

해수 분리 세균 *Bacillus* sp. DH-9의 항균활성

김영만^{2*}·김도균^{1,2}·김남희¹·변태환^{1,2}·김아라¹·이은우^{1,2}·권현주^{1,2}·김병우^{1,2}

동의대학교 식품영양학과, ¹동의대학교 생명응용학과,

²동의대학교 블루바이오 소재개발 센터

Antibacterial Activity of *Bacillus* sp. DH-9 Isolated from Sea Water

Young-Man Kim^{2*}, Do Kyun Kim^{1,2}, Nam Hee Kim¹, Tea Hwan Byun^{1,2},
Ah Ra Kim¹, Eun-Woo Lee^{1,2}, Hyun-Ju Kwon^{1,2}
and Byung-Woo Kim^{1,2}

Department of Food Science and Nutrition, Donggeui University,
Busan 614-714, Korea

¹Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University,
Busan 614-714, Korea

²Blue-Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

Emerging of antibiotic resistance of pathogenic bacteria is now a very serious problem in the clinics to treat the diseases, which have been easy to cure by antibiotic treatments before. Unfortunately, antibiotics developed till now are not effective any more against the resistant bacteria. Lots of efforts to discover new antibiotics having novel and unique structures and functions are really urgent and undergoing in the whole world. In this study, we tried to screen and isolate some unique bacterial strains producing antibacterial substances from the sea water, which is the poor environment for bacteria to make their growing. Three bacterial strains among 916 strains isolated showed inhibition clear zone on the marine agar plate growing pathogenic bacteria including *Acinetobacter baumannii*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*. One of them, which was identified as *Bacillus* sp. DH-9 from 16S rRNA gene analysis, showed especially considerable antibacterial activity against *S. aureus* which is notorious for methicillin resistant *S. aureus* (MRSA). The growth of *S. aureus* was totally inhibited when the supernatant of *Bacillus* sp. DH-9 culture was treated on.

Key words: Antibacterial activity, Bacteria identification, Pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp.

서 론

병원성 세균의 항생제 내성 현상은 이미 전 세계적으로 임상 치료 현장에서 심각한 문제일 뿐 아니라, 사회적 혼란과 경제적 피해를 야기하고 있다 (Kapil, 2005). 광범위하고 무분별한 항생제 남용과 오용은 항생제에 내성을 가진 병원성 세균의 등장을 촉진하였고, 특히 여러 가지 항생제에 내성을 가지는 복합 다제내성 세균도 등장하였다 (Neu, 1992; Normark and Normark, 2002). 세균에 의해 한번 획득된 내성은 세균들 사이에서 빠르게 전파되었다. 특히 다양한 감염성 세균이 모여서 한정된 공간에서 많은 사람의 접촉이 이루어지는 병원에서 특히 빠르게 전파되었다. 이러한 병원내 감염은 약제 내성 유전자를 공유할 수 있는 세균들의 특성 때문에 그 위험성이 더욱 심각하다 (Goldmann et al., 1996). 따라서 항생제 내성 세균에 효능을 가지는 새로운 항생제 및 내성기작 저해제를 찾는 노력들이 여러 가지 방법으로 진행되고 있다 (Fraise, 2006; Butler and Buss, 2006; Stavri et al., 2007).

해양유래 세균을 비롯한 해양생물로부터 분리된 물질은 기존의 육상생물 또는 육상세균에서 유래된 물질에서 찾을 수 없었던 새로운 구조와 생리활성의 이차대사산물의 원천이 되고 있다 (Gulder and Moore, 2009). 특히 해양세균은 해양 영양성분의 생화학적 순환에 필수적인 역할을 하며, 그들의 이차대사산물은 신약개발이나 생명공학의 응용분야에서 광범위하게 활용되고 있다. 이에 따라 특유의 환경적응력과 다양한 대사활성에 따라 항암, 항당뇨, 항균 등 다양한 생리활성 물질을 생산한다고 알려져 있다 (Gram et al., 2009). 실제로 *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp. 그리고 *Ruegeria* sp.는 다양한 항균활성물질을 생산한다고 알려져 있으며, 최근에는 MRSA에 대해 기존의 항생제보다 높은 항균활성을 나타내는 물질을 생산하는 해조류 유래 *Pseudomonas* sp.의 보고가 있었다 (Salomon et al., 2004; Isnansetyo et al., 2001). 따라서 본 연구에서는 여러 가지 병원성 세균에 대해 항균활성을 나타내는 해양유래의 세균을 분리하여 동정하고자 하였으며, 항균활성 물질 생산의 최적조건을 결정하고자 하였다.

