

반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus* 억제 물질 생산 *Streptomyces* sp.의 분리 및 동정

오세택 · 이준재 · 이지연 · 김진규 · 양시용 · 김양수¹ · 송민동*
건국대학교 생명공학과, ¹울산의과대학교 서울아산병원 감염내과

Isolation and Identification of *Streptomyces* sp. Producing Anti-vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* Substance. Oh, Se-Teak, Jun-Jae Lee, Ji-Youn Lee, Jin-Kyu Kim, Si-Yong Yang, Yang-Soo Kim¹, and Min-Dong Song*. Department of Biotechnology, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea, ¹Division of Infectious Diseases, Seoul Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul 138-736, Korea – An Actinomycetes producing an anti-VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) substance was isolated from soil. The cultural, morphological, physiological and phylogenetic analyses of an isolated strain were investigated for identification. Cultural characteristics based on ISP (International *Streptomyces* Project) were as follows: white aerial mycelium, yellow reverse side, and good growth on various medium. Also, the isolate did not produce the soluble pigment. Morphological characteristics were showed cylindrical spore chain and smooth spore surface by SEM (Scanning Electron Microscope). Physiological characteristics were showed LL-type by DAP isomer analysis and detected glycine, glutamic acid and alanine. A phylogenetic analysis of the 16S rDNA provided a clue that the isolated strain was actually a member of the genus *Streptomyces*, because the determined sequence exhibited a higher homology with *Streptomyces echinatus*. The isolate was identified to be a genus of *Streptomyces* sp.. The optimal culture conditions for the maximum production of anti-VRSA substance by *Streptomyces* sp. were attained in a culture medium composed of 2.0% (w/v) glucose, and 0.4% (w/v) yeast extract. The anti-VRSA substance was highly produced after 5 days of culture. Optimal pH and temperature conditions for the production of anti-VRSA substance were pH 7.0 and 28°C, respectively.

Key words: VRSA, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* sp.

*Staphylococcus aureus*는 수술 후 상처 부위를 통한 감염, 병원생활에 따른 폐렴, 그리고 다른 종류의 원내 감염에 많은 영향을 끼친다. *S. aureus*의 가장 주목할 만한 특징은 다양한 항생제에 내성을 가지고 있다는 것이다. MRSA(methicillin-resistant *S. aureus*)는 1961년에 처음으로 발견되었으며, 이후로 20년 동안 MRSA의 비율은 유럽 여러 나라에서 1~2% 비율로 증가 하였으며, 북유럽의 스페인, 프랑스, 이탈리아에서는 30~40%까지도 나타났다. MRSA가 선진국의 공중보건상 심각한 문제로 대두되고 있는 이유는 높은 감염률뿐만 아니라(<1-80%), teicoplanin과 vancomycin을 제외한 현재 사용되고 있는 대부분의 항생제에 내성을 가지고 있기 때문이다. Vancomycin은 MRSA에 의한 원인이 되는 감염에 대하여 가장 확실한 치료제였으나, 1997년에 vancomycin에 내성을 갖는 VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*)가 국내뿐만 아니라 미국, 프랑스, 브라질, 스코틀랜드, 남아프리카 등에서 분리되었다

[1, 5, 7, 11, 14, 18]. VRSA는 보통 여러 항생제에 내성을 가지고 있어서 완전한 박멸이 어렵다. 항 MRSA와 항 VRE (vancomycin-resistant *Enterococci*)의 활성을 갖는 물질들이 개발되었지만[13, 15], VRSA 감염의 완벽한 치료를 기대하기는 어려운 실정이다. 따라서, 항 VRSA 활성을 갖는 새로운 약을 찾아내는 것이 중요하며 이러한 목적에서 항 VRSA 물질을 생산하는 미생물을 선발하고자 하였다. 본 연구의 목적은 항 VRSA 물질을 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 항 VRSA 물질 생산조건을 검토하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

VRSA를 억제하는 미생물 분리를 위해 사용된 분리균주로 AMC(Asan Medical Center, Korea)로부터 AMC11094 (MIC: 8 µg/ml)를 제공받아 이용하였다. 기본 배양배지로 BHI(Brain heart infusion) 배지를 이용하였다.

