열, 살균소독제, 항생제에 의한 분리 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) 제어

이은진 · 박종현*

경원대학교 식품생물공학과

Biocontrol of Isolated *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) by Heat, Sanitizer, and Antibiotic

Eun Jin Lee and Jong-Hyun Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea

Abstract

Tolerance against heat, sanitizers, and antibiotics of 112 *Cronobacter* isolates classified by desiccation was determined to permit effective biocontrol in powdered foods. The isolates were classified into three groups: dry-tolerant (n=37), dry-sensitive (n=7), and dry-intermediate (n=68). The strains that were highly tolerant to drying also showed high heat tolerance that they seemed to have high tolerance to heat after dry stress in powdered foods like infant formula. Sodium hypochlorite and benzalkonium chloride concentrations necessary to achieve a 5-log reduction in viable counts (CFU/mL) were 15-25 ppm and 5-15 ppm, respectively. However, there was little difference of the efficacy of these sanitizers between dry-sensitive and -tolerant strains for planktonic cells suspended in 3% albumin. The minimal inhibition concentration (MIC) of β -lactam ampicillin was 64-128 ppm for 90% of the strains. The isolates were consistently sensitive to kanamycin and naldixic acid (MIC=4 ppm). Dry-tolerant strains displayed more antibiotic resistance than dry-sensitive strains. The results indicate that dry-tolerant *Cronobacter* isolates often possess heat and antibiotic resistance, indicated the need for potent sterilization treatments of powdered foods.

Key words: powdered food, *Cronobacter*, desiccation, heat, sanitizer, antibiotic

서 론

Cronobacter spp.는 원래 *Enterobacter sakazakii*로 명명되어 오다가 Iversen 등(2008)에 의하여 새 *Cronobacter* spp.로 개명하도록 제안되었다. DNA-DNA 혼성화, 표현형에 의하여 *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* 등의 5종으로 재분류되었다. 이 균은 그람 음성, 운동성이 있고, 포자를 형성하지 않는 Enterobacteriaceae과의 간균으로 물, 토양 등의 환경과, 여러 가지 가공식품 및 신선식품 등에 존재한다(Friedemann, 2007). 이 균은 조제분유 생산공정이나 가정에서도 발견되고 있으며 *Cronobacter* spp.는 유아에게 치명적인 영향을 주는 급성 기회 감염균으로 주로 생후 1개

월 이내의 신생아, 조산아, 저체중아, 유아에게서 수막염(neonatal meningitis), 패혈증(bacteremia), 신생아 괴사성 장염(necrotizing enterocolitis) 등의 병을 일으키는 것으로 알려졌다(Arad *et al.*, 2001; Farmer *et al.*, 1980; Guillaume-Gentil, 2005). 매우 드물게 감염되지만 *Cronobacter* spp.에 감염된 영유아의 치사율이 33-80% 이상인 것으로 알려져 있으며 매우 치명적인 세균(Iversen *et al.*, 2003)으로 간주되고 있으며 전 세계적으로 조제분유내의 오염정도는 2.4-14.2%인 것으로 보고되어 있다(Iversen *et al.*, 2004; Muytjens *et al.*, 1988). 최근 국내에 시판 중인 조제분유를 대상으로 *Cronobacter* spp.의 스크리닝 및 특성을 분석한 연구(Yoo *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006) 이후로 조제분유 내에 *Cronobacter* spp.가 존재하는 것으로 밝혀져 문제가 되고 있다.

이 *Cronobacter* spp.의 가장 큰 특징은 건조 저항성이 높은 것인데 *E. agglomerans*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*에 비해 오랫동안 생존했고 상대습도가 낮을수

*Corresponding author : Jong-Hyun Park, Dept. of Food Science and Biotechnology, Seongnam 461-701, Korea. Tel: 82-31-750-5523, Fax: 82-31-750-5273, E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr

록 *Cronobacter* spp.의 생존율이 높았다(Breeuwer *et al.*, 2003; Barron *et al.*, 2007). 또한 Edelson-Mammel 등 (2005)은 조제분유의 높은 영양성분으로 인해 700일 이상 생존이 가능하다고 보고하였다. 이렇게 *Cronobacter* spp.가 분말형 건조식품이나 환경등에 오염이 높다고 보고되는 것은 다른 미생물 혹은 다른 Enterobacteriaceae 종에 비하여 삼투압과 건조 스트레스에 높은 저항성을 가지기 때문인 것으로 알려지고 있다(Lehner *et al.*, 2004). 이러한 특성은 *Cronobacter* spp.의 기능적으로 다른 유전자 중 건조 스트레스에 관여하는 trehalose 등의 유전자가 발현되기 때문이라고 보고하였다(Breeuwer *et al.*, 2003). 다른 설명으로는 건조에 대하여 extracellular polysaccharide 등의 biofilm의 형성능이 크기 때문일 것으로 설명하고 있다(Tamaru *et al.*, 2005). 이와같은 *Cronobacter* spp.의 높은 biofilm 형성능력은 물리적 장벽을 형성함으로써 UV light, 삼투압 스트레스, 열처리, 영양고갈, 산, 세정액, 항생제, 항체 등의 환경스트레스에 대하여 저항성을 높여 줄 수 있다(O'Toole *et al.*, 2000).

Cronobacter spp.를 제어하기 위해서 가장 손쉬운 열처리 제어법이 많이 연구되어 왔다(Nazarowec-White *et al.*, 1997; Edelson-Mammel *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007). 이러한 연구의 가장 큰 특징은 *Cronobacter* spp. 각각의 종류에 따라 열에 대한 내성이 아주 다양하여 D₁₀58이 9.9 분의 열저항성을 가지고 있는 균주도 있으나 대부분의 균주는 72°C의 15초 살균조건에서 8 log unit 이상이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 WHO는 조제분유를 70°C 이상의 열수로 환원하면 *Cronobacter* spp.를 불활성화할 수 있다고 제안하였다(FAO-WHO, 2006). 그러나 조제분유의 생산공정중에서 살균이 잘 이루어지지 않기도 하고 조제분유 생산시에 포장공정 등에서 교차오염이나 원료의 교차오염을 줄이는 노력이 필요하다고 제안하였다. 현실적으로 대부분의 자연계 *Cronobacter* spp.는 biofilm을 형성한 상태로 오염되어 있을 가능성이 크다 할 수가 있다. 그러나 biofilm을 형성하는 건조내성 *Cronobacter* spp.의 열저항성에 대한 연구는 거의 없는 것으로 보인다.

Polyvinyl chloride(PVC), teflon, wool, 고무와 스텐인레스 금속에서 *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*와 *L. monocytogenes*은 부착하지 않은 균체에 비해 quaternary ammonium compound(QAC) sanitizer에 저항력을 가지고 있다(Breeuwer *et al.*, 2003). *Candida albicans*의 antifungal agent 실험에서는 부유균(planktonic cell)에 비해 biofilm의 MIC값이 더 높았다고 한다(Barron *et al.*, 2007). 그리고 *E. sakazakii*도 부유상태에서는 살균제가 잘 작용하지만 금속표면에서의 biofilm을 형성한 세균에는 잘 작용하지 않는다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2007). 이러한 효과는 biofilm 때문에 세균 균체내로의 살균제의 침투가 잘 이루어지지 않는 것로부터 유발된다고 볼 수 있다.

병원에 입원한 환자의 치료를 위한 항생제의 유효성에 대한 관심은 최근에 점점 높아지고 있다. 일반적으로 자연계에서 분리된 *Cronobacter* spp.는 대부분 β -lactam과 cephalosporin에 민감하고 benzylpenicillin과 oxacillin 등에는 상대적으로 저항성이 높다고 보고하였다(Stock *et al.*, 2002; Farmer *et al.*, 1980; Muytjen *et al.*, 1986). 아울러 β -lactamase의 활성의 변화에 의하여 항생제내성 병원성균의 출현이 보고되었다(Paterson *et al.*, 2005; Girlich *et al.*, 2001). 오염된 상처에서 분리된 *Cronobacter* spp.균은 ampicillin, gentamycin 및 cefotaxime에 저항성이 컸다고 보고하였다(Dennison and Morris, 2002). 그러나 국내 분리균주에 대한 항생제 내성에 대한 보고는 아직 없는 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 조제분유 등의 건조분말 식품 등에서 분리하여 건조내성 정도가 다른 *Cronobacter* spp.로부터 열, 항생제, 살균제에 대한 내성특성 분석하여 *Cronobacter* spp.을 제어하는 효과적인 방법을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

균주와 시약

본 연구에서 사용된 *Cronobacter* spp.는 국내에서 유통 중인 조제분유, 이유식, 생식, 선식, 샐러드 등 비가열 섭취식품 160종의 시료로부터 분리되어 당 연구실의 균주 은행에 보관되어 있는 112균주를 사용하였다(Lee *et al.*, 2009). 생화학적, 생리학적 특성을 비교하기 위해 공시균주인 *C. muytjensii* ATCC 51329와 *C. sakazakii* KCTC 2949를 사용하였으며 사용되는 시약은 특급시약을 사용하였다.

