

농산물 생산 환경에서 분리된 *Staphylococcus aureus*의 항생제 내성 및 독소 유전자 확인

박수희* · 김정숙** · 김경열* · 정덕화*** · 심원보***†

*경상대학교 응용생명과학부, **경상대학교 농업생명과학연구원, ***광주과학기술원 물리화학부

Identification of Toxin Gene and Antibiotic Resistance of Staphylococcus Aureus Isolated from Agricultural Product Cultivation Environments

Su-Hee Park*, Jeong-Sook Kim**, Kyeong-Yeol Kim*, Duck-Hwa Chung***, Won-Bo Shim***†

*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University,
Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

**Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

***School of Physics and Chemistry, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea

ABSTRACT

Objectives: This study was undertaken to analyze *Staphylococcus aureus* from cultivation environments for agricultural products and to confirm antibiotic resistance and enterotoxin genes for the isolated *S. aureus*.

Methods: A total of 648 samples were collected from apple, peach, ginseng and balloon flower farms. *S. aureus* was isolated from soil, agricultural water, personal hygiene elements (hands, gloves and clothes) and work utensils (boxes).

Results: *S. aureus* was detected in a total of 25 samples and 72 strains were isolated. The resistance rate of the isolated *S. aureus* strains was confirmed at 33.3%, with 24 resistant strains among the total of 72. Fourteen different patterns types were found, and three pattern types (NV, OX, VA) were confirmed most frequently. As result of the detection of enterotoxin gene type, four gene types (*sea*: 1, *sed*: 4, *seg*: all isolated *S. aureus*, *sei*: all isolated *S. aureus*) were analyzed among a total of nine types.

Conclusions: This study demonstrates that personal hygiene techniques should be properly managed, such as washing and sterilization before or after work, because agricultural contamination by *S. aureus* frequently developed through improper management.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, enterotoxin, cultivation environments

I. 서 론

세균성 식중독(bacterial foodborne diseases)이란 세균이 증식한 식품을 섭취함으로써 급성 위장염 등을 주요 증상으로 하여 건강 장애를 일으키는 것을 말한다.¹⁾ 농산물과 관련된 식중독의 원인이 되는 병원

성 미생물의 오염은 재배단계에서부터 유통과정에 이르는 전 단계에서 발생할 수 있고, 특히 생산현장에서 토양이나 오염된 관개용수, 비위생적인 수확 후 환경 및 작업자는 직접적인 오염원이 될 수 있다.²⁾

국내의 최근 5년간 병원성 미생물에 의한 식중독 발생 현황을 보면 전체 식중독 건수는 525건으로

†Corresponding author: School of Physics and Chemistry, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea, Tel: +82-62-715-2033, Fax: +82-62-715-2039, E-mail: wbsim75@gist.ac.kr

Received: 19 August 2013, Revised: 10 September 2013, Accepted: 25 September 2013

Table 1. The kinds and number of samples collected for microbial assessment

Sources	Type of samples	Farms				Total
		Apple	Peach	Balloon flower	Ginseng	
Environments	Soil	36	36	48	36	156
	Agricultural water	36	36	48	36	156
Personal hygiene	Clothes	24	24	32	24	104
	Gloves	24	24	32	24	104
	Hands	24	24	32	24	104
Work utensils	Box	12	12	NS ¹⁾	NS	24
Total		156	156	192	144	648

¹⁾ NS : Not sampled

9,302명의 환자가 발생하였으며, 그 중 *Staphylococcus aureus*에 의한 식중독 발생은 61건(11.6%), 환자 수 2,150명(11.1%)으로 *pathogenic E. coli*와 *Salmonella* spp. 다음으로 세 번째로 높게 발생한 것으로 나타났다.³⁾

*S. aureus*는 통성혐기성 그람 양성구균으로 심한 구토와 설사를 발생시키는 독소형(enterotoxin) 식중독 세균이며, 병원 내 감염의 주요 원인균 외에도 사람과 동물의 화농성 질환에 의해 식품으로 오염될 수 있는 식중독균이다. 식품에 직접 접촉하는 사람에 의해 쉽게 감염될 수 있어 식품위생상 중요하게 다루어지고 있는 대표적인 세균이며^{4,5)} 다양한 독성인자를 생성한다.

