

훈제오리에서 캄필로박터균 생물막 및 Viable But Non-Culturable(VBNC) 상태에서의 행동특성

조혜진 · 전혜리 · 윤기선
경희대학교 식품영양학과

Behavior of *Campylobacter jejuni* Biofilm Cells and Viable But Non-Culturable (VBNC) *C. jejuni* on Smoked Duck

Hye Jin Jo, Hye Ri Jeon, and Ki Sun Yoon

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University

ABSTRACT Biofilm cells and viable but non-culturable (VBNC) state may play a role in the survival of *Campylobacter jejuni* under unfavorable environmental conditions. The objective of this study was to investigate the behavior of *C. jejuni* biofilm cells and VBNC cells on smoked duck. The transfer of *C. jejuni* biofilm cells to smoked duck and its ability to resuscitate from biofilm and VBNC cells on smoked duck was investigated. Transfer experiments were conducted from *C. jejuni* biofilm cells to smoked duck after 5 min, 1 h, 3 h, and 24 h contact at room temperature, and the efficiency of transfer (EOT) was calculated. In addition, smoked duck was inoculated with *C. jejuni* biofilm and VBNC cells and then stored at 10, 24, 36, and 42°C to examine the cells' ability to resuscitate on smoked ducks. The 5 min contact time between *C. jejuni* biofilm cells and smoked duck showed a higher EOT (0.92) than the 24 h contact time (EOT=0.08), and the EOT decreased as contact time increased. Furthermore, *C. jejuni* biofilm cells on smoked duck were not recovered at 10, 24, and 36°C, and *C. jejuni* VBNC cells were not resuscitated at 42°C. Although the resuscitation of *C. jejuni* biofilm and VBNC cells was not observed on smoked duck, microbial criteria of *C. jejuni* is needed in poultry and processed poultry products due to risk of its survival and low infectious dose.

Key words: *C. jejuni*, biofilm, viable but non-culturable (VBNC), smoked duck

서 론

최근 인구의 고령화, 여성의 경제활동 확대, 국민소득의 증가 및 식생활의 서구화 등의 영향에 의해 식품소비 패턴이 변화하고 있다. 특히 국민의 건강에 대한 관심이 증가하는 흐름에 따라 몸에 좋다고 인식되고 있는 흰 살 육류인 오리 고기의 소비량이 꾸준히 증가하고 있으며, 최근 가정에서도 오리고기를 이용할 수 있는 여건이 개선되어 가정 내 오리고기 소비가 증가하고 있다(1). 그러나 이러한 축산 가공품 수요가 증가함과 동시에 매년 육류 및 가공품에 의한 식중독이 꾸준히 발생하고 있어 지속적인 관리가 필요할 것으로 보인다(2). 가금류에서의 *Campylobacter*의 감염은 매우 빈번하게 발생하며 도계과정에서 장내에 존재하던 균이 육계로 전이되는데, 이때 식중독 발생의 주원인은 날 닭고기를 다룰 경우 다른 음식으로 교차오염 되거나 불충분한 가열을 하는 경우인 것으로 보고되고 있다(3-5). *Campylobacter jejuni*

는 매우 소량인 500개 정도의 균수로도 식중독을 유발할 수 있어(6,7) 가금류에서의 *C. jejuni* 생존력에 대한 이해는 식품안전에서 매우 중요하다.

*Campylobacter*는 그람 음성의 만곡형 또는 나선형의 간균이나 공기 노출, 건조, 낮은 pH(pH<5.0), 열처리, 냉동 등의 환경적 스트레스에 의해 균들이 점차 구형으로 변하는 특성을 갖는다(8). 이러한 특성을 보인 *Campylobacter*는 세포막이 온전하고 호흡 등의 대사활성은 유지하나 일반적인 실험실 배양조건에서는 성장하지 못해 살아있으나 집락을 이루지 못하는 세포의 상태 viable but non-culturable (VBNC)이 된다(9). 이러한 변화는 성장 중 정지기에서 정상적인 일로써 다른 curved 또는 vibrioid 균주(*Helicobacter pylori*, *Vibrio vulnificus*) 및 *Escherichia coli*에서도 관찰되었다(10-12). 한편 이렇게 구형으로 변형된 VBNC 상태의 *C. jejuni*는 환경적 스트레스에 적응하여 잘 살아남으며, 특히 낮은 온도에서 식품 가공 처리에 대한 저항성이 더 높다는 연구 결과가 있다(13-15). VBNC 상태의 *Campylobacter*균으로 오염된 것을 섭취 시 장내에서 다시 나선형으로 바뀌어 활성을 가짐으로써 장염을 일으키며, horse blood, hemin 및 charcoal 등의 산소 억제 물질 첨가, 미호

Received 14 March 2016; Accepted 9 May 2016

Corresponding author: Ki Sun Yoon, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

E-mail: ksyoon@khu.ac.kr, Phone: +82-2-961-0264

기 조건의 배양 등은 나선형으로의 회복을 증가시킨다는 보고가 있으나(16,17), VBNC 상태의 *C. jejuni*를 섭취 시 장 내에서 회복이 불가능하다는 연구 결과도 있어 추후 이에 대한 연구가 계속 더 필요하다(18). VBNC 상태의 *Campylobacter*는 감염 가능성에 있어서 보건학적으로도 매우 중요한 문제이며, *Campylobacter*균에 의한 식중독을 예방하기 위해서는 식품에서 VBNC 상태의 *Campylobacter*균의 회복 및 증식 가능성에 대한 이해가 필요하다.

