International Journal of Oral Biology, Vol. 40, No. 1 March 31 2015, p. 35-39
Copyright ⓒ 2015, *The Korean Academy of Oral Biology*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2015.40.1.035

International Journal of Oral Biology

Effects of Sub Minimal Inhibitory Concentration of Metronidazole and Penicillin on Morphology of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Scanning Electron Microscopy Observation

Ye Won Kwon and Si Young Lee*

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

(received February 26, 2015; revised March 12, 2015; accepted March 13, 2015)

Minimal inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of antibiotics that inhibits the visible growth of bacteria. It has been reported that sub-MIC of antibiotics may result in morphological alterations, along with the biochemical and physiological changes in bacteria. The purpose of this study was to examine morphological changes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, after the treatment with sub-MIC metronidazole and penicillin. The bacterial morphology was observed with scanning electron microscope, after incubating with sub-MIC antibiotics. The length of *A. actinomycetemcomitans* was increased after the incubation with sub-MIC metronidazole and penicillin. Sub-MIC metronidazole and penicillin inhibited bacterial division and induced long filaments. Our study showed that metronidazole and penicillin can induce the morphological changes in *A. actinomycetemcomitans*.

Key words: antibiotic, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, morphology, sub-MIC

*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.

서 론

세균의 증식을 억제하는 항생제의 최소농도를 최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)라고 정의한다. 항생제가 최소억제농도 이하의 농도(sub-MIC)일 때, 세균의 증식을 억제하지는 못하지만, 형태적 변화나 초미세구조적 변화, 생화학적 특성, 부착특성을 포함한 여러 가지 세균의 특성에 영향을 미친다는 것이 널리 알려져 있다[1]. 이전의 연구에서, 치주질환 및 구강 내 감염을 치료하기 위해 사용되는 amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin, tetracycline의 sub-MIC안에서 발생하는 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*의 형태변화를 광학현미경으로 관찰함으로써, 몇 가지의 항생제가 이들 세균의 형태변화에 영향을 미친다는 것을 확인하였다[2]. 그 중, *A. actinomycetemcomitans*는 일부 치주질환과 관련이 있는 중요한 치주 병원체이며, leukotoxin (LT)와 cytolethal destending toxin (CDT)와 같은 외독소를 생산하며 파골세포를 활성화 시킬 수 있어 그 병원성이 매우 큰 것으로 보고되고 있다[3].

다양한 세균에 대해서 여러 종류의 항생제가 세균의 형태변화에 미치는 영향은 이미 많이 보고되었다[4-6]. Souza 등의 연구에서는 sub-MIC의 β-lactam계 항생제가 *F. nucleatum*의 형태변화를 유도한다고 보고했으며[7], *Escherichia coli*와 *Proteus mirabilis*의 형태변화에 대하여 조사한 연구들은 다양한 β-lactam계 항생제가 형태변화

를 유도하는 과정에서 항생제의 농도가 증가할수록 세균의 형태가 길어지고, 점점 더 농도가 증가하면 스페로플라스트를 형성하며, MIC농도 이상까지 올라갔을 때는 결국 용해(lysis)되는 것을 확인하였다[4,5]. 우리의 이전 연구에서, sub-MIC의 penicillin과 metronidazole에서 배양된 *A. actinomycetemcomitans*가 가느다란 실모양으로 길어지는 현상을 확인했지만[2], 이런 현상이 발생하는 원인에 대해서는 광학현미경 관찰만으로는 설명할 수가 없었다. 따라서 본 연구에서는 penicillin과 metronidazole에 의한 *A. actinomycetemcomitans*의 형태변화의 양상을 주사전자현미경을 이용하여 좀 더 자세하게 관찰하였고 세균의 길이가 길어지는 이유에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양조건

A. actinomycetemcomitans ATCC 33384는 조선대학교 치과대학의 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양 받았다. 세균 배양을 위하여 Brain Heart Infusion (BHI, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체배지를 사용하였고, 90% N_2, 5% CO_2, 5% H_2를 포함하는 37℃ 혐기성 환경(Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc. Cornelius, Oregon, USA)에서 24시간 배양되었다. 분광광도계를 사용하여 세균 현탁액의 탁도를 측정하였으며 표준곡선에 적용하여 세균의 수를 정량하였다.

