

## Mannitol-Egg York-Polymyxin B 선택 배지에서 *Bacillus cereus* 계수 방법의 재평가

윤숙현<sup>1</sup> · 김용상<sup>1</sup> · 정도연<sup>2</sup> · 한금수<sup>2</sup> · 엄태봉<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 자연과학대학 생물과학부 및 전북대학교 유전공학연구소, <sup>2</sup>순창장류연구소

장류에서 식중독 미생물인 *Bacillus cereus*의 계수 방법상 문제점을 해결하기 위하여, *B. cereus* 선택 배지인 mannitol-egg york-polymyxin B (MYP)에서 자란 약 1,500개의 집락들을 형태적 차이에 따라 12종으로 분류하였다. 생화학 특성 및 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과 집락 주위로 환을 형성하는 직경 11~16 mm 크기의 집락들은 *B. cereus*와 *B. cereus* subsp. *cytotoxis*로 동정되었고, 환을 형성하지 않아 *B. cereus* 계수에 포함시키지 않았던 직경 5 mm 크기의 분홍색 집락은 *B. cereus*로, 6.5 mm 크기의 이중환을 형성하여 *B. cereus*로 계수하기가 모호하였던 붉은색 집락은 *B. cereus*로 동정되었다. 나머지 세 종들은 *Enterococcus* sp., *Brevibacillus* sp., *B. subtilis*로 밝혀졌다. *B. cereus*로 동정된 9종 모두에서 적어도 한 종류 이상의 *B. cereus* 독소 유전자들을 함유하고 있었지만 다른 형태들에서는 발견되지 않았다.

**Key words** □ *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* selective media, microbial enumeration, microbial identification

한국인에게 장류는 식탁에 빼놓을 수 없는 발효식품이기 때문에 식품으로서 안전성 확보는 무엇보다도 중요한 과제이다. 이들 중 전통적 방법에 따라 제조한 장류는 필연적으로 자연 환경에 그대로 노출되기 때문에 토양이나 대기 중의 위해 미생물들에 의해 발효나 숙성과정 동안 독소들을 생성할 가능성이 높다. 특히 *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*와 함께 *Bacillus* subgroup I에 속하는 그람 양성균인 *B. cereus*는 발효 시 haemolysin BL (HBL), non-hemolytic enterotoxin (NHE), cytotoxin K (cytK)와 같은 설사나 장염을 일으키는 단백질 독소와 구토를 일으키는 펩티드 형태의 cereulide 독소를 생산할 수 있으며 *B. cereus* 균주 또는 환경에 따라 만드는 독소들의 종류나 그 생산량이 다르다는 것이 보고되었다(3~7, 9, 10, 11, 13). 식품 내 대략  $10^5$ ~ $10^8$  CFU/g 수준에서 발병한다는 점을 고려하여 전 세계적으로 *B. cereus* 허용 기준을 식품에 따라  $10^2$ ~ $10^4$  CFU/g 범위에서 정하고 있으며, 2006년 식품의약품안전청은 고추장, 된장, 청국장, 춘장, 혼합장 등의 장류 제품에서 허용 *B. cereus* 균 수를  $10^4$  CFU/g 이하로 고시하였다(1). 현재 식품공전상 *B. cereus* 계수와 동정은 mannitol-egg york-polymyxin B (MYP) 배지를 사용하여 혼탁한 환이 있는 분홍색 집락을 일차적으로 계수한 뒤 이들 집락을 대상으로 현미경적 관찰과 생화학 검사를 하도록 정하고 있다. MYP 배지의 사용은 *B. cereus*의 mannitol 비대사성, lecithinase 활성 능력, Gram(-) 세균 성장을 억제하는 polymyxin B 저항성 등 생화학적 대사 특성을 고려한 것이다. 현재 MYP 배지는 미국 FDA/CFSAN, AOAC에서

*B. cereus* 계수용 공인 배양 시약으로 쓰이고 있고, methoprim 저항성과  $\beta$ -galactosidase 특성을 보강해 *B. cereus* 선택성을 더 보강한 chromogenic polymyxin B-methoprim agar medium (Oxoid, UK)이 계수용 배지로 보급되고 있다. 그러나 전통 장류와 같이 수많은 미생물이 존재하는 경우에는 *B. cereus*에 선택적 배양 특성을 가진 MYP 배지라도 *B. cereus*로 분류하기 모호한 형태의 집락들이 관찰되기 때문에 정확한 계수가 쉽지 않았다. MYP 배지에서 *B. cereus*의 계수 시 생화학 및 분자생물학적 기법을 통해 집락의 형태별로 *B. cereus* 여부를 확인할 수 있는 동정 프로토콜이 확립되어야 하는데 아직까지 장류에서 보고된 바가 없어 계수 정확성에 의문을 가질 수 밖에 없다. 이와 함께 식품 위생에서 실질적인 문제는 *B. cereus*의 단순 계수가 아닌 *B. cereus* 독소 생산균 수에 있고 *B. cereus*에서 발견되는 설사 및 구토 독소 유전자들이 *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. polymixa* 등에서도 발견되기 때문에 선택 배지에서 자란 집락들이 이들 독소를 함유하고 있는지 확인할 필요가 있다. 이 연구는 MYP 선택배지 상에서 *B. cereus*를 구분하고 독소 유전자 함유 여부를 판별하기 위해, 형태별로 생화학적 동정, 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정, 독소 유전자 확인을 위한 PCR을 수행함으로써 식품공전상 *B. cereus* 계수 방법을 개선하는데 목표를 두었다.

