

細菌의 抗生物質 耐性에 관한 研究

Macrolide系 抗生物質에 對한 誘導 耐性 *Bacillus*屬 細菌

崔應七·金炳珏·沈美慈*·鄭敬壽·禹晶媛·金惠鈴·李鍾吉

서울大學校 藥學大學·德成女子大學 藥學部*

(Received July 30, 1982)

Eung Chil Choi, Byong Kak Kim, Mi Ja Shim*, Kyeong Soo Chung,

Jeong Won Woo, Hye Rung Kim and Chong Kil Lee

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151

and Department of Pharmacy, Duk-Sung Women's College, Seoul 132, Korea

Studies on the Resistance to Antibiotics in Bacteria

Induced Resistance to Macrolide Antibiotics in *Bacillus* sp.

Abstract—Several strains of bacteria having resistance to macrolide antibiotics were isolated. EMR-1, one of them, exhibited the induced resistance to macrolide antibiotics and this microorganism was identified as a bacterium belong to *Bacillus* species. The subinhibitory concentration of erythromycin or oleandomycin induced strong resistance to both erythromycin and oleandomycin themselves and to other macrolide antibiotics such as leucomycin, spiramycin and josamycin. The effective concentration of inducer, erythromycin was 0.0016~0.2 μ g/ml. The inactivating enzyme of these antibiotics was not produced by EMR-1.

Erythromycin, oleandomycin, leucomycin, spiramycin, josamycin 등 macrolide계 항생물질과 lincomycin은 다수의 Gram 양성균, 몇가지 Gram 음성균, 리켓치아의 일부 및 PLT류에 유효한 중범위 항생물질이다. 이들 항생물질은 부작용도 적으며, 주로 호흡기 계통의 감염에 사용되고 있다.

이들 macrolide계 항생물질과 lincomycin의 유효성을 계속 유지하기 위하여, 이들 항생물질에 대한 내성 균주의 분리 및 내성 발생기전에 대한 연구가 필요하다.

Macrolide계 항생물질에 대한 내성 연구는 erythromycin을 중심으로 해서, 주로 *Staphylococcus aureus* 내성 균주에 대해 많이 수행되었으며,¹⁻⁷⁾ *Streptococcus pyogenes*,⁸⁾ *E. coli*⁹⁾ 및 *Bacillus subtilis*¹⁰⁾ 내성 균주에 대해서도 보고된 바 있다.

*Staphylococcus aureus*의 macrolide계 항생물질 내성 균주는 세 가지 췌으로 분류되고 있으나 본질적으로는 두 가지로 생각할 수 있다. 즉 본래부터 내성을 갖는 것, 즉 constitutive resistant bacteria와 소량의 erythromycin 등에 의해 내성이 유도되어 erythromycin을 포함한 다수의 macrolide계 항생물질에 내성을 갖는 것, 즉 induced resistant bacteria로 나눌 수 있다.

내성 연구 특히 내성 기구를 바람직하게 수행하기 위해서는 적어도 세 가지 세균, 즉 *Staphylococcus aureus*, *E. coli* 및 *Bacillus subtilis*를 대상으로 해야 한다. *Bacillus subtilis*의 eryth-

romycin 내성 균주에 대해서는 constitutive resistant strain이 보고되어 있다.¹⁰⁾ 이번 연구에서는 *B. subtilis*로 추정되는 erythromycin 내성 *Bacillus*속 세균을 분리하고, 분리된 세균의 erythromycin 유도 내성에 대하여 연구 검토하였다.

實 驗 方 法

試藥 및 培地— Erythromycin (EM)은 柳韓洋行에서, oleandomycin (OM)은 한국 Pfizer에서, leucomycin (LM)은 健豊製藥에서, josamycin (JM)은 東亞製藥에서 제공받아 사용하였다. 항생물질 디스크는 昭和藥品化工(東京)의 것을 사용하였으며, ATP, acetyl CoA, c-AMP, NAD 등은 독일 Boehringer Mannheim의 제품을 사용하였다.

