

Antibacterial activity of *Chamaecyparis obtuse* extract and Profile of Antimicrobial Agents Resistance for Metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*

Jonghwa Yum^{†,*}

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

In vitro antimicrobial activities of hot water extracts of *Chamaecyparis obtuse*, for clinical metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* (MBLPA.) was compared to commonly used conventional antimicrobial agents. All MBLPA was susceptible to colistin or amikacin, but also to imipenem 88.6%, meropenem 100%, piperacillin 85.7%, ceftazidime 97.1%, gentamicin 97.1%, and ciprofloxacin 100% were non-susceptible. MIC range to imipenem, meropenem, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, and ciprofloxacin for MBLPA were each 1 - >128 μ g/mL, 4 - >128 μ g/mL, 4 - >128 μ g/mL, 8 - >128 μ g/mL, 4 - >128, and 2- >128 μ g/mL. MIC range to aztreonam for MBLPA were 1 - 128 μ g/mL. MIC₉₀ to imipenem, meropenem, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, and ciprofloxacin for MBLPA were each 32 μ g/mL, >128 μ g/mL, >128 μ g/mL, >128 μ g/mL, >128 μ g/mL, and 128 μ g/mL. MIC₉₀ to colistin and amikacin were each 1 μ g/mL and 64 μ g/mL. The hot water extracts of *C. obtuse* leaf had the lowest MIC range (0.25 - >0.5 μ L/mL), MIC₅₀ (>0.5 μ L/mL), and MIC₉₀ (>0.5 μ L/mL) of the clinical MBLPA tested, and it was possible more potent than various conventional antimicrobial agents for MBLPA infection patients. Therefore, it suggested the possibility of using extract components of *C. obtuse* or their derivatives to treat MBLPA infection patients.

Key Words: *Chamaecyparis obtuse*, Metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*, Antibacterial activity, Antimicrobial agent

포도당비발효 그람음성 막대균 중 *Pseudomonas aeruginosa*는 폐렴, 요도염, 창상감염 등을 일으키며 원내감염의 중요한 병원체이다(Hong, 2006; Lister et al., 2009; Potron et al., 2015; Farhan et al., 2019). 이들 세균에 의한 감염증 치료에 imipenem이나 meropenem과 같은 carbapenems이 우수한 약제로 알려져 있다. 임상에서 분리된 *P. aeruginosa*의 carbapenem 내성은 계속적으로 증가 추세로 출현하고 있으며, 이들 세균의 분리 빈도 또한 높아지며 다양한 계열의 약제에 내성을 보인다(Jones et al., 2002; Andrade et al., 2003; Walsh et al., 2005). Imipenem이나 meropenem과 같은 carbapenems에 대한 내성 기전 중 metallo- β -lactamase

(MBL) 생성으로 인한 내성은 이들 약제를 분해하는 기전으로 비교적 높은 MIC를 보이며, integron, plasmid, transposon과 같은 mobile element와 관련하여 획득성 내성 그람음성 막대균의 분리율이 증가 추세에 있다. 이들 MBL 생성 세균에 의한 감염증 치료에 어려움이 증가할 것으로 예상된다.

한편, 민간용법으로 감염질환 치료에 사용되어 온 천연물로부터 항균물질을 분리하는 연구가 다양하게 진행되어 왔다(Lee et al., 2009; Hong, 2006; Yang et al., 2007). 천연물 중 식물에서 추출한 *Chamaecyparis obtuse* 성분에는 α -pinene, terpinem-4-ol, α -terpineol 등과 같은 물질이 항균

Received: May 8, 2024 / Revised: May 21, 2024 / Accepted: May 31, 2024

*Professor.

[†]Corresponding author: Jonghwa 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.

력을 보이며, 이들 추출물이 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, 그리고 *Streptococcus mutans* 등과 같은 다양한 병원성 세균에 대해 항균력을 보인다는 보고가 있었다(Lee et al., 2009; Yang et al., 2007).

