pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 2, pp. 169~175 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

농산물 중 *Staphylococcus aureus*의 분리를 위한 선택배지 평가

김세리[1] · 이서현[1] · 서민경[1] · 김원일[1] · 박경훈[1] · 윤혜정[1] · 윤요한[2] · 유순영[3] · 류경열[4] · 윤종철[1] · 김병석[1]*
[1]농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과, [2]숙명여자대학교 식품영양학과
[3]서울지방식약청, [4]농촌진흥청 연구정책국 평가관리과

Evaluation of Selective Media for Isolation of *Staphylococcus aureus* from Agricultural Products

Se-Ri Kim[1], Seo-Hyun Lee[1], Min-Kyoung Seo[1], Won-Il Kim[1], Kyeong-Hun Park[1], Hye-Jeong Yun[1], Yohan Yoon[2], Soon-Young Yoo[3], Kyoung-Yul Ryu[4], Jong-Chul Yun[1], and Byung-Seok Kim[1]*
[1]Microbial Safety Division, Department of Agro-Food Safety, NAAS, RDA
[2]Department of Food &Nutrition, Sookmyung Women's University
[3]Seoul Regional Korea Food & Drug Administration
[4]R&D Evaluation Division, Research Policy Bureau, RDA
(Received March 26, 2012/Revised May 9, 2012/Accepted June 13, 2012)

ABSTRACT - Five kinds of selective media, such as mannitol salt agar (MSA), Baird-Parker agar (BPA), Baird-Parker supplemented with rabbit plasma fibrinogen (BPA+RPF), CHROMagar *Staphylococcus aureus* (CSA), and Petrifilm Staph Express count system (Petrifilm), were compared to recommend the optimum selective media for isolation of *Staphylococcus aureus* from agricultural products. Seventy four target and non target bacteria were inoculated on five selective media to analyze sensitivity and specificity. In the recovery test of injured *S. aureus* cells, *S. aureus* was exposed to acid (1% lactic acid for 10 min), heat (60°C for 90s), and cold (−20°C for 1h) conditions. And artificially contaminated agricultural products (iceberg lettuce, green pepper, and cherry tomato) was enumerated on five selective media. The sensitivity of BPA+RPF, CSA, Petrifilm, MSA, and BPA were 100%, 100%, 100%, 90.5%, 90.5%, respectively. In addition, the specificity of BPA+RPF, CSA, MSA, BPA and Petrifilm were 100%, 100%, 84.6%, 75.0%, 67.3%, respectively. However, no difference among five selective media was observed in recovery on injured *S. aureus* cell and enumeration from agricultural products. This results suggest that BPA+RPF and CSA are the optimum media for detection of *S. aureus* from agricultural products.

Key words: Agricultural products, *Staphylococcus aureus*, selective media, sensitivity, specificity

서 론

최근 국민들의 생활수준 향상과 건강에 대한 관심 증대로 육식보다 채식, 그리고 가공식품보다 자연 식품을 선호하고 있다. 과거의 식중독 발생은 고기류와 생선 등 단백질이 풍부한 식품에 의한 식중독이 대부분을 차지하고 있었으나 최근에는 과일과 채소 등에서 비롯된 식중독 사례가 증가하고 있다[1-2]. 또한 신선과채류를 통하여 발생하는 식중독은 대부분 주변의 환경으로부터 오염된 식품을 섭취함으로써 발생하는데 미생물에 의한 것이 많은 비중을 차지하고 있다고 보고되고 있다[3-4]. 과일과 채소로 인한 식중독 원인균으로는 *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*등이 있다. 그 중 *S. aureus*는 국내 유통 중인 농산물에서 검출된다는 보고가 있어 철저한 관리가 필요한 시점이다[4-6]. 식품공전에는 신선편의 농산물의 *S. aureus*의 관리기준은 g당 100 CFU 이하로 정하고 있다[7].

*S. aureus*에 의한 식중독을 예방하기 위해서는 신속 정확하게 이 세균의 존재 여부를 분석하는 것이 중요하다. *S. aureus*를 비롯한 식중독 세균을 분리하는 방법으로 선택배지를 사용한 검출법은 시간은 오래 걸리나, 가장 정확한 방법이다. 그래서 ISO, FDA, 및 AOAC 등과 같은 기관에서도 표준시험법으로 채택하고 있다. 표준시험법의 정

*Correspondence to: Byung-Seok Kim, Microbial safety division Department of Agri-food safety Rural Development Administration, 249, Sedun-dong, Gwonseon-gu, Suwon-si 441-707, Korea
Tel: 82-31-290-0445, Fax: 82-31-290-0407
E-mail: kim2000@korea.kr

확성과 효율성을 높이기 위해서는 분리능력이 우수한 선택배지를 사용하는 것이 가장 중요하다[8].

