

수은, 6가크롬 오염토양으로부터 분리된 방선균군의 생태학적 특성

조민혜 · 한상미¹ · 백하주² · 황경숙*

목원대학교 바이오산업학과, ¹농촌진흥청 농업과학기술원 농업생물부,
²경상북도 보건환경연구원

Ecological Characteristics of Actinomycetes from Mercury and Chrome Polluted Soil

Min-Hye Cho, Sang-Mi Han¹, Ha-Ju Baek² and Kyung-Sook Whang*

Department of Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea

¹Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea, ²Gyeongsang Buk-Do Government Public Institute of Health and Environmental, Daegu 702-710, Korea

Abstract – Ecological characteristics of microbial populations inhabiting heavy metal polluted soil were investigated. The samples were collected from 293 sites around an factory and industry at Gyeongsangbuk-do. We measured the contents of seven heavy metal elements (Cd, Cu, As, Hg, Pb, Cr⁶⁺, CN), seven sites have been seriously contaminated by mercury and chrome. A quantitative evaluation of microbial populations in mercury and chrome contaminated soil was examined by using plate count method. Bacterial numbers in polluted soil samples ranged from 7.4×10^5 to 9.3×10^7 cfu g⁻¹, about 10~100 fold less than the count for the unpolluted soil. Moulds were not detected in chrome polluted soil. The log values of actinomycetes of each contaminated soil samples were log ranged from 6.18 to 7.52. The ratio of actinomycetes was similar to unpolluted soil. The investigation showed actinomycetes to be the major microbial population inhabiting the mercury and chrome polluted soil.

Thirty-one isolates among the total isolates were examined for antibacterial activity. These isolates were identified based on a phylogenetic analysis using 16S rRNA gene nucleotide sequences, they were categorized in three major phylogenetic groups, belong to the *Streptomyces* (6 strains), *Saccharopolyspora* (3 strains), *Nocardiodes* (1 strain). On the phylogenetic tree, the clade consisting of five isolates were distantly related to all of the established *Streptomyces* genera, indicating the possibility as members of new species.

Key words : Actinomycetes, Chrome, Mercury, Micrflora phylogeng

서 론

토양은 인간, 동·식물, 미생물의 터전이며 인간에게

식량, 물, 휴식공간을 제공하는 귀중한 자원의 보고이다. 이러한 토양은 오염물질을 분해 또는 완충시키는 역할을 함으로써 환경오염원을 스스로 정화할 수 있는 기능이 있다(Goyer 1997). 그러나, 1970년대 이후 급진적인 산업발전에 따라 배출되는 오염물질은 토양의 허용한계 이상으로 축적되어 토양의 자정기능을 상실케 하였으며

* Corresponding author: Kyung-Sook Whang, Tel. 042-829-7593, Fax. 042-829-7590, E-mail. kswhang@mokwon.ac.kr

토양의 기능 및 구조를 파괴하고 있다 (Wade *et al.* 1993). 또한 대규모 공업단지의 확대와 농경지 및 과수 재배시 과도한 농약사용 등과 과다한 오염물질의 배출로 인하여 대기 및 토양환경의 오염이 심각한 문제로 대두되었다. 이와 관련하여 대기 및 토양오염에 따른 식생의 변화와 토양오염으로 유발된 토양 산성화가 산림 생태계에 미치는 영향 등이 조사되었다 (Klaassen 1980). 공업단지가 밀집된 지역의 토양중에는 중금속 농도가 중금속 오염 우려치보다 높게 나타나고 있으며, 심한 경우에는 100배가 넘는 곳도 존재한다. 중금속은 식물체 뿌리를 통해 쉽게 흡수되지만, 고농도로 토양내에 축적되면 식물생육에 커다란 영향을 끼치며, 먹이사슬 경로를 통해 인간과 가축에도 흡수된다 (Khanm *et al.* 1983; Baker *et al.* 1994)

중금속 오염토양에 대한 지금까지의 미생물학적 연구는 중금속으로 인한 토양오염 수준과 독성에 관한 연구 (조 등 1995; 김 등 2002)를 비롯하여, 미생물이 생물지화학 순환의 주요 구성원이고 생태계 내에서 유기물을 분해하는 역할을 맡고 있는 중요성 때문에 중금속에 대한 미생물의 다양한 적응 및 해독기작이 다수 보고된 바 있다 (Foster 1983; 박 등 1992). 이러한 중금속에 대한 미생물의 다양한 해독기작에 의하여 미생물들은 중금속에 대하여 내성을 지닐 수 있게 된다. 뿐만 아니라 대부분의 중금속 유입이 과도하기 때문에, 중금속 내성인자들은 conjugation 방법 등을 통하여, 서로 전이되고 재조합되어 중금속 내성인자를 동시에 지니고 있는 R-plasmid 형태로 자연 생태계에서 종종 출현되고 있다 (Rubens *et al.* 1979; Perry and Silver 1982; 이 등 1993). 최근 연구에서는 이러한 미생물을 이용한 오염지역의 생물학적 복원방법의 활용이 주목되고 있다. 본 연구는 중금속 오염이 예상되는 경상북도 내 293개 공업지역을 대상으로 토양 오염도를 분석하였으며, 이들 중금속 오염지역 중 수은과 6가크롬의 오염도가 심각하게 나타난 7개 지역을 대상으로 중금속 오염토양 내 미생물 군집의 생태학적 특성에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

