

## 대구시 북구지역의 식용얼음에서 세균 분포 및 동정

김수정

대구보건대학 임상병리과

식용얼음은 식품의 제조·가공·조리 등에 직접 사용하거나 그대로 먹기 위해 먹는 물을 얼린 얼음을 뜻하며 얼음의 제조 및 판매 과정에서 미생물이 교차 오염되면 식중독 및 장염을 유발한다. 또한 식용얼음 뿐만 아니라 상수계통, 약수물, 상수와 냉온수기의 정수된 물에서도 여러 가지 원인에 의해서 세균이 증식하는 것으로 나타났다. 이런 이유로 대구시 북구지역에서 생산되는 식용얼음의 위생 상태를 살펴보고자 무작위로 15곳을 선정하여 Brain Heart Infusion 배지에서 세균을 배양한 결과 1곳을 제외한 14곳의 검체에서 균이 증식되었고 그람염색 결과, 그람음성간균이 80% 차지하였고 그람양성구균 17% 그리고 그람음성구균 3%의 분포를 나타냈다. 그람음성간균의 잠정적인 동정방법으로 API 20E kit와 API 20NE kit를 이용한 결과 *Enterobacter cloacae*, *Chryseomonas luteola*, *Pantoea* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Providencia rettgeri* 등이 검출되었다. 5곳에서 분리된 그람양성구균을 API Staph kit를 이용한 잠정적 동정결과 L업소에서 분리된 균은 식중독을 일으키는 병원성이 강한 *Staphylococcus aureus*로 동정되었다. 본 연구에서는 대구시 북구지역의 식용 얼음류에 존재하는 일반세균 및 병원성 세균의 분포를 조사함으로써 식용얼음의 위생 상태에 대한 주의를 부각시키고 나아가 대구시 타지역의 식용얼음에 대한 세균분포 조사 및 위생상태 점검에 대한 필요성을 시사한다.

**Key words** □ edible ice, *E. coli*, general bacteria, *S. aureus*

여름철 기온이 상승함으로 인해 냉음료, 특히 음식점에서의 식용얼음 소비가 증가되고 있다. 식용얼음이란 식품의 제조·가공·조리 등에 직접 사용하거나 그대로 먹기 위하여 먹는 물을 얼린 얼음을 뜻하며 식용얼음을 많이 사용하고 있는 곳은 패스트푸드점이나 카페 등이 있다(6). 이러한 식용얼음은 대체적으로 매장에서 직접 만들어 사용하거나, 대형 제조업체로부터 만들어 놓은 얼음을 구매하여 음료수 등에 첨가하여 소비자에게 판매되고 있다. 대부분의 사람들이 섭취하고 있는 식용얼음이 얼마나 위생적으로 유통되는지를 2007년 식품 의약품 안전청에서 조사하였다. 그 결과 시중유통 식용 얼음류 191건을 수거·검사한 결과, 제주시, 충북, 충북 청원군, 대전시, 부산시, 서울시에 소재하는 식용 얼음제조업체에서 기준을 초과하는 일반 세균수(기준: 100이하/ml) 및 대장균군(기준: 음성/50 ml)이 검출됨으로 부적합 판정을 받았다(6, 7). 위생 상태는 제조 업소들의 부실한 관리로 인하여 지하수를 얼음 제조용 용수로 사용하면서 정제, 소독 등의 공정을 거치지 않는 경우, 비위생적인 제조시설로 인해 미생물이 교차 오염되는 것으로 조사되었다(7). 또한 녹색소비자연대에서 서울시내 지역의 대형 커피 전문점 9곳과 패스트푸드점 5곳, 모두 14곳을 선정하여 54개 지점에서 아이스 커피를 구입해 세균수와 대장균군 검사를 실시한 결과 30% (15곳)에서 기준치 이상의 세균이 조사되었으며 식용얼음 및 수질로부터 분리된 병원성세균