그동안 *S. aureus* 분리를 위해 식품공전과 많은 시험법에서 가장 널리 사용된 배지는 난황첨가 mannitol salt agar (MSA)와 Baird-Parker agar (BPA)이다[7]. 난황첨가 MSA는 고농도 염에 내성을 가지고 mannitol을 이용하며 lipase를 분비하는 *S. aureus*의 특성을 이용한 배지이다. 또한 Baird-parker agar는 난황에 혼합되어 있는 tellurite를 환원시켜 회색-검정 색깔의 광택이 있는 집락을 형성하고 집락 주위에 투명환이 형성되는 원리를 이용한 배지이다[9]. 이외에도 modified Baird-Parker 한천배지를 기본으로 하여 간편한 필름형태로 판매되고 있는 건조필름법이 있다. 이 배지는 정확한 황색포도상구균 계수를 위하여 DNase activity를 측정할 수 있는 필터를 보조적인 선발 마커로 사용하고 있다[10]. 하지만 *S. aureus* 분리를 위하여 사용되는 이들 배지에서 *S. aureus*와 유사하게 감별되는 *Staphylococcus spp.* 때문에 확인실험에 소요되는 인력과 비용을 증가시킬 수 있는 단점을 가지고 있다.

최근에 이런 배지의 낮은 선택성을 해결하기 위하여 Barid-Parker agar를 개선하여 난황 에멀젼 대신에 소 유래의 피브리노겐과 토끼혈청을 첨가한 배지가 Barid-Parker RPF (BPA+RPF)와 chromogenic agar들이 개발되었다. BPA+RPF는 *S. aureus*의 대표적인 특성인 coagulase를 생산하는 특성을 배지 상에서 측정할 수 있도록 설계되어 있다. 그래서 균주의 분리와 동시에 coagulase test를 동시에 수행할 수 있는 장점을 가지고 있으며 BPA에 비해 위양성 결과가 적어 보다 효율적인 배지로 평가 받고 있다[11]. 또한 1990년 이후부터 chromogenic agar에 대한 연구들이 진행되었으며 이들 배지는 육안으로 쉽게 위양성 결과를 일으키는 유사한 세균들을 구별할 수 있는 장점이 있어 실용성을 인정받고 있다[8].

한편, 식중독균 분리를 위해 사용되어지는 선택배지는 열이나 식품첨가물, 자외선에 의해 손상된 세균들이 존재할 시 이들 세균들을 회복하는 능력을 구비해야한다. 왜냐하면 손상된 세균들이 그들이 생존하기에 적합한 환경에 노출되면 왕성한 생육과 동시에 enterotoxin을 생성할 수 있기 때문에 손상된 세포들을 검출 하지 못하면 *S. aureus*의 위해를 간과하게 되기 때문이다[12]. 따라서 손상된 세균에 대한 복원능을 평가하는 것은 매우 중요한 일이다. 그리고 농산물에는 *S. aureus*와 유사한 *Staphylococcus spp.*가 분포하기 때문에[13] *Staphylococcus spp.*에서 *S. aureus*를 효과적으로 분리하는 배지를 선택하는 것은 대단히 필요하다. 하지만 그동안 배지에 대한 연구들은 식품을 대상으로 진행되어 왔고 농산물 중 *S. aureus*를 분리할 목적으로 선택배지를 평가한 사례는 드물다.

따라서 본 연구는 농산물 중 *S. aureus*의 효율적인 검출을 위하여 4종의 선택배지와 1종의 petrifilm의 민감성, 선택성, 손상된 세포에 대한 복원력 및 농산물에서 회수능을 평가하여 *S. aureus*의 검출법 확립의 기초자료로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

균주와 배지

본 연구에 사용된 균주는 *S. aureus* 21주, *Stapylococcus spp.* 20주, 그 외 식중독균 33주이며 이들 균주는 식품의약품안전청, 질병관리본부, 농업유전자원정보센터, 한국미생물보존센터, 한국생명자원센터에서 분양받았다(Table 1). 각 균주는 10% glycerol이 함유된 tryptic soy broth (TSB)에 현탁 후 −70°C에서 보관하며 사용하였다. 연구에 사용된 배지는 난황첨가 mannitol salt agar (MSA: Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), 난황과 tellurite가 첨가된 Barid-Parker agar (BPA: Oxoid), 토끼혈장이 첨가된 Barid-Parker agar (BPA+RPF: Oxoid), 3M petrifilm Staph Express count plates (petriflm: 3M, St. Paul, MN, USA) 및 CHROMagar *Staphylococcus aureus* (CS: CHROMagar, Paris, France)를 사용하였다.