### 재료 및 방법

#### 분리 균 및 배양

장류 내 *B. cereus*의 배양과 계수는 식품의약품안전청 식품공전 일반 시험법에 준해 행하였다(2). 즉, 전북 소재 전통 장류 업

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-63-270-3439, Fax: 82-63-270-3362  
E-mail: tbuhm@chonbuk.ac.kr

체들로부터 구입한 여섯 종류의 된장, 고추장, 청국장들을 대상으로 각 시료당 5 g을 취해 인산 완충액으로 단계별 희석한 시료액 0.2 ml을 MYP (Difco) 한천 배지에 도말하고 30°C에서 24 시간 및 48시간 배양 후 나타난 집락을 계수하였다. 선택 배지로서 MYP 배지 이외에 chromogenic polymyxin B-methoprim agar (CPMA, Oxoid) 배지를 사용하였고 배양 조건은 MYP 배지에서와 동일하였다.

**집락의 형태적 분류 및 동정**

여섯 종류의 시료들을 10<sup>2</sup>~10<sup>4</sup> 배로 희석한 뒤 배양한 18개 MYP 평판 배지에서 약 1,500개의 집락들을 형태적 차이에 의해 12종으로 구분하였다. 각 형태별로 1 toothpick을 취하여 새로운 MYP 한천배지에 접종하고 30°C에서 24시간 배양하였다. 균 모양은 그람 염색 후 광학 현미경을 통해 관찰하였다(8). 생화학적 동정을 위해 VITEK 2 System (bioMérieux Vitek Inc., USA)의 매뉴얼에 따라 각 균 배양액이 46종 건조 배지 및 생화학 반응물로 구성된 BCL ID card (bioMérieux Vitek)에 주입되고, 15분 간격으로 결과들이 VITEK 2 Compact software (bioMérieux Vitek)에 통합적으로 저장 분석하면서 14시간 후 동정이 완료되었다. 16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균 동정을 위해 universal primer로서 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3')와 800R (5'-TACCAGGTATCTAATCC-3')을 이용, 각 균주의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭하였고 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열들은 accession no. FJ982654~FJ982665로 GenBank에 등재하였다. 각 균주의 염기서열은 NCBI database로부터 BLASTN program (16)과, Ribosomal Database Project 10.10 (RDP)의 database로부터 SeqMatch program version 3을 사용하여 표준균주(type strain)들의 16S rRNA 유전자 염기서열들과 상동성을 비교하였다. 결정

한 염기서열들 간의 상호 비교는 CLUSTAL W 프로그램을 사용하였다(15). RDP database상 B. cereus 표준균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 이용할 수 없었으므로 계놈 프로젝트를 통해 균주 동정에 대한 신뢰성이 확인된 B. cereus Q1 (GenBank accession no. CP000227), B. cereus AH187 (CP001177), B. cereus 03BB102 (CP001407), B. cereus subsp. cytotoxic NVH2391-98 (152022606), B. anthracis A0248 (CP001598)을 계통도 작성에 이용하였다. 계통도는 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화 되도록 보정한 후 Kimura's two-parameter method와 maximum parsimony (MP)법을 사용하여 작성하였다. 산출된 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위하여 Bootstrap 분석을 1,000회 실행하였다. 계통분석과 bootstrap 분석은 PAUP version 4.0b를 사용하였다(14).

**B. cereus 독소 유전자 검출**

GenBank의 각 B. cereus 독소 유전자 염기서열들에서 PRIMER3 program (12)을 사용해 일차적인 primer 후보들을 찾은 뒤, BLASTN program으로 부터 얻은 독소 유전자들 내의 염기서열 상동 부위들과 대조하여 최종 primer를 선정하였다 (Table 1). 분리주들을 nutrient broth에 순수 접종하여 흡광도 0.7 까지 자란 균의 DNA를 추출한 뒤 각 독소 유전자 확인을 위해 PCR은 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 58°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭 과정을 30회 반복과 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**집락의 형태적 분류**

