

Listeria monocytogenes YM-7의 생리적 특성

김영목 · 박옥연 · 목종수 · 장동석
부산수산대학교 식품공학과

Physiological Characteristics of *Listeria Monocytogenes* YM-7

Young-Mog KIM, Uk-Yeon PARK, Jong-Soo MOK and Dong-Suck CHANG

Department of Food Science & Technology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

Listeria monocytogenes has been increasingly recognized as an important food poisoning and pathogenic bacterium which is Gram positive, non spore forming and facultative anaerobic rod shape. Bacteriological and physiological characterization of *L. monocytogenes* YM-7 isolated from a patient was performed.

Optimum growth condition of *L. monocytogenes* YM-7 was at 37°C, pH 8.0 and 0% sodium chloride in tryptic soy broth, and then it grew pretty well in the range of 8~40°C, pH 5.0~10.0 and up to 7% of sodium chloride in the medium. The highest hemolysin activity of hemolysin produced by *L. monocytogenes* YM-7 was shown in the stationary phase of its growth. Hemolysin produced by the isolated strain was stable at 4°C and pH 6.0~8.0, while it was gradually unstable by increasing the storage temperature.

Key words : *Listeria monocytogenes*, listeriosis, hemolysin activity

서 론

Listeria monocytogenes(*L. monocytogenes*)는 Gram 양성, 무포자 간균으로 β -hemolysin을 생성하는 식중독 및 병원성 세균으로 특히 저온에서도 증식 가능 하기 때문에 일반식품 뿐만 아니라 냉동식품과 유제품 등의 저온보장식품에서도 검출될 확률이 높은 균으로 알려져 있고, 이러한 점이 최근의 냉장유통 제품의 급격한 증가에 따라 문제가 되고 있다(Johnson et al., 1990; Bahk and Marth, 1989; Lovett et al., 1986).

또한 이 균은 사람과 가금류 뿐만 아니라 물, 공기, 목초, 하수 등의 자연계와 우유, 육류, 채소류, 수산물 가공식품, 냉동식품 등 거의 대부분의 식품에서 검출되고 있으며(Farber et al., 1987; Skovagard and Morgen, 1988), 특히 1980년대에 들어와 이 균에 의한 집

단 식중독이 유럽과 북미대륙에서 발생하여 주목을 받기 시작했다. 1981년 캐나다에서 양배추 샐러드인 coleslaw 섭취에 의한 환자발생과, 1983년 미국 메사추세츠주에서 저온살균우유에 의한 환자발생(Fleming et al., 1985), 그리고 1987년 덴마크, 스위스, 영국 등의 유럽지역에서도 리스테리아증(Listeriosis)이 발생하는 등 *L. monocytogenes*에 의한 식중독사고는 전세계적으로 증가 추세에 있다(Farber and Peterkin, 1991).

우리나라에서도 수입식품의 증가로 *Listeria*균의 오염정도에 대한 조사와 오염방지대책이 시급한 실정이지만 국내에서는 이 균에 대한 연구가 거의 전무한 상태이다.

이에 본 연구에서는 *L. monocytogenes*균으로 인한 중독 사고 방지에 필요한 자료를 얻기 위하여 병원성

을 가지며 용혈성이 강한 *L. monocytogenes*을 분리 선 정하여 이 균의 생리적 특성(온도, 식염, pH 및 용혈 독소의 특성)에 관하여 시험한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시험 균주의 동정

시험용 균주는 리스테리아 유사증을 일으킨 환자의 혈액으로부터 분리하였으며, 분리균의 동정은 Fig. 1 과 같은 방법으로 하였다.

2. CAMP시험

분리균의 용혈능 검정을 위한 CAMP 시험은 면양 적혈구(5%) 한천평판과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538과 *Rodococcus equi* ATCC 25729를 사용하였다.

3. 분리균의 병원성시험

분리된 균의 병원성은 배양균체를 생리식염수로 세척하여 마우스(ICR계, 16~18g)의 복강에 주사($10^9/ml$)한 후 사망여부로 측정하였는데 5일 이내에 사망 하면 병원성이 있는 것으로 간주하였다(Stelma et al, 1987).

