

In vitro Antimicrobial Activity of a New Isolate *Streptomyces* sp. BCNU 1030Ji Hun Bang¹, Hye Jung Choi¹, Cheol Soo Ahn², Dong Wan Kim³, Yong Kee Jeong⁴ and Woo Hong Joo^{1*}¹Interdisciplinary Program in Biotechnology and Department of Biology, ²Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea²Cho-A Pharm Co, LTD., Haman-kun 637-810, Korea⁴Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Received February 22, 2011 / Accepted March 1, 2011

This work focused on screening and characterizing antibiotic-producing actinomycetes to develop new antibiotics that can overcome the growing resistance of disease-causing microbes. One-hundred actinomycetes strains were isolated from soil samples from Chungcheongbuk-do, Korea using various kinds of actinomycetes isolation media, including a starch casein agar medium and potato dextrose agar (PDA). Among them, strain BCNU 1030 was determined to show strong antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Biochemical, physiological, and 16S rRNA sequence analyses indicated that strain BCNU 1030 belonged to the genus *Streptomyces*. Strain BCNU 1030 exhibited antibiotic activity against a wide range of bacteria, especially methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The minimum inhibitory concentration (MIC) of BCNU 1030 dichloromethane extract was determined to be 0.78 µg/ml for MRSA CCARM 3090. Therefore, *Streptomyces* sp. BCNU 1030 has potential for anti-MRSA drug development.

Key words : Antibacterial activity, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, minimum inhibitory concentration, *Streptomyces*.

서 론

오늘날 항생제 내성을 나타내는 세균으로 인한 감염질환은 인류의 건강을 위협하는 심각한 문제를 야기시키고 있다[1]. 대표적으로 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 비강이나 피부 등에서 감염을 일으켜 다른 사람에게 전파되며, 장독소에 의한 식중독, 생명을 위협하는 패혈증 및 심장 내막염, 독소 충격 증후군(toxic shock syndrome), 폐렴 등을 유발시키는 맹독성의 병원성 세균이다[6,20].

1940년대 황색포도상구균으로 인한 감염은 세균의 세포벽 합성을 억제하여 항균활성을 나타내는 β-lactam계 항생제인 penicillin을 사용하여 치료하였으나 β-lactamase를 생성하는 penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*가 등장하여[13,15] β-lactamase에 안정한 반합성 penicillin인 methicillin을 치료에 이용하고 있다[17]. 이후 1961년에 영국에서 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)가 분리되어 처음 보고되었고, 우리나라에서도 1980년대에 등장하기 시작하여 급격한 증가추세를 보이면서 원내감염의 주 원인균으로 자리를 잡았다[11,25]. MRSA는 penicillin, ampicillin, cephalosporin 등 β-lactam계 항생제 및 macrolides 계 항생제 등 대부분의 항생제에 대한 다제내성(multidrug resistance)을 가지고 있어[19],

주로 glycopeptide계 항생제인 vancomycin과 teicoplanin이 MRSA 감염증의 치료제로 사용되어 왔다[4]. 그러나 최근 임상학적으로 vancomycin에도 내성을 나타내는 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)가 국내외에서 분리되어 보고되면서 항생제 내성세균에 대한 문제가 매우 심각한 상황에 이르렀다[7,21].

감염증 치료에 사용되고 있는 다수의 항생제에 내성이 있는 병원성 세균의 등장으로 효과적인 새로운 항생물질의 개발을 절실히 요구되고 있다. 토양은 다양한 미생물이 존재하고 있으므로 이들 미생물이 생산하는 항균성 물질을 탐색할 수 있는 좋은 천연 자원이다. 특히, 토양 속에 다수 존재하는 방선균인 *Streptomyces* 종은 streptomycin, chloramphenicol, neomycin, kanamycin, vancomycin 등 항생물질의 70% 이상을 생산하고 있어 의학적, 산업적으로 매우 유용한 자원이다 [8,12,23,26,27]. 그러나 최근에는 방선균이 생산하는 새로운 항생물질의 발견이 감소하고 있어 규명되지 않은 항생물질의 발견을 위하여 방선균에 대한 지속적인 연구가 필요하다[16].

