

대나무 산림토양으로부터 수집한 *Streptomyces* 속 방선균의 계통학적 다양성

이효진¹ · 황경숙^{1,2*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²목원대학교 미생물생태자원연구소

Biodiversity and Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* Collected from Bamboo Forest Soil

Hyo-Jin Lee¹ and Kyung-Sook Whang^{1,2*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

²Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received August 5, 2010/Accepted September 17, 2010)

To investigate a quantitative evaluation of the actinobacteria, we have collected samples from various kinds of bamboo forest soil. Each different layers contained 2.7×10^6 - 2.7×10^8 CFU/g of actinobacteria which was the highest in litter layers of *Sasa borealis* forest soil. We obtained 330 actinobacteria from different layers of bamboo forest soil; litter (100 strains), humus (70 strains), and rhizosphere soil (160 strains). Based on the colony morphology (aerial mycelium, substrate mycelium, and soluble pigment), isolates were divided into thirty-six groups and we selected 50 representative isolates. 16S rRNA gene sequence analysis showed *Streptomyces* was major actinobacteria (94%) and they were categorized as cluster I (2 strains), II (35 strains), III (6 strains), and IV (7 strains), respectively. The diversity index of 50 *Streptomyces* collected from the bamboo forest soil was calculated with the Shannon-Wiener method. Bamboo litter showed higher diversity index level of 3.33 than that of humus and rhizosphere soil. Also, antibiotic activities of our isolates were investigated against *Botrytis cinerea*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, and *Bacillus cereus* and found in 74, 16, 25, and 24 strains, respectively.

Keywords: bamboo forest soil, biodiversity, phylogeny, *Streptomyces*

방선균은 토양, 하천, 바다, 근권, 부엽토, 동물의 내장, 퇴비, 혈관, 대기, 생활하수, 폐수 등 거의 모든 자연환경에 분포하고 있다(26). 이들 다양한 자연환경 시료를 대상으로 방선균 다양성을 조사한 결과, *Streptomyces* 속이 69.4%로 가장 많이 존재하며, *Micromonospora* 속 11.4%, *Nocardia* 속 6.1%, *Streptosporangium* 속 2% 그리고 *Actinomadura*, *Nocardopsis*, *Microbispora* 속 등이 각각 0.9%씩 분포한다고 보고되었다(16). 현재 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>)와 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)에 등록된 *Actinomycetales* 목에는 46과 256속 1924종의 표준균주가 보고되고 있다. *Actinomycetales* 목에 속하는 46과 중 가장 큰 계통군으로 알려진 *Streptomycetaceae* 과에는 10속 615종으로 분류되고 있으며, 특히 자연환경 중에 가장 많이 분

포하는 것으로 알려진 *Streptomyces* 속에는 574종 38아종이 보고되고 있다.

우리 나라의 경우, 국내 자연환경으로부터 분리·동정된 *Streptomyces* 속의 표준균주는 총 12종으로 한국농업미생물자원센터(KACC)에 8종, 토양으로부터 분리된 *S. koyangensis* KACC 20561^T (17), 감자 더듬이병 발생지역으로부터 분리된 *S. luridiscabiei* KACC 20252^T, *S. niveiscabiei* KACC 20254^T, *S. puniscabiei* KACC 20253^T (20), 4-phenyl-3-butenic acid 생성균주 *S. thermoalcalitolerans* KACC 20184^T (8), 토양으로부터 분리된 호열성 방선균 *S. thermocarboxydovorans* KACC 21022^T, *S. thermocarboxydus* KACC 21021^T (11), cellulase-free endo-xylanase 물질을 생산하는 *S. thermocrophilus* KACC 20183^T (7)이 등록되었으며, Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에 4종 ; 식물병원성 곰팡이 (*Alternaria mali*, *Colletotrichum orbiculare*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rhizoctonia*

* For correspondence. E-mail: kswang@mokwon.ac.kr; Tel: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

solani, and *Phytophthora capsici*)에 대한 항균활성 물질을 생산하는 *S. cheonanensis* KCTC 9786^T (9), 토양으로부터 분리된 *S. seoulensis* KCTC 9819^T (4), 토양으로부터 분리된 호열성 방선균 *S. thermospinosporus* KCTC 9909^T (10), 토양으로부터 분리된 호산성 방선균 *S. yeochonensis* KCTC 9926^T (12)이 등록되어 있다.

