

The Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides on the Growth Inhibition of *Salmonella* Typhimurium through Imd Pathway in *Drosophila* Intestine

Yun-Ji Lim, Yea-Hyeon Jo, Hwa-Jung Kim and Jeong-Kyu Park*

Department of Microbiology, Cancer Research Institute, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Some *Bacillus* species present in fermented foods are regarded as probiotics because of their ability to modulate the prevention of some intestinal infections and the modulation of the inflammatory immune response. We isolated bacteriocin-like substances producing *Bacillus subtilis* and *B. lentus* from Cheonggukjang, a traditional Korean fermented soybean paste having an inhibitory effect against *Salmonella* Typhimurium using a well diffusion inhibition assay and a broth co-culturing method. *B. subtilis* or *B. lentus* was fed to *Drosophila melanogaster* alone as well as in combination with *Salmonella* Typhimurium and survival was monitored daily. The survival rates by oral feeding *B. subtilis*, *B. lentus* and *Salmonella* Typhimurium separately resulted in 85, 90 and 75%, respectively. In contrast, survival rates of co-feeding of *B. lentus* with *Salmonella* Typhimurium were increased from 75 to 90% during 7 days post-feeding as compared to *Salmonella* Typhimurium alone. However, *B. subtilis* in co-feeding with *Salmonella* Typhimurium significantly reduced *D. melanogaster* survival rate (85 to 70%). We found that the immune response to *B. lentus* and *Salmonella* Typhimurium is characterized synergistic activation of antimicrobial peptide gene expression by Imd pathway. In conclusion, the *in vitro* and natural-route infection of the *D. melanogaster* digestive system can result in the use of the probiotic *B. lentus* for effective treatment of *Salmonella* Typhimurium infection. We therefore propose the strain *B. lentus* as a suitable candidate probiotics for use in the prevention and treatment of the intestinal infections caused by *Salmonella* Typhimurium.

Key Words: Antimicrobial peptide, *B. lentus*, *Salmonella* Typhimurium, *Drosophila melanogaster*

서론

살모넬라증(salmonellosis)은 오염된 음식물과 음료수 섭취로 감염된다. 우리나라에서는 장염형이 90% 이상이며 대표적인 원인균은 *Salmonella enterica serotype* Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium)과 *Salmonella enterica serotype* Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis)이다. 우리나라

에서 분리되는 대부분의 *Salmonella* Enteritidis는 다제내성균이 없지만 *Salmonella* Typhimurium은 50% 이상이 ampicillin, chloramphenicol, sulfonamide, tetracycline 등의 항생제에 다제내성을 보인다 (1). 원인으로 *Salmonella* Typhimurium에 오염된 고기, 우유제품 등을 통하여 사람이 감염되는데 최근 가축사료에 항생물질을 사용하는 것이 원인의 일부로 추정되고 있다. 그러므로 다제내성 *Salmonella* Typhimurium에 대한 대체치료법 개발이 요구

Received: March 19, 2013/ Revised: May 21, 2013/ Accepted: May 23, 2013

*Corresponding author: Jeong-Kyu Park, M.D. & Ph.D. Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-747, Korea.

Phone: +82-42-580-8244, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: jekpark@cnu.ac.kr

**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2010-0013298).

©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/>).

되고 있다.

프로바이오틱스(probiotics)는 기존 항생물질을 대체할 수 있는 기대가 되는 대체치료법이다. 프로바이오틱스는 적절한 균 수를 복용하였을 때 숙주의 건강에 유익을 주는 살아있는 미생물로 정의 되고 있다. 프로바이오틱스는 Lactobacilli와 Bifidobacteria를 포함한 유산균(lactic acid bacteria, LAB)과 Bacillus species, yeasts가 이용되며, 항미생물 펩티드(antimicrobial peptide, AMP)를 생산하여 다른 균의 성장을 억제하는 기능이 있다 (2, 3). 이들이 전통적으로 유럽에서는 요구르트(yoghurt), 치즈(cheeses)와 같은 발효유제품에서 우리나라에서는 김치, 된장 및 청국장과 같은 발효식품으로부터 섭취되어 왔다 (4).

우리나라 김치에서는 Lactobacillus species, Leuconostoc species, Weissella species 등이 분리되며, 그 이외에 *B. licheniformis*, *B. pumilus* 등이 분리배양되었다 (5, 6)고 한다. 된장에서는 *Leuconostoc mesenteroide*, *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus faecium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 등의 발효균과 *Mucor plumbeus*, *Aspergillus oryzae*, *Debaryomyces hansenii* 등의 진균이 분리되었으며 (7), 청국장에서는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. polyfermenticus*, *B. thuringiensis* 등이 분리배양되었다 (8)고 한다. 외국에서 *B. subtilis*는 바닐라, 커피, 코코아 등의 향을 증진시키기 위하여 발효식품의 생산에 사용되어 왔다 (9). 또한 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* 및 *B. subtilis* 등은 포도, 배 등의 식물조직에서도 흔히 분리되며 식물의 보호나 성장증진에 매우 중요한 것으로 알려져 있다 (10).

아포를 형성하는 Bacillus species는 열, 건조, 살균제에도 견딜 수 있어 토양, 진흙, 바위, 채소, 식품 등과 같은 다양한 환경에서 발견된다. 또한 식품의 조리과정과 소화 과정에 영향을 받지 않기 때문에 동물의 소화기계에 집락을 형성할 수 있는 장점을 가지고 있어 프로바이오틱스로서 유용성이 제기되어 왔다 (11). *B. subtilis*는 마우스에 장염을 일으키는 *Citrobacter rodentium*에 의한 장염발생을 막을 수 있었으며 (12), *B. licheniformis*를 프로바이오틱스로서 사용했을 때 닭의 장내점막면역의 균형을 유지하며 장용모 구조의 회복에 도움을 주는 것으로 알려졌다 (13). 칠면조를 대상으로 수행한 연구에서 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 *Salmonella* Typhimurium의 장관 균 집락 형성을 유의하게 감소시켰다 (14)고 한다. 최근 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*는 프로바이오틱스로서 안전하다

(15, 16)고 보고되었다. 따라서 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 사람이나 동물에 모두 이용할 수 있는 매우 유용한 프로바이오틱스 균주라고 할 수 있다 (9). 프로바이오틱스는 균주(strain)마다 특별한 특성이 있다. 균주마다 숙주세포와 직접 반응하는 표면 발현분자, 분비 단백질 및 대사산물들의 특별한 능력이 다르기 때문이다. 장내 균무리의 1%를 구성하는 *B. clausii*는 CD4⁺ T 세포의 증식을 자극하고 병원균의 성장을 억제하는 박테리오신(bacteriocin)을 생산한다. 박테리오신은 항균 펩티드로서 동종 또는 동종균주를 살균 또는 정균하는 특성이 있다. 그람양성 박테리오신은 종류가 많고 다양하지만 다른 그람양성균만을 사멸하여 항균범위가 비교적 좁다. 또한 진핵세포에서 생산되는 항미생물 펩티드와 많은 점에서 유사하다. 전통적으로 박테리오신 생산은 프로바이오틱스 균주의 선정에 중요한 요소로 생각되어 왔다 (17).

