

Antimicrobial Activities of Corn Silk Extract of *Klebsiella pneumoniae*

Hyun-Kyung Kang and Il Kwon Bae*

Department of Dental Hygiene, College of Health and Welfare, Silla University, Busan 46958, Korea

Received August 21, 2015 / Revised October 12, 2015 / Accepted October 13, 2015

Klebsiella pneumoniae is found in the normal flora of the skin, mouth, respiratory tract, urinary tract, and intestines in human. However, the stain is opportunistic pathogen, which is the causative agent of community acquired pneumonia. Corn silk has been known to be effective for antimicrobial activity against pathogenic bacteria, including *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et al. In this study we focused on the antimicrobial properties of con silk water extract of *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* isolates *K. pneumoniae* ATCC 13883 and broad-spectrum β -lactamase (BSBL), extended-spectrum β -lactamase (ESBL), carbapenemase-producers. Antimicrobial susceptibilities were determined by the disk diffusion method. Searches for *bla* genes were performed by PCR amplification and direct sequencing. MacConkey agar plate medium was prepared using the corn silk extracts (50% or 100%) instead of distilled water for antimicrobial activity test. The microbial growth inhibitory potential of *K. pneumoniae* was determined by using the MacConkey agar plate spreading method, and the plate was incubated 18 hr at 37°C. Genes encoding β -lactamases including SHV-1 (n=8), SHV-2a (n=8), SHV-5 (n=2), SHV-11 (n=2), SHV-12 (n=18), TEM-1 (n=10), CTX-M-3 (n=2), CTX-M-14 (n=2), CTX-M-15 (n=1), GES-5 (n=5), KPC-2 (n=6), KPC-3 (n=4), and NDM-1 (n=2) were detected. The corn silk extract showed significantly antimicrobial activity against *K. pneumoniae* ATCC 13883, but BSBLs, ESBLs, and carbapenemase producers were not. Therefore, corn silk extract is thought to be able to assist in the prevention and rapid recovery of infectious disease caused by *K. pneumoniae*.

Key words : Antimicrobial activity, corn silk extract, growth inhibitory potential, *Klebsiella pneumoniae*, pathogenic bacteria

서 론

지역사회 획득 폐렴은 항균제 처방에 의한 치료에도 불구하고 환자의 사망확율이 10%가 넘는 감염성 질환 가운데 가장 흔한 사망원인군이다[15]. 또한 2012년도 국내에서 폐렴으로 인한 사망자수는 인구 10만 명당 10,341명으로 전체 3.9%를 차지하였으며 10년 전에는 사망원인 순위 12위였으나 6위로 상승하였다. 이는 국내 10대 사망원인에서 감염으로 인한 사망 중 1위에 해당된다. 또한 전년 대비 남성은 9위에서 7위, 여성은 6위에서 5위로 사망률이 각각 상승하였다[10].

지역사회 획득 폐렴의 주요 원인균은 그람양성균에 *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, 그람음성균에 *Klebsiella pneumoniae*와 *Haemophilus influenza* 등이 있으며, 그 밖에 주로 소아 청소년기 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma pneumoniae*가 있다[1]. 이 가운데 *K. pneumoniae*는 하수, 토양, 식물

의 껍질에서 사람, 말, 돼지 등 포유류의 피부까지 우리의 주변 환경에 흔히 존재하는 세균으로 지역사회 획득 폐렴뿐 아니라 화농성 감염증과 알코올중독증 환자에서 폐렴을 유발하는 것으로 알려져 있다[6]. 이 세균은 대부분 병원내 감염증의 원인균이고 소아당뇨나 만성폐쇄성질환 등을 앓고 있는 면역저하 환자에게 기회감염증을 일으키는 균으로 알려져 있다[5, 19]. 미국의 질병관리통계센터(CDC)의 보고에 따르면 *Klebsiella* 감염증은 전체 병원감염증의 3-7%를 차지하며, 이러한 현상은 영국이나 독일에서도 유사하다[21]. *Klebsiella*는 병원감염증 중 요로감염증의 6-17%, 폐렴의 7-14%, 패혈증의 4-15%, 창상 감염의 2-4%, 중환자실 환자 감염의 4-17% 및 신생아 패혈증의 3-20%의 원인이 되는 것으로 보고되었다[4, 14].

*K. pneumoniae*는 종 특이적 염색체성 SHV (sulfhydryl reagent variable)형, LEN (*Klebsiella pneumoniae* strain LEN-1)형 또는 OKP (Other *Klebsiella pneumoniae* β -lactamase)형 broad-spectrum β -lactamase를 생성하므로 ampicillin, amoxicillin, carbenicillin, ticarcillin 등 penicillin계 항균제에 자연 내성이다[13]. 따라서 이 세균의 감염증 치료시 광범위 β -lactam 항균제인 oxyimino-cephalosporins가 널리 사용되고 있다.

옥수수 수염(*Zea mays* silk)은 강혈당, 토혈, 지혈, 비출혈, 평간, 설열, 각기, 축농증, 이담작용 및 이뇨작용을 하는 것으

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5430, Fax : +82-51-999-5707

E-mail : ikbae@silla.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.

로 알려져 있고 일부의 보고에서는 식중독의 주요 원인균으로 알려진 *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* 등에 항균활성이 있는 것으로 확인되어 식품의 향료 및 첨가물로 활용되기도 한다[4, 13, 18]. 하지만 옥수수 수염 추출액 혹은 그 성분이 *K. pneumoniae*에 대한 항균활성 여부를 밝힌 보고는 드물다.

