pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 3, pp. 309~315 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.3.309

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Research Note

축·수산·전통식품 중 황색포도상 구균의 정량적 분석을 위한 Petrifilm™ Staph Express Count Plate의 성능 평가

유윤정† · 최유나† · 최승호[1] · 방현조[1] · 윤요한[2] · 하지명[2]* · 이수민[2]*
숙명여자대학교 식품영양학과
[1]한국쓰리엠 식품안전사업팀
[2]숙명여자대학교 위해분석연구센터

Efficiency of Petrifilm™ Staph Express Count Plate for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Meat, Fishery Product, and Korean Traditional Foods

Yoonjeong Yoo†, Yuna Choi†, Seungho Choi[1], Hyunjo Bang[1], Yohan Yoon[2], Jimyeong Ha[2]*, and Soomin Lee[2]*
Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea
[1]Food Safety Division, 3M Korea, Seoul, Korea
[2]Risk Analysis Research Center, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea
(Received April 11, 2019/Revised April 30, 2019/Accepted May 24, 2019)

ABSTRACT - To enumerate *Staphylococcus aureus* in food, Baird-Parker Agar (BPA) is usually used in the conventional method, However it requires time and space for the preparation and plating, and incubation. Thus, use of the 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate (STX Petrifilm) might be appropriate to solve these challenging problems. The purpose of this study was to compare the efficiency of STX Petrifilm with BPA for enumeration of *S. aureus* in various foods. A mixture of *S. aureus* strains ATCC29213, ATCC25923, and ATCC13565 was inoculated on marinated pork chop, beef (chuck tender), dried filefish, semi-dried squid, rice cake, and *Japchae* (stir-fried glass noodles) at 2, 3, 5, and 7 Log CFU/g. *S. aureus* cell counts were enumerated by spread-plating on STX Petrifilm and BPA after 0 and 24 hours at 4°C (marinated pork chop, beef, semi-dried squid, and stir-fried glass noodles) and 25°C (dried filefish and rice cake). Recovery of STX Petrifilm for *S. aureus* from various food samples was compared with BPA, and the results showed that there were no significant differences between two selective media in all cases. The results indicated that STX Petrifilm had enough efficiency to recover *S. aureus* from various foods as well as saving time and space.

Key words : 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate, Baird-Parker Agar, *Staphylococcus aureus*, Selective media, Detection

최근 생활수준 향상과 1인 가정 증가에 따른 식생활 패턴 변화로 도시락, 김밥, 샌드위치 등 즉석섭취 식품을 섭취하는 비율이 대폭적으로 늘고 있다. Kim 등[1)]의 연구에 따르면 5 종류(김밥, 초밥, 회, 샐러드, 샌드위치)의 즉석섭취 식품에서 *Staphylococcus aureus*가 모두 검출되었으며, 식중독 세균 중 가장 높은 검출률을 보였다. 더불어, *S. aureus*에 오염된 식품을 섭취하여 식중독에 걸리거나 식품에서 *S. aureus*가 검출되어 제품이 회수 조치된 사례가 꾸준히 발생하고 있다. 추가적인 조리, 가열 없이 섭취하는 즉석섭취 식품의 경우, 식중독 세균 노출 시 대규모 식중독 사고를 발생시킬 가능성이 있으므로 오염에 주의해야 한다[2)].

식품에서 *S. aureus*를 신속, 정확하게 검출하는 것은 식품의 안전성을 평가하는 데 중요하다. *S. aureus*를 비롯하

†Yoonjeong Yoo and Yuna Choi are equally contributed.
*Co-correspondences to: Soomin Lee, Risk Analysis Research Center, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea
Tel: +82-2-2077-7585, Fax: +82-2-710-9479
E-mail: slee0719@naver.com
*Co-Correspondences to: Jimyeong Ha, Risk Analysis Research Center, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea
Tel: +82-2-2077-7585, Fax: +82-2-710-9479
E-mail: hayan29@naver.com

여 다양한 식중독 세균을 식품으로부터 분리하기 위하여 주로 선택배지를 사용하는데, 해당 검출법은 정확한 방법이나 많은 시간이 소요된다[3]. *S. aureus* 검출을 위한 선택배지로 난황첨가 만니톨 식염한천배지(mannitol salt egg yolk agar, MSEY agar), Baird-Parker 한천배지(baird-parker agar, BPA), 토끼 혈장(RPF)이 첨가된 Baird-Parker 한천배지, Vogel johnson agar, CHROMagar staph aureus, RAPID' Staph 등이 있다.

