

## *Pyricularia oryzae*의 성장을 억제하는 물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. NA-52의 분리 및 동정

윤원호<sup>1</sup> · 임대석 · 이명섭 · 김창한\*

건국대학교 동물자원연구센터 분자세포생물학교실, <sup>1</sup>서일전문대학 식품가공학과

**Isolation and Identification of *Streptomyces* sp. NA-52 Producing Growth Inhibitor against *Pyricularia oryzae*.** Won-Ho Yoon<sup>1</sup>, Dae-Seog Lim, Myung-Sub Lee and Chang-Han Kim\*. Laboratory of Molecular Cell Biology, Animal Resources Research Center, Konkook University, Seoul 143-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Processing, Seoil Junior College, Seoul 131-208, Korea - The aim of the present research program was to isolate a strain of actinomycetes producing antifungal substance. Soil samples were collected from various sites in Korea and a number of actinomycetes were isolated from the soil samples by applying selective agar for actinomycetes. Among isolates, a strain (NA-52) producing antifungal substance against *Pyricularia oryzae* was selected. Chemotaxonomic and numerical identification were carried out for the isolate. Fifty taxonomic unit characters were tested and the data were analyzed numerically using TAXON program. The isolate was identified as a synonym of *streptomyces diastaticus* belong to cluster No. 19 (*Streptomyces diastaticus*). But it showed a low similarity to *S. diastaticus* in simple matching coefficients, hence it was considered as one new species in *Streptomyces*.

농촌진흥청에 의하면, 우리나라에서 벼의 병 가운데서 가장 무서운 질병이 *Pyricularia oryzae*에 의한 벼의 감염, 즉 벼 도열병균이라고 한다. 1963년부터 1973년도에 이르는 과거의 10년간에는 도열병으로 인한 연평균 감수율이 7.3%로서 전체 벼 병의 피해율중 40%에 해당된 적도 있다고 보고되고 있다.

*Pyricularia oryzae*의 분생포자는 서양배 모양이며 2개의 격막을 가지고 있고 거의 무색이다. 수분이 있으면 발아관을 내고 다시 부착기를 형성하여 각피 또는 기공을 통해서 침입한다(1). 병원균은 벚짚 또는 볏씨의 병든 부분에서 균사 혹은 분생포자의 형태로 월동하여 제 1차 전염원이 된다. 제 1차감염이 시작되는 시기는 대체로 병든 종자일 경우 파종 10일후에 발생하며, 제 2차감염은 바람에 의한 분생포자에 의해서 일어난다. 비가 자주오고 일조가 부족하며 냉랭하고 습한 일기, 강한 바람, 수온과 지온의 낮음, 질소비료의 과용, 밀식, 이앙기의 지연 등이 도열병을 유발한다고 보고되어 있다(2). 따라서 도열병은 장마시작을 전후로 벼 농지에 신속하게 번지기 때문에 방제가 매우 어려운 식물병이라 할 수 있다.

이러한 도열병에 대한 치료제 개발 및 이용현황은 미생물 발효산물을 이용한 치료제로서 kasugamycin, cycloheximide, blastocidin S 및 유기합성 농약 등이 개발되어 실용화되고 있다(3, 4). 국내에서도 그 외에 새로운 항진

균성 항생물질의 개발에 역점을 두어 벼문고병(5)과 고추역병(6) 등의 농약개발에 대한 연구가 수행되고 있지만 아직까지 신물질로서 등록된 치료제는 없는 실정이다.

본 연구는 미생물 대사산물로부터 농업용 항생물질의 탐색을 수행하던 과정에서 벼 도열병균에 대해 강한 방제효과를 나타내는 항진균성 항생물질 생산균주를 선별하였기에, 그 생산균주 NA-52를 동정하였다.

### 재료 및 방법

#### 방선균의 분리

전국각지에서 5~10 cm 깊이의 미경작지 토양을 채취하여 3 주일간 그늘에서 풍건한 다음 100℃의 drying oven에서 1시간 건열처리한 것과 건열처리하지 않은 토양시료로 나누어 각각 1g씩을 멸균증류수 10 ml에 넣어 약 1분간 vortexing한 후 방치한 다음 그 상정액을 10배 희석법으로 멸균증류수로 희석하여 그 희석액 1 ml씩을 각각 멸균 petri dish에 취하고 방선균 분리용 평판배지 20 ml씩을 각각 주입하여 평판을 만든 다음 28℃에서 7~14일간 배양하였다. 평판에 나타난 콜로니들중에서 방선균의 형태적 특성이 인정되는 균주들을 분리하였다.

#### 사용배지

방선균 선택적 분리배지는 1% glycerin, 1% soluble starch, 0.03% casein, 0.2% KNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% NaCl, 0.005% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.001% thiamine · HCl, 0.9% agar를 함유하는 S 배지

\*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3679, Fax. 82-2-3436-0266

E-mail: chhan@kkucc.konkuk.ac.kr

Key words: Antifungal antibiotic, Numerical identification, *Streptomyces diastaticus*, *Pyricularia oryzae*.

