

# V Actinomycetes의 분류

농업과학기술원 작물보호부 농약 개발과  
유 재 흥

## 1. 서 론

### (1) 방선균의 일반적 특징

방선균(*Actinomycetes, ray fungi*)은 원핵 생물로서 균사체로 생육하는 그람 양성세균이며, 분류학적으로는 균사체를 형성하는 곰팡이의 특징과 핵막이 없는 원핵세균의 특징을 가지고 있으며 하등미생물 중에서도 형태적 분화정도가 진보된 균사상의 세균이고 균사의 폭이 0.3~1.0 $\mu$ m 정도의 미세한 사상세균이다. 대부분의 방선균은 DNA의 평균 GC 함량이 68% 이상으로 높고, 종균간의 DNA의 상보성이 많고, 형태적 특징에 있어서나 생리적으로도 매우 유사한 균군끼리 모여져 있다.

생육 후기에 균사가 단열하여 일반세균과 같이 되는 것, 곰팡이 모양으로 긴 균사를 갖고, 기균사를 착생하며 여러 형태의 포자, 포자낭, 균핵과 같은 것, 분포자기와 비슷한 것 등의 특수구조물을 형성하기도 하는 미생물군이다. 대부분은 토양중에서 쉽게 분리 할 수 있으며, 동물병원균, 수생균, 또는 식물병원균도 있다. 또 호열성균이 많고, 항생물질의 생산균으로서도 유명하다.

이러한 방선균은 현재 다양한 생리활성물질을 탐색하기 위한 연구 재료로써 많이 이용되어 왔다 (Tanaka 등 1990). 즉 지금까지 알려진 각종 항생물질중 40% 이상이 방선균에서 분리되었을 뿐 아니라 (Berdy 1984) 많은 효소와 생리활성물질이 방선균으로부터 탐색되어져 왔다.

한편 토양 중의 방선균 분포에 대한 많은 연구가 보고되어 왔는데 (Horst 1981), 이 중 토양 방선균의 일반적인 분포에 대하여 보고한 사실에 의하면 (Lechevalier 1989) 토양 중에는 *Streptomyces*속이 69.4%로써 가장 많이 존재하며, 그 다음으로는 *Micromonospora*속, *Nocardia*속, *Streptoporangium*속이 11.4%, 6.1%, 2.0%씩 분포하며 *Actinomadura*속, *Nocardiopsis*속, *Microbispora*속도 각각 0.9%씩 분포한다고 하였다. 따라서 방선균의 일반적인 특징과 종류에 따른 특징을 나타내고 분류에 있어 필요한 실험 방법(형태특성, 생태적 특성 및 세포벽 구성성분의 변화)에 대하여 간단히 나타내고자 한다.

#### 1) 균사형의 방선균이 세균에 포함되는 이유

방선균은 균사의 폭이 세균과 같으나, 갈라진 균사, 기균사형성 등이 곰팡이와 유사하다. 그러나 다음과 같은 이유로 세균 속에 포함시킨다.

- 1) 균사의 미세구조가 세균과 같고 원시핵세포이다.
- 2) 세포벽의 화학조성이 gram 양성세균과 유사하다. 즉 세포벽의 기본구조가 Muco복합체(peptidoglycan의 복합체)이며 teichoic acid를 함유하고 있다.
- 3) 형태적으로 일반세균에 가까운 중간형태를 한 방선균이 연속적으로 연결되어 존재한다.

2) 형태적 특징

가. 균 사

균사에는 영양균사(vegetative mycelium)와 기균사(aerial mycelium)가 있다. 영양균사에는 그림 1과 같이 배양 후기에 균사가 단열(fragmentation)을 일으켜 구균이나 간균 같은 세포로 변하는 *Nocardia*형과 단열하지 않고 균사형을 유지하는 생활사를 가진 *Streptomyces*형이 있다. 방선균의 종류에 따른 균사의 형태를 나타내면 그림 2와 같다.

영양균사 및 기균사는 속에 따라 특징적인 연쇄상 혹은 단독으로 착생한 포자 또는 포자낭 등을 형성한다. 그 외에 균핵(sclerotium), 분포자기(pycnidium)와 같은 구조물과 점질포자용합체(actinosporangium) 등을 형성하기도 한다.