여러 독성인자 중 식중독의 원인이 되는 staphylococcal enterotoxin (SE)은 *S. aureus*가 식품 및 환경에서 증식하는 과정 동안 생산되며,⁶⁾ 항원특이성에 따라 enterotoxin A, B, C, D, E, G, H, I, J 형이 있다.^{7,8)} 장독소의 생산은 온도에 민감하여 18°C에서 3일 또는 37°C에서 12시간 이상 배양 시 생산된다고 보고되고 있으며, 이는 균의 증식에 적합한 온도와 일치한다.⁹⁾ *S. aureus*는 이들 독소형 중 한 가지 또는 두 가지 이상을 동시에 생산하고, 독소형과는 관계없이 식중독을 일으키나 A형이나 D형에 의한 식중독 발생 사례가 많은 것으로 보고되고 있으며, 특히 B형은 가장 강한 내열성을 가진 것으로 알려져 있다.^{10,11)}

환경 및 각종 식품에 대한 *S. aureus*의 오염도 및 enterotoxin 생산주의 분포 등에 관한 연구는 많이 보고되고 있는데, 이들 연구에 따르면 사람의 25~50%가 황색포도상구균 보유자이며, 이들 중 15~20%는 enterotoxin 생산주를 보유하고 있는 것으로 알려져 있

다.¹²⁾ 또한 딸기 재배 농장과 주스제조 상점에서 SEA와 SEB형 독소를 생산하는 균주가 분리되었고,^{11,13)} 신선편의 식품 중 채소가 주성분인 샌드위치 53개 중 7개에서 *S. aureus*의 오염을 확인하였으며¹⁴⁾ 특히 새싹채소에서 분리된 균주는 9개의 항생제에 대하여 내성을 갖는 것으로 나타났다.¹⁵⁾ 이와 같이 *S. aureus*는 식품의 제조가공 현장뿐만 아니라 농산물 재배과정에서도 오염될 가능성이 존재하므로 재배지 현장에서의 위생관리도 필요하며, 이를 위해서는 농산물 생산현장을 대상으로 연구한 자료가 확보되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 농산물 생산 환경 위생관리를 위한 근거자료로 활용하기 위해 농산물 중 과실류와 약용작물 생산 환경에 대한 *S. aureus*의 분포도를 조사하였으며, *S. aureus*를 분리하여 항생제 내성, 내성패턴 및 PCR을 이용한 독소 유전자 유형을 확인 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료채취

건강에 대한 관심이 증가함에 따라 소비가 많이 되고 있는 과실류와 약용작물의 안전성을 확보하기 위해 이들의 생산 환경 중 *S. aureus* 오염분포를 조사하고자 하였다. 이를 위해 대표적 작물로 과실류는 사과와 복숭아를, 약용작물은 인삼과 도라지를 선정하여 각 작물을 재배하는 농장의 재배환경(토양 및 관개용수), 개인위생(손, 장갑, 작업복) 및 작업 도구(박스)를 대상으로 총 648개의 시료를 채취하였다 (Table 1). 시료채취 횟수는 각 작물의 생산단계를

휴면단계, 재배단계, 수확포장단계 3단계로 구분하여 각각 1회씩 총 3회로 하였다.

토양의 경우 방사형채취방법으로 각 필지 당 선정된 임의의 부분을 포함시켜 동서남북으로 각각 5 m 거리에 있는 지점의 토양을 혼합한 후 각 시료 당 약 1 kg이 되도록 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였으며, 용수의 경우 실제 농업용수로 사용되고 있는 하천수 또는 지하수를 멸균 채수병(Medi-land, Korea)에 약 1 L씩 수집하였다. 그리고 작업자 개인위생과 관련된 장갑 및 작업복 그리고 작업도구에서의 박스는 모두 표면검체의 형태에 따라 채취 가능한 면적 또는 10×10 cm의 면적대로 Swab kit (3M eswab, 3M China Ltd., Shanghai, China)를 사용하여 swabbing하였고, 작업자 손의 경우 손을 50 mL의 멸균생리식염수(0.85% NaCl)가 담겨져 있는 멸균 sampling bag에 넣고 골고루 씻어내는 방법인 Glove juice법¹⁶⁾에 준하여 시료를 채취하였다. 모든 채취 시료는 분석할 때까지 냉장온도에 보관하여 4시간 이내에 실험을 실시하였다.

