

가금티브스균 *Salmonella gallinarum*의 생육을 저해하는 길항미생물의 선발 및 동정

김진락 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Isolation, Identification and Cultural Condition of the Antagonistic Microorganism Against *Salmonella gallinarum* Causing Fowl Typhoid

Jin-Rack Kim and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

Diarrhea and death of chicken have been brought about by fowl typhoid caused by *Salmonella gallinarum*, which causes a great loss of chicken farms. For the development of the probiotic which can control a fowl typhoid of *S. gallinarum* without any adverse effect of commercial existing antibiotics, we isolated antagonistic intestinal bacteria against *S. gallinarum* from a bowel of the chicken which was pastured in a chicken farm of Gumi, Kyoungbuk. An Y3 strain which had a strong antagonistic ability to *S. gallinarum* was selected as a candidate of chicken probiotic microorganism among isolated strains. It was identified as a *Bacillus amyloliquefaciens* by 98% similarity by the result of cultural, physiological, biochemical test and Biolog system(MicrologTM 4.0), and named as *Bacillus amyloliquefaciens* Y3. The strain showed the strongest antagonistic activity and a good growth at pH 5-9, 37°C.

Key words – fowl typhoid, antagonistic bacteria, *Salmonella gallinarum*,

서 론

Salmonella 속 세균은 통성혐기성 그람음성 간균으로 장내세균과에 속하며[3,7], 닭의 전염병인 가금 티프스의 원인균으로 성계에서 패혈증, 장염 등의 증상을 유발하여 높은 폐사율을 보이며 분변을 통해 지속적으로 확산되는 급성 또는 만성병이다[6,9]. *Salmonella* 감염증은 일반적으로 *Salmonella pullorum*에 의한 추백리, *Salmonella gallinarum*

에 의한 가금티프스, 그리고 이들 혈청형들을 제외한 나머지 여러 *Salmonella*균에 의하여 발생하는 가금파라티프스로 구분되고 있다.

Salmonella 속 세균에서 기존 항생물질에 대한 내성균의 출현은 기존 항생물질의 무분별한 남용으로 발생하여 사람과 동물의 질병치료나 공중보건에 어려움을 주고 있다. 이들 내성균주의 발현은 동종 또는 이종세균간의 집합을 통해 전달될 수 있으므로 약제내성균의 증가에 영향을 미치고 있다[2,10,11]. 내성균의 출현을 억제하기 위해서 정상 장내 세균총을 이루게 될 생균제를 이용한 동물 질병의 생물학적 방제가 절실히 필요한 실정이다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-810-2395, Fax : 053-811-4319
E-mail : sdkim@yumail.ac.kr

생균제(probiotics)란 동물의 소화관내에서 장내미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에 유익한 작용을 하는 미생물의 정상생태인 장내균총을 정상화함으로써 유해균을 억제하고 감염의 예방을 도모할 수 있는 작용기작을 가지는 제제이다[5]. 가금류의 *Salmonella* 감염을 감소시키기 위해서는 가금류 장내에 *Salmonella*가 전이, 증식되는 것을 억제해야 하는데[1], 정상장내균총의 가장 중요한 기능은 의부로부터 침입한 병원성 세균의 생육을 억제하고 이들이 장벽에 colonization되는 것을 방제하는데 있다고 알려져 있다[8].

따라서 본 연구에서는 가금티프스균인 *Salmonella gallinarum*의 생육을 강력히 억제하는 길항균주를 토종닭의 장으로부터 분리, 선발하여 이 균주들의 배양특성, 동정, 길항균의 길항물질을 추정함으로써 가금티프스 방제용 생균제 개발의 기초 자료로 삼고자 하였다.

