

단 보

돼지위축성비염과 가금티푸스 병원균을 저해하는 *Bacillus amyloliquefaciens* TK3의 분리 및 특성 조사

정택경 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 생명과학과

Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* TK3 inhibiting causative bacteria of atrophic rhinitis and fowl typhoid

Taeck-Kyung Jung and Hong-Gyu Song*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received February 16, 2015; Accepted May 4, 2015)

ABSTRACT: For prevention of atrophic rhinitis of swine by *Bordetella bronchiseptica* and fowl typhoid by *Salmonella gallinarum*, bacterial strains showing antimicrobial activity against those pathogenic bacteria were isolated from various samples collected at animal farms. Among 372 bacterial isolates strain TK3 showed the highest antibacterial activity against both pathogens, and was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by 16S rRNA gene sequence analysis. *B. amyloliquefaciens* TK3 could inhibit growth of both pathogens by secretion of antibacterial compounds such as siderophore, rhamnolipid and antimicrobial peptide. Production radius of siderophore on Chrome azurol S agar plate by strain TK3 was 0.53 cm after 14 days of incubation, and concentration of siderophore in King's B medium was 1.06 mmol/ml. It also secreted 82.4 mg/L of rhamnolipid, and antimicrobial peptide that completely inhibited growth of both pathogens at concentration of 30 µl/ml in LB medium.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella gallinarum*, antibacterial activity

돼지 호흡기 질병은 전 세계적으로 양돈산업에서 가장 높은 이환율과 치사율을 나타내며 그 중 가장 중요한 돼지위축성비염(atrophic rhinitis)은 가장 오래 전부터 알려진 돼지 질병 중의 하나로 *Bordetella bronchiseptica*에 의해 일어난다 (Zhao *et al.*, 2011). 이 질병의 주요 증상은 재채기, 콧물, 코막힘, 호흡곤란 및 성장부진 등이 있으며 이에 대한 효과적인 대책 중 하나는 효과적인 백신 접종이 있으나 그 효과가 완전하지는 않으며, 사료에 항생제 첨가는 항생제 내성균주의 발생을 유발한다(Lu, 2001). 한편 가금티푸스(fowl typhoid)는 *Salmonella gallinarum*이 일으키는 조류의 전염병으로 간과 비장의 증대, 설사 및 높은 폐사 등을 특징으로 하는데 닭에서 병 발생률은 닭의 품종, 연령과 계절 등에 따라 다르게 나타난

다(Lee *et al.*, 2003). 가금티푸스의 예방은 주로 백신 접종을 통해 이루어지며, 이 질병에 대한 연구도 *S. gallinarum*에 대한 다양한 백신 개발에 집중되고 있다(Geng *et al.*, 2014; Jawale *et al.*, 2014; Nandre and Lee, 2014). 그러나 고병원성 병원균 등의 원인으로 백신의 효과가 완전하지 못하여 알로에 추출물 등의 투여(Waihenya *et al.*, 2002)나 내병원성 닭 품종 육종(Kim *et al.*, 2002) 등이 시도된 바 있다. 그러나 축산업에서 병원체의 차단이 무엇보다 중요하며 이를 위해 축사의 철저한 청소, 환기 및 소독이 요구된다. 또한 병원체를 저해하는 미생물을 이용하면 보다 효율적으로 병원균을 제어할 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 축산업에서 큰 피해를 일으키는 두 질병의 병원체의 예방 방법을 개발하기 위해 이들에 대한 항균활성이 있는 세균 균주를 분리하고자 하였다.