이에 본 연구에서는 미국 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)의 항균제 감수성 검사의 표준균주인 *Escherichia coli* ATCC 25922균주[7]와 *K. pneumoniae* ATCC 13883균주 및 임상에서 분리된 세균들을 대상으로 옥수수 수염 추출액의 항균효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

옥수수 수염 추출액

추출액의 제조는 건조된 옥수수수염 218.2 g을 전기약탕기에 1차 증류수 2,000 ml를 넣고 물의 양이 반으로 이 될 때까지 가열한 후, 추출액을 filter paper (Adantec No.2, Japan)를 이용하여 감압여과하였다.

실험균주 및 배양

본 연구를 위하여 *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883 각 1주와 임상에서 분리된 항균제 내성 *K. pneumoniae* 30주를 대상으로 하였다(Table 1). 항균제 내성세균 30주는 본 연구팀이 수집한 것으로 이들이 생성하는 효소는 broad-spectrum β -lactamase (BSBL)인 SHV-1 (n=1), extended-spectrum β -lactamase (ESBL)인 SHV-2a (n=2), SHV-12 (n=5), CTX-M-14 (n=1), CTX-M-15 (n=1), CTX-M-3과 SHV-12 동시생성균주(n=2), CTX-M-14와 SHV-12 동시생성균주(n=1)였으며 carbapenemase인 GES-5 (n=5), KPC-2 (n=6), KPC-3 (n=4), NDM-1 (n=2)이었다. 대상 균주의 균종은 MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) 및 16S rRNA 염기서열 분석으로 동정하였다.

시험 균주를 36°C 항온기에서 18시간 진탕배양 한 후, 새로운 배지에 1% 접종하여 탁도가 McFarland No. 0.5가 될 때까지 재배양하였으며, 배양액을 10³배와 10⁴배 희석한 후, 평판배지에 도말배양하고 다시 36°C 항온기에서 18시간배양하여 균주의 집락생성 여부를 확인하였으며 이를 3회 반복실험 하였다.

배지의 제조

평판배지는 pancreatic digest of gelatin 17.0 g, peptone 3.0 g, lactose 10.0 g, bile salt 1.5 g, sodium chrolide 5.0 g, agar 13.5 g, neutral red 0.03 g, crystal violet 0.001 g이 포함된 powder를 멸균증류수 1,000 ml 넣고 MacConkey 한천 평판배지(BBL, Cockeysville, MI, USA)를 제조하였다. 옥수수 수염의 항균력 확인을 위해서 멸균증류수 대신 옥수수 추출액을 50%

혹은 100%를 넣어 MacConkey 한천 평판배지를 제조하였다.

항균제 감수성 시험

디스크 확산법으로 시험하였다[7]. 항균제 디스크로 ampicillin, cephalothin, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime, meropenem 및 ertapenem 디스크(BBL)를 사용하였다. 결과의 정확성을 위해 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다(Table 1).

ESBL 생성확인 시험

Double-disk synergy (DDS) 시험을 하였다[9]. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에 amoxicillin-clavulanic acid (20 μ g/10 μ g, BBL), 그 주 위에는 30 μ g의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 36°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다(Table 1).

Carbapenemase 생성확인 시험

Hodge 변법으로 carbapenemase 생성여부를 확인하였다[11]. *E. coli* ATCC 25922의 탁도를 McFarland No. 0.5로 맞추고 후 MacConkey 한천(BBL)에 고르게 접종하였다. 배지의 중앙에 ertapenem 디스크(30 μ g, BBL)를 놓은 후, 시험균주를 백금기로 디스크로부터 평판의 가장자리로 한 줄로 굵게 접종하였다. 36°C로 호기성 환경에서 18시간 배양 후 시험균주 접종선 중앙쪽 말단부가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되면 양성으로 판정하였다(Table 1).

Metallo- β -lactamase (MBL) 생성확인 시험

Lee 등[12]의 방법에 따라 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-disk synergy 시험으로 선별하였다. 즉, 순배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, tryptic soy broth 배지(BBL)에 접종하여 McFarland No. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천(BBL)에 고르게 접종한 후, EDTA 디스크(5 mM)를 가운데 두고 imipenem과 meropenem 디스크(각 10 μ g, BBL)를 양옆에 두되 가장자리 간격이 1.5 cm가 되도록 배치하였다. 세균이 접종된 배지는 36°C 항온기에 18시간배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

내성유전형 확인 시험

내성 유전자를 검출하기 위한 primer는 Table 2와 같다. 시험세균의 genomic DNA 추출액 2 μ l, primer 각 1 μ l (10

Table 1. Characteristics of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates using in this study

