

새로운 항균활성을 보이는 토양 분리 세균 *Paenibacillus polymyxa* DY1의 분류와 동정

신은석 · 이희무 · 이복권¹ · 김성훈¹ · 권순일² · 유관희^{3,*}

안동대학교 생명과학과, ¹질병관리본부 국립보건연구원 장내세균팀,
²대구보건대학 임상병리과, ³상지대학교 생명과학과

항생제 내성 세균의 출현으로 새로운 항생물질의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다. 본 연구에서는 새로운 항균활성물질을 개발하고자 강원도 대암산 용늪 토양으로부터 새로운 항균물질을 생산하는 균을 분리하였고, 이를 동정하였다. 생화학적 시험과 16S ribosomal DNA 염기서열 분석결과 *Paenibacillus polymyxa* 균과 가장 높은 상동성을 보여주었다. 지방산 조성의 분석에서도 이 균주는 *Paenibacillus polymyxa*와 가장 가까웠다. 이 균주가 생산하는 항균물질은 1군 법정 전염병을 일으키는 *Salmonella enterica* serovar Typhi와 *Shigella dysentery*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, 그리고 *Vibrio cholera* 등의 병원성 세균에 성장억제 효과를 나타냈으며, 다른 일반 식중독 장내세균에도 성장억제 효과를 나타냈다. 이 균주가 생산하는 항균활성 물질은 과거에 보고된 것과 다른 새로운 것으로 보이며, 광범위한 항균활성으로 인하여 새로운 항생물질 개발 후보로 많은 잠재력을 가진 것으로 평가된다.

Key words □ 16S ribosomal DNA sequence, antibacterial activity, fatty acid, *Paenibacillus polymyxa*

항생제는 세균의 생장을 억제하거나 사멸시키는 항균물질 중의 하나이다. 병원성 세균에 대한 항균물질은 1928년 영국의 A. Fleming이 *Penicillium notatum*으로부터 penicillin을 발견하여 (12), 2차 세계대전에서 창상감염증을 효과적으로 치료함으로써 인류 역사상 가장 우수한 치료제의 하나로 등장하였다. 그러나 1950년대 초 penicillin에 의하여 사멸되지 않는 *Staphylococcus* 균주가 자주 나타나기 시작했으며, penicillin에 내성을 나타내며, tetracycline과 erythromycin에도 내성을 나타내는 *Staphylococcus* 균주가 보고되었다(25).

Methicillin이 임상에 사용되기 시작한 1960년대 이후 methicillin에 내성을 나타내는 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)이 영국에서 보고되었으며(39), vancomycin에 내성을 나타내는 *Enterococcus faecium*의 비율은 1999년의 29%, 2000년의 32%, 2001년의 28% 그리고 2002년에는 33%로 점차 증가하는 추세이다(3). Vancomycin은 현재까지 페니실린 및 세파제 항생제 내성균주 치료에 가장 효과적으로 사용되고 있으나, 1986년 vancomycin 내성 *Enterococci*가 다수 보고 되었으며(2, 8, 23), 국내에서도 vancomycin에 내성을 갖는 내성 균주(VRSA; Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)가 보고되었다(1). 그 후 미국(36), 프랑스, 홍콩 등 5개국에서 6명의 감염사례가 보고되었다(14). 제 3세대 cephalosporin에 내성인 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumonia*가 증가하고 있으며(16),

근래에 개발된 fluoroquinolone에 내성을 갖는 내성균도 급증하고 있다(7). 1991년부터 2000년까지 국내에서 분리된 *Shigella sonnei* 122균주에 대한 항균제 감수성 시험결과에 따르면 trimethoprim과 streptomycin은 100%의 내성율을 나타내었으며, sulfamethoxazole은 94%, tetracycline은 93% 그리고 nalidixic acid는 90%의 높은 내성율을 나타내었다(37).

이처럼 현재 항생제 내성 및 다제내성 세균의 증가로 치료가 어려운 경우가 많아졌으며, 앞으로 세균감염 치료가 더욱 어려워질 것으로 세계적인 전문가들이 예측하고 있다(21). 이에 따라 다제내성균에 대하여 항균효과를 가지는 새로운 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 학계와 산업계에서는 새로운 항생물질인 천연항생제 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(26). 천연항생제는 생화학적, 구조적 특징에 따라 양이온 펩타이드, 음이온 펩타이드, 방향성 펩타이드 그리고 헤모글로빈으로 잘 알려진 산소-결합 단백질로부터 파생된 항균성 펩타이드(예: hemocyanin) 등 4가지로 분류되고 있다(4).