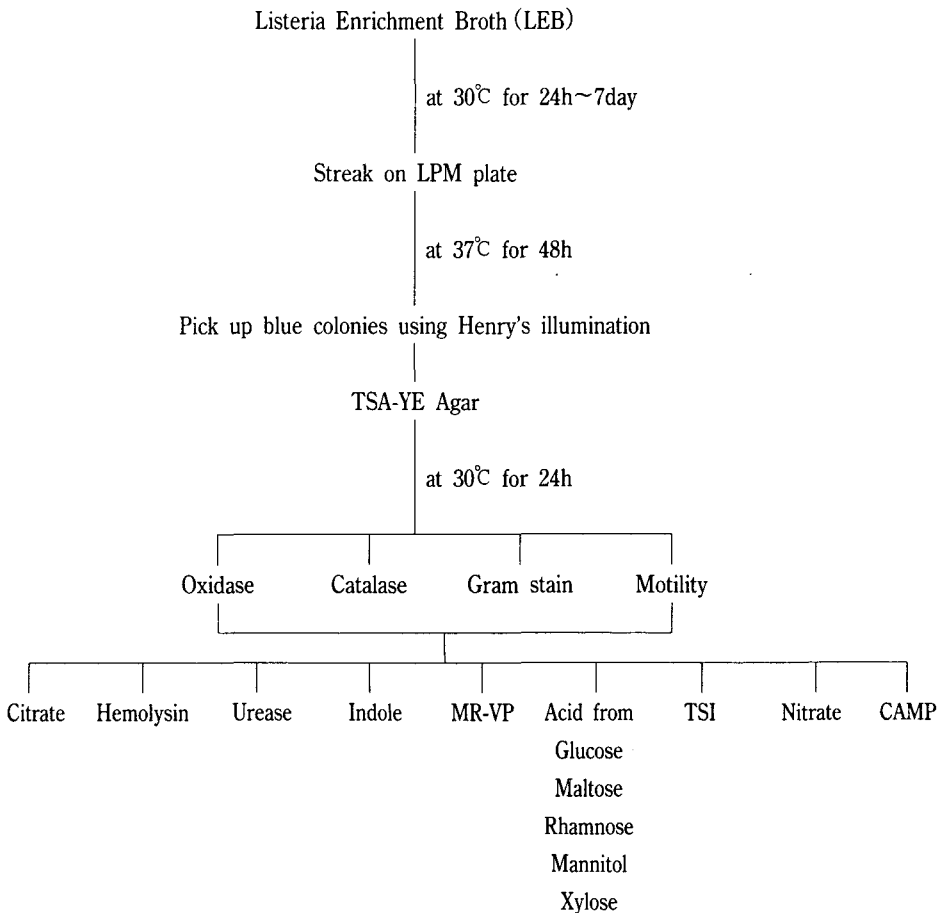


Fig. 1. Isolation and identification procedure for *Listeria* sp.

4. *L. monocytogenes*의 증식에 영향을 미치는 환경인자

1) 온도

*L. monocytogenes*의 생육에 미치는 온도의 영향은 TSB배지(NaCl 0%)에 종균을 접종한 후 4, 8, 20, 37 및 40°C에서의 배양 시간별 균수의 변화를 LPM 한천 평판배지(Table 1)로 측정하였다.

Table 1. Composition of LPM medium for *Listeria* sp. isolation

Agar	15.0 g
Glysin anhydride	10.1 g
LiCl	5.0 g
NaCl	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Beef extract	35.0 g
Phenylethyl alcohol	2.5 g
Esculin	1.0 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Distilled water	1000 ml
pH 7.0 ± 0.1	
〈Additive〉	
1% Moxalactam solution	2.0 ml

2) 염분 농도 및 pH

*L. monocytogenes*의 생육에 미치는 염분 농도 및 pH의 영향은 염분 농도 및 pH를 각각 조절한 200ml의 TSB 배지에, 37°C에서 24시간 전배양된 배양액을 접종한 후, 37°C에서 진탕 배양(140 cycle/min)하면서 균 증식정도를 UV-Visible Recording Spectrophotometer (Shimadzu Co., UV-160)를 사용하여 660nm에서 흡광도로 측정하였다.

