

## *Bacillus licheniformis* EMR 균주에서 린코사마이드계 항생물질에 의한 유도내성

최 응 칠 · 우 정 원 · B. 와이스브럼\*

서울대학교 약학대학 · 위스컨신대학교 의과대학\*

(Received November 22, 1986)

### Inducible Resistance to Lincosamide Antibiotics by Lincosamide Antibiotics in *Bacillus licheniformis*

Eung Chil Choi, Jungwon Woo Chung and Bernard Weisblum\*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea and

\*Pharmacology Department, University of Wisconsin Medical School, Madison Wisconsin 53706, U.S.A.

**Abstract**—To clarify resistance mechanisms of lincosamide antibiotics, it was examined whether lincosamide antibiotics was able to induce high resistance to macrolide and lincosamide antibiotics against EMR-1 strain of *Bacillus* species. And it was also examined whether the inducible resistance was plasmid-mediated or chromosome-mediated. This strain was identified as *Bacillus licheniformis* by its morphological and physiological characteristics. The subinhibitory concentrations of lincomycin and clindamycin induced high resistance in the strain to lincosamide antibiotics, but not to macrolide antibiotics. The inducible resistance was not eliminated by treating the strain with ethidium bromide, and plasmid was not identified by the alkaline lysis method of plasmid preparation. These results indicate, therefore, that the inducible resistance to macrolide and lincosamide antibiotics in the strain may be chromosome-mediated, not plasmid-mediated.

항생물질은 수많은 질병의 치료에 널리 쓰이고 있으며 그 효과 또한 매우 크다. 그러나 최근에는 이러한 항생물질의 계속적인 사용에 따른 내성균의 출현으로 이들 내성균에 유효한 항생물질의 개발이 시급하게 되었다. 내성균의 출현을 막고 또 내성균에 유효한 항생물질을 반합성하기 위해서는 내성균의 출현 현황과 내성발생기전에 대한 연구가 필요하게 되었으며 따라서 이러한 연구가 많이 진행되고 있다.

저자는 에리스로마이신 등 마크로라이드계 항생물질에 내성을 나타내는 세균을 공기중에서 분리하여 이 세균이 *Bacillus*속 세균임을 확인하였으며 이 *Bacillus*속 세균이 소량의 에리스로마이신 또는 올레안도마이신과의 접촉에 의해 내성이 유도되어 에리스로마이신, 올레안도마이신에 대해 고도의 내성을 나타냄을 밝힌 바 있다.<sup>1)</sup> 이 *Bacillus*속 세균을 EMR-1 *Bacillus*속 세균이라

칭하였으며 에리스로마이신, 류코마이신 등 마크로라이드계 항생물질에 대해 유도 내성을 갖는 것 이외에 린코마이신, 클린다마이신 등 린코사마이드계 항생물질에 대해서도 내성을 나타냄이 디스크법에 의해 예견되었다.

린코사마이드계 항생물질은 중범위 항생물질로 임상적으로 호흡기 계통의 감염등에 매우 중요하게 사용되고 있다. 이들 항생물질에 대한 내성기전은 별도로 연구된 바 없고 마크로라이드계 항생물질에 대한 내성기전과 동일시되고 있다.<sup>2~5)</sup> 즉 세균의 23S ribosomal RNA의 변화에 기인하는 것으로 알려지고 있으며<sup>6,7)</sup> 내성유도인자로는 마크로라이드계 항생물질 중 14환의 기본구조를 가진 에리스로마이신과 올레안도마이신만이 작용하는 것으로 밝혀져 있다.<sup>8~10)</sup> 그러나 린코사마이드계 항생물질과 마크로라이드계 항생물질은 그 구조면에서 큰 차이가 있으므로 모두 단백질

의 생합성을 억제함으로써 항균작용을 나타낸다 하더라도 그 내성기전이 반드시 같다고는 볼수 없다.