의 종류로는 *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Salmonella* spp., *Shigella*, *Serratia*, *Yersinia*, *Staphylococcus* spp. 등의 세균이 검출되었다(3). 식자재의 신선한 보관을 위해 얼음을 야채에 넣어 보관시 오염된 얼음이 녹으면서 야채에 *Escherichia coli* O157:H7 이 오염된 사례가 보고되었다(14). 멸균 처리되어 시중에 판매되는 청량음료에서도 미생물이 검출되었으며 음료수의 제조과정에서 미생물의 오염을 조사한 보고서에 의하면 식수를 U.V로 멸균하고 멸균실에서 제조하여 제품으로 생산되어도 음료뚜껑과 tap water에서 세균 검출이 보고되었다(2). 서울시의 상수계통에서는 병원성 세균인 *Aeromonas*의 분포를 조사한 결과 *Aeromonas salmonicida* 1점이 검출되었다(9). 많은 공공장소에서 사용중인 냉온수기의 미생물 오염정도를 조사한 연구에서는 냉수에서 *Micrococcus* spp., *Kocuria kristinae*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus warneri*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium indologenes*, *Myroides* spp.가 검출되었다(10). 약수물, 상수와 냉온수기의 정수된 물에서도 여러 가지 원인에 의해 세균이 증식하는 것으로 나타났다(1, 4, 5, 11). 그러므로 음용수를 이용하여 제조되는 식용얼음 역시 위생상태가 깨끗하다고 할 수 없으며 또한 위생적으로 생산된 얼음이라도 운송과정에서 미생물 감염이 되는 경우도 있다. 체빙기를 통해 자체적으로 얼음을 만들어 음료수나 빙수를 판매하는 업소들도 제조, 취급, 판매하는 과정에서 미생물에 의한 오염가능성을 가진다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-53-320-1303, Fax: 82-53-320-1450  
E-mail: sjkim@mail.dhc.ac.kr

따라서 본 연구에서는 비위생적인 식용얼음의 섭취가 식중독의 원인뿐만 아니라 수인성 질병의 원인이 될 수 있으므로 아직 보고된 바 없는 대구시 북구지역의 카페, 패스트푸드점 등에서 사용하는 식용 얼음류를 검체로 이용하여 일반세균 분포와 병원성 세균을 동정하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 검체 채취

2008년 7월 7일 대구시 북구지역 내 패스트푸드점, 카페 및 토스트점 총 15곳에서 검체를 채취하여 실험하였다.

#### 검사 방법

카페 및 토스트점 등 15곳에서 채취한 식용얼음을 멸균증류수로 씻은 후 멸균한 용기에 넣어 무균상태로 실온에서 녹인다. 녹인 원액을 10배, 100배, 1000배 희석하여 만든 것을 일반 세균 분리를 위해 Brain Heart Infusion (BHI) agar (Becton, Dickinson and Company, USA)에 배양하였고 대장균 및 그람음성세균 분리배양을 목적으로 MacConkey agar (Becton, Dickinson and Company, USA), Salmonella-Shigella agar (Becton, Dickinson and Company, USA)에 각각 균을 접종하여 35 배양기에서 18~24시간 배양하였다. 그람양성세균의 분리를 위해 BHI agar에서 배양된 세균집락을 형태에 따라 임의로 집락을 선정하여 BHI agar에 계대 배양하였다(6, 12). 이렇게 순수 분리된 균들에 대해 그람염색을 실시한 후, 그람양성균으로 확인된 균들은 catalase, coagulase test를 실시하였고, 두 검사에 양성인 균들을 다시 mannitol salt agar (Becton, Dickinson and Company, USA)에 접종하였다. MSA에서 mannitol을 분해한 균들은 API Staph kit (API system: bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, USA)로 동정한 후, API web site (<http://localhost/jsp/ident/index.jsp>)에 연결해 동정결과를 확인하였다. *S. aureus*와 유사한 특징을 갖는 것으로 추정되는 균들에 대해 45°C 발육 시험, xylose (Duksan pure chemical Co., Korea), arabinose (Sigma chemical Co., USA), coagulase test, hemolysis test, DNase 생성능 test, novobiocin 항생제 감수성 검사를 추가로 실시하였다. MacConkey agar에서 배양된 균들도 각 검체마다 집락을 선정하여 그람염색 후, MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar에 분리 배양하였다. 이렇게 배양된 균들은 API 20 E kit, API 20 NE kit로 동정한 후, API web site에 연결해 동정결과를 확인하였다.

