J. Korean Fish. Soc. 32(3), 256~260, 1999

한수지, 32(3), 256~260, 1999

잔류 항균물질에 대한 미생물학적 간이검사법의 검출감도 비교

정승희 · 김진우 · 손상규
국립수산진흥원 병리과

Comparison of Detectable Levels for Screening Residual Antibacterial Agents by Bioassay

Sung Hee JUNG, Jin Woo KIM and Sang-Gyu SOHN
Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Pusan 619-900, Korea

Minimun-detectable levels to 28 antibacterial agents used for the prevention and the treatment of fish diseases were determined to establish optimal detective method of bioassay in fish by the EEC 4-plate method, the modified method of EEC 4-plate and the standard method of analysis in food safety regulation. The test organisms used in the methods of bioassay were as follows: *Bacillus subtilis* BGA (*B. subtilis*) and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus*) in the EEC 4-plate method, *B. subtilis, M. luteus,* and *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. cereus*) in the modified of EEC 4-plate, and *B. subtilis, M. luteus, B. cereus* and *Bacillus stearothermophilis* var. *calidolactis* C-953 (*B. stearothermophilis*) in the standard method. The standard method showed predominant sensitivity in the detection of penicillins (PCs), and was also highly sensitive to aminoglycosides (AGs). The sensitivity of standard method in the detection of tetracyclines (TCs), macrolides (MLs), nitrofuran derivatives (NFs) and quinolones (QNs) was very low, and against sulfonamides (SAs), however, was extremely low. The modified method of EEC 4-plate showed very high sensitivity to TCs. Both the EEC 4-plate and the modified method of EEC 4-plate showed competitively high sensitivity in the detection of PCs, MLs, NFs, QNs and SAs. All the methods studied in the experiment showed very low sensitivity against chloramphenicol (CMs). Consequently, the modified method of EEC 4-plate was the best bioassay method with a wide range of sensitivity for the optimal detection of the residual antibacterial agents in fish.

Key words: bioassay, antibacterial agents, EEC 4-plate method, minimum-detectable level

서 론

미지의 시료로부터 잔류하는 항균성물질을 스크리닝하는데 이용되는 미생물학적 간이검사법 (bioassay)은 광범위한 항균스펙트럼을 가지는 공인된 표준균주를 사용하며 우유, 꿀벌, 가축, 새우 및 어류 등의 분야에서 적용되고 있는 매우 편리한 검사법이다 (Park et al., 1990; Jinbo et al., 1992, 1994, 1995; Lee et al., 1993; Kamakura et al., 1994; Baek et al., 1996). 현재 우리 나라에 있어 육류 (식육)중 잔류하는 항균물질의 간이검사법은 농림부고시에 의해 EEC 4-plate법에 따르고 있다. 또한 보건복지부고시에 의해 식품공전 (1994)에는 축산식품중 잔류하는 항균물질의 간이검사법이 따로 규정되어 있다. 이와 같이 부처별로 담당하는 업무의 성격이 달라서 육류와 축산식품의 검사법이 통일되어 있지 않은 것은 각 시험방법이 지니고 있는 나름대로의 장점 때문인 것으로 추정된다. 한편 어류에 있어서는 수산용으로 시판되는 항균물질이 육류나 축산식품과는 많이 달라서 과연 이러한 방법중에서 어느 쪽이 더 적합한지 또는 독자적인 검사법의 확립이 필요한지를 검토하는 일은 급선무라고 판단된다. 현재 국립수산진흥원 병리과에서는 어체내 항균물질의 잔존유무 모니터링을 정기적으로 실시하고 있는데 아직까지 통일된 검사법이 확립되어 있지 않지만 Jung and Kim (1997)의 보고에서 도출된 결과로써 EEC 4-plate법을 약간 변형한 변법을 적용하고 있다.