본 연구에서는 디스크 법에서 예견된 바와 같이 EMR-1 *Bacillus*속 세균에 대하여 린코사마이드계 항생물질이 내성유도인자로 작용하는가를 아보았으며 또 이렇게 내성이 유도되었을 경우 EMR-1 *Bacillus*속 세균이 고농도의 린코사마이드계 항생물질과 마크로라이드계 항생물질에 동시에 내성을 나타내는가의 여부를 확인하였다. 또 EMR-1 *Bacillus*속 세균의 종을 동정하는 실험을 행하였으며 이 세균이 나타내는 유도내성이 프라스미드에 기인하는 것인지 염색체에 기인하는 것인지를 알아보았다.

### 실험 방법

항생물질—에리스로마이신(EM), 린코마이신(LCM), 클린다마이신(CLDM), 올레안도마이신(OM), 류코마이신(LM)등의 항생물질은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

내성균의 동정<sup>11,12)</sup>—EMR *Bacillus*속 균주에 대해 아래와 같은 실험을 하여 생리학적 특징을 관찰하였으며 그 결과로 종을 결정하였다. 대조균으로 *Bacillus subtilis* ATCC 6633균주에 대해서도 동일조건으로 같이 실험하였으며 필요에 따라서 *Escherichia coli*에 대해서도 동시에 실험하였다.

- 1) Production of catalase
- 2) Voges-Proskauer reaction (VP test)
- 3) Methyl red (MR) test
- 4) Growth in anaerobic agar

협기성 agar tall(높이 7.6cm)에 nutrient broth에서 37°C로 하룻밤 진탕 배양한 균액을 백급이로 취해 시험관 끝까지 찰려서 접종한 다음 37°C에서 배양하면서 3일과 5일째에 성장여부를 관찰하였다.

- 5) Growth at 50°C and at 65°C
- 6) Growth in 7% NaCl
- 7) Acid and gas from glucose
- 8) Oxidation or fermentation of glucose

- 9) Reduction of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to NO<sub>2</sub><sup>-</sup>
- 10) Starch hydrolysis
- 11) Decomposition of casein
- 12) Citrate utilization
- 13) Indole production
- 14) Gelatin hydrolysis
- 15) Urease activity
- 16) LV (Lecitho-Vitellin) test

내성의 유도실험<sup>1)</sup>—1) 린코사마이드계 항생물질에 대한 유도내성의 관찰

AC broth(peptone 2%, yeast extract 0.3%, dextrose 0.5%, ascorbic acid 0.02%, pH7.3) 5ml에 탁도가 0.2되도록 표준균액을 넣고 inducer로 LCM을 5μg/ml의 농도(CLDM의 경우에는 1μg/ml의 농도)를 첨가하였다. 37°C에서 3시간 동안 진탕 배양한 후 새로운 배지 5ml에 위의 균액의 탁도가 0.05가 되도록 넣고 LCM 500μg/ml(CLDM의 경우에는 100μg/ml)되도록 첨가하였다. 대조균으로 위의 배양균액을 사용하되 항생물질은 첨가하지 않은 것과 유도인자없이 3시간 동안 배양한 균액을 사용하고 항생물질을 넣은 것을 준비하였다. 동일조건에서 배양하면서 1시간마다 540nm에서 O.D를 측정하여 성장곡선을 그렸다.

2) 마크로라이드계 항생물질에 대한 유도내성의 관찰

AC broth 5ml에 탁도가 0.2되도록 표준균액을 넣고 1)과 동일한 조건으로 진배양한 후 새로운 배지 5ml에 균액의 탁도가 0.05되도록 넣고 EM, OM 또는 LM을 100μg/ml되도록 첨가한 다음 역시 1)과 동일한 방법으로 배양하면서 1시간마다 540nm에서 O.D.를 측정하여 성장곡선을 그렸다.

프라스미드의 존재여부 실험—*Bacillus*속 균 EMR에서 EM내성에 관한 유전자가 염색체에 있는가 또는 프라스미드에 있는가를 알기 위하여 우선 프라스미드의 존재여부를 확인하였다. ethidium bromide에 의한 프라스미드 제거법과 alkaline lysis 법에 의한 프라스미드의 분리확인법을 실시하였다.

