J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 3, pp. 222~226 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

나트륨 염 복합조성물의 마우스 살모넬라증에 대한 항균 및 치료효과

이여은[1] · 차춘남[2] · 박은기[3] · 김석 · 이후장*

경상대학교 수의과대학 생명과학연구원, [1]경상대학교 보건대학원 환경보건학과
[2]경상대학교 산업시스템공학부 공학연구원, [3]고신대학교 의과대학 인문사회의학교실

Evaluation of Antibacterial and Therapeutic Effects of a Sodium salts Mixture against *Salmonella typhimurium* in Murine Salmonellosis

Yeo Eun Lee[1], Chun-Nam Cha[2], Eun-Kee Park[3], Suk Kim, and Hu Jang Lee*

Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
[1]Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health, Gyeongsang National University, Chinju, 660-751, Korea
[2]Engineering Research Institute, Department of Industrial Systems Engineering, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea
[3]Department of Medical Humanities and Social Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan 602-703, Korea
(Received June 7, 2011/Revised June 11, 2011/Accepted June 17, 2011)

ABSTRACT - Salmonellosis is a major bacterial zoonosis that causes self-limited enteritis to fatal infection in animals and food-borne infection and typhoid fever in humans. Multidrug-resistant strains of *Salmonella* spp. has increased over the last several decades and recently causes more serious problems in public health. The present study was investigated bacteriocidal effects of sodium chlorate, sodium azide, sodium cyanide, and sodium salts mixture containing sodium chlorate, sodium azide, and sodium cyanide on infection with *S. typhimurium* in macrophage RAW 264.7 cells, and antibacterial effects of sodium salts mixture for murine salmonellosis. In infection assay of *S. typhimurium* in RAW 264.7 cells, bacterial survival rates within macrophage in all treated groups was significantly reduced comparing to that of the control group with the passage of incubation time. Administration of sodium salts mixture showed a therapeutic effect for *S. typhimurium* infected ICR mice. The mortality of mice treated with sodium salts mixture was 70% until 12 days, while that of control mice was 100% until 9 days after *S. typhimurium* infection. The results of this study strongly indicate that sodium salts mixture has a potency treatment for murine salmonellosis.

Key words: Salmonellosis, sodium salts mixture, therapeutic effect, ICR mouse

살모넬라 감염증은 광범위하게 다양한 질병을 유발하는 대표적인 인수공통전염병으로서, 가축에서는 설사와 치명적인 감염을 유발시키며, 사람에서는 식중독과 장티푸스를 유발시키는 것으로 알려져 있다[1-4]. 살모넬라 감염증의 원인체인 *Salmonella spp.*는 그람음성 간균으로, 숙주영역이 상당히 넓고, 2,000여종 이상의 다양한 혈청형을 갖고 있으며, 국내 식중독 발생원인의 대부분을 차질할 정도로 감여빈도가 매우 높다[5]. *Salmonella spp.*는 숙주 세포 내로 침입하여 기생하면서 질병을 유발하므로 항생제를 이용한 치료가 매우 어려우며, 다량의 항생제 사용에 따른 항생제 내성균의 발현 역시 증가하고 있는 실정이다[6,7].

최근, 살모넬라균과 대장균 등을 포함하는 유해 식중독균들에 의한 질병 예방 및 치료를 목적으로 많은 항생제들이 사용됨에 따라, 항생제 내성균들의 출현이 빈번해 지고 있어서 공중보건 상에 있어서 중요한 문제로 대두되고 있다[8-11].

한국소비자보호원이, 2002년 6월부터 2003년 5월에 걸쳐서, 서울과 수도권 지역에서 판매되는 육류, 어류, 야채류 등 212종을 대상으로 세균 검출 여부와 검출된 균의 항생제 내성 획득 여부를 조사한 결과, 살모넬라균, 대장균군, 황색포도상균, 병원성 리스테리아균, 그리고 비브리오균 등이 검출되었으며, 검출된 대부분의 균들에서 항생제 내성균이 출현하였으며, 특히, 검출된 살모넬라균의 94%

*Correspondence to: Hu Jang Lee
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-2352, Fax: 82-55-772-2308
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

이상이 항생제 내성균이었다고 보고하였다[12,13].

