

BSPE 00244-443-7

생리활성물질 탐색을 위한 해양방선균의 분리, 분류 및
보전체계 확립에 관한 연구

A Study on the Isolation, Classification and Maintenance of Marine
Actinomycetes for the Screening of Bioactive Substances

1992. 5.

한국해양연구소

제출문

한국 해양연구소장 귀하

본 보고서를 “생리활성물질 탐색을 위한 해양방선균의 분리,
분류 및 보전체계확립에 관한 연구” 과제의 최종보고서로
제출합니다.

1992년 5월

연구책임자 : 김 상 진 (해양미생물 연구실, 책임연구원)

이 흥 금 (해양미생물 연구실, 선임연구원)

연구원 : 조 기 용 (해양미생물 연구실, 선임연구원)

정 상 운 (해양미생물 연구실, 연구원)

권 개 경 (해양미생물 연구실, 연구원)

요약문

I. 제목

생리활성물질 탐색을 위한 해양방선균의 분리, 분류 및 보존체계확립에 관한 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

1922년 Fleming의 penicillin 발견을 서두로 질병극복을 위한 항생물질의 개발은 끝없이 이루어져 왔다. 또한 항생물질에 내성을 갖는 균주의 출현으로 인해 새로운 항생제 개발 및 암, AIDS의 치료제 개발이 최근 절실하게 요구되어진다. 우리나라도 세계 여러나라와 동등한 위치에 서서 물질특허를 낼 수 있기 위해서는 자체내의 기술개발과 신규 생리활성 물질의 개발이 필요 불가결하다.

지금까지 생리활성물질의 탐색 대상은 주로 육상생태계와 관련되었으며 대부분의 항생물질들은 육상생태계의 방선균에서 생산되어 왔다. 현재 새로운 생리활성물질을 찾아내기 위해서 육상생태계와는 달리 다양한 환경조건을 가진 해양생태계나 극지생태계에도 눈을 돌려 새로운 종류의 방선균을 대상으로 여러가지 생리활성물질이 탐색되고 있다. 최근에는 이를 위한 기초로 희귀방선균의 분리, 동정 및 분류하는 방법의 개발이 활발히 이루어지고 있으며 이러한 정보를 computer를 이용하여 분석하고 해석하여 신뢰성

이 높고 신속한 방선균의 분류체계를 개발하고 있다.

본 연구의 목적은 다양한 해양환경에서 해양방선균을 분리하고, 분리방선균의 생리 생태학적 정보를 얻기 위해서 서식지에 따라 방선균을 분류하며 효과적인 균주보존 방법을 확립하여 해양방선균으로부터 생리활성물질 탐색에 활용하고자 한다.

III. 연구내용 및 범위

1. 150여개의 시료로부터 약 2500주의 방선균 분리
2. 분리방선균중 형태학적 특성이 다른 234균주 선별
3. 선별방선균의 생리 생화학적 성질 관찰
4. 수리분류학적 방법을 이용한 선별방선균의 분류
5. 최적의 분리방선균의 보존방법 확립

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 균주의 분리 및 보존

한국의 32개 지역과 괌도, 필리핀, 남극 등에서 채취한 150 여개의 시료로부터 약 2500 주 가량의 방선균을 분리하여 10% glycerol 용액에 저장하여 - 80 °C 에서 보존 중이다.

2. 균주의 분류

1) 균주의 선별

분리한 방선균주 중 군집의 형태와 색상이 다른 균주를 선별한 결과 해양으로부터 24주, 호소에서 32주, 해변토양에서 38주, 온대지역토양에서 65주, 열대토양에서 41주, 남극토양에서 34주가 각각 선별되었다.

2) 수리분류학적 방법

234개의 선별균주와 표준균주 8개 균주의 59가지의 생리 생화학적 시험결과를 Taxon program과 Multi variate statistics package program을 이용하여 비교 분석하였다.

3) 서식처에 따른 군집의 분류

서식처별로 clustering한 결과 85% 이상의 유사성을 갖고 있는 군집이 해양에서 3, 호소에서 3, 해변토양에서 5, 온대토양에서 8, 열대토양에서 3, 남극토양에서 4개로 총 165개 균주가 26개의 군집으로 분류되었다.

각 군집의 centroid type strain을 $S_m=90\%$ 이상으로 clustering한 결과 cluster I(해양, 온대토양방선균), II(호소, 해변토양, 온대토양방선균), III(해변토양, 온대토양방선균), IV(해양, 호소방선균), V(온대토양, 온대토양방선균)을 얻었다. 이 결과로 미루어 해양에서 분리된 방선균은 온대지역 토양과 호소에서 분리된 방선균과 유사한 특성을 나타내고 있었다.

극지에서 분리된 방선균은 다른 biotope에서 분리된 방선균과 $S_m=85\%$ 이상으로 clustering되지 않는 결과로 미루어 매우 독특하고 다양한 군집특성을 나타내는 것으로 판단된다.

4) 서식처에 따른 방선균의 특성

해양방선균과 호소방선균의 고분자물질 분해능과 H_2S 생성능은 다른 서식처의 방선균에 비하여 아주 높았다. 해양방선균과 열대방선균의 97%이상은 pH 5.0 - 10.0에서 성장할 수 있었다. 한편 극지방선균과 해양방선균은 항생제 및 성장저해화학물질에 대한 내성이 다른 서식처의 방선균보다 낮은 것으로 미루어 두 생태계는 이들 물질에 대한 오염이 적은 것으로 사료된다.

3. 결론

매우 독특한 환경조건을 갖고 있는 해양과 극지생태계에서 분리한 방선균은 다른 biotope에서 분리한 방선균과 구별되는 다양하고 특이한 성질을 갖고있다. 따라서 해양방선균 및 극지방선균은 앞으로 신물질 탐색대상으로서 주목받아야 할 것으로 사료된다. 보존 중인 2500여개의 방선균은 앞으로 신물질 탐색에 매우 귀중한 자원으로 활용될 수 있다.

Summary

During the performance of a project under the title "A Study on the Isolation, Classification and Maintenance of Marine Actinomycetes for the Screening of Bioactive Substances" we obtained following results.

1. About 2,500 strains of Actinomycetes were isolated from various samples e.g. sea water, sand, sediments of sea and lake, muds, humus, and soils in various climate regions.
2. Isolated strains whose aerial and substrate mycelia showed different colours were selected from each sample and characterized. 234 selected strains included 24 strains from sea, 32 strains from lake, 38 strains from seashore soils, 65 strains from soil in temperate region, 41 strains from tropic soils, and 34 strains from Antarctic soils.
3. For numerical taxonomy of selected strains, data of 59 physiological and biochemical tests were analyzed with Taxon program and Multi variate statistics package program.
4. Cluster analysis with 85% similarity in each biotope generated 26 clusters: 3 clusters each from sea, lake, and tropic soils, 4 clusters from Antarctic soils, 5 clusters from seashore soils, 8 clusters from soils in temperate region.

5. 26 centrotype strains were clustered into 5 groups with Sm value of 90% or more. Centrotype strain of cluster 3(sea) was grouped into cluster I with strain 2044(cluster 18, soils from temperate region). Cluster IV included strain 4503(cluster 1, sea) and strain 309(cluster 4, lake). These results showed selected marine Actinomycetes strains have a taxonomical resemblance to lacustrine Actinomycetes and to soil Actinomycetes from temperate region. None of centrotype strains from Antarctic soils were grouped with strains from other biotopes. This implied Antarctic Actinomycetes have a taxonomical characteristic of its own, probably due to their extreme environments.
6. Marine Actinomycetes and lacustrine Actinomycetes showed higher activity in degradation of polymers like as xanthine and production of hydrogen sulfide. Antarctic Actinomycetes and marine Actinomycetes were relatively sensitive to antibiotics and chemical inhibitors, which implied biotopes like marine or Antarctica were not so much contaminated with such substances.
7. Marine and Antarctic Actinomycetes revealed to have various and extraordinary properties distinguishable from those of other biotopes. So marine Actinomycetes and Antarctic Actinomycetes will deserve more attention in search for noble compounds. In labor stalked 2500 strains are thought be valuable sources for the screening of new microbial products.

목차

1. 서론	9
2. 재료 및 방법	13
2.1. 시료	13
2.2. 표준균주	13
2.3. 배지	14
2.4. 균주 분리 및 보존	20
2.5. 형태학적 특성	20
2.6. 생리 생화학적 특성	22
2.7. Computer analysis	25
3. 결과 및 고찰	27
3.1. 균주 분리 및 보존	27
3.2. 선별균주의 형태학적, 생리 생화학적 특성	30
3.3. 방선균의 수리학적 분류	40
참고문헌	57
부록	64

Contents

1. Introduction -----	9
2. Materials and methods -----	13
2.1. Samples -----	13
2.2. Type strains -----	13
2.3. Media -----	14
2.4. Isolation and preservation -----	20
2.5. Morphological tests -----	20
2.6. Physiological and biochemical tests -----	22
2.7. Computer analysis -----	25
3. Results and discussion -----	27
3.1. Isolation and selection of strains -----	27
3.2. Characteristics of selected strains -----	30
3.3. Numerical taxonomical analysis -----	40
References -----	57
Appendix -----	64

1. 서론

방선균은 1875년 Cohn에 의해 발견된 이래 다양한 자연환경에서 발견되어 왔으며 streptomycin, actinomycin등 많은 항생물질을 생산한다고 밝혀짐으로써 산업적으로 중요한 미생물로서 관심의 대상이 되어졌다. 이제까지 알려진 항생물질은 700여종에 이르며 이 중 100여종이 생산되어 실제 이용되고 있으나 대부분 토양미생물을 대상으로 탐색된 것이었다.

지금까지 유용한 방선균의 탐색방법은 경험에 의존하는 경향이 있었으며 자연생태계에서의 항생물질의 중요성, 방선균의 분류, 분포 및 생태학에 대한 연구가 미비한 결과로 분리방법에 문제가 많았다(Williams and Vickers 1986, 1988). Grein과 Meyers(1958)가 해수의 저질층과 부유물에서 항생제 생성 Actinomycetes를 분리하고 성장에 대한 연구를 한 이래 근래에 와서는 해양생태계 뿐만아니라 산성(Kang 1988), 염기성 환경(Vyas등 1990), 고온, 저온, 고염(Gochnauer등 1975, Johnson등 1986)등 극한 생태계로 부터 방선균이 분리되어서 많은 연구가 진척되어 왔었다. 또한 이러한 방선균으로부터 2차 대사산물을 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있는데 그예로 호열성 *Thermoactinomyces antibioticus*로부터 Thermorubin C (Craveri 1964)이 발견되었으며 Yoshida등(1973)은 저온성 *Streptomyces* sp.에서 항생물질 sp.351을 분리하였다. 해양 생태계로부터는 Okazaki등(1975)이 *Chainia*를 분리하여 새로운 항생제 SS-228Y를 발견하였고 내열성 *Streptomyces* sp.에서 Okami등(1976)은 aplasmomycin을 발견하였다.

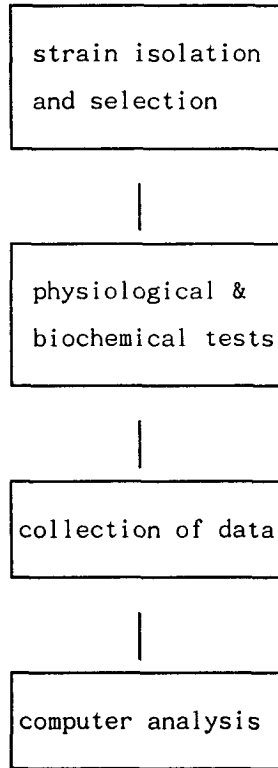
다른 세균에 비해 생태적인 역할이나 분류체계가 정확히 규명되지 않은 방선균의 경우에는(Gyllenberg 1988) 일반적인 배지에서 나타나는 결

과를 갖고 자연 환경에서의 분포를 조사하고 분류위치를 설정한다면 실질적인 분포등을 비교하기 어렵고 특정분류군에 대한 방선균만이 강조될 수 있다. 따라서 새로운 방선균이나 희귀방선균을 효율적으로 얻기 위해서는 선택분리과정이 필요하다(Nonomura and Hayakawa 1988, Omura 1988). 선택분리를 위해서는 다양한 시료의 수집, 시료의 전처리(Pisano 등 1986), 선택분리배지 사용 및 배양방법의 변화(Iubii and Omura 1982) 등이 요구된다. 최근 몇몇 방선균의 경우 수리분류학적 분류, 동정과정 중 얻어진 객관적 결과를 바탕으로한 선택적 분리 배지가 개발되었으며 각 군집에 대해 가장 특징적인 성질을 선택배지 조성에 반영하기도 한다(Athalye 등 1981, McCarthy and Cross 1981).

미생물의 분류방법에는 몇몇 형태적 특성이나 생리적 특성에 따라 분류하는 고전적 분류법(classical taxonomy), 여러 균주들의 많은 형질에 대한 유사도를 컴퓨터를 이용하여 분석하여 수리적으로 분류하는 수리분류법(numerical taxonomy)과 생화학적 분자생물학적 분석방법을 이용하여 세포의 구성성분, 단백질, 핵산등을 비교하는 화학분류법(chemotaxonomy) 등이 있다.

수리분류는 전체적인 유사성에 근거를 두기 때문에 우선 순위가 정해진 몇몇 특징보다도 체계적으로 시험한 많은 양의 정보가 한 군집의 특성을 나타내기때문에 strain variation을 수용할 수 있고 시험균주나 시험항목을 추가하여도 큰 영향을 받지 않는 stability가 있는 장점이 있다(Kurylowicz and Gyllenberg 1988).

수리분류의 이론적 개념을 간단히 요약하면 Fig.1과 같다(Austin and Priest 1986).



- * S_m Value:simple matching
- * clustering:UPGMA(average linkage)
- * centrotpe clustering

Fig.1. Stages in numerical taxonomy analysis

분류대상인 분류단위(OTU)의 각 쌍에 대한 유사도를 구한 후 동질성의 정도에 따라 군집(cluster)을 이룬 OTU를 dendrogram으로 표시한다. Ssm(simple matching coefficient)과 UPGMA(Unweighted pair group method with arithmetic average technique)을 써서 분석할 경우 종(species)으로 분류되기 위해서 유사도가 80-85%, 속(genus)은 60-65%가 되어야 한다.

Dendrogram을 평가할때도 군집내/군집간 유사도(intra/intercluster

similarity)를 구해서 군집의 밀집도와 다른 군집과의 분리정도를 알아본다. 각 군집을 대표하고 있는 OTU를 chemotaxonomy로 분석하기도 하는데 (Goodfellow등 1988) 이를 위해서 OTU의 중심주(centroid type)이나 가상 중심주(HMO)를 구한다.

방선균의 수리분류연구로는 Actinomadura(Athalye등 1985), Actinomyces(Holmberg and Nord 1975), Actinoplanetes(Ruan등 1988), Mycobacterium(Kubica등 1972), Nocardia(Orchard and Goodfellow 1980), Rhodococcus(Helmke and Weyland 1984), Streptomyces(Williams 등 1983), Thermomonospora(McCarty and Cross 1984)등에 대하여 이루어졌다.

지금까지 국내에서 행하여진 방선균에 관한 연구는 한국토양에서 항생 물질을 생산하는 Streptomyces의 분포조사, 분리 및 동정에 관한 연구이며, 대부분의 균주가 중성 토양에서 분리된 균주로 해양이나 극한 환경의 방선균에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 외국의 경우는 많은 종의 방선균이 해양에서 분리 동정되었으며(Kemmerling등 1989) 분리된 방선균이 육지로 부터 유입되어 해양에서 일시적으로 서식하거나 또는 우연히 분리된 개체가 아니라 해양 생태계의 일부분임이 밝혀졌다(Weyland 1981a, b, Weyland and Helmke 1988).

본 연구에서는 생리활성물질 탐색을 위해 해양 방선균을 분리하고 해양 방선균의 특성을 다른 환경의 방선균과 비교 연구하기 위하여 호소, 해변토양, 온대토양, 열대토양, 남극토양에서 다양한 방선균을 분리하여 Taxon Program, MVSP program을 사용하여 서식처에 따른 특성을 수리분류학적 방법으로 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

본 실험에서는 해양방선균을 분리하기 위하여 해수, 해안의 모래, 바다의 sediment, 해수, 염전수, 갯벌흙 등에서 시료를 채취하였다. 해양과 다른 생태학적 환경에서 자라는 방선균을 분리하기 위해서는 국내의 호소, 육상지역 및 열대지역, 극지지역을 대상으로 시료를 수집하였는데 주로 호소의 저질층, 호소주변의 토양, 섬주위 및 바닷가의 토양, 해양지방의 미경작지토양, 내륙지방의 부식토를 중심으로 채취하였다.

