

연구과제 최종보고서

과 제 명	농산물 발생 병원성미생물(식중독균)의 특성 규명 연구				
총연구기간	2017년 1월~2018년 12월	당해연도 연구기간	2018년 1월~2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 안전성분석과 (자체)	연구 책임자	구분	직위	성명
			정	과 장	김동호
			부	주무관	김성연
		참여 연구원	직위		성명
			팀장		문지영
			주무관		김민주
			주무관		김종찬
			연구원		서동연
참여부서					
사업구분	단년도 () 다년도 (√)	총 (2)개년 중 (2)차 연도			
연구결과 요약	<p>○ 생식으로 섭취하는 채소류 등에서 주로 발생하는 병원성미생물(식중독균)에 대한 특성을 규명하기 위해서 농산물 및 재배환경(토양, 용수 등)으로부터 <i>B. cereus</i>(73주), <i>E. coli</i>(67주), <i>Sal. enterica</i>(4주), <i>S. aureus</i>(8주)의 4종 152주를 분리하였음</p> <p>○ 농산물에서의 식중독균 오염원 파악을 위하여 독소 유전자 유형별로 검출하여 분류하였으며, 분리된 50주 <i>E. coli</i>는 총 26제 중 14제의 항생제에 대한 내성이 발견되어 항생제 내성균 발생실태 파악을 위한 기초 자료를 확보</p> <p>○ 농산물과 재배환경에서 분리된 균주에 대한 DB 추적 및 미생물 유전체 정보의 자원화를 통하여 농산물 안전 관리체계 구축과 농산물 관련 식중독 사고에 대한 예방대책 수립에 활용</p>				

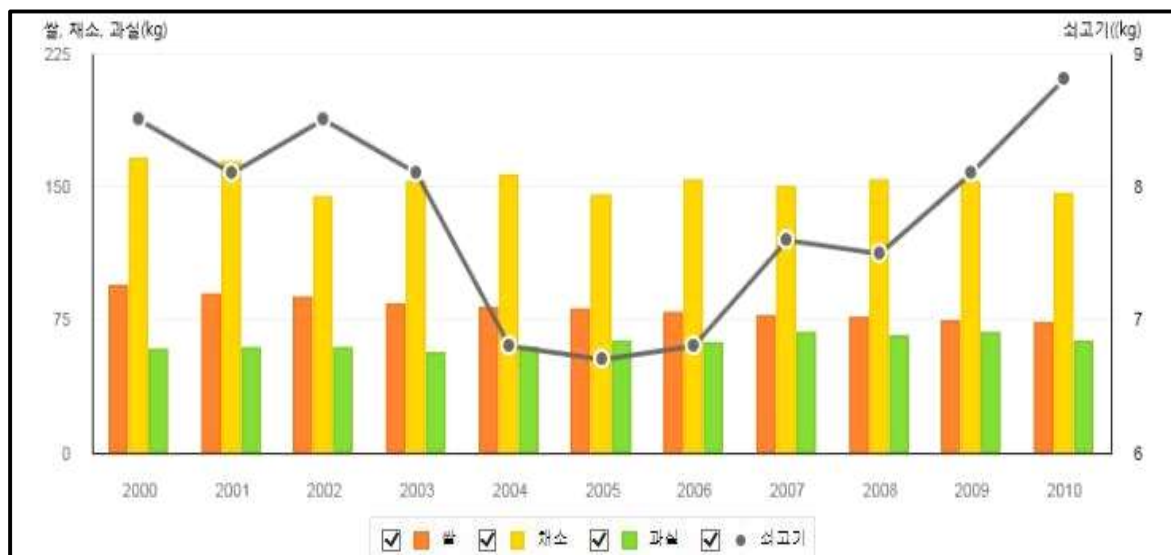
농산물 발생 병원성미생물(식중독균)의 특성 규명 연구

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

국내의 신선 채소류 등 농산물 수요 및 엽채류·과실류에 대한 1인당 소비량이 증가하는 추세이다. 농산물의 경우 병원성미생물이 육류 등에 비해 상대적으로 적음에도 불구하고, 별도의 가열조리 없이 섭취되어 높은 위해도를 가지므로 농산물에서 병원성미생물 안전관리의 중요성이 부각되고 있다.

