

## 넙치 근육중 잔류 옥시테트라사이클린의 간이스크리닝 검출방법 비교연구

정승희<sup>†</sup> · 김진우

국립수산진흥원 병리과

실험에는 *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341을 상법에 따라 제작하여 muller hinton agar(Difco)에 각각 접종한 뒤, 3가지 조건의 pH가 조정된 검사용 평판배지(plate)인 *B. subtilis*(pH 6.0), *B. cereus*(pH 6.0), *B. subtilis*(pH 7.2), *B. subtilis*(pH 8.0), *M. luteus*(pH 8.0)의 EEC 4-plate변법을 이용하였다. 넙치에 옥시테트라사이클린(OTC)을 농도 100 mg/kg/day으로 단 1회 강제 경구 투여한 후 1일, 3일, 5일, 10일, 15일, 20일, 25일 30일마다 3마리씩 채취하여 시료의 처리를 각각 달리한 근육직접법, 추출디스크법, 직접디스크법의 3종류 간이스크리닝법으로써 OTC의 잔존유무를 분석하였다. *B. subtilis*(pH 6.0)배지는 투여 후 1일째 근육직접법에서만 양성반응으로 의심되는 의양성반응(±)을 나타내었을 뿐 30일까지 간이스크리닝법 3종류가 모두 음성반응을 나타내었다. *B. subtilis*(7.2), *B. subtilis*(8.0), *M. luteus*(8.0)배지는 투여 후 1일째부터 30일까지 간이스크리닝법 3종류가 모두 음성반응을 나타내었다. 그러나 *B. cereus*(pH 6.0)배지는 1일째부터 15일까지 간이스크리닝법 3종류가 모두 명확한 양성반응, 투여 후 20일째 근육직접법과 직접디스크법은 의양성반응(±)을 보였으나 추출디스크법은 분명한 음성반응, 그리고 투여 후 25일째 및 30일째는 시험조작법 모두가 음성반응을 나타내었다. 따라서 근육직접법, 추출디스크법, 직접디스크법의 간이스크리닝법 3종류는 OTC의 양성반응 판정에 커다란 차이가 없었으며, *B. cereus*는 OTC의 모니터링에 유효한 균주라는 사실을 확인하였다.

**Key words:** Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Oral administration, Oxytetracycline, Screening method, EEC 4-plate method

유럽연합(EU)은 직접디스크법의 EEC 4-plate법, 일본은 추출디스크법의 3-plate법, 미국 및 카나다는 swab을 이용하는 CAST (Calf Antibiotic & Sulfa Test), STOP(Swab Test On Premises) 및 LAST(Live Animal Swab Test)의 간이스크리닝법을 채택하고 있다(Johnston *et al.*, 1981; Schothorst *et al.*, 1978; 近藤 등, 1989). 현재 우리나라에서는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341균주를 이용한 직접디스크법의 EEC 4-plate법 또는 BmDA(*Bacillus megaterium* Disk Assay)법을 식육중 잔류 항균성물질의 간이스크리닝법으로 사용하고 있다(농림부 고시 제1996-99호). 한편으로는 식품공전상 축산식품중 잔류

항생물질의 간이 스크리닝법으로 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 및 *B. stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C-953균주가 추가로 설정된 추출디스크법이 수재되어 있어 간이스크리닝법의 시험조작 방법이 통일되어 있지 않는 실정이다.

간이스크리닝법에 사용되는 시험조작 방법이 양성반응의 결과판정에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 정확한 검토가 이루어지지 못한 상태에서 직접디스크법의 EEC 4-plate법이 여체내 잔류 항균성물질의 간이스크리닝법으로 사용되고 있다. 본 실험은 식육중 잔류 항균성물질의 간이스크리닝법으로 사용되고 있는 근육직접법, 직접디스크법, 추출디스크법을 어류에 응용하여 각 검출방법간 잔존유무 분석에 차이가 있는지를 조사하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author

## 재료 및 방법

검사용 균주에는 *B. subtilis* BGA, *M. luteus* ATCC 9341, *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (이하 *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*으로 명시하였다), *M. luteus*의 증균용 배지에는 muller hinton broth(Difco), 옥시테트라사이클린(OTC) 검사용 배지로는 muller hinton agar(Difco)를 사용하여 Jung and Kim(1997)의 방법에 따라서 시험 평판배지를 제작하였다. 시험 평판배지는 pH조건을 6.0, 7.2, 8.0으로 *B. subtilis*(pH 6.0), *B. cereus*(pH 6.0), *B. subtilis*(pH 7.2), *B. subtilis*(pH 8.0), *M. luteus*(pH 8.0)의 EEC 4-plate변법을 사용하였다. 단 *B. subtilis*(pH 7.2)배지에는 trimethoprim을 최종 배지 ml당 0.05 µg이 되도록 첨가하였다.