항생제 준비 및 처리

Sub-MIC 항생제가 *A. actinomycetemcomitans*의 형태변화에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위하여 치과의료에서 일반적으로 사용하는 항생제 중, metronidazole과 penicillin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)을 실험에 사용하였다. 항생제의 stock solution은 pore size가 0.22 μm인 필터를 사용하여 여과한 후 사용하였다.

항생제 최소억제농도(MIC)의 측정

실험 균주에 대한 항생제의 MIC측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 권고하는 액체배지 희석법을 이용하였다[8]. 세균 배양 배지에 항생제를 1/2 연속 희석한 후 세균을 5 x 10^5 cells/ml가 되게 접종하고 배양 후 육안으로 관찰했을 때, 세균 성장이 억제된 최소항생제 농도를 측정하여 MIC를 결정하였다. 각 항생제의 MIC 측정 농도 범위는 0.002 μg/ml에서 1024 μg/ml였다.

주사전자현미경 관찰(Scanning Electron Microscope, SEM)

*A. actinomycetemcomitans*의 형태변화를 관찰하기 위해 Variable Pressure Field Emission Scanning Electron Microscope (VP-FE-SEM, SUPRA55VP, Zeiss, Germany)를 사용하였다. *A. actinomycetemcomitans*는 1/2x MIC의 metronidazole과 penicillin을 첨가한 배지에서 37℃ 혐기성 배양 조건(90% N_2, 5%CO_2, 5%H_2)으로 24시간 동안 배양되었다. 항생제가 처리된 세균과 처리되지 않은 세균의 현탁액은 원심 분리하여, PBS (pH 7.4)에 2.5%로 희석한 glutaraldehyde를 처리하여 1시간 동안 고정하였다. 고정된 샘플은 PBS를 사용하여 10분동안 3번씩 씻어낸 후, 에탄올에 30분 동안 처리하여 탈수시켰다. 임계점 건조 후, 샘플을 stub위에 고정시키고, 금으로 코팅하여 SEM으로 관찰하였다.

길이 측정 방법

세균의 크기는 Nikon NIS-Element program (DS-Fi2, Nikon)을 이용하여 측정하였다. 관찰한 하나의 필드에서 각각 20개의 세균을 무작위로 선택하여 길이를 측정하고, 측정한 값의 평균으로 길이 변화를 비교하였다.

통계분석

Sub-MIC 항생제가 처리된 세균과, 처리가 되지 않은 세균의 전체적인 길이 차이를 통계학적으로 확인하기 위하여 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis법을 사용하였다 (유의확률 $p < 0.05$). 통계분석은 Software Package for Social Sciences (SPSS, version 20.0, IBM Inc., USA)를 사용하여 수행하였다.

결 과

*A. actinomycetemcomitans*의 전자현미경 관찰에서 항생제 처리가 되지 않은 세균은 부드럽고 짧은 막대모양으로 관찰되었다(Fig. 1). 그러나 sub-MIC의 metronidazole과 penicillin을 포함하는 배지에서 배양된 세균은 세균폭의 변화는 없었으나, 세균의 길이가 평균적으로 5배에서 8배 정도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이런 길이변화의 차이는 통계적으로 유의하게 확인되었다($p < 0.05$). Fig 2와 Fig 3의 전자현미경 사진에서 살펴보면, 정상적인 세균은 성장하면서 어느 정도의 길이가 되면 분열되어 따로 떨어져야 하는데, sub-MIC의 metronidazole과 penicillin을 처리한 세균들은 분열이 완전히 일어나지 못하고, 연속적으로 연결되어 길게 늘어