본 연구는 EEC 4-plate법 및 그 변법, 식품공전상 간이검사법으로써 수산용으로 많이 사용되는 항균물질을 중심으로 이들에 대한 최저 검출한계를 서로 비교하여 어체내 잔류 항균물질의 최적 간이검사법으로서의 유효성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기구

실험에 사용된 28종류의 항균물질 중에서 ciprofloxacin (CFX)은 제일제당, enrofloxacin (EFX)과 norfloxacin (NFX)은 바이엘, florfenicol (FF)은 한국동물약품, ofloxacin (OFX)과 pefloxacin (PFX)은 팔이합성화학, sodium nifurstyrenate (NFS-Na)는 대성미생물사로부터 직접 원료를 구입하였고 나머지는 Sigma사 (USA)로부터 구입하였다 (Table 1). 항균물질은 Table 1에 나타낸 완충액에 용해시킨 뒤 희석액으로써 2배수로 단계 희석하여 각 농도별로 실험에 사용하였다.

pertridish는 87×15 mm (세원양행), filter paper는 직경 10 mm (두께 1.3 mm, 흡수량 78 ± 2 μℓ, Toyo co., Japan)를 고압증기멸균 (121℃, 15분)하여 충분히 건조시켜서 사용하였다. 그리고 시험평판배지위에 형성된 저지원의 직경은 vernier caliper (Matsui co., Japan)를 이용하여 측정하였다.

2. 시험균액의 조제

1) 아포부유액 조제

Nutrient agar (Difco, NA) 300 mℓ를 배양병 (roux bottle)에 넣고 고압증기멸균 (121℃, 15분)하였다. 계대 보관되어 온 *Bacillus subtilis* BGA (*B. subtilis*), *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. cereus*), *Bacillus stearothermophilis* var. *calidolactis* C-953 (*B. stearothermophilis*)을 saline 5 mℓ에 각각 1 loopful (직경 2 mm) 현탁시켜 미리 준비한 배양병에 분주하여 *B. subtilis* 및 *B. cereus*는 30℃에서 7일간, *B. stearothermophilis*는 55℃에서 3일간 배양하였다.

Table 1. Dissolution and diluted solution of each antibacterial agents

	Antibacterial agent	Dissolution solution	Diluted solution
PCs	Penicillin G (PCG)	D-1[1]	D-1
	Ampicillin (ABPC)	D-1	D-1
AGs	Streptomycin sulfate (SM)	D-2[2]	D-2
TCs	Oxytetracycline-HCl (OTC)	D-3[3]	D-3
	Doxycycline-HCl (DOXY)	D-3	D-3
	Chlortetracycline-HCl (CTC)	D-3	D-3
	Tetracycline-HCl (TC)	D-3	D-3
MLs	Erythromycin (EM)	Methanol, D-2	D-2
	Spiramycin (SPM)	Methanol, D-2	D-2
NFs	Sodium nifurstyrenate (NFS-Na)	Distilled water (D.W.)	D.W.
QNs	Ciprofloxacin (CFX)	Glacial acetic acid, D.W.	D.W.
	Enrofloxacin (EFX)	Glacial acetic acid, D.W.	D.W.
	Norfloxacin (NFX)	Glacial acetic acid, D.W.	D.W.
	Pefloxacin (PFX)	Glacial acetic acid, D.W.	D.W.
	Ofloxacin (OFX)	Glacial acetic acid, D.W.	D.W.
	Oxolinic acid (OA)	1N NaOH, D-1	D.W.
	Nalidixic acid (NA)	1N NaOH D-1	D-1
	Flumequine (FM)	1N NaOH D-1	D.W.
	Piromidic acid (PA)	1N NaOH, D.W.	D.W.
Others	Chloramphenicol (CM)	Methanol, D-1	D-1
	Florfenicol (FF)	Acetonitril, D-1	D.W.
	Thiamphenicol (TP)	D-1	D-1
SAs	Sulfamonomethoxine (SMMX)	1/10 Vol. ammonia solution (28%), D-2	D-2
	Sulfisomidine (SID)	1/10 Vol. ammonia solution (28%), D-2	D-2
	Sulfamethazine (SMT)	1/10 Vol. N, N-dimethylformamide, D-2	D-2
	Sulfadimethoxine (SDMX)	1/10 Vol. ammonia solution (28%), D-2	D-2
	Sulfathiazol (STZ)	1/10 Vol. N, N-dimethylformamide, D-2	D-2
	Trimethoprime (TMP)	Methanol, 0.1M citric acid	D-2

[1] : Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) 7.0 g+disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 6.0 g per D.W 1000 ㎖, adjust to pH 6.0 ± 0.1.
[2] : Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) 13.3 g+potassium hydrogen (KOH) 6.2 g per D.W 1000 ㎖, adjust to pH 8.0 ± 0.1.
[3] : Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) 13.6 g per D.W 1000 ㎖, adjust to pH 4.5 ± 0.1.