실험에 사용한 넙치(평균 체중 357±38.7 g)는 국립수산물진흥원 사육실에서 양식하여 왔으며 약제의 사용은 전혀 없었다. OTC-HCl(Sigma)는 완충액을 사용하여 농도 100 µg/ml으로 준비하였다. 약제사료의 제작에는 넙치용 분말사료, α-starch, OTC용액을 섞어 만들었는데 분말 사료량: α-starch: OTC(100 µg/ml)의 혼합비율은 9:1:60이었다. 이러한 비율로 만들어진 paste형태의 약제사료를 유발에다 잘 혼합하고 실리콘 튜브를 끼운 주사기에 주입하여 넙치를 3-aminobenzoic acid ethyl ester(Sigma)로써 마취(0.15 g/해수 l)시킨 뒤, 체중 100 g당 1.2 ml 되도록 위내에 강제로 삽입해서 단 1회 경구 투여하였다(100 mg/kg/day). 약제가 투여된 넙치는 수온 약 19°C에서 사육하면서 경과 일수별로 실험에 제공하였다.

약제 투여 후 일정 경과일마다 넙치를 3마리씩 채취하여 근육직접법의 경우는 각 개체로부터 근육을 각변 약 1 cm가 되는 정육면체의 형태로 무균적으로 절취한 후 검사배지에 올렸고, 직접디스크법에서는 근육을 절개하여 절개 단면사이에 멸균 펄프디스크(직경 10 mm, Advantec toyo)를 삽입하여 약 1시간동안 조직액을 흡수시킨 것을 검사배지위에 올렸다. 한편, 추출디스크법에서는 근육 5 g을 절취하고 20 ml의 구연산 아세트완충액을 첨가하여 호모게나이저(Heidolph DIAX 600)로 마쇄한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이 때 얻어진 상층액에 펄프디스크를 담귀 충분히

적신 후 풍건시킨 다음 검사배지에 올렸다. 시료를 올린 모든 배지는 냉장고에서 약 1-2시간 정도 정치시켰으며 35°C, 18시간 동안 배양하여 저지원의 형성유무와 크기를 조사하였다. 배지위에 나타난 저지원의 직경이 1 mm 이상인 것을 양성, 1 mm 미만인 것을 의심이 가는 양성반응인 의양성반응(±)으로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

Table 1에는 넙치 24마리에 OTC를 경구 투여한 후 EEC 4-plate변법에 의해 근육직접법, 직접디스크법, 추출디스크법을 모두 사용한 잔존유무 분석 결과를 나타내었다. *B. subtilis*(pH 6.0)배지에서는 투여 후 1일째 근육직접법에서만 2마리가 의양성반응(±)이 나타났을 뿐, *B. subtilis*(pH 7.2)를 비롯한 시험배지 3종류는 1일째부터 전부 음성반응을 나타내었다. 그러나 *B. cereus*(pH 6.0) 배지에서는 투여 후 1일째부터 15일째까지 모두 명확한 양성반응, 20 일째에 의양성반응(±)을 보여 좋은 대조를 이루었다. 유일하게 양성반응을 나타낸 *B. cereus*(pH 6.0)배지의 경우 시험조작법 3종류에 따른 양성반응의 판정에는 별다른 차이가 없었으나 투여 후 15일째에 근육직접법 및 추출디스크법은 2마리가 양성반응을 보였으며 직접디스크법은 3마리가 양성반응을 보였다. 한편 투여 후 20일째에 추출디스크법은 음성반응을 보였으나 근육직접법 및 직접디스크법은 각각 2마리가 의양성반응(±)을 보였다. 따라서 간이스크리닝법 3종류는 OTC의 양성반응 판정에 별다른 영향을 미치지 않았으나 추출디스크법이 근육직접법 및 직접디스크법에 비하여 약간 검출성적이 떨어지는 것으로 나타났다. 현재 *B. cereus* 균주는 우리나라 및 일본의 식품공전상 축산식품중 잔류 항균성물질의 간이스크리닝법에 표준균주로 이용되고 있으며, OTC를 비롯한 클로르테트라사이클린의 개별분석법 뿐만 아니라 테트라사이클린계의 확인시험에도 이용되고 있다(Lee et al., 1994). 연구결과에서 *B. cereus*균주는 *B. subtilis* 및 *M. luteus*균주보다 잔류 OTC의 모니터링에 유효한 균주라는 사실을 확인하였다. 훙川 등(1993)은 뱀장어에 OTC를 농도 500 mg/kg/day으로 제작한 약제사료를 6-7일



간 투여해서 자유롭게 먹도록 한 후, *B. subtilis* ATCC 6633 단일 시험균을 상법으로 제작한 antibiotic medium 8 (Difco) 배지에 첨가하여 근육을 1 g 정도 되도록 잘라 근육직접법으로써 잔류의 정도를 분석하였다. 투약 종료 1일 후에 나타난 세균발육 저지원의 크기가 평균 3.9 mm였고, 5일 후에는 평균 0.4 mm 그리고 10일 후에는 저지원이 형성되지 않았다. 통상 직접법에서는 저지원의 크기가 1 mm 이상인 경우를 양성반응으로 판정하기 때문에 이 실험에서는 5일 후부터 배양어 근육에서 OTC는 잔류하지 않는다고 해석할 수 있겠다. 본 실험에서는 OTC만을 농도 100 mg/kg/day으로 단 1회 섭취에 강제 경구 투여하였기 때문에 의양성반응(±)을 보인 20일까지는 근육에 잔류한다고 추정된다.

