야생꿩으로부터 가금티프스 억제균 *Sphingomonas sanguis*의 선발 및 항*Salmonella* 물질 생산 조건

류향선 · 이현승 · 임종희 · 김진락 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

(2003년 11월 11일 접수, 2004년 1월 27일 수리)

가금티프스는 닭, 오리, 칠면조, 꿩 등 가금류에 *Salmonella gallinarum*이 원인균이 되어 발병하는 질병이다. 본 연구는 가금티프스를 방제하기 위한 생균제 개발을 위한 기초조사의 목적으로 가금티프스 원인균인 *S. gallinarum*의 생육을 저해시킬 수 있는 길항균을 야생꿩에서 분리, 선발했다. 최종적으로 3종의 우수 길항균주를 선발하였으며 선발, 분리된 길항균을 동정한 결과 L19, L33균주는 similarity가 100%인 *Sphingomonas sanguis*로 동정되었고 L50균주는 similarity가 96.2%로써 *Sphingomonas sanguis*의 근연종으로 동정되었다. 선발된 길항균주가 생산한 길항물질의 특성을 확인해본 결과, *S. gallinarum*을 저해하는 물질이 고분자성 물질이고 내열성임을 추정할 수가 있었다. *S. sanguis* L19의 경우 배양 20시간 이후부터 길항물질이 생산되었으며 탄소원, 질소원을 각각 maltose, $(NH_4)_2SO_4$를 첨가하였을 때 가장 높은 길항력을 나타내었다. *S. sanguis* L33의 경우 배양 22시간 이후부터 길항물질이 생산되었으며 탄소원, 질소원을 각각 galactose, urea를 첨가하였을 때 가장 높은 길항력을 나타내었다. *S. sanguis* L50은 배양 10시간 이후부터 길항물질을 생산하였으며 탄소원, 질소원을 각각 saccharose, $(NH_4)_2S_2O_8$으로 하였을 때 가장 높은 길항력을 나타내었다.

Key words: antagonistic bacteria, *Salmonella gallinarum*, fowl typhoid, *Sphingomonas sanguis*

서 론

Fowl typhoid(FT)는 *Salmonella gallinarum*을 원인균으로 하는 가금류의 패혈성 질병으로 1900년대 Rhode Island의 Curtice에 의해 명명되어졌다. 국내에서는 1992년 경기도 김포군 지역에서 처음 보고되었고 1994년 이후 전국적으로 발병하여 양계농가에 막대한 경제적 손실을 주고 있다.[1] FT는 전염성이 매우 강하여 발생시 각종 방역수단으로 처리함에도 불구, 효과적인 방제가 이뤄지지 않고 있으며, 원인균이 가금류에 감염하면 잠복, 기생도 하게 되므로 일단 감염된 농장에서는 백신에 의한 예방이나 항균제에 의한 치료에 의해서도 완전방제가 어려운 실정이다.

Blankenship 등에 의하면 가금류의 *Salmonella* 감염을 감소시키기 위해서는 가금류 장내에 *Salmonella*가 colonization되는 것을 억제해야 하는데,[2] 정상장내균총의 가장 중요한 기능은 외부로부터 침입한 병원성 세균이 장벽에 colonization되는 것을 방제하는데 있다고 Schlessinger은 설명하였다.[3] 이를 근거하여 정상장내세균총을 이루게 될 생균제를 이용한 FT의 방제가 절실히 요구되는 실정이다. 생균제(probiotics)란 동물의 소화관내에서 장내미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에 유익한 작용을 하는 장내균총을 정상화함으로써 유해균을 억제하고 병원균 감염의 예방을 할수 있는 제제이다.[4] 또한 항생제와 달리 축산물내의 잔류문제나 내성균 증가와 같은 보건상의 문제가 없기 때문에 FT에 대한 좋은 방제대책이 될 수 있을것으로 생각된다.[5]

따라서 본 연구에서는 가금티프스균 *S. gallinarum*의 생육을 강력히 억제하는 길항균을 야생꿩의 장으로부터 분리, 선발하였고 이들의 특성조사, 동정, 길항균의 길항물질을 추정함으로써 생균제 개발의 기초자료로 삼고자 하였다.

