

腸內細菌의 時間差 混合培養이 보여주는 菌數測定の 比較

黃善哲 · 全普誠

(高麗大 醫技大 臨床病理科)

Colony Count with Mixed Culture of Enteric Bacteria
by *in vitro* Quantitative Method

WHANG, Sung Chul, and Bo Soung JOUN

(Dept. of Clinical Pathology, School of Med. Technology, Korea Univ.)

ABSTRACT

This study was attempted to see more clear relationships among the enterobacteria, especially between the intestinal normal flora and pathogenic enteric bacteria.

It has been known that some intestinal normal flora produce the bacterial metabolites that are harmful to other enteric bacteria. One of the metabolites is known as colicin, the protein fraction, which possesses certain degree of inhibitory effect against other bacterial growth. As a preliminary study for a colicin purification, the antagonistic effect of *E. coli* to groups of *Salmonella* and *Shigella* has been studied by means of *in vitro* quantitative culture method.

1. *E. coli* showed definite inhibitory effects against both *Salmonella* and *Shigella* groups in the mixture of two organisms.
2. The inhibitory effects of *E. coli* in the *E. coli-Salmonella* and the *E. coli-Shigella* mixture occurred from 4 hours incubation following the inoculation.
3. Even the complete inhibition of pathogenic enteric bacterial growth was noticed in the *E. coli-Salmonella* mixture at overnight incubation.
4. Among the diluted mixtures, 1 : 100, 1 : 1,000, and 1 : 10,000, survival rate of pathogenic enteric bacteria in the mixtures with *E. coli* showed least affected at the 1 : 1,000 dilution.
5. It was found that the antagonistic effect against groups of *Salmonella-Shigella* was depending upon the groups of the genera.

諸 論

病原性腸內細菌, 特히 *Salmonella* 및 *Shigella* 菌屬이 非病原性腸內細菌으로 汚染된 臨床可檢物에 섞였을 때 그 發育이 눈에 띄이게 減少될 뿐만 아니라 어느 境遇인全體發育이 抑制되는 수도 있다. 臨床可檢物內에서의 이와같은 病原性腸內細菌의 損失을 防止하기 爲하여 可檢物의 細菌同定節次 第一段階로 增菌培地를 使用하며 또는 選擇培地를 使用하기도 한다. 그러나 問題

는 어느 培地에서든 우리가 願하는 腸內細菌과 願치않는 菌이 섞여 一般培地에 섞여졌을 때엔 그릇된 同定으로 끝날 可能性도 없지 않다. 이와같은 結果는 腸內細菌相互間의 培抗關係(antagonism)로 因한 것이라고 알려져 있으며 이 關係는 病原性細菌인 *Salmonella*와 *Shigella*菌들이 非病原性腸內常住菌, 特히 大腸菌(*E. coli*)에게 언제나 못당하게 되어있는 一方의인 것이다. 培抗關係의 主要因은 腸內細菌中 몇 菌屬이 갖고 있는 代謝產物의 一種인 colicin(단백

물질) 때문이라고 알려 졌다.

著者들은 이와같은 拮抗關係의 試驗管上의 實驗을 통한 colicin 分離의 前期實驗으로 *E. coli*와 *Salmonella* 및 *Shigella*의 各 四群菌株(group A, B, C와 D)의 混合培養을 時間差와 稀釋差를 두어 實驗한 結果에서 얻은 集落計算(colony count)의 比較值를 報告한다. 이 實驗結果로 얻을 수 있었던 잠정적인 成績은 主로 混合可檢物이 同棲하는 時間에 따라 보여주는 全體菌數의 差와 可檢物의 稀釋倍數에 따르는 菌檢出度의 顯著한 差를 들 수 있다.

材料 및 方法

1. 實驗에 使用된 菌株

Salmonella A, B, C 및 D群과 *Shigella* A, B, C 및 D群菌株는 國立保健研究院에서 分讓받은 것으로 實驗前 各群抗血清으로 確認한 8個의 菌株들이 있으며 大腸菌株는 臨床可檢物에서 分離된 것으로 生化學的 檢査로 確認되고 또한 EMB에서 典型的인 色彩를 形成한 것을 使用하였다.

