

서해 아암도 갯벌토양 미생물의 개체군 분석 및 RAPD 분석에 의한 방선균의 생태학적 연구

조영주 · 김정한 · 전은수 · 이상미 · 박동진 · 이재찬 · 이항범 · 김창진*
한국생명공학연구원 첨단생물소재연구센터

Studies on Microbial Ecology of Actinomycetes in Tideland Soils. Cho, Young-Ju, Jeong-Hwan Kim, Eun-Soo Jeon, Sang-Mi Lee, Dong-Jin Park, Jae-Chan Lee, Hyang Burm Lee, and Chang-Jin Kim*. Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea - Ecological characteristics of microorganisms in tideland soils were studied by investigation of microbial diversity and population. Twenty soil samples were taken at surface, 10, 20 and 30 cm depth each. Bacteria, actinomycetes and fungi were isolated on each selective isolation medium containing different concentration of NaCl. Actinomycetes were the most isolated from soil samples taken at 10 cm depth and isolated by humic acid-vitamin (HV) medium without sea water or salt. Twenty nine strains of actinomycetes were isolated at surface soil and 74, 39, 37 strains were at 10, 20, and 30 cm depth, respectively. All these isolates were analysed and grouped by random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR analysis. Many of the isolates were clustered into *Microtetraspora* and *Pseudonocardia*. Fungal isolates were highly distributed at the surface soil and isolated well on potato dextrose agar (PDA) medium with sea water. Bacterial isolates were highly distributed at surface soil and isolated well by nutrient medium without sea water or salt. Soil samples taken at 10 cm depth showed the highest microbial diversity and population.

Key words: RAPD, UPGMA, Tideland, Actinomycetes, Microbial diversity

다양한 서식형태를 갖고 있는 갯벌에는 수많은 해양 무척추동물들과 미생물, 미세조류들이 서식하고 있다. 갯벌에는 먹이연쇄에서 가장 중요한 역할을 하는 유기물이 수중이나 퇴적물의 표면에 널리 존재하고 있으면서 세균과 같은 미생물에 의해 분해되어 이용되거나 또 다른 생물체에 영양분을 공급하고 있다. 같은 형태의 서식지라도 갯벌은 염분이나 표면노출 시간에 따라 서식하는 생물의 종류도 다르고 이웃하는 생물 종류에 따라 변하기도 하는데, 연안습지 생태계는 바다와 육지가 만나는 경계지대에 놓여 있어 판이한 두 생태계를 구성하는 미생물들을 부분적으로 수용할 수 있기 때문에 미생물의 종류가 더욱 다양하다[17]. 그리고 갯벌 미생물은 해안의 암반 미생물에 비해 그 종류가 훨씬 적고 단순하다고 알려져 있지만 조석에 의한 환경변동이 큰 갯벌에 일단 적응하게 되면 먹이가 풍부하고 공간 경쟁이 적어 크게 번성하게 된다.

이러한 갯벌토양의 특성에 따른 생태학적 연구가 가능하지만 갯벌 미생물에 관해서는 아직까지 연구가 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 서해안지역의 아암도 갯벌토양 내에 존재하는 미생물들 중 방선균, 세균, 곰

팡이에 대한 각 미생물군의 토양깊이와 염 농도에 따른 생태학적 특성을 파악하기 위하여 선택배지를 사용하여 각 미생물군의 분포양상을 조사하였고 방선균에 대해서는 분리된 균주를 대상으로 RAPD방법을 사용하여 그 다양성을 분석하였다.

재료 및 방법

토양시료

2000년 11월 초순, 인천광역시 연수구 아암도 갯벌토양을 서로 다른 지점 5 곳으로부터 지표, 지하 10, 20, 30 cm의 각 깊이별로 각각 10 g씩 채취하여 모두 20점의 갯벌토양시료를 본 연구에 사용하였다(Fig. 1).