미생물은 환경적 스트레스에 대한 방어기작으로 일시적인 변화 혹은 돌연변이를 통해 적응하거나 생물막(biofilm) 등을 형성한다(19). Biofilm은 미생물이 분비한 polysaccharide의 matrix 구조 속에 형성된 미생물들의 3차원적 구조물로서 biofilm이 표면에 부착하면 extracellular polysaccharide(EPS)의 합성을 촉진해 항생물질에 대한 내성을 강화함으로써 자신을 보호하고, 유전자 변형 등에 의해 성숙한 biofilm이 된다. 그러나 biofilm 내부가 기아상태가 되면 세포는 이탈하게 되며 다시 부유 상태의 미생물로서 존재하게 된다(20). *C. jejuni*는 일반 호기적인 환경에서는 증식이 불가능하며 사람 간의 전이 또한 불가능하지만, *C. jejuni*에 의한 오염은 광범위하게 발생하며 감염률 또한 높다는 것은 의문이나 이는 *C. jejuni*가 biofilm을 형성함으로써 환경에 적응하며 유지한다는 것으로 설명할 수 있다. *C. jejuni*의 biofilm에 대한 선행연구는 전자현미경을 이용하여 biofilm 형성 표면에서 *C. jejuni*의 증식 여부 및 구조를 확인하는 연구(21), *C. jejuni*가 biofilm을 형성하는 환경 요인을 분석하는 연구(22), *C. jejuni* 단일 및 혼합 균주의 biofilm 형성 구조를 비교한 연구(23,24)가 있다. 또한, biofilm을 형성하는 표면 및 재료에 의한 biofilm 생성량의 차이를 분석하는 연구(25), biofilm에서 *C. jejuni*의 생육력과 배양성을 확인하고 형성된 biofilm을 측정하는 연구(26) 등 biofilm 형성 자체에 대한 연구가 주로 이루어졌으나 형성된 biofilm이 식품에 노출되었을 때 전이 및 노출 후의 증식 가능성을 조사한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 훈제오리에서 *C. jejuni*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*의 성장특성을 비교하고 biofilm 상태 또는 VBNC 상태의 *C. jejuni*가 교차오염에 의한 전이특성 및 훈제오리에서의 재증식 가능성을 분석하였다.

재료 및 방법

시험 균주 및 균액의 준비

본 연구에 사용된 균주 *Campylobacter jejuni*(ATCC 33291)와 *Salmonella* Typhimurium(ATCC 13311)은 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM, Seoul, Korea)에서, *Listeria monocytogenes*(ATCC15313)는 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea)에서 분양받아 각 0.16% agar가 첨가된

Brucella broth(BB; BD, Sparks, MD, USA), Brain heart infusion broth(BHI; BD), yeast extract 0.6%가 첨가된 Tryptic soy broth(TSB; BD)에 20% glycerol을 첨가하여 -80°C 에 보관하였다. 매 실험 시 각각의 균주 10 μL 를 *C. jejuni*는 10 mL의 0.16% agar가 첨가된 BB에 접종하여 36°C 에서 24시간 동안 100 rpm으로 배양하였으며, *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*는 각각 BHI broth와 0.6% yeast extract가 첨가된 TSB에 접종하여 36°C 에서 24시간 동안 140 rpm으로 배양하였다.

훈제오리에서 식중독 균의 생육 변화 측정

본 연구에 사용된 훈제오리는 오리업계에서 높은 시장 점유율을 보이는 브랜드의 제품을 사용하였다. 훈제오리는 제조일자로부터 7일 이내에 입고된 시료를 구입하였으며 2시간 이내에 실험장소로 운반하여 본 실험에 사용하였다. 훈제오리는 끓는 물에서 1분간 가열처리 후, clean bench에서 10 g씩 petri dish에 무균적으로 담고 각 시료에 미리 준비된 균주 *C. jejuni*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 현탁액을 100 μL 씩 접종하여 초기균의 농도가 각각 3.0 ± 0.5 log CFU/g 수준이 되도록 하였다(27). 각각의 오리샘플은 실제 유통/판매되는 상태에 따라 진공 포장하여 각각 10, 15, 24°C 의 온도에 저장하며 *C. jejuni*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*의 증식 및 생존을 조사하였다. *C. jejuni*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*의 생육 변화 측정은 샘플링한 각 시료를 stomacher로 2분간 균질화한 후 9 mL의 0.1% 펩톤수로 단계별 희석하여 사용하였다. 적당한 농도의 희석액을 Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar(mCCDA; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), Xylose lysine deoxycholate agar(XLD; BD) 및 Palcam agar(Oxoid Ltd.) 배지에 spiral plater(Whitley automatic spiral palter; Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK)로 각각 분주하고, mCCDA는 42°C 미호기 조건(5% H_2 , 10% CO_2 , 85% N_2)의 인큐베이터(miniMACS, Don Whitley Scientific)에서 2~3일간 배양하였으며, XLD 및 Palcam agar는 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 24~48시간 배양 후 형성된 집락수를 계수하여 colony forming unit(CFU)으로 표시하였다(28).

C. jejuni biofilm의 형성

본 연구에서는 *C. jejuni* biofilm을 형성하기 위해 7.6×2.6 cm^2 규격의 슬라이드 글라스가 이용되었으며, 슬라이드 글라스 전체 표면적 중 약 7 cm^2 를 접촉 표면적으로 이용하였다. Biofilm을 형성하기에 앞서 슬라이드 글라스 표면의 오염물질을 제거하기 위해 각각의 슬라이드 글라스를 아세톤으로 세척 및 소독하여 증성세제에 1시간 동안 담근 후 멸균 증류수로 세제를 제거하고 70% 알코올을 이용하여 건조하였다. 살균과정 이후 멸균 증류수에 세척하고 60°C 에서 2시간 동안 건조한 후 121°C 에서 15분간 고온고압멸균기

를 이용하여 멸균 처리하여 준비하였다(29).

준비된 균주 현탁액은 0.16% agar가 첨가된 멸균 Brucella broth(BB)에 접종하여 초기 농도가 $4.0 \pm 0.5 \log \text{CFU/mL}$ 가 되도록 하였다. 준비된 균액 15 mL가 첨가된 50 mL의 conical tube에 멸균된 슬라이드 글라스를 넣어 42°C 미호기 조건(5% H₂, 10% CO₂, 85% N₂)의 인큐베이터(miniMACS, Don Whitley Scientific)에서 72시간 동안 배양하였다. 실험에 사용하기에 앞서 느슨하게 부착되었거나 부착되지 않고 부유하는 균주를 제거하기 위해 배양 후 0.1% 멸균 펩톤수 45 mL로 세척하였다. 세척한 슬라이드 글라스는 15 mL의 멸균 BB가 첨가된 50 mL conical tube에 수직으로 넣고 같은 조건에서 배양하였다. 충분히 biofilm을 형성하기 위해서 본 과정을 9일 동안 3회 반복하였다(30,31). 이 과정을 통해 슬라이드 양쪽 면에 biofilm을 형성하였다.