*In vitro*에서 세균과 세균간의 상호관계, 세균과 숙주세포와의 상호관계를 연구할 수 있다. 그러나 *in vivo*에서는 장내 정상균무리와의 관계, 숙주의 면역반응, 순응도의 문제, 윤리문제 및 고비용 등으로 프로바이오틱스와 병원균과의 상호관계를 연구하는데 장애가 되고 있다. 그러므로 *in vivo*에서 세균과 세균간의 관계뿐만 아니라 숙주의 면역반응을 연구하기 위한 적합한 연구 모델이 요구된다. 이러한 연구 모델로서 초파리(*Drosophila melanogaster*)의 이용이 제시되었다 (18).

초파리는 세균에 의한 장관상피세포 손상을 보호하는 chitinous matrix와 같은 물리적 기구와 장관의 세균증식을 일정하게 유지하는데 기여하는 장관상피세포에서 생산되는 ROS와 AMP와 같은 화학적 기구를 가지고 있다. 세균감염에 반응하여 생산되는 AMP는 Toll과 immune deficiency (Imd) 신호경로를 경유하여 생산된다. Imd 경로는 그람음성세균과 Bacillus species 감염에 대한 반응을 조절하며, Dipterin과 같은 AMP 유전자의 발현을 조절한다. Toll 경로는 그람양성세균과 진균감염에 대한 반응을 조절하며, Drosomycin과 같은 유전자 발현을 유도한다. AttacinA, CecropinA 및 Defensin의 유도는 Imd 또는 Toll 경로와 또는 두 경로 모두와 관계가 있다. 두 경로 모두의 돌연변이주는 미생물감염에 대한 감수성이 증가한다. 이와 같은 두 경로의 상승작용은 숙주의 선천면역 반응범위를 확대시킬 수 있다. 또한 두 개의 서로 다른 병원균 인식신호의 협동작용도 숙주의 선천면역 반응범위를 확대시킬 수 있다 (19).

본 연구자들은 청국장에서 유래된 그람양성 *B. subtilis* 와 *B. lentus*가 구멍확산억제시험(well diffusion inhibition assay)에서 그람음성 *Salmonella* Typhimurium을 사멸시키는 현상을 관찰할 수 있었다. 이어서 액체배지를 이용한 동시배양법(coculturing)으로 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제를 확인하였으며, 초파리 경구감염을 이용한 초파리의 생존율, *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제율 및 AMP 발현유도 등을 실시하여 *Bacillus* species가 *Salmonella* Typhimurium에 대한 선천면역반응과의 상승작용으로 Imd 경로의 AMP 생산을 증가시켜 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 억제시키는 결과를 얻을 수 있었다.

재료 및 방법

Bacillus species의 분리배양 및 동정

청국장 5 g을 각각 20 ml의 멸균된 생리식염수에 넣어 균질화 하고 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 그 침사를 생리식염수 1 ml로 부유하였다. Luria-Bertani (LB) 평판배지에 선상도말한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 집락을 그람염색, 아포염색 그리고 무산소배양 등으로 산소 아포형성 그람양성막대균을 확인하였다. 일차 동정은 API 50 CHB (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)로 제조회사의 사용법에 따라 실시하였다. 확인 동정은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으로 하였다 (20). *Bacillus* species를 배양하여 Genomic DNA Prep Kit (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 사용하여 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭(Biometra, Gottingen, Germany)을 시행하였다. 사용된 primer pair는 순방향은 27F로 역방향은 1492R을 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 예열 후에 95°C(1분), 45°C(1분), 72°C(1.5분)의 순으로 30 cycle을 시행하였으며 72°C에서 10분간 정치하였다. Agarose gel 전기영동으로 PCR 산물을 확인하고 Agarose gel extraction kit (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA)에 넣어 *E. coli* DH5 α competent cells을 형질전환 하였다. 재조합 플라스미드를 정제하여 순방향 primer T7과 역방향 primer SP6를 이용하여 ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Kit와 ABI PRISM 377 Sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT,

USA)를 사용하여 플라스미드의 유전자 서열을 MacroGen Corporation (Seoul, Korea)에서 수행하였다. 염기서열 데이터의 상동성 검색은 BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)에 접속하여 수행하였다.

구멍확산억제시험(Agar well diffusion inhibition assay)

배양된 표적균주(*Salmonella* Typhimurium)를 10⁻⁴으로 희석하여 100 μ l를 4 ml soft agar에 넣고 혼합하여 LB 평판배지에 도말하여 굳혔다. Pasteur pipette 손잡이 부분으로 구멍을 뚫었다. LB 액체배지에서 72시간 배양된 시험균주(*Bacillus* species)를 각 구멍에 40 μ l씩 넣고 배양기에 일정 시간 정치한 후 배양하였다. 배양 24시간 후에 표적균주 성장 억제지역의 직경을 측정하였다.

동시배양에 의한 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제

Lavermicocca P 등 (21)의 방법을 약간 수정하여 동시배양에 의한 병원균의 성장 억제를 조사하였다. 각 *Bacillus* species를 LB 액체배지에서 72시간 배양하여 LB 액체배지로 1 \times 10⁸ CFU/ml를 준비하였다. *Salmonella* Typhimurium도 LB 액체배지에 24시간 배양하여 동일한 방법으로 준비하였다. 준비된 *Bacillus* species 균액 400 μ l에 *Salmonella* Typhimurium 균액 20 μ l를 혼합하여 37°C에서 배양하였다. 1, 3, 5 및 7일 간격으로 20 μ l를 각각 취하여 생리식염수로 10배씩 순차적으로 희석하여 희석액을 만들었다. 각 희석액 20 μ l를 MacConkey 우무평판배지 위에 떨어뜨리고 37°C에서 18시간 배양한 후 집락수를 측정하였다. *Bacillus*는 MacConkey 우무평판배지 위에서 집락을 형성을 하지 못하는 것을 이용하여 *Salmonella* Typhimurium의 집락수를 측정하였다.

