KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 42, No. 3, pp. 361~367 (2010)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

쌀밥에서 분리한 *Bacillus cereus*와 *Bacillus thuringiensis*의 독소유전자 분석

전종혁 · 박종현*
경원대학교 식품생물공학과

Toxin Gene Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolated from Cooked Rice

Jong-Hyuk Jeon and Jong-Hyun Park*
Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University

Abstract Bacterial contamination of cooked rice was analyzed to evaluate the microbial safety. Thirty raw rice samples were collected in Korea and cooked in an electric rice cooker. Mesophilic aerobe, food-poisoning *Bacillus cereus* group, and their toxin genes were determined on cooked rice. The percentage of total mesophilic aerobe based on 1-3 log CFU/g was 27% among the samples. *Bacillus* spp. in MYP selective medium was similar to the number of mesophilic aerobe, whileas *Bacillus* spp. was detected in most samples after enrichment. Thirty-seven isolates from 30 cooked rices were identified as *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. valismortis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, and *Brevibacillus laterosporus*. Twenty isolates (54%), more than half of the isolates, were *B. thuringiensis* while nine (27%) were identified as *B. cereus*. All *B. thuringiensis* isolates possessed non-hemolytic toxin genes and interestingly, seven *B. cereus* among nine isolates possessed emetic toxin genes. More *B. thuringiensis* was present on the cooked rice than *B. cereus* and most *B. cereus* possessed emetic toxin genes rather than diarrheal toxin genes. Therefore, food-borne outbreak due to *B.cereus* on the cooked rice kept at room temperature might be examples of emetic food-poisoning.

Key words: cooked rice, mesophilic aerobe, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, emetic toxin gene

서 론

쌀밥은 우리의 주식으로 식생활에서 절대적인 위치를 차지하고 있으며 최근에는 이를 가공하여 산업화가 이루어지고 있다. 그러나 국산 쌀의 미생물 오염현황을 조사한 결과에 의하면 쌀은 5-6 log CFU/g의 높은 세균 오염정도를 보여주고 있으며 *Bacillus cereus* group균들도 1-2 log CFU/g 검출되어 주식으로서 쌀 원료의 미생물 안전성은 취약한 상태이다(1). 따라서 이러한 원료로 생산되는 생식이나 선식으로부터 이들 세균의 오염을 제거하기 위한 노력을 기울이고 있다(2). 쌀의 품질을 저하시키거나 부패시키는 세균들은 주로 *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. circulans*인 것으로 알려져 있으나 국내에서 쌀밥의 품질에 영향을 주고 있는 이러한 세균에 대한 자료를 찾기가 어렵다. 매년 급속하게 증가하고 있는 식중독 발생은 김밥, 도시락 등의 조리식품에 의한 사고가 약 20%를 차지하고 있어 취반용 또는 가공용 쌀의 미생물적인 위생도를 높이는 연구기술개발이 시급히 요망된다(3).

*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea
Tel: 82-31-750-5523
Fax: 82-31-750-5273
E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr
Received April 12, 2010; revised May 5, 2010;
accepted May 14, 2010

B. cereus group에는 *B. cereus, B. thuringiensis, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. weihenstephanensis,* 그리고 *B. anthracis*가 있다(4,5). 이 *B. cereus* group은 유전학적으로 유사하고 표현형은 매우 다양하나 모두 lecithinase 양성이고, mannitol을 분해하지 못하며, Voges Prausker 양성이다. 이들은 토양, 물, 대기 등 주변 환경에 널리 분포하고 있는 포자를 형성하는, Gram 양성 통성 혐기성 세균으로서, 탄수화물 식품의 제조, 유통 및 조리과정에서 오염되어 식품의 부패 또는 사람의 질병을 일으킨다(3,4).

이중에서 *B. cereus*는 구토형 혹은 설사형 식중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. *B. cereus*는 소장에서 증식하는 동안 생성되는 열에 약한 장독소(enterotoxin)에 의해 설사 식중독의 원인이 될 수 있다(6). *B. cereus*는 구토형 독소(emetic toxin)와 아울러 최소 5가지의 다른 enterotoxin을 생성하는 주요한 병원균이다. Hemolysin BL(HBL)과 non-hemolytic enterotoxin(NHE)은 3개의 단백질로 구성된 반면 EntFM, CytK와 BceT는 one-component toxin이다(7). HBL과 NHE enterotoxin은 *B. cereus*에 의해 발생한 설사형(diarrheal type) 식중독의 원인이 된다고 알려져 있는데 이 중에서 HBL은 *B. cereus* 설사증에 가장 주된 독성 요소로 여겨지고 있다(8). 그런데 독성을 나타내기 위해서는 구성요소 모두가 존재해야 하며, 세 구성요소의 비율이 1:1:1일 때 독성이 가장 높을 수 있다고 보고하였다(9). *B. cereus*는 식품에 널리 존재하지만 *B. cereus*에 의해 발생된 설사형 식중독은 비교적 드물고 설사를 일으키는 능력은 균주마다 다르다고 알려져 있다(10).

