

시금치로부터 병원성세균의 분리 및 동정

김혜정 · 김영훈¹ · 이동선 · 백현동*

경남대학교 생명과학부, ¹경남보건환경연구원

Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria from Spinach

Hye-Jung Kim, Young-Hoon Kim¹, Dong-Sun Lee and Hyun-Dong Paik*

Division of Life Sciences, Kyungnam University

¹Gyeongsangnam-do Provincial Government Institute of Health and Environment

Raw and washed spinaches were tested to evaluate the incidences of *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* O157:H7, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. Four pathogenic bacteria were isolated from spinach samples, and identified by morphological and biochemical methods, including API and ATB identification systems. Isolates from MacConkey, Cereus Selective, Clostridium Perfringens, and Baird-Parker agar media were in 99.9, 99.8, 99.9, and 97.8% agreements with *A. hydrophila*, *B. cereus*, *C. perfringens*, and *S. aureus* at the species level, respectively. SET-RPLA revealed, among the five strains of *S. aureus* isolates, two produced type A enterotoxin. All five strains of *B. cereus* isolates produced enterotoxin as revealed with CRET-RPLA.

Key words: spinach, pathogenic microorganism, identification, enterotoxin, RPLA

서 론

고도의 산업화는 국민의 생활수준을 향상시켰을 뿐만 아니라 여성의 사회진출 기회가 확대되면서 식생활에 대한 가치관의 변화를 가져왔다. 따라서 이전의 가정식 위주의 식단에서 단채식 및 외식의 비중이 점차 증가하고, 반가공 조리되어 포장된 식자재를 이용한 조리가 증가하는 추세를 보이고 있다. 이러한 반가공 조리된 포장 식자재의 사용은 가정에서는 조리시간을 줄이면서도 우수한 품질의 식사를 제공해줄 수 있고, 외식업체나 급식업소에서는 노동의 효율적인 사용과 절감, 효율적인 에너지 사용, 원가 절감 등의 이점을 얻을 수 있다. 유럽의 여러 나라를 비롯한 서구에서는 오랫동안 cook-chill system을 이용한 식자재 가공 및 포장 방법이 연구되어 왔으며, 식품 유통에서의 체계적인 운영방식을 활용해 오고 있는 반면, 식생활 문화가 다른 동양권에서는 그 도입이 비교적 최근에 시도되고 있다^(1,4).

Cook-chill 제품들은 일반적으로 포장한 후에 저온 살균하는 공정과 함께 냉장 온도에서 저장하는 가공 방법으로, 저

온 살균과 포장내에 산소농도를 낮게 유지시킴에 따라 산화반응을 억제하고 우수한 관능적 품질을 유지할 수 있는 반면, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* 등과 같은 포자형성균은 열처리를 통해서 사멸되지 않기 때문에 식품의 안전성에 위협이 되고 있다^(5,6). 또한 열처리 후 포장 과정 중에 미생물의 2차 오염이 될 수 있는데 이 중에서 *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* 등과 같은 저온성세균이 문제시 된다⁽⁶⁾.

따라서 본 연구에서는 열에 민감한 채소로서 소비량이 많은 시금치에 대해서, 원료 시금치와 수세한 시금치의 미생물학적 품질을 측정하기 위하여 병원성세균을 분리하고, 분리된 병원성세균의 생화학적 특성 및 독소 생성능을 측정하여 원료 시금치의 잠정적 위해를 조사함으로써 cook-chill 가공 공정시 위생적으로 공급할 수 있는 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시금치 재료

부산의 시장에서 상품의 시금치(*Spinacia oleracea* L.)를 구입하여 냉장상태로 (<7°C) 운반하여 24시간 이내에 병원성세균의 분리 실험에 사용하였다.

