

Bacillus cereus : 식품 안전의 복병

구민선

안전성연구단

Bacillus cereus : An Ambusher of Food Safety

Min-Seon Koo

Food Safety Research Group

*Bacillus cereus*는 토양, 물 등 자연계 도처에 퍼져있는 그람 양성 간균으로 독소형 식중독균 중 하나이다. 최근 들어 분유, 된장, 떡 등에 오염이 확인되면서 규제가 강화되고 있다. *B. cereus*는 쌀, 향신료, 육류, 난가공품, 유가공품 등 다양한 가공식품과 익히지 않고 섭취하는 식품에 널리 분포하고 있다. 처음으로 *B. cereus*에 의한 식중독이 보고된 것은 1950년경 노르웨이였으며, 원인 식품은 하루 전에 미리 만들어져 상온 보관된 바닐라 소스였다. 이를 섭취한 사람들이 설사형 식중독을 일으키게 됨으로써 확인되었으며, 오염 수준은 $2.5 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ CFU/g 였다.

B. cereus 식중독은 *B. cereus*가 생산하는 독소에 의한 것으로 설사형(diarrheal disease)과 구

토형(emetic disease) 2가지가 있다. 이 균에 의한 식중독은 국가별로 특징이 있어, 일본은 설사형보다는 구토형이 10배 이상 자주 보고되며, 유럽이나 북아메리카에서는 설사형이 대부분으로 보고되고 있다. 설사형 식중독은 장내에서 *B. cereus*가 생산한 장독소에 의해 발생되며, 8~16시간의 잠복기 후 복통, 설사, 메스꺼움 등의 증상이 나타나며, 대부분 24시간 안에 회복된다. 구토형 식중독은 튀기거나 삶은 쌀 관련 식품과 밀접하게 관련되어있으며, 잠복기가 0~5시간으로 비교적 짧고, 오심, 구토, 위경련 등의 증상이 나타내며, 심한 경우 간장의 기능 부전과 더불어 사망까지 이르게 한다. 또한 구토형 장독소는 열에 강한 내성이 있어서 121°C에서 90분간 가열하여도 활성이 유지된다.

*B. cereus*의 1차적 서식처는 토양이다. 따라서 우리 주위의 거의 모든 식품이 이 균의 오염을 피할 수가 없다. 또한 이 균은 열에 강한 내생 포자와 biofilm를 생산하여 식품은 물론 제조공정과 포장공정에서도 서식이 가능하다고 알려져 있다. 따라서 *B. cereus*의 오염을 최소화하고, 효과적으로 제어하기 위해서는 우선 *B. cereus*의 특성을 정확히 파악하여야 한다. 특성 분석을 통하여 위생적이고 효율적인 원료 생산 및 처리, 가공 공정이 설계되어야, *B. cereus*의 오염이 최소화된 안전한 먹을거리를 생산할 수 있을 것이다.

*Bacillus cereus*의 특징

1. 분류학적 위치

Bacillus 속은 그람 양성균의 포자를 생산하는 간균들로, 주로 토양과 물에서 발견된다. 분류학적으로 *Bacillus* 속은 51개의 분명하게 정의된 종과 분류학적으로 아직 불명확한 위치에 있는 일부 종으로 구성되어 있다. 이 속은 포자의 형태에 따라 3개의 subgroup으로 나뉜다. *Bacillus cereus*는 *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* 등과 같이 subgroup I에 속한다. 이 subgroup에 포함된 종들은 표현형에서 약간의 차이가 있지만, 유전학적으로는 매우 유사하다.

*B. cereus*가 속한 subgroup 내에서는 각 균종들은 생화학적, 생리학적, 형태학적으로 매우 유사하다. 특히, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*의 16S rRNA 서열은 매우 높은 homology (>99%)를 보인다. 하지만 병원성에서는 차이를 보여 *B. anthracis*는 포유동물에 대해, *B. thuringiensis*는 곤충류에 대해 병원성이 있다. 많은 연구자들이 *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*는 *B. cereus*의 아종으로 분류되어야 한다고 제안하고 있다. 따라서 이들을 정확하게 동정하기 위해서는 추가적인 시험을 진행하여야 한다.

*B. cereus*는 강한 β -hemolytic이며, *B. mycoides*는 때때로 집락의 아래에만 완벽한 용혈반응이 보이는 약한 β -hemolytic이다. *B. anthracis*는 nonhemolytic이지만, 오랜된 집락은 약한 γ -hemolysis를 일으키기도 한다. *B. cereus*는 penicillin 내성, sheep blood agar에서의 hemolysis, 35°C에서의 운동성, 42°C에서 빠른 성장, gelatin 가수분해능, 당 이용능(포도당, 맥아당, salicin) 등에서 *B. anthracis*와는 뚜렷한 차이를 보인다. *Bacillus* subgroup I간의 주요 특징은 Table 1과 같다.

