

碩士學位 請求論文  
指導教授 金 守 基

國內市販 離乳仔豚 飼料의  
有害微生物에 관한 研究

A Study on the Pathogenic Bacteria in  
Commercial Feed for Weaned Piglets

2009年 6月

建國大學校 農畜大學院

畜産資源生産學科

朴 泳 俊

國內市販 離乳仔豚 飼料의  
有害微生物에 관한 研究

이 論文을 農學 碩士學位 請求論文으로 提出합니다

2009年 6月

建國大學校 農畜大學院

畜産資源生産學科

朴 泳 俊

朴泳俊의

農學 碩士學位 請求論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (印)

審査委員 \_\_\_\_\_ (印)

審査委員 \_\_\_\_\_ (印)

2009年 6月 日

建國大學校 農畜大學院

# 목 차

표 목 차 .....	iii
그림목차 .....	iv
부록목차 .....	v
국문초록 .....	vi
I 서 론 .....	1
II 재료 및 방법 .....	4
1 시료수집 .....	4
2 시료분석 .....	6
1) 살모넬라( <i>Salmonella</i> spp) .....	6
(1) 선별시험(Screening Test) .....	6
(2) 확인시험 .....	9
2) 대장균( <i>E. coli</i> ) .....	13
(1) 증균배양 .....	13
(2) 분리배양 .....	13
(3) 확인시험 .....	13
3) 리스테리아( <i>Listeria monocytogenes</i> ) .....	16
(1) 증균배양 .....	16
(2) 분리배양 .....	16
(3) 확인시험 .....	16
III 결과 및 고찰 .....	21
1. <i>Salmonella</i> spp .....	21
1) 선별시험(Screening test) .....	21
2) 확인시험 .....	21

3) <i>Salmonella</i> spp의 생화학적특성 .....	21
2. <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	24
1) 증균 및 분리배양 .....	24
2) 확인시험 .....	24
3) <i>E. coli</i> 의 생화학적특성 .....	24
3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
1) 증균 및 분리배양 .....	27
2) 확인시험 .....	27
IV 결 론 .....	29
참고문헌 .....	30
부 록 .....	32
ABSTRACT .....	35

## 표 목 차

<Table 1>	Collected sample list of feed for weaned piglets .....	4
<Table 2>	Culture media and analyzer for research .....	5
<Table 3>	Culture media for the analysis of <i>Salmonella</i> spp. ....	8
<Table 4>	Typical morphology of <i>Salmonella</i> spp on the selective culture medium .....	9
<Table 5>	Reading table of API 20E kit .....	15
<Table 6>	Material formation of used culture medium to <i>E. coli</i> analysis	17
<Table 7>	Culture medium for the analysis of <i>L. monocytogenes</i> .....	20
<Table 8>	Positive samples for <i>Salmonella</i> spp. ....	21
<Table 9>	Results of API 20E kit reaction .....	23
<Table 10>	Positive samples for <i>E. coli</i> .....	24
<Table 11>	Results of API 20E kit reaction .....	26
<Table 12>	Positive samples for <i>L. monocytogenes</i> .....	27
<Table 13>	Results of API Listeria kit reaction .....	28

## 그림 목차

<Figure 1> Flow chart of <i>Salmonella</i> spp screening test .....	7
<Figure 2> Used API 20E kit for confirming of <i>Salmonella</i> spp .....	11
<Figure 3> Flow chart of <i>E. coli</i> analysis .....	14
<Figure 4> Flow chart of <i>Listeria monocytogenes</i> analysis .....	18
<Figure 5> API Listeria kit for <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19

## 부 록 목 차

1. 배지사진 .....	32
2. API 20E 동정 kit 사진.....	33
3. 그람염색을 한 후 광학현미경 사진.....	34



# 국내시판 이유자돈 사료의 유해미생물에 관한 연구

본 연구에서는 유해미생물중 가장 보편적이면서 돼지의 설사병을 일으키는 *Escherichia coli*와 *Salmonellae*속 균, *Listeria monocytogenes*가 이유자돈사료에 어느 정도 존재하는지를 조사하여 사료의 안전성에 대한 자료로 활용하고자 하였다.

이유자돈사료 100점을 2008년 10월부터 6개월간 수집하여 *Salmonella* spp, *E. coli* 및 *L. monocytogenes*에 대한 분석을 실시하였으며 *Salmonella* spp의 경우 선별시험에서 14점이 Positive로 나타났으나 선택배지를 이용한 분리배양과 API 20E kit를 이용한 확인시험에서 최종 3점이 검출이 되었으며 이는 전체의 3%에 해당하는 결과이다. 또한 *Salmonella* spp이 검출된 채취 시기를 보면 2009년 2월과 3월에 채취한 시료에서 검출이 되었다. 이 외에 *Enterobacter*속 균과 *Citrobacter*속 균이 검출되었다.

*E. coli*의 경우 증균배양에서는 25점이 발효관에 가스가 발생하였다. 이들을 분리 배양한 결과 6점이 EMB agar에서 *E. coli*의 전형적이 집락형태인 녹색금속의 광택을 관찰할 수 있었으며, 이를 다시 API 20E kit를 이용하여 확인시험을 한 결과 3점이 *E. coli*로 판명되었다. *E. coli*가 검출된 채취 시기는 *Salmonella* spp와 마찬가지로 2009년 2월과 3월에 채취한 시료에서 검출이 되었으며, 또한 분리 배양을 실시하여 *E. coli* 특정 집락으로 판정된 시료 중 *E. coli*로 판정되지 않는 시료는 모두 *Enterobacter*속 균으로 동정되었다.

*L. monocytogenes*의 경우 Fraser broth를 이용한 증균 배양에서는 85점이 *L. monocytogenes*의 전형적인 특징인 갈색으로 변화되어 다시 선택적배지인 Oxford agar에 도말을 하였다. 그 중 8점이 *L. monocytogenes* 집락형태와 비슷한 모양으로 나타났다. 그러나 이를 API Listera kit를 이용해서 확인시험을 하였으나 검출되지 않았으며 16s rDNA Sequencing을 이용하여 동정한 결과 *Bacillus licheniformis*로 판명되었다.

---

주제어 : 이유자돈사료, *Salmonella* spp, *E. coli*, *L. monocytogenes*

# I. 서 론

사료라 함은 동물이 섭취하는 모든 음식물을 말하는 것으로 동물에 대한 영양성분이 풍부하고 이용가치가 있으면 좋은 사료라 할 수 있다. 그러나 사료 중에 병원성미생물이 오염되어 있으면 직접 및 간접적으로 동물의 질병을 야기 시킬 수 있는 가능성을 지니고 있으며, 비병원성 미생물에 오염되었다 하더라도 사료의 변질을 일으키는 중요한 원인으로 역할을 함으로써 사료적 가치를 상실케 한다. 특히 독소살생능력이 있는 곰팡이 종류가 오염되었을 경우에는 급성 또는 만성 중독성 질병을 일으켜 폐사, 발육부진 등 동물의 건강을 위협하게 된다. 사료의 미생물 오염은 가축에 대한 질병 피해 이외에도 사료의 영양성분의 손실 및 기호성의 감소 등으로 사료적 가치를 저하시킨다. 사료에 오염된 미생물은 사료의 종류, 오염미생물의 종류, 미생물의 수 및 이들 미생물이 사료 중에서 서식할 수 있는 조건의 부여 등 여러 가지 요인이 사료로 인한 동물 건강에 미치는 유해 작용과 관계된다(마 등, 1987). 영양성분이 풍부하고 품질이 좋은 사료라고 하더라도 위생적으로 안전성이 결여되어 있으면 사료로서의 가치는 없는 것이다. 특히 양돈사육에 있어서 통상 영양, 질병방제, 관리 및 번식의 4개 분야로 분류할 수 있으며 이 분야 중 어느 한 분야만 발전하거나 뒤떨어질 경우 최대의 성과를 기대할 수 없으며 사양계획과 질병방제 및 육종계획이 잘 세워져야 소기의 성과를 올릴 수 있게 된다. 그 중 양돈사업에서 가장 중요한 것은 사양관리라고 할 수 있다. 돼지는 철저한 보살핌과 깨끗한 물 그리고 따뜻한 돈사와 건조한 바닥을 좋아한다(Gray, M. L 등, 1966). 그러나 돼지사료 중에 병원미생물에 오염되어 있으면 돼지사육에 있어서 질병을 야기 시킬 수 있는 가능성을 지니고 있으며, 특히 어린돼지사료에 병원성미생물이 오염되면 폐사 할 수도 있다.

이처럼 사료의 미생물오염에 의한 가축의 집단폐사의 예는 1960년 영국의

철면조농장에서 케냐로부터 수입된 땅콩껍질에 기인되어 발생되었음이 밝혀졌다. 이는 땅콩껍질에 오염되었던 *Aspergillus flavus*가 생성한 Aflatoxin에 의해 발생되었다(강 등, 1982).