미생물을 이용한 생명소재 산업은 21세기 바이오산업의 근간이다. 방선균은 유전적 다양성과 함께 기능적 다양성을 지니고 있기 때문에 고부가가치 자연자원으로 경제적 잠재가치를 가진 것으로 인정되고 있다. 방선균은 항생물질을 포함한 생리활성물질을 생산하는 균주로 주목 받아 오면서 지금까지 알려진 약 10,000여 종의 항생물질 중 75% 이상이 방선균에 의해 분리되었으며, 생리활성물질은 약 64%가 방선균류, 곰팡이류 25.6%, 기타 미생물로부터 분리되었다. 이와 같이 항생물질 및 생리활성물질 등 다양한 종류의 천연유기화합물을 생산하는 방선균은 미생물 유전자원의 보고로서 신물질의 탐색 및 생합성기작에 대해 깊이 연구되어 왔다(3, 6). 이들 방선균은 생리생화학적으로 매우 다양한 미생물로 의약품, 농약, 건강보조식품 및 식품소재, 성장조절제, 살충제, 제초제 등 다양한 분야에 이용되어 신물질을 탐색하기 위한 미생물 유전자원 소재연구 탐색을 위한 연구가 다양한 환경을 대상으로 활발히 진행되고 있다(1, 2, 18, 19).

본 연구에서는 국내에 자생하는 왕대, 분죽, 조릿대, 호미죽과 같은 주요 대나무종 산림토양의 낙엽층, 부식층 그리고 근권토양 내 분포하는 방선균 밀도를 조사하고 방선균을 수집하였으며, 각 대나무림 토양으로부터 분리된 대표 방선균의 계통학적 다양성을 조사하여 바이오 소재산업에 활용 가능한 유전자원 다양성 확보를 위한 기반연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시료 채취

전라남도 담양 죽녹원 내에 자생하고 있는 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 분죽(*Phyllostachys nigro* var. *henonis*), 조릿대(*Sasa boreali*), 호미죽(*Phyllostachys nigra* f. *punctata*) 대나무림의 낙엽층, 부식층, 표층으로부터 약 15 cm 아래의 근권으로부터 토양시료를 채취하였다. 채취한 토양시료는 polyethylene vinyl에 넣어 4°C에 보존한 후 24시간 이내에 실험하였다(31).

방선균 계수 및 분리

낙엽시료 및 토양시료를 1 g씩 정량하여 9 ml의 멸균수에 넣고 초음파기(Sonics VCX750, Vibra cell, USA)로 30 W에서 2분간 분산시킨 다음 9 ml의 멸균수에 순차적으로 희석하였다. 희석된 시료 100 µl를 방선균 선택배지인 SCA (Starch, 10 g; Casein, 1 g; MgSO₄·7H₂O, 1.02 g; K₂HPO₄, 0.5 g; Agar, 1.5%; cycloheximide, 0.25 g, pH 5.5) 평판배지에 분주하여 고르게 도말하였다. 28°C에서 10일간 배양하면서 평판배지 상에 형성된 방선균 콜로니를 계수하고 순수분리하였다

(13). 분리된 방선균은 20% glycerol에 현탁한 후 -86°C의 deep freezer (SANYO co., Japan)에 넣어 보존하였다(31).

방선균 계통해석

순수 배양된 방선균 단일 colony를 주형으로 직접 PCR 증폭을 하였다. *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 사용하였다. PCR은 27 Forward primer, 1 µl; 1492 Reverse primer, 1 µl; EF-Taq polymerase (Solgent co., Korea), 0.25 µl; dNTP, 1 µl; 10× buffer, 5 µl; band doctor, 5 µl; H₂O, 36.75 µl를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후, initial denaturation 94°C, 2 min; denaturation 94°C, 30 sec; annealing 54-56°C, 40 sec; extension 72°C, 1 min 동안 30 cycle을 반복하고, 72°C에서 5 min간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAMPR PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응을 실시하였다.

16S rRNA 유전자 PCR 증폭산물은 1% agarose gel, 0.5× TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100V, 25 mA로 30분 동안 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad, USA)한 후, ethidium bromide (EtBr)로 15분간 염색하여 UV 하에서 증폭여부를 확인하고, QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 16S rRNA 유전자 PCR 증폭 산물은 27 Forward primer와 1492 Reverse primer를 각각 사용하여 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems)로 cycle sequencing을 수행한 후, ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 약 700 bp 이상 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)에 등록하였고(accession no. FJ547383-FJ547387, GQ287639, HM748597, HM748598, HQ267972-HQ268013), NCBI/RDP/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. CLUSTAL X program (29)으로 Multiple Sequence Alignment한 후, MEGA 4.0을 사용하여 Phylogenetic consensus tree를 작성하였다(27). 각 시료 내 세균군집의 다양도 지수(Diversity Index)는 Margalef의 정보이론에 의해 유도된 Shannon-Wiener function (H')의 공식을 이용하여 산출하였고(24), 균등도 지수(Evenness Index)는 Pielou에 의해 제안된 지수를 적용하여 계산하였다(6).

