

## Effects of Natural Compounds from Various Plant Eradicate the Persister Cell of *Edwardsiella tarda* Treated with Antibiotics of Florfenicol and Amoxicillin

Nakyong Kim<sup>1</sup>, Dae-hyuk Kweon<sup>2</sup> and Sung-Koo Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Sungkyunkwan University, Gyeonggi-do 440-746, Korea

Received March 16, 2012 / Revised May 9, 2012 / Accepted May 17, 2012

High concentration of antibiotics has been used to treat the outbreak of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella tarda* in aquaculture. However, not all of the bacteria have been killed with high concentrations of antibiotics treatment by the formation of persister cells with a dormant state. The main objective of this study was to kill persister cell using antibiotics with the addition of natural plant compounds. Antibiotics used in this study consist of 100 mg/ml florfenicol and 100 mg/ml amoxicillin. Ten natural plant compounds with persister cell inhibitor activity to *E. coli* were obtained from Protein Engineering and Systems Biology Lab. of Sungkyunkwan University. The persister cell inhibition activities of those natural plant compounds were evaluated in test tube. Concentrations of the antibiotics were in the ranges of 25~200 µg/ml. The persister cell formation was observed after 16 hours of culture. Persister cells were killed by antibiotics with natural plant compounds. Among ten natural plant compounds, *Gynostemma pentaphyllum*, *Mallotus japonicus*, and *Orixa japonica* showed persister cell formation inhibition activities. The optimal concentrations of *G. pentaphyllum*, *M. japonicus*, and *O. japonica* for the inhibitor of persister cell formation were 100 µg /ml, 100 µg /ml, and 200 µg /ml, respectively. *In vivo* study was carried out to evaluate the effect of the antibiotics with natural plant compounds using aquacultural fish, olive flounder, as test animals. *G. pentaphyllum*, *M. japonicus*, and *O. japonica* of 30 µg/ml, 10 µg/ml, and 10 µg/ml with antibiotics reduced cumulative mortalities, showing the effectiveness of persister cell inhibition.

**Key words** : Persister cell, edwardsiellosis, *Edwardsiella tarda*, olive flounder

### 서 론

최근 전 세계적으로 항생제 오남용이 큰 문제가 되고 있으며, FDA와 WHO에서는 식용작물, 가축, 어류에 대한 항생제 사용 감소를 권고하고 있다. Persister cell은 1944년 Joseph Bigger에 의해 처음 보고되었으며[3], 황색포도상구균이 페니실린에 대한 저항성을 가지며, 그 저항 기작이 돌연변이(resistant)와 다르기 때문에 persister cell이라 명명하였다[3]. Persister cell은 기존의 항생제를 분해하는 저항균체(resistant cell)와는 다른 특성으로 항생제에 대한 저항성을 가지는데, 항생제가 존재하는 환경에서 persister cell은 새로운 기작으로 항생제에 대한 내성을 형성하여 사멸되지 않고 생명을 유지한다. 즉, Toxin-Antitoxic module (TA module)에서 발현된 TisB 단백질은 항생제를 포함한 DNA 손상 유도물질에 의해 형성되며, 이는 proton motive force를 떨어뜨려 ATP 수준을 감소시켜 persister cell로서 그 대사 범위를 최소화하여 휴면상태와 같은 환경을 형성하여 생존한다. 또한 persister cell은 항생제가 존재하는 환경에서만 휴면 상태로 유도시키

는 유전자가 발현되는 것이 특징이다. 항생제가 존재하면 persister cell로 잠복해 있다가 항생제가 사라지면 다시 활성을 가져 대사활동과 분열을 시작한다[12,14]. 그러므로, persister cell은 질병 재발의 원인이 되고 있으며, 이를 제거하려고 대량의 항생제를 투여하는 원인이 되고 있다. Persister cell 형성에 대한 메커니즘은 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있으나, 이러한 persister cell에 관한 연구는 항생제 사용 저감을 위해 많은 연구가 수행되고 있는 실정이다.

