KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 37, No. 2, pp. 321~327 (2005)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

연구노트

서부 경남지역 딸기 농장에서의 *Staphylococcus aureus*의 분리와 Staphylococcal enterotoxin a, b, c gene 검색

김세리 · 심원보 · 김지훈 · 황승재 · 박선자[1] · 하상도[2] · 김근성[2]
이규호[3] · 김민곤[4] · 김광엽[5] · 김철호[6] · 정덕화*

경상대학교 응용생명과학부, [1]경상대학교 의과대학, [2]중앙대학교 식품공학과, [3]한국외국어대학교 환경학과,
[4]한국생명공학연구원, [5]충북대학교 식품공학과, [6]동국대학교 한의과대학

Screening of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin a, b, c gene in Strains Isolated from Strawberry Farms in Western Gyeongnam

Se-Ri Kim, Won-Bo Shim, Ji-Hun Kim, Seung-Jae Hwang, Seon-Ja Park[1], Sang-Do Ha[2], Keun-Sung Kim[2], Kyu-Ho Lee[3], Min-Gon Kim[4], Kwang-Yup Kim[5], Cheol-Ho Lim[6], and Duck-Hwa Chung*

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University
[1]Department of Anatomy, College of Medicine, Gyeongsang National University
[2]Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University
[3]Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Hankuk Univ. of Foreign Studies
[4]Laboratory of Integrative Biotechnology, Korea research Institute of Bioscience and Biotechnology
[5]Department of Food Science and Technology, Chungbuk University
[6]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

***Staphylococcus aureus* is spread worldwide and can result in food poisoning outbreaks. Among samples collected from soil, water, protected houses, packing houses, employees, strawberries, and leaves, and analyzed for *S. aureus* contamination, 16% samples 'showed *S. aureus* contamination, particularly on employees' hands, scissors, and strawberries. Examination of enterotoxins A, B, and C genes of *S. aureus* by PCR revealed sea and seb in 92 and 38% of total strains, respectively, whereas sec was not detected. In conclusion, implementation of Good Agricultural Practice is necessary for preventing food-borne diseases of staphylococcal origin, thereby ensuring the safety of farm-to-table products.**

Key words: *Staphylococcus aureus*, strawberry farms, enterotoxin, Good Agricultural Practice (GAP)

서 론

식품소비에 있어 질적, 양적인 변화와 함께 확대된 외식과 음식문화의 국제 교류가 증가함에 따라 식품의 오염과 변질의 기회가 급증하고 이에 따라 식품 위해의 종류와 원인들이 점차 다양해지고 있는 실정이다. 과거의 식중독 사례를 보면 고기류와 생선 등 단백질이 풍부한 식품에 의한 식중독이 대부분을 차지하고 있었으나 최근에는 이들 식품과 더불어 과일과 야채 등에서 비롯된 식중독 사례가 증가하고 있다는 점은 주목할 만하다(1). 미국의 경우 cantaloupe, tomato, parsley, alfalfa sprout, scallions, radish sprout, 사과주스, 오렌지 주스등에서 식중독균이 검출된바 있으며 실제 이들 식품이 원인이 되어 식중독이 발생한 사례가 있다(2-3). 그 대표적인 사례로 2000년 7월 미국에서 1명의 사상자와 60여명의 환자를 발생시킨 시즐러 레스토랑의 식중독 사고는 과채류 안전관리의 중요성을 일깨워 주는 중요한 사건이다(1).

과채류에서 빈번하게 검출되는 식중독균으로는 *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*등을 들 수가 있다(4-5). 그 중 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)는 Renia(6) 등의 연구에서 나타난바와 같이 *Salmonella* spp.와 더불어 야채류에 부착력이 강하여 세척으로 제거되기 어려울 뿐만 아니라 환경에 대한 저항성이 강하다. 또한 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어 식품에 쉽게 오염

*Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Division of Applied Life Science Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-751-5480
Fax: 82-55-757-5485
E-mail: dhchung@gsnu.ac.kr

