

## 알칼리조건에서 *Escherichia coli* O157:H7의 적응 및 항균요법제에 대한 감수성

권 오 진 · 배 종 호\*

대경대학 호텔제과제빵과, \*대구미래대학 제과제빵학과

### Habituation of *Escherichia coli* O157:H7 in Alkali and Susceptibility of Causative Agents

Oh-Jin Kwon and Jong-Ho Bae\*

Dept of Hotel Baking Technology, Taekyeung College, KyeongSan 712-850, Korea  
\*Dept. of Confectionery Decoration, Taegu Future College, KyeongSan 712-250, Korea

#### Abstract

Habituation to alkali condition and susceptibility to antimicrobial agents were investigated to determine methods to inactivation *Escherichia coli* O157:H7 associated with food poisoning. The investigation showed that *Escherichia coli* O157:H7 growth at pH 9.0 was much more resistant to extremes of alkaline pH(11.5) than at pH 7.0. Habituation occurred within 6hr at pH 9.0. The susceptibilities of *Escherichia coli* O157:H7 to 13 drugs examined were found highest in regard to saicin and ceftriaxone and lowest in regard to erythromycin and josamycin. No significant changes in minimal inhibitory concentration(MIC) values of bactericidal effect was found when saicin and ceftriaxone were irradiated with doses of 5~100KGy.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, alkali, habituation, gamma irradiation,

#### 서 론

*Escherichia coli* O157:H7은 사람이나 동물의 장관에 서식, 설사나 복통을 일으키는 병원성 대장균의 일종으로 다른 설사유발 세균에 비해 검출에 어려움이 있고 또한 용혈성 요독증성후군(hemolytic uremic syndrome, HUS)에 의한 뇌의 장애 및 중추신경증상을 수반하면 사망(5%)에 이르게 할 수 있다<sup>1-4)</sup>. *Escherichia coli* O157:H7은 주로 동물의 분비물에서 유래되어 농장이나 경작지 등의 고농도의 암모니아성 폐기물을 통해 수질환경에 오염되며 이러한 수질의 순환적 알칼리화(alkalinization) 즉, 물리·화학적인 스트레스는 미생물의 군집이나 증식상태에 영향을 미치게 되고 나아가서는 스트레스에 적응하여 저항성을 가지게 된다<sup>5-7)</sup>. 이러한 생태적 관점에서 열<sup>8)</sup>, 산화<sup>9)</sup>,

영양결핍<sup>10)</sup>, ethanol<sup>11)</sup>, 산<sup>12,13)</sup> 처리가 미생물의 저항성에 미치는 영향이 많은 연구자들에 의해 보고되어 왔다. *Escherichia coli* O157:H7에 의한 감염은 매우 심각한 사회문제의 하나로 이를 최소화하기 위해서 본 균주의 생태학적 특성을 살펴보는 것은 공중보건상 매우 중요하다<sup>4,15)</sup>. 또한 감염치료제의 병원성 미생물오염에 의한 사고도 빈번하여 1966년 스웨덴에서 감산선치료제에 *Salmonella* 오염으로 수백명의 감염환자가 발생하였고 이와 유사한 예로서 국외 의료잡지에 안연고나 세정제 등으로 인한 사고예가 백여건 정도 보고되고 있다<sup>16,17)</sup>. 따라서 병원성 미생물에 오염된 의약품을 감마선이나 전자선을 이용하여 실온하에서 비파괴적으로 살균처리가 가능한 이점이 있지만 방사선 에너지 흡수에 의한 유용성분의 분해나 활성변화에 관한 안전성 문제를 검토해야할 필요가 있다<sup>18-21)</sup>.

