

β-Lactam계 항생물질 내성균주의 β-Lactamase 생산의 유도

조경순* · 정영기†

동의대학교 미생물학과
*부산광역시 보건환경연구원

Induction of β-Lactamase on β-Lactam Antibiotics Resistant Bacterium

Kyung-Soon Cho* and Young-Kee Joung†

Department of Microbiology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea
*Public Health and Environment Institute of Pusan, Pusan 613-104, Korea

Abstract

Bacillus subtilis J105, high resistant bacteria against β-lactam antibiotics, become higher resistant through induction of β-lactamase in the presence of β-lactam antibiotics.

When there is no antibiotics in medium, the production of resistance-inductive β-lactamase reached its plateau 15 hours later. But when there is ampicillin (500μg/ml) in medium, the production of enzyme reached its plateau 25 hours later since cultivating bacteria, whereas it is found that enzyme 2,900 units/ml about 20 times as much as compared with not-presence of antibiotics was activated.

In addition, as the result of MIC comparing applying ampicillin-treated and non-treated strain MIC of ampicillin-treated strain is about 2~27 times higher. It is considered that this strain induce β-lactamase production by ampicillin-treatment, then increasing its resistance.

It is found that this resistant strain induce β-lactamase production against cephalosporin antibiotics as well as penicillin. As the result of examining the time of adding antibiotics for each phase of growth, it is concluded that logarithmic phase is the most effective.

As the above, it is suggested that this strain is a peculiar strain that its resistance is induced high by various β-lactam antibiotics.

Key words : β-lactamase induction, β-lactamase, antibiotics resistant.

서 론

임상에서 세균이 항생제의 존재에 의하여 내성을 유도하게 된다면 이는 실로 중요한 문제점을 야기하게 된다. 그

러므로 β-lactam계 항생제와 그에 의한 내성의 주체가 되는 β-lactamase(EC3.5.2.6) 유도에 관한 연구는 이전부터 보고되어 왔다¹⁻⁴⁾.

Gram 음성세균의 경우 β-lactamase는 세포막과 peripla-

† Corresponding author

smic space 등에 penicillin binding protein과 함께 존재하고 있으며 이를 역시 β -lactam 항생물질에 접촉하게 되면 생성이 유도된다는 연구가 Rossi 등에 의하여 보고된 바 있다⁵⁾. 그에 비하여 Gram 양성세균은 β -lactamase를 체외로 분비하는 균이 많다. Gram 양성균 중 *Staphylococcus aureus* 역시 β -lactamase를 분비하는 균이지만 plasmid 상에서 효소의 생산을 조절하고 있다고 보고된 바 있다⁶⁾. *E. coli*에서는 lac operon이 유도 조절 기구로서 거론되고 있으며, *P. aeruginosa*의 약제에 의한 β -lactamase의 유도기구 역시 *E. coli*의 lac operon의 조절기작과 비슷하다고 한다.

Thomas 등은 β -lactam계 항생물질에 대하여 내성균인 *Enterobacter cloacae*를 대상으로 penicillin계 및 cephalosporin계 항생물질에 대한 내성유도를 밝힌 바 있다⁷⁾. 이 균은 항생물질의 존재 하에서 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)가 10~100배이상 높아지는 현상을 확인하였고 약제에 의한 유도기작을 증명하였다.

필자 등은 β -lactam 항생물질의 역ガ를 높이기 위한 연구의 일환으로 다양한 β -lactam 항생물질에 내성이 강한 균주를 탐색하여 균주의 특성을 보고 한 바 있다⁸⁾. 이어서 본보에서는 내성균이 β -lactam계 항생물질에 의해 β -lactamase의 생산을 유도하므로 강한 약제내성을 가지는 특성이 있어 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

다양한 β -lactam계 항생물질에 강한 내성을 가지는 균주를 자연에서 분리하였다. 전보에서 *Bacillus subtilis* J105로 동정된 바 있는 내성균주를 사용하였다⁹⁾. 내성균의 배양은 30°C에서 10시간부터 30시간까지 실험의 용도에 의하여 배양시간을 달리하여 배양하였다.

2. 내성유도의 시험

내성균주의 β -lactamase 생성분비에 있어서 β -lactam 항생물질을 처리한 균주와 처리하지 않은 대조균주의 MIC(minimal inhibitory concentration)를 비교하기 위하여 broth dilution susceptibility 방법으로 측정하였다⁹⁾.