시료채취방법은 해수와같은 액체시료는 멸균된 시료병에 직접 수집하였고 토양시료는 표면으로부터 2-5 cm 깊이의 시료를 spatula를 사용하여 멸균된 시료병에 넣은 후 실험실로 운반하였다. 채취한 시료는 신속히 처리하거나 4 °C에 처리전까지 보관하였다.

2.2. 표준균주

방선균의 생화학적 특성시험의 정확성을 검증하기 위하여 다음과같은 균주를 표준균주로 사용하였다.

실험실균주번호	종 명
8336	<i>Micromonospora carboracea</i> ATCC 27114
8339	<i>Streptomyces anulatus</i> ATCC 23345
8340	<i>Streptomyces rimosus</i> NRRL 2234
8341	<i>Streptomyces viridifaciens</i> ATCC 11989
8342	<i>Streptomyces albus</i> ATCC 3004
8343	<i>Streptosporangium roseum</i> ATCC 12428
8347	<i>Oerskovia turbata</i> ATCC 25835
8348	<i>Streptomyces halstedii</i> ATCC 3325

2.3. 배지

배지명칭은 실험실에서 사용한 것을 그대로 명명하였다. ISP배지는 International Streptomyces Project 에서 Streptomyces를 동정하기위해 사용하였던 배지를 변형하여 사용하였다 (Shirling and Gottlieb, 1966).

특별한 설명이 부여되지 않는한 모든 배지는 autoclave로 121 °C, 1bar 에서 15분 간 멸균하였다. PH는 1 mol/l NaOH 용액 또는 HCl용액으로 보정 하였다.

Bennett

(Modified Bennett's agar medium)

Glucose	2.0	g
Yeast Extract	1.0	g
Malt Extract	1.0	g
Peptone	2.0	g
Agar	15	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml

pH 7.4

ISP 1

(Tryptone-yeast extract agar)

Trypton	5.0	g
Yeast Extract	3.0	g
Agar	15	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml

pH 7.0-7.2

ISP 4

(Inorganic salts-starch Agar)

Soluble Starch	10.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	g
NaCl	1.0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	g
CaCO ₃	2.0	g
Trace salts solution A	1.0	ml
Agar	20	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml
pH 7.0-7.4		

ISP 6

(Peptone-yeast extract iron agar)

Peptone	15.0	g
Proteose Peptone	5.0	g
Yeast Extract	1.0	g
Ferric ammonium citrate	0.50	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	0.080	g
Agar	15	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml
pH 7.0-7.2		

ISP 7

(Tyrosine agar)

Glycerol	15.0	g
L-tyrosine	0.5	g
L-asparagine	1.0	g
K ₂ HPO ₄	0.50	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	g
NaCl	0.50	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.010	g
Trace salts solution A	1.0	ml
Agar	15	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml
pH	7.2-7.4	

ISP 9

(Basal mineral salts agar)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.640	g
KH ₂ PO ₄	2.380	g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	5.650	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	g
Trace salts solution B	1.0	ml
Methyl red	0.004	g
Agar	15	g

dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml
pH 6.8-7.0		

당, 유기산, 아미노산 이용능을 시험할 경우에는 시험물질 10% 용액을 여과멸균한 후 원하는 최종농도를 얻을 수 있도록 적당량을 멸균된 ISP 9 배지에 첨가한다.

Trace salts solution A

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.10	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	g
dist. water	100.0	ml

Trace salts solution B

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.640	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.110	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.790	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.150	g
dist. water	100.0	ml

Simmon's citrate agar

Sodium citrate	2.0	g
MgSO ₄	0.20	g

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
Bromothymol blue	0.080	g
Agar	15	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml
pH 6.9		

Triple sugar iron agar

Bacto Beef Extract	3.0	g
Bacto Yeast Extract	3.0	g
Bacto Peptone	15.0	g
Proteose Peptone	5.0	g
Dextrose	1.0	g
Lactose	10.0	g
Sucrose	10.0	g
Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.20	g
NaCl	5.0	g
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0.30	g
Phenol red	0.024	g
Agar	12	g
dist. water	250	ml
Aged sea water	750	ml
pH 7.2		

2.4. 균주 분리 및 보존

해수와 같은 액체 시료는 전혀리없이 직접 Bennett 배지에 적당량 접종하여 유리병으로 도말하였다. 고체시료는 2g정도의 시료를 petri dish에 옮긴 후 50 °C에서 1시간 건조하는 전처리 과정을 거쳐 다른 세균의 수를 감소시킨 후 aged sea water에 희석하여 Bennett배지에 접종하였다.

접종한 agar plate는 30°C 항온기에서 포자형성이 잘 일어나도록 2-4주간 배양하였다.

Agar plate상에서 외관상 방선균 특징을 가진 colony중 해부 현미경(20×, 100×)으로 관찰하여 단일 colony라 단정될 경우 이를 분리하여 Bennett 배지에 접종하였다. 동일 배지에 계대배양을 하면서 순수분리가 확인된 방선균들은 Bennett slant agar에 옮기고 30°C에서 약 7일간 배양하여 균주가 완전히 성장한 후 cap으로 사용된 종이 stopper를 멸균된 고무마개로 교체한 후 4 °C에서 보존하였다.

장기간 보존할 경우는 plate 상의 포자를 glycerol용액에(10% w/v)현탁하여 멸균된 eppendorf tube에 모은 후 - 80 °C의 deep freezer에서 냉동보관하였다.

2.5. 형태적 특성

2.5.1. 균집형태 및 색깔 관찰

Bennett배지와 ISP 4배지에 시험균을 접종하여 30°C에서 14일 간 배양한 후 형태적 특성을 관찰하였다. 색소의 관찰방법은 Locci(1989)에 따라 Actinomycetes의 spore mass(또는 기균사)와 substrate mycelium(기층균사) 및 soluble pigment가 함유된 agar를 택하여 Tresner & Backus (1963)의 색환과 비교하여 색의 변화를 관찰하였다. 그 color 범위는 다음과 같다. Spore mass color는 blue, gray, green, red, violet, white, yellow에서 결정하였고 substrate mycelium과 soluble pigment의 color는 yellow-brown, red-orange, green, blue, violet에서 결정하였다.

2.5.2. 전자 현미경에 의한 관찰

Actinomycetes가 가지고 있는 포자의 형태와 표면구조, 포자사슬의 형태 관찰을 위해 Scanning Electron Microscope(SEM)를 이용하였고 SEM 시료의 준비는 다음과 같이 하였다.

30 °C에서 2주동안 균을 배양한 후 포자가 잘 형성된 ISP4 agar plate에 직접 구멍을 뚫어 8%(w/v) glutaraldehyde용액으로 채우고 plate를 밀봉하여 실온에서 1일동안 방치하여 예비고정(prefixation)하였다. 고정된 시료는 약 5mm×5mm×1mm의 크기로 자른 후 P₂O₅가 들어 있는 밀폐용기에 넣어 - 20 °C에서 3일-4일동안 동결건조하여 수분을 제거하였다. Aluminum stub위에 양면 테이프를 붙히고 그 위에 말린 시료를 올려놓은 후 Bio-Rad E5550 SEM coating system을 사용하여 gold coating한 후 SEM(Philips model 515)으로 관찰하였다.

2.6. 생리 생화학적 특성

시험항목은 Berd(1973), Cross(1989) 및 Lechevalier(1989) 등이 사용한 Actinomycetes등정방법을 참조로 선별하였다. 모든 균주는 Bennett배지에서 1주일 동안 30 °C로 배양한 후 96 well green plate에 분주된 시험배지에 replica(Sigma)를 사용하여 접종하였다.

2.6.1. Melanoid pigment 생성능

ISP 1(Trypton-Yeast extract agar), ISP 6(Pepton-Yeast extract iron agar), ISP 7(Tyrosine agar)을 사용하였으며 30 °C에서 일주일 간 배양한 후 greenish black의 색이 나타났을 때 positive로 판정하였다.

2.6.2. 탄소원 이용능

여과멸균한 탄소원을 기본배지인 ISP 9 배지에 첨가하여 접종하였다. Test sugar로서 glucose, fructose, sucrose, xylose, arabinose, rhamnose, inositol, mannitol, dulcitol, mannose, raffinose, lactose, maltose, cellobiose, galactose, dextrin, trehalose, glycogen, salicin, glycerol을 최종농도가 1%(w/v)로 되도록 첨가 하였다.

30 °C에서 일주일 간 배양한 후 결과를 분석하였는데 sugar를 넣지 않은 것을 control로 sugar 이용능의 기준으로 삼아 control보다 좋은 성장을 나타낸것을 positive라고 했고, control보다 성장상태가 저조한 것을 negative로 판정하였다.

Sugar의 이용으로 acid가 생성되는 것을 시험할 경우는 methyl red

(0.004g/l)가 첨가된 배지에서 30 °C에서 1주일 간 배양 후 배지가 red color로 변하면 산생성능 positive라고 판정하였다.

2.6.3. 유기산 이용능

유기산 이용능은 minimal salts media로 ISP 9를 사용하였으며 시험한 유기산은 Na-acetate, Na-benzoate, Na-succinate, Na-malate, Na-lactate, Na-tartrate로 최종농도가 1.0%가 되도록 첨가하였고 citrate는 0.2%로 Simmon's citrate agar를 사용하였다. 30 °C에서 1주일 간 배양한 후 결과를 기록하였다.

2.6.4. 아미노산 이용능

Amino acid의 이용능은 ISP 9 media에 tyrosine, serine, alanine을 최종농도가 0.2% 되도록 첨가하여 30 °C에서 1주일 간 배양한 후 관찰하였다.

2.6.5. 분해능

Degradation test로는 ISP 9배지에 xanthine(1%), casein(skim milk 1%), esculin(esculin 0.01% + ferric citrate 0.05%), starch(0.2%)를 첨가하여 30°C에서 1주일 간 배양한 후 xanthine과 casein은 배지가 투명해지면 positive로 기록하였다. Gelatin(12%)을 agar 대신 첨가하여 배양 후 gelatin 용해현상이 나타나면 positive로 판정하였다. Esculin 분해 positive인 경우는 배양 후 배지의 색이 검거나 흑갈색으로 변하였다.

2.6.6. Catalase test

Catalase test는 Bennett 배지에서 1주일 간 배양한 균체에 3%의 H_2O_2 용액을 떨어뜨려 기포가 발생되면 positive라고 판정하였다.

2.6.7. Nitrate reduction test

Bennett 배지에 1주일 간 배양한 균체를 증류수에 현탁하고 Griess-Ilosvay reagent(I,II)를 첨가하였을 때 적색반응이 나타나면 positive로 판정하였다.

2.6.8. H_2S 의 생성능

Tripple Sugar Iron Agar(Bacto)에 30 °C에서 1 주일 동안 배양한 후 Black의 color를 나타내면 positive 라고 판정 하였다.

2.6.9. 성장온도, pH, 염도

pH 에 대한 감수성은 Bennet 배지를 각각 pH 5.0, pH 7.4(control), pH 10.0으로 조절하여 시험하였고, 온도에 따른 성장 특성은 4°C, 20°C, 30°C (control) 에서 조사되었다. 또한 염농도에 따른 감수성은 각각 3%, 7%의 염 농도에서 조사되었다.

2.6.10. 항생제에 대한 감수성

사용된 항생제 및 그 농도는 gentamicin(100 μ g/ml), neomycin(50 μ g/ml), vancomycin(50 μ g/ml), penicillin G(10 I.U), rifampicin(50 μ g/ml), tobramycin(50 μ g/ml) 이다. Bennett 배지에 6줄로 균을 streak한 후 직경 5mm로 자른 Whatman paper No.1을 각 항생제액에 적신 후 streak한 부위에 올려놓고 30 °C에서 1주일 간 배양 하였다. 증류수에 적신 여과지를 올려 놓은 것을 control로 배양 후 나타나는 inhibition zone을 비교측정하였다.

2.6.11. 성장저해물질에 대한 내성

Chemical inhibitor에 대한 감수성은 Bennett 배지에 crystal violet (0.001%), sodium azide (0.2%), potassium tellurite (0.05%), phenol (0.1%)를 첨가하여 30°C에서 1주일 동안 배양한 후 성장정도를 비교 관찰 하였다.

Lysozyme에 대한 감수성은 Bennett배지에 lysozyme의 농도가 5mg/100ml 이 되도록 첨가하여 30 °C에서 1주일간 배양한 후 성장결과를 비교 조사하였다.

2.7. Computer analysis

+ 또는 - 로 수집된 data는 Taxon program으로 그 code를 0 과 1 로 변환한 후 MVSP Program 을 사용하여 similarity를 구한 후 cluster analysis 과정을 거쳐 그 결과를 dandrogram으로 나타내었다. 각 OTU들 간의 similarity는 S_{sm} 상수를 이용하여 계산하였고, clustering은 UPGMA 군집연

산법에 따라 85%이상의 유사성을 갖는 3개 이상의 OTU를 한 cluster로 규정하였다. 서식처별로 clustering한 후에는 한 cluster내의 centroid와 OTU들간의 intra-cluster similarity를 각각 구하였다. 또한 한 서식처내에서 cluster들 사이의 minimal inter-cluster similarity를 구하였다.

또한 분리균주의 생리 생화학적 특성을 서식처별로 비교하기 위하여 각 서식처의 총균주의 각 시험항목에 대한 positive 결과를 백분율로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주 분리 및 보존

한국의 32개 지역과 괌도, 필리핀, 남극 등에서 150여개의 시료를 채취하여 약 2500주 가량의 방선균을 분리하고 서식처에 따라 해양, 호소, 해변 토양, 온대지역토양, 열대토양, 극지토양방선균으로 분류하였다. 분리한 방선균주의 ISP4 배지와 Bennett 배지에서 포자색상, 기충균사의 색상, 수용성색소 생성여부 및 색상을 비교 관찰하여 각 시료 별로 다른 색상이나 군집형태를 갖고 있는 균주를 선별하였다. Table 1에 요약한 바와 같이 시료특성 및 시료채취 지역에 따라 해양으로부터 24주, 호소에서 32주, 해변토양에서 38주, 온대지역토양에서 65주, 열대토양에서 41주, 남극토양에서 34주가 각각 선별되었다.

분리된 2500 여 균주의 Bennett agar plate 에 배양된 포자는 glycerol용액(20% w/v)에 현탁하여 멸균된 eppendorf tube에 모은 후 -80°C 의 deep freezer에서 냉동보존하였다. 선별된 방선균들은 Bennett slant agar에 배양한 후 고무마개로 밀폐하여 4 °C에서 보존하였다.

Table 1. Sampling sites and number of selected strains from each sample.

No.	채취지역	시료특성	선별균주수
1	대변항	ES	3
2	남해	ES	1
3	인천	ES	2
4	일광	ES	7
		ES	1
5	홍도	ES	6
		OS	10
6	군산	ES	2
7	태종대	ES	1
		OS	2
8	광죽포	ES	1
		OS	2
9	화진포	ES	1
10	팔당	EL	18
		OH	13
11	청송	EL	7
12	공지천	EL	2
13	삽교천	EL	5
14	다대포	OS	3
15	속초	OS	4

Table 1. Continued.

No.	채취지역	시료특성	선별균주수
16	대 천	OS	1
17	완 도	OS	4
18	울릉도	OS	4
		OH	5
19	구조라	OS	7
20	서 산	OH	1
21	인하대	OH	2
22	포 천	OH	2
23	지리산	OH	4
24	영 암	OH	6
25	당 진	OH	10
26	불영계곡	OH	1
27	안 동	OH	5
28	봉의산	OH	2
29	무등산	OH	3
30	철 원	OH	5
31	송 정	OH	4
32	해운대	OH	2
33	괘	OT	11
34	필리핀	OT	30
35	남 극	OA	34

(약자는 부록참조)

3.2. 선별균주의 형태학적, 생리 생화학적 특성

선별균주 총 234개와 표준균주 8개 균주의 ISP4 배지와 Bennett 배지에 배양 결과 나타난 포자색상, 기층균사의 색상, 수용성색소 생성여부 및 색상은 부록에 요약하였다.

주사현미경으로 관찰한 결과 포자사슬의 형태는 대부분 straight 또는 flexible 하며 Fig.2에서 보는바와 같이 10개 이상의 포자가 한 포자사슬을 이루고 있었다. Spira형태나(Fig.3) Rectinaculum-Apertu 형태(Fig.4)의 포자사슬모양이 관찰되기도하였는데 대부분 한 포자사슬 내의 포자수는 10개 이상이었다. 포자표면은 대부분 smooth하나 (Fig.5) spiny하거나 (Fig.6) warty한 포자도 관찰되었다(Fig.7). 또한 Fig.8과 같은 nocardioform의 filaments를 가진 방선균이나 Fig.9의 monospore 형태의 방선균등 다양한 형태의 방선균이 관찰되기도 하였다. 포자사슬의 형태, 포자수, 포자표면을 주사현미경으로 관찰한 결과는 부록에 요약하였다.