이어서 멸균한 유리구슬 (직경 4 mm)과 멸균증류수 20 ㎖를 배양병 안에 넣고 조용히 흔들어서 균태가 함유된 현탁액을 3,000 rpm, 20분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 멸균증류수 20 ㎖를 넣고 vortex mixing하여 다시 원심분리하였다. 이 과정을 2번 반복한 후에 상층액을 버리고 멸균증류수 30 ㎖를 가하여 *B. subtilis* 및 *B. cereus*는 65℃에서 30분간, *B. stearothermophilis*는 95℃에서 10분간 가열하였다. 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 이 과정을 반복한 후에 상층액을 버린 뒤 saline 30 ㎖를 분주하여 vortex mixer로 부유시켜 *B. subtilis* 및 *B. cereus*는 70℃에서 30분간 한번 더 가열하였다. 이 농후한 아포부유원액들 중에서 *B. subtilis* 및 *B. cereus*는 NA배지에서 표준평판희석법으로 10^7 spores/㎖, *B. stearothermophilis*는 McFarland No. 2의 농도가 되도록 saline으로 희석하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 균현탁액 제작

계대 보관되어 온 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus*)을 시험전날 Tryptic soy broth (Difco) 20 ㎖에 1 loopful (직경 2 mm) 접종하여 35℃에서 하루밤 배양하였다. 이 배양액으로부터 NA배지에서 표준평판희석법으로 2×10^7 CFU/㎖가 되도록 멸균증류수로 희석하여 4℃에 보관하면서 7일 이내에 실험에 사용하였다.

3. 시험배지의 제작

1) EEC 4-plate법 시험평판법

EEC agar (peptone 6.9 g, NaCl 5.1 g, KH_2PO_4 1.0 g, agar 13.0 g/D.W. 1 ℓ)를 고압증기멸균 (121℃, 15분)한 뒤 55℃로 가온 보존해 두고, 이 배지 100 ㎖당 상기 방법에 따라 제작한 *B. subtilis* 아포부유액 및 *M. luteus* 균현탁액을 1 ㎖씩 첨가하여 pH를 조절하여 충분히 섞은 다음 petridish에 6 ㎖씩 분주하여 *B. s.* (pH 6.0), *B. s.* (pH 7.2), *B. s.* (pH 8.0), *M. l.* (pH 8.0)의 시험평판배지 4종류를 제작하고 disk assay를 실시하였다. 이 때 *B. s.* (pH 7.2)의 평판배지에는 trimethoprim (TMP)을 최종농도 0.1 ㎍/㎖가 되도록 첨가하였다. 제작된 시험평판배지는 4℃에 보관하면서 3일 이내에 모두 사용하였다. disk assay에는 농도별로 단계 희석한 항균물질 80 ㎕를 filter paper에 분주하고 이를 풍건시킨 다음, 제작해 둔 시험배지 위에 얹고 냉장고 안에서 2시간 동안 정치시켜 filter paper의 항균물질이 배지 속으로 충분히 스며들도록 하였다. 그 뒤에 *B. subtilis*는 30℃, *M. luteus*는 35℃에서 하루 밤 배양한 후, vernier caliper로써 filter paper를 포함한 저지원의 직경이 12 mm이상부터 양성으로 판정하였다.

