

우리나라 加工食品중의 *Clostridia perfringens* 의 分布

漢陽大學校 醫科大學 微生物學敎室

韓王洙 · 趙陽子 · 權鍾奎 · 徐仁銖

=Abstract=

Clostridium Perfringens Associated with Korean Canned Foods

Wang Soo Han, V.D., Yang Ja Cho, M.D., Chong kyu kwon, Inn Soo Suh, M.D.

Department of Microbiology, College of Medicine, Hanyang University
Seoul, Korea

A total of 100 swelled, springered or flipped canned meat and fish products were studied the degree of contamination with clostridias and serological relationships to Hobbs'13 "heat resistant" types. heat resistance of spores and susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates to several antibiotics. Samples examined in this study were collected from Seoul area from June to October, 1975 and prepared in Korea.

Clostridias were isolated from 46 (46%) of these samples; 19 strains of *Cl. perfringens*, 9 strains of *Cl. oedematiens* A, B, 5 strains of *Cl. sordelli*, each 3 strains of *Cl. chauvoei*, *Cl. oedematiens* C-E, and *Cl. difficile*, 2 strains of *Cl. sporogenes*.

The highest percentage of contamination by *Cl. perfringens* was found in beef products (26.5%), and the following (5.2%) in mackerel pike and none in baitop shell, whale, manna brand. and top shell.

One of 19 isolates of *Clostridium perfringens* found in meat products was shown to produce heat resistant spores which resist 100° C for 60 minutes and others were heat labile strains which is killed at 90° C for 30 minutes.

The distribution of Hobbs' serotype of 19 isolates were each 4 strains of type 6, 8, and 11, 1 strain of type 13 and others untypable.

19 Strains of *Cl. perfringens* were shown a marked susceptibility to cefamezin, lincomycin and minocin and relatively sensitive to vibramycin, geopen, and chloramphenicol. A marked resistance to kanamycin, colimycin, and gentamycin were shown.

Aerobic enteropathogens from samples were not recovered.

서 론

세균성 식중독은 그 병인의 차이에 따라 感染型和 毒素型으로 분류되나 *Clostridium*(이하 *Cl.*) *perfringens* 식중독은 enterotoxin의 존재가 확인되기까지는 感染

型에 속하는 것으로 생각되었었다. *Cl. perfringens*의 enterotoxin은 芽胞를 형성할때에만 생산되는 것이므로 (Strong, 1971) 生菌에 의한 經口루어가 식중독발병에 절대 필요하며 死菌 또는 培養濾液으로서는 일어나지 않는 것이 입증되어 이 식중독은 毒素型에 속하는 것

이 확인되었다(Duncan 등 1971; Hauschild, 1971).

*Cl. perfringens*는 식물(Mcckillap, 1959), 자연계(Smith, 1963), 동물 및 사람의 腸내용물(Kraneveld 등 1934 a, b, Hobbs 등 1953, Yamamoto 등, 1961; Collee 등, 1961)에 널리 분포하고 있어 실지 *clostridia* 중독에 의한 산발 또는 집단 발생에에서의 원인되어지는 특정菌株의 구명은 그리 쉬운일이 아니며 그 관전은 집단발생에의 경우 검출물과 검출균주의 血清型的 균일성을 확인하는 것이며 산발에에서도 耐熱性 *Cl. perfringens*의 排菌상태와 검출균주의 혈청型的 확인 이의는 그 방법이 없는 것으로 생각된다.

*Cl. perfringens*에 의한 사람의 消化器系 질병에 대하여서는 독일에서 처음으로 F型菌에 의한 "Enteritis necroticans"가 보고되어 그 치명율이 40%에 이룸으로서 학계의 주목을 끌게 되었다(Eiessler 등, 1949). 그 후 영국, 미국 및 일본에서 A형균의 일종의 變異株에 의한 중독에가 많이 보고되었다(Hobbs 등, 1953; 山縣, 1958), 이들의 *clostridia*는 Hobbs의 血清型別이 가능하고 非溶血性이며 끓는 물에서 한시간에서 네시간에 이르는 시간사이에사도 견디는 耐熱性芽胞를 갖으며(Hobbs 등, 1953; Collee 등, 1961) 이러한 芽胞가 소 매시관육류에 10.5%~35%로 분포하고 있어 加工食品 통조림의 加工段階 및 滅菌過程에 특별한 주의가 요망(Hobbs 등, 1959)되고 있다. 미국에서는 최근 溶血性이며 Hobbs의 型分類에는 해당되지 않는 易熱性 *clostridia*가 다수 분리되므로(Hall 등, 1963) 耐熱性型에만 주목하였던 중전의 견해에 대해서는 재 검토가 필요하게 되었다.

*Cl. perfringens*식중독의 發病機轉의 구명 또는 예방을 위하여서는 이균의 자연계 분포에 대한 조사가 필요한 것으로 지금까지 그 보고가 많이 있으나 그 성격에 있어서는 많은 차이가 있는 것은 조사한 지역, 및 시기 또는 검사방법등의 차이에 연유한다고 생각할 수 있을 것이다.

우리나라의 *Cl. perfringens* 중독은 아직까지는 드문 것으로 되어있으나 사회, 경제의 발달에 따라 식생활의 형태가 달라져 가공식품의 이용도가 날로 높아가꾸 있어 장차 이균에 의한 식중독의 발생이 증가할 것으로 생각된다.