Isolates	Antimicrobial susceptibilities test											Double-disk synergy test			EDTA synergy test		Enzymes	
	AM	CF	FOX	CAZ	CTX	IPM	MEM	ETP	synergy test	modified-Hodge test	EDTA synergy test	class A β -lactamase	class C β -lactamase	Carbapenemase				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	SHV-1						
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	R	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	SHV-12						
KSK15102	R	R	S	I	S	S	S	S	+	+	+	SHV-12						
AJK05004	R	R	S	R	R	S	S	S	+	+	+	SHV-12						
AJK05008	R	R	S	R	R	S	S	S	+	+	+	CTX-M-14						
AJK05011	R	R	I	R	R	S	S	S	+	+	+	SHV-2a						
AJK05019	R	R	S	R	S	S	S	S	+	+	+	SHV-12						
BDK05003	R	R	S	R	R	S	S	S	+	+	+	SHV-12						
BDK05007	R	R	R	R	R	S	S	R	+	+	+	SHV-12						
BDK07044	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	SHV-12		GES-5				
BDK07057	R	R	R	R	R	I	R	R	+	-	-	SHV-12		GES-5				
BDK07242	R	R	R	R	R	I	R	R	+	-	-	SHV-12		GES-5				
BDK07254	R	R	R	R	R	I	R	R	+	-	-	SHV-12		GES-5				
BDK07274	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	SHV-12		GES-5				
HYK05001	R	R	S	R	R	S	S	S	+	-	-	SHV-12, CTX-M-3						
KSK15103	R	R	R	S	R	S	I	R	+	-	-	SHV-2a, CTX-M-14						
KSK15105	R	R	R	R	R	I	R	R	+	-	-	SHV-12						
KSK15106	R	R	R	S	R	S	I	R	+	-	-	SHV-12, CTX-M-3, TEM-1						
UKP12001	R	R	R	R	R	I	I	R	+	-	-	SHV-12, TEM-1	CMY-2	KPC-3				
UKP12002	R	R	R	R	R	I	I	I	+	-	-	SHV-12, SHV-1, TEM-1		KPC-3				
UKP12003	R	R	R	R	R	I	I	R	+	-	-	SHV-12, SHV-1, TEM-1		KPC-3				
UKP12004	R	R	R	R	R	I	I	R	+	-	-	SHV-12, SHV-1, TEM-1		KPC-3				
UKP12005	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	SHV-12, SHV-1, TEM-1		KPC-2				
UKP12006	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	SHV-12, SHV-1, TEM-1		KPC-2				
UKP12007	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	SHV-11, TEM-1		KPC-2				
UKP12008	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	TEM-1		KPC-2				
UKP12009	R	R	R	R	R	I	I	I	+	-	-	SHV-1, SHV-5		KPC-2				
UKP12010	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	SHV-1, SHV-5, TEM-1		KPC-2				
UKP12110	R	R	R	R	R	R	R	R	+	+	+	SHV-11, TEM-1, CTX-M-15		NDM-1				
UKP12111	R	R	R	I	I	R	R	R	-	+	+	SHV-11		NDM-1				

Table 2. Primers used for the detection and sequencing of this study

PCR target	Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Reference
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT	[20]
	TEM-R	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA	
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	CCG GGT TAT TCT TAT TTG TCG CT	[3]
	SHV-R	TAG CGT TGC CAG TGC TCG	
<i>bla</i> _{CTX-M} (CTX-M-1 cluster)	CTX-M-1F	CCG TCA CGC TGT TGT TAG G	[2]
	CTX-M-1R	GAC GAT TTT AGC CGC CGA C	
<i>bla</i> _{CTX-M} (CTX-M-9 cluster)	CTX-M-9F	GAT TGA CCG TAT TGG GAG TTT	[3]
	CTX-M-9R	CGG CTG GGT AAA ATA GGT CA	
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GTT AGA CGG GCG TAC AAA GAT AAT	[2]
	GES-R	TGT CCG TGC TCA GGA TGA GT	
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	GTC ACT GTA TCG CCG TCT AGT TC	[2]
	KPC-R	TGG TGG GCC AAT AGA TGA TT	
<i>bla</i> _{CMY} (CMY-1 cluster)	CMY-1F	CAA CGA CAA TCC ATC CTG TG	[2]
	CMY-1R	GAG CCG GTC TTG TTG AAG AG	
<i>bla</i> _{CMY} (CMY-2 cluster)	CMY-2F	AGT AAG ACG TTT AAC GGC GTG T	[2]
	CMY-2R	TTA TGC ACC CAT GAG GCT TT	
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GCC CAA TAT TAT GCA CCC GG	[2]
	NDM-R	CTC ATC ACG ATC ATG CTG GC	

pmole)를 *Taq* DNA polymerase 1 unit/10 µl, 2X reaction buffer, 4 mM MgCl₂, enzyme stabilizer, sediment, loading dye, pH9.0의 0.5 mM 각 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP가 포함된 2X Prime Taq premix (Genetbio, Daejeon, Korea)에 혼합하여 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus Co., Norwalk, Ct., USA)으로 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30분간 annealing, 72°C에서 30분간 extension을 30회 반복 시행하였다. 증폭산물 3 µl를 1.5% agarose gel (Seakem LE agarose, FMC Bioproducts, MA, USA)에 20분간 전기영동하여 증폭산물의 유무를 확인하였다. PCR 증폭산물을 추출하여서 sequencease version 2.0 DNA sequencing kit (US biochemicals, OH, USA)를 이용하여서 양방향으로 염기서열을 분석하였다.