2. *S. aureus* 오염 분포확인

채취된 각 시료는 멸균된 0.85% 생리식염수를 이용하여 균질화 한 다음 10진 희석법으로 단계희석하였다. 희석한 시료용액은 0.1 및 1 mL씩을 취하여 baird-parker agar (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 도말한 다음 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 불투명 환의 검은색 집락 형성유무를 확인하였다. 확인된 집락 중 5개를 선별하여 tryptic soy broth (Difco)에 배양하고, 선택성이 높은 CHROMagar™ Staph aureus (bioMérieuxSA, Marcy Etoile, France)에 다시 배양하여 전형적인 *S. aureus* 집락을 확인하였다. 이때 *S. aureus* 집락을 tryptic soy agar (Difco)에 접종하여 증균시킨 후 DNA를 추출하여 PCR로 최종 확인하였다. 이때 DNA 추출은 McPherson 등¹⁷⁾의 방법을 참고하여 boiling법으로 추출하였으며, PCR은 Maixime PCR PreMix kit (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 이용하여 실시하였다.

3. 항생제 내성 및 내성패턴 확인

분리된 *S. aureus* 균주의 항생제 내성 및 내성패턴 확인은 Clinical and Laboratory Standards

Institute(CLSI) 가이드라인¹⁸⁾에 따라 실시하였으며, *S. aureus*의 항생제 내성확인 실험에 많이 사용되는 항생제 중 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, neomycin, novobiocin, oxacillin, rifampin 및 vancomycin 등 총 10종의 항생제를 선택하여 사용하였다.

먼저 시료에서 분리된 *S. aureus* 균주를 tryptic soy broth (Difco)에 배양(37°C, 18 h)한 다음 멸균 생리식염수로 희석하여 균수를 10⁸ CFU/mL (MacFarland scale 0.5-표준탁도)로 조정하여 접종균액을 준비하였다. 준비된 접종 균액은 멸균된 면봉으로 Mueller Hinton Agar (Difco) 표면 전체에 고르게 도말한 후 실온에 5분간 방치하여 습기를 제거하였다. 습기가 제거된 배지 표면에 준비된 항생제 디스크를 20 mm 간격으로 부착하여 37°C에서 18~24시간 배양한 다음 균 생장억제대(zone)의 지름을 측정하였다. 항생제 내성 범위 및 판단은 CLSI의 기준에 따라 R (Resistant), I (Intermediate), S (Susceptible)로 판단하였으며, 대조균으로는 *S. aureus* ATCC 23235를 사용하였다.

4. 독소 유전자형 확인

*S. aureus*로 확인된 분리균주들을 대상으로 *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* 및 *sej* 등 총 9종의 장독소 유전자를 PCR로 확인하였다. 사용된 *S. aureus* 분리균주들의 DNA는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology)를 이용하여 추출하였다. 먼저 분리균주를 활성화 시킨 배양액 1 mL (O.D₆₀₀: 0.8~1.0)을 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 상등액을 제거하고 pre-buffer 50 µL와 lysozyme solution 3 µL을 넣어 혼합한 다음 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 여기에 250 µL G-buffer를 넣고 가볍게 혼합하여 다시 65°C에서 15분간 반응시킨 후 250 µL의 binding Buffer를 넣고 10분간 vortexing하였다. 이 용액을 G-spin™ column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 다음 column을 500 µL의 washing buffer A와 B로 순서대로 세척을 하고, 세척이 끝난 G-spin™ column은 새로운 eppendorf tube로 옮겼다. 여기에 100 µL의 elution buffer를 넣어 1분간 실온에 방치한 후 원심분리 (13,000 rpm, 1분)하여 DNA를 추출한 다음 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 pre-denaturation 3분(94°C),

Table 2. Oligonucleotides used to detect the enterotoxin genes of isolated *S. aureus* strains

Enterotoxin	Target gene	Primer	Oligonucleotide sequences(5' to 3')	Amplification size(bp)
SEA	<i>sea</i>	SEA-1	ACGATCAATTTTTACAGC	544
		SEA-2	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	
SEB	<i>seb</i>	SEB-1	GAATGATATTAATTTCGCATC	416
		SEB-2	TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	
SEC	<i>sec</i>	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257
		SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCCA	
SED	<i>sed</i>	SED-1	TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT	334
		SED-2	CCACCATAACAATTAATGC	
SEE	<i>see</i>	SEE-1	ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA	170
		SEE-2	TAACCTACCGTGGACCC	
SEG	<i>seg</i>	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400
		SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	
SEH	<i>seh</i>	SEH-1	TCACATCATATGCGAAAGCAG	357
		SEH-2	TAGCACCAATCACCCCTTCC	
SEI	<i>sei</i>	SEI-1	TGGAACAGGACAAGCTGAAA	467
		SEI-2	TAAAGTGGCCCCCTCCATACA	
SEJ	<i>sej</i>	SEJ-1	CAGCGATAGCAAAAATGAAACA	426
		SEJ-2	TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA	

