

하수중의 *Salmonella spp.* 분리방법에 관한 비교연구

김 성 수·염 중 화*

강원도 보건환경연구원, 워터스 생명환경연구소*

A Study on the *Salmonella spp.* isolation method in the sewage specimens

Sung-Soo Kim and Jong-Hwa Yum*

*Public Health & Environment Research Institute of Kangwon-Do,
Waters Environment Research Center**

Abstract

This study was carried out in order to compare the methods for *Salmonella spp.* isolation from sewage and to settle the most appropriate conditions for that isolation. The direct enrichment method was more effective than the pre-enrichment method for *Salmonella spp.* isolation. The rate of detection was much higher when the specimens were enriched at 41.5 °C than when at 35 °C. Usage of XLBG agar medium showed better results for *Salmonella* isolation than that of SS medium. It can be suggested that the most effective combination for *Salmonella spp.* isolation was the direct centrifugation(3,000 rpm, 100ml)-direct enrichment(41.5 °C)-usage of XLBG medium.

I. 서 론

*Salmonella spp.*은 인간과 동물의 장관에 주로 기생하는 그람음성 간균으로 배설물 등을 통해 전파되며 자연계에 널리 분포되어 있다. 이들은 장관으로부터 배출된 뒤에도 하천

수나 해수, 사료 등의 환경에서 장기간 생존할 수 있어 오염의 지표세균으로 인정되며 인간의 건강에 잠재적인 위험 요인으로 인식되어 왔다^{1,2,3,4)}. 따라서 환경 중의 *Salmonella spp.*의 존재를 정성 및 정량적으로 평가하려는 시도가 계속되어 왔으며 많은 방법과 배지

가 고안되어 사용되고 있다^{5, 6, 7, 8)}. 특히 최근에는 Immunoimmobilization⁹⁾, enzyme immunoassays^{10, 11)}, DNA probes^{12, 13)}, immuno-PCR¹⁴⁾, 그리고 Hydrophobic grid membrane filters¹⁵⁾ 등을 이용한 신속하고 정확한 *Salmonella* spp. 검출방법이 개발되어 있으나, 많은 비용과 숙련된 기술이 필요하여 일선 검사소에서는 활용하기에 어려운 문제점이 있어 간단하고 정확한 검사 방법이 필요한 실정에 있다. 증균배지로는 TBG 배지가 SF 배지보다 효과적이고, 평판배지 중에는 SS 배지가 *Salmonella* spp.의 분리에 유리하다고 알려져 있으며, 일반적인 방법으로는 4~6일이 소요되나¹⁶⁾ Salmosyst broth를 이용하여 48시간내에 검출이 가능한 방법을 제시한 바 있으며,¹⁷⁾ Jameson(1962)은 *Salmonella* spp.의 배양시 lag phase 도달 시간과 generation time이 37°C보다 41.5°C에서 더 짧다는 것을 밝혔으며, Spino¹⁸⁾은 이를 이용하여 37°C와 41.5°C에서의 증균효과를 비교하여 41.5°C에서 *Salmonella* spp.의 배양이 보다 효과적임을 확인하였다. 그러나 *Salmonella* spp.의 분리 동정은 가검물의 종류에 따라 분리 효과에 많은 차이를 보이고 있어 가검물의 특징에 따라 사용배지, 배양온도, 그리고 배양시간 등에 대한 적절한 검토후 적절한 분리 방법을 선택할 것을 권장하고 있다¹⁹⁾.

본 논문은 자연 환경 중 *Salmonella* spp.의 오염이 만연 되어있을 것으로 추정되는 하수 중에서, *Salmonella* spp.의 효과적인 분리방법 체계를 모색하고, 현장에 적용가능한 자료가 되도록하기 위하여 가검물 전처리 방법과 배양온도에 따른 분리율의 차이, 분리 효과와 평판배지 종류에 따른 분리 효과를 비교

하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. *Salmonella* spp. 분리용 시료

춘천 시내 하수를 대상으로 *Salmonella* spp.를 분리한 결과, 분리율이 가장 높았던 후평천(70.4%)과 약사천(55.6%)을 대상으로 각 5회씩 채수하여 가검물로 사용하였다.