2) EEC 4-plate변법 시험평판법

고압증기멸균(121℃, 15분)하여 55℃로 가온 보존 중인 EEC agar 배지 100 ㎖당 상기 방법에 따라 만든 *B. subtilis* 및 *B. cereus* 아포부유액과 *M. luteus* 균현탁액 1 ㎖씩을 넣고 pH를 조절하여 충분히 섞은 다음 petridish에 6 ㎖씩 분주하여 *B. c.*(pH 6.0), *B. s.*(pH 6.0), *B. s.*(pH 7.2), *B. s.*(pH 8.0), *M. l.*(pH 8.0)의 시험평판배지 5종류를 제작하였다. EEC 4-plate법과 동일한 방법으로 disk assay를 실시하여 *B. subtilis* 및 *B. cereus*는 30℃, *M. luteus*는 35℃에서 하루 밤 배양한 후, vernier caliper로써 filter paper를 포함한 저지원의 직경이 12 mm이상부터 양성으로 판정하였다.

3) 식품공전상 간이검사법 시험평판법

Antibiotic medium (AM) No. 2, 5, 8 (Difco)배지를 고압증기멸균(121℃, 15분)하여 55℃로 가온 보존해 두고, 상기 방법에 따라 만든 *B. subtilis* 아포부유액과 *M. luteus* 균현탁액 1 ㎖씩을 AM 5배지 100 ㎖당, *B. cereus* 아포부유액 1 ㎖를 AM 8배지 100 ㎖당, 그리고 *B. stearothermophilis* 아포부유액 1 ㎖를 AM 2배지 100 ㎖당 첨가하여 충분히 섞은 다음 petridish에 6 ㎖씩 분주하여 *B. s.*(AM 5), *B. c.*(AM 8), *B. s. c.*(AM 2), *M. l.*(AM 5)의 시험평판배지 4종류를 제작하였다. EEC 4-plate법과 동일한 방법으로 disk assay를 실시하여 *B. subtilis* 및 *B. cereus*는 30℃, *M. luteus*는 35℃, *B. stearothermophilis*는 55℃에서 하루 밤 배양한 후, vernier caliper로써 filter paper를 포함한 저지원의 직경이 12 mm이상부터 양성으로 판정하였다.

결 과

EEC 4-plate법 및 그 변법에 따른 항균물질의 최저 검출감도를 시험균별로 Table 2에 나타내었다. *M. luteus*는 penicillin계(PCs) 및 macrolide계(MLs)에 매우 높은 검출감도를 나타내었으나 나머지 계열의 항균물질에 대해서는 감도가 대단히 떨어졌다. pH가 각각 조절된 *B. subtilis*는 대체로 모든 계열의 항균물질에 대해 전반적으로 고른 감도를 보였다. 특히 sulfonamide계(SAs)의 경우 TMP를 첨가한 pH 7.2에서 높은 검출감도를 나타내었다. *B. cereus*는 tetracycline계(TCs)에 대하여 *B. subtilis*나 *M. luteus*보다 우수한 감도를 나타내었으나 나머지 계열의 항균물질에 대해서는 검출감도가 떨어졌다. 모든 시험균은 chloramphenicol계(CMs)에 대하여 상당히 감도가 떨어졌다.

식품공전상 간이검사법에 따른 항균물질의 최저 검출감도를 시험균별로 Table 3에 나타내었다. *B. stearothermophilis*는 PCs에 대하여 검출한계가 2.5~5 ppb로 월등하게 우수한 항균활성을 나타내었으며 TCs와 MLs에 대하여는 다소 감도를 나타내었다. *M. luteus*는 PCs에 대하여 25~50 ppb로 우수한 감도를 보였으며 MLs에 대해서 약간 감도를 나타내었다. *B. subtilis*는 aminoglycoside계(AGs)에 대하여 다른 균보다 좋은 감도를 보였으며 *B. cereus*는 TCs에 대하여 높은 검출감도를 나타내었다. 모든 시험균들은 nitrofuran계(NFs), CMs, SAs, quinolone계(QNs)중 CFX와 EFX를 제외하고 대단히 낮은 검출감도를 나타내었다. Table 2와 3에서 나타낸 바와 같이 항균물질은 그 계열에 따라서 시험균마다 검출감도가 각기 다르기 때문에 그 검출감도에 따라서 계열을 어느 정도 추정할 수 있음을 관찰하였다.

