

# *Escherichia coli*와 *Bacillus cereus*에 오염된 상토, 토양 및 관개용수가 상추의 미생물 안전에 미치는 영향

김세리<sup>1</sup> · 이서현<sup>1</sup> · 김원일<sup>1</sup> · 김병석<sup>1</sup> · 김준환<sup>2</sup> · 정덕화<sup>3</sup> · 윤종철<sup>1</sup> · 류경열<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물팀, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 답작과, <sup>3</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>4</sup>농촌진흥청 연구정책국 연구성과관리과

## Effect of Medium, Soil, and Irrigation Water Contaminated with *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* on the Microbiological Safety of Lettuce

Se-Ri Kim<sup>1</sup>, Seo-Hyun Lee<sup>1</sup>, Won-Il Kim<sup>1</sup>, Byung-Seok Kim<sup>1</sup>, Jun-Hwan Kim<sup>2</sup>, Duck Hwa Chung<sup>3</sup>, Jong Chul Yun<sup>1</sup>, and Kyoung Yul Ryu<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Microbial Safety Team, Department of Agri-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Rice Research Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea

<sup>3</sup>Division of Applied Life Science, Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>4</sup>R&D Performance Evaluation and Management Division, Research Policy Bureau, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

**Abstract.** Many outbreaks of food-borne illnesses have been associated with the consumption of fresh vegetables and fruits contaminated with food-borne pathogens. Contaminated medium, manure and irrigation water are probable vehicles for the pathogen in many outbreaks. The aim of this study was to determine the potential transfer of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* from medium and soil fertilized with contaminated compost or irrigation with contaminated water to the edible parts of lettuce. Moreover, survivals of the two pathogens on lettuce contaminated medium, soil and irrigation water were estimated. Lettuce seeds were planted in medium contaminated with 7.5 log colony forming unit (CFU)/g of *E. coli* and *B. cereus*. Seedlings grown in the contaminated medium were transplanted in soil fertilized with contaminated pig manure compost or uncontaminated soil. Contaminated irrigation water with *E. coli* and *B. cereus* at 8.0 log CFU/mL was applied only once on the plant by sprinkle irrigation and surface irrigation. Although *E. coli* and *B. cereus* in medium and sprouted lettuce after planting seeds were reduced as time passed, these pathogens survived in seedling raising stage for extended periods. The numbers of *E. coli* and *B. cereus* in lettuce grown on contaminated soil were detected over 4.0 log CFU/g for 21 days. The numbers of *E. coli* and *B. cereus* in lettuce applied by sprinkle irrigation were higher than those of surface irrigation by 5.0 log CFU/g. Our results indicated that contaminated medium, soil and irrigation water can play an important role in the presence of food-borne pathogens on vegetables.

**Additional key words:** food-borne illness, fresh vegetable, pathogen

### 서 언

신선 채소는 인간에게 비타민, 미량원소 및 섬유소를 공급하는 중요한 농산물이다. 하지만 엽채류는 표면적이 넓고

생산 과정 중 주변환경과 접촉 빈도가 높아 유해미생물에 오염되기 쉬우며 최근에 농산물 유래의 식중독 발생이 국내 외적으로 보고되고 있다(CDC, 2006; Choi et al., 2005; FDA, 2009; Patel and Sharma, 2010). 미국의 경우 1996년

\*Corresponding author: kyryu@korea.kr

※ Received 7 February 2012; Revised 25 May 2012; Accepted 29 May 2012. 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ007612)의 지원에 의해 이루어진 것임

부터 2008년까지 농산물과 관련된 식중독이 82건 발생하였으며 그 중 엽채소와 관련된 사고는 28건이었다(FDA, 2009). 엽채류에 의한 식중독 사고의 예로는 2006년에 *Escherichia coli* O157:H7(*E. coli* O157:H7)에 오염된 시금치가 원인이 되어 발생한 식중독 사고를 들 수 있으며 이 사고로 199명 이상의 환자가 발생하였고 3명이 사망하였다(CDC, 2006). 그 외에도 영국에서 발생한 *Salmonella* Thompson에 오염된 상추로 인한 식중독과 덴마크에서 발생한 *Salmonella* Anatum에 의해 오염된 바질에 의한 식중독 등이 있다(Patel and Sharma, 2010). 이러한 식중독 사고들로 인하여 과거에는 소비자들이 농산물을 고를 때 품질을 최우선으로 고려하였으나 최근에는 안전을 우선으로 고려한다고 보고되고 있다(Nam, 2010).

농산물과 관련된 식중독 사고의 원인이 되는 병원성 미생물의 오염은 재배단계에서 유통과정에 이르는 전 단계에서 일어날 수 있으며, 특히 생산과정에서 완전하게 부숙되지 않은 퇴비를 시비한 토양에서 농산물을 재배하거나 오염된 관개용수의 사용은 농산물의 병원성 미생물 오염의 주요한 원인이 될 수 있다(Burnett and Beuchat, 2001; FDA, 2005).