따라서, 본 연구에서는 국내 분리된 MBL-Producing *P. aeruginosa* (MBLPA)의 항균제 내성 양상을 조사하고, 임상에서 분리된 이들 세균에 대한 *C. obtuse* 열수추출물의 항균력을 분석하고자 하였다.

2010년 서울시 3차 의료기관에서 반복 분리 균주를 제외한 MBLPA 35주를 분양 받아 시험하였으며, 균종 동정은 전통적인 방법과 상품화된 kit (ID 32 GN system, bio-Merieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하였다. *P. aeruginosa* ATCC 27853을 항균제 감수성 시험에 참조 균주로 사용하였다.

건조 *C. obtuse* 잎 1 kg을 9 L DW에 100°C에서 8시간 30분 동안 열수추출한 후, 100 mL로 농축하였다. 농축한 열수추출물을 소분하여 -70°C에 보관하여 시험에 사용하였다. *C. obtuse* 잎 열수추출물을 멸균된 빈 디스크에 각각 0 µL, 3 µL, 5 µL, 10 µL, 그리고 20 µL씩 적하 하고, 안전 캐비닛 안에서 상온 조건으로 건조시켜 시험 세균에 대한 항균력 시험에 사용하였다.

Imipenem 혹은 meropenem에 비감수성인 균주를 선별하여 Carbapenem-Hodge 변형 시험에 양성인 균주를 우선 선별하고, 이들 균주는 imipenem 혹은 meropenem과 EDTA + sodium mercaptoacetic acid (SMA) double disk synergy 시험(DDS)을 시행하였다(Lee et al., 2001; Lee et al., 2003). 항균제 감수성 시험을 위한 균주를 McFarland 0.5관 탁도로 조정하여 멸균된 면봉을 이용하여 Muller-Hinton agar (Difco Laboratories, USA)에 접종한 후 imipenem 혹은 meropenem 10 µg disk와 760 µg EDTA + 2 mg SMA disk를 가장 자리가 10 mm 혹은 15 mm 간격으로 엮고 36°C에서 18시간 배양하였다. 두 디스크 사이의 억제대가 커져 상승효과(synergism)이 확인되면 양성으로 판독하였다. 이들 세균은 20% skim milk에 부유하여 -70°C에 보관하여 시험에 사용하였다.

LSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)의 권장에 따라, 항균제 최소억제농도 시험(Minimal inhibitory concentration; MIC)은 시험 세균을 10⁴ CFU의 접종액으로 조정 후 Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, USA)에 접종하고 18시간 동안 배양하여 agar dilution method(고체한천희석법)으로 시험하였다. 시험에 사용한 항균제는

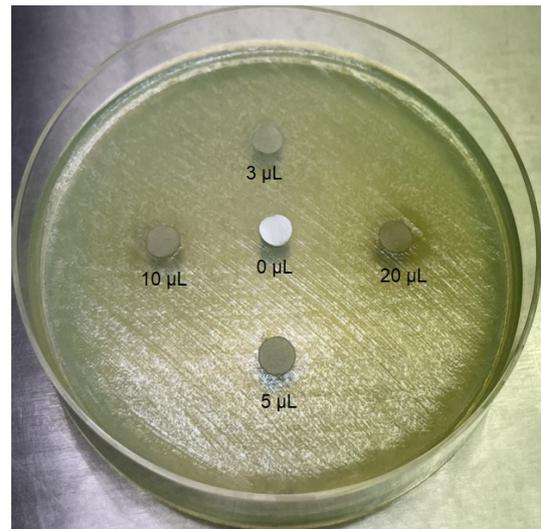


Fig. 1. The result of antibacterial effect screen test for water extracts of *Chamaecyparis obtuse* leaf for metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* using disk diffusion test.

piperacillin (Wyeth, USA), ceftazidime (GlaxoSmithKline, UK), cefotaxime (Handok, Korea), imipenem (Merck Sharp & Dohme, USA), meropenem (Sumitomo, Japan), aztreonam (Bristol-Myers Squibb, USA), amikacin (Dong-A Pharmaceutical, Seoul, Korea), ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, China), gentamicin (Chong Kun Dang, Seoul, Korea), 그리고 colistin (Sigma-Aldrich, St.louis, Mo, USA)이다.

