

## 항생제 다제내성균 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 생육저해물질 생산 방선균의 분리 및 항균활성

강동희, 배호경, 김현수\*

### Isolation and Antibacterial Activity of Actinomycetes Producing Growth Inhibition Compounds Against Multi-antibiotic Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*

Kang, Dong Hee, Ho-Kyung Bae, and Hyun-Soo Kim\*

접수: 2010년 10월 26일 / 게재승인: 2011년 2월 24일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Of the 500 Actinomycetes isolates obtained from soil, one isolate grown on maltose as the sole carbon source produced compound BHK-P19, which inhibited the growth of multiple drug resistant *P. aeruginosa* 0245. Ultraviolet radiation mutagenesis curtailed production of BHK-P19. Mutation of the BHK-P19 producer using N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine obviated the antibacterial activity to *P. aeruginosa* 0245, but not towards *P. aeruginosa* 0225. The mixing of BHK-P19 and BHK-S5 culture extracts inhibited *P. aeruginosa* 0254, 0225 and 1113. The combined application of BHK-P19 culture extract and *Schizandra chinensis* Baillon extract inhibited *P. aeruginosa* 0254, 0225, 0826, 1113, 1378, 1731 and 2492. Use of various concentrations of BHK-P19 culture extract and ampicillin markedly increased antibacterial activity against multi-drug resistant *P. aeruginosa* 1113.

**Keywords:** multi-antibiotic resistance, *pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, actinomycetes

#### 1. 서론

의학의 진보는 과거 불치병으로 알려졌던 많은 질환의 치료를 가능하게 하면서 인간의 생명연장과 질병에 의한 고통, 장애요인을 감소시켜 인간의 존엄성을 유지하는데 이바지하였다. 그러나 한편으로는 감염에 취약한 노령인구의 증가, 만성 퇴행성 질환자의 증가, 항생제 남용 및 장기간의 항생제 사용으로 인한 항생제 내성균 증가, 각종 인체 내 삽입술의 확대 등 의학이 발달 할수록 병원감염은 급속히 증가하고 있어 매우 심각한 문제점을 야기 시키고 있다.

원내 감염은 일반병동보다는 중환자실이나 면역저하환자 대상병동에서 병원감염률이 높게 발생하는 경향을 보여주고 있으며, 특히 중환자실은 일반 입원실보다 약 6배 높게 발생하는 것으로 보고되고 있다 [1]. 국내 병원 내 감염보고에서 나타난 균주 중 가장 많은 것은 *Staphylococcus aureus* (20~22%)이며 그 다음으로 많이 분리되는 균이 *Pseudomonas aeruginosa* (8~18%)이다. 그 외에도 *Escherichia coli*, *Serratia*, *Actinobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Streptococcus* 등이 분리되고 있다 [2,3,4]. 이 중에서 *P. aeruginosa*는 건강한 사람의 소화기에 상재하며 피부, 비점막 (nasal mucosa) 및 인두 (throat) 등에서도 상재할 수 있으며 폐렴, 비노기계 감염, 창상감염, 패혈증 등의 원내감염의 원인이 된다 [5,6].

*P. aeruginosa*는 병원 내 폐렴 및 요로 감염에서 흔히 동정되는 Gram 음성 간균 (병원성 폐렴 18.1%, 요로감염 16.3%)으로 알려져 있으며, Gram 음성 간균에 의한 병원 균혈증에서도 *Escherichia coli*와 *Klebsiella spicies*에 이어 세 번

계명대학교 자연과학대학 미생물학과  
Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea  
Tel: +82-53-580-5284, Fax: +82-53-580-6447  
e-mail: hskim@kmu.ac.kr

제로 흔하며, 전체 균혈증의 7위를 차지할 정도로 드물지 않다 [7]. 이러한 *P. aeruginosa*에 의한 감염의 치료는 실제 임상에서 조기에 발견하여 적절하게 치료하는 것이 쉽지 않으며, *P. aeruginosa*에 의한 bloodstream infection은 심각하고 치명적일 수 있는 상태로 18%~62%의 사망률을 보여 균혈증으로 인한 사망의 경우 2위를 차지하는 것으로 알려져 있다 [8]. 오늘날 사용 중인 항생물질은 의학의 발달과 함께 지속적으로 발견, 개발되어 질병치료에 널리 사용되고 있으나, 점차 내성이 생긴 병원성 미생물이 출현하게 되면서 현 의학계에서는 심각성이 크게 대두되고 있는 실정이다. 특히 *P. aeruginosa*와 *Acinetobacter baumannii*의 경우 지금까지 Gram 음성 세균 감염의 치료의 최후의 보루로 여겨지던 carbapenem 계열의 항생제마저도 내성인 균주가 확산되어 큰 문제가 되고 있다 [9,10]. *P. aeruginosa*의 경우, 다수의 항생제 및 항균화학요법제에도 내성을 보이는 다제내성 녹농균 (MRPA, multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*)으로 폐렴이나 패혈증 등에 발병 시 치료가 힘든 내성균으로 분류되고 있다 [11,12]. 다제내성 *Acinetobacter* (multi drug resistant *Acinetobacter baumannii*, MRAB) [10,13]은 최근 일본에서 사망자가 보고되어 경각심을 야기 시켰으며, 새로운 내성 균주들의 출현에 따른 내성균 대처를 위한 항생물질의 개발은 빠르게 진행되고 있다. 현재의 항생물질요법의 기초를 이룬 penicillin의 실용화 이후 주로 방선균을 대상으로 새로운 항생물질의 탐색이 진행되고 있으며, 현재까지의 알려진 항생물질은 1만 여종에 이르고, 이 중에서 60% 이상이 방선균으로부터 생산되고 있다. 최근에는 방선균을 대상으로 암이나 바이러스에 의한 질병에 유효한 물질의 연구도 진행 중이며, 내성균이나 그람 음성균 등 특정 균주에 유효