오늘날, 전 세계적으로 항생제 내성균의 출현 및 식품 내 잔류 등에 따른 공중보건에 미치는 위해를 최소화하기 위해 기존의 항생제를 대체하기 위해, 한약재나[14,15], 생균제인 probiotics[16,17], 프로폴리스[18,19] 등에서 항균활성 물질을 탐색하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 살모넬라, 대장균, 황색포도상구균, 부류셀라균 등과 같은 세포 내 절대기생 세균들의 에너지대사에 관여하는 효소의 작용을 이용하거나[20-23], 이들 효소의 활성을 저해시키는 물질[24-26] 등을 이용한 항생제 대체 물질의 개발에 대한 연구도 진행되고 있다.

염소산나트륨은 강력한 산화력을 갖고 있는 화학물질로서, 냄새가 없는 백색의 결정성 분말이며, 조해성이 있으며, 물에 쉽게 잘 용해되는 성질을 갖고 있는 것으로 알려져 있으며, 제지펄프의 산화제와 표백제, 성냥과 화약의 제조, 직물 염색 및 염색제 제조, 가죽의 처리과정, 음용수 소독제로 사용되는 과산화 염소의 제조, 치약 및 구강청정제 등 다양한 용도로 사용되고 있다[27,28]. 최근, sodium chlorate를 가축의 장점막 세포 내 기생하는 병원성 세균인 살모넬라와 대장균에 의한 질병의 예방 및 치료에 이용하고자 하는 많은 연구가 진행되어 왔다. 실험적으로 살모넬라와 *E. coli* O157:H7을 감염시킨 돼지에 있어서 염소산나트륨의 경구투여에 따른 살균효과 확인시험[21], 소에서 *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*)과 *E. coli* O157:H7에 대한 염소산나트륨의 살균효과 확인시험[22], 포유자돈에 대한 염소산나트륨의 경구투여를 통해 살모넬라에 대한 효과 확인시험[23] 등 염소산나트륨의 *Salmonella typhimurium*과 *E. coli*에 대한 항균효과를 확인하기 위한 연구가 진행되었다.

Sodium azide는 무색의 이온성 분말로서, 토양과 용수 중 세균과 곰팡이의 소독제로 사용되며, 병원과 실험실에서는 광범위 살균제로 사용되고 있다[29]. Sodium azide는 세포 내 기생세균의 물질대사에 관여하는 respiratory nitrate reductase의 활성을 억제함으로서 살균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[24-26]. Sodium cyanide는 무색의 결정성 분말로서 물에 잘 녹고, 수용액은 알칼리성을 나타내며, sodium cyanide와 염류들은 공업용으로 사용되며, 의약품의 코팅제로도 사용되고 있다[30]. Sodium cyanide의 cyanide 이온(CN^-)은 sodium azide와 같이 세포 내 기생세균의 물질대사에 관여하는 respiratory nitrate reductase의 활성을 억제함으로서 살균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[24,25,30].

본 연구에서는 살모넬라균과 같은 세포 내 기생세균의 물질대사에 관여하여 항균활성이 있는 것으로 알려진 sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide로 구성된 복합제를 이용하여 세포 내 기생 *Salmonella typhimurium*에 대한 항균활성과 살모넬라 감염 마우스에 대한 치료효과를 평가하였다.

재료 및 방법

공시제제

본 연구에서 사용된 sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide는 Sigma-Aldrich Korea (Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

Sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide는 정량하여 각각 1M의 용액을 만들어 4°C 냉장고에 보관하면서, 실험에 사용할 때, 증류수로 희석하여 적정 농도로 만든 다음, 멸균 필터(Millipore mebrane filter, Maryland, USA)를 이용하여 멸균한 다음 실험에 사용하였다.

사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) (ATCC 14028)은 국립수의과학원으로부터 분양받아 사용하였다.

*S. typhimurium*의 배양은 1.5% LB agar 평판배지에 배양된 균 집락을 순수 분리하여 Luria-Bertani (LB) broth (Difco Laboratories, Michigan, USA)에 접종하고 37°C에서 20시간 이상 stationary phase가 되도록 교반 배양하였다.

