

〈Original article〉

항 Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* 활성을 가지는 해양미생물 *Pseudomonas* sp. YJ-1의 분리와 특성

우 예 주 · 정 성 윤*

대구가톨릭대학교 의생명과학과

Isolation and Characterization of a Marine Bacterium, *Pseudomonas* sp. YJ-1 with Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Activity

Ye-Ju Woo and Seong-Yun Jeong*

Department of Biomedical Science, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Republic of Korea

Abstract - The aim of this study was to isolate and identify marine bacterium with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity, and to purify the anti-MRSA compound, as well as to determine its activity and synergistic effects. Among the marine bacteria isolated in this study, the YJ-1 isolate had the strongest anti-MRSA activity. The YJ-1 isolate was identified on the basis of its biochemical characteristics and an analysis of 16S rRNA gene sequences. The YJ-1 isolate showed over 99.2% homology with *Pseudomonas stutzeri*, and was designated as a *Pseudomonas* sp. YJ-1. The optimal culture conditions were 25°C and initial pH 7.0. For the purification of the anti-MRSA compounds, the YJ-1 was cultured in Pa PES-II medium, and the culture filtrates were extracted by ethyl acetate, hexane, and 80% MeOH. The 80% MeOH fraction was separated by a C₁₈ ODS column, silica gel chromatography and a reverse phase HPLC, to yield three anti-MRSA agents, the MR1, MR2, and MR3 compounds. When the MR1 compound of 250 µg mL⁻¹ concentration was applied to the MRSA cells, over 95% of bacterial cells was killed within 48 hr. Compared with vancomycin and ampicillin, the MR1 compound showed significant anti-MRSA activity. In addition, the anti-MRSA activity was increased by dose and time dependent manners. Furthermore, the combination of an MR1 compound with vancomycin produced a more rapid decrease in the MRSA cells than did the MR1 compound alone. Taken together, our results suggest that the *Pseudomonas* sp. YJ-1 and its anti-MRSA compounds could be employed as a natural antibacterial agent in MRSA infections.

Keywords : antibacterial, anti-MRSA activity, marine bacterium, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, purification, synergistic effect

서 론

* Corresponding author: Seong-Yun Jeong, Tel. 053-850-3772,
Fax. 053-850-3727, E-mail. jsymicro@cu.ac.kr

현대적인 개념의 항생제로서 처음으로 임상에서 사용된 penicillin은 감염 질환을 가진 수많은 환자의 생명을 구함으

로써 기적의 약으로 불리었다. 그러나 penicillin이 사용된지 얼마 지나지 않아 penicillin에 내성을 가지는 *Staphylococcus aureus*가 등장하였다. 이에 β -lactam계 항생제인 methicillin이 치료제로 사용되게 되는데, 이 항생제에도 내성을 나타내는 *S. aureus*가 1961년 영국에서 처음 발생하기 시작하여 현재까지도 세계 각지에서 보고되고 있다(Nagai *et al.* 2003; Davis *et al.* 2007).

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 gram positive로 원내 감염의 원인균이며, penicillin, cephalosporin, carbapenem, monobactam 등 대다수의 항생제에 치료가 되지 않는 다제내성(multidrug resistance)을 나타낸다(Akcam *et al.* 2009; Yee *et al.* 2011). 분리 비율은 일본, 홍콩, 미국 등에서 50% 이상의 높은 비율로 나타나며(Bell *et al.* 2002; Grundmann *et al.* 2006), 국내에서도 병원감염으로 확인된 *S. aureus* 중 MRSA의 분리 빈도는 70~90% 선으로 매우 심각한 수준이다(Lee *et al.* 2004; Park *et al.* 2007). 또한 최근 지역사회 내 MRSA 감염이 빠르게 증가하고 있는 추세이며 미국에서는 매년 1만 9천여 명, 유럽에서도 수천 명이 사망하고 있는 심각한 상황이다(Crum *et al.* 2006; Bassetti *et al.* 2009). 이에 우리나라에서도 MRSA에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 매년 항생제 내성균은 증가 일로에 있어, 항생제 변화의 주기적인 검토와 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다(Hong *et al.* 2016). 우리나라에서 발견되는 MRSA 중에서 절반 이상을 차지하는 대표적인 균주인 ST5 MRSA는 일본에서 유래한 하나의 계통에 속하는 것으로 나타났다. 이는 MRSA를 포함한 다제내성균 전파에 있어서 국가 간의 경계가 없으며 나날이 높아져가는 항생제 내성문제를 해결함에 있어 국가 간 협력이 필요함을 시사한다.

MRSA의 치료제로 glycopeptide 제제인 vancomycin을 사용하였으나 1996년 일본에서 vancomycin에 감수성이 감소한 *S. aureus* (hetero-vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*; hVISA)가 처음 보고되었고(Hiramatsu 2001), 미국과 유럽에서도 vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA)가 확인된 바 있어(Howden *et al.* 2010), 마지막 보루라고 여겨지던 glycopeptide 제제의 효용성이 심각하게 흔들리기 시작하였다(Boyle-Vavra *et al.* 2001). 따라서 높은 원내 감염율, 지역사회 내 MRSA 감염의 증가, MRSA 치료제로 사용되고 있는 vancomycin 내성균주의 출현의 증가로 새로운 항생제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다(Kitai *et al.* 2005; Yucel *et al.* 2005).

미생물이 생산하는 많은 생리활성물질들은 의약품 산업 등 다양한 분야에서 상업적으로 이용되고 있으며, 현재도 여러 분야에서 미생물은 새로운 천연물질의 개발을 위한 잠재적인 소재로서 각광 받고 있으므로, 이들의 탐색과 응용을

위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(Jung and Chang 2009). 특히 제약 및 의약분야에서 임상적으로 사용되는 항생제는 대부분 미생물로부터 분리된 천연물질이거나, 이들 물질을 선도물질로 사용하여 합성된 반합성 물질이다(Faver *et al.* 2003). 미생물이 2차 대사산물로 생산하는 항생물질들은 주로 *Bacillus*나 *Streptomyces*와 같은 방선균으로부터 얻었다. 특히 *Streptomyces*는 streptomycin, chloramphenicol, neomycin, kanamycin, vancomycin 등 항생물질의 70% 이상을 생산하고 있어 의학적, 산업적으로 매우 유용한 자원이다(Watve *et al.* 2001). 그러나 수십 년간의 연구로 새로운 원천이 고갈되는 양상을 보여 경제성이 떨어지고 있는 추세이다(Berdy 2005; Koehn and Carter 2005). 이에 선진국들은 해양미생물 유래 천연물에 대해 집중적인 연구를 수행하고 있다(Proksch *et al.* 2003).

