

## 다제내성 *Acinetobacter baumannii*의 성장을 억제하는 항생물질을 생산하는 방선균의 분리·동정 및 항균효과

이기형\*

공주대학교 산업과학대학 응용미생물 전공

Received: January 7, 2011 / Revised: March 4, 2011 / Accepted: March 5, 2011

**Isolation and Identification of a *Streptomyces* sp. that Produces Antibiotics Against Multidrug - Resistant *Acinetobacter baumannii*. Rhee, Ki-Hyeong\***. Department of Applied Microbiology, Kongju National University, Chungnam 340-702, Korea – I isolated the actinomycete strain KH223 from soil samples collected from the Kye Ryong mountain area. This strain is antagonistic to the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. KH223 was confirmed as belonging to the genus *Streptomyces* based on the scanning electronmicroscopy(SEM) observations of the diaminopimelicacid(DAP) type and morphological and physiological characteristics. Comparison of the 16S rDNA nucleotide sequences revealed that KH223 has a relationship with *Streptomyces galbus*. Production of antibiotics by KH223 was most favorable when cultured on a glucose, polypeptone, and yeast extract(PY) medium for 6 days at 27°C. The supernatant was found to exhibit an antimicrobial effect on various kinds of bacteria and fungi. Particularly, butanol and ethylacetate extracts of KH223 and cyclo(trp-trp) exhibited significant activity against *A. baumannii* at concentration ranges of 0.8-12.5 µg/mL, 5.0-25 µg/mL and 12.5→100 µg/mL, respectively. Moreover, in contrast to cyclo(trp-trp) had shown to activity against *Micrococcus luteus* JCM 1464 at the concentration of 12.5 µg/mL, the butanol extract of KH223 showed significant activity against *Bacillus subtilis* IAM 1069 and *Micrococcus luteus* JCM 1464 at the concentration of 0.4 and 0.8 µg/mL, respectively. These results suggest that KH223 may have a great potential in the production of new antibiotics to combat multidrug-resistant pathogens and further studies may be warranted for the same.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, multi-drug resistant, *Streptomyces* sp. KH223

### 서 론

자연은 임상에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역억제제 뿐만 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 생장촉진제, 살충제, 제초제등을 포함하여, 경이로울정도로 무수한 생물학적 활성을 지니는 화합물들을 생산한다. 생리활성물질을 생산하는 미생물 중 여전히 75% 이상은 방선균에 의한 것이며, 이러한 이유로 방선균은 항생물질로 대표되는 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 산업적으로나 의학적으로 중요한 미생물로 다루어지게 되었다 [7, 17]. 지금까지 많은 종류의 항생물질이 발견·분리되어 질병치료에 널리 이용되고 있으나, 점차 내성이 생긴 병원성 미생물이 출현하게 되었다. 1980년 이후 과도한 항생제의 사용으로 더욱 더 많은 내성균주가 발생되고 있으며, 항생제의 남용으로 인한 내성균주의 출현은 인간에게 예상치 않는 문제점이 나타나게 되었다 [3, 4]. *Acinetobacter baumannii*

는 포도당 비발효 그람음성 간균으로, 최근 증가하고 있는 병원감염의 주요한 원인균 중 하나로 병원 환경에서 상당기간 생존가능하며 사람이나 기구에 의한 전파로 병원 내 감염을 유발하며 균혈증, 뇌막염, 요로감염, 창상감염 등을 일으키는 등, 병원감염 폐렴의 중요한 원인균이다. 최근에는 이라크에 파견된 미군들에 *A. baumannii* 감염사례가 심각하게 대두되고 있으며 사망률이 20% 이상 된다 [1]. *A. baumannii*는 Beta-lactam 항균제를 비롯한 대부분의 약제에 높은 내성을 보이고 있다. 현재까지는 imipenem이 가장 효과적인 치료제로 사용되고 있었다 [2]. Imipenem 내성 균주에 의한 감염은 사실상 기존에 쓰이던 항균제로는 치료가 어려우며 최근 colistin 같은 기존에 쓰이지 않던 치료제를 사용하거나 두 가지 이상의 항균제를 병합하는 것이 시도되고 있다. 하지만 최근에는 이들 항생제에도 내성을 보이는 균주가 보고되고 있다 [8, 10, 12]. 현재 *A. baumannii*에 감염되면 효과적으로 치료할 수 있는 적절한 항생제가 아직까지는 없는 점에서 특별한 대안이 없고, 또한 새로운 내성균주들의 출현이 계속되고 있는 추세에 항내성균성 항생물질의 개발 현황은 현재까지 내성발현에 초점을 맞춰 끊임없는 물질 분리 연구

