

The Antibacterial Activity Against Fish Pathogen of *Paenibacillus* sp. MK-11 Isolated from Jeju Coast

Min-Sun Kim¹, So-Hyun Park¹, Dong-Hwi Kim¹ and Moon-Soo Heo^{1*}

¹Major of Aquatic Life Medicine, Faculty of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received June 10, 2014 / Revised June 24, 2014 / Accepted July 9, 2014

In this study, we isolate and identify bacteria from seawater collected from Jeju coast, to evaluate the antimicrobial activity against the fish pathogenic bacteria. 14 bacterial strains were isolated and identified using physiological, biochemical and molecular tools. Antibacterial activity of all the 14 isolates were screened against four major fish pathogens namely, two Gram-positive: *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* and two Gram-negative: *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*. Results revealed that among the 14 isolates, MK-11 was found to have antibacterial activity against *S. iniae*, *S. parauberis*, *V. anguillarum*. Particularly, *S. iniae* was susceptible with the MIC value of 250 µg/ml. The biochemical and physio-chemical results reveal that MK-11 had the sugar-alcohol disassemble ability of the D-sorbitol and D-mannitol. Also the utilization of the yeast extract, sorbitol and di-potassium phosphate were noted to be high. The optimum culture condition such as pH and temperature was recorded as pH 6.0, 25°C and along with 1% NaCl which differs from the previous reports particularly in nutrient resolutions. As results of the analysis of 16S rDNA sequences, MK-11 show the high similarity with *Paenibacillus polymyxa*, *P. jamilae*, *P. brasilensis* 99.78%, 99.43%, 99.39%, respectively. Hence, in the present study, the isolated *Paenibacillus* sp. MK-11 from Jeju seawater possesses the antibacterial activity against fish pathogens and it could be used as a new antibiotic agents against the gram positive fish pathogens.

Key words : Antibacterial activity, biochemical test, marine bacteria, *Paenibacillus* sp, *Streptococcus iniae*

서 론

1990년대 초반부터 넙치의 수요가 급격하게 증가함에 따라 넙치양식 산업 또한 발전하고 있다[19]. 하지만 고밀도 사육으로 인한 어류의 스트레스와 수질저하 등 여러 요인으로 폐사량이 급격히 증가되고 있다. 이로 인해 생산량이 점차 감소하여 경제적으로 큰 손실을 초래하게 된다.

넙치 폐사의 주요 원인으로 세균성 질병, 기생충성 질병, 바이러스성 질병이 있다. 그 중 세균성 질병이 넙치의 많은 폐사를 유발하며 원인균으로는 *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*로 알려져 있다[15]. 치료방법으로 항생제 투여 및 백신과 같은 화학적 요법을 사용하게 된다[14]. 하지만 항생제의 무분별한 사용으로 어체 내 항생제의 잔존량이 높아지고 내성균주가 등장하는 등 여러 부작용을 일으킨다[6].

이러한 문제점을 해결하기 위해 새로운 메커니즘을 갖는

천연항생물질이 주목 받고 있다. 하지만 1980년 이후 육상의 미생물로부터 분리된 항생물질의 관한 연구는 꾸준히 감소하고 있는 실정이다[1]. 따라서 육상과는 환경이 다른 해양미생물이 큰 관심을 받고 있다[13]. 해양미생물의 다양성과 대사산물에 대한 연구는 아직 미비하기 때문에 새로운 항균물질작용을 기대할 수 있다.

Paenibacillus sp. 균들은 다양한 환경에서 분리되어지며 항균활성물질을 생산한다고 보고되어지고 있다. 또한 광범위한 항미생물 효과가 알려져 있으며 많은 연구가 진행되고 있다[21].

이번 연구에서는 해수로부터 *Paenibacillus* sp. 균을 분리하였고 어류질병세균에 대한 항균활성을 평가하였다. 그리고 분리된 *Paenibacillus* sp.의 염기서열 분석과 형태학적 및 생화학적 테스트를 수행하였고 최적 배양조건을 탐색하였으며 해양 유래 *Paenibacillus* sp.의 새로운 항균물질의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-712-3473

E-mail : msheo@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

해양유래 미생물 분리 및 보관

시료는 제주특별자치도 서귀포시 대정읍 인근 연안의 해수를 멸균된 채수병에 채취하여 4°C에 보관 운송 하였다. 채취된 시료는 멸균된 0.85% 생리식염수에 1 ml를 넣고 10¹~10⁴배로

희석하여 Marine Agar, Brain Heart Infusion Agar, Tryptic Soy Agar (MA, BHIA, TSA, Difco, USA)에 도말 하여 25°C에서 7일간 배양하였다. 배지 상에서 나타나는 균의 형태학적 모습을 관찰하여 분리하였으며 분리된 균주는 24% (v/v) glycerol에 현탁하여 -85°C에 보관 하였다.

