

## Characterization and Identification of an Agar-Degrading Motile Bacteria Strain

Sung Wan Kang, Ah Young Yoo, Jong Eam Yu and Ho Young Kang\*

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received February 10, 2012 / Revised February 22, 2012 / Accepted February 22, 2012

A bacterial strain, CK214, exhibiting high motility on an LB agar (1.5%, w/v) surface was isolated from the environment. The formation of unusual agar shrinking around colonies on agar plates was observed. The strain grew on minimal media containing pure agar as a sole carbon source. The cell-free culture supernatant of CK214 generated a reduced form of sugar in the *in vitro* reaction with the use of pure agar as a substrate, suggesting the secretion of an agar-degrading enzyme. The CK214 strain showed swarming motility on the solid media containing a wide range of concentrations of agar (0.5, 1.0, 1.5, 2.0% w/v). Various tests, including Gram staining, API analysis, and phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences identified that the CK214 strain was a G(+) rod-shaped bacterium grouped in genus *Paenibacillus*. Electron microscopic analysis demonstrated that the *P. CK214* strain is peritrichously flagellated. Through transposon random mutagenesis, several agar-degrading activity defective mutants (ADMs) were generated. These mutants will be used in the future experimentation for the study of the correlation between agar-degrading activity and motility.

**Key words** : Agar-degrading activity, swarming, *Paenibacillus*

## 서 론

Agar는 주로 해양 홍조류가 생산해내는 다당류로써 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있다[6,21]. Agarose와 agaropectin의 기본구조는 같지만 agaropectin은 agarose보다 분자량이 낮으며 더 많은 황산기를 포함하고 있다. Agar의 주 구성성분은 agarose로서 전체 agar의 70%를 차지한다. Agarose는 D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactose가 교대로  $\beta$ -1,4 결합과  $\alpha$ -1,3 결합으로 연결된 단위체인 agarobiose의 중합체이다[6]. 대부분 해양생태계에서 생산되는 agar는 여러 agar 분해 박테리아에 의해 탄소원과 에너지원으로 이용된다. 대부분의 agar 분해 박테리아는 해양생태계에 서식하는 해양 미생물이지만 수생환경에 서식하지 않는 agar 분해 박테리아 또한 발견되고 있다[12,13].

*Paenibacillus*는 내생포자를 형성하는 그람 양성 박테리아로서 이전에는 *Bacillus*로 분류되었다[2,14]. 대부분 서식지 환경에서 다양한 분해 효소를 생산하며 물질 순환에 중요한 역할을 담당한다[17,27]. *Paenibacillus*의 몇몇 종은 일반적인 다른 세균들과는 다르게 고체표면에서 소용돌이, 가지, 키팔 형태와 같은 특유의 swarming 운동 형태를 보이는데 *P. alvei*, *P. dendritiformis*, *P. vortex*가 대표적이다[7,14,28]. Swarming 운동은 편모 활성을 필요로 하며 swarming 운동을 하는 대부분의 박테리아는 주로 주모성 편모를 가진다[9,10,25]. 여러 환경적 요인에 의한 편모 유전자의 발현 조절은 swarming 운동

을 하는 박테리아에게는 매우 중요한 요인이다[10,19,26,29]. 이러한 환경적 요인 중 특히 당 이용성은 편모의 발현 조절과 함께 박테리아의 운동성에 크게 관여한다.

본 연구에서는 agar 표면 환경에 생육하면서 특유의 소용돌이, 가지형의 swarming 운동 능력을 가지며, 집락 주위에 움푹한 투명환을 형성하는 agar 분해 활성을 지니는 균주를 분리하였다. 이 분리균주가 가지는 특이한 표현형적 특성에 관심을 가져 그 균을 동정하고 agar 이용성과 높은 swarming 운동 능력과의 상관관계를 파악하기 위한 연구를 수행하여 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

## 사용 균주 및 배양 조건

본 연구에서 사용된 *Paenibacillus* sp. CK214는 Luria-Bertani (LB)와 M9 (0.2% w/v sugar, 33.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.55 mM NaCl, 9.35 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 액체배지 또는 1.5% (w/v) agar를 첨가한 고체배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다[3]. 최소배지는 M9 CK214 균주의 효소액을 분리하기 위해서 0.2% (w/v) agar가 첨가된 LB 액체배지에서 24 시간 동안 배양하였다.