耐性菌의 分離 및 同定— EM을 100 μ g/ml 함유한 nutrient agar plate를 만들고, plate 위에 낙하균을 받아, 37°C에서 24시간 배양하였다. 독립된 세균 집락을 순수 분리하였다. 집락의 모양과 현미경 관찰로 *Bacillus*속으로 예견되는 세균에 대해 내성 실험을 행하고, 선발된 EMR-1 균주에 대해 Gram 염색, 포자 염색(Schaeffer and Fultou spore stain),¹¹⁾ 열내성 시험(60°C, 30분)을 행하였다.

感受性·耐性 實驗— Paper disk법을 이용하였다. Nutrient agar slant에 37°C, 16시간 배양하였다. 수정 nutrient broth (beef extract 10g, peptone 10g, yeast extract 2g, glucose 5g, NaCl 5g/l, pH 7.4)에 slant의 균을 접종하여, 37°C에서 16시간 배양하여 표준 균액으로 하였다. 수정 nutrient agar (수정 nutrient broth+agar 15g/l) 15ml에 표준 균액 30 μ l를 첨가하여 plate를 만들었다. 그 위에 각종 항생물질디스크를 놓았다. 37°C에서 16시간 배양하여, 디스크 주위에 생긴 저지원의 크기와 모양으로 감수성, 내성, 내성의 성질 등을 판정하였다.

耐性の 誘導— 수정 nutrient broth 20ml에 탁도가 0.2 되도록 표준 균액을 넣고, inducer로 EM을 0.00032~1 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하였다. 37°C에서 3시간 배양한 후 새로운 배지 20ml에 위의 배양 균액을 탁도가 0.07 되도록 넣고, EM 또는 LM을 100 μ g/ml 되도록 첨가하였다. 대조균으로 위의 배양 균액을 사용하되 항생물질을 첨가하지 않은 것과, inducer 없이 3시간 배양한 균액을 사용하고 항생물질을 넣은 것을 준비하였다. 동일 조건에서 배양하여 2시간마다 660nm에서 O.D.를 측정하여 성장도를 조사하였다.

抗生物質 不活性化 酵素 實驗— 1) 세포 추출물의 조제 : 수정 nutrient broth 20ml에 EMR-1을 접종하여 37°C에서 하룻밤 前培養하였다. 1.8l의 세 배지에 前培養 균액과 250 μ g의 EM을 넣고, 37°C에서 4시간 진탕 배양하였다. 원심분리(1000g, 20분)하여 균체를 얻고 TMK buffer (Tris-HCl 100mM, KCl 60mM, MgOAc₂ 10mA, 2-mercaptoethanol 6mM, pH 7.8)로 3번 세척하였다. 균체 2.5g에 海砂 5g과 TMK buffer 6ml를 넣고 분쇄하였다. 원심분리(10,000g, 30분)하여 얻은 상등액을 세포 추출물로 하였다. 2) 분활성화 반응 : 250 μ g/ml EM 0.1ml, 세포 추출물 0.2ml, TMK buffer 0.1ml, ATP 등 cofactor용액 0.1ml를 혼합해, 37°C에서 2시간 반응시켰다. 80°C에서 5분 가열하여 반응을 중결시킨 후 원심분리하여(10,000g, 20분) 상등액을 취하였다. 상등액에 남아 있는 EM의 역가를 *B. subtilis*에 대한 저지원의 크기로 비교하였다.

實 驗 結 果

耐性菌의 分離 및 同定— 100 μ g/ml의 EM을 함유한 agar plate에 낙하균을 받아 배양하고, 생성된 집락 중 세균만 취해 순수 분리하였다. 순수분리된 균주에 대해 디스크 법을 실시하였다. Macrolide계 항생물질에 대해 유도 내성을 나타내는 것으로 예견되는 균주를 선택하여(감수성·

내성 실험 참조) EMR-1이라 칭하고, 동정하였다. EMR-1 균주는 호기성 조건하에서 태양빛없이, 유기물질을 이용하여 양호하게 성장하였다. Gram 염색하여 관찰하였을 때 EMR-1 균주는 Gram 양성, 간균이었으며 크기는 $0.5 \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$ 로 균체 표면이 강하게 보였다. 포자 염색하였을 때 세포 중앙에 타원형의 포자가 관찰되었다. (Fig. 1) 60°C 에서 30분간 가열하였을 때 EMR-1 균주는 사멸하지 않았으며, 포자 염색에 의해 포자가 관찰되었다. 이러한 결과로부터 EMR-1 균주는 *Bacillus*속 세균임이 확인되었다.