지금까지 사용되어온 천연물 중 항균활성을 나타내는 대표적인 물질로는 pH를 산성으로 바꾸거나 기질의 세포막 통과를 방해하여 효과를 나타내는 유기산(29), 그람양성균에 효과가 좋은 것으로 알려진 지방산(17) 그리고 식물의 안토시아닌과 색소관련 화합물(38) 등이 있다.

방선균으로부터 항균항생제, 항암제, 효소저해제, 농업용 항생제, 면역조절제 등 다양한 생리활성물질을 찾아내기 위한 탐색작업이 이루어지고 있다(30).

또한 식물로부터 새로운 항균물질을 개발하고자 하는 연구도

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-730-0433, Fax: 82-33-730-0430
E-mail: khyoo@mail.sangji.ac.kr

진행되고 있다. 오미자 추출물의 식중독균 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균효과가 보고되었으며(24), 황기 종자와 잘 말린 복숭아도 방선균의 성장을 억제하는 물질을 함유하고 있음이 보고되었다(20, 26).

이처럼 천연항생물질을 개발하고자 하는 연구는 많은 분야에서 지속적으로 이루어지고 있으며, 세균으로부터 천연항생물질을 개발하고자 하는 연구도 활발하게 전개되고 있다(10, 19).

특히 *Bacillus polymyxa*는 polymyxin B와 같은 작은 펩타이드 항생물질을 생산한다고 알려져 있다(18, 33). 이 균주는 gatavaline, jolipeptin, gavaserin, saltavalin, substance BN 109와 LI-F 등과 같은 다양한 항균물질을 생산한다는 사실이 보고되었다(22, 34).

최근에는 분자생물학적 연구방법을 응용하여 항생물질 생산균주에 대한 생합성 효소와 그 유전자들의 발현기작을 연구하여 새로운 항생물질을 개발하려는 방법과, 고전적 방법인 항생물질 스크린 방법을 병행하여 새로운 항생물질을 탐색하는 연구가 이루어지고 있다(15). 유전공학 기법을 이용한 더욱 적극적인 접근 방법으로 세포 내에서 유용한 이차대사산물을 생산하기 위하여 생합성 경로를 재구성하려는 시도가 현재 진행되고 있다.

오늘날 내성으로 인한 새로운 항생제 개발의 필요성이 점점 커지고 있어 많은 제약회사들이 지난 몇 년간 소홀히 했던 항균제 연구를 다시 활기 있게 하고 있으며(32), 항생제를 개발하려는 노력은 penicillin, cephalosporin, tetracycline 및 glycopeptide 등 기존의 항생제를 개량하는 것과 oxazolidinone 등의 전혀 새로운 부류의 항생제를 개발하는 방향으로 연구가 진행되고 있다(31).

본 연구에서는 각종 병원균에 대하여 항균활성을 나타내는 새로운 세균을 토양으로부터 분리하여, 그 항균활성의 기초적인 범위를 조사하고, 분리된 세균에 대하여 형태학적, 생화학적, 분자생물학적인 동정을 하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

토양에서 분리한 균의 항균활성을 알아보기 위하여 표준 균주로 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 균주가 사용되었다. 식중독 균주로는 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC)가 사용되었다. 이에 더하여 1군 법정 전염병을 일으키는 병원체로 enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae*가 사용되어 총 18종의 균주가 이 연구에 사용되었다(Table 1). 보존배지로써 Nutrient Agar 배지가 사용되었고, 항균활성을 위한 선택배지로써 4 µg/ml penicillin G, 5 µg/ml polymyxin B sulfate가 첨가된 항생제 배지가 사용되었다. 증균배지로써 Nutrient Broth, Brain Heart Infusion, Mueller