대식세포 내 항균효과

마우스 탐식세포인 RAW 264.7 세포를 10% fetal bovine serum (Difco Laboratories, Michigan, USA)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO_2, 37°C 환경에서 배양하였다. 탐식세포는 본 실험에 사용되기 하루 전에 96-well cell culture plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 5×10^4/well의 농도로 분주한 후, 5% CO_2, 37°C 환경 하에서 배양하여 60-70%가 응집상태로 자란 세포를 이용해 실험을 수행하였다. 탐식세포에 *S. typhimurium*을 감염시키기 위해, MOI 20 (multiplex of infection)이 되게 감염시켜 37°C, 5% CO_2 환경에서 1시간 동안 배양한 후, 세포에 탐식되지 않은 세포 외부의 균을 죽이기 위하여 기존의 배지에 30 μg/ml의 gentamicin을 첨가한 배지로 교체한 후, 30분 동안 더 배양하였다. 이 후에 기존 연구논문을 참고하여[24-26], 15 mM sodium chlorate, 0.1 mM sodium azide, 0.1 mM sodium cyanide, 그리고 복합제 (15 mM sodium chlorate + 0.1 mM sodium azide + 0.1 mM sodium cyanide)를 각각의 배지에 첨가하고 4, 8, 16, 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 이후 감염된 세포는 각각의 시간대별로 멸균된 phosphate buffer saline(pH 7.4)으로 3회 세척한 후, 멸균된 증류수를 이용해 세포를 용해시켜 세포 내 균을 LB agar 평판배지에 spreading하여 다시 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, CFU를 측정하였다.

실험동물

5주령, 평균체중 17.9 ± 1.6 g의 Specific Pathogen Free

(SPF) ICR 마우스 암컷 40마리를 구입하여 ((주)양성, 용인), SPF 마우스임을 확인하기 위한 미생물학적 검사를 실시하여 특정 병원체가 없는 것을 확인한 후 실험에 사용하였다. 마우스는 대조군과 실험군 각각 10마리씩을 임의로 선택하여 케이지에 분리하여, 1주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. SPF 상태를 유지하기 위해 음수, 사료, 깔짚 등은 모두 고압멸균 후 사용하였으며, 사육온도와 습도는 각각 22 ± 1.0°C과 50 ± 10%로 하였으며, 12시간 간격으로 조명을 조절하였으며, 환기는 자동으로 조절되는 실험동물 사육장치 ((주)쓰리샤인, 대전)에서 사육하였다.

마우스 접종 및 약제투여

대조군과 실험군 모두에 대하여 *S. typhimurium*이 2×10^5 CFU/ml가 되도록 하여 0.1 ml를 마우스의 복강을 통하여 주입하여 감염시켰다.

*S. typhimurium*을 마우스에 감염시킨 후, 대조군에는 약제를 첨가하지 않은 음용수를, 실험군 I에는 음용수 1 L에 sodium chlorate을 1.6 g (15 mM) 첨가한 음용수를, 그리고 실험군 II에는 음용수 1 L에 sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide를 각각 1.6 g (15 mM), 19.5 mg (0.1 mM), 14.7 mg (0.1 mM)을 첨가한 음용수를 급여하였다. 음용수는 매일 자유롭게 섭취하도록 하였고, 12일 동안 급여하면서, 급여 기간 동안에 매일 마우스의 생존율을 관찰하여 기록하였다. 마우스를 이용한 모든 실험절차는 국립경상대학교의 동물윤리협의회의 승인을 받아 본 위원회의 규정에 의거하여 실험을 수행하였다(GNU-LA-2011-63).

통계학적 분석

결과에 대한 통계적 처리는 Sigma plot(Systat Software Inc., USA)을 이용하여 student's t-test로 실시하였으며, $p < 0.05$일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

대식세포 내 항균효과

Fig. 1은 마우스 탐식세포인 RAW 264.7 세포에 *S. typhimurium*을 감염시킨 다음, 15 mM sodium chlorate, 0.3 mM sodium azide, 그리고 0.3 mM sodium cyanide를 첨가하여, 경시별로 *S. typhimurium*의 세포 내 증식억제 효과를 나타낸 것이다.