병원성세균 분리

시금치 25 g을 무균적으로 취하여 0.1% 멸균 펩톤수

*Corresponding author: Hyun-Dong Paik, Division of Life Sciences, Kyungnam University, 449 Wolyoung-dong, Masan 631-701, Korea

Tel: 82-55-249-2689

Fax: 82-55-249-2995

E-mail: hdpaiik@kyungnam.ac.kr

225 mL를 가하여 10,000 rpm에서 2분 동안 균질화(model AM-10, Nihonseiki Kaisha, Tokyo, Japan)하여 검액으로 사용하였다. *Salmonella*는 Selenite F broth(Difco, USA)와 Rapaport-Vassiliadis R10 broth(Difco)를 사용하여 35°C에서 24시간 중균배양하여 Hektoen Enteric agar (Difco)와 SS agar (Difco) 선택배지에 희선도말하여 35°C에서 24~48시간 배양하였다. *Shigella* spp.와 *Yersinia enterocolitica*는 BAM⁽⁷⁾의 방법에 따라 실험하였고, *A. hydrophila*와 *Plesiomonas shigelloides*는 alkaline peptone water(pH 8.6, Difco)를 사용하여 30°C에서 24시간 중균배양하여 MacConkey agar(Difco, USA)에 희선도말하여 30°C에서 24시간 배양하였다. *Escherichia coli* O157:H7는 Noboviocin을 첨가한 modified EC medium에 접종하여 35°C와 43°C에서 24시간 배양하여 MacConkey Sorbitol agar와 Fluorocult *E. coli* O157:H7 agar(Merck, Germany)에서 희선도말하여 35°C에서 24시간 배양하였다.

B. cereus, *Campylobacter jejuni* 및 *L. monocytogenes*는 BAM⁽⁷⁾의 방법으로 실험하였고, *Clostridium perfringens*는 시금치 25 g을 무균적으로 취하여 젤라틴 용액 225 mL를 가하여 균질화한 후 Cooked meat medium(Difco, USA)에 접종하여 35°C에서 24시간 중균배양하였다. 난황 첨가 Clostridium Perfringens agar(heart infusion 5 g, casein peptone 10 g, proteose peptone 10 g, sodium chloride 5 g, lactose 10 g, phenol red 50 mg, agar 20 g, distilled water 1000 mL, final pH 7.6)에 희선 도밀하여 100% 질소로 치환한 BBL anaerobic jar (Difco, USA)에서 35°C, 24~48시간 배양하였다. *Staphylococcus aureus*는 8.5% sodium chloride를 첨가한 Tryptic Soy broth (Difco, USA)를 사용하여 35°C에서 24시간 중균배양하여 egg yolk 첨가한 Mannitol Salt agar(Difco, USA)와 EY Tellurite Enrichment를 첨가한 Baird-Parker agar(Difco, USA)에 희선도밀하여 35°C에서 24~48시간 배양하였다.

병원성세균의 동정

*A. hydrophila*는 MacConkey Agar에서 lactose 음성, oxidase 양성의 전형적인 접락을 선택하여 KIA slant agar(Difco)와 MIL medium(Difco)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하고, 그람염색을 실시하여 전형적인 균주는 API ID32E kit(bioMerieux, France)를 이용하여 동정하였다.

*B. cereus*는 Cereus Selective agar(Merck, Germany)에서 mannitol을 분해하지 않고 lecithinase를 생성하는 전형적인 분홍색 접락을 선별한 후 그람염색을 실시하여 포자를 갖는 그람 양성 간균으로 확인된 균은 API 50CHB(bioMerieux)와 API 20E kit(bioMerieux)를 이용하여 동정하였다.

*C. perfringens*는 mannitol을 분해하고 lecithin을 분해하는 전형적인 유황색 접락을 선택하여 호기성 비발육 시험, catalase 시험, 그람염색을 실시하여 전형적인 접락은 API 20A kit(bioMerieux)를 이용하여 동정하였다.

*S. aureus*는 mannitol을 분해하고 lecithin을 분해하는 전형적인 접락을 선택하여 clumping factor, coagulase, catalase 시험을 하고, 그람염색을 실시하여 전형적인 접락은 API Staph kit(bioMerieux)를 이용하여 동정하였다.