분리 *Cronobacter* spp.의 열 감수성

공시균주인 *C. muytjensii* ATCC 51329과 *C. sakazakii* KCTC 2949를 포함하여 112개의 건조분말 식품유래 분리균주를 대상 시험균주로 정하였다. 7×7 cm²의 스텐인레스 스틸에 20 μ L를 떨어뜨린 후 25°C, 상대습도 75%의 항온항습 인큐베이터(Daehan Scientific, Seoul, Korea)에서 건조시킨 후 0, 4, 8, 24, 48시간째에 50 μ L D.W.로 20회씩 2회 pipetting 하여 건조된 균체를 회수하여 TSA(Oxoid)에 도말한 후 37°C에서 24시간동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였다. 사멸정도에 따라 건조민감, 건조내성, 중간그룹으로 분류하였다(Lee *et al.*, 2009).

공시균주를 포함한 112개의 *Cronobacter* spp.를 건조 특성에 따라 세 그룹으로 나누어 10 mL의 TSB(Oxoid, Hampshire, UK)에서 37°C 24시간동안 전 배양 시킨 균주를 최종 생균수가 7 log CFU/mL의 수준이 되도록 희석하였다. 각각 1 mL씩 1.5 mL tube에 나누어 담은 후 60°C

항온수조에서 5분간 incubation시킨 후 4°C ice bath로 냉각시킨 후 100 µL를 취해 TSA(Oxoid)에 도말한 후 37°C에서 24시간 동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였으며 초기 균수와와의 차이를 log로 표기하였으며 각 그룹 간 평균과 표준편차를 계산하여 표기하였다.

살균소독제의 *Cronobacter* spp.에의 효능

건조내성에 대한 분류에 따라 시험 균주로 건조내성, 건조민감 *Cronobacter* spp.를 대표적으로 3균주씩 선별하여 TSB에서 37°C, 24시간동안 전배양한 후 2차 계대하여 사용하였다. 살균소독력 시험에 사용된 살균소독제는 그 유효성분 중 실제 제품수와 사용량이 가장 많은 것으로 알려진 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)과 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride)을 이용하였다(Lee *et al.*, 2005). 살균소독력 시험은 Kim(2005) 등의 살균소독력 시험법에 따랐다. 사용된 희석액은 trypton, pancreatic digest of casein(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) 1 g과 8.5 g NaCl을 증류수 1 L에 녹인 후 멸균하여 사용하였다. 중화제는 polysorbate 80(Fulka chemie, Switzerland) 30 g과 lecithin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)를 희석액에 가하여 1 L로 만든 용액을 사용하였으며 경수로 A용액(MgCl₂, 18.84 g과 CaCl₂ 46.24 g을 증류수 1 L에 용해)

3 mL과 B용액(NaHCO₃ 35.02 g을 증류수 1 L에 용해) 8 mL을 989 mL의 증류수와 혼합한 뒤 pore size 0.45 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 간섭물질로 albumin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)용액(청정조건: 3 g/L, 오염조건 30 g/L)을 여과 멸균하여 사용하였다. 시험 중 모든 시약, 시험균, 시험액은 항온수조에서 20±1°C로 유지하였다. 살균 소독력 시험은 간섭물질 1 mL를 멸균 시험관에 넣고 시험균 현탁액 1 mL를 첨가하여 혼합하고 20±1°C에서 2 min±10 sec동안 방치한 후 8 mL의 시험용액을 첨가하여 20±1°C에서 5 min±10 동안 반응시켰다. 이 액 1 mL를 중화제 8 mL와 물 1 mL가 들어 있는 멸균 시험관에 첨가하고 20±1°C에서 5 min±10 s 동안 중화시켰다. 이 중화반응 혼합액 1 mL씩을 2개의 petri dish(SPL, Korea)에 각각 넣고 TSA를 12-13 mL씩 분주하여 잘 섞은 후 36±1°C에서 24시간 배양하여 발생한 집락 수로부터 살균 소독력을 계산하였다. 시험 검증법으로 시험조건 검증시험, 중화제 독성 검증시험, 희석 중화 검증시험은 Fig. 2와 같은 방법으로 수행하였다. 또한 살균소독력 평가를 위한 시험균주로 Gram(-)와 Gram(+)를 대표하는 *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 1949와 *Staphylococcus aureus* ATCC 12103을 사용하였다.

