KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 39, No. 1, pp. 104~107 (2007)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

연구노트

유통식품에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 및 *Escherichia coli*의 살균소독제 감수성

김형일* · 전대훈 · 강길진[1] · 엄미옥 · 성준현 · 강한샘 · 곽효선 · 권기성 · 이영자

식품의약품안전청 식품평가부, [1]광주지방식품의약품안전청

Comparative Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Korean Foods to Commercially Available Sanitizers/Disinfectants

Hyung-Il Kim*, Dae-Hoon Jeon, Kil-Jin Kang[1], Mi-Ok Eom, Jun-Hyun Sung, Han-Saem Kang, Hyo-Sun Kwak, Ki-Sung Kwon, and Young-Ja Lee

Center for Food Evaluation, Korea Food and Drug Administration

[1]Kwangju Regional KFDA

Abstract To investigate the comparative susceptibility of *E. coli* and *S. aureus* strains isolated from Korean foods to sanitizers/disinfectants, the bactericidal efficacies of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride were assessed by quantitative suspension tests in both 'clean' and 'dirty' conditions, respectively. The sanitizers/disinfectants achieved over 5-log reduction in viable counts of all strains at the tolerance exemption concentration, except in the case of *S. aureus* exposure to sodium hypochlorite under dirty condition. There were no significant differences in the susceptibility of antibiotic-resistrant and antibiotic-sensitive isolated strains to the sanitizers/disinfectants ($p > 0.05$).

Key words: susceptibility, *E. coli*, *S. aureus*, sanitizers/disinfectants

서 론

기구 등의 살균소독제는 식중독 예방 등 식품의 위생적 처리를 위해 집단급식소나 식품제조업체에서 식품의 제조·가공시 사용되는 설비·기구 등에 대한 살균소독 목적으로 그 사용량이 점차 늘어날 것으로 예상된다. 현재 식약청으로부터 인정된 기구 등 살균소독제 제품은 모두 140여종(1)으로 이 제품들은 모두 『기구등의 살균소독제 한시적 기준 및 규격 인정기준』(1)에 따라 시험하여 살균소독력이 있다고 인정된 제품이다. 이 때 살균소독력 평가시 사용되는 공시균주는 제외국의 시험방법(2-3)과 식약청의 연구사업(4-5)을 검토하여 G(−)와 G(+)를 대표하면서 균의 제어가 비교적 쉽고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있는 *Escherichia coli* ATCC 10536(또는 ATCC 11229)과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538이 선택되었다. 이 두균주의 사용은 살균소독제의 국가관리와 무역장벽 해소에 매우 유용한 것이다. 그러나, 현행 기준에 만족하는 살균소독제가 실제로 국내에서 식중독을 일으키고 있는 식중독 원인균에 대하여 어느 정도의 살균효과가 있는지 국내식품에서 분리한 균주를 대상으로 한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 살균소독제에 대한 내성은 획득내성(aquired resistance)보다는 균의 biofilm 형성이나 세포막의 형태 등 자연내성(intrinsic resistance)(6)이 주된 원인이지만 식품가공공장에서 분리된 *Staphylococcus* spp.중 약 13% 가량이 benzalkonium chloride에 내성이 있는 것으로 보고(7)된 바 있다. 환경이나 임상에서 분리한 병원균이 표준균주보다 일반적으로 살균소독제에 대해 감수성이 낮은 것으로 알려져 있고(8) MRSA(methicillin resistance *Staphylococcus aureus*)균이나 다재내성균(multiple-antibiotic-resistance)에 대한 살균소독제의 내성(resistance) 문제도 보고(9,10)된 바 있다. 따라서, 국내에서 인정된 기구 등의 살균소독제가 우리나라에서 식중독을 일으키는 원인균에 대해 어느 정도의 살균소독 효과를 나타내는지 식품에서 분리된 분리주를 대상으로한 살균소독력 평가가 이루어져야 할 필요가 있다. 본 연구에서는 우선 살균소독제 유효성분중 실제 제품수와 사용량이 가장 많은 것으로 알려진(11) 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)과 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride)을 대상으로 국내 유통식품에서 분리한 *E. coli*와 *S. aureus*의 살균소독제에 대한 감수성(susceptibility)을 공시균주와 비교하고 항생제에 내성을 나타내는 균이 살균소독제에도 내성을 나타내는지 관련 여부를 확인하고자 하였다.

