선택배지를 활용한 전통적 식중독세균 분리 기법

Detection and Isolation of Foodborne Bacteria using Conventional Culture Media

김용수[1] · 하상도*

Yong-Soo Kim[1], Sang-Do Ha*

한국보건산업진흥원[1], 중앙대학교*

Korea Industry Health Development Institute[1]

Department of Food Science & Technology, Chung-Ang University*

1. 서 론

식품의 안전성을 위협하는 요인들로는 미생물학적인 것, 화학적인 것, 물리적인 것으로 분류할 수 있다. 이들 요인들 중 미생물학적 요인이 대부분을 차지하고 있으며, 특히 식중독의 원인이 되는 다양한 병원성 세균들에 의한 영향이 가장 크다고 할 수 있다. 식품산업현장에서는 병원성 미생물로부터 식품의 안전성을 확보하기 위하여 HACCP 등을 도입하여 이들에 의해 야기될 수 있는 악영향을 미연에 방지하기 위한 노력을 지속적으로 하고 있다. 한편으로 식중독세균에 대한 검출 기술의 수준이 눈부시게 발전하고 있는 것도 사실이다. 이러한 경향을 반영하기라도 하 듯 병원성 세균 검출과 관련된 최근 연구경향을 분석한 연구결과[1] 미생물 검출에 가장 관심을 가지고 있는 분야가 식품산업분야이며, 가장 관심을 가지는 검출대상 미생물로는 *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. 순으로 나타났다. 식중독세균을 검출하는 기법과 관련된 문헌발표 경향도 PCR 등을 이용한 분자생물학적 방법을 선두로 생화학적 특성을 이용한 전통적인 분석방법, ELISA 등을 면역학적 방법 외에 바이오센서, 전기영동 기법을 이용하는 등 다양하게 전개되고 있다. 신속 · 간편 · 편리한 검출기법의 개발이 급속하게 증가하고 있는 반면 생화학적 특성을 활용한 전통적인 검출방법 개발에 대한 연구는 점차 줄어들고 있다. 그러나 선택배지를 사용한 전통적인 검출방법은 현재까지 국제적으로 식품의 미생물 기준을 규정하는 정해진 분석방법이며, 국제표준기구(AOAC, CEN, AFNOR, DIN 등)에서도 식중독세균 검출을 위한 표준시험방법(Gold standard)으로 채택되어 있다[2-8].

국제적으로 통용되는 표준시험방법들은 일부 정량적 분석이 필요한 식중독세균의 경우를 제외하고는 증균(Enrichment), 선택(Selection), 확인(Confirmation)의 기본적인 3단계 절차로 구성되어있다. 식품으로부터 식중독세균을 검출하기 위해서는 시료채취계획(Sampling plan)을 제외하고 중요한 것이 식품의 제조가공 및 주위환경으로부터 다양한 종류의 스트레스를 받은 식중독세균을 소실 없이 검출할 수 있는 증균(Enrichment)배양하는 방법과 분리능력이 우수한 선택배지를

*Corresponding author : Sang-Do Ha
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Daeduk-myun, Ansung-si, Gyunggi-do 456-756, Korea
Tel: +82-31-670-4831 / Fax: +82-31-675-4853
E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

사용하는 것이다[9, 10]. 이러한 조건에 만족할 수 있는 증균 및 선택배지 개발을 위하여 수많은 연구자들의 노력이 있었으며[11-15], 지금도 검출대상 식중독세균의 생화학적 특성을 감안한 검출방법 및 배지개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 특히, 1990년 이후 식중독세균 검출방법에 fluorogenic 또는 chromogenic 기질을 함유한 배지를 개발하여 적용한 연구들이 진행되었고[16-24], 이중 많은 배지들이 상업화되어 현재 판매되고 있다. 이들 선택배지들이 각광을 받고 있는 이유는 기존 분석방법의 틀 안으로 도입이 용이하고 이전에 사용된 선택배지들 보다 높은 성능을 보유하고 있기 때문이다. 또한 일부 배지들의 경우 국제적인 표준시험방법들에서 식중독세균 분리용 선택배지로서 사용을 권고되거나 지정되고 있다. 본고에서는 식중독을 유발하는 세균 중 *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7 및 *Listeria monocytogenes*에 대하여 국내외에서 통용되는 검출방법 중 국내 식품공전, ISO와 FDA의 방법을 중심으로 전통적인 식중독균 분리기법에 대한 설명을 하고자 한다.

2. 본 론

가. *Salmonella* sp.

Salmonella sp.를 식품으로부터 분리 또는 검출하기 위하여 사용되는 국내 식품공전, ISO 및 FDA에서 사용되는 방법을 간략히 도식화하여 그림 1에 나타내었다. *Salmonella* sp. 검출방법에는 2단계의 증균과정 중 비선택성 증균과정이 포함되어 있는 것이 가장 큰 특징이라 할 수 있다.

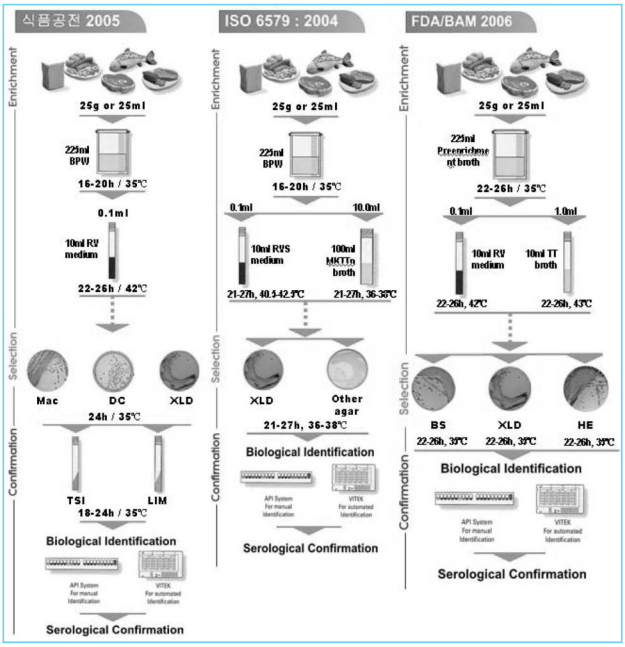

그림 1. 식품으로부터 *Salmonella* sp. 검출방법.

