

## 냉각탑수에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2 배양여액의 *Legionella pneumophila*에 대한 항균활성

박은희\* · 차인호 · 이상준<sup>1</sup>

부산광역시 보건환경연구원 미생물과, <sup>1</sup>부산대학교 미생물학과

**Antimicrobial Activity of Culture Filtrates from *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2 Isolated from Cooling Tower-Water against *Legionella pneumophila*.** Park, Eun-Hee, In-Ho Cha, and Sang-Joon Lee<sup>1</sup>. Department of Microbiology, Busan Institute of Health and Environment, Busan 613-104, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Busan National University, Busan 609-735, Korea – *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2 possessing antimicrobial activity against *Legionella pneumophila* was isolated from cooling tower-waters. The culture filtrates of *P. aeruginosa* KLP-2 showed antimicrobial activity against *L. pneumophila*, *Vibrio cholerae* non-O1, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. The culture filtrates of *P. aeruginosa* KLP-2 showed the highest antimicrobial activity against *L. pneumophila* among microorganisms tested in this study. The optimal conditions of temperature, pH, carbon source and nitrogen source to obtain maximal antimicrobial activity from culture filtrates of *P. aeruginosa* KLP-2 were determined to be 35°C, pH 7.0, 1% of glycerol and 0.6% of proteose peptone, respectively. The antimicrobial activity of culture filtrates from *P. aeruginosa* KLP-2 was highest against *L. pneumophila* when cultivated with shaking for 24 h and without shaking for 4 days at 35°C.

**Key words:** *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial activity

*Legionella*속 균은 레지오넬라증(legionellosis)을 유발시키는 원인균으로 40종, 60개의 혈청형과 1종의 unnamed *Legionella* genomospecies이 밝혀져 있으며[2,13,19], 이들 중 사람에게 병원성을 나타내는 균종으로는 *L. pneumophila*를 비롯한 17종이 알려져 있다[3,4,18]. 특히 *L. pneumophila*는 레지오넬라 감염증의 90% 정도를 차지하는 것으로 보고되고 있어 본 균에 대한 관심이 증대되고 있다.

*Legionella*속 균은 포자와 협막이 없는 그람음성의 호기성 간균으로 호수, 강, 개울, 자연온천, 진흙, 지하수, 화산 활동과 관련된 연못, 물가의 토양 등의 자연 환경뿐만 아니라 냉각탑수, 증발형 콘덴서, 가습기, 치과에서 사용되는 물과 같은 인공환경에서도 빈번하게 분리된다. 특히, 대형건물의 냉각탑수가 *Legionella*속 균으로 오염될 경우 비산되는 냉각탑수의 흡입으로 인하여 레지오넬라증이 유발될 수 있으며[16,17], 또는 건물내의 급배수시설에 형성된 biofilms내에서 증식한 균이 샤워시 aerosol을 통해 확산됨으로써 인체감염이 이루어지는 것으로 알려져 있다[12]. 최근 이와 같은 인체감염을 예방하기 위한 냉각탑수 중의 *Legionella*속 균의 저감방법에 관한 연구가 활발히 이루어

지고 있다.

냉각탑수 중의 *Legionella*속 균의 제거 방법으로는 염소 소독, 자외선 소독, 오존소독, 전기분해에 의한 금속이온의 발생 등을 이용한 소독법이 잘 알려져 있으며, 이들 방법 중 염소소독이 널리 이용되고 있다. 그러나 염소소독은 배관시설을 쉽게 부식시킬 뿐만 아니라 지속적으로 투입하지 않을 경우 잔류효과가 감소하고[10], trihalomethane과 같은 발암성 물질을 생성하는 등의 단점이 알려져 있다[21].

따라서 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법으로 식물이나 미생물로부터 무독성 천연물질의 탐색이나 유용한 길항미생물을 이용한 생물학적 방제 방법의 개발이 절실히 요구된다.

