

Ethidium Bromide 에 의한 *Streptomyces bobili* (YS-40) 의 R-Plasmid 除去

金相達 · 都在浩
韓國人蔘煙草研究所
(1982년 9월 24일 수리)

Elimination of R-Plasmid in *Streptomyces bobili* (YS-40) by Ethidium Bromide

Sang Dal Kim and Jae Ho Do
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute
Seoul, Korea
(Received September 24, 1982)

Abstract

Streptomyces bobili (YS-40) isolated from soil was tested that it had drug resistance against penicillin, cephalosporin series antibiotics and other antibiotics in the previous paper. The treatment of *Streptomyces bobili* (YS-40) with ethidium bromide (EtBr), acriflavine and sodium dodecyl sulfate (SDS) resulted in the elimination of R-plasmid from the host strain. Minimum growth inhibitory concentrations (MIC) of Hg, Ag, penicillin-G, ampicillin, chloramphenicol, oxytetracycline, streptomycin and kanamycin were found to be 15, 10, > 3,000, > 100, > 1,000, > 100, < 5 and < 5 μ g/ml respectively. Among the curing agents, EtBr was proved to be the most powerful compound for the elimination of R-plasmid in the strain and the elimination rate with EtBr (10 μ g/ml) was about 98%. Optimal pH for the elimination of R-plasmid was pH 7.0 and the R-plasmid in the cells incubated for 24 hrs was proved to be eliminated most effectively.

Aerial mass color, soluble pigment formation and reverse side color were reported to be often the plasmid associated characteristics of the R-plasmid bearing bacteria. But these characteristics of the uncured and cured *Streptomyces bobili* (YS-40) showed no changes in the most of the pigment formation media tested in this work.

緒 論

1952年 Lederberg¹가 非Mendel性 遺傳을 하며 染色體와는 獨立하고있는 遺傳因了 즉 extra-chromosomal genetic element를 plasmid라고 명

命한 後 이 plasmid에 對한 많은 研究가 이루어 졌으나 최근에는 이 plasmid를 微生物의 autonomously replicating extrachromosomal DNA로 制限하여 부르고 있다. Plasmid의 機能은 antibiotic resistance (R-factor), colicin synthesis

(colicin factor), toxin formation, metabolic enzyme의 生成, restriction endonuclease의 生産等이며 특히 R-plasmid(R-factor)에 對해서는 많은 研究가 이루어졌다.²⁻⁵ Bacteria의 β -lactam antibiotics에 對한 耐性은 chromosomal⁶⁻⁸ 및 extrachromosomal⁹⁻¹² β -lactamase에 起因되나 그 中에서 R-plasmid에 依해서 生成되는 β -lactamase에 對한 研究가 大部分이다.

著者等은 前報에서 *Streptomyces* sp.가 生産하는 penicillinase의 生産條件, 性質 및 菌株의 同定에 對해서 報告한 바가 있으나¹³⁻¹⁵ 本報에서는 이러한 penicillinase 生産이 R-Plasmid에 起因되며 이 R-plasmid를 curing agent로 處理하여 除去시키는데 必要한 몇가지 條件을 檢討하여 얻은 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

菌株

本 實驗에 使用된 菌株은 前報¹⁵에서 報告한 *Streptomyces bobili* 내지 그 類緣菌으로 同定된 것을 使用했으며 이 菌株은 glucose-asparagine agar培地에서 繼代培養하여 4℃에서 保管하면서 使用하였다.

培養

菌体内的 drug resistant factor(R-plasmid)를 除去하기 위해서 Ogawara等¹⁶이 使用한 培地를 使用하였으며 培地組成은 Table 1과 같다.

Table 1의 curing medium(medium C)에 菌의 孢子를 一定量 接種하여 310rpm으로 28℃의 진탕배양기에서 12時間 培養하였다.

Curing

培養된 菌체를 殺菌된 cheese cloth로 여과한 後 이 여액 一定量을 acriflavine, ethidium bromide, sodium dodecyl sulfate가 各 濃度別로 添加된 curing medium에 再接種하여 210rpm으로 28℃에서 48時間동안 curing시켰다. 이것을 殺菌된 0.85% saline으로 3배 세척한 後 회석하

Table 1. Composition of Curing and Drug-Susceptibility Testing Medium for the Elimination of R-Plasmid.