본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp. YJ-1 균주와 같은 속인 *Pseudomonas*속은 약 800여 종의 생리 활성물질을 생산한다고 보고되었으며, 이 중에서 약 50여 종의 항생물질이 보고되었다(Berdy 2005). *Pseudomonas*속에서 생산된 물질 가운데 현재 상용화된 항생물질은 *P. fluorescens*가 생산하는 pseudomonic acid 외에는 거의 없는 실정으로(Fritza *et al.* 2009), 최근에 MRSA에 대해 기존의 항생제보다 높은 항균활성을 나타내는 물질을 생산하는 해양 *Pseudomonas*속이 보고되었다(Salomon *et al.* 2004). 해양은 지구의 70%를 차지하고 있으며, 지구에 존재하는 생물의 80% 이상이 해양에 서식하고 있다(Hamann and Scheuer 1993). 이에 다양한 물리적 환경조건을 가지고 있으며 토양에 비해 비교적 특수한 환경이라고 할 수 있는 해양미생물을 대상으로 MRSA에 항균활성을 가지는 물질을 screening 한다면, 기존의 항균물질과는 다른 구조나 작용 메커니즘을 가지는 새로운 항균물질을 개발할 가능성이 높을 것이다(Gulder and Moore 2009).

이에 본 연구에서는 해양에서 분리한 항MRSA 활성을 나타내는 YJ-1 균주를 분리, 동정하고 생리, 생화학적 특성을 조사하였으며, 이 균주가 생산하는 항MRSA 활성물질을 분리, 정제하여 신규 항생제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 해양미생물의 분리 및 표준 균주의 배양

MRSA에 강력한 항균활성을 나타내는 균주를 분리하기 위해, 울진 앞바다의 표층 해수를 멸균된 MB 채수기로 무균적으로 채수하였으며, 채수된 시료는 ice-box에 보관하여 3시간 이내에 연구실로 옮겨 실험하였다. 본 실험에 사용할 항MRSA 활성을 가지는 미생물을 분리하기 위해, 해수 시

료를 십진희석법으로 희석하여 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 mL, seawater 1 L, initial pH 7.6) 배지 (Taga 1968)에 평판도말법으로 도말하여 20°C에서 7일간 배양 후, 형성된 특징적인 형태의 colony를 모두 선별하였다. 분리한 균주는 nutrient agar (NA; difco, USA) 배지에 3차 streaking 한 후 single colony를 확인하여 순수 분리하였다.

분리 균주들의 항MRSA 활성 조사를 위한 MRSA 표준 균주는 Korea Culture Center of Microorganisms (KCCM; Seoul, Korea)에서 분양받은 표준 균주 MRSA KCCM 40511과 동아대학교 병원에서 임상 분리한 6개 (DA 3, 9, 11, 12, 16, 18)의 MRSA 균주들 (strains)을 사용하였다. 또한 Korean Collection for Type Cultures (KCTC; Daejeon, Korea)에서 5종의 병원성 세균들을 분양받아 항균활성용 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 균주들은 nutrient broth (NB; difco, USA)배지와 PPES-II 배지를 사용하여 25~30°C에서 배양하였다. 본 실험에서 사용한 병원성 세균들은 다음과 같다; *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358, *Bacillus subtilis* KCTC 1028, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2001, *Legionella birminghamensis* KCTC 2007, *Shigella flexneri* KCTC 2008.

2. 분리 균주들의 항MRSA 활성 검증

항MRSA 활성을 가지는 분리 균주들의 활성을 검증하기 위하여 각 분리 균주들의 배양농축액을 이용하여 disk agar diffusion assay (National committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 2009)법으로 측정하였다. 즉, 본 실험의 MRSA 표준 균주인 MRSA KCCM 40511 균주가 도말된 NA 배지에 각 분리 균주들의 배양농축액을 2-fold serial dilution 하여 paper disk에 loading한 후 25°C에서 48시간 배양 후 생육 저지대 (inhibition zone)의 직경 (mm)을 측정하였다. 이때 positive control로 동량의 vancomycin (Merck, Germany)을 첨가하여 활성을 비교 측정하였다. 예비실험 결과, 가장 우수한 항MRSA 활성을 보인 균주를 선별하여 YJ-1이라 명명한 이후 실험에 사용하였다.

3. YJ-1 균주의 염기서열 분석 및 동정

MRSA에 대한 가장 높은 활성을 보인 YJ-1 균주를 분류, 동정하기 위해서, API 20NE와 API 50 CH kit (Biomerieux, France)를 이용하였으며, 또한 Biochemical tests for identification of medical bacteria (MacFaddin 1980)의 방법에 준하여 형태적, 생리 및 생화학적 특성들을 조사하였다. 그 결과를 apiweb™ database에 입력하여 1차적으로 분류학적 유

사성을 검토하였으며, 또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 염기서열 분석을 진행하였다 (Dunbar *et al.* 2000). 즉 선별된 YJ-1 균주를 PPES-II 배지에서 18시간 배양한 후 AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer 쌍은 49F (5'-AGAATTCTNANACATGCAAGTCG AICG-3')와 1492R (5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTTACG ACTT-3')을 사용하였다. 이때 forward primer의 5'에는 제한 효소 EcoRI의 인식 부위를, reverse primer의 5'에는 BamHI의 인식 부위를 첨가하였다.

PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 실시하였다. 먼저 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 µL의 *Escherichia coli* XL1-blue competent cell에 transformation시킨 후 alkaline lysis mini-prep 방법 (Sambrook *et al.* 1989)으로 plasmid를 mini-prep 하였다. 또한 Termination Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer, USA)와 ABI 377 genetic analyzer (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 염기서열을 분석한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GeneBank database에서 가장 상동성이 높은 균주들과 염기 서열을 비교하였다. 염기서열을 Clustal W program으로 정렬한 후, MEGA 5 package (Tamura *et al.* 2011)를 이용하여 계통도를 작성하였다. 계통 분류학적 유연관계에 대한 통계적 안정성을 검증하기 위하여 1,000회의 resampling에 근거한 bootstrap 분석을 수행하였다.

4. 조추출액의 열과 pH에 대한 안정성 검증

YJ-1 균주가 생산하는 물질의 열 안정성 및 pH 안정성을 알아보기 위한 실험은 다음과 같다. 미생물 분리 후 냉장 보관되어 있던 YJ-1 균주를 nutrient agar에 streaking 한 후 single colony를 확인하고 이를 nutrient broth 75 mL 삼각 flask에 접종하여 전배양 하였다. 전배양액을 PPES-II 액체 배지 37 L에 재접종하여 최적 배양 조건인 25°C, pH 7.0에서 100 rpm으로 7일간 배양하였다. 배양 후 세균 배양액을 8,000 × g로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 pore size 0.2 µm polycarbonate membrane filter로 여과하였다. 이 배양 여과액을 ethyl acetate (DUKSAN, Korea)와 1:1로 혼합하고 ethyl acetate로 3회 반복 추출하여 rotary evaporator

(Eyela, Japan)로 감압 농축하여 조추출액(ethyl acetate 추출액)을 얻었다. 이 조추출액을 4, 20, 40, 60, 80, 100°C에서 24시간 방치한 후, MRSA KCCM 40511 균주배양액(5.0×10^6 cells mL⁻¹)에 10%가 되도록 접종하여 anti-MRSA의 상대 활성을 비교 측정하였다. 이 때 control에는 조추출액 대신 동량의 신선한 PPES-II 액체배지를 첨가하였으며, 가장 활성이 높았던 4°C를 기준으로 상대 활성을 측정하였다.