어류 질병 세균에 대한 항균활성 탐색

분리된 균주에서 어류 질병 세균에 대한 항균활성을 탐색하기 위해 Disc Diffusion method를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 어류 질병 세균은 그람양성 2종(Gram-positive: *Streptococcus iniae* KCTC 3757, *Streptococcus parauberis* KCTC 3651), 그람음성 2종(Gram-negative: *Vibrio anguillarum* KCTC 2711, *Edwardsiella tarda* KCTC 12267)으로 생물자원센터 KCTC (Korean Collection for Type Culture)로 부터 분양 받았다. 분양 받은 병원균은 Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco, USA)에 접종하여 25°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 0.85% 생리식염수로 희석하여 0.5 McFaland 탁도로 맞춘 뒤 멸균된 면봉으로 Mueller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 도말 하였다. 분리된 14균주를 Marine Broth (MB, Difco, USA)에 배양한 후, 원심분리기(Micro 17TR, Hanil, Korea)를 사용하여 4,745x g, 15 min간 원심하였고 분리한 상층액을 8 mm paper disc에 50 µl를 적하하여 건조 시켰다. 그 뒤 어류질병균이 도말된 MHA에 일정간격으로 올려놓고 25°C에서 24시간 배양 후 형성된 억제존(Clear zone)의 지름(mm)을 측정하였다. 또한 이전 연구결과[8, 20]에서 *S. iniae*에 대한 항균활성이 높은 균주를 분양 받아 비교실험을 하였다.

양식장에서 주로 사용하는 항생제 5종(Neomycin, Gentamicin, Tetracycline, Oxytetracycline, Erythromycin) (Sensi-Disc, BBL, USA)을 사용하여 *S. iniae*에 대한 항생제 감수성 테스트를 수행하였다.

최소억제농도 측정

*S. iniae*에 대한 최소억제농도를 확립하기 위하여 항균활성이 가장 높은 균주의 배양액을 14,240× g, 10분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 여과한 후 농축기(HS-2001N, HAHN SHIN, Korea)를 사용하여 농축하고 동결건조를 한 뒤 3차 멸균 증류수로 단계희석 하여 농도별로 적하 하였다. 24시간 배양 후 분광광도계(GB/Libra S22, Biochrom, USA)를 사용하여 660 nm에서 Optical density (O.D)값을 측정하였다.

형태학적 및 생화학적 동정

어류질병세균에 대하여 가장 뛰어난 항균활성을 보여 선발된 균주의 형태학적 동정을 위해 scanning electron microscope (JSM-6700F, JEOL Ltd., Japan) 촬영 및 그람 염색을 수행하였으며, casein, starch, nitrate 환원 실험, catalase, urease 가수분해 실험, oxidase test, hemolytic, Tween 40, 80, indole

생성능, Voges-proskauer test, Methyl Red test, Citrate utilization test 및 API 50 CHB Kit (BIOMERIEUX, USA)를 사용하여 생화학적 동정 및 당 이용능을 조사하였다.

최적배양조건 탐색

선발된 균주의 최적생육조건을 알아보기 위해 온도, NaCl, pH를 각각 설정하여 실험을 수행하였다. 배양 온도는 15~40°C(5°C 간격), NaCl 농도 1~5%, pH는 2.0~9.0 범위로 각각 설정하여 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, USA)배지를 제조하였다. 제조한 배지에 균주를 접종 후 24시간 동안 배양하여 660 nm에서 생육도를 측정하였다. 선발 균주의 최적 배지성분의 검토는 GY배지(glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02%)를 사용하였다[6]. 탄소원은 glucose, sorbitol, mannose, soluble starch, lactose, fructose, sucrose, 질소원은 yeast extract, malt extract, peptone, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, 무기염은 NaCl, MgSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, K₂HPO₄, FeSO₄·7H₂O를 각각 1%씩 첨가하여 25°C에서 24시간 배양한 후 660 nm에서 생육도를 측정하였다.