Table 3. Detection of *S. aureus* from different cultivation environments for agricultural products

Samples	Detection rate (%)				Total
	Apple farms	Peach farms	Balloon flower farms	Ginseng farms	
Soil	0/36(0)	0/36(0)	0/48(0)	0/36(0)	0/156(0)
Irrigation water	0/36(0)	0/36(0)	0/48(0)	0/36(0)	0/156(0)
Clothes	2/24(8.3)	1/24(4.2)	2/32(6.2)	0/24(0)	5/104(4.8)
Gloves	3/24(12.5)	1/24(4.2)	1/32(3.1)	0/24(0)	5/104(4.8)
Hands	9/24(37.5)	1/24(4.2)	5/32(15.6)	0/24(0)	15/104(14.4)
Box	0/12(0)	0/12(0)	0/0(0)	0/0(0)	0/24(0)
Total	14/156(9.0)	3/156(1.9)	8/192(4.2)	0/144(0)	25/648(3.9)

denaturation 1분(94°C), primer annealing 30초(*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*: 57°C, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*: 60°C) 및 extension 30초(72°C)의 조건으로 30 cycle을 수행하였고, final extension은 72°C에서 7분간 실시하였다. 이때 사용한 primers의 염기서열은 문헌¹⁹⁻²⁶⁾을 참고하여 Table 2와 같이 선택하였으며, PCR 증폭생성물은 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 확인하였다.

실험에 사용된 표준균주는 *S. aureus* ATCC 13565(SEA, SEG), ATCC 14458(SEB, SEI), ATCC 19095(SEC), ATCC 23235(SED, SEJ), ATCC 27664

(SEE)와 장독소 SEH 생성이 확인된 임상분리주를 사용하였고, 음성 대조균주로는 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313와 *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311를 사용하였다.

III. 결 과

1. 농산물 생산 환경에서의 *S. aureus* 오염 분포
사과, 복숭아, 인삼 및 도라지 생산 환경에서 *S. aureus*의 오염 분포도를 확인해 본 결과는 Table 3

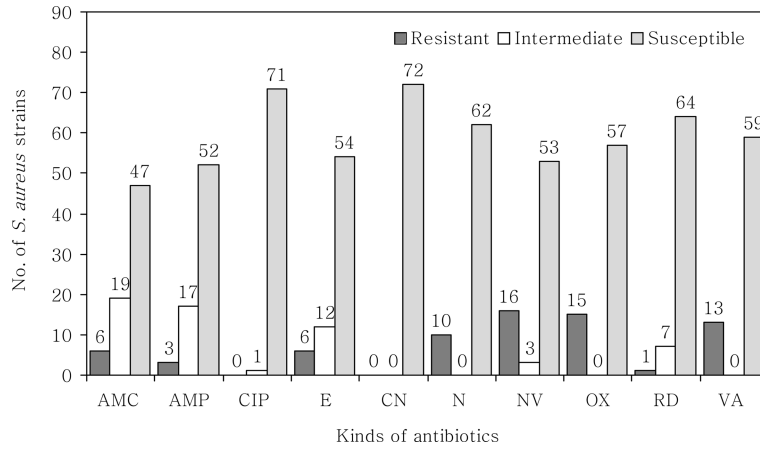


Fig. 1. Resistance of isolated *S. aureus* strains from cultivation environments for agricultural products. AMC: amoxicillin-clavulanic acid; AMP: ampicillin; CIP: ciprofloxacin; E: erythromycin; CN: gentamicin; N: neomycin; NV: novobiocin; OX: oxacillin; RD: rifampin; VA: vancomycin.

과 같다. 4종의 농산물 재배지 모두에서 작업자 개인위생과 관련된 손, 장갑, 옷 시료에서만 *S. aureus*가 검출되었다. 검출비율은 총 3.9%로, 개인위생관련 시료가 총 312점 중에서 25점으로 가장 많이 검출되었다. 농산물별로 검출현황을 살펴보면 사과 농장에서 가장 많은 14점(옷 2점, 장갑 3점, 손 9점)이 검출되었고 그 다음으로 도라지 농장에서 8점(옷 2점, 장갑 1점, 손 5점), 복숭아 농장에서 3점(옷 1점, 장갑 1점, 손 1점)이 검출되었으며 인삼 농장에서는 모든 시료에서 검출되지 않았다.