*Streptomyces costaricanus*는 1995년 Costa Rica에서 항선충 및 항진균 활성을 나타는 특징을 가진 토양으로부터 처음 분리된 신종으로서, 이 균의 생리·생화학적 특징이 보고된 바 있으나 이 균이 생산하는 생리활성 천연물질에 대해서는 보고된 바가 없다[5]. 이에 본 연구에서는 충청북도 단양으로부터 분리한 *S. costaricanus* 균주가 생산하는 항생물질의 MRSA 및 세균에 대한 항균활성 및 최소저해농도(Minimum Inhibitory

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

Concentration : MIC) 등을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

방선균의 분리 및 선별

전국에서 채집한 토양을 먼저 100℃에서 10분 전처리한 후, 희석평판배양법으로 starch casein agar (SCA, 10% soluble starch, 2% potassium phosphate dibasic, 2% potassium nitrate, 0.3% casein, 0.05% magnesium sulfate, 0.02% calcium carbonate, 0.01% ferrous sulfate), potato dextrose agar (PDA, 7% potato, 20% glucose), nutrient agar (NA, 0.1% beef extract, 0.2% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% NaCl)에 도말하여 28℃에서 3-14일 배양하였다. 평판배지에 형성되는 콜로니의 형태, 포자의 형성여부, 균사의 색 등의 형태적 특징에 따라 방선균을 순수분리하였다. 분리된 방선균 중 항균활성이 뛰어난 균주를 선별을 위해 MRSA, 그람 양성 및 음성 세균을 시험균으로 사용하여 가장 넓은 항균스펙트럼을 나타내는 방선균을 선택하였다.

사용 균주

선택되어 순수분리된 방선균의 항균활성 검정을 위하여 MRSA CCARM 3089, CCARM 3090, CCARM 3091, CCARM 3095와 그람 양성세균 *Bacillus subtilis* KCTC 10111 (ATCC 465), *Micrococcus luteus* KACC 10488 (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* IMSNU 11088 (ATCC 6538), 그람 음성세균 *Escherichia coli* IMSNU 10080 (ATCC 10798), *Proteus mirabilis* IMSNU 20367 (ATCC 29906) 및 *Proteus vulgaris* IMSNU 13025 (ATCC 13315)를 각각 한국 항생제내성균주은행 (Culture collection of antimicrobial resistant microbes, CCARM)과 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean collection for type culture, KCTC), 한국농업미생물자원센터 (Korean agricultural culture collection, KACC) 및 서울대학교 미생물연구소(Institute of microbiology Seoul National University, IMSNU)에서 분양 받아 사용하였다.

항균물질 생산균주의 동정

선발된 균주를 동정하기 위해 Shirling과 Gottlieb의 방법 [24]과 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법 [14]을 참고하여 International Streptomyces Project (ISP)에 명시된 배지에서 14일 동안 배양하면서 성장정도, 기균사의 색, 배면의 색, 멜라닌 색소 형성 여부를 관찰하였고 basal medium (2% pancreatic digest of casein, 5% NaCl, 0.3% dipotassium phosphate)을 사용하여 탄소원 활용 실험을 시행하였다. 생리, 생화학특징으로 5%~7% NaCl 농도에서의 성장여부 및 최저 성장 pH를 조사하였고 streptomycin, ampicillin 등의 항생제에 대한 저항성 및 화학적 억제제인 0.01% crytal vio-

let, 0.1% phenol 등에서의 생육 여부에 대해 조사하였다. 그리고 생리, 생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 준하여 조사하였다.