Table 2. Comparison of minimum detectable levels of antibacterial agents in the test organisms by the EEC 4-plate method (*B. s. pH 6.0* ; *B. s.* pH 7.2 ; *B. s.* pH 8.0 ; *M. l.* pH 8.0) and the modified method of EEC 4-plate (*B. c.* pH 6.0 ; *B. s.* pH 6.0 ; *B. s.* pH 7.2 ; *B. s.* pH 8.0 ; *M. l.* pH 8.0)

Antibacterial agent		Minimum detectable levels (μg/㎖)				
		B. cereus (pH 6.0)	*B. subtilis* (pH 6.0)	*B. subtilis* (pH 7.2)	*B. subtilis* (pH 8.0)	*M. luteus* (pH 8.0)
PCs	PCG	50	0.05	0.05	0.1	0.05
	ABPC	25	0.1	0.1	0.1	0.025
AGs	SM	2.5	1	0.5	0.5	2.5
TCs	OTC	0.1	0.5	0.5	0.5	2.5
	DOXY	0.05	0.05	0.1	0.1	2.5
	CTC	0.05	0.1	0.25	0.25	2.5
	TC	0.1	0.5	0.5	0.5	5
MLs	EM	0.5	0.5	0.25	0.25	0.05
	SPM	10	5	0.5	1	0.25
NFs	NFS-Na	2.5	0.5	2.5	5	>100
QNs	CFX	1	0.25	0.25	0.25	>100
	EFX	2.5	0.25	0.25	0.25	10
	NFX	10	2.5	1	1	50
	PFX	2.5	1	1	2.5	>100
	OFX	2.5	0.5	0.5	0.5	10
	OA	1	0.5	2.5	5	>100
	NA	10	2.5	5	10	>100
	FM	2.5	0.5	2.5	5	>100
	PA	5	1	10	25	>100
SAs	SMMX	>100	10	0.1	50	>100
	SID	>100	25	0.5	50	>100
	SMT	>100	100	1.0	100	>100
	SDMX	>100	10	0.25	50	>100
	STZ	>100	10	0.1	25	>100
	TMP	>100	2.5	1	1	25
CMs	CM	10	10	10	5	10
	TP	50	25	25	10	25
	FF	2.5	2.5	2.5	5	25

간이검사법들의 최저 검출한계를 서로 비교한 결과를 Table 4에 나타내었다. 식품공전상 간이검사법은 PCs가 매우 높은 검출감도를 보였으며 AGs에 다소 감도를 나타내었으나 SAs에 대해서는 감도가 상당히 떨어졌다. EEC 4-plate변법은 TCs에 대하여 우수한 검출감도를 나타내었으며 PCs, MLs, NFs, SAs, QNs중 일부에 대하여는 EEC 4-plate법 및 그 변법이 거의 비슷하게 감도를 나타내었다.

고 찰

전세계에서 오래 전부터 사용되고 있는 가장 대표적인 bioassay는 디스크를 이용하는 한천평판확산법이다(Schothorst et al., 1978; Jonston et al., 1981). 본 실험에서 사용한 EEC 4-plate법 및 그 변법, 식품공전상 간이검사법은 이 방법에 속한다. 특정한 항균물질을 지정해서 검출하지 않는 이상, 축산물 위생처리법에

Table 3. Comparision of minimum detectable levels of antibacterial agents in the test organisms by the standard method of analysis in food safety regulation

Antibacterial agent		Minimum detectable levels (μg/mℓ)			
		B. cereus (AM 8)	*B. subtilis* (AM 5)	*B. luteus* (AM 5)	*B. stearothermophilis* (AM 2)
PCs	PCG	50	0.1	0.05	0.005
	ABPC	25	0.25	0.025	0.0025
AGS	SM	2.5	0.25	5	1
TCs	OTC	0.25	0.5	5	0.5
	DOXY	0.1	0.25	5	0.25
	CTC	0.05	0.25	2.5	0.25
	TC	0.25	0.5	5	0.5
MLs	EM	0.5	0.5	0.1	0.25
	SPM	10	2.5	0.5	0.5
NFs	NFS-Na	1	5	>100	2.5
QNs	CFX	5	0.25	10	1
	EFX	5	0.25	25	2.5
	NFX	5	1	50	5
	PFX	10	2.5	>100	10
	OFX	5	1	25	5
	OA	2.5	2.5	>100	25
	NA	10	10	>100	>100
	FM	2.5	5	>100	50
	PA	5	10	>100	100
SAs	SMMX	>100	>100	>100	>100
	SID	>100	>100	>100	>100
	SMT	>100	>100	>100	>100
	SDMX	>100	>100	>100	>100
	STZ	>100	>100	>100	>100
	TMP	>100	10	>100	10
CMs	CM	25	10	10	25
	TP	>100	50	25	5
	FF	10	5	25	2.5

