

국내 유통 돈분 액비의 미생물 함량 모니터링

임성목 · 이지호 · 고우리 · Anitha Kunhikrishnan · 김원일*

국립농업과학원 유해화학과

Monitoring of Microorganisms in Commercial Liquid Pig Manures in Korea

Seong-Mook Lim, Ji-Ho Lee, Woo-Ri Go, Anitha Kunhikrishnan, and Won-Il Kim*

Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

Total aerobic bacteria, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. were examined in commercial liquid pig manures. Commercial liquid pig manures (n=33) were collected from muck joint resource recovery plant at April, June, August, October 2009, Korea. Total aerobic bacteria were incubated at 37°C for 24-48 hrs, and quantified as a colony-forming unit (CFU) mL⁻¹. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. were followed by Korean Food Standards Codex method. Colony of *Salmonella* spp. was confirmed by API kit and real time polymerase chain reaction (PCR). Total aerobic bacteria isolated from fermented commercial liquid pig manures ranged from 2.8 to 24.3 × 10⁴ CFU mL⁻¹. *Escherichia coli* O157:H7 was not detected, and *Salmonella* spp. showed the low detection frequency at only 1 sample. This study suggests that continuous monitoring in commercial liquid pig manures is required to improve the agricultural food through management of agricultural land contaminated with liquid pig manures.

Key words: Commercial liquid pig manure, *Escherichia coli* O157:H7, PCR, *Salmonella* spp., Total aerobic bacteria

서 언

최근 식량에 대한 패러다임이 수량 및 품질에서 안전성 및 기능성으로 전환되는 시점이다. 이에 따라 안전 농산물 생산에 대한 국민의 관심 증대와 함께 농산물 생산에 투입되는 농업 자재의 안전성 확인이 필요한 시점이다. 현재 우리나라 가축분뇨 발생량이 연간 46,534천톤이며, 이중 양돈 분뇨가 전체 38%인 17,843천톤을 차지하고 있으며 (MAFF, 2010), 가축분뇨의 86.6% 정도인 40,286천톤이 퇴·액비로 재 활용되어 유기물과 질소의 급원으로 이용되고 있어 분뇨를 이용한 퇴·액비의 벼, 맥주보리, 유채 등 다양한 작물생육 및 토양환경에 미치는 영향에 대한 연구는 상당히 수행되어 왔다 (Lee et al., 2011; Park et al., 2011).

그러나, 동물의 분뇨 혹은 사체와 같은 유기물을 이용한 퇴비의 제조과정에서 적절한 숙성과정을 거치지 않고 비료로 사용될 경우 토양, 지하수, 관계용수를 오염시키며, 이는 농산물 오염의 원인이 될 수 있지만, 가축분뇨 퇴·액비 이용에 따른 영농 및 인체에 대한 안전성 조사가 미흡한 실정이다. 농산물 안전성과 관련하여 우리나라 뿐 아니라, CODEX

(Codex Alimentarius Commission) 및 EU (European Union) 국가 등에서 농경지 토양 등 농업환경 및 농산물에 대한 중금속 등 유해물질의 규제기준이 확대되고 있고 나아가 영농에 사용되는 농자재에 대한 관리기준 설정이 시급하다. 현재 국내에서는 농산물 ('07~'08) 및 농업환경 ('99~'08)의 중금속 모니터링은 농촌진흥청 등에서 실시하고 있으며, 액비에 대한 중금속 등 유해물질의 모니터링은 가축분뇨 퇴·액비의 장기연용을 위한 연구목적으로 부분적인 수행되고 있고, 항생물질에 대하여는 현황 및 농산물로의 흡수이행과 관련하여 상당한 연구가 수행되었으나, 유해미생물에 대한 조사 및 흡수이행 연구는 미흡한 실정이다.