Nutrient broth 100ml를 가압 멸균하고 냉각한 후 β -lactamase 유도제로서 ampicillin 500 μ g/ml를 첨가한다. 그

리고 전배양한 내성균주를 2% 되도록 접종하여 30°C에서 진탕 배양한 후 세포의 최종 농도가 10⁶cells/ml 되도록 유도배양 하였다.

유도제로서 여러 가지 β -lactam 항생물질 중에서 penicillin계는 6종류, cephalosporin계는 3종류를 선택하여 항생물질 희석 방법에 따라 제조하고 2배수 희석법에 의하여 희석한 후 각 농도별로 nutrient배지에 첨가하여 즉시 사용하였다. 항생물질로 유도 배양한 균주를 내성 검사용 액체 배지에 2% 접종하여 30°C 진탕 배양기에서 18~22시간 배양한 후 균의 생육 여부를 대조구와 비교하여 MIC(최소 억제농도)를 결정하였다. 대조구의 배지는 항생물질을 첨가하지 않은 배지를 사용하였다.

3. β -lactam 항생물질의 농도에 의한 유도 효과

내성균주가 여러 가지 β -lactam 항생물질들에 의하여 세포의 β -lactamase 유도 효과를 측정하기 위하여 penicillin 계 6종류, cephalosporin계 3종류를 유도제로 사용하면서 10배수 희석의 각 농도별로 본 균주와 반응시켜 β -lactamase 유도 효과를 측정하였다¹⁰⁾.

4. β -lactamase의 활성측정법

본 연구에 사용한 β -lactamase 활성측정법은 penicillin과 cephalosporin의 다양한 기질을 사용할 수 있는 rapid fixed-time assay의 변형법인 iodometric assay method¹¹⁾를 응용하여 실시했다. β -lactamase 활성의 1unit는 1분 동안 1 μ Mol의 기질을 가수분해하는 효소량으로 정의하였다.

5. 생육시기에 따른 β -lactamase 생산의 유도

내성균주의 생육시기에 따라 β -lactam 항생물질인 유도제를 첨가하여 β -lactamase를 생산하는 kinetics의 차이를 검토하였는데 방법은 Minami 등의 변법으로 행하였다¹⁰⁾.

즉, 500ml의 삼각 flask에 nutrient 배지를 100ml씩 5개 분주하여 가압 멸균한 후 한 개는 내성균주 *Bacillus* sp. J 105 균주를 접종하고 30°C 진탕 배양기에서 하룻밤 동안 배양하여 세포가 1×10⁶~3×10⁸ CFU/ml 되도록 전배양 하였다. 전배양액을 20ml씩 취하여 새로운 nutrient 배지 100ml가 들어 있는 삼각 flask에 각각 접종하고(1:5 dilution) 같은 배양 조건에서 계속 배양하면서 β -lactam 항생물질 중에서 본 균주가 가장 유도효과가 높은 cloxacillin

β -Lactam계 항생물질 내성균주의 β -Lactamase 생산의 유도

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 유도제로서 배양 후 각각 0, 5, 13시간에 첨가하였다. 나머지 한 개는 유도제를 첨가하지 않은 대조구로서 유도한 것과 활성을 비교하였다. 유도제를 첨가한 이후부터는 18시간까지 지속적으로 배양하면서 2시간 간격으로 배양액 5ml씩 취하여 원심분리(12,000rpm, 20min, 4°C)하고 상등액을 세포외로 분비한 조효소를 사용하였다. 조효소는 ampicillin을 기질로 하는 iodometric 법법에 의하여 활성을 측정하였으며 생육시기별에 따라 항생물질에 의하여 유도되는 β -lactamase 활성을 검토하였다.

결과 및 고찰

1. 유도제에 의한 β -lactamase의 생산

유도제로서 ampicillin의 존재와 비존재하에서 내성균주에 의하여 내성을 주관하는 β -lactamase의 생산을 비교하였다. Fig. 1에서 보이는 바와 같이 배양시간에 따라 β -lactamase의 생산 정도가 다르지만, 유도제의 존재 여하에 따른 효소 생산량이 크게 차이 남을 알 수 있었다.

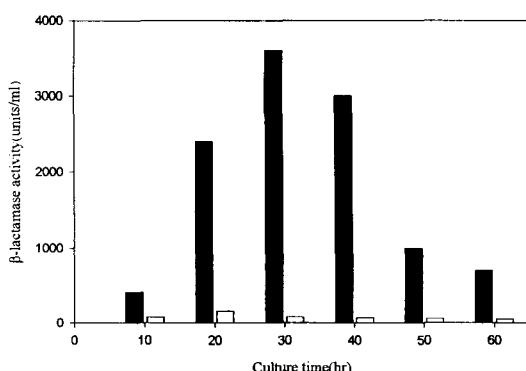


Fig. 1. β -lactamase production with and without inducer (ampicillin). Cultivation was carried out for 60hr, 30°C.

