

항MRSA 활성을 보이는 *Paenibacillus incheonensis* YK5의 분리 및 특성

윤영준^{1,2*} · 김혜영² · 이태수² · 김정완^{2*}

¹인천자연환경연구소, ²인천대학교 생물학과

국내 토양으로부터 MRSA에 대해 항균활성을 보이는 세균들을 분리하였다. 이들 가운데 가장 높은 항MRSA균 활성을 보인 YK5 균주는 호기성 간균으로 운동성이 있고, 내생포자를 형성하였으며, 인들을 형성하지 않았고, mannitol을 분해하여 산을 생성시키지 않았다. 이 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Paenibacillus* 속 세균들의 유전자와 95-98%의 상동성을 나타냈는데 특히 *P. elgii*와 가장 높은 상동성을 보였으나, 기타 생리·생화학적 특성에서 다른 점들이 관찰되어 *P. incheonensis* YK5로 명명되었다. *P. incheonensis* YK5를 SST 배지에 접종하여 37°C에서 96 시간 배양한 다음 그 상등액으로부터 부탄올로 추출된 항균물질은 그람 양성균인 MRSA 20 균주들과 *Streptococcus pneumoniae*, 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* 10 균주들, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae* 및 인체병원성 진균인 *Cryptococcus neoformans*와 *Trichophyton* spp.에 대하여 광범위한 항균효과를 나타냈다. 또한 이 항균물질은 20-100°C 사이의 온도구간에서 안정한 활성을 유지하였을 뿐만 아니라, pH 3.0-7.0의 넓은 pH 범위에서 활성을 나타내 MRSA를 비롯한 다양한 병원균에 대한 항생물질로서의 가능성을 보였다.

Key words □ 16S rRNA, broad antimicrobial activity, MRSA, *Paenibacillus incheonensis* YK5

미생물이 생산하는 항균물질은 20세기 중반에 실용화되어 수많은 물론 농작물 및 가축의 질병치료와 수확증진에 획기적인 기여를 함으로써 인류 역사에 지대한 공헌을 하였다. 그러나, 항생제에 대한 내성균의 증가는 전 세계적으로 커다란 위협인자가 되고 있는데, 특히 전 세계적으로 출현하고 있는 그람 양성 구균 병원균의 항생제 내성은 세균성 감염에 의한 질병치료에 있어서 가장 심각한 문제이다. 특히 병원 내에서 입원환자와 외래환자에 의해 면역이 저하된 환자가 감염되어 중증을 발생시키는 사례가 증가하면서 인류 건강에 큰 위협인자로 대두되고 있다.

1941년에 개발된 penicillin은 인체병원성 질환인 화농성염증, 패혈증 등을 일으키는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 감염증을 치료하는데 널리 사용되었다. 그러나, 약 10년 후 penicillin에 내성을 나타내는 PRSA (penicillin resistant *S. aureus*)가 보고되었고 이에 β -lactamase에 안정성이 있는 반합성 penicillin인 methicillin, oxacillin 등이 개발되어 임상에 사용되었다(22). 그러나, methicillin을 사용하기 시작한 다음해부터 methicillin에 내성을 나타내는 methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) 균주들이 발견되어 전 세계적으로 병원 감염율을 증가시키고(6, 37) 집단 발병을 유발시키며(9), 지역사회획득 MRSA (community-acquired, CA-MRSA) 감염을 일으킨다는 연구보고가 계속되고 있다(1, 31).

2003년 미국의 국가병원감염감시체계(national nosocomial infection surveillance system, NNIS) 조사에 의하면 MRSA가 *S. aureus*의 59.5%로 확인되었으며(25), 국내에서는 병원감염으로 확인된 *S. aureus* 중 MRSA가 70-90%로 나타나 매우 심각한 상태인 것을 알 수 있다(28). 그 후 MRSA가 glycopeptide계인 vancomycin에 대해 감수성을 보이는 것이 확인되어 이를 치료제로 사용하였으나, 1996년 일본에서 vancomycin에 감수성이 감소한 *S. aureus* (hetero-vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*; hVISA)가 처음으로 보고되었고(13, 14), 미국에서도 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)가 확인된 바 있다(4). 국내에서도 1997년 한 대학병원에서 패혈증으로 숨진 환자에서 VRSA 균주가 검출되어 내성균주의 심각성을 인식하게 되었다(18).