\*Corresponding author

Tel: +82-41-330-1626, Fax: +82-41-330-1629

E-mail: howard@kongju.ac.kr

가 진행중이나 아직까지 주목할 만한 성과는 거의 없는 형편이다. 따라서 앞으로 내성병원균주에 대한 강력한 살균효과를 나타내는 새로운 항생제의 개발이 시급한 것으로 판단된다.

본 연구자는 새로운 항생물질을 개발하고자 하는 연구의 일환으로 다양한 미생물을 분리하였으며 이들 연구를 기초로 하여 독성이 없으며 또한 항균스펙트럼이 넓은 새로운 항생물질을 탐색해 보았다. 먼저 다제내성 *A. baumannii*에 유효한 항생물질을 생산하는 방선균을 분리하고자 계통산 일대의 토양을 수집하여 수집한 토양시료에서 1차적으로 170여 균주를 분리하였다. 이들 균주를 사용하여 *A. baumannii*에 비교적 큰 항균활성을 보이는 균주 2종을 선별하여 각각 KH222, KH223라 명명하였으며, *A. baumannii*에 강한 활성을 보이는 KH223을 공시균주로 사용하였다. 또한 본 연구의 일환으로 *A. baumannii*에 강한 활성을 보이는 항생물질을 생산하는 방선균인 KH29 균주의 동정 및 균주가 생산하는 물질의 동정이 완료된 내용의 연구 논문을 기 발표한 바 있다[6]. 기 발표된 항 *A. baumannii* 항생물질인 cyclo (trp-trp)과의 항생능력 비교연구를 바탕으로 보다 우수한 항생제를 생산할 수 있는 기반을 마련하고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 항생물질을 생산하는 균주의 분리

항균활성물질을 생산하는 균주를 분리하기 위하여 계통산 일대에서 토양을 채취하였으며, 토양시료 1 g을 60°C에서 30분간 건조하여 잘게 분쇄한 다음, 멸균된 증류수 9 ml의 멸균수에 현탁 후, 현탁액 1 ml를 Bennett's agar 배지(glucose 10 g, polypepton 2.0 g, meat extract 1.0 g, yeast extract 1.0 g, agar 15.0 g, 증류수 1,000 mL, pH 7.0)에 도말하였다. Bennett's agar 배지에는 곰팡이와 세균의 증식을 억제하기 위해 nalidixic acid와 cyclohexamide를 2 mg/L를 첨가하였다. 이를 27°C, 5-7일간 배양하여 평판에 나타난 colony 중에서 형태와 색소를 기준으로 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 보이는 colony만 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주는 yeast-malt extract agar 배지(yeast extract 4.0 g, meat extract 10.0 g, glucose 4.0 g, agar 15.0 g, 증류수 1,000 mL, pH 7.0)에서 1주일 동안 25°C에서 배양하여 *A. baumannii* 대하여 항균활성 물질을 생산하는 균주를 최종 선별하였다.

### 테스트 균주

검정균주로 2007-2009년 간 고려대학교 구로병원 감염내과에서 분양받은 49균주(*A. baumannii* 1-49)의 *A. baumannii*를 사용하였다. 또한 다양한 병원성 세균인 *Bacillus subtilis* IAM 1069, *Micrococcus luteus* JCM 1464, *Streptomyces murinus* JCM 4333, 진균인 *Candida albicans* IFO 6258, *Aspergillus niger* ATCC 9642를 사용하였다.