1) Ethidium bromide에 의한 프라스미드 제거실험

Ethidium bromide를 0.3 $\mu$ g/ml~80 $\mu$ g/ml의 농도로 함유하는(two-fold serial dilutions) 시험관에, 표준균액을 배배지로 희석한(1:500) cell broth를 가한다음 30°C에서 16시간 진탕 배양하였다. 균의 성장이 거의 없는 최저농도의 배양액을 멸균증류수로 희석하여 agar plate에서 집락을 생성시켰다. 생성된 집락을 agar plate에 도말하여 다시 순부분리한 다음 순수 분리된 각 균주를 EM을 50 $\mu$ g/ml의 농도로 함유하는 agar plate에 다시 접종하여 성장여부를 관찰하였다.

2) Alkaline lysis 법에 의한 프라스미드의 분리확인

Ish-Horowicz가 수정한 Birnboim과 Doly의 방법을 사용하였다.<sup>13)</sup>

**실험결과 및 고찰**

내성균의 동정—EMR-1균주는 호기성이며, 그람 염색과 포자염색에 의해 그람양성, 포자형성 간균으로 판정되어 *Bacillus*속임이 밝혀졌다. 그 종을 밝히고자 생리학적 실험을 하였으며 그 결과는 아래와 같다. (Table I) 그 결과의 종합으로 EMR *Bacillus*속 균주는 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. 특히 혐기성 agar에서의 성장의 실험 결과 대조로 사용한 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 균주의 경우에는 agar tall의 표면에서만 균의 성장이 관찰되었는데 비하여 EMR *Bacillus*속 균주는 tall의 밑바닥까지 균의 성장이 관찰되었다. 따라서 EMR *Bacillus*속 균주는 *B. subtilis*가 아니라 *B. licheniformis*임이 확인되었다. EMR균주가 *B. licheniformis*일 것이라는 것은 nutrient agar plate에서 집락이 퍼져나가는 모양에서도 예견되었었다.

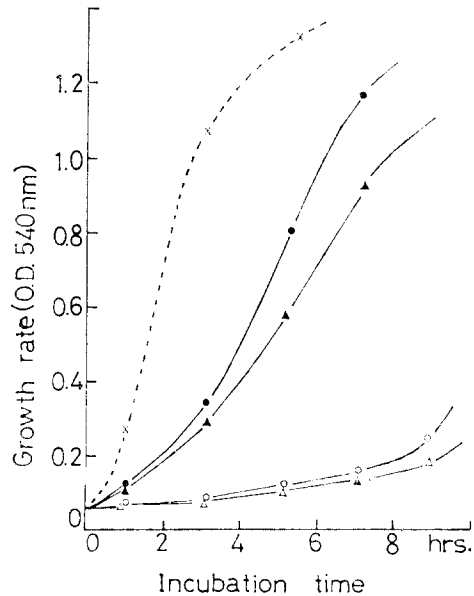
내성의 유도 실험—디스크법에서 예견된 대로 EMR *Bacillus*속 균주가 린코사마이드계통의 항생물질에 의해 내성이 유도되는가를 액내배양에서 관찰하였다.

1) 린코사마이드계 항생물질에 대한 유도내성의 관찰

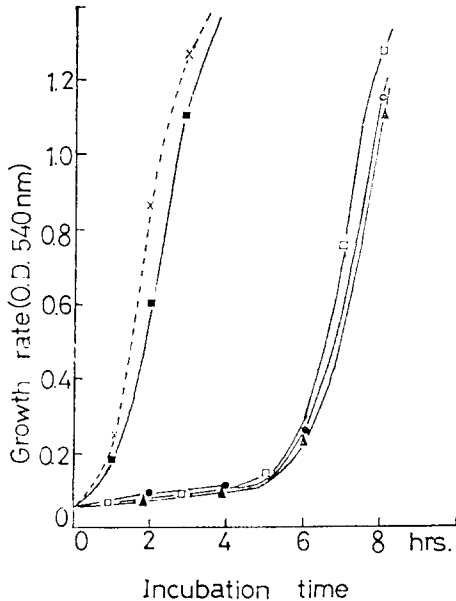
LCM(또는 CLDM)을 MIC(*Bacillus subtilis* ATCC 6633 기준)보다 낮은 농도로 첨가한 액