항균활성능

수집된 방선균의 항균활성능을 검토하기 위하여 국내 대표적인 식물병원성곰팡이로 딸기잰빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea* KACC 40963)과 세균성혹마병원균(*Xanthomonas campestris* KACC 10913), 고추세균성점무늬병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* KACC 12872) 및 식중독균(*Bacillus cereus* KACC 11240)을 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양 받아 검정균주로 사용하였다. *Botrytis cinerea* 곰팡이에 대한

Table 1. Some characteristics of Bamboo and *Quercus* forest soil

Sample	pH	Water content (%)	Log No. of actinobacteria (CFU/g)	Isolation of actinobacteria
Bamboo Litter				
<i>Phyllostachys nigro var. henonis</i>	6.4	62.0	6.4	20
<i>Sasa boreali</i>	6.4	37.3	8.7	50
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	6.6	59.9	6.6	30
Bamboo Humus soil				
<i>Phyllostachys nigro var. henonis</i>	5.0	19.5	7.0	30
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	5.1	22.4	7.0	40
Bamboo Rhizosphere soil				
<i>Phyllostachys nigro var. henonis</i>	5.1	23.0	7.2	50
<i>Phyllostachys nigra f. punctata</i>	5.8	15.6	7.7	30
<i>Sasa boreali</i>	6.4	16.0	6.4	50
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	4.8	48.6	7.0	30
<i>Quercus</i> forest soil				
Litter layer	5.3	23.8	5.3	
Humus layer	5.6	48.2	6.2	
Rhizosphere soil	5.2	38.7	6.5	
Total				330

항균활성 검정은 *in vitro* 항균활성 확인법에 따라 PDA 배지에 검정균주를 각각 접종한 후 분리된 방선균 균주를 대치배양하여 균체 주위에 형성된 생육저지대(growth inhibitor clear zone)의 크기에 따라 항균활성 수준을 결정하였다. *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 및 *Bacillus cereus*의 세균에 대한 항균활성 시험은 paper disc 법에 따라 생육저지영역의 직경을 측정하였다(30).

결과 및 고찰

다양한 대나무 산림토양으로부터 방선균 수집

국내 자생하는 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 분죽(*Phyllostachys nigro var. henonis*), 조릿대(*Sasa boreali*), 호마죽(*Phyllostachys nigra f. punctata*) 대나무림의 낙엽층, 부식층, 근권토양으로부터 채취한 시료의 pH, 수분함량 및 방선균 밀도 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. 대나무 산림토양 낙엽층 pH는 6.4-6.6을 나타내었으며, 부식층은 약 pH 5.0, 근권토양은 pH 4.8-6.4를 나타내어 낙엽층에 비해 비교적 낮은 pH를 나타내었다. 각 층위별 방선균 밀도를 조사한 결과 2.7×10^6 - 2.7×10^8 CFU/g로 상수리림 토양(2.2×10^5 - 3.2×10^6 CFU/g)에 비해 10-100배 이상 높은 계수치를 나타내었으며, 특히 조릿대 낙엽층 내에는 2.7×10^8 CFU/g의 높은 밀도로 계수되었다. 본 연구에서는 이들 다양한 종류의 대나무림 낙엽층으로부터 100균주, 부식층으로부터 70균주, 근권토양으로부터 160균주 총 330균주의 방선균을 수집하였다.

대나무 산림토양으로부터 수집된 방선균의 형태분류

국제미생물방선균위원회(I.S.P; International Streptomyces

Project)는 방선균의 분류 기준을 정하고 이에 대한 내용을 Bergey's manual of determinative bacteriology 8판에 기재하였다(15). 본 연구에서는 대나무 산림토양으로부터 수집된 방선균 330균주의 형태분류를 위하여 SCA 평판배지에 배양 후 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8판에 의거하여 방선균 형태(기균사, aerial mycelium, 기중균사, substrate mycelium 및 색소형성)를 관찰한 결과, 총 36개 방선균군집으로 대부분류되었다(Table 2).