또한 YJ-1 균주가 생산하는 물질의 pH 안정성을 알아보기 위해서, 최적 조건에서 배양한 YJ-1 균주 배양 여과액의 조추출액을 pH 2.0~9.0으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정치한 후, 다시 pH를 7.0으로 조절하여 상기와 동일한 방법으로 anti-MRSA 상대 활성을 비교 측정하였다. 이때 pH는 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0~5.0)와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0~10.0)를 사용하여 조절하였다. 또한 control에는 각각의 pH에 따라서 조추출액을 포함하지 않은 buffer 용액을 첨가하였다.

5. YJ-1의 물질 분리, 정제와 항MRSA 활성 및 항균활성 측정

YJ-1 균주가 생산하는 항MRSA 물질을 분리, 정제하기 위한 실험은 다음과 같다. 상기의 ethyl acetate 조추출액을 hexane (Duksan, Korea)과 80% MeOH로 이층 분배하고 감압 농축하여 상기의 조건으로 배양한 MRSA KCCM 40511에 대하여 항균활성 테스트(NCCLS, 2009)를 행하였다. 활성을 나타낸 80% MeOH층을 C₁₈ ODS open column (DAISO, Japan)으로 분획하였다. 용매로는 D.W., 20% MeOH부터 100% MeOH까지, dichloromethane을 사용하였다. 용출된 fraction들을 감압 농축하여 항MRSA 활성을 보인 80% MeOH층을 silica gel chromatography (Silica 60, Merck, Germany)를 이용하여 다시 분획하였다. 용매로는 hexane과 ethyl acetate를 8:2, 6:4, 4:8, 8:2로 혼합한 것, ethyl acetate, MeOH, dichloromethane을 사용하였다. 항MRSA에 활성이 높게 나타난 100% MeOH fraction을 reverse phase HPLC (YMC ODS-A column, 10×250 mm; 60~100% MeOH flow rate, 1.5 mL min⁻¹)로 분리, 정제하여 순수한 항MRSA 물질 MR1, MR2, MR3를 얻었다.

이상의 추출, 정제 방법으로 얻은 최종 순수물질 MR1, MR2, MR3의 활성 측정법은 다음과 같다. 먼저 항MRSA 활성 측정을 위해 MRSA 표준 균주인 MRSA KCCM 40511 균주를 포함하여 MRSA 임상 분리 균주들(DA 3, 9 11, 12, 16, 18)을 최적 조건으로 배양한 후, nutrient agar 배지에 100 µL를 도말배양하고 MR1, MR2, MR3 물질을 각각 5 µg부터 2-fold dilution하여 disk에 접종하여 저해환의 크기를 측

정하였다. 또한 그 외 KCTC에서 분양받은 5종의 그람 양성 및 그람 음성의 병원성 세균들에 대한 항균활성도 상기의 방법으로 동일하게 비교 측정하였다. 이때 MR1, MR2, MR3 물질의 농도는 0.31 µg disk⁻¹로 통일하여 항균활성을 비교하였다.

6. 시판 항생제와의 첨가 시간별 항MRSA 활성 비교 측정

MR1 물질의 첨가 시간별, 농도별 항MRSA 활성을 시판중인 β-lactam계 항생제와 비교 실험하였다. 먼저 24 well plate에 최적 조건(25°C)으로 배양한 MRSA KCCM 40511 균주 배양액을 넣고, 신선한 PPES-II 액체배지를 첨가하여 균주의 최종 농도가 5.0×10^6 cells mL⁻¹가 되도록 하였다. 이후 MR1 물질을 1 mg mL⁻¹가 되도록 첨가하여 2-fold dilution으로 48시간 배양하며 살아있는 MRSA KCCM 40511 균주의 생균수를 측정하여 항MRSA 활성을 측정하였다. 이때 positive control로 동량의 β-lactam계 항생제인 ampicillin (Merck, Germany)과 glycopeptide계 항생제인 vancomycin (Merck, Germany)을, negative control로 동량의 MeOH (Duksan, Korea)를 첨가하였다. 또한 각각의 항생물질은 배양 3시간, 18시간, 27시간에 각각 첨가하여 배양하면서 각 항생물질의 첨가 시간별 활성을 3시간 간격으로 5회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

7. MR1과 vancomycin의 병용 시 첨가 시간별 synergy 효과 측정

MR1 물질과 vancomycin의 synergy 효과를 알아보기 위하여, 상기와 같은 방법으로 실험하였다. 최종 농도가 250 µg mL⁻¹가 되도록 동량의 MR1 물질과 vancomycin을 함께 첨가하여 배양하면서 MRSA KCCM 40511 균주의 배양 시간별 생균수를 측정하였다. 2가지 항생물질의 병용 처리 시, 첨가 시기도 상기의 실험과 비교하기 위하여 3시간, 18시간, 27시간으로 하였으며, 이때 negative control로 동량의 MeOH를 첨가하였고 5회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 항MRSA 활성 균주 YJ-1의 분리 및 동정

울진 연안 해역의 해수로부터 서로 다른 colony색과 형태를 가진 92개의 해양미생물 균주를 분리하였으며, 그 각각

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of a YJ-1 isolate selected from API 20NE, API 50CH, and other tests

Tests	Results	Tests	Results
Cell shape	rod	Assimilation of:	+
Color	creamy-yellow on PPES-II agar	<i>N</i> -Acetyl-glucosamine	+
Gram staining	Negative	Citrate	+
Motility	motile	Caprate	+
Spore	non-spore forming	Malate	+
Oxidase test (cytochrome oxidase)	+	Adipate	-
Catalase test	+	D-Xylose	+
pH optimum	7.0	D-Trehalose	+
Temperature optimum (°C)	25	Phenylacetate	-
Growth at 4°C-37°C	+	Gluconate	+
Growth at 40°C	-	Glucose	+
Indole production	-	Maltose	-
Reduction of nitrates to nitrites	-	Mannitol	+
Acidification during glucose fermentation	-	Mannose	+
Arginine dihydrolase	+	L-Arabinose	+
Urease	-		
DNase	-		
Presence of β -glucosidase (esculin hydrolysis)	-		
Presence of β -galactosidase	-		
Tween 80 hydrolysis	+		
Gelatin hydrolysis (protease)	+		

+, Positive result or growth; -, Negative result or no growth. Values in parentheses were read after 48 hr.