<국내 주요 농산물 1인당 연간 소비량(2015 농림축산식품부 작물통계)>



농산물과 관련된 식중독사고의 원인이 되는 병원성미생물 오염은 재배단계에서 유통과정에 이르는 전 단계에서 일어날 수 있으며, 특히 생산현장에서 토양이나 오염된 용수, 비위생적인 수확 후 환경 및 작업자는 직접적인 오염원이 될 수 있어 주의가 요구된다. 식중독 원인균으로는 *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* 등이 있으며, 오염된 식중독균의 특성을 규명하기 위해서 다양한 환경과 숙주에서 분리된 균주의 분포와 분자유전학적 분석을 통한 독소 유형의 분석은 농산물 위해

평가의 근거 자료를 마련하는 안전관리 측면에서 필요하다.

※ 제외국은 식중독 원인균 DB 시스템 운영 현황

유럽-EnterNet, 미국-Pulse-Net, Food-Net, 호주-OzFoodNet, 아시아-태평양-Pulse-Net 등

그리고 최근 가축의 사육과 수산양식 및 농작물을 재배하는 농장에서 질병 예방과 성장 촉진을 목적으로 많은 항생제를 사용하고 있다. 이로 인하여 농축산물에서 분리된 균주들도 항생제 저항성을 보이고 있어 항생제 내성은 의약계만의 문제가 아니다. 농산물에서의 항생제 내성균의 출현을 우려하는 이유는 농업 현장에서 분포하는 세균이 항생제 내성을 갖게 되면 인간에게 감염을 일으키는 세균에게 내성 유전자를 전달할 수 있기 때문이다. 이러한 항생제 내성 문제에 대응하기 위해서는 무엇보다도 먼저 항생제 내성균의 발생실태 파악이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 농산물 및 재배환경(토양, 용수 등)에서 유래된 병원성 미생물에 대한 분리·동정을 통하여 독소 생성 유전자 등 유전적 특성을 분석하고 항생제 내성 실태를 조사하여 농산물 안전관리를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

나. 연구목표

- 1) 생식으로 섭취하는 채소류 등에서 주로 발생하는 병원성미생물(식중독균)에 대한 특성을 규명하기 위해서 다양한 환경과 숙주에서 균주의 분포 및 분리·동정
- 2) 분자유전학적 분석을 통한 독소 유형별 검출 및 분류를 실시하여 농산물에서의 식중독균 오염원 파악
- 3) 항생제 내성균 발생실태 파악으로 사전 예방적 안전관리 자료 확보
- 4) 농산물과 재배환경(토양, 용수 등)에서 분리된 균주에 대한 DB 축적으로 미생물 유전체 정보의 자원화

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

- 1) 병원성미생물의 분리 및 동정

농산물 및 재배환경(토양, 용수 등)으로부터 *B. cereus*(57주), *E. coli*(50주), *Sal. enterica*(4주), *S. aureus*(8주)의 4종 119개 균주를 분리하여 본 연구에 사용하였다.

각 미생물의 분석은 식품공전의 미생물시험법을 준용하였으며, 분리된 집락은 VITEK 2 Compact (BioMerieux, France)를 사용하여 최종 동정하였다. 분리된 균주는 Microbank cryogenic vials (Pro-Lab Diagnostics, Canada)에 넣어 -70℃ deep freezer에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

2) DNA 추출

분리 동정된 균주는 Nutrient agar(NA: Oxoid) 배지에 도말한 후 37℃에서 18~24시간 배양하고 배양된 집락은 200 μ l 멸균 증류수에 부유 시켰다. 95℃에서 10분 이상 가열하고 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 template DNA로 사용하였다.

3) 병원성대장균 유전자 분석

병원성대장균은 대장균이라는 동일 종(Species) 내에 병원성 인자의 보유 유무에 따라 일반적인 비병원성대장균과 병원성대장균으로 구분할 수 있다. 병원성 대장균의 감염기작에 따른 5개 분류에 따라 특징적인 병원성 유전자를 확인할 수 있다. 현재까지 제외국 검사기관 등에서 사용하고 있는 다양한 병원성 인자는 표 1과 같다.