선택배지의 민감도와 특이도 분석

4종의 선택배지와 1종의 페트리필름의 민감도와 특이도를 분석하기 위하여 각 균주를 nutrient agar (NA: Oxoid)에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 NA에서 배양한 균주를 한 백금이 취하여 TSB 100 µl가 든 96 well plate에 현탁시킨 후 37°C에서 24시간 배양시키고 각 선택배지에 멀티채널 피펫을 사용하여 2 µl씩 접종한 다음 37°C, 24시간 배양하였다. 페트리필름의 경우 앞서와 같이 96 well plate 상에서 배양하고 배양된 균액 100 µl를 900 µl의 0.1% peptone water (PW: Oxoid)와 혼합하여 10^5배와 10^6배 희석하였다. 두 농도로 희석된 균액을 1 ml씩 페트리필름에 접종하고 37°C, 24시간 배양하였다. 배양 후 colony 색깔과 형태를 중심으로 양성, 음성, 위양성, 위음성을 판정하였고 위양성, 위음성 균주에 대해서는 각각의 선택배지에서 한번 더 획선배양하여 성상을 확인하고 최종 판정하였다.

또한 각 선택배지가 농산물 표면에 존재하는 균주들을 저해 혹은 구별할 수 있는지를 비교하고자 양상추, 고추, 토마토를 각각 25 g씩 buffered peptone water (BPW: Oxoid) 225 ml이 든 스토머쳐 백에 넣고 2분간 균질화 시킨 후 37°C 24시간 배양하였다. 이후 0.1% PW에서 10배 단계 희석하고 각 선택배지에 200 µl씩 도말하고 37°C 24시간 배양한 후 각 선택배지에서 총세균수와 *S. aureus* 의심집락을 계수하였다. 또한 *S. aureus* 의심집락은 VITEK (VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 최종 동정하였다.

Table 1. Bacteria used in this study

Group	Bacteria[1)]
Staphylococcus aureus (n=21)	*Staphylococcus aureus* (ATCC 23235, ATCC 25923, ATCC 27664, ATCC 29213, ATCC 13565, ATCC 14458, KACC 11596, KACC 10778, KACC 13236, Perilla leaf (12 strains))
Other *Staphylococcus* spp. (n=20)	*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35983), *Staphylococcus arlettae* (KACC 13254), *Staphylococcus auricularis* (KACC 13252), *Staphylococcus capitis subsp.capitis* (KACC 13242), *Staphylococcus caprae* (KACC 13251), *Staphylococcus carnosus subsp.carnosus* (KACC 13250), *Staphylococcus haemolyticus* (KACC 13238), *Staphylococcus hominis subsp.hominis* (KACC 13243), *Staphylococcus intermedius* (KACC 13247), *Staphylococcus lugdunensis* (KACC 11270), *Staphylococcus pasteuri* (KACC 13185), *Staphylococcus saprophyticus subsp.bovis* (KACC 13231), *Staphylococcus sciuri subsp. sciuri* (KACC 13244), *Staphylococcus simulans* (KACC 13241), *Staphylococcus warneri* (KACC 10785), *Staphylococcus xylosus* (KACC 13239)
Foodborne pathogens (n=33)	*Escherichia coli* O157:H7 (meat, ATCC 13890, ATCC 43889, ATCC 43894, ATCC 35150, ATCC 43895), *Escherichia coli* - Enterotoxigenic (NCCP 13717), *Escherichia coli* - Enterotoxigenic (NCCP 13718), *Escherichia coli* - Enteroinvasive (NCCP13719), *Escherichia coli* - Enterohemorrhagic (NCCP 13720), *Escherichia coli* - Enterohemorrhagic (NCCP 13721), *Escherichia coli* (KACC 11930, KACC 13821) *Salmonella typhimurium* (ATCC 19585), *Salmonella enteritidis* (ATCC 4931), *Salmonella bongori* (ATCC 43975), *Salmonella arizonae* (ATCC 13314) *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544, ATCC 12868, ATCC 29004, Barely, Fried pepper) *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 19113, ATCC 19114, ATCC 19115, ATCC 19116) *Bacillus cereus* (KCTC 1092, KCCM 40138, ATCC 10876, ATCC 13061, KACC 13074)
Other bacteria (n=4)	*Streptococcus alactolyticus* (KACC 13886), *Streptococcus canis* (KACC 13819), *Streptococcus equinus* (KACC 13794), *Micrococcus lylae* (KACC 20621)