장류에서 분리한 약 1,500개의 집락들을 대상으로 형태에 따

**Table 1.** Primers used in this study for the detection of *B. cereus* toxin genes

Target gene	Primers	Amplicon length (bp)	Accession number
<i>nheA</i>	5'-ATATGCGCAAAATGTAATTGCTCCA-3' 5'-TGCCTTCTTCAACATTTGTTGAATTT-3'	935	AY835995
<i>nheB</i>	5'-ACTTATGGCAGTATTTGCAGCAGGA-3' 5'-TGCAACGCTGTAATTGCAGTATCAA-3'	972	AY835995
<i>nheC</i>	5'-GACCAGCAGGATTCCCAGATGTAAT-3' 5'-CCACGCCTTCATGTAATTTTTCTGT-3'	930	AY835995
<i>hblA</i>	5'-ACCAGTAGCGACTTTTGCAAGTGAA-3' 5'-TTTTGAGCTGCATTCTCAATATGCC-3'	909	AY822584
<i>hblC</i>	5'-ATCAATACTCTCGCAACACCAATCG-3' 5'-ATGTGCTCGTTGCTCTGCTGTAAT-3'	957	AY822584
<i>hblD</i>	5'-GACTGAAGACAGCATTGGCTCAAAC-3' 5'-CGATGCTTTTCGAAATGAATTCCTGC-3'	1059	AY822584
<i>cytK</i>	5'-CCGCTGTTTTGCTAGTAGTGCTGT-3' 5'-ACGTCTTTTACGTTGTTTCCAACCC-3'	901	DQ019311
<i>cesB</i>	5'-AAAGAATGTTTCACCGAAGACGGTT-3' 5'-ACACACTTCTTTCCGATTCCACCT-3'	1181	AB248763

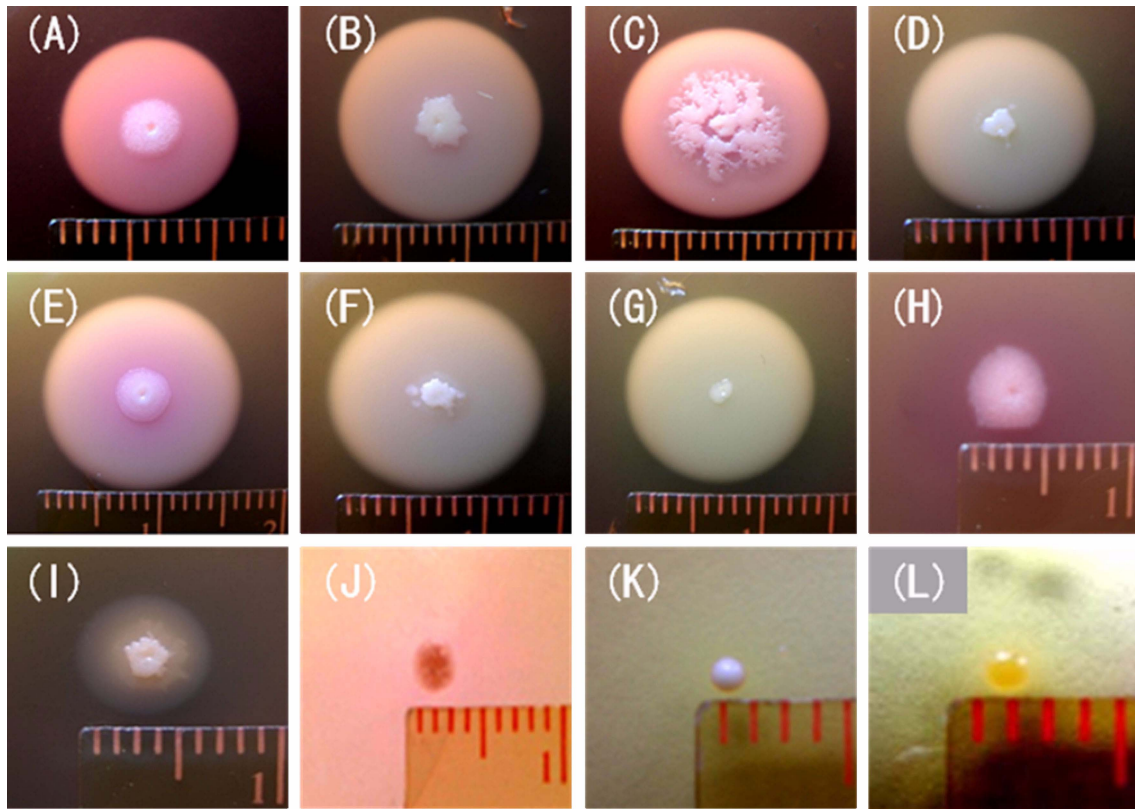


Fig. 1. Typing based on morphological difference of typical colonies grown on MYP agar plates. Distance between two bars of the ruler is 1 mm.