1. 토양 시료의 채취 및 토양분석

공업지역이 밀집해 있는 경상북도 내 23개 시, 군 지역 중 중금속 오염이 예상되는 293개 지역을 대상으로 토양시료를 채취하였다. 토양시료는 토양 표면으로부터 15cm 이하에서 채취하고 골고루 혼합한 다음 4°C의 온

도에서 보관하였다.

분석항목은 중금속 6개 항목(카드뮴, 구리, 비소, 수은, 납, 6가 크롬)과 일반항목 2개(시안과, 유류) 및 pH이며, 중금속 항목은 원자흡광광도계를 이용하여 분석하였으며, 시안은 흡광광도법으로 그리고, 유류는 가스크로마토그래프법으로 분석하였다. (토양 측정망 오염도 조사. 환경부)

2. 세균수 측정

중금속 오염토양 시료중에 분포하는 세균수 측정을 위해 육즙영양배지 (Nutrient Broth : beef extract 10 g, peptone 10 g, NaCl 5 g, pH 7.0)를 사용하였고, 곰팡이 계수에는 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco)배지, 방선균 계수에는 방선균 선택배지인 SCA (Starch Casein Agar: MgSO₄ · 7H₂O 1.02 g, Starch 10 g, Casein 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, Cyclo-heximide 0.25g, pH 7.0) 배지를 이용하였다. 수은 내성 방선균 측정을 위해 HgCl₂ (Mercury standard solution, Showa co., Japan)를 방선균 선택배지인 SCA배지에 50 ppm과 100 ppm씩 각각 첨가하여 28°C에서 10일간 배양한 후 평판상에 형성된 집락수를 측정하였다 (유 등 1997).

3. 방선균 분리 및 길항력 검정

100 mL의 멸균수에 1g의 토양을 넣고 homogenizer (Nikon Seiki Co., Tokyo)를 이용하여 15,000 rpm에서 2분간 분산 처리하였다. 분산된 토양 현탁액을 순차적으로 희석한 상기의 방선균 선택배지를 사용하여 28°C에서 10일 이상 배양한 후 균총의 색과 현미경하에서 균사의 형태적 특성을 관찰한 후 방선균을 순수분리 하였다 (여 등 1996). 길항력 검정을 위하여 Gram 양성세균인 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)와 Gram 음성세균인 *Escherichia coli* (IAM 1026)를 검정균주로 이용하여 중층배지를 준비하고, 중금속 오염토양으로부터 순수 분리된 방선균을 각각 접종하여 검정균 중층배지 위에 형성된 생육저지대의 유무 및 환의 크기를 통하여 길항력을 판정하였다 (고 등 1991; 김 1996).

4. DNA의 추출 및 정제

Chromosomal DNA의 분리는 Gram 양성세균 또는 방선균 DNA추출법 (김 등 2002)을 변형하여 수행하였다. 각 균주를 50 mL의 starch-casein broth에 접종하고, 균체 집균을 위하여 28°C에서 160 rpm으로 4일 동안 진탕배양한 후 원심분리기 (high speed refrigerated centrifuge

22k, Hanil., Co, Korea)를 이용하여 8,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하였다. 균체에 500 μ L의 Saline-EDTA buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0)를 넣어 washing한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 200 μ L의 extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0)를 첨가하여 잘 현탁 시킨 후 산화 알미늄을 소량 첨가하고 mixer (Motor cordless, Kontes., Co, USA)를 사용하여 2분간 갈아주었다. 50 μ L의 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가한 후 60°C에서 5~10분간 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 200 μ L의 phenol B를 첨가한 후 원심분리 하였다. 상층액에 50 μ L chloroform을 넣어 2회 원심분리 했다. 최종적으로 얻은 상층액에 800 μ L 냉동보존된 99% ethanol을 첨가한 후 -20°C에서 한시간 이상 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리한 다음 진공 건조 (Micro Vac MV-100, TOMMY)하였다. 최종적으로 50 μ L의 멸균 증류수를 첨가하여 DNA를 추출하고 전기영동 (Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)으로 확인하였다.