■ : with inducer, □ : without inducer

즉, 유도제가 존재하지 않을 경우에는 배양 15~20시간 만에 효소 생산이 가장 좋았으나, 유도제 존재시에는 25~30시간에 효소 생산이 가장 양호하였다. 그러나 유도제 존재와 비존재의 조건에 대한 효소 생산은 약 20배의 차이가 있었다. 따라서 본 내성균은 β -lactamase 생산에 있어서 유

도제의 존재가 절대적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

2. 다양한 β -lactam 항생물질에 대한 내성 유도 균주의 MIC 변화

penicillin계, cephalosporin계 항생물질을 대상으로 ampicillin(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 유도제로 하여 유도제를 처리한 것과 처리하지 않은 균주에서 각 약제에 대한 MIC를 비교하였다.

Table 1에서 보이는 바와 같이 penicillin계 항생물질의 경우는 유도제를 처리한 균주가 처리하지 않은 균주보다 MIC가 2~4배 가량 높았다. 이 중에서도 piperacillin의 경우는 약 27배 가깝게 MIC를 높이는 결과를 보였다. 특히, cephaolesporin계의 항생물질은 유도제를 처리하지 않은 경우에 MIC가 150~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도로 penicillin계 항생물질 보다 낮은 편이나 유도제를 처리할 경우에는 2~5배로 높아지는 것을 알았다. 이는 항생물질인 유도제에 의하여 β -lactamase 생산의 증가가 MIC를 높이는 결과를 초래한 것이다.

Table 1. Comparison with uninduced and induced strain on broth dilution minimal inhibitory concentration(MICs) by various β -lactam antibiotics

β -lactam antibiotics	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Approx. induction ratio
	Uninduced strain	Induced strain ¹⁾	
Penicillin-G	>2,000	6,000	3.0
Cloxacillin	500	1,000	2.0
Ampicillin	>4,000	12,000	3.0
Amoxacillin	>4,000	16,000	4.0
Carbenicillin	>4,000	6,000	1.5
Piperacillin	150	>4,000	26.7
Cefazolin	150	400	2.7
Cefradine	>200	400	2.0
Cefotaxime	>200	>1,000	5.0

¹⁾induced cell by ampicillin 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

본 연구에 사용한 내성균주 *Bacillus subtilis* J105는 상기에 언급한 바와 같이 penicillin계의 항생물질을 분해하는 penicillinase의 활성과 cephalosporin계 항생물질에도 활성

을 가지는 cephalosporinase의 역할을 동시에 가진다는 것을 알 수 있었다. 나아가 이들의 유도 효과도 penicillin계와 cephalosporin계의 항생물질에 공통으로 유효하는 특이한 내성균임을 알 수 있었다.

3. 각종 항생물질에 의한 β -lactamase의 유도 효과

여러 종류의 penicillin계 항생물질과 cephalosporin계 항생물질에 내성균주의 β -lactamase 생산 유도에 미치는 영향을 비교하였다. 본 균주에 다양한 β -lactam 항생물질을 10, 100, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 효소의 생산 유도 효과를 조사한 결과 Table 2에 보이는 바와 같이 각 항생제에 따라 유도제의 효과는 다양함을 알 수 있었다. ampicillin, amoxacillin은 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 효소 생산 유도 효과가 높았고, penicillin-G, cloxacillin, carbenicillin은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 β -lactamase 유도 활성이 높게 나타났는데, 그 중에서도 cloxacillin은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서 1,152 unit/ ml 의 높은 효소 생산을 보였으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대해서도 2,518 unit/ ml 란 가장 높은 생산을 보였다.

Table 2. Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Bacillus* sp.

Inducer	Enzyme induction at drug con. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	10	100	1000
None	90			
Ampicillin		570	538	993
Penicillin-G		95	297	190
Cloxacillin		1,152	2,518	0
Amoxacillin		457	709	804
Carbenicillin		259	513	443
Cefazolin		527	258	0
Cefradine		722	780	0
Cefotaxime		216	527	0

The numbers on the table mean β -lactamase production expressed as the activity(units/ ml) of the induced enzyme with ampicillin as the substrate.

또한, cephalosporin계 항생물질도 β -lactamase 유도 효과가 있었으나 cefazolin은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 cefradine은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 좋은 유도 효과를 보였다.