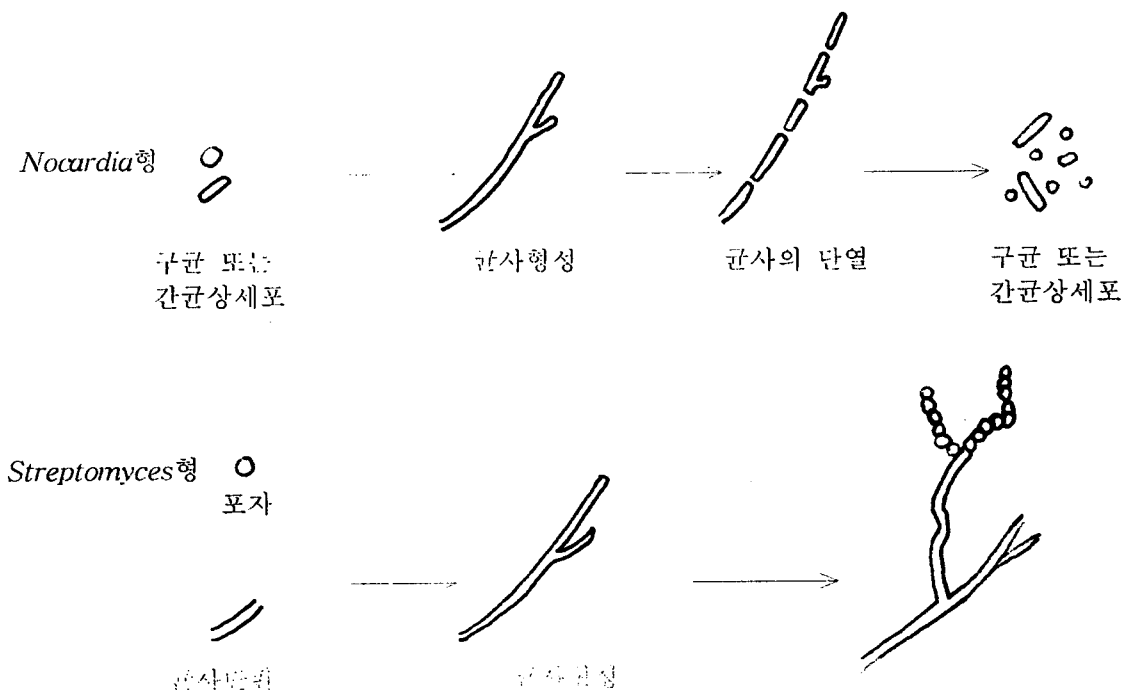


Fig. 1 *Nocardia*형과 *Streptomyces*형 영양균사의 특징

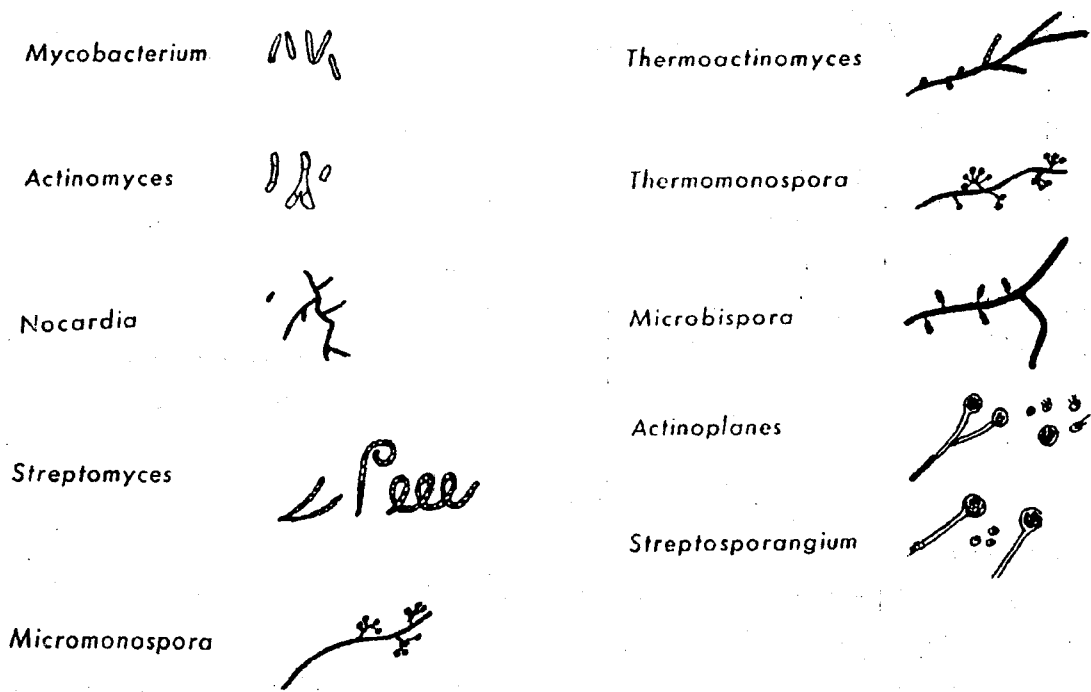


Fig. 2 Schematic representation of growth and reproduction of various genera of the *Actinomycetes*

#### 나. 포 자

일반적으로 구형, 난형, 원통형과 같은 것이 많고, *Streptomyces* 속의 포자를 전자현미경으로 관찰하면 그의 표면이 평평한 것, 가시가 돋은 것, 모발상 또는 돌기가 있는 것 등이 있으며, *Actinoplanes* 속의 포자는 극속편모를 하고 있다.