한 신 항생물질이나 항생물질의 유도체 연구가 활발하게 이루어지고 있다 [14,15].

본 연구에서는 다제내성을 가진 병원성 *Pseudomonas*에 특이적으로 작용하는 항생물질을 개발하기 위한 기초연구로서 토양에서 항생제 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균성 물질을 생산하는 방선균을 분리하고, 다양한 조건 하에서 생산된 항균성 물질을 한약재 및 항생제와 혼합하여 항균 활성을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 방선균의 분리

방선균의 분리는 지리산 (35지역), 경북일대 및 대구 계명대학교 주위 (40지역)에서 채취한 토양을 사용하였다. 각각의 토양 시료 1 g을 멸균수 9 mL에 현탁 후  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ 으로 희석하여 oat meal 배지 (oat meal 15 g, agar 18 g/L)와 Humic acid - Vitamin (HV) agar 배지 [16]에 100  $\mu$ L씩 도말하고, 28°C에서 5~7일간 배양한 후 육안으로 colony 형태와 광학현미경을 통하여 500균주를 순수 분리하였다.

### 2.2. 시험균주

시험균주는 Gram 양성세균인 *Bacillus subtilis* PCI 219, Gram 음성세균인 *Escherichia coli* KCTC 1682와 항생제 다제내성균인 *P. aeruginosa*를 사용하였다. *P. aeruginosa*는 대구가톨릭대학교 병원 진단검사의학과 미생물부에서 환자의 가검물로부터 분리한 후 MicroScan<sup>®</sup>으로 항생제 감수성 검사를 실시하여 항생제 3종 이상에 대해 내성을 가지는

**Table 1.** Antibiotics sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* by MicroScan<sup>®</sup>

Antibiotics	Strains							
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	0225	0254	0347	0826	1113	1378	1731	2492
Sensitivity								
Amikacin	S	S	S	I	S	S	S	R
Ampicillin	-	R	R	-	-	I	-	S
Ampicillin/sulbactam	-	R	R	-	-	R	-	R
Aztreonam	R	R	R	I	I	S	I	S
Cefepime	S	I	I	R	S	I	I	S
Cefotaxime	R	-	-	R	R	-	R	-
Ceftazidime	I	I	R	I	I	S	I	S
Ceftriaxone	R	R	R	R	R	R	R	-
Cephalothin	-	R	R	-	-	R	-	R
Ciprofloxacin	-	S	R	S	S	R	R	R
Gentamicin	S	S	S	-	S	I	-	S
Imipenem	R	S	R	R	S	S	S	S
Levofloxacin	-	-	-	-	S	-	R	-
Meropenem	S	-	-	R	S	-	S	-
Piperacillin	-	R	R	-	-	S	-	S
Piperacillin/tazobactam	I	S	S	I	I	S	R	S
Ticarcillin/CA	R	R	R	R	-	S	R	S
Tobramycin	S	S	S	S	S	S	S	S
Trimethoprim/sulfametho	-	R	R	-	-	R	-	R

I: Intermediate, R: Resistant, S: Sensible, -: Untested.

8균주 (No. 0225, 0254, 0347, 0826, 1113, 1378, 1731, 2492)를 선별하여 사용하였으며, 8균주의 항생제 내성은 Table 1과 같다.

MicroScan<sup>®</sup>은  $Ca^{2+}$ 와  $Mg^{2+}$ 가 함유된 Mueller-Hinton 배지에 다양한 항생제가 희석되어 있어 검사 대상인 미생물의 최소억제농도 (MIC) 또는 정량적인 감수성 (Susceptible, Intermediate, Resistant)을 억제하는 가장 낮은 항균제 농도를 확인하는 것이 가능하다.