A)



B)



Fig.2. Straight to flexuous (Rectus-Flexibilis) spore chains of isolated Actinomycetes strains: A: strain 616, B: strain 8327.

A)



B)

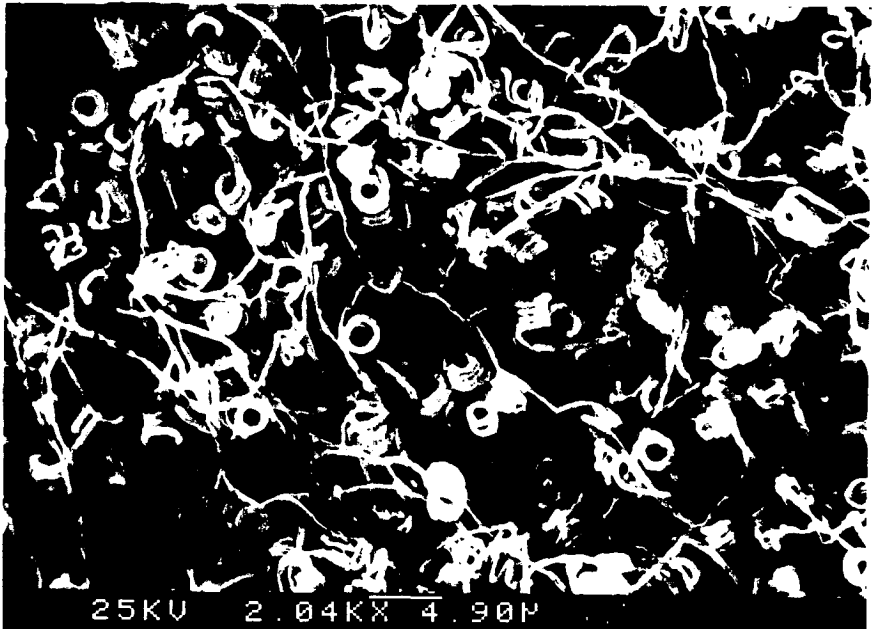


Fig.3. Spiral (*Spira*) spore chains of isolated Actinomycetes strains:
A: strain 7651, B: strain 8328.

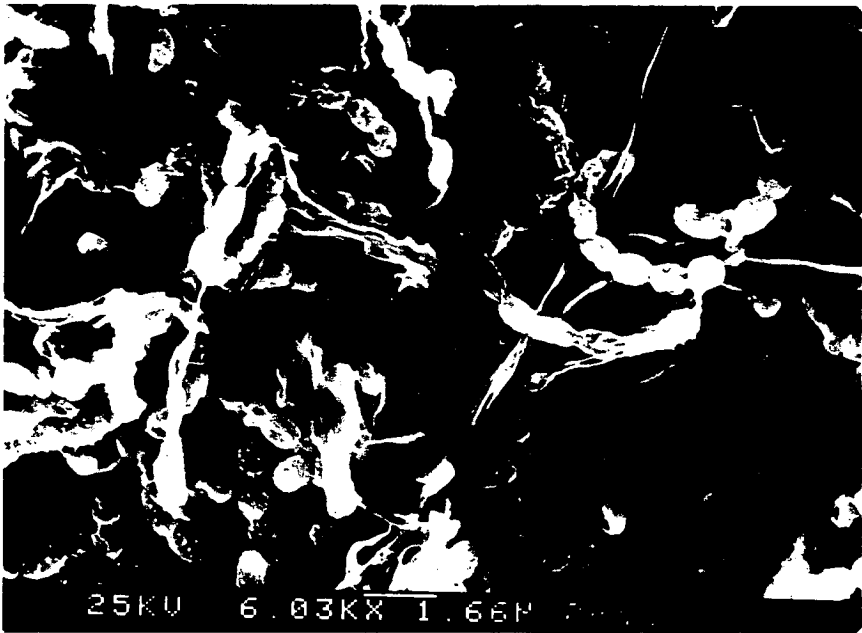


Fig.4. Looped (Rectinaculum-Apertu) spore chains of isolated Actinomycetes strain 8330.

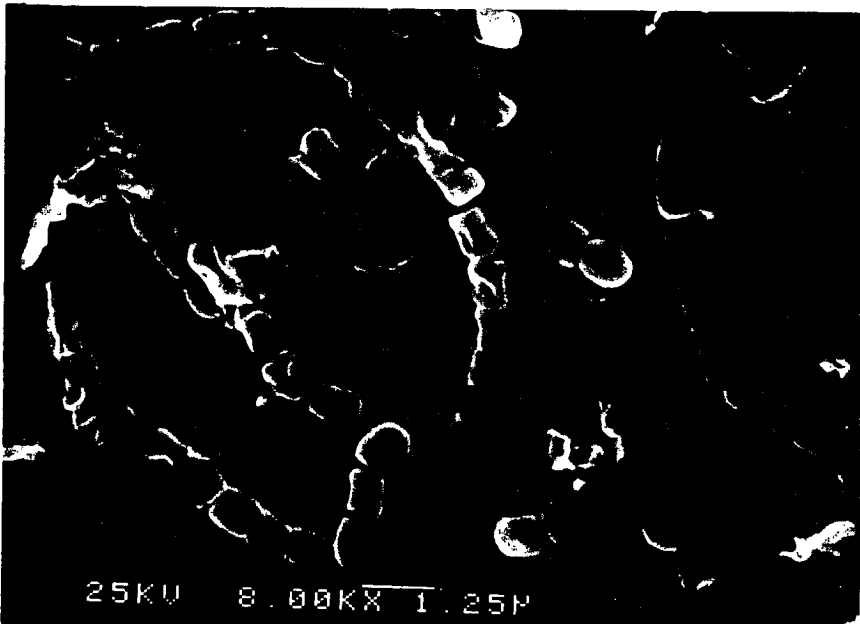


Fig.5. Smooth spores of isolated Actinomycetes strain 1312.

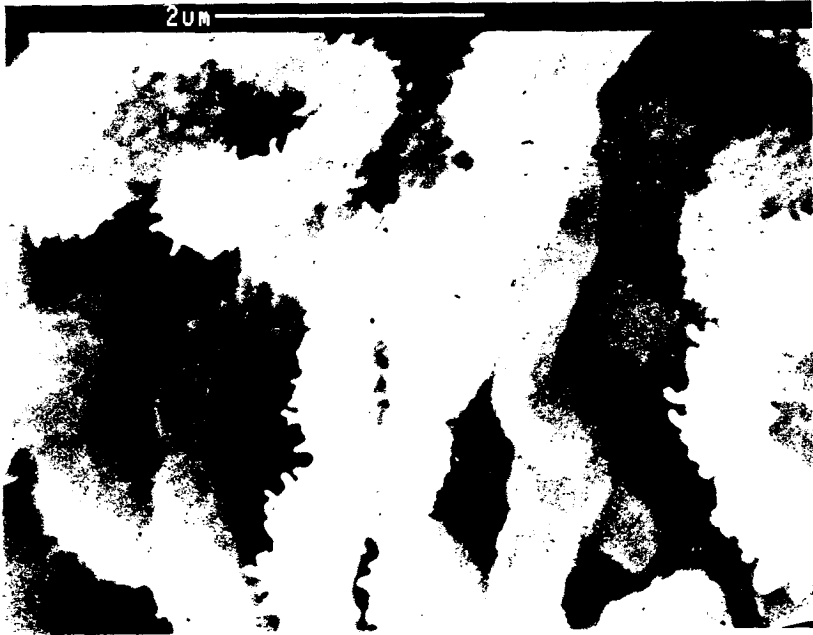
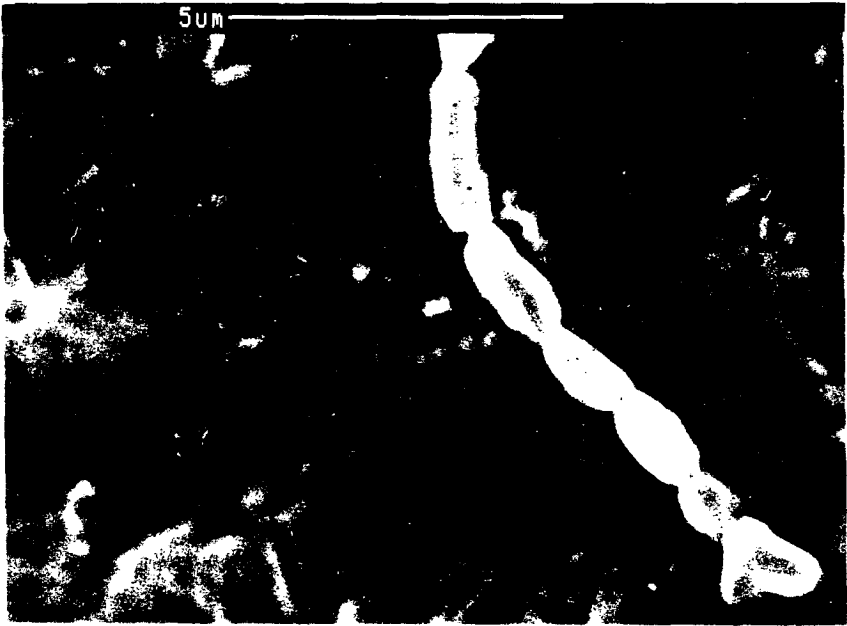


Fig.6. Spiny spores of isolated Actinomycetes strain 3717.



Fig.7. Warty spores of isolated Actinomycetes strain 8260.

A)



B)

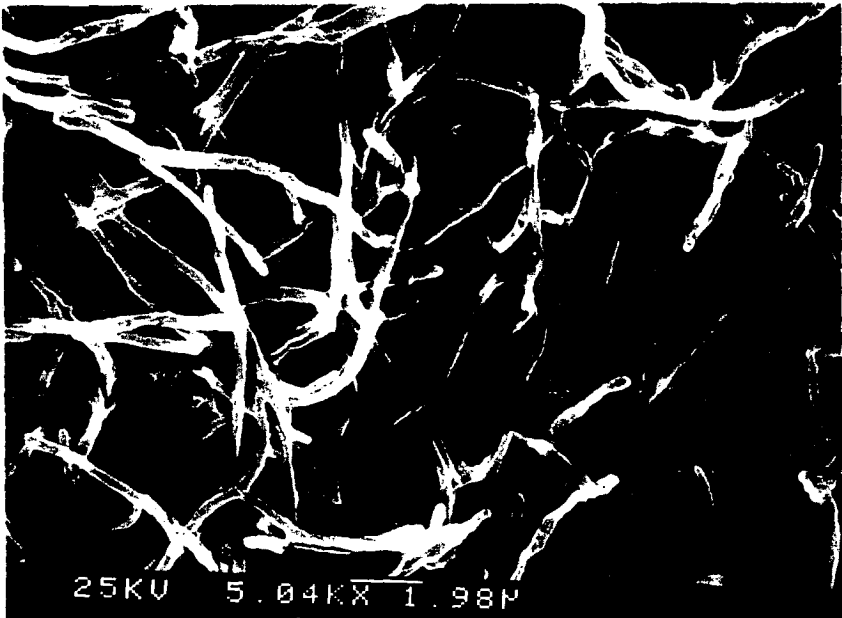
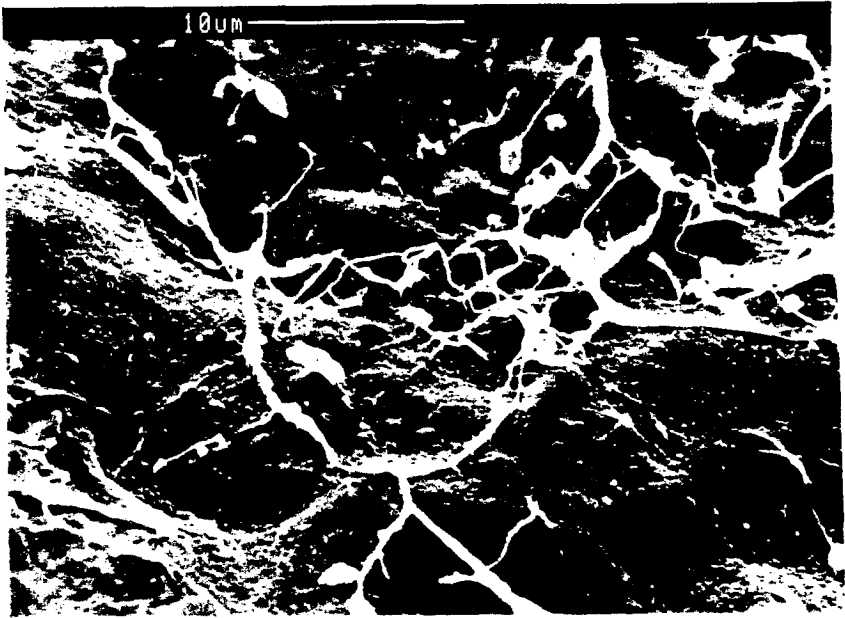


Fig.8. Filaments of isolated nocardioform Actinomycetes strains: A: strain 9, B: strain 8316.

A)



B)

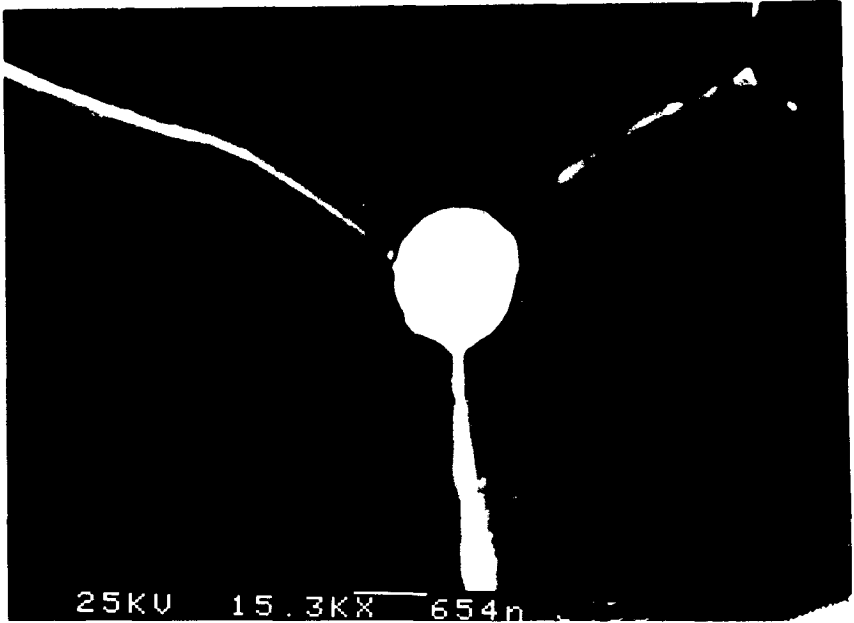


Fig.9. Single spore producing Actinomycetes strains: A: strain 1308,
B: strain 4505.

시험균주의 멜라닌색소형성, 탄소원 및 질소원 이용, 생화학적 분해능, 효소특성, 성장특성, 항생제 및 성장저해물질 내성 등 (2.6.참조) 59가지의 생리, 생화학적 시험결과는 부록에 수록하였다.

표준균주 8균주의 형태학적 관찰 결과와 생리시험의 결과는 Bergey's manual(Locci 1989)에 나타난 결과와 일치하였는 데 이로써 시험의 오차가 거의 없었음을 확신할 수 있었다.

각 서식처집단의 생리 생화학적 특성을 비교하기 위하여 시험 항목 결과 전체에서 positive항목을 percentage로 나타내어 서식처 별로 분석하고 그 결과를 Table 2에 요약하였다.