<표 1. 병원성대장균별 병원성인자 검출 대상>

(출처 : Methods for detection and molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli*)

Pathotype	Target Gene
장병원성 대장균 : EPEC (Enteropathogenic <i>E. coli</i>)	<u>bfpA</u> (+) or <u>eaeA</u> (+), uidA(+) and vtx(-)
장독소성 대장균 : ETEC (Enterotoxigenic <i>E. coli</i>)	<u>ST</u> (+) and/or <u>LT</u> (+)
장침습성 대장균 : EIEC (Enteroinvasive <i>E. coli</i>)	inV(+) or <u>ipaH</u> (+)
장흡착성 대장균 : EAEC (Enteraggregative <i>E. coli</i>)	<u>aggR</u> (+) or aap(+) or aaiA(+) or EAST1(astA)
장출혈성 대장균 : EHEC (Enterhemorrhagic <i>E. coli</i>)	<u>vtx1</u> and/or <u>vtx2</u> and/or eae(+)

PowerChek™ Diarrheal *E. coli* 4-plex Real-time PCR Kit I 과 Kit II (Kogene biotech, Korea)를 사용하여 multiplex 방법으로 8가지 병원성 *E. coli* 유전자(LT, ST, VT1, VT2, bfpA, eaeA, aggR, ipaH) 여부를 분석하였다.

분석 키트의 반응액 조성은 premix solution 15 μ l, template DNA 5 μ l로 total volume 20 μ l로 하여, 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 50°C/2분, 95°C/10분으로 가열한 후, 95°C/15초, 60°C/1분간 반응하였고, 이를 40번 반복하여 반응시켰다.

4) 바실러스 세레우스 병원성 유전자 분석

*B. cereus*는 구토 혹은 설사를 일으키는 독소형 식중독 세균으로 알려져 있다. *B. cereus*에 의한 설사형 식중독은 *B. cereus*가 소장에서 증식하는 동안 생성되는 장독소(enterotoxin)에 의해 유발되며, 구토형 식중독은 emetic toxin과 균 증식 대사산물인 cereulide가 원인이 된다. 구토를 유발하는 독소는 저분자 펩타이드로 126°C로 90분간 가열하여도 파괴되지 않는 열 저항성과 산, 알칼리, 단백질 가수 분해효소에도 저항성을 가지고 있다. *B. cereus*에서 5개의 설사형 독소와 구토형 독소를 검출하기 위한 대상 유전자는 표 2와 같다.

<표 2. 바실러스 세레우스 생성 독소별 검출 대상>

Type of syndrome	Toxin	Target Gene
Diarrhea	Haemolysin BL(HBL)	hblA, <u>hblC</u> , hblD
	non-haemolytic enterotoxin(NHE)	<u>nheA</u> , nheB, nheC
	Cytotoxin K(CytK)	<u>cytK</u>
	Enterotoxin T(BceT)	<u>bceT</u>
	Enterotoxin FM(EntFM)	<u>entFM</u>
Emetic	Emetic toxin(EM)	EM
	Cereulide	<u>CER</u>

PowerChek™ *Bacillus cereus* Toxin ID Real-time PCR Kit(Kogene biotech, Korea)를 사용하여 multiplex 방법으로 6가지 병원성 *B. cereus* 유전자(CER, hblC, bceT, entFM, nheA, cytK) 여부를 분석하였다.

분석 키트의 반응액 조성은 premix solution 10 μ l, primer/probe mixture 5 μ l, template DNA 5 μ l로 total volume 20 μ l로 하여, 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 2. 가. 3) 병원성대장균 분석과 동일하다.

5) 항생제 감수성 시험

분리 동정된 *E. coli* 균주에 대해서 NA 배지에서 37℃, 18~24시간 배양 후 0.45% sodium chloride 용액 3 mL에 0.6 MacFarland로 탁도를 맞춘 후 시험 균액 145 μ l를 새로 준비된 0.45% sodium chloride 용액 3 mL에 혼합하여 균의 탁도를 조절하였다. 탁도를 맞춘 시험 균액은 VITEK 2 AST-N169 및 N211 test kit (BioMerieux, France)를 사용하여 항생제 감수성 검사를 하였다.

