

유산균이 대장균 및 살모넬라균의 증식에 미치는 영향

축산물위생검사소

정경태 · 이우원 · 김홍태

Effects of Lactic acid bacteria on Growth of *E coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in Mouse

Veterinary Service Laboratory

Kyung-Tae Chung · Woo-Won Lee · Hong-Tae Kim

Abstract

This study was performed to find out the growth effect of orally administrated lactic acid bacteria against *E coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* inoculated into gastric lumen of mice. The experimental mice challenged with each 0.2ml of suspension containing 5×10^8 CFU of the pathogens were divided into 4 groups: Control group, not administrated after inoculation of the pathogens; A group, pre-administrated, on a daily basis 7days before inoculation of the pathogens; B group, pre-administrated, on a daily basis 3days before inoculation of the pathogens; C group, administrated daily on 1day after inoculation of the pathogens. 3 groups was orally administered with *Lactobacillus casei* and *L acidophilus* at 5×10^9 CFU/0.2ml. Lactic acid bacteria administrated showed growth inhibition effect on *E coli* O157:H7 in 21 days after inoculation of the pathogens by the level of $<10 \sim 3.2 \times 10^1$ CFU/g, whereas $7.5 \times 10^1 \sim 6.4 \times 10^2$ CFU/g was detected in the control and C group. The growth inhibition effect of lactic acid bacteria administration on *S typhimurium* was similar to level of on *E coli* O157:H7 in 21 days after inoculation of the pathogens. The growth inhibition effect on two kinds of pathogens was observed more highly in the *L acidophilus* administrated group than the *L casei* administrated group.

Key words : *E coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *L casei*, *L acidophilus*, Growth inhibition effect

I. 서 론

*Salmonella*속 균과 *E. coli* O157:H7은 사람에서 식중독 및 장염을 일으키는 대표적인 병원체로 알려져 있다.¹⁾ *Salmonella*속 균은 자연계에 널리 분포되어 거의 모든 척추동물에서 분리되며, 사람을 비롯한 많은 종류의 동물에서 각종 질병의 원인이 된다.²⁾ 이 속균의 보균동물이 사람에게 대한 감염원이 되고 있어 환경이나 오염된 식품을 통하여 식중독을 일으키므로 공중 보건상 대단히 중요시되고 있다.^{3,4,5)} *Salmonella* 감염증은 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등을 일으키는 전신성 질병이며 몇몇 속주 특이성이 있는 균종을 제외하고는 거의 모든 포유동물에 감염을 일으키는 인수공통전염병이다.

E. coli O157:H7은 1982년 미국에서 hamburger patty에서 본 균에 의한 식중독이 처음 보고된 이래 북미, 남미, 유럽, 남아프리카, 호주 등 세계 각국에서 문제 시되고 있는 바 근년에는 일본에서 폭발적으로 환자가 발생한 바 있다. *E. coli* O157:H7은 오염된 식품을 통하여 감염되며, 특히 분쇄한 쇠고기가 주요 오염원으로 작용하고 있다.^{6,7,8)} verotoxin 또는 siga-like toxin(SLT)을 산생하여 사람에게 강한 병원성을 나타내어 용혈성 요독증후군(HUS),^{9,10)} 출혈성 결장염(HC),^{10,11)} 혈전성 혈소판 감소성 자반병(TTP)⁶⁾을 일으킨다.