### 2.3. 항생물질 생산균주의 검색

토양에서 분리된 방선균 500균주는 항생물질 생산능을 확인하기 위해 본 연구실에서 주로 사용하는 항생물질 생산 배지인 A6 배지 (soybean meal 10 g, glucose 10 g, NaCl 5 g,  $CaCO_3$  1 g/L), SV 배지 (bacto casitone 7.5 g, yeast extract 7.5 g, glycerol 15 g, NaCl 2.5 g/L)와 YS 배지 (yeast extract 1 g, glucose 10 g, NaCl 5 g, bacto-soytone 10 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L)를 사용하여 각각의 배지 20 mL (100 mL erlenmeyer flask)에 분리균주의 slant로부터 1-2백금이 접종하여 28°C, 150 rpm에서 5일간 배양하였다. 시험균주는 LB 배지 (peptone 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 5 g/L, pH 6.8)와 Nutrient 배지 (beef extract 3 g, peptone 5 g/L, pH 6.8, Difco Co.)에 계대배양한 후 4°C에 보관하여 사용하였다. 항균성 물질 생산능은 agar diffusion법으로 측정하였으며, 배양액을 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액 20  $\mu$ L를 paper disc ( $\varnothing$  6 mm, Whatman Co.)에 첨가하여 일반 시험균주인 *B. subtilis* PCI 219와 *E. coli* KCTC 1682가 함유된 평판배지 위에 얹고 37°C에서 24시간 배양하여 inhibitory zone이 형성되는 균주를 1차로 선별하였다. 1차 선별균주는 YS 배지에 7일간 배양한 후 일반 시험균주인 *B. subtilis* PCI 219와 *E. coli* KCTC 1682에 항균 활성이 가장 우수한 균주를 공시균주로 선별하였으며, *Actinomycetes* BHK-P19로 명명하였다.

### 2.4. 항생물질 생산조건의 검토

공시균주 BHK-P19의 항균성 물질 생산에 미치는 탄소원의 영향은 YS 배지 20 mL (100 mL erlenmeyer flask)에 탄소원으로 glucose, maltose, saccharose, fructose, starch, lactose, mannose를 각각 1%씩 첨가하여 공시균주 BHK-P19의 포자 현탁액 ( $10^7$  spores/mL) 100  $\mu$ L를 접종 후 28°C, 150 rpm에서 7일간 배양한 후 항균활성을 측정하였다. 질소원의 영향은 선정된 탄소원이 첨가된 YS 배지에 각각 유기질소원으로 peptone, soytone, yeast extract, tryptophan 및 무기질소원으로  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4Cl$ 를 0.1% 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 배양한 후 항균활성을 측정하였다.

### 2.5. 항균성 물질의 추출 및 농축

항균성 물질은 공시균주 BHK-P19를 MS 배지 (yeast extract 1 g, maltose 10 g, NaCl 5 g, bacto-soytone 10 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L)에 접종하여 28°C, 150 rpm에서 7일간 배양한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양 상등액을 분리하고 rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo Rikakikai

Co. A-3S. Japan)를 이용하여 감압 농축한 후 멸균 증류수로 용해시켜 실험에 사용하였다. 항균성 물질의 추출은 배양 상등액에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 수행하였으며, 추출물의 농축은  $Na_2SO_4$ 를 적당량 첨가하여 수분을 제거 한 후 evaporator로 감압 농축하여 소량의 ethyl acetate에 용해시켜 실험에 사용하였다.

### 2.6. 변이주 분리

항균성 물질의 생산증대를 위하여 공시균주 BHK-P19의 포자 현탁액을 멸균수로  $10^4$ 으로 희석한 다음 oat meal 배지에 도말하여 각각 30초, 60초, 80초간 254 nm의 U.V.를 조사하여 28°C에서 7일간 배양하였다. U.V. 처리 후 생성된 colony 형태와 포자 색을 관찰하여 공시균주 BHK-P19와 다른 8균주를 선별하였으며, MS 배지에 접종하여 동일한 방법으로 항균 활성을 측정하였다.

NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 이용한 변이 처리는 공시균주 BHK-P19의 포자현탁액 ( $10^5$  spores/mL)을 12,000 rpm, 10분간 원심분리한 후 NTG가 첨가된 0.5 M Tris-maleate buffer (pH 7.0) 1 mL로 현탁하였다. 현탁액을 28°C에서 20분, 40분, 60분간 반응 시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 Tris-maleate buffer로 2회 세척하였다. 세척한 현탁액은  $10^3 \sim 10^5$ 으로 희석하여 SFM 배지 (mannitol 20 g, soya flour 20 g, agar 20 g/L)에 100  $\mu$ L씩 도말하여 28°C에서 7일간 배양하였다. 생성된 균주는 공시균주 BHK-P19와 비교하여 colony 형태와 포자색이 다른 19균주를 선별하였다. 분리균주는 MS배지에서 동일한 방법으로 배양하여 항균활성을 검토하였다.