본 연구에 사용된 병원성 균주는 *Edwardsiella tarda*로서 담수 및 해수에서 어류에게 에드워드병(Edwardsiellosis)을 유발시킨다. 특히 넙치 양식에서 가장 많이 피해를 입히고 있는 병원성균으로서, 에드워드증의 발병 증상으로는 복부팽창, 탈장 등의 증상이 있으며, 주로 고수온기에 많이 나타나는 질병이다[9,10]. *E. tarda*에 대한 다양한 항생제가 개발되어 있지만 내성균의 출현으로 그 효과가 좋지 않으며, 또한 persister cell에 의한 질병 재발을 방지하기 위해 균사멸 농도보다 훨씬 높은 농도의 항생제를 처리하고 있는 실정이다[6].

본 실험실에서는 10종의 식물 추출물을 이용하여 persister cell의 항생제 내성 저감 효과를 실험하였다. 10종의 식물 추출물 중 persister cell 저감 효과를 나타내는 추출물로 *Gynostemma pentaphyllum* (돌위), *Mallotus japonicas* (예덕

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5868, Fax : +82-51-629-5863

E-mail : skkim@pknu.ac.kr

나무), *Orixa japonica* (상산)을 확인 할 수 있었다. 다년생 식물인 돌피는 사포닌(saponins)계열 화합물인 gypenosides, 방향성분인 phylloidalin과 flavonoids, carotene 등을 함유한다[11,17]. 또한 예덕 나무는 낙엽소교목으로 잎 부위에 rutin, isoprenoid 유도체 및 geranin, mallotusinic acid, mallotinic acid 등을 함유하며[13,16], 상산은 범의귀과에 속하는 낙엽 관목으로 그 구성 성분은 알려져 있지 않다. 대부분의 식물 추출물들은 단독으로 사용 하였을 때는 persister cell의 저감 효과가 없지만 항생제와 함께 사용하면 persister cell의 저감효과가 높아진다고 보고된다. 그러므로, 본 연구에서는 항생제와 식물 추출물을 함께 사용하여 persister cell 사멸 및 저감 효과가 높은 추출물을 찾는 것이며, *in vitro* 및 넘치를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 persister cell의 저감 효능을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 기본 배양 조건

본 연구에서 사용한 *Edwardsiella tarda* NH1은 에드워드스증으로 폐사한 넘치로부터 분리한 균주 및 타 연구실에서 분리 보존하고 있던 균주를 분양받아 사용하였다. 기본 배지 조성은 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, Detroit, U.S.A)에 1.5% NaCl이 포함 된 배지를 사용하였으며, 24시간 동안 215 rpm, 30°C 조건 하에 배양을 실시하였다[4,5].

### 식물 추출물 및 항생제 조성과 처리방법

10종의 식물 추출물들은 성균관 대학교 단백질 공학 연구실에서 HTS (high throughput screening) system을 이용하여 항생제와 식물추출물을 같이 처리하였을 때 *E. coli* persister cell의 저감 효과가 나타난 식물 추출물들을 선별한 것을 분양 받았으며, Table 1에 실험에 사용한 10종의 식물 추출물을 나타내었다. 식물 추출물들은 DMSO (Dimethyl sulfoxide, SIGMA)용매에 1 mg/ml의 농도로 사용되었다. 본 실험에서 항생제는 연쇄상구균증과 에드워드스병의 치료제로 사용되는

수산용 AF-주(DaeSung Microbiological Labs. Co., LTD, Korea)를 사용하였으며, 이는 amoxicillin 100 mg/ml와 florfenicol 100 mg/ml이 혼합되어 있다.

