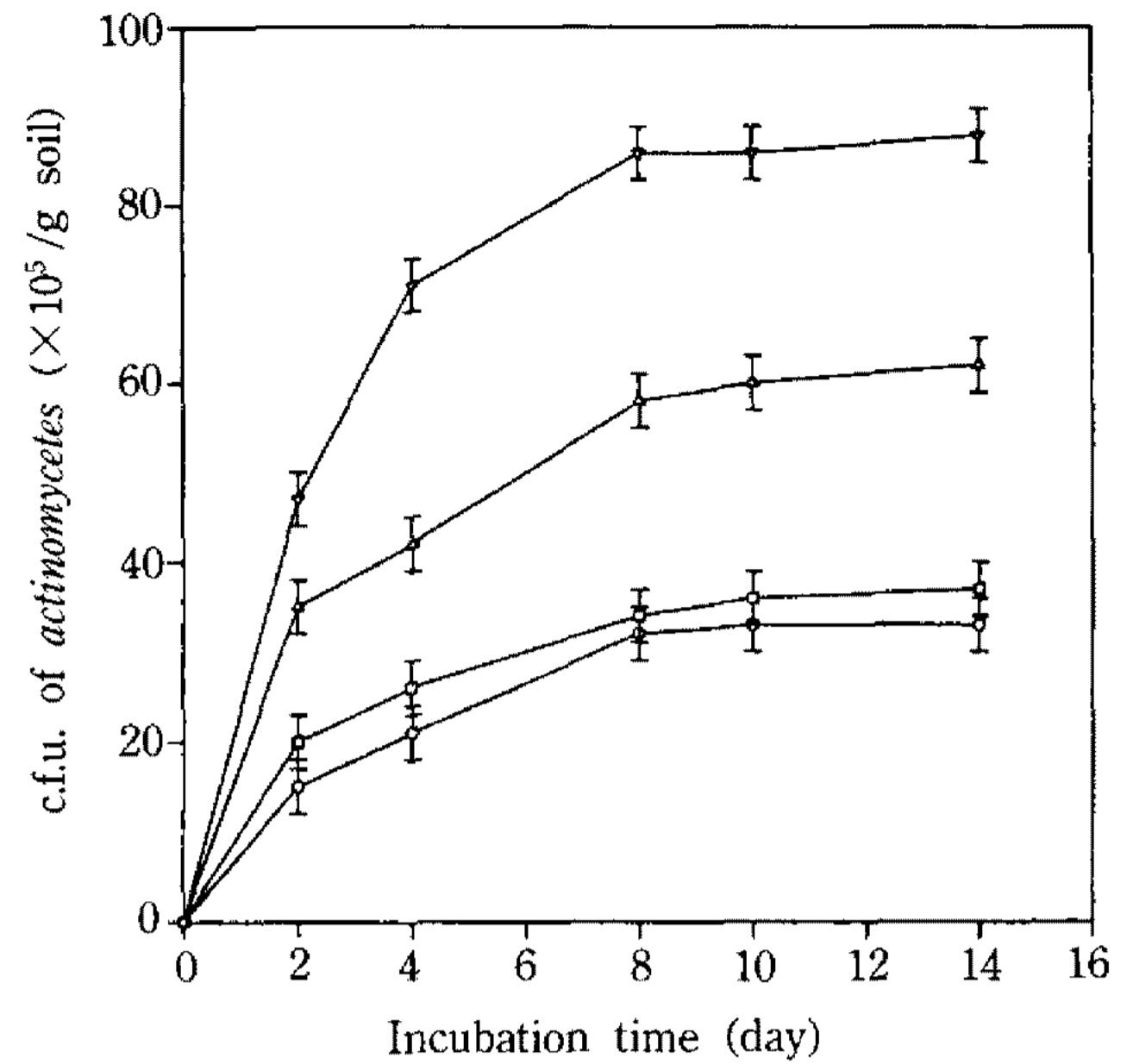


Fig. 2. Numbers of actinomycetes and bacteria on HVA and HHPVA isolation plates.
 -○-: HVA-bacteria, -□-: HVA-bacteria, -△-: HVA-actinomycetes, -▽-: HVA-actinomycetes

제거하고 상등액을 1N-HCl 용액으로 중화시켰다.

