Korean J. Org. Agric.
Volume 31, Number 4: 381-394, November 2023
http://dx.doi.org/10.11625/KJOA.2023.31.4.381

ISSN 1229-3571 (Print)
ISSN 2287-819X (Online)

고추 및 토마토 친환경 및 관행재배지에서 분리한 인체 유해세균의 항생제 저항성 평가*

이성희** · 도지원*** · 김성겸*** · 오광교**** · 박재호***

Evaluation of Antibiotics Resistance for Human-harmful Bacteria Isolated from Eco-friendly and Practical Cultivation Farms of Hot Pepper and Tomato

Lee, Sung-Hee · Do, Jiwon · Kim, Seong Kyeom · Oh, Kwang Kyo · Park, Jae-Ho

This study was conducted to monitor the antibiotics resistance of human-harmful bacteria isolated in the agricultural environment for hot peppers (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). As a result, we isolated 120 bacterial species (34 on fruits, 48 in soil, 21 in water, and 17 in manure), identified them with the 16S rRNA sequence, analyzed minimum inhibitory concentration (MIC) for 26 antibiotics using Sensititre ARIS Hi-Q system and then evaluated whether each bacterial genus acquired resistance for the tested antibiotics or not, according to the CLSI criteria. From difference in MIC between eco-friendly (EFM) and practical (PFM) cultivation farms, *Klebsiella* spp. isolated from EFM was resistant to ampicillin (AMP) and nalidixic acid (NAL), and that isolated from PFM was resistant to streptomycin (STR) and tetracycline (TET). *Enterobacter* spp. isolated from EFM was resistant to AMP and azithromycin (AZI), and that isolated from PFM was resistant to AMP, AZI, and STR. Meanwhile, *Pseudomonas* spp. isolated from EFM and PFM were all resistant to AMP, AZI, cefotaxime (FOT), cefoxitin (FOX), ceftriaxone (AXO), CHL, NAL, and STR. *Staphylococcus* spp. isolated from EFM and PFM were resistant to gentamycin (GEN), STR, and kanamycin (KAN), and in particular, that from EFM showed resistance for erythromycin (ERY). In conclusion, our study suggested that EFM lead STR antibiotics resistance for human-harmful bacteria to decrease, because only the bacteria isolated from hot

* 본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01629806)의 지원으로 수행되었음.

** Corresponding author, 충청북도농업기술원 유기농업연구소(darkhorses@korea.kr)
*** 충청북도농업기술원 유기농업연구소
**** 국립농업과학원 유해생물과

pepper and tomato crop with PFM have showed resistance against STR antibiotics, regardless of bacterial genus.

Key words : *antibiotics resistance, hot pepper, human-harmful bacteria, tomato*

Ⅰ. 서 론

2022년 우리나라 고추(*Capsicum annuum*)와 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 시설재배 면적은 각각 3,758 및 6,111 ha이고 충북지역은 29 및 375 ha로 전국 대비 낮은 수준이다(KOSIS, https://kosis.kr/index/index.do). 또한, 전국 친환경재배 면적은 각각 554.2 및 412.7 ha이고 충북지역은 46.7 및 80.4 ha이다(친환경 인증관리 정보시스템, https://www.enviagro.go.kr/portal/main/main.do). 국민소득 향상과 건강에 대한 관심이 커지면서 식이섬유와 미네랄이 풍부한 채소 등 신선농산물의 수요가 증가하고 있어 미생물학적인 안전관리와 함께 친환경농산물을 찾는 소비자들이 증가하고 있다(Kim et al., 2019a; Seo et al., 2019; Cho et al., 2020; Lee, 2021). 특히, 과채류 등 비가열 신선농산물은 세척 및 가열처리를 하지 않고 바로 섭취하는 경우 미생물 오염의 우려가 있어 인체에 유해할 수 있다(Jung et al., 2012; Kim et al., 2019b; Park et al., 2021). 실제로, 2008년과 2010년 및 2016년 미국에서 멕시코산 신선 고추의 *Salmonella* spp. 오염으로 인한 식중독 사건이 발생하였다고 FDA는 보고하였다(Ministry of Food and Drug Safety, 2017). Centers for Disease Control and Prevention (2021) 보고에 의하면 포장 샐러드, 잎채소, 양파, 새싹채소, 로메인 상추에서 *Salmonella* spp. 및 *E. coli*에 오염되었고 이로 인해 식중독 사고가 발생하였다고 보고되었다. 고추와 당근에서도 *E. coli*가 오염되었다고 보고되었다(Kim et al., 2017; Jeong et al., 2018).

한편, 인체 유해세균에 의한 감염증 치료를 위해 사용하였던 항생제들의 오·남용으로 식중독균인 *Staphylococcus aureus*에서 메티실린을 비롯한 여러 항생제에 대하여 저항성을 보이는 이른바 슈퍼박테리아가 출현하였다. 우리나라의 경우, 일반 환자에서 분리된 *S. aureus*의 86%가 메티실린에 저항성을 가지고 있다(Kim et al., 2006). 또한 2002년 미국 미시간 주에서는 메티실린 저항성 균주를 치료할 목적으로 사용되는 반코마이신에 저항성을 보이는 균주에 감염된 환자가 발생되는 등 항생제 내성 균주에 대한 보고 사례가 증가하고 있다(Chang et al., 2003).