설사형 장독소와는 다르게 구토형 독소의 경우는 단지 그 물질이 valinomycin과 아주 유사한 cereulide([D-*O*-Leu-D-Ala-L-*O*-

Val-L-Val]$_3$)로만 알려져 있다(11). 이 cereulide는 작고 열안정성이 아주 큰 cyclic dodecadepsipeptide로써 동물에서 세포독성을 가지고 있는데 potassium ionophore로 작용하여 미토콘드리아에 독성을 주는 것으로 알려져 있다(12,13). 구토형 *B. cereus*에 의한 식중독은 주로 튀기거나 끓인 쌀 등과 관련된 제품과 파스타와 국수같은 곡류식품 등의 전분질 식품에서 미리 분비되어 있는 cereulide에 의해 일어나고 있다. 또한 단일식품에 여러 개의 다른 cereulide를 생산하는 균이 오염될 수 있다(14). *B. cereus*는 식품과 환경에 어디든지 존재하지만, cereulide는 특별한 *B. cereus*에 의해 생성된다고 한다(15). 이러한 *B. cereus*는 생장 조건이나 배지가 독소 생성에 강한 영향을 주며 포자 형성과 enterotoxin 생성과의 관계는 명확하지 않지만, emetic toxin의 생성은 포자를 형성하는 동안에 생기는 것으로 보고되어 있다(16,17).

*B. thuringiensis*는 δ-entotoxin이라 불리는 crystalline intracellular protein을 생성하고 위장질환의 발병과 관련이 있으며(18,19), 몇몇 *B. thuringiensis*는 enterotoxin을 생성하여 식중독을 유발한다고 보고되고 있다(20,21). 게다가 몇몇 *B. thuringiensis*는 *B. cereus*의 발병과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자를 지닌 것으로 보고되었다(22).

최근의 냉장유통이 보편화되었어도 냉장식품의 유통기간 연장과 노약자의 증가는 *B. cereus*의 식중독 위험을 증가시키고 있다. 그리고 구토형 독소를 검출하는 보편적인 방법이 없어 오로지 설사형 독소의 분석에만 치우치는 경향이 있다. 이것은 식중독 질병의 원인으로써 *B. cereus*를 과소평가하게 하는 원인이 될 수 있다. 구토형 독소를 생성하는 *B. cereus*는 설사형 독소를 생성하지 않기 때문이다(16). 이러한 *B. cereus*는 식중독을 유발할 뿐만아니라 상처, 눈등에의 감염에도 관여하고 있으나 식중독성 *B. cereus*의 분류, 독소 및 그 생리학, 생화학적인 연구는 산발적이었다. 그리고 *B. thuringiensis*의 식중독 유발에 대한 연구는 더욱 더 부족한 실정이다.

그러므로 이러한 *Bacillus*에 대한 적절한 정보의 확보는 *Bacillus* 유발 식중독의 제어와 쌀밥의 안전관리에 기여할 것으로 보인다. 우리는 세계적으로 몇 되지 않은 *B. cereus* 식품기준규격을 가지고 있는 나라인데 2005년 생식류 등에 *B. cereus*의 규정이 새롭게 제정(3)된 이후에 이들을 관리하고 있는데 현재 규정되어 있는 법규가 효력을 발휘하기 위해서는 시급히 *B. cereus* group의 분리동정, 더 정확한 PCR 선별분류와 보다 더 정밀한 생리화학적인 특성을 근거로 한 첨단 기법의 개발 적용이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 우리 쌀밥에 존재하는 식중독 유발세균인 *B. cereus* group의 분포와 그의 독소 특성을 분석평가하여 쌀밥의 안전관리에 활용될 기초자료를 확보하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

쌀밥취반과 중온성 호기 세균수 계수

본 연구를 수행하기 위하여 전국에서 생산되고 있는 쌀 30종을 수집하였다. 경기도 8종, 강원도 2종, 충북 2종, 충남 3종, 전북 7종, 전남 5종, 경북 3종 등이었으며 품종별로는 일반계 11종, 고시히카리 4종, 추청 7종, 새추청 1종, 기타 7종이었다. 이들은 모두 도정미(9분도)이었고 3-4월에 수집하였다. 전국 각지에서 수집된 쌀을 수돗물로 2회 고르게 수세한 후 일반 취반기로 취반하였다. 취반 직후 밥통을 외부로 옮겨서 1-2시간 상온에 방치하여 온도를 낮추었다. 멸균 spatula로 쌀밥 25 g을 골고루 무균백에 무균적으로 채취하고, buffered peptone water(BPW) 225 mL (Oxoid, Hamlshire, UK)를 넣어 균질기(IUL, Barcelona, Spain)로 교반하였다. 총 균수를 계수하기 위하여 plate count agar(PCA) (Oxoid)에 $10^{1,3,5}$까지 멸균 인산완충 희석액으로 희석하여 도말한 후 37°C 항온조에서 12-24시간 배양한 후 콜로니를 계수하였다.