머리카락 용액 배지의 조성

배지의 조성은 HVA(humic acid-vitamin agar)배지의 조성과 동일하나 humic acid 대신에 머리카락 용액을 첨가하였다. 배지의 성분은 Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, CaCO₃ 0.02 g, 머리카락 건물중량으로 0.4 g(조제용액 1 ml는 머리카락 건물중으로 0.04 g에 해당함), agar 18 g, 증류수 1000 ml로 하였으며 pH는 7.2로 조정하였으며 복합 vitamin-B를 첨가하였고, 사상균 억제제를 위해서는 cycloheximide, 세균을 억제키 위해 nalidixic acid를 각각 첨가하였다. 머리카락 용액은 배지 1l에 대하여 머리카락 건물중량으로 0.008 g, 0.4 g, 0.8 g, 1.2 g, 1.6 g, 2.4 g을 각각 첨가하였다.

방선균수의 측정

회석 평판법을 사용하였으며 배양온도는 28°C 에서 14일간 배양하였다. 균수의 측정은 회석 평판법에 의한 3반복으로 하였다.

결과 및 고찰

Fig.1은 세 가지 토양들로부터 방선균을 분리했을 때, 머리카락 건물중량으로 배지 1l에 대하여 각각 0.08 g, 0.4 g, 0.8 g, 1.2 g, 1.6 g 그리고 2.4 g을 첨가

하였을 때의 균수이다. 감자 연작지 토양의 경우는, 0.4 g일 때 균수가 가장 많았고 머리카락의 첨가농도가 증가하면 균수는 적어지다가 1.6 g에서 약간 많아졌다. 참깨와 채소 연작지 토양에서는 0.08 g~0.4 g에서 많은 균수를 보였으며 그 이상의 농도가 되면 균수는 급격히 적어졌다. 머리카락 농도가 0.4 g 이상에서는 방선균 수가 감소하는지 그 이유에 대해서는 앞으로 검토되어야 할 것이다. 또한, 감자연작지 토양에서는 다른 토양에서 보다 많은 수의 방선균이 분리되었다. 이는 감자연작지 토양의 경우 유기물 함량이 높기 때문에 다양한 방선균이 다수 존재하고 있었기 때문인 것으로 여겨진다.

Fig.2는 Fig.1에서 선택한 0.4 g의 머리카락 용액 배지와 기존의 우수한 방선균 선택배지인 HVA 배지와 비교 그래프이다. 그림에서 알 수 있듯이 머리카락 용액배지는 HVA 배지에서보다 많은 방선균 수가 측정되었다. 그리고 머리카락 용액배지를 사용할 경우 HHVA 평판 배지상에 나타난 방선균의 colony의 형태가 HVA 평판배지상의 방선균의 colony의 형태보다 더 명확하게 관찰될 수 있었다.

머리카락 용액 배지를 이용하여 감자 연작지 토양으로부터 분리된 방선균을 순수 분리한 후, 현미경 관찰을 한 결과 *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*의 5종류의 속을 분리 동정하였다. 기존의 방선균 선택배지인 HVA 배지보다 머리카락 용액을 이용한 배지가 방선균의

수와 속의 다양성에서 우수한 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Berdy, J. 1985. *Screening, Classification and Identification of Microbial Products*, Pp. 9-31. Ellis Horwood Publisher, Chichester.
2. 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.
3. Hayakawa, M. and H. Nonomura, 1987. Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 609-616.
4. Susan, B. 1989. Melanins, Pp. 5692. 11th ed. *In The Merck Index*, Merck & Co., Inc., U.S.A.
5. 한국생화학회, 교재편찬 위원회 편저. 1979. 단백질의 가수분해. Pp. 84-86. 탐구당.

(Received May 20, 1994)