

다약제내성균에 대한 항균 활성을 가지는 *Bacillus subtilis* MP56 균주의 분리 및 특성분석

박성용¹ · 유진철² · 성치남³ · 조승식^{1*}

¹목포대학교 약학과, ²조선대학교 약학과, ³순천대학교 생물학과

Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* MP56 with Antimicrobial Activity against MDR (Multi Drug Resistant) Strains

Sungyong Park¹, Jincheol Yoo², Chinam Seong³, and Seungsik Cho^{1*}

¹Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University, Muan 534-729, Republic of Korea

²Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

³Department of Biology, College of Natural Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea

(Received February 22, 2013 / Accepted March 22, 2013)

A new *Bacillus* strain designated as MP56 producing antimicrobial substance has been isolated from the mud flat of Korea. The strain MP56 was found to exhibit broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-positive pathogenic microorganisms and MDR (multi drug resistant) strains. The 16S rRNA sequence revealed that the MP56 was closely related to *Bacillus subtilis* with 99.93% homology. The optimal medium composition for production of antimicrobial substance in the *B. subtilis* MP56 were 1% mannitol, 1% oat meal, 0.01% CaCl₂. Antimicrobial activity of the culture broth against different pathogenic strains was assessed using the antimicrobial spectrum. The result suggests that *Bacillus* strain MP56 produces high quality antimicrobial substance that might be very useful to control varieties of pathogenic microbial growth.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fermentation, MDR (multi drug resistant)

오늘날까지 사람과 동물에게 사용된 광범위한 항생제의 사용으로 인해 다양한 항생제에 내성을 가진 세균이 출현하였고 신종 항생제 내성 세균의 보고 건수도 해마다 증가하고 있다(Alanis, 2005). 다약제 내성 세균에는 MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), VRSA (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin resistant enterococci) 등이 있다. MRSA의 경우 1961년 영국에서 보고되었고, 국내에서는 80년대부터 보고되기 시작하여 현재는 원내감염의 대표적 원인균으로 간주되고 있다(Turos *et al.*, 2002). 기존의 *Staphylococcus aureus* (황색포도상 구균)의 경우 penicillin, ampicillin, macrolides 등의 항생제균으로 치료가 가능하였으나, 장기간 사용으로 인한 다제 내성으로 인해 최근에는 vancomycin, teicoplanin, linezolid 등의 항생물질이 사용되고 있다. 그러나 vancomycin이나 linezolid의 경우 사용된 기간에 비하여 이미 내성균에 대한 보고가 되고 있어 인간의 건강을 더욱 위협하고 있다. 따라서, 항생제 내성균을 극복하기 위한 신규 소재의 개발이 절실히 요구되고 있다(Woodford *et al.*, 2000; Drago *et al.*, 2008; Hashizume, 2012; Long and Vester, 2012).

Bacillus 속 미생물 중 *Bacillus subtilis*는 포자 형성균으로 토양이나 물 등에서 자라며 대부분이 유기물을 분해하는 특성을 가진다. 또한 메주, 청국장 등의 발효에 이용되는 미생물로서 그 유용성과 안전성이 널리 인정되어 있다. 다수의 *Bacillus* 속 미생물의 특징 중 하나는 넓은 항균 스펙트럼을 가지는 bacteriocin, bacteriocin like substances (BLS)를 생산할 수 있다는 점이다. *Bacillus* 속 미생물이 생산하는 대표적인 항생물질에는 subtilin, surfactin, fengycin, gramicidins, tyrocidine, iturine, bacitracin 등이 있다(Delcambe, 1950; Kluge *et al.*, 1988; Nakano and Zuber, 1990; Klein *et al.*, 1993). 이들은 peptide 계열에 속하며, 항생제 내성을 보이지 않거나 생체내에 축적되지 않는 장점을 가지고 있어 의약, 동물의약 산업 등에 천연 항생 소재로서 개발 가치가 크다. 따라서 본 연구자들은 항생제 내성 세균에 유효한 항균성 물질을 생산하는 *Bacillus* 속 균주를 전남 서해안의 갯벌에서 순수 분리하여, 균주 동정 및 최적 발효조건, 항균 효능을 조사하였다.