이에 저자는 그렇게 많이 연구되어 있지 않은 *Cl. perfringens*의 우리나라 가공식품중의 분포와 分離菌의 Hobbs의 13 "heat resistant"型에 대한 血清學的關係, 芽胞의 熱抵抗性 및 몇가지 종류의 抗菌劑에 대한 감수성을 측정하여 몇가지 지견을 얻었기에 *clostridia*

중독 예방을 위한 기초자료를 삼고자 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

이조사는 1975년 6월부터 10월에 걸쳐 서울시안에 흩어져 있는 도매상 및 소매상으로부터 판매하기 위하여 보관되어 있는 육류 또는 어류 가공식품(통조림)중의 관으로 봐서 이상이 있다고 보이는 즉 (1) Swell, (2) Flipper, (3) Springir 되어 있는 통조림 내용을 그 재료로 하였다.

2. 방 법

増菌培養은 통조림을 滅菌한 칼, 핀셋 및 모세관 피펫을 사용하여 무균적으로 통조림의 내용물을 1g 또는 1ml을 채취하여 이를 증균배지인 Tarozzi의 liver liver broth, 7ml에 넣어 37°C에서 48시간 증균시킨 다음 分離배양하였다.

가검물에서 *Salmonella*를 분리하기 위하여 Selenite broth 90ml에 試料 10g 또는 10ml을 넣어 37°C에서 24시간 증균시켰다.

가검물에서 *Staphylococcus*를 분리 하기 위하여 Nutrient broth, 7ml에 분주된 배양기에 試料 1g 또는 1 ml을 넣어 37°C에 24시간 증균시켰다.

가검물에서 *Vibri*를 분리하기 위하여 3% 食鹽 peptone水, 7ml에 試料 1g 또는 1ml을 넣어 37°C에서 16~18시간 증균시켰다.

3. 分 離

*Clostridia*를 분리하기 위하여 liver liver broth에 증균한 것을 Nagler modified Lecithinase medium에 분리 도말한 다음 Shotensach法에 따라 37°C에서 48시간 嫌氣培養하였다. 평판상에서 lecithinase반응에 의하여 황색의 白濁環을 갖은 콜로니에 대하여 생물학적 및 생 화학적 시험을 실시하였다.

Salmonella 분리는 Selenite F. broth에 증균 한것을 MacCankey agar plate에 도말하여 37°C에 24시간 배양한 후 의심되는 콜로니에 대하여 필요한 성장시험을 하였다.

Staphylococcus 분리는 nutrient broth에 증균한 것을 mannitol salt agar 平板에 도말하여 37°C에 18~24시간 배양한후 황색반투명 콜로니에 대하여 필요한 성장시험을 실시하였다.

*Vibrio parahaemolyticus*의 환리는 3% 食鹽 peptone 末에 증균시킨 것을 TCBS 평판배지에 포함하여 37°C에 18~24시간 배양한 다음 청록색 콜로니에 대하여 필요한 정상시험을 실시하였다.

4. 生化學的 性狀試驗

Bacto-thioglycollate medium without dextrose(pH 7.2)를 3ml씩 분주한 시험관을 고압멸균하여 급히 냉각시킨 다음 여기에 분리배양에서 검출된 열기균집락 3개 이상을 각각 접종, 37°C에 72시간 배양한 후 아래와 같은 정상시험을 하였다.

1) Indol test; Bacto-thioglycollate medium without dextrose (Difco)를 3ml씩 시험관에 분주하여 12 1°C 15분간 멸균하여 급히 냉각시킨 다음 여기에 분리 균주를 접종하여 37°C, 72시간 배양한 다음 Kovac's reagent를 1~2적울 증침시켜서 약액과 접촉면에 赤紅色을 나타내는 경우 陽性으로 판정하였다.

2) 運動性試驗; Bacto-thioglycollate medium without dextrose (Difco)에 agar 0.15%을 넣어 끓인 후 pH를 7.2로 맞추어 이를 3ml씩 작은 시험관에 나누어 넣고 이를 121°C, 15분간 멸균한 다음 급히 냉각시켜 高層으로 만들어 여기에 분리된 균주를 穿刺한 다음 37°C에 24~48시간 배양하여 배지전체가 혼탁되면 양성으로 하고 穿刺線에 따라서만 균이 발육되면 음성으로 하였다.

3) Sugar fermentation; Bacto-thioglycollate medium without dextrose에 각 糖類를 1%씩 넣어 pH 7.2로 맞추는 다음 작은 시험관에 약 3ml씩 나누어 넣고 이를 110°C에서 15분 멸균하여 급히 냉각시킨 다음 분리 균주를 접종, 이를 37°C, 72시간 배양한 후 0.2% B.T. 액을 2-3방울 퍼터트려 노란색으로 변하는 경우 양성으로 판정 하였다.

4) Iron milk stormy fermentation; 10% skim milk에 agar 0.1% 넣어 끓인 후 pH 6.8로 맞추는 다음 3ml씩 나누어 넣은 시험관에 쇠못끝(길이 약 1cm) 1개 넣고 121°C, 15분간 멸균한 다음 여기에 분리균주를 접종, 37°C에 24~48시간 배양하면서 우유의 응고와 stormy fermentation 가스산생의 유무를 보았다.

5. 嫌氣性確認試驗

Shötensack법으로 Nagler modified lecithinase medium에서 발육한 白濁環의 藥落은 일단 위의 배지에 이식도말하고 이를 好氣性條件에서 37°C, 48시간 배양하

여 발육이 억제되는 경우에는 嫌氣性임을 확인하였다.

6. 分離菌 芽胞의 耐熱性試驗

분리된 균주의 내열성시험은 liver liver broth에서 37°C, 24시간 배양한 다음 다른 시험관에 무균적으로 1ml씩 옮겨 소정온도에서 가열하여 급히 냉각시킨 다음 Zeissler's medium에 劃線도말, 37°C, 48시간 shoten-sach法 열기배양하여 발육의 유무를 관찰하였다.