식중독세균 검출에서 증균과정을 비선택적 증균배양과 선택적 증균배양으로 구분하여 적용할 수 있는데 일반적으로 식품의 제조공정에서 가열 혹은 냉동 등의 검출대상 식중독세균의 손상을 야기할 수 있는 절차의 포함 여부에 따라 결정되어 진다. 공인된 *Salmonella* sp. 검출방법의 각 단계별로 사용되는 증균과 선택배지들을 표 1에 나타내었다. 눈여겨 볼 부분은 국내 식품공전을 제외하고는 살모넬라 검출을 위하여 1종 이상의

표 1. *Salmonella* sp. 검출방법의 각 단계별로 사용되는 배지

Method	Culture media		
	Pre-Enrichment Broth	Enrichment Broth	Selective Agar
Food Code	Buffered Peptone water	RV[1] Broth	MacConkey Agar or Deoxycholate Citrate Agar or XLD[2] Agar
ISO 6579:2002	Buffered Peptone water	RVS[3] Broth and MKTTn[4] Broth	XLD Agar and any Other Selective Agar[5]
FDA/BAM	Buffered Peptone water Lactose Broth Trypticase Soy Broth Nutrient Broth	RV Broth and Tetrathionate Broth	Bismuth Sulphite Agar and Hektoen Agar and XLD Agar

[1]RV : Rappaport-Vassiliadis, [2]RVS : Rappaport-Vassiliadis with Soya, [3]MKTTn(Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin),
[4]XLD : Xylose Lysine Deoxycholate, [5]Brilliant green agar, bismuth sulfite agar, etc.

증균배지와 선택배지를 사용하는 것이다. 사용되는 배지의 종류와 수는 식중독균의 검출방법에 있어서 inclusivity와 exclusivity를 고려하여 결정될 수 있다.[9] 이러한 결정은 검출하고자 하는 균의 분리 또는 표준균주를 사용하여 다양한 검증을 통하여 이루어질 수 있다. 포함시켜야 할 균주와 제외해야 될 균주의 범위에 의해 사용되는 배지의 종류와 수는 자연스럽게 결정되는 것이다. 물론 인체에 유해한 영향을 미치는 식중독세균을 모두 포함하여야 하지만 현실적으로는 불가능한 경우가 대부분이다.

Salmonella sp.의 비선택적 증균배양에 사용되는 buffered peptone water는 높은 pH 완충능력을 가지고 있어 가장 많이 선호되는 배지이다. 하지만, *Salmonella* sp. 이외의 다른 균의 생육정도가 높다는 단점을 가지고 있어 brilliant green, crystal violet 또는 malachite green등의 선택인자(Selective agents)를 첨가하여 사용하기도 한다[14]. FDA의 bacteriological analytical method(BAM)에서는 buffered peptone water을 포함한 비선택성 증균배지를 검출대상 식품의 종류에 따라 개별적으로 다양하게 적용하고 있다.

식품으로부터 *Salmonella* sp.의 검출에 있어서 시료채취를 제외하고 가장 크게 영향을 주는 것은 선택적 증균배양(표 2)이며, 배지의 종류, 배양 시간과 온도가 분리의 중요한 핵심요소이다.[9, 14] 일반적으로 사용되는 선택적 증균배양용 배지로 초기에는 sodium biselenite가 함유된 배지를 사용하였으나 성분이 가진 독성으로 인해 최근에는 공인된 검출방법은 Rappaport-Vassiliadis broth, Muller-Kauffmann tetrathionate broth 등의 증균배지 사용을 채택하고 있다. 국내 식품공전에서도 Selenite F broth에서 RV broth로 선택적 증균배지로 개정된 것과 ISO 65795)의 2004년 버전에서도 기존에 사용된 Selenite cysteine broth 대신 Muller-Kauffmann tetrathionate broth으로 변경된 것을 들 수 있다. *Salmonella* sp.의 선택적 증균배양에서 가장 많이 사용되는 RV broth는 *Salmonella* sp.가 다른 장내세균과의 세균들에 비해 비교적 높은 삼투압 조건과 산성조건에서 생육이 가능하고, malachite green에 대한 내성이 높으며, 생육에 요구되는 영양조건이 장내세균에 비해 비교적 낮은 특성을 최대한 활용한 선택적 증균배지라 할 수 있다. RV 배지가 *Salmonella* sp. 증균배지로서 가장 적절한 조건을 가지고는 있으나 *S. typhi*의 생육을 억제하고, 배지를 제조하여 보관시 pH가 떨어지는 현상 등의 단점을 가지고 있다[14]. 이러한 RV broth의 단점 보완하고 $MgCl_2$ 함량을 최적화하고 soya peptone으로 대체한 RVS broth가 개발되었으나 여전히 S. typhi에 대한 검출이 숙제로 남아 있다. RV나 RVS broth 모두 접종비율에 매우 민감하여 일반적으로 1:100으로 접종하도록 요구되고 있다.[5, 8] 이는 *Salmonella* sp.와 다른 장내세균과의 배양초기부터 경쟁을 유도시켜 *Salmonella* sp.의 점유비율을 높이기 위함이다. 또한 배양온도를 42℃의 고온에서 증균하는 것 또한 경쟁구도에 있는 장내세균에 비해 우월한 점유율을 확보하기 위한 방법이다.[9, 14]

표 2. *Salmonella* sp. 검출에 사용되는 선택적 증균배지

Selective Enrichment Broth	Advantage	Disadvantage
Selenite F Broth	· Will grow a wide range of serovars including *S. typhi*	· Not very selective
Selenite Cysteine Broth	· Cysteine enhances *Salmonella* growth. · Inoculum to enrichment broth ratio not critical	· Not very selective
Tetrathioate Broth(USP)	· Use instead of Muller-Kauffmann tetrathionate broth for *S. typhi*	
Muller-Kauffmann tetrathionate Broth	· Improved selectivity. Inoculum to enrichment broth ratio not criticla	· Inhibitory to *S.typhi, S. pullorum* and *S. gallinarum*
Rappaport-Vassiliadis (RV) Broth	· Superior productivity to selenite and tetrathionate broths for most serovars	· Inhibitory to *S. typhi*, and some other serovars · Inoculum to enrichment broth ratio critical · pH of broth may fall on storage
Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) Broth	· More productive than RV broth. · pH of medium does not reduce on storage	· Inhibitory to *S. typhi*, and some other serovars · Inoculum to enrichment broth ratio critical

