

서부 경남지역 토마토 농장에서 분리된 *Staphylococcus aureus*의 내독소 유전자의 특성과 항생제 감수성

김진수¹ · 이진하² · 김지훈 · 최주미 · 김세리³ · 하상도⁴ · 김근성⁴
이규호⁵ · 김민곤⁶ · 김광엽⁷ · 김철호⁸ · 정덕화*

경상대학교 응용생명과학부, ¹부산식품의약품안전청, ²강원대학교 바이오산업공학부,
³농촌진흥청 작물과학원 영남농업연구소, ⁴중앙대학교 식품공학과, ⁵한국외국어대학교 환경학과,
⁶한국생명공학연구원, ⁷충북대학교 식품공학과, ⁸동국대학교 한의과대학

Characteristics of Enterotoxigenic genes and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Tomato Farms in Western Gyeongnam

Jin-Soo Kim¹, Jin-Ha Lee², Ji-Hun Kim, Ju-Mi Choi, Se-Ri Kim³, Sang-Do Ha⁴, Keun-Sung Kim⁴,
Kyu-Ho Lee⁵, Min-Gon Kim⁶, Kwang-Yup Kim⁷, Cheol-Ho Kim⁸, and Duck-Hwa Chung*

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

¹Busan Regional Food & Drug Administration

²Division of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

³Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA

⁴Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

⁵Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies

⁶Laboratory of Integrative Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

⁷Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

⁸Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract To provide microbial information for the safety of agricultural production, the presence of enterotoxin genes and antibiotic susceptibility of 14 isolated *Staphylococcus aureus* (11.7%) strains were investigated using PCR-based methods and disk diffusion method, respectively. Among enterotoxin-encoding genes, *sea* was detected from two isolates (14.3%), *sea* and *sed* genes were co-detected from three isolates (21.4%), and *sea*, *sed*, and *see* genes in seven isolates (50.0%), whereas *seb*, *sec*, and *tsst* were not detected in any isolate. Nine (64.3%), eight (57.1%), six (42.9%), two (14.3%), and one (7.2%) isolates were resistant to penicillin, novobiocin, ampicillin, erythromycin and oxacillin, and doxycycline and kanamycin, respectively. Methicillin-resistant *S. aureus* was found in roller of B farm and in hydroponic solution of D farm.

Key words: *Staphylococcus aureus*, tomato farms, enterotoxin gene, antibiotic susceptibility

서 론

최근 국민들의 생활수준 향상으로 인하여 건강에 대한 관심이 날로 증가되고 있어 육식보다 채식, 그리고 가공식품보다 자연 식품을 선호하는 추세이다. 따라서 과거의 식중독 사례는 고기류와 생선 등 단백질이 풍부한 식품에 의한 식중독이 대부분을 차지하고 있었으나 최근에는 이들 식품과 더불어 과일과 야채 등에서 비롯된 식중독 사례가 증가하고 있다(1). 또한 신선 과채류를 통하여 발생하는 질병은 대부분 주변의 환경으로부터 오염된

식품을 섭취함으로써 발생하는데 그 중에서도 미생물에 의한 것이 많은 비중을 차지하고 있다고 보고되고 있다(2). 야채류에서 일반적으로 발견되는 미생물의 수는 10³-10⁹ CFU/g에 이르며 그 오염 경로도 다양하다(3). 수확 전에는 분변, 토양, 관개수, 살충제 먼지, 동물, 곤충, 관리자의 손등이 오염원이나 수확 후에는 수확장비, 운송수단, 얼음, 물, 포장과정, 저장단계에서의 교차오염이 가능하며 이외에도 취급자의 손, 곤충, 동물 등에 의한 오염이 있을 수 있다(4).

과채류에서 빈번하게 검출되는 식중독균으로는 *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 등을 들 수가 있으며(5) 그 중 *S. aureus*는 Reina 등(6)의 연구에서 나타난 바와 같이 *Salmonella* spp와 더불어 야채류에 부착력이 강하여 세척으로 제거되기 어려울 뿐만 아니라 환경에 대한 저항성이 강하다. 또한 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어 식품에 쉽게 오염되기 때문에 식품 위생상 중요하

*Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Division of Applied Life Science Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

Tel: 82-55-751-5480

Fax: 82-55-757-5485

E-mail: dhchung@gsnu.ac.kr

Received October 4, 2005; accepted January 24, 2006

게 다루어지고 있는 세균이다(7). *S. aureus*에 의한 식중독은 균이 식품에서 증식하면서 생성된 독소를 섭취함으로써 발생하는 독소형 식중독이다. 자연계에는 여러 종류의 포도상구균이 있으나 내독소(enterotoxin)를 생산하는 균종은 *S. aureus*에 한정된다(8). 내독소(enterotoxin)는 분자량이 약 26,000~35,000 Da인 단일 폴리펩티드이며, 면역학적으로 서로 다른 9가지, 즉 enterotoxin A, B, C, D, F, G, H, I, J형이 있다. 독소형과는 관계없이 식중독을 일으키나, 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있다. 식중독을 일으킬 수 있는 enterotoxin의 양은 1 µg 이상인 것으로 알려져 있다(9-11). 한편 식중독과는 무관하지만 발열, 발진, 혈압하강, 각종 장기에 장애를 일으키는 것을 포도상구균성 쇼크 증상이라고 보고하였으며 *S. aureus*에 의해 발생하는 일종의 중독 증상인 독소성 쇼크 증후군(toxin shock syndrome)이 바로 *S. aureus*가 생산하는 enterotoxin F와 pyrogenic enterotoxin C에 의한 것으로 밝혀졌다(8). 또한 Matsunaga 등(12)의 연구에서 enterotoxin의 생성과 TSST의 생성과는 밀접한 관련이 있다고 보고하였다. 이러한 TSST 유발균주는 최초로 환자로부터 분리되었으나 최근에는 오염된 식품으로부터 검출되고 있다. 뿐만 아니라 과거에 주로 병원환경에 한정되어 발견되던 내성 균주들이 최근에는 식품 생산 환경에서 자주 발견되는데 그 중 대표적인 것이 메치실린 저항성 포도상구균(MRSA; Methicillin Resistant *S. aureus*)이다. 특히 Boehme 등(13)의 연구에서는 sprout에서 분리된 균주가 9개의 항생제에 대해서 내성을 갖는 것으로 나타나 농산물도 항생제내성에 대한 안전지대가 아님이 드러났다. 따라서 토마토를 비롯한 농산물이 *S. aureus*에 오염되는 것을 예방하는 것은 농산물의 안전성 확보에 있어 대단히 중요한 것으로 사료된다. 이를 위하여 농산물의 재배, 수확, 포장과정에서 발생 가능한 *S. aureus*의 오염원을 식별하고 분리된 *S. aureus*의 특성을 파악한 후 이를 사전에 예방하는 것이 필요하다. 최근 *S. aureus*를 비롯한 병원성 미생물의 오염을 최소화하기 위한 노력의 일환으로 FDA와 USDA에서는 식품의 원료가 되는 농축산물을 안전하고 위생적으로 공급할 수 있도록 생산자 및 관리자가 지켜야 하는 위해요소 차단 규정으로 Good Agricultural Practice(GAP) 제도 도입을 권장하고 있다(14-15). 그러나 이러한 제도의 도입을 위해서는 먼저 농산물을 생산하는 각 단계에서 발생할 수 있는 위해를 검색하고 이해하는 것이 이루어져야 하지만 아직도 농산물의 재배환경에서부터 각종 식중독 미생물을 비롯한 기초적인 위해요소의 분석 자료가 대단히 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 안전한 농산물 공급을 위한 기초 단계로서 우리나라에서 기후풍토가 적합하여 전국적으로 재배되고 있는 토마토를 중심으로 먼저 토마토의 전 생산과정에 걸쳐 *S. aureus*의 오염도를 검색하였다(16). 아울러 분리된 *S. aureus*에 대하여 PCR법으로 enterotoxin과 *tsst* 생성 gene을 검출하고 각종 항생제에 저항성을 갖는 균주의 존재 여부를 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

