

Antibacterial activity of *Chamaecyparis obtuse* Extract and Profile of Antimicrobial Agents Resistance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Jong Hwa Yum^{†,*}

Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan 47340, Korea

In vitro antimicrobial activities of hot water extracts of *Chamaecyparis obtuse*, for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was compared to commonly used conventional antimicrobial agents. All MRSA was susceptible to linezolid or vancomycin, but also to erythromycin. MIC range and MIC₉₀ to erythromycin, clindamycin, levofloxacin, tetracycline for MRSA were each 4 µg/mL, 2 ~ >128 µg/mL, ≤0.06 ~ >128 µg/mL, 0.25 ~ >128 µg/mL, 0.25~64 µg/mL and 4 µg/mL, .128 µg/mL, >128 µg/mL, >128 µg/mL, 64 µg/mL. The hot water extracts of leaf of *C. obtuse* had the lowest MIC range, MIC₅₀, and MIC₉₀ (0.125 µL/mL) for the MRSA tested, and it was possible more potent than various conventional antimicrobial agents. Screen antibacterial drug candidate with high antibacterial activity such as derivatives of *C. obtuse* leaf extract such as terpinen-4-ol or using combined therapy with commercialized antibacterial agents will likely be helpful in treating refractory MRSA infections.

Key Words: *Chamaecyparis obtuse*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Antibacterial activity, Terpinen-4-ol, Antimicrobial agent

최근 그람양성 구균의 항균제 내성이 증가하고 있어 최근 몇 년간 큰 문제로 대두되고 있다. 새로운 치료제로 합성약물인 oxazolidinone은 그람양성 세균에 항균력을 보인다. 유일하게 시판되는 oxazolidinone인 linezolid는 23S rRNA peptidyl transferase에 결합하여 세균의 단백질 번역 개시를 억제한다(Shinabarger, 1999).

다양한 지역에서 폭넓게 사용되는 약물인 linezolid는 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)을 포함하여 vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) 및 penicillin 내성 *Streptococcus pneumoniae*와 같은 대부분의 그람양성 세균 감염 치료에 효과적이다(Andes et al., 2002; Attassi et al., 2002; Kato et al., 2021). 그러나, 최근 몇몇 연구에서는 브라질, 중국, 프랑스, 독일, 이탈리아 및 스웨덴에서 linezolid

내성 staphylococci와 enterococci의 출현 보고가 점차 증가하고 있다. 따라서, MRSA를 포함한 그람양성 감염환자의 치료에 점차 어려움이 증가할 것으로 예측된다. Linezolid에 대한 주요 내성 기전은 23S rRNA 유전자의 돌연변이와 최근에 소개된 이동 가능한 chloramphenicol-florfenicol 내성(*cfi*) methyltransferase 유전자 때문인 것으로 알려져 있다(Jones et al., 2009).

MRSA를 비롯한 그람양성 구균 감염 치료에 있어 항균제 내성 문제가 점차 심각하게 대두되고 있으며, 민간 요법으로 감염질환 치료에 사용되어 온 식물로부터 항균 물질을 분리하기 위한 연구가 다양하게 활발히 진행되고 있다(Lee et al., 2009; Hong et al., 2004; Yang et al., 2007). 그 중 침엽수 종 추출물에서 terpinen-4-ol은 항균 효과를 나

Received: January 11, 2024 / Revised: January 23, 2024 / Accepted: February 5, 2024

*Professor.

†Corresponding author: Jong Hwa Yum. Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan 47340, Korea. Tel: +82-51-890-2682, Fax: +82-505-182-6877, e-mail: auxotype@deu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

타내는 주요 성분으로 알려진 바 있다(Lee et al., 2009; Yang et al., 2007). 또한, 식물에서 추출한 천연물질이 항산화 성분 효능을 가지면서 각종 병원성 미생물의 세포벽과 세포막의 기능을 약화시키고 효소 활성을 억제하는 것으로 보고되는 등 다양한 천연물질에서의 항균 효능을 보고한 바 있다(Lee et al., 2015). 이에 새로운 약제 탐색 기술과 병용요법 등의 방법 개발이 필요하다.