표 3. *Salmonella* sp. 검출에 사용되는 선택배지

Selective Agar	Selective Agent	Identificaion System	Colony form
MacConkey Agar	Na[1]-desoxycholate Na-citrate	Lactose fermentation	Colorless, translucent colony
Desoxycholate Citrate Agar	Na-desoxycholate Na-citrate Na-thiosulfate	Lactose fermentation Hydrogen sulfide(H_2S) production	Colorless/pale-pink colony with a black/gray center
SS[2] Agar	Brilliant green Bile salts	Lactose fermentation H_2S production	Colorelss, translucent colony with a black center
Hektoen Entric Agar	Bile salts (Novobiocin-optinal)	Lactose, sucrose & salicin fermentation H_2S production	Blue-green colony with a black center
XLD[3] Agar	Na-desoxycholate Brilliant green (XLBG Agar)	Lactose, sucrose & salicin fermentation H_2S production Lysine decarboxylation	Red, translucent colony with a black center
Brilliant Green Agar	Brilliant green	Lactose & sucrose fermentation	Red, pink-white opaque colony
MLCB[4] Agar	Brilliant green Crystal Violet	Mannitol fermentation H_2S production Lysine decarboxylation	Purple-black/Mauve-grey colony with a black center
Bismuth Sulfite Agar	Bismuth sulfite Brilliant green	Metallic luster formation H_2S production	Black colony with brown/black zone & metalic sheen

1) Na : Sodium, 2) SS : Salmonella-Shigella, 3) XLD : Xylose Lysine Deoxycholate, 4) MLCB : Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar.

증균배양 과정은 *Salmonella* 균의 분포가 높을 경우에는 이후 검출과정에서 별다른 어려움이 없지만, 만약 증균과정에서 *Salmonella* sp.의 분포가 낮을 경우에는 선택배지를 활용한 분리가 무엇보다 중요한 역할을 수행할 수 밖에 없다.[14] *Salmonella* sp. 분리에 사용되는 선택배지는 표 2에서 보는 것과 같이 선택인자들에 따라 *Salmonella* sp. 분리용 배지를 크게 Bile salt agar, Brilliant green agar와 Bismuth sulfite agar의 3가지 계열로 나눌 수 있다. 다양한 *Salmonella* sp. 선택배지들 중 공인된 시험방법에서 공통적으로 포함되어 있는 선택배지가 Xylose lysine deoxycholate(XLD) 한천배지인데, 원래 이 배지는 *Shigella* sp.를 분리하기 위하여 개발된 배지였으나, 현재에는 *Salmonella* sp. 검출을 위하여 많이 사용되고 있다. 대부분의 선택성 한천배지는 표 3에서 보는 것과 같이 탄소원으로 첨가되는 Lactose의 분해능과 hydrogen sulfite(H_2S) 생성능을 주요 감별요소로 제조된 것이다.[9, 14, 17, 19] 하지만 이들 전통적으

표 4. 살모넬라 검출에 사용되는 Chromogenic 한천배지

Bland Name	Company	Identification System	Colony form
Rambach agar	CHROMagar/ Merck/Heipha	Propylene glycol & X-Gal[1]	Red
AES Salmonella agar plate(ASAP)	AES	Unknown Chromogenic Substance(UCS) & X-Gal	Magenta-red
SM ID2 Medium	Biomérieux	X-Gal & X-Glu[2]	Pink to mauve
CHROMagar® Salmonella Agar(CSA)	CHROMagar	USC & X-Gal	Mauve
Oxoid Salmonella Chromogen Agar(OSCM)	Oxoid	Magenta-cap[3] & X-Gal	Pink to purple
BBL™ CHROMagar™ Salmonella	BD	USC	Pink to mauve
Harlequin™ Salmonella ABC	Lab M	X-α-Gal[4] & CHE-Gal[5]	Blue-green
Rainbow® Salmonella Agar	Biolog	USC & X-Gal	Black
R&F Salmonella Agar	R&F Laboratories	X-Gal & 2-Deoxy-D-ribose	Pink to mauve

[1]X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoly-galactoside, [2]X-Glu : 5-bromo-4-chloro-3-indoly-glucuronide, [3]Magenta-cap : 5-bromo-6-chloro-3-indoly-caprylate, [4]X-α-Gal : 5-bromo-6-chloro-3-indoly-α-D-galactopyranoside, [5]CHE-Gal : 3,4-cyclohexenoesculetin-β-D-glactoside.

로 사용되어온 분리배지로는 Lactose를 분해하는 *S. arizona*와 H_2S를 생성하지 않는 *Salmonella* sp.를 포함한 모든 *Salmonella* sp.를 분리할 수 없다. 따라서 공인된 검출방법으로 시험을 수행할 경우 선택배지에서 전형적인 집락을 우선 선별하고 만약 전형적인 집락이 없을 경우 비 전형적인 집락까지도 검출하여야 하며, *Salmonella* sp.와 유사하게 감별되는 *Citrobacter* sp.와 *Proteus* sp.에 대한 부분도 *Salmonella* sp.의 검출에서는 고려되어야 한다.[14, 19]

이러한 기존에 사용되던 배지들의 낮은 선택성을 해결하기 위하여 1990년 이후부터 chromogenic 기질을 사용한 선택배지들에 대한 연구들이 진행되었으며[17, 19, 24], 표 4에서 보는 것과 같이 많은 종류의 chromogenic 배지들이 상업화되어 판매되고 있다. chromogenic 기질을 함유한 배지는 개발단계로 구분하여 1세대와 2세대로 그게 대별할 수 있는데 주로 1세대 배지는 *Salmonella* sp.의 특이효소에 반응하는 하나의 chromogenic 기질을 함유시켜 배지의 sensitivity를 강조한 데 비해, 2세대 chromogenic 한천배지에는 2개 이상의 기질을 함유되어 *Salmonella* sp. 이외의 분리에 어려움을 주는 경쟁관계에 있는 장내세균들과의 감별을 더욱 용이하게 할 수 있도록 배지의 specificity를 향상시켰다.