2. 가검물의 전처리

가검물은 채수후 즉시 실험실로 옮겨 실험에 착수하였다. 가검물 10ml와 100ml를 3,000 rpm에서 15분간 원심분리후 상정액은 세균수 측정에 사용하고 침전물은 *Salmonella* spp. 분리에 사용하였다. 활성탄(Activated charcoal)처리는 하수 600ml당 0.6g의 비율로 활성탄을 혼합하고 100rpm에서 60분간 진탕시킨(Shaking)후, 그중 10ml와 100ml를 취하여 원심분리 방법과 동일하게 실험하였다.

3. 배 지

예비 배양용 배지는 Buffered Peptone Water(pH 7.4)를 사용하였고 배양용 배지로는 Tetrathionate Broth에 Brilliant Green을 1:10의 비율로 첨가한 것을 사용하였다. 분리 배지로는 H₂S를 생산하는 *Salmonella* spp. 분리에 널리 사용하는 SS agar배지(Difco)와 David Hussong 등이²⁰⁾ 추천하는 XLBG(Brilliant Green을 7ppm이 되도록 첨가한 것) 배지를 사용하였다.

4. 실험방법

실험은 Fig. 1과 같은 흐름에 따라 실시하

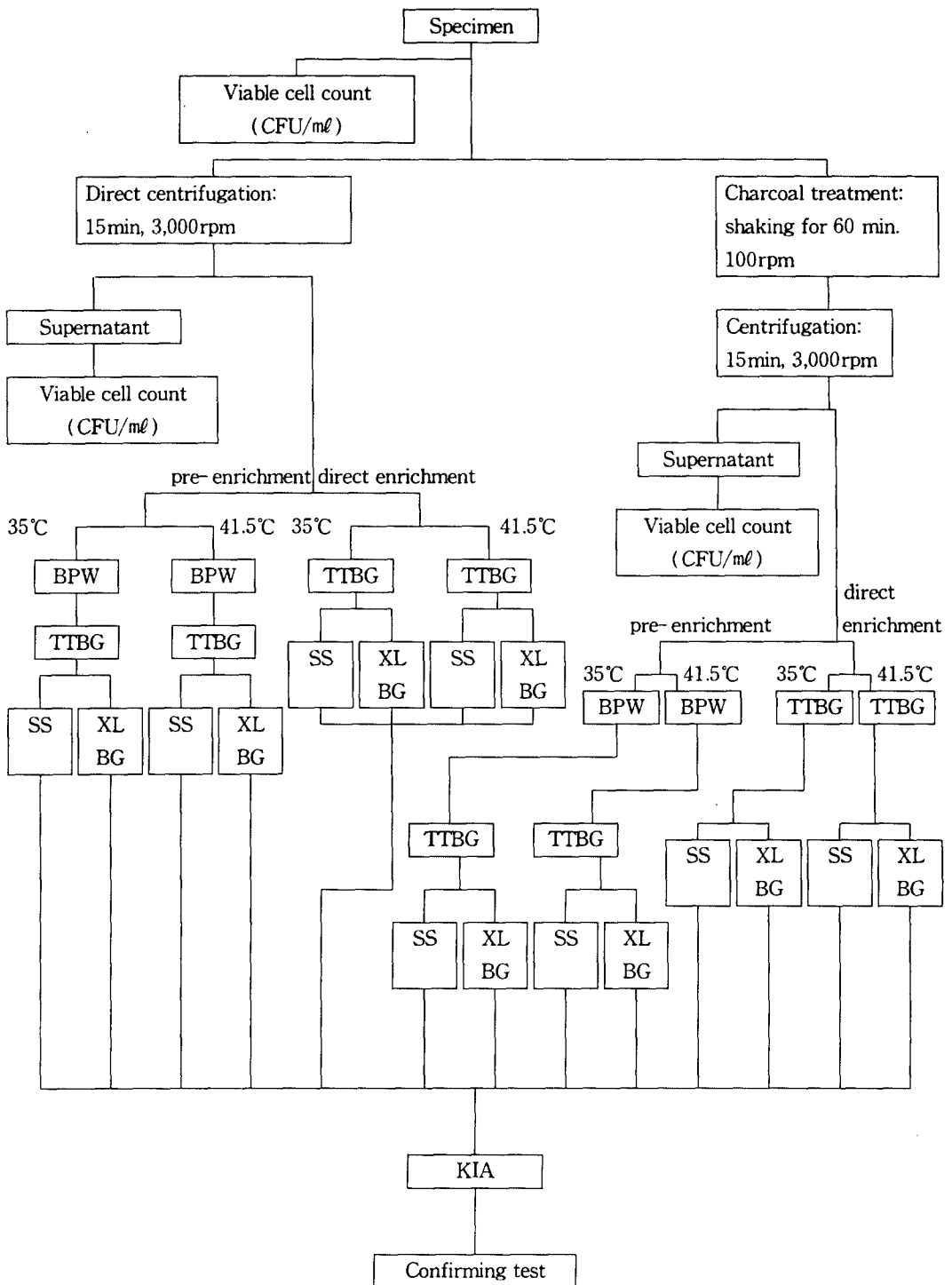


Fig. 1. Schematic diagram for *Salmonella* spp. isolation.