이 결과는 앞에서 언급한 바와 같이 본 내성균에 대하여 내성 유도제로서 penicillin계 항생물질뿐만 아니라 cephalosporin계 항생물질에 대해서도 β -lactamase 유도 효과가

뛰어난 것을 보여주고 있다.

4. β -lactamase 유도에 대한 cloxacillin의 최적농도

본 균주는 cloxacillin에 대한 MIC농도가 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Table 1)이므로 그 이하의 농도, 즉 최종농도가 10, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 각각 회석하여 대수 증식 기에서 이들을 첨가하고 6시간 배양한 후 원심분리하여 상등액으로 β -lactamase의 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 유도제로서 cloxacillin 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도일 때 최고 활성이(24,000 units)의 β -lactamase를 유도 생산하였다. 이 결과는 유도제를 첨가하지 않은 대조구(6 units)와 비교하면 약 4,000배나 활성이 더 높았다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 활성이 13,000 units로 비교적 낮았으나 cloxacillin 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 16,000 units로 다소 좋은 편이었다. 그러나 cloxacillin 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 가장 높은 효소 유도 활성을 나타내었으므로 유도제의 최적 농도는 cloxacillin 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 결정할 수 있었다.

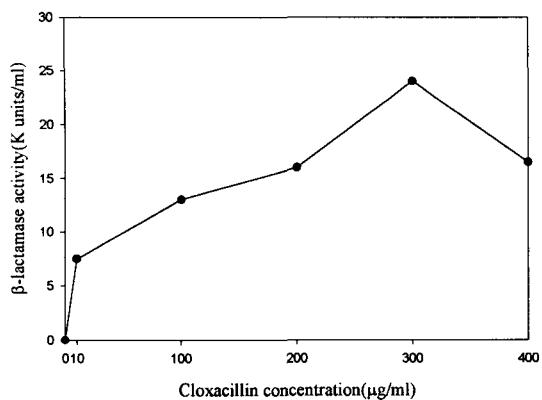


Fig. 2. Influence of cloxacillin concentration on induction of β -lactamase in *Bacillus subtilis* J105. Induction was performed for 5hr and β -lactamase activity was assayed with ampicillin as substrate.

5. 유도제 첨가시기에 따른 β -lactamase 생산효과

본 균주가 β -lactamase를 효과적으로 유도하기 위하여 유도제를 첨가하는 적절한 생육시기를 검토하였다. 그리고 유도제로서는 Table 2의 결과를 토대로 하여 cloxacillin을 사용하였다. 균주의 각 생육시기에 따라 cloxacillin 300 μg

/ml을 배지에 첨가하여 30°C에서 지속 배양하면서 β -lactamase생성의 Kinetics를 측정한 결과 Fig. 2에서 보이는 바와 같다.

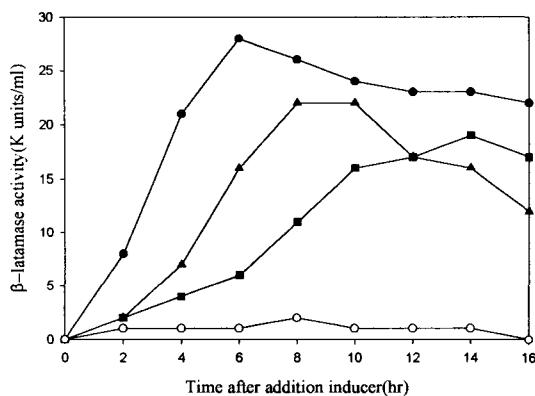


Fig. 3. Kinetics of β -lactamase formation in *Bacillus subtilis* J105. *Bacillus* sp. J105 was diluted 5-fold with culture broth and incubated with shaking at 30°C. Cloxacillin was added to a final concentration of 100 μ g/ml as an inducer for β -lactamase formation at the start of the incubation(lag phase, —▲—), 5hr after incubation(mid log phase, —●—) and 13hr after incubation(stationary phase, —■—). The induced cells were harvested by centrifugation at 2, 4, 6, 8, 12 and 16hr after the addition of cloxacillin. β -lactamase formation without an inducer(—○—)

Bacillus subtilis J105 균주의 생육시기 대수증식기(배양 5시간)에 유도제 cloxacillin 300 μ g/ml 농도를 첨가하여 6시간 지속 배양하였을 때 최고의 β -lactamase 비활성 29,000 units를 얻을 수 있었다. 또한, 유도기에 유도제를 첨가한 경우에는 8시간 지속 배양하였을 때 가장 높은 활성의 22,000units로서 전체적으로 보아 다소 낮은 활성을 보였다. 정지기(배양 13시간)에 유도제를 첨가한 경우는 14시간 지속배양하였을 때 plateau를 나타내면서 이 때 β -lactamase 활성은 18,000units로 가장 낮은 편이었다. 이와 같이 유도제의 첨가가 첨가되는 생육시기는 대수증식기에서 가장 빠르고 효소의 유도 효과도 좋으며 유도기와 정지기는 점차 효소의 유도시기도 늦으면서 유도효과도 떨어지는 것으로 나타났다.