2. 형태학적특징

*Bacillus cereus*는 그람 양성 간균으로, 내생포장(endospore)과 영양세포(vegetative cell) 두 가지의 형태학적 특징을 가진다. 영양세포는 통성 혐기성 간균(facultative aerobic rod)으로 직경은

Table 1. Characterization of *Bacillus cereus* group

Species	Colony morphology	Hemolysis	Mobility	Susceptible to penicillin	Parasporal crystal inclusion
<i>B. cereus</i>	White	+	+	-	-
<i>B. anthracis</i>	White	-	-	+	-
<i>B. thuringiensis</i>	White/grey	+	+	-	+
<i>B. mycoides</i>	Rhizoid	(+)	-	-	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	Separated from <i>B. cereus</i> by growth at < 7°C and not at 43°C and can be identified rapidly using rDNA or cspA (cold shock protein A) targeted PCR.				
<i>B. pseudomycooides</i>	Not distinguishable from <i>B. mycoides</i> by physiological and morphological characteristics. Clearly separable based on fatty acid composition, and 16S RNA sequences.				

(출처: Adley et al., 2005)

1.0~1.2 μm이고, 길이는 3.0~5.0 μm로, 긴 사슬로 자라는 경향이 있다. 성장초기 동안에는 그람 양성이지만, 성장 말기에는 그람 음성으로 되기도 한다. 이 세균은 주모성 편모(peritrichous flagellae)가 있어 운동성이 있지만, 운동성이 없는 것도 있다.

3. 생리학적 · 생화학적 특징

영양세포의 성장을 위한 최적온도는 28~35°C이지만, 10~12°C의 저온 및 48~50°C의 고온에서도 최소한의 성장이 가능하다. 일부 균주는 55°C 및 4~5°C의 온도에서도 천천히 성장할 수 있다. *B. cereus*는 분리된 오염원에 따라 다른 성장특성을 보이는데, 낙농제품에서 분리된 대부분의 *B. cereus* 분리주는 저온에서도 성장이 가능하다.

성장을 위한 최적 pH는 6.0~7.0이지만, 성장

가능 pH 범위는 4.9~9.3이며, 수분활성도(Aw)는 0.912~0.950의 범위이다.

영양세포는 열에 비교적 약하나, 포자는 열에 저항성이 있으며, 고지방 식품과 수분활성도가 낮은 건조식품 등에서는 열에 대한 강한 저항성을 보인다. 또한 포자는 습열(moist heat)보다는 건열(dry heat)에 더 강한 저항성이 있다.

4. *Bacillus cereus*의 혈청형(Serotype)

*B. cereus*는 flagellar (H) antigen에 따라 18개의 혈청형으로 나뉜다. 이들 중 8개의 혈청형은 식중독을 유발시킨다. 혈청형 1, 3, 4, 5, 8, 12는 구토형과 관련되고, 혈청형 1, 6, 8, 9, 10, 12는 설사형과 관련된다. 혈청형 1, 8, 12는 구토형과 설사형 모두와 관련되는 것으로 알려져 있다.

5. 독소

*B. cereus*는 lecithinase, protease, β -lactamase, sphingomyelinase, cereolysin, hemolysin BL 등 매우 다양한 세포외 독소(extracellular toxins)와 효소, 설사형 독소(The Diarrhoeal Toxins), 구토형 독소(The Emetic Toxin), haemolysins, phospholipases C, PlcR(A regulator of extracellular virulence factor gene expression) 등과 같은 병원성 유발인자를 생산한다. 이 중 직접적으로 식중독과 관련된 것은 설사형 독소와 구토형 독소이다. 구토형 독소는 열에 강한 저항성이 있어서, 126°C에서 90분간이나 생존할 수 있으나, 설사형 독소는 56°C에서 5분 안에 비활성화 된다.

5.1. 설사형 독소(The Diarrhoeal Toxins)

*B. cereus*의 설사형 식중독과 관련된 독소는 Table 2와 같다. 이중 주요 설사형 독소는

haemolysin BL(HBL)이다. 이 독소는 B, L₁, L₂의 3 부분으로 구성되었으며, 구성 요소 각각은 활성이 없으며, 함께 존재하여야 haemolytic 활성이 있다. 열에 불안전하여 56°C에서 5분 안에 활성을 소실하며, trypsin과 pronase 처리에도 활성을 소실한다. HBL은 hemolysis, cytolysis, demonecrosis, vascular permeability, enterotoxigenic activity 등의 많은 증상과 관련된다.