### Persister cell 저감 효과 확인

고농도의 항생제에서 존재하는 persister cell의 저감 효과 확인을 위하여 다양한 농도의 식물 추출물을 첨가하여 농도를 최적화하였다. 대조군은 5 ml의 TSB 배양액에 DMSO 용매를 첨가하여 사용하였으며, 실험군은 TSB 배양액에 항생제를 각각 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도로 첨가 하였고, 식물 추출물은 1-200 µg/ml 농도로 각각 첨가하여 persister cell 저감 효과를 관찰하였다. Persister cell 저감효과가 나타난 항생제와 식물 추출물 혼합액을 첨가하여 시간에 따른 persister cell 저감 효과를 확인하였다. 대수 증식기의 *E. tarda* 병원균 배양액에 추출물과 항생제를 첨가하여 24시간 동안 저감 수준을 CFU로 측정하여 확인하였다[14].

### 실험어 및 사육 수조

본 연구에 사용된 실험어류는 여수에 있는 해안수산에서 구입하여 2주간 실험환경에 적응할 수 있도록 평균수온을 19°C에서 20°C로 유지시켜 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 예비 사육 후 치어 넘치(초기 평균무게: 25.6±1 g)는 총 20개의 사각 플라스틱 수조에 각 15마리씩 무작위로 선택하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 해수는 0.1 µm 필터로 여과하여 해수를 공급하였고, 전 실험기간 동안 평균수온은 21°C에서 23°C 범위로 적정수온을 유지하였다.

### *In vivo* test

Persister cell 저감 효과를 확인 한 식물 추출물 항생제 혼합액 투여방법은 치어기 넘치에 복강 주사법을 통해 투여하였다. 투여 전, *E. tarda*는  $4.0 \times 10^4$  CFU/ml 농도의 병원균액을 0.1 ml/fish로 각각 공격시험을 진행하였다. 공격 시험 후 1일 뒤에 각각 농도별로 혼합한 식물추출물과 항생제 혼합액을 주사하였다. 넘치에 대한 공격 시험의 결과는 12일 간의 누적 폐사율로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### Persister cell 형성 확인

Persister cell은 항생제의 농도가 높더라도 세포의 viability를 유지하며 일정한 세포 수를 유지하였다. Fig. 1과 같이 *E. tarda*의 배양액 속에 항생제의 첨가 농도가 증가함에 따라 CFU가 점점 감소하였지만, 25 µg/ml 이상의 항생제 농도에서는 CFU가 거의 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. 이는 *E. tarda* 병원균이 높은 항생제 농도 속에서 일정

Table 1. List of natural plant compound used in this study

Scientific name	Used part
<i>Magnolia obovata</i>	stem-bark
<i>Alnus firma</i>	flower
<i>Panax ginseng</i>	root
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	whole Plant
<i>Mallotus japonicus</i>	fruit
<i>Cuscuta japonica</i>	whole Plant
<i>Sophora flavescens</i>	aerial part
<i>Pinus koraiensis</i>	root
<i>Magnolia obovata</i>	leaf
<i>Orixa japonica</i>	leaf,stem,flower

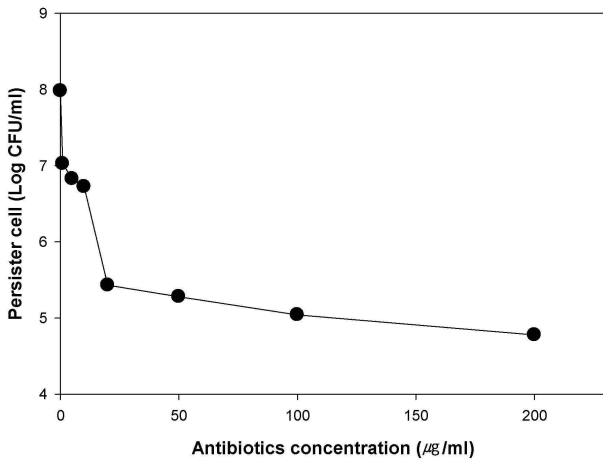


Fig. 1. Persister cell formation *E. tarda* after the infection and the treatment of florfenicol and amonicillin in the range of 1 to 200 µg/ml incubated for 16 hr at 30°C.

하게 유지되는 것으로 보아 항생제 농도의 증가와는 관계 없이 일정한 CFU를 유지하는 persister cell 구간을 형성하는 것으로 판단된다[7].