분자생물학적 동정(16S rDNA계통분석)

선발된 균주의 DNA는 Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, USA)를 사용하여 추출하였다. 균주의 16S rDNA 유전자 증폭을 위해 primer는 27 Forward primer와 1492 Reverse primer를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 초기 변성단계 5분, 94°C에서 변성단계 1분, 55°C에서 결합단계 1분, 72°C에서 합성단계 1분으로 총 30 cycle, 최종 합성단계로 72°C에서 5분 PCR (US/MYGein32, MJ RESEARCH, USA)을 실시하였다. 증폭된 16S rDNA는 ㈜솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석 하였다. 분석된 염기서열은 미국 국립생물정보센터인 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program에서 Genbank database와 Ez Taxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)의 database를 이용하여 유사한 염기서열을 비교하였으며 가장 근연속 또는 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 결정된 염기서열과 database에서 확인한 표준 미생물 염기서열을 ClustalW software로 multiple alignment를 수행하고 Mega 5.0 software 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

결 과

해양유래 미생물 분리

채집된 해수를 연속희석법으로 분리 배양하여 미생물의 colony의 성장에 따라 총 14 균주를 분리하였다(Table 1).

Table 1. Marine bacteria isolated from the seawater samples

Strain	Bacteria	Color	Medium
MK-01	<i>Ponticoccus gilvus</i> (NJ12171)	Opaque yellow	MA
MK-02	<i>Bacillus infantis</i> (KF010512)	Opaque white	MA
MK-03	<i>Alteromonas</i> sp. (X86461)	☞Yellow	MA
MK-04	<i>Alteromonas marina</i> (JQ409379)	☞Vivid yellow	MA
MK-05	<i>Bacillus tequilensis</i> (KF683171)	☞White	MA
MK-06	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (KF776137)	Chrome yellow	MA
MK-07	<i>Bacillus subtilis</i> (KC961634)	Opaque white	MA
MK-08	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (X86466)	☞Yellow	MA
MK-09	<i>Mycobacterium obuense</i> (JQ660308)	Red	MA, BHIA
MK-10	<i>Pseudomonas elodea</i> (NZ_AGF0100104)	Colorless	MA
MK-11	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (JF747221)	Light yellow	MA, BHIA, TSA
MK-12	<i>Shewanella</i> sp. (DQ531951)	Stale yellow	MA
MK-13	<i>Mycobacterium</i> sp. (U46146)	Orange	MA, BHIA
MK-14	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (AF18245)	Light yellow	MA

어류질병에 대한 항균활성 탐색

본 연구에서 항균활성 테스트 결과 MK-08은 *S. iniae*에서만 항균활성을 보였다. MK-11 균주는 *S. parauberis*, *S. iniae*, *V. anguillarum*에서 항균활성을 보였고 특히 *S. iniae*에서 가장 높은 항균활성을 나타냈다. MK-08, MK-11 균주를 제외한 다른 균주에서는 항균활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과를 토대로 *S. iniae*에 대하여 가장 우수한 항균활성을 보인 MK-11을 선정하여 최소억제농도를 측정된 결과 250 µg/ml의 농도로 나타났다(Table 2).

또한 타 균주와의 항균활성 비교 결과 넙치 장으로부터 분리된 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1, 발효식품으로부터 분리한 *Bacillus* sp. IS-2보다 MK-11이 높은 항균활성을 나타내었다. 또한 Gentamicin, Neomycin, Oxytetracycline과 비슷한 항균

활성을 나타내었다(Table 3).

형태학적 및 생화학적 동정

MK-11은 그람양성 간균의 형태를 보였으며, 크기는 2.0 µm으로 나타났다(Not data). Colony는 동그란 모양의 연한 노란색을 띄었다. 호기성을 띄었으며 Casein, Starch, Catalase 가수분해, Nitrate 환원 실험, Voges-prokauer test 및 Methyl Red test에도 모두 양성을 보였고, Tween 80을 수해시킬 수 있었으며, indole 생산능 및 탄소원으로써 citrate를 활용할 수 있었다(Table 4). API 50CHB Kit를 사용하여 MK-11의 당 및 당 알코올 분해로 인한 산 생성능을 확인한 결과 D-mannitol과 D-sorbitol을 포함한 24개의 기질로부터 당자화에 의해 산을 생성하는 것으로 나타났다(Table 5).