(pH 7.0~7.2)와 0.1% glucose, 0.1% glycerol, 0.03%  $K_2HPO_4$ , 0.03%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.03% NaCl, 0.03% L-asparagine에 0.1% trace salts solution, 1% vitamins solution, 1% antibiotics solution을 함유하는 AV 배지 (pH 6.4)를 사용하였고, 분리한 방선균의 보존용 배지는 Bennett's 배지를 사용하였다(7).

세균검정평판을 위한 배지는 0.3% glucose, 1% polypeptone, 0.5% NaCl, 1% meat extract, 1% agar를 함유하는 glucose bouillon 배지(pH 7.0)를 사용하였고, 진균검정평판을 위한 배지는 potato dextrose agar(PDA, 합성배지)를 사용하였으며, 녹조류검정평판을 위한 배지는 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.0005%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1% Arnon's A-5 solution, 0.5% yeast extract, 2% glucose, 1.2% agar를 함유하는 Arnon's A-5 배지를 사용하였다. 한편, 항생물질생산을 위한 전배양배지는 1% glucose, 0.2% polypeptone, 0.1% yeast extract, 0.1% meat extract, 0.05% asparagine, 0.01% thiamine · HCl을 함유하는 PCII 배지(pH 7.0)와 0.5% glucose, 0.3% polypeptone, 0.2% yeast extract, 0.5% meat extract, 1% soluble starch, 1% glycerol, 0.1% casein (from milk), 0.2%  $CaCO_3$ , 0.001% thiamine · HCl을 함유하는 PY 본배양배지(pH 7.0)를 사용하였다. 균주동정을 위한 배지는 ISP에서 제시한 배지를 사용하였다(8).

### 항균활성 측정

전배양을 2일간 실시하고 4일간의 본배양이 끝난 배양액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상징액과 균체를 분리하여 세균 및 진균류에 대하여 *in vitro* 항균활성 검정을 실시하였다. 세균은 glucose bouillon 배지, 진균류는 potato dextrose agar, 그리고 녹조류는 Arnon's A-5 배지를 사용하였고, 검정평판은 균의 종류에 따라 중층검정평판과 단층검정평판을 조제하여 사용하였으며, 중층검정평판의 조제는 배지 20 ml를 petri dish에 부어 응고시켜 하층을 만들고 진탕 또는 정지 배양한 검정균을 동일배지에 접종하여 4~5 ml를 하층배지위에 중층으로 만들었고, 단층검정평판은 균을 접종한 배지 약 5 ml를 단층으로 하여 평판을 조제하여 사용하였다. 항균활성의 측정시 상징액은 penicillin의 공정검정법에 준한 원통평판법, 균체는 증류수로 두번 세정한 후 균체량과 같은양의 acetone으로 추출하여 paper disk method에 따라 행하였으며, 28~37°C, 18~24시간 배양하여 평판에 나타난 저지원의 직경(mm)을 측정하여 그 항균활성으로 나타내었다.

### 균주의 동정

분리균주의 수리동정을 위해 사용된 형태학적, 생리생화학적 50개의 단위형질 분석은 Williams 등의 방법을

따랐다(9, 10). 탄소원 이용 이외의 모든 시험에서는 Bennett's 배지에서 14일간 배양한 후 멸균증류수 4 ml를 넣어 포자현탁액을 만들고, 이 포자현탁액을 멸균시험관에 무균적으로 옮겨서 접종원으로 사용하였다(11).

**형태학적 특성 분석** 기균사의 형태는 Bennett's 배지를 이용한 Groove method(12)로 28°C에서 14일간 배양한 후 위상차 현미경으로 관찰하였으며, ISP 3배지(8)에 배양하면서 기균사의 색깔, 배면색깔 등 콜로니 형태를 관찰하였다. 기균사 포자사슬의 관찰은 주사전자현미경 (Model S-800, Hitachi, Japan)으로 15,000배로 관찰 및 촬영하였다.

**세포벽의 diaminopimelic acid 이성체와 아미노산 분석** 분리균주 NA-52를 tryptic soy broth 배지로 7일간 진탕배양한 후 원심분리(11,000 g, 15분)에 의하여 균체를 회수하고 회수한 균체를 멸균증류수로 3회 세척한 후 동결건조하였다. DAP와 아미노산 분석을 위하여 동결건조된 균사 20 mg을 6 N HCl 5 ml와 같이 시험관에 넣고 밀봉한 후 100°C에서 18시간 가수분해하여 여과, 탈염산, 농축하고 이 농축액을 cellulose TLC(10×10 cm, HFTLC Cellulose, Merck Co.)의 시료로 하여 methanol-water-5 N HCl-pyridine(80:15:5:10)으로 전개시킨 다음 acetic ninhydrin으로 발색시켜 Sigma사 표준제품과 비교하였다(13).

**배양 및 생리학적 특성조사** 포자와 영양균사의 색깔은 inorganic salts-starch agar(8) 평판에서 용해성색소는 glycerol-asparagine agar(8) 평판에서 28°C, 14일간 배양 후 관찰하였으며 색깔의 판정은 Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards(ISCC-NBS, United States Dept. of Commerce) Centroid Color Charts와 대조하여 결정하였다. ISP 방법에 따른 각종 배지상의 생육특성도 같은 방법으로 조사하였으며 pH에 따른 용해성 및 영양균사의 색깔 변화는 0.05 N NaOH와 HCl를 몇 방울 떨어뜨린 후 색깔의 변화유무를 관찰하였고, melanin 색소 생성여부는 peptone-yeast extract-iron agar(8), tyrosine agar(8) 및 trypton-yeast extract broth(8)에서 28°C, 4일간 배양 후 관찰하였다.