식물 추출물 첨가에 의한 *E. tarda* 성장 곡선

10종의 식물 추출물(Table 1)을 단독으로 첨가하여 배양하였을 때 *E. tarda* 병원균의 성장곡선을 비교하였다. 이는 항생제에 식물 추출물을 첨가하였을 때 특이적인 persister cell의 저감 효과를 알아보기 위해 항균 효과가 없는 식물 추출물을 선별하였다. 그 결과 Fig. 2D의 돌외(*G. pentaphyllum*), Fig. 2E의 예덕나무(*M. japonicas*), Fig. 2J의 상산(*O. japonica*)에서 나타난 바와 같이 대조군인 *E. tarda* 성장곡선과 단독으로 식물 추출물을 첨가한 실험군의 성장곡선에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며, 이는 식물 추출물 자체로는 항균 효과가 없다는 것을 나타내고 있으므로 이것들의 persister cell 저감 효과를 확인하였다.

항생제와 식물 추출물 혼합액의 persister cell 저감 효과 확인

기존에 알려진 식물 추출물과 항생제의 병용에 대한 연구들은 대부분 항균효과가 있는 식물 추출물을 사용하여 병원균의 저감 효과를 확인하였으나[8], 본 연구에서는 persister cell의 특이적인 저감 효과를 확인 하기 위하여 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 선별된 항균 활성이 없는 3종의 식물 추출물을 항생제와 함께 사용하였다. 그 결과, 돌외와 예덕나무가 100 µg/ml, 상산은 200 µg/ml의 농도에서 persister cell의 사멸 효과를 나타내었다. 이는 첨가한 3종의 식물 추출물이 항생제에 의해 형성된 persister cell의 저감 효과를 향상시키는 것이라 판단된다.

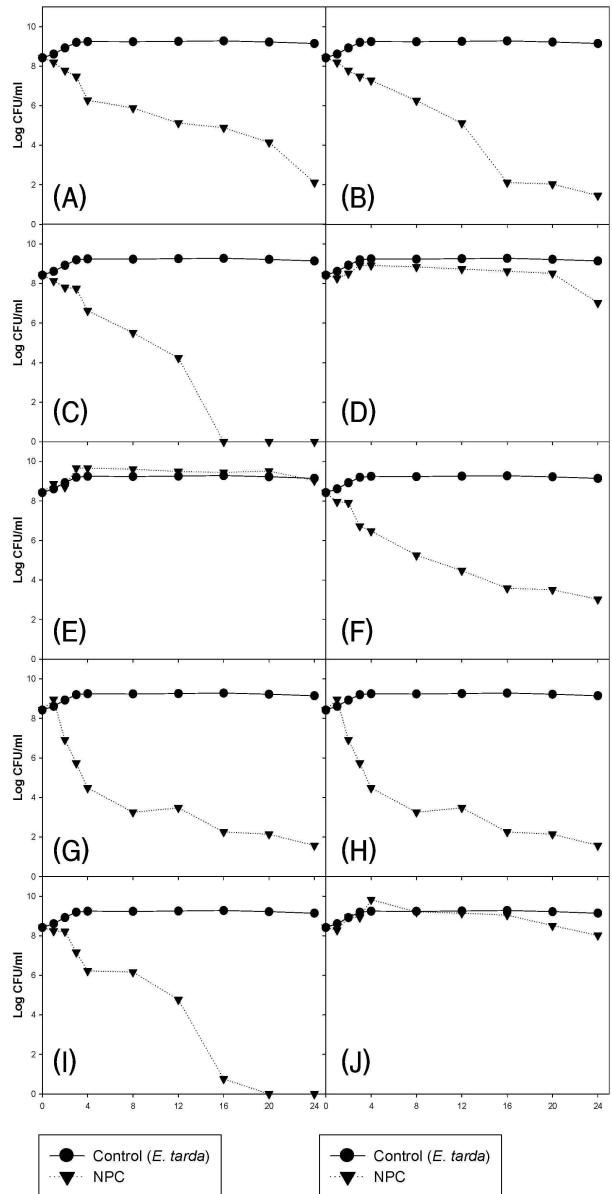


Fig. 2. Cell growth of *E. tarda* treated with natural plant compounds at 30°C in shaking incubator. (A) *M. obovata*, (B) *A. firma*, (C) *P. ginseng*, (D) *G. pentaphyllum*, (E) *M. japonicas*, (F) *M. japonicus*, (G) *S. flavescens*, (H) *P. koraiensis*, (I) *M. obovata*, (J) *O. japonica*