모든 분리 균주는 API kit와 ATB automated identification system(bioMerieux)을 사용하여 Bergey's Manual of System-

atic Bacteriology⁽⁸⁻¹⁰⁾에 기술된 일반적인 방법에 준하여 동정하였다.

독소 확인 시험

*B. cereus*의 enterotoxin 생성능은 reversed passive latex agglutination test kit(CRET-RPLA, Denka Seiken, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였고, *S. aureus*는 SET-RPLA(Denka Seiken)를 사용하였으며 제조회사의 사용설명서에 따라 enterotoxin을 확인하였다. Enterotoxin을 측정하기 위하여 *B. cereus*는 Brain Heart Infusion broth(BHI, Difco) 배지에 32°C에서 6시간 진탕배양(rotary shaker, 110 rev/min, Dongil Scientific Instrument MFG, Co., Korea)하고, *S. aureus*는 37°C에서 24시간 진탕배양하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(model MICRO 17R; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea)하여 상동액을 취하여 enterotoxin 생성능 시험에 사용하였다.

결과 및 고찰

병원성세균의 분리 및 동정

시금치를 포함한 대부분의 야채는 물을 함유하고 있으므로 미생물이 증식하기에 적당하기 때문에 실제로 많은 병원성세균이 샐러드 야채에서 많은 범위로 분리되었다⁽¹¹⁾. 따라서 본 연구에서는 식료품과 cook-chill 제품의 미생물학적 품질을 평가하고, 대량 생산으로 집단 식중독을 일으킬 수 있는 cook-chill 제품에 대한 식중독균에 대한 안전성을 확보하기 위하여 원료 시금치와 수세한 시금치에 대해 식중독 원인균의 분포를 조사하였다.

*A. hydrophila*는 수세한 시금치에서만 분리되었고, 원료 시금치에서는 분리되지 않았으며, 이것은 수세 중 사용된 지하수에서 오염된 것으로 사료된다. 분리 균주는 그람 음성 간균으로 lactose 음성, sucrose 양성, glucose를 분해하여 산과 gas를 생성하고, oxidase 양성, lysine과 ornithine decarboxylase 음성, arginine dihydrolase와 NO₂ 생성 양성으로 ATP system에서 *A. hydrophila*의 종에 대해 99.9% 상동성을 보였다(Table 1). *A. hydrophila*는 그람 음성 수인성 병원성균으로 담수, 해수, 염소처리한 물, 오염된 물에서 분리되었고, 야스파라거스, 브로콜리, 양배추, 각종 샐러드와 야채와 같은 농산물 제품으로부터 분리되었다⁽¹²⁻¹⁷⁾.

포자를 형성하는 *B. cereus*균은 원료 시금치와 수세한 시금치에서 분리되었다. 분리 균주는 그람 양성 포자형성균으로 mannitol 음성, lecithinase 양성균으로 Simmon's citrate 음성, NO₂ 생성, glucose, fructose, mannose, starch를 분해하고 lysine과 ornithine decarboxylase 음성, arginine dihydrolase 양성으로 ATP system에서 *B. cereus*종에 대해 99.8% 상동성을 보였다(Table 2). *Bacillus cereus*는 전세계적으로 자연에 널리 분포되어 있기 때문에 중요한 식중독균이며, cook-chill 야채 식품에서 지배적인 호기성균으로 보고되었다⁽¹⁸⁾. Fang 등은 155개의 곡류 제품에서 *B. cereus*가 인스탄트 곡류와 곡류 혼합물에서 겹출율이 각각 26%, 38%이라고 보고하였고, 320개의 야채에서 *B. cereus*를 3.4% 분리하였고, 콩, 곡류, Komjac에서 각각 5.1%, 9.5%, 2.4% 분리되었다^(19,20). Choma 등⁽²¹⁾은 cook-chill 가공한 직후의 야채 퓨레의 20%에