Sodium chlorate, sodium cyanide, sodium azide, 그리고 복합조성물(sodium chlorate + sodium cyanide + sodium azide)을 첨가한 배지에서 세포 내 *S. typhimurium*의 증식이 대조군과 비교하여 경시별로 매우 유의한 감소를 보였으며 ($p < 0.05$), 배양 24시간에는 약제를 첨가한 모든 배지에서 세포 내 *S. typhimurium*의 증식이 대조군과 비교하여 90% 이상 억제되었으며, 복합조성물을 첨가한 세포에서는 *S. typhimurium*의 증식이 다른 모든 약제들보다도 현저하게 억제되는 결과를 보였다.

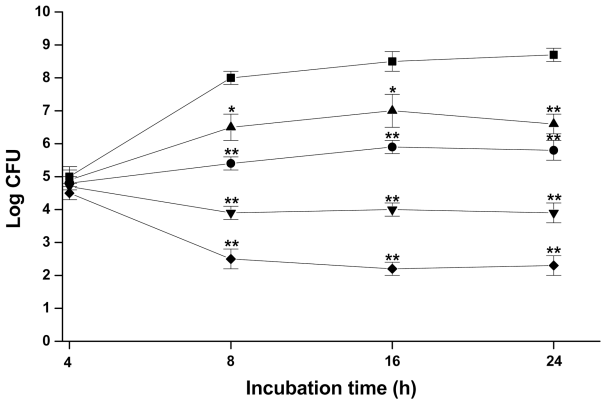

Fig. 1. The effects of sodium chlorate, sodium azide, sodium cyanide and sodium salts mixture containing sodium chlorate, sodium azide, and sodium cyanide on intracellular replication of *S. typhimurium* in macrophages. ■, control; ▲, the group treated with 0.1 mM sodium azide; ●, the group treated with 0.1 mM sodium cyanide; ▼, the group treated with 15 mM sodium chlorate; ◆, the group treated with sodium salts mixture (15 mM sodium chlorate, 0.1 mM sodium cyanide, 0.1 mM sodium azide). At different times of incubation 4, 8, 16 and 24 h, RAW 264.7 cells infected with *S. typhimurium* were lysed, and the numbers of viable bacteria were monitored. Intracellular replication efficiency was evaluated by Log_{10}CFU. Data are the averages of the three experiments, and error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences with untreated value are indicated by asterisks (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Brian 등[24]은 *E. coli* DH_{5a} 균주를 이용하여 nitrate reductase에 작용하는 미량원소들에 대한 연구를 통하여, azide와 cyanide가 세포 내 기생세균이 갖고 있는 respiratory nitrate reductase의 활성을 억제시켜 에너지를 얻지 못하게 함으로서 세포 내 기생세균의 증식을 억제하며, cyanide의 respiratory nitrate reductase 저해작용이 azide 보다 높다는 사실을 보고하였다. 본 연구에서도 sodium cyanide를 첨가한 세포에서 sodium azide를 첨가한 세포보다 *S. typhimurium*의 증식억제가 높게 나타나, Brian 등의 연구 결과와 일치하는 결과를 나타내었다.

Anderson 등[22]의 연구에 따르면, 세포 내 기생세균인 *S. typhimurium*이 갖고 있는 respiratory nitrate reductase가 nitrate와 유사한 구조를 갖고 있는 chlorate를 chlorite로 환원시켜 chlorite가 세포 내 *S. typhimurium*을 사멸시키는 작용을 하는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서 나타난 복합제의 세포 내 *S. typhimurium*의 현저한 증식억제 효과는, sodium azide와 sodium cyanide의 respiratory nitrate reductase의 활성억제와, sodium chlorate의 세포 내 *S. typhimurium*의 살균작용이 결합되어 상승효과를 나타난 결과로 사료된다.