### 2.7. 항균성 물질의 혼합에 따른 항균활성

공시균주 BHK-P19가 생산하는 항균성 물질은 다른 방선균 배양액의 ethyl acetate 추출물, 한약재 추출물 및 기존의 항생제와 혼합하여 항균활성을 확인하였다. 다른 방선균은 1차 균주 선별에서 *B. subtilis* PCI 219에 항균활성을 강하게 나타낸 10균주를 선별하여 SV 배지 20 mL에 각 균주를 접종한 후 28°C, 150 rpm에서 7일간 배양하였다. 항균성 물질 추출은 공시균주 BHK-P19 배양액의 추출과 동일한 방법으로 수행하였다. 추출물은 소량의 ethyl acetate를 사용해 10 mg/mL 농도로 용해시켜 공시균주 BHK-P19의 ethyl acetate 추출물 (10 mg/mL)과 각각 10  $\mu$ L씩 (total 20  $\mu$ L) 혼합 후 시험균주에 대한 항균활성을 측정하였다.

한약재 추출물과 혼합 시 항균활성은 선행 연구결과를 참조하여 *P. aeruginosa*에 항균활성이 알려진 한약재 (형개, 황금, 조협, 백질려, 오미자, 감조, 마황, 방풍, 고삼, 박하)를 사용하였다. 각 한약재 10 g에 methanol 100 mL를 첨가하여 24시간 실온에서 추출한 후 여과, 감압 농축하였으며, 10 mg/mL의 농도로 조제하여 공시균주 BHK-P19의 ethyl acetate 추출물 (10 mg/mL)과 각각 10  $\mu$ L씩 혼합 후 시험균주에 대한 항균 활성을 측정하였다.

기존 항생제와 혼합 시 항균활성은 항생제 다제내성 균주인 *P. aeruginosa* 8균주에 대하여 항균력이 약한 apramycin, ampicillin, cholramphenicol과 nalidixic acid을 선정하여

**Table 2.** Antibacterial activity of BHK-19 on various carbon sources

Carbon sources	Incubation time (days)	Strains									
		<i>E. coli</i> KCTC 1682	<i>B. subtilis</i> PCI 219	<i>P. aeruginosa</i>							
				A	B	C	D	E	F	G	H
Inhibitory zone (∅, mm)											
Glucose		8	9	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose		11	10	10	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose		8	9	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	7	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch		8	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose		10	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose		8	9	-	-	-	-	-	-	-	-

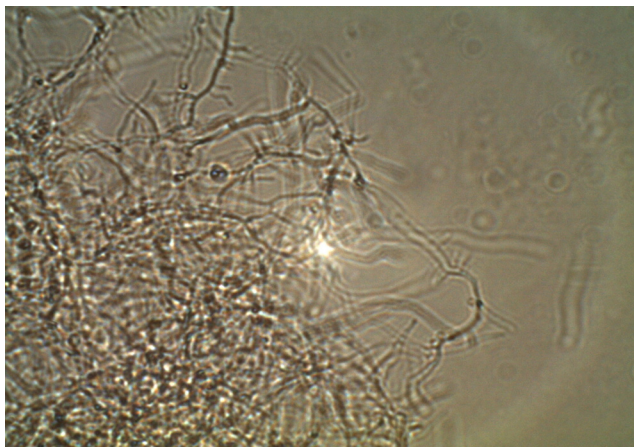
A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492, -: No inhibition.

수행하였다. 공시균주 BHK-P19 배양 추출액 (10 mg/mL)을 각각의 항생제 농도 (0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL)에 따라 각각 10 µL씩 동량 혼합 후 시험균주에 대하여 항균활성을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 항균성 물질 생산균주의 분리

다양한 토양시료로부터 500 균주의 방선균을 분리하였으며, 이들 분리균주 중 항균성 물질 생산균주는 A6 배지, SV 배지와 YS 배지에 7일간 배양 후 배양액 중 일반 시험균주 *B. subtilis* PCI 219와 *E. coli* KCTC 1682에 항균활성이 우수한 20 균주를 1차 선별하였다. 선별한 20 균주를 YS배지에 접종하여 3~7일간 배양한 결과 배양 7일째 항균활성이 가장 우수한 균주를 선별하였으며 (결과 미공개), 광학현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1에 보는 바와 같이 균사의 발육상태가 양호하고 전형적인 방선균 형태를 보여 *Actinomycetes* BHK-P19라고 명명하였다.



