pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 3, pp. 222~225 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.3.222

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

식품 유래 대장균군의 발색 배지 분리 효율 비교

이다연[1] · 김희언[1] · 이진성[2] · 김근성[3] · 조용선[1]*
[1]한국식품연구원 식품분석센터, [2]경기대학교 생명과학과, [3]중앙대학교 식품공학과

Comparative Evaluation of Selective Chromogenic Media for Coliforms Bacteria Isolated from Food

Da-Yeon Lee[1], Hee-Eon Kim[1], Jin-Sung Lee[2], Keun-Sung Kim[3], and Yong-Sun Cho[1]*
[1]*Food Analysis Center, Korea Food Research Institute*
[2]*Dept. of Biological Sciences, Kyonggi University, Korea*
[3]*Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Korea*
(Received December 21, 2015/Revised January 17, 2016/Accepted June 13, 2016)

ABSTRACT - In this study, the performance of five selective media for coliform bacteria was evaluated. In total, 83 coliform isolates from ready-to-eat food and 21 reference strains were inoculated in five agar media : Chromocult coliform agar (Merck Millipore), HiCrome coliform agar (Sigma), CHROMagar ECC chromogenic media, Brilliance *E. coli*/coliform selective agar (OXOID), and endo agar (Merck Millipore). Coliform isolates and reference strains were inoculated on the selective media to test media sensitivity and specificity. The tested media showed the following sensitivities for the isolated strains: Chromocult coliforms agar and HiCrome coliform agar, 94%; Brilliance *E. coli*/coliform selective agar, 93%; CHROMagar ECC chromogenic media, 92%; and endo agar, 74%. In addition, all media showed 100% specificity, except for endo agar (71%). Moreover Chromocult coliform agar and HICrome coliform agar showed high levels recovery. Taken together, these results identified Chromocult coliform agar and HICrome coliform agar as an effective selective medium for coliforms with higher sensitivity and specificity compared to other media tested in this study.

Key words : Selective media, Coliforms, Chromogenic media, Evaluation

대장균군은 물, 토양 등 자연계에 분포되어 있으며, 사람과 동식물 장내에 존재하는 그람 음성의 간균으로 유당을 분해하여 가스를 생성하는 세균으로 식품의 위생을 판단하는 기초가 된다[1)]. 일반적으로 대장균군 검사는 추정시험, 확정시험, 완전시험의 3단계로 나누어서 하며 부적합 또는 양성 판정은 확정시험 단계에서 선택 배지에서 전형적인 대장균군 집락의 생성 여부로 판정한다. 그러므로 대장균군 선택 배지는 대장균군 결과를 확인하는 중요한 요소로 작용을 한다[2)].

최근 생활 수준이 향상되고 식생활 패턴이 변화됨에 따라 김밥, 샌드위치 등 완전하게 조리되어 판매 유통되는 식품의 소비가 늘어나고 있다. 식품의약품안전처의 식중독 통계를 보면 즉석 식품으로 인한 식중독 발생 사고가 증가하고 있으며, 따라서 위생관리가 중요한 관점으로 대두되고 있다. 식품에 초기에 미생물에 의해 오염되어 있을 경우, 부적절한 유통 및 보관으로 인해서 미생물이 기하급수적으로 증가 할 우려가 있으므로 위생의 기초가 되는 대장균군에 대한 미생물학적 관리가 필요하다[3,4)].

식품으로부터 세균의 존재를 확인하는 시험 방법 중 전통적인 방법으로 선택배지를 사용한 검출 방법은 시간이 오래 걸리나, 가장 정확하고 편리하다. 따라서 ISO, AOAC 및 AFNOR 등과 같은 국제 표준 기구에서도 표준시험방법(Gold standard)으로 채택하고 있다[1,2)]. 또한 대장균군은 종류가 다양하기 때문에 특정 미생물을 검출하는데 이용하는 PCR 등의 시험 방법은 적용이 어려우며 시험 방법이 복잡하다. 국제적인 시험 방법은 증균(enrichment)을 통해서 손상되거나 스트레스를 받은 세균을 활성화 시키고 배지를 이용하여 선택(selection) 한 후 선택된 세균을 확인(confirmation)의 단계를 거친다[3,5)]. 그러나 증균하는 과정 중에 목적하지 않은 세균이 과성장 할 경우는 원하는