한편 *Pseudomonas*속 균은 토양, 담수 등 자연계에 널리 서식하면서 많은 생물학적 활성을 가진 2차 대사산물을 생산함으로써 토양에서 다양한 생태학적 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 이들 중에서 fluorescent *Pseudomonas*가 생산하는 항진균성 물질의 식물병원균에 대한 항균작용은 잘 알려져 있다. 특히 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 항균성 물질 중 pyocyanine(1-hydroxy-5 methylphenazine)은 산소 라디칼 생성을 증가시킴으로써 강한 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[5,7,14,20].

본 연구에서는 냉각탑수 중의 *Legionella*속 균을 저감시킬 수 있는 방법개발을 위한 연구의 일환으로 *Legionella pneumophila*에 대하여 강력한 항균활성을 가진 *Pseudomonas*속 균을 냉각탑수로부터 분리 동정하고 대사산물에

\*Corresponding author

Tel. 82-051-757-7502, Fax. 82-051-757-2879

E-mail: peh731@yahoo.co.kr

대한 항균활성을 확인함으로써 새로운 생물자원을 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 배지 및 배지조성

*Pseudomonas*속 균을 분리하기 위한 배지로는 asparagine broth [asparagine DL 3.0 g,  $K_2HPO_4$  1.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g per liter (pH 7.0)], acetamide broth [acetamide 10.0 g, NaCl 5.0 g,  $K_2HPO_4$  1.39 g,  $KH_2PO_4$  0.73 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, phenol red 0.012 g per liter (pH 7.0)] 및 *Pseudomonas* isolation agar (DIFCO Lab., Detroit, USA)를 사용하였으며, 항균성 물질 생산용 배지는 asparagine broth를 기초배지로 사용하였다.

### *Pseudomonas*속 균의 분리

*Pseudomonas*속 균을 분리하기 위한 시료는 부산시내에 위치한 대형건물 30곳의 냉각탑수를 사용하였으며, 균 분리는 폐수 처리 표준법을 변형하여 실시하였다[15]. 즉, 시료 50 ml를 3배농도 asparagine broth 25 ml에 넣고 35°C에서 48시간 배양한 후, 암실에서 장파장(365 nm)의 자외선을 조사할 때 녹색형광을 띠는 배양액 1 백금이를 acetamide broth에 접종하여 35°C에서 24시간 배양하였다. Actamide broth에서 적자색을 나타낸 배양액 1 백금이를 *Pseudomonas* isolation agar에 도말하고 35°C에서 24시간 배양하여 형성된 집락을 순수 분리하였다. 분리된 균은 nutrient broth와 glycerol를 50%씩(v/v) 넣은 보관용 배지에 접종하여 -70°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 분리균주의 동정

분리된 *Pseudomonas*속 균을 동정하기 위하여 Gilardi [6], Kreig 등[9] 및 Macfaddin[11]의 방법에 따라 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 검토하였으며, API ID 32 GN kit (bioMérieux sa, France)를 이용하여 동정하였다. 또한 분리균의 혈청학적 동정을 위하여 *Pseudomonas aeruginosa* poly antiserum I-III(Denka Seiken co., Japan)을 사용하여 슬라이드 응집반응으로 확인하였다. 응집 유무의 판정은 육안으로 분명하게 확인되는 응집이 30초 이내에 일어나는 경우를 양성으로, 그렇지 않은 경우를 음성으로 판정하였다. 동정을 위한 형태학적, 배양적, 생화학적 특성 및 혈청학적 특성 시험에는 표준균주인 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strain을 함께 공시하여 시험하였다.

### 항균활성 검색

분리한 *Pseudomonas*속 균이 생산하는 항균성 물질을 회수하기 위하여 분리균을 asparagine broth에 접종하고 35°C에서 7일간 50 rpm으로 진탕 배양하였다. 이 배양액을