[1)]ATCC : American Type Culture Collection, NCCP : Korean National Culture Collection for Pathogens, KACC : Korean Agricultural Culture Collection, KCCM :Korean Culture Center of Microorganisms, KCTC : Korean Collection for Type Culture

선택배지의 회복능 조사

선택배지는 특이도와 더불어 농산물 생산, 유통환경으로부터 다양한 종류의 스트레스를 받은 식중독 세균을 손실없이 검출할 수 있어야 한다. 따라서 산, 열, 저온 스트레스에 노출 시킨 후 각 선택배지에서 회복능을 조사하였으며 그 과정은 다음과 같다. 먼저 *S. aureus* (ATCC 23235)를 7 ml의 TSB에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하고 4000 × g에서 20분간 원심 분리하였다. 이후 7 ml의 phospate buffered saline (PBS: Oxoid)로 2번 washing 한 다음 $O.D_{600}$ 1로 맞추었다(10^9 cell/ml). 준비된 균현탁액을 각종 스트레스에 노출시켰으며 산 스트레스는 1% lactic acid (Kanto chemical, Tokyo, Japan)가 함유된 BPW (pH 2.26) 4.5 ml에 0.5 ml의 균주 현탁액을 넣고 10분간 반응시켰다. 열스트레스는 BPW 4.5 ml을 1시간 동안 60°C에서 pre-heating 시킨 후 균액 0.5 ml을 넣고 90초간 반응시켰다. 또한 저온스트레스는 BPW 4.5 ml에 균액 0.5 ml을 넣고 –20°C에 1시간 동안 반응시켰다. 각종 스트레스에 노출된 균주는 0.1% PW에서 10배 단계 희석하고 각 선택배지와 TSA에 200 µl씩 도말하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 각 선택배지에서 전형적인 집락을 계수하였다.

농산물에서 회수율 조사

농산물 중 *S. aureus*의 정량적 회수율을 조사하고자 특성이 서로 다른 세가지 농산물 (양상추, 고추, 토마토)을 모델식품으로 하였다. 농산물은 수원소재의 하나로마트에서 구입하였다. 앞서 회복력 시험에서 준비된 균액을 4.0 log CFU/ml로 희석하고 각 시료 25 g에 100 µl씩 마이크로피펫으로 접종하였다. 접종 후 15 분간 부착시키고 시료를 스토머처백에 넣은 다음 225 ml의 D/E neutralizing broth (Difco, Sparks, MD, USA)를 넣어 균질화 시켰다. 이후 0.1% PW에서 10배 단계 희석하고 각 선택배지에 200 µl씩 도말하고 37°C에서 24시간 배양하였으며 각 선택배지에서 전형적인 집락을 계수하였다.

통계처리

각 선택배지의 민감도과 특이도는 백분율로 나타내었으며 산출방식은 다음과 같다.

% 민감도 = 양성 × 100 / (양성 + 위음성),

% 특이도 = 음성 × 100 / (음성 + 위양성)으로 산출하였다.

또한 회복능과 회수율조사는 3반복으로 수행하였며 관찰된 실험결과는 SAS 통계 프로그램(version 9.1, SAS Institute, NC, USA)의 ANOVA test를 이용하여 분석하였다. 각각의 처리군이 통계적으로 유의적으로 나타나는 경우에 ($p < 0.05$) 평균값은 LSD test를 통하여 다중비교를 하였다.

결과 및 고찰

민감도와 특이도분석

*S. aureus*를 비롯한 74균주는 난황첨가 MSA, 난황과 tellurite과 첨가된 BPA, 토끼혈장이 첨가된 BPA+RPF, CSA

및 petrifilm에 대한 민감도와 특이도를 분석하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 민감도는 MSA(90.5%), BPA(90.5%), BPA+RPF(100%), CSA(100%), petrifilm(100%)로 나타나 BPA+RPF, CSA, petrifilm의 민감도가 높았다. 들깻잎에서 분리된 *S. aureus* 1주와 ATCC 14458는 MSA상에서 colony 주위에 불투명환을 형성하지 않았으며 BPA상에서는 colony 주위에 투명환을 형성하지 않았다. *S. aureus*는 lipase를 생성·분비하여 MSA 상에서 colony 주위에 노란색의 불투명환을 형성시키고 BPA 상에서 egg yolk을 분해하는 lecithinase를 분비하여 colony 주위에 투명환을 형성시킨다[9]. 그러나 위음성을 보인 *S. aureus* 2주는 lipase와 lecithinase를 생성·분비하는 능력이 약하여 MSA상에서 불투명환을, BPA 상에서 투명환을 형성하지 못한 것으로 판단된다.