재료 및 방법

바실러스의 분리 및 항생물질 생산 균주 선별

전남 서해안의 갯벌에서 수집한 시료 1 g을 멸균 증류수 10 ml

*For correspondence. E-mail: sscho@mokpo.ac.kr; Tel.: +82-61-450-2687; Fax: +82-62-450-2689

에 현탁시키고, 10^{-10} 의 희석배수로 단계 희석하였다. 희석한 시료는 0.1 ml씩 4% NaCl이 포함된 MRS 평판 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 수종의 *Bacillus*를 선별하여 동일 배지에 3회 반복 도말하여 균체를 순수 분리하였다. 분리된 *Bacillus* 중 항균 활성이 뛰어난 균주를 선별하기 위해 그람 양성, 음성세균 및 다약제 내성균(MRSA, VRSA, VRE 등)을 시험균으로 사용하여 가장 넓은 항균 스펙트럼을 나타내는 *Bacillus*를 선택하였다.

사용 균주

순수분리된 *Bacillus* 균의 항균활성 검정을 위하여 그람양성 및 음성균 *Alcaligenes faecalis* ATCC 1004, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 9341, *Salmonella typhimrium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 1923, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, *Enterococcus faecium* ATCC 8043, *Enterococcus cloacae* ATCC 13047, *Staphylococcus aureus* subsp. aureus ATCC 10537, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928 (R209), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p를 한국생명공학 연구원생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양 받아 사용하였으며, 다약제 내성균인 MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin resistant Enterococci), IMP (carbapenemase 생성 imipenem 내성균), ESBL (extended-spectrum β -lactamase 생성균)는 순천대학교 생물학과 미생물학 실험실에서 분양 받아 사용하였다.

16S rRNA 염기서열 분석

MP56 균주의 16S rRNA 염기서열분석을 위하여 27F (forward primer, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (reverse primer, 5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3') 2개의 primer를

사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 결정된 16S rRNA 유전자는 GenBank 데이터베이스와 비교 검색하였으며 계통수 작성은 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) 방법을 이용하였으며 진화거리는 Jukes와 Cantor (1969)의 식을 이용하였다. 계통수의 신뢰도는 1,000회 반복을 통한 bootstrap 분석(Felsenstein, 1985)을 실시하여 확인하였다.

항균활성 검증

MP56 균주의 항균활성 검증은 그람 양성, 음성 세균 및 다약제내성 세균에 대하여 조사하였다. 시험균주는 muller hinton broth에서 37°C 조건으로 배양하여 탁도를 McFarland 탁도가 0.5가 되도록 조절하여 항균시험에 사용하였다. 항균활성 검증은 paper disk diffusion method (Toama *et al.*, 1978)에 따라 시험하였다. 시험 균주를 Muller Hinton agar 배지에 0.1 ml 도말하고 MP56 균주의 배양액 40 μ l를 paper disk (Toyo, 0.8 mm)에 적하한 후 37°C에서 배양하여 나타나는 생육 저지환의 크기로 항균활성을 평가하였다.

최적 배양조건

분리 균주의 최적배지 성분은 질소원 고정화에 탄소원은 mannitol, fructose, glucose, D-sorbitol, maltose, lactose 및 sucrose를 각각 1% (w/v) 농도로 첨가하고 MP56 균주의 전 배양액을 1.5%씩 접종한 후 37°C에서 24시간, 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액은 원심 분리하여 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928 균주에 대한 항균활성을 측정하여 탄소원에 따른 상대적인 항균효능을 비교하였다. 질소원은 yeast extract, peptone, tryptone, malt extract, beef extract, oat meal, soy bean meal, NH₄Cl, ammonium sulfate 등을 각각 1% (w/v) 농도로 첨가한 후 탄소원의 검토 방법과 동일하게 수행하였다. 금속원소는 CaCl₂, NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄, MgSO₄ 및 MnSO₄ 등을 각각 0.01% (w/v)씩 첨가하여 탄소원의 검토방법과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰

바실러스의 분리 및 항생물질 생산 균주 선별

전남 서해안의 갯벌에서 수집한 시료를 멸균 증류수에 현탁시켜 단계 희석법을 이용하여 균주를 MRS 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 약 20종의 *Bacillus* 균주를 선별하였다. 순수 분리된 *Bacillus* 균주 중 그람 양성, 음성 세균 및 다약제 내성균(MRSA, VRSA, VRE 등)에 우수한 저해 활성을 보이는 균주를 선별하여 MP56이라고 명명하였다(Fig. 2). 항균 물질을 생산하는 *Bacillus* 속 균주는 메주, 김치, 토양 등 다양한 소재에서 분리가 보고되었으나 갯벌에서 분리한 항균물질 생산 *Bacillus* 균주에 대한 보고는 없었다(Chang and Yang, 2007; Moshafi *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012).