먼저 돼지위축성비염 병원균인 *B. bronchiseptica*와 가금티푸스의 원인균인 *S. gallinarum*에 대한 항균능을 가진 균주들

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

을 선별하기 위해 강원도 춘천시 인근에 있는 축산농가에서 돼지와 닭의 분변, 돼지 비강액과 축사 인근 토양을 채취하였다. 채취한 시료는 멸균된 0.85% NaCl 용액에 넣어 교반한 후 연속희석을 하고 Luria-Bertani (LB) 한천배지(LA: tryptone 10 g, NaCl 10 g, yeast extract 5 g, agar 15 g, 증류수 1 L)에서 배양하여 형태적으로 다른 372개의 세균 집락을 순수분리 하였다. 순수분리된 균주에 대한 여러 가지 항균활성을 조사한 후 우수한 항균활성을 가진 균주들은 LB 액체배지에 배양하여 그람염색 후 광학현미경으로 형태적 특징을 관찰하였다. 이들의 분류학적 위치를 확인하기 위해 LA 배지에서 배양 후 (주)마크로젠에 16S rRNA 유전자 분석을 의뢰하고 분석된 염기서열을 NCBI에 등록된 균주 염기서열과 비교하여 상동성을 비교하여 동정하였다. 분리균주 중 항균활성이 가장 우수한 TK3 균주는 돼지 비강에서 분리한 그람양성 간균으로 LA 배지에서 24시간 이내에 내생포자를 형성하는 것을 Schaeffer-Fulton 염색으로 확인하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T와 99.0%의 가장 높은 상동성을 나타내어 *B. amyloliquefaciens* TK3로 명명하였다.

B. amyloliquefaciens TK3의 항균능을 조사하였는데 LA 배지에 *B. bronchiseptica*와 *S. gallinarum*를 도말한 후 TK3 균주를 희석점종 하고 2일간 배양하여 병원균 성장을 억제한 투명대 형성을 확인하였는데 두 가지 병원균의 성장을 모두 억제하였다. 이후 *B. amyloliquefaciens* TK3의 항균활성물질 생성능을 조사하기 위해 먼저 siderophore 생성능을 측정하였는데 siderophore는 철의 chelation을 통해 미생물 병원체를 억제하는 것으로 보고되었다(Fgaier and Eberl, 2011). Chrome azurol S agar plate assay (Schwyn and Neilands, 1987)를 통해서 siderophore의 생성을 정성적으로 탐색한 결과 TK3 균주가 생성능을 나타냈으며 12일 동안 siderophore 생성에 의해 반지름 0.53 cm의 투명대가 생성되었다. 또한 King's B 액체배지 (protease peptone 20 g, glycerol 10 ml, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, pH 7.2, 증류수 1 L)에서 TK3 균주의 siderophore 생성량을 측정된 결과 배양 2일째 1.06 mmol/ml로 가장 높은 siderophore 농도를 나타내었으며 7일까지 0.7-0.8 mmol/ml 수준을 유지하였는데(Fig. 1), 이는 *Bacillus* sp. RFO41의 0.04 mmol/ml (Lee and Song, 2008)과 *Pseudomonas fluorescens*의 여러 균주들의 0.01 mmol/ml 내외의 생성량(Nagarajkumar *et al.*, 2004)과 비교하면 상당히 높은 생성능을 나타내었다. 여러 *Bacillus* 종들이 다양한 종류의 siderophore를 생성하므로 (Wilson *et al.*, 2006) TK3 균주가 생성하는 siderophore의 종류와 구조를 조사할 필요가 있을 것이다.

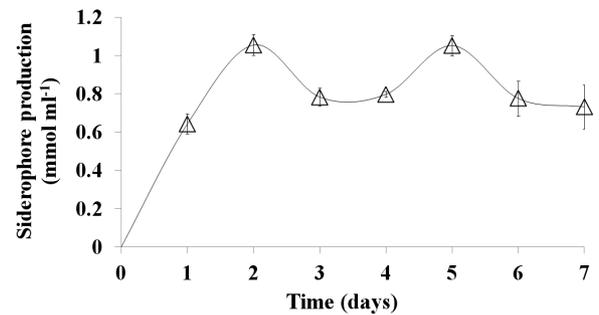


Fig. 1. Siderophore production by *B. amyloliquefaciens* TK3 in King's B medium. Values are means \pm SD (error bar) for triplicate.

