

퇴비에서 식중독균 검출을 위한 DNA 추출 방법 비교

김성연[†] · 서동연[†] · 문지영^{*}

국립농산물품질관리원 시험연구소 안전성분석과

Comparison of DNA Extraction Methods for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria from Livestock Manure Composts

Sung-Youn Kim[†], Dong-Yeon Seo[†], Ji-Young Moon^{*}

Division of Safety Analysis, Experiment & Research Institute National Agricultural Products Quality Management Service, Gimcheon, Korea

(Received July 10, 2019/Revised September 7, 2019/Accepted November 28, 2019)

ABSTRACT - This study investigated the efficacy of DNA extraction methods for real-time PCR detection of foodborne pathogenic bacteria in livestock manure composts. Livestock manure composts were inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and incubated in enrichment broth. For DNA extraction, enriched samples were treated following boiling method, by chloroform, C₁₈ powder, and proteinase K. As a result, 4 species of bacteria were detected by real-time PCR when subjected to boiling for 30 min and treated with proteinase K. These results suggest that detection of foodborne pathogens by real-time PCR from livestock manure composts could be applicable using effective DNA extraction methodology such as the boiling method or proteinase K.

Key words : Livestock manure composts, Real-time PCR, Boiling method, Chloroform, Proteinase K

전 세계적으로 농산물 생산환경에 대한 위생관리는 강조되고 있다. 2017년 국제식품규격위원회(CODEX)에서는 위생적인 신선 과일 및 채소의 생산을 위하여 생산환경에서 용수, 비료, 토양 등의 구체화된 위생관리 내용을 포함하여 신선 과채류에 대한 위생실행규범을 개정하였으며, 특히 비료의 경우에는 부숙, 살균 등을 통하여 병원균을 감소시키고 농산물의 교차오염을 예방할 수 있도록 규정하고 있다¹⁾. 국내에서는 비료 공정규격설정 및 지정에서 가축분퇴비, 퇴비, 부숙겨 등 부산물비료는 *Escherichia coli* O157:H7과 *Salmonella* spp.에 대해서 불검출 기준을 적용하고 있다²⁾.

비료는 식물에 영양을 주거나 식물의 재배를 돕기 위하여 흙에서 화학적 변화를 가져오게 하는 토양개량용 자재를 지칭하며³⁾, 부산물비료는 가축분뇨, 음식물폐기물, 톱밥 등의 유기성자원을 혼합한 비료이다^{2,4)}. 이중 가축분뇨, 가

축분퇴비 등에는 다양한 종류의 병원성미생물이 포함될 수 있으며, 대표적인 식중독균으로는 pathogenic *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* 등이 있다⁵⁾. 이러한 가축분퇴비는 신선 농산물에 대한 미생물학적 오염원으로 제기되었으며, 부적절하게 사용 시에는 주변 관개수 오염을 유발할 수 있다⁶⁾.

퇴비의 미생물 분석은 선택배지를 사용하는 배양에 기반하고 있다⁷⁾. 이러한 미생물 검출법은 국제적으로 표준시험 방법(gold standard)으로 통용되고 있는 반면에⁸⁾, 미생물 배양을 위해서는 시간이 오래 걸리며, 많은 노동력이 소모되는 단점이 있다⁹⁾. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)을 미생물 분석에 활용하면 이러한 단점을 보완하여 신속하고 정확하게 미생물을 검출할 수 있다. 또한 real-time PCR은 별도의 전기영동 과정 없이 실시간으로 유전자 증폭 결과를 확인할 수 있으므로 그 사용이 증가하는 추세이다.

미생물의 유전자 증폭은 다양한 요인들에 의하여 영향을 받을 수 있다. 주요한 인자로는 추출된 DNA의 농도와 순도, 검출하고자 하는 대상 시료 매질(matrix) 내의 당(polysaccharides), 염(salts)과 같은 저해인자(inhibitor)의 존재 유무 등이 있다^{10,11)}. 따라서 유전자 증폭의 효율성을 높이기 위해서 DNA를 추출하여 정제할 수 있는 방법들이 활

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Correspondence to: Ji-Young Moon, Division of Safety Analysis, Experiment & Research Institute National Agricultural Products Quality Management Service, Yongjeon-ro 141, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk 39660, Korea