사용된 항생제는 cefazolin, ciprofloxacin, ESBL, nalidixic acid, ampicillin/sulbataM, gentamicin, imipenem, tetracycline, ceftazidime, cefepime, ceftazidime, etapenem, levofloxacin, meropenem, piperacillin/tazobactam과 tigecycline 26종이었으며, 검사 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011)에 따라 판정하였다.

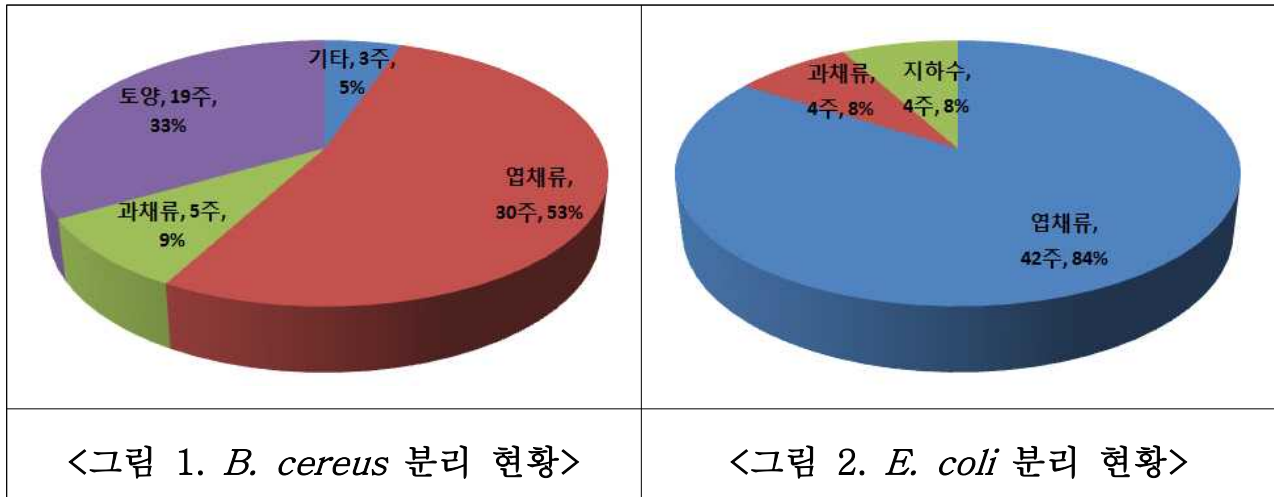
3. 결과 및 고찰

가. 농산물 및 재배환경에서 미생물 분리

농산물 및 재배환경(토양, 용수 등)으로부터 *B. cereus*(73주), *E. coli*(67주), *Sal. enterica*(4주), *S. aureus*(8주)의 4종 152주를 분리하였다.

균주명	분리균수
<i>Bacillus cereus</i>	73
<i>Escherichia coli</i>	67
<i>Salmonella enterica</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
계	152

*B. cereus*의 경우 상추, 배추 등 농산물 유래의 균주가 38주 검출되고 토양에서 19주가 분리되었으며, *E. coli*는 상추, 들깻잎 등 농산물 유래의 균주가 46주, 지하수에서 4주가 분리되었다.