농산물 생산과정의 퇴비에서 사용은 토양의 비옥도와 수분보유력(water-holding capacity)를 증진시키고, 토양침식을 예방하며 토양 내 유용미생물의 생장을 촉진시키는 중요한 역할을 한다(Gagliardi and Karns, 2002a, 2002b). 그러나 퇴비의 원료가 되는 가축의 분뇨에서 *E. coli* O157:H7 등과 같은 식중독 세균이 검출된 바 있으며 *E. coli* O157:H7이 오염된 퇴비를 토양에 시용하고 다양한 환경에 노출시켰을 때 수주에서 6개월까지 생존할 수 있다고 보고되고 있다(Faith et al., 1996; Jiang et al., 2002). 또한 *E. coli* O157:H7이 오염된 퇴비를 토양에 시용하고 상추를 이식했을 때 상추 잎에서도 *E. coli* O157:H7이 발견되었고 세척제 처리 후에도 생존하고 있는 것을 증명한 Solomon et al.(2002a)의 연구결과는 부적절한 퇴비의 사용은 농산물의 오염으로 이어질 수 있음을 시사한다.

또한 1995년과 1996년에 미국에서 발생한 상추에 의한 식중독 사고는 *E. coli* O157:H7에 오염된 관개용수 사용으로 인한 사고라고 추정하였으며 원인농산물을 재배한 농가는 축사 주위에 있는 우물의 물을 관개용수로 사용하였다고 보고되었다(Solomon et al., 2003). 그러나 병원성 미생물에 오염된 관개용수라 할지라도 관수법에 따라 작물로의 이행 정도는 차이가 있다. Oliveria et al.(2011)의 연구에서 *L. innocua*에 오염된 관개용수로 지표면관수법과 살수관수법으로 상추에 관수하고 상추에 *L. innocua*가 전이된 정도를 측정할 결과, 살수관수법으로 관수한 상추에서 *L. innocua*

가 100배 높게 검출되었다. 이러한 연구결과들은 관개용수의 미생물 안전성과 올바른 관수법의 중요성을 제시하는 중요한 자료이다. 하지만 그 동안의 연구는 육묘 이후에 오염된 토양과 관개용수에 의해 병원성 미생물의 전이와 작물에서 생존에 관한 연구로 파종부터 수확기 전반에 걸친 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 생산환경에서 가장 널리 빈번하게 검출되는 *Bacillus cereus*, 엽채류의 주요한 식중독 원인균인 *Escherichia coli*를 대상 균주로 선정하여 육묘단계의 상토, 재배과정의 토양, 관개용수가 이들 병원성미생물에 오염되었을 때 상추의 안전성에 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 현탁액준비

본 연구를 위하여 사용한 균주는 장출혈성대장균(*Escherichia coli* O157:H7)의 대체균주(surrogate)인 *Escherichia coli* K-12(KCCM 41300)와 *Bacillus cereus*(ATCC 6538)를 사용하였다. 시료 중 존재하는 background microflora의 생육을 억제하고자 대상 균주를 rifampicin 저항성을 유도하였다. Rifampicin 저항성 유도는 tryptic soy agar(TSA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) 상에서 배양한 각 균주를 1 loop 취하여  $50\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 rifampicin(R; Biosesang, Sungnam, Gyeonggi, Korea) 이 함유된 luria bertani broth (LB, Oxoid, England)에 접종하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 진탕 배양하였다. 이후  $50\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 rifampicin이 함유된 luria bertani agar(LA; Oxoid, England)에 접종하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하여 얻었다. Rifampicin 저항성균은 20% glycerol을 함유하는 TSB-R를 사용하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 사용 시에는 상온에서 해동한 후  $10\mu\text{L}$ 를 취하여 7mL의 TSB-R에 넣은 후 *E. coli*는  $37^{\circ}\text{C}$ , *B. cereus*는  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 동안 배양하였다. 이후 1차 배양액 1mL을 200mL의 TSB-R에 접종하고 *E. coli*는  $37^{\circ}\text{C}$ , *B. cereus*는  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 2차 배양하였다. 배양된 균은  $4,500 \times g$ , 15분간 원심분리한 후 phosphate buffered saline(PBS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 시험균을 현탁하였다. 이후 생균수가 7.0-8.0log colony forming unit(CFU)/mL가 되도록 희석하여 본 연구에 사용하였다.