Table 1. Bacterial strains used in this study

Items	Bacterial strains
Standard strains	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213
Group I communicable diseases bacteria	<i>Salmonella</i> Typhi
	<i>Salmonella</i> Paratyphi A
	<i>E. coli</i> (EHEC) ^a
	<i>Shigella sonnei</i>
	<i>Shigella dysenteriae</i>
	<i>Shigella boydii</i>
Food poisoning bacteria	<i>Vibrio cholerae</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>E. coli</i> (EIEC) ^b
	<i>E. coli</i> (EPEC) ^c
	<i>E. coli</i> (ETEC) ^d
	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	

^aEHEC: Enterohemorrhagic *E. coli*

^bEIEC: Enteroinvasive *E. coli*

^cEPEC: Enteropathogenic *E. coli*

^dETEC: Enterotoxigenic *E. coli*

Hinton Broth (Difco, Maryland, USA) 배지가 사용되었으며, 식중독균 증균배지로써 TSA (Difco, Maryland, USA) 배지가 사용되었다.

항균활성물질 생성균의 분리 및 선발

강원도 양구군에 위치한 대암산 용늪 주변의 산림이 잘 보존되어 있는 활엽수 아래 지표 2-5 cm 깊이의 토양 50-100 g을 채취하여 멸균된 비닐봉지에 넣고 ice box에 보관하여 실험실로 옮겨 4°C 냉장고에 보관하였다. 보관된 토양 1 g을 멸균증류수 9 ml에 잘 섞어 80°C에서 10분간 열처리 후 상층액을 1,000 배로 희석하였다. 희석액을 선택배지(4 µg/ml penicillin G, 5 µg/ml polymyxin B sulfate 함유)에 도말하고 28°C 항온기에서 48시간 배양하였다. 선택배지에 자란 각각의 집락을 백금으로 취하여 Nutrient Broth (NB) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양시킨 후, 13,000 × g에서 2분간 원심분리하고, 상등액을 취하여 0.22 µm 필터를 이용하여 여과시켰다. 항균활성균의 선별은 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 균을 Brain Heart Infusion (BHI) 배지에서 18시간 배양한 후, 배양된 균을 멸균된 면봉을 이용하여 Nutrient Agar 평판배지의 전표면에 끌고루 접종한 다음 표면을 건조시키고, 그 위에 여과된 분리균주 배양용액 25 µl를 떨어뜨려 18-24시간 배양시킨 후 항균력을 확인하였다(Fig. 1).

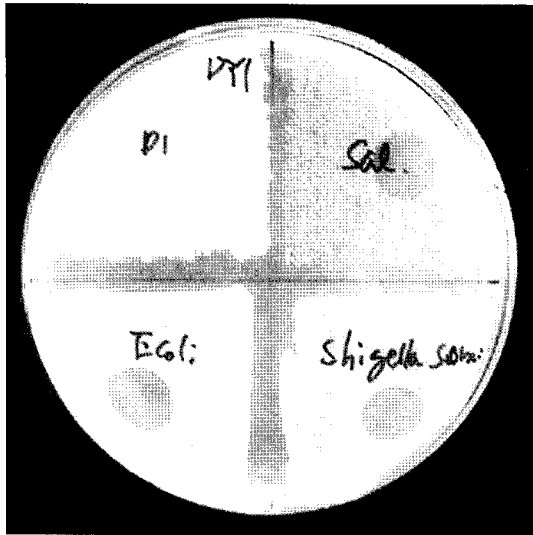


Fig. 1. Antibacterial activities of DY1 strain on the TSA medium indicated by clear inhibition zone formed around the drop. D1: *Bacillus thuringiensis*, *E. coli*; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Sal*; *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei*; *Shigella sonnei*.

병원성 세균에 대한 항균활성 시험

선발된 균으로부터 얻어진 여과 배양용액을 이용하여 병원성 미생물에 대한 항균활성 시험을 disk diffusion 방법을 사용하여 수행하였다. 멸균된 disk에 진공건조기를 이용하여 8배 농축한 배양 여과액 60 μ l를 disk에 적신 후 건조하여 시험균주가 도말된 평판배지에 떨어뜨려 30°C에서 18-24 시간 배양시킨 후 억제대의 크기를 측정하였다.