의 colony를 PPES-II 평판배지에서 순수 분리하여 MRSA KCCM 40511에 대한 항MRSA 활성을 조사하였다. 총 4종의 균주가 항MRSA 활성을 보였으며, 그중 가장 강력한 활성을 나타낸 균주를 YJ-1이라 명명하였다. YJ-1 균주를 API 20NE와 API 50CH kit 및 MacFaddin의 방법에 따라 실험한 결과, 본 균주의 형태적, 생리 및 생화학적 특성은 다음과 같다. YJ-1 균주는 그람 음성 간균으로 운동성이 있고 포자를 형성하지 않았다. 또한 oxidase, catalase 양성이고, indole 생성능은 음성으로 나타났고, urease와 Dnase 활성은 없었으나 gelatin 액화능은 있었다(Table 1). 더욱이 YJ-1 균주의 최적 성장 조건을 조사하기 위하여 온도, pH, NaCl을 농도별로 실험한 결과, 최적 성장 온도는 25°C였으며, 40°C 이상에서는 성장하지 못하였고, 최적 pH는 7.0으로 나타났다. 또한 최적 염농도는 1% NaCl 농도에서 가장 높게 나타났지만, 0% NaCl 농도에서와 큰 차이는 없었다(Table 1). 이상의 결과들을 apiweb™ database에 입력하여 1차적으로 속 레벨까지 동정한 결과 *Pseudomonas*속으로 판명되었다. 이후 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용하여 염기서열을 분석하고, 계통분류학적 유연관계를 조사한 결과, YJ-1 균주의 16S rRNA gene은 *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588^T 균주의 16S rDNA와 99.2%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 이상의 결과 본 균주는 *Pseudomonas* sp. YJ-1으로 명명하고 이후의 실험을 진행하였다.

2. 조추출액의 열과 pH에 대한 안정성

Pseudomonas sp. YJ-1이 생산하는 물질의 열 안정성을 조사한 결과를 Fig. 2A에 나타내었다. YJ-1 균주의 ethyl acetate 조추출액은 4°C에서 가장 안정하였으며 60°C까지 활성의 차이가 거의 없었다. 또한 80°C와 100°C에서도 상대 활성이 80%로 나타나 비교적 안정한 결과를 나타내었다. 따라서 본 균주가 생산하는 항MRSA 물질은 열에 안정한 내열성 물질로 판단된다. 또한 본 균주가 생산하는 항MRSA 물질의 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 2B에 나타내었다. pH 7.0에서 가장 활성이 높게 나타났으며, pH 6.0과 8.0에서 93% 이상의 상대 활성을 나타내었고, pH 9.0에서도 79%의 상대 활성을 보여 알칼리에도 비교적 안정한 물질로 판단된다. 또한 pH 5.0 이하에서는 점점 상대 활성이 떨어지지만 pH 2.0에서도 55%의 상대 활성을 보여, *Pseudomonas* sp. YJ-1이 생산하는 항MRSA 물질은 강산에도 견디는 내산성 물질을 포함하고 있는 것으로 판단된다. 이상의 결과로 YJ-1 균주의 ethyl acetate 조추출액에는 1가지 이상의 활성 물질이 존재하며, 그중 어떤 물질은 강산과 강알칼리에도 비교적 안정한 물질로 추정된다.

3. YJ-1 균주의 항MRSA 물질의 분리, 정제

YJ-1 균주를 각 2 L의 삼각 플라스크에서 25°C, 100 rpm으로 교반하며 7일간 배양하여 총 37 L를 배양하였다. 이

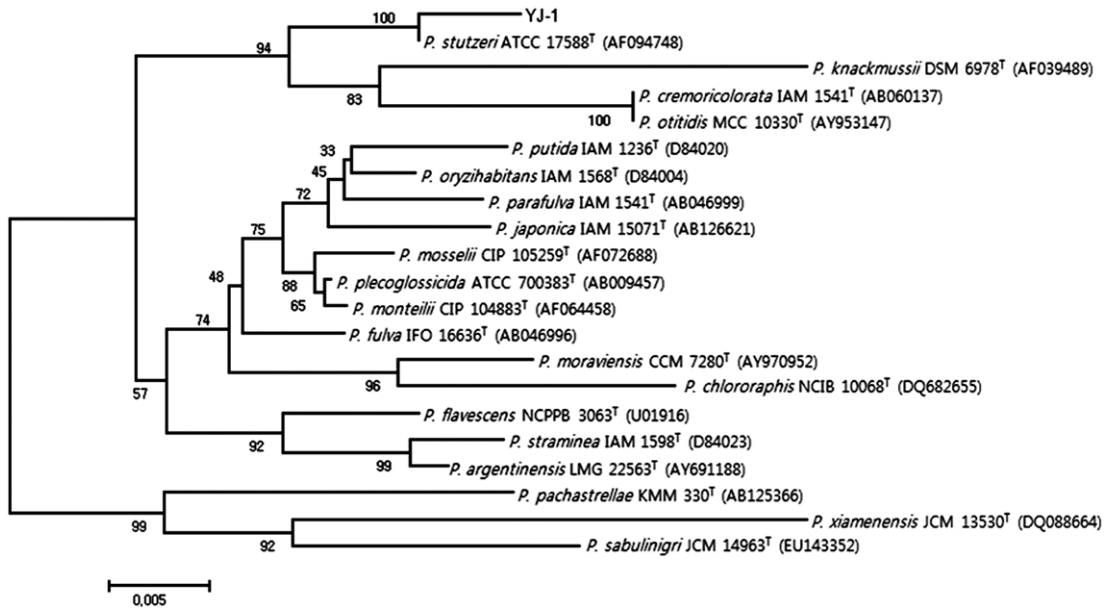


Fig. 1. A phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of *Pseudomonas* sp. YJ-1 and closely related members of the genus *Pseudomonas*. The numbers at the nodes are the levels of bootstrap support based on a neighbour-joining analyses of 1,000 replications.

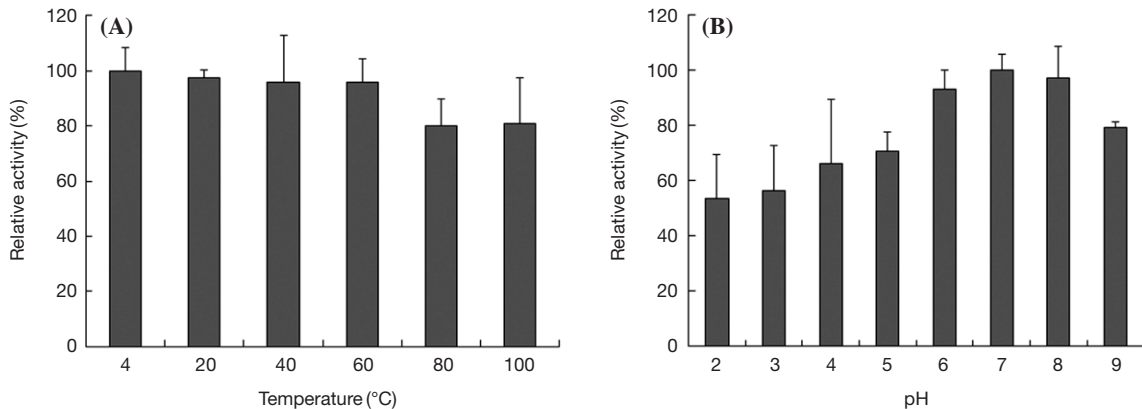


Fig. 2. The thermal (A) and pH stability (B) of the ethyl acetate extract of *Pseudomonas* sp. YJ-1. For the thermal stability test, the ethyl acetate extract was incubated at an indicated temperature for 24 hr. For the pH stability, the ethyl acetate extract was suspended in 50 mM sodium acetate buffer for the range of pH 2.0 to 5.0 and 50 mM sodium phosphate buffer for pH 6.0 to 10.0, and then kept in each buffer for 24 hr. After treatment, the anti-MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) activity was estimated. All assays were done in five times.