라 분류한 결과 12종으로 나눌 수 있었으며, 각 집락의 균은 그 램 염색 시 현미경하에서 양성을 나타냈다. 먼저 집락 주위에 11~16 mm의 불투명한 분홍색 환을 가지기 때문에 MYP 계수 매뉴얼(Difco)에 따라 *B. cereus*로 분류할 수 있는 6종의 형태 (Fig. 1A~G)를 확인하였다. 이들 중 집락 (B), (D), (F), (G)는 형태적으로는 서로 닮았으나 평판 배양 시 주위 환의 직경과 색, 집락에 대한 환 크기 비율에서 항상 구분할 수 있는 차이를 나타냈다. (A)는 환 전체가 붉은 분홍색으로 다른 형태들 것보다 진했고, (C)의 집락 모양은 방사상의 뿌리 모양을, (E)는 집락에 가까운 쪽 주위의 환이 붉은 분홍색을 나타냈다. 이외에 5종의 다른 형태 집락(Fig. 1H~L)들이 관찰되었다. 이들 중 장류에서 자주 발견되는 (H)는 집락 주위에 환을 만들지 않아 계수 매뉴얼상 *B. cereus*로 판단할 수 없는 직경 약 5 mm의 무광택 원형 또는 타원형 분홍색 집락이었고, (I)는 (A)~(G)에서 보인 전형적인 직경 12~15 mm의 환들과 달리 6.5 mm 크기의 작은 반투명 외환과 3.5 mm의 얇은 분홍색 내환을 가져 매뉴얼에 따른 형태 분류 상 *B. cereus*로 분류하기가 모호하였다. 나머지 3종(Fig. 1J~L)은 주위 배지를 붉은색으로 변화시키는 2~4 mm의 타원형 붉은색 집락(J), 주위 배지를 옅은 노랑색으로 변화시키는 1 mm 직경 반구 형태의 광택 있는 흰색 집락(K)과 역시 주위 배지가 옅은 노랑으로 변화된 직경 약 1.5 mm 반구 모양의 투명한 노랑색 집락(L) 형태였다.

#### 집락 형태별 생화학적 동정

각 형태별 균 동정을 위해 배양균에 대한 46종류의 생화학 반응을 실시하였다(Table 2). *B. cereus* 선택 배지에서 형태 특성 때문에 *B. cereus* 계수에 포함시킨 집락 형태 (A)~(G) 중, (A)를 제외한 (B)~(G)는 생화학적 동정 결과 87~94%의 신뢰도로 *B. cereus*로 동정되었다. 집락 (A)는 나머지 균들과 형태적으로는 유사했지만 미확인종으로 나왔는데, 전체 46종류 반응 중 (B)~(G)균들과 공통적으로 달랐던 반응은  $\alpha$ -glucosidase (-), 탄소 원으로 D-trehalose 및 D-ribose (-), 6.5% NaCl에서 성장 (-)였다. 집락 주위 환이 없어 형태적으로 달랐던 (H)는 생화학 반응들 중  $\beta$ -N-acetyl-L-glucosaminidase (-),  $\alpha$ -glucosidase (-), D-trehalose 이용성 (-)에서 (B)~(G)들과 공통적으로 달라 미확인종으로 분류되었고, 역시 미확인종인 (A)와는  $\beta$ -N-Acetyl-L-glucosaminidase (-), Ala-Phe-Pro arylamidase (+),  $\alpha$ -glucosidase (-), D-ribose 이용성 (+), 6.5% NaCl 성장 (+)인 점에서 생화학적 반응에 차이가 있었다. 한편 집락 주위에 이중환 형성과 작은 크기 때문에 형태상 *B. cereus*로 분류하기 모호했던 집락 (I)는 생화학 동정에서 93%의 높은 확률로 *B. cereus*로 동정되었다. 나머지 세 종류 중 2~4 mm의 타원형 붉은색 집락 (J)는 *B. sphaericus*/*B. fusiformis* (93% probability)로, 1 mm 직경의 광택나는 흰색 집락 (K)는 *B. coagulans* (86% probability)로, 직경 약 1.5 mm의 광택이 있고 투명한 노랑색을 띠며 배지 주위를 노랑으로 바꾸는 집락 (L)은 *B. licheniformis* (85% probability)로 동정되었다. 생화