Biofilm으로부터 훈제오리로의 전이 및 재증식 가능성

형성된 biofilm으로부터 교차오염에 의해 식품에 전이된 *C. jejuni*가 다시 증식할 가능성을 조사하기 위해 petri dish에 무균적으로 담은 훈제오리 위에 양쪽 면에 biofilm이 형성된 슬라이드 글라스를 부착시키고 그 위에 다시 훈제오리를 올려 의도적으로 훈제오리가 *C. jejuni* biofilm cells에 노출되도록 하였다. 고기가 포개어 있음을 가정하여 무게 약 100 g 정도의 물체를 올려놓고 압력을 가하여 부착된 훈제오리 노출면의 초기 균수가 약 $4 \sim 5 \log \text{CFU/g}$ 또는 $4 \sim 5 \log \text{CFU/surface}$ 가 되게 하였다. 이때 노출시간은 접촉 직후(5분), 1시간, 3시간, 24시간으로 설정하여 측정하였다. 형성된 biofilm으로부터 훈제오리를 노출해 전이된 집락수를 계수하여 전이율(efficiency of transfer, EOT)을 다음과 같이 계산하였다(32).

$$\text{Efficiency of transfer (EOT)} = \frac{\text{CFU on destination}}{\text{CFU on source}}$$

또한, 9일간 배양하여 형성된 biofilm을 0.1% 멸균 펩톤수로 세척한 후 멸균된 swab용 면봉을 이용하여 biofilm을 제거하고 10 mL의 0.1% 멸균 펩톤수가 담긴 conical tube에 옮겨 1분간 vortex 하며 섞어주었다. Biofilm cells을 접종한 훈제오리는 실제 유통/판매되는 상태에 따라 진공 포장 후 각각 10, 24, 36°C의 온도에 24시간 동안 저장하여 *C. jejuni* biofilm cells의 증식 가능성을 조사하였다. Biofilm cells이 전이된 훈제오리 및 biofilm cells 접종 후 1일간 배양한 훈제오리는 각각 멸균백에 옮겨 담고 시료와 같은 양의 0.1% 멸균 펩톤수를 가하여 stomacher로 2분간 균질화한 후 9 mL의 0.1% 펩톤수로 단계별 희석하여 사용하였다. 적당한 농도의 희석액을 mCCDA(Oxoid Ltd.) 한천배지에 spiral plater(Whitley automatic spiral palter; Don Whitley Scientific)로 각각 분주하고, 42°C 미호기 조건(5% H₂, 10% CO₂, 85% N₂)의 인큐베이터(miniMACS, Don Whitley Scientific)에서 2~3일간 배양 후 형성된 집락수를

계수하여 colony forming unit(CFU)으로 표시하였다.

VBNC 상태의 *C. jejuni* 생육력 및 재증식 가능성

훈제오리에서 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 증식 가능성을 조사하기 위해 본 연구에서는 VBNC 상태의 *C. jejuni*를 실험에 앞서 준비하였다. VBNC 상태의 *C. jejuni* 실험에 사용된 균주는 앞서 진행된 실험과 같은 방법으로 준비하여 초기 농도가 $4.0 \pm 0.5 \log \text{CFU/mL}$ 가 되도록 하였다. 일반적으로 많이 사용되는 저온(10°C) 저장방법으로 VBNC 상태를 유도하였으며, 정해진 시간 간격으로 시료를 채취하여 배양성(culturability)과 생육력(viability)을 확인하였다(15). VBNC 상태로 유도된 *C. jejuni*의 배양성을 확인하기 위하여 미생물 시료를 일정량 취한 후 적당한 농도로 희석하여 mCCDA(Oxoid Ltd.) 배지에 spiral plater(Whitley automatic spiral palter; Don Whitley Scientific)로 각각 분주하고, 42°C 미호기 조건(5% H₂, 10% CO₂, 85% N₂)의 인큐베이터(miniMACS, Don Whitley Scientific)에서 2~3일간 배양 후 형성된 집락수를 계수하여 colony forming unit(CFU)으로 나타내었다. VBNC 및 biofilm cells의 생육력은 LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit(Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 사용하여 확인하였다. 시료에 1.5 μL의 SYTO9(3.34 mM)와 1.5 μL의 propidium iodide(PI; 20 mM) 염색액을 처리한 후 상온의 어두운 곳에서 15분 이상 반응시킨 다음 Fluorescence Microscope(Nikon Eclipse Ti; Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)를 사용하여 살아있는 세포는 녹색으로, 손상된 세포는 붉은색으로 나타나는 것을 관찰하였다(33).

훈제오리에서 VBNC 상태 *C. jejuni*의 재증식 가능성을 조사하기 위해 훈제오리에 살아있으나 배양성이 없는 VBNC로 확인된 *C. jejuni* 균액을 100 μL씩 접종하였다. 각 시료는 실제 유통/판매되는 상태에 따라 진공 포장하여 각각 42°C의 온도에 24시간 동안 저장하여 VBNC 상태로 유도된 *C. jejuni*의 증식 가능성을 조사하였다. 저장 후의 시료는 멸균백에 옮겨 담고 0.1% 멸균 펩톤수를 가한 후 stomacher로 2분간 균질화하여 mCCDA(Oxoid Ltd.) 한천 배지에 spiral plater(Whitley automatic spiral palter; Don Whitley Scientific)로 각각 분주하고, 42°C 미호기 조건(5% H₂, 10% CO₂, 85% N₂)의 인큐베이터(miniMACS, Don Whitley Scientific)에서 2~3일간 배양 후 VBNC 유도된 *C. jejuni*의 재증식 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

유통기한 내 훈제오리에서 고 위험군 병원성 식중독균의 증식 및 생존 가능성 조사

국내의 오리육의 위생실태 연구에 따르면 *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. 및 *L. monocytogenes*를 비롯한 다양한 미생물들이 유통과정에서 오리육 및 오리 유래의 축산

물 등의 품질에 영향을 주는 것으로 보고되었다(34-38). 최근 서울시에 있는 대형마트정육점과 정육점에서 판매하고 있는 오리 60수에서 *Campylobacter*균을 모니터링 한 결과 오리 6수(10%)에서 *Campylobacter*가 검출되었는데 분리된 *Campylobacter*균은 colony PCR을 통하여 *C. coli*(4)와 *C. jejuni*(2)인 것으로 나타났으며 모두 독성유전자 Cdt A/B/C 양성이며 nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin 등에 높은 내성을 보였다(39).