*Correspondence to: Yong-Sun Cho, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Sungnam, Gyunggi 13539, Korea
Tel: 82-31-780-9242, Fax: 82-31-780-9280
E-mail: yscho@kfri.re.kr

세균을 분리하는 과정이 어려울 수 있다. 따라서 선택성이 높으면서 목적하는 세균만 잘 자랄 수 있는 선택 배지의 선별은 시험의 결과를 판정하는데 중요하다[4,6].

대장균군 선택성을 높이기 위한 다양한 발색 배지들이 있다. 발색 배지 개발 연구는 1990년 이후 진행되었으며 이들 배지는 육안으로 쉽게 위양성 결과를 일으키는 유사한 세균들을 구분할 수 있는 장점이 있어 실용성이 인정받고 있으며[5], Chromogenic 배지는 β-galactosidase (Lac)와 β-glucuronidase (Gus)의 효소기질을 이용하여 대장균/군을 동시 검출 하는 배지라고 보고되어있다[7]. 대장균군 발색 배지 중 CHROMagar™ ECC 배지는 대장균/군 검출 배지로 양성 집락은 mauve로 나타나며 음성 집락은 colourless이다. *Hafnia*의 경우는 위음성을 나타낼 수도 있다. Brilliance *E.coli*/coliform agar는 두 가지의 다른 효소기질을 사용하여 대장균/군을 검출 하는데 사용하는 배지이다[8-10]. 대장균군은 galactosidase를 생성 시켜서 pink 집락으로 검출이 가능한 배지이다. Chromocult coliform agar (Merck)는 대장균군 검출 시 pepton, pyruvate, sorbitol이나 phosphate buffer를 첨가하여 손상된 세균의 성장을 증진시키고 chromogrenic 기질인 β-D-galactosidase가 salmon-gal로 분해되어서 salmon이나 red를 띠는 원리를 이용하였다. 대장균은 purple의 집락을 형성한다[4]. HiCrome™ coliform agar는 식품에 존재하는 대장균/군을 검출하는데 사용하는 배지이다. Sodium lauryl sulfate에 의해서 그람양성 균을 억제시키며 salmon-gal과 X-glucuronide의 두 기질이 포함되어 있어서 salmon-gal이 분해되어 β-D-galactosidase가 생성되면서 대장균군을 검출할 수 있으며 이 때 집락은 salmon-to-red로 변하며 tryptophan에 의해서 indole 반응을 활성화 시킨다. X-glucuronide의 발색기질에 의해 대장균을 검출 할 수 있는 배지이다[8,9].

그러나 발색배지는 특성 성분을 증진 시키기 위해 개발된 배지이므로 특정한 대장균군에 대한 저해가 일어 날 수도 있다. 그러므로 본 연구에서는 식품에서 분리한 대장균군을 시중 유통 중인 5가지의 선택 배지에서의 분리성능 비교 검토를 통해서 식품에서 대장균군을 높은 분리율을 얻을 수 있는 배지를 제시하고자 하며 새로운 대장균군 배지를 개발하고자 하는 연구 시 기존 선택배지와 비교 할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 한다.

Materials and Methods

실험 균주

최종 조리된 식품에서 식품공전 방법에 따라 대장균군을 분리하였다. 분리한 대장균군은 VITEK II (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)의 생화학 장비를 이용하여 동정 구분하였다. 시험에 사용한 균주는 ATCC, KCTC, NCCP에서 분양 받은 대장균/군 표준균주 21종, 식품에서 분리한 83종의 대장균군(*Citrobacter frenudii* 4균주, *Citrobacter sakazakii* 3균주, *Enterobacter aminigenus* 6균주, *Enterobacter aerogenes* 3균주, *Enterobacter asburiae* 2균주, *Enterobacter cloacae* 26균주, *Klebsiella oxytoca* 6균주, *Klebsiella pneumonia* 33균주), 비대장균군 7균주를 사용하였다.