시간에 따른 persister cell 저감 효과 확인

Fig. 4에 나타난 바와 같이 항생제와 선별된 3종의 식물 추출물들을 시간의 경과에 따라 감소 효과를 확인하였다. Persister cell의 저감효과는 3종의 식물 추출물들 전부 16시간 만에 완전한 사멸이 일어났으며, 그 저감 효과는 4~12 시간에서 감소 차이를 보였다. 즉, 돌외와 예덕나무의 경우 8시간 이후부터 저감 효과가 나타났고, 상산의 경우 2시간 이

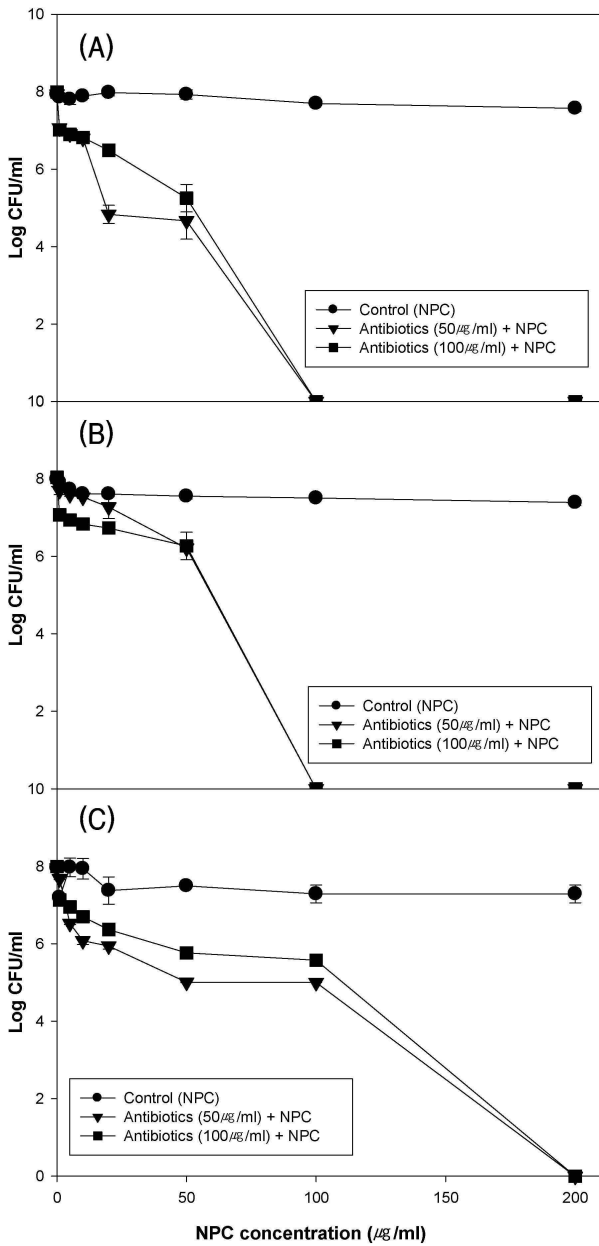


Fig. 3. Effect of natural plant compounds with antibiotics to kill persister cells in shaking incubator for 16 hr at 30°C. (A) *G. pentaphyllum*, (B) *M. japonica*, (C) *O. japonica*; NPC=natural plant compound