었다. 분리용 평판배지는 배양 온도와 관계없이 35°C에서 24시간 배양하였다. SS 배지상에서는 lactose 비분해성, H₂S 생성 집락을 *Salmonella spp.* 집락으로 추정하고, XLBG 배지에서는 연녹색 혹은 자색의 H₂S 생성 집락을 *Salmonella spp.* 집락으로 추정하여 조균(picking)하였다. 집락의 조균수는 평판배지에서 H₂S 생성 집락수가 5개 이하로 형성된 평판배지에서는 모든 집락을 조균하였고, 5개 이상의 집락을 생성한 평판배지에서는 임의로 5개의 집락을 조균하는 것을 원칙으로 하였다. *Salmonella spp.*의 확인 시험은 KIA배지의 성장, oxidase, lysin decarboxylation, dulcitol fermentation, 그리고 *Salmonella* O 항원 다가 혈청(Min ESS set II; Difco)의 slide 응집반응 시험을 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 전처리 방법에 따른 균체의 농축 효과

Table 1은 직접 원심분리 방법과 활성탄 처리 방법에 의한 균체의 농축효과를 세균수 측정 방법에 의해 비교한 결과이다. 농축효과는 가검물을 원심처리한 상정액의 세균수를 조사함으로써 농축효과를 판정하였는데 직접 원심분리한 경우는 49.7±5.2%, 48.5±6.3%로 나타났고 활성탄 처리후 원심분리한 경우는 70.5±6.4%, 70.4±5.8%로 나타나 활성탄 처리를 하였을 때 높은 분리율을 보였다(Table 1).

2. 예비 배양방법(pre-enrichment method)과 직접 배양방법(direct enrichment method)의 분리효과 비교

예비 배양 방법(pre-enrichment meth-

Table 1. Effects of cell concentration by pretreatment method(%)

Sites	Direct centrifugation	Charcoal centrifugation
Hupyung stream (n=5)	49.7±5.2	70.5±6.4*
Yaksa stream (n=5)	48.5±6.3	70.4±5.8*

* : p<0.05(Student's test), compared with direct centrifugation

Data are means±SEM of 5 experiments

Note : Effect of cell concentration(%)=[1-{Viable cell count of raw sewage)-(Viable cell count of supernatant)}÷(Viable cell count of raw sewage)]×100

od)과 직접 배양방법(direct enrichment method)에 의한 *Salmonella spp.*의 분리 결과는 Table 2와 같다. 전반적으로 예비 배양방법보다는 직접 배양방법에 의한 분리 효과가 높은 것으로 나타났으며(Table 2, 3), 배양 온도에 있어서는 35°C보다 41.5°C에서 배양한 것이 약 3배정도 높은 분리율을 나타냈다. 전처리 방법으로 직접 원심분리한 방법의 경우 예비 배양했을 때는 35°C와 41.5°C에서 각각 12.5%와 25.0%의 분리율을 나타내었으나, 직접 배양했을 때는 35°C와 41.5°C에서 각각 27.5%와 75.0%의 분리율을 보여 직접 배양한 방법이 보다 높은 분리율을 나타냈다. 그러나 활성탄 처리를 한 경우, 35°C에서 배양했을 때는 예비 배양방법과 직접 배양 방법에서 분리율이 각각 5.0%와 20.0%로 나타나 예비 배양방법보다 직접 배양방법이 효과적인 것으로 나타났으며, 41.5°C에서 배양한 경우 공히 32.5%의 분리율을 보여 분리

Table 2. Comparison of detection (rate) of *Salmonella spp.* from sewage with various isolation conditions

Enrichment		Direct centrifugation (n=40)	Charcoal centrifugation (n=40)
Pre-enrichment	35°C	5(12.5%)	2(5.0%)
	41.5°C	10(25.0%)	13(32.5%)
Direct enrichment	35°C	11(27.5%)	8(20.0%)
	41.5°C	30(75.0%)	13(32.5%)

방법상 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

3. 41.5°C에서 증균배양했을 때 시료의 전처리 방법에 따른 *Salmonella spp.*의 분리율
가검물의 전처리 방법에 따른 *Salmonella spp.*의 분리 결과는 Table 3과 같다. 가검물

을 원심분리하여 직접 배양방법으로 분리한 경우, 10ml와 100ml의 채취수에서 분리율이 각각 90%(10ml)와 100%(100ml)로 나타나, 예비 배양했거나 활성탄 처리후 직접 배양했을 때보다 높은 분리율을 보였다.