16S 리보솜 RNA 염기서열분석

BCNU 1030 균주의 16S 리보솜 RNA 염기서열분석을 위하여 universal primer인 27F (forward primer, 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (reverse primer, 5'-GGTT ACCTTGTTACGACTT-3') 2개의 primer를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. GenBank의 database에 등록된 16S 리보솜 DNA 염기서열을 대상으로 상동성을 비교, 분석하였으며 Bioedit (USA), Clustal X2.0 (CLC bio, Denmark), Mega 4 program을 사용하여 neighbor joining method를 기반으로 계통수를 작성하였다.

항균활성 검증 및 항균활성물질의 기초 최적 생산조건 조사
선발된 균주의 항균활성 검증은 MRSA와 그람양성 세균 3종, 그람음성 세균 3종에 대하여 조사하였다. 시험균주의 탁도를 McFarland number 0.5가 되도록 배양하여 시험균주의 최적배지에 0.1 ml를 도말하였다. 선발된 균주의 배양액 10 μl를 paper disk diffusion method [22]에 따라 시험균주가 도말된 배지에 점적한 뒤 시험균주의 최적온도에서 1~2일간 배양하여 결과를 관찰하였다. 선발된 균주의 기초적인 항균물질 생산조건을 검토하기 위하여 nutrient broth (NB), tryptic soy broth (TSB), PDB, ISP 배지 등을 기본으로 하여 pH, 온도 및 배양시간에 따른 최적 생산조건을 조사하였다.

최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

선발된 균주의 기초 최적 생산조건을 조사한 결과를 토대로 2 l 삼각플라스크에서 1 l 배양하였다. 배양 상등액을 dichloromethane (DCM)으로 추출하여 DCM 추출물을 얻었으며, 동등한 조건으로 6 N HCl 침전을 통해 peptide 추출물을 얻었다. 두 추출물을 감압 농축하여 최소저해농도를 측정하기 위한 실험시료로 사용하였으며 각각의 실험시료를 최고농도에서 부터 2 배수 씩 희석시켜 시험균주를 0.5 MacFaland의 농도로 0.1 ml 도말한 NA 배지에 농도별로 10 μl씩 점적하였다. 시험균주의 최적온도에서 24~72시간 배양한 후 실험시료를 점적한 부분의 미생물의 증식 여부를 관찰하여 최소저해농도를 결정하였다.

결 과

항균물질 생산 균주의 분리

항균물질 생산 균주를 분리하기 위하여 토양 시료 1 g을 멸균수에 10³~10⁵까지 희석하고 그 현탁액을 PDA, SCA, NA

배지에 도달하여 25°C에서 3~14일간 배양한 결과, 배양된 평판배지에서 약 100개의 방선균을 순수분리하였다. 순수분리된 방선균 중 MRSA, 그람 양성세균 및 그람 음성세균에 대해 우수한 저해 활성을 보이는 균주를 선발하여 BCNU 1030이라고 명명하였다.

항균물질 생산균주의 동정

BCNU 1030균주의 동정을 위하여 배양학적 성질과 생리 및 생화학적 특성을 조사하였다(Table 1). ISP배지에서 배양상의 특징을 조사한 결과, ISP 1, ISP 2, ISP 3, ISP 4 배지에서는 집락의 색이 옅은 회갈색이며, 배면은 옅은 노란색을 나타내었고 생육이 좋았으며, ISP 5 배지에서는 흰색의 군사가 관찰되었고 생육 다소 속도가 느렸다. ISP 2, ISP 3, ISP 5 배지에서는 노란색의 가용성 색소의 생산이 관찰되었으며, ISP 6, ISP 7 배지에서는 멜라닌 색소는 형성하지 않음을 확인할 수 있었다. Basal medium을 사용하여 선발된 균주의 탄수화물 자화능을 확인 한 결과, D-fructose, D-mannitol, raffinose, rham-