전 세계적으로 *S. aureus*의 분석을 위하여 주로 BPA나 만니톨 식염한천배지(mannitol salt agar; MSA)를 허용하고 있으나, Wilson 등[4]의 연구결과에 따르면 BPA를 이용하여 여러 식품에서 *S. aureus*를 분리할 때, 투명한 환이 형성되지 않아 추가적인 확인시험이 필요할 수 있다고 한다. 또한 MSEY agar의 경우, 국내 식품공전[5]에 따르면 *S. aureus* 정성 시험 시에만 인정되는 배지이며, 정량 시험 시에는 인정되지 않는다. Kim 등[6]의 연구결과에 따르면 *Listeria*도 MSA에서 *S. aureus*의 전형적인 집락을 나타내 검출에 혼돈이 있다고 한다. 더불어 두 한천배지는 121°C에서 15분간 멸균 후 egg yolk enrichment를 첨가하여 굳힌 후 사용해야 하기 때문에 사용 전 제조 시간이 오래 소요되며 인큐베이터 배양 시 많은 공간이 확보되어야 한다는 단점이 있다.

현대 산업 현장에서는 신속하고 정확한 균체 검출을 요구하고 있어, 표준화된 공정에 의해 완제품으로 제공되는 건조필름법 사용이 보편화 되어 있다. 건조필름은 전통적인 한천배지에 비하여 표준화된 공정을 통해 완제품 상태로 만들어져 실험자가 실험 전 배지를 준비하는 데 소요되는 시간을 단축해주고, 한천배지보다 부피가 작아 배양 시 차지하는 공간을 줄일 수 있다. 또한 실험 시 분주 후 도말 과정 없이 바로 배양하기 때문에 실험 소요시간을 줄여 일의 능률을 높인다. 특히 *S. aureus* 검출용 건조필름인 Petrifilm™ Staph Express Count Plate (STX Petrifilm)는 배양 후 *S. aureus* 균체만 선택적으로 염색하기 때문에 실험자가 쉽게 구분해 낼 수 있다는 장점이 있다. 하지만 STX Petrifilm의 *S. aureus* 검출 효율 평가가 이루어진 바 없어 다른 배지들과 검출 효율을 비교해볼 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 축산식품, 수산식품, 전통식품을 대상으로 BPA와 STX Petrifilm을 이용하여 *S. aureus* 정량시험을 실시하고, 그 결과를 비교·분석함으로써 *S. aureus* 검출용 건조필름의 성능을 평가하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 식품 시료는 축산식품, 수산식품, 전통식품으로 구분하였다. 축산식품에는 돼지고기 주물럭(marinated pork chop)과 육회용 꾸릿살(beef; chuck tender), 수산식품에서는 쥐포(dried filefish)와 반건조 오징어(semi-dried squid)를 사용하였고, 전통식품에는 떡(rice cake)과 잡채(*Japchae*; stir-fried glass noodles)를 2018년 12월에 2개씩 총 3회 구입하여 실험을 진행하였다. 쥐포, 반건조 오징어와 당일 생산된 돼지고기 주물럭, 잡채는 서울 시내 대형마트에서 구입하였으며, 서울역 인근 정육점에서 육회용 꾸릿살, 떡집에서 당일 생산된 호박떡을 구입하였다. 시험법에는 BPA (MBcell, CA, USA)를 구입하여 사용하였으며, 건조필름은 STX Petrifilim (3M, St. Paul, MN, USA)을 사용하였고, 적자색 균체 확인을 위해 확정용 디스크 3M™ Petrifilm™ Staph Express Disk (3M)를 사용하였다.

사용 균주

본 연구에서는 *S. aureus* (ATCC29213, ATCC25923, ATCC13565)를 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 사용했으며, 각 균주는 20% glycerol을 함유하여 -70°C에 보관하며 사용하였다.