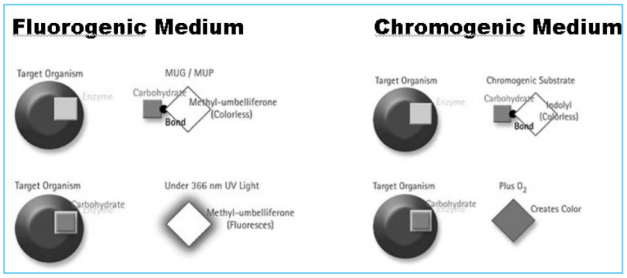

그림 2. Chromogenic과 fluorogenic 기질의 작용기작.

이들 배지에 사용되는 chromogenic과 fluorogenic 기질들은 그 특성에 따라 다양한 선택배지에 이용될 수 있다.[21, 22] Coumarin 유도체인 fluorogenic 기질의 경우 수용성으로 가격과 감도 면에서 많은 장점을 가지고 있으나, 한천배지에 사용할 경우 너무 확산되어 감별을 어렵게 만들고, 배지의 pH에 영향을 받는 등의 단점을 가지고 있어 주로 액상배지에 많이 사용되고 있다. 비수용성인 Chromogenic 기질은 열에 매우 안정하여 한천배지에 사용할 수 있으나 가격이 높고, 산소의존성이라는 단점을 가지고 있다.[21, 22] 이들 기질들은 검출하고자 하는 균이 생산하는 특정효소에 작용하도록 고안되어 있는데, 기본적인 배지에서의 작용기작은 그림 2에서 보는 것과 같이 chromogenic과 fluorogenic 기질에 결합된 특정 carbohydrate가 효소에 의해 분리됨에 따라 육안 혹은 UV(365㎚)상에서 관찰될 수 있는 특성을 가지고 있다. 현재 상업적으로 사용되는 chromogenic과 fluorogenic 기질은 표 5와 같다.

나. *Escherichia coli* O157:H7

식품으로부터 *E. coli* O157:H7를 검출하는 가장 핵심적인 사항은 일반 *E. coli*와 구분하여 혈청형만 다른 이들 균들을 분리하는 것이라 할 수 있다[9]. 바꾸어 말하면 *E. coli* O157:H7검출에 가장 방해가 되는 요소가 전형적인 *E. coli*의 간섭이라 할 수 있다. *E. coli* O157:H7를 전형적인 *E. coli*와 구분하여 분리할 수 있는 차이점은 24시간 이내에 Sorbitol과 Rhamnose를 분해하지 않으며, 42℃ 이상에서는 생육이 미약하거나 할 수 없다는 것과 β-glucuronidase 활성이 없다는 것이다.[9, 25, 26] 그림 3과 같이 공인된 분석방법들이 이러한 *E. coli* O157:H7의 특성을 이용하고 있으며, 이들 분석방법에 사용되는 증균과 선택배지들은 다음 표 6과 같다.

표 5. 상업적으로 사용되는 chromogenic과 fluorogenic 기질

Chromogenic Substances	Fluorogenic Substance
5-bromo-4-chloro-3-indoly-(X) 3-indoxy-(Y™) 6-chloro-3-indoly-(Salmon™) 5-bromo-6-chloro-3-indoly-(Magenta™) 5-bromo-3-indoly-(Lapis™) N-Methylindoxyl-(Green™) 2-Nitrophenyl-(ONP)	4-methylumbelliferone(4-MU) 7-amido-4-methylcoumarin(7-AMC) 4-trifluoromethylumbelliferone(4-TMU)

표 6. *E. coli* O157:H7 검출방법에 사용되는 증균과 선택배지

Method	Culture media	
	Enrichment Broth	Selective Agar
Food Code	mEC with novobiocin	SMAC[1]
ISO 16654:2001	mTSB[2] with novobiocin	CT-SMAC[3] and other selective agar
FDA/BAM	EEB[4]	CT-SMAC

[1]SMAC : Sorbitol MacConkey Agar, [2]mTSB : modified Tryptic Soy Broth, [3]MCT-SMAC : Sorbitol MacConkey Agar with Cefixime and Tellurite, [4]EEB : EHEC Enrichment Broth(vancomycin, cefsulodin and cefixime)

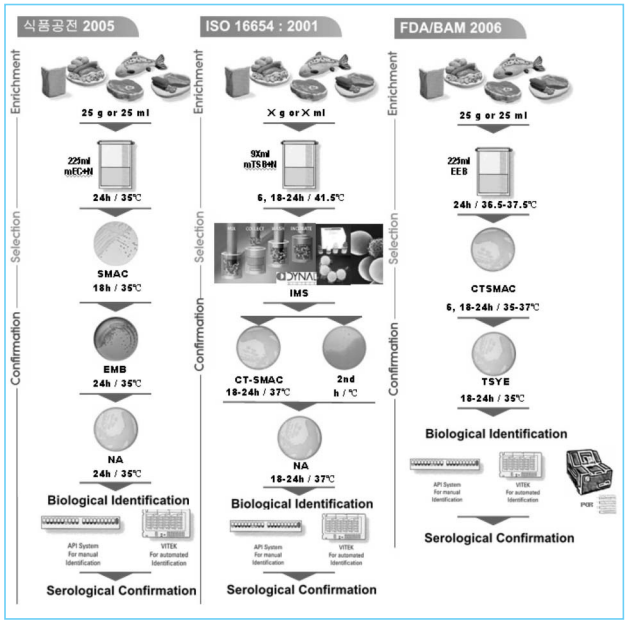

그림 3. 식품으로부터 *Escherichia coli* O157:H7 검출방법.