Tel: 82-54-429-7761, Fax: 82-54-429-7779

E-mail: jymoon76@korea.kr

용되고 있으며, 가열처리, 계면활성제, 효소(lysozyme, pronase, proteinase K), phenol, guanidine thiocyanate, EDTA, 동결-해동, 초음파, bead를 사용하는 방법 등이 있다¹²⁾. 퇴비에는 각종 다양한 유기물과 무기물이 포함되어 있으며, 특히 음식물폐기물이 혼합된 경우에는 염(salts)이 존재하게 되므로 PCR inhibitor로 작용할 수 있다. 따라서 적합한 방법으로 DNA를 추출하는 것이 분석 결과의 신뢰성 확보를 위하여 중요하다.

이에 따라 본 연구에서는 퇴비에서 식중독균 검출을 위한 미생물 DNA의 추출 방법을 비교하였다. 대표적으로 사용되는 가열과 효소 처리 방법을 적용하였으며, 분리된 DNA의 정제를 위해서 chloroform과 흡착제(sorbent)를 처리하여 효과를 알아보려고 하였다. 각 실험 방법에 따른 미생물 검출 결과를 비교하여 퇴비에서 적합한 DNA 추출 방법을 확립하고자 수행하였다.

Materials and Methods

사용 균주 및 배양

-80°C 냉동고에서 cryo bead (Microbank, Prolab Diagnostic, Richmond Hill, Canada)에 보관되어 있는 4종 식중독균 균주를 해동시키고, nutrient agar (NA; Merck, Darmstadt, Germany)에 획선도말(streaking)하여 37°C에서 24시간 배양하였다. [*E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* NCTC 11994, *B. cereus* ATCC 10876]. 단일 집락으로 순수 분리된 각 균주는 tryptic soy broth (TSB; Oxoid, Hampshire, UK) 5 mL에 1 백금이 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 원심분리하여 (4,000×g, 20 min) 상등액을 제거하였다. 회수된 미생물 균체는 0.85% saline (8.5 g/L NaCl; Junsei Chemical, Tokyo, Japan)에 현탁시키고 4종 균주를 혼합하여 혼합배양액(culture cocktail)을 제조하였다. 혼합배양액은 십진희석(serial dilution)하여 각 균주의 최종농도가 약 10³⁻⁴ CFU/mL 또는 10⁶⁻⁷ CFU/mL에 도달하게 하였다.

퇴비 인위접종 및 배양

퇴비는 가축분뇨와 음식물폐기물이 혼합된 것을 시료로 사용하였으며 25 g을 칭량하여 2가지로 구분된 혼합배양액 1 mL씩 각각 접종하였다. 접종량은 저농도(10² CFU/g)와 고농도(10⁵ CFU/g)로 구분하였으며 멸균백(Whirl-pak, Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)에 옮겨 담아 225 mL TSB를 첨가하여 37°C에서 24시간 증균배양(enrichment)을 실시하였다.

DNA 분리

가열 처리(Boiling)

1 mL 증균배양액을 1.5 mL 튜브(Eppendorf, Hamburg,

Germany)에 취하여 10,000 ×g에서 1분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 500 μL 멸균증류수(distilled water; DW)에 침전물(pellet)을 재부유 시키고 이 과정을 2회 반복하여 세척하였다. 최종 침전물은 200 μL DW에 현탁시켜 95°C에서 10, 20, 30, 60분 동안 가열하고 이후 원심분리하여 (10,000 ×g, 5분) 상등액을 template DNA로 사용하였다.

DNA 정제(Purification)

유기용매와 흡착제의 유기물 제거에 따른 유전자 검출 효율을 확인하기 위해서 95°C에서 30분 동안 가열한 시료를 취하여 동량(200 μL)의 chloroform과 20 mg의 C₁₈ 분말(octadecyl-derivatized silica; Septra C18-E, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 첨가하였다. 혼합된 시료는 vortexing (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)하여 상온에서 5분간 방치하고 이후 10,000 ×g에서 10분간 원심분리한 상등액을 template DNA로 사용하였다.

효소 처리(Proteinase K treatment)

Proteinase K는 DNA 추출 시 단백질을 분해하는 용도로 사용 가능하며 해당 효소가 포함되어 있는 시판되는 DNA 추출키트 Powerprep DNA extraction from food and feed kit (Kogene Biotech, Seoul, Korea)를 사용하였다. DNA prep은 제조사에서 제공하는 방법에 따라 실시하였다.