5. 16S rDNA의 PCR 증폭

16S rDNA를 증폭하기 위해서 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 27F (5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGG-AGGTGATCCAGCCGCA-3') primer를 이용하였다 (Horada 1978; Klaassen 1980). 16S rDNA 증합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 위하여 추출된 DNA 1 μ L (50~100 ng)에 27F primer, 1 μ L; 1492R primer, 1 μ L; Ex Taq polymerase, 0.25 μ L; dNTP, 4 μ L; 10X buffer, 5 μ L; H₂O, 37.75 μ L를 0.2 mL PCR 반응 tube에 넣고 잘 혼합한 후 다음 조건에 따라 PCR (GeneAmp^R PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응을 실시하였다. 94°C, 6분간 반응한 다음 94°C, denaturation 1분, 55°C, annealing 1분, 72°C, extension 2분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension을 실시하였다. 16S rDNA를 확인하기 위해서 PCR 증폭산물은 1%의 agarose gel (1 \times TAE buffer; 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 1 \times TAE buffer에서 100 V, 25 mA로 30분간 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 20분간 염색하여 UV (Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 확인하고, PCR 정제 kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 16S rDNA는 분광광도계 (Spectrophotometer, UVIKON 930)를 이용하여 농도를 확인하였다.

6. 16S rDNA 염기서열 분석

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 5 μ L, 3.2 μ M 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer 1 μ L, 16S rDNA sample 1 μ L (90 ng)에 총량이 20 μ L가 되도록 멸균된 3차 증류수를 sequencing PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 다음 조건에 따라 cycle sequencing 반응을 실시하였다. 96°C에서 30초, 43°C에서 30초 그리고 60°C 4분으로 25회 반복하였다. PCR 산물에 냉동 보존된 100% ethanol 50 μ L와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 μ L를 첨가한 후 15,000 rpm에서 25분간 침전시켰다. 250 μ L의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 TSR (template suppression reagent) 20 μ L를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation한 후 얼음위에서 냉각시켰다.

ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 결정된 16S rDNA (500~580 bp) 염기서열의 homology는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다. 계통도의 작성은 각 염기서열의 alignment는 Clustal X algorithm를 이용하여 병렬로 정렬하였고 (Thomson *et al.* 1994), 근린 결합법에 의거 (Saitou *et al.* 1987) 계통도를 작성 하였다.

결과 및 고찰

1. 토양 중금속 오염

액상 및 고형 폐기물에 의해 중금속오염이 예상되는 경상북도 293개 공업지역을 대상으로 카드뮴, 구리, 비소, 수은, 납, 6가크롬, 시안 등 7종류의 중금속 함량과 오일 오염도를 측정된 결과 공장밀집지역 및 금속광산지역의 중금속 농도가 다른 지역에 비해 비교적 높게 나타났다 (Table 1).

본 연구에서는 중금속 오염이 높게 검출된 여러지역 중 7개 지역의 공장 및 금속광산 지역으로부터 토양시료를 채취하여 상기의 중금속 오염도와 pH를 분석하였다 (Table 2). 7개 지역은 토양 분석 결과 토양오염우려기준 (2004. 환경부)과 비교하여 수은과 6가크롬의 함량이 비교적 높게 검출되었으며, 특히 4개 지역 (MK-20, MK-13, ML-5, MM-4)의 토양에서는 수은의 함량이 타 지역에 비해 매우 높게 검출되었고, 3개 지역 (MP-12, MF-142, MY-4)의 토양에서는 다른 지역에서 검출되지 않은 6가크롬이 0.05~0.1 ppm 검출되었다.

Table 1. Physicochemical analysis of soil samples from Gyeongsangbuk-do area

(Unit: mg/kg)

