

산림토양으로 부터 내산성 *Streptomyces* sp.
균주의 분리 및 동정

김재현·송도한

단국대학교 이공대학 미생물학과

Isolation and Identification of an acidoduric
Streptomyces sp. from Forest Soil

Kim, Jae Heon and Do Han Song

Department of Microbiology, Dan Kook University, Cheonan 330

ABSTRACT: In this study, an acidoduric *Streptomyces* strain was isolated and identified from acidic forest soil around Dankook University, Cheonan Campus. This isolated strain had rod-shaped, smooth, non-motile spore and the shape of spore chain was compact spiral. This structure appeared similar to the sporangium of the genus *Streptosporangium* but this strain proved to be a *Streptomyces* strain by an electron microscopic study and cell wall analysis. This strain showed a best growth on neutral medium, was also able to grow on the acidic media of pH 4.0 and pH 5.0. The color determination of this strain on various agar media and other physiological tests were carried out by ISP-methods. From these results, the isolated strain was considered to be *Streptomyces mirabilis*.

KEY WORDS □ acidoduric, *Streptomyces mirabilis*.

일반적으로 *Streptomyces*는 pH 5.0 이하가 되면 생장이 중지되나, Jensen에 의해서 1930년에 생장을 위해서 산성조건이 요구되는 *Streptomyces acidophilus*가 분리되었고, pH 3.5~5.0에서 생장이 이루어지는 호산성 균주가 Khan과 Williams (1975)에 의해서 분리되는 등 산성조건에서 생장이 이루어지는 *Streptomyces*가 토양에 존재한다는 사실이 밝혀졌다. 이같은 *Streptomyces* 균주들은 다른 미생물이 분비하는 혐기성 분해산물에 의한 microenvironment의 pH 상승에 의해 성장하기도 하나 극히 소수의 *Streptomyces*는 스스로 산성조건에 적응할 수 있다(Alexander, 1977; Hagedorn, 1976; Lynch와 Pool, 1979). Hagedorn(1976)에 따르면 중성이나 알칼리성 토양보다 산성토양에서 분리된 *Streptomyces*가 산성

에 대해서 강한 내성을 갖는다고 하였으며, 호산성 균주들을 호중성 균주(neutrophilic strain)들과 비교할 때 탄수화물의 이용양상 등의 생리적인 차이가 발생되는데, 호산성 균주들이 arabinose, xylose, glycerol을 더 잘 이용하는 것으로 나타났다(Khan과 Williams, 1975; Williams 등, 1971).

또한 2차 대사산물인 항생물질의 양상에도 차이가 발생하여 내산성 균주들에 의해서 생성된 항생물질이 호중성 균주들에 의해서 생성된 것에 비해서 그람음성 세균에 보다 큰 활성를 갖는다(Nkanga와 Hagedorn, 1978).

국내의 경우에도 항생물질을 분비하는 *Streptomyces*를 토양으로 부터 분리 동정하는 등, 토양내 *Streptomyces*에 대한 많은 연구가 보고 되었

으나(이민재 등, 1976; 조성호 등, 1977; 서용만과 홍순우, 1977; 서용만 등, 1977), 내산성 균주에 대한 연구는 미흡하므로 본 실험에서는 국내의 토양으로부터 산성조건에서 생장이 가능한 *Streptomyces*를 분리 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

토 양

본 실험의 목적상 산성토양을 선택하기 위하여 단국대 천안캠퍼스 주위의 숲속 토양을 채취하여 pH를 측정하였다. 측정 방법은 비이커에 3차증류수 50ml와 숲속 토양 10g을 넣고 분쇄기를 사용하여 10분간 분쇄시킨 후 pH 미터기(Fisher model No. 620)로 측정하였다.

배 지

내산성 균주의 분리 및 보관을 위해서 사용된 배지는 pH5.0으로 조절된 Bennett 한천배지를 사용했다. 배지조성; glucose 10g, beef extract 1g, yeast extract 1g, casitone 2g, agar 20g, 증류수 1l.

산성 조건에서 분리균주의 성장가능성 여부를 조사하기 위하여 완충용액이 사용되었는데, pH 4.0, 5.0, 6.0에서는 0.05M sodium phosphate-citric acid buffer, pH7.0에서는 0.05M phosphate buffer, pH8.0에서는 0.05M tris-HCl buffer를 각각 이용하였다. 이때 산성조건에서 한천의 가수분해를 막기 위하여 pH4.0과 5.0에서는 beef extract 1g, yeast extract 1g, casitone 2g을 0.05M sodium phosphate-citric acid buffer 용액 800ml에 녹인 것과 glucose 10g을 증류수 200ml에 녹인 것을 따로 멸균한 후 합쳐서 사용하였다.

