J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 4, pp. 289~295 (2011)

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

상추와 생산환경의 미생물 안전성 평가

김세리 · 이지영[1] · 이서현 · 김원일 · 박경훈 · 윤혜정 · 김병석[2] · 정덕화[3] · 윤종철 · 류경열*

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부, [1]식품의약품안전성 식품기준과,
[2]농촌진흥청 행정법무담당관실, [3]경상대학교 응용생명과학부

Evaluation of Microbiological Safety of Lettuce and Cultivation Area

Se-Ri Kim, Ji-Young Lee[1], Seo-Hyun Lee, Won-Il Kim, Kyoung-Hun Park, Hye-Jeong Yun, Byeong-Suk Kim[2], Duck-Hwa Chung[3], Jong-Chul Yun, and Kyoung-Yul Ryu*

Department of Agro-Food Safety, NAAS, RDA, [1]Food Standardization division, FDA
[2]Administrative management & Legal affairs office, RDA,
[3]Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

(Received September 5, 2011/Revised October 10, 2011/Accepted November 8, 2011)

ABSTRACT - Produce, including leafy vegetables, has been implicated in several outbreaks of food illness. To evaluate microbiological safety of lettuce and it's cultivation area, a total of 147 samples were collected from lettuce farms and post harvest facility at Icheon, Gyeonggi province. The collected samples were assessed for presence of sanitary indicator microorganisms (Aerobic plate count, coliform count, *Escherichia coli*) and foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*). The population of APC was over 4.0 log CFU from most of the samples. While the numbers of APC, and coliform of lettuce at 62 days after transplanting were 4.18 log CFU/g, and 1.00 log CFU/g, respectively, those of 10 days after transplanting were 5.37 log CFU/g, and 2.87 log CFU/g, respectively. *B. cereus* was highly detected from soil and balance which were contaminated with 3.5 log CFU/g, and 2.6 log CFU/100 cm^2, respectively. The number of *E. coli* recovered from gloves was 3.5 log CFU/hand. However, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes* were not detected. These data suggested that risk management system should be introduced to lettuce farms to enhance safety of lettuce.

Key words: Lettuce, microorganisms, risk management system

신선 채소는 인간에게 비타민, 미량원소 및 섬유소를 공급하는 중요한 농산물이다. 특히 엽채류는 표면적이 넓고 생산 과정 중 주변환경과 접촉 빈도가 높아 유해미생물에 오염되기 쉬우며 최근에 농산물 유래의 식중독발생이 국내외적으로 보고되고 있다[1-4]. 식약청에서 발표한 국내 식중독 발생통계자료에 의하면 원인식품이 밝혀진 식중독 중 곡류와 채소류로 인한 식중독 발생은 6.0%로 타 식품에 비하여 상대적으로 낮지만 매년 4.2%~8.0%비율로 꾸준히 발생하고 있다[5]. 미국의 경우도 1996년부터 2008년까지 농산물과 관련된 식중독이 82건 발생하였으며 그 중 엽채소와 관련된 사고는 28건 이었다[2]. 엽채류에 의한 식중독사고의 예로는 2006년에 *Escherichia coli* O157:H7(*E. coli* O157:H7)에 오염된 시금치가 원인이 되어 발생한 식중독 사고를 들 수 있으며 이 사고로 199명 이상의 환자가 발생하였고 3명이 사망하였다[3]. 그 외에도 영국에서 발생한 *Salmonella* Thompson에 오염된 상추로 인한 식중독과 덴마크에서 발생한 *Salmonella* Anatum에 의해 오염된 바질에 의한 식중독 등이 있다[4]. 과거에 비하여 농산물에 의한 식중독 발생의 증가원인은 과일과 채소 소비 증가, 수입 농산물의 증가, 역학조사의 발달, 식중독세균 동정기술의 발달로 볼 수 있다[2,6,7].

식중독균들은 토양, 오염된 관개수, 비위생적인 취급을 통해 농산물에 전이되며 대부분의 신선 엽채류는 일반적으로 병원체를 사멸시키거나 또는 그 수를 감소시키는 가공공정의 과정을 거치지 않기 때문에 병원성 미생물에 의한 엽채류의 오염은 농산물 안전에 영향을 끼칠 수 있다[8,9]. 따

*Correspondence to: Kyoung-Yul Ryu, Microbial safety division Department of Agri-food safety Rural Development Administration, 249, Sedun-dong, Gwonseon-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 441-707, Korea
Tel: 82-31-290-0445, Fax: 82-31-290-0407
E-mail: kyryu@korea.kr

라서 상추를 비롯한 엽채류에 의한 식중독사고의 발생을 예방하기 위해서는 생산, 포장 및 유통단계에서 발생할 수 있는 위해를 분석하고 사전 관리하는 것이 식중독사고의 위험을 감소시킬 수 있는 최선의 방법이다.

