J. Fd Hyg. Safety 11(4), 315 - 321(1996)

식육중 잔류 항균물질의 검출을 위한 *Bacillus megaterium* 디스크 검사킷트 개발

손성완† · 조병훈 · 진남섭 · 이혜숙 · 육순학* · 김재학 · 이재진 · 이영순**
*농촌진흥청 수의과학연구소, *두산기술원 **서울대학교 수의학과*

Development of *Bacillus megaterium* Disk Assay Kit for the Determination of Antibacterial Residues in Animal Tissues

Seong-Wan Son†, Byung-Hoon Cho, Nam-Seup Jin, Hye-Sook Lee, Soon-Hak Yook*, Jae-Hak Kim, Jae-Jin Lee and Young-Soon Lee**
*National Veterinary Research Institute, Rural Development Administration, *Dusan Technology Institute, **College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

ABSTRACT—Various antimicrobial drug screen tests have been used in order to ensure food safety. However, the conventional screen tests, the Swab Test on Premises(STOP, USA), the Calf Antibiotic and Sulfa Test(CAST, USA) and the European Economic Community 4-plate Test(FPT, EU) are not sufficiently rapid or sensitive enough to detect low levels of sulfa drugs in meat. We developed a new screen test kit for the determination of the antimicrobial residues in meat called the *Bacillus megaterium* Disk Assay(BmDA). A comparison of BmDA with the older screen tests showed BmDA was as good as the older ones with several advantages. The new test kit is faster-it can be read in 4~6 hours instead of 16~18 hours. Moreover, BmDA can discriminate sulfa drugs from other antimicrobial drugs because p-aminobenzoic acid countacts the inhibiting action of sulfa drugs. Minimum detectable levels of sulfa drugs were significantly improved at the level of 0.025~0.1 ppm compared with the level of 1.0 ppm in FPT. A comparison of BmDA with the older screen tests in HPLC confirmed meat samples exeeded the Korean tolerance value of 0.1 ppm showed BmDA was the most sensitive in the microbiological screen tests. As the microbiological screen tests have already known, a person familiar with simple laboratory techniques should have no difficulty in using it to detect antimicrobial residues in meat. This would be a simple, economic method of antimicrobial residues detection which might be succesfully used by many laboratories.

Key words □ Microbial inhibition method, *Bacillus megaterium*, Sulfonamides, Antimicrobial residues, Meat.

축산물내 잔류 항균물질의 검사법은 검사목적에 따라 다양한 방법이 사용되고 있지만, 일반적으로 도축현장에서 사용할 수 있는 간이검사법으로는 미생물의 균발육억제능을 이용한 미생물학적 방법[4-6]과 항원항체반응을 기초로 하여 효소, 형광물질, 방사성 동위원소 등 표지물질을 이용하는 면역학적 방법[1-3] 등이 이용되고 있다. 이들중 어떤 특정항균물질 혹은 특정계열의 항균물질을 검출하기 위해서는 특이성이 높은 면역학적 방법 등[10]이 유리한 반면, 다량의 시료에 대해 광범위한 물질을 동시에 검출하기 위해서는 미생물학적 방법이 효율적이라 할 수 있다.

우리나라에서는 최근 수년간 잔류 항균물질로 인한 식육의 안전성을 확보하기 위한 일환으로 미생물학적 방법의 하나인 EEC 4-plate 법을 지육의 간이검사법으로 사용하여 왔다.[14] 미국이나 카나다 등에서는 1979년 미농무성 산하 식품안전검사국(FSIS/USDA)에서 *B. subtilis*를 이용하여 소 및 닭 등의 신장에서 잔류검사를 수행할 수 있도록 개발한 Swab Test on Premises(STOP), 출하전에 생산자가 혈액이나 오줌을 검사하여 식육중 항균물질의 잔류농도를 예측할 수 있도록 고안된 Live Animal Swab Test(LAST), *B. megaterium*을 이용한 Calf Antibiotic & Sulfa test(CAST)

† Author to whom correspondence should be addressed.

등을 도축장에서 널리 활용해 오고 있다.[4-6,9] 하지만 이들 기존방법들은 검사시간이 16~18시간으로 장시간 소요되므로 잔류검사에 의한 식육의 출고 및 유통지연에 따른 막대한 경제적인 손실이 예상된다.