실험재료 및 방법

정상장내세균의 분리. 경북 청도 지역에서 야생에 서식하는 야생꿩의 소장과 대장을 길항균의 분리원으로 하였다. 균주의 분리방법은 소장과 대장 각각의 적출물 1 g을 멸균된 생리식염수 10 ml에 넣어 균질하게 혼탁시켰으며 부유상등액 1 ml를 멸균된 생리 식염수 9 ml에 섞어 10^{-6}까지 단계별로 희석하였으며, 이들을 MRS평판배지, LB평판배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%)에 0.1 ml씩을 도말하여 37°C에서 1일간 배양하여 생성되는 colony를 순수분리하였다.

가금티프스 길항균의 선발. 가금티프스 원인균 *Salmonella gallinarum*을 LB 배지에 전배양한 배양액 0.1 ml를 혈청평판배지(Tryptic soy broth 0.3%, agar 1.5%, 혈청 5%)[6]에 도말하고 혈청배지상에 1.5×1.5 cm 크기의 정사각형안에 분리균을 tooth pick방법으로 접종하여 1일간 37°C에서 배양한 후 *S. gallinarum*의 생육을 억제하는 clear zone을 형성하는 길항균을 선발하였다.

선발균의 유산균 특성 확인. BCP배지(glucose 1%, peptone 0.5%, beef extract 0.3%, bromocresol purple solution 20%(v/v), agar 2%, pH 7.0)를 이용하여 *S. gallinarum*에 길항력을 가

*연락저자
Phone: 82-53-810-2395; Fax: 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

진 선발균들을 획선을 긋고 대조군으로 *Bacillus* sp.와 *E. coli*를 획선 도말한 후, 1일간 37℃에서 배양하였다.

선발균의 담즙산과 산성에 대한 내성실험. 선발된 길항균주의 담즙산과 산성환경에 대한 저항성 유무를 알아보기 위하여 혈액평판배지(Brain heart infusion agar, 혈액 5%)에 전배양시킨 선발균주를 무처리 LB 배지, 0.3% 담즙산이 첨가된 LB 배지, pH를 3.0, 4.0, 5.0으로 각각 맞춘 LB 배지에 50 μl씩 각각 접종한 후 1일간 37℃에서 배양하였다. 무처리 LB 액체배지의 배양균 1 ml와 0.3% 담즙산이 첨가된 LB 배지의 배양균 1 ml, pH를 3.0, 4.0, 5.0으로 각각 맞춘 LB 배지의 배양균 1 ml를 멸균된 생리식염수 10 ml에 넣어 균질하게 현탁시켰으며 부유상등액 1 ml를 멸균된 생리 식염수 9 ml에 섞어 10^{-4}까지 단계별로 희석하여 LB agar 배지에 도말하여 생균수를 계수하였다.

선발 길항균주의 동정. 선발된 길항균주의 동정을 위해서 그람염색과 oxidase test, catalase test, TSI(Triple sugar iron) agar test를 행하였고 최종적으로 Biolog®사의 세균동정시스템(MicroLog 3.01C)을 사용하여 검정실험 하였다.

혼합배양 상등액의 길항물질 특성 확인. 선발된 길항균주가 생산하는 길항물질의 특성을 알아보기 위하여 MRS 액체배지 100 ml에 길항균과 *S. gallinarum*을 혼합접종, 배양한 후 8000 rpm, 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액으로부터 고분자, 저분자를 분리하기 위하여 Amicon의 Centriprep T10K를 이용, 3,000×g, 55분간 원심분리 하였고, 내열성을 알아보기 위하여 80℃에서 20분간 중탕으로 가열하였다.[7,8]

유기용매 전이성을 확인하기 위하여 상등액에 동량의 butanol을 처리한후 4℃에서 하룻밤 보관한 후, 분리된 butanol층을 회수하여 감압 농축하였다. 농축 후 증류수 2 ml, methanol 2 ml에 각각 용해하여 길항력을 확인하였다[9].

배양시간에 따른 길항물질 생산 영향. 5 ml MRS 액체배지에 각 길항균을 48시간 전배양 시킨 후 원심분리를 2회 반복하여 배지성분을 씻어내었다. 배지성분을 씻어내고 남은 균체에 5 ml의 멸균증류수를 첨가하여 혼탁시킨 균체액 300 μl를 300 ml MRS broth에 접종, 48시간 배양하면서 두 시간을 간격으로 8 ml씩 회수하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 생육정도를 확인하였다. 모든 sample을 얻은 후에 원심분리하여 상등액을 회수한 후 동시에 길항력을 확인하였다.