되기 때문에 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있는 세균이다(7-8). *S. aureus*에 의한 식중독은 균이 식품에서 증식하면서 생성된 독소를 섭취함으로서 발생하는 독소형 식중독이다. 자연계에는 여러 종류의 포도상구균이 있으나 내독소(enterotoxin)을 생산하는 균종은 *S. aureus*에 한정된다(9). Enterotoxin은 분자량이 약 26,000-35,000 Da인 단일 폴리 펩티드이며, 면역학적으로 서로 다른 9가지, 즉 enterotoxin A, B, E, D, E, F, G, H, I, J형이 있지만(10) 독소형과는 관계 없이 식중독을 일으키며, 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있다(11-12). 더욱이 내독소는 trypsin, chymotrypsin, renin 및 papain과 같은 단백질 분해 효소에 의해 분해되지 않으며, 내열성이 강하여 독소형에 따라서는 100°C에서 30분간 가열해도 완전 파괴되지 않는다(13,14). 식중독을 일으킬 수 있는 enterotoxin의 양은 1 μg 이상인 것으로 알려져 있으며(15,16), 이러한 독소의 생산은 온도에 민감하여 균의 증식에 적합한 온도와 일치한다. *S. aureus* 식중독의 예방법은 식품으로의 *S. aureus*의 오염방지, 오염균의 증식 및 enterotoxin 생성 억제방법, 식품에 생산된 독소를 분해 해독하는 방법을 들 수 있다. 그러나 *S. aureus*는 자연계에 널리 분포되어 있을 뿐만 아니라 식품으로의 오염경로도 매우 다양하여 식품이 이 균에 오염될 기회가 대단히 높기 때문에 근본적으로 *S. aureus*의 오염방지는 거의 불가능하다(14). 하지만 과채류에서는 *S. aureus*를 비롯한 병원성 미생물의 오염을 최소화할 수 있으며 이러한 노력의 일환으로 FDA와 USDA에서는 농산물의 생산과정에 Good Agricultural Practice (GAP)제도를 도입할 것을 권장하고 있다(17). GAP제도란 식품의 원료가 되는 농축산물을 안전하고 위생적으로 공급할 수 있도록 생산자 및 관리자가 지켜야 하는 생산 및 취급과정에서의 위해요소 차단 규정을 의미한다. 즉, 환경에 대한 위해요인을 최소화 하고, 안전한 식품 원료를 제공하기 위하여 농축산물의 재배, 수확, 수확후 처리, 저장 과정중의 화학제, 중금속, 미생물에 대한 관리 및 그 관리 사항을 표기하여 소비자가 알 수 있도록 하는 체계로서 특히 이 제도는 물리, 화학, 미생물학적 위해 중 미생물학적 위해에 보다 초점을 맞추고 있다는 것이 이 제도의 특색이다(18). 이 제도의 도입을 위해서는 먼저 농산물을 생산하는 각 단계에서 발생할 수 있는 위해를 찾고 이해하는 것도 함께 이루어져야 한다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 널리 소비되고 있으며 조직이 무르고 상처가 나기 쉬우며 병원균의 침입을 받기 쉬운 딸기(19)를 중심으로 딸기의 전 생산과정에 걸쳐 *S. aureus*를 검색하고 분리된 *S. aureus*에 대하여 PCR법으로 enterotoxin A, B, C 생성 gene의 존재 여부를 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

장소 선정 및 시료채취

본 연구를 위하여 2004년 5월부터 6월 사이에 서부경남지역 딸기 농장 3곳(1곳: 토양재배농장- 토양에 딸기를 심어 생산하는 방식, 2곳: 양액재배농장- 딸기의 생육에 필요한 영양분을 함유하고 있는 양액과 상토를 섞은 배지에 딸기를 심고 가꾸는 방식)을 선정하여 *S. aureus*를 검색하였다. 또한 분리된 *S. aureus*에 대해서는 enterotoxin a, b, c gene의 존재 유무를 PCR법으로 확인하였다.

S. aureus 분리를 위한 시료 채취는 다음과 같이 실시하였다. 먼저 토양, 상토 그리고 배지(상토+양액)의 경우, 토양재배 농가에서는 토양을, 양액재배농가에서는 상토와 배지를 각각 100 g 씩을 취하여 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였다. 관개용수는 각 농가에서 사용하고 있는 지하수를 채취하였고 원수는 양액 제조에 사용될 물로서 인위적으로 공급되는 영양분을 섞기 전에 원수 저장고에 저장되어 있는 물을 채취하였다. 또한 양액은 딸기의 생육을 촉진하고 딸기의 생장에 영양원으로 작용할 수 있는 성분을 함유하는 용액이며 본 연구에 사용된 양액은 딸기에 공급하기 직전에 양액 저장고에 보관중인 용액을 분석하였다. 이들 용액은 각각 1 L씩 채수병에 채취되었다.

딸기 농장의 각종 용액의 저장탱크, 수확용기와 작업도구는 사용 중인 것을 채취하였으며 포장용기와 포장지는 사용 전의 것을 채취하였다. 표면검체의 채취는 검체의 형태에 따라 가능한 면적 또는 100 cm^2의 면적을 swab 하였다(20).

또한 작업자의 손과 장갑에 대해서는 작업 전 또는 작업 중일 경우에 물로 씻은 후 glove juice법으로 채취하였다(21). 딸기 농장의 각종 딸기는 100 g 정도를 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였으며 이렇게 채취된 모든 시료는 얼음을 채운 ice box에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다.

본 연구에 사용된 시료는 총 71개이며 Table 1과 같다.

Table 1. The kinds and number of samples collected from 3 farms for microbial assessment

Sources	Type of sample	The number of samples
Soil & Water	Soil	1
	Mixed medium	2
	Medium	2
	Irrigation water	3
	Pre-hydroponic solution	3
	Pre-hydroponic solution tank	3
	Hydroponic solution	3
	Hydroponic solution tank	3
Protected house	Water curtain	3
	Mulching vinyl	3
	Sprinkler	3
	Scissors	3
	Collection container	3
Packing house	Packing table	3
	Polyethylene bowl	3
	Polyethylene case	3
	Wrap	3
Employees	Hands (Protected house)	3
	Gloves (Protected house)	3
	Clothes (Protected house)	3
	Hands (Packing house)	3
	Gloves (Packing house)	3
Strawberry & Leave	Strawberry (Protected house)	3
	Leave (Protected house)	3
	Strawberry (Packing house)	3
Total		71

사용된 균주

병원성 미생물의 분리와 *S. aureus*의 enterotoxin gene 생성여부 검색에 양성 대조군으로 사용된 표준 균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 13565(SEA), *Staphylococcus aureus* ATCC 14458

(SEB), *Staphylococcus aureus* ATCC 19095(SEC)이다. 또한 음성 대조균로는 *Eschericha coli* O157:H7 ATCC 43894, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enteritidis* KCTC 12400, *Bacillus cereus* KCCM 11714를 사용하였으며 이들 균주는 식품의약품안전청으로부터 분양받아 본 연구에 사용하였다.

