

## 제주 연안에서 분리된 해양방선균의 이화학적 특성 및 다양성

김 만 철 · 허 문 수\*

제주대학교 수산생명의학과

### Physico-chemical Characteristics and Diversity of Marine Actinomycetes Isolated from the Coast of Jeju Island

Man-Chul Kim and Moon-Soo Heo\*

Department of Aquatic Life Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

**Abstract** – To investigate the variations of physico-chemical factors in four stations (Hanlim, Aewol, Sinchon, Hamdeok) at Jeju coastal area, Water temperature, Salinity, dissolved oxygen (DO), pH, chemical oxygen demand (COD), suspended solid (SS), ammonia-nitrogen (NH<sub>4</sub>-N), nitrite-nitrogen (NO<sub>2</sub>-N), nitrate-nitrogen (NO<sub>3</sub>-N) were analysed. The ranges of water temperature were from 26.23 to 28.6°C, the salinity were from 31.4 to 32.88‰, the pH were from 8.15 to 8.35, the chemical oxygen were from 0.48 to 0.91 mg L<sup>-1</sup>. A total of 52 strains of marine actinomycetes was isolated from Jeju Island coastal area. They were characterized by determining morphological and physio-biochemical properties, the API kit and confirmed by molecular methods including partial sequencing of 16S rRNA. A neighbor-joining tree of partial 16S rRNA sequences divided the 52 isolates in 2 major groups, 22 strains of Gram positive bacteria/*Actinobacteria* (division)/*Actinomycetales* (order)/*Streptomycineae* (suborder)/*Streptomycetaceae* (family)/*Streptomyces* (93.1%) and 2 strains of *Streptosporangineae* (suborder)/*Nocardiopsaceae* (family)/*Nocardopsis* (6.9%).

**Key words** : physico-chemical, marine actinomycetes, Jeju, 16S rRNA

## 서 론

자연은 임상에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역 억제제 뿐만 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 성장촉진제, 살충제, 제초제, 구충제 등을 포함하여, 경이로울 정도로 무수한 생물학적 활성을 지니는 화합물들을 창조해내고 있으며, 현재까지는 식물체를 비롯한 천연자원 및 미생물로부터 생리활성물질을 탐색하기 위하여 많

은 연구가 이루어지고 있다(Okazaki 1987; Okami *et al.* 1988; Tsukamoto *et al.* 1998).

방선균은 오랜 역사를 갖고 있는 알콜이나 초산발효 등과 같은 식품관련 산업과는 달리 주로 현대의약품의 개발과 함께 그 응용성과 중요성이 인식되어 현재까지 중요하게 다루어지고 있는 유용한 산업 미생물 군이라 할 수 있다. 방선균은 토양 속에 다양하게 존재하는 미생물의 일종으로 그람양성 진정세균에 속하며, 항생물질로 대표되는 이차대사산물, 생리활성물질, 비타민 등의 저분자물질을 생산하는 등 산업적인 응용범위가 매우 넓다 (Jones 1985; Beppu *et al.* 1991). 이러한 생리활성물질을

\* Corresponding author: Moon-Soo Heo, Tel. 064-754-3473, Fax. 064-756-3493, E-mail. msheo@jejunu.ac.kr

생산하는 미생물 중 여전히 75% 이상은 방선균에 의한 것이며 (Miyadoh 1993), 이러한 이유로 방선균은 항생물질로 대표되는 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 신물질의 탐색 및 생합성 기작에 대해 깊이 연구되어 왔다. 실제적으로 최근 20년간 보고된 생리활성물질이 항암제인 경우에는 방선균 유래가 82% 이상으로 절대 다수를 차지하고 있다고 보고되었다 (Berdy 1989; Iwai and Takahashi 1992; Lee *et al.* 1997; Kim *et al.* 1998). 그러나 신규 생리활성물질 탐색과정에서 이미 밝혀진 물질이 재차 분리되는 악순환이 계속되면서, 그 경제성과 효용성이 현격하게 떨어지고 있기 때문에 신규 생리활성물질 탐색의 효용성을 높이는 다양한 노력이 이루어지고 있다.

지금까지 미생물 자원을 이용한 연구 및 산업적 응용은 거의 모두 육상 자원 유래의 미생물들을 이용해 왔다. 방선균 및 방선균 유래 항생물질 대부분이 육상에서 토양에서 분리된 균주를 가지고 연구가 되어져 왔으며, 현재까지 사용되고 있는 거의 모든 항생물질들이 육상자원을 이용하여 생산되어져 왔다. 그렇지만 해양미생물 및 방선균에 관하여서는 아직까지 거의 연구되지 않은 분야이다. 미생물의 서식지로서 해양의 환경조건은 육상과 현저한 차이가 있기 때문에 해양에 있어서 방선균의 microflora는 육상과는 상당히 다를 것으로 생각되어지며, 또한 연안 해역에 존재하는 방선균 중에는 육상에서 유입된 담수 등으로 인하여 육상의 토양으로부터 유래된 방선균도 많은 것으로 알려지고 있다. 이들 중에는 해양이라고 하는 특이한 환경에 적응한 결과 대사계가 변화되어 새로운 2차 대사산물을 생산하는 균주도 있을 것으로 기대되며 해양은 새로운 생리활성물질 생산균주의 탐색원으로써 지극히 흥미로운 분야라고 말할 수 있다.