길항균 생육에 미치는 탄소원의 영향. 탄소원이 길항균의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 minimal배지[K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, sodium citrate 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% pH 7.0]를 기본으로 하여 0.1%의 탄소원(arabinose, saccharose, glucose, lactose, galactose, mlatose, fructose)을 달리 첨가하여 37℃에서 30시간 배양후 600 nm 흡광도를 비교측정하여 균성장도를 비교하였다. 이때 탄소원의 이용성 여부는 탄소원을 첨가하지 않은 배지를 대조구로 하였다. 그리고 탄소원에 따른 길항력의 변화를 비교하기 위하여 탄소원에 따른 각 배양액을 원심분리하여 상등액을 회수한 후 동시에 길항력을 확인하였다.

길항균의 생육에 미치는 질소원의 영향. 질소원이 길항균의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 minimal배지[saccharose 1.0%, K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, sodium citrate 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% pH 7.0]를 기본배지로 하고 11가지의 질소원[protease peptone, $(NH_4)_2S_2O_8$, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, urea, bacto peptone, $(NH_4)_2HPO_4$, malt extract, beef extract, yeast extract, tryptone]을 0.1% 첨가하여 37℃에서 30시간 배양후 600 nm 흡광도를 비교 측정하여 균 성장도를 비교하였다. 이때 질소원의 이용성 여부는 질소원을 첨가하지 않은 배지를 대조구로 하였다. 그리고 질소원에 따른 길항력의 변화를 비교하기 위하여 질소원에 따른 각 배양액을 원심분리하여 상등액을 회수한 후 동시에 길항력을 확인하였다.

결과 및 고찰

야생꿩의 정상장내세균의 분리. 경북 청도지역에서 야생으로 서식하는 야생꿩의 소장과 대장으로부터 정상장내세균을 분리 한 결과, 소장에서는 MRS agar 배지에서 5개의 균주와 nutrient agar 배지에서 5개의 균주가 분리되었고, 대장에서는 MRS agar 배지에서 38개의 균주와 nutrient agar 배지에서 40개의 균주가 분리되었다. MRS agar 배지에서 분리된 colony는 새로운 MRS agar 배지에, LB agar 배지에서 분리된 colony는 새로운 LB agar 배지에 37℃, 1일간 배양한 후 4℃에서 보관하였다.

가금티프스 길항균주의 선발. Tooth-pick 접종방법으로 발육저지 측정법을 이용해서 가금티프스 원인균 *Salmonella gallinarum*의 생육을 억제하는 clear zone을 형성하는 길항균주를 선발한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 야생꿩 대장(large intestine)에서 분리된 78개의 균주 중에서 3종의 높은 길항능을 가진 방제균을 선발할 수 있었고 이들을 각각 L19, L33, L50으로 명하였다.

선발 길항균의 유산균 특성 확인. 선발된 가금티프스 길항균이 유산균 기능을 발휘하는 장내세균으로의 역할을 하는지를 알기위해 BCP 배지에서 배양한 결과 Fig. 2에서 보이는 것과 같이 선발된 세 균주 모두 획선 주위에 황색환을 형성하여, 분