후부터 persister cell의 저감 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

넙치를 이용한 *E. tarda*의 persister cell 저감을 위한 *in vivo* test

*In vitro* test를 통해 식물 추출물과 항생제를 병용하여 persister cell 저감 효과가 확인된 3종의 식물 추출물을 이용하여 넙치를 이용한 12일간의 누적 폐사율을 조사하였다. 그 결

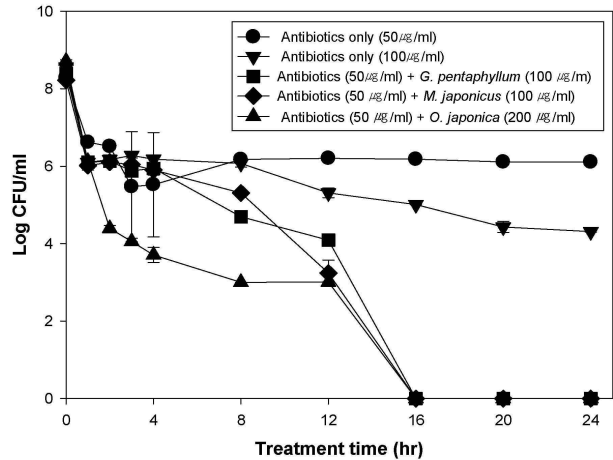


Fig. 4. Time dependent killing effect of *E. tarda* with the addition of natural plant compounds in incubated at 30°C with shaking.

과, 식물 추출물과 항생제 혼합액의 복강 투여구가 항생제 단독의 복강 투여구 보다 낮은 누적 폐사율이 나타났고, 항생제에 첨가한 식물 추출물의 농도가 30 µg/ml, 예덕나무 10 µg/ml, 상산 10 µg/ml 농도 투여구에서 가장 낮은 누적 폐사율이 관찰되었다(Fig. 5). 또한 식물 추출물의 복강 투여구 농도에서 대조구와 비슷한 생존율을 나타내어, 본 연구에 사용된 식물 추출물 농도는 어체에 독성이 없다고 판단되었다. 또한 Yoshicawa 등[19]의 논문에서 본 연구에 사용된 3종의 식물 추출물 농도보다 높은 농도로 복강 투여하였을 경우 간 활성화에 악영향을 주는 것이 아니라 오히려 투여했을 때 혈청에서 antibody 생산이 증가하였고 비장세포에서 분비되는 cytokine도 증가하는 것으로 나타났다. 예덕나무는 급성, 아급성 및 만성 독성 시험에서 독성을 나타내지 않는 것으로 보고되고 있으며[15], 상산에 관한 독성 시험은 열매 중간 종자에 독성이 있다고 알려져 있는 것과 달리 본 연구에 사용된 잎, 뿌리, 꽃 부위에서는 독성이 없는 것으로 판단된다.

본 연구의 결과 식물 추출물과 항생제 혼합액이 *E. tarda* 병원균으로 인한 폐사율을 감소 시키고, persister cell 형성을 저해하여 넙치의 생존율을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 연구에 사용된 세가지 추출물인 돌의, 예덕나무, 상산은 항균 활성을 가지지 않은 농도에서 항생제와 병용하여 persister cell의 저감 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 질병 예방 및 치료 등의 목적으로 항생제 사용량을 획기적으로 감소시킴으로서, 내성균의 증가와 어체 내 잔류 항생제로 인한 숙주 생물의 부조화 등의 부작용을 감소시켜, 동물 내 잔류 및 내성균의 출현을 방지할 수 있는 새로운 가능성을 제시한 결과라 판단된다. 향후 추출물과 항생제에 의한 persister cell 저감 효과의 메커니즘을 명확히 규명하여 어류양식 또는 축산업에 관한 산업적인 응용 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.