기균사의 색상은 gray, brown, pink, yellow, orange, black, purple, kaki 그리고 ivory 등 9가지의 색을 나타내었으며, 이들 균주 중 97균주가 gray색의 기균사로 대부분 백색 포자를 형성하였다. 기중균사는 white, ivory, yellow, orange, pink, brown 그리고 purple 등 7가지의 색을 나타내었으며, 206균주가 백색의 기중균사를 나타내었다. 배지 내 수용성 색소는 yellow, brown, pink, purple 등 4가지 색소를 형성하였으며, 배지표면을 변색시키는 균주도 다수 포함되었다. 또한 층위별 수집된 방선균 콜로니 특성을 확인한 결과, 대나무림 낙엽층으로부터 수집된 방선균 100균주는 총 23개의 군집형태로 나타났으며, 기균사가 생성되지 않거나 yellow 또는 pink색을 나타내는 16, 21, 22의 군집형태가 높은 비율을 나타내었다. 부식층으로부터 수집된 방선균 70균주에 대하여 콜로니 특성을 확인한 결과, 총 17개의 군집으로 분류 할 수 있었으며, 기균사가 gray 또는 kaki색을 나타내는 2, 27 군집형태가 우점적으로 분포하였다. 또한, 근권 토양으로부터 수집된 방선균 160균주는 총 26개의 군집형태로 분류되었으며, 기균사가 gray, yellow, white 또는 kaki색을 나타내는 4, 6, 13, 16, 27 군집형태가 높은 비율을 나타내었다.

이상의 결과로부터 36개 방선균군집 중 11개 군집(2, 3, 4,

Table 2. Morphological classification of actinobacteria collected from different layers of bamboo forest soil

Colony Type	Morphological characteristics			No. of Actinobacteria		
	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	L	H	R
1	gray, black / ws	white	none	6	-	-
2	gray / ws	white	none	7	11	3
3	gray / ws	yellow	yellow	1	5	8
4	light gray/ ws	white	none	5	8	14
5	white	ivory	brown	5	5	9
6	white (circle)	white	none	-	5	11
7	dark brown / ws	white	none	5	4	4
8	light brown / ws	white	none	-	2	4
9	orange / ws	orange	brown	-	1	2
10	none	ivory	light brown	-	3	4
11	white / ws	white	none	2	2	9
12	ivory	ivory	light brown	-	-	5
13	gray	white	none	3	2	12
14	light pink	light pink	none	2	-	3
15	light black	white	none	-	-	1
16	yellow /ws	yellow	yellow	14	6	14
17	white	ivory	dark brown	-	1	4
18	none	yellow	yellow	1	-	-
19	yellow / ws	yellow	yellow	1	-	-
20	pink	pink	pink	-	-	1
21	none	white	light brown	14	-	2
22	pink	white	none	11	-	-
23	none	ivory	none	1	-	-
24	none	white	none	1	-	-
25	light brown	brown	none	-	-	3
26	light brown / ws	brown	none	-	-	1
27	kaki / ws	white	none	9	10	25
28	white	white	none	-	-	2
29	kaki	white	none	1	2	5
30	gray / ws	brown	light brown	-	-	6
31	White (irregular)	white	none	-	-	2
32	light pink / ws	white	none	3	1	6
33	dark gray	white	light purple	1	-	-
34	red / ps	purple	dark purple	1	-	-
35	light brown	light brown	none	1	2	-
36	dark gray	brown	none	5	-	-
Total				100	70	160

WS, white spot; L, Litter; H, Humus; R, Rhizosphere soil

5, 7, 11, 13, 16, 27, 29, 32)이 대나무 산림토양의 각 층위에 공통적으로 분포하였으며, 특히 2, 4, 16, 27 균집이 우점적으로 분포하는 특징을 나타내었다.

대나무 산림토양으로부터 수집된 방선균의 계통학적 다양성

대나무 산림토양으로부터 수집된 방선균 330균주를 대상으로 형태 관찰을 통하여 분류된 36개 방선균군집에 속하는 대표 방선균 36균주와 우점적으로 나타난 방선균군집으로부터 14균

주를 선발하였다. 각 대표 방선균에 대해 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하고 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)를 이용하여 상동성 검색한 결과, 47균주가 *Streptomyces* 속에 속하였으며 *Kitasatospora* 속에 속하는 균주는 3균주로 확인되었다.

대표 방선균 50균주에 대한 16S rRNA 유전자 염기서열을 CLUSTAL X로 Multiple sequence alignment 한 후, MEGA 4.0 (Molecular evolutionary genetics analysis)을 사용하여 Phylogenetic tree 분석한 결과, 4개의 group으로 분류되었다.