VRSA 억제 미생물의 분리

토양샘플로부터 얻어진 미생물들 중 AMC11094를 test 균

*Corresponding author
Tel: 82-43-840-3612, Fax: 82-43-852-9377
E-mail: minds@kku.ac.kr

주로 disk diffusion method를 이용하여 clear zone을 형성하는 미생물을 얻었다. 토양샘플을 0.2% Tween80을 함유한 멸균생리식염수로 혼탁추출한 후 생리식염수로 희석하여 PDA(potato dextrose agar)에 도말하여 얻어진 미생물들 중 colony 형태 등으로 방선균으로 추정되는 미생물들을 Bennett's agar에 다시 순수분리 하였다. 얻어진 각각의 균주들을 250 ml Erlenmeyer flask를 이용하여 Bennett's broth 50 ml에 집중한 다음 호기적인 조건으로 28°C, 180 rpm으로 4일간 교반배양 후 멸균거르기로 거른 다음 원심분리하여 얻은 상등액을 항균활성 분석에 사용하였다. 항균활성은 VRSA를 BHI broth에서 12시간 배양한 배양액을 멸균한 BHI agar에 첨가하여 얻은 test plate에 각각의 방선균 배양 상등액 40 µl씩을 loading한 paper disk를 올려놓은 후 37°C에서 24시간 배양한 다음 clear zone을 확인하여 항균 활성을 측정하였다.

선발된 방선균의 동정

최종 선발된 방선균의 속을 결정하기 위하여, 방선균 세포벽의 구성 성분인 2,6-diaminopimelic acid(DAP) 형태를 Shirling과 Gottlieb 방법[17]과 Bergey's Manual of Systematic bacteriology[20]에 의하여 제안된 International *Streptomyces* Project(ISP)에 의한 방법으로 분석하였다. 분리된 미생물을 tryptic soy broth(TSB)에 3일 동안 배양하였으며, 원심분리하여 얻어진 세포를 SDS(sodium dodesylsulfate) 처리를 한 후, 6N HCl 5ml로 18시간 동안 수조에서 가열하여 가수분해 하였다. 얻어진 가수분해 산물을 농축한 다음, TLC plate(10×10 cm, HFTLC Cellulose, Merck CO.)상에 MeOH/H₂O/5NHCl/pyridine (80:15:5:10)와 함께 용해하였다[2, 6]. Meso-DAP와 LL-DAP 동위체를 모두 포함하는 0.01 M DL-DAP(Sigma) 5 µl와 다른 아미노산들을 기준으로 하여 플레이트 상에 점적하였다[21]. 분리된 미생물의 포자 형태는 주사전자현미경(scanning electron microscope)으로 관찰하였으며, 시료는 Williams와 Davies의 방법[19]에 의하여 준비하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

16S rDNA 분석은 Wizard Genomic DNA Prep. kit (Promega)을 사용하여 chromosomal DNA를 분리하였으며 2개의 보편적인 primer를 사용하는 PCR을 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 forward primer(27F): 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', reverse primer(1492R): 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었다. 각각의 0.5 µM primer, 200 µM deoxynucleoside triphosphate, 10X PCR buffer 10 µl, 그리고 *Taq* DNA polymerase 2U을 포함한 100 µl의 PCR 반응액으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건으로 30 cycles(95°C에서 60 초, 60°C에서 45 초, 72°C

에서 80 초) 동안 계속적으로 증폭하였으며, 72°C에서 5분간 신장(Takara PCR Terminal Cycler)시켰다[10, 12]. PCR 산물을 2% agarose gel로 전기영동을 실시하였으며 PCR 산물을 Wizard SV Gel과 PCR Clean-Up System(Promega)을 사용하여 추출하였다. Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems)와 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR product의 염기 서열 분석을 수행하였다.

종족 계통적 분석

분리균주의 16S rDNA 염기서열과 함께 *Streptomyces* 속과 몇몇 다른 관련된 분류군의 16S rDNA 유전자 염기서열과 함께 CLUSTAL X software를 사용하여 배열하였다. 계통도는 같은 NEIGHBOR program의 neighbor-joining method[16]를 사용하여 설계하였다.