Bacillus cereus group 분리 및 증균 동정

희석액 혹은 증균배양액 25 mL를 취한 후, 225 mL의 멸균 인산완충 희석액에 가하여 2분간 고속으로 균질화하여 시험용액으로 하였다. 이 인산완충 희석액을 사용하여 10^{-2}에서 10^{-6}까지 10배 단계 희석하여 시료를 조제하였다. MYP 한천평판배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 단계별 희석용액 0.2 mL씩 5개에 도말하여 총 접종액이 1 mL이 되게 한 후 30°C에서 24시간 배양한 후 집락 주변에 lecithinase를 생성하는 혼탁한 환이 있는 분홍색 집락을 계수하였다. 계수한 평판에서 전형적인 집락을 선별하여 PCA 한천배지에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 그람염색을 실시하여 포자를 갖는 그람양성, catalase, 긴 형태의 간균으로 확인된 균은 운동성, β-hemolysis, 혐기배양시 포도당 이용 등의 생화학시험을 실시하였다(3,23). 그리고 MYP배지에서 분홍색콜로니를 제외한 나머지 균들도 분리하여 간단한 생화학적인 분석과 아울러 동정하였다. 동정은 TSA한천배지(Difco)에서 계대한 후 VITEK2™(BioMrieux, Marcy l'Etoile, France) 혹은 API kit™ (BioMrieux)으로 동정하였다.

B. cereus group에서 *B. cereus, B. thuringiensis* 선별 동정

쌀밥에서 분리된 MYP 선택배지의 분홍색 콜로니 *B. cereus* group로부터 *B. cereus, B. thuringiensis*를 선별 동정하고자 하였다. 이는 *gyrB*, *cry* primer를 활용한 multiplex PCR을 수행하여 *B. cereus, B. thuringiensis*를 선별 동정하였다(24). 이때 필요한 primer는 Table 1에 표기된 *gyrB*와 *cry*유전자를 검출하는 primer를 사용하였다. PCR은 30 cycles로 94°C에서 1분, 58°C에서 1.5분, 72°C에서 2.5분, 마지막으로 72°C에서 7분을 수행하였다. 또한 결정체 독소를 갖고 있는 *B. thuringiensis*만의 특성을 이용하여 *cry* 유전자를 target으로 하는 K3, K5 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다(25). PCR은 gene cycler(BioRad, Hercules, CA, USA)로 25 cycles로 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 1.5분, 마지막으로 72°C에서 7분을 수행하였다. PCR 산물은 0.5% TAE buffer에 0.5 μg/mL ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel로 전기영동한 후 UV transilluminator(Seolin Biotech, Suwon, Korea)에서 amplicon을 확인하였다.

B. cereus group의 설사형과 구토형 독소유전자 분석

*B. cereus*와 *B. thuringiensis*에서 4개의 설사형독소와 구토형 독소유전자를 PCR로 선별동정하였다. PCR은 *hblA* 유전자의 검출을 위해 5 cycles로 70°C에서 1분, 72°C에서 1.5분, 30 cycles로 94°C에서 30초, 65°C에서 1분, 72°C에서 1.5분, *hblCD* 유전자의 검출을 위해 36 cycles로 94°C에서 30초, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분을 각각 수행하였다(26). PCR 산물은 0.5% TAE buffer에 0.5 μg/mL ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel로 전기영동한 후 UV transilluminator(Seolin Biotech)에서 밴드를 확인하였다. Nonhemolytic enterotoxin의 검출을 위해 *nheA* 유전자를 target으로 하는 nheA344S, nheB843A primer를 사용하였으며, PCR은 30 cycles로 94°C에서 15초, 55°C에서 45초, 72°C에서 2분을 수행하였다(27). Enterotoxin T 독소의 검출을 위해 *bceT* 유전자를 target으로 하는 ETF, ETR primer를 사용하였으며, PCR은 35 cycles로 94°C에서 20초, 56°C에서 20초, 72°C에서 20초를 수행하였다(27). Cytotoxin K 독소의 검출을 위해 *cytK* 유전자를 target으로 하는

Table 1. Primers used to detect the emetic/enterotoxin genes from *B.cereus* group with PCR

