

Effect of Sub-Minimal Inhibitory Concentration Antibiotics on Morphology of Periodontal Pathogens

Ye Won Kwon and Si Young Lee*

Department of Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

(received May 08, 2014; revised Jun 04, 2014; accepted Jun 04, 2014)

Minimal inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of antibiotics that inhibits the visible growth of a microorganism. It has been reported that sub-MIC of antibiotics may result in morphological alterations along with biochemical and physiological changes in bacteria. The purpose of this study was to examine morphological changes of periodontal pathogens after treatment with sub-MIC antibiotics. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Porphyromonas gingivalis* were used in this study. The MIC for amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin, and tetracycline were determined by broth dilution method. The bacterial morphology was observed with bright field microscope after incubating with sub-MIC antibiotics. The length of *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* were increased after incubation with metronidazole; penicillin and amoxicillin. *P. gingivalis* were increased after incubating with metronidazole and penicillin. However, *F. nucleatum* showed decreased length after incubation with doxycycline and tetracycline. In this study, we observed that sub-MIC antibiotics can affect the morphology of periodontal

pathogens.

Key words: antibiotic, anaerobe, morphology, MIC

서론

사람에서 발병하는 치주질환은 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, 그리고 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*와 같은 그람음성균이 주요 원인균으로 작용한다[1,2]. 항생제 사용은 치주질환의 일반적인 치료방법으로 흔하게 사용되는 치료법이다[3]. 항생제의 최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)는 세균의 증식을 억제하는 항생제의 최소농도를 의미하는데, 이러한 항생제의 최소억제농도 이하의 농도(sub-MIC)는 세균을 죽이거나 증식을 억제하지는 못하지만 다양한 미생물에서 형태적, 초 미세구조적 변화와 생화학적 특성, 부착특성을 포함한 여러 가지 특성에 영향을 미친다는 것이 널리 알려져 있다[4].

몇 가지 연구에서 항생제의 sub-MIC가 세균에 미치는 여러 가지 영향 중, sub-MIC가 유도하는 형태변화 대한 연구가 다양한 종류의 세균에서 보고되었다. Souza 등의 연구에서 β -lactam계 항생제의 sub-MIC가 *F. nucleatum*의 형태변화를 유도한다고 보고했고[5], Fonseca 등의 연구에서 또한, *P. aeruginosa*에 β -lactam계 항생제의 sub-MIC농도로 처리했을 때, 세균의 형태가 변하는 것을 보고하였다[6]. Silvestro 등의 연구에서는 *Bacteroides fragilis*가 clindamycin에 노출되었을 때, 일부 집단에서

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea.
Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410,
E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

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.

세포의 길이가 늘어나는 것을 광학현미경으로 관찰하여 보고했다[7]. 이와 같이 sub-MIC 항생제가 세균에 미치는 다양한 효과에 대한 연구가 많이 이루어져 있지만, sub-MIC 항생제가 구강 치주병원균에 형태적으로 미치는 효과에 관한 연구는 아직 많지 않다.

본 연구에서는 여러 종류의 sub-MIC 항생제가 그람 음성 치주병원성 세균인 *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* 그리고 *P. gingivalis*에 형태적으로 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양조건

본 연구에서는 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *F. nucleatum* ATCC 23726 그리고 *P. gingivalis* ATCC 33277를 사용하였다. 이 균주들은 조선대학교 치과대학의 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 무료로 분양을 받았다. 세균 배양을 위하여 *A. actinomycetemcomitans*는 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체배지를 사용하였고, *F. nucleatum* 과 *P. gingivalis*는 trypticase soy broth (Becton, Dickinson and Company)에 yeast extract (Becton, Dickinson and Company) 1 mg/ml, hemin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5 µg/ml과 menadione (Sigma Chemicals Co.) 1 µg/ml을 첨가한 배지를 사용하였다. 모든 균주는 90% N₂, 5% CO₂, 5% H₂를 포함하는 혐기성 환경(Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc. Cornelius, Oregon, USA)에서 배양되었다. 세균 현탁액은 spectrophotometer (Smart Plus 2700; Young-woo inst., Seoul, Korea)를 사용하여 탁도를 측정하였으며 미리 결정해놓은 표준곡선에 적용하여 세균 수를 정량하였다.