Source	Investigation item	pH	Cd	Cu	As	Hg	Pb	Cr ⁶⁺	CN	Oil	Number of area	
Liquidthe water	Imbrued the rivers	Low	4.4	0.000	0.480	0.000	0.0000	1.05	0.00	0.00	-	30
		High	8.3	0.470	11.280	0.400	0.0395	10.00	0.00	0.06	-	
		Average	6.0	0.133	3.873	0.075	0.0128	3.98	0.00	0.00	-	
	Factory and industry	Low	3.8	0.000	0.130	0.000	0.0000	0.80	0.00	0.00	0.0000	153
		High	9.7	0.840	44.225	0.388	0.0543	60.00	0.15	0.29	56.6150	
		Average	6.5	0.152	4.028	0.050	0.0098	5.33	0.00	0.01	3.7422	
	Used of special water	Low	5.3	0.065	2.360	0.036	0.0057	0.65	0.00	0.00	-	6
		High	7.1	0.370	42.955	0.238	0.1441	12.90	0.05	0.00	-	
		Average	6.6	0.166	10.968	0.131	0.0376	5.58	0.02	0.00	-	
Solid waste	General waste reclamation erasure	Low	4.2	0.000	0.200	0.000	0.0000	0.60	0.00	0.00	0.000	82
		High	7.4	1.730	70.250	0.308	0.0574	30.50	0.10	0.06	20.383	
		Average	5.9	0.125	3.512	0.039	0.0133	3.88	0.00	0.00	1.547	
	Designation waste reclamation erasure	Low	7.5	0.045	2.535	0.000	0.0000	2.60	0.00	0.00	0.2	1
		High	7.5	0.045	2.535	0.000	0.0000	2.60	0.00	0.00	0.2	
		Average	7.5	0.045	2.535	0.000	0.0000	2.60	0.00	0.00	0.2	
	Metal mining	Low	4.1	0.000	0.835	0.000	0.0000	1.25	0.00	0.00	-	21
		High	6.8	0.635	73.300	1.050	0.6510	89.00	0.05	0.13	-	
		Average	5.2	0.238	9.523	0.255	0.0653	14.53	0.00	0.03	-	
Total											293	

Table 2. Heavy metal concentration of soil collected from pollut ed factory and industry area

Soil sample	Source (region)	Heavy metal (ppm)								pH
		Cd	Cu	As	Hg	Pb	Cr ⁶⁺	CN		
MK-20	Metal mine	0.64	8.5	0.6	0.65	21.6	0	0	4.4	
MK-13	Metal mine	0.21	7.16	0.25	0.29	10.25	0	0.1	4.5	
ML-5	Special water	0.37	4.21	0.09	4.21	0.65	0	0	7.1	
MM-4	Metal refinery	0.11	2.94	0	0.13	4.2	0	0	7.5	
MP-12	Reclamation and incinerating facility	0.17	4.58	0.04	0.01	3.95	0.1	0	7	
MF-142	Factory and industry	0.1	0.77	0.08	0.01	2.6	0.1	0	8.2	
MY-4	Scrap iron drippings	0.16	13.28	0.32	0	19.1	0.05	0	7.8	

2. 수은 및 6가크롬 오염토양 내 미생물 flora의 특성

본 연구에서는 수은과 6가크롬 오염이 심각한 7개 지역의 토양을 중심으로 이들 중금속 오염토양에 분포하는 미생물 flora특성을 검토하였다. 중금속 오염토양 중에 분포하는 미생물 flora의 정량적 평가를 위하여 대조구 토양으로 산업 활동이 전무한 독도토양의 지화학적 특성에 관한 보고(김 등 1986; 김 2000) 의하면 상기의 중금속 물질이 매우 낮은 농도로 검출되었다.

독도로부터 채취한 토양내 세균수는 1.1×10^8 cfu g⁻¹ 이 측정되었고, 수은 오염토양 중에는 $1.0 \sim 9.4 \times 10^7$ cfu g⁻¹, 6가크롬 오염토양 중에는 $7.4 \times 10^5 \sim 9.4 \times 10^6$ cfu g⁻¹ 이 측정되어 대조구 토양에 비해 10~100배 이상 낮은 세균밀도를 나타내었다.

수은 오염토양 내 곰팡이수는 $1.0 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^5$ cfu

g⁻¹으로 대조구 토양에 비해 10~100배 이상 낮은 밀도를 나타내었고, 6가크롬 오염토양의 경우 곰팡이는 거의 검출되지 않았다. 이와 같은 결과로부터 6가크롬 오염토양 중 6가크롬에 대해 내성을 갖는 곰팡이가 매우 적게 분포해 있다고 판단되었다.

한편, 방선균수는 수은 오염토양의 경우 $6.7 \times 10^5 \sim 7.5 \times 10^7$ cfu g⁻¹이 측정되어 대조구 토양내 방선균수와 비슷한 분포율을 나타내었으며, 6가크롬 오염토양 내 방선균수는 $4.8 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ cfu g⁻¹이 측정되었다(Fig. 1). 이와 같은 결과로부터 수은 및 6가크롬 오염토양 내 방선균 밀도가 다른 미생물 개체군에 비해 높은 분포율을 나타내어 수은에 대한 내성을 갖는 방선균이 오염토양 중에 다수 분포해 있음으로 추정되었다.