Table 1. Characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from washed spinach using MacConkey agar

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Gram stain	- ¹⁾	β -Glucuronidase	-
Shape	Rod	Malonate	-
Gas from glucose	+ ²⁾	Indole	-
Motility	+	N-Acetyl- β -glucosaminidase	-
Hydrogen sulfide	-	β -Galactosidase	-
Ornithine decarboxylase	-	Glucose	+
Arginine dihydrolase	+	Saccharose	+
Lysin decarboxylase	-	L-Arabinose	+
Urease	-	D-Arabitol	-
L-Arabinol	-	α -Glucosidase	-
Galacturonate	-	α -Galactosidase	-
5-Ketogluconate	-	Trehalose	+
Lipase	+	Rhamnose	-
Phenol red	+	Inositol	-
β -Glucosidase	+	Cellobiose	+
Mannitol	+	Sorbitol	-
Maltose	+	α -Maltosidase	+
Adonitol	-	L-Aspartic acid arylamidase	-
Palatinose	-		

¹⁾-: negative, ²⁾+: positive.

서 *B. cereus*를 분리하였으며 10°C와 20°C에서 저장한 cook-chill 제품에서는 *B. cereus*가 계속 증식하였으나 4°C에서 저장한 제품은 검출되지 않았다고 보고하였다. Valero 등⁽²²⁾은 저온성 *B. cereus*가 5°C에서 증식한다고 보고하였다. 따라서 cook-chill 제품에서 *B. cereus*의 증식을 억제하기 위해서는 3°C 이하의 냉장 저장으로 *B. cereus*에 의한 식중독 사건을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.

*C. perfringens*는 원료 시금치와 수세한 시금치에서 분리되었으며 이들 균주들은 그람 양성 간균으로 포자를 형성하며 mannitol을 분해하고 lecithinase를 생성하였다. 그리고 catalase 음성, 호기성 조건에서 비발육하였으며, lactose, mannose, saccharose, maltose, trehalose를 분해하며, *C. perfringens* 종에 대해 99.9%의 상동성을 보였다(Table 3). *C. perfringens*는 토양, 물, 육류, 가금류와 같은 식품, 그리고 동물의 장관 등에 널리 분포되어 있으며, 열에 내성인 포자를 형성하고 비교적 높은 온도에서 매우 빠른 속도로 증식하는 특징 때문에 소매에 판매되는 식품의 조작에서 부적절한 냉각이 *C. perfringens*에 의한 식중독의 주요한 원인이다⁽²³⁾. Gillespie 등은 ready-to-eat 제품에서 *C. perfringens*를 검출하였다고 보고하였으며⁽²⁴⁾, Juneja 등은 *C. perfringens*를 접종한 cook-chill 제품에서 15시간 이상의 냉각이 *C. perfringens*의 증식을 억제한다고 보고하였다⁽²⁵⁾.

E. coli O157:H7는 소의 장관에 존재하는 균으로 *E. coli* O157:H7균이 원인인 식중독 사건의 약 6%가 야채와 샐러드에 의해 발생되는 것으로 알려져 있으나⁽¹¹⁾, Soriano 등⁽²⁶⁾의 연구결과와 같이 본 연구에서는 분리되지 않았다.

*L. monocytogenes*는 냉장 온도에서 증식할 수 있으며 분변, 하수, 거름 등에서 분리되며 원료 야채에서 광범위하게 분리된다. *L. monocytogenes*는 원료 및 가공 야채에서 광범위하게 분리되었으며^(11,27,28), Arumugaswamy 등⁽²⁹⁾은 엽경류에서

4%의 비율로 분리하였고, 콩나물에서 20%의 비율로 분리하였으나 본 연구에서는 분리되지 않았다.

*Salmonella*는 가장 빈번히 보고되는 식중독 균 중의 하나로 이집트에서는 야채와 샐러드에서는 *Salmonella* spp.를 분리하였고 스페인에서는 필드와 판매되고 있는 야채에서 7.5% 분리하였다⁽¹¹⁾. 그러나 본 연구에서는 Siriano 등⁽²⁶⁾과 같이 원료 시금치와 수세한 시금치에서 분리되지 않았다.