회수율 분석

식품 시료에 대해 식품공전[5]에 수록된 *S. aureus* 정성시험법에 준하여 MSEY agar와 BPA를 이용하여 *S. aureus* 검출 시험을 예비실험으로써 실시하였다. MSEY agar보다 BPA의 민감도가 높은 것으로 판단되어 식품공전에 등재되어 있는 BPA와 STX Petrifilm의 각 식품 시료에 대한 *S. aureus* 회수율을 분석하였다. *S. aureus* 단일 집락을 tryptone soy broth (TSB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 10 mL에 현탁하여 37°C의 조건에서 24시간 배양한 후, 균액 0.1 mL을 새로운 TSB 10 mL에 현탁하고 동일한 조건에서 배양시켜 세균의 활성을 최대화 시켰다. *S. aureus* 혼합 균액을 1,912 ×g, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 후 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 총 2회 세척하여 접종할 균액을 준비하였다. 6종의 식품 시료(돼지고기 주물럭, 육회용 꾸릿살, 쥐포, 반건조 오징어, 떡, 잡채)를 무균적으로 멸균백에 25 g씩 담은 후 각각의 시료에 세균이 2, 3, 5, 7 Log CFU/g가 되도록 십진 희석하여 *S. aureus* 균액 0.1 mL을 접종한 후, 30 번씩 문질러 균액을 시료에 균질화 시켰다. 15분의 부착시간을 가진 후 0시간에 해당하는 회수율을 분석하였다. 회수율 분석을 위해 50 mL의 0.1% buffered peptone water (BPW, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 희석용액을 시료에 첨가하여 균질기(BagMixer, Interscience, St. Nom, France)에서 60초간 균질화한 후, 균질액을 0.1% BPW 용액에 단계별로 희석하여 BPA와 STX Petrifilm에 평판 도말하였다. 또한 접종 24시간 후에 회수율을 분석하기 위해 1일간 각 시료의 보관 온도인 4°C(돼지고기 주물럭, 육회용 꾸릿살, 반건조 오징어, 잡채)와 25°C(쥐포,

떡)에 저장한 다음 0시간과 동일한 시험법을 실시하였다. 24시간 배양 후에 BPA에서는 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검정색 집락을 계수하였고, STX Petrifilm은 제조사인 3M 주식회사의 실험방법에 따라 적자색으로 염색되어 나타나는 집락을 계수하였다. 그러나 적자색 이외의 검정색이나 녹색 계열의 집락이 나타나거나 불순물로 인하여 적자색 집락의 확인이 어려운 경우는 2차 확정용 디스크를 삽입하여 동일한 온도에서 3시간의 추가 배양을 하여 분홍색의 구역이 관찰되는 집락을 계수하였다.

통계 분석

각 시료에 대한 회수율 분석 시험은 샘플을 2개로 하여 총 3회 반복 실험(n=6)을 통해 얻은 CFU/g을 Log_{10}값으로 전환하여 통계 처리하였다. BPA와 STX Petrifilm을 사용하여 얻은 결과를 통계 프로그램 SAS (Version 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA)의 paired *t*-test를 이용하여 α=0.05 수준에서 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

회수율 분석

6 종류의 시료에 대하여 예비실험으로써 증균배양 후 MSEY agar와 BPA에 획선도말을 한 결과, BPA가 MSEY agar보다 더 많은 시료에서 양성으로 확인되었기 때문에