感受性·耐性實驗— 분리된 EMR-1 균주가 어떤 종류의 내성을 갖는가를 알기 위해 디스크 법으로 감수성 및 내성 실험을 하였다. EMR-1 균액을 함유한 agar plate에 항생물질 함유 디스크를 놓고 배양한 후 디스크 주위의 저지원을 관찰하였다(Fig. 2). EM, OM, LCM 디스크 주위에는 원형의 저지원이 생성되었으나, 저지원 안에는 상당수의 집락이 생성되어 분명하게 보이지 않았다. 이러한 현상은 EM, OM 또는 LCM 등에 의해 EM, OM 또는 LCM 자체 각각에 대해 유도 내성을 가짐을 의미하는 것으로 추측할 수 있다. LM, SPM 또는 JM에 의한 저지원은 EM 디스크가 있는 쪽(중앙)이 찌그러졌다. 이러한 현상은 중앙에 있는 EM에 의해 LM, SPM 또는 JM에 대한 내성이 유도되었다고 추측할 수 있다.

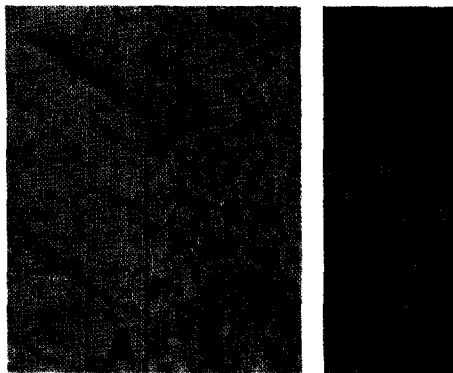


Fig. 1—The morphology of EMR-1 bacteria after spore staining (A) and Gram staining (B).
in A blue: spore, red: vegetative cell,
in B violet: vegetative cell, red: vegetative cell of *E. coli*.

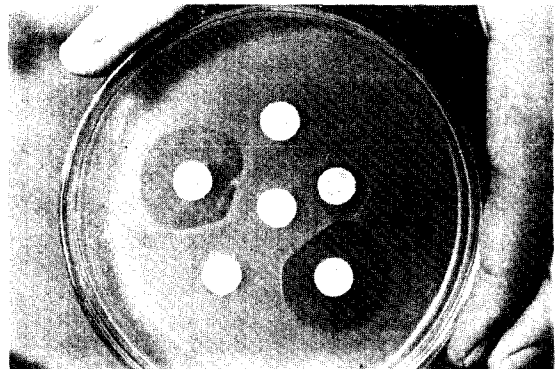


Fig. 2—The resistance induction with macrolide antibiotics in EMR-1.

E: erythromycin L: leucomycin J: josamycin O: oleandomycin li: Lincomycin Sp: Spiramycin

耐性的誘導— 디스크 법에 의해 EMR-1 균주는 EM 또는 OM에 의해 내성이 유도되어 EM, OM, LM 등에 대해 내성을 갖게 됨이 예견되었다. 이러한 내성 유도를 액내 배양에서 관찰하였다.

EM을 MIC(*Bacillus subtilis* ATCC 6633 기준) 보다 낮은 농도로 첨가한 액체 배지에서 EMR-1 균을 3시간 배양(유도)하고, EM을 $100 \mu\text{g/ml}$ 함유한 액체 배지에 옮겨 계속 배양하였다. Fig. 3에 유도시의 EM 농도별로 성장 곡선을 표시하였다. EM을 첨가하지 않고 3시간 배양하였을 때 EMR-1 균주는 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 EM을 함유한 새 액체 배지에서 성장이 억제되었다. 그러나 $0.0016 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 의 EM을 넣고 3시간 배양(유도)하였을 때는 EMR-1 균주가 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 EM을 함유한 새 액체 배지에서 성장되었다. 즉 소량의 EM 존재하에서 3시간 배양함에 의해 EM에 대한 내성이 유도되었다.