식품 및 식품의 제조, 사람, 기구, 기계 등의 조리환경에 의한 2차 오염의 가능성⁽⁵⁾이 있는 *S. aureus*는 원료 시금치와 수세한 시금치에서는 분리되었다. 분리된 *S. aureus*는 mannitol을 분해하고 lecithinase를 생성하는 그람 양성 구균으로 catalase, coagulase, hemolysin 및 lactose 양성, xylose 음성으로 ATB system에서 *S. aureus* 종에 대해 97.8% 상동성을 보았다(Table 4). Fang 등⁽²⁰⁾은 320개의 야채에서 *S. aureus*를 28.1% 분리하였고 Siriano 등⁽²⁶⁾은 원료 상추에서 2.5% 분리하였음을 보고한 바 있다.

*Y. enterocolitica*는 장관, 새, 물고기, 수중 환경 등에 광범위하게 분포되어 있으며, Nortje 등⁽³⁰⁾은 남아프리카에서 생성되는 원료육과 가공 식육에서 *Y. enterocolitica*를 다수 분리하였으나 본 연구에서는 Siriano 등⁽²⁶⁾의 보고와 같이 분리되지 않았다. 그 외의 식중독의 원인균인 *Shigella* spp., *P. shigelloides*, *P. aeruginosa* 등은 시금치에서 분리되지 않았다.

*A. hydrophila*는 냉장온도에서 성장할 수 있으며, 식품 가공 장의 습기 있는 부분에 존재할 수 있기 때문에 cook-chill 제품의 2차오염의 가능성이 있다⁽⁶⁾. Cook-chill 제품에서 *Aeromonas*의 증식에 의한 식중독은 3°C 이하에서 28일 이하로 저장하고, 섭취하기 전에 적당한 재가열에 의하여 줄일 수 있다⁽⁶⁾.

본 연구를 통해 검출된 *A. hydrophila*, *B. cereus*, *C. perfringens* 및 *S. aureus*와 같은 병원성세균들의 존재는 소비자에게 잠정적 위해로 존재한다. 원료 시금치에 병원균이 존재

Table 2. Characteristics of *Bacillus cereus* isolated from raw spinach using Cereus Selective agar

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Gram stain	+ ¹⁾	Cellobiose	+
Shape	rod	Maltose	+
Spore formation	+	Lactose	-
Cell diameter>1.0 μm	+	Melibiose	-
Sporangium swollen	- ²⁾	Saccharose	-
Spore shape	ellipsoidal	Trehalose	-
Spore position	central	Inulin	+
Catalase	+	Melezitose	-
Anaerobic growth	+	Raffinose	-
Egg-yolk lecithinase	+	Starch	+
Glycerol	+	Glycogen	+
Erythritol	-	Xylitol	-
D-Arabinose	-	Gentibiose	-
L-Arabinose	-	D-Turanose	-
Ribose	+	D-Lyxose	-
D-Xylose	-	D-Tagatose	-
L-Xylose	-	D-Fucose	-
Adonitol	-	L-Fucose	-
β-Methyl-D-xyloside	-	D-Arabitol	-
Galactose	-	L-Arabitol	-
D-Glucose	+	Gluconate	-
D-Fructose	+	2-Keto gluconate	-
D-Mannose	+	5-Keto gluconate	-
L-Sorbose	-	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	-
Rhamnose	-	Arginine	+
Dulcitol	-	Lysine	-
Inositol	-	Ornithine	-
Mannitol	-	Simmon's citrate	-
Sorbitol	-	Hydrogen sulfate	-
α-Methyl-D-mannoside	-	Urea	-
α-Methyl-D-glucoside	-	Tryptophane	-
N-Acetyl glucosamine	+	Indole	-
Amygdalin	+	Voges-Proskauer	-
Arbutin	+	Kohn's gelatin	+
Esculin	+	NO ₂ production	+
Salicin	+		

¹⁾+: positive, ²⁾⁻: negative.

