

R プラスミド : pNV 13 による carbadox 耐性機序について

大前 憲一・米沢 昭一

農林水産省動物医薬品検査所

(昭和 57 年 8 月 4 日受付)

豚糞便由来大腸菌から検出した Carbadox(Cdx) 耐性形質を有する R plasmid : pNV 13を用いて Cdx 耐性機構について検討した。pNV 13 による Cdx の化学的修飾に関する検討では、*Escherichia coli* C を宿主菌とした場合、培養液中の Cdx の特異吸収 (375 nm 付近) が消失し新たな波長 (360 nm 付近) での吸収が認められた。これらの変化は L-cysteine の存在により促進された。また *E. coli* C pNV 13 から得た浸透圧処理粗酵素液を用いた NADPH 還元反応系で、L-cysteine 存在下で Cdx の還元が認められた。しかし *E. coli* C 由来のそれでは Cdx の還元は認められなかった。他方、*E. coli* C pNV 13 を EDTA 処理したときの該菌の Cdx に対する耐性度の低下は認められず、このことから pNV 13 による Cdx 透過性の低下機構は否定された。なお *E. coli* AB 1157(rec⁺) 株および同 AB 2463(rec⁻) 株を用いて pNV 13 の宿主菌の DNA 損傷修復能に与える影響について検討したが、rec 機能には直接関係しないものと考えられた。

これらのことより pNV 13 による Cdx 耐性機構としては、NADPH 依存 Cdx 還元酵素が宿主菌の periplasm 内に新たに出現することに起因するものと推定された。

Carbadox(Cdx) は、quinoxaline-di-N-oxide 化合物の一つである合成抗菌剤で、日本においては畜産分野の専用薬として 1969 年以降豚赤痢を対象に使用されている^{1,2)}。また本剤の特徴の一つとして、同系の薬剤である olaquinox (Odx)³⁾ や quinox (Qdx)⁴⁾ と同様に、嫌気性下でより強い抗菌力を示すことも知られている⁵⁾。しかし、これら化合物の抗菌力発現の機序さらに本薬剤に対する耐性菌の出現状況およびその耐性機序については不明な点が多い。

最近、著者らは、豚糞便由来大腸菌から Cdx 耐性株を検出するとともに、その耐性が R プラスミド支配であったことを報告した⁶⁾。

そこで今回、Cdx 耐性形質を有する R プラスミドの一つである pNV 13⁶⁾ を用いて、その耐性機序について検討したので報告する。

I. 材料および方法

1. 供試 R プラスミドおよび供試菌株 :

豚由来大腸菌から検出され、Cdx, streptomycin(SM), spectinomycin (SPC) および ampicillin(ABPC) 耐性形質を有する pNV 13⁶⁾ を用いた。宿主菌株には、*E. coli* C, *E. coli* ML 1410, *E. coli* AB 1157 および *E. coli* AB 2463 を用いた。

2. 供試薬剤 :

抗菌剤として Cdx, SM, SPC, ABPC, kanamycin (KM), Odx および Qdx を、また変異原陽性対照物

質としては 4-nitroquinolin-N-oxide (4NQN), N-methyl-N-nitrosoguanidine (MNNG) および mytomycin-C(MT-C) を用いた。Cdx は、少量の 1N NaOH で溶解したのち滅菌精製水で所定の濃度に希釈して用いた。また 4NQN および MNNG は、dimethylsulfoxide で溶解し、他の残りの薬剤はすべて滅菌精製水を用いて溶解した。

3. 薬剤の膜透過性に関する試験法 :

薬剤の膜透過性低下の有無は、ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 処理による生菌数の減少から判定した^{7,8)}。すなわち pNV 13 を保有する *E. coli* C (*E. coli* C pNV 13) を Trypticase soy broth(BBL) で 37°, 18~24 時間培養後、新鮮な同培地に移植し、37°, 5 時間振盪培養したものを出発材料とした。培養菌液は、遠心集菌したのち、EDTA-Tris buffer (EDTA 0.001 M, Tris 0.01 M, pH 7.5) に再浮遊し、37° で 10 分間反応させた。その後直ちに滅菌生理食塩液で希釈したのち、Cdx を 1.56 μg/ml 含有する DHL 寒天平板に塗抹した。平板を 37°, 18~24 時間 Gas pack system(BBL) で嫌気培養後、発育した集落数を測定した。対照実験としては、*E. coli* C について同一操作で処理したのち発育した集落数を同様に測定した。