항 VRSA물질 생산을 위한 최적의 배양 조건

분리균주의 항 VRSA 물질 생산조건 검토를 위해 배지원별(탄소원, 질소원), 배지 초기 pH 및 온도에 따른 최적 생산조건을 도출하였다. 배양은 배양액 50 ml을 250 ml Erlenmeyer flask안에서 호기적인 조건으로 28°C에서 5일 동안 180 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양 후 얻은 상등액을 paper disk 법을 이용하여 clear zone 형성에 따른 항 VRSA 분석을 하였다.

결과 및 고찰

VRSA 억제물질 생산 미생물의 분리

다양한 토양 시료로부터 clear zone 형성여부를 통한 VRSA 억제물질 생산 균주를 1차적으로 10개 균주를 분리하였으며, 최종적으로 가장 VRSA 억제력이 우수한 1개 균주를 최종적으로 선발하였다.

분리된 균주의 배양, 형태적, 생리적 특성

항 VRSA물질을 생산하는 최종 선발 균주의 동정을 위해서, International *Streptomyces* Project(ISP)에 따라 여러가지 배지 상에서 분석하였다[17]. Table 1에 나타난 것처럼, 선발균주는 모든 plate(ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 7, asparagines-glucose agar, glycerol asparagine agar, potato dextrose agar, nutrient agar, Bennett's agar)에서 10일 동안 배양한 결과 모두 성장이 우수하였으며, 포자 형성을 나타내었고 비확산성의 색소를 생산해 내지 않음을 확인하였다. 포자 덩어리 색깔은 배지조건에 따라 하얀색에서 초록색 균사였던 반면에, 반대편은 배지의 조건에 따라 하얀색에서 갈색의 빛깔을 띠었으며 회색빛을 띠는 호기적 포자 덩어리는 드물게 관찰되었다.

분리균주를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 호기적 균사

Table 1. Cultural characteristics of a selected *Streptomyces* sp.¹

Medium ²	Growth	Spore mass color	R.S.C*	S.P**
ISP 2 agar	good	white	yellow	none
ISP 3 agar	good	white	light reddish brown	none
ISP 4 agar	good	green	yellow	none
ISP 7 agar	good	yellow	yellow	none
Glucose asparagine agar	good	white & yellow	yellow	none
Glycerol asparagine agar	good	yellow	yellow	none
Potato dextrose agar	good	white	yellow	none
Nutrient agar	good	yellowish white	yellowish gray	none
Bennett's agar	good	white	yellow	none

¹The cultural characteristics were observed after cultivation on each agar plate at 28°C for 5 days.

²ISP 2 agar (yeast extract-malt extract agar: 0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, 2% agar), ISP 3 agar (oatmeal agar: 2% cooked & filtered oatmeal, 1.8% agar, 0.1% trace salt solution), ISP 4 agar (inorganic salts-starch agar: 1% soluble starch, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% NaCl, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.2% CaCO₃, 0.1% trace salt solution, 2% agar), ISP 7 agar (tyrosine agar: 0.5% gelatin peptone, 0.3% beef extract, 0.5% tyrosine, 1.5% agar), Glucose asparagine agar (0.05% K₂HPO₄, 0.05% asparagine, 1% glucose, 1.5% agar), Glycerol asparagine agar (ISP 5 agar: 0.1% asparagine, 1% glycerol, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% trace salt solution, 2% agar), Potato dextrose agar (30% potatoes, 2% glucose, 1.5% agar), Nutrient agar (0.5% peptone, 0.3% beef extract, 1.5% agar), Bennett's agar (1% glucose, 0.2% N-Z amine type A, 0.1% yeast extract, 0.1% beef extract, 1.5% agar)

* reverse side color, ** soluble pigment. The color was assigned by matching the color to ISCC-NBS Centroid Color Charts [8].



Fig. 1. Spore surface of an isolated *Streptomyces* sp. on Bennett's agar medium at 28°C for 7 days.