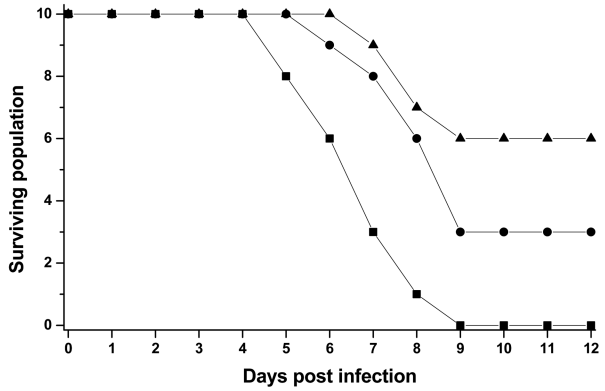

Fig. 2. Therapeutic effects of a sodium salts mixture containing sodium chlorate, sodium azide and sodium cyanide for murine salmonellosis. Mortality was observed daily for 12 days postinfection. ■, control group treated with water (n = 10); ●, group I treated with sodium chlorate (1.6 g/L water, n = 10); ▲, group II treated with a combination of sodium chlorate (1.6 g/L), sodium azide (19.5 mg/L) and sodium cyanide (14.7 mg/L) (n = 10).

S. typhimurium 감염 마우스에 대한 치료효과

Fig. 2는 마우스에 *S. typhimurium*을 공격 접종한 후, sodium chlorate와 복합제(sodium chlorate + sodium azide + sodium cyanide)를 각각 음수로 급여한 후, *S. typhimurium*에 대한 치료효과를 경시별 마우스의 생존율로 나타낸 것이다.

무투여 대조군에는 감염 후 4일째부터 마우스의 폐사가 나타나기 시작하여 9일째 모두 폐사하였으며, sodium chlorate를 음용수 1 L에 1.6 g을 첨가하여 급여한 실험군 I에서는 *S. typhimurium*을 감염시킨 후 5일째부터 폐사가 발생하여 실험종료 시까지 3마리가 생존하여 생존율 30%를 나타내었다. 반면에, 음용수 1 L에 sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide를 각각 1.6 g (15 mM), 19.5 mg (0.1 mM), 14.7 mg (0.1 mM)을 첨가하여 급여한 실험군 II에서는, *S. typhimurium*을 감염시킨 후 6일째부터 폐사가 발생하여 실험종료 시까지 6마리가 생존하여 60%의 높은 생존율을 보였다.

Jung 등[31]은 오매 열수추출물을 *S. typhimurium*에 감염된 BALB/c 마우스에 4 mg씩 12일 동안 경구 투여하여 마우스의 생존율이 30%였다고 보고하였다. Anton 등[32]은 *S. typhimurium*을 감염시킨 CF-1 마우스에 ampicillin, ceftriaxone, 그리고 moxalactam 항생제를 각각 농도별로 하루에 8시간 간격으로 3회에 걸쳐서 피하에 투여하여 *S. typhimurium* 감염증에 대한 치료효과를 확인하였다. 그 결과, ampicillin을 64 mg/kg body weight로 투여한 군에서는 8일째에 60% 생존율을 나타내었고, ceftriaxone을 1 mg/kg body weight로 투여한 군에서는 12일째에 60% 생존율을 보였으며, moxalactam을 16 mg/kg body weight로 투여한 군에서 5일째에 20% 생존율을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서, sodium chlorate를 음용수 1 L에 1.6g을 첨가하여 급여한 실험군 I과 음용수 1 L에 sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide를 각각 1.6 g (15 mM), 19.5 mg (0.1 mM), 14.7 mg (0.1 mM)을 첨가하여 급여한 실험군 II의 경우에는 투약 8일째에 생존율이 각각 60과 70%를 나타내었고, 실험종료일인 12일째에 실험군 I과 실험군 II에서의 생존율은 각각 30과 60%를 보였다. 따라서 실험군 II의 경우에는 Anton 등[32]이 실험에 사용한 ampicillin, ceftriaxone, moxalactam 등과 같은 항생제와 비교하여 보다 높은 치료효과를 나타내었다.