사료중에서 분리되는 주요 미생물중 세균은 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorascens*, *Salmonellae* 속 등이 있다. 이러한 미생물 중에서도 식중독을 일으키는 유해미생물은 가축의 설사병을 유발할 수 있다. 이러한 설사병을 유발하는 주요 세균에는 대장균, 크로스트리디움, 살모넬라균, 돼지적리균 등이 있으며 이 중 대표적인 설사병원균은 *Escherichia coli*(*E. coli*)와 *Salmonellae*속 균이 있는데 이 중 *E. coli*는 양쪽 끝이 둥글고 길이 2~4 $\mu$ m, 나비 0.4~0.7  $\mu$ m의 간균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 있으며 포자를 만들지 않고 그람음성균이다. 또한 *E. coli*는 건강한 동물의 장내에 존재하는 균으로 1893년 Jensen이 송아지 설사 중의 원인이 대장균이라는 것을 보고한 이후 병원성과 관련된 많은 연구가 이루어졌다. 특히 이유자돈에서의 대장균성 설사증은 발생하면 24~48시간 이내에 폐사할 수도 있으며 설사한 돼지는 탈수 상태가 되고 체중이 감소한다. 설사에 의한 탈수는 자돈에 있어서 치명적이며, 설사이전에 심한 체액의 손실로 폐사할 수도 있다. 살아남은 돼지도 성장률을 감소시켜 출하지연을 초래하여 막대한 경제적 손실을 가져오며 대장균에 대한 면역이 없는 자돈의 경우 발병율이 100%에 이르고 치사율 또한 60~70% 정도가 되며 이유전 새끼돼지 손실 또한 약 40~50%를 차지하고 있어 경제적 손실이 큰 문제로 대두되고 있다(박 등, 1982). 이러한 설사증상은 어린돼지에서 많이 발생하며 그 감염시기에 따라 신생자돈 설사, 포유자돈 설사, 이유자돈 설사로 나눌 수 있으며 이러한 증상으로 인해 사료효율 저하, 증체율 감소, 출하일령 지연 등으로 막대한 경제적 손실을 초래한다.

*E. coli*외에 사료 중에 함유되어 있는 병원성 미생물중 *Salmonellae*속 균이 있으며 이 균은 그람음성의 무포자 편모 단간균으로 사람과 동물에 있어서 식중독 내지 위장염을 일으키는 인수공통전염병 중 하나이기 때문에 중요

하게 다루어야 한다. 또한 사료로 인한 닭의 *Salmonella*감염증이 사람의 *Salmonellosis*와 관계된다는 점에서 많은 연구가 이루어졌으며 소, 돼지등의 사료에 대하여 *Salmonella*균에 관한 연구를 통하여 이들 동물의 질병발생과 관련된다는 것을 시사하였다. 이외에도 몇가지 살모넬라속균은 돼지에서 패혈증을 일으킨다(박 등, 1997).

위의 균 이외에도 사료중에 여러 가지균들이 존재하지만 사람에게 있어서 가장 치명적인 균인 *Listeria monocytogenes*에 대한 오염도를 추가로 조사하였다. *L. monocytogenes*는 그람양성인 무포자 단간균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 활발하며 사람과 동물에게 유산, 패혈증 또는 화농성 뇌막염을 유발시킨다(Kenuth, 1982; Lee et al., 1997). 이처럼 *L. monocytogenes*는 다른 식중독 균에 비해 치사율이 대단히 높아 외국 여러 나라에서 집중적인 조사연구가 진행되었다. 하지만 우리나라의 경우 임상 병리학적인 보고는 있으나 사료에 대한 *L. monocytogenes*에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

또한 국내사료와 수입사료를 관리하는 법령인 사료관리법에서는 *Salmonella* D그룹만 유해미생물 검정 항목으로 설정되었을 뿐 *E. coli*, *L. monocytogenes*, 기타 유해미생물에 대한 검정항목 설정이 이루어져 있지 않은 상태이며, *Salmonella* D그룹도 가금류의 배합사료와 단미사료를 제외하고는 검정항목에서 제외되어 있다.

본 실험에서는 유해미생물중 가장 보편적이면서 돼지의 설사병을 일으키는 *E. coli*와 돼지와 사람모두에게 위험한 *Salmonellae*속균, *L. monocytogenes*가 이유자돈사료에 어느 정도 존재하는지를 조사하여 사료의 안전성에 대한 자료로 활용하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료수집

본 실험에 사용된 시료는 2008년 10월부터 6개월간 강원도를 제외한 8개도에서 국립농산물품질관리원 시험연구소로 의뢰된 공시료 중 이유자돈사료만을 선별하여 총 100점을 이용하였으며 시료는 냉장고에 보관하면서 본 실험을 실시하였다. Table 1은 본 실험에 사용된 이유자돈사료의 수집 시기와 지역을 나타낸 것이다.

<Table 1> Collected sample list of feed for weaned piglets

Region	year		'08				'09			Total	
	month		10	11	12	1	2	3			
Keonggi	-		2	-		4	-		4	10	
Chungbuk	2		-		5	-		-	1	8	
Chungnam	-		1		6	-		-	9	16	
Jeonbuk	6		-		-	-		5	4	15	
Jeonnam	-		-		1	5		-	3	9	
Gyeongbuk	2		3		-	2		-	1	8	
Gyeongnam	-		4		6	3		-	6	19	
Jeju	3		-		2	-		10	-	15	
Total			13		10	20		14	15	28	100

## 2. 시료분석

본 실험은 *Salmonella* spp, *E. coli* 및 *L. monocytogenes* 3 종류의 유해미생물에 대한 검출실험을 실시하였으며, 실험방법은 국립농산물품질관리원 시험연구소에서 사용하고 있는 분석법과 한국소비자보호원 시험검사국 식품미생물팀에서 사용하는 분석법을 병용하여 실시하였다. Table 2는 본 실험에 사용된 배지 및 분석기기에 관한 목록이다.

<Table 2> Culture media and analyzer for research

Organism	material list	
	Culture medium	Analyzer
<i>Salmonella</i> spp	• Buffered peptone water	
	• Rappaport-Vassiliadis broth	
	• M-broth	• mini-VIDAS(BioMerieux INC)
	• Muller Kauffmann Tetrathionate w/novobiocin broth	• API 20E kit(BioMerieux Inc)
	• Hektoen Enteric agar	• Optical microscope
	• Xylose Lysine Desoxycholate agar	
	• Nutrient agar	
<i>E. coli</i>	• EC broth	• API 20E kit(BioMerieux Inc)
	• Eosin Methylen Blue agar	• Optical microscope
	• Nutrient agar	
<i>L. monocytogenes</i>	• UVM modifide Listeria enrichment broth	
	• Fraser broth	• API Listeria kit(BioMerieux Inc)
	• Listeria selective supplement	• Optical microscope
	• Oxford agar	
	• Oxford Listeria selective supplement	

## 1) 살모넬라(*Salmonella* spp)

*Salmonella* spp 검출실험은 크게 선별시험과 확인시험으로 나누어 실시하였으며 확인시험 과정은 1차적으로 선택배지를 사용하여 균을 분리한 후 확인동정 실험을 실시하였다.