따라서 본 연구에서는 설파제에 가장 민감한 *B. megaterium* 균주를 이용하여 설파제의 검출감도가 높고 검사소요시간을 단축한 미생물학적 신속검사킷트를 개발하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시 재료

식육시료 — 전국 각 시 도 가축위생시험소(특별시 및 광역시는 보건환경연구원)의 협조로 해당 도축장에서 도축된 소, 돼지 및 닭 근육을 수집하여 시료로 사용하였다.

표준시약 — Sulfamethazine(SMZ)을 비롯한 설파제, trimethoprim(TMP), p-aminobenzoic acid(PABA) 및 polyethylenglycol은 Sigma사 제품, penicillin G, ampicillin, streptomycin, gentamicin, tetracycline 및 bacitracin은 Fluka사 제품을 사용하였으며, 이외의 시약도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다.

시험용 균주 및 아포액 조제

시험용 균주 — *B. megaterium* ATCC 9885, *B. cerues var. mycoides* ATCC 11778, *B. subtilis* BGA, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. stearothermophilus* ATCC 10149 및 *B. stearothermophilus* ATCC 7953 등 6종의 균주를 공시하였다. 배지로는 계대보존용으로 tryptic soy agar(TSA, Difco), 증균 및 아포 조제용으로 A-K #2 sporulating agar (BBL), 균수측정용 배지로 plate count agar(Difco)을 사용하였으며, 시험용배지로는 Mueller-Hinton agar(Difco), PM indicator agar(PM, Difco) 등을 사용하였다.

아포액 조제 — A-K #2 sporulating agar(BBL) 사면배지를 사용하여 계대보존한 공시균주를 37°C 에서 2일간 배양하여 멸균유리구슬과 2~3 m*l*멸균증류수를 넣어 집균하였다. 이것을 미리 Roux bottle에 A-K #2 sporulating agar를 300 m*l*씩 분주하여 고압증기멸균하여 굳힌 평판에 접종하여 고르게 편 다음 37°C에서 18-24시간 배양한 후 실온에 6일간 방치하였다.

그후 멸균유리구슬(직경 4 mm)과 멸균증류수 25 m*l*를 넣고 조심스럽게 흔들어 균을 취해 멸균원침관에 옮겨 항온수조 65°C에서 30분간 가열한 다음 5°C에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 일정량의 멸균증류수를 넣어 혼합기로 부유시켜 원심분리하는 이 세척과정을 총 3회 반복하였다. 마지막으로 원심분리한 후 상층액을 버리고 남은 잔사를 20 m*l*의 멸균 증류수로 재부유시켜 균수를 측정하여 사용하였다. 단, *B. megaterium* ATCC 9885 균주의 아포정제는 Johnston[4,5]의 아포정제 방법에 따라 수행하였다.

시험 방법

시험용 평판 조제 — PM 배지를 사용해 동량으로 2개를 만들어 고압멸균한 후 48~50°C로 식혀 하나에는 m*l* 당 10 g의 TMP 용액을 배지 100 m*l*당 1 m*l*를 첨가하여 혼합한 후 페트리디쉬(87×15 mm)에 각 8 m*l*씩 분주하였다(TMP 평판). 또다른 배지에는 TMP 용액 및 m*l*당 2.5 mg의 PABA 용액을 배지 100 m*l*당 각 1 m*l*씩을 첨가하여 잘 혼합한 다음 페트리디쉬에 각 8 m*l*씩 분주하여 평판을 만들어 사용하였다(PABA 평판).

시험용 평판의 검사 — 시험균을 도말한 각 시험용 평판당 일정간격으로 4개의 지육검사용 디스크를 올려 놓고 TMP 평판에는 0.1 μg/m*l*의 SMZ용액을, PABA 평판에는 100 μg/m*l* SMZ용액을 각각 75 μ*l*씩 흡수시키고 중앙부위에는 감수성 시험용 neomycin 디스크(5 μg)를 올려 44~45°C 배양기에 넣어 4~6시간 배양한 후 발육억제대의 형성유무를 확인하였다. 이때 배양기에는 비이커에 약 200 m*l*의 물을 담아 두어 시험용 평판의 건조를 방지하였다. 배양후 TMP 평판에서는 억제대가 형성되고 PABA 평판에서는 억제대가 형성되지 않고 두 평판의 neomycin 디스크 주변에 형성된 억제대의 크기가 15~20 mm인 lot의 평판을 시료검사용으로 사용하였다.