이상의 연구결과로부터, 복합조성물 (음용수 1 L 중 1.6 g sodium chlorate, 19.5 mg sodium azide, 14.7 mg sodium cyanide)이 감염세포 내 *S. typhimurium*의 증식을 현저하게 억제시킴으로서 살모넬라 감염 마우스의 치료에 매우 높은 효과를 보일 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2010-0021247).

요 약

본 연구는 세포 내 기생세균인 *S. typhimurium*의 세포 내 대사과정에서 중요한 역할을 하는 respiratory nitrate reductase의 활성 및 활성 억제 물질인 sodium chlorate, sodium azide, 그리고 sodium cyanide으로 조성된 복합조성물을 이용하여 RAW 264.7 세포에 감염된 *S. typhimurium*의 증식억제 효과와, *S. typhimurium* 감염 마우스에 대한 치료효과를 평가하기 위하여 수행되었다.

복합조성물을 이용하여 RAW 264.7 세포 감염 *S. typhimurium*에 대한 증식억제 효과 확인시험을 수행한 결과, 세포 배양 24시간에 대조군과 비교하여 90% 이상의 *S. typhimurium*의 증식이 억제되었다. 또한, *S. typhimurium*을 감염시킨 마우스에 복합조성물을 투여한 결과, 70%의 높은 생존율을 보였다.

따라서 본 연구의 결과로부터, sodium chlorate, sodium azide, sodium cyanide로 조성된 복합조성물을 *S. typhimurium*에 감염된 마우스에 투여할 경우 *S. typhimurium*의 증식을 억제하여 감염증상을 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Cleaveland, S., Laurenson, M.K. and Taylor, L.H.: Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos. Trans. R.*