항생제 최소 억제 농도(MIC)의 측정

실험 균주에 대한 항생제의 MIC는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 권고하는 액체배지 희석법으로 측정하였다[8]. 실험에 사용된 항생제는 치과 영역에서 사용되고 있는 amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin 그리고 tetracycline (Sigma Chemical Co.)을 사용하였고, 항생제의 stock 용액은 pore size가 0.22µm 필터(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과 한 후 사용하였다. 최소억제농도(MIC)는 유리 시험관을 이용한 two-fold serial macro-dilution 법으로 측정하였다. 즉 혐기성세균 배양기에 2일 이상 prereduce 시킨 배양 배지에 항

생제를 1/2 연속 희석한 후 세균을 5 x 10⁵ cells/ml가 되게 접종하고 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*는 72시간, *A. actinomycetemcomitans*는 24시간 배양 후 육안으로 세균 성장이 억제된 최소항생제 농도를 측정하였다. 각 항생제의 측정 농도 범위는 0.002 µg/ml에서 1024 µg/ml였다.

세균 형태 관찰

Sub-MIC 항생제가 세균 형태에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 세균을 1/2 x MIC 또는 1/8 x MIC농도의 항생제가 포함된 액체배지와 항생제가 포함되지 않은 액체배지에 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*는 72시간, *A. actinomycetemcomitans*는 24시간 배양하였다. 세균 배양액은 phosphate-buffered saline (PBS)을 사용하여 원심분리(14,000 xg)로 2회 세정하였다. 이렇게 얻은 세균 현탁액을 slide glass에 도말하고 crystal violet으로 염색한 뒤, 광학현미경(NiKon, E400, Japan)을 사용하여 1,000 x 배율에서 관찰하였다. 세균의 크기는 Nikon NIS-Element software (DS-Fi2, Nikon)을 이용하여 측정하였으며, 각 세균의 길이는 광학현미경으로 관찰한 하나의 필드에서 각각 20개의 세균을 무작위로 선택하여 측정된 값의 평균을 이용하여 길이 변화를 조사하였다.

통계 분석

각 항생제의 sub-MIC가 처리된 세균과, 처리가 되지 않은 세균의 전체적인 길이 차이를 통계학적으로 확인하기 위하여 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis 법을 사용하였다(유의확률 $p < 0.05$). Mann-Whitney 법은 항생제 sub-MIC의 각 농도인 1/2 x MIC와 1/8 x MIC 농도에서 배양한 세균을 각각 아무런 처리를 하지 않은 세균과 비교했을 때, 각 sub-MIC농도의 항생제가 세균의 길이에 어떤 영향을 미치는지 통계적으로 확인하기 위하여 수행하였다(유의확률 $p < 0.05$). 통계분석은 Software Package for Social Sciences (SPSS, version 20.0, IBM Inc., USA)를 사용하여 수행하였다.

결과

항생제의 MIC측정

A. actinomycetemcomitans, *F. nucleatum* 그리고 *P. gingivalis*의 macro-dilution 법에 의해 측정된 MIC는 Table 1에 나타내었다. *A. actinomycetemcomitans*는 amoxicillin, doxycycline, penicillin, tetracycline에 대한 MIC보다 metronidazole에서 훨씬 높은 MIC값이 관찰되었다. 또한, amoxicillin과 penicillin의 MIC값은 다른 두 종인 *F.*

Table 1. The minimal inhibitory concentrations of antibiotics

Antibiotic	MIC (µg/ml)		
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	<i>F. nucleatum</i> ATCC 23726	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277
Amoxicillin	0.250	0.031	0.031
Doxycycline	0.063	0.031	0.031
Metronidazole	4.000	0.016	0.031
Penicillin	0.500	0.008	0.031
Tetracycline	0.063	0.063	0.016

*nucleatum*과 *P. gingivalis*보다 높게 관찰되었다. *F. nucleatum*에서 penicillin의 MIC값은 다른 항생제의 MIC값보다 낮게 관찰되었다.