본 연구에서 가금류의 주요 식중독 세균인 *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*를 인위적으로 오염시킨 훈제오리고기를 10, 15, 24°C에서 유통기한 동안 저장하면서 관찰한 미생물의 증식 및 생존 결과는 Fig. 1과 같다. 10°C에서 저장한 훈제오리에서의 *C. jejuni*는 느린 속도로 감소하여 30일 이내에 사멸하는 경향을 보였다. 그

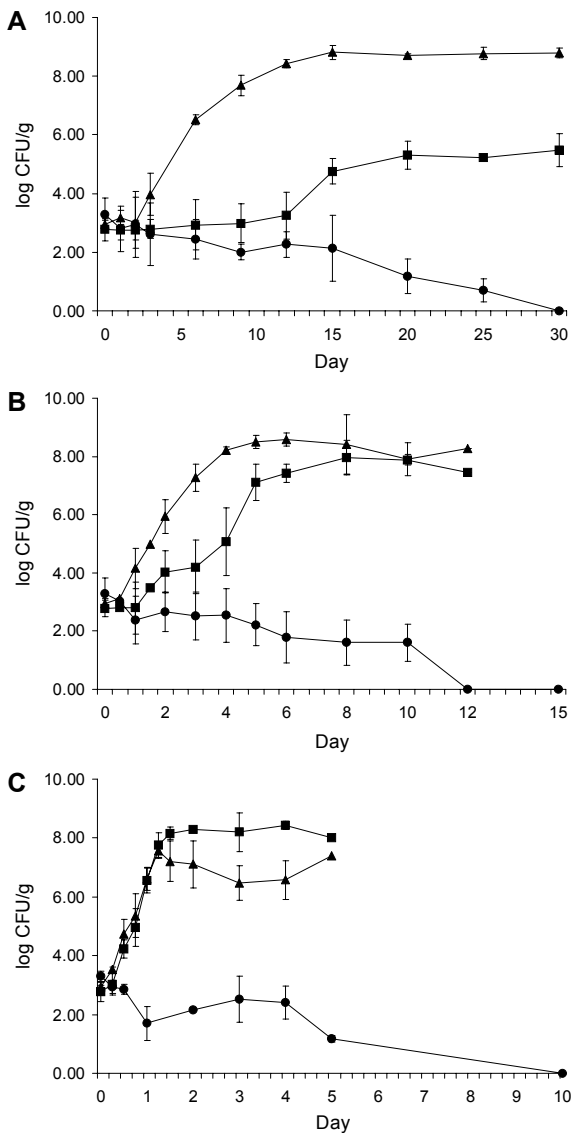


Fig. 1. Growth and survival of pathogens in smoked duck meat at (A) 10°C, (B) 15°C, and (C) 24°C. ●: *C. jejuni*, ■: *S. Typhimurium*, ▲: *L. monocytogenes*.

리나 *S. Typhimurium*은 약 12일까지 일정한 수준을 유지하다가 이후 서서히 증식하여 최종 저장기간 30일 이내에서는 약 1 log CFU/g 증가하였으며, *L. monocytogenes*는 저장 3일 후부터 증식하여 약 15일 이내에 최대증식수준까지 증식하였다(Fig. 1A). 이는 식육가공품 중 진공 포장하여 10°C에 저장한 폭참에서 저장 35일 이후 *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*가 각각 약 5.5와 8.0 log CFU/g 이상의 수준까지 증가하였다는 선행연구 결과와 비슷한 결과였다(40). 따라서 훈제오리에서의 *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*의 미생물학적 기준규격이 현재의 음성(41)으로 관리하는 것이 적절한 것으로 사료된다.

15°C와 24°C에서 *C. jejuni*는 사멸하였으며, *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*는 저장기간 내에서 성장속도에 차이가 있으나 최대 수준까지 증식하는 경향을 보였다. 15°C에서 *S. Typhimurium*은 저장 3일 후 증식하기 시작하여 약 12일 쯤 최대증식수준에 도달하였으며, *L. monocytogenes*는 저장 12시간 후부터 빠른 속도로 증식하기 시작하여 저장 5일 만에 최대증식수준에 도달하였다(Fig. 1B). 그러나 24°C에서 *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*의 증식 속도에는 큰 차이가 없었으나 최대증식수준이 *S. Typhimurium*이 약 1 log CFU/g 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 1C).

반면 10, 15, 24°C에서 *C. jejuni*는 훈제오리에서 각각 약 30, 12, 10일까지 생존하는 것으로 나타나 상온보다 냉장 온도에서 더 잘 살아남는 것으로 나타났다. 이는 *Campylobacter*가 4°C의 습도가 적절한 미호기 조건에서 2~4주, -20°C에서는 2~5개월간 생존 가능하나 상온에서는 수일 내에 사멸하는 것으로 보고된 연구(13), 그리고 대표적인 가금류인 닭고기 패티에서 *C. jejuni*는 실온보다 냉장 온도에서 더 잘 생존한다는 연구(42)와 유사한 결과였다. 축산물 가공품 중 햄류로 분류되는 훈제오리의 유통온도는 10°C이며 유통기한이 약 30일인 것을 고려했을 때 *Campylobacter*의 초기 오염 수준이 식중독을 유발하는 500 CFU/g 수준 이하에서는 유통기한 내에 문제가 없을 것으로 사료된다. 현재 국내에서는 축산식품에 대해 *C. jejuni*에 대한 기준규격이 설정되어 있지 않은 상태이다. 그러나 낮은 온도에서 *C. jejuni*는 저항성이 증가하고 살아있으나 배양은 불가능한 상태(VBNC)로 적절한 조건에서 회복되어 병원성을 일으킬 가능성이 있으므로 지속적인 관리의 필요성이 제시되었다(3).