Table 2. The antibacterial activity comparison with the isolated strain about fish pathogens and minimum inhibitory concentration (MIC) result

Fish disease bacteria	Isolated strains (inhibition zone (mm))				MIC
	MK-08 (50 µl)	MK-11 (50 µl)	CY-2	IS-2	MK-11
<i>S. iniae</i>	14	20	14.2	18.2	250 µg/ml
<i>S. parauberis</i>	-	15	16.2	8.9	ND
<i>E. tarda</i>	-	-	10.1	13.5	ND
<i>V. anguillarum</i>	-	11	11.1	18.4	ND

The isolated other bacteria strains didn't show antibacterial activity. (ND) CY-2, *Lactobacillus rhamnosus*, IS-2, *Bacillus* sp.

Table 3. Antibiotics resistance of *Streptococcus iniae*

Antibiotics	Concentrations (µg)	Diameter of inhibition zone (mm)			<i>S. iniae</i>
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive	
Gentamicin (10 µg)	10	≤12	13~14	15≥	19 mm
Erythromycin (15 µg)	15	≤13	14~22	23≥	26 mm
Neomycin (10 µg)	10	≤12	13~16	17≥	20 mm
Oxytetracycline (30 µg)	30	≤14	15~18	19≥	20 mm
Tetracycline (30 µg)	30	≤14	15~18	19≥	23 mm

Table 4. General physiological characteristics of isolated *Paenibacillus* sp. MK-11

Morphological and biochemical identification	
MK-11	
cell size	~ 2µm
motile spores	-
colony color	light yellow
Gram test	+
anaerobic conditon	-
Haemolytic	-
Casein	+
Starch	+
Nitrate	+
Urease	-
Oxidase	-
Catalase	+
Tween 40	+
Tween 80	+
indole test	+
Voges-proskauer test	+
Methyl Red test	+
Citrate utilization	+

Table 5. The biochemical characteristics of *Paenibacillus* sp. MK-11 by API 50CHB KIT test

Carbohydrate source	strain	
	MK-11	
Glycerol	-	Salicin +
Erythritol	-	D-celiobiose +
D-arabinose	-	D-maltose +
L-arabinose	-	D-lactose(bovine origin) +
D-ribose	+	D-melibiose +
D-xylose	+	D-saccharose(sucrose) +
L-xylose	+	D-TREhalose +
D-adonitol	-	Inulin +
Methyl-βD-xylopyranoside	-	D-melezitose -
D-galactose	+	D-raffinose +
D-glucose	+	Amidon(starch) +
D-fructose	+	Glycogen +
D-mannose	+	Xylitol -
L-sorbose	-	Gentiobiose +
L-rhamnose	-	D-Turanose +
DULcitol	-	D-lyxose -
INOsitol	-	D-tagatose -
D-mannitol	+	D-Fucose -
D-Sorbitol	+	L-Fucose -
Methyl-αD-mannopyranoside	-	D-arabitol -
Methyl-αD-glucopyranoside	+	L-arabitol -
N-AcetylGlucosamine	-	potassium Gluconate -
Amygdalin	+	2-Keto gluconate -
Arbutin	+	5-Keto gluconate -
Esiculin ferric citrate	+	

최적배양조건 탐색

MK-11의 배양조건에 따른 생육 검토를 알아본 결과 20 ~ 35°C가 최적 생장온도로 나타났으며 25°C에서 가장 높은 생육도를 나타내었다(Fig. 1A). pH는 6.0에서 가장 높은 생육도를 보였으며(Fig. 1B), 1% NaCl이 첨가되었을 때 최고의 생육을