nose, sucrose 그리고 D-xylose는 탄소원으로 잘 이용하여 생장함을 알 수 있었다. 한편 D-glucose는 탄소원으로 잘 이용하지 못하였으며, L-arabinose는 탄소원으로 전혀 이용하지 못하는 것을 알 수 있었다. 또한, BCNU 1030의 생리적 특징을 관찰한 결과, protease를 분비하는 것으로 나타났으며, pH 3.5~9의 범위에서 생육하는 것으로 관찰되었다. NaCl의 농도에 대한 내성을 조사한 결과 5%~7%의 농도에서는 생육하지 못하였다. 화학적 억제제인 0.01% crystal violet, 0.1% phenol에서도 생육하지 못하였으며, 항생제에 대한 감수성 실험결과 streptomycin에 대해서는 내성이 없었다.

16S 리보솜 RNA 염기서열 분석

분리균주 BCNU 1030의 정확한 동정을 위하여 16S 리보솜 RNA 염기서열을 분석한 결과 *S. costaricanus*, *S. murinus* 등과 99% 상동성이 있음이 확인되었으며, 계통학적으로는 *S. costaricanus*의 subcluster에 속하는 균주로 확인되었다(Fig. 1)

Table 1. Differential characteristics of strain BCNU 1030 in comparison with related *Streptomyces costaricanus*

Charateristics	<i>Streptomyces</i> sp. BCNU 1030	<i>Streptomyces costaricanus</i>
Spore mass color/substrate mycelium color on :		
ISP medium 2 ^a	gray-brown / yellow	gray-brown / yellow
ISP medium 3	gray-brown / brown	gray-brown / brown
ISP medium 4	gray-brown / yellow	gray-brown / yellow
ISP medium 5	ivory / yellow	gray-brown / yellow to yellow- brown
Production of melanoid pigment on :		
ISP medium 6	-	-
ISP medium 7	-	-
Soluble pigment in :		
ISP medium 2	yellow	yellow
ISP medium 3	yellow	-
ISP medium 4	-	-
ISP medium 5	yellow	yellow
Use of carbon soures :		
L-Arabinose	-	-
D-Fructose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Mannitol	+	+
Raffinose	+	-
Rhamnose	+	-
Sucrose	+	-
D-Xylose	+	+
Growth in the presence of		
NaCl (5%)	-	-
NaCl (6%)	-	-
NaCl (7%)	-	-
Phenol (0.1%)	-	-
Crystal violet (1 µg /ml)	-	+
Streptomycin (20 µg /ml)	-	-
Minimum pH for growth	3.5	3.5

^aISP: International Streptomyces Project medium.