16S 리보솜 RNA 염기서열 분석

분리균주 MP56의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA 염기서

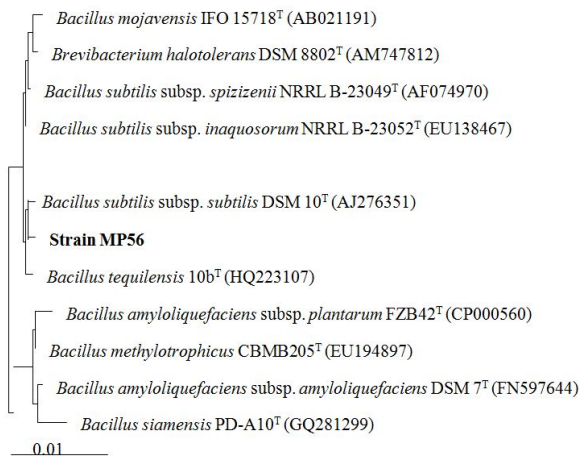


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA nucleotide sequences showing the position of strain MP56.

열을 분석한 결과 *B. subtilis*와 99.93% 상동성이 있으며, 계통학적으로 *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10^T와 유사한 균주로 확인되었다(Fig. 1).

최적 배양조건

항생물질의 생산에 미치는 각종 성분들의 영향을 검토한 결과는 다음과 같다. 탄소원은 기본배지(1% yeast ex)에 각각 탄소

Table 1. Inhibitory spectrum of *B. subtilis* MP56.

Test organism	Susceptibility
Gram-negative	
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 1004	-
<i>Salmonella typhimrium</i> KCTC 1925	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC	-
<i>Enterococcus cloacea</i>	-
Gram-positive	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-
<i>Mycrobacterium smegmatis</i> ATCC 9341	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 10537	+
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1928 (R209)	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	+
MRSA 693E	+
MRSA 4-5	+
MRSA 5-3	+
MRSA S1	+
MRSA S3	+
MRSA U4	+
MRSA P8	+
MRSA B15	+
VRSA(MRSA2-32)	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-
VRE 2	-
VRE 3	-
VRE 4	-
VRE 5	-
VRE 6	-
VRE 82	-
VRE 89	-
VRE 98	-
IMP 100	+
IMP 102	+
IMP 120	+
IMP 123	+
IMP 129	+
ESBL LMH-B1	-
ESBL LMH-P3	-
ESBL LMH-S1	-
ESBL LMH-U4	-
ESBL LMH-W1	-

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against infectious strains. -, no inhibition zone; +, above 1.2 mm.

원 농도를 1% (w/v)가 되게 하여 1일간 배양하여 결정하였으며 결과는 Fig. 3과 같다. MP56 균주는 mannitol과 sucrose순으로 높은 항생물질 생산능을 보여주었다. Fructose, glucose, lactose는 균주 생장을 증가시켰으나 항생물질 생산능이 비교적 낮았다. 질소원에 따른 항생물질 생산을 검토한 결과 유기질소원은 항생물질의 생산에 전체적으로 좋은 효과를 보이는 반면, 무기질소원은 항생물질의 생산이 아주 낮거나 없는 것으로 보아 항생물질의 생산에 유기질소원이 효과적으로 쓰이는 것을 알 수 있었으며 유기 질소원 중 oat meal이 가장 높은 항생물질 생산효과를 나타내었다(Fig. 4). 무기물질 및 금속염류가 항생물질에 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 mannitol 1%, oat meal 1%에 0.01%의 무기물질 및 금속염을 첨가하여 항생물질 생성에 관한 실험을 하였으며, 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 표에서 나타낸 바와 같이 CaCl₂를 사용하였을 때 가장 우수한 항생물질 생산능을 나타내었다. NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄, MgSO₄ 및 MnSO₄를 첨가한 경우는 항생물질 생산능의 저하를 보이지는 않았다. 이상과 같이 MP56 균주의 항균 물질 생산을 위한 최적 배지 조성은 mannitol 1%, oat meal 1%, CaCl₂ 0.01%였다. *Bacillus subtilis* MP56을 최적 배양조건으로 배양할 때 배양시간이 항균 물질의 생산에 미치는 영향을 검토하여 세포량, 활성의 변화, pH 변화는 Fig. 6에 나타내었다. 항균 물질은 10시간째에 최대로 생산되었으며 이후 48시간까지 안정적으로 활성이 유지되었다. Yoo 등(2007)이 동정한 *Bacillus* 속 균주는 48시간 배양후 활성이 급격히 떨어져 12-36시간을 최적 배양시간으로 보고하였다. 그러나 Seo 등(2010)이 분리한 *Bacillus lichemiformis* KJ-9의 경우 식물병원성 균주에 대한 항균력은 24-60시간에 나타나는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 분리한 항균 미생물을 이용하여 항균성 소재 생산 시에는 *Bacillus subtilis* sp. MP56 균주를 12-48시간 배양하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

