

Effect of frozen storage and various concentrations of sucrose media on survivability of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) for oral challenge of weaner pigs

Hyun Min Cho¹, Joo Won Kang¹, Yeong Kuk Kim¹, Joo Bin Lee¹, Chan Yi Oh¹, Jung Min Heo^{1*}, Young-Joo Yi^{2*}

¹Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Division of Biotechnology, Safety, Environment and Life Science Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

*Corresponding author: jmheo@cnu.ac.kr, yijj@jbnu.ac.kr



OPEN ACCESS

Citation: Cho HM, Kang JW, Kim YK, Lee JB, Oh CY, Heo JM, Yi YJ. 2016. Effect of frozen storage and various concentrations of sucrose media on survivability of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) for oral challenge of weaner pigs. Korean Journal of Agricultural Science 43:788-793.

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20160082>

Editor: Woo Kyun Kim, University of Georgia, USA

Received: August 10, 2016

Revised: August 12, 2016

Accepted: September 13, 2016

Copyright: ©2016 Korean Journal of Agricultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Post-weaning diarrhea (PWD), mostly caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), remains to be a major source of economic loss in swine industry. The use of the ETEC-oral challenge model is often applied to mimic unsanitary commercial swine farm conditions where pathogens and unknown complex microbes exist and can cause severe infections in pigs. The purpose of this study was (1) to estimate ETEC density using spectrophotometric computation, (2) to determine survivability of ETEC after storing at -20°C for 7 days, and (3) to evaluate survivability of ETEC after blending with diluted sweeteners (0, 5, 10, 20, and 40% sucrose in phosphate buffered saline [PBS]). Cell density was quantified using UV-VIS spectrophotometer and counting ETEC colony forming units (cfu) at 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, and 240 min. The established linear equation ($y = 0.0031x^2 - 0.0079x + 0.0043$ and $y = 0.0046x^2 - 0.0151x + 0.0113$) was used for robust quantification of each ETEC cell density. ETEC stored at -20°C showed 108 cfu/mL after thawing and incubation. When ETEC was blended with sweeteners (20 and 40%), survival of ETEC was decreased by 58 and 54% in 5 min post blending. However, addition of 20% of sweetener resulted in a higher survivability than those with other media concentrations. Therefore, the use of ETEC-oral challenge model would be possible as a stable method if we could confirm the appropriate medium that increases survivability of ETEC in weaner pigs.

Keywords: enterotoxigenic *Escherichia coli*, oral challenge model, post-weaning diarrhea, weaner pig

Introduction

이유자돈 시기에 설사를 일으키는 주요 요인 중 하나로 *Escherichia coli* (*E. coli*)가 지목되고 있으며, 이로 인한 설사는 성장률 저하, 폐사와 같은 증상을 초래 하고 양돈 농가에 경제적 손실을 가져 온다(Kim et al., 2011). Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)는 신생자돈이나 이유자돈에서 공통

적으로 설사를 유발 시킬 수 있는 인자로써(Moon et al., 1980; Moon and Bunn, 1993; Melin et al., 2000), 통성혐기성 (facultative anaerobe) 박테리아가 병원성 대장균과 비병원성 대장균의 형태로 장내나 대변에 존재한다(Hampson, 1994; Pluske et al., 2002). ETEC는 병원성 대장균으로, 이에 민감한 십이지장과 공장 등을 감염 시키고 증식하여 독소를 발생하고 소장과 대장 점막을 자극하므로 전해질과 수분 대사에 이상을 초래하여 조직 내 수분을 장관 내로 유출시켜 설사를 유발시킨다(Cho et al., 1992). 이유자돈은 환경 변화, 생리적 변화, 영양적 스트레스와 모돈으로부터 전달 받은 면역력이 감소하는 시기로, 병원성 대장균의 독소 발생으로 인한 감염에 매우 민감한 시기라 할 수 있다(Hedemann et al., 2006; Heo et al., 2010; Kim et al., 2012; Heo et al., 2013). 하지만 이유자돈의 성장률과 소화관내 건강에 관한 연구들은 일반 양돈 사육 농가의 환경과는 다르게 깨끗하고 위생적인 환경으로 만들어진 실험 시설에서 수행되었다(Beloeil et al., 2003; Heo et al., 2013; Kim et al., 2014). 따라서 이러한 환경에서 얻어진 연구 결과물을 실질적으로 현장에 적용하기에는 더 많은 실험적 검증이 필요하다 할 수 있다(Heo et al., 2013). 그러므로 이러한 환경적 차이를 줄이고 현실적인 결과를 도출하고자 이유자돈 실험을 대상으로 ETEC를 구강 공격 접종 모델로 하여 일반 농장 환경을 모방하는 방법들이 시도되어 왔다(Heo et al., 2013; Kim et al., 2014). ETEC 공격 접종을 하기 위해서는 생시 체중, ETEC의 농도, 자돈의 일령 및 건강상태 그리고 돈사의 시설과 환경 등이 고려되어야 할 사항들이 있다(Fairbrother et al., 2005). ETEC 공격接种의 문제점은 첫째로, 접종 시 ETEC의 농도를 즉시 측정 할 수 없고, 두번째로 적절한 접종 농도를 준비하는데 시간이 오래 걸린다는 것이다. 또한 trypticase soy broth (TSB)로 배양한 ETEC를 PWD증상을 유도하기 위하여 사료에 섞어 급여하거나 공격 접종을 하게 되는데 TSB가 이유자돈에게 기호성이 낮아 ETEC의 접종이 원활히 되지 않으며, 공격 접종 시 ETEC가 식도로 주입되지 않고 기도로 주입 될 수가 있어 폐사로 이어 질 수 있다(Kim et al., 2014). 이러한 다양한 문제점을 해결하고자 sweetener와 dextrose를 TSB와 혼합하여 이용함으로써 이유자돈에게 기호성을 높이는 방법이 보고 되었다(Kim et al., 2014). 또한 Sucrose를 사료에 5% 첨가함으로써 기호성이 높아졌다는 연구가 있다(Munro et al., 2000).