한다면 일반적인 수세 과정으로 완전히 제거될 수는 없으며 열처리에 의해 병원성균을 제거하거나 감소시킬 수 있다. 그러나 *C. botulinum*, *C. perfringens*, *B. cereus* 등과 같은 포자 형성균은 열처리를 통해서 사멸되지 않기 때문에 식품의 안전성에 위협이 되고 있다⁽⁶⁾. 따라서 시금치 원료로 하는 cook-chill 제품에서 포자 형성하는 *B. cereus*와 *C. perfringens*의 증식을 예방하기 위해서는 원료 세척단계에서 살균할 수 있는 방법(예, 오존수, 전해수 처리 등)이 강구되어야 하며, cook-chill 방법의 개선, 충분한 냉각, 5°C 이하의 냉장 저장, nisin과 같은 천연 보존제의 첨가 등의 다양한 방안의 모색과 시도가 필요한 것으로 생각된다.

Enterotoxin 생성

원료 시금치와 수세한 시금치에서 분리된 *S. aureus* 5균주

중에서 2균주는 enterotoxin A를 생성하였고 나머지 3균주는 enterotoxin을 생성하지 않았으며, 5종의 분리균주에서는 enterotoxin B, C, D가 검출되지 않았다. 원료 시금치에서 분리한 *B. cereus* 5균주는 모두 enterotoxin을 생성하였다. *S. aureus* enterotoxin A(SEA)는 다른 독소에 비해 가장 빈번하게 생성되는 독신이다. Fang 등은 320개의 야채에서 분리한 *S. aureus* 38균주에서 17균주가 enterotoxin A, B, C, D를 생성하였고, *B. cereus*는 7균주 중 1균주가 설사성 독소를 생성하였다고 보고하였다⁽²⁰⁾. Beattie 등은 저온성 *B. cereus*의 91% 가 cytotoxin을 생성하고 BCET-RPLA와 ELISA immunoassay에서 각각 51%와 85%가 독소를 생산하는 것을 확인하였다고 보고한 바 있다⁽³¹⁾.

Table 3. Characteristics of *Clostridium perfringens* isolated from raw spinach using Clostridium Perfringens agar

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Gram stain	+	Xylose	- ²⁾
Shape	Rod	Arabinose	-
Spore formation	+	Gelatin	+
Catalase	-	Esculin	-
Tryptophane	-	Glycerol	-
Urease	-	Cellobiose	-
Glucose	+	Mannose	+
Mannitol	-	Melezitose	-
Lactose	+	Raffinose	-
Saccharose	+	Sorbitol	-
Maltose	+	Rhamnose	-
Salicin	-	Trehalose	+
Aerobic growth	+	Egg-yolk lecithinase	+
Anaerobic growth	-		

¹⁾+: positive, ²⁾⁻: negative.**Table 4. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from raw spinach using Baird-Parker agar**

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Gram stain	+	Acid(aerobically) from	
Shape	irregular clusters	D-Glucose	+
Colony pigment (carotenoid)	+	D-Fructose	+
Egg-yolk Lecithinase	+	D-Mannose	+
Catalase	+	Maltose	+
Aerobic growth	+	Lactose	+
Anaerobic growth	+	D-Trehalose	+
Growth on NaCl agar		D-Mannitol	+
10%(w/v)	+	Xylitol	-
15%(w/v)	+	D-Melibiose	-
Growth at		Raffinose	-
15°C	+	Xylose	-
45°C	+	Sucrose	+
Cytochrome C (oxidase test)	- ²⁾	Potassium nitrate	+
Coagulase	+	β-Naphthyl-acid phosphate	+
Hemolysis	+	Sodium pyruvate	+
Clumping factor	+	α-Methyl-D-glucoside	-
Deoxyribonuclease	+	N-Acetyl-glucosamine	+
Urease	+	Arginine	+

¹⁾+: positive, ²⁾⁻: negative.