수은 오염이 심한 2개 지역(MK-20, MM-4)에서 채취한 토양 시료에 대해 수은 내성을 나타내는 방선균 수

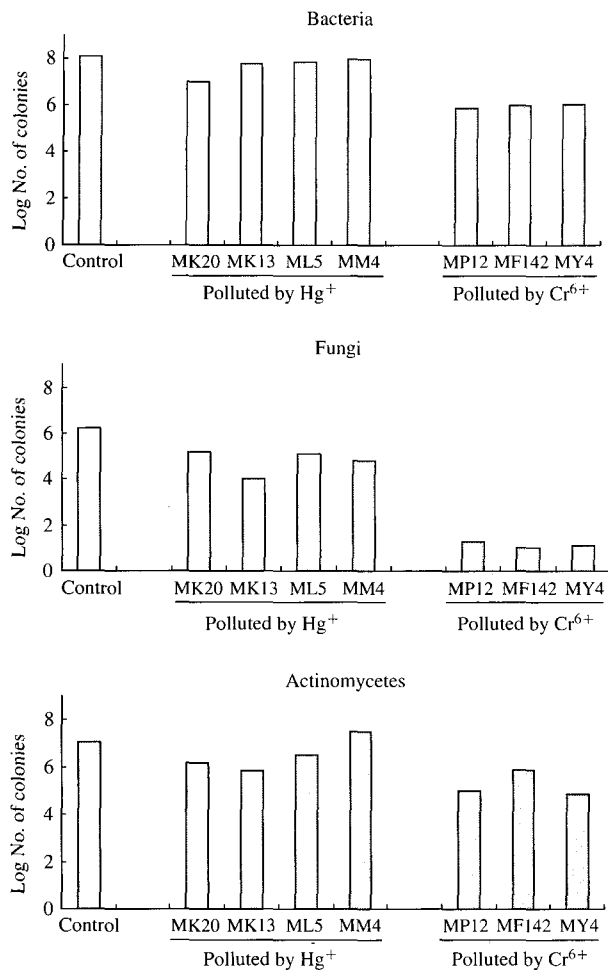


Fig. 1. Comparison of the number of microflora. The samples were collected from mercury and chrome polluted soil at Gyeong-sangbuk-do.

를 측정할 결과 HgCl₂ 50 ppm을 첨가한 배지에서의 미생물 수는 1.5 × 10³ ~ 1.7 × 10⁶ cfu g⁻¹ 이었고, 100 ppm 농도의 HgCl₂를 첨가한 배지에서는 1.8 × 10³ ~ 6.5 × 10⁴ cfu g⁻¹ 이 측정되어, 대조구 토양보다 100배 이상 높게 분포해 있음이 확인되었다 (Fig. 2).

3. 중금속 오염토양으로부터 방선균의 분리

수은 및 6가크롬 오염토양 중 다른 미생물 개체군에 비해 비교적 높은 분포율을 나타낸 방선균의 특성을 검토하였다. 방선균 선택배지(SCA)를 사용하여 수은 오염토양으로부터 방선균 50균주, 6가크롬 오염토양으로부터 100균주를 각각 분리하여 검정균주 *Escherichia coli* 와 *Staphylococcus aureus*에 대한 길항력을 조사하였다. 그 결과, *S. aureus*에 길항력을 가지는 나타내는 수은오염토양에서 5균주, 6가크롬 오염토양에서 11균주가 선발

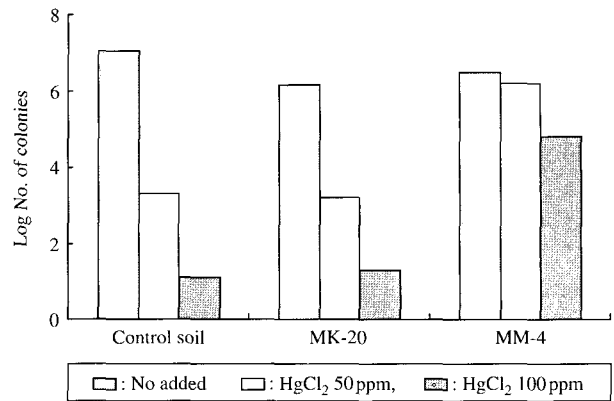


Fig. 2. Comparison of the number of actinomycetes on HgCl₂ added to the SCA medium.

Table 3. Number of antibacterial isolates collected from heavy metal polluted soils.

Sample	Total isolate	Test bacteria	
		<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>E. coli</i> (IAM 1026)
Polluted by Hg ⁺	50	5	6
Polluted by Cr ⁶⁺	100	11	15

되었으며, *E. coli*에 길항력을 갖는 균주는 수은 오염토양에서 6균주, 6가크롬 오염토양에서 15균주가 선발되었다. 그리고 Gram양성 및 음성의 검정균주 모두에서 길항력을 나타낸 균주는 6균주이었다 (Table 3).