2. 분리된 S. aureus 균주의 항생제 내성 및 내성패턴 확인

*S. aureus*가 검출된 25점의 시료에서 총 72개(옷 17, 장갑 9, 손 46)의 균주를 분리하였다. 이들을 대상으로 10종의 항생제에 대한 내성을 확인한 결과 24개(33.3%)의 균주에서 8종의 항생제에 대한 내성이 확인되었다. Novobiocin에 대해 내성을 갖는 균주가 16주로 22.2%의 가장 높은 내성 비율을 차지하였으며, oxacillin에 15균주(20.8%), vancomycin에 13균주(18.1%), neomycin에 10균주(13.8%), amoxicillin-clavulanic acid와 erythromycin에 각각 6균주(8.3%), ampicillin에 3균주(4.2%), rifampin에 1균주(1.4%)가 내성을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 내성패턴은 하나의 균주가 최대 6종의 항생제에 대해 내성을 보이는 패턴부터 최소 1종의 항생제에 내성을 보

Table 4. Multiple resistance patterns of isolated *S. aureus* strains

No. of antibiotic	Resistant patterns	No. of isolate	Rate (%)
6	AMC, AMP, N, NV, OX, VA	1	4.2
	N, NV, OX, RD, VA	1	
5	AMC, N, NV, OX, VA	1	12.5
	AMC, AMP, N, NV, OX	1	
4	E, NV, OX, VA	1	20.8
	AMP, NV, OX, VA	1	
	AMC, NV, OX, VA	1	
3	N, NV, OX, VA	2	20.8
	NV, OX, VA	5	
2	E, N	4	16.7
	AMC	2	
1	NV	2	25.0
	E	1	
	OX	1	
Total		24	100

이는 패턴까지 총 14가지의 패턴이 나타났다. 내성을 보이는 균주들에서 가장 많이 나타난 내성패턴은 3종의 항생제 novobiocin, oxacillin, vancomycin에 내성을 가지는 것으로 전체의 20.8%(5 균주)를 차지하였다. 이 외에는 1 종의 또는 4종의 항생제에 대한 내성을 가진 균주가 차례로 많이 나타났으며,

Table 5. Distribution of enterotoxin rates (%) of *S. aureus* strains

Enterotoxin gene types	No. of strains	Isolation rate (%)	Sources
sea	1/72	1.4	Hand(1)
seb	0/72	0	-
sec	0/72	0	-
sed	4/72	5.5	Hand(2), Cloths(1), Glove(1)
see	0/72	0	-
seg	72/72	100	Hand(46), Cloths(17), Glove(9)
seh	0/72	0	-
sei	72/72	100	Hand(46), Cloths(17), Glove(9)
sej	0/72	0	-

ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, neomycin, novobiocin, oxacillin, vancomycin 등 총 6 종류의 항생제에 내성을 보이는 균주도 1주(4.2%)가 발견되었다(Table 4).

3. 분리된 *S. aureus* 균주의 독소 유전자형 확인

총 648개의 시료 중 *S. aureus*의 존재가 확인된 25점에서 분리된 균주 72개의 독소 유전자형을 확인한 결과는 Table 5와 같다. *sea* 유전자는 사과 농장의 재배단계 중 작업자 손 시료에서 분리된 *S. aureus* 1주(1.4%)에서 확인이 되었다. 그리고 *sed* 유전자는 복숭아 농장의 재배단계 중 작업자 옷에서 분리된 *S. aureus* 1주와 수확 및 선별단계에서 사용한 장갑에서 분리된 *S. aureus* 1주, 도라지 농장의 재배단계 중 작업자 손에서 분리된 *S. aureus* 2주에서 검출되어 총 4개(5.5%)의 *S. aureus* 분리주에 *sed* 유전자가 존재함을 확인하였다. *seg*와 *sei* 유전자는 분리된 *S. aureus* 72주에서 모두 확인되었으며, 나머지 *seb*, *sec*, *see*, *seh* 및 *sej* 유전자는 검출되지 않았다.

IV. 고 찰

국민들의 식품안전과 관련된 위해요인에 대한 우려도는 식중독 미생물에 대한 우려가 가장 높고 (42.5%), 그 다음으로 식품첨가물(19.1%), 바이러스

(12.0%), 잔류농약(6.4%), 유전자재조합식품(4.7%), 기생충(4.5%) 순인 것으로 조사되었다.²⁷⁾ 또한 이 등²⁸⁾의 연구에서도 식중독 미생물에 대한 우려가 잔류농약이나 식품첨가물, 항생물질 등에 대한 우려보다 높은 것으로 조사되었다. 이처럼 식중독 미생물에 대한 우려도가 다른 원인물질 보다 높은 것은 이들에 의한 식중독 사고의 발생이 증가하고 있음을 의미하며, 동시에 농산물 및 식품에서의 식중독 미생물 관리를 보다 강화해야 할 필요성이 있다는 것을 의미한다. 따라서 식품가공제조 현장뿐만 아니라 식품의 원료가 되는 농산물의 생산 환경에서도 식중독 미생물의 관리가 필요하다.