### 결 과

#### 식용얼음에서 미생물의 분포

15곳의 검체를 BHI 배지에 배양한 결과 1곳을 제외한 14곳의 검체에서 균이 증식 되었다. 14곳의 검체에서 나온 일반세균 집락수를 측정하였다. 식품위생법 시행령 식용얼음 규격의 일반세균수는 1 ml 당 100 이하를 규정으로 하고 있다. 이것을 기준으

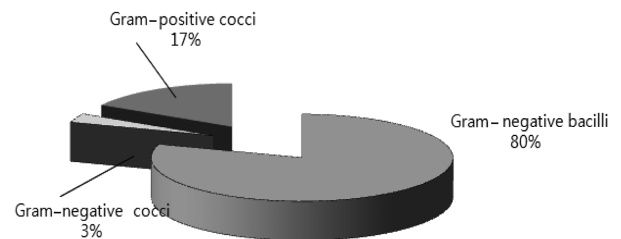
**Table 1.** Colony count of microorganism isolated from edible ice (The regulation by Korea Food and Drug Administration standard indicates that the number of bacteria should be less than 100 CFU/ml) Samples were collected at 15 places in Northern area of Daegu, Korea. Fifteen places were named randomly in alphabetical order from A to O.

Place	Colony count no. (CFU/ml)
A	768
B	556
C	236
D	654
E	676
F	668
G	384
H	290
I	828
J	784
K	800
L	596
M	634
N	624
O	0

로 대구시 북구 인근지역 15곳을 채취한 결과 14곳의 검체에서 일반세균수를 초과하였고 1곳의 검체에서는 전혀 세균이 자라지 않았다(Table 1). BHI agar와 MacConkey agar에 배양된 집락을 그람염색하였으며 그 결과 그람음성간균이 80% 차지하였고 그람양성구균 17% 그리고 그람음성구균 3%의 분포를 나타냈다(Fig. 1).

#### 그람음성세균 중 병원성세균 동정

그람염색으로 분류한 집락을 표현형에 따라 동정하기 위해 API kit를 사용하였으며 먼저 그람음성간균으로 나타난 것을 API 20E kit, API 20NE kit를 이용하여 동정한 결과, *Enterobacter cloacae* (7곳)가 가장 많이 검출 되었고, *Chryseomonas luteola*, *Pantoea* spp., *Klebsiella pneumoniae*,



**Fig. 1.** Proportion of microorganisms isolated from edible ice in Northern Daegu area, Korea By incubation in Brain Heart Infusion plate, 80% of Gram-negative bacilli, 17% of Gram-positive cocci, and 3% of Gram-negative cocci were cultured. Samples were collected on July 7, 2008.

**Table 2.** Identification of microorganisms isolated from edible ice using the API kit

Source	Identification (No.)
15 places (Gram-negative bacilli)	<i>Enterobacter cloacae</i> (7)
	<i>Chryseomonas luteola</i> (5)
	<i>Pantoea</i> spp. (4)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. (1)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (1)
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i> (1)
	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (1)
	<i>Serratia plymuthica</i> (1)
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
	<i>Enterobacter sakazakii</i> (1)
	<i>Providencia rettgeri</i> (1)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Providencia rettgeri* 등이 검출 되었다(Table 2). API 20E kit와 API 20NE kit를 이용하여 3회 반복하고 잠정적 동정결과 90% 이상의 상동성을 나타냈다.

**그람양성세균 중 병원성세균 동정**

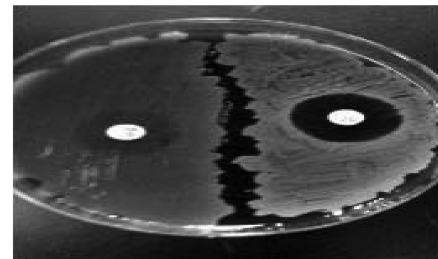
그람염색 결과, 그람양성구균이 나온 5개의 검체를 대상으로 catalase 시험을 하였고, catalase 시험결과 양성인 검체를 coagulase test와 MSA (mannitol salt agar) 배지에서 mannitol 당 분해 유무를 알아보았다(Table 3). 세 가지 실험 중 모두 양성으로 나온 2개(A, L)의 검체를 생화학적 검사인 45°C 발육능, D-xylose, L-arabinose 당 분해시험, 용혈능, Novobiocin 감수성 시험 등을 실시하였다. Table 4에서 보여지듯이 L업소는 45°C에서 발육하였으나 A업소는 45°C에서 발육하지 않았고 D-xylose, L-arabinose 당 분해시험에서는 A업소 검체에서만 양성이 되었음을 확인하였다(Table 4). Novobiocin 감수성 시험에서 A업소 검체에서는 내성을 나타내었고, L업소 검체에서는 감수성을 나타내었다 (Fig. 2). 따라서 L업소에서 분리된 균은 *S. aureus*로 동정되었고 A업소에서 검출된 균은 *S. xylosus*로 동정되었다(Table 4). 이러한 결과는 API Staph kit를 이용하여 재동정한 결과 두 검체에