**Fig. 1.** Micrograph of BHK-19 mycelia (× 1000).

#### 3.2. 항균성 물질의 생산조건

공시균주 BHK-P19의 항균성 물질 생산성 증대를 위한 탄소원의 영향은 YS배지의 glucose 대신 여러 가지 탄소원을 1%

첨가한 후 7일간 배양하여 항균활성을 확인하였다. Table 2에서 보인 바와 같이 공시균주 BHK-P19는 탄소원으로 maltose를 사용하였을 때 항생제 다제내성 *P. aeruginosa* 8균주 중 0254 균주에 항균활성 (∅, 10 mm)을 나타내었다. 또한 일반 시험균주인 *E. coli* KCTC 1682와 *B. subtilis* PCI 219에 항균활성이 각각 11 mm와 10 mm로 가장 강한 결과를 나타내었다. 나머지 탄소원은 *E. coli* KCTC 1682와 *B. subtilis* PCI 219에 저지원 8~10 mm의 항균력을 보였으나, 항생제 다제내성 *P. aeruginosa*에는 항균력을 보이지 않았다. 질소원의 영향은 탄소원으로 maltose가 첨가된 YS배지에 각종 질소원을 0.1%가 되도록 첨가하여 7일간 배양하여 항균성 물질 생성능을 조사한 결과 항균력의 변화를 보이지 않았다 (결과 미공개). 이 결과에서 공시균주 BHK-P19의 배양은 YS배지에 탄소원으로 maltose (MS배지)를 사용하여 실험을 수행하였다.

#### 3.3. 공시균주 BHK-19의 변이주 분리

공시균주 BHK-P19의 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균력 증대를 위해 U.V. 및 NTG를 사용하여 변이주를 분리하였다. 그 결과 U.V. 처리 시는 우수한 균주를 분리하지 못하였으나 (결과 미공개), NTG 처리 시에는 분리된 19 균주를 MS 배지에 7일간 배양한 후 시험균주에 대한 항균활성을 확인하였다. 변이균주 중 BHK-N14 균주는 공시균주 BHK-P19가 항생제 다제내성 *P. aeruginosa* 0245를 저해하는 것 (Table 2)과 다르게 Table 3에서 보는 바와 같이 *P. aeruginosa* 0225에 항균활성을 보였다. *E. coli* KCTC 1682와 *B. subtilis* PCI 219에 대한 BHK-N14 균주의 항균활성은 각각 11 mm와 10 mm으로 나타났다.

**Table 3.** Antibacterial activity of isolated mutant BHK-19 by NTG treatment

Mutant	Strains										
	<i>E. coli</i> KCTC 1682	<i>B. subtilis</i> PCI 219	<i>P. aeruginosa</i>								
			A	B	C	D	E	F	G	H	
Inhibitory zone (∅, mm)											
N14	10	11	-	10	-	-	-	-	-	-	-

A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492, -: No inhibition.

**Table 4.** Antibacterial activity of mixture by BHK-19 and another strain culture extract

Strains	Test sample									
	BHK-19 (10 mg/mL) + Another culture extract (10 mg/mL)									
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10
	Inhibitory zone (∅, mm)									
<i>E. coli</i> KCTC 1682	8	-	10	-	8	8	11	10	9	-
<i>B. subtilis</i> PCI 219	14	12	16	13	13	11	10	10	11	12
<i>P. aeruginosa</i>	A	-	-	-	10	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	9	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	8	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492, -: No inhibition.

**3.4. 항균성 물질의 혼합에 따른 항균활성**

공시균주 BHK-P19가 생산하는 항균성 물질은 배양액만으로 내성균 *P. aeruginosa* 0245를 제외하고 저해활성을 보이지 않아 (Table 2) 다양한 유래의 항균성 물질을 실험재료 및 방법에 따라 ethyl acetate로 추출, 농축하여 혼합처리 후 항균활성을 검토하였다.

**3.4.1. 다른 방선균유래 항균성 물질과의 항균활성**

공시균주 BHK-P19의 항균성 물질은 MS배지에 7일간 배양한 후 ethyl acetate로 추출하여 10 mg/mL의 농도로 하여 사용하였으며, 분리한 다른 방선균 10 균주 배양액의 ethyl acetate 추출물 (10 mg/mL)과 각각 10 µL (total 20 µL)씩 paper disc에 첨가하여 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 공시균주 BHK-P19와 다른 방선균 유래 항균성 물질의 혼합은 BHK-S4 균주와 BHK-S7 균주의

항균성 물질을 제외하고 *E. coli* KCTC 1682에 대한 항균활성이 떨어졌으며, *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균활성은 상승하였다. 공시균주 BHK-P19와 BHK-S5 균주의 항균성 물질 혼합은 내성균 *P. aeruginosa* 0254, 0225와 1113에 각각 10 mm, 9 mm와 8 mm의 항균활성을 나타내었으며, 첨가농도별 항균활성은 Table 5에서 보는 바와 같이 1 mg/mL와 2.5 mg/mL의 농도에서 *B. subtilis* PCI 219에만 나타났고, 5 mg/mL의 농도에서는 *P. aeruginosa* 0225에 8 mm의 항균활성을 나타내었다. 공시균주 BHK-P19의 항균성 물질은 단독으로 사용하기보다 BHK-S5 균주의 항균성 물질과 함께 각각 10 mg/mL의 농도로 혼합하여 사용 시 다양한 내성균 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성이 상승하는 것으로 확인되었다.