#### (2) 방선균의 분류

*Mycobacterium* 및 그의 연쇄균(*Mycobacteriaceae*과)를 제외한 *Actinomycetales*목의 균을 방선균이라 하는데, 다음에는 Waksman에 의한 분류로서 종래의 형태와 생태적 특징에 중점을 두고, 세포벽 구성성분의 분석 등에 의한 방선균의 분류에 대하여 나타내었다.

##### 1) *Actinomyceae* 과

배양 후기에 영양균사가 단열하여 간상 또는 구상으로 되는 균군이다.

*Actinomyces*는 혐기성 또는 미호기성인 균군이다. *Nocardia*는 *Mycobacterium*과 *Streptomyces*와의 중간적 균군이고 균사가 초기에 단열하는 soft( $\alpha$ -type)과 그렇지 않고 균사의 형성이 많은 hard

type( $\alpha$ -type)의 균이 있다. 대부분은 호기성으로 부분적인 항산성을 가지고 있거나 혹은 항산성을 가지지 않는다. 동물병원성을 나타내는 방선균이 많고 *Actinomyces* 및 *Nocardia*의 양쪽의 속에 포함된다. *Promicromonospora*는 *Micromonospora*와 같이 포자병의 끝에 포자를 1개씩 착생한다.

## 2) *Streptomycetaceae* 과

영양균사는 분열하지 않고, 포자낭을 형성하지 않는다.

*Micromonospora*(중온균)와 *Thermonospora*(고온균)는 기균사를 착생하지 않고 포자를 영양균사에 있는 짧은 포자병의 끝에 1개 착생한다. 그 이외의 균은 기균사를 착생한다. 토양방선균이며 주요한 항생물질생산균인 *Streptomyces*는 포자를 기균사에 연쇄상으로 착생한다. *Micropolyspora*는 짧은 연쇄상의 포자를 기균사와 영양균사의 양쪽에 형성한다. *Thermoactinomyces*(고온균) 및 *Microbispora*(중온균)은 기균사에 각각 1개씩 또는 2개씩 포자를 착생한다. *Thermopolyspora*(고온균)는 포자를 연쇄상으로 형성한다.

## 3) *Actinoplanaceae* 과

포자낭을 형성하는 방선균군으로 수생균과 육생균이 있으며 gelatin을 분해하는 균이다. 포자의 형태에 따라 분류하면 다음과 같다.

- 1) 포자를 포자낭 안에 나선형으로 감싼 연쇄상으로 형성하는 균군이고, 포자가 운동성이 있는 것과 없는 것이 있다. 운동포자를 형성하는 균으로서 포자낭 안에 아구균의 극속편모포자를 만드는 *Actinoplanes* 와 가끔 구부러진 단간 내지 장간균장으로 1~다수의 극편모가 있는 운동포자를 만드는 *Spirolospora* 등이 있다. 전자는 기균사를 형성하지 않으나 후자는 기균사를 형성하고 그 곳에 운동포자낭을 형성한다.

비운동포자를 형성하는 균 중에서 *Streptosporangium*은 기균사에 구형포자를 함유한 구형의 포자낭을 형성하고, *Amorphosporangium* 은 기균사에 구형포자를 함유한 구형의 포자낭을 형성하고, *Amorphorangium*은 기균사를 형성하지 않고 영양균사에 두간균장편모를 함유한 불규칙적인 형태를 한 포자낭을 형성한다.

- 2) 포자를 포자낭 안에 많이 평행한 연쇄상으로 형성하는 균군이고, 포자는 운동성이 있다. *Ampullariella*는 극속편모가 있는 간상포자를 병모양으로 포자낭을 형성한다. *Pilimelia*는 극단편모가 있는 간상포자를 가늘고 긴 포자낭 안에 형성한다.
- 3) 포자를 가늘고 긴 포자낭 안에 한 줄의 연쇄상으로 형성한다. *Microellobospora* 속이 있으나 포자는 운동성이 없다.

## 4) 기 타

*Chainia*는 균핵과 같은 구조물을, *Actinosporangium*은 점질포자융합체를, *Pseudonocardia*(고온균)는 *Nocardia*와 유사하게 영양균사에 격벽이 생기나 단열하지 않고, *Streptomyces*와 같이 기균사에 포자를 착생한다. *Dermatophilus*는 *Actinomycetaceae*와 같이 균사가 단열한다. 그러나 독특한 포자형성법이 있으므로 별도의 새로운 과에 속한다고 생각된다. 포자는 운동성이 있다. 동물의 피부병균의 한 종류이다.