Fig. 1. Test and validation procedure for bactericidal suspension test (Kim *et al.* 2005).

항생제 감수성 측정

분리한 *Cronobacter* spp.의 항생제 감수성은 한천 희석 방법을 이용하여 수행하였다(Zarazaga, 1999). 대상 항생제로는 네 가지 계열의 항생제가 사용되었는데 β -lactam 계열의 ampicillin, aminoglycoside 계열의 kanamycin, streptomycin과 neomycin, broad spectrum 계열의 chloramphenicol과 tetracycline이, Gram negative spectrum 계열의 rifampicin, nalidixic acid가 사용되었다. 대상 균주는 분리된 110개의 야생균주와 두 개의 표준 균주로 총 112개의 *Cronobacter* spp.가 시험 균주로 사용되었다. 각 시험 균주는 Muller-Hinton(MH) broth(Oxoid, Hampshire, England)에서 37°C전 배양 시켰다. MH 한천배지(MHA)에 각 항생제를 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 ppm으로 단계별로 희석하여 첨가한 항생제배지를 만들고 각 시험균액을 tooth-picking하여 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 최소 생육저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 농도로 결정하였다. 그리고 건조 내성균주 37주와 건조민감 균주 7주를 별도로 분리하여 각각의 항생제에 대한 내성을 비교하였다.

결과 및 고찰

분리 *Cronobacter* spp.의 건조 특성에 따른 열 감수성

공시균주를 포함하여 국내에서 분리한 112개의 *Cronobacter* spp.를 건조내성에 따라 세 그룹으로 나누었다. 이들을 37개의 건조저항 균주, 7개의 건조민감 균주, 그리고 68개의 중간그룹으로 분류하여 연구를 수행하였다(Lee *et al.*,

Fig. 2. Death profiles of seven dry-sensitive, 68 dry-intermediate, and 37 dry-tolerant *Cronobacter* spp. by heat at 60°C from the 7 log scale inoculum.

2009). 이들 각각의 균을 60°C 항온수조에서 사멸정도를 측정하였다. 전 배양한 초기균주는 7 Log CFU/mL 수준이었으며 사멸정도를 보았을 때 건조민감 그룹은 평균 5 Log scale이 사멸되었으며 평균 3 Log scale이 사멸한 건조저항 그룹보다 높은 사멸을 보였다. 중간그룹의 경우 위의 건조실험에서 건조저항 그룹에 가까운 것으로 나타났는데 평균 2 Log scale의 낮은 사멸을 보여주었다. 오차범위가 넓었지만 저항 특성이 열저항성 그룹과 비슷한 것으로 사료된다(Fig. 2). 그러므로 건조저항을 가지고 있는 *Cronobacter* spp.는 열에 대해서도 저항성이 큰 것으로 보인다. 여러 연구자들에 의한 연구에 의하며 *Cronobacter* spp.의 열저항성은 매우 다양한 것으로 보고되어 있다(Nazarowec-White and Farber, 1997, Beewer *et al.*, 2003, Edelson-Mammel *et al.*, 2004). 항생제와 biocide에 대한 교차저항성(cross-resistance)의 특성(Rusell and Day, 1996)과 같이 건조저항성도 열저항성과 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나 무엇보다도 조제분유등의 건조식품에서 살아있는 *Cronobacter* spp.는 건조저항성이 클 것으로 보인다. 현재 WHO에서는 70°C에서 조제분유를 환원시키라고 권하고 있지만 조제분유상태에서의 *Cronobacter* spp.는 열저항성도 크기 때문에 이에 대한 심도있는 연구가 더 따라야 할 것으로 보인다. 열처리로부터 살아남은 세균이거나 식품중의 산, 염, 온도 등 자연적으로 가해진 스트레스를 견디어 낸 세균들은 다른 스트레스를 가해도 일부 균주는 교차보호(cross protection) 특성으로 인해 식품 속에서 더 독성이 강해진다고 보고하였다(Gurtler *et al.*, 2007). 따라서 조제분유등의 건조 스트레스에 노출되었고 살아남은 *Cronobacter* spp.는 교차보호로 인해 여러 가지 스트레스에서도 높은 내성을 보일 수 있을 것으로 사료된다.