## Agar 분해 활성 측정

분리균 CK214의 배양액으로부터 분리한 효소액의 agar 분해 활성 측정은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 법을 이용하였다[8]. 효소액을 분리하기 위해 0.2% (w/v) agar가 첨가된 200 ml의 LB 액체배지에 전배양액 0.1% (v/v)를 접종하여 24 시간

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2266, Fax : +82-51-513-4532  
E-mail : hoykang@pusan.ac.kr

동안 진탕 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm 속도로 20 분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 상등액은 centriprep (Millipore)을 이용하여 약 100배 농축하였다. 농축된 효소액을 0.2% (w/v) agar가 첨가된 PBS (Phosphate Buffered Saline) 용액과 1:9 (v:v)로 섞은 후 5 분간 반응하였다. 이 반응액을 DNS 시약과 1:3 (v:v)으로 잘 섞은 후 80°C에서 15 분간 반응시켰다. DNS 시약과 반응한 시료는 파장 575 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 운동성 관찰

운동성은 2 ml의 LB 액체배지에서 12 시간 배양한 CK214 균주 배양액 5  $\mu$ l를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) LB agar 평판배지에 떨어뜨린 후 37°C에서 20 시간 동안 배양하면서 관찰하였다. CK214 균주의 각 조건에 따른 운동성은 고체평판배지에서 이동한 지름의 길이(mm)를 재어 측정하였다. CK214 균주의 이동이 완전한 원형의 모습이 아닌 경우, 가장 멀리 이동한 거리를 측정하여 기록하였다.

#### 그람 염색 및 광학 현미경 관찰

1.5% (w/v) LB agar 평판배지에서 배양한 CK214 균주, *Salmonella typhimurium* (그람음성대조균주), *Bacillus subtilis* (그람양성대조균주)를 0.85% NaCl 용액에 현탁하였다. 현탁액은 slide glass에 한 방울 떨어뜨린 후 열고정 시켰으며, 여기에 crystal violet 용액을 2-3 방울 떨어뜨린 후 1 분간 염색하였다. 염색된 시료를 3차수로 세척한 이후 요오드 용액을 2-3 방울 떨어뜨려 1 분간 반응 시킨 후 acetone isopropanol이 1:3 (v/v)으로 섞인 용액으로 탈색하였다. 최종적으로 safranin 용액으로 1 분간 대조 염색 후 광학 현미경을 통해 세포의 형태 및 그람염색성을 관찰하였다.

투과 전자 현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)

CK214 전배양액 10  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 1.0% (w/v) LB 고체 평판배지에서 배양하여 swarming 운동한 CK214 균체를 0.85% (w/v) NaCl 용액 1 ml에 부드럽게 현탁하였다. 균주 현탁액을 grid에 부착시키고 1% (w/v) uranyl acetate로 1 분간 염색한 후 투과 전자 현미경(TEM, H-7600, HITACHI, 부산대학교 공동실험 실습관)을 사용하여 균체를 관찰하였다 ( $\times 10000$ -25000).

#### 16S rDNA 염기서열분석 및 계통발생학적 분석

16S rDNA 염기서열분석을 위해 PCR 증폭기법을 이용하여 CK214 균주의 16S rRNA를 암호화하는 DNA 절편을 증폭하였다. Primer는 16S rDNA 염기분석서열을 위한 universal primer인 B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 U1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하였으

며, PCR은 다음과 같은 조건으로 수행하였다: 94°C에서 5 분간 pre-denaturation 시간을 준 후 94°C에서 30 초간 denaturation, 42°C에서 30 초간 primer annealing, 72°C에서 1 분간 polymerization 과정을 25 회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 10 분간 마지막 합성 시간을 주었다. 증폭된 16S rDNA는 Gel and PCR Purification Kit (Solgent)를 사용하여 정제하였으며, 정제된 DNA 단편을 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝 하였다. DNA 단편의 염기서열분석은 Solgent 사에 의뢰하였으며, 분석하여 얻은 CK214의 16S rDNA 염기서열과 상동성을 가지는 다른 박테리아의 염기서열을 찾기 위해 BLAST 분석을 수행하였다. 분석된 BLAST 결과를 토대로 한 16S rDNA 염기서열들을 CLUSTAL W2 Multiple Sequence Alignment 프로그램을 통해 비교하였다(www.ebi.ac.uk). 계통수의 작성은 Tree view (1.6.6) 소프트웨어를 사용하였으며 Bootstrep 신뢰성 분석은 1,000회 반복 수행되었다. 계통발생학적 분석에 사용된 박테리아는 다음과 같다: *Paenibacillus lautus* strain OFB-7 (HM439459), *P. lautus* (AB073188), *Paenibacillus* sp. 6495m-C2 (AJ509004), *Paenibacillus* sp. PRE17 (EU880530), *Paenibacillus* sp. H28-08 (AM162307), *P. glucanolyticus* (AB073189), *P. vortex* strain V453 (HQ005270), *Paenibacillus* sp. isolate vortex (AJ131119), *Paenibacillus* sp. R-30939 (AM910282), *P. lactis* strain IB-188D (FN429978), *P. lactis* strain MB 2035 (AY257870), *P. lactis* strain MB 1871 (AY257868), *Bacillus* sp. DB104 (HM566817), *P. lactis* strain ZYb1 (FJ445392), *Paenibacillus* sp. P30 (AM162319), *P. ginsengagari* Gsoil 3125 (AB245383), *Geobacillus* sp. Y412MC10 (CP001793), *Paenibacillus* sp. XP1-2 (GQ981313), *Paenibacillus* sp. H25-07 (AM162303), *Bacterium* DE5 (EU520331).