**종 수리동정을 위한 특성 분석** 주군집(major cluster) 동정을 위한 50 단위형질(unit character)은 Williams 등(9, 10)의 방법에 따라 시험하였다. 형태 및 색소 형성, 항균력 시험, 분해능 및 항생물질 내성 시험, 효소시험, 성장 및 영양요구성 시험 등은 평판배지를 사용하였으며 질산염 환원, 황화수소( $H_2S$ ) 생성, hippurate 가수분해와 arbutin 분해능 시험은 시험관을 사용하였다. 접종된 배지는 28°C에서 일정기간 배양하여 결과를 관찰하였고, 모든 시험결과는 Williams 등(9, 10)의 분류기준과 비교하여 동정하였다.

**TAXON program** TAXON program은 영국 Newcas-

tle upon Tyne 대학 미생물학과의 A. C. Ward 박사에 의하여 개발된 프로그램으로서 서울대학교 미생물학과의 도움을 받아 데이터를 확립하였다. 데이터의 입력은 단위 형질의 특성을 + 혹은 -로 간단하게 입력하고, 입력된 자료를 CLUSTAN으로 분석하여 수리분류를 할 수 있으며, 수리분류 데이터를 기본으로 하여 작성된 identification probability matrix의 특성과 미지균의 특성을 비교·분석함으로써 수리동정하였다(14, 15).

### 결과 및 고찰

#### 항생물질 생산균의 선별

채취한 토양시료로부터 방선균 313균주를 분리하였으며 분리한 방선균중 항진균성 항생물질을 생산하는 분리균주는 13균주 였으며, 그 항균성은 Table 1과 같다. 그 중에서 분리균주 NA-52는 Gram 양성균과 음성균에 대하여 항균효과를 보이지 않았으나 식물병원성 곰팡이, 특히 *Pyricularia oryzae*와 녹조류인 *Chlorella regularis*에 선택적으로 항균성을 가졌으므로 공시균주로 최종선별하였다.

#### 분리균주 NA-4803의 속(genus) 동정

분리균주 NA-52의 기균사 형태는 Bennett's agar 평판에서 14일간 배양하여 위상차현미경(×400, ×1000)으로 관찰한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이, 기균사의 존재를 확인하였고 *Streptoverticillium*의 특징인 verticil은 관찰되지 않았다. 포자표면의 형태는 ISP 3(8) 평판 배지에서 14일간 배양하여 주사전자현미경으로 관찰한