**Table I**—Morphological and physiological characteristics of EMR-1 *Bacillus* strain.

	EMR-1 strain	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
Gram staining	+	+
Motility	+	+
Spore shape	oval	oval
Catalase	+	+
VP test	+	+
MR test	—	—
Anaerobic growth	+	—
Growth at 50°C	+	+
Growth at 65°C	—	—
Growth in 7% NaCl	+	+
Acid from glucose	+	+
Gas from glucose	—	—
O/F of glucose	F	F
Nitrate reduction	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Citrate utilization	+	+
Indole production	—	—
Gelatin hydrolysis	+	+
Urease activity	+	+
LV(lecithinase)	—	—

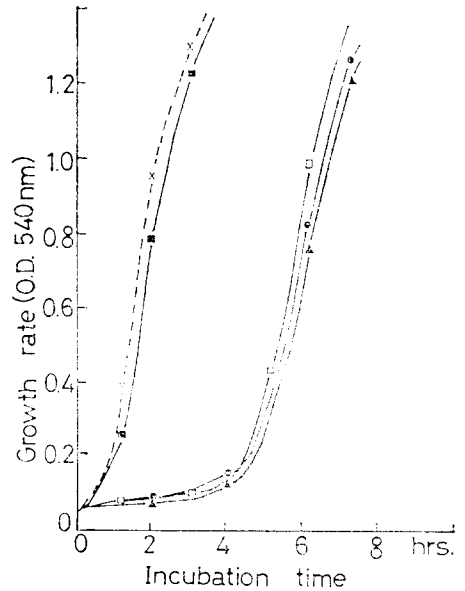


**Fig. 1**—Effect of LCM(CLDM) on induction of LCM (CLDM) resistance—Growth curves of EMR-1 strain in broth medium(x) and broth medium containing 500mcg/ml of LCM(•, ◯) (100mcg/ml of CLDM(▲, △)). Inocula were shaken for 3 hrs in broth medium(x, ◯, △) and broth medium containing 5mcg/ml of LCM(•) (1mcg/ml of CLDM(▲)).

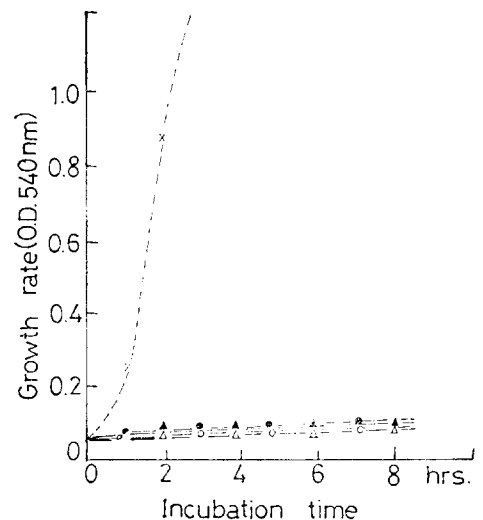


**Fig. 2**—Effect of LCM(CLDM) on induction of EM resistance—Growth curves of EMR-1 strain in broth medium( $\times$ ) and broth medium containing 100mcg/ml of EM( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\square$ ). Inocula were shaken for 3 hrs in broth medium( $\times$ ,  $\square$ ) and broth medium containing 5mcg/ml of LCM( $\bullet$ ) (1mcg/ml of CLDM( $\blacktriangle$ ), 1mcg/ml of EM( $\blacksquare$ )).

