

들깨잎 재배단지에서 분리한 *Staphylococcus aureus*의 독소 유전자와 항생제 감수성 분석

김세리¹ · 차민희¹ · 정덕화² · 심원보^{3*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과, ²경상대학교 응용생명과학부, ³세계김치연구소

Profiles of Toxin genes and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Perilla Leaf Cultivation Area

Se-Ri Kim¹, Min-Hee Cha¹, Duck-Hwa Chung², and Won-Bo Shim^{3*}

¹Microbial Safety Team, Department of Crop Life Safety, NAAS, RDA,

²Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, ³World Institute of Kimchi

(Received October 4, 2014/Revised December 10, 2014/Accepted February 19, 2015)

ABSTRACT - Thirty one of *Staphylococcus aureus* isolated from perilla leaf cultivation areas in Miryang were investigated on the characteristics, such as enterotoxin genes and antibiotic susceptibility. Five toxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *see*) were examined by PCR method. Disc diffusion method was used to examine the antibiotic susceptibility of *S. aureus* by using 18 types of antibiotic discs with different concentrations. Among enterotoxin-encoding genes, *sea* and *sed* genes were co-detected from 4 isolates (12.9%), *sed* gene was founded in 9 isolates (29.0%), and *see* gene was founded in 1 isolate (3.2%). However *seb* and *sec* and *tsst* were not detected in any isolates. As a result of antibiotic susceptibility test, 7 isolates (22.6%) were resistant to 12 antibiotics (penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cephalothin, imipenem, gentamicin, tetracycline, ofloxacin, norfloxacin, and erythromycin). 2 isolates (6.5%) were resistant to 5 antibiotics (penicillin, ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, gentamicin, and telithromycin). MRSA (Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*) was founded in packing vinyl, hands, and perilla leaves.

Key words : perilla leaves, *S. aureus*, toxigenic genes, antibiotics susceptibility

최근 국민들은 생활수준향상과 건강에 대한 관심 증대로 조리하지 않고 바로 섭취하는 신선 농산물을 선호하고 있어 그로 인한 식중독발생보고 건수도 증가하고 있다^{1,2}. 농산물 안전성을 위협하는 식중독사고의 원인이 되는 병원성 미생물 오염은 재배단계에서 유통과정에 이르는 전 단계에서 일어날 수 있으며, 특히 생산현장에서 토양이나 오염된 관개용수, 비위생적인 수확 후 환경 및 작업자는 직접적인 오염원이 될 수 있다는 보고가 있다³. 식중독 원인균으로는 *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Camphylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* 등이 있다⁴. 그 중 *S. aureus*는 Reina⁵ 등의 연구에서 나타난 바와 같이 *Salmonella* spp.와 더불어 채소류에 부착력이 강하여

세척으로 제거하기 어렵다. 또한 이 세균은 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 존재하고 있어 식품에 쉽게 오염되기 때문에 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있다⁶.

*S. aureus*에 의한 식중독은 균이 식품에서 증식하면서 생성된 독소를 사람이 섭취함으로써 발생하는 독소형 식중독이다. 자연계에는 여러 종류의 *Staphylococcus*속이 있으나 enterotoxin을 생산하는 균종은 *S. aureus*에 한정된다⁷. Enterotoxin은 분자량이 약 26,000~35,000 Da인 단일 폴리펩티드이며, 면역학적으로 서로 다른 18가지, 즉 enterotoxin A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, U형이 있다⁸. 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있으며 독소 중 B형이 열에 가장 안정한 것으로 알려져 있다⁹. 또한 *S. aureus*가 분비하는 내독소는 물과 식염수에 녹는 특성이 있으며 대부분의 독소들은 chymotrypsin, renin, papain 같은 소화 효소에도 안정적이기 때문에 음식물 섭취 후 소화기관에서도 그들의 활

*Correspondence to: Won-Bo Shim, World Institute of Kimchi, kimchiro 86, Namgu, Gwangju 503-360, Korea
Tel: 82-62-610-1700, Fax: 82-62-610-1701
E-mail: wbskim@wikim.re.kr

성이 그대로 유지되므로 각별한 주의가 필요하다^{10,11)}.

만약 세균에 의해 식중독이 발생되었을 때 항생제의 선택은 초기 진료에 결정적 영향을 주게 되므로 분리균주에 대한 항생제 내성 조사가 반드시 필요하다. 특히, 최근에 감염증 치료를 위한 목적으로 사용하였던 항생제들의 오·남용으로 식중독균인 *S. aureus*는 메티실린을 비롯한 여러 항생제에 대하여 저항성을 보이는 이른바 슈퍼박테리아가 출현하였다. 우리나라의 경우 일반 환자에서 분리된 *S. aureus*의 86%가 메티실린에 저항성을 가지고 있다고 보고되었다¹²⁾. 또한 2002년 미국 미시간 주에서는 메티실린 저항성균주를 치료할 목적으로 사용되는 반코마이신에 저항성을 보이는 균주에 감염된 환자가 발생하는 등 항생제 내성 균주에 대한 보고사례는 증가하고 있다¹³⁾.