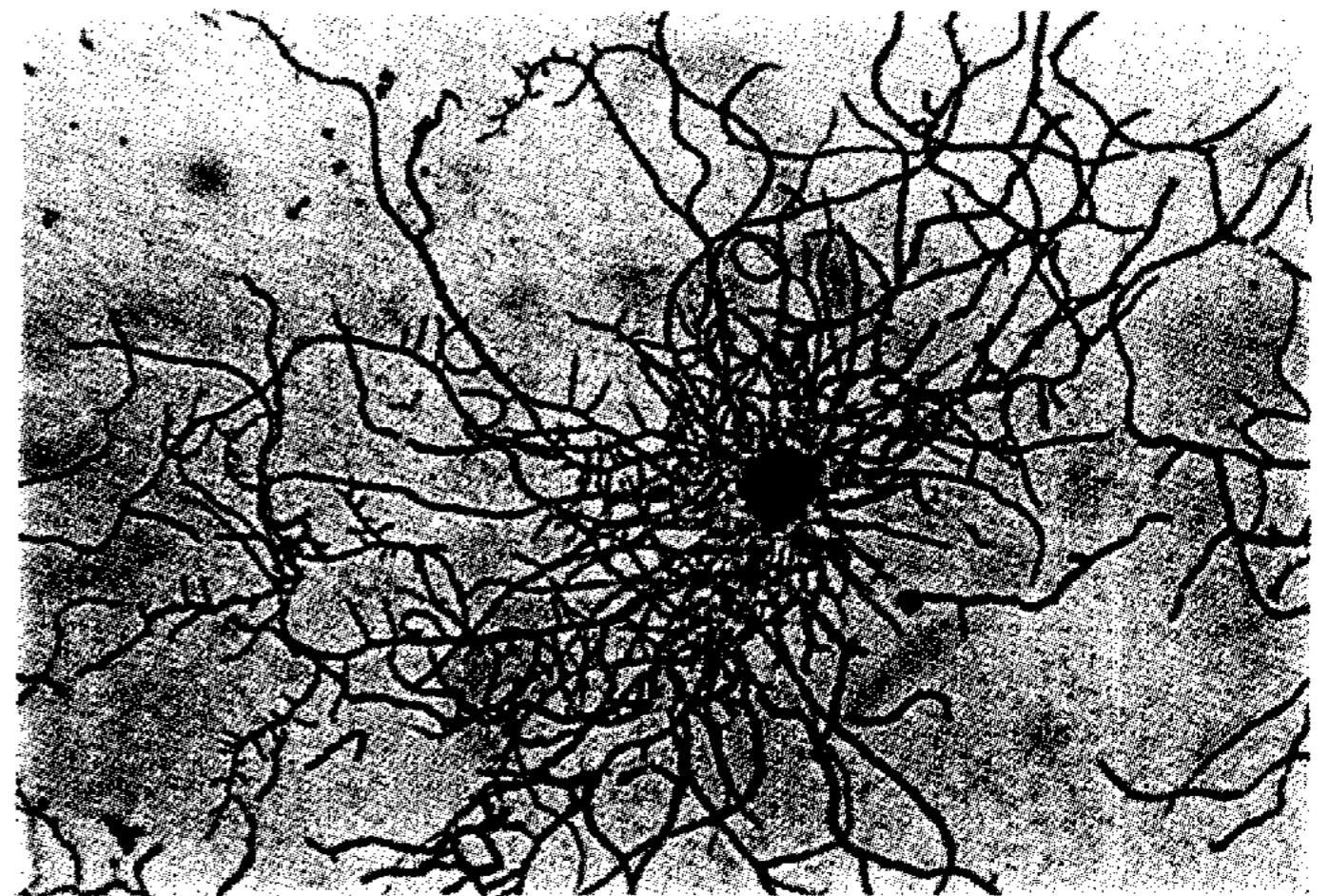


Fig. 1. Microphotograph of strain NA-52.

결과, 완전한 spiral으로 선단에 원통형의 마디모양을 하고 있었으며 포자표면은 전형적인 smooth type이었다 (Fig. 2). 세포벽의 DAP isomer type은 Table 4에서 보는 바와 같이, LL-DAP와 glycine을 함유함으로써 wall chemotype 분류상의 chemotype I에 해당되는 것으로 밝혀졌다. 배양 및 생리학적 특성은 Table 2에서 보는 바와 같이, spore mass는 회색이었고 영양균사는 red/orange 색이었으며 가용성색소는 갈색으로 관찰되었다. 또한 영양균사 및 용해성색소의 산·알칼리 조건하에서의 색깔 변화도 없었으며, peptone-yeast extract-iron agar와 tyrosine agar에서 melanin 색소를 생성하였으며 균사의 분단현상, 경화현상 및 영양균사의 포자형성 역시 관찰되지 않았다. ISP 방법에 따른 각종 배지에서의 배양성의 특성은 Table 3에서 보는 바와 같이, yeast extract-

Table 1. Antimicrobial activity of 13 isolates

Test microorganisms	Inhibition zone diameter (mm)*												
	N1-A <sub>2</sub>	N-5	HA-26	N-50	NA-52	HA-66	NA-84	H-86	HA-86	N-89	HA-133	N-136	H-157
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	16	16	16	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA-209P	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium phlei</i> IID Timothe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Psuedomonas fluorescens</i> IAM 1201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> IAM 4905	17	19	0	0	0	20	15	14	21	0	0	0	0
<i>Mucor ramannianus</i> IAM 6128	15	0	0	12	0	27	17	0	13	0	0	0	0
<i>Chlorella regularis</i>	13	21	20	14	40	25	12	20	13	0	0	0	0
<i>Alternaria mali</i>	11	0	0	16	0	0	0	00	11	14	20	0	0
<i>Pyricularia oryzae</i> IFO 5994	17	0	0	0	24	0	0	11	10	15	0	20	10
<i>Rhizoctonia solani</i> IFO 6258	13	0	0	0	0	0	0	0	14	23	22	0	0
<i>Cylindrocarpon destructant</i>	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0
<i>Botrytis cinerea</i> IFO 5365	22	0	0	13	0	0	0	0	22	0	0	0	0
<i>Fusarium solani</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glomerella cingulate</i> IFO 9767	17	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0
<i>Alternaria alternate</i>	12	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*Antimicrobial activity was measured by cylinder method.



Fig. 2. Scanning electron microphotograph of spore surface of strain NA-52.

Medium: oatmeal agar, Cultivation: 28°C for 14 days.

malt extract agar(ISP 2), oatmeal agar(ISP 3), glycerol-asparagine agar(ISP 5), Bennett's agar 및 potato dextrose agar 배지에서는 생육이 양호한 것으로 나타났다. 이외의 특성에 있어서는 Table 4에서 보는 바와 같이, 탈지분유는 응고와 펩톤화를 유도하였으며 cellulose는 분해하지 못하였다. NaCl 내성은 6% 이하였으며, 생육적온은 27°C~37°C이었고, 생육에 적합한 pH 범위

Table 2. Cultural and physiological characteristics of strain NA-52

Characteristics	Strain NA-52
Color of spore mass	
Red	-
Yellow	-
Gray	+
Green	-
Blue	-
Violet	-
White	-
No distinctive substrate mycelial pigments	+
Pigmentation of substrate mycelium	
Red/Orange	+
Green	-
Blue	-
Violet	-
Production of diffusible pigments	+
Pigmentation of diffusible pigments	
Red/Orange	-
Yellow/Brown	+
Green	-
Blue	-
Violet	-
Sensitivity of substrate pigment to pH	-
Sensitivity of diffusible pigment to pH	-
Melanin production on peptone/yeast/iron agar	+
Melanin production on tyrosine agar	+
Fragmentation of mycelium	-
Sclerotia formation	-
Sporulation on substrate mycelium	-

는 6.0~8.0이었다. 또한 포자낭과 운동성포자는 관찰되지 않았으며 마혈청의 용혈작용도 없었다. 따라서, 분리 균주 NA-52는 배양특성과 형태학적 특성 등을 검토한 결과, *Streptomyces* 속으로 동정되었다(Table 5).