따라서 본 실험의 목적은 첫째, ETEC의 colony forming unit과 optical density의 관계를 이용하여 ETEC의 농도를 측정하는데 이용 할 수 있는 공식을 수립하며, 둘째, ETEC를 -20°C에 저장 보관한 뒤 생존율을 확인하고, 셋째, ETEC에 다양한 농도의 sucrose를 첨가하여 ETEC에서의 생존 적정 농도를 알아 보는 것이다.

Materials and Methods

대장균의 분리 및 배양

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli* O141: K85ab, and *E. coli* O139: K82; Centers for Disease Control & Prevention, Cheongju, Chungbuk, South Korea)의 균주를 *in vitro* 실험에 이용했다. ETEC를 sheep blood (50 mL/L; MB cell, LA, CA, USA) agar plate (Blood agar base, MB cell)에 도포하고(McDonald et al., 2001), 37°C 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 ETEC의 single colony를 취하여 멸균된 튜브에 준비한 20 mL TSB에 넣고 상온(20 - 25°C)에서 24시간 배양하였다. 그 후 4 mL를 취하여 400 mL TSB가 들어있는 글라스 비이커에 옮겨 100배 희석시켰다. 희석시킨 용액을 37°C로 조정된 수조에서 4시간동안 배양시켰다. 배양 동안 30분 단위로 나누어 총 9번의 serial dilution과 UV-VIS spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Biochrom, Cambridge, England)를 이용하여 colony forming unit의 측정값과 600 nm에서의 optical density를 조사하였다.

대장균 동결

ETEC (*E. coli* O141: K85ab)의 colony-forming unit (cfu)/mL이 10^8 - 10^9 에 도달하였을 때, 50 mL씩 falcon tube에 8개로 나누어 분주하였다. 분주된 샘플들은 원심분리기를 이용하여 4°C에서 15분 동안 $3,000 \times g$ 로 원심 분리를 한

뒤, 상층액 제거 후 -20°C 에서 동결 시켰다. 동결 시킨 ETEC를 1, 3, 5 그리고 7일에 각각 37°C 의 TSB 50 mL를 넣어 해동 후 serial dilution 한 후 optical density를 측정하였다.

Sweetener 처리

분리 및 배양 그리고 희석된 ETEC (*E. coli* O139: K82) 25 mL와 phosphate buffered saline (PBS)으로 희석된 sucrose (0, 5, 10, 20%, 40%) 25 mL을 각각 혼합 시킨 뒤 생존률을 조사하였다.

Results and Discussion

각각의 ETEC (*E. coli* O141: K85ab, and *E. coli* O139: K82)를 serial dilution한 용액을 5% sheep blood agar에 도포 한 후 37°C 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 colony forming unit 개수와 optical density를 측정한 값의 관계는 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 측정된 optical density는 ETEC colony forming units 각각에서 $R^2 = 0.9811$, $R^2 = 0.9909$ 값이 성립되었다. 그러므로 설립된 곡선형공식은 TSB에서의 ETEC 농도 정량 시 이용 할 수 있으며, 각 개체마다 필요한 접종 ETEC 농도의 정확성이 상기 결과의 곡선형공식에 의하여 개선될 수 있다.