균주 분리

숲속 토양 10g과 멸균된 증류수 50ml를 비이커에 넣고 분쇄기로 10분간 분쇄시킨 후, 토양 용액을 10^{-3} ~ 10^{-5} 까지 희석하여 Bennett 한천배지에 접종 도말 하였다. 접종된 한천배지를 30°C에서 5일간 배양한 후 생성된 콜로니중에서 형태와 색소를 기준으로 *Streptomyces*속에 속하는 것으로 보이는 콜로니들을 선택하여 분리하였다. 분

리된 균주들을 새로운 배지에 재차 접종배양함으로써 순수 분리균주를 획득하였다.

배 지

형태적 특성을 관찰하기 위하여 Bennett 한천배지가 이용되었으며, pH별 성장량 및 성장곡선의 측정에는 Bennett 배양액이 사용되었다. 배양상의 특성, 탄소화합물의 이용여부, nitrate 환원능력과 melanin 생성 여부를 조사하기 위하여 ISP (International *Streptomyces* Project)의 기준에 따른 한천배지가 이용되었다.

이들 배지의 제조 접종 및 관찰은 모두 Shirling과 Gottlieb의 방법(1964)에 준하였다.

접종방법

액체 배지에 접종하기 위한 포자용액은 균주가 배양된 한천사면 배지에 멸균된 증류수 5ml를 넣고 멸균침으로 긁어서 vortex로 혼합시켜 만들었다. 배지 100ml당 1ml씩 접종하였다.

탄소화합물의 이용 여부와 nitrate 환원능력을 조사하기 위하여 세척된 균사체가 접종되었다. Bennett 배양액에 30°C, 85rpm으로 5일간 진탕 배양하여 얻어진 균사체를 여과세척하고 멸균된 분쇄기를 이용하여 균질의 균사체용액을 만들었으며 이 용액을 적당량씩 배지에 접종하였다.

형 태

*Streptomyces*의 분류에 중요 기준이 되는 포자의 형태와 포자배열 형태를 광학현미경으로 관찰하기 위하여 30°C에서 3일간 슬라이드 배양을 하였고 포자의 표면형태는 전자현미경으로 관찰되었다.

세포벽의 아미노산 및 당류의 분석은 Kutzner (1981)에 의해 기술된 방법에 의해 시행되었다.

pH별 성장량 및 성장곡선

포자용액을 각 pH별로 접종하여 30°C에서 배양한 후 미리 무게가 측정된 여과지(Toyo No. 2)에 여과시켜 말린 후의 무게를 측정하여 증가량으로써 결정하였다.

배양상의 특성

ISP 한천배지 No. 2, 3, 4, 5에 포자용액 0.05ml를 각각 교차접종한 후, 30°C에서 7일, 14일, 21일간 배양한 후 색상표 (ISCC-NBS CENTROID, color chart, standard sample

No. 2106)를 사용하여 1차 균사체와 2차 균사체의 색깔 및 용성색소의 색깔을 관찰하였다. 그람염색과 항 산성염색은 Bennett 배양액에서 48시간 배양 후 시행되었다.

결과 및 고찰

내산성 균주의 분리

시료를 채취한 숲속 토양의 pH는 5.3이었다. 이 토양에서 얻어진 용액을 초기 pH가 5.0으로 조절된 한천배지에 접종, 배양하여 60여종의 균주가 순수분리되었고, 이들 중에서 성장상태가 양호한 균주들 중 임의로 명명된 51G 균주를 선택하여 내산성 실험을 실시하였다.

이때 기준 균주로써 *Streptomyces griseus* (H-96)는 pH6.0 이상에서만 생장이 가능한데 반하여 51G 균주는 pH4.0 부터 8.0까지 모든 조건에서 생장이 가능하였다(Fig. 1).

pH별 성장량의 측정결과, pH4.0에서 19mg, 5.0에서 21mg의 저조한 성장량을 보였으나 pH7.0에서는 108mg의 높은 성장율을 보였다(Table 1).