기기 및 시약

*S. aureus*의 증균배양을 위하여 10% NaCl이 첨가된 trypticase Soy Broth(TSB, Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며 선택배지로 Mannitol Salt Agar(Difco, Detroit, MI, USA))와 Barid-Parker Agar(Oxoid, England)를 사용하였다. 또한 생화학적 동정을 위하여 DNase agar(Difco, USA), 1N-HCl, Sheep blood agar(BioMerieux, France), H_2O_2, Rabbit plasma(BBL, Detroit, MI, USA), API Staph(BioMerieux, France)가 사용되었다. 분리된 *Staphylococcus aureus*가 enterotoxin을 생성할 수 있는 gene을 가지는가에 대한 여부를 PCR법으로 검색하였으며 PCR에 사용된 시약은 다음과 같다. 먼저 DNA 추출에는 Brain Heart Infusion(Difco, USA) Broth, 2% Triton X-100, lysostaphin (Sigma, USA), Proteinase K(Sigma, USA), phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1), 0.3 M sodium acetate, Isopropanol, 70% cold ethanol 그리고 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였다. 또한, PCR 분석에는 10x PCR buffer(Takara, Japan), 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate (Takara, Japan) 25 mM $MgCl_2$(Takara, Japan) primers(Bioneer, Korea) 그리고 AmpliTaq DNA polymerase(Takara, Japan)을 사용하였으며 PCR 생성물 확인을 위한 전기영동에 agarose gel(SeaKem agarose, FMC Bioproducts, USA)을 사용하였다.

그리고 PCR분석에 사용된 기기로는 PCR증폭기(GeneAmp PCR System 2400; Applied Biosystem, Norswalk, USA)와 전기영동장치(BioRad, USA) 그리고 UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, Japan)가 사용되었다.

*Staphylococcus aureus*의 분리

모든 시료는 clean bench에서 무균적으로 처리하였으며, *S. aureus* 분리를 위하여 관개용수, 원수, 양액은 멸균된 감압 여과 장치를 이용하여 시료 250 mL를 여과지(Advantec MFS, Inc. 0.45 μm)에 막 여과한 후 egg-york tellurite emulsion이 함유된 Baird-Parker agar에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하였고(22) 각종 기기와 기구 및 환경에서 채취된 시료와 손 시료의 경우 각각 1 mL를 취하여 10% NaCl이 함유된 TSB 10 mL에 접종하였다. 또한 상토, 흙, 배지, 딸기 및 잎은 멸균된 시약 스푼을 이용하여 10 g을 취하여 10% TSB 90 mL과 혼합하고 균질화시킨 후 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균된 균액을 Mannitol salt agar에 37°C, 24시간 획선 배양한 후 mannitol 분해능이 있는 황색불투명 집락을 선택하여 다시 2차 선택 배지로서 Egg-yolk tellurite emulsion을 첨가한 Baird-parker agar에 37°C, 24시간 획선 배양하였고, tellurite 저해효과에 의해 검은색 침전을 형성하며 단백질 분해(proteolysis) 작용으로 집락주위에 밝은 환(clear zone)이 나타나는 단일 집락을 취하여 생화학적 확인실험에 사용하였다. 생화학적 확인 실험으로는 분리 배양된 단일 집락에서 Gram positive와 포도상의 배열을 갖는 구균(cocci)임을 확인하였고 *Streptococcus* spp. 와의 구분을 위해 catalase test를 실시하였으며 deoxyribonuclease 생성능 확인을 위하여 DNase test, sheep blood agar상에서 β-용혈을 확인하였다. 그리고 혈액 응고성 균주 판별을 위해 coagulase test를 실시하였다. Coagulase 실험에 사용한 방법은 tube coagulase test(표준방법)로서 37°C, 16시간동안 BHI broth에서 배양한 균액 500 μL와 동량의 rabbit plasma 서로 혼합한 후 37°C, 16-18시간 반응 시킨 후 최종 관찰하여 응집반응이 나타나는 것을 양성으로 판단하였다. 이러한 여러 가지 생화학적 성상들을 *S. aureus* 표준균주 ATCC 13565와 비교하여 실험하였으며 API staph kit를 사용하여 재확인하였다(23).

PCR을 이용한 Staphylococcal Enterotoxin a, b, c Gene의 검색

Genomic DNA의 추출: Enterotoxin gene 검색을 위한 PCR에 사용될 DNA는 Johnson 등(24)의 방법으로 추출하였다. BHA에 보관된 *S. aureus*를 한 백금이 취하여 BHI(Brain Heart Infusion) broth에 접종한 후 37°C, 16시간 배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 배양액으로부터 얻은 pellet은 190 μL의 2% Triton X-100에 현탁시켰다. 현탁액은 95°C에서 15분간 반응시켰으며 반응이 끝난 후 세포에 25 μg/mL 농도의 lysostaphin 10 μL를 혼합한 후 37°C에서 30분간 세포용해를 시켰다. 그 후 1 μL의 proteinase K(200 μg/mL)를 첨가하고 65°C에서 15분 동안 반응한 후 100 μL의 phenol과 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24 : 1)을 첨가하여 시료와 혼합 한 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액은 새로운 tube에 옮기고, 이 조작을 두 번 더 반복하여 단백질이 제거되고 DNA가 함유된 수용액 층을 얻었다. 이 수용액 층에 0.3 M sodium acetate(10%, 20 μL)와 120 μL의 isopropanol를 첨가한 후 4°C, 14000rpm에서 20분간 원심 분리하였고, 상층액을 제거하여 얻은 pellet에 두 배 부피의 70% cold ethanol을 가하여 세척 후 공기 중에서 자연 건조하였다. Pellet은 30 μL의 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켰고 이렇게 얻은 2 μL의 수용액은 PCR 분석을 위한 template DNA로 사용되었다.

