

## 다수 배지의 사용에 따른 방선균의 중복 분리빈도

김창진\* · 이강현 · 아끼라 시마즈<sup>1</sup> · 유익동

한국과학기술연구원 유전공학연구소, <sup>1</sup>동경대학교 분자세포생물학연구소

### Reisolation Frequency of Soil Actinomycetes on Multiple Isolation Media

Kim, Chang-Jin\*, Kang-Hyun Lee, Akira Shimazu<sup>1</sup> and Ick-Dong Yoo

Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejeon

<sup>1</sup>Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Tokyo University

**Abstract** — For effective screening research, to isolate many different strains not duplicated would be essential. Three kinds of media were used for selective isolation of actinomycetes to test the reisolation frequency. Sixty species were isolated on Bennet's agar, 47 were on glycerol-asparagine agar and 77 were on humic acid-vitamin agar from 10 domestic soil samples. All of these isolates were identified to the genus level based on morphological characters and examined the sameness on each medium. The reisolation frequency between two different media was 10% or so(8.3~16.7%) and among three different media was 25% or so(22.1~27.7%).

일반적으로 *Streptomyces*속 이외의 방선균을 희소 방선균이라 하는데(1) 원래는 토양 등 자연계에 분포하는 밀도가 낮거나 인위적으로 분리 또는 배양이 어려운 방선균을 의미한다(2, 3). 한편 지금까지 토양 중에 존재하는 미생물종의 약 1% 미만만이 활용되고 있다고 알려져(4) 있으므로 자연계에는 현재 우리가 이용하지 못하고 있는 희소방선균을 포함하는 많은 미지의 방선균이 있을 것이다. 따라서 앞으로도 이러한 방선균으로부터 많은 새로운 생리활성물질이 탐색될 것으로 예상된다(5, 6).

성공적으로 생리활성물질 탐색연구를 하기 위해서는 효율적인 screening 방법의 개발과 더불어 이와 연계한 방선균의 분리 연구가 필요하다. 선택적인 screening 방법을 사용하는 경우에는 분리하고자 하는 방선균의 신규성이나 중복여부가 큰 문제가 되지 않으나 일반적인 screening 방법을 사용하는 경우에는 screening에 이용되는 방선균주가 중복되지 않으면서도 다양한 균주라야 할 것이다(7). 다수의 방선균 분리를 위해서는 동시에 여러 종류의 균분리 배지를 사용할 수도 있겠지만 그 경우에는 많은 균주가 중복하여 분리될 것이므로 적절하게 균분리 배지를 선

정하여야 할 것이다. 본 연구에서는 동일한 토양시료로부터 동시에 서로 다른 몇가지 균분리 배지를 이용하여 방선균을 분리하였을 때 어느 정도의 방선균이 상호 중복하여 분리되는지를 조사하였다. 이렇게 하여 각종 생리활성물질 탐색연구에 적합한 균분리 배지의 사용기준을 정하고자 하였다. 이를 위하여 3종류의 균분리 배지를 이용하였으며 각 배지 상에 나타난 서로 다른 모든 종류의 방선균주를 분리한 후 각 균주를 genus 수준에서 동정하고 비교함으로써 중복하여 분리되는 빈도를 조사하였다.

#### 토양시료, 방선균 분리배지 및 균동정

방선균의 분리를 위한 시료로서는 경상북도 영풍군 소재 소백산 지역에서 수집한 산림 토양시료 10점을 사용하였으며, 토양시료를  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$ 배로 희석하여 3종류의 각기 다른 배지상에 접종하였다. 균분리용 배지로서는 방선균을 선택적으로 분리하고자 할 때 많이 사용하는 Bennet's agar 배지(glucose 10g, yeast extract 1g, bacto peptone 2g, beef extract 1g, agar 20g/중류수 1L), glycerol-asparagine agar 배지(L-asparagine 1g, glycerol 10g,  $K_2HPO_4$  1g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1mg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1mg, agar 20g/중류수 1L), humic acid-vitamin agar 배지