체배지에서 EMR-1 *Bacillus*속 균주를 3시간 배양하여 내성을 유도시키고 LCM을 500 $\mu$ g/ml(또는 CLDM을 100 $\mu$ g/ml) 함유한 액체배지에 옮겨 계속 배양하였다. Fig. 1에 액체배지에서의 성장을 곡선으로 표시하였다. LCM(또는 CLDM)을 첨가하지 않고 3시간 배양하였을때 EMR-1 *Bacillus*속 균주는 500 $\mu$ g/ml의 LCM(또는 100 $\mu$ g/ml의 CLDM)을 함유한 새 액체배지에서 성장이 억제되었다. 그러나 5 $\mu$ g/ml의 LCM(또는 1 $\mu$ g/ml의 CLDM)을 넣고 3시간 배양하여 내성을 유도시킨 EMR-1 *Bacillus*속 균주는 5 $\mu$ g/ml의 LCM(또는 CLDM) 존재하에 3시간 배양함에 의해 LCM(또는 CLDM)에 대한 내성이 유도되어 이보다 훨씬 고농도인 500 $\mu$ g/ml의 LCM(또는 100 $\mu$ g/ml의 CLDM)을 함유한 새 배지에서 성장하였다. 소량의 LCM 또는 CLDM에 의해 내성이 유도된 균주는 100 $\mu$ g/ml의 CLDM이나 500 $\mu$ g/ml의 LCM을 함유하는 배지에서 모두 성장하였으므로 교차유도내성(cross inducible resistance)을



**Fig. 3**—Effect of LCM(CLDM) on induction of OM resistance—Growth curves of EMR-1 strain in broth medium( $\times$ ) and broth medium containing 100mcg/ml of OM( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\square$ ). Inocula were shaken for 3 hrs in broth medium( $\times$ ,  $\square$ ) and broth medium containing 5mcg/ml of LCM( $\bullet$ ) (1mcg/ml of CLDM( $\blacktriangle$ ), 1mcg/ml of OM( $\blacksquare$ )).



**Fig. 4**—Effect of LCM(CLDM) on induction of LM resistance—Growth curves of EMR-1 strain in broth medium( $\times$ ) and broth medium containing 100mcg/ml of LM( $\bullet$ ,  $\square$ ,  $\blacktriangle$ ). Inocula were shaken for 3 hrs in broth medium( $\times$ ,  $\square$ ,  $\blacktriangle$ ) and broth medium containing 5mcg/ml of LCM( $\bullet$ ) (1mcg/ml of CLDM( $\blacktriangle$ )).

가짐을 관찰하였다.

2) 마크로라이드계 항생물질에 대한 유도내성의 관찰

1)에서와 같은 조건에서 3시간 배양후 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 EM(또는 OM, LM)을 함유한 새 액체 배지에서 EMR-1 *Bacillus*속 균주를 배양하였다. 그때의 성장곡선을 Fig. 2~4에 표시하였다. 소량의 LCM(또는 CLDM)을 넣고 3시간 배양하였을때와 항생물질 없이 배양하였을때의 EMR-1 *Bacillus*속 균주는 둘 다 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 EM(또는 OM, LM)에 의해 성장이 억제되는 것이 관찰되었다. 즉 소량의 LCM이나 CLDM에 의해 EMR-1 *Bacillus*속 균주에서는 LM, EM, OM과 같은 마크로라이드계 항생물질에 대한 내성이 유도되지 않았다.

린코사마이드계 항생물질에 의한 내성유도실험결과 이균주는 린코마이신, 클린다마이신등에 의하여 내성이 유도되어 린코사마이드계 항생물질에 대한 강한 내성을 갖게 되나 에리스로마이신, 올레안도마이신, 류코마이신 등의 마크로라이드계 항생물질에 대해서는 내성을 갖지 않는 것이 밝혀졌다. 이는 에리스로마이신, 올레안도마이신 등에 의하여 내성이 유도되어 마크로라이드계와 린코사마이드계 항생물질 모두에 대하여 강한 내성을 갖게 되는, 즉 14환 마크로라이드계 항생물질에 의한 내성 유도 성질과 비교하여 불특이한 현상으로 생각되며<sup>10)</sup>, 린코사마이드계 항생물질에 대한 이 균주의 내성기전을 보다 자세히 밝히는 것은 가치가 있다고 사료된다.