또한, *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*의 경우 일반적인 유통/보관 온도인 10°C에서도 증식이 가능하며, 특히 가공품 및 RTE 식품은 적절한 가열처리 없이 소비할 경우 식중독 발생 가능성이 높다는 점에서 제품 제조 단계에서부터 위생적인 제조관리가 필요하다. 이러한 결과는 추후 가금류 가공품에서 microwave를 이용한 미생물 저감화 연구(43)와 같은 추가적인 연구를 수행함으로써 최종 공정과정에서 성과목표를 설정하고, 훈제오리 및 오리육 가공품에

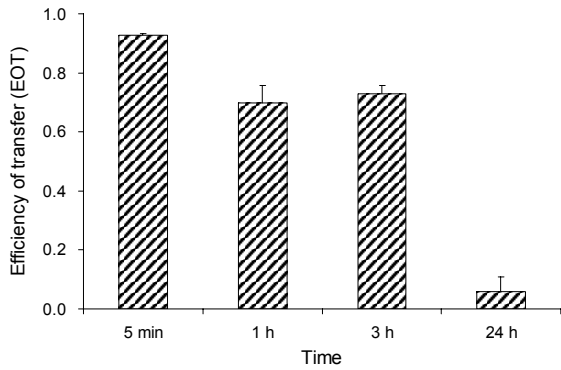


Fig. 2. Efficiency of transfer from *C. jejuni* biofilm to smoked duck meat as a function of exposure time.

오염될 가능성이 있는 병원성 식중독균의 증식을 억제하기 위한 온도 설정 및 안전 관리의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

C. jejuni biofilm cells에서 훈제오리로의 전이

슬라이드 글라스에 형성된 *C. jejuni* biofilm에서 훈제 오리육으로의 전이율을 조사하기 위하여 biofilm에 접촉 및 노출시간(5분, 1시간, 3시간, 24시간)을 고려하여 전이율을 분석하였다(Fig. 2). 선행연구에 따르면 *C. jejuni*에 오염된 닭가슴살에서 양상추로의 전이율은 온도에 따른 차이가 없는 것으로 나타나 본 실험에서는 온도차를 고려하지 않고 실온의 조건에서 진행되었다. *C. jejuni* biofilm이 형성된 슬라이드 글라스에서 훈제 오리육으로의 전이율은 노출시간이 길어질수록 점차 감소하는 경향으로 나타났으며, 평균적으로 5분에서 가장 높은 전이율이 나타났고 24시간에서 가장 낮은 전이율을 나타내었다. 비록 균주의 차이는 있으나 *L. monocytogenes* biofilm이 식품에 노출되었을 때 전이가 가능한 것을 확인하였으며, *L. monocytogenes*에 오염된 컨베이어벨트 및 스테인리스 스틸 등의 식품접촉면에서 돈육으로의 전이율이 초기에 높았다가 시간이 지나면서 점차 감소하였다는 결과와 같은 경향을 보였다(32). 또한, 본 연구에서 3일 간격으로 9일 동안 형성한 biofilm을 LIVE/DEAD BacLight 염색시약을 이용하여 관찰한 결과 슬라이드 글라스에 형성된 *C. jejuni* biofilm의 균주들은 살아있는 상태였으며(Fig. 3), 살아있는 상태로 biofilm을 형성한 균들 또한 부유하는 상태의 균들과 같은 양상을 보임으로써 식품으로 전이할 수 있음을 시사한다. 표면에 오염된 미생물이 식품으로 전이될 확률은 접촉표면의 미생물 농도, 표면물질에 대한 미생물의 부착력에 좌우된다는 연구가 보고되었다(44). 특히 표면 자유에너지 및 습윤성을 갖는 표면에서 부착률이 높게 나타나는 결과에 따라 스테인리스 스틸 및 유리와 같은 친수성 재질의 표면에서 biofilm의 형성 및 미생물의 부착이 잘 일어난다(45,46). 본 연구에서 훈제 오리육은 수분 함량이 많아 *C. jejuni* biofilm에 단시간 노출된 경우 슬라이드 글라스보다 전이율이 높았으나, 실온 및 산소

의 노출에 민감한 *C. jejuni*의 특성에 따라 시간이 지나면서 건조가 진행되어 전이율이 감소한 것으로 생각한다.

훈제오리에서 C. jejuni biofilm의 재증식 가능성

부적절한 세척 및 소독에 의해 쉽게 형성되는 biofilm은 식품에 노출되어 전이할 수 있다는 것을 이전 실험을 통해 확인하였으며, 본 연구에서 *C. jejuni* biofilm cell을 4~5 log CFU/g 정도로 인위적으로 오염시킨 훈제오리육을 진공 포장하여 10, 24, 36°C에 1일간 저장하면서 *C. jejuni* biofilm의 증식 가능성을 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 훈제오리의 일반 유통/보관 온도인 10°C와 실온, 그리고 일반적으로 *C. jejuni*가 증식 가능한 온도인 36°C에서 저장하였으나, *C. jejuni* biofilm은 모든 온도에서 재증식이 불가능한 것으로 관찰되었다. 그러나 *C. jejuni* biofilm은 24°C보다 10°C에서 생존율이 더 높은 것으로 관찰되어 *C. jejuni*가 상온에서보다 냉장 온도에서 더 잘 살아남는다는 연구와 유사한 결과였다(13). 한편 살아있는 상태의 *C. jejuni*의 경우 36°C에서 증식할 수 있음에도 불구하고 훈제 오리육에 전이된 후 진공포장 상태의 혐기적 조건에서 36°C에서 1일간 배양한 *C. jejuni* biofilm은 재증식하지 않았다. 이는 훈제오리육의 포장상태가 진공포장상태이나 *C. jejuni* 성장 최적조건인 미호기성의 까다로운 성장 조건이 되지 못했으며 항균 효과를 보이는 훈제공정이 성장을 저지하였을 것으로 생각한다. 또한, 지방 및 단백질 함량이 높은 오리육의 특성상 높은 온도에서 보관함에 따라 부패가 진행되어 지방 산패 및 휘발성 염기 질소 생성, pH 변화 등이 수반하였을 것으로 예상된다. 그러나 장내에서 생존가능성이 높은 *C. jejuni*의 특성(47)을 고려할 때 식품으로 살아있는 상태의 *C. jejuni* biofilm 전이의 위험성에 주의가 요망된다. 식품에서 biofilm의 재증식 가능성에 대한 연구가 매우 부족하며, 특히 최근 소비가 증가하고 있는 오리육 및 훈제오리 제품에 대한 연구가 매우 부족한 점을 고려할 때 오리가공품의 안전한 유통을 위한 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