특히, 농산물은 특별한 가열처리 없이 원료식품을 그대로 섭취하는 경우가 있으므로 식중독 원인균이 농산물에 포함되어 있는 경우 식중독을 유발할 수 있으며 특히 최근 신선 농산물이 원인 식품이 된 식중독 사례가 증가되고 있어 농산물에 대한 안전 관리의 중요성이 부각되고 있다. 미국 농업연구청 (Agricultural Research Service, ARS) 산하 US Salinity Lab에서는 농식품 안전성에 대한 연구가 강화되면서 오염물질에 의한 작물체 오염 예측모델을 가지고 유해미생물에 적용하기 위한 연구가 추진되고 있고, 분변과 퇴비, 오염된 관계용수에 있는 세균, 바이러스 등의 병원성 생물이 농작물로의 이행가능성과 오염된 농작물에서 병원성미생물의 생존 등을 조사하고 그 결과를 작물체 오염을 예측

접수 : 2011. 11. 24 수리 : 2011. 12. 16

*연락처 : Phone: +82312900527

E-mail: wikim721@korea.kr

하기 위한 자료로 활용하고 있다. 이에 따라 본 연구는 국내 유통되는 액비 내 유해미생물인 총호기성 박테리아, *Salmonella* spp. *Esherichia coli* O157:H7의 함량을 모니터링하고, 이를 통해 액비 내 유해미생물의 농산물의 전이를 경감시키는 연구의 기초 자료를 확보하여 안전농산물 생산에 기여하기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

액비 시료채취 액비시료는 전국의 가축분뇨공동자원화 시설, 액비유통센터 및 자영 축산농가 등 15지점을 선정하였고, 시료 채취는 2009년 4월, 6월, 8월, 10월에 시기별 완숙 액비로서 포장에 시용이 가능한 시료를 각각 10, 12, 8, 3점으로 총 33점을 채취하여 분석재료로 사용하였다.

총호기성 균, 대장균 군/대장균의 정량적 분석 액비 내 유해미생물 분석을 위해 액비 25 mL를 buffered peptone water (BPW, Difco, USA) 225 mL이 담긴 멸균된 stomacher bag에 넣어 10배 희석한 뒤에 stomacher (easyMIX, AES CHEMUNEX, FRANCE)를 이용하여 2분간 균질화하였다. 균질화 된 시료는 buffered peptone water를 이용하여 10배씩 연속 희석하였다.

총 호기성 균 (total aerobic bacteria)의 정량적 분석을 위해서 앞서 준비한 시료 1 mL를 3MTM petrifilm aerobic count plate (St. Paul, MN, USA)위에 분주하여 37°C에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 petrifilm 위에 형성된 colony를 계수하여 colony-forming unit (CFU) mL⁻¹로 나타내었다. 또한 대장균군 (coliform) 및 대장균 (*E. coli*)의 정량적 분석을 위해서는 3MTM petrifilm *E. coli*/coliform count plate (St. Paul, MN, USA)에 분주하여 37°C에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 기포를 가진 blue colony를 *E. coli* 양성으로, 기포를 가진 red colony와 blue colony를 coliform 양성으로 간주하여 계수하였다.

***Esherichia coli* O157:H7 동정 및 오염수준의 정성적 분석** *E. coli* O157:H7 정성적 분석은 식품공전 (KFDA, 2011)의 방법에 의해 실시되었다. 검체 25 mL를 무균적으로 취하여 novobiocin antimicrobial supplement (BactoTM Oxford antimicrobial supplement, Difco)를 첨가한 EC Medium, Modified (mEC, Difco, USA) 225 mL가 담긴 멸균된 stomacher bag에 넣어 stomacher 를 이용하여 2분간 균질한 후 37°C에서 24시간 동안 배양 하였다. 증균된 액은 sorbitol MacConkey agar (SMAC; Difco, USA)에 streaking 하였고, 37°C에서 24시간 동안 배양되었다. 배양 후 의심되는 colony는 latex test로 확인하였고, 더욱 정확한 확정을 위해 colony

를 ttryptic soy agar (TSA, Difco, USA)에 계대한 후, API kit (API 20E, Kogene, Korea)와 *Esherichia coli* O157: H7 박테리아 유전자 검출을 위해 디자인된 kit (Power ChekTM Real-time PCR kit VT2, Kogenebiotech, Korea)를 control로 사용하여 시료 내 *Esherichia coli* O157: H7의 양성여부를 확인하였다.