Table 3. Cultural characteristics of strain NA-52

Medium	Growth	Spore mass color*	Reverse side color*	Soluble pigment*
Yeast ext.-malt ext. agar(ISP 2)	good	med. Gy (265)	d. Br (56)	s. Br (55)
Oatmeal agar (ISP 3)	good	med. Gy (265)	d. B (59)	Br. O (54)
Inorganic salts-starch agar (ISP 4)	poor	none	I. O (52)	I. pPr (249)
Glycerol-asparagine agar (ISP 5)	good	med. Gy (265)	m. Br (58)	m. Br (58)
Peptone-yeast ext. iron agar (ISP 6)	moderate	none	br. OY (67)	none
Tyrosine agar (ISP 7)	poor	I. Gy (264)	P. OY (73)	none
Sucrose-nitrate agar	moderate	I. Gy (264)	m. O (53)	I. O (52)
Glucose-asparagine agar	moderate	med. Gy (265)	d.y Br (75)	m. Br (58)
Nutrient agar	moderate	white (263)	I. OY (70)	none
Bennett's agar	good	I.br Gy (63)	d. gy Br (62)	s. Br
Potato dextrose agar	good	I.br Gy (63)	d. Br (59)	d. Br
Czapek's agar	moderate	I. Gy (264)	I. O (52)	I. O (52)
Starch agar	poor	I. Gy (264)	m.y Br (77)	I. Br (57)

\*Color names and color code were assigned according to ISCC-NBS Centroid Color Charts.

**Table 4. Other physiological characteristics of strain NA-52**

Characteristics	Strain NA-52
Cell wall composition	LL-DAP
Sporangium and motile spore	-
Melanoid pigment production in tryptone-yeast ext. broth (ISP 1)	-
Gelatin liquefaction	
glucose-peptone gelatin (28°C)	+
gelatin(28°C)	+
Skim milk (28°C & 37°C)	
coagulation	+
peptonization	+
Cellulose decomposition	-
NaCl tolerance	6%≥
Optimal temperature for growth	28°C~37°C
Optimal pH for growth	6.0~8.0
Streptomycin tolerance (µg/ml)	40≥
Horse blood hemolysis	-

**TAXON program을 이용한 분리균주 NA-52의 종 (species) 동정**

종 수준의 동정을 위하여 실시한 분리균주 NA-52의 단위특성은 Table 6과 같다. *Streptomyces* 주군집을 대상으로 TAXON program을 사용하여 수리동정한 결과, Table 7과 같이 주군집 19, 즉, *Streptomyces diastaticus* group에 대한 Willcox probability가 0.507500으로 주군집 18(*Streptomyces cyaneus*)의 Willcox probability(0.471359) 보다 높았으므로 주군집 19에 속할 확률이 높았다. 분리균주 NA-52와 cluster 19 구성균주와의 분류단위 특성은 단순비교계수(simple matching coefficient;  $S_{SM}$ )로 비교한 결과, Table 8과 같았다. 단순비교계수( $S_{SM}$ ) 분석으로는 중심균주인 *S. phaeoviridis* ISP 5285와는 50% S-level을 나타내었으나 cluster 19의 20개 구성균주의 대표균주인 *Streptomyces diastaticus* ISP 5496과는 70%의 S-level을 나타내어 분리균주 NA-52는 단순비교계수( $S_{SM}$ )

**Table 6. Unit characters of strain NA-52**

1. Morphology and pigmentation	
Spore chain morphology: rectiflexibilis (RFS); -, spirales (SPI); +	
Color of spore mass : red (RED); -, grey (GRY); +	
Mycelial pigment : red/orange	
Diffusible pigment : production (PIG); +, yellow/brown (YBP); +	
Melanin production on: PYI medium (MPI); +, tyrosine medium (MTY); +	
2. Antimicrobial activity	
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB); -	<i>Micrococcus luteus</i> (LUT); +
<i>Candida albicans</i> (ALB); -	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CER); -
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR); -	<i>Aspergillus niger</i> (NIG); -
3. Biochemical tests	
Lecithinase (LEC); -	Lipolysis (LIP); +
Pectin hydrolysis (PEC); -	Nitrate reduction (NO <sub>3</sub> ); -
H <sub>2</sub> S production (H <sub>2</sub> S); +	Hippurate hydrolysis (HIP); -
4. Degradative tests	
Elastin(ELA); +	Xanthine(XAN); +
Arbutin(ARB); +	
5. Antibiotic resistance	
Neomycin (NEO); +	Rifampicin (RIF); +
Oleandomycin (OLE); +	Penicillin (PEN); +
6. Growth tests	
45°C (45C); -	NaCl(7NA); +
Sodium azide (01Z); +	Phenol (PHN); +
Potassium tellurite (01T); +	Thallus acetate (T01); +
7. Compounds as sole source of nitrogen	
DL-α-amino-n-butyric acid (BUT); +	L-Cysteine (CYS); +
L-Valine (VAL); +	L-Phenylalanine (PHE); -
L-Histidine (HIS); +	L-Hydroxyproline (HYD); +
8. Organic compounds as sole source of carbon	
Sucrose (SUC); -	meso-Inositol (INO); -
Mannitol (MAN); -	L-Rhamnose (RHA); +
Raffinose (RAF); +	D-Melezitose (MEZ); -
Adonitol (ADO); +	Dextran (DEX); +
D-Melibiose (MEB); +	Xylitol (XYT); +

\*The three letters in parenthesis are the code names for computer analysis.