본 연구에서는 국내에서 분리된 MRSA에 대한 항균제 내성 양상을 분석하고, 이들 세균에 대한 *Chamaecyparis obtuse*의 잎과 가지의 열수추출물의 항균 효과를 분석하고자 하였다.

2010년 부산시 3차 의료기관에서 반복되지 않게 분리된 *S. aureus* 25주를 분양 받아 시험대상으로 시험하였으며, 균종 동정은 전통적인 방법과 ID32 STAPH를 이용하였다. *S. aureus* ATCC 25923와 *S. aureus* ATCC 29213을 항균제 감수성 시험에 참조 균주로 사용하였다.

건조 *C. obtuse* 잎과 가지를 각각 1 kg을 9 L DW에 넣고 100°C에서 8시간 30분 동안 열수추출 한 후, 100 mL로 농축한 열수추출물을 -70°C에 보관하여 시험에 사용하였다. *C. obtuse* 잎과 가지 열수추출물을 멸균된 빈 디스크에 0 µL, 5 µL, 10 µL, 15 µL, 그리고 20 µL씩 첨가하고 건조시켜 시험 세균에 대한 항균력 시험에 사용하였다.

MRSA의 검출은 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)의 권장에 따라 30 µg cefoxitin 디스크를 이용하여 methicillin에 대해 내성인 균주를 선별하였다.

항균제 최소억제농도 시험(Minimal inhibitory concentration; MIC)은 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)의 권장에 따라, 항균제 감수성 시험은 10⁴ colony forming units의 접종액을 Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, USA)에 접종하고 18시간 동안 배양하여 고체한천 희석법(agar dilution method)으로 시험하였다. 시험에 사용한 항균제는 linezolid (Dong-A Pharmaceutical Co.), erythromycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), clindamycin (Korea Upjohn, Seoul, Korea), gentamicin (Chong Kun Dang, Seoul, Korea), levofloxacin (Daiichi Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), tetracycline (Sigma Chemical, St. Louis, MO), vancomycin (Daewoong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)이다.

C. obtuse 잎과 가지 열수추출물을 각각 디스크확산법을 이용하여 임상에서 분리된 MRSA에 대한 감수성 시험에서 농도가 증가함에 따라 시험 세균의 억제대가 증가하여 이들 세균에 대한 항균력을 확인하였다(Fig. 1). 또한, *C. obtuse* 잎 열수추출물의 항균력 시험은 열수추출