#### Random mutagenesis

Agarase 결손 돌연변이주를 구축하기 위해서 transposon을 이용한 random mutagenesis 방법을 수행하였다[22]. CK214 균주와 transposon 유전자(TnphoA)가 클로닝 되어 있는 플라스미드 pRT733을 가지는 *Escherichia coli*  $\chi$ 7213/pRT733 균주를 각각 2 ml의 LB 액체배지에 배양한 후 원심분리를 이용하여 균체를 분리하였다. 이 균체를 20  $\mu$ l의 LB 액체배지에 재현탁 한 후 각 현탁액을 잘 섞어서 diaminiopipelic acid (DAP)이 첨가된 LB 평판배지에 떨어뜨린 후 37°C에서 배양하였다. 배양 중 pRT733 플라스미드는 CK214 균주 내로 접합을 통해 이동하게 된다. pRT733이 들어간 CK214 균주 내에서는 transposon의 염색체 내 삽입이 이루어지며, transposon 삽입이 일어난 균주의 선별은 transposon 유전자 내에 포함된 kanamycin 내성 유전자를 이용하였다. DAP이 첨가된 LB 평판배지에서 배양한 균체 1 백금이를 100  $\mu$ l의 LB 액체배지에 재현탁한 후 2.0% (w/v)의 agar가 첨가된 kanamycin (50  $\mu$ g/ml) 항생제 배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다.

## 결과 및 고찰

Agar 표면에서 agar 분해능을 가지는 swarming 박테리아의 분리

Agar 표면 환경에서 분리한 CK214 균주는 LB agar 평판배지에서 이동 중에 스스로 집락을 형성하며 소용돌이 형태의 특이한 swarming 운동 능력을 보였으며 집락 주위로 움푹한 투명환이 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 1A). 집락 주위의 투명환은 일반적으로 일부 protease를 생산하는 균주가 우유가 첨가된 고체평판배지에서 집락 주위로 투명환을 형성하는 것처럼 여러 가지 분해 효소에 의해 나타난다[5,23]. LB agar 평판배지에서 CK214 집락 주위의 투명환이 움푹 들어간 것은 고형화제로 사용된 agar가 분해되어 생기는 현상이라 추정되었다. CK214 균주는 agar를 분해하여 탄소원으로 이용할 것이라는 가설을 설정하고서 이를 실험적으로 증명하기 위하여 M9 최소배지에 단일 탄소원으로 0.2% (w/v) agar만을 넣고 37°C에서 24 시간 동안 진탕 배양한 후 파장 600 nm에서 흡광도를 측정하여 CK214 균주의 성장을 확인하였다. 예측한 바와 같이 agar를 넣지 않은 M9 최소배지에서는 균이 생육하지 않은 반면에 agar가 들어있는 배지에서는 균이 생육하였음을 관찰하였다(Data not shown). 이를 통해 CK214 균주는 agar를 분해하여 탄소원으로 이용하는 균주 중의 하나임을 확인할 수 있었다.

CK214 균주의 agar 분해 활성을 측정하기 위해 CK214 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 분리한 후, 농축, 여과하여 효소액을 준비하였다. 준비된 효소액을 PBS에 희석하여 DNS 용액과 섞어 80°C에서 15 분간 반응시킨 후, 반응한 시료는 파장 575 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 1B). 측정된 흡광도를 galactose 용액을 이용해 측정된 표준곡선과 비교해 생성된 환원당의 양을 측정하였다. CK214 배양액으로부터 추출한 효소액의 환원당 생성 정도는 0.31 mmol/mg · min으로 나타났으며, 이 결과를 통해 CK214 균주가 agar 분해 효소를 세포 외부로 분비하여 그 분해산물을 성장에 이용한다는 것을 알 수 있었다.

### CK214 균주의 swarming 운동

CK214 균주는 1.5% (w/v) agar 배지 표면에 특유의 swarming 형태를 나타내며 뛰어난 운동 능력을 보였다. 다양한 농도의 agar 표면에서 CK214 균주의 swarming 운동 능력의 변화를 관찰하기 위하여 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) LB agar 평판배지에서 운동성을 조사하였다. CK214 균주 전배양액 5 µl 를 각 농도의 LB agar 평판배지에 떨어뜨린 후 37°C에서 20 시간 동안 배양하였다. CK214 균주는 0.5, 1.0, 1.5% (w/v) agar 농도에서 활발한 운동 능력을 보였으며 2.0% (w/v) 이상의 agar 농도에서 운동 능력이 급격히 감소하였다(Fig. 2). 1.0% (w/v) agar 농도에서 가장 높은 운동성을 보였는데 대표