	Curing medium* (Medium C)	Drug-susceptibility testing medium** (Medium D)
Glucose	10	10
Peptone	4	-
Yeast extract	4	-
Sodium asparaginate	-	1
Asparagine	-	0.5
KH ₂ PO ₄	2	-
K ₂ HPO ₄	4	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.5
CaCO ₃	-	0.5
Agar	-	20
pH	7.0	7.0

Gram per liter of distilled water

*Curing of R-plasmid DNA was carried out by adding appropriate concentration of ethidium bromide, acriflavine and sodium dodecyl sulfate in curing medium (Medium C).

**Penicillin-G was added with the concentration of 100 μ g/ml in the medium to detect penicillin susceptible colonies.

여 penicillin-G (100 μ g/ml)가 含有되어 있는 drug-susceptibility testing medium(medium D)에 一定量씩 接種하여 28℃에서 2~3日間 培養한 後 penicillin-G 無添加자와의 colony數 差異를 colony counter로 計測하였다.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)의 測定

本菌의 Hg, Ag 및 몇가지 抗生物質에 對한 生育 最少阻害濃度를 調査하기 위하여 glucose-asparagine液体培地에 Hg, Ag 및 抗生物質을 各 濃度別로 添加하여 菌의 孢子를 一定量씩 接種하여 28℃에서 3日間 定置培養한 後 그 生育度를 調査하였다.

色素生成의 变化

Ethidium bromide에 依해서 R-plasmid가 除去된 菌과 原菌의 aerial mass color, melanoid pigment, reverse side color의 变化有無를 調査하기 위하여 主로 melanoid色素生成用培地에 使用되는 peptone, tryptone, tyrosine이 含有된 7 가지 培地에서 14日間 培養하면서 色素生成의 变化를 調査하였다.

試藥

Acriflavine, ethidium bromide는 Sigma 製品, sodium dodecyl sulfate는 Kanto chemical 社の 製品을 使用하였으며 그 外의 試藥은 特級 또는 1級을 使用하였다.

結果 및 考察

Minimum inhibitory concentrations (MIC)

本 菌株의 Hg, Ag 및 여러가지 抗生物質에 對한 生育 最少阻害濃度를 調査해 본 結果는 Table 2 와 같다.

Table 2. Minimum Inhibitory Concentrations of Mercury, Silver and Antibiotics on the Growth of *Streptomyces bobili*(YS-40)

	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)
HgCl ₂	15
AgNO ₃	10
Penicillin-G	>3000
Ampicillin	> 100
Chloramphenicol	>1000
Oxytetracycline	> 100
Streptomycin	< 5
Kanamycin	< 5

The inoculum size was 3×10^6 cells/ml. The strain was incubated at 28°C for 3 days in glucose-asparagine liquid medium supplemented with various concentrations of mercury, silver and antibiotics.

Hg와 Ag의 MIC는 15, 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며 penicillinase의 主된 基質로 使用되는 penicillin-G는 >3,000 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났는데 비해서 β -lactamase에 安定한 penicillin-G의 유도체인 ampicillin은 >100 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 그러나 aminoglycoside係 抗生物質인 streptomycin과 kanamycin은 5 $\mu\text{g/ml}$ 以下로 aminoglycoside系에 對해서는 거의 耐性을 가지고 있지 않았다.

R-plasmid의 除去에 미치는 curing agent의 影響

本 菌株의 penicillin에 對한 藥劑耐性이 R-plasmid에 起因됨을 확인함과 동시에 이 R-plasmid를 除去하기 위해서 curing agent로 使用되는 acriflavine, ethidium bromide, sodium dodecyl sulfate를 여러가지 濃度別로 處理시켜 본 結果는 Table 3 과 같다.

보통 R-plasmid의 除去를 위해서는 acridines,¹⁷ ethidium bromide¹⁸; rifampin,¹⁹ thymine starvation,²⁰ crystal violet,²¹ sodium dodecyl sulfate,²² 및 mitomycin C 등이 利用되며 최근에는 novobiocin²³의 效果가 확인되었으나 本 實驗에서는 一般적으로 많이 使用되는 ethidium bromide, acriflavine, sodium dodecyl sulfate를 使用하였다.