항생제는 임상에서 뿐만 아니라 가축의 사육과 수산양식 및 농작물을 재배하는 농장에서도 질병의 예방과 성장 촉진을 목적으로 많은 양이 사용되고 있어 농축수산업 현장에서도 항생제 내성균주의 출현은 예외가 아닐 수 없다. Boehme¹⁴⁾ 등의 연구에서는 새싹채소에서 분리된 균주가 9개의 항생제에 대해서 내성을 갖는 것으로 나타났다. 항생제의 내성을 갖는 기작은 자연돌연변이 또는 적응 변이주에 의한 내성이 생기는 방법과 교차내성 또는 유전자 전달에 의해서 내성이 생기는 방법이다. 이때 항생제 내성의 전달에 관여하는 유전물질은 주로 플라스미드로 플라스미드에 의한 항생제내성 획득은 여러 차례에 걸쳐 일어날 수 있어, 다양한 종류의 항생제에 대한 내성을 동시에 갖는 균도 출현하고 있다¹⁵⁾.

따라서 본 연구에서는 들깨잎을 대상으로 주요 생산지인 밀양에서 들깨잎의 미생물에 대한 오염도를 조사하였고 분리된 *S. aureus*의 독소유전자 검색과 항생제 내성 조사를 통하여 toxicity를 평가하였다.

재료 및 방법

장소 선정 및 시료 채취

본 연구는 들깨잎 주생산지인 밀양지역 38농가에서 들깨잎을 수집하여 *S. aureus*를 분리하였다. 이후 *S. aureus*가 검출된 5농장을 선정하여 들깨잎이 접촉 가능한 토양, 관개용수, 작업자, 수확 후 환경에서 *S. aureus*를 분리 하였다. 분리된 *S. aureus*에 대하여 독소유전자와 항생제 감수성조사를 실시하였다.

들깨잎의 *S. aureus* 오염도 조사를 위한 시료채취는 수확·포장과정을 거쳐 박스에 담긴 들깨잎을 시료채취용 팩에 담아와 본 연구에 사용하였다. 또한 들깨잎의 생산 환경에서의 *S. aureus* 분포를 조사하기 위한 시료 채취 과정은 다음과 같다. 토양의 경우 하우스 내의 토양을 약 100 g 씩 시료채취용 팩에 채취하였다. 들깨잎에 사용되는 관개용수는 분수 호스 내에 있는 물을 채취하였고, 지하수나

지표수는 수원(水原)으로부터 퍼올린 물을 1 L 씩 채수병에 채취하였다. 또한 들깨잎 포장 작업 시에는 들깨잎의 시들음 방지를 위해서 사용하는 물은 분무기에 담긴 물 약 500 mL 정도를 1 L 채수병에 채취하였다. 들깨잎 농장의 수확용기와 작업도구는 사용 중인 것을 채취하였고 포장 비닐은 사용 전의 것을 대상으로 하였다. 작업자의 복장은 농장에서 일하는 작업자의 상의를 대상으로 하였으며 수확용기, 작업도구 및 작업자 복장은 10 cm × 10 cm 크기의 면적대를 사용하여 100 cm²의 면적을 면봉으로 문질러 채취하였다. 또한 작업자의 손은 0.85% 생리식염수 50 mL을 멸균 팩에 붓고 손을 넣어 30초간 씻어서 손에 있는 미생물을 채취하는 glove juice법으로 하였다¹⁶⁾. 들깨잎은 수확 전 하우스에 심겨진 들깨잎과 수확·포장이 끝나 박스에 담긴 들깨잎을 대상으로 채취하였으며 채취량은 수확전의 것은 36장 수확후의 것은 3개 묶음 (1묶음 = 12장)을 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였으며 이렇게 채취된 모든 시료는 얼음을 채운 아이스박스에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다(Table 1).