최근 미생물 등 위해요소를 관리하기 위한 노력의 일환으로 식품의 원료가 되는 농축산물을 안전하고 위생적으로 공급할 수 있도록 농산물의 생산부터 수확 후 포장단계까지 농산물에 잔류할 수 있는 농약·중금속 또는 미생물 등의 위해요소를 사전에 관리하여 안전성을 확보하는 제도인 Good Agricultural Practice (GAP)제도 도입을 권장하고 있다[10]. 그러나 이러한 제도의 도입과 활성화를 위해서는 먼저 농산물을 생산하는 각 단계에서 발생할 수 있는 위해를 분석하고 이해하는 것이 이루어져야 하지만 농산물과 관련된 연구는 소비단계에 국한되어 있어 아직도 농산물의 재배, 수확 후 단계의 위해요소 분석에 필요한 기초자료가 대단히 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 상추의 육묘에서 수확 후 출하 전까지 각 단계에서 위생지표세균과 병원성 미생물을 조사하여 주요 오염원을 확인하였다.

재료 및 방법

시료 채취

본 연구는 2010년 4월부터 7월까지 이천지역 상추농가 두 곳과 대상농가의 상추를 저장, 포장하는 수확 후 처리 시설을 선정하여 재배단계(파종 후 15일, 정식 후 10일, 22일, 62일), 수확단계, 수확 후 단계로 구분하여 시료를 수집하였다. 본 연구에 사용된 시료는 종자, 퇴비, 액비, 관개용수, 상토, 토양, 상추, 작업자의 손, 장갑, 저울, 컨베이어밸트, 포장지 등 총 147 점이었고, 이들 시료를 대상으로 위생지표세균(일반세균, 대장균군, *E. coli*)과 병원성미생물(*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*)을 분석하였다. 육묘단계의 상추 종자는 약 50 g씩 취하여 시료채취용 멸균 팩에 담았고, 퇴비, 사용전의 상토는 멸균된 가위로 포장지를 자른 후 약 200 g씩을 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였다. 육묘단계에 사용 중인 상토는 상추 주변에서 약 200 g씩을 취하여 시료채취용 팩에 채취하였다. 관개용수는 하우스 내에서 사용하는 물을 1 리터씩 채수병에 채취하였다. 정식 후 재배과정의 토양은 상추 주변에서 약 200 g씩을 취하여 시료채취용 팩에 채취하였고 관개용수는 하우스 내에 관개용수 파이프에 있는 물을 채수병에 1 리터를 채취하였다. 또한 육묘기와 정식후의 재배중인 상추는 직접 멸균된 장갑을 착용하고 손으로 채취하였다. 육묘~재배과정 중 토양, 관개용수, 상추는 시기별로 4회에 걸쳐 수집되었다.

수확 과정 중 사용되는 포장지는 수확 상자 내부에 있는 포장비닐을 대상으로 하였고 수확 후 과정의 저울과 컨베이어밸트는 작업과정 중에 채취하였다. 포장지 및 수확 후 처리환경은 10 cm × 10 cm 크기의 면적대를 사용하여 100 cm^2의 면적을 면봉으로 문질러 채취하였다[11]. 또한 작업자의 손은 0.85% 생리식염수 50 ml을 멸균 팩에 붓고 손을 넣어 30초간 씻어서 손에 있는 미생물을 채취하는 glove juice법으로 채취하였다[12]. 수확단계의 상추는 수확 전과 수확 후의 상추를 취하였고 수확 후 처리단계의 상추는 수확 후 처리 시설에 입고된 상추와 수확 후 처리가 끝나고 포장지에 담긴 상추를 약 100 g씩 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였다. 이렇게 채취된 모든 시료는 얼음을 채운 아이스박스에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다 (Table 1).

위생지표세균의 측정

위생지표세균의 분석을 위하여 상추, 퇴비, 토양, 상토는 25 g을 취하여 0.85% 생리식염수 225 ml과 혼합하고 stomacher에서 2분간 균질화시켰다. Glove juice법과 swab법으로 채취된 시료는 30초간 vortex한 후 사용하였다. 균질화된 시료는 그 중 1 ml을 취하여 10배 단계희석한 후 일반세균 및 coliform 측정용 petrifim(3M, St. Paul, MN, USA)에 접종하고 37ºC 24시간 배양하였다[13]. 또한 *E. coli*의 측정은 정량과 정성을 동시에 수행하였다. 정량분석은 3M사의 petrifilm™(3M, St. Paul, MN, USA)을 이용하였으며 각 농도별로 1 ml씩 취하여 film에 접종하고 37ºC에서 24시간 배양 후 기포를 가진 blue colony만을 *E. coli*로 인

Table 1. Samples for investigation of microoganisms from lettuce farms and post harvest facility