프라스미드의 존재 여부—EMR 균주에서 EM 내성의 원인 유전자가 염색체 위에 있는가 혹은 프라스미드 위에 있는가를 알기 위하여 우선 프라스미드의 존재여부를 알아보았다. alkaline lysis 법에 의한 프라스미드 minipreparation과 ethidium bromide에 의한 프라스미드 제거 실험을 실시하였다.

프라스미드 mini preparation을 5회 실시하였으나 프라스미드의 존재를 확인할수 없었다. 또한 ethidium bromide로 EMR를 처리하고 살아남은 균이 EM내성을 그대로 유지하고 있는가, 아니면 프라스미드소실에 의해 EM내성이 소실되

는가를 관찰한 결과 역시 내성이 그대로 남아있어 프라스미드 존재가 확인되지 않았다(data 생략). 따라서 EMR균주의 내성 관련 유전자는 일단 염색체위에 있는 것으로 추정하였다. 그러나 분자량이 아주 큰 프라스미드의 존재여부는 완전히 배제할 수 없다.

## 결론

에리스로마이신 등에 유도내성을 나타내는 *Bacillus*속 EMR-1 균주는 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. 이 균주에서 클린다다이신, 린코마이신 등의 린코사마이드계 항생물질에 의해 내성이 유도되어 같은 린코사마이드계 항생물질에 내성을 나타냈으며, 마크로라이드계 항생물질에 대해서는 내성을 보이지 않았다. 이것은 린코사마이드계 항생물질의 내성기전이 마크로라이드계 항생물질의 내성기전과 다를 것이라는 것을 예견한 것이다. 이 균주에서 프라스미드가 확인되지 않았으며, 따라서 이 내성은 염색체에 기인한다고 생각된다.

## 감사의 말씀

이 연구논문은 1985년 한국과학재단의 박사 해외연수 지원계획에 의해서 이루어진 연구결과와 일부이다. 이에 동 재단에 깊이 감사한다.

## 문헌

- 1) Choi, E.C., Kim, B.K., Shim, M.J., Chung, K.S., Woo, J.W., Kim, H.R., and Lee, C.K.: *Yakhak Hoiiji* 26, 169 (1982).
- 2) Weaver, J.R. and Patte, P.A.: *J. Bacteriol.* 88, 574 (1964).
- 3) Weisblum, B., Siddhikol, C., Lai, C.J. and Demohn, V.: *J. Bacteriol.* 106, 835 (1971).
- 4) Ono, H., Inoue, M., Mao, J.C. and Mitsushashi, S.: *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11, 661 (1974).
- 5) Tanaka, K., Teraoka, H., Tamaki, M., Otaka, E. and Osawa, S.: *Science* 162, 576 (1969).
- 6) Lai, C.J., Dahlberg, J.E. and Weisblum, B.: *Bi-*

- ochemistry* 12, 457 (1973).
- 7) Lai, C.J., Weisblum, B., Fahnestock, S.R. and Nomura, M.: *J. Mol. Biol.* 74, 67 (1972).
- 8) Hashimoto, H., Oshima, H. and Mitsuhashi, S.: *Japan J. Microbiol.* 12, 321 (1968).
- 9) Ono, H., Inoue, M., Mao, J.C. and Mitsuhashi, S.: *Japan J. Microbiol.* 19, 343 (1975).
- 10) Allen, N.E.: *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11, 669 (1977).
- 11) Cowan, S.T.: *Manual for the Identification of Medical Bacteria*(2nd ed.), Cambridge University Press p.70-72 (1974).
- 12) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*(8th ed.) The Williams and Wilkins Co., Baltimore. p.529-550 (1974).
- 13) Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Res.* 7, 1513 (1979).