장소 선정 및 시료채취

본 연구를 위하여 2004년 7월 서부 경남지역 토마토 농장 5개 장소를 선정하여 토양, 각종 용수, 포장실, 재배실, 작업자, 토마토 및 잎에 대한 *S. aureus*를 검색하고 분리된 *S. aureus*에 대하여 enterotoxin과 *tsst*를 생성하는 gene을 PCR법으로 조사하였다. 또한 여러 가지 항생제에 저항을 갖는 균주의 존재여부를 조사하였다. 본 실험을 위한 시료 채취 과정은 다음과 같다. 먼저 토

양의 경우 100 g씩을 취하여 멸균된 시료 채취용 팩에 채취하였다. 관개용수는 각 농가에서 사용하고 있는 강물 혹은 지하수를 채취하였고 원수는 양액의 제조에 사용될 물로서 인위적으로 공급되는 영양분을 섞기 전에 원수 저장고에 저장되어 있는 물을 채취하였다. 또한 양액은 토마토의 생육을 촉진하고 토마토의 생장에 영양원으로 작용할 수 있는 성분을 함유하는 용액이며 본 연구에 사용된 양액은 토마토에 공급하기 직전에 양액 저장고에 보관중인 용액을 실험에 사용하였다. 이들 용액은 각각 1L씩 채수병에 채취되었다.

토마토 농장의 각종 용액의 저장탱크, 수확용기와 작업도구는 사용 중인 것로부터 채취하였으며 포장박스는 사용 전의 것에서 채취하였다. 이들 시료는 10 cm × 10 cm 혹은 10 cm × 4 cm 크기의 면적대를 사용하여 100 cm² 혹은 40 cm²의 면적을 swab하였다(17). 또한 작업자의 손과 장갑에 대해서는 작업 전 또는 작업 중일 경우에 물로 씻은 후 glove juice법(18)에 준하여 채취하였다. 각종 토마토와 잎은 멸균된 시료채취용 팩에 100 g 정도를 채취하였으며 이렇게 채취된 모든 시료는 얼음을 채운 ice box에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다.

본 연구에 사용된 시료는 총 120개이며 시료 종류는 Table 1과 같다.

사용된 균주

병원성 미생물의 분리와 *S. aureus*의 enterotoxin gene 생성여부 검색에 양성 대조균으로 사용된 표준 균주는 *S. aureus* ATCC 13565(SEA), *S. aureus* ATCC 14458(SEB), *S. aureus* ATCC

Table 1. The kinds and number of samples collected from 5 tomato farms for the microbial assessment

Sources	Type of sample	The number of samples
Soils and water	Soil	5
	Irrigation water	5
	Pre-hydroponic solution	5
	Pre-hydroponic solution tank	5
	Hydroponic solution	5
	Hydroponic solution tank	5
Protected houses	Collection container	5
	Vinyl	5
	Wall	5
	Cart	5
	Scissors	5
Packing houses	Inputed hole	5
	Roller	5
	Weighing dish	5
	Goods gathered table	5
	Packing container	5
Employees	Hands (Protected house)	5
	Gloves (Protected house)	5
	Clothes (Protected house)	5
	Hands (Packing house)	5
	Clothes (Packing house)	5
Tomatoes and leaves	Tomato (Protected house)	5
	Tomato (Packing house)	5
	Leaves (Protected house)	5
Total		120

19095(SEC), *S. aureus* ATCC 23235(SED), *S. aureus* ATCC 27664(SEE), *S. aureus* NML-008(TSST)이다. 또한 음성 대조균으로는 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* KCCM 11714를 사용하였으며 이들 균주는 식품의약품안전청으로부터 분양받아 본 연구에 사용하였다.

기기 및 시약

*S. aureus*의 증균배양을 위하여 10% NaCl이 첨가된 trypticase soy broth(Difco, USA)를 사용하였으며 선택배지로 mannitol salt agar(Difco, USA)와 Barid-Parker agar(Oxoid, England)를 사용하였다. 또한 생화학적 동정을 위하여 DNase agar(Difco, USA), 1 N HCl, sheep blood agar(BioMerieux, France), H₂O₂, rabbit plasma(BBL, USA), API Staph(BioMerieux, France)가 사용되었다. 분리된 *S. aureus*가 enterotoxin을 생성할 수 있는 gene을 가지는가에 대한 여부를 PCR법으로 검색하였으며 PCR에 사용된 시약은 다음과 같다. 먼저 DNA 추출에는 brain heart infusion broth(Difco, USA), 2% Triton X-100, lysostaphin(Sigma chemical Co., USA), proteinase K(Sigma chemical Co., USA), phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1), 0.3 M sodium acetate, isopropanol, 70% cold ethanol 그리고 TE buffer(10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였다. 또한, PCR 분석에는 10×PCR buffer(Takara, Japan), 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate(Takara, Japan) 25 mM MgCl₂, (Takara, Japan) primers(Bioneer, Korea) 그리고 *AmpliTag* DNA polymerase(Takara, Japan)을 사용하였으며 PCR 생성물 확인을 위한 전기영동에 agarose gel (SeaKem agarose, FMC Bioproducts, USA)을 사용하였다.