Real-time PCR 반응조건

4종 식중독균의 검출은 시판되는 real-time PCR 키트 Powerchek multiplex pathogen detection kit (Kogene Biotech)를 사용하였다¹³⁾. 각 균의 target gene과 증폭 산물의 크기는 Table 1과 같다. Real-time PCR을 위한 반응물은 15 μL mixture (primer, probe, Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, reaction buffer)가 담긴 튜브에 5 μL template DNA를 첨가하여 총량이 20 μL가 되게 하였다. PCR 반응은 ABI 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였으며, 반응조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1회로 하여 40 cycle을 반응시켰다. Ct (threshold cycle)값은 형광커브와 역치선이 만나는 cycle 값으로 ABI 7500 software (Applied Biosystems)로 분석하였다.

Table 1. Target genes used for detection of 4 species pathogens in this study

Genus	Target gene	Product size (bp)
<i>E. coli</i> O157:H7	VT2	112
<i>S. Typhimurium</i>	invA	138
<i>L. monocytogenes</i>	prfA	95
<i>B. cereus</i>	groEL	105

Table 2. Comparison of real-time PCR detection of 4 species foodborne pathogens using boiling method (10, 20, 30, 60 min) in livestock manure composts

Boiling time (min)	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. Typhimurium</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>B. cereus</i>	
	Low ¹⁾	High ²⁾	Low	High	Low	High	Low	High
10	ND ³⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	23.4±1.19	ND	20.4±0.39	ND	30.2±0.27	ND	23.9±0.07
30	21.7±0.07	20.7±2.13	20.3±0.01	17.7±2.40	30.1±0.01	25.3±0.01	23.9±0.12	26.0±0.01
60	21.5±0.57	17.0±0.09	20.0±1.21	15.6±0.01	28.8±0.10	24.8±0.05	24.1±0.46	24.9±0.07

¹⁾Low inoculum level, 10² CFU/g

²⁾High inoculum level, 10⁵ CFU/g

³⁾ND, Not detected

Results and Discussion

가열 시간에 따른 DNA 추출 효율 비교

퇴비 배양액에서 DNA 추출을 위하여 가열 시간을 다르게 하였을 때 4종 식중독균 검출 결과를 비교하였다 (Table 2). 10분간 가열을 통해서는 2가지로 구분한 저농도와 고농도에서 모두 검출되지 않았으며, 20분 가열에서는 4종균 모두 고농도로 초기 접종한 배양액에서만 유전자 증폭 결과 검출되었고 검출 Ct값은 20.4-30.2 범위를 나타내었다. 30분 가열에서는 4종 식중독균이 저농도와 고농도에서 모두 검출되었으며, 60분 가열에서는 고농도의 Ct값(15.6-24.9)이 30분 가열(17.7-26.0)과 비교하였을 때 낮은 경향을 나타내어 검출 효율이 높아진 것을 확인할 수 있었다. 같은 방법으로 균주를 접종하지 않고 배양한 퇴비를 60분간 가열하였을 때는 4종 식중독균 모두 검출되지 않았다(data not shown).

미생물 배양액의 DNA 추출을 위한 가열 처리 방법은 그 방법이 쉽고 간편하며 비용대비 높은 효율을 나타내므로 널리 사용되고 있다. 부유물이 많이 존재하지 않는 미생물 배양액의 경우 일반적으로 5-10분 가열로 세포의 lysis를 통하여 DNA를 추출할 수 있으나, 퇴비 배양액의 경우 다양한 유기물과 무기물의 혼합물로 배양액의 탁도가 높아 30분 가열을 통해서 증폭 가능한 DNA 농도를 추출할 수 있었다. Elizaquivel과 Aznar의 연구에서도 혼합 배양액에서 가열 처리를 통한 DNA 추출은 그 효율이 낮다고 보고하였다¹⁴⁾.

유기용매와 흡착제 첨가에 따른 DNA 추출 효율 비교

미생물 배양액을 30분 가열 처리한 후 잔존하는 유기물의 제거를 위하여 chloroform과 C₁₈ 분말을 첨가하고 DNA 추출 효율을 비교하였다(Fig. 1). 4종 식중독균 모두 30분 가열 처리, 30분 가열 처리 후 chloroform 첨가 그리고 30분 가열 처리 후 chloroform과 C₁₈ 모두 첨가한 3가지 실험 결과에서 DNA 검출의 차이를 나타내지 않았다.