2. 培 地

增菌培地로 nutrient broth를 使用하였으며 稀釋用 溶液으로도 같은 培地를 썼다.

한便 分離鑑別用으로는 MacConkey 平板培地를 使用하였다.

3. 實驗方法

第一次로 *E. coli*와 *Salmonella* 및 *Shigella*를 液體培地인 nutrient broth에 各 各 3입어 하루밤 增菌시킨 후 다시 2ml의 nutrient broth에 各 한 loopful씩 섞어 直時 MacConkey 平板에 그 混合液 한 loopful을 全面塗抹培養하였다. 이 菌混合液을 2時間 37°C에서 培養후 다른 MacConkey平板에 3입어 培養했으며 繼續하여 4時間, 8時間, 그리고 한밤 培養후 위와같은 方法으로 塗抹培養하였다. 第二次 試驗은 *E. coli*와 *Salmonella* 및 *Shigella*等 모두 9個菌株를 液體培地에 純粹培養 한 후 미리 준비한 1ml 分注된 nutrient broth에 1:100, 1:1,000 및 1:10,000으로 菌株를 同量混合稀釋하여 그 混

合菌液의 0.01ml(直徑 4mm짜리 白金耳使用)를 MacConkey 平板培地에 全面塗抹培養하고 같은 方法으로 4時間, 8時間 및 한밤 培養한 것을 그때 그때 앞에서 말한 비대로 稀釋하여 各 各 培養하였다.

第一次試驗의 集落計算은 總數를 센것이 아니고 平板培地를 均等하게 分割한후 集落의 分布가 고르다고 보여지는 곳을 세어 實數를 比較하였다.

第二次試驗은 一次時와는 달리 全面에 자라난 集落을 乳糖(lactose) 分解菌과 非分解菌으로 나누어 A.O. colony counter로 各 各 計算하여 그 數에 稀釋倍數를 곱하였다.

結 果

1. 定量法으로 하지 않은 第一次 試驗의 結果는 Table 1에서 보는 바와같이 *E. coli*와 *Salmonella* group A의 混合된 狀態에서 4 時間에 이르기까지는 *Salmonella* group A의 菌數가 *E. coli*에 비해 적기는 하지만 셀수 있을만큼 發育하였다. 8時間과 한밤을 培養한 混合液에서는 *E. coli*는 셀수 없을만큼 많이 자라나는데 反하여 *Salmonella* group A는 集落이 全혀 보이지 않았다. 이와 비슷한 結果는 *Salmonella* group B와 group D의 境遇에도 나타났다. 다만 *E. coli*와 *Salmonella* group C의 境遇만은 比較가 안되도록 集落數의 差는 있으나 한밤을 培養한 後에도 셀수 있을 만큼의

Table 1. No. of colonies grown from *E. coli-Salmonella* mixture

Hour	Group			
	<i>E. coli: Salmonella</i>			
	<i>Sal. gr. A</i>	<i>Sal. gr. B</i>	<i>Sal. gr. C</i>	<i>Sal. gr. D</i>
Immediate	17 : 3*	18 : 12	14 : 25	12 : 2
2 Hours	31 : 18	20 : 35	25 : 14	14 : 7
4 Hours	43 : 25	15 : 15	22 : 17	16 : 25
8 Hours	TMTC: 2	TMTC: 10	25 : 13	TMTC: 2
18 Hours	TMTC: 0	TMTC: 1	TMTC: 15	TMTC: 2

*: Counted at one particular area where showed even colony distribution

Table 2. No. of colonies grown from *E. coli-Shigella* mixture

Group Hour	<i>E. coli: Shigella</i>			
	<i>Shig.</i> gr.A	<i>Shig.</i> gr.B	<i>Shig.</i> gr.C	<i>Shig.</i> gr.D
Immediate	9:—*	6:—	15:—	9:14
2 Hours	21:1	15:11	20:—	20:20
4 Hours	TMTC: 5	TMTC: 3	TMTC: 3	30:21
8 Hours	TMTC: —	TMTC: —	TMTC: —	TMTC: 50
18 Hours	TMTC: —	TMTC: —	TMTC: —	TMTC: 50