디스크확산법을 이용하여 *C. obtuse* 잎 열수추출물을 임상에서 분리된 MBLPA에 대한 항균력 시험은 디스크 확산법을 이용하여 시험한 결과, 열수추출액의 농도가 증가함에 따라 시험 균주의 억제대가 점차 증가하여 이들 시험 세균에 대한 항균력을 확인하였다(Fig. 1). 또한, *C. obtuse* 잎 열수추출물의 항균력 시험은 열수추출물을 각각의 농도 별로 Mueller-Hinton agar (MH agar; Difco laboratories, USA)에 각각의 시험 세균을 10⁴ CFU의 농도로 조정 후 접종하고 18시간 동안 배양하여 고체한천희석법으로 시험하였다.

*P. aeruginosa*는 흔히 외인성 감염과 내인성 감염을 모두 일으키고 특히 원내감염이 흔하며, 환자의 폐렴, 창상 감염이나 요 감염이 빈번하여 감염 전파가 흔하게 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 세균은 VIM, IMP, SIM, NDM 등의 MBL을 생성하는 균주가 점차 증가하고 있어, 그람음성 세균 감염 치료에 가장 우수한 carbapenem 계 항균제에 내성이어서 이들 감염증 치료가 어려운 경우가

Table 1. Antimicrobial activities of *Chamaecyparis obtuse* extract with those of other antibiotics against 35 for metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

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	0.25->0.5 $\mu\text{L/mL}$	>0.5 $\mu\text{L/mL}$	>0.5 $\mu\text{L/mL}$	NA ^a	NA	NA
Imipenem	1->128	16	32	11.4	5.7	82.9
Meropenem	4->128	>128	>128	0	5.7	94.3
Piperacillin	8-128	32	64	14.3	82.9	2.9
Cefotaxime	4->128	>128	>128	NA	NA	NA
Ceftazidime	8->128	128	>128	2.9	5.7	91.4
Aztreonam	1-128	8	64	57.2	35.7	17.1
Amikacin	2-64	32	64	20.0	80.0	0
Gentamicin	4->128	>128	>128	2.9	0	97.1
Ciprofloxacin	2->128	64	128	0	2.9	97.1
Colistin	0.5-2	1	1	100	NA	0

^aNA, not applicable

^bS, susceptible; I, intermediate; R, resistant

혼하다. 이에 *C. obtuse* 성분 중 α -pinene, terpinem-4-ol, α -terpineol 등과 같은 성분이 세균에 대하여 항균력을 갖는다는 보고 등이 있어 이들 추출물이 임상에서 분리된 MBLPA 35주를 대상으로 항균력 시험을 하였다. 이들 균주를 대상으로 디스크확산법을 이용한 항균력 시험 결과, *C. obtuse* 잎 열수출물은 3 μL , 5 μL , 10 μL 그리고 20 μL 추출물을 첨가한 디스크에서 각각 7 mm, 8 mm, 12 mm 그리고 14 mm의 억제대를 보여 MBLPA에 대한 항균활성능을 확인하였다(Fig. 1).

임상에서 분리된 MBLPA에 대한 MIC 범위는 imipenem 1 - >128 $\mu\text{g/mL}$ 와 meropenem 4 - >128 $\mu\text{g/mL}$ 로 높은 수준을 보였고, MIC₉₀은 각각 32 $\mu\text{g/mL}$ 와 >128 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 비감수성 비율이 각각 88.6%와 100%이었다(Table 1). 이는 그람음성 세균 감염증 치료에 가장 우수한 imipenem이나 meropenem과 같은 항균제의 오남용과 plasmid나 transposon 등과 같은 mobile element 유전자에 의해 수평전달이 가능한 이유 등으로 인해 이들 carbapenem 계열 약제에 내성이 증가하고 있는 것으로 판단된다. 또한, cefotaxime과 ceftazidime의 MIC 범위는 각각 4 - >128 $\mu\text{g/mL}$ 과 8 - >128 $\mu\text{g/mL}$ 으로 높은 수준을 보였으며, MIC₉₀은 모두 >128 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 ceftazidime의 비감수성 비율은 97.1%이었다. Ciprofloxacin과 gentamicin의 MIC 범위는 각각 2 - >128 $\mu\text{g/mL}$ 과 4 - >128 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 MIC₉₀은 각각 >128 $\mu\text{g/mL}$ 과 128 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 이들 항균제의