4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하고, 상등액을 pore size 0.45  $\mu$ m의 membrane filter(Millipore)로 여과한 다음, Rotary vaccum evaporator(Tokyo Rikakikai Co., Ltd)를 이용하여 최초량의 1/5로 농축한 것을 항균활성 검사용 시료로 사용하였다. 항균활성 검색에 있어서 indicator strain으로 사용된 12종의 병원성 및 비병원성 균주들은 국립보건원으로부터 분양받아 사용하였고 디스크 확산법으로 항균활성을 검색하였다. 항균활성 검색에 사용한 배지로는 *Legionella pneumophila* ATCC(American Type Culture Collection) 33152에 대하여는 Buffered charcoal yeast extract(BCYE) agar(DIFCO Lab., Detroit, USA)를, 나머지 11종의 균주에 대하여 Mueller Hinton agar(DIFCO Lab., Detroit, USA)를 사용하였다. *L. pneumophila*에 대하여 BCYE agar plate에서 35°C로 48시간 배양된 균체를 멸균된 생리 식염수에 McFarland's nephelometer standard 0.5의 탁도가 되도록 조절한 다음, 멸균면봉으로 BCYE agar plate에 골고루 도말하였다. 농축한 항균활성 검사용 시료 30  $\mu$ l를 점적한 멸균여과지( $\phi$ 8 mm, Toyo)를 *L. pneumophila*가 도말된 BCYE agar 표면에 부착시키고 90% 습도를 유지한 35°C 배양기에서 48시간 배양하여 형성된 생육 저지환의 직경으로 항균활성의 정도를 판정하였다.

### 분리균의 항균성 물질 생산 최적조건

전 배양 단계로서, 분리한 공시균주를 50 ml의 asparagine broth에 접종한 후, 35°C에서 50 rpm으로 24시간 진탕 배양하였다. 배양액을 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하고 균체를 회수하여 멸균 생리식염수로 2회 세척한 다음, 660 nm에서 흡광도 1.0이 되도록 탁도를 조절하여 본 배양을 위한 접종 균으로 사용하였다. 본 배양은 전 배양단계에서 준비된 균액을 50 ml의 asparagine broth에 접종한 다음, 첫 접종 후 24시간 동안은 50 rpm으로 진탕 배양하고, 그 이후 6일간은 정지 배양하면서 배양온도, pH, 탄소원 및 질소원에 따른 항균성 물질의 생산조건과 활성을 확인하였다. 즉, 10~40°C 범위의 배양온도와 4.0~10.0의 pH 범위, glycerol을 비롯한 16종의 탄소원 및 beef extract를 비롯한 15종의 질소원에 대하여 항균성 물질의 최적 생산조건을 확인하였으며, 이 때 탄소원과 질소원은 각각 1%와 0.2%를 기본 농도로 첨가하여 실험한 다음, 가장 높은 항균활성을 나타내는 탄소원과 질소원에 대하여 탄소원은 1~8%, 질소원은 0.2~1%까지 농도별 최적조건을 확인하였다. 한편, 각 항목별 최적 생산조건을 조합한 상태에서 배양시간에 따른 항균성 물질의 최적 생산조건을 확인하였으며, 각 실험에서 UV visible spectrophotometer (Shimadzu Co., UV-1201, Japan)를 이용하여 660 nm에서 생육도를 측정함으로써 생육도와 항균활성과의 관계를 비교하였다.

**결과 및 고찰**

***Pseudomonas*속 균의 분리**

대형 냉각탑수 30건으로부터 16주의 *Pseudomonas* spp. 를 분리하고 이들 분리균의 배양여액이 항균활성을 나타내는지 여부를 여러 종류의 세균을 대상으로 조사한 결과 4주의 *Pseudomonas*속 분리주가 항균활성을 나타내었다 (Table 1). 이들 중 KLP-2 strain이 *Legionella pneumophila* ATCC 33152에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타내었을 뿐만 아니라 *Vibrio cholerae* non-O1 ATCC25872, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC17686, *Staphylococcus aureus* ATCC6538P에 대해서도 높은 항균활성을 나타내어 항균성 물질 생산용 공시균으로 선정하였다.