결 과

항균제 감수성

시험을 위해 수집한 세균을 대상으로 ampicillin, cephalothin, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime, ertapenem 및 meropenem에 대한 항균제 감수성 검사를 시행하였다. 표준균주로 사용된 *E. coli* ATCC 25922와 *K. pneumoniae* ATCC 13883은 ampicillin을 제외한 모든 항균제에 감수성을 보였으며 TEM-1, SHV-1, SHV-11 등 BSBL만 생성하는 균주는 ampicillin과 cephalothin 항균제를 제외한 모든 항균제에 감수성을

보였다. CMY-1, -2 및 FOX-1을 생성하는 세균은 ampicillin, cephalothin 및 cefoxitin에 내성을 보였고 SHV-2a, -5, -12 및 CTX-M형 ESBL을 생성하는 균주는 ampicillin, cephalothin, ceftazidime, cefotaxime 등에 내성을 보였다. 또한 KPC형과 NDM-1형을 생성하는 세균은 ertapenem과 meropenem 항균제 모두에 내성을 보였고 GES-5를 생성하는 세균은 ertapenem 항균제에는 내성을 보였으나 meropenem 항균제에는 감수성으로 확인되었다(Table 1).

실험균주의 내성표현형

SHV-2a, -5, -12, GES-5, CTX-M형 및 KPC형 β-lactamase를 생성하는 세균은 class A ESBL 생성여부 확인을 위한 DDS시험에서 모두 양성반응을 보였고 GES-5, NDM-1 및 KPC형 β-lactamase 생성세균은 carbapenemase 생성여부를 확인하는 carbapenem 디스크를 이용한 Hodge 변법시험에서 양성반응을 보였으며 NDM-1 생성균주는 EDTA와 carbapenem 디스크를 이용한 MBL 생성여부를 확인하는 시험에서 양성반응을 보였다(Table 1).

실험균주의 항균제 내성유전형

PCR 산물의 염기서열 분석결과 *bla*_{SHV-1} (8주), *bla*_{SHV-2a} (8주), *bla*_{SHV-5} (2주), *bla*_{SHV-11} (2주) 및 *bla*_{SHV-12} (18주)로 가장 흔하였고 *bla*_{TEM-1} (10주), *bla*_{CTX-M-3} (2주), *bla*_{CTX-M-14} (2주), *bla*_{CTX-M-15} (1주), *bla*_{GES-5} (5주), *bla*_{KPC-2} (6주), *bla*_{KPC-3} (4주) 및 *bla*_{NDM-1} (2

주)이 확인되었으며 *bla*_{CMY-1}과 *bla*_{CMY-2} 유전자도 검출되었다 (Table 1).

옥수수 중탕액이 함유된 배지의 항균효과

시험을 위하여 선택된 세균들은 표준균주, BSBL 생성균주, ESBL 생성균주 및 carbapenemase 생성균주 등 4개 그룹으로 분류하였으며 표준균주를 제외한 균주들을 모두 임상에서 분리된 균주이다. 본 연구를 위하여 각 그룹별로 해당되는 세균에 대해 McFarland No. 0.5의 탁도에서 각각 10³배와 10⁴배 희석하여 3회 반복시험 하였다.

실험의 대상이 된 표준균주는 *E. coli* ATCC 25922와 *K. pneumoniae* ATCC 13883이며 두 균종 가운데 *K. pneumoniae* ATCC 13883 균주는 제조된 배지에서 증식되지 않아 옥수수 추출액 제조배지에 대한 감수성이 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 1).

실험을 위해 수집된 균주 가운데 BSBL 생성균주는 SHV-1을 생성하는 KSK15102 1주뿐이었다. 이 세균은 ampicillin,

cephalothin에 내성, ceftazidime에 중간내성이었고 cefoxitin, cefotaxime, ertapenem, meropenem 및 imipenem 항균제에 감수성을 보였으나 옥수수 추출액 제조배지에는 감수성을 보이지 않았다(Fig. 2A).

ESBL을 생성하는 균주는 모두 10주이었다. 이들은 SHV-12 생성균주가 5주(AJK05004, AJK05008, BDK05003, BDK05007, KSK15105)이었고 CTX-M-14 (AJK05011), SHV-2a (AJK05019) 및 SHV-2a와 CTX-M-14 동시생성(KSK15103)균주가 각 1주이었으며 SHV-12와 CTX-M-3 동시생성균주도 2주(HYK05001, KSK15106) 있었다. ESBL 생성균주는 ampicillin과 cephalothin에 모두 내성이었고 ceftazidime 혹은 cefotaxime 항균제 가운데 하나에 내성을 보였으며 일부 세균(KSK15103, KSK15105, KSK15106)은 ertapenem 항균제에 내성을 보이기도 하였다(Table 1). ESBL 생성 *K. pneumoniae*는 옥수수 추출액 제조배지에서 감수성을 보인 균주는 없었다(Fig. 2B).