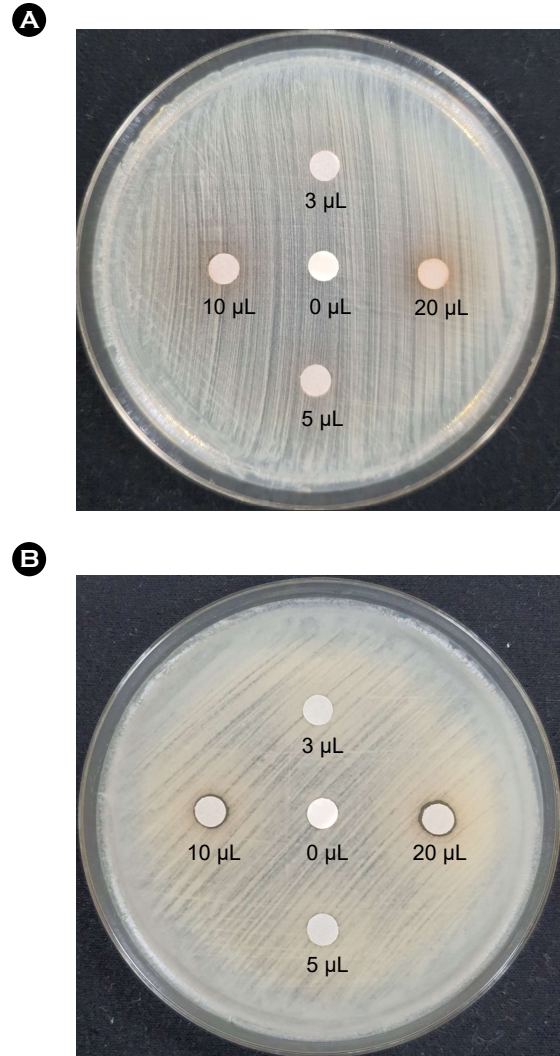


Fig. 1. The result of antibacterial effect screen test for water extracts of *Chamaecyparis obtuse* branch (A) and leaf (B) for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* using disk diffusion test.

물 각각의 농도별로 Mueller-Hinton agar (MH agar; Difco laboratories, USA)에 시험 세균 10⁴ colony forming units의 접종액을 접종하여 18시간 동안 배양하여 고체한천희석법으로 시험하였다.

건조 *C. obtuse* 잎과 가지의 열수추출물의 MRSA에 대한 항균력 시험은 MH agar에서 디스크확산법으로 시험한 결과, *C. obtuse* 가지 추출물에서는 모두 항균활성능이 검출되지 않았다(Fig. 1A). *C. obtuse* 잎 추출물에서는 10 µL와 20 µL 첨가한 디스크에서 각각 7 mm, 8 mm의 억제대를 보여 MRSA에 대해 항균활성능을 확인하였다(Fig. 1B). 임상에서 분리된 MRSA에 대한 항균제의 MIC 범위는

Table 1. Antimicrobial activities of *Chamaecyparis obtuse* extract with those of other antibiotics against 25 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			% of isolates ^b		
	Range	50% of strains	90% of strains	S	I	R
<i>Chamaecyparis obtuse</i> extract	0.125 $\mu\text{L/mL}$	0.125 $\mu\text{L/mL}$	0.125 $\mu\text{L/mL}$	NA ^a	NA	NA
Linezolid	4	4	4	100	NA	0
Erythromycin	2 ~ >128	4	>128	0	52	48
Clindamycin	≤ 0.06 ~ >128	0.12	>128	68	0	32
Gentamicin	0.12~16	0.5	8	88	12	0
Levofloxacin	0.25 ~ >128	0.25	>128	64	0	36
Tetracycline	0.25~64	0.5	64	72	0	28
Vancomycin	0.5~1	1	1	100	0	0

^aNA, not applicable, ^bS, susceptible; I, intermediate; R, resistant

linezolid 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 vancomycin은 0.5~1 $\mu\text{g/mL}$ 로 낮은 수준을 보였고, MIC₉₀은 각각 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 1 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 모두 감수성 비율이 100% 이었다(Table 1). 그러나 최근 linezolid와 vancomycin 내성 균주 출현이 증가하고 있어 이들 항균제에 대한 내성균 출현이 증가할 것으로 판단된다. 또한, gentamicin의 MIC 범위는 0.12~16 $\mu\text{g/mL}$ 로 낮은 수준을 보였고, MIC₉₀은 8 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이 항균제에 대해 감수성인 균주 비율은 88%이었다. Yum 등의 2010년 보고에 의하면 gentamicin에 대한 국내 서울 지역에서 분리된 MRSA의 감수성 비율은 13%이었다(Yum et al., 2010). Gentamicin 내성유전자는 plasmid, transposon 등 mobile element에 의해 수평 전달이 가능한데, gentamicin에 대한 이들 MRSA의 감수성 비율은 시기나 지역에 따라서 차이가 있을 수 있는 것으로 판단된다.