7. Hobbs 型의 決定

Zeissler's media에 순 배양한 균을 백금으로 굵어 0.4% phosphate buffered solution으로 濃厚한 균액을 만들어 抗原으로 하고 抗血清은 日本東芝化學의 耐熱性 A型 Welchii菌 診斷血清을 사용하였다. 응집반응은 slide 법으로 하였으며 성적판정은 10초 이내에 강한 응집이 일어나면 양성으로 하였다. 배조(항원+0.4% phosphate buffered saline)에서도 강한 응집이 이러나는 경우는 양성으로 하지 않았다 혼합 균항혈청의 어느 것에서도 응집이 일어나지 않는 경우는 항원을 100°C, 60분 가열하여 2,000 rpm, 20분간 遠沈, 그 상청액으로 같은 방법에 따라 응집반응을 실시하여 그래도 응집되지 않는것은 型別不能株로 하였다. 이상의 응집 반응에서 혼합각균 항혈청 및 식염액에 약한응집이 일어나도 한종류의 혼합균 항혈청과 어떤 한형 항혈청에 강한 응집이 일어나면 응집이 일어난 型抗血清으로 菌型을 결정하였다. 두개 이상의 형혈청에 응집되는 경우는 강하게 응집하는 혈청형을 피검균의 균형으로 결정하였다.

8. 抗菌物質에 대한 感受性試驗

분리한 균주를 liver liver broth에 37°C, 24시간 배

Table 1. Enteropathogens in the tinned foods

	100 samples
Staphylococcus	—
Enterococcus	—
Escherichia	—
Proteus	—
Arizona	—
Salmonella	—
Shigella	—
V. parahaemolyticus	—

Table 2. Criteria for identification of clostridias

Species	Spore formation	Aerobic growth	Indol	Fermentation reaction				Colony on Nagler media	
				Iron milk	Glucose	Lactose	Sucrose	Opalescence	Pearl-like layer
<i>C. welchii</i> , A-F	O, S	-	-	A C G	+	+	+	+	-
<i>C. butyricum</i>	O, S	-	-		+	+	+	-	-
<i>C. multifermentans</i>	O, S	-	-		+	+	+	-	-
<i>C. tertium</i>	O, S	-	-		+	+	+	-	-
<i>C. fallax</i>	O, S	-	-		+	+	+	-	-
<i>C. chauvoei</i>	O, S	-	-	A C	+	+	+	-	-
<i>C. septicum</i>	O, S	-	-	A C	+	+	-	-	-
<i>C. sphenoides</i>	R, T	-	±		+	+	-	-	+
<i>C. botulinum</i> , A,B	O, S	-	-	A C / B D	+	-	-	+	+
<i>C. butulinum</i> , C-E	O, S	-	-		+	-	-	+	+
<i>C. oedematiens</i> , A	O, S	-	-	A C	+	-	-	+	-
<i>C. oedematiens</i> , B	O, S	-	-	A C	+	-	-	+	-
<i>C. oedematiens</i> , C	O, S	-	-	A C	+	-	-	-	-
<i>C. oedematiens</i> , D	O, S	-	+	A C	+	-	-	+	-
<i>C. bifermentans</i>	O, S	-	+	B D	+	-	-	+	-
<i>C. sordellii</i>	O, S	-	+		+	-	-	+	-
<i>C. sporogenes</i>	O, S	-	-	B D	+	-	-	+	+
<i>C. tetanomorphum</i>	R, T	-	±		+	-	-	-	-
<i>C. capitovale</i>	O, T	-	±		+	-	-	-	-
<i>C. cochlearium</i>	O, T	-	-		-	-	-	-	-
<i>C. tetani</i>	R, T	-	+		-	-	-	-	-
<i>C. histolyticum</i>	O, S	-	-	B D	-	-	-	-	-

Key : A, acid ; B, blackening ; C, clot ; D, digestion ; G, gas ; O, oval ; R, round ; S, subterminal ; T, terminal ; +, positive ; -, negative.

양한다음 배양액 약 0.5ml를 Zeissler's medium 평판에 도포하고 Ericsson 등(1971) 방법에 따라 시험하였다. 성적은 48시간 배양한후에 판정하였다.

성 적

好氣性 病原性細菌의 분리 : 제 1 표에서 보는바와같이 육류 및 어개류로 만든 가공식품 통조림 100건을 대상으로한 세균학적 검사에서 *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Arizona*, *Salmonella*, *Shigella* 및 *Vibrio parahaemolyticus*는 분리되지 않았다.

Clostridia의 분리 : Clostridia의 동정은 제 2 표에 따라 실시하였으며 분리성적은 제 3 표와 같다.

Cl. perfringens A가 19주, *Cl. oedematiens* A,B

Table 3. Species of clostridias isolated from tinned foods

Species identified	No. of isolates	Percent
<i>C. perfringens</i> A	19(4)*	41.3
<i>C. oedematiens</i> , A,B	9	19.6
<i>C. sporogenes</i>	2	4.3
<i>C. chauvoei</i>	3	6.5
<i>C. sordellii</i>	5	10.9
<i>C. oedematiens</i> , C-E	3	6.5
<i>C. biofermentans</i>	2	4.3
<i>C. difficile</i>	3	6.5
Total	46	100

* Numerals in parenthesis indicate the number of strains unclassified by serologic test.

Table 4. Sources of isolates of clostridias

Source	No. examined	No. of isolates	Species of isolates
Bai top shall	2	0	
Beef	68	38	C. perfringens (71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 81, 82, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, & 99) C. oedematiens (32, 35, 38, 44, 46, 48, & 50) C. sporogenes (57) C. chauvoei (33-2, 60-2, 40-2) C. sordellii (36, 42, 47, 49, 51, & 59) C. oedematiens, C-E (39, 40-1 & 58) C. biofermentans (52 & 54)
Whale	3	0	
Macksrel pike	19	6	C. perfringens (15) C. sporogenes (29) C. defficile (87 & 90) C. oedematiens A,B (19, 28)
Mana brand	1	0	
Fish ball	5	0	
Top shell	1	0	
Sea mussel	1	1	C. difficile (88)

* Numerals in parenthesis indicate strain number isolated.