5. *L. monocytogenes*가 생산하는 용혈독소

1) 용혈조독소의 조제

37°C에서 24시간 전배양한 배양액 5ml를 300ml BHI broth에 접종한 후 37°C에서 24시간까지 진탕 배양하면서 4시간마다 배양액 10ml씩을 취하여 원심분리(6000×g, 10min, 4°C)하여, 상청액을 membrane filter (Milipore, pore size, 0.45µm)로 여과한 것을 용혈독소 실험용 조독소액으로 사용하였다.

2) 혈구현탁액 조제

용혈활성 검사에는 면양혈구를 사용하였다. 0.1%의 bovine serum albumin이 함유된 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 6.0)으로 신선한 면양혈구를 세척하는 (1600×g, 5min) 조작을 4회 정도 반복하여 얻은 순수한 면양혈구를 0.01 M PBS에 최종농도가 1% 되게 현탁하여 용혈독력 검사에 사용하였다.

3) 용혈독소의 독력 검사

*L. monocytogenes*가 생산하는 용혈활성은 Matar et al.(1992)의 방법에 따라 측정하였다. 단계적으로 희석한 용혈독소 1ml와 0.01 M PBS 1ml를 섞어서 37°C에서 5분간 방치한 다음에 1%의 면양혈구 1ml를 첨가하고, 다시 37°C에서 45분간 반응한 후 원심분리(1600×g, 5min)하여 얻은 상청액을 540nm에서의 흡광도를 측정하여 *L. monocytogenes*가 생산하는 용혈독소의 활성을 측정하였다.

반응계에 가한 적혈구의 50%를 파괴하는 독소량을 1 용혈 단위(1 hemolytic unit: HU)로 하여 용혈활성을 나타내었다.

4) 용혈독소의 안정성

① 온도

온도가 *L. monocytogenes*가 생산한 용혈독소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 준비된 용혈독소 용액을 4, 20, 37, 50 및 60°C에 보관하면서 시간별로 독력 변화를 측정하였다. 처리 후 용혈활성의 변화는 5. 3)과 같은 방법으로 측정하였다.

② pH

pH 변화가 *L. monocytogenes*가 생산한 용혈독소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 5.0~9.0으로 각각 조정된 PBS에 조독소를 1:1 비율로 혼합하여 1시간동안 정치시킨 후 독력의 변화를 측정하였다. 용혈활성의 변화는 5. 3)과 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *L. monocytogenes*의 분리 및 동정

시료에서 분리한 균주 중 LPM 배지에서 전형적인 흑자색의 집락을 *Listeria* 속으로 추정하여 생화학 실험을 행한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Results of physical and biochemical tests for *Listeria* sp.

Strain	Gram	Shape	Mot	Cat	Oxi	Nit	Cit	TSI	H ₂ S	MR	VP	Ind	Hem	CAMP		Ure	Acid from					Mou
														Sta	Rho		Glu	Man	Mal	Rha	Xyl	
<i>L. monocytogenes</i>																						
ATCC 15313	+	short rod	+	+	-	-	-	A/A	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
YM-7	+	short rod	+	+	-	-	-	A/A	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>L. innocua</i>																						
ATCC 33090	+	short rod	+	+	-	-	-	A/A	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i>																						
ATCC 19119	+	short rod	-	+	-	-	-	A/A	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+

Gram; Gram stain, Mot; Motility(20~25°C), Cat; Catalase, Oxi; Oxidase, Nit; Nitrate, Cit; Citrate, H₂S; H₂S, MR; Methyl-Red, VP, Voges proskauer, Ind; Indol, Hem; Hemolysin, Sta; *Staphylococcus aureus*, Rho; *Rhodococcus equi*, Ure; Urease, Glu; Glucose, Man; Mannitol, Mal; Maltose, Rha; Rhamnose, Xyl; Xylose, Mou; Mouse pathogenic test.

분리균주의 형태는 Gram 양성 단간균이었으며, 운동성 측정 결과 반고체 배지 표면에서 3~5mm 아래에 전형적인 우산 모양의 층이 형성되었고, mannitol 과 xylose는 이용하지 못하나 rhamnose는 이용할 수 있어 Jone and Seeliger (1993)의 보고와 일치하였다.