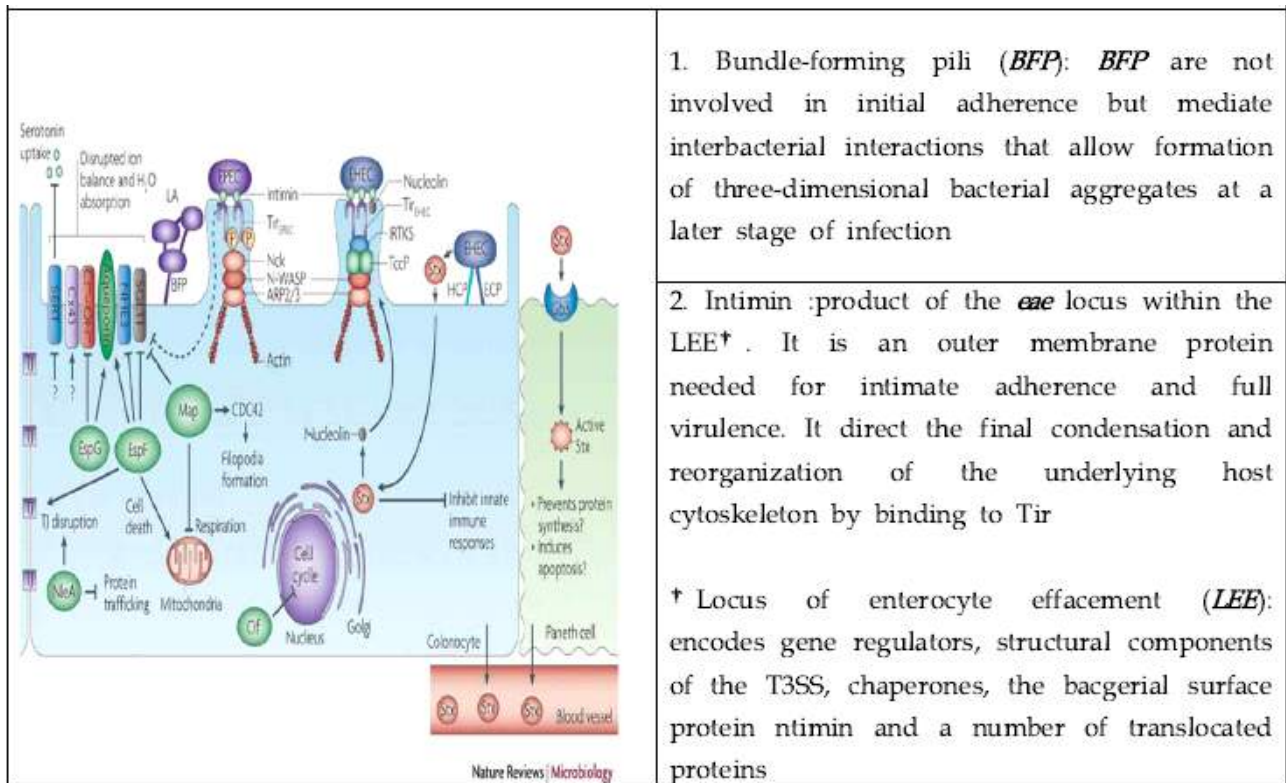


*S. enterica*의 경우 새싹채소에서 4주가 분리되었으며, *S. aureus*는 농산물 2주, 용수 4주, 토양에서 2주가 분리되었다.

나. 병원성대장균 유전자 분석 결과

분리된 50주 *E. coli*의 병원성 여부를 유전자 분석 결과, 깻잎 유래 1주에서 *eaeA*, *bfpA*의 유전자가 동시에 검출되고 VT1, VT2는 검출되지 않아 장병원성 대장균(EPEC)의 특성을 나타내었다. EPEC는 장상피 세포에 부착하여 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다<그림 3>.

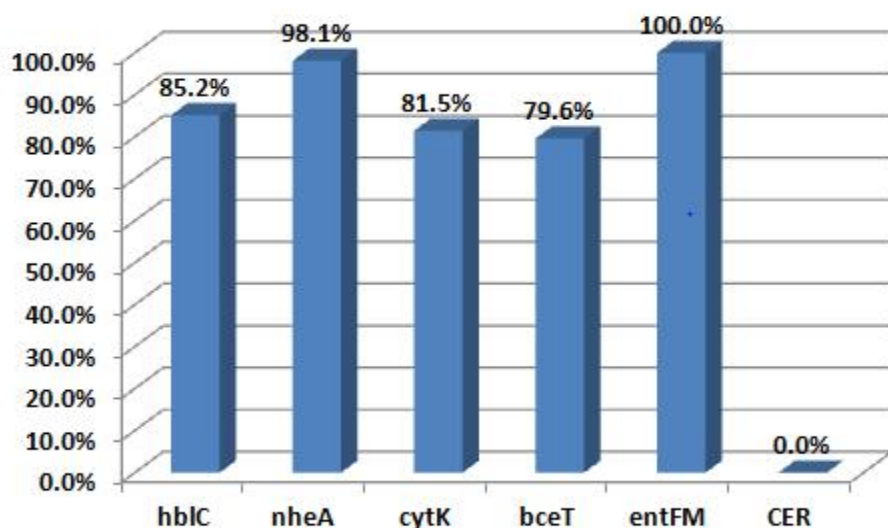
그 외 49주 *E. coli*는 8가지 병원성 유전자(LT, ST, VT1, VT2, *bfpA*, *eaeA*, *aggR*, *ipaH*)가 모두 검출되지 않았다.



