

단 보

SeO₂의 메티실린-내성 황색포도상구균에 대한 생육 억제 효과

한영환*

동국대학교 의생명공학과

Inhibitory effect of SeO₂ on cell growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Yeong-Hwan Han*

Department of Medical Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 38066, Republic of Korea

(Received December 2, 2015; Accepted December 21, 2015)

ABSTRACT: This study was carried out to determine the antibacterial activity of SeO₂ against pathogenic bacteria, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Using the disc diffusion method, SeO₂ showed higher antibacterial activity against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria used in this study. Coccus-form bacteria showed much susceptible to SeO₂, compared to bacillus-form bacteria. Compared to antibiotics-susceptible *S. aureus*, antibiotics used in this study showed lower antibacterial activity against MRSA. As 200-500 µg/disc of SeO₂ was applied, diameters of clear zone for *S. aureus* and MRSA were 20-32.7 mm and 13.5-17.9 mm, respectively. For MRSA, minimal inhibitory concentration of SeO₂ was 40 µg/ml. When SeO₂ was added in culture broth, cell growth of MRSA was inhibited. These results will be applied to determine antibacterial mechanism of MRSA and other pathogenic microorganisms.

Key words: *Staphylococcus aureus*, inhibitory effect, methicillin resistant, MIC, SeO₂

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 0.8-1.0 µm 크기의 그람 양성, 통성혐기성 구균으로 식중독뿐만 아니라 피부의 화농, 중이염, 장염, 방광염 등의 원인균이다. 최근 대부분의 항생물질에 저항성을 나타내는 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)가 출현하여, 패혈증, 심내막염, 뇌수막염, 폐렴, 골수염 등의 전신 감염을 일으키기도 한다. MRSA에 의한 폐렴 및 패혈증의 사망률은 20% 이상으로 비교적 높은 편으로 알려져 있다. MRSA는 β-lactam 뿐만 아니라 다른 계열의 항생제에 대해서도 내성으로, vancomycin 또는 teicoplanin 등 glycopeptide 계열 항생제가 사용되고 있다.

MRSA에 대한 국내 연구는 항생제 및 화합물에 대한 연구(Yoo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2011; Visutthi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012), 미생물을 이용한 항균활성 연구(Lim, 1995; Lee *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2015)와 천연물의 항균활

성에 대한 연구(Seong, 2004; Shin and Seong, 2006; Lee *et al.*, 2007) 등이 보고되어 왔다.

이산화셀레늄(SeO₂)은 유리공업의 착색제, 사진인화용 토너에 사용되어 왔다. SeO₂의 열 안정성(녹는점; 340°C) 및 우수한 수용성(20°C; 38.4 g/100 ml)의 특성이 있다. 현재까지 SeO₂를 이용한 항균활성에 관한 연구 보고는 확인할 수 없었다. 항생제 내성 *S. aureus*가 유발하는 농가진 등의 피부병에 SeO₂의 사용 가능성에 대한 기초연구를 수행함이 본 연구의 목적이다.

실험에 사용한 균주는 국내 균주 분양기간으로 부터 입수하여 계대 배양하여 사용하였다(Table 1). 세균 배양용 배지는 MB cell (Kisanbio사) 제품을 사용하였다. SeO₂은 일본 대정화금(주)사 제품을, 항생제 methicillin은 Sigma사, 항생제 감수성 paper disc는 Sensi-Discs (BD BBL)를 사용하였다. Paper disc (Advantec, thin 8 mm)는 Toyo Roshi Kaisha 사 제품을 사용하였다. 액체배양 생육 측정용 분광광도계(spectrophotometer)는 Optizen (Mecasys)을 사용하였다.

*For correspondence. E-mail: yghan@dongguk.ac.kr;
Tel.: +82-54-770-2213; Fax: +82-54-770-2386

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	Strains	Species	Strains
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2617 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1621
<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 1925	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	CCARM 3795
<i>Proteus bulgaris</i>	KCTC 2512	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	CCARM 3089
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC 2513	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	CCARM 3090
<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 12151	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	CCARM 3095
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1012	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	CCARM 3108
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065		

^a KCTC, Korean Collection for Type Cultures, Daejeon; KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms, Seoul; CCARM, Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, Seoul

Table 2. Effect of SeO₂ on cell growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria

Species	Gram reaction	Form	Clear zone (dia, mm)		
			200 µg ^a	500 µg	1 mg
<i>E. coli</i> KCTC 2617	Negative	Rod	8.0±0 ^b	8.0±0	8.0±0
<i>S. typhimurim</i> KCTC 1925	Negative	Rod	8.0±0	9.0±0.3	9.8±0.7
<i>P. bulgaris</i> KCTC 2512	Negative	Rod	8.0±0	8.5±0.3	9.3±0.8
<i>P. aeruginosa</i> KCTC 2513	Negative	Rod	8.0±0	8.0±0	9.0±1.7
<i>B. subtilis</i> KCCM 12151	Positive	Rod	8.0±0	10.6±1.7	12.0±1.1
<i>B. cereus</i> KCTC 1012	Positive	Rod	8.0±0	8.0±0	8.0±0
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	Positive	Coccus	16.2±0.8	21.5±1.2	26.8±2.4
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	Positive	Coccus	16.9±1.9	25.2±2.9	33.3±2.1

^a Loading amount on 8-mm disc.

^b Average±STD for 5-6 replicates. 8.0±0 means no antibacterial activity.

생육저지환의 측정은 disc diffusion 방법으로 수행하였다. 한천배지에 전 배양된 각 배양액 100 µl를 도말한 다음, 10 µl loading된 paper disc를 정지하였다. 37°C의 항온기에서 3일 동안 배양한 다음, 생육저지환의 직경(dia, mm)으로 시료의 생육 억제 정도를 판별하였다. 최소생육억제농도(MIC)의 측정을 위하여 시험관에 배지 10 ml을 분주한 다음, 접종 농도가 5%가 되도록 접종하였다. SeO₂ 용액을 각각의 농도에 맞추어 첨가한 다음, 항온기(37°C)에서 24시간 동안 배양후 탁도(OD₆₆₀)를 측정하였다.

사용한 균주 중 그람 양성균에 대해 SeO₂의 항균활성은 없거나 미미하였다. 그람 양성균에 대해 간균 형태의 *Bacillus* 속보다는 구균 형태의 *Streptococcus*, *Staphylococcus*속의 세균에 대해 더 우수한 항균활성을 보여 주었다(Table 2). 이 결과는 세균의 구조 및 형태에 따르는 SeO₂의 항균활성에 대해 더 많은 종 및 균주를 대상으로 연구할 필요성이 제기 되었다.

황색포도상구균과 MRSA에 대해 항생제 감수성을 비교하여 실험한 결과, 알려진 바와 같이 사용한 모든 항생제에 대해 MRSA의 항생제에서 감수성이 작은 것으로 나타났다(Table 3). 항생제-감수성 *S. aureus*의 ampicillin 및 methicillin에 대

한 항생제 감수성은 매우 크게 나타났으나, MRSA 균주 특성에서 예측되는 바와 같이 가장 작게 나타났다. MRSA에 대한 chloramphenicol과 vancomycin은 다른 항생제와 비교시 상대적으로 우수한 결과를 보여주었다. 농도별 SeO₂ 적용하였을 때, 항생제 실험의 결과와 같이 MRSA에서 낮은 항균활성을

Table 3. Antibacterial activity of various antibiotics against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)

	Loading amount (µg/disc)	Size of clear zone (dia, mm) ^a	
		<i>S. aureus</i> KCTC1621	<i>S. aureus</i> CCARM 3089 (MRSA)
Ampicillin ^b	10	51.8±3.0 ^c	7.3±0.2
Streptomycin	10	22.3±1.2	12.4±1.1
Chloramphenicol	30	32.8±1.6	20.0±1.1
Tetracycline	30	32.3±1.5	8.9±0.5
Vancomycin	30	24.8±0.9	15.7±1.8
Methicillin ^d	30	42.6±1.7	8.0±0

^a Antibacterial activity was determined by the disc diffusion method.

^b 10-30 µg of antibiotics/7-mm Sensi-disc was used.

^c Average±STD for 5-6 replicates.

^d 30 µg/8-mm paper disc (thin) was used.