요 약

Cook-chill 제품의 원료로 사용하는 시금치와 수세한 시금치에 대해 *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* O157:H7, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 등 12종류의 병원성세균의 존재 여부를 확인하였다. 이를 시금치로부터 4종의 병원성세균을 분리하여 API kit와 ATB 자동 동정기를 포함한 형태학적 및 생화학적 방법에 의해 동정하였다. MacConkey agar에서 분리된 균은 그람 음성 간균으로 glucose를 이용하여 gas를 생성하며, lactose 음성, sucrose 양성, lysine 양성으

로 ATP system에서 *A. hydrophila* 종에 대해 99.9%의 상동성을 보였다. Cereus Selective agar에서 분리된 균은 그람 양성 간균, 포자 형성균으로 catalase 양성, mannitol 음성, lecithinase 양성, Simmon's citrate 음성, NO₂ 생성 양성, arginine 양성균으로 ATB system에서 *B. cereus* 종에 대해 99.8%의 상동성을 보였다. Clostridium Perfringens agar에서 분리된 균은 그람 양성 간균, 혐기성균으로 포자를 형성하며, mannitol 양성, lecithinase 양성으로 ATB system에서 *C. perfringens* 종에 대해 99.9%의 상동성을 보였다. Baird-Parker agar에서 분리된 균주는 그람 양성 구균으로 mannitol, lecithinase, lactose, clumping factor, coagulase 및 hemolysin 양성, xylose 음성으로 ATB system에서 *S. aureus* 종에 대해 97.8%의 상동성을 보였다. *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Y. enter-*