E. coli O157:H7의 증균은 일반세균 또는 *E. coli*의 증균에 사용되는 EC(*E. coli*) broth와 tryptic soy broth에 novobiocin, vancomycin, cefsulodin과 cefixime 등의 선택인자를 첨가한 변형된 증균배지를 주로 사용한다. 사용되는 증균배지들의 성능에 대한 비교연구자료에 따르면 분리균주를 사용한 일부 연구에서 mEC(modified EC) 배지가 mTSB(modified TSB)에 비해 다소 높은 생산성을 나타내었고, EEB(EHEC Enrichment Broth)에 함유된 선택인자가 *E. coli* O157을 억제하는 것으로 보고 되고 있다.[27] ISO 검출방법과 같이 IMS를 사용한 방법이 가장 효과적인 방법으로 알려져 있기도 하다.[27, 28] 열이나 냉동 쇼크를 받은 *E. coli* O157:H7의 분리에는 증균배양이 필수적으로 포함되어야 한다.[9, 10] *E. coli* O157:H7의 증균배양에 있어서 중요한 부분은 먼저 *E. coli* O157:H7의 생균수를 높이는 부분으로 FDA 방법 중 진탕배양과 시간대별 증균배양을 들 수 있다. 이러한 과정을 거치는 가장 큰 이유가 *E. coli* O157:H7와 일반 *E. coli*의 증균배양액에서의 비율이 검출제한선인 1:1000이상[29]에서 검출하기 위한 의도로 해석될 수 있다. ISO 검출방법[6]에서 IMS를 사용하는 것도 이와 같은 문제점을 해결하기 위한 것이다. *E. coli* O157:H7의 분리를 위하여 그동안 가장 보편적으로 사용된 배지가 *E. coli* O157:H7의 sorbitol 분해능이 없는 특성을 이용한 Sorbitol MacConkey(SMAC) 한천배지로 *E. coli* O157:H7는 이 배지 상에서 무색의 집락을 형성한다. 그러나 SMAC는 *Proteus* sp., *Aeromonas* sp.와 일부 sorbiol 비분해성 *E. coli*가 무색의 집락을 형성함에 따라 확인시험에 소요되는 인력과 비용을 증가시킬 수 있는 단점을 가지고 있다. 따라서 sorbitol 비분해성 *E. coli*가 분해할 수 있는 Rhamnose와 cefixime을 첨가한 CR-SMAC[11] 등 그동안 SMAC의 선택성을 증가시키기 위하여 많은 연구가 진행되었다. 현재까지 *E. coli* O157:H7를 분리하는데 가장 많이 사용되는 선택배지는 cefixime과 tellurite를 첨가한 CT-SMAC[22]이다. 이 배지에 첨가된 cefixime은 낮은 농도에서

표 7. *E. coli* O157:H7 검출방법에 사용되는 선택배지

Selective medium	Selective agents	Identification system	Colony form
SMAC Agar	Bile salt & Crystal violet	Sorbitol fermentation	Colorless colony
CT-SMAC Agar	Bile salt & Crystal violet Cefixime & tellurite	Sorbitol fermentation	Colorless colony

표 8. *E. coli* O157:H7 검출에 사용되는 Chromogenic 한천배지

Bland Name	Company	Chromogenic & Fluorogenic Substances	Colony colour
BCM® *E. coli* O157:H7(+)	Biosynth	Unknown Chromogenic Substance(UCS)	Blue-black
R&F *E. coli* O157:H Agar	R&F Laboratories	X-Gal[1] & Y[2]-Gal	Blue-black
Flurocult® *E.coli* O157:H7 Agar	Merck	MUG[3]	Greenish
Flurocult® HC Agar after SZABO	Merck	MUG	Greenish
O157 ID Medium	Biomérieux	UCS	Blue-green
BBL™ CHROMagarTM O157	BD	UCS	Mauve
CHROMagar® O157	CHROMagar	UCS	Mauve
Harlequin™ SMAC-BCIG	Harlequin	BCIG[4]	Colorless
Oxoid Sorbitol MacConkey Agar with BCIG	Oxoid	BCIG	Colorless
Rainbow® agar O157	Biolog	UCS	Black

[1]X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoly-galactoside, [2]Y : 3-indoxyl, [3]MUG : 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronic acid, [4]BCIG : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

Proteus spp.를 억제하고, tellurite는 *E. coli* O157:H7보다 전형적인 *E. coli*의 생육을 저해할 수 있어 SMAC에 비해 높은 선택성을 가질 수 있다.[27] 한편으로 대부분의 *E. coli* O157:H7가 β-glucuronidase 활성이 없다는 특성을 활용하여 fluorogenic 기질인 MUG(4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronic acid)와 chromogenic 기질인 BCIG(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)를 첨가한 선택배지들도 상업화되어 판매되고 있다.

최근 chromogenic 기질을 이용한 *E. coli* O157:H7 분리용 선택배지들(표 8)이 많은 연구에서 기존의 선택배지와 동등하거나 높은 성능을 가지고 있음이 밝혀지고 있고[11, 15, 22] FDA/BAM에서는 일부 chromogenic 한천배지의 사용을 권고하고 있다. 표 8에서 보는 것과 같이 이들 배지에 사용된 chromogenic 기질의 종류는 제조회사 권익차원에서 공개되어 있지 않다. 그러나 이들 배지에서 육안으로 관찰할 수 있는 다양한 집락의 형태는 배지에 포함된 chromogenic 기질, carbohydrate와 pH indicator의 상호작용에 의한 것으로 보이며, 영양성분과 이들 성분들의 함량과 배합비가 배지의 성능을 좌우하는 열쇠로 작용하는 것으로 알려져 있다.

다. *Listeria monocytogenes*

국제적으로 통용되는 *Listeria monocytogenes*의 검출방법 개발의 원류는 USDA-FSIS(US Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service)와 FDA에서 개발된 방법을 따르고 있다. USDA-FSIS의 검출방법은 육류나 가금류에서의 *L. monocytogenes*의 검출방법이고, 그 외 가공식품 등은 FDA의 검출방법을 적용하고 있다. 국내 식품공전도 이들 두 개의 방법을 분석대상 식품군에 따라 다르게 적용하고 있다(그림 4).