선발된 항균활성 물질 생산 균주의 형태학적, 생화학적 동정

선발된 항균활성물질 생산 균주를 동정하기 위하여 선택배지에서 성장한 균주를 NA 배지에서 24시간 배양한 후 그람염색을 하여 균의 크기 및 모양, parasporal crystal의 형성, hemolysis, motility, catalase 및 oxidase test, VP test, glucose로부터의 acid 생성, β -galactosidase 생성, 인돌 생성능력 등을 조사하였다. 또한 API 50 CHB kit (Bio Merieux, France)를 사용하여 50여 종의 당 이용도를 조사하였다(27). 동정을 위하여 Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (9)와 The Genus *Bacillus* (13)를 참고하였다.

16S ribosomal DNA 염기서열 분석

선발된 균주의 16S rDNA 유전자를 Polymerase Chain Reaction (PCR)으로 부분적으로 증폭시켰다. 16S rDNA 증폭용 Universal primer인 16S Forward primer; 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'와 16S Reverse primer; 5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'를 사용하였다. PCR은 먼저 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 2 min의 열반응주기를 30 cycles 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 3분간 연장반응 마친 후 반응물을 4°C에 보관하였다. PCR 반응물

을 DNA purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 순수 분리한 후, automatic sequencer를 통해 염기서열을 결정하였다. 미국 NIH 산하 NCBI 홈페이지에서 제공하는 nucleotide blast search program을 이용하여 근연종에 대한 조사를 하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

지방산 분석

Trypticase Soy Agar (Difco, Maryland, USA) 배지에서 삼분도 말법으로 배양된 균들 중에서 3번째로 도말한 균을 루프를 이용하여 1.5 ml Effendorf tube에 넣고, methanol과 NaOH가 들어있는 용액을 1 ml 넣은 다음 100°C에서 가열하여 지방산을 가수분해하여 얼음에서 식힌 후, methanol과 HCl이 들어있는 용액 2 ml를 첨가하고, 80°C에서 10분간 정치하여 fatty acid methyl ester (FAME)화 시켰다. 상온에서 식힌 n-hexane 추출물 1.25 ml을 가하여 혼합하고, 원심분리하여 윗부분의 n-hexane 층만을 분리하여 질소가스로 농축시킨 후, 농축용액을 NaOH와 methanol이 들어있는 용액을 이용하여 한번 세척한 다음 GC vial에 옮겨서 분석하였다. 지방산 분석은 GCFID (Hewlett-Packard 6890, USA)으로 Gas liquid chromatography (GLC)를 사용하였고, 분석은 Sherlock software (Version 4.5)를 이용하여 분석하였다. Column은 capillary column을 사용하였으며, detector는 Flame ionization detector (FID)를 사용하였다.

결 과

항균활성물질 생산균주의 선별

병원성세균의 성장을 억제하는 물질을 생산하는 균의 선별과 정에서 DY1부터 DY11 균주까지 총 11종류의 균주를 분리하였다(자료 미제시). 분리한 11균주 중 *Escherichia coli* ATCC 25922 균주에 가장 큰 성장억제효과를 나타내는 DY1 균주를 최종적으로 연구대상 균주로 선발하였다. DY1 균주를 배양한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 *E. coli*, *Shigella sonnei* 및 *Salmonella Typhi*가 도말된 평판배지에 떨어뜨린 후 37°C에서 18시간 반응시킨 결과 평판배지 상에서 뚜렷한 성장억제대를 나타내었다(Fig. 1).

병원성세균에 대한 항균활성 시험 결과

DY1 균주의 배양여과액은 시험된 18종류의 장내세균 중에서 15종류의 균주에 대하여 항균활성을 보였다(Table 2). 1군 법정 전염병균인 *E. coli* (EHEC), *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae*와 일반 식중독세균인 *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* (ETEC, EPEC, EIEC)에도 성장을 억제시키는 효과를 나타냈다. 그러나 그람양성 세균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* 및 *Listeria monocytogens*에 대해서는 성장억제 효과를 나타내지 않았다(Table 2).