*: Counted at one particular area where showed even colony distribution

Table 3. Total count of *E. coli-Salmonella* gr. A by ten-fold dilution method

Interval	Dil. 1:100	1:1,000	1:10,000
Immediate	170:3×10 ²	224:40×10 ³	16:36×10 ⁴
4 Hours	640:8×10 ²	116:4×10 ³	9:1×10 ⁴
8 Hours	480:8×10 ²	33:2×10 ³	5:1×10 ⁴
18 Hours	*	NG	NG

*: Not countable

Table 4. Total count of *E. coli-Salmonella* gr. B by ten-fold dilution method

Interval	Dil. 1:100	1:1,000	1:10,000
Immediate	1520:88×10 ³	146:36×10 ³	54:25×10 ⁴
4 Hours	808:8×10 ²	99:3×10 ³	19:0×10 ⁴
8 Hours	872:16×10 ³	92:9×10 ³	5:0×10 ⁴
18 Hours	*	600:120×10 ³	10:3×10 ⁴

*: Not countable

Table 5. Total count of *E. coli-Salmonella* gr. C by ten-fold dilution method

Interval	Dil. 1:100	1:1,000	1:10,000
Immediate	*	9:51×10 ³	8:56×10 ⁴
4 Hours	1072:128×10 ²	81:25×10 ³	6:1×10 ⁴
8 Hours	1588:496×10 ²	102:116×10 ³	8:9×10 ⁴
18 Hours	*	35:40×10 ³	1:0×10 ⁴

*: Not countable

Table 6. Total count of *E. coli-Salmonella* gr. D by ten-fold dilution method

Interval	Dil. 1:100	1:1,000	1:10,000
Immediate	96:10×10 ²	456:224×10 ³	32:84×10 ⁴
4 Hours	256:24×10 ²	9:1×10 ³	1:0×10 ⁴
8 Hours	1016:72×10 ²	75:26×10 ³	9:0×10 ⁴
18 Hours	*	560:16×10 ³	85:2×10 ⁴

*: Not countable

Salmonella 集落의 發育하였다는 것이다. *E. coli*와 *Shigella*의 네 群菌株를 混合培養했을 때의 結果는 Table 2에서와 같이 *E. coli*의 *Shigella*에 대한 拮抗作用이 *Salmonella*의 境遇와 比較하여 더욱 甚한 것으로 나타났다. 拮抗反應이 時間적으로 빨리 나타났을 뿐더러 拮抗能力도 強力한 것으로 나타났다. *E. coli*와 *Shigella* group A와의 混合液을 直刻培養 했을 때 *E. coli*는 자라는데 反하여 *Shigella*는 자라지 않았다. 2時間 培養된 것에도 크게 數의 差를 두고 적게 자랐다. 4時間後엔 比較할 수 없게 數字의 差를 보였으며 8時間 後엔 *Shigella* group A는 全히 자라지 않았다. *Shigella* group B와 C의 境遇도 이와 비슷한 結果였으며 *Shigella* group D는 *E. coli*의 拮抗作用에 가장 적게 影響을 받은 것으로 나타나나 한밤후에는 다른 群菌과 마찬가지로 全體發育抑制 되었다.

2. *E. coli*와 *Salmonella* 各群菌種을 同量純粹培養 後 이틀 各各 1:100, 1:1,000 및 1:10,000으로 稀釋하여 直時 Mac-Conkey 平板培地에 0.01ml를 塗抹培養하고 같은 方法으로 4時間, 8時間과 한밤 培養해서 定量的인 方法으로 集落計算을 하였다. 成績의 全般的인 共通點이라고 할 수 있는 것은 稀釋倍數가 높아짐에 따라 *E. coli*와 *Salmonella* 菌集落의 比가 낮아진다는 것을 알 수 있었다.