성장곡선의 측정결과에 의하면 pH7.0에서 2일째에 대수증식기를 나타냈으나 3일째 부터는 정지기에 돌입하였다. pH5.0에서는 5일째까지 잠복기

Table 1. The dry weight of strain 51G after 5 days

pH	Dry weight (mg/50 ml)
4.0	19
5.0	21
6.0	69
7.0	108
8.0	94

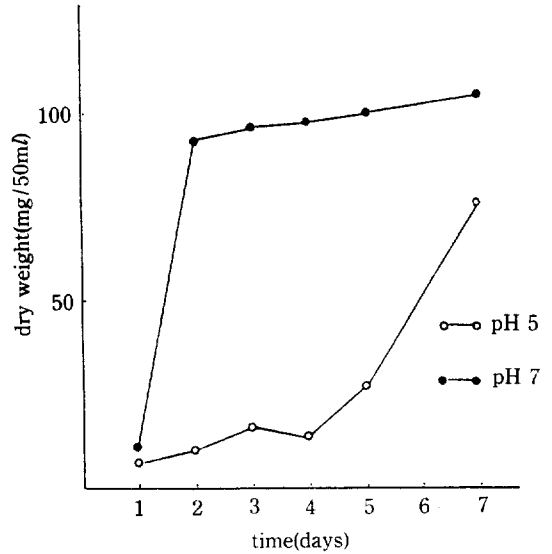


Fig. 2. The growth of strain 51G in Bennett liquid medium at 30°C, 85 rpm.

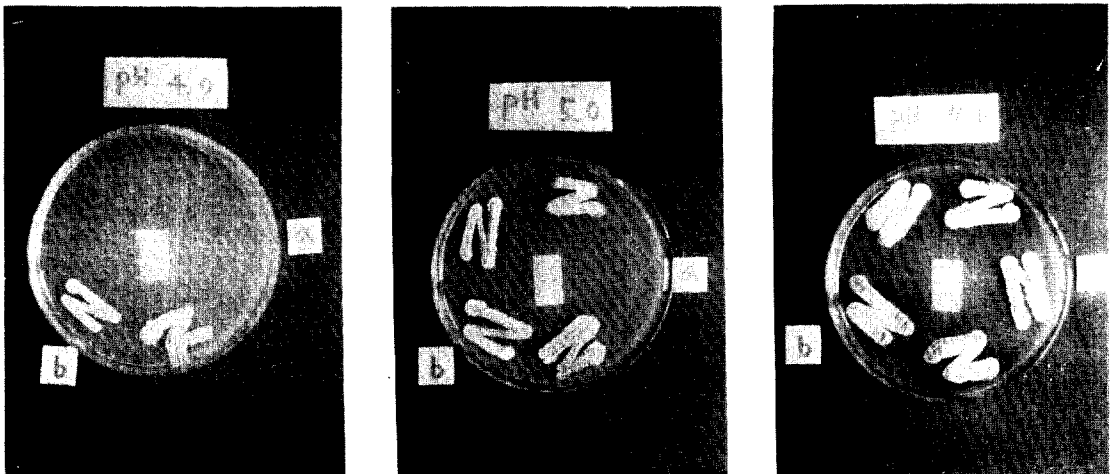


Fig. 1. The effect of pH on the growth of isolated strains, incubated for 5 days at 30°C a; control (*Streptomyces griseus*), b; strain 51G

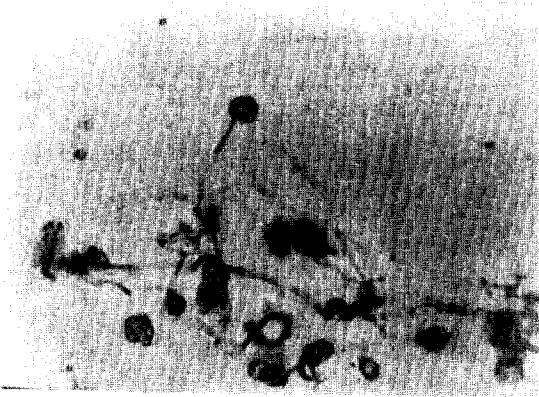


Fig. 3a. Photomicrograph of aerial mycelia of strain 51 G.

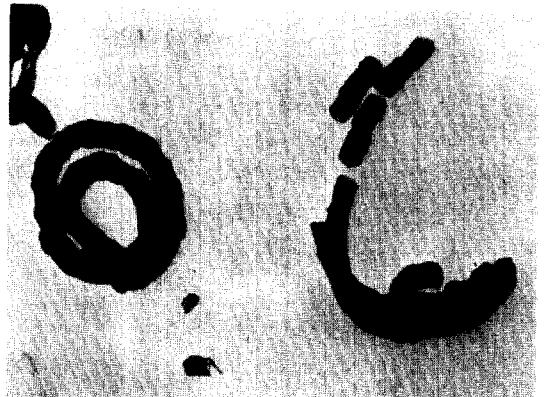


Fig. 3b. Electron micrograph of the spore bearing structure of strain 51 G.