5.2. 구토형 독소(The Emetic Toxin)

구토형 독소는 cereulide로 펩타이드 항생제인 vancomycin과 밀접하게 관련되어진 ionosphoric 수용성 펩타이드이다. 분자량은 1.2 kDa이며, 열에 대한 강한 저항성이 있어, 121°C에서 90분간 가열하여도 활성이 소실되지 않는다. 또한, pH에도 안정하여 2~11 범위에서도 활성이 유지되며, 트립신이나 펩신 처리에도 안정하다. *B. cereus*가 생산하는 구토형 독소는 곡류 등과 같은 특별한 기질에서 성장할 때 만들어지는 것

Table 2. The toxins of *Bacillus cereus* and their properties

Toxins	Illness Associated	Genes Associated	Size
Haemolysin BL (HBL)	Diarrhoeal	B- <i>hbla</i> L ₁ - <i>hb1C</i> L ₂ - <i>hb1D</i>	B-35 kDa L ₁ -36 kDa L ₂ -45 kDa
Enterotoxin T	Diarrhoeal	bceT	41 kDa
Non haemolytic enterotoxin (NHE)	Diarrhoeal	A- <i>nheA</i> B- <i>nheB</i> C- <i>nheC</i>	
Enterotoxin FM	Diarrhoeal	<i>entFM</i>	Three component toxin 39, 45 and 105 kDa
Emetic Toxin	Emetic	Unknown	1.2 kDa

으로 알려져 있다. 볶거나 조리된 쌀가공 식품에서 *B. cereus*에 의한 식중독 발생시 구토형 독소에 의한 것이 거의 95%를 차지한다.

독성 정보

1. 임상적 특성

*B. cereus*는 설사형과 구토형 두 종류의 식중독을 일으킨다. 설사형 식중독은 *B. cereus*의 영양세포 또는 포자를 섭취하여, 인체의 장 내에서 생산된 장독소(enterotoxins)로 인해 발생하는 것이고, 구토형 식중독은 *B. cereus* 균이 생산한 독소(cereulide)를 섭취하여 발생하는 것이다.

설사형 식중독은 다른 독소형 식중독균인 *Clostridium perfringens*과 식중독 증상이 매우 유사하다. 잠복기는 8~19시간이며, 물 같은 설사, 어지러움, 복통 등이 일어나며, 메스꺼움과

설사가 동반되기도 한다. 그러나 구토 증상은 거의 일어나지 않으며, 이런 증상들은 대부분 24시간 정도 후에 회복된다. 열은 거의 발생하지 않으며, 보통 수액을 보충하는 치료를 하며, 사람 간에는 전염되지 않는다.

구토형 식중독은 *B. cereus*가 생산한 독소(cereulide)로 오염된 식품을 섭취하였을때 발생하는 것으로, 설사형 식중독보다 심하고 치명적이다. 잠복기는 설사형보다 비교적 짧아 1~6시간 범위지만, 대략 3시간이면 증상이 발현된다. 심한 구토가 주요 증상으로, 메스꺼움, 구토와 같이 심한 복통 및 설사가 수반되기도 한다. 설사가 수반되기는 하지만 설사형처럼 지속되지는 않으며, 대부분의 증상은 24시간 이내에 진정된다. 구토형 식중독 증상은 *Staphylococcus aureus*에 의한 식중독과 증상이 매우 유사하다. Table 3에 *B. cereus*, *C. Perfringens*, *S. aureus*에 의한 식중독 증상과 관련 식품을 비교하였다.

Table 3. Clinical and epidemiological similarities between illnesses caused by *B. cereus*, *C. perfringens*, and *S. aureus*

	<i>C. perfringens</i> 장독소	<i>B. cereus</i> 독소		<i>S. aureus</i> 장독소
		설사형	구토형	
잠복기 (h)	8~22	8~16	1~5	2~6
지속기 (h)	12~24	12~14	6~24	6~24
설사, 복통	특징적	특징적	상당히 높은 빈도	높은 빈도
메스꺼움, 구토	드물다	때때로 발생	특징적	특징적
병원성	독소	독소	독소	독소
주요 매개 식품	조리된 육류, 가금류로 만들어진 소스	육가공식품, 스프, 야채, 푸딩, 가금류가공식품, 낙농제품	조리된 쌀, 파스타 (면류)	육가공식품, 가금류 가공식품

(출처: Lindbäck & Granum, 2001)

2. Infectious Dose

*B. cereus*의 설사형 식중독은 오염된 균수가 10^5 CFU/g 이상이면 발병하지만, 식중독 발생의 10% 정도는 10^5 CFU/g의 이하에서도 발생한다. 또한 $10^3 \sim 10^5$ CFU/g 의 낮은 범위에서도 노약자 등의 고위험군에게는 발병할 수도 있다. 또한 *Bacillus* 균주에 따라 독소 생산량이 차이가 있어서, 섭취한 식품에서 *B. cereus*가 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g 정도여도 완전히 안전하다고 할 수 없다.