Stage	Source	Unit of sample	No. of sample
Cultivation	Seed	50 g	6
	Compost	200 g	6
	Liquid fertilizer	1 l	6
	Medium (before using)	200 g	6
	Medium (using)	200 g	6
	Irrigation water	1 l	24
	Soil	200 g	24
	Lettuce	50 g	24
Harvest	Gloves	1 hand	6
	Packing vinyl	100 cm^2	6
	Lettuce (before havest)	100 g	6
	Lettuce (after harvest)	100 g	6
Post harvest	Balance	100 cm^2	3
	Conveyer	100 cm^2	3
	Packing plastic bag	100 cm^2	3
	Hands	1 hand	3
	Gloves	1 hand	3
	Lettuce(before packing)	100 g	3
	Lettuce(after packing)	100 g	3
	Total		147

정하였다. 최종균수는 전형적인 집락을 보이는 균주 × 희석배수로 계산하였다. 또한 정성분석은 상추를 비롯한 고체시료의 경우 25 g을 취하여 225 ml의 EC broth에서 37ºC에서 24시간 증균 배양하였고, glove juice법과 swab법으로 채취한 시료는 1 ml을 채취하여 10 ml의 발효관이 든 EC broth(Oxoid, UK)에서 증균하였다. 배양액 1 loop를 취하여 EMB agar(Oxoid, UK)에 재접종하였다. 이 후 37ºC, 24시간 배양 후 금속광택을 나타내는 집락을 VITEK(VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 최종 동정하였다[13].

병원성 미생물 분리 · 동정§

E. coli O157:H7

E. coli O157:H7의 증균을 위해 고체 시료는 25 g을 취하여 225 ml의 mEC broth(Oxoid, UK)에서 37ºC에서 24시간의 배양하였고, glove juice법과 swab법으로 채취한 시료는 1 ml을 채취하여 10 ml의 mEC broth(Oxoid, UK)에서 증균하였다. 배양액 1 loop를 취하여 *E. coli* O157:H7의 선택배지인 sorbitol MacConkey agar(SMA, Oxoid, UK)에 도말한 후 37ºC에서 24시간 배양하였다. 이후 sorbitol MacConkey agar 상에서 무색의 단일 집락을 취하여 EMB agar에 접종하고 37ºC, 24시간 배양하였다. EMB agar상에서 금속광택을 나타내는 집락을 취하여 Nutrient agar(NA, Oxoid, UK)에 접종한 후 37ºC, 24시간 재배양하였다. *E. coli* O157:H7의 동정은 PowerCheck™ *E. coli* O157:H7 Detection Kit(Power check PCR kit, Kogen, Korea)를 이용하여 PCR로 1차 확인을 거친 후, 양성으로 의심되는 시료는 VITEK(VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 최종 동정하였다[13]. 대조군으로 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894를 사용하였다.

Salmonella spp.

Salmonella spp. 분리는 식품공전[13]에 준하여 실험하였다. 상추를 비롯한 고체시료는 25 g을 225 ml의 buffered peptone water에 glove juice법과 swab법으로 채취한 시료는 1 ml을 채취하여 10 ml의 buffered peptone water에서 증균하였다. 1차 증균한 후 10 ml의 Rappaport Vassiliadis R10 Broth(Difco, USA)에 1차 증균액 100 µl를 접종하여 37ºC, 24시간 배양한 후 균액 1 loop를 취하여 선택배지인 XLD (Oxoid, UK)에 도말하였다. 이후 37ºC에서 24시간 배양하여 전형적인 *Salmonella* spp. 의심집락을 취하여 NA(Oxoid, UK)에 접종한 후 37ºC, 24시간 재배양하였다. 동정은 PowerCheck™ *Salmonella* spp. Detection Kit(Power check PCR kit, Kogen, Korea)를 이용하여 PCR로 1차 확인을 거친 후, 양성으로 의심되는 시료는 VITEK(VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 최종 동정하였다[13]. 또한 대조군으로 *S.* Typhimurium ATCC 13314를 사용하였다.

L. monocytogenes

L. monocytogenes 균주의 분리를 위해 상추, 퇴비, 토양 및 상토는 25 g을 225 ml의 *Listeria* enrichment broth(Oxoid, UK)에 swab한 시료와 glove juice법으로 채취한 시료는 1 ml을 채취하여 10 ml의 *Listeria* enrichment broth에 접종 후 30ºC에서 24시간 배양하였다. 배양된 균액을 100 µl 취하여 다시 2차 증균 배지인 fraser broth(Difco, USA)에 넣고 30ºC, 24시간 증균하였다. 이후 선택배지인 oxford agar (Oxoid, UK)에 획선 도말하고 30ºC, 24-48시간 배양한 다음 black halo에 brown-green의 특이성을 보인 집락을 취하여 다시 0.6% yeast extract가 첨가된 trypticase soy agar에 접종하고 30ºC, 24시간 배양하였다. 최종 동정은 Power-Check™ *Listeria monocytogenes* Detection Kit(Power check PCR kit, Kogen, Korea)를 이용하여 PCR로 1차 확인을 거친 후, 양성으로 의심되는 시료는 VITEK(VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 최종 동정하였으며 대조군으로 *L. monocytogenes* ATCC 15313를 사용하였다[13].