또한 제주도 같은 해양환경과 육상 환경 조건에 따라 독특한 생태적 특성을 보이는 곳에서 서식하는 생물자원 및 해수로부터 분리되어진 방선균을 포함한 미생물에 대한 연구는 현재까지 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 제주도의 천연적 환경조건을 갖추고 있는 제주도 연안 해역에서 분리된 해양 방선균의 다양성을 연구하였으며, 차후 제주도 해양미생물 연구 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 해양유래 방선균주 분리 및 보관

균주의 샘플링을 위해서 제주시 4지역(한림, 애월, 신촌, 함덕) (Fig. 1)의 해수욕장을 중심으로 해수, 생물시료,

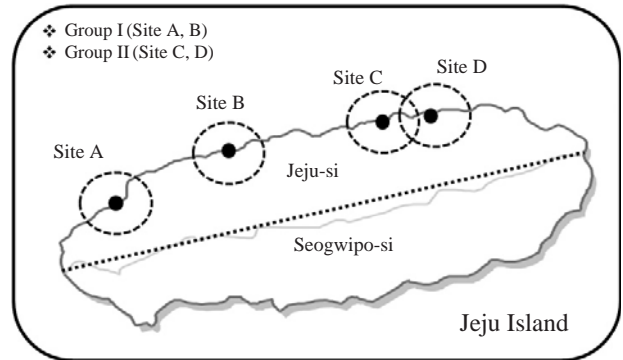


Fig. 1. The map for sea water sampling site in Jeju Island, Korea. Site A, Han-lim; Site B, Ae-wol; Site C, Sin-chon; Site D, Ham-deok.

해조류를 각각 채취하여 방선균 분리용 시료로 사용하였다. 해수 시료인 경우 샘플링 지역에서 다양하게 채취되었다. 해양 방선균 분리용 배지로 Marine agar (MA, Difco)와 ISP 2 (Difco. Co. USA)를 사용하였으며, 균주의 보존을 위해서 성장이 확인된 배지의 액체 배지를 이용하여 보관하였다.

방선균의 분리를 위해서 멸균 생리식염수에 해수는  $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 배로 희석하여 0.1 mL를 배지에 도달한 후 배양되었으며, 생물시료나 해조류 같은 경우에는 homogenizer를 사용하여 잘게 분쇄하여 멸균 해수에 희석한 후, MA 및 ISP 2 배지에 도달하여  $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 에서 7~15일간 배양하여 배지상에서 나타나는 방선균의 군사체의 형태학적 모습을 관찰하여 방선균을 분리하였다.

### 2. 환경요인 분석

수온 및 염분, pH는 YSI 600QS를 이용하여 현장에서 측정하였으며, 용존산소 (DO)는 현장에서 DO meter를 사용하여 측정하는 방법과 산소병에 고정하여 실험실로 옮긴 후 Winkler-Azide 방법을 병행하여 측정하였다 (APHA 1993). 화학적 산소요구량 (COD)은 Carberg (Carberg 1972)방법에 따라 분석하였다. 그리고 총질소 (T-N)는 암모니아성 질소 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), 질산성 질소 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), 아질산성 질소 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ )의 합으로 나타냈고, 측정방법은 Strickland와 Parson (Strickland and Parsons 1972) 및 해양환경 공정시험방법 (해양수산부 2002)에 따라 분석하였다. 또한 인산염 인 ( $\text{PO}_4\text{-P}$ )과 부유물질 (SS) 측정도 위 방법에 의해 분석하였다.

### 3. 종속영양세균 분석

조간대 주변 해수에 분포되어 있는 종속영양세균을 조사하기 위해 각 조사 지역에서 만조시 해수를 채수하여

도말 평판법 (spread plate method)으로 간접적으로 계수하였다. 채수한 해수를 무균적으로 4°C를 유지하여 실험실로 옮긴 후 10단계 희석법을 이용하여 0.85% 멸균생리식염수에 희석한 후 MA에 도말하여 25°C에서 2일간 배양한 후 자란 colony를 계수하였다. 배지상에 출현한 집락수 (Colony Forming Unit: CFU)를 평판계수법에 따라 계수하였다.