항균활성 평가

그람 양성세균 그람 음성세균 및 다제내성균을 대상으로

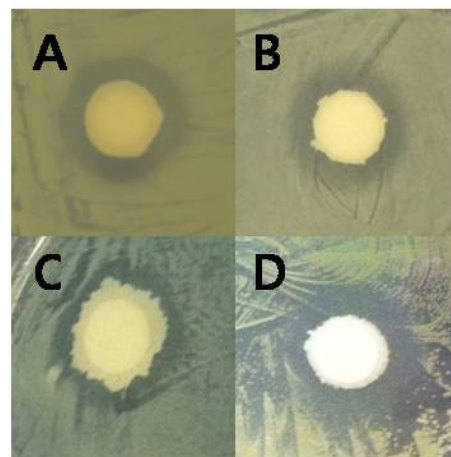


Fig. 2. Antimicrobial activities of the isolated *Bacillus subtilis* MP56. (A) *Staphylococcus aureus* ATCC10537, (B) MRSA 5-3, (C) VRSA (MRSA 2-32), (D) IMP 100.

MP56 균주 배양액의 항균 활성을 조사한 결과, 그람 음성균에는 감수성을 보이지 않았다. 그러나 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 10537, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928 (R209) 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p에서 감수성을 보였다. 특히 최근 국내 임상 환자에서 분리된 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) 균주 9종과 imipenem 내성균주 5종에 대해 감수성을 보였다(Table 1). Kim 등(2010)은 *Bacillus polyfermenticus* KJS-2에서 macrolactin 계열의 물질을 정제하여 macrolactin A, 7-O-malonyl macrolactin A, 7-O-succinyl macrolactin A, macrolactin E 및 macrolactin F의 구조를 규명하였으며 특히 3종의 항생물질인 macrolactin A, 7-O-malonyl macrolactin A, 7-O-succinyl macrolactin A는 4종의 MRSA, VRE에 효과적으로 성장억제를 나타내었다. 또한 Aunpad and Na-Bangchang (2007)은 *Bacillus pumilus* strain WAPB4 균주

에서 bacteriocin인 Pumilicin 4를 정제하여 그람 양성균 중 10종의 *Bacillus* 속, *Lactobacillus* 속 균주 및 4종의 MRSA 및 1종의 VRE에서 항생물질 감수성을 확인하여 펩타이드 항생제로써 개발 가능성을 시사하였다. 식품, 토양 유래 *Bacillus* 속 미생물이 생산하는 항균 물질 중 MRSA, VRE 같은 임상 균주에 효과적인 소재는 많이 연구되고 있으나, imipenem 내성균에 유효한 성분 에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구진이 분리한 *B. subtilis* MP56 균주는 최근 분리된 methicillin 및 imipenem 내성균주에 대하여 고른 항균 활성을 보여 다제내성균을 극복하기 위한 의약소재로써 응용 가능성을 시사하였다.