Primer는 Tsen 등(25)(Staphylococcal enterotoxin A)과 Becker 등(26)(Staphylococcal enterotoxin B, Staphylococcal enterotoxin C)에 의해 밝혀진 염기서열을 참고로 하여 선택하였다. 세 종류 enterotoxin에 대한 primers의 특이적 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같으며 각각의 primer는 Bioneer사 (Chengwon, Chungbuk, Korea)에서 합성하였다.

PCR 반응 용액은 10x PCR buffer 5 μL, 200 μM의 deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM $MgCl_2$, 20 pM primers, 2 μL의 DNA 그리고 AmpliTaq DNA polymerase(Takara) 1.2 units을 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 50 μL로 조절하였다.

또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94°C에서 5분간 predenaturation을 실시한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, sea 56°C, seb 55°C, sec 52°C에서 40초간 각각 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30cycles을 수행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.8% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

결과 및 고찰

*Staphylococcus aureus*의 검색

토양과 수질: 토양과 수질에서 *S. aureus*의 검색 결과 A 농장의 상토에서 *S. aureus*가 검출되었다(Table 3). 상토는 양액재배에서 배지를 제조하는 원료로 사용되는 물질이므로 상토

Table 2. Sequences and location of primers for the amplification of each gene

Gene	Primers	Oligonucleotides (5' to 3')	Location	Products (bp)
SEA	*sea*-1	AAG TGC CGA TCA ATT TAT GGC TA	443-465	219
	sea-2	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	637-660	
SEB	*seb*-1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	634-653	477
	seb-2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT	1088-1100	
SEC	*sec*-1	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	665-690	271
	sec-2	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	913-935	

Table 3. Detection of *Staphylococcus aureus* in 3 farms

ItemsFarms	Soil & water	Protected house	Packing room	Employee	Strawberry & Leave
A	Medium	Scissors	-	-	Leave Strawberry (Packing house)
B	-	-	-	Hands (Protected house) Hands (Packing house)	Leave
C		Scissors Collection container	Packing table	Hands (Protected house) Hands (Packing house) Clothes (Packing house)	

의 오염은 곧 배지의 오염으로 이어질 것으로 우려된다. 특히 딸기의 경우 기는 줄기(stolon)로 되어 있어 토양이나 배지와의 접촉이 빈번하며 만약 *S. aureus*를 비롯한 병원성 미생물이 토양 속에 존재할 경우에 딸기를 오염시킬 가능성이 다른 채소나 과일보다 크다. 그리고 실제 Mpuchane 등(27)과 Kaneko(28)의 연구에서도 시중에 유통되고 잇는 생채소류에서 병원성 미생물이 빈번하게 검출됨이 드러났으며 그 원인을 Mpuchane와 Kaneko 등을 비롯한 많은 학자들은 토양을 간주하고 있어 토양을 안전하게 관리하는 것이 대단히 중요하다(27-28).

양액 재배의 경우는 토양재배와는 달리 거름을 사용하지 않으며 거름대신에 양액을 주입하고 있다. 따라서 양액재배에 있어서는 딸기의 지지역할을 하는 상토를 안전하게 저장하기 위한 공간을 확보하여 외부환경으로부터 기인하는 미생물의 오염을 막고 양액제조와 보관을 위생적으로 하는 것이 필요하리라 사료된다.

관개용수, 원수, 양액과 같은 수질에서는 S. *aureus*가 불검출되었으나 농업에 쓰이는 각종 용소의 오염은 작물로 직접 병원균을 옮길 수 있는 매체로 작용할 수 있다고 보고되고 있다. 특히, 이 사실은 Norman(29)의 연구에서 오염된 관개용수의 사용은 수확된 농산물에서 병원성 미생물의 분리를 증가시킨다는 것을 밝힘으로써 입증되었다. 따라서 수질을 안전하게 관리하기 위해서는 무엇보다도 수원이 병원성 미생물에 의해 오염되는 것을 막아야한다고 미 FDA에서는 보고하였으며 이를 위해서는 수원에 동물이 침입하는 것을 막고 수원근처에 화장실 설치를 제한함으로써 분변이 수원으로 흘러들어오는 것을 방지해야 할 것이다. 또한 병원성 미생물의 존재가 의심될 때는 반드시 수질분석기관에 의뢰하여 *S. aureus*를 비롯한 병원성 미생물 검사를 실시해야 할 것으로 판단된다.