### 분리균주의 생리 생화학적 특성조사

분리균주의 형태학적 특징은 yeast-malt extract agar를 이용하여 Inclined cover slip method[11]로 27°C에서 14일간 배양한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Actinomycetes Taxonomy의 방법에 따라 International Streptomyces Project(ISP) 배지에 배양하면서 기균사의 색깔, 배면 색깔, 수용성 색소의 생성여부 등을 관찰하였다. 포자 표면의 형태는 Yeast-malt extract agar 사면배지를 이용하여 27°C에서 14일간 배양하여 전처리 과정을 거쳐 주사 전자현미경(Scanning electron microphotograph, Model S-800, Hitachi Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 세포벽의 DAP(Diaminopimelic acid) 이성체를 분석하기 위해서 분리균주를 Yeast-malt extract broth 배지로 7일간 진탕배양한 후 원심분리(2,000 × g, 20 min)에 의하여 균체를 회수하고 회수한 균체를 멸균 증류수로 3회 세척한 후 동결 건조하여 건조균체를 얻었다. 유리용기(Pyrex)에 건조균체를 1 mg 넣고 6 N HCl 1 mL을 넣은 다음 밀봉하여 100°C에서 18시간 반응시켰다. 여과지(Whatman NO. 1)로 여과한 다음 여과액을 진공증발기로 60°C에서 감압 건조하였고, 세 번 반복 후 잔류물에 증류수를 0.3 mL 첨가한 다음 Cellulose F TLC plate에 점적하였다. 전개용매는 methanol: water: 10 N HCl: pyridine (80 : 15 : 5 : 10, v/v)를 사용하였으며 발색 시약으로 0.1%(wt/vol) acetic ninhydrin을 분무한 후 100°C에서 2분간 가열하였다. DAP의 판정은 표준시료(Sigma)와 전개거리를 비교하였다[7, 13, 19].

### 16S ribosomal DNA 유전자 염기서열을 이용한 계통분류

Genomic DNA는 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용해 추출한 후 16S rDNA 유전자 염기 분석에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGT-TTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTGT-TACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR 증폭하였다[15]. 16S ribosomal DNA 유전자를 PCR 기기를 이용하여, 94°C에서 5 min, 94°C에서 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 72°C 10 min, 25°C 10 min, 4°C에서 조건으로 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, USA)을 이용하여 정제하고, 정제된 PCR 산물은 ABLPRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석 하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 유전자 서열과 비교하였으며, 유전자서열의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 프로그램을 이용하여 비교 분석하였다[5, 15].

### 최소 저해농도(Minimum Inhibitory Concentration; MIC) 측정 및 항생물질 추출

분리균주가 테스트 균주에 대해 가장 항균활성이 좋은 조건을 확인하기 위해 전배양 PCII 배지(glucose 1.0%,

polypeptonee 0.2%, yeast extract 0.1%, asparagine 0.05%, thiamine 0.001%, pH 7.0) 10 mL와 유리구슬 4-5개를 넣어 멸균시킨 시험관에 KH223 균주를 접종하여 27°C에서 48시간 배양하였다. 최적의 항생물질 생산을 위하여 생산최적배지인 PY배지(starch 1%, glycerol 1%, glucose 0.5%, meat extract 0.5%, yeast extract 0.2%, polypeptone 0.3%, casein 0.1%, CaCO<sub>3</sub>0.2%, thiamine · HCl 0.001%, pH 7.0) 100 mL을 500 mL용 삼각플라스크에 넣어 멸균한 후 전 배양액 2 mL씩을 접종하여 27°C에서 4일간 배양하여 상등액을 원심분리 한 후 부탄올, 헥산 그리고 에틸아세테이트로 차례로 추출하여 BN 분획물, HX 분획물, EA 분획물을 각각 얻어 농축하였다. 최소저해농도(MIC) 측정은 NCCLS의 표준화된 한천희석법으로 실시하였다[9, 16]. 각각의 분획물들을 100 µg/mL에서 0.5 µg/mL까지 각각 최종농도보다 10 배 높은 농도로 만들어 멸균한 후 50°C로 식힌 측정용배지에 10개의 각 농도별로 만들어진 항생물질을 9:1의 비율로 시험관에서 잘 섞은 후 표준 접시에 부었다. 굳은 뒤에 35-37°C의 배양기에 넣어 30-45분간 말린 후 3일 이내에 사용하였다. 접종한 최종균수를 5×10<sup>5</sup> CFU/mL로 맞춘 뒤 낮은 농도의 항생물질이 든 배지부터 접종한 후 35°C에서 48시간 배양하였다. 각 균주는 duplication하여 분주하였다. 배양한 후 육안으로 균이 자라지 않는 항생물질 최소농도를 MIC로 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 항균활성균주의 분리