#### 4. 16S rRNA 염기서열 분석

분리된 미생물의 16S rRNA 분석은 각각 1.5% NaCl이 첨가된 MB (Difco, USA) 배지 5 mL에 접종하여 Shaking incubator를 이용하여 25°C에서 200 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5 mL microcentrifuge tube로 옮겨서 16,000 × g에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하여 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, Unicam UV/VIS Spectrophotometer (Helios β. Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다. PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 μM에 universal primer pairs (27F forward primer; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R reverse primer; 5'-GGTACCTGTTCAGACTT-3'), 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μL로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 증폭하였다. 증폭 과정은 94°C pre-denaturation 2분, 94°C denaturation 45초, 55°C annealing 45초, 72°C extension 1분의 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72°C에서 5분간 extension을 실시하였으며 증폭된 PCR product는 1% agarose (Agarose LE, Promega Co.) gel을 0.5 μg mL<sup>-1</sup> ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR product는 (주)솔젠트사 (Dajeon, Korea)에 의뢰하여 ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열 분석을 수행하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 분석 프로그램인 BLASTN programs 이용하여 분리되어진 미생물을 가장 근연속이나 종으로 나타나는 것을 확인하였다.

#### 5. 16S rRNA 계통 분석

염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하여 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 또한 미국 미시간주립대의 Ribosomal Database Project II (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>)내에 저장되어 있는 bacteria 16S rRNA 서열과 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit/>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software (Thompson *et al.* 1997)을 이용하여 Neighbor-joining (Saitou and Nei 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1,000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열 간 유전적 거리는 Jukes and Cantor (1969) 모델을 이용하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 분리균주의 특성

제주시 해수욕장을 중심으로 시료 (해수, 해양동물 및 해조류)를 채취하여 배양배지상에서의 방선균의 배양특성을 보이는 균주 총 52균주를 분리하였으며, 제주시 동부지역 (A, B)에서는 24균주, 서부지역 (C, D)은 28균주가 분리되었다 (Fig. 1). 분리된 방선균들은 액체배지 (Marine Broth, Difco, USA) 상에서 다양한 색소를 생산하는 특성을 보였으며, 분리되어진 대부분의 균주들 성장 온도 범위는 4~40°C까지 범위에서 성장이 가능하였으며, 10~35°C 범위에서 좋은 성장을 보였다. 염분 농도 실험에서는 다양한 염분 농도에서도 성장이 가능한 광염성 미생물과 초기 생육 배지내에 염분 (>1%)이 있어야만 성장이 가능한 호염성 미생물이 존재하였다. 이러한 염분농도에 대한 성장실험결과 (Not shown data)는 방선균이 육상에서 해양으로 유입이 되어서 적응을 하면서 생존을 한 종들과 그러한 종들이 오랜 시간 진화를 거듭하면서 해양미생물로서의 양상을 보여주는 중요한 자료가 된다. 이 결과로 해양에서 분리된 방선균은 다양한 온도와 높은 염 농도에서도 성장이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

### 2. 환경요인 분석

시료를 채집한 지역 (Site A~Site D) 해수의 이화학적

**Table 1.** Analysis of environmental factor and bacterial count in intertidal zone, Jeju Island

Factor	Temp. (°C)	Salinity (‰)	pH	DO (mg mL <sup>-1</sup> )	COD (mg mL <sup>-1</sup> )	SS (mg mL <sup>-1</sup> )	TIN (mg mL <sup>-1</sup> )	T-P (mg mL <sup>-1</sup> )	Bacterial count (CFU mL <sup>-1</sup> )
Site A	26.23	32.88	8.34	6.78	0.48	1.03	0.743	0.018	2.0 × 10 <sup>5</sup>
Site B	28.60	32.40	8.35	6.87	0.91	3.20	0.954	0.065	5.0 × 10 <sup>5</sup>
Site C	27.60	31.40	8.25	6.83	0.87	3.90	0.954	0.065	4.0 × 10 <sup>5</sup>
Site D	28.60	32.40	8.15	6.83	0.88	3.50	0.932	0.074	3.6 × 10 <sup>5</sup>

특성 결과를 Table 1에 나타내었다. 해양유래 방선균주를 분리하기 위해 생물 시료를 채집한 지역의 수온, pH 그리고 염분을 조사해 본 결과 수온은 25.8~28.6°C로 각 지역별로 큰 차이는 없었다. pH는 8.15~8.56 범위로 측정이 되었는데 전반적으로 약 알칼리성을 나타내었다. 염분농도는 일반적으로 담수의 유입정도와 강우량, 증발량 등의 영향을 받는다. 평균적인 해수의 염분농도는 32.5~34.3‰ 정도인데 조사지역은 31.40~32.88‰ 사이로 큰 변화를 나타내지는 않았다.

해양생물서식에 있어서 없어서는 안되는 용존산소(DO)는 그 농도가 5 mg L<sup>-1</sup> 이상은 되어야만 어류의 호흡에 지장이 없는 것으로 밝혀져 있다. 특히 유기물 유입이나 급격한 부영양화로 인하여 식물플랑크톤의 대량 증식에 따른 사후 생물체의 분해과정 중 수중의 용존산소를 급격히 소모할 때는 해역의 빈 산소 수피나 혐기성 상태가 야기되어 해역의 부패를 초래한다(서귀포시 1998). 용존산소(DO) 농도를 조사지역 별로 살펴보면 최저 농도는 Site A에서 6.78 mg mL<sup>-1</sup>를 나타냈으며 최고는 Site B에서 6.87 mg mL<sup>-1</sup>를 나타냈다. 화학적 산소 요구량(COD)은 BOD와 더불어 주로 유기물질의 농도를 간접적으로 나타내는 지표이다. 일반적으로 KMnO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>와 같은 산화제를 이용하여 수중의 피 산화물을 이용하여 산소량을 나타내는 것으로 해수 같이 무기물질을 함유하고 있을 경우 BOD 측정이 불가능할 경우 COD를 측정한다. 화학적 산소요구량은 Site A에서 0.48 mg mL<sup>-1</sup>로 가장 낮은 농도를 나타냈으며, Site B에서 가장 높은 0.91 mg mL<sup>-1</sup>의 농도를 나타냈다.