유산균은 위장에서의 위산분비를 감소시키고 소화액의 분비를 촉진하여 섭취된

음식물의 흡수를 돕는다. 특히 유산균중 위산이나 담즙산에 사멸되지 않고 장내로도 달한 유산균은 장내의 유용균의 증식을 촉진하고 장내 유해균의 증식을 억제하여 정장작용과 노화방지에 도움이 되며 혈중 콜레스테롤량을 저하시켜 각종 질병에 대한 저항효과까지 나타내는 것으로 알려져 있다.^{12,13)} 유산균은 장점막에서 병원성 세균이 정착하는 것을 경쟁적으로 저지시키거나 장관내 pH를 산성으로 저하시키므로써 세균의 발육을 억제시킬 뿐 아니라¹⁴⁾ 대장균이 생성한 엔테로독신을 중화시키거나, 병원성 세균에 유해한 항균성 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 유산균은 소화기장관내 정상상재균중 다수를 차지하는 균종으로 Methnikoff¹⁶⁾는 소화기장관내에 적정수의 유산균을 정착시킴으로써 여러 부패균에 의한 독성대사물이 숙주에 끼치는 해로운 영향을 줄일 수 있다고 보고한 이래 소화기질환 환자에게 유산균제제를 투여하여 장관점막에 정착시킴으로써 치료에 보조 역할을 담당케하려는 시도가 있어왔다. Tramer,¹⁷⁾ Shahani와 Ayebo,¹²⁾ Sandine¹⁸⁾은 유산균 발효유가 위장장애, 간장질환, 신염, 하리, 대장염, 식욕부진에 효과가 있을 뿐만 아니라 병원성 세균의 억제, 소화흡수의 촉진, 간장기능의 촉진 등에 좋다고 보고하였다. 또한 Bogdanov 등,¹⁹⁾ Reddy 등,²⁰⁾ Farmer 등²¹⁾은 복수암세포와 육종세포를 이식한 마우스에 유산균 발효유를 투여한 결과 암세포의 증식억제 작용이 있었다고 보고하

였다. *Lactobacillus casei*와 *L acidophilus*도 장질환의 치료에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있다. 가축에서 유산균의 투여 효과를 보면 *L acidophilus*를 돼지에 급여한 결과 장염의 감소와 증체효율의 개선 효과가 있음이 알려져 있고, *Str faecium*도 사료효율을 높여 주므로써 가축의 성장을 촉진하여 병원성 장내세균의 증식을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 유산균의 장점과 더불어 최근 몇 년동안 유산균의 병원성 세균 발육억제 및 항균작용에 대한 실험이 면역학적 측면에서 시도되고 있다. 어린 가축에 있어 위장질환을 예방함은 물론 치료 보조제로 쓰일 수 있는 간단한 면역 생물학적인 방법을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 실험에서는 유제품에 일반적으로 널리 사용되고 있는 대표적 유산균인 *L casei*와 *L acidophilus*를 마우스에 투여한 뒤 장내 유해세균인 *S typhimurium*과 *E. coli* O157:H7을 투여하여 이들 병원성 세균의 증식효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시균주 및 배양

유산균은 시중에서 유통중인 발효유로부터 분리한 *L casei*와 *L acidophilus*를 사용하였다. *Lactobacilli* MRS broth에 접종하여 37°C에서 12시간 배양하였다,

*S typhimurium*과 *E. coli* O157:H7을

Brain heart infusion broth(Difco)에 접종하여 37°C에서 18~24시간 진탕배양(250rpm)한 것을 동일 신선배지에 2회 계대 진탕배양(5시간)하였다. 배양액을 원심침전하여 균체를 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 용액으로 3회 세척한 다음 5×10^8 CFU 수준으로 희석하여 사용하였다.

2. 공시동물

동물은 자체사육실에서 사육중인 5~8주령의 체중 약 20~30g의 마우스를 화염 소독한 mouse cage에서 사육하면서 건강을 확인하고, *E. coli* O157:H7 선택배지인 Sorbitol MacConkey agar(SMAC, Difco)와 *S almonella* 선택배지인 Xylose lysin dextrose(XLD, Difco) 배지에 분변을 배양하여 미감염 동물을 선발 확인하였다. 사료는 멸균된 배합사료와 물을 자유 급식 시켰다.

3. 유산균 및 병원성 세균의 투여

유산균의 경구투여에 의한 병원성 세균의 증식효과를 알아보기 위하여 Table 1에서와 같이 실험구(4개)를 설정하였고 각 실험구마다 15두의 마우스를 설정하였으며, 대조군과 유산균 투여군에 병원성 세균 투여 7일과 3일전부터, 병원성 세균 투여 후 1일부터 매일 5×10^9 CFU의 유산균 0.2ml을 경구투여기를 이용하여 구강내에 투여하였다.