*A. baumannii*, 그람양성 세균, 그람음성 세균, 효모 및 곰팡이에 대해 항균활성 검사를 시행하여 항균스펙트럼이 비교적 넓으며 항균활성이 큰 2개 균주를 선별하여 KH222, KH223라 명명하였다. 본 논문에서는 *A. baumannii*에 상대적으로 강한 항균활성을 보이는 물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. KH223를 공시균주로 사용하였다.

### 분리균주의 동정

분리균주 KH223는 기균사의 색깔, 배면 색깔, 수용성 색소의 생성여부 등을 관찰한 결과 전형적인 *Streptomyces* 속의 특징을 나타내었다[11, 14, 18]. 또한 포자사슬의 형태는 ISP 4페이지에서 14일간 배양한 후 광학현미경(Olympus BX 50, X400)을 이용하여 관찰한 결과 rectiflexible이었고, 전자현미경관찰에서 포자는 타원형으로 이어진 막대모양이었다(Fig. 1). 세포벽의 DAP이성체와 아미노산을 분석한 결과 세포벽의 DAP는 LL-DAP이고 아미노산은 alanine, glycine 등이 검출되었다(Fig. 2). 또한 16S ribosomal DNA 염기서열과 NCBI에 등록된 균주들의 16S 리보솜유전자 염기서열들을 상호 비교하여 계통수를 작성하여 분리균주 KH223의 계통학적 위치를 확인한 결과 *S. galbus*의 subcluster에 속해



Fig. 1. Scanning electron microphotograph of spore surface of KH223 cultured on yeast - malt extract agar for 14 days at 27°C.

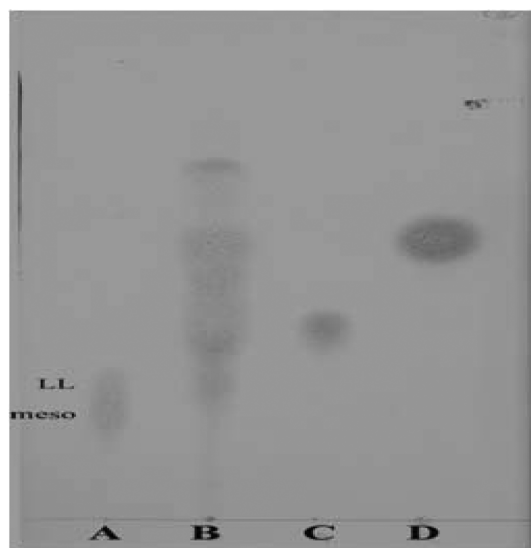
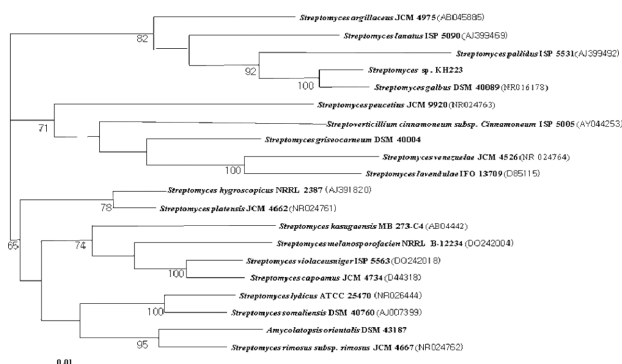


Fig. 2. Cellulose thin layer chromatogram of DAP isomers, glycine and alanine. Lane A, DAP isomers (LL: LL DAP, meso: meso DAP); Lane B, whole cell hydrolysate of the strain KH223; Lane C, Glycine; Lane D, alanine.