상에서 원통형의 긴 포자와 부드러운 포자 표면을 관찰할 수 있었다(Fig. 1)[3]. Diaminopimelic acid(DAP)는 세포벽에 LL-DAP 타입으로 존재한다는 것을 확인하였으며(Fig. 2), glycine, glutamic acid 그리고 alanine 또한 검출되었다. 형태적 특성과 세포벽의 DAP 타입을 기초로 하여, 최종선발 균주를 *Streptomyces* 속으로 결정하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

GenBank에서 인용한 높은 상동의 *Streptomyces* sp.와 비교하여 16S rDNA 염기 서열을 분석하였다. 균주의 16S rDNA 1.5 Kb 단편의 염기 서열은 forward와 reverse primer를 이용하여 증폭하였으며 BLAST program에 의한 GenBank에 따라 비교하여 염기서열을 결정하였다. 분리균주의 16S rDNA의 부분적 염기 서열과 *Streptomyces*

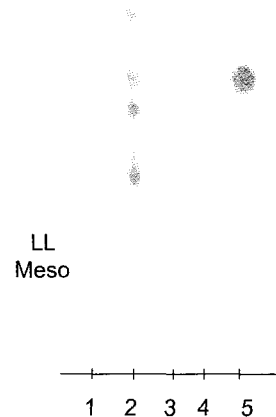


Fig. 2. Thin layer chromatogram (TLC) of cell wall hydrolysates of *Streptomyces* sp. isolate. Lane 1, standard; LL-DAP, Meso-DAP; Lane 2, whole cell hydrolysate of *Streptomyces* sp. isolate; Lane 3, glycine; Lane 4, glutamic acid; Lane 5, alanine.

*echinatus*의 16S rDNA의 부분적 염기 서열을 비교한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 16S rDNA의 염기 서열은 *S. echinatus*(GenBank accession number, AJ399465)와 99%의 높은 상동성을 보였다. 선발균주는 *Streptomyces*속임을 확인하였으며 16S rDNA를 분석결과 *S. echinatus*와 종속 계통 발생적으로 유연관계에 있는 것으로 나타났다(Fig. 4).

```

Query: 51 caagt cgaacgat gaagccct tccgggtggatt tagtggcgaacgggtgagtaaacacgtgg 110
          |||
Sbjct: 1 caagt cgaacgat gaagccct tccgggtggatt tagtggcgaacgggtgagtaaacacgtgg 60

Query: 111 gcaatctgccttgcactctgggacaagccctggaaacggggtctaataccgggataatgagc 170
          |||
Sbjct: 61 gcaatctgccttgcactctgggacaagccctggaaacggggtctaataccgggataatgagc 120

Query: 171 cggaaacggcatgggttctgggtgttaaagctccggcgggtgcaggatgagcccggcgcctatc 230
          |||
Sbjct: 121 cggaaacggcatgggttctgggtgttaaagctccggcgggtgcaggatgagcccggcgcctatc 180

Query: 231 agcittgttgggtgaggtaacgggtcaccaaggcgaacgagcgggtagccggcctgagagggcg 290
          |||
Sbjct: 181 agcittgttgggtgaggtaacgggtcaccaaggcgaacgagcgggtagccggcctgagagggcg 240

Query: 291 accggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaat 350
          |||
Sbjct: 241 accggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaat 300

Query: 351 attgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgcgcccgcgtgagggatgacggccttcggg 410
          |||
Sbjct: 301 attgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgcgcccgcgtgagggatgacggccttcggg 360

```

Fig. 3. A comparison of 16S rDNA partial sequence of an isolated strain with *Streptomyces echinatus*. Query means *Streptomyces* sp. isolate and Sbjct means *Streptomyces echinatus*.

성장도 및 항 VRSA 활성

미생물 성장과 항 VRSA 활성과의 관계를 파악하기 위해서, 11일간 28°C, 180 rpm 조건으로 배양한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 배양 상등액의 항 VRSA 활성은 배양 3일 후에 발견할 수 있었으며, 배양 5일 후 거의 최대 활성에 도달하였고, 배양 11일까지도 활성이 저하되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 균주의 death phase 이후에도 항균물질이 안정함을 나타내었고, 배양시간을 고려해 볼 때 본 배양조건 하에서 배양 5일후에 harvest 하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