배양액을 ethyl acetate와 1 : 1 혼합한 후, 3회 반복 추출하여 ethyl acetate층을 회수하였다. 회수한 층을 evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축하여 2.665 g의 조추출물을 얻었다 (Fig. 3). 조추출물을 hexane과 80% MeOH로 이층 분배하여 지질층을 제거하였다. 항MRSA 활성을 나타낸 80% MeOH층 (1.547 g)을 가지고 C₁₈ ODS open column을 행하여 총 7개의 분획을 얻었다. 각 분획을 감압 농축하고 항MRSA 활성을 테스트 후, 활성을 나타낸 80% MeOH층 (0.082 g)을

silica gel column chromatography를 행하여 총 7개의 분획을 얻었다. 가장 활성이 높게 나온 100% MeOH층 (59 mg)을 reverse phase HPLC로 분리, 정제하여 3개의 순수 물질, MR1 (4 mg), MR2 (33 mg), MR3 (4 mg)를 최종적으로 얻었다 (Fig. 3).

4. 최종 정제 순수물질의 항MRSA 활성 및 항균활성

YJ-1 균주 배양액을 각종 유기용매, C₁₈ ODS column,

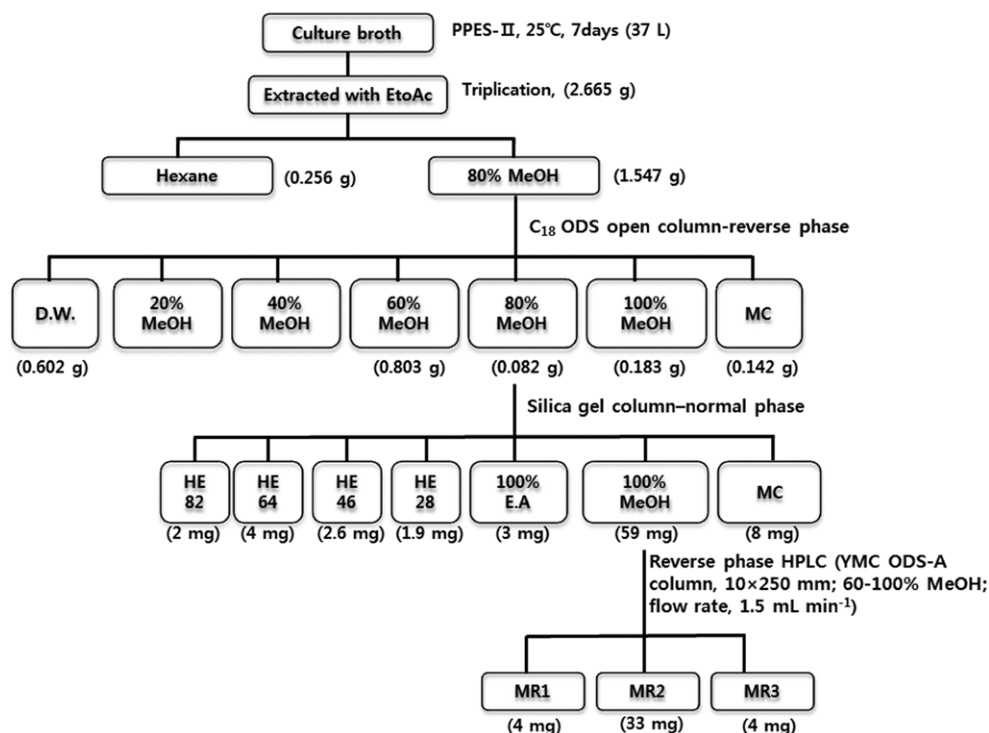


Fig. 3. Purification steps and yields of *Pseudomonas* sp. YJ-1.

silica gel chromatography, reverse-phase HPLC를 이용하여 추출, 정제하여 얻은 최종 순수물질 MR1, MR2, MR3의 항MRSA 활성과 항균활성을 측정된 결과는 다음과 같다(Fig. 4와 5, Table 2와 3). MRSA 표준 균주인 MRSA KCCM 40511 균주를 nutrient agar 배지에 100 μL 를 도말배양하고 MR1, MR2, MR3 물질을 각각 5 μg 부터 2-fold dilution하여 disk에 접종한 결과, 5 $\mu\text{g disk}^{-1}$ 농도에서 MR1 물질은 16 mm의 억제환을 MR2 물질은 24 mm의 억제환을 형성하였고, MR3 물질은 MIC (Minimum inhibitory concentration) 정도의 활성을 각각 나타내었다. 이때 positive control로 동량의 vancomycin을 첨가하여 활성을 비교 측정하였는데, MR2 물질은 vancomycin과 거의 비슷한 활성을 보여주었다(Fig. 4와 5, Table 2).

또한 MRSA 임상 분리 균주에 대한 항MRSA 활성과 그 외 그람 양성, 그람 음성의 병원성 세균들에 대한 항균활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 이때 MR1, MR2, MR3 물질의 농도는 0.31 $\mu\text{g disk}^{-1}$ 로 동일하여 항균활성을 비교하였다. 그 결과 실험 균주에 따라 활성은 조금씩 차이가 났지만, MR1 물질의 경우 MRSA 임상 분리 균주 DA 9, DA 12와 DA 18 균주 및 *Legionella birminghamensis* KCTC 2007 균주에 대해서 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. MR2 물질의 경우 DA 11과 DA 18 균주에 대해서 항MRSA 활성을

Table 2. The anti-MRSA activity of each pure compounds against the MRSA KCCM 40511. The MR1, MR2, and MR3 compounds were purified by a reverse-phase HPLC

	Concentration ($\mu\text{g disk}^{-1}$)				
	0.31	0.63	1.25	2.5	5
	Inhibition zone diameter (mm) ¹				
MR1	9	10	12	13	16
MR2	8	13	15	18	24
MR3	– ²	–	–	–	MIC ³

¹Disk diameter (6.0 mm) was included.

²–: No inhibitory zone was formed.

³Minimum inhibitory concentration.

나타내었고, 특히 그람 음성인 *Bacillus subtilis* KCTC 1028 균주에 대해서 14 mm의 가장 높은 저해환을 형성하였다. 그러나 그 외의 균주에 대해서는 항균활성을 보이지 않거나, MIC (minimum inhibitory concentration) 정도의 낮은 활성을 보여주었다. 이와는 달리 MR3 물질은 0.31 $\mu\text{g disk}^{-1}$ 의 농도에서는 실험한 모든 균주에 대해서 거의 활성을 나타내지 못하였다(Table 3). 또한 이상의 결과를 Table 2의 실험 결과와 비교해 볼 때, MR1과 MR2 물질은 농도에 비례하여 활성이 증가하였으나, MR3 물질은 5 $\mu\text{g disk}^{-1}$ 농도에서도 활성이 없거나 MIC 정도의 약한 활성을 나타내었다. 또한