NNIS에 의하면 병원감염균 중 두 번째로 자주 발생하는 vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE; 15)도 28.5%로 점차 증가하고 있으며(25), 국내에서는 11-45%가 증가하였다고 보고된 바 있다(28). 또한 VRE는 접합을 통해 내성 유전자를 *S. aureus*에게 전이시켜 VRSA의 발생을 증가시킨다는 연구보고에 따라 임상적으로 그 중요성이 대두되었다(27). 이 외에도 1995년에 국내에서 *Streptococcus pneumoniae*의 penicillin에 대한 내성율이 70% 이상이라고 보고되면서 주목을 받게 되었으며, 국내 역학 연구 조사 결과 penicillin 뿐만 아니라 3가지 이상의 항균제에 동시 내성을 보이는 다제내성균주의 비율이 30%를 넘어 세계 최고의 수준이라고 것이 확인되었다(34).

Ceftazidime이나 cefotaxime와 같은 cephalosporin 계통의 항

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-11-9080-6493/82-11-9286-8641, Fax: 82-32-770-4424
E-mail: yo8495@incheon.ac.kr/kjw5864@incheon.ac.kr

생제에 대해서도 *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Escherichia coli* 등의 병원균들이 내성을 나타냈으며, fluoroquinolone계 항생제에 대해서는 50%가 넘는 내성율을 보였다고 보고되었다(19). 이와 같은 통계 결과는 전세계적으로 항생제 내성균주 증가로 인하여 감염환자 치료에 어려움이 증대되고 있다는 것을 나타내며, 이와 같은 심각한 문제점을 인식하여 항생제 내성균주에 효과적으로 대처할 수 있는 항생제 개발에 많은 연구가 필요하다.

이를 위해 새로운 항생물질 개발에 많은 노력을 기울이고 있는데 이미 수많은 미생물을 검색하여 신규 항생물질을 분리하는 것은 한계에 도달한 상태라는 것이 지배적인 의견이며, 따라서 기존의 각종 항생물질의 구조를 변화시켜 신규물질을 유도해 내는 화학적 방법에 주로 의존하고 있다. 그러나 이제 quinolone, cephalosporin, carbapenem 등과 같은 기존의 항생제를 기반으로 하는 화학구조를 갖는 합성항생제의 개발도 한계에 달했고, 따라서 전혀 새로운 분자 구조 및 작용기전을 갖는 신규물질 개발이 필수가 되었다.

미생물이 2차 대사산물로 생산하는 항생물질들(37) 가운데 64%가 방선균으로부터 분리되었으며, 13%와 23% 정도는 각각 세균과 곰팡이로부터 분리되었다(3). 이들 중 *Bacillus cereus* QN03323에서 생산된 thiopeptide 항생제는 staphylococci와 enterococci에 대해서 항균활성이 있었으며(22), *Streptomyces* 속 HIL Y-9420704에서 추출한 cyclic peptide 항생제인 methylsulfomycin은 MRSA 균주와 vancomycin과 teicoplanin에 저항성을 보이는 균주에 대해 항균활성을 보였다(36).

따라서, 본 연구에서는 신규 천연항생물질을 개발하고자 국내 토양에서 항생물질을 생산하는 미생물을 탐색하고, 순수 분리한 후 기존의 항생제에 대해서 내성을 보이는 MRSA와 병원성 미생물들을 대상으로 항생작용을 확인하여 항균활성이 우수한 균주를 선발하였으며, 그 형태 및 생리·생화학적 특성과 DNA 염기서열 분석방법을 통하여 동정하고, 최종 선발된 우수 항생물질 생산균주로부터 항생물질을 추출하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 채집

국내 여러 지역(인천(남촌, 고잔, 강화), 경기도(구리, 김포, 성남), 강원도(영월, 인제, 정선, 평창, 홍천), 충청남도(부여, 안성, 익산, 논산), 충청북도(괴산, 청원), 전라북도(구례, 임실, 장수, 함양), 경상북도(안동, 영천, 청송, 포항, 영주))의 비옥한 토양을 지면에서 4~5 cm 깊이에서 모종삽으로 채취하여 비닐 팩에 담아 실험실로 운반한 다음 분리하였다.

실험균주의 순수분리

시료 1g을 멸균수 9 ml에 넣고 충분히 vortex한 후 $10^6 \sim 10^7$ 로 희석한 다음 Nutrient Agar (NA; 0.5% peptone, 0.3% beef extract, 1.5% 한천)에 도말하여 37°C 배양기에서 12~15시간 배양하였다. 평판배지에 형성된 집락의 모양, 색깔과 크기 등에 따

라서 균주를 순수분리 하였다. 순수분리된 균주는 -70°C 초저온 냉동고에 넣어 보관하였다.

항균물질 생산균주의 선발

순수분리된 균주의 항균물질 생산 여부를 탐색하기 위하여 먼저 대조균주인 MRSA와 *P. aeruginosa*를 각각 5 ml Nutrient Broth (NB)에 접종한 다음 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 15~18시간 배양하였다. MRSA와 *P. aeruginosa* 배양액 200 μ l를 도말한 Mueller-Hinton Agar (Difco, USA) 배지 상에 순수분리된 균주들을 tooth-picking하여 접종한 다음 37°C 배양기에서 18~24시간 배양하였다. 배지 상에서 MRSA와 *P. aeruginosa*에 대해서 동시에 성장억제대(inhibition zone)를 형성하는 균주들을 잠재적인 항균물질 생산균주로 선발하였다.