탄소원과 질소원의 영향

Peptone 0.2%(w/v), yeast extract 0.1%(w/v), beef extract 0.1%(w/v)를 기본 질소원으로, glucose 1%를 기본 탄소원으로 각각의 성분을 포함한 배지를 이용하여 28°C에서 5일간 배양하여 항 VRSA 활성을 측정된 결과 탄소원으로 glucose 2%, 질소원으로 yeast extract 0.4%가 최적의 배지조건으로 도출되었다(Fig. 6, Fig. 7). 기본질소원과 탄소원은 Bennett's 배지조성을 기본으로 하였으며, 탄소원의 경우 glucose 첨가농도에 따라 항균활성이 증가됨에 따라 경제성을 고려한 glucose 첨가농도 제고도 검토할 필요가 있다. 질소원의 경우 Bennett's 배지의 질소원 총 함량(0.4%)을 첨가기준으로 조사한 바 Fig. 7에 나타난 바와 같이 yeast

extract, beef extract, soybean meal을 제외하고는 항균활성이 미약하게 나타났다. 질소원의 경우 yeast extract와 beef extract를 기준으로 첨가농도별, 혼합비율 등의 조사를 통해 항균물질 생산성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

초기 pH와 온도의 영향

Glucose 2%, yeast extract 0.4%를 최적배지로 하여 초기 pH와 온도가 항 VRSA 물질생산에 미치는 영향을 파악한 결과 초기 pH가 7.0 일때 최적의 항 VRSA 활성을 나타내었으며 최적 온도는 28°C로 나타났다(data not shown). 초기 pH가 항 VRSA 활성에 미치는 영향을 보면 pH 6 이하 일 때, 항 VRSA 활성은 없었으며, pH 7.0일 때 최적의 항 VRSA 활성 수준에 도달하였으며 pH 7.0 이상으로 증가하면 항 VRSA 활성은 감소하는 경향을 나타내었다. 배양온도에 따른 영향을 파악하기 위해 8, 20, 28, 30, 37, 45°C의 단계적인 온도를 적용하여 항 VRSA 활성에 미치는 영향을 분석한 결과 최대의 항 VRSA 활성은 28°C에서 나타났으며 배양 온도가 최적의 배양 온도보다 높거나 낮을 때 항 VRSA의 활성은 감소하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 분리균주인 *Streptomyces* sp.의 항 VRSA 활성물질 생산을 위한 배양조건은 glucose 2%, yeast extract 0.4%의 배지조성으로 초기 pH는 7, 배양온도는 28°C인 것으로 나타났다.