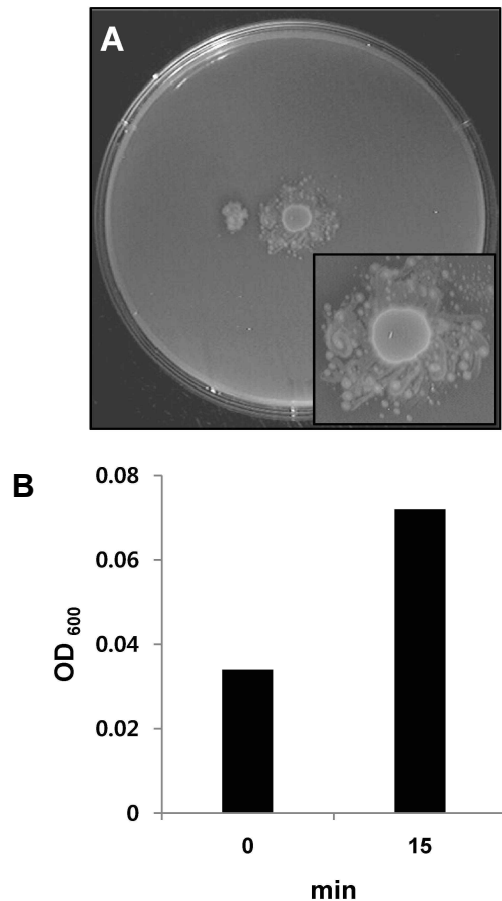


Fig. 1. A colonial characteristics and agar-degrading activity of CK214 strain. (A) Preculture media of CK214 strain was dropped on the middle of LB agar plate and incubated at 37°C for 20 hrs. The self-organized vortices and clear region around colonies were showed. (B) Agar-degrading activity of the cell-free culture supernatant of CK214 strain was measured by DNS method as described in M & M.

적인 swarming 운동성 박테리아인 *S. typhimurium* [10,16] 과 비교하였을 때 약 5배 더 높은 운동성을 보였다. *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 와 같은 대부분의 박테리아에게 1.0% (w/v) agar 표면 환경은 습기가 부족하여 swarming 운동을 하기엔 효과적이지 못한 환경이지만[9,10,11,18] CK214 균주는 이런 조건에서 다른 일반적인 swarming 운동 박테리아에 비해 높은 운동성을 보여주었다. 특히하게도 0.5% agar 조건에서 CK214는 스스로 집락을 형성하는 특유의 swarming 형태가 나타나지 않고 *S. typhimurium*과 *P. aeruginosa*가 swimming 운동을 할 때와 비슷한 형태를 나타내었다 [4,15,16]. 이는 0.5% agar 평판배지의 습기가 많은 조건이 CK214 균주의 운동성 패턴 변화와 관련이 있음을 보여준다.

### CK214 균주의 동정

CK214 균주의 agar 분해 활성과 swarming 운동성에 관한

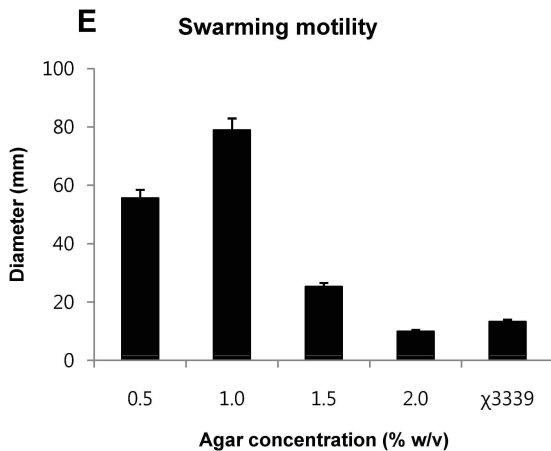
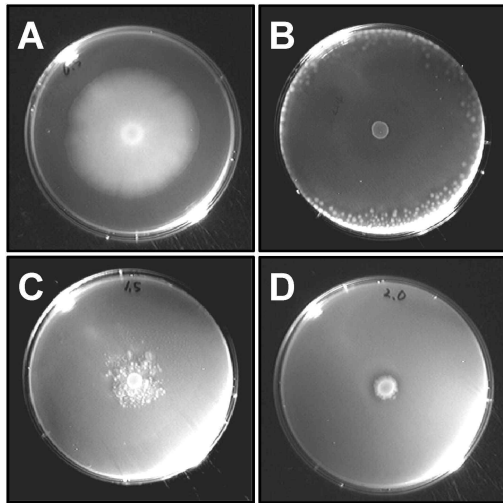


Fig. 2. Swarming motility of CK214 according to the variable agar concentration. (A-D) Gross morphology of *Paenibacillus* sp. CK214 on media containing 0.5 or 2.0% (w/v) of agar. (E) CK214 strain was spotted on LB swarming plates containing 0.5-2.0% (w/v) agar. The strain was incubated at 37°C for 20 hrs. Diameter of swarming region was measured in triplicate.