Table 3. Number of *Salmonella* positive specimens when the specimens enriched at 41.5°C

Pretreatment	Volume of Sample	Pre enrichment (n=10)	Direct enrichment (n=10)
Direct centrifugation	10ml	4	9
	100ml	5	10
Charcoal centrifugation	10ml	4	7
	100ml	5	4

4. 41.5°C에서 직접 배양(direct enrichment method)했을 때 SS 배지와 XLBG 배지 사용에 따른 *Salmonella spp.*의 분리율

Table 4는 41.5°C에서 직접 배양방법을 사

용하고, 분리배지로써 SS 배지와 XLBG 배지를 사용하여 direct centrifugation과 charcoal centrifugation했을 때 *Salmonella spp.*가 분리된 가검물의 수를 나타낸 것이다. SS 배지 사용시 가검물 10건 중 최저 0개

Table 4. Comparison of SS medium and XLBG medium for the effect of *Salmonella* detection when the specimens were enriched at 41.5°C directly

Pretreatment	Volume of Sample	SS (n=10)	XLBG (n=10)
Direct centrifugation	10ml	6	9
	100ml	5	10
Charcoal centrifugation	10ml	2	7
	100ml	0	4

에서 최고 6개의 가검물에서 *Salmonella* spp.가 분리되었으나 XLBG 배지 사용시는 최저 4개에서 최고 10개의 집락이 분리되어, XLBG 배지의 사용이 SS 배지 사용보다 전처리 방법에 관계없이 1.5~4배 이상의 높은 분리율을 보이는 것으로 나타났다(Table 3).

5. SS 배지와 XLBG 배지상에 형성된 H₂S 생산 집락 및 *Salmonella* spp.의 검출 결과

24시간 배양후 형성된 H₂S생산 집락은 각각 80개 평판에서 XLBG 배지에서 1669개,

SS 배지에서 1,339개의 집락형성을 보여, XLBG 배지를 사용했을 때 330개의 집락이 더 형성되는 것으로 나타났다. 이들 집락에서 SS 배지와 XLBG 배지에서 각각 564개, 396개의 집락을 조균하여 *Salmonella* spp.에 대한 동정실험한 결과, *Salmonella* spp.으로 확인된 것은 XLBG 배지에서 220개의 집락을 형성하여 55.6%의 분리율을 나타냈고, SS 배지가 58개의 집락을 형성하여 10.3%의 분리율을 나타내, SS 배지를 사용한 경우보다 XLBG 배지를 사용한 경우에 약 5배 이상의 높은 분리율을 보였다(Table 5).

Table 5. Number of H₂S positive colony formed on the SS medium and the XLBG medium, and number of *Salmonella* isolation from the media

Medium	No. of colony suspected	No. of colony picked	No. of <i>Salmonella</i> isolates
SS (n=80)	1,339	564	58(10.3%)*
XLBG (n=80)	1,669	396	220(55.6%)*

* Ratio of the number of *salmonella* isolates to the number of colony picked.

IV. 결 론

본 실험에서 비교한 예비 배양방법과 직접 배양방법의 효과에 대해서는 이견이 있다. 가축의 사료나 식품류같은 열·건조 및 냉동 처리과정을 거친 가검물에 포함되어 있는 *Salmonella* spp.은 가사된(sublethally injured) 상태에 있기 때문에 *Salmonella* spp.을 직접 배양하는 것보다는 예비 배양하는 것이 효과적일 수 있다. 그러나 본 실험 결과는 예비 배양방법보다 직접 배양방법이 높은 분리율을 나타냈다. 이는 하수에 *Salmonella* spp.와

경쟁적인 성장을 하는 균이 많이 존재하여 예비 배양시 이들 균의 증식으로 *Salmonella* spp.의 증식이 억제된 것으로 추정된다.