농산물 생산을 위해 국내에서 등록되어 사용되고 있는 농업용 항생제는 옥솔린산, 발리다마이신, 스트렙토마이신, 가스가마이신, 옥시테트라사이클린 등이 있다(Korea Crop Protection Association, https://www.koreacpa.org). 농용항생제 저항성에 대한 연구는 많지 않지만, 참다래궤양병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 38개 균주가 스트렙토마이신에 대하여 저항성이라고 보고되었다(Lee et al., 2020). 농산물과 관련하여 들깨 잎에서 분리한

*S. aureus*의 항생제 감수성 분석결과도 독소형 유전자 보유집단에 따라 항생제 반응이 크게 다르며 여러 항생제에 대한 내성 비율이 매우 높다고 보고되었다(Kim et al., 2015).

따라서 본 연구는 고추와 토마토의 재배환경을 친환경재배지와 관행재배지로 구분하고 각각의 재배환경(과실, 토양, 용수, 퇴비)에서 인체 유해세균의 오염실태를 조사하였다. 또한, 이들 농산물 재배환경에서 인체 유해세균의 항생제 저항성에 대한 잠재적인 위험성을 평가하고 농산물 재배환경의 안전한 관리와 인체 유해세균의 항생제 내성 최소화를 위한 관리대책에 필요한 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시료 채취 및 순수 분리

본 연구는 2021년부터 2022년까지 고추 및 토마토 재배지를 대상으로 친환경(국립농산물품질관리원 친환경 인증관리 정보시스템, https://www.enviagro.go.kr/portal/main/main.do) 및 관행재배지로 구분하여 매년 작물별 12개소에서 96점씩 시료를 채취하였다. 각 농가에서 과실, 토양, 용수 및 퇴비 시료를 채취하였고 농업용 항생제 감수성 검사 매뉴얼에 따라 각각의 선택배지를 이용하여 증균 및 분리 배양을 한 다음, 순수분리를 하였다(RDA, 2022). 순수분리한 세균은 LB 배지(Difco, Becton, Dickinson and Company, MD, USA)에서 25℃, 12~16시간 배양하였고 배양액을 Cryovial (SPL Life Science, KR)에 넣은 다음, -80℃ 초저온 냉동고(Wisd, Daihan Scientific Co. Ltd, KR)에 저장하여 실험에 사용하였다.

2. 분리세균 동정

분리한 세균은 ㈜마크로젠(©Macrogen, Inc.)에 의뢰하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였고 BLAST 방법으로 Genebank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 자료와 비교 분석하여 동정하였다. 그람 음성세균인 *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Entrerobacter*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Acinetobacter* 및 *Pseudomonans* spp.와 그람 양성균인 *Staphylococcus*와 *Enterococcus* spp.로 동정된 세균만을 선정하여 항생제 저항성 검정에 사용하였다.

3. 항생제 최소억제농도 검정

동정한 인체 유해세균에 대해 그람 음성균과 양성균으로 구분한 다음(RDA, 2022), 국립농업과학원 유해생물과에 분석을 의뢰하였다. 사용한 항생제는 26종으로 그람 음성균에 대해서

Amikacin (abbr., AMI), Ampicillin (AMP), Azithromycin (AZI), Cefotaxime (FOT), Cefoxitin (FOX), Ceftazidime (TAZ), Ceftriaxone (AXO), Chloramphenicol (CHL), Ciprofloxacin (CIP), Colistin (COL), Gentamicin (GEN), Imipenem (IMI), Nalidixic Acid (NAL), Streptomycin (STR), Tetracycline (TET) 및 Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) 등 16종의 항생제를 사용하였다. 또한, 그람 양성균에 대해선 Ampicillin (AMP), Chloramphenicol (CHL), Ciprofloxacin (CIP), Gentamicin (GEN), Streptomycin (STR), Tetracycline (TET), Tylosin tartrate (TYLT), Vancomycin (VAN), Daptomycin (DAP), Erythromycin (ERY), Florfenicol (FFN), Kanamycin (KAN), Linezolid (LZD), Quinupristin/dalfopristin (SYN), Salinomycin (SAL) 및 Tigecycline (TGC) 등 16종의 항생제를 사용하였다. 분리한 세균에 대한 항생제 최소억제농도는 Sensititre ARIS Hi-Q (Thermo Fisher Scientific Inc., Kr)와 자동형광분석장비(Sensititre Optiread)에 의해 분석되었고(Jones et al., 2015; Kim et al., 2021) 항생제 저항성 여부는 CLSI (2020) 기준에 준하여 판정하였다.

4. 통계 분석

분리한 각각의 인체 유해세균에 대해 친환경(무농약 및 유기농 포함)과 관행재배지로 구분하였고 처리 간 통계분석은 Microsoft Exel 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA) 프로그램을 이용하여 유의성 5% 수준에서 T-test 양측검정을 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