그리고 PCR 분석에 사용된 기기로는 PCR 증폭기(GeneAmp PCR System 2400; Applied Biosystem, Norwalk, CT, USA)와 전기영동장치(BioRad, USA) 그리고 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)가 사용되었다.

항생제 내성 검사를 위한 디스크는 ampicillin(AM), amikacin (AN), novobiocin(NB), clindamycin(CC), cephalothin(CF), erythromycin(E), tetracycline(Te), cefuroxime(CXM), vancomycin(Va), penicillin(P), norfloxacin(NOR), doxycycline(D), gentamycin(GM), cefazolin(CZ), cefoperazone(CFP), kanamycin(K), trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT), bacitracin(B), rifampin(RA), nitrofurantoin(F/N), neomycin(N), oxacillin(OX)이며 모두 BBL사 제품이었다.

Staphylococcus aureus의 분리

모든 시료는 clean bench에서 무균적으로 처리하였으며, *S. aureus* 분리를 위하여 관개용수, 원수, 양액은 멸균된 감압 여과 장치를 이용하여 시료 250 mL를 여과지(Advantec MFS, Inc. 0.45 μm)에 막 여과한 후 egg-york tellurite emulsion이 함유된 Baird-Parker agar에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하였고 각종 기기와 기구 및 환경에서 채취된 시료와 손 시료의 경우 각각 1 mL을 취하여 10% NaCl이 함유된 TSB 10 mL에 접종하였다. 또한 토양, 토마토, 잎은 멸균된 시약 스푼을 이용하여 10 g을 취하여 10% TSB 90 mL과 혼합하고 균질화 시킨 후 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균된 균액을 mannitol salt agar에 37°C, 24시간 희석 배양한 후 mannitol 분해능이 있는 황색불투명 집락을 선택하여 다시 2차 선택 배지로서 egg-yolk tellurite emulsion을 첨가한 Baird-Parker agar에 37°C, 24시간 희석 배양하였다. 검은 색 집락을 형성하며 집락주위에 밝은 환(clear zone)이 나타나는 단일 집락을 취하여 생화학적 확인실험에 사용하였다. 생화학적

확인 실험으로는 분리 배양된 단일 집락에서 Gram positive와 포도상의 배열을 갖는 구균(cocci)임을 확인하였고 catalase test, DNase test, coagulase test를 실시하였으며 또한 sheep blood agar 상에서 β-용혈을 확인하였다. 이러한 여러 가지 생화학적 성상들을 *S. aureus* 표준균주 ATCC 13565와 비교하여 실험하였으며 API staph kit를 사용하여 재확인하였다(19).

PCR을 이용한 staphylococcal enterotoxin gene 및 tsst gene의 검색

Enterotoxin gene 검색을 위한 PCR에 사용될 DNA는 Johnson 등(20)의 방법으로 추출하였다. BHA에 보관된 *S. aureus*를 한 백금이 취하여 BHI broth에 접종한 후 37°C, 16시간 배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 배양액으로부터 얻은 pellet은 190 μL의 2% triton X-100에 현탁시켰다. 현탁액은 95°C에서 15분간 반응시켰으며 반응이 끝난 후 세포에 25 μg/mL 농도의 lysostaphin 10 μL를 혼합한 후 37°C에서 30분간 세포용해를 시켰다. 그 후 1 μL의 proteinase K(200 μg/mL)를 첨가하고 65°C에서 15분 동안 반응한 후 100 μL의 phenol 과 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24:1)을 첨가하여 시료와 혼합한 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액은 새로운 tube에 옮기고, 이 조작을 두 번 더 반복하여 단백질이 제거되고 DNA가 함유된 수용액 층을 얻었다. 이 수용액 층에 0.3 M sodium acetate(10%, 20 μL)와 120 μL의 isopropanol을 첨가한 후 4°C, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였고, 상층액을 제거하여 얻은 pellet에 두 배 부피의 70% cold ethanol을 가하여 세척 후 공기 중에서 자연 건조하였다. Pellet은 30 μL의 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켰고 이렇게 얻은 2 μL의 수용액은 PCR 분석을 위한 template DNA로 사용되었다.

Primer는 Tsen 등(21)(*sea*)과 Becker 등(22)(*seb*, *sec*, *see*, *tsst*) 그리고 Monday 등(23)(*sed*)에 의해 밝혀진 염기서열을 참고로 하여 제작하였다. 여섯 종류의 독소에 대한 primers의 특이적 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같으며 각각의 primer는 Bioneer 사(Chengwon, Chungbuk, Korea)에서 합성하였다.

PCR 반응 용액은 10× PCR buffer 5 μL, 200 μM의 deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 20 pM primers, 2 μL의 DNA 그리고 *AmpliTag* DNA polymerase 1.2 units을 첨가하고 3 차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 50 μL로 조절하였다.

또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, *sea* 56°C, *seb* 55°C, *sec* 52°C, *sed* 51°C, *see* 50°C, *tsst* 57°C에서 40초간 각각 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30 cycle을 수행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.8% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

분리된 Staphylococcus aureus에 대한 항생제 내성 검사

항생제 내성 실험은 Bauer 등(24)의 disc diffusion method에 의하여 실험하였다. 접종 균액은 Muller-Hinton broth에서 24시간 배양한 균을 멸균 생리식염수로 희석하여 Mac-Farland scale No 0.5 BaSO₄ 표준비색관(1.175% BaCl₂, 0.5 mL + 0.36 N H₂SO₄ 99.5 mL : 10⁸ CFU/mL에 맞추었다. 평판배지는 Muller-Hinton broth를 121°C에서 15분간 멸균한 후 45-50°C로 식히고 직경 90 mm의 페트리디쉬에 20 mL씩 분주하였다. 접종 균액을 배지 전체에 골고루 도말한 다음 배양기 내에서 10분간 정지시켜 습기를 제거하

Table 2. Sequences and location of primers for the amplification of each gene

Genes	Primers	Oligonucleotides (5' to 3')	Location	Products (bp)
SEA	sea-1	AAG TGC CGA TCA ATT TAT GGC TA	443-465	219
	sea-2	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	637-660	
SEB	seb-1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	634-653	477
	seb-2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT	1088-1100	
SEC	sec-1	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	665-690	271
	sec-2	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	913-935	
SED	sed-1	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C	368-389	384
	sed-2	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G	752-734	
SEE	see-1	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	482-560	179
	see-2	ATA ACT TAC CGT GGA CCC TTC	640-660	
TSST	tsst-1	AAG CCC TTT GTT GCT TGC G	51-69	445
	tsst-2	ATC GAA CTT TGG CCC ATA CTT T	481-495	

였다. 항균제 디스크를 20 mm 간격으로 배지 표면에 부착시킨 후 37°C에서 20시간 배양하였으며 NCCLS의 기준에 따라 감수성 여부를 판단하였다(25).