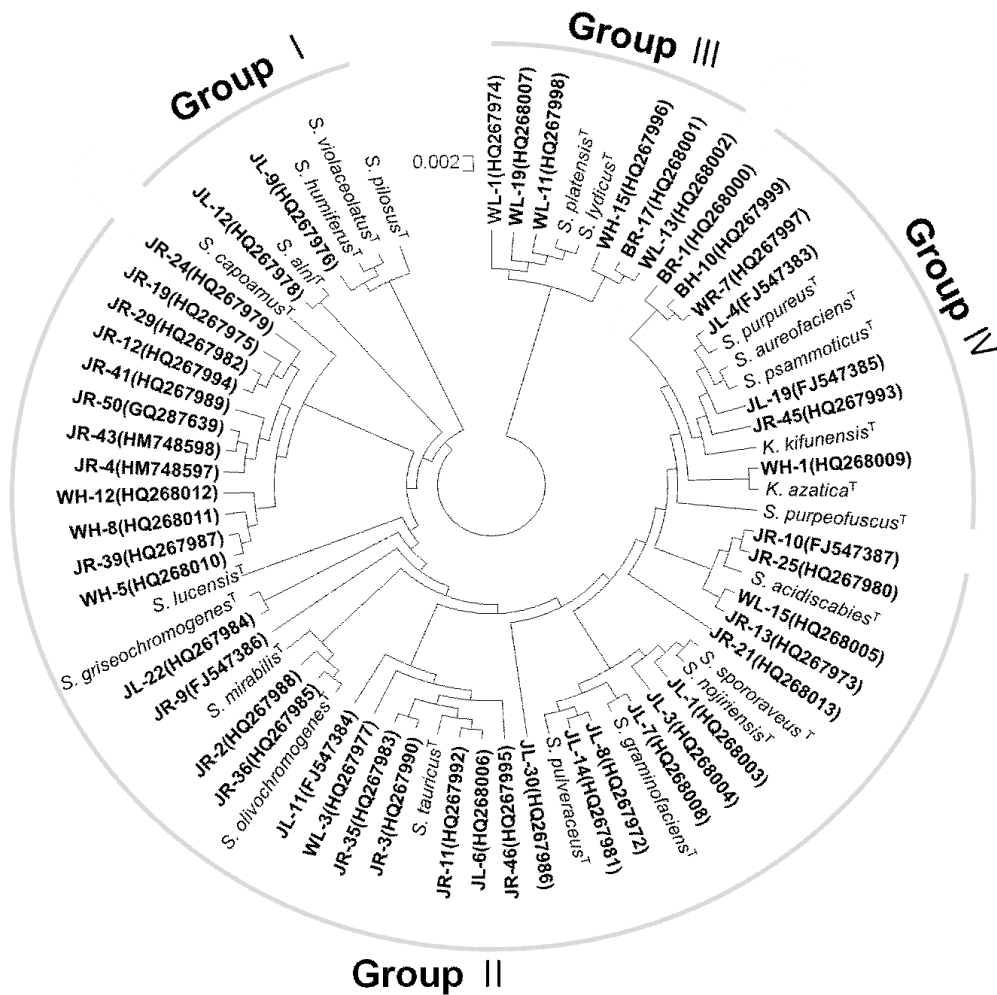


Fig. 1. Phylogenetic tree showing relatedness of *Streptomyces* by neighbor-joining grouping of the aligned sequences of the 16S rRNA gene.

각 group에 속하는 *Streptomyces* 속의 참조균주와 비교한 결과, *Streptomyces alni*, *Streptomyces violaceolatus* 등을 포함하는 group I에 2균주가 속하였으며, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces capoamus*, *Streptomyces graminofaciens*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces olivochromogene*, *Streptomyces nojiriensis*, *Streptomyces olivochromogene*, *Streptomyces pulveraceus*, *Streptomyces tauricus* 등을 포함하는 group II에 35균주가 속하는 특징을 나타내었다. *Streptomyces pensis*, *Streptomyces ldicus* 등을 포함하는 group III에 6균주가 포함되었으며, *Streptomyces purpureus*, *Kitasatospora azatica*, *Kitasatospora kifunensis* 등을 포함하는 group IV에는 7균주가 포함되었다(Fig. 1).

이상의 결과로부터 대나무 산림토양으로부터 수집된 방선균은 계통학적으로 4개의 *Streptomyces* 속 group에 속하는 다양한 방선균이 존재함을 알 수 있었으며, 특히 group II에 속하는 *Streptomyces*가 우점 계통군임이 확인되었다.