김 등²⁹⁾이 토마토 농장에서 *S. aureus*의 분포를 조사한 결과 총 120점의 시료 중 14점(11.6%)의 시료에서 *S. aureus*가 검출되었고, 검출된 시료는 토양, 관개용수, 작업자의 옷, 손, 장갑 등이었다. 김 등¹³⁾의 연구결과에 따르면 딸기 농장의 생산현장에서 채취된 시료 중 16%의 시료가 *S. aureus*에 오염이 되어 있었으며, 개인위생과 관련된 옷과 복장에서 검출률이 높았다. 본 연구에서는 이들보다 검출률은 조금 낮았으나, 검출된 시료는 개인위생과 관련된 항목으로 비슷한 분포를 나타내어 농산물 생산 환경에서의 위생관리는 작업자 개인위생과 밀접한 관계가 있음을 확인하였다. 또한 *S. aureus*가 검출된 시료는 각기 다른 작물의 재배지와 재배시기에 채취되었기 때문에 작물의 종류와 재배시기와는 관계없이 전반적으로 작업자의 위생관리에 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

항생제는 임상에서 뿐만 아니라 가축, 수산양식 및 농작물을 재배하는 농장에서도 질병의 예방과 성장촉진을 목적으로 많은 양이 사용되고 있으며, 식중독 발생 시 초기 진료에 큰 영향을 미치므로 분리균주에 대한 항생제 내성 조사는 매우 필요하다.³⁰⁾ 농산물이나 생산 환경에서 분리된 *S. aureus*의 항생제 내성과 관련된 연구결과를 살펴보면 Boehme 등¹⁵⁾의 연구에서 새싹채소로부터 분리된 균주가 9개의 항생제에 대해서 내성을 갖는 것으로 확인되었다. 김 등²⁹⁾이 토마토 농장에서 분리한 균주는 penicillin, novobiocin, ampicillin, erythromycin, oxacillin, kanamycin 및 doxycycline에 내성을 보임과 동시에 71.4%에 해당하는 균주가 2종류 이상의 항생제에 대해 내성을 나타내었고, 농산환경을 대상으로 한 연

구에서는 분리된 균주가 ampicillin과 penicillin에 높은 내성을 가지는 것으로 확인되었다.³¹⁾ 또한 김³⁰⁾이 수행한 연구에서는 들깨잎 농장의 포장비닐, 손 및 들깨잎에서 oxacillin에 내성을 보이는 MRSA균주가 22.2% 검출되었다. 이와 같이 농산물 생산 환경에서 분리된 미생물도 항생제에 내성을 가지고 있는 것이 확인되고 있는데, 이는 농산물 재배 시 사용되는 퇴비의 원료로부터 기인할 수 있으며, 퇴비가 원인인 교차오염으로 인해 작업자의 손, 장갑, 복장 등에서 분리된 균주에서도 항생제 내성이 확인될 수 있다. 따라서 농산물 생산 환경에서 분리된 균주에 대한 항생제 내성에 대해서 체계적이고 지속적인 연구를 통해 관리가 이루어져야 할 것이다.