살균소독제의 *Cronobacter* spp.에 대한 효능

식품 생산공정시에 작업장 표면에 부착하고 있는 세균을 살균소독하기 위한 상업용 살균소독제로는 4급 암모늄염, 차아염소산, 유기산등을 사용하고 있지만 이들에 대한 국내분리 *Cronobacter* spp.에의 효능에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그리고 여러 가지 재질로 만들어진 작업장 표면위에서 *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*와 *L. monocytogenes*는 부착하지 않은 세포에 비해 4급 암모늄염계(quaternary ammonium compound, QAC) 살균소독제에 저항력을 가지고 있다(Res 1993; Pickett, 1996). 이는 이들이 형성하는 biofilm이 저항력에 영향을 준 것으로 보고되었지만 건조내성이 다른 *Cronobacter* spp.가 유기물로 오염된 부유세포(planktonic cell)상태에서의 직접적인 효능 비교는 찾아볼 수가 없다.

건조내성 3균주와 건조민감 3균주를 염소계 살균소독제인 차아염소산나트륨 용액(sodium hypochlorite solution)과 4급암모늄계(QACs)인 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride)

에 대한 살균소독력을 비교측정하였다. Sodium hypochlorite와 benzalkonium chloride는 살균소독제 유효성분 중 실제 제품수와 사용량이 가장 많은 것으로 알려져 있다(Lee, 2005). 살균농도는 *Cronobacter* spp.가 5 Log CFU/mL이나 99.999%의 사멸을 보이는 최초 농도로 설정하였다. Sodium hypochlorite는 두 그룹 대부분 15-25 ppm의 범주에 속하였고 각 건조내성 그룹간의 큰 구별성은 없었다. 그리고 청정조건과 오염조건에서 5 ppm 가량의 차이를 보이는 것을 확인하였으나 오염정도가 살균력에 크게 반영되지는 않는 것으로 보인다(Fig. 3). 반면 QACs인 benzalkonium chloride는 살균 농도가 5-15 ppm 으로 sodium hypochlorite 보다 낮은 농도에서 저해됨을 나타냈으며 각 그룹에 따라 5 ppm의 차이를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 4). 청정조

Fig. 3. Concentration of sodium hypochlorite for reduction of 5 Log CFU/mL of three dry-sensitive and three tolerant *Cronobacter* spp. Albumin of 3% was contaminated at dirty condition.

Fig. 4. Concentration of benzalkonium chloride for reduction of 5 Log CFU/mL of three dry-sensitive and three tolerant *Cronobacter* spp. Albumin of 3% was contaminated at dirty condition.

건과 오염조건에 따라서는 건조내성 균주중 한 균주만 차이를 보여 오염조건과 살균력의 상관관계는 크지 않은 것으로 보인다. 따라서 이러한 실험 결과로 볼 때 살균소독제를 이용한 *Cronobacter* spp.의 제어 시에는 sodium hypochlorite 보다 benzalkonium chloride가 저 농도에서 효과적으로 작용할 것으로 사료된다. Albumin으로 3%(w/v) 오염시킨 후의 살균력은 건조내성 균주와 건조 민감균주 모두 2가지의 살균소독제가 크게 영향을 주고 있지 않음을 알 수가 있었다. *Cronobacter* spp.가 유기물질에 오염되어 존재할 때 biofilm을 형성할 수 있는 조건에서는 살균제의 효능이 낮아진다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2007). 이는 *Cronobacter* spp.가 조제분유같은 적절한 영양원을 이용하여 biofilm을 형성하였기 때문이다(Kim *et al.*, 2006). 따라서 조제분유 등의 오염 유기물질에 의하여 *Cronobacter* spp.가 biofilm을 형성시키지 않게 하기 위하여 생산환경이나 분유 수유 기기에 대한 신속한 청결작업이 살균소독과 같이 중요함을 알 수가 있었다.

