pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 6, pp. 393~398 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.6.393

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

신선편이 엽채류의 병원성 *E. coli* 검출을 위한 생화학적동정법 비교 분석

최유경[1,2] · 이희영[1,2] · 이수민[1,2] · 김세정[1,2] · 하지명[1,2] · 이지연[1,2] · 오혜민[1,2] · 윤요한[1,2]*
[1]숙명여자대학교 식품영양학과, [2]숙명여자대학교 위해분석연구센터

Comparison of Biochemical Identification to Detect Pathogenic *Escherichia coli* in Fresh Vegetables

Yukyung Choi[1,2], Heeyoung Lee[1,2], Soomin Lee[1,2], Sejeong Kim[1,2], Jimyeng Ha[1,2], Jeeyeon Lee[1,2], Hyemin Oh[1,2], and Yohan Yoon[1,2]*
[1]*Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea*
[2]*Risk Analysis Research Center, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea*
(Received October 3, 2016/Revised October 17, 2016/Accepted October 30, 2016)

ABSTRACT - The objective of this study was to isolate pathogenic *Escherichia coli* from fresh vegetables with selective media and Petrifilm, and identify a suspicious colony using biochemical identification. Twenty gram of lettuce, twenty gram of cabbage and ten gram of sprout were prepared, and a 5-strain mixture of pathogenic *E. coli* (Enterohemorrhagic *E. coli* NCCP11142, Enterotoxigenic *E. coli* NCCP14037, Enteropathogenic *E. coli* NCCP14038, Enteroaggregative *E. coli* NCCP14039, Enteropathogenic *E. coli* NCCP15661) was inoculated to obtain 1, 2 and 3 log CFU/g. Eighty to ninety milliliter of buffered peptone water (BPW) was placed and pummeled for 60 s. As a results, the Petrifilm method was all positive, but enrichment method of qualitative analysis was negative except for 3-log CFU/g inoculated lettuce. Regarding biochemical identification of pathogenic *E. coli*, the identification rates were dependent on type of methods and vegetables; lettuce: API 20E 100% (44/44), Microgen GNA 100% (44/44) and Food System 66.7% (10/15), cabbage: API 20E 64.7% (22/34), Microgen GNA 50% (16/32) and Food System 60% (9/15), sprout: API 20E 65.1% (28/43), Microgen GNA 62.3% (27/43) and Food System 53.3% (8/15). These results could be useful in determining an appropriate method to detect pathogenic *E. coli* in fresh vegetables.

Key words : fresh cut produce, *Escherichia coli*, genetic analysis, biochemical analysis

최근 간편성과 합리성을 추구하는 소비자가 많아지면서 구입 후 바로 먹거나 조리에 사용할 수 있도록 세척, 박피, 다듬기 과정 등을 거친 신선편이 농산물에 대한 수요가 증가하고 있다[1]. 신선편이 농산물은 특성상 식중독 세균 제어가 쉽지 않아 국내외적으로 신선 농산물 섭취로 인한 식중독 사고가 지속적으로 발생하고 있다[2]. 2015년, 국립농산물품질관리원에서 생식채소류 내 식중독 세균 7종(*E. coli*, Enterohemorrhagic *E. coli, S. aureus*, *Salmonella*, *B. cereus, C. perfringens, L. monocytogenes*)에 대한 오염도를 조사한 결과, 12.8% (77/601)의 생식채소류에서 병원성 세균이 검출되었는데 원인 식중독 세균으로는 *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*가 대부분인 것으로 나타났다[3]. 특히, 농산물에서 병원성 *E. coli*가 검출된 사례를 살펴보면, 국내 대형할인마트에서 판매중인 새싹채소 32% (16/50)에서 평균 2.4 log CFU/g, 샐러드 26.7% (8/30)에서 평균 2.2 log CFU/g의 병원성 *E. coli*가 검출되었고[4], 국내 재래시장에서 유통 중인 상추 29% (6/21), 깻잎 53% (8/15), 오이 10% (2/21)에서 1.0~2.7 $\log_{10}$ CFU/g, 대형마트에서 유통 중인 상추 33% (5/15), 깻잎 53% (8/15), 오이 7% (1/15)에서 1.0~3.5 $\log_{10}$ CFU/g의 병원성 *E. coli*가 분리된 바 있다[5]. 미국에서는 1996년부터 2008년까지 원인식품이 농산물인 식중독 사고 총 82건 중 엽채류 섭취로 인한 식중독 사고가 28건 발생하였고[6], 2011년 독일에서는, 새싹 혹은 신선채소 내 시가독소생성대장균O104:H4 (Shiga-toxin producing *E. coli* O104:H4, STEC) 오염이 원인으로 추정되는 집단 식중독 사고가 발생한 바 있다[7].