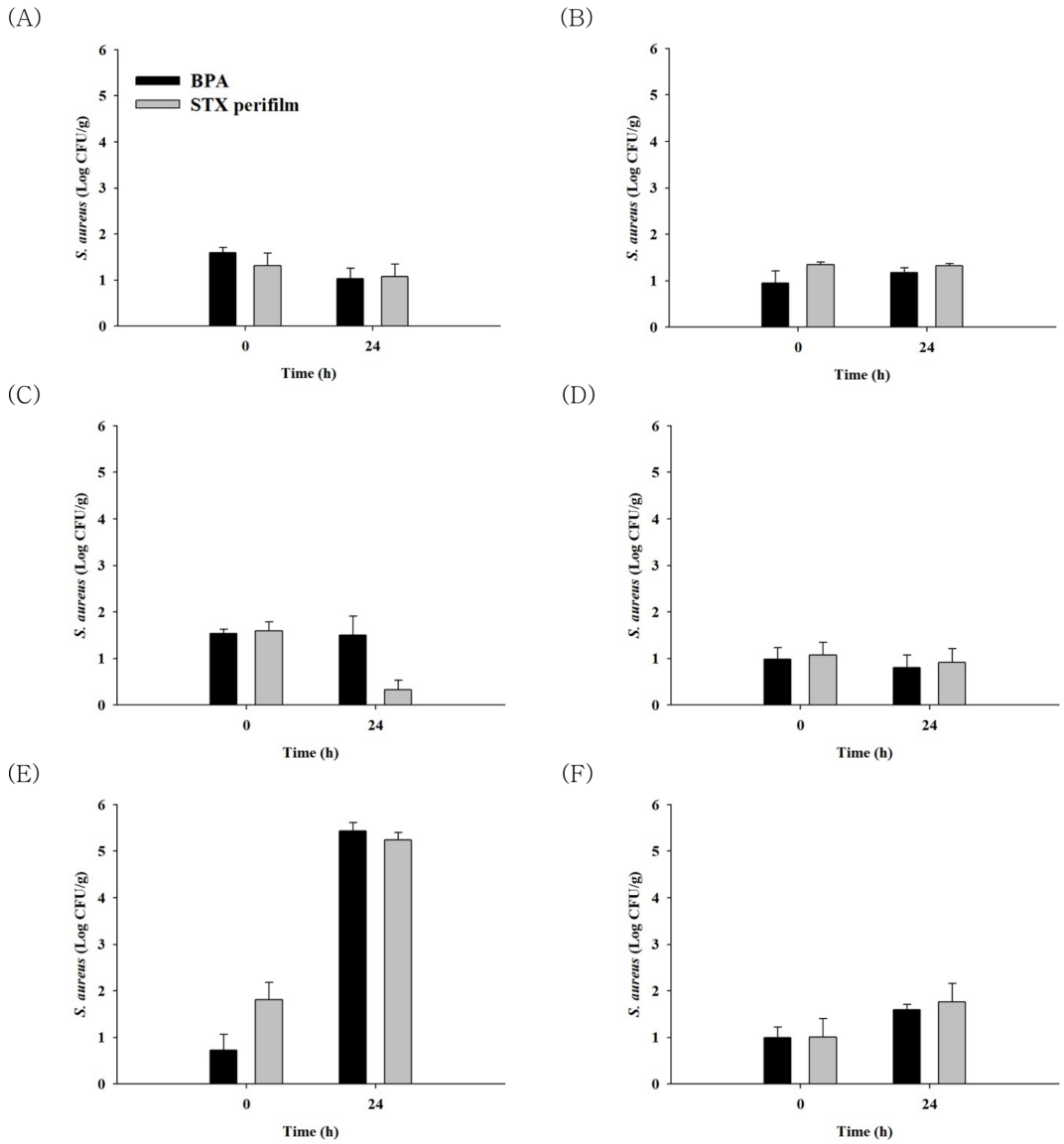

Fig. 1. Comparison of Petrifilm™ Staph Express Count plate and Baird-Parker agar for *Staphylococcus aureus* enumeration in foods at 2-Log inoculation level. (A) marinated pork chop, (B) beef (chuck tender), (C) dried filefish, (D) semi-dried squid, (E) rice cake, and (F) *Japchae*. There were no significant differences in all samples (P>0.05).