### 상토 및 상추의 병원성미생물 오염도 및 생존

오염된 상토가 파종 후 육묘기간 동안 상추의 미생물안전성에 미치는 영향 분석은 다음과 같이 수행되었다. 먼저 상

토는 상토 속에 존재하는 미생물의 영향을 줄이고자 고온가압멸균처리(121°C, 15분)를 하였다. 멸균처리 된 상토(Seoul Bio, Eumsung, Chungbuk, Korea) 800g에 8.0logCFU/mL 농도의 *E. coli*, *B. cereus* 현탁액 160mL과 멸균증류수 840mL을 넣고 멸균주걱으로 섞은 다음 40공 육묘용 포트에 담았다. 포트의 한 block당 2립의 적상추 종자를 파종하였다. 주변환경의 병원성미생물 오염을 예방하고자 포트 하부에 tray를 받쳤으며 관수는 tray에 수분이 마를 때마다 보충해주었다. 상추를 심은 tray는 25°C, 상대습도 70-80%로 유지되는 국립식량과학원의 인공기상동에 옮겨 성장시켰다. 미생물 분석을 위하여 파종직후, 파종 후 6일, 11일, 17일, 21일, 28일에 멸균장갑을 착용하고 상추는 멸균가위로 지면으로부터 0.5cm 부위를 잘랐으며, 상토는 상추 채취 후 플러그 내에 있는 것을 채취하여 *E. coli*와 *B. cereus*를 조사하였다.

### 토양 및 상추의 병원성미생물 오염도 및 생존

정식 후 재배과정 중 병원성미생물에 오염된 퇴비가 사용된 토양이 상추의 미생물안전성에 미치는 영향은 다음과 같이 분석하였다. 퇴비는 돈분을 원료로 한 퇴비(Jeilbiryo, Pyeongtaek, Gyeonggi, Korea)로, 토양은 농업생물부 시험포(경기도 수원)의 토양을 사용하였고 퇴비와 토양 속에 존재하는 미생물의 영향을 줄이고자 고온가압멸균처리(121°C, 15분)를 하였다. 멸균 처리된 퇴비 300g에 8.0logCFU/mL 농도의 *E. coli*, *B. cereus* 현탁액 30mL을 넣고 섞었다. 이후 미생물을 오염시킨 퇴비와 토양 2.7kg, 멸균증류수 270mL을 넣고 멸균주걱으로 섞은 다음 지름 30cm 포트에 담았다. 앞서 오염된 상토에서 21일 동안 성장시킨 상추 묘를 병원성미생물로 오염시킨 토양이 담긴 포트와 오염시키지 않은 토양이 담긴 포트에 각각 한 주씩 이식하였다. 주변환경의 병원성미생물 오염을 예방하고자 포트 하부에 tray를 받쳤으며 표면이 마를 때 포트 표면에 300mL씩 관수하였다. 상추의 생장은 25°C, 상대습도 70-80%로 유지되는 국립식량과학원의 인공기상동에 수행하였으며 미생물 분석을 위한 시료는 파종 직후, 파종 후 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일, 49일에 멸균장갑을 착용하고 상추는 파종직후와 파종 후 21일까지는 1마디, 28일에 2마디, 35일에는 3마디, 42일에는 4마디, 49일에는 5마디에 있는 상추를 채취하였고, 토양은 상추 주변의 것을 채취하여 *E. coli*와 *B. cereus*를 조사하였다.

### 관수법에 따른 상추의 병원성미생물 오염도 및 생존

관수법에 의한 상추로 미생물 오염도와 오염 후 상추 표면에서 미생물의 생존을 조사하기 위하여 21일 묘를 지름

15cm 포트에 이식한 후 20일 성장시켰으며 토양의 영향을 배제하기 위하여 최하위엽을 제거하고 앞서 8.0logCFU/mL 농도의 *E. coli*, *B. cereus* 현탁액을 살수관개법을 재연하기 위하여 분무기에 넣고 상추 전체에 100mL을 분무하고, 지표면관개법을 재연하기 위하여 화분의 표면에 100mL을 관수하였다. 상추의 채취는 관수 직후, 관수 후 3일, 7일, 14일, 21일, 26일, 32일, 40일에 멸균장갑을 착용하고 관수직후와 파종 후 7일까지는 2마디, 14일에 3마디, 21일에 4마디, 26일에 5마디, 32일에 6마디, 40일에 7마디에 있는 상추를 채취하였다.

### 미생물 분석

채취된 시료에서 *E. coli*와 *B. cereus*의 분석은 다음과 같이 수행하였다. 육묘기 동안의 상추는 엽의 크기와 무게가 적기 때문에 1-3g, 정식 이후의 상추는 10g을 사용하였고 상토와 토양은 25g을 사용하였다. 각 시료는 스토머크백(Interscience®, Paris, France)에 넣고 각 시료의 9배의 0.1% peptone water(Oxoid, England)를 가하여 2분간 stomacher (Bagmixer 400VW, Interscience®, Paris, France)에서 균질화하였다. 균질화한 검액은 10배 단계희석한 후 200μL씩 TSA-R agar에 접종한 후 *E. coli*는 37°C, *B. cereus*는 30°C에서 24-48시간 배양한 후 집락을 계수하였다. 또한 *B. cereus*는 포자형성균이므로 포자도 동시에 조사하였으며 포자농도의 결정은 앞서 균질화 된 시료 1mL을 취하여 e-tube에 넣고 80°C, 15분간 가열하고 10배 단계 희석한 후 200μL씩 brain heart infusion agar(BHIA; Oxoid, England)에 접종하였다. 접종된 플레이트는 30°C에서 24-48시간 배양하고 집락을 계수하였다. 총세균수와 포자수는 전형적인 집락을 보이는 균주 × 희석배수로 계산하였고, *B. cereus*의 총세포수는 영양세포와 포자수를 의미한다.