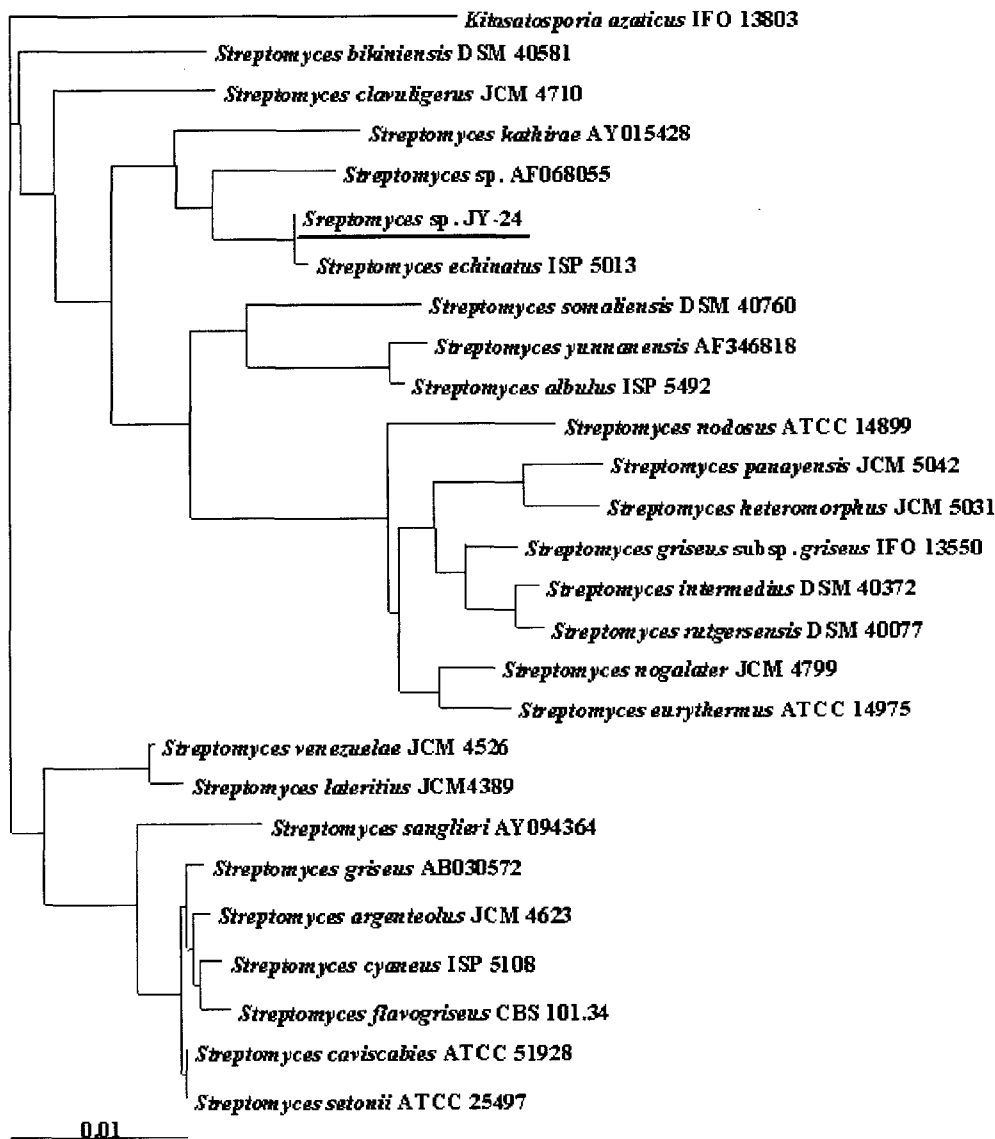


Fig. 4. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence. The diagram show the positions of an isolated strain, type strains of *Streptomyces* sp., and representatives from some other related taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

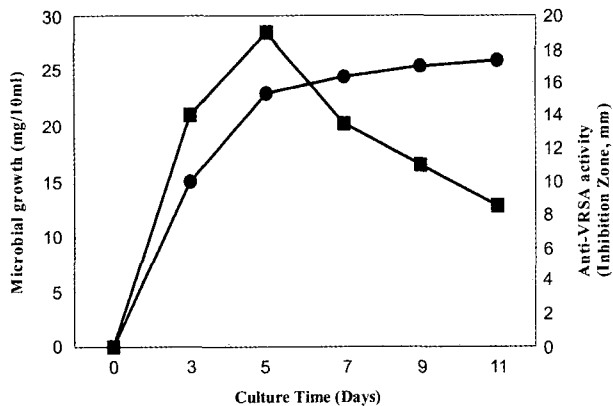


Fig. 5. Time course of microbial growth and anti-VRSA activity of *Streptomyces* sp. isolate. ■, Anti-VRSA activity, inhibition zone size (mm); ●, Microbial growth (mg/10 ml).

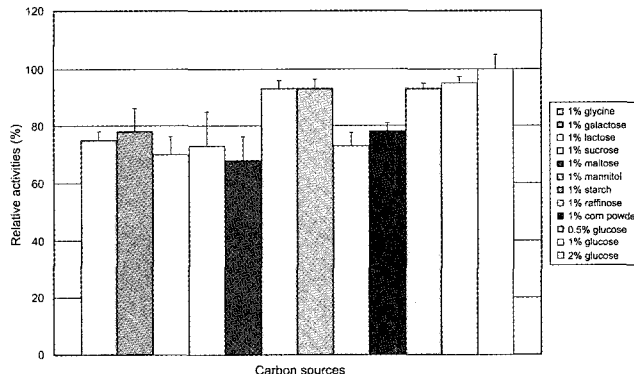


Fig. 6. Effects of carbon sources on the production of anti-VRSA substance from *Streptomyces* sp. isolate. Culture conditions; 28°C, 180 rpm for 5 days. Basal medium; 0.2% peptone, 0.1% yeast extract, and 0.1% beef extract.