**Key words:** Reisolation frequency, actinomycetes, screening, multiple media  
\*Corresponding author

(humic acid 1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, KCl 1.71 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, CaCO<sub>3</sub> 0.02 g, agar 20 g/증류수 1 L)를 사용하였다(8, 9). 각 시료가 접종된 plate는 28°C에서 2주간 배양하였고 배양 후 각 배지상에 나타난 colony를 Bennet's agar 배지상에 다시 옮겨 순수 분리한 후 육안 및 광학 현미경(long working distance 렌즈 장착)을 이용하여 방선균의 genus 동정에 필요한 각종 형태적인 특징을 조사하였다. 또한 thin layer chromatography(cellulose TLC, Merck 5715, 전개용매 : methanol-H<sub>2</sub>O-5 N HCl-pyridine = 80 : 15 : 5 : 10) 방법(10)에 의해 균사 세포벽 성분의 하나인 diaminopimelic acid의 형태를 조사하였으며 필요한 경우에는 ISP 방법(8)과 Bergey's manual(11)에 준하여 기타의 생리화학적 특성을 조사하였다. 이렇게 하여 분리된 모든 방선균을 genus 수준에서 동정하였으며 각각의 동정 결과를 비교하여 분리된 방선균의 분리배지간 동일성 여부를 조사하였다.

### 각 배지간 분리 균주의 중복성

먼저 각 균분리 배지에 따른 방선균의 분리 결과를 보면 Table 1과 같다. 공시한 토양 시료 10점으로부터 총 184종의 균주가 분리되었다. 이 중 Bennet's agar 배지에서는 60종의 균주, glycerol-asparagine agar 배지에서는 47종의 균주, humic acid-vitamin agar 배지에서는 77종의 균주가 분리되어 humic acid-vitamin agar 배지에서 가장 많이 분리되는 경향이었다. 분리된 방선균 중에는 *Streptomyces* 이외의 소위 희소방선균에 해당하는 균주가 35종으로써 전체의 약 20%를 차지하였는데 genus별로는 *Nocardia*와 *Nocardiopsis*가 대부분이었다. 배지에 따라서는 *Nocardia*가 Bennet's agar 배지와 glycerol-asparagine agar 배지에서, *Nocardiopsis*가 humic acid-vitamin agar 배지에서 잘 분리되는 경향이었다. 특히 Bennet's agar 배지에서는 지금까지 보고된 바 없는, 새로운 genus에 속하는 한 균주가 분리되었다. 이 균주에 대하여는

**Table 1. Population of actinomycete genera on various isolation media**

Media	Genus	Stm.	Stv.	Kit.	Mim.	Noc.	Amy.	Ncp.	Acm.	Etc	Total
Bennet's agar		45	1	0	1	6	1	3	1	2	60
Glycerol-asparagine agar		36	0	1	1	5	0	2	1	1	47
Humic acid-vitamin agar		68	0	1	0	1	1	5	1	0	77
Total		149	1	2	2	12	2	10	3	3	184

Stm.; *Streptomyces*, Stv.; *Streptoverticillium*, Kit.; *Kitasatosporia*, Mim.; *Micromonospora*, Noc.; *Nocardia*, Amy.; *Amycolata*, Ncp.; *Nocardiopsis*, Acm.; *Actinomadura*, Etc; other genus.