**Table 2.** Biochemical characterization for the identification of strains classified by colony shape

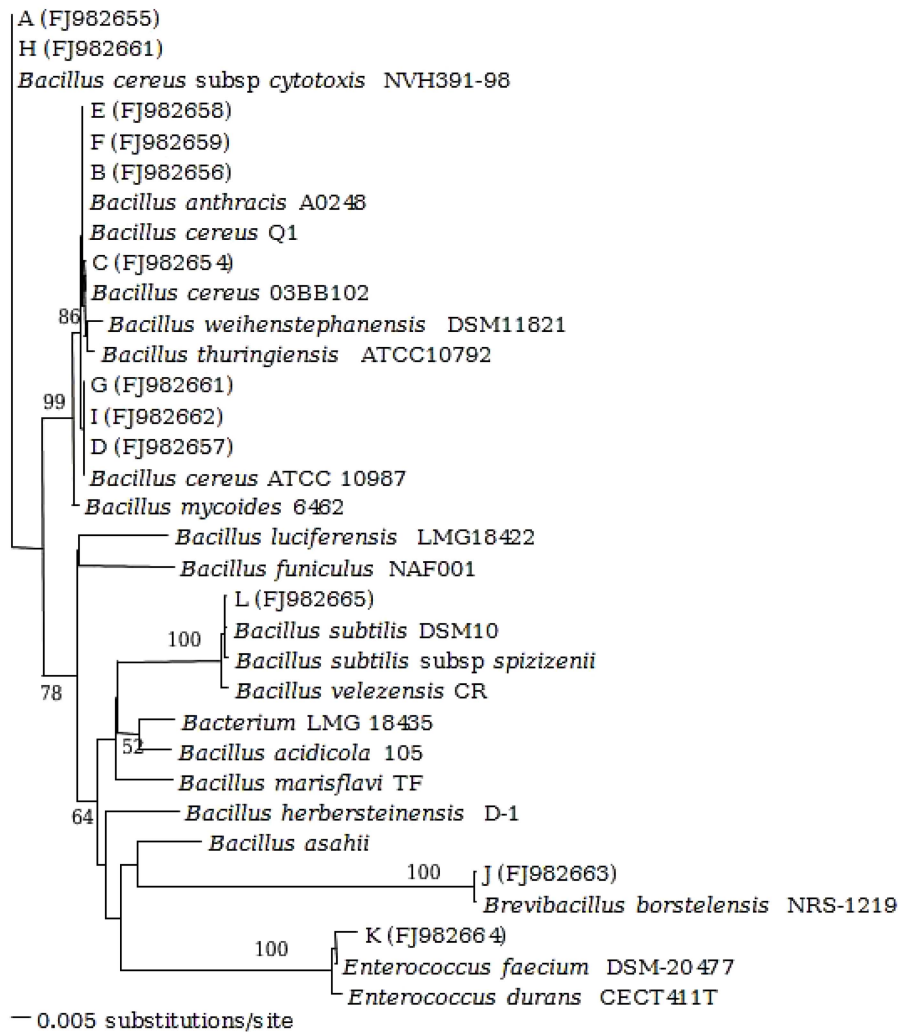
Biochemical test	Colony type											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Gram Staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Xylosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Lysine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Aspartate arylamidase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Phenylalanine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Proline arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
L-Pyrrolydonyl arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Alanine arylamidase	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Tyrosine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
β-N-Acetyl-glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Ala-Phe-Pro arylamidase	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glycogen	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Myoinositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Methyl-α-D-glucopyranose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ellman	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Methyl-D-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltotriose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Glycine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Mannose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Palatinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
β-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Phosphrylcholine esterase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Pyruvate	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
α-Glucosidase	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Trehalose	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Ribose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Putrescine assimilation	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 6.5% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Kanamycine resistance	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Oleandomycin resistance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Esculin hydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tetrazolium red	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Polymyxin B resistance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

학 동정에 사용한 BCL ID Card 및 소프트웨어는 42가지 *Bacillus* 종만을 구분할 수 있는 프로그램으로 구성되었기 때문에 *Bacillus*가 아닌 속이나, *Bacillus* 아종의 경우 동정하기 어렵다. 특히 자연에 노출된 상태로 발효와 숙성과정을 거치는 전통 장류의 경우 *Bacillus* 이외의 다양한 균들이 함께 성장하는 경우가 흔하기 때문에 생화학적 동정 결과의 재확인을 위해 16S rRNA 유전자의 염기서열 차이에 의한 동정을 수행하였다.

