

## Persistence of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in Soil, Liquid Manure Amended Soil, and Liquid Manure

Kyu-Seok Jung\*, Min-Ha Kim, Sung-Gi Heu, Eun-Jung Roh, Dong-Hwan Lee, Jeong-A Lim,  
Jae-Gee Ryu, and Kye-Hoon Kim<sup>1</sup>

National Academy of Agricultural Science, Wanju 565-851, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Environmental Horticulture, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received: October 4 2014, Revised: November 14 2014, Accepted: November 14 2014)

While searching for healthier diets, people became more attentive to agricultural organic products. However, organic foods may be more susceptible to microbiological contamination because of the use of livestock manure compost and liquid manure, potential sources of pathogenic bacteria. This study was undertaken to investigate the persistence of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in soil, liquid manure amended soil, and liquid manure. Loamy soil, liquid manure amended soil, and liquid manure were inoculated with *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes*. Samples were incubated in consistent moisture content at 25°C. Samples had been periodically collected during 120 days depending on the given conditions. *S. enterica* and *E. coli* O157:H7 survived over 120 days in loamy soil and over 60 days in liquid manure amended soil, respectively. *L. monocytogenes* decreased faster than other pathogens in soil. *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes* survived for up to 5 days in liquid manure. *S. enterica* and *E. coli* O157:H7 in soil decreased by 2 to 2.5 log CFU g<sup>-1</sup> for 120 days. *S. enterica* and *E. coli* O157:H7 in liquid manure amended soil decreased slowly for 21 days. However, *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes* sharply decreased after 21 days. *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes* in soil increased by 0.5 to 1.0 log CFU g<sup>-1</sup> for 7 days. Foodborne pathogens in soil and liquid manure amended soil gradually decreased over time.

**Key words:** Soil, Liquid manure, Foodborne pathogens

**Decimal reduction time (DRT) for *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes* in soil, liquid manure amended soil, and liquid manure at 25°C.**

Pathogens	Treatment	Regression equation	R <sup>2</sup>	DRT (days)
<i>S. enterica</i>	Soil	Log <sub>10</sub> A = -0.0223t + 8.5095	0.79	44.8
	Soil+liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -0.0891t + 8.396	0.94	11.2
	Liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -8.4818t + 8.4818	0.94	0.1
<i>E. coli</i> O157:H7	Soil	Log <sub>10</sub> A = -0.021t + 9.0525	0.79	47.6
	Soil+liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -0.0921t + 9.2715	0.97	10.8
	Liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -1.9505t + 9.1664	0.83	0.5
<i>L. monocytogenes</i>	Soil	Log <sub>10</sub> A = -0.0672t + 8.0657	0.81	14.8
	Soil+liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -0.0772t + 7.4778	0.92	12.9
	Liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -1.552t + 7.3999	0.95	0.6

\*Corresponding author : Phone: +82632383405, Fax: +82632383840, E-mail: win258@korea.kr

§Acknowledgement: This work was supported by a grant from the Agenda Program (PJ0085132014), Rural Development Administration, Republic of Korea.

## Introduction

농산물과 관련된 대부분의 식중독 사고는 수확하기 전 몇 가지 경로를 통하여 작물을 오염시킨 병원균 때문에 발생한다 (Burnett et al., 2001). 채소에서 장내 세균의 1차적 오염원인은 동물 또는 사람의 분변이며, 비료로서의 분뇨사용이 미생물 오염에 많은 영향을 준다. Brinton et al. (2009)은 퇴비에서 *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*가 검출된다고 하였다. 토양은 가축분뇨에 오염될 경우 *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Bacillus cereus*와 같은 병원성 미생물이 존재할 수 있어 토양에서 생산되는 채소류에 오염될 가능성이 높다 (Roberts et al., 1982). 농업용수는 병원성 미생물이 포함된 가축분뇨에 오염될 수 있고 오염된 관개수가 작물 재배에 이용되었을 때 뿌리, 잎을 통해 작물체 내부로 침투할 수 있다. Solomon et al. (2002)은 *E. coli* O157:H7는 오염된 퇴비에서 뿌리를 통하여 양상추에 침투할 수 있으며, 양상추 잎으로 전이될 수 있다고 하였다. 많은 병원성 미생물이 토양에서 오랫동안 생존할 수 있기 때문에 가축분뇨가 농경지에 이용되기 전에 부숙과정을 통해 병원성 미생물을 제거함으로써 위험성을 줄일 수 있다 (Bolton et al., 2012).