### (3) 방선균을 동정, 분류하는 일반적방법

#### 1) 균 분리 배지

균 분리 배지로서는 방선균을 위한 선택 분리배지로 많이 사용되고 있는 Bennet's agar(glucose 10g, yeast extract 1g, Bacto peptone 1g, beef extract 1g, agar 20g, 증류수 1L, pH 7.2)와 humic acid-vitamin agar(humic acid 1g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, KCl 1.71g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g, CaCO<sub>3</sub> 0.02g, agar 20g, 증류수 1L, pH 7.2)배지를 사용한다. 일반적으로 많이 사용되고있는 방선균용 배지는 참조1에 나타내었다

#### 2) 방선균 분리

일정지역에서 채취한 각 토양시료는 하루밤 상온에서 일정량을 건조시킨 후 100℃에서 1시간 열처리한다. 전 처리된 토양시료는 멸균 생리식염수에 10<sup>-3</sup>~10<sup>-4</sup>으로 희석한 후 희석액 0.1ml씩을 humic acid-vitamin agar와 Bennet's agar배지에 접종하고 28℃에서 2주간 배양한다. 배양 후에 나타난 각 colony를 Bennet's agar배지 상에 옮겨 일정 시간 재 배양하고, 육안 및 현미경 하에서 형태적으로 서로 상이한 균주를 선정하고 순수 분리 한다.

#### 3) 분리 방선균의 속 동정

##### 가. 형태학적 특정조사

배양 후에 나타난 각 colony를 Bennet's agar배지 상에 옮겨 일정 시간 재 배양하고, 육안 및 현미경 하에서 형태적으로 서로 상이한 균주를 선정하고 순수 분리 한다. 균사의 형태는 yeast ext., malt ext. 고체배지(ISP No.1)에 1회 접종하고 30℃에서 14일간 배양한 후 전자현미경으로 관찰 한다. 방선균 속의 특성을 그림3과 이에 대한 설명을 표 1 에 나타내었다.

##### 나. 배양학적 특성 조사

각 살균된 배양기에 3일간 배양한 분리균주를 접종하여 성장도, 기균사의 색, 배면의 색, 가용성 색소 등 배양상의 특성을 ISP(International Streptomyces Project) system에 준하여 배양 7 일, 14일, 21일째 관찰한다. 필요한 경우 3일, 5일, 10일째도 관찰한다. 이에 따른 방선균 속의 특성을 표 2,3에 나타내었다.

##### 다. 생리학적 특성 조사

분리균주의 생육온도, 당이용성 및 산 생산여부를 관찰한다. 또한 이외의 다음과 같은 여러 가지 생리학적 특성을 검토한다. H<sub>2</sub>S 생성 실험, Gelatin Hydrolysis 시험, Starch Hydrolysis 시험, Lipid hydrolysis Test, Casein Hydrolysis Test, Indole production test(amino acid tryptophan의 분해능력 실험), Gram stain(gram positive and negative), Catalase Test(hydrogen peroxide의 분해능), Oxidase(cytochrome oxidase), Urease(urea 분해능), 우유의 응고 및 peptone화 시험, Nitrate Reduction Test, Cellulose 가수분해 시험, Esculin 가수분해 시험 및 Antibiotics resistance 시험