Chloroform은 유기용매로 물과 잘 섞이지 않고 핵산 추

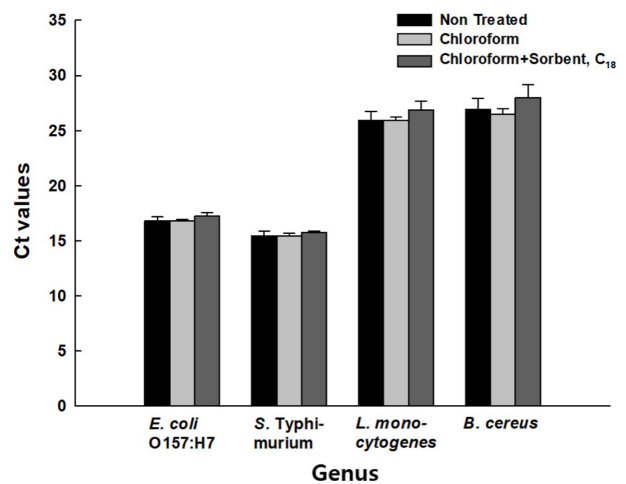


Fig. 1. Comparison of real-time PCR detection of 4 species foodborne pathogens treated with chloroform and C₁₈ powder in livestock manure composts. Mean Ct ± SD values are not significantly different ($P > 0.05$).

출 과정에서 유기물의 제거를 위하여 첨가하여 사용되고 있다. 본 연구에서도 퇴비 배양액에 잔존하는 유기물의 제거를 통하여 유전자 검출 효율을 높일 수 있는지 알아보았으나, 30분 가열 처리한 미생물 배양액의 경우 그 효과는 미미한 것으로 나타났다.

효소 처리에 따른 DNA 추출 효율 비교

Proteinase K가 포함된 DNA 추출 키트를 사용하여 저농도와 고농도의 2가지로 구분한 퇴비 배양액에서 DNA 추출을 수행하고 real-time PCR로 분석하였을 때 미생물별 검출 결과를 Table 3에 나타내었다. 퇴비 배양액에 proteinase K를 처리하면 효과적으로 DNA를 추출하여 유전자 증폭을 통해 미생물 검출이 가능하였으며 저농도 초기 접종 배양액보다 고농도 배양액의 Ct값이 낮게 나타나므로 접종량에 따라 배양 이후 존재하는 미생물 수준의 차이에 기인하는 것으로 판단할 수 있다. 하지만 *B. cereus*

Table 3. Comparison of real-time PCR detection of 4 species foodborne pathogens treated with proteinase K in livestock manure composts

Genus	Low ¹⁾	High ²⁾
<i>E. coli</i> O157:H7	21.2±0.65	17.3±0.55
<i>S. Typhimurium</i>	21.3±0.61	16.5±0.60
<i>L. monocytogenes</i>	33.1±0.78	24.9±0.91
<i>B. cereus</i>	26.7±0.60	26.8±0.95

¹⁾Low inoculum level, 10² CFU/g

²⁾High inoculum level, 10⁵ CFU/g

의 경우 저농도와 고농도의 Ct값이 유사한 수준으로 나타나 이와 같은 경향을 벗어났으며 Table 2의 가열 처리에서도 초기 접종량에 따라 Ct값은 반비례하지 않으므로 *B. cereus*는 24시간 배양 이후 저농도와 고농도에서 존재하는 미생물량의 차이가 없음을 추측할 수 있다.

Proteinase K를 처리한 것과 가열 처리 하였을 때의 미생물 검출 결과(Table 2)를 비교하면 본 실험에서 그람 음성 세균인 *E. coli* O157:H7과 *S. Typhimurium*의 경우 60분 가열 처리 한 것과 유사한 검출 효율을 나타내었으며, 그람 양성 세균인 *L. monocytogenes*와 *B. cereus*는 30분 가열 처리보다 그 효율이 낮게 나타났다. Wang 등은 소세지에서 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 DNA 추출을 위하여 proteinase K를 처리하는 것은 10분 가열 이후 spin column으로 정제하는 것을 대체 가능하다고 보고한 바 있다¹⁵⁾.