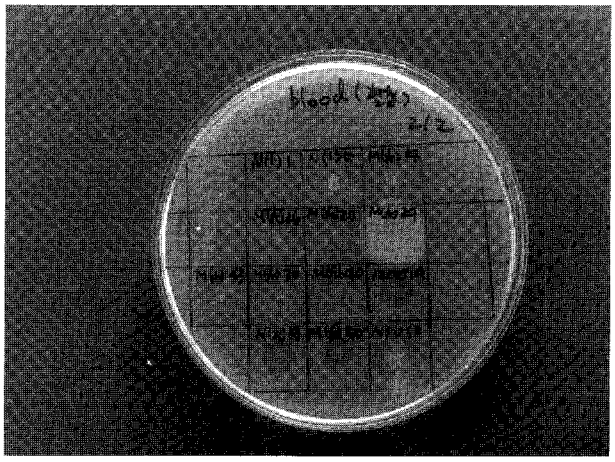
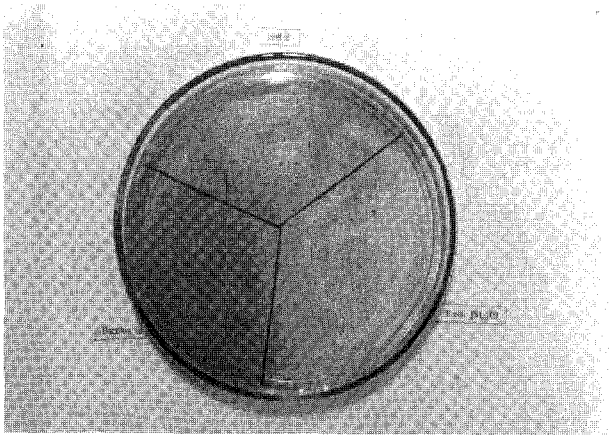
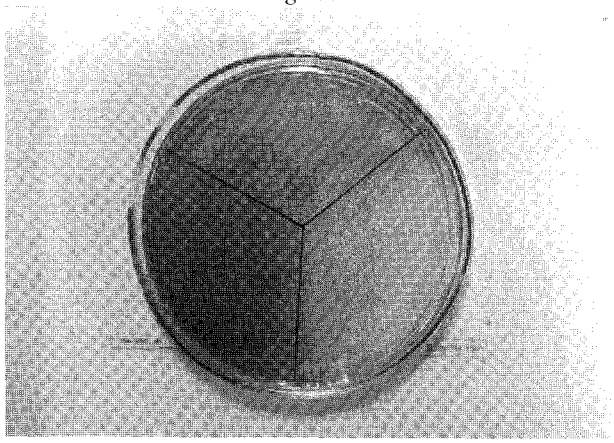


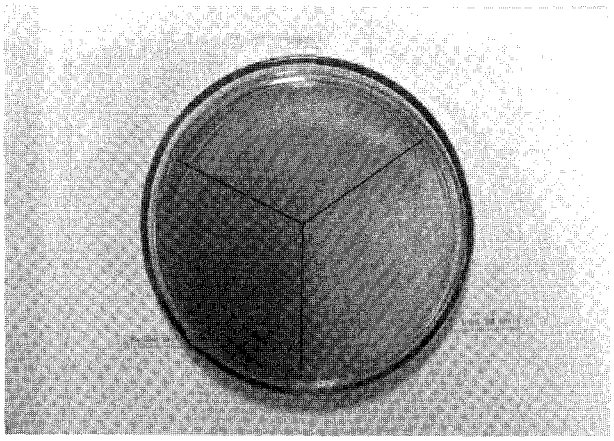
Fig. 1. Inhibition halo of *Salmonella gallinarum* lawn on blood serum media by isolated strain from a wild pheasant.



<*S. sanguis* L19>



<*S. sanguis* L33>



<*S. sanguis* L50>

Fig. 2. Golden halo of selected strains on BCP media which can selected lactic acid fermenting bacteria.

리선발된 길항균주들이 모두 유산균의 특성을 가지는 유산생산능이 있임을 확인 할 수 있었다. 대조군의 경우 *Bacillus* sp.는 비유산균으로 황색환을 형성하지 못하였다.

선발길항균의 담즙산과 산성에 대한 저항성. 선발된 균주를 실제 가금류에 섭취시켰을때 장내에 쉽게 정착되고 위에서 사멸되지 않는 특성을 확인함으로서 우수한 생균제의 가능성을 조사하였다. 선발된 균주의 담즙산과 산성 pH에 대한 저항성을 검사한 결과는 선발균주 모두 산성 pH에 대한 저항성이 비교적 약했으며, 또한 담즙산에 대한 내성검사 결과는 L50 균주만이 내성을 가지고 있는 것으로 Table 1과같이 나타났다.

Table 1. 0.3% bile acid and tolerance by acid pH

	S. sanguis L19	S. sanguis L33	S. sanguis L50
0.3% bile acid	-	+	+
pH 3.0	-	-	-
pH 4.0	+	-	-
pH 5.0	+	+	+

Table 2. Identification of strain L19, L33, L50 by their physiological and biochemical characteristics

Characteristics	Strain L19, L33, L50
Gram stain	-
Rod-Shaped/Endospore	(+)/(+)
Catalase test	+
Voges-Proskauer test	-
Gas from glucose	+
Hydrolysis of casein	+
gelatin	+
starch	+
Utilizaion of citirate	+
Formation of indole	-
Growth at pH 6.8 nutrient broth	+
5.7 nutrient broth	+
Growth at 30°C	+
40°C	+
50°C	-
Biolog (MicroLog™ 3.01C)	*Sphingomonas sanguis* (L19: 100%, L33: 100%, L50: 96.2%)

*Symbol: +, positive -, negative.