재배시설

재배시설에서 *S. aureus*를 검색한 결과, A, C 농장의 가위와, C 농장의 수확 용기에서 *S. aureus*가 검출되었다(Table 3). 미 FDA자료에 의하면 오염된 수확용기와 기구들은 쉽게 병원성 미생물을 농산물로 교차 오염시킬 수 있다고 보고하고 있으며(30) 본 연구의 결과에서도 가위와 수확용기가 *S. aureus*에 오염되어 있음이 확인되어 오염된 각종 용기와 도구에 의한 미생물의 교차오염 가능성을 시사하고 있다. 또한 본 연구를 위하여 시료를 채취하러 갔을 당시 모든 수확용기와 기구들은 흙이나 이물질에 오염되어 있었으며 각종 농기구들을 보관하기 위한 공간이 마련되어 있지 않았다. 따라서 용기와 기구에 의한 딸기의 교차오염을 예방하기 위해서는 먼저 각종 기구와 기기를 보관할 수 있는 공간의 확보와 세척, 소독을 할 수 있는 시설의 설치가 필요하다. 또한 농기구를 사용한 후에는 반드시 세척, 소독과정을 거쳐야 할 것으로 생각된다.

포장시설

*S. aureus*를 포장시설에서 검색한 결과 C 농장의 포장대에서 *S. aureus*가 검출되어 포장단계의 비위생적 관리로 인한 딸기의 교차오염이 우려된다. 미 FDA 자료에 따르면 포장시설, 포장 기기에서 병원성 미생물이 발견되어왔으므로 특별한 위생관리 없이는 포장시설 및 기기와의 접촉에 의한 교차오염을 야기할 수 있다고 보고하였다(30). 따라서 포장시설의 청결은 딸기의 안전성 확보에 있어 매우 중요한 요소로 판단되므로 포장시설의 청결을 유지하기 위해서는 우선 작업 전 후의 포장대를 깨끗이 청소하고 각종 포장재를 외부로부터 기인한 먼지나 공중낙하균에 오염되지 않게 적절하게 보관하는 것이 이루어져야 한다. 그리고 매일 작업이 끝난 후에는 포장실 내를 청소하고 해충과 쥐의 침입을 막아 교차오염을 미연에 방지할 수 있는 중점적인 위생관리가 필요하다고 본다.

작업자

딸기 농장에 종사하는 작업자들에 대해 *S. aureus*를 생화학적 방법으로 동정한 결과 Table 3과 같다. 한편, 환경 및 각종 식품에 대한 *S. aureus*의 오염도 및 enterotoxin 생산주의 분포 등에 관한 연구는 많이 보고되고 있는데, 사람의 25-50%가 황색포도상구균 보균자이며, 이들 중 15-20%는 enterotoxin 생산주인 것으로 알려져 있다(16). 또한 Hatakka 등(31-33)을 비롯한 많은 학자들의 연구결과에서도 이 균이 특히 개인위생에 관

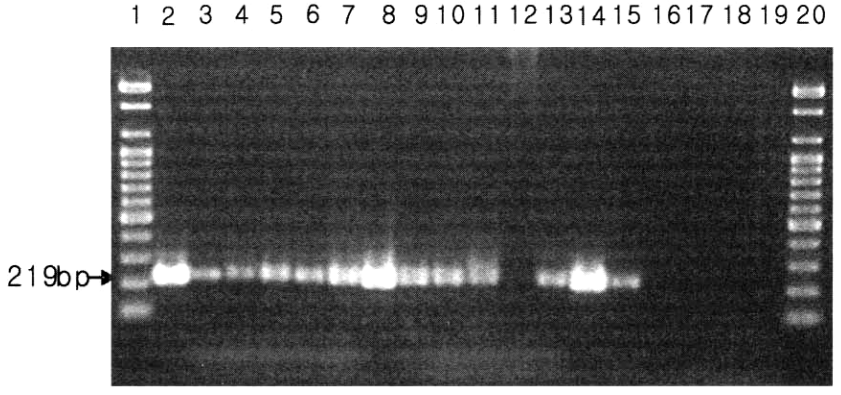

Fig. 1. The profile of the sea gene of *S. aureus* isolated from the strawberry farms.
lane 1: Marker, lane 2: *S. aureus* (ATCC 13565), lane 3: A Medium, lane 4: A Scissors, lane 5: A Leave, lane 6: A Strawberry (Packing house), lane 7: B Hands (Protected house), lane 8: B Hands (Packing house), lane 9: B Leave, lane 10: C Scissors, lane 11: C Collection container, lane 12: C Packing table, lane 13: C Hands (Protected house), lane 14: C Hands (Packing house), lane 15: Clothes (Packing house), lane 16: *L. monocytogenes*, lane 17: *B. cereus*, lane 18: *E. coli*, lane 19: *S. enteritidis*, lane 20: Marker.

