

## 먹는물공동시설에서 배양조건에 따른 *Yersinia* 속의 검출방법에 관한 연구

미생물검사팀

허영봉 · 홍채규 · 김진아 · 서영호 · 이 향 · 육동현 · 최성민 · 김진곤

## Studies on Cultural Conditions for the Detection of *Yersinia* spp. from Mineral Spring Water

*Microbial Inspection Team*

**Young-bong Heo, Chae-kyu Hong, Jin-a Kim, Young-ho Seo,  
Hyang Lee, Dong-hyun Yook, Sung-min Choi and Jin-gon Kim**

### Abstract

A total of 124 mineral spring water samples in Seoul collected from May to Sep. 2007 were analyzed for the presence of *Yersinia* species, according to culture condition. The resistance of *Yersinia enterocolitica* to three different concentrations(0.1%, 0.25%, and 0.5%) of KOH solution was tested. Among the 124 total samples, 12(9.7%) were determined to be contaminated with *Yersinia* species. Among the 12 strains of *Yersinia* isolates, 11 isolates were identified as *Yersinia enterocolitica* and 1 isolate was *Yersinia pseudotuberculosis*. When KOH treatment with direct culture method and KOH treatment with a cold enrichment(4°C and 10°C) method were compared to determine which evidenced the better isolation ratio, the KOH treatment-cold enrichment method was shown to have an isolation ratio twice that of the KOH treatment-direct culture method. In the case of the KOH treatment-cold enrichment method, the isolation ratio was a maximum of 8.1% for 0.1% KOH(20 min.), 9.7% for 0.25% KOH(15 sec.) and 4.8% for 0.5% KOH(10 sec.). Two enrichment temperatures(4°C, 10°C) for the isolation of *Yersinia* species were compared, and the results under both conditions were similar.

**Key words** : mineral spring water, *Yersinia* species, KOH treatment

### 서 론

장내세균과에 속하는 *Yersinia* 속균은 냉장온도

5°C에서도 성장이 가능한 저온세균으로서 대표적인 병원균으로는 *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* 및 *Yersinia enterocolitica*가 있

다. *Y. pestis*는 감염된 벼룩이나 공기감염에 의한 혈액과 폐에 급성, 세균성 질환을 유발하지만 *Y. pseudotuberculosis*와 *Y. enterocolitica*는 오염된 식품 섭취에 의한 세균성 장염을 유발한다. 특히 *Y. enterocolitica*는 세계 여러나라에서 세균성 장염의 원인으로 *Salmonella*와 *Campylobacter* 만큼 발생되고 있다고 보고되고 있다(3). *Y. enterocolitica*는 가축과 야생동물에서도 검출되며 이들 동물과의 직·간접 접촉 또는 보균동물의 배설물에 오염된 물, 우유 및 음식물의 섭취를 통해 인체감염이 일어나는 것으로 추정된다(4). 또한 *Y. pseudotuberculosis*와 함께 등산로와 체육공원 등에 위치한 먹는물공동시설 및 우물에서 분리율이 점점 증가하고 있어 집단 식중독과 같은 국민 보건위생상 중요한 문제로 대두되고 있다. 따라서 환경부에서는 먹는물관리법에서 먹는물공동시설의 안전성을 확보하기 위하여 *Yersinia*균에 대한 규격기준(음성/2 L)을 마련하였다. 하지만 먹는물수질공정시험법에 명시되어 있는 직접배양법은 소요시간이 짧은 반면 분리율이 낮은 단점을 가지고 있어 정확한 검출을 위해서는 저온증균 과정이 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 먹는물수질공정시험법에 명시되어 있는 *Yersinia*균에 대한 검출방법을 바탕으로 배양조건에 따른 *Yersinia*균의 검출 특성을 비교 검토하여 *Yersinia*균의 검출방법에 있어서 분리율을 향상시키기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