방선균의 분리

토양 0.1 g을 멸균수 1 ml에 넣고 각각 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 배까지 희석한 다음, 방선균 선택분리배지인 HV agar 배지 [6] [humic acid 1.0 g, Na_2HPO_4 0.5 g, KCl 1.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 0.02 g, vitamin (*p*-aminobenzoic acid 0.5 mg, biotin 0.25 mg, Ca-pantothenate 0.5 mg, inositol 0.5 mg, thiamine-HCl 0.5 mg), cycloheximide 50 mg, nalidixic acid 20 mg, agar 20 g, pH 7.2, distilled water 1L]를 기본배지로 하여 여기에 증류수 대신 바닷물을 첨가한 배지와 1.5% NaCl, 그리고 5%

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4332, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: changjin@mail.kribb.re.kr

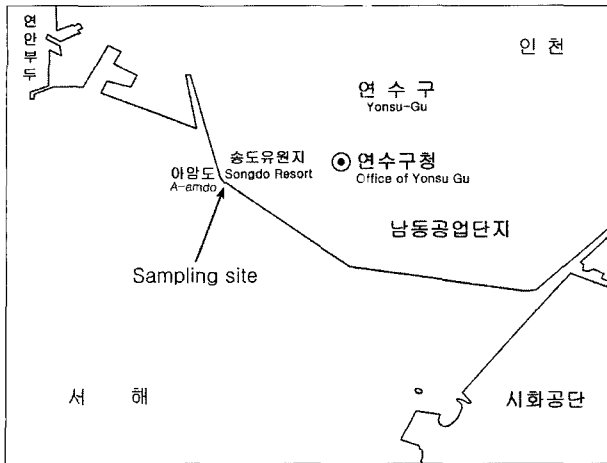


Fig. 1. Sampling site of tideland at Incheon A-amdo.

NaCl을 첨가한 3종류의 배지를 제조하여 각각의 토양 희석액을 도달한 다음 28°C에서 14일간 배양한 후 각 배지상에 나타나는 방선균의 개체군을 분석하였다. 이 때 분리된 각 균주는 한국생명공학연구원 항생물질연구실내의 균주보존실에 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

세균의 분리

토양 0.1 g을 멸균수 1 ml에 넣고 잘 섞은 후 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 배까지 희석하여 세균 선택분리배지인 nutrient agar (Difco) 배지를 기본배지로 하여 증류수 대신에 바닷물을 첨가한 배지 또는 1.5% NaCl 또는 5% NaCl을 첨가한 3종류의 배지상에 도달하여 35°C에서 24시간 배양한 후 각 배지상에 나타나는 세균의 개체군을 분석하였다.

곰팡이의 분리

토양 0.1 g을 멸균수 1 ml에 넣고 잘 섞은 후 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 배까지 희석하여 곰팡이 선택분리배지인 PDA 배지를 기본배지로 하여 증류수 대신에 바닷물을 첨가한 배지 또는 1.5% NaCl 또는 5% NaCl을 첨가한 3종류의 배지상에 도달하여 28°C에서 14일간 배양한 후 각 배지상에 나타나는 곰팡이의 개체군을 분석하였다.

Genomic DNA 분리

앞에서 분리한 각각 다른 방선균주를 Bennett's agar[3] (glucose 10 g, yeast extract 1 g, bacto peptone 2 g, beef extract 1 g, agar 20 g) 배지에 접종하여 28°C에서 72시간 동안 배양한 후 배양된 균체로부터 genomic DNA를 추출하였다. Total genomic DNA의 분리는 Wilson과 Maize의 방법[2]을 변형하였으며 세포내 단백질 및 다당류 제거에 적당한 단백질 침전법을 이용하였다. 각각의 균체 시료를 -20°C에서 20분간 방치한 뒤, 실온에서 40분간 더 방치한

다음 다시 한번 -20°C에서 20분간 방치하기를 반복하였다. 균체를 분리하여 TE buffer (Tris 25 mM; EDTA 25 mM, pH 8.0) 600 μ l를 첨가한 후 lysozyme (50 μ g/ μ l) 2 μ l와 RNase A (50 μ g/ μ l) 2 μ l를 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시킨 다음, 5M NaCl 50 μ l와 10% SDS 120 μ l를 첨가한 후 잘 섞어서 65°C에서 30분간 반응시키고, 5M potassium acetate 240 μ l를 첨가한 후 얼음 속에서 20분간 방치한 다음 12,000 rpm, 4°C 조건하에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액 750 μ l를 새로운 microtube에 옮겨 isopropanol 1 ml을 첨가한 후 12,000 rpm, 4°C 조건하에서 5분간 원심분리하여 얻은 DNA pellet을 건조시킨 다음 TE buffer에 녹여서 사용하였다.