Sub-MIC 항생제가 세균형태에 미치는 영향

A. actinomycetemcomitans

광학현미경을 이용하여 각 항생제의 sub-MIC에서 배양한 *A. actinomycetemcomitans*의 형태를 관찰한 결과 sub-MIC의 amoxicillin에서는 세균의 면적이 전체적으로 증가하는 것을 보여주었으며, sub-MIC의 penicillin과 metronidazole에서 배양된 세균의 길이가 늘어나는 것이

관찰되었다(Fig. 1). 이런 길이변화의 차이는 통계적으로 유의하게 확인되었다($p < 0.05$). 그러나, doxycycline과 tetracycline에서는 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다. Penicillin과 metronidazole은 모든 sub-MIC농도에서 *A. actinomycetemcomitans*의 길이가 항생제를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의하게 길어지는 것을 확인하였다($p < 0.05$). Amoxicillin은 1/2 x MIC에서만 항생제를 처리하지 않은 대조군에 비해 *A. actinomycetemcomitans*의 형태변화에 유의한 차이를 나타내는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

F. nucleatum

광학현미경을 이용하여 각 항생제의 sub-MIC에서 배양한 *F. nucleatum*의 형태를 관찰한 결과 amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin 그리고 tetracycline의 sub-MIC에서 세균의 길이 변화가 관찰되었다(Fig. 2). 이런 길이변화의 차이는 통계적으로 유의하게 확인되었다($p < 0.05$). Sub-MIC농도의 amoxicillin, penicillin, metronidazole에서 배양된 *F. nucleatum*은 세균의 길이가 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, doxycycline과 tetracycline의 sub-MIC는 세균의 길이를 감소시켰다. 또한, sub-MIC 항생제가 유도하는 *F. nucleatum*의 형태변화는 sub-MIC 농도에 의존적 이었다. 세균의 길이변화는 세균이 항생제의 더 높은 농도에서 배양될수록 명확하게 관찰되었다. 사용한 항생제의 모든 sub-MIC농도에서 *F. nucleatum* 길이가 항생제를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의하게 변화하는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

P. gingivalis

각 항생제의 sub-MIC에서 배양한 *P. gingivalis*의 형태를 관찰한 결과 sub-MIC의 penicillin과 metronidazole에서 배양된 세균의 길이가 길어지는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 이런 길이변화의 차이는 통계적으로 유의하게 확인되었다($p < 0.05$). 그러나, amoxicillin, doxycycline 그리고 tetracycline에서는 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다. 사용한 metronidazole의 모든 sub-MIC농도에서 *P. gingivalis*

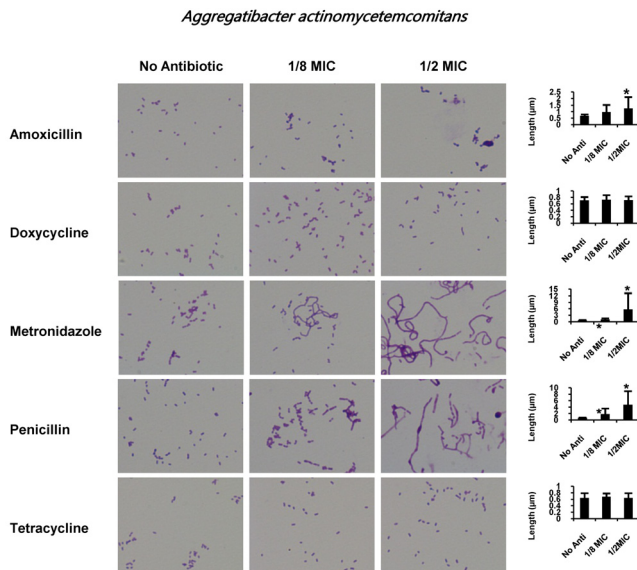


Fig 1. The effect of sub-MIC antibiotics on bacterial morphology of *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384. The bacteria were incubated with sub-MIC antibiotics and the bacterial morphology was observed with light microscope (x1000). The length of bacteria was determined with Nikon NIS-Element software and shown in right side of figure. The values are the means of measurements of twenty individual bacterial cell and the error bars indicate standard deviations of the mean. * Statistically significant compared with untreated control bacteria ($p < 0.05$).