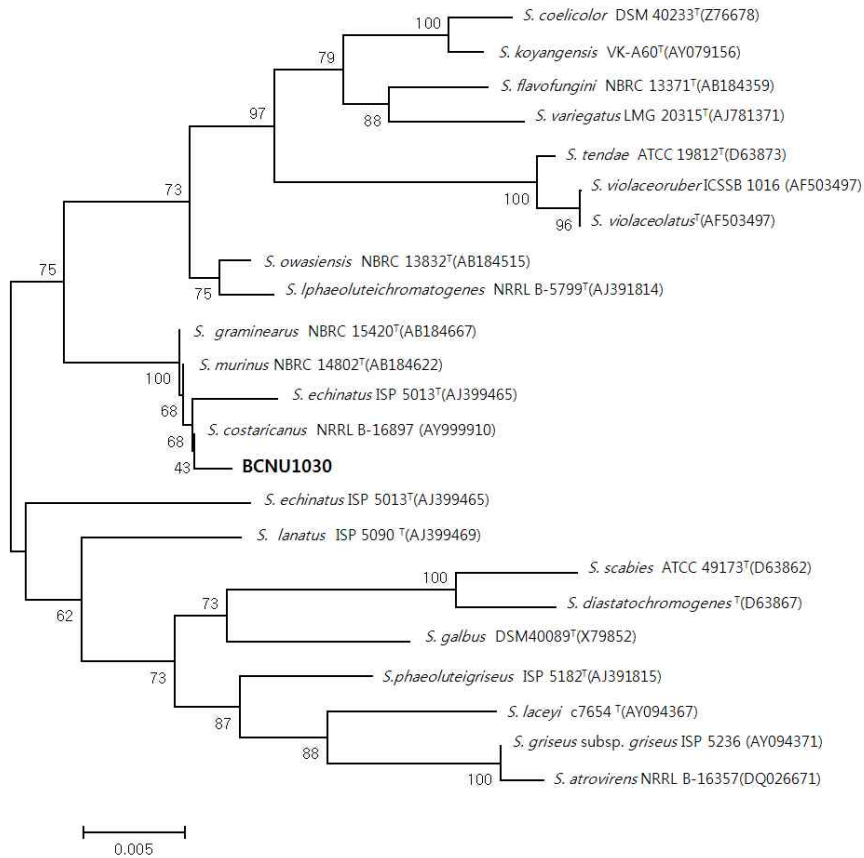


Fig. 1. A phylogenetic tree, showing the position of *Streptomyces* sp. BCNU 1030 among the *Streptomyces* species.

항균활성 측정 및 최적 생산조건 검토

MRSA, 그람 양성세균 및 그람 음성세균을 대상으로 BCNU 1030의 항균 활성을 조사한 결과, MRSA CCARM 3089, CCARM 3090, CCARM 3091, CCARM 3095에서 각각14 mm, 16 mm, 16 mm, 18 mm의 우수한 생육억제환을 나타내었다. 그람양성 세균인 *B. subtilis*와 *M. luteus*에 대해서는 10 mm의 생육억제환을 나타내었으며 *S. aureus*에서는 12 mm의 생육억제환을 나타내었다. 그람음성 세균인 *P. mirabilis*와 *P. vulgaris*에서는 8 mm의 다소 약한 생육억제환을 나타내었고, *E. coli*에서는 생육억제환이 나타나지 않았다(Table 2). 항균활성 측정 결과, BCNU 1030은 MRSA에 대한 저해활성이 뛰어난 것을 확인하였기에, MRSA를 대상으로 항균물질의 최적 생산 조건을 조사하기 위해 PDB, ISP, SCB, TSB 등의 배지에서 20 일 동안 배양하면서 24시간마다 배양 상등액을 취하여 항균활성을 조사하였다. 그 결과 8일간의 배양액에서부터 MRSA에 대한 저해활성을 확인할 수 있었으며, 16일간 배양하였을 때 ISP 4 배지의 배양 상등액에서 MRSA에 대한 저해활성이 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 ISP 4배지에 pH 및 온도를 달리하여 생산조건을 검토한 결과, pH 8.4, 28℃에서 10일간 배양하였을 때 MRSA 균에 대해 가장 뛰어난 항균활성

을 나타내었다.

최소저해농도 조사

BCNU 1030의 배양 상등액에서 추출한DCM 추출물은 테스트 균주인 MRSA 균주에 대하여 0.78 µg/ml의 저농도에서 생육을 저해하였으며, 그람양성 세균인 *B. subtilis* *M. luteus*에 대해서도 0.39 µg/ml의 농도에서 항균활성을 보였다. 그람음

Table 2. Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. BCNU 1030 against test MRSA and bacteria

	Microorganisms	Zone of inhibition (mm)
MRSA	<i>S. aureus</i> 3089	14.0±0.91
	<i>S. aureus</i> 3090	16.0±0.36
	<i>S. aureus</i> 3091	16.0±0.42
	<i>S. aureus</i> 3085	18.0±0.36
Gram positive bacteria	<i>B. subtilis</i>	10.0±0.36
	<i>M. luteus</i>	10.0±0.38
	<i>S. aureus</i>	12.0±0.42
Gram negative bacteria	<i>E. coli</i>	0.0±0.00
	<i>P. mirabilis</i>	8.0±0.31
	<i>P. vulgaris</i>	8.0±0.22