정량분석의 검출한계는 50CFU/g이므로 50CFU/g이하의 농도에서는 미생물의 존재 유무를 확인할 수 없기 때문에 정성분석을 동시에 수행하였고 정성분석법은 다음과 같다. 육묘기 동안은 상추는 3g, 정식 이후의 상추는 10g, 상토와 토양은 25g을 취하여 225mL의 buffered peptone water (BPW; Oxoid, England)에서 37°C, 24시간 증균하였고 배양액 1 loop를 취하여 *E. coli*는 eosin methylene blue agar (EMB; Oxoid, England)에 *B. cereus*는 mannitol egg yolk polymyxin agar(MYP; Oxoid, England)에 재접종하였다. 이후 37°C, 24시간 배양 후 전형적인 집락을 *E. coli*는 VITEK (VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 *B. cereus*는 PCR 방법으로 최종 동정하였다.

*B. cereus*를 검출하기 위한 PCR 조건은 Choo et al.(2007)

의 방법으로 *gryB* 유전자 *cry* 유전자를 대상으로 multiplex PCR을 수행하였다. PCR 반응은 intron사의 i-star Taq PCR kit(Intron, Seoungnam, Gyeonggi, Korea)을 사용하였으며 DNA 5 $\mu$ L primer는 10pM 농도로 2쌍 첨가하고 3차 멸균 증류수로 최종 반응용액을 20 $\mu$ L로 조절하였다. 또한 PCR thermal cycle(BioRad, Hercules, CA, USA)의 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation을 실시한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 2분간 primer annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1.5분간 extension의 조건으로 30cycle을 수행하고, final extension을 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭 생성물은 1.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다. 대조군으로는 *Bacillus cereus* ATCC 10876와 *Bacillus thuringensis* ATCC 29730을 사용하였다.

### 통계 처리

미생물 균수는 log CFU/mL, g으로 나타내었으며, 모든 실험은 3반복하였으며 각 실험 결과에 대해서는 SPSS 통계 처리 프로그램 version 11을 사용하여 ANOVA와 Duncan's multiple range test를  $\alpha = 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 상토의 오염이 상추의 미생물 안전성에 미치는 영향

상토의 병원성미생물의 오염이 육묘기 상추의 미생물 안전성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figs. 1, 2와 같다. 상토에 *E. coli*의 초기 오염농도는 7.5log CFU/g이었으며 시간이 경과하면서 점차 감소하였지만 육묘기 끝 무렵인 28일까지도 4.7log CFU/g로 존재하고 있었다. 한편, *B. cereus*의 경우는 파종 후 6일 동안 총 세균수가 2.3log CFU/g 감소하였고 이후 21일까지는 유의적인 감소를 보이지 않았다( $P > 0.05$ ). 포자 수는 28일간 2.0log CFU/g 내외로 일정하게 유

지되었다. 상추의 출아하는 시점인 6일째에 상추에서 4.9, 3.6log CFU/g가 검출되어 오염된 상토에서 상추로 병원성 미생물이 출아시점부터 직접 이행될 수 있음을 확인하였다. 또한 상추 중 *E. coli*와 *B. cereus*는 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였지만 육묘기 내내 생존 가능하였다. Kim et al. (2011)의 연구결과에서도 상추농가의 상토와 상추에서 *E. coli*와 *B. cereus*가 동시에 검출되어 상토의 미생물 오염은 상추의 오염으로 이어질 수 있다고 보고하였다. 본 연구결과를 통해 볼 때 상토의 병원성 미생물오염은 상추로 병원성미생물이 이행 가능하며 한번 오염된 상추의 표면에서 병원성미생물은 오랫동안 생존 가능하기 때문에 상토의 안전성은 상추의 안전성에 영향을 미침을 알 수 있다. 따라서 상토의 안전성확보를 위해서는 위생적인 생산관리, 유통 전 주기적인 미생물검사가 필요할 것으로 사료된다.

### 토양의 오염이 상추의 미생물 안전성에 미치는 영향

육묘기에 병원성미생물에 오염된 상추가 정식 후 토양의 오염 유무에 따라 상추의 안전성에 미치는 영향을 조사한

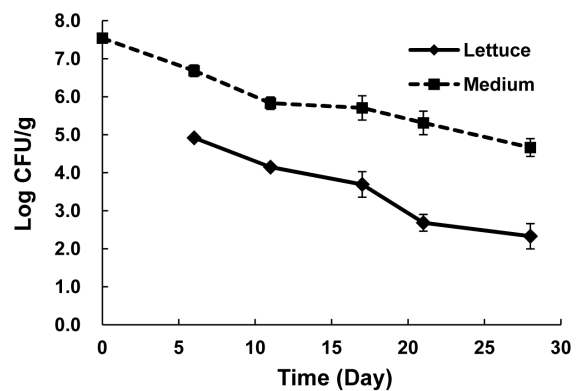


Fig. 1. Survival of *Escherichia coli* in medium and lettuce after planting seeds in contaminated medium. Error bars indicate standard deviation.