서식처에 따른 방선균의 특성을 보면 모든 서식처의 방선균 80%이상이 glucose, fructose, mannose, cellobiose, galactose, dextrin, glycogen, glycerol를 탄소원으로 잘 이용할 수 있었다. 해양방선균과 호소방선균은 유사한 탄소원 이용 spectrum을 나타내었는데 sucrose, rhamnose, inositol, dulcitol, raffinose, lactose등에 대한 이용률은 낮았다. 또한 다른 서식처의 방선균에 비하여 xanthine, gelatin 등의 고분자물질에 대한 분해능과 H₂S생성능이 아주높았다. 해양 또는 열대지역에서 분리한 균주의 97%이상이 pH5.0 - 10.0에서 성장가능한 결과는 분리된 해양방선균과 열대방선균의 성장 pH의 범위가 넓다는 것을 시사한다. 해변토양에서 분리한 균주들은 다른 방선균이 잘 이용하지 못하는 inositol을 탄소원으로 이용할 수 있으며 dulcitol 이나 raffinose도 이용하였다. 극지방선균과 해양방선균은 rifampicin 같은 항생제 및 phenol 등의 성장저해화학물질에 대한 내성이 다른 서식처의 방선균보다 낮았다. 이것으로 미루어 두 생태계는 이들 물질에 대한 오염이 적은 것으로 사료된다.

Table 2. Cultural and physiological characteristics of Actinomycetes:
percent of positive reactions.

No. of STRAINS	BIOTOPE	SEA	LAKE	SEA SHORE	TEMPERATE REGION	TROPIC REGION	ANTARCTIC REGION
		24	32	38	65	41	34
CHARACTERISTICS		24	32	38	65	41	34
MELANIN PRODUCTION	IS1	4.2	6.3	2.6	1.5	9.8	5.9
	IS6	16.7	21.9	7.9	3.1	4.9	0.0
	IS7	4.2	0.0	0.0	7.7	24.4	38.2
SUGAR UTILIZATION	CON	54.2	37.5	52.6	33.8	56.1	61.8
	GLU	100.0	96.9	97.4	84.6	97.6	94.1
	FRU	100.0	93.8	89.5	93.8	87.8	85.3
	SUC	58.3	43.8	65.8	58.5	78.0	38.2
	XYL	100.0	100.0	94.7	95.4	95.1	76.5
	ARA	100.0	96.9	100.0	84.6	95.1	70.6
	RHA	41.7	34.4	65.8	41.5	75.6	67.6
	INO	66.7	43.8	92.1	49.2	80.5	47.1
	MAN	100.0	96.9	100.0	95.4	100.0	79.4
	DUL	58.3	31.3	71.1	61.5	63.4	17.6
	MAO	100.0	96.9	97.4	93.8	92.7	97.1
	RAF	41.7	25.0	76.3	52.3	61.0	47.1
	LAC	54.2	34.4	86.8	73.8	80.5	79.4
	MAL	100.0	100.0	97.4	73.8	90.2	85.3
	CEL	100.0	93.8	100.0	87.7	92.7	85.3
	GAL	100.0	100.0	89.5	81.5	92.7	91.2
	DEX	100.0	90.6	94.7	86.2	92.7	88.2
TRE	100.0	93.8	100.0	81.5	97.6	73.5	
GLY	100.0	96.9	97.4	90.8	97.6	91.2	
SAL	91.7	71.9	78.9	72.3	78.0	67.6	
GLC	91.7	93.8	94.7	96.9	85.4	82.4	
ORGANIC ACID UTILIZATION	ACE	70.8	62.5	60.5	76.9	78.0	67.6
	BEN	0.0	0.0	21.1	0.0	0.0	0.0
	CIT	70.8	50.0	55.3	50.8	0.0	0.0
	SUN	100.0	100.0	89.5	92.3	87.8	67.6
	MAT	100.0	93.8	84.2	89.2	82.9	55.9
	LAT	87.5	78.1	71.1	92.3	75.6	64.7
	TAR	50.0	53.1	63.2	72.3	73.2	38.2

Table 2. Continued.

No. of STRAINS		SEA	LAKE	SEA SHORE	TEMPERATE REGION	TROPIC REGION	ANTARCTIC REGION
BIOTYPE							
CHARACTERISTICS		24	32	38	65	41	34
AMINO ACID AS SOLE C & N	ALA	87.5	90.6	97.4	89.2	97.6	82.4
	SER	95.8	93.8	100.0	84.6	97.6	76.5
	TYR	95.8	96.9	89.5	92.3	85.4	82.4
DEGRADATION OF POLYMER	STA	100.0	90.6	92.1	93.8	95.1	97.1
	CAS	100.0	90.6	100.0	98.5	97.6	76.5
	XAN	87.5	87.5	55.3	75.4	78.0	73.5
	GEL	91.7	93.8	26.3	49.2	61.0	79.4
	ESC	75.0	50.0	34.2	36.9	24.4	76.5
BIOCHEMICAL TEST	CAT	62.5	68.8	65.8	86.2	78.0	94.1
	NIT	29.2	50.0	50.0	24.6	17.1	0.0
	H2S	95.8	96.9	5.3	9.2	7.3	5.9
OPTIMAL GROWTH CONDITION	PH5	100.0	87.5	73.7	75.4	97.6	88.2
	PH1	100.0	96.9	92.1	81.5	100.0	88.2
	TM4	8.3	3.1	18.4	32.3	0.0	29.4
	TM2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	SA3	95.8	93.8	97.4	80.0	100.0	94.1
	SA7	91.7	100.0	92.1	76.9	97.6	76.5
ANTIBIOTICS RESISTANCE	GEN	0.0	0.0	2.6	3.1	0.0	0.0
	NEO	4.2	6.2	15.8	13.8	9.8	0.0
	RIF	25.0	50.0	65.8	40.0	58.5	0.0
	TOB	12.5	28.1	26.3	33.8	17.1	8.8
	VAN	8.3	15.6	13.2	15.4	12.2	2.9
	PEN	91.7	90.6	92.1	90.8	90.2	82.4
CHEMICAL RESISTANCE	CRY	12.5	3.1	15.8	6.2	4.9	2.9
	SOD	12.5	6.3	5.3	6.2	7.3	8.8
	POT	4.2	3.1	10.5	7.7	17.1	32.4
	PHE	54.2	81.3	81.6	93.8	95.1	47.1
	LYS	66.7	40.6	78.9	78.5	100.0	67.6

(약자는 부록참조)

3.3. 방선균의 분류

3.3.1. 서식처별 방선균의 분류

Biotope별로 clustering한 결과 얻어진 각 서식처별 dendrogram은 Fig.10 부터 Fig.15 에 나타내었다. Intra/intercluster similarity, centrotypic 균주 및 cluster 수 등 수리분류학적 방법으로 분류한 분석결과를 Table 3 에 요약하였다.

85% 이상의 유사성을 갖고 있는 군집은 해양에서 3, 호소에서 3, 해변토양에서 5, 온대토양에서 8, 열대토양에서 3, 남극토양에서 4개로 총 122개 균주가 26개의 군집으로 분류되었다. 분리균주 234개의 균주 중 약 50% 정도인 122개 균주만 clustering 되었지만 한 cluster내의 intracluster similarity는 대부분 89%이상으로 각 cluster내의 균주들은 높은 유사도를 갖고 있었다. 각 서식처의 44-59%의 균주들은 ungrouped되었다.

군집수가 각각 3개인 해양, 온대, 호소지역의 방선균은 minimal intercluster similarity가 63, 61, 56 % 인 반면, cluster 8개를 가진 온대지역 토양방선균은 39%를 나타내었다. 해변토양 방선균의 경우는 5개의 cluster에 51%의 minimal intercluster similarity를, 극지 방선균은 4개의 cluster에 41%의 minimal intercluster similarity를 나타내었다.

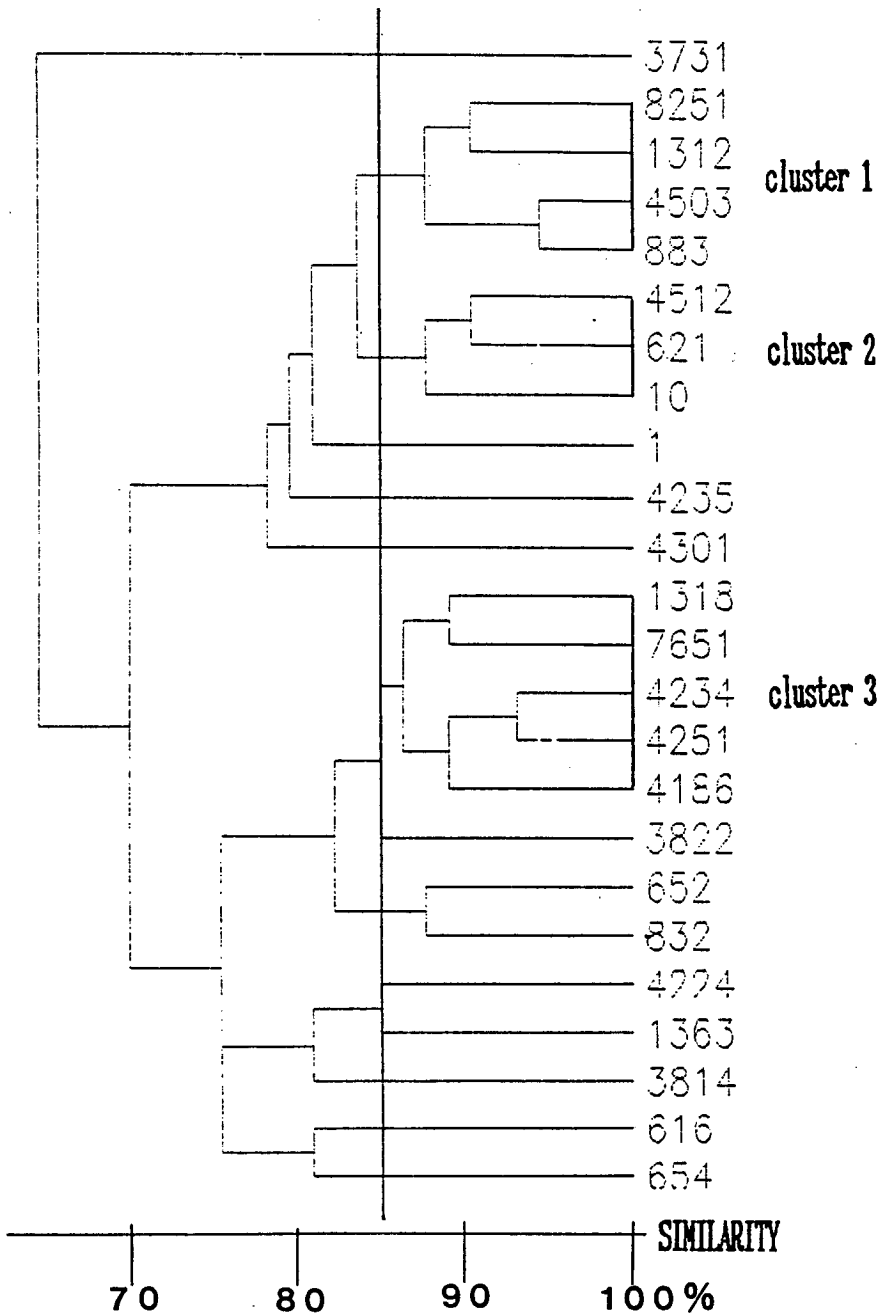


Fig.10. Dendrogram of isolated marine Actinomycetes strains.

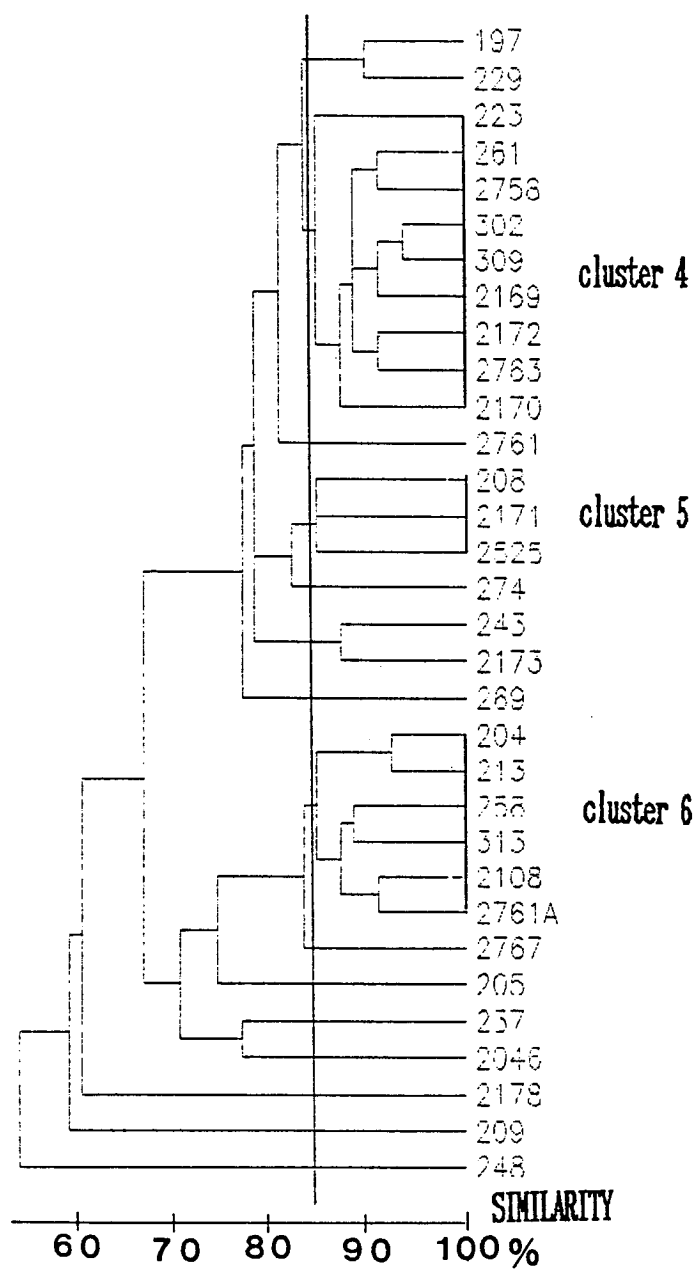


Fig.11. Dendrogram of Actinomycetes strains isolated from lake.

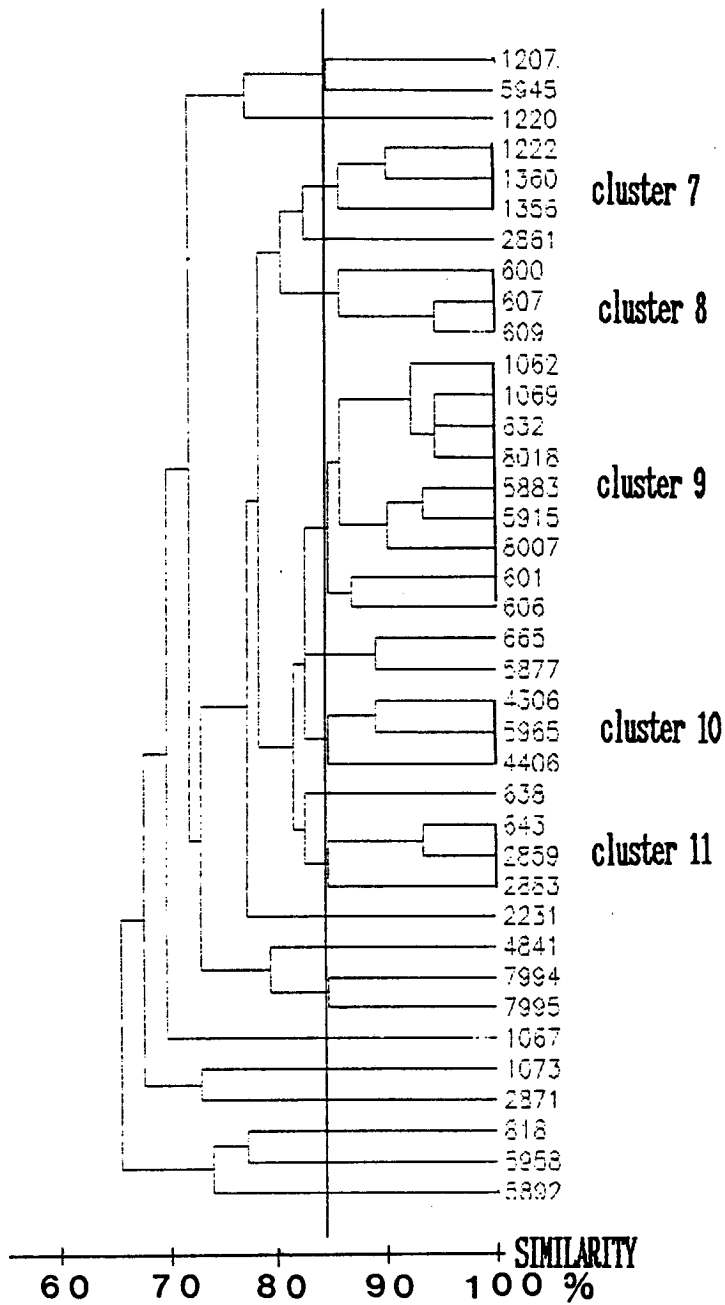


Fig.12 Dendrogram of soil Actinomycetes strains isolated from seashore.