면양혈구배지에서의 용혈활성을 관찰한 결과 분리균주와 *L. ivanovii* ATCC 19119는 강한 용혈활성을 나타내었다. 그러나 *L. monocytogenes* ATCC 15313은 용혈활성이 관찰되지 않아 면양혈구에서 용혈활성을 나타내지 않는다는 Kathariou et al. (1991)의 보고와 같았다.

Listeria 속 중에서 병원성을 가지는 *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*를 구별할 수 있는 CAMP 시험 결과, 분리균주는 *S. aureus*에서 용혈활성이 관찰되었고, *R. equi*에서 용혈활성이 관찰되지 않았다. 그러나 *L. ivanovii* ATCC 19119는 *S. aureus*에서 용혈활성이 관찰되지 않았으나 *R. equi*에서 용혈활성이 관찰되었다. 이러한 결과는 *L. monocytogenes*는 *S. aureus*균에서, *L. ivanovii*는 *R. equi*균에서 용혈활성을 나타낸다는 Ralovich (1989)와 Bille and Doyle (1991)의 보고와 일치하였다.

한편 병원성 시험 결과 분리균주와 *L. ivanovii* ATCC 19119를 접종한 마우스는 5일 이내에서 사망하여 병원성을 나타내었으나 *L. monocytogenes* ATCC 15313은 병원성을 나타내지 않았다.

이상과 같은 세균학적, 특성시험의 결과 분리균은 *L. monocytogenes*로 동정 되었으며, 이후의 추가적인

특성시험을 위하여 *L. monocytogenes* YM-7 이라고 명명하였다.

2. *L. monocytogenes*의 증식에 영향을 미치는 환경인자

1) 온도

TSB 배지에 접종한 *L. monocytogenes* YM-7 균의 온도에 대한 증식정도를 Fig. 2에 나타내었다.

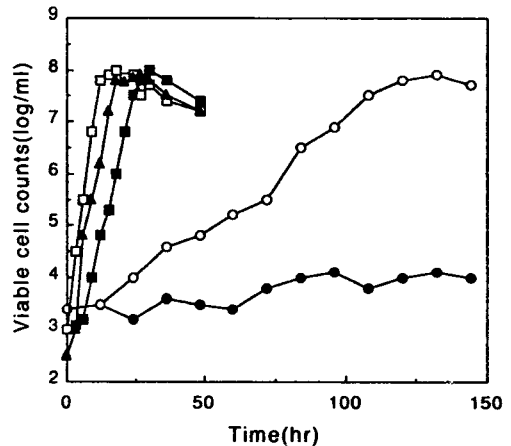


Fig. 2. Effects of temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* YM-7 in tryptic soy broth.

—●— 4°C —○— 8°C —■— 20°C
 —□— 37°C —▲— 40°C

L. monocytogenes YM-7 균은 37°C에서 최대증식을 보여 30~37°C가 최적증식온도라는 Seeliger and Jo-

nes (1986)와 Cho et al. (1994)의 보고와도 일치 하였으나, 4°C에서는 증식을 보이지 않아 대부분의 *L. monocytogenes*가 4°C에서 증식이 가능하다는 Seeliger and Jones (1986)의 보고와는 달랐다. 그러나 8°C에서는 점진적으로 증식하여 배양 120시간경에 최적배양온도인 37°C에서와 비슷한 최대증식치를 나타내었다.

이상의 결과로 *L. monocytogenes* YM-7은 4°C에서는 증식하지 못하였지만 8°C에서는 증식이 가능하므로 5°C 이하의 온도 유지가 어려운 가정용 냉장고 냉장실에서의 식품보관은 리스테리아균의 증식을 효과적으로 저지하기 어려운 것으로 생각된다.

2) 염분농도

L. monocytogenes YM-7 균주의 증식에 미치는 식염 농도의 영향을 Fig. 3과 같이, *L. monocytogenes* YM-7은 식염 농도 0%에서 균증식이 가장 왕성하였고 식염 농도 7%까지는 유도기만 연장될 뿐 그 후는 급격한 증식의 양상을 보였다. 이러한 결과는 TSB 배지에서 *L. monocytogenes* Scott A가 10%의 식염 농도에서 증식한다는 MacClure et al. (1989)의 보고 처럼 비교적 높은 식염 농도에서 증식이 가능 하였다.