있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

### 최소저해농도의 측정

최소생육저해농도에 대한 실험결과 부탄올분획에서 2종의 *A. baumannii* 5, 10에 대해 0.8 µg/mL의 높은 항균활성을 보였으며 에틸아세테이트 분획에서 2종의 *A. baumannii* 10, 30에 대해 12.5 µg/mL의 비교적 강한 항균활성을 보였다. 또한 테트라사이클린의 최소생육억제농도 범위(25 µg/mL - > 100 µg/mL)와 cyclo(trp-trp)의 최소생육억제농도 범위(12.5



**Fig. 3.** Dendrogram showing the relationships between *Streptomyces* sp. KH223 and other *Streptomyces* sp. The rooted tree constructed by using the neighbor-joining method: the scale bar indicates 0.01 substitution per nucleotide position. Bootstrap values higher than 65% are given at branching points. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences of isolates and representative species of related taxa.

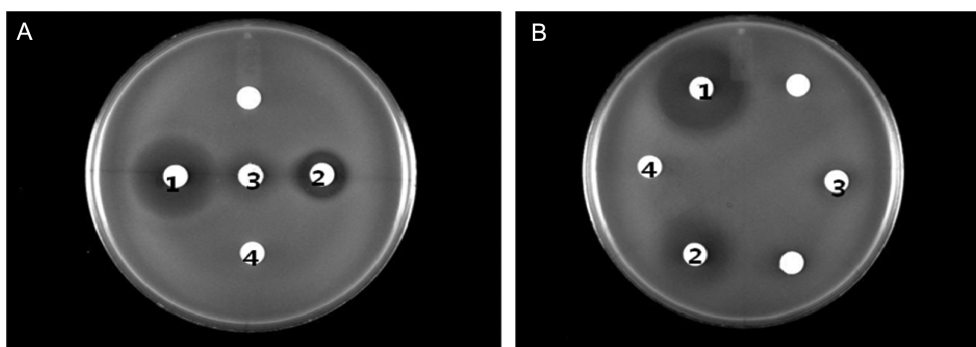
$\mu\text{g/mL}$  -  $>100 \mu\text{g/mL}$ ) 비교해 볼 때 *A. baumannii* 중에 넓은 범위의 항균스펙트럼을 갖는 것으로 판단된다. 이는 부탄올 추출물이 정제과정중이기 때문에 주요성분 이외에 복합성분의 영향이 아닌가 추측된다. 또한 cyclo(trp-trp)의 *A. baumannii*에 대한 항균활성 결과는 본 연구자가 이미 보고

한 50여종의 *A. baumannii*에 대한 항균활성 결과와 유사하게 나타내었다[6]. 핵산분획물과 에틸아세테이트 분획물에서는 5종(5, 10, 25, 30, 40)의 *A. baumannii*에 대해 각각 최소생육저해농도 범위( $25 \mu\text{g/mL}$  -  $50 \mu\text{g/mL}$ ), ( $5.0 \mu\text{g/mL}$  -  $25 \mu\text{g/mL}$ )으로 비교적 약한 항균활성이 측정되었다(Table 1, Fig. 4A). 병원성 세균과 진균에 대한 최소생육저해농도 측정결과 부탄올 분획물에 대한 *Micrococcus luteus* JCM 1464와 *Bacillus subtilis* IAM 1069는 각각  $0.4 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.8 \mu\text{g/mL}$ 로 낮은 농도에서도 세균의 생육을 저해함이 관찰되었다. *Candida albicans* IFO 6258, *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Streptomyces murinus* JCM 4333에 대한 부탄올 분획물의 항균효과는 각각  $3.2 \mu\text{g/mL}$ ,  $1.6 \mu\text{g/mL}$ ,  $3.2 \mu\text{g/mL}$ 로 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물에서는 최소생육저해농도 범위  $0.8 \mu\text{g/mL}$ 에서  $6.4 \mu\text{g/mL}$ 로 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 핵산분획물에서도 대조항생물질인 테트라사이클린과 비교하여 볼 때 농도범위  $2.5 \mu\text{g/mL}$ 에서  $12.5 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 항생효과를 관찰할 수 있었다. 또한 cyclo(trp-trp)에서는 최소생육저해농도범위( $5.0 \mu\text{g/mL}$  -  $25 \mu\text{g/mL}$ )으로 테트라사이클린에 비해서는 비교적 강한 항균활성을 나타내었으나 각각의 유기용매추출물보다는 약한 항균활성을 보여주고 있다(Table 2, Fig. 4B). 본 연구결과는 토양으로부터 분리한 방선균의 부탄올, 에틸아세테이트, 핵산 분획물이 항생제 내성균주들을 포함한 다양한 세균 및 진균에 우수한