**Table 5. Comparisons of diagnostic characteristics between the genus *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineosporia*, *Sporichthya* and strain NA-52**

Characteristics	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptoverticillium</i>	<i>Kineosporia</i>	<i>Sporichthya</i>	Strain NA-52
Colony size	Discrete	Discrete	Small	Microscopic	Discrete
Substrate mycelium	+	+	+	-	+
Spores	+	-	-	-	+
Sporangia	-	-	+	-	-
Motile spores	-	-	+	-	-
Aerial mycelium	+	+	-	+	+
Chains of arthrospores	+	+	-	+	+
Arthrospores in verticils	-	+	-	-	-
Spore surface smooth	+	+	-	+	+
Spore surface hairy, spiny, or warty	+	-	-	-	-
Motile spores	-	-	-	+	-
Wall chemotype*	I	I	I	I	I

\*Wall chemotype: I, LL-DAP and glycine.

**Table 7. Identification of strain NA-52 to the major cluster of *Streptomyces* by TAXON program**

TAXON Major cluster (Centrotype member)	TAXON 95% distance	TAXON radius	% probability of strain further away	Willcox probability
19 ( <i>Streptomyces diastaticus</i> )	0.5712	0.4508	0.0001	0.507500
18 ( <i>Streptomyces cyaneus</i> )	0.5590	0.4497	0.0004	0.471359
1B ( <i>Streptomyces anulatus</i> )	0.5669	0.4404	0.0000	0.016257
12 ( <i>Streptomyces rochei</i> )	0.5664	0.4173	0.0000	0.003056
5 ( <i>Streptomyces exofoliatum</i> )	0.5784	0.4455	0.0000	0.000799
40 ( <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> )	0.5482	0.3805	0.0000	0.000796
1C ( <i>Streptomyces halstedii</i> )	0.5592	0.3883	0.0000	0.000182
10 ( <i>Streptomyces fulvissimus</i> )	0.5630	0.4036	0.0000	0.000049
21 ( <i>Streptomyces griseoruber</i> )	0.5586	0.3709	0.0000	0.000002
6 ( <i>Streptomyces violaceus</i> )	0.5885	0.4126	0.0000	0.000001
15 ( <i>Streptomyces chromofuscus</i> )	0.5921	0.4271	0.0000	0.000001
17 ( <i>Streptomyces griseoviridis</i> )	0.5953	0.3943	0.0000	0.000000
20 ( <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> )	0.6028	0.3720	0.0000	0.000000

**Table 8. Simple matching coefficient ( $S_{SM}$ ) of strain NA-52 to member organisms in *Streptomyces* cluster 19**

ISP No.	Strain	ATCC No.	$S_{SM}$ (%)
5496	<i>Streptomyces diastaticus</i>	3315	70
F1	<i>Streptomyces sp.</i>		66
5355	<i>Streptomyces lincolensis</i>	25466	58
5262	<i>Streptomyces bottropensis</i>	25435	56
5560	<i>Streptomyces tauricus</i>	27470	56
5256	<i>Streptomyces coralus</i>	23901	54
5489	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	14812	52
5031	<i>Streptomyces minoensis</i>	19787	52
M315	<i>Microellohosporia flava</i>	15332	52
5028	<i>Streptomyces achromogenes</i>	12767	52
5429	<i>Streptomyces glomeraurantiacus</i>	19839	52
M301	<i>Microellohosporia cinerea</i>	15840	50
5285	<i>Streptomyces phaeoviridis</i>	23947	50
5490	<i>Streptomyces nigellus</i>	27450	50
5263	<i>Streptomyces humidus</i>	12760	48
5309	<i>Streptomyces vastus</i>	25506	48
5449	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	12309	48
5481	<i>Streptomyces galilaeus</i>	14969	46
5553	<i>Streptomyces mirabilis</i>	27447	46
5451	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	3336	40

분석결과로 볼 때 *Streptomyces diastaticus*와 가장 유사한 것으로 나타났다. 분리균주 NA-52의 단위형질 특성을 cluster 19의 hypothetical median organism(HMO), centrotype인 *S. phaeoviridis*, 분리균주 NA-52와 가장 근접한 균주인 *S. diastaticus*와 최외각 균주(outer-most member strain; OMS)인 *S. coralus*의 TAXON unit character와 Willcox probability 등을 비교한 결과 Table 9와 같았다. 분리균주 NA-52의 주군집 19에서의 TAXON distance(0.5712)가 95% TAXON radius(0.4508)보다 크고, 또한 주군집 19에 속하는 구성균주들중 분리균주 NA-52보다 cluster centroid에 더 가까이 있다고 하는 확률(% of probability strain further away)이 낮은 것으로 보아 분리균주 NA-52는 주군집 19에 속하기는 하나 주군집 19의 최외각 균주(OMS)인 *S. coralus* ISP 5256 보다 TAXON distance가 크므로 분리균주 NA-52는 cluster 19의 외각에 존재하는 것으로 사료되었다. 주군집을 동정하는데 필요한 50개의 단위형질중 Table 10에서 보는 바와 같이, 형태학적, 항균력, 질소원의 이용성 및 효소활성 등의 35개 단위형질이 분리균주 NA-52와 가장 근접한 균주인 *S. diastaticus*와 동일한 결