Target gene	Primer	Primer sequence (5'→3')	Product size(bp)	Reference
gyrB	BC1 BC2r	ATTGGTGACACCGATCAAACA TCATACGTATGGATGTTATTC	365	22
gyrB	BT1 BT2r	ATCGGTGATACAGATAAGACT CCTTCATACGTATGAATATTATTT	368	22
cry	K3 K5	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC AGGACCAGGATTTACAGGAGG	1600- 1700	23
hblA	HblA1 HblA2	GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA	873	24
hblC	HBLC-N HBLC-C	AATAGGTACAGATGGAACAGG GGCTTTCATCAGGTCATACTC	399	24
hblD	HBLD-N HBLD-C	AATCAAGAGCTGTCACGAAT CACCAATTGACCATGCTAAT	439	24
nheA	nheA344S nheB843A	TACGCTAAGGAGGGGCA GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	499	25
bceT	ETF ETR	TTACATTACCAGGACGTGCTT TGTTGTGATTGTAATTTCAGG	428	25
cytK	F2 R7	AACAGATATCGGTCAAAATGC CGTGCATCTGTTTCATGAGG	623	26
ces	CesF1 CesR2	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	1269	27

F2, R7 primer를 사용하였으며, PCR은 30 cycles로 95°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분을 수행하였다(28). 구토형 독소를 검출을 위해 *ces* 유전자를 target으로 하는 CesF1, CesR2 primer를 사용하였으며, PCR은 95°C에서 15분, 5 cycles로 95°C에서 1분, 53°C에서 75초, 72°C에서 50초, 25 cycles로 95°C에서 1분, 58°C에서 75초, 72°C에서 50초, 마지막으로 72 °C에서 5분을 수행하였다(29).

결과 및 고찰

쌀밥으로부터의 호기성 중온균수와 *B. cereus* group의 분포

전기밥솥에서 취반을 한 후 밥을 상온에서 약 1-2시간 식힌 후 총균수와 *B. cereus* group의 분포를 분석하였다. 30개의 쌀밥시료로 부터 미생물을 12시간 이상 배양한 배지에서 검출한 결과 균이 검출되지 않은 것부터 최대 3 log 규모까지 균수가 나타났다. 30개의 쌀밥중 8개의 시료(27%)에서 총균수가 1-3 log CFU/g 규모로 검출되었고 22개의 시료에서는 균이 검출되지 않았다. 그리고 *B. cereus* group 선택배지 MYP에서의 계수결과도 8개의 시료(27%)에서 균이 검출되었으며 1-3 log 규모의 *Bacillus*가 분포가 되어 있는 것으로 분석되었다. 그러나 MYP에서 균이 검출되지 않은 시료들도 증균한 후에는 *Bacillus* 균들이 검출되었는데 약 80%의 시료인 23개에서 *Bacillus*가 분포하고 있는 것을 알 수가 있었다. 그리고 총균수 계수 결과와 *B. cereus* group의 결과를 비교했을 때, 거의 유사한 계수가 보이는 것을 Table 2로부터 확인할 수 있다. 그러므로 쌀밥의 총균수의 대부분은 *Bacillus* 계통인 것으로 보인다.

쌀밥의 총세균수 및 *Bacillus*에 대한 보고는 많지 않은 것으로 보인다. 쌀밥에는 총 호기성 중온균이 2 log 규모로 보고(30)되어 있고 쌀밥에는 *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. circulans* 등이 주로 오염되어 있으며 밥통속에서 품질저하를 일으키며(29) 또한 부패를 유발한다고 하였다(32). 아울러 다른 연구에서도 *B. cereus, B. thuringiensis, B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus*등의 유해 세균들이 검출되었다(33). 그리고 쌀밥에 *B. cereus*가 2.77 log CFU/g 존재하여 식중독의 위험성에 있다고 보고하였다(34). 따라서 일반적으로 27%의 쌀밥에서 1-3 log CFU/g정도의 총 중온성 호기균과 이와 같은 정도로의 *Bacillus* 세균이 존재하는 것으로 보인다.

쌀밥으로부터의 *B. cereus* group 분리 및 동정

열처리되는 쌀밥에서 자랄 수 있는 세균은 포자를 형성하여 고온의 조건을 견딜 수 있어야 한다. 포자를 형성할 수 있는 균은 *Bacillus* 속과 *Clostridium* 속 등이다. 그러나 *Clostridium* 속은 편성 혐기성(strict anaerobe)균으로서 공기중에 노출되었을 때 성장이 잘 이루어지지 않아 상온에서 보관하는 쌀밥내에서 생육이 어렵다. 취반 후 쌀밥에서 *Bacillus*속에 속하는 일부는 독소를 생산하여 식중독을 일으킬 수 있는 반면, 다른 일부는 강한 효소활성으로 인해 식품의 부패를 유발하게 된다. 이러한 *Bacillus* spp.는 매우 다양한 종들이 포함되어 있는데 Gram(+)로 내생포자(endospore)를 형성하는 호기성 간균으로 보통 catalase효소를 가지고 있다(4,5).