2021~2022년 고추와 토마토 작물에 대한 친환경 및 관행재배지에서 선택배지를 활용하여 세균을 순수분리하고 동정한 결과, 인체 유해세균 120종이 분리되었다(Table 1). 고추에서 분리한 균은 74종으로 과실에서 21종(A21), 토양에서 29종(B29), 용수에서 13종(C13) 그리고 퇴비에서 11종(D11)이 분리되었다. 특히, 고추 친환경재배지에서 분리한 균은 31종(A8, B11, C8, D4)이었고 관행재배지에서 분리한 균은 43종(A13, B18, C5, D7)이었다. 토마토에서 분리한 균은 46종으로 과실에서 13종(A13), 토양에서 19종(B19), 용수에서 8종(C8) 그리고 퇴비에서 6종(D6)이 분리되었는데, 친환경재배지에서 분리한 균은 26종(A11, B8, C4, D3)이었고 관행재배지에서 분리한 균은 20종(A2, B11, C4, D3)이었다. 분리된 인체유해세균 종류를 보면, 그람 음성균인 *Klebsiella* spp. 16종(A2, B7, C3, D4)은 고추 친환경 및 관행재배지에서 각각 6종(A1, B3, C1, D1) 및 8종(A1, B4, D3)이었으며, 토마토는 친환경재배지에서만 2종이 분리되었다. *Enterobacter* spp. 41종(A16, B19, C3, D3)은 고추 친환경 및 관행재배지에서 각각 7종(A3, B2, C1, D1) 및 13종(A3, B8, C1, D1)이었고 토마토 친환경 및

관행재배지에서는 각각 15종(A9, B5, D1) 및 6종(A1, B4, C1)이었다. *Pseudomonas* spp. 43종(A11, B15, C13, D4)은 고추 친환경 및 관행재배지에서 각각 14종(A3, B3, C6, D2) 및 14종(A7, B3, C2, D2)이 분리되었고 토마토 친환경 및 관행재배지에서는 각각 5종(A1, B2, C2) 및 10종(B7, C3)이 분리되었다. 한편, 그람 양성균인 *Staphylococcus* spp. 10종(A4, B2, D4)은 고추 친환경 및 관행재배지에서 각각 2종(A1, B1) 및 4종(A2, B1, D1)이 분리되었고 토마토 친환경 및 관행재배지에서는 각각 2종(A1, D1) 및 2종(D2)이 분리되었다. 위의 결과로부터, 소비자가 이용하는 고추와 토마토의 열매에서 분리된 세균은 34종으로 전체 분리균의 28.3%정도이었고 토양에서 분리한 세균은 40%, 용수에서 분리한 것은 17.5%이었으며, 퇴비에서 분리한 것은 14.2%이었다. 또한, 고추와 토마토 친환경재배지에서 분리한 세균은 47.5%이었고 관행재배지에서 분리한 세균은 52.5%로 큰 차이를 보이지는 않았다. 한편, 고추와 토마토 열매에서 인체 유해세균 분리율이 상대적으로 높았는데, 이는 토양, 용수 및 퇴비 등을 통해 과실로 오염된 것이라 생각한다. 실제로, 신선농산물의 인체 유해세균 오염은 다양한 경로를 통해서 이루어지고 토성, pH, 온도 등 환경요인에 영향을 받기 때문에 병원성 미생물의 생존과 특정한 조직에서 내재화에 관련한 연구가 보고되었다(Hora et al., 2005; Franz et al., 2007; Klerks et al., 2007; Sharma et al., 2009; Wright et al., 2017). 가지과 작물의 재배기간 동안 높은 기온과 습도는 미생물이나 해충에 감염될 가능성이 높고 과피의 당 성분으로 인하여 유해 미생물의 증식 가능성이 높으며, 작업자나 시설의 위생 상태에 따라 교차오염의 가능성이 높다(Park and Kwon, 2015; Jeong et al., 2018). *Staphylococcus aureus*는 사람과 동물, 공기, 먼지, 하수, 농업용수 등 다양한 유형에 존재한다는 보고(Yeni et al., 2016)처럼, 다양한 인체 유해세균이 과실, 토양, 용수 및 퇴비에서 분리되었다. 또한, 신선 농산물의 미생물 분포도 분석 연구에서 유기농산물과 관행농산물에서의 세균오염 정도는 차이가 거의 없고, 병원성 미생물의 오염수준도 비교적 안전하다는 보고(Park et al., 2014)처럼, 분리된 인체 유해세균 대부분은 작목 및 재배 유형과 상관없어 보였다. 비록, *Salmonella* 및 *Acinetobacter* spp.가 고추 및 토마토 친환경재배에서 분리되지 않은 점은 주목할 만하지만, 이를 뒷받침하기 위해서는 더 많은 시료채취 및 동정이 필요할 것으로 판단되었다.

분리한 인체 유해세균 120종의 항생제 26종에 대한 최소억제농도 검정 결과는 Table 2와 같았다. CLSI 기준에 준하면, 그람 음성균인 Enterobacterales는 *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 및 *Salmonella* spp.을 포함하는데(RDA, 2022), 우선 *E. coli*는 검정한 각각의 항생제에 대하여 각 평균 MIC 값이 감수성 또는 중도 감수성으로 판명되었고 *Klebsiella* spp.는 AMP와 NAL에 대하여 저항성을 보였다. *Enterobacter* spp.는 AMP와 STR에 대해 저항성을 보였고 *Salmonella* spp.는 비록 분리 균주 수가 적었지만, FOX에서만 저항성으로 판정되었다. *Acinetobacter* spp.도 비록 분리 균주 수가 적었지만, AMP, FOX, CHL 및 STR에서만 저항성을 보였고 나머지 항생제에 대해서는 감수성을 보였다. *Pseudomonas* spp.는 AMP, NAL 및