Williams 등은 *Streptomyces*의 형태적·생리적 특징을 기초로 19개의 major group과 40개의 minor group 그리고 18개의

single member 그룹으로 분류하였다(32). 그 후, *Streptomyces*의 유전자 염기서열 정보가 확립되면서 Stackebrandt 등은 *Streptomyces*속에 속하는 69균주를 대상으로 16S rRNA와 23S rRNA 유전자 정보를 바탕으로 7개의 주요 그룹으로 분류하였다(25). 최근 Lanoot 등은 주요 *Streptomyces* 158균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 해석을 통해 97-98%로 cut-off한 결과 4개의 cluster와 25개의 subcluster로 분류하였으며, 16S-ITS를 *Bst*UI과 *Hae*III 제한효소를 이용한 finger printing 방법에 의거하여 59개의 cluster로 재분류하였다(14).

본 연구에서 대나무 산림토양으로부터 수집된 *Streptomyces* 속 방선균 50균주를 Lanoot의 16S rRNA 유전자 정보를 바탕으로 분류한 4개의 cluster 및 25개의 subcluster 계통군과 비교 검토한 결과, 대나무림 낙엽층으로부터 수집된 방선균은 cluster I, II, III, IV에 모두 속하였으며 다양성 지수는 3.33, 균등도 지수는 0.89로 확인되어 높은 다양성을 나타내었다. 대나무림 부식층으로부터 수집된 6균주는 각각 cluster II, III, IV에 속하였으며, 근권토양으로부터 수집된 방선균의 88%가 cluster II에 속하여 다양성 지수는 1.68, 균등도 지수는 0.75를

Table 3. Delineation of clusters with closely related species among 50 *Streptomyces* based on the Lanoot's classifying, the diversity index was calculated with the Shannon-Wiener method.

Strain	Cluster I					Cluster II					Cluster III					Cluster IV					S	E					
	S1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			21	22	23	24	25
Litter																											
WL-1										●											●						
WL-3									●												●						
WL-11																					●						
WL-13																				●							
WL-15								●												●							
WL-19																				●							
JL-1										●																	
JL-3										●																	
JL-4																									●		3.33 0.89
JL-6								●																			
JL-7																●											
JL-8																	●										
JL-9	●																										
JL-11										●																	
JL-12					●																						
JL-14																											
JL-19																	●								●		
JL-22																									●		
JL-30									●																		
Humus																											
WH-1																										●	
WH-5													●														
WH-8													●														1.46 0.61
WH-12													●														
WH-15																					●						
BH-10																									●		
Rhizosphere																											
Soil																											
WR-7																										●	
BR-1																										●	
BR-17																					●						
JR-2									●																		
JR-3										●																	
JR-4													●														
JR-9									●																		
JR-10									●																		
JR-11								●																			
JR-12													●														
JR-13														●													
JR-19																											1.68 0.75
JR-21									●																		
JR-24														●													
JR-25									●																		
JR-29																											
JR-35										●																	
JR-36									●																		
JR-39														●													
JR-41														●													
JR-43														●													
JR-44									●																		
JR-45																											
JR-46														●													
JR-50																										●	

S, shannon-wiener; E, Evenness

Table 4. Isolation of novel actinobacteria based on 16S rRNA gene sequence by BLAST search

Strain No.	Best match	Match/ Total nt	Similarity (%)
JL-6	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> ATCC 700248 ^T	1319/1338	98.5
JR-4	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	1371/1396	98.3
JR-11	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> ATCC 700248 ^T	1327/1346	98.5
JR-12	<i>Streptomyces lucensis</i> NBRC 13056 ^T	1361/1385	98.3
JR-19	<i>Streptomyces lucensis</i> NBRC 13056 ^T	1360/1384	98.3
JR-24	<i>Streptomyces lucensis</i> NBRC 13056 ^T	1361/1385	98.3
JA-41	<i>Streptomyces bungoensis</i> NBRC 15711 ^T	1334/1358	98.2
JR-43	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	1263/1288	98.1
JR-50	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	1158/1183	97.9

나타내었고, subcluster 9, 10, 13에 우점적으로 분포하였다 (Table 3).