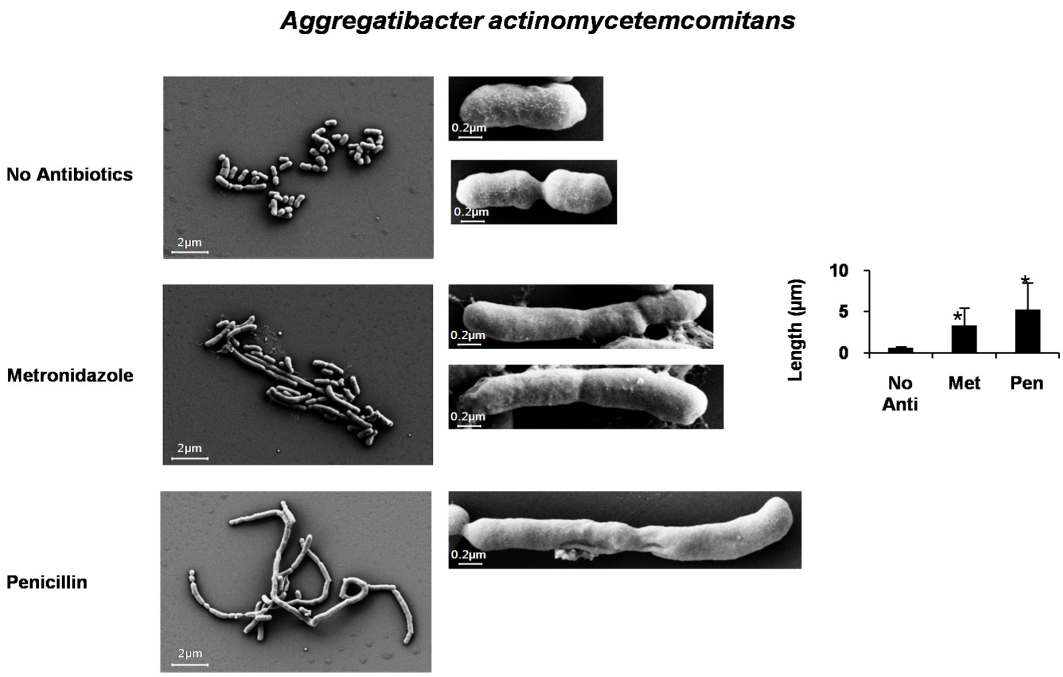

Fig 1. The effect of sub-MIC antibiotics on bacterial morphology of *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384. The bacteria were incubated with sub-MIC antibiotics and the bacterial morphology was observed with scanning electron microscopy. The length of bacteria was shown in right side of figure. The values 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 ($p < 0.05$).

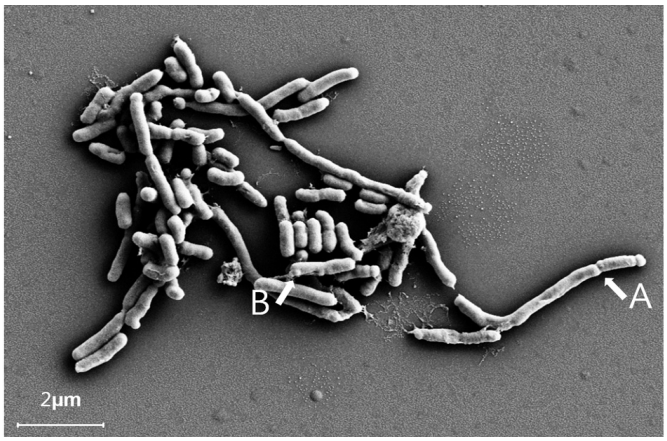

Fig 2. *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 exposed to sub-MIC metronidazole. Filaments with blebs were observed. A, filamentation; B, bleb.

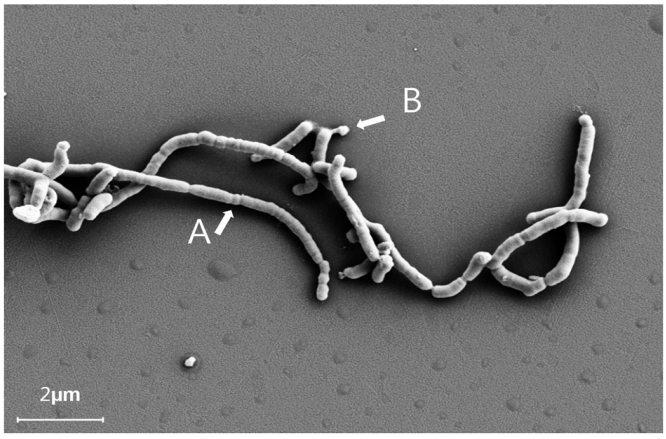

Fig 3. *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 exposed to sub-MIC penicillin. Filaments with blebs were observed. A, filamentation; B, bleb.