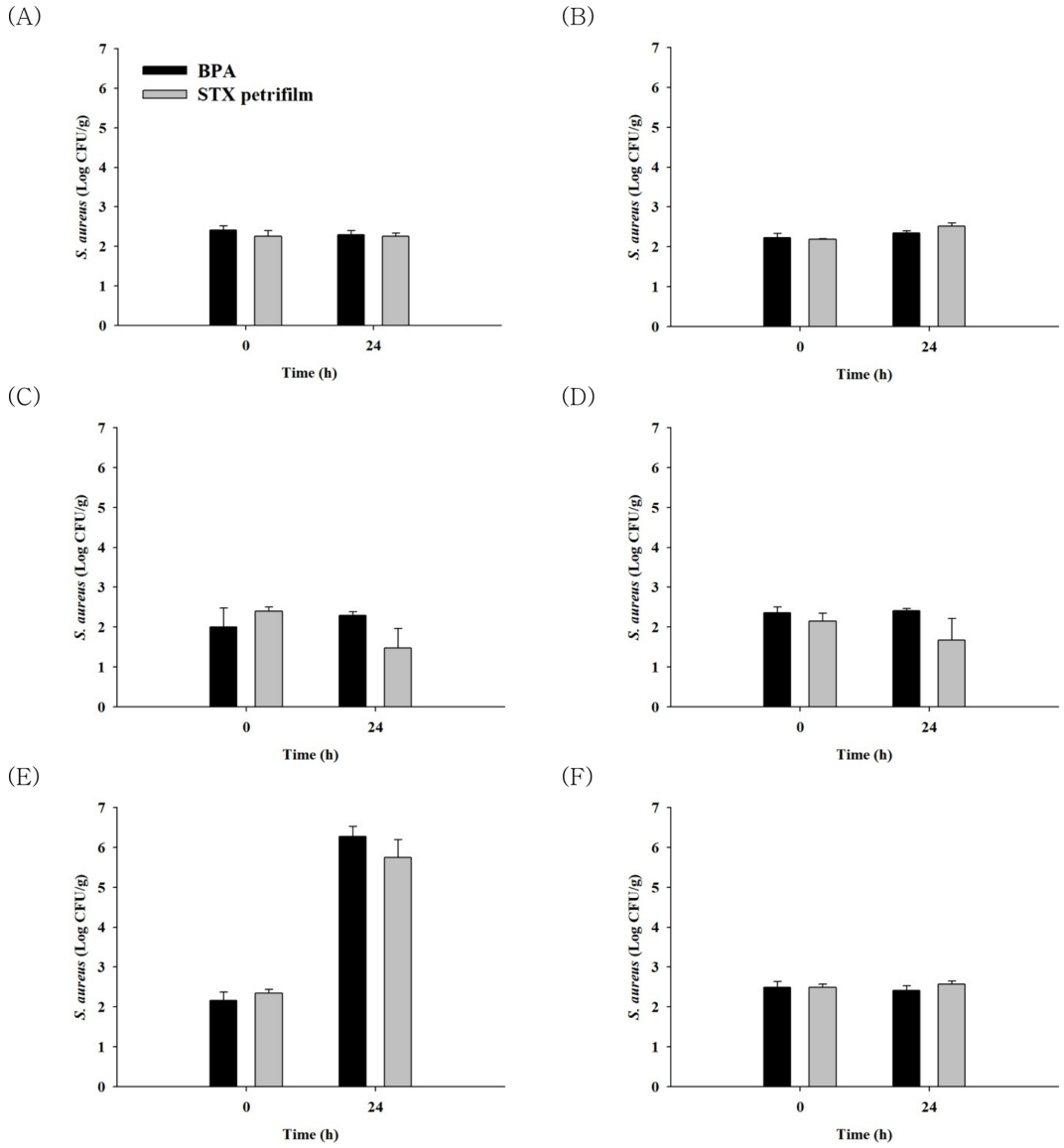

Fig. 2. Comparison of Petrifilm™ Staph Express Count plate and Baird-Parker agar for *Staphylococcus aureus* enumeration in foods at 3-Log inoculation level. (A) marinated pork chop, (B) beef (chuck tender), (C) dried filefish, (D) semi-dried squid, (E) rice cake, and (F) *Japchae*. There were no significant differences in all samples (P>0.05).

민감도가 더 높다고 판단하였다. Oh 등[7]의 연구에서 *S. aureus*에 대한 MSA, BPA, STX Petrifilm의 민감도를 비교한 결과 각각 76.6%, 86.6%, 90%로 나타났고, Kim 등[3] 또한 MSA에서 *Listeria*가 *S. aureus*의 전형적인 집락 형태를 나타내었다고 보고함에 따라 *S. aureus* 선택배지 중 MSA의 민감도가 비교적 낮음을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 실험에서는 STX Petrifilm과 식품공전에 등재된 선택배지 중 민감도가 높은 BPA의 회수율을 비교하였다.

회수율 측정을 위해 6가지 시료에 *S. aureus*를 농도 별로 접종하여 배양한 결과, 2, 3, 5, 7 Log CFU/g이 되도록 접종한 모든 시료에서 0시간과 24시간 후에 STX Petrifilm과 BPA에서 *S. aureus*가 비슷한 수준으로 회수된 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 1, 2, 3, 4), 이를 통계 처리한 결과 BPA와 STX Petrifilm으로 얻은 세균 수의 유의적인 차이는 없었다(P>0.05). Kim 등[8]은 한국 전통식품에, Viçosa 등[9]은 원유와 치즈에 *S. aureus*를 접종한 후 회수율을 조사하였고 그 결과 기존의 전통적인 미생물 시험법과 STX Petrifilm을 사용한 시험법에 유의적 차이가 없는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 같은 접종농도에서 시료별로 회수된 *S. aureus* 세균수의 차이는 시료별로 존재하는 일반세균수의 차이 때문인 것으로 판단된다. Lee 등[10]의 연구 결과에서 식품 내 일반 세균수가 많을 경우, 저농도의 식중독 세균은 식품에서 생장이 저해되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구