같은 조건에서 3시간 배양한 후, $100 \mu\text{g/ml}$ 의 LM을 함유한 새 액체 배지에서 EMR-1 균주를 배양하였다. 그때의 성장 곡선을 Fig. 4에 표시하였다. 역시 $0.0016 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 의 EM을 넣고 3시간 배양하였을 때는 EMR-1 균주가 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 LM을 함유한 새 액체 배지에서 성장하였다. 즉

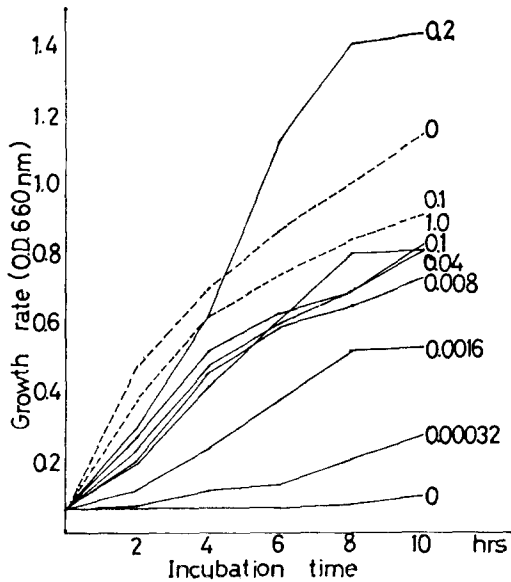


Fig. 3—Effect of erythromycin concentration on the induction of erythromycin resistance. The figures denote the concentration of erythromycin ($\mu\text{g/ml}$) in the induction mixture. The dotted lines exhibit the growth curve of EMR-1 in the modified nutrient broth without erythromycin and the solid lines exhibit the growth curves in the medium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin after the induction.

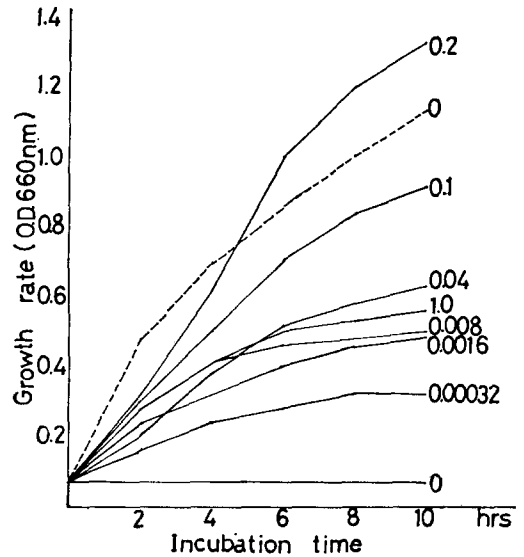


Fig. 4—Effect of erythromycin concentration on the induction of leucomycin resistance. The figures denote the concentration of erythromycin ($\mu\text{g/ml}$) in the incubation mixture. The dotted lines exhibit the growth curves of EMR-1 in the modified nutrient broth without leucomycin and the solid lines exhibit the growth curves in the medium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ leucomycin after the induction.

소량의 EM 존재하에서 3시간 배양함에 의해 LM에 대한 내성이 유도되었다.

抗生物質 不活性化 酵素 實驗— 내성 균주가 EM을 불활성화하는 효소를 생성하는가 그렇지 않는가를 알아 보았다. 내성 균주를 소량의 EM을 함유한 배지에서 배양하여 얻은 균체를 분쇄하여 세포 추출물을 얻고, 이 세포 추출물과 EM을 ATP 등 cofactor 존재하에 반응시켰다. 잔존한 EM의 역가를 저지원의 크기로 측정하고, EM 역가 상실 정도로 불활성화 효소 존재 여부를 판정하였다.