무균적으로 근육을 절단하는 근육직접법은 검사수가 적을 때 사용가능하며 펄프디스크를 비롯한 시험기구의 구비가 되어 있지 않는 현장에서 손쉽게 적용할 수 있지만 근육자체의 처리과정에서 세균이 오염되어 저지원이 명료하게 형성되지 못하는 경우가 종종 발생하는 결점을 가진다. 추출디스크법의 경우는 호모게나이저, stomacher 등이 필요하기 때문에 현장에서 손쉽게 이용하기에는 어려운 방법이라 하겠다. 반면에 직접디스크법은 검사개체수가 많은 경우에도 비교적 간편하게 이용할 수 있는 방법이며 근육직접법 및 추출디스크법과 비교할 때 OTC의 양성반응 판정에서도 충분히 신뢰성이 있는 것으로 나타났다. 금후 어체내 잔류하는 OTC를 비롯한 테트라사이클린계

의 모니터링은 EEC 4-plate변법에 의해 보다 신뢰성이 클 것으로 여겨진다.

## 사 사

이 논문은 해양수산부에서 시행한 1997년도 수산 특정 연구개발 사업비로 연구되었습니다.

## 참고문헌

- Johnston, R., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G. and Schwab, B.: A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *J. Food Prot.*, 44: 828-831, 1981.
- Jung, S. H. and Kim, J. W.: Studies on the bioassay method for the detection of aquatic antibacterial agents. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Inst.*, 53: 145-158, 1997.
- Lee, C. W., Kim, S. H., Jang, Y. M., Kwak, H. S., Baek, S. Y., Choi, B. H. and Lee, K. Y.: The study of residual antibiotics methodology in meat (II). *Rep. of Nat. Ins. of Hlth.*, 31: 509 - 516, 1994.
- Schothorst, M., Leusden, F. M. and Nouws, J. F. M.: Antibiotic residues, regulations, tolerances, and detection in the european economic community. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61: 1209 - 1213, 1978.
- 近藤房生, 松本和之, 永田禪代: わが國と歐米における畜産物中の残留抗菌性物質簡易検査法の比較. 畜産の研究, 43: 353-356, 1989.
- 宮川宗記, 竹内喜夫, 立木宏幸, 上野隆二: 水産用醫藥品に關する研究. 抗菌性物質の簡易残留検査法の開發. 平成4年度 魚病對策技術開發研究成果報告書, pp. 117-125. 日本水産資源保護協會, 1993.

## A Comparative Study of the Detectable Methods of Residual Oxytetracycline in Muscle of Flounder (*Paralichthys olivaceus*) with Simplified Screening Test

Sung-Hee Jung and Jin-Woo Kim

*Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, 408-1, Shirang-ri, Kijang-up, Kijang County, Pusan 619-900, Korea*

By standardized method, *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 were seeded on the muller hinton agar (Difco) plate, and pH was adjusted to 6.0, 7.2, and 8.0. Five agar plates, *B. subtilis* (pH 6.0), *B. cereus* (pH 6.0), *B. subtilis* (pH 7.2), *B. subtilis* (pH 8.0), and *M. luteus* (pH 8.0), were employed as test plates of modified EEC 4-plate method. Oxytetracycline (OTC) with a diet was orally administered to flounder, *Paralichthys olivaceus*, at 100 mg/kg once a day. After oral administration, modified EEC 4-plate method by the three screening test using muscle-direct, extraction-disk and direct-disk methods was conducted for 3 fish at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days. Muscle-direct treatment of *B. subtilis* (pH 6.0) was found to be dubious positive ( $\pm$ ) at the 1st day after the administration; thereafter, it was found to be negative to the last day of the experiment. Extraction-disk and direct-disk treatment of *B. subtilis* (pH 6.0) were found to be negative from the 1st day to the last day after the administration. *B. subtilis* (pH 7.2), *B. subtilis* (pH 8.0), and *M. luteus* (pH 8.0) by the three screening tests, were found to be negative all the way after the administration. On the other hand, *B. cereus* (pH 6.0) by the three screening tests was clearly found to be positive for the first 15 days after the administration, and then muscle-direct and direct-disk treatment of *B. cereus* (pH 6.0) were found to be dubious positive at 20th days after the administration. However extraction-disk treatment of *B. cereus* (pH 6.0) was clearly found to be negative at the same stage; thereafter, the three screening tests of *B. cereus* (pH 6.0) were found negative to the last of the experiment. These findings showed that to have equal sensitivity to those determination for the residual detection of OTC, and also confirmed that *B. cereus* was effective test organism for the monitoring of OTC.

---

*Key words:* Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Oral administration, Oxytetracycline, Screening method, EEC 4-plate method