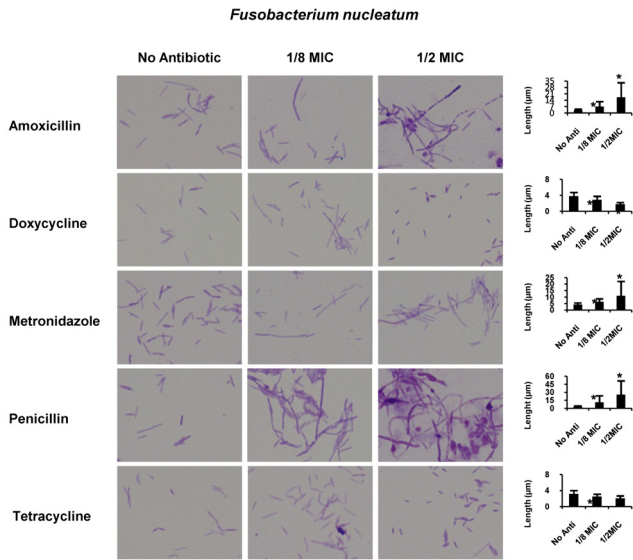


Fig 2. The effect of sub-MIC antibiotics on bacterial morphology of *F. nucleatum* ATCC 23726. The bacteria were incubated with the sub-MIC antibiotics and bacterial morphology was observed with light microscope (x1000). The length of bacteria was determined with Nikon NIS-Element software and shown in right side of figure. The values are the means of measurements of twenty individual bacterial cell and the error bars indicate standard deviations of the mean. * Statistically significant compared with untreated control bacteria ($p < 0.05$).

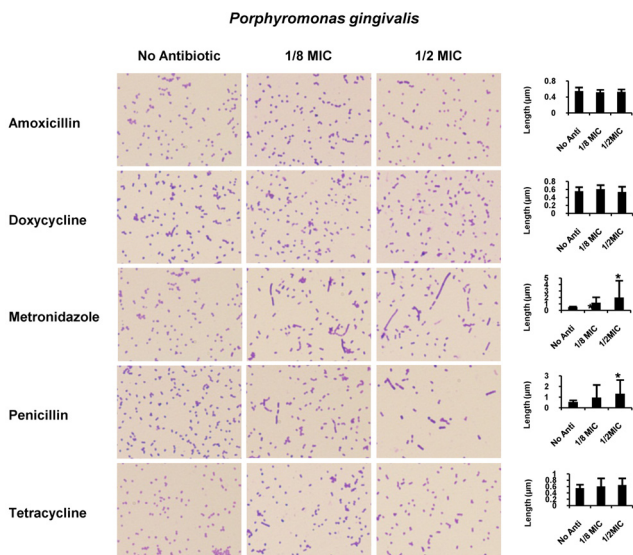


Fig 3. The effect of sub-MIC antibiotics on bacterial morphology of *P. gingivalis* ATCC 33277. The bacteria were incubated with sub-MIC antibiotics and the bacterial morphology was observed with light microscope (x1000). The length of bacteria was determined with Nikon NIS-Element software and shown in right side of figure. The values are the means of measurements of twenty individual bacterial cell and the error bars indicate standard deviations of the mean. * Statistically significant compared with untreated control bacteria ($p < 0.05$).