병원성 미생물로 오염된 가축분 퇴비, 액비 등을 사용한 작물을 식용하여 발생하는 식중독 사고를 예방하기 위해서는 병원성 미생물이 전혀 없는 안전한 퇴비, 액비를 생산하는 것이 가장 좋은 방법이다. 외국은 안전한 퇴비생산을 위한 부숙온도, 부숙기간 설정 등의 엄격한 기준이 있어 제도적으로 관리하고 있으나 우리나라는 아직 부숙조건에 관한 기준도 없는 실정이다. 가축분 퇴비 생산 시 부숙온도와 부숙기간 등의 부숙조건을 제대로 준수하면 안전한 가축분 퇴비가 생산될 것이고 결과적으로 농산물의 안전성 확보도 이루어질 것이다. 본 연구는 국내에서 유통되는 가축분 액비와 토양을 대상으로 병원성 미생물 (*S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*)에 따른 생존능 및 생존기간을 비교, 분석하고 그 결과를 바탕으로 적극적인 예방측면에서 안전한 가축분뇨 액비의 생산과 생산 후 위생적인 관리의 중요성을 제시하고자 수행하였다.

## Materials and Methods

**사용 균주 및 식중독균 생존조사** 돼지의 분뇨를 주 원료로 생산된 돈분 액비를 수집하여 사용하였으며, 접종 균주로 *S. enterica* ATCC 13311, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *L. monocytogenes* ATCC 15313를 사용하였다. 균주는 Tryptic Soy Broth (Difco Co., Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C shaking incubator (VS 8480, Vision Science, Korea) 250~280 rpm에서 18시간 진탕배양 하였다. 배양액을 10,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 회수한 균체침전물에 0.1% Buffered Peptone Water (Difco Co., Detroit, MI, USA) 20 mL를 가한 후 washing 과정을 2회 실시한 다음 세균수가 약 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>이 되도록 농도를 맞추어 실험에 사용하였다. 실험구는 토양 (양토) 처리구, 액비 처리구, 액비와 토양 (양토) 혼합처리구를 선정하였다. 토양 처리구와 액비 처리구는 멸균된 토양 (액비) 각각 500 g (mL)을 멸균된 polypropylene box (2.3 L, Locknlock co., Korea)에 넣고, 여기에 준비해 놓은 각각의 균주별 접종액 50 mL를 가한 후 균질화하였고, 액비와 토양 혼합처리구는 토양과 액비를 3:1로 혼합하여 토양 처리구와 같은 방법으로 처리하였다. 사전 실험을 통해 polypropylene box (Locknlock)의 수분손실이 거의 일어나지 않는 것을 확인하였고, 토양 처리구는 20% 수분함량, 액비와 토양 혼합처리구는 40% 수분함량으로 실험을 하였다. 토양과 가축분 액비가 섞인 토양에 유해미생물 접종 후 수분손실을 막기 위하여 밀봉상태를 유지하면서 25°C의 incubator (VS 1203 PFC, Vision Science, Korea)에서 120일 동안 배양하면서 매주 1회씩 시료를 채취하여 생존 균수를 측정하였다. 시험에 사용한 액비와 토양의 이화학적 특성은 Table 1, 2와 같고, 액비에서 *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*는 검출되지 않았다.

**유해미생물의 분리 및 동정** *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*의 분리는 채취한 시료를 균질화한 뒤 3 g을 취해서 buffered peptone water (Difco Co., Detroit, MI, USA) 27 mL에 접종한 후 stomacher (easyMIX, AES CHEMUNEX, France)로 2분 동안 균질화하였다. 균질화 된 시료는 buffered

**Table 1. Chemical properties of the liquid manure used in the experiment.**

pH	EC (dS m <sup>-1</sup> )	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> %	T-K <sub>2</sub> O
9.3	12.53	0.25	0.12	0.27

**Table 2. Chemical properties of the soil used in this study.**

pH (1:5)	OM (g·kg <sup>-1</sup> )	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg·kg <sup>-1</sup> )	Exch.(cmol(+) kg <sup>-1</sup> )				NH <sub>4</sub> (mg·kg <sup>-1</sup> )	T-N (%)
			K	Ca	Mg	Na		
6.4	14	181	0.22	6.6	2.4	0.1	10	0.11

peptone water (Difco)를 이용하여 10배씩 연속 희석하였다. *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*의 정량적 분석을 위해서 앞에서 준비한 시료 1 mL를 각각의 선택배지위에 도말하여 37°C에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 각 배지 위에 형성된 colony를 계수하여 colony forming unit (CFU) g<sup>-1</sup>으로 나타내었다. 의심집락은 세균부유액과 반응한 산물의 색변화로 판단하는 API test (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), 항원항체의 응집반응결과로 판단하는 Latex test (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) 또는 PCR을 수행하여 동정하였다.