특성을 보다 자세히 연구하기 위하여 CK214 균주를 동정할 필요가 있어 연구를 수행하였다. 연구하는 것과 동시에 CK214 균주를 동정하기 위한 연구들을 수행하였다. 우선 그람염색법으로 CK214 균체를 염색한 후 광학 현미경으로(Carl Zeiss, Primo Star) CK214 균주의 형태 및 그람 염색성을 관찰하였다. CK214 균주는 그람양성의 간균으로 *Bacillus subtilis*와 비교하여 그 형태와 크기가 매우 비슷하였다(Data not shown). 생화학적 특성에 따른 CK214 균주의 동정을 위해 API 분석과 vitek2 분석을 부산광역시 보건환경연구원(Busan, Korea)에 의뢰하였다. API 분석 결과, CK214 균주는 *Bacillus circulans*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus macerans*와 각각 69.6%, 16.1%, 13.9%의 유사성을 나타내었다. 또한 vitek2 분석에 의

Table 1. Identification of CK214 strain by biochemical analysis

Assay	Strain	Identity (%)
API	<i>Bacillus circulans</i>	69.6
	<i>Paenibacillus lautus</i>	16.1
	<i>Paenibacillus macerans</i>	13.9
Vitek	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	94.0

한 동정 결과 *Paenibacillus amylolyticus*와 94%의 유사성을 보이는 것으로 나타났다(Table 1). 생화학적 테스트 결과만으로 중 수준의 동정을 결정하기에는 무리가 있었기 때문에, 우리는 최종적으로 16S rDNA 염기서열분석에 기초한 계통발생학적 분석법을 이용하여 CK214의 동정을 수행하였다. CK214의 16S rRNA를 암호화하는 DNA는 universal primer B27F와 U1492R를 사용하여 PCR 증폭하였다. 업체에 분석 의뢰하여 얻은 CK214의 16S rDNA의 염기서열을 이용하여 BLAST 분석한 결과, *Paenibacillus lactis* strain MB 2035 (AY257870)와 99%의 가장 가까운 유사성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Data not shown). CK214 균주의 계통발생학적 위치를 확인하기 위해 16S rDNA 염기서열을 기초로 한 계통수를 작성하였다. CK214 균주를 포함한 BLAST 결과에서 유사성을 보였던 균주들의 16S rDNA 염기서열들을 CLUSTAL W2 Multiple Sequence Alignment 프로그램을 통해 비교하였다. 계통수는 Tree View (1.6.6) 소프트웨어를 이용하여 작성하였으며, 그 결과 CK214 균주가 *Paenibacillus* 속의 여러 균주들과 매우 가까운 연관성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

내생포자를 형성하는 그람양성의 호기성 박테리아인 *Paenibacillus*는 환경에서 여러 분해 효소를 생산하며 몇몇 종에서는 소용돌이, 가지, 키타 형태 같은 특유의 swarming 운동 형태를 나타낸다. 그람양성의 CK214 균주는 *Bacillus subtilis*와 그 형태와 크기가 비슷하고 agar 분해 효소를 생산하며 소용돌이, 가지형태의 *Paenibacillus* 전형적인 swarming 운동 형태를 나타내었다. 이는 알려진 *Paenibacillus*의 특징과도 일치하였으며, CK214 균주가 *Paenibacillus* 속에 포함된다는 또 하나의 증거가 되며, 우리는 CK214 균주를 *Paenibacillus* sp. CK214라 명명하였다.

환경 중 agar 유무에 따른 *Paenibacillus* sp. CK214 균주의 편모 형성

일반적으로 *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*와 같은 swarming 운동을 하는 대부분의 박테리아들은 주모성 편모를 가지며, 고체표면에서의 표면마찰과 점성을 극복하기 위해서는 활발한 편모 활성을 필요로 한다. agar 고체표면에서 뛰어난 swarming 운동 능력을 보이는 *Paenibacillus* sp. CK214 균주에서도 편모 활성이 매우 중요하게 작용할 것이라 생각하고 투과 전자 현미경(TEM)을 이용하여 CK214 균주의 편모를 관찰