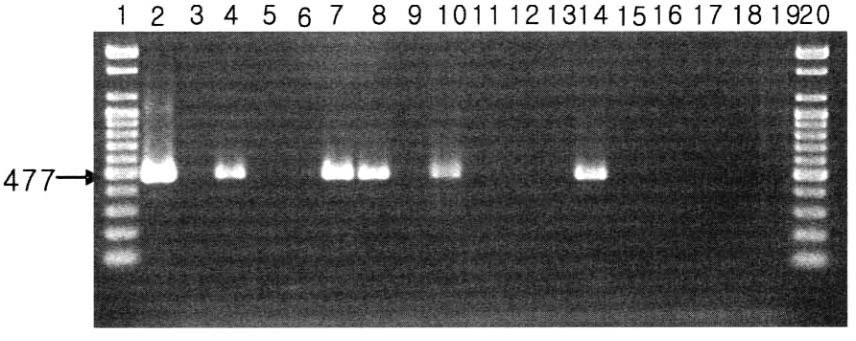

Fig. 2. The profile of the seb gene of *S. aureus* isolated from the strawberry farms.
lane 1: Marker, lane 2: *S. aureus* (ATCC 14458), lane 3: A Medium, lane 4: A Scissors, lane 5: A Leave, lane 6: A Strawberry (Packing house), lane 7: B Hands (Protected house), lane 8: B Hands (Packing house), lane 9: B Leave, lane 10: C Scissors, lane 11: C Collection container, lane 12: C Packing table, lane 13: C Hands (Protected house), lane 14: C Hands (Packing house), lane 15: Clothes (Packing house), lane 16: *L. monocytogenes*, lane 17: *B. cereus*, lane 18: *E. coli*, lane 19: *S. enteritidis*, lane 20: Marker.

련된 손, 코, 피부, 복장에서 빈번하게 검출된다고 보고하였다. 본 연구에서도 Table 3에서 나타난 바와 같이 *S. aureus*를 농산물이나 기기 등으로 전파할 수 있음을 시사한다. 따라서 이상의 내용을 미루어볼 때 작업자의 개인위생을 향상시키는 것은 딸기의 안전성 확보에 있어 가장 중요하다고 판단되며 이를 위해서는 우선 주기적인 위생교육으로 작업자 스스로 개인위생의 중요성에 대한 의식 전환이 이루어져야 하며 또한 딸기를 수확, 포장하는 작업에 장갑을 착용하지 않는 경우가 많기 때문에 화농성 피부질환 등에 감염된 환자가 딸기를 생산하는 것을 방지하고 작업 전 후로 손을 씻고 소독하는 작업은 필수적이라 판단된다. 이를 위하여 농장주는 반드시 손을 씻는 시설과 화장실, 그리고 탈의실과 같은 개인위생을 개선할 수 있는 시설을 설치해야하고 이를 제대로 실천할 수 있도록 포스터와 안내물을 부착해야 할 것으로 사료된다(30).

딸기와 잎

*S. aureus*를 딸기와 잎에서 검색한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 A 농장의 포장실 딸기와 A, C농장의 재배실 딸기 잎에서 *S. aureus*가 검출되었다. 특히 A 농장의 포장실 딸기에서의 *S. aureus*의 검출은 여러 생산단계를 거쳐 오는 동안 오염된 토양과 각종용수, 작업환경, 기구, 그리고 작업자와의 교차오염에 의한 것으로 판단된다. 또한 김(4,5) 등을 비롯한 여러 학자들의 연구에서 *S. aureus*가 농산물에서 빈번하게 검출된다고 보고하고 있으나 이 세균은 단순한 세척으로 제거하기 어렵기 때문에 사전에 *S. aureus*의 오염을 예방하는 것이 중요하다. 이는 각 단계가 위생적으로 이루어질 때 가능한 것이므로 모든 단계를 위생적으로 관리하는 새로운 위생관리 제도인 Good Agricultural Practice(GAP) 제도를 도입해야 한다.

Staphylococcal Enterotoxin a, b, c Gene의 검색

sea gene 검색: 딸기 농장 세 곳으로부터 분리된 *S. aureus*에 대한 enterotoxin A 생성(sea gene) 여부를 PCR법으로 증폭하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 1에서 나타난바와 같이 C 포장대를 제외한 나머지 모든 시료에서 sea gene이 검출되었다. 이는 *S. aureus*에 의한 식중독이 주로 A형이나 D형에 의해 일어난다는 보고들과 일치하는 것으로 나타났다(11-12). 분리된 균주의 대부분이 sea를 생성할 수 있는 균주로 나타남에 따라 딸기 생산환경에서 *S. aureus*의 오염을 예방하기 위한 대책이 수립되어야 할 것으로 판단된다.

seb gene 검색: 딸기 농장의 토양과 수질, 재배시설, 포장시설, 작업자 및 딸기와 잎에서 분리된 *S. aureus*에 대한 enterotoxin B 생성 (seb gene) 여부를 확인한 결과 Fig. 2와 같다. 분리된 *S. aureus*의 38%에서 표준균주인 ATCC 14458과 같은 위

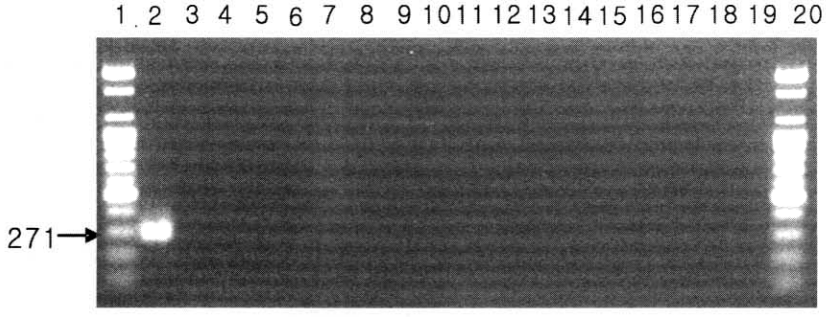

Fig. 3. The profile of the sec gene of *S. aureus* isolated from the strawberry farms
lane 1: Marker, lane 2: *S. aureus* (ATCC 19095), lane 3: A Medium, lane 4: A Scissors, lane 5: A Leave, lane 6: A Strawberry (Packing house), lane 7: B Hands (Protected house), lane 8: B Hands (Packing house), lane 9: B Leave, lane 10: C Scissors, lane 11: C Collection container, lane 12: C Packing table, lane 13: C Hands (Protected house), lane 14: C Hands (Packing house), lane 15: Clothes (Packing house), lane 16: *L. monocytogenes*, lane 17: *B. cereus*, lane 18: *E. coli*, lane 19: *S. enteritidis*, lane 20: Marker