9주, Cl. sordelli 5주이며 Cl. chauvoei, Cl. oedematiens, C, Cl. difficile 등은 각 3주 기타 Cl. sporogenes, Cl. bifermentans 는 각 2주의 순위로 분리되었으나 생물학적 및 생화학적 조사에서 Cl. perfringens A와 일치한 성상을 나타낸 4주는 耐熱性 A형 Hobb's 抗血清으로 型別되지 않았다.

檢體別 clostridia의 분리: 제 4표에서 보는바와 같이 소고기 (beef)에서는 검체수 68건중 38주가 분리되었으나 그중 Cl. perfringens가 18주로서 제일 많았으며 다음이 Cl. oedematiens A,B 7주, Cl. sordellii 5주 Cl. chauvoei 3주, Cl. bifermentans 및 Cl. oedematiens C가 각 2주, Cl. sporogenes 1주의 순위로 통정되었다.

꽁치 (macheral pike)에서는 검체수 19건중 6주가 분리되었으며 그중 Cl. oedematiens A, B 및 Cl. difficile 이 각 2주였으며 Cl. perfringens와 Cl. sporogenes는 각 1주였다. 홍합 (sea mussel)에서는 검체수 1건중에서 Cl. difficile 1주가 분리되었다. 골뱅이 (fai top shell) 2건 및 고래고기 (whale) 3건, 자양고기 (mana brand) 1건, 소라 (top shell) 1건에서는 분리되지 않았다.

분리된 clostridia의 Hobb's 血清型: 분리된 嫌氣菌 46주중 생물학적성상이 Cl. perfringens의 그것과 일치

되는 19주를 zeissler's medium에 37°C, 2일간 상기법에 의하여 嫌氣培養한 후 0.4% phosphate buffered saline (pH 6.8)으로 균액을 만들어 Hobb's type A의 각 抗血清으로 血清型別을 실시하였든바 그 성적은 제 5표에서 보는바와 같다. 즉 2주 (균주번호 15 및 71)만은 생균으로서 II 群抗血清에 응집되어 型別이 가능하였든바 6型 및 8型이었다. 그러나 남은 17주에서는 生菌으로서 各群 抗血清에 응집되지 않음으로 이들균을 각각 100°C, 60분간 가열한 후 2,000 rpm, 20분간 遠沈하여 얻은 上清液으로 응집반응을 실시하였든바 2주는 群抗血清에 전혀 응집되지 않았으며 4주는 各群 抗血清의 둘 또는 세가지의 群抗血清에 현저하게 응집되며 0.4% phosphate buffered saline에도 응집을 나타내므로 型別이 불가능하였다 남은 10주에서는 各群 抗血清에 特異的凝集을 나타내므로 型別이 가능하여 6型, 및 8型이 각각 3주 11型이 4주, 13型이 1주였다.

분리된 Clostridia의 芽胞 熱抵抗性: 분리된 clostridia 46주의 아포 열저항성을 보기위해 각 균주를 Zeissler's medium에 37°C, 2일간 위법에 의한 嫌氣培養을 실시한후 0.4% phosphate buffered saline으로 균액을 만들어 芽胞染色에 의한 芽胞의 존재를 확인한 다음

Table 5. Serological characters of isolates of *Clostridium perfringens*

Strain* No.	Group antisera			Type antisera													Phosphate buffered saline
	I	II	III	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
15	-	++	-						++	-	-	-					-
71	-	++	-						-	-	++	-					-
72	-	++	+						-	-	++	-					-
74	-	+	+										-	++	-	-	-
75	-	++	-						-	-	++	-					-
77	+	++	+														+
78	-	+	+						-	-	++	-					-
80	-	+	++										-	++	-	-	-
81	+	+	+														+
82	-	++	+						++	-	-	-					-
91	+	+	+														+
92	-	++	+						++	-	-	-					-
93	-	++	+						++	-	-	-					-
94	-	+	++										-	-	-	++	-
95	-	-	-														-
96	-	+	++										-	++	-	-	-
97	+	+	+														+
98	-	+	++										-	++	-	-	-
99	-	-	-														-

* Except strain No. 15 and 71, other strains were performed slide agglutination test with each of centrifugates obtained by centrifugation at 2,000 rpm for 20 minutes after boiling for 60 minutes. Each strains of clostridias employed were grown on Zeissler's medium under anaerobic condition at 37°C for 2 days and suspended in 0.4% phosphate buffered saline (pH 6.8).

Table 6. Heat resistance of spores of isolates of clostridias

90°C		100°C			Isolates*
30m.	60m.	60m.	120m.	180m.	
-	-	-	-	-	<i>C. perfringens</i> (15, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 81, 82, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99), <i>C. oedematiense</i> (A, B (19, 28, 32, 49)) <i>C. chauvoei</i> (40)
+	-	-	-	-	<i>C. oedematiense</i> , A, B (19, 28, 32, 46) <i>C. chauvoei</i> (33-1, 40-1, 60-2) <i>C. sordelli</i> (42, 49)
+	+	-	-	-	<i>C. sporogenes</i> (29, 57) <i>C. oedematiense</i> , A, B (35, 38, 44, 48, 50) <i>C. sordelli</i> (36, 47, 51, 59) <i>C. biofermentans</i> (54) <i>C. perfringens</i> (71) <i>C. difficile</i> (90)
+	+	+	-	-	None

* Numerals in parentheses indicate strain No.