4. 수은 및 6가크롬 오염토양으로부터 분리된 방선균의 계통학적 특성

수은 및 6가크롬 오염토양으로부터 분리된 길항력이 있는 방선균의 계통학적 특성을 밝히기 위해 대표균주 10균주의 16S rDNA 부분염기서열 (약 650 bp)을 결정하여 계통학적 위치를 검토하였다. 16S rDNA 염기서열 결과를 DDBJ/NCBI/Genbank의 database와 상동성 검색을 수행한 결과, 분리된 방선균들은 3개의 계통군으로 분류되었다. 방선균목 중 *Streptomyces* 속에 가까운 유연관계를 가진 6균주가 가장 큰 계통군을 이루었으며 이들 균주는 대부분이 *Streptomyces venezuelae*와 97%의 상동성이 확인되었다. *Saccharopolyspora* 속에 가까운 유연관계를 나타낸 3균주는 *Saccharopolyspora spinosa*, *Saccharopolyspora gregorii*와 95~96%의 상동성이 확인되었다. 그리고 *Nocardioides* 속에 가까운 유연관계를 가진 1균주는 *Nocardioides fulvus*와 97%의 상동성이 확인되었다. 이 중 *Streptomyces* 속에 위치하는 분리균주는 기존의 균들과는 독립적으로 위치하는 것으로 확인되었다

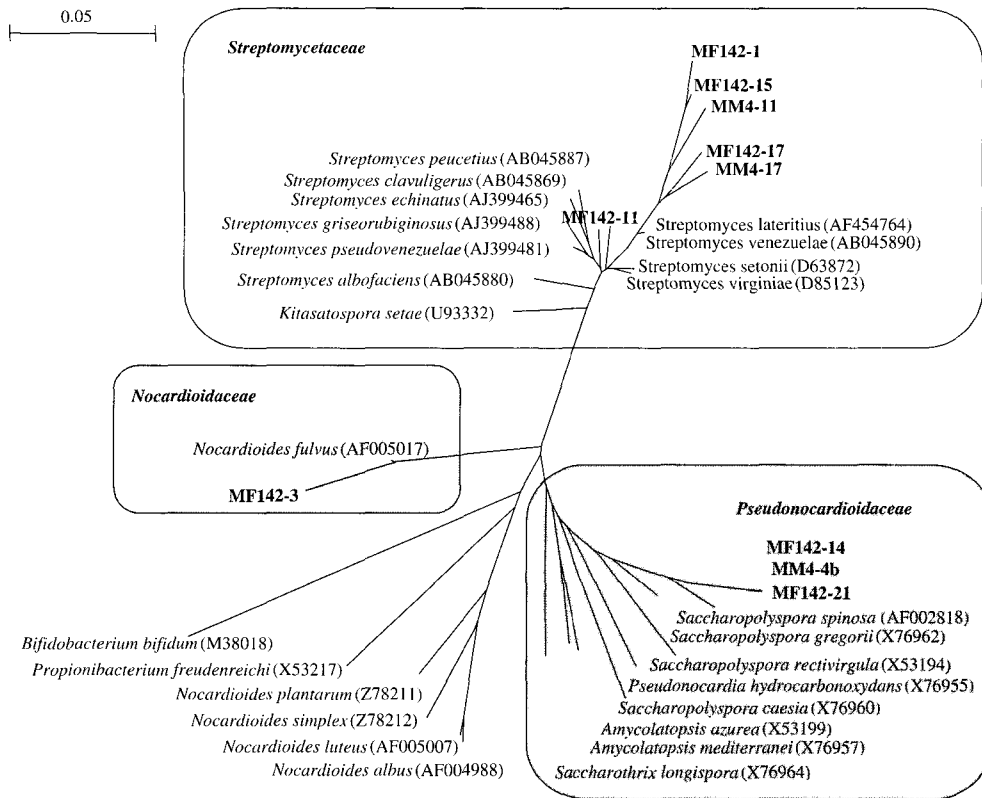


Fig. 3. Phylogenetic relationship within the actinomycetes collected from mercury and chrome polluted. The isolates were found to fall with in three major phylogenetic group; suborder Streptomycetaceae (6 strains); suborder Nocardioidaceae (onestrain) and suborder Pseudonocardioideae (3 strains). Scale bar is 5 nucleotide substitution in 100 bases.

(Fig. 3).