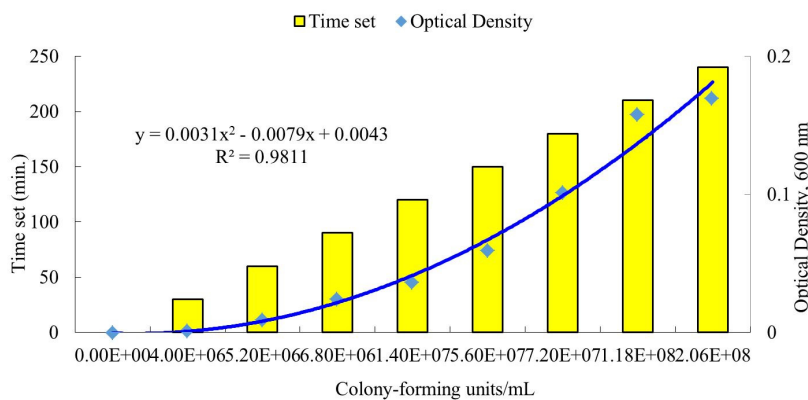


Fig. 1. Relationship between optical density of enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* O141: K85ab) solution at 600 nm (in TSB) and the number of *E. coli* colony forming units determined after plating the dilution media on 5% blood agar and overnight incubation at 37°C and *E. coli* grown time.

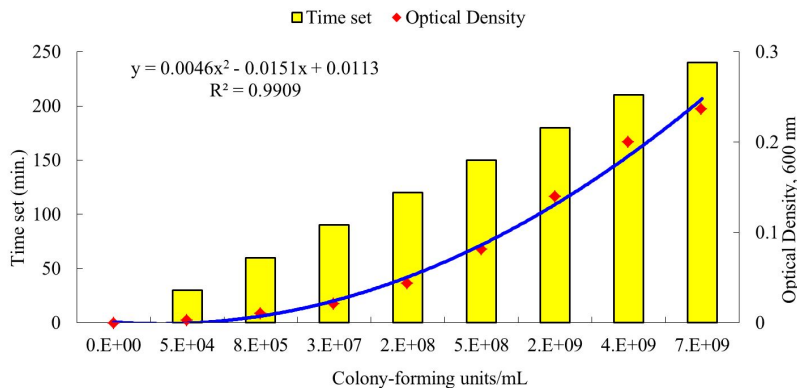


Fig. 2. Relationship between optical density of enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* O139: K82) solution at 600 nm (in TSB) and the number of *E. coli* colony forming units determined after plating the dilution media on 5% blood agar and overnight incubation at 37°C and *E. coli* grown time.

동결보존하여 1, 3, 5, 7일 동안 저장한 ETEC의 생존 능력은 Fig. 3와 Fig. 4와 같다. ETEC의 각 저장기간 동안 optical density값은 1일을 제외하고 값에 차이가 나지 않았다(Fig. 3). Fig. 4에서는 1, 3, 5, 7일의 colony forming unit의 값이 서로 다르게 나타났는데, Jensen et al. (2006)과 Kim et al. (2014)에 따르면 colony forming unit이 10^8 - 10^9 이면 일반 양돈 농장과 유사한 환경을 만들 수 있다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험결과에서도 10^8 cfu/mL을 유지하였으므로 ETEC를 7일간 동결 보존 후 효과적으로 사용할 수 있다고 사료된다(Fig. 4). *E. coli*의 균주는 저장 및 이동 시 -70°C 또는 더 낮은 온도에서 보관하는 경우도 있다 (Noamani et al., 2003; Chen et al., 2004; Sorensen et al., 2009). 본 연구결과에서는 ETEC가 -20°C 에 효과적으로 저장 되어 해동된 뒤 배양한 결과 대장균 생존 능력에는 문제가 없음을 알 수 있었다(Fig. 3 and 4).