L. monocytogenes 검출방법의 특징은 먼저 2단계의 선택적 증균배양을 유도하고 esculin이 함유된 선택배지를 사용하는 방법을 택하고 있다는 것이다. *L. monocytogenes* 검출에

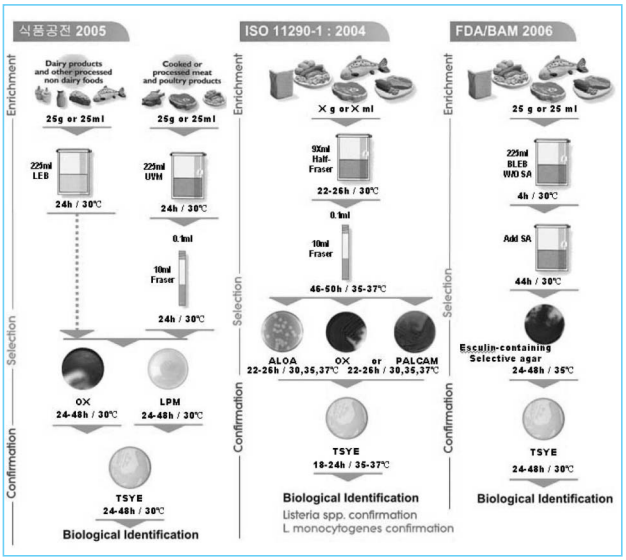

그림 4. 식품으로부터 *Listeria monocytogenes* 검출방법.

표 9. *Listeria monocytogenes* 검출방법 별 각 단계에서 사용되는 배지

Method	Culture media		
	1'st Enrichment Broth	2'nd Enrichment Broth	Selective Agar
Food Code	LEB[1]	-	Oxford Agar or LPM[3] Agar
	UVM[2]	Fraser	
ISO 16654:2001	Half-Fraser	Fraser	ALOA[4] and Oxford Agar or PALCAM[5] Agar
FDA/BAM	BLEB[6] without Selective agents	*Add Selective agents*	Esculin containing Selective Agar

[1]LEB : Listeria Enrichment Broth, [2]UVM : Univesity of Vermont Madium, [3]LPM : Lithium chloride-Phenylethanol-Moxalactam, [4]ALOA : Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti, [5]PALCAM : PolymyxinB-Acriflavin-Lithium chloride-Ceftazidine-Aesculin-Mannitol, [6]BLEB : Base Listeria Enrichment Broth.

가장 많이 사용되는 Oxford agar를 비롯한 표 10에서의 선택배지 대부분이 *Listeria* spp.가 생성하는 esculinase에 의해 배지에 함유된 esculin이 escuetin으로 분해되어 ferric ammonium citrate의 ferric iron과 결합하여 집락의 색깔이 녹갈색이 되고 집락 주변에 검은색 환을 형성하는 일명 esculin-ferric iron indicator system에 의한 검출방법이 전통적으로 사용되고 있다.[13, 20, 23]

증균배양을 기초로 한 식품에서의 *L. monocytogenes*의 검출방법에는 몇가지 문제점을 가지고 있다. 먼저 검출에 소요되는 시간이 길다. 예로 ISO의 시험방법의 경우에 식품에 *L. monocytogenes*가 없다는 결과를 얻기 까지 최소한 5일의 시간이 소요되고 양성의 결과가 나와 생화학적 검증까지 수행하다면 이보다 훨씬 많은 시간이 소요된다.[13, 30, 31] 둘째 식품의 가공공정에서 열과 냉동에 의한 치명적인 손상을 입은 *L. monocytogenes*의 검출에는 적용될 수 없다는 것이다.[13, 32] 손상 받은 균들이 식품에서는 생육이 가능해도 증균과정에서는 배지에 포함된 선택인자들에 의해 생존할 수 없다.[31, 32] 세 번째 다양한 식품재료로부터 *L. monocytogenes*의 검출에 적합한 단일 선택배지는 없다는 것이다. 식품의 종류, *Listeria monocytogenes*의 균수와 기타 오염균, *L. monocytogenes*의 상태 등 모든 조건들이 선택배지에 영향을 받는다.[13, 32] 마지막으로 일부 *L. monocytogenes*는 증균과 선택과정에서 매우 민감한 특성을 나타낸다.[32] 리스테리아증(Listeriosis)의 50~70%을 유발하는 혈청형 4b의 경우 *L. monocytogenes*의 검출방법에 사용되는 증균과 분리과정에서 검출될 가능성이 매우 낮다는 것이다. 이러한 문제는 선택배지에 사용되는 선택인자가 *L. monocytogenes* 보다는 경쟁관계에 있는 *Listeria* sp.의 생육을 돕기 인자로 작용하기 때문이

표 10. *Listeria monocytogenes* 검출방법에 사용되는 선택배지

Selective Agar	Advantage	Disadvantage
LPM[1] Agar	• More selective than McBride agar	• Poor inhibition of enterococci and *Bacillus* spp.
MOX[2] Agar	Inhibits enterococci and *Bacillus* spp. Improved inhibition of antibiotic resistant staphylococci	• Slower growth of *Listeria* spp. • Colonies comparatively small
Oxford Agar	• Inhibits enterococci and staphylococci • Presumptive identificaion of *Listeria* spp.	• Not differentiate between esculin positive genera • Some *Listeria* spp. inhibited at 35-37℃ • Lactbacilli may not be inhibited
PALCAM[3] Agar	• Inhibits enterococci and staphylococci • Microaerophilic incubation atmosphere inhibits *Pseudomonas* spp. • Good productivity of *Listeria* spp. • Differential identification system distinguishes *Listeria* spp. and enterococci	• Poor inhibition of *Bacillus* spp. • Comparatively inhibitory to stressed *Listeria* spp.