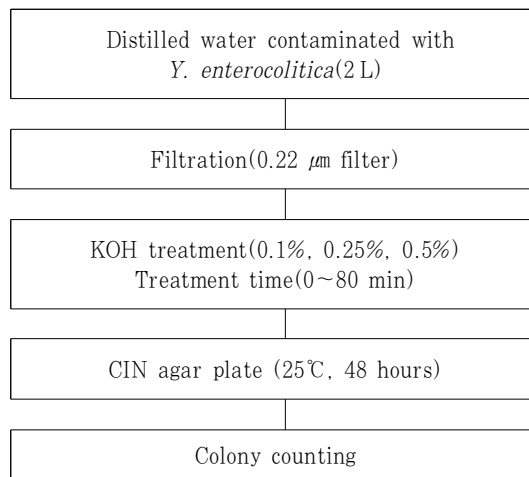
본 실험은 2007년 5월 서울시 먹는물공동시설에서 분리된 *Y. enterocolitica* 1개 분리주를 사용하여 KOH농도와 처리시간에 따른 내성시험을 실시하였고 2007년 5월부터 9월까지 서울시내 먹는 물 공동시설로부터 채수된 124건에 대하여 직접배양법과 KOH 처리후 저온증균법에 따라 *Yersinia*균의 분리를 실시하였다.

### 2. Alkali 용액 및 증균배지

KOH정(JUNSEI, JAPAN)을 0.1%, 0.25%, 0.5% 용액이 되도록 0.85% NaCl에 녹여 멸균하여 사용하였으며 증균 및 균 분리를 위해 CIN(Cefsulodin Irgasan Novobiocin : Difco, USA) 배지를 사용하였다.

### 3. KOH 농도와 처리시간별 내성 시험

서울시 먹는물공동시설에서 분리한 *Y. enterocolitica*를 Brain Heart Infusion Broth(Difco, USA)에 접종하여 25℃에서 24시간 배양한 것을 생리 식염수로 mL당  $6 \times 10^4$ 이 되도록 만들어 희석한 균부유액 10 mL를 멸균 처리된 증류수 2 L에 혼합하고 그림 1에 표시한 방법에 따라 멸균된 0.22  $\mu$ m(Millipore, USA)의 여과지로 200 mL씩 음압여과한 후 이 여지를 0.1%, 0.25%, 0.5% KOH용액으로 0~80분 처리하여 CIN배지에서 25℃에서 48시간 배양 후 생균수를 측정함으로써 KOH 접촉시간별 *Yersinia*균의 KOH내성을 검사하였다.

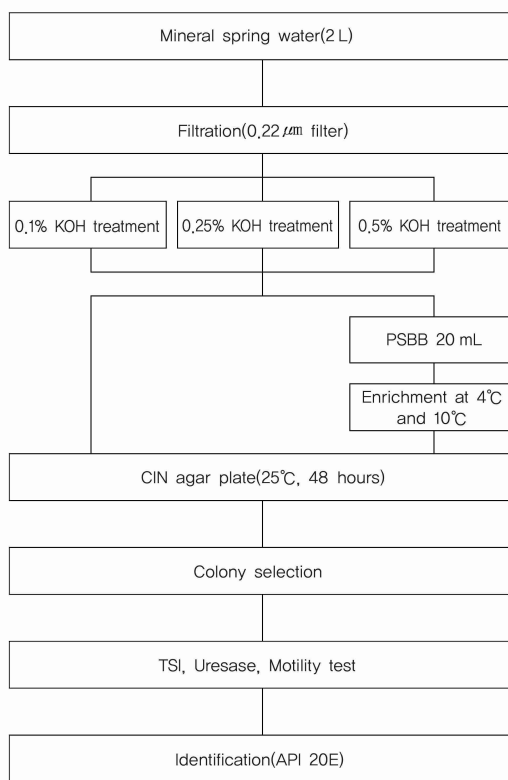


**Fig. 1.** Method for KOH resistance test of *Yersinia enterocolitica*.

### 4. 배양조건에 따른 Yersinia균의 분리

무균적으로 채수된 먹는물공동시설물 2 L를 그림 2와 같이 KOH내성 시험과 같은 방법으로 여과 후 0.1% KOH에서 20분, 0.25% KOH에서 15초,