초파리 경구감염에서 *Bacillus* species가 초파리 생존율에 미치는 영향

성인 암컷 초파리를 분리하여 3시간을 굶겨 준비하였다. LB 우무평판배지에 배양한 *Bacillus* species와 *Salmonella* Typhimurium을 각각 OD600=0.2 (5% sucrose in LB broth)로 맞춰서 준비하였다. 3 M paper 2.5 \times 3.5 cm²에 500 μ l씩 적셔서 배양 시험관 벽에 붙여 넣었다. 성인 암컷 초파리 20마리씩을 이 시험관에 옮겨 24시간 빨아 먹게 하였다. 그리고 초파리를 새로운 corn meal agar가 든 시험관에 옮겼다. 3일 마다 새로운 배지의 시험관에 옮기면서

9일 동안 매일 생존율을 조사하였다.

초파리 경구감염에서 *Bacillus* species가 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제에 미치는 영향

위에서와 같이 *Bacillus* species를 경구감염 시킨 24시간 후에 *Salmonella* Typhimurium을 같은 방법으로 경구감염 시켰다. 새로운 corn meal agar가 든 시험관에 옮기고 3일 마다 새로운 배지의 시험관에 옮기면서 1, 2, 3, 5 및 7일 동안 초파리 몸통을 취하여 생리식염수를 넣어 분쇄하였다. 이를 MacConkey 우무평판배지 위에 배양하여 *Salmonella* Typhimurium의 균 수를 측정하였다.

초파리 경구감염에서 *Bacillus* species가 AMP 발현에 미치는 영향

초파리 장관으로부터 total RNA의 분리

초파리 경구감염 후 6, 24 및 48시간 후에 각각 장관을 분리하여 total RNA를 easy-BLUETM Total RNA Extraction Kit (Intron, Seongnam, Korea)를 이용하여 얻었다. 초파리 마리당 1 ml의 easy-BLUE 용액으로 완전히 용해한 후, 200 μ l의 chloroform 용액을 가하여 혼합하였다. 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 400 μ l의 상층액을 분리하여 새로운 1.5 ml eppendorf tube로 옮기고 400 μ l의 isopropanol을 가하여 상온에서 10분간 방치하였다. 다시 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 후, 상층액을 제거하고 얻은 RNA pellet을 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 포함된 500 μ l의 75% ethanol로 세척하였다. 4 $^{\circ}$ C, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 얻은 RNA pellet을 건조시켜 40 μ l의 RNase free water로 용해하였다.

Primer DNA 준비

초파리에서 분리된 total RNA의 증합연쇄반응에 사용된 oligonucleotide primer들은 Bioneer (Daejeon, Korea)사에서 주문 합성하여 사용하였다.

증합효소 연쇄반응에 의한 AMP의 mRNA 발현 분석

Total RNA는 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들어 주형으로 사용하고 적절한 primer에 의해 표적유전자를 증폭시켰다. Reverse Transcription Premix (5X, ELPis)를 이용하여 총 반응액이 50 μ l가 되도록 nuclease free water를 가한 후 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 94 $^{\circ}$ C에서 5분 반응하여 cDNA를 얻었다. cDNA 중 1 μ l를 취하여 Prime Taq Premix (2X, GENET Bio)를 이용해 증합효소연쇄반응을 시행함으로써

cDNA 증폭반응을 실시하였다.

전기영동에 의한 PCR 산물의 검색

PCR이 끝난 후 증폭된 PCR 산물을 5 μ l 취하여 1 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel에 0.5% Tris Acetate EDTA (TAE) buffer 상에서 100 V로 20분 동안 전기영동을 수행하였다. 이동한 DNA 띠의 위치를 자외선 투사기 상에서 관찰하였다. Standard marker로는 ELPis biotech사에서 제조한 100 bp DNA ladder marker를 사용하였다.

결 과

Salmonella Typhimurium 성장 억제 활성이 있는 *Bacillus* species의 분리배양

우리나라 청국장에서 *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. smithii* 및 *B. subtilis* 등이 분리배양되었다. 이들 중에 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제 기능이 있는 균을 알아보기 위하여 Agar well diffusion inhibition assay를 실시하였다. Fig. 1에서와 같이 well의 직경이 5 mm이었는데 *B. subtilis* (1800)는 12 mm, *B. lentus* (1900)는 16 mm, 또 다른 *B. lentus* (2720)는 12 mm의 투명 억제대를 관찰할 수 있었다. 이 결과에 따라 *B. subtilis*와 *B. lentus*를 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제 활성이 있는 균으로 결정하였다.

액체배지에서 혼합배양으로 *Bacillus* species에 의한 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제

*B. subtilis*와 *B. lentus*를 72시간 그리고 *Salmonella* Typhimurium은 24시간 액체배양하여 동량을 혼합배양하였다. *B. subtilis*와 *B. lentus*가 MacConkey 우무평판배지 위에서 집락 형성을 하지 못하는 것을 이용하여 *Salmonella* Typhimurium의 집락수를 측정하였다(Fig. 2). 배양 24시간에 *Salmonella* Typhimurium만 배양한 경우 대조군 *Salmonella* Typhimurium의 균집락수는 9×10^8 , *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 함께 배양한 경우 *Salmonella* Typhimurium은 2.7×10^8 , *B. lentus*과 함께 배양한 경우 *Salmonella* Typhimurium은 3.0×10^8 이었다. 그러나 배양 5일에 *Salmonella* Typhimurium만 배양한 경우 3×10^8 이었으나, *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 함께 배양한 경우 *Salmonella* Typhimurium은 5×10^4 , *B. lentus*와 함께 배양한 경우 *Salmonella* Typhimurium이 3.5×10^4 으