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration of *Streptomyces* sp. BCNU 1030 solvent extracts against MRSA

Microorganisms	chloramphenicol ($\mu\text{g/ml}$)	Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$)	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ($\mu\text{g/disk}$)	
			DCM fraction	peptide fraction
<i>S. aureus</i> 3089	3.12	≥ 80	0.78	5
<i>S. aureus</i> 3090	0.09	0.132	0.78	5
<i>S. aureus</i> 3091	6.25	≥ 100	0.78	5
<i>S. aureus</i> 3095	3.12	≥ 40	0.78	5

Abbreviation: DCM, dichloromethane

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration of *Streptomyces* sp. BCNU 1030 solvent extracts against bacteria

Microorganisms	Chloramphenicol ($\mu\text{g/ml}$)	Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$)	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ($\mu\text{g/ml}$)	
			DCM fraction	peptide fraction
<i>B. subtilis</i>	<0.003	0.019	0.39	1.25
<i>M. luteus</i>	<0.003	0.009	0.39	1.25
<i>S. aureus</i>	<0.003	0.039	0.78	2.5
<i>E. coli</i>	0.19	0.078	-	-
<i>P. mirabilis</i>	0.048	0.039	0.39	1.25
<i>P. vulgaris</i>	0.006	0.039	0.39	1.25

성 세균인 *P. mirabilis*, *P. vulgaris*에 대해서는 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 생육을 저해하였다. Peptide 추출물은 테스트 균인 MRSA 4종의 균에 대하여 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 생육을 저해하였으며, 그람양성 세균인 *B. subtilis*, *M. luteus*와 그람음성 세균인 *P. mirabilis*, *P. vulgaris*에 대해서 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 저해활성을 보였다. DCM 추출물과 peptide 추출물 모두 MRSA, 그람 양성세균 및 그람 음성세균에 대한 항균활성을 보였으나 DCM 추출물이 상대적으로 더 우수한 활성을 나타냈다(Table 3,4). BCNU 1030의 항균력 측정 시 저해활성이 전혀 없었던 *E. coli*에 대해서는 추출물 역시 항균활성을 보이지 않았으나, BCNU 1030 균주로 항균활성을 측정된 결과와 달리 두 추출물의 최소저해농도는 MRSA균주 보다 시험균주인 *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *P. mirabilis* 및 *P. vulgaris* 세균에 대하여 저해활성이 더 좋은 것으로 나타났다.

고찰

오늘날 국내외로 MRSA 균주의 분리빈도가 매년 급증하고 있으며, 치료에 사용되는 항생제에 대한 내성문제가 심각해지면서 새로운 항생제의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 실정을 반영한 anti-MRSA물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들면, *Streptomyces*로부터 laidlomycin, Kakadumycin A, munumbicin B 및 depsipeptide계 항생물질인 vinylamycin가 anti-MRSA물질로서 보고된 바 있다[2,3,10,28]. 그리고 캄보디아의 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. 의 ethyl acetate (EA) 추출물 및 말레이시아의 식물에서 분리한 *Streptomyces* sp. 의 EA 추출물도 MRSA 및 그람양성 세균에 대한 저해활성이 있음이 보고되고 있다[9,18]. 이처럼 항균 물질을 생산하는 대표적인 미생물인 방선균 중 *Streptomyces*속

은 MRSA에 대한 새로운 항생물질을 찾는 연구의 소재로서 매우 유용함이 여러 연구자들에 의해서 입증되었다.