실험재료 및 방법

가금티프스 길항균 분리 및 선발

경북 구미 지역에서 자연 방사하여 사육하는 토종닭의 소장과 대장을 길항균의 분리원으로 하였다. 소장과 대장에서 각각의 적출물 시료 1g을 멸균된 생리식염수 10ml에 넣어 균질하게 혼탁시켜, 10^5 까지 희석하였으며, 이들을 LB배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%)에 도말하여 37°C에서 1일간 배양하여 생성되는 colony를 순수 분리하였다. 그 후 가금티프스 원인균인 *Salmonella gallinarum*을 LB 액체 배지에 전배양한 배양액 0.1 ml를 혈청평판배지(Tryptic soy broth 0.3%, Agar 1.5%, 혈청 5%)에 유리봉으로 도말하고 혈청배지상에 분리균을 희석 접종하여 2일간 37°C에서 배양한 후 가금티프스 원인균인 *S. gallinarum*의 생육을 억제하는 clear zone을 형성하는 길항균을 선발하였다.

선발 길항균주의 동정

선발균주 strain Y3의 분류학적 동정을 위해 Bergey's manual of systematic bacteriology[4]의 세균 분류동정 지침서의 시험항목을 기준으로 하여 각 항목을 실험하였고, 최종적으로 Biolog사의 동정시스템(MicroLog™ 4.0)을 사용하여 검정실험 하였다. 각 실험에 사용한 배지조성과 실험

방법은 Bergey's manual of systematic bacteriology[4]을 참조하였다.

길항물질 생산을 위한 배지조건

Davis minimal medium[K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, Glucose 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, glucose 0.1%]에 glucose를 제외시키고 10종의 탄소원을 1.0%씩 첨가하여 37°C에서 2일간 균을 배양한 후, 그 원심분리하여, 상등액을 균체량 측정법(cell mass test)에 따라 길항력을 조사하였다. 또한 결정된 최적의 탄소원에 대하여 0.1~1.0%까지 농도별로 길항력을 확인하였다.

질소원 경우 Davis minimal medium에 질소원인 ammonium sulfate를 제외시키고 앞의 결과에서 선택된 탄소원을 최적 농도로 넣어 준 후 10종의 무기 및 유기 질소원을 0.5%씩 첨가하고 길항물질 생산에 미치는 영향을 조사 후 0.1~0.5% 농도에서 길항력을 조사하였다.

선발 길항균의 담즙산에 대한 안정성 및 길항력

선발길항균의 담즙산에 대한 안정성을 알아보기 위하여 LB평판배지에 전배양시킨 선발균주를 0.5%까지 단계별로 담즙산이 첨가된 LB broth에 접종한 후 2일간 37°C에서 배양하였다. LB broth에 가금티프스 원인균 *Salmonella gallinarum*을 50μl씩 접종한 후 여과한 배양액 1ml씩을 첨가하여 1일간 37°C에서 배양 후 길항력을 조사하였다.

선발 길항균의 pH 및 온도에 따른 길항력

선발 길항균의 pH에 대한 생육도와 안정성을 알아보기 위하여 LB평판배지에 전배양시킨 선발균주를 pH 3.0~10.0으로 조정된 LB broth에 접종하고 2일간 37°C에서 배양된 상등액을 이용하여 길항력을 조사하였다. 길항물질 생산에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C에서 선발 균주를 2일간 배양 후 길항력을 조사하였다.

배양 상등액의 길항물질 특성 확인

배양상등액의 길항물질의 특성을 알아보기 위하여 LB 액체배지 1 L에 선발균주를 배양한 후 8000 rpm, 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액으로부터 고분자, 저분자를 분리하기 위하여 Amicon centriprep

T10K를 이용, 3000×g에서 45분간 원심분리 하였고, 내열성을 알아보기 위하여 80℃에서 20분간 중탕으로 가열하였다.

선발균주가 생산하는 길항물질을 *n*-butanol로 추출하여 조정제 후 50℃에서 감압 농축하고 증류수, methanol에 각각 용해하여 길항물질의 활성을 여지 디스크법(filter paper disk test)으로 조사하였다.