비감수성 비율은 각각 100%와 97.1%로 매우 높은 수준을 보였다. VIM, IMP 및 SIM과 같은 MBL 유전자는 흔히 integron이라는 mobile element 유전자에 위치하고 있어 이들 유전자의 삽입과 이동 등이 용이할 뿐 아니라, integron 안에 위치하는 유전자 카세트에 aminoglycoside 계열, fluoroquinolone 계열 등 다양한 종류의 항균제 내성 유전자가 존재할 수 있어 MBLPA는 흔히 여러 종류 항균제에 내성을 보이는 다제내성 특성을 보이는 것으로 보인다.

MBLPA에 대한 그 외 항균제의 MIC 범위는 aztreonam 1 - 128 $\mu\text{g/mL}$, amikacin 2 - 64 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 colistin 0.5 - 2 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, MIC₉₀은 각각 64 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교적 낮은 수준을 보였다. 또한 이들 항균제의 MBLPA에 대한 감수성율은 각각 57.2%, 20%, 그리고 100%로 나타나, 비교적 높은 감수성율을 보였으나, 이들 항균제에 대한 내성이 출현하고 있으므로, 향후 이들 약제에 대한 MBLPA 감염증 치료가 어려워질 것으로 예상된다.

MBLPA에 대한 *C. obtuse* 잎 추출액은 디스크확산법을 이용한 항균력 시험에서 추출물의 양이 증가할수록 억제대도 크게 형성하였다. 또한, *C. obtuse* 잎 추출물의 MIC 범위는 0.25 - >0.5 $\mu\text{L/mL}$ 이었고, MIC₅₀과 MIC₉₀은 모두 >0.5 $\mu\text{L/mL}$ 으로 항균력을 보였다. 따라서, MBLPA 감염증 치료에 *C. obtuse*의 추출물 중 α -pinene, terpinem-4-ol, α -

terpineol 등과 같은 성분이나 이들 유도체를 MBLPA 감염 환자의 치료에 활용할 수 있는 가능성을 제시해 주었다. 또한 이들 성분을 기존의 상품화된 향균제와 병합요법을 사용하는 등의 개선을 시도한다면 난치성 MBLPA 감염증 치료에 보다 효과적인 새로운 치료법이 도출될 수 있는 가능성이 있을 것으로 보인다.

ACKNOWLEDGEMENT

I thank Professor Kyungwon Lee of Yonsei University College of Medicine for his help with strain collection.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother.* 2003. 52: 140-141.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; approved standards M2-M11, 28th ed. Wayne PA: CLSI; 2018.
- Farhan SM, Ibrahim RA, Mahran KM, Hetta HF, Abd ERM. Antimicrobial resistance pattern and molecular genetic distribution of metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Minia, Egypt. *Infect Drug Resist.* 2019. 12: 2125-2133.
- Hong SB. *In vitro* Antimicrobial Combination Therapy in Metallo- β -lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J Clin Lab Sci.* 2006. 38: 166-172.
- Jones RN, Kirby JT, Beach ML, Biedenbach DJ, Pfaller MA. Geographic variations in activity of broad-spectrum β -lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: summary of the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002. 43: 239-243.
- 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 K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001. 7: 88-91.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 4623-4629.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009. 22: 582-610.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015. 45: 568-585.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005. 18: 306-325.
- Yang JK, Choi MS, Seo WT, Rinker DL, Han SW, Cheong G-W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtuse* leaf essential oil. *Fitoterapia.* 2007. 78: 149-152.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2024.30.2.96>

Cite this article as: Yum J. Antibacterial activity of *Chamaecyparis obtuse* extract and Profile of Antimicrobial Agents Resistance for Metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical Science Letters.* 2024. 30: 96-99.