구토형 식중독은 *B. cereus*가 $10^3 \sim 5 \times 10^{10}$ CFU/g에서부터 발생할 수 있다고 보고되었다. 그러나 균종 간 독소 생산능이 다르고, 섭취하는 사람의 민감도에 다르기 때문에 절대적이지는 않다. 일본에서 식중독이 발생한 식품에서 구토형 독소의 양은 $0.01 \sim 1.28 \mu\text{g/g}$ 으로 조사되었다. 일반적으로 독소에 양성 반응을 보인 식품에는 *B. cereus*가 10^5 CFU/g 이상 존재하였다. 그러나 모든 식품에서 *B. cereus*가 $10^4 \sim 10^5$ CFU/g가 존재하여도 항상 독소가 검출되지는 않는다.

발생 및 노출

1. 오염경로

*Bacillus cereus*의 1차적 서식처는 토양이다. 토양 1g당 포자 기준으로 $10^3 \sim 10^5$ 수준이 있다고 알려져 있다. *B. cereus*와 *B. thuringiensis*는 식

물의 뿌리 주위와 지렁이의 장에서도 발견된다. *B. cereus*는 찬 곳을 좋아하는 psychrotrophic 균주로 기후에 영향을 많이 받는다.

*B. cereus*의 2차적 오염 경로는 *B. cereus*가 생산하는 내생포자에 의한 강한 부착(adhesion) 특성 때문에 발생할 수 있다. 이 세균은 바이오필름을 만들어 식품 가공 설비에 표면에 부착되어 생존하고 있다가, 식품으로 전이되어, 오염시킨다. 실제로 우유 silo tank에 부착되어 있던 *B. cereus*가 우유를 오염시킨 보고도 있으며, 저온살균 처리 공정, 분유 제조 공정 등에서도 오염이 발생되고 있다.

복합조미식품에서 첨가되는 원부재료, 조직증강제, 피단, 허브, 향신료 등에서도 *B. cereus* 포자가 발견되었으며, 식품 포장재인 paper mill 공장과 포장재에서도 발견되었다.

결론적으로 *B. cereus*는 도처에 존재해서, 대부분의 익히지 않고 바로 먹는 식품에서의 존재는 피할 수가 없다. 따라서 위생적인 가공 설비 공정과 디자인이 가공식품의 오염을 최소화하기 위해 필수적이다.

2. 관련 식품

*B. cereus*는 토양세균의 일종으로 자연계에 널리 분포하므로 농작물을 비롯한 대부분의 식품에 오염되어 있다. 따라서 거의 모든 종류의 식품이 *B. cereus* 식중독과 연관이 있다고 할 수 있다.

*B. cereus*와 관련이 높은 원인식품으로는 설

사형인 경우 육류, 스프류, 바닐라소스, 소시지, 푸딩 등이며, 구토형은 쌀밥 및 볶음밥에 의한 것이 압도적으로 많다. 스파게티, 튀김국수 등 원인식품의 90%가 전분을 주체로 한 식품에 의하여 식중독이 발생하고 있다. 또한 *B. cereus*는 생우유의 아포 형성 미생물로 알려져 있으며, 살균한 우유나 완전한 우유에서도 분리되고 있다.

체 세균성 식중독에서 높은 비중을 차지하고 있지는 않다. 2003년에 3건, 2006년에는 5건이 발생하였으나, 2008년에는 14건에 376명의 환자가 발생하였다(Fig. 1). 2006년에 발생한 *B. cereus* 식중독은 어패류, 음용수, 육가공품, 복합조리식품, 야채류 등 다양한 식품이 원인이 되어 전국적으로 발생하였다.

오염현황

1. 국내 현황

1.1. 식중독 발생 현황

우리나라에서 *B. cereus*에 의한 식중독은 전

1.2. 오염현황

국내에서는 최근 국민 다소비식품인 생식(선식), 장류, 떡류 등에서 *B. cereus*가 발견됨으로써 큰 우려를 주고 있다. 시중에서 유통 중인 떡류, 선식, 장류 등에서 *B. cereus*의 오염도는 Table 4와 같다.