시료 검사 — TMP 및 PABA 평판을 1개군으로 평판당 시료 4개 및 neomycin 디스크 하나를 올려 검사하였다. 외과용 수술칼(No. 22)을 사용하여 무균적으로 식육을 절개하여 한 시료당 2개의 지육검사용 디스크(직경 10 mm, Adventec 1995210)를 핀셋으로 절개부위에 삽입하여 30~60분후 디스크를 꺼내 두 종류의 시험용 평판위에 각각 하나씩 올려 시험용 평판 검사시와 동일하게 배양하여 결과를 판정하였다.

결과 판정 — 항균물질 표준용액 및 시료를 검사한 후 TMP 및 PABA 평판 어느쪽이든 균발육억제대가 형성되지 않으면 음성으로 판정하고, 두개의 평판 어느쪽에서든 직경 12 mm이상의 억제대가 형성되면 항균물질 양성으로 판정하였다.

양성으로 판정된 경우 TMP 평판에서 양성, PABA 평판에서 음성이면 설파제가 잔류하는 것으로, 두개의 평판 모두 양성이면 설파제 이외의 항균물질이거나 설파제와 기타 항균물질이 동시에 잔류되는 것으로 추정하였으며, 이들 양

성시료에 대해서는 HPLC 등 기타 정성 정량시험법으로 정확도를 확인하였다.

최저검출한계 및 특이성 시험

42종의 항균물질에 대해 10배 계단희석하여 검출감도를 스크리닝한 농도구간에서 2배 계단희석한 후 3반복 시험하여 3회 모두 균발육억제대의 직경이 12 mm이상 형성될 경우를 최저검출한계로 설정하였다. TMP 및 PABA 평판위에 지육검사용디스크를 올려 놓은 즉시 희석농도별로 검사용디스크의 평균흡수량 75 μl씩을 흡수시켜 시험균을 배양하여 각 평판별 최저검출한계치 및 설파제의 특이성을 시험하였다.

정확도 비교

검사킷트의 야외 적용성여부를 결정하기 위해 미국의 Charm Science사가 개발한 미생물수용체측정법(Charm II test)에 따라 소, 돼지 및 닭의 근육시료 20 g을 전처리하여 각 계열별 시험방법에 따라 항균물질을 검사하였다.[1]

Charm II test 결과 양성시료에 대해 BmDA법으로 검출능을 확인하였으며, 시료고체상분산처리법(matrix solid phase dispersion, MSPD)을 이용한 고속액체크로마토그라프법(high performance liquid chromatograph, HPLC)으로 설파제의 동시다제분석을 수행하였다.[7] 이상의 분석 방법간의 시험결과를 비교하여 정확성을 확인하였다.

보존성 조사

검사킷트의 유통기한을 설정하기 위하여 제조일로 부터 일주일 간격으로 시험용평판을 SMZ 0.1 μg/ml 혹은 100 μg/ml과 neomycin 디스크를 올려 억제대의 형성유무 및 직경을 측정하여 시험용 평판의 검사조건에 일치함을 확인하였다.

결과 및 고찰

최적측정조건 시험

시험용 배지 및 균주 선발—설파제에 대한 감수성이 높은 것으로 알려진 *B. megaterium* 균주를 이용하여 항균물질의 검사용으로 널리 사용되는 Plate count agar(PCA), Mueller-Hinton medium(MH), PM indicator agar(PM), Antibiotic Medium(AM) #2, AM #5 및 AM #8 등 6종의 시험용 배지에서 SMZ의 검출감도를 비교하였던 바, PM 배지가 PCA 등 기타 5종의 배지보다 높은 검출감도를 나타내었다(Table 1). PM 배지 이외의 PCA등 5종의 배지에서 검출소요시간은 대부분의 미생물학적 방법과 같이 16~18시간 소요된 반면, PM 배지에서는 3 1/2~4시간으로 검사소요시간의 단축이 가능한 것으로 나타나 PM 배지를 시험용배지로 선발하였다.