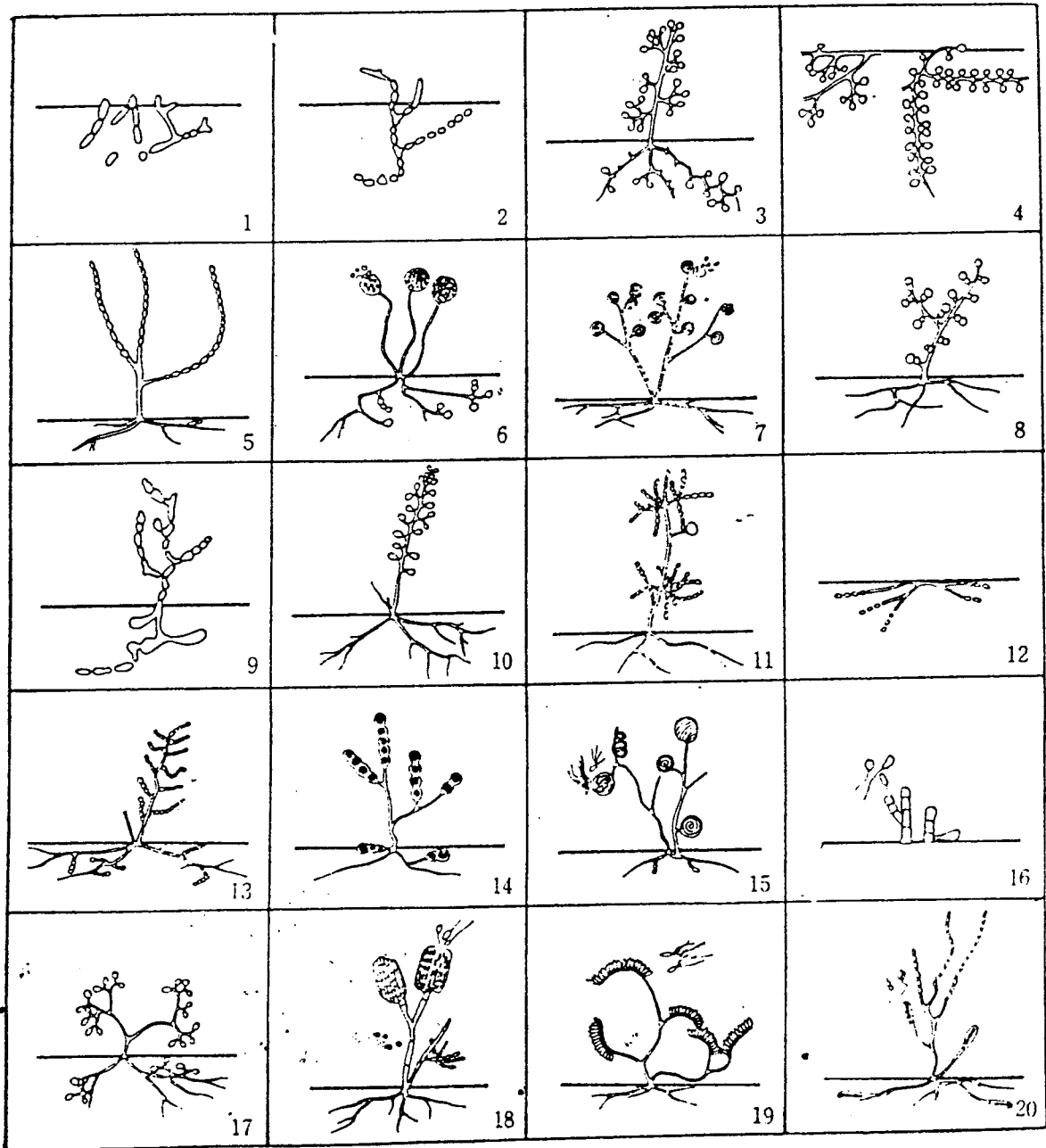


Fig. 3 방선균 속의 형태

표 1. 방선균속의 특성

속 명	그림 번호	균 사 체		포 자			기 타 특 징
		영양균사의 발 단	기균사의 존 재	분생자의 연 쇠	포자낭, 포 자	편 모, 모 자	
<i>Actinomyces</i>	1	+	-	-	-	-	미호기성, 병원성
<i>Nocardia</i>	2	+	-	-	-	-	기균사를 형성하는 것도 있다.
<i>Thermoactinomyces</i>	3	-	+	-	-	-	포자수는 1개, 호온성
<i>Micromonospora</i>	4	-	-	-	-	-	기균사를 형성하는 것도 있다, 포자는 1개
<i>Streptomyces</i>	5	-	+	+	-	-	기균사상의 분생장의 연쇄는 같고리, 고 또는 나선상
<i>Actinoplans</i>	6	-	-	-	+	+	기균사 형성
<i>Streptoporangium</i>	7	-	+	-	+	-	포자낭 포자는 나선상으로 배열
<i>Microbispora</i>	8	-	+	+	-	-	분생자의 연쇄는 보통 2개
<i>Pseudonocardia</i>	9	+	+	-	-	-	영양균사는 지그재그로 신장 증온~호온성
<i>Thermonospora</i>	10	-	+	-	-	-	포자는 기균사에서 만형성, 분생자는 1개로 내생포자는 아님
<i>Streptovercillum</i>	11	+	+	+	-	-	윤생사를 형성하는 <i>Streptomyces</i>
<i>Bacterionema</i>	12	+	-	-	-	-	토성 혐기성, catalase(+)
<i>Micropolyspora</i>	13	-	+	+	-	-	영양균사와 기균사에 1~10개의 분생자를 착생
<i>Microellobosporia</i>	14	-	+	-	+	-	포자낭은 배지중이나 공기중에 형성하고 2~7개의 포자를 형성
<i>Spirillospora</i>	15	-	+	+	+	+	포자낭은 5~24nm, 코일 모양으로 포자가 배열, 편모는 1~수개
<i>Sporichthya</i>	16	-	+	-	-	+	영양균사는 흔적, 기균사가 분단되어 편모포자가 된다
<i>Actinobifida</i>	17	-	+	-	-	-	두갈래로 분기하는 <i>Thermoactinomyces</i> 속, 내생포자 1개씩 형성
<i>Pilimelia</i>	18	-	+	+	+	+	포자낭은 원형, 원통형, 포자는 세로로 나열장
<i>Planomonospora</i>	19	-	+	-	+	+	포자낭은 방추형이며, 2개가 평행으로 형성되고 그안에 단1개의 편모포자가 있다
<i>Kilasatoa</i>	20	-	+	+	+	+	<i>Streptomyces</i> 와 비슷하나 포자낭 등을 가지느 것이 다르다