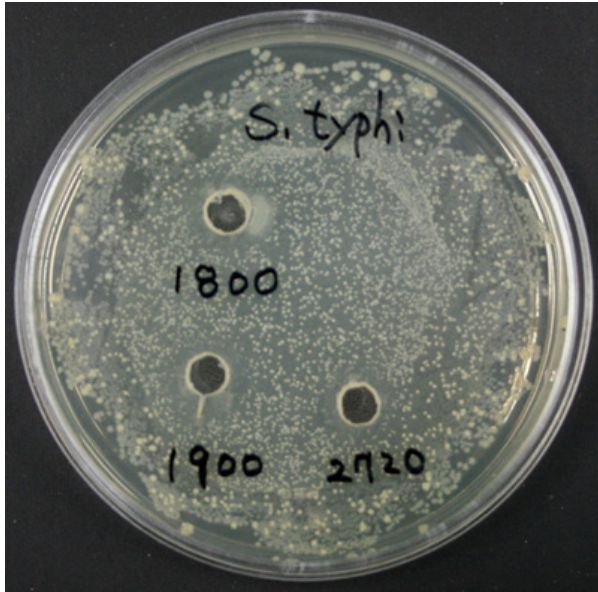


Figure 1. Detection of antimicrobial activity of *B. subtilis* (BS) or *B. lentus* (BL) with *Salmonella* Typhimurium (ST) by agar well diffusion assay. The indicator organism (*Salmonella* Typhimurium) in the 0.7% soft agar was spread on the surface of solid agar medium. Pasteur pipette was used to create 5 mm wells in the overlaid base agar plate. The well was filled with 30 μ l of the cell free supernatant of Bacillus species. The plates were incubated and examined for the clear zones around the wells. Bacillus species isolated from a traditional fermented soybean paste displayed a wide range of antimicrobial activity against *Salmonella* Typhimurium. *S. typhi*: *Salmonella* typhimurium, 1800: *Bacillus subtilis*, 1900: *Bacillus lentus*-1, 2720: *Bacillus lentus*-2.

로 4 log만큼 의미 있는 감소를 보였다. 이에 더하여 Agar well diffusion inhibition assay와는 다르게 배양 7일에 *Salmonella* Typhimurium만 배양한 경우 2×10^8 , *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 함께 배양한 경우 *Salmonella* Typhimurium은 3×10^4 이었으나 *B. lentus*와 함께 배양한 경우 *Salmonella* Typhimurium이 모두 사멸되었다. 이와 같은 결과로 혼합배양 7일에 *B. subtilis*는 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 감소시켰으나 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium을 사멸시킬 수 있었다.

초파리 경구감염에서 Bacillus species가 초파리 생존율에 미치는 영향

*B. subtilis*와 *B. lentus*가 *in vitro*에서 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 억제시키는 현상이 관찰되었다. Bacillus species는 토양과 물 등의 자연에 존재하며, 김치와 청국장 등 발효식품의 섭취를 통하여 장관에 정상균

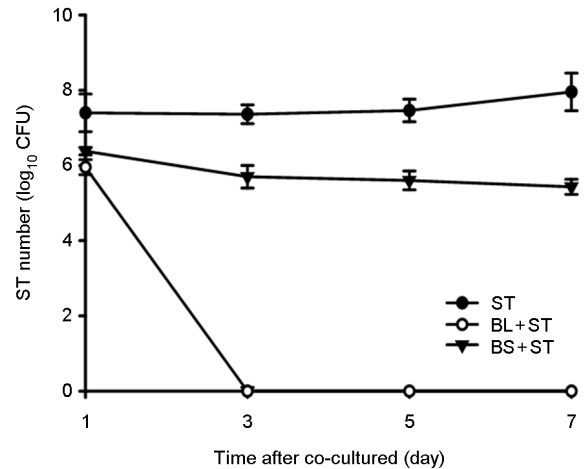


Figure 2. The effect of co-cultured *B. subtilis* (BS) or *B. lentus* (BL) with *Salmonella* Typhimurium (ST) to inhibit the growth of ST in broth. BS or BL were mixed at a ratio of approximately 1:1 and co-cultured in broth at 24 h interval for 7 days. They were plated on MacConkey agar plate to determine viable cell count of ST. BL resulted in the complete killing of ST within 7 days co-cultured in broth, but BS did not observed the bactericidal effect.

무리로 존재한다. *Salmonella* Typhimurium은 경구감염으로 장염을 일으킨다. 동물의 장관에서는 정상균무리와 병원균과의 직접적인 관계뿐만 아니라 장관의 획득면역과 장상피세포에 의한 선천면역 등이 복합적으로 서로 작용하게 된다. 따라서 *in vivo* 동물의 장관에서 Bacillus species와 *Salmonella* Typhimurium의 상호관계 연구가 요구되었다.

포유동물에서 *Salmonella* 침습을 막는 선천면역은 Goblet cell에서 생산되는 점액과 Paneth cell에서 생산되는 defensin과 같은 AMP가 중요한 역할을 한다. 초파리는 세균에 의한 장관상피세포 손상을 보호하는 chitinous matrix와 같은 물리적 기구와 장관의 세균증식을 일정하게 유지하는데 기여하는 장관상피세포에서 생산되는 ROS와 AMP와 같은 화학적 기구를 가지고 있다. 그러므로 초파리도 소화기관의 선천면역기능을 분석할 수 있는 간단하고도 효과적인 모델이 될 수 있다.

성인 암컷 초파리에 *B. subtilis*, *B. lentus*, *Salmonella* Typhimurium, *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium 그리고 *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 경구로 섭취하게 하여 9일 동안 관찰하면서 생존율을 각각 관찰하였다(Fig. 3). *B. subtilis*는 5일까지 96%의 생존율을 보였으나 7일째부터는 85%로 감소하였다. *B. lentus*는 6일까지 96%이었

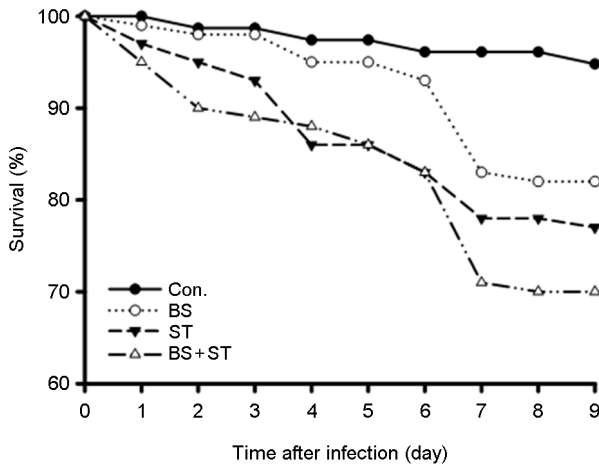


Figure 3. Survival analysis of *D. melanogaster* that were oral feeding with *B. subtilis* (BS), *B. lentus* (BL), *Salmonella* Typhimurium (ST), BS/ST and BL/ST. Adult female flies were fed 5% sucrose in nutrient broth containing BS, BL, ST, BS/ST and BL/ST for 24 h, then transferred to sterile food. Survival rate (%) were determined over indicated time.