DNA 순도 측정 및 정량

정제한 genomic DNA는 Ultrospec^R 3000 spectrophotometer(Amersham Pharmacia Biotech, England) DNA 정량분석기를 사용하여 분석한 다음 260 nm와 280 nm의 흡광도 비가 1.8 이상으로 나타난 순수한 DNA 시료를 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 분리한 DNA 시료는 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

RAPD 방법을 이용한 방선균의 다양성 분석

분리한 DNA 시료에 PCR premixture (10 mM dNTPs 0.6 μ l, $10\times$ Taq buffer (w/15 mM MgCl₂) 3.0 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) 200 ng을 넣고 방선균 universal primer (SRILS UniPrimerTM Kit I) No.9 (100 ng/ μ l)를 1.5 μ l 첨가하여 PCR를 실시하였고, PCR 후 10 μ l의 PCR 산물을 1.0%의 agarose gel에 loading한 후, 100V로 45분간 전기영동한 다음, ethidium bromide로 염색하고 증류수로 세척하여 UV transilluminator (260 nm)에서 결과를 확인하여 사진을 촬영하여 군집분석에 이용하였다. 군집분석은 Bio-Rad사의 Quantity one (quantitation software)를 이용하여 UPGMA[5] 방법을 이용하여 분석하였고, 표준비교균주로는 *Actinosynnema mirum* KCTC 9184, *Amycolatopsis fastidiosa* KCTC 9297, *Actinokineosproa inagensis* KCTC 9571, *Actinomadura madurae* KCTC 9192, *Dactylosporangium aurantiacum* KCTC 9073, *Gordonia amarae* KCTC 9803, *Geodermatophilus obscurus* KCTC 9177, *Kitasatosporia setae* KCTC 9182, *Kibdelosporangium aridum subsp. largum* KCTC 9363, *Microbispora rosea subsp. rosea* KCTC 9181, *Microtetraspora angiospora* KCTC 9190, *Nocardia pseudosporangifera* KCTC 3489, *Nocardioopsis dassonvillei* KCTC 9190, *Pseudonocardia thermophila* KCTC 9149, *Promicromonospora citrea* KCTC 9069, *Streptomyces flavopersicus* KCTC 9221, *Saccharopolyspora erythraea* KCTC 9053, *Sebekia benithana* KCTC 9173, *Saccharomonospora azurea* KCTC 9475,

Terrabacter tumescens KCTC 9133, *Tsukamurella* sp. KCTC 9827를 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)으로부터 분양 받아 사용하였다.

결과 및 고찰

갯벌 토양내의 미생물 분석

토양 깊이에 따른 방선균의 분포를 분석한 결과 NaCl이나 바닷물을 첨가하지 않은 HV agar 배지에서 가장 많은 수의 방선균이 분리되었고 (1.5~2.0 × 10⁴ cfu/g soil), 다음으로 1.5% NaCl, 5% NaCl, 바닷물이 첨가된 배지 순으로 나타났으며, 깊이에 따른 방선균은 지하 10 cm에서 가장 많은 방선균이 분리되었고, 다음으로 표층, 지하 20 cm, 지하 30 cm 순으로 나타났는데(Fig. 2) 이는 지하 10 cm 이내에 방선균의 80%가 존재한다는 Takahashi[17] 등의 연구결과와 일치한다.

토양 깊이에 따른 세균의 분포를 분석한 결과 방선균의 경우에서와 유사하게 바닷물이나 NaCl를 첨가하지 않은 nutrient agar 배지에서 가장 많은 수의 세균이 분리되었고, 다음으로 1.5% NaCl, 5% NaCl, 바닷물 순으로 나타났다. 깊이에 따른 세균은 표층에서 가장 많은 수(7.0 × 10⁶ cfu/g soil)가 분리되었고, 다음으로 지하 10 cm, 지하 20 cm, 지하 30 cm 순으로 나타났다(Fig. 3).

토양 깊이에 따른 곰팡이의 분포를 분석한 결과 바닷물을 첨가한 PDA 배지에서 가장 많은 수 (7.3 × 10¹ cfu/g soil)의 곰팡이가 분리되었고 다음으로 1.5% NaCl, 아무 것도 첨가하지 않은 PDA agar 배지 (Difco), 1.5% NaCl, 5% NaCl 순으로 나타났으며, 깊이에 따라서는 표층에서 가장 많은 곰팡이가 분리되었으며, 지하 10 cm, 지하 20 cm, 지하 30 cm 순으로 나타났다(Fig. 4). 갯벌토양시료에서 곰팡이의 분포수는 일반토양 시료에 비해 세균 및 방선균의 분리빈도보다 비교적 낮은 것을 알 수 있었다.