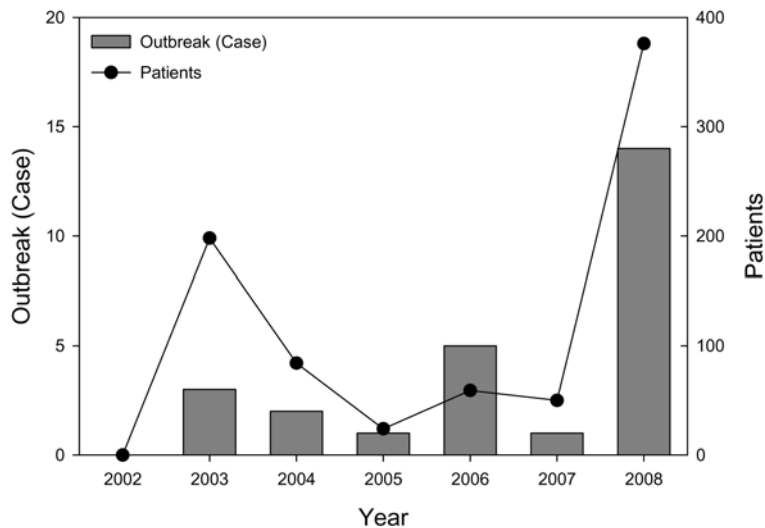


Fig. 1. Foodborne outbreaks by *B. cereus* reported by Korea between 2002 and 2008
 (출처: 식품의약품안전청, 식중독 발생 통계현황)

Table 4. Occurrence of *B. cereus* in *Sunsik, Kimbab, Rice Cake, Doenjang* and *Kochujang*

Sample	Result (CFU/g)	Detection rate (%)	Positive Samples /Total sample	Reference
<i>Sunsik</i>	< 10 ²	13.0	21 / 161	조용선 등 (2008)
	10 ² < ~ < 10 ³	20.5	33 / 161	
	> 10 ³	1.9	3 / 161	
<i>Kimbab</i>		21.7	2 / 23	김중범 등 (2006)
<i>Rice cake</i>		20	3 / 15	
Traditional <i>Kochujang</i>	< 10 ³	68	23 / 34	
	10 ³ < ~ < 10 ⁴	23	8 / 34	
	> 10 ⁴	9	3 / 34	
Industrial <i>Kochujang</i>	< 10 ³	54	7 / 85	강인형 등 (2005)
	10 ³ < ~ < 10 ⁴	23	3 / 85	
	> 10 ⁴	8	1 / 85	
Traditional <i>Doenjang</i>	< 10 ³	47	13 / 28	
	10 ³ < ~ < 10 ⁴	25	7 / 28	
	> 10 ⁴	14	4 / 28	
Industrial <i>Doenjang</i>	< 10 ³	75	12 / 16	
	10 ³ < ~ < 10 ⁴	19	3 / 16	
	> 10 ⁴	0	0 / 16	

2. 국외 현황

미국에서 1988~1992년 사이 발생한 총 식중독은 2,423건으로 77,375명의 환자가 발생하였다. 이중 *B. cereus*에 의한 식중독은 21건으로 433명의 환자가 발생하였으며, 주요 원인 식품은 중국 음식이었다. 이외에도 육류, 우유, 야채, 생선 등 다양한 식품이 *B. cereus*로 인한 식중독과 연관되었다.

호주의 New South Wales에서 1977~1984년 사이 *B. cereus*에 의한 식중독은 전체 식중독 발생의 39%를 차지하였으며, 대부분이 쌀과 관련되어 발생하였다.

각국에서 발생하는 *B. cereus* 식중독 형태는 나라별로 차이를 보인다. 일본은 구토형이 설사형보다 10배 이상 발생하는 반면, 유럽과 남아메리카에서는 설사형이 더 빈번하게 보고되었다. 이 차이는 국가 간에 존재하는 식이와 영양의 차이에서 오는 것으로 분석되고 있다.

유럽에서 발표된 주요 식품의 *B. cereus* 오염도는 Table 5와 같다.

위해평가

일반적으로 *B. cereus*에 의해 설사형 식중독

Table 5. Examples of incidence of *B. cereus* in various foods

Food categories	% of positive samples (limit of detection CFU/g)	Numbers of <i>B. cereus</i> in positive samples (CFU/g)
허브류와 향신료류	100% (10 ²)	10 ² ~10 ⁶
차가운 즉석편이식품	6~21%	10 ³ ~10 ⁵
(all categories positive)		
신선 채소류	0~100% (10)	10 ² ~ 8 × 10 ³
채소 샐러드류	2% (10 ²)	< 10 ³
조리된 냉장식품		
- 상온 보관	0% (10)	< 10
- 4°C 보관	0% (10)	< 10
- 10°C 보관	0~100%	10 ⁴ ~ 10 ⁶
밀가루	55% (10 ²)	10 ³
제과류	90% (10 ²)	10 ³ ~ 10 ⁴
저온살균 우유		
- 사용기한까지 7°C에서 보관	8% (10 ²)	< 10 ³ ~ > 10 ⁵
- 8일간 7°C에서 보관 후	56% (10)	10 ³ ~ 3 × 10 ⁵
분유	27% (10)	4 ~ 40 spores /g
조제분유	75% (0.04)	0.04 ~ 1 MPN/g