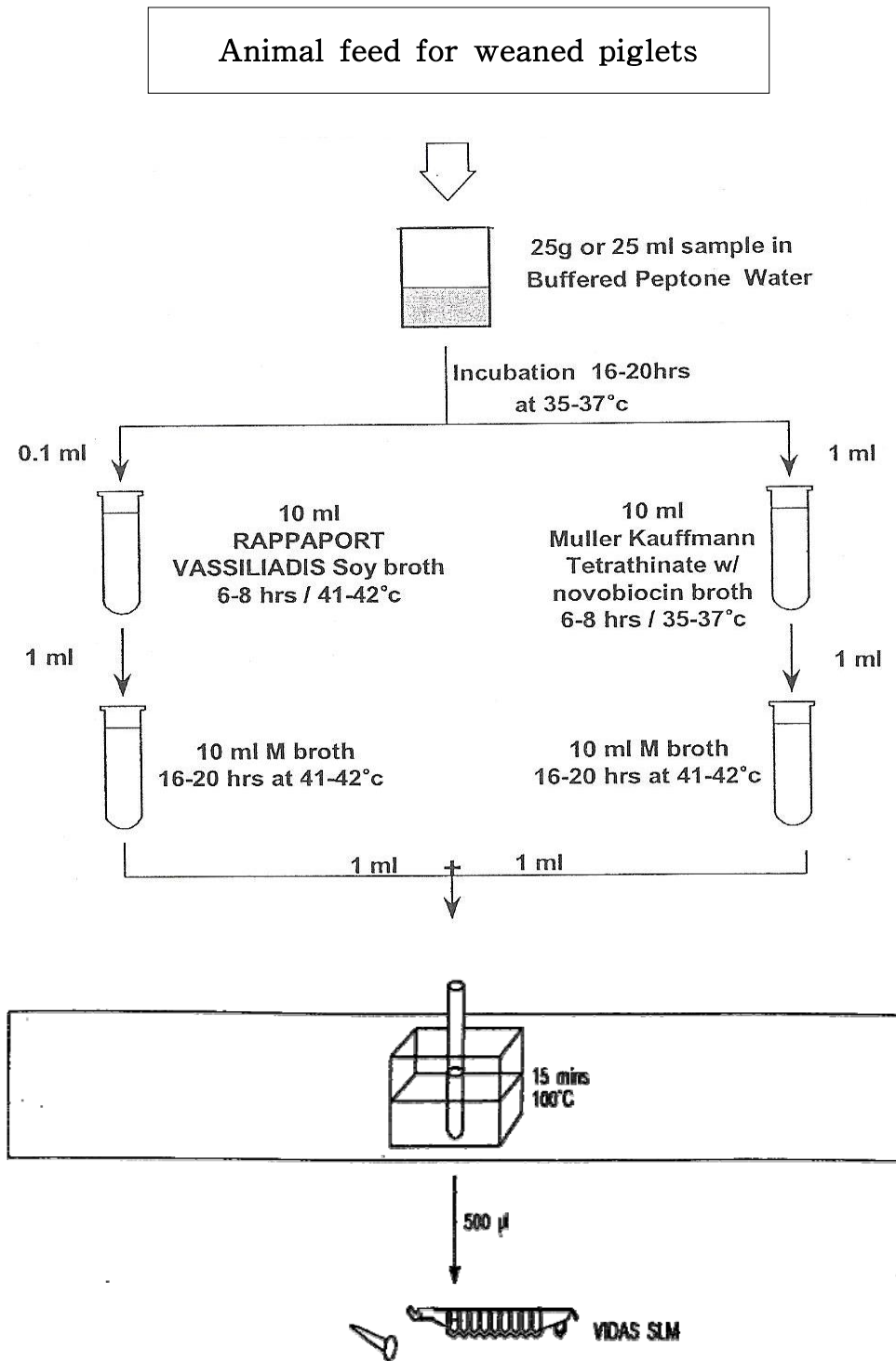
### (1) 선별시험(Screening Test)

검체 25g에 Buffered peptone water(BPW)(DIFCO) 225ml을 넣고 35~37°C에서 18시간 배양하여 증균을 시키고 이를 다시 Rappaport-Vassiliadis(RV) broth 10 ml와 Muller Kauffmann Tetrathionate w/novobiocin(MKTT) broth 10 ml에 BPW에서 배양한 검체액을 각각 0.1 ml과 1 ml을 넣고 41~42°C와 35~37°C에서 6~8시간 분리배양하였다. 이렇게 배양된 RV에서 배양한 배양액과 MKTT에서 배양한 배양액에서 1 ml씩을 M broth에 접종 한 후 41~42°C에서 16~20시간 배양하였다. 이를 다시 RV배양액을 넣고 배양한 M broth 1 ml과 배양액을 넣고 배양한 M broth 1 ml을 빈 시험관에 넣고 섞은 후 중탕용기에서 100°C, 15분간 가열한 시료액을 VIDAS SLM에 500  $\mu$ l를 주입한 후 기기분석을 실시하였다. 본 실험의 분석흐름도는 Fig. 1과 같다

*Salmonella* spp 선별시험용 검출기기는 mini-VIDAS(Vitek Immuno Diagnostic Assay System) (Biomerieux INC)를 사용하였으며 분석원리는 ELFA(Enzyme Linked Fluorescent-immuno Assay) 즉 효소면역반응에 형광도를 읽는 원리이며 본 장비의 처리속도는 종목에 따라 45~80분 정도이며 *Salmonella* spp의 경우는 45분 정도가 소요되었다. Strip에는 Ready to use type로 희석액, 세척액, 반응 효소액 그리고 기질이 모두 갖춰져 있다. 또한 반응 효소는 Alkaline phosphatase를 사용하며 형광 기질은 4-Methylumbelliferyl phosphate를 사용하였다. 본 장비는 control시약과 standard시약이 있어 표준TV(Test value)값을 설정해주어 검체의 TV값과 비교하여 높으면 Positive값을 낮으면 Negative값으로 나타냈다.

Table 3은 *Salmonella* spp 검출실험에 사용된 배지의 성분 조성표를 나타낸 것이다.





<Fig. 1> Flow chart of *Salmonella* spp screening test

<Table 3> Culture media for the analysis of *Salmonella* spp

Culture medium	Composition
•BPW broth	•Peptone ..... 10.0g
	•Monopotassium phosphate..... 1.5g
	•Sodium Chloride ..... 5.0g
	•Disodium Phosphate ..... 3.5g
•HE agar	•Proteose Peptone ..... 12.0g
	•Yeast Extract ..... 3.0g
	•Bile salts No.3 ..... 9.0g
	•Sodium Thiosulfate ..... 5.0g
	•Lactose ..... 12.0g
	•Acid Fuchsin ..... 0.1g
	•Saccharose ..... 12.0g
	•Bromthymol Blue ..... 65.0mg
	•Salicin ..... 2.0g
	•Ferric Ammonium Citrate ..... 1.5g
•Sodium Chloride ..... 5.0g	
•Agar ..... 14.0g	
•XLD agar	•Xylose ..... 3.75g
	•L-Lysine ..... 5.0g
	•Lactose ..... 7.5g
	•Sodium Desoxycholate..... 2.5g
	•Sacharose ..... 7.5g
	•Sodium Chloride ..... 5.0g
	•Yeast Extract ..... 3.0g
	•Sodium Thisulfate ..... 6.8g
	•Phenol Red ..... 0.08g
	•Ferric Ammonium Citrate ..... 0.8g
•Agar ..... 15.0g	

(2) 확인시험

선별시험에서 사용한 RV broth와 SC broth 배양액을 10  $\mu$ l Loop를 이용하여 Hektoen Enteric(HE) 배지와 Xylose Lysine Desoxycholate(XLD) 배지에 35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 24시간을 배양하여 Table 4에서 서술한 형태의 집락(colony)이 검출되면 순수배양을 실시한 후 최종적으로 Nutrient agar배지에 35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 24시간을 분리배양한 후 확인시험을 실시하였다.

<Table 4> Typical morphology of *Salmonella* spp on the selective culture medium

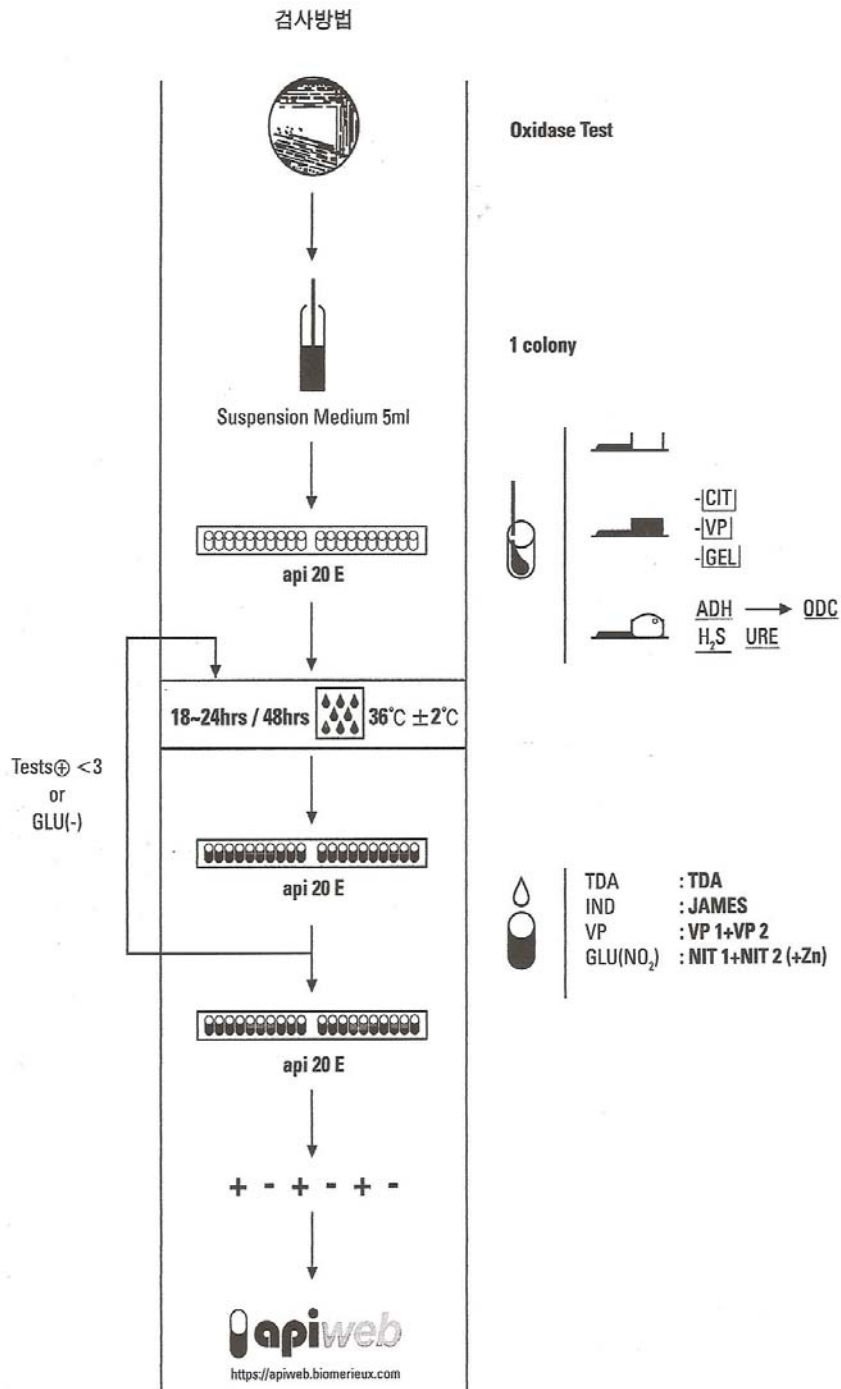
Culture medium	Typical morphology of <i>Salmonella</i> spp
HE agar	<ul style="list-style-type: none"><li>• Green-Blue or Green colony existed black cercle in center</li><li>• Almost big and sheen black cercle existed in Center or all of colony.</li></ul>
XLD agar	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pink colony existed black cercle in center</li><li>• Almost big and sheen black cercle existed in Center or all of colony.</li></ul>