가검물의 전처리 과정은 보다 간편하게 *Salmonella* spp.를 분리하고, 또한 분리율을 향상시키기 위하여 고안된 것으로, 직접 원심 분리하여 침전물을 사용한 경우가 활성탄을 사용한 경우보다 분리 효과가 높은 것으로 나타났다. 활성탄과 같은 물질은 세균에 대해 표면흡착 능력이 있는 것으로 알려져 있어 가검물의 농축 효과가 높을 것으로 기대되어 사용했으나, 직접 원심분리의 경우와 비교해 볼 때

*Salmonella spp.*의 분리율이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나, 생균수 측정법에 의해 균체의 농축 효과를 분석해 본 결과 3,000rpm으로 직접 원심분리한 경우에 다양한 분리율을 보이고 있으므로 균의 농축 효과에 대한 비교 검토가 있어야 할 것으로 생각된다.

배양온도는 분리하고자 하는 균의 생리적 특성과 관계있으므로, *Salmonella spp.*의 증식에는 영향을 미치지 않으면서 기타 미생물의 성장율을 저해하는 온도가 효과적이라고 생각된다. 각 배양온도에 따른 *Salmonella spp.*의 분리율은 35°C 보다 41.5°C에서 배양하는 것이 *Salmonella spp.*의 분리율의 향상에 효과적인 것으로 나타났다. 장내세균 중에는 40°C 이상의 온도에서 성장 속도가 억제되는 균이 많이 있으며, *Salmonella spp.*의 대부분은 41.5°C에서 성장 억제가 되지 않는 것으로 알려져 있어 41.5°C가 배양온도로 선택되는 경우가 많다^{18, 21, 22, 23)}.

지금까지 국내에서는 *Salmonella spp.*의 분리 배지로 MacConkey배지와 SS 배지를

많이 사용해 왔으며 이중 SS 배지는 H₂S 생산 *Salmonella spp.*의 감별에 용이하고 제조법도 간단해 많이 사용하는 배지이다. 그러나, *Proteus spp.*와 같은 H₂S 생산균의 발육이 용이해 이들 균의 집락과 혼재해 있을 때, 육안으로 구별이 어려워 *Salmonella spp.*의 분리에 어려움을 주는 경우가 있다. XLBG 배지는 David Hussong(1984)등이 사용하여 *Salmonella spp.*의 분리에 보다 효과적임을 입증한²⁰⁾ 배지이며, 여과 멸균한 Brilliant Green을 6~7ppm되게 첨가할 경우 *Proteus vulgaris*를 비롯한 많은 장내 세균의 성장을 억제할 수 있고 *Salmonella spp.*의 집락은 그의 세균의 집락, 특히 *Citrobacter freundii*같이 경쟁적인 세균의 집락과 쉽게 구별되는 것이 특징인 배지이다. SS 배지와 XLBG 배지간의 분리율을 비교한 결과, SS 배지는 조균된 집락중 10.3%가 *Salmonella spp.*으로 확인되었으나 XLBG 배지는 55.6%로 나타나 SS 배지에 비해 5배 이상의 높은 분리 효과를 나타냈다(Table 5).

Table 6. Detection of *Salmonella* positive specimens with various combinations of methods

Combination with pretreatment	Medium	SS		XLBG	
		35°C (n=10)	41.5°C (n=10)	35°C (n=10)	41.5°C (n=10)
Cen-Pr-10		1	1	2	4
Cen-Pr-100		1	0	1	5
Cen-Di-10		2	6	5	9
Cen-Di-100		0	5	4	10
Ac-Pr-10		1	2	0	4
Ac-Pr-100		0	2	1	5
Ac-Di-10		2	2	4	7
Ac-Di-100		0	0	2	4

* Cen: Centrifugation, Pr: Pre-enrichment, Ac: Activated charcoal and centrifugation, Di: Direct enrichment, 10, 100: specimen volume(ml).

결론적으로, 하수에서는 예비 배양보다는 직접 배양방법이 효과적이었으며, 전처리 방법으로는 활성탄에 의한 흡착방법보다 직접 원심분리방법이 효과적인 것으로 나타났다. 또한 배양 온도는 35℃보다 41.5℃에서 배양효과가 더 좋았으며, 처리할 가검물의 양의 분리율 비교에서는 10ml와 100ml 사용간에 유의한 차이는 없었으나 100ml의 가검물 처리시 100%의 분리율을 나타내었다.

따라서, 하수에서의 *Salmonella spp.*의 분리에 원심분리(100ml)-직접 증균배양(41.5℃)-XLBG배지의 실험 체계를 적용하는 것이 보다 높은 분리율을 기대할 수 있는 것으로 나타났다(Table 6).