## II 2. Taxonomy of Actinomycetales

Table 2 Taxonomy of Actinomycetales

Family	Aerial Mycelium	Genus	Sporulation
<i>Actinomycetaceae</i>			
Substrate mycelium, fragmenting into bacillary elements	Absent (anaerobic)	<i>Actinomyces</i>	
	Absent or Present (aerobic)	<i>Nocardia</i>	
<i>Streptomycetaceae</i>			
Substrate mycelium not fragmenting into bacillary elements	Absent	<i>Micromonospora</i>	Single spores on substrate mycelium only (mesophilic)
	Present	<i>Thermomonospora</i>	Single spores on aerial mycelium only (thermophilic)
	Present	<i>Thermoactinomyces</i>	Single spores on aerial and substrate mycelium (thermophilic)
	Present	<i>Microbispora</i> ( <i>Waksmania</i> )	Pairs of spores on aerial mycelium only (mesophilic)
	Present	<i>Streptomyces</i>	Chains of spores on aerial mycelium only (mesophilic and thermophilic)
	Present	<i>Micropolyspora</i>	Chains of spores and single spores on aerial and substrate mycelium (mesophilic)
<i>Actinoplanaceae</i>			
Spores occurring in sporangia	Absent	<i>Actinoplanes</i>	Spherical sporangia with motile sporangiospores
	Present	<i>Streptosporangium</i>	Spherical sporangia with nonmotile sporangiospores
	Present	<i>Microellobosporia</i>	Club-shaped sporangia with nonmotile sporangiospores



표 3. Cultural characteristics of the isolated strain

Medium	Growth	Acrial mass color	Reverse side color	Soluble pigment
Bennet's agar	+++	Yellowish gray	Reddish brown	Yellowish gray
Glucose asparagine agar	+	Whitish gray	Yellowish gray	Pale brown
Glycerol asparagine agar (ISP No. 5)	++	Yellowish gray	Pale brown	Pale brown
Nutrient agar	+++	Yellowish gray	Reddish brown	Reddish brown
Salt starch agar (ISP No. 4)	+	Yellowish gray	Yellowish gray	Brown
Sucrose nitrate agar (Czapek-Dox agar)	++	Yellowish gray	Yellowish gray	Reddish brown
Tyrosine agar (ISP No. 7)	+	Gray	Brown	Brown
Yeast extract agar (ISP NO. 1)	+++	Yellowish gray	Reddish brown	Reddish brown
Yeast ext., malt ext. agar (ISP NO. 2)	+++	Gray	Reddish brown	Reddish brown

라. 세포벽 구성 성분의 분석

분류하고자 하는 균주의 2, 6-diaminopimelic acid, 아미노산 및 당 분석은 agar배지 상에서 적절하게 생육된 균사체를 일정하게 취하고 이를 6N-HCl로 110°C에서 16시간정도 가수분해한 후 thin layer chromatography (cellulose TLC, Merck no. 5718, 전개 용매 : methanol-H<sub>2</sub>O-5N HCl-pyridine=80:15:5:10) 방법으로 분석한다. 표준 아미노산, 표준당 등을 이용하여 TLC를 행한 후 나타내어진 Rf값을 비교하여 아미노산, 당 및 2, 6-diaminopimelic acid의 종류를 확인한 후 방선균을 분류 동정한다. 세포벽 구성성분으로 LL-type의 DAP가 존재하면 *Streptomyces* sp., meso-DAP가 존재하면 *Actinomadura* sp.로 분류된다 그림 5, 6 와 표 4, 5, 6 에 예를 들어 나타내었다.

마. 분리균의 동정

분리균의 동정은 주로 Bergey's manual of systematic bacteriology(Williams 등 1989), Bergey's manual of determinative bacteriology(Buchanan 과 Gibbson 1989), ISP strain key (Kuster 1972) Shirling 과 Gottlieb의 방법(1968) 및 방선균의 동정 실험법등 (清野昭雄 1985)에 수록 되어 있는 일반적인 동정법에 따라 행한다.

## 2. 결 론

토양으로부터 분리된 방선균은 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성 및 세포벽 구성성분의 분석에 의하여 분류할 수 있다. 특히 방선균의 특성이 세균의 특성과 유사하므로 생리학적 특성에 대하여 자세하게 실험을 행하여야 한다. 위에 나타난바 와 같이 방선균을 분류하는데 있어 여러 가지 방법이 있지만 중요한 항목은 세포벽 구성성분의 분석 이라 할 수 있겠다. 따라서 분리되어진 균주의 올바른 방선균으로의 분류하고자 한다면 무엇보다도 세포벽 구성성분의 정확한 분석을 행하여 이를 기준으로 하여 속명을 동정하여야 한다.