취반 직후의 쌀밥으로부터 *B. cereus* group을 위한 MYP 선택배지상에서 검출되는 콜로니로부터 29개의 *B. cereus* group를 분리하였다. 일차적으로 간단한 생화학적인 특성을 분석하고 다시 분리된 균을 API CHB50, VITEK2 Rapid identification system (BioMrieux), 그리고 PCR를 사용하여 동정하였다. MYP상에서 노란색 콜로니 등을 나타내는 균체의 경우 API CHB50, VITEK2를 이용하고 분홍색 콜로니를 나타내는 균주의 경우 *B. cereus* group으로 간주하고 곧바로 PCR의 방법을 이용했다. API kit는 생화학테스트 결과를 API web에서 확인하였고 ID%의 경우 95% 이상의 결과를 나타냈다. VITEK2의 경우 얻어낸 결과 중 ID%가 최소 85% 이상인 결과만을 선정하여 다음 실험으로 이어 진행했다.

이들 30개의 쌀밥으로부터 MYP배지에서 37균주를 분리하였고 이 분리균주를 동정하였는데, 이들은 *B. thuringiensis*, *B.*

Table 2. Viable counts of mesophilic aerobe and *Bacillus* spp. for the cooked rices on PCA and MYP medium (Unit: log CFU/g)

Raw rice Number	Total viable count on PCA	*Bacillus* spp. on MYP
R-1	-	+
R-2	2.003	2.230
R-3	2.000	1.602
R-4	3.700	+
R-5	-	+
R-6	-	+
R-7	-	+
R-8	-	+
R-9	1.000	+
R-10	-	+
R-11	-	+
R-12	-	1.000
R-13	1.000	1.000
R-14	-	1.000
R-15	-	+
R-16	2.505	2.519
R-17	1.000	1.477
R-18	-	1.000
R-19	-	+
R-20	-	-
R-21	-	+
R-22	-	-
R-23	-	+
R-24	-	-
R-25	-	+
R-26	-	-
R-27	-	-
R-28	-	-
R-29	-	-
R-30	2.000	+

-: Non-detected, +: Detection after enrichment

cereus, *B. valismortis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Brevibacillus laterosporus* 등으로 나타났다(Table 3). 이들은 모두 Gram(양성), catalase(양성)이었고 용혈활성은 *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*에서 관찰되었다. 37개의 분리 균주 중 50% 이상인 20개(54%)의 분리주가 *B. thuringiensis*로 나타났고 그 다음으로 9개(27%) 분리주는 *B. cereus*이였다. 그리고 3균주(8%)의

Table 3. Biochemical characteristics and classification of identified isolates from cooked rices with MYP selective medium

Isolate identification	Hemolysis	Isolate number/ Total (%)	ID method (%ID)
B. thuringiensis	+	20/37 (54)	MYP, PCR
B. cereus	+	9/37 (27)	MYP, PCR
B. valismortis	-	3/37 (8)	VITEK2 (90)
B. pumilus	+	1/37 (3)	VITEK2 (95)
B. coagulans	-	1/37 (3)	VITEK2 (85)
B. lichemiformis	-	1/37 (3)	VITEK2 (96)
Brevibacillus laterosporus	+	1/37 (3)	VITEK2 (85)
Geobacillus stearothermophilus	-	1/37 (3)	API kit (98)

Symbols: +, hemolysis; -, non-hemolysis

*B. valismortis*와 나머지 균들은 1개(3%)씩으로 동정되었다. 분리 균주 대부분이 *B. cereus* group으로 식중독을 유발할 수 있는 세 균으로 분석되었고 분리된 *B. cereus* 9균주중 *B. cereus* 16번 균주만 다른 분리 *B. cereus*와 다른 당자화성을 보여 주었다(Table 4). *B. valismortis, B. pumilus, B. licheniformis* 등의 *Bacillus* spp.는 쌀밥의 저장시 부패를 일으키고 *B. licheniformis, B. pumilus*(35)의 경우는 식중독 발병과도 원인이 있다는 사례가 알려져 있다. *Bacillus* spp.의 경우 높은 효소 활성에 의해 식품의 부패에 주된 원인으로 알려져 있고, 따라서 이들 균에 대한 제어 연구는 쌀가공식품에 있어 필수적이라고 할 수 있다.

분리균주 중 절반 이상의 분포를 보이는 *B. thuringiensis* 중 몇몇 *B. thuringiensis*는 enterotoxin을 생성한다고 보고되고 있고 *B. cereus*의 발병과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자를 지닌 것으로 보고되었다(20,22). 그리고 미국의 생쌀에서 분리한 *B. cereus* group를 분석한 결과에 의하면 주로 *B. cereus*가 대부분을 차지하고 있었고 다음으로 *B. thuringiensis*가 분리되었는데 *B. cereus*가 약 8배나 더 많이 검출된 것으로 보고되었다(36). 그러나 덴마크 즉석섭취 식품중에서 전분이 함유된 조리식품에서 *B. cereus*-like bacteria가 검출되었고 이들 40개중에서 대부분인 31개가 *B. thuringiensis*로 확인되었다(37). 본 연구에서는 *B. thuringiensis*가 *B. cereus*보다 약 2배나 더 많이 검출되었는데 국가별 혹은 식품별 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*간의 상대적인 분포비율은 차이가 있는 것으로 보인다. 이러한 *B. thuringiensis*와 아울러 식중독을 주로 유발시키는 *B. cereus*는 취반 후의 쌀밥도 적절한 온도로 보관이 이루어지지 않으면 증식하여 식중독을 유발시킬 수 있을 것으로 보인다(38).