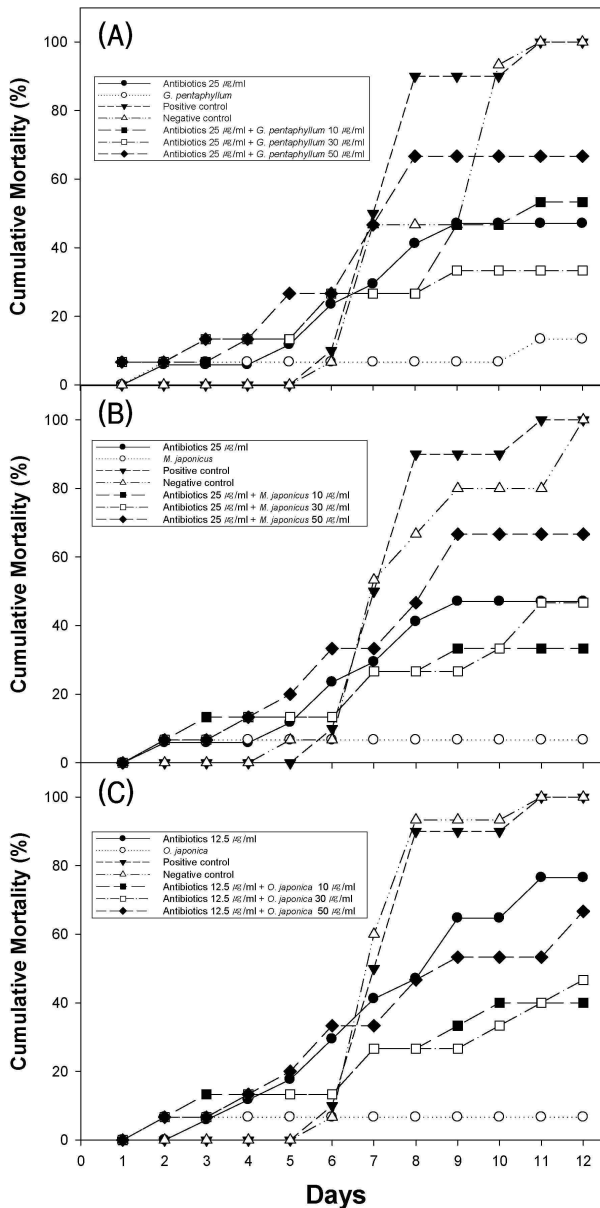


Fig. 5. The cumulative mortalities in olive flounder injected three natural plant compounds with antibiotics after the challenge with *E. tarda* at  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . (A) *G. pentaphyllum*, (B) *M. japonica*, (C) *O. japonica*

### 감사의 글

본 연구는 2010년도 농림수산식품부에서 지원하는 수산실용화기술개발사업(110082-3)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 대학원생(김나경) 지원의 Brain Busan 21 program에 감사드립니다.

### References

1. Ahn, Y. S., Shin, D. H., Baek, N. I., Seong, R. S. and Woo,

- G. J. 2001. Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substance from *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 271-277.
2. Al-Dhaheri, R. S. and Douglas, L. J. 2008. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1884-1887.
3. Bigger, J. W. 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* **244**, 497-500.
4. Choi, S. H. and Kim, K. H. Generation of two auxotrophic genes knock-out *Edwardsiella tarda* and assessment of its potential as a combined vaccine in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). 2011. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **31**, 58-65.
5. Choi, S. H., Nam, Y. K. and Kim, K. H. 2010. Novel expression system for combined vaccine production in *Edwardsiella tarda* ghost and cadaver cells. *Mol. Biotechnol.* **46**, 127-133.
6. Heo, J. H., Jung, M. H., Cho, M. H., Kim, G. H., Lee, J. Y., Yang C. B. and Shin, H. C. 2002. The study on fish diseases with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeognam. *J. Vet. Clin.* **19**, 19-22.
7. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. and Lewis, K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Letters* **230**, 13-18.
8. Kim, E. H. and Rhee, G. J. 1999. Activities of ketonic fraction from *Leptospermum scoparium* alone and synergism in combination with some antibiotics against various bacterial strains and fungi. *Yakhak Hoeji* **43**, 716-728.
9. Kim, J. S., Rho, S. and Heo, M. S. 2001. Spatial and temporal occurrence of *Edwardsiella tarda* at flounder farms in jeju. *Kor. J. Environ. Biol.* **19**, 173-181.
10. Kusuda, R. and Kawai, K. 1998. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.* **33**, 221-227.
11. Kuwahara, M., Kawanishi, F., Komiya, T. and Oshio, H. 1989. Dammarane saponins from *Gynostemma pentaphyllum* Makino and isolation of malonylginsenosides-Rb1, -Rd, and malonylgypenoside V. *Chem Pharm. Bull.* **37**, 135-139.
12. Lewis, K. 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 48-56.
13. Lim, H. K., Kim, H. S. and Choi, H. S. Protective and therapeutic effects of *Malloti cortex* extract on carbon tetrachloride- and galactosamine-induced hepatotoxicity in Rats. *Biomol. Ther.* **7**, 35-43.
14. Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G. and Gerdesa, K. 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 13206-13211.
15. Roberts, M. E. and Stewart, P. S. 2005. Modeling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* **151**, 75-80.
16. Saijo, G., Nonaka, G. and Nishioka, I. 1990. Gallic acid esters of bergenin and norbergenin from *Mallotus japonicus*. *Phytochem. Lett.* **29**, 267-270.
17. Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A. B., Kaldalu, N., Kurg, K. and Lewis, K. 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* **6**, 53-61.
18. Yoo, M. H., Jeong, J. B., Kim, E. H., Lee, H. H. and Jeong,