3) pH

L. monocytogenes YM-7 균주를 여러 pH 조건에서 배양했을 때의 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

L. monocytogenes YM-7은 pH 5.0~10.0에서 증식이 가능하였으며 pH 8.0에서 가장 빠른 증식을 나타내었으나 pH 4.0과 11.0에서는 증식하지 못하였다. 이러한 결과는 *L. monocytogenes*가 pH 5.5~9.5 범위에서 증식 한다는 Seeliger and Jones (1986)의 보고와는 다소 차이가 있었지만, pH 4.3~5.2의 TSB 배지에서 *L. monocytogenes* Scott A가 증식가능하다는 Ita and Hutkins (1991)의 보고와 *Listeria* enrichment broth에서 pH 5.0에서 증식 가능하다는 Cho et al. (1994)의 보고와도 비슷하였다. 또한 균의 증식에 대한 식염농도의 영향에서와 마찬가지로 최적 pH를 벗어난 범위에서도 유도기만 연장될 뿐 그후 급격한 증식이 일어났다.

이상의 결과로 보아 *L. monocytogenes*균은 고농도의 식염과 폭 넓은 범위의 pH영역에서 빠른 증식 및 저온에서의 증식능력 그리고 감염시의 병원성 등으로 미루어 볼 때 식품위생 관리상의 커다란 장애 요소로 작용할 것으로 생각된다.

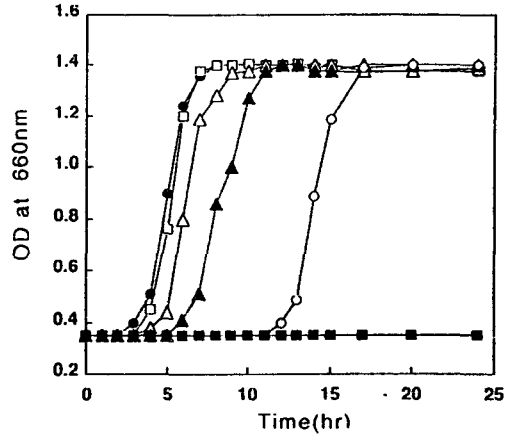


Fig. 3. Effects of NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes* YM-7 in tryptic soy broth.

—●— 0% —□— 1% —△— 3%
 —▲— 5% —○— 7% —■— 9%

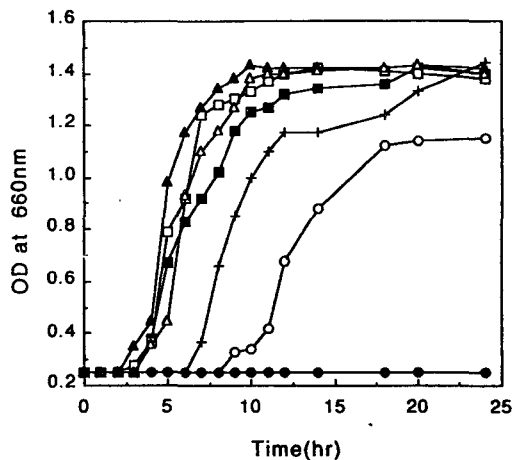


Fig. 4. Effects of pH on the growth of *Listeria monocytogenes* YM-7 in tryptic soy broth.

—●— pH 4.0 —○— pH 5.0
 —■— pH 6.0 —□— pH 7.0
 —▲— pH 8.0 —△— pH 9.0
 —+— pH 10.0 —◇— pH 11.0

3. *L. monocytogenes* YM-7이 생산하는 용혈독소

1) 용혈독소의 독력

L. monocytogenes YM-7의 균증식도(660nm에서의 흡광도)에 따른 용혈활성은 Fig. 5와 같다. *L. monocytogenes* YM-7은 37°C에서 용혈독소를 가장 많이 생산하였는데, 용혈활성은 배양 시간 경과에 따라 점차적으로