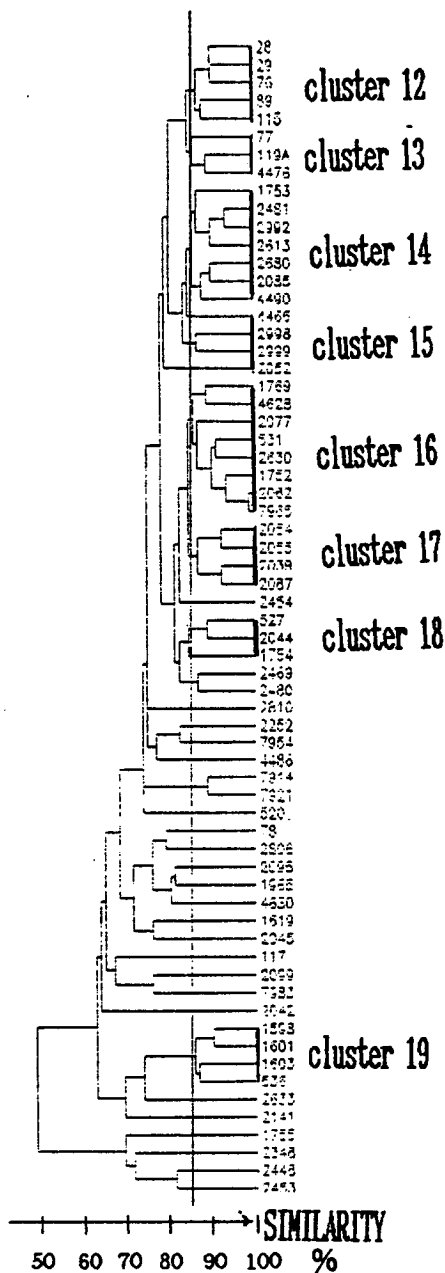


Fig.13 Dendrogram of soil Actinomycetes strains isolated from temperate region.

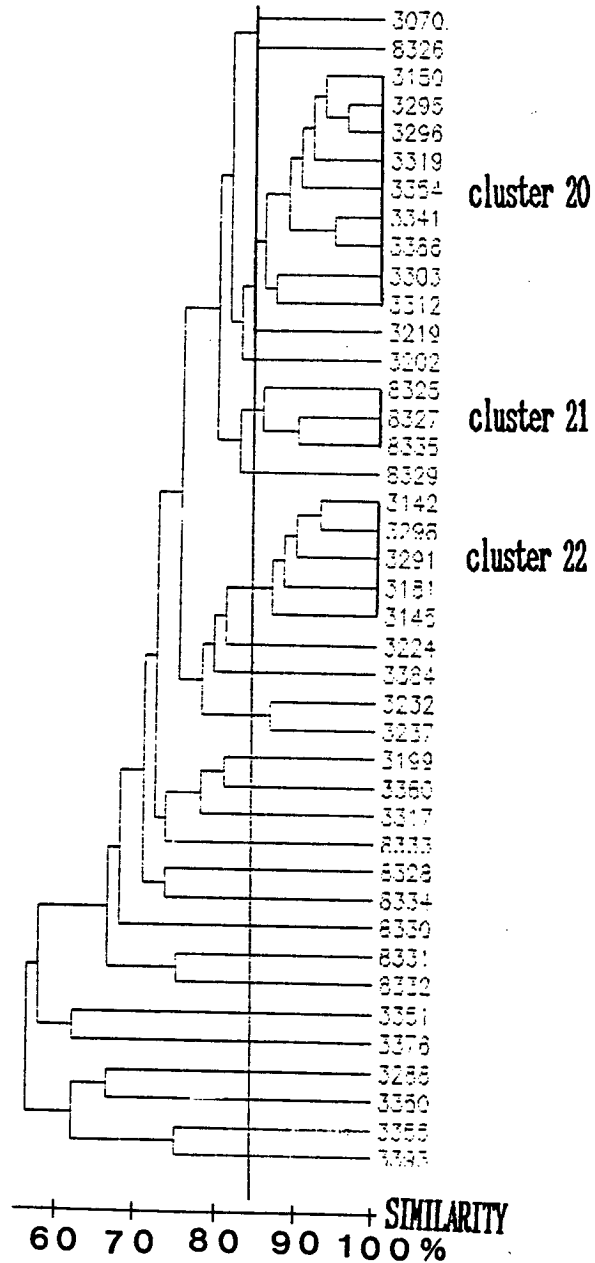


Fig.14 Dendrogram of soil Actinomycetes strains isolated from tropic region.

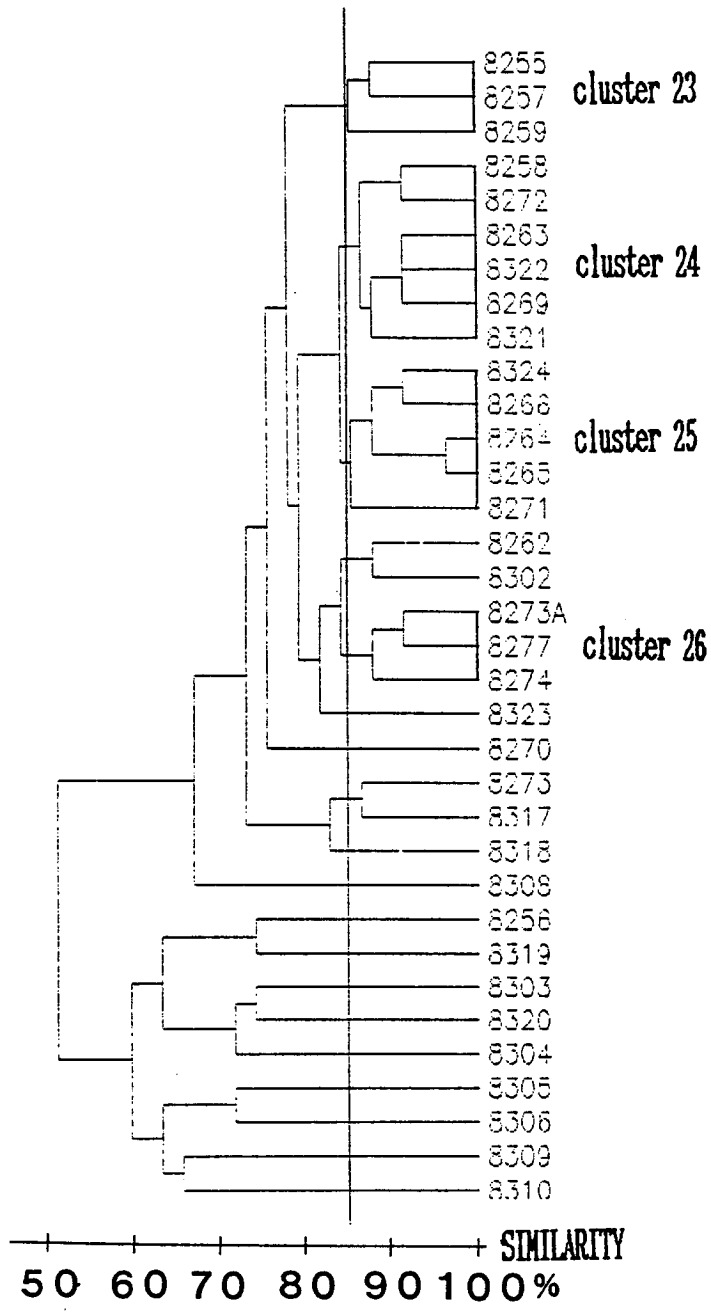


Fig.15 Dendrogram of soil Actinomycetes strains isolated from Antarctica.

Table 3. Data of the numerical taxonomic analysis.

(1) Biotope	(2) Number of Actinomycetes tested	(3) Minimal Site of the analysis	(4) Number of clusters	(5) Number of ungrouped strains	(6) $\bar{x}(5)$ (2)	(7) Clusters and (Number of strains per cluster)	(8) Strain number of the centroid strain and its S_{str}	(9) Intracuster S_{str} of the clusters	(10) S_{s} of the value for S_{str}	(11) $(S_{\text{s}}/S_{\text{str}}) \times 100$
Sea	24	63	3	12	50.0	1(4)	4503 (94.4)	92.7	1.46	1.6
						2(3)	4512 (92.4)	92.1	0.48	0.5
Lake	32	56	3	14	43.8	4(9)	309 (94.3)	92.1	1.52	1.6
						5(3)	208 (89.8)	89.8	0	0
Sea shore	38	51	5	17	44.7	6(6)	258 (91.2)	90.3	0.70	0.7
						7(3)	1360 (89.8)	88.7	1.29	1.4
Temperate region	65	39	8	28	43.1	8(9)	607 (89.8)	89.8	2.24	2.5
						10(3)	8018 (89.9)	89.9	1.56	1.8
Tropic region	41	61	3	24	58.5	11(3)	5965 (89.8)	88.7	1.29	1.5
						12(5)	2859 (91.5)	89.8	2.24	2.5
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	76 (92.8)	76	91.5	0.85	0.9
						13(3)	4476 (90.7)	89.8	0.85	0.9
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	14(7)	2481 (92.1)	90.8	1.08	1.2
						15(3)	2998 (88.1)	87.5	0.92	1.1
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	16(8)	2062 (93.2)	90.5	2.07	2.3
						17(4)	2055 (92.1)	91.5	0.65	0.7
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	18(3)	2044 (89.8)	88.1	1.29	1.5
						19(4)	1598 (88.7)	88.1	0.65	0.7
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	20(9)	3295 (92.1)	92.1	1.40	1.5
						21(3)	8327 (91.5)	90.6	0.98	1.1
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	22(5)	3298 (94.9)	93.9	0.77	0.8
						23(3)	8255 (89.8)	88.7	0.97	1.1
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	24(6)	8258 (92.2)	90.4	0.97	1.1
						25(5)	8324 (91.5)	90.2	1.28	1.4
Antarctic region	34	41	4	17	50.0	26(3)	8277 (93.2)	90.6	1.96	2.2
						26(3)	8277 (93.2)	90.6	1.96	2.2

3.3.2. 서식처간 방선균의 분류학적 비교

Table 3 의 26개의 centrotypic strain을 $S_m=90\%$ 이상으로 clustering 한 결과 12개의 centrotypic들이 5개의 cluster로 나누어졌다. 그 결과는 Fig.16에 나타내었다. Cluster I 은 해양 cluster 3 및 온대토양 cluster 18번의 centrotypic 방선균인 4234 및 2044로 이루어져 있다. 호소 cluster 6의 중심주 258은 해변토양 cluster 9의 중심주 8018, 온대토양 cluster 16의 중심주 2062 및 열대토양 cluster 20의 3295 균주와 함께 cluster II로 분류되었다. cluster III는 해변토양 cluster 7의 중심주 1360 과 온대토양 cluster 17의 2055 중심주로 이루어져 있다. 해양 cluster 1의 4503 균주와 호소 cluster 4의 309균주는 cluster IV를 이루었다. 온대토양 cluster 중 cluster 12의 중심주 76과 cluster 13의 4476은 한 cluster로 분류되어 cluster V를 이룬다.

이 결과로 미루어 cluster I과 IV에서 보는 바와 같이 해양에서 분리된 방선균은 온대지역토양과 호소에서 분리한 방선균과 유사한 특성을 나타내고 있다. 극지방선균은 $S_m=90\%$ 이상에서는 다른 서식처의 cluster centrotypic과 cluster를 이루지 않았는데 이는 선별한 극지방선균이 타 서식처의 방선균과 다른 분류학적 특성을 지니고 있음을 나타낸다.

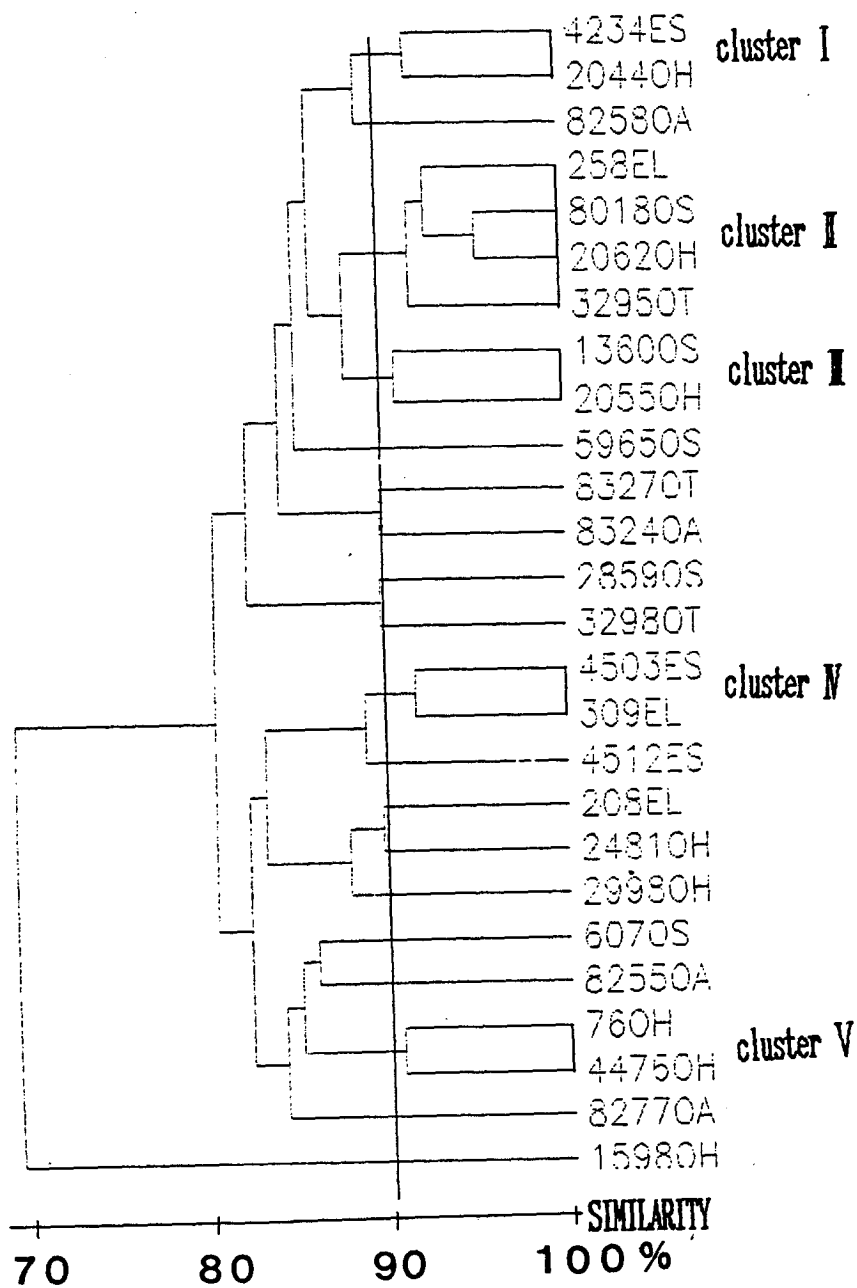


Fig.16. Dendrogram of 26 centrotypic strains.

234 개의 선별균주전체를 8 개의 표준균주와 함께 clustering한 결과를 Fig.17 의 dendrogram 에 나타내었다. 그림과 같이 166개의 균주가 23개의 cluster로 분류될 수 있었는데 표준균주 중에서는 한 균주만 clustering 되었다. 따라서 나머지 7개 표준균주와 같은 종은 분리균주에 없다고 추정할 수 있다. 분리균주616(해양방선균), 8326(열대토양방선균), 8324 및 8266(극지방선균)들은 표준균주8339 (*Streptomyces anulatus* ATCC 23345)와 함께 한 cluster를 이루었다.

각 biotope의 방선균을 수리분류학적 방법으로 분류하고 비교한 결과 매우 독특한 환경조건을 갖고 있는 해양과 극지생태계에서 분리한 방선균은 다른 biotope에서 분리한 방선균과 구별되는 다양하고 특이한 성질을 갖고 있음을 알 수 있었다.

앞으로는 기존의 여러가지 probabilistic identification matrix를 이용하여 해양방선균이나 극지방선균을 속(genus)이나 종(species)까지 동정할 수 있는지를 확인해 볼 예정이다. 또한 여러가지 분류데이터를 토대로 해양이나 극지 방선균의 컴퓨터 동정 행렬 프로그램 작성이 필요할 것이다. 아울러 균주의 명확한 분류 및 동정을 위하여 분리균주의 chemotaxonomy가 요구된다.