항균물질 생산균주의 항균력 검증

항균물질 생산균주의 항균력을 검증하기 위하여 우선 SST 액체배지(2.0% soluble starch, 1.0% sucrose, 1.0% tryptone, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl; pH 6.8)에 접종한 후 37°C에서 4~5일간 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양된 균주에서 항균물질을 얻기 위하여 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 회수하였다.

MRSA와 *P. aeruginosa*를 각각 5 ml NB 배지에 접종하여 37°C에서 15~18시간 진탕 배양한 다음 Mueller-Hinton Agar에 각각 200 μ l씩 도말하였다. 위에서 회수한 상등액 50 μ l를 원형 paper disc (Avantec, 8 mm, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)에 점적하여 건조시킨 후 균을 도말한 배지 위에 놓고 37°C에서 18~24시간 배양하여 그 결과 형성된 성장억제대의 지름을 측정하였다.

항균물질 생산균주의 동정

항균물질 생산균주를 동정하기 위하여 Bergey's Manual에 따라 그람 염색, 형태, 운동성, 당 분해능 등의 생리·생화학적 특성을 분석하였다(15). 또한 생리학적 특성 분석을 확인하기 위하여 API 20E Kit (Bio Merieux Co., France)를 사용하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

선별된 균주의 유전학적인 동정과 계통학적 유연관계를 분석하기 위하여 분리균주를 5 ml TSB 배지에 접종한 후 15시간 배양한 다음 Sambrook (30) 등의 방법을 이용하여 염색체 DNA를 분리하였다. Universal primer [fYU2; 5'-TAACACATGCAAGTCGAGCG-3', rYU2; 5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3']를 사용하여 윤(39) 등이 실험한 방법을 변형하여 PCR를 수행하였다. 염기서열 결정은 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 염기서열의 상동성 분석은 GenBank의 database에 등록된 16S rDNA 염기서열들을 대상으로 nucleotide blast search program을 사용하여 수행하였다(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

계통학적 유연관계를 분석하기 위하여 CLUSTAL X 프로그램 (CLC bio, 덴마크)을 이용하여 정렬시킨 후(35) CLC Free

Workbench Program (CLC bio A/S, <http://www.clcbio.com>)의 neighbor joining method에 따라 evolutionary distance matrix를 얻어 계통수를 작성하였다. 계통학적 유연관계에 대한 통계적 안정성을 검증하기 위하여 1,000회의 resampling에 근거한 bootstrap 분석을 수행하였다.

항균 조추출물의 분리

항균물질 생산균주를 SST 배지에 접종한 다음 37°C에서 200 rpm으로 교반하며 4~5일간 배양하였다. 배양액을 14,000×g로 30분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 butanol과 1:1로 혼합한 후 butanol 층을 회수하였다. 회수한 butanol 층을 동결건조기로 (Operon Co., Korea) 건조시킨 후 조추출물을 얻었다.

항균 조추출물의 항균력 시험

항균물질 생산균주에서 얻은 조추출물의 항균력을 분석하기 위하여 먼저 MRSA 균주와 *P. aeruginosa*를 대상으로 Mueller-Hinton Agar에 각각 20 µl씩 분주한 후 임상에서 사용되는 항생제인 oxacillin (1 µg/ml ; BBL, Ireland), vancomycin (30 µg/ml ; Liofilchem, Italy), polymyxin B (100 µg/ml ; Liofilchem, Italy), cefoperazone (30 µg/ml ; BioMerieux, France)과 선별된 균주의 조추출물을 증류수 (20 mg/ml)에 용해시킨 후 paper disc에 50 µl를 점적하여, 건조시킨 후 도말한 배지 위에 놓고 37°C에서 18~24시간 배양한 다음 성장억제대의 지름을 측정하였다. 또한 그람

양성균주인 *S. pneumoniae*, 그람 음성균주 *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *K. pneumoniae* 및 병원성 진균인 *Cryptococcus neoformans*와 *Trichophyton* spp. 등의 병원미생물에 대한 항균활성도 조사하였다.

항균 조추출물의 내열성 측정

항균물질의 내열성을 측정하기 위하여 항균 조추출물을 증류수(20 mg/ml)에 용해시킨 후 200 µl씩 미세원심분리관에 넣어 60°C, 80°C 및 100°C의 온도에서 1시간, 121°C에서는 15분 혹은 30분간 반응시켰다. 열처리한 각 조추출물을 paper disc에 50 µl씩 점적한 후 agar diffusion법으로 MRSA와 *P. aeruginosa* 균주에 대한 항균 효과를 측정하였다.