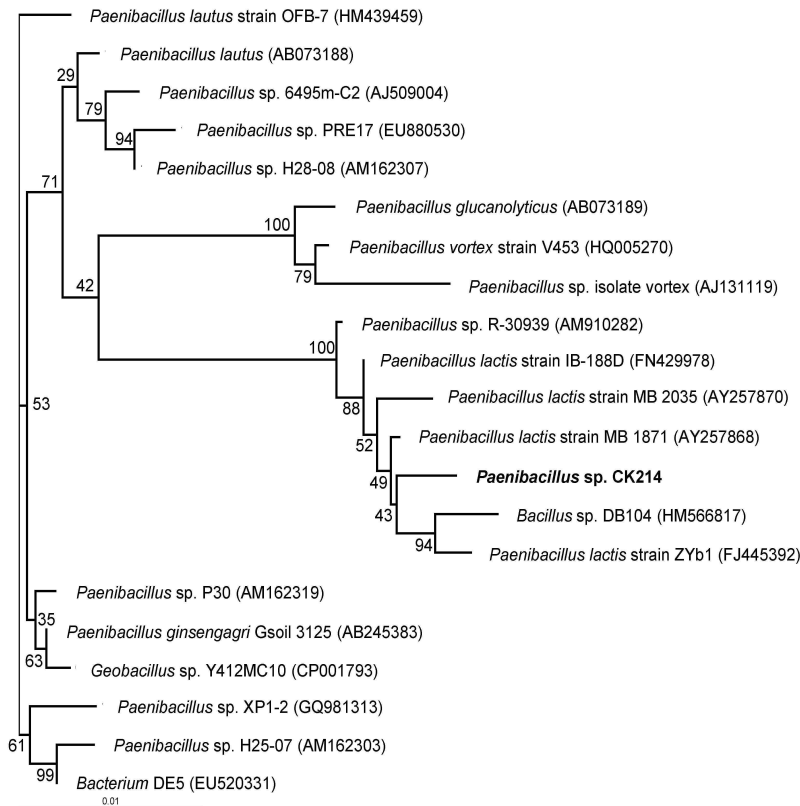


Fig. 3. Phylogenetic tree of CK214 strain. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showed the positions of strain CK214 and some related taxa. Bootstrap values (percentages of 1000 resamplings) are given at branch points. Bar, 1% estimated sequence divergence.

하였다(Fig. 4). LB agar (1.5% w/v) 평판배지에서 배양한 CK214 균주의 경우 단일 세포 주위로 여러 개의 주모성의 편모가 나타난 것을 관찰하였다. LB 액체배지에서 배양한 CK214 균주의 경우 agar 고체표면 조건에서는 나타났던 주모

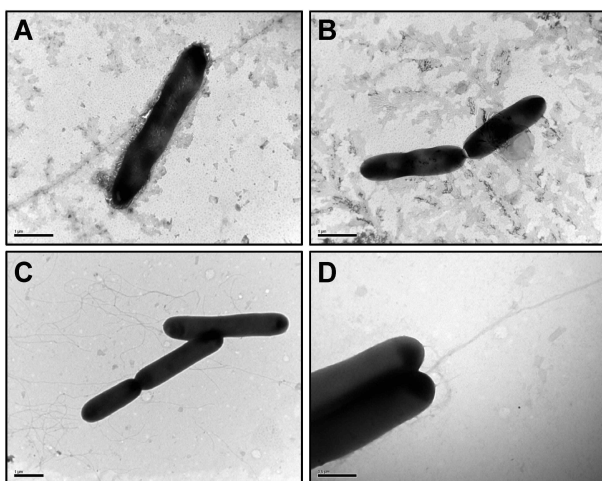


Fig. 4. Electron microscopic images of CK214. Cells were extracted from LB broth (A-B) or agar plates (C-D). Cells diluted with 0.85% NaCl were dyed and dried for two minutes on the grid by 1% (w/v) uranyl acetate. Bars indicate 0.5 μm.

성 편모가 관찰되지 않았다. Swarming 운동성 박테리아로 잘 알려진 *Proteus mirabilis*는 여러 환경적 요인에 의해 세포와 편모 길이의 증가, 편모 수의 증가 등의 swarmer cell로의 분화가 일어난다. 고체 표면 조건은 swarmer cell로의 분화에 관여하는 환경적 요인 중 하나이다[1,24]. CK214 균주의 agar 고체 표면 조건에서의 flagellation 또한 효과적인 swarming 운동에 필요한 세포 분화의 한 종류라 생각할 수 있다.

#### Agarase 결손 돌연변이주의 구축

당 이용성은 박테리아의 운동성과 관련한 유전자의 발현 조절에 관여하는 중요한 요소 중 하나이다. *Paenibacillus* sp. CK214 균주는 agar를 분해 활성을 이용하여 agar를 탄소원, 에너지원으로 이용한다. 지금까지 박테리아의 agar 분해 활성에 대한 연구를 살펴보면, agar를 분해하는 균주들은 agarase 효소를 생산하여 agar 분해 활성 가졌으며[12,13,20], CK214 균주 역시 agarase 효소를 생산할 것이라 예상할 수 있었다. CK214 균주의 agar 분해 활성이 운동성에 어떠한 영향을 끼치는지 앞으로의 연구를 위하여 분자생물학적인 접근법으로 agar 분해 효소를 암호화 하는 유전자를 찾는 작업과 동시에, random mutagenesis를 통한 agar 분해활성 결손 돌연변이주의 구축 작업을 함께 진행하였다. 재료 및 방법에 자세히 언급한 바와 같이 Kanamycin (Km) 내성 유전자를 선별 marker로