S. aureus 분리 및 동정

수집된 시료에서 *S. aureus*를 31균주 (재배환경: 관개용수 1주, 수확 후 환경: 포장대 3주, 포장용기 1주, 작업자: 작업자 복장 1주, 작업자 손 3주, 들깨잎 22주)를 분리하였으며 분리, 동정법은 다음과 같다. *S. aureus*는 정량과 정성 검사를 실시하였다. 정량검사의 경우 위생지표세균을 위해 전처리된 검액을 단계희석 한 후 각 희석농도에 대하여 250 µL씩 Baird-Parker agar 4 plate에 접종한 후 37°C, 48시간 배양한 후 전형적인 형태를 나타내는 집락을 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 NA배지에 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 PCR kit (Power check PCR kit, Kogen, Korea)와 VITEK (VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로

Table 1. Samples for investigation of characteristics of *S. aureus* isolated from perilla leaves cultivation environment

Sources	Unit of sample	No. of samples
Soil	100 g	15
Ground water	1 L	15
Irrigation water	1 L	12
Collection container	100 cm ²	15
Packing table	100 cm ²	15
Water in spray	500 mL	15
Packing vinyl	100 cm ²	15
Hands	1 hand	15
Clothes	100 cm ²	15
Perilla leaves (Green house)	36 leaves	15
Perilla leaves (Packed)	36 leaves	129
Total		276

확인동정하였다. 최종균수는 *S. aureus*의 수치는 전형적인 집락을 보이는 균주 × 양성 균주 수/5주의 test균주 × 희석 배수로 계산하였다.

또한 정성 검사는 들깨잎 25 g을 225 mL의 10% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 넣고 2분간 stomacher에서 균질한 후 37°C에서 16시간 전 배양하고 배양액을 Baird-Parker agar (Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 37°C에서 24~48시간 획선 배양한 후 검은 색, 집락주위에 투명 환(clear zone)이 나타나는 단일 집락을 취하여 확인실험에 사용하였다. 확인실험은 정량검사와 동일하게 PCR kit (Kogen, Korea)와 VITEK (Biomerieux, France)을 사용하였고 대조균으로 *S. aureus* 표준 균주 ATCC 25923을 사용하였다¹⁷⁾.

독소유전자 분석

독소유전자 분석을 위한 DNA는 Intron사의 DNA추출 kit (G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit, Intron, Korea)를 사용하여 추출하였다. *S. aureus*를 한 loop 취하여 Luria-Bertani (LB, Oxoid, England) broth 5 mL에 접종한 후 37°C에서 180 rpm 16시간 진탕 배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 13,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 배양액으로부터 얻은 pellet은 pre-buffer 50 µL와 lysozyme 3 mL를 첨가한 뒤 37°C 20분간 반응시켰다. 이후 G-buffer 250 µL을 넣고 65°C에서 15분간 반응시킨 후 binding buffer 250 µL를 넣고 slow vortexing을 하여 칼럼에 로딩한 후 13000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 칼럼과 결합한 DNA의 세척을 위하여 washing buffer 1 500 µL넣고 13000 rpm에서 1분간 원심분리하고 이어 washing buffer 2를 1과 동량 넣고 13000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 최종 elution buffer 100 µL를 넣고 13000 rpm 1분간 원심분리하여 이를 enterotoxin gene 검출을 위한 template DNA로 사용하

Table 2. Primers used to detect the enterotoxin genes of *S. aureus* isolated from perilla leaves farms

Genes	Primers	Oligonucleotides (5' to 3')
<i>sea</i>	sea-F	AAG TGC CGA TCA ATT TAT GGC TA
	sea-R	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA
<i>seb</i>	seb-F	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG
	seb-R	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT
<i>sec</i>	sec-F	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG
	sec-R	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC
<i>sed</i>	sed-F	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C
	sed-R	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G
<i>see</i>	see-F	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC
	see-R	ATA ACT TAC CGT GGA CCC TTC

였다. *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 19095 (*sec*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed*), *S. aureus* ATCC 27664 (*see*)이다. 또한 음성 대조균으로는 *L. monocytogenes* ATCC 15313, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *B. cereus* KCCM 11714를 사용하였다. Primer는 Tsen¹⁸⁾ 등 (*sea*)과 Karsten¹⁹⁾ 등 (*seb*, *sec*, *see*) 그리고 Monday²⁰⁾ 등 (*sed*)에 의해 밝혀진 염기서열을 참고로 하여 제작하였다. 여섯 종류의 독소에 대한 primers의 특이적 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같으며, 각각의 primer는 Bioneer사 (Chengwon, Chungbuk, Korea)에서 합성하였다. PCR 반응 용액은 Intron사의 PCR pre-mix (Intron, Korea)를 사용하였다. pre-mix에는 reaction buffer, taq polymerase가 함유되어 있어 10 pM primer와, 5 µL의 DNA를 첨가하고 3차 멸균 증류수