*S. aureus*가 아닌 균주(53주)가 음성으로 판단되는 정도를 특이도라 하였으며 5종의 선택배지의 특이도는 MSA (84.6%), BPA(75.0%), BPA+RPF(100%), CSA(100%), Petrifilm(67.3%)로 나타났다. 5종의 배지에서 다른 식중독균은 특이도에 영향을 주지 않았지만 *S. aureus*와 생화학적으로 유사한 특성을 가진 *Staphylococcus spp*. *Streptococcus spp*. *Micrococcus spp.*는 선택배지에서 위양성 결과를 보였다. MSA배지상에서는 난황을 분해하지는 않지만 노란색 colony를 형성하는 8종의 *Staphylococcus spp.*가 관찰되었다. BPA 상에서 뚜렷한 환은 보이지 않지만 검은색 colony를 형성한 12종의 *Staphylococcus spp.*와 *Streptococcus alactolyticus*가 관찰되었다. 또한 Petrifilm상에서는 전형적인 *S. aureus*와 같이 짙은 보라색에 보조필름을 끼웠을 때 DNase 양성 반응을 보이는 *S. intermidius*와 DNase 음성이나 짙은 보라색을 보여 *S. aureus*의 분리에 혼돈을 주는 15종의 *Staphylococcus spp.*와 *Micrococcus lylae*가 관찰되었다. 하지만 BPA+RPF는 양성균주에 대하여 뚜렷한 환을 형성하고, CSA는 *S. aureus*외의 *Staphylococcus spp.*에 대하여 색상으로 뚜렷이 구별할 수 있었다. MSA, BPA, Petrifilm에서 특이도가 낮은 원인을 분석해 보면 MSA는 내염성과 mannitol분해능을 기초로 BPA와 Petrifilm은 tellurite 환원력을 기초로 개발된 배지로[9] *S. aureus*외에 *Staphylococcus spp. Streptococcus spp. Micrococcus spp.*의 일부가 내염성, nannitol 분해능, tellurite 환원력을 보유하고 있어 이들 배지에서 위양성 결과를 보인 것으로 판단된다.

또한 각 선택배지의 농산물 표면에 존재하는 균주들을 저해 혹은 구별할 수 있는지를 조사하고자 3종의 농산물(양상추, 고추, 토마토)을 증균시킨 후 각 선택배지에 도말하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 BPA에서 검고 주위에 투명환(clear zone)이 나타나는 colony와 petrifilm에서 짙은 보라색을 나타내는 colony를 관찰할 수 있었다. 이들 colony를 VITEK으로 동정한 결과 *Staphylococcus hominis, Staphylococcus xylosus*으로 확인되었다. Oh[14] 등

Table 2. Sensitivity, specificity and false-positive bacteria on five different media

	MSA[1)]	BPA[2)]	BPA+RPF[3)]	CSA[4)]	Petrifilm[5)]
Sensitivity	90.5	90.5	100.0	100.0	100.0
Specificity	84.6	75.0	100.0	100.0	67.3
False positive strain					*S. intermedius*
Strains of similar to *S. aureus*[6)]	*S. arlettae* *S. capitis subsp.capitis* *S. caprae* *S. carnosus* *S. intermedius* *S. pasteuri* *S. saprophyticus* *S. xylosus*	*S. epidermidis* *S. arlettae* *S. caprae* *S. carnosus* *S. hominis* *S. intermedius* *S. lugdunensis* *S. pasteuri* *S. saprophyticus* *S. sciuri* *S. warneri* *S. xylosus* *Streptococcus alactolyticus*			*S. epidermidis* *S. arlettae* *S. auricularis* *S. capitis* *S. caprae* *S. carnosus* *S. haemolyticus* *S. hominis* *S. pasteuri* *S. saprophyticus* *S. simulans* *S. warneri* *S. xylosus* *S. alactolyticus* *S. canis* *Micrococcus lylae*

[1)]MSA : Mannitol salt agar
[2)]BPA : Baird-Parker agar
[3)]BPA+RPF : Baird-Parker agar with rabbit plasms fibrinogen
[4)]CSA : CHROMagar *Staphyloccus aureus*
[5)]Petrifilm : 3M petrifilm Staph Express count plates
[6)]The strains have a similar shape and color to *S. aureus*

Table 3. Effect of natural background bacteria on specificity of five different media