Table 7. Sensitivity pattern of isolates of clostridias to antimicrobial agents

		perfringens	oedem- atience A.B	sporo- genes	chau- oei	sorde- llii	oedem- atience C-E	biferm- entans	deffic- ille	Total	%
Ampicillin	S*	18	9	1	2	6	4	2	3	42	91.8
	FS							2		2	4.3
	R	1		1						2	4.3
Colimycin	S	2	5	1		1		2		9	8.6
	FS	1						2		3	6.5
	R	16	4	1	2	5	3		3	34	78.9
Kanamycin	S	2								2	4.3
	FS		4			1				5	10.9
	R	17	5	2	2	6	2	2	3	39	84.8
Erythromycin	S	7	9		2	5	2			25	56.5
	FS	1		2						3	6.5
	R	11				1		2	3	17	37.0
Streptomycin	S		7	1		2	3		3	28	60.9
	FS			1						1	2.2
	R	7	2		2	4		2		17	37.0
Gentamycin	S	3	6	1		1	2			12	26.1
	FS	1								1	2.2
	R	15	3	1	2	6	1	2	3	33	71.7
Penicillin	S	16	9	1	2	4	2		3	37	80.4
	FS							2		2	4.3
	R	3		1		2	1			7	15.2
Cefamezin	S	18	9	2	2	6	3	2	3	45	97.8
	FS	1								1	2.2
	R										
Oxytetracyclin	S	3	9	1	2	5	3		1	24	52.2
	FS	4		1				2	1	8	17.4
	R	12			1	1			1	14	30.4
Vibramycin	S	18	9	1	2	5	3		3	41	89.1
	FS	1		1						2	4.3
	R					1		2	3	63	6.5
Chloramphenicol	S	15	8	1	2	5	3	2	3	39	84.8
	FS	2								2	4.3
	R	2	1	1		1				5	10.9
Lincomycin	S	19	9	2	2	5	3		3	43	93.5
	FS					1					
	R					1		2		3	6.5
Geopen	S	16	9	1	2	5	3	2	2	40	87.0
	FS	2				1			1	4	8.7
	R	1		1						2	4.3
Nevoblocetin	S	2	8		2	5	3			20	43.5
	FS	17		1		1			1	20	43.5
	R		1	1				2	2	6	13.0
Cloxacillin	S	10	7	1	2	5	2			27	58.7
	FS	2	1			1				4	8.7
	R	7	1	1			1	2	3	15	32.6
Minocin	S	19	9	1	2	5	3		3	42	91.3
	FS			1						1	2.2
	R					1		2		3	6.5

* S, sensitive; FS, fairly sensitive; R, resistant.

90°C 및 100°C의 항온수조속에서 30분, 60분, 120분 및 180분 작용시켰다. 이상과 같이 처리한것을 각각 zeissler's medium에 37°C, 2일간 위법에 의한 嫌氣培養을 실시발육의 유무를 보았다. 제 6표에서 보는바와 같이 *Cl. perfringens* 19주중 18주는 90°C 30분간 처리로 발육을 하지못하였으나 1주만이 90°C, 60분간 처리로도 발육하였다. *Cl. oedematience* A, B 9 주중 4주는 90°C, 60분간 처리로서도 발육하였다. *Cl. chauvoei* 4주중 1주를 제외한 3주에서는 90°C, 30분간 처리로서도 발육하였다. *Cl. sordelli* 2주는 90°C, 30분간 처리에서도 발육하였다. *Cl. sporogens*, *Cl. oedematience*, C-E, *Cl. biofermentance* 및 *Cl. difficile*에서는 분리 全菌株가 다같이 熱抵抗性을 보여 90°C, 60분간 처리에서는 발육이 가능하였다.

Clostridia의 抗菌物質에 대한 感受性: 분리된 *Clostridia perfringens*의 16종 항균물질에 대한 감수성은 제 7 표에서 보는바와 같다. 즉 90% 이상의 감수성을 나타내는 항균물질은 cefamezin(97.8%), lincomycin(93.5%), ampicillin 및 minocin(91.3%)이며 80% 이상의 감수성을 나타내는 항균물질은 vibramycin(89.1%), geopen(87%), chloramphenicol(84.8%) 및 penicillin(80.4%)으로서 높은 감수성을 나타냈으나 50% 전후의 감수성을 나타내는 항균물질은 erythromycin(56.5%), streptomycin(60.9%), oxytetracyclin(52.2%), novobiocetin(43.5%), 및 cloxacillin(58.7%)이었으며 kanamycin(4.3%), colimycin(19.6%), gentamycin(26.1%)에 대해서는 낮은 감수성을 나타냈다.

고 찰

통조림의 부패의 원인은 주로 세균에 의한 것으로서 密封불완전과 제조시의 살균부족으로 구별할 수 있다.

Frayier(1974)에 의하면 통조림의 密封操作 즉 뚜껑의 조이기 상태가 나쁘면 외부로부터 공기 또는 물이 세균과 함께 통속으로 들어가 발육하므로써 통조림 내용물을 부패시킨다는바 이에 관여하는 세균으로는 주로 芽胞가 없는 세균 등(*Proteus*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*)이며 한편 밀봉후 加熱殺菌 조작이 불충분할 때에는 주로 芽胞를 갖는세균 등 (*Bac. mesentericus*, *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *Bac. megatherium*) 또는 드물게는 구균류가 관여 하며, 이들 균종들은 殺菌操作의 가열에 견디어 통속에 남은 공기를 이용, 발육하므로써 내용물의 酸敗를 이르게 한다. 또한 嫌氣性 芽胞

形成菌(*Cl. sporogenes*, *Cl. butrificum*, *Cl. butyrium*, *Cl. perfringens* 등)의 耐熱性 芽胞가 살균조작이 끝난 후에도 살아남아 이 균종이 好氣性細菌과 공존하는 경우 호기성균이 통조림속의 공기를 소비한 후에 비로서 발육하거나 또는 호기속의 공기가 없는 곳에서 발육하므로써 酸敗를 이끄는 것이라고 기재하고 있다.