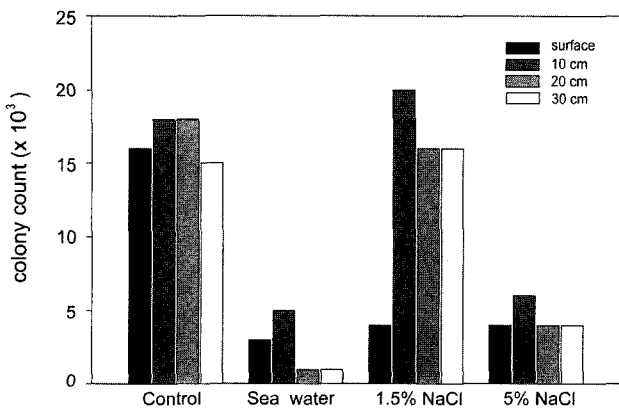


Fig. 2. Number of actinomycete colonies on the isolation plates by the depths and salt concentrations.

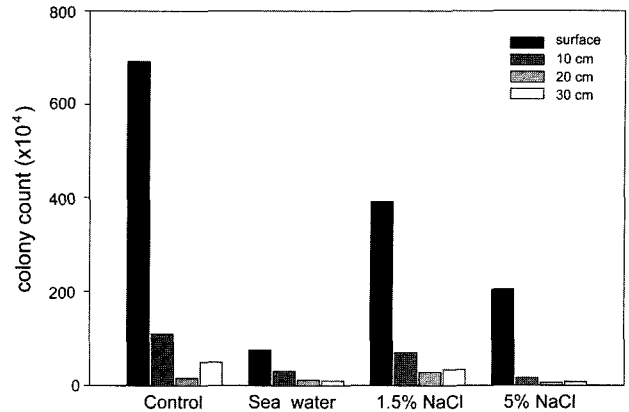


Fig. 3. Number of bacterial colonies on the isolation plates by the depths and salt concentrations.

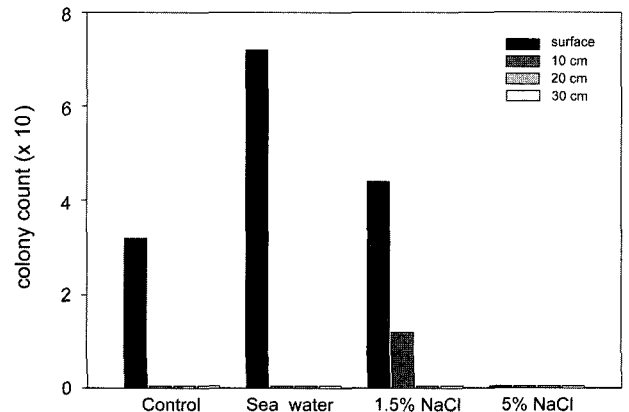


Fig. 4. Number of fungal colonies on the isolation plates by the depths and salt concentrations.

RAPD 방법을 이용한 방선균의 다양성 분석

총 175 주의 다양한 방선균 균주가 갯벌토양으로부터 분리되었으며, 깊이별로는 지표에서 29 균주, 지하 10 cm에서 74 균주, 지하 20 cm에서 39 균주, 그리고 지하 30 cm에서 37 균주가 분리되었는데, 지하 10 cm의 토양에서 가장 많은 수의 방선균 균주를 분리할 수 있어 다양성이 가장 풍부한 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 RAPD 방법을 이용하여 얻어진 band pattern 중 그 일부를 Fig. 5에 나타내었는데, Quantity one을 이용하여 UPGMA 방법으로 군집분석을 실시한 결과 15개의 cluster(Fig. 6)로 크게 나눌 수 있었으며, 각 균주에 대한 결과를 종합하여 Table 1에 나타내었다. 전체적으로는 대부분의 균주들이 우점종을 형성하지 않았으나 *Promicromonospora citrea*, *Microtetraspora angiospora*, *Kineospora aurantiaca*, *Sebekia benithana*, *Kibdelosporangium aridum* 과 동일한 cluster에 속하는 균주들이 가장 많은 것으로 나타나 *Streptomyces* 속 이외의 소위 희소방선균[1]이 많이 분리되었다.