Table 3. Antibiotics used for the antibiotic resistance test

	Group	Antibiotics
β-Lactam	Penicillin	Penicillin (P), Ampicillin (AMP), Oxacillin (OX)
	β-Lactam/β-Lactamase inhibitor combinations	Amoxicillin-clavulanic acid (AMC)
	Cephems	Cefazolin (KZ), Cephalothin (KF)
	Carbapenems	Imipenem (IPM)
	Aminoglycosides	Gentamicin (CN)
non β-Lactam	Glycopeptides	Vancomycin (VA)
	Tetracyclines	Tetracycline (TE)
	Fluoroquinolones	Ofloxacin (OFX), Norfloxacin (NOR)
	Macrolides	Erythromycin (E)
	Ketolide	Telithromycin (TEL)
	Folate pathway inhibitor	Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)
	Phenicol	Chloramphenicol (C)
	Streptogramins	Rifampin (RD) Quinupristin-dalfopristin (QD)

를 사용하여 최종 반응용액을 20 μ L로 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°C에서 40초간 각각 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30cycle을 수행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.8% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 National committee for clinical laboratory standards (NCCLS) 가이드라인을 참조하였고 또 한 본 연구에 사용된 항생제 종류는 Table 3에서 보는 바와 같다²¹⁾. 접종 균액은 Muller-Hinton broth (Oxoid, England)에서 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 상온에서 10분간 정치시켜 습기를 제거하였다. 항균제 디스크를 20 mm 간격으로 배지 표면에 부착시킨 후 37°C에서 24시간 배양하였으며 NCCLS의 기준에 따라 감수성 여부를 판단하였다. 대조균으로는 *E. coli* ATCC 25922과 *S. aureus* ATCC25923을 사용하였다. 항생제 선정은 NCCLS 가이드라인에서 추천하는 항생제를 선정하였고 항생제 감수성 기준을 적용하였다.

결과 및 고찰

*S. aureus*의 오염분포

들깨잎에서 *S. aureus*를 조사한 결과, 0~2.92 log₁₀ CFU/g 수준이었으며 검출빈도는 7.9%(9/114)였고 2곳의 농가에서 *S. aureus*가 2.00 log₁₀ CFU/g 이상으로 검출되었다 (data not shown). 이는 Kim²²⁾ 등이 수행한 즉석섭취 야채 샐러드의 미생물 오염조사에서 총 120건 중 4건(3%)보다는 높은 빈도를 보였고 Jung²³⁾ 등이 수행한 비가열 섭취 채소류의 미생물 오염도 조사결과, 깻잎 10.0%, 치커리 22.2%, 배추 17.6%, 상추 12.0%에서 *S. aureus*가 검출되었다고 보고하고 있어 이 보다는 조금 낮은 수준이었다. 또한 워싱턴 D. C.에 위치한 market에서 sprout, 셀러리, cauliflower, 브로커리를 대상으로 병원성 미생물을 분석한 결과 상추 10점 중 1점에서 *S. aureus*이 검출되었다고 보고된 바 있다²⁴⁾. 이 처럼 *S. aureus*는 엽채류에서 빈번히 검출되고 있음을 알 수 있다. 들깨잎 생산 환경에서 *S. aureus*를 조사한 결과, 5 농가 중 3 농가의 생산환경에서 *S. aureus*가 검출되었다. 검출시료는 A 농가의 포장대, D

농가의 포장비닐과 작업자 손, E 농가의 관개용수와 복장이었고 검출 수준은 0.33 ± 0.58 ~ 1.31 ± 1.30 log₁₀ CFU/100 cm² 이었다(data not shown). Kim²⁵⁾ 등이 수행한 토마토농장에서 *S. aureus*를 검색한 결과 총 120점 중 14점의 시료에서 *S. aureus*가 검출되었고 검출된 시료는 토양, 관개용수, 작업자의 복장, 손, 장갑, 토마토였다. 이는 본 연구결과와 유사한 경향이다. 특히 건강한 사람의 25~50%는 *S. aureus*의 보균자이며, 이들 중 15~20%는 enterotoxin 생성균주인 것으로 알려져 있어 *S. aureus*는 작업자에 의해 쉽게 오염될 수 있다. Tan²⁶⁾ 등은 말레이시아에 있는 초등학교 급식종사자들의 손을 대상으로 *S. aureus*를 검사하였는데 조리 전, 조리 중, 조리 후에 각각 74.1%, 65.9%, 70.6%의 종사자들의 손에서 *S. aureus*가 검출되었다고 보고하였다. Park²⁷⁾ 등은 4종의 농산물 생산 환경에서 *S. aureus*의 검출한 결과, 4종의 농산물 재배지에서 작업자 개인위생과 관련된 손, 장갑, 옷, 시료에서만 검출되었다고 보고하였으며 이는 개인위생의 중요성을 시사하는 결과라 할 수 있다.