Table 2. Antimicrobial activities of DY1 against various pathogenic enteric bacteria

Pathogenic bacterial strains	Inhibition zones (mm)	
Group 1 communicable diseases bacteria	<i>Salmonella</i> Typhi	13
	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	9
	<i>Shigella sonnei</i>	14
	<i>Shigella flexneri</i>	14
	<i>Shigella dysenteriae</i>	12
	<i>Shigella boydii</i>	12
	<i>E. coli</i> (EHEC)	14
Food poisoning bacteria	<i>Vibrio cholerae</i>	14
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	10
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	9
	<i>E. coli</i> (EIEC)	12
	<i>E. coli</i> (ETEC)	12
	<i>E. coli</i> (EPEC)	15
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	12
	<i>Bacillus cereus</i>	0
	<i>Listeria monocytogens</i>	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12	

형태학적 및 생화학적 특성

DY1 균주의 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과 세포의 크기는 1 μm 이상의 크기를 나타냈으며, catalase 양성반응을 나타냈고, L-arabionose로부터 acid를 생산하는 L-arabionose 양성반응을 나타냈다(Table 3). 그람염색에서는 그람양성 간균으로 나타났으며, 형태는 사슬로 연결된 간균의 형태이었다(자료 미제시). Sporangium swollen과 parasporal crystal, 혐기성 성장, VP test, gelatin의 가수분해, Egg-yolk lecithinase, indol 생성, 운동성, oxidase, β -galactosidase 반응 등은 모두 음성으로 나타났다(Table 3). API 50 CHB kit를 이용한 실험결과 DY1 균주는 glycerol 등 26종의 당에는 양성반응을 나타냈으나, erythritol 등 23종의 당에는 음성반응을 나타내었다(Table 4). Biomerieux (<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/watertesting/api/apiweb.htm>, Hazelwood, MO, USA) 회사 홈페이지에서 제공하는 Apiweb (<https://apiweb.biomerieux.com>)을 통한 분석 결과 *Paenibacillus polymyxa* 균에 84%의 상동성을 나타내었다.

16S ribosomal DNA 염기서열 분석 결과

DY1 균주의 DNA를 추출하여 PCR로 16S rDNA를 부분적으로 증폭을 하여 염기서열을 결정된 결과 1,416 bp에 대한 염기서열 정보를 얻었다(GeneBank Accession number EF 108320). 이 염기서열로 NCBI에서 제공하는 Nucleotide BLAST search를 수행한 결과, DY1 균주는 다수의 *Paenibacillus polymyxa* 균주

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of DY1 strain

Items	Characteristic	Items	Characteristic	
Cell diameter	>1.0 μm	+	Hydrolysis gelatin	-
Gram stain		+	Egg-yolk lecithinase	-
Catalase		+	Formation of indole	-
Anaerobic growth		-	Hemolysis of blood agar plate	-
Voges-Proskauer test		-	Sporangium swollen	-
Acid from			Parasporal crystal	-
D-Glucose		-	Motility	-
L-Arabinose		+	Oxidase	-
D-Xylose		-	Dihydrolase of grainine	-
D-Mannitol		-	β -Galactosidase	-

Table 4. The biochemical characteristics of strain DY1 by API 50 CHB test

Carbohydrate source	DY1	Carbohydrate source	DY1
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Celibiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
β -Methyl-D-Xylose	+	Melezitose	-
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	+
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α -Methyl-D-Mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-Glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-Keto-Gluconate	-
Arbutin	+	5-Keto-Gluconate	-
Esculin	+		

와 높은 pairwise identity를 보였으며 이중 *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-603 (Accession number AY 359632)와 99.79% (1,413/1,416)로 가장 높은 상동성을 보여 주었다.

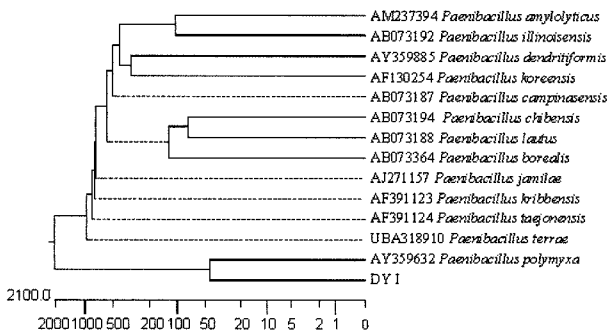


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram derived by the 16S rDNA sequences of DY1 strain and various *Paenibacillus* spp. in genus *Paenibacillus*. The tree shows DY1 is the closest to *Paenibacillus polymyxa* of the genus *Paenibacillus*. The tree was rooted from a Jotun-Hein method of 16S rDNA sequences from DY1-related species available in GenBank. GenBank accession numbers were shown in front of species name.