BCNU 1030은 충청도 단양의 토양에서 분리되었으며, *Streptomyces* 속에 속하는 균으로Costa Rica의 항선충 및 항진균에 활성을 지니는 토양으로부터 분리된 *S. costaricanus*와 99%의 상동성을 나타냄이 본 연구에서 확인되었다. 국내 연구진에 의하여서도 *S. costaricanus*의 균주가 분리된 바 있다. 국내 토착 분리균주인 *S. costaricanus*는 식물병원성균에 대한 항균활성이 있음이 조사되어 식물방제제로서의 특허가 등록되어 있지만, 국외와 마찬가지로 *S. costaricanus*가 생산하는 anti-MRSA 항균활성과 anti-MRSA 물질에 대해서는 보고된 바가 없다[29]. 이에 비하여 BCNU 1030은 MRSA 균주를 포함한 그람양성 세균과 그람음성 세균에 대하여 넓은 항균 스펙트럼을 가진 것을 확인하였다. 본 연구에서 사용된 4종의 MRSA에 대하여 BCNU 1030의 DCM 추출물은 MRSA에 대하여 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서 저해활성을 나타냄을 확인 할 수 있었기에 BCNU 1030의 DCM 추출물에 대하여 anti-MRSA물질의 분리, 정제 및 구조와 화학적 특성을 규명하기 위한 지속적인 연구가 필요하다. 또한 BCNU 1030 균주를 사용하여 항선충 및 항진균 활성 조사도 추후 연구를 통해서 이루어져야 하며 이를 토대로 항선충과 항진균 물질의 분리와 그 이용에 대한 연구가 절실히 요구된다.

감사의 글

본 연구는 한국교육과학기술부, 한국연구재단 및 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력 양성사업으로 수행된 연구 결과임.

References

- Alanis, A. J. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* **36**, 697-705.
- Castillo, U. F., G. A. Strobel, E. J. Ford, W. M. Hess, H. Porter, J. B. Jensen, H. Albert, R. Robison, M. A. Condrón, D. B. Teplow, D. Stevens, and D. Yaver. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 3 endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* **148**, 2675-2685.
- Castillo, U., J. K. Harper, G. A. Strobel, J. Sears, K. Alesi, E. Ford, J. Lin, M. Hunter, M. Maranta, H. Ge, D. Yaver, J. B. Jensen, H. Porter, R. Robinson, D. Millar, W. M. Hess, M. Condrón, and D. Teplow. 2005. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 3 an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 183-190.
- Chesneau, O., A. Morvan, and N. E. Solh. 2000. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 887-890.
- Esnard, J., T. L. Potter, and B. M. Zuckerman. 1995. *Streptomyces costaricanus* sp. nov. isolated from nematode suppressive soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 775-779.
- Han, S. J., P. M. Jung, H. G. Kim, E. H. Hwang, and I. W. Seong. 1999. Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants. *J. Pediatr. Surg.* **34**, 381-386.
- Herwaldt, L., L. Boyken, and M. Pfaller. 1991. *In vitro* selection of resistance to vancomycin in bloodstream isolates of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 1007-1012.
- Howard, T. D. 1953. The production of neomycin by *Streptomyces fradiae* in synthetic media. *Appl. Microbiol.* **1**, 103-106.
- Higginbotham, J. and C. D. Murphy. 2010. Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* **165**, 82-86.
- Igarashi, M., T. Shida, Y. Sasaki, N. Kinoshita, H. Naganawa, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1999. Vinylamycin, a new depsipeptide antibiotic, from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)* **52**, 873-879.
- Kang, M. W. and Y. R. Kim. 1993. Infection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Chemother.* **11**, 17-26.
- Ketaki, B. and S. K. Majumdar. 1975. Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 391-395.
- Koffler, H., S. G. Knight, and W. C. Frazier. 1947. The effect of certain mineral elements on the production of penicillin in shake flasks. *J. Bacteriol.* **53**, 115-123.
- Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera, pp. 2451-2492. In Williams, S. T., M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 9th, vol. 4, *Williams & Willikins*, Baltimore.
- Lyon, B. R. and R. Skurray. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiol. Rev.* **51**, 88-134.
- Miyado, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. *Actinomycetologica* **7**, 100-106.
- 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. *J. Antibiot. (Tokyo)* **56**, 123-128.
- Norazli, G., M. Z. Noraziah, S. Vikineswary, B. Norhidayah, F. D. Basri, H. H. Lian, and N. M. Sidik. 2008. Isolation and characterization of a novel endophytic *Streptomyces* SUK 06 with antimicrobial activity from Malaysian Plant. *Asian J. Plant Sci.* **7**, 189-194.
- Ogawa, H. 1981. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to β -lactam antibiotics. *Microbiol. Rev.* **45**, 591-619.
- Park, S. G., Y. O. Hwang, J. H. Jung, and K. M. Lee. 2001. Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food-borne patients in Seoul. *J. Fd Hyg. Safety* **16**, 159-167.
- Park, S. U. and J. B. Kim. 2000. Characterization and frequency of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Korea. *Korean J. Biomed Lab. Sci.* **6**, 201-208.
- Perez, C., M. Pauli, and P. Bazerque. 1990. An antibiotics assay by agar well diffusion method. *Acta Biol. Med Exp* **15**, 113-115.
- Swart, E. A., D. Hutchison, and S. A. Waksman. 1949. Neomycin, recovery and purification. *Arch Biochem* **24**, 92-103.
- Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313-340.
- Turos, E., T. E. Long, M. I. Konaklieva, C. Coates, J. Y. Shim, S. Dickey, D. V. Lim, and A. Cannons. 2002. N-thiolated beta-lactams: novel antibacterial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2229-2231.
- Waksman, S. A., H. C. Reilly, and D. B. Johnstone. 1946. Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **52**, 393 - 397.
- Watve, M. G., R. Tickoo, M. M. Jog, and B. D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**, 386-390.
- Yoo, J. C., J. H. Kim, J. W. Ha, N. S. Park, J. K. Song, J. W. Lee, S. C. Park, M. S. Kim, and C. N. Seong. 2007. Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *J. Microbiol.* **45**, 6-10.
- Yun, B. D., C. S. Park, I. G. Lee, H. S. Ko, H. M. Oh, H. S. Kim, C. Y. Ahn, and M. S. Kim. 2006. *Streptomyces costaricanus* VSC-67 KCTC 10910BP active against plant fungal pathogens. Korea patent 10-2006-002611.