**Table 9. Comparisons of taxonomic scores between hypothetical median organism (HMO), centrotype, outer-most member strain (OMM), best matched organism (BMO) and strain NA-52 in cluster 19**

Member strain in cluster 19	TAXON distance	95% TAXON radius	% probability of strain further away	Willcox probability
HMO Centrotype	0.2568	0.4508	99.9072	0.997032
( <i>Streptomyces phaeoviridis</i> )	0.3296	0.4508	92.9354	0.997509
OMM				
( <i>Streptomyces coralus</i> )	0.4435	0.4508	7.2571	0.447286
BMO				
( <i>Streptomyces diastaticus</i> )	0.4131	0.4508	24.9473	0.778569
Isolate (strain NA-52)	0.5712	0.4508	0.0001	0.507500

**Table 10. Comparison of taxonomic unit characters among member organisms in cluster 19 of *Streptomyces* and willcox probability calculated by TAXON program**

Taxonomic unit characters (TAXON code)	Positive character state (%)	HMO in cluster 19	Centrotype in cluster 19	Best matched strain	Isolate	Outer-most member
RFS	40	-	+	-	-	+
SPI	60	+	-	+	+	-
RED	15	-	-	-	-	-
GRY	50	+	-	+	+	-
ROS	15	-	-	+	+	-
PIG	10	-	-	+	+	-
YBP	5	-	-	+	+	-
MPI	50	+	+	-	+	+
MTY	50	+	+	-	+	+
SUB	20	-	-	-	-	+
LUT	20	-	-	-	+	+
ALB	1	-	-	-	-	-
CER	1	-	-	-	-	-
MUR	5	-	-	-	-	+
NIG	10	-	-	-	-	-
LEC	1	-	-	-	-	-
LIP	25	-	+	-	+	-
PEC	70	+	+	-	-	+
NO3	45	-	-	-	-	+
H2S	80	+	+	+	+	+
HIP	25	-	-	-	-	-
ELA	35	-	-	+	+	+
XAN	50	+	+	+	+	+
ARB	55	+	-	+	+	+
NEO	1	-	-	-	+	-
RIF	70	+	+	-	+	+
OLE	25	-	-	-	+	+
PEN	50	+	+	+	+	-
45C	15	-	-	-	-	+
7NA	30	-	-	-	+	-
01Z	5	-	-	-	+	-
PHN	95	+	+	+	+	+
01T	75	+	+	+	+	+
T01	5	-	-	-	+	-
BUT	30	-	-	+	+	+
CYS	75	+	+	+	+	+
VAL	70	+	+	+	+	+
PHE	20	-	-	-	-	-
HIS	70	+	-	+	+	+
HYD	20	-	-	+	+	+
SUC	75	+	+	-	-	+
INO	80	+	+	+	-	+
MAN	85	+	+	+	-	+
RHA	95	+	+	+	+	+
RAF	85	+	+	+	+	+
MEZ	25	-	+	-	-	+
ADO	15	-	-	-	+	-
DEX	15	-	-	-	+	-
MEB	95	+	+	+	+	+
XYT	15	-	-	-	+	+
Matched		30	25	35	50	27
Mismatched		20	25	15	0	23
S <sub>SM</sub> Value (%)		60	50	70	100	54
Strain		Hypothetical median organism	<i>Streptomyces phaeoviridis</i>	<i>Streptomyces diastaticus</i>	NA-52	<i>Streptomyces coralus</i>
Willcox probability		0.997032	0.997509	0.778569	0.507500	0.447286

\* % value : Percent positive value indicates the occurring percentage in cluster 19.

과를 나타내었으나 항생물질에 대한 내성, inositol과 mannitol 등의 당이용성 등의 15개 단위형질에서는 차이를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 분리균주 NA-52는 actinomycetes에 속하는 475 type strains 중에서 major group에 속하고 TAXON program을 이용하여 cluster 19에 속하는 것으로 판명되었으며, cluster 19에 속하는 20균주의 최외각 균주보다도 더 먼 외각에 존재하므로 분리균주 NA-52는 새로운 종(species)으로 동정되었다. 따라서 *Streptomyces* sp. NA-52는 새로운 항진균성 항생물질을 생산할 가능성이 높은 것으로 추정되었다.