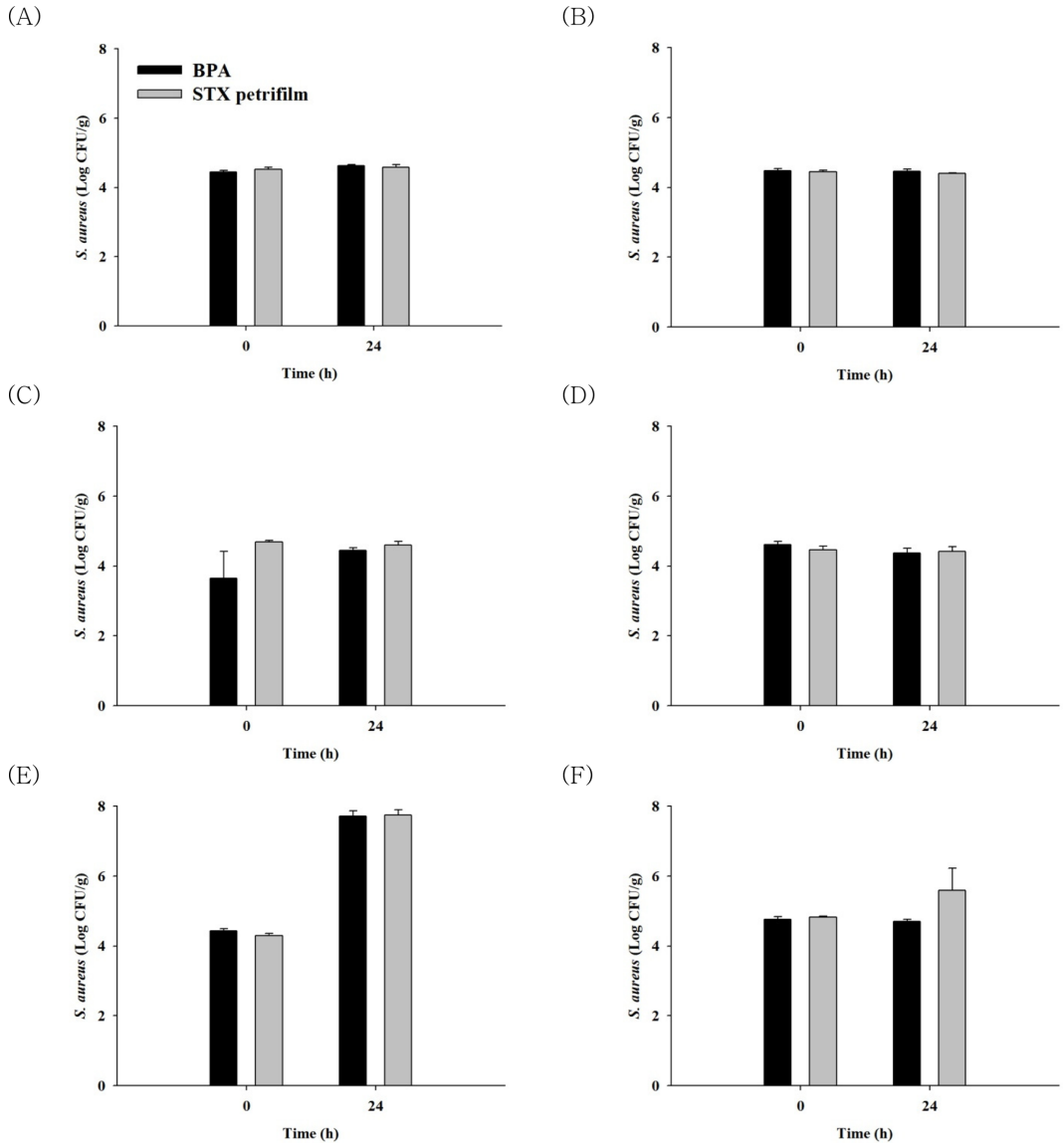

Fig. 3. Comparison of Petrifilm™ Staph Express Count plate and Baird-Parker agar for *Staphylococcus aureus* enumeration in foods at 5-Log inoculation level. (A) marinated pork chop, (B) beef (chuck tender), (C) dried filefish, (D) semi-dried squid, (E)rice cake, and (F) *Japchae*. There were no significant differences in all samples (P>0.05).

에서도 식품 시료에 존재하는 일반 세균수가 *S. aureus* 회수율에 영향을 주어 시료 별 결과 차이가 나타났을 것이라고 판단된다.