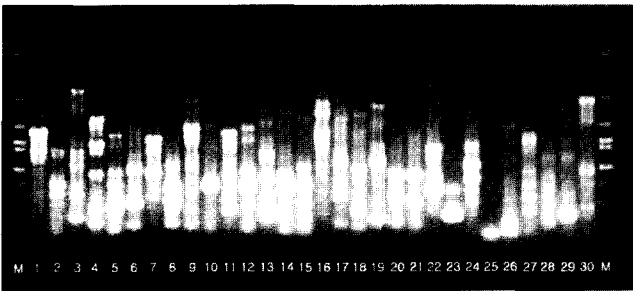


Fig. 5. Some of RAPD profiles showing polymorphism of actinomycete isolates from tideland soils. lane 1, A.001436; lane 2, A.001437; lane 3, A.001438; lane 4, A.001439; lane 5, A.001440; lane 6, A.001441; lane 7, A.001442; lane 8, A.001443; lane 9, A.001444; lane 10, A.001436; lane 11, A.001436; lane 12, A.001436; lane 13, A.001436; lane 14, A.001445; lane 15, A.001446; lane 16, A.001447; lane 17, A.001448; lane 18, A.001449; lane 19, A.001450; lane 20, A.001451; lane 21, A.001452; lane 22, A.001453; lane 23, A.001454; lane 24, A.001455; lane 25, A.001456; lane 26, A.001457; lane 27, A.001458; lane 28, A.001459; lane 29, A.001460; lane 30, A.001461; M: size marker

Cluster 1은 *Nocardioides simplex*, *Gordonia amarae*, *Rhodococcus erythropolis*의 표준균주를 포함하여 총 9 주의 분리균주로 구성되었고, cluster 2는 *Pseudonocardia thermophila*, *Dactylosporangium aurantiacum*과 23 주의 분리균주들이 속하였다. Cluster 3은 *Promicromonospora citrea*, *Microtraspota angiospora*, *Kineospora aurantiaca*, *Sebekia benithana*, *Kibdelosporangium aridum*을 포함한 49 주의 분리균주가 포함되며, cluster 4는 *Saccharomonospora erythraea*를 포함한 2 균주로 구성되었고, cluster 6은 *Nocardiopsis dassonvillei*를 포함한 8 균주로, cluster 7은 *Actinosynnema mirum*을 포함한 22 균주로 구성되었으며, cluster 9는 *Actinokineospora inagensis*, *Microbispora rosea*를 포함한 11 균주로 구성되었고, cluster 10은 *Streptomyces flavopersicus*와 3 주의 분리균주가 속하였으며, cluster 11은 *Terrabacter tumescens*와 2 주의 분리균주로 구성되었고, cluster 13은 *Actinomadura madurae*, *Kitasatospora setae*를 포함한 2 균주로 구성되었으며, cluster 14는 *Saccharopolyspora reythraea*, *Nocardia pseudosporangifera*, *Geodermatophilus obscurus*를 포함한 3 주의 분리균주로 구성되었다(Fig. 6).

방선균은 일반적으로 많은 항생물질을 생산하는 미생물 군으로 알려져 있으며[4], 최초로 *Streptomyces*에서 streptomycin을 분리한 후, 보다 많은 수의 항생물질을 얻기 위해 방선균의 분류학적 연구가 시작되어[18] 현재는 희소방선균 [13,14]의 분리에 많은 연구가 집중되고 있다. 방선균의 생태학적 분포에 관한 이해는 다양한 균주의 효과적인 분리를 위한 선택적 분리방법의 개발[7,11]과 더불어 중요한 연구목표의 하나가 된다. Lechevalier 등[12]은 16종의 토양