0.5% KOH에서 10초 처리한 후 직접배양법에서는 이 여지를 CIN평판배지에서 25℃, 48시간 배양 후 의심되는 붉은 색 집락을 선택하여 TSI배지, 요소배지 및 운동성 배지에 접종하여 예비실험을 실시하고 API 20E kit로 분리동정하였다. KOH 처리 후 저온증균법에서는 이 여지를 Peptone Sorbitol Bile Broth (PSBB)배지 20 mL에 가하여 각각 4℃, 10℃의 배양온도에서 증균 배양한 후 5~10일 간격으로 CIN 평판배지에 도말하여 25℃에서 48시간 배양후 같은 방법으로 분리동정하였다.



**Fig. 2.** Method of Isolation and Identification for *Yersinia* species.

## 결과 및 고찰

### 1. *Yersinia*속균의 균종별 분리 현황

2007년 5월부터 9월까지 서울시내 먹는물공동 시설로부터 채수된 124건에 대하여 배양조건별로 분리한 결과 *Yersinia*속균의 분리 현황은 표 1과 같다. 실험한 124건 중 12건에서 *Yersinia*균이 검출되어 9.7%의 검출율을 나타내었다. 분리된 *Yersinia*속균의 균종별 분포는 12건 중 *Y. enterocolitica*가 11주, *Y. pseudotuberculosis*가 1주로 대부분 *Y. enterocolitica*가 검출되었다. 이 등(5)의 강원도내 먹는물공동시설에서 분리된 *Yersinia*균 40주 중 *Yersinia enterocolitica*가 33주(82.5%) 분리되었고, 함 등(6)의 서울지역 먹는물공동시설에서 분리한 *Yersinia*균 86주 중 *Y. enterocolitica*가 62주(72.9%)로 가장 많이 분리되어 먹는물공동시설에서의 주요 오염 원인은 *Y. enterocolitica*로 나타났다.

### 2. KOH 농도별 처리시간에 따른 *Yersinia*균의 내성

증균 배양한 *Y. enterocolitica*를 생리 식염수로 mL당  $6 \times 10^4$ 이 되도록 만들어 멸균 처리된 증류수 2L에 주입한 다음 이를 여과하여 0.1%, 0.25%, 0.5% KOH용액으로 처리한 후 CIN agar상에서 *Yersinia*균의 손실이 최소화되는 KOH 처리시간대를 파악하고자 *Yersinia* 생균수를 측정된 결과는 그림 3과 같다.

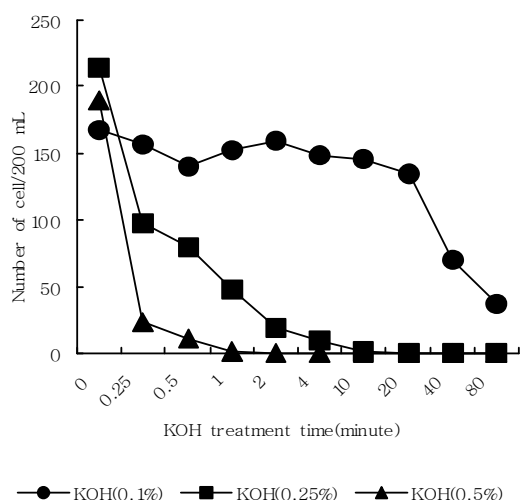
실험결과 0.1% KOH농도에서는 20분대까지는 큰 차이가 없었으나 40분에는 50%이상이 감소하였다. 0.25% KOH농도에서는 15초 처리시 50% 정도 사멸되고 1분간 처리시 급속히 감소하여 20분에 완전히 사멸하였다. 0.5% KOH 농도에서도

**Table 1.** Number of isolated *Yersinia* species from spring water

No. of samples	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Sum(%)
124	11	1	12(9.7) <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> The number in parenthesis means detection rate.