의하면 가축의 모든 식육에 대해서 유해물질인 항균물질의 잔존 여부를 검사할 때 반드시 1차 검사항목으로 이 검사법이 활용되고 있다.

Lee et al. (1992) 및 Baek et al. (1996)은 *B. cereus*가 tetracycline계, *B. subtilis*는 aminoglycoside계, *M. luteus*는 macrolide계와 penicillin계, *B. stearothermophilis*는 penicillin계에 각각 높은 감도를 나타낸다고 보고하여 본 연구의 검출성적과 유사하였다. 이러한 검출성적은 *B. cereus*가 tetracycline계의 확인동정 (Lee et al., 1994), *M. luteus*는 penicillin계 및 macrolide계 그리고 *B. subtilis*는 aminoglycoside계의 확인동정 (박, 1988)에 사용되는 대표 시험균주라는 사실과 잘 일치하였다. *B. subtilis*는 여러 항균물질에 대해 넓은 항균스펙트럼을 가지고 있어 가장 대표적인 균주로 사용되고 있으나 Table 2에서 살펴보면, 최근 들어 어류양식장에서 많이 사용되고 있는 quinolone계에 대하여는 CFX=EFX (0.2 μg/mℓ)>OFX=OA=FM (0.5 μg/mℓ)>NFX=PFX=PA (1 μg/mℓ)>NA (2.5 μg/mℓ)의 순으로 CFX 및 EFX를 제외하면 항균활성이 매우 낮았다.

sulfonamide계의 효율적인 검출을 위해서는 이 계열과 항균력의 상승효과를 보이는 TMP를 첨가해야 한다고 보고하고 있다

Table 4. Comparison of minimum detectable levels of antibacterial agents by the methods of bioassay

Antibacterial agent		Minimum detectable levels (μg/mℓ)		
		EEC 4-plate method	Modified method of EEC 4-plate	Standard method
PCs	PCG	0.05	0.05	0.005
	ABPC	0.025	0.025	0.0025
AGs	SM	0.5	0.5	0.25
TCs	OTC	0.5	0.1	0.25
	DOXY	0.05	0.05	0.1
	CTC	0.1	0.05	0.05
	TC	0.5	0.1	0.25
MLs	EM	0.05	0.05	0.1
	SPM	0.25	0.25	0.5
NFs	NFS-Na	0.5	0.5	1
QNs	CFX	0.25	0.25	0.25
	EFX	0.25	0.25	0.25
	NFX	1	1	1
	PFX	1	1	2.5
	OFX	0.5	0.5	1
	OA	0.5	0.5	2.5
	NA	2.5	2.5	10
	FM	0.5	0.5	2.5
	PA	1	1	5
SAs	SMMX	0.1	0.1	>100
	SID	0.5	0.5	>100
	SMT	1.0	1.0	>100
	SDMX	0.25	0.25	>100
	STZ	0.1	0.1	>100
	TMP	1	1	10
CMs	CM	5	5	10
	TP	10	10	5
	FF	2.5	2.5	2.5

(Kondo et al., 1988; Park et al., 1990; Jinbo et al., 1992; Jung and Kim, 1997). Table 2에서 TMP를 첨가한 *B. s.* (pH 7.2) 배지에서만 sulfonamide계에 대하여 높은 검출감도를 타나낸 사실은 앞선 연구자들과 동일한 결과이다. *Escherichia coli* NIHJ는 chloramphenicol계의 확인동정 (박, 1988)에 이용되고 있다. Lee et al. (1992)에 의하면 chloramphenicol의 최저검출한계가 5 μg/mℓ여서 본 실험의 EEC 4-plate법과 그 변법의 성적과 잘 일치하였다. 그런데 동위원소를 부착한 항생물질을 경쟁적으로 반응시켜 판독하는 Charm II test에서 chloramphenicol의 최저검출한계가 1 ppb (Baek et al., 1996)인 경우와 비교하면 항균활성은 상당히 낮아서 여전히 bioassay의 문제점으로 남아있다.