(출처: EFSA 2005)

이 발생하기 위해서는 균의 양이 1.2×10³~10⁸ CFU/g이고, 구토형 식중독 경우는 10³~5×10¹⁰ CFU/g 이다. 영국에서 *B. cereus* 식중독 발생시 오염균의 농도를 분석한 결과 10⁵~10⁹CFU/g 일 때 가장 많이 발생하였으며, 10⁵CFU/g 이하의 낮은 농도에서의 발생건수도 *B. cereus* 식중독 발생의 5.9%를 차지하였다.

일본에서 발생한 식중독에서 오염된 식품에 존재하는 구토형 독소의 양은 0.01~1.28 µg/g 범위였다. Table 6은 일본에서 구토형 식중독과 관련된 오염된 식품 시료에서 구토형 독소량을 분석한 것이다. 오염된 식품은 쌀, 면 관련제품

이었다.

1. *Bacillus cereus*의 성장 제어 및 비활성화

1.1. 온도의 영향

중온균인 *B. cereus*는 최적 성장 온도는 30~37°C이지만, 10~42°C에서와 냉장온도에서도 천천히 성장할 수 있다. 5개의 *B. cereus* 표준균주 카테일을 만들어 온도별로 doubling time을 측정한 결과 온도가 낮아질수록 lag time이 증가하여, 19.5°C에서는 1.6시간, 14.2°C에서는 2.9시간,

Table 6. Emetic toxin production in food samples implicated in vomiting-type food poisoning due to *B. cereus* in Japan

Incident no.	Incriminated food	Toxin titer (ng/g)
1	Fried rice	1280
2	Boiled rice	640
3	Chow mein	640
4	Boiled rice	320
5	Fried rice	160
6	Fried rice	160
7	Boiled rice	160
8	Curry and rice	80
9	Spaghetti	80
10	Boiled rice	80
11	Spaghetti	40
12	Noodle	20
13	Boiled rice	10
14	Fried rice	ND ^a

^a ND: not detected (< 5 ng/g)
(출처: Agata et al. 2002)

9.6°C에서는 4시간, 6.5°C에서는 6.7시간이었다. *B. cereus* 포자는 열에 강한 저항성을 가지고 있다. *B. cereus* 포자의 D₈₅ (85°C에서 미생물이 90% 사멸하는데 걸리는 시간)은 33.8~106분이 고, 증류수에서 D₉₅값은 1.5~36.2분이었으며, 우유에서는 1.8~19.1분이었다. D값은 *B. cereus*의 오염원에 따라 차이를 보인다. Table 7은 오염원에 따른 *B. cereus* 포자에 대한 열 저항성의 차이를 보여준다.

2. pH의 영향

*B. cereus*는 특별히 산에 저항성이 있는 세균

은 아니다. Citric acid로 산성화된 홍당무 기질 하에서 성장을 위한 최소 pH 값은 4.5~4.75 사이였으며, 염산으로 우유를 산성화하였을때 37°C, pH 4.1에서 약한 성장이 관찰되었다. 하지만 25°C에서는 *B. cereus*의 성장률이 pH 7과 5.5 사이에서 거의 일정하다. 그러나 그 이하에서는 급격히 떨어진다.

3. 염의 영향

*B. cereus*의 성장에 대한 NaCl의 영향은 시험에 따라 일치된 결과를 보이지는 않는다. *B. cereus*의 성장 최소 pH인 pH 4.7, NaCl 농도

Table 7. Examples of heat resistance of *B. cereus* spores, expressed as time for one decimal reduction of the initial number of spores(D)

Origin of strains	Number of strains tested	Heating Temp. (°C)	D (min)		
			Mean	Min.	Max.
Milk	6	95	2.0	1.8	2.8
		100	0.,8	0.7	1.5
Various dairy products	25	100	3.5	2.0	5.4
Rice	6	92	22	16	36
		100	4.8	4.2	6.3
Rice	13	95	2.8	1.5	6.0
Various foods	12	90	NC	2.2	> 100
Cooked vegetables	52	90	NC	0.7	5.9
Spoiled canned vegetables	2	129.4	NC	0.19	0.28
Foodborne diarrhoeal cases	6	100	6.7	0.6	27
Vegetables	2	90	4.0	21.5	39.0

(출처: EFSA, 2005)

0.5%(w/v) 조건 하에서는 시험한 모든 온도 구간(14~41°C)에서 성장이 가능하였다. 그러나 5%의 NaCl 농도 하에서는 21~39°C의 온도에서만 성장이 관찰되었고, 성장을 위한 최소 pH는 5.5였다. 7% NaCl 농도에서는 어떤 온도 조건에서도 성장이 관찰되지 않았다.