이상과 같이 해양방선균 및 극지방선균은 다른 환경에서 분리되는 방선균과는 달리 특이한 성질을 갖고 있는 것으로 미루어 앞으로 다양한 신규 생체활성물질을 성공적으로 탐색하는데 있어서 주요한 탐색대상으로서 계속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

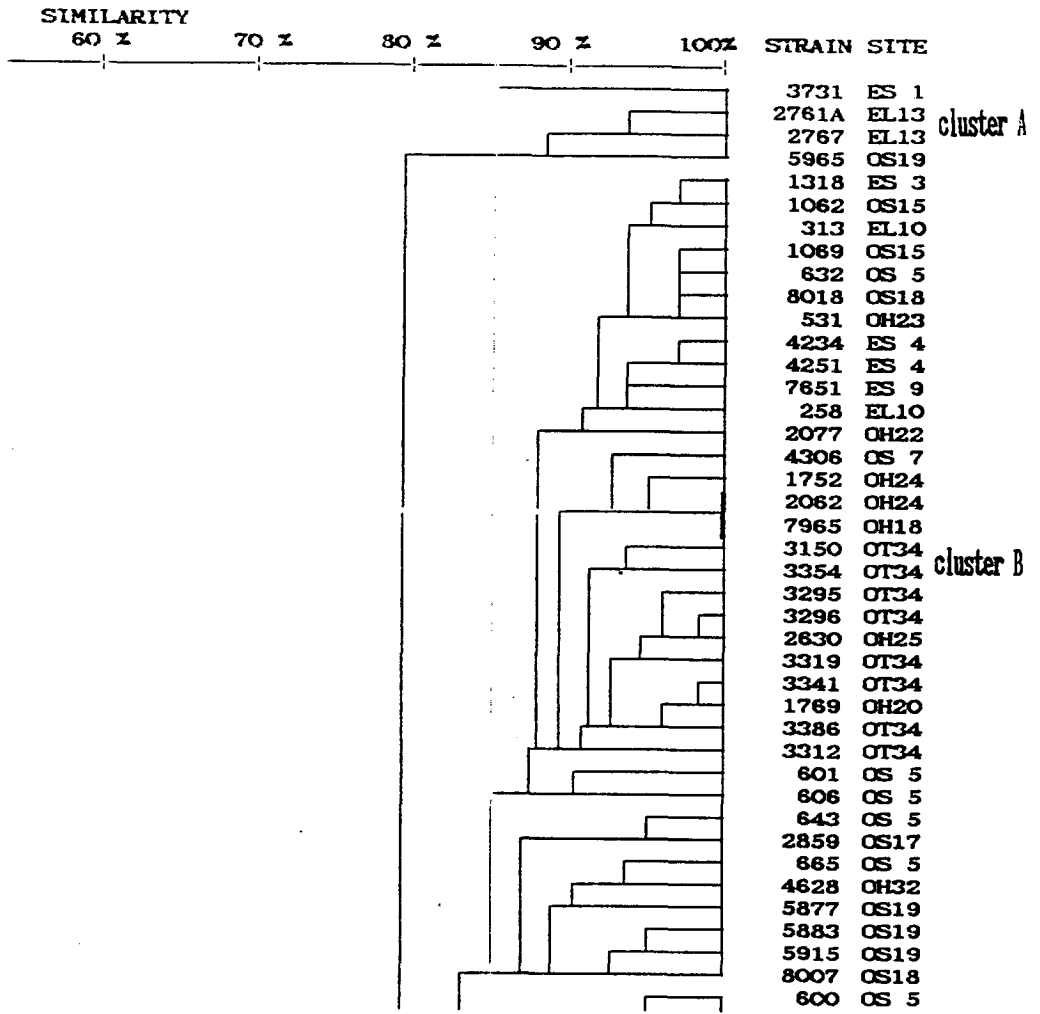


Fig.17. Dendrogram of 234 isolated Actinomycetes strains and 8 type strains.

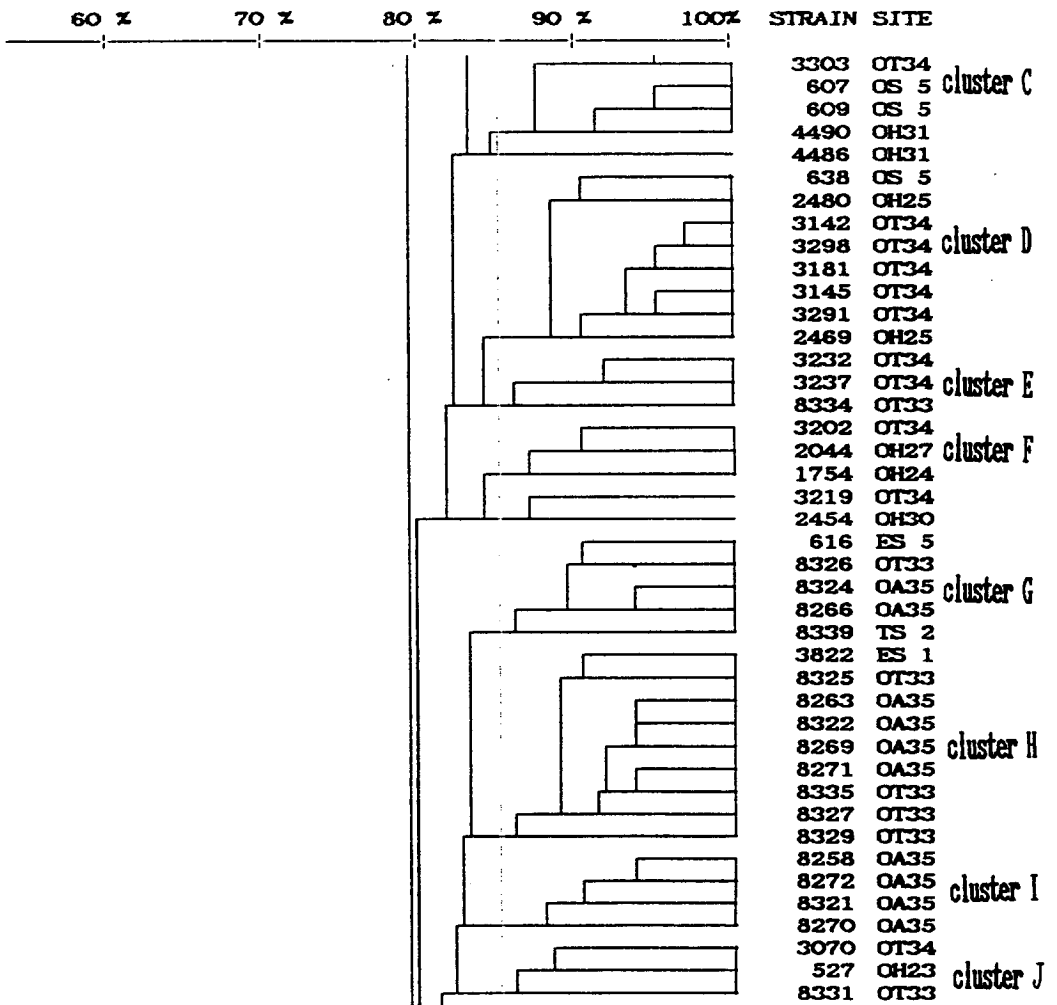


Fig.17. Continued(1).

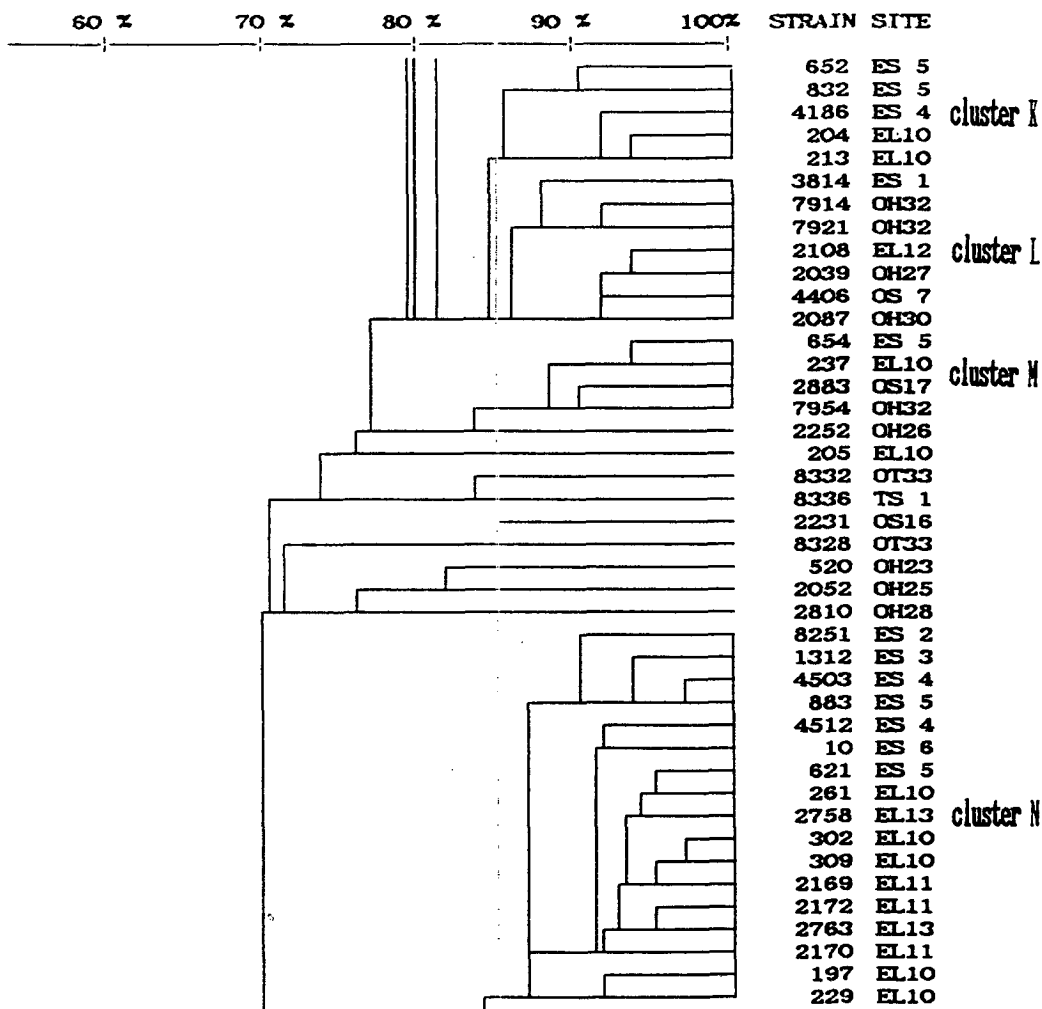


Fig.17. Continued(2).

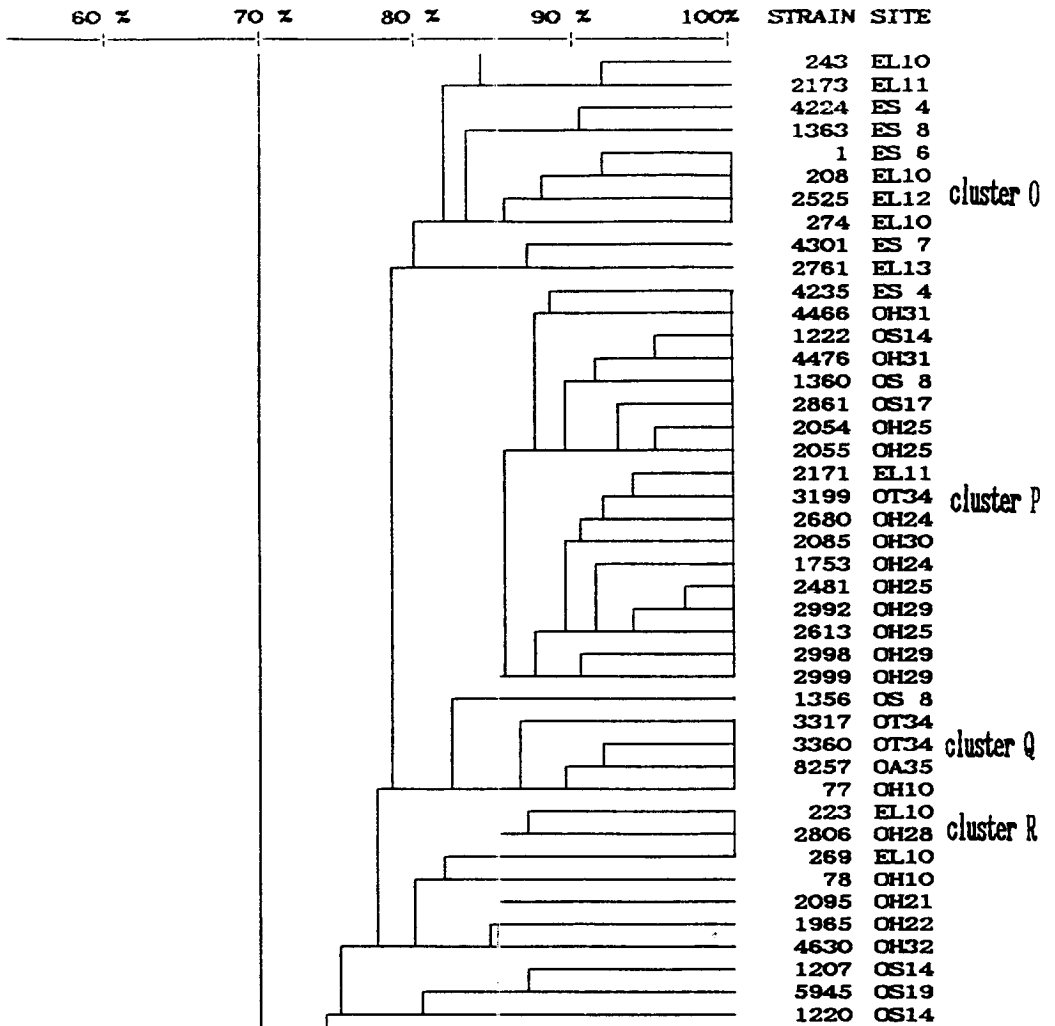


Fig.17. Continued(3).