Table 1. Isolation media used this study

Isolation media	Colony color for Coliforms	Colony color for other coliforms	Company
CHROMagar ECC	Mauve	Colourless or inhibited	CHROMagar
Brilliance E.coli/ Coliform agar	pink	Colourless	OXOID
Chromocult Coliform agar	salmon to red	Colourless	Merck
HICrome coliform agar	salmon to red	Colourless	SIGMA
ENDO agar	salmon to red	Colourless	Merck

비교 평가 배지

평가한 분리 배지는 국제적으로 공인 인증 받은 선택하였다. 발색 배지 별 대장균/군에 대한 생화학적 양상은 Table 1과 같다.

선택배지의 민감도와 특이도 분석

5종의 선택 배지에 식품에서 분리한 대장균군, 비대장균군을 획선 배양하여 배지에서 권장하는 온도 및 배양 시간을 준수하여 colony 색깔과 형태를 중심으로 양성, 음성, 위양성, 위음성을 판정하였고, 위양성, 위음성의 균주에 대해서는 각각의 선택 배지에서 한번 더 획선 배양하여 성상을 확인하고 최종 판정을 하였다. 각 선택배지의 민감도와 특이도는 백분율로 나타내었으며 산출 방식은 다음과 같다.

$$\text{민감도(Sensitivity)} = \text{양성균주}/(\text{양성균주} + \text{위음성균주}) \times 100$$
$$\text{특이도(Specificity)} = \text{음성균주}/(\text{음성균주} + \text{위양성균주}) \times 100$$

발색배지 회수율 확인 시험

식품에서 분리한 다양한 종류의 대장균군을 McFarland 0.5로 탁도를 맞춘 뒤 희석 한 후 5종의 대장균군 배지에 각 100 μl씩 분주 한 후 37°C에서 24시간 배양 후에 배지에서 자란 colony를 계수하여 endo agar (Merck, Darmstadt, Germany)를 비교로 해서 회수율을 확인 시험하였다.

Results and Discussion

선택배지의 민감도와 특이도 분석

대장균군 표준균주 21종에 대한 발색배지의 민감도는

Table 2. Sensitivity, Specificity, and False-positive bacteria on five different media

Selective media	Sensitivity (%)			Specificity (%)
	Coliforms			Other Coliforms (N = 7)
	Type strains (N = 21)	Isolation Coliforms (N = 83)	Total (N = 104)	
CHROMagar ECC	76%(16/21)	96% (80/83)	92%	100%(7/7)
Brilliance *E.coli*/coliform medium	86%(18/21)	95% (79/83)	93%	100%(7/7)
Chromocult coliform agar	95%(20/21)	94%(78/83)	94%	100%(7/7)
HICrome coliform agar	91%(19/21)	95% (79/83)	94%	100%(7/7)
ENDO agar	91%(19/21)	70% (58/83)	74%	71%(2/7)

Table 3. Result of selective media for *Citrobacter frenudii*

균주명	CHROM agar ECC	Brilliance E.coli/coliform medium	Chromocult coliform agar	HICrome coliform agar	ENDO agar
Citrobacter frenudii	-	-	-	-	-
Citrobacter frenudii	+	+	+	+	-
Citrobacter freundii	-	-	-	-	-
Citrobacter freundii	-	-	-	-	-

Table 4. Selective agar recovery of food isolation Coliforms

Strain	CHROM agar ECC	Brilliance *E.coli*/ coliform medium	Chromocult coliform agar	HICrome coliform agar	ENDO agar
Citrobacter freundii	0.81	0.84	0.98	1.05	1.0
Cronobacter sakazakii	0.45	0.81	0.90	0.86	1.0
Enterobacter aerogenes	0.78	0.88	1.03	0.90	1.0
Enterobacter amigenus2	0.64	0.83	1.02	0.88	1.0
Enterobacter asburiae	0.92	1.23	1.04	1.22	1.0
Enterobacter cloacae	0.69	1.00	1.02	0.99	1.0
Klebsiella oxytoca	0.86	0.98	0.95	0.97	1.0
Klebsiella pneumoniae	0.87	1.02	0.97	1.06	1.0
Average	0.75	0.95	0.99	0.99	1.0