H. D. 2002. Application of a new conjugation method to fish pathogenic bacteria containing R plasmid for the analysis of drug-resistant status in aquaculture. *J. Fish Sci. Technol.* **35**, 115-121.

19. Yook, C. S. 1990. *Coloured Medicinal Plants of Korea*, pp. 576, Academy Book Co. Korea.

초록 : 천연 식물 추출물 첨가에 의한 어류 에드워드증(*Edwardsiellosis*) 발생균인 *Edwardsiella tarda*에 항생제 투여로 생성되는 persister cell 저감 효과

김나경<sup>1</sup> · 권대혁<sup>2</sup> · 김성구<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부경대학교 생물공학과, <sup>2</sup>성균관대학교 유전공학과)

본 연구는 어류 병원균의 비 유전성을 가지는 항생제 내성균인 persister cell에 관한 연구이다. Persister cell은 기존의 항생제를 분해하는 저항균체(resistant cell)와는 다른 특성으로 항생제에 대한 저항성을 가지는데, 항생제가 존재하는 환경에서 새로운 기작으로 항생제에 대한 내성을 형성한다. 그래서 기존의 양식장에서 어류를 키울 때 어류에 투여하는 항생제는 일반적인 균주의 사멸 항생제 농도보다 더 높은 농도의 항생제를 투여하게 된다. 특히, *E. tarda*에 대한 다양한 항생제가 개발되어 있지만 내성균의 출현으로 그 효과가 좋지 않으며, 또한 persister cell에 의한 질병 재발을 방지하기 위해 균사멸 농도보다 훨씬 높은 농도의 항생제를 처리하고 있다.

Persister cell의 특이적인 저감 효과를 확인 하기 위하여 선별된 3종의 식물 추출물(돌외, 예덕나무, 상산)을 항생제와 함께 사용하였으며, 돌외와 예덕나무가 100 µg/ml, 상산은 200 µg/ml의 농도에서 persister cell의 사멸 효과를 나타내었다. 또한 넙치를 이용한 12일간의 누적 폐사율을 조사한 결과, 식물 추출물과 항생제 혼합액의 복강 투여구가 항생제 단독의 복강 투여구 보다 낮은 누적 폐사율이 관찰되었고, 항생제에 첨가한 식물 추출물의 농도가 돌외 30 µg/ml, 예덕나무 10 µg/ml, 상산 10 µg/ml의 농도 투여구에서 가장 낮은 누적 폐사율을 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용된 세가지 추출물들(돌외, 예덕나무, 상산)은 항균 활성을 가지지 않은 농도에서 항생제와 병용하여 persister cell의 저감 효과가 있음을 확인하였다.