으며 8일에는 90%로 감소하였다. *Salmonella* Typhimurium은 생존율이 날마다 감소하여 3일에 94%, 4일에 85%, 7일에 75%로 감소하였다. *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 섭취시켰을 때는 2일에 90%, 6일에 84%로 감소하였다. 그러나 7일째에 70%까지 감소하였다. *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 함께 섭취시켰을 때는 2일에 93%로 감소하였으나 5일까지 유지되었으며 7일부터 90%를 유지하였다. 이상의 결과로 *B. subtilis*와 *B. lentus* 각각은 초파리 생존율을 90%로 유지하였으나 *Salmonella* Typhimurium은 75%의 낮은 생존율을 보였다. *B. subtilis*는 *Salmonella* Typhimurium과 함께 초파리 생존율 감소를 *Salmonella* Typhimurium 단독 보다 5% 이상 낮추었다. 반면에 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium에 의한 초파리 생존율 75%를 90%로 오히려 15% 정도 높이는 결과가 관찰되었다.

초파리 경구감염에서 *Bacillus* species가 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제에 미치는 영향

Salmonella Typhimurium은 조건무산소세균으로 포식세포 또는 포식세포 이외의 상피세포 내에서 생존할 수 있다. 세포 내에서 salmonella-containing vacuole로 알려진 변형된 포식소체 안에서 증식하여 생존한다. 초파리에서는 공포가 없이 상피세포 안에서 발견된다. 성인 암컷

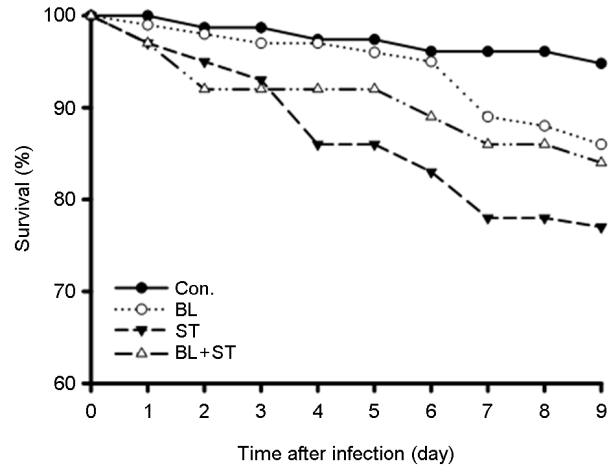


Figure 4. Effect of oral feeding with *B. lentus* (BL) or *B. subtilis* (BS) on eradication of *Salmonella* Typhimurium (ST) in *D. melanogaster*. Adult female flies were fed 5% sucrose in nutrient broth containing ST, BL/ST and BS/ST for 24 h, and then transferred to sterile food. Guts were dissected and crushed at various times after ingestion using micropestle, and then homogenate was serially diluted in LB medium. The number of colony forming units (CFU) was determined through growth overnight at 37°C on MacConkey agar.

초파리에 *Salmonella* Typhimurium, *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium 그리고 *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 경구로 섭취하게 하여 4일 동안 관찰하면서 매일 몸통을 취하여 생리식염수를 넣어 분쇄하였다. 이를 MacConkey 우무평판배지 위에 배양하여 *Salmonella* Typhimurium의 균 수를 측정하였다(Fig. 4). 24시간 후 3가지 조건에서 *Salmonella* Typhimurium은 모두 1×10^4 의 균집락이 관찰되었다. *Salmonella* Typhimurium 단독을 경구감염 시킨 후 2일에는 3.3×10^4 , 4일에는 6.2×10^6 으로 점차 균 수가 증가하는 증식이 관찰되었다. *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 경구감염 시킨 경우에는 2일에 1.8×10^7 으로 증가하였으나 점차 감소하여 4일에 1.3×10^6 으로 감소되었다. 그러나 *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 감염시킨 경우에는 2일에 3.6×10^5 , 3일에 3.8×10^6 으로 증가하였으나 4일에는 *Salmonella* Typhimurium이 배양되지 않았다. 이상의 결과로 초파리의 장관에서 *B. subtilis*는 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 억제시키지만 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium을 사멸시키는 것이 확인되었다.

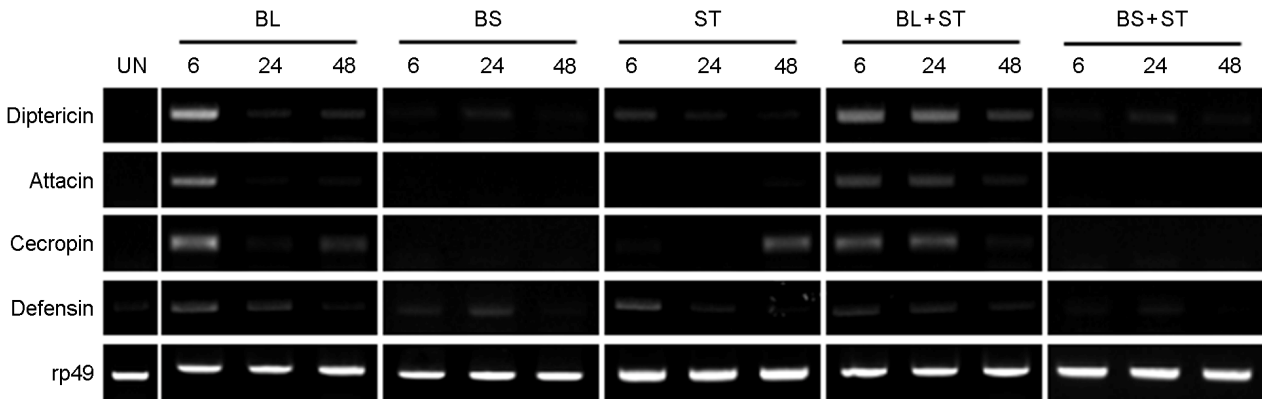


Figure 5. Synergistic induction of antimicrobial peptides (AMPs) genes of *D. melanogaster* that were oral feeding with *B. subtilis* (BS), *B. lentus* (BL), *Salmonella Typhimurium* (ST), BS/ST and BL/ST. Total RNA was isolated from fly intestine treated with different combinations of BS, BL and ST for 6, 24 and 48 h as indicated. The RNA samples were analyzed by RT-PCR. rp49 was used as the experimental expression standard.