Table 3 에서 보는 바와 같이 ethidium bromide를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度로 添加하였을 때 98.0%까지의 R-plasmid 除去率을 보였으며 acriflavine은 61.1%, sodium dodecyl sulfate는 43.8%의 除去率을 보였다. Ogawara等¹⁶의 *Streptomyces* E750-3의 β -lactamase生産에 미치는 acriflavine, sodium dodecyl sulfate, ethidium bromide의 影響을 調査한 實驗에서 sodium dodecyl sulfate (25 $\mu\text{g/ml}$) 處理에 依해서 63.8%, acriflavine (40 $\mu\text{g/ml}$) 處理에 依해서는 2.8%의 R-plasmid 除去率을 보였으며 ethidium bromide (10 $\mu\text{g/ml}$) 處理에 依해서는 除去效果가 없었다는 報告와는 多少의 差異를 보이고 있으나 Bouanchaud等¹⁸의 enterobacteria와 staphylococci를 對象으로 한 antibiotic resistance의 除去實驗中에서 *Salmonella derby* LA71. R35의 경우 ethidium bromide ($2500 \times 10^{-6}\text{M}$)에 依해서 ampicillin resistance가 100% 除去되었다는 報告와는 잘 一致되

Table 3. Effect of Ethidium bromide, Acriflavine and Sodium dodecyl sulfate on the Elimination of R-Plasmid in *Streptomyces bobili*(YS-40)

Reagent	Concentration of reagents ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colonies tested	No. of colonies cured	Percentage of cured colonies
Ethidium bromide	0	148	147	0.3
	2	239	34	14.2
	5	244	104	42.6
	10	301	295	98.0
	15	113	99	87.6
Acriflavine	2	229	56	24.5
	4	370	203	54.9
	6	90	51	56.7
	8	36	22	61.1
	12	0	0	0
Sodium dodecyl sulfate	5	102	26	25.5
	10	110	45	40.9
	15	103	45	43.7
	20	276	116	42.0
	25	101	19	18.8

In order to cure penicillin R-Plasmid of the strain, the spores of the strain were incubated in the medium C at 28°C for 12 hrs with rotary shaking incubator(310rpm). The cultures were filtered with sterilized cheese cloth and inoculated in the medium C again (Inoculum size: 5.6×10^5 cells/ml) and treated with various curing agents at 28°C for 48hrs with rotary shaker(210rpm). The test of elimination of R-plasmid was carried out with incubation at 28°C for 48hrs in the medium D including benzyl penicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) or not.

어 ethidium bromide의 處理效果가 가장 우수하였다.

pH의 影響

R-plasmid의 除去에 미치는 pH의 影響을 調査하기 위하여 curing medium (medium C)의 pH를 5.5~9.0으로 調節하여 ethidium bromide를 最終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 되게 添加하고 5.6×10^5 cells/ml의 菌을 接種한 後 28°C에서 210rpm으로 48時間 培養시킨 結果는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서 보는바와 같이 pH7.0에서 curing시켰을때 97.0%의 R-plasmid가 除去되었는데 이 結果는 *Staphylococcus aureus* LA78을 対象으로한 實驗結果에서 ethidium bromide를 8×10^{-6}

M濃度로 處理했을때 pH7.2에서 50%程度로 가장 크게 R-plasmid가 除去된다는 報告¹⁸와 類似하게 나타났다.

培養時間의 影響

菌体の 培養時間이 R-plasmid의 除去에 어떠한 影響을 미치는 가를 調査하기 위하여 48時間까지 培養을 하면서 그 除去率을 調査한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는바와 같이 24時間 培養함으로써 그 除去率이 99.6%로 가장 높았는데 이는 前報¹³의 結果에서 확인된 本菌株의 初期代數增殖期 到達時間인 24時間과 一致하였다. 이것은

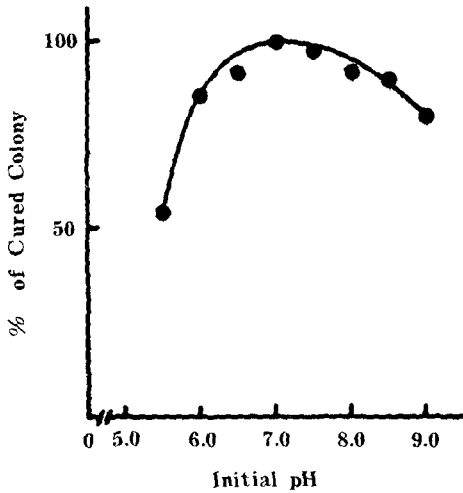


Fig 1. Effect of pH on the Elimination of R-Plasmid.