수중의 용존 물질이나 현탁입자(세균이나 플랑크톤을 포함하는 미립자로 이루어진 유기물질)들을 부유물질(SS)이라 하는데 이들은 어패류의 호흡을 방해하고, 물의 투명도를 저하시켜 광합성을 방해함으로써 수중의 광합성생물의 기초 생산력을 저하시키는 원인으로 작용한다. 조사지역의 SS는 최저 0.89 mg mL<sup>-1</sup>에서 최고 3.90 mg mL<sup>-1</sup> 농도를 나타내고 있다. 해역 수질 환경기준 I등급 즉 수산생물 서식, 양식 및 산란에 적합한 수질 기준으로 부유물질은 10 mg mL<sup>-1</sup>로 규정되어 있는데, 본 연구에서 조사된 4개 조사지역 표층의 SS 평균값이 I등급

기준으로 조사되었다.

해수에서 총 질소는 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)의 합으로 나타내는데, 주로 암모니아성 질소와 질산성 질소가 대부분을 차지한다. 조사결과 총 질소값은 0.629~0.954 mg mL<sup>-1</sup> 농도로 나타났다.

해수의 인산염 인 농도는 해양에 존재하는 생물체의 생산력을 제한하는 인자로 작용하는데 저농도의 경우 플랑크톤 수의 증가를 억제함으로써 바다의 생산력을 제한하는 것으로 알려져 있다. 조사지역의 인산염 인 농도는 0.018~0.074 mg mL<sup>-1</sup>로 나타났다.

### 3. 종속영양세균

수환경내의 종속영양세균은 해당 수역내의 유기물 양과 아주 밀접한 상관관계를 가지고 있다. 과량의 유기물이 유입되면 일시적으로 종속영양세균의 밀도가 급증하게 되어 순간적인 조류의 번식과 더불어 용존산소의 양이 줄어들어 심각한 혐기적 상태를 일으킬 수가 있다(Brock 1997). 이렇듯 환경적인 면이나 생물학적인 면에서 미치는 영향이 크므로 이들의 밀도를 조사, 분석하면 수질환경을 판정할 때 지표로 쓰일 뿐만 아니라 수환경의 변화를 예측, 판단하는 자료로 활용할 수가 있다.

종속영양세균의 개체수에 의한 수서환경의 영양화 정도를 비교함에 있어서 개체수가 10<sup>2</sup> CFU mL<sup>-1</sup> 이하이면 빈영양역, 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>이면 부영양역, 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>이면 과영양역 그리고 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> 이상이면 폐수역으로 구분한 하 등(1978)의 기준에 따르면 본 연구에서 조사한 4 지역은 2.0 × 10<sup>5</sup>~5.0 × 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>로 나타나 과영양역에 속하는 것으로 나타났다.

### 4. 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통분석

제주시 연안에서 분리된 방선균 52균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 계통 분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인하여 본 결과 제주도 제주도 동부지역(Group I, Site A, B) 해양에서 분리된 방선균 24균주는 Gram positive bacteria (division)/Actinobacteria (class)/