\* Corresponding author : Oh-Jin Kwon

본 연구에서는 *Escherichia coli* O157:H7에 의한 감염 예방 및 치료제에 의한 2차 감염을 막기 위하여 고농도의 알칼리 상태에서의 균주를 노출시킨 후 회석 혹은 중화가 균주의 증식에 미치는 효과와 감마선 조사 및 비조사된 항균요법제의 감수성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 Iowa State University(Iowa Pork Industry Center, USA)에서 분양받은 *Escherichia coli* O157:H7(ATCC 43894)을 사용하였다. 균주는 tryptic soy agar(TSA, Difco Laboratories, Detroit, Mich.)의 사면배지에 24시간 계대배양 후 이것을 tryptic soy broth(TSB, Difco) 100ml에 1 백금을 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양(150rpm)한 다음 배양액 1.0ml를 다시 새로운 100ml의 TSB 배지에 접종하고 16시간 진탕배양시켜 정상기(stationary phase)의 영양세포를 얻었다. 이 영양세포 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리(9,000×g)하여 얻은 균체를 살균된 Butterfield's phosphate buffer(0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> adjusted to pH 7.1 with NaOH, 이하 buffer)로 2회 세척, 재원심분리하여 최종 영양세포의 농도를 약 10<sup>9</sup> CFU/ml가 되도록 조절하여 사용하였다.

### 2. 감마선 조사

항균요법제는 micro test tube(∅10×40mm)에 1.0g의 시료분말을 넣은 다음 감마선을 조사하였다. 감마선 조사는 선원 10만 Ci, <sup>60</sup>Co 감마선 조사시설을 이용하여 분당 71.5Gy의 선량율로 5, 10, 20, 30kGy 및 100kGy의 총 흡수선량을 얻도록 조사하였다.

### 3. 알칼리에서의 적응성

TSB의 pH를 5M HCl과 1M NaOH로 pH 4~12로 조정한 후 autoclave로 살균하고 균주를 접종(약 10<sup>8</sup> CFU/ml), 37°C에서 24시간 진탕배양(150rpm)하여 pH별 증식을 조사하였다. 알칼리 처리 후 균주의 적응성 검사는 균 현탁액 1.0ml를 pH 11.5로 조정된 99ml의 TSB 배지에 접종한 후 0, 3, 5분 및 8분간 알칼리 용액에 노출시켰다. 노출된 균체액은 pH가 9, 11인 새로운 10ml의 액체배지에 0.1ml를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 살균된 냉 buffer로 적절히 희석하여 TSA 평판배지에서 형성된 집락을 계수하여 조사하였다. 알칼리 용액에서의 노출시간에 따른 효과는 pH 11.5에서 3~8분간 노출시킨 균체액을 37°C

에서 4~8시간(interval: 1시간) 진탕배양(180rpm)하면서 균주의 증식상태를 spectrophotometer(UV-1601PC, Shimadzu)로 600nm에서의 흡광도값을 조사하여 비노출된 control(이하 control)과 비교하였다.

### 4. 항균요법제에 대한 감수성

항균요법제에 대한 감수성은 여러 농도의 약제가 포함된 10ml의 TSB 배지에 균 현탁액 0.1ml를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 육안으로 증식을 관찰할 수 없는 접종관만을 골라 그 0.1ml를 평판배지에 도말하여 집락이 생성되지 않거나 10 CFU/ml 이하를 최소발육저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)로 하여 감수성치를 판정하였다. 항균요법제는 시판되는 13종[augmentin(일성신약), erythromycin(보령제약), cephradine(엘지화학), saicin(일동제약), ampicillin(영진약품), josamycin(동아제약), ofloxacin(제일약품), oxytetracycline(한국화이자), chloramphenicol(종근당), lincocin(상아제약), cefadroxil(고려제약), cefaclor(유한양행), ceftriaxone(제일제당)]의 항생제를 구입하여 사용하였으며 그 농도는 ml 당 0, 0.024, 0.048, 0.098, 0.195, 0.39, 0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μg 및 100 μg이 되게 하여 사용하였다. 또한 균주에 대해 감수성이 높은 약제는 감마선을 조사하여 비조사군과 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 알칼리에서의 적응성

고농도의 알칼리 서식환경에서 *Escherichia coli* O157:H7의 증식상태를 시험관상에서 조사하기 위해 배양액의 pH를 달리하여 균주의 증식을 조사하였다. Fig. 1과 같이 *Escherichia coli* O157:H7은 pH 7~10까지의 중성에서 약알칼리 부근에서 증식이 가장 좋았으며 pH 11 이상에서는 균주의 증식이 억제되었다. 따라서 이 균주는 산성쪽보다 알칼리성쪽에서 좀 더 저항성이 있을 것으로 생각된다. 다음으로 고농도의 알칼리 용액(pH 11.5)에서 균주를 노출시킨 후 각각 중성(pH 7) 및 약알칼리성(pH 9)으로 조정된 TSB 배지에 접종하여 그 증식상태를 평판에서의 균수와 액체배지 상태에서의 흡광도값으로 조사하였다. 전체적으로 pH 11.5에 노출시 control 보다 균주의 증식이 약간 억제되었으며 특히 8분 노출 후 pH 7.0에서 배양시는 약 1 log cycle 이상의 균수가 감소되었고 대조적으로 pH 9에서는 저항성이 약간 있었다(Table 1). 이러한 차이는 노출동안 균주가 배지의 pH를 낮추는