***Salmonella* spp. 동정 및 오염수준의 정성적 분석** *Salmonella* spp.의 정성적 분석은 식품공전 (KFDA, 2011)의 방법에 의해 실시되었다. 검체 25 mL를 무균적으로 취하여 buffered pepton water (BPW, Difco, USA) 225 mL이 담긴 멸균된 stomacher bag 에 넣어 stomacher를 이용하여 2분간 균질화 한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양 하였다. 증균된 액의 1 mL를 Buffered rappaport-vassiliadis broth (Difco, USA) 9 mL에 넣어 42°C에서 24시간 동안 배양하였다. 2차 증균 배양된 액은 xylose lysine desoxycholate agar (XLD, Difco, USA) 에 streaking 하였고, 37°C에서 24시간 동안 배양되었다. 배양 후 의심되는 colony는 latex test로 확인하였고, 더욱 정확한 확정을 위해 colony를 ttryptic soy agar (TSA, Difco, USA)에 계대한 후, API kit (API 20E, Kogene, Korea)와 *Salmonella* spp. 박테리아 유전자 검출을 위해 디자인된 kit (PowerChekTM Real-time PCR kit, Kogenebiotech, Korea)를 control로 사용하여 시료 내 *Salmonella* spp.의 양성여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에 사용된 돈분 액비 내 총호기성 균, 대장균 군/대장균의 함량은 Table 1과 같다. 평균 총 균수 ($\times 10^4$ CFU mL⁻¹)는 4월에는 24.3 \pm 39.5, 6월에는 11.3 \pm 12.6, 8월에는 7.5 \pm 15.7, 그리고 10월에는 2.8 \pm 2.7로 조사되었으며, 액비 채취시기별로 돈분 액비 내 총 호기성 균, 대장균군/대장균의 함량이 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았지만 (**p* > 0.05), 4월과 6월 시기의 총 균수가 다른 시기에 비해 다소 증가하는 경향을 보여주었다. 돈분 액비 내 대장균 함량이 10⁵~2.0 $\times 10^7$ CFU mL⁻¹로 보고되었다 (Han, 2008; Hur, 2010). 퇴비 내 약 88% 정도가 10⁷ CFU g⁻¹이상 나타났고, 이러한 미생물 균을 제거하지 않고 식품을 섭취할 경우는 식중독을 일으킬 가능성을 보고하였다 (Jung et al., 2011). 하지만, 충분한 부숙된 후에는 대장균 군이 10²~10³ CFU g⁻¹으로 감소되었다 (Larney et al., 2003).

돈분 액비의 유해 미생물을 검사한 결과는 Table 2와 같다. 장출혈성 대장균 (*E. coli* O157:H7)은 검출되지 않았지만 살모넬라 (*Salmonella* spp.)는 8월 채취한 시료에서 1건 검출되어, 3%의 낮은 검출빈도를 보여주었다. 이에 대한 *Salmonella*

Table 1. Average and ranges of total bacteria isolated from fermented commercial liquid manures.

	Apr.	Jun.	Aug.	Oct.
	----- × 10 ⁴ CFU mL ⁻¹ -----			
Avg. ± SD	24.3 ± 39.5	11.3 ± 12.6	7.5 ± 15.7	2.8 ± 2.7
Min.	0.18	0.13	1.70	0.91
Max.	28.4	32.7	46.0	4.93

Table 2. Detection for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. isolated from fermented commercial liquid manures (n=33).

Strains	Apr.	Jun.	Aug.	Oct.
<i>E. coli</i> O157:H7	ND [†]	ND	ND	ND
<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	1	ND

[†]ND, Not detected.