결과 및 고찰

Staphylococcus aureus의 검색

토양과 용수: 토양과 수질에서 *S. aureus*의 검색 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 C 농장의 토양, C, D, E 농장의 관개용수 그리고 D, E 농장의 양액에서 검출되었다.

토양에서 미생물은 공중질소를 고정하여 작물에 질소를 공급하며 호르몬성의 성장촉진물질을 분비할 뿐만 아니라 작물이 이용할 수 없는 유기태 질소를 무기태로 전환하여 작물이 질소를 이용할 수 있게 하는 등 작물과 미생물의 상호작용에 아주 중요하다(26). 하지만 *S. aureus*와 같은 인체에 유해한 세균이 토양에 존재할 경우 작물로 이행해서 증식가능하기 때문에 농산물의 안전성 확보를 위해서는 토양에 위해미생물이 생육하는 것을 예방해야 한다. 또한 Kim 등(27)의 연구에서도 인공토양으로 알려져 있는 상토에서 *S. aureus*가 분리된 바 있을 뿐만 아니라 Kaneko 등(28)의 연구에서는 대부분의 농산물들이 병원성 미생물에 오염되어 있었으며 그 원인을 토양으로 간주하고 있어 토양의 건전성은 안전한 농산물을 생산하기 위한 전제조건으로 판단된다. 따

라서 토양의 안전성 확보를 위해서는 부적절한 퇴비사용을 금하고 가급적 토마토를 비롯한 작물과 잎이 토양에 닿는 것을 최소화해야 할 것으로 사료된다.

또한 관개용수나 양액과 같은 각종 용수에서의 *S. aureus*의 검출로 용수에 의한 직접 오염이 우려된다. 최근 토양 재배에서 조차도 예전과는 달리 양액 재배에서와 같이 거름으로 복합비료를 물에 타서 공급하거나 작물 생육에 필요한 필수원소를 일정 비율로 섞은 양액을 토양 위로 튜브를 설치한 후 튜브내로 공급하는 농가가 늘고 있다. 이러한 방식은 양분과 동시에 수분을 공급하는 방식이며 이 방식으로 수분의 공급이 불충분할 경우에 직접 관개하는 방식을 취하고 있다. 또한 유리온실의 경우 온실 내의 온도가 높게 되면 벌레 의한 수정이 이루어지지 않기 때문에 실내 온도가 높을 경우 실온을 낮추기 위하여 살수관개 형태로 수분을 공급한다. 이때 사용되는 관개용수는 토마토의 표면에 직접 접촉하기 때문에 관개용수의 오염은 토마토의 오염으로 직결된다고 할 수 있다. 이는 Norman(29)의 연구에서 오염된 관개용수의 사용은 수확된 농산물에서 병원성 미생물의 검출률을 증가시킨다는 것을 밝힘으로써 입증되었다.

한편 양액은 비료의 3대 요소인 질소, 인산, 칼륨을 비롯하여 16가지 이상의 필수원소로 제조된다(30). 이러한 원소들은 작물의 생육을 촉진하는 것은 물론이고 세균을 비롯한 미생물에게도 영양원으로 작용할 수 있다. 따라서 각종 용수의 안전성 확보를

Table 3. Screening of *Staphylococcus aureus* on 5 farms

Farms	Items	Soil and water	Protected house and packing house	Employee	Tomato and leaves	Isolation rate
A		-	-	-	-	0% (0 of 24)
B		-	Roller	Clothes (Protected house)	Leave and tomato (Packing house)	16.7% (4 of 24)
C		Soil and irrigation water	-	Hands (Protected house)	-	12.5% (3 of 24)
D		Irrigation water Hydroponic solution	-	Hands (Protected house) Glove (Protected house)	-	16.7% (4 of 24)
E		Irrigation water Hydroponic solution	-	Clothes (Packing house)	-	12.5% (3 of 24)
Isolation rate		20.0% (6 of 30)	2.0% (1 of 50)	20.0% (5 of 25)	13.3% (2 of 15)	11.7% (14 of 120)

Table 4. Screening of Staphylococcal enterotoxin genes on 5 tomato farms

Wild strains	Results						Rate
	sea	seb	sec	sed	see	tsst	
B - Roller	-	-	-	-	-	-	14.3%
D - Gloves (Protected house)	-	-	-	-	-	-	(2 of 14)
C - Hands (Protected house)	+	-	-	-	-	-	14.3%
D - Irrigation water	+	-	-	-	-	-	(2 of 14)
B - Leaves	+	-	-	+	-	-	21.4%
B - Clothes (Protected house)	+	-	-	+	-	-	(3 of 14)
C - Soil	+	-	-	+	-	-	
B - Tomato (Packing house)	+	-	-	+	+	-	50.0%
C - Irrigation water	+	-	-	+	+	-	(7 of 14)
D - Hands (Packing house)	+	-	-	+	+	-	
D - Hydroponic solution	+	-	-	+	+	-	
E - Irrigation water	+	-	-	+	+	-	
E - Hydroponic solution	+	-	-	+	+	-	
E - Clothes (Packing house)	+	-	-	+	+	-	

위한 방안으로 수원에 동물이 침입하는 것을 막고 수원이 인접한 곳에 화장실 설치를 제한함으로써 분변이 수원으로 흘러들어오는 것을 방지할 것과 주기적인 수질검사를 해야 한다(31). 아울러 각종 용수를 보관하는 저장고의 주기적인 세척과 소독으로 오염된 저장고에 의한 교차오염을 최소화해야 할 것으로 사료되는 바이다.

