한국전자현미경 학회지 제10권 제1,2호 1980
Kor. Jour. Electron Microscopy, Vol. 10, No.1,2 1980

대장균(*E. coli* B)의 항생제처리가 T_3 phage의 부착에 미치는 영향

정 상 진 · 김 은 수
(연세대학교 이과대학 생물학과)

Treatment of *E. coli* B with two Antibiotics and their Influence on T_3 phage Absorption

Sang - Jin Chung and Woon - Soo Kim
(Dept. of Biology, Coll. of Science, Yonsei University, Seoul, Korea)

Abstract

E. coli B was treated with colistin and kanamycin and the influence of these antibiotics on the absorption of T_3 phage was studied using the plaque counting method and the electron microscope.

E. coli B treated with colistin was sharply inhibited on phage absorption and cell walls were severely damaged showing some spiny appearance around the walls.

No influence of kanamycin was noted on phage absorption. Bacterial cells treated with kanamycin showed wave form in the structure of walls and a profound change was noted in the cytoplasm where it was concentrated along the periphery of the inner wall leaving the center of the cell to appear almost empty.

서 론

Colistin은 그람음성균의 세포벽 및 세포막의 구조를 파괴시켜, 세포막의 선택적흡수기능을 저해한다고 보고되었다(Chapman 1962). 그람음성균의 세포벽은 지질다당류와 지질단백질의 두성분으로 구성되어 있는데 일련의 보고에 의하면 colistin은 지질다당류를 분해한다고 하였다(Iida, 1971; Koike등 1971; Lopes등 1969).

Kanamycin은 streptomycin과 함께 aminoglycoside 항생제로서 그람양성균, 그람음성균, 항산성균등에 널리 작용하는데 이는 kanamycin이 세포내에서 30S리보좀과 결합하여 mRNA의 단백질번역을 저지시키는 작용을 한다고 알려져 있으며(Carica등, 1971; Crofton, 1969), 세포내 기질의 산소흡수를 저해한다는 보고(Bobikov, 1970)도 있다.

항생제에 의하여 변화된 세균의 phage 감염효과에 대하여 Mudd등(1953)과 Kellenberger등(1958)이 기술했고 Koike(1971)등은 그람음성균에 colistin 및 polymyxin B를 처리하여 phage를 감염시키는 연구를 통해 이들 항생제가 지질다당류를 분해한다고 보고했다.

이들의 연구가 항생제에 대한 세포의 변화및 phage 흡착에 관한 정보를 얻으려는데 목적을 두고 있는바 본 연구는 그람음성균인 *E. coli* B에 위에 기술한 약제를 처리하여 일어나는 세포의 변화와 이에 의한 T_3 phage부착에 대한 영향을 관찰 비교하려 하였다.

재료 및 실험방법

A. 세균 및 phage

본 연구에 사용된 균주는 뉴욕대학교 메디칼센터 미생물연구실로 부터 기증받은 *E. coli* B와 T_3 phage를 사용하였다.

B. 항생제 및 배지

Sodium-colistin methane sulfate는 한일제약(서울)

제를, kanamycin sulfate는 동아제약(서울)제를 사용하였으며 이들 약제들은 수용액으로 만들어 4°C에 보존하였으며, 2주일이내에 사용하였다.

C. T_3 phage의 *E. coli* B 세포부착율의 측정

Logarithmic phase의 1×10^9 cells/m*l*의 *E. coli* B 0.9m*l*에 여러농도의 항생제를 생리식염수 0.1m*l*를 혼합한 다음 37°C에서 10분간 정온처리하였다. 다음 37°C에서 미리 온도처리한 1.7×10^9 particles/m*l*의 T_3 phage 1m*l*를 첨가시켜 *E. coli* B세포에 감염시켰다. 이것을 다시 37°C에서 10분간 방치하고 이중 0.1m*l*를 취하여 0.3m*l*의 클로로호름을 포함하는 생리식염수 9.9m*l*에 희석하여 *E. coli* B에 대한 T_3 phage의 부착반응을 고정시켰다. 그리고 *E. coli* B에 부착되지 않은 T_3 phage의 수는 plaque counting method(Adams, 1959)로 세었다. 그리고 *E. coli* B에 부착된 T_3 phage의 부착율은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\left[1-\left(\frac{\text{부착후의 잔여 phage수}}{1/2\ \text{부착전의 phage수}}\right)\right]\times100$$