STR에서 저항성을 보였다. 한편, 그람 양성균인 *Staphylococcus* spp.(RDA, 2022)는 GEN, STR, ERY 및 KAN에서 저항성을 보인 반면, *Enterococcus* spp.는 GEN, STR, DAP, ERY, KAN 및 SYN에서 저항성으로 판명되는 MIC 값을 보였다. 이처럼 분리한 인체 유해세균의 속 간에도 각 항생제에 대한 MIC 표준편차가 크게 나타났는데, 이는 가뭄, 과습 등 재배환경 스트레스, 유전자 돌연변이 및 항생제 저항성을 가진 플라스미드의 획득 등에 기인할 것이라 판단된다. Poole (2012)은 환경적 스트레스가 항생제 내성에 영향을 준다고 보고하였고 Kim 등(2021)은 분리한 무름병세균이 농업환경에서 사용하지 않는 항생제에 대해 다양한 감수성을 보였다고 하였다. 특히, DNA 합성을 저해하는데 효과적인 Quinolone 계열의 NAL에 대한 무름병균의 MIC가 4-128 μg/mL 범위로 다양하게 나타났다고 하였고 또한, AZI, CHL 및 STR에 대해서도 MIC 차이가 있었다고 보고하였다.

분리한 인체유해 세균 중 그람 음성균과 양성균에 대해 친환경재배지와 관행재배지 간 각각의 항생제 MIC를 비교한 결과는 Table 3 및 4와 같았다. 그람 음성균인 *Klebsiella*와 *Enterobacter* spp.에 대한 재배지 간 MIC 차이는 검정한 항생제에서 모두 유의성이 없었지만, 친환경재배지에서 분리한 *Klebsiella* spp.은 AMP와 NAL에 대해 저항성을 보였고 관행재배지에서 분리한 것은 중도 감수성을 보였다. 또한, 관행재배지에서 분리한 *Klebsiella* spp.은 STR과 TET에 대해 저항성으로 판정된 반면에, 친환경재배지에서 분리한 것은 감수성이었다. 친환경재배지에서 분리한 *Enterobacter* spp.는 AMP와 AZI에서 저항성을 보였고 관행재배지에서 분리한 것은 AMP, AZI 및 STR에서 저항성으로 판정되었다. 한편, 친환경재배지에서 분리한 *Pseudomonas* spp.는 AMP, AZI, CHL, NAL 및 SXT에 대해 관행재배지에서 분리한 것보다 MIC가 유의하게 높았고 두 재배지에서 분리한 것은 모두 AMP, AZI, FOT, FOX, AXO, CHL, NAL 및 STR에 대해 저항성을 보였다(Table 3). 그람 양성균인 *Staphylococcus* spp.는 관행재배지에서 분리한 것이 CIP에 대하여 유의하게 MIC 값이 높았지만 모두 감수성으로 판명되었다. 친환경 및 관행재배지에서 분리한 것은 GEN, STR 및 KAN에 대해 저항성을 보였고 특히, 친환경재배지에서 분리한 것이 ERY에 대해 저항성으로 판정되었으나, 관행재배지에서 분리한 것과 비교하여 유의성은 없었다(Table 4). 한편, 그람 음성균인 *Pseudomonas* spp.는 *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fulva*, *P. oryzihabitans*로 대부분 동정되었고 재배 유형에 따라 여러 항생제에서 유의한 차이를 보였는데, 이는 *Pseudomonas* spp.가 인간, 동물, 토양, 식물 등에서 광범위하게 발견되는 그람 음성세균으로 식물과의 유해성 유무(*P. putida*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, etc.) 및 특별한 생물적 분해능이 있어 생물학적 환경정화(*P. putida*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, etc.) 특성을 가지는 종을 포함하기 때문일 것이라 추정되었다. 특히, 인체 유해세균인 녹농균 *P. aeruginosa*는 지금까지 항생제 저항성에 대해 가장 많이 연구된 유일한 종으로, Lupo 등(2018)의 보고에 의하면 *P. aeruginosa*는 동물에서 항생제 CIP 저항성이 최대 63%이었고 enrofloxacin 저항성이 81%이었으며, GEN 및 AMI 저항성이 각각 최대 56.5% 및 15.2%이었다고 하였다. 이러한 저항성

획득은 배출펌프단백질(efflux pump) 등의 본래의 저항성 및 점 돌연변이 또는 저항성 유전자 획득을 통해 이루어진다(Hancock, 1998; Breidenstein et al., 2011). 그람 양성균인 *Staphylococcus* spp.는 *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. condimenti* 등이었고 포도상구균인 *S. aureus*는 분리되지 않았다. *S. aureus*는 다른 세균보다 항생제에 대한 빠른 반응과 함께 진화하는데, 항생제 저항성 기작은 돌연변이, 유전자 이동, 대립유전자 증가 등을 통해 효소를 이용하여 항생제를 불활성화시키거나 항생제 타겟의 변형 또는 항생제를 트래핑시키기 때문이었다(Pantosti et al., 2007). 이와 같이 인체 유해세균의 항생제 저항성 획득은 항생제 오·남용과 다른 농약과의 혼용으로 항생제에 대한 저항성이 최대 10만 배까지 빠르게 증가하여 인류의 공중 보건에 상당한 위협이 되고 있다(Kurenbach et al., 2018; Dixit et al., 2019; Serwecińska, 2020; Srichamnong et al., 2021). 또한 항균물질로 널리 사용되는 양이온 계면활성제가 과다 축적될 경우 항생제에 대한 저항성을 유발한다고 보고되었다(Louvado et al., 2012; Zhou and Wang, 2020). 이는 Kim 등(2023)의 연구와 비슷하게, 본 시험에서도 주성분 외에 함유되어 있는 기타 물질(계면활성제, 색소, 보조제, 증량제 등)에 의해서 항생제에 대한 세균 종간의 저항성 차이가 나타났을 것으로 판단되었다.