chromocult coliform agar (Merck)가 가장 높았으며 식품에서 분리 대장균군 83 균주 및 표준균주로 시험한 결과는 chromocult coliform agar (Merck)와 HICrome coliform agar 가장 높았다. Endo agar는 chromogenic 배지에 비해 민감도가 현저하게 낮았는데(Table 2) 이는 *Citrobacter* 속, *Enterobacter* 속, *Cronobacter* 속, *Klebsiella* 속 모두 검출이 가능한 일반적인 coliform 선발배지의 경우 specificity가 낮게 나타난 보고와 유사하였다[11]. 상업적으로 판매 중인 chromogenic 대장균군 검출 배지는 90%의 높은 감도를 보였다. 그러나 민감도 결과에서 식품에서 분리한 *Citrobacter frenudii* 4균주 중 3균주가 시험에 사용한 대장균군 발색배지에서 위음성 반응 보였으며, endo agar에서는 4균주 모두 위음성 반응을 보여서 식품에서 *Citrobacter frenudii*에 의해 오염되었을 때는 배지상에서 정확하게 구분 되지 않았다(Table 3). *Citrobacter frenudii*는 β-glucuronidase를 생성하지만 소수의 혈철형에서만 β-glucuronidase 활성이 나타난다는 보고가 있으며[1,2], β-glucuronidase를 생성에 대한 기작은 정확히 알려져 있지 않았다. Brenner K.P 등[1]은 플라스미드가 반응에 영향을 줄 수 있다고 논하고 있다. 따라서 만일 식품에서 *Citrobacter frenudii*를 검출을 하고자 하였을 때는 상업적인 대장균군 배지는 검출 감도가 낮으므로 추가적인 대장균군 확인 시험이 필요하고 생각된다. 비대장균군에 대한 특이도는 모든 chromogenic 배지가 7/7(100%)로 쉽게 분리 할 수 있었다. 그러나 비chromogenic 배지인 endo agar는 특이도가 71%로 낮았으며 *Salmonella, Shigella*에서 위양성 반응을 보였다.

선택배지의 회수율 확인 시험

식품에서 분리한 분리한 대장균군 83균주의 선택배지에서의 회수율은 비chromogenic 배지인 endo agar를 기준(1.0)으로 하여 비율로 계산한 결과 CHROMagarECC는 *Enterobacter asburiae*에서 최고 회수율(0.92), *Cronobacter sakazakii* 에서 최저 회수율(0.45)을 보였으며, Brilliance *E.coli*/coliform medium는 *Enterobacter asburiae* (1.23)

Klebsiella pneumonia (1.02)에서 Endo agar보다 높은 회수율을 보였다. Chromocult coliform agar는 4균주에서 Endo agar보다 높은 회수율을 보였으며 *Cronobacter sakazakii*에서 최저 회수율(0.90)를 보였다. HICrome coliform agar 배지에서는 *Enterobacter asburiae* (1.22)로 가장 높은 회수율을 보였다. 최저 회수율은 *Cronobacter sakazakii* (0.86)을 나타냈다(Table 4). 전체 분리 균주에 대한 회수율 결과 Chromocult와 HICrome coliform agar에서 4종의 선택배지 중 가장 높은 회수율을 보였다. R.d Gonsalez 등[4]에 의하면 대장균군의 효율적인 배지로 violet re bile agar (VRBA)와 Chromocult coliform agar (Merck)가 일반적으로 대장균 및 대장균군을 검출하는데 효과적이라고 하였다. 본 연구의 결과에서도 Chromocult coliform agar와 HICrome coliform agar의 두 배지의 민감도가 다른 발색 배지에 비해 높아 다양한 식품에서 대장균군을 효율적으로 검출하는데 가장 적합한 배지로 생각된다. 개별 분리배지의 경우 분리 효율이 월등하게 높지 않기 때문에 적어도 두 가지 또는 세 가지의 분리배지를 동시에 사용하여야 식품에서 검출 확률을 증가시킬 수 있다는 보고가 있으므로[13] 대장균군을 분리할 때는 기존의 식품공전에 등재되어 있는 Endo agar와 발색기질이 포함되어 있는 배지를 보안해서 사용한다면 효과적인 검출이 가능 할 것으로 생각된다.