**분리균의 동정**

분리된 KLP-2 strain의 형태학적 특징은 아포를 형성하지 않는 그람음성의 단간균으로 운동성을 나타내었고, 전자현미경으로 확인한 결과 flagella를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 분리균의 생화학적 성상 및 API ID 32 GN을 이용한 동정 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다. KLP-2 strain은 catalase, oxidase, urease, gelatin liquefaction, citrate test에서는 양성반응을, MR-VP test, H<sub>2</sub>S, indole 시험에서는 음성 반응을 arginine dehydrolase 시험에 양성 반응을, O/F시험에 oxidation 반응을 나타내었다. 또한 4°C에서는 성장하지 못한 반면 41°C에서는 성장하였고 pyocyanine과 pyoverdine의 색소를 생산하여 표준균주인 *P. aeruginosa* ATCC27853과 동일한 성상을 나타내었으며, 혈청학적 동정 결과 *P. aeruginosa* antiserum poly III에 강한 응집반응을 나타내었다. 이러한 결과들은 선행연구자들이 보고[9,11]한 *P. aeruginosa*의 성상과 일치하였으며, 편의상 *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2로 명명하였다.



Fig. 1. Transmission electron micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2 isolated from cooling tower-water. (Magnification: × 40,000)

**항균성 물질 생산의 최적조건**

**배양온도.** *P. aeruginosa* KLP-2의 배양온도를 10~40°C까지 달리하면서 7일간 배양한 배양여액의 *L. pneumophila*에 대한 항균활성 결과는 Fig. 2와 같다. 10°C 배양에서는 균의 성장은 확인되었으나 배양여액의 항균활성이 관찰되지 않았고, 20~40°C까지는 균의 생육 및 항균활성이 나타났으나, 35°C에서 배양한 배양여액이 직경 18.0 mm의 억제환을 형성하여 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

**pH.** 배지의 pH를 4.0~10.0까지 달리하면서 35°C에서 7일간 *P. aeruginosa* KLP-2를 배양하였을 때 배양여액의 *L. pneumophila*에 대한 항균활성은 Fig. 3과 같다. 배지의 pH가 4.0~9.0까지는 직경 12 mm 이상의 비교적 큰 억제환을 형성하였으나, pH 10에서는 균의 생육 및 항균활성이 전혀 관찰되지 않았으며, Chang 등[5]이 phenazine 색소를

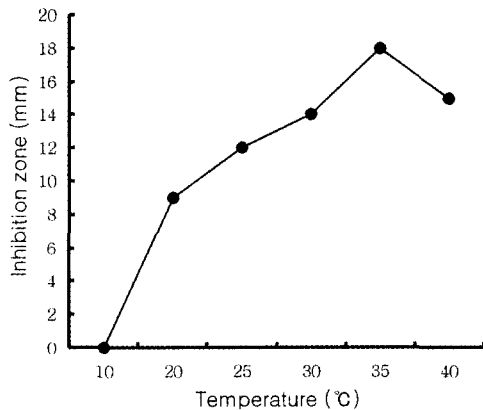
**Table 1. Antimicrobial spectrum of culture filtrates from *Pseudomonas* sp. isolated from cooling tower-waters**

Microorganisms	Inhibition zone (mm)			
	<i>Pseudomonas</i> spp. isolates			
	KLP-1	KLP-2	KLP-5	KLP-9
<i>E.coli</i> ATCC 9637	0	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Newport ATCC 6962	0	0	0	0
<i>Proteous vulgaris</i> ATCC 6059	0	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i> non O1 ATCC 25872	0	12	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0	15	14	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 17686	0	16	15	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0	13	0	0
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC33152	14	18	15	14
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0

**Table 2. Comparison of biochemical characteristics of KLP-2 strain & *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Tests	KLP-2 strain	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Cytochrome oxidase	+	+
Catalase	+	+
Oxidation/Fermentation	Oxidation	Oxidation
Growth at 4°C	No growth	No growth
Growth at 41°C	Growth	Growth
Urease	+	+
Arginine dehydrolase	+	+
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Indole production	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-
Citrate utilization	+	+
VP-MR test	-	-
Gelatin liquefaction	+	+
Pyocyanine	+	+
Pyoverdine	+	+

+, positive; -, negative



**Fig. 2. Effect of temperature on the production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* KLP-2.**

생산하기 위한 배지의 pH와 동일한 pH 7.0일 때 18 mm의 억제환을 형성하여 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