적요

최근 국내외로 MRSA, VRE 등의 다약제 내성 균주의 분리빈도가 매년 급증하고 있고, 시판하고 있는 항생제 중 가장 효능이 강력한 제품들도 다약제 내성균 출현율이 증가함에 따라 이를 극복할 새로운 항생제의 개발이 요구되고 있다. 다약제 내성균

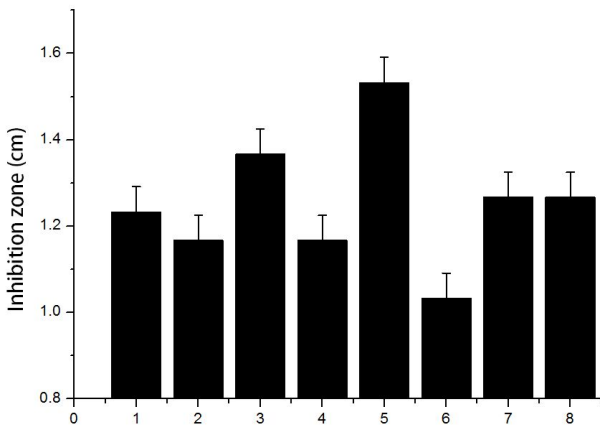


Fig. 3. Effect of carbon sources on antimicrobial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* sp. MP56. 1, fructose; 2, lactose; 3, sucrose; 4, maltose; 5, mannitol; 6, sorbitol; 7, glucose; 8, MRS medium.

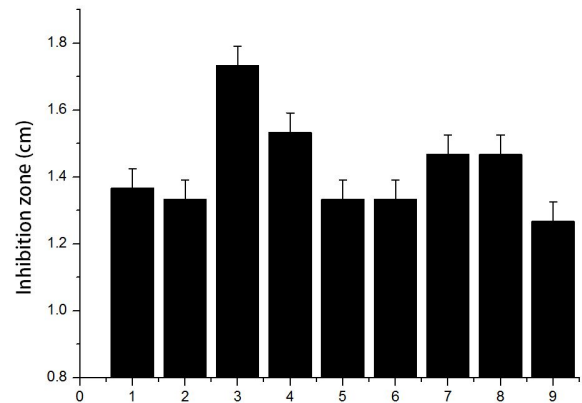


Fig. 5. Effect of metal ion on antimicrobial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* sp. MP56. 1, MgCl₂; 2, MnSO₄; 3, CaCl₂; 4, KCl; 5, NaCl; 6, Na₂HSO₄; 7, MgSO₄; 8, none; 9, MRS medium

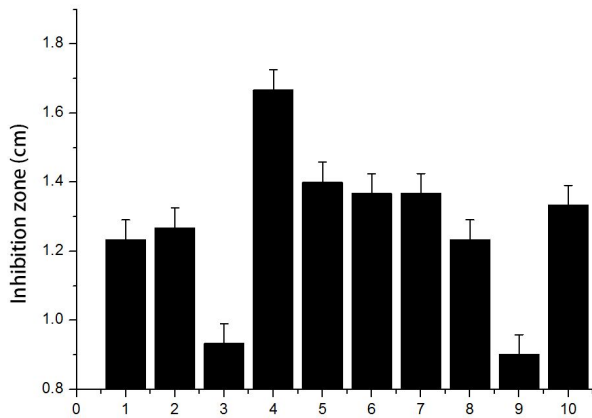


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on antimicrobial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* sp. MP56. 1, yeast extract; 2, peptone; 3, tryptone; 4, oat meal; 5, beef extract; 6, soy bean meal; 7, malt extract; 8, NH₄Cl; 9, ammonium sulfate; 10, MRS medium.

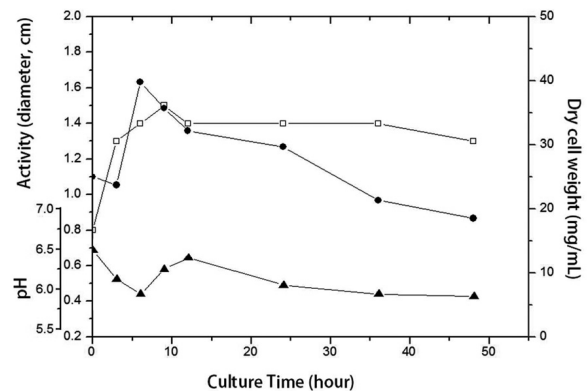


Fig. 6. Production profiles of antimicrobial substance from the culture broth strain *B. subtilis* sp. MP56. Dry cell weight (-●-), antimicrobial activity (-□-), pH (-▲-)