미생물이 분비하는 계면활성제도 항균활성을 나타낼 수 있는데 *Pseudomonas aeruginosa*가 분비하는 rhamnolipid가 *B. bronchiseptica*의 생물막을 교란시키므로 이 병원체 제거를 위한 항미생물제로 사용될 수 있다고 보고되었다(Irie *et al.*, 2005). 이에 *B. amyloliquefaciens* TK3를 rhamnolipid biosurfactant-specific screening medium에 접종하여 균주 집락 주변에 halo zone 형성 유무로 rhamnolipid 생성능을 판단하였는데(Siegmund and Wagner, 1991) TK3 균주 접종부위에서 halo zone이 형성되었으며, 2%의 glucose 또는 glycerol이 포함된 최소 액체배지에서 배양 후 orcinol 방법을 통해 rhamnolipid의 양을 정량하였다(Candrasekaran and Bemiller, 1980). Glucose 첨가 시 5일째 82.4 mg/L를 생성하였고, glycerol 첨가 시 2일째 34.4 mg/L를 생성하여(Fig. 2) *E. coli* TnERAB보다 우수한 rhamnolipid 생성능을 나타내었다(Wang *et al.*, 2007).

Antimicrobial peptides (AMPs)는 다양한 생물들이 비특이적 방어 목적으로 분비하는 저분자량의 단백질로 세균, 바이러스 및 진균에 대해 광범위한 항미생물 활성을 갖는다 (Izadpanah and Gallo, 2005; Bahar and Ren, 2013). 본 연구의 *B. amyloliquefaciens* TK3가 AMPs를 생성하는지는 먼저

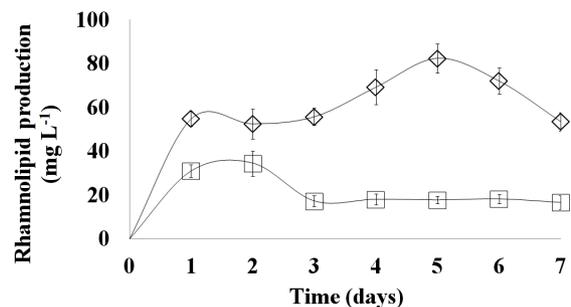


Fig. 2. Rhamnolipid production by *B. amyloliquefaciens* TK3 in 2% glucose (◇) and 2% glycerol (□) added MS medium. Values are means \pm SD (error bars) for triplicate.

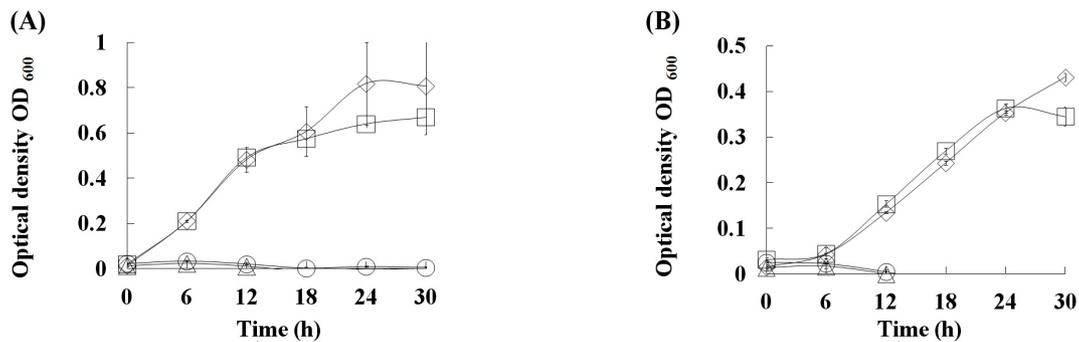


Fig. 3. Changes in growth of *B. bronchiseptica* (A) and *S. gallinarum* (B) in LB medium with addition of different concentration of antimicrobial peptide [Control (◇), 10 (□), 30 (△) and 50 (○) µl/ml] produced by *B. amyoliquefaciens* TK3. Values are means±SD (error bars) for triplicate.