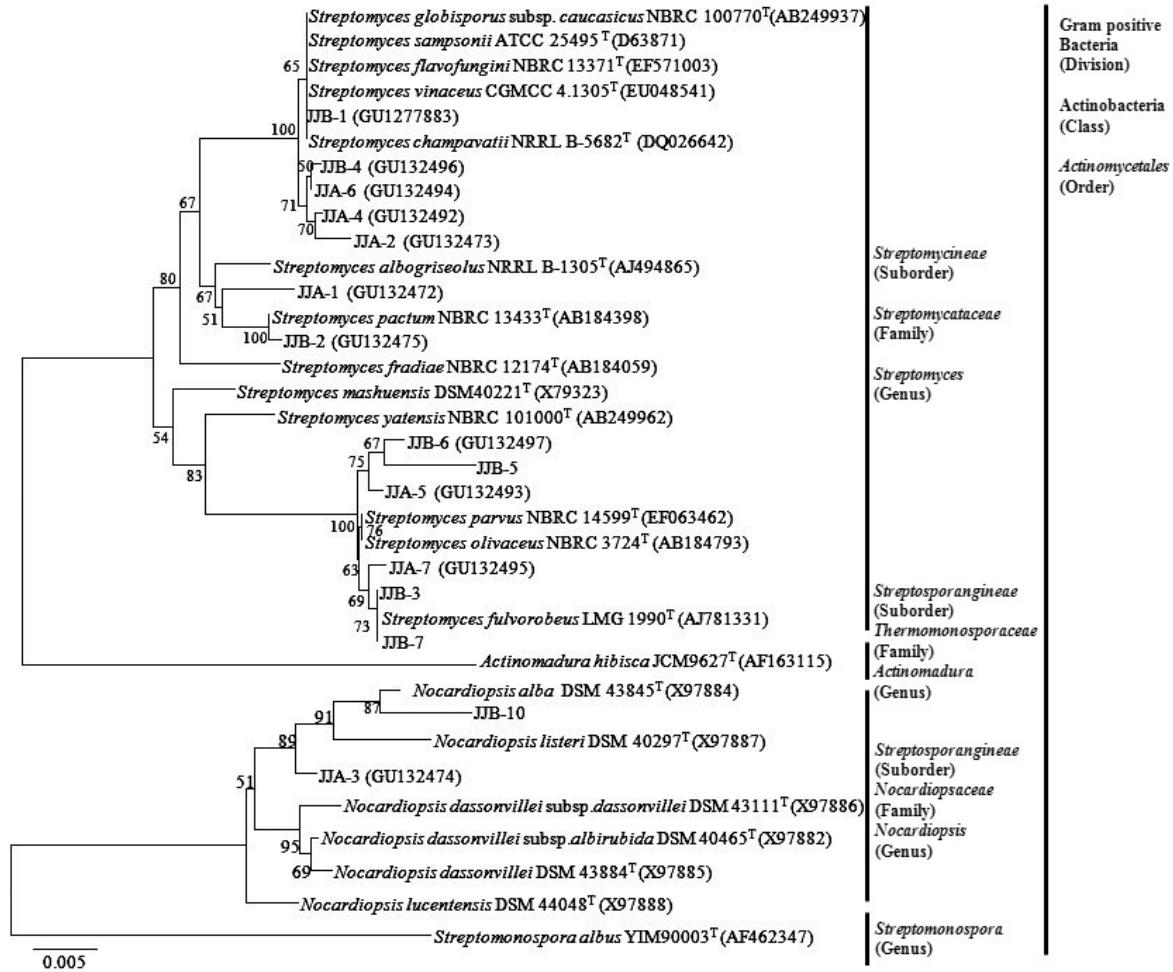


Fig. 2. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group I (site A, B). The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

Table 2. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence (Group I)

Isolation site	Strain No.	The closest species	Similarity (%)	Strain No.	The closest species	Similarity (%)
A	JJA-1	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	98.24	JJA-8	<i>Streptomyces globisporus</i>	99.37
	JJA-2	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.39	JJA-9	<i>Streptomyces sampsonii</i>	98.76
	JJA-3	<i>Nocardiopsis listeri</i>	98.78	JJA-10	<i>Streptomyces flavofungini</i>	99.12
	JJA-4	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.85	JJA-11	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.23
	JJA-5	<i>Streptomyces parvus</i>	99.54	JJA-12	<i>Streptomyces vinaceus</i>	98.45
	JJA-6	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.85	JJA-13	<i>Streptomyces parvus</i>	99.34
	JJA-7	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	99.77	JJA-14	<i>Streptomyces globisporus</i>	99.48
B	JJB-1	<i>Streptomyces vinaceus</i>	99.37	JJB-6	<i>Streptomyces parvus</i>	99.24
	JJB-2	<i>Streptomyces pactum</i>	99.85	JJB-7	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	99.20
	JJB-3	<i>Streptomyces fluvorobeus</i>	98.88	JJB-8	<i>Streptomyces pactum</i>	99.78
	JJB-4	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.69	JJB-9	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	98.87
	JJB-5	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.55	JJB-10	<i>Nocardiopsis alba</i>	98.38

Actinomycetales (order)/Streptomycineae (suborder)/Streptomycataceae (family)/Streptomyces (genus)에 22 균주 (JJA-1, JJA-2, JJA-4, JJA-5, JJA-6, JJA-7, JJA-8, JJA-9,

JJA-10, JJA-11, JJA-12, JJA-13, JJA-14, JJB-1, JJB-2, JJB-3, JJB-4, JJB-5, JJB-6, JJB-7, JJB-8, JJB-9), Actinomycetales (order)/Streptosporangineae (suborder)/Nocardiopsaceae

(family)/*Nocardioopsis* (genus)에 2균주 (JJA-3, JJB-10)가 분리되었다 (Fig. 2). Table 2에 나타낸 similarity는 blast search 때 나타난 가장 근연속과 종에 대한 값이다. JJA-2, JJA-4, JJA-6, JJA-11, JJB-4은 type strain인 *Streptomyces champavatii* (DQ026642)와 각각의 16S rRNA 염기 서열을 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 similarity를 계산하였을 때 99.39, 99.85, 99.85, 99.23, 99.69%를 나타내었으며, JJA-7, JJB-3, JJB-7은 *Streptomyces fluvorobeus* (AJ781331)와 99.77, 98.88, 99.20%의 similarity를 보였다. JJA-1, JJB-9은 *Streptomyces albogriseolus* (AJ494865)와 98.24, 98.87%, JJA-5, JJA-13은 *Streptomyces parvus* (EF063462)와 99.54, 99.34%의 similarity값을 나타내었