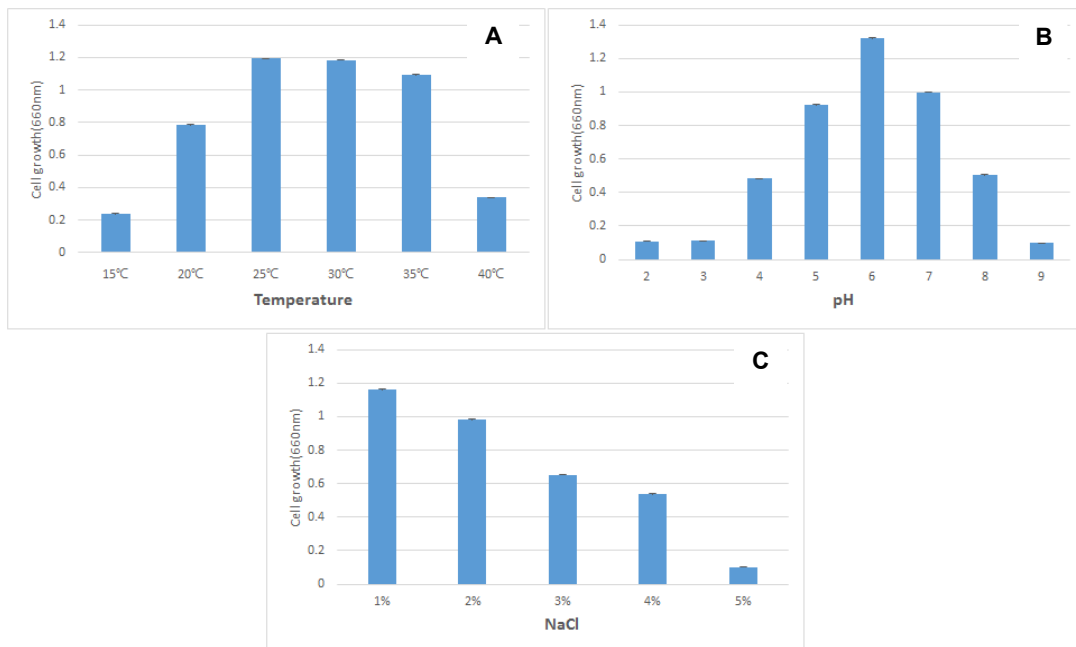


Fig. 1. The various cultivation test of the *Paenibacillus* sp. MK-11 strains. (A), 15~40°C; (B), pH 2.0~9.0; (C), NaCl 1~5%. The results showed highest with 25°C, pH 6.0, NaCl 1%.

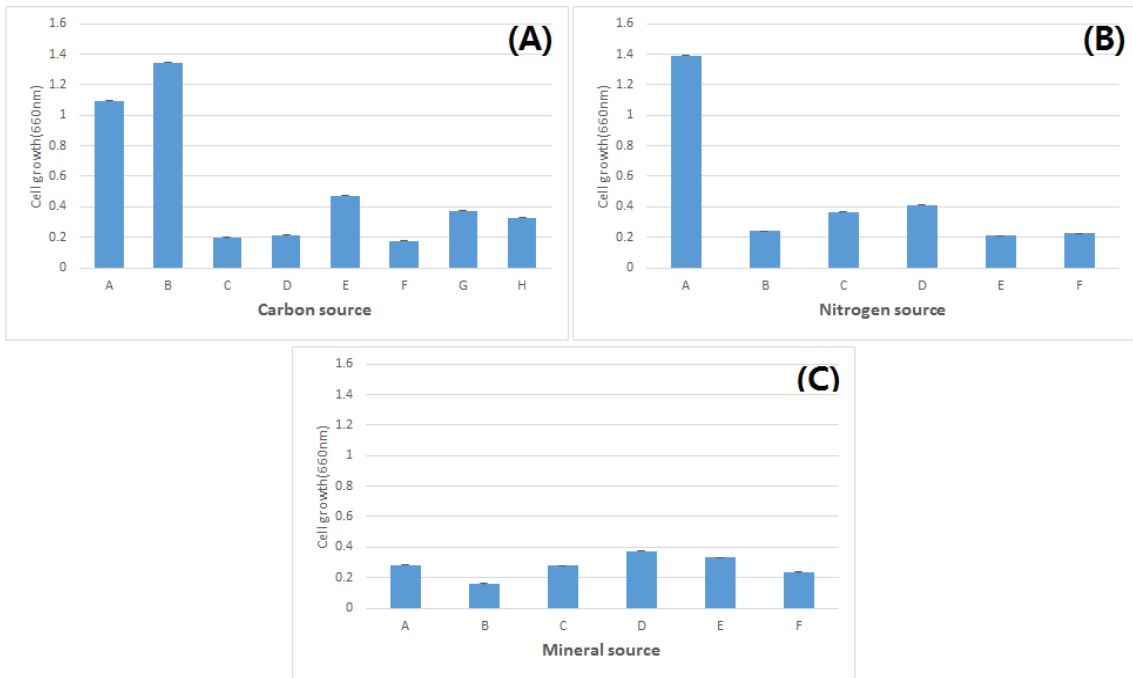


Fig. 2. The best cultivation according to the various nutrient of *Paenibacillus* sp. MK-11 strains. (A), Carbon source: A: Glucose, B: Sorbitol, C: Mannose, D: Soluble starch, E: Lactose, F: Fructose, G: Sucrose, H: Control; (B), Nitrogen source: A: Yeast extract, B: Malt extract, C: Peptone, D: NaNO₃ (=sodium nitrate), E: (NH₄)SO₄ (=Ammonium sulfate), F: Control; (C), Mineral source: A: NaCl (=Sodium chloride), B: MgSO₄·7H₂O (=Magnesium sulfate), C: CuSO₄·5H₂O (=Copper(II) sulfate), D: K₂HPO₄ (=dipotassium phosphate), E: FeSO₄·7H₂O (=Ferrous sulfate), F: Control. The results showed highest with sorbitol, yeast extract, K₂HPO₄.