선발 길항균주의 동정. 길항균의 동정을 위하여 그람 염색을 실시한 결과는 L19, L33, L50 균주 모두 그람음성 간균임이 확인되었다. TSI agar test 로부터 세 균주 모두 가스를 생성한다는 것을 알 수 있었다. 그리고 Biolog®사의 세균동정시스템(MicroLogTM 3.01C)을 사용하여 검정실험한 결과 세가지 균주 모두 *Sphingomonas sanguis*의 근연종으로 동정되었다.

길항균주가 생산한 길항 물질의 특성. 선발된 길항균주가 *S. gallinarum*이 존재할 때 더 많은 길항물질을 생산하였다. 따라서 길항 균주들을 *S. gallinarum*과 혼합배향한 후 상등액에서 회수한 길항물질의 특성을 확인한 결과, *S. sanguis* L19, *S. sanguis* L33, *S. sanguis* L50의 배양상등액과 열처리 배양상등액, 고분자 분액, 열처리 고분자 분액에서 *S. gallinarum*의 균성장이 억제된 것으로 나타났으나, 저분자 분액과 열처리 저분자 분액에서는 *S. gallinarum*의 균성장이 높게 나타났다. 이를 통해 *S. gallinarum*을 저해하는 물질이 고분자성이고 내열성임을 추정할 수가 있었다. 또한 butanol 전이층에서 *S. gallinarum*의 생육이 억제된 결과를 통해 길항물질이 butanol에 전이되는 것을 알 수 있었다(Table 3).

길항균 배양시간에 따른 방제물질의 생산. 길항균의 배양시간에 따른 균 성장도와 방제물질 생산성을 알아본 결과 *S. sanguis* L19, *S. sanguis* L33은 유사한 생육곡선을 나타내었으며 *S. sanguis* L19는 20시간, *S. sanguis* L33은 22시간 이후부

Table 3. Characteristics of the antagonistic material of for anti-*S. gallinarum*

	Strain	L19	L33	L50
Inhibition*	Supernatants	89.6	89.3	89.6
	Heated supernatants	89.8	89.5	89.6
	High M.W. (>10K) sub.	89.7	89.5	89.5
	Heated high M.W. (>10K) sub.	89.7	89.4	89.7
	Low M.W. (<10K) sub.	35.1	33.3	31.9
	Heated low M.W. (<10K) sub.	34.6	35.6	31.4
	N-butanol extract	88.5	88.7	89.6

*(control O.D–sample O.D)×100/1.394 (%)
Optical density: 600 nm, O.D of control: 1.394

Table 4. Effect of carbon sources for the production of antagonistic substance from *S. sanguis* L19, L33, L50 against *S. gallinarum*

	L19		L33		L50	
	Cell growth	Relative activity*	Cell growth	Relative activity	Cell growth	Relative activity
None	0.001	0	0.003	0	0.001	0
Aarabinose	0.019	12.3	0.097	2.1	0.022	5.4
Saccharose	0.124	80.3	**0.148**	80.1	0.050	**80.2**
Glucose	**0.160**	79.7	0.135	80.4	0.017	6.7
Lactose	0.041	6.7	0.144	11.2	0.054	10.7
Galactose	0.120	21.7	0.043	**78.5**	0.027	11.2
Maltose	0.094	**79.3**	0.043	74.0	0.052	4.3
Fructose	0.134	75.4	0.146	13.3	**0.056**	11.2

*(control O.D–sample O.D)×100/1.394 (%)
Optical density: 600 nm, O.D of control: 1.023.
It calculated a relative activity as compared with relative activity/cell growth.