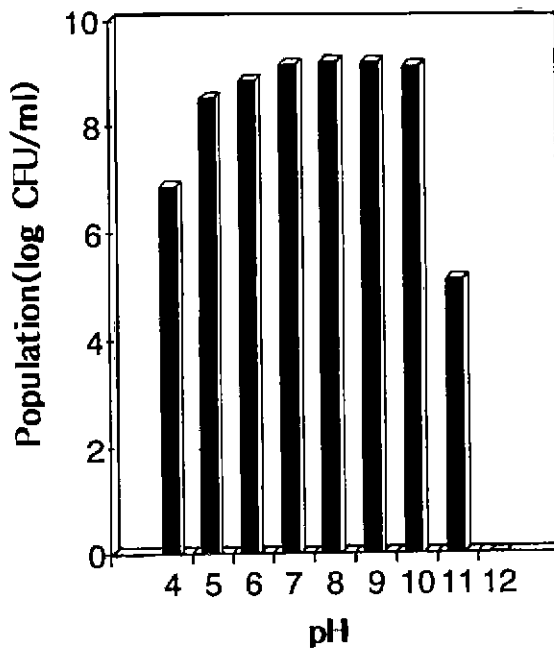


Fig. 1. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in tryptic soy broth at different pH values adjusted with 5M HCl or 1M NaOH and incubated at 37°C.

Table 1. Resistance of habituated *Escherichia coli* O157:H7 to damage by alkali (pH 11.5)

| Growth pH | Exposure time (min) | Cell population (log CFU/ml) |
|-----------|---------------------|------------------------------|
| 7.0       | 0                   | 9.78                         |
|           | 3                   | 9.23                         |
|           | 5                   | 9.22                         |
|           | 8                   | 8.17                         |
| 9.0       | 0                   | 9.77                         |
|           | 3                   | 9.17                         |
|           | 5                   | 9.15                         |
|           | 8                   | 9.16                         |

Range of the results for the strain tested was determined after 24hr of incubation in the tryptic soy agar. All values are averages of duplicate trials.

능력에 기인하는 것이 아니라 알칼리 서식환경에서의 적응능력 즉 표현형 (phenotype)의 차이에 기인되는 것으로 생각된다<sup>22)</sup>. 한편, 이러한 생물학적인 표현형의 변화를 배양액의 흡광도값으로 조사하기 위해 알칼리에서 노출 후 상기와 동일한 pH에서의 증식상태를 살펴 본 결과는 Table 2와 같았으며 pH 7에서는 3분과 5분 노출 후 8시간이 경과되어야만 control과 비교해 90% 이상 증식하였으며 8분 노출시에는 8시간

Table 2. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in broth after exposure to alkali

| Growth pH | Exposure time (min) | Growth of exposed organism as a percentage of untreated control at |      |      |       |       |
|-----------|---------------------|--|------|------|-------|-------|
|           |                     | 4hr  | 5hr  | 6hr  | 7hr   | 8hr   |
| 7.0       | 3                   | 88.5   | 89.8 | 89.2 | 89.5  | 99.8  |
|           | 5                   | 64.0   | 78.2 | 78.4 | 89.5  | 91.5  |
|           | 8                   | 56.0   | 59.5 | 75.4 | 77.4  | 79.2  |
| 9.0       | 3                   | 83.7   | 95.0 | 99.5 | 100.0 | 100.0 |
|           | 5                   | 77.6   | 92.1 | 99.1 | 99.0  | 99.4  |
|           | 8                   | 64.5   | 70.7 | 75.9 | 93.1  | 99.2  |

Range of the results for the strain tested was determined after 24hr of incubation in the tryptic soy broth. Test organism at an initial concentration of ca  $10^5$  CFU/ml was inoculated to the broth.