참 고 문 헌

1. Cherry, W. B., J. B. Hanks, B. M. Thomason, A. M. Murlin, J. W. Biddle, and J. M. Croon : Salmonellae as index of pollution of surface waters, Appl. Microbiol. Vol. 24 : 334-340. 1972.
2. Thomason, B. M., W. B. James, and W. B. Cherry : Detection of Salmonellae in the environment, Appl. Microbiol. Vol. 30 : 764-767. 1975.
3. Humphrey, T. J., E. Slater, K. McAlpine, R. J. Rowbury, and R. J. Gelbert. *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61 : 3161-3163. 1995.
4. Jean, G. P., B. Lakshmi, C. Russell, and I. Kim : Characterization of lipopoly-saccharide heterogeneity in *Salmonella enteritidis* by an improved gel electrophoresis method, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61 : 2845-2851.
5. Russ, C. F., and W. A. Yanko : Factors affecting Salmonellae repopulation in composted sludges, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 41 : 597-602. 1981.
6. Cook, W. L., R. A. Champion, and D. G. Ahearn : Isolation of *Salmonella enteritidis* serotype agona from eutrophic regions of freshwater lake, Appl. Microbiol. Vol. 28 : 723-725. 1974.
7. Munro, P. M., G. N. Flatau, R. L. Clement, and M. J. Gauthier : Influence of the RpoS(KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61 : 1853-1858. 1995.
8. Duffy, G., A. Ellison, W. Anderson, M. B. Cole, and G. S. A. B. Stewart : Use of bioluminescence to model the thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* in the presence of a competitive microflora, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61 : 3463-3465. 1995.
9. D'Aoust, J. Y., and A. M. Sewell : Reliability of the immunodiffusion 1-2 test system for detection of Salmonella in foods, J. Food Prot. Vol. 51 : 853-856. 1988.

10. D'Aoust, J. Y., and A. M. Sewell : Detection of *Salmonella* by the enzyme immunoassay(EIA) technique, J. Food Sci. Vol. 51 : 484-488. 1986.
11. Van Poucke, L. S. G. *Salmonella*-Tek, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 56 : 924-927. 1990.
12. Curiale, M. S., D. McIver, S. Weathersby, and C. Planer : Detection of salmonellae and other *Enterobacteriaceae* by commercial deoxyribonucleic acid hybridization and enzyme immunoassay kits, J. Food Prot. Vol. 53 : 1037-1046.
13. Rose, B. E., C. M. Liabres, and B. Bennett : Evaluation of a colorimetric DNA hybridization test for detection of *Salmonella* in meat and poultry products, J. Food Prot. Vol. 54 : 127-130. 1988.
14. Fluit, A. C., M. N. Widjoatmodjo, A. T. Box, R. Torensma, and J. Verhoef : Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 59 : 1342-1346. 1993.
15. Entis, P. : Improved hydrophobic grid membrane filter method, using EF 18 agar, for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 73 : 734-742. 1990.
16. International Organization for Standardization : Microbiology-general guidance on methods for the detection of *Salmonella*, International standard ISO 6579. International Organization for Standardization. Geneva.
17. Pignato, S., A., M. Marino, M. C. Emanuele, V. Iannotta, S. Caracappa, and G. Giammanco : Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61 : 1996-1999. 1995.
18. Spino, D. F. : Elevated-temperature technique for the isolation of *Salmonella* from streams. Appl. Microbiol, Vol. 14 : 591-596. 1966.
19. 손준용, 이길웅, 염재창, 박만석 : 동물사료에서의 *Salmonella* 균속분리에 관한 비교연구, 국립보건원보. 22권 185-193. 1985.
20. Hussong, D., N. K. Enkiri, and W. D. Burge : Modified agar medium for detecting environmental *Salmonellae* by the most-probable-number method, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 48 : 1026-1030. 1984.
21. Dudley, D. J., M. N. Guentzel, M. J. Ibara, B. E. Moore, and B. P. Sajik : Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 39 : 118-126. 1980.
22. Langeland, G. : *Salmonella spp.* in the environment of sewage treatment

- plants in oslo, norway. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 43 : 1111-1115. 1982.
23. Bell, J. B., W. R. Macrae, and G. E. Elliott : Incidence of R factors in coliform, fecal coliform, and Salmonella populations of the red river in canada, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 40 : 486-491. 1980.