[1]LPM : Lithium chloride-Phenylethanol-Moxalactam, [2]MOX : modified Oxfordi,
[3]PALCAM : PolymyxinB-Acriflavin-Lithium chloride-Ceftazidine-Aesculin-Mannitol, [6]BLEB : Base Listeria Enrichment Broth

표 11. *Listeria monocytogenes* 검출에 사용되는 Chromogenic 한천배지

Bland Name	Company	Chromogenic Substances	Colony form
ALOA™	AES/Biolife	X-β-D-Glu[1] & L-α-phosphatidyl inositol	Green-blue colony with a opaque halo
CHROMagar® Listeria Agar	CHROMagar	X-β-D-Glu & L-α-phosphatidyl inositol	Blue-turquoise colony with a white precipitate
Oxoid Chromogenic Listeria Agar(OCLA)	Oxoid	X-β-D-Glu & L-α-phosphatidyl inositol	Blue-turquoise colony with a white precipitate
Harlequin® Listeria Agar	Harlequin	CHE-β-D-Glu[2]	Black colony
Rapid'L.mono	Bio-rad	X-IP[3] & Xylose	Blue-turquoise colony Red-brown
BCM® *Listeria monocytogenes* Plating Medium	Biosynth	X-β-D-Glu & X-IP	Blue-turquoise colony with a white precipitate
BBL™ CHROMagar™ Listeria	BD	X-β-D-Glu & L-α-phosphatidyl inositol	Blue-turquoise colony with a white precipitate
R&F *Listeria monocytogenes* detection system	R&F Laboratories	X-β-D-Glu & X-IP	Blue-turquoise colony with a white precipitate
LIMONO-Ident-agar	Heipha	X-β-D-Glu & X-IP	Green-blue colony with a opaque halo

[1]X-β-D-Glu : 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl--β-D-glucopyranoside, [2]CHE-β-D-Glu : Cyclohexeno-esculetin-β-D-glucopyranoside, [3]X-IP : 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-myo-inositol-L-phosphate.

다. 예를 들어 선택배지에 첨가되는 acriflavine의 경우 *L. innocua* 보다는 *L. monocytogenes*의 생육을 저하시켜 최종단계에서 *L. innocua*의 생균수로 인하여 *L. monocytogenes*의 검출율이 현저하게 떨어지게 된다.[33]

이러한 문제점들을 해결하기 위하여 FDA 방법의 경우 초기에 *L. monocytogenes*에 영향을 주지 않도록 선택인자를 첨가하지 않고 증균배양하고, 어느 정도 증균이 이루어진 후 선택인자를 첨가하여 추가적인 증균배양 과정을 수행하도록 하고 있다. 또한 *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*만이 가지고 있는 *plc* A 유전자에 코드된 phosphatidylinositol-specific phospholipase C에 특이하게 반응하는 Chromogenic 기질을 첨가한 선택배지들이 개발되었다(표 11).

특히 ISO 시험방법의 경우 2004년에 수정[7]을 통하여 chromogenic 한천배지에 하나인 ALOA(Agar *Listeria* According to Ottaviani and Agosti) 배지를 사용하도록 하고 있다. 이 배지에는 L-α-phosphatidyl inositol(PI-PLC)과 X-β-D-Glu의 2가지 chromogenic 기질이 포함되어 있는데 *Listeria* spp.는 X-β-D-Glu를 분해할 수 있는 β-D-glucosidase를 생성할 수 있어 푸른색의 집락을 형성하고, phosphatidylinositol-specific phospholipase C를

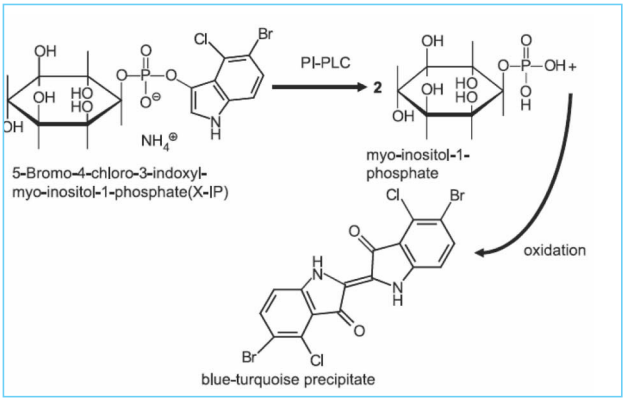

그림 5. X-IP를 사용한 PI-PLC 검출기작.

생성할 수 있는 *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*는 집락 주변의 불투명한 환을 형성함에 따라 구분할 수 있도록 해준다. 이러한 기작(그림 5)을 가진 많은 종류의 배지들이 현재 시판되고 있으나, *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*를 명확하게 구분해 주는 배지는 거의 없다.[13, 18]. Bio-rad사에서 개발한 Rapid 'L.*mono*의 경우에도 xylose(*L. ivanovii*는 이용할 수 있음)를 첨가하여 구분을 할 수 있도록 하고 있으나, xylose 분해에 의한 배지의 착색으로 인해 구분이 모호한 경우가 많이 발생하고 있다. 따라서 정확한 *L. monocytogenes*의 검출을 위해서는 이후 생화학적 검증과 같은 확인시험은 필수적이다.

3. 결론 및 시사점

식품으로부터 식중독세균을 검출하는 대부분의 전통적인 방법들은 검출절차에서 보는 것과 같이 분리하고자 하는 식중독세균에 적합한 선택배지들에 의존할 수 밖에 없다. 이러한 선택배지들은 높은 선택성과 경제성과 정성적인 결과 보다는 정량적인 결과를 나타낼 수 있어야 한다. 하지만 불행하게도 식품산업에서 이들 선택배지를 이용한 검출방법을 적용하기에는 경제성 뿐 만 아니라 소요되는 시간이 항상 걸림돌로 작용하고 있다. 즉, 배지를 제조하고, 배지에서 생육한 집락을 관찰하고 균수를 계수하여야 하며, 분리균의 생화학적 검증을 하는 것은 많은 시간과 인력이 투입되어야 되는 일이다.[9] 또한 전통적인 검출방법의 성공여부는 대상이 되는 식품에서는 검출하고자 하는 식중독세균의 존재여부와 오염수준, 사용하는 선택배지가 검출 대상균과 이와 경쟁하는 균에 대한 억제의 균형을 어떻게 유지하며 어떻게 구분하느냐 하는 배지의 성능과 시간, 온도 및 산소농도 등의 배양조건에 따라 달라질 수 밖에 없는[33] 많은 변수를 내포하고 있다. 전통적인 검출방법이 안고 있는 이러한 단점들을 최소화하기 위하여 IMS 등 면역학적 또는 분자생물학적 기법들을 접목시키고 있고, 증균에서 분리와 확인을 동시에 할 수 있는 package 형태의 제품들이 시판되고 있다. 이러한 제품 중 일부는 AFNOR 등 국제표준기구로부터 인증을 받았고 대부분 chromogenic 기질을 함유한 선택배지들이 package에 포함되어 있을 만큼 국제적으로도 배지가 가진 성능에 대한 인지도가 높다고 할 수 있다. Sensitivity(양성을 양성으로 나타낼 수 있는 배지가 가진 능력) 및 specificity(음성을 음성으로 나타낼 수 있는 배지가 가진 능력)를 강조한 이들 배지의 사용이 주는 장점 중의 하나가 선택배지에서 분리 후 수행해야 될 확인시험에 소요되는 인력, 시간 및 비용을 줄일 수 있다는 것이다. 따라서 전통적인 식중독세균의 검출방법의 개발방향은 확인시험에 소요되는 시간을 줄일 수 있는 specificity가 높은 선택배지의 개발에 집중될 것으로 예측할 수 있다.