D. 전자현미경의 관찰

Logarithmie phase의 *E. coli* B 5m*l*에 0.5m*l*의 10^3 μg/m*l*의 kanamycin과 $10^2\mu$g/m*l*의 colistin을 10분간 처리한 것과 상기의 항생제처리를 한 *E. coli* B 5m*l*에 MOI 100~200의 T_3 phage 5m*l*를 5분간 감염시킨 것을 각각 Kellenberger고정액으로 고정한후 에타놀계열에 탈수시킨 후 Epon 812에 포매하였다(Kellenberger 등, 1958). 표본의 미세절편은 Sorvall Porterblum MT-2B로 작성하였으며, 이것을 lead nitrate와 uranyl acetate로 이중염색하여 Hitachi HS-7S 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

A. T_3 phage의 세포부착에 미치는 colistin의 영향

Colistin을 처리한 *E. coli* B 세포에 대한 T_3 phage의 부착율은 제한구에서 77.3%였으나 1μg처리 시 부터 59.1%로 급격히 감소하기 시작하여 1,000μg 처리시에는 13.2%까지 감소하였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of colistin on absorption of T_3 phage to *E. coli* B.

Colistin applied (μg)	T_3 absorbed (%)
0	77.3
1	59.1
10	44.7
100	33.4
1000	13.2

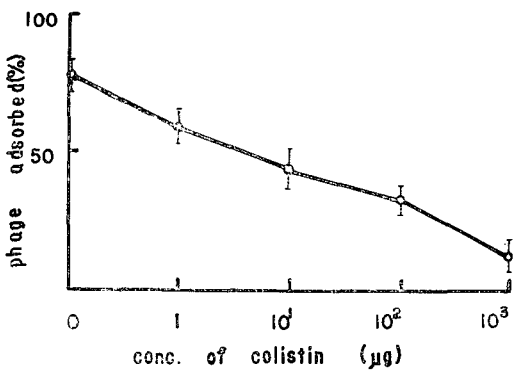


Fig. 1. Dose response of colistin for the absorption efficiency of T_3 phage to host cells.

B. Colistin에 의한 세포의 형태적 변화및 T_3 phage 부착

Colistin을 처리한 *E. coli* B 세포의 세포벽에서는 날카로운 돌출이 관찰되었으며 심하게 분해된 부분은 세포질의 노출도 관찰되었다(Fig. 2). 한편 세포벽이 분해되지 않은 부분은 그 구조에 있어 심한 굴곡이 관찰되었으나 세포질내의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

그리고 colistin을 처리한 세포의 세포벽에 대한 T_3 phage의 부착은 현저히 저하되어 세포벽이 파손되지 않은 부위에만 간혹 T_3 phage가 부착된 것이 관찰되었다(Fig. 4).

C. T_3 phage의 세포 부착에 미치는 kanamycin의 영향

kanamycin에 의한 T_3 phage의 *E. coli* B 세포에의 부착은 제한구에서는 82.8%였으며 100μg처리 시 까지 큰 변화를 보이지 않다가 1,000μg 51.9%로 부착율이 크게 감소하기 시작하였다(Table 2. Fig. 5).