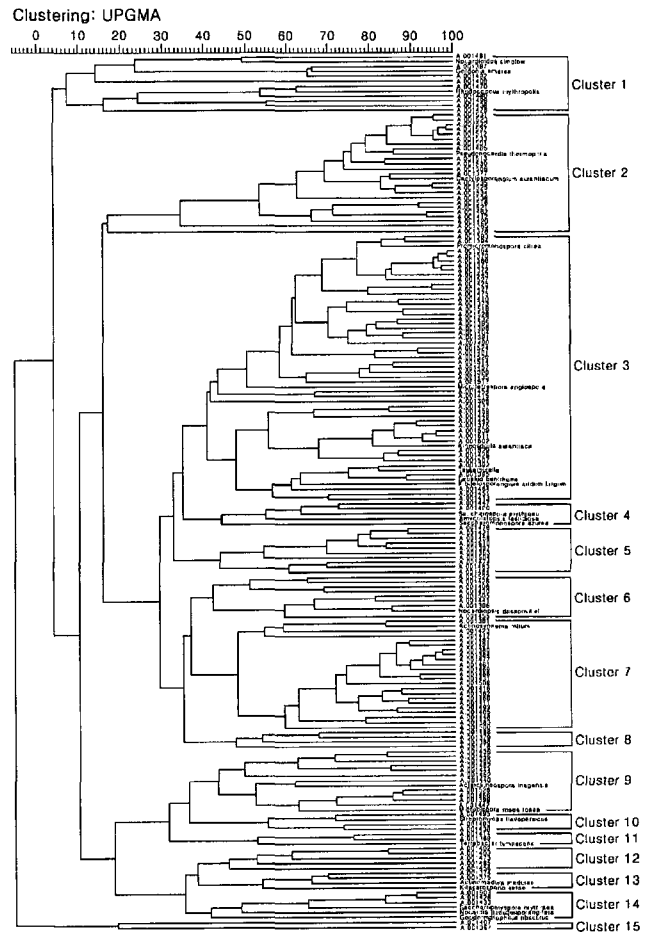


Fig. 6. A dendrogram showing the results of cluster analysis of 175 actinomycete isolates by RAPD analysis.

으로부터 5,000주의 방선균을 분리·동정하여 *Streptomyces* 속 방선균이 95%로 대부분을 차지함을 보고한 바 있으나 저자들은 균주분리시 동일균주가 재분리되는 중복성을 피하기 위해 동일 균주를 배제한 후 서로 다른 방선균만을 대상으로 토양 방선균의 분포 다양성을 조사한 바 있다[8-10]. 그 결과 산림, 밭, 초지, 논 등의 일반토양에서는 *Streptomyces* 속을 제외한 희소방선균은 30~40% 이었고, 자연 석회동굴에서 분리한 방선균의 *Streptomyces* 속과 희소방선균의 분포 비율이 각각 26.9%와 73.1%임을 밝힌 바 있다[16]. 그리고 계절에 따른 강변토양 방선균의 분포는 계절변화에 크게 좌우되며 가을철이 높은 다양성을 나타내는 것으로 보고한 바 있다[15].

본 연구에서는 RAPD 방법을 통한 군집분석을 통해 갯벌이라는 특수한 환경조건에 분포하는 방선균들을 분류하였는데 이러한 다양한 방선균의 효과적인 분류를 통해 향후 새로운 효소 및 항생제와 같은 생리활성물질 탐색을 위한 미생물 자원 확보 및 그 기초자료로서 활용할 수 있을 것이다.