Pérez-Rodríguez 등(48)은 식중독 발생의 주요 원인으로 교차오염과 전이를 지적하고 있으며, *C. jejuni* biofilm은 본 연구 결과 냉장 온도에서 생존율이 높은 것으로 나타나 식품산업과 가정에서 기구 및 용기의 세척·소독을 철저히 수행하여 biofilm의 생성을 예방하는 것이 중요하며, 이를 현장에 적용하여 biofilm을 관리할 수 있는 실용화 연구가 필요할 것으로 사료된다.

훈제오리에서 VBNC 상태의 C. jejuni cell의 재증식

본 연구에서 10°C에 저장한 *C. jejuni*는 훈제오리육뿐만 아니라 일반 영양배지인 brucella broth에서 저장 20~30일 이내에 배양성 감소 및 사멸하는 것으로 관찰되었다(Fig. 5A). 본 연구에서는 배양성이 감소하여 사멸하는 것으로 나타나는 20일 저장의 *C. jejuni*를 LIVE/DEAD BacLight 염색시약을 이용하여 관찰한 결과 살아있지만 배양할 수 없는

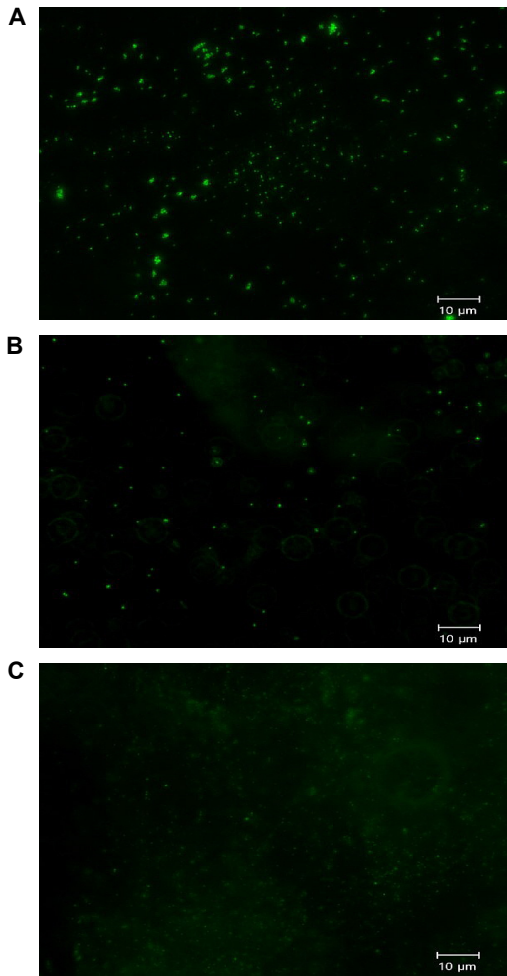


Fig. 3. Confocal images of LIVE/DEAD BacLight™ assay of *C. jejuni* biofilm after (A) 3 days, (B) 6 days, and (C) 9 days for cell viability.

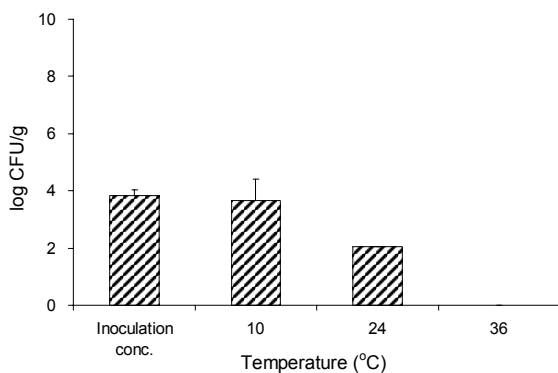


Fig. 4. Resuscitation from *C. jejuni* biofilm on vacuum packaged smoked duck meat as a function of temperature.

VBNC 상태를 확인하였다(Fig. 5B). 또한, 10°C에서 유도한 VBNC 상태의 *C. jejuni*를 훈제오리육에 오염시킨 후 진공포장하여 42°C에 1일간 저장하며 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 재증식 가능성을 분석하였으나 최적 증식 온도인 42°C에서도 재증식은 관찰되지 않았다. 이는 본 연구의 대상 식품

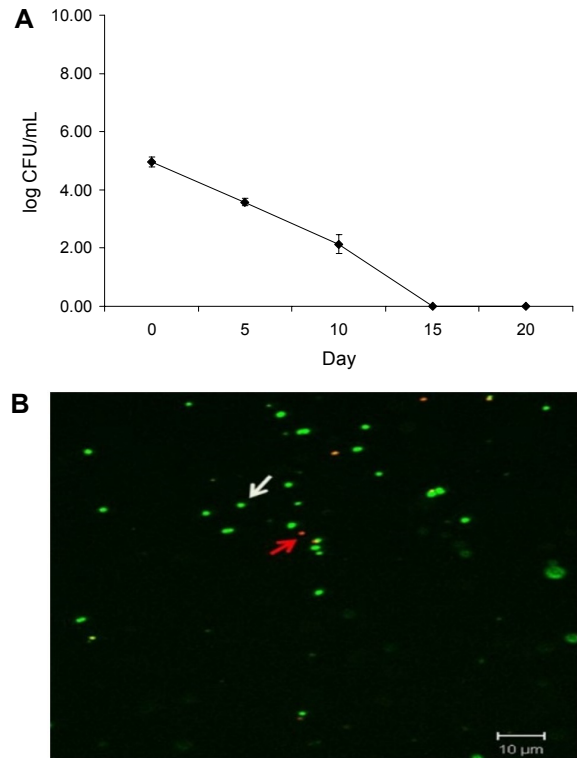


Fig. 5. (A) Survival of *C. jejuni* under aerobic condition in brucella broth at 10°C and (B) confocal images of LIVE/DEAD BacLight™ assay of VBNC *C. jejuni* after 20 days for cell viability, containing a mixture of viable (green) and dead (red) bacteria.