D. kanamycin에 의한 세포의 형태적 변화

1,000μg/m*l*의 kanamycin을 처리한 *E. coli* B의 세포는 세포질 내부에 큰 변화를 나타냈다. 즉 세포질은 거의 모두 세포막부위로 집중되었으며 또한 세포벽은 파

Table 2. Effect of kanamycin on absorption of T_3 phage to *E. coli* B.

kanamycin applied (μg)	T_3 absorbed (%)
0	82.8
1	81.5
10	78.2
100	73.2
1000	51.9
10000	34.7

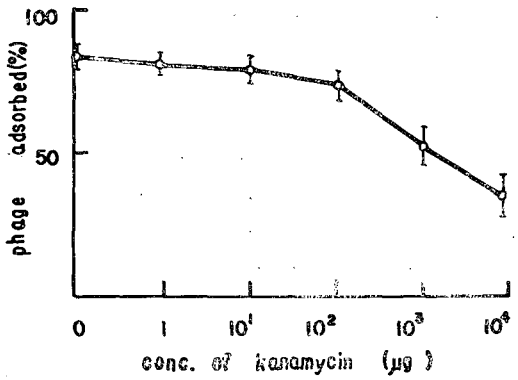


Fig. 5. Dose response of kanamycin for the absorption efficiency of T_3 phage to host cells.

상으로 혼란되었으며 세포질과 세포벽 사이의 분리현상도 관찰되었다(Fig. 6).

그리고 이 세포에 대한 T_3 phage의 부착은 정상적 세포벽에서나 혼란된 세포벽에서나 별 차이없이 일어나는 것이 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

Koike등(1969)은 polymyxin B를 그람음성균에 노출시키면 세포의 최외층에서 날카로운 돌출이 형성되며, 분해된 막구조 사이로 세포질이 노출되었다고 보고하였으며 Lopes등(1969)은 polymyxin B가 지질다당류를 분해한다고 보고하였는데 colistin을 처리한 본 실험에서 *E. coli* B의 세포는 상기의 보고들과 같이 세포벽에서 날카로운 돌출이 관찰되었으며 막구조의 굴곡도 심하였고 분해된 막구조사이로의 세포질 노출도 관찰되었다. T_3 phage의 부착을 colistin 1μg처리 시부터 현저히 감소하는 추세를 보이긴 하였으나 Koike등(1972)은 1μg처리 시 부터 부착이 거의 억제된것에 비해 본 실험에서는 10^3μg처리시에 그 부착이 거의 억제되었다. 또한 전자현미경 관찰에서 막구조가 완전한 세포벽에서는 T_3 phage가 부착되었으나 분해된 벽에서는 부착이 관찰되지 않았는데 이것은 colistin이 T_3 phage의 부착부위인 지질다당류를 분해하기 때문인 것으로 생각된다.

한편 Ariji등(1971)은 kanamycin을 처리한 결핵성 간균의 전자현미경 관찰에서 세포질내의 리보좀이 명확히 나타나지 않았고 짙은농도의 큰 과립과 액포가 나타났는데 이러한 현상은 kanamycin의 영향을 받은 리보좀에 의한 단백질 합성의 저해에 의한것이라고 보고하였으며, Bobikov(1971)는 kanamycin이 세포내 기질의 산소흡수를 방해한다고 보고하였는데, 본 실험에서는 kanamycin을 처리한 세포의 세포질이 거의 세포 바깥부분으로 집중되어져 있었으며 세포벽이 혼란된 것이 관찰되었는데 이것은 이 부위에 T_3 phage의 부착이 여전히 일어나고 있는 것으로 보아 kanamycin이 세포벽에 작용하는 것이 아니라 세포벽쪽으로 집중된 세포질에 의한 영향으로 간주되는데 이는 Ariji등(1971)의 막구조 신장에 관한 제시와 연관이 있는 것으로 추측된다.

결 론

1. Colistin을 처리한 *E. coli* B 세포에 대한 T_3 *phage*의 부착은 크게 감소되었으며세포는 그 벽구조가 돌출되거나 분해되었다.

2. Kanamycin을 처리한 *E. coli* B 세포에 대한 T_3 phage의 부착은 별로 영향을 받지 않았으며 그 세포형태는 세포질이 세포벽쪽으로 집중되어져 있었으며 세포벽은 혼란되어졌다.

REFERENCES

Adams, M. H. 1959, Bacteriophages. Interscience Publishers, *Inc., New York.*

Ariji, F., J. Yamaguchi and S. Oka, 1971: Electron microscopic studies of tubercle bacilli treated with kanamycin. *Kenkkaku*, 46:53-57.