Carbapenemase를 생성하는 균주는 모두 17주이었다. 이들은 GES-5생성균주가 5주(BDK07044, BDK07057, BDK07242, BDK07254, BDK07274)이었고 6주(UKP12005, UKP12006,

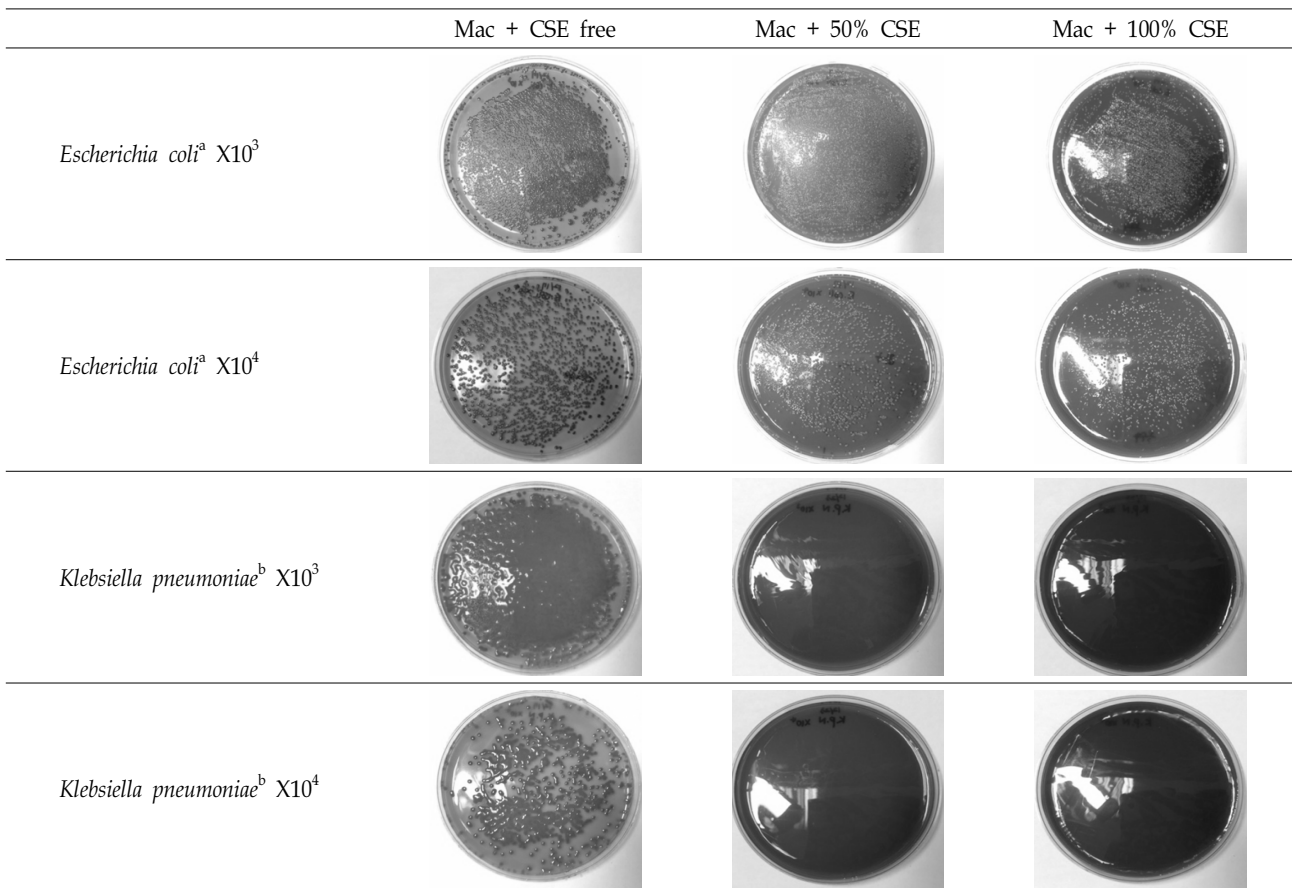


Fig. 1. Growth of colonies of *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 13883 from spreads plated by the plate spreading method on the MacConkey agar with/without corn silk extract. Two dilutions (10³ and 10⁴) of the spread inoculant were incubated at 37°C for 18 hr. Mac + CSE; MacConkey agar with corn silk extract, ^a *Escherichia coli* ATCC 25922, ^b *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