4. DNA 損傷性およびその修復に関する試験法 :

Cdx, Odx および Qdx の DNA 損傷性は、組み換え能を有する *E. coli* AB 1157 株 (rec⁺) および同能欠

損変異株 *E. coli* AB 2463 株 (*rec*⁻) を用いて、該薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の比較で検討した。また pNV 13 が Cdx による DNA 損傷の修復に関与するか否かについては、pNV 13 を保有する *rec*⁺ 株、および *rec*⁻ 株を混合培養法により作出し、本菌株に対する Cdx および DNA 損傷陽性対照薬剤の MIC の比較より判定した。

5. Cdx の化学的修飾に関する試験法：

(1) 培養菌液中での Cdx の吸光度の変化

pNV 13 の宿主菌として *E. coli* C を用いた。*E. coli* C pNV 13 を Trypticase soy broth 100 ml で 37°, 18~24 時間培養後 5°, 4,000 rpm 15 分間遠心し集菌した。次いで冷滅菌生理食塩液を用い同様の操作で 2 回洗浄したのち、Cdx 25 µg/ml と L-cysteine 0.1% を同時に含有する Trypticase soy broth 2 ml ならびに Cdx 25 µg/ml のみを含有する同培地にそれぞれ再浮遊した。菌浮遊液は水中に 10 分間放置し、次いで 37° で 20 分間および 40 分間培養後、冷 ethanol 6 ml を加え 5°, 4,000 rpm 15 分間遠心し、その上清を吸光度測定試料とした。なお吸光度の測定は、自記分光光度計 (日立 124 型) を用い波長 400 nm から 280 nm まで走査した。測定時の対照キュベットには、Trypticase soy broth または 0.1% L-cysteine 含有同培地を ethanol で同様に処理したものを用いた。

(2) 菌体抽出粗酵素液による Cdx の還元

7. 粗酵素液の作成：*E. coli* C pNV 13 を Cdx 1 µg/ml 含有 High-phosphate-glycerol medium (pH 7.1)⁹⁾、200 ml で 37°, 16 時間培養後 5°, 4,000 rpm 15 分間遠心して集菌した。次に冷滅菌生理食塩液を用い同様の操作で 2 回洗浄したのち、同生理食塩液 15 ml に再浮遊した。菌浮遊液は、超音波破砕機 (Tomysseiko, K.K. UP 200 P) で 20 kHz 10 分間処理したのち、4°, 17,000 G 20 分間遠心し、その上清を超音波処理粗酵素液とした。一方、浸透圧処理粗酵素液は、Nev r⁹⁾ の方法に準じて調製した。すなわち、同様に培養し、冷

滅菌生理食塩液で 2 回洗浄した *E. coli* C pNV 13 を 1 M NaCl, 1 m MEDTA 含有 0.03 M Tris-HCl (pH 7.3) 80 ml に再浮遊し、21° 5 分間反応させた。次に同浮遊液を 4,000 rpm 15 分間遠心集菌し、冷滅菌蒸留水 15 ml に再浮遊して、4°, 5 分間浸透圧ショックを加えた。その後 4°, 17,000 G 20 分間遠心しその上清を浸透圧処理粗酵素液とした。

イ. Cdx の還元反応系：Cdx の還元は、nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) および nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を用いた 2 つの反応系により実施した。

NADH 反応系：NADH 386 n mol, ethanol 172 n mol, alcohol dehydrogenase 18 単位, ATP 20 µmol, Mg Cl₂ 32 µmol, Cdx 200 µg および菌体抽出粗酵素液 500 µl とし、0.13% L-cysteine 含有 0.067 M phosphate buffer (pH 7.2) または L-cysteine を除いた同 buffer にて総量 4 ml とした。各系は、37°, 30 分間反応させたのち、各々 1 ml を取り、これに冷 ethanol 4 ml を加え 4°, 7,000 rpm 15 分間遠心しその上清を 375 nm で測定した。なお測定時の対照キュベットには、0.06 M phosphate buffer または 0.13% L-cysteine 含有同 buffer を冷 ethanol 処理したものを用いた。