최종 확인시험은 API 20E kit(BioMerieux Inc.)를 이용한 생화학적 검정을 실시하였다. 그 방법은 Nutrient agar배지에서 자란 colony를 API용 Suspension midium 5 ml에 넣은 후 vortex하여 API 20E kit(BioMerieux Inc.)에 접종한 후 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 20가지의 생화학적 Test에 대한 반응 결과를 판독표를 보고 양성과 음성을 확인하여 기록지에 (+/-)로 표시하였다. TDA(Tryptophane DeAminase) test, IND(Indole

production) test, VP(Voges Proskauer)Test등은 보조시약을 첨가한 후 나타난 반응을 기록지에 (+) 또는 (-)로 표시한 후 BioMerieux사 홈페이지 (<https://apiwep.biomerieux.com>)에 기록지결과를 입력하여 최종적으로 확인하였다.

또한 *Salmonella* spp로 동정된 검체의 집락을 그람염색하여 현미경으로 관찰하였다. 그람염색법은 총 4가지 시약을(Crystal violet, Gram's iodine, Ethanol, Safranin) 처리하여 염색여부를 확인하는 방법으로 그람양성(+)인 경우는 보라색을 띠게 되고 그람음성(-)인 경우는 붉은색을 띠게 된다. 그람염색은 DIFCO사에서 판매되는 제품을 사용하였다.

염색방법은 균 집락을 멸균증류수와 섞어 슬라이드 글라스에 균을 펼친 후 알코올램프를 이용하여 고정하고 Crystal violet를 처리하여 1분간 정치시킨 후 흐르는 물로 2초간 세척하고 Gram's iodine 용액을 처리하여 1분간 정치시킨 후 다시 흐르는 물로 2초간 세척하고 Ethanol로 충분히 씻은 후 Safranin 용액을 처리하여 30초가 정치 후 흐르는 물로 씻은 후 건조시킨 다음 현미경으로 관찰하였다.



<Fig. 2> Used API 20E kit for confirming of *Salmonella* spp

<Table 5> Reading table of API 20E kit

Test	Reactions/Enzymes	Results	
		Negative	Positive
ONPG	$\beta$ -galactosidase	colorless	yellow
ADH	Arginine Dihydrolase	yellow	red/orange
LDC	Lysine Decarboxylase	yellow	red/orange
ODC	Ornithine Decarboxylase	yellow	red/orange
CIT	Citrate utilization	pale green/yellow	blue-green/blue
H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S production	colorless/greyish	black deposit/thin line
URE	Urease	yellow	red/orange
TDA	Tryptophane Deaminase	colorless	pink
IND	Indole production	no diffusion	pink/red
VP	Voges Proskauer	blue/blue-green	diffusion of black pigment
GEL	Gelatinase	blue/blue-green	yellow greyish yellow
GLU	Glucose	blue/blue-green	yellow
MAN	Manitol	blue/blue-green	yellow
INO	Inositol	blue/blue-green	yellow
SOR	Sorbitol	blue/blue-green	yellow
RHA	Rhamnose	blue/blue-green	yellow
SAC	Saccharose	blue/blue-green	yellow
MEL	Melibiose	blue/blue-green	yellow
AMY	Amygdalin	blue/blue-green	yellow
ARA	Arabinose	blue/blue-green	yellow

## 2) 대장균(*E. coli*)

대장균 검출실험은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 증균배양과 분리배양, 확인시험 3단계로 실시하였으며 증균배양과 분리배양은 일반 미생물시험법에 준하여 실시하였다. 확인시험은 API 20E kit을 이용하여 실시하였다.

Table 6은 대장균 검출실험에 사용된 배지의 성분조성표를 나타낸 것이다.

### (1) 증균배양

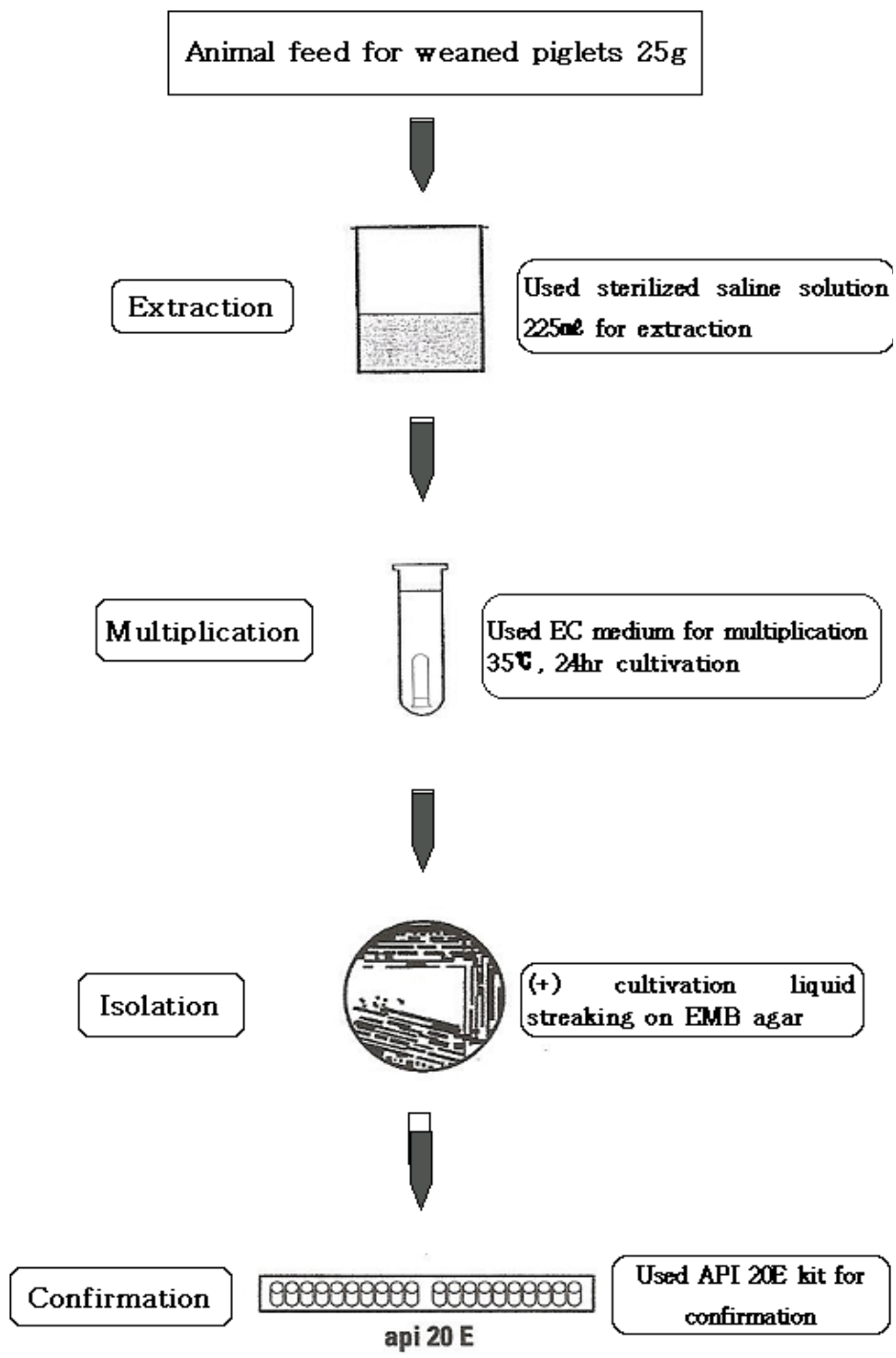
검체 25 g를 스토마크백에 칭량한 후 멸균생리식염수 225 ml를 넣고 스토마커를 이용하여 추출한 후에 추출액을 발효관이 들어있는 EC broth(DIFCO) 10 ml에 1 ml씩을 3개 시험관에 접종하여 44.5±0.5℃에서 24±2시간 배양을 실시하여 발효관에 가스가 발생한 시료를 추정실험 양성으로 판단하였다.