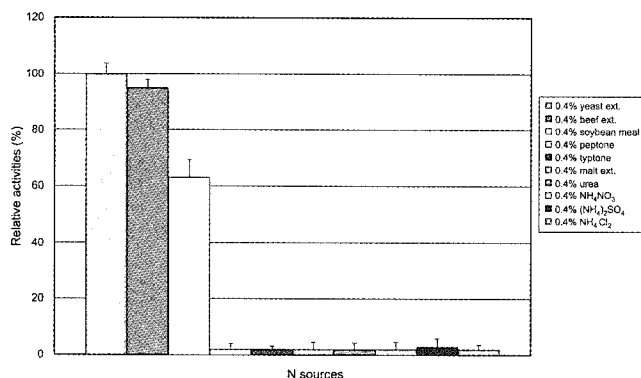


Fig. 7. Effects of nitrogen sources on the production of anti-VRSA substance by *Streptomyces* sp. isolate. Culture conditions; 28°C, 180 rpm for 5 days. Basal medium; 2.0% glucose.

감사의 글

본 연구논문은 2003년도 과학기술부 지정 지역협력연구센터사업(건국대학교 바이오 식·의약 연구센터, R12-2003-003-00017-0)의 지원과 일부 아산생명과학연구소 지원(2002-131)에 의해 얻은 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Chesneau, O., A. Morvan, and S. N. En. 2000. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 897-890.
- Choi, W. C., S. Y. Hwang, T. K. Park, and S. K. Kim. 2002. Identification of *Streptomyces* sp. producing new polyene antibiotics and *in vivo* antimicrobial activity of Tetrin C against phytopathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 204-208.
- Dietz, A. and J. Mathew. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl. Microbiol.* **21**: 527-533.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogenetic Inference Package. Version 3.5. University of Washington, Seattle, U.S.A.
- Ferraz, V., A. G. Duse, M. Kassel, A. D. Black, T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* occurs in South Africa. *S. Afr. Med. J.* **90**: 1113.
- Harper, J. J. and G. H. G. Davis. 1979. Two-dimensional thin-layer chromatography for amino acid analysis of bacterial cell walls. *International J. Systematic Bacteriol.* **29**: 56-58.
- Hood, J., G. F. S. Edwards, B. Cosgrve, E. Curran, D. Morrison, and C. G. Gemmell. 2000. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* at a Scottish hospital. *J. Infect.* **40**: A11.
- ISCC-NBS Color-Name Charts Illustrated with Centroid Colors. National Bureau of Standards, U.S.A.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3. Academic press, New York, U.S.A.
- Kim, B. J., M. J. Cho, J. C. Kim, K. Y. Cho, G. J. Choi, C. H. Lee, and Y. H. Lim. 2001. *Streptomyces* showing antifungal activities against six plant pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1120-1123.
- Kim, M. N., C. H. Pai, J. H. Woo, J. S. Ryu, and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3879-3881.
- Lee, C. H., B. J. Kim, G. J. Choi, K. Y. Cho, H. J. Yang, C. S. Shin, S. Y. Min, and Y. H. Lim. 2002. *Sreptomycetes* with antifungal activity against rice blast causing fungus, *Magnaporthe grisea*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 1026-1028.
- Lee, M. J., D. S. Lim, M. S. Lee, W. H. Yoon, and C. H. Kim. 1997. Characterization of *Streptomyces* sp. AMLK-135 producing anti-MRSA antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 397-401.
- Ploy, M. C., C. Grelaud, C. Martin, L. de Lumley, and F. Denis. 1998. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet.* **351**: 1212.
- Rhee, K. H., K. H. Choi, C. J. Kim, and C. H. Kim. 2001. Identification of *Streptomycetes* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to vancomycin-resistant Enterococci. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 469-474.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* sp. *International J. Systematic Bacteriol.* **16**: 313-340.
- Smith T. L., M. L. Pearson, and K. R. Wilcox. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New Engl. Med.* **340**: 493-501.
- Williams, S. T. and F. L. Davis. 1967. Use of a scanning electron microscope for the examination of Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **48**: 171-177.
- William, S. T., M. E. Sharpe, J. G. Holt, R. G. E. Murray, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. W. Mouldar, N. Pfening, P. H. A. Sneath, and J. T. Staley. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4. William & Willkins, Baltimore.
- Yamada, K. and K. Kamagata. 1970. Taxonomic studies on Coryneform bacteria. II. Principle amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.

(Received Mar. 25, 2005/Accepted June 11, 2005)