Table 4. Carbohydrate assimilation of isolated *B. cereus* from cooked rice by API rapid identification CHB50

No. strain	Carbohydrate					
	Salicin	Amidon	Glycogen	D-Turanose	D-Tagatose	L-Fucose
B. cereus No.16	-	+	+	-	-	-
B. cereus No.18	+	-	-	+	+	-
B. cereus No.19	+	-	-	+	-	-
B. cereus No.20	+	-	-	-	-	-
B. cereus No.21	+	-	-	+	-	-
B. cereus No.22	+	-	-	(+)	-	-
B. cereus No.23	+	-	-	+	(+)	(+)
B. cereus No.24	+	-	-	-	-	-
B. cereus No.25	+	-	-	+	-	-

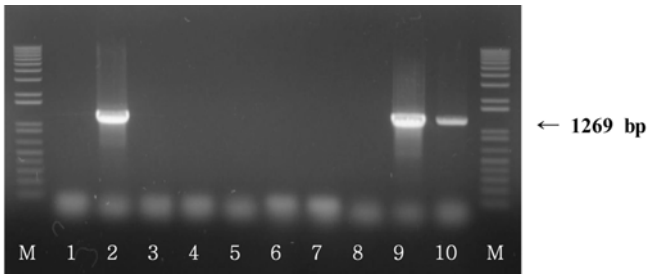

Fig. 1. Detection of *ces* gene for *B. cereus* by CesF1, CesR2 primer. Lane 1, *B. cereus* KCCM 40935 (negative control); Lane 2, *B. cereus* NCTC 11143 (positive control); Lane 3-10 *Bacillus cereus* isolates.

*B. thuringiensis*와 *B. cereus*의 독소유전자 분석

PCR을 이용하여 hemolysin BL(HBL), non-hemolytic enterotoxin (Nhe), enterotoxin T(BceT), cytotoxin K(CytK), emetic toxin (Ces)(Fig. 1)의 존재유무를 각각의 primer를 사용하여 분석하였다. 현재까지 설사형 식중독은 HBL, Nhe toxin이 주로 유발시키고 구토형 식중독은 Ces toxin(cerulide)이 유발하는 것으로 알려져 있다(20).

분리된 *B. cereus*는 설사형 식중독을 유발시키는 *hbl* 유전자가 검출되지 않고 *nhe*와 *ces* 유전자가 주로 검출되었다(Table 5). 그러나 흥미롭게도 쌀밥에서 분리한 *B. cereus*는 9개의 분리 균주 중 7개가 구토형 식중독 유발 *ces* 유전자만을 가지고 있는 것으로 분석되었다. 일반적으로는 *B. cereus*가 *ces* 유전자보다는 *hbl*와 *nhe* g유전자를 더 많이 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 다른 연구자의 보고(36)에 의하면 생쌀에서 분리한 94개의 *B. cereus*에서 단 한 균주도 emetic toxin을 생산하지 못했고 약 57%균주는 *hbl* 유전자를, 90% 균주는 *nhe* 유전자를 가지고 있었다. 그리고 11개의 *B. thuringiensis*의 경우는 90%가 *cry* 유전자를 가지고 있었고, 모든 균주는 *nhe*와 *hbl*를 가지고 있었다. 그리고 즉석섭취식품에서 분리된 40개의 *B. cereus* 중에서 단지 한 개 균주만이 emetic toxin를 생산하고 있었다(37). 우유나 목장에서 분리한 5,668개의 *B. cereus*에서 Ces독소 분비 균주는 검출되지 않았고 3,401개의 유가공 공장이나 기구에서 분리한 *B. cereus*에서도 단지 0.05%정도의 Ces 분비 균주만 검출되었다(39). 이러한 구토형 *B. cereus*는 10°C에서는 거의 자라지 못하고 48°C에서는 모든 균주가 잘 생육하지만(40) 대체적으로 구토형 *B. cereus*는 23-28°C에서 가장 많은 Ces toxin(cereulide)를 생산하였고 39°C까지만 구토형 독소인 cereulide를 분비한다고 알려져 있다(41). 그리고 *B.thuringiensis* 독소에 대한 보고에 의하면 74개의 균주중 모두 non-haemolytic enterotoxin을 가지고 있는 것으로 보고되었고 *hbl*과 *bceT* 유전자도 가지고 있다고 하였다(42). 따라서 식중독 유발 Nhe 독소를 많이 함유하고 있는 것으로 보인다. 본 연구의 분리균주중 많은 비율을 차지하고 있는 *B. thuringiensis*도 식중독유발 유전자 *nhe* 등을 가지고 있어서 이 유전자가 발현되어 독소가 일정수준 이상 생성되면 식중독을 유발할 수 있을 것으로 보인다.