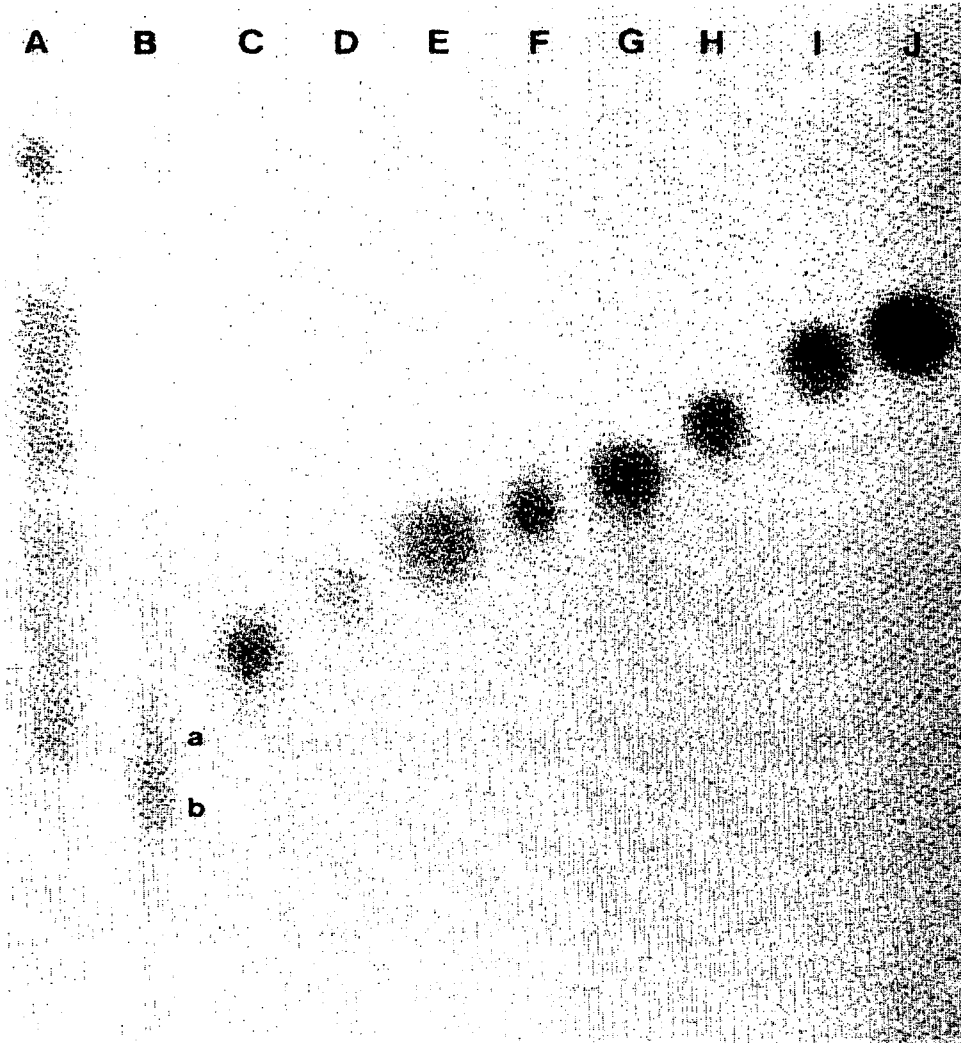


Fig. 4 Thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid isomers and amino acids of the isolated strain.

A : Isolated cell wall hydrolysate  
 B : Standard 2,6- diaminopimelic acid isomers ;  
     a : LL-DAP              b : meso-DAP  
 C : Histidine D : Aspartic acid E : Glycine F : Lysine  
 G : Serine H : Glutamic acid I : Threonine J : Alanine