지금까지 퇴비에서 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 분석 방법의 적용을 위하여 가열 처리, 효소, 유기용매 및 흡착제에 의한 DNA 추출 결과를 비교하였다. 그 결과 30분 가열 처리와 proteinase K 효소 처리를 통하여 퇴비 배양액에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 사용한 식중독균의 검출이 가능한 것으로 판단되었다. 향후 이러한 연구결과는 농산물의 안전성 확보를 위하여 농업자재로 사용되는 퇴비, 가축분퇴비 등의 식중독균 분석에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구에서는 가축분퇴비에 존재할 수 있는 식중독균의 검출을 위하여 기존의 배양을 이용한 방법을 대체할 수 있는 real-time PCR을 적용하고자 하였으며, 이에 따라 유전자 증폭에 영향을 미치는 DNA 추출 방법에 따른 식중독균 검출 효율을 비교하였다. 적용한 방법은 가열 처리, 유기용매 및 흡착제 처리, 효소 처리의 3가지로 구분할 수 있으며, 각 방법에 따른 DNA의 검출 효율을 실험 결과로 나타내었다. 가열 처리 방법에서는 가열 시간의 증

가에 따라 DNA 검출 효율이 높아지는 경향을 나타냈으며, 유기용매 및 흡착제는 효과를 나타내지 않았고, 효소 처리의 경우에는 그람 양성균 보다는 그람 음성균의 DNA가 추출 효율이 더 높은 것으로 나타났다. 결론적으로 퇴비에서 30분 이상의 가열 처리와 효소의 처리를 통한 DNA 추출 방법은 real-time PCR을 적용한 식중독균 검출에 적합한 것으로 판단된다.

References

- Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables. CXC 53-2003. Codex alimentarius, Rome, Italy (2017).
- Korean Establishment of the legal standards and the designation of fertilizers. Rural Development Administration, Wanju, Korea (2019).
- Korean Fertilizer Control Act. Minister of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea (2019).
- Kang, C.Y., Park, H.T., Seo, D.S., Kang, S.P., 2014, Development strategy for the byproduct fertilizer industry. R720-2. Korea Rural Economic Institute, Naju, Korea.
- Jung, K.S., Heu, S.G., Roh, E.J., Lee, D.H., Yun, J.C., Kim, K.H., Prevalence of pathogenic bacteria in livestock manure compost and organic fertilizer. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, **44**, 824-829 (2011).
- Lee, T., Kim, S.R., Han, S.H., 2009, Infection status of hazardous microbes in vegetables and analyze their infection route. Rural Development Administration, Wanju, Korea.
- Korean Examination of the quality of fertilizer and sampling standard. Rural Development Administration, Wanju, Korea (2019).
- Kim, H.J., Kim, Y.S., Chung, M.S., Oh, D.H., Bahk, G.J., Chun, H.S., Ha, S.D., Trends in rapid detection methods for food-borne pathogenic microorganisms by using new technologies. *J. Food Hyg. Safety*, **25**, 376-387 (2010).
- Koo, E.J., Kim, D.H., Oh, S.W., Comparison of DNA isolation methods for detection of foodborne pathogens by real-time PCR from foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **48**, 335-340 (2016).
- Mafra, I., Silva, S.A., Moreira, E., Silva, C., Beatriz, M., Oliveira, P.P., Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*, **19**, 1183-1190 (2008).
- Pinto, A.D., Forte, V.T., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena, F.P., Tantiello, G., A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*, **18**, 76-80 (2007).
- Cullen, D.W., Hirsch, P.R., Simple and rapid method for direct extraction of microbial dna from soil for per. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 983-993 (1998).
- Yun, B.H., Jang, Y.J., Kim, Y.R., Kim, H.Y., Kim, W.I., Han, S.H., Kim, S.R., Ryu, J.G., Kim, H.J., Virulence profile and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from flies captured from agricultural environment. *J. Food Hyg. Safety*, **32**, 147-153 (2017).

14. Elizaquivel, P., Aznar, R., Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh minimally processed vegetables. *J. Food Prot.*, **71**, 2110-2114 (2008).
15. Wang, X., Jothikumar, N., Griffiths, M.W., Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.*, **67**, 189-192 (2004).