**Table 3.** Biochemistry analysis of the Gram-positive cocci

Place	Catalase	Coagulase	MSA
C	-	.	.
D	+	+	-
A	+	+	+
M	+	-	.
L	+	+	+

**Table 4.** Biochemistry analysis of the *S. aureus* and *S. xylosus*

Characteristics	L	A
45°C growth	+	-
D-Xylose	-	+
L-Arabinose	-	+
Hemolysis	+	-
DNase agar	+	-
Novobiocin	- (susceptible)	+ (resistant)
Identification	<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosus</i>



A : resistance L : sensitivity

**Fig. 2.** Antimicrobial susceptibility test of the Novobiocin Discriminate between *S. aureus* and *S. xylosus* using Novobiocin A, Novobiocin resistance; L, Novobiocin sensitivity

서 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus*로 나타났다. 잠정적 동정은 API Staph kit를 이용하여 3회 반복하였다.

**고 찰**

여름철 더운 날씨로 인해 많은 사람들은 시원한 음료를 찾게 되는데, 일반 음식점에서나 패스트푸드점에서는 시중에서 판매하고 있는 식용얼음을 이용하여 음료로 판매하고 있으며, 또한 제빙기를 통해 즉석에서 만들어 판매하는 경우도 있다. 최근 시중에 유통 중인 식용얼음에서 *E. coli* (대장균), *S. aureus* (황색포도상구균)을 포함한 장내세균이 검출된 사례가 보고되었다(7). 식약청 보도자료에 의하면 식용얼음의 세균오염 원인으로는 제조 공장에서의 부식된 냉각탱크, 나무 및 비닐로 된 얼음 성형틀 뚜껑, 작업장 바닥, 습기가 많은 작업장 벽면 등의 작업시설 등으로 보고되었다(7). 그러나 무균적으로 제작된 식용얼음일지라도 음식점에서나 패스트푸드점에서 사용 과정에서 오염 가능성을 민간단체는 서울지역 몇 곳을 지정하여 조사한 결과 일반세균수와 대장균수가 허용치를 벗어났다(3).

따라서 본 연구는 대구 북구지역에 패스트푸드점과 일반 카페 및 음식점 15곳에서 얼음류 검체를 채취하여 조사한 결과 식품 위생법 시행령 식용얼음 규격의 일반세균수는 1 ml 당 100 이하 이어야 하는데 15곳을 조사한 결과 14곳의 검체에서 이를 초과하였고 그람음성세균의 경우 *Enterobacter cloacae*, *Chryseomonas luteola*, *Pantoea* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Providencia rettgeri* 등이 검출되었다. 가장 많이 검출된 *Enterobacter cloacae*는 장내세균과로서 물, 토양 및 사람의 장관에 상재하며 유아에 요독성 요독증의 원인균이며 그 밖에 기회감염, 요로감염, 호흡기감염, 피부 상처 감염, 패혈증, 수막염 등의 원인균으로 알려져 있다. 다음으로 분포율이 높은 세균으로 *Chryseomonas luteola*는 토양, 식물, 물 등에서 분포하며 인간에서 상재균은 아니며 기회감염과 원내 감염을 일으키는 세균으로 알려져 있다. 또 기회감염을 일으키는 균으로서 *Klebsiella pneumoniae*는 사람의 임상재료에서 가장 흔히 분리되는 균으로 모든 감염증을 일으키는 기회감염, 원내감염의 원인균이며 애주가 또는 노인에게 격증폐렴, 농흉을 일으킨다(8, 13). 식용얼음에서 병원성이 낮은 기회감염성 세균 및 장내세균 등의 검출뿐만 아니라 병원성 세균도 검출되었다. 본 연구에서도 1곳에서 *S. aureus* (황색포도알구균)가 검출되었으며 *S. aureus*는 화농성 염증, 폐렴, 폐화농증, 장염, 식중독 등을 유발하는 병원성이 강한 세균으로 알려져 있다.