이상의 결과로부터 수은 및 6가크롬 중금속 오염토양 내 미생물 군집의 정량적 평가 결과 방선균군이 가장 높은 분포율을 나타내었으며, 수은과 6가크롬에 내성을 갖고 항균 활성이 강한 방선균이 다수 분리되었다. 토양 내 방선균 군집은 항생제, 항암제와 같은 다양한 종류의 생리활성물질의 생합성 능력과 더불어 (Hopwood *et al.* 1985; Hopwood 1988; McDaniel *et al.* 1993; Champaness *et al.* 1994; Vogtli M *et al.* 1994), 자연계에 존재하는 난분해성 화합물을 포함한 다양한 구조의 유해 독성물질의 분해능이 탁월하여 오래 전부터 생태학 및 환경학적 관점에서 매우 유용한 환경미생물로 보고되어 왔다 (Antai *et al.* 1982; Crawford 1988; Ramachandra *et al.* 1988; Crawford *et al.* 1993; Yee *et al.* 1997). 일부 토양미생물생태학자는 미생물군집의 분포에 따라 토양을 크게 4가지 유형으로 나누고 있다. 즉, 효모와 유산균이 우점을 이루는 발효형토양, 광합성세균이 우점을 이루는 합성형토양, 곰팡이 또는 병원성세균이 우점을 이루는 부패형토양 그리고 방선균이 우점을 이루는 정균형토양으

로 분류하고 있다 (Higa 1991). 본 연구결과에서 중금속 오염이 심각한 토양 중 정균활동을 하는 방선균 군집의 분포가 높게 나타나고, 이들 중금속에 내성을 갖는 세균군이 높게 나타나는 것은 토양 내 이들 방선균에 의해 점진적으로 중금속 물질이 정화되어가고 있으리라 판단된다.

본 연구에서 분리된 방선균 균주들은 모두 색소를 가지고 있었으며 기균사를 형성하였다. 이 균주들은 강한 항균 활성과 고농도의 수은에 내성을 나타내었으며, 16S rDNA 염기서열 분석결과 MF142-1, MF142-11, MF142-15, MF142-17, MM4-11 그리고 MM4-17균주는 기지의 *Streptomyces* 참고균주들과 97%의 상동성이 확인되었다. 특히 Strain MM4-11과 Strain MM4-17 균주는 고농도의 수은에 내성을 나타내며 강한 항균활성능을 갖는 균주로 보다 세밀한 세균학적 정보에 관한 검토를 수행할 계획이다. 이들 균주의 특성이 밝혀진다면 중금속 오염이 극심한 공장 및 공업지역의 토양 환경 복원에 활용될 수 있는 균주개발이 이루어 질 수 있을 것으로 기대한다.

적 요

경상북도내의 금속광산, 공장 및 공업지역의 토양의 오염도를 조사하고 중금속 오염토양 중에 분포하는 미생물 flora의 정량적 평가를 위하여 청정지역인 독도토양과 비교한 결과, 일반세균의 경우 10~100배 낮은 분포율을 나타내었으며, 6가크롬 오염토양 중 곰팡이는 거의 검출되지 않았다. 방선균은 수은 오염토양의 경우 $6.7 \times 10^5 \sim 7.5 \times 10^7$ cfu g⁻¹, 6가크롬 오염토양 내 방선균 수는 $4.8 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ cfu g⁻¹이 측정되어 대조구 토양 내 방선균 분포와 비슷한 높은 분포율을 나타내었다. 수은 오염토양 시료를 HgCl₂ 50 ppm과 100 ppm을 각각 첨가한 배지에 접종하여 방선균수를 측정 한 결과 대조구 토양에 비해 10배 이상의 높은 수를 확인하였다. 수은 및 6가크롬의 오염토양으로부터 분리된 방선균 150 균주에 대해 항균력을 검토한 결과 31균주가 양성반응을 나타내었다. 이들 방선균 중 강한 항균활성을 나타낸 10균주를 선발하여 계통학적 특성을 검토한 결과 *Streptomyces* 속, *Saccharopolyspora* 속, 그리고 *Nocardioidea* 속에 속하는 3개의 계통군으로 분류되었다. 이들 분리균주중에는 기지 미생물종과 97% 이하의 낮은 상동성을 나타내는 신규미생물도 다수 포함되어 있었다.

이상의 결과로부터, 본 연구에서 조사된 수은 및 6가크롬 오염토양내 중금속 내성 및 항균활성을 갖는 방선균이 높게 분포해 있음이 확인되어, 난분해성 화합물을 포함한 다양한 구조의 유해 독성물질의 정균작용으로 인한 중금속 오염토양 내 환경의 복원이 효율적으로 이루어 질 수 있을 것으로 기대되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

고영희, 민태익, 오태광, 윤병대, 이강혁, 김성숙. 1991. 생체활성물질 탐색을 위한 미생물의 분리에 관한 연구 (I). 과학기술처 연구보고서. BSG70110-295-3.
 김규한. 2000. 독도 알칼리 화산암류의 K-Ar 연대와 Nd-Sr 조성. 지질학회지. 36:313-324
 김소연, 박동진, 권오성, 임채영, 김판경, 이상화, 김창진. 1996. 국내 분리 방선균의 항균활성 특성. 한국미생물