Souza 등[11]은 중온성 호기성 세균에서 기존의 전통적인 미생물 시험법과 petrifilm을 이용한 시험법의 상관계수가 높다고 보고하였으며, STX Petrifilm 사용법은 기존의 전통적인 미생물 시험법과 비교하여 회복능이 우수했다고 보고하였다. Ingham 등[12]은 몇몇 식품에서 분리된 *S. aureus*는 BPA에서 전형적인 집락 형상을 띄지 않는 경우가 있다고 보고하였다.

결론적으로 STX Petrifilm은 식품내에 존재하는 *S. aureus*를 정량적으로 분석하는데 있어 기존의 선택배지와 큰 차이가 없으므로, 기존 배지의 사용을 대체할 수 있을 것으로 생각되며 이로 인해 분석 시간의 단축과 최소 배양공간의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 식품으로부터 *S. aureus*를 분리하는 데 사용되는 선택배지들의 성능을 평가하였다. 먼저 BPA와 MSEY agar의 민감도 비교를 통해 BPA를 선택하였고, 이 배지의 회수율을 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate (STX petrifilm)의 회수율과 비교하였다. 축산식품 중 돼지고기 주물럭과 육회용 꾸릿살, 수산식품 중 쥐포와 반건

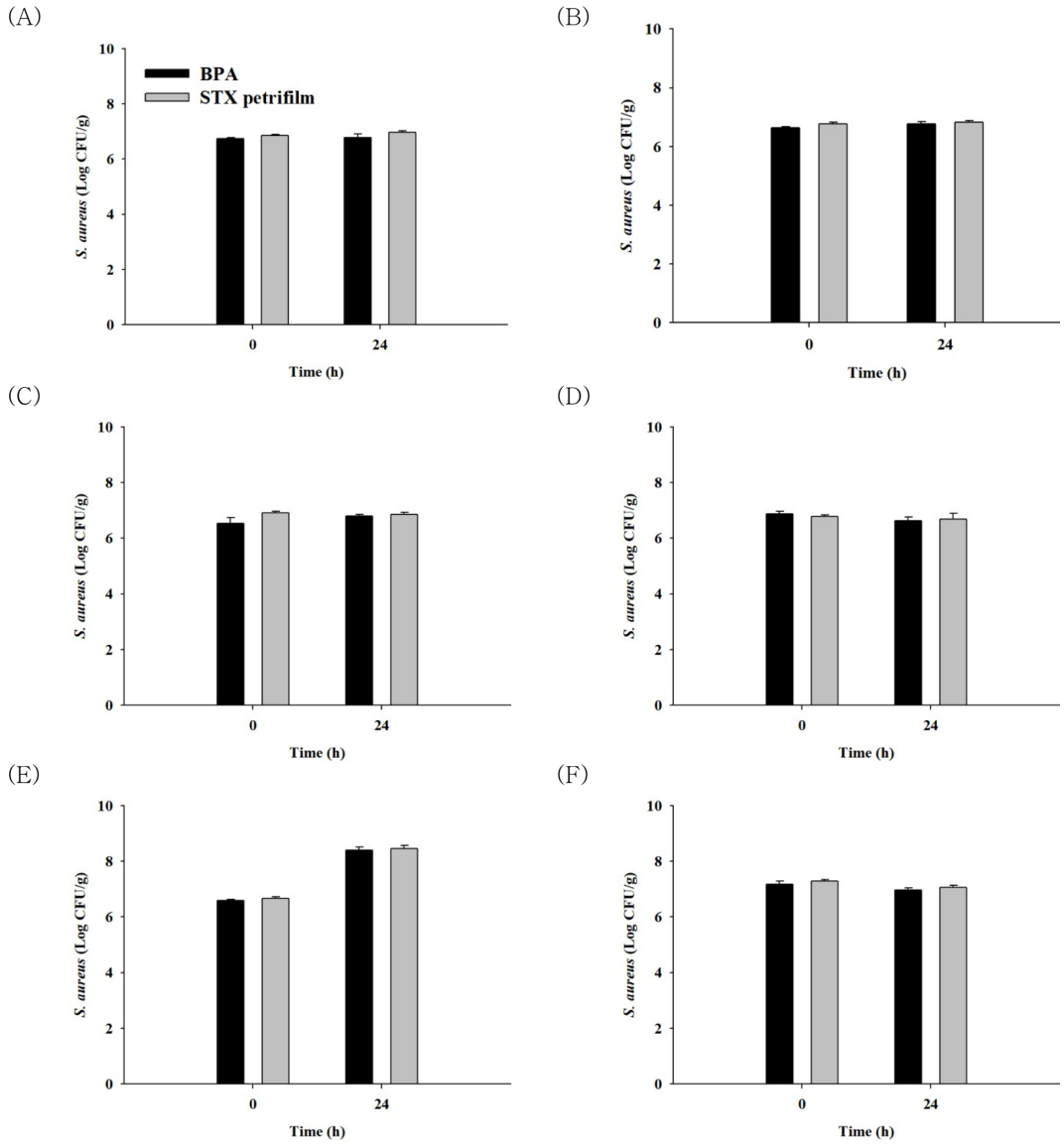

Fig. 4. Comparison of Petrifilm™ Staph Express Count plate and Baird-Parker agar for *Staphylococcus aureus* enumeration in foods at 7-Log inoculation level. (A) marinated pork chop, (B) beef (chuck tender), (C) dried filefish, (D) semi-dried squid, (E) rice cake, and (F) *Japchae*. There were no significant differences in all samples (P>0.05).

조 오징어, 전통식품 중 떡과 잡채를 선정하여 *S. aureus*를 접종한 후 BPA와 STX Petrifilm 배지를 사용하여 회수율 분석 실험을 실시하였다. 6가지 식품에 대해 인위적으로 *S. aureus*를 저농도에서부터 고농도까지 접종한 후 0시간과 24시간 후의 검출률을 측정하였다. 두 배지 간의 유의 수준을 분석한 결과 식품의 종류, 접종 농도에 관계없이 두 선택배지 간에 통계적 유의차는 없는 것으로 확인되었다(P>0.05). 따라서 STX Petrifilm은 BPA를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 배지의 준비 및 도말에 소요되는 분석시간을 절감하고 배양에도 최소한의 공간이 필요하게 되어 신속, 정확한 분석에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Kim, H.K., Lee, H.T., Kim, J.H., Lee, S.S.: Analysis of microbiological contamination in ready-to-eat foods. *J. Food Hyg. Saf.*, **23(4),** 285-290 (2008).
2. Choi, J.W., Park, S.Y., Yeon, J.H., Lee, M.J., Chung, D.H., Lee, K.H., Kim, M.G., Lee, D.H., Kim, K.S., Ha, S.D.: Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *J. Food Hyg. Saf.,* **20(1),** 43-47 (2005).