Table 1. The number of human-harmful bacteria isolated from each cultivation environment

Human-harmful bacteria	Hot pepper		Tomato		Total (n=120)
	EFM (n=31)	PFM (n=43)	EFM (n=26)	PFM (n=20)	
Total (n=120)	A8 B11 C8 D4	A13 B18 C5 D7	A11 B8 C4 D3	A2 B11 C4 D3	A34 B48 C21 D17
E. coli	B1	B2 C1	-	-	B3 C1
Klebsiella spp.	A1 B3 D1C1	A1 B4 D3	C2	-	A2 B7 C3 D4
Enterobacter spp.	A3 B2 C1 D1	A3 B8 C1 D1	A9 B5 D1	A1 B4 C1	A16 B19 C3 D3
Salmonella spp.	-	C1	-	-	C1
Campylobacter spp.	-	-	-	-	-
Acinetobacter spp.	-	-	-	A1	A1
Pseudomonas spp.	A3 B3 C6 D2	A7 B3 C2 D2	A1 B2 C2	B7 C3	A11 B15 C13 D4
Staphylococcus spp.	A1 B1	A2 B1 D1	A1 D1	D2	A4 B2 D4
Enterococcus spp.	B1	-	B1 D1	D1	B2 D2

Note: Abbreviation: EFM, an eco-friendly farming method; PFM, a practice farming method; A, fruit; B, soil; C, agricultural water; D, isolated from manure.

Table 2. Analysis on MIC between 120 human-harmful bacteria isolated and 26 antibiotics

Antibiotics (ug · ml^{-1})	G (-) bacteria						G (+) bacteria	
	E. coli (n=4)	*Klebsiella* spp. (n=16)	*Enterobacter* spp. (n=41)	*Salmonella* spp. (n=1)	*Acineto-bacter* spp. (n=1)	*Pseudomonas* spp. (n=43)	*Staphylo-coccus* spp. (n=10)	*Enteroco-ccus* spp. (n=4)
AMI	4.0±0	4.0±0	4.3±1.9	4.0	8.0	4.0±0	-	-
AMP	19.5±29.8	34.8±22.9 R	37.8±23.4 R	16.0	32.0 R	57.9±17.3 R	1.3±1.0	1.3±0.5
AZI	7.5±6.2	10.6±5.2	17.9±9.6	8.0	8.0	28.6±9.5	-	-
FOT	1.0±0	1.0±0	1.8±4.9	1.0	8.0	22.6±11.4	-	-
FOX	4.0±0	8.0±9.5	30.0±8.4	32.0 R	32.0 R	31.4±3.7	-	-
TAZ	1.8±1.5	1.0±0	1.1±0.3	1.0	4.0	3.2±2.7	-	-
AXO	1.0±0	1.0±0	1.8±4.8	1.0	8.0	20.1±11.7	-	-
CHL	7.0±2.0	8.8±6.4	12.1±8.4	16.0	32.0 R	29.6±6.9	7.2±1.7	7.0±2.0
CIP	0.1±0.1	0.2±0.2	0.1±0.1	0.03	0.1	0.3±0.6	0.4±0.1	0.8±0.4
COL	5.5±7.0	2.0±0	4.2±5.0	2.0	2.0	2.4±2.2	-	-
GEN	1.0±0	1.0±0	1.1±0.2	1.0	4.0	1.5±0.7	128.0±0 R	128.0±0 R
IMI	1.0±0	1.0±0	1.2±0.7	1.0	1.0	3.0±2.3	-	-
NAL	17.5±31.0	34.1±56.0 R	14.9±29.5	4.0	4.0	55.5±35.0 R	-	-
STR	4.0±2.8	11.5±31.1	16.6±37.4 R	8.0	32.0 R	43.8±37.3 R	128.0±0 R	128.0±0 R
TET	2.0±0	10.3±31.4	5.0±3.6	2.0	2.0	11.4±8.7	2.0±0	2.0±0
SXT	1.0±0	1.9±3.8	1.1±0.2	1.0	1.0	9.2±5.7	-	-
TYLT	-	-	-	-	-	-	1.4±0.5	17.5±31.0
VAN	-	-	-	-	-	-	2.2±0.6	9.5±15.0
DAP	-	-	-	-	-	-	0.8±0.5	9.4±15.2 R
ERY	-	-	-	-	-	-	18.2±26.2 R	16.8±31.5 R
FFN	-	-	-	-	-	-	3.6±0.8	3.5±1.0
KAN	-	-	-	-	-	-	128.0±0 R	128.0±0 R
LZD	-	-	-	-	-	-	2.2±0.6	6.0±6.7
SYN	-	-	-	-	-	-	1.4±1.0	10.8±14.5 R
SAL	-	-	-	-	-	-	2.0±0	9.5±15.0
TGC	-	-	-	-	-	-	0.2±0.1	0.3±0.1

Note: 1. Abbreviation: AMI, Amikacin; AMP, Ampicillin; AZI, Azithromycin; FOT, Cefotaxime; FOX, Cefoxitin; TAZ, Ceftazidime; AXO, Ceftriaxone; CHL, Chloramphenicol; CIP, Ciprofloxacin; COL, Colistin; GEN, Gentamicin; IMI, Imipenem; NAL, Nalidixic Acid; STR, Streptomycin; TET, Tetracycline; SXT, Trimethoprim / sulfamethoxazole; TYLT, Tylosin tartrate; VAN, Vancomycin; DAP, Daptomycin; ERY, Erythromycin; FFN, Florfenicol; KAN, Kanamycin; LZD, Linezolid; SYN, Quinupristin / dalfopristin; SAL, Salinomycin; TGC, Tigecycline.