항균물질 조추출물의 pH에 대한 안정성 분석

항균물질의 pH에 따른 항균활성 및 그 안정성을 알아보기 위하여 pH 구간 별로 다음과 같이 실험하였다. Glycine-HCl buffer (pH 2.2~3.0), citric acid-NaOH buffer (pH 4.0~6.0), Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0) 및 glycine-NaOH buffer (pH 10.0)를 사용하여 항균물질 조추출물(20 mg/ml) 용액을 준비하고 37°C 항온수조에서 1시간 반응시켰다. 이 항균물질 용액들을 중화시킨 다음 paper disc에 각각 50 µl씩 점적하여 MRSA와 *P. aeruginosa* 균주에 대한 항균 효과를 agar diffusion법으로 분석하였다.

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of *P. incheonensis* YK5

| Characteristics | YK5 | Characteristics | YK5 |
|------------------------|--------------------|----------------------|----------------|
| Gram stain | + ^a | Lysine decarboxylase | - ^b |
| Morphology | rod | Urease | - |
| Cell size | 2.9~3.7×0.6~0.8 µm | Hydrolysis of | |
| Motility | + | casein | + |
| Endospore shape | Elipsoidal | gelatin | + |
| Endospore position | Terminal | lipase | + |
| Catalase | + | starch | + |
| Anaerobic growth | - | Growth in NaCl 1% | + |
| Methyl red | - | NaCl 2% | ± |
| Oxidase | V ^c | NaCl 3% | - |
| Acid from | | Growth at 30°C | + |
| D-Arabinose | - | 40°C | + |
| D-Glucose | + | 45°C | + |
| D-Mannitol | - | 50°C | - |
| Nitrate reduction | + | Growth at pH 5 | - |
| Production of indole | - | pH 6 | + |
| Utilization of citrate | - | pH 8 | + |
| Arginine dihydrolase | - | pH 9 | + |

^a 90% or more of strain are positive

^b 90% or more of strain are negative

^c variable

결 과

항균물질 생산 균주의 동정

토양에서 분리되어 항균물질을 생산하는 균주들 중 MRSA와 *P. aeruginosa* 균주에 대해 동시에 성장억제대를 형성한 균주들을 일차적으로 선별하였으며, 그 중 가장 우수한 활성을 보이는 균주를 YK5라고 명명하였다.

Bergey's Manual에 의거하거나 API 20E kit를 사용하여 분석한 이 균주의 형태적, 생리·생화학적 특성은 Table 1에 보인 바와 같았다. 이 균은 그람 양성 간균으로 통성호기성이며, 운동성을 보였으며, 크기는 약 2.9~3.7×0.6~0.8 μm, ellipsoid 모양의 내생포자를 모세포 말단에 형성하는 것이 관찰되었다. 또한, catalase, nitrate reduction, urease 양성이고, casein, gelatin, starch 가수분해효소를 생산하며, 포도당을 분해하여 산을 생산하였으나, arabinose와 mannitol로 부터는 산을 생산하지 않았다. Methyl red, indole 생성, citrate 이용능, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase는 모두 음성반응을 나타냈다. 이 균주의 최적 성장온도는 30~37°C이었고 45°C 이상의 온도에서는 성장하지 못하였으며, pH 6.0~9.0와 1.0% NaCl 이하에서는 잘 성장하였으나, NaCl이 2.0% 이상일 때에는 생장이 관찰되지 않았다. 이러한 결과에 의해 이 균주는 *Bacillus* 속 세균일 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

16S rDNA 분석을 통한 계통분석

YK5의 염색체 DNA로 부터 PCR을 통해 1,315 bp의 16S rDNA 단편을 증폭하고 그 염기서열을 결정하여 그 계통학적 유연관계를 조사하였다. 그 결과 YK5 균주의 16S rRNA 유전자는 *Paenibacillus elgii* SD17 균주의 16S rDNA와 98%의 상동성을 보여 가장 유사성이 높은 것으로 나타났고, *P. ourofinensis* AC13MSD (97%), *P. ehimensis* (96%), *P. koreensis* (95%), *P. polymyxa* (92%)와도 높은 상동성을 보였다(Fig. 1). 이 외에도 *Bacillus mucilaginosus* (96%), *B. chitnolyticus* (93%), *B. marcerans* (88%), *B. megaterium* (87%)과도 비교적 높은 상동성

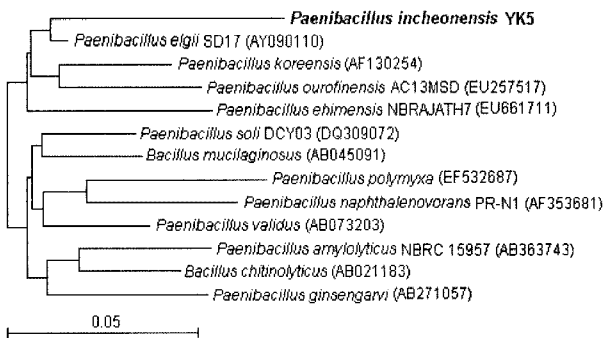


Fig. 1. A dendrogram of the phylogenetic relationship of *P. incheonensis* YK5 with other bacteria based on the sequences of the 16S rRNA genes using neighbor joining method with 1000 bootstrapping.