<그림 3. EPEC의 특성>

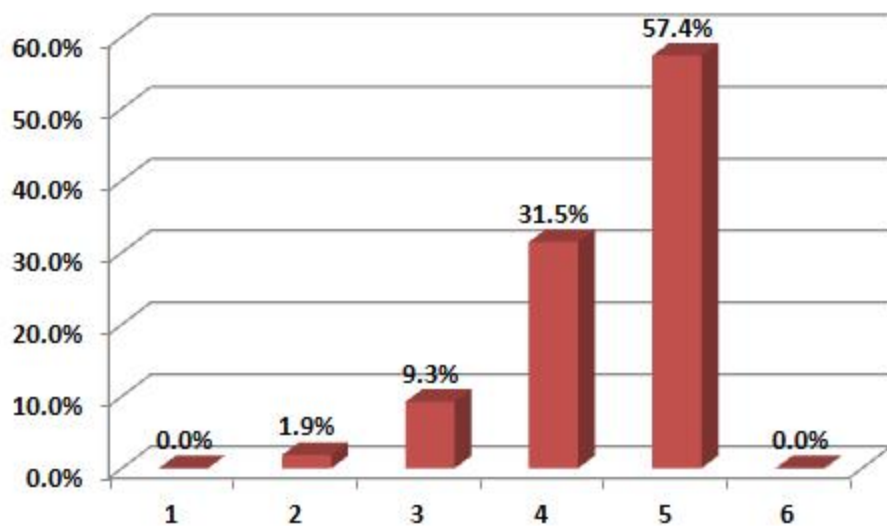
다. 바실러스 세레우스 병원성 유전자 분석 결과

*B. cereus*가 생성하는 6가지 독소 유전자(CER, hblC, bceT, entFM, nheA, cytK) 검출 비율은 그림 4와 같다. 설사형 독소인 entFM은 모든 균주에서 검출되었고, nheA 98.1%, hblC 85.2%, cytK 81.5%, bceT 79.6%로 검출되었으며, 구토형 독소인 CER은 모든 균주에서 검출되지 않는 것으로 나타났다.