*colitica*를 포함한 다른 병원성세균은 분리되지 않았다. 시금치에서 분리한 *S. aureus* 5균주 중 2균주는 SET-RPLA kit에서 enterotoxin type A를 생성하였고 3균주는 enterotoxin을 생성하지 않았다. *B. cereus* 5균주는 CRET-RPLA kit에서 모두 enterotoxin을 생성하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Bailey, J.D. *Sous vide*: past, present and future, pp. 243-261. In: Principles of Modified-Atmosphere and *Sous Vide* Product Packaging. Farber, J.M. and Dodds, K.J. (eds.). Technomic Publishing, Lancaster, UK (1998)
2. Light, N. and Walker, A. An overview of cook-chill catering, pp. 3-22. In: Cook-chill Catering: Technology and Management. Light, N. and Walker, A. (eds.) Elsevier Applied Science, New York, USA (1990)
3. Creed, P.G. and Reeve, W. Principles and applications of *sous vide* processed foods, pp. 57-88. In: *Sous Vide* and Cook-Chill Processing for the Food Industry. Ghazala, S. (ed.), Aspen Publishers, Gaithersburg, USA (1998)
4. Kim, G.-T., Koo, K.-M., Paik, H.-D., Lyu, E.-S. and Lee, D.-S. Processing and storage of spinach products using cook-chill and sous vide methods. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 1095-1101 (2001)
5. Creed, P.G. Sensory and nutritional aspects of sous vide processed foods, pp. 190-205. In: *Sous Vide* and Cook-Chill Processing for the Food Industry. Ghazala, S. (ed.), Aspen Publishers, Gaithersburg, USA (1998)
6. Caterine, J.M. and Elizabeth, A.S. Microbiological safety aspects of cook-chill foods, pp. 311-336. In: *Sous Vide* and Cook-Chill Processing for the Food Industry. Ghazala, S. (ed.) Aspen Publishers, Gaithersburg, USA (1998)
7. George, J.J., Robert, I.M. and Ruth, B. FDA's Bacteriological Analytical Manual (2001)
8. Brenner, D.J., Farmer, J.J., Frederiksen, W. and Shewan, J.M. Vibrionaceae and other Gram-negative facultatively anaerobic rods, pp. 408-548. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Holt J.G. (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984)
9. Claus, D., Moore, L.V.H., Norris, J.R. and Willis, T. Endospore forming bacteria, pp. 1104-1207. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Holt J.G. (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984)
10. Kloos, W.E., Kocur, M., Murray, R.G.E., Pulverer, G. and Schleifer, K.H. Micrococci and allies, pp. 408-548. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Holt J.G. (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984)
11. Gillian, A.F., Christopher, T. and David, O. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Int. J. Food Sci. Technol. 34: 1-22 (1999)
12. Callister, S.M. and Agger, W.A. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. Appl. Environ. Microbiol. 53: 249-253 (1987)
13. Berrang, M.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2167-2171 (1989)
14. Marchetti, R., Casadei, M.A. and Guerzoni, M.E. Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. Italian J. Food Sci. 4: 97-108 (1992)
15. Hudson J.A. and Lacy, K.M. Incidence of motile aeromonas in New Zealand retail foods. J. Food Prot. 54: 696-699 (1991)
16. Knochel, S. and Jeppesen, C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. Int. J. Food Microbiol. 10: 317-322 (1990)
17. Garcia-Gimeno, R.M., Sanchez-Pozo, M.D., Amaro-Lopez, M.A. and Zurera-Cosano, G. Behavior of *Aeromonas hydrophila* in vegetable salads stored under modified atmosphere at 4 and 15°C. Food Microbiol. 13: 369-374 (1996)
18. Carlin, F., Guinebretiere, M.H., Choma, C., Pasqualini, R., Bracconier, A. and Nguyen-The, C. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purees. Food Microbiol. 17: 153-165 (2000)
19. Fang, T.J., Chen, C.Y. and Chen, H.H.L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* on a vegetarian food treated with nisin combined with either potassium sorbate or sodium benzoate. J. Food Safety 17: 69-87 (1997)
20. Fang, T.J., Chen, C.Y. and Kuo, W.Y. Microbiological quality and incidence of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in vegetarian food products. Food Microbiol. 16: 385-391 (1999)
21. Choma, C., Guinebretiere, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E. and Nguyen-The, C. Prevalence characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. J. Appl. Microbiol. 88: 617-625 (2000)
22. Valero, M., Leontidis, S., Fernandez, P.S., Martinez, A. and Salmeron, M.C. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. Food Microbiol. 17: 605-612 (2000)
23. Juneja, V.K., Whiting, R.C.M. and Synder, O.P. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat. Food Microbiol. 16: 335-349 (1999)
24. Gillespie, I., Little, C. and Mitchell, R. Microbiological examination of cold ready-to-eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. J. Appl. Microbiol. 88: 467-474 (2000)
25. Juneja, V.K., Synder, O.P., and Cygnarowicz-Provost, M. Influence of cooling rate on outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in cooked ground beef. J. Food Prot. 57: 1063-1067 (1994)
26. Soriano, J.M., Rico, H., Molto, J.C. and Manes, J. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and spanish potato omelette from restaurants. Food Microbiol. 18: 159-163 (2001)
27. De Simon, M., Tarrago, C. and Ferrer, M.D. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). Int. J. Food Microbiol. 16: 153-156 (1992)
28. Steinbruegge, E.G., Maxcy, R.B. and Liewen, M.B. Fate of *L. monocytogenes* on ready to serve lettuce. J. Food Prot. 51: 596-599 (1988)
29. Arumugaswamy, R.K., Rusul Rahamat Ali, G. and Nadzriah Bte Abd. Hamid, S. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. 23: 117-121 (1994)
30. Norrie, G.L., Vorster, S.M., Greebe, R.P. and Steyn, P.L. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats. Food Microbiol. 16: 213-217 (1999)
31. Beattie, S.H. and Williams, A.G. Detection of toxigenic strains *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. Lett. Appl. Microbiol. 28: 221-225 (1999)

(2002년 8월 23일 접수; 2003년 2월 3일 채택)