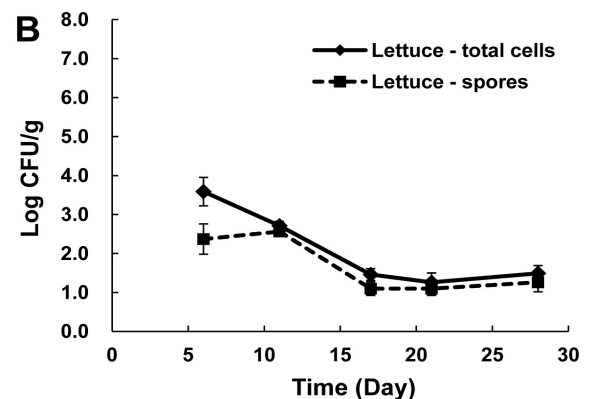
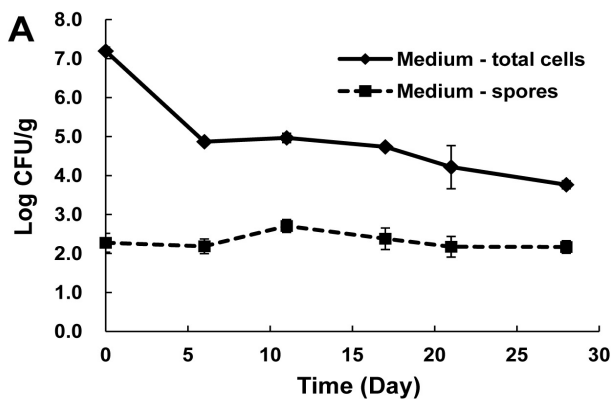


Fig. 2. Survival of total cells and spores of *B. cereus* in medium (A) and lettuce (B) after planting seeds in contaminated medium. Error bars indicate standard deviation.

결과는 Figs. 3과 4와 같다. 앞서 오염된 상토에서 상추를 재배한 후 21일째 병원성미생물의 오염이 없는 토양에 이식하고 상추에서 *E. coli*, *B. cereus*를 조사한 결과 이식 후 14일 이후부터 검출되지 않았다(data not shown). 한편, *E. coli*와 *B. cereus*로 오염된 퇴비를 토양에 시비한 경우는 Figs. 3과 4에서 보는 바와 같이 토양에서는 42일간 *E. coli*와 *B. cereus*가 6.0log CFU/g 내외로 유의적인 감소 없이 유지되고 있었다( $P > 0.05$ ). Islam et al.(2005)은 토양에 *E. coli* O157:H7을 오염시킨 후 생존기간을 조사한 결과 196일까지 생존하였다고 보고하였고, Oliveira et al.(2012)도 토양에서 *E. coli*는 9주 이상 생존가능하며 봄철보다 가을철에 보다 높은 농도로 생존이 유지되었다고 보고하였다. 토양에서 병원성 미생물의 생존기간은 연구당시의 온도, 습도, 일사량 등에 따라 달라질 수 있으며 특히 자외선의 노출이 많은 포장에서 온실보다 생존이 불리하다고 한다(Zhang et al., 2009).

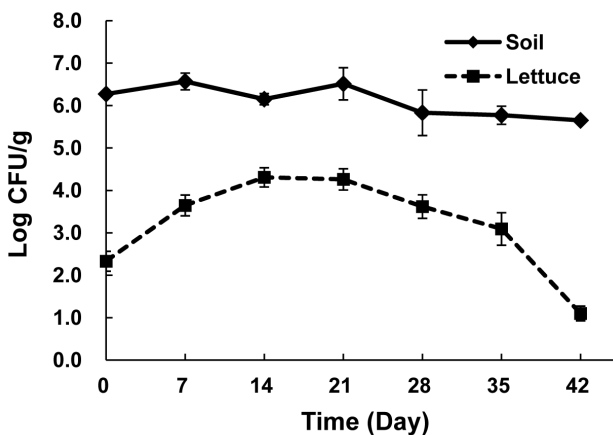
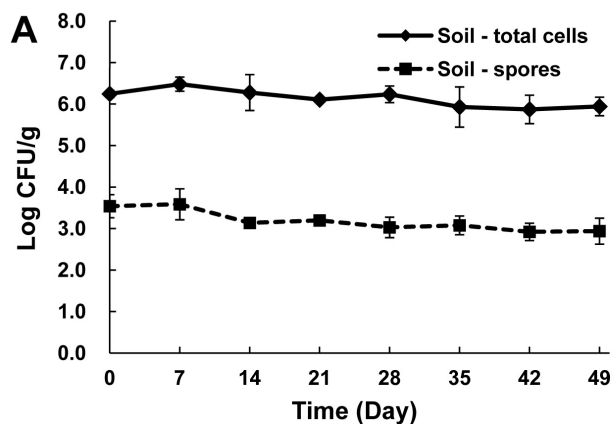


Fig. 3. Survival of *Escherichia coli* in soil and lettuce grown in contaminated soil. Error bars indicate standard deviation.