Bobikov, E. V., 1970: Studies on the effect of neomycin and related substances on the permeability of cytoplasmic membranes and oxidative processes in *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeurinosa*. *Antibiotiki*, 15:794-797.

Carica, P. M., C. A. Terazzolo, F. Baralle, and I. D. Algranti, 1971: Studies on associations factor of bacterial ribosomes: Effect of several antibiotics. *Biochem Biophysic Acta*, 246:291-299.

Chapman, G. B. 1962: Cytological aspects of antimicrobial antibiosis. Ⅰ. Cytological changes associated with the exposure of *E. coli* to colistin sulfate. *J. Bactriol*· 84:169-179.

Chapman, G. B. 1962: Cytological aspects of antimicrobial antibiosis. Ⅱ. Cytological changes associated with the exposure of *Pseudomonas aerugirosa* and *Bacillus megaterim* to colistin sulfate. *J. Bacteriol.* 84:180-185.

Crofton, J. 1969: Some principles in the chemotheraphy of bacterial infections. *Brit. Med. J.* 56 50:137-141.

Iida, K. 1971: The effect of polymyxin on the cell envelope of gram-negative bacteria. *Fukuoka Acta Med.* 62:962-980.

Kellenberger, E., A. Ryter, and J. Séchaud. 1958: Electron microscope study of DNA-containing plasms. Ⅱ, Vegitative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological state. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:671-678.

Koike, M., K. Iida and T. Matsuo. 1969. Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin. *J. Bacteriol.* 97:448-452.

Koike, M. and K. Iida. 1971: Effect of polymyxin on the bacteriophage receptors on the cell walls of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 180:1402-1411.

Lopes, J., and W. E. Inniss. 1969: Electron microscopy of effect of polymyxin on *E. coli* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 100:1128-1130.

Mudd, S., J. Hillier, E. H. Beutner, and P. E, Hartman. 1953: Light and electron microscopic studies of *E. coli* coliphage interactions. Ⅱ. The electron microscopic cytology of the *E. coli* B-T_2 system. *Biochim. Biophys. Acta.* 10:153-179.

Legends of figures

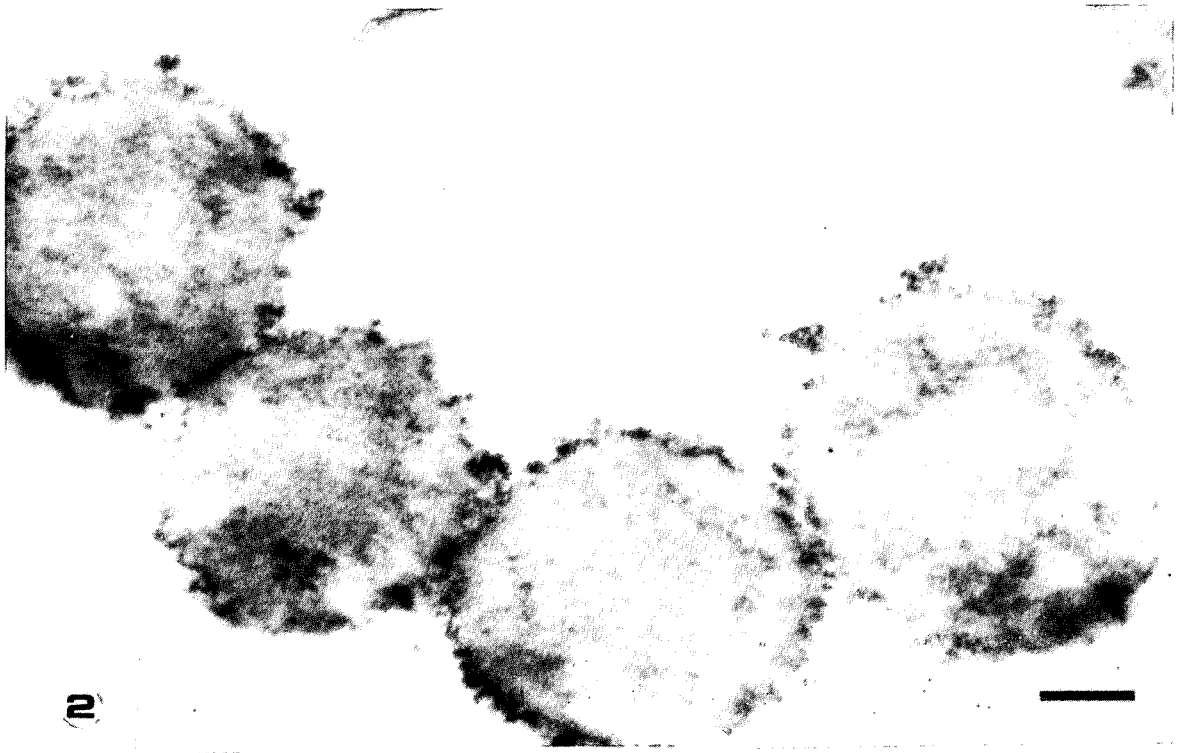
Fig. 2. Electron micrograph of *E. coli* B treated with colistin. Cell walls ware diffused severely. Markers represent 100 nm.