재배실 및 포장실: *S. aureus*를 재배실 및 포장실에서 검색한 결과 B 농장의 롤러에서 1건 검출되었다. 미 FDA 자료에 따르면 재배시설 및 포장시설에서 병원성 미생물이 발견되어왔고 오염된 기구 및 환경은 쉽게 병원성 미생물을 농산물로 옮길 수 있다고 보고하였다(4). 실제 본 연구를 위하여 농장을 방문 했을 당시 각종 기기류는 여러 가지 물질에 의해 오염되어 있었으며 세척이 전혀 이루어지고 있지 않았다. 또한 토마토의 수확 후 선별에서 출하까지의 과정은 일반적으로 수확 후 포장실로 옮겨져 오면 선별기에서 선별한 다음 박스에 담아 출하하는데 선별은 투입고, 롤러를 거쳐 웨이팅디쉬에서 무게별 크기별로 분류해서 집하대에 모으고 집하대에 모인 토마토를 박스에 담아 당일 바로 출하하는 방식을 취하고 있다. 이러한 과정은 선별 후 예냉 과정을 거쳐 염소를 비롯한 소독제가 담긴 용액에서 소독과정까지 거쳐서 출하하는 형태를 취하고 있는 미국이나 유럽 등의 외국과는 조금 다른 방식이다. 2004년 CDC에서 보고한 토마토에 의한 식중독 사건은 3건이었고 원인 추적결과 오염된 세척수였는데(32) 국내의 경우 수확 후 세척과정 없이 바로 출하를 하고 있기 때문에 세척 수에 의한 오염은 우려되지 않는다. 따라서 본 연구 결과로 예상할 수 있는 미생물의 오염은 오염된 선별대와 포장재에 의한 교차오염이다. 단체급식에서 확인되었던 가장 중요한 위험 요인이 음식물과 준비기구 표면과의 교차오염이라는 Bisbini 등(33)의 보고는 식중독에서 교차오염의 예방의 중요성을 시사하고 있으며 이는 비단 단체급식 뿐만 아니라 농산물 등 원료를 생산하는 환경에서도 고려되어야 할 사항으로 사료된다. 따라서 매일 작업이 끝난 후에는 포장실 내를 청소하고 해충과 쥐의 침입을 막아 교차오염을 미연에 방지할 수 있는 중점적인 위생관리가 필요하다고 본다.

작업자: 토마토 농장에 종사하는 작업자들에 대해 *S. aureus*를

생화학적 방법으로 분리, 검색한 결과 Table 3과 같다. A 농장을 제외한 4개의 농장에 근무하는 작업자의 손, 복장, 장갑에서 *S. aureus*가 분리 되었으며 포장실 보다 재배실에 근무하는 작업자에서 더욱 높은 빈도로 검출되었다. 한편 건강한 사람의 25-50%는 *S. aureus*의 보균자이며, 이들 중 15-20%는 enterotoxin 생성균주인 것으로 알려져 있다는 보고에서 나타났듯이 식품을 취급하는 사람들의 개인위생이 식품의 안전성에 미치는 영향이 매우 크다고 볼 수 있다(34). 그 외 Kim 등(27)을 비롯한 다른 연구자들의 연구에서도 본 연구와 유사하게 개인 위생과 관련된 시료에서 *S. aureus*가 빈번하게 검출되었다. 또한 2002년 스페인에서 일어난 *S. aureus*에 의한 식중독의 원인물질을 PFGE 방법으로 추정한 결과 원인균과 작업자에서 분리된 균의 PFGE(Pulse Field Gel Electrophoresis) 패턴이 동일하여 식중독의 원인을 작업자라고 확정한 사례에서처럼 작업자는 직접 *S. aureus*를 비롯한 식중독균을 식품이나 농산물로 옮길 수 있는 운반체로 작용할 수 있다(35).

이상의 결과로 미루어 볼 때 작업자의 개인위생에 대한 안전성 확보는 곧 토마토의 품질 안전성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단되며 농장에서는 작업자를 대상으로 한 주기적인 위생교육으로 '개인의 위생관리가 왜 필요한 것인가?'와 작업 전후로 손을 씻고 소독하는 행위와 장갑의 착용이 필수적이라는 것을 느낄 수 있도록 교육이 되어야 할 것이다. 아울러 농장주는 손을 씻는 시설과 화장실, 그리고 탈의실과 같은 개인위생을 향상시킬 수 있는 시설을 설치하고 포스터와 같은 안내물을 부착하여 이를 제대로 실천할 수 있도록 노력해야 한다.

토마토와 잎: *S. aureus*를 토마토와 잎에서 검색한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 B 농장의 토마토 잎과 포장실의 토마토에서 *S. aureus*가 검출되었다. Kim 등(27)은 딸기농장에서 *S. aureus*를 분리하였으며 그 결과 세 농장 중 두 농장의 딸기 잎과 한 농장의 재배실 딸기에서 *S. aureus*가 검출되어 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 또한 Lee 등(36)은 시판 식물성 식품에서의 오염 지표 세균 분포를 조사한 결과 채소류에서 *S. aureus*가 $1.1 \times 10^7/g$ 으로 검출되었다고 보고하였고 Jung 등(37)은 경기, 서울지방의 마트와 농산물 시장에서 구입한 상추의 37%에서 *S. aureus*가 검출되었다고 보고하였다.

이러한 농산물에서 미생물의 검출이 갖는 의의는 대부분의 농산물이 미생물을 감소시킬 수 있는 열처리 없이 이용되므로 오염된 채 그대로 섭취한다는 것과 토마토를 비롯한 과체에 부착된 세균은 단순한 세척으로는 제거될 수 없으며 표면에서 조직 속으로 침투할 수 있을 뿐만 아니라 약산성에서 내산성을 획득하여 조직 속에서 증식이 가능하다는 데 있다(38). 따라서 농산물의 오염은 식중독을 야기할 수 있는 잠재적 가능성을 배제할 수 없다. 토마토의 안전성을 확보하기 위해서는 수확에서 포장으로 이어지는 과정에 발생할 수 있는 오염요소들을 제거시키는 것이 관건이 될 것이며 앞서 재배시설이나 포장시설에서 지적인 바와 같이 온실과 포장실 내의 청결 그리고 각종 기구들에 대한 위생적 관리가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Staphylococcal enterotoxin과 TSST-1 유전자의 검색

Staphylococcal enterotoxin은 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 생물학적 활성에 의해 검출될 수 있으며 최근에는 실험실에서 간단하게 latex agglutination와 ELISA 그리고 PCR법에 의해 분석되고 있다. 이들 방법을 Zshock 등(39)이 비교해본 결과 그 결과가 98.9% 일치하였다고 보고하였다. 그러나 latex agglutination법과 ELISA는 조작이 많이 필요하며 경제적이지만 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 경제적이고 신속한 PCR 방법을 이용하였다(39).