보였다(Fig. 1C). 최적 배지에서는 탄소원은 sorbitol (Fig. 2A), 유기질소원에서는 yeast extract (Fig. 2B), 무기염은 dipotassium phosphate (Fig. 2C)의 이용능이 높았다.

lae (AJ271157) 99.43%, *Paenibacillus brasiliensis* (AF273740) 99.39%로 가장 높은 유사도가 나타났다(Fig. 3).

고 찰

16S rDNA계통분석

MK-11의 분석된 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 *Paenibacillus polymyxa* (JF747221)와 99.78%, *Paenibacillus jami-*

일반적으로 *Paenibacillus* sp.는 주로 토양[9, 21], 발효식품 [16], 식물뿌리[2], 해수퇴적층[12] 등 다양한 환경으로부터 분

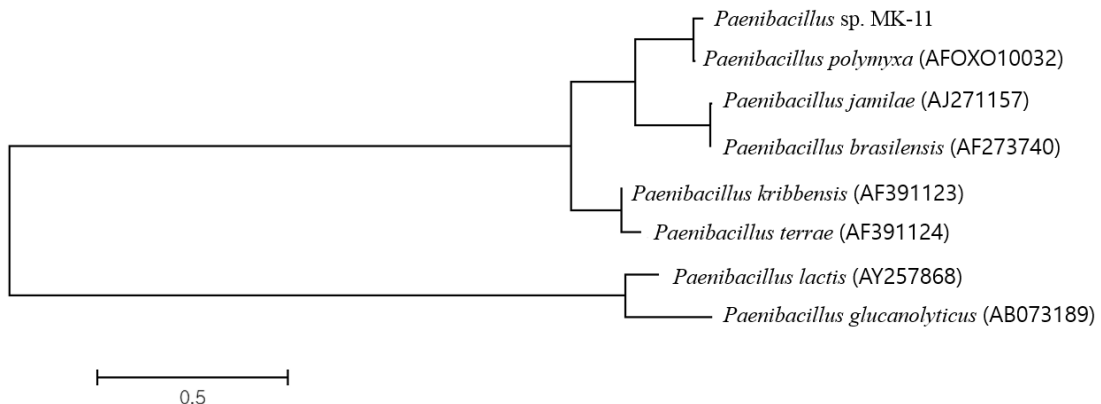


Fig. 3. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence of *Paenibacillus* sp. MK-11. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences showing the position of strain *Paenibacillus* sp. MK-11. Bootstrap percentage (from 1,000 replications)>50% are shown at branch points.

리되는 만큼 나타나는 항균물질도 매우 다양하다. 이전 연구 결과 발효식품으로부터 분리한 *Paenibacillus* sp.는 probiotics로 활용되고 있으며[3], *P. polymyxa* OSY-DF는 Polymyxin E1, Lantibiotic, Paenibacillin을 생산하여 식물의 세균성 질병에 대한 항균활성이 보고된 바 있다[7]. 그리고 토양에서 분리된 *P. polymyxa* Jsa-9이 생산하는 Polymyxin B6와 *P. polymyxa* DY-5, DY-1의 경우 식물성 질병 중 그람양성균과 진균에 대한 항균활성을 보였다[4, 11, 21].

해수 퇴적층으로부터 *Paenibacillus* sp. 와 *P. polymyxa*가 분리되었으며[5], *Paenibacillus* sp.는 그람음성균인 *Vibrio* sp.에 대해 항균작용이 보고된 바 있으나[18], 그람양성균에 대한 항균활성 연구결과는 없었다. 또한 다양한 패턴의 항균작용을 갖는 *Paenibacillus* 속이 해수로부터 분리된 경우는 드물며, 어류질병에 관한 항균활성 연구 또한 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 해수로부터 분리한 *Paenibacillus* sp.를 이용하여 어류질병에 대한 항균활성을 평가하고자 하였다.