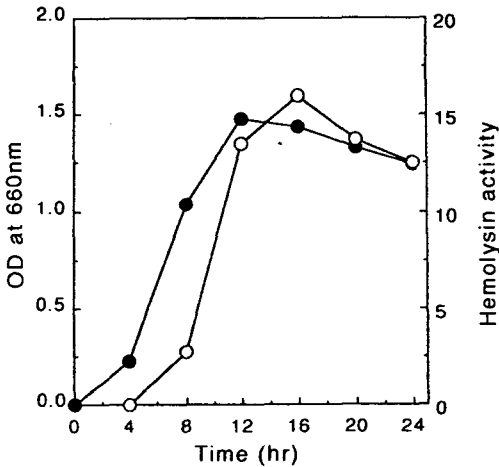


Fig. 5. Pattern of cell growth and hemolysin production of *Listeria monocytogenes* YM-7 in BHI broth at 37°C for 140 cycles/min. —●— OD —○— Hemolysin

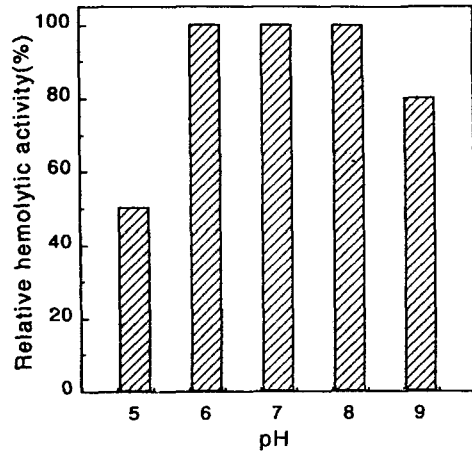


Fig. 7. Change of hemolytic activity of the hemolysin produced from *Listeria monocytogenes* YM-7 by pH for 1 hour.

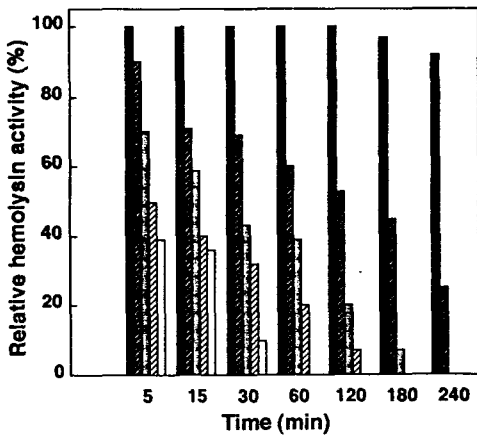


Fig. 6. Change of hemolytic activity of the hemolysin produced from *Listeria monocytogenes* YM-7 by incubation time and temperature. □ 4°C □ 20°C □ 37°C □ 50°C □ 60°C

로 증가되어 배양 8시간째에 2.75 HU, 12시간째에 13.5 HU의 용혈활성을 나타냈으며, 배양 16시간째에는 16 HU의 가장 높은 용혈활성을 나타내었다. 그리고 용혈활성은 균생육곡선의 정지기부근에서 최대활성을 나타내었다.

2) 용혈독소의 안정성

① 온도

L. monocytogenes YM-7 균주가 생산하는 용혈독소의 온도에 대한 안정성을 살펴본 결과는 Fig. 6과 같다.

상징액 중의 용혈독소는 4°C에서는 안정하여 4시간 후에도 90% 이상의 활성을 유지하였으나, 20°C 이상의 온도에서는 불안정하여 20°C의 경우 4시간후에 용혈활성이 25%로 저하되고, 37°C의 경우 2시간후에 80%로, 50°C와 60°C의 경우 각각 3시간과 1시간후에 용혈활성이 측정되지 않는 것으로 보아, 이 용혈독소는 온도에 대단히 불안정하다는 것을 알 수 있었다. 하지만 37°C의 경우 180분 후에도 용혈활성이 남아 있어 안전성이 우려된다. 이상의 결과는 *L. monocytogenes* F 2365 균주가 생산하는 용혈독소는 37°C에서 200분 경과 후에도 용혈활성이 남아 있다는 Matar et al. (1992)의 결과와 비슷하였다.

② pH

L. monocytogenes YM-7 균주가 생산하는 용혈독소의 pH에 대한 안정성을 시험한 결과는 Fig. 7과 같이, pH 6.0~8.0에서는 1시간후에도 독력의 변화가 없었으나, 그 이외의 pH 영역에서는 용혈독소는 매우 불안정하였다. 이러한 결과는 *L. monocytogenes* F2365 균주의 용혈독소가 pH 6.0~8.0 범위에서 용혈활성의 변화가 거의 없다는 Matar et al. (1992)의 결과와 유사하였다.