Table 1. Design of experimental groups based on administration of lactic acid bacteria

Groups	Condition of administrated
Control	Non-administrated, after inoculation of the pathogens
A group	Pre-administrated, on a daily basis 7days before inoculation of the pathogens
B group	Pre-administrated, on a daily basis 3days before inoculation of the pathogens
C group	Administrated daily on 1day after inoculation of the pathogens

4. *S typhimurium*과 *E. coli* O157:H7의 균수 측정

병원성 세균의 증식성을 조사하기 위하여 실험동물의 분변을 무균적으로 채취하였다. 각 실험구 개체의 분변 1g을 9ml의 생리식염수에 균질화한 다음 10배 단계희석하여 MacConkey agar와 SMAC에 도말 배양하여 *E. coli* O157:H7의 균수를 측정하였다. SMAC에서 음성인 집락을 취하여 MUG test를 실시하여 MUG 음성임을 확인하면서 *E. coli* O157:H7의 균수를 측정하였다.

*S typhimurium*의 균수를 측정하기 위하여 XLD 배지에 단계희석된 분변을 도말 배양하여 *Salmonella* 특유의 black center 균 집락수를 측정하고 MUCAP test와 생화학적 정상검사를 통하여 접종균임을 확인하였다.

III. 결 과

1. 유산균이 *E. coli* O157:H7의 증식에 미치는 영향

유산균 *L casei*와 *L acidophilus*의 급여가 *E. coli* O157:H7의 증식에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 2에서와 같다. *L casei*를 급여한 대조군, 전 시험구에서 접종 1일에 균수가 $2.1 \times 10^5 \sim 7.1 \times 10^5$ CFU/g으로 다소 차이가 있었으나, 대조군 및 전 시험구에서 접종 4일까지는 균수가 증가되었고, 접종 7일 후부터는 균수가 감소하기 시작하였으며, A군과 B군이 접종 21일후에는 각각 1.3×10^1 , 3.2×10^1 CFU/g으로 현저한 감소를 나타내었으나, 대조군과 C군은 각각 1.9×10^2 및 6.4×10^2 CFU/g으로 다소 완만한 감소를 보였다.

*L acidophilus*를 급여한 접종 1일에 A, B, C군은 대조군에 비해 균의 증식이 다소 억제되었다. 접종 4일까지는 대조군 및 전 시험구에서 균수가 증가되었으나, 접종 7일 후부터는 감소하는 경향이었으며, A군의 경우 접종 3주일 후에는 균이 거의 검출되지 않았다.

Table 2. Fecal shedding of *E. coli* O157:H7 in mouse administrated with lactic acid bacteria

Days	Number of <i>E. coli</i> O157:H7(CFU/g)							
	<i>L casei</i>				<i>L acidophilus</i>			
	Control	A	B	C	Control	A	B	C
1	7.1×10^5	2.3×10^5	3.2×10^5	2.1×10^5	3.8×10^5	8.6×10^4	6.9×10^4	8.3×10^4
4	8.2×10^5	8.9×10^5	9.2×10^5	1.8×10^6	1.9×10^6	2.2×10^5	7.6×10^5	9.7×10^5
7	2.5×10^5	6.7×10^3	1.5×10^4	4.5×10^4	2.4×10^5	5.6×10^3	6.7×10^3	9.6×10^4
10	3.2×10^4	8.3×10^2	7.2×10^3	9.1×10^3	5.8×10^4	8.3×10^2	9.8×10^2	2.5×10^4
14	4.6×10^3	1.6×10^2	8.7×10^2	4.5×10^3	4.2×10^3	2.8×10^1	8.7×10^1	7.1×10^2
21	1.9×10^2	1.3×10^1	3.2×10^1	6.4×10^2	1.8×10^2	<10	<10	7.5×10^1

Table 3. Fecal shedding of *S typhimurium* in mouse administrated with lactic acid bacteria