초파리 경구감염에서 *Bacillus* species가 AMP 발현에 미치는 영향

초파리는 선천면역을 담당하는 AMP를 생산하여 침습된 병원균을 제거한다. 초파리의 AMP는 Toll pathway에 의하여 발현이 유도되는 Drosomycin과 Metchnikowin, Imd pathway에 의하여 유도되는 Dipteracin 및 두 pathway의 상호조절에 의하여 발현되는 Cecropin, Defensin 및 Attacin 등이 있다. Imd pathway는 그람음성세균과 *Bacillus* species에 의하여 인지되어 활성화 되며 Toll pathway는 그람양성균에 의하여 활성화 된다.

초파리에 *B. subtilis*, *B. lentus*, *Salmonella Typhimurium*, *B. lentus*와 *Salmonella Typhimurium* 그리고 *B. subtilis*와 *Salmonella Typhimurium*을 경구 투여하고 배양시간 별로 초파리 몸통을 분쇄하여 얻은 RNA로부터 Dipteracin, Attacin, Cecropin, Defensin 등의 유전자 발현 정도를 RT-PCR 방법으로 측정하였다(Fig. 5). *B. lentus*는 경구섭취 후 6시간에 Dipteracin, Attacin, Cecropin 등이 발현되었으나 24시간 후부터는 발현이 매우 약하였다. *B. subtilis*는 모두 발현이 미미하였다. *Salmonella Typhimurium*은 Defensin을 약하게 발현하였다. *B. lentus*와 *Salmonella Typhimurium*을 동시에 섭취시킨 경우 *B. lentus* 단독에서 보다 Dipteracin, Attacin, Cecropin의 발현이 48시간에 까지 지속되었다. 반면에 *B. subtilis*와 *Salmonella Typhimurium*은 대상 AMP의 발현이 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 *B. lentus*는 Dipteracin, Attacin, Cecropin의 발현을 유도하며 *B. lentus*

은 *Salmonella Typhimurium*과 협력하여 Dipteracin, Attacin, Cecropin의 발현을 24시간 까지 지속시켰다.

고 찰

본 연구에서 청국장으로부터 분리배양된 *B. subtilis*와 *B. lentus*가 *in vitro*에서 *Salmonella Typhimurium*의 성장을 억제하였으며 *B. lentus*는 *Salmonella Typhimurium*으로 경구감염된 초파리의 생존율을 상승적으로 증가시키는 결과를 얻을 수 있었다. 즉, *B. subtilis*와 *B. lentus*가 한천구 명확산억제시험으로 *Salmonella Typhimurium*의 성장을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 액체배지 동시배양법에서 *B. subtilis*는 *Salmonella Typhimurium*의 성장을 4 log (10⁴) 이상 감소시켰으며 *B. lentus*는 *Salmonella Typhimurium*을 완전사멸 시켰다. 일반적으로 *Bacillus*는 다른 *Bacillus* species와 포도알균과 같은 그람양성균에 항미생물작용이 있다. 그러나 *B. megaterium* 22에서 생산되는 megacin 22는 *Salmonella Typhimurium*과 *S. aureus*의 성장을 억제하였다 (22)고 한다. 그러므로 *B. lentus*와 *B. subtilis*는 *Salmonella Typhimurium*에 대한 항생물질과의 병합치료 또는 대체치료제로 개발할 가치가 있다고 생각되었다.

최근 *Salmonella Typhimurium*의 치료에 fluoroquinolone과 ceftriaxone이 흔히 사용되고 있으나 이들에 대한 내성균과 다제내성균이 증가하고 있다. 건강인의 장관에는 병원균의 집락 형성을 효과적으로 막는 정상균무리가 있다.

이들은 영양분을 가장 효과적으로 이용할 수 있도록 하며, 장관세포와 장관면역계의 발달을 촉진시킨다. 프로바이오틱스는 정상균무리와의 공생을 촉진하여 직접적으로 병원균과 경쟁을 한다. 그러므로 프로바이오틱스는 소화관 감염의 효과적인 대체치료제가 될 수 있다 (12, 23). 프로바이오틱스로 많이 사용되고 있는 유산균(LAB)은 박테리오신이나 과산화물 등의 생산을 통하여 장내 병원균의 성장을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (24, 25). 무균 마우스 실험에서 *Lactobacillus acidophilus* LA1의 배양액이 *Salmonella* Typhimurium을 포함한 그람음성 및 포도알균을 포함한 그람양성에 항미생물 기능이 있었다 (24)고 한다. 유산균에 비하여 아포형성 *Bacillus* species는 열에 안정하며 실온에 보관이 가능한 장점이 있다. 또한 위산에도 견딜 수 있어 장까지 도달할 수 있으며 무산소조건에서도 증식할 수 있어 장관에 존재할 수 있다. *Bacillus*의 서식처는 토양이며 곡식, 야채 그리고 저온 살균 우유에도 존재한다. 사람은 토양에서 유래된 균을 이용한 발효식품의 섭취로 획득된다. 콩발효식품으로 *B. subtilis*는 일본의 Natto와 서아프리카 dawadawa와 나이지리아의 okpehe 생산에 이용되며 (26) 우리나라에서는 청국장, 된장 또는 김치 등의 발효에 이용된다. 프로바이오틱스로서 *Bacillus* species는 면역증강, 항미생물작용 및 경쟁적 배제 등의 기능이 알려져 있다. 그러므로 *B. subtilis*와 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium의 경구감염에 대한 대체치료제로의 적용 가능성이 높다.