과거 일본에서는 *B. subtilis*와 *M. luteus*의 2-plate법을 축·수산식품중의 잔류 항균성물질의 스크리닝에 사용하고 있었으나 현재는 tetracycline계의 확인동정에 사용되는 *B. cereus*를 추가로 포함시킨 3-plate법으로 변경하였다. 즉 개정전의 두 균주만으로는 tetracycline계의 검출성적이 부진하였음을 잘 보여주고 있다 (Jinbo et al., 1995; Jung and Kim, 1997). 우리 나라의 경우 현재의 식품공전상 검사법이 개정되기 이전까지는 일본과 거의 비슷한 상황이었다. 그런데 식품공전상 검사법 (Table 3)과 일본의 3-plate법 (Jung and Kim, 1997)은 sulfonamide계에 대하여 감도가

낮아서 이 계열의 스크리닝은 거의 불가능하다는 사실을 관찰하였다. 항생물질의 사용은 곧바로 식품과 관련된 법규의 규제를 받는데 식품위생법에 의한 보건복지부고시('96-10호)에서 어류 및 바다가재의 항생물질 잔류 허용기준의 적용을 받는 약제는 OTC 한가지로 0.1 μg/mℓ 이하이다. 이러한 잔류 허용기준을 bioassay만으로 해석한다면 본 연구에서 EEC 4-plate변법은 OTC에 대한 최저검출한계가 0.1 μg/mℓ이므로 일단 잔류 허용기준을 깨끗하게 스크리닝할 수 있으나 EEC 4-plate법과 식품공전상 검사법은 불가능하였다. 그리고 EEC 4-plate변법은 OTC뿐만 아니라 sulfonamide계의 검출성적도 식품공전상 검사법보다 뛰어나는 등 수산용으로 사용되는 여러 계열의 항균물질을 비교적 성공적으로 스크리닝할 수 있어서 어체내 항균성 물질의 잔류 monitoring을 위한 유효한 bioassay법으로 확인되었다. 한편 동물용 의약품의 잔류 허용기준이 57종류인데 비하여 수산생물의 경우 OTC를 제외한 나머지 항생물질에 대해서는 무잔류의 원칙이 적용되고 있다. 그런데 수산용 약품의 안전사용기준을 살펴보면 농림부고시('95-85호)에 의해 OA, FF, FM의 3종류만 설정되어 있고 OTC의 사용에 대해서는 언급이 없다. 그렇다면 OTC 이외의 항생물질은 법적으로 사용을 금지하는 것인지 명확한 설명이 없는 상태여서 앞으로 보다 많은 수산용 약품의 잔류 허용기준이 설정되어야 할 것이며 나아가서 안전사용기준도 현실성 있게 재차 보완할 필요성이 절실히 요구된다.

요 약

본 연구는 EEC 4-plate법과 그 변법 그리고 식품공전상 간이검사법으로써 어류질병의 예방 및 치료에 사용되는 28종류의 항균물질에 대한 최저 검출한계를 서로 비교하여 어체내 잔류 항균물질의 최적 간이검사법(bioassay)으로서의 유효성을 확인하고자 하였다. 식품공전상 간이검사법은 PCs에 뛰어난 검출감도를 나타내었으며 AGs에 대하여 좋은 감도를 보였으나 TCs, MLs, NFs, QNs에 대해서는 낮은 검출감도를 나타내었다. 한편, SAs에 대하여는 대단히 저조한 감도를 보였다. EEC 4-plate변법은 TCs에 대하여 우수한 검출감도를 나타내었다. EEC 4-plate법 및 그 변법은 PCs, MLs, NFs, QNs, SAs에 대하여 상대적으로 높은 검출감도를 나타내었다. 시험법들은 모두 CMs에 대하여는 검출감도가 낮았다. 결국 EEC 4-plate변법이 여러계열의 항균물질에 대해 검출감도가 뛰어나고 항균활성의 범위가 넓어 어체내 잔류 항균성물질을 가장 유효하게 스크리닝할 수 있는 간이검사법으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 해양수산부에서 시행한 수산특정 연구개발사업의 연구비에 의하여 수행되었음을 밝힙니다. 본 연구과제의 수행중에 많은 도움을 준 팔이합성화학 정재경 후배 님께 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

Baek, S.Y., Kim, H.I., Park, K.S., Kim, S.H. and K.R. Kwon. 1996. A comparative study of the detectable methods of residual antibiotics in milk. J. Fd. Hyg. Safety, 11 (2), 129~134 (in Korean).

Jinbo, K., Monma, C., M. Matsumoto and T. Maruyama. 1992. Simplified detection method for residual tetacyclines and sulfa drugs in honey by microbiological assay. J. Food Hyg. Soc. Japan, 33 (3), 217~222 (in Japanese).

Jinbo, K., Kataoka, J., Monma, C., Iyoh, T., Maruyama, T. and M. Matsumoto. 1994. Survey of residual antibiotic agents in livestock and fishery products in Tokyo. J. Food Hyg. Soc. Japan, 35 (2), 210~214 (in Japanese).

Jinbo, K., Kataoka, J., Kokubo, Y., Konuma, H. and F. Kondo. 1995. Sensitivity of microbiological simplified method to residual antibiotics in meat and marine products. J. Food Hyg. Soc. Japan, 36 (4), 525~531 (in Japanese).

Jonston, R.W., Reamer, R.H., Harris, E.W., Fugate, H.G. and B. Schwab. 1981. A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. J. of Food Protection, 44 (11), 828~831.

Jung, S.H. and J.W. Kim. 1997. Comparative studies on the bioassay method for the detection of residual antibacterial agents. Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst, Korea, 53, 145~158 (in korean).

Kamakura, K., Hasegawa, M., Koiguchi, S., Goto, I., Shiraishi, S., Hirata, K., Yamana, T. and Y. Tonogai. 1994. Detection and determination of tetracyclines in imported frozen shrimp by bioassay and HPLC. J. Food Hyg. Soc. Japan, 35 (3), 310~314 (in Japanese).

Kondo, F., Akahoshi, M. and G. Tokutomi. 1988. An improved microbioassay for the detection and determination of sulfonamide residues in animal tissues. Bull. Fac. Agri. of Miyazaki University, 35 (1), 71~79 (in Japanese).

Lee, C.W., Jang, Y.M., Baek, S.Y., Kwak, H.S., Choi, B.H. and C.J. You. 1992. Detection of residual antibiotics by microbiological assay (I). Comparison of detection sensitivity on test organisms and media. The Rep. of Nat. Inst. of Heal., 29 (2), 402~413 (in Korean).

Lee, C.W., Jang, Y.M., Kim, S.H., Baek, S.Y., Kwak, H.S., Choi, B.H. and K.O. Lee. 1993. Study on the detection of residual antibiotics in meat (1). The Rep. of Nat. Inst. of Heal., 30 (2), 428~436 (in Korean).

Lee, C.W., Kim, S.H., Jang, Y.M., Kwak, H.S., Baek, S.Y., Choi, B.H. and K.Y. Lee. 1995. The study of residual antibiotics methodology in meat (II). Identification of tetracyclines. The Rep. of Nat. Inst. of Heal., 31 (2), 509~516 (in Korean).

Park, J.M., Son, S.W., Cho, T.H., Cho, J.H., Namgung, S., Park, K. S. and M.H. Lee. 1990. Detection of antibiotic residues in pork and poultry. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 14 (1), 61~68 (in korean).

Schothorst, M., F.M. Leusden, and J.F.M. Nouws. 1978. Antibiotic residues, regulations, tolerances, and detection in the european economic community. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61 (5), 1209~1213.

박종명. 1988. 축산식품중의 잔류물질 시험법. 상록출판사, pp.36~83.

식품공전. 1994. 축산식품중의 잔류물질 시험법. 한국식품공업협회, pp. 807~811.

1999년 2월 3일 접수
1999년 4월 19일 수리