본 연구에서 수집한 16S rRNA 유전자 염기서열 해석 결과, 분리균주 중 9균주는 *Streptomyces* 속 근연종과 98.5% 이하의 상동성을 나타내어 신종으로 제안 할 수 있는 균주로 예상되었다 (Table 4). 이상의 결과로부터 국내에 자생하는 대나무 산림 토양의 낙엽층, 부식층 및 근권토양 내에는 높은 밀도의 방선균이 분포하여 방선균의 우수한 서식처임을 확인할 수 있었다. 또한 대나무림 낙엽층, 부식층 및 근권토양으로부터 수집된 방선균의 96% 이상이 *Streptomyces* 속에 속하는 특징을 나타내었으며, 이들 *Streptomyces* 속 방선균은 층위별로 특징적인 계통군이 분포해 있음을 알 수 있었다.

항균활성 방선균 탐색

대나무 산림토양으로부터 수집된 방선균 총 330균주를 딸기 잭빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*), 세균성흑마병원균(*Xanthomonas campestris*) 그리고 고추세균성점무늬병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)에 대한 항균활성능을 검토한 결과, *S. alni*, *S. violaceolatus*, *S. graminofaciens*, *S. olivochromogene*, *S. acidiscabies*, *S. capoamus*, *S. olivochromogene*, *S. griseochromogenes*, *S. nojiriensis*, *S. pulveraceus*, *S. tauricus*, *S. platensis*, *S. ldicus*, *S. purpureus*, *K. azatica*, *K. kifunensis*를 포함하는 74균주가 딸기잭빛곰팡이병원균에 대한 항균활성능을 나타내었다. 세균성흑마병원균에 대해 항균활성능을 나타낸

Table 5. Screening of antibiotics-producing actinobacteria isolated from different layers of bamboo forest soil

Pathogen	No. of isolates		
	Litter	Humus	Rhizosphere soil
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40963	30	-	44
<i>Xanthomonas campestris</i> KACC 10913	6	-	10
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> KACC 12872	13	-	12
<i>Bacillus cereus</i> KACC 11240	4	6	14

16균주는 *S. capoamus*, *S. tauricus*, *S. acidiscabies*, *S. platensis*에 속하는 특징을 나타내었으며, 고추세균성점무늬병원균의 경우 *S. olivochromogene*, *S. violaceolatus*, *S. capoamus*, *S. griseochromogenes*, *S. graminofaciens*, *S. acidiscabies*, *S. tauricus*, *S. nojiriensis*에 속하는 25균주가 항균활성균주로 선발되었다. 그리고 *S. capoamus*, *S. acidiscabies*, *S. griseochromogenes*, *S. olivochromogene*, *S. tauricus*, *S. pulveraceus*, *S. purpureus*, *K. azatica*, *K. kifunensis*에 속하는 24균주가 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성능을 나타내었다 (Table 5). 이상의 결과로부터 대나무 산림토양은 바이오 소재로 활용할 수 있는 항균활성 방선균을 탐색할 수 있는 우수한 서식처라고 판단된다.