또한 오염된 토양에서 생육시킨 상추에서 *E. coli*의 농도는 이식 직후보다 이식 후 7일째에 10배 정도 증가한 후 첫 수확기인 21일째까지 4.3log CFU/g를 유지하였다. 이후 점차 감소하였다. 이는 병원성 미생물로 오염된 토양에 상추를 재배하였을 때 하위엽은 토양과 접촉할 기회가 많아 하위엽의 오염도가 상위엽 보다 높다고 판단된다(Oliveria et al., 2012). *B. cereus* 경우, 4.0log CFU/g 이상의 높은 농도가 이식 후 35일째까지 지속된 후 42일째부터 감소하였다. 이는 이전에 수행된 여러 연구자의 결과(Kim et al., 2011; Oliveria et al., 2011; Solomon et al., 2002a)와 같은 경향을 보였다. Kim et al.(2011)은 상추농장의 토양에서 62일 동안 *B. cereus*의 수가 시간의 경과에 따른 유의적인 차이 없이 3.5log CFU/g 수준이 유지되었고 상추가 토양에서 멀어질수록 유해미생물의 수가 줄어든다고 보고하였다. 또한 Oliveria et al.(2011)에 따르면 *L. innocua*는 토양 속에서 총 실험 기간인 9주 동안 계속 생존하였으며 *L. innocua*로 오염된 토양에 이식한 상추에서도 *L. innocua*가 발견되어 토양 중 유해미생물은 작물로 이행될 수 있음을 확인하였다. Solomon et al.(2002a)은 토양을 인위적으로 *E. coli*로 오염시키고 상추를 심었을 때 *E. coli*는 작물 외부 뿐만 아니라 root system을 통해 작물로 내부로 들어와서 가식부위까지 이동한다고 보고한 바 있다.

따라서 병원성미생물에 오염된 퇴비 등을 통한 토양의 유해미생물 오염은 작물의 미생물안전성에 크게 영향을 끼치므로 이를 예방하는 것이 필요하다. 병원성 미생물의 토양 유입을 차단하기 위해서는 우선 퇴비는 완전하게 부숙된 것을 사용하고 퇴비생산업체는 유통 전 자가 검사를 통하여 안전성이 확보된 퇴비를 유통시키는 것이 대단히 중요하다고 판단된다. 또한 *B. cereus*는 고온에서도 안정한 포자를 형성하기 때문에 퇴비생산과정 중에 사멸시키기 어려우며

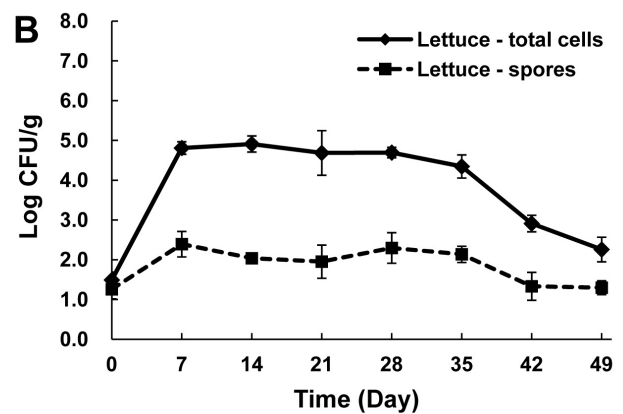


Fig. 4. Survival of total cells and spores of *B. cereus* on soil (A) and lettuce (B) grown in contaminated soil. Error bars indicate standard deviation.

퇴비를 통해 토양 내에 유입되게 되면 작물의 생산과정 중에 균에 쉽게 오염될 수 있다. 따라서 이 균의 오염을 예방하기 위해서는 멀칭을 통하여 토양과 접촉을 최소화하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

### 관수법이 상추의 미생물 안전성에 미치는 영향

살수관수법과 지표면관수법이 상추의 미생물 안전성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 5와 Fig. 6과 같다. 관수법의 차이에 따라 상추의 *E. coli*와 *B. cereus* 오염수준은 유의적인 차이를 보였다( $P < 0.05$ ). *E. coli*가 8.0log CFU/mL로 오염된 관개용수를 살수관수법, 지표면관수법으로 처리 후 상추의 오염수준은 각각 7.0log CFU/g, 2.0log CFU/g로 살수관수법이 10만배 정도 높았다. 또한 처리 후 7일째 지표면관수법을 처리한 구에서는 *E. coli*가 검출되지 않았으나 살수관수법을 처리한 구에서는 3.8log CFU/g이 존재하고 있었고 30일까지 검출되었다. *B. cereus*에 오염된 관개용수