**집락 형태별 16S rRNA에 의한 동정**

형태별로 분류한 12종의 16S rRNA 유전자 염기서열은 27~1492 bp 영역에서 PCR 증폭 및 서열 분석을 통하여 동정에 중요한 50~900 bp 영역서열을 포함, 약 1,450~1,490 bp들을 판독하였다. RDP 표준균주 및 게놈 프로젝트 사용 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열과 비교한 계통분석도(Fig. 2)로부터 형태별 분리균들은 *B. cereus*, *B. cereus* subsp. *cytotoxis*, *Brevibacillus*, *B. subtilis*, *Enterococcus*의 다섯 그룹으로 분류할 수 있었으며 *B. cereus*들 사이에서도 세 가지의 소그룹으로 구분되었다. 집락 (A)와 (H)는 *B. cereus* subsp. *cytotoxis* MHV 391-98과 각각 99.7% (1476 bp/1481 bp) 및 99.9% (1483/1485)의 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성을 보였고, 집락 (D), (G), (I)는 *B. cereus* ATCC 10987과 순서별로 99.7% (1478/1483), 99.8% (1477/1480), 99.7% (1477/1481)의 상동성, 집락 (B), (E), (F)는 순서별로 *B. cereus* Q1과 99.8% (1456/1459), 99.9% (1478/1480), 99.7% (1478/1482), *B. anthracis* A0248과는 99.7% (1456/1460), 99.8% (1478/1481), 99.7% (1478/1482)의 상동성을, 집락 (C)는 *B. cereus* 03BB102와 99.9% (1480/1481) 상동성을 보였다. 특징적으로 9종 모두 3'쪽의 최말단 위치(1,450~1,485 bp)에서 1~5개의 염기서열에 차이가 있었다. 따라서 16S rRNA 유전자 염기서열로부터 (C), (D), (G), (I)는 *B. cereus*로, (B), (E), (F)는 *B. cereus* 또는 *B. anthracis*로, (A), (H)는 *B. cereus* subsp. *cytotoxis*로 동정할 수 있었다. *B. cereus* group에 속하는 *B. cereus*와 *B. anthracis*는 유전적으로 매우 가까운 근연종이기 때문에 (B), (E), (F)의 경우 16S rRNA 유전자 염기 서열 결과만으로는 동정하기 어려워 생화학적 대사 특성을 이용한 동정 결과를 참고하였다. 생화학적 동정 결과 세 집락 (B), (E), (F)는 *B. anthracis*가 아닌 *B. cereus* (88%, 91%, 92% probability)로 분류되었으므로 이들 균들은 *B. cereus*로 동정하였다. 집락 (A)와 (H)는 일반 *B. cereus*보다 특히 심한 식중독을 야기해 *B. cytotoxicus*라고도 부르는 *B. cereus* subsp. *cytotoxis*와 같은 계통



**Fig. 2.** Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationship of isolates from fermented soybean products by morphological classification aligned with reference strains from domain bacteria based on 16S rDNA sequences. Bootstrap values are shown in a bootstrap analysis of 1,000 replicates. The scale bar indicates an estimated change of 0.5%.

으로 분류되었으며 일반 *B. cereus* 계통과는 구분되었다(Fig. 2). 생화학 동정 결과 (A)와 (H)는 미확인종으로 나왔으나 *B. cereus* subsp. *cytotoxis*의 생화학 패턴 정보가 VITEK 2 database에 아직 입력되어 있지 않다는 점(bioMérieux Vitek Korea 서신)과, (A)와 (H)가 *B. cereus* subsp. *cytotoxis* NVH 391-98의 16S rRNA 유전자 염기서열과 모두 99.7% 이상의 높은 염기서열 상동성을 가진 점을 고려하여, (A)와 환이 없는 (H)를 *B. cereus* subsp. *cytotoxis*로 동정하였다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 집락(A)와 (H)는 *B. cereus*의 한 아종이므로 *B. cereus* 집락 계수에 포함시키는 것이 당연하다. MYP 계수 매뉴얼상 형태적으로 *B. cereus*에 포함시킬 수 없었던 2-4 mm의 타원형 붉은색 집락 (J)는 계통분석 결과 표준균주인 *Brevibacillus borstelensis* NRS-1219와 94% 상동성을, BLAST search에서 2종의 *Brevibacillus borstelensis* 비표준균주들과는 99.7%의 상동성(각각 1467/1472 및 1465/1470 서열 일치)을 나타냈다. 직경 1 mm 크기의 흰색

집락 (K)는 *Enterococcus faecium* DSM20477과 99.1% (1478/1491)의 상동성을, 직경 1.5 mm의 투명한 노랑색 집락 (L)은 *B. subtilis* DSM10과 99.7% (1483/1488)의 상동성을 나타냈다. 16S rRNA 유전자 염기 서열에 의한 집락 (J), (K), (L)의 동정은 생화학적 동정결과와 달랐다. 생화학적 분석으로 *B. sphaericus*/*B. fusiformis*로 동정된 (J)의 경우 표준균주들인 *B. sphaericus* L14010와 *B. fusiformis* L14013의 16S rRNA 유전자에 대한 염기서열 상동성은 각각 88% 및 87%, 생화학적으로 *B. coagulans*로 동정된 (K)의 경우 표준균주 *B. coagulans* IAM12463과의 상동성은 88%, (L)의 경우 표준균주 *B. licheniformis* DSM13과는 97% 상동성을 보였다. 일반적으로 같은 종의 기준을 99% 이상의 서열 일치도로 볼 때 적어도 (J), (K)의 생화학적 동정결과는 정확하지 않았으므로 16S rRNA 유전자 염기서열 결과를 이용하여 (J)는 *Brevibacillus* spp., (K)는 *Enterococcus* spp., (L)은 *B. subtilis*로 동정하였다.