**Table 2. Multiplicity of actinomycete strains isolated on various isolation media**

Media	Bennet's agar(B)				Glycerol-asparagine agar(GA)				Humic acid-vitamin agar(HV)			
	Duplicated number			Total	Duplicated number			Total	Duplicated number			Total
	GA	HV	GA+HV		B	HV	B+HV		B	GA	B+GA	
1	0	1	0	4	0	0	0	3	1	0	0	4
2	1	0	0	7	0	1	1	4	0	1	1	12
3	0	1	0	7	0	0	0	5	2	0	0	10
4	0	1	0	6	0	2	0	8	1	2	0	15
5	0	2	0	6	0	0	0	4	1	0	0	5
6	0	1	0	4	0	2	0	3	1	2	0	6
7	1	2	0	7	1	1	0	5	1	1	0	8
8	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1
9	2	1	0	8	2	2	0	4	1	1	0	7
10	1	1	0	10	2	0	0	9	0	0	1	9
Total	5(8.3)	10(16.7)	0	60	5(10.6)	7(14.9)	1(2.1)	47	8(10.4)	7(9.1)	2(2.6)	77
(%)	15(25.0)				13(27.7)				17(22.1)			

차후 별도로 보고할 예정이다.

그리고 각 균분리 배지간에 동일한 균주가 중복하여 분리되는 빈도를 조사하였을 때 Bennet's agar 배지상에서 분리된 균주와 glycerol-asparagine agar 배지 및 humic acid-vitamin agar 배지상에서 분리된 균주의 8.3% 및 16.7%가 중복하여 분리되었고, glycerol-asparagine agar 배지상에서 분리된 균주와 Bennet's agar 배지 및 humic acid-vitamin agar 배지상에서 분리된 균주의 10.6% 및 14.9%가 중복하여 분리되었고, humic acid-vitamin agar 배지상에서 분리된 균주와 Bennet's agar 배지 및 glycerol-asparagine agar 배지상에서 분리된 균주의 10.4% 및 9.1%가 각각 중복하여 분리되었다. 따라서 본 연구에 사용된 3가지 배지중 2종류의 배지를 동시에 사용하여 방선균을 분리하면 배지 상호간에 중복하여 분리되는 방선균종은 평균 11.7%에 해당하고, 3종류를 동시에 사용하였을 때는 전체 분리된 방선균종의 25% 정도가 상호 중복하여 분리되었다(Table 2).

이와같이 여러 종류의 균분리 배지를 사용할 수록 분리되는 전체 방선균종의 수와 서로 상이한 방선균종의 수가 증가하겠지만 상대적으로 중복하여 분리되는 방선균종의 수도 증가한다. 따라서 각 연구자는 연구목적에 적합한 배지의 종류 뿐만 아니라 몇가지 배지를 사용할지를 함께 고려하여 screening에 적합한 배지를 선택하여야 할 것이다. 각종 생리활성물질 탐색연구의 경우 여러 종류의 균분리 배지를 사용하면 분리된 균주중에서 중복하여 분리된 균주를 제거하는 단계가 필요하겠지만 대체로 한 종류의 균분리용 배지를 사용하는 것보다는 2~3종류 정도의 균분리 배지를 동시에 사용하는 것이 일반적인 screening 연구에는 효과적이라 판단된다.

### 참고문헌

1. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, Pp. 33-67. In M. Goodfellow(ed.), *Actinomycetes in biotechnology*, Academic

- Press, London.
2. Iwai, Y. 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.
3. Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes, new breed of actinomycetes. *J. microorganism* 3: 453-461.
4. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1987. Microorganisms as Cattle, Pp. 3-8. In *Yomiuri Science*, Vol. 20, Yomiuri Press, Tokyo.
5. Zaehner, H., H. Drautz, P. Fiedler, R. Grote, W. Keller-Schierlein, W.A. Koenig, and A. Zeeck. 1988. Ways to new metabolites from actinomycetes, Pp. 171-183. In Y. Okami(ed.), *Biology of Actinomycetes '88*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
6. Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification, Pp. 3-25. In M.E. Bushell(ed.), *Bioactive Metabolites from Microorganisms*, Elsevier, Amsterdam.
7. Williams, S.T. and J.C. Vickers. 1988. Detection of actinomycetes in the natural environment, Pp. 265-270. In Y. Okami(ed.), *Biology of Actinomycetes '88*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
8. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
9. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.* 65: 501-509.
10. 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.
11. 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 & Wilkins, Baltimore.

(Received April 9, 1994)