Table 4. Antibacterial activity of SeO₂ against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* CCARM 3089 (MRSA)

Loading amount (μg/disc)	Clear zone (dia, mm)	
	<i>S. aureus</i> KCTC 1621	<i>S. aureus</i> CCARM 3089 (MRSA)
500	32.7±1.6	17.9±1.4
400	28.5±1.2	17.2±1.6
300	23.5±0.5	15.1±1.3
200	20.3±2.5	13.5±1.0
100	18.4±0.6	9.4±1.5
80	14.2±1.1	8.3±0.2
60	12.7±0.5	8.0±0
40	8.2±0.2	8.0±0
20	8.0±0	8.0±0

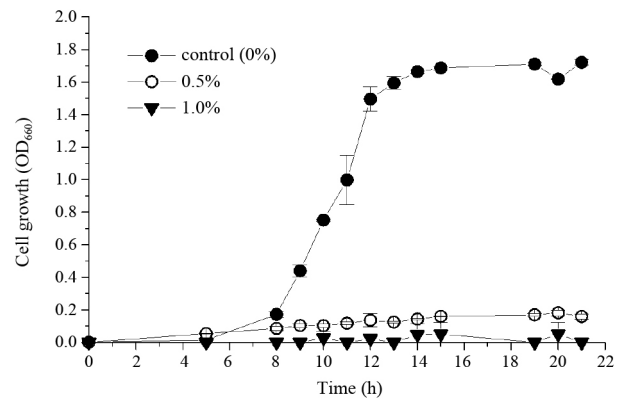
Table 5. Antibacterial activity of SeO₂ against methicillin-resistant *S. aureus* CCARM 3089 (MRSA)

Strain of <i>S. aureus</i> (MRSA) in CCARM	Clear zone (dia, mm)		
	200 μg ^a	500 μg	1 mg
3795	8.5±0.3 ^b	11.8±0.7	13.3±1.1
3089	10.3±0.4	16.8±0.8	17.3±1.7
3090	10.3±0.5	14.8±0.2	14.5±0.3
3095	9.5±0.2	15.0±0.8	15.5±0.6
3108	8.8±0.3	16.2±0.6	16.8±0.7

^a Loading amount on 8-mm disc.^b Average±STD for 5-6 replicates. 8.0±0 means no antibacterial activity.

보여주었다(Table 4). 200-500 μg/disc의 농도에서 *S. aureus*의 생육저지환 직경은 20.3-32.7 mm, MRSA의 경우 13.5-17.9 mm로 작게 나타났다. SeO₂ 첨가 배양액에 대한 MRSA 생육 측정 결과, 40 μg/ml의 농도에서 생육이 억제되었다.

여러 MRSA 균주의 SeO₂에 대해 200-1,000 μg/disc 범위에서 항균활성을 측정된 결과, loading 농도에 따라 항균활성이 증가함을 나타내었다(Table 5). SeO₂가 첨가된 액체 배지에서 MRSA에 대한 항균활성 측정 결과, 0.5% 및 1.0%가 첨가된 배지에서의 세균 생육은 억제되었다(Fig. 1). 이 결과는 배양 시간 경과에 따르는 viable cell 농도 측정의 결과, 첨가되지 않은 대조군의 viable cell 농도는 증가하였으나 첨가군의 viable cell 농도는 증가하지 않은 결과와 일치하였다(Table 6). Fig. 1 및 Table 6의 결과는 SeO₂의 항균 활성이 bacteriostatic 특성을 나타내었다. 그람 양성 세균에 대해 SeO₂의 항균 활성이 더 우수한 결과는 그람 양성 세균의 세포벽을 구성하는 peptidoglycan 생성과 연관되어 있을 것으로 추론된다. SeO₂의 항균활성이 실험한 그람 음성균에 대해 적게 나타나는 이유가 그람 음성균 외막의 구조 및 조성과의 관련이 있는지, 실험한 그람 양성균에 대

**Fig. 1.** Addition effect of SeO₂ on cell growth of methicillin-resistant *S. aureus* CCARM 3089. Cell growth was carried out at 37°C in Brucella broth with shaking (120 rpm) and then, determined spectrophotometrically at OD₆₆₀.**Table 6.** Antibacterial activity of SeO₂ against methicillin-resistant *S. aureus* CCARM 3089 (MRSA)

Time (h)	Viable cells (CFU/ml)		
	Final concentration of SeO ₂ (%) ^a		
	0	0.5	1.0
0	1.3±0.8×10 ⁵	1.8±0.3×10 ⁵	1.2±0.4×10 ⁵
5	8.2±1.9×10 ⁵	4.3±3.9×10 ⁴	6.1±2.8×10 ⁴
10	1.6±0.7×10 ⁸	4.0±0.4×10 ⁴	8.0±5.6×10 ⁴
15	3.5±3.2×10 ⁷	6.0±2.8×10 ⁴	6.3±2.4×10 ⁴
20	6.8±3.3×10 ⁷	1.3±1.2×10 ⁶	1.2±0.2×10 ⁵

^a Cells were cultivated at 37°C for 24 h on Brucella agar.