**탄소원.** 각종 탄소원 1%를 첨가한 asparagine broth (pH 7.0)에 *P. aeruginosa* KLP-2를 접종하고 35°C에서 7일간 배양하였을 때 탄소원 종류에 따른 항균성 물질 생산 정도는 Table 4와 같다. 공시한 16종의 탄소원 중 glycerol 첨가배지의 배양여액이 *L. pneumophila*에 대하여 22 mm의 억제환을 형성하여 가장 높은 항균활성을 나타낸 반면, glucose를 비롯한 15종의 공시 탄소원이 각각 첨가된 배양여액은 *L. pneumophila*에 대한 억제환을 전혀 나타내지 못하여 항균성 물질이 생산되지 않는 것으로 확인되었

**Table 3. Identification of KLP-2 strain by API ID 32 GN strip**

Tests	KLP-2 strain	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Rhamnose	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+
D-Ribose	+	+
Inositol	-	-
D-Sucrose	-	V
Maltose	-	-
Itaconate	+	+
Suberate	V*	+
Malonate	V	+
Acetate	+	+
DL-Lactate	+	+
L-Alanine	+	+
Mannitol	+	+
D-Glucose	+	+
Salicin	-	-
D-Melibiose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Sorbitol	-	-
L-Arabinose	-	-
Propionate	+	+
Caprate	+	+
Valerate	+	+
Citrate	+	+
Histidine	+	+
5-Ketogluconate	-	-
Glycogen	-	-
3-hydroxy-benzonate	-	-
2-Ketogluconate	+	+
3-hydroxy-butyrate	+	+
4-hydroxy-benzoate	+	+
L-Serine	+	+
L-Proline	+	+

KLP-2 strain and *P. aeruginosa* ATCC27853 were identified as *Pseudomonas aeruginosa* 99.9% and 99.5% by API 32GN strip, respectively. +, positive; -, negative; V, variable

다. 또한 1%에서 8%까지 glycerol의 첨가농도별 항균활성을 확인한 결과 1% 첨가된 배양여액에서 가장 높은 항균활성을 나타내어(결과 미제시) 본 균의 항균성 물질 생산을 위한 최적 탄소원으로 확인되었다. 이러한 결과는 Brisbane 등[4]과 Baron 등[1]이 *Pseudomonas*속 균으로부터 항균성 물질의 생산을 위해 배지의 탄소원으로 glycerol을 사용하였다는 사실과 무관하지 않았다. 특히 glucose가 첨가된 배지에서는 가장 높은 생육도를 보였음에도 불구하고 색소의 생산과 *L. pneumophila*에 대한 항균성이 나타나지 않아 균의 생육 정도는 항균성 물질 생산에 직접적인 연관성이 없

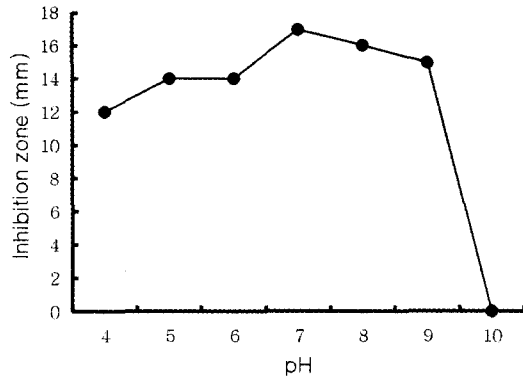


Fig. 3. Effect of pH on the production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* KLP-2.

는 것으로 확인되었다. 그러나 Kanner 등[8]의 보고에 의하면 *Pseudomonas*속 균의 배양에 있어서 탄소원으로 1% glucose를 첨가하였을 때 가장 많은 색소를 생산한다고 보고하였고, Chang 등[5]은 *P. aeruginosa* 균주가 탄소원으로써 glycerol이 함유된 *Pseudomonas* P broth에 배양하였을 때 phenazine류의 색소가 전혀 생산되지 않았다고 보고하여 본 연구 결과와 많은 차이를 나타내었다. 한편, 첨가되는 탄소원의 종류에 따른 *P. aeruginosa* KLP-2의 색소 생산은 탄소원으로써 glycerol을 첨가하였을 때 배양액이 녹색을 발하였고, 다른 탄소원을 첨가한 배지에서는 색소를 전혀 생산하지 않아 *P. aeruginosa* KLP-2 유래의 색소물질이 *L. pneumophila*에 대한 항균력과 깊은 연관성이 있는 것으로 추측되며, 색소의 물질규명에 대한 연구가 요구된다.