PM 배지는 본래 65°C에서 증식하는 고온균이면서 60°C에서 세대기간(doubling time)이 8.4분으로 *E. coli*의 21분에 비해 매우 짧은 *B. stearothermophilus var. calidolactis* 균주를 이용하여 우유중에서 penicillin계 항생물질을 3 1/2시간내 검출하는 시험용 배지로 알려져 있지만,[11] 이 시험에서 나타난 바와 같이 PM 배지를 사용하여 45°C 배양하였을 때 *B. megaterium* 균주도 배양 3 1/2~4시간내 잔류항균물질의 검출이 가능하였다.

이 PM 배지에서 *B. megaterium* ATCC 9885 이외에 식육 및 우유를 포함한 축산물내 잔류 항균물질의 검사용 균주로 널리 사용되는 *B. cereus var. mycoides* ATCC 11778, *B. subtilis* BGA, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. stearothermophilus* ATCC 10149 및 ATCC 7953 등 5종의 시험용 균주에 대해 검출능을 비교확인하기 위하여 SMZ에 대한 검출감도를 측정한 결과, *B. megaterium*을 제외한 다른 균주의 최저검출한

Table 1. Incubation time of *B. megaterium* for the detection of sulfamethazine(SMZ) in the various assay media

Assay media	Incubation time(hrs)	MDL of SMZ(ppm)
Plate count agar, pH 7.0±0.2	16~18	10.0
Mueller Hinton medium, pH 7.3±0.1	16~18	2.5
PM indicator agar, pH 7.8±0.2	3.5~4	1.0
Antibiotic Medium #2, pH 6.6±0.1	16~18	100.0
Antibiotic Medium #5, pH 7.9±0.1	16~18	10.0
Antibiotic Medium #8, pH 5.9±0.1	16~18	>100.0

Table 2. Sensitivity of sufamethazine to the various test organisms in PM indicator agar

Microorganisms	Incubation time & temperature	Minimum Detectable Levels (MDL, μg/ml)
B. cereus var. mycoides ATCC 11778	16h, 32°C	>500
B. megaterium ATCC 9885	3.5h, 45°C	1.0
B. subtilis BGA	16h, 32°C	100
B. subtilis ATCC 6633	16h, 32°C	100
B. stearothermophilus ATCC 10149	3.5h, 45°C	50
B. stearothermophilus ATCC 7953	3.5h, 45°C	50

계는 SMZ으로서 50 μg/ml이상으로 설파제의 검출감도가 낮은 반면, *B. megaterium* 균주의 최저검출한계는 1.0 μg/ml으로 가장 높은 검출감도를 나타내었다(Table 2).

시험용 평판의 TMP 첨가농도 선발 — 우리나라에서 설정하고 있는 식육중 SMZ 등 5종 설파제의 최대잔류허용한계치(MRLs)는 0.1 ppm인데도 불구하고,[15] SMZ의 검출감도는 Table 1에 나타난 바와 같이 SMZ의 검출감도가 가장 높은 PM 배지에서도 1.0 ppm으로서 MRL이하까지의 검출이 불가능하였다. 이에 설파제의 검출감도를 높이기 위하여 배지내 TMP의 첨가농도를 설정하였다. TMP는 합성항균제의 하나로서 수의임상에서 sulfamethoxazole등과 함께 콕시듐 등의 치료목적으로나 실험실 연구목적으로 병용할 경우 세균의 엽산생합성과정에 관여하는 dihydrofolate reductase에 높은 특이성을 나타내어 설파제와 상승효과가 있는 것으로 알려져있다.[9]

PABA가 함유되어 있지 않아 설파제의 검출이 용이한 배지로 알려져있는 MH 배지와 본 시험에서 선발한 PM 배지 2종을 공시하여 TMP 농도별 SMZ의 검출감도를 비교하였던 바, MH 및 PM 배지 모두 TMP를 첨가하지 않거나 0.05 μg/ml를 첨가하거나 MH 배지내 0.1 μg/ml를 첨가할 경우 MRL까지의 검출이 불가능하였으며, MH 배지내 0.15 μg/ml 혹은 PM 배지내 0.1 μg/ml를 첨가할 경우 SMZ 0.1 ppm까지 검출이 가능하였다(Fig. 1). 따라서 배지별 TMP 첨가농도는 각각 PM 배지 0.1 μg/ml 및 MH 배지 0.15 μg/ml이었다.