치인 477bp의 뚜렷한 증폭 생성물을 확인 할 수 있었다. seb gene이 검출된 시료는 작업자의 손과 가위였다. Enterotoxin B는 특히 강한 내열성을 가진 것으로 알려져 있기 때문에 *S. aureus*의 오염을 근본적으로 예방하는 것이 대단히 중요하다(34). 따라서 작업장 내의 손 씻기 시설과 소독 시설의 마련이 시급하며 가위를 비롯한 각종 기구와 기기의 효율적인 세척과 소독이 필요할 것으로 판단된다.

sec gene 검색

딸기 농장으로부터 분리된 *S. aureus*에 대한 enterotoxin C gene을 검색한 결과는 Fig. 3에서는 보는 바와 같으며 분리된 *S. aureus* 모두 enterotoxin C 생성 gene을 가지지 않는 것으로 나타났다.

Enterotoxin gene 검색 결과를 종합해 보면 Table 4와 같으며 enterotoxin A의 경우 농장에서 분리된 *S. aureus*의 92%가 sea를 생성할 수 있는 gene을 가지는 것으로 나타났다. 또한 농장에서 분리된 *S. aureus*의 38%가 enterotoxin B 생성 gene을 지는 것으로 나타났으며 분리된 균주 모두 enterotoxin C를 생성할 수 있는 gene은 가지지 않는 것으로 나타났다. 하(35)는 목장에서 분리한 96개의 시료에 대한 PCR 분석결과, seb(49.2%), MRSA(37.1%), ETA(41.2%), ETB(82.5%), TSST-A(15.8%)로 나타나 대부분의 *S. aureus*는 2개 내지 4개의 내독소를 함께 가지고 있는 것으로 보고하였으며 본 연구 결과에서도 38%의 분리된 균주가 2개 이상의 독소를 함께 지니는 것으로 나타났다. 또한 Matsunaga(36) 등의 연구에서 enterotoxin의 생성과 toxin shock syndrome toxin(TSST)의 생성과는 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있어 enterotoxin에 의한 식중독과 함께 toxin shock syndrome 유발 가능성까지 내포하고 있다. 따라서 *S. aureus*를 비롯한 병원성 미생물의 오염을 근본적으로 예방할 수 있는 사전 위생관리제도인 GAP 제도가 도입되어야 하며 이에 대한 연구, 투자 및 적용이 우선시 되어야 할 것으로 사료된다. 또한 주기적인 육안검사와 미생물 검사를 통한 위생상태의 확인이 이루어져야 하고 만약 위생 수준이 불만족스러울 경우 소독을 비롯한 대책이 마련되어야 할 것이다.

Table 4. Screening of Staphylococcal enterotoxin genes in 3 strawberry farms

Wild strains	Results		
	sea	*seb*	*sec*
A-Medium	+	-	-
A-Scissors	+	+	-
A-Leave	+	-	-
A-Strawberry (Packing house)	+	-	-
B-Hands (Protected house)	+	+	-
B-Hands (Packing house)	+	+	-
B-Leave	+	-	-
C-Scissors	+	+	-
C-Collection container	+	-	-
C-Packing table	-	-	-
C-Hands (Protected house)	+	-	-
C-Hands (Packing house)	+	+	-
C-Clothes (Packing house)	+	-	-

요 약

본 연구는 서부경남지역 딸기 농장 세 곳에서 *Staphylococcus aureus*를 검색하기 위하여 수행하였다. 본 연구를 위하여 각 농장의 토양과 수질, 재배시설, 포장시설, 작업자 그리고 딸기와 잎으로부터 총 71점의 시료를 채취하였다. 채취된 시료 중 16%의 시료가 *Staphylococcus aureus*에 오염되어 있는 것으로 나타났으며 이들 균들이 내열성 독소인 enterotoxin A, B, C를 생성할 수 있는 gene의 유무를 확인하기 위하여 PCR를 수행하였다. 그 결과 분리된 균주의 92%가 sea gene을 가지는 것으로 나타났으며 seb gene의 경우는 분리된 균주의 38%에서 나타났다. 그러나 sec를 생성하는 균주는 없었다. 따라서 딸기의 미생물학적 오염을 예방하기 위해서는 체계적인 위생관리 시스템인 우수농산물관리제도(GAP)를 도입해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(03-PJ1-PG1-CH11-0003).