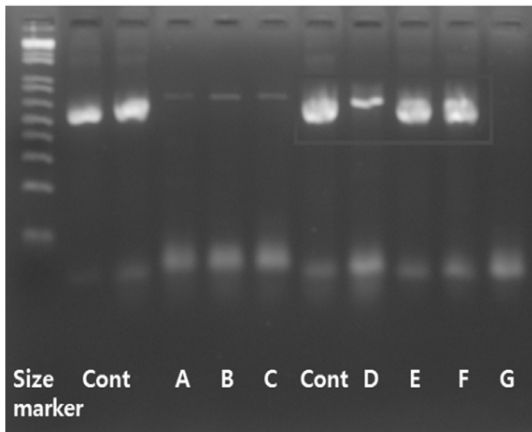


Fig. 1. PCR test of *Salmonella* spp. in the liquid pig manures. *Salmonella* spp. was detected in the one sample among the surveyed commercial liquid pig manures (cont, *Salmonella* spp.; A, B, C, non-contaminated liquid pig manures; D, E, F, contaminated liquid pig manures).

*spp.*의 정확한 확정을 위해 PCR 시험을 수행한 결과를 제시하였다 (Fig. 1). Fig. 1에서처럼 오염된 돈분 액비 시료 내 *Salmonella* spp. 발현능은 *Salmonella* spp.만을 주입한 대조군에서의 발현능과 유사하게 나타났다. 그러나, 오염되지 않은 돈분 액비시료 내 *Salmonella* spp.은 발현되지 않았다. 이를 통해 최종적으로 오염된 돈분 액비 내 *Salmonella* spp.를 최종적으로 확인하였다.

장출혈성 대장균 오염은 돈분 분변이 주 오염원으로서, 환경 중으로 배출되면 10⁵~10⁸ CFU g⁻¹이 검출되는데, 돈분 액비를 사용하기 전 액비의 pH, 박테리아 농도, 포기조건, 온도 등의 조건에 따라 장출혈성 대장균 오염정도가 다르게 나타난다 (Kudva et al., 1998). 돈 분뇨의 부숙 기간이 45일 이전인 경우, 분변성 대장균이 4.4 × 10⁵ CFU g⁻¹으로 검출되었다 (NAAS, 2008). 또한, Jung et al., (2011)의 결과에 의하면, 가축 분뇨 퇴비에서 *E. coli* O157:H7과 *Salmonella* spp.는 검출되지 않았다. 본 연구결과에서도 동일하게 총 33점 중 1점

에서만 *Salmonella* spp.가 검출된 것으로 보아, 돈분 자체에 유해미생물이 오염되어있지만, 부숙 시키는 과정에서 고온으로 인해 미생물 군들이 충분히 사멸된 것으로 판단된다. 돈분 액비의 부숙 기간에 따라 중온성 및 고온성 미생물 검출정도가 다르게 나타났지만, 살모넬라 균은 부숙 기간에 관계없이 모든 시료에서 검출되지 않았다 (NAAS, 2008). 살모넬라 균은 돈분 액비를 18주 이상 숙성 시키면 검출되지 않는다고 보고하였고 (Heo, 2010). 완전히 부숙 되지 않은 퇴비 내에서는 *E. coli* O157:H7과 *Salmonella* spp.이 생존할 수 있다고 보고 하였다 (Cote et al., 2006). 이렇게 돈분 액비에서 유해미생물이 검출되는 것이 우려되는 이유는 액비를 제조하는 과정에서 적절한 숙성을 시키지 않고, 비료로 이용할 경우 토양과 관개용수를 오염시키며, 이는 농산물 오염의 주 원인이 될 수 있다. 이는 액비로 인해 토양, 관개용수, 작물의 안전성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 미국 및 유럽국가에서는 퇴비 내 병원성 미생물에 대한 기준을 설정해놓고 있으며, 특히 *E. coli* O157:H7과 *Salmonella* spp.는 검출되어서는 안 되는 것으로 규정하고 있다 (Brinton et al., 2009). 이에 반해 국내에서는 가축 분뇨 활용 퇴·액비 내 미생물 평가 기준안을 제시하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이에 대응하여 국내 가축분뇨를 활용한 액비를 사용하기 전, 액비 내 함유된 유해 미생물의 지속적인 모니터링과 더불어, 부숙 기간 및 부숙도를 평가하여 액비로 사용 가능한 기준을 설정해야 할 것으로 판단된다.