**3.4.2. 한약재 유래 항균성 물질과의 항균활성**

한약재 추출물은 10 mg/mL의 농도에서 *E. coli* KCTC 1682, *B. subtilis* PCI 219와 다제내성 *P. aeruginosa*에 항균효과가 없었다 (결과 미계재). 공시균주 BHK-P19의 항균성 물질과 혼합 시 한약재 추출물의 농도는 상승효과를 확인하기 위해 항균효과가 없었던 10 mg/mL로 하였으며, 공시균주의 ethyl acetate 추출물 (10 mg/mL)과 각각 10 µL씩 (total 20 µL) 혼합 후 시험균주에 대한 항균활성을 확인하였다. 그 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 공시균주의 ethyl acetate 추출물과 한약재 추출물의 혼합은 백질려 추출물을 제외하고 *E. coli* KCTC 1682에 대한 항균활성이 떨어졌으며, *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균활성은 황금, 조협, 백질려, 오미자, 방풍 및 박하 추출물을 각각 혼합 시 상승하였다. 공시균주 BHK-P19의 ethyl acetate 추출물과 오미자 추출물 (e)의 혼합 시 항균활성은 항생제 다제내성 *P. aeruginosa* 1113, 0225, 1731, 0254, 2492, 1378과 0826에 8~10 mm로 나타나 항균활성 상승효과가 가장 우수하였고, 감초 (f)와 고삼 (i)에서도 *P. aeruginosa* 1113에 각각 10 mm와 11 mm로 나타나 항균활성 상승효과를 확인하였다. 공시균주 BHK-P19의 ethyl acetate 추출물은 오미자 추출물과 혼합처리 시 다수의 내성균에 항균활성 상승효과가 있으며, 감초와 고삼을

**Table 5.** Antibacterial activity of extract mixture concentration by BHK-19 and strain S-5

Strains	Concentration (mg/mL)			
	BHK-19 + Strain S-5			
	1 + 1	2.5 + 2.5	5 + 5	10 + 10
	Inhibitory zone (∅, mm)			
<i>E. coli</i> KCTC 1682	-	-	-	8
<i>B. subtilis</i> PCI 219	11	12	13	13
<i>P. aeruginosa</i>	A	-	-	10
	B	-	-	8
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	8
	F	-	-	-
	G	-	-	-
	H	-	-	-

A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492. -: No inhibition.

**Table 6.** Antibacterial activity of mixture by BHK-19 and oriental herb extracts

Strains	Extracts									
	BHK-19 (10 mg/mL) + Oriental plants (10 mg/mL)									
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
	Inhibitory zone( $\emptyset$ , mm)									
<i>E. coli</i> KCTC 1682	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> PCI 219	-	12	-	-	8	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	A	-	-	-	10	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	9	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	8	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	8	10	-	-	11	-
	F	-	-	-	8	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	9	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	10	-	-	-	-	-

A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492.

a: *Schizonepeta tenuifolia* va, *japonica* (형개), b: *Scutellaria baicalensis* (황금), c: *Koraiensis nakai* (조합), d: *Fructus Tribuli* (백질여), e: *Schizandra chinensis* (오미자), f: *Glycyrrhiza uralensis* (감초), g: *Ephedra sinica* (마황), h: *Ledebouriella seseloides* (방풍), i: *Sophora flavescens* Aiton (고삼), j: *Mentha arvensis* var. *piperascens* (박하), -: No inhibition.

각각 혼합하였을 때는 항균력이 다소 더 강하게 나타나는 것을 확인하였다.

### 3.4.3. 항생제와의 항균활성

시판 항생제와의 항균활성은 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항생제 감수성 검사에 사용되지 않았던 항생제 apramycin, ampicillin, chloramphenicol, nalidixic acid와 kanamycin을 대상으로 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL와 5 mg/mL 농도로 조제한 다음 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성을 확인하였다. Kanamycin은 Table 7에서 보는 바와 같이 다제내성 *P. aeruginosa* 8 균주에 대하여 0.5 mg/mL의 농도에서 항균력이 강하게 나타났으나, 나머지 항생제는 농도에 따라 항균활성이 전혀 없거나 약하게 나타났다. 단백질 합성을 억제하는 apramycin, chloramphenicol과 kanamycin은 5 mg/mL의 농도에서 *P. aeruginosa* 8균주에 항균력을 나타냈으나, 세포벽 합성을 억제하는 ampicillin은 *P. aeruginosa* 8균주에 항균활성이 전혀 나타나지 않았다. 세균의 DNA gyrase 활성을 방해하는 nalidixic acid는 다제내성 *P. aeruginosa* 0826과 1113에 항균활성을 나타냈다. 이 결과로부터 공시균주 BHK-P19의 ethyl acetate 추출물과 혼합 시 사용될 항생제는 항균력이 높았던 kanamycin을 제외한 apramycin, ampicillin, chloramphenicol과 nalidixic acid로 하였으며, BHK-P19 추출물과 각각 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL와 5 mg/mL의 농도가 되도록 조절하여 동량으로 혼합을 한 후 항균활성을 확인하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 공시균주 BHK-P19 추출물은 시판 항생제와 혼합 시 Table 7과 비교하여 *P. aeruginosa* 1113과 2492를 제외하고 모두 우수한 항균활성을 나타내었으며, 항균력이 동일하거나 증가하였다. Ampicillin은 단독으로 처리 시 다제내성 *P. aeruginosa* 8균주에 모두 항균활성이 없었으나, 공시균주 BHK-P19 추출물과 혼합 시 다제내성 *P. aeruginosa* 1113에 특이적으로