GenBank에 등록된 다른 균주들의 16S rDNA 염기서열 정보와 DNASTAR의 MegAlign 프로그램을 이용하여 Jotun-Hein method (28)로 분석한 결과 염기서열간의 유전적 거리와 molecular phylogenetic tree를 얻을 수 있었다(Fig. 2).

지방산 분석시험 결과

지방산을 추출하여 gas chromatography로 분석한 결과(자료 미 제시), 선발된 균주인 DY1 균주의 지방산 조성은 주로 iso-branched fatty acid와 anteiso-branched fatty acid로 구성되어 있었으며, C_{15:0} anteiso-fatty acid가 63.55%로 가장 많이 함유되어 있었으며, C_{16:0} iso-fatty acid가 9.3%, C_{17:0} anteiso-fatty acid가 9.25% 함유되어 있었다.

지방산 조성은 다른 그람양성균들처럼 iso-type과 anteiso-type으로 구성되어 있었으며, anteiso-type이 큰 비중을 차지하고 있었다. 지방산 분석결과를 이용하여 DY1 균주를 동정한 결과 *Paenibacillus*에 속하는 *Paenibacillus polymyxa*에 가장 가까웠다. 이 결과는 *Paenibacillus polymyxa*와 *Paenibacillus terrae*의 지방산 분석결과와 유사한 결과를 나타냈다(35).

고 찰

본 연구에서는 대암산 토양으로부터 항균활성물질을 생산하는 균주들을 분리하고, 그 중 가장 항균활성이 높은 DY1 균주를 선발하였다. 이 DY1 균에 대한 독립적인 동정작업인 생화학적 시험, 지방산 분석 시험, 16S rDNA 염기서열 분석에서 모두 최근 연종으로 *Paenibacillus polymyxa*가 도출되는 결과가 나왔다. 이에 더하여 Gram 염색 특성, 형태학적 관찰까지 모두 종합하여 볼 때 *Paenibacillus polymyxa*가 DY1에 가장 가까운 근연종으로 결론지을 수 있었다. 그리하여 본 연구에서는 DY1 균주를 *Paenibacillus polymyxa* DY1으로 명명하였다. *Paenibacillus polymyxa*는 rDNA를 이용한 분자생물학적 분류방법으로 분류된

3종류의 *Bacillus* 그룹 중 새로운 genus로 보고된 최초의 토양미생물로(24), 항균활성물질을 생산하는 균주이다.

Paenibacillus polymyxa DY1은 시험된 18종 중 15종의 병원성 장내세균과 식중독균의 성장을 저해하는 효과를 나타냈다. 과거 *Paenibacillus polymyxa* 균주가 생산하는 polyxin을 사용하여 *Bacillus cereus*를 포함한 17종류의 세균에 대한 항균효과를 측정 한 결과, 토양에서 분리된 그람양성균에는 항균력이 있었으나, *Pseudomonas*와 *Salmonella*에는 항균력이 없었다(38). 그러나 이와 반대로 본 연구에서 분리 및 선발한 *Paenibacillus polymyxa* DY1 균주가 생산하는 항균물질은 *Salmonella*를 포함한 그람 음성 식중독균 및 1군 법정전염병 균에 강한 항균력을 나타내었으나, 그람양성 세균에는 항균력이 없었다. 따라서 *Paenibacillus polymyxa* DY1이 생산하는 항균물질은 종래에 보고된 것과 다른 새로운 항균물질로 판단된다. 더욱이 이 물질은 중요한 여러 가지 병원성 장내세균에 뛰어난 항균활성을 보여(Table 2) 앞으로 새로운 항생물질 후보로 개발될 잠재력이 충분히 가진 것으로 보인다. 최근에 새로운 항균물질을 생산하는 균주를 찾고자 하는 연구가 세계적으로 다각적으로 이루어지고 있다. 그러나 국내에서는 아직 새로운 균주의 발굴에 아직 이렇다 할 성과를 이루어내지 못하고 있다. 특히 *Paenibacillus polymyxa*로부터 생산하는 항균활성물질에 대한 연구는 아직 부족한 상황이다. *Paenibacillus* 속은 발효된 소세지, olive-mill 폐수, 부엽토, 토양 등에서도 분리 및 동정되었다(5, 6, 11, 40). 본 연구에서는 사람의 접근이 거의 없는 1,300 m 고지에 있는 대암산 용늪의 토양에서 *Paenibacillus polymyxa* DY1을 분리하였다. *Paenibacillus polymyxa* 균주는 다양한 생태적 환경에서 분리되므로 이 세균의 생태적 환경에 대한 조사가 더 이루어져야 될 것으로 판단된다.