Fig. 3. Electron micrograph of *E. coli* B treated with colistin. Cell wall was changed into wave form (→) but cytoplasm was not influenced.

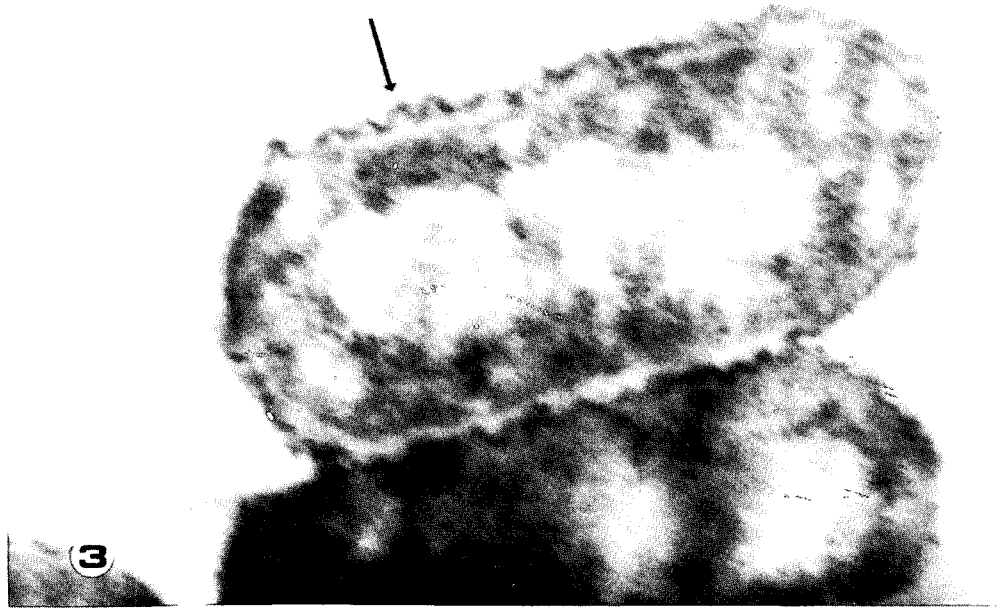
Fig. 4. Electron micrograph of *E. coli* B treated with colistin. T_3 phage attacked intact cell(→) and didn't attack diffused cell(⇢).

Fig. 6. Electron micrograph of *E. coli* B treated with kanamycin. Cytoplasm was concentrated along the periphery of the inner wall.