Table 5. Effect of nitrogen sources for the production of antagonistic substance from S. sanguis L19, L33, L50 against *S. gallinarum*

	L19		L33		L50	
	Cell growth	Relative activity*	Cell growth	Relative activity	Cell growth	Relative activity
None	0	0	0.001	16.1	0	0
Protease peptone	0.633	5.0	0.582	17.9	0.906	13.6
$(NH_4)_2S_2O_8$	0.002	0.8	0.027	20.1	0.023	**25.2**
$NH_4H_2PO_4$	0.037	19.4	0.379	82.7	**1.049**	84.5
$(NH_4)_2SO_4$	0.020	**16.9**	0.485	77.1	0.140	13.7
Urea	0.210	17.1	0.019	**14.7**	0.306	19.7
Bacto peptone	0.779	46.9	0.391	9.8	0.783	18.3
$(NH_4)_2HPO_4$	0.270	14.2	0.453	81.9	0.019	14.9
Malt extract	0.037	13.6	0.072	18.9	0.028	18.3
Beef extract	0.570	14.1	0.562	19.9	0.587	21.2
Yeast extract	**0.922**	59.1	**1.055**	21.5	0.686	82.2
Tryptone	0.749	35.3	0.652	34.9	0.375	82.1

*(control O.D–sample O.D)×100/1.394 (%)
Optical density: 600 nm, O.D of control: 1.248.
It was calculated a relative activity as compared with relative activity/cell growth.

터 *S. gallinarum*에 대한 길항력을 나타내었다. *S. sanguis* L50은 배양후 10시간부터 길항력을 나타내었다.

길항균 생육에 미치는 탄소원의 영향. 탄소원에 따른 길항균의 생육정도를 알아본 결과, *S. sanguis* L19는 glucose, *S. sanguis* L33은 saccharose, *S. sanguis* L50은 fructose에서 가장 높은 균체 성장도를 보였으나, 탄소원에 대한 길항물질 생산성은 *S. sanguis* L19의 경우 maltose, *S. sanguis* L33은 galactose, *S. sanguis* L50은 saccharose 첨가구에서 가장 높았다.

길항균 생육에 미치는 질소원의 영향. 질소원에 따른 길항균의 생육정도를 알아본 결과, *S. sanguis* L19와 *S. sanguis* L33은 yeast extract, *S. sanguis* L50은 $NH_4H_2PO_4$에서 가장 높은 균체 성장도를 보였으나, 질소원에 따른 길항물질 생산성은 *S. sanguis* L19의 경우 $(NH_4)_2SO_4$, L33은 urea, *S. sanguis* L50은 $(NH_4)_2S_2O_8$에서 가장 높았다.

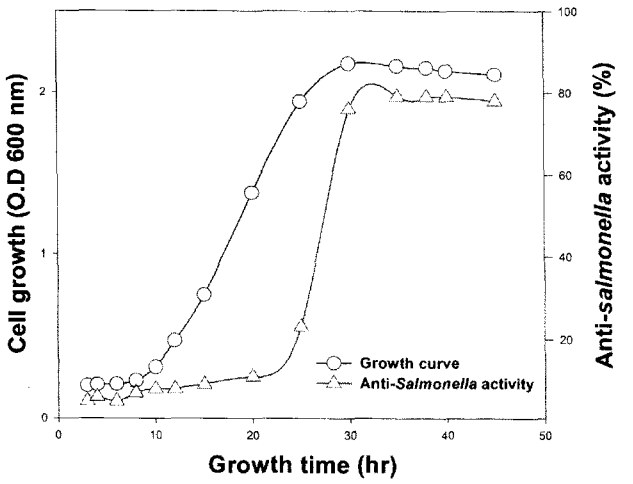


Fig. 3. Cell growth and antagonistic substance production of *S. sanguis* L19.

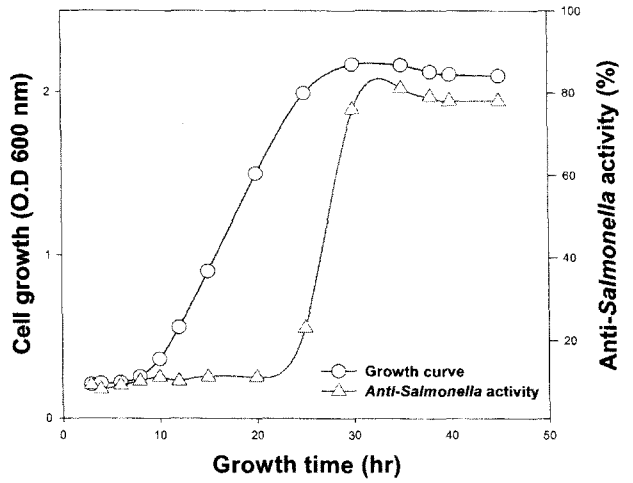


Fig. 4. Cell growth and antagonistic substance production of *S. sanguis* L33.