Minami¹⁰⁾등이 *Enterobacter*속의 균주로서 유도 효과를 본 경우 유도제로는 cefoxitin 10 μ g/ml을 첨가하였으며, 이 경우도 대수 증식기에서 가장 활성이 높은 결과를 보였다고 보고 하였다. 이들은 대수 증식기에 유도제를 첨가하여 2시간 만에 β -lactamase의 최고 활성을 보였으며 그 이후부터는 활성이 급격히 떨어지는 현상을 보였다고 한다. 그러나 본 균주는 이와는 약간 달리 최고 활성시기 이후부터 유도 배양 16시간 이상 까지 75%까지 활성을 유지하였으며 매우 서서히 활성이 떨어지는 특성을 보였다.

요약

β -lactam계 항생물질에 강한 내성을 가지는 세균 *Bacillus subtilis* J105는 항생물질 존재 하에서 β -lactamase를 유도 생산하여 내성이 더 강해진다.

배지에 항생물질이 존재하지 않을 때는 내성을 유도하는 β -lactamase의 생산은 15시간 만에 plateau에 달했다. 그러나 배지 중에 ampicillin(500 μ g/ml)이 존재할 때는 배양 25시간 만에 효소 생산이 plateau에 달하나 항생물질 비존재시와 비교하면 효소 활성은 약 20배인 2,900 units/ml나 많이 생산하는 것을 알 수 있었다. 또한, ampicillin 처리한 것과 무처리 균주를 여러 β -lactam계 항생물질에 적용하여 MIC를 비교해 본 결과 ampicillin 처리 균주의 MIC가 2~27배 가량 높은 것을 알 수 있었다. 이것은 본 균주가 ampicillin 처리함으로서 β -lactamase 생산을 유도하여 내성을 증가시킨 것으로 사료된다.

본 내성균주는 penicillin뿐만 아니라 cephalosporin계 항생물질에 대해서도 β -lactamase 생산을 유도하는 것을 알았다. 그 중에서도 300 μ g/ml의 cloxacillin이 효소생산유도에 가장 최적 농도였다. 항생물질 첨가 시기를 균의 생육시기별로 조사한 결과 대수증식기가 가장 효과적인 결론을 얻었다. 이상의 결과로 본 내성균주는 다양한 β -lactam계 항생물질에 의하여 내성이 강하게 유도되는 특이적인 균주임을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 동의대학교 학술연구조성비의 지원에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Hennessey, T. D. Inducible β -lactamase in *Enterobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **49**, 277–285(1967).
2. Nordström, K., and R. B. Syres. Effect of sublethal concentrations of benzylpenicillin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **6**, 741–746(1974).
3. Nordström, K., and R. B. Syres. Induction kinetics of β -lactamase biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **6**, 734–740(1974).
4. Sykes, R. B., and M. Matthew. The β -lactamase of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**, 115–157(1976).
5. Rossi, L., E. Tomin, Y. R. Cheng, and R. Fontana. Regulation of penicillin-binding protein activity : Description of methicillin-incucible penicillin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **27**, 828–831(1985).
6. Cohen, S., and H. M. Sweeney. Constitutive penicil-linase formation in *Staphylococcus aureus* owing to a mutation unlinked to the penicillinase plasmid. *J. Bacteriol.* **95**, 1368–1374(1968).
7. Thomas, D. G., and C. C. Sander. Characterization of β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **23**, 91–97(1983).
8. Cho, K. S., W. D. Kang, D. H. Kim, H. Beak, H. K. Sung and Y. K. Jeong. Characterization of resistant bacterium against β -lactam antibiotics, Reserch J. Dong-eui univ. **28**, 403–410(1998).
9. Ingo, Haller. Importance of extracellular and cell-bound β -lactamase in mediating resistance of *Staphylococcus aureus* to mezlocillin. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **25**, 125–127(1984).
10. Minami, S., A. Yotsuji, M. Inoue, and S. Mitsuhashi. Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **18**, 382–385(1980).
11. Sawai, T., I. takahashi, and S. Yamagishi. Iodometric assay method for beta-lactamase with various beta-lactam antibiotics as substrates. *J. Bacteriol.* **13**, 910–913(1977).