## 요 약

전국 각지의 토양에서 313균주의 방선균을 분리한 결과, 우리나라의 벼 병해 중에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 병원성 곰팡이인 벼도열병균, *Pyricularia oryzae*에 대해 선택적인 항진균 활성을 나타내는 방선균 NA-52를 선발하여 그 균주의 동정을 실시하였다. TAXON program을 이용하여 분리균주 NA-52의 형태학적 특성, 배양상의 특성, 항진균성 및 생리학적 특성 등을 검토한 결과, cluster 19(*Streptomyces diastaticus*)에 속하는 *Streptomyces diastaticus*와 거의 일치하나 항생물질에 대한 내성과 당 이용성에서 mannitol과 sucrose를 이용하지 못하는 것으로 보아 분리균주 NA-52는 cluster 19(*Streptomyces diastaticus*)에 속하는 또 다른 특성을 지닌 새로운 균주로서 동정되었다.

## 감사의 글

본 연구에서 TAXON program 사용과 data 분석에 큰 도움을 준 서울대학교 미생물학과 발효미생물연구실에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Ainsworth, G. C. and G. R. Bisby. 1971. Dictionary of the fungi. 6th ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
2. 韓國植物保護學會 編. 1972. 韓國植物病·害蟲·雜草名鑑.
3. Omura, S. 1992. The search for bioactive compounds from microorganisms. Pp. 213-262. Springer-Verlag, Tokyo.
4. Blumanerova, M., V. Kristufek, J. Jizba, P. Sedmera, and V. Landa. 1989. Research of streptomycetes producing pesticides and plant growth regulators, Pp. 237-252. In M. E. Bushell, U. Grafe(ed.), *Bioactive metabolites from microorganisms, progress in industrial microbiology*. Vol. 21, Elsevier, Amsterdam.
5. Lee S. Y., W. G. Sang, J. R. Hwang, H. W. Yoon, Y. C.

- Shin and M. J. Cho. 1992. Antifungal activity of *Serratia marcescens* culture extracts against phytopathogenic fungi (possibility for the chitinases role). *J. Microbiol. and Biotechnol.* **2**: 209-214.
6. 김창진, 이인경, 윤봉식, 유익동. 1993. *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 균주가 생산하는 concanamycin B의 항고추역병 활성. *한국산업미생물학회지* **21**: 322-328.
7. 임대석, 윤상균, 이명섭, 윤원호, 김창한. 1996. 항진균성 항생물질을 생산하는 *Streptoverticillium* sp. NA-4803의 분리 및 동정. *한국산업미생물학회지* **24**: 664-670.
8. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
9. Williams, S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vickers, G. Alderson, P. H. A. Sneath, M. Sackin, and A. M. Mortimer. 1983. A probability matrix for the identification of some streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
10. Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, and M. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
11. Wellington, E. M. H. and S. T. Williams. 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters.* **6**: 151-157.
12. Okami Y. and M. Suzuki. 1958. A simple method for microscopical observation of streptomycetes and critique of *Streptomyces* grouping with reference to aerial structure. *J. Antibiot.* **11**: 250-253.
13. Yamada, K. and K. kamagata. 1970. Taxonomic studies on coryneform bacteria. II. Principle amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
14. Kim, I. S., H. T. Kim, A. C. Ward, M. Goodfellow, Y. C. Hah, and K. J. Lee. 1992. Numerical identification of a *Streptomyces* strain producing thiol protease inhibitor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 220-225.
15. Rho, Y. T., H. T. Kim, K. H. Oh, H. I. Kang, A. C. Ward, M. Goodfellow, Y. C. Hah, and K. J. Lee. 1992. Numerical identification of a *Streptomyces* strain producing spores in submerged culture. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 278-286.
16. Staneck, J. L. and G. D. Robert. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatograph. *Appl. microbiol.* **28**: 226-231.
17. Nitsch, B. and Kutzner, H. J. 1969. Egg-yolk agar as a diagnostic medium for *Streptomyces*. *Experimentia.* **25**: 113-118.
18. Lechevalier, H. A. and M. P. Lechevalier. 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes, Pp. 227-291. In A. Dietz and D. W. Thayer.(ed.), *Actinomycete taxonomy, special publication 6*. Society for Industrial microbiology, Arlington.
19. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descrip-



- tions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 69-189.
20. Dietz, A. and Mathews, J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl. Microbiol.* **2**: 527-533.
21. Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E. and Lechevalier, H. A. 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**: 421-423.
22. Goodfellow, M. 1989. Supregentic classification of actinomycetes. Pp. 2333-2339. In Williams, S. T., Elisabeth Sharpe, M. and Holt, J. G.(ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams and Wilkins.
23. Goodfellow, M., Alderson, G. and Lacey, J. 1979. Numerical taxonomy of *Actinomadura* and related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **112**: 95-111.
24. Lechevalier, H. A., Okami, Y. and Arai, M. 1988. Antibiotics produced by actinomycetes. Pp. 1-349. In Laskin, A. I. and Lechevalier, H.A.(ed.) *Handbook of Microbiology*, 2nd ed., Vol. 9, Part A., CRC Press.
25. Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
26. Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. Pp. 2451-2508. In Williams, S. T., Elisabeth Sharpe, M. and Holt, J. G.(ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams and Wilkins.
27. Willcox, W. R., Lapage, S. P., Shoshana Bascomb and Curtis, M. A. 1972. Identification of bacteria by computer: theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 317-330.
28. Nonomura, H. and Ohara, Y. 1969. The distribution of actinomycetes in soil. IV. A selective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part I. *J. Ferment. Technol.* **47**: 463-469.

(Received 22 June 1997)