S. aureus

*S. aureus*는 정성과 정량 검사를 실시하였으며 정성검사의 경우 고체시료 25 g을 225 ml의 10% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth(Difco, USA)에 넣고 2분간 stomacher에서 균질하였고 glove juice법과 swab법으로 채취한 시료는 1 ml를 10 ml의 10% TSB에 접종 하였다. 이후 37ºC 16시간 증균하고 배양액을 Baird-Parker agar(Oxoid, UK)에 37ºC, 24-48시간 배양한 후 검고 lethicinase 작용으로 집락주위에 밝은 환(clear zone)이 나타나는 단일 집락을 취하여 확인실험에 사용하였다. 또한 정량시험은 위생지표세균을 위해 전처리된 검액을 단계희석 한 후 각 희석농도에 대하여 250 µl씩 Baird-Parker agar 4 plate에 접종한 후 37ºC, 48시간 배양한 후 전형적인 형태를 나타내는 집락을 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선발하여 NA 배지에 접종하고 37ºC에서 24시간 배양한 후 확인 동정하였다. 최종균수는 *S. aureus*의 수치는 전형적인 집락을 보이는 균주 × (양성균주수/5주의 test균주) × 희석배수로 계산하였다. 정성, 정량검사의 확인실험은 PCR kit(Powercheck kit, Kogen, Korea)를 이용한 PCR법과 VITEK(VITEK-2 compact, Biomerieux, France)을 사용한 생화학법으로 수행하였고 대조군으로 *S. aureus* 표준 균주 ATCC 25923을 사용하였다[13].

B. cereus

*B. cereus*의 오염도를 조사하기 위하여 상추, 토양, 퇴비 및 상토는 25 g을 취하여 225 ml의 phosphate buffered dilution water을 가하여 2분간 stomacher에서 균질화하였다. 또한 glove juice법과 swab법으로 채취한 시료는 30초간 vortex하였다. 균질화한 검액은 단계희석 한 후 250 µl씩 MYP

agar 4 plate에 접종한 후 30ºC, 24-48시간 배양한 후 전형적인 형태를 나타내는 집락을 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선발하여 NA배지에 접종하고 30ºC에서 24시간 배양한 후 PCR법에 의하여 확인하였다. 최종균수는 전형적인 집락을 보이는 균주 ×(양성균주수/5주의 test균주) × 희석배수로 계산하였다. *B. cereus*의 동정은 PCR 법으로 확인하였다. *B. cereus*를 검출하기 위한 PCR 조건은 Choo 등[14]의 방법으로 *gryB*유전자 *cry*유전자를 대상으로 multiplex PCR을 수행하였다. PCR 반응은 intron사의 i-star Taq PCR kit을 사용하였으며 DNA 5 µl primer는 10 pM 농도로 2쌍 첨가하고 3차 멸균 증류수로 최종 반응용액을 20 µl로 조절하였다. 또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94ºC에서 5분간 predenaturation을 실시한 후, 94ºC에서 30초간 denaturation, 55ºC에서 2분간 primer annealing, 72ºC에서 1.5분간 extension의 조건으로 30cycle을 수행하고, final extension을 72ºC에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다. 대조군으로는 *Bacillus cereus* ATCC 10876와 *Bacillus thuringenesis* ATCC 29730을 사용하였다.

통계 처리

미생물 균수는 log colony forming unit(CFU)/m1, 100 cm^2, g, hand으로 나타내었으며, 토양과 상추의 결과에 대해서는 SPSS 통계처리 프로그램 version 11을 사용하여 ANOVA와 Ducan's multiple range test를 $\alpha = 0.05$에서 유의성을 검증하였다.

Table 2. Populations of microorganisms in irrigation water, medium, and lettuce during the seedling stage

(Unit : log CFU/m1, g)

Sample	Microorganism			
	APC	Coliform	*E. coli*	*B. cereus*
Seed	N.D.[1)]	N.D.	N.D.	N.D.
Irrigation water	1.43 ± 0.40	N.D.	N.D.	N.D.
Medium (Before using)	4.85 ± 1.05	1.26 ± 1.44	0.36 ± 0.88	1.41 ± 0.72
Medium(Using)	5.86 ± 0.64	1.73 ± 1.90	1.02 ± 1.16	2.99 ± 0.15
Lettuce	4.88 ± 0.54	1.47 ± 1.62	1.31 ± 1.43	1.96 ± 0.31

[1)] N.D.: Not detected (Detection limit: irrigation water: < 1 CFU/m1, other samples: < 10 CFU/g)

결과 및 고찰

상추 재배단계의 미생물 분포

상추 재배단계의 위생지표세균과 병원성미생물의 분포를 조사한 결과 Table 2, 3, 4에서 보는 바와 같다. 육묘단계

Table 3. Populations of microorganisms in agricultural materials and irrigation water collected from lettuce farms

(Unit : log CFU/m1, g)

Sample	Microorganism			
	APC	Coliform	*E. coli*	*B. cereus*
Compost	6.21 ± 0.53	1.34 ± 1.52	N.D.[1)]	1.20 ± 0.80
Liquid fertilizer	8.36 ± 0.33	N.D.	N.D.	N.D.
Irrigation water[2)] (10 days after transplanting)	4.38 ± 0.35[a]	N.D.[a]	N.D.	N.D.
Irrigation water (22 days after transplanting)	4.75 ± 0.12[ab]	1.20 ± 0.85[b]	N.D.	N.D.
Irrigation water (62 days after transplanting)	5.74 ± 0.20[b]	1.38 ± 1.02[b]	N.D.	N.D.