의 배양까지도 80% 이하의 낮은 증식을 나타내었다. 그러나 pH 9에서는 3~8분 노출시켜 5~7시간 경과 후 control과 비교해 90% 이상 균수가 회복되었다. 이와같은 결과로 고 농도의 알칼리에서 노출시킨 후 증식이 control의 90% 이상이 되는 시간을 비교해 보면 pH 9에서는 pH 7에서 보다 3시간 정도가 단축되어 손상된 세포의 회복은 서식환경에서의 적응능력에 따라 다르게 나타났다. Goodson과 Rowbury<sup>22)</sup>는 알칼리 (10.5~11.5)에서 8분 노출 후 pH 7에서 *E. coli*를 완전히 저해시켰고 pH 9에서는 증식이 활발하여 60분 이내에 균주는 완전히 적응된다고 보고하여 본 실험 결과와 비교하면 pH 9에서만 부분적으로 일치하였다.

## 2. 항균요법제에 대한 감수성

일반적으로 식중독 균주는 저선량 조사로서 충분히 살균할 수 있으나 아포형성 균주들은 고선량의 조사로서만 불활성화되기 때문에 조사에너지에 의한 물질의 변화가 일어날 수 있다. 식품조사에서는 국제적으로 그 안전성이 공인된 선량은 평균 10kGy 이하로서 규정되어 있으므로<sup>23)</sup> 의약품에서도 이에 준하여 생각할 수 있다. 이에 본 실험에서는 의약품 특히, 항균요법제인 항생제에 감마선을 조사하여 약제에 미치는 효과를 비조사시와 비교하였고 또한, 오조사에 의해 의약품이 고선량으로 조사될 가능성이 존재하므로 10kGy 이상의 선량에서도 살균효과를 조사하였다. 사용한 13종의 약제 중에서 erythromycin과 josamycin은 각각 최소발육저해농도(MIC) 값이 100 µg/ml 이상으로 나타나 본 균주를 저해하지 못하였으며 saicin, ceftriaxone 및 ofloxacin은 살균효과가 매우 좋았다

**Table 3. Minimal inhibitory concentration (MIC)<sup>1)</sup> of drugs for *Escherichia coli* O157:H7**

| Drugs           | MIC( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------------|-------------------------|
| Augmentin       | 12.5                    |
| Erythromycin    | 100< <sup>2)</sup>      |
| Cephadrine      | 25                      |
| Saicin          | 0.049                   |
| Ampicillin      | 6.25                    |
| Ofloxacin       | 100<                    |
| Josamycin       | 0.195                   |
| Oxytetracycline | 50                      |
| Chloramphenicol | 12.5                    |
| Lincocin        | 100<                    |
| Cefadroxil      | 12.5                    |
| Cefaclor        | 25                      |
| Ceftriaxone     | 0.098                   |

<sup>1)</sup>MIC means the each drugs concentration level of no growth after cultured at tryptic soy broth for 24hr.

<sup>2)</sup>Means that the tested bacterium was not inhibited with those concentrations.

(Table 3). 한편 이러한 약효가 감마선 조사에 의해서도 동일한 결과를 나타내는지에 대해 살펴본 결과, 가장 감수성이 높았던 saicin과 ceftriaxone에 5~100 kGy로 감마선을 조사하여도 균주에 대한 감수성의 변화는 관찰되지 않았다. 본 결과로 볼 때 10kGy에서는 물론 고선량인 100kGy의 조사 후에도 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항생제의 살균효과가 동일하여 감마선 조사의 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다. 권 등<sup>24)</sup>은 6종의 위생관련 세균들에 대해서도 감마선 조사된 항생제에 대한 본 결과와 동일한 효과를 보고한 바 있고, Modha 등<sup>25)</sup>은 *E. coli*에 대해서 novobiocin의 저해효과 및 cationic compounds에 의한 상승효과를 보고한 바 있다.