분리된 미생물 중 어류질병세균에 대해 항균활성을 보이는 균주를 선별하였고, 그 중 *Paenibacillus* sp. MK-11 균주가 그람양성균인 *S. iniae*에 가장 높은 항균활성을 보였다. 항생제 디스크와 비교한 결과 거의 비슷한 수준의 항균활성능을 보여주는 것으로 나타났으며, 이는 기존 항생제를 대체할 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

*S. iniae*에 대한 항균활성이 있는 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 [20], *Bacillus* sp. IS-2 [8], 약용식물의 Ethanol 추출물과 Essential oil[17]보다 *Paenibacillus* sp. MK-11이 더 높은 활성을 나타냈다.

최소억제농도를 측정한 결과 250 µg/ml로 나타났다. 이는 식물로부터 추출한 Essential oil의 320 µg/ml에 비해 낮은 농도임을 알 수 있었다[17].

API 50CHB Kit를 이용하여 당 및 당알코올로부터 산 생성능을 분석한 결과 토양에서 분리된 *Paenibacillus polymyxa* DY-1 와 비교하였을 때 D-mannitol과 D-sorbitol로부터 산을 생성하지 못하였으나 본 연구에서 분리된 *Paenibacillus* sp. MK-11 산을 생성하는 것을 알 수 있었다[21].

항생제 내성균주인 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)에 대하여 항균활성을 나타낸 *P. incheonensis*의 경우 NaCl 0~2%의 생육 범위[22]를 나타내었으나, 본 연구에서 사용한 *Paenibacillus* sp. MK-11은 최대 4%의 NaCl 첨가 배지에서 생장이 관찰되었다. 이는 실험균주의 생장에 어느 정도의 염분이 필요한 것으로 생각할 수 있다. 또한 pH는 4.0~8.0로 나타났다.

최적 배양조건에 있어 탄소원과 질소원에 따른 배양학적 차이도 알 수 있었다. 산간지대에서 분리한 *Paenibacillus* sp. BCNU5011 [9], 일반토양에서 분리된 *P. incheonensis* YK5 [22]는 탄소원으로 Dextrose를 이용하는 반면 본 연구의 *Paenibacillus* sp. MK-11은 sorbitol의 이용능이 더 높았다. 유기질소원

에서도 peptone의 이용능이 가장 높다고 보고됐지만[22], 분리된 *Paenibacillus* sp. MK-11는 yeast extract의 분해능이 더 높았다. 무기염에서는 dipotassium phosphate의 분해능이 높게 나타났다.

따라서 해수에서 분리한 *Paenibacillus* sp. MK-11은 이전 연구와 다른 다양한 생화학적 특성을 가지고 있으며, 주요 어류 질병인 *S. iniae*에 대하여 높은 항균활성을 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 추후 *Paenibacillus* sp. MK-11의 항균물질 추출과 항균작용기전, 항균물질의 독성에 대한 안전성 연구를 진행하여 양식산업에 적용하여 항생물질로서의 이용 가능성을 평가하고자 한다.

감사의 말

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행되었으며 이에 대해 깊은 감사를 드립니다. (NRF-2013H1B8A2032163)

References

1. Arasu, M. V., Duraipandiyan, V. and Ianacimuthu, S. 2013. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere* **90**, 479-487.
2. Berge, O. L., Guinebreiere, M. H., Achouak, W. F., Normand, P. P. and Heulin, T. R. 2002. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 607-616.
3. Choi, H. J., Kim, D. W. and Joo, W. H. 2014. Characteristics of *Paenibacillus* sp. BCNU5016 as a novel probiotic. *J Life Sci* **24**, 161-166.
4. Deng, Y., Lu, Z. X., Bi, H., Lu, F. X., Zhang, C. and Bie, X. M. 2011. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B₆ produced by *Paenibacillus polymyxa* strain Jsa-9. *Peptides* **32**, 1917-1923.
5. Gontang, E. A., Fenical, W. and Jensen, P. R. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3272-3282.
6. Han, Y. J. 2011. Isolation and identification of marine Actinomycetes and antibiotic-resistance pathogenic bacteria for antimicrobial activity. M.D. dissertation, Jeju National University, Jeju, Korea.
7. He, Z. G., Kislal, D. G., Zhang, L. W., Yuan, C. H., Green-Church, K. B. and Yousef, A. E. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* **73**, 168-178.
8. Jang, I. S. 2012. Isolation and cultural characterization of antibacterial substance produced bacterium, *Bacillus* sp. IS-2 and supplementation infeed on immune response, disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* M.D. dis-