II. 実験成績

1. 薬剤の膜透過性への影響

Cdx の宿主菌内への透過性に与える pNV 13 の影響を検討した成績は、Table 1 に示した。すなわち、Cdx 含有平板上における EDTA 処理前および処理後の *E. coli* C pNV 13 の生菌数を比較すると、前者が 1.5×10^9 個、後者が 7.8×10^8 個であり、両者間に特別な差は見出せなかった。なお pNV 13 を保有しない *E. coli* C は、EDTA 処理とは無関係に Cdx 1.56 µg/ml でその発育が阻止された。

2. Cdx による DNA 損傷性と pNV 13

Table 2 は、*rec*⁺ 株および *rec*⁻ 株に対する Cdx, Odx, Qdx および KM の MIC を好気性および嫌気性

Table 1 Effect of EDTA treatment on viable cell count

Strain tested	EDTA treatment ¹⁾	Viable cell count on agar plat containing ²⁾	
		None Cdx ³⁾	1.56 µg/ml of Cdx
<i>E. coli</i> C(pNV 13)	Before	2.0×10^9	1.5×10^9
	After	1.4×10^9	7.8×10^8
<i>E. coli</i> C	Before	8.9×10^8	$< 2.0 \times 10^4$
	After	1.5×10^9	$< 2.0 \times 10^4$

1) Cells in the early exponential phase were tested with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-Tris buffer (pH 7.5) at 37° for 10 minutes.

2) DHL agar was used. 3) Carbadox

Table 2 Minimum inhibitory concentration of quinoxaline-di-N-oxide compounds in *rec*⁺ and *rec*⁻ *Escherichia coli*

Compounds	Aerobic condition			Anaerobic condition		
	Rec ⁺ ¹⁾	Rec ⁻ ²⁾	Rec ⁺ /Rec ⁻	Rec ⁺	Rec ⁻	Rec ⁺ /Rec ⁻
Carbadox	25 ³⁾	0.78	32	0.78	0.025	32
Olaquinox	100	1.56	64	6.25	0.1	64
Quinoxin	100	3.13	32	1.56	0.05	32
Kanamycin	3.13	3.13	1	3.13	3.13	1

1) Rec⁺: *E. coli* AB 1157(recombination-proficient strain)2) Rec⁻: *E. coli* AB 2463(recombination-deficient strain)3) $\mu\text{g/ml}$

Table 3 Change of carbadox minimum inhibitory concentration by plasmid pNV 13 at anaerobic condition

Compound	Rec ⁺ strain ¹⁾		Rec ⁻ strain ²⁾	
	None plasmid	pNV 13	None plasmid	pNV 13
Carbadox	0.78 ³⁾	12.5	0.025	0.78
4NQO ⁴⁾	3.13	6.25	0.1	0.2
MNNG ⁵⁾	200	200	25	25
Mitomycin C	1.56	1.56	0.1	0.1
Kanamycin	3.13	3.13	3.13	3.13

1) Rec⁺ strain: *E. coli* AB 1157(recombination-proficient strain)2) Rec⁻ strain: *E. coli* AB 2463(recombination-deficient strain)3) $\mu\text{g/ml}$

4) 4NQO: 4-nitroquinolin-N-oxide

5) MNNG: N-methyl-N-nitrosoguanidine

培養下で比較検討した成績である。なお KM は、DNA 損傷陰性対照とした。Cdx の両菌株に対する嫌気性下での MIC は、*rec*⁺ 株で 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、*rec*⁻ 株で 0.025 $\mu\text{g/ml}$ であり、その MIC 値の比率は 32:1 であった。またこれら DNA 損傷性は、同時に供試した Odx および Qdx でも認められその程度も Cdx のそれとほぼ同程度であった。なおこれら薬剤の DNA 損傷性は、好気性下でも認められた。

Table 3 は、pNV 13 を保有した場合の各種薬剤に対する嫌気性下での感受性を示したものである。すなわち *rec*⁻ 株では、pNV 13 を保有することにより Cdx の MIC は、0.025 $\mu\text{g/ml}$ から 0.78 $\mu\text{g/ml}$ へと約 32 倍の上昇が、また *rec*⁺ 株でも 0.78 $\mu\text{g/ml}$ から 12.5 $\mu\text{g/ml}$ へと約 16 倍の MIC 値の上昇が同様に認められた。

一方、同時に供試した 4NQO、MNNG および MT-C では pNV 13 保有による各薬剤の MIC 値に顕著な上昇は認められなかった。

3. Cdx の化学的修飾

Fig. 1 Absorption spectrum of carbadox treated by *E. coli* C(pNV 13) or *E. coli* C.