Cronobacter spp.의 건조내성에 따른 항생제 감수성 특성

110종의 분리균주와 2종의 공시균주를 4가지 계열의 8가지 항생제에 대한 최소생육저해농도(MIC)를 분석하였다. β -Lactam 계열의 항생제는 transpeptidase의 작용을 억제하여 세균의 세포벽을 구성하는 peptidoglycan layer의 합성을 저해작용을 하며 대표적으로 penicillin과 ampicillin이 있다. β -lactam 계열의 ampicillin의 경우 8 ppm에서 256 ppm의 분포를 보이며 약 90%가 64-128 ppm의 높은 농도에서 저해되었고 256 ppm 이상의 농도에서도 생육하는 분리균주가 확인되어 높은 내성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 따라서 ampicillin에 약한 내성 그룹과 강한 그룹으로 분리되었으며 내성이 있는 균주들이 더 많은 것으로 나타났다. 일부 *Cronobacter* spp. 분리균주는 대부분의 β -lactam 항생제에 민감하다고 보고하였지만 일부 병원성 분리균주는 β -lactam 항생제에 내성이 크다고 알려져 있다(Stock and Wiedemann, 2002, Paterson *et al.*, 2005, Dennison and Morris, 2002). 따라서 분리균주의 분

Fig. 5. Ratio of 112 *Cronobacter* spp. isolates by different minimal inhibition concentration for ampicillin.

리원에 따라 혹은 균주에 따라 매우 다른 항생제 내성 특성을 보여 주는 것으로 보인다.

Aminoglycoside 계열의 항생제는 세균의 ribosome에 작용하여 RNA가 정상적 결합을 차단해 단백질 합성 저해하는 작용을 하며 대표적으로 kanamycin, streptomycin, neomycin 등이 있다. Aminoglycoside 계열로 분류되는 kanamycin, streptomycin, neomycin에 대한 연구결과로 kanamycin의 MIC는 0.5 ppm에서 16 ppm의 범위를 보였으며 주로 4 ppm에서 많은 균주가 저해됨을 보였고 streptomycin, neomycin의 경우 1 ppm에서 16 ppm의 분포를 보였고 주로 8 ppm에서 저해되는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 이는 β -lactam 계열의 항생제를 aminoglycoside 계열보다 32배 이상의 높은 농도로 처리해야 *Cronobacter* spp.를 사멸시킬 수 있음을 보여준다.

Broad spectrum을 보이는 tetracycline은 tetracycline 계열 항생제로 세균의 ribosome에 작용하여 t-RNA의 전사를 방해하여 단백질의 합성을 억제하여 항균작용을 한다. Broad spectrum을 보여주는 항생제인 chloramphenicol과 tetracycline의 경우 대부분이 16 ppm의 농도에서 저해됨을 확인하였으며(Fig. 7) 또한 Gram(-) 세균에서 주로 저해를 보여 주는 rifampicin과 nalidixic acid는 각각 16 ppm, 4 ppm에서 대부분 균들이 저해를 보였다(Fig. 8).

따라서 네 가지 계열의 항생제 중 β -lactam 계열의

Fig. 6. Ratio of 112 *Cronobacter* spp. isolates by different minimal inhibition concentration for kanamycin, streptomycin, and neomycin.

Fig. 7. Ratio of 112 *Cronobacter* spp. isolates by different minimal inhibition concentration for chloramphenicol and tetracycline.

Fig. 8. Ratio of 112 *Cronobacter* spp. isolates by different minimal inhibition concentration for rifampicin and nalidixic acid.

Fig. 9. Minimal inhibition concentration of antibiotics for dry-sensitive and tolerant *Cronobacter* spp. isolates. Seven dry-sensitive and 37 dry-tolerant strains were experimented and meaned. MIC range 0: 0, 1: 0.5, 2: 1, 3: 2, 4: 4, 5: 8, 6: 16, 7: 32, 8: 64, 9: 128, 10: 256(ppm). A: ampicillin, K: kanamycin, S: Streptomycin, N: neomycin, C: chloramphenicol T: tetracycline R: rifampicin NA: nalidixic acid.

ampicillin이 가장 높은 내성을 보였고 aminoglycoside 계열의 kanamycin과 Gram(-) spectrum의 nalidixic acid에서 가장 낮은 내성을 보였으며 *Cronobacter* spp.의 항생제 제어시 aminoglycoside 계열의 항생제를 사용하는 것이 바람직 할 것으로 보인다. 그러나 일반적으로 항생제의 내성과 보다 좋은 침투성을 확보하기 위하여 이 세균을 제어하기 위해서는 한 개의 항생제보다는 여러 개의 항생제를 같이 처리하는 것이 권장되고 있다(Lai, 2001; Block *et al.*, 2002).