- sertation, Jeju National University, Jeju, Korea.
9. Joo, W. H., Choi, H. J., Kim, Y. E., Bang, J. H., Kim, D. W., Ahn, C. S. and Jeong, Y. K. 2011. Characterization of an indigenous antimicrobial substance-producing *Paenibacillus* sp. BCNU5011. *KSBB J* **26**, 100-106.
 10. Kim, H. Y., Weon, H. Y., Kim, W. G. and Yoo, K. H. 2009. Identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY5 with antifungal activity against crop pathogenic fungi. *Korean J Mycol* **37**, 181-188.
 11. Lal, S. H. and Tabacchioni, S. V. 2009. Ecology and biotechnological potential *Paenibacillus polymyxa*. a minireview. *Indian J Microbiol* **49**, 2-10.
 12. Lee, J. N., Shin, N. R., Jung, M. J., Roh, S. W., Kim, M. S., Lee, J. S., Lee, K. C., Kim, Y. O. and Bae, J. W. 2013. *Paenibacillus oceanisediminis* sp. nov. isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 428-434
 13. Moon, Y. G. 2009. Diversity of marine microorganisms isolated from intertidal zone in the summer season of Jeju Island. Ph.D. dissertation, Jeju National University, Jeju, Korea.
 14. Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Ann Rev Fish Dis* **3**, 145-185.
 15. Park, S. I. 2009. Disease control in Korean aquaculture. *Fish Pathol* **44**, 19-23.
 16. Piuri, M., Sanchez-Rivas, S. and Ruzal, S. M. 1998. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett Appl Microbiol* **27**, 9-13.
 17. Pirbalouti, A. G., Broujeni, V. N., Momeni, M., Poor, F. M. and Hamed, B. 2011. Antibacterial activity of Iranian medicinal plants against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Biol Sci Belgrade* **63**, 59-66.
 18. Rattanachaiakunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2010. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Sci* **76**, 287-293.
 19. Ravi, A. V., Musthafa, K. S., Jegathammal, G., Kathiresan, K. and Pandian, S. K. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Lett Appl Microbiol* **45**, 219-223.
 20. Song, C. Y. 2013. Isolation and culture condition characterization of antibacterial substance produced bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* CY-1; its probiotic effect. M.D. dissertation, Jeju National University, Jeju, Korea.
 21. Yoo, K. H., Shin, E. S., Lee, B. K., Kim, S. H. and Kwon, S. I. 2007. Identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY1 isolated from Korean soil with new antibacterial activity. *Korean J Microbiol* **43**, 47-53.
 22. Yoo, Y. J., Kim, H. Y., Lee, T. S. and Kim, J. W. 2008. Isolation and characterization of a *Paenibacillus incheonensis* YK5 with antimicrobial activity against MRSA. *Korean J Microbiol* **44**, 326-332.

초록 : 제주연안으로부터 분리한 *Paenibacillus* sp. MK-11의 어류 질병 세균에 대한 항균활성 탐색

김민선¹ · 박소현¹ · 김동휘¹ · 허문수^{1*}

(¹제주대학교 해양의생명과학부 수산생명의학전공)

제주 연안에서 분리한 해양유래미생물 14종을 이용하여 어류질병세균 4종에 대해 항균활성을 탐색하였다. 그 결과, MK-11이 그람양성균인 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*에 대하여 항균활성을 나타내었다. 특히 *S. iniae*에 대해 뛰어난 활성을 보였으며 최소 억제 농도는 250 µg/ml로 나타났다. 최적 성장 조건은 25°C, pH 6.0, 1% NaCl로 나타났으며, 최적 배지 조건은 탄소원 sorbitol, 질소원 yeast extract, 무기염 dipotassium phosphate (K₂HPO₄)으로 나타났다. API 50CHB kit 결과, D-sorbitol 과 D-mannitol을 추가적으로 분해하여 산을 생성하였다. 16S rDNA 염기서열 분석결과, MK-11은 *Paenibacillus polymyxa*, *P. jamilae*, *P. rasilensis* 와 각각 99.78%, 99.43%, 99.39%의 유사도를 나타내었다. 이처럼 다양한 특성을 지닌 *Paenibacillus* sp. MK-11은 그람양성균에 대한 새로운 항생물질로서의 이용가능성을 보였으며, 추가 연구를 통해 *in vivo*에 적용 가능할 것으로 사료된다.