저자가 선정했던 대상재료는 육류 및 어패류 등의 통조림식품이며 만든 날짜가 오래된 것 중에서도 罐 자체가 兩面膨脹(swell), 片面膨脹(springer) 또는 flipper(관 뚜껑이 편평하나 손가락으로 누르면 들어가면서 낮은 소리를 내나 곧 편평하게 되며 대개의 경우 脫氣不完全때문) 등의 외관이 극히 불량한 통조림들이다. 이러한 불량통조림을 선정한 이유는 통조림 식품의 불량 원인을 구명하기 위한 것이었으며 그 수집에 있어서는 제조업자와의 사이에 많은 애로가 있어 100건을 수집하는데 끝이었다.

조사한 성격에 의하면 好氣性 腸系起病菌중 *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Arizona*, *Salmonella*, *Shigella* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 등 9종에 대한 분리는 전대상에서 1건도 없었다. 이러한 결과는 이들 통조림이 만들어 진 날짜가 오래 경과하였다는 점과 또는 멸균처리 때문이라고 생각된다.

그러나 열기성환경하에서 실시한 clostridia계 嫌氣菌은 46주가 분리되어 높은 검출율을 나타냈으며 그중 *Cl. perfringens*가 19주로서 전체 분리 clostridia의 42%를 차지하여 그 비율이 제일 높았다고 다음이 *Cl. oedematians* A, B 9주(19.6%), *Cl. sordellii* 5주(10.9%) *Cl. chauvoei*, *Cl. oedematians*, C~E 및 *Cl. difficile* 이 각 3주(6.5%), *Cl. sporogenes* 및 *Cl. biofermentans*가 각 2주(4.3%)였다. 이상 clostridia의 同定은 일정 기준에 의하여 실시되었던 것이나 *Cl. perfringens*를 제외한 소수 clostridia에서는 동정기준의 정상중 한 개성상의 차이가 있는 것은 주요성상이 아닌 경우 그대로 동정하였다.

이상과 같이 *Cl. perfringens* 및 기타 clostridia계 嫌氣菌이 통조림속에 존재하는 사실은 嫌氣性細菌의 芽胞가 耐熱性이 비교적 강하고 제조과정에서의 불완전 밀봉 또는 살균처리의 불충분에 기인되는 것으로 생각할 수 있다.

저자의 식품중 *Cl. perfringens*의 분리율은 소고기 통조림에서 26.5%(檢體 69건중 18주 분리)가 檢出되어 소패육류에서의 *Cl. perfringens*의 검출율은 42~82%(Hall 등, 1963), 100%(杉谷, 1974), 소간 26%(Canada 등, 1964) 등과 비교하여 크게 감소하는 경향은 인정되

지 않았다. 불량 콩치통조림에서는 5.3%(檢體 19건중 1주)의 검출율인바 소대 어패류에서 평균 검출율은 8.2%(Nakamura, 1968) 인것과는 큰 차이가 없었다. 홍합, 굴뱅이, 고래고기, 자양고기, 소라에서는 검출되지 않았다. 대체로 어패 류식품보다 육류식품에서 검출율이 높은 사실은 *Cl. perfringens* 식중독이 육류 식품에 기인(Parry, 1963; Nelson 등, 1966)된다는 점과 합치되는 것으로 보여진다.

*Clostridium perfringens*의 熱抵抗性(100°C, 60분)은 분리균주의 1%(Hall 등, 1963), 1.5%(Hobbs 등, 1959), 7.02%(孫 등, 1973)에서 나타나는 것으로 보고되어 있으나 저자의 통조림식품에서 분리된 19주중 18주의 *Cl. perfringens*는 易熱性(90°C, 30분 가온으로 사멸)이었다 Hobbs(1960)는 식중독을 일으키는 耐熱性 *Cl. perfringens*는 毒素原성이 약한 것으로 지적하고 종래의 classical type에 대하여 atypical variant라 하였으며 石田(1962)도 같은 보고를 하였다. 그후 Canada(1965)는 마우스의 食餌實驗에서 *Cl. perfringens*가 장관을 통과하면 耐熱性이 높아지는 것을 관찰하였다. 이러한 사실로 미루어 *Cl. perfringens* 중독에는 耐熱性인 것과 병행하여 일어나는 현상 즉 毒素産生과의 관계가 예상되어 Hauschild 등(1971) Strong 등(1971)은 *Cl. perfringens*를 원숭이와 사람에게 투여하여 설사를 일으키게 하여 enterotoxin의 산생을 증명하였다. Strong 등(1971)은 enterotoxin의 산생에는 시험관내에서 균세포가 芽胞형 형성할 때에만 증명되며 芽胞형성이 일어나지 않고서는 균세포의 증식만으로는 enterotoxin이 증명되지 않는다는 사실을 입증하였다. 이러한 사실로 봐서 장관내에서는 용이하게 아토틀 형성하여 생물학적 활성을 갖은 enterotoxin을 합성, 遊離하는 것으로 추론하였다. 실지 Hall 등(1963) 中津川 등(1972)은 易熱性 *Cl. perfringens*의 식중독을 보고하고 있다. 저자의 통조림으로부터 분리한 易熱性 *Cl. perfringens*도 위의 사실등과 관련하여 검토하는 경우 사람에게 식중독을 일으킬 가능성은 배제할수 없을 것이다.

분리된 *Cl. perfringens* 19주의 Hobbs 血清型은 제 6, 8 및 11型이 각 4주로 많았으며 제 13型이 1주가 있어 68.4%가 型別되었다. 남은 균주는 非特異的 응집이 심하게 일어나거나 또는 응집이 일어나지 않음으로 型別이 불가능하였다. 型別 可能菌株에 있어서도 2주를 제외한 17주는 生菌으로는 型別이 불가능하였다.