적요

국내 자생하는 왕대, 분죽, 조릿대, 호마죽과 같은 다양한 대나무 산림토양의 낙엽층, 부식층, 근권토양 내 방선균 밀도 측정 결과, 2.7×10^6 - 2.7×10^8 CFU/g로 계수되었으며, 특히 조릿대 낙엽층 내에는 2.7×10^8 CFU/g의 매우 높은 밀도로 분포하였다. 본 연구에서는 대나무림 낙엽층으로부터 100균주, 부식층으로부터 70균주 그리고 근권토양으로부터 160균주로 총 330균주의 방선균을 수집하였다. 이들 분리된 균주들의 기균사, 기중균사 및 색소형성 등을 관찰한 결과 36개 방선균 균집으로 분류되었다. 각 그룹으로부터 대표 방선균 50균주를 선발하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석하고 계통학적 위치를 검토한 결과, 94%가 *Streptomyces* 속에 속하였으며, cluster I (2균주), II (35균주), III (6균주), 그리고 IV (7균주)에 속하는 특징을 나타내었다. 대나무 산림토양으로부터 수집된 *Streptomyces* 속 방선균 50균주를 Shannon-Wiener법에 의해 다양성 지수를 산출한 결과, 대나무림 낙엽층으로부터 수집된 방선균의 다양도는 3.33으로 부식층과 근권토양 보다 높게 나타났으며, 근권토양으로부터 수집된 방선균의 88%가 cluster II에 속하는 특징을 나타내었다. 본 연구에서 수집한 방선균을 *Botrytis cinerea*, *Xanthomonas campestris* 그리고 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*에 대해 항균활성능을 검토한 결과, 각 74균주, 16균주, 25균주 그리고 24균주가 항균활성능을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업(M-02-20080704171810)으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Berdy, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* 18, 309-406.
- Berdy, J. 1985. Screening, classification and identification of microbial products, pp. 9-31. In M.S. Verral (ed.), *Discovery and isolation of microbial products*, Society of Chemical Industry, Ellis Horwood Ltd., London, UK.
- Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: Screening and identification, pp. 3-27. In M.E. Bushell (ed.), *Bioactive metabolites from microorganisms*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Chun, J.S., H.D. Youn, Y.I. Yim, H. Lee, M.Y. Kim, Y.C. Hah, and S.O. Kang. 1997. *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 492-498.
- Dilly, O.J., J. Bloem, A. Vos, and J.C. Munch. 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 468-474.
- Higton, A.A. and A.D. Roberts. 1998. In B.W. Bycroft (ed.), *Dictionary of antibiotics and related substances*, pp. 10-18. Chapman and Hall, New York, USA.
- Kim, B., A.M. Al-Tal, K.S. Bum, P. Somasundaram, and M. Goodfellow. 2000. *Streptomyces thermocrophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 505-509.
- Kim, B., N. Sahin, D.E. Minnikin, J. Zakrzewska-Czerwinska, M. Mordarski, and M. Goodfellow. 1999. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 7-17.
- Kim, H.J., S.C. Lee, and B.K. Hwang. 2006. *Streptomyces cheonanensis* sp. nov., a novel streptomycete with antifungal activity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 471-475.
- Kim, S.B. and M. Goodfellow. 2002. *Streptomyces thermospini-sporus* sp. nov., a moderately thermophilic carboxydophilic streptomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1225-1228.
- Kim, S.B., C. Falconer, E. Williams, and M. Goodfellow. 1998. *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydophilic species from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 59-68.
- Kim, S.B., C.N. Seong, S.J. Jeon, K.S. Bae, and M. Goodfellow. 2004. Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 211-214.
- Kuster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of Streptomyces. *Nature* 202, 928-929.
- Lanoot, B., M. Vancanneyt, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M.C. Cnockaert, P. Dawyndt, Z. Liu, Y. Huang, and J. Swings. 2005. Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Res. Microbiol.* 156, 755-762.
- Leadbetter, E.R. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., pp. 599-881. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
- Lechevalier, H.A. 1989. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4th ed. pp. 2344-2347. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
- Lee, J.Y., J.Y. Lee, H.W. Jung, and B.K. Hwang. 2005. *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenic acid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 257-262.
- Matsuzawa, Y., O.T. Yoshimoto, H. Naganawa, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1980. Biosynthesis of anthracycline antibiotics by *Streptomyces galilaeus*. II. structure of new anthracycline antibiotics obtained by microbial glycosidation and biological activity. *J. Antibiot.* 33, 1341-1347.
- Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes-new breed of actinomycetes. *J. Microorganism.* 3, 453-461.
- Park, D.H., J.S. Kim, S.W. Kwon, C. Wilson, Y.M. Yu, J.H. Hur, and C.K. Lim. 2003. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 2049-2054.
- Rudi, K., G.H. Kleiberg, R. Heiberg, and J.T. Rosnes. 2007. Rapid identification and classification of bacteria by 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses (RFMCA). *Food Microbiol.* 24, 474-481.
- Rudi, K., M. Zimonja, and T. Næs. 2006. Alignment-independent bilinear multivariate modelling (AIBIMM) for global analyses of 16S rRNA gene phylogeny. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1565-1575.
- Shimazu, A., C.J. Kim, and I.D. Yoo. 1993. Diversity of Actinomycetes Species, morphology and life cycle. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 88-94.
- Stackebrandt, E.W., W. Liesack, and B.M. Goebel. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7, 232-236.
- Stackebrandt, E.W., W. Liesack, and D. Witt. 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene* 115, 255-260.
- Takashi, S. 1987. Cosmopolitan actinomycetes. *J. Microorganism* 3, 482-492.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Tanaka, Y. and S. Omura. 1990. Metabolism and products of actinomycetes an introduction. *Actinomycetol.* 4, 13-14.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Turnidge, J.D. and J.M. Bell. 2005. Antimicrobial susceptibility on solid media, pp. 8-60. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, London, UK.
- Whang, K.S. and S.H. Yu. 1995. Growth patterns of soil bacteria in different organic nutrient concentrations and isolation of facultative and obligate oligotrophic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 21, 319-324.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, and M.J. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1743-1813.