토마토 농장 다섯 곳으로부터 분리된 *S. aureus*의 Staphylococcal enterotoxin과 *tsst* 유전자를 검색한 결과, Table 4와 같이 14개의 분리균주 중 12균주(85.7%)가 enterotoxin 유전자를 소유하였다. 유전형별로 보면 *sea* 유전자 하나만을 갖는 균주는 2주(14.3%), *sea*와 *sed* 유전자를 동시에 갖는 균주가 3주(21.4%), *sea*, *sed* 및 *see* 유전자가 모두 검출된 균주는 7주(50.0%)였다. 그러나 *sec*, *sed*와 *tsst* 유전자를 갖는 균주는 검출되지 않았다. 즉 거의 모든 시료는 *sea* 유전자를 가지며 그 중 70% 이상의 균주는 2개 이상의 독소 유전자를 소유하는 것을 의미한다. 이는 Jung 등(37)이 수행한 상추와 원유에서 분리한 균주들 중 *sea* 유전자를 소유한 균주가 43%로 가장 높게 나타났다는 결과와 일치하였다. 또한 본 연구 결과는 일반적으로 식품에서 분리된 균주 중 enterotoxin type A가 가장 많이 검출된다는 기존의 연구결과와 일치한다고 할 수 있다. 한편 Kim 등(27)은 딸기농장에서 분리한 *S. aureus*로 독소 생산 실험을 한 결과 *sea*, *sea*와 *seb* 동시 생성균, *sec* 유전자가 각각 92, 38, 0%로 각각 검출되어 *sea*와 *seb* 유전자의 검출 빈도가 높았고 또한 Kim 등(40)이 수행한 딸기 주스상점에서 분리한 *S. aureus* 역시 *sea*, *seb* 및 *sec*가 각각 100, 55, 0%로 나타나 *sea*와 *seb* 유전자가 빈번하게 검출되었다. 이 결과는 본 연구에서 *sea*, *sed* 및 *see*가 빈번하게 검출된 경향과는 조금 다를 수 있다. 또한 Tsen 등(41)이 수행한 육류 가공품에서 분리된 *S. aureus*에서 enterotoxin 검색결과 *sea*, *seb*, *sec*, *sed* 그리고 *sea*와 *sed*를 동시에 생성하는 균주가 각각 75, 12.5, 6.3, 3.1, 7.8%로 보고하였다. 더욱이 Hazariwala 등(42)의 가금류 유래 *S. aureus* 분리균주에 대하여 enterotoxin 유전자를 검출시험 한 결과에 의하면 *sea*, *seb*, *sec* 및 *sed* 유전자가 각각 12.2, 2.4, 22, 24.4%로 각각 검출되어 *sec* 및 *sed* 유전자의 검출 빈도가 높다고 보고하였다. 한편 Klotz 등(43)은 임상에서 분리한 *S. aureus* 분리 균주에서도 *sea*, *seb*, *sec* 및 *sed* 유전자의 검출 비율이 12.9, 9.7, 21.5% 그리고 14.0%로 나타나 *sec*와 *sed* 유전자의 검출 빈도가 상대적으로 높다고 보고하였다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 본 연구에서 토마토 농장에서 분리한 *S. aureus* 분리 균주의 enterotoxin 유전자 검출 실험에서 *sea* 유전자가 가장 높은 빈도로 검출되어 Jung 등(37), Kim 등

(27), Tsen 등(41)의 연구결과와 일치하였으나, 가금류와 임상에서 분리한 *S. aureus*에서 *sec*와 *sed* 유전자가 빈번하게 검출되었다는 Hazariwala 등(42)과 Klotz 등(43)의 연구결과와는 상이하였다. 한편, Kim 등(27)이 수행한 딸기 농장에서 분리된 균주의 38%가 *seb* 균주인 것으로 나타났으나 본 연구에서는 *seb* 유전자를 갖는 균주가 검출되지 않아 농산물에 따라 검출되는 *S. aureus*의 enterotoxin의 검출양상이 달랐음을 확인하였다. 즉, 이러한 차이는 분리하는 장소와 시료에 따라서 *S. aureus*가 갖는 유전자가 차이가 있음을 의미하는 것으로 판단되므로 시료와 장소에 따라 분리된 균주가 어떤 유형의 enterotoxin을 생성하는지에 대한 조사가 이루어져야 할 것으로 판단되는 바이다.

분리된 *Staphylococcus aureus*에 대한 항생제 감수성 검사

항생제 내성은 집단 식중독이 발생되었을 때 초기 진료에 결정적 영향을 주게 되므로 분리균주에 대한 항생제 내성 조사가 반드시 필요하다. 그러므로 각 시료에서 분리된 병원성 미생물에 대한 항생제 민감성 실험을 수행하였으며 그 결과는 Table 5와 같다. 분리된 균주는 penicillin(64.3%), novobicin(57.1%), ampicillin(42.9%), erythromycin(14.3%), oxacillin(14.3%), kanamycin(7.2%), doxycycline(7.2%)에 내성을 보였다. 2제 이상의 항생물질에 대하여 내성을 나타낸 균주는 10주(71.4%)였으며 B 농장의 재배실에서 일하는 작업자의 복장에서 분리된 균주는 4제의 항생제에 내성을 보이는 복합저항성을 갖는 것으로 나타났다. 특히 B 농장의 플라와 D 농장의 양액에서 분리된 균주는 oxacillin에 내성을 갖는 MRSA(Methicillin Resistant *S. aureus*) 균주인 것으로 나타났다. 또한 vancomycin에 대한 항생제 민감성 실험에서 분리 균주 모두 민감성으로 나타나 본 연구에서는 vancomycin 저항성 황색포도상구균(VRSA; Vancomycin Resistant *S. aureus*)은 없는 것으로 나타났다. 항생제 내성에 대한 조사는 병원에서 주로 행해졌으나 최근에는 식품, 농산물, 식품 제조환경에서도 항생제내성 검사를 실시하고 있다. 1998년 Tsen 등(41)의 연구결과에 따르면 식품에서 분리된 enterotoxingenic *S. aureus*의 51.6%가 penicillin에 대한 내성을 가지나 methicillin과 vancomycin을 비롯한 다른 항생제에 대한 내성은 보이지 않은 것으로 나타났다. 또한 2000년에 Ha 등(10)이 실시한 단체급식환경에서 실시한 항생제 내성 균주 조사 결과 총 4개의 *S. aureus*를 분리하였으며 분리된 균주 모두 ampicillin과 penicillin에 내성을 보였고 1주는 MRSA균주로 나타났다. 한편 2004년 Boehme 등(13)의 연구에서는 sprout에서 분리된 균주가 9개의 항생제에 대해서 내성을 갖는 것으로 나타났다. 이는 해를 거듭할수록 식품에서 분리된 균주가 항생제에 대한 내성을 갖는 빈도가 증가하고 있음을 반영한다. 그리고 sprout에서 복합내성균주 검출과 본 연구에서 대부분의 분리균주가 항생제 내성을 가짐으로써 토마토를 비롯한 농산물도 항생제 내성의 안전지대가 아님이 드러났다. 특히 최근 항생제 내성균에 대한 논란이 증가되면서 MRSA에 대한 관심 또한 커지고 있다. Speller 등(44)의 조사에 의하면 영국과 웨일즈에서 분리한 *S. aureus*의 경우 methicillin 내성은 1989-1991년까지는 1.5%이었으나 1995년에는 13.2%로 분리율이 급격히 높아진 것으로 나타났다. 또한 Baiocchi 등(45)이 oxacillin 내성이 1980년대에 39%에서 1990년대 69%로 증가하였다고 보고하였다. 더욱이 Ha 등(10)이 실시한 단체급식환경에서 실시한 항생제 내성균주조사에서 MRSA균주가 출현한 것과 본 연구에서 분리된 14주 중 2주가 MRSA로 분리됨에 따라 병원뿐만 아니라 식품환경, 작물생산 환경도 MRSA에 노출되어있음을 알 수 있다. 이렇게 MRSA균주의 출현을 우려하는 이유는 methicillin 저항유전자인 *mec A* 유전자의