*Corresponding author: ymkim@deu.ac.kr

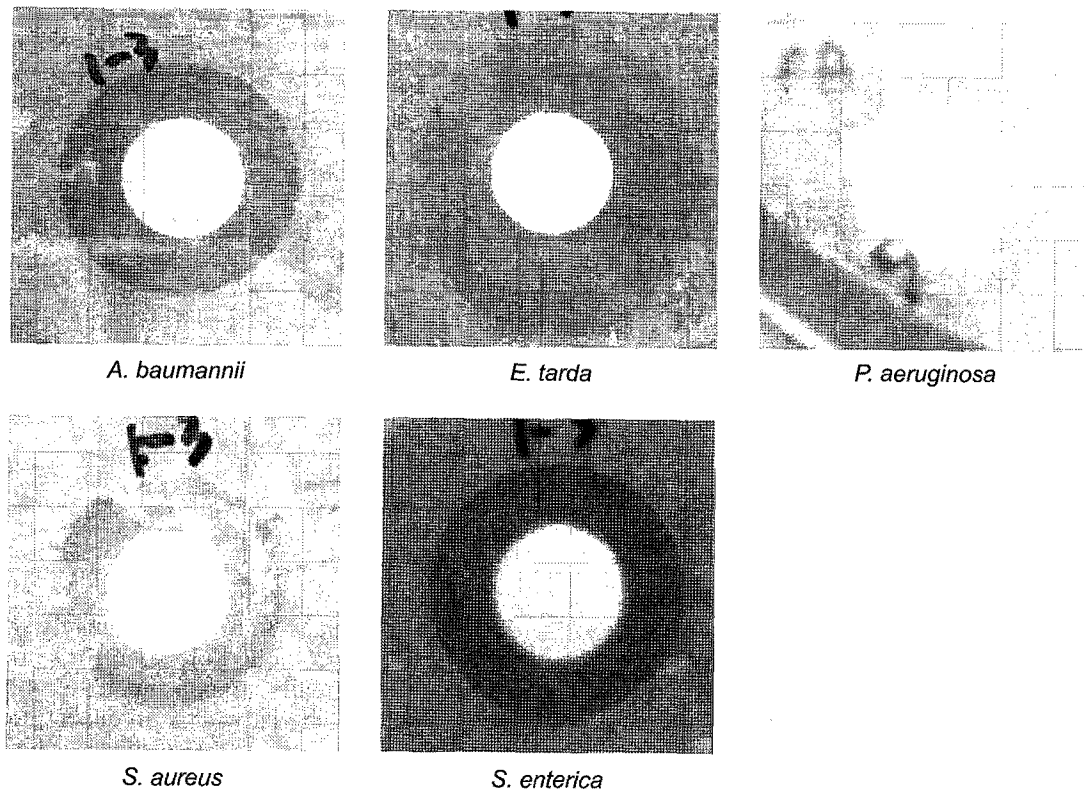


Fig. 1. Screening of antibacterial activity of isolated strain DH-9 against various pathogenic bacteria. Thirty μl of culture broth of strain DH-9 was loaded onto the paper disk placed on the marine agar plate inoculated by swabbing each pathogenic bacteria indicated in the figure.

재료 및 방법

사용균주 및 재료

항균활성 대상균주는 *Acinetobacter baumannii* KCTC 2508, *Edwardsiella tarda* KCTC 12267, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 15442, *Staphylococcus aureus* KCTC 6538, *Salmonella enterica* KCTC 1925를 각각 Korean Collection For Type Cultures (KCTC, Korea)에서 구입하여 nutrient broth (Difco Co.)에서 배양하며 실험에 사용하였다. 해수유래 균주 분리용 배지는 marine agar (Difco Co.)를 사용하였으며 그 밖의 시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

해수유래 균주의 분리

2008년 1월부터 9월까지 부산광역시 가덕도와 경상남도 거제도 부근 해역에서 채취한 해수 및 모래, 펄 등을 균주 분리원으로 사용하였다. 분리 및 배양배지는 marine agar (Difco Co.)를 사용하였으며, 30°C에서 3일간 배양한 후 평판 배지 상에 나타나는 단일 콜로니를 분리한 후, 다시 한 번 단일 콜로니로 순수분리하여 -80°C에서 glycerol stock 하면서 실험에 사용하였다.