에 유효한 항생제의 예로 vancomycin, teicoplanin, linezolid가 다약제 내성균에 유효한 의약품으로 쓰이고 있으며 방선균이나 *Bacillus* 등의 배양액에서 다약제 내성균에 유효한 물질의 발굴에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 넓은 항균범위를 가지고, 체내 축적이 적은 항생물질에 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구진은 국내 서해안의 갯벌에서 *Bacillus* 속 미생물을 수중 분리하였으며, 다약제 내성균에 항균 활성을 지니는 MP56 균주를 선발하였고, 균주 동정 결과 *Bacillus subtilis* 와 99.93%의 16S rRNA 상동성을 나타냄을 본 연구에서 확인하였다. 국내외 연구진에 의하여 다수의 *Bacillus* 속 미생물이 분리된 바가 있으며, 항균 물질에 대한 연구도 보고된 바 있다. 그러나 국내 갯벌에서 분리된 *Bacillus* 속 균주 배양액의 임상균주에 대한 항균 효능 평가에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 본 연구에서 *Bacillus* 속 균주 MP56 배양액이 국내에서 분리한 임상 균주인 MRSA, IMP 균주에 대해 우수한 항균 활성을 나타내어 최적 발효조건과 항균범위를 본 논문을 통해 보고하였으며, 추후 MP56 균주 배양액에서 항균물질의 분리, 정제 및 구조 규명을 위한 후속 연구를 수행할 예정이다.

감사의 말

본 논문은 2012 학년도 목포대학교 교내연구비 지원(2012-0186)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Alanis, A.J. 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **36**, 697-705.
- Aunpad, R. and Na-Bangchang, K. 2007. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr. Microbiol.* **55**, 308-313.
- Chang, H.C. and Yang, E.J. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJ1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 339-346.
- Choi, Y.H., Cho, S.S., Simkhada, J.R., and Yoo, J.C. 2012. A novel thermotolerant and acidotolerant peptide produced by a *Bacillus* strain newly isolated from a fermented food (kimchi) shows activity against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Antimicrob.* **40**, 80-83.
- Delcambe, L. 1950. Iturine, new antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *C R Seances. Soc. Biol. Fil.* **144**, 1431-1434.
- Drago, L., Nicola, L., and De Vecchi, E. 2008. A comparative *in-vitro* evaluation of resistance selection after exposure to teicoplanin, vancomycin, linezolid and quinupristin-dalfopristin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 608-611.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Hashizume, H. 2012. Studies for the development of novel anti-MRSA/VRE drugs. *Yakugaku zasshi : J. Pharm. Soc. Jap.* **132**, 59-67.
- Jukes, T.H. and C.R.C. 1969. Evolution of protein molecules. Mammalian protein metabolism, pp. 21-132. In Munro, H.N. (ed.). Academic Press, New York, N.Y., USA.
- Kim, D.H., Kang, K.R., Kim, H.W., Yoon, S.Y., Kim, C.G., Yamaguchi, T., Sohng, J.K., and Kang, J.S. 2010. Structure determination of macrolactin compounds with antibacterial activities isolated from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *J. Life Sci.* **20**, 1792-1800.
- Klein, C., Kaletta, C., and Entian, K.D. 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 296-303.
- Kluge, B., Vater, J., Salnikow, J., and Eckart, K. 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* **231**, 107-110.
- Long, K.S. and Vester, B. 2012. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 603-612.
- Moshafi, M.H., Forootanfar, H., Ameri, A., Ameri, A., Shakibaie, M., Dehghan-Noudeh, G., and Razavi, M. 2011. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS1 isolated from soil. *Pak. J. Pharm. Sci.* **24**, 269-275.
- Nakano, M.M. and Zuber, P. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**, 223-240.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Seo, D.C., Ko, J.A., Gal, S.W., and Lee, S.W. 2010. Characterization of *Bacillus lichemiformis* KJ-9 isolated from soil. *J. Life Sci.* **20**, 403-410.
- Toama, M.A., Issa, A.A., and Ashour, M.S. 1978. Effect of agar percentage, agar thickness, and medium constituents on antibiotics assay by disc diffusion method. *Pharmazie* **33**, 100-102.
- Turos, E., Long, T.E., Konaklieva, M.I., Coates, C., Shim, J.Y., Dickey, S., Lim, D.V., and Cannons, A. 2002. N-thiolated beta-lactams: novel antibacterial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2229-2231.
- Woodford, N., Warner, M., and Aucken, H.M. 2000. Vancomycin resistance among epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 258-259.
- Yoo, H.S., Sohn, M.E., Cho, S.J., Park, S.K., and Lee, S.W. 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 87-94.