孫 등(1973)은 어패류에서 분리한 耐熱性 *Cl. welchii* A型 7주에서 16.7%가 易熱性 *Cl. perfringens* 35주에서는 83.3%가 각각 型別가능하였으며 제 2, 3, 5, 6, 8,

9, 13, 型이 분포하고 있음을 보고하고 있다.

분리된 *Clostridium perfringens*의 抗菌劑感受性은 cefamezin, lincomycin, ampicillin 및 minocin에 대하여 각각 90%이상의 균주가 감수성을 보였으며 vibramycin, geopen, chloramphenicol 및 penicillin에 대해서는 각각 80% 이상의 균주가 감수성을 보였다. erythromycin, streptomycin, oxytetracyclin novobiocetin 및 closacillin에 대해서는 50%의 균주가 감수성을 보였고 kanamycin, colimycin, gentamycin에 대해서는 소수의 균주만이 감수성을 보였다 Mathony(1973)는 Kirby-Bauer disc법(1966)으로 *Clostridium perfringens* 90주의 항균제 감수성을 보고한 성적에 의하면 bacitracin 및 chloramphenicol에 대해서는 전균주가 감수성을 나타냈으나 erythromycin 및 tetracycline에 대해서는 91%의 균주가 감수성이었고 penicillin G 및 ampicillin에 대해서는 74% 및 71%의 균주가 감수성이었으나 kanamycin neomycin, sulfadiazine 및 streptomycin은 모든 균주에 대하여 전혀 抗菌작용을 나타내지 못했다고 하였다. Johnstone 등(1968)은 *Clostridium welchii* 102주중 11주는 tetracycline에 대하여 耐性을 나타내므로 penicillin G가 가장 좋은 약제이나 알리지 발생을 방지하기 위해 erythromycin의 이차적 항균제를 추천하고 있다.

저자의 성적과 다른 보고자의 성적과 비교하면 대체로 일치되는 抗菌작용이 강한 것은 chloramphenicol 및 penicillin이며 저자의 성적에서는 80%이상의 균주가 감수성인데 비하여 다른 성적에서는 전 균주가 감수성이며 ampicillin은 90%이상의 균주가 감수성인데 비하여 다른 성적에서는 71%가 감수성을 나타내고 있어 가장 좋은 藥劑로 생각된다. Erythromycin은 저자의 전 균주의 50%가 감수성인데 비하여 다른 성적에서는 91% 및 100%의 감수성을 보여주고 있으며 oxytetracyclin은 저자의 전 균주의 50%가 감수성인데 다른 성적에서는 91%, 10.7%가 각각 감수성이며 streptomycin은 저자의 50%감수성에 비하여 다른 성적에서는 전혀 감수성을 나타내지 않고 있다. 이와같은 감수성의 차이는 여러가지 원인들이 있겠으나 분리균의 지역적, 년도, 및 감수성시험방법등의 차이에 기인되는 것으로 생각 된다.

총체적으로 우리나라 불량통조림의 clostridia계 嫌氣균에 의한 고도의 오염은 罐의 뚜껑 밀봉 및 멸균과정에서의 불충분한 처리로 인한 clostridia의 罐內 진입의 가능성을 말하는 것으로 볼수있어 앞으로의 통조림 생산과정에서의 각단계에 대한 면밀한 검토가 필요할 것

으로 생각된다.

한편 통조림에 분포하는 易熱性 *Cl. perfringens* 및 기타 clostridia가 분포하고 있는 이상 人體起病性과 직접 연결되는 것은 아니라 하여도 二次적 의의를 지니는 것이며 나아가 대량의 易熱性 *Cl. perfringens*가 經口 的으로 침입하는 경우 위에서 高熱할바와같은 病原的 役割에 대한 가능성은 배제할수 없는 문제이다.

결 론

1. 우리나라 가공식품중 供試한 兩面膨脹, 片面膨脹 또는 후리파(flipper)의 외관을 나타내는 不良통조림의 원인은 嫌氣性 clostridia의 오염에 기인하는 것임으로 이들 제품과정에서의 기술적연구가 더욱 필요하다.

2. 不良통조림 100건중 46건으로부터 clostridia가 분리되었으며 그중 *Cl. perfringens* 19주, *Cl. oedematiens* A,B 9주 *Cl. sordelli* 5주 *Cl. chauvoei* *Cl. oedematiens* CE, *Cl. difficile* 각 3주, *Cl. sporogens* 2주였다.

3. 각종 檢體別 *Cl. perfringens*의 분리율은 소고기제품(26.5%)에서 높았고 다음이 광치제품(5.2%)이었으나 갈뱅이, 고래고기, 자양고기, 소라통 제품에서는 분리되지 않았다.

4. *Cl. perfringens*의 熱抵抗性은 19주 중 1주는 耐熱性(100°C, 60분 가온으로 생존)이나 18주는 易熱性(90°C, 30분 가온으로 사멸)이 었다.

5. *Cl. perfringens*의 Hobbs 血清型은 6, 8, 및 11型이 각 4주, 13型이 1주, 남은 다른균주는 型別이 되지 않았다.

6. *Cl. perfringens*의 抗菌物質 感受性은 cefamezin, lincomycin, minocin에 대하여 제일높았고 다음이 vibramycin, geopen 및 chloramphenicol이나 kanamycin, colimycin, gentamycine에 대하여서는 대단히 알았다.

7. 好氣性 腸內病原性細菌은 분리되지 않았다.

* 이 연구는 產學協同財團 學術研究費로 이루어 졌으며 깊은 사의를 포함니다.

REFERENCES

1) Bäuér, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, T. C. and Turck, M.: *Antibiotic Susceptibility Testing*

by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.