[1)] N.D.: Not detected (Detection limit: liquid fertilizer and irrigation water: < 1 CFU/m1, compost: < 10 CFU/g)
[2)] Irrigation water was collected three times from transplanting to last harvest

Table 4. Populations of microorganisms in soil and lettuce from transplanting to 62 days after transplanting

(Unit : log CFU/m1, g, 100 cm^2, hand)

Sample	Stage	Microorganism			
		APC	Coliform	*E. coli*	*B. cereus*
Soil	Before planting	6.46 ± 0.34[a]	3.04 ± 0.30[a]	1.15 ± 0.53[a]	3.48 ± 0.21[a]
	10 days after transplanting	6.55 ± 0.34[a]	2.96 ± 0.65[a]	1.00 ± 0.80[a]	3.58 ± 0.27[a]
	22 days after transplanting	6.60 ± 0.30[a]	3.23 ± 0.20[a]	1.56 ± 0.33[a]	3.46 ± 0.33[a]
	62 days after transplanting	7.30 ± 0.53[b]	3.77 ± 0.69[a]	1.62 ± 0.25[a]	3.54 ± 0.33[a]
Lettuce	10 days after transplanting	5.37 ± 0.28[b]	2.87 ± 0.24[b]	1.00 ± 0.74[b]	1.94 ± 0.30[b]
	22 days after transplanting	5.53 ± 0.15[b]	2.16 ± 0.42[ab]	N.D.[a1)]	1.88 ± 0.39[b]
	62 days after transplanting	4.18 ± 0.18[a]	1.00 ± 0.92[a]	N.D.[a]	N.D.[a]

[1)] N.D.: Not detected (Detection limit: < 10 CFU/g)
[2)] Values with same letter in a column are not significantly different at 5% levels of Duncan's multiple range test

의 미생물 분석결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 상추의 육묘단계에서 사용하는 상토에서 일반세균수 5.86 log CFU/g, *B. cereus* 2.99 log CFU/g으로 사용전의 상토에 비하여 약 10배 정도 증가하였다. 상추는 상토에 파종 후 관수하고 25ºC~30ºC에서 재배되기 때문에 이 과정 중에 상토의 미생물이 증식된 것으로 판단된다. 종자에서는 세균이 검출되지 않았는데 이는 본 연구에 사용된 종자는 소독제로 코팅된 것으로 종자코팅에 의해 미생물이 종자에 접촉하는 것을 방지되었고 소독제에 의해 미생물이 사멸된 것으로 추정된다. 상추에서는 일반세균수 4.88 log CFU/g, *B. cereus* 1.96 log CFU/g가 검출되었으며 검출된 세균의 종류가 상토와 일치하였다. 상추의 재배과정에 사용되는 퇴비의 일반세균수는 6.21 log CFU/g, 대장균군 1.34 log CFU/g이었으며 *B. cereus*는 1.20 log CFU/g이었다. 또한 액비는 일반세균수가 8.36 log CFU/ml로 높게 검출되었지만 병원성미생물은 검출되지 않았다(Table 3). 재배단계의 관개용수의 일반세균수는 4.00 log CFU/ml 이상이었으며 시간이 경과하면서 세균의 수도 유의하게 증가하여 정식 후 62일째는 5.74 log CFU/ml이었다. 또한 토양의 세균수는 정식전에 6.46 log CFU/g이었고 재배기간이 경과함에 따라 약 1.0 log CFU/g 증가하였으나 대장균군, 대장균, *B. cereus*의 수는 재배기간에 관계없이 일정한 수준을 유지하고 있었다(Table 4). 상추의 경우, 정식 후 10일부터 첫 수확기인 정식 후 22일까지 일반세균수의 변화는 거의 없었고 *B. cereus*도 약 2.0 log CFU/g 수준을 유지하였다. 한편 상추가 토양으로부터의 거리가 40 cm이상 멀어지는 정식 후 62일엔 일반세균수가 1.35 log CFU/g 감소한 4.18 log CFU/g이었다. *E. coli*, *B. cereus*는 검출되지 않았다. 토양에서 거리가 멀어지면 상추의 미생물의 수가 감소하는 것을 통해 볼 때 상추의 재배과정 중 오염은 육묘단계에서 시작되고 주요한 오염원은 토양과 상토로 추정된다. 한편, 상추 재배단계에서 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*는 검출되지 않았다(data not shown).