을 갖는 것으로 분석되었다. 따라서 YK5는 *Paenibacillus* 속 세균으로 동정되었으며, *P. incheonensis* YK5로 명명되었다.

항균 조추출물의 항균력 시험

P. incheonensis YK5를 SST 배지에서 배양하고 배양액을 butanol과 1:1로 혼합하여 butanol 층을 회수하여 조추출물을 얻었다. 조추출물의 항균 활성작용을 시험한 결과 MRSA 20 균주들과 *P. aeruginosa* 10 균주에 대해 광범위한 성장억제대를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 2). 시험한 모든 MRSA 균주들은 YK5 조추출물 외에 vancomycin에 대해 감수성을 보였고, oxacillin에 대해서는 저항성을 보였다. *P. aeruginosa* 균주들은 모두 YK5에 대해서만 감수성을 보였고 cefoperazone과 polymyxin B에 대해서는 저항성을 보였다. YK5 조추출물은 이 두 병원성 세균 외에 그람 양성균 *S. pneumoniae*, 그람 음성균인 *S. typhi*, *S.*

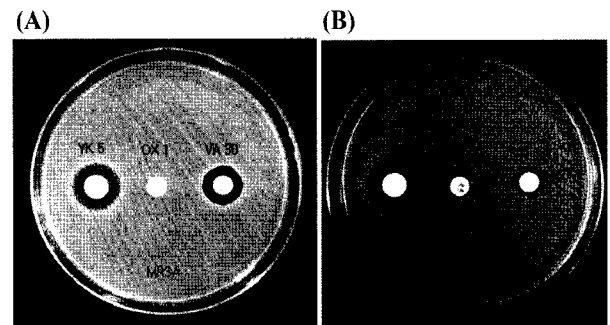


Fig. 2. Effects of antimicrobial substances against the growth of MRSA (A) and *P. aeruginosa* (B). YK5 represents inhibition zone of growth of MRSA or *P. aeruginosa* formed by partially purified crude extract of *P. incheonensis* YK5 (50 μl); OX1, oxacillin (1 μl/ml), and vancomycin (30 μg/ml); VA30. PB100 represents the zone of *P. aeruginosa* formed by polymyxin B (100 μg/ml); CFP 30 by Cefoperazone (30 μg/ml).

Table 2. Antimicrobial activity of the crude extract of *P. incheonensis* YK5 against various pathogenic microorganisms

| Pathogenic microorganisms ^a | Inhibition zone ^b (mm) |
|--|-----------------------------------|
| MRSA (20 strains) | 18~22 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 18 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10 strains) | 18~22 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 19 |
| <i>Salmonella paratyphi</i> | 18 |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 16 |
| <i>Shigella flexneri</i> | 19 |
| <i>Escherichia coli</i> | 16 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 18 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 21 |
| <i>Trichophyton</i> spp. | 20 |

^a Strains were clinical isolates from hospitals in Incheon.

^b Diameters of inhibition zone in mm

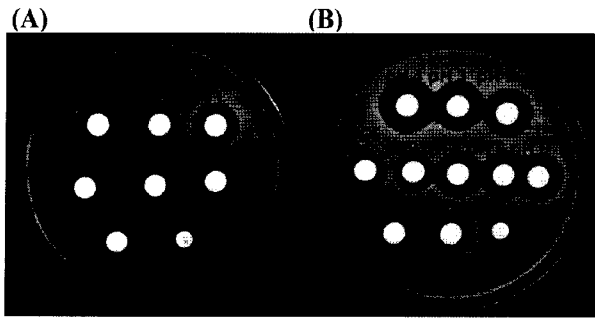


Fig. 3. Effects of temperature (A) and pH (B) on the antimicrobial activity of *P. incheonensis* YK5 against MRSA. Control was the crude extract incubated at 30°C (A) or pH 7.0 (B).

paratyphi, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, 및 인체병원성 진균인 *C. neoformans*과 *Trichophyton* spp. 등 다양한 병원성 미생물에 대해서도 항균활성을 보였다(Table 2).