## 요 약

본 연구는 병원성 *Escherichia coli* O157:H7에 의한 감염을 예방하기 위하여 알칼리에서의 적응성과 항균요법제에 의한 불활성화 효과를 조사하였다. *Escherichia coli* O157:H7은 고 농도의 알칼리(pH 11.5)에 노출 후, pH 9에서의 증식이 pH 7에서 보다 좀 더 저항성이 있게 나타나 알칼리에서의 적응능력이 강했다. 이러한 알칼리 적응성은 pH 9에서 6시간 이내에서 잘 나타났다. 한편, *Escherichia coli* O157:H7은 항균요법제 중 saicin과 ceftriaxone에서 감수성이 매우 높았

고 반면, erythromycin과 josamycin에서는 저항성이 높았다. 또한 saicin과 ceftriaxone에 5~100kGy로 감마선을 조사하여도 균주의 최소발육저해농도(MIC)에는 영향을 미치지 않았다.

## 참고문헌

1. Ratnam, S., March, S. B., Ahmed, R., Bezanson, G. S. and Kasatiya, S.: Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7, *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2006~2012 (1988).
2. Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokow, R. and Morris G. K.: Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *J. Clin. Microbiol.*, 18, 289~302 (1993).
3. Doyle, M. P. and Schoeni, J. L.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2394~2396 (1987).
4. Thompson, J. S., Hodge, D. S. and Borczyk, A. A.: Rapid biochemical test to identify verotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157, *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2165~2168 (1990).
5. Rice, E. W., Johnson, C. H., Wild, D. K. and Reasoner D. J.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis, *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 38~40 (1992).
6. McGowan, K. L., Wickersham, E. and Strockbine, N. A.: *Escherichia coli* O157:H7 from water, *Lancet*, 967~968 (1989).
7. Conner, D. E. and Kotrola, J. S.: Growth of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 382~385(1995).
8. Ahmed, N. M., Conner, D. E. and Huffman, D. L.: Heat-resistance *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, 60, 606~610 (1995).
9. Demple, B. and Halbrook, J.: Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, *Nature*, 304, 466~468 (1983).
10. Jenkins, D. E., Schultz, J. E. and Matin, A.: Starvation-induced cross-protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenge in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 170, 3910~3914 (1988).
11. Michel, G. P. F. and Starka, J.: Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*, *J. Bacteriol.*, 165, 1040~1042 (1986).

12. Goodson, M. and Rowbury, R. J.: Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value, *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 77~79 (1989).
13. Abdul-Raouf, U. M., Beuchat, L. R. and Ammar, M. S.: Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2364~2368 (1993).
14. Doyle, M. P.: *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods, *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 289~302 (1981).
15. Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A. and Lior, H.: A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home, *N. Engl. J. Med.*, 317, 1496~1500 (1987).
16. 木村捷二郎, 越川富比古, 泰松明子:  $\gamma$ 線照射法による生薬の微生物汚染対策の問題点, *J. Antibact. Antifung. Agents*, 23, 691~697 (1995).
17. 國立衛生試驗所衛生微生物部: 厚生省藥務局審査課報告 (1972~1975).
18. 육홍선, 정영진, 김정옥, 권오진, 변명우: 감마선과 오존 처리가 알로에와 화분의 오염미생물 제거 및 지방산 조성에 미치는 영향, *한국식품과학회지*, 29, 527~532 (1997).
19. 변명우, 육홍선, 권오진, 조성기, 이성희: 오존처리와 감마선 조사가 스피루라나와 다시마 분말의 품질특성에 미치는 영향, *한국식품과학회지*, 29, 764~770 (1997).
20. Chen, Y. P., Andrews, L. S. and Grodner, R. M.: Sensory and microbial quality of Irradiated crab meat products, *J. Food Sci.* 61, 1239~1242 (1996).
21. Byun, M. W., Yook, H. S., Kwon, O. J. and Kang, I. J. : Effects of gamma irradiation on physicochemical properties of Korean red ginseng powder, *Radiat. Phys. Chem.*, 49(4), 483~489 (1997).
22. Goodson, M., and Rowbury, R. J.: Habituation to alkali in *Escherichia coli*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 9, 71~73 (1989).
23. WHO: Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee on the wholesomeness of irradiated food. Technical Report Series-659, p.34 (1981).
24. 권오진, 정민선, 정영진: 감마선 조사가 세균의 열 및 항생물질 감수성에 미치는 영향, *한국위생과학회지*, 2, 67~74(1997).
25. Modha, J., Barrett-Bee, K. J. & Rowbury, R. J.: Enhancement by cationic compounds of the growth inhibitory effect of novobiocin in *Escherichia coli*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 219~223 (1989).

---

(1999년 11월 6일 접수)