초록 : 신규 분리균주 *Streptomyces* sp. BCNU 1030의 *in vitro* 항균활성

방지훈¹ · 최혜정¹ · 안철수² · 김동완³ · 정영기⁴ · 주우홍^{1*}

(¹창원대학교 생명공학협동과정 및 생물학과, ²조아제약(주), ³창원대학교 미생물학과, ⁴동아대학교 생명공학과)

질병을 유발하는 미생물들의 항생물질에 대한 증가하는 내성문제를 극복할 수 있는 새로운 항생물질을 개발하고자 항생물질을 생산하는 방선균을 탐색하여 특성화하는데 본 연구는 초점을 맞추고 있다. 충청북도 일대의 토양으로부터 PDA, starch casein agar 등의 배지를 이용하여 100여 개의 방선균주를 순수분리하였다. 순수분리된 방선균주 중 메티실린 내성 황색포도상구균에 가장 활성이 뛰어난 BCNU 1030을 선발하여 형태학적, 생화학적, 분자생물학적 방법으로 동정한 결과 *Streptomyces* 속으로 동정되었다. 분리균주인 BCNU 1030은 MRSA를 포함한 그람양성 및 그람음성세균에 대한 폭넓은 항균스펙트럼을 가졌다. BCNU 1030의 디클로로메탄 추출물은 MRSA CCARM 3090에 대하여 최소0.78 µg/ml의 농도에서 저해활성이 있음이 확인되었다. 그러므로 BCNU 1030은 새로운 anti-MRSA 항생물질의 개발에 있어서 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.