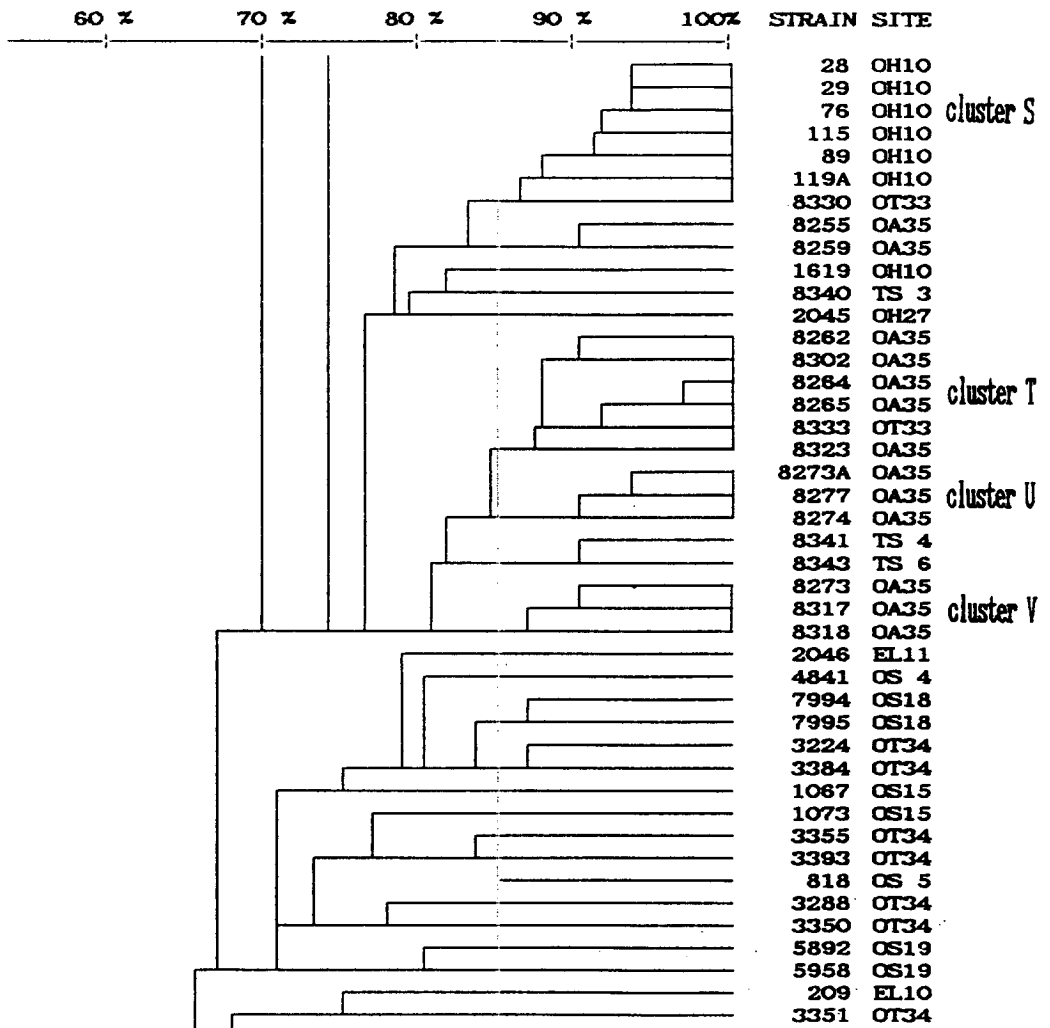
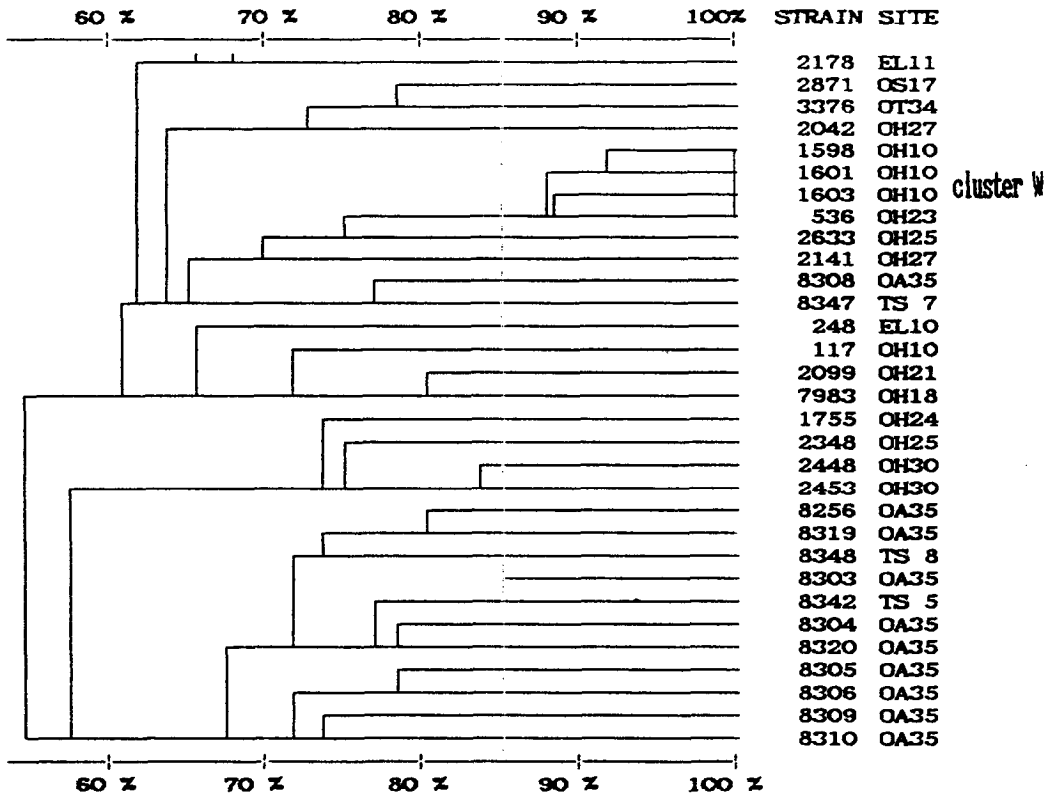


Fig.17. Continued(4).



ES : SEA. EL : LAKE
 OS : SOIL SEA SHORE
 OH : SOIL TEMPERATE REGION
 OT : SOIL TROPIC REGION
 OA : SOIL ANTARCTIC REGION
 TS : TYPE STRAIN
 1-35 : VARIOUS SAMPLING SITE

Fig.17. Continued(5).

참고문헌

Austin, B., F. Priest. 1986. Modern bacterial taxonomy. pp10-42.

Athalye, M., J. Lacey, M. Goodfellow. 1981. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. J. Appl. Bact. 51:289-329.

Athalye, M., M. Goodfellow, J. Lacey, R. P. White. 1985. Numerical classification of Actinomadura and Nocardiosis. Int. J. Syst. Bact. 35:86-98.

Berd, D. 1973. Laboratory identification of clinically important aerobic Actinomycetes. Appl. Microbiol 25:665-681.

Craveri, R., C. Coronelli, H. Pagoni, P. Sensi. 1964. Thermorubin, a new antibiotic from a Thermoactinomyce. Clinica Med. Ital. 17:511.

Cross, T. 1989. Growth and examination of Actinomycetes-some guidelines. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 4. eds. S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt. pp2340-2343.

Gochnauer, M. B., G. G. Leppard, P. Komaratat, M. Kates, T. Novitsky,

D.J.Kushner. 1975. Isolation and Characterization of *Actinopolyspora halophila* gen.et sp.nov., an extremely halophilic actinomycete. Can. J.Microbiol. 21:1500-1511.

Goodfellow, M., E.Stackebrandt, R.M.Kroppenedt. 1988. Chemotaxonomy and actinomycete systematics. In Biology of Actinomycetes '88: Proceedings of 7th Intenational Symposium on Biology od actinomycetes. eds. Y.Okami, T.Beppu, H.Ogawara. pp233-238.

Grein, A., S.P.Meyers. 1958. Growth characteristics and antibiotic production of Actinomycetes isolated from littoral sediments and materials suspended in sea water. J.Bact. 76:457-463.

Gyllenberg, H.G. 1988. Problems in taxonomy of Streptomycetes. In Biology of Actinomycetes '88: Proceedings of 7th International symposium on Biology of Actinomycetes. eds. Y.Okami, T.Beppu, H.Ogawara. pp11-18.

Helmke, E., H.Weyland. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an Actinomycete from the sea. Int. J. Syst. Bact. 34:127-138.

Holmberg, K. C.E.Nord. 1975. Numerical taxonomy and laboratory identification of *Archnia* and some related bacteria. J.Gen.Microbiol. 112:95-111.

Iubii, Y., S. Omura. 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiotics*. 35:123-141.

Johnson, K. G., J. P. H. Lanthier, M. B. Gochner. 1986. Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycetes. *Arch. Microbiol.* 143:370-378.

Kang, H. I. 1988. Taxonomic study of acidophilic and neutrotolerant actinomycetes. Ph.D. Thesis Seoul National University.

Kemmerling, C., D. Witt, W. Liesack, H. Wegland, E. Stacke-Brand. 1989. Approaches for the molecular identification of Streptomycetes in marine environment. *In Current Topics in Marine Biotechnology* pp423-426.

Kubica, G. P., I. Baess, R. E. Gordon, P. A. Jenkins, J. B. G. Kwapinski, C. MaCdurmont, S. R. Pattyn, H. Saito, V. Silcox, J. L. Stanford, K. Takeya, M. Tsukamura. 1972. A cooperative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 73:55-70.

Kurylowicz, W., H. G. Gyllenberg. 1988. Problems in taxonomy of Streptomycetes. *In Biology of Actinomycetes '88: Proceedings of 7th International symposium on Biology of Actinomycetes*, eds. Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara. pp11-18.

Lechevalier, H.A. 1989. A practical guide to generic identification of Actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4. eds. S.J. Williams, M.E. Sharpe, J.G. Holt. pp2344-2347.

Lechevalier, H.A. M.P. Lechevalier. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. In *Prokaryotes*. Chap. 142. pp1915-1922.

Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4. eds. S.J. Williams, M.G. Sharpe, J.G. Holt. Section 29. pp2451-2469.

McCarty, A.J., T. Cross. 1981. A note on the selective isolation medium for the thermophilic actinomycete, *Thermomonospora chromogena*. *J. Appl. Bact.* 51:299-302.

McCarty, A.J., T. Cross. 1984. A taxonomy study of *Thermomonospora* and other monosporic Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 51:299-302.

Nonomura, H., M. Hayakawa. 1988. New methods for the selective isolation of soil Actinomycetes. In *Biology of Actinomycetes '88*, eds. Y. Okami, J. Beppu, H. Ogawara. pp288-293.

Okami, Y. 1976. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb. Ecol.* 12:65-78.

Okami, Y., T. Okazaki, T. Kitahara, H. Umezawa. 1976. Studies on marine microorganisms V. A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. J. Antibiotics. 29:1019-1025.

Okazaki, T., T. Kitahara, Y. Okami. 1975. Studies in marine microorganisms IV. A new antibiotic ss-228 Y produced by *chainia* isolated from shallow sea mud. J. Antibiotics. 28:176-184.

Omura, S. 1988. Search for bioactive compounds from microorganisms -strategies and methods. In Biology of Actinomycetes'88. Proceedings of 7th International Symposium of Biology of Actinomycetes. eds. Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara. pp26-31.

Orchard, V. A., M. Goodfellow. 1980. Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil. J. Gen. Microbiol. 118:295-312.

Pisano, M. A., M. J. Sommer, M. M. Lopez. 1986. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:285-288.

Ruan, J. S., L. Xiaotao, Z. Yamei, S. Yantin. 1988. Numerical classification and chemotaxonomy of *Actinoplanetes* and *Nocardiae*. In

Biology of Actinomycetes'88. Proceedings of 7th International Symposium on Biology of Actinomycetes. eds. Y.Okami, T.Beppu, H.Ogawara. pp221-232.

Shirling, E.B., D.Gottlieb. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. Int.J.Syst.Bact. 16:313-340.

Tresner, H.D., E.J.Backus. 1963. System of color wheels for streptomycete taxonomy. Appl.Microbiol. 11:335-338.

Vyas, P., V.Chauthaiwale, S.Phadatara, V.Deshpande, M.C.Srinivasan. 1990. Studies on the alkalophilic streptomyces with extracellular xylanolytic activity. Biotechnol. Letters. 12:225-228.

Weyland, H. 1981a. Distribution of Actinomycetes on the sea floor. *In* Actinomycetes. Zbl. Bakt. Suppl. 11. eds. Schaal, Pulverer. pp185-193.

Weyland, H. 1981b. Characteristics of Actinomycetes isolated from marine sediments. *In* Actinomycetes. Zbl. Bakt. Suppl. 11. eds. Schaal, Pulverer. pp309-314.

Weyland, H., E.Helmke. 1988. Actinomycetes in the marine environment. *In* Biology of Actinomycetes'88. Proceedings of 7th International Symposium in Biology of Actinomycetes. eds. Yoshiro Okami, T.Beppu,

M.Ogawara. pp294-299.

Williams,S.T., M.Goodfellow, G.Alderson, E.M.H:Wellington, P.H.A. Sneath, M.Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J.Gen.Microbiol. 129:1743-1813.

Williams.S.T, Vickers.J.C. 1986. The ecology of antibiotic production. Microb.Ecol. 12:43-52.

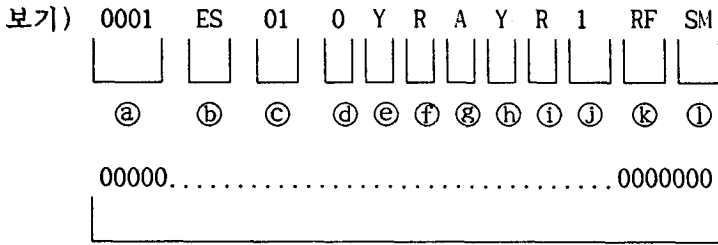
Williams.S.T, Vickers.J.C. 1988. Detection of Actinomycetes in the natural environment - problems and perspectives. In Biology of Actinomycetes '88. eds. Y.Okami, J.Beppu, H.Ogawara. pp265-270.

Yoshida,N., Y.Hachiya, K.Ueda, Y.Tani, K.Ogata. 1973. Antibiotic complex SP 351 produced by a psychrophile *Streptomyces* sp. No.351. Agric.Biol.Chem. 37:661-667.

Zippel,M., M.Neigenfind. 1988. Preservation of Streptomyces. J.Gen.Appl. Microbiol. 34:7-14.

부록

부록 보는 법



③

②군주일련번호

⑥시료종류

- ES : 해양
- EL : 호소
- OS : 해변토양
- OH : 온대지역토양
- OT : 열대지역토양
- OA : 남극토양

③시료채취지역

- | | |
|---------|----------|
| 1. 대변항 | 19. 구조라 |
| 2. 남해안 | 20. 서산 |
| 3. 인천 | 21. 인하대 |
| 4. 일광 | 22. 포천 |
| 5. 홍도 | 23. 지리산 |
| 6. 군산 | 24. 영암 |
| 7. 태종대 | 25. 당진 |
| 8. 광죽포 | 26. 불영계곡 |
| 9. 화진포 | 27. 안동 |
| 10. 팔당 | 28. 봉의산 |
| 11. 청송 | 29. 무등산 |
| 12. 공지천 | 30. 철원 |
| 13. 삽교천 | 31. 송정 |
| 14. 다대포 | 32. 해운대 |
| 15. 속초 | 33. 감도 |
| 16. 대천 | 34. 필리핀 |
| 17. 완도 | 35. 남극 |
| 18. 울릉도 | |

④포자색깔(Bennett배지)

B : blue A : gray G : green R : red
V : violet W : white Y : yellow
O : no spore mass formation

㉔기층균사 색깔(Bennett 배지)

Y : yellow-brown R : red-orange
G : green B : blue V : violet

㉕수용성색소(Bennett 배지)

Y : yellow-brown R : red-orange
G : green B : blue V : violet
O : no diffusible Pigment

㉖포자색깔(ISP4 배지)

㉔항 참조

㉗기층균사 색깔(ISP4 배지)

㉔항 참조

㉘수용성 색소(ISP4 배지)

㉔항 참조

㉙포자사슬내의 포자수(ISP4 배지)

10 : 포자수 10개이상
5 : 포자수 3-10
1 : single

㉚포자사슬 형태(ISP4 배지)

RF : Rectus - Flexibilis
RA : Rectinaculum - apertu
Sp : Spira

㉛포자표면(ISP4 배지)

SM : smooth
WA : warty
SN : spiny
HA : hairy

㉜Biochemical tests + : positive
- : negative

1) melanin pigment production

ISP1 : in ISP1 medium
ISP6 : in ISP6 medium
ISP7 : in ISP7 medium

2) Sole carbon souces(1% w/v in ISP9 medium)

CON : without sugar
GLU : D-glucose
FRV : D-fructose

SUC : sucrose
XYL : D-xylose
ARA : L-arabinose
RHA : L-rhamnose
INO : I-inositol
MAN : D-mannitol
DUL : dulcitol
MAO : mannose
RAF : raffinose
LAC : lactose
MAL : D-maltose
CEL : cellobiose
GAL : D-galactose
DEX : dextrin
TRE : trehalose
GLY : glycogen
SAL : salicin
GLC : glycerol

3) Organic acid utilization(1% w/v in ISP9 medium)

ACE : sodium acetate
BEN : sodium benzoate
CIT : sodium citrate (0.2% w/v in Simon citrate agar)
SUN : sodium succinate
MAT : sodium malate
LAT : sodium lactate
TAR : sodium tartrate

4) Sole C-and N sources(0.2 % w/v in ISP9 medium)

ALA : L-alanine
SER : L-serine
TYR : tyrosine

5) Degradation of

STA : starch (0.2% w/v)
XAN : xanthine(1.0% w/v)
ESC : esulin (0.1% w/v)
CAS : casein (1.0% w/v)
GEL : gelatin (1.0% w/v)

6) Biochemical tests

CAT : catalase
NIT : nitrate reduction
H2S : H₂S production

7) Growth responses

pH5 : growth at pH 5.0
pH1 : growth at pH 10.0

TM4 : optimal growth temp. of 4°C
TM2 : optimal growth temp. of 20°C
SA3 : optimal growth with 3% NaCl
SA7 : optimal growth with 7% NaCl

8) Susceptibility to

GEN : gentamycin(100 μg/ml)
NEO : neomycin (50 μg/ml)
RIF : rifampicin(50 μg/ml)
TOB : tobramycin(50 μg/ml)
VAN : vancomycin(50 μg/ml)
PEN : penicillin(10 i.u.)