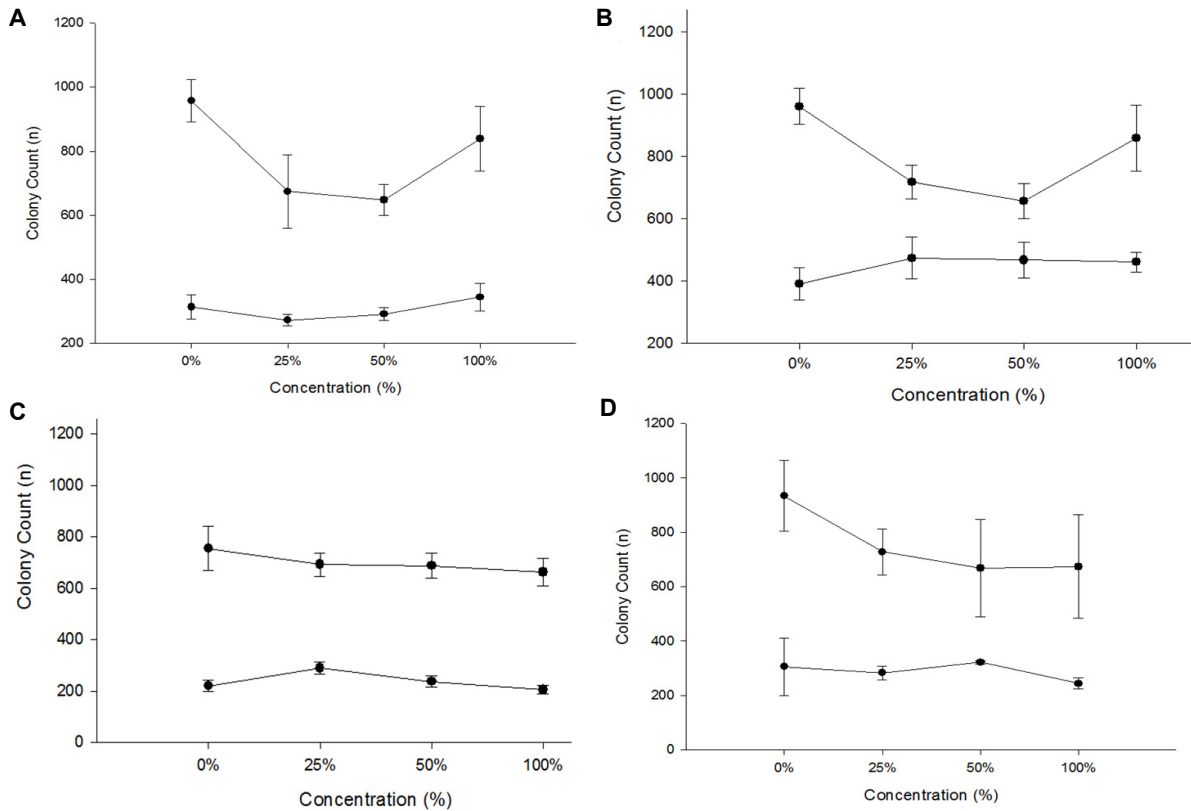


Fig. 2. Antimicrobial activities of corn silk extract in *K. pneumoniae* isolates. A) BSBL producer, B) ESBL producer, C) class A carbapenemase (KPC, GES-5) producer, D) class B metallo-β-lactamase (NDM-1) producer.

UKP12007, UKP12008, UKP12009, UKP12010)는 KPC-2, 4주 (UKP12001, UKP12002, UKP12003, UKP12004)는 KPC-3, 2주 (UKP12110, UKP12111)는 NDM-1 생성균주이었으며 옥수수 추출액으로 제조된 배지에는 감수성을 보이지 않았다(Fig. 2C, 2D).

고찰

옥수수수염을 이용한 pet-ether, chloroform 및 methanol 등 유기용매 추출물과 flavonoid glycoside 추출물은 병원성 미생물인 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* 등에 항균력이 있는 것으로 알려져 있다[16]. 그러나 유기용매를 이용한 옥수수수염 추출물의 일반적인 적용은 매우 어렵고 그 사례도 찾아보기 힘들다.

본 연구에서는 일반적으로 접하기 쉽고 음용이 가능한 형태의 옥수수수염 추출액을 이용하여 지역사회 폐렴의 주요 원인 균인 *K. pneumoniae*에 대한 항균능력 보유여부를 시험하였다. *K. pneumoniae*의 항균제 내성획득 기전은 항균제에 대한 가수분해능이 있는 효소의 생성, 세포외막 단백질(outer membrane

protein)의 변화, 결합 단백질의 변성에 의한 친화도 변이, 유출 펌프(efflux pump)의 과량발현 등 비효소적 기전이 있으며 이 가운데 가장 중요한 기전은 효소의 생성이다. 따라서 본 연구의 대상이 된 *K. pneumoniae*는 이 균이 생성하는 주요 효소인 β-lactamase의 종류에 따라 효소를 생성하지 않는 표준균주, BSBL 생성균주, ESBL 생성균주 및 carbapenemase 생성균주로 구분하였다(Table 1).

먼저 표준균주인 *K. pneumoniae* ATCC 13883 균주는 옥수수수염 추출액이 50% 함유된 평판배지에서 집락이 발견되지 않았다. 이를 통하여 항균제에 노출되지 않고 내성을 획득하지 않은 지역사회 폐렴의 원인 *K. pneumoniae*의 경우, 옥수수수염 추출액에 대한 감수성 있음을 유추할 수 있었다(Fig. 1).

BSBL 생성균주의 특성은 3세대 cephalosporin, monobactam, carbapenem계 항균제를 제외한 penicillin계, 1세대 cephalosporin 항균제에 내성을 갖는 세균으로 TEM-1, -2와 SHV-1, -11 등의 효소를 생성하는 세균에 내성을 보인다. 본 연구를 위해 수집된 균주 가운데 BSBL 생성균주는 *bla_{SHV-1}* 유전자를 보유한 KSK15102 균주이었으며, 이 세균은 penicillin계 항균제인 ampicillin과 1세대 cephalosporin 항균제인 cephalothin에 내성이었고 3세대 cephalosporin 항균제인 ceftazidime에 중간내성, cefotaxime에는 감수성을 보였으며 cephamycin계 항균제인 cefoxitin과 carbapenem계 항균제인

ertapenem, meropenem 및 imipenem 항균제에 감수성을 보였다(Table 1). BSBL을 생성하는 KSK15102 균주는 옥수수수염 추출액 0%, 25%, 50%, 100% 함유 배지에 균주를 McFarland No. 0.5의 탁도에서 10^3 배 희석한 경우, 각각 평균 967개, 674개, 648개 및 839개로 확인되었고 10^4 배 희석한 경우, 각각 평균 313개, 272개, 292개 및 344개로 확인되어 BSBL 생성균주는 옥수수수염 추출액에 감수성을 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2A).