Table 5. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from tomato farms

Strains	AM	CC	Te	P	GM	K	RA	F/M	AN	CF	CXM	NOR	CZ	SXT	N	NB	E	Va	D	CFP	B	OX	Susceptible (%)	Intermediate (%)	Resistant (%)	
Leave	S ¹⁾	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R ²⁾	S	S	S	S	P ³⁾	S	91.0	4.5	4.5
Tomato (Storage house)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	91.0	4.5	4.5	
B Clothes (Protected house)	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S	68.0	14.0	18.0	
Roller (Protected house)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	81.8	4.5	13.7	
Irrigation water	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	91.0	0	9.0	
C Soil	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	91.0	0	9	
Hands (Protected house)	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	86.0	4.5	9.5	
Irrigation water	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	81.8	4.5	13.7	
Hydroponic solution	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	86.0	4.5	9.5	
D Hands (Protected house)	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	91.0	0	9.0	
Gloves (Protected house)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	91.0	4.5	4.5	
Irrigation water	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	91.0	0	9.0	
E Hydroponic solution	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	91.0	0	9.0	
Clothes (Packing house)	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	91.0	0	9.0	
Susceptible (%)	57.1	92.8	85.7	35.7	100	92.8	100	100	100	100	79.6	100	100	100	92.8	35.7	71.4	100	92.8	100	92.8	79.5	87.0			
Intermediate (%)	0	7.2	14.3	0	0	0	0	0	0	0	21.4	0	0	0	7.2	7.2	14.3	0	0	0	0	7.2	7.2	3.5		
Resistant (%)	42.9	0	0	64.3	0	7.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57.1	14.3	0	7.2	0	0	14.3			9.5	

AM: Ampicillin, CC: Clindamycin, Te: Tetracycline, P: Penicillin, Gm: Gentamycin, K: Kanamycin, RA: Rifampin, F/M: Nitrofurantoin, AN: Amikacin, CF: Cephalothin, CXM: Cefuroxime, NOR: Norfloxacin, CZ: Cefazolin, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole, N: Neomycin, NB: Novobiocin, Va: Vancomycin, D: Doxycycline, CFP: Cefoperazone, B: Bacitracin, CFM: Cefixime, OX: Oxacillin, ¹⁾S: Susceptible, ²⁾R: Resistant, ³⁾I: Intermediate

수평이동으로 인하여 쉽게 퍼질 수 있기 때문에 예방하기 어려우며, 치료에 쓸 수 있는 항생제가 많지 않고, methicillin 뿐 아니라 다른 항생제에도 동시 내성을 보여 고도의 사망률을 나타내는 패혈증을 비롯한 각종 질환의 치료에 어려움을 주기 때문이다(46).

결론적으로 본 연구의 결과에서도 알 수 있듯이 항생제 내성이 더 이상 병원에서만 문제가 아님이 드러남에 따라 식품이나 농산물을 제조, 생산하는 환경에서도 이 분야에 대한 체계적, 지속적 연구가 이루어져야 할 것으로 것이다.

요 약

본 연구는 서부 경남지역 토마토 농장 5 곳에서 총 120점의 시료를 수집하여 *S. aureus*를 분리하였으며, 분리된 *S. aureus*에 대하여 PCR에 방법을 이용, 내독소 유전자(enterotoxin genes)와 디스크 확산방법(disk diffusion method)을 이용하여 22가지 항생제에 대하여 항생제 감수성 실험을 수행하였다. 본 연구의 결과 14점의 시료(11.7%)가 *S. aureus*에 오염되어 있었다. 가장 빈번하게 검출된 시료로는 관개용수, 양액, 작업자의 손 그리고 토마토였다. 또한 14개의 시료에서 enterotoxin 유전자가 검출되었고, 이들 중 *sea* 유전자를 갖는 균주는 2주(14.3%), *sea*와 *sed* 유전자를 동시에 갖는 균주가 3주(21.4%), *sea*, *sed* 및 *see* 유전자가 모두 검출된 균주는 7주(50.0%)였다. 그러나 *sec*, *sed*와 *tsst* 유전자를 갖는 균주는 검출되지 않았다. 분리된 균주를 대상으로 항생제 내성실험결과 penicillin에 대한 항생제 내성이 64.3%로 뚜렷하게 높은 것으로 나타났다. 그 외 novobiocin(57.1%)에 대하여 8 균주, ampicillin(42.9%)에 대하여 6균주, erythromycin(13.4%), oxacillin(14.2%)에 대하여 2 균주, kanamycin(7.2%), doxycycline(7.2%)에 대하여 1 균주가 내성을 나타내었다. 특히 B 농장의 롤러와 D 농장의 양액에서 분리된 균주는 oxacillin에 내성을 갖는 MRSA(Methicillin Resistant *S. aureus*) 균주였다. 따라서 본 연구 결과는 안전 농산물 생산을 위한 미생물학적 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (03-PJ1-PG1-CH11-0003).