The initial pH of curing medium was adjusted from 5.5 to 9.0 and inoculum size was 5.6×10^8 cells/ml. Cured colonies were calculated by colony counter with incubation in the medium D at 28°C for 72 hrs.

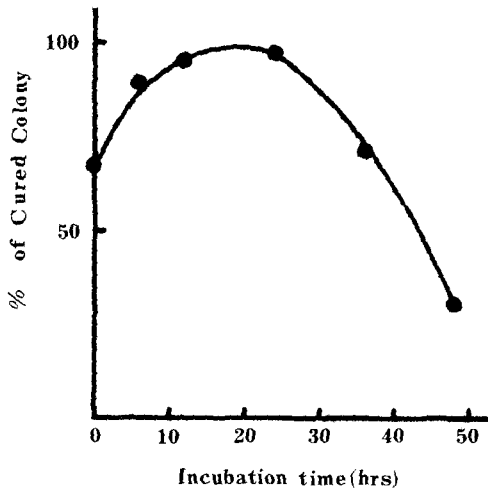


Fig 2. Effect of Incubation Time on the Elimination of R-Plasmid.

Inoculum size was 1.5×10^6 cells/ml. After cured the strain in the each incubation time, cured colonies were calculated by colony counter with incubation in the medium D at 28°C for 72 hrs.

休止期나 後期代数増殖期에 있는 老衰한 菌体 보다는 新生한 菌体内的 R-plasmid의 除去率이 훨씬 높다는 것을 알 수 있다.

色素生成能의 变化

藥劑耐性和 더불어 melanin 色素生成 또한 Plasmid에起因될 수 있기 때문에^{24,25} 原菌과 ethidium bromide處理에依해서 R-plasmid가 除去된 菌의 aerial mass color, melanoid pigment, reverse side color 生成能의 变化를 調査한 結果는 Table 4와 같다.

原菌과 plasmid除去菌의 aerial mass color는 peptone beef extract agar培地에서 原菌이 greyish pink이었으나 plasmid가 제거된 菌이 grey라는점 以外에는 大部分의 培地에서 거의 变化가 없었다. Soluble pigment의 경우도 tryptone-yeast extract broth에서 原菌이 pale brown이었으나 plasmid除去菌은 無色으로 나타났으나 다른 培地에서는 거의 变化가 없었다. 그리고 reverse side color 生成能은 7種의 培地에서 거의 变化가 없었다.

이 結果는 *Streptomyces kasugaensis*를 acriflavine (20 μ g/ml)으로 處理했을때 2~5%의 抗生物質生成能을 잃어 버렸으나 aerial mycelium 形成에는 影響을 미치지 않았다는 Okanishi²⁵의 報告와 類似하게 나타났다. 이것은 몇가지 種類의 plasmid가 acriflavine處理에依해서 同時に 除去되지 않는다는 報告^{26,27}로 미루어 보아 本菌株는 penicillin에 對한 藥劑耐性은 잃더라도 色素生成能은 거의 잃지 않았으며 本菌株의 色素生成能은 R-plasmid와 關係가 없는 것으로 推測된다.

要 約

Streptomyces bobili (YS-40)의 Hg, Ag, penicillin-G, ampicillin, chloramphenicol, oxytetracycline, streptomycin, kanamycin에 對한 生育最少阻害濃度는 各各 15, 10, >3,000, >100, >1,000, >100, <5, <5 μ g/ml였으며 本菌株의 R-plasmid를 除去시키기 위하여 ethidium bromide, acriflavine, sodium dodecyl sulfate等

Table 4. Comparison of Cultural Characteristics of Original and Cured Strain

Medium	Growth		Aerial mass color		Soluble Pigment		Reverse side color	
	Uncured	Cured	Uncured	Cured	Uncured	Cured	Uncured	Cured
1	G	G	Greyish pink	Grey	Brown	Brown	Yellow	Yellow
2	G	P	Grey	Grey	Brown	None	Yellow	Yellow
3	E	G	White	White	None	None	Yellow	Yellow
4	E	E	Reddish brown	Reddish brown	Brown	Brown	Yellow	Yellow
5	M	M	Limpid black	Limpid black	Black	Black	Black	Black
6 *	P	P	Limpid grey	Limpid grey	None	None	Brown	Brown
7 **	M	M	Grey	Grey	Blue	Blue	Yellow	Yellow

The strain was incubated on various kinds of medium at 28°C for 14 days.