### (2) 분리배양

증균배양과정에서 발효관에 가스가 발생한 증균배양액에서 10  $\mu$ l Loop를 이용하여 Eosin Methylene Blue(EMB)agar(DIFCO)에 도말하여 35℃에서 24±2시간 배양하였다. 이때 대장균의 경우 배지 안에 있는 Lactose를 분해 할 경우 산이 생성되어 Eosin Y, Methylene blue지시약에 의해 진한 금속성이 있는 청색 집락형태가 나타나는데 위에서 처리한 배지의 균집락이 녹색금속 광택이 있을 경우 순수배양하기 위하여 EMB agar에 1회 더 도말하여 분리한 후 확실하게 녹색금속광택이 띄는 한 집락을 이용하여 Nutrient agar(DIFCO)에 도말하여 35℃에서 24±2시간 배양하였다.

### (3) 확인시험

Nutrient agar에 배양된 균 집락중 한 개의 집락을 이용해 그람염색 음성과 Oxidase test음성을 확인하고 최종확인에는 API 20E kit(BioMerieux Inc., Marcy 1'Etoile, France)를 이용하였으며 확인시험에 대한 모든 과정은 *Salmonella* spp와 동일한 방법으로 실시하였다.



<Fig. 3> Flow chart of *E. coli* analysis



<Table 6> Material formation of used culture medium to *E. coli* analysis

Culture medium	Material formation
•EC broth	•Tryptose ..... 20.0g
	•Lactose ..... 5.0g
	•Bile Salts No.3 ..... 1.5g
	•Dipotassium Phosphate ..... 4.0g
	•Monopotassium Phosphate ..... 1.5g
	•Sodium Chloride ..... 5.0g
•EMB agar	•Pancreatic Digest of Gelatin ..... 10.0g
	•Lactose ..... 10.0g
	•Dipotassium Phosphate ..... 2.0g
	•Eosin Y ..... 0.4g
	•Methylene Blue ..... 65.0mg
	•Agar ..... 15.0g

### 3) 리스테리아(*Listeria monocytogenes*)

*Listeria monocytogenes* 검출실험은 한국소비자보호원에서 사용하고 있는 방법을 이용하여 증균배양, 분리배양, 확인시험 순으로 실시하였으며, API Listeria kit을 이용하여 *Listeria monocytogenes* 동정을 실시하였다.

Table. 7은 *Listeria monocytogenes* 검출실험에 사용된 배지의 성분조성표이다.

#### (1) 증균배양

##### ① 1차 증균

검체 25 g을 스토마커백에 칭량한 후 리스테리아 증균배지인 UVM modifide Listeria enrichment broth(DIFCO) 225 ml를 넣고 30℃에서 24시간 배양하였다.

##### ② 2차 증균

1차 증균한 검체 100  $\mu$ l를 Fraser Listeria selective supplement가 첨가된 Fraser broth(MERCK) 10 ml이 들어있는 시험관에 접종하여 35℃에서 48~72시간 배양을 하였다. 여기서 배양한 시험관중 배양액이 검게 변한 검체를 추정시험 양성으로 판단하여 분리배양을 실시하였다.

#### (2) 분리배양

증균 배양 결과 추정시험 양성으로 판단되는 배양액 중 10  $\mu$ l를 Loop (1회용 플라스틱)를 이용하여 Oxford Listeria selective supplement가 첨가된 Oxford agar(MERK)에 도말한 후 30℃에서 48~72시간 배양하였다.

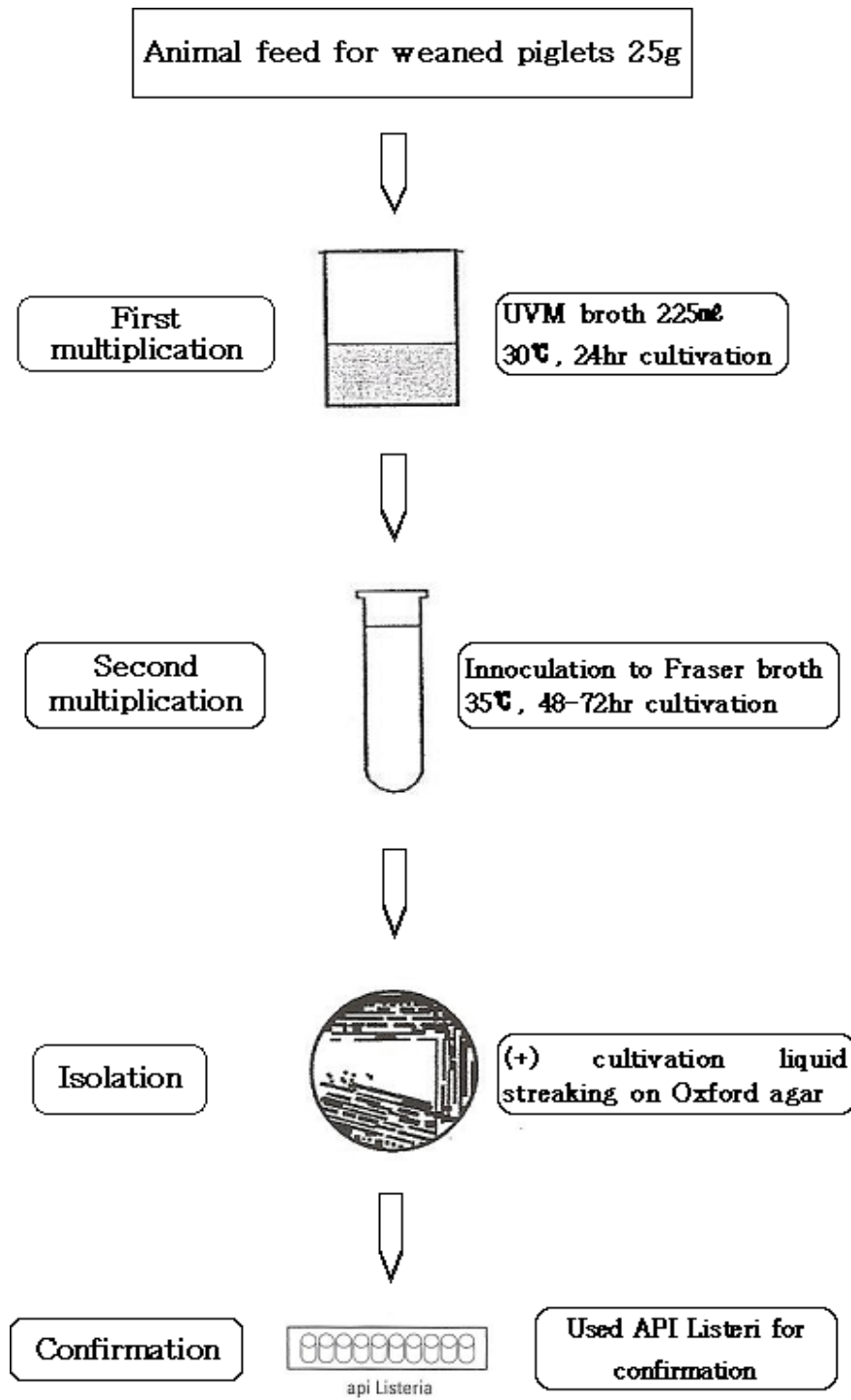
본 배지에서는 균주의가 검게변하고 원형모양으로 도넛처럼 균의 가운데가 들어갔으며, 흰색계통을 띤 균을 *Listeria monocytogenes*로 판정하여 1회 더 분리배양을 한 후 확인시험을 실시하였다.