Table I에서 볼 수 있는 바와 같이 ATP, ATP+c-AMP, acetyl CoA 또는 NAD를 cofactor로 하여 EM을 내성균 세포 추출물과 반응시키고, 잔존한 EM에 의한 저지원의 크기를 비교하였을 때, 그 크기는 감수성 균의 세포 추출물을 사용한 계, 또는 세포 추출물을 첨가하지 않은계에서의 저지원의 크기와 별 차이가 없었다. 이것은 내성균의 세포 추

Table I—The size of inhibition zone by the remained erythromycin after incubation with the cell extract of EMR-1.

Reaction mixture	Inhibition zone (diameter in mm)
ATP 20mM, TMK, EM, cell extract	22
ATP 20mM, c-AMP 10mM, TMK, EM, cell extract	21.5
Acetyl CoA 10mM, TMK, EM, cell extract	21.7
NAD 10mM, TMK, EM, cell extract	21.2
ATP 20mM, TMK, EM, cell extract*	22.5
TMK, EM	24

The diameter of disks is 8mm.

* The cell extract prepared from *B. subtilis* ATCC 6633 was used.

Bacillus subtilis ATCC 6633 was used in bioassay.

출물과의 반응에 의해 EM이 변함을 받지 않는 것을 의미하며, 이 내성 균주가 EM을 불활성화하는 효소를 생성하지 않는 것으로 판단된다.

考 察

낙하균에서 분리된 macrolide계 항생물질 내성 균주 EMR-1은 배양 조건, 집락 모양, Gram 염색, 포자 염색 및 열내성 검사의 결과 등에 의해 *Bacillus* 속 세균임이 인정되었다.

Macrolide계 항생물질에 대한 감수성, 내성 실험 및 내성 유도 실험 결과 이 균주는 EM 등에 의해 내성이 유도되어 EM을 포함한 기타 macrolide계 항생물질에 대해 내성을 갖게 됨이 밝혀졌다. 이렇게 내성이 유도되는 *Bacillus*속 균주는 처음 발견된 것이므로, 균주의 종을 확인하는 것은 가치가 있다고 사료된다.

디스크 법에 의한 감수성·내성 실험에서 EM, OM, LCM의 디스크 주위에는 원형의 저지원이 생겼으나, 저지원 안에는 상당수의 집락이 생성되었다. 이것은 디스크에서 용출되는 EM 등이 디스크를 중심으로 원상으로 확산되어 나가고, 이때 확산된 소량(<MIC)의 EM 등에 의해 내성이 유도되어 EMR-1 균주가 EM 등 자체에 대해 내성을 발현함을 의미하는 것이다.

또한 LM, SPM, JM 디스크에 의한 저지원이 찌그러진 것은 중앙에서 확산되어 나온 소량의 EM 등에 의해 내성이 유도되어, 배양 시작 후 충분한 시간이 경과하여 MIC를 초과하는 충분한 양의 LM 등이 확산되어 왔을 때에도 성장할 수 있음을 의미하는 것이다.

EM, OM 또는 LCM에 의해 EM, OM 또는 LCM 자체, 그밖의 macrolide계 항생물질에 대한 내성의 유도가 디스크법에 의해 예견되었으며, 이러한 예견이 액체배양법에 의해 증명되었다. 0.0016~1 μ g/ml의 EM을 첨가한 액체 배지에서 3시간 배양(유도)에 의해 EMR-1 균주는 EM 자신과 LM에 대해 내성이 유도되었다. Macrolide계 항생물질 중 14-membered ring계 항생물질이 inducer로 작용하고, 16-membered ring, 12-membered ring계 항생물질에 의해서는 내성이 유도되지 않는다는 것이 EM 내성 *Staphylococcus aureus* 균주에서 연구되어 있다.⁷⁾

*Bacillus*속 세균인 EMR-1 균주에서 EM, OM에 의해 내성이 유도되고, LM, JM, SPM 등에 의해서는 내성이 유도되지 않는 것은 위의 결과와 일치한다. 디스크 법에서 EMR-1 균주가 LCM에 의해 LCM 자체에 대해 내성 유도된 것으로 예견된 점은 더욱 연구할 가치가 있다고 사료된다.