**질소원.** Asparagine을 포함한 각종 유기질소원 0.2%를 첨가한 배지 [ $K_2HPO_4$  1.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g per liter, (pH 7.0)]에 *P. pseudomonas* KLP-2를 접종하고 37°C에서 7일간 배양하였을 때 질소원 종류에 따른 항균성 물질 생산 정도는 Table 5와 같다. 질소원이 전혀 첨가되지 않은 배지에서는 균의 생육과 항균활성이 관찰되지 않았고, 유기질소원인 tryptone, yeast extract, asparagine, beef extract, casamino acid, peptone 등을 첨가한 배지에서는 비교적 높은 생육도와 *L. pneumophila*에 대한 항균성을 나타내었으며, 이들 유기질소원 중 가장 높은 항균력을 나타낸 proteose peptone의 농도를 0.2%에서 1%까지 달리하면서 실험한 결과 0.6%의 proteose peptone을 첨가하였을 때 가장 높은 생육도와 항균활성을 나타내어(결과 미제시) 본 균의 항균성 물질 생산을 위한 최적 질소원으로 확인되었다. 반면 무기질소원으로는  $KNO_3$ 를 첨가한 배양여액에서만 항균활성이 확인되었고, 그 외의 무기질소원에서는 항균활성이 전혀 확인되지 않았을 뿐만 아니라 균의 생육도 미미하였다.

이와 같은 결과는 *P. aeruginosa*로부터 항균성 물질인 phenazine-1-carboxylic acid를 생산하기 위하여 질소원으로

Table 4. Effect of carbon source on the production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* KLP-2

Carbon source <sup>a</sup>	Growth <sup>c</sup> (OD at 660 nm)	Inhibition zone (mm)
Basal medium <sup>b</sup>	0.86	14.0
Glycerol	1.86	22.0
Glucose	2.23	ND
Maltose	1.41	ND
Dulcitol	1.04	ND
Galactose	1.79	ND
Arabinose	1.72	ND
Soluble starch	0.95	ND
Lactose	1.82	ND
Sucrose	0.82	ND
Rhamnose	1.11	ND
Raffinose	1.42	ND
Xylose	1.88	ND
Adonitol	0.98	ND
Inositol	1.13	ND
Saccharose	0.85	ND
Mannose	1.20	ND

<sup>a</sup>1% carbon source was added in basal medium.

<sup>b</sup>Basal medium is asparagine broth.

<sup>c</sup>Growth was measured after cultivation for 24 h.

<sup>d</sup>Inhibition zone represents antimicrobial activity of culture filtrates harvested at 7 days post-inoculation.

Table 5. Effect of nitrogen source on the production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* KLP-2

Nitrogen source <sup>a</sup>	Growth <sup>c</sup> (OD at 660nm)	Inhibition zone <sup>d</sup> (mm)
Basal medium <sup>b</sup>	0.14	ND
Beef extract	1.92	20.0
Casamino acid	1.16	17.0
Peptone	1.93	14.0
Proteose peptone	2.21	32.0
Tryptone	2.34	26.0
Yeast extract	2.68	20.0
Asparagine	2.16	17.0
$(NH_4)_2HPO_4$	0.41	ND
$(NH_4)_2SO_4$	0.62	ND
$CH_3COONH_4$	0.54	ND
$KNO_3$	0.98	12.0
$NaNO_2$	0.35	ND
$NaNO_3$	0.38	ND
$NH_4Cl$	0.24	ND
Urea	0.37	ND

<sup>a</sup>0.2% nitrogen source was added in basal medium.

<sup>b</sup>Basal medium is asparagine broth without asparagine.

<sup>c</sup>Growth was confirmed after 24 h of culture.

<sup>d</sup>Inhibition zone means antimicrobial activity; sample for antimicrobial activity was used culture filtrates cultured for 7 days. ND, not detected.