다. 이외에도 *Streptomyces*속에서는 type strain *S. globisporus* (AB249937)와 JJA-8, JJA-14 균주가 99.37, 99.48%, *S. sampsonii* (D63871)와 JJA-9 균주가 98.76%, *S. flavofungini* (EF571003)와 JJA-10 균주가 99.12%, *S. vinaceus* (EU048541)와 JJA-12, JJB-1 균주가 98.45, 99.37%, *S. pactum* (AB184398)과 JJB-2, JJB-8 균주가 99.85, 99.78%, *S. olivaceus* (AB184793)와 JJB-5 균주가 98.55%의 similarity 값을 각각 나타내었다. *Nocardioopsis*속 균주 JJA-3 균주는 type strain *N. listeri* (X97887)와 98.78%, JJB-10 균주는 *N. alba* (X97884)와 98.38%의 similarity 값을 나타내었다. 이러한 계통학적 분석을 기초로하여 최종적으로 Site A, B (Group I)에서는 *Streptomyces*속 균주 10종

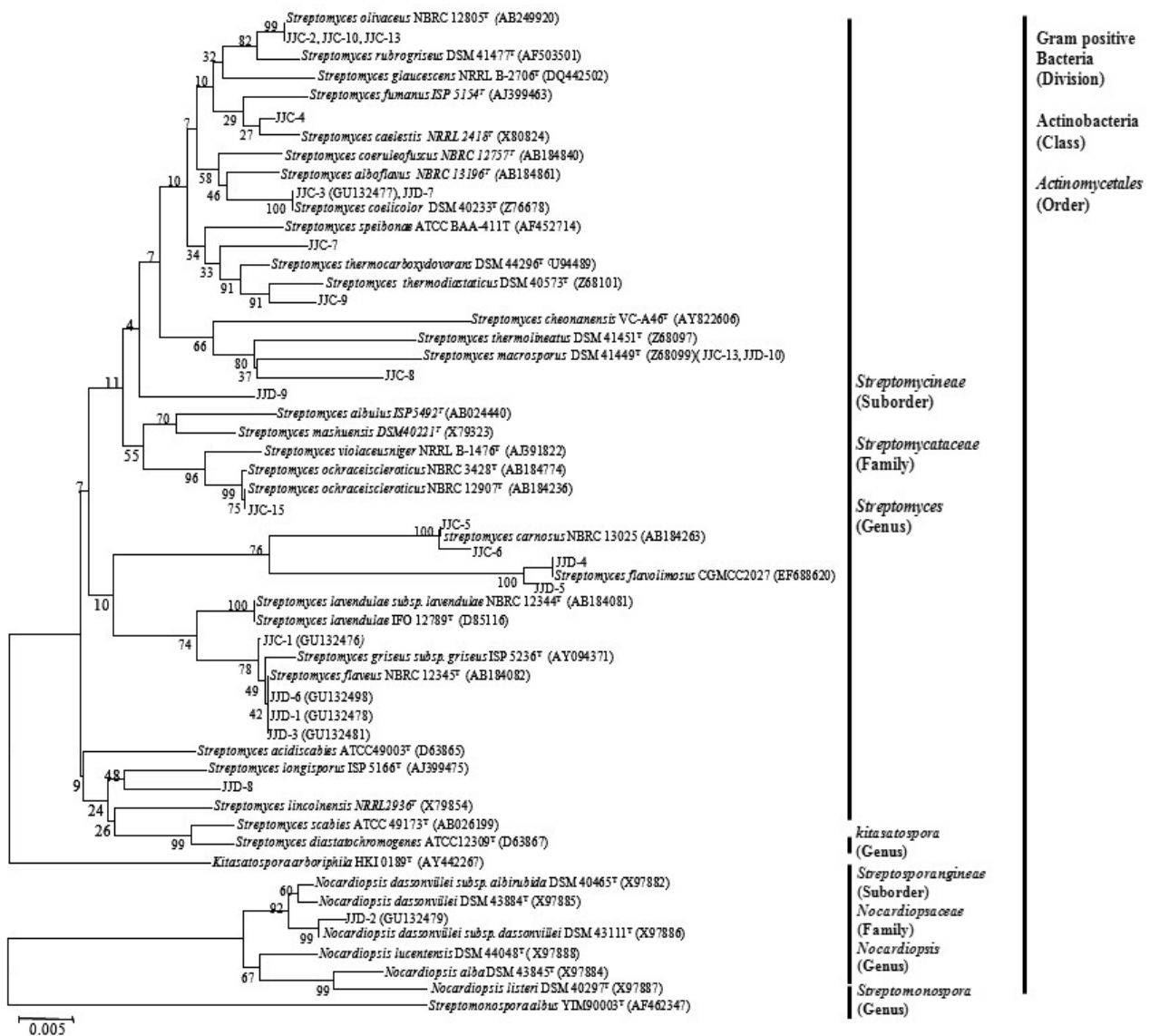


Fig. 3. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group II (site C, D). The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