2. R, resistance decision for the antibiotics by CLSI (2020) criteria.

향후, 추가적으로 더 많은 인체 유해세균을 분리 후, 16S rRNA 및 Multi Locus Sequence Typing (MLST)으로 동정하고 병원성 검정이 필요할 것으로 사료되었다. 또한, Sensititre ARIS Hi-Q 시스템과 함께 disc diffusion 및 E-test stripe 방법을 통해, 분리한 인체 유해세균들이 얼마만큼의 항생제 농도에서 억제되는지를 검정하고 CLSI 기준에 따라 항생제 저항성 여부를 지속적으로 비교 분석할 필요가 있다.

Table 3. Comparison of MIC between farming methods and 16 antibiotics by the Gram-negative bacteria isolated

Antibiotics ($ug \cdot ml^{-1}$)	*Klebsiella* spp. (n=16)			*Enterobacter* spp. (n=41)			*Pseudomonas* spp. (n=43)		
	EFM (n=8)	PFM (n=8)	Signifi-cance	EFM (n=22)	PFM (n=19)	Signifi-cance	EFM (n=19)	PFM (n=24)	Signifi-cance
AMI	4.0	4.0	ns†	4.0	4.6	ns	4.0	4.0	ns
AMP	44.5 R	25.0	ns	32.1 R	44.3 R	ns	64.0 R	53.0 R	0.02*
AZI	11.3	10.0	ns	17.4 R	18.5 R	ns	32.0 R	25.9 R	0.02*
FOT	1.0	1.0	ns	1.1	2.6	ns	24.4 R	21.1 R	ns
FOX	8.0	8.0	ns	28.9	29.1	ns	32.0 R	31.0 R	ns
TAZ	1.0	1.0	ns	1.2	1.0	ns	3.0	3.3	ns
AXO	1.0	1.0	ns	1.0	2.6	ns	22.7 R	18.0 R	ns
CHL	6.5	11.0	ns	14.1	9.7	ns	32.0 R	27.7 R	0.03*
CIP	0.2	0.1	ns	0.1	0.1	ns	0.2	0.3	ns
COL	2.0	2.0	ns	4.6	3.6	ns	2.0	2.7	ns
GEN	1.0	1.0	ns	1.0	1.1	ns	1.5	1.5	ns
IMI	1.0	1.0	ns	1.1	1.2	ns	3.7	2.4	ns
NAL	49.8 R	18.5	ns	18.5	10.7	ns	67.4 R	46.1 R	0.05*
STR	3.3	19.8 R	ns	9.5	24.8 R	ns	37.1 R	49.1 R	ns
TET	2.3	18.3 R	ns	6.2	3.7	ns	12.4	10.6	ns
SXT	1.0	2.9	ns	1.0	1.1	ns	11.8	7.2	0.01**

Note: 1. Abbreviation: EFM, an eco-friendly farming method; PFM, a practice farming method; AMI, Amikacin; AMP, Ampicillin; AZI, Azithromycin; FOT, Cefotaxime; FOX, Cefoxitin; TAZ, Ceftazidime; AXO, Ceftriaxone; CHL, Chloramphenicol; CIP, Ciprofloxacin; COL, Colistin; GEN, Gentamicin; IMI, Imipenem; NAL, Nalidixic Acid; STR, Streptomycin; TET, Tetracycline; SXT, Trimethoprim / sulfamethoxazole.

2. †t-test: p value for two-tailed test and ns, not significant.

3. R, resistance decision for the antibiotics by CLSI (2020) criteria.

Table 4. Comparison of MIC between farming methods and 16 antibiotics by the Gram-positive bacteria isolated

Antibiotics ($ug \cdot ml^{-1}$)	Staphylococcus spp. (n=10)		
	EFM (n=4)	PFM (n=6)	Significance
AMI	1.8	1.0	ns†
CHL	7.0	7.3	ns
CIP	0.3	0.4	0.025*
GEN	128.0 R	128.0 R	ns
STR	128.0 R	128.0 R	ns
TET	2.0	2.0	ns
TYLT	1.8	1.2	ns
VAN	2.5	2.0	ns
DAP	0.6	0.9	ns
ERY	40.3 R	3.5	ns
FFN	3.5	3.7	ns
KAN	128.0 R	128.0 R	ns
LZD	2.0	2.3	ns
SYN	1.0	1.7	ns
SAL	2.0	2.0	ns
TGC	0.3	0.2	ns

Note: 1. Abbreviation: EFM, an eco-friendly farming method; PFM, a practice farming method; AMI, Amikacin; CHL, Chloramphenicol; CIP, Ciprofloxacin; GEN, Gentamicin; STR, Streptomycin; TET, Tetracycline; TYLT, Tylosin tartrate; VAN, Vancomycin; DAP, Daptomycin; ERY, Erythromycin; FFN, Florfenicol; KAN, Kanamycin; LZD, Linezolid; SYN, Quinupristin / dalfopristin; SAL, Salinomycin; TGC, Tigecycline.
2. †t-test: p value for two-tailed test and ns, not significant.
3. R, resistance decision for the antibiotics by CLSI (2020) criteria.