15초 처리시 85%정도 사멸하고 2분간 처리했을 경우 완전히 사멸하였다. 탁(7)이 0.15% KOH에서 30분간 처리할 경우 *Yersinia*는 거의 사멸하지 않고 *E. coli*와 *E. aerogenes*등이 완전히 사멸한다고 보고한 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 탁(7)은 *Yersinia*가 mL당  $10^2$  이하로 오염되었을 경우에도 KOH 전처리후 증균법이 우수하다고 하였으나 Fukushima(8)는 증균하지 않고 KOH 처리할 경우 가검물 g당  $10^2$  이상으로 *Yersinia*가 오염된 가검물이라야 균분리가 가능하다고 하였다. 따라서 적은양의 *Yersinia*가 오염되어있는 물시료에서는 먼저 증균하지 않고 KOH 전처리를 할 경우 처리시간 15초에서 급격히 감소하는 0.5% KOH로 전처리하기 보다는 0.1% KOH농도로 40분 이내로 처리하거나 0.25% KOH농도로 15초 이내로 처리하는 것이 더 효과적이라고 사료된다.



**Fig. 3.** KOH resistance of *Y. enterocolitica* after filtration.

### 3. 배양조건에 따른 *Yersinia*균의 분리 효과

KOH 처리시간에 따른 *Yersinia*균의 내성시험을 바탕으로 먹는물공동시설에서 채수한 시료를  $0.22 \mu\text{m}$ 여지로 여과한 후 0.1% KOH에서 20분, 0.25% KOH에서 15초, 0.5% KOH에서 10초 처리하여 배양조건에 따른 *Yersinia*균을 분리한 실험결과는 표 2와 같다.

*Yersinia*균의 분리는 KOH로 전처리 후 저온증균법으로 배양하였을 때 배양조건에 따라 1.6% (2/124건)~9.7%(12/124건)가 분리된 반면에 직접배양법에서는 0%~2.4%(3/124건)가 분리되어 저온증균법이 직접배양법보다 2배 이상 높은 검출율을 나타내었다. 이 등(9)이 *Y. enterocolitica*의 배양방법에 따른 분리율 비교평가에서 저온증균법이 직접배양법보다 3.5배의 높은 검출율을 나타내었다는 보고와 유사한 결과를 얻었다.

KOH 처리농도별 저온증균법에서는 4°C, 10°C에서 모두 10일 배양하였을 때 *Yersinia*균을 분리할 수 있었는데 0.5% KOH로 10초 처리하였을 경우 직접배양법에서뿐만 아니라 저온증균법에서도 분리율이 0.25% KOH, 0.1% KOH로 처리하였을 때 보다 50%이상 감소하였다. 이는 KOH내성 시험에서 알 수 있듯이 높은 농도의 KOH로 처리할 경우 KOH에 감수성이 있는 경쟁세균을 쉽게 사멸시킬 수 있지만 *Yersinia*균도 사멸할 가능성이 있어 KOH농도가 *Yersinia*균이 적게 오염되어 있는 시료에 영향을 미친 것으로 사료된다.

배양온도별 *Yersinia*균의 분리율은 4°C와 10°C에서 저온증균할 경우 약간의 차이를 나타내었는데 4°C에서 10일 이상 배양할 경우 10°C에서 배양할 때 보다 분리율이 3%정도 증가하는 것으로 나타났다. *Yersinia*균은 냉장온도에서도 성장 가능한 저온세균으로서 Paterson 등(10)에 따르면 *Y. enterocolitica*가 3~4°C의 저온에서 3~4주 후 현저한 증균이 이루어졌다고 보고하였다.

따라서 본 실험의 결과로부터 먹는물수질공정시험법에 의한 직접배양법과 0.25% KOH로 전처리 후 4°C에서 10~15일간 저온증균하는 방법을 병용한다면 물을 통한 식중독 원인균의 분리율을 보다 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

## 결론

2007년 5월부터 9월까지 서울시내 먹는물공동시설로부터 채수된 총 124건에 대하여 배양조건에 따른 *Yersinia*속균의 검출 특성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