Paenibacillus polymyxa DY1이 생산하는 항균활성물질이 기존의 항생제를 대체하거나 보완할 새로운 후보물질로서의 가치를 가지는 유용성을 판단하기 위해서는 현재 임상적으로 문제가 되고 있는 각종 다제 내성균에 대한 종합적인 항균력 평가가 있어야 할 것이며, 동물실험을 통한 안전성도 평가되어야 할 것이다. 본 연구에서 발견된 새로운 항균활성물질은 새로운 항균특성과 광범위한 항균능력으로 보아 향후 새로운 항균물질 개발 후보로 좋은 잠재력을 가졌다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 권희안. 1996. 내성균주를 겨냥한 최신 항생제 개발 동향. 대한약사회지 7, 97-102.
2. 김병섭, 임태현, 박은우, 조광연. 1995. Benzimidazole계 및 N-phenylcarbamate계 살균제에 다중 저항성인 갯빛곰팡이균의 발생. 한국식물병리학회지 11, 146-150.
3. 김성규, 김준명, 김호훈, 배직현, 정운섭, 조동택. 2003.

- 항균제 내성소식 11, 1-2.
4. 박윤경, 함경수. 2005. 항균펩타이드의 구조와 활성에 관한 상관관계. *미생물과 산업* 31, 4-14.
 5. Aguilera, M., M. Monteoliva-Sanchez, A. Suarez, V. Guerra, C. Lizama, A. Bennaser, and A. R. Cormenzana. 2001. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill waste water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1687-1692.
 6. Ash, C., F.G. Priest, and M.D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 253-260.
 7. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
 8. Cheong, H.J. 1997. Vancomycin resistant *Enterococci*. *J. Korean Soc. Chemother.* 15, 27-43.
 9. David, R.B. and R. N. Castenhol. 1973. Bergey's manual systematic bacteriology. p. 721. Springer, press 2nd ed. New York, USA
 10. Duffy, B.K. and G. Defago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2429-2438.
 11. Elo, S., I. Suominen, P. Kampfer, J. Juhanoja, M. Salkinoja-Salsonen, and K. Haahtela. 2001. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 535-545 .
 12. Fleming, A. 2001. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bull. World Health Organ.* 79, 780-90.
 13. Gordon, R.E., W.C. Haynes, and C.H. Pany. 1973. *The Genus Bacillus. Agriculture Handbook* No. 427. Agriculture Research Service, U. S. Department of Agriculture, Washington D.C., USA
 14. Hiramatsu K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670-1673.
 15. Hutchinson, C.R. and I. Fujii. 1995. Polyketide synthase gene manipulation; A structure function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 201-238.
 16. Jacoby, G.A. 1991. More extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1697-1704.
 17. Kabara, J.J. 1985. Medium chain fatty acids and esters, p. 109. *Antimicrobial in Foods*. Marcel Dekker Inc., New York, USA
 18. Kajimura, Y. and M. Kaneda. 1997. Fusaricidins B, C and D new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 isolation, structure elucidation and biological activity. *Japan J. Antibiotics* 50, 220-228.
 19. Kimer, S., P.E. Hammer, D.S. Hil, A. Altmann, I. Fischer. L.J. Weislo, M. Lanahan, K.H. van Pee, and J.M. Ligon. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180, 1939-1943.
 20. Koo, B.S., J.C. Ryu, T.Y. Chung, and K.C. Kim. 1998. Purification and characterization of natural antifungal protein from astragal seeds (*Astragalus membranaceus*). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 379-386.
 21. Kunin, C.M. 1993. Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. *Ann. Intern. Med.* 118, 557-561.
 22. Kurusu, K., K. Ohba, T. Arai, and K. Fukushima. 1987. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07 and F08, produced by *B. polymyxa*. I. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* 40, 1506-1514.
 23. Leclereq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courbalin. 1998. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin. *N. Engl. J. Med.* 319, 157-161.
 24. Lee, S.H. and Y. S. Lim. 1997. Antimicrobial effects of *Shizandra chinensis* extract against *Listeria monocytogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol.* 25, 442-447.
 25. Lepper, M.H., H.F. Dowling, G.G. Jackson, B. Moulton, and H.W. Spies. 1953. Effect of antibiotic usage in the hospital on the incidence of antibiotic-resistant strains among personnel carrying *Staphylococci*. *J. Lab. Clin. Med.* 42, 832-839.