문 헌

- Choi JW, Park SY, Yeon JH, Lee MJ, Chung DH, Lee KH, Kim MG, Lee DH, Kim KS, Ha SD. Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *J. Food. Hyg. Safety* 20: 43-47 (2005)
- Park HO, Kim CM, Woo GJ, Park SH, Lee DH, Chang EJ, Park KH. Monitoring and trends analysis of food poisoning outbreaks occurred in recent years in Korea. *J. Food. Hyg. Safety* 16: 280-294 (2001)
- Harris LJ, Beuchat LR, Kajs TM, Ward TE, Taylor CH. Efficacy and reproducibility of a produce wash in killing *Salmonella* on the surface of tomatoes assessed with a proposed standard method for produces sanitizer. *J. Food Prot.* 64: 1447-1485 (2001)
- FDA. Guidance for industry, Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables. Available from: <http://csan.fda.gov>. Accessed Oct. 26, 1998.
- Kim HJ, Park JK, Lee DS, Paik HD. Changes of indicator microorganisms and pathogenic bacteria in spinach during cook-chill

- process. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 927-930 (2002)
- Reina LD, Fleming HP, Breidt F. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. *J. Food Prot.* 65: 1881-1887 (2002)
- Suk SU, Park SC. Staphylococcal infections. *J. Infection* 17: 115-122 (1985)
- Jang DS, Sin DH, Chung DH, Kim CM, Lee IS. Food hygienic. Jeongmungak Co., Seoul, Korea. pp. 71-111 (2002)
- Chen TR, Hsiao MH, Chiou CS, Tsen HY. Development and use of PCR primers for the investigation of C₁, C₂ and C₃ enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 63-70 (2001)
- Ha KS, Park SJ, Shim WB, Chung DH. Screening of MRSA (Methicilline Resistant *Staphylococcus Aureus*) and *seb* gene in producing strains isolated from food service environment of elementary schools. *J. Food. Hyg. Safety* 18: 79-86 (2003)
- Park SG, Hwang YO, Jung JH, Lee KM. Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food-borne patients in Seoul. *J. Food Hyg. Safety* 16: 159-167 (2001)
- Matsunaga T, Kamata S, Kakiuchi N, Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 297-300 (1993)
- Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Mol. Nutr. Food Res.* 48: 522-531 (2004)
- FDA. Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA survey of imported fresh interim results. Available from <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodsur9.html>. Accessed July 31, 2001.
- Kim SY. Indication system for the verification in agricultural food safety. pp. 23-42. In: Symposium on GAP application strategy for the safety agricultural production. July 29, Gyeongsang National University, Jinju, Korea. The Center of Agri-food Safety. Jinju, Korea (2004)
- Jeong HB, Cho MA, No IR, Kang NJ, Jeong HJ, Kim HT, Kang KY. 'Tannara', a new full ripe tomato for protected cultivation. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 22: 25-28 (2004)
- Sveum WH, Moberg LJ, Rude RA, Frank JF. Microbiological monitoring of the food processing environment. 3rd ed. American Public Health Association, Washington D.C., USA. pp. 51-74 (1992)
- Anonymous. Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). *Fed. Regist.* 43: 1242-1243 (1978)
- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 17th ed. Method 987.09. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (2000)
- Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *S. aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:426-430 (1991)
- Tsen HY, Chen TR. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 685-690 (1992)
- Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of Staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2548-2553 (1998).
- Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3411-3414 (1999)
- Bauer AW, Kerdy WM, Sherris JC, Turek M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496 (1966)
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. M7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA (2003)
- Cho SJ, Park CJ, Oem DI. Soil science, Hyangmunsa Co., Seoul, Korea, pp. 109-128 (1996)
- Kim SR, Shim WB, Kim JH, Hwang SJ, Park SJ, Ha SD, Kim KS, Lee KH, Kim MG, Kim KY, Kim CH, Chung DH. Screening of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin a, b, c

- gene in strain isolated from strawberry farms in Western Gyeongnam. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 321-327 (2005)
28. Kaneko KI, Hideki H, Yoshimitsu O, Junko K, Masahiko K, Koki T, Yasuo S, Masuo O. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. J. Food Prot. 62: 644-649 (1999)
 29. Norman NN, Wang LL. Studies on the use of sewage effluent for irrigation of truck crops. J. Milk Food Technol. 24: 44-47 (1961)
 30. Kang SM. Crops Physiology, Hyangmunsa Co., Seoul, Korea, pp. 77-127 (1996)
 31. Gambrell MP, Mara DD, Silva SA. Physiochemical treatment of tropical wastewater: production of microbiologically safe effluents for unrestricted crop irrigation. Water Sci. Technol. 26: 1449-1458 (1992)
 32. Centers for disease control and prevention. Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes-United states and Canada, 2004. Available from: <http://www.cdc.gov>. Accessed April 8, 2005.
 33. Bisbini P, Leoni E, Nanetti A. An outbreak of *Salmonella* harbor associated with roast rabbit in a restaurant. Eur. J. Epidemiol. 16: 613-618 (2000)
 34. Brown MH. Meat microbiology. Applied Science Publishers, London, England. pp. 269-486 (1982)
 35. Martin MC, Fueyo JM, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic stains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. Int. J. Food Microbiol. 94: 279-286 (2004)
 36. Lee YW, Park SG. Distribution of indicator organisms and influence of storage temperature and period in commercial plant food. J. Food Hyg. Safety 14: 1-8 (1999)
 37. Jung HJ, Cho JI, Park SH, Ha SD, Lee KH, Kim CH, Song ES, Chung DH, Kim MG, Kim KY, Kim KS. Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 134-141 (2005)
 38. Bell WA, Marquis RE. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1134-1138 (1991)
 39. Zshock M, Botzler D, Blocher S, Sommerhauser J, Hamann HP. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tsst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reacton. Int. Dairy J. 10: 569-574 (2000)
 40. Kim SR, Park SJ, Shim WB, Kim HK, Chung DH. Detection of *Staphylococcus aureus* and screening Staphylococcal enterotoxin a, b, c genes in strains isolated from strawberry juice shops in Jin-ju. Korean J. Env. Hlth. 31: 23-30 (2005)
 41. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. Food Microbiol. 15: 33-41 (1998)
 42. Hazariwala A, Sanders Q, Hudson CR, Hofacre C, Thayer SG. Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and human invasive staphylococcal disease. Avian Dis. 46: 132-136
 43. Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J. Clin. Microbiol. 41: 4683-4687 (2003)
 44. Speller DC, Johnson AP, James D, Marpes RR, Chalett A, Gorge RC. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolated of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-95. Lancet 359: 323-325 (1997)
 45. Baiocchi P, Galie M, Santini C, Czarfagna P, Cassone M, Tarasi D, Venditti M. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from blood to currently used antistaphylococcal drug. J. Chemother. 10: 25-28 (1998)
 46. Ha DJ, Kim YC, Kim YJ. Management of infection for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at an orthopaedic surgery department. J. Korean Orthop. Assoc. 38: 34-38 (2003)