유럽공동체에서는 동물의 사료매개 감염질환을 예방할 목적으로 *E. faecium* NCIMB 10415를 동물사료 첨가물로 승인되어 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 새끼돼지에 *Salmonella* Typhimurium DT104를 경구감염 시킨 후 *E. faecium*을 경구 투여하여도 *Salmonella* 균의 배설을 감소시키지 못하였다 (27)고 한다. 이와 같이 *in vitro*에서 관찰되었던 세균과 세균간의 상호관계 또는 세균과 숙주세포와의 단순한 상호관계가 *in vivo*에서는 관찰되지 않을 수 있다. 그러므로 소화관에서 프로바이오틱스에 의한 병원균의 치료효과를 관찰하기 위하여서는 실험동물을 대상으로 한 평가가 요구된다. 그러나 동물모델의 선정에서 장내 정상균무리와의 관계, 숙주의 면역반응, 윤리문제, 순응도의 문제 및 고비용 등이 장애가 되고 있다.

동물의 장관에서는 정상균무리와 병원균과의 직접적인 관계뿐만 아니라 장관의 획득면역과 장관세포에 의한 선천면역 등이 복합적으로 서로 작용하게 된다. 포유동물

에서 *Salmonella* 침습을 막는 선천면역은 Goblet cell에서 생산되는 점액과 Paneth cell에서 생산되는 Defensin과 같은 AMP가 중요한 역할을 한다. 초파리는 장의 발달, 재생 및 질환 등을 조절하는 신호경로 면에서 사람의 장내질환모델로 사용될 수 있을 만큼 유사성이 매우 높다 (28). 초파리는 AMP의 생산과 탐식과 같은 선천면역을 조절하는 기전을 알아내는 우수한 실험동물모델이다. 초파리는 *Salmonella* Typhimurium에 의한 전형적인 감염질환을 일으키지는 않지만 경구감염에 의하여 선천면역반응을 유도할 수 있으며 초파리 순환계와 세포 내로 침습할 수 있다 (29). 초파리 장관상피세포에서 생산되는 ROS와 AMP는 장관의 세균증식을 일정하게 유지하는데 관여한다. 그러므로 초파리도 소화기계의 선천면역기능을 분석할 수 있는 간단하고도 효과적인 실험동물모델이 될 수 있다.

성숙한 암컷 초파리에 *B. subtilis*, *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 경구감염 시키고 9일 동안 생존율을 관찰하여 *Bacillus* species가 *Salmonella* Typhimurium 감염에 미치는 영향을 조사하였다. *B. subtilis*는 85% 그리고 *B. lentus*는 90%의 생존율을 보였다. *Salmonella* Typhimurium의 생존율은 75%로 *B. subtilis*나 *B. lentus*에 비하여 낮은 생존율을 보였다. 다음에는 *Salmonella* Typhimurium 감염에 의한 생존율에 *B. subtilis*와 *B. lentus*가 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 경구감염 시켰을 때 90%의 생존율을 보여 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium에 의한 치사효과를 보완하였다. 그러나 *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 경구감염 시켰을 때에는 70%로 각각을 경구감염 시켰을 때보다 상승적으로 치사율을 증가시켰다. 초파리 경구감염으로 장관상피세포의 손상과 장관 형태의 소실 등의 형태학적 변화가 특징적으로 관찰되었다. 장관상피세포의 손상은 정상적인 소화기능에 장애를 주어 죽음에 이르게 하였다고 생각되었다. 이상의 결과로 *B. subtilis*는 *Salmonella* Typhimurium와 함께 초파리 생존을 감소를 *Salmonella* Typhimurium 단독 보다 5% 이상 낮추었다. 반면에 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium에 의한 초파리 생존율 오히려 15% 정도 높이는 결과가 관찰되었다.

경구감염을 통하여 초파리 장관에서 *B. subtilis*와 *B. lentus*가 *Salmonella* Typhimurium의 성장 억제에 미치는 영향을 조사하였다. *Salmonella* Typhimurium은 조건무산 소세균으로 포식세포 또는 포식세포 이외의 상피세포 내

에서 생존할 수 있다. 세포 내에서 salmonella-containing vacuole로 알려진 변형된 포식소체 안에서 증식하여 생존한다. 초파리에서는 공포가 없이 상피세포 안에서 발견된다 (29). 성인 암컷 초파리에 경구감염 후 몸통을 생리식염수를 넣어 분쇄하였다. 이를 MacConkey 우무평판 배지 위에 배양하여 *Salmonella* Typhimurium의 균 수를 측정하였다. 24시간 후 *Salmonella* Typhimurium 단독, *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium 및 *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium의 3가지 조건에서 *Salmonella* Typhimurium은 모두 1×10^4 의 균집락이 관찰되었다. *Salmonella* Typhimurium 단독을 경구감염 시킨 후 4일에는 6.2×10^6 으로 점차 균 수가 증가하였다. *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 경구감염 시킨 4일에 1.3×10^6 이 관찰되었다. 그러나 *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 감염시킨 경우에는 2일에 3.6×10^5 이었으나 4일에는 *Salmonella* Typhimurium이 배양되지 않았다. 이상의 결과로 초파리의 장관에서도 *in vitro*에서와 유사하게 *B. lentus*는 *Salmonella* Typhimurium을 사멸시키는 것이 확인되었다.

적응면역기구가 없는 초파리는 선천면역을 담당하는 AMP를 생산하여 침습된 미생물에 대응한다. Imd pathway는 그람음성세균과 *Bacillus* species에 의하여 인지되고 활성화 되어 Diptericin이 발현된다. Toll pathway는 그람양성균에 의하여 활성화 되어 Drosomycin과 Metchnikowin가 유도된다. Attacin, Cecropin 및 Defensin 등은 두 pathway의 상호조절에 의하여 발현된다 (30). 초파리 장관에서 *B. subtilis*와 *B. lentus*가 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 억제시키는 기전과 AMP의 역할과의 관계를 조사하였다. *B. lentus*는 경구섭취 후 6시간에 Diptericin, Attacin, Cecropin 등이 발현되었으나 24시간 후부터는 발현이 매우 약하였다. *B. subtilis*는 모두 발현이 미미하였다. *Salmonella* Typhimurium는 Defensin만을 약하게 발현시켰다. *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium을 동시에 섭취시킨 경우 *B. lentus* 단독에서 보다 Diptericin, Attacin, Cecropin의 발현이 48시간에 까지 지속되었다. 반면에 *B. subtilis*와 *Salmonella* Typhimurium은 AMP의 발현이 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 *B. lentus*는 Diptericin, Attacin, Cecropin의 발현을 유도하며 *Salmonella* Typhimurium과 협력하여 Diptericin, Attacin, Cecropin의 발현을 상승적으로 높게 그리고 48시간 까지 지속시켰다. *In vitro*에서와 유사하게 초파리의 장관에서도 *B. lentus*가 *Salmonella* Typhimurium을 사멸시킨