를 나타낸 후 6일째 부터 대수증식기를 보였다. 즉 이 균은 산성조건에서 적응기를 거친 후, 중성 조건에서와 비슷한 생장량을 보였다(Fig. 2).

이같은 결과로 부터 분리균주는 중성조건에서 생장이 우수하지만 산성조건에서도 생장이 가능한 내산성 균주로 추정 되었다.

균의 동정

형태

전자, 광학현미경을 통한 관찰결과는 포자의 형태가 간상형으로 운동성이 없었다. 크기는 폭이 1.0 μm , 너비가 1.0~1.5 μm 이었으며, 표면 구조는 매끈한 형태였다. 포자의 배열상태는

compact spiral 구조였으며 spiral의 회전폭은 3.8~6.3 μm 이었다. 이 compact spiral 구조는 외견상 포자낭처럼 보였으나(Fig. 3a), *Streptosporangium roseum*과 비교 관찰한 결과 포자낭벽을 발견하지 못하였다. 또한 *Streptosporangium roseum*의 포자낭은 증류수에서 파괴되지 않은 상태로 존재하는 것이 확인되었으나, 분리 균주의 한천사면 배지에 증류수를 넣어 얻은 용액에는 포자낭의 구조가 전혀 존재하지 않았다. Schaefer (1969)에 따르면 토양에서 분리된 *Streptosporangium indianesis*의 spiral spore chain이 점액성 물질에 둘러쌓여 마치 포자낭처럼 보이거나 이러한

Table 2. Cultural characteristics of strain 51G

Medium	culture time (days)	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
Yeast extract	7	medium gray	black	grayish yellow
Malt extract	14	medium gray	black	grayish yellow
agar (ISP No. 2)	21	olive gray	black	grayish yellowish brown
Oatmeal agar	7	light gray	black	none
(ISP No.3)	14	olive gray	black	light reddish brown
	21	grayish olive	black	light grayish brown
Inorganic salts-starch	7			
	14			
agar* (ISP No. 4)	21	grayish yellowish green	dark grayish olive	none
Glycerol-asparagine	7	light greenish green	grayish yellow green	none
agar (ISP No. 5)	14	olive gray	grayish olive green	grayish greenish yellow
	21	light olive gray	olive black	yellowish brown

* Color was determined after 3 weeks because of weak growth on this medium.

경우 *Streptosporangium* 속으로 동정하는 것은 타당하지 못하다. 포자낭을 형성하는 *Streptomyces* 속 균주들을 *Actinosporangium*으로 따로 분류하기도 했으나, 이 경우에도 포자낭이 제 2차 균사체의 단순한 집합체임이 밝혀져 그 속의 타당성이 상실되었다(Goodfellow와 Cross, 1983).

따라서 세포벽 분석을 통한 동정을 실시하였다(Lechevalier, 1977).

세포벽의 아미노산 및 당류의 분석

분리 균주의 세포벽을 분석한 결과, 분리 균주는 *Streptomyces* 속에 특이적인 LL-DAP와 glycine을 함유하고 madurose가 함유되지 않은 type I에 속하는 세포벽을 가진 것으로 판정되었다.

배양상의 특성

ISP 배지 No. 2, 3, 4, 5에서 관찰된 배양상의 특성은 1차 균사체는 검정색 내지 회색계통의 녹색을, 2차 균사체는 주로 회색계통의 색깔을, 용성 색소는 황갈색계통의 색깔을 띠었으며 Inorganic salts-starch agar에서는 2주동안 생장이 저조하여 3주째 비로소 관찰이 가능하였다(Table 2).

nitrate 환원성, melanin 생성여부 및 염색반응

그람염색 결과는 양성을 나타내었고 항 산성염색은 음성을 나타내어 전형적인 *Streptomyces* 속과 일치되었다. nitrate 환원력의 조사결과는 시간이 지남에 따라 환원되는 양이 점차 증가하였고, ISP No. 1, 6, 7에서 melanin 색소가 생성되는 것이 관찰되었다(Table 5).

탄소화합물 이용

실험에 사용된 탄소화합물들은 sucrose와 raffinose를 제외하고 모두 잘 이용되었다.