3. Kim, S.R., Lee, S.H., Seo, M.K., Kim, W.I., Park, K.H., Yun, H.J., Yoon, Y.H., Yoo, S.Y., Ryu, K.Y., Yun, J.C., Kim, B.S.: Evaluation of selective media for isolation of *Staphylococcus aureus* from agricultural products. *J. Food Hyg. Saf.,* **27(2),**

169-175 (2012).
4. Wilson, I.G., Gilmour, A., Cooper, J.E., Bjourson, A.J., Harvey, J.A.: A non-isotopic DNA hybridization assay for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.,* **22(1),** 43-54 (1994).
5. MFDS: Korean Food code. Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_01.jsp. (2019).
6. Kim, H.J., Oh, S.W.: Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. *Food Sci. Biotechnol*., **19(4),** 1097-1101 (2010).
7. Oh, M.H., Kang, S.I., Hong, S.P., Oh, S.W.: Comparison of four different isolation media for *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **38(5),** 606-611 (2009).
8. Kim, K.S., Bae, E.K., Ha, S.D., Park, Y.S., Mok, C.K., Hong, K.P., Kim, S.P., Park, J.: Evaluation of dry rehydratable film method for enumeration of microorganisms in Korean traditional foods. *J. Food Hyg. Saf*., **19(4)**, 209-216 (2004).
9. Viçosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., Nero, L.A.: Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiol*., **27(4)**, 447-452 (2010).
10. Lee, J.H., Song, K.Y., Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Han, J.A., Chung, Y.H., Seo, K.H.: Comparison of standard culture method and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. *Korean J. Food Sci. An*., **30(3),** 410-418 (2010).
11. Souza, L.M.J.D., Costa, A.C., Nero, L.A., Couto, E.P., Ferreira, M.D.A.: Evaluation of Petrifilm™ system compared with traditional methodology in count of indicators of sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk. *LWT-Food Sci. Technol*., **35(2)**, 375-379 (2015).
12. Ingham, S.C., Becker, K.L., Fanslau, M.A.: Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *J. Food Prot*., **66(11)**, 2151-2155 (2003).