결론

액비 품질향상을 위한 액비 내 유해미생물의 현황을 파악하고 액비 내 유해미생물의 농산물로의 전이를 경감시키는 연구의 기초 자료를 확보하기 위하여 전국적으로 4월, 6월, 8월, 10월 4회에 걸쳐 채취한 유통액비에서 유해미생물을 조사하였다. 유통액비 33점의 총 미생물량은 2.8~24.3 × 10⁴

CFU mL⁻¹로 조사되었고, 조사 액비에서 *E. Coli* O157: H7 균은 검출되지 않았으나, *Salmonella spp.*는 1점에서 검출되었다. 그러나 검출된 미생물에 대한 농산물 안전성과의 관련성을 파악하기 위하여 액비 시용에 따른 토양에서의 검출 여부 및 작물로의 전이 등 이에 관한 보다 세심한 연구가 수반되어야 할 것이다. 따라서, 농산물 안전성 향상을 위한 가축 액비를 포함하여 영농자재의 지속적인 조사와 안전관리가 필요한 실정이다. 본 연구를 통해 기술적 측면에서는 액비 유해미생물 허용기준설정의 근거자료를 제공할 수 있고, 또한, 경제적·산업적 측면에서는 액비에 의한 오염농경지 관리방안을 제시하고, 친환경 품질인증 농가 및 GAP 농가 생산 농산물의 안전성을 확보하며, 국민의 우리 농산물 안전성에 대한 신뢰감을 회복하는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ007 2052011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

Brinton, W.F., P. Stone, and T.C. Blewett. 2009. Occurrence and levels of fecal indicators and pathogenic bacteria in market ready recycled organic matter composts. *J. Food Prot.* 72:332-339.

Cote, C., A. Villeneuve, L. Lessard, and S. Quessy. 2006. Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Quebec. *Livestock Sci.* 102:104-210.

Han, C.B. 2009. The changes of component of piggery slurry during fermentation periods. Master. Thesis, Gongju National

University, Gongju, Korea.

Heo, M.Y. 2011. The effect of aeration on the slurry quality and microbial communities in liquid swine manure during the digestion. Master. Thesis.

Jung, K.S., S.G. Heu, E.J. Roh, D.H. Lee, J.C. Yun, and K.H. Kim. 2011. Prevalence of pathogenic bacteria in livestock manure compost and organic fertilizer. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(5):794-800.

KFDA, 2011. Analytical methods of Microorganisms in foods, Korea Food and Drug Administration (KFDA), Seoul, Korea.

Kudva, I.T., K. Blanch, and C.J. Hovde. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3166-3174.

Larney, F.J., L.J. Yanke, J.J. Miller, and T.A. McAllister. 2003. Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure. *J. Environ. Qual.* 32: 1508-1515.

Lee, S.B., K.M. Cho, N.H. Baik, J.J. Lee, Y.J. Oh, T.I. Park, and K.J. Kim. 2011. Effects of Application Method of Pig Compost and Liquid Pig Manure on Yield of Whole Crop Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Chemical Properties of Soil in Gyeonwa Reclaimed Land. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(3):353-360.

MAFF. 2010. Discharges amounts of livestock manure and resource recycling. MAFF (Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries).

NAAS. 2008. Study for setting assessment criteria in compost and liquid fertilizer derived from livestock manures. RDA (Rural Development Administration) NAAS (National Academy of Agricultural Science) project reports.

Park, J.M., T.J. Lim, S.E. Lee, and I.B. Lee. 2011. Effect of Pig Slurry Fertigation on Soil Chemical Properties and Growth and Development of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Korean Society of Soil Science and Fertilizer.* 44(2): 194-199.