이는 *E. coli*의 *Salmonella*에 對한 拮抗作用이 稀釋倍數가 높아지면 弱화된다는 것을 나타내는 것으로 볼 수 있다. 時間差를

두고한 集落計算에서는 第一次 試驗일 때와 마찬가지로 混合接種後 4時間을 頂上으로 그 集落數가 8時間 後부터 下降하기 始作하였으며 한밤이 지난 後의 境遇는 1:100으로 稀釋된 培地上에서 *Salmonella*菌의 發育抑制로 計算이 不可能하였다. 그러나 *Salmonella* group A의 境遇를 除外하고 나머지 *Salmonella* group B, C 및 D 菌種들은 Table 4, 5와 6等에서 보는 바와 같이 1:1,000 및 1:10,000으로 稀釋된 混合液으로 培養했을 때 한밤 後에도 셀수 있을 만큼의 集落이 計算되었다. 이와같은 結果는 第一次 試驗에서 해본 稀釋되지 않은 混合液을 時間差만 두고 했을 때 보여주던 한밤 培養後 *Salmonella* 群菌들의 全面發育抑制와는 아주 좋은 比較가 된다. 또 한가지 全體的인 試驗에서 얻을수 있었던 結果는 *E. coli*의 拮抗作用에 對하여 被害를 제일 적게 입고 *Salmonella*가 發育할 수 있었던 稀釋倍數가 1:1,000이었다는 것이다. 1:100인 경우 *E. coli*가 지나치게 優勢하고 1:10,000인 경우엔 菌發育이 거의 抑制된 狀態였다. 이상 全般的인 實驗成績은 *Salmonella* 群別로 보면 *E. coli*와 *Salmonella* group A의 경우 直時 培養된 것중 1:10,000倍로 稀釋된 곳에서 오히려 *E. coli*보다 *Salmonella* group A 菌數가 倍以上 많았다가 4時間 後부터 急激히 下降하여 하룻밤이 지난후의 것에서는 *E. coli*나 *Salmonella*가 모두 자라지 않았다. 이와같은 結果는 다른 세群(group B, C 및 D)에서도 볼 수 있다. 또 *E. coli*의 數가 많은 곳에서 일수록 反比例的으로 *Salmonella*菌이 빠른 速度로 死滅해 가고 있었음을 보여준다. *Salmonella* group B, C와 D 등은 *E. coli*의 拮抗作用에 一般的으로 어느 程度의 耐性이 있음을 보여 주었으며 특히 group B의 1:1,000 稀釋液에서는 培養時間에 關係없이 꾸준히 同棲를 持續하였다. 勿論 發育菌數도 그 比가 一律的인 것을 알 수 있었다. *Salmonella* group C는 1:1,000 稀釋에서 오히려 *E. coli*의

集落數를 증가하고 있었으며 이와같은 現狀은 하룻밤 混合培養 後에도 같게 나타났다.

Salmonella group D도 1:1,000 稀釋液에서 group C의 경우처럼 우세하지는 않았으나 8時間後와 하룻밤 후에도 集落數는 줄었으나 셀수 있을 만큼은 發育되었음을 알 수 있었다.

考 察

本實驗은 腸內細菌間的 拮抗關係의 要因이라고 알려진 어떤 細菌의 代謝產物의 一種인 colicin을 分離하여 腸內細菌 特別 病原性菌인 *Salmonella* 菌屬에 對한 作用을 檢討하기 위한 一連의 實驗中 一部인 것이다. 우리나라에서는 colicin의 分離가 報告된 例는 없지만 *Shigella*菌의 鷄胎內增殖能과 이에 對한 *E. coli*의 拮抗作用을 動物實驗法으로 한 報告가 있다.

趙(1973)는 *E. coli*의 培養液 및 이를 millipore로 濾過시킨 그 濾液도 함께 鷄胎에 試驗했으나 colicin이라고 생각되는 이 代謝產物의 이름을 밝히지는 않았다. 第一次 試驗으로 行한 *E. coli*와 *Salmonella*의 4個 群에 屬한 菌種들과의 混合液을 各各 直時, 2時間, 4時間, 8時間 및 하룻밤 培養한것은 lactose 分解菌과 非分解菌의 區別이 可能한 MacConkey 平板培地에 全面塗抹接種 하룻밤 37°C에서 培養한 後 集落數를 均等하게 자랐다고 보이는 곳을 골라 各各 區別하여 세었다. 이는 單純히 *E. coli*와 *Salmonella* 菌이 同量混合된 狀態에서 時間이 지남에 따라 보여주는 두 菌사이의 關係를 보기 爲한 것이었으며 좀더 나아가서 *E. coli*가 갖고있는 *Salmonella*菌에 對한 一般的인 拮抗作用을 보기 爲한 것이었다. 하나의 參考試驗으로 *Shigella*群 4個群屬을 가지고는 *Salmonella*의 경우와 똑같이 해보았다. 이 두 實驗에서 比較할 수 있었던 것은 *E. coli*의 *Shigella*菌에 對한 拮抗作用이 *Salmonella* 菌에 비해 더 甚한것을 알 수 있었다. 이는 앞으로 더 繼續實驗을 通하여 좀더 確實한 結論을 얻을수 있겠다. 이 基礎實驗에서 얻