식품에서 식중독세균의 검출에 있어서 가장 이상적인 방법은 검출과정이 간단하고 경제적이며 정확하여야 한다는 것이다. 또한 정성적 결과보다는 정량적인 결과가 산출 가능하여야 하고, 덧붙이면 자동화된 방법으로 전환이 가능하여야 한다는 것인데[32], 이러한 이상적인 검출방법은 현재까지 존재하지 않는다. 여러 방법들이 각각의 장점을 갖고 있을 뿐이다. 즉, 현실적 대안은 현재까지 개발된 각각의 방법을 목적과 대상에 따라 시의적절하게 병용 사용하여야 한다는 것이다. 그러나 식중독균 검출을 위한 최선의 방법 개발을 위하여 과학자들은 끊임없는 노력을 경주하여야 할 것이다.

참고 문헌

1. Olivier Lazcka, I., Del Campo, F.J. and Munoz, F.X.: Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosens. Bioelectron. Article in press, correted proof*,(2006)
2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - part 1: Detection method, Amendment 1: Modification of the isolation media and the heamolysis test, and inclusion of precision data, ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004
3. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - part 2: Enumeration, ISO 11290-2:1998
4. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - part 2: Enumeration method, Amendment 1: Modification of the enumeration medium, ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004
5. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., ISO 6579:2002/Cor.1:2004
6. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157, ISO 16654:2001
7. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, Part 1: Detection method, ISO 11290-1:1996
8. Milk and milk products - Detection of *Salmonella* spp. ISO 6785:2001 and IDF 93:2001
9. de Boer, E.: Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods, *Int. J. Food Microbiol.* **45:** 43-53 (1998)
10. Clavero, M.R.S. and Beuchat, L.R., 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freese-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 3268-3273 (1995)
11. Chapman, P.A., Siddous, C.A., Zadik, P.M. and Jewes, L.: An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* **35:** 107-110 (1991)

12. Curtis, G.D.W. and Lee, W.H.: Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes, Int. J. Food Microbiol.* **26:** 1-13 (1995)
13. Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P.M.: Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review, *FEMS Microbiol.* Rev. **29:** 851-875 (2005)
14. Martin, B.: Media for *Salmonella, Int. J. Food Microbiol.* **26:** 117-131 (1995)
15. Stephen D.W. and Andrew J.B.: Evaluation of techniques for enrichment and isolation of Escherichia coli O157:H7 from artificially contaminated sprouts, *Int. J. Food Microbiol.* **71:** 87-92 (2001)
16. Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M. and Sabrowski, A., Curtis, G.D.E. and Holzapfel, W.H.: Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended, *Int. J. Food Microbiol.* **109:** 127-131 (2006)
17. Cooke, V.M., Miles, R.J., Price, R.G and Richardson, A.C.: A novel chromgenic ester agar medium for detection of Salmonellae, Appl. Environ. Microbiol., **65:** 807-812 (1999)
18. Gracieux, P., Roche, S.M., Pardon, P. and Velge, P.: Hypovirulent *Listeria monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid'L.mono media, *Int. J. Food Microbiol.* **83:** 133-145 (2003)
19. Herbert, D. and Martin, A.: Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species, J. Clin. Microbiol. **33:** 802-804 (1995)
20. Leclercq, A.: Atypical colonial morphology and low recoveries of Listeria monocytogenes strains on Oxford, PALCAM, Rapid' L.mono and ALOA solid media, *J. Microbiol. Methods*, **57:** 251-258 (2004)
21. Manafi, M.: New developments in chromogenic and fluorogenic culture media, *Int. J. Food Microbiol.* **60:** 205-218 (2000)
22. Manafi, M. and Kremsmaier, B.: Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Int. J. Food Microbiol.* **71:** 257-262 (2001)
23. Reissbrodt, R.: New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic Listeria spp. - an overview, *Int. J. Food Microbiol.* **95:** 1-9 (2004)
24. Susan, M., Tom, O. and Sharon, C.: Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of *Salmonella* strains form stool samples, *J. Clin. Microbiol.* **40:** 2999-3003 (2002)
25. de Boer, E. and Beumer, R.R.: Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50:** 119-130 (1999)
26. Raghubeer, E.V. and Matches, J.R.: Temperature range for growth of *Escherichia coli* O157:H7 and selected coliforms in E. coli medium. *J. Clin. Microbiol.* **28:** 803-805 (1990)
27. Heuvelink, A.E. and Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., de Boer, E.: Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of Escherichia coli O157 from minced beef. *J. Food Protect.* **60:** 817-824 (1997)
28. Bolton, F.J., Crozier, L. and Williamson, J.K.: Isolation of Escherichia coli O157 from raw meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* **23:** 317-321 (1996)
29. Malihe, R., Noveir, A. and Kadir, H.: A study on selective broths and agar media for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 Serotype, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **24:** 459-464 (2000)
30. Wan, J., King, K., Forsyth, S. and Coventry, M.J.: Detection of *Listeria monocytogenes* in salmon using Probelia polymerase chain reaction system. *J. Food. Prot.* **66:** 436-440 (2003)
31. Donnelly, C. W.: *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutr. Rev.* **59:** 183-194 (2001)
32. Robin L.T.C., Hung L. and Hall, J.C.: Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J. Microbiol. Methods* **64:** 141-170 (2006)
33. Beumer, R.R. and Hazeleger, W.C.: *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. FEMS *Immunol. Med.* Microbiol. **35:** 191-197 (2003)