*Corresponding author: Hyung-Il Kim, Center for Food Evaluation, Korea Food and Drug Administration, 194 Tongil-ro, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1696-8
Fax: 82-2-380-1361
E-mail: khi0306@kfda.go.kr
Received October 17, 2006; accepted November 30, 2006

재료 및 방법

사용균주 및 시약

E. coli ATCC 10536 및 *S. aureus* ATCC 6538은 질병관리본부 병원체방어연구실로부터 분양받아 사용하였으며 식품에서 분리한 *E. coli* 및 *S. aureus*는 식약청 식품미생물팀에서 NCCLS(12)에 따라 표준평판 디스크확산법으로 항생제 내성시험을 실시하

Table 1. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolates used in this study

Culture no.	Species	Isolated area	Isolated date	Source	Resistance to antibiotics
E1	*E. coli*	Masan	'04.4.6	Chicken	AM[1], S, CIP, SXT, C, TE
E2		Daejeon	'04.9.1	Beef	NONE
E3		Seoul	'04.9.6	Beef	NONE
E4		Daegu	'04.9.21	Oyster	NONE
E5		Gwangju	'04.10.11	Chicken	TE
E6		Gwangju	'04.10.11	Spotty belly greenling	TE
E7		Seoul	'04.3.22	Chicken	AM, S, CIP, SXT, TE
E8		Gumi	'04.4.19	Black rock fish	AM, CZ, CF, S, AmC, CIP, TE
E9		Suwon	'04.5.4	Pork	AM, S, CIP, TE
E10		Chongju	'04.5.10	Chicken	AM, S, TE
E11		Seoul	'04.6.7	Chicken	AM, S, TE
E12		Incheon	'04.6.21	Chicken	AM, S, CIP, SXT, TE
S1	*S. aureus*	Daejeon	'03.2.24	Dried meat	NONE
S2		Gwangju	'03.4.21	Dried meat	P
S3		Incheon	'03.5.21	Black rock fish	P
S4		Seoul	'03.6.23	Flatfish	P
S5		Daejeon	'03.7.7	Frozen food	P
S6		Seoul	'03.8.18	Pork	NONE
S7		Daejeon	'03.4.7	Beef	P, E
S8		Gwangju	'03.10.20	Pork	P, TE
S9		Suwon	'04.5.4	pork	P, CC
S10		Chongju	'04.5.10	Hamburger	CC
S11		Jeju	'05.7.18	Black rock fish	TE
S12		Gwangju	'04.10.11	Black rock fish	P, TE

[1]AM: Ampicillin, CZ: Cefazolin, CF: Cephalothin, S: Streptomycin, AmC: Amoxicillin/clavulanic acid, CIP: Ciprofloxacine, P: Penicillin, CC: Clindamycin, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole, E: Erythromycin, C: Chloramphenicol, and TE: Tetracycline.

고 계대 보관중인 것을 사용하였다(Table 1).

살균소독제에 대한 감수성을 조사하기 위한 유효성분으로 차아염소산나트륨은 Fisher Scientific사(Fair Lawn, NJ, USA), 염화벤잘코늄은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 각각 구입하여 사용하였다.

식품분리균에 대한 차아염소산나트륨과 염화벤잘코늄의 살균소독력 평가

살균소독제에 대한 식품분리균주의 bacterial resistance를 조사하기 위하여 초기균수가 5 log reduction이 나타나는 차아염소산나트륨과 염화벤잘코늄의 최소 농도를 구하고 이를 공시균주와 비교하였다. 이때 살균소독력 시험방법은 Kim 등(5)의 살균소독력시험법에 따랐으며, 유의성 검증은 Student's *t*-test로 양측 검증을 시행하여 p 값이 0.05 이하일 때를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