4. 기타

이산화탄소와 산소 농도가 *B. cereus*의 성장에 영향을 주는지를 확인한 결과, 성장을 억제하는 최대 이산화탄소 농도는 50%였다. 시험한 어떤 조건에서도 완전히 성장을 억제하지는 못하였으나, 이산화탄소의 비가 증가할수록 *B. cereus* 성장률은 감소되었다.

세균의 포자 제어를 위해서는 non-thermal 기술이 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 고압처리와 열처리를 단계별로 사용하여 효과를 높이기도 한다. *B. cereus*의 포자는 irradiation에도 내성을 가지고 있다고 알려져 있다.

일반적으로 *B. cereus*는 nutrient broth 하에서 0.1M 초산(acetic acid), 개미산(formic acid), 유산(lactic acid)으로 비활성화 된다. 따라서 제빵 분야에서 *B. cereus*의 성장을 억제하기 위해서, 소르빈산, 프로피온산 등을 첨가하며, 가공 치즈, 낙농제품, 캔음식 등에서는 유산균이 생산하는 bacteriocin인 nisin을 사용하기도 한다. 이외에도 벤조인산, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), polyphosphate 등도 사용된다.

각국의 관리현황

1. 기준 규격

우리나라의 식품공전에서 2009년 현재 *B. cereus*를 규제하고 있는 식품 유형은 장류(메주 제외) 및 소스류, 복합조미식품, 절임식품, 조림식품, 특수용도식품, 생식, 즉석 섭취·편의식품 등이 있다. 영아용 조제식, 영유아식 등이 포함된 특수 용도식품은 가장 엄격하게 기준을 설정하여 g당 100 CFU 이하로 기준이 설정되어 있다. 생식류, 즉석섭취·편의식품과 더 이상의 가공, 가열 조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공식품이 g당 10^3 CFU (평균 제품은 음성)이하로, 장류(메주 제외), 소스류, 복합조미식품, 절임식품, 조림식품 등은 *B. cereus*를 10^4 /g 이하(평균 제품은 음성)로 기준을 설정하였다.

유아식의 경우 호주, 미국, 유럽 등 각 나라에서 *B. cereus*의 기준을 g당 100 이하로 기준을 설정하고 있다.

분석법

1. 국내 식품의 공인 방법

우리나라 식품공전 미생물 시험법 중 바실러스 세리우스(*Bacillus cereus*)의 시험법은 정성 시험법과 정량시험법, 두 가지가 있다. 정성시

험법은 인산완충희석액을 희석액으로 사용하여 MYP 분리배지에 도말접종하여 30°C에서 48시간까지 배양하여 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별하여 형태학적, 생리학적 확인시험을 거친 후 확정한다. 정량시험법으로는 정성시험과 동일한 방법으로 시료를 처리하여 최초 희석액 $10^2 \sim 10^6$ 까지를 MYP 한천평판배지에 단계별 희석용액 0.2 mL씩 5장을 도말하여 총 접종액이 1 mL이 되게 한 후 30°C에서 24시간 배양한 후 집락 주변에 lecithinase를 생성하는 혼탁한 환이 있는 분홍색 집락을 계수한다. 전형적인 집락은 정성시험과 같은 방법으로 확인 시험을 실시한다.

2. 국내 *B. cereus* 감염증 확인법

국내에서 *B. cereus* 감염증의 확인은 분변 등 인체시료에서 균이 검출되어야 한다. 식품에서의 시험방법과 동일한 방법으로 시험하여 균이 확인되고, 식품과 배양균에서 모두 장독소 단백질이 검출되어야 한다. 또한 PCR법으로 독소 유전자 확인 시험도 거친다. PCR을 이용한 설사형 식중독 *B. cereus* 진단법에는 독소 관련 유전자인 단백질 복합체 2종(hemolysin BL, nonhemolytic enterotoxin)과 enterotoxic 단백질 3종(enterotoxic T, cytotoxin K, enterotoxin FM) 등 총 5 종류의 독소 단백질에 대한 9종의 primer 9종을 이용하여 Multiplex-PCR을 수행한다.