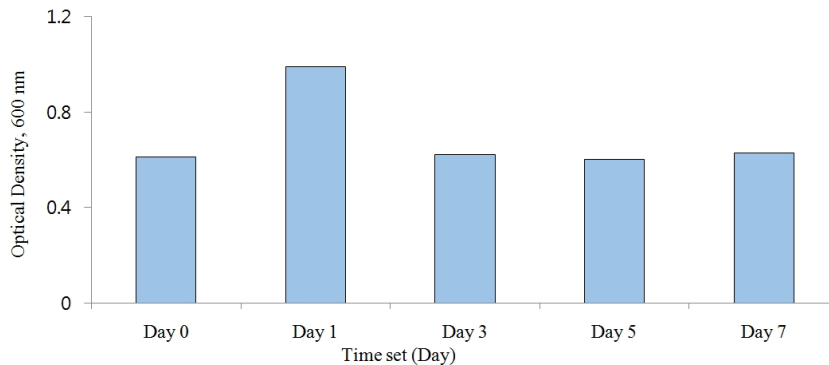


Fig. 3. Optical density of enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* O141: K85ab) stored at -20°C for 7 days in TSB.

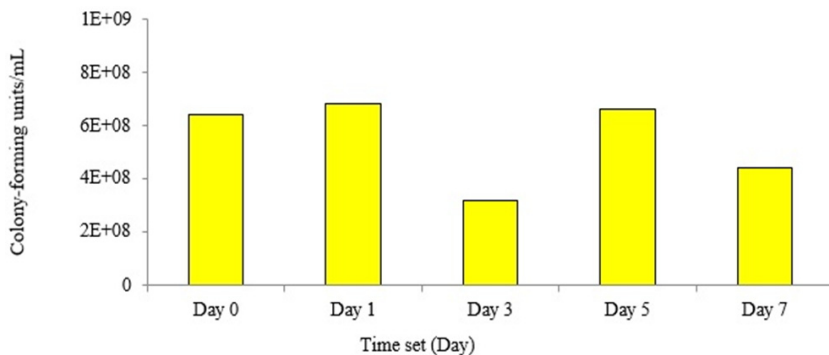


Fig. 4. The number of *E. coli* (*E. coli* O141: K85ab) colony forming units determined after plating the dilution media on 5% blood agar and overnight incubation at 37°C .

서로 다른 sucrose 농도 대한 colony 수는 Fig. 5와 같다. 그 결과 5% sucrose 농도에서는 0%와 비슷하게 자라는 것을 볼 수 있다. 10 또는 20%처리 시 5분 후에 감소하는 경향을 보였으나 차후에 급격한 성장을 하였다. 40%처리 시 5분 후부터 감소하는 경향을 보였으며 그 이후에는 유의적 변화가 없었다. Small et al. (1994)에 따르면 TSB로 희석한 45%의 sucrose를 60분 처리하였을 때 삼투압에 높아지는 영향으로 대장균이 사멸하여 증식하지 않았다고 보고 된바 있다. 하지만 본 결과에서는 PBS로 희석한 10%와 20% sucrose 농도에서 생존 능력이 점진적으로 증가한 바, 대장균 증식에 긍정적인 영향을 끼치는 것을 확인하였다. 그러므로 PBS와 TSB희석액에 따른 비교 실험과 더불어, sucrose 농도에서의 생존율을 알아보기 위한 실험이 필요하다고 보여진다. 추가적으로 sucrose 처리 시 이유자돈의 기호성 적합 여부에 관한 실험이 필요 하다고 사료된다.

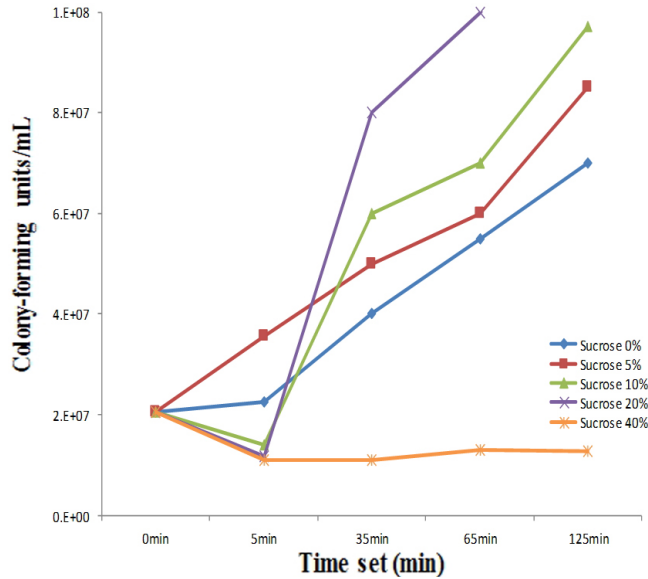


Fig. 5. Effect of dilution media on survival of an enterotoxigenic strain of *E. coli* (*E. coli* O139: K82) after blending.