따라서 우리 식습관에서 쌀밥을 취반후에 밥통에 보관하는 것은 구토형 식중독을 제어할 수 있는 좋은 방법인 것으로 보인다. 그러나 밥통에 보관하지 않고 실온에서 보관하는 경우는 구토형 *B. cereus*의 증식을 유발시켜 구토형 식중독이 일어날 확률이 높은 것으로 보인다. 그러므로 한국의 쌀밥에는 *Bacillus*가 주된 오염 세균으로 존재하고 있으며 *B. cereus* group중 *B. thuringiensis*가 제일 많이 분포하고 있다. 특히 오염된 *B. cereus*에는 대부분이 구토형 유전자를 함유하고 있어서 쌀밥 식중독이 일어난다면 설사형일 경우보다는 구토형일 것으로 사료된다.

요 약

쌀밥의 미생물 안전성을 평가하기 위하여 쌀을 취반한 후 세균을 분석하였다. 전국에서 생산되는 생쌀 30개를 수집하여 취반 후에 중온성 호기성균과 MYP선택배지에서 *Bacillus cereus* group를 분리 동정하여 그의 분포도와 독소유전자를 분석하였다. 취반 직후의 쌀밥 27%에서 1-3 log CFU/g정도의 총 중온성 호기균과 거의 같은 정도로의 *Bacillus* spp.가 존재하는 것으로 나타났다. 그러나 균이 검출되지 않은 시료들도 증균한 후에는 *B. cereus* group균들이 검출되어 사실상 대부분의 시료에서 *Bacillus* spp.가 분포하고 있는 것을 알 수 있었다. 이들 시료로부터 37개의 분리하여 동정한 균주는 *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. valismortis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus stearo-*

Table 5. Toxin gene distribution of *B. cereus* and *B. thuringiensis* isolated from cooked rices

No. strain	Toxin gene						
	HBL Complex						
	hblC	*hblA*	*hblD*	*nheA*	*bceT*	*cytK*	*ces*
B. cereus KCCM 40935	+	+	+	+	+	+	-
B. cereus NCTC 11143	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
B. cereus No.16	+	+	+	+	+	+	-
B. cereus No.18	-	-	-	+	-	+	+
B. cereus No.19	-	-	-	+	-	+	+
B. cereus No.20	-	-	-	+	-	+	+
B. cereus No.21	-	-	-	+	-	+	+
B. cereus No.22	-	-	-	+	-	+	+
B. cereus No.23	-	-	+	+	-	+	+
B. cereus No.24	-	-	-	+	-	+	-
B. cereus No.25	-	-	+	+	-	+	+
Twenty isolates *B. thuringiensis*	+/-	NA	NA	+	-	-	-