결과 및 고찰

E. coli 및 *S. aureus*의 초기균수(CFU/mL)에 대하여 5 log reduction이 나타나는 차아염소산나트륨과 염화벤잘코늄의 최소 농도를 조사한 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 각각 나타내었다. 염소계 살균소독제의 유효성분으로 많이 사용되는 차아염소산나트륨의 경우 99.999% 이상의 살균력을 나타내는 농도가 *E. coli* ATCC 10536은 청정조건 및 오염조건에서 유효염소로서 각각 50, 120 mg/L인 반면, 식품분리균주는 50-65, 220-250 mg/L로 식품분리주가 오염조건에서 차아염소산나트륨에 대한 감수성이 상대적으로 낮은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 그러나, *S. aureus* ATCC 6538은 청정 및 오염조건에서 유효염소로서 각각 100 mg/L과 385 mg/L의 농도에서 99.999%의 살균소독력을 나타냈으며 식품분리균주는 청정 및 오염 조건에서 각각 80-100, 320 mg/L의 농도에서 99.999%의 살균소독력을 나타내어 공시균주와 식품분리주사이에 감수성 차이는 크지 않은 것으로 나타났다($p > 0.05$). 일반적으로 환경이나 임상에서 분리한 병원균이 표준균주보다 살균소독제에 대해 감수성이 낮으며 G(−)균이 G(+) 보다 살균소독제에 내성이 있는 것으로 알려져 있지만(8), *E. coli*는 peptidoglycan층에서 교차결합하는 두 tetrapeptide의 가교가 비교적 간단한 구조인데 반하여 *S. aureus*는 복잡한 3차구조로 되어 있고, 차아염소산나트륨이 중성 pH 이상에서는 차아염소산과 ClO^- 이온과 함께 존재하므로 대체로 (−)charge를 띄는 세포 표면과의 반발로 인하여 염소의 세포내 침투를 어렵게 하기 때문(13)에 *S. aureus*의 경우 공시균주 및 식품분리균주 모두 제어가 어려운 것으로 보인다. 또한, 염소가 반응성이 매우 큰 물질로 유기물, 금속 등에 의해 효과가 급속히 감소(14,15)하기 때문에 오염조건에서는 살균소독을 위해 과량의 차아염소산나트륨이 필요하므로 다른 계열의 살균소독제보다 기구등의 표면에 존재할 수 있는 유기물질에 대해 더 주의깊은 세척과정이 필요할 것으로 보인다.

이상과 같이 *E. coli*의 경우 공시균주에서 살균소독력이 나타나더라도 실제 식품분리균주에서는 살균소독력이 나타나지 않을 수 있으나 차아염소산나트륨으로 99.999% 이상의 살균소독력을 나타내려면 *S. aureus* 공시균주가 *E. coli* 식품분리균주보다 더 높은 농도가 요구되므로 식품분리균주의 차아염소산나트륨에 대한 내성으로 인한 위험은 없을 것으로 판단된다.

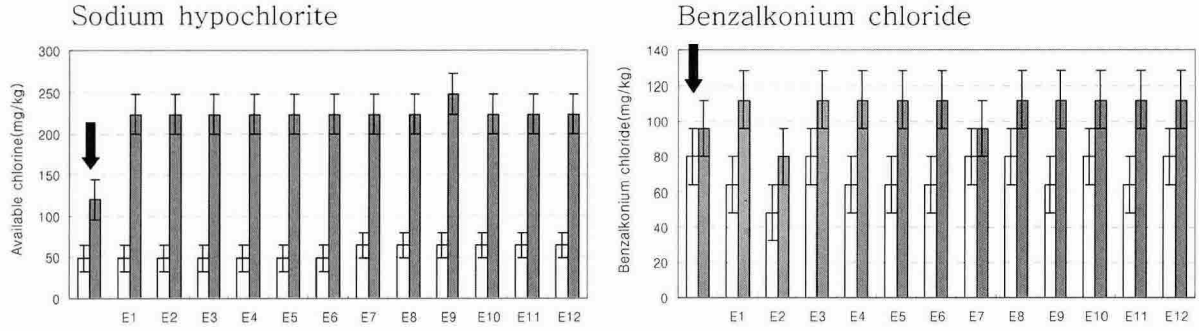

Fig. 1. Minimum bactericidal concentration of sanitizers/disinfectants to achieve 5 log reduction of *E. coli* isloates (□, clean conditions; ■, dirty conditions). The arrows indicate *E. coli* ATCC 10536 used as a reference starin.

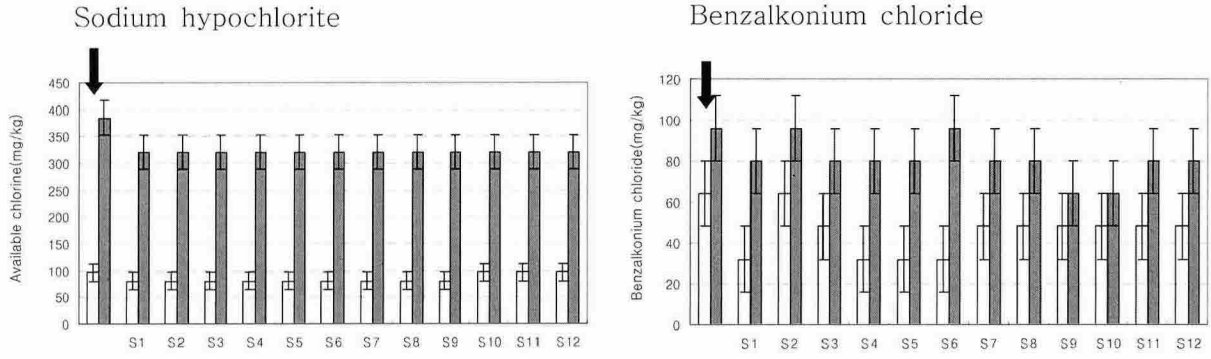

Fig. 2. Minimum bactericidal concentration of sanitizers/disinfectants to achieve 5 log reduction of *S. aureus* isloates (□, clean conditions; ■, dirty conditions). The arrows indicate *S. aureus* ATCC 6538 used as a reference starin.

염화벤잘코늄은 청정조건 및 오염조건, 균주에 따른 살균소독력에 큰 차이를 보이지 않았으며($p > 0.05$) 모두 120 mg/L 이하에서 99.999% 이상의 살균소독력을 나타냈다. 최근 4급암모늄염에 대한 내성연구(16-18)가 많이 보고되고 있으나 항생물질의 경우와는 달리 아직까지 살균소독제의 내성에 대한 공인된 실험법이나 구분은 없는 실정이며 연구자에 따라 각기 다른 기준을 적용하고 있다. Soumet 등(18)은 살균소독제에 대하여 감수성균의 2-4배정도 높은 농도에서 생육가능한 균을 내성균이라 보았는데, 이 기준을 적용할 경우 본 연구에서 사용된 식품분리균들 중 내성이 있다고 판단할 수 있는 균은 발견되지 않았다. 또한 항생제에 대한 다재내성(multidrug resistance)균주와 일반내성 혹은 내성이 없는 감수성 균주사이에도 살균소독제에 대한 감수성이 크게 다르지 않았으며($p > 0.05$) 이는 다른 연구자의 보고(7,8,20,21)와도 유사한 것이었다. 최근 염화벤잘코늄과 chloramphenicol의 cross-resistance가 언급(17)된 바 있고, 몇몇 staphylococci가 efflux system을 사용하여 4급암모늄계 살균소독제를 세포내에서 제거할 수 있는 유전인자(*qacA, qacB, qacC, qacG, qacH*)를 가지고 있다는 사실이 보고(7,22,23)된 바 있다. 따라서, *qac* 유전자를 가진 균이 4급암모늄계 살균소독제 처리시 생존가능성을 높일 수 있을 것이라는 우려가 있지만 이것은 매우 낮은 농도에서 관찰된 것이기 때문에 실제로 살균소독제 처리 표면의 세척과정이 충분히 이루어진다면 살균소독제 제조업자의 권장사용농도 사용시 식품제조환경에서 분리된 균주의 살균소독제 내성은 문제가 되지 않을 것으로 판단된다.

요 약

유통식품에서 분리한 *E. coli* 및 *S. aureus*의 차아염소산나트륨과 염화벤잘코늄에 대한 감수성을 현탁액시험법으로 청정조건과 오염조건에서 각각 조사한 결과 차아염소산나트륨의 오염조건에서 *S. aureus*가 5 log 감소의 살균소독력이 나타나지 않았을 뿐, 모든 균주가 사용범위 내에서 살균소독력을 나타내었으며, 항생제 내성균과 감수성균에 대한 살균소독제 감수성의 차이는 발견되지 않았다($p > 0.05$).

문 헌

1. Food and Drug Administration. List of approved sanitizer/disinfectant products by KFDA. Available from: http://kfda.go.kr. Accessed Oct. 1, 2006
2. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Method 960.09. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1995)
3. British Standards Institution. Chemical Disinfectants and Antiseptics-Quantitative suspension test for the Evaluation of Bactericidal Activity of Chemical Disinfectant and Antiseptics Used in Food, Industrial, Domestic, and Institutional Areas-Test Method and Requirement (Phase 2, Step 1), European Committee for Standardization, EN 1276, UK (1997)
4. Cho YH, Kim YS. Evaluation of safety and efficacy of sanitizers and disinfectants (II). The Annual Report of KFDA. 7: 840 (2003)
5. Kim HI, Lee KH, Kwak IS, Eom MO, Jeon DH, Sung JH, Choi

JM, Kang HS, Kim YS, Kang KJ. The establishing test method of bactericidal activity and the evaluating of Korean disinfectants/ sanitizers efficacy. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 838-843 (2005)
6. Russell AD. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. Int. Biodeter. Biodegr. 36: 247-265 (1995)
7. Langsrud S, Sidhu MS, Heir E, Holck AL. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. Int. Biodeter. Biodegr. 51: 283-290 (2003)
8. Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. J. Hosp. Infect. 43 (Suppl.): S57-S68 (1998)
9. Kampf G, Jarosch R, Rden H. Limited effectiveness of chlorhexidine based hand disinfextants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J. Hosp. Infect. 38: 297-303 (1998)
10. Spencer RS. The emergence of epidemic, multiple-antibiotic-resistant *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* and *Burkholderia* (*Pseidomonas*) *cepacia*. J. Hosp. Infect. 30 (Suppl.): 453-464 (1995)
11. Lee MJ, Kim YS, Cho YH, Park HK, Park BK, Lee KH, Kang KJ, Jeon DH, Park KH, Ha SD. Evaluation of efficacy of sanitizers and disinfectants marked in Korea. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 671-677 (2005)
12. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. M7-A6 vol. 23 No. 2, M7-A5 vol. 20 No. 2 Clinical and Laboratory Standards Institute, Baltimore, MA, USA (2003)
13. Junli H, Li W, Nanqi R, Fang M, Juli. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. Water Res. 31: 607-613 (1997)
14. Vijayakumar C, Wolf-Hall C. Minimum bacteriostatic and bactericidal concentrations of household sanitizers for *Escherichia coli* strains in tryptic soy broth. Food Microbiol. 19: 383-388 (2002)
15. Bloomfield S. Chlorine and iodine formulations. Joseph A. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. pp. 133-158 (1996)
16. Chapman JS. Biocide resistance mechanisms. Int. Biodeter. Biodegr. 51: 133-138 (2003)
17. Langsrud S, Sundheim G, Holck AL. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. J. Appl. Microbiol. 96: 201-208 (2004)
18. Soumet C, Ragimbeau C, Maris P. Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. Lett. Appl. Microbiol. 41: 291-296 (2005)
19. Mcdonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. Jan: 147-179 (1999)
20. Russell D. Do biocides select for antibiotic resistance? J. Pharm. Pharmacol. 52: 227-233 (2000)
21. White DG, Mcdermott PF. Biocides, drug resistance and microbial evolution. Curr. Opin. Microbiol. 4: 313-317 (2001)
22. Sundheim G, Langsrud S, Heir E, Holck AL. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. Int. Biodeter. Biodegr. 41: 235-239 (1998)
23. Heir E, Sundheim G, Holck AL. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. FEMS Microbiol. Lett. 163: 49-56 (1998)