분리균주의 동정

분리균주의 동정은 16S rRNA 염기서열을 결정하여 Database와 비교검색으로 실시하였다. Chromosomal DNA의 추출은 Berns and Thomas (1965)가 기술한 일반적인 방법에 따라 실시하였고, DNA의 분리 및 조작에 사용한 시약 및 polymerase chain reaction (PCR)을 위한 시약들은 Takara사 (일본)와 Solgent사 (한국)의 것을 사용하였다. 분리균의 16S rDNA를 증폭하기 위해 PCR 반응에 사용된 DNA oligonucleotide는 solgent사에 의뢰하여 합성하였다. Primers는 27F primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 1492R primer (5'-GGCTACCTGTTACGACTT-3')를 사용하였다 (Dunbar et al., 2000). PCR 반응 조건은 다음과 같다. Taq polymerase 0.5 μL (2.5 U), Taq polymerase buffer 5 μL ($\times 10$), 2.5 mM dNTP 4 μL , dH₂O 34.5 μL 에 20 pmol의 각 primer 2 μL 와 2 μL 의 주형DNA를 첨가하여 잘 혼합한 후 반응액을 94°C에서 30초간 변성시켰다. 이를 55°C에서 30초간 annealing 한 후 72°C에서 1분간 polymerization시키는 과정을 30회 반복하였다. 이후 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 프로그램을 이용하여 GenBank에 등록된 ribosomal RNA gene sequence와 비교

분석 하였다 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). 분리균주의 크기와 형태학적 특징은 주사전자현미경 Hitachi S-2400을 이용하여 분석하였다.

분리균주 배양 최적 온도 및 pH

배양 온도 20, 25, 30, 35, 37℃와 pH 5~8로 보정한 배양 배지에서 각각 24시간 배양한 후 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 분리 균주 배양의 최적온도와 최적 pH를 측정하였다.

분리균주의 항균활성 검색

항균활성 검색은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009)의 표준방법에 따라 disk diffusion method를 사용하였다. 즉, marine broth에서 하룻밤 배양한 대상균주 현탁액을 한천 배지 상에 멸균된 면봉으로 고르게 도말하고 paper disk (Avantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan, 지름 8 mm)를 울린 후, 분리균주 배양 여과액 (0.22 μm pore size) 30 μL를 각각 가하여 흡수시켰다. 37℃에서 24시간 배양한 후 paper disk 주변으로 생성된 생육 저해환의 지름을 비교하여 항균활성을 검색하였다.

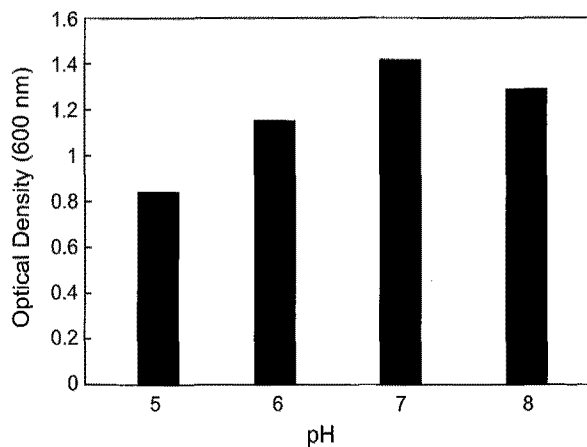
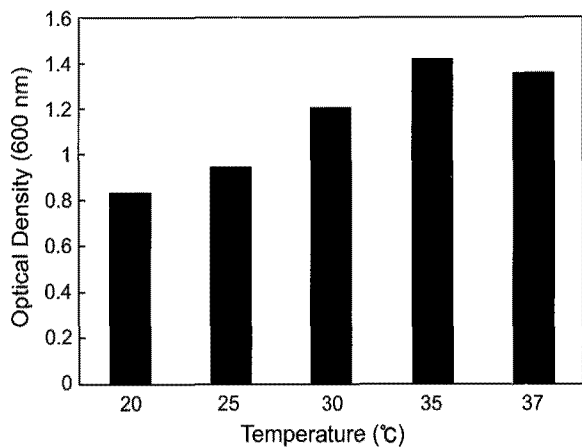


Fig. 2. Optimal temperature and pH for the growth of strain DH-9 isolate in marine broth.

생육시기에 따른 항균활성 측정

분리균주의 생육시기에 따른 항균물질 생산 정도를 파악하기 위한 실험은 다음과 같이 진행하였다. 최초 균량을 1×10⁵ CFU/mL로 맞춘 *S. aureus* 배양액 840 μL에 별도로 배양하여 시간대별로 수거한 *Bacillus* sp. DH-9의 배양상등액을 여과 (0.22 μm pore size)하여 제균한 배양액을 동일량 (160 μL) 첨가하여 다시 37℃에서 24시간 배양한 후, 살아남은 *S. aureus*의 균의 양을 생균수 측정법으로 결정하였다.