Conclusion

공격 접종에 필요한 ETEC에 농도 측정방법, 보관 온도에 따른 생존을 그리고 기호성을 높이기 위한 sucrose첨가 실험은 다음과 같은 결과를 얻었다. ETEC에 colony forming unit, optical density를 측정된 값의 관계를 통하여 설립된 곡선형공식을 이용하게 되면, TSB에서의 ETEC의 세포 density의 농도를 구할 수 있다. 또한, ETEC를 -20°C에서 7일간 보관한 결과 colony forming unit이 10^8 cfu/mL 이상을 유지할 수 있었다. PBS로 10%와 20% 희석된 sucrose 첨가 시 colony forming unit값이 5분 후에 감소하는 경향을 보였으나 차후에 급격한 성장을 하였다. 결과적으로 이유자돈에 대한 공격 접종을 위한 효과적인 방법을 수립할 수 있었다.

Acknowledgements

본 연구는 2016년도 농촌진흥청 연구개발사업(과제번호: PJ 01088203)에 의해 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Beloil PA, Chauvin C, Toquin MT, Fablet C, Le notre Y, Salvat G, Madec F, Fravallo P. 2003. *Listeria monocytogenes* contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France. *Veterinary Research* 34:737-748.
- Chen X, Gao S, Jiao X, Liu XF. 2004. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhea in eastern China. *Veterinary microbiology* 103:13-20.
- Cho KH, Park NC, Keun HI, Kim LZ, Park DS. 1992. Antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea. *Korean Journal of Veterinary Service* 15:134-143
- Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* 6:17-39.
- Hampson DJ. 1994. Postweaning *Escherichia coli* diarrhea in pigs. In: Gyles, C.L. (Ed), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. pp. 171-192. CAB International, Guildford, UK.

- Hedemann MS, Jensen BB, Poulsen, HD. 2006. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *Journal of Animal Science* 84:3310-3320.
- Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ, Pluske JR. 2010. Effects of dietary protein level and zinc oxide supplementation on performance responses and gastrointestinal tract characteristics in weaner pig challenged with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Animal Production Science* 50:827-836
- Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ, Nyachoti CM. 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pig: A review of feeding strategies to control post-weaning diarrhea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 207-237.
- Jensen GM, Frydendahlb K, Svendsen O, Jorgensen CB, Cirerac S, Fredholm M, Nielsen J P, Moller K. 2006. Experimental infection with *Escherichia coli* O149:F4ac in weaned piglets. *Veterinary Microbiology* 115:243-249.
- Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Pluske JR. 2012. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology* 173:3-16
- Kim JC, Pluske JR, Yoo J, Heo JM. 2014. Establishment of a linear regression equation for quantification of beta-hemolytic *Escherichia coli* in different media and survival of hemolytic *Escherichia coli* after blending with three different media. *CNU Journal of Agricultural Science* 41:135-139.
- Kim SJ, Kim JD, Yang SY, Kim NH, Lee CH, Yang DS, Han, JH. 2011. Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection of weaned piglets. *Korean Journal of Veterinary Service* 34:341-352.
- McDonald DE, Pethick DW, Mullan BP, Hampson DJ, 2001. Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *The British Journal of Nutrition* 86:487-498.
- Melin L, Katouli M, Lindberg Å, Fossum C, Wallgren P. 2000. Weaning of piglets. Effects of an exposure to a pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 47:663-675.
- Moon HW, Bunn TO. 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11:213-220.
- Moon HW, Kohler EM, Schneider RA, Whipp SC. 1980. Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types, and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infection and Immunity* 27:222-230.
- Munro PJ, Lirette A, Anderson DM, Ju HY. 2000. Effects of a new sweetener, Stevia, on performance of newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 80:529-531.
- Noamani, BN, Fairbrother JM, Gyles CL. 2003. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Veterinary Microbiology* 97:87-101.
- Pluske JR, Pethick DW, Hopwood D, Hampson DJ. 2002. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pig. *Nutrition Research Reviews* 15:333-371.
- Small P, Blankenhorn D, Zinser E, Slonczewski JL. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *Journal of Bacteriology* 176:1729-1737.
- Sorensen MT, Vestergaard EM, Jensen SK, Lauridsen C, Højsgaard S. 2009. Performance and diarrhea in piglets following weaning at seven weeks of age: challenge with *E. coli* O 149 and effect of dietary factors. *Livestock Science* 123:314-321.