은成績은 *E. coli*의拮抗能이 가장旺盛하게 나타나기始作하는 때가接種後4時間頃이라는 것이었으며萬若 두가지菌液을 한밤培養後라면 *Salmonella*나 *Shigella*가全體發育이抑制된다는 것으로 나타났다.

*Shigella*인 경우各群에 따라 보여주는差異點은 없었으나 *Salmonella*의 경우엔 group C가顯著하게拮抗作用에對한耐性이 있음을 보여 주었다. 한밤混合培養後에도 *Salmonella*群의集落을 셀수 있었다. 第二次試驗에서는 *E. coli*와 *Salmonella*群屬만 가지고定量法으로集落計算을 하였다.稀釋倍數 및 時間差에 따르는集落數의比較는그리큰意義가 없다고 하겠으나 *Salmonella*의 group에 따라 *E. coli*의拮抗作用에對한反應의差가 있음을 볼수 있었다.

다시 말해서 어느 group의菌種은拮抗作用에對한耐性을 뚜렷하게 보이는 것이 있는가 하면 상당한感受性を 보이는 것도 있다.

이와같은成績은 Hardy, Brooks 및 Jiyima 등이 한實驗에서도 擧論된바 있다. 이와같은拮抗能에對하여 높은耐性を 보인 것이 특히 *Salmonella* group B, C와 D인데 그중에서도 group C는 전혀 그影響을 받지 않는 것으로 나타났다. 一次試驗에서와 달리稀釋된混合液에서는 8時間後까지比較的容易하게 *Salmonella*菌의檢出이可能했다.

同量混合된狀態에서는 4時間이 고비였으나稀釋된培養에서는菌種에 따라 18時間後까지도發育抑制를當하지 않은 것을 볼수 있다. 1:1,000으로稀釋될 경우 1:100일 때보다 *Salmonella*發育도가 훨씬 좋았으나 1:10,000인 경우에培養時間이經過됨에 따라成長集落數의減少를 보인 곳도 있고 또는 전혀 자라지 않은 곳도 있다.

病原性腸內細菌을非病原性腸內細菌, 특히大腸菌과混合된被檢體로부터分離하는 하나의方便으로分離培養前에稀釋해서 심었을때 그分離檢出율이 더 높다는 것에對한實驗과一致되는 것을 알수 있다. 이는臨床에서의病原性腸內細菌, *Shigella-Salmonella* group을大便에서分離하려 할 때 꼭 이행이 되어야 할 것이다. 또한被檢體를 받는直時處理하지 않고長時間放置해 두었을 경우 우리가願하는菌의拮抗作用에依한死滅을招來한다는 것을確認하게 된 것이기도 하다. *Salmonella*나 *Shigella* group들 중에서도 *E. coli*의拮抗能에對한感受성이一律적이 아니고 그 group에 따라差가 있음은興味있는結果였다고 본다.病原性腸內細菌이體 내에서病變을 일으키는程度라던지年齡과個人的免疫에 따르는病度の差같은 것의 하나로 *E. coli*의體 내에서의拮抗能에對한實驗도繼續試圖해 불만한課題라고 본다.

摘 要

이번 colicin 分離實驗의基礎過程인 一, 二次試驗을 통하여 著者들은 다음과 같은 잠정적인 結果를 얻었음을 報告한다.

1. *E. coli*와 *Salmonella* 또 *E. coli*와 *Shigella*를 同量混合해서 培養時間差를 두고集落計算을 했을 경우 언제나 *E. coli*가 *Salmonella*나 *Shigella*菌에 비해 越等 數字의으로 強勢를 보이며 특히 8時間後에는 *Salmonella*나 *Shigella*가 全面抑制를 當하였다.