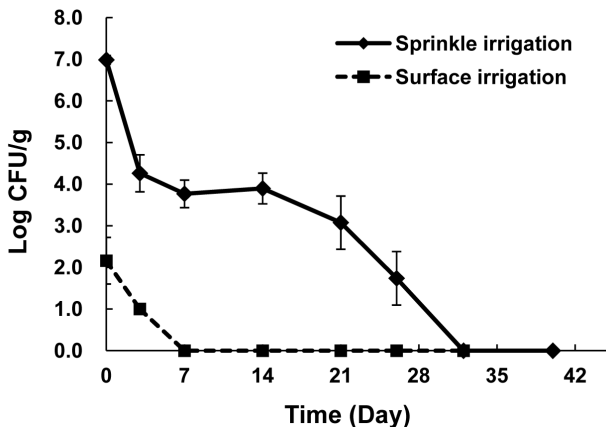


Fig. 5. Survival of *Escherichia coli* on lettuce applied by sprinkling and surface irrigation with contaminated water. Error bars indicate standard deviation.

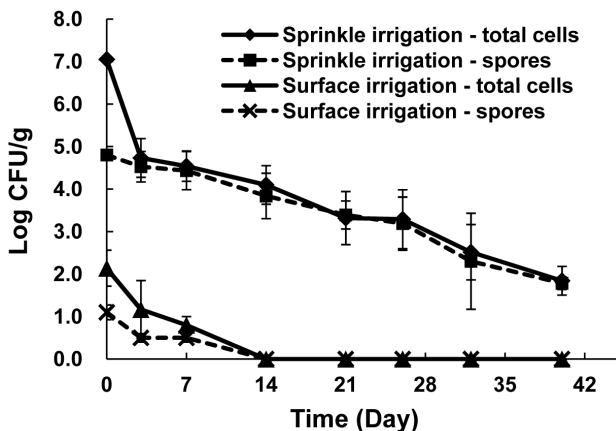


Fig. 6. Survival of *Bacillus cereus* on lettuce applied by sprinkling and surface irrigation with contaminated water. Error bars indicate standard deviation.

를 처리한 직후 상추의 오염수준은 *E. coli*와 같은 수준이었다. 살수관수 처리한 구에서 3일째부터 총세균수와 포자수가 같은 농도로 40일까지 검출되었고(Fig. 6) *B. cereus*는 처리 후 3일 이내에 영양세포는 사멸하고 포자형태로 존재하는 것으로 추정된다. 특히 포자는 135°C에서 4시간 이상 견딜 수 있는 내열성을 가지고 있으며 환경 스트레스에 대한 저항력이 높아 한번 오염되면 제거가 어렵다(Ryu and Beuchat, 2005). Oliveria et al.(2011) 연구에서도 *L. innocua* 7.0log CFU/mL 수준으로 오염된 관개용수로 지표면관수법과 살수관수법으로 상추에 물을 주고 상추에 전이된 *L. innocua*의 농도는 각각 1.4log CFU/g, 4.9log CFU/g로 나타나 이는 관수법에 따라 미생물의 전이율이 현저하게 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 또한 Solomon et al.(2002b)은 실험실에서 인위적으로 관개용수를 *E. coli* O157:H7을 오염시킨 후 상추에 살포하였더니 세척 후에도 *E. coli* O157:H7이 발견되었다. 미생물에 오염된 관개용수를 살포할 경우, 병원성미생물은 작물의 기공을 통하여 작물 내부로 침투가능하며 내부에 침투한 병원성미생물은 소독제 처리에도 사멸되지 않고 살아 남아 농산물 안전에 영향을 미치기 때문에 관개용수의 안전확보와 올바른 관수법의 사용은 안전한 상추 생산에 중요한 포인트이다(Saldana et al., 2011). 따라서 수원의 안전성 확보를 위하여 수원에 동물이 침입하는 것과 화장실 설치를 제한하여 오염원이 수원으로 흘러 들어오는 것을 방지하고 살수관수법보다 토양표면에서 관수하는 지표면관수법이나 점적관수법을 사용하는 것이 바람직할 것으로 보인다.