써 배지 중에 peptone을 첨가한 Brisbane 등[4]의 보고 및 pyocyanine을 생산하기 위하여 아미노산인 L-aspartic acid를 질소원으로 사용한 Baron 등의[1] 결과와 상이하였으며, phenazine류의 색소 생산 실험에서 무기질소원인 urea를 질소원으로 사용한 Chang 등[5]의 결과와도 상이하였다.

이러한 연구자들 간의 차이점은 실험에 이용되는 균주의 특성에 의한 것으로 사료되며, 본 연구에 사용된 *P. aeruginosa* KLP-2 균주는 탄소원과 마찬가지로 공급되는 질소원의 종류에 따라 생육도 및 *L. pneumophila*에 대한 항균성 물질 생산에 많은 차이를 나타내었다.

상기의 시험결과를 통해 결정된 항균성물질 생산의 최적 조건으로 배양할 경우, 배양기간에 따른 항균력의 정도는 Fig. 4 및 5와 같다. *P. aeruginosa* KLP-2 균주는 배양 후 1일째의 배양액에서부터 *L. pneumophila*에 대한 항균성

물질의 생산이 확인되었고, 배양 5일째에 직경 40 mm의 억제환을 보여 가장 높은 항균력을 나타내었다. 배양 6일부터는 항균력이 다소 감소되기는 하였으나 비교적 완만하게 감소되는 경향을 보였다.

요 약

냉각탑수 중의 *Legionella*속 균을 저감시킬 수 있는 방법개발의 일환으로 *L. pneumophila*에 강한 항균성물질을 생산하는 *P. aeruginosa* KLP-2 균주를 냉각탑수로부터 분리 동정하였다. *P. aeruginosa* KLP-2 균주의 배양여액은 *L. pneumophila*외에 *Vibrio cholerae* non- O1, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus*에 대해서도 항균활성을 나타내었다. *P. aeruginosa* KLP-2 균주 배양여액의 항균활성을 증가시키기 위한 최적조건은 0.1%의  $K_2HPO_4$ 와 0.05%의  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 조성된 무기염배지에 탄소원으로써 1%의 glycerol, 질소원으로써 0.6%의 proteose peptone이 첨가된 pH 7.0의 배지 조건에서 가장 높은 항균활성을 나타내었으며, 35°C에서 20시간 진탕배양 (50 rpm)한 후 4일간 정지 배양하였을 때 최대의 항균활성을 나타내었다.

REFERENCES

1. Baron, S. S. and J. J. Rowe. 1981. Antibiotic action of pyocyanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 814-820.
2. Benson, R. F., W. L. Thacker, M. I. Daneshvar, and D. J. Brenner. 1996. *Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. *Intern. J. System. Bacteriol.* 46: 631-634.
3. Bornstein, N., A. Mercatello, D. Marnet, M. Surgot, Y. Deveaux, and J. Fleurette. 1989. Pleural infection caused by *Legionella anisa*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2100-2101.
4. Brisbane, P. G., L. J. Janik, M. E. Tate, and R. F. O. Warren. 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1967-1971.
5. Chang, P. C. and A. C. Blackwood. 1968. Simultaneous production of three phenazine pigments by *Pseudomonas aeruginosa* Mac 436. *Can. J. Microbiol.* 15: 439-444.
6. Gilardi, G. L. 1991. *Pseudomonas* and related genera, pp. 429-441. In A. Balows, J. H. William, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (eds.). *Manual of clinical microbiology*. Ammerican Society for Microbiology, Washington, D. C.
7. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* 141: 156-163.
8. Kanner, D., N. N. Gerber, and R. Bartha. 1978. Pattern of phenazine production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 134: 690-692.
9. Kreig, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Sys-*

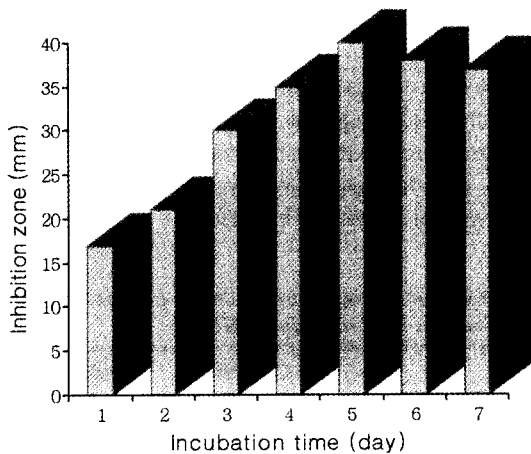


Fig. 4. Production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* KLP-2 using the optimal medium. Optimal medium (pH 7.0) was composed of 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.05%  $MgSO_4$ , 0.6% proteose peptone and 1% glycerol. *P. aeruginosa* KLP-2 was incubated for 24 h with shaking and then incubated for 6 days at 35°C without shaking.