의 길이가 항생제를 처리하지 않은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 길어지는 것을 확인하였다($p < 0.05$). Penicillin은 1/2 x MIC에서만 항생제를 처리하지 않은 대조군에 비해 *P. gingivalis*의 길이가 통계적으로 유의하게 길어지는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

고찰

항생제는 치태로부터 발생하는 대표적인 감염성 구강 질환 중 한가지인 치주질환의 치료를 위해 보조적으로 사용된다[9]. 항생제를 불규칙적으로 복용하는 것은 항생제의 농도가 서서히 감소하여 sub-MIC에 도달하는 기간을 유발하기 때문에 구강 세균에 대한 항생제 sub-MIC 효과에 관한 연구가 필요하다.

항생제의 sub-MIC는 세균의 증식을 억제하거나 죽이지는 못하지만 세균의 병독성에 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다[10]. 다양한 β -lactam계 항생제의 sub-MIC는 *Escherichia coli*에서 리보솜의 수와 분포를 포함한 세균의 초 미세구조의 변화와, 세포벽의 형태변화 및 신장과 확장을 유도한다고 보고되는 등[11], 항생제의 sub-MIC는 다양한 세균에서 형태 및 초미세구조에서의 변화, 생화학적 특성의 변화와 부착능력에서의 변화 등을 포함하는 여러 가지 효과를 나타낸다[4] 이러한 효과는 항생제의 농도가 MIC나 Minimal Bactericidal Concentration (MBC)에 도달한 이후부터 특정한 시간 동안 주변조직 사이에서 발생하는 항생제-세균 상호작용의 변화를 야기하기 때문에 치료적으로 중요한 의미를 지닐 수 있다.

항생제 sub-MIC의 여러 가지 효과 중 형태변화와 관련하여, 일부 항생제는 직간접적으로 세균의 단백질 합성과정을 변화시켜 그람음성 막대균의 길이를 길게 유도하거나 방추형의 형태를 유도한다고 알려져 있다[12]. Sub-MIC의 imipenem과 piperacillin/tazobactam을 사용하여 *Pseudomonas aeruginosa*중의 형태변화를 연구한 논문에서, imipenem은 1/2 x MIC에서 *P. aeruginosa*를 원래 모양보다 짧고 둥근 모양을 유도하였고, piperacillin/ tazobactam은 1/2 x MIC에서 *P. aeruginosa*의 길이가 길게 유도되는 것을 관찰하였다[6]. 또한, sub-MIC의 florfenicol[13]과 chloramphenicol[14]은 *Staphylococcus aureus*의 세포벽을 두껍게 유도한다고 보고되었다.

치주병원균인 *F. nucleatum*를 사용한 Souza 등의 이전 연구에서 세균의 형태변화가 ampicillin, ampicillin-sulbactam 그리고 piperacillin-tazobactam를 포함하는 β -lactam계 항생제에서 발생했으며, 이 항생제들이 세균의 길이를 길어지게 하고, 평균 세균 면적을 22배 이상 증가시키는 것을 관찰하

었다. 반면에, chloramphenicol, levofloxacin, metronidazole, clindamycin과 같은 항생제에서는 약간의 변화만이 관찰되었다고 보고했다[5].

우리의 연구에서도 β -lactam계 항생제로 amoxicillin과 penicillin을 사용했지만, penicillin에서만 실험에 사용된 모든 세균의 형태가 급격하게 변하는 것을 관찰하였다. Amoxicillin은 *F. nucleatum*에서만 급격한 형태변화를 유도했으며, *A. actinomycetemcomitans*에서는 세균의 두께를 약간 증가시키는 것이 관찰되었다. 반면에, metronidazole에서는 세균주 모두에서 형태변화를 유도하는 것이 관찰되었다. 결과적으로 실험에 사용된 모든 항생제인 amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin 그리고 tetracycline의 sub-MIC가 *F. nucleatum*의 형태변화를 유도하는 것을 관찰하였고, *A. actinomycetemcomitans*는 amoxicillin, penicillin 그리고 metronidazole의 sub-MIC에서 형태변화가 관찰되었으며, *P. gingivalis*은 penicillin과 metronidazole의 sub-MIC에서 길이가 길어지는 것을 관찰하였다.