Table 1. Clustering of actinomycete isolates by RAPD analysis

No.	Isolates	Type strain	Cluster	No.	Isolates	Type strain	Cluster
1	A.001363		5	55	A.001417		7
2	A.001364		3	56	A.001418		7
3	A.001365		2	57	A.001419		ND
4	A.001366		3	58	A.001420		2
5	A.001367		15	59	A.001421		5
6	A.001368		ND	60	A.001422		ND
7	A.001369		ND	61	A.001423		7
8	A.001370		3	62	A.001424		ND
9	A.001371		3	63	A.001425		3
10	A.001372		3	64	A.001426		6
11	A.001373		3	65	A.001427		3
12	A.001374	<i>Actinomadura madurae</i>	13	66	A.001428		3
13	A.001375	<i>Actinomadura madurae</i>	13	67	A.001429	<i>Saccharopolyspora reythraea</i>	14
14	A.001376	<i>Kineoporia aurantiaca</i>	3	68	A.001430		6
15	A.001377	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	2	69	A.001431		7
16	A.001378		2	70	A.001432		3
17	A.001379		8	71	A.001433	<i>Saccharopolyspora reythraea</i>	14
18	A.001380		7	72	A.001434		ND
19	A.001381		7	73	A.001435		3
20	A.001382		7	74	A.001436		9
21	A.001383		7	75	A.001437		3
22	A.001384		7	76	A.001438		1
23	A.001385		3	77	A.001439		10
24	A.001386	<i>Nocradiopsis dassonvillei</i>	6	78	A.001440	<i>Actinokineospora inagensis</i>	9
25	A.001387	<i>Gordonia amarae</i>	1	79	A.001441	<i>Nocradiopsis dassonvillei</i>	6
26	A.001388		8	80	A.001442	<i>Microbispora rosea rosea</i>	9
27	A.001389	<i>Terrabacter tumescens</i>	11	81	A.001443		3
28	A.001390		3	82	A.001444		9
29	A.001391		3	83	A.001445	<i>Kineoporia aurantiaca</i>	3
30	A.001392	<i>Tsukamurella</i>	3	84	A.001446		9
31	A.001393	<i>Promicromonospora citrea</i>	3	85	A.001447		4
32	A.001394	<i>Promicromonospora citrea</i>	3	86	A.001448		7
33	A.001395	<i>Sebekia benithana</i>	3	87	A.001449		ND
34	A.001396		3	88	A.001450		ND
35	A.001397		5	89	A.001451		3
36	A.001398		3	90	A.001452		9
37	A.001399	<i>Microbispora rosea rosea</i>	9	91	A.001453		ND
38	A.001400		4	92	A.001454		3
39	A.001401		3	93	A.001455		6
40	A.001402		12	94	A.001456		12
41	A.001403		12	95	A.001457		3
42	A.001404		3	96	A.001458		5
43	A.001405		7	97	A.001459		3
44	A.001406		6	98	A.001460		ND
45	A.001407		15	99	A.001461		7
46	A.001408		ND	100	A.001462		2
47	A.001409		1	101	A.001463		ND
48	A.001410		3	102	A.001464		3
49	A.001411		7	103	A.001465	<i>Pseudocardia thermophila</i>	2
50	A.001412		2	104	A.001466	<i>Microbispora rosea rosea</i>	9
51	A.001413		3	105	A.001467		ND
52	A.001414	<i>Terrabacter tumescens</i>	11	106	A.001468		7
53	A.001415		3	107	A.001469		7
54	A.001416		8	108	A.001470	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1

ND: Not determined

Table 1. continued

No.	Isolates	Type strain	Cluster	No.	Isolates	Type strain	Cluster
109	A.001471		ND	143	A.001505	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	6
110	A.001472		ND	144	A.001506		2
111	A.001473		12	145	A.001507		3
112	A.001474		5	146	A.001508		7
113	A.001475		3	147	A.001509	<i>Kineoporia aurantiaca</i>	3
114	A.001476		5	148	A.001510		ND
115	A.001477		7	149	A.001511	<i>Kineoporia aurantiaca</i>	3
116	A.001478		1	150	A.001512	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2
117	A.001479		ND	151	A.001513		2
118	A.001480	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1	152	A.001514		3
119	A.001481	<i>Nocardioides simplew</i>	1	153	A.001515		ND
120	A.001482		9	154	A.001516		2
121	A.001483		5	155	A.001517		3
122	A.001484		5	156	A.001518		3
123	A.001485		12	157	A.001519		5
124	A.001486		7	158	A.001520		3
125	A.001487		7	159	A.001521		2
126	A.001488		8	160	A.001522		6
127	A.001489		9	161	A.001523	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2
128	A.001490		3	162	A.001524		3
129	A.001491		7	163	A.001525	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	2
130	A.001492	<i>Gordonia amarae</i>	1	164	A.001526	<i>Microbispora rosea rosea</i>	9
131	A.001493		10	165	A.001527		3
132	A.001494		ND	166	A.001528		3
133	A.001495	<i>Streptomyces flavopersicus</i>	10	167	A.001529		3
134	A.001496		ND	168	A.001530		2
135	A.001497		ND	169	A.001531	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2
136	A.001498		1	170	A.001532	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2
137	A.001499		7	171	A.001533	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2
138	A.001500		7	172	A.001534	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	2
139	A.001501	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2	173	A.001535	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	2
140	A.001502	<i>Kineoporia aurantiaca</i>	3	174	A.001536		2
141	A.001503	<i>Saccharopolyspora reythraea</i>	14	175	A.001537	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	2
142	A.001504		5				