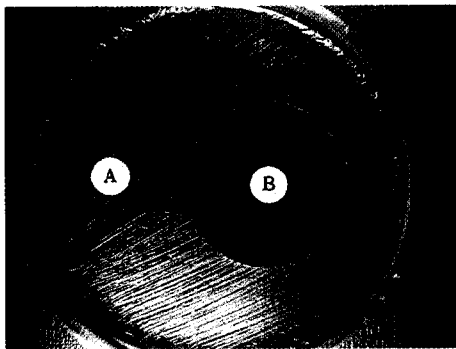


Fig. 5. Antimicrobial activity of culture filtrates from *P. aeruginosa* KLP-2 against *L. pneumophila* ATCC33152. A, culture filtrates of *P. aeruginosa* ATCC27853; B, culture filtrates of *P. aeruginosa* KLP-2.

- tematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141–175. Williams and Willkins, Baltimore, U.S.A.
10. Landeen, L. K., M. T. Yahya, and C. P. Gerba. 1989. Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3045–3050.
  11. Macfaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams and Willkins, Baltimore, U.S.A.
  12. Marrao, G. A., A. Verissimo, R. G. Bowker, and M. S. Dacosta. 1993. Biofilms as major sources of *Legionella* spp. in hydrothermal areas their dispersion into stream water. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**: 25–33.
  13. Rodger, F. K. and A. W. Pasculle. 1991. *Legionella*. pp 442–453. In A. Balows, J. H. William, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (eds.). *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
  14. Sorensen, R. U., J. D. Klinger, H. A. Cash, P. A. Chase, and D. G. Dearborn. 1983. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. *Infect. Immun.* **41**: 321–330.
  15. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 1992. pp. 9–31. 18th ed. American Public Health Association, Baltimore, Maryland.
  16. States, S. J., L. F. Conley, J. M. Kuchta, B. M. Oleck, M. J. Lipovich, R. S. Wolford, R. M. Wadowsky, A. M. McNamara, J. L. Sykora, G. Keleti, and R. B. Yee. 1987. Survival and multiplication of *Legionella pneumophila* in municipal drinking water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 979–986.
  17. Stout, J. E., V. L. Yu, R. M. Vickers, J. Zuravleff, M. Gest, A. Brown, R. B. Yee, and R. Wadowsky. 1982. Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in water supply of hospital with endemic Legionnaires' disease. *N. Engl. J. Med.* **306**: 466–468.
  18. Thacker, W. L., J. W. Dyke, R. F. Benson, D. H. Havlich, JR., B. Robinson-Dunn, H. Stiefel, W. Schneider, C. W. Moss, W. R. Mayberry, and D. J. Brenner. 1992. *Legionella lansingensis* sp. nov. isolated from patient with pneumonia and underlying chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2398–2401.
  19. Thacker, W. L., R. F. Benson, L. Hawes, H. Gidding, B. Dwyer, W. R. Mayberry, and D. J. Brenner. 1991. *Legionella fairfieldensis* sp. nov. isolated from cooling tower waters in Austria. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 475–478.
  20. Wilson, R., T. Pitt, G. Taylor, D. Watson, J. MacDermot, D. Sykes, D. Roberts, and P. Cole. 1987. Pyocyanine and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **79**: 221–229.
  21. Worley, S. D., W. B. Wheatley, H. H. Kohl, J. A. Van Hoose, H. D. Burkett, and N. Bodor. 1983. The stability in water of new chloramine disinfectant, *Water Res. Bull.* **19**: 97–100.

(Received May 24, 2001/Accepted Aug. 10, 2001)