결과 및 고찰

가금티프스 길항균 분리 및 선발

경북 구미 지역에서 자연 방사하여 사육하는 토종닭의 소장과 대장을 길항균의 분리원으로 하여 LB배지에 순수 분리한 결과 육안으로 관찰하여 형태적으로 상이한 23종을 분리하였다. 이들을 대상으로 가금티프스 원인균 *Salmonella gallinarum*에 대한 길항균의 선발을 발육저지측정법을 이용해서 생육을 억제하여 clear zone을 형성하는 억제 균주를 분리, 선발하였다(Fig. 1).

선발 길항균의 동정

선발균주 strain Y3의 분류학적 동정을 위해 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[4]조사와 Biolog사의 동정시스템(MicroLog™ 4.0)을 이용하여 최종 동정하여 본 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*와 98%의 상동성이 확인되었

으므로 본 연구에 사용된 strain Y3를 최종적으로 *Bacillus amyloliquefaciens* Y3균주로 명명하였다(Table 1).

길항물질 생산을 위한 배지조건

배지에 사용되는 영양원에 따른 길항물질 생산의 영향을 조사하여 본 결과 Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 탄소원은 균생장이나 길항물질 생산성에 있어서 가장 우수한 maltose가 최적이었다. 또한 maltose 농도별로 길항물질 생산성을 조사한 결과로는 0.3% 첨가시에 그 생산성이 가장 우수하였다(Fig. 2).

질소원에 대한 길항물질 생산성을 조사하여 본 결과 Table 3에서 볼 수 있는 것 같이 길항물질 생산성에 있어서 다양한 질소원들 중 NH₄Cl가 가장 높은 길항물질 생산성을 보였으며 NH₄Cl을 0.2% 첨가한 배지에서 길항물질 생산성이 가장 우수하였다(Fig. 3).

선발 길항균의 담즙산에 대한 안정성 및 길항력

0.5%까지 단계별로 담즙산이 첨가된 LB broth에 접종한 후 2일간 37℃에서 배양한 후 길항균주의 성장도를 spectrophotometer(Hitach U-2000)을 이용하여 600nm에서 균

Table 1. Identification of strain Y3 by their physiological and biochemical characteristics.

Characteristics	Stain Y3
Gram stain ^a	+
Rod-Shaped/Endospore	(+)/(+)
Catalase test	+
Voges-Proskauer test	-
Gas from glucose	-
Hydrolysis of casein	+
gelatin	+
starch	+
Utilizaion of citrate	+
Formation of indole	-
Growth at pH 6.8 nutrient broth	+
5.7nutrient broth	+
Growth at 30℃	+
40℃	+
50℃	-
Biolog (MicroLog™ 4.0)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (98%)

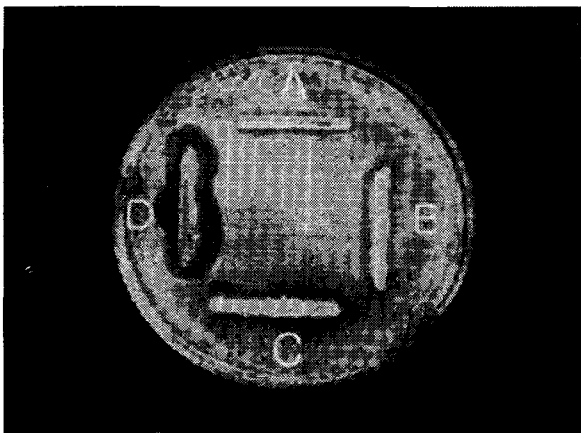


Fig. 1. Inhibition halo of *Salmonella gallinarum* on LB agar plate by selected strain.
A : Control, C : Strain Y8.
B : Strain Y11, D : Strain Y3.

Table 2. Effect of carbon sources for the production of antagonistic substance from *B. amyloliquefaciens* Y3 against *S. gallinarum*

Carbon source	Cell growth (CFU)	Relative activity (%)
Arabinose	1.8×10^5	72.8
Fructose	5.5×10^6	92.3
Lactose	3.8×10^6	85.2
Xylose	3.0×10^6	81.5
Glucose	1.4×10^6	62.3
Maltose	6.1×10^6	100
Saccharose	1.8×10^5	72.8
Starch	1.2×10^6	68.6
Mannitol	8.0×10^4	51.9
Galactose	6.0×10^3	55.6

*Various carbon sources(0.1%) were added to the medium [K₂HPO₄ 0.7%, sodium citrate 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.2%.] Cultivation was carried out for 2 days at 37°C.