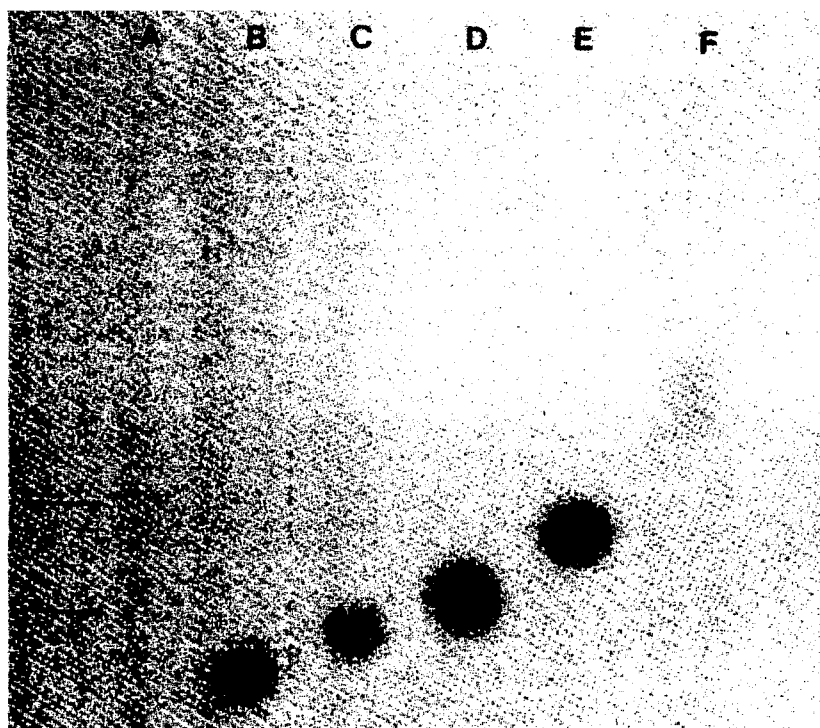


Fig.5 Thin layer chromatogram of whole cell sugars from the isolated strain.

A : Isolated cell wall sugars      B : Galactose  
 C : Glucose                              D : Arabinose  
 E : Xylose                                 F : Rhamnose

Table 4. Major constituents present in cell wall preparations of aerobic actinomycetes  
 (All preparations contained major amounts of glucosamine, muramic acid, alanine and glutamic acid. DAP=2, 6-diaminopimelic acid)

Cell Wall Tape	Genera	Glycine	L-DAP	meso-DAP	Arabinose	Galactose
I	<i>Sterptomyces</i>		+			
	<i>Microellobosporia</i>		+			
II	<i>Microomonospora</i>					
	<i>Actinoplanes</i>	+			+	
	<i>Ampullariella</i> <i>Amorphosporangium</i>					
III	<i>Sterptosporangium</i>					
	<i>Spirillospora</i>					
	<i>Dermatophilus</i>				+	
	<i>Thermoactinomyces</i> <i>Microbispora</i> <i>Nocardia madurae</i> type					
IV	<i>Thermomonospora</i>					
	<i>Micropolyspora</i>				+	+
	<i>Nocardia farcinicaasteroides</i> type <i>Mycobacterium</i>				+	+

Table 5 Classification of the actinomycetes based on cell wall composition

Family	Genus	Cell Wall Components	
		Sugars	Amino Acids
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Nocardia</i>	Arabinose, galactose	Alanine, glutamic acid, DL-diaminopimelic acid
	<i>Mycobacterium</i>		
	<i>Corynebacterium</i>		
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>	Galactose	Alanine, glutamic acid, lysine
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	No characteristic sugar	Alanine, glutamic acid glycine

Table 6 Characteristic cell wall components of various genera of actinomycetes

Group	Characteristic Cell Wall Components	
	Amino Acids	Sugars
1. <i>Actinomyces</i> type	Lysine, glutamic acid, alanine	Galactose, no pentose
2. <i>Nocardia</i> type	Meso-and/or DD-DAP, glutamic acid, alanine	Arabinose, galactose
3. <i>Actinoplanes</i> type	Meso-and/or DD-DAP and smaller amount of LL-DAP, glycine, glutamic acid, alanine; may or may not have "solw-moving component"	May or may not have pentoses
4. <i>Streptosporangium</i> type	Meso-and/or DD-DAP and smaller amount of LL-DAP, glutamic acid, alanine	No or little pentose, no characteristic sugar
5. <i>Sterptomyces</i> type	LL-DAP, glycine, glutamic acid, alanine	No or little pentose, no characteristic sugar

### 3. 참고문헌

1. Berdy, J. 1984. New ways to obtain new antibiotics. j. *Antibiotics*. 7: 278-290.
2. Buchanan, R. and N. E. Gibbson. 1989. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
3. 清野昭雄. 1985. 放線菌の同定實驗法. 日本放線菌研究會編.
4. Horst, W. 1981. Characteristics of Actinomycetes isolated from marine sediments. 1981. . *Actinomycetes. zbl. Bakt. Suppl.* 11 Pp. 309-314. Gustav fischer Verlag. Stuttergart New York.
5. 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 and Wilkins, Baltimore.
6. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description od type cultures of *Streptomyces* III., Additional species descriptions from first and second studies. *Intern. J. System. Bacteriol.* 18: 279-392
7. Tanaka, Y. and S. Omura. 1990. Metabolism and products of actinomycetes-an introduction. *Actinomycetol.* 4: 13-14.
8. Williams, S.T., M. Elisabeth Sharpe, and J. G. Holt. 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore