

대장균군과 대장균의 검출을 위한 건조필름 방법의 평가

†박 헌 국

동남보건대학 식품영양과

Evaluation of Dry Rehydratable Film Method for Detection of Coliform Bacteria and *Escherichia coli*

†Heon-Kuk Park

Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea

Abstract

The adaptability of dry rehydratable film for the qualitative evaluation of coliform bacteria and *Escherichia coli* was tested. In general, culture methods that employ lactose broth or desoxycholate lactose agar are used for qualitative tests of coliform bacteria. Culture using lactose broth showed a high detection yield and low selectivity when compared to the dry rehydratable film. However, culture methods that employ lactose broth required a long time(48 hrs) for qualitative tests of coliform bacteria and complicated procedures were required to prepare the medium. The detection of coliforms using desoxycholate lactose agar had a slightly higher selectivity than the dry rehydratable film method, but this difference was not statistically significant. However, the preparation of the desoxycholate lactose agar was complicated. EC broth for the detection of *E. coli* showed the highest detection yield and lowest selectivity; however, this method required complicated procedures for preparation of the medium as well. Overall, the dry rehydratable film had a slightly lower detection yield than the other methods. The detection yield of dry rehydratable film method was over 37.1% at a concentration of 1 cfu/ml. Additionally, the dry rehydratable film method showed high selectivity and did not require preparation. However, because the selectivity of the dry rehydratable film was high, it took a long time(36 hrs) to detect *E. coli*. Overall, these findings indicate that dry rehydratable film can be used for qualitative detection of coliforms and *E. coli*.

Key words: dry rehydratable film, coliform bacteria, *E. coli*, detection.

서 론

식품의 제조, 가공 또는 저장과정이 얼마나 위생적인 과정을 거쳤는가, 또는 수산물이나 농산물이 얼마나 청정한 환경에서 생산되었는가의 지표가 되는 미생물을 지표미생물(indicator organisms)이라고 한다. 식품위생의 척도는 분변의 오염과 밀접한 관련을 가지고 있으므로 지표미생물들은 분변과 관련이 있어야 하며, 자연적인 오염균으로 존재해서는 안되며, 식품을 취급하는 과정에서 병원균과 유사한 정도의 내성이 있어야 하며, 쉽게 검출이 가능해야 한다. 이에 해당하는

미생물로는 대장균군, 대장균, 장구균 등이 있는데, 이들은 질병을 직접 유발하지는 않지만 장내에 상존하는 미생물이므로 식품에서 이들 지표미생물이 검출된다는 것은 소화기계 전염병균이나 식중독균의 공존 가능성이 있다는 것을 나타낸다.

대장균군이라 함은 Gram 음성의 포자를 형성하지 않는 간균으로 35°C에서 48시간 이내에 유당을 발효시켜 가스를 형성하는 호기성 또는 통성혐기성 세균을 말한다. 대장균군에는 *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* 등이 속한다. 특히 대장균

† Corresponding author: Heon-Kuk Park, Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health University, 937 Jeongja-dong, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 440-714, Korea. Tel: +82-31-249-6422, Fax: +82-31-249-6420, E-mail: foodopia@dongnam.ac.kr

(*Escherichia coli*)은 분변성 대장균군 중에서 가장 대표적인 미생물로 44.5°C에서 유당을 발효시켜 가스를 형성한다.

대장균군 및 대장균의 검출 실험은 일반적으로 식품공전의 방법에 따라서 수행한다(식품의약품안전청 2007). 대장균군의 정성실험에서는 Durham관을 넣은 lactose broth에 시험액을 접종하고 35°C에서 48시간 동안 배양한 후 가스 생성 여부를 확인하고 의심이 가는 시험관에서 균주를 취하여 확인 실험을 행하거나, 멸균된 페트리접시에 시험액 1 ml를 가하고 50°C 정도로 식힌 desoxycholate lactose agar 배지를 가하여 굳힌 다음 35°C 항온기에서 24시간 동안 배양하고 의심이 가는 집락을 선별하여 확인 실험을 행한다. 그러나 lactose broth에서는 대장균군뿐만 아니라 살모넬라를 비롯한 유당을 발효하여 가스를 생산하는 모든 균이 검출되므로 선택성이 매우 낮고, 배지의 제조가 번거롭고, 배지를 제조하는데 시간이 오래 걸리며, 검출에도 48시간이라는 시간이 소요된다. 또한 desoxycholate lactose agar 배지를 사용하는 방법도 유당의 발효성에 따라서 분홍색 콜로니의 형성 여부를 검사하는 것으로 대장균군뿐만 아니라 살모넬라와 시겔라를 비롯한 소화기계 병원균을 비롯한 다수의 미생물이 검출되므로 선택성이 매우 낮고, 배지의 제조 및 조작이 번거롭다는 단점이 있다. 대장균의 정성실험에서는 EC broth에 시험액을 접종하고 44.5°C에서 24시간 동안 배양한 후 가스의 생성 여부를 확인하고 의심이 가는 시험관에서 균주를 취하여 확인을 행한다. 그러나 EC broth에서는 대장균뿐만 아니라 *Enterobacter*와 *Klebsiella*의 일부도 증식하여 가스를 발생시킬 수 있으므로 선택성이 낮다는 것과 배지의 제조가 번거롭다는 단점이 있다. 따라서 기존의 대장균군 및 대장균의 정성실험은 현장에서 시료를 채취한 다음 실험실로 옮겨서 실험을 수행해야만 한다.

건조필름은 미생물이 증식할 수 있도록 영양성분을 필름에 코팅하여 건조한 것으로 시료를 접종하면 수분을 흡수하여 한천배지와 같이 겔을 형성함으로써 미생물이 증식할 수 있도록 처리한 건조필름이다. 필름 상에 도포되어 건조된 배지에 시료액 1 ml를 가하여 배지가 시료액을 흡수하게 한 다음 35°C 항온기에서 24~36시간 정도 배양하는 간단한 조작에 의하여 대장균군 및 대장균의 검출이 가능하기 때문에 배지를 제조할 필요가 없고, 부피를 적게 차지하므로 다량의 시료를 처리할 수 있으며, 지시약이 혼합되어 있으므로 검출이 용이하다는 등의 장점을 가지고 있어서 외국에서는 미생물 실험용 배지로 널리 사용되고 있다(Nelson 등 1984; Ginn 등 1986; Restino & Lyon 1987; Curiale 등 1989; Matner 등 1990; Curiale 등 1991). 특히 1990년도에는 Association of Official Analytical Chemists(AOAC)에 의해 우유로부터의 미생물 분석법으로 공인된 바 있다(AOAC 1990).

그러나 우리나라에서는 대장균군 및 대장균의 검출법으로써의 타당성에 대한 국내의 연구 결과가 극히 부족하여(Kwak 등 1995; Ha SD 1996; Kim 등 2004; Cho 등 2005) 아직까지는 적극적인 사용을 꺼리고 있다. 특히 기존의 연구는 모두 식품에 존재하는 대장균과 대장균군의 검출 빈도를 다른 배지를 사용한 실험법과 단순 비교한 것으로 균체의 농도에 따른 검출 가능성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대장균군 및 대장균의 정성 실험에 있어서 기존의 실험방법을 대체하여 건조필름을 이용할 수 있는지의 여부를 평가하기 위하여 각 균체 농도별로 검출율을 조사하여 비교하였다.

재료 및 방법

1. 균주

실험대상 미생물로는 대장균군인 *E. aerogenes* KCCM12177, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KCCM40890과 대장균 *E. coli* KCCM11234를 선정하여 실험하였으며, 냉동건조된 형태로 사단법인 한국중균협회 한국미생물보존센터에서 분양 받아 사용하였다. 분양 받은 균주는 nutrient broth(Difco, USA)에서 1일간 배양하여 활성화시킨 후, 냉장상태에서 평판 배지에 보관하면서 사용하였다.

2. 배지

실험에 사용된 desoxycholate lactose agar, lactose broth, EC broth는 Difco사(USA)의 제품을, 건조필름은 3M사(USA)의 Petrifilm™을 사용하였다.

3. 방법

실험대상 균주 3종을 10 ml nutrient broth에 접종하여 12시간 배양한 후, 100 ml nutrient broth에 재접종하고 OD가 약 0.5~0.6인 대수기에 도달할 때까지 항온진탕배양기에서 진탕배양하여 균액을 준비하였고 배양액은 냉장보관하면서 사용하였다. 보관되었던 균주 배양액을 균체 농도가 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 및 0.125 cfu/ml가 되도록 희석하였으며, 대장균군 검출의 경우 대장균군 검사용 건조필름, desoxycholate lactose agar, lactose broth에, 대장균 검출의 경우 대장균 검사용 건조필름, EC broth에 각 희석액 1 ml씩을 접종하고 24~48시간 배양하면서 균의 증식 여부를 확인하였다.

4. 통계처리

각 배지별 검출율의 유의적 차이는 SPSS(Version 12.0)를 이용하여 χ^2 -검정으로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 대장균의 검출

식품공전상의 대장균 검출법인 desoxycholate lactose agar 평판배양법 및 Durham관을 넣은 lactose broth 배양법과 건조 필름 배양법을 비교하였다.

E. coli KCCM11234의 경우, 거의 모든 농도에서 3가지 방법을 이용한 검출율이 유의적인 차이를 보였다. Lactose broth 배양법의 검출율이 모든 농도에서 가장 높았으며, desoxycholate lactose agar 평판배양법, 건조필름법의 순으로 검출율이 높았다(Table 1). 이는 건조필름법, desoxycholate lactose agar 평판배양법, lactose broth 배양법의 순으로 선택성이 높기 때문으로 생각되며, 선택성이 높은 건조필름의 경우는 손상된 세포의 재생이 더욱 어렵기 때문인 것으로 추정된다. 특히 *E. coli*의 경우는 다른 균에 비하여 냉장, 냉동 및 건조에 대한 내성이 낮아서 세포의 손상이 더 크기 때문에 검출율이 상대적으로 낮은 것으로 판단된다. 그러나 시료액의 균체 농도가 1 cfu/ml까지는 건조필름법이 34.3%, desoxycholate lactose agar 평판배양법이 77.1%, lactose broth 배양법이 82.9%로 3가지 방법 모두 33% 이상의 검출율을 보이기 때문에 시료당 3개의 배지에 접종하여 실험을 행할 경우 시료 중에 존재하는 *E. coli*의 검출이 가능하였다.

E. aerogenes KCCM12177의 경우는 거의 모든 농도에서 3가지 방법을 이용한 검출율의 유의적인 차이가 발견되지 않

았다(Table 2). 더욱이 균체 농도가 1 cfu/ml까지는 건조필름법이 67.4%, desoxycholate lactose agar 평판배양법이 69.8%, lactose broth 배양법이 80.0%로 3가지 방법 모두 50% 이상의 높은 검출율을 보이고 있기 때문에 각각 시료당 2개의 배지에 접종하여 실험을 행할 경우 시료 중에 존재하는 *E. aerogenes*의 검출이 가능하였다.

K. pneumoniae subsp. *pneumoniae* KCCM40890의 경우는 모든 농도에서 3가지 방법을 이용한 검출율의 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Table 3). 더욱이 균체 농도가 1 cfu/ml까지는 건조필름법이 58.3%, desoxycholate lactose agar 평판배양법이 66.7%, lactose broth 배양법이 65.0%로 3가지 방법 모두 50% 이상의 검출율을 보이고 있기 때문에 각각 시료당 2개의 배지에 접종하여 실험을 행할 경우 시료 중에 존재하는 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*의 검출이 가능하였다.

E. coli KCCM11234, *E. aerogenes* KCCM12177, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KCCM40890 모두에 대하여 lactose broth 배양법의 검출율이 가장 높았으며, desoxycholate lactose agar 평판배양법, 건조필름법의 순으로 검출율이 높았다. Lactose broth 배양법의 경우는 검출율이 가장 높는데 반하여 비교적 선택성이 낮고, 검출에 48시간이 소요되며, 실험 시마다 배지를 제조하여야 하는 등 번거로운 조작을 필요로 한다. Desoxycholate lactose agar 평판배양법의 경우는 검출율이 건조필름법보다 다소 높지만 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 실험 시마다 배지를 제조하여 적당한 온도로 식혀서 분주하여야 하는 등

Table 1. Comparison of detection yields of *Escherichia coli* KCCM11234 by the detection method for coliform bacteria

Concentration of inoculum(cfu/ml)	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Dry rehydratable film	100.0	91.4	65.7	34.3	31.4	8.6	0.0
Desoxycholate lactose agar	100.0	100.0	94.3	77.1	48.6	42.9	5.7
Lactose broth	100.0	100.0	100.0	82.9	60.0	42.9	11.4
Significance χ^2	-	6.176	20.440	21.618	5.816	12.727	4.242
P	-	0.046	0.000	0.000	0.055	0.002	0.120
Theoretical detection yield	100.0	100.0	100.0	100.0	50.0	25.0	12.5

Table 2. Comparison of detection yields of *Enterobacter aerogenes* KCCM12177 by the detection method for coliform bacteria

Concentration of inoculum(cfu/ml)	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Dry rehydratable film	88.4	72.1	67.4	44.2	16.3	4.7
Desoxycholate lactose agar	90.7	79.1	69.8	23.3	20.9	9.3
Lactose broth	100.0	100.0	80.0	44.0	56.0	20.0
Significance χ^2	3.003	8.211	1.283	4.974	13.970	4.201
P	0.223	0.016	0.527	0.083	0.001	0.122
Theoretical detection yield	100.0	100.0	100.0	50.0	25.0	12.5

Table 3. Comparison of detection yields of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KCCM40890 by the detection method for coliform bacteria

Concentration of inoculum(cfu/ml)		8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Dry rehydratable film		100.0	94.4	83.3	58.3	41.7	16.7	5.6
Desoxycholate lactose agar		100.0	91.7	86.1	66.7	33.3	25.0	11.1
Lactose broth		100.0	100.0	80.0	65.0	15.0	30.0	0.0
Significance	χ^2	-	1.739	0.358	0.578	4.175	1.456	2.694
	P	-	0.419	0.836	0.749	0.124	0.483	0.260
Theoretical detection yield		100.0	100.0	100.0	100.0	50.0	25.0	12.5

번거로운 조작을 필요로 하였다. 반면에 건조필름법은 검출율이 다소 낮지만 시료액의 균체농도가 1 cfu/ml 이상에서는 33~50% 이상의 검출율을 보이므로 최대 3개의 배지에 접종하여 실험을 행할 경우 시료 중에 대장균의 존재 여부를 확인할 수 있는 수준이었으며, 선택성이 높고, 별다른 준비나 조작을 필요로 하지 않으므로 누구나 쉽게 대장균을 검출하는데 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 이와 같은 사실을 종합해 볼 때 건조필름법은 대장균의 정성실험을 행하는데 있어서 현장에서 손쉽게 실시할 수 있는 방법으로 대장균의 검출에 널리 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

2. 대장균의 검출

식품공전상의 대장균 검출법인 Durham관을 넣은 EC broth 배양법과 건조필름법을 비교하였다.

E. coli KCCM11234는 거의 모든 농도에서 EC broth 배양법의 검출율이 건조필름법의 검출율보다 높았다. 그러나 시료액의 균체 농도가 1 cfu/ml까지는 2가지 방법 모두 33% 이상의 검출율을 보였기 때문에 시료당 3개의 배지에 접종하여 실험할 경우 시료 중에 존재하는 *E. coli*의 검출이 가능하였다.

*E. coli*의 검출에 있어서 EC broth 배양법은 검출율은 높으나 선택성이 떨어지며 실험조작이 번거로운 반면, 건조필름법은 검출율이 다소 낮으나 시료액의 균체 농도가 1 cfu/ml 이상에서는 33% 이상의 검출율을 보이므로 3개의 배지에 접종하여 실험할 경우 시료 중에 대장균의 존재 여부를 확인할

수 있는 수준이며, 또한 선택성이 높고, 별다른 준비나 조작을 필요로 하지 않으므로 누구나 쉽게 대장균을 검출하는데 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 단지 건조필름법은 균주에 대한 선택성이 높아서 손상된 균체의 검출이 어려웠으며, 손상된 균체가 증식하는데 보다 많은 시간이 소요되므로 정확한 실험을 위해서는 대략 36시간 정도의 배양이 필요하였다. 이와 같은 사실을 종합해 볼 때 건조필름은 대장균의 정성실험을 행하는데 있어서 현장에서 손쉽게 실시할 수 있는 방법으로 기존의 방법을 대체하여 대장균의 검출에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

대장균 및 대장균의 정성실험에 건조필름을 이용할 수 있는지를 평가하였다. 대장균의 정성실험에 있어서 lactose broth 배양법의 경우는 검출율이 가장 높는데 반하여 비교적 선택성이 낮고, 검출에 48시간이 소요되며, 실험 시마다 배지를 제조하여야 하는 등 번거로운 조작을 필요로 하였다. Desoxycholate lactose agar 평판배양법의 경우는 검출율이 건조필름보다 다소 높지만 유의적인 차이를 보이지 않는 정도이며, 실험시마다 배지를 제조하여 적당한 온도로 식혀서 분주하여야 하는 등 번거로운 조작을 필요로 하였다. 반면에 건조필름을 사용할 경우는 검출율이 다소 낮지만 시료액의 균체농도가 1 cfu/ml 이상에서는 *E. coli* KCCM11234의 경우 34.3%, *E. aerogenes* KCCM12177의 경우 67.4%, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