 26. Lim, T.H., J.M. Lee, T.H. Chang, and B.J. Cha. 2000. Antifungal activity and identification of an *Actinomyces* strain isolated from mummified peaches. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 161-166.
 27. Logan, N.A. and R.C. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1871-82.
 28. Lunter, G, I. Miklos, A. Drummond, J.L. Jensen, and J. Hein. 2005. Bayesian estimation of phylogeny and sequence alignment. *BMC Bioinformatics* 1, 83.
 29. Mark, A.D. 1985. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Oregon State University, Corvallis, OR 97331.
 30. Okami, Y. and K. Hotta. 1998. Search and discovery of new antibiotics. p. 33-67. In M. Goodfellow (ed.). *Actinomyces in biotechnology*. Academic Press. London, UK
 31. Omura, S. and R. Oiwa. 1984. Studies on bioactive compounds from microorganisms. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 57, 75-204.
 32. Park, Y.J., E.J. Oh, M.K. Kang, B.K. Kim, S.M. Kim, and S.I. Sin. 1997. Emergence of teicoplanin resistant *Staphylococci*. *J. Korean Soc. Chemother.* 15, 89-95.
 33. Paulus, H. and E. Gray. 1964. The biosynthesis of polymyxin B by growing cultures of *B. polymyxa*. *J. Biol. Chem.* 239, 865-871.
 34. Pichard, B., J.P. Larue, and D. Thouvenot. 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *B. polymyxa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 215-218.
 35. Piuri, M., C. Sanchez-Rivas, and S.M. Ruzai. 1998. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 9-13.
 36. Quirk, M. 2002. First VRSA isolate identified in USA. *Lancet Infect. Dis.* 2, 510.
 37. Seol, S.Y., Y.S. Kim, Y.S. Jeong, J.Y. Oh, H.Y. Kang, and D.C. Moon. 2006. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Shigella sonnei* isolates in Korea. *J. Med. Microbiol.* 55, 871-877.
 38. Somaatmadia, D., J.J. Powers, and M.K. Hamdy. 1964. Anthocyanins. VI. Chelation studies on anthocyanins and other related compound. *J. Food Sci.* 29, 644.
 39. Waxman, D.J. and J.L. Strominger. 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 815-829.
 40. Yoon, J.H., H.M. Oh, B.D. Yoon, K.H. Kang, and Y.H. Park. 2003. *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., bioflocculants for efficient harvesting of algal cells. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 295-301.

(Received November 14, 2006/Accepted December 26, 2006)

ABSTRACT : Identification and Characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY1 Isolated from Korean Soil with New Antibacterial Activity

Eun-seok Shin, Hee-Moo Lee, Bok-Kwon Lee¹, Sung-Hoon Kim¹, Sun-il Kwon², and Kwan-hee Yoo^{3,*} (Department of Biology, Andong University, ¹Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, Korean NIH, ²Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, ³Department of biology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea)

The DY1 strain of Gram-positive, rod-shaped bacteria was isolated from the soil sample collected from Daeam mountain, Korea. The culture filtrate of DY1 strain showed a broad spectrum of antimicrobial activity on various pathogenic and food poisoning enteric bacterial species tested *in vitro*. It showed significant growth-inhibitory effect on *Salmonella enterica* sp., *Shigella* sp., pathogenic *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Yersinia enterocolitica*. For the identification of the DY1 strain, morphological, biochemical and molecular phylogenetic approaches were performed. The DY1 strain was found to be a member of the genus *Paenibacillus* on the basis of morphological and biochemical analyses. The 16S rDNA of DY1 showed the highest pairwise identity with *Paenibacillus polymyxa* with 99.79% (1,413 bp/1,416 bp). The antimicrobial entity from DY1 looked different from previously reported ones and seems to have a great potential to be further studied as a candidate of new antibiotics to control multi-drug resistant pathogens.