본 연구의 결과를 통해 볼 때 상토와 토양 오염은 작물에 직접적인 영향을 미침을 알 수 있고 이는 다른 연구자의 결과에서도 확인할 수 있다. Islam 등[15]의 연구에서 토양에 *E. coli* O157:H7을 오염시킨 후 생존기간을 조사한 결과 196일까지 생존하였다고 보고하여 병원성 미생물이 오랜 기간동안 토양내에 생존할 수 있음을 알 수 있다. 또한 Oliveria 등[16]에 따르면 *L. innocua*의 경우 토양 속에서 총 실험 기간인 9주 동안 계속 생존하고 있었으며 *L. innocua*로 오염된 토양에 이식한 상추에서도 *L. innocua*가 발견되어 토양 중 유해미생물은 작물로 이행 될 수 있음을 확인하였다. Solomon[17]의 연구에서는 토양을 인위적으로 *E. coli*로 오염시키고 상추를 심었을 때 *E. coli*는 작물 외부 뿐만 아니라 root system을 통해 작물로 내부로 들어와서 가식부위까지 이동한다고 보고하였다. 따라서 토양 중 유해미생물은 작물 오염에 크게 영향을 끼치므로 오염된 토양에 의한 작물로 이행을 예방하는 것이 필요하다. 병원성 미생물의 토양 유입을 차단하기 위해서는 우선 퇴비는 완전하게 부숙된 것을 사용하고 야생동물의 출입을 차단하는 것이 필요하다. 본 연구에서 검출된 *B. cereus*는 포자를 형성하기 때문에 토양 내에서 제어하기는 어렵다. 이 균의 오염을 예방하기 위해서는 멀칭을 통하여 토양과 접촉을 최소화하는 것이 효과적이다.

본 연구에서는 관개용수에서 병원성미생물은 검출되지 않았지만 관개용수의 안전성 확보는 안전 농산물 생산을 위해 중요하다. Solomon[18]은 실험실에서 인위적으로 관개용수를 *E. coli* O157:H7을 오염시킨 후 상추에 살포하였더니 세척 후에도 *E. coli* O157:H7이 발견되었다. 또한 Oliveria 등[16]은 *L. innocua* 7.0 log CFU/ml 수준으로 오염된 관개용수로 지표면관수법과 살수관수법으로 상추에 물을 주고 상추에 전이된 *L. innocua*의 농도는 각각 1.4 log CFU/g, 4.9 log CFU/g였다고 보고하였다. 이는 관수법에 따라 미생물의 전이율이 현저하게 차이가 나는 것을 알 수 있다. 현재 농가에서 주로 살수관수법을 사용하고 있는데 미지표면관수법이나 점적관수법을 사용하는 것이 안전성 측면에서 바람직할 것으로 보인다.

상추의 수확~수확 후 단계의 미생물 분포

수확과정 중 작업자장갑, 수확용기, 수확 전 후의 상추를 대상으로 미생물 오염도를 조사한 결과, 작업자장갑, 수확 전 후의 상추에서 일반세균수가 각각 5.94 log CFU/hand, 5.37 log CFU/g, 5.61 log CFU/g이었고 *B. cereus*는 1.66~1.97 log CFU/g로 시료 간 세균수의 차이는 없었고 병원성미생물인 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*는 검출되지 않았다(data not shown).

수확 후 환경과 상추에 대한 미생물학적 오염도를 조사한 결과(Table 5), 포장지와 작업자 손을 제외한 시료에서 일반세균수 4.00 log CFU/g, 100 cm^2이상, 대장균군 2.50 log CFU/g, 100 cm^2이상 검출되었고 상추와 직접 접촉하는 시료에서 *B. cereus*가 검출되었다. 특히 작업자의 장갑에서 일반세균수 6.34 log CFU/hand, 대장균군 3.94 log CFU/hand, *E. coli* 3.49 log CFU/hand로 타 시료에 비하여 균수가 높았다. 이는 상추가 입고된 후 포장과정까지 저울 1회, 컨베이어벨트 1회를 통과하지만 작업자의 장갑은 5-6회 정도 접촉하기 때문에 상대적으로 타 시료에 비하여 접촉 빈도가 높은데서 기인된 것으로 사료된다. 한편 작업자의 손에서 *S. aureus*가 검출되었지만 장갑 착용으로 상추로 전이될 가능성은 낮다고 보여진다(data not shown). Perez-rodriguez[19] 등의 연구에서 맨손으로 작업한 후 손을 씻는 것 보다 장갑을 착용하고 식품을 핸들링하는 것이 교차오염 예방에 훨씬 더 효과적이라고 보고하였다. Kim 등[20,21]이 수행한 들깻잎과 토마토의 생산 환경에서 미생물오염도를 조사한 결