것은 *B. lentus*와 *Salmonella* Typhimurium이 협력하여 Imd pathway를 통한 활성화의 결과로 평가되었다. 초파리에서 세균의 경구감염은 선천면역반응의 Imd 경로에 의하여 조절되는 Diptericin과 Attacin을 장관상피세포에서 선택적으로 발현시킨다. 초파리에게 *Pseudomonas entomophila* 또는 *Serratia marcescens*와 같은 그람음성균이 경구감염 되면 Imd 경로가 활성화되고 장관상피세포에서 ROS와 AMP가 생산되어 침습균이 제거된다 (31, 32)고 한다. 이때 발현되는 AMP가 경구감염을 일으킨 세균을 제거하는데 중요한 역할을 하며, 두 개의 서로 다른 pathogen recognition signal이 협동하여 더 넓은 범위의 AMP가 활성화 된다 (30)고 한다.

이상의 결과로 *B. lentus*는 한천구멍확산억제시험과 액체배지를 이용한 동시배양법으로 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 억제시키는 결과를 얻을 수 있었다. 초파리 경구감염에서는 *B. lentus*가 *Salmonella* Typhimurium에 대한 반응과의 상승작용으로 Imd 경로의 Diptericin, Attacin 및 Cecropin의 발현을 상승적으로 증가시켜 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 억제시키는 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로 청국장에서 유래된 *B. lentus*는 *in vitro*와 초파리 장관에서 *Salmonella* Typhimurium에 의한 감염을 제어할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Kim S. *Salmonella* serovars from foodborne and waterborne diseases in Korea, 1998-2007: total isolates decreasing versus rare serovars emerging. J Korean Med Sci 2010;25:1693-9.
- 2) Atassi F, Servin AL. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. FEMS Microbiol Lett 2010;304:29-38.
- 3) Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarría J, Iglesias JR, et al. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol 2011;77:1335-43.
- 4) Pineiro M, Stanton C. Probiotic bacteria: legislative framework-- requirements to evidence basis. J Nutr 2007;137: 850S-3S.
- 5) Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, et al.

- Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:2264-74.
- 6) Song YR, Song NE, Kim JH, Nho YC, Baik SH. Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from Kimchi. *J Gen Appl Microbiol* 2011;57:169-75.
 - 7) Kim TW, Lee JH, Park MH, Kim HY. Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese- and Chinese-fermented soybean pastes using nested PCR-DGGE. *Curr Microbiol* 2010;60:315-20.
 - 8) Kwon GH, Lee HA, Park JY, Kim JS, Lim J, Park CS, *et al.* Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *Int J Food Microbiol* 2009;129:282-7.
 - 9) Logan NA. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* 2012;112:417-29.
 - 10) Reva ON, Smirnov VV, Pettersson B, Priest FG. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:101-7.
 - 11) Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res Microbiol* 2009;160:375-9.
 - 12) Jones SE, Knight KL. *Bacillus subtilis*-mediated protection from *Citrobacter rodentium*-associated enteric disease requires espH and functional flagella. *Infect Immun* 2012;80:710-9.
 - 13) Deng W, Dong XF, Tong JM, Zhang Q. The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. *Poult Sci* 2012;91:575-82.
 - 14) Wolfenden RE, Pumford NR, Morgan MJ, Shivaramaiah S, Wolfenden AD, Pixley CM, *et al.* Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and *Salmonella* reduction in commercial turkey brooding houses. *Poult Sci* 2011;90:2627-31.
 - 15) Nithya V, Muthukumar SP, Halami PM. Safety assessment of *Bacillus licheniformis* Me1 isolated from milk for probiotic application. *Int J Toxicol* 2012;31:228-37.
 - 16) Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, *et al.* The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig Dis Sci* 2008;53:954-63.
 - 17) Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett* 2012;334:1-15.
 - 18) Apidianakis Y, Rahme LG. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis Model Mech* 2011;4:21-30.
 - 19) Charroux B, Royet J. Gut-microbiota interactions in non-mammals: what can we learn from *Drosophila*? *Semin Immunol* 2012;24:17-24.
 - 20) Choi YH, Chung J, Na HS. Molecular methods for studying the human microbiota. *J Bacteriol Virol* 2013;43:67-72.
 - 21) Lavermicocca P, Valerio F, Lonigro SL, Di Leo A, Visconti A. Antagonistic activity of potential probiotic *Lactobacilli* against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Curr Microbiol* 2008;56:175-81.
 - 22) Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:201-32.
 - 23) Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, *et al.* Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 2012;336:1325-9.
 - 24) Bernet-Camard MF, Liévin V, Brassart D, Neeser JR, Servin AL, Hudault S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:2747-53.
 - 25) van de Guchte M, Ehrlich SD, Maguin E. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol* 2001;91:147-53.
 - 26) Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 2011;28:214-20.
 - 27) Kreuzer S, Machnowska P, Aßmus J, Sieber M, Pieper R, Schmidt MF, *et al.* Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Vet Res* 2012;43:58.
 - 28) Apidianakis Y, Rahme LG. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis Model Mech* 2011;4:21-30.
 - 29) Frandsen JL, Gunn B, Muratoglu S, Fossett N, Newfeld SJ. *Salmonella* pathogenesis reveals that BMP signaling regulates blood cell homeostasis and immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14952-7.
 - 30) Liehl P, Blight M, Vodovar N, Boccard F, Lemaitre B. Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog*

2006;2:e56.

- 31) Nehme NT, Liégeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, *et al.* A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. PLoS Pathog 2007;3:e173.
- 32) Yuk JM, Jo EK. Toll-like receptors and innate immunity. J Bacteriol Virol 2011;41:225-35.
-