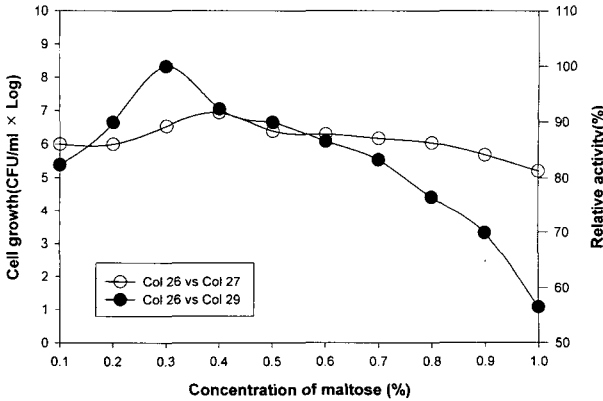


Fig. 2. Effect of maltose concentration on the production of antagonistic substance from *B. amyloliquefaciens* Y3.

탁도를 측정된 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 담즙의 농도가 올라갈수록 균성장 및 길항력이 감소하는 것을 알 수가 있었다. 그러나 0.2% 첨가 경우에도 비교적 높은 균성장 과 길항물질 생산성을 보였으므로 실제 가금용 생균제로 사용하여도 체내에서 급격한 활성의 저하없이 가금티브스 균을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

선발 길항균의 pH 및 온도에 따른 길항력

배양온도는 균성장과 길항력 모두 37°C가 가장 좋은 것

Table 3. Effect of nitrogen sources for the production of antagonistic substance from *B. amyloliquefaciens* Y3 against *S. gallinarum*

Nitrogen sources	Cell growth (CFU/ml)	Relative activity
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	1.4×10^6	87.4(%)
Tryptone	2.8×10^7	95.0
NH ₄ Cl	3.6×10^7	100
Proteosepeptone No.3	7.3×10^6	88
Yeast extract	1.9×10^7	94.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.5×10^6	85.4
NH ₂ HPO ₄	1.7×10^7	95.1
NaNO ₃	9.4×10^3	86.4
Beef extract	5.4×10^7	86.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.8×10^6	88.3

*Various nitrogen sources(0.1%) were added to the medium [maltose 0.3% K₂HPO₄ 0.7%, sodium citrate 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, KH₂PO₄ 0.2%.] Cultivation was carried out for 2 days at 37°C.

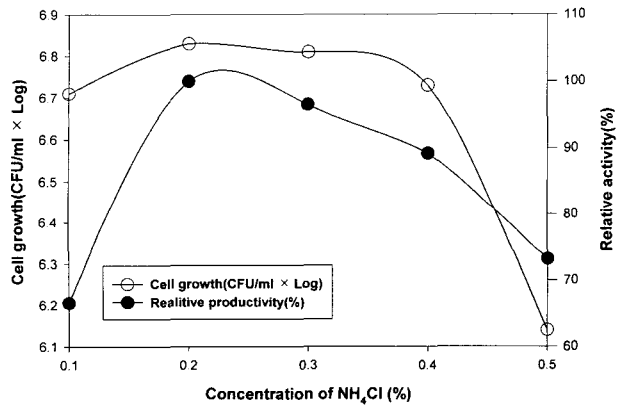


Fig. 3. Effect of NH₄Cl concentration on the production of antagonistic substance from *B. amyloliquefaciens* Y3.

으로 나타났다(Table 4). 또한 20~45°C까지 넓게 균성장 및 길항물질 생산성이 양호하였다. 가금류를 포함한 항온 동물의 체온이 대부분 37°C임을 고려해볼 때 길항물질의 생산 및 생육에 큰 영향은 없을 것으로 추정된다.