이렇게 항생제가 세균의 형태를 변화시키는 기작은 몇몇의 항생제에 대해서만 일부 알려져 있을 뿐이다. 그 중, imipenem이나, piperacillin/tazobactam과 같은 β -lactam계 항생제들은 몇 가지 penicillin-binding proteins (PBPs)에 친화도를 가지고 있어서 세포 표면에 변화를 유도하며[15], chloramphenicol이나 florfenicol과 같은 항생제들도 세균 세포벽 두께를 증가시키는 것은 이런 항생제가 단백질 합성 과정에서 세포벽을 구성하는 물질을 계속해서 합성하도록 유도하기 때문으로 생각된다고 보고하였다[14].

이러한 세균의 형태적 변화는 세균부착과 같은 병독성에 영향을 미친다고 알려져 있다[16]. Fonseca 등은 piperacillin/tazobactam의 sub-MIC로 유도된 세포의 형태변화가 고정상의 *P. aeruginosa*의 부착능력을 상당히 감소시키는 것을 밝혔으며[17], 항생제의 sub-MIC가 세균의 형태와 부착의 상관관계는 몇 가지 연구에서 관련성이 있는 것으로 보고가 되었지만, 세균의 형태변화가 어떻게 부착에 영향을 미치는지에 관한 구체적인 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. Sub-MIC로 유도되는 세포벽 소수성의 변화나 단백질 생성의 변화 등 세균의 형태변화가 부착에 영향을 미치는 기전은 더 세밀한 추가 연구를 통하여 밝혀져야 할 것이다.

본 연구를 통하여, sub-MIC의 항생제가 다양한 양상으로 치주질환 관련 세균의 형태학적 변화를 유도함을 보였으며, 이러한 형태변화가 세균의 병독력에 미치는 영향에 대한 추가 연구들은 선택적 항생제 치료에 대한 연구에 중요한 기반을 제공할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (2010-0025532)

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

1. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:66-77.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-187.
3. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000 1996;10:45-78.
4. Lorian V. Effects of low antibiotic concentration on bacteria: Effects on ultrastructure, their virulence and susceptibility to immunodefenses. *Antibiotics in Laboratory Medicine* 1986;2nd:493-555.
5. de Souza Filho JA, Diniz CG, Barbosa NB, de Freitas MC, Lopes Neves MS, da Gama Mazzei RN, Gameiro J, Coelho CM, da Silva VL. Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Anaerobe* 2012;18:566-575.
6. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. *J Appl Microbiol.* 2007;103:1828-1837.
7. Silvestro EM, Nakano V, Arana-Chavez VE, Marques MV, Avila-Campos MJ. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;257:189-194.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M07-A8, vol.29, no.2, 8th ed., CLSI. Wayne, PA, 2009.
9. Sbordone L, Barone A, Ramaglia L, Ciaglia RN, Iacono VJ. Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. *J Periodontol.* 1995;66:69-74.
10. Braga PC, Sasso MD, Sala MT. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45:15-25.

11. Svanborg-Ed'en C, Sandberg T, Alestig K. Decrease in adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells in vitro by subinhibitory concentrations of ampicillin. *Infection*. 1986;6:121-124.
12. Guss SP, Bawdon RE. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of cephalosporins on *Bacteroides* species. *J Antimicrob Chemother*. 1984;13:633-635.
13. Blickwede M, Valentin-Weigand P, Rohde M, Schwarz S. Effects of subinhibitory concentrations of florfenicol on morphology, growth, and viability of *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51:293-296.
14. Giesbrecht P, Ruska H. Chloramphenicol induced changes in the ultrastructure of bacteria. *Klin Wochenschr*. 1968; 46:575-582.
15. Horii T, Kobayashi M, Sato K, Ichiyama S, Ohta M. An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41:435-442.
16. Ofek I, Beachey EH, Eisenstein BI, Alkan ML, Sharon N. Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of beta-lactam and aminoglycoside antibiotics. *Rev Infect Dis*. 1979;1:832-837.
17. Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2004; 53:903-910.