**Table 3.** Distribution of *B. cereus* toxin genes in strains showing different morphology

Type	<i>nhe</i>			<i>hbl</i>			<i>cytK</i>	<i>ces</i>
	A	B	C	A	C	D		
A	-	+	-	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	-
D	+	+	+	-	-	-	-	-
E	+	+	+	-	-	-	+	-
F	+	+	+	-	-	-	-	-
G	+	+	+	-	-	-	-	-
H	-	+	-	-	-	-	-	-
I	+	+	+	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-
L	-	-	-	-	-	-	-	-

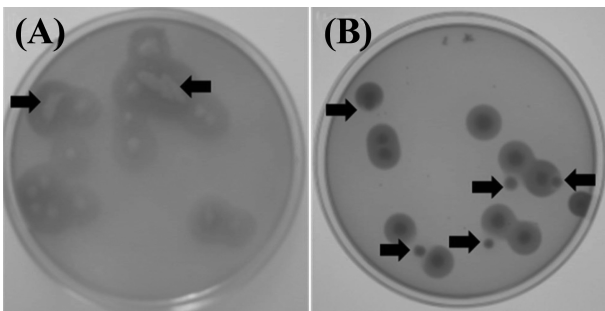
**집락 형태별 *B. cereus* 독소 유전자의 확인**

집락 형태별로 *B. cereus* group이 지닌 주요 장독소 유전자들 (*nhe*, *hbl*, *cytK*, *ces*)의 존재 유무를 PCR을 통해 확인하였다 (Table 3). *B. cereus*로 동정된 집락 (A)~(I)는 4종의 독소 유전자들 중 적어도 1종 이상을 가지고 있었으나, 다른 집락 (J)~(L)은 모두 *B. cereus* 독소 유전자를 함유하고 있지 않았다. 설사를 유발하는 *Nhe* 독소는 *NheA*, *NheB*, *NheC* 단량체들이 복합체를 이루어 형성된다(9). *B. cereus*로 동정된 (B)~(G)와 (I)는 *nheA*, *nheB*, *nhe* 유전자를 모두 가진 반면 *B. cereus* subsp. *cytotoxicus*로 동정된 (A)와 (H) 집락은 *nheB* 유전자만 가지고 있다는 점이 달랐다. 최근 장류에서 *Bacillus*선택 배지에서 자란 집락 152개를 대상으로 독소 유전자 유무를 PCR로 확인한 결과 모두 한 가지 이상의 독소 유전자를 함유했고 특히 설사 독소 유전자인 *nheABC*의 경우 151개의 집락에서 모두 발견되었다(결과 미제시). 그러나 집락 형태별로 특정한 독소 유전자 패턴은 보이지 않았고 각 균주 별로 생산하는 독소 종류는 다르게 나타났다. 이러한 결과는 411종의 *B. cereus*를 대상으로 PCR에 의한 독소

유전자 분석 결과, 411종 모두에서 *nheABC*가 검출되고, 종류에 따라 각기 다른 독소 유전자를 함유한다는 보고와 일치한다(10).

**집락의 계수**

장류에서 MYP 배지를 사용했을 때 자주 관찰되었던 *B. cereus* 계수상 문제점은 Fig. 1C와 같이 뿌리모양으로 퍼지는 형태의 집락들이 인접되어 있을 때 정확한 계수가 어렵다는 점이 었다(Fig. 3A). 이 경우 화살표로 표시된 부분은 3~5개의 방사형 뿌리 모양의 집락들이 함께 연결되어 있어 대략적인 계수 판단이 가능할 뿐이다. 이에 반해 항생제 methoprim이 더 첨가된 CPMA 배지에서 집락은 주로 3~10 mm 직경의 초록색 집락 주위로 작은 흰색 환을 형성하므로 MYP 배지보다 계수하기가 더 분명하다는 장점이 있다. 따라서 MYP 배지에 의한 *B. cereus* 계수의 정확성을 위해 CPMA 배지에서 배양을 동시에 수행하는 것도 바람직할 것이다. 그러나, 장류의 경우 CPMA 배지에서도 주 집락 형태 이외에 4종의 다른 형태(0.5 mm~1 mm 직경의 환이 없는 진한 초록색 집락, 3 mm 직경의 환이 없는 진한 초록색 집락, 3~5 mm 직경의 흰색 집락, 2~3 mm 직경의 투명 집락)들이 발견되었으므로 계수 방법의 정립을 위해 이들 형태 역시 동정이 필요하다. Fig. 3B의 화살표로 표시된 집락 (H)는 청국장장에서 자주 발견되었으며, 이 경우 환이 있는 집락만 세는 MYP 계수 매뉴얼로는 *B. cereus* 집락수가 11개이다. 하지만 (H)를 *B. cereus* 계수에 포함시킨 새 계수 기준에 따라 *B. cereus* 수는 45% 증가한 16개로 정정되어야 한다. 특히 식품공전의 규제 제한선 근처 균수를 함유한 장류의 경우 이러한 계수 차이는 문제가 될 수 있기 때문에 앞으로 식품공전의 *B. cereus* 계수 방법에서 집락 형태를 구체적으로 호호하지 않게 정의해둘 필요가 있다. 또한 동정상 *B. cereus*와 구분되는 *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thurigiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. polymixa*들과 같은 다른 *B. cereus* group 역시 *ceres*형 독소를 분비할 수 있음을 고려하여, 앞으로 식품공전에 단순히 균수 상한선을 명시하는 것 보다 식품 내 *B. cereus* 독소들의 최대 허용량을 기준으로 하여 규제하는 쪽이 합리적이라고 생각한다. 이를 위해, 각 독소의 인체 내 독성 허용량 설정과 함께 독소들을 정성 및 정량적으로 간단하게 분석할 수 있는 방법의 개발이 요구된다.