생명공학회지. 24:166-172.
 金允圭, 吉田武義, 李大聲, 青木廉一郎. 1986. 獨島火山噴出物 地球化學的研究核心理研究報告. 19:353-48.
 김현아, 배범한, 장윤정, 이인숙. 2002. 철광산 및 식물의 중금속 제거에 관한 연구. 한국생태학회지. 25:7-14.
 박영식, 이기성, 한갑진. 1992. 금강 수역 내 미생물군집의 유기물 분해능과 자정. 한국육수학회지. 25:151-166.
 여운형, 윤봉식, 황경숙, 이정옥, 유승현. 1996. *Micromonospora* sp. SA-246 균주가 생산하는 Isochromanequinone계 항생물질. 한국미생물생명공학회지. 24:321-326.
 유경만, 전희근, 박준봉, 이인수, 박진숙, 하남주, 박용근. 1997. 대전 지역의 공단 폐수에서 분리한 수은과 카드뮴 내성 세균의 분리 및 특성 한국환경과학회지. 6:249-258.
 이기성, 고동규, 최원창, 오태엽, 박영식, 최청일, 최영길. 1993. 금강수역내 항생제 및 중금속내성균의 분포 및 동시내성빈도 환경생물. 11:131-144.
 조도순, 김준호. 1995. 수중 초본 식물의 중금속 내성에 관한 연구. 한국생태학회지 18:147-156.
 Antai SP and D Crawford. 1982. Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. Can. J. Microbiol. 29:142-143.
 Baker AJ, RD Reeves and ASM Hajar. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British population of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J & C. Presel (Brassicaceae). New Phytol. 129:61-68.
 Bakir F, SF Damlujis, L Amin-Raki and M Murtadha. 1973. Methyl mercury poisoning in Iraq. Science 181:230-241.
 Champaness WC and KF Chater. 1994. Regulation and integration of antibiotic production and differentiation in *Streptomyces* spp., pp.61-93. In P. Piggot, C.P. Moran, and P. Youngman (eds.), Regulation of bacterial differentiation, American Society for Microbiology, U.S.A.
 Crawford D. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic press. London.
 Crawford D, J Doyle, Z Wang, C Hendricks, S Bentjen, H Bolton, J Fredrickson and B Bleakley. 1993. Effects of a lignin peroxidase-expressing recombinant *Streptomyces lividans* TK23.1, on biogeochemical cycling and the numbers and activities of microorganisms in soil. Appl. Environ. Microbiol. 59:508-518.
 Foster TJ. 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiology 30:772-779.
 Goyer RA. 1997. Toxic and essential metal interaction. Annu. Rev. Nutr. 17:37-50.
 Higa T. 1991. 미생물 농업이용과 환경보전. pp. 60-70.
 Hopwood DA. 1988. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B235: 121-138.

- Hopwood DA, MJ Bibb, KF Chater, R Kisser, DJ Bruton, HM Kisser, DJ Lydiate, CP Smith, JM Ward and H Schrempf. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, John Innes Foundation. UK.
- Horada M. 1978. Methyl mercury poisoning due to environmental cotamination (Minamata disease). pp. 261. In Toxicity of heavy metals in the environmental. Marcel Dekker. USA
- Khanm S and NN Khan. 1983. Influence of lead and cadmium on the growth and nutrient concentration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and egg-plant (*Solanum melongena*). Plant Soil. 74:387-394.
- Klaassen CD. 1980. Heavy metals and heavy metal antagonists. pp. 1615-1637 Macimilian Publishing Co. Inc. United Kingdom
- McDaniel R, S Ebert-Khosla, DA Hopwood and C Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides. Science 262:1546-4550.
- Perry, RD and S Silver. 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. J. Bacteriol. 150:973-97.
- Ramachandra M, D Crawford and G Hertel. 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces*. Biodegradation 7:129-136.
- Rubens CE, WF McNeill and WE Farrar 1979. Transfoable plasmid deoxyribonucleic acid sequence in *Pseudomonas aeruginosa* with mediates resistance to Gentamicin and four other antimicrobial agents. J. Bacteriol. 139(3):877-882.
- Saitou N and M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Thomson JD, DG Higgins and TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:19-37.
- Vogtli M, PC Chang, SN Cohen. 1994. afsR2: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Mol. Microbiol. 14:643-653.
- Wade MJ, BK Davis, JS Darlisle, AK Klein and LM Valoppi. 1993. Environmental transformation of toxin metals. Occup. Med. 8:574-601.
- Yee DC and TK Wood. 1997. 2,4-dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase. Biotechnol. Prog. 13:53-59.

Manuscript Received: June 29, 2005

Revision Accepted: September 21, 2005

Responsible Editorial Member: Seung Bum Kim
(Chungnam Univ.)