건조 특성에 따라 분류된 7종의 건조민감 균종과 37종의 건조내성 균주의 항생제 MIC 비교하였다. Neomycin의 경우 그룹간의 가장 큰 차이를 보였으나 전반적으로 모든 항생제에 대해서 건조내성이 균주가 높은 항생제 내

성을 지니고 있는 것을 보아 환경 스트레스에 강한 저항성이 서로 연결되어 있는 것으로 보인다(Fig. 9).

요 약

국내의 건조분말 식품에서 분리한 *Cronobacter* spp.의 건조내성에 따른 열, 살균소독제, 항생제에 대한 내성특성 분석하여 *Cronobacter* spp.을 제어하는 효과적인 방법을 연구하고자 하였다. 분리된 37개의 건조저항 균주, 7개의 건조민감 균주, 그리고 68개의 중간그룹의 균주 총 112개에 대하여 분석한 결과 건조내성을 가지고 있는 *Cronobacter* spp.는 열에 대해서도 저항성이 큰 것으로 나타났다. 따라서 조제분유등의 건조 스트레스에 노출되어 살아남은 *Cronobacter* spp.는 열 스트레스에서도 높은 내성을 보일 수 있을 것으로 사료된다. 살균소독제를 이용한 *Cronobacter* spp.의 제어효능은 sodium hypochlorite는 15-25 ppm와 benzalkonium chloride는 5-15 ppm 농도에서 5 log CFU/mL 살균 효과가 있었다. Albumin으로 3%(w/v)오염시킨 부유세균의 살균력은 건조내성 균주와 건조민감 균주 모두에서 오염전과 비슷하여 유기물 오염상태에서도 살균소독제 효능에는 큰 영향을 주고 있지 않음을 알 수가 있었다. 그리고 항생제 내성은 β -lactam 계열의 ampicillin에 대하여 약 90% 분리주가 64-128 ppm의 농도에서 최소저해 농도를 보여 주었다. Aminoglycoside 계열의 kanamycin과 Gram(-) spectrum의 nalidixic acid에서 4 ppm의 가장 낮은 내성을 보였다. 건조민감 균주와 건조내성 균주의 최소저해농도 경우 전반적으로 모든 항생제에 대해서 건조내성이 높은 균주가 더 큰 항생제 내성을 지니고 있는 것으로 나타났다. 따라서 분리 *Cronobacter* spp.의 건조내성이 열과 항생제의 저항성과 관련이 있는 것으로 보인다. 그러므로 조제분유와 같은 분말식품과 그 원료의 오염 *Cronobacter* spp.의 살균제어에 더 강력한 처리가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 농림기술관리센터의 지원에 의해 이루어진 연구(108147-02-1-CG000)의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Arad, I., Baras, M., Gofin, R., Bar-Oz, B., and Peleg, O. (2001) Dose parity affect the neonatal outcome of very-low-birth-weight infants? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Rep. Biol.* **94**, 283-289.
2. Barron, J. C. and Forsythe, S. J. (2007) Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **70**, 2111-2117.
3. Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., and Joosten, H. M. (2003) Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 967-973.
4. Block, C., Peleg, O., Minster, N., Bar-Oz, B., Simhon, A., Ard, I., and Shapiro, K. (2002) Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 613-616.
5. Dennison, S. K. and Morris, J. (2002) Multiresistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in an adult. *Infect. Med.* **19**, 533-535.
6. Edelson-Mammel, S. G., Porteous, M. K., and Buchanan, R. L. (2005) Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **68**, 1900-1902.
7. Friedemann M. (2007) *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food. Microbiol.* **116**, 1-10.
8. Edelson-Mammel, S. G. and Buchanan, R. L. (2004) Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J. Food Prot.* **67**, 60-63.
9. Edelson-Mammel, S. G., Porteous, M. K., and Buchanan, R. L. (2005) Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **68**, 1900-1902.
10. Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., and Brenner, D. J. (1980) The Enterobacteriaceae study group. *Enterobacter sakazakii*: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 369-58.
11. Food and Agriculture Organization-World health Organization (FAO-WHO) (2006) *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. In: *Microbiological Risk Assessment Series* 10, World Health Organization-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Switzerland.
12. Girlich, D., Poirel, L., Leelaporn, A., Karim, A., Tribudharat, C., Fennewald, M., and Nordmann, P. (2001) Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 175-182.
13. Guillaume-Gentil, O., Sonnard, V., Kandhai, M. C., Marugg, J. D., and Joosten, H. (2005) A Simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Prot.* **68**, 64-69.
14. Gurtler, J. B. and Beuchat, L. R. (2007) Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature. *J. Food Prot.* **70**, 2095-2103.
15. Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., and Lehner, A. (2008) *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter*

- dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1442-1447.
16. Iversen, C. and Forsythe, S. J. (2003) Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Food Sci. Technol.* **14**, 443-454.
 17. Iversen, C., Lane, M., and Forsythe, S. J. (2004) The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 378-382.
 18. Kim, H., Ryu, J. H., and Beuchat, L. R. (2007) Effectiveness of disinfectant in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1256-1265.
 19. Kim, H., Ryu, J. H., Beuchat, L. R. (2006) Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5846-5856.
 20. Kim, H. I., Lee, K. H., Kwak, I. S., Eom, M. O., Jeon, D. H., Sung, J. H., Choi, J. M., Kand, H. S., Kim, Y. S., and Kang, K. J. (2005) The establishing test method of bactericidal activity and the evaluating of Korean disinfectants/sanitizer efficacy. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 838-843.
 21. Kim, S. H. and Park, J. H. (2007) Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* Isolates during rehydration of powdered infant formula. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 364-368.
 22. Jung, M. K. and Park, J. H. (2006) Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 152-157.
 23. Lai, K. K. (2001) *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. *Medicine* **80**, 113-22.
 24. Lee, E., Ryu, T. H., and Park, J. H. (2009) Tolerance of Korean *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolates to desiccation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**, 681-686.
 25. Lee, M. J., Kim, Y. S., Choi, Y. H., Park, H. K., Park, B. K., Lee, K. H., Kang, K. J., Jeon, D. H., Park, K. H., and Ha, S. D. (2005) Evaluation of efficacy of sanitizers and disinfectants marketed in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 671-677.
 26. Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B., and Stephan, R. (2005) Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: Aspect promoting environmental persistence. *J. Food Prot.* **68**, 2287-2294.
 27. Muytjens, H. L. and J. van der Ros-van de Repe. (1986) Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 367-370.
 28. Muytjens, H. L., Roelofs, W. H., and Jasper, G. H. J. (1988) Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 743-746.
 29. Nazarowec-White, M. and Farber, J. M. (1997) Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 9-13.
 30. O'Toole, G. A., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49-79.
 31. Paterson, D. L., Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P. R., Woods, G. L., Satishchandran, V., Snyder T. A., Harvey, C. M., Tessler, H., Dinubile, M. J., and Chow, J. W. (2005) In vitro susceptibilities of aerobic and facultative gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: The 2003 study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART). *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 965-973.
 32. Pickett, E. and Murano, E. A. (1996) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizer after exposure to a chemical shock. *J. Food Prot.* **59**, 374-378.
 33. Res, T. J. and Frank, J. F. (1993) Susceptibility of starved planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate count. *J. Food Prot.* **56**, 573-576.
 34. Russell, A. D. and Day, M. J. (1996) Antibiotic and biocide resistance in bacteria. *Microbios.* **85**, 45-65.
 35. Stock, I. and Wiedemann, B. (2002) Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**, 564-578.
 36. Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., and Sakamoto, T. (2005) Crucial role of extracellular polysaccharide in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7327-7333.
 37. Yoo, M. K., Kim, S. S., and Oh, S. S. (2005) Isolation and genotyping of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula manufactured in Korea. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 875-877.
 38. Zarazaga, M., Saenz, Y., Portillo, A., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., Campo, R. D., Baquero, F., and Torres, C. (1999) In vitro activities of ketolide HMR 3647, mactolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. *Antimicro. Agent Chemo.* **43**, 3039-3041.

(Received 2010.3.30/Revised 2010.6.2/Accepted 2010.6.9)