**Table 1.** Minimum Inhibitory Concentration of *Streptomyces* sp. KH223 solvent extracts against *Acinetobacter baumannii*.

Test organisms	Tetracycline ( $\mu\text{g/mL}$ )	Minimal Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		BN fraction	HX fraction	EA fraction	Cyclo(trp-trp)
<i>A. baumannii</i> 5*	50	0.8	50	25	25
<i>A. baumannii</i> 10	$> 100$	0.8	25	12.5	12.5
<i>A. baumannii</i> 25	$> 100$	5.0	25	25	25
<i>A. baumannii</i> 30	25	12.5	25	12.5	12.5
<i>A. baumannii</i> 45	50	5.0	50	5.0	$>100$

\*Random isolated at shown to among the similar clear zones of each parts. The data representative results of three independent determinations.



**Fig. 4.** Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. KH223 against *A. baumannii* and other pathogen(*Bacillus subtilis* IAM 1069). (A) Extracts of KH223 against *A. baumannii*[1: buthanol, 2: ethylacetate, 3: hexane, 4: control (only buthanol)], (B) Antimicrobial agents against other pathogen(*Bacillus subtilis* IAM 1069)[1: buthanol extract, 2: cyclo(trp-trp), 3: tetracycline, 4: control(only buthanol)].

**Table 2. Minimum Inhibitory Concentration of *Streptomyces* sp. KH223 solvent extracts against other pathogens.**

Test organisms	Tetracycline ( $\mu\text{g/mL}$ )	Minimal Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		BN fraction	HX fraction	EA fraction	Cyclo(trp-trp)
<i>Candida albicans</i> IFO 6258	25	3.2	12.5	6.4	50
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1069	50	0.4	3.2	0.8	12.5
<i>Micrococcus luteus</i> JCM 1464	50	0.8	2.5	1.6	50
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	12.5	1.6	12.5	5.0	12.5
<i>Streptomyces murinus</i> JCM 4333	12.5	3.2	2.5	5.0	5.0

Abbreviation: BN: Buthanol, HX: Hexane, EA: Ethylacetate. The data representative results of three independent determinations.

는 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), VRE(vancomycin-resistant *enterococci*), CRE(cabapenam-resistant *enterococci*) 등에 대하여, 기존 항생제와 부탄올 분획물의 병용요법에 의한 항생제 내성균주제어 가능성도 검토하고 있다. 또한 앞으로 부탄올 분획물과 에틸아세트 분획물의 정제 및 물질동정연구의 진행을 계획하고 있다. 이는 신규항생제 개발에 중요한 토대를 마련할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