결과 및 고찰

항균활성 균주의 분리 및 배양 조건

부산광역시 가덕도와 경상남도 거제도 인근 해역의 해수로 부터 marine agar를 사용하여 균주를 분리하여 평판배지 상에 나타나는 육안상의 성상으로 분류한 결과, 총 916 균주가 분리되었다 (data not shown). 각각의 분리균주의 분리균주 배양액의 상등액을 0.22 μm pore size filter로 멸균한 여과액과 paper disk diffusion method를 이용한 항균활성을 나타내는 균주를 검색하였다. 대상 병원성 균주는 항균활성 대상균주는 *S. aureus* KCTC 6538, *P. aeruginosa* KCTC 15442, *S. enterica* KCTC 1925, *E. tarda* KCTC 12267, *A. baumannii* KCTC 2508를 사용하였다. 그 결과 916개 균주 중 3개의 균주에서 대상균주 5종 모두에 대해 뚜렷한 저해환과 항균활성을 나타내었다 (Fig. 1). 이 중 가장 강력한 항균활성을 나타낸 균주를 선택하여 DH-9으로 명명하고 실험을 진행하였다.

분리 균주 DH-9을 배양 온도 20, 25, 30, 35, 37℃와 pH 5~8로 보정한 marine broth 액체배지에서 각각 24시간 배양한 후 600 nm에서의 흡광도를 측정하여, 분리 균주 배양의 최적온도와 최적 pH를 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 분리 균주 DH-9은 20℃에서도 생육은 가능하였으며 최적 배양 온도는 35℃로 나타났다. 또한 pH 7에서 최적의 생육을 보여, 이후 실험에서는 pH 7의 배지에서 35℃ 배양조건으로 실험을 진행하였다.

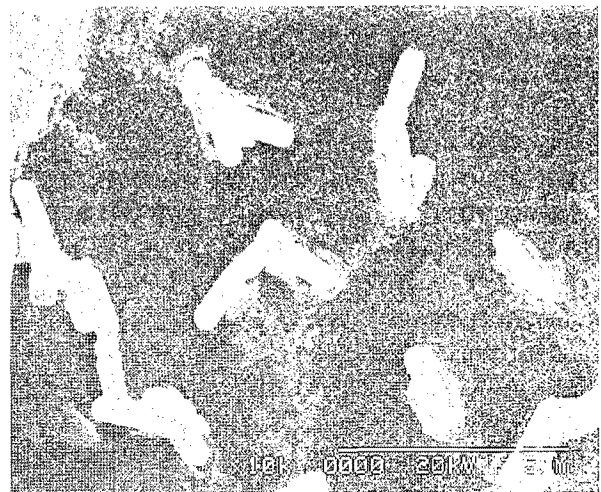


Fig. 3. Scanning electron microscopy of strain DH-9 showing typical shape of *Bacillus* sp.

Table 1. 16S rRNA partial sequence (1,438bp) and identification of the isolated strain DH-9 by homology search based on 16S rRNA. The sequence data was analyzed via ribosomal database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

```

1 gtgctataca tgcaagtcga gcgacacagaa gggagcttgc tcccggatgt tagcggcgga
61 cgggtgagta acacgtgggt aacctgcctg taagactggg ataactccgg gaaaccggag
121 ctaataccgg atagttcctt gaaccgcatg gttcaaggat gaaagacggt ttcggctgtc
181 acttacagat ggaccgcgg cgcattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcga
241 cgatgcgtag ccgacctgag agggatgatc gccacactgg gactgagaca cggcccagac
301 tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg
361 ccgcgtgagt gatgaagtt ttcggatcgt aaagctctgt tgtagggaa gaacaagtgc
421 aagagtaact gcttgcacct tgacggtaac taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc
481 agcagccgcg gtaatacgtg ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggct
541 cgcaggcggg ttcttaagtc tgatgtgaaa gccccggct caaccgggga gggctattgg
601 aaactgggaa acttgagtgc agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc
661 gtagagatgt ggaggaacac cagtggcga ggcgactctc tggtctgtaa ctgacgctga
721 ggagcgaaa gctgggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga
781 tgagtgctaa gtgttagggg gtttccgccc cttagtgtctg cagctaacgc attaagcact
841 ccgcctgggg agtacggctc caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa
901 gcgggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc
961 ctctgacaac cctagagata gggctttccc ttcggggaca gagtgacagg tgggtcatgg
1021 ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttg gtttaagttcc gcaacgagcg caacccttga
1081 tcttagttgc cagcattcag ttgggcactc taagggtgact gccggtgaca aaccggagga
1141 aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa
1201 tggacagaac aaagggctgc gagaccgcaa ggtttagcca atcccacaaa tctgttctca
1261 gttcggatcg cagtctgcaa ctgcactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcgatc
1321 agcatgccgc ggtgaatcag ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag
1381 tttgcaacac ccgaagtcgg tgaggtaacc tttatggagc cagccgccga agtayatnc

```

Reference strains	(accession no.)	Identity (%)
<i>Bacillus</i> sp. By253Ydz-fq	(EU070406)	99
<i>Bacillus subtilis</i> strain Bobby2007	(EF563825)	99
<i>Bacillus</i> sp. ZY011	(EU652879)	99
<i>Bacillus</i> sp. BM1-b	(EU940370)	99
<i>Bacillus pumilus</i> strain SDB-01	(EU874254)	99

항균활성 균주 DH-9의 동정

분리 균주 DH-9의 동정은 16S rRNA 염기서열을 결정하여 Database와 비교검색으로 실시하였다. DH-9 균주의 genomic DNA를 이용하여 PCR을 시행한 결과, 1,438 bp의 염기서열을 결정하였으며, 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들의 database와 비교한 결과 *Bacillus* sp. By253Ydz-fq (accession no. EU070406), *Bacillus subtilis* strain Bobby2007 (EF563825), *Bacillus* sp. ZY011 (EU652879) 등의 *Bacillus* 속에 포함되는 균주들과 99%의 높은 상동성을 나타내었다 (Table 1). 이 결과로부터 분리 균주 DH-9을 *Bacillus* sp. DH-9으로 명명하였다. 또한 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 크기 0.4~0.5 × 1.6~2.0 μm의 곧은 간균으로 전형적인 *Bacillus* sp.의 형태를 보여주었다 (Willey et al., 2008).

시판 항생제와의 항균활성 비교

Bacillus sp. DH-9과 임상에서 사용 중인 항생제와의 항균활성을 비교하였다. Aminoglycoside계열의 항생제로 *S. aureus* 감염증에 대해 β-lactam 약제와 병용투여가 이루어지는 kanamycin (Km) 30 μg을 비교시약으로 사용하였다. 그 결과 평판배지 상에 나타난 Km의 저해환의 크기는 190 mm로 *Bacillus* sp. DH-9의 배양상등액 여과액 (30 μL)에 의한 저해환의 크기 (180 mm)와 거의 동일하게 나타났다. *Bacillus* sp. DH-9이 생산한 *S. aureus*에 대한 항균활성 물질은 항생제 Km과는 달리 배양상등액의 여과액 속에 다량 희석되어 있는 것을 고려할 때, 본 항균물질을 순수분리 하였을 경우의 활성은 분리정도에 따라 상승할 것으로 판단된다. 또한 배양상등액으로부터 항균물질을 분리하고 그 항균 기작을 파악한 후

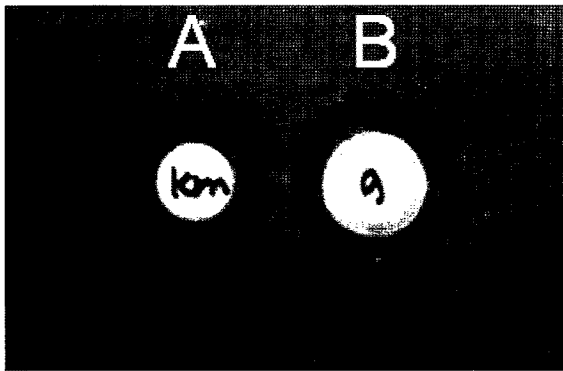


Fig. 4. Antibacterial activity of *Bacillus* sp. DH-9 against *S. aureus*. Commercial antibiotic kanamycin (30 µg) (A) was compared with the supernatant of *Bacillus* sp. DH-9 (B). *S. aureus* was plated on agar plate before loading each antibacterial solution.

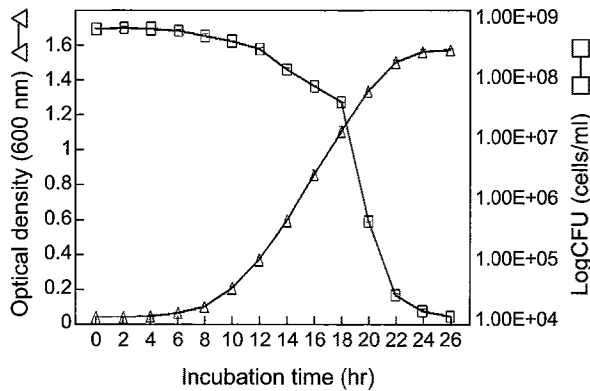


Fig. 5. Antibacterial activity of *Bacillus* sp. DH-9 against *S. aureus*. The supernatant of *Bacillus* sp. DH-9 (△-△) from the indicated incubation time was added to the culture broth of *S. aureus* cells (1×10^5 CFU/mL) and incubated at 37°C for 24 h. Survived *S. aureus* cells (□-□) were detected with plate counting method. This result was represented from the duplicated individual experiments.

항생제 내성으로 인해 사용하지 못하고 있던 기존의 항생제들과의 병용방법을 통해 시너지 효과를 기대해 볼 수 있다.

생육시기에 따른 항균활성 측정

항균활성물질 생산의 최적 배양시간을 결정하기 위하여 *Bacillus* sp. DH-9의 생육곡선과 이에 따른 *S. aureus*에 대한 항균활성을 조사하였다 (Fig. 4). 최초 균량을 1.0×10^5 CFU/mL으로 맞춘 *S. aureus* 배양액에 배양 시간대별로 수거한 *Bacillus* sp. DH-9의 배양상등액을 동일량 첨가하여 다시 24시간 배양한 후, 살아남은 *S. aureus*의 균수를 생균수 측정법으로 결정하였다. 그 결과, *Bacillus* sp. DH-9의 생육 8시간까지는 배양상등액에 *S. aureus*에 대한 항균활성을 나타내지 않았으나, 배양 12시간 때부터 항균활성을 나타내어 배양 22시간 때의 배양상등액에 의한 처리에 의해 살아남은 *S. aureus*는 초기

접종량 보다 낮아지는 것이 관찰되어 *Bacillus* sp. DH-9이 생산하는 항균물질은 살균적인 효능이 있음을 추정할 수 있었다. 이 같은 항균활성은 26시간 배양 관찰 시까지 지속되었다. 이 결과로부터 항균활성물질 생산을 위해서는 *Bacillus* sp. DH-9의 22시간 부근 배양액을 사용하는 것이 최적임을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2007학년도 동의대학교 교내 연구비 (과제번호: 2007AA139)에 의하여 수행된 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Berns KI and Thomas CA. 1965. Isolation of the high molecular DNA from *Haemophilus influenzae*. J Mol Biol 11, 476-490.

Butler MS and Buss AD. 2006. Natural products-the future scaffolds for novel antibiotics? Biochem Pharmacol 71, 930-940.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-10th ed. CLSI. Wayne, PA, U.S.A., M02-A10.

Dunbar J, Ticknor LO and Kuske CR. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Appl Environ Microbiol 66, 2943-2950.

Fraiese AP. 2006. Tigecycline: the answer to beta-lactam and fluoroquinolone resistance? J Infect 53, 293-300.

Goldmann DA, Weinstein RA, Wenzel RP, Tablan OC, Duma RJ, Gaynes RP, Schlosser J and Martone WJ. 1996. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. JAMA 275, 234-40.

Gram L, Melchiorson J and Bruhn JB. 2009. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. Mar Biotechnol (NY) 2009 Oct 13. [Epub ahead of print].

Gulder TA and Moore BS. 2009. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. Curr Opin Microbiol 12, 252-260.

Isnansetyo A, Horikawa M and Kamei Y. 2001. In vitro anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine

- alga. *J Antimicrob Chemother* 47, 724-725.
- Kapil A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: Need to comtemplate. *Indian J Med Res* 121, 83-91.
- Neu HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257, 1064-1073.
- Normark BH and Normark S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252, 91-106.
- Salomon CE, Magarvey NA and Sherman DH. 2004. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat Prod Rep* 21, 105-121.
- Stavri M, Piddock LJ and Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 59, 1247-1260.
- Willey JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. 2008. Prescott, Harley, and Kleins's Microbiology 7th ed. McGraw-Hill Inc. New York, NY, U.S.A., 578-582.

2010년 1월 15일 접수

2010년 1월 29일 수정

2010년 2월 22일 수리