**Table 2.** Comparison of detection method for isolation of *Yersinia* species from spring water

Detection method		Enrichment period				Total
		2 days	5 days	10 days	20 days	
0.1% KOH treatment	Direct isolation	3(2.4) <sup>1)</sup>	-	-	-	3(2.4)
	Enrichment at 4°C	-	0	8(6.5)	2(1.6)	10(8.1)
	Enrichment at 10°C	-	0	6(4.8)	0	6(4.8)
0.25% KOH treatment	Direct isolation	3(2.4)	-	-	-	3(2.4)
	Enrichment at 4°C	-	0	8(6.5)	4(3.2)	12(9.7)
	Enrichment at 10°C	-	0	8(6.5)	0	8(6.5)
0.5% KOH treatment	Direct isolation	0	-	-	-	0
	Enrichment at 4°C	-	0	4(3.2)	2(1.6)	6(4.8)
	Enrichment at 10°C	-	0	2(1.6)	0	2(1.6)

<sup>1)</sup> Detection number. The number in parenthesis means detection rate.

1. 먹는물공동시설에서 채수된 총 124건 중에 12건에서 *Yersinia*균이 검출되어 9.7%의 검출율을 나타내었으며 균종별 분포는 12건중 *Y. enterocolitica*가 11주, *Y. pseudotuberculosis*가 1주로 대부분 *Y. enterocolitica*가 검출되었다.

2. KOH 처리시간에 따른 *Yersinia*균의 내성 시험 결과 0.1% KOH농도에서는 40분 처리 후 50%이상 생존수가 감소하였다. 0.25% KOH농도에서는 15초 처리시 50% 정도 사멸되고 20분에 완전히 사멸하였다. 0.5% KOH 농도에서도 15초 처리시 85%정도 사멸하고 2분간 처리했을 경우 완전히 사멸하였다.

3. 배양방법에 따른 *Yersinia*균의 분리결과는 KOH 전처리 후 4°C와 10°C에서 저온증균법으로 배양하였을 때 직접배양법보다 2배 이상 높은 검출율을 나타내었다.

4. KOH 처리농도별 저온증균법에서는 0.1% KOH로 20분 처리했을 경우 최고 8.1% (10/124건), 0.25% KOH로 15초 처리했을

경우 최고 9.7%(12/124건), 0.5% KOH로 10초 처리하였을 경우 최고 4.8%(6/124건)의 분리율을 나타내었다.

5. 배양온도별 *Yersinia*균의 분리율은 4°C와 10°C에서 저온증균할 경우 약간의 차이를 나타내었는데 4°C에서 10일 이상 배양할 경우 분리율이 3% 증가하는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

1. 변신철, 노우섭 : 서울북부지역 웅달샘에서 분리한 *Yersinia* 속균에 관한 연구. 환경위생학회지, 24(1):141~150, 1998.
2. 박석기, 황영옥, 정지현, 정윤태 : 병원미생물 시험법, 2000.
3. Cover TL and Aber RC : Medical progress -(*Yersinia enterocolitica*). N. Eng. J. Med., 321:16~24, 1989.
4. FDA : Bacteriological analytical manual 6th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 11.01~11.09, 1984.
5. 이택수, 박부길, 오덕환 : 먹는 샘물에서 분리한 *Yersinia* spp.의 분리 및 특성. 한국식품

- 영양과학회지, 30(5):796~801, 2001.
6. 함희진, 안미진, 김정현 : 최근 5년간 서울시 내 약수터에서 분리한 여시니아속균의 균종별 분포 및 생화학적 정상조사. 한국식품위생안전성학회, 13(4):412~418, 1998.
  7. 탁연빈 : *Yersinia enterocolitica*의 신속증균법. 한국수의공중보건학회지, 16(1):1~6, 1992.
  8. Fukushima H : Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuber-*
  - culosis* form meat. Appl. Environ. Microbiol., 50:710~712, 1985.
  9. 이향, 최성민, 함희진, 이영기, 안미진, 최채만, 오수경 : *Yersinia*속균의 검출을 향상방법 및 분리균의 항생제 내성에 관한 연구. 서울시보건환경연구원보, 12:3~9, 1998.
  10. Paterson JS and Cook R : A method of the recover of *Pasteurella pseudotuberculosis* from faeces. J. Pathol. Bacteriol., 5:241~242, 1963.