2. *E. coli*의拮抗能에對한 *Shigella*의感受성은 *Salmonella*에 비해 더욱 높았으며 네개의試驗菌株中 group에 따르는感受성의差를 볼수 없었다. 反面 *Salmonella* 群中에는 group C와 D, 특히 group C는 group A나 B에 비해比較的 강한耐性を 보였다.

3. *E. coli*와 *Salmonella*의各 group 菌數를 同數混合하여 이를 다시 時間差를 두고 培養한후 1:100, 1:1,000 및 1:10,000 등으로稀釋하여 定量法으로集落計算을 한成績은 一次試驗에서 보다 *E. coli*의拮抗能에關하여 좀더 자세히 알수 있었다.

4. 稀釋된狀態下에서의 *E. coli*의拮抗能은減少되었고 특히混合液을 1:1,000으로稀釋했을 경우

가장 적게 그 影響을 받는다는 것을 알 수 있었다. 이 成績은 많은 腸內細菌으로 汚染된 被檢體들이 어느 정도로 稀釋하면 理想的인 同定結果를 臨床적으로 얻을 수 있느냐를 提議하는 것으로도 볼 수 있다.

5. 稀釋된 混合菌液은 時間經過에 따르는 拮抗能의 作用을 最少限으로 받는다는 成績을 얻었다. 이는 汚染된 被檢體로부터 *Salmonella*를 分離하려면 되도록 빨리 處理하던지 아니면 稀釋된 狀態로 保管해야 된다는 것을 알려주고 있다.

9. 稀釋된 混合液의 集落計算으로 얻은 또 하나의 成績은 *Salmonella* 群中 group C는 *E. coli*의 拮抗能에 對한 高度의 耐性を 보였으며 group D도 어느 程度의 時間差에 對한 耐성이 있음을 보여 주었다. 이는 좀더 細部の인 試驗을 통하여 보다 確實한 結果를 얻을 수 있다.

引 用 文 獻

1. Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. Interscience Publications, N.Y.
2. Bradley, D.E., 1967. *Bact. Rev.*, **31**, 230.
3. Brooks, K., Clark, A.J., 1967. Behaviour of bacteriophage in a recombination-deficient strain of *E. coli*. *J. Virol.*, **1**, 283—293.
4. De Alwis, M.C.L., and Thomlinson, J.R., 1973. The incidence and distribution of colicinogenic and colicin-sensitive *E. coli* in the gastro-intestinal tract of the pigs. *J. gen. Microbiol.*, **74**, 45—52.
5. Frankel, S., et al., 1970. Gradwohl's clinical laboratory method and diagnosis. 7th ed., **2**, 1398.
6. Hardy, K.G., and Meynell, G.G., 1972. Colicin factors and mitomycin-C. *J. gen. Microbiol.*, **73**, 547—549.
7. Herschman, H.R., and Helinski, D.R., 1967. Comparative study of the events associated with colicin induction. *J. Bact.*, **94**, 691—699.
8. Ivanovics, G., 1962. *Bact. Rev.*, **26**, 103.
9. Jacob, F., et al., 1960. Microbial genetics. 10th Symp. Soc. Gen. Microbiol, **10**, 67.
10. Jiyima, T., 1962. Studies on the colicinogenic factor in *E. coli* K12 induction of colicin production by mitomycin-G. *Biken J.*, **5**, 1—8.
11. Konisky, J., and Nomura, M., 1967. *J. Molec. Biol.*, **26**, 181.
12. Ozaki, M., et al., 1966. *Biken J.*, **9**, 201.
13. Wilson, G.S., and Miles, A.A., 1966. Principles of bacteriology and immunity. 15th ed., **1**, 199.
14. Zinsser, H., 1968. Microbiology. 14th ed., 163.
15. 趙陽子, 徐仁鍊, 1969. *Shigella* 鷄胎感染에 관한 研究. 友石醫大雜誌, **6**, 2.
16. 趙陽子, 1973. 痢疾菌의 鷄胎感染에 미치는 大腸菌의 役割. 高麗醫大雜誌, **10**, 2.