그러나 PM 배지내 TMP 0.1 μg/ml를 첨가한 평판에서의 검출가능시간은 4~6시간인 반면, MH 배지내 TMP 0.15 μg/ml를 첨가한 평판의 검출가능시간이 16~18시간으로서 신속성이 떨어지므로 TMP를 배지 ml당 0.1 μg농도로 첨가한 PM 배지를 검사킷트의 TMP 평판으로 선발하였다.

시험용 평판의 PABA 첨가농도 선발 — PABA는 대부분의 세균에서 pteridine, glutamic acid와 같은 성분과 함께 엽산생합성과정에서 dihydrofolic acid의 합성에 필요로 하지만 이것이 배지내 과량이 존재하면 설파제의 항균능이 억제되는 것으로 알려져 있다.[12] 이를 기초로 하여 설파제와 설파제 이외의 항균물질과 구별하기 위하여 적정 PABA 농도를 선발하였던 바, Table 3에 나타난 바와 같이 11종 설파제에 대한 검출감도는 배지내 10 μg/ml의 PABA를 첨가시 설파제의 종류에 따라 다소 차이는 있지만 25~100 ppm이었으며, 25 및 50 μg/ml의 PABA를 첨가시 모두 100 ppm 혹은 그 이상이었다. 따라서 잔류농도의 설파제를 길항시키기 위한 PABA의 적정농도는 25~50 μg/ml임이 확인되었다. 그러나 PABA는 환축의 화농성 농포나 자연계에도 널리 분포하며 수의 임상에서 리켓치아에

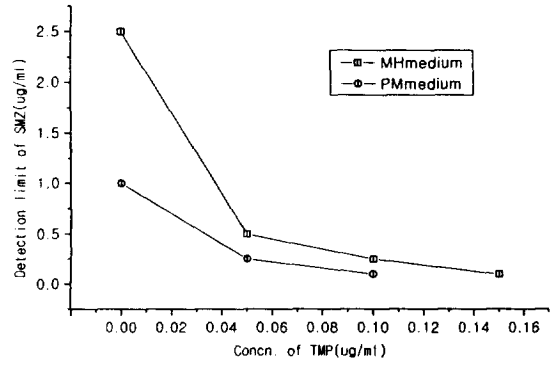

Fig. 1. Improvement of sensitivity of sulfamethazine by adding trimethoprim to agar plates.

Table 3. Sensitivity of sulfonamides to the different concentrations of PABA added to media

Sulfonamides	PABA added(μg/ml)		
	10	25	50
Sulfamethazine	50	>100	>100
Sulfamerazine	100	>100	>100
Sulfadiazine	100	>100	>100
Sulfadimethoxine	50	100	100
Sulfaquinoxaline	50	100	100
Sulfathiazole	50	100	100
Sulfisoxazole	100	>100	>100
Sulfisomidine	100	>100	>100
Sulfamonomethoxine	25	100	100
Sulfachlorpyridazine	100	>100	>100

의한 질병의 치료제로 사용되는 등 경우에 따라서는 농도가 높을 경우 오히려 PABA에 의한 억제작용도 예상할 수 있으므로 25 μg/ml를 PABA의 시험농도로 설정하였다.[13]

검출감도 및 특이성

항균물질의 최저검출한계 — TMP 평판에서 11종 설파제 표준용액에 대한 최저검출한계는 sulfamonomethoxine이 0.025 ppm으로 가장 민감하였으며, sulfaquinoxaline 및 sulfamethoxypyridazine이 0.05 ppm, SMZ을 비롯한 기타 설파제가 0.1 ppm으로 우리나라의 잔류허용기준 0.1 ppm 이하까지 검출가능하였다. 이와 같은 검출감도는 기존의 FPT에서 TMP를 일정농도로 첨가하더라도 SMZ 등 5종 설파제가 약 1.0 ppm수준인 점과 비교할 때 검출감도가 높은 것으로 나타났다.[12]

설파제 이외의 31종의 항균물질에 대한 검출감도는 penicillin등 4종의 β-lactam계 항생물질이 0.05~0.25 ppm이었

으며, gentamicin등 4종의 aminoglycoside계가 1.0~5.0 ppm, erythromycin등 4종의 macrolide계가 0.05~0.25 ppm, oxytetracycline등 3종의 tetracycline계가 0.5~1.0 ppm, bacitracin등 2종의 polypeptide계 0.25~0.5 ppm, monensin등 2종의 polyether계가 10.0 ppm, nitrofuran 유도체인 furazolidone이 0.5 ppm, enrofloxacin 등 2종의 quinolone 유도체가 0.5~2.5 ppm, trimethoprim등 2종의 diaminopyrimidine 유도체가 0.25~2.5, novobiocin 및 chloramphenicol이 2.5 ppm, thiamphenicol 및 carbadox는 10.0 ppm이었던 반면, olaquindox, amprolium 및 clopidol은 100 ppm이상의 농도에서도 검출되지 않았다.