#### (3) 확인시험

Catalase test를 실시하여 양성이 나온 검체는 API Listeria 동정

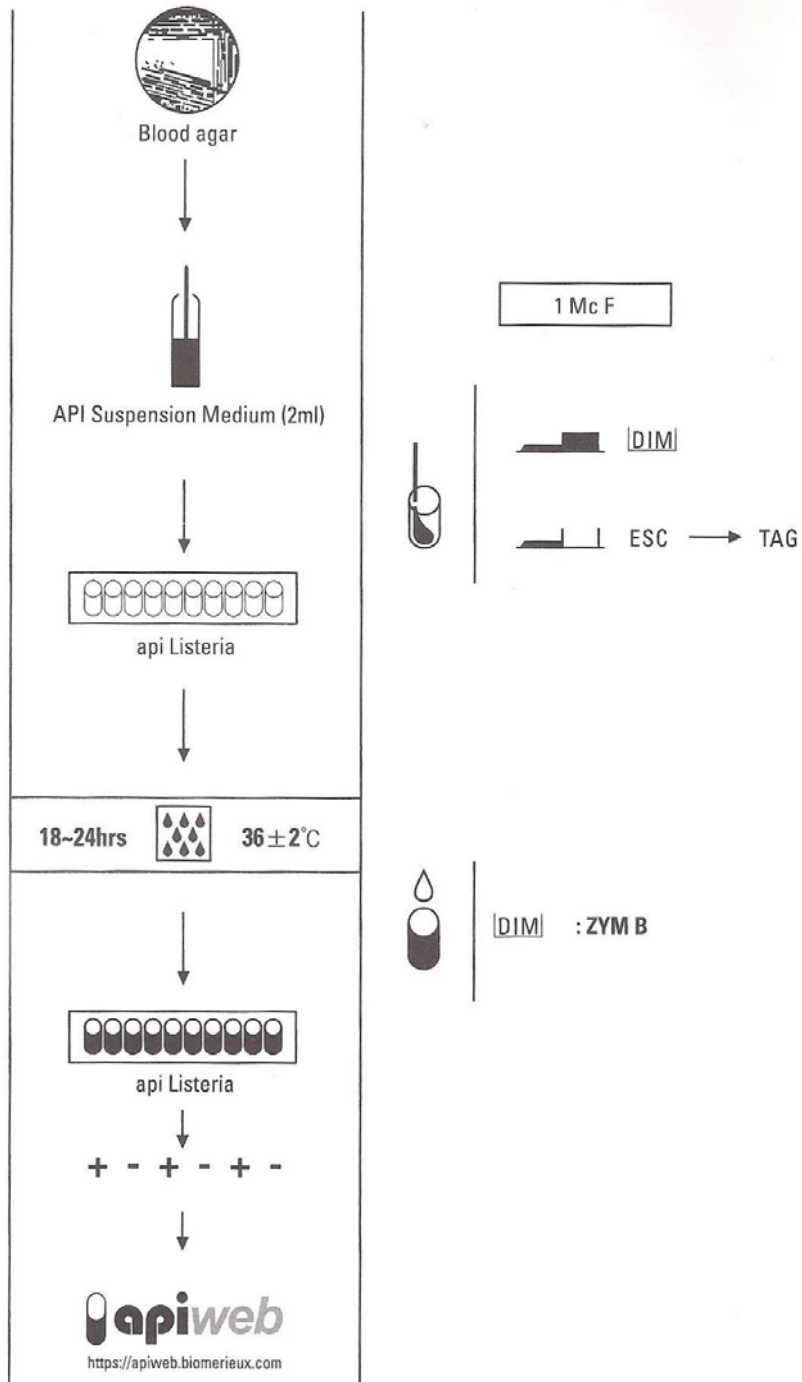
kit(BioMerieux Inc.)을 이용하여 최종확인 시험을 하였으며, 동시에 그람 염색을 해서 그람양성균임을 확인하였다.

Catalase test는 *Listeria monocytogenes*로 의심되는 집락을 면봉으로 채취하여 3%과산화수소수를 섞어서 거품발생의 유무로 판단하였으며 *Listeria monocytogenes*의 경우 Catalase 반응은 양성으로 표시된다.



<Fig. 4> Flow chart of *Listeria monocytogenes* analysis

검사방법



<Fig. 5> API Listeria kit for *Listeria monocytogenes*

<Table 7> Culture medium for the analysis of *L. monocytogenes*

Culture medium	Composition
•UVM broth	•Pancreatic Digest of Casein ..... 5.0g
	•Proteose Peptone No. 3 ..... 5.0g
	•Beef Extract ..... 5.0g
	•Yeast Extract ..... 5.0g
	•Sodium Chloride ..... 20.0g
	•Disodium Phosphate ..... 9.6g
	•Monopotassium Phosphate ..... 1.35g
	•Esculin ..... 1.0g
	•Nalidixic Acid ..... 0.02g
•Acriflavine HCl ..... 12.0mg	
• F r a s e r broth	•Pancreatic Digest of Casein ..... 5.0g
	•Proteose Peptone No. 3 ..... 5.0g
	•Beef Extract ..... 5.0g
	•Yeast Extract ..... 5.0g
	•Sodium Chloride ..... 20.0g
	•Disodium Phosphate ..... 9.6g
	•Monopotassium Phosphate ..... 1.35g
	•Esculin ..... 1.0g
	•Nalidixic Acid ..... 0.02g
•Acriflavine HCl ..... 24.0mg	
•Lithium Chloride ..... 3.0g	
•Oxford agar	•Pancreatic Digest of Casein ..... 5.0g
	•Proteose Peptone No. 3 ..... 5.0g
	•Yeast Extract ..... 5.0g
	•Tryptic Digest of Beef Heart ..... 2.7g
	•Starch ..... 0.9g
	•Sodium Chloride ..... 4.4g
	•Esculin ..... 1.0g
	•Ferric Ammonium Citrate ..... 0.5g
	•Lithium Chloride ..... 15.0g
•Agar ..... 15.3g	

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. *Salmonella* spp

##### 1) 선별시험(Screening test)

미생물검출기인 mini-VIDAS를 이용한 *Salmonella* spp 시험결과 시료검체 100점중 14점에서 Positive가 나왔으며 Table 8에서 보는바와 같이 이 중 대부분이 2009년 2월~3월에 채취한 시료들이었다. 이는 전체 중 14%에 해당하는 수치이다.

<Table 8> Positive samples for *Salmonella* spp

Organism	Year		2008			2009	
	Month						
	10		11	12	1	2	3
<i>Salmonella</i> spp	-		-	-	-	8	6

##### 2) 확인시험

선별시험에서 Positive로 나왔던 14점을 선택배지에 도말한 결과 이중 8점이 *Salmonella* spp전형적인 집락형태를 띄었으며 이들을 채취 시기별 내역을 보면 2월에 채취한 시료중 3점이 3월에 채취한 시료가 5점이 *Salmonella* spp전형적인 집락형태를 띄었다.

이들 8점을 다시 최종 확인시험을 한 결과 총 3점의 시료에서 *Salmonella* spp가 검출되었으며 2월에 채취한 시료에서 1점, 3월에 채취한 시료에서 2점이 검출되었다. 이는 전체 채취시료의 3%에 해당하는 것으로 이유자돈사료 중에서도 *Salmonella* spp가 검출된다는 것을 보여주는 것이었다.

##### 3) *Salmonella* spp의 생화학적특성

*Salmonella* spp에 대한 생화학test는 API 20E 동정kit로 실시하였으며 각각의

생화학반응 결과는 Table. 10에서 나타난 것과 같다. Oxiase Test결과는 음성이 나왔으며 그람염색의 결과 또한 음성으로 나왔으며 단간균 형태를 띠고 있어 *Salmonella* spp의 특징과 일치하는 결과가 나왔다.

또한 분리배양에서 특정집락으로 분류된 8점 중 *Salmonella* spp로 판명되지 않은 시료는 16S rDNA sequencing결과 *Enterobacter*속 균과 *Citrobacter*속 균으로 동정되었다.