따라서 *S. aureus*의 오염을 최소화하기 위하여 작업자를 대상으로 한 주기적인 위생교육과 작업 전 후로 손을 씻고 장갑의 착용이 필수적이다. 또한 수확 후 처리 작업이 끝난 후에는 반드시 작업장 내의 청소, 소독을 통하여 *S. aureus*를 비롯한 유해세균에 들깨잎이 오염되는 것을 예방해야 한다.

*S. aureus*의 독소 유전자 분석

들깨잎과 생산 환경에서 분리된 *S. aureus* 균주 31종에 대하여 enterotoxin A, B, C, D, E 생성유전자를 PCR로 증폭하여 분석한 결과 4개의 서로 다른 그룹으로 분류되었다(Table 4). 1번 group은 sea와 sed유전자를 동시에 보유하는 균주 group, 2번 group은 sed 유전자만 보유하는 group, 3번 group은 see 유전자만 보유하는 group, 4번 group은 5가지 독소 생성유전자를 보유하지 않는 균주들의 group이다. 분리균주의 12.9%가 group 1에 속하며 들깨잎에서만 분리되었고 group 2로 분류되는 균주는 29.0%였으며 다양한 시료에 고르게 분포하고 있었다. 검출된 시료는 들깨잎 16.1%, 작업자의 복장, 포장대, 관개용수 등 생산 환경에서 분리된 균주의 29.0%였다. 또한 see 유전자

Table 4. Toxigenic patterns of *S. aureus* strains isolated from 5 perilla leaves farms

Group	sea	seb	sec	sed	see	Frequency(%)
1	+ ¹⁾	- ²⁾	-	+	-	12.9(4)
2	-	-	-	+	-	29.0(9)
3	-	-	-	-	+	3.2(1)
4	-	-	-	-	-	54.9(17)

¹⁾+: positive, ²⁾:- negative

를 보유하는 균주는 포장대에서 분리된 3.2%에서 검출되었다. 한편 *seb*와 *sec*를 유전자를 보유한 균주는 없었다. 들깨잎과 생산 환경에서 분리된 균주 45.1%가 enterotoxin 생성 유전자를 보유하고 있어 *S. aureus*가 독소생성에 유리한 환경에 노출되면 식중독을 야기시킬 수 있는 가능성을 내포하고 있다. Jung²⁸⁾ 등이 수행한 상추와 원유에서 분리한 균주들 중 *sea* 유전자를 소유한 균주가 43%로 가장 높게 나타났다. 또한 Kim²⁹⁾ 등이 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 높았다. 이 결과는 본 연구에서 *sed* 가 빈번하게 검출된 경향과는 조금 다름을 알 수 있다. 또한 Park²⁷⁾ 등은 4종의 농산물 생산 환경에서 분리된 *S. aureus* 72균주를 대상으로 독소 유전자를 확인한 결과, *sea* 유전자는 1균주에서 검출되었고 *sed* 유전자는 6균주에서 검출되었다. 또한 *seg*와 *sei*유전자는 *S. aureus* 72균주 모두 검출되었다. Aydin³⁰⁾ 등의 연구에서는 육류, 육류제품, 우유, 유제품, 그리고 제과류, 즉석식품 등에서 분리한 *S. aureus*의 독성 유전자의 유무를 실험한 결과, 총 147개의 분리균주 중 92(62%)개에서 *S. aureus* enterotoxin 유전자, exfoliative toxin 유전자, toxic-shock syndrome toxin 유전자가 검출되었다. 또한 classical enterotoxin 유전자들(*sea* to *see*)보다 *sei*유전자가 보다 많이 검출된 경향을 미루어볼 때 본 연구에서 5가지 유전자가 모두 불검출된 균주들도 *seg*나 *sei* 유전자를 보유할 가능성이 있을 것으로 추정된다.

한편, Cho³¹⁾ 등이 국내 다양한 식품에서 분리한 황색포도상구균의 장독소 phenotype유형과 genotype유형을 분석한 결과, enterotoxin 유전자를 보유하고 있어도 독소 발현이 되지 않았다고 보고하였다. 또한 Aydin³⁰⁾ 등의 연구에

서도 독소유전자를 보유하는 92주 중 12주에서 면역분석법으로 독소생성여부를 측정하였을 때 면역분석법에서는 독소생성음성으로 나타났으며 이러한 현상은 Staphylococcal enterotoxin 생성이 낮기 때문이거나 enterotoxigenic 유전자들이 완전히 발현되지 않았기 때문이라고 보고하였다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 분리하는 장소와 시료에 따라서 *S. aureus*가 갖는 독소유전자가 차이가 있는 것으로 판단되므로 시료와 장소에 따라 분리된 균주가 어떤 유형의 enterotoxin을 생성하는지에 대한 조사가 체계적으로 이루어져야 한다. 또한 enterotoxin 유전자가 검출이 된다고 하여도 그 활성의 정도는 알 수 없으므로 면역분석법을 병행하는 것이 필요하다고 보인다.

항생제 내성 분석

항생제는 임상에서 뿐만 아니라 가축, 수산양식 및 농작물을 재배하는 농장에서도 질병의 예방과 성장촉진을 목적으로 많은 양이 사용되고 있다. 항생제 내성은 집단 식중독이 발생되었을 때 초기 진료에 결정적 영향을 주게 되므로 분리균주에 대한 항생제 내성 조사가 반드시 필요하다. 따라서 각 시료에서 분리된 병원성 미생물에 대한 항생제 민감성 실험을 수행하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 31종의 균주는 8개의 내성 패턴으로 grouping되었다.

8제의 β-Lactam계 항생제와 4제의 비 β-Lactam계 항생제(penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cephalothin, imipenem, gentamicin, tetracycline, ofloxacin, norfloxacin, erythromycin)에 내성을 보인 group 1은 22.6%였다. Group 1에 해당하는 균주는 포장비닐, 작업자의 손 그리고 들깨잎에서 분리된 균주에서 나타났다. 또한 penicillin, ampicillin에 저항성, gentamycin

Table 5. Antibiotic resistance patterns of *S. aureus* isolated from perilla leaves farms

Group	P*	AMP	OX	AMC	KZ	KF	IPM	CN	VA	TE	OFX	NOR	E	TEL	SXT	C	RD	QD	Frequency
1	R ¹⁾	R	R	R	R	R	R	R	S ³⁾	R	R	R	R	S	S	S	S	S	22.6(7)
2	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	6.5(2)
3	R	R	S	S	S	S	S	I ²⁾	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	25.8(8)
4	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	9.7(3)
5	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	25.8(8)
6	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	9.7(3)
7	R	R	S	S	S	S	S	I	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	3.2(1)
8	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.2(1)

*P: penicillin, AMP: ampicillin, OX: oxacillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, KZ: cefazolin, KF: cephalothin, IPM: imipenem, CN: gentamicin, VA: vancomycin, TE: tetracycline, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin, E: erythromycin, TEL: telithromycin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, C: chloramphenicol, RD: rifampin, QD: quinupristin-dalfopristin
 Abbreviation - P: penicillin, AMP: ampicillin, OX: oxacillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, KZ: cefazolin, KF: cephalothin, IPM: imipenem, CN: gentamicin, VA: vancomycin, TE: tetracycline, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin, E: erythromycin, TEL: telithromycin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, C: chloramphenicol, RD: rifampin, QD: uinupristin-dalfopristin

¹⁾R; Resistant, ²⁾I; Intermediate, ³⁾S; Susceptible

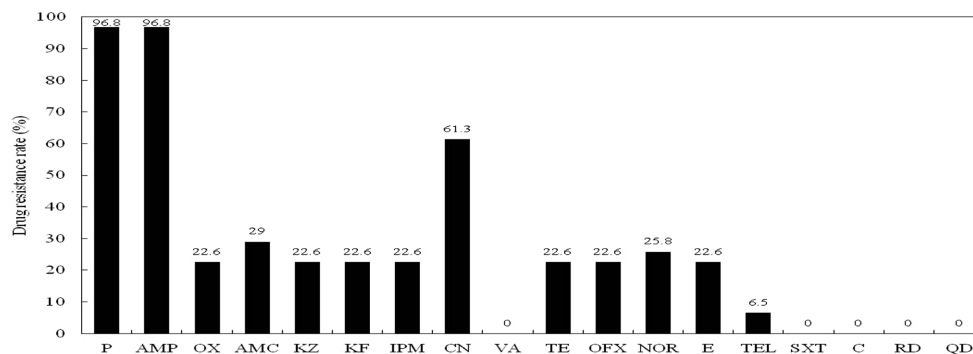


Fig. 1. Resistance of *S. aureus* strains isolated from perilla leaves farms against various antibiotics. *P: penicillin, AMP: ampicillin, OX: oxacillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, KZ: cefazolin, KF: cephalothin, IPM: imipenem, CN: gentamicin, VA: vancomycin, TE: tetracycline, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin, E: erythromycin, TEL: telithromycin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, C: chloramphenicol, RD: rifampin, QD: quinupristin-dalfopristin

에 중도저항성을 보인 group 3은 25.8%, penicillin, ampicillin, gentamycin에 저항성을 보인 group 5은 25.8%였다.

항생제별로는 들깨잎에서 분리된 균주 1주를 제외한 나머지 균주(96.8%)에서 모두 penicillin과 ampicillin에 저항성을 보였다(Fig. 1). 또한 amoxicillin-clavulanic acid에 29.0%, cefazolin에 22.6%, cephalothin에 22.6%, imipenem에 22.6%, gentamycin에 61.3%, tetracycline에 22.6%, ofloxacin에 22.6%, norfloxacin에 25.8%, erythromycin에 22.6%, telithromycin에 6.5%가 내성을 보였으며 vancomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, rifampin, quinupristin-dalfopristin에 대한 내성을 보이는 균주는 없었다. 한편, oxacillin에 내성을 보이는 MRSA (Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*)균주가 22.6% 검출되었으며 검출된 시료는 group 1에 해당하는 균주로 포장비닐, 손, 들깨잎이었다. MRSA 균주의 출현을 우려하는 이유는 methicillin 저항유전자인 *mecA* 유전자의 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 때문이다³²⁾.

항생제 내성에 대한 조사는 병원에서 주로 행해졌으나 최근에는 식품, 농산물, 식품 제조환경에서도 항생제내성 검사를 실시하고 있다. 1998년 Tsen³³⁾ 등의 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. 하지만 2004년 Boehme¹⁴⁾ 등의 연구에서는 새싹에서 분리된 균주가 9개의 항생제에 대해서 내성을 갖는 것으로 나타났고 Kim²⁵⁾ 등이 수행한 토마토농장에서 분리한 *S. aureus*의 항생제 내성을 조사한 결과 penicillin (64.3%), novobicin (57.1%), ampicillin (42.9%), erythromycin (14.3%), oxacillin (14.3%), kanamycin (7.2%),

doxycycline (7.2%)에 내성을 보였으며 2제 이상의 항생물질에 대하여 내성을 나타낸 균주는 10주 (71.4%)였다. 이외에도 식품에서 분리된 *S. aureus* 중 캐나다 6.4%, 스페인 1.6%, 네덜란드 2.5%, 이탈리아 3.8%, 한국 2.4%의 균주가 MRSA로 보고되고 있어 항생제 내성이 더 이상 병원에서만 문제가 아님을 알 수 있다³⁴⁾.

따라서 농축수산물 생산 현장에서도 항생제를 오남용하는 사례가 없도록 지속적인 모니터링과 교육이 필요하다고 사료된다.

요 약

본 연구는 들깨잎과 들깨잎 생산환경을 대상으로 31개의 시료를 채취하여 *S. aureus* 를 분리 하였다. 분리된 *S. aureus* 31주의 toxicity를 평가하고자 독소유전자와 항생제 내성을 검색하였다. 그 결과 분리된 균주에서 4개의 서로 다른 독소유전자 패턴은 확인하였으며 *sea*와 *sed*유전자를 동시에 보유하는 균주는 4균주 (12.9%)였고, *sed* 유전자를 보유하는 균주는 9균주 (29.0%)였으며 *see* 유전자를 보유하는 균주는 1균주 (3.2%)였다. 한편 *seb*와 *sec* 유전자를 보유하는 균주는 없었다. 항생제 내성평가결과, 12제의 항생제(penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cephalothin, imipenem, gentamycin, tetracycline, ofloxacin, norfloxacin, and erythromycin)에 내성을 보인 균주는 7균주 (22.6%)였다. 또한 분리된 균주의 2균주 (2.6%)는 5제의 항생제(penicillin, ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, gentamycin, and telithromycin)에 내성을 보였고 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)는 포장지, 장갑, 들깨잎에서 발견되었다. 따라서 본 연구결과는 들깨잎에 오염된 *S. aureus*에 의하여 독소형 식중독이 발생할 가능성을 시사하며 들깨잎과 생산 환경에서 항생제 저항성 *S. aureus*가 검출되어 의약계뿐만 아니라 농업현장에서도 항생제내성균주 출현을 예방하는 대

책이 요구된다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업인 농식품 중 유해미생물 안전관리기반기술 개발(과제번호: PJ011237)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Sevell, A.M., Farber, J.M.: Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *J. Food Prot.*, **64**, 1863-1877 (2001).
- 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., Ha S.D.: Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *Korean J. Food Hyg. Safety.*, **20**, 43-47 (2005).
- 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, 2005.
- Burnett, S.L., Beuchat, L.R.: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 104-110 (2001).
- Reina, L.D., Fleming, H.P., Breidt, F.J.R.: Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. *J. Food Prot.*, **65**, 1881-1887 (2002).
- Suk S.U., Park S.C.: Staphylococcal infections. *J. Infection.*, **17**, 115-122 (1985).
- Jang D.S., Sin D.H., Chung D.H., Kim C.M., Lee I.S.: Food hygienic. Jeongmungak Co., Seoul, Korea. pp. 71-111. 2002
- Chen, T.R., Hsiao, M.H., Chiou, C.S., Tsen, H.Y.: 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).
- Lee E.J.: The effect of temperature and time on the multiplication of *Staphylococcus* in foods. *Korean Journal of Public Health.*, **9**, 381-387 (1972).
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 16-34 (2000).
- Loir, Y.L., Baron, F., Gautier, M.: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.*, **2**, 63-76 (2003).
- Kim S.H., Ryu J.H., Kim M.S., Choi H.J.: The risk factors and prognosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia : focus on nosocomial acquisition. *The Korean Journal of Medicine.*, **71**, 405-414 (2006).
- Chang, S., Suvert, D.M., Hageman, J.C., Boulton, M.L., Tenover, F.C., and Pouch, D.F.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1342-1347 (2003).
- 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).
- Kang C.S.: Study on the resistance and prevention of antibiotics. *Patent 21.*, **54**, 37-43 (2004).
- Anonymous. Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). *Fed. Regist.* **43**, 1242-1243 (1978).
- KFDA. Korean Food code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 75-105 (2002).
- Yang, I.C., Shih, D.Y., Huang, T.P., Huang, Y.P., Wang, J.Y., Pan, T.: Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J. Food Prot.*, **68**, 2123-2130 (2005).
- Tsen, H.Y., Chen, T.R.: 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).
- Karsten, B., Ricarda, R., Georg, P.: 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, S.R., Bohach, G.A.: Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3411-3414 (1999).
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard-9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. pp. 6-80 (2006).
- Kim J.S., Bang O.K., Chang H.C.: Examination of microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salad. *J. Food Hyg. Safety.*, **19**, 60-65 (2004).
- Jung S.H., Hur M.J., Ju J.H., Kim K.A., Oh S.S., Go J.M., Kim Y.H., Im J.S.: Microbiological evaluation of raw vegetables. *J. Food Hyg. Safety.*, **21**, 250-257 (2006).
- Thunberg, R.L., Tran, T.T., Bennett, R.W., Matthews, R.N., Belay, N.: Microbial evaluation of selected fresh produces obtained at retail markets. *J. Food Prot.*, **65**, 677-682 (2002).
- Kim J.S., Lee J.H., Kim J.H., Choi J.M., Kim S.R., Ha S.D., Kim K.S., Lee K.H., Kim M.G., Kim K.Y., Kim C.H., Chung D.H.: Characteristics of enterotoxigenic genes and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Tomato Farms in Western Gyeongnam. *Korean J. Food Sci Technol.*, **38**, 295-303 (2006).
- Tan S.L., Lee H.Y., Mahyudin N.A.: Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *Food Control*, **44**, 203-207 (2014).
- Park S.H., Kim J.S., Kim K.Y., Chung D.H., Sim W.B.: Identification of toxin gene and antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* isolated from agricultural product cultivation environments. *J. Environ Health Sci.*, **39**, 465-473 (2013).
- Jung H.J., Cho J.I., Park S.H., Ha S.D., Lee K.H., Kim C.H., Song E.S., Chung D.H., Kim M.G., Kim K.Y., Kim K.S.: Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. *Korean. J. Food Sci. Technol.*, **37**, 134-141 (2005).
- Kim S.R., Shim W.B., Kim J.H., Hwang S.J., Park S.J., Ha S.D., Kim K.S., Lee K.H., Kim M.G., Kim K.Y., Kim C.H.

- Chung D.H.: 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).
31. Aydin, A., Sudagidan, M., Muratoglu, K.: Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *Int. J. food Microbiol.*, **148**, 99-106 (2011).
32. Cho Y.S., Lee J.Y., Lee M.K., Sin D.B., Kim D.H., Park K.M.: Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* pathogenic factors isolated from various foods in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 648-665 (2011).
33. Ha D.J., Kim Y.C., Kim Y.J.: Management of infection for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at an orthopaedic surgery department. *J Korean Orthop Assoc.*, **38**, 34-38 (2003).
34. Tsen, H.Y., Yu, G.K., Wang, K.C., Wang, S.J., Chang, M.Y., Lin, L.Y.: 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).
35. Crago B., Ferrato C., Drews S.J., Svenson L.W., Tyrrell G., Louie M.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiol.*, **32**, 202-205 (2012).