**Table 3.** Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence (Group II)

Isolation site	Strain No.	The closest species	Similarity (%)	Strain No.	The closest species	Similarity (%)
C	JJC-1	<i>Streptomyces griseus</i>	99.56	JJC-9	<i>Streptomyces thermodiastaticus</i>	98.83
	JJC-2	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.76	JJC-10	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.92
	JJC-3	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	98.45	JJC-11	<i>Streptomyces longisporus</i>	98.34
	JJC-4	<i>Streptomyces caelestis</i>	97.28	JJC-12	<i>Streptomyces scabies</i>	99.21
	JJC-5	<i>Streptomyces carnosus</i>	96.09	JJC-13	<i>Streptomyces macrosporus</i>	97.34
	JJC-6	<i>Streptomyces carnosus</i>	96.24	JJC-14	<i>Streptomyces cheonanensis</i>	99.10
	JJC-7	<i>Streptomyces somaliensis</i>	97.94	JJC-15	<i>Streptomyces ochraceiscleroticus</i>	98.53
	JJC-8	<i>Streptomyces macrosporus</i>	97.05			
D	JJD-1	<i>Streptomyces flaveus</i>	100	JJD-8	<i>Streptomyces longisporus</i>	98.09
	JJD-2	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	99.35	JJD-9	<i>Streptomyces mashuensis</i>	97.87
	JJD-3	<i>Streptomyces griseus</i>	99.85	JJD-10	<i>Streptomyces macrosporus</i>	99.01
	JJD-4	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	96.26	JJD-11	<i>Streptomyces cellulosa</i>	98.72
	JJD-5	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	96.39	JJD-12	<i>Streptomyces scabies</i>	98.76
	JJD-6	<i>Streptomyces flaveus</i>	100	JJD-13	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.34
	JJD-7	<i>Streptomyces alboflavus</i>	98.31			

(species), *Nocardiopsis*속 균주 2종을 최종적으로 확인하였다.

제주시 서부지역 (Group II, Site C, D) 해양에서 분리된 방선균 28균주는 Gram positive bacteria (division)/Actinobacteria (class)/Actinomycetales (order)/Streptomycineae (suborder)/Streptomycataceae (family)/Streptomyces (genus)에 27균주 (JJC-1, JJC-2, JJC-3, JJC-4, JJC-5, JJC-6, JJC-7, JJC-8, JJC-9, JJC-10, JJC-11, JJC-12, JJC-13, JJC-14, JJC-15, JJD-1, JJD-3, JJD-4, JJD-5, JJD-6, JJD-7, JJD-8, JJD-9, JJD-10, JJD-11, JJD-12, JJD-13), Actinomycetales (order)/Streptosporangineae (suborder)/Nocardiopsaceae (family)/Nocardiopsis (genus)에 1균주 (JJD-2)가 분리되었다 (Fig. 3).

Table 3에 나타난 similarity는 blast search 때 나타난 가장 근연속과 종에 대한 값이다. JJC-2, JJC-10, JJD-13은 type strain인 *Streptomyces olivaceus* (AB249920)와 각각의 16S rRNA 염기서열의 similarity를 계산하였을 때 98.76, 98.92, 98.34%로 각각 나타났으며, JJC-1, JJD-3은 *Streptomyces griseus* (AY094371)와 99.56, 99.85%의 similarity를 보였다. *Streptomyces macrosporus* (Z68099)와 JJC-8, JJC-13, JJD-10은 97.05, 97.34, 99.01%의 similarity를 보였다. 또한 JJC-5, JJC-6은 *Streptomyces carnosus* (AB184263)와 96.09, 96.24%로 분석결과가 나타나 신종 후보종으로 분리되었으며, 이외에 *Streptomyces*속에서는 *Streptomyces coeruleofuscus* (AB184840) (JJC-3, 98.45%), *Streptomyces caelestis* (X80824) (JJC-4, 97.28%), *Streptomyces somaliensis* (AJ007403) (JJC-7, 97.94%), *Streptomyces thermodiastaticus* (Z68101) (JJC-9, 98.83%), *Streptomyces longisporus* (AJ399475) (JJC-11, 98.34%; JJD-8, 98.09%), *Streptomyces scabies* (AB026199) (JJC-12, 99.21%; JJD-12, 98.76%), *Streptomyces cheonanensis* (AY822606) (JJC-

14, 99.10%), *Streptomyces ochraceiscleroticus* (AB184236) (JJC-15, 98.53%)으로 나타났다. 그리고 균주 JJD-1, JJD-6은 *Streptomyces flaveus* (AB184082)와 100%의 similarity를 보여 동일한 균주임을 확인할 수 있었으며, JJD-2 균주는 *Nocardiopsis dassonvillei* (X97885)와 99.35%의 유사도를 보였다. 최종적으로 Site C, D (Group II)에서는 *Streptomyces*속 균주 17종 (species), *Nocardiopsis*속 균주 1종을 최종적으로 확인하였다.