<Table 9> Results of API 20E kit reaction

Test	Reaction Enzymes	Sample No.							
		43	46	48	51	60	61	83	84
ONPG	$\beta$ -galactosidase	+	+	-	-	+	-	-	+
ADH	Arginine Dihydrolase	+	+	+	+	+	-	+	+
LDC	Lysine Decarboxylase	-	+	+	+	-	-	+	+
ODC	Ornithine Decarboxylase	-	+	+	+	-	+	+	+
CIT	Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S production	+	+	+	+	+	+	+	+
URE	Urease	-	-	-	-	-	+	-	-
TDA	Tryptophane Deaminase	-	-	-	-	-	+	-	-
IND	Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	Voges Proskauer	+	+	+	+	+	-	+	+
GEL	Gelatinase	-	-	-	-	-	+	-	-
GLU	Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+
MAN	Manitol	+	+	+	+	+	-	+	+
INO	Inositol	-	+	+	-	-	-	+	-
SOR	Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	+
RHA	Rhamnose	+	+	+	-	+	-	+	+
SAC	Saccharose	-	+	-	-	-	-	-	+
MEL	Melibiose	-	+	+	+	-	-	+	+
AMY	Amygdalin	-	+	-	-	-	-	-	+
ARA	Arabinose	+	+	+	+	+	-	+	+

## 2. *Escherichia coli*(*E. coli*)

### 1) 증균 및 분리배양

증균배양을 실시하여 발효관에 가스가 발생한 시험관은 총 25개 정도 나타났으며, 이들 중 선택배지에 분리배양한 결과 6점에서 대장균 집락의 특성인 녹색금속광택을 갖는 집락이 발견되었다(Table 10). 이들 6점은 채취 시기별로는 2월~3월에 채취한 시료에서 나타났으며, 이는 살모넬라와 같은 시기였다.

<Table 10> Positive samples for *E. coli*

Organism	Year		2008			2009	
	Month		10월	11월	12월	1월	2월
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	3	3

### 2) 확인시험

분리배양에서 전형적인 대장균 집락의 모습을 보인 6점에 대하여 API 20E kit을 이용하여 확인시험을 한 결과 총 3점이 *E. coli*로 동정되었다.

이를 채취시기별로 보면 2월에 채취된 시료가 2점, 3월에 채취된 시료가 1점으로 나타났다. 이는 전체 시료의 3%에 해당하는 결과이며, *Salmonella* spp와 마찬가지로 사료에서 검출이 된다는 것을 보여준 결과이다.

### 3) *E. coli*의 생화학적특성

*E. coli*에 대한 생화학시험은 API 20E kit로 실시하였으며 각각의 생화학반응 결과는 Table. 13에서 나타난 것과 같다. Oxiase Test결과는 음성이 나왔으며 그립염색한 결과 또한 음성으로 나왔고 단간균 형태를 띠고 있어 *E. coli*균의 특징

과 일치하는 결과가 나왔다.

또한 분리배양을 실시하여 *E. coli* 특정 집락으로 판정된 시료 중 *E. coli*로 판정되지 않는 시료는 16S rDNA sequencing 결과 모두 *Enterobacter*속 균으로 동정되었다.

<Table 11> Results of API 20E kit reaction

Test	Reaction Enzymes	Sample No.					
		37	45	47	48	67	71
ONPG	$\beta$ -galactosidase	+	+	+	+	+	+
ADH	Arginine Dihydrolase	+	-	-	-	+	+
LDC	Lysine Decarboxylase	+	+	+	+	-	-
ODC	Ornithine Decarboxylase	+	+	+	+	-	+
CIT	Citrate utilization	+	-	-	-	+	+
H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-
URE	Urease	+	-	-	-	-	-
TDA	Tryptophane Deaminase	+	-	-	-	+	+
IND	Indole production	+	+	+	+	-	-
VP	Voges Proskauer	+	-	-	-	+	+
GEL	Gelatinase	-	-	-	-	-	-
GLU	Glucose	+	+	+	+	+	+
MAN	Manitol	+	+	+	+	+	+
INO	Inositol	+	-	-	-	-	-
SOR	Sorbitol	+	+	+	+	+	-
RHA	Rhamnose	+	+	+	+	+	+
SAC	Saccharose	+	-	-	-	+	+
MEL	Melibiose	+	+	+	+	+	+
AMY	Amygdalin	+	-	-	-	+	+
ARA	Arabinose	+	+	+	+	+	+

### 3. *Listeria monocytogenes*

#### 1) 증균 및 분리배양

증균배양을 실시하여 배양액이 검거나 검은 갈색으로 변한 시료는 85개였으며 이들을 분리배양 한 결과 이중 8점만이 *L. monocytogenes*균 집락의 특성을 가지고 있었다(Table 12). 이를 채취시기별로 보면 12월에 채취한 시료중 1점이 의심집락으로 검출되었고 2월에 채취한 시료가 6점 3월에 채취한 시료가 1점으로 2월에 채취한 시료가 가장 많이 검출되었다.

<Table 12> Positive samples for *L. monocytogenes*

Organism	Year	2008			2009		
	Month	10	11	12	1	2	3
<i>L. monocytogenes</i>		-	-	1	-	6	1

#### 2) 확인시험

의심집락의 확인시험을 위해 Catalase test와 API Listeria kit를 이용한 동정시험을 한 결과 Catalase test는 양성이 나왔으나 API Listeria kit를 이용한 동정시험 결과는 의심집락 모두가 *L. monocytogenes*균이 아닌 것으로 나타났으며 이들 집락을 그람염색한 후 결과를 확인한 결과도 그람음성으로 그람양성인 *L. monocytogenes*균의 특성과 일치하지 않았다. 또한 16s rDNA Sequencing을 이용하여 동정한 결과 8점 모두 *Bacillus licheniformis*으로 나타났다.

<Table 13> Results of API Listeria kit reaction

Test	Reaction Enzymes	Sample No.							
		1	46	56	68	72	81	91	100
DIM	Differentiation	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	hydrolysis(Esculin)	-	-	-	-	-	-	-	-
αMAN	α-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
DARL	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
XYL	Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
RIB	Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-
G1P	Glucose-1-Phospate	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-

## IV 결 론

본 실험은 국내시판중인 이유자돈 사료내에서 검출되는 유해미생물의 종류에 대한 자료를 수집하기 위하여 실험을 실시하였다. 또한 본 실험에서는 가장 보편적이면서 돼지의 설사병등을 야기시키는 *Escherichia coli* 와 인수공통 식중독균인 *Salmonella* spp 그리고 사람에게 가장 치명적인 *Listeria monocytogenes*에 대한 검출실험을 실시하였다

그 결과 *Escherichia coli*가 100점중 3점이 검출되어 전체시료의 3%에 해당되며, 의뢰시기별로 2009년 2월과 3월에 의뢰된 시료에서 검출되었다

또한 *Salmonella* spp의 경우도 전체 100점의 시료중 3점이 검출되었고, 의뢰시기별로는 *Escherichia coli*와 같은 시기에 의뢰된 시료에서 검출이 되었으며 *Escherichia coli*와 *Salmonella* spp가 같이 검출된 시료도 1점이 있었다.

*Listeria monocytogenes*에 대한 분석을 실시하여 증균배양에서 *Listeria monocytogenes*의 균집락형태와 유사한 양상을 띤 시료가 8점이었으나 최종확인을 한 결과 모두 *Bacillus licheniformis*로 판정되었다.

위의 결과를 요약해보면 국내에서 생산되는 돼지사료 중 이유자돈에 공급되는 사료에서 많은 것은 아니지만 *Salmonella* spp와 *Escherichia coli*가 발견이 되었으며 이는 돼지사료도 유해미생물 오염에 노출될 수 있다는 추정할 수 있으며 2008년보다 최근에 의뢰된 시료에서 발견된 점으로 봐서 HACCP에 더욱 신경을 써야할 것으로 사료되며 어린돼지가 먹는 이유자돈사료에 대한 관리가 필요할 것으로 사료 된다

또한 본 실험에서 검출된 *Salmonella* spp와 *Escherichia coli* 이외에 타 유해미생물에 대한 연구도 지속적으로 이루어져야하며 모든 배합사료에 대한 유해미생물 오염도에 관한 연구 또한 지속적으로 되어져야 할 것으로 생각된다.