Blood agar 배지에서 균주를 도말하여 배양한 결과 자라난 균주 집락 주위로 용혈활성으로 인한 투명대가 형성되는 것으로 AMP 활성이 있는 것을 확인하였는데(Nakano *et al.*, 1988), Wang 등(2010)도 본 연구의 TK3와는 다른 균주인 *B. amyoliquefaciens* ES-2에 의한 AMP 생성을 보고한 바 있다. *B. amyoliquefaciens* TK3가 생산하는 AMP도 동일한 방법으로 준비하였는데 100 ml의 LB 액체배지에 균주를 접종하여 30°C, 암조건, 160 rpm에서 36시간 배양을 한 뒤 원심분리(10,000 × g, 20 min, 4°C) 하였다. 상등액을 회수하여 6 N HCl를 사용하여 pH를 2로 만들고 4°C에서 30분 동안 저장한다. 원심분리(3,000 × g, 20 min, 4°C)하여 pellet을 모은 후에 다시 15 ml의 메탄올로 용해를 시킨다. 그 뒤 1 N NaOH로 pH7로 보정한 뒤 공극 0.22 µm 소수성 필터로 여과를 하고 회전진공농축기를 사용하여 AMP 물질을 회수하여 동결건조(-80°C, 12 h) 시킨다. AMP에 의한 병원균 사멸동역학을 측정하기 위해 LB 액체배지에서 배양한 두 병원균을 OD₆₀₀이 1.0이 되도록 보정한 배양액 150 µl와 동결건조된 AMP 물질을 농도를 달리해서 최종 부피가 200 µl가 되도록 넣는다. 병원체 잔류는 37°C, 암조건, 150 rpm에서 6시간 간격으로 microplate reader (Tekan, Model Infinite M200)를 이용하여 OD₆₀₀을 측정하였다. 대조균은 AMP 물질을 넣지 않고 병원균의 성장을 동시에 측정하였다. *B. bronchiseptica*와 *S. gallinarum*은 AMP의 농도를 10 µl/ml로 처리 시 각각 18시간과 24시간 이후에 생장이 서서히 억제되었는데(Fig. 3) 이는 *Bacillus subtilis* 생성 AMP에 의한 *Vibrio parahemolyticus*의 성장 억제와 유사한 양상이었다(Xu *et al.*, 2013). AMP의 농도를 높여 30과 50 µl/ml로 처리 시 두 병원균의 성장을 100% 억제하였다.

돼지위축성비염과 가금티푸스의 예방에는 다양한 백신이 사용되며 치료에는 여러 항생제를 이용하고 있으나 항생제 내성 균주의 발생으로 인한 문제가 상존하고 있다(Lu, 2001). 돼

지위축성비염의 경우 비강에 bacitracin이나 mupirocin 같은 항생제 연고 이외에 estrogen 연고를 사용할 수 있으며(Al-Shehri, 2002), 최근 glucocorticoid 비강분무제가 개발된 바 있다(Okubo *et al.*, 2015). 가금티푸스의 경우에는 *Aloe* 추출물의 경우 투여 시 치료 효과가 보고되었다(Waihenya *et al.*, 2002). 본 연구에서 *B. amyoliquefaciens* TK3는 siderophore, rhamnolipid와 AMP를 분비하여 항균활성을 나타내는데 이들은 병원균이 내성을 갖지 못하며 또한 두 병원균 이외에도 다른 여러 병원체들을 억제할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 AMP는 이미 다양한 항생물질로 사용되고 있으며 특히 기존 항생물질에 내성을 가지고 있거나 생물막을 형성하는 병원체를 효율적으로 제어할 수 있다(Izadpanah and Gallo, 2005; Bahar and Ren, 2013). 따라서 *B. amyoliquefaciens* TK3는 양돈업과 양계업 같은 축산업에서 분무제 또는 음수나 사료첨가제로 사용할 경우 여러 가지 가축병원체를 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.

적 요

*Bordetella bronchiseptica*에 의한 돼지위축성비염과 *Salmonella gallinarum*에 의한 가금티푸스 방지 방법을 찾기 위해서 두 세균병원체에 항균활성을 갖는 세균 균주를 축산농가의 여러 시료로부터 분리하였다. 분리균주 372개 중 TK3 균주가 두 병원체에 대해 가장 우수한 항균활성을 나타내었으며, 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus amyoliquefaciens*로 동정되었다. *B. amyoliquefaciens* TK3는 siderophore, rhamnolipid와 antimicrobial peptide 같은 항균물질을 분비하여 두 병원체의 성장을 저해할 수 있었다. TK3 균주는 Chrome azurol S 환천 평판에서 siderophore 생성반지름이 14일 배양 후 0.53 cm이었으며, King's B 배지에서 1.06 mmol/ml의 siderophore를 생

성하였다. 또한 82.4 mg/L의 rhamnolipid를 분비하였으며, LB 배지에 30 µl/ml 농도의 추출된 antimicrobial peptide 첨가 시 두 병원체의 생장을 완전히 저해하였다.