Days	Number of <i>S typhimurium</i> (CFU/g)							
	<i>L casei</i>				<i>L acidophilus</i>			
	Control	A	B	C	Control	A	B	C
1	5.4×10^5	2.9×10^5	3.9×10^5	2.8×10^5	5.4×10^5	7.3×10^4	4.9×10^4	7.5×10^4
4	6.4×10^5	6.3×10^5	5.2×10^5	3.4×10^5	3.7×10^6	1.9×10^5	2.1×10^5	8.1×10^5
7	7.5×10^4	3.8×10^3	5.8×10^3	3.7×10^3	3.2×10^5	8.4×10^3	5.4×10^4	6.3×10^4
10	4.3×10^4	7.2×10^2	6.4×10^2	1.6×10^3	4.7×10^4	7.8×10^2	8.5×10^2	3.2×10^3
14	4.1×10^3	5.1×10^1	9.1×10^1	2.8×10^2	4.1×10^3	2.9×10^1	8.8×10^1	9.4×10^2
21	2.5×10^2	<10	1.3×10^1	5.1×10^1	2.9×10^2	<10	1.2×10^1	3.7×10^2

2. 유산균이 *S typhimurium*의 증식에 미치는 영향

유산균 *L casei*와 *L acidophilus*의 급여가 *S typhimurium*의 증식에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 3에서와 같다. *L casei*를 급여한 대조군, 전 시험구에서 접종 1일에 균수가 $2.8 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^5$

CFU/g으로 거의 유사한 균수를 나타내었고, 대조군 및 전 시험구에서 접종 4일까지는 균수가 증가되었으나, 접종 7일 후부터는 균수가 감소하기 시작하였으며, 전 시험구에서 그 후 점차 감소하여 접종 3주일 후에는 A군의 경우 거의 균의 배설을 관찰할 수 없었고, B, C군의 경우 1.3

$\times 10^1 \sim 5.1 \times 10^1$ CFU/g으로 현저한 감소를 보였으며, 대조군의 경우에는 접종 3주일 후에는 2.5×10^2 CFU/g으로 다소 완만한 감소세를 나타내었다.

*L acidophilus*를 급여한 접종 1일에는 유산균 *L casei*를 급여한 군수와 유사하였고, A, B군은 접종 3주일 후에는 군수가 거의 배설되지 않거나 현저하게 증식이 억제된 반면, 대조군과 C군은 접종 3주일 후까지 다소 완만하게 억제되는 경향을 보였다.

IV. 고찰 및 결론

*Salmonella*속 균과 *E. coli* O157:H7은 사람에서 식중독 및 장염을 일으키는 대표적인 병원체로 알려져 있다. 유산균은 위장에서의 위산분비를 감소시키고 소화액의 분비를 촉진하여 섭취된 음식물의 흡수를 돕는다. 특히 유산균중 위산이나 담즙산에 사멸되지 않고 장내로 도달한 유산균은 장내의 유용균의 증식을 촉진하고 장내 유해균의 증식을 억제하여 정상작용과 노화방지에 도움이 되며 혈중 콜레스테롤량을 저하시키며 각종 질병에 대한 저항효과까지 나타내는 것으로 알려져 있다. 유산균은 장점막에서 병원성 세균이 정착하는 것을 경쟁적으로 저지시키거나 장관내 pH를 산성으로 저하시키므로써 세균의 발육을 억제시킬 뿐 아니라 대장균이 생성한 엔테로톡신을 중화시키거나, 병

원성 세균에 유해한 항균성 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 실험에서는 식중독 예방의 기초자료로 활용코자 유제품에 일반적으로 널리 사용되고 있는 대표적 유산균인 *L casei*와 *L acidophilus*를 마우스에 급여한 뒤 장내 유해세균인 *S typhimurium*과 *E. coli* O157:H7을 투여하여 이들 병원성 세균의 증식효과를 비교 시험하였다.

유산균 *L casei*와 *L acidophilus*의 급여가 *E. coli* O157:H7의 증식에 미치는 효과를 조사한 결과 유산균 급여군에서 비급여 대조군에 비하여 *E. coli* O157:H7의 증식이 억제되었다. 이러한 결과는 앞선 연구자들이 보고한 유산균이 병원성 세균에 대한 증식억제 효과가 있었다는 것과 유사하였다. Perdigon 등²²⁾에 의하면 쥐에 유산균을 급여하였을 경우 대식세포 및 임파구를 활성화시켜 면역력이 증가되었다고 하였는데, 본 실험에서도 유산균 급여 10일 후부터 군수가 현저히 감소한 것도 유산균에 의한 면역증강 및 발육억제 작용과 관계가 깊은 것으로 사료된다.