Medium 1:Peptone-beef extract agar, 2:Tryptone-yeast extract broth,
3:Tyrosine agar, 4:Glucose-yeast extract-beef extract-peptone agar,
5:Peptone-yeast extract-iron agar, 6:Melanin formation medium,
7:Glucose-peptone-asparagine agar

Growth;E:Excellent, G:Good, M:Moderate, P:Poor

*Composed of 0.1% yeast extract, 0.1% L-tyrosine, 0.85% NaCl, 2% agar.

**Composed of 1% glucose, 0.05% asparagine, 0.1% peptone, 0.05% K₂HPO₄, 2% agar.

의 curing agent를 처리시킨 결과를 요약하면 다음과 같다. Ethidium bromide를 10 μ g/ml의 농도로 처리했을때 98.0% 정도의 R-plasmid를除去시킬 수 있었다. pH7.0에서 curing시켰을 때 R-plasmid가 가장 잘除去되었으며 本菌을 24時間동안 培養해서 curing시켰으므로 R-plasmid의 除去率이 가장 높게 나타났다. Ethidium bromide에 의해서 R-plasmid가 除去된 菌과 原菌을 여러가지 色素生成培地에서 培養시켜 培養上の 特性을 調査해 본 結果 peptone-beef extract agar培地에서 aerial mass color가 greyish pink에서 grey로 變했으며 tryptone-yeast extract broth에서 培地에서 soluble pigment가 pale brown에서 無色으로 變했다.

이 結果로는 aerial mycelium, melanin 生成과 R-plasmid는 無關하다고 推測된다.

参 考 文 献

1) Lederberg, J. : *Physiol. Rev.*, **32**, 403 (1952)

2) Mitsuhashi, S. : *Gunma J. Med. Sci.*, **14**, 169 (1965)
3) Mitsuhashi, S. : *Japan. J. Microbiol.*, **11**, 49 (1967)
4) Clowes, R. C. : *Bacteriol. Rev.*, **36**, 361 (1972)
5) Mitsuhashi, S. : *Mol. Cell. Biochem.*, **26**, 135 (1979)
6) Jaurin, B., T. Grundström, T. Edlund, and S. Normark : *Nature*, **290**, 221 (1981)
7) Lindström, E. B., H. G. Boman, and B. B. Steele : *J. Bacteriol.*, **101**, 218 (1970)
8) Dale, J. W., and J. T. Smith : *Biochem. J.*, **123**, 507 (1971)
9) Novick, R. P. : *Fed. Proc.*, **26**, 29 (1967)
10) Dale, J. W., and J. T. Smith : *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **68**, 1000 (1976)
11) Lindqvist, R. C., and K. Nordström : *J. Bacteriol.*, **101**, 232 (1970)
12) Elwell, L. P., M. Roberts, L. W. Mayer, and

- S. Falkow : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11**, 528 (1977)
- 13) Do, J. H., S. D. Kim, and D. H. Yi : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 177 (1982)
- 14) Do, J. H., and S. D. Kim : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 185 (1982)
- 15) Do, J. H., and S. D. Kim : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 236 (1982)
- 16) Ogawara, H., and S. Nozaki : *J. Antibiot.*, **30**, 337 (1977)
- 17) Hirota, Y. : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **46**, 57 (1960)
- 18) Bouanchaud, D. H., M. R. Scavizzi, and Y. A. Chabbert : *J. Gen. Microbiol.*, **54**, 417 (1968)
- 19) Bazzicalupo, P., and G. P. Tocchini-Valentini : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 298 (1972)
- 20) Clowes, R. C., E. E. M. Moody, and R. H. Pritchard : *Genet. Res.*, **6**, 147 (1965)
- 21) Rubin, S. J., and E. D. Rosenblum : *J. Bacteriol.*, **108**, 1192 (1972)
- 22) Sonstein, S., and J. N. Balwin : *J. Bacteriol.*, **109**, 262 (1972)
- 23) Mchugh, G. L., and M. N. Swartz : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12**, 423 (1977)
- 24) Gregory, K. F., and J. C. C. Huang : *J. Bact.*, **87**, 1287 (1964)
- 25) Okanishi, M., T. Ohta, H. Umezawa : *J. Antibiot.*, **23**, 45 (1970)
- 26) Mitsuhashi, S., K. Harada, and M. Kameda : *Nature*, **189**, 947 (1961)
- 27) Hashimoto, H., K. Komo, and S. Mitsuhashi : *J. Bacteriol.*, **88**, 261 (1964)