Table 5. Populations of microorganisms in the samples collected from post harvest facility

(Unit : log CFU/ml, g, 100 cm^2, hand)

Sample	Microorganism			
	APC	Coliform	*E. coli*	*B. cereus*
Balance	5.42 ± 1.09	2.65 ± 0.58	1.62 ± 0.54	2.59 ± 1.43
Conveyer	5.79 ± 0.51	2.68 ± 0.03	1.44 ± 1.26	2.16 ± 1.25
Packing plastic bag	1.16 ± 0.28	N.D.[1)]	N.D.	N.D.
Hands	4.82 ± 0.35	0.90 ± 0.85	N.D.	N.D.
Gloves	6.34 ± 0.58	3.94 ± 0.31	3.49 ± 0.42	2.53 ± 0.60
Lettuce (Before packing)	5.30 ± 0.18	2.80 ± 0.63	1.77 ± 0.68	1.81 ± 0.87
Lettuce (After packing)	5.69 ± 0.04	3.23 ± 0.20	1.49 ± 0.85	2.22 ± 0.58

[1)] N.D.: Not detected (Detection limit: < 10 CFU/g, 100 cm^2, hand)

과에서도 작업자의 손이나 장갑에서 일반세균수가 타 시료에 비하여 높게 검출되었고 *S. aureus*도 검출되어 본 연구와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 작업자의 손이나 장갑에 의한 교차오염을 예방하기 위해서는 작업자를 대상으로 한 주기적인 위생교육이 필요하고 작업 전 후로 손을 씻고 소독하는 행위와 장갑의 착용이 필수적이다. 또한 장갑은 자주 교체하는 것도 작업자에 의한 오염을 예방하는 중요한 방법이라 생각된다.

저울과 컨베이어벨트에서 일반세균수 5.42 log CFU/100 cm^2, 대장균군 2.65 log CFU/100 cm^2, *B. cereus* 2.16 log CFU/100 cm^2이상 검출되었다. Kim 등[20)]이 수행한 들깻잎의 수확 후 처리시설 내의 포장대에서도 일반세균수가 약 5.00 log CFU/100 cm^2였고 대장균군은 2.52 log CFU/100 cm^2, *B. cereus*는 2.00 log CFU/100 cm^2 내외로 본 연구와 비슷한 수준이었다. Ryu 등[22)]에 의하면 stainless steel 표면에 *B. cereus*가 오염되어 있을 때 영양세포는 상대습도 85%이하에서는 하루만에 3.0 log CFU/10 cm^2가 사멸하지만 포자의 경우 실험기간인 6일 동안 초기농도를 그대로 유지하고 있었다. 그러나 *B. cereus*는 200 ppm chlorine을 3분 이상 처리 했을 때 영양세포와 포자가 동시에 사멸하는 것을 확인하였다. 따라서 수확 후 처리시설에서는 작업 후에 세척, 소독을 통하여 미생물을 제거할 수 있으며 이를 통하여 상추로 전이되는 것을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

상추의 미생물 수준은 포장 전과 후에 큰 차이는 없었고 *B. cereus*외에 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7은 검출되지 않았다(data not shown). 이는 그동안의 다른 연구자의 결과와 상이한 것으로 수확 후 처리 시설로 입고된 상추의 세균수와 수확 후 시설 내부 환경에서 검출되는 세균수의 농도가 큰 차이가 없어서 미생물 수에 영향이 없는 것처럼 나타났다. 하지만 Johnston[23)] 등과 Ailes[24)] 등 연구에서는 수확 당시보다 수확 후 세척, 포장 절차를 마친 농산물에서 일반세균수와 대장균군의 농도가 유의하게 증가하는 것으로 나타나 오염된 수확 후 처리 환경은 농산물의 안전성에 직접적인 영향을 끼칠 수 있음을 보고하였다. 따라서 상추의 미생물 안전성 확보를 위해서는 육묘 단계부터 수확 후 단계에 이르기까지 각 단계에서 발생할 수 있는 위해를 최소화하는 것이 중요하다. 농산물 생산 전 단계에 발생할 수 있는 위해를 관리하는 제도가 바로 농산물우수관리제도(GAP)이다. 상추의 안전성 확보와 소비자 신뢰를 구축하기 위해서는 이 제도의 정착과 활성화가 필요하다.