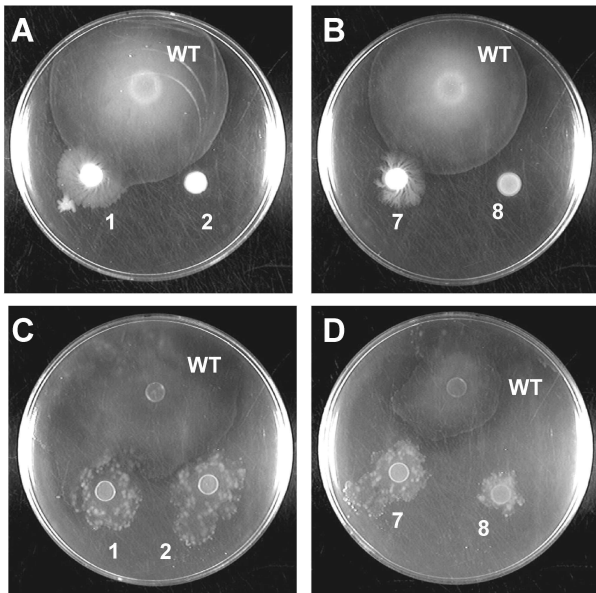


Fig. 5. Swarming motility of CK214 agarase defect strains with wild type strain. Preculture media of CK214 ADM strains and wild type strain were dropped on the middle of LB agar plate and incubated at 37°C for 20 hrs. (A-B) 0.5% (w/v) agar. (C-D) 1.0% (w/v) agar.

가지는 *TnphoA* transposon을 분자생물학적인 도구를 이용하여 random mutagenesis 과정을 수행하여 선별을 시작하였다. 집락 주위로 옅푸른 투명한 환의 형성 정도가 저하된 8 개의 집락을 선별한 후 Kanmycin 항생제 배지에 다시 접종하여 최종적으로 4 개의 agar 분해활성 결손 돌연변이주를 선별하였다(Data not shown). Transposon의 삽입에 의한 agar 분해 활성의 감소가 agarase 유전자 자체의 불활성화에 의한 것인지, 관련 유전자의 불활성화에 의한 간접적 영향인지를 알기 위한 분자 생물학적 접근에 의한 추가 연구가 필요한 상태이다.

Agarase 결손 돌연변이주의 운동성 감소

선별한 agar 분해활성 결손 돌연변이주(Agar degrading activity defective mutant ADM)들과 CK214 야생형 균주의 운동성을 0.5, 1.0% (w/v) LB agar 평판배지에서 비교하였다 (Fig. 5). 앞서 CK214 야생형 균주는 0.5, 1.0% (w/v) agar 조건에서 높은 운동성을 나타내었지만 4개의 ADM 균주는 모두 0.5, 1.0% agar 조건에서 야생형 균주에 비해 운동성이 급격히 감소하였다. 이는 agar 분해 활성에 의한 agar 이용성이 CK214의 운동성에 직/간접적으로 관여하고 있다는 것을 보여준다. 여러 환경적 요인에 의해 편모 유전자의 발현이 조절 된다는 것이 이전 연구들에서 보고되었으며[10,24], *Paenibacillus* sp. CK214 균주의 agar 분해 활성과 운동성 및 편모 발현간의 상관관계를 알기 위한 추가 연구가 필요하다.

감사의 글

이 과제는 부산대학교 교수국외장기과전지원비에 의하여 연구되었음.

References

- Alavi, M. and R. Belas. 2001. Surface sensing, swarmer cell differentiation, and biofilm development. *Methods. Enzymol.* **336**, 29-40.
- Ash, C., F. G. Priest, and M. D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 253-260.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300.
- Clegg, S. and K. T. Hughes. 2002. FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184**, 1209-1213.
- Cristobal, H. A., M. A. Lopez, E. Kothe, and C. M. Abate. 2011. Diversity of protease-producing marine bacteria from sub-antarctic environments. *J. Basic. Microbiol.* **51**, 590-600.
- Fu, X. T. and S. M. Kim. 2010. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar. Drugs* **8**, 200-218.
- Fujihara, M., K. Maeda, E. Sasamori, M. Matsushita, and R. Harasawa. 2009. Effects of chelating reagents on colonial appearance of *Paenibacillus alvei* isolated from canine oral cavity. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 147-153.
- Ha, J. C., G. T. Kim, S. K. Kim, T. K. Oh, J. H. Yu, and I. S. Kong. 1997. beta-Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**, 1-6.
- Harshey, R. M. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **13**, 389-394.
- Harshey, R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 249-273.
- Harshey, R. M. and T. Matsuyama. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8631-8635.
- Hosoda, A., M. Sakai, and S. Kanazawa. 2003. Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1048-1055.
- Hu, Z., B. K. Lin, Y. Xu, M. Q. Zhong, and G. M. Liu. 2009. Production and purification of agarase from a marine agarolytic bacterium *Agarivorans* sp. HZ105. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 181-190.
- Ingham, C. J. and E. Ben Jacob. 2008. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiol.* **8**, 36-42.