항균 조추출물의 특성

P. incheonensis YK5 균주에서 추출한 항균물질의 항균력이 온도와 pH에 따라 어떻게 영향을 받는지 MRSA와 *P. aeruginosa* 균주를 대상으로 실험하였다. 20°C부터 100°C까지 20°C씩 올라가면서 1시간 동안 반응시킨 결과 해당 온도 구간에서 항균활성에 변화가 전혀 없었다(Fig. 3). 그러나 121°C로 15분 동안 반응시켰을 때 활성이 다소 감소하였고, 30분 반응시킨 후에는 상당히 감소하였으며, 1시간 처리했을 때는 완전히 없어지는 것으로 나타났다. 따라서 YK5 균주가 생산하는 항균물질은 열에 대하여 매우 안정한 물질인 것으로 분석되었다.

또한 pH에 따른 항균활성은 pH 3.0~7.0 범위에서 항균활성이 높았는데, 특히 pH 4.0에서 가장 높았다(Fig. 3). 반면에 pH 8.0 이상에서는 활성이 많이 감소하였으나 pH 10.0에서도 여전히 항균활성이 남아있는 것으로 나타났다. 따라서 YK5 균주가 생산하는 항균물질은 넓은 pH 범위에 걸쳐 안정한 것을 알 수 있었다.

고 찰

국내 토양으로부터 분리된 항균물질을 생산하는 균주들 중에서 MRSA와 *P. aeruginosa* 균주에 대해 동시에 항균활성을 보이는 균주들을 선발하였으며, 그 중 가장 큰 성장억제대를 보인 YK5 균주를 선택하였다. YK5 균주는 형태적, 생리·생화학적 특성 분석과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *Paenibacillus* 속 세균으로 동정되었고, 계통학적 유연관계를 조사한 결과 *P. elgii* strain SD17과 98% 상동성을 보이는 것으로 나타났다. 이에 두 균주간의 생리·생화학적 특성을 비교했을 때, *P. elgii* strain SD17은 혐기적 생장이 가능하였고, indole 양성이었으며, mannitol로부터 산을 생성시켰고, pH 8.5까지 성장하였으며, 2.0% NaCl에서 잘 성장하였지만(17), 본 연구에서 분리된 YK5 균주는 혐기적 성장을 하지 못하였고, indole 음성이었으며, mannitol로부터 산을 생성시키지 못하였고, pH 9.0까지 성장하였

으나, 2.0% NaCl 이상에서는 성장하지 못하였다. 따라서 이러한 차이점을 근거로 YK5 균주는 *Paenibacillus* 속의 새로운 종으로 판단되어 *P. incheonensis* YK5로 명명하였다.

Paenibacillus 속은 원래 *Bacillaceae* 과의 *Bacillus* 속에 속해 있었으나 16S rRNA 유전자 염기서열의 상동성을 근거로 *Bacillaceae* 속으로 부터 분리되었으며(2), *P. polymyxa*, *P. thiamunolyticus*, *P. validus* (23), *P. alginolyticus* (24), *P. larvae* subsp. *larvae* (12) 등의 새로운 종이 보고된 바 있다. *Paenibacillus* 속 세균들은 다양한 항진균물질과 항생물질을 생산한다고 알려져 있는데(26, 33), *P. polymyxa*는 peptide계의 polymyxin A, E (colistin), circulin, lantibiotic, paenibacillin 등의 항생물질을 생산하고(7, 10, 11, 32), *P. kobensis* M은 mattacin (polymyxin M; 20), *P. thiamunolyticus*는 octopyglin과 baciphelacin을 생산하는 것으로 보고된 바 있다(5, 33). *P. polymyxa* OSY-DF 균주는 polymyxin과 paenibacillin 두 가지 항생물질을 생산하는데 polymyxin은 그람 음성균에 대해서만 항균활성을 보였고, paenibacillin은 그람 양성균에 대해서만 항균력을 보였으며 항진균 활성에 대한 언급은 없었다(10, 11, 22). Paenibacillin은 23 kDa 정도의 펩티드로 매우 높은 열안정성과 광범위한 pH에서 활성을 보이는 것으로 보고되었다.

P. incheonensis YK5 균주의 조추출물은 항생제 내성균주인 MRSA, 병원성 그람 양성균인 폐렴균, 다양한 그람 음성의 식중독균 및 인체병원성 진균에 대하여 광범위한 항균력을 나타냈다. 전 세계적으로 다제내성균주의 출현 문제가 너무도 심각하기 때문에 앞으로 새로 개발되는 항생제는 그람 양성균과 그람 음성균에 효과가 있으면서 또한 다제내성균으로 인한 질병제어에 효과적일 뿐만 아니라, 인체에 대한 안전성이 가장 중요하다(8, 10, 39). 따라서, 본 연구에서 분리된 *P. incheonensis* YK5이 생산하는 항생물질은 광범위한 항균활성을 보일 뿐만 아니라 다제내성균에 대해서도 항균력을 보여 새로운 항생제 개발의 가능성을 제시한다고 사료된다. 또한 항생제 제조과정에서 요구되는 내열성(29)과 pH에 대한 안정성의 경우 *P. incheonensis* YK5 균주의 항균물질은 100°C에서 1시간 반응한 후에도 항균 활성을 보여 열에 매우 안정한 것으로 나타났으며, pH 3.0~7.0 범위에서 활성이 우수하고 pH 10.0에서도 활성이 여전히 남아있어 광범위한 pH에서 이용이 가능할 것으로 사료되었다.