Ⅳ. 적 요

본 연구는 국내에서 재배되고 있는 고추와 토마토 재배지의 환경에서 분리한 인체 유해 세균에 대한 항생제 저항성을 모니터링하기 위해 수행되었다. 그 결과, 48 개소에서 분리한 인체유해 세균 120종(과실에서 34종, 토양에서 48종, 용수에서 21종, 퇴비에서 17종)을 16S rRNA 염기서열 분석으로 동정하였고, Sensititre ARIS Hi-Q 시스템을 이용하여 26종의 항생제에 대한 최소억제농도(MIC)를 분석하였으며, CLSI 기준에 준하여 저항성을 평가하였다.

친환경재배지에서 분리한 *Klebsiella* spp.은 ampicillin (AMP)와 nalidixic acid (NAL)에 대해 저항성을 보였고 관행재배지에서 분리한 것은 streptomycin (STR)과 tetracycline (TET)에 대해 저항성으로 판정되었다. 친환경재배지에서 분리한 *Enterobacter* spp.는 AMP와 azithromycin (AZI)에서 저항성을 보였고 관행재배지에서 분리한 것은 AMP, AZI 및 STR에서 저항성으로 판정되었다. 한편, 친환경 및 관행재배지에서 분리한 *Pseudomonas* spp.는 모두 AMP, AZI, cefotaxime (FOT), cefoxitin (FOX), ceftriaxone (AXO), CHL, NAL 및 STR에 대해 저항성을 보였다. 친환경 및 관행재배지에서 분리한 *Staphylococcus* spp.는 gentamycin (GEN), STR 및 kanamycin (KAN)에 대해 저항성을 보였고 특히, 친환경재배지에서 분리한 것은 erythromycin (ERY)에 대해 저항성을 보였다. 이상의 결과를 종합하면, 고추 및 토마토 관행재배지에서 분리된 인체 유해세균만이 세균 속에 상관없이 항생제 STR에 대한 저항성을 보임에 따라, 친환경재배는 인체 유해세균의 항생제 STR에 대한 저항성이 낮아지도록 유도할 것이라 판단되었다.

[Submitted, August, 10, 2023; Revised, November, 2, 2023; Accepted, November, 8, 2023]

References

1. Breidenstein, E. B., C. de la Fuente-Núñez, and R. E. Hancock. 2011. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 19: 419-426. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005.
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2021. List of selected multistate foodborne outbreak investigations. Available from: https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreakslist.html Accessed Sep. 14.
3. Chang, S., D. M. Suvert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, and D. F. Pounch. 2003. Infection with vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N. Engl. J. Med. 348: 1342-1347.
4. Cho, S. J., S. H. Jeong, Y. J. Seo, T. S. Kim, H. H. Lee, M. G. Lee, J. M. Seo, B. S. Cho, and J. B. Kim. 2020. Prevalence and toxin characteristics of *Bacillus cereus* isolated from vegetables in Gwangju metropolitan city. Korean J. Food Nutr. 33: 142-148.
5. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th edition CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA.
6. Dixit, A., N. Kumar, S. Kumar, and V. Trigun. 2019. Antimicrobial resistance: progress in

the decade since emergence of New Delhi metallo-β-lactamase in India. Indian J. Community Med. 44: 4-8.

7. Franz, E., A. A. Visser, A. D. van Diepeningen, M. M. Klerks, J. Termorshuizen, and A. H. C. van Bruggen. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Food Microbiol. 24: 106-112.
8. Hancock, R. E. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. Clinical Infectious Diseases 27 (Suppl 1): S93-S99. https://doi.org/10.1086/514909.
9. Hora, R., K. Warriner, B. J. Shelp, and M. W. Griffiths. 2005. Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 following biological and mechanical disruption of growing spinach plants. J. Food Prot. 68: 2506-2509.
10. Jeong, B. R., S. M. Seo, H. J. Jeon, E. J. Roh, S. R. Kim, T. Lee, J. G. Ryu, K. Y. Ryu, and K. S. Jung. 2018. Evaluation on microbial contamination in red pepper and red pepper cultivated soil in Korea. J. Food Hyg. Saf. 33: 347-353.
11. Jones, R. N., N. M. Holliday, and P. R. Rhomberg. 2015. Validation of a commercial dry form broth microdilution device (sensititre) for testing tedizolid, a new oxazolidinone. J. Clin. Microbiol. 53(2): 657-659.
12. Jung. K. S., E. J. Roh, K. Y. Ryu, W. I. Kim, K. H. Park, D. H. Lee, K. H. Kim, J. C. Yun, and S. G. Heu. 2012. Monitoring of pathogenic bacteria in organic vegetables from Korean market. Korean J. Soil Sci. Fert. 45: 560-564.
13. Kim, D. W., N. Y. S. Kim, C. R. Kim, M.-I. Jeong, K. K. Oh, B.-E. Kim, J.-G. Ryu, J. E. Jung, S. N. Jee, and K.-Y. Ryu. 2021. Investigation of Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentration of *Pectobacterium* spp. Isolated from Agricultural Produce. Korean J. Pestic. Sci. 25(4): 1-10.
14. Kim, J. H., D. V. Lee, M.G. Lee, K. Y. Ryu., T. S. Kim, G. R. Gang., K. W. Seo, and J. B. Kim. 2019a. Monitoring and risk assessment of pesticide residues in school foodservice agricultural products in Gwangju metropolitan area. J. Food Hyg. Saf. 34: 283-289.
15. Kim, J.-Y., K.-H. Baek, S.-Y. Lee. 2023. Evaluation of Resistance of Phytopathogenic Bacteria to Agricultural Antibiotics. Res. Plant Dis. 29(2): 168-173.
16. Kim, S. H., K. I. Lee, S. Y. Heo, and W. J. Lee. 2019b. Research on fresh-cut fruits and vegetables. Korea Rural Economic Institute: 256p.
17. Kim, S. H., J. H. Ryu, M. S. Kim, and H. J. Choi. 2006. The risk factors and prognosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: focus on nosocomial acquisition.