FDA (Food and Drug Administration)에 따르면 *S. aureus* 식중독이 발생하려면 *S. aureus*가 5.00 log CFU/g 이상 수준에서 staphylococcal enterotoxin (SE)이 존재해야 한다고 알려져 있으며, 일본의 경우 발생하는 SE의 형태는 A형이 88.2%(366/587)로 가장 많다.¹⁰⁾ 최근 정 등³²⁾이 상추와 원유에서 분리한 *S. aureus*와 김 등¹³⁾이 딸기 농장에서 수집한 시료에서 분리한 *S. aureus*로 독소 생산 실험을 한 결과 *sea*와 *seb* 유전자의 검출 빈도가 높은 것으로 보고하였으며, 김 등³⁰⁾의 연구에서는 *sea*와 *sed* 유전자를 동시에 보유하는 균주 12.9%, *sed* 유전자만 보유하는 균주 29.0% 및 *see* 유전자 보유균주 3.2%가 각각 검출되었다. Tsen 등³³⁾은 육류 가공품에서 분리된 *S. aureus*의 독소를 확인한 결과 *sea*, *seb*, *sec*, *sed*를 생성하는 균주는 각각 75%, 12.5%, 6.3%, 3.1%를 차지하고, *sea*와 *sed*를 동시에 생성하는 균주도 7.8% 검출되었다고 보고하였다. 가공류에서 분리된 *S. aureus*의 독소 유전자 확인 실험에서는 *sec*와 *sed* 유전자의 검출빈도가 높은 것으로 확인되었다.³⁴⁾ 하지만 이들의 연구에서는 모두 *seg*와 *sei* 유전자는 검출되지 않았다. 일반적으로 식품에서 분리된 균주에는 대부분 *sea*, *seb*, *sec* 및 *sed* 유전자가 있는 것으로 알려져 있으며¹⁰⁾ 이들의 연구에서 분리된 균주도 식품에서 분리된 것들이 대부분이었다. 하지만 본 연구에서 분리된 균주는 작업자의 개인위생과 관련된 시료에서 분리된 것으로 식품에서와는 달리 *seg*와 *sei*가 추가로 확인된 것으로 보인다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 일반적으로 농산물 생산 환경이나 식품에서 공통적인 독소 유전자가 검출되

지만 시료에 따라서는 다른 독소유전자가 검출될 가능성이 있고, 균을 분리하는 장소와 시료에 따라서 검출빈도는 달라질 수 있음을 알 수 있다. 본 연구에서도 식품에서 검출되는 *sea*와 *sed* 유전자가 분리되기는 하였으나 기존의 연구에서는 *sea* 유전자의 검출 빈도가 높은 것과는 달리 *sed* 유전자가 많이 검출되었다.

V. 결 론

본 연구는 농산물 재배농장의 위생관리를 위한 근거자료로 활용하기 위해 농산물 생산 환경 중 *S. aureus* 오염도를 조사하고 시료에서 분리된 *S. aureus*는 항생제 내성, 내성패턴 및 독소 유전자형을 확인하였으며 그 내용은 다음과 같다.

사과, 복숭아, 인삼 및 도라지 재배농장에서 수집된 총 648점의 시료 중 3.9%에 해당하는 25점의 시료에서 72개의 *S. aureus* 균주가 분리되었으며, 이들을 대상으로 10종의 항생제에 대한 내성을 확인한 결과 24개(33.3%)의 균주에서 내성이 확인되었다. 특히 novobiocin에 대한 내성 비율이 22.2%로 가장 높은 것으로 나타났고, oxacillin에 대해서는 15균주(20.8%), vancomycin에 대해서는 13균주(18.1%)가 내성을 가지는 것으로 확인되었다. 내성패턴은 총 14가지의 패턴이 나타났고, 그 중 3종(novobiocin, oxacillin, vancomycin)의 항생제에 내성을 가지는 균주가 많은 것으로 확인되었다.

분리된 72개의 *S. aureus* 균주에 대해 enterotoxin 유전자를 확인한 결과 9종의 독소유전자 중 4종의 독소유전자(*sea*, *sed*, *seg*, *sei*)가 검출되었다. *sea*형 독소 유전자를 가진 균주는 1주(25%), *sed*형 독소 유전자를 가진 균주는 4주(75%)로 확인되었고, *seg*와 *sei*형 독소 유전자는 모든 균주에서 확인되었다. 특히 *sea*와 *sed*형 독소 유전자를 가진 균주가 분리된 시료는 손, 장갑, 작업복으로 모두 작업자 개인 위생과 관련된 시료였다.

이러한 연구 결과를 통해 농산물 생산 환경에서는 작업자 개인위생이 *S. aureus* 오염 원인이 될 가능성이 높음을 확인할 수 있었고, 이에 따라 안전한 농산물을 생산하기 위해서는 작업 전후에 있어 세척이나 소독과정을 통한 작업자 개인위생관리가 철저히 이루어져야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009216)의 지원에 의해 이루어 졌음.