## 적 요

제주도 연안해역 4개 지역 (한림, 애월, 신촌, 함덕) 해수의 온도, 염분농도, 용존산소량 (DO), 화학적 산소요구량 (COD), 부유물질 (SS), 암모니아성 질소 (NH<sub>3</sub>-N), 질산성 질소 (NO<sub>3</sub>-N) 및 아질산성 질소 (NO<sub>2</sub>-N)와 같이 다양한 이화학적 특성을 확인하였다. 해수의 평균 온도는 26.23~28.6°C, 염분농도는 31.4~32.88‰, pH는 8.15~8.35, COD는 0.48~0.91 mg L<sup>-1</sup>, DO는 6.78~6.87 mg L<sup>-1</sup>로 나타났다.

해수에서 분리된 해양방선균은 총 52종으로 제주도 동부지역 (A, B)에서는 24균주, 서부지역 (C, D)은 28균주가 분리되었다. 분리된 해양방선균은 16S rRNA 염기서열 분석을 이용하여 최종적으로 동정되었으며, 염기서열 정보를 기초로하여 유사도 (similarity)를 조사하였다.

분리된 방선균의 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 계통 분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인하여 본 결과 제주도 제주도 동부지역 (Site A, B) 해양에서 분리된 방선균 24균주는 Gram positive bacteria (division)/Actinobacteria (class)/Actinomycetales (order)/Streptomy-

*cineae* (suborder)/*Streptomycataceae* (family)/*Streptomyces* (genus)에 22 균주, *Actinomycetales* (order)/*Streptosporangineae* (suborder)/*Nocardiopsaceae* (family)/*Nocardiopsis* (genus)에 2 균주가 분리되었다.

제주시 서부지역 (Site C, D) 해양에서 분리된 방선균 28균주는 Gram positive bacteria (division)/*Actinobacteria* (class)/*Actinomycetales* (order)/*Streptomycineae* (suborder)/*Streptomycataceae* (family)/*Streptomyces* (genus)에 27균주, *Actinomycetales* (order)/*Streptosporangineae* (suborder)/*Nocardiopsaceae* (family)/*Nocardiopsis* (genus)에 1균주가 분리되었다.

### 참 고 문 헌

- 서귀포시. 1998. 중문하수종말처리장 방류수역에 대한 공동 어장의 생물상 조사(최종보고서). pp. 20-48.
- 하영철. 1978. 진해만 해양기초보고서. 서울대학교 미생물학과. pp. 25-57.
- 해양수산부. 2002. 해양환경공정시험방법. pp. 15-67.
- Beppu T and S Horinouchi. 1991. Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica* 57:S44-S47.
- Berdy J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification. pp.3-25(27). In Bioactive metabolites from microorganisms (Bushell ME and U Grafe eds.). *Progress in Industrial Microbiology*.
- Brock TD. 1997. Microbial activities in nature. pp.406-456. In *Biology of microorganisms* (8th ed.). Prentice-Hall, Inc., Engle Wood Cliffs. New Jersey.
- Carberg SR. 1972. International council for the exploration of the sea Charlorteland Denmark. pp. 305-315.
- Iwai Y and Y Takahashi. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds. pp.281-302. In *The search for bioactive compounds from microorganisms* (Omura S ed.). Springer Verlag, New York.
- Jones GH. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 163:1215-1221.
- Jukes TH and CR Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. pp.21-132. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro HN ed.). Academic Press. New York.
- Kim JB, DH Yi, WS Shin and CM Koh. 1998. Antibacterial activity of antibiotic (K-681) from *Streptomyces* sp. 681 against *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Microbiol.* 33:69-75.
- Lee MJ, DS Lim, MS Lee, WH Yoon and CH Kim. 1997. Characterization of *Streptomyces* sp. AMLK-135 producing anti-MRSA antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 7:397-401.
- Miyadoh S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. *Actinomycetol.* 7:100-106.
- Okami Y and K Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics. pp.33-67. In *Actinomycetes in biotechnology* (Goodfellow M ed.). Academic Press. London.
- Okazaki T. 1987. Rare actinomycetes, new breed of actinomycetes. *J. Microorganisms.* 3:453-461.
- Saitou N and M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Strickland JDH and TR Parsons. 1972. A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Con. No. 167.* Fisheries Reserch Borad of Canada, Ottawa. pp. 1-311.
- Thompson JD, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin and DG Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Tsukamoto M, S Nakajima, H Arakawa, Y Sugiura, H Suzuki, M Hirayama, S Kamiya, Y Teshima, H Kondo, K Kojiri and H Suda. 1998. A new antitumor antibiotics, BE-19412A, produced by a *Streptomyces*. *J. Antibiotics.* 51:908-912.

Manuscript Received: August 18, 2010  
Revision Accepted: November 15, 2010  
Responsible Editor: Hak Young Lee