- a: *E. coli* C(pNV 13), L-cysteine
 b: *E. coli* C, L-cysteine
 c: *E. coli* C (pNV 13)
 d: *E. coli* C
 e: None bacteria, L-cysteine

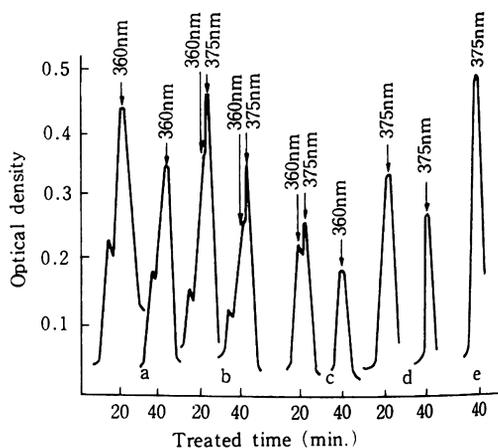


Table 4 Effect of NADH and NADPH on the reduction of carbadox in the extract of *E. coli* C (pNV 13) and *E. coli* C with or without L-cysteine

Addition	Sonic extract		Osmotic shock extract		None extract (control)
	<i>E. coli</i> C (pNV 13)	<i>E. coli</i> C	<i>E. coli</i> C (pNV 13)	<i>E. coli</i> C	
NADH, L-cysteine	29.4 (84.0%)	26.6 (76.0)	25.7 (73.4)	21.9 (62.5)	35.0 (100)
NADH	32.2 (71.1)	28.5 (62.9)	35.0 (77.0)	40.5 (89.4)	45.3 (100)
NADPH, L-cysteine	31.1 (64.8)	25.7 (53.5)	27.5 (57.3)	46.0 (98.0)	48.0 (100)
NADPH	26.6 (57.8)	28.5 (62.0)	46.0 (100)	46.0 (100)	46.0 (100)

The carbadox concentration was expressed as $\mu\text{g/ml}$. The initial concentration of carbadox used was 50 $\mu\text{g/ml}$. The carbadox concentration was determined as described in method after incubation of 30 min.

a. 培養菌液中の Cdx の吸光度の変化

Fig. 1 は, *E. coli* C pNV 13 および *E. coli* C 培養菌液中の Cdx の吸光度の変化を L-cysteine 存在下または非存在下で経時的に測定したものである。まず L-cysteine 存在下の *E. coli* C pNV 13 を用いた反応系をみると, Cdx の特異吸収である 375 nm 付近の吸収は反応 20 分ですでに消失し, 新たに 360 nm 付近の吸収のみが出現した。一方, pNV 13 非保有の *E. coli* C の場合をみると, 反応時間の経過とともに 375 nm と 360 nm の吸収が同時に出現した。次に L-cysteine 非存在下での *E. coli* C pNV 13 反応系をみると, 反応 20 分では 375 nm 付近の吸収が認められるが, 時間の経過とともに 360 nm の吸収のみが認められるだけとなった。他方, pNV 13 非保有の *E. coli* C では反応 40 分でも 375 nm 付近の吸収が認められただけであった。

b. 菌体抽出粗酵素による Cdx の還元

E. coli C pNV 13 および *E. coli* C から得られた超音波処理粗酵素液および浸透圧処理粗酵素液を用いた各還元反応系での Cdx の残存量は Table 4 に示したとおりである。NADH 反応系では, 超音波処理および浸透圧処理粗酵素とも Cdx 量の低下が認められた。しかし, これら Cdx 量の低下は, 両粗酵素を除いた ethanol, alcohol dehydrogenase を含む対照でも認められた。したがってこれら対照での残存 Cdx 量を 100% とすると, 各反応系での Cdx 残量は 62.5~89.4% となり, *E. coli* C pNV 13 由来粗酵素および *E. coli* C 由来のそれとの差は明確ではなかった。

一方, NADPH 反応系においては, 浸透圧処理粗酵素液の Cdx 還元活性に差が認められた。

すなわち, *E. coli* C pNV 13 の粗酵素液を用いた系では, Cdx の残存量が約 60% に低下したが, *E. coli* C 由来のそれでは Cdx 残存量の低下は認められなかった。またこれらの反応は, L-cysteine 存在下でのみ認められた。しかし, 超音波処理粗酵素液では, *E. coli* C