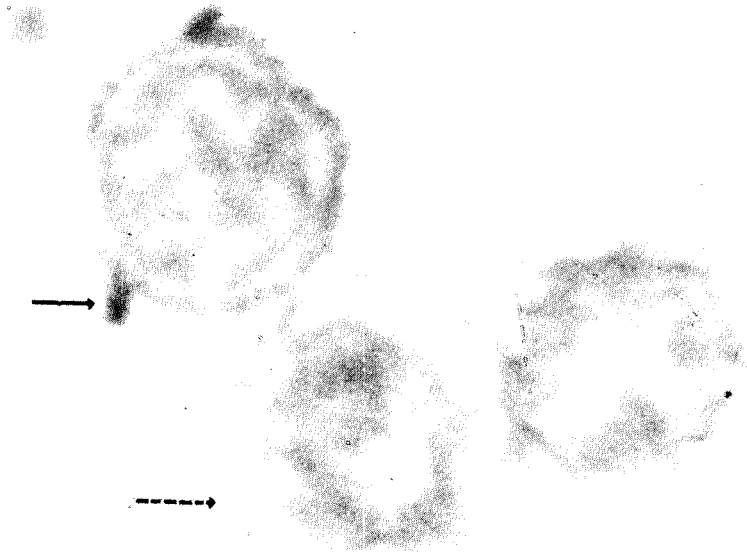
Fig. 7. Electron micrograph of *E. coli* B treated with kanamycin. T_3 phages attacked intact cell wall (→) and disturbed cell(⇢).



2

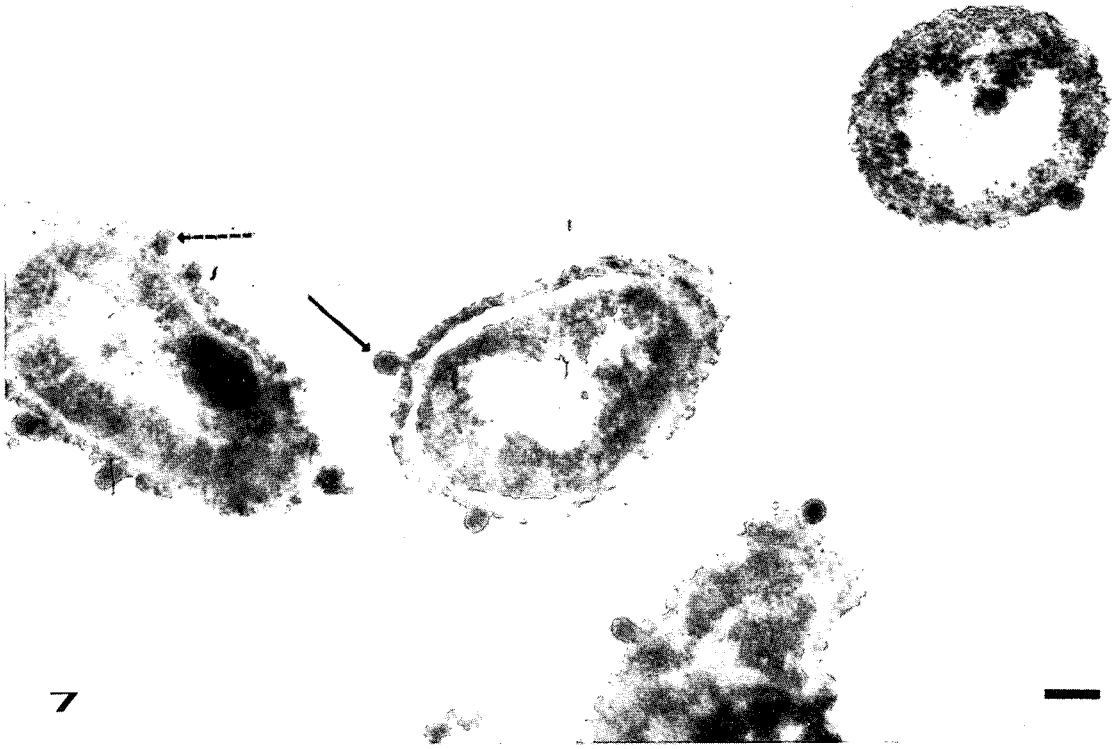


3



4

6



7