문 헌

1. Park HO, Kim CM, Woo GJ, Park SH, Lee DH, Chang EJ, Park KH. Monitoring and trends analysis of food poisoning outbreaks occurred in recent years in Korea. J. Fd. Hyg. Safety 16: 280-294 (2001)
2. Harris LJ, Beuchat LR, Kajs TM, Ward TE, Taylor CH. Efficacy and reproducibility of a produce wash in killing *Salmonella* on

the surface of tomatoes assessed with a proposed standard method for produces sanitizer. J. Food Prot. 64: 1447-1485 (2001)
3. Hedberg CW, Anulo FG, White KE, Langkop CW, Schell WL, Stobierski MC, Schuchat A, Besser JM, Dietrich S, Helsel L, Griffein PM, McFarand JW, Osterhorn MT. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: Implications for Public Health. Epidemiol. Infect. 122: 385-393 (1999)
4. Baeuchat LR. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59: 204-216 (1995)
5. Kim HJ, Park JK, Lee DS, Paik HD. Changes of indicator microorganisms and pathogenic bacteria in spinach during cook-chill process. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 927-930 (2002)
6. Laura DR, Henry PF, Frederick Breidt JR. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. J. Food Prot. 65: 1881-1887 (2002)
7. Suk SU, Park SC. Staphylococcal infections. J. Infect. 17: 115-122 (1985)
8. Kim DH, Kim BS, Lee KH, Ju YR, Oh KS, Kim HS, Choi YK. A study on diagnosis of Staphylococcal food poisoning and enterotoxin. The Report of National Institute of Health 27: 54-63 (1990)
9. Jang DS, Sin DH, Chung DH, Kim CM, Lee IS. Food Hygienic. Jeongmungak Co., Seoul, Korea. pp. 71-111 (2002)
10. Chen TR, Hsiao MH, Chiou CS, Tsen HY. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foodborne outbreaks. Int. J. Food Microbiol. 71: 63-70 (2001)
11. Hepner E. Food Poisoning and *Salmonella* Infectious in England and Wales, 1976-1978. Publ. Hlth. London 94: 337-379 (1980)
12. Noterman S, Heuvelman CJ. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *S. arueus*. J. Food Sci. 48: 1832-1840 (1983)
13. Kim SG, Kim CH, Kim TU, Lee GS, Jeong GS. Advanced Hospital Hygienics, Gomunsa Co., Seoul. Korea. pp. 251-256 (2000)
14. Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. Int. J. Food Microbiol. 68:105-113 (2001)
15. Lee EJ. The effect of temperature and time on the multiplication of *Staphylococcus* in foods. Korean J. Public Health 9: 381-387 (1992)
16. Brown MH. Meat Microbiology. Applied Science Publishers, London, England. pp. 269-486 (1982)
17. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA survey of imported fresh interim results. Available from http://www.cfsan.Fda.gov/~dms/prodsur9.html. Accessed July 31, 2001.
18. Kim SY. Indication system for the verification in agricultural food safety. pp.23-42. In: Symposium on GAP Application Strategy for the Safety Agricultural Production. July 29, Gyeongsang National University, Jinju, Korea (2004)
19. Yu KM, Newman C, Archbold DD, Hamilton-Kemp TR. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry fruit and reduction of the pathogen population by chemical agents. J. Food Prot. 64: 1334-1340 (2001)
20. Sveum, WH, Moberg LJ, Rude RA, Frank JF. Microbiological monitoring of the food processing environment. 3rd ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. pp. 51-74 (1992)
21. Anonymous. Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). Fed. Regist. 43: 1242-1243 (1978)
22. Korea Food and Drug Administration. Food code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp.75-105 (2002)
23. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 17th ed. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (2000)
24. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *S. aurues* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29:426-430 (1991)
25. Tsen HY, Chen TR. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 685690 (1992)
26. 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)
27. Mpuchane S, Gashe BA. Prevalence of coliforms in raditionally dried leafy vegitables sold in open marketss and food stores in Gaborne, Bostswana. J. Food Prot. 59: 28-30 (1999)
28. Kaneko KI, Hideki H, Yoshimitsu O, Junko K, Masahiko K, Koki T, Yasuo S, Masuo O. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. J. Food Prot. 62: 644-649 (1999)
29. Norman, NN, Wang LL. Studies on the use of sewage effluent for irrigation of truck crops. J. Milk Food Technol. 24: 44-47 (1961)
30. 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, 1998.
31. Hatakka M, Bjorkoth KJ, Asplund K, Maki-Petays N, Korkeala HJ. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. J. Food Prot. 63: 1487-1491 (2000)
32. Inikura Y, Ikejima S, Hirata I, Arai T, Kusunoki K, Jin M, Ohta K. The incidence of *Staphylococcus aureus* in food handler, and coagulase type and enterotoxin producibility of the isolates. Tokyo Metropolitan Res. Lab. Public Health Annu. Rep. 38: 145-149 (1987)
33. Sekiguchi Y, Asaka K, Kawabata A, Saito M, Kanoh S, Kanoh T. The incidence of *Staphylococcus aureus* in students of trade schools, and coagulase types, enterotoxin producibility and susceptibilities to antibiotics of the isolates. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 38: 417-418 (1997)
34. Ha KS, Park SJ, Shim WB, Chung DH. Screening of MRSA (Methicilline Resistant *Staphylococcus Aureus*) and seb gene in producing strains isolated from food service environment of elementary schools. J. Fd. Hyg. Safety 18: 79-86 (2003)
35. Ha KS. Detection and analysis of toxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stock farms. MS thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam, Korea (2002)
36. Matsunga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. J. Vet. Med. Sci. 55: 297-300 (1993)

(2005년 1월 29일 접수; 2005년 3월 28일 채택)