## 초 록

최근 상추와 같은 농산물에 의한 식중독사고가 발생하고 있으며 그 원인으로 병원성 미생물에 오염된 퇴비, 관개용수의 사용이라고 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 육묘단계의 상토, 재배과정의 토양, 관개용수의 *Escherichia coli*와 *Bacillus cereus* 오염이 상추의 안전성에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다. 이를 위하여 상토는 두 균주로 7.5log CFU/g 수준으로 오염시킨 후 상추종자를 파종하고 28일간 생육시켰고, 오염되지 않은 토양과 6.0log CFU/g 수준으로 오염시킨 토양에 오염된 상토에서 21일간 자란 묘를 이식하고 49일간 인공기상동 (25°C, 상대습도 70-80%)에서 생육시켰다. 또한 8.0log CFU/mL로 오염된 관개용수로 지표면관수법과 살수관수법으로 상추에 관수하고 40일간 병원성미생물의 오염 및 생존을 조사하였다. 그 결과 육묘기의 상토와 상추 중 *E. coli*와 *B. cereus*는 시간이 경과함에 따라

점차 감소하였지만 육묘기 내내 생존 가능한 것으로 확인되었다. 토양에서는 42일간 *E. coli*와 *B. cereus*가 6.0log CFU/g 내외로 유의적인 감소 없이 유지되고 있었다. 오염된 토양에 이식된 상추는 21일째까지 *E. coli*와 *B. cereus*의 농도가 4.0log CFU/g 이상 유지되었고 이식 후 42일까지도 검출되었다. 또한 살수관수법으로 처리한 구에서 지표면관수법으로 처리한 구보다 상추의 오염수준이 5.0log CFU/g 정도 높았다. 따라서 본 연구의 결과는 병원성미생물에 오염된 상토, 토양, 관개용수는 농산물의 병원성미생물 오염에 직접적인 원인이 될 수 있음을 시사한다.

**추가 주요어 :** 식중독, 신선채소, 병원균

## 인용문헌

- Burnett, S.L. and L.R. Beuchat. 2001. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. *J. Int. Microbiol. Biotechnol.* 27:104-110.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Update on multi-state outbreak of *E. coli* O157:H7 infections from fresh spinach, October 6, 2006. <http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100606.htm>.
- Choi, J.W., S.Y. Park, J.H. Yeon, M.J. Lee, D.H. Chung, K.H. Lee, M.G. Kim, D.H. Lee, K.S. Kim, and S.D. Ha. 2005. Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *Korean J. Fd. Hyg. Safety* 20:43-47.
- Choo, E.Y., S.S. Jang, K.S. Kim, K.G. Lee, S. Heu, and S.R. Ryu. 2007. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *J. Food Prot.* 70:917-922.
- Faith, N.G., J.A. Shere, R. Brosch, W. Arnold, S.E. Ansay, M.S. Lee, J.B. Luchanky, C.W. Kaspar. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1519-1525.
- Food and Drug Administration (FDA). 2005. Guidance for industry, Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables. <http://csan.fda.gov>.
- Food and Drug Administration (FDA). 2009. Guidance for Industry: Guide to minimize microbial food safety hazards of leafy greens; draft guidance. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlantProducts/ucm174200.htm>.
- Gagliardi, J.V. and J.S. Karns. 2002a. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:877-883.
- Gagliardi, J.V. and J.S. Karns. 2002b. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ. Microbiol.* 4:89-96.
- Islam, M., M.P. Doyle, S.C. Phatak, P. Millner, and X. Jiang. 2005. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiol.* 22:63-70.
- Jiang, X., J. Morgan, and M. P. Doyle. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2605-2609.
- Kim S.R., J.Y. Lee, S.H. Lee, W.I. Kim, K.H. Park, H.J. Yun, B.S. Kim, D.H. Chung, J.C. Yun, and K.Y. Ryu. 2011. Evaluation of microbiological safety of lettuce and cultivation area. *Korean J. Fd. Hyg. Safety* 26:289-295.
- Nam, S.W. 2010. Industrial efforts for enhancing food safety and suggestion to improve policy, p. 9. Workshop for food safety policy committee. Prime Minister's Office, Seoul, Korea.
- Oliveira, M., J. Usall, I. Vinas, C. Solsona, and M. Abadias. 2011. Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiol.* 28:590-596.
- Oliveira, M., I. Vinas, J. Usall, M. Anguera, and M. Abadias. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* 156:133-140.
- Patel, J. and M. Sharma. 2010. Differences in attachment of *Salmonella enteric serovars* to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* 139:41-47.
- Ryu, J.H. and L.R. Beuchat. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* 68:2614-2622.
- Saldana, Z., E. Sanchez, J. Xicohtencatl-Cortes, J.L. Puente, J.A. Giron. 2011. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Front. Microbiol.* 2:1-9.
- Solomon, E.B., S. Yaron, and K.R. Matthews. 2002a. 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.
- Solomon, E.B., C.J. Potenski, and K.R. Matthews. 2002b. Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J. Food. Prot.* 65:673-676.
- Solomon, E.B., H.J. Pang, and K.R. Matthews. 2003. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *J. Food. Prot.* 66:2198-2202.
- Zhang, G., L. Ma, L.R. Beuchat, M.C. Erickson, V.H. Phelan, and M.P. Doyle, 2009. Lack of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. *J. Food. Prot.* 72:2028-2037.