이 훈제오리로서 이미 훈제가공식품의 경우 보존제가 첨가되어 있거나 훈제에 의한 항균 효과를 기대할 수 있어 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 재증식 가능성을 연구하기에는 적절하지 않은 식품인 것으로 생각한다. 그러나 VBNC *Campylobacter*균으로 오염된 것을 섭취 시 장내에서 다시 나선형으로 바뀌어 활성을 가짐으로써 장염을 일으킨다는 보고(16)와 상반되게 병아리에서 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 회복은 불가능한 것으로 보고(18)되는 결과도 있어 역학적 관점에서 볼 때 VBNC 상태의 *Campylobacter*의 감염 가능성은 매우 중요한 문제이므로 추후 이에 대한 연구가 계속 더 필요할 것으로 생각한다. 또한, 동물이나 영양배지에서 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 회복 및 재증식 가능성을 관찰한 선행 연구와 달리 식품에서 VBNC의 존재, 회복, 재증식 가능성을 관찰하여 이에 대한 위험성을 분석하는 연구는 매우 부족한 실정 이므로 다양한 식품군에서 이에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

요 약

본 연구에서 가금류의 주요 병원성 식중독 균을 인위적으로 오염시킨 훈제오리육을 진공포장 조건에서 10, 15, 24°C에 저장하면서 유통기한 동안 관찰한 미생물의 증식 및 생존

결과 *Campylobacter jejuni*는 저장기간 이내에 사멸하는 경향을 보였으며, *Salmonella* Typhimurium과 *Listeria monocytogenes*는 균주의 성장 속도에는 차이가 있었으나 증식하는 경향을 보였다. 훈제오리의 유통온도는 10°C이며 유통기한이 약 30일인 것을 고려했을 때, 초기 오염 수준이 *Campylobacter* 균주에 의한 식중독을 유발하게 되는 균수 500 CFU/g 수준 이하에서는 유통기한 내에 문제가 없을 것으로 생각한다. 그러나 낮은 온도에서 저장성이 증가하며 살아있으나 배양은 불가능한 상태인 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 특성에 따라 적절한 조건에서 회복되어 병원성을 일으킬 가능성이 있으므로 *C. jejuni*에 대한 지속적인 관리가 필요하다. 또한, *S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*의 경우 일반적인 유통/보관 온도인 10°C에서도 증식이 가능하며, 특히 가공품 및 RTE 식품은 적절한 가열처리 없이 소비할 경우 식중독 발생 가능성이 높다는 점에서 제품 제조 단계에서부터 위생적인 관리가 필요하다. 본 연구에서는 *C. jejuni* biofilm cells을 인위적으로 오염시킨 훈제오리육을 진공포장 하여 일반 유통/보관 온도인 10°C와 실온, 그리고 일반적으로 *C. jejuni*가 증식 가능한 온도인 36°C에서 저장하였으나, *C. jejuni* biofilm cell은 훈제오리에서는 모든 온도에서 재증식이 불가능한 것으로 관찰되었다. 또한, 10°C의 저온에서 유도한 VBNC 상태의 *C. jejuni*를 훈제오리에 인위적으로 오염시키고 혐기적 조건에서 42°C에 1일간 저장하며 VBNC 상태의 *C. jejuni*의 재증식 가능성을 분석하였으나, 최적 증식 온도인 42°C에서도 재증식은 관찰되지 않았다. 이처럼 본 연구에서는 biofilm을 형성한 *C. jejuni*도 VBNC 상태의 *C. jejuni*는 살아 있으나 훈제오리에서의 증식은 관찰되지 않았다. 따라서 훈제오리에서의 *C. jejuni*의 위험성은 매우 적은 것으로 생각한다. 그러나 *C. jejuni*의 경우 매우 적은 양으로도 식중독을 일으킬 수 있고 *C. jejuni* biofilm 및 VBNC의 특성에 따라 잠재적인 위험성을 포함하는 동시에 유통/보관 온도인 냉장 온도에서 더 잘 살아남는다는 점에서 식중독 발생의 주요 원인으로 작용할 수 있는 교차오염과 전이를 예방하는 것이 중요하므로 이에 대한 관리가 강조되어야 할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Korea Duck Association. 2013. Duck Consumption. http://www.koreaduck.org/sub/statistics_3_7.asp?mNum=3&sNum=3&p=7 (accessed Nov 2013).
2. Ministry of Food and Drug Safety. 2013. Foodborne Illness Statistics. http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=519&menu_grp=MENU_GRP02 (accessed Nov 2013).
3. Franco DA, Williams CE. 1994. *Campylobacter jejuni*. In *Foodborne Disease Handbook*. Hui YH, Gorham JR, Murrell KD, Cliver DO, eds. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA. p 71-96.
4. Skirrow MB. 1991. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Int J Food Microbiol* 12: 9-16.
5. Stern N, Nachamkin I, Blaser M, Tompkins L. 1992. Reser-

- voirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA. p 49-60.
6. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* 157: 472-479.
7. Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Mégraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P. 2005. *Campylobacter*. *Vet Res* 36: 351-382.
8. Nachamkin I. 1999. *Campylobacter* and *Arcobacter*. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. 7th ed. ASM Press, Washington, DC, USA. p 716-726.
9. Ku HK, Park SR, Kim SK. 2008. Characterization of viable but nonculturable condition of *Escherichia coli* induced with copper. *Korean J Microbiol Biotechnol* 36: 209-214.
10. Bogosian G, Morris PJ, O'Neil JP. 1998. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 64: 1736-1742.
11. Day AP, Oliver JD. 2004. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J Microbiol* 42: 69-73.
12. Oliver JD. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43: 93-100.
13. Blaser MJ, Hardesty HL, Powers B, Wang WL. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J Clin Microbiol* 11: 309-313.
14. Moran AP, Upton ME. 1987. Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. *J Appl Bacteriol* 62: 527-537.
15. Rollins DM, Colwell RR. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 52: 531-538.
16. Jones DM, Sutcliffe EM, Curry A. 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol* 137: 2477-2482.
17. Stern NJ, Jones DM, Wesley IV, Rollins DM. 1994. Colonization of chicks by non-culturable *Campylobacter* spp.. *Lett Appl Microbiol* 18: 333-336.
18. Ziprin RL, Droleskey RE, Hume ME, Harvey RB. 2003. Failure of viable nonculturable *Campylobacter jejuni* to colonize the cecum of newly hatched leghorn chicks. *Avian Dis* 47: 753-758.
19. Hengge-Aronis R. 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 2: 148-152.
20. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
21. Joshua GW, Guthrie-Irons C, Karlyshev AV, Wren BW. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 152: 387-396.
22. Reeser RJ, Medler RT, Billington SJ, Jost BH, Joens LA. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Appl Environ Microbiol* 73: 1908-1913.
23. Sanders SQ, Boothe DH, Frank JF, Arnold JW. 2007. Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *J Food Prot* 70: 1379-1385.
24. Teh KH, Flint S, French N. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial pop-

- ulations. *Int J Food Microbiol* 143: 118-124.
25. Moe KK, Mimura J, Ohnishi T, Wake T, Yamazaki W, Nakai M, Misawa N. 2010. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J Vet Med Sci* 72: 411-416.
 26. Ica T, Caner V, Istanbul O, Nguyen HD, Ahmed B, Call DR, Beyenal H. 2012. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 78: 1033-1038.
 27. Park NY, Hong SH, Yoon KS. 2014. Effects of commercial marinade seasoning and a natural blend of cultured sugar and vinegar on *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* Typhimurium and the texture of chicken breasts. *Poult Sci* 93: 719-727.
 28. Park NY, Ro EY, Jo HJ, Park KS, Yoon KS. 2014. Effect of packaging and temperature on survival kinetics of *Campylobacter jejuni* on precooked chicken breast. *J Food Saf* 34: 371-379.
 29. Rossoni EMM, Gaylarde CC. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol* 61: 81-85.
 30. Marques SC, Rezende JdGOS, Alves LAdF, Silva BC, Alves E, Abreu LRd, Piccoli RH. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol* 38: 538-543.
 31. Rodríguez A, McLandsborough LA. 2007. Evaluation of the transfer of *Listeria monocytogenes* from stainless steel and high-density polyethylene to Bologna and American cheese. *J Food Prot* 70: 600-606.
 32. Kim SJ, Kim GH, Park JH, Park BG, Park MS, Oh DH. 2012. Analysis of transfer rate on *Listeria monocytogenes* contaminated pork meat during processing. *J Fd Hyg Safety* 27: 432-441.
 33. Wadhawan T, Maruska ZB, Siripattanakul S, Hill CB, Gupta A, Prüss BM, McEvoy JM, Khan E. 2011. A new method to determine initial viability of entrapped cells using fluorescent nucleic acid staining. *Bioresour Technol* 102: 1622-1627.
 34. Adzitey F, Huda N, Ali GR. 2012. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* in ducks: A review. *Foodborne Pathog Dis* 9: 498-505.
 35. Flament A, Soubbotina A, Mainil J, Marlier D. 2012. Prevalence of *Salmonella* serotypes in male mule ducks in Belgium. *Vet Rec* 170: 311.
 36. Ku SK, Hwang SH, Lim SD, Lee KH, Kim YB. 2013. Nutritional characteristics and quality changes of duck by-products during frozen storage at -20°C. *Korean J Food Sci An* 33: 109-118.
 37. Little CL, Richardson JF, Owen RJ, de Pinna E, Threlfall EJ. 2008. Prevalence, characterisation and antimicrobial resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* in raw poultry-meat in the UK, 2003-2005. *Int J Environ Health Res* 18: 403-414.
 38. Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *Int J Food Microbiol* 53: 75-80.
 39. Choi BG, Park JH, Kim HS, Jeon HR, Min JH, Yoon KS. 2015. Effect of slightly acidic electrolyzed water on the egg quality and the survival of *S. enteritidis* during storage. Abstract No P-J06 presented at the conference of the Korea Society of Foodservice Sanitation. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea.
 40. Michaelsen AR, Sebranek JG, Dickson JS. 2006. Effects of microbial inhibitors and modified atmosphere packaging on growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Typhimurium and on quality attributes of injected pork chops and sliced cured ham. *J Food Prot* 69: 2671-2680.
 41. Ministry of Food and Drug Safety. 2016. Animal product of processing standards and component specification. <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=687&pageNo=1&seq=10248&cmd=v> (accessed Mar 2016).
 42. Yoon KS, Burnette CN, Oscar TP. 2004. Development of predictive models for the survival of *Campylobacter jejuni* (ATCC 43051) on cooked chicken breast patties and in broth as a function of temperature. *J Food Prot* 67: 64-70.
 43. Morey A, Singh M, McKee SR. 2012. Efficacy of manufacturer recommended microwave time against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken products. *Int J Poult Sci* 11: 177-180.
 44. Midelet G, Carpentier B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl Environ Microbiol* 68: 4015-4024.
 45. Boulange-Petermann L, Baroux B, Bellon-Fontaine MN. 1993. The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. *J Adhesion Sci Technol* 7: 221-230.
 46. Bryers JD. 1987. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol Prog* 3: 57-68.
 47. Stintzi A, Marlow D, Palyada K, Naikare H, Panciera R, Whitworth L, Clarke C. 2005. Use of genome-wide expression profiling and mutagenesis to study the intestinal life-style of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 73: 1797-1810.
 48. Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, Garcia RM, Zurera G. 2008. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: A review. *Trends Food Sci Technol* 19: 131-144.