요 약

본 연구는 상추를 대상으로 재배~수확 후 단계의 미생물학적 안전성을 평가하고자 이천지역 상추농가와 수확 후 처리시설에서 위생지표세균(일반세균수, 대장균군, *E. coli*)과 병원성미생물(*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*)을 조사하였다. 상추 생산과정의 미생물 오염도 조사 결과, 대부분의 시료에서 일반세균수 수준은 4.0 log CFU/(ml, g, 100 cm^2, hand)이었다. 또한 수확 후 처리시설에서 사용되는 장갑에서 *E. coli*가 3.5 log CFU/hand로 비교적 높게 검출되었고, *B. cereus*는 토양과 저울에서 각각 3.5 log CFU/g, 2.6 log CFU/100 cm^2로 타 시료에 비해 높았다. 특히 정식 후 10일 째 상추의 일반세균수, 대장균군수 및 *B. cereus*의 오염수준이 정식 후 62일째 상추 보다 각각 1.19, 1.87, and 1.94 log CFU/g 정도 높은 것으로 나타났다. 한편 *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp, 및 *L. monocytogenes*은 검출되지 않았다. 본 연구의 결과를 통하여 상추의 유해미생물 오염은 생산단계부터 발생되고 있음이 확인되었고 이러한 유해미생물의 오염을 사전에 관리하기 위해서는 생산에서부터 소비까지 위해요소를 관리하는 시스템의 도입이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업인 농식품중 유해미생물안전관리기반기술 개발(과제번호: PJ007614)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. 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. and Ha, S.D.: Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *Korean J. Fd. Hyg. Safety*, **20**, 43-47 (2005).
2. FDA: Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Leafy Greens; Draft Guidance Available from: http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm174200.htm Accessed January **15**, 2010 (2009).
3. CDC: Update on Multi-State Outbreak of *E.coli*O157:H7 Infections From Fresh Spinach, October 6, 2006. Available from:http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100-606.htm Accessed Febrary **20**, 2010 (2006).
4. Patel, J. and Sharma, M.: Differences in attachment of *Salmonella enteric* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.*, **139**, 41-47 (2010).
5. KFDA: Analysis on the trend of food-poising over the last 5 years. Available from: http://www.foodnara.go.kr/portal/site/kfdaportal/template. Accessed Aug. 25, (2010).
6. Sewell, A.M., and Farber, J.M.: Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *J. Food Prot.*, **64**, 1863-1877 (2001).
7. Beuchat, L.R.: Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.*, **4**, 413-423 (2002).
8. FDA: Guidance for industry, Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables. Available From: http://csan.fda.gov. Accessed Oct. 26, (2005).
9. Burnett, S.L. and Beuchat, L.R.: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. *J. Int. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 104-110 (2001).
10. Kim, S.Y.: Indication system for the verification in agricultural food safety. In: *Symposium on GAP application strategy for the safety agricultural production*. July 29, Gyeongsang National University, Jinju, Korea. The Center of Agri-food Safty. Jinju, Korea pp.23-42 (2004).
11. Sveum, W.H., Moberg, L.J., Rude, R.A. and Frank, J.F.: *Microbiological monitoring of the food processing environment*. 3rd ed. American Public Health Association, Washington D.C., USA. pp. 51-74 (1992).
12. Anonymous: Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). *Fed. Regist.* **43**, 1242-1243 (1978).
13. KFDA: *Korean Food code*. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp.75-105 (2002).
14. Choo, E.Y., Jang, S.S., Kim, K.S., Lee, K.G., Heu, S.G. and Ryu, S.R.: Prevlence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *J. Food Prot.*, **70**, 917-922 (2007).
15. Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiol.*, **22**, 63-70 (2005).
16. Oliveira, M., Usall, J., Vinas, I., Solsona, C. and Abadias M.: Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiol.,* **28**, 590-596 (2011).
17. Solomon, E.B., Yaron, S. and Mattews, K.R.: Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 397-400 (2002).
18. Solomon, E.B., Potenski, C.J. and Mattews K.R.: Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J. Food. Prot.*, **65**, 673-676 (2002).
19. Perez-Rodriguez, F., Todd, E.C.D., Valero, A., Carrasco, E., Garcia, R.M., and Zurera, G.: Linking quantitative exposure assessment and risk management using the food safety objective concept: an example with *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios. *J. Food Prot.*, **69**, 2384-2394 (2006).
20. Kim, S.R., Lee, J.Y., Lee, S.H., Ko, H.S., Yoon, Y.H., Kwon, S.H., Ryu, K.Y., Yun, H.J., Kim, W.I., Yun, J.C., Kim, D.H. and Chung, D.H.: Distribution of Hazardous Microorganisms in Perilla Leaf Cultivation Areas. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **43**, 243-248 (2001).
21. Kim, J.S., Shim, W.B., Kim, J.H., Kim, S.B. and Chung D.H.: Sanitary microbial distribution at the tomato farms in western Gyeongnam. *Korean J. Env. Hlth.*, **32**, 77-88 (2006).
22. Ryu, J.H. and Beuchat, L.R.: Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyactic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.*, **68**, 2614-2622 (2005).
23. Johnston, L.M., Jaykus, L.A., Moll, D., Martinez, M.C., Anciso, J., Mora, B. and Moe, C.L.: A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.*, **68**, 1840-1847 (2005).
24. Ailes, E.C., Leon, J.S. Jaykus, L.A., Johnston, L.M., Clayton, H.A., Blanding, S., Kleinbaum, D.G., Backer, L.C., and Moe, C.L.: Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. *J. Food Prot.*, **71**, 2389-2397 (2008).