3. 외국의 공인 시험법

대부분의 나라에서 식품의 *B. cereus*를 모니터링하기 위해 우리나라와 같이 평판 도말법을 많이 사용한다. 미국과 대부분의 유럽에서 사용하는 선택배지에는 egg yolk가 포함되어 있어서, 선택배지에서 성장한 집락주위가 혼탁하고 항생제인 polymyxin B에 대해 내성이 있는 것을 *B. cereus*로 확인한다. Association of Official Analysis Chemists International(AOAC International)이 출간한 'Official Methods of Analysis'에서도 식품에서 *B. cereus*의 정량시험을 위해 mannitol-egg yolk agar를 사용한다. 살아있는 *B. cereus*의 집락 수가 g당 1,000 이상이라면, tryptic soy polymyxin broth를 사용하여 Most Probable Number(MPN) 방법을 권장하고 있다. 의심되는 식품에서 *B. cereus*의 정확한 수준을 예측하는 것을 불가능하기 때문에 직접 균을 측정하는 방법과 MPN 방법이 연속적으로 사용된다.

4. 독소 검출법

4.1. 설사형 독소 검출법

(Diarrhoeal toxin detection method)

*B. cereus*가 생산하는 장독소를 검출하기 위해서는 2개 제품의 immunoassy kit가 유용하다. 'TECRA Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay(BDE-VIA)'는 Bioenterprises Pty

Ltd(Roseville, Australia)가 제작하여 TECRA diagnostics(Batley, UK)가 판매하고 있는 것이고, OXOID(Basingstoke, UK)가 제작한 'Bacillus cereus Enterotoxin Reverse Passive Latex Agglutination(BCET-RPLA) kit'도 있다. 각 제품별로 서로 다른 항원을 검출하기 때문에 두 개의 kit 결과에는 차이가 있기도 하다. 일반적으로 BCET-RPLA는 HBL의 L2 component에 특이적이라는 것이 알려져 있다.

세포주를 이용하여 설사형 독소를 검출할 수도 있다. 주로 많이 사용되는 세포주는 Vero(monkey kidney)와 CHO(Chinese hamster ovary)이다. 이들 세포주를 이용하여 세포독성평가(Cell Cytotoxicity Assays)를 할 수도 있다.

4.2. 구토형 독소 검출법

(Emetic toxin detection method)

설사형 독소처럼 kit를 이용하여 비교적 간단하게 구토형 독소를 검출하는 방법은 아직 없다. 현재 주로 사용되는 방법은 cell culture assays이다. 주로 사용되는 세포주는 Int 407, CHO, Hep-2로, 이들 세포주에서 일어나는 미토콘드리아의 vacuolation을 광학현미경으로 관찰하여 확인한다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 이용하는 HEp-2 cell based assay 방법이 좀 더 민감하다고 보고되었다.

참고문헌

1. 강인형, 모니터링 관내 유통식품에 대한 품질평가, 식품의약품안전청 05202지특화571, 한국, 2005
2. 김중범, 박용배, 박명기, 신상운, 권연옥, 고환옥, 김종찬, 곡류가공품에서 분리한 *Bacillus cereus*의 독소 유전자 분포 연구, 경기도 보건환경연구원보, 156-164, 2006
3. 식품의약품안전청, 식품 위해물질 총서 “식품중 바실러스세레우스란?”, 2007
4. 식품의약품안전청, 2006년 식중독 발생현황, 2007
5. 조용선, 정은영, 이명기, 양철영, 신동빈, 선식에서 *Bacillus cereus*의 분리 및 특성 조사와 열에 대한 사멸률 연구, 한국식품위생학회지, 23(4) 343-347, 2008
6. Agata N, Ohta M, Yokoyama K, Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods, Int. J. Food Microbiol, 73, 23-27, 2002
7. Burgess G, Horwood P, Development of improved molecular detection methods for *Bacillus cereus* toxins. Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No 04/049, RIRDC Project No UJC-8A, 2006
8. EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs, The EFSA Journal, 175, 1-48, 2005
9. Final assessment report application A454, *Bacillus cereus* limits in infant formula. Food standards Australia New Zealand, 2004
10. Gilbert RJ, Stringer MF, Pearce JM, The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of poisoning, J. Hyg., 71, 433-444, 1974
11. Lindbäck T, Granum PE, Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxin, In: Methods in biotechnology, Vol 21; Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols. Human Press Inc., Totowa, NJ. 2005,
12. Marianne D. Miliotis, Jeffrey W, Bier. *Bacillus cereus* In: International Handbook of Foodborne Pathogens, MARCEL DEKKER, Inc. New York, USA, 2003
13. Peters AC, Thomas L, Winpenney JWT, Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature, FEMS Microbiological Letters, 77, 309-314, 1991

구민선 이학박사

-
- 소속 한국식품연구원 안전성연구단
 - 전문분야 미생물(위해미생물, 항균물질)
 - E-mail minsk@kfri.re.kr
 - TEL 031-780-9161