이러한 결과는 기존의 FPT, STOP 및 CAST과 검출감도를 비교할 때 물질에 따라 다소 차이는 있지만 β-lactam계에서는 STOP이 0.1~12.5 ppm, FPT 및 CAST가 0.0062~1.0 ppm으로 BmDA가 다소 높거나 비교적 유사한 결과를 나타내었다.[6,12] Aminoglycoside계는 STOP의 1.0~100 ppm에 비해 BmDA가 다소 높은 감도를 나타내었으나 FPT 및 CAST의 0.062~6.2 ppm에 비해 다소 떨어지는 검출감도를 나타내었다. Tetracycline계는 FPT, CAST, BmDA, STOP순으로 나타났으며, macrolide계, polypeptide계 및 chloramphenicol 등도 기존의 방법과 비교할 때 항균물질에 따라 다양한 양상을 나타내었다.

설파제에 대한 특이성 — 25 μg/ml농도로 PABA를 첨가한 PABA 평판에서 설파제에 대한 특이성시험으로 TMP 평판과 PABA 평판에서의 억제양상을 비교하였을 때 설파제 이외의 항균물질에서는 TMP 평판과 PABA 평판 공히 동일한 검출감도 및 2 mm이상의 억제대직경 차이를 나타내지 않았으며, 11종 설파제의 경우 공히 100 ppm미만의 농도에서는 TMP 평판에서만 억제양상이 나타나고 PABA 평판에서는 억제양상을 보이지 않아 개개별 설파제에 대한 특이성은 매우 높은 것으로 나타났다.

설파제 잔류식육을 이용한 검출능 비교

정밀분석법과의 비교 — Charm II test에 의한 스크리닝 및 HPLC에 의한 확인 정량을 통해 설파제가 잔류된 것으로 확인된 식육중에서 우리나라가 설정하고 있는 설파제의 최대잔류허용한계를 초과한 돈육 7점 및 우육 1점 총 8시료중 6시료에서 양성검출이 가능하였으며, SMZ으로써 식육중 검출가능농도는 >0.14~0.22 ppm 범위일 것으로 예상되었다.

항균물질이 검출된 6개의 돈육중 5시료는 TMP 평판에서는 양성으로 PABA 평판에서는 음성으로 검출되어 설파제의 잔류를 확인할 수 있었으며, 나머지 한 시료도 억제대직경에 있어서 TMP 평판 42.3 mm에 비해 PABA 평판 32.3 mm로 균발육억제대의 현저한 차이가 인정되어 설파제가 잔류된 것을 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 4. Minimum detectable levels(MDL) of antimicrobial drugs in *B. megaterium* disk assay

Antibaterails	MDL, μg/ml	Antibaterails	MDL, μg/ml
Sulfamethazine	0.1	Spiramycin	0.1
Sulfamerazine	0.1	Tylosin	0.1
Sulfadimethoxine	0.1	Chlortetracycline	0.5
Sulfamonomethoxine	0.025	Oxytetracycline	1.0
Sulfaquinoxaline	0.05	Tetracycline	1.0
Sulfathiazole	0.1	Bacitracin	0.5
Sulfadiazine	0.1	Virginiamycin	0.25
Sulfisoxazole	0.1	Monensin	10.0
Sulfisomidine	0.1	Salinomycin	10.0
Sulfachlorpyridazine	0.1	Novobiocin	2.5
Sulfamethoxypyridazine	0.05	Chloramphenicol	2.5
Penicillin G	0.05	Furazolidone	0.5
Ampicillin	0.05	Oxolinic acid	2.5
Amoxicillin	0.05	Enrofloxacin	0.5
Cloxacillin	0.25	Carbadox	10.0
Gentamicin	1.0	Olaquindox	>100
Neomycin	2.5	Ormethoprim	2.5
Streptomycin	1.0	Trimethoprim	0.2
Hygromycin B	5.0	Thiamphenicol	10.0
Erythromycin	0.05	Amprolium	>1000
Oleandomycin	0.25	Clopidol	>1000