Korean J. Med. 71: 405-414.

18. Kim, S. R., M. H. Cha, D. K. Chung, and W. B. Shim, 2015. Profile of toxin genes and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from perilla leaf cultivation area. J. Fd. Hyg. Safety 30(1): 51-58.
19. Kim W. I., M. G. Gwak, A. R. Jo, S. D. Ryu, S. R. Kim, S. H. Ryu, H. Y. Kim, and J. G. Ryu. 2017. Investigation of microbiological safety of on-farm produce in Korea. J. Food Hyg. Saf. 32: 20-26.
20. Klerks, M. M., E. Franz, M. van Gent-Pelzer, C. Zijlstra, and A. H. C. van Bruggen. 2007. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. ISME J., 1: 620-631.
21. Kurenbach, B., A. M. Hill, W. Godsoe, S. Van Hamelsveld. and J. A. Heinemann. 2018. Agrichemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution. PeerJ 6: e5801.
22. Lee, M. N. 2021. A study on eco-friendly food consumption value and purchasing behavior -Comparative analysis according to the level of involvement-. FoodService Industry Journal 17: 305-319.
23. Lee, Y. S., G. H. Kim, Y. R. Song, C. S. Oh, Y. J. Koh, and J. S. Jung. 2020. Strepto-mycin resistant isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. Res. Plant Dis. 26(1): 44-47.
24. Louvado, A., F. J. R. C. Coelho, P. Domingues, A. L. Santos, N. C. M. Gomes, A. Almeida, and A. Cunha. 2012. Isolation of surfactant-resistant pseudomonads from the estuarine surface microlayer. J. Microbiol. Biotechnol. 22: 283-291.
25. Lupo, A., M. Haenni, and J. Y. Madec. 2018. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and Pseudomonas spp. Microbiol. Spectrum 6(3): ARBA-0007-2017.
26. Ministry of Food and Drug Safety. 2017. Report of pathogen outbreak of Mexican red pepper contaminated with *Salmonella* spp. in USA. Available from: https://impfood.mfds.go.kr/CFCAA01F02/getCntntsDetail?cntntsSn=254613
27. Pantosti, A., A. sanchini, and M. Monaco. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Future Microbiol. 2(3): 323-334.
28. Park, B. K., S. H. Kwon, M. S. Yeom, S. Y. Han, M. J. Kang, S. J. Seo, K. S. Joo, and M. J. Heo. 2021. Monitoring and risk assessment of pesticide residues in school foodservice agricultural products in Incheon. Korean J. Food Sci. Technol. 53: 470-478.
29. Park, S. B. and S. C. Kwon. 2015. Microbiological hazard analysis for HACCP system application to red pepper powder. J. Korea Acad.-Ind. Co. Soc. 16: 2602-2608.

30. Park, W. J., H. Y. Ryu, G. Y. Lim, Y. D. Lee, and J. H. Park 2014. Microbial prevalence and quality of organic farm produce from various production sites. Korean J. Food Sci. Technol. 46: 262-267.
31. Poole, K. 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. J. Antimicrob. Chemother. 67: 2069-2089.
32. RDA (Rural Development Administration). 2022. Agricultural Antibiotics Susceptibility Test Manual. 47 pp.
33. Seo, U. H., H. J. Kang, K. B. Yoon, Y. J. An, and J. B. Kim. 2019. Analysis of dietary fiber, mineral content and fatty acid composition in Cheonggak (*Codium fragile*). Korean J. Food Nutr. 32: 328-334.
34. Serwecińska, L. 2020. Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. Water 12: 3313.
35. Sharma, M., D. T. Ingram, J. R. Patel, P. D. Millner, X. Wang, A. E. Hull, and M. S. Donnenberg. 2009. 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.
36. Srichamnong, W., N. Kalambaheti, S. Woskie, P. Kongtip, J. Sirivarasai, and K. R. Matthews. 2021. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria on hydroponically grown butterhead lettuce (*Lactuca ativa* var. *capitata*). Food Sci. Nutr. 9: 1460-1470.
37. Wright, K. M., L. Crozier, J. Marshall, B. Merget, A. Holmes, and N. J. Holden. 2017. Difference in internalization and growth of *Escherichia coli* 0157:H7 within the apoplast of edible plants spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. Microb. Biotechnol. 10: 555-569.
38. Yeni, F., S. Yavas, H. Alpas, and Y. Soyer. 2016. Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: a review of recent outbreak. Crit. Riv. Food Sci. 56: 1532-1544.
39. Zhou, C. and Y. Wang. 2020. Structure-activity relationship of cationic surfactants as antimicrobial agents. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 45: 28-43.