ESBL 생성균주의 특성은 cephamycin과 carbapenem계 항균제를 제외한 모든 β -lactam계 항균제에 내성을 보이는 것으로 BSBL을 제외한 TEM형, SHV형, CTX-M형 등의 효소가 이에 속한다[8]. 본 연구를 위해 수집된 SHV-12 생성균주 5주(AJK05004, AJK05008, BDK05003, BDK05007, KSK15105), SHV-2a 생성균주(AJK05019) 및 SHV형과 CTX-M형 ESBL을 동시생성 균주(HYK05001, KSK15103)는 모두 ESBL의 전형적인 특성을 가지고 있었으며 CTX-M-14 생성균주(AJK05011)는 전형적인 cefotaximase의 특성을 보였다(Table 1). 하지만 이들 균주 가운데 AJK05004, BDK05007 및 KSK15105 균주는 cephamycin 항균제인 cefoxitin에도 내성이었으나 AmpC β -lactamase 생성여부를 확인할 수 있는 PCR에서 음성반응을 보여 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 BDK05007과 KSK15105 균주는 carbapenem 항균제인 ertapenem에 내성을 보였고 KSK15105 균주는 meropenem 내성, imipenem에 중간내성을 보였다. 이들 균주에 대해 carbapenemase 생성 여부확인을 위한 modified-Hodge 시험과 EDTA synergy 시험에서 음성반응을 보였고 carbapenemase 생성 유전자 확인을 위한 PCR에서도 음성반응을 보여 이들 균주가 chromosomal AmpC- β -lactamase의 과량생성 혹은 ESBL 생성과 함께 세포의 외막에 존재하는 porin 소실 등이 원인인 것으로 유추되었다[17]. 본 연구의 대상이 된 ESBL 생성균주는 in vitro에서 ceftazidime에 활성이 있는 SHV형과 cefotaxime에 활성이 있는 CTX-M형이 선정되었다. 이들 균주는 옥수수수염 추출액 0%, 25%, 50%, 100% 함유 배지에 균주를 McFarland No. 0.5의 탁도에서 10^3 배 희석한 경우, 각각 평균 962개, 718개, 657개 및 859개로 확인되었고 10^4 배 희석한 경우, 각각 평균 391개, 474개, 468개 및 461개로 확인되어 ESBL 생성균주는 옥수수수염 추출액에 감수성을 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2B).

Carbapenemase 생성균주는 penicillin계, cephalosporin계, monobactam계 뿐 아니라 carbapenem계 항균제를 가수분해할 수 있는 효소로 class A β -lactamase의 GES형 일부와 KPC형 및 class B β -lactamase의 IMP형, VIM형, NDM형 등이 있다[22]. 본 연구를 위해 수집된 carbapenemase 17주 가운데 GES-5 생성균주(BDK07044, BDK07057, BDK07242, BDK07254, BDK07274)는 모두 ampicillin, cephalothin, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime, ertapenem, meropenem 및 imipe-

nem 항균제에 중간 혹은 내성이었고 bla_{GES-5} 유전자뿐 아니라 bla_{SHV-12} 유전자도 보유하고 있었으며 bla_{CMY-1} 유전자를 동시에 보유한 균주(BDK07274)도 있었다. KPC형 carbapenemase를 생성하는 균주의 특성은 ampicillin, cephalothin, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime, ertapenem, meropenem 및 imipenem 항균제에 중간 혹은 내성이었으며 이들은 모두 KPC β -lactamase 외에 다른 β -lactamase를 동시에 생성하였다. 또한 KPC-3를 생성하는 균주들은 모두 meropenem과 imipenem 항균제에 중간내성을 보였다(Table 1). NDM-1 생성균주 가운데 UKP12110 균주는 CTX-M-15 ESBL을 동시에 생성하여 모든 시험항균제에 내성을 보였고 UKP12111균주는 ceftazidime과 cefotaxime을 제외한 모든 시험항균제에 내성을 보였다. 본 연구의 대상이 된 class A carbapenemase 생성균주는 GES-5형, KPC-2형 및 KPC-3형 등이었다. 이들 균주는 옥수수수염 추출액 0%, 25%, 50%, 100% 함유 배지에 균주를 McFarland No. 0.5의 탁도에서 10^3 배 희석한 경우, 각각 평균 755개, 692개, 687개 및 662개로 확인되었고 10^4 배 희석한 경우, 각각 평균 220개, 290개, 236개 및 206개로 확인된다. Class B MBL 생성균주는 NDM-1형이었는데 이들 균주는 옥수수수염 추출물 0%, 25%, 50%, 100% 함유 배지에 균주를 McFarland No. 0.5의 탁도에서 10^3 배 희석한 경우, 각각 평균 934개, 728개, 668개 및 673개로 확인되었고 10^4 배 희석한 경우, 각각 평균 306개, 283개, 322개 및 244개로 확인되어 carbapenemase 생성균주는 옥수수수염 추출액에 감수성을 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2C, 2D).

본 연구의 결과 일반적으로 응용이 가능한 옥수수수염 추출액은 임상에서 항균제에 노출된 항균제 내성 획득 *K. pneumoniae*에 대한 감수성은 보이지 않았지만 지역사회를 통해 감염될 수 있는 *K. pneumoniae*에 의한 폐렴 등에는 충분히 예방효과가 있는 것으로 확인되었다.