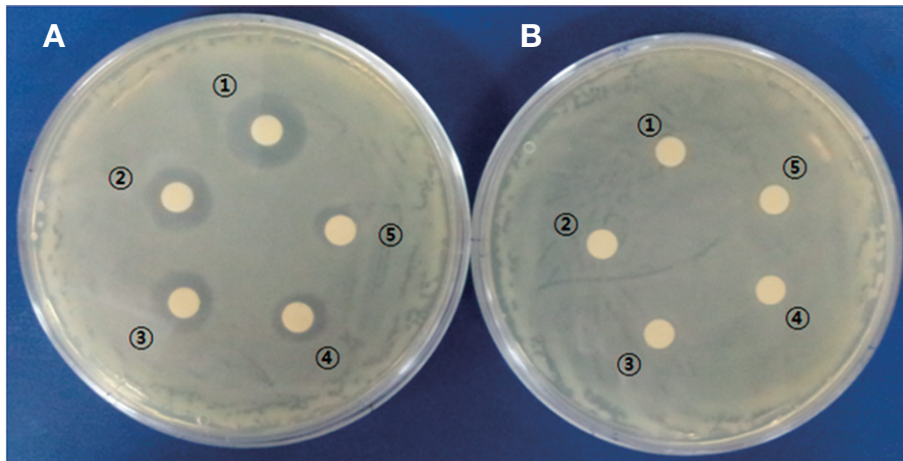


Fig. 4. Anti-MRSA activity of MR1 compound against MRSA KCCM 40511. MR1 compound was purified by a reverse-phase HPLC. (A) 1, MR1 5 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 2, MR1 2.5 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 3, MR1 1.25 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 4, MR1 0.63 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 5, MR1 0.31 $\mu\text{g disk}^{-1}$. (B) Negative control: 100% MeOH.

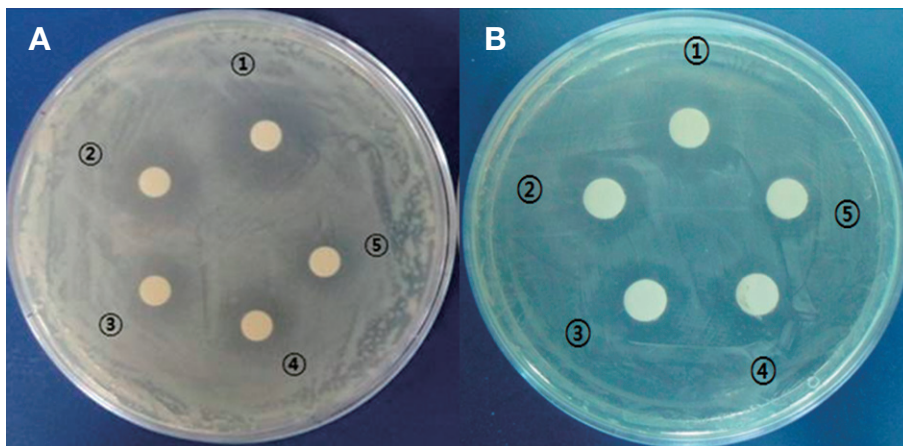


Fig. 5. Anti-MRSA activity of the MR2 compound against MRSA KCCM 40511. MR2 compound was purified by a reverse-phase HPLC. (A) 1, MR2 5 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 2, MR2 2.5 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 3, MR2 1.25 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 4, MR2 0.63 $\mu\text{g disk}^{-1}$; 5, MR2 0.31 $\mu\text{g disk}^{-1}$. (B) Positive control: vancomycin of equal concentration.

MR1과 MR2 물질은 기존의 상용 항생제들과 마찬가지로 gram negative 균주보다 gram positive 균주에 대해 더 높은 항균활성을 나타내었다(Table 3). 즉, MR1과 MR2 물질은 β -lactam계 항생제와 마찬가지로 peptidoglycan층을 파괴하여 gram positive 균주에 활성이 높은 것으로 판단되었다. 이상의 결과 MR1과 MR2 물질의 활성이 높은 것으로 판단됨에 따라, 보다 넓은 항균 스펙트럼을 보인 MR1 물질을 선택하여 후속 실험을 진행하였다.

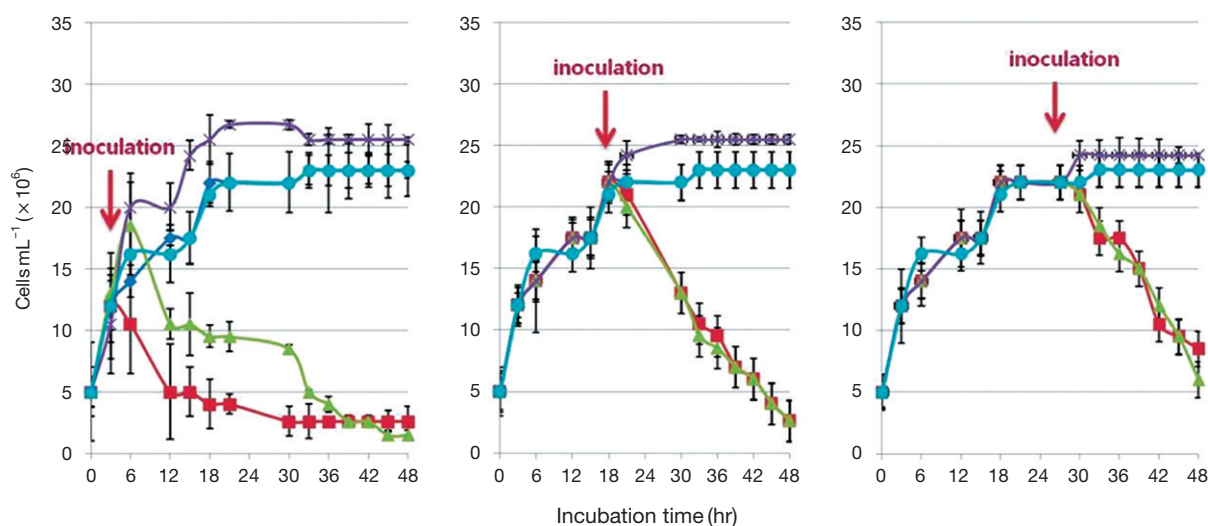
5. 시판 항생제와의 첨가 시간별 항MRSA 활성 비교

표준 균주인 MRSA KCCM 40511 균주의 증식에 따른

MR1 물질과 vancomycin 및 ampicillin의 첨가 시간별 항 MRSA 활성을 비교 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 먼저 각 항생물질을 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도로 첨가하였을 때의 결과를 살펴보면, MR1을 배양 3시간에 첨가하였을 때 9시간 만에 cell수의 급격한 저하를 나타내었으며, MRSA 치료제제로 사용되는 vancomycin보다 우수한 활성을 보여주었다. MR1을 배양 18시간과 27시간에 첨가하였을 때는 12시간 후에 급격한 cell 수의 감소를 일으켰으며, 48시간 이내에 거의 모든 MRSA KCCM 40511 균주를 사멸시켰다. 이 경우 MR1은 vancomycin과 거의 비슷한 수준의 활성을 나타내었다. 또한 MRSA KCCM 40511 균주는 negative control인

Table 3. Anti-MRSA activity against various MRSA strains and antibacterial activity against various pathogenic bacteria. The MR1, MR2, and MR3 compounds were purified by a reverse-phase HPLC