*Correspondence to: Yohan Yoon, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea
Tel: 82-2-2077-7585, Fax: 82-2-710-9479
E-mail: yyoon@sookmyung.ac.kr

국내 농식품의 생물학적 관리 우선순위 설정 연구에 따르면, 통계자료와 역학조사를 바탕으로 리스크 프로파일 우선순위를 선정한 결과, 병원성 *E. coli*는 농식품으로 인한 식중독 사고 발생빈도와 위해도가 높다고 판단되어 그룹 I로 분류되었다. 특히, 병원성 *E. coli*는 그룹 I에 속한 병원성 세균 중 가장 많은 식중독 발생건수와 환자수가 발생한 것으로 분석되었다[8]. 즉, 국내에서 유통되어 판매되고 있는 농산물의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서는 병원성 *E. coli*에 대한 관리가 중요하며 이와 함께 정확한 검출방법이 필요하다고 할 수 있다. 현재 식중독 세균 검출을 위한 분석법으로는 선택배지 분리법, 생화학적, 면역학적, 분자생물학적 원리를 이용한 방법이 사용되고 있는데[9], 식품공전 시험법의 경우 모든 시료에 대해 동일한 방법으로 일괄 적용하고 있어 농산물 시료의 특성을 고려한 분석이 어려운 실정이다. 농산물에는 많은 양의 background 미생물 균총이 존재하여 소량의 위해 미생물이 함께 존재할 경우 검출이 어렵고[10], 또한 농산물은 다른 식품과는 달리 중량당 표면적이 상이하여 이를 고려한 분석이 중요하다고 할 수 있다[9].

본 연구에서는 신선편이 엽채류 3종(양상추, 양배추, 어린잎채소)에 대해 선택배지와 건조필름을 통해 병원성 *E. coli*를 분리하고 의심집락을 생화학적분석법을 이용하여 동정함으로써, 신선편이 엽채류 내 병원성 *E. coli*의 동정 결과를 비교 분석하고자 하였다.

Materials and Methods

시료준비 및 균액 접종

서울 시내 대형마트에서 신선편이 엽채류 3종(양상추, 양배추, 어린잎채소)을 구입한 후, 양상추 20 g, 양배추 20 g, 어린잎채소 10 g을 각각 15개씩 멸균백에 채취하였다. 병원성 *E. coli*는 Enterotoxigenic *E. coli* NCCP14037, Enteropathogenic *E. coli* NCCP14038, Enteroaggregative *E. coli* NCCP14039, Enteropathogenic *E. coli* NCCP15661, Enterohemorrhagic *E. coli* NCCP11142 다섯 가지 균주를 혼합하여 사용하였다. 각 균주의 단일 집락을 tryptic soy broth (TSB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 용액 10 ml에 넣고 37°C에서 24 시간 동안 배양한 다음, 새로운 TSB 용액 10 ml에 100 μl 분주하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하여 균의 활성을 최대화하였다. 준비된 균액은 1,912 × g, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 후 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 2번 세척한 다음 십진 희석하여 최종 접종 농도가 각 1, 2, 3 log CFU/g가 되도록 농도별 5개의 시료에 100 μl씩 접종하였다.

선택배지 · 건조필름을 이용한 대장균 분리

병원성 *E. coli*의 분리를 위해 각 시료 당 0.1% buffered peptone water (BPW; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 양상추에 80 ml, 양배추에 80 ml, 어린잎채소에 90 ml를 넣고 1분간 균질화(BagMixer; Interscience, St. Nom, France)한 다음, 선택배지와 건조필름을 이용하여 병원성 *E. coli*를 분리하였다. 선택배지를 이용한 경우, 발효관을 넣은 EC 배지(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 시험관 3개에 희석용액을 1 ml씩 접종한 다음 44.5°C에서 24시간 배양하였고, 발효관에 가스가 발생한 경우 EMB 배지(Becton, Dickinson and Company)에 획선 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 건조필름을 이용한 경우, 희석용액 1 ml을 건조필름(Coliform/*E.coli* Petrifilm, 3M, St. Paul, MN, USA)에 분주한 다음 37°C에서 24시간 배양하여 가스가 생성된 푸른 집락을 계수하였다.

분리된 대장균의 동정

생화학적분석법

생화학동정키트 3종 API 20E (Biomerieux, France), Microgen GNA (Microgen, UK), Food System (Liofilchem s.r.l, Italy)을 이용하여 사용 매뉴얼에 따라 분석하였다. Food System의 경우, 균질화된 용액을 이용하여 매뉴얼에 따라 키트에 분주하여 결과를 확인하였다. API 20E와 Microgen GNA의 경우 선택배지 · 건조필름 시험에서 확인된 의심집락을 이용하여 분석하였는데, 증균시험 양성인 경우 EMB 배지로부터 확보한 단일집락을 사용하였다. 증균시험 음성인 경우 건조필름 시험에서 확보된 단일 의심집락을 TSB에 37°C에서 24시간 배양시킨 다음 MacConkey agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 획선 도말하여 37°C에서 24시간 배양시켰다. 생화학동정키트 분석을 위해 MacConkey agar에서 단일 집락을 TSB에 37°C에서 24시간 배양시킨 후 nutrient agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 획선 도말하고 37°C에서 24시간 배양하여 단일 집락을 생화학적 분석에 사용하였다. API 20E는 20개의 기질에 세균 부유액을 배양시킨 후 반응 산물의 색 변화를 분석한 다음 apiweb (http://apiweb.biomerieux.com)에 생화학적 패턴 결과(양성 혹은 음성)를 입력하여 데이터베이스 내에서 균을 판정하였다. Microgen GNA는 12개의 기질에 세균 부유액을 배양시킨 후 대사반응물과 생화학 시약의 반응에 따른 색 변화를 분석한 다음, 생성된 4자리 코드를 Microgen ID System Software (MID-60)에 입력하여 균을 판정하였다. Food System은 12개의 생화학 시약에 균 배양배지를 넣어 배양시킨 후 나타나는 색변화로 판정하였으며, 두 가지 시약(7, 8번 시약)과의 반응이 양성일 경우 병원성 *E. coli*로 판정하였다.

Results and Discussion

신선편이 엽채류 3종에 대한 대장균 분리 분석

신선편이 엽채류 3종(양상추, 양배추, 어린잎채소)에 최종접종농도 1, 2, 3 log CFU/g의 병원성 *E. coli*를 접종한 후 식품공전 시험법에 따른 선택배지 및 건조필름 시험 분석을 실시한 결과, 양상추의 경우 1, 2 log CFU/g을 접종한 모든 시료에서 증균배양 시험 음성, 3 log CFU/g을 접종한 모든 시료에서 증균배양 시험 양성으로 확인되었고, 건조필름 시험 결과 1, 2, 3 log CFU/g 접종 시료에서 각각 평균 1.4, 2.3, 3.2 log CFU/g이 검출되었다(Table 1). 양배추와 어린잎채소의 경우 1, 2, 3 log CFU/g을 접종한 모든 시료에서 증균배양 시험 음성으로 확인되었고, 건조필름 시험결과 양배추 1, 2, 3 log CFU/g 접종 시료에서 각각 평균 0.8, 1.2, 2.5 log CFU/g이 검출되었으며(Table 2), 어린잎채소 1, 2, 3 log CFU/g 접종 시료에서 각각 평균 1.6, 2.6, 3.4 log CFU/g이 검출되었다(Table 3). 대부분의 시료에서 정량시험은 양성인데 반해 정성시험이 음성인 점을 살펴보았을 때, 신선편이 엽채류 분석에 적합한 병원성 *E. coli* 정성시험법 개선이 필요할 것으로 사료된다. 신선편이 엽채류 내에서 병원성 *E. coli*가 선택적으로 증균이 잘 이루어지지 않은 것은 EC 배지에 접종된 시험원액 1 ml에 병원성 *E. coli*가 미량 존재하였기 때문인 것으로 판단되며, 일부 연구에서는 농산물 내 병원성 *E. coli* 증균 배양을 위해 시료를 EC 배지와 함께 배양시켜 병원성 *E. coli*를 분리한 바 있다[12-13].

병원성 *E. coli* 동정을 위한 생화학적 분석법 결과비교

양상추에서 분리된 병원성 *E. coli*에 대한 생화학적 분석법의 결과를 비교하기 위해, 증균배양 및 건조필름 시험에서 분리한 병원성 *E. coli* 의심집락을 이용하여 생화학적 분석을 실시하였다. 생화학적 분석을 위해 사용된 API 20E, Microgen GNA 동정키트 분석결과 의심집락 100% (44/44)가 *E. coli*로 동정되었다. Food System의 경우, 66.7% (10/15)가 *E. coli*로 동정되었다. Food System은 신속한 생화학적 분석을 위해 사용되고 있는데[14], API 20E와 Microgen GNA보다 분석시간이 적게 소요된다는 장점이 있지만 동정결과를 판정하는 생화학기질의 개수가 API 20E (20개), Microgen GNA (12개)에 비해 다소 적어 (2개) 결과판정에 어려움이 있다고 판단되었다.

양배추에서 분리된 병원성 *E. coli*에 대한 생화학적 분석법의 결과를 비교하기 위해, 건조필름 시험에서 분리된 병원성 *E. coli* 의심집락을 이용하여 생화학적 분석을 실시하였다. 생화학적 분석을 위해 사용된 API 20E 분석결과 접종 농도 1 log CFU/g인 경우 100% (7/7), 2 log CFU/g인 경우 58.3% (7/12), 3 log CFU/g인 경우 53.3% (8/15)가 병원성 *E. coli*로 동정되었다. Microgen GNA 분석결과 접종 농도 1 log CFU/g인 경우 57.1% (4/7), 2 log CFU/g인 경우 33.3% (4/12), 3 log CFU/g인 경우 61.5% (8/13)가 병원성 *E. coli*로 동정되었으며, Food System 분석결과, 접

Table 1. Analysis result of *Escherichia coli* in lettuce

Target concentration	Sample	Korea Food Code		Biochemical identification		
		Petrifilm method (log CFU/g)	Enrichment method	API 20E	Microgen GNA	Food System
1 log CFU/g	S-1	1.7	-[1)]	100% (14/14)	100% (14/14)	40% (2/5)
	S-2	1.5	-			
	S-3	1.3	-			
	S-4	1.0	-			
	S-5	1.6	-			
2 log CFU/g	S-1	2.2	-	100% (15/15)	100% (15/15)	60% (3/5)
	S-2	2.3	-			
	S-3	2.4	-			
	S-4	2.3	-			
	S-5	2.3	-			
3 log CFU/g	S-1	3.2	+[2)]	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (5/5)
	S-2	3.2	+			
	S-3	3.2	+			
	S-4	3.2	+			
	S-5	3.0	+			
Total				100% (44/44)	100% (44/44)	66.7% (10/15)

[1)]Negative result
[2)]Positive result

Table 2. Analysis result of *Escherichia coli* in cabbage

Target concentration	Sample	Korea Food Code		Biochemical identification		
		Petrifilm method (log CFU/g)	Enrichment method	API 20E	Microgen GNA	Food System
1 log CFU/g	S-1	0.7	-[1)]	100% (7/7)	57.1% (4/7)	60% (3/5)
	S-2	0.7	-			
	S-3	0.7	-			
	S-4	1.0	-			
	S-5	1.0	-			
2 log CFU/g	S-1	1.0	-	58.3% (7/12)	33.3% (4/12)	60% (3/5)
	S-2	1.3	-			
	S-3	1.0	-			
	S-4	1.0	-			
	S-5	1.5	-			
3 log CFU/g	S-1	2.4	-	53.3% (8/15)	61.5% (8/13)	60% (3/5)
	S-2	2.2	-			
	S-3	2.8	-			
	S-4	2.6	-			
	S-5	2.5	-			
Total				64.7% (22/34)	50% (16/32)	60% (9/15)

[1)]Negative result

Table 3. Analysis result of *Escherichia coli* in sprout

Target concentration	Sample	Korea Food Code		Biochemical identification		
		Petrifilm method (log CFU/g)	Enrichment method	API 20E	Microgen GNA	Food System
1 log CFU/g	S-1	1.7	-[1)]	46.2% (6/13)	46.2% (6/13)	60% (3/5)
	S-2	2.1	-			
	S-3	1.3	-			
	S-4	1.3	-			
	S-5	1.7	-			
2 log CFU/g	S-1	2.6	-	46.7% (7/15)	40% (6/15)	40% (2/5)
	S-2	2.5	-			
	S-3	2.5	-			
	S-4	2.8	-			
	S-5	2.5	-			
3 log CFU/g	S-1	3.4	-	100% (15/15)	100% (15/15)	60% (3/5)
	S-2	3.3	-			
	S-3	3.4	-			
	S-4	3.4	-			
	S-5	3.6	-			
Total				65.1% (28/43)	62.3% (27/43)	53.3% (8/15)

[1)]Negative result

종 농도 1 log CFU/g인 경우 60% (3/5), 2 log CFU/g인 경우 60% (3/5), 3 log CFU/g인 경우 60% (3/5)가 병원성 *E. coli*로 동정되었다. 즉, 병원성 *E. coli* 의심집락에 대해 API 20E는 64.7% (22/34), Microgen GNA는 50% (16/32), Food System은 60% (9/15)가 병원성 *E. coli*로 분석되었다.

어린잎채소에서 분리된 병원성 *E. coli*에 대한 생화학적 분석법의 결과를 비교하기 위해, 건조필름 시험에서 분리된 병원성 *E. coli* 의심집락을 이용하여 생화학적 분석을 실시하였다. 생화학적 분석을 위해 사용된 API 20E 분석 결과 접종 농도 1 log CFU/g인 경우 46.2% (6/13), 2 log

CFU/g인 경우 46.7% (7/15), 3 log CFU/g인 경우 100% (15/15)가 병원성 *E. coli*로 동정되었다. Microgen GNA 분석결과 접종 농도 1 log CFU/g인 경우 46.2% (6/13), 2 log CFU/g인 경우 40% (6/15), 3 log CFU/g인 경우 100% (15/15)가 병원성 *E. coli*로 동정되었으며, Food System 분석결과, 접종 농도 1 log CFU/g인 경우 60% (3/5), 2 log CFU/g인 경우 40% (2/5), 3 log CFU/g인 경우 60% (3/5)가 병원성 *E. coli*로 동정되었다. 즉, 병원성 *E. coli* 의심집락에 대해 API 20E는 65.1% (28/43), Microgen GNA는 62.3% (27/43), Food System은 53.3% (8/15)가 병원성 *E. coli*로 분석되었다. 이상의 결과를 살펴보았을 때, 생화학동정키트 3종에 대해 병원성 *E. coli* 의심집락을 동정한 결과 API 20E의 병원성 *E. coli* 동정률이 가장 높은 것으로 나타났다.

농산물로부터 병원성 *E. coli* 오염도를 조사한 여러 연구에서는 동정법 간의 결과 비교보다는 검출과 동정 자체에 중점을 두고 있다. Saeed 등(2013)은 채소류로부터 병원성 *E. coli*를 선택배지에 순수 분리한 후 API 20E를 사용하여 동정하였고[15], Shearer 등(2001)은 유전자 분석법(PCR)을 이용하여 신선채소류에서 *E. coli* O157:H7 등의 세균을 검출하였다[16]. 또한, 정 등(2012)은 국내 유통 중인 유기농 채소류로부터 병원성 미생물을 동정하는데 16s rRNA sequencing, PCR, API 분석을 사용하였다[17]. 하지만, 현재 농산물 내 병원성 *E. coli*를 동정하는 분석방법 간의 결과 비교에 대한 연구는 다소 미흡한 것으로 보이며, Barry 등(1979)은 API 20E, Microgen 키트를 이용하여 장내세균과에 대한 생화학적 분석을 실시한 결과 동정결과가 적합하다고 판단한 바 있다[18]. 또한, 유전자 분석법에 비해 생화학적 분석법의 동정률이 낮은 것은 생화학적 분석법이 결과 판정에 있어 다소 주관적일 수 있다는 한계점이 한 요인으로 작용했을 것으로 생각되며 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구의 결과는 신선편이 엽채류의 병원성 *E. coli* 검출에 적합한 시험법 선택을 위한 기초자료로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ0119302-016)의 지원에 의해 이루어진 것임.

국문요약

본 연구에서는 선택배지와 건조필름을 이용하여 신선편이 엽채류 3종(양상추, 양배추, 어린잎채소)에서 병원성 *E. coli*를 분리하였고, 의심집락 동정을 위해 생화학적 분석법을 사용하여 동정한 후 결과를 비교 분석하였다. 양상추 20 g, 양배추 20 g, 어린잎채소 10 g에 병원성 *E. coli* 혼합 균액(Enterohemorrhagic *E. coli* NCCP11142, Enterotoxigenic *E. coli* NCCP14037, Enteropathogenic *E. coli* NCCP14038, Enteroaggregative *E. coli* NCCP14039, Enteropathogenic *E. coli* NCCP15661)을 최종농도가 1, 2, 3 log CFU/g이 되도록 접종하였고, BPW (80~90 ml)을 넣은 후 60초 동안 균질화하여 분석하였다. 연구결과, 모든 시료에서 건조필름 시험 양성, 양상추 시료 일부(최종농도 3 log CFU/g 접종시료)를 제외한 모든 시료에서 증균배양법을 이용한 정성시험결과가 음성으로 나타났다. 증균배양과 건조필름 시험을 통해 분리한 병원성 *E. coli*를 이용하여 생화학적 분석을 실시한 결과, 양상추에서 분리한 병원성 *E. coli*의 경우, API 20E 100% (44/44), Microgen GNA 100% (44/44), Food System 66.7% (10/15)의 동정률이 나타났다. 양배추의 경우, API 20E 64.7% (22/34), Microgen GNA 50% (16/32), Food System 60% (9/15), 어린잎채소의 경우, API 20E 65.1% (28/43), Microgen GNA 62.3% (27/43), Food System 53.3% (8/15)가 병원성 *E. coli*로 동정되었다. 본 연구의 결과는 신선편이 엽채류에 대한 병원성 *E. coli* 검출법 선택에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

References

1. National Agricultural Products Quality Management Service (http://www.naqs.go.kr).
2. Jo, M.J., Jeong, A.R., Kim, H.J., Lee, N., Oh, S.W., Kim, Y.J., Chun, H.S., Koo, M.: Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 91-97 (2011).
3. National Agricultural Products Quality Management Service. Available at: http://www.naqs.go.kr/multiboard/board/detail.naqs?menu=MN30511&groupno=283&cate=0&page=1&seq=48438&schType=&schKeyword= Accessed on September **28**, 2016 (2016).
4. Kang, T.M., Cho, S.K., Park, J.Y., Song, K.B., Chung, M.S., Park, J.H.: Analysis of microbial contamination of sprouts and fresh-cut salads in a market. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 490-494 (2011).
5. 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. *J. Food Hyg. Saf.,* **20**, 43-47 (2005).
6. FDA: Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Leafy Greens. Available at: http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm174200.htm. Accessed on September **28**, 2016 (2009).
7. EFSA (European Food Safety Authority): Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock, *EFSA Journal*, **9**, 2390 (2011).
8. Lee, C., Sung, D., Oh, S.: Profiling and priority selection of foodborne pathogens in fresh produce. *J. Food Hyg. Saf.,* **27**,

356-365 (2012).

9. Kim, S.R., Choi, S.Y., Seo, M.K., Lee, J.Y., Kim, W.I., Yoon, Y., Ryu, K.Y., Yun, J.C., Kim, B.S.: Establishment of sample preparation method to enhance recovery of food-borne pathogens from produce. *J. Food Hyg. Saf.*, **28**, 279-285 (2013).
10. Food and Agriculture Organization/World Health Organization: Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: microbiological risk assessment series 14 meeting report. (World Health Organization. eds.) FAO/WHO, pp. 9 (2008).
11. Wang, G., Clark, G.C., Rodgers, G.F.: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Miccrobiol.,* **40**, 3613-3619 (2002).
12. Mazaheri, S., Salmanzadeh-Ahrabi, S., Falsafi, T., Aslani, M.M.: Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* from lettuce samples in Tehran. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*, **7**, 38-42 (2014).
13. Kim, S.R., Lee, J.Y., Lee, S.H., Kim, W.I., Park, K.H., Yun, H.J., Kim, B.S., Chung, D.H., Yun, J.C., Ryu, K.Y.: Evaluation of microbiological safety of lettuce and cultivation area. *J. Food Hyg. Saf.*, **26**, 289-295 (2011).
14. Sadek, Z.I., Hosny, I.M., El-Kholy, W.I., El-Dairouty, R.K.: Comparative investigations for detection of foodborne microorganisms in Egyptian hard cheese "Ras" using conventional and fast biochemical tests, *Glob. Vet.*, **3**, 189-195 (2009).
15. Saeed, A.Y., Mazin, H., Saadi, A., Hussein, S.O.: Detection of *Escherichia coli* O157 in vegetables. *J. Agric. Vet. Sci*., **6**, 16-18 (2013).
16. Shearer, A.E.,, Strapp, C.M., Joerger, R.D.: Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella* enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. *J. Food Prot.*, **64**, 788-795 (2001).
17. Jung, K.S., Roh, E.J., Ryu, K.Y., Kim, W.I., Park, K.H., Lee, D.H., Kim, K.H., Yun, J.C., Heu, S.G.: Monitoring of pathogenic bacteria in organic vegetables from korean market. *Korean J. Soil Sci. Fert*., **45**, 560-564 (2012).
18. Barry, A.L., Badal, R.E.: Rapid identification of *Enterobacteriaceae* with the Micro-ID system versus API 20E and conventional media. *J. Clin. Microbiol*., **10**, 293-298 (1979).