이런 이유로 대구시 북구지역 뿐만 아니라 여러 지역의 식용얼음을 조사할 필요가 있을 것으로 사료된다. 그리고 본 연구에서는 세균의 동정방법으로 생화학적 방법과 간이신속동정키트(API kit)를 이용하였다. 이은숙 등은 상수계통에서 병원성균인 *Aeromonas*를 동정시 지방산 추출을 이용한 미생물분류동정장치(Microbial Identification System, MIDI)로 분석하였으며 분자적 typing 분석의 필요성을 언급하였다(9). 그리고 이은화 등은 냉온수기에서의 세균 분리 동정에서는 API kit를 이용하여 잠정적으로 동정하였으며 분자적 동정방법을 검해야 하는 필요성을 제시하였다(10). 따라서 본 연구에서 동정된 세균의 정확성을 높이기 위해 향후 분자적 기법인 16S rRNA를 이용한 유전자의 염기서열을 분석하여 상동성을 확인한다면 더욱 정확한 미생물동정결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 김관기, 최성부. 2002. 교내 구내식당 음용수와 복도 정수기의 미생물 오염 조사. 용인대학교 환경보건학과.
2. 김용배, 이평국, 조건희, 조남선. 1973. 청량음료의 미생물 오염에 대하여. 미생물학회지 11, 129-133.
3. 녹색소비자연대전국협의회. 2008. 서울시내 아이스크림등서 세균수 기준치 초과 매장별 위생실태 조사. 녹색소비자연대.
4. 백영만, 정용, 박제철, 김형진. 2006. 다중이용시설에서의 먹는물 위해성 평가. 한국물환경학회지 22, 1107-1119.
5. 송희봉, 김남연, 정동숙, 이영주, 전현숙, 김용혜, 장우석, 김장익. 2003. 대구 달비약수터의 수질과 영향인자. 대한환경공학회지 25, 1570-1578.
6. 식품안전. 2008. 식품 의약품 안정청. 식품별 기준 및 규격. 449-453.
7. 최재순, 한일규. 2007. 식용얼음 위생관리 주의. 식약정보도자료.
8. 이진섭, 김승곤, 김신무, 김영권, 오홍백, 정경석, 정태화. 2004. 원색도감 진단 병원미생물학. 고려의학.
9. 이은숙, 이목영, 한선희, 가중익. 2007. 서울시 상수계통에서 병원성균 *Aeromonas* (감마-프로테오박테리아) 분포연구. 미생물학회지 43, 106-110.
10. 이은화, 고지윤, 김중철. 2008. 냉온수기에서 일반세균의 분포 및 분리한 세균의 특성. 미생물학회지 44, 244-250.
11. 정팔진, 곽동희, 권영호. 1997. 먹는물의 세균학적 안정성 평가. 대한환경공학회지 19, 521-527.
12. Case, C.L. and T.R. Johnson. 1984. Laboratory experiments in microbiology, pp. 43-46. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California, USA.
13. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, pp. 358-362. 12<sup>th</sup> ed., Elsevier, PA, USA.
14. Kim, J.K. and M.A. Harrison. 2008. Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to romaine lettuce due to contact water from melting ice. *J. Food Prot.* 71, 252-256.

(Received November 14, 2008/Accepted February 10, 2009)

## ABSTRACT: Identification and Distribution of the Pathogenic Microorganisms Isolated from Edible Ice in North Area of Daegu, Korea

Su Jung Kim (Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Republic of Korea)

The definition of edible ice is frozen water for the use of food manufacturing, processing, or cooking, as well as for the direct eating. It has been reported that in the process of ice manufacturing and its selling, edible ice is contaminated with some microorganisms, which causes food poisoning and gastroenteritis. It was shown that besides in the edible ice, germ growth caused by various reasons occurred in the mineral water, tap water, water filtering system, and water purifier. With public awareness, in order to examine the sanitary conditions of edible ice in the Northern area of Daegu metropolitan city, 15 places were randomly selected. As a result, 14 places were found to be contaminated with microorganisms. After incubating on the Brain Heart Infusion (BHI) agar plate, 80% of Gram-negative bacilli, 17% of Gram-positive cocci, and 3% of Gram-negative cocci were cultured. *Enterobacter cloacae*, *Chryseomonas luteola*, *Pantoea* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter bau-*

*mannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* or *Providencia rettgeri* were detected. Gram-positive cocci cultured in BHI agar plate from 5 specimens were identified as *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus xylosus*, which is well known bacteria causing strong food poisoning. This present paper raises questions on the importance and awareness of sanitary conditions of edible ice and the identification of pathogenic microorganisms living in the edible ice in relation to their distribution. The examination of sanitary conditions of edible ice in other areas in Daegu seems to be also needed to find out if there are similar cases.