## V 참고문헌

1. 강국희, 성문희, 방태영, 임찬수. 1985. 돼지설사 원인균 *E. coli*의 생육저해에 대한 유산균의 효과. 成大論文集(科學技術編) 第36輯 NO.1
2. 강호조, 강정부. 1982. 국내시판 사료에 대한 위생학적 연구. 1. 곰팡이 및 Aflatoxin의 오염상태. 한국수의공중보건학회지 6(2):95~103
3. 김교창,도대홍. 1991. 돼지에서 유래한 병원성 대장균의 내열성 장독소 생산유전자의 Cloning 및 발현. Food Hygiene 6(3,4) : P147-155
4. 마점술. 1987. 사료미생물 오염에 대한 연구. 서울대학교 수의과대학 연구 보고서
5. 박용하외 6인. 1997. 가축의 장내세균 분리 동정 및 배양에 관한 연구. 한국 과학기술연구원 부설 생명공학연구소 연구보고서
6. 박응복. 1982. 돼지의 살모넬라성 하리증의 예방과 치료. 한국영양사료학회지. Vol.6 No.1
7. 윤용덕, 1983, 여름철 새끼돼지 대장균성 설사증, 축산진흥 7 : P124~127
8. 정인호. 1996. 전남 지방의 설사 자돈에서 분리된 병원성 *Escherichia coli*에 관한 연구. 전남대학교 대학원 석사학위
9. 정종화. 1992. *Listeria monocytogenes*의 분리 및 채소추출물의 영향. 경북대학교 대학원 석사학위
10. 축산기술연구소. 2002. 새로운 돼지 사육기술. 농협중앙회. P235-245
11. 한국소비자원 시험검사국 식품미생물팀. 2009. 식품미생물 실험분석기법 매뉴얼
12. 홍현지, 이민영, 이연희. 2006. 2006년 돼지에서 분리한 대장균의 내성 현황. Natural Science, SWINE. Vol. 18 : P69-75
13. Lee,J.A.,S.K.Kim,O.S.Cho,and Y.G.Park. 1997. Investigation of respiratory disorders in slaughtered pigs. korean J.Vet.Serv.20 : P27-36
14. Gray, M. L. and A. H.Killinger. 1966. *Listeria monocytogenes* and



- listeric infection Bacteriol. Rev. 30(2) : P309-382
15. Kenneth C. Lepley. 1982. 돼지의 사료와 단백질 요구량. 한국영양사료 학회지. 6-1 : P43~63
  16. Mikolajcik, E. M. 1986. Listeriosis-A food hazard about which we know little. Cult. Dairy prod. J. 21(4) : P28
  17. Smith HW, Halls, Sheila. 1967.: Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Path Bact. 93 : P531~543
  18. World Health Organization. 1958. Joint WHO/FAO expert committee on zoonoses (second report). 169 : 8

<부 록>

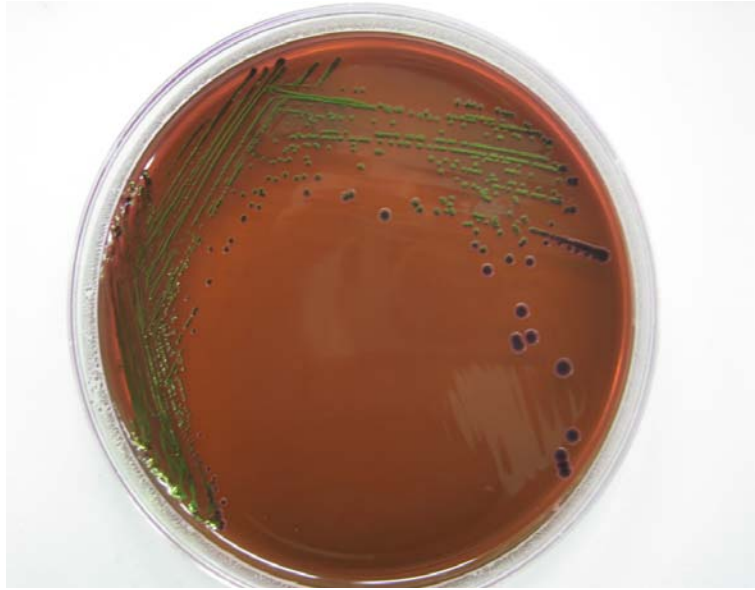
1. 배지사진



(HE agar에 도말된 *Salmonella* spp)



(XLD agar에 도말된 *Salmonella* spp)



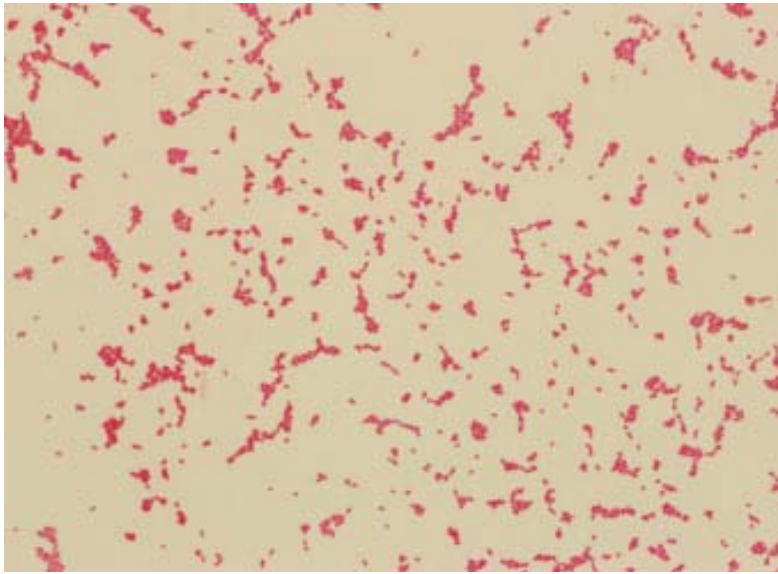
(EMB agar에 도말된 *E. coli*)

## 2. API 20E 동정 kit 사진

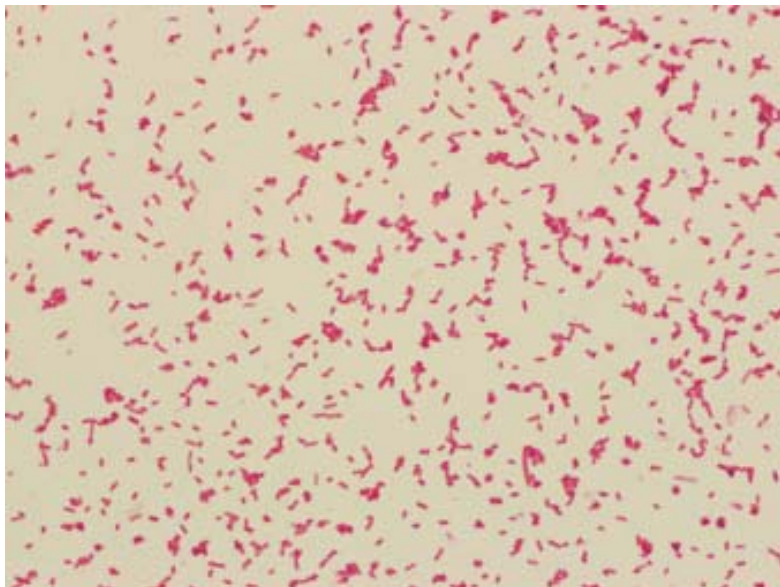


(API 20E 동정kit에 접종된 *Salmonella* spp)

3. 그람염색을 한 후 광학현미경 사진



(그람염색결과 음성, *Salmonella* spp)



(그람염색결과 음성, *E. coli*)

## Abstract

# A Study on the Pathogenic Bacteria in Commercial Feed for Weaned Piglets

Park, Young Jun

Department of Animal Resources & Production

The Graduate School of Agriculture & Animal Science

This study was conducted to investigate the safety of commercial feeds, testing the contamination of pathogenic bacteria *Escherichia coli* which is the most universal harmful organism causing diarrhea of pigs, *Salmonellae* germs that are dangerous to both pigs and men, and *Listeria monocytogenes* existed in dry feed of early weaning pigs.

One hundred samples of weaning piglet feed were collected from October 2008 for six months. As for *Salmonella* spp. fourteen samples were found to be positive in sorting tests. But in isolation and cultivation using selective media and confirmation tests using API 20E kit, 3 samples were detected, which occupied 3% of the total. Also based on the period of time when *Salmonella* spp was detected, they were found from samples collected during February and March and areas of Jeollanam-do, Gyeongsangnam-do, and Jeju-do. The other strains were verified to *Enterobacter* sp. and *Citrobacter* sp. by 16s rDNA sequencing

As for *E. coli*, in diffusion cultivation, 25 samples had gas inside fermentation pipes. As a result of isolation and cultivation of them, six samples had glimmer of green metal, a typical habitation form of *E. coli* in EMB agar. Based on confirmation tests of these using API 20E kit, three samples were confirmed to be *E. coli*. As for period of time for detection of *E. coli*, just like that of *Salmonella* spp, it was during February and March 2009. As for areas, Gyeonggi-do, Gyeongsangbuk-do, and Jeollanam-do had one respective sample. The other strains were

*Enterobacter* sp. by 16s rDNA sequencing

As for *L. monocytogenes*, in diffusion cultivation using Fraser broth, eighty five samples changed to brown color, the typical characteristic of *L. monocytogenes* and spreading was conducted on Oxford agar, the selective media, again. Eight of them showed appearances that were similar to the habitation form of *L. monocytogenes*. However, by using API Listera kit, *L. monocytogenes* was not detected. Based on 16s rDNA sequencing, they were found to be of *Bacillus licheniformis*.

---

Keyword: Feed for weaned piglets, *Salmonella* spp, *E. coli*, *L. monocytogenes*