Table 4. Comparison of detection yields of *Escherichia coli* KCCM11234 by the detection method for *Escherichia coli*

Concentration of inoculum(cfu/ml)		8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Dry rehydratable film		100.0	88.6	65.7	37.1	5.7	5.7	0.0
EC broth		100.0	97.1	91.4	42.9	31.4	8.6	0.0
Significance	χ^2	-	1.938	6.873	0.238	7.652	0.215	-
	P	-	0.356	0.018	0.808	0.012	1.000	-
Theoretical detection yield		100.0	100.0	100.0	100.0	50.0	25.0	12.5

KCCM40890의 경우 58.3%의 검출율을 보이므로, 최대 3개의 배지에 접종하여 실험할 경우 시료 중에 대장균군의 존재 여부를 확인할 수 있는 수준이며, 선택성이 높고, 별다른 준비나 조작을 필요로 하지 않으므로 쉽게 대장균군을 검출하는데 사용할 수 있었다. 대장균의 정성실험에 있어서 EC broth 배양법은 검출율은 높으나 선택성이 떨어지며 실험조작이 번거로운 반면 건조필름법은 검출율이 다소 낮다. 시료액의 균체농도가 1 cfu/ml 이상에서는 37.1%의 검출율을 보이므로 3개의 배지에 접종하여 실험할 경우 시료 중에 대장균의 존재 여부를 확인할 수 있는 수준이며, 선택성이 높고, 별다른 준비나 조작을 필요로 하지 않으므로 쉽게 대장균을 검출하는데 사용할 수 있었다. 단지 건조필름법은 균주에 대한 선택성이 높아서 손상된 균체의 검출이 어려웠으며 손상된 균체가 증식하는데 보다 많은 시간이 소요되므로 정확한 실험을 위해서는 대략 36시간 정도의 배양이 필요하였다. 전반적인 상황으로 판단해 볼 때 건조필름은 대장균군 및 대장균의 정성실험을 행하는데 있어서 현장에서 손쉽게 실시할 수 있는 방법으로 기존의 방법을 대체하여 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

참고문헌

- AOAC. 1990. Official Method of Analysis. 15th ed. Arlington, VA
- Cho MH, Bae EK, Ha SD, Park YS, Mok CK, Hong KP, Kim SP, Park JY. 2005. Evaluation of dry hydratable film method for enumeration of microorganisms in meat, dairy and fishery products. *Korean J Food Sci Technol* 37:294-300
- Curiale MS, Fahey P, Fox TL, McAllister JS. 1989. Dry rehydratable films for enumeration of coliform and aerobic bacteria in dairy products: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 72:312-318
- Curiale MS, Sons T, McIver DE, McAllister JS, Halsey B, Roblee D, Fox TL. 1991. Dry rehydratable films for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 74:635-648
- Ginn RE, Packard VS, Fox TL. 1986. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 69:527-531
- Ha SD. 1996. Evaluation of dryfilm method for isolation of microorganisms from foods. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24:178-184
- Kim KS, Bae EK, Ha SD, Park YS, Mok CK, Hong KP, Kim SP, Park JY. 2004. Evaluation of dry hydratable film method for enumeration of microorganisms in Korean traditional foods. *J Food Hyg Safety* 19:209-216
- Kwak IS, Chang JK, Lee KS. 1995. Bacterial counts in ginseng products by dry rehydratable film method. *J Food Hyg Safety* 10:41-43
- Matner RR, Fox TL, McIver DE, Curiale MS. 1990. Efficacy of Petrifilm *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. *J Food Prot* 53:145-150
- Nelson CL, Fox TL, Busta FF. 1984. Evaluation of dry medium film (Petrifilm VRB) for coliform enumeration. *J Food Prot* 47:520-525
- Restino L, Lyon RH. 1987. Efficacy of Petrifilm VRB for enumerating coliforms and *Escherichia coli* from frozen raw beef. *J Food Prot* 50:1017-1022
- 식품의약품안전청. 2009. 식품공전

(2009년 11월 11일 접수, 2009년 12월 14일 채택)