Agricultural Products	log CFU/ml									
	MSA[1)]		BPA[2)]		BPA+RPF[3)]		CSA[4)]		Petrifilm[5)]	
	Total colonies	Presumptive positive colonies	Total colonies	Presumptive positive colonies	Total colonies	Presumptive positive colonies	Total colonies	Presumptive positive colonies	Total colonies	Presumptive positive colonies
Iceberg lettuce 1	7.69	ND[6)]	6.81	ND	7.27	ND	7.67	ND	6.28	ND
Iceberg lettuce 2	6.75	ND	7.56	ND	7.77	ND	6.82	ND	6.41	ND
Green pepper 1	7.77	ND	7.29	ND	7.75	ND	7.71	ND	6.45	ND
Green pepper 2	6.13	ND	6.57	ND	6.56	ND	7.38	ND	6.43	ND
Cherry tomato 1	8.44	ND	8.14	5.18	8.15	ND	8.08	ND	7.57	5.74
Cherry tomato 2	6.22	ND	7.95	ND	6.00	ND	5.49	ND	4.78	ND

1)MSA : Mannitol salt agar
2)BPA : Baird-Parker agar
3)BPA+RPF : Baird-Parker agar with rabbit plasm fibrinogen
4)CSA : CHROMagar *Staphyloccus aureus*
5)Petrifilm : 3M petrifilm Staph Express count plates
6)ND : Not detected

은 MSA, BPA, BPA+RPF, petrifilm에서 민감성과 선택성을 비교한 결과 민감성은 MSA(76.6%), BPA(86.6%), BPA+RPF(100%), petrifilm(90%)였고 선택성은 4종의 배지 모두 100%라고 보고하였다. 민감성 평가에 대한 결과는 본 연구와 비슷한 경향을 보였지만 선택성에 대한 결과는 상이하였다. 이는 선택성 평가에 *S. aureus*와 유사한 *Staphylococcus spp.*를 공시균주로 사용하지 않고 *S. aureus*와 특성이 다른 4종의 식중독균 30주를 선택성 평가에 사용하였기 때문에 얻어진 결과로 보인다. 본 연구에서도 다른 식중독균은 선택성에 영향을 미치지 않았다. 또한 Oh[14)] 등은 MSA를 이용하여 건제품 41종 대하여 21개의 *S. aureus* 의심집락을 분리하여 4종의 선택배지에 접종하여 배양한 결과 *S. carnosus*는 MSA, BPA, perifilm에서 양성과 같은 반응을 보였고, BPA+RPA에서는 뚜렷하게 구별되어 연구에 사용한 4종의 배지 중 BPA+RPF가 여러면에서 가장 우수한 성능을 보인다고 보고하였다. Carricajo[15)] 등은 *S. aureus*는 CSA에서 전통적인 배지에서는 분리되지 않는 *S. aureus*까지도 분리가능하고, 민감성은 98%, 선택성은 100%라고 보고하였고, Samra[16)] 등은 병원성 검체에서 *S. aureus*를 분리할 목적으로 CSA, tryptic soy blood agar (TSBA), MSA의 민감성과 선택성을 평가한 결과, CSA가 민감성 99%, 선택성 100%로 가장 우수하다고 보고하였다. 따라서 BPA+RPF와 CSA는 민감성과 선택성면에서 우수한 배지로 판단된다.

선택배지의 회복능 및 농산물에서 회수능 조사

본 연구에서는 각종 스트레스에 노출 시킨 *S. aureus*의 복원력을 평가하고자 산, 열, 저온 처리 후에 각 선택배지와 TSA에 도말하여 얻어진 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. TSA는 세균의 생육을 억제할 수 있는 선택성 물

Table 4. The recovery of acid-, heat- and cold- injured *S. aureus* on five different media

Medium	log CFU/ml[1)]		
	Acid-injured (1% lactic acid for 10 min)	Heat-injured (60°C for 90s)	Heat-injured (−20°C for 1h)
TSA[2)]	9.04 ± 0.06[a8)]	8.89 ± 0.04[a]	9.11 ± 0.09[a]
MSA[3)]	9.00 ± 0.03[a]	8.69 ± 0.06[a]	9.07 ± 0.04[a]
BPA[4)]	9.04 ± 0.04[a]	8.88 ± 0.02[a]	9.12 ± 0.02[a]
BPA+RPF[5)]	8.87 ± 0.06[a]	8.60 ± 0.15[a]	9.00 ± 0.08[a]
CSA[6)]	9.03 ± 0.04[a]	8.78 ± 0.03[a]	9.12 ± 0.05[a]
Petrifilm[7)]	8.75 ± 0.02[a]	8.28 ± 0.10[a]	8.94 ± 0.06[a]