배양 pH에 따른 길항세균의 균 성장도와 길항물질 생산성은 pH 3에서 pH 10까지 조사한 결과 Table 9에서 볼 수 있는 것과 같이 균증식 및 생산성은 pH 7에서 가장 좋았다. 또한 pH 5~pH 9까지 양호한 균의 증식 및 생산성을 보였다(Table 5).

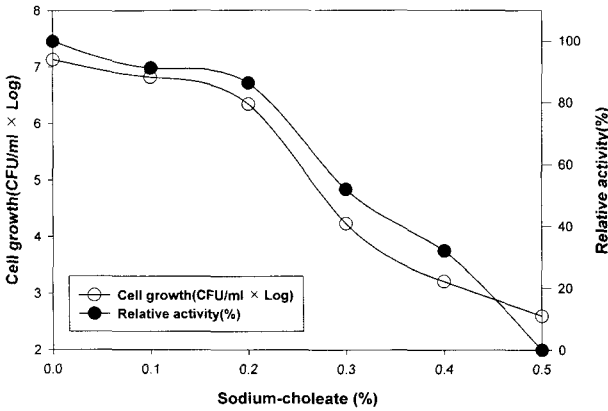


Fig. 4. Effect of sodium-choleate on the production of antagonistic substance from *Bacillus amyloliquefaciens* Y3.

Table 4. Temperature effect the cell growth and antagonistic substance production from *Bacillus amyloliquefaciens* Y3

Temperature(°C)	Cell growth (CFU/ml)	Relative activity
20	4.3×10^7	73.0(%)
25	4.5×10^7	85.7
30	4.5×10^7	92.9
37	4.7×10^7	100
45	3.9×10^7	87.3
50	1.2×10^3	48.9

배양 상등액의 길항물질 특성 확인

회수한 상등액을 Amicon centrifrep T10K를 이용하여 M.W, 10,000을 기준으로 고분자, 저분자를 분리한 후 80°C에서 20분간 중탕으로 열처리하여 길항력을 측정하여 본 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 내열성이 있는 저분자성 길항물질임을 확인할 수가 있었다. 또한 선별균주가 생산하는 길항물질을 n-butanol로 추출하여 조정제 후 50°C에

Table 5. pH effect the cell growth and antagonistic substance production from *Bacillus amyloliquefaciens* Y3

pH	Cell growth (CFU/ml)	Relative activity
3.0	2.8×10^2	6.1(%)
4.0	2.9×10^2	11.0
5.0	5.3×10^6	84.2
6.0	5.6×10^6	95.0
7.0	6.8×10^6	100
8.0	5.3×10^6	87.3
9.0	2.3×10^6	75.4
10.0	1.8×10^2	48.9

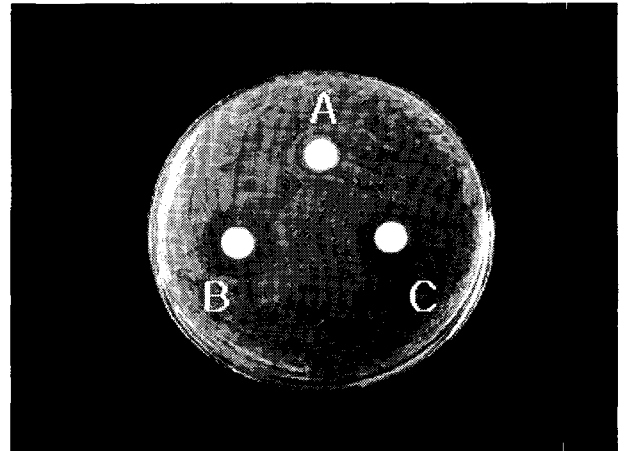


Fig. 5. Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens*Y3 against *S. gallinarum*.

- A : Control.
- B : n-butanol extract was dissolved with water.
- C : n-butanol extract was dissolved with methanol.

서 감압 농축하고 증류수, methanol에 각각 용해하여 길항물질의 활성을 여지 디스크법으로 조사하여 저분자의 용매추출성 길항물질임을 확인하였다(Fig. 5).