나는 것이 확인되었다(Fig 2-A, Fig 3-A). 또한, 일부 세균의 표면이 세포파편과 같은 물질들로 지저분한 것을 관찰할 수 있었으며, 구형의 커다란 bleb들도 함께 관찰되었다(Fig 2-B, Fig 3-B).

고 찰

항생제는 치태로 인하여 발생하는 감염성 구강질병인 치주질환의 치료를 위해 사용하거나 혹은 치료의 보조적인 목적으로 사용된다[9]. 항생제를 복용하면, 시간이 지남에 따라 체내의 항생제 농도가 서서히 감소하게 되어 sub-MIC에 도달하는 기간을 유발하기 때문에 구강세균과 관련된 항생제 sub-MIC효과에 관한 연구가 필요하다.

그람음성균은 β-Lactam계 항생제가 존재하는 환경에서 성장할 때, 항생제에 대한 반응으로 스페로플라스트를 형성하는 것으로 알려져 있다[10]. 이렇게, 스페로플라스트나 L-형과 같은 항생제에 대한 세균의 적응반응

이 관찰되기 시작하면서 미생물이 환경에 적응하여 나타나는 형태나 생화학적 특성에서 변화에 대한 연구가 주목 받기 시작하였다[11]. 다양한 연구에서, sub-MIC의 항생제는 세균의 증식을 억제하거나 죽이지는 못하지만 세균의 생물학적 특성에 영향을 줄 수 있다고 알려져 있는데[12], 이러한 효과는 항생제의 농도가 MIC에 도달한 이후부터 특정한 시간 동안, 조직들 사이에서 발생하는 항생제와 세균간의 상호작용을 변화시킬 수 있기 때문에 치료적으로 중요한 의미를 지닐 수 있다[1,12,13].

Lorian의 연구에서는 *Escherichia. coli, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumonia, Salmonella typhimurium*와 같은 세균을 1/6x MIC의 ampicillin으로 처리했을 때, 세균이 30-90 μm길이로 길게 늘어나는 것을 관찰하였다[14]. 또한 sub-MIC의 penicillin에서는 *Proteus vulgaris, Vibrio cholera, Salmonella typhimurium*의 길이가 길어지는 것을 관찰했으며, *Pseudomonas pyocyanea*는 가느다란 실 모양과 구형의 형태가 유도되는 것을 확인하였다[14,15]. 그 외에도 sulfathiozol, nalidixic acid, nitrofurantoin 등의 sub-MIC 항생제 가 다양한 세균의 길이를 길어지게 하는 것이 관찰되었다[16-18].

우리의 연구에서는, sub-MIC의 metronidazole과 penicillin을 처리한 후에 *A. actinomycetemcomitans*의 길이가 상당히 길게 늘어난 것을 관찰할 수 있었다. *A. actinomycetemcomitans*는 본래 사슬이나 포도상으로 연결되어 자라지 않고 따로 떨어져서 자라는 세균이지만, sub-MIC의 항생제에서 관찰된 세균은 사슬모양처럼 세균이 연속적으로 붙어서 길게 늘어난 것을 관찰할 수 있었다. Sub-MIC의 chloramphenicol에서 *Staphylococcus aureus*의 형태변화를 관찰한 Hancock과 Park의 연구논문에서는 세균의 크기증가가 항생제의 활성으로 세포벽물질의 합성을 계속적으로 진행한 결과라고 주장하였고[19], Burdett와 Murray는 sub-MIC의 항생제에서 세포의 형태가 길게 늘어나는 현상은 항생제가 세포벽을 가로지르는 septum의 성장을 저해함으로써, 세포분열을 막았기 때문에 발생한다고 주장하였다[10]. 우리의 연구에서 관찰된 세균의 길이증가도 세균이 성장하면서 분열되어야 했던 부분이 항생제의 작용으로 분열이 억제되어 계속 연결되면서 생성된 변화라고 추정된다. 이것은, 세포가 따로 떨어져 있을 때 보다 세균의 표면적을 감소시키고 생존하기 어려운 환경조건에서 생존 확률을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