**Fig. 3.** Colonies grown on mannitol-egg yolk-polymyxin B agar plates. Arrows indicate (A) aggregates of type (C), and (B) type (H), which are identified as *B. cereus* by 16S rRNA gene sequence analysis.

**감사의 말**

본 연구는 2008년 농림기술개발사업(ARPC-20083069) 및 2008년 한국대학교육협의회 대학교수 국내교류연구 지원계획(임태봉)에 의해 수행되었습니다.

**참고문헌**

1. 식품공전. 2008. 식품의약품안전청. 고시 제 2007-38호.
2. 식품공전. 2008. 식품의약품안전청. 일반 시험법 10-8-40.
3. Altayar, M. and A.D. Sutherland. 2005. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J. Appl. Microbiol.* 100, 7-14.

4. Apetroaie, C., M.A. Andersson, C. Sproer, I. Tsitko, R. Shaheen, E.L. Jaaskelainen, L.M. Wijnands, R. Heikkila, and M.S. Salkinoja-Salonen. 2005. Cereulide-producing strains of *Bacillus* show diversity. *Arch. Microbiol.* 184, 141-151.
5. Birgit, M.P., R. Dietrich, B. Nibler, E. Martlbauer, and S. Scherer. 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5436-5442.
6. Granum, P.E. and T. Lund. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 223-228.
7. Guinebriere, M.H., V. Broussolle, and T. Nguyen-The. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3053-3056.
8. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, and S.T. Williams. 1994. Group 18: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, pp. 559-564. In J.G. Holt, K.H. Schleifer, J.G. Tully, J. Ursing, M. Bryant, N.R. Krieg, J. Liston, J.W. Moulder, R.G.E. Murray, C.F. Niven, and N. Pfennig (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.
9. Lindback, T., A. Fagerlund, M.S. Rodland, and P.E. Granum. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150, 3959-3967.
10. Ngamwongsatit, P., W. Buasri, P. Pianariyanon, C. Pulsrikarn, M. Ohba, A. Assavanig, and W. Panbangred. 2008. Broad distribution of enterotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 352-356.
11. Ouhib, Q., T. Clavel, and P. Schmitt. 2006. The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Curr. Microbiol.* 53, 222-226.
12. Rosen, S. and H.J. Skaletsky. 2000. PRIMER3 on the WWW for general users and for biologist programmers, pp. 365-386. In S. Krawetz and S. Misener (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Method in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, USA.
13. Schoeni, J.L. and A.C. Wong. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Prot.* 68, 636-648.
14. Swofford, D.L. 1998. PAUP\*. Phylogenetic Analysis using Parsimony. 4.0 ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
15. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
16. Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203-214.

(Received June 5, 2009/Accepted June 22, 2009)

---

**ABSTRACT : Reevaluation of Enumeration of *Bacillus cereus* Grown on Mannitol-Egg York-Polymyxin B Agar**

**Suk Hyun Yun<sup>1</sup>, Yong Sang Kim<sup>1</sup>, Do Yeon Jeong<sup>2</sup>, Kum Su Hahn<sup>2</sup>, and Tai-Boong Uhm<sup>1\*</sup>**  
 (<sup>1</sup>Faculty of Biological Sciences and Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Republic of Korea, <sup>2</sup>Institute of Sunchang Fermented Soybean Products, Sunchang 595-804, Republic of Korea)

To avoid ambiguity in counting the number of colony, about 1,500 of colonies grown on *B. cereus* selective agar plates were grouped into 12 types by morphological difference and then identified by biochemical and 16S rDNA nucleotide sequence. Among them, seven colony types with 11 to 15 mm diameters of halo were identified as *B. cereus* or *B. cereus* subsp. *cytotoxis*. Five mm sized colonies with no halo, which have not been considered as *B. cereus* according to the manufacturer's manual, were identified as *B. cereus*. A colony type with double halos of only 6 mm in diameter was also *B. cereus*. Other three types were proven to be *Enterococcus* sp., *Brevibacillus* sp., and *B. subtilis*, respectively. PCR results showed that only 9 types that are identified as *B. cereus* strains harbor at least one of *B. cereus* toxin genes.