2) 朴魯祥: *Welchii* 菌에 의한 魚貝類의 汚染에 대한 調査研究, 保健獎學會報, 93-97, 1973.

3) Collée, J. C., Knowlden, J.A., and Hobbs, B.C., *Studies on the growth, sporulation and carriage of Clostridium welchii, special reference to food poisoning strains. J. Appl. Bacteriol.*, 24:326-339, 1961.

4) Canada, J.C. and Strong, D.H.: *Clostridium perfringens in bovine livers. J. Food Sci.*, 29: 862-864, 1964.

5) Canada, J.C. and Strong, D.H.: *Effects of animal alimentary passage on the heat resistance of Cl. perfringens. Appl. Microbiol.* 13:788-792, 1965.

6) Duncan, C.L. and Strong, D.H.: *Clostridium perfringens type A food poisoning. I. Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of Clostridium perfringens in monkeys. Infect. Immunity*, 3:167-170, 1971.

7) Ericsson, H.M. and Sherris, J.C.: *Antibiotic sensitivity testing. Acta path. Microbiol. Scand. Section B Supplement*, 217, 1971.

8) Frazier, W.C.: *Food Microbiology*. 2nd ed., TATA McGraw Publishing Co., 1974.

9) Hobbs, B.C., Smith, M.E. Oakley, C.L. Warrack, G.H. and Gruickshank, *Clostridium welchii food poisoning. J. Hyg.*, 51:74-101, 1953.

10) Hobbs, B.C., and Wilson, J.G.: *Contamination of wholesale meat supplies with Salmonellae and heat-resistant clostridium welchii. Monthly Bull. Min. Health Public Health Lab. Serv.*, 18:198-206, 1959.

11) Hall, H.E., Angelotti, R., Lewis, K.H. and Forster, M.J.: *Characteristics of Clostridium perfringens strains associated with food and foodborne disease. J. Bacteriol.*, 85:1094-1103, 1963.

12) Hobbs, B.C.: *Food poisoning d) Staphylococcal and Clostridium welchii food poisoning. Royal Soc. Health J.*, 80:267-271, 1960.

13) Hauschild, A.H.W., Walcroft, M.J. and Campbell.

- W.: *Emesis and diarrhea induced by enterotoxin of Clostridium perfringens type A in monkeys*. *Can. J. Microbiol.* **17**:1141-1143. 1971,
- 14) 石田勝一, 山岸高由, 西田尚紀, 1962. *Clostridia*,
- 15) Johoston, F.R.C., and Cockroft.: *Clostridium welchii resistance to tetracycline*. *Lancet.*, **1**: 660-661, 1968.
- 16) Kraneveld, F.C., and Djaenoedin, R.: *Anaerobic bacillen en de door hen versoorzaakte infections bij de huisdieren in NederlanschIndie 13:Het voorkomen van den gasbacil van Frankel in den darminhoud en de faeces van gezonde honden en katten*. *Ned-Indische blad. Diergeneesk.* **46**:284-287, 1934.
- 17) Kraneveld, F.C., and Djaenoedin, R.: *Anaerobic bacillen en de door hen veroorzaakte infections bij de huisdieren in NederlanschIndie. Het voorkomen van den Frankel, schen gasbacil in den inhoud van den eindarm by gezonde varkens ned-Indische blad. Diergeneesk.* **46**: 395-399, 1934.
- 18) Mathony, D.E.: *Antibiotic sensitivity of Clostridium perfringens and L-forms of Cl. perfringens induced by bacteriocin*. *Can J. Microbiol.*, **19**:735-739, 1973.
- 19) Mckillop, E.J.: *Bacterial contamination of hospital food, with special reference to Cl. welchii food poisoning*. *J. Hyg.* **57**:31-46, 1959.
- 20) Nakamura, M. and kally, K.D.: *Incidence of Clostridium perfringens in fish and fish products*, *H.L.S.*, **5**:84-88, 1968.
- 21) Nelson, K.E., Agar, E.A., Marks, J.R and Ensu-
 anuel, I.: *Clostridium perfringens food poisoning report of an outbreak*. *Am. J. Epidemiol.*, **83**:86-95, 1966.
- 22) 中津川 修二, 赤弱莊賓, 淺川豊: 易熱性ウエルシユ菌による食中毒例と分離菌株の性状について. *食衛誌*, **13**:542-546, 1972.
- 23) Strong, D.H., Duncan, C.L. and Perma, G.: *Clostridium perfringens type A. food poisoning II. Response of the rabbit illeum as an indication of Clostridium perfringens in human beings*. *Infect. Immunity.*, **3**:171-178, 1971.
- 24) Smith, I. D. S.: *Clostridium perfringens food poisoning*. p. 77-83. In L.W. Slanttz, C.O. Chichester, A.R. Gaufin, and Z.J. Ordal (ed.), *Microbiological quality of food*. *Academic press, Inc., New York*, 1973.
- 25) 孫準鏞, 金昆, 金永翰, 李明遠, 温玉, 柳在根.: 韓國에서生産되는魚貝類에汚染된 clostridium welchii의分布調査. *保健研究院報*. **10**:79-88, 1973.
- 26) 杉谷哲: *Clostridia perfringens*의研究. *感染學會雜誌*, **48**:201-210, 1974.
- 27) Yamamoto, R., Sadler, W.W., Adler, H.E. and Stewart, G.F.: *Characterization of Clostridium perfringens isolated from market poultry*. *Appl. microbiolol.*, **9**:337-342. 1961.
- 28) Yamagata, H.: *Modern media*, **4**:92. 1958.
- 29) Zeissler, J. und Rassfeld-Sternberg, L.: *Zur bakteriologie der enteritis necroticans. 1. Ein neuer bazillus im darmnh. alt von kranken mit enteritis necroticans*. *Zbl, Bakt. 1. Abt. Orig.*, **153**:304-312. 1949.