유산균 *L casei*와 *L acidophilus*의 급여가 *S typhimurium*의 증식에 미치는 효과를 조사한 결과에서도 유산균 급여군이 비급여군에 비하여 군수가 현저하게 억제되었다는 결과로 미루어 볼 때, *E. coli* O157:H7의 증식에 미치는 효과와 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과 역시 앞선 연구자들이 보고한 유산균이 병원성 세균에 대한 증식억제 효과 및 면역증강

효과와 관계가 있다는 것이 입증되었다고 판단되었다. 다만 앞의 결과에서도 나타났듯이 병원성 세균을 투여한 후에 유산균을 급여한 C군에서는 결과가 미흡하여 병원성 세균에 대한 방어효과를 인정하기에는 다소 미흡하였다. 이상과 같은 결과로 미루어 볼 때 병원성 미생물에 대한 예방효과로 유산균을 급여할 경우 최소한 7일 이전부터 매일 급여하는 것이 가장 효과적일 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Karmali, M.A.: Infection by verocytotoxin-producing *E coli*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2: 15~39. 1989.
2. Edward P.R. and Galton M.M.: *Salmonellosis. Adv. Vet. Sci.* 11: 1~63. 1967.
3. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Microbiology*. 4th ed, *Harpes and Row Publishers*, 576~579. 1990.
4. EL-Glazzar P.E. and Martin E.H.: *Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. J. Dairy Sci.* 75: 2327~2343. 1994.
5. Murray PR, Pfaller MA, Tenouer FC, Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. ASM Press, 467~471. 1999.
6. Brain, M.C., Dacie, J.V., Hourihane, DO'B.: Microangiopathic hemolytic anemia; the possible role of vascular lesions in pathogenesis. *Br. J. Hamatol.* 8: 358~373. 1962.
7. Marques, L.R.M., Peiris, J.S., Cryz, S.J.: *E coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 33~38, 1987.
8. Doyle, M.P.: *E coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 12: 289~301, 1991.
9. Karmali, M.A., Petric, M., Lom, C.: The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *E coli*, *J. Infect. Dis.*, 151: 775~782, 1985.
10. Hockin, J.C., Lior, H.,: haemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *E coli* O157:H7 in Canada. *Can. Dis. Wkly. Rep.*, 13: 203~204, 1987.
11. Pai, C.H., Gordon, R., Sim, H.V.: Sporadic causes of hemorrhagic colitis associated with *E coli* O157:H7. *Ann. Int. Med.*, 101: 738~742, 1984.
12. Khem, M., Shahani, K.M. and Amadu, D., Ayebo, A.D.: Role of dietary *Lactobacilli* in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33: 2488, 1980.

13. Gilliland, S.E. and Sprck, M.L.: Antagonistic ation of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative culture, *J. Food protect.*, 40(12): 820, 1977.
14. Stamer, J.R.: The lactic acid bacteria; Microbes of diversity. *Food Technol.*, 33: 63, 1979.
15. Collins, E.B. and Aramaki, K.: Production hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 63: 533, 1980.
16. Metchnikoff, E.: The prolongation of life. 1st ED. *Putmans Sons, New York*, 1988.
17. Tramer, J.: Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature*, 21: 204~205, 1966.
18. Sandine, W.E.: Fenctions of intestinal lactic acid bacteria in humans. Second Annual National Symposium for Lactic acid bacteria and health, Korea, 43~54, 1981.
19. Bogdanov, I.G., P.G. Dalev, and A.I. Gurenich: Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall, *FEBS Letters*, 57: 259~261, 1975.
20. Reddy, G.V., K.M. Shahani, and M.R. Banerjee.: Inhibitory effect of yogurt on enrich ascites tumor cell proliferation, *J. Natl. Cancer Inst.*, 50: 815~817,
21. Farmer, R.E., G.V. Reddy, and K.M. Shahani: Antitumor activity of yogurt fractions. *J. Dairy Sci.*, 57: 582~590, 1974.
22. Perdigon, G., Nader de Macias, M.E., Alvarez, S., Oliver, G. and Pedce de Ruiz Holgado, A.A.: Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *L acidophilus*. *J. Dairy Res.*, 57: 255~264, 1990.