해 *Streptococcus*, *Staphylococcus* 속 구균이 *Bacillus* 속 간균보다 더 우수한 이유에 대해 후후 규명하고자 한다. 본 연구는 독성이 있는 SeO₂가 어떻게 MRSA에 대해 항균활성이 있는지를 감수성 *S. aureus*와 비교하여 항균활성 기작에 관련된 기초 연구로 수행하였다.

적 요

본 연구는 SeO₂의 메티실린-내성 *S. aureus*에 대한 항세균 활성을 규명하고자 수행하였다. Disc diffusion method를 이용하여 SeO₂의 항세균 활성을 측정된 결과, 그람 양성 세균이 그람 음성 세균과 비교시 우수하였다. 사용한 그람 양성 세균 중 *Streptococcus*, *Staphylococcus* 속 세균이 *Bacillus* 속 간균과 비교시 더 우수하였다. 사용한 모든 MRSA에 항균활성이 나타났다. 항생제의 생육저지환을 측정된 결과, 사용한 모든 항생제에 대해 MRSA의 항균활성이 작게 나타났다. 200-500 μg/disc

범위의 SeO₂ 적용시 *S. aureus* 및 *S. aureus* CCARM (MRSA)에 대한 생육저지환의 직경은 각각 20-32.7 mm 및 13.5-17.9 mm이었다. SeO₂의 MRSA에 대한 최소생육억제농도는 40 µg/ml이었다. 액체배지에 0.5% 및 1%의 SeO₂를 첨가한 결과, MRSA의 생육이 억제 되었다. 본 SeO₂의 항균활성 실험 결과는 추후, SeO₂의 항균활성 기작의 규명, 병원성 세균 및 항생제내성 미생물에 적용될 수 있다고 판단된다.

References

- Ding, R., Xue-Chang Wu, X.C., Qian, C.D., Teng, Y., Li, Q., Zhan, Z.J., and Zhao, Y.H. 2011. Isolation and identification of lipopeptide antibiotics from *Paenibacillus elgii* B69 with inhibitory activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol.* **49**, 942-949.
- Ji, K., Jeong, T.H., and Kim, Y.T. 2015. Anti-MRSA properties of prodigiosin from *Serratia* sp. PDGS 120915. *J. Life Sci.* **25**, 29-36.
- Kim, S.G., Kim, M.J., Jin, D.C., Park, S.N., Cho, E., Freire, M.O., Jang, S.J., Park, Y.J., and Kook, J.K. 2012. Antimicrobial effect of ursolic acid and oleanolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Microbiol.* **48**, 212-215.
- Lee, D.S., Eom, S.H., Jeong, S.Y., Shin, H.J., Je, J.Y., Lee, E.W., Chung, Y.H., Kim, Y.M., Kang, C.K., and Lee, M.S. 2012. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) substance from the marine bacterium *Pseudomonas* sp. UJ-6. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **35**, 171-177.
- Lee, D.S., Jeong, S.Y., Kim, Y.M., Lee, M.S., Ahn, C.B., and Je, J.Y. 2009. Antibacterial activity of aminoderivatized chitosans against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Bioorgan. Medicin. Chem.* **17**, 7108-7112.
- Lee, J.W., Ji, Y.J., Lee, S.O., and Lee, I.S. 2007. Effect of *Saliva miltiorrhiza* Bunge on antimicrobial activity and resistant gene regulation against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Microbiol.* **45**, 350-357.
- Lim, Y.H. 1995. Structure elucidation of a potent anti-MRSA antibiotic, AM3, produced by *Streptomyces* sp. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **38**, 516-521.
- Seong, I. 2004. Antimicrobial activities of *Scutellaria baicalensis* and *Phellodendrom amurense* against MRSA and *Candida*. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 17-22.
- Shin, S.H. and Seong, I.H. 2006. Antimicrobial activity of the extracts from *Paeonia japonica* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Microbiol.* **42**, 54-58.
- Visutthi, M., Potjanee Srimanote, P., and Voravuthikunchai, S.P. 2011. Responses in the expression of extracellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomycinone. *J. Microbiol.* **49**, 956-964.
- Yoo, J.C., Kim, J.H., Ha, J.W., Park, N.S., Sohng, J.K., Lee, J.W., Park, S.C., Kim, M.S., and Seong, C.N. 2007. Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *J. Microbiol.* **45**, 6-10.