15. Inoue, T., R. Shingaki, and K. Fukui. 2008. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**, 81-86.
16. Kim, W., T. Killam, V. Sood, and M. G. Surette. 2003. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J. Bacteriol.* **185**, 3111-3117.
17. Ko, C. H., C. H. Tsai, P. H. Lin, K. C. Chang, J. Tu, Y. N. Wang, and C. Y. Yang. 2010. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* **101**, 7882-7888.
18. Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden, and J. C. Pechere. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**, 5990-5996.
19. Lai, H. C., J. C. Shu, S. Ang, M. J. Lai, B. Fruta, S. Lin, K. T. Lu, and S. W. Ho. 1997. Effect of glucose concentration on swimming motility in enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 692-695.
20. Lu, X., Y. Chu, Q. Wu, Y. Gu, F. Han, and W. Yu. 2009. Cloning, expression and characterization of a new agarase-encoding gene from marine *Pseudoalteromonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1565-1570.
21. Marinho-Soriano, E. 2001. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *J. Biotechnol.* **89**, 81-84.
22. Matsuo, J., S. Oguri, S. Nakamura, T. Hanawa, T. Fukumoto, Y. Hayashi, K. Kawaguchi, Y. Mizutani, T. Yao, K. Akizawa, H. Suzuki, C. Simizu, K. Matsuno, S. Kamiya, and H. Yamaguchi. 2010. Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res. Microbiol.* **161**, 711-719.
23. Nicodeme, M., J. P. Grill, G. Humbert, and J. L. Gaillard. 2005. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 641-648.
24. Rather, P. N. 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ. Microbiol.* **7**, 1065-1073.
25. Senesi, S., E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, E. Parisio, and A. Galizzi. 2004. Surface-associated flagellum formation and swarming differentiation in *Bacillus subtilis* are controlled by the ifm locus. *J. Bacteriol.* **186**, 1158-1164.
26. Stella, N. A., E. J. Kalivoda, D. M. O'Dee, G. J. Nau, and R. M. Shanks. 2008. Catabolite repression control of flagellum production by *Serratia marcescens*. *Res. Microbiol.* **159**, 562-568.
27. Sudo, M., M. Sakka, T. Kimura, K. Ratanakhanokchai, and K. Sakka. 2010. Characterization of *Paenibacillus curdolanolyticus* intracellular xylanase Xyn10B encoded by the xyn10B gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2358-2360.
28. Tcherpakov, M., E. Ben-Jacob, and D. L. Gutnick. 1999. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 239-246.
29. Vorobyeva, N. V., M. Sherman, and A. N. Glagolev. 1982. Bacterial chemotaxis controls the catabolite repression of flagellar biogenesis. *FEBS Lett.* **143**, 233-236.

## 초록 : Agar를 분해하는 swarming 박테리아 균주의 특성과 동정

강성완 · 유아영 · 유종연 · 강호영\*

(부산대학교 생명과학부 미생물학과)

환경에서 분리된 CK214 균주는 1.5% (w/v) agar가 포함되어 있는 LB 평판배지에서 빠르게 이동하는 특징을 가지며, agar 고체평판배지 위의 CK214 균주의 집락 주위로 움푹한 투명환이 관찰되었다. 이 균주는 단일 탄소원으로 agar만이 첨가된 최소 배지에서 잘 자랐으며, DNS 법을 이용하여 CK214 균주의 외부추출성분이 agar 분해 활성을 가진다는 것을 확인하였다. CK214 균주는 다양한 농도의 agar (0.5, 1.0, 1.5 2.0% w/v)가 포함된 고체평판배지에서 swarming 운동을 하였다. CK214 균주를 동정하기 위해 그람염색과 현미경 관찰, 생화학적 분석(API), 16S rRNA 염기서열분석에 기초한 계통발생학적 분석을 수행하였다. 이를 통해 CK214 균주는 그람 양성의 간균으로, *Paenibacillus* 속에 포함되었으며 *Paenibacillus lactis* MB 2035와 가장 가까운 연관성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 CK214 균주는 agar 고체표면에서 주모성의 편모를 형성하는 것을 투과 전자 현미경(TEM)을 통해 관찰하였다. CK214 균주의 agarase 활성과 운동성의 연관성에 관한 앞으로의 연구를 위해 transposon random mutagenesis에 의한 agar 분해활성 결손 돌연변이주를 구축하였다.