기존 미생물학적 방법과의 검출능 비교 — HPLC에 의해 SMZ이 0.1 ppm이상 검출된 돈육에 대하여 BmDA, FPT, CAST 및 STOP에 의한 동일개체의 근육 혹은 신장에서의 검출능을 비교하였던 결과, SMZ으로서 0.22 및 0.34 ppm이 검출된 시료에서는 BmDA에서만 양성으로 검출되었으며, SMZ이 2.91 ppm 검출된 신장시료에서는 FPT, CAST 및 STOP에서도 검출이 가능하였으나 근육에서는 공히 검출이 되지 않았다(Table 6). 이 결과를 손 등[12]에 의한 FPT의 검출한계성적과 비교할때 FPT에서 SMZ 표준용액으로서 검출감도가 약 1.0 ppm수준이었던 결과와 달리 실제 식육시료에서는 검출능의 차이가 있는 것으로 나타났다.

Randecker 등[8]이 식육중 SMZ의 잔류여부를 확인할 수 있는 예측지표를 설정하기 위해서 체조직간의 잔류상관관계를 구명하기 위한 연구결과에 의하면 휴약일수 혹은 개체에 따라 조직간의 잔류비율이 다소 차이는 있지만, 체조

Table 5. Comparision of BmDA with Charm II test and HPLC in sulfonamide-positive swine and bovine muscle samples

Species	Charm II test[1] (cpm)	BmDA[2]		HPLC	
		TMP plate	PABA plate	Sulfonamides	Concn.(ppm)
Swine	1724	-	-	Sulfamethazine	0.11
Swine	1728	-	-	Sulfamethazine	0.14
Swine	1374	+	-	Sulfamethazine	0.22
Swine	886	+	-	Sulfamethazine	0.34
Swine	700	+	-	Sulfamethazine	0.73
Swine	711	+	-	Sulfamethazine	0.84
Swine	643	+	-	Sulfamethazine	2.91
Bovine	570	+	±	4 Sulfamethazine[3]	44.88

[1]Mean CPM(count per minute) value of spiked samples at 0.05 μg sulfamethazine/g in 6 antimicrobial drugs free swine muscles was 3184.

[2]The result of *B. megaterium* disk assay(BmDA) is as follows: +; positive result as it has formed over 12 mm inhibition zone, -; negative result as it has not formed inhibition zone, ±; positive result as it has formed over 12 mm inhibition zone, but the inhibition zone of PABA plate(32.3 mm) was more less than that of TMP plate(42.3 mm).

[3]Concentration of each sulfonamides was 19.2 ppm of sulfamethazine, 15.72 ppm of sulfamerazine, 8.65 ppm of sulfadiazine, 1.27 ppm sulfadiazine,respectively.

Table 6. Comparison of BmDA with conventional microbiological tests for detecting sulfamethazine in swine tissues

HPLC in muscle(μg/g)	CAST in kidney	STOP in kidney	FPT in muscle	BmDA in muscle
0.11	-	-	-	-
0.14	-	-	-	-
0.22	-	-	-	+
0.34	-	-	-	+
2.91	+	+	-	+

+; positive result as it has formed over 12 mm inhibition zone, -; negative result as it has not formed inhibition zone

직내 잔류비율은 오줌, 혈청, 간, 신장, 근육순으로 오줌이 가장 높게 잔류하며, 근육에 비해 신장이 약 2.2배 높게 잔류되는 것으로 보고하였다. 이러한 상관관계와 이상의 결과로 볼 때 FPT, CAST 및 STOP에 비해 BmDA가 설파제에 대한 검출감도에 있어서 가장 높은 방법으로 사료된다.

보존성 조사

이 BmDA를 시제품으로 제작한 후 검사킷트의 유효기간을 설정하기 위해 보존기간에 따른 SMZ에 대한 검출감도를 비교한 결과, TMP 평판에서 SMZ의 검출감도는 6개월간 공히 0.1 ppm으로 유지되었으며, PABA 평판에서도 SMZ의 검출감도가 6개월간 공히 100 ppm이상으로 PABA의 길항능이 유지되어 안정성이 인정되었다.