감사의 말

본 연구는 2012년 중소기업청 건강관리프로그램 R&D 지원사업의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Al-Shehri, A. 2002. Medical treatment of chronic rhinitis. *Internet J. Otorhinolaryngol.* <https://ispub.com/IJORL/2/1/8308#>.
- Bahar, A. and Ren, D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543–1575.
- Candrasekaran, E. and Bemiller, J. 1980. Constituent analyses of glycosaminoglycans, pp. 89–96. In Whistler, R. (ed.) *Methods in carbohydrate chemistry*. Academic Press Inc. New York, USA.
- Fgaier, H. and Eberl, H. 2011. Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *J. Theor. Biol.* **273**, 103–114.
- Geng, S., Jiao, X., Barrow, P., Pan, Z., and Chen, X. 2014. Virulence determinants of *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum identified by PCR signature-tagged mutagenesis and the *spiC* mutant as a candidate live attenuated vaccine. *Vet. Microbiol.* **168**, 388–394.
- Irie, Y., O'Toole, G., and Yul, M. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 237–243.
- Izadpanah, A. and Gallo, R. 2005. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 381–390.
- Jawale, C., Chaudhari, A., and Lee, J. 2014. Generation of a safety enhanced *Salmonella* Gallinarum ghost using antibiotic resistance free plasmid and its potential as an effective inactivated vaccine candidate against fowl typhoid. *Vaccine* **32**, 1093–1099.
- Kim, K., Lee, Y., Kang, M., Han, S., and Oh, B. 2002. Comparison of resistance to fowl typhoid among crossbreed chickens artificially infected with *Salmonella gallinarum*. *Kor. J. Poult. Sci.* **29**, 59–75.
- Lee, Y., Kim, K., Kwon, Y., Kang, M., Mo, I., Kim, J., and Tak, R. 2003. Prevalent characteristics of fowl typhoid in Korea. *J. Vet. Clin.* **20**, 155–158.
- Lee, K. and Song, H. 2008. Production of antifungal materials by *Bacillus* sp. which inhibit growth of *Phytophthora infestans* and *Fusarium oxysporum*. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 258–263.
- Lu, C. 2001. Studies on atrophic rhinitis: the prevalence in Korea, the development of PCR technique and the efficacy of atrophic rhinitis vaccine. Ph. D. thesis of Kangwon National University.
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., and Velazhahan. 2004. Involvement secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* **159**, 73–81.
- Nakano, M., Marahiel, M., and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 5622–5668.
- Nandre, R. and Lee, J. 2014. Comparative evaluation of safety and efficacy of a live *Salmonella gallinarum* vaccine candidate secreting an adjuvant protein with SG9R in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **162**, 51–58.
- Okubo, K., Okamasa, A., Honma, G., and Komatsubara, M. 2015. Safety and efficacy of fluticasone furoate nasal spray in Japanese children 2 to <15 years of age with perennial allergic rhinitis: a multicentre, open-label trial. *Allergol. Int.* **64**, 60–65.
- Schwyn, B. and Neilands, J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47–56.
- Siegmund, I. and Wagner, F. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on minimal agar. *J. Biotechnol. Tech.* **5**, 265–268.
- Waihenya, R., Mtambo, M., Nkwengulila, G., and Minga, U. 2002. Efficacy of crude extract of *Aloe secundiflora* against *Salmonella gallinarum* in experimentally infected free-range chickens in Tanzania. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 317–323.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P., Goddard, W., and Tang, Y. 2007. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 842–853.
- Wang, Y., Lu, Z., Bie, X., and Lv, F. 2010. Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 189–196.
- Wilson, M., Abergel, R., Raymond, K., Arceneaux, J., and Byers, B. 2006. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **348**, 320–325.
- Xu, D., Wang, Y., Sun, L., Liu, H., and Li, J. 2013. Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. *Food Control* **30**, 58–61.
- Zhao, Z., Wang, C., Xue, Y., Tang, X., Wu, B., Cheng, X., He, Q., and Chen, H. 2011. The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease. *Vet. J.* **188**, 337–340.