NA: Not applied

thermophilus, *Brevibacillus laterosporus* 등으로 나타났다. 분리 균주중 20개(54%)의 분리주가 *B. thuringiensis*로 나타났고 그 다음으로 9개(27%)의 *B. cereus*이였다. 그리고 3개(8%)의 *B. valismortis*와 각각 1개(3%)의 *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Brevibacillus laterosporus*이였다. *B. thuringiensis*는 모두에서 non-hemolytic toxin gene(*nhe*)을 가지고 있었고 9개의 *B. cereus*중 7균주가 emetic toxin 유전자를 함유하고 있었다. 따라서 쌀밥에는 *B. thuringiensis*가 *B. cereus*보다 더 높은 빈도로 분포되어 있고 *B. cereus*는 설사형 독소유전자 보다는 구토형 독소를 더 많이 가지고 있었다. 취반 후 쌀밥을 상온에서 보관하여 발생되는 *B. cereus* 식중독은 설사형보다 구토형일 가능성이 더 많을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 율촌재단과 2009년도 경원대학교 학술연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Kim SH, Kim JS, Choi JP, Park JH. Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agricultural and marine products. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 594-598 (2006)
2. Chang TE. Moon SY, Lee KW, Park JM, Han JS, Song OJ, Shin IS. Microflora of manufacturing process and final products of *saengshik*. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 501-506 (2004)
3. Korea Food and Drug Administration. http://www.kfda.go.kr. accessed on Dec. 18, 2009.
4. Lechner S. Mayr R. Francis KP. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1373-1382 (1998)
5. Nakamura LK. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1031-1035 (1998)
6. Granum PE. *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Bacteriol. 23(Suppl.): 61S-66S (1994)
7. Hansen BM, Høiby PE, Jensen GB, Hendriksen NB. The *Bacillus cereus bce*T enterotoxin sequence reappraised. FEMS Microbiol. Lett. 223: 21-24 (2003)
8. Beecher DJ, Wong ACL. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. J. Biol. Chem. 272: 233-239 (1997)
9. Schoeni JL, Wong AC. Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol. 53: 159-167 (1999)
10. Guinebretiere MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-born *Bacillus cereus* strains. J. Clin. Microbiol. 40: 3053-3056 (2002)
11. Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett. 121: 31-34 (1994)
12. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int. J. Food Microbiol. 73: 23-27 (2002)
13. Mikkola R, Saris NE, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: The emetic toxin of *B. cereus*. Eur. J. Biochem. 263: 112-117 (1999)
14. Pirhonen T, Andersson MA, Jskelinen EL, Salkinoja-Salonen MS, Honkanen-Buzalski T, Johansson TM. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. Food Microbiol. 22: 87-91 (2005)
15. Agata N, Ohta M, Mori M. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. Curr. Microb. 33: 67-69 (1996)
16. Glatz BA, Goepfert JM. Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermentor-grown cultures. Appl. Environ. Microbiol. 32: 400-404 (1976)
17. Turnbull PCB. *Bacillus cereus* toxins. pp. 397-448. In: Pharmacology of Bacterial Toxins. Dorner F, Drews J (eds). Pergamon Press, Oxford, England (1986)
18. Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R, Kasatiya S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. Lett. Appl. Microbiol. 21: 103-105 (1995)
19. Noguchi H. Development of *Bacillus thuringiensis* in Japen. pp. 283-291. In: Advanced engineered pesticides. Kim L. (eds). Marcel Dekker, New York, NY (1993)
20. Perani M, Bishop AH, Vaid A. Prevalence of β-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific δ-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 160: 55-60 (1998)
21. Damgaard PH, Larsen HD, Hansen BM, Bresciani J, J ø rgensen K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. Lett. Appl. Microbiol. 23: 146-150 (1996)
22. Prss BM, Dietrich R, Nibler B, Mrtlbauer E, Scherer S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microb. 65: 5436-5442 (1999)
23. Hwang JH. Biochemical characteristics and enterotoxin gene distribution of food-borne *Bacillus cereus*. MS thesis, Kyungwon University, Gyeonggi, Korea (2009)
24. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus, B. thuringiensis, B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. Appl. Environ. Microb. 65: 1483-1490 (1999)
25. Kuo W-S, Chak K-F. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1369-1377 (1996)
26. Rowan NJ, Caldow G, Gemmell CG, Hunter IS. Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. Appl. Environ. Microb. 69: 2372-2376 (2003)
27. Celandroni EG, Salvetti SF, Barsotti C, Baggiani A, Senesi S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. FEMS Microbiol. Lett. 208: 129-134 (2002)
28. Lund T, De Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol. 38: 254-261 (2000)
29. Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Mrtlbauer E, Scherer S. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microb. 71: 105-113 (2005)
30. Kim YS, Oh BC, Shin DH. The extension of the shelf life of cooked rice by the treament with the plant extract and their volatile constituents. Food Sci. Biotechnol. 13: 519-522 (2004)
31. Park SK, Cho YS, Shon MY, Seo KJ. Occurence and repression of off-odor in cooked rice during storage under low temperature warming condition of electric rice cooker. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 919-924 (1997)
32. Roh HJ, Shin YS, Lee KS, Shin MK. Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 66-71 (1996)
33. Oh MH, Cox JM. Development and application of a centrifuagation-plate method to study the biodiversity of *Bacillus* species in rice products. Food Control 21: 7-12 (2010)
34. Lee MS, Chang DS. Distribution and physiological characteristic of *Bacillus cereus* in rice and rice products. Bull. Korean Fish. Soc. 13: 163-172 (1980)
35. From C, Hormazabal V, Granum PE. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. Int. J. Food Microbiol. 115: 319-324 (2007)
36. Ankolekar C, Rahmati T, Labbe' RG. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. Int. J. Food Microbiol. 128: 460-466 (2009)

37. Rosenquist H, Smidt L, Anderson SR, Jensen GB, Wilcks A. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. FEMS Microbiol. Lett. 250: 129-136 (2005)
38. Cronin UP, Wilkinson MG. The growth, physiology and potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse. Food Control 20: 822-282 (2009)
39. Svensson B, Monthan A, Shaheen R, Ansesson MA, Salkinoja-Salonen M, Christiansson A. Occurence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. Iut. Dairy J. 16: 740-749 (2006)
40. Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, Svensson B, Nguyen-the C, Ehling-Schulz. Emetic toxin-producing strains of *B.cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. Int. J. Food Microbiol. 109: 132-138 (2006)
41. Apetroaie-Constantin C, Shaheen R, Andrup L, Smidt L, Rita H, Salkinja-Salonen. Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol. 127: 60-67 (2008)
42. Rivera AMG, Granum PE, Priest FG. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 190: 151-155 (2000)