ND: Not determined

요 약

갯벌 토양 내에 존재하는 방선균, 세균, 곰팡이의 다양성 및 개체군 분석을 위해 토양 깊이(지표, 지하 10 cm, 지하 20 cm, 지하 30 cm)와 염농도(균분리 배지상에 바닷물, 1.5% NaCl, 5% NaCl을 첨가함)에 따른 생태학적 특성을 분석하였다. 방선균으로는 총 175 균주를 분리할 수 있었고 이를 대상으로 RAPD-PCR 방법을 이용하여 군집분석을 하였다. 방선균의 경우 깊이 10 cm에서 가장 많은 개체수를 보였으며 NaCl이나 바닷물이 포함되지 않은 HV agar 배지에서 가장 많은 수의 균주들이 나타났고, 토양깊이에 따른 다양성의 경우 지표에서 29 균주, 지하 10 cm에서 74 균주, 지하 20 cm에서 39 균주, 지하 30 cm에서

37 균주가 분리됨으로써 지하 10 cm 이내에서 다양한 방선균이 존재함을 알 수 있었다. 방선균 군집분석을 한 결과 15개의 cluster로 나눌 수 있었으며, *Promicromonospora citrea*, *Microtetraspora angiospora*, *Kineosporia aurantiaca*, *Sebekia benithana*, *Kibdelosporangium aridum*과 동일한 cluster에 속하는 균주들이 많았고, 그 외에 다양한 균주들이 존재함을 알 수 있었다. 곰팡이의 경우 지표면의 토양을 바닷물이 함유된 배지에서 배양했을 때 가장 많은 수가 나타났고, 세균의 경우도 지표면의 토양을 염이 첨가되지 않은 nutrient agar 배지로 배양하였을 때 가장 많은 세균을 분리할 수 있었다. 이러한 결과는 갯벌토양에서는 표층 및 지하 10 cm 이내에서 가장 다양하고 많은 수의 미생물이 존재하고 있음을 나타낸다고 하겠다.

REFERENCES

1. Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo, and F. Marinelli. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. **78**: 399–405.
2. Mehling, A., U. F. Wehmeier, and W. Pieperberg. 1995. Amplification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS. Microbiol. Letters*. **128**: 119–126.
3. Atlas, R. M. 1993. *Handbook of Microbiological Media*, pp. 126–127. 1st ed. CRC, Florida.
4. Berdy, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure, pp. 308–406. In Perlman, D. (ed.), *Advanced in Applied Microbiology*. Academic, New York.
5. De Buyser, M. L., A. Morvan, F. Grimont and N. El Solh. 1989. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 989–999.
6. Hayakawa, M. and H. Nonmura. 1987. Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501–509.
7. Horst, W. 1981. Characteristics of actinomycetes isolated from marine sediments, pp. 309–314. In K. P. Schaal and G. Pulverer (eds.), *Actinomycetes, suppl.*, **11**. Gustav Fisher Verlag · Stuttgart, New York.
8. Kim, C. J., K. H. Lee, A. Shimazu, and I. D. Yoo. 1994. Reisolation frequency of soil actinomycetes on multiple isolation media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 329–331.
9. Kim, C. J., K. H. Lee, A. Shimazu, O. S. Kwon, and D. J. Park. 1995. Isolation of rare actinomycetes on various types of soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 36–42.
10. Kim, P. K., O. S. Kwon, C. Y. Lim, D. J. Park, and C. J. Kim. 1997. Genus distribution of soil actinomycetes on different depth. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 534–536.
11. Kizuka, M., R. Enokita, K. Takahashi, and T. Okazaki. 1997. Distribution of the actinomycetes in Republic of South Africa investigated using a newly developed isolation method. *Actinomycetol.* **11**: 54–58.
12. 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.
13. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, pp. 33–67. In M. Good Fellow (ed.), *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, London.
14. Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes: New breed of actinomycetes. *The Bimonthly J. Microorganism* **3**: 453–461.
15. Park, D. J., O. S. Kwon, S. H. Lee, and C. J. Kim. 1999. Genus diversity of actinomycetes isolated seasonally from riverside soils. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 515–517.
16. Park, D. J., S. H. Lee, H. R. Park, O. S. Kwon, S. H. Park, S. H. Yeo, M. Uramoto, and C. J. Kim. 2000. Genus diversity of soil actinomycetes isolated from natural lime caves. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 129–133.
17. Takahashi, Y., Y. Seki, Y. Tanaka, R. Oiwa, Y. Iwai, and S. Omura. 1990. Vertical distribution of microorganism in soils. *J. Actinomyces*. **4**: 1–6.
18. Vandamme, E. J. 1984. Antibiotic search and production; an overview, p. 3–32. In Vandamme E. J. (ed.), *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Marcel Dekker, New York.

(Received Dec. 21, 2001/Accepted Feb. 25, 2002)