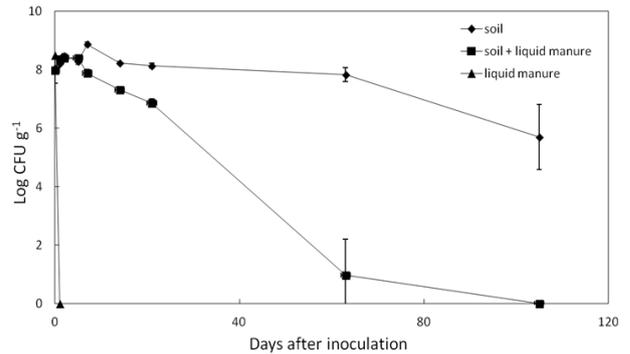
**DRT 측정식** 미생물이 90% 사멸하는 데 걸리는 시간인 decimal reduction time (DRT) 값은 다음과 같은 식에 적용하여 계산하였다 (Himathongkham et al., 1999). Regression equation은 Microsoft Excel 프로그램을 이용하여 구하였다.

$$DRT = -\log(N_0/N) / t$$

$N_0$ : 미생물의 초기밀도,  $N$ : 미생물의 최종밀도,  $t$ : 시간

## Results and Discussion

**가축분 액비와 토양에서 *S. enterica*의 생존변화** Fig. 1은 *S. enterica*를 토양, 가축분 액비가 섞인 토양, 가축분 액비에 접종하였을 때 생존 양상을 보여주고 있다. 가축분 액비에 접종하였을 때 *S. enterica*가 며칠 이내로 사멸하였으며 토양에 접종한 *S. enterica*는 가장 오래 생존하였다. *S. enterica*의 생존기간은 토양보다 액비를 혼합한 토양에서 짧았는데, 이는 액비가 있는 토양이 수분함량이 많은 조건이므로 *S. enterica*가 오래 생존하기가 어려웠다고 생각한다. 병원성 미생물인 *Salmonella*는 가축분뇨에 존재할 수 있고 토양에서 160~200일까지 생존할 수 있으며 (Holley et al., 2006), 가축분 액비가 비료로 사용될 때 액비에 존재하는 병원균은 토양에 장기간 생존할 수 있으므로 토양을 통



**Fig. 1. *S. enterica* survival in soil, liquid manure amended soil, and liquid manure at 25°C (n=9, error bars=SD).**

하여 작물로 옮겨질 수 있다. 가축분 액비에 *S. enterica*가 빨리 사멸하는 이유는 액비의 pH가 9.3으로 세균이 생존하기 어려운 강염기성 상태이기 때문으로 생각한다. Tyrrel and Quinton (2003)은 pH가 높으면 병원성 미생물은 빨리 사멸한다고 보고하였다. *Salmonella* spp.는 돈분 슬러리에서 8°C에서 14일, 20°C에서 8일, 37°C에서 8일 미만 생존할 수 있다고 보고하였는데 (Mitscherlich and Marth, 1984), 가축분 액비에서 빨리 사멸하는 본 실험결과와 비슷한 경향이 있었다. 토양에서 0~100일까지는 서서히 감소하였으며 감소폭이 낮았다. 가축분 액비가 섞인 토양에서 0~20일까지는 서서히 감소하였으나 그 이후로는 급격히 감소하여 100일 정도에는 모두 사멸하였다. *S. enterica*의 DRT 값은 토양에서 44.8일, 가축분 액비가 섞인 토양에서 11.2일, 가축분 액비에서 0.1일이었다 (Table 3).

**가축분 액비와 토양에서 *E. coli* O157:H7의 생존변화** 토양, 가축분 액비가 섞인 토양, 가축분 액비에 *E. coli* O157:H7를 접종하였을 때 생존 변화 양상을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 토양에 접종한 *E. coli* O157:H7는 가장 오래 생존하였고 가축분 액비에 접종한 *E. coli* O157:H7은 며칠 이내로 가장 빨리 사멸하였다. *E. coli* O157:H7는 25°C 토

**Table 3. Decimal reduction time (DRT) for *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes* in soil, liquid manure amended soil, and liquid manure at 25°C.**