요 약

리스테리아 증세로 의심 되는 환자의 혈액으로부터

분리한 균은 저온에서의 운동성 시험, 용혈능 검정 시험, 당 이용성, CAMP 시험의 결과 전형적인 *L. monocytogenes*의 특성을 보여 *L. monocytogenes* YM-7로 동정하고 명명하였다.

L. monocytogenes YM-7의 세균학적 특성과 이 균이 생산하는 용혈독소의 이화학적 특성은 다음과 같다.

L. monocytogenes YM-7 균주는 Gram 양성 간균으로, 운동성 측정 결과 반고체 배지에서 우산 모양의 층이 생겼고, 최적증식조건은 37°C, 식염 농도 0%, pH 8.0 이었고, 이 균의 생육 가능범위는 8~40°C, 식염 농도 0~7%, pH 5.0~10.0였다.

L. monocytogenes YM-7 균주가 생산하는 용혈독소는 균 생육곡선의 정지기 부근에서 최대 활성을 나타내었다. 이 용혈독소는 비교적 열에 불안정 하였으나, 37°C에서 180분 후에도 용혈활성이 남아 있었다. 그리고 용혈독소는 pH 6.0~8.0에서 안정하였으나 그 외의 pH 영역에서는 매우 불안정 하였다.

참 고 문 헌

- Bahk, J. R. and E. H. Marth. 1989. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 17(6), 634~644.
- Bille, J. and M. P. Doyle. 1991. *Listeria* and *Erysipelothrix*. Manual of Clinical Microbiology (5th). American society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 287~295.
- Cho, S. H., K. O. Kim., J. H. Chung and C. H. Ryu. 1994. Outbreaks and control of listeriosis attributed to agricultural, marine and animal husbandry products. J. Food Hygiene and Safety, 9 (4), 191~198.
- Farber, J. M. and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev., 55(3), 476~511.
- Farber, J. M., M. A. Johnston, U. Purvis and A. Loit. 1987. Surveillance of soil and semi-soft cheese or the presence of *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol., 5, 157~163.
- Fleming, D. W., S. L. Cochi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Plikaytis, M. B. Hilmes, A. Audurier, C. V. Broome and A. L. Reingold. 1985. Pasteurized milks a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New England J. Medicine, 312(7), 404~407.
- Ita, P. S. and R. W. Hutkins. 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. J. Food Protection, 54(1), 15~19.
- Johnson, J. L., M. P. Doyle and R. G. Cassens. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products (a review). J. Food Protection, 53(1), 81~91.
- Jones, D. and H. P. R. Seeliger, 1993. The Genus; The Prokaryotes (2nd), A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, application. vol. II, Springer-Verlag. New York, 1595~1616.
- Kathariou, S. and L. Pine. 1991. The type strains of *Listeria monocytogenes*: a source of continuing difficulties. Int. J. Syst. Bacteriol., 41(2), 328~330.
- Lovett, J., D. W. Francis and J. M. Hunt. 1986. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. J. Food Protection, 50, 188~192.
- MacClure, P. J., T. A. Roberts and P. OttoOgura. 1989. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. Lett. Appl. Microbiol., 9, 95~99.
- Matar, G. M., W. F. Bibb, L. Helsel, W. Dewitt and B. Swaminathan. 1992. Immunoaffinity purification, stabilization and characterization of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b. Res. Microbiol., 143, 489~498.
- Ralovich, B. 1989. Methods to determine virulence of *Listeria* strains. Inter. J. Food microbiol., 8, 269~272.

- Seeliger, H. P. R. and D. Jones. 1986. Genus *Listeria*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II. Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1235~1245.
- Skovgard, N. and C. A. Morgen. 1988. Detection of *Listeria* sp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Inter. J. Food Microbiol., 6, 229~242.
- Stelma, G. N., Jr. A. L. Reyes, J. T. Peeler, D. W. Francis, J. M. Hunt, P. L. Spaulding, C. H. Johnson and J. Lovett. 1987. Pathogenicity testing for using immunocompromised mice. J. Clin. Microbiol., 25, 2085~2089.
-
- 1995년 6월 19일 접수
1995년 8월 18일 수리