Test bacteria	Concentration ($\mu\text{g disk}^{-1}$)	MR1	MR2	MR3
		Inhibition zone diameter (mm) ¹		
Gram positive				
DA ² 3	0.31	7	MIC ³	MIC
DA 9	0.31	10	- ⁴	-
DA 11	0.31	MIC	9	-
DA 12	0.31	10	-	-
DA 16	0.31	MIC	-	-
DA 18	0.31	9	8	-
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC ⁵ 1028	0.31	7	14	-
Gram negative				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2001	0.31	-	MIC	-
<i>Legionella birminghamensis</i> KCTC 2007	0.31	10	MIC	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> KCTC 2358	0.31	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	0.31	-	-	-

¹Disk diameter (6.0 mm) was included.²DA : MRSA strains were isolated in Medical Hospital of Dong-A University.³Minimum inhibitory concentration.⁴- : No inhibitory zone was formed.⁵Korean Collection for Type Cultures.**Fig. 6.** Comparison of the Anti-MRSA activity of the MR1 compound, vancomycin, and ampicillin against MRSA KCCM 40511 by the inoculation time. -■-, MR1 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; -▲-, vancomycin 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; -×-, ampicillin 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; -◆-, MRSA KCCM 40511; -●-, 100% MeOH.

MeOH에 의한 항균활성은 보이지 않았으며, ampicillin에 대해서는 약한 항균활성을 보였다. 이것은 ampicillin의 농도가 낮아서 나타나는 현상으로 판단된다(Fig. 6). MR1과 각 항생물질들을 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 와 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 고농도로 첨가하였을 때의 실험 결과, 3가지 항생물질 모두 3시간 이내에 MRSA KCCM 40511 균주의 증식을 억제하는 것으로 나타났으며, 더욱이 MR1의 첨가량과 반응시간에 비례하여 항 MRSA 활성이 증가하였다(자료 미제시). 이상의 결과 MR1

물질은 ampicillin보다 월등히 우수한 항균활성을 보였으며, vancomycin과 비슷하거나 보다 우수한 항균활성을 보이는 것으로 판단된다.

6. MR1과 vancomycin의 병용 시 첨가 시간별 synergy 효과

MRSA KCCM 40511 균주의 증식에 따른 MR1 물질과 vancomycin의 병용 처리 시(최종 농도 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 항

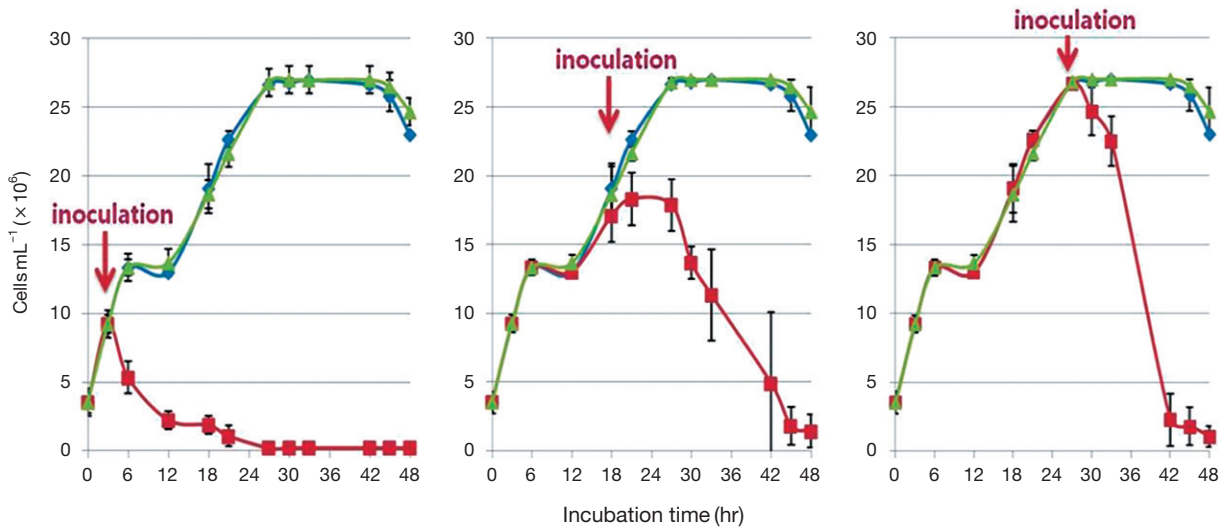


Fig. 7. Synergistic effect of a MR1 compound and vancomycin against MRSA KCCM 40511 by the inoculation time. ■-, MR1 and vancomycin 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ◆-, MRSA KCCM 40511; ▲-, 100% MeOH.

MRSA synergy 효과를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 먼저 배양 3시간에 병용 첨가 시, 3시간부터 cell수의 급격한 감소가 나타나기 시작하여 첨가 24시간 후에 생균수가 zero에 가까워져 단독처리 시 보다 우수한 활성을 보여주었다. 또한 배양 18시간에 병용 첨가 시, 바로 효과가 발생하지는 않았지만 첨가 9시간 후에 효과가 나타나기 시작하여 첨가 27시간 후에 $2.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ 로 감소하였다. 배양 27시간에 병용 첨가 시에는 바로 cell수의 감소가 나타나기 시작하여, 첨가 21시간 후에 생균수가 zero에 가까워졌다. 배양 18시간 후에 병용 처리하였을 때 항MRSA 활성이 조금 느리고 낮게 나타나는 것은, 실험 시 신선한 PPES-II 배지를 넣어주어서 MRSA KCCM 40511 균주의 생존력이 조금 증가한 결과로 판단된다. 이상의 결과를 Fig. 6의 결과와 비교해보면, MR1과 vancomycin을 각각 단독처리 했을 때보다 병용 처리 시, 첨가 시간에 상관없이 모두 항MRSA 활성 증가 현상이 나타났음을 알 수가 있었다. 즉 본 연구에서 순수 분리한 항생물질인 MR1은 vancomycin과 함께 처리했을 때, 항MRSA 활성이 증가하는 synergy 효과를 보여 주었다.

순수 분리한 항생물질과 기존 항생물질과의 조합에 의한 synergy 효과는 항생물질 개발의 중요한 연구대상이 되어왔다 (Shiota *et al.* 2004). Kim *et al.* (2009)은 20-hydroxyecdysone을 ampicillin과 gentamicin에 각각 첨가하였을 때, 항MRSA 활성이 각각 $4.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ 와 $0.031 \mu\text{g mL}^{-1}$ 까지 증가하였다고 보고하였다. 또한 최근 Cha *et al.* (2014)은 단삼에서 분리한 cryptotanshinone과 항생제 병용 처리 시의 MRSA에 대한 synergy 효과를 조사한 결과, ampicillin, oxycillin,

vancomycin의 각각의 단독처리보다 병용 처리 시 항균활성의 synergy 효과가 매우 높아짐을 보고 하였다.