Pathogens	Treatment	Regression equation	R <sup>2</sup>	DRT (days)
<i>S. enterica</i>	Soil	Log <sub>10</sub> A = -0.0223t + 8.5095	0.79	44.8
	Soil+liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -0.0891t + 8.396	0.94	11.2
	Liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -8.4818t + 8.4818	0.94	0.1
<i>E. coli</i> O157:H7	Soil	Log <sub>10</sub> A = -0.021t + 9.0525	0.79	47.6
	Soil+liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -0.0921t + 9.2715	0.97	10.8
	Liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -1.9505t + 9.1664	0.83	0.5
<i>L. monocytogenes</i>	Soil	Log <sub>10</sub> A = -0.0672t + 8.0657	0.81	14.8
	Soil+liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -0.0772t + 7.4778	0.92	12.9
	Liquid manure	Log <sub>10</sub> A = -1.552t + 7.3999	0.95	0.6

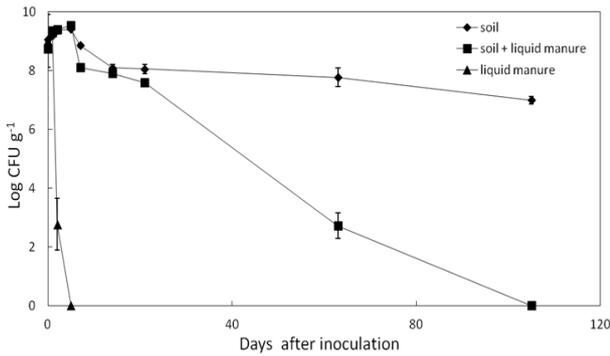


Fig. 2. *E. coli* O157:H7 survival in soil, liquid manure amended soil, and liquid manure at 25°C (n=9, error bars=SD).

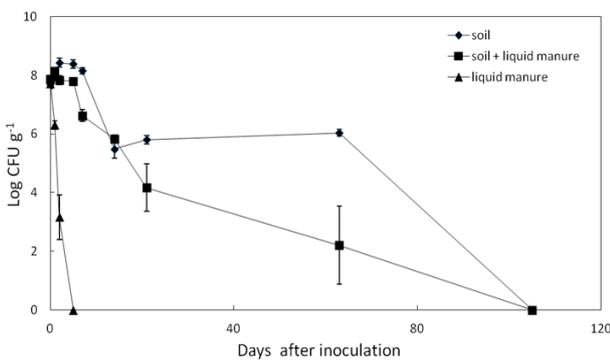


Fig. 3. *L. monocytogenes* survival in soil, liquid manure amended soil, and liquid manure at 25°C (n=9, error bars=SD).

양에서 최소 8주 동안 생존할 수 있으며 (Mubiru et al., 2000), 가축분 퇴비에서 4개월 동안 생존할 수 있으며 (Kudva et al., 1998), 토양에서는 130일 동안 생존할 수 있다고 보고 하였는데 (Maule, 2000), 본 결과에서도 토양에서 3개월 이상 생존할 수 있었다. 가축분 액비가 섞인 토양에서의 *E. coli* O157:H7 사멸속도는 토양에서의 사멸속도보다 빠른 결과를 보였으며 20~60일 사이에 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 높은 수분함량이 *E. coli* O157:H7의 생존에 불리한 환경조건이기 때문으로 생각한다. 0~20일까지는 토양과 가축분 액비가 포함된 토양의 *E. coli* O157:H7 생존차이가 거의 없었지만 20일 이후부터 사멸속도의 차이가 크게 나타났다. 이는 가축분 액비가 *E. coli* O157:H7의 생존에 큰 영향을 미친다고 판단한다. 병원균이 접종된 토양에서 *E. coli* O157:H7와 *Salmonella* spp.가 3일 동안 증가했다는 보고가 있는데 (Himathongkham et al., 1999), 본 결과에서도 0~7일 사이에 토양과 가축분 액비가 포함된 토양에서 *E. coli* O157:H7가 조금 증가하는 경향을 볼 수 있다. 그러므로 농작물 재배환경에서 *E. coli* O157:H7가 오염이 되었을 때 증식할 가능성이 있으므로 위생관리상 각별한 주의가 필요하다. *E. coli* O157:H7의 DRT 값은 토양에서 47.6일, 가축분 액비가 섞인 토양에서 10.8일, 가축분 액비에서 0.5일이었다 (Table 3).