<그림 4. *B. cereus* 독소 유전자별 검출율>

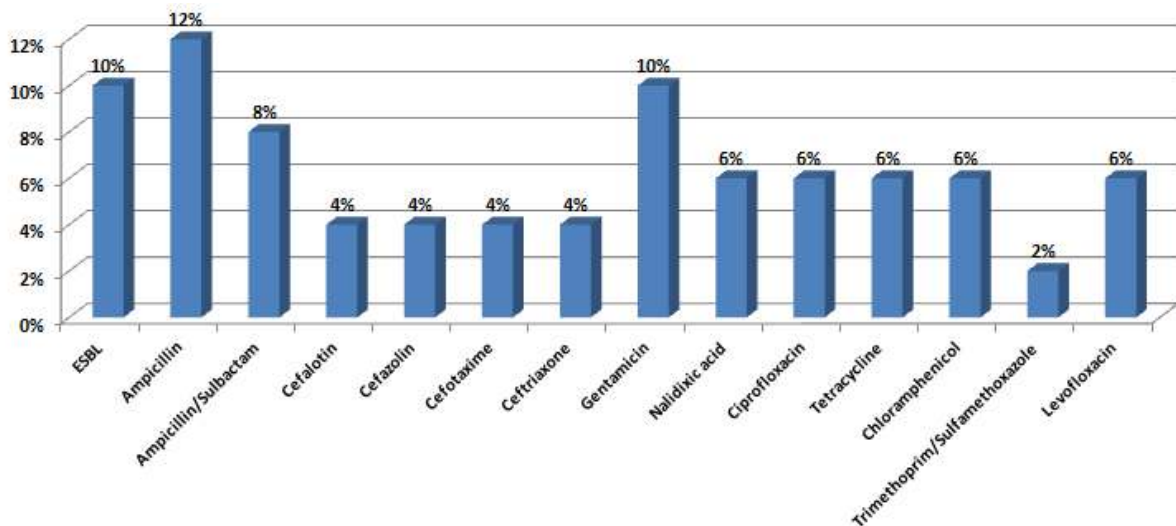
*B. cereus*가 생성하는 6가지 독소 유전자를 모두 보유하는 균주는 없었고, 5가지 유전자 보유 균주가 57.4%로 가장 높은 빈도를 나타냈다. 모든 균주는 설사형 독소 유전자를 2가지 이상 보유하는 것으로 나타났으며, 유전자 검출의 지역별, 농산물과 재배환경 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.



<그림 5. *B. cereus* 독소 검출 유형별 분류>

라. *E. coli*의 항생제 내성 결과

분리된 50주 *E. coli*의 항생제 내성 비율은 그림 6과 같다. 총 26제의 항생제에 대하여 14종의 항생제에 대한 내성이 발견되었으며, 각 항생제 별 로는 Ampicillin 12%, ESBL 10%, Gentamicin 10%, Ampicillin/Sulbactam 8%, Nalidixic acid 6%, Ciprofloxacin 6%, Tetracycline 6%, Chloramphenicol 6%, Levofloxacin 6%, Cefalotin 4%, Cefazolin 4%, Cefotaxime 4%, Ceftriaxone 4%, Trimethoprim/Sulfamethoxazole 2%로 나타났다.



<그림 6. 분리된 *E. coli*에 대한 항생제별 내성률>

반면 12종의 항생제 Amikacin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Aztreonam, Cefepime, Cefotetan, Cefoxitin, Ceftazidime, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Piperacillin/Tazobactam, Tigecycline는 모든 균주에서 100% 감수성을 나타내었다.

항생제 내성을 나타내는 균주는 9주(18%)로 그 중 4주는 숙주나물, 3주는 부추, 2주는 상추에서 유래하였다.

4. 기대성과 및 활용방안

생식으로 섭취하는 채소류 등에서 주로 발생하는 병원성미생물(식중독균)에 대한 특성을 규명하기 위해서 다양한 환경과 숙주에서 균주의 분포 및 분리·동정을 실시하였다. 농산물에서의 식중독균 오염원 파악을 위하여 유전자 분석을 통한 독소 유형별 검출 및 분류하였고, 항생제 내성균 발생실태 파악으로 사전 예방적 안전관리 자료를 확보하였다.

농산물과 재배환경(토양, 용수 등)에서 분리된 균주에 대한 DB 축적 및 미생물 유전체 정보의 자원화를 통하여 농산물 안전 관리체계 구축과 관련 식중독 사고에 대한 예방대책 수립에 활용하고자 한다.

5. 참고문헌

- 1) 김세리 등, 들깨잎과 생산환경에서 분리한 *Bacillus cereus*의 독소 유전자와 항생제 감수성 분석, 한국식품과학회지 43(2): 134-141 (2011).
- 2) 윤보현 등, 농업환경에 서식하는 파리에서 분리된 *E. coli*의 병원성 유전자 및 항생제 내성 조사, J. Food Hyg. Saf. 32(2): 147-153 (2017).
- 3) 허정원 등, *Salmonella enterica*의 유전적 특성 및 항생제 내성연구.
- 4) 김진희 등, 수산물에서 식중독 세균을 신속하게 검출하는 최근 기술, Safe Food 11(3): 16-24 (2016).