향후 본 연구에서 순수 분리한 항생물질인 MR1, MR2 및 MR3의 조합에 의한 항MRSA synergy 효과 및 기타 잘 알려진 기존 항생물질과의 조합에 의한 synergy 효과를 조사한다면 새로운 항생물질 개발의 기초자료로서 활용 가치가 높을 것으로 판단된다. 또한 MR1과 MR2 물질이 기타 감염성의 병원성 세균에 미치는 영향에 대해서도 면밀히 연구할 가치가 높다고 판단된다.

적 요

본 연구의 목적은 항 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 활성을 가지는 해양미생물을 분리, 동정하고 항MRSA 물질을 분리 정제하여 그 물질의 활성과 시너지 효과를 밝히는 것이다. 본 연구에서 분리한 해양미생물 중에서, YJ-1 분리 균주가 가장 강한 항MRSA 활성을 나타내었다. YJ-1 균주는 생화학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초하여 분류 동정되었다. YJ-1 균주의 염기서열은 *Pseudomonas stutzeri*와 99.2%의 상동성을 나타내어, *Pseudomonas* sp. YJ-1이라 명명하였다. 이 균주의 최적 성장조건은 25°C와 초기 pH 농도 7.0이었다. 항MRSA 물질들을 분리정제하기 위하여 YJ-1 균주를 PPES-II 배지에 배양하였으며, 배양 상등액을 ethyl acetate, hexane과 80% MeOH로 순차적으로 추출하였다. 활성을 보인 80% MeOH 분획을

C₁₈ ODS 칼럼 크로마토그래피, silica gel 크로마토그래피와 역상 HPLC법으로 순차적으로 정제하여 항MRSA 활성을 가지는 3개의 순수물질 MR1, MR2 및 MR3를 얻었다. 250 µg mL⁻¹ 농도의 MR1 물질을 MRSA 세포에 접종했을 때, MRSA 세포의 95%가 48시간 이내에 사멸하였다. 활성을 vancomycin 및 ampicillin과 비교해 보아도, MR1 물질은 보다 우수한 항MRSA 활성을 나타내었다. 또한 항MRSA 활성은 투여량과 시간에 비례하여 증가하였다. 더욱이 MR1 물질과 vancomycin을 조합하여 시너지 효과를 보았을 때, MR1 물질을 단독으로 투여했을 때보다 신속한 MRSA 세포의 감소를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 종합해보면, MRSA 감염에 있어서 *Pseudomonas* sp. YJ-1과 이것이 생산하는 항MRSA 물질은 천연 항균제로서 기여할 수 있으리라 판단된다.

사 사

이 논문은 2012년도 대구가톨릭대학교 교내연구비 지원에 의한 것임(20121382).

REFERENCES

- Akcam FZ, GB Tinaz, O Kaya, A Tigl, E Ture and S Hosoglu. 2009. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in mecA-positive *Staphylococcus aureus*, and comparison of mecA with femA, femB, femX positivities. *Microbiol. Res.* 164: 400-403.
- Bassetti M, E Nicco and M Mikulska. 2009. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? *Int. J. Antimicrob. Agents* 34:S15-S19.
- Bell JM, JD Tumidge and A Sentry. 2002. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia Pacific and South Africa: results from sentry antimicrobial surveillance program, 1998-1999. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:879-881.
- Berdy JJ. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1-26.
- Boyle-Vavra S, RB Carey and RS Daum. 2001. Development of vancomycin and lysostaphin resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:617-625.
- Cha JD, JH Lee, KM Choi, SM Choi and JH Park. 2014. Synergistic effect between cryptotanshinone and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evid.-based Complement Altern.* 2014:450572.
- Crum NF, RU Lee, SA Thornton, OC Stine, MR Wallace, C Barrozo, A Keffer-Norris, S Judd and KL Russell. 2006. Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Med.* 119:943-951.
- Davis SL, MB Perri, SM Donabedian, C Manierski, A Robinson-Dunn, MK Hayden and MJ Zervos. 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Clin. Microbiol.* 45:1705-1711.
- Dunbar J, LO Tickno and CR Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2943-2950.
- Faver B, B Hofbauer, KS Hildering and NS Ryder. 2003. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J. Clin. Microbiol.* 41:4817-4819.
- Fritza E, A Fekete, J Lintelmann, P Schmitt-Kopplin and RU Meckenstock. 2009. Isolation of two *Pseudomonas* strains producing pseudomonic acid A. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 56-64.
- Grundmann H, M Aires-de-Sousa, J Boyce and E Tiemersama. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368:874-885.
- Gulder TA and BS Moore. 2009. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:252-260.
- Hamann MT and PJ Scheuer. 1993. Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 5825-1826.
- Hong SN, J Kim and HH Sung. 2016. A study on changes in antimicrobial resistant *Staphylococcus aureus* from wound isolates in a South Korean University hospital for the past 10 years. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* 48:335-342.
- Howden BP, JK Davies, PD Jonhson, TP Stinear and ML Grayson. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:99-139.
- Hiramatsu K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect.*

- Dis. 1:147–155.
- Jung JH and HC Chang. 2009. *Bacillus polufermenticus* CJ9, isolated from Jeju, showing antifungal and antibacterial activities. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 37:340–349.
- Kim ES, SI Jeong, JH Kim, C Park, SM Kim, JK Kim, KM Lee, SH Lee, H So and R Park. 2009. Synergistic effects of the combination of 20-hydroxyecdysone with ampicillin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Microbiol. Biotechnol. 19:1576–1581.
- Kitai S, A Shimizu, J Kawano, E Sato, C Nakano, T Uji and H Kitagawa. 2005. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. J. Vet. Med. Sci. 67:107–110.
- Koehn FE and GT Carter. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 4:206–220.
- Lee K, SJ Jang, HJ Lee, N Ryoo, M Kim, SG Hong and Y Chong. 2004. Increasing prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae*, and imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Korea: KONSAR study in 2001. J. Korean Med. Sci. 19:8–14.
- MacFaddin JF. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 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, physicochemical properties and biological properties. J. Antibiot. 56:123–128.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M07-A8. 8th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Park YJ, JS Jeong, ES Park, ES Shin, SH Kim and YS Lee. 2007. Survey on the infection control of multidrug-resistant microorganisms in general hospitals in Korea. Korean J. Nosocomial Infect. Control 12:112–121.
- Proksch P, RA Edrada and R Ebel. 2003. Drugs from the sea—opportunities and obstacles. Mar. Drugs 1:5–17.
- Salomon CE, NA Magarvey and DH Sherman. 2004. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. Nat. Prod. Rep. 21:105–121.
- Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Shiota S, M Shimizu, J Sugiyama, Y Morita, T Mizushima and T Tsuchiya. 2004. Mechanisms of action of corilagin and tellimagrandin I that remarkably potentiate the activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 48:67–73.
- Taga N. 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the KuroShio current. Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ. 12:65–76.
- Tamura K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei and S Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731–2739.
- Watve MG, R Tickoo, MM Jog and BD Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch. Microbiol. 176:386–390.
- Yee C, D Biek, K Karause and G Williams. 2011. Ceftarolin: a cephalosporin with anti-MRSA activity. Clin. Microbiol. Newsl. 33:161–169.
- Yucel N, S Citak and M Onder. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiol. 22:241–245.

Received: 26 November 2017

Revised: 14 December 2017

Revision accepted: 14 December 2017