### 가축분 액비와 토양에서 *L. monocytogenes*의 생존변화

Fig. 3은 토양, 가축분 액비가 섞인 토양, 가축분 액비 내 *L. monocytogenes*의 생존변화를 나타낸 것이다. 토양, 가축분 액비가 섞인 토양에서 *L. monocytogenes*는 오래 생존하였고, 가축분 액비에서 가장 빨리 사멸하였다. 토양에서 0~7일까지는 약간 증가하였으며 7~15일까지 급격히 감소하였다. 15~70일까지는 일정한 수준을 유지하다가 100일 정도에 모두 사멸하였다. 가축분 액비가 섞인 토양에서는 0~20일까지는 급격히 감소하다가 그 이후로 서서히 감소하여 100일 정도에 모두 사멸하는 경향을 보였다. 액비를 처리하지 않은 토양에서 *L. monocytogenes*는 *S. enterica*와 *E. coli* O157:H7보다 생존기간이 짧았는데 생존능력이 두 균보다 낮다는 결과를 알 수 있었고, Jung et al. (2013)은 가축분 퇴비에서 *L. monocytogenes*가 *S. enterica*보다 생존기간이 짧다고 하였다. *L. monocytogenes*의 DRT 값은 토양에서 14.8일, 가축분 액비가 섞인 토양에서 12.9일, 가축분 액비에서 0.6일이었다 (Table 3). *L. monocytogenes*의 토양에서 DRT 값은 *S. enterica*와 *E. coli* O157:H7의 토양에서 DRT 값보다 많이 낮았는데 이는 그람 음성균 (*S. enterica*, *E. coli* O157:H7)과 그람 양성균 (*L. monocytogenes*)의 차이 때문이라고 생각한다.

### Conclusions

본 연구는 국내에서 유통되는 가축분 액비를 대상으로 병원성 미생물 (*S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*)의 생존능 및 생존기간을 조사하고 농산물의 안전성을 확보하기 위하여 안전한 가축분 액비의 생산과 이용에 도움을 주고자 수행하였다. 국내 유통되는 가축분 액비와 토양에 *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*를 접종하여 생존 변화양상을 조사한 결과, 토양, 가축분 액비가 섞인 토양, 가축분 액비에 따라서 다른 경향을 나타내었는데 토양에서 가장 오래 생존하였고, 액비에서 가장 빨리 사멸하였다. 가축분 액비가 섞인 토양에서는 2개월 이상 생존할 수 있으므로 위생관리상 병원성 미생물에 오염되지 않도록 각별한 주의가 필요하다. 병원성 미생물 중에서 *L. monocytogenes*가 *S. enterica*와 *E. coli* O157:H7보다 빨리 사멸하는 결과를 보였다. 액비화 과정에 충분한 부숙기간을 거치면 병원성 미생물이 모두 사멸될 수 있다. 우리나라는 가축분 액비 생산과정에서 부숙온도와 부숙기간의 기준이 없는데, 미생물학적으로 안전한 액비를 생산하기 위해서는 부숙온도와 부숙기간의 설정이 반드시 필요하다고 생각한다.

### References

Bolton, D.J., C. Ivory, and D.A. McDowell. 2012. The effect of

- urea and ammonia treatments on the survival of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in pig slurry. *J. Appl. Microbiol.* 114:134-140.
- Brinton, W.F., P. Storms, 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.
- Burnett, S.L. and L.R. Beuchat. 2001. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27:104-110.
- Himathongkham, S., S. Bahari, H. Riemann, and D. Cliver. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *REMS Microbiol. Lett.* 178:251-257.
- Holley, R.A., K.M. Arrus, K.H. Ominski, M. Tenuta, and G. Blank. 2006. *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *J. Environ. Qual.* 35:1170-1180.
- Jung, K.S., S.G. Heu, E.J. Roh, M.H. Kim, H.J. Gil, N.Y. Choi, D.H. Lee, J.A. Lim, J.G. Ryu, and K.H. Kim. 2013. Survival of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in chicken and pig manure compost. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 46:469-473.
- Kudva, I.T., K. Blanch, and C.J. Hovde. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3166-3174.
- Maule, A. 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in soil, water and on surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 88:71-78.
- Mitscherlich, E. and E.H. Marth. 1984. *Microbial survival in the environment.* Springer-Verlag, New York.
- Mubiru, D.N., M.S. Coyne, and J.H. Grove. 2000. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. *J. Environ. Qual.* 29:1821-1825.
- Roberts, D., G.N. Watson, and R.T. Gilbert. 1982. Contamination of food plants and plant products with bacteria of public health significance. p. 169-195. In: Rhodes-Roberts, M., Skinner, F.A. (ed.). *Bacteria and Plants.* Academic Press, London.
- Solomon E.B., S. Yaron, and K.R. Matthews. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:397-400.
- Tyrrel, S.F., and J.N. Quinton. 2003. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *J. Appl. Microbiol.* 94:87-93.