Lorian의 연구에서는, sub-MIC의 nitrofurantoin을 처리한 *E. coli*가 길게 늘어나면서 bleb들도 함께 생성되는 것을 관찰하였다[14]. 이처럼, 본 실험에서도 sub-MIC의 metronidazole과 penicillin을 포함하는 배지에서 배양한 세균 표면에서 bleb들이 관찰되었다. Metronidazole과 penicillin은 항생제 작용 기전이 다름에도 불구하고 본 실험에서는 *A. actinomycetemcomitans*의 형태 변화에 유사한 결과를 유발하였는데 그 이유는 아직 불확실하다. Metronidazole과 penicillin이 어떠한 분자생물학적 기작으로 세균의 형태 변화에 영향을 미쳤는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이러한 세균의 형태변화는 세균부착과 같은 병독성에 영향을 미친다고 알려져 있다[20]. Fonseca 등의 연구에서 sub-MIC의 piperacillin과 tazobactam에서 유도된 세포의 형태 변화가 *P. aeruginosa*의 부착능력을 상당히 감소시키는 것을 관찰하였다[21]. 이처럼 sub-MIC의 항생제가 유도하는 세균의 형태변화와 부착이 서로 관련이 있는 것으로 보고되었지만, 세균의 형태변화가 세균부착에 미치는 영향력에 대한 구체적인 기전은 아직 명확하게 알려지지 않았다. 앞으로 sub-MIC의 항생제에서 세포의 형태변화에 수반되는 세포벽 소수성의 변화나 단백질 생성의 변화 등이 부착 및 바이오필름 형성과 같은 세균 병독력에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구를 통해서 밝혀져야 할 것이다.

본 연구를 통하여, sub-MIC의 metronidazole과 penicillin이 *A. actinomycetemcomitans*의 형태적 변화를 유도함을 보였으며, 이러한 형태변화가 세균의 병독성에 어떻게 영향을 미치는 지에 대해서는 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

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

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Lorian V. Effects of low antibiotic concentration on bacteria: Effects on ultrastructure, their virulence and susceptibility to mimunodefenses, pp. 493-555, Antibiotics in Laboratory Medicine, 1986;2th.
2. Kwon YW, Lee SY. Effect of sub-minimal inhibitory concentration antibiotics on morphology of periodontal

pathogens. Int J Oral Biol. 2014;39:115-120. doi : http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2014.39.2.115.
3. Ricahrd J, Lamont, Howard F, Jenkinson. Virulence factors of periodontal bacteria, pp 50-51, Oral microbiology at a glance, 2010.
4. Ellis LF, Herron DK, Preston DA, Simmons LK, Schlegel RA. Evaluation of antibiotic efficacy using electron microscopy: Morphological effects of guanylureido cephalosporin, chlorobenzoylureido cephalosporin, BL- P1654, and carbenicillin on *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1976;9:334-342.
5. Greenwood D, F. O. Acomparison of the effects of ampicillin on *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. J Med Microbiol. 1969;2:435-441.
6. Greenwood D, F. O. Comparison of the responses of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* to seven B-lactam antiviotics. J Infect Dis. 1973;128:211-222.
7. 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. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.007.
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. Burdett ID, Murray RG. Septum formation in *Escherichia coli*: Characterization of septal structure and the effects of antibiotics on cell division. J Bacteriol. 1974;119: 303-324.
11. Guze L,B. Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms. pp. 181-182, Williams and Wilkins, Baltimore, 1968;122.
12. 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. doi: 10.1093/jac/45.1.15.
13. Svanborg-Edén 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. 1978;6(Issue 1 supplement):S121-S124.
14. Lorian V. Abnormal forms of bacteria. Mt Sinai J Med. 1976;43:762-775.
15. Fleming A, Voureka A, Kramer IR, Hughes WH. The morphology and motility of *Proteus vulgaris* and other organisms cultured in the presence of penicillin. J Gen Microbiol. 1950;4:257-269.
16. Brzin B. Unusual cell form of bacterium anitratum produced by sulfonamides. Experientia. 1966;22:149-150.
17. Goss WA, Deitz WH, Cook TM. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1964;88: 1112-1118.
18. Lorian V, Popoola B. The effect of nitrofurantoin on the morphology of gram-negative bacilli. J Infect Dis. 1972;125:187-189.
19. Hancock R, Park JT. Cell-wall synthesis by *Staphylococcus aureus* in the presence of chloramphenicol. Nature. 1958;181:1050-1052.
20. 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.
21. 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. doi: 10.1099/jmm.0.45637-0.