이에 향후, *P. incheonensis* YK5 균주의 항균물질을 순수하게 정제하여 위의 다제내성균을 포함한 광범위한 항균활성이 단일 물질로 인해 나타난 것인지 확인하고, 그 화학적 특성과 구조를 규명하고, 또한 항생기작을 밝히고자 한다. 아울러 세포 및 동물 실험을 통해 인체에 대한 독성여부도 파악하여, 차세대 항생제로서의 개발 가능성을 확인하고자 한다.

참고문헌

1. Aram, J. and A.E. Glatt. 1998. True community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 19, 106-107.
2. Ash, C., F.G. Priest, and M.D. Collins. 1993. Molecular identifica-

- tion 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.
3. Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites : Screening and identification. In M.E. Bushell and U. Grafe (eds.), *Bioactive metabolites from microorganisms*, Elsevier, Amsterdam, 3, 25.
 4. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002 *MMWR* 51, 565-567.
 5. Chung, Y.R., C.H. Kim, I. Hwang, and J. Chun. 2000. *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1495-1500.
 6. Davis, S.L., M.B. Perri, S.M. Donabedian, C. Manierski, A. Singh, D. Vager, N.Z. Haque, K. Speirs, R.R. Muder, B. Robinson-Dunn, M.K. Hayden, and M.J. Zervos. 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection. J. Clin. Microbiol.* 45, 1705-1711.
 7. Falagas, M.E. and S.K. Kasiakou. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1333-1341.
 8. Falagas, M.E. and S.K. Kasiakou. 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit. Care.* 10, R27.
 9. Gedney, J. and R.W. Lacey. 1982. Properties of methicillin-resistant staphylococci now endemic in Australia. *Med. J. Aust.* 1, 448-450.
 10. Govaerts, C., J. Orwa, A. Van Schepdael, E. Roets, and J. Hoogmartens. 2002. Characterization of polypeptide antibiotics of the polymyxin series by liquid chromatography electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *J. Pept. Sci.* 8, 45-55.
 11. He, Z., D. Kisla, L. Zhang, C. Yuan, K.B. Green-Church, and A.E. Yousef. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 168-178.
 12. Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Janssen, K. Kersters, P. De Vos, N.A. Logan, N. Ali, and R.C.W. Berkeley. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1966) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1984) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270-279.
 13. Hiramatsu, K. 2001. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* : a new model of antibiotic resistance. *J. Infect. Dis.* 1, 1-16.
 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. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Snecht, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th, Williams Wilkins, USA.
 16. Jeffrey, W.W., S. Tallapragada, P. Farrel, and L.M. Dembry. 1996. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant *Enterococci*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 210-212.
 17. Kim, D.S., C.Y. Bae, J.J. Jeon, S.J. Chun, H.W. Oh, S.G. Hong, K.S. Baek, E.Y. Moon, and K.S. Bae. 2004. *Paenibacillus elgii* sp. nov., with broad antimicrobial activity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2031-2035.
 18. Kim, M.N., C.H. Pai, J.H. Woo, J.S. Ryu, and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3879-3881.
 19. Kim, K.M., J.H. Yoo, J.H. Choi, E.S. Park, K.S. Kim, K.S. Kim, S.R. Kim, S.M. Kim, H.J. Kim, J.S. Jung, K.H. Yoo, H.S. Oh, S.W. Yoon, M.R. Suh, Y.K. Yoon, J.Y. Lee, Y.K. Jang, H.Y. Jin, S.W. Kim, Y.R. Kim, Y.S. Kim, Y.S. Kim, J.U. Kim, J.M. Kim, K.R. Peck, H. Lee, M.D. Oh, S.H. Lee, W.K. Lee, S.H. Lee, M.H. Chung, S.I. Jung, H.J. Cheong, and W.S. Shin. 2006. Nationwide surveillance results of nosocomial infections along with antimicrobial resistance in intensive care units of sixteen university hospitals in Korea, 2004. *Kor. J. Nosocomial Infect. Control.* 11, 79-86.
 20. Martin, N.I., H. Hu, M.M. Moake, J.J. Churey, R. Whittal, R.W. Worobo, and J.C. Vederas. 2003. Isolation, structural characterization, and properties of mactacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. *J. Biol. Chem.* 278, 13124-13132.
 21. Michael, A.G. 2000. Infection prevention and control unit and the division of infectious disease, department of medicine, the University Health Network, University of Toronto, Ontario. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emerging community pathogen? A review of the literature. *Can. J. Infect. Dis.* 11, 202-211.
 22. Nagai, K., K. Kanigiri, N. Arao, K. Suzumura, Y. Kawano, M. Yamaoka, H. Zhang, H. Zhang, M. Watanabe, and K. Suzuki. 2003. Novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J. Antibiot (Tokyo)*. 56, 123-128.
 23. Nakamura, L.K. 1984. *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 224-226.
 24. Nakamura, L.K. 1987. *Bacillus alginolyticus* sp. nov. and *Bacillus chondroinius* sp. nov., two alginate-degrading species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 284-286.
 25. National Nosocomial Infections Surveillance System. 2004. National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control.* 32, 470-485.
 26. Nielson, P. and J. Sorensen. 1997. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 183-192.
 27. Noble, W.C., Z. Virani, and R.G.A. Cree. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 72, 195-198.
 28. Park, Y.J., J.S. Jeong, E.S. Park, E.S. Shin, S.H. Kim, and Y.S. Lee. 2007. Survey on the infection control of multidrug-resistant microorganisms in general hospitals in Korea. *Kor. J. Nosocomial Infect Control.* 12, 112-121.
 29. Rollema, H.S., O.P. Kuipers, P. Both, W.M. De Vos, and R.J. Siezen. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2873-2878.
 30. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
 31. Saravolatz, L.D., N. Markowitz, L. Arking, D. Pohlod, and E. Fisher. 1982. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Epidemi-