由来のそれにも Cdx 残存量の低下が認められた。

III. 考 察

SUTER らは, ニトロソグアニジン処理により得た大腸菌の耐性変異株を用いて Cdx を含む quinoxaline-di-N-oxide 化合物の作用機序を検討し, 本化合物の di-N-oxide 部の還元過程で生ずる中間体が抗菌力の本体であろうと結論している¹⁰。また BEUTIN らは, 本化合物の抗菌力と DNA 損傷性との間に密接な関連のあることを報告している¹¹。同様に YOSHIMURA らは, Cdx および Odx の DNA 損傷性が, *E. coli* NIHJ 株の超音波処理粗酵素により NADPH 存在下で減弱されることを報告している¹²。これら一連の報告は, quinoxaline-di-N-oxide 化合物の抗菌力発現に di-N-oxide 部の還元が重要な役割を果していることを示している。

一方, 自然界に存在する Cdx 耐性菌による Cdx 耐性機構に関しては, これまでまったく不明であった。その理由は, Cdx 耐性株が検出されなかったためである。しかし最近, 著者らは, 豚由来大腸菌から Cdx 耐性株を検出するとともに, 本耐性が伝達性 R プラスミド支配であったことを報告した⁶。そこで本 R プラスミドの一つである pNV 13 による Cdx 耐性機構を検討したところ, pNV 13 を保有した *E. coli* C は, L-cysteine 存在下において Cdx を著明に分解することが, 培養液中の Cdx 特異吸収波長の変化から明らかとなった。このことから, 酸化還元電位が低い条件下で Cdx を他の化合物へ変化させる反応系が pNV 13 保有 *E. coli* C において存在することが指摘された。

次に, 菌体抽出粗酵素液を用いた還元反応系で得られた成績は以下のことを示唆している。NADH 系においては, *E. coli* C pNV 13 および *E. coli* C とも浸透圧処理で得られた粗酵素液が超音波処理のそれとほぼ同様の Cdx 残存量の低下を示したこと, また *E. coli* C pNV 13 と *E. coli* C との間にそれほど大差を認めないことから, これらの還元酵素は pNV 13 にかかわり

なく *E. coli* C 固有の酵素であり, periplasmic enzyme として存在するものと考えられた。一方, NADPH 系では, L-cysteine 含有の系で *E. coli* C pNV 13 の浸透圧処理粗酵素は強く Cdx を還元するが, *E. coli* C のそれでは Cdx の還元は認められなかった。

一方, 超音波処理粗酵素では, *E. coli* C 由来の粗酵素でも Cdx の還元が認められた。これらの結果から pNV 13 を保有することにより, NADPH-L-cysteine 依存の Cdx 還元酵素が, 新たに宿主菌の periplasmic enzyme として存在することが示された。このことは, Cdx の還元が, periplasm 内で NADH 依存還元酵素に加えて NADPH 依存還元酵素でも進行することとなり, その結果 *E. coli* C pNV 13 は Cdx 還元過程で生ずる中間体の影響を受け難くなるため Cdx 耐性となるものと考えられた。

しかし, この NADPH 依存還元酵素が, 本来 *E. coli* C の cytoplasmic enzyme として存在し, pNV 13 により periplasmic enzyme になるのか, またはまったく異なるものかは現在のところ不明である。これらについては, さらに各酵素の定量的な検討を含めた詳細な酵素学的な検索が今後必要であると思われた。

次に, quinoxaline-di-N-oxide 化合物の DNA 損傷性については, OHTA ら¹³⁾, YOSHIMURA ら¹⁴⁾ および BEUTIN ら¹¹⁾ の報告があり, 塩基置換型および frame shift 型の変異原物質であることが知られている。今回 pNV 13 が宿主菌の DNA 損傷修復に関与しているかについても検討したが, pNV 13 を保有した菌株と元株に対する Cdx の MIC の比が rec^+ 株および rec^- 株でそれぞれ 16 倍または 32 倍と大差のないことから rec 機能とは直接関係がないものと考えられた。