Table 6. Characteristics of the antagonistic material of *Bacillus amyloliquefaciens* Y3 for *Salmonella gallinarum* inhibition.

Strain	Inhibition by high M.W. (> 10K) sub.		Inhibition by low M.W. (< 10K) sub.		Culture broth	
	No heated	Heated*	No heated	Heated*	No heated	Heated*
Y3	12(%)	10	86	80	100	92

*After treatment for 20min at 80°C, the residual activity was measured.

요 약

가금티프스는 가금류에 *Salmonella gallinarum*이 원인균이 되어 발병하는 양계산업에 막대한 지장을 주는 질병이다. 가금티프스를 억제하기 위한 생균제 개발을 위한 목적으로서 가금티프스 원인균인 *Salmonella gallinarum*의 생육을 저해시킬 수 있는 길항균주를 토종닭의 내장으로부터 분리하여 생육특성과 길항물질 생산성을 조사하고, 이 균주를 분류학적으로 동정하였다. 분리된 길항균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 98% 상동성을 나타내어 최종적으로 *Bacillus amyloliquefaciens* Y3로 명명하였다. 0.3% maltose, 0.2% NH₄Cl, 37℃, pH 7에서 균생육 및 길항물질의 생산능이 가장 우수하였으나 장내 담즙에 대한 내성은 크게 나쁘지 않을 것으로 확인되어졌다. 생산된 길항물질을 추정하여 본 결과 분자량이 10,000보다 작은 저분자물질이었으며 80℃에서 20분간 열처리한 후에도 80%의 활성을 유지하는 내열성 물질임을 확인할 수 있었다. 향후 선발되어진 *Bacillus amyloliquefaciens* Y3가 생산해내는 길항물질에 대한 연구와 개량을 통하고 장내 정착성 실험을 거쳐 우수균주로 확인되면 양계산업에 사용될 우수한 생균제로 개발이 가능할 것이라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 영남대학교 교비연구비의 지원에 의해서 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. Blankenship, L. C., Bailey, J. S., Cox, N. A., Stern, N. J., Brewer, R. and Williams, O. 1993. Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to dimin-

ish *Salmonellae* in commercial broiler chickens. *Poultry Sci.* **72**, 1667-1672.

2. Gang, H. O., S. W. Kim, K. H. Lee, J. S. Ha, S. C. Park, K. S. Jung, K. W. Lee and J. C. Song. 2002. Virulence and plasmid profiles of *Salmonella gallinarum* isolated from chickens. *Kor. J. Vet. Clin.* **19**, 159-164.

3. Gillespie, J. H., J. F. Timoney and F. W. Scorrt. 1988. Hangan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. *Comstock Pub. Assoc. Ithaca and London.* **8**, 74-88.

4. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed, *Williams & Wilkins, U.S.A.*

5. Kim, H. A., J. Y. Cho, J. G. Hong and Y. H. Khang. 2001. Isolation and charaterization of an animal probiotics. *Journal of Resource Development.* **20**, 65-69.

6. Lee, D. S and T. W. Hahn. 2000. Virulence, Antibiotics susceptibility and plasmid profiles of *Salmonella gallinarum* isolation from chickens in Korea. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth* **24**, 49-57.

7. Linton A. H. 1983. Guidelines on prevention and control of Salmonellosis. *WHO Geneva.* 10-128.

8. Schlessinger, D. 1975. In *Microbiology*, American Society for Microbiology, American Society for Microbiology, Washngton, D.C. 110-157.

9. Shivaparasad, H. L. 1997. Pullorum disease and fowl typhoid. In *Disease of Poultry*. Calnek BW et al. pp 82-96. 10th eds, Iowa State University Press, Ames, Iowa.

10. Terakano N, Ohya T and Ueda H. 1980. A survey on drug resistance and R plasmid in *Salmonella* isolated from domestic animals in Japan. *JPN. J. Ve.t. Sci.* **24**, 543-550.

11. Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev.* **27**, 87-115.

(Received October 4, 2003; Accepted November 17, 2003)