- cologic observations during a community-acquired outbreak. *Ann. Intern. Med.* 96, 11-16.
32. Selim, S., J. Negrel, C. Govaerts, S. Gianinazzi, and D. Van Tuinen. 2005. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6501-6507.
33. Slepecky, R.A. and H.E. Hemphill. 1991. The genus *Bacillus*-non-medical. In *The Prokaryotes*, p. 1663-1696. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. Springer, New York, USA.
34. Song, J.H., J.W. Yang, J.H. Joung, S.J. Kang, and N.Y. Lee. 2000. Unique alterations in Penicillin-binding protein 2B of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Korea. *Kor. J. Infect. Dis.* 32, 108-114.
35. Thomson, J.D., T.J. Gibso, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
36. Vijayakumar, E.K., J. Kenia, T. Mukhopadhyay, and S.R. Nadkarni. 1999. Methylsulfomycin I, a new cyclic peptide antibiotic from a *Streptomyces* sp. HIL Y-9420704. *J. Nat. Prod.* 62, 1562-1564.
37. Waksman, S.A. and A.T. Heinrich. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *J. Bacteriol.* 46, 337-341.
38. Wenzel, R.P. 1982. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.* 97, 440-442.
39. Yoon, Y.J., K.H. Im, Y.H. Koh, S.K. Kim, and J.W. Kim. 2003. Genotyping of six pathogenic *Vibrio* species based on RFLP of 16S rDNAs for rapid identification. *J. Microbiol.* 41, 312-319.

(Received August 20, 2008/Accepted November 12, 2008)

ABSTRACT : Isolation and Characterization of a *Paenibacillus incheonensis* YK5 with Antimicrobial Activity against MRSA

Young-Jun Yoon^{1,2*}, Hye-Young Kim², Tae-Soo Lee², and Jung-Wan Kim^{2*} (¹Incheon Natural Environment Institute, Incheon 402-749, Republic of Korea, ²Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Republic of Korea)

Various bacteria were isolated from Korean soil samples based on their capability inhibiting the growth of MRSA strains. Among them, strain YK5 with the highest activity was a Gram positive sporulative bacillus with motility. It did not produce indole and no acid was formed from mannitol by the bacterium. The 16S rRNA sequence of the strain showed 95~98% homology with those of *Paenibacillus* spp.. The bacterial isolate shared the highest homology with that of *P. elgii* (98%), but was named as *Paenibacillus incheonensis* YK5 due to differences in physiological properties. Butanol extract of the *P. incheonensis* YK5 culture grown in SST medium at 37°C for 96 hr showed a broad antimicrobial activity against Gram-positive (MRSA and *Streptococcus pneumoniae*) and negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) pathogenic bacteria and fungi (*Cryptococcus neoformans* and *Trichophyton*). The antimicrobial activity in the crude extract was stable in a broad range of temperature and pH, 20~100°C and 3.0~6.0, respectively. Therefore, the antimicrobial activity of *P. incheonensis* YK5 had potential as a novel antibiotics for pathogens including MRSA.