위의 결과들을 바탕으로 분리균주 51G는 Nonomura(1974) 및 Kuester(1972)의 분류법에 따라 *Streptomyces mirabilis*인 것으로 밝혀졌다. 호산성 및 내산성인 *Streptomyces*는 산성토양에서

Table 3. Physiological characteristics of strain 51G

Characters	Culture time (days)	Result
nitrate reduction	7	-
in Bacto-Nitrate Broth	14	+
	21	++
melanin production		
Tryptone-yeast extract broth	2	+
	4	+
Peptone-yeast extract iron agar	2	+++
	4	+++
Tyrosine agar	2	weak
	4	+

Table 4. Carbon utilization pattern of strain 51G after 2 weeks.

Carbon sources	Utilization
D-glucose*	++
no carbon source**	-
L-arabinose	++
i-inositol	++
D-mannitol	++
D-fructose	++
rhamnose	±
sucrose	-
raffinose	-

* : positive control; ** : negative control;
 +++ : strongly positive utilization;
 + : positive utilization;
 ± : doubtful utilization;
 - : negative utilization.

총 세균수의 40.1~67.6%에 이르는 것으로 알려져 있다(Hagedorn 1976). 이들은 식물산분해인 cellulose, hemicellulose, lignin 등의 분해에 관여하는 것으로 생각되며, 특히 분해 과정에서 유기산이 생성되는 경우 이들의 생존은 더욱 중요한 의미를 지니게 되는 것으로 생각된다.

적 요

본 실험에서는 숲속 토양으로부터 산성조건에서 생장이 가능한 내산성 균주를 분리 동정하였다. 분리된 균주는 형태적 관찰과 박층 크로마토그래피에 의한 세포벽 분석과 ISP 분류 기준에 따른 생리적 실험을 통하여 동정하였으며, 이 균주의 포자는 형태가 간상형이고 표면구조는 매끈한 형태였다. 포자의 배열형태는 compact spiral 구조였으며 이 균주는 명확한 포자낭벽을 갖고 있지 않았고, 세포벽 분석결과에 따르면 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 밝혀졌다.

또한 중성조건에서 생장이 우수하나 산성조건에서도 생장이 가능한 내산성 균주로써, Nonomura의 분류 기준에 의하면 *Streptomyces mirabilis*인 것으로 동정되었다.

참고문헌

1. 서용만, 홍순우. 1977. 항생물질 생산 *Streptomyces*의 분리 및 동정에 관하여. 미생물학회지, **15**: 93-99.
2. 서용만, 민경희, 홍순우. 1977. *Streptomyces albus*와 *Streptomyces globosus*의 몇가지 생리 생장적 특성에 관하여. 미생물학회지, **15**: 123-130.
3. 이민재, 하영철, 안정선. 1976. *Streptomyces*속의 분리 및 동정에 관한 연구. 미생물학회지, **14**: 25-35.
4. 조성호, 안정선, 권영명. 1977. 수종 *Streptomyces*의 분리 동정에 관하여. 미생물학회지, **15**: 170-175.
5. Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*, pp. 36-51. John Willey and Sons Inc., New York.
6. Goodfellow, M. and T. Cross. 1983. Classification, pp. 7-164. eds; Goodfellow, M., Mordarski, M. and S.T. Williams. *The Biology of the Actinomycetes*. Academic Press.
7. Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 189-216.
8. Hagedorn, C. 1976. Influence of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 68-375.
9. Khan, M.R. and S.T. Williams. 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soil-VIII. *Soil Biol. Biochem.* **7**: 345-348.
10. Küster, E. 1972. Simple working key for the classification and identification of named taxa included in the international Streptomyces Project. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 139-148.
11. Kutzner, H.J. 1981. The family Streptomycetaceae. pp. 2028-2090. eds: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and H.G. Schlegel. *The Prokaryotes. A handbook of Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, Vol II*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
12. Lechevalier, H.A. 1977. Soil or Oxidative Actinomycetes. pp. 363-371. eds: Laskin, A.I. and H.A. Lechevalier, *CRC Handbook of Microbiology*, 2nd edition. CRC Press. Inc.
13. Lynch, J.M. and N.J. Pool. 1979. *Microbial ecology*, pp. 72-73. John Wiley and Sons., New York.
14. Nkanga E.J. and C. Hagedorn. 1978. Detections of antibiotic-producing *Streptomyces* inhabiting forest soil. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **14**: 51-59.
15. Nonomura, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the Streptomycetes included in ISP. *J. Ferment. Tech.* **52**: 78-92.
16. Schäfer, D. 1969. Eine neue Streptosporangium-Art aus türkischer Steppenerde. *Arch. Mikrobiol.* **66**: 365-373.
17. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1964. Methods manual. p 1-27. Streptomyces Type Culture Project.

(Received July 18, 1987)