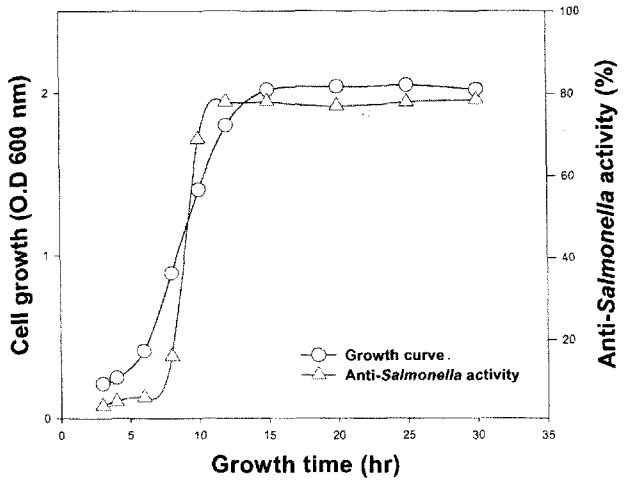


Fig. 5. Cell growth and antagonistic substance production of *S. sanguis* L50.

감사의 글

이 연구는 학술진흥재단(KRF 2001-005-G2009)의 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

1. Blankenship, L. C., Bailey, J. S., Cox, N. A., Stern, N. J., Brewer, R. and Williams, O. (1993) Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. *Poultry Sci.* **72**, 1667-1672.
2. Cho, M. K., Kim, K., Kim, J. H., Lee, T., K. and Kim, K. Y. (2000) Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 279-28.
3. Kim, G. S. (1999) Current situation and prosfects of poultry diseases in Korea. *Annual Rev Inst. Anim Med.* **8**, 7-19.
4. Kim, H. A., Cho, J. Y., Hong, J. G. and Kang, Y. H. (2001) Isolation and characterization of an animal probiotics. *J. Resource Dev.* **20**, 65-69.
5. Lee, J. K., Kim, W. T., Lee, J. H., You, J. H. and Shin, W. C.. (1991) General microbiology, physiology and metabolism; Isolation and identification of lactic acid bacteria for preparation of probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 429-432.
6. Park, H. S., Lee, J. H. and Um, T. B. (1999) Probiotic properties of *lactobacillus salivarius* isolated from chicken intestines. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1003-1009.
7. Schlessinger, D. (1975) In *Pages in Microbiology, American Society for Microbiology, Washngton, D.C.* pp. 110-157.
8. Shin, H. T., Keum, D. H., Rlee, H. W., Hoang, B. S. and Rlee, J. H.. (2001) Screening of yeasts for the development of direct fed microbials. *J. Anim. Sci. Technol.* **43**, 721-726.
9. Woo, Y. K., Lee, H. S., Lee, Y. J., Kang, M. S., Kim, B. H. and Kim J. H. (2000) Characteristics of *Salmonella* species isolated from domestic poultry and environmental samples in Korea. *Korean J. Vet. Res.* **40**, 505-514.

Isolation and Identification of *Sphingomonas sanguis* from Wild Pheasant and Production of Antagonistic Substance against Fowl Typhoid causing *Salmonella gallinarum*

Ryu, Hyang-Son, Hyun-Seung Lee, Jong-Hui Lim, Jin-Rack Kim and Sang-Dal Kim* (*Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea*)

Abstract: The antagonistic microorganisms against *Salmonella gallinarum* causing fowl typhoid were isolated from the gut of wild pheasant. The isolated L19, L33, L50 strains were showed the characteristics of isolated Gram negative, rods, catalase positive and oxidase negative. Finally, all strains were identified as *Sphingomonas sanguis* by Biolog® system. The optimal carbon sources of *Sphingomonas sanguis* L19, L33 and L50 for the these growth were glucose, saccharose, and fructose respectively. But the optimal carbon sources of *S. sanguis* L19, L33, L50 for the antagonistic material production were maltose, galactose, and saccharose respectively. The optimal nitrogen sources of *S. sanguis* L19, L33, L50 for the growth were yeast extract, yeast extract, and $NH_4H_2PO_4$, respectively. But the optimal nitrogen sources of *S. sanguis* L19, L33 and L50 for the antagonistic material production were $(NH_4)_2SO_4$, urea, $(NH_4)_2S_2O_8$, espectively.

Key words: antagonistic bacteria, *Salmonella gallinarum*, fowl typhoid, *Sphingomonas sanguis*
*Corresponding author