Soc. Lond B. Biol. Sci. **356**, 991-999 (2001).
2. Kim, G.S., Kim, D.H., Lim, J.J., Lee, J.J., Han, D.Y., Lee, W.M., Jung, W.C., Min, W.G., Won, C.G., Rhee, M.H., Lee, H.J. and Kim, S.: Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen *Salmonella* within the raw 64.7 macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 2012-2017 (2009).
3. Kim, D.H., Lim, J.J., Lee, J.J., Jung, W.C., Shin, H.J., Lee, H.J., Kim, G.S. and Kim, S.: Antibacterial and therapeutic effects of houttuynia cordata ethanol extract for murine salmonellosis. *Kor. J. Environ. Agricul.* **27**, 156-162 (2008).
4. Valle, E. and Guiney, D.G.: Characterization of salmonella-induced cell death in human macrophage-like THP-1 cells. *Infect. Immun.* **73**, 2835-2840 (2005).
5. 김동혁, 이진주, 임정주, 김대근, 김곤섭, 이후장, 민원기, 이만휘, 장홍희, 김석. 삼백초 수용성 추출물의 *Salmonella typhimurium* 균에 대한 항균 및 숙주세포 내 사멸 효과 규명. 농업생명과학연구, **46**, 111-119 (2011)
6. 식품의약품안전청. 축산용 항생제 관리시스템 구축. 식품의약품안전청, 서울, pp. 19-93 (2006).
7. Lee, M.H., Lee, H.J. and Ryu. P.D.: Public health risks: Chemical and antibiotic residues. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **14**, 402-413 (2001).
8. Mah, M.W. and Memish, Z.A.: Antibiotic resistance. An impending crisis. *Saudi Med. J*. **21**, 1125-1129 (2000).
9. Prescott, J.F. Antimicrobial use in food and companion animals. *Anim. Health Res. Rev*. **9**, 127-133 (2008).
10. Gould, I.M. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**(Suppl. 1), S2-9 (2008).
11. Ruiz, J., Capitano, L., Nunez, L., Castro, D., Sierra, J.M., Hatha, M., Borrego, J.J. and Vila, J.: Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 699-702 (1999).
12. 참여연대: 축·수산 동물약품(항생제) 실태 보고서 I, 참여연대, 서울, pp. 11-21 (2005).
13. 이연옥, 정원철, 차춘남, 김곤섭, 이여은, 김석, 이후장. 한약재 복합추출물과 점토광물질 혼합제의 *Escherichia coli* H:157:H7에 대한 항균효과. 한국식품위생안전성학회지, **25**, 1-5 (2010).
14. Kong, B., Wang, J. and Xiong, Y.L. Antimicrobial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum-packaged pork. *J. Food Prot*. **70**, 641-647 (2007).
15. Chattopadhyay, D., Maiti, K., Kundu, A.P., Chakraborty, M.S., Bhdra, R., Mandal, S.C. and Mandal, A.B. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. *J. Ethnopharmacol.* **77**, 49-55 (2001).
16. Bravo, M.V., Bunout, D., Leiva, L., de la Maza, M.P., Barrera, G., de la Maza, J. and Hirsch, S. Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* on prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult outpatients with amoxicillin treatment. *Rev. Med. Chil.* **136**, 981-988 (2008).
17. Collado, M.C., Isolauri, E., Salminen, S. and Sanz, Y. The impact of probiotic on gut health. *Curr. Drug Metab.* **10**, 68-78 (2009).
18. Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D. and Pantanella, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol. Res.* **161**, 327-333 (2006).
19. Mani, F., Damasceno, H.C., Novelli, E.L., Martins, E.A. and Sforcin, J.M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 95-98 (2006).
20. Smith, D.J., Oliver, C.E., Shelver, W.L., Caesar, T. and Anderson, R.C.: Chlorate metabolism in pure cultures of *Escherichia coli* O157:H7 pretreated with either nitrate or chlorate. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10216-10224 (2009).
21. Anderson, R.C., Callaway, T.R., Buckley, S.A., Anderson, T.J., Genovese, K.J., Sheffield, C.L. and Nisbet, D.J.: Effect of oral sodium chlorate administration on *Escherichia coli* O157:H7 in the gut of experimentally infected pigs. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 125-130 (2001).
22. Anderson, R.C., Buckley, S.A., Kubena, L.F., Stanker, L.H., Harvey, R.B. and Nisbet, D.J.: Bactericidal effect of sodium chlorate on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 in rumen contents *in vitro*. *J. Food. Prot.* **63**, 1038-1042 (2000).
23. Patchanee, P., Crenshaw, T.D. and Bahnson, P.B.: Oral sodium chlorate, topical disinfection, and younger weaning age reduce *Salmonella enterica* shedding in pigs. *J. Food Prot.* **70**, 1798-1803 (2007).
24. Brian, J.N.J., Lee, J.A., Luis, M.R., Clare, J.T., Clive, S.B., Enrique, F., Antonia, H., Julea, N.B. and David, J.R.: Tuning a nitrate reductase for function. *J. Biol. Chem.* **279**, 32212-32218 (2004).
25. Afshar, S., Johnson, E., de Vries, S. and Schröder, I.: Properties of a thermostable nitrate reductase from the hyperthermophilic *Archaeon Pyrobaculum aerophilum*. *J. Bacteriol.* **183**, 5491-5495 (2001).
26. Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H. and Strynadka, N.C.J.: Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 681-687 (2003).
27. Helliwell, M. and Nunn, J.: Mortality in sodium chlorate poisoning. *Br. Med. J.* **1**, 1119-1121 (1979).
28. Merck Index: *Sodium chlorate,* 12th ed. *(*S. Budavari, Ed.*),* Merck & Company, White House Station, New Jersey, pp. 1473-1474 (1996).
29. Chefetz, B., Stimler, K., Shechter, M. and Drori, Y.: Interactions of sodium azide with triazine herbicides: Effect on sorption to soils. *Chemosphere* **65**, 352–357 (2006).
30. Hébert, C.D.: NTP technical report on toxicity studies of sodium cyanide. National Institutes of Health, Maryland, pp. 7-9 (1993).
31. Jung, W.C., Cha, C.N. and Lee, H.J.: Antibacterial effects of *Mume Fructus* water extract against *Salmonella typhimurium* in murine salmonellosis. *Kor. J. Env. Hlth*. **35**, 362-364 (2009).
32. Anton, P.A., Kemp, J.A., Butler, T. and Jacobs, M.R.: Comparative efficacies of ceftriaxone, moxalactam, and ampicillin in experimental *Salmonella typhimurium* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 312-315 (1982).