Acknowledgement

이 논문은 2014 년도 중소기업청 중소기업기술개발지원사업에 의해 수행된 것입니다.

국문요약

식품에서 대장균군을 효율적으로 분리하기 위해 대장균군 선택배지 5종: Chromocult Chromocult coliform agar (Merck), Hicrome coliform agar (Sigma), CHROMagar ECC, Brilliance E.coli/coliform medium (OXOID), endo agar (Merck)을 선별하여 식품 분리 대장균군 83종 및 표준균주 21종에 대해서 민감도와 특이도를 분석한 결과 Chromocult coliform agar와 HICrome coliform agar에서 94%도 민감도가 가장 높았으며, Brilliance *E.coli*/coliform medium는 93%, CHROMagar ECC는 92%, ENDO agar는 74%의 민감도를 나타냈다. Chromocult coliform agar와 HICrome coliform agar는 대장균군의 회수율도 높았다. 그러므로 Chromocult coliform agar와 HICrome coliform agar는 대장균군을 분리하는데 가장 효율적인 배지로 생각된다.

References

1. Brenner, K.P., Rankin, C.C., Roybal, Y.R., Stelma, G.N.J., Scarpino, P.V., Dufour, A.P.: New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia Coli* in Water. *Appl. Environ. Microbiol*., **59**, 3534-3544 (1993).
2. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Korea Food code (2015).
3. Kim, H.J., Oh, S.W.: Performance Comparison of 5 Selective Media used to Detect *Staphylococcus aureus* in Foods. *Food Sci. Biotechnol*., **19**, 1097-1101 (2010).
4. González, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D., De Sousa, G.B.: Evaluation of a Chromogenic Medium for Total Coliforms and *Escherichia Coli* Determination in Ready-to-Eat Foods. *Food Microbiol*., **20**, 601-604 (2003).
5. 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.: Evaluation of Selective Media for Isolation of *Staphylococcus aureus* from Agricultural Products. *J. Fd. Hyg Safety*, **27**, 169-175 (2012).
6. Samra, Z., Heifetz, M., Talmor, J., Bain, E., Bahar, J.: Evaluation of use of a New Chromogenic Agar in Detection of Urinary Tract Pathogens. *J. Clin. Microbiol*., **36**, 990-994 (1998).
7. Fricker, E.J., Fricker, C.R.: Use of Two presence/absence Systems for the Detection of *E. Coli* and Coliforms from Water. *Water Res*., **30**, 2226-2228 (1996).
8. Manafi, M.: New Developments in Chromogenic and Fluorogenic Culture Media. *Int. J. Food Microbiol*., **60**, 205-218 (2000).
9. Filius, P.M.G., Van, Netten D., Roovers, P.J.E., Vulto, A.G., Gyssens, I.C., Verbrugh, H.A., Endtz, H.P.: Comparative Evaluation of Three Chromogenic Agars for Detection and Rapid Identification of Aerobic Gram-negative Bacteria in the Normal Intestinal Microflora. *Clinical microbiology and infection*, **9**, 912-918 (2003).
10. Manafi, M.: Fluorogenic and Chromogenic Enzyme Substrates in Culture Media and Identification Tests. *Int. J. Food Microbiol*., **31**, 45-58 (1996).
11. Kim, H.J., Koo, M.S., Oh, S.W.: Performance Comparison of 3 Different Isolation Media of *Cronobacter Sakazakii*. *J Korean Soc Food Sci Nutri*., **39**, 764-768 (2010).
12. Sartory, D.P., Howard, L.: A Medium Detecting β-glucuronidase for the Simultaneous Membrane Filtration Enumeration of Escherichia Coli and Coliforms from Drinking Water. *Lett. Appl. Microbiol*., **15**, 273-276 (1992).
13. Uyttendaele, M., Bagamboula, C.F., De Smet, E., Van Wilder, S., Debevere, J.: Evaluation of Culture Media for Enrichment and Isolation of *Shigella Sonnei* and *S. Flexneri*. *Int. J. Food Microbiol*., **70**, 255-265 (2001).