MRSA에 대한 그 외 항균제의 MIC 범위는 erythromycin 2 ~ >128 $\mu\text{g/mL}$, clindamycin ≤ 0.06 ~ >128 $\mu\text{g/mL}$, levofloxacin 0.25 ~ >128 $\mu\text{g/mL}$, tetracycline 0.25~64 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, MIC₉₀은 각각 >128 $\mu\text{g/mL}$, >128 $\mu\text{g/mL}$, >128 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 64 $\mu\text{g/mL}$ 로 높았다. 또한, 이들 항균제의 MRSA에 대한 감수성율은 각각 0%, 68%, 64%, 그리고 72%로 나타나, erythromycin을 제외하고 아직은 높은 감수성율을 보이고 있으나, 점차 이들 항균제에 대한 내성이 증가하고 있는 추세이므로 이들 약제를 사용한 MRSA 감염증 치료에 어려움이 예상된다.

*C. obtuse*의 잎 추출물의 MIC 범위, MIC₅₀와 MIC₉₀은 모두 0.125 $\mu\text{L/mL}$ 이었다. 이에 *C. obtuse*의 잎 추출물의 MRSA에 대한 항균력이 확인되었다. *C. obtuse* 잎 추출액은 디스크확산법에 의한 항균제 감수성 시험에서 억제대

를 형성하였고, MIC 시험을 시행한 결과 0.125 $\mu\text{L/mL}$ 에서 MIC 값을 나타내어, 새로운 항균제 후보물질로써 기존 상품화된 항균제와의 병용요법이나, 식품산업 등에서 방부제로써 사용 가능성을 보여주었다. 따라서, *C. obtuse* 잎 추출물 성분 중 terpinen-4-ol 등과 같은 성분의 유도체에 의한 높은 항균활성 물질을 탐색하거나, 상품화된 항균제와 병용요법을 사용한다면 난치성 MRSA 감염 치료에 도움이 될 것으로 예상된다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Dong-eui University foundation grant 2022, I thank professor Jeong-Hwan Shin of Inje University Busan Paik Hospital for his help in collecting strains.

CONFLICT OF INTEREST

The author declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Andes D, Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. *In vivo* pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). Antimicrob Agents Chemother. 2002. 46: 3484-3489.
- Attassi K, Hershberger E, Alam R, Zervos MJ. Thrombocytopenia associated with linezolid therapy. Clin Infect Dis. 2002. 34: 695-698.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; approved standards M2-M11, 28th ed. Wayne PA: CLSI; 2018.

- Hong EJ, Na KJ, Choi IG, Choi KC, Jeung EB. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biol Pharm Bull*. 2004. 27: 863-866.
- Jones RN, Ross JE, Bell JM, Utsuki U, Fumiaki I, Kobaysashi I, Trunidge JD. Zyvox annual appraisal of potency and spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009. 65: 404-413.
- Kato H, Hagihara M, Asai N, Shibata Y, Koizumi Y, Yamagishi Y, Mikamo H. Meta-analysis of vancomycin versus linezolid in pneumonia with proven methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021. 24: 98-105.
- Lee JH, Lee BK, Kim JH, Lee SH, Hong SK. Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtuse*. *J Microbiol Biotechnol*. 2009. 19: 391-396.
- Lee JW, Yoon JH, Park JW. Effect of grapefruit seed extract fir abtubacteruak activity on the coated packaging. *Food Eng Prog*. 2015. 19: 104-110.
- Shinabarger D. Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999. 8: 1195-1202.
- Yang JK, Choi MS, Seo WT, Rinker DL, Han SW, Cheong GW. Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtuse* leaf essential oil. *Fitoterapia*. 2007. 78: 149-52.
- Yum JH, Choi SH, Yong D, Chong Y, Im WB, Rhee DK, Lee K. Comparative *In vitro* activities of torezolid (DA-7157) against clinical isolates of aerobic and anaerobic bacteria in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. 54: 5381-5386.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2024.30.1.32>

Cite this article as: Yum JH. Antibacterial activity of *Chamaecyparis obtuse* Extract and Profile of Antimicrobial Agents Resistance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedical Science Letters*. 2024. 30: 32-35.