참고문헌

- Lee HM, Lee GY, Yoon EK, Kim HJ, Kang YS, Lee DH, et al. Computation of maximum edible time using monitoring data of *Staphylococcus aureus* in kimbap and food microModel. *J Fd Hyg Safety*. 2004; 19(1): 49-54.
- Food and Drug Administration. Guidance for industry. Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables. Available: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/UCM169112.pdf> [accessed 2 August. 2013].
- Ministry of Food and Drug Safty. Statistics system on Foodborne Disease, Statistics of cause bacteria. Available: <http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do?MenuCode=33> [accessed 2 August. 2013].
- Cho JI, Lee SH, Choi JH, Choi EJ, Hwang IG. Analysis of prevalence and survival pattern of *Staphylococcus aureus* from dried seasoned fishes. *J Fd Hyg Safety*. 2011; 26(4): 366-369.
- Yoon AR. Identification and type classification of staphylococcal enterotoxin isolated from ready-to-eat foods [dissertation]. [Seoul]: Korea University; 2008
- Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin in raw pork and uncooked smoked ham-a comparision of classical culuring detection and RFLP-PCR. *Int J Food Microbiol*. 2001; 68(1-2): 105-113.
- Naomi B, Avraham R. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*. 2000; 61(1): 1-10.
- Lee WW, Jung BY, Kim SH, Lee SM, Lee GR, Kim GH, et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* and detection of enterotoxin from pigs and cattle carcass by PCR. *Korean J Vet Serv*. 2010; 33(3): 255-261.
- Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3): 857-862.
- Ministry of Food and Drug Safety. *Staphylococcus aureus*, risk profile. Available: http://www.foodnara.go.kr/foodnara/board-list.do?boardId=series&mid=S07_05_03&page=3 [accessed 2 August 2013]
- Kim SR, Park SJ, Shim WB, Lim HK, Chung DH. Detection of *Staphylococcus aureus* and screening staphylococcal enterotoxin a, b, c genes in strains isolated from strawberry juice shops in jinju. *J Environ Health Sci*. 2005; 31(1): 23-30.
- Frazier WC, Westhoff DC. Food Microbiology, 3rd ed. New Delhi: MacGraww-Hill Book Company Press; 2007. p.432-438.
- Kim SR, Shim WB, Kim JH, Hwang SJ, Park SJ, Ha SD, et al. Screening of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin a, b, c gene in strains isolated from strawberry farms in western gyeongnam. *Korean J Food Thchnol*. 2005; 37(2): 321-327.
- Bae HJ, Park HJ. Hazard analysis of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat sandwiches. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2007; 36(7): 938-943.
- Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Mol Nutr Food Res*. 2004; 48(7): 522-531.
- Anonymous. Guidelines for efferctiveness testing of surgical hand scrub(glove juice test). *Fed Regist*. 1978; 43: 1242-1243.
- McPherson MJ, Taylor GR, Quire P. In PCR-A practical approach. New York: Oxford University Press; 1991. p.29-33.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; Approved standard, 11th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. p.1-50.
- Etley MJ, Mekalanos JJ. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*. 1988; 170(1): 34-41.
- Jones CL, Khan S. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1987; 166(1): 29-33.
- Bohach GA, Schlievert PM. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet*. 1987; 209(1): 15-20.
- Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*. 1989; 171(9): 4799-4806.
- Couch JL, Soltis MT, Betley MJ. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*. 1988; 170(7): 2954-

- 2960.
24. Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1998; 66(7) : 3337-3348.
 25. Ren K, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, Fischetti VA et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J Exp Med*. 1994; 180(5): 1675-1683.
 26. Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant(sej). *FEMS Microbiol Lett*. 1998; 168(2): 227-233.
 27. Park JY, Choi EH, Choi JH, Shim SK, Park HS, Park KH, et al. Assessment of consumer's food safety perceptions and practices. *J Fd Hyg Safety*. 2009; 24(1): 1-11.
 28. Lee JY, Kim KD. A study on the perception of and concern for food safety among urban housewives. *Korean J Food Preserv*. 2009; 16(6): 999-1007.
 29. Kim JS, Lee JH, Kim JH, Choi JM, Kim SR, Ha SD, et al. Characteristics of enterotoxigenic genes and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from tomato farms in Western Gyeongnam. *Korean J Food Thchnol*. 2006; 38(2): 295-303.
 30. Kim SR. Study on the evaluation of microbial safety of perilla leaves(*perilla frutescens*) and suggestion of methods to reduce microbial loads [dissertation]. [Jinju]: Gyeongsang National University; 2010
 31. Chung YH. antibiotic resistance and effect assessment in agricultural enviromment. Seoul: Korea Food and Drug Administration; 2009. p.28-37.
 32. Jung HJ, Cho JI, Park SH, Ha SD, Lee KH, Kim CH, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettucees and raw milk. *Korean J Food Thchnol*. 2005; 37(1): 124-141.
 33. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin I(TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food microbiolgy*. 1998; 15: 33-41.
 34. Hazariwala A, Sanders Q, Hudson CR, Hofacre C, Thayer SG, Maurer JJ. Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and humans invasive staphylococcal disease. *Avian Dis*. 2002; 46(1): 132-136.