항균활성을 보였다 (Table 8, Fig. 2). 공시균주 BHK-P19 (*P. aeruginosa* 0254 저해)와 다제내성 *P. aeruginosa*에 항균활성이 다른 (Table 2, Table 3) 변이주 BHK-N14 (*P. aeruginosa* 0225 저해) 추출물도 ampicillin과 2.5 mg/mL, 5 mg/mL의 농도로 각각 혼합 시 Fig. 2와 같이 다제내성 *P. aeruginosa* 1113에 항균활성이 나타났으며, BHK-P19 추출물과 동일한 항균활성을 나타내었다.

**Table 7.** Antibacterial activity of commercial antibiotics

Concentration of antibiotic (mg/mL)	<i>P. aeruginosa</i>							
	A	B	C	D	E	F	G	H
	Inhibitory zone ( $\emptyset$ , mm)							
Apramycin	0.5	-	7	-	-	-	-	-
	1	-	8	-	-	-	-	9
	2.5	-	10	7	-	7	-	10
	5	8	11	8	8	10	8	12
Ampicillin	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-	-
Chloramphenicol	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	11	8	8	23
	2.5	9	-	-	9	12	10	9
Nalidixic acid	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	11	-	-	-
	2.5	-	-	-	9	12	-	-
Kanamycin	0.5	-	-	-	12	13	-	-
	1	7	12	7	10	7	7	8
	2.5	10	14	8	14	9	9	11
	5	14	22	13	21	17	13	18

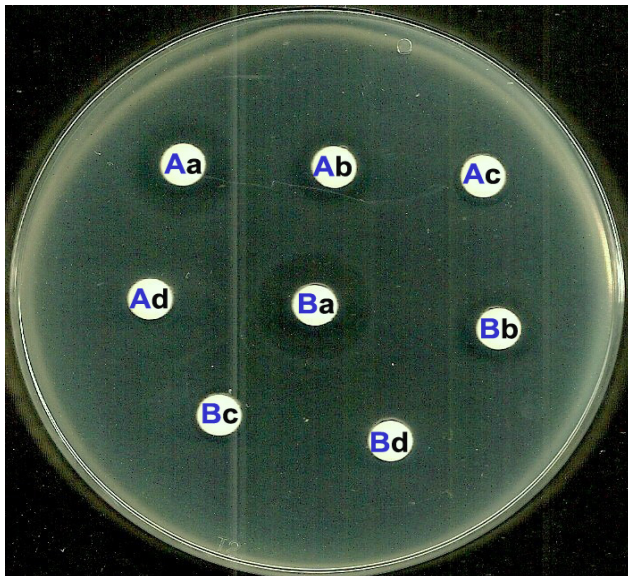
A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492.

-: No inhibition.

**Table 8.** Antibacterial activity of mixture by same concentration of BHK-19 and antibiotics

Test sample (mg/mL)	<i>P. aeruginosa</i>								
	A	B	C	D	E	F	G	H	
BHK-19 + Antibiotics									
Inhibitory zone (∅, mm)									
Apramycin	0.5	-	7	-	-	-	-	-	-
	1	-	8	-	-	-	-	-	7
	2.5	7	11	7	6	7	7	7	10
	5	8	14	8	9	8	10	8	12
Ampicillin	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	7	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	15	-	-	-
	5	-	-	-	-	18	-	-	-
Chloramphenicol	0.5	-	-	-	-	-	-	-	12
	1	9	-	-	-	12	9	8	24
	2.5	11	-	6	10	9	10	12	28
	5	14	12	9	12	11	14	15	28
Nalidixic acid	0.5	-	-	-	-	7	-	-	-
	1	-	-	-	-	9	-	-	-
	2.5	-	-	-	10	12	-	-	-
	5	7	-	-	13	14	-	-	-

A: 0254, B: 0225, C: 0347, D: 0826, E: 1113, F: 1378, G: 1731, H: 2492.  
 -: No inhibition.



A: BHK-N14 (5 mg/mL), B: BHK-19 (5 mg/mL).  
 a: Ampicillin 5 mg/mL, b: Ampicillin 2.5 mg/mL, c: Ampicillin 1 mg/mL, d: Ampicillin 0.5 mg/mL.

**Fig. 2.** Antibacterial activity of mixture by ampicillin with BHK-N14 and ampicillin with BHK-19 on *P. aeruginosa* 1113.