1)Means ± standard deviations
2)TSA : Trypticase soy agar
3)MSA : Mannitol salt agar
4)BPA : Baird-Parker agar
5)BPA+RPF : Baird-Parker agar with rabbit plasm fibrinogen
6)CSA : CHROMagar *Staphyloccus aureus*
7)Petrifilm : 3M petrifilm Staph Express count plates
8)Different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$)

Table 5. Quantitative recovery of *S. aureus* from green pepper, perilla leaves, iceberg lettuce, cucumber, and cherry tomato on five different media

Medium	log CFU/g[1]		
	Iceberg lettuce	Green pepper	Cherry tomato
MSA[2]	3.17 ± 0.11[a7)]	3.13 ± 0.03[a]	3.05 ± 0.10[a]
BPA[3]	3.09 ± 0.07[a]	3.25 ± 0.05[a]	3.02 ± 0.02[a]
BPA+RPF[4]	3.07 ± 0.07[a]	3.07 ± 0.04[a]	3.00 ± 0.03[a]
CSA[5]	3.14 ± 0.03[a]	3.20 ± 0.07[a]	3.14 ± 0.25[a]
Petrifilm[6]	3.03 ± 0.08[a]	3.05 ± 0.08[a]	3.01 ± 0.06[a]

1)Means ± standard deviations
2)MSA : Mannitol salt agar
3)BPA : Baird-Parker agar
4)BPA+RPF : Baird-Parker agar with rabbit plasm fibrinogen
5)CSA : CHROMagar *Staphyloccus aureus*
6)Petrifilm : 3M petrifilm Staph Express count plates
7)Different letters within a column are significantly different ($P<0.05$)

질이 함유되어 있지 않기 때문에 이 배지를 대조군으로 사용하였으며 손상된 세포의 회복능을 *S. aureus*용 선택배지와 통계적 유의차를 보이지 않았다.

또한 현재 식품공전에 신선편의 농산물에 대하여 1 g 당 100 마리 이하로 존재해야 한다는 정량적 기준을 설정해 놓은 실정이다[7]. 각 선택배지가 농산물에서 정량적으로 *S. aureus*를 손실없이 분리할 수 있는 지를 평가하고자 각종 농산물에 *S. aureus*를 인위적으로 접종한 후 선택배지에서 회수하였다. 그 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 농산물 종류별 선택배지별 유의적인 차이는 없었다. Vicosa[17] 등의 연구에서도 인위적으로 생우유와 소프트 치즈에 *S. aureus*를 접종한 후 BPA, BPA+RPF, petrifilm에 도말하여 정량적으로 회수했을 때 배지 간에 차이는 없었다. 또한 Oh[14] 등은 광어회에 Jo[18] 등은 돼지고기에 인위적으로 접종하고 증균배양 후 회수했을 때 선택배지간 회수 효율에 커다란 차이는 없었다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 하지만 BPA+RPF는 coagulase 양성균주를 손쉽게 분리할 수 있는 장점이 있고, CSA는 기타 *Staphylococcus spp.* 속들과 *S. aureus*를 색깔로 쉽게 육안으로 구별할 수 있어서 확인시험에 소요되는 인력, 시간 및 비용을 줄일 수 있다. 따라서 민감도, 특이도, 회수율 측면을 고려해 볼 때 농산물 중 *S. aureus*를 분리할 시 BPA+RPF와 CSA를 사용하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단된다. 또한 효율성이 높은 이들 배지를 식품공전에 등재시켜 제도권내로 도입한다면 보다 신속하게 *S. aureus*에 오염된 농산물을 선별해 낼 수 있어 농식품안전관리 수준을 향상시킬 수 있을것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 농산물로부터 *S. aureus*분리에 적합한 배지를 선발하고자 난황첨가 mannitol salt agar (MSA), 난황과 tellurite과 첨가된 Barid-Parker agar (BPA), 토끼혈장이 첨가된 Barid-Parker agar (BPA+RPF), 3M petrifilm Staph Express count plates (Petriflm) 및 CHROMagar *Staphylococcus aureus* (CSA)의 민감도, 특이도, 손상된 세포에 대한 회복능, 농산물로부터 회수율에 대하여 비교 실험을 하였다. 민감도와 특이도를 조사하기 위하여 *S. aureus* 21주, *Stapylococcus spp.* 20주, 그 외 식중독균 33주를 각 선택배지에 접종하였으며 손상된 세포에 대한 회복능은 조사를 위하여 열(60°C, 90초), 산(1% lactic acid, 10분), 저온(–20°C, 1시간) 처리하였다. 또한 양상추, 토마토, 고추에 *S. aureus*를 4.0 log CFU/g농도로 접종하고 각 선택배지에 도말하였다. 민감도는 BPA+RPF(100%) = CSA(100%) = petrifilm(100%) > MSA(90.5%) > BPA(90.5%), 특이도는 BPA+RPF(100%) = CSA(100%) > MSA(84.6%) > BPA(75.0%) > petrifilm(67.3%) 순으로 나타났다. 한편, 손상된 세포의 회복능과 농산물에서 회수율은 5종의 배지에서 차이가 없었다. 따라서 농산물 중 *S. aureus*를 분리할 시 BPA+RPF와 CSA를 사용하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업인 농식품 중 유해미생물 안전관리기반기술 개발 (과제번호 : PJ007614)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Choi, J.W., Park, S.Y., Yeon, J.H., Lee, M.J., Chung, D.H., Lee, K.H., Kim, M.G., Lee, D.H., Kim, K.S. and Ha, S.D.: Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *Korean J. Fd. Hyg. Safety*, **20**, 43-47 (2005).
2. FDA: Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Leafy Greens; Draft Guidance Available from: http://www.fda.gov/Food/GuidanceCompli-anceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Produce-andPlanProducts/ucm174200.htm Accessed January **15**, 2010 (2009).
3. CDC: Update on Multi-State Outbreak of *E.coli*O157:H7 Infections From Fresh Spinach, October 6, 2006. Available from: http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100606. htm Accessed Febrary **20**, 2010 (2006).
4. Patel, J. and Sharma, M.: Differences in attachment of *Salmonella enteric* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.*, **139**, 41-47 (2010).
5. Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.P., and Park, J.H.: Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agaricultural and marine products. *Korean J. Food Sci. Technol,*. **38**(4), 594-598 (2006).
6. Kim, J.S., Bang, O.K., and Chang, H.C.: Examination of

microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salad. *J. Fd. Hyg. Safety,* **19**, 60-65 (2004).

7. KFDA: *Korean Food code*. Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea. pp.5-29-34 (2012).
8. Kim, Y.S. and Ha, S.D.: Detection and isolation of foodborne bacteria using conventional culture media. *Safe food,* **1**(4), 5-15 (2006).
9. Baird-Parker, A.C.: An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.*, **25**, 12-19 (1962).
10. Wendy, A.M., Victoria, A.A., and Ann, M.S.: 3M^{TM} Perifilm^{TM} Staph Express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of meat, seafood, and poultry: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, **86**, 947-953 (2003).
11. Maxine, E.M. and Eleanor, B.T.: Comparision of several selective media for isolation and differentiation of coagulase-positive strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.,* **12**, 169-172 (1964).
12. Barid, R.M. and Lee, W.H.: Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 15-24 (1995).
13. Lee, D.H., Ryu, J., Park, S.Y., Roh, E., Oh, C.S., Jung, K.S., Yun, J.C., and Heu, S.: Changes of bacterial diversity depend on the spoilage of fresh vegetables. *Res. Plant Dis.,* **17**(1), 38-43 (2011).
14. Oh, M.H., Kang, S.I., Hong, S.P., and Oh, S.W.: Comparison of four different isolation media for *Staphylococcus aureus*. *J Korean Soc Food Sci. Nutr.*, **38**(5), 606-611 (2009).
15. Caricajo, A., Treny, A., Fonsale, N., Bes, M., Reverdy, M.E., Gille, Y., Aubert, G., and Freydiere, A.M.: Performance of the chromogenic medium CHROMagar *Staphylococcus aureus* and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2581-2583 (2001).
16. Samra, Z.O., Ofir, O., and Bahar, J.: Optimal detection of Staphylococcus aureus from clinical specimens using a new chromogenic medium. *Diagn. Micr. Infec. Dis.*, **49**, 243-247 (2004).
17. Vicosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., and Nero, L.A.: Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese : An evaluation of Baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and petrifilm^{TM} Staph express count system. *Food Microbiol.*, **27**, 447-452 (2010).
18. Jo, S.H., Ha, J.H., Kim, K.S., Shim, Y.H., Kwon, K.S., Han, J.A., Hwang, I.G., Ha, S.D., and Oh, D.H.: Evaluation of selective media for isolation of foodborne bacteria. *Korean J. Fd. Hyg. Safety,* **22**, 388-394 (2007).