なお, pNV 13 により宿主菌内への Cdx の透過性が低下することも否定的であった。

文 献

- 1) DAVIES, J. W.; K. G. LIBKE & E. T. KORNEGAY: Carbadox in the prevention of experimentally induced swine dysentery. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 153: 1181~1184, 1968
- 2) THRASHER, G. W.; J. E. SHIVELY, C. E. ASKELESON, W. E. BABCOCK & R. R. CHIQUEST: Effect of feeding carbadox upon the growth and performance of young pigs. *J. Anim. Sci.* 28: 208~215, 1969
- 3) BERTSCHINGER, H. U.: Die chemotherapeutisch wirksamkeit von olaquinox bei ferkeln mit experimenteller colidiarrhöe und colienteritaxeme. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 118: 397~408, 1976
- 4) HENNESSY, T. D. & J. R. EDWARDS: Antibacterial properties of quindoxin: a new growth promoting agent. *Vet. Rec.* 90: 187~191, 1972
- 5) 大野芳明, 斎藤健二, 柏崎 守, 波岡茂郎: 嫌気性下における *Salmonella* の Carbadox に対する感受性. *日獣会誌* 27: 451~453, 1974
- 6) OHMAE, K.; S. YONEZAWA & N. TERAKADO: R plasmid with carbadox resistance from *Escherichia coli* of porcine origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 86~90, 1981
- 7) LEIVE, L.: Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by ethylenediaminetetra-acetate. *J. Biol. Chem.* 243: 2373~2380, 1968
- 8) TERAKADO, N.; T. FUKUYASU & T. SHIMIZU: Some characteristics of high macarbofycin-resistant mutants of *Escherichia coli* isolated from gnotobiotic pigs. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 12: 207~212, 1972
- 9) NEU, H. C. & J. CHOU: Release of surface enzymes in Enterobacteriaceae by osmotic shock. *J. Bacteriol.* 94: 1934~1945, 1967
- 10) SUTER, W.; A. ROSSELET & F. KNUSEL: Mode of action of quindoxin and substituted quinoxaline-di-N-oxides on *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 770~783, 1978
- 11) BEUTIN, L.; E. PRELLER & B. KOWALSKI: Mutagenicity of quindoxin, its metabolites and two substituted quinoxaline-di-N-oxides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 336~343, 1981
- 12) YOSHIMURA, H.; M. NAKAMURA & T. KOEDA: Mutagenicities of carbadox and olaquinox-growth promoters for pigs. *Mutation Res.* 90: 49~55, 1981
- 13) OHTA, T.; M. MORITA, Y. KANEDA, K. WATANABE, T. MIYAZAWA, F. SUGIYAMA & Y. SHIRASU: Mutagenicity screening of feed additives in the microbial system. *Mutation Res.* 77: 21~30, 1980

STUDIES ON THE MECHANISM OF CARBADOX RESISTANCE WITH R PLASMID (pNV 13)

KENICHI OHMAE and SHOICHI YONEZAWA

National Veterinary Assay Laboratory, Kokubunji, Tokyo 185

Studies were made on the mechanism of carbadox (Cdx) resistance by using R plasmid (pNV 13) which encoded Cdx-resistance substance and was detected from *Escherichia coli* of porcine fecal origin.

The chemical modification of Cdx with pNV 13 was investigated. When *E. coli* C was used as a host, the specific adsorption (at about 375 nm) disappeared from the culture fluid and another absorption appeared at a new wavelength (at about 360 nm).

These changes were induced distinctly by *E. coli* C pNV 13 and stimulated in the presence of L-cysteine. Also in the presence of L-cysteine, the reduction of Cdx was noticed in the system of NADPH reduction with a crude enzymatic fluid obtained from *E. coli* C pNV 13 by treatment with osmotic shock. It was not noticed, however, in the fluid obtained from *E. coli* C.

On the other hand, when treated with EDTA, *E. coli* C pNV 13 showed no decrease in Cdx resistance, indicating that the mechanism of reduction of Cdx permeability in pNV 13 might be negative. Moreover, the *E. coli* AB 1157(rec⁺) and *E. coli* AB 2463(rec⁻) strains were used to examine the effect of pNV 13 on the ability of the repair of damage of DNA. No effect was found, however, on stimulating it, pNV 13 was not related to recombination-proficient.

In conclusion, it was presumed that the mechanism of Cdx resistance by pNV 13 might be derived from NADPH-dependent, Cdx-reducing enzyme contained in the bacterial periplasm newly.