**4. 결론**

본 연구는 토양에서 분리된 방선균으로부터 항생제 다제내성 *P. aeruginosa*를 대상으로 항균효과를 증대시키는 물질을 검토했었다. 분리 방선균으로부터 항균활성이 우수한 BHK-P19

균주를 최종 선발하였으며, YS 배지에 탄소원을 maltose로 하여 배양 시 다제내성균 중 *P. aeruginosa* 0225에 항균활성을 나타내었다. BHK-P19의 항균성 물질은 *B. subtilis* PCI 219에 강한 항균활성을 보이는 다른 분리 방선균주의 배양액과 혼합 시 다제내성균 *P. aeruginosa* 3균주 (0254, 0225, 1113)에 대해 10 mg/mL 농도에서 항균력이 나타났으며, 한약재 추출물과 혼합 시에는 특히 오미자에서 시험내성균 *P. aeruginosa* 7균주 (1113, 0225, 1731, 0254, 2492, 1378, 0826)에 항균활성이 나타났다. BHK-P19의 항균성 물질과 시판항생제를 혼합 시 항균활성은 항생제 apramycin과 cholramphenicol의 경우 2.5 mg/mL 혼합 시 우수한 항균력 상승효과를 나타내었으며, ampicillin과 혼합 한 경우에는 다제내성 *P. aeruginosa* 1113에 강한 항균력이 확인되었다. 방선균 BHK-P19가 생산하는 항균성 물질은 정제를 통해 항생제 다제내성 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성이 증대될 것으로 사료되며, 다른 한약재 추출물과 시판 항생제 성분과의 혼합처리 시에는 항균활성을 상승시키는 작용을 하는 것으로 확인되었다.

따라서 방선균 BHK-P19가 생산하는 항균성 물질 및 한약재 추출물의 혼합사용으로 항생제 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 신약개발과 시판항생제의 사용량 감소에 도움이 될 것으로 사료된다.

**감사**

본 연구는 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의한 것입니다.

**References**

1. Bonten, M. J. (2002) Infection in the intensive care unit: prevention strategies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15: 401-405.
2. Park, K. H. (2007) Nosocomial infection rates and risk factors in intensive care units of a university hospital. M.D. Thesis. University of Chosun, Dong-gu, Gwangju, Korea.
3. Oh, H. S. (2005) A study on the nosocomial infection control and development of evaluation indices and model in Korea. Ph.D. Thesis. National University of Seoul, Gwanak-gu, Seoul, Korea.
4. Cho, Y. S. (2000) A study on the validity of the hospital infection surveillance records collected by ward liaison nurses. M.D. Thesis. National University of Seoul, Gwanak-gu, Seoul, Korea.
5. Yoo, J. S. (2008) Characterization of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and functional analysis of PA2491 gene. Ph.D. Thesis. University of Korea, Seongbuk-gu, Seoul, Korea.
6. Doring, G., M. Horz, J. Ortel, H. Grupp, and C. Wolz (1993) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Epicemiol. Infect.* 110: 427-436.
7. Gaynes, R. and J. R. Edwards (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 41: 848-54.
8. Vidal, F., J. Mensa, M. Almela, J. A. Martinez, F. Marco, C.

- Casals, J. M. Gatell, E. Soriano, and M. T. Jimenez de Anta (1996) Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment. Analysis of 189 episodes. *Arch. Intern. Med.* 156: 2121-2126.
9. Falagas, M. E., P. K. Koletsi, and I. A. Bliziotis (2006) The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 55: 1619-1629.
  10. Pankuch, G. A., H. Seifert, and P. C. Appelbaum (2010) Activity of doripenem with and without levofloxacin, amikacin, and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67: 191-197.
  11. Zaborina, O., J. E. Kohler, Y. Wang, C. Bethel, O. Shevchenko, L. Wu, J. R. Turner, and J. C. Alverdy (2006) Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5: 14.
  12. Inglis, T. J., K. A. Benson, L. O'Reilly, R. Bradbury, M. Hodge, D. Speers, and C. H. Heath (2010) Emergence of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Western Australian hospital. *J. Hosp. Infect.* 76: 60-65.
  13. Jung, J. Y., M. S. Park, S. E. Kim, B. H. Park, J. Y. Son, E. Y. Kim, J. E. Lim, S. K. Lee, S. H. Lee, K. J. Lee, Y. A. Kang, S. K. Kim, J. Chang, and Y. S. Kim (2010) Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC Infect. Dis.* 10: 228.
  14. Neu, J. M. and G. D. Wright (2003) Inhibition of sporulation, glycopeptide antibiotic production and resistance in *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009 by protein kinase inhibitors. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 15-20.
  15. Bang, B. H. and E. J. Jeong (2009) Isolation and optimal producing conditions of broad spectrum antibiotics from *Streptomyces* sp. Y-88. *Korean J. Food & Nutr.* 22: 103-109.
  16. Hayakawa, M. and H. Nonomura (1987) Huminc acid - vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* 65: 501-509.