Aminoglycoside계 항생물질의 내성 기전의 하나로, 내성균이 이들 항생물질을 불활성화하는 효소를 생성한다는 사실이 일반화되어 있다. 이와 같은 불활성화 효소에 의한 내성 발현은 β -lactam계 항생물질 내성 및 chloramphenicol 내성의 경우에도 일반화되어 있다. 그러나 macrolide계 항생물질 내성균에서는 아직까지 불활성화 효소가 발견되어 있지 않다.

EMR-1 균주는 불활성화 효소 반응 실험 결과 그러한 효소를 생성하지 않는 것으로 밝혀졌다. 따라서 EMR-1 균의 내성은 다른 내성 기전에 기인할 것이다.

EM 내성인 *Staphylococcus aureus*에서는 그들 ribosome이 변화되어 있으며,¹²⁾ 그러한 변화가 내성의 기전으로 설명되고 있다. 즉 내성 균주의 23S ribosomal RNA에는 N⁶, N⁶-dimethyladenine이 감수성 균주에 비해 다량 포함되어 있으며,^{13,14)} 그러한 변화로 인해 EM과 chemoreceptor인 ribosome의 결합이 어려워져 내성화된다고 설명한다.¹⁴⁻¹⁶⁾ EMR-1 균주의 내성 기전으로 이러한 ribosome의 변화를 생각할 수 있다.

結 論

낙하균 중에서 macrolide계 항생물질에 내성인 세균을 분리하였으며, 이 세균은 포자 생성 등에 의해 *Bacillus*속 세균으로 판명되었다. 이 내성균은 소량의 EM, OM 등에 의해 내성이 유도 되어, EM, OM 자체 및 LM, SPM, JM 등 다른 macrolide계 항생물질에 대해 강한 내성을 나타냈다. 내성을 유도하는 inducer의 적정농도는 0.0016~0.2g/ml였다. 내성 기전의 하나로 불활성화효소 생성 여부를 조사하였으나 생성하지 않았다.

이 研究는 産學協同財團의 81年度 學術研究費에 의해 수행된 것이며, 이에 同財團에 깊이 감사한다.

文 獻

1. J.R. Weaver and P.A. Pattee, *J. Bacteriol.*, **88**, 574 (1964).
2. M. Kono, T. Kasuga and S. Mitsuhashi, *Japan J. Microbiol.*, **10**, 109 (1966).
3. H. Hashimoto, H. Oshima and Mitsuhashi, *Japan J. Microbiol.*, **12**, 321 (1968).
4. B. Weisblum, C. Siddhikol, C.J. Lai and V. Demohn, *J. Bacteriol.*, **106**, 835 (1971).
5. T. Tanaka and B. Weisblum, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **5**, 538 (1974).
6. H. Ono, M. Inoue, J. C-H. Mao and S. Mitsuhashi, *Japan J. Microbiol.*, **19**, 343 (1975).
7. N.E. Aller, Macrolide resistance in *S. aureus*: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **11**, 661 (1974).
8. J.M.S. Dixon and A.E. Lipinski, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1**, 333 (1972).
9. K. Tanaka, H. Teraoka, M. Tamaki, E. Otaka and S. Osawa, *Science*, **162**, 576 (1969).
10. S.B. Taubman, N.R. Jones, F.E. Young and J.W. Corcoran, *Biochim. Biophys. Acta.*, **123**, 438 (1966).
11. *Methods in Microbiology* (J.R. Norris and W. Ribbons ed.) p.123-124. Academic Press, London and New York. (1971).
12. B. Weisblum, Macrolide resistance in *S. aureus*, p.217-8. In *Drug action and drug resistance in bacteria*, Vol. I. Macrolide antibiotics and lincomycin, University Park Press, Baltimore. (1971).
13. C.J. Lai, J.E. Dahlberg, and B. Weisblum, *Biochemistry* **12**, 457 (1973).
14. C.J. Lai and B. Weisblum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 856 (1971).
15. B. Weisblum, C. Siddhikol, C.J. Lai and V. Demohn, *J. Bacteriol.* **106**, 835 (1971).
16. C.J. Lai, B. Weisblum, S.R. Fahnestock, and M. Nomura, *J. Mol. Biol.* **74**, 67 (1972).