계룡산 지역에서 토양시료를 채취하여 항생제 다제내성균을 효과적으로 제어할 수 있는 항생물질 생산균주를 분리, 탐색하는 과정에서 *Streptomyces* sp. KH223균주를 선별하였다. 분리균주의 생화학적 특징과 16S ribosomal DNA 유전자 염기서열 분석 결과, 분리균주가 *Streptomyces galbus*에 속함이 확인되었다. 분리균주의 배양 상등액은 49종의 *Acinetobacter baumannii* 외 다양한 세균과 진균 등에 항균 활성을 가지고 있었으며 특히 분리균주의 부탄올, 에틸아세트아이트 분획물은 10여종의 *A. baumannii*에 최소생육저해농도 범위 0.8  $\mu\text{g/mL}$ 에서 5.0  $\mu\text{g/mL}$ 으로 강한 항균력을 보였으며 기 분리된 cyclo(trp-trp)의 최소생육저해농도 범위 12.5  $\mu\text{g/mL}$  보다도 강한 항균활성을 나타내었다. 또한 각각의 유기용매 분획물과 cyclo(trp-trp)은 *Candida albicans* IFO 6258, *Bacillus subtilis* IAM 1069, *Micrococcus luteus* JCM 1464, *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Streptomyces murinus* JCM 4333 등 5종의 세균과 진균에 대해 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 50  $\mu\text{g/mL}$  범위의 비교적 강한 항균력을 나타내었다. 본 실험을 통하여 얻은 결과는 분리균주의 유용성과 앞으로 추가적인 정제, 물질동정 실험을 통하여 새로운 항생물질을 탐색하는 기초를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- Aswapokee, N. S., B. Tiengrim, K. Charoenk, and K. Sangsiriwut. 1998. Antimicrobial resistant pattern of *Acinetobacter* sp. *J. Infect. Dis.* **15**: 43-48.
- Baraibar, J., H. Correa, D. Mariscal, M. Gallego, J. Valles, J., and M. Rello. 1997. Risk factors for infection by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients with nosocomial pneumonia. *Chest.* **112**: 1050-1054.
- Bello, H., G. Gonzalez, M. Dominguez, R. Zemelman, A. Garcia, and S. Mella. 1997. Activity of selected beta-lactams, ciprofloxacin, and amikacin against different *Acinetobacter baumannii* biotypes from Chilean hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **28**: 183-186.
- Hanberger, H., J. A. Garcia-Rodriguez, M. Gobernado, H. Goossens, L. E. Nilsson, and M. J. Struelens. 1999. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. *J. Am. Med. Assoc.* **281**: 67-71.
- Jeanmougin, F. and G. Orsini. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 403-405.
- Lee, K. H., G. W. Kim, and K. H. Rhee. 2010. Identification of *Streptomyces* sp. KH29, which produces an antibiotic substance processing an inhibitory activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Biotech.* **20**: 1672-1676.
- Lim, D. S., S. K. Yoon, M. S. Lee, W. H. Yoon, and C. H. Kim. 1996. Isolation and identification of *Streptovercillium* sp. NA-4803 producing antifungal substance. *Kor. J. Appl. Microbiol.* **24**: 664-670.
- Manikal, V. M., D. Landman, G. Saurina, E. Oydna, H. Lal, and J. Nale. 2000. Endemic carbapenam-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York city, vide-prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic age. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 101-106.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard M7-A3. NCCLS, Villanova, Pa.
- Park, A. J. and H. R. Hong. 2003. Evaluation of methods for detection of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* to imipenem. *Korean J. Lab. Med.* **23**: 388-394.
- Pridham, T. G., C. W. Hesseltine, and R. G. Benedict. 1958. A guide for classification of *Streptomyces* according to selected group placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* **6**: 52-79.
- Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culve, and R. P. Gaynes. 1999. Nosocomial infections in medical intensive

- care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.* **27**: 887-892.
13. Rhee, K. H. 2002. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**: 664-670.
  14. Sader, H. S., R. N. Jones, A. C. Gales, P. Winokur, K. C. Kugler, M. A. Pfaller, and G. V. Doern. 1998. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). SENTRY Latin America Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**: 289-301.
  15. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor joining method: A new method for constructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
  16. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
  17. Umezawa, H., A. L. Demain, and H. Hata. 1982. Trends antibiotic research, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo. 154-170.
  18. Williams, S. T. and F. L. Davies. 1967. Use of a scanning electron microscope for the examination of Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **48**: 171-177.
  19. Williams, S. T., M. E. Sharpe, J. G. Holt, G. E. Murray, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. W. Mouldar, N. P. Pfennig, H. A. Sneath, and J. T. Staley. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore.