

로메인 상추에서 병원성미생물의 생존 및 증식 특성

김나예슬 · 김채린 · 김다운 · 정명인 · 오광교 · 김보은 · 류재기 · 정지은 · 전익성 · 류경열*
농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과

Survival and Growth Characteristics of Foodborne Pathogen in Romaine Lettuce

Na-Ye Seul Kim, Chae Rin Kim, Da-Woon Kim, Myung-In Jeong, Kwang Kyo Oh, Bo-Eun Kim,
Jae Gee Ryu, Jieun Jung, Ik Sung Jeon, Kyoung-Yul Ryu*

Microbial Safety Division, Agro-food Safety & Crop Protection Department, National Institute of
Agricultural Science (NIAS), Rural Development Administration (RDA), Wanju, Korea

(Received September 6, 2021/Revised October 29, 2021/Accepted October 29, 2021)

ABSTRACT - The purpose of this study was to provide safety management information by analyzing the survival and growth-related properties of foodborne pathogens from Romaine lettuce. After cultivating *E. coli* O157:H7 for 72 h on Romain lettuce via spray inoculation, the bacteria population increased by 2.0 log CFU/g from the initial population, confirming the possibility of survival and multiplication of the pathogen thereon. The study also revealed that there is no significant difference in the cultivation of *E. coli* O157:H7 after 72 h from inoculation on damaged and undamaged lettuce leaves. As a result of investigating distribution of *E. coli* O157:H7 on damaged lettuce leaves, it was found that the bacteria is unlikely to adhere on the smooth surface of undamaged leaves and, thus, results in a low population density, whereas the bacteria cluster on the rough surface of damaged leaves and easily enter through the damaged tissues. Furthermore, after 24 h of cultivation of the pathogenic microbe in the extract with concentrations of 10-100%, utilization of the lettuce extract by the pathogen was found to be 8.9 log CFU/mL *E. coli* O157:H7, 8.6 log CFU/mL *L. monocytogenes*, and 8.8 log CFU/mL *P. carotovorum*. The increase in the population of both the pathogenic microbe and foodborne pathogen reached over 4 log CFU/mL, implying the microbe can utilize the lettuce extract as a source of nutrition. Compared to the initial inoculation concentration in 0.1% lettuce extract, the final concentration has increased up to 2.7 log CFU/mL *E. coli* O157:H7, 1.3 log CFU/mL *L. monocytogenes*, and 2.9 log CFU/mL *P. carotovorum*. Accordingly, the study confirms that the minimal growth concentration of the pathogenic microbe is lower than 0.1% and that the pathogen possibly survive and multiply inside the lettuce leaves given the lettuce extract with concentration of 0.1% is consistently supplied through the damaged tissues.

Key words: Foodborne pathogen, Survival, Growth, Lettuce

국민소득 향상과 건강에 대한 관심이 커지면서 채소 과일 등 신선농산물의 수요가 증가하였다. 최근 비대면 소비 문화가 정착하여 온라인 시장환경에서도 빠른 속도로 규모가 확대되고 있어 미생물학적인 안전관리는 더욱 중요한 관심의 대상이 되었다¹⁾.

농산물은 농장부터 식탁까지 전달되는 과정에서 다양한 유해요인과 접촉하는 기회가 많기 때문에 병원성미생물 오염도 쉽게 발생할 수 있다. 농산물이 병원균에 오염된 이후에는 그 밀도를 줄이거나 제거하는데 적용 가능한 수단이 매우 제한적이므로 병원균을 효과적으로 관리하는 방법은 생산 유통 및 소비과정 중 오염원과 접촉 기회를 차단하는 것이다²⁾. 그런데 신선농산물 표면에는 다양한 미생물 집단이 분포한다고 알려져 있으며, 토양과 접촉하는 식물조직은 빗물 또는 관계수에 의하여 지속적으로 수많은 토양오염원과 접촉하게 된다. 다양한 경로를 통해서 오염된 농산물 표면의 미생물은 토성, 유기물 함량, 영양원

*Correspondence to: Kyoung Yul Ryu, Microbial Safety Division, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Korea
Tel: +82-63-238-3403, Fax: +82-63-238-3405
E-mail: kyryu@korea.kr, rky62@hanmail.net

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이용 가능성, 수소이온농도, 온도 등을 포함한 환경요인에 영향을 받기 때문에 병원성 미생물의 생존과 특정한 조직에서 내재화에 관련한 연구가 다양하게 보고되고 있다³⁻⁷.

농산물 잎 표면은 얇은 막 형태의 미세표면 수분과 육안으로 보이지 않는 미세수분 방울이 있는데, 이는 대기 속 물질이 주위의 수증기를 흡수하여 수용액을 만드는 조해과정을 통하여 낮에도 잎 표면에서 미세수분을 유지하게 된다⁸. Grinberg 등⁸)에 따르면 건조 환경에 대비하고 세균 집합체 주변에 안정적인 미세 수분방울을 형성한다는 사실을 밝히고 미세수분 방울의 크기는 세균덩어리 크기에 따라 증가하고 더불어 세균들의 생존율은 미세물방울 크기가 클수록 높아졌다고 보고하였다. 또한 토양과 상추 잎에 오염된 퇴비와 관계수를 처리하고 *Escherichia coli* O157:H7 병원성 미생물의 생존력을 연구한 결과 토양에서 9주 동안 생존했으나, 상추 잎에서는 관계수 공급 시 초기밀도가 일시적으로 높다가 검출 한계 이하로 감소하였다. 그리고 상추 잎 표면에서 호기성 세균은 9주 동안 생존했으나 이는 품종에 따라서 다르며, 재배기간 동안 환경조건에 크게 영향을 받는다고 하였다. 다른 연구에서도 유해미생물이 오염된 토양과 관계수로부터 상추의 가식부위로 전이됨을 확인하였는데 이런 전이가 뿌리를 통하여 이동하거나 또는 곤충과 같은 매개체에 의하여 전파되어 내재화 되는지는 확인할 수 없다고 보고하였다⁹.

E. coli O157:H7 병원균 정착을 위한 잎의 상처가 식품안전과 생물학적 특성의 관련성 연구에서 식물세포 안쪽으로 세균 침입은 확인하지 못했으나 잎의 세포간극과 엽육세포에 부착한 형태로만 관찰하였다¹⁰. Wright 등⁷)은 상추와 시금치 가식부위의 세포간극에서 *E. coli* O157:H7의 증식과 내재화에 차이를 담배 모델식물과 비교한 연구에서 접종한 병원균이 잎과 뿌리에서 확인하였는데, 식물 중, 조직 및 접종량 등이 모두 병원균의 내재화에 영향을 주었다고 보고하였다. 특히 신선농산물에서 병원균 생육이 억제되었으나 20일 이상까지도 생존한다고 하였으며 *Nicotiana benthamiana* 모델식물에서 400배정도 증가했다고 하였다. 그러나 상추와 시금치 잎의 세포간극에서 병원세균의 증식이 저하되는 것은 공중보건을 위해서 재확인하여야 하고 동시에 *Nicotiana benthamiana* 모델식물의 세포간극에서 병원세균 증식에 관여하는 요인을 밝히는 것은 매우 중요하다고 하였다.

농산물에 적용하는 생산성 향상기술은 식물병원균을 대상으로 많이 발전되었으며 안정적인 식량공급의 기반을 구축하였으나 병원성미생물에 대한 안전관리 연구는 대부분 단편적으로 수행되어 왔다. 그러나 병원성 미생물이 신선농산물에 오염된다면 이들이 비기주인 농산물에서 어떻게 생존하는지와 증식에 영향을 주는 요인들을 밝혀내는 것은 매우 중요하다. 병원성 미생물은 식물 품종의 형태적, 생물적, 화학적 특성과 유도저항성 등과 연계하여 생

존과 증식이 일어나고 동시에 다양한 환경요인들이 관여하기 때문에 미생물의 개체수를 예측하는 것은 매우 어렵다. 본 연구는 농산물에서 병원성 미생물이 생존과 증식에 필요한 여러 요인 가운데 로메인 상추 잎 추출액을 이용하여 식중독세균 2종과 식물병원세균의 최소성장농도를 비교하였고, 이를 안전관리를 위한 자료로 이용하고자 실시하였다.

Materials and Methods

사용 균주

본 연구에 사용한 3개 균주는 ampicillin 내성 *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19113) 그리고 감자에서 분리한 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*이었다. 실험에 사용하기 위하여 세 균주는 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 접종하고, *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*는 37°C, *P. carotovorum*은 28°C에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. 그 후 상추에서 증식 여부를 확인하기 위하여 병원균 접종액은 흡광도 1.0으로 조절한 후 멸균증류수로 단계 희석을 통하여 3-4 log colony forming unit (CFU)/mL 농도로 조절하여 사용하였다.

E. coli O157:H7 회수율

로메인 상추 잎에 ampicillin 내성 *E. coli* O157:H7 균주를 접종한 후 시간에 따른 균의 밀도변화를 회수율로 조사하였다. 로메인 상추는 온실에서 정식한지 30일 경과한 묘를 사용하여 상위에서 2-3에 위치한 잎을 실험에 사용하였다. 로메인 상추 잎에 *E. coli* O157:H7 초기농도가 3-4 log CFU/mL가 되도록 조절하여 소형스프레이 분무기로 접종액이 상추잎 표면을 따라 흐르게 5-6회 분무처리하였다. 접종한 로메인 상추 잎은 각각 5장씩 나누어 20°C에서 배양하며 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72시간마다 *E. coli* O157:H7 균수를 측정하였다. 로메인 상추 잎에 접종한 *E. coli* O157:H7 균수조사는 각각 시료의 배양시간에 따라 회수하여 시료균질기(Stomacher Bag Mixer 400, Interscience, Saint Nom France)로 1분간 처리하고, 멸균증류수로 단계 희석하여 100 µg/g ampicillin 첨가 tryptic soy agar(TSA, Difco Laboratories)에 100 µL씩 도말하였다. 그리고 배지는 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 집락(CFU)을 계수하여 회수율을 조사하였다.

로메인 상추 잎의 상처 유무에 따른 *E. coli* O157:H7 생존율

로메인 상추 잎에 상처 유무에 따른 *E. coli* O157:H7 생존율을 조사하기 위하여 멸균된 바늘(길이 50 mm)을 이용하여 로메인 상추 잎의 뒷면에 상처를 인위적으로 만들었고, 대조군은 아무 처리를 하지 않았다. 접종원은 *E. coli* O157:H7 초기농도가 3-4 log CFU/mL가 되도록 조절하여

spray법으로 접종하고, 인위적인 상처가 있는 상추 잎과 대조군에서 시간 경과에 따른 접종한 균의 균수 변화를 비교하였다. 이때, 상처가 있는 상추와 대조군 시료는 각각 시간별로 5장씩 나누어 20°C에서 배양하여 0, 3, 6, 24, 48, 72시간마다 처리시료를 회수하여 Stomacher Bag Mixer 400 (Interscience)으로 1분간 처리하고, 멸균증류수로 단계 회석하여 *E. coli* O157:H7 균수를 측정하였다. *E. coli* O157:H7의 밀도는 100 ppm ampicillin 첨가 TSA 배지에 100 mL씩 도말 한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하여 집락을 계수하였다.

로메인 상추 잎의 *E. coli* O157:H7 분포조사

상추 잎 표면의 상처 유무에 따라 *E. coli* O157:H7 분포를 조사하기 위하여 주사형 전자현미경을 이용하였다. 상추 잎 표면에 인위적인 상처 처리방법은 생존율 조사방법과 동일하게 처리하였다. 접촉상처는 로메인 상추 두 장을 1분 동안 마찰시키며 물로 씻어 물리적 접촉에 의한 상처를 유도하였다. 그리고 무처리와 상처 처리한 상추 잎에 4 log CFU/mL 농도의 *E. coli* O157:H7를 접종하여 30분 동안 방치한 후 처리군별로 균수를 비교하였다. 주사형 전자현미경 관찰용 시료(크기 1 cm×1 cm)는 전 고정(Karnovsky's fixative)과 후 고정(1% OsO₄) 처리 이후에 탄올을 이용하여 탈수하고, amyl acetate로 치환하여 critical point dryer (Hitachi HCP-2, Tokyo, Japan)로 건조하고 전자현미경(Gemini SEM 300, Carl zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

병원성 미생물의 상추 추출물 이용 및 최소 생육농도 조사

상추 추출물은 온실에서 정식한지 40일 경과한 로메인 상추를 수확하여 착즙기(Hurom HU-400, Seoul, Korea)로 분쇄한 후 microfilter (pore size 0.22 μm)로 여과하여 실험에 사용하였다. 상추 추출물 이용여부를 확인하기 위하여 최소배지(Minimal 9 medium, Difco)로 농도가 무처리, 10, 20, 30, 50, 100%가 되도록 희석하였다. 상추 추출물을 이용하여 접종원 농도가 3-4 log CFU/mL가 되도록 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *P. carotovorum*을 500 μL씩 접종하고, 28°C에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. 그리고 배양 전·후 균의 밀도는 TSA 배지에 100 μL씩 도말하여 상추 추출물 이용여부를 확인하였다. 또한 병원성 미생물의 상추추출물 이용 최소생육농도는 동일한 방법으로 0-1%, 1-10%의 농도로 처리하여 생육여부 실험을 진행하였다.

Results and Discussion

E. coli O157:H7의 회수율

로메인 상추 표면에 접종된 *E. coli* O157:H7의 배양시

간에 따른 회수율 실험결과는 Fig. 1과 같았다. *E. coli* O157:H7의 초기 균수는 3.5 log CFU/g이었으며 배양 8시간 동안 생존율에 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 그러나 접종 후 24시간이 경과하였을 때 1.4 log CFU/g 증가하였고, 72시간에는 2.0 log CFU/g 증가량을 보였다.

이는 상추 및 들깻잎 등의 엽채류에서 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*를 접종하여 20°C, 24시간 배양한 후 1-1.5 log CFU/g의 증가율을 보였다는 Kim 등¹¹⁾과 Koseki 등¹²⁾의 연구와 유사하게 나타나 로메인 상추 잎에서 *E. coli* O157:H7의 생존 및 증식이 가능한 것으로 보였다. 시금치를 이용한 시험에서 *E. coli* O157:H7의 접종농도가 4 log CFU/g이고, 분석시료 25 g을 24시간 이내에 분석하는 경우 회수율은 92% 수준이라고 했는데 이는 비슷한 수준으로 병원균을 접종한 본 연구의 결과와 유사하였다⁷⁾. 그러나 병원균의 회수율은 시간경과에 따라서 회수율이 현저하게 낮아졌다는 하였는데 이는 농산물에서 병원균의 생존과 지속에 영향을 주는 영양원을 포함하여 농산물의 형태적 특성 등의 다양한 요인이 관여하였을 것으로 생각되며 향후 구체적인 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

한편, Park 등¹⁴⁾은 생산지에서 수집한 신선 유기농산물의 미생물 분포도 분석연구에서 유기농산물과 관행농산물에서의 세균 오염 정도에의 차이가 거의 없고, 병원성 미생물의 오염수준도 비교적 안전한 것으로 판단하였다. 이는 농산물이 병원성 미생물의 생존과 증식을 위하여 적절한 영양원 혹은 은신처를 제공하지 않기 때문이라고 생각된다. 병원성 미생물이 검출되었다면 생산에서 소비에 이르는 과정에 어떠한 요인들이 관여하여 생존과 증식이 가능한지 구체적인 증거가 제시되어야 할 것이다. 콩잎마름병을 유발하는 식물병원성 *Pseudomonas syringae*와 비병원성 *Pseudomonas syringae*, *Pentoea agglomerans* 등을 포함하는 3종의 생존과 성장을 콩의 엽편에서 비교하였다. 그 결과 식물병원성균은 비병원성 균에 비하여 환경 스트레스 조건에서도 생존율이 높고, 엽편을 차지하는 병원균 집단의 면적이 크게 증가하였으나, 비병원성과 비기주인 경우

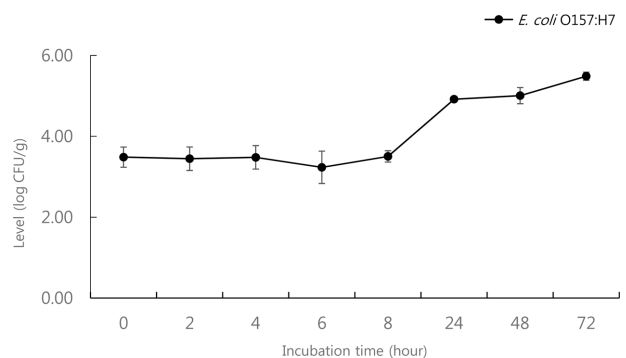


Fig. 1. Changes of *E. coli* O157:H7 population inoculated in romaine lettuce.

접종원은 집단의 면적을 증가시키지 못하고 결국은 줄어들었다고 보고되었다¹⁵⁾. 이는 식물병원균이라도 비기주 혹은 병원성이 없는 경우에는 식물체와 상호관계를 통하여 영양원이나 적절한 은신처를 확보해야 생존과 증식이 가능하므로 농산물에서 검출된 병원성 미생물도 최소한 생존조건이 밝혀져야 한다.

상처 유무에 따른 E. coli O157:H7의 생존율

로메인 상추 표면의 상처 유무에 따른 E. coli O157:H7의 생존율을 비교한 결과는 Fig. 2와 같았다. 상처가 있는 상추에서 초기 균수는 4.1 log CFU/g이고 대조군에서 3.9 log CFU/g으로 차이가 없었다. E. coli O157:H7를 접종한 후 24시간이 경과하였을 때에도 상처가 있는 상추에서 4.9

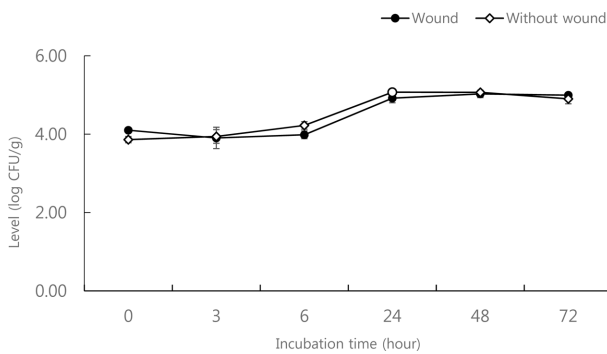


Fig. 2. The survival rate of *E. coli* O157:H7 between with and without wound in romaine lettuce.

log CFU/g이고 상처가 없는 상추에서 5.1 log CFU/g으로 증가하였으나 통계적으로 유의미한 차이가 없었다. 병원균 접종 72시간 이후에 상처가 있는 상추와 대조군에서 초기 균수와 비교하여 각각 0.9 log CFU/g과 1.0 log CFU/g 수준으로 증가하였다. 그러나 상처가 있는 상추와 대조군 상추에서 24, 48, 72시간 동안 배양 후 균수 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는 *E. coli* O157:H7이 상처를 통해 상추 성분을 영양원으로 이용함으로써 대조군에 비하여 상처가 있는 상추에서 더 큰 증가량을 보일 것이라는 기대와 달리 유의적 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 상추 표면에 인위적으로 처리한 상처의 수와 크기가 작아 접종한 *E. coli* O157:H7 균수가 이 상처에 침입하여 충분한 증식을 하지 못하였기 때문으로 생각되었다. 그러나 대조군 상추와 상처가 있는 상추에서 통계적으로 유의한 차이는 아니지만 비슷한 균수를 유지한 것은 *E. coli* O157:H7을 접종할 때 남아있던 배지 성분에 의하여 72시간 동안 비슷한 균 수가 유지된 것으로 사료되었다.

로메인 상추의 상처에 따른 E. coli O157:H7의 분포

로메인 상추 표면에 접종한 *E. coli* O157:H7의 분포는 Fig. 3과 같다. 로메인 상추 표면에 상처가 없고 *E. coli* O157:H7을 접종하지 않았을 때에는 기공과 주변에서 미생물 형태의 병원균이 없었으며 깨끗한 표면이 확인되었고(Fig. 3A), 상처가 없지만 *E. coli* O157:H7을 접종한 경우는 상추잎 표면의 기공주변과 움푹 들어간 요철부에서 낮은 밀도로 병원균이 분포하였다(Fig. 3B). 로메인 상

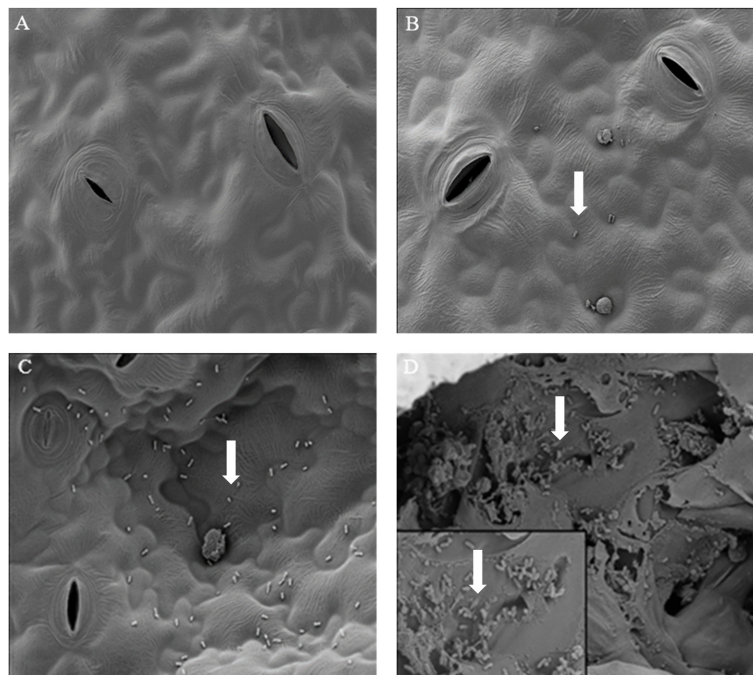


Fig. 3. Localization of *E. coli* O157:H7 in romaine lettuce (arrows indicate the inoculated bacteria). Control (A) without wound inoculated by *E. coli* O157:H7 (B), after rubbed with lettuce leaves (C) with wound (D). A-D (×1,000), D (×3,000).

추의 잎을 서로 비비며 세척하고 *E. coli* O157:H7을 접종한 경우에도 상추 표면에 낮은 밀도이지만 병원균을 확인할 수 있었다(Fig. 3C). 로메인 상추 잎은 표면이 매끄럽고 주름이 거의 없어서 세척하는 과정에 물리적인 상처가 발생하지 않았지만 국내산 적상추는 주름이 많고 울퉁불퉁한 요철이 심한 형태적 특성이 있어 세척하는 과정에 흔하게 잎이 찢어지거나 상처가 발생 할 수 있으며 *E. coli* O157:H7 등이 부착하여 생존하기에 유리할 것으로 사료되었다⁷⁾.

그러나 상추잎 표면에 바늘로 인위적인 상처를 만들고 *E. coli* O157:H7을 접종한 경우 상처를 중심으로 다수의 균이 밀집되어 나타났고, 상처 내부의 깊은 곳으로 이동하는 양상을 나타냈다(Fig. 3D). 잎 표면에 상처가 발생하는 경우 *E. coli* O157:H7 등 미생물은 상처부위로 유입되어 은신처를 확보하게 될 것으로 판단되었다. 특히 상추 등 엽채류 엽육조직의 상처부위는 광합성을 통한 다양한 탄수화물 등 영양원이 존재하여 유입한 병원균과 접촉할 기회를 제공하고 외부환경의 변화에 대한 물리적 방어에 관여 할 것으로 사료되었다. 비록, 상추 잎 표면의 상처 부위에서 *E. coli* O157:H7 같은 미생물이 어떤 경로를 통하여 농산물 내부에 능동적으로 유입되는지는 확인하지 못했지만 기계적인 상처를 통하여 발생한 공간을 통하여 유입되는 것을 전자현미경을 이용하여 확인하였다. 이번 연구결과는 로메인 상추와 같이 상처가 없는 경우에는 *E. coli* O157:H7 같은 균이 자유롭게 부착하지 못하는 것으로 나타났고, 상처 부위의 거친 표면에는 균이 밀집되어 상처를 통해 상추 내부로 침입하는 것으로 판단되었다. 다만 상추 엽육조직의 상처로 유입한 *E. coli* O157:H7균이 어떻게 지속적으로 생존할 수 있는지에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료되었다.

이전에 수행된 연구에서 시금치와 상추의 가식 부위 세포간극에서 *E. coli* O157:H7균의 성장과 내재화의 차이를 *Nicotiana benthamiana*와 비교실험을 통하여 설명하였다⁷⁾. 병원성 미생물은 시금치와 상추 잎에서 성장이 억제되었고 식물체 조직에 최소량이라도 내재화된다면 공중보전에 위

협을 일으킬 것이라고 하였다. 그러나 *Nicotiana benthamiana* 같은 모델식물에서 2.5 log CFU/g 수준으로 증식하였고, 잎의 세포간극에서 증식하고 안쪽으로 침투하며 최소 감염량 이상으로 증식하여 충분한 전염원을 제공한다고 하였다. 반면 상추의 조직에서 *E. coli* O157:H7의 내재화를 확인하지 못했지만^{10,11)}, *E. coli* O157:H7와 *Salmonella*가 상추의 내부조직에 정착되어 있다고^{3,5)} 보고하였다. 이와 같이 식물조직에 영향을 주지 않고 병원성세균이 뿌리를 통하여 상추 잎에서 내재화 할 수 있는지는 생존력과 관련하여 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Xu 등²⁾은 상추에 오염된 관계수를 분무처리로 접종한 토양에서 *E. coli* O157:H7균이 오랫동안 생존했으나 엽권에서는 빠르게 감소하였고, 피복 형태에 따라서 영향을 적게 받는다고 보고하였다. 또한 농작물 재배환경은 온도, 강수량 같은 요인이 토양수분 유지에 연계되어 대장균과 같은 장내세균 집단의 밀도에 영향을 준다고 밝혔으며, 멀칭 처리는 장내세균의 생존력을 향상시켜 주었지만 구체적인 요인을 분석하여 제시하지 않았다. 그리고 유용미생물 토양처리가 토양미생물 군집에 영향을 미친다고 하였으나 이는 특정세균의 증식과 감소에 영향을 주었는지 확인 할 수 없다고 하였다⁶⁾. 이런 군집변화는 토양 내에서 양분경쟁 또는 대사물질의 활성도에 따라 특정 미생물의 종 분포가 증가 또는 감소하고 있음을 추정할 수 있었다.

병원성미생물의 상추 추출물 이용 여부

병원성 미생물인 *E. coli* O157:H7와 *L. monocytogenes*가 로메인 상추 추출물을 직접 영양원으로 증식할 수 있는지를 확인한 결과는 Table 1과 같았다. 상추 추출물을 무처리, 10-100% 농도로 조절하여 병원성 미생물 접종하고 24 시간 배양 하여 균수를 비교하였고, 식물병원균인 *P. carotovorum*을 대조군으로 하였다. *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *P. carotovorum* 3종 세균은 모두 상추 추출물이 없는 무처리에서 밀도의 변화를 나타내지 않았고, 동시에 최소배지(Minimal 9 medium)에서는 균의 증식이

Table 1. Growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Pectobacterium carotovorum* in the different concentrations of romaine lettuce extract

Extract (%)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
	Before (0)	After (24 h)	Before (0)	After (24 h)	Before (0)	After (24 h)
Control	4.20±0.03	4.20±0.02 ^c	4.32±0.06	4.19±0.07 ^e	4.11±0.04	4.06±0.04 ^c
10	4.20±0.03	8.90±0.09 ^a	4.38±0.04	8.64±0.17 ^d	4.23±0.05	8.84±0.01 ^{ab}
20	4.24±0.03	9.07±0.03 ^a	4.35±0.03	8.89±0.09 ^c	4.25±0.01	8.92±0.06 ^a
30	4.30±0.03	8.94±0.09 ^a	4.38±0.02	9.10±0.00 ^b	4.08±0.12	8.70±0.06 ^b
50	4.24±0.01	8.92±0.05 ^a	4.41±0.05	9.43±0.04 ^a	4.22±0.04	8.90±0.04 ^a
100	4.26±0.04	8.62±0.22 ^b	4.38±0.04	9.33±0.04 ^a	3.98±0.24	8.98±0.22 ^a

* Different letters above table indicate significant differences among extract concentrations.

Table 2. Minimum growth concentration of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Pectobacterium carotovorum* in romaine lettuce extract

Extract (%)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
	Before (0)	After (24 h)	Before (0)	After (24 h)	Before (0)	After (24 h)
0	3.88±0.11	4.52±0.03 ^{g*}	3.69±0.07	3.33±0.05 ⁱ	4.13±0.10	4.38±0.07 ^d
0.1	4.21±0.11	6.95±0.05 ^f	3.56±0.10	4.85±0.04 ^h	4.28±0.04	7.19±0.03 ^c
0.2	3.94±0.26	7.35±0.18 ^e	3.53±0.12	5.54±0.17 ^g	4.35±0.01	7.49±0.03 ^b
0.3	4.18±0.32	7.65±0.11 ^d	3.57±0.17	6.09±0.02 ^f	4.28±0.04	7.69±0.11 ^a
0.4	4.15±0.09	7.76±0.06 ^{cd}	3.56±0.06	6.41±0.08 ^e	4.03±0.47	7.71±0.04 ^a
0.5	4.15±0.05	7.86±0.07 ^{bc}	3.49±0.01	6.66±0.06 ^d	4.36±0.05	7.72±0.17 ^a
0.6	3.66±0.31	7.78±0.12 ^{cd}	3.49±0.08	6.66±0.05 ^d	4.34±0.02	7.75±0.02 ^a
0.7	4.17±0.24	7.91±0.09 ^{abc}	3.49±0.04	6.81±0.05 ^c	4.38±0.02	7.78±0.07 ^a
0.8	3.68±0.73	7.95±0.07 ^{ab}	3.48±0.15	6.93±0.04 ^b	4.33±0.05	7.80±0.11 ^a
0.9	3.66±0.37	8.07±0.05 ^a	3.60±0.11	6.97±0.02 ^b	4.37±0.03	7.78±0.10 ^a
1.0	3.91±0.08	8.05±0.03 ^a	3.62±0.10	7.21±0.03 ^a	4.19±0.05	7.84±0.06 ^a

* Different letters above table indicate significant differences among extract concentrations

일어나지 않음을 확인하였다.

그러나 상추 추출물 최소농도(10%)에서 24시간 동안 배양했을 때 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *P. carotovorum*은 각각 비슷한 수준으로 증식하였다. 또한 상추 추출물이 10, 20, 30, 50, 100% 농도에서 병원성미생물이 식물병원균과 유사한 4 log CFU/g 이상의 증가율을 나타내어 상추 추출물을 영양원으로 사용할 수 있는 것으로 판단되었다. 이는 상추추출물이 10% 이상인 경우에는 농도에 상관없이 식중독세균과 식물병원세균이 비슷한 수준으로 증식하여 상추에서 병원성 미생물의 생존 및 생육을 위한 최소농도 확인이 필요하였다.

병원성미생물의 상추 추출물 최소생육농도

병원성미생물인 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*와 식물병원균인 *P. carotovorum*의 로메인 상추 추출물에서 최소생육농도를 확인한 결과는 Table 2에 나타내었다. 상추 추출액 이용 여부에 대한 실험에서 병원성 미생물이 24시간에 이내에 크게 증식하여 0.1% 수준으로 희석한 추출액에서 균수변화를 조사하였다. 우선 상추 추출액 농도를 1~10% 수준으로 조절하였을 때 앞선 실험에서와 같이 상추 추출액 1%와 10% 처리농도에서 3종세균의 밀도변화는 *E. coli* O157:H7 0.6 log CFU/mL, *L. monocytogenes* 1.1 log CFU/mL, *P. carotovorum* 0.6 log CFU/mL 수준으로 균수가 차이가 없었다. 그러나 상추 추출액 처리 최소농도인 0.1%에서 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *P. carotovorum* 균수 변화가 있었다.

이는 병원성 미생물 초기밀도와 비교할 때 *E. coli* O157:H7 2.7 log CFU/mL, *L. monocytogenes* 1.3 log CFU/mL, *P. carotovorum* 2.9 log CFU/mL 수준의 증가율을 보였다. 특히

병원성 미생물인 *E. coli* O157:H7과 식물병원균인 *P. carotovorum*은 약 3.0 log CFU/mL의 유사한 증가를 나타냈고, *L. monocytogenes*는 1.3 log CFU/mL 수준으로 비교적 낮은 증가를 보였으나 1.0 log CFU/mL 이상 증가하였기 때문에 세 균주 모두 최소생육농도는 0.1%보다 낮은 것으로 판단되었다. 이 결과 상처를 통해 0.1% 이상의 상추 추출물이 병원성미생물에 공급되면 상추 내부에서 생존 및 증식이 가능하였다. 이번 실험결과는 상추에서 병원성 미생물의 생존과 생육을 위해서 영양원 공급이 필요하고, 병원성 미생물이 상처를 통하여 유출되는 물질을 영양원으로 이용할 수 있음을 확인하였다. 그러므로 상추의 재배, 수확 및 유통 중에 병원성미생물이 이용하는 영양원을 차단한다면 농산물에서 생존과 생육을 억제할 수 있기 때문에 안전성이 향상 될 것으로 사료되었다.

Acknowledgments

본 연구는 2021년도 농촌진흥청 국가연구개발사업 (PJ01516801)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 로메인 상추에서 병원성미생물이 생존과 생육의 특성을 분석하여 안전관리 정보를 확보하고자 실시하였다. 로메인 상추에서 분무 접촉한 *E. coli* O157:H7은 72시간 배양 후 초기균수 보다 2.0 log CFU/g 수준으로 증가하여 생존 및 증식이 가능한 것으로 판단되었다. 상추 잎의 상처 유무에 따른 *E. coli* O157:H7은 배양 72시간 후 유의적 차이가 없었다. 상추 잎에 인위적인 상처에

내어 *E. coli* O157:H7을 집중하고 병원균의 분포를 조사한 결과 상처가 없는 상추는 표면이 매끄러워 균이 부착하지 못하거나 균수가 매우 낮았고, 상처가 있는 상추 잎은 거친 표면에 균이 밀집되어 상처를 통해 상추 내부로 침입하는 것으로 판단되었다. 병원성미생물의 상추 추출물 이용 여부는 10-100% 농도에서 배양 24시간 이후에 *E. coli* O157:H7 8.9 log CFU/mL, *L. monocytogenes* 8.6 log CFU/mL, *P. carotovorum* 8.8 log CFU/mL로 나타났다. 이는 병원성미생물과 식물병원균이 유사한 4 log CFU/g 이상의 증가율을 나타내어 미생물이 상추 추출물을 영양원으로 사용할 수 있는 것으로 판단되었다. 상추 추출물 0.1%에서 초기 접종 농도와 비교하여 *E. coli* O157:H7 2.7, *L. monocytogenes* 1.3, *P. carotovorum* 2.9 log CFU/mL 수준으로 증가하였다. 이에 따라 병원성 미생물의 최소생육농도는 0.1%보다 낮은 것으로 판단되었고, 상처를 통해 지속적으로 0.1% 수준의 상추 추출물이 병원성미생물에 제공되면 상추 내부에서도 생존 및 증식이 가능할 것으로 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Na-Ye Seul Kim <https://orcid.org/0000-0002-4692-428X>
 Chae Rin Kim <https://orcid.org/0000-0001-7072-378X>
 Da-Woon Kim <https://orcid.org/0000-0002-4240-0964>
 Myung-In Jeong <https://orcid.org/0000-0001-8261-7300>
 Kwang Kyo Oh <https://orcid.org/0000-0001-5300-2091>
 Bo-Eun Kim <https://orcid.org/0000-0003-3386-5732>
 Jae Gee Ryu <https://orcid.org/0000-0001-7048-6796>
 Jieun Jung <https://orcid.org/0000-0003-2380-9198>
 Ik Sung Jeon <https://orcid.org/0000-0003-2794-0142>
 Kyoung-Yul Ryu <https://orcid.org/0000-0003-2136-0147>

References

- Kim, S.H., Lee, K.I., Heo, S.Y., Lee, W.J., 2019. Research on fresh-cut fruits and vegetables. Korea Rural Economic Institute. Naju, Korea, pp. 253.
- Xu, A., Buchanan, R.L., Evaluation of sampling methods for the detection of pathogenic bacteria on pre-harvest leafy greens. *Food Microbiol.*, **77**, 137-145 (2019).
- Franz, E., Visser, A.A., van Diepeningen, A.D., Klerks, M.M., Termorshuizen, A.J., van Bruggen A.H.C., Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiol.*, **24**, 106-112 (2007).
- Hora, R., Warriner, K., Shelp, B.J., Griffiths, M.W., Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 following biological and mechanical disruption of growing spinach plants. *J. Food Prot.*, **68**, 2506-2509 (2005).
- Klerks, M.M., Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C., van Bruggen A.H.C., Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *ISME J.*, **1**, 620-631 (2007).
- Sharma, M., Ingram, D.T., Patel, J.R., Millner, P.D., Wang, X., Hull, A.E., Donnenberg, M.S., A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *J. Food Prot.*, **72**, 1513-1520 (2009).
- Wright, K.M., Crozier, L., Marshall, J., Merget, B., Holmes, A., Holden N.J., Difference in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microb. Biotechnol.*, **10**, 555-569 (2017).
- Grinberg, M., Orevi, T., Steinberg, S., Kashtan, N., Bacterial survival in microscopic surface wetness. *eLife*, **8**, e48508 (2019).
- Oliveira, M., Vinas, I., Usall, J., Anguera, M., Abadias, M., 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 (2012).
- Mulaosmanovic, E., Windstam, S.T., Vagsholm, I., Alsanius, B.W., Size matters: Biological and food safety relevance of leaf damage for colonization of *Escherichia coli* O157:H7 gfp+. *Front. Microbiol.*, **11**, 608086 (2021).
- Kim, W.I., Jung, H.M., Kim, S.R., Park, K.H., Kim, B.S., Yun, J.C., Ryu, K.Y., Investigation of microbial contamination levels of leafy greens and its distributing conditions at different time - Focused on perilla leaf and lettuce. *J. Food Hyg. Saf.*, **27**, 277-284 (2012).
- Koseki, S., Isobe, S., Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. *Int. J. Food Microbiol.*, **101**, 217-225 (2005).
- Rodriguez, E.G., Gundersen, A., Sbidio, A., Koike, S., Evaluation of post contamination survival and persistence of applied attenuated *Escherichia coli* O157:H7 and naturally-contaminating *Escherichia coli* O157:H7 on spinach under field conditions and following postharvest handling. *Food Microbiol.*, **77**, 173-184 (2019).
- Park, W.J., Ryu, H.Y., Lim, G.Y., Lee, Y.D., Park, J.H., Microbial prevalence and quality of organic farm produce from various production sites. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **46**, 262-267 (2014).
- Wilson, M., Hirano, S.S., Lindow, S.E., Location and survival of leaf-associated bacteria in relation of pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1435-1443 (1999).
- Kim, Y.S., Kim, S.Y., An, J.H., Sang, M.K., Weon, H.Y., Song J.K., Changes in resident soil bacterial communities in response to inoculation of soil with beneficial *Bacillus* spp.. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **46**, 253-260 (2018).