또한 BmDA 검사킷트는 사용하는데 특별한 기술이 요구되지 않으며 조작이 간편한 경제적인 방법으로 도축현장이나 실험실에서 많이 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

국문요약

식육중 잔류항균물질의 간이검사법으로 이용되고 있는 EEC 4-plate 법 등 기존의 미생물학적 검사법이 설파제에 대한 검출감도가 낮고 검사시간이 장시간 소요되는 점을 개선하고 간이검사킷트로 개발하기 위해 시험하

였다. 시험용평판을 조제하기 위한 최적배지로는 PM indicator agar이었으며, *B. stearothermophilus* 등 6종의 공시균주중 *B. megaterium*이 설파제에 대한 검출감도가 가장 높게 나타났다. 설파제에 대한 특이성을 높이기 위한 평판내 PABA의 첨가농도는 25 μg/m*l*이었으며, 설파제의 검출감도를 높이기 위해 TMP의 첨가농도는 0.1 μg/m*l*이었다. 이때 검사소요시간은 기존 검사법이 16~18시간인데 비해 4~6시간 이내로 검사시간을 단축할 수 있었다. 42종의 항균물질에 대한 최저검출한계는 11종 설파제가 0.025~0.1 ppm 수준으로 나타났으며, 기타 항균물질에 대해서도 tetracycline계 등 일부물질을 제외하고 기존의 미생물학적 방법과 거의 유사한 검출감도를 나타냈다. HPLC에 의해 SMZ이 허용기준이상 잔류가 확인된 식육에 대해 기존의 미생물학적 방법과 검출능을 비교한 결과, FPT, CAST 및 STOP에 비해 BmDA가 높은 검출능을 나타내었다. 시험제작한 BmDA 검사킷트의 경시별 보존기간에 따른 SMZ에 대한 검출감도는 6개월간 공히 0.1 ppm으로 안정성이 인정되었다.

참고문헌

1. Anonymous.: Charm II test for antimicrobial drugs in tissue. Operator's manual. 04/01/94, MSU05 (1994).
2. Charm, S.E., Zomer, E. and Salter, R.: Confirmation of widespread sulfonamide contamination in northeast U.S. Market milk. *J. Food Protec.*, **51**, 920-924 (1988).
3. Dixon-Holland, D.E. and Katz, S.E.: Competitive direct Enzyme-linked immunoassay for detection of sulfamethazine residues in swine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1137-1140 (1988).
4. Johnston, R.W.: Problem calves kidney sulfonamide test. Laboratory Communication No. 33, FSIS/USDA (1982).
5. Johnston, R.W.: Serum and urine sulfonamide residue preslaughter test. Laboratory Communication No. 34, FSIS/USDA (1982).
6. Korsrud, G.O. and Macneil, J.D.: Evaluation of the swab test on premises, the calf antibiotic and sulfa test, and a microbial inhibitor test with standard solutions of 22 antibiotics. *J. Food Protec.*, **51**, 43-46 (1988).
7. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., Short, C.R. and Barker, S.A.: Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 423-426 (1990).
8. Randecker, V.W., Reagan, J.A., Engel, R.E., Soderberg, D.L. and McNeal, J.E.: Serum and urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. *J. Food Protec.*, **50**, 115-122 (1987).
9. Russell, A.D. and Quesnel, L.B.: Antibiotics; Assessment of antimicrobial activity and resistance. U.S. ed. Academic Press Inc., New York (1983).
10. Simpson, R.M., Suhre, F.B. and Shafer, J.W.: Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of five sulfonamide residues in animal tisssue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 23-26 (1985).
11. Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. and Painter, P.R..: The microbial world. 5th ed. Prentice-Hall International Ltd., London (1986).
12. 손성완, 진남섭, 조병훈, 심영화, 김인천, 박종명: 축산물중 잔류항균물질의 계열별 동시다제분석법 개발에 관한 연구. 가축위생연구소, 시험연구보고서. p427 (1993).
13. 조병훈, 김봉환, 손성완, 진남섭, 박종명: 원유중 잔류 설파제의 검출을 위한 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 환원시험법의 개량. 한국수의공중보건학회지, 17, 77-86 (1993).
14. 농림수산부편: '94 축산발전계획. p416 (1994).
15. 보건사회부편: 식품공전. 한국식품공업협회 (1994).