9) Resistance to

CRY : crystal violet (0.001% w/v)
SOD : sodium azide (0.2 % w/v)
POT : potassium tellurite(0.05 % w/v)
PHE : phenol (0.1 % w/v)
LYS : lysozyme (0.005% w/v)

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l)

3731	ES	01	A	Y	0	A	V	0	10	RF	SM
8251	ES	02	W	R	0	Y	G	G			
1312	ES	03	W	Y	0	W	Y	0	10	MV	SM
4503	ES	04	Y	Y	0	Y	G	G	10	RF	SM
883	ES	05	Y	R	R	Y	G	G	10	RF	SM
4512	ES	04	A	R	R	Y	G	G	10	RA	AM
621	ES	05	Y	R	0	Y	G	G	10	RF	SM
10	ES	06	A	R	R	A	G	G	10	RA	SM
1	ES	06	Y	Y	Y	Y	G	G	10	RF	SM
4235	ES	04	W	Y	0	Y	G	G	5	RF	SM
4301	ES	07	Y	R	0	Y	G	0	10	RF	SM
1318	ES	03	A	R	R	A	R	0	10	RA	SM
7651	ES	09	V	R	0	V	R	0	10	SP	SM
4234	ES	04	W	Y	0	Y	G	0	10	RF	SM
4251	ES	04	Y	Y	Y	Y	G	0	10	RF	SM
4186	ES	04	W	Y	0	Y	G	0	10	RF	SM
3822	ES	01	W	Y	0	Y	Y	Y	10	RF	SM
652	ES	05	A	R	R	A	R	0	10	SP	SM
832	ES	05	Y	R	R	Y	G	0	10	RF	SM
4224	ES	04	A	Y	0	A	Y	0	10	SP	SM
1363	ES	08	Y	R	0	W	Y	0	10	RF	SM
3814	ES	01	A	Y	0	Y	Y	0	10	RF	SM
616	ES	05	Y	Y	Y	W	Y	0	10	RF	SM
654	ES	05	V	Y	0	A	V	0	10	SP	SM
197	EL	10	W	R	0	Y	G	0	10	RF	SM
229	EL	10	W	Y	Y	Y	Y	0	10	VM	SM
223	EL	10	Y	R	R	G	G	G	10	RF	SM
261	EL	10	A	R	R	Y	G	0	10	RF	SM
2758	EL	13	W	R	0	Y	G	G			
302	EL	10	A	R	R	Y	G	G	10	RF	SM
309	EL	10	Y	Y	0						
2169	EL	11	A	R	R	Y	G	G			
2172	EL	11	R	R	0	Y	G	0	5	RF	SM
2763	EL	13	Y	R	R	Y	G	G			
2170	EL	11	A	R	R	O	Y	0	10	RF	SM
2761	EL	13	Y	R	R	G	G	G			
208	EL	10	W	R	R	Y	Y	0	10	RF	SM
2171	EL	11	W	Y	0	Y	Y	0	10	RF	SM

ⓂIIICGFSXARIMDMRLMCGDTGSGABCSTASTSCXGECNHPPTTSSGNRTVPCSPPL
SSSOLRUYRHNAUAAAAEAERLALCEIUAAALEYTAAESAIZHHMAAEEIOAEROOHY
ⓐ 167NUUCLAONLOFCLLLXEYLCENTNTRARRASNLCCTTS514237NOFBNNYDTES

3731---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
8251---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
1312---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
4503---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
883---++++-+---+-----+-----+-----+-----+-----+
4512---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
621---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
10---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
1---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
4235---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
4301---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
1318---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
7651---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
4234---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
4251---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
4186++-+++++-----+-----+-----+-----+-----+
3822---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
652---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
832---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
4224---++++-+---+-----+-----+-----+-----+-----+
1363---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
3814---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
616---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
654---++-++++-+-----+-----+-----+-----+-----+
197---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
229---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
223---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
261---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
2758---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
302---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
309---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
2169---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
2172---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
2763---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
2170---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
2761---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+
208---+++++-----+-----+-----+-----+-----+
2171---++-+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+

2525	EL	12	W	Y	Y	Y	G	0	10	RA	SM
274	EL	10	Y	R	0	G	G	G	10	RA	SM
243	EL	10	G	R	0	Y	G	G	10	RF	SM
2173	EL	11	A	R	0	Y	G	0	10	RF	SM
269	EL	10	A	R	R	Y	G	0	10	RF	SM
204	EL	10	A	Y	0	A	V	0	10	RF	SM
213	EL	10	V	Y	0	A	V	0	10	RF	SM
258	EL	10	V	R	R	V	R	0	10	RA	SM
313	EL	10	A	R	0	V	R	0	10	RA	SM
2108	EL	12	Y	Y	0	Y	Y	Y	10	RF	SM
2761A	EL	13	A	Y	0	A	Y	0			
2767	EL	13	A	Y	0	A	Y	0			
205	EL	10	A	R	B	A	G	0	10	SP	SM
237	EL	10	A	Y	0	W	Y	0	10	RA	SM
2046	EL	11	A	R	R	A	G	0			
2178	EL	11	G	Y	0	Y	Y	0	10	RF	SM
209	EL	10	A	Y	0	0	Y	0	10	RF	SM
248	EL	10	A	G	0	0	Y	0	10	RF	SM
1207	OS	14	V	Y	0	A	V	0			
5945	OS	19	V	G	0	Y	Y	0			
1220	OS	14	Y	Y	0	Y	Y	0			
1222	OS	14	Y	R	0	Y	G	0			
1360	OS	08	W	R	0	Y	Y	0			
1356	OS	08	W	R	0	Y	Y	0			
2861	OS	17	Y	Y	0	G	G	0			
600	OS	05	A	R	R	0	G	G			
607	OS	05	A	R	R	Y	G	G			
609	OS	05	A	R	0	Y	G	G			
1062	OS	15	V	R	0	A	R	0			
1069	OS	15	V	V	V	A	V	0			
632	OD	05	V	R	R	A	R	0			
8018	OS	18	V	R	0	A	R	0			
5883	OS	19	A	G	0	A	Y	0			
5915	OS	19	A	Y	0	A	Y	0			
8007	OS	18	A	Y	0	A	Y	0			
601	OS	05	V	R	R	V	V	0			
606	OS	05	A	G	0	0	Y	0			
665	OS	05	V	V	0	A	Y	0			
5877	OS	19	V	Y	0	W	Y	0			
4306	OS	07	V	V	0	A	R	0			
5965	OS	19	V	G	0						
4406	OS	07	Y	Y	Y	W	Y	0			
638	OS	05	A	Y	Y	G	Y	0			

2525-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
274+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
243-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2173-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
269+-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
204+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
213+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
258-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
313-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2108+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2761A-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2767-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
205-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
237-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2046-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2178-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
209+-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
248+-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1207-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
5945-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1220-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1222-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1360-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1356-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2861-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
600-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
607-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
609-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1062-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1069-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
632-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
8018-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
5883-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
5915-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
8007-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
601-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
606-----+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
665-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
5877-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
4306-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
5965+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
4406+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
638-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

643	OS	05	V Y 0	A Y 0
2859	OS	17	W Y 0	A V 0
2883	OS	17	V V 0	A V 0
2231	OS	16	A G 0	O Y 0
4841	OS	04	V Y 0	R Y 0
7994	OS	18	A Y 0	W Y 0
7995	OS	18	R Y 0	Y Y 0
1067	OS	15	W R 0	W Y 0
1073	OS	15	O Y 0	O Y 0
2871	OS	17	O R 0	O Y 0
818	OS	05	A Y 0	A Y 0
5958	OS	19	Y Y Y	Y Y Y
5892	OS	19	W R R	W Y 0
28	OH	10	Y Y 0	Y G G
29	OH	10	W Y 0	Y G G
76	OH	10	W Y 0	W G G
89	OH	10	W R 0	Y Y Y
115	OH	10	Y Y 0	Y G G
77	OH	10	Y Y 0	Y G G
119A	OH	10	Y Y 0	Y G G
4476	OH	31	Y Y 0	Y G 0
1753	OH	24	W R 0	W G G
2481	OH	25	R Y Y	Y Y 0
2992	OH	29	Y R B	Y Y 0
2613	OH	25	R Y V	Y G G
2680	OH	24	Y R 0	Y G 0
2085	OH	30	A Y 0	Y Y 0
4490	OH	31	W Y Y	Y G 0
4466	OH	31	W Y Y	Y Y 0
2998	OH	29	W Y 0	Y Y 0
2999	OH	29	Y R B	Y G 0
2052	OH	25	Y Y 0	Y G 0
1769	OH	20	A Y 0	A V 0
4628	OH	32	V Y 0	A G 0
2077	OH	22	A V 0	V R 0
531	OH	23	W Y 0	V Y 0
2630	OH	25	V Y 0	A V 0
1752	OH	24	A R 0	A Y 0
2062	OH	24	V R 0	A R 0
7965	OH	18	V R 0	A R 0
2054	OH	25	V G 0	A Y 0
2055	OH	25	Y Y Y	Y G G
2039	OH	27	Y Y Y	Y Y 0

2087	OH	30	A	Y	Y	Y	Y	0
2454	OH	30	V	V	0	A	V	0
527	OH	23	V	V	0	A	V	0
2044	OH	27	V	R	R	A	V	V
1754	OH	24	A	R	R	A	V	0
2469	OH	25	V	V	0	A	V	0
2480	OH	25	A	Y	0	A	V	0
2810	OH	28	R	R	Y	Y	G	0
2252	OH	26	A	G	0	A	V	0
7954	OH	18	A	V	0	A	Y	0
4486	OH	31	V	Y	0	A	Y	0
7914	OH	18	W	Y	B	R	V	V
7921	OH	18	Y	Y	Y	W	Y	Y
520	OH	23	V	Y	0	A	Y	0
78	OH	10	W	Y	0	Y	G	G
2806	OH	28	V	R	B	Y	G	0
2095	OH	21	Y	Y	0	Y	G	G
1965	OH	22	W	Y	0	Y	Y	0
4630	OH	32	A	G	0	O	Y	0
1619	OH	10	A	Y	0	A	G	0
2045	OH	27	A	Y	Y	A	Y	0
117	OH	10	W	G	0	O	Y	0
2099	OH	21	W	Y	0	A	Y	0
7983	OH	18	A	Y	0	A	Y	0
2042	OH	27	V	Y	0	O	Y	0
1598	OH	10	V	Y	Y	V	G	0
1601	OH	10	V	Y	Y	V	Y	0
1603	OH	10	Y	R	Y	Y	Y	0
536	OH	23	W	R	0	W	G	0
2633	OH	25	V	V	V	A	G	0
2141	OH	27	Y	Y	0	Y	Y	0
1755	OH	24	O	Y	0	O	Y	0
2348	OH	25	W	Y	0	O	Y	0
2448	OH	30	W	Y	0	O	Y	0
2453	OH	30	O	Y	0	O	Y	0
3070	OT	34	A	Y	0	A	G	0
8326	OT	33	Y	Y	Y	Y	Y	0
3150	OT	34	Y	Y	0	Y	Y	0
3295	OT	34	W	R	0	V	R	0
3296	OT	34	A	G	0	A	Y	0
3319	OT	34	A	Y	0	A	Y	0
3354	OT	34	W	R	0	A	R	0
3341	OT	34	A	G	0	A	G	0

2087-----+++++-----+++++-----+-----+
2454--+-+++++-----+++++-----+++++-----+-----+
527-----+++++-----+++++-----+++++-----+-----+
2044-----+++++-----+++++-----+-----+-----+
1754+-----+++++-----+++++-----+-----+-----+
2469--+-+++++-----+++++-----+++++-----+-----+
2480-----+-+++++-----+++++-----+++++-----+-----+
2810-----+++++-----+-+-----+++++-----+-----+-----+
2252-----+++++-----+-+-----+++++-----+-----+-----+
7954-----+-+++++-----+++++-----+++++-----+-----+
4486-----+++++-----+++++-----+-+-----+-----+-----+
7914+-----+++++-----+++++-----+-----+-----+-----+
7921+-----+++++-----+++++-----+++++-----+-----+
520-----+++++-----+-+-----+++++-----+-----+-----+
78-----+++++-----+-+-----+++++-----+-----+-----+
2806-----+-+-----+-----+++++-----+++++-----+-----+-----+
2095-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
1965-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
4630-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
1619-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
2045-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
117-----+++++-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+
2099-----+-+-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+
7983-----+-+-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+
2042-----+++++-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
1598-----+++++-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+
1601-----+++++-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+
1603-----+++++-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+
536-----+++++-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+
2633-----+++++-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+
2141-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1755-----+-+-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+
2348-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
2448-----+++++-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
2453-----+-+-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+
3070-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
8326-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3150-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3295-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3296-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3319-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3354-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3341-----+++++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

3386	OT	34	V R O	V R O			
3303	OT	34	W Y O	Y G O			
3312	OT	34	W R O	A R O			
3219	OT	34	A R O	A V O			
3202	OT	34	A R O	V V V			
8325	OT	33	W Y O	A Y O			
8327	OT	33	O Y O	A Y O			
8335	OT	33	V G O	A Y O			
8329	OT	33	A G O	A G O			
3142	OT	34	A Y O	A Y O			
3298	OT	34	A Y O	A Y O			
3291	OT	34	A Y O	A Y O			
3181	OT	34	A V V	A V O			
3145	OT	34	A V O	A V O			
3224	OT	34	A Y O	A Y O			
3384	OT	34	A Y O	A G O			
3232	OT	34	O Y O	A Y O			
3237	OT	34	A Y O	A Y O			
3199	OT	34	Y Y O	Y G O			
3360	OT	34	Y Y O	Y G G			
3317	OT	34	Y Y O	Y G G			
8333	OT	33	O R O	R R O			
8328	OT	33	A Y O	A Y O			
8334	OT	33	G G O	A Y O			
8330	OT	33	O Y G	Y Y O			
8331	OT	33	O Y G	Y Y O			
8332	OT	33	R Y Y	R Y O			
3351	OT	34	O Y O				
3376	OT	34	O Y O	O Y O			
3288	OT	34	A V O	A V O			
3350	OT	34	O Y O				
3355	OT	34	O Y O	O Y O			
3393	OT	34	O Y O	O Y O			
8255	OA	35	A R O	W Y O	10	RF	SM
8257	OA	35	A R O	W Y O	10	RF	SM
8259	OA	35	A Y O	W G O	10	RF	SM
8258	OA	35	W Y O	W G O	10	RF	SM
8272	OA	35	W Y O	W Y Y	10	RF	SM
8263	OA	35	W Y O	A G O	10	RF	SM
8322	OA	35	W Y O	W Y O	5	RF	SM
8269	OA	35	W Y O	W Y O	10	RF	SM
8321	OA	35	W Y Y	G G O	5	RF	SM
8324	OA	35	W Y O	W G O	10	RF	SM

8266	OA	35	W	Y	0	W	Y	0	10	RA	SM
8264	OA	35	W	Y	0	W	Y	0	10	RF	SM
8265	OA	35	W	Y	0	W	Y	0	10	RF	SM
8271	OA	35	W	Y	0	W	Y	0	10	RA	SM
8262	OA	35	G	G	0	G	G	0	10	RF	SM
8302	OA	35	A	G	G	A	G	0	5	RF	SM
8273A	OA	35	Y	G	G	G	G	0	10	RF	SM
8277	OA	35	Y	Y	R	Y	Y	0	10	RF	SM
8274	OA	35	Y	Y	R	Y	Y	0	10	RF	SM
8323	OA	35	A	Y	0	W	G	0	10	RF	SM
8270	OA	35	W	Y	0	W	Y	0	10	RF	SM
8273	OA	35	W	G	G	A	G	G	5	RF	SM
8317	OA	35	W	G	G	W	G	0	10	RF	SM
8318	OA	35	W	G	G	W	G	0	10	RF	SM
8308	OA	35	W	G	0	A	G	0	5	RF	SM
8256	OA	35	O	R	0	O	R	0	5	RF	SM
8319	OA	35	G	R	0				10	RF	SM
8303	OA	35	W	G	0	W	Y	0	10	RA	SM
8320	OA	35	W	G	0	A	G	0	10	RA	SM
8304	OA	35	O	Y	0	W	Y	0	10	RF	SM
8305	OA	35	W	G	0	W	G	0	10	SP	SM
8306	OA	35	O	Y	0	W	G	0	5	RA	SM
8309	OA	35	O	Y	0	W	G	0	10	RF	SM
8310	OA	35	O	Y	0	A	Y	0	10	RA	SM

8266--+++++---+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8264--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8265--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8271--+++++-----+++++-----+-----+++++-----+-----++
8262--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8302--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8273A--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8277--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8274--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8323--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8270--+++++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8273--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8317--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8318--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8308--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8256--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8319--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8303--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8320--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8304--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8305--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8306--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8309--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8310--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8336--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8339--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8340--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8341--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8342--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8343--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8347--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++
8348--+++-----+++-----+++++-----+-----+++++-----++