References

- Amin, A. N., Cerceo, E. A., Deitzelzweig, S. B., Pile, J. C., Rosenberg, D. J. and Sherman, B. M. 2014. The hospitalist perspective on treatment of community-acquired bacterial pneumonia. *Postgrad. Med.* **126**, 18-29.
- Bae, I. K., Kang, H. K., Jang, I. H., Lee, W., Kim, K., Kim, J. O. and Lee, K. 2015. Detection of carbapenemases in clinical Enterobacteriaceae isolates using the VITEK AST-N202 card. *Infect. Chemother.* **47**, 167-174.
- Bae, I. K., Lee, B. H., Hwang, H. Y., Jeong, S. H., Hong, S. G., Chang, C. L., Kwak, H. S., Kim, H. J. and Youn, H. 2006. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 315-319.
- Bennett, C. J., Young, M. N. and Darrington, H. 1995. Differences in urinary tract infection in male and female spi-

- nal cord injury patients on intermittent catheterization. *Paraplegia*. **33**, 69-72.
5. Bergogne-Berezin, E. 1995. Nosocomial pathogens: new agents, incidence, prevention. *Press. Med.* **24**, 89-97.
 6. Carpenter, J. L. 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev. Infect. Dis.* **12**, 672-682.
 7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Information Supplement. 24th ed, M100-S24. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
 8. D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L. and Rossolini, G. M. 2013. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 305-317.
 9. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G. and Philippon, A. 1988. Extended-spectrum β -lactamase conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 867-868.
 10. Lee, J. W. and Song, J. H. 2013. Annual report on the causes of death statistics 2012. Statistical Office
 11. Lee, K., Kim, C. K., Yong, D., Jeong, S. H., Yum, J. H., Seo, Y. H., Docquier, J. D. and Chong, Y. 2010. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J. Microbiol. Methods* **83**, 149-152.
 12. Lee, K., Lim, Y. S., Yong, D., Yum, J. H. and Chong, Y. 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4623-4629.
 13. Lee, Y. H., Cho, B., Bae, I. K., Chang, C. L. and Jeong, S. H. 2006. *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 β -lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum β -lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 β -lactamase gene. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 1259-1261.
 14. Lye, W. C., Chan, R. K. T., Lee, E. J. C. and Kumarasinghe, G. 1992. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. *J. Infect.* **24**, 169-174.
 15. Michael, J. F., Melanie, A. S., Catherine, A. C., Sunita, S. M., Steadman, S. S., Lisa, A. W. and Wishwa, N. K. 1996. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumoniae: a meta-analysis. *JAMA* **275**, 134-141.
 16. Nessa, F., Ismail, Z. and Mohamed, N. 2012. Antimicrobial activities of extracts and flavonoid glycosides of corn silk (*Zea mays* L). *Int. J. Biotech. Well. Indus.* **1**, 115-121.
 17. Paterson, D. L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Control.* **34**, S20-S28.
 18. Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum β -lactamase: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657-686.
 19. Podschun, R. and Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 589-603.
 20. Ryoo, N. H., Kim, E. C., Hong, S. G., Park, Y. J., Lee, K., Bae, I. K., Song, E. H. and Jeong, S. H. 2005. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 698-702.
 21. Schaberg, D. R., Culver, D. H. and Gaynes, R. P. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* **91**, 72S-75S.
 22. Queenan, A. M. and Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440-458.

초록 : 옥수수수염 추출액의 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 항균활성

강현경 · 배일권*

(신라대학교 보건복지대학 치위생학과)

*Klebsiella pneumoniae*는 인간의 피부, 구강, 호흡기, 요로, 장관 등에서 일반적으로 존재하는 상재세균이다. 하지만 지역사회획득 폐렴의 주요 원인이 되는 기회감염균이기도 하다. 옥수수수염은 *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 등 병원성 세균에 대해 항균활성이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 옥수수수염 농축액의 *K. pneumoniae*에 대한 항균능을 확인하고자 하였다. 이를 위해 *K. pneumoniae* ATCC 13883, broad-spectrum β -lactamase (BSBL) 생성균주, extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성균주 및 carbapenemase 생성균주를 수집하였다. 항균제 감수성 검사는 디스크 확산법을 사용하였고 내성유전자는 PCR 증폭과 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 또한 항균활성 실험을 위하여 옥수수수염 농축액을 이용하여 MacConkey agar 평판배지(50%, 100%)를 제조하였고 균주의 성장억제를 확인하기 위하여 제조된 배지에 *K. pneumoniae*를 평판도말하여 37°C 항온기에서 18시간동안 배양하였다. 수집된 *K. pneumoniae*는 SHV-1 (n=8), SHV-2a (n=8), SHV-5 (n=2), SHV-11 (n=2), SHV-12 (n=18), TEM-1 (n=10), CTX-M-3 (n=2), CTX-M-14 (n=2), CTX-M-15 (n=1), GES-5 (n=5), KPC-2 (n=6), KPC-3 (n=4) 및 NDM-1 (n=2)을 보유하고 있었다. 시험에 사용된 *K. pneumoniae* 균주 가운데 *K. pneumoniae* ATCC 13883균주에 대해 항균활성이 있었으나 BSBL, ESBL 및 carbapenemase 생성균주